
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

UM ESTUDO QUÍMICO DA *Artemisia annua* L.
ACCLIMATADA NO BRASIL

MARY ANN FOGLIO

Tese de Doutorado

Orientadora

Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

Campinas

1996



UNIDADE IQ
 N.º CHAMADA: T/UNICAMP
F689e
 V. 28315
 T. 667/96
 P. 02
 C. 11
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 16/08/96
 N.º OPD

CM-00091448-5



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
 UNICAMP**

Foglio, Mary Ann
 F689e Um estudo químico da *Artemisia annua* L. aclimatada no
 Brasil. / Mary Ann Foglio. -- Campinas, [SP : s.n.], 1996.

Orientadora: Anita Jocelyne Marsaioli.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Química.

I. *Artemisia annua* L. 2. Artemisinina. 3. Ácido artemi-
 sininico. 4. Qinghaosu I-V. I. Anita Jocelyne Marsaioli. II.
 Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química III.
 Título.

Foglio, Mary Ann

Um estudo químico da *Artemisia*
annua L. aclimatada no Brasil

T/UNICAMP/F689e
 DEVCLVEE NONE LEIT. (28315/96)

*Aos meus filhos, Marcelo e Carolina,
pelo amor e paciência*

Agradecimentos

À Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli, pela orientação, compreensão, dedicação e formação profissional no decorrer deste trabalho.

À Diretoria e aos servidores do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Unicamp, pelo incentivo e amizade recebidos.

Ao Prof. Nikolai Sharapin, pelo apoio para a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Química da Unicamp, pelas facilidades concedidas.

À Dra. Vera Ferracini, pelo fornecimento do padrão de nor-tailorina.

À Sonia e à Paula, pela obtenção dos espectros de RMN.

A todos os colegas do laboratório da Profa. Dra. Anita J. Marsaioli, pela colaboração na execução deste trabalho.

À Susi Mary Bonzanini, pela amizade e apoio técnico no decorrer da execução deste trabalho.

Aos amigos Rodney, Márcio, Aline, Renato, Rui, Carmen e Adilson pela cooperação e amizade.

À Dra. Vera Lúcia Garcia Redher, pelas críticas, sugestões e, principalmente, pela inestimável amizade.

Ao Dr. João Ernesto de Carvalho, pelas críticas, sugestões e amizade incondicional durante todos estes anos.

À Carmen Lúcia Rodrigues Arruda pela amizade e enorme carinho, como também pelo apoio no acabamento desta tese.

A todos da Área de Ensaios Biológicos do CPQBA, pela atenção que sempre me deram.

A todos os amigos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

À Yara dos Santos Leite, pelo eterno apoio, carinho e cuidado com os meus filhos.

A meus pais, Mário e Susana, pelo inestimável apoio e exemplo.

Índice

	página
Introdução.....	1
Histórico	2
Considerações sobre o gênero	4
Mecanismo de ação	8
Metabólitos secundários não voláteis encontrados na <i>Artemisia annua</i> L.	10
Biossíntese	15
Metabólitos secundários voláteis descritos na <i>Artemisia annua</i> L.	17
Objetivos.....	19
Resultados e Discussão.....	21
Otimização do processo de obtenção da artemisinina <u>13</u>	22
Otimização dos métodos analíticos	24
Secagem e armazenamento da <i>Artemisia annua</i> L.....	27
Otimização dos métodos de extração e purificação de artemisinina <u>13</u> e ácido artemisinínico <u>30</u>	28
Isolamento e identificação de amorfanos procedentes de <i>Artemisia annua</i> L.	35
Qinghaosu (<u>21</u>).....	36
Qinghaosu II (<u>22</u>)	41
Qinghaosu V (<u>12</u>).....	45
Óleo essencial da <i>Artemisia annua</i> L.	49
Considerações gerais e determinação dos componentes principais.....	49
Obtenção de padrões	64
Co-injeção dos padrões <u>112</u> , <u>113</u> , <u>114</u> , <u>115</u> , <u>116</u> , <u>117</u>	75
Comportamento sazonal	81
Conclusões.....	86

Parte Experimental - Material e Métodos.....	88
Composto <u>13</u>	95
Composto <u>30</u>	98
Composto <u>22</u>	104
Composto <u>21</u>	112
Composto <u>12</u>	119
Composto <u>80</u>	126
Composto <u>48</u>	128
Composto <u>87</u>	130
Amostras de óleo essencial para estudo sazonal.....	132
Metodologia analítica semi-quantitativa para dosagem de artemisinina.....	132
Transformações químicas para obtenção de amorfanos.....	135
Metilação do ácido artemisinínico.....	135
Redução da dupla terminal do composto <u>115</u>	138
Redução do éster <u>116</u>	141
Reação de mesilação do composto <u>117</u>	144
Redução do composto <u>118</u>	146
Reação de epoxidação do composto <u>112</u>	149
Formação da cetona <u>114</u>	156
Bibliografia.....	164

Anexos

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Sigla	Descrição
CCD:	cromatografia em camada delgada
CC:	cromatografia em coluna
CCE:	cromatografia em camada espessa
GC:	cromatografia gasosa
GC/MS:	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
HPLC:	cromatografia líquida de alta eficiência
IR:	índice de retenção
COLOC:	espectro bidimensional de correlação heteronuclear (C,H) a três ligações
COSY:	espectro bidimensional de correlação homonuclear (H,H)
HETCOR:	espectro bidimensional de correlação (C,H) a uma ligação
DEPT:	espectro de RMN ¹³ C intensificado sem distorção por transferência de polarização (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)
Hz:	hertz
IVTF:	infravermelho
RMN¹H:	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN¹³C:	ressonância magnética nuclear de carbono
ppm:	partes por milhão
J:	constante de acoplamento
s:	singleto
sl:	singleto largo
d:	dubleto
dd:	duplo dubleto
ddd:	triplo dubleto

Sigla	Descrição
m:	multiplete
NOE:	Efeito Overhauser nuclear
NOESY:	Espectro bidimensional de NOE
TMS:	tetrametilsilano
E:	espectro
EM:	espectro de massas
eV:	elétron volt
m/z:	relação massa carga
pf:	ponto de fusão
Rf:	relação da distância percorrida pela amostra / distância percorrida pelo eluente em cromatografia de camada delgada
tr:	tempo de retenção
THF:	tetra-idrofurano
t.a.:	temperatura ambiente
t:	triplete
δ:	deslocamento químico em partes por milhão
$[\alpha]_D$:	rotação ótica específica
MHz:	megahertz
Hac:	ácido acético
AMCP:	ácido meta cloro perbenzóico
M⁺:	íon molecular
DMSO:	dimetilsulfóxido
CDCl₃:	clorofórmio deuterado

Resumo

UM ESTUDO QUÍMICO DA *ARTEMISIA annua* L. ACLIMATADA NO BRASIL

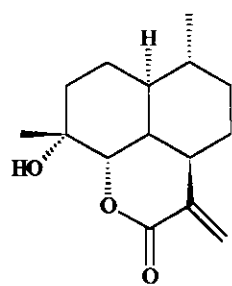
Mary Ann Foglio; CPQBA-UNICAMP, CP 6171, Campinas 130183-970, São Paulo, Brasil;
Anita Jocelyne Marsaioli, Instituto de Química-Unicamp, CP 6154, Campinas 130183-970,
São Paulo, Brasil

Artemisia annua L. é uma *Asteracea* oriunda da Ásia conhecida pela produção de artemisinina **13**, um potente antimalárico. Por ser uma espécie de grande interesse elegemos como tema desta tese estudar vários aspectos da variedade aclimatada no Brasil.

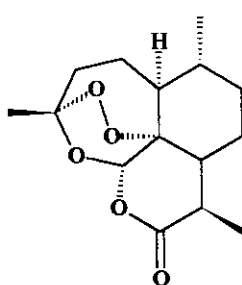
Os metabólitos secundários não voláteis **12**, **21**, **22**, **30** foram isolados por métodos cromatográficos convencionais os quais apresentam o sistema bicíclico [4.4.0] decano *cis*. Estes compostos apresentam tendências conformacionais que variam de acordo com o tipo de substituinte que possuem. Assim nós nos propusemos a fazer um estudo espectroscópico sistemático destes amorfanos naturais e preparamos alguns padrões **112**, **113**, **114** contendo o sistema bicíclico [4.4.0] decano *cis* para também serem caracterizados. A análise dos espectros de uma e duas dimensões de correlação homo e heteronuclear permitiram uma atribuição precisa dos átomos de carbono e hidrogênio além de indicarem a tendência conformacional destes compostos.

A composição dos constituintes voláteis encontrados no óleo essencial da planta aclimatada no Brasil foram estudados por GC/MS (HP 5890/ HP 5970). A utilização dos dados de índices de retenção e espectros de massas aliado a co-injeção de padrões permitiu determinar quarenta e nove componentes no óleo essencial. Um dos compostos determinados **125** revelou ser um esqueleto inédito não descrito anteriormente em plantas.

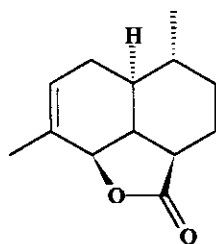
Também foi abordado o estudo comparativo do perfil cromatográfico do óleo essencial da *Artemisia annua* L. cultivadas no Brasil comparado a óleos de *Artemisia annua* L. de outras procedências. Um acompanhamento sazonal da *Artemisia annua* L. possibilitou observar a variação dos teores dos principais componentes encontrados na planta verificando a o comportamento da artemisinina **13** em relação à produção do óleo essencial. Foi avaliada a viabilidade econômica de produção da artemisinina **13** utilizando diversos materiais no seu processo de obtenção. Dessa forma conseguiu-se obter o princípio ativo **13** num custo global de 11 dólares e 50 centavos por grama de artemisinina **13**.



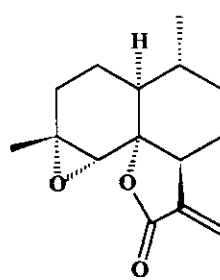
12



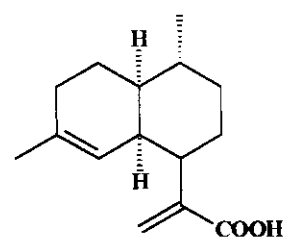
13



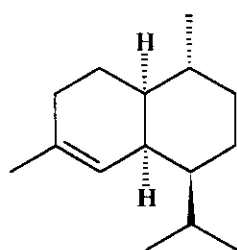
21



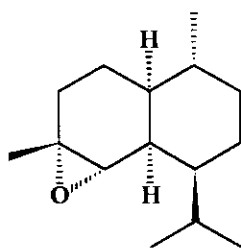
22



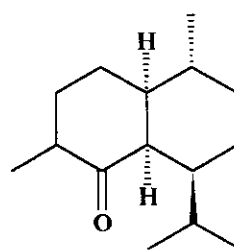
30



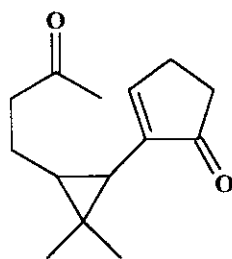
112



113



114



125

Abstract

A STUDY OF THE ESSENTIAL OIL OF *Artemisia annua* L. ADAPTED TO BRAZILIAN CLIMATE

Mary Ann Foglio, CPQBA-UNICAMP, CP 6171, Campinas 130183-970, São Paulo, Brazil;
Anita Jocelyne Marsaioli, Instituto de Química-UNICAMP, CP 6154, Campinas 130183-970, São Paulo, Brazil

The Asteracea *Artemisia annua* L. native of the Asian continent is well known for the production of a potent antimalarial compound, artemisinin **13**. The purpose of this work was to study some chemical aspects of the plant adapted to Brazilian climate.

The total hydrogen and carbon-13 NMR assignment of compounds **12**, **21**, **22** and **30** isolated from *Artemisia annua* L. as well as that of compounds **112**, **113** and **114**, obtained through chemical transformations, are reported. The conformations and conformational equilibria of these compounds in solution which possess a *cis*-decalin moiety were obtained from spectral data and molecular mechanics calculations.

The identification of the essential oil of the plant cultivated in Brazil was studied using GC/MS (HP 5890/HP 5970). Forty nine constituents were determined by association of retention time data and co-injection of authentic standards. Compound **125** is a new carbon skeleton not published up to this date.

Comparison of the gas chromatography profile of the *Artemisia annua* L. essential oil produced in Brazil with those of other origins revealed significant variation of their constituents. The seasonal behavior of artemisinin **13** content versus essential oil production was observed during one harvest period.

The economical viability of several purification methodologies for artemisinin production were tested. In this work we produced the antimalarial compound **13** at a total cost of US\$ 11,5 per gram.

Introdução

I. Histórico

A utilização de ervas medicinais é tão antiga quanto a humanidade. Para o tratamento dos diversos males que os acometiam, nossos antepassados utilizavam-se, por tentativa e erro, de diversas espécies vegetais obtendo, às vezes, o sucesso da cura /1/. A cultura chinesa tem-se utilizado do conhecimento popular de ervas medicinais durante os últimos cinco séculos.

As origens desta cultura são desconhecidas mas, supostamente, iniciou-se na época dos cinco soberanos, no período de 2953-2208 aC, que introduziram esta filosofia de princípios médicos. Shen-Nong é reconhecidamente o fundador da medicina chinesa e adorado pelos nativos como um Deus, pois a ele são atribuídas as virtudes das plantas e a capacidade de experimentar venenos /2/.

Uma grande contribuição nesta área foi feita pelo médico e naturalista Li Shi-Zhen (1518-1593), em sua obra Ben-Cao-Gang-Mo, publicada em 1590, onde ele descreveu 1892 drogas e 8160 receitas /3/.

Como a Ásia é o continente onde a medicina tradicional é mais praticada, alguns governos como os da China, Índia, Sri-Lanka e Japão têm encontrado meios de legalizar e reconhecer o uso desta prática. No Sri-Lanka existe um Ministério para a medicina indígena. Na Índia, no Ministério da Saúde local, foi criado o Departamento de Medicina Tradicional. Já no Japão, atualmente, 47% dos médicos utilizam métodos da medicina tradicional chinesa aliados à terapêutica ocidental no tratamento de seus pacientes. Na China, a medicina tradicional foi ignorada até a revolução de 1949 que implantou a República Popular da China. A partir dessa data, o governo incentivou a política de união entre a medicina ocidental e a tradicional, criando, em 4 de janeiro de 1986, o Ministério Independente de Medicina Tradicional Chinesa /4/.

Existem hoje na China cerca de 5136 espécies vegetais utilizadas popularmente como medicinais das quais 300 foram estudadas chegando-se à identificação de seus princípios ativos /4/. Incentivado pelo governo, esse estudo teve início em 1967 com objetivo de descobrir novas fontes de medicamentos /1/. Uma dessas espécies foi a *Artemisia annua* L., que Li Shi-Zhen em sua obra Ben-Cao-Gang-Mo, cita o uso de preparações desta planta para combater a febre provocada pela malária /3/.

A situação da malária no Brasil nos anos cinquenta era de até sete milhões de casos anuais, índice que vinte anos depois diminuiu para cinco milhões, atualmente encontra-se num patamar de 500 mil casos por ano. Estima-se que a malária leva a óbito dez mil pessoas por ano. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que a ocorrência global de malária aguda

e crônica atinge de 220 a 230 milhões de casos por ano, sendo responsável por dois milhões de mortes por ano, o que a coloca como a maior epidemia do mundo. Este índice é superior ao observado para Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS)/5/. Dessa forma a pesquisa e desenvolvimento de novos antimaláricos é de fundamental importância. Como esta patologia é encontrada somente em países subdesenvolvidos (Figura 1) existe pouco interesse das indústrias em financiar pesquisas para o desenvolvimento de novos antimaláricos, cabendo a agências de fomento do terceiro mundo o ônus destas pesquisas.



Figura 1: Situação mundial da malária

II. Considerações sobre o gênero

Pesquisadores chineses estudaram mais de trinta espécies do gênero *Artemisia* para confirmar a atividade antimalárica das mesmas. Entre os metabólitos secundários isolados das diversas espécies do gênero *Artemisia* os mais característicos são as lactonas sesquiterpênicas /6/. Os dados existentes sobre lactonas sesquiterpênicas do gênero *Artemisia* foram compilados segundo os sub-gêneros: *Abrotanum*; *Absinthium*; *Drancunculus*; *Seriphidium*; *Tridentatea*.

As diversas classes de estruturas das lactonas sesquiterpênicas do gênero *Artemisia* são originárias de transformações biossintéticas a partir dos germacranolídeos 1, estas assim são transformadas biossinteticamente em classes mais avançadas através de ciclizações, rearranjos, e oxidações originando os esquelitos básicos dos elemanolídeos 2, eudesmanolídeos 3, guainolídeos 4, cadinolídeos 5, psilostacinolídeos 6, /7/. Os principais tipos de lactonas sesquiterpênicas encontradas no gênero *Artemisia* são a santonina 7, matricarina 8, absintina 9, anabsintina 10, artemisina 11, artenuína 12 /7/ (Figura 2 e 3).

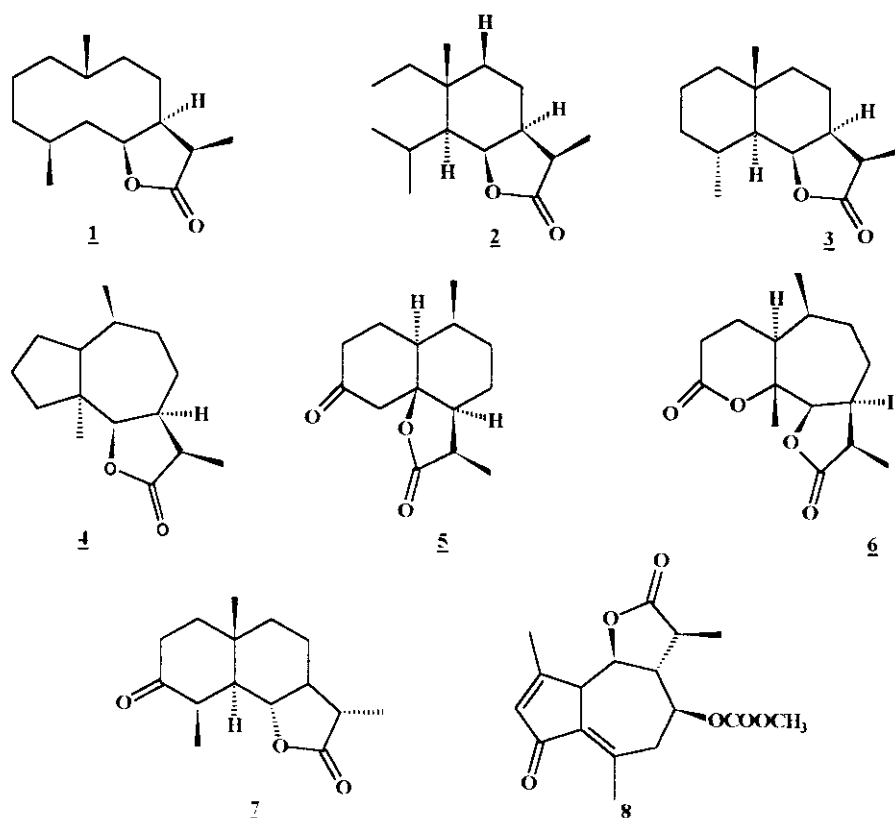


Figura 2: Compostos encontrados no gênero *Artemisia*/7/

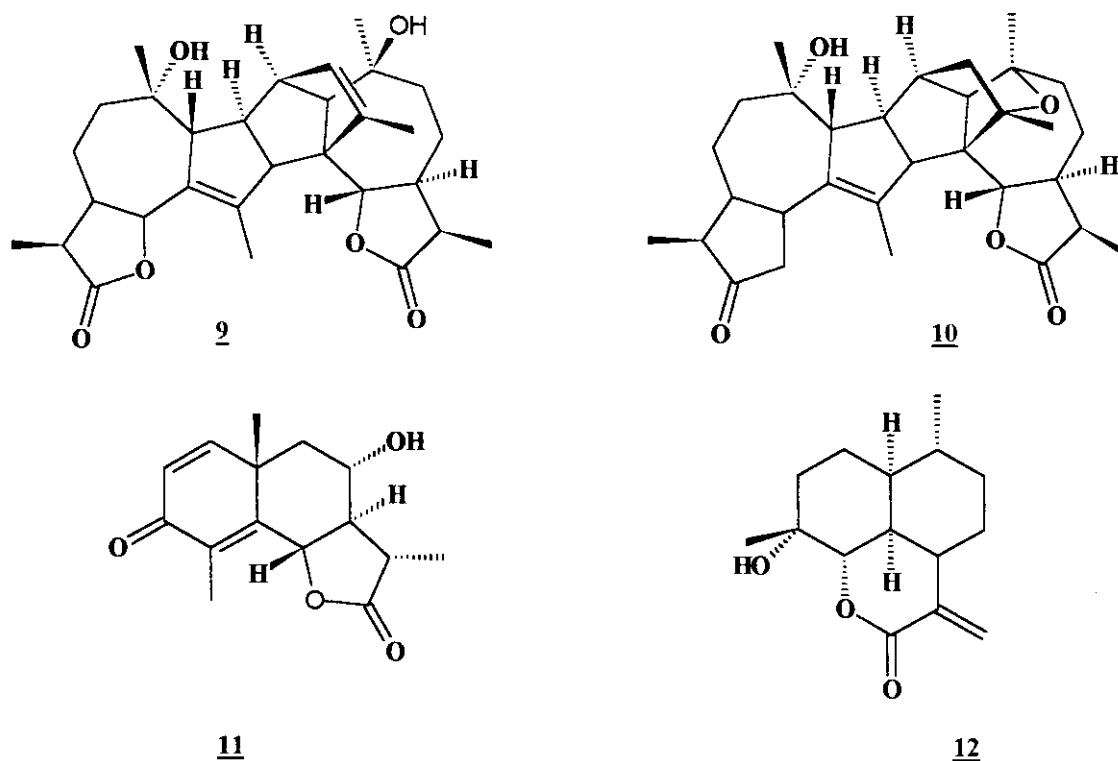
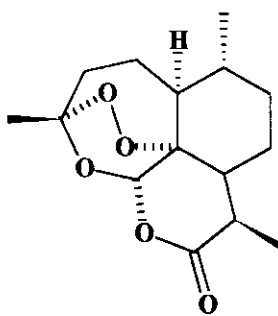


Figura 3: Compostos encontrados no gênero *Artemisia*/7/

Porém só a *Artemisia annua* L. e a *Artemisia apiecea* provaram ser eficazes contra o *Plasmodium falciparum* e o *Plasmodium vivax* /8/. Grupos americanos /9/ estudaram as espécies *Artemisia ludovica*, *A.vulgaris*, *A.schmidtiana*, *A.pontica*, *A.arbuscula* e *A.drancunculus*, que não apresentaram atividade antimalárica. A peculiaridade sobre as outras espécies do gênero é que a *Artemisia annua* L. e a *Artemisia apiecea* apresentam um princípio ativo com uma lactona sesquiterpênica e o grupo 1,2,4-trioxano. Este composto foi identificado a partir do extrato de éter etílico dessas espécies, denominado artemisinina **13**, que, quando submetido a testes farmacológicos, apresentou atividade antimalárica /10/. A artimisinina **13** é de ação rápida e atua sobre as formas de malária provocadas pelo *Plasmodium vivax* e o *Plasmodium falciparum*, inclusive sobre as formas de malária provocadas pelo *Plasmodium* resistente ao tratamento às cloroquinas /11/.



13

A *Artemisia annua* L. é uma Asteraceae (tribo Anthemidea) nativa de regiões de clima temperado, na China, em países do Sudeste da Europa (Bulgária, Romênia e antiga Iugoslávia), em Piemonte (Itália) e na Moldavia (antiga URSS) /12/. Na literatura, até o momento, estão descritas 400 espécies deste gênero /13/.

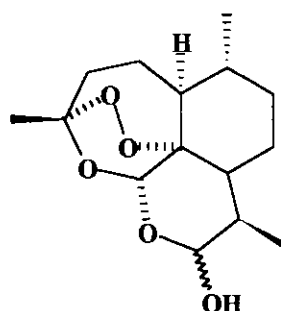
Na Índia, a espécie foi introduzida pela CIMAP (Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants), com sementes fornecidas pelo “Kew Royal Botanic Gardens”, Inglaterra. Atualmente, está sendo cultivada no “Kashmir Valley”- Paquistão para produção de artemisinina 13 em larga escala /10/



Figura 4: *Artemisia annua* L. cultivada no Brasil (hibrido Ch x Viet 55, em estado de corte)

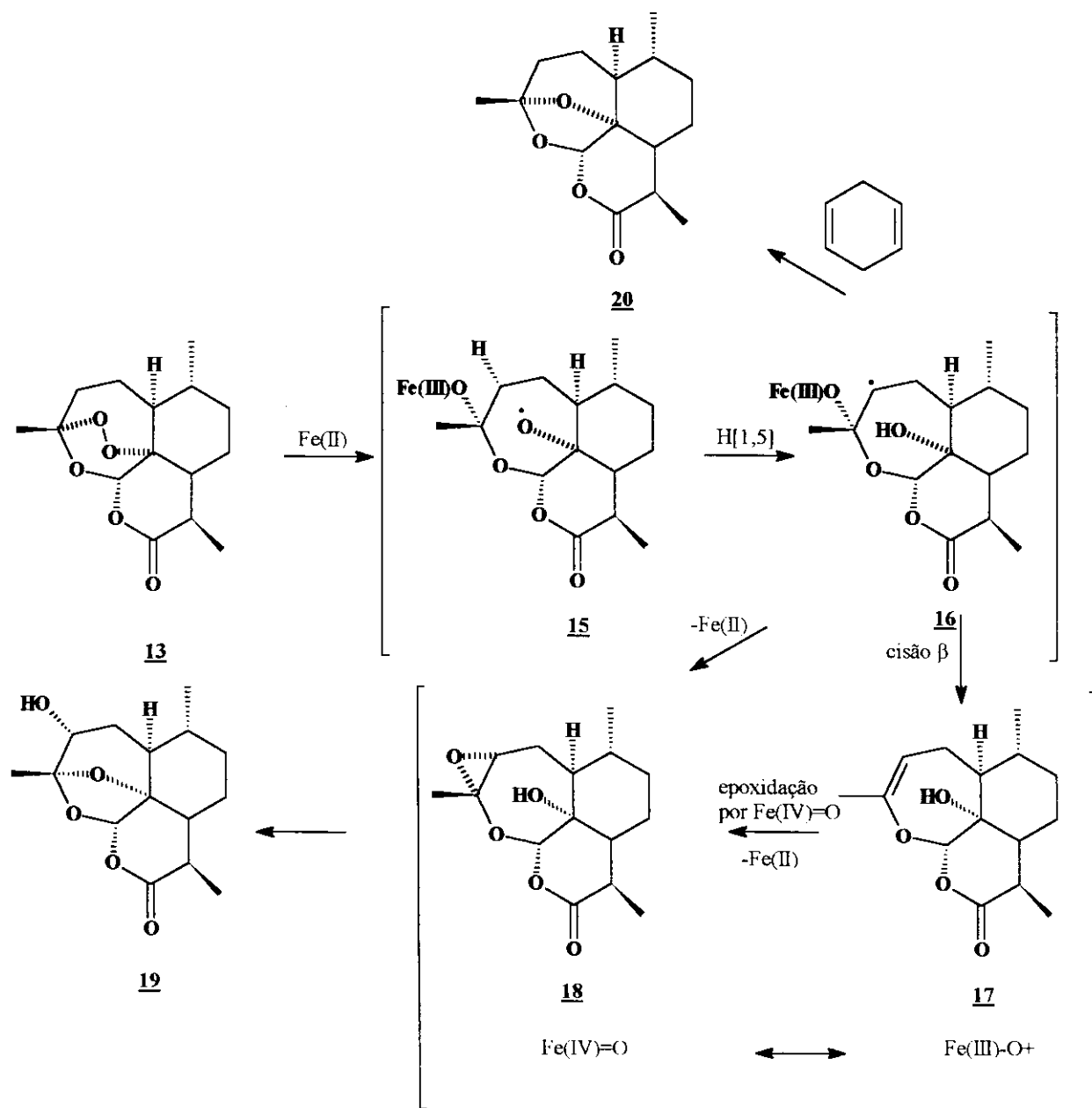
III. Mecanismo de Ação

Apesar de produzir um rápido desaparecimento dos parasitas do sangue, a recorrência da doença nesses pacientes é mais rápida que naqueles tratados com cloroquinas. Uma das hipóteses para essa recorrência é a rápida eliminação da artemisinina do organismo. Esse fato motivou vários grupos de pesquisa /14/ a modificar a estrutura da artemisinina **13**, para aumentar sua potência antimalárica. Com esta finalidade, foi sintetizado o artemisininelactol **14**, que apresentou o dobro da atividade antimalárica /14/.



14

O mecanismo da ação tóxica da artemisinina **13** e seus derivados sobre o *Plasmodium* ainda não está totalmente esclarecido. A formação de radicais de oxigênio ativado (superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxílicos) desempenha um papel importante, pois os derivados, sem o grupo peróxido, são inativos. Alguns trabalhos indicam que esses radicais provocam lesões na membrana nuclear e mitocondrial do parasita, por inibição da síntese de ácidos nucleicos e de proteínas /15/. Trabalhos recentes sugerem que a reação da artemisinina **13** com o heme presente no interior do parasita leva à produção de radicais livres, citotóxicos. Esses mecanismo de ação poderiam explicar a toxicidade seletiva da artemisinina **13** e seus derivados ao *Plasmodium*, quando comparada à observada em outros tipos de células /16, 17/. Estudos recentes propõe que o peróxido orgânico da artemisinina é reduzido por parasitas ricos em ferro, formando intermediários radiculares citotóxicos /18/. Por esse mecanismo haveria a formação de uma espécie Fe(IV)-oxi **18**, por cisão homolítica da ligação O-C, a partir de um radical β -ferro-oxy-etil **16**, levando à formação de um potente agente alquilante, um epóxido altamente eletrofílico **18** (Esquema 1). Este mecanismo representa a primeira menção da geração de Fe(IV)=O **18**, durante ativação do 1,2,4-trioxano com íon ferro /18/.



Esquema 1: Sugestão de mecanismo de formação de intermediários radicais /18/

IV. Metabólitos secundários não voláteis encontrados na *Artemisia annua* L.

Até 1995, vinte e quatro sesquiterpenos (12,13,19,21 até 41) foram isolados da *Artemisia annua* L., sendo a maioria destes compostos relacionados à série dos amorfanos que se caracterizam pelo esqueleto básico (1S, 6S, 7S)-7-(2-propil)4,10-dimetilbiciclo [4.0.4]/16-30/ (Figura 5).

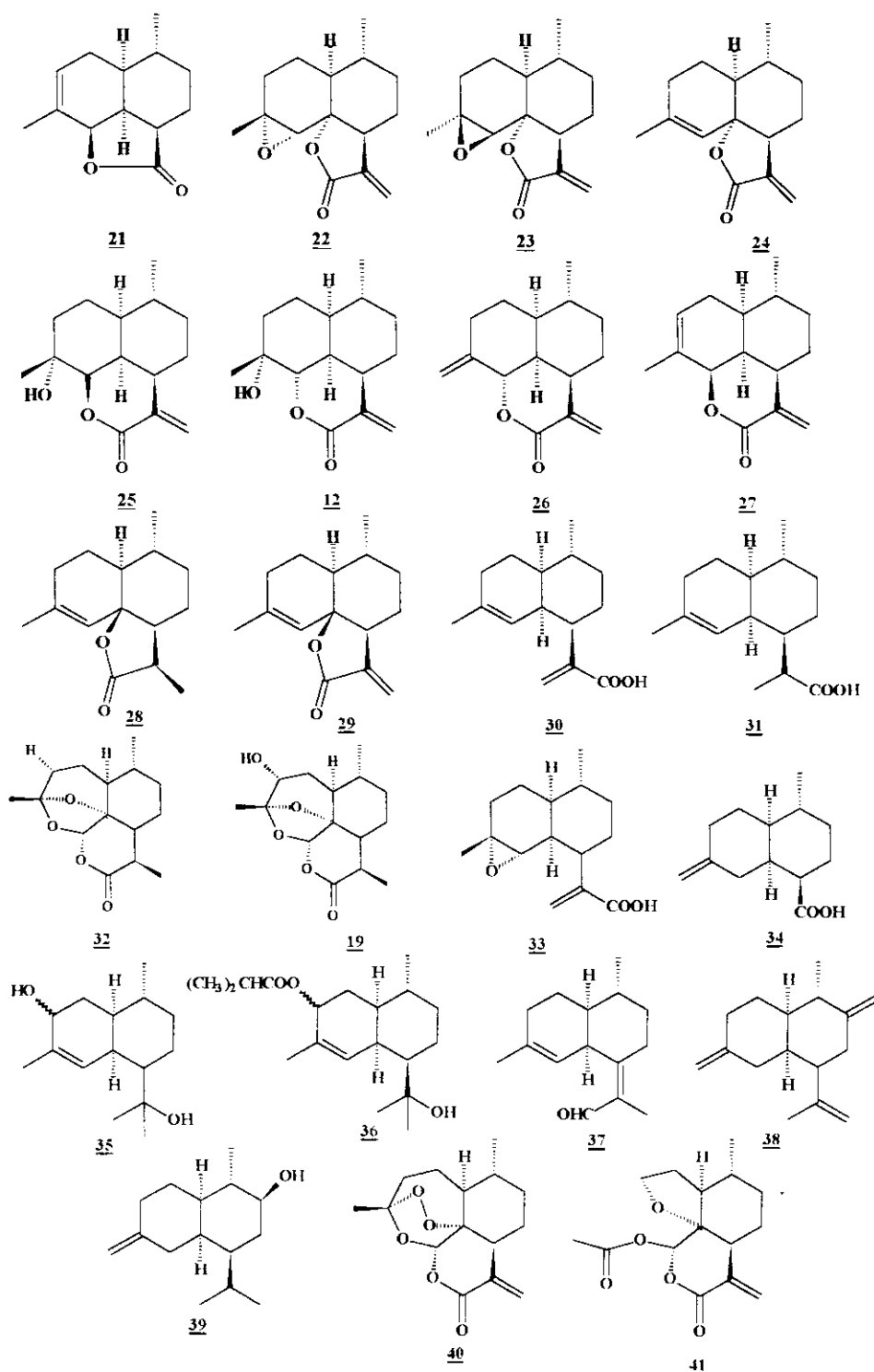


Figura 5: Terpenos identificados na *Artemisia annua* L /16-30/

Estes compostos possuem esqueleto básico de cadinanos 42, podendo ser encontrados na natureza em óleos essenciais, petróleo e âmbar. A família dos cadinanos pode ainda ser dividida em amorfanos 43, cadinanos 44, bulgaranos 45, e muurolanos 46, dependendo da estereoquímica relativa da junção dos anéis e do grupo isopropila /29/ (Figura 6).

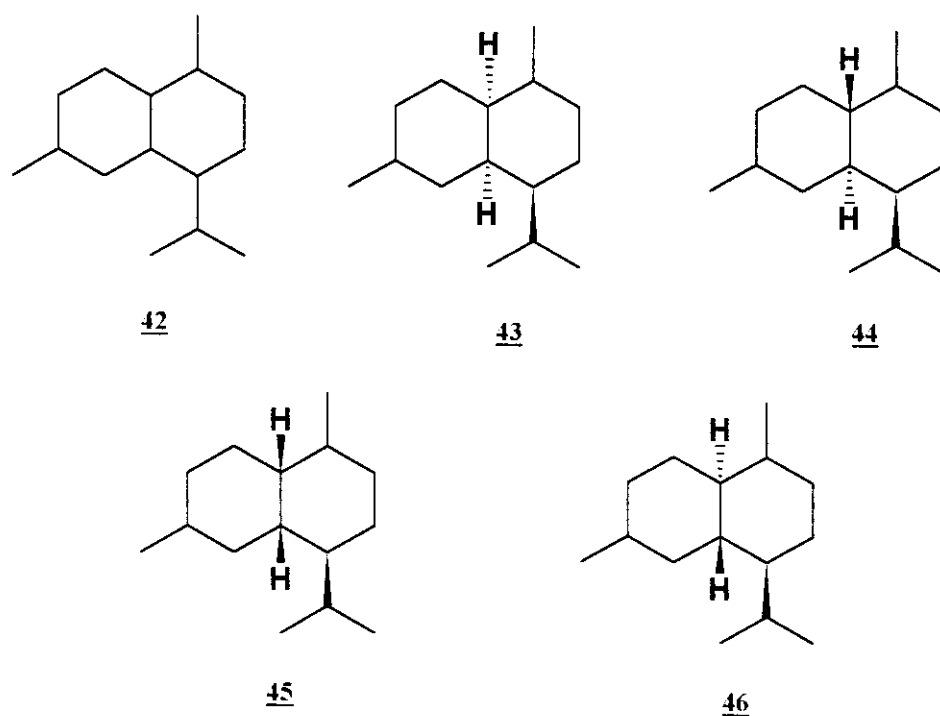
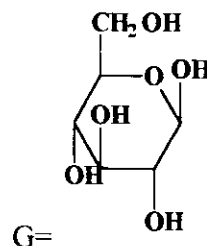
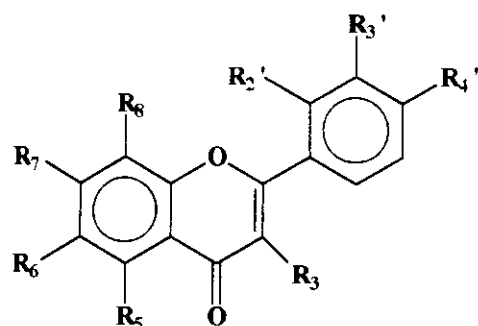


Figura 6: Esqueletos carbônicos da família dos cadinano/29/

Além dos amorfanos, até o presente momento foram descritos trinta e quatro flavonóides na *Artemisia annua* L. (Tabela 1) /28-33/.

Tabela 1: Flavonóides encontrados na *Artemisia annua* L.



# Composto	Nome Comum	Nome IUPAC	Substituintes*
<u>47</u>	astragalina	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona, 3 - (β-glucopiranosiloxi)0, 5,7 - di-idroxi, 2 - (4 - hidroxifenil)	R ₃ =G; R ₅ =R ₇ =R ₄ '=OH
<u>48</u>	artemetina	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona, 2 - (3,4 - dimetoxifenil), 5 - hidroxi - 3,6,7 - trimetoxi	R ₃ =R ₅ =R ₄ '=R ₆ =R ₇ =OCH ₃ ; R ₅ '=OH
<u>49</u>	apigenina	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona - 5,7 - di-idroxi, 2 - (4 - hidroxifenil)	R ₄ '=R ₅ =R ₇ '=OH
<u>50</u>	axillarina	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona - 2 - (3,4 - di-idroxifenil), 5,7 - di-idroxi, 3,6 - dimetoxi	R ₃ =R ₆ =OCH ₃ ; R ₃ '=R ₄ '=R ₅ '=R ₇ '=OH
<u>51</u>	casticina	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona, 5 - hidroxi - 2 - (3 - hidroxi - 4 - metoxifenil) - 3,6,7 - trimetoxi	R ₃ =R ₆ =R ₇ =R ₄ '=OCH ₃ ; R ₃ '=R ₅ '=OH
<u>52</u>	chrysoeriol	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona, 5,7 - di-idroxi - 2 - (4 - hidroxi - 3 - metoxifenil)	R ₃ '=OCH ₃ ; R ₄ '=R ₅ '=R ₆ '=OH
<u>53</u>	chrysosplenol-D	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona, 2 - (3,4 - di-idroxifenil) - 5 - hidroxi - 3,6,7 - trimetoxi	R ₃ =R ₆ =R ₇ '=OCH ₃ ; R ₃ '=R ₄ '=R ₅ '=OH
<u>54</u>	chrysosplenetina	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona, 5 - hidroxi - 2 - (4 - hidroxi - 3 - metoxi) - 3,6,7-trimetoxi	R ₃ =R ₅ =R ₆ =R ₇ '=OCH ₃ ; R ₄ '=R ₅ '=OH
<u>55</u>	cirsilineol	4H-1-Benzopirano-4 - ona,5-hidroxi-2-(4-hidroxi-3,2metoxifenil)-6,7-dimetoxi	R ₃ '=R ₆ '=R ₇ '=OCH ₃ ; R ₄ '=R ₅ '=OH
<u>56</u>	cirsiliol	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona, 2 - (3,4 - dihidroxifenil) - 5 - hidroxi - 6,7 - dimetoxi	R ₃ '=R ₄ '=R ₅ '=OH; R ₆ '=R ₇ '=OCH ₃
<u>57</u>	cirsimaritina	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona, 5 - hidroxi - 2 - (4 - hidroxifenil) - 6,7 - dimetoxi	R ₄ '=R ₅ '=OH; R ₆ '=R ₇ '=OCH ₃
<u>58</u>	eupatorina	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona, 5 - hidroxi - 2 - (3 - hidroxi - 4 - metoxifenil) - 6,7 - dimetoxi	R ₃ '=R ₅ '=OH; R ₄ '=R ₆ '=R ₇ '=OCH ₃
<u>59</u>	isoquercitrina	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona, 2 - (3,4 - di-idroxifenil) - 3 - (β-D-glucofuranosiloxi) - 5,7 - di-idroxi	R ₃ '=R ₄ '=R ₅ '=R ₇ '=OH; R ₅ '=G
<u>60</u>	isorhamnetina	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona, 3,5,7 - trihidroxi - 2 - (4 - hidroxi - 3 - metoxifenil)	R ₃ '=R ₄ '=R ₅ '=R ₇ '=OH; R ₆ '=OCH ₃
<u>61</u>	isokaempferida	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona, 5,7 - di-idroxi - 2 - (4 - hidroxifenil) - 3 - metoxi	R ₃ '=OCH ₃ ; R ₄ '=R ₅ '=R ₇ '=OH
<u>62</u>	Kaempferol	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona 3,5,7 - trihidroxi - 2 - (4 - hidroxifenil).	R ₄ '=R ₅ '=R ₆ '=R ₇ '=OH
<u>63</u>	luteolina	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona, 2 - (3,4 - di-idroxifenil) - 5,7 - di-idroxi	R ₃ '=R ₄ '=R ₅ '=R ₇ '=OH
<u>64</u>	luteolina-7-metiléter	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona, 2 - (3,4 - di-idroxifenil) - 5 - hidroxi - 7 - metoxi	R ₃ '=R ₄ '=R ₅ '=OH; R ₇ '=OCH ₃
<u>65</u>	luteolina-7-O-glucosideo	4H-1-Benzopirano-4 - ona, 2-(3,4-di-idroxifenil)-5-hidroxi-7-glucosideo	R ₃ '=R ₄ '=R ₅ '=OH; R ₇ '=Oglucosideo

continua

continuação Tabela 1

# Composto	Nome Comum	Nome IUPAC	Substituintes*
<u>66</u>	penduletina	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona , 5 - hidroxí - 2 - (4 - hidroxí - 3 - metoxifenil) - 3,6,7 - trimetoxi	$R_3=R_6=R_7=OCH_3$; $R_4'=R_5=OH$
<u>67</u>	quercitina	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona , 2 - (3,4 - diidroxifenil) - 3,5,7 - trihidroxí	$R_3=R_5=R_7=R_3'=R_4'=OH$
<u>68</u>	quercitina-32metileter	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona , 2 - (3,4 - diidroxifenil) - 3 - metoxi - 5,7 - diidroxí	$R_3=OCH_3$; $R_5=R_7$; $R_3'=R_4'=OH$
<u>69</u>	quercitina-3'-O-glucosídeo	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona , 2 - (3,4 - diidroxifenil) - 3 - glucosídeo - 5,7 - diidroxí	$R_3=glucosídeo$; $R_5=R_7=R_3'=R_4'=OH$
<u>70</u>	quercetagitina-6,7,3',4'-tetrametileter	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona , 2 - (3,4 - dimetoxifenil) - 6,7 - metoxi - 3,5 - diidroxí	$R_3=R_5=OH$; $R_3'=R_4'=R_6=R_7=OCH_3$
<u>71</u>	quercetagitina-4'-metileter	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona , 2 - (3 - hidroxí - 4 - metoxifenil) - 3,5,6,7 - tetrahidroxí	$R_3=R_5=R_6=R_7=R_3'=OH$; $R_4'=OCH_3$
<u>72</u>	quercetagitina-32metileter	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona , 2 - (3,4 - diidroxifenil) - 3 - metoxi , 5,6,7 - trihidroxí	$R_3=OCH_3$; $R_3'=R_4'=R_5=R_6=R_7=OH$
<u>73</u>	quercimeritrina	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona , 2 - (3,4 - diidroxifenil) - 7 - (β -D- glucopiranosíloxi)-3,5 - diidroxí	$R_3=R_4'=R_5=R_5'=OH$; $R_7=G$
<u>74</u>	rhamnetina	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona , 2 - (3,4 - diidroxifenil) - 3,5 - diidroxí	$R_3=R_4'=R_3'=R_5=OH$
<u>75</u>	rhamnocitrina	4H-1-Benzopirano-4 - ona,3,5-di-idroxí-2-(4-hidroxifenil)-7-metoxi	$R_3=R_3'=R_5=OH$; $R_7=OCH_3$
<u>76</u>	tamarixetina	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona , 3,5,7 - trihidroxí - 2 - (3 - hidroxí - 4 - metoxifenil)	$R_3=R_3'=R_5=R_7=OH$; $R_4'=OCH_3$
<u>77</u>	tomentina	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona , 2 - (3,4 - diidroxifenil) - 5,6 - diidroxí - 3,7 - dimetoxi	$R_3=R_7=OCH_3$; $R_3'=R_4'=R_5=R_6=OH$
<u>78</u>	5,2',4'-trihidroxí-6,7,5'-trimetoxiflavona	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona , 2 - (2,4 - diidroxí - 5 - metoxifenil) - 5 - hidroxí - 6,7 - dimetoxi	$R_2'=R_4'=R_5=OH$; $R_5'=R_6=R_7=OCH_3$
<u>79</u>	5,7,8,3'-tetrahidroxí-3,4'-dimetoxiflavona	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona , 2 - (3 - hidroxí - 4 - metoxifenil) - 5,7,8 - trihidroxí - 3 - metoxi	$R_3=R_4'=OCH_3$; $R_3'=R_5=R_7=R_8=OH$
<u>80</u>	3,6,7,3'-tetra-o-metil-5 - hidroxiflavona	4H - 1 - Benzopirano - 4 - ona , 2 - (3 - metoxi) - 3,6,7 - trimetoxi - 5 - hidroxí	$R_3=R_3'=R_6=R_7=OCH_3$; $R_5=OH$

* substituintes que não foram indicados, subentende-se que sejam átomos de hidrogênio

Também foram citados um esteróide 81, dois triterpenos 82, 83 /31/, um diol de cadeia longa 84 /29/, dois acetilenos 85, 86 /30/ quatro cumarinas 87, 88, 89, 90 /27/ e dois cromônios 91, 92 /32/ (Figura 7).

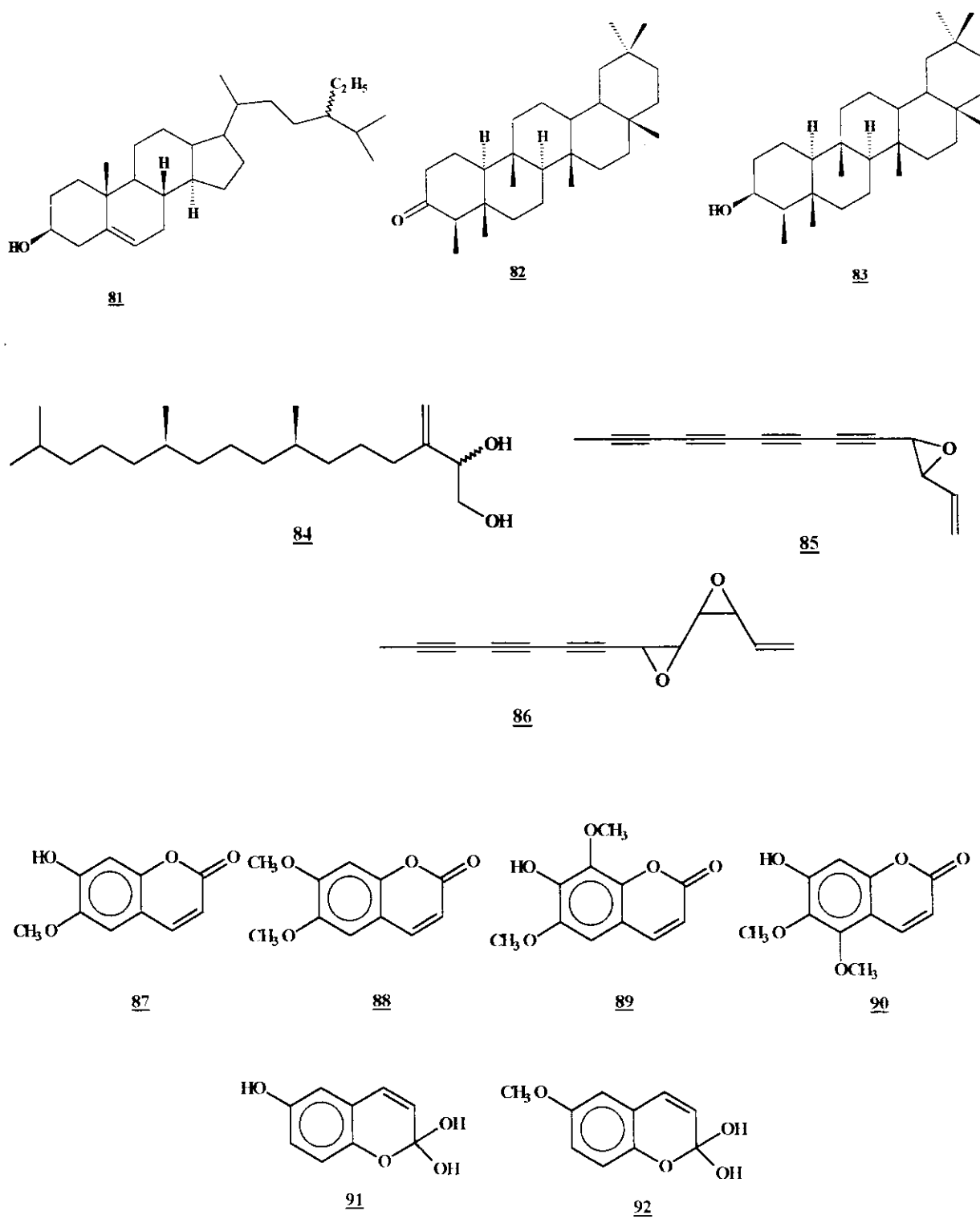
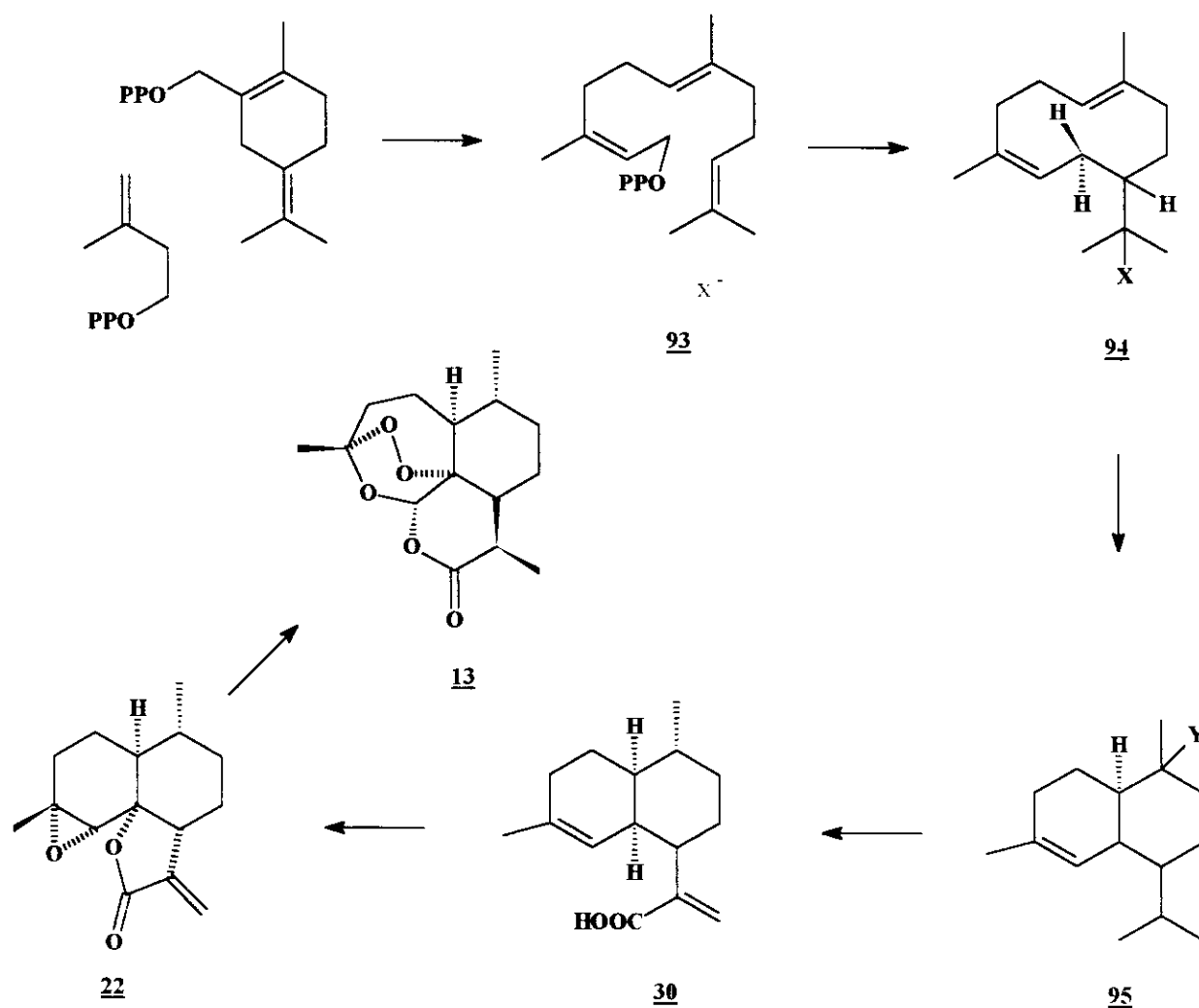


Figura 7: Outros componentes identificados na *Artemisia annua* L./27-32/

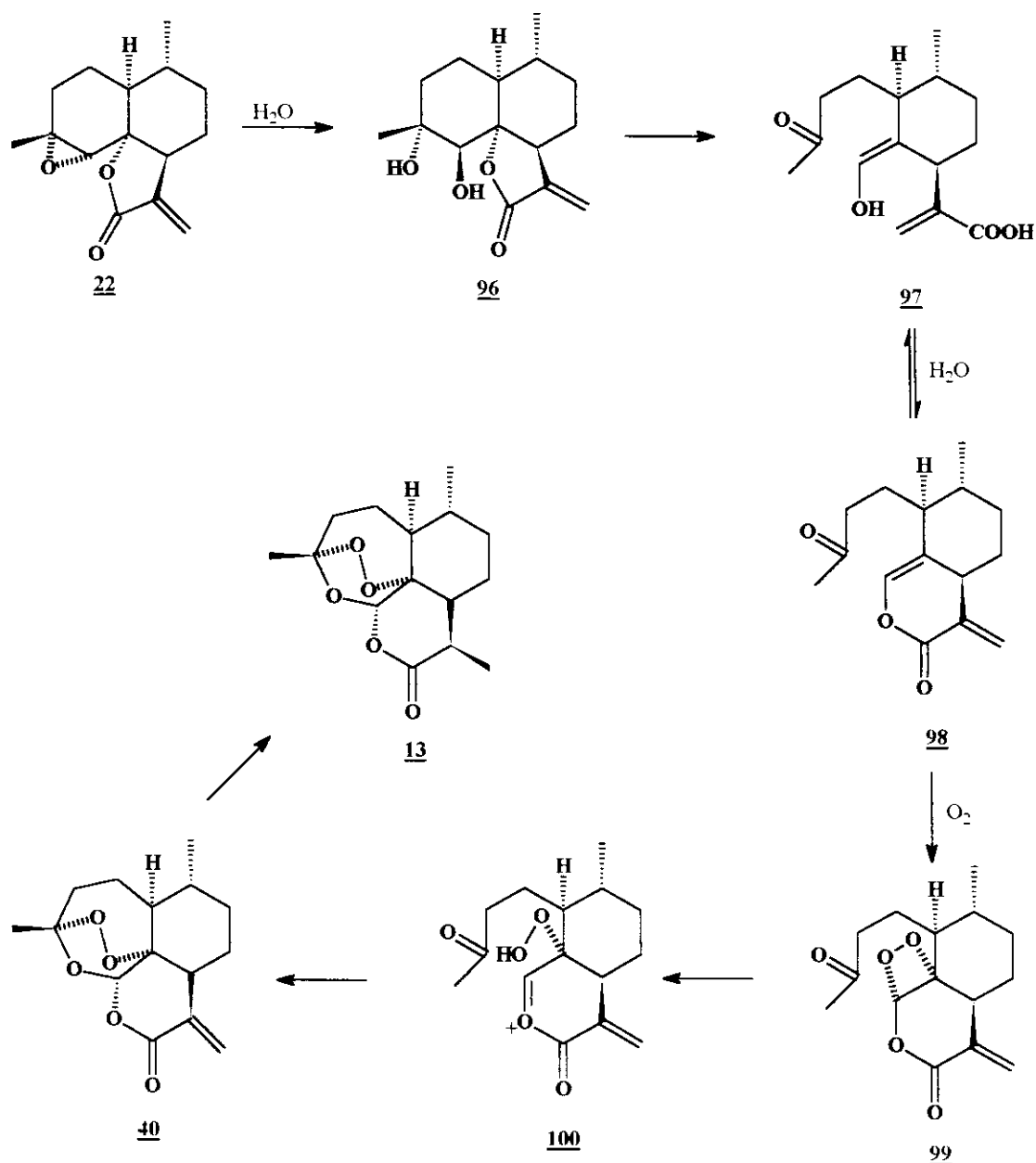
V. Biossíntese

A rota biossintética da artemisinina **13** foi inicialmente estudado por Sangwan e col. /33/ que demonstraram que inicialmente ocorria a ciclização do *cis*-farnesilpirofosfato **93**, dando origem ao esqueleto **95**. No trabalho sequencial de Nair e col. /34/ evidenciou-se que o ácido artemisinínico **30** era um precursor na biossíntese da artemisinina **13**. A biotransformação do ácido artemisinínico **30** em artenuína b **22** e posterior transformação enzimática em artemisinina **13** foi posteriormente comprovado por Brown e col. /35/ (Esquema 2).



Esquema 2: Biotransformações ocorridas para formação da artemisinina **13** /33-35/

Apesar de não serem conhecidas as etapas intermediárias até a obtenção da artemisinina 13, a literatura /36/ sugere um caminho de bioconversão hipotético (Esquema 3), no qual o anel epóxido do composto 22 sofre clivagem, levando à formação de um cadinolideo di-hidroxilado 96. O composto 96 sofre um “rearranjo de Grob”, levando à formação de um enol 97, que através de uma oxidação enzimática produz um peróxido tensionado, 99 precursor do artemisitenol 40 e a artemisinina 13 /36/.



Esquema 3: Biotransformação da artemisinina 13 a partir da artenuína b 22 /36/

VI. Metabólitos secundários voláteis descritos na *Artemisia annua* L.

A *Artemisia annua* L. produz um óleo essencial de sabor amargo, aroma doce e refrescante, e odor típico de graminea com nuances de cânfora 101/37/. Apesar de seu interesse comercial ainda ser limitado, é utilizado como fragrância em produtos de perfumaria e cosméticos, não provocando irritações na pele. O óleo apresenta atividade antimicrobiana e antimicótica /37/.

O óleo essencial de *Artemisia annua* L. tem sido exaustivamente estudado nas suas diferentes fases vegetativas. Em todas as partes da planta foram descritas a existência de óleo essencial porém o maior conteúdo foi verificado nas inflorescências. Análises em plantas secas demonstraram teores de até 3,2% de óleo essencial para as inflorescências. O mesmo trabalho cita que o teor da artemisia cetona 102 varia ao decorrer do ciclo da planta. Anterior ao florescimento o óleo essencial é pobre em artemisia cetona 102 e iniciando-se o florescimento observa-se um aumento drástico deste componente no óleo essencial /10/.

Um outro trabalho estudou as diferenças nos constituintes de *Artemisia annua* L. resultantes de sementes originárias da China e do Vietnã. Uma diferença expressiva foi verificada tanto na quantidade do óleo essencial como nos seus constituintes não-voláteis. O componente principal do óleo essencial de plantas provenientes de sementes Chinesas foi a artemisia cetona 102 enquanto que o óleo essencial proveniente da planta resultante de sementes Vietnamitas apresentou como componentes majoritários a cânfora 101 o β -cariofileno 103, trans- β -farneseno 104 e 1,8-cineol 105 sendo que a artemisia cetona 102 estava ausente /6,37/.

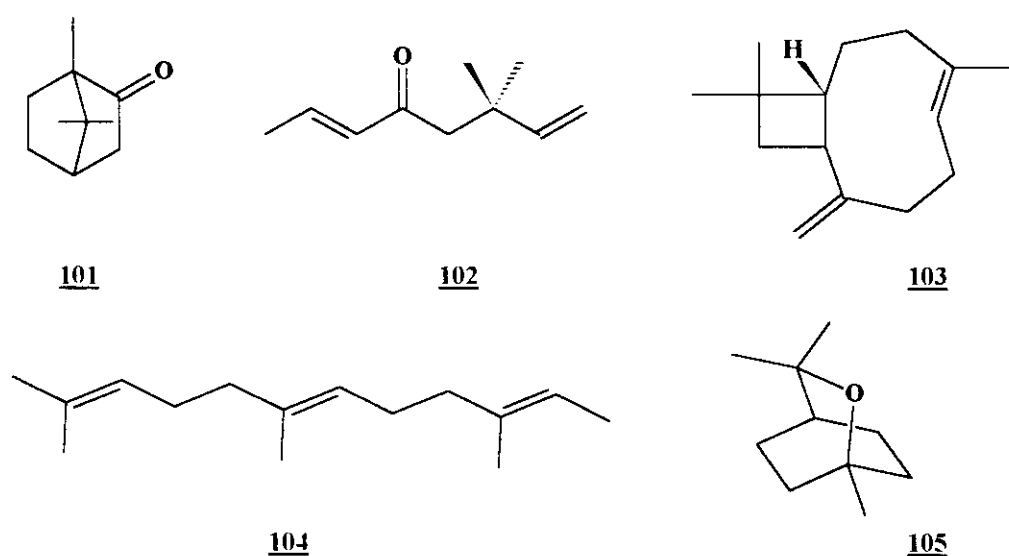


Figura 8: Terpenóides encontrados no óleo essencial de *Artemisia annua* L.

Outro fato relatado foi sobre a variação dos seus constituintes, enquanto a *Artemisia annua* L. originária de sementes Chinesas apresentou alto teores de óleo essencial rico em monoterpenos, aquela proveniente de sementes Vietnamitas apresentou baixos teores de óleo essencial e estes contendo um grande conteúdo de sesquiterpenos. Também foi descrito que a variedade Chinesa produzia baixos teores de artemisinina **13** comparada a variedade Vietnamita porém produzia alto teores de seus precursores, ácido artemisinínico **30** e artenuína b **22**. Acredita-se que na variedade Vietnamita a biossíntese dos terpenóides prossegue nos monoterpenos formando os sesquiterpenos. Sugere-se que estas diferenças sejam decorrentes de diferentes quimiotipos dentro de uma mesma espécie. Isto foi constatado pois *Artemisia annua* L. proveniente de sementes de origens distintas porém cultivadas sob as mesmas condições agrônômicas de solo, clima e local apresentaram variações como já citadas /37/. Assim concluíram que a *Artemisia annua* L. com o quimiotipo Vietnamita era ideal para produção de artemisinina **13** enquanto a *Artemisia annua* L. com o quimiotipo Chinês era favorável à produção do óleo essencial.

Tabela 2: Comparação da composição do óleo essencial de *Artemisia annua* L. de procedências distintas

Composto	#	% Chinesa	% Vietnamita
artemisia cetona	102	63,11	-
cânfora	101	3,3	23,8
β -cariofileno	103	—	5,6
trans- β -farneseno	104	—	3,8
1,8 cineol	105	—	3,1

Objetivos

O objetivo deste trabalho se enquadra dentro de um contexto mais global que envolveu a aclimação da *Artemisia annua* L. a partir de sementes provenientes da China, fornecidas pelo Prof. Dr. James McChesney (Mississippi-EUA) e sementes híbridas fornecidas pela MEDIPLANT (CENTRE DE RECHERCHES SUR LES PLANTES MÉDICINALES ET AROMATIQUES - Suíça), originárias de clones a partir de sementes Chinesas e Vietnamitas. Esse estudo teve o propósito de determinar a potencialidade econômica das diferentes variedades e verificar qual se adaptaria melhor às condições climáticas encontradas no Brasil.

A partir destes primeiros resultados, determinar a melhor época de plantio e colheita da planta (máximo da relação princípio ativo/biomassa). Para finalizar o estudo de viabilidade econômica da planta, foi necessário avaliar concomitantemente os parâmetros químicos e agrônômicos da *Artemisia annua* L.

Portanto coube neste trabalho:

- Inicialmente obter os padrões de artemisinina 13 e ácido artemisinínico 30 puros, necessários para o monitoramento de produção de plantas com maior teor do princípio ativo 13.
- Investigação de métodos viáveis de obtenção de artemisinina 13 e ácido artemisinínico 30 em escala de laboratório, semi-piloto e piloto.
- Caracterização espectroscópica de amorfos existentes na *Artemisia annua* L., cujos dados não se encontravam detalhados na literatura especializada.
- Estudo dos componentes voláteis da planta, como também o acompanhamento sazonal do óleo essencial da *Artemisia annua* L., comparativamente à produção de artemisinina 13 durante um ciclo completo da planta.
- Obtenção de padrões por transformações de grupos funcionais que permitissem analisar os componentes minoritários do óleo essencial.

Resultados e Discussão

I. Otimização do Processo de Obtenção da Artemisinina 13

De acordo com os objetivos de nosso trabalho foi necessário inicialmente aclimatar *Artemisia annua* L. no CPQBA - UNICAMP. Esta etapa foi realizada pelo setor de agronomia do CPQBA que datam de 1987 quando foram produzidas as primeiras plantas obtidas de sementes cedidas pelo Prof. Dr. Hermógenes de Freitas Leitão do Instituto de Biologia da UNICAMP. De procedência incerta (provavelmente Europa), estas sementes foram utilizadas para produção das primeiras mudas que possibilitaram trabalhos de identificação botânica, produção de sementes e estudos preliminares de desenvolvimento da planta. Em 1988 foram fornecidas pelo Prof. Dr. James McChesney (Mississippi-EUA) sementes provenientes da China. Duas outras variedades híbridas, originárias de clonagens de sementes Chinesas e Vietnamitas foram aclimatadas posteriormente em 1991, SI/FI e SII/FII, as quais foram fornecidas pela MEDIPLANT (CENTRE DE RECHERCHES SUR LES PLANTES MÉDICINALES ET AROMATIQUES - Suíça) responsável pelo trabalho de melhoramento das sementes. Detalhes sobre os aspectos agrônômicos deste trabalho encontram-se em relatórios internos e em diversas teses de mestrado elaboradas pela equipe do CPQBA.

Desde o início deste trabalho ficou claro que todo o trabalho de campo deveria ter um respaldo analítico quali e quantitativos dos constituintes de interesse econômico (ácido artemisinínico 30 e artemisinina 13). Assim sendo a primeira etapa foi o isolamento destes dois padrões utilizando um extrato bruto hexânico da parte aérea da planta. A purificação foi realizada através de técnica de cromatografia em coluna de sílica, fornecendo artemisinina 13 e ácido artemisinínico 30 em 0,001% e 0,01% de rendimentos respectivamente. O composto 13 e 30 foram caracterizados pela comparação de seus ponto de fusão, rotação ótica e dados espectroscópicos com aqueles existentes na literatura/38,39/. Vale a pena comentar que para a artemisinina 13 as atribuições já haviam sido feitas anteriormente ao início do nosso trabalho por Blasko e col. em 1988 /38/ (Figura 9). Durante o desenvolvimento do nosso trabalho de atribuição dos dados espectroscópicos de RMN¹H e C¹³ do ácido artemisinínico 30 Misra e colaboradores /40/ publicaram os dados relativos ao ácido artemisinínico 30 os quais apresentaram total concordância com nosso trabalho. A atribuição dos deslocamentos químicos de RMN¹H e ¹³C do ácido artemisinínico 30 estão mostrados na Figura 9, que estão condizentes aos descritos na literatura/40/.

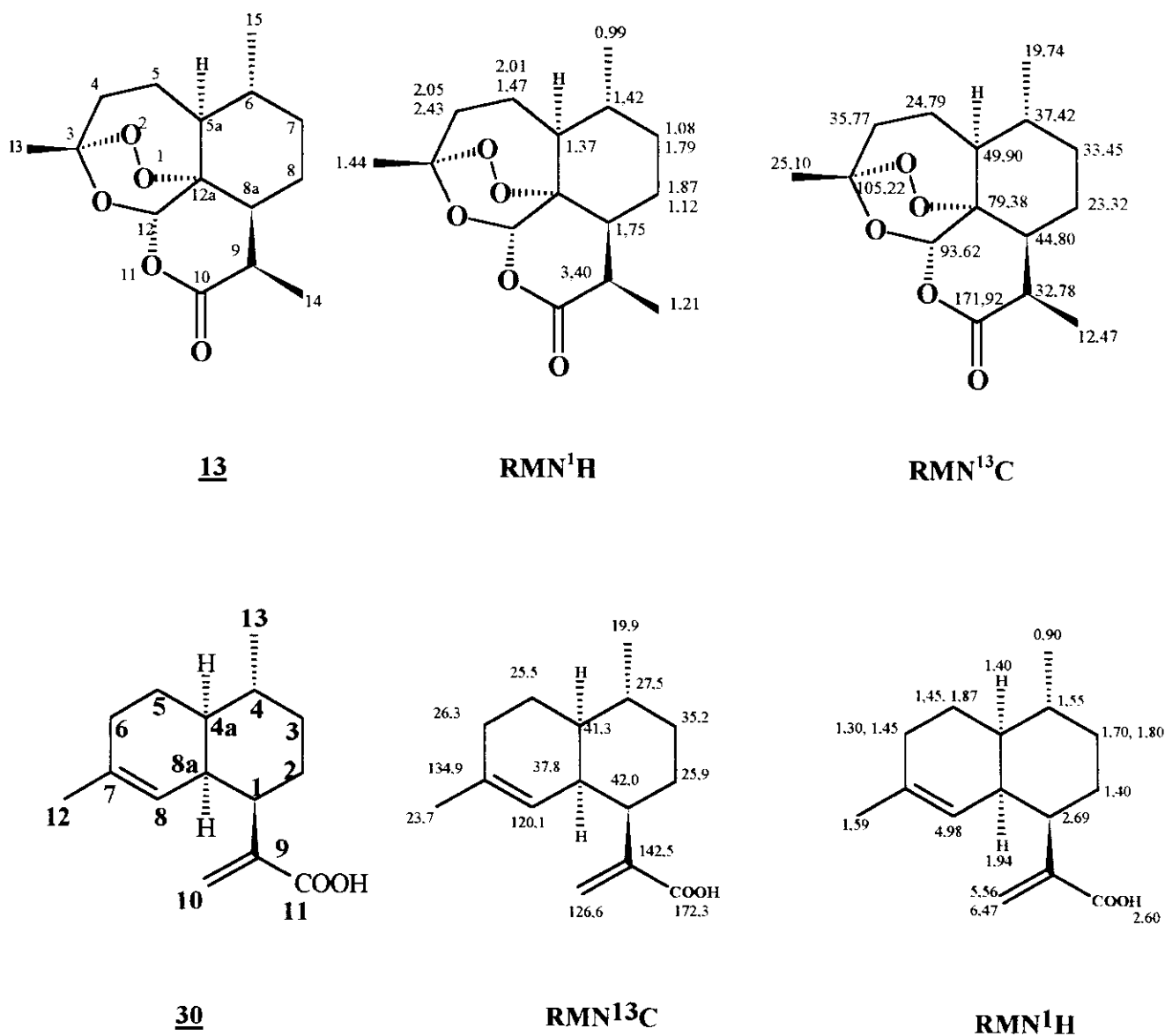


Figura 9: Atribuição por RMN ^1H e ^{13}C da artemisinina **13** e ácido artemisinínico **30**

A partir destes padrões foi possível pesquisar:

- métodos analíticos eficientes e economicamente viáveis que permitissem avaliar os teores de **13** e **30** nas diversas espécies aclimatadas e época apropriada para colheita da planta.
- forma de colheita, secagem e armazenamento da planta.
- otimização dos métodos de extração e purificação de **13** e **30**.

I.a. Otimização dos métodos analíticos

Com o objetivo de monitorar a produção de artemisinina **13** na planta tentaram-se diversos métodos analíticos como resumimos na Tabela 3 a seguir. Inicialmente foram feitas tentativas por vários métodos de HPLC /41/ sem no entanto ter conseguido resultados satisfatórios. Com a dificuldade encontrada em detectar o endoperóxido sesquiterpênico **13** experimentou-se analisar a artemisinina **13** por cromatografia gasosa acoplado ao detector de massas (GC/MS; HP5890/HP5970) fazendo-se a detecção pelo método SIM (“Selected Ion Monitoring”). A análise utilizando o detector de massas permite a detecção por dois métodos. O método Scan faz uma varredura da amostra detectando todos os íons que estão presentes, enquanto no método SIM escolhem-se alguns íons característicos do composto sob análise. Geralmente escolhem-se de preferência o íon molecular e os fragmentos de maior abundância com peso molecular mais alto, que permite uma sensibilidade maior já que o detector apenas monitora alguns íons. No método Scan perde-se na sensibilidade da análise pois todos os íons da molécula são monitorados. No que se refere ao GC/MS (SIM) foi a primeira técnica que permitiu uma quantificação de **13** possibilitando selecionar mudas, para o setor de agronomia, para serem transplantadas no campo, como também nos diversos extratos obtidos com hexano, etanol, diclorometano, tolueno e acetato de etila (Tabela 4). A quantificação foi feita monitorada pelos íons m/z 282, 165, 137 característicos da artemisinina **13** com a programação de temperatura I, descrito na parte experimental (Figura 10).

Tabela 4 : Quantificação de **13** por GC/MS utilizando método SIM

Extrato	% Artemisinina
Hexano	0,09
Tolueno	0,09
Etanol	0.08
Acetato de etila	0,10

A inconveniência do método é que o composto **13** é termicamente lábil causando a formação de produtos de pirolise. Além disto cada amostra leva 40 minutos de tempo de análise como também é uma técnica cara por envolver o uso de um equipamento sofisticado. Alternativamente utilizou-se cromatografia por camada delgada (CCD) para se fazer dosagens semi-quantitativas /41e/. Apesar deste não ser um método tão sensível quanto os outros, este método permitiu analisar comparativamente um grande numero de amostras simultaneamente a um custo baixo e rápido. Portanto através desta técnica foram monitorados todos os ensaios realizados no CPQBA.

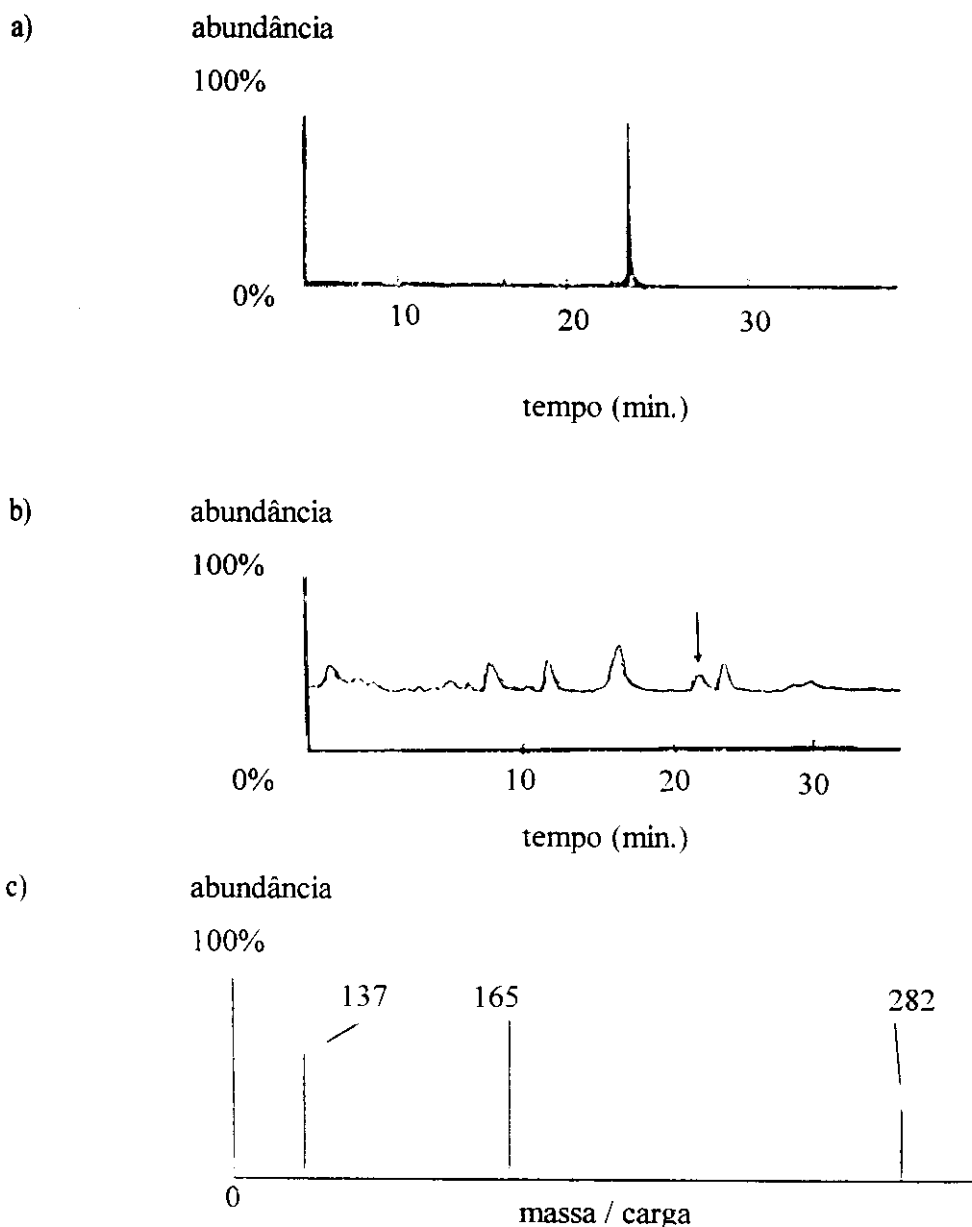
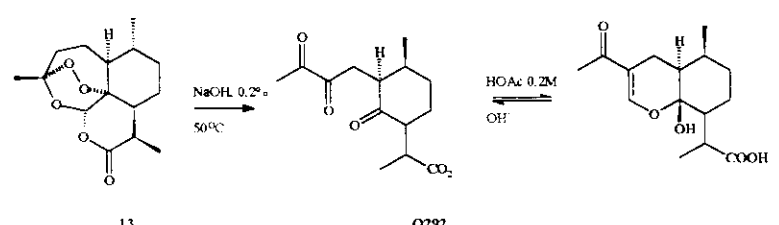


Figura 10 : a) GC de padrão de **13** b) GC de amostra do extrato etanolico dosado c) picos monitorados do composto **13** e do extrato etanolico dosado

Tabela 3 : Métodos analíticos testados para dosar artemisinina 13

Análise	Observações
HPLC com detetor eletroquímico /41a/	Testes realizados com o detetor eletroquímico para verificação de seu funcionamento não apresentaram resultados satisfatórios. Operando-se com um potencial de - 0,9 volt, potencial este necessário para a análise de artemisinina <u>13</u>, não se conseguiu uma estabilização da linha de base do aparelho. Por este motivo, abandonou-se esta técnica de análise.
HPLC com detetor UV utilizando reação pré-coluna /41b/	Este método prevê a transformação da artemisinina <u>13</u> no produto Q292  The reaction scheme shows the chemical transformation of artemisinin (13) into the product Q292. Artemisinin (13) is a sesquiterpene lactone with a complex bicyclic structure. It reacts with NaOH (0.2%) at 50°C to form an intermediate, which then reacts with HOAc (0.2M) and OH- to form Q292. Q292 is a sesquiterpene lactone with a different structure, featuring a carboxylic acid group and a different ring arrangement. O acompanhamento da reação de hidrólise da artemisinina por CCD (clorofórmio/metanol - 90/10) mostrou o aparecimento de outros produtos de degradação, além do produto de hidrólise. Por este motivo, abandonou-se este método de análise.
HPLC com detetor UV utilizando reação pós-coluna /41c/	Os testes foram realizados com uma solução de artemisinina padrão na concentração de 15 mg/ml, onde pudemos observar a detecção por UV, tendo conseguido a reprodutibilidade das injeções. Devido a problemas de equipamentos interrompemos esta técnica de análise.

continua

Análise	Observações
GC com detetor de ionização de chama (FID)/41D/	Neste tipo de análise, ocorre a degradação da molécula de artemisinina em 3 outros compostos, identificados por 3 picos distintos no cromatograma. Escolheu-se o de maior intensidade para servir como referência para análise. Foram realizados testes com solução de artemisinina padrão. Pode-se observar que em injeções de solução padrão abaixo de 5,0 mg/ml (5000 ppm) não se consegue reprodutibilidade de análise. Outros testes deverão ser realizados para a confirmação deste método.
GC/MS com detetor de massas com detecção SIM /41e/	A sensibilidade deste método é de 0,1-1,0 mg/ml ou seja de 100-1000ppm. Portanto foi necessário determinar as concentrações em nossas análises ampliando os cromatogramas observados e correlacioná-los com a abundância do padrão injetado.
Cromatografia de Camada Delgada (CCD) /41f/	Método atualmente utilizado por ser reprodutível, rápido, barato, poder dosar várias amostras numa mesma corrida e permitir analisar simultaneamente artemisinina 13 e ácido artemisinínico 30 .

I.b. Secagem e Armazenamento da *Artemisia annua* L.

Rodrigues e colaboradores /42/ avaliaram parâmetros que pudessem alterar o teor do princípio ativo **13** ao coletar, secar, moer e armazenar a planta. Evidenciou-se que os melhores resultados foram alcançados quando a planta era seca à sombra evitando temperaturas altas que decompõe o composto **13**. Também na etapa de moagem da planta constatou-se elevação da temperatura recorrendo-se a utilização de gelo seco para processar as folhas (o talo da planta era desprezado por apresentar altos teores de graxa aliados a traços de **13**).

Armazenamento da *Artemisia annua* L. a temperatura ambiente ao abrigo da luz durante um período de seis meses acarretou numa diminuição de 25% do princípio ativo comparado ao valor determinado no dia do processamento do material. Constatou-se que o

material coletado poderia ser submergido em etanol e estocado sob refrigeração a 5°C sem prejuízo do teor da artemisinina **13**. O fator importante neste caso é que não existam nem traços ácidos ou básicos que destroem o endoperoxídeo. Alternativamente observou-se que a planta seca e moída com gelo seco pode ser estocada a -20°C sem ocorrer perdas de **13** durante um período semelhante ao primeiro testado.

Portanto conclui-se que para minimizar as eventuais perdas do composto de interesse **13** deve-se evitar temperaturas elevadas e variações de pH quando armazenando em solvente orgânico.

Ic. Otimização dos Métodos de Extração e Purificação de Artemisinina **13 e Ácido Artemisinínico **30****

A proposta básica para obtenção de artemisinina **13** foi de enfatizar técnicas operacionais simples e também a redução dos custos de produção. Os ensaios realizados visaram viabilizar a produção deste princípio ativo **13** por um método que se adequasse as instalações disponíveis no CPQBA - UNICAMP.

Sohly e colaboradores /43/ citam técnicas de extração para a artemisinina **13** trabalhosos que empregam reagentes caros, como por exemplo partição líquido-líquido com acetonitrila e separação em coluna cromatográfica utilizando sílica-gel, esta técnica apresenta a inconveniência da sílica ser cara (R\$ 90/Kg) e como por vezes o produto requer repetidas operações de cromatografia para ser purificado encarecendo muito o processo.

Inicialmente realizamos os ensaios em escala de laboratório para posteriormente serem adaptados em escala semi-piloto e piloto. O agravante principal nesta etapa foi adequar as instalações existentes para manipulação em grandes proporções sem ocorrer grandes perdas de material.

Foram avaliados no processo de extração fatores de segurança, eficiência extrativa, toxicidade e seletividade extrativa. A capacidade extrativa de tolueno, diclorometano, hexano e etanol foram comparados. Constatamos que o poder extrativo variava muito pouco de um solvente para outro. Roth e colaboradores /44/ citam o uso frequente de hexano. Constatamos porém que o hexano também apresenta uma seletividade para graxas o que dificulta o processo de purificação subsequente da artemisinina **13**. O hexano por ser um solvente bastante inflamável também requer instalações à prova de explosão ao efetuar-se o “scale up”. O diclorometano e tolueno apesar de serem eficientes agentes extratores da artemisinina **13** foram

descartados por serem mais tóxicos do que o hexano e etanol. Este último revelou-se um solvente tão eficiente quanto os outros além de ser menos tóxico e o mais barato dos quatro.

Na etapa de purificação dos extratos brutos foram testados métodos de separação sólido-líquido mais compatíveis com métodos industriais, utilizando materiais acessíveis. Ponderamos a possibilidade de realizar a purificação com uma resina de troca iônica. Imaginamos que esta poderia reter o ácido artemisinínico **30** deixando eluir seletivamente a artemisinina **13**. Porém vários testes utilizando trocadores de íons aniônicos demonstraram resultados análogos aqueles observados com suportes mais econômicos (R\$150/Kg resina), não apresentando vantagem de seu uso. O potencial de purificação de diversos suportes foram testados frente a sílica-gel de coluna (artigo Merck 7734, R\$ 90/Kg) Em escala de laboratório foram realizados testes partindo-se de 3g de extrato bruto em cada ensaio. Na tabela 5 relacionamos os diferentes suportes testados com as vantagens e desvantagens encontradas para seu uso.

Neste caso optamos pela substituição da sílica convencional (Artigo Merck 7734) pela sílica precipitada (®Zeozil) que mesmo levando-se em conta a perda de solvente (14%) traz uma economia global de 40 vezes no processo.

Com o intuito de tentar reduzir o custo gasto em solventes na etapa de purificação do extrato bruto testou-se cromatografia em coluna seca utilizando um filme de polietileno flexível como coluna. Apesar da economia de solvente que esta coluna acarreta observou-se que o extrato se difundia pela coluna necessitando-se de outras colunas para alcançar o produto **13** puro. Como ao fazer a coluna cromatográfica tradicional reciclamos o solvente com 86% de recuperação não achamos vantajoso investir nesta alternativa pois a economia de solvente não seria tão significativa comparada as adaptações que se fariam necessárias nas instalações da planta piloto, como também as dificuldades que teriam de ser contornadas ao extrapolar o processo para a escala semi-piloto e piloto.

Extração líquido-líquido com hexano/metanol também foi testado com intuito de purificar o extrato bruto para obtenção de artemisinina **13**. Porém constatamos que o fator de partição não era eficiente havendo uma separação de 33% de artemisinina **13** no hexano acompanhado de material graxo e outros componentes apolares e 66% do princípio ativo no metanol junto com outros componentes polares requerendo ainda a utilização de coluna cromatográfica para obter o composto puro.

Tabela 5: Suportes testados para purificação de artemisinina **13**

Suporte	Vantagem	Desvantagem
Terra Diatomita (®Celite)	Custo R\$ 12/Kg	Separação pouco eficiente, passa tudo junto
Sílica precipitada (®Zeozil)	Custo R\$ 1,9/Kg requer 7 vezes menos de suporte que sílica convencional	Requer 3 vezes mais solvente que a sílica normal
Alumina	-	R\$ 100/kg, Separação pouco seletiva quando comparada a sílica-gel
Trocador iônico	-	R\$ 150/Kg; Separação pouco seletiva quando comparado a sílica-gel
silica-gel para camada delgada	-	R\$ 90/kg, utiliza uma proporção 1 extrato:10 Suporte
Sílica-gel coluna (artigo Merck 7734)		R\$ 90/kg, utiliza 1 extrato :20 suporte

De acordo com as instalações existentes optamos por realizar a purificação da artemisinina **13** conforme descrito no fluxograma da Figura 11. Para purificação do extrato bruto foi inicialmente passado por uma coluna contendo 20 Kg de ®Zeozil na qual se eluiu com 55 L de hexano puro para separar as graxas, após separou-se a fração rica em artemisinina **13** eluindo com 60 L de uma mistura de Hexano/acetato de etila 15%. Ao constatar que todo princípio ativo tinha saído eluimos a coluna com 20 L de hexano/acetato de etila 30% e 53 L de acetato de etila puro. Os outros componentes **12**, **21**, e **22** foram isolados da fração neutra do extrato após separação da artemisinina **13** (fluxograma da figura 11a) e o ácido artemisinínico **30** foi isolado do extrato básico (fluxograma da figura 11b).

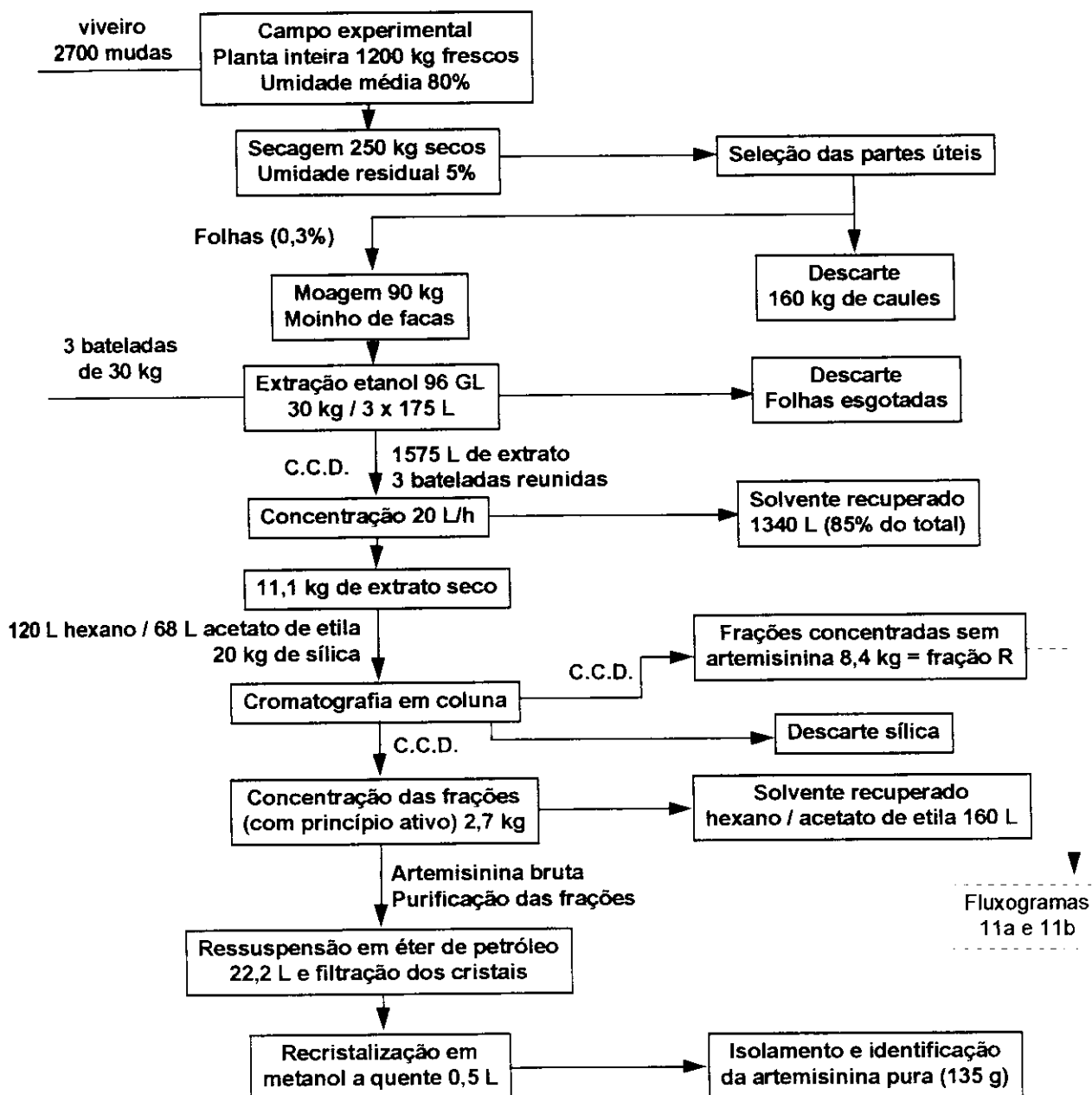


Figura 11. Fluxograma da obtenção de artemisinina pura e outros sesquiterpenos da *Artemisia annua* L.

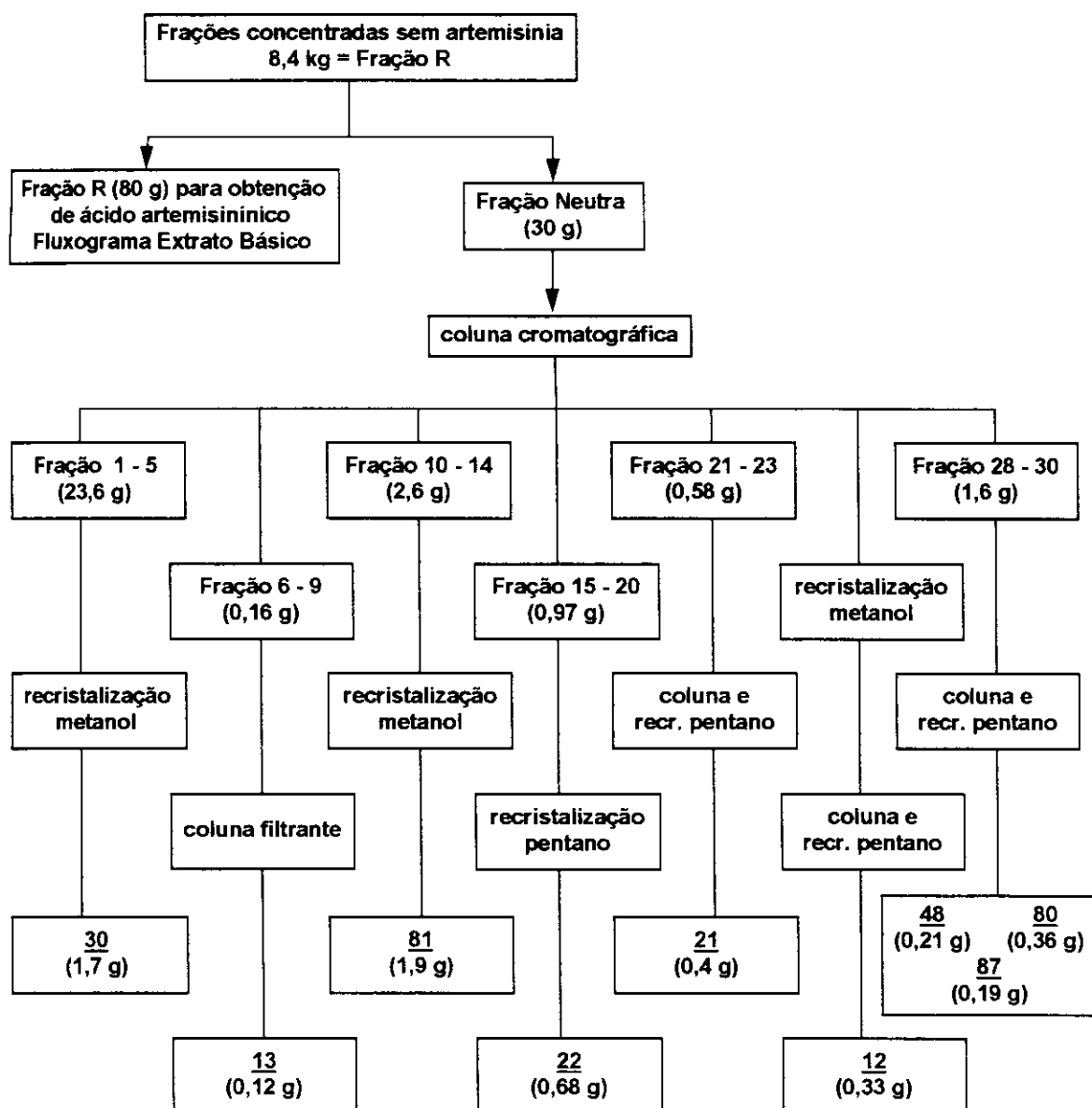


Figura 11a. Fluxograma do isolamento dos compostos 12, 21, 22, 30, 48, 80, 81 e 87 a partir do extrato neutro.

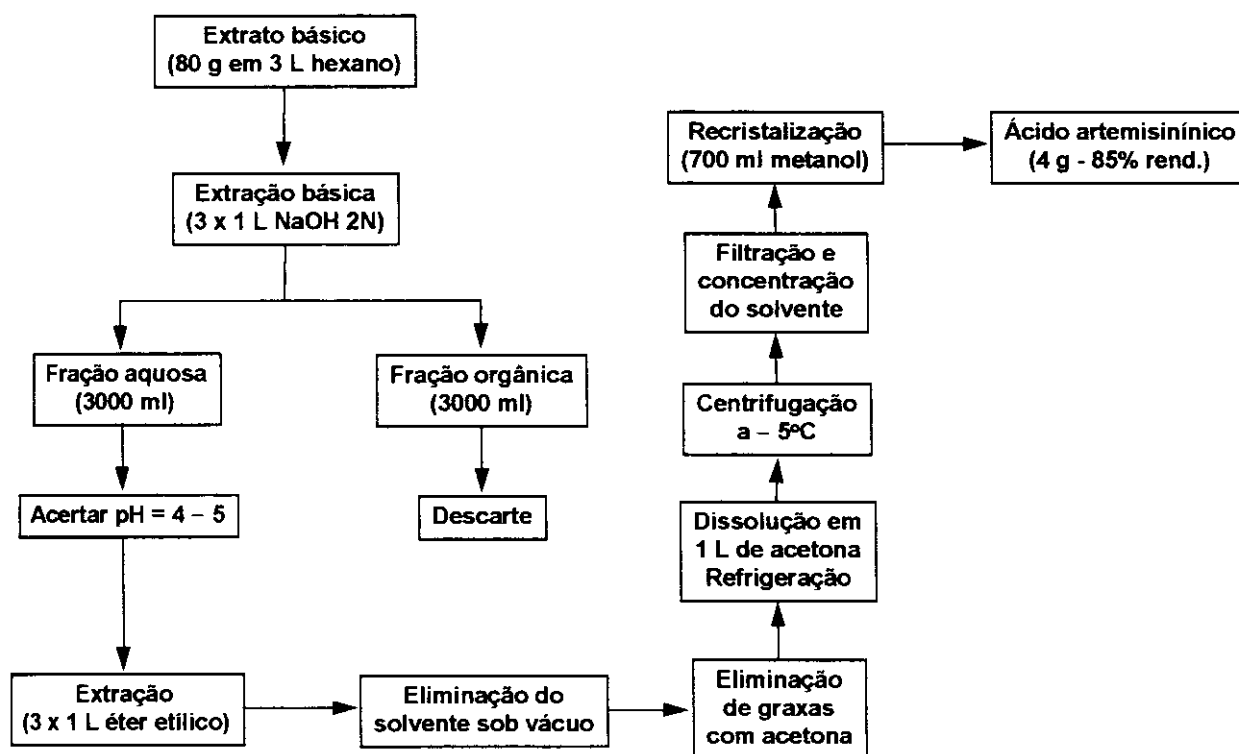


Figura 11b. Extração a partir da fração básica para obtenção do ácido artemisinínico

A utilização de etanol como solvente aliado ao uso de sílica precipitada como suporte na separação por cromatografia em coluna foi repassado em escala semi-piloto de modo a estimarmos o custo de produção de artemisinina **13**. Levando-se em conta desde a produção agrônômica, mão de obra, depreciação dos equipamentos, secagem, moagem, extração, concentração e separação cromatográfica do extrato bruto a equipe do CPQBA- UNICAMP /42/ conseguiu produzir a artemisinina **13** em 50 % de rendimento em relação ao teor inicial (0.3% na folha) a um custo de US\$11,5/g. Preços de catalogo, como Aldrich/1993 e Sigma/1995 citam um custo por grama de US\$ 196/g e US\$ 249/g respectivamente. Fonte internacional não revelada de 1986 refere-se a um valor de US\$ 50/g.

Apesar da evolução dos teores de princípio ativo **13** verificada na *Artemisia annua* L. cultivada no Brasil (de $\approx 0.001\%$ em 1988 para $\approx 0,4\%$ em 1995) notamos que ainda precisamos dimensionar melhor os controles analíticos. O método atualmente utilizado permite tirar conclusões quanto à escolha de caminhos a serem seguidos pois está análise é comparativamente precisa, porém como não é exata leva a distorções quanto os rendimentos finais alcançados. A equipe do CPQBA está na iminência de adequar um método por HPLC eficiente que forneça resultados precisos e exatos dos rendimentos finais alcançados. Paralelamente estamos investindo no uso de um densitômetro na leitura das análises por CCD que permite contornar o erro humano ao se fazer a leitura das placas.

Os rendimentos totais de extração e purificação do endoperóxido sesquiterpênico **13** ainda estão aquém do desejável (50% de rendimento final), porém consideramos que aumentou significativamente nossa experiência quanto aos cuidados que devem ser tomados nas manipulações desta planta para otimizar o seu cultivo e produção da artemisinina **13** e ácido artemisinínico **30**.

II. Isolamento e identificação de amorfanos procedentes de *Artemisia annua* L.

Apesar da grande quantidade de dados existentes relativos a *Artemisia annua* L. percebeu-se que existia uma lacuna quanto aos dados espectroscópicos dos amorfanos identificados na planta. Observou-se que os dados encontrados na literatura se limitavam à confirmação das estruturas sem levar em conta a atribuição dos deslocamentos químicos de todos os átomos de hidrogênio e de carbono das moléculas estudadas. Compostos contendo junção de anéis *cis* são interessantes de ponto de vista espectroscópico pois apresentam

alternativas conformacionais. Vale aqui salientar que a espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C é uma das técnicas mais sensíveis para a análise conformacional de moléculas em solução.

No fluxograma da Figura 11a descrevemos as etapas realizadas a partir da obtenção do extrato de *Artemisia annua* L. concentrado para adquirir os compostos 21, 22, 12 para nosso estudo. Ao decorrer do trabalho também foram isolados uma cumarina 87, dois flavonóides 48 e 80 e um esteróide 81.

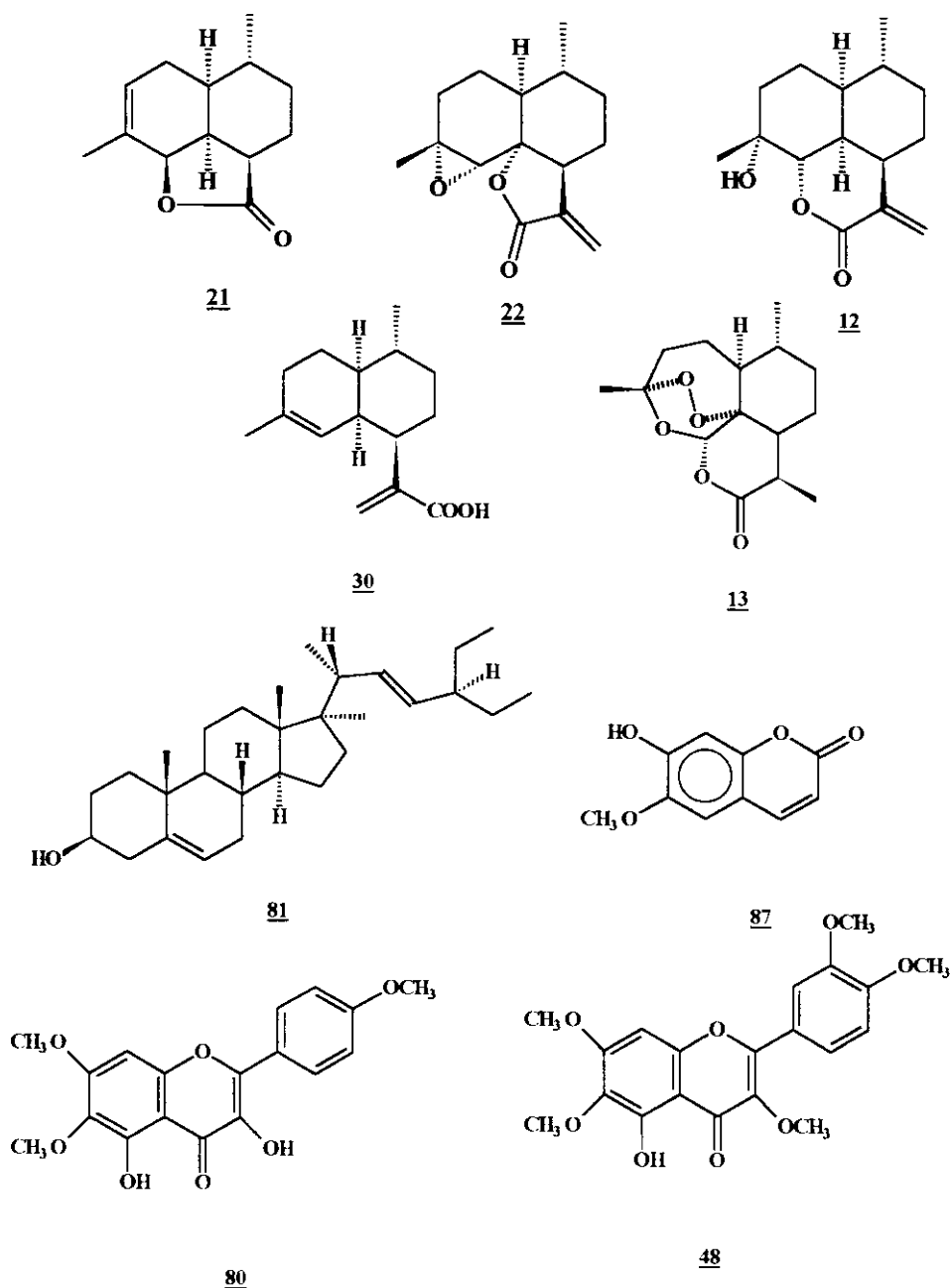
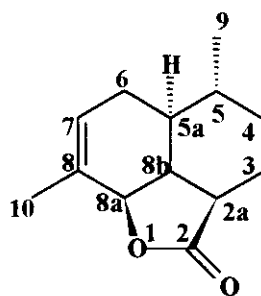


Figura 12: Compostos isolados da *Artemisia annua* L cultivada no Brasil

Qinghaosu I(21)

O composto **21** foi isolado (0,02% em relação a folha seca da planta) conforme a metodologia indicada no fluxograma da Figura 11a. Por comparação de seus dados de ponto de fusão, massas, RMN¹H e infravermelho com os da literatura /45/ confirmamos a sua estrutura. No espectro de infravermelho constatamos a banda correspondente a carbonila da lactona em 1750 cm⁻¹. No espectro de massas observou-se o íon molecular em m/z 206 numa abundância relativa de 78%.



21

Como citado anteriormente a atribuição dos sinais de RMN¹H deste composto estavam incompletos e de RMN¹³C inexistentes. Para a atribuição dos sinais de RMN¹H e ¹³C analisou-se minuciosamente os espectros de uma e duas dimensões H₂H (COSY) e H₂C (HETCOR e COLOC) e o espectro bidimensional de correlação heteronuclear H₂C à longa distância foi obtido utilizando um tempo de evolução $\tau=0,083s$ o qual corresponde a $\tau=1/J$ onde $J=12Hz$. Adotou-se uma sequência de análise dos dados espectrais para facilitar a interpretação. Inicialmente determinamos os carbonos primários, secundários e terciários a partir do espectro de RMN¹³C-DEPT 90° e 135° e os carbonos quaternários foram determinados por comparação do espectro de RMN¹³C com os dados observados no espectro de RMN¹³C-DEPT. A correlação entre os sinais de ¹³C e ¹H no espectro bidimensional do tipo HETCOR permitiu determinar a atribuição dos ¹H. Estes dados foram tabulados segundo o tipo de carbonos (Tabela 6) conjuntamente com as informações obtidas nos espectros.

Tabela 6: Correlação dos átomos de carbono aos átomos de hidrogênio do composto **21**

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	COLOC	#C
C [#]	179,5	-	-	179,5/1,70 (C ₂ /H ₃)	2
C [#]	131,1	-	-	131/1,86 (C ₈ /H ₁₀); 131/2,20 (C ₈ /H ₆)	8
CH	124,8	5,65	dd,J(7,6) = 6,5; J(7,6') $\cong$ 3	124,8/5,65 (C ₇ /H ₇); 124,8/2,20 (C ₇ /H ₆); 124,8/1,86 (C ₇ /H ₁₀)	7
CH	77,4	4,67	d _{largo} , J(8a,8b) = 7,2	77,4/1,86 (C _{8a} /H ₁₀); 77,4/4,67 (C _{8a} /H _{8a}); 77,4/5,65 (C _{8a} /H ₇)	8a
CH	39,1	2,96	ddd,J(8b,2a) = 10,2; J(2a,3),J(2a,3') $\cong$ 4	39,1/2,96 (C _{2a} /H _{2a})	2a
CH	37,0	2,85	ddd,J(8b,2a) = 10,2; J(8a,8b) = 7,2; J(5a,8b) = 5,7	37,0/2,20 (C _{8b} /H ₆)	8b
CH	32,8	1,54	multipeto	32,8/0,78 (C _{5a} /H ₅)	5a
CH	25,2	1,54	-	25,2/0,78 (C ₅ /H ₅)	5
CH ₂	27,2	1,10 e 1,80	-	27,2/0,78 (C ₄ /H ₉)	4
CH ₂	25,1	2,00 e 2,20	dddlargo; J(6 _a ,6 _e) = 17; J(6 _e ,7) = 3; J(5a,6 _e) = 2-3; J(5a,6 _a) = 5,8	25,1/2,00 (C ₆ /H ₆) 25,1/2,20 (C ₆ /H ₆)	6
CH ₂	18,5	1,70 e 2,00	-	-	3
CH ₃	20,4	1,86	-	20,4/1,86 (C ₁₀ /H ₁₀)	10
CH ₃	19,8	0,78	-	19,8/0,78 (C ₉ /H ₉)	9

Assim os sinais em 179,5 ppm, 131,1ppm, 124,8 e 77,4 do espectro de RMN¹³C foram atribuídos a C₂, C₈, C₇, C_{8a} respectivamente. Para a atribuição dos sinais em 20,4 ppm e 19,8 ppm correspondentes às duas metilas, levamos em consideração a correlação entre o sinal 20,4 ppm e o sinal simples em 1,86 ppm, correspondente a uma metila ligada a uma olefina (C₁₀) e a correlação entre o sinal em 19,8 estava correlacionado com um dubleto em 0,78 ppm atribuído assim a C₉ (E21-HETCOR) Para atribuição dos três CH e três CH₂ aliamos os dados observados no experimento de RMN bidimensional H,H (E21-COSY) e C,H (E21-COLOC).

Pela teoria dos deslocamentos químicos os sinais em 2,85 e 2,96 ppm poderiam ser atribuídos a H_{2a}. Observamos que o sinal em 2,96 ppm se correlacionava com os sinais em 1,70 e 2,00 ppm correspondente ao CH₂ da posição 3 (RMN 2D H,H; E21-COSY) sendo portanto este o sinal correspondente a H_{2a} e o sinal em 2,85 ppm correspondente a H_{8b}. Assim o sinal de hidrogênio do CH que aparece em 1,54 ppm foi atribuído ao H_{5a}. A atribuição de H_{8b} foi corroborada pela correlação a longa distância C_{8b}/H₆ no espectro de E21-COLOC (Tabela 6). Foi possível atribuir os CH₂ restantes pela observação no espectro de correlação H,H (COSY), que o H₇ alílico em 5,65 ppm se correlacionava com os hidrogênios em 2,00 e 2,20 ppm atribuídos ao H₆ e H_{6'}. O CH₂ em 1,80 e 1,10 ppm foi atribuído à posição 4 por exclusão. No espectro E21-COLOC confirmamos essa dedução pela correlação existente entre C₄/H₉ (27,2/0,78 ppm)

A partir de modelos moleculares ficou evidente que o composto **21** apresenta uma estrutura conformacionalmente flexível podendo existir como **21a** e **21b**. Esta flexibilidade se deve a existência do sistema *cis* decalínico, dificultando pois a determinação de sua conformação preferencial em solução, a qual poderia ser obtida a partir dos conhecimentos adquiridos na análise anterior e através de uma minuciosa investigação das constantes de acoplamento no espectro de RMN¹H. A partir da conformação **21a** esperar-se-ia que H_{8b} (2,85 ppm) se apresentasse sob a forma de um duplo-duplo-dubleto com constantes de acoplamento J_{8b,8a}=6,8; J_{8b,2a}=5,2; J_{8b,5a}=5,6, enquanto que para conformação **21b** as constantes deveriam ser J_{8b,8a}=7,4; J_{8b,2a}=6,6; J_{8b,5a}=6,2. As medidas experimentais revelaram constantes de acoplamento com valores intermediários aos previstos para as conformações **21a** e **21b**, evidenciando a presença de um equilíbrio conformacional rápido para a escala de tempo do RMN (**21a** ↔ **21b**) (Figura 13). Também foram determinadas as constantes de acoplamento para os outros hidrogênios da molécula e comparadas aos valores teóricos esperados (Tabela 7).

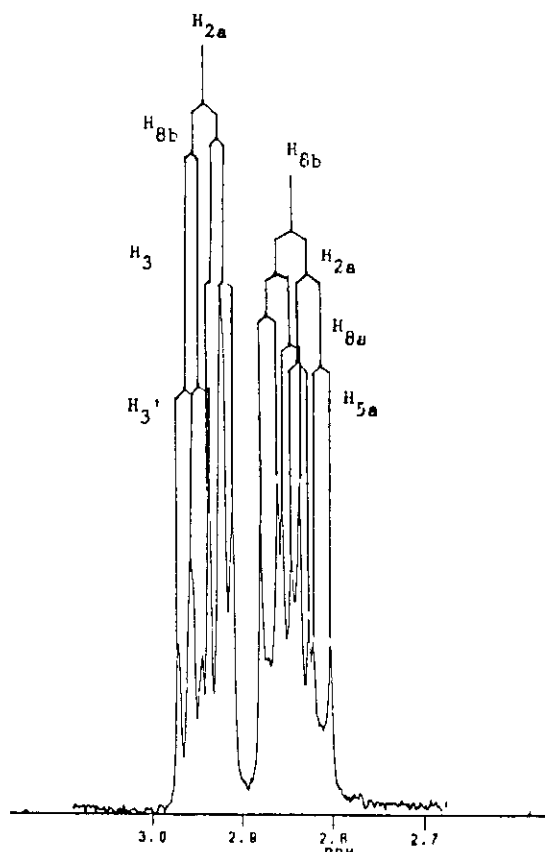


Figura 13 : Duplo-duplo-dublete observado para H_{8b}

A partir de cálculos de mecânica molecular de várias conformações alternativas para **21** obtivemos duas conformações de menor energia, ou seja **21a** e **21b** com uma diferença de energia de 1,8 KJ entre elas /46-48/.

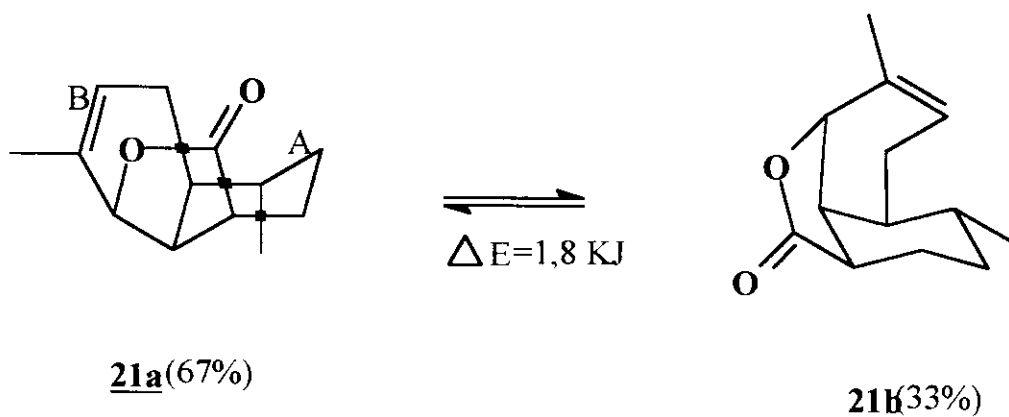


Figura 14: Conformações de menor energia do composto **21** previsto por cálculos de mecânica molecular (MM_2)

As geometrias otimizadas revelaram que em ambas conformações o anel B do sistema *cis* decalínico possuía forma bote e o anel A forma cadeira. Caso a barreira energética entre as duas conformações fosse pequena ocorreria uma interconversão dinâmica, e esperar-se-ia uma razão de 2,1:1 entre as populações de **21a** (67%) e **21b** (33%) a 298K. As constantes de acoplamento esperadas para $^3J(H,H)$ foram calculadas utilizando a razão **21a/21b** citada e a equação $J=8,5 \cos^2 \phi -0,3$ para $0^\circ \leq \phi \leq 90^\circ$ e $J=9,5 \cos^2 \phi -0,3$ se $90^\circ \leq \phi \leq 180^\circ$. Deste modo as constantes de acoplamento esperadas seria $J_{calculada} = 0,66 J_{21a \text{ calculada}} + 0,33 J_{21b \text{ calculada}}$. As constantes de acoplamento assim calculadas foram comparadas às constantes de acoplamento experimentais observadas no espectro de RMN¹H (tabela 7). Estes resultados estavam de acordo com a existência de um equilíbrio conformacional rápido entre **21a** e **21b** em solução.

Tabela 7: $^3J(H,H)$ calculados e experimentais para o composto **21**

Ângulo	21a (67%) (°)	21b (33%) (°)	J _{calculado} (Hz)	J _{experimental} (Hz)
H-C ₇ -C ₆ -H	-18,1 (7,4)	-104,9 (0,3)	5,0	6,5
H-C ₇ -C ₆ -H'	99,5 (0,0)	11,7 (7,9)	2,6	3,0
H-C ₆ -C _{5a} -H	-59,6 (1,9)	56,0 (2,4)	2,1	2,3
H-C ₆ -C _{5a} -H'	-179,7 (9,2)	-62,8 (1,5)	6,6	5,8
H-C _{5a} -C _{8b} -H	33,4 (5,6)	-29,1 (6,2)	5,8	5,7
H-C _{8a} -C _{8b} -H	24,3 (6,8)	-18,2 (7,4)	7,0	7,7
H-C _{8b} -C _{2a} -H	36,1 (5,2)	25,4 (6,6)	5,7	10,2
H-C _{2a} -C ₃ -H	-70,8 (0,6)	-163,0 (8,4)	3,2	4,0
H-C _{2a} -C ₃ -H	44,8 (4,0)	-45,4 (3,9)	4,0	4,0

Na Figura 15 visualizamos a molécula do composto **21** com seus deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono treze.

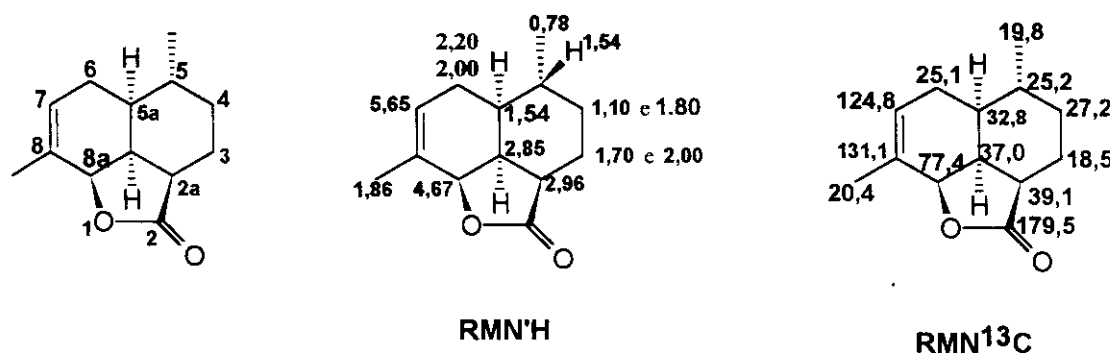
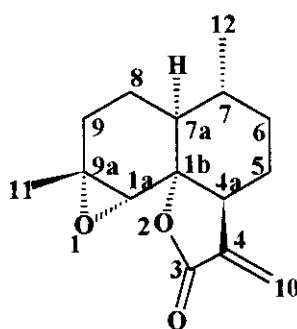


Figura 15: Atribuição espectroscópica por RMN¹H e ¹³C do composto **21**

Qinghaosu II (22**)**

A partir de folhas secas (0,03% de rendimento) obtivemos o composto **22** conforme o procedimento descrito no fluxograma da Figura 11a, como um cristal branco com um ponto de fusão de 154°C . No seu espectro de infra-vermelho constatamos a banda da carbonila em 1770 cm⁻¹ e uma banda de estiramento C=C em 1665 cm⁻¹. A partir do espectro de massas confirmamos, íon molecular em m/z 248.



22

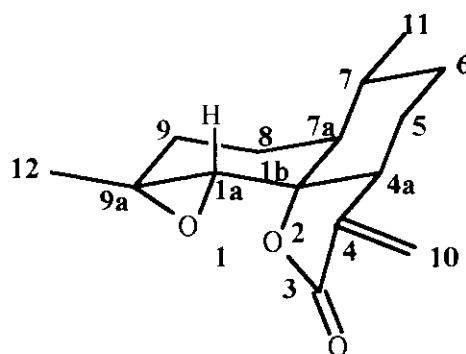
Valendo-se da filosofia utilizada para o composto **21** fizemos a atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e átomos de carbono do composto **22** por análise das correlações em uma e duas dimensões H,H e H,C. As correlações a longa distância foram determinadas a partir de experimentos RMN¹³C- COLOC utilizando tempos de evolução $\tau=0,083s$ e $\tau=0,05s$ correspondentes a $\tau=1/J$ onde J é igual a 12 e 20 Hz respectivamente.

Dos espectros unidimensionais de RMN¹³C e RMN¹³C-DEPT 90° e 135° determinamos os tipos de carbonos e seus deslocamentos químicos. Aliamos estes dados as correlações entre os sinais de ¹H, ¹³C nos espectros bidimensionais do tipo HETCOR determinando os deslocamentos químicos dos hidrogênios (Tabela 8).

Tabela 8: Correlações observadas por RMN¹H e RMN¹³C do composto **22**

Carbono	δ 13C (δppm)	δ 1H(ppm)	J (Hz)	COLOC	#C
C#	170,2	-	-	170,2/5,43 (C ₃ /H ₁₀) 170,2/6,16 (C ₃ /H ₁₀)	3
C#	138,8	-	-	138,8/2,74 (C ₄ /H _{4a})	4
C#	81,2	-	-	81,2/1,48 (C _{1b} /H _{5axial}) 81,2/2,74 (C _{1b} /H _{4a})	1b
C#	58,4	-	-	58,4/1,34 (C _{9a} /H ₁₂) 58,4/1,56 (C _{9a} /H ₉) 58,4/1,93 (C _{9a} /H ₈)	9a
CH	58,7	2,68	slargo	58,7/1,34 (C _{1a} /H ₁₂) 58,7/1,48 (C _{1a} /H _{7a})	1a
CH	52,8	2,74	dddd, J(4a,5 _a)=15 J(4a,5 _e)≅ J(4a, 10a)≅J(4a,10b)≅3	52,8/2,74 (C _{4a} /H _{4a}) 52,8/6,16 (C _{4a} /H ₁₀)	4a
CH	43,7	1,48	-	43,7/0,99 (C _{7a} /H ₁₁) 43,7/1,90 (C _{7a} /H ₆)	7a
CH	30,7	1,48	-	30,7/1,26 (C ₇ /H ₆) 30,7/1,48 (C ₇ /H ₇)	7
CH ₂	117,8	5,43 e 6,16	d, J(10a,4a) = J10b,4a) ≅ 3,2	-	10
CH ₂	33,9	1,26 e 1,90	-	33,9/0,99 (C ₆ /H ₁₁)	6
CH ₂	24,3	1,76 e 1,93	-	24,3/1,76 (C ₉ /H ₉)	9
CH ₂	21,7	1,40 e 2,06	J(5 _a ,5 _e)=14; J(5 _e ,6 _a) ≅ J(5 _e ,6 _e) ≅ J(5 _e ,4a) ≅ 3	21,7/2,06 (C ₅ /H ₅) 21,7/1,26 (C ₅ /H ₆)	5 _e 5 _a
CH ₂	16,3	1,56	-	16,3/1,76 (C ₈ /H ₉) 16,3/1,56 (C ₈ /H ₈)	8
CH ₃	22,8	1,34	s	22,8/1,34 (C ₁₁ /H ₁₁)	11
CH ₃	18,6	0,99	d, J(11,7)=6	18,5/0,99 (C ₁₂ /H ₁₂)	12

Com base na teoria dos deslocamentos químicos, os sinais em 170,2; 138,8; 117,8 ppm foram atribuídos a C₃, C₄, e C₁₀ respectivamente. As duas metilas foram facilmente distinguidas no seu espectro de RMN¹H pois a metila na posição-12 apresenta-se como um singlete desblindado em 1,34 ppm por estar adjacente a um heteroátomo enquanto a metila na posição-11 apresenta-se como um dubleto em 0,99 ppm pois se encontra acoplado ao H₇. O H_{1a} poderia ser atribuído tanto aos sinais em 2,68 ou 2,74 ppm por estar no carbono do epóxido. Como no espectro bidimensional de correlação H,H (COSY) observou-se que os hidrogênios da olefina em 5,43 e 6,16 ppm se correlacionam com o sinal em 2,74 ppm, conclui-se que o H_{1a} corresponde ao deslocamento químico em 2,68 ppm e o H_{4a} foi atribuído a 2,74 ppm. Por exclusão o H_{7a} foi atribuído a 1,48 ppm.



22

Figura 16: Vista estereoquímica do composto **22**

Foi observado também que H_{4a} (2,74 ppm) se correlacionava com o CH₂ em 1,40 e 2,06 ppm atribuindo este assim, a posição-5. Por sua vez constatamos a existência de correlação entre os deslocamentos químicos de 1,40 ppm com 1,26 e 1,90 ppm atribuindo estes hidrogênios a posição-6. Esta atribuição foi corroborada pela correlação a longa distância (E22-COLOC) onde verificou-se uma correlação entre C₅/H₆ (21,7/1,26 ppm) e C₆/H₁₁ (33,9/0,99 ppm). Restaram portanto atribuir os dois CH₂ em 16,3 e 24,3 ppm. Tanto as correlações bidimensionais H,H (E22-COSY) e H,C a longa distância (E22-COLOC) não foram suficientes para distinguir claramente entre estas duas posições. Para atribuímos os dois hidrogênios H₈ e H₉ recorremos ao experimento bidimensional do tipo NOESY (“Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy”) que permitiu estudar as correlações espaciais da molécula

/49/. A partir deste constatamos uma correlação entre H_{12} e 1,56 ppm que verificamos assim corresponder à posição-8. O deslocamento químico de C_8 , 16,3 ppm ($\Delta\delta=11$ ppm), é pouco usual comparado a outros amorfanos (exemplos: **21** e **12**) e pode ser atribuído ao efeito γ -gauche adicional introduzido pelo oxigênio em C_{1b} . A proteção deste tipo com valores altos são conhecidos para substituintes norbornanos endo-substituídos /50/.

Para confirmar a configuração relativa recorremos ao experimento de RMN^1H -NOESY que permitiu observar uma correlação do H_{1a} com os deslocamentos químicos em 1,40 ppm correspondente ao átomo de hidrogênio axial do carbono C_5 e em 1,34 ppm com os átomos de hidrogênio da metila em C_{12} . Também observou-se que o átomo de hidrogênio da dupla ligação com sinal em 5,43 ppm se correlacionava com o átomo de hidrogênio em 2,74 ppm possibilitando desta maneira confirmar a estereoquímica relativa da molécula. O valor da constante de acoplamento entre H_{4a} e H_5 (15 Hz) foi concordante com o valor teórico de um acoplamento H_{axial} - H_{axial} assim sendo o composto **22** não apresenta interconversão conformacional em solução.

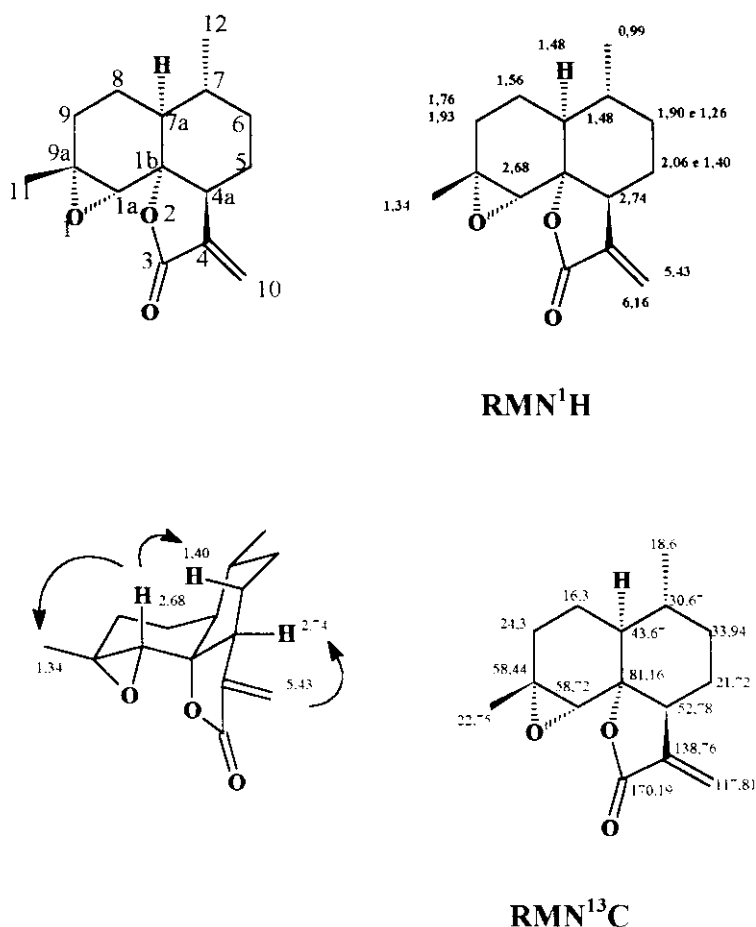
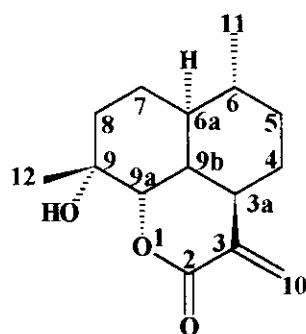


Figura 17: Dados de RMN^1H e ^{13}C do composto **22**

Qinghaosu V (**12**)

A partir das folhas secas como indicado no fluxograma da Figura 11a, isolamos o composto **12** (0,01% de rendimento) com um ponto de fusão de 145-146°C. Confirmamos também a estrutura do composto **12** por comparação de seus dados experimentais de infravermelho, massas e RMN¹H com aqueles dados descritos na literatura /51/. Foi observada uma banda de hidroxila no espectro de infravermelho em 3470 cm⁻¹ e outra correspondente a carbonila da lactona em 1722 cm⁻¹. O espectro de massas esta de acordo com a formula molecular da amostra pela presença do íon molecular em m/z 250.



12

Para atribuição dos átomos de hidrogênio e carbono da molécula **12**, utilizamos procedimentos análogos aos descritos para a análise dos espectros 1D e 2D homo e heteronucleares descritos para os compostos **21** e **22**. Para determinar as correlações a longa distancia recorreremos ao experimento de RMN¹³C-COLOC no qual utilizamos tempos de evolução de $\tau=0,083s$ e $\tau=0,05s$ os quais correspondem a $\tau=1/J$ onde os valores de J são 12 e 20 Hz respectivamente. Na tabela 9 relacionamos os tipos de carbonos que foram determinados a partir dos dados fornecidos do espectro de RMN¹³C-DEPT 90° e 135°. A correlação entre os sinais de H e C foram definidos pela análise do espectro de correlação bidimensional ¹H, ¹³C do tipo HETCOR

Tabela 9 : Dados de RMN¹H e RMN¹³C do composto **12**

Tipo C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	COLOC	#C
C ^z	166,2	-	-	166,2/5,62(C ₂ /H ₁₀) 166,2/6,51(C ₂ /H ₁₀)	2
C ^z	139,4	-	-	139,4/5,62(C ₃ /H ₁₀) 139,4/6,5(C ₃ /H _{10b})	3
C ^z	70,3	-	-	70,3/1,36 (C ₉ /H ₁₂)	9
CH	80,1	4,37	d, J(9b,9a)=11,6	80,1/1,36 (C _{9a} /H ₁₂)	9a
CH	42,3	1,43	-	42,3/1,66 (C _{6a} /H ₇ ou C _{6a} /H ₈)	6a
CH	39,6	2,66	ddd, J(3a,4 _a)=11,9; J(3a,9b)≅J(3a,4 _e)≅4,4	39,6/6,51 (C _{3a} /H ₁₀)	3a
CH	35,9	2,36	ddd, J(9b,9a)=11,6; J(9b,3a)≅J(9b,6a)≅4,4	35,9/1,66 (C _{9b} /H ₄) 35,9/2,36 (C _{9b} /H _{9b})	9b
CH	27,5	1,48	-	27,5/1,66(C ₆ /H ₄) 27,5/1,80 (C ₆ /H ₄)	6
CH ₂	129,6	5,62	dd, J(10,10')=J(10,4a)=1,5	129,6/2,66(C ₁₀ /H ₁)	10
CH ₂	34,9	1,80 _e e 1,14 _a	dddd, J(5 _e ,5 _a)=13,2; J(5 _e ,6a) =J(5 _e ,4 _e)=J(5 _e ,4 _a)=3,5	34,8/0,88 (C ₅ /H ₁₁)	5
CH ₂	32,2	1,47 e 1,66	-	32,2/1,36 (C ₈ /H ₁₂)	8
CH ₂	30,8	1,37 e 1,66	-	30,8/1,66 (C ₇ /H ₇)	7
CH ₂	21,9	1,66 e 1,86	-	21,9/1,66 (C ₄ /H ₄)	4
CH ₃	27,4	1,36	s	27,4/1,36 (C ₁₂ /H ₁₂)	12
CH ₃	20,0	0,88	d, J(11,7)=6	20,0/0,88 (C ₁₁ /H ₁₁)	11

A análise destes primeiros dados permitiu atribuir os carbonos C₂, C₃, C₉ e C₁₀ como sendo os sinais em 166,2; 139,4; 70,3 e 129,6 ppm respectivamente. O sinal em 80,1 ppm foi atribuído ao C_{9a} pois este deslocamento químico está de acordo com um CH adjacente a um heteroátomo ficando desblindado em relação aos outros átomos de CH. A distinção entre as metilas foi facilitada pois o sinal em 27,4 ppm que corresponde ao sinal simples em 1,36 ppm no espectro HETCOR estava mais desblindado que o sinal em 0,88 ppm, esta diferença se

justifica pelo C₁₂ encontrar-se adjacente a uma hidroxila. Como o sinal em 1,48 ppm se correlacionava com os hidrogênios da metila na posição-11 atribuímos este sinal a H₆. No espectro de correlação H,H (E12-COSY) observamos uma correlação do H_{9a} (4,36 ppm) com um hidrogênio em 2,36 ppm que por sua vez se correlacionava com o sinal em 2,66 ppm. Evidenciando assim a sequência, H_{9a}-H_{9b}-H_{3a} ou alternativamente H_{9a}-H_{9b}-H_{6a}. Para podermos atribuir corretamente os deslocamentos químicos de H_{3a} e H_{6a} foi necessário recorrer a análise do espectro de correlação a longa distância C,H (E12-COLOC) que permitiu determinar que o C_{6a} se correlacionava com o sinal em 1,66 ppm enquanto que o sinal em 39,6 ppm se correlacionava com o sinal em 6,51 ppm correspondente a olefina e portanto o sinal em 39,6 ppm foi atribuído a C_{3a}. Por exclusão atribui-se ao H_{6a} o deslocamento químico em 1,43 ppm. De forma análoga foram atribuídos os CH₂. Como no espectro de correlação C,H (E12-HETCOR) constatamos que tanto os sinais em 32,2; 30,8 e 21,9 ppm se correlacionavam em 1,66 ppm foi necessário recorrer a análise das correlações C,H a longa distância (E12-COLOC) para diferenciar entre eles. Constatamos que a metila na posição-12 se correlacionava com 32,2 ppm portanto este sinal foi atribuído ao C₈ (1,47 e 1,66 ppm) portanto o deslocamento químico em 1,66 ppm que se correlacionou com 2,65 e 1,86 ppm seria correspondente a H₄. A partir do espectro de correlação C,H (HETCOR) temos que o sinal em 21,9 ppm corresponde aos hidrogênios 1,66 e 1,86 ppm portanto podemos concluir que o hidrogênio em 2,66 se correlaciona com a posição-4 que corresponde aos deslocamentos químicos de hidrogênios de 1,66 e 1,86 ppm. Por exclusão o carbono em 30,8 ppm (1,37 e 1,66 ppm) seria atribuído a posição-7.

Segundo Jeremic e col. /51/ a lactona **12** coexiste na *Artemisia annua* L. com a artenuína E **25**. O ponto de fusão de 144-145°C observado já nos forneceu uma primeira indicação que tínhamos isolado o composto **12** pois para o composto **25** a literatura cita um ponto de fusão de 125-126°C. A configuração relativa de **12** foi confirmada por experimento de diferença de NOE(“Nuclear Overhauser Effect”) que permitiu verificar as relações espaciais da molécula. A partir desse espectro tivemos as evidências que H_{9a} (4,37 ppm) se correlacionava espacialmente com o sinal em H₈ (1,47 ppm), H₆ (1,48 ppm). Também foi constatado que o H₄ se correlacionava espacialmente com os hidrogênios da olefina. Estes resultados permitiram confirmar que o diastereoisômero isolado por nos tratava-se do composto **12**.

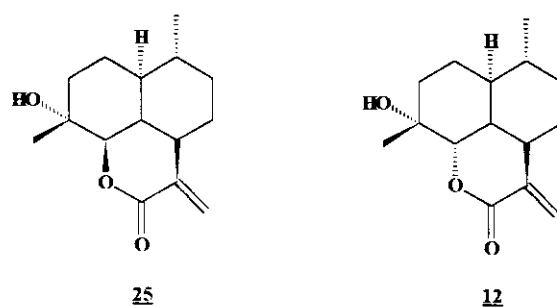


Figura 18: Composto **12** e composto **25**

Através da análise das constantes de acoplamento no espectro unidimensional de hidrogênio de H_{9a} e H_{9b} observou-se uma constante de acoplamento de 11,6 Hz. No caso do composto **12** isto seria coerente pois os átomos de hidrogênio H_{9a} e H_{9b} estão numa relação *trans* H_a-H_b (normalmente varia de 8-14 Hz). Para o diastereoisômero **25** os hidrogênios vicinais apresentariam um ângulo aproximado de 60° com uma constante de acoplamento previsto de 2-3 Hz (Figura 19).

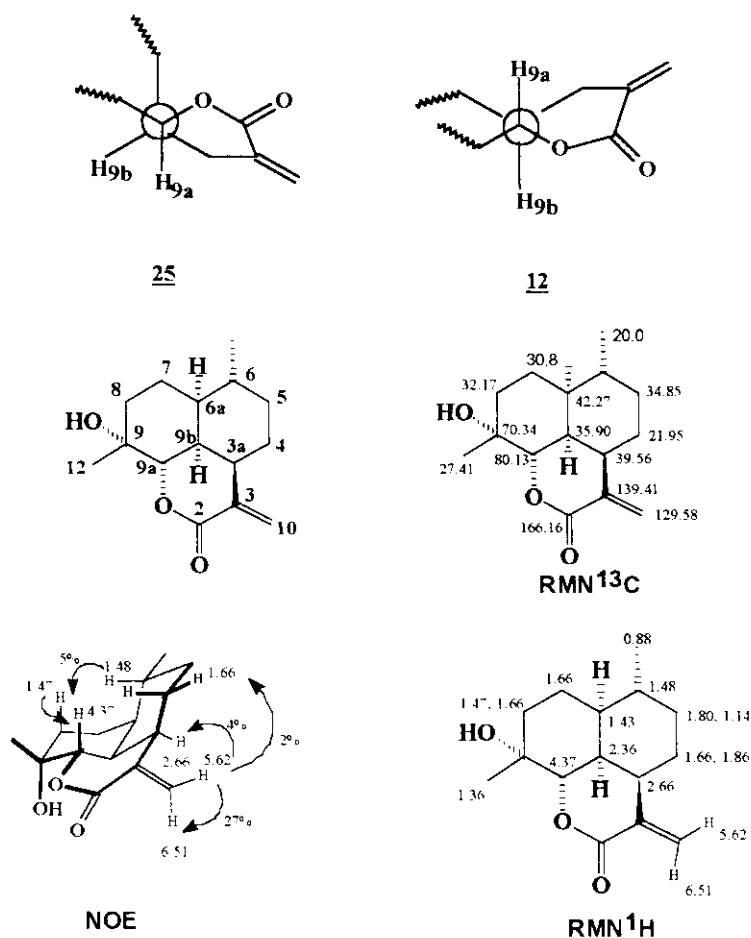


Figura 19: Projeção de Newman para o composto **12** e **25** e atribuição espectroscópica do composto **12**

III. Óleo essencial de *Artemisia annua* L.

III.1. Considerações gerais e determinação dos componentes principais

Nesta parte de nosso trabalho nos nós propusemos avaliar os componentes voláteis da *Artemisia annua* L. cultivada no Brasil a partir de um híbrido SII/FII originário da clonagem de sementes Chinesas e Vietnamitas, fornecidas pela MEDIPLANT (CENTRE DE RECHERCHES SUR LES PLANTES MÉDICINALES ET AROMATIQUES - Suíça), assim como verificar a variação sazonal dos mesmos.

O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação da planta fresca, sendo analisados por GC/MS. Esta é uma das técnica analíticas mais difundidas atualmente para a análise de misturas voláteis que resulta da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

A biblioteca de espectros de massas Wiley /52/ instalada no GC/MS (HP 5890/HP 5970) foi tomada como referência do tipo de esqueleto carbônico dos componentes presente no óleo. No entanto a identificação somente pela fragmentação observada não é suficiente para a caracterização dos diversos componentes encontrados no óleo essencial pois o padrão de fragmentação de vários sesquiterpenos são similares sem diferenças significativas nas suas abundâncias relativas. Podemos ilustrar esta afirmação com os compostos **106** e **107** respectivamente (Figura 20). Notamos que apesar das suas diferenças estruturais os seus espectros de massas são semelhantes. Para contornar esta problemática recorreu-se à utilização de índices de retenção dos componentes do óleo essencial e à utilização de padrões autênticos para serem co-injetados. O uso de índices de retenção associados à comparação de espectros de massas tem-se demonstrado muito eficaz na elucidação dos componentes de óleos essenciais.

Apesar de existir vários sistemas propostos para determinação dos índices de retenção /53/ o mais citado em livros textos é o índice de Kovats no qual o comportamento do composto é relacionado a um hidrocarboneto de cadeia longa utilizando uma escala logarítmica, assim Índice de retenção (IK), determinado em condições isotérmicas, é definido como:

$$IK = 100N + 100n [\log t'_R(A) - \log t'_R(N)] / [\log t_R(N-n) - \log t'_R(N)]$$

onde:

N: # de carbonos do hidrocarboneto com tempo de retenção maior do que o composto sendo analisado

- n: # de carbonos do hidrocarboneto com tempo de retenção menor do que o composto sendo analisado
- t_R(A): tempo de retenção do composto sendo analisado
- t_R(N): tempo de retenção do hidrocarboneto de cadeia maior
- t_R(n): tempo de retenção do hidrocarboneto de cadeia menor

Alguns fatores que podem desviar os valores obtidos experimentalmente à aqueles da literatura podem ser atribuídos a:

- Variação da polaridade da fase líquida da coluna decorrente do uso prolongado da mesma.
- Colunas provenientes de diferentes fornecedores, havendo variações no grau de interação do material da fase líquida com a amostra.
- Variação da temperatura de determinação do índice de retenção daquele descrito na literatura.

Como utilizamos uma programação com variação de temperatura optamos pela aplicação do índice de retenção de Van den Dool e Kratz /54/ onde:

$$IR = [(T_s - T_{cn-1}) / (T_{cn} - T_{cn-1})] \times 100 + 100_{cn-1}$$

T_s: tempo de retenção da substância analisada

T_{cn}: tempo de retenção do n-alcane que elui após a substância analisada

T_{cn-1}: tempo de retenção do n-alcane que elui antes a substância analisada

C_{n-1}: n-alcane que elui antes da substância analisada

Mesmo apresentando variações com os índices de retenção da literatura estes valores são muito úteis. Os valores experimentais observados podem ser corrigidos pois a sequência de eluição se mantém constante independente da temperatura em que são efetuadas as determinações. Como existem várias referências que citam diversos terpenos com seus respectivos índices de retenção fica fácil extrapolar estes dados para o valor experimental obtido, tendo assim uma indicação com uma alta probabilidade de identificar corretamente o composto.

Neste estudo foram identificados vários compostos por comparação de seus índices de retenção, espectros de massas com os da literatura e co-injeção com padrões autênticos. À avaliação destes parâmetros se fez necessário para não incorrer em interpretações

equivocadas dos dados analisados. Por exemplo podemos citar os espectros de álcoois sesquiterpênicos terciários os quais não apresentam íon molecular facilmente visível, podendo ser confundidos com outros sesquiterpenos sem o grupo hidroxila na molécula (**106** e **108**). Também ao comparar os espectros de massas de alguns sesquiterpenos e seus álcoois análogos (**106** e **109**; **110** e **111**; Figura 21) observou-se diferenças sutis nos espectros correspondentes aos álcoois os quais apresentavam aparentemente duas sequências de fragmentação quando comparada ao seus hidrocarbonetos análogos. No caso dos compostos **110** e **111** verificamos que o cadinol **110** apresentava uma sequência de fragmentação em m/z 164, 149, 137, 121, 109, 95, 81, 71, 57 e 43 peculiar a ele e outros em m/z 204, 189, 161, 119, 93, 91, 77 e 41 comum ao composto **111**, a partir desta constatação sugerem-se dois mecanismos de fragmentação viáveis para o álcool, um por decomposição direta e outro por decomposição indireta acompanhada de desidratação do álcool /55/.

A grande similaridade observada nos perfis dos espectros de massa corroborou a necessidade de se fazer uso de padrões autênticos para confirmar a presença dos diversos componentes no óleo essencial como também determinar seus índices de retenção. Através desta metodologia foi possível confirmar vários componentes do óleo essencial. A utilização de padrões comerciais permitiu ao co-injetá-los, confirmar a presença de quarenta e três compostos no óleo essencial (Tabela 10). Nos cromatogramas da figura 21 foram indicados os componentes descritos na tabela.

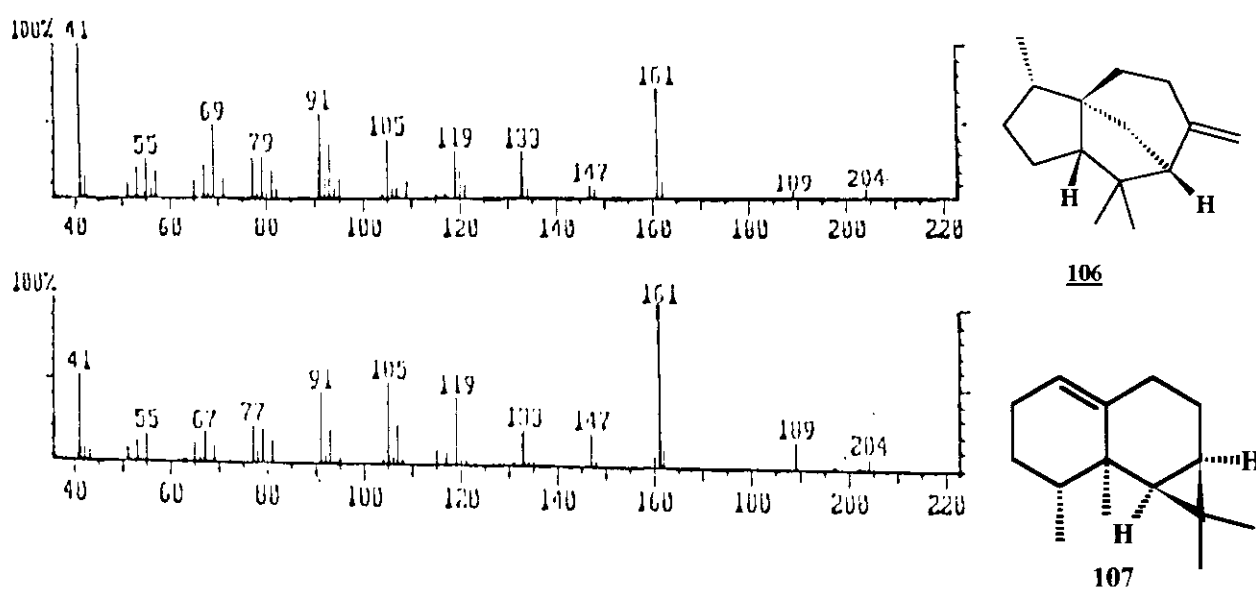


Figura 20: Espectros de massas dos compostos **106** e **107**

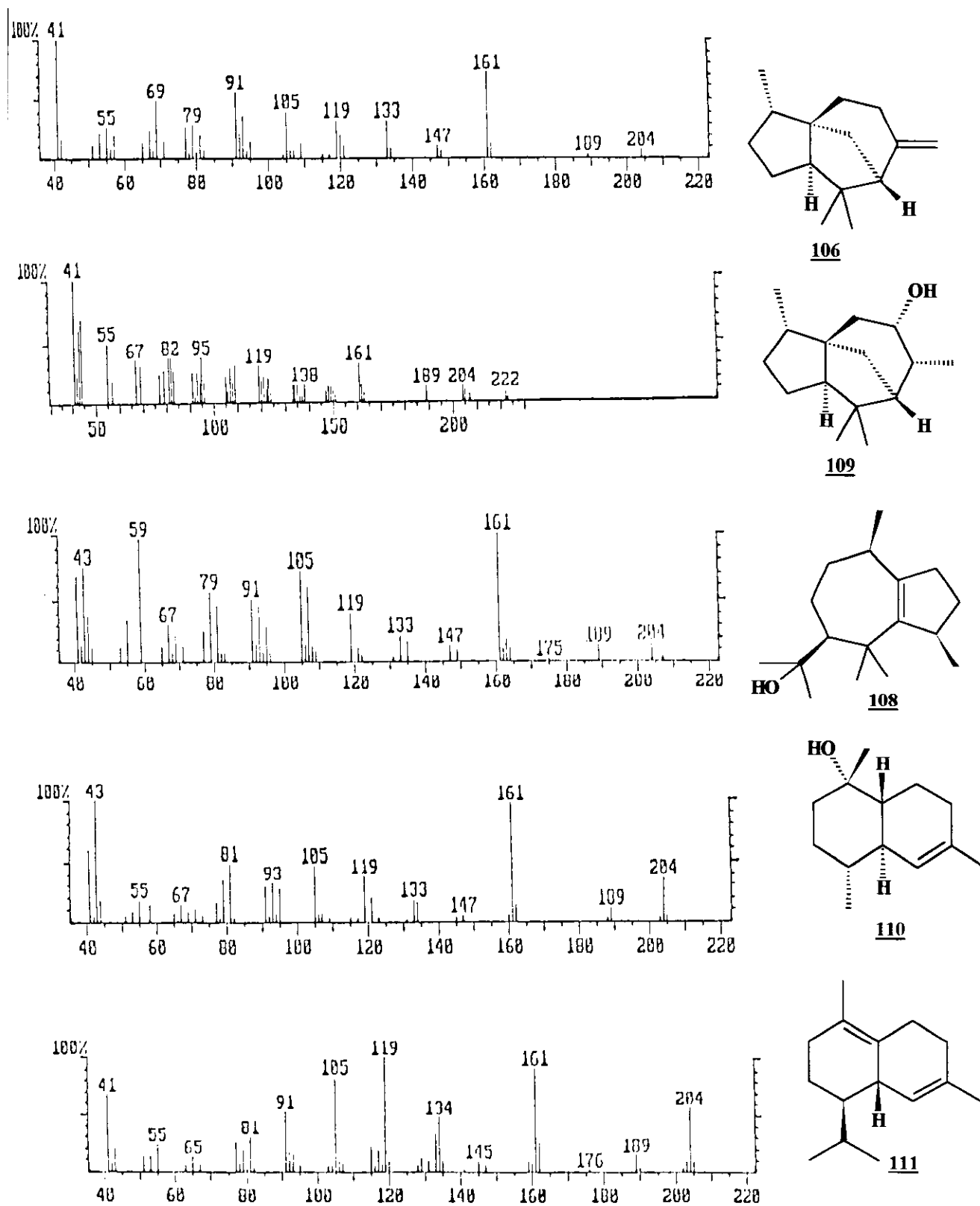
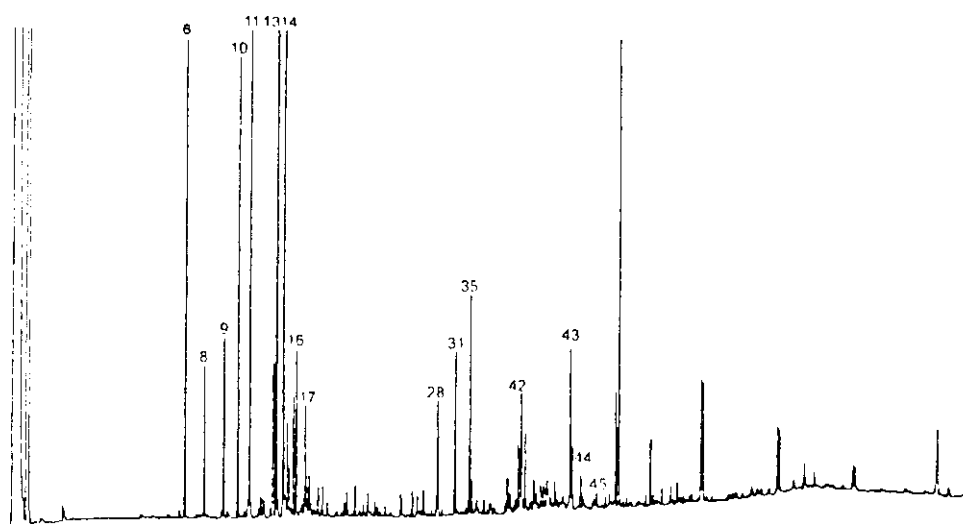


Figura 21 : Sesquiterpenos e seus álcoois análogos (**106** e **109**; **110** e **111**) e comparação dos espectros de massas de **106** e **108**

a)



b)

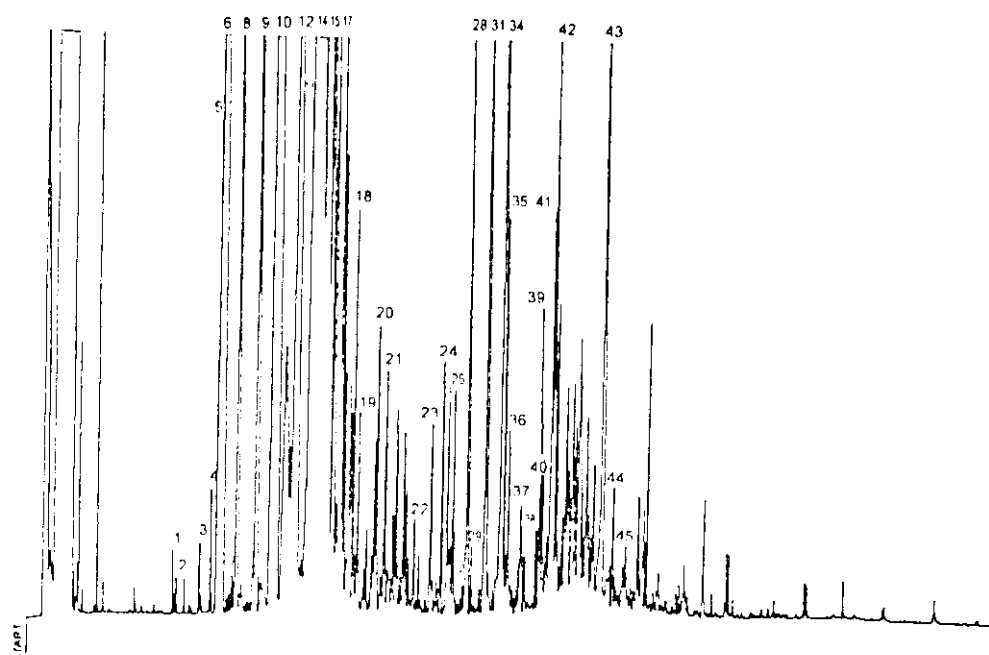
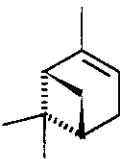
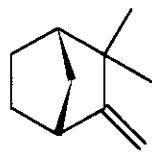
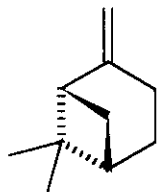
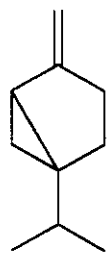
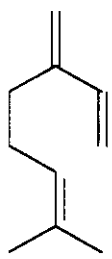
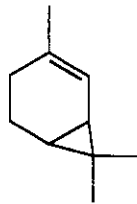
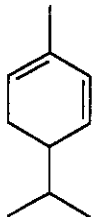
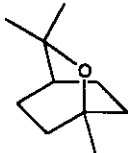
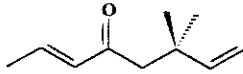
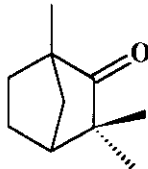


Figura 22: a) Cromatograma do óleo essencial de *Artemisia annua* L. b) Cromatograma do óleo essencial de *Artemisia annua* L. ampliado

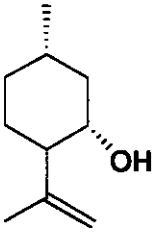
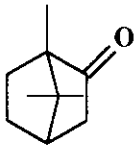
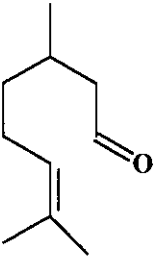
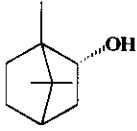
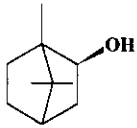
Tabela 10: Compostos identificados no óleo essencial de *Artemisia annua* L.

# Composto	Índice de Retenção	Estrutura	Fragmentação	
			m/z	%
1	945,06		136	8
α -pineno			121	15
			93	100
			77	20
			51	6
			43	10
2	962,66		136	31
canfeno			121	68
			107	34
			93	100
			79	28
			41	26
3	972,30		136	8
β -pineno			121	14
			103	5
			93	100
			69	20
			43	10
4	1007,27		136	75
sabineno			121	98
			93	100
			91	40
			53	10
			41	22
5	1010,38		136	5
mirceno			121	7
			115	2
			93	82
			65	65
			41	100

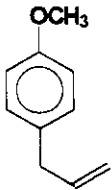
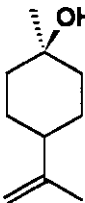
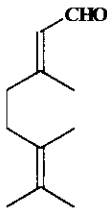
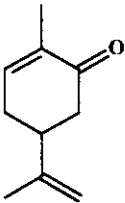
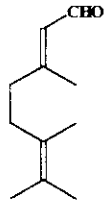
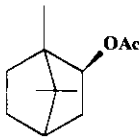
continua

# Composto	Índice de Retenção	Estrutura	Fragmentação	
			m/z	%
6 2-careno	1018,61		136	41
			121	77
			93	100
			91	50
			43	20
			41	35
7 felandreno	1021,61		136	20
			121	3
			93	100
			91	30
			43	3
8 1,8-cineol	1031,62		154	43
			139	63
			121	6
			111	36
			96	36
			93	29
9 artemísia cetona	1055,27		43	100
			152	-
			83	100
			55	30
10 fenchona	1073,37		39	8
			136	50
			79	100
			77	20
			53	15
			43	10
			41	20

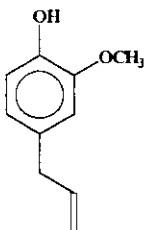
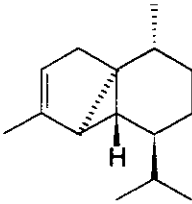
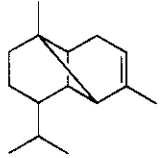
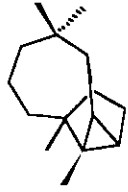
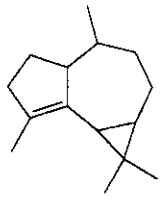
continua

# Composto	Índice de Retenção	Estrutura	Fragmentação	
			m/z	%
11 isopulegol	1091,52		154	23
			136	51
			121	63
			95	63
			93	60
			69	100
			41	91
12 cânfora	1174,77		152	18
			126	2
			108	40
			95	100
			81	75
			41	60
13 citronelal	1183,68		154	7
			121	25
			95	63
			69	100
			41	100
14 borneol	1188,97		154	-
			139	5
			121	18
			110	18
			95	100
			41	35
15 isoborneol	1214,29		154	1
			139	8
			136	10
			121	16
			110	17
			95	100

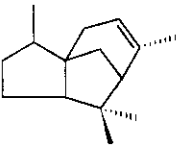
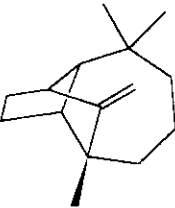
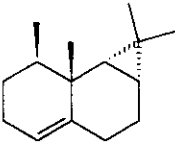
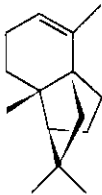
continua

# Composto	Índice de Retenção	Estrutura	Fragmentação	
			m/z	%
16 estragol	1224,18		148	100
			121	50
			117	55
			98	25
17 l-terpineol	1232,37		154	-
			136	40
			121	30
			93	60
			71	100
			43	80
18 citral	1241,58		152	-
			137	4
			123	4
			94	9
			69	73
			41	100
19 carvona	1252,89		150	17
			108	37
			93	34
			82	100
			54	40
20 citral	1266,28		152	-
			137	4
			123	4
			94	9
			69	73
			41	100
21 acetato de isobornila	1300,81		196	1
			136	82
			93	100
			43	75

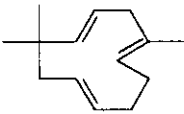
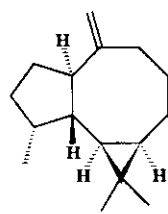
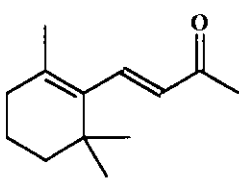
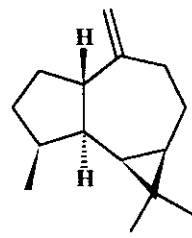
continua

# Composto	Índice de Retenção	Estrutura	Fragmentação	
			m/z	%
22 eugenol	1312,92		164	100
			149	35
			126	25
			77	25
23 α -cubebeno	1338,11		204	18
			161	71
			119	80
			105	100
			41	57
24 α -copaeno	1353,15		204	14
			161	79
			119	93
			105	100
			41	66
25 longiciclene	1389,76		204	20
			189	20
			161	25
			133	32
			119	55
			94	98
			41	100
26 α -gurjuneno	1401,14		204	100
			189	85
			161	94
			119	74
			105	98
			93	30
			41	40

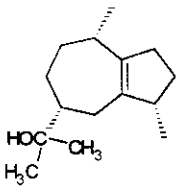
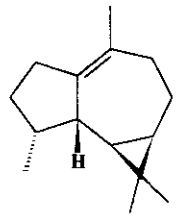
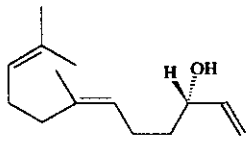
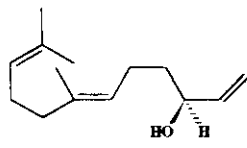
continua

# Composto	Índice de Retenção	Estrutura	Fragmentação	
			m/z	%
27 β -cedreno	1417,62		204	34
			189	3
			161	100
			119	33
			93	43
			91	57
			43	78
			41	98
28 longifoleno	1426,53		204	27
			189	36
			161	68
			135	39
			109	63
			94	57
			91	95
			41	100
29 calareno	1429,56		204	18
			189	20
			161	100
			121	6
			93	30
			41	35
30 α -neocloveno	1442,28		204	23
			189	71
			161	86
			105	96
			77	46
			55	45
			41	100

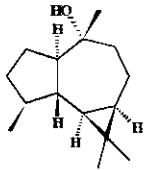
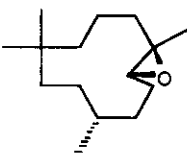
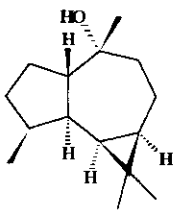
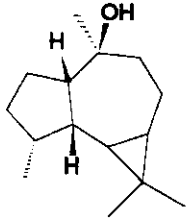
continua

# Composto	Índice de Retenção	Estrutura	Fragmentação	
			m/z	%
31 humuleno	1447,39		204	3
			189	2
			121	22
			93	100
			81	35
			41	25
32 aromadendrano	1458,09		204	60
			189	40
			161	98
			93	83
			91	80
			69	70
			41	100
33 β-ionona	1464,42		192	8
			177	100
			135	13
			123	20
			119	12
			95	10
34 alloaromandreno	1476,72		204	17
			189	10
			161	33
			133	31
			105	50
			93	53
			91	52
			81	45
			43	100

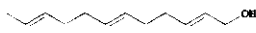
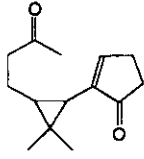
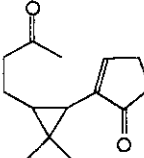
continua

# Composto	Índice de Retenção	Estrutura	Fragmentação	
			m/z	%
35 guaial	1481,26		222	7
			204	16
			189	19
			161	100
			107	48
			91	40
			59	76
36 ledeno	1503,29		204	12
			189	12
			161	26
			105	63
			91	63
			79	44
			41	100
37 nerolidol (Z)	1519,12		222	-
			189	4
			136	21
			93	80
			69	100
			43	100
38 nerolidol (E)	1525,16		222	-
			189	4
			136	21
			93	80
			69	82
			43	100

continua

# Composto	Índice de Retenção	Estrutura	Fragmentação	
			m/z	%
39 epiglobulol	1551,72		222	-
			204	17
			161	32
			109	39
			81	39
			43	100
40 oxido cariofileno	1567,10		220	-
			205	3
			187	3
			161	3
			107	19
			91	41
			79	58
			41	100
41 globulol	1573,35		222	-
			204	17
			161	32
			109	39
			81	39
			43	100
42 viriflorol	1579,66		222	-
			204	18
			189	18
			161	30
			109	43
			69	43
			43	100

continua

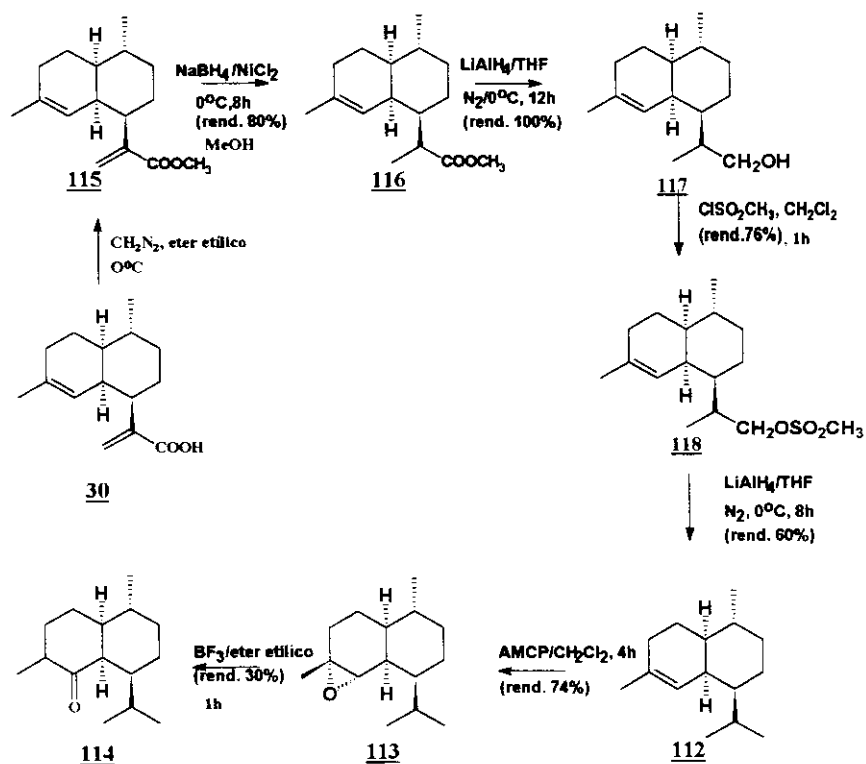
# Composto	Índice de Retenção	Estrutura	Fragmentação	
			m/z	%
43 farnesol	1608,96		222	-
			204	3
			189	3
			161	4
			93	20
			81	30
			69	100
			41	98
44 2-ciclonenten-1-one-2[2.2-dimetil-3(3-butanona)ciclonnoni l]	1715,98		220	-
			205	15
			202	14
			187	14
			163	14
			121	19
			96	33
			91	43
45 2-ciclonenten-1-one-2[2.2-dimetil-3(3-butanona)ciclonnoni l]	1732,84		220	-
			205	15
			202	14
			187	14
			163	14
			121	19
			96	33
			91	43
			43	100

* Todas as estereoquímicas aqui indicadas se referem a configurações relativas

III.2. Obtenção de Padrões

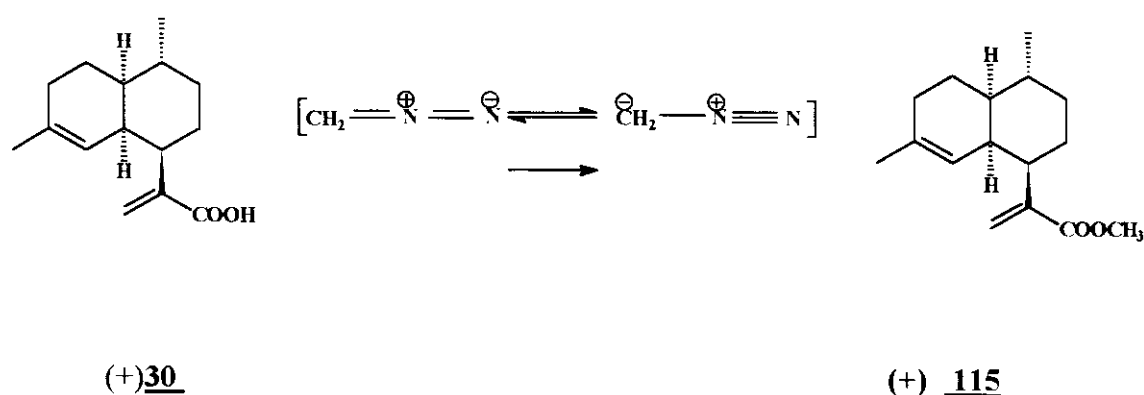
Para podermos determinar os componentes voláteis minoritários desta planta ponderamos inicialmente sobre o método mais conveniente de proceder. O fracionamento de uma grande quantidade do óleo essencial ($\approx 100\text{g}$ de óleo) resultaria numa fração enriquecida com os compostos de interesse possibilitando estudá-los por GC/MS. O inconveniente desta metodologia decorre da grande quantidade de planta necessária para se conseguir óleo essencial suficiente para os estudos. Na época em que se iniciou este trabalho não tínhamos instalações adequadas para processos em escala semi-piloto. Alternativamente optamos pela preparação de padrões os quais poderiam ser co-injetados ao óleo para constatar a presença ou não de estruturas iguais ou análogas.

Isto nos motivou a procurar algum dos possíveis intermediários biossintéticos de artemisinina **13** no óleo essencial de *Artemisia annua* L.. Visualizamos pois utilizar o ácido artemisinínico **30** como precursor quiral dos padrões **112**, **113**, **114** uma vez que o ácido **30** possui um esqueleto carbônico análogo a artemisinina **13** além de ser comprovadamente um intermediário biossintético da mesma /33-35/. Estes fatos, aliado a seu alto teor na planta (1,2%) nos forneceu um bom material de partida para os padrões. O ácido artemisinínico **30** foi isolado conforme descrito anteriormente no fluxograma da Figura 11b.



Esquema 4: Rota para obtenção dos padrões **112**, **113**, **114**

Apesar de utilizarmos um substrato quiral para preparação dos padrões não foi avaliado a pureza ótica dos mesmos, visto que todo o trabalho de GC/MS foi feito numa coluna aquiral. Os padrões **112**, **113**, **114** foram preparados conforme descrito no Esquema 4 através de conversões de grupos funcionais. Iniciou-se com a esterificação de ácido artemisinínico **30** utilizando diazometano em éter etílico a 0°C. O agente alquilante, “o íon metildiazonium” se formou através de um rearranjo 1,3 nitrogênio-oxigênio seguida de uma reação de eliminação em meio básico onde ocorreu desprotonação no carbono α. Um dos métodos mais convenientes é o que envolve tratamento básico do N-nitroso-N-metil-p-toluenossulfoamida /56/.

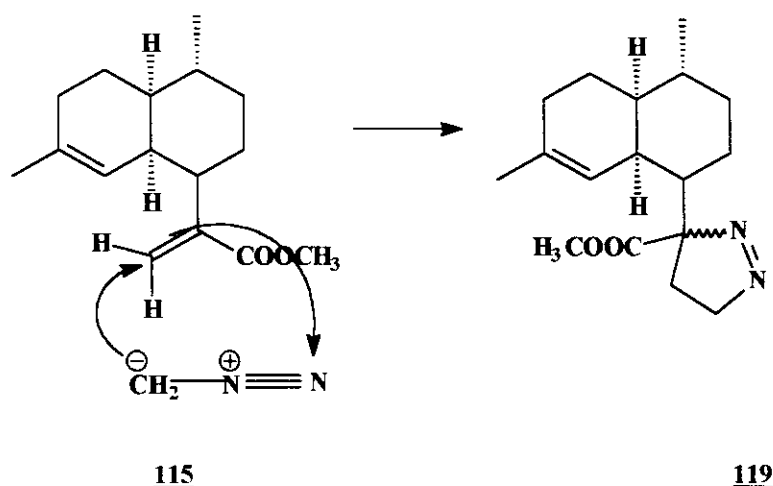


Esquema 5: Adição de diazometano no ácido artemisinínico **30**

O diazometano reagiu instantaneamente com o ácido **30** formando o composto **115**. O produto de reação não precisou ser purificado uma vez que a reação de esterificação com diazometano foi rápida e limpa. Constatou-se a formação do éster **115** pelo íon molecular m/z 248 no espectro de massas, que correspondeu a uma diferença de 15 u.m.a. do íon molecular do ácido artemisinínico **30**. No espectro de RMN¹H de **115**, observou-se o aparecimento de um singlete em 3,60 ppm correspondente aos átomos de hidrogênios da metoxila.

Apesar da simplicidade desta etapa observamos que excessos de diazometano levavam a formação de um composto que no espectro de RMN¹H não apresentava os deslocamentos relativos aos átomos de hidrogênio da dupla ligação exocíclica em 5,4 e 6,3 ppm, como também apresentava um íon molecular m/z 290 no seu espectro de massas. Essa diferença de 42 u.m.a. correspondeu a massa de CH₂N₂. Aparentemente o excesso de diazometano ou a

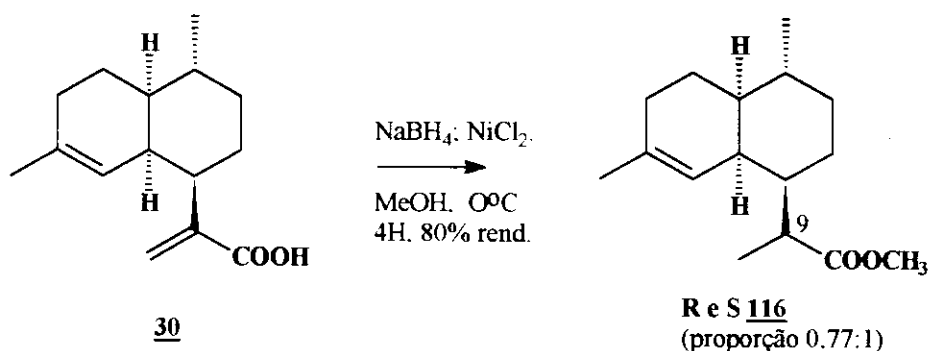
elevação da temperatura do meio reacional levaram a uma cicloadição 1,3 dipolar à dupla ligação exocíclica, levando à formação do composto **119**. A estrutura de **119** foi confirmada pelo relato recente de Kim e Choi /57/.



Esquema 6: Adição de excesso de diazometano no ácido artemisinínico **30**

Para reduzir a dupla ligação conjugada ao éster **115** foi necessário, considerar a presença da dupla ligação endocíclica, uma vez que esta pode ser facilmente hidrogenada na presença de catalisadores de Pt e Pd. Desta maneira escolhemos um catalisador que permitisse uma redução branda e regiosseletiva da dupla ligação conjugada ao éster. O catalisador de escolha foi o de níquel-boro que foi preparado a partir de cloreto de níquel e boroidreto de sódio/58/. Constatou-se no espectro de RMN¹H o desaparecimento dos dois sinais correspondente aos átomos de hidrogênio da dupla ligação exocíclica em 5,4 e 6,3 ppm com aparecimento de um dubleto correspondente aos hidrogênios da metila C₁₂ em 1,1 ppm.

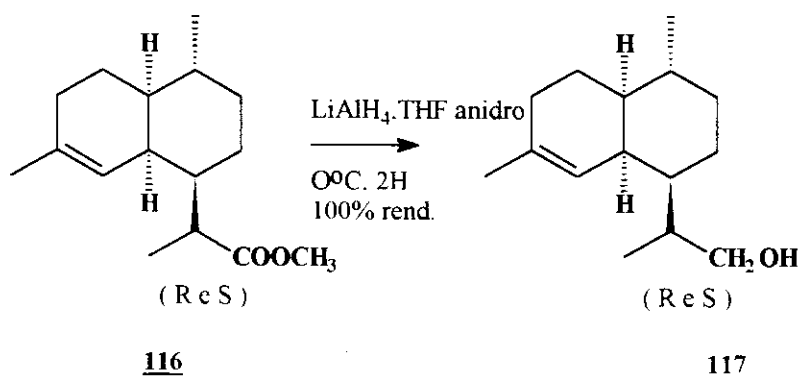
Ao injetar à amostra no GC/MS observou-se dois picos com tempos de retenção 15,4 e 16,3 min numa proporção de 0,77:1. Através da análise de seus espectros de massas verificou-se que ambos apresentavam o mesmo íon molecular m/z 250 e mesmo padrão de fragmentação demonstrando tratar-se dos diastereoisômeros R e S no átomo de carbono C₉.



Esquema 7: Diastereoisômeros do composto **116**

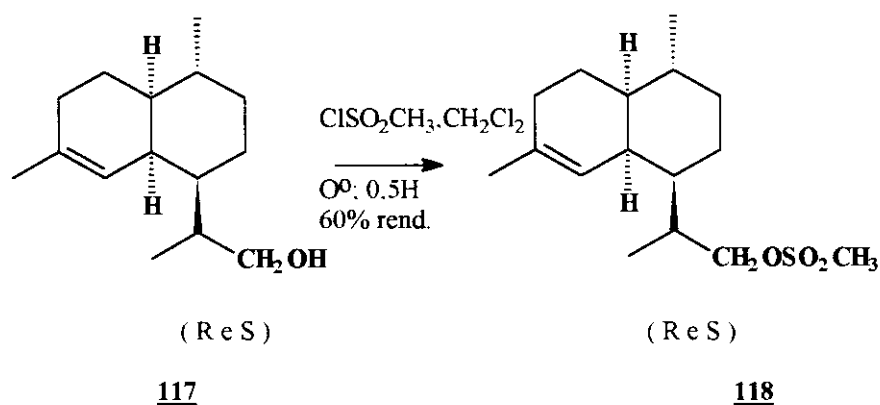
Não nos ativemos em distinguir entre o isômero R e S uma vez que durante as reações subsequentes (derivados **112**, **113**, **114**) perderíamos a assimetria do carbono C₉.

Para reduzir o grupo éster de **116** ao álcool **117** utilizou-se LiAlH_4 em quantidades equimolares em THF anidro a 0°C . O produto de reação foi purificado por cromatográfica em coluna de sílica obtendo-se o composto **117** em 100% de rendimento. No infra-vermelho observou-se um banda em 3360 cm^{-1} e o desaparecimento do estiramento da carbonila em $1736,3\text{ cm}^{-1}$ evidenciando a formação da hidroxila. No espectro de RMN^1H constatou-se o desaparecimento do deslocamento relativo à metila da metoxila em 3,6 ppm. No espectro de massas confirmou-se a formação do álcool **117** pelo íon molecular em m/z 222, como também pela perda de 31 u.m.a. correspondentes à perda de CH_2OH e pelo pico base em m/z 163 que se atribui a perda de $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$.



Esquema 8: Formação do composto **117**

A reação de proteção do álcool **117** com cloreto de mesila se fez necessária para conseguir um bom grupo abandonador que poderia ser facilmente substituído pelo íon hidreto, levando a formação do hidrocarboneto **112**. O álcool **117** foi submetido as condições de mesilação utilizando-se cloreto de mesila em CH_2Cl_2 a 0°C . Acompanhou-se a reação por CCD, onde se observou após meia hora a formação de um produto menos polar. Nesta etapa não se purificou o produto da reação. O composto **118** teve sua estrutura confirmada através da análise no espectro de infravermelho onde observamos o desaparecimento da banda de álcool em 3360 cm^{-1} apresentando absorções em 1355 e 1177 cm^{-1} características para o grupo $\text{S}=\text{O}$. No espectro de RMN^1H foi possível detectar um singlete correspondente aos átomos de hidrogênios da metila do grupo mesila em $3,0\text{ ppm}$.



Esquema 9: Formação do composto **118**

A reação de **118** com LiAlH_4 em THF a 0°C resultou no composto **112** em 60% de rendimento. Após 8 horas de reação purificou-se o produto numa coluna de sílica impregnada com AgNO_3 10%. Os compostos insaturados se complexam com Ag^+ possibilitando a separação destes, dos compostos saturados /59/.

A identificação do composto **112** foi feita pela análise do espectro de massas observando-se o íon molecular em m/z 206 e pelo pico base em m/z 163 correspondente a perda do grupo isopropil. Apesar de utilizarmos a sílica impregnada com AgNO_3 10% tivemos grande dificuldade em separar o composto **112** das graxas que apresentavam uma polaridade bem próxima a este composto. Assim não foi possível obter-se um espectro de RMN^1H nítido. Muito embora o composto **112** se encontrava contaminado por graxas foi possível no espectro de RMN^{13}C diferenciar os sinais correspondentes ao hidrocarboneto **112**

devido as diferenças de intensidade daquelas da graxa. Também por comparação com os dados de RMN¹³C para o ácido artemisinínico **30**, que possui um esqueleto análogo com exceção da posição C₃, foi possível confirmar a atribuição do composto **112**.

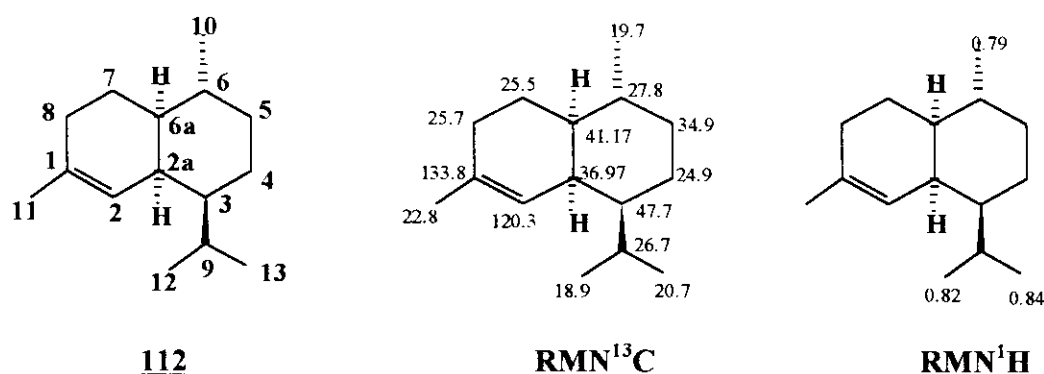


Figura 23: Atribuição por RMN¹H e ¹³C do composto **112**

A reação de epoxidação do composto **112** foi feita utilizando-se como oxidante o ácido meta-cloro-perbenzóico em diclorometano a temperatura ambiente durante 4 horas. Análise dos espectros de RMN¹H, ¹³C e massas permitiu confirmar a formação do epóxido **113** em 74% de rendimento.

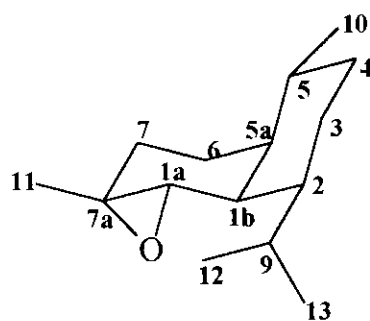


Figura 24 : Composto **113**

No espectro de RMN¹H observou-se o desaparecimento do deslocamento em δ 3,65 ppm referente a dupla ligação. No espectro de massas constatou-se um íon molecular em m/z 222 correspondente à introdução de 16 u.m.a. no composto **112**.

Tabela 11 :Dados espectroscópicos do composto 113

#C	δ 13C(ppm)	δ 1H(ppm)	J (Hz)	COLOC
1	-	-	-	-
1a	59.6	2.63	-	59.6/0.91 (C _{1a} /H _{5a}) 59.6/1.98 (C _{1a} /H _{1b})
1b	39.4	1.98	J(1b.5a)≅J(1b.2) ≅4	39.4/2.63 (C _{1b} /H _{1a}) 39.4/1.60 e 1.84 (C _{1b} /H ₃)
2	47.4	0.95	J(2.1b) ≅4*	47.4/0.89 (C ₂ /H ₁₃)
3	27.7	1.72 e 1.78	J(3 _a , 3 _e) ≅11.7; J(3 _a ,2) ≅6; J(3 _e ,2) ≅J(3 _e ,4 _a) ≅J(3 _e ,4 _e) ≅3	27.7/1.98 (C ₃ /H _{1b})
4	35.4	0.87 e1.66	-	35.4/1.60 (C ₄ /H ₃);35.4/1.84 (C ₄ /H ₃); 35.4/0.78 (C ₄ /H ₁₀)
5	29.5	1.18	-	29.5/0.87 (C ₅ /H ₄);29.5/1.66 (C ₅ /H ₄); 29.5/1.60 (C ₅ /H ₃); 29.5/1.84 (C ₅ /H ₃)
5a	40.5	0.91	-	40.5/0.78(C _{5a} /H ₁₀);40.5/2.63(C _{5a} /H _{1a});40.5/0.87(C _{5a} /H ₄); 40.5/1.66(C _{5a} /H ₄)
6	22.3	1.53 e 1.26	-	22.3/1.53 (C ₆ /H ₆);22.3/1.26 (C ₆ /H ₆)
7	24.9	1.60 e 1.84	J(7 _a ,7 _e)≅11.7;J(7 _a ,6 _a) ≅6; J(7 _a ,6 _e) ≅3	24.9/1.18 (C ₇ /H ₅)
7a	57.5	-	-	57.5/1.24 (C _{7a} /H ₁₁)
9	29.0	1.60	-	29.0/0.95 (C ₉ /H ₂)
10	19.1	0.78	J(10.5) ≅7	19.1/0.91 (C ₁₀ /H _{5a})
11	23.6	1.24	s	23.6/2.68 (C ₁₁ /H _{1a}); 23.6/1.98 (C ₁₁ /H _{1b})
12	20.9	0.93	J(12.9) ≅7	20.9/0.89 (C ₁₂ /H ₁₃)
13	21.5	0.89	J(13.9) ≅7	21.5/0.93 (C ₁₃ /H=12)

* outras constantes de acoplamento não puderam ser definidas

Observamos adicionalmente um pico em m/z 204 correspondente à perda de H₂O, em m/z 179 a perda do grupo isopropil e em m/z 161 que corresponde a perda simultânea do grupo isopropil e água. Uma análise da constante de acoplamento no espectro de RMN¹H entre H_{1a} e H_{1b} permitiu determinar que estes hidrogênios formavam um ângulo diedrico de

face β [$J(1a,1b) \cong 7$]

face α [$J(1a,1b) = 0$]

Na Figura 26 temos a atribuição espectroscópica de RMN¹H e ¹³C do composto **113**.

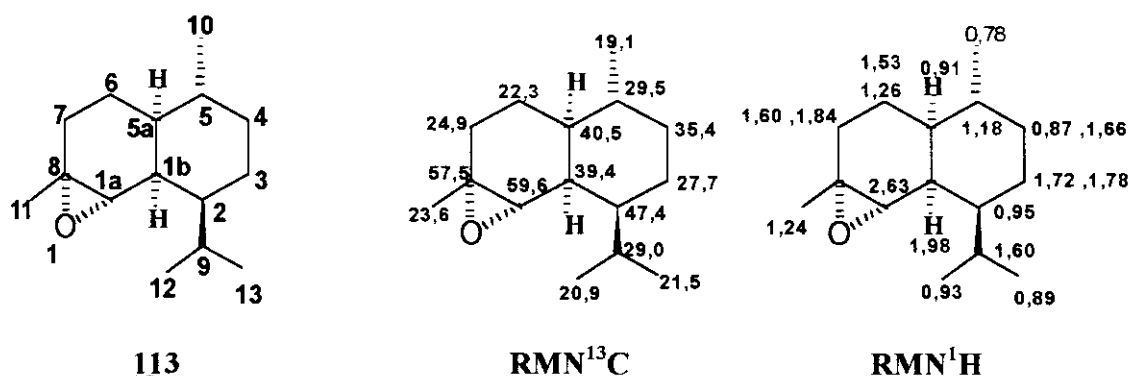
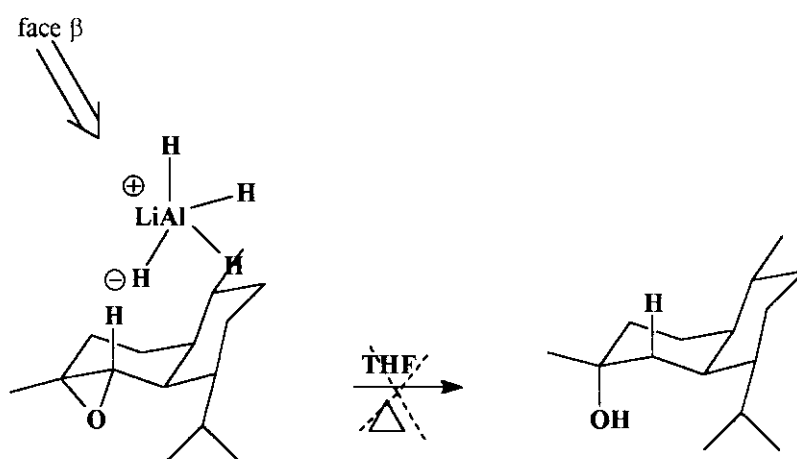


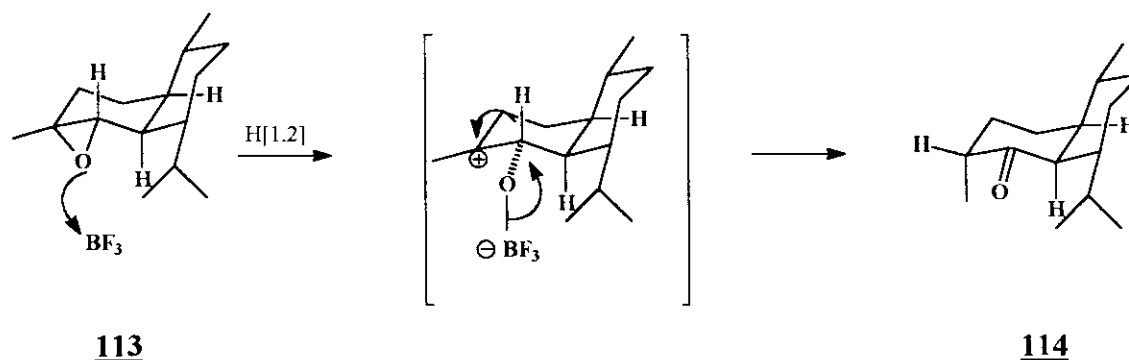
Figura 26: Atribuição por RMN¹H e ¹³C do composto **113**

A partir do composto **113** tentou-se obter o álcool **120**, através da reação de abertura do epóxido com um agente redutor nucleofílico, neste caso LiAlH₄. O hidreto se adiciona preferencialmente no átomo de carbono menos substituído e com uma abertura *anti-peri-planar*. Algumas tentativas de abertura do epóxido **113** com LiAlH₄ mostraram-se infrutíferas mesmo utilizando-se condições bem drásticas (temperaturas reacionais elevadas), observava-se sempre a recuperação do material de partida **113**. Os resultados obtidos mostraram que a fusão *cis* dos anéis torna a face β da molécula impedida estericamente dificultando assim a entrada do hidreto.



Esquema 11: Tentativa de formação do composto **120**

Por outro lado, tratamento do epóxido **113** com BF_3 em éter etílico a 0°C , forneceu após purificação em coluna cromatográfica a cetona **114** em 30% de rendimento. Este tipo de reação de rearranjo é comum quando epóxidos são tratados com reagentes ácidos como por exemplo éterato de BF_3 . Inicialmente o BF_3 se complexa ao oxigênio levando a formação de um intermediário contendo um íon carbônio, que através do rearranjo de H leva a formação da cetona **114**. Também pode se formar a cetona por aquecimento do epóxido /60/.



Esquema 12: Formação do composto **114**

O rearranjo do epóxido à cetona **114** foi confirmado pelo espectro de RMN^{13}C onde observou-se o aparecimento de um sinal em 217,2 ppm característico do átomo de carbono da carbonila. A metila do C_8 em δ 17,5 ppm sofreu uma proteção em relação a mesma metila do epóxido que aparecia em δ 23,6 ppm. A fim de confirmar a configuração relativa da cetona **114** formada tentamos determinar as constantes de acoplamento entre os átomos de hidrogênio H_8 e H_{7a} , H_{7e} , esta tentativa foi malograda pois este sistema de três spins (visualizado ao irradiar o hidrogênio da metila em 1,15 ppm) apresentou-se como um duplo dubleto com distorções de segunda ordem. A configuração relativa da metila C_8 foi possível de ser determinada através do experimento de diferença de NOE no qual irradiou-se o hidrogênio em 2,99 ppm observando-se um aumento de 3,4% da intensidade do sinal correspondente aos átomos de hidrogênios da metila C_{11} (1,15 ppm) como também em 5,9% (1,54 ppm) o átomo de hidrogênio H_{5a} , em 2,6% (1,88 ppm) a intensidade do átomo de hidrogênio H_6 confirmando deste modo que o grupo metila em 17,5 ppm encontrava-se na posição axial

Tabela 12 : Dados espectroscópicos do composto 114

#C	$\delta^{13}\text{C}(\text{ppm})$	$\delta^1\text{H}(\text{ppm})$	J(Hz)	COLOC
1	217.2	-	-	-
1a	47.1	2.99	dd, J(1a,5a)=J(1a,2) $\cong$ 4	-
2	47.8	0.80	dddd J(2,1a)=J(2,3) $\cong$ 4; J(2,9)=11	47.8/0.68 (C ₂ /H ₁₂) 47.8/0.81 (C ₂ /H ₁₃)
3	28.3	1.50 e 1.54	-	28.3/1.54 (C ₃ /H ₃) 28.3/1.50 (C ₃ /H ₃)
4	36.1	0.87 e 1.66	-	36.1/0.87 (C ₄ /H ₄) 36.1/1.66 (C ₄ /H ₄)
5	30.8	1.18	-	30.8/0.75 (C ₅ /H ₁₀)
5a	48.7	1.54	dddd, J(5a,1a)=J(5a,5)=J(5a,6)=4	48.7/1.54 (C _{5a} /H _{5a=})
6	23.1	1.68 e 1.88	-	23.1/1.68 (C ₆ /H ₆) 23.1/1.88 (C ₆ /H ₆)
7	25.8	1.60	-	25.8/1.60 (C ₇ /H ₇)
8	46.3	2.32	J(8,11) $\cong$ 7; J(8,7 _a)=J(8,7 _c) $\cong$ 3	46.3/1.15 (C ₈ /H ₁₁)
9	29.0	1.96	J(9,2) $\cong$ 11; J(9,13) $\cong$ J(9,12) $\cong$ 3	29.0/1.96 (C ₉ /H ₉) 29.0/0.81 (C ₉ /H ₁₃) 29.0/0.68 (C ₉ /H ₁₂)
10	19.1	0.75	d, J(10,5) $\cong$ 7	19.1/0.75 (C ₁₀ /H ₁₀)
11	17.5	1.15	d J(11,8) $\cong$ 7	17.5/2.32 (C ₁₁ /H ₈) 17.5/1.15 (C ₁₁ /H ₁₁)
12	20.8	0.68	d, J(12,9) $\cong$ 7	20.8/0.68 (C ₁₂ /H ₁₂) 20.8/1.96 (C ₁₂ /H ₉) 20.8/0.81 (C ₁₂ /H ₁₃)
13	21.9	0.81	J(13,9) $\cong$ 7	21.9/0.81 (C ₁₃ /H ₁₃) 21.9/0.68 (C ₁₃ /H ₁₂) 21.9/1.96 (C ₁₃ /H ₉)

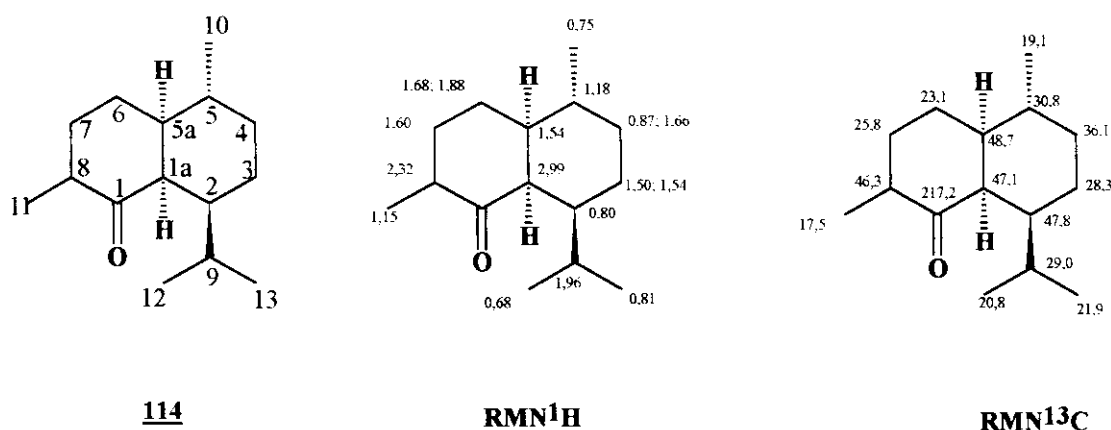


Figura 29: Atribuição por RMN¹H e ¹³C do composto **114**

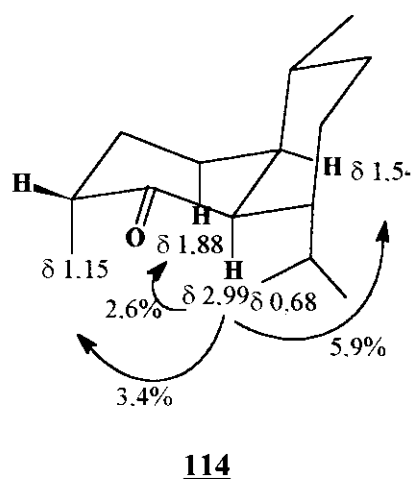


Figura 30: Átomos de hidrogênio que apresentaram alteração na intensidade do sinal ao irradiar o H_{1a}

II.3. Co-injeção dos padrões **112**, **113**, **114**, **115**, **116** e **117**

Os padrões uma vez preparados foram injetados no GC/MS (HP 5890/HP 5970) para determinarmos o seu comportamento cromatográfico (Programação I). Constatou-se que na região do cromatograma correspondente aos padrões não havia nenhum pico com espectro de massas semelhante aos dos padrões **112**, **113**, **114** e **117** ou esqueletos análogos. Uma análise do cromatograma do óleo essencial tratado com diazometano permitiu detectar, por

comparação com os padrões, a presença dos compostos **115** e **116**. Concluímos portanto que o óleo essencial continha tanto o ácido artemisinínico **30** como também sua forma reduzida **31**. Estes compostos foram co-injetados numa amostra de óleo essencial sem tratamento de diazometano permitindo determinar seus índices de retenção (**31** foi gentilmente cedido por Noronha /61/). Foram detectados assim os diastereoisômeros R e S com índices de retenção 2025,99 e 2059,91. Estes diastereoisômeros foram determinados numa proporção de 5:1 respectivamente, sem ter determinado qual isômero elui primeiro na coluna.

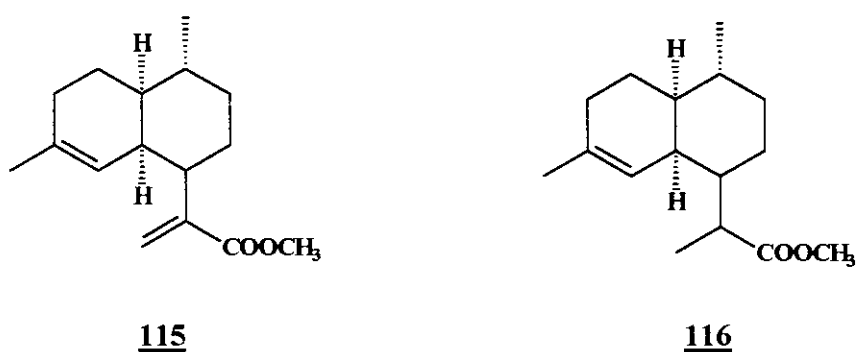


Figura 31: Composto 115 e 116

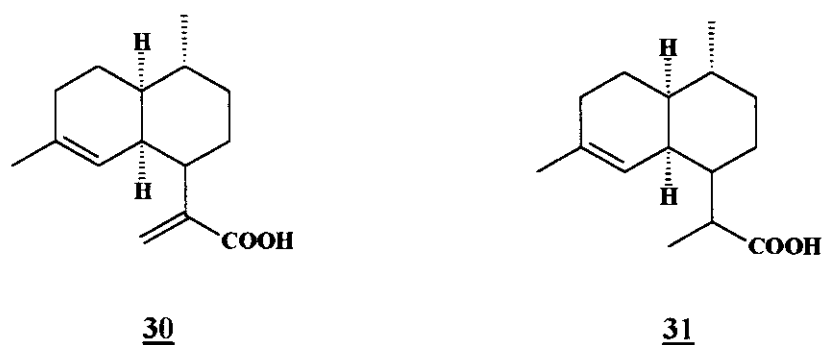


Figura 32: Composto 30 e 31

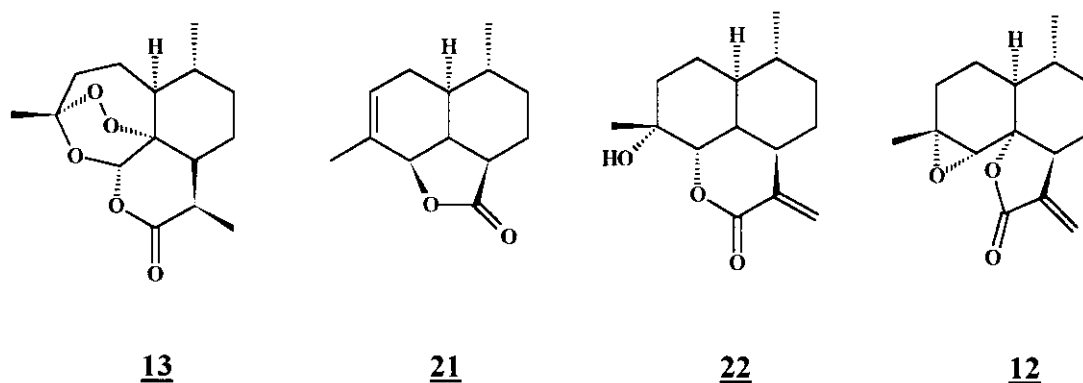
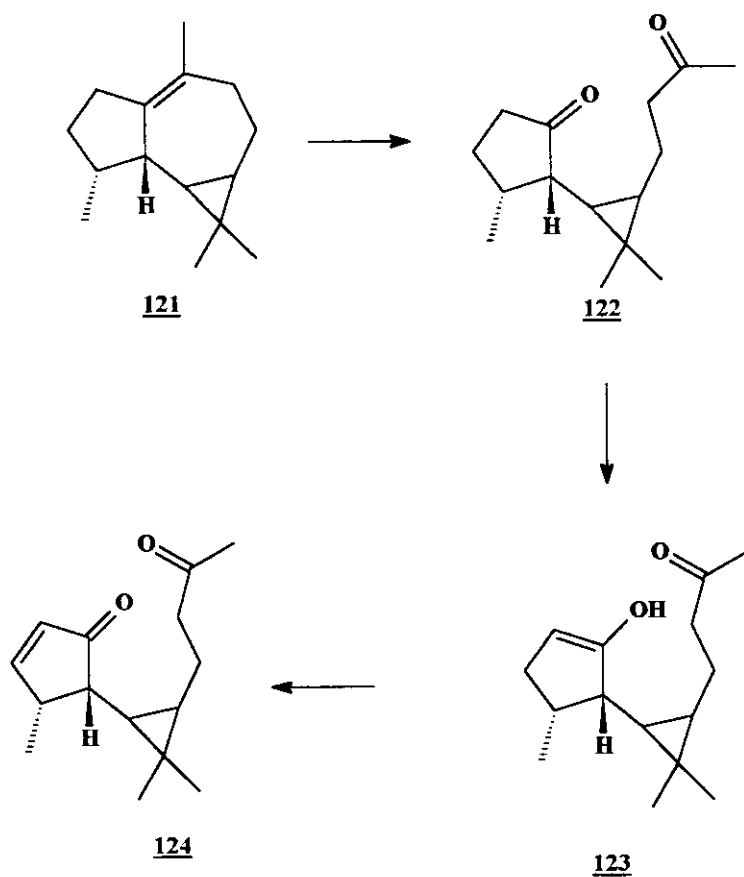


Figura 33: Compostos 13, 21, 22 e 12

Os compostos com índices de retenção 1956,7; 1957,0; 2239,3 e 2396,8 apresentaram perfis análogos aos compostos 13, 21, 12 e 22 respectivamente. A co-injeção destes no óleo essencial permitiu confirmar a presença deles. Como estes compostos fazem parte dos constituintes fixos da planta constatamos que a hidrodestilação arrasta traços destes componentes.

A análise dos resultados obtidos com os padrões 112, 113, 114, 115, 116 e 117 levou-nos a considerar que o sistema enzimático da *Artemisia annua* L. não leva à formação preferencial de sesquiterpenos na forma de álcoois e sim a componentes oxidados resultantes de clivagens oxidativas das duplas ligações, fato não muito comum. Uma evidência disto é a própria formação da artemisinina 13 /33-35/. Por analogia com o processo de biossíntese da artemisinina 13, imaginamos que outros componentes da planta poderiam ser resultantes de clivagens oxidativas de componentes insaturados encontrados no óleo essencial, como exemplo, o ledeno 121 no qual a oxidação poderia levar à formação do produto 122, e posteriormente ao de 124. Este raciocínio nos levou a procurar no óleo esqueletos carbônicos análogos ao composto 124 (Esquema 13).



Esquema 13: Clivagem oxidativa do ledeno **121**

A análise da região do cromatograma de íon totais (índice de retenção de 1608 a 1972) revelou uma série de compostos com íon molecular em m/z 220 e fragmentos em m/z 205; 202; 187; 177; 163, 105; com pico base em m/z 43.

Uma análise detalhada dos compostos com índice de retenção 1715,53 e 1732,84 demonstrou tratar-se de compostos análogos a **125**.

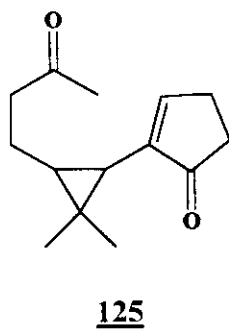


Figura 34: Composto **125**

O composto **125** foi obtido através da reação intramolecular de cicloadição de Pauson-Khand /62/, onde o complexo hexacarboniladicobalto de um alcino reage com uma olefina, produzindo uma ciclização intramolecular com formação sequencial da ciclopentanonas (Esquema 19). Este padrão foi preparado e devidamente caracterizado na tese da Dra. Vera Lúcia Ferracini /62a/.

Ao co-injetar o padrão **125** no óleo essencial de *Artemisia annua* L. constatamos que ele eluía juntamente com os picos em 16,76 e 17,39 min. (Programação II). A análise dos seus espectros de massas demonstraram serem praticamente idênticos com pequenas diferenças que poderiam ser atribuídas a impurezas da linha de base (Figura 35).

A partir destes dados sugerimos que o composto em questão tratava-se das formas *cis* e *trans* do composto **125**.

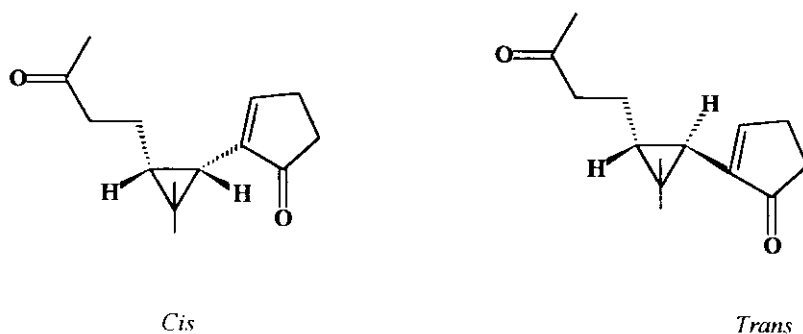
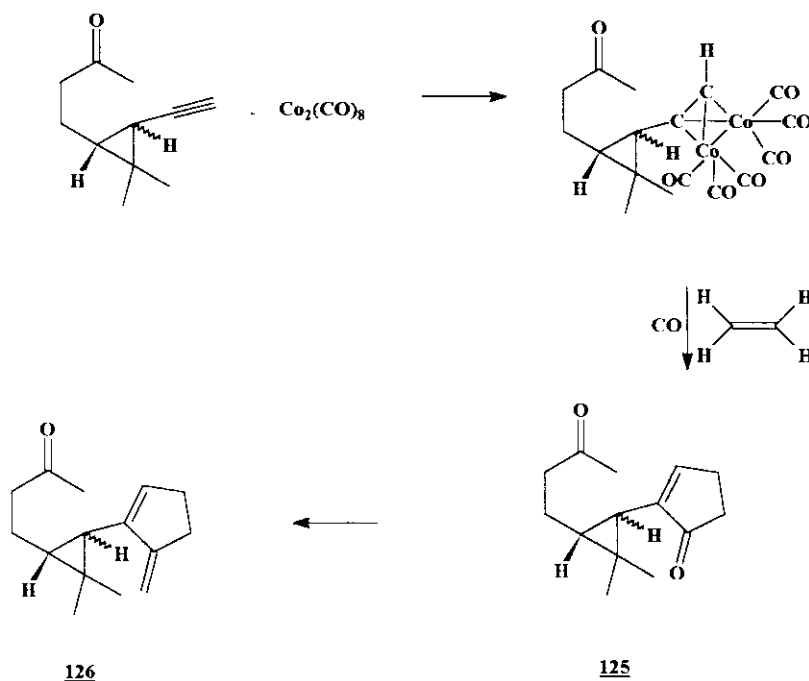


Figura 36: Formas *cis* e *trans* do composto **125**



Esquema 14: Transformações para obtenção da tailorina **126**

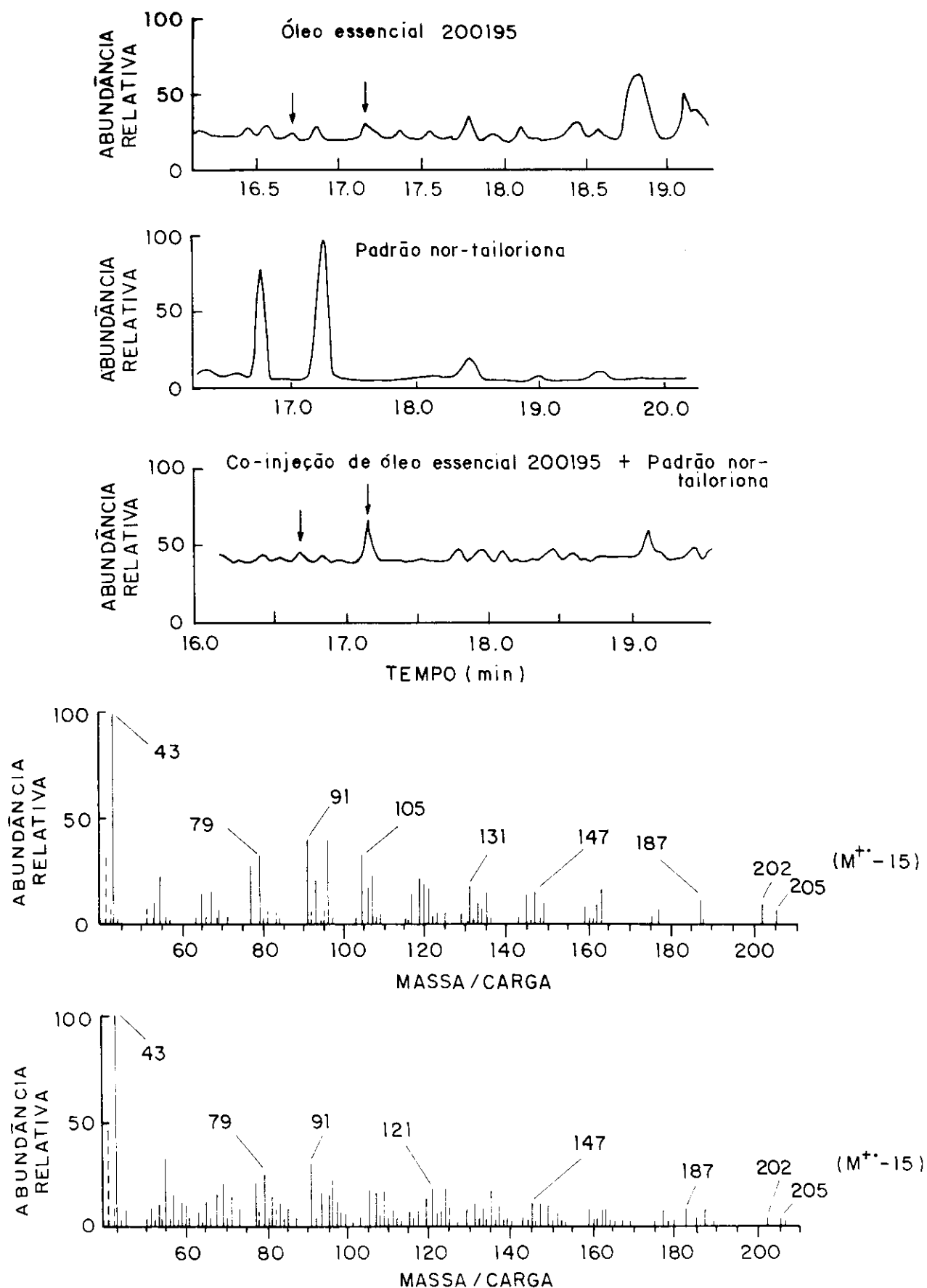


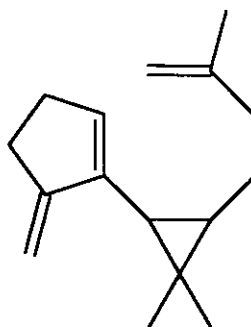
Figura 35 : Cromatograma do óleo essencial, padrão **125** e co-injeção de **125** os respectivos espectros de massas para os tempos de retenção 16,76 e 17,39 min.

Uma pesquisa no Chemical Abstract , até o presente momento, revelou que o composto **125** ainda não foi descrito na literatura sendo, portanto inédito com a revelação de um novo esqueleto carbônico.

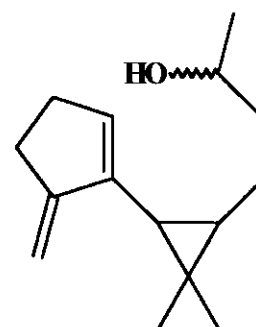
Foram analisados os espectros de massa dos componentes com índice de retenção próximos ao composto **125**. O composto com índice de retenção 1691,74 apresentou uma fragmentação em m/z 216(75%); 201 (42%); 173 (76%); 145 (83%); 135 (61%); 105 (100%); 41 (100%). Por comparação com dados de fragmentação encontrados na literatura sugerimos que poderia tratar-se do composto **127** /55/.

Também foi observado um composto com índice de retenção 1809,42 que apresentou uma fragmentação com padrão análogo ao do composto **125**. Este por sua vez apresentou um íon molecular em m/z 220 (7%) e fragmentos em m/z 202 (3%); 177 (5%); 162 (12%); 147 (15%); 105 (100%); 91 (68%); 55 (34%) e em m/z 43 (100%). Por comparação com compostos análogos encontrados na literatura sugerimos que pudesse tratar-se do composto **128**.

Como não tínhamos estes padrões para fazer as co-injeções não foi possível confirmar a presença deles no óleo essencial. Oportunamente estes compostos poderão ser preparados podendo assim confirmar estas estruturas no óleo essencial.



127



128

III.4. Comportamento Sazonal

O estudo sazonal da *Artemisia annua* L. foi realizado durante um ciclo completo da planta que neste experimento compreendeu cinco meses após o transplante das mudas para o campo experimental do CPQBA-UNICAMP. Foram feitas coleta semanais (dia e horário fixos) de amostras das plantas. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação da planta fresca. A cada amostragem foi determinado o teor de óleo essencial, teor de artemisinina e a razão monoterpenos/sesquiterpenos (chamado % de terpenos, Tabela 13).

Tabela 13: Comportamento sazonal da *Artemisia annua* L. cultivada no Brasil

Semana	Data	Parte planta	% óleo essencial	% artemisinina	% terpenos
1	14/10/94	folha	0,05	0,24	4,69
2	21/10/94	folha	0,10	0,16	1,22
3	28/10/94	folha	0,13	0,32	1,22
4	31/10/94	folha	0,13	0,40	2,21
5	05/11/94	folha	0,08	0,40	3,29
6	11/11/94	folha	0,07	0,39	0,96
7	25/11/94	folha	0,06	0,40	0,43
		inflorescência	0,06	0,20	4,34
8	02/12/94	folha	0,09	0,40	2,1
		inflorescência	0,22	0,20	1,37
9	09/12/94	folha	0,09	0,40	1,22
		inflorescência	0,03	0,20	0,17
10	12/12/94	inflorescência	0,09	0,08	1,72
11	20/12/94	inflorescência	0,14	0,08	2,83
12	06/01/95	inflorescência	0,17	0,03	5,12
13	20/02/95	inflorescência	0,21	0,03	5,81
14	23/02/95	inflorescência	0,34	0,02	6,15

Os dados da tabela 13 foram colocados em gráficos permitindo visualizar o comportamento sazonal dos três fatores analisados: Teor do óleo na planta, teor de artemisinina e teor da razão monoterpenos/sesquiterpenos (Figuras 37, 38, 39).

A partir da Figura 37 observamos que o teor máximo de óleo essencial na planta foi alcançado na 8ª semana (0,22%) e na 14ª semana (0,34%) provenientes das inflorescências. A diferença que se constatou nestes óleos é a qualidade dos mesmos. Enquanto no óleo essencial obtido na 8ª semana se observou uma razão monoterpenos/sesquiterpenos baixa

(1,37) na 14^a semana obtivemos um valor maior para esta razão (6,15; Figura 39). O aroma do óleo com uma razão mono/sesquiterpênica alta apresenta um buquê muito agradável pois é rico em compostos monoterpênicos. Já o outro óleo apresentou uma razão terpênica baixa indicando que predominam os sesquiterpenos levando a características aromáticas distintas. Portanto constatamos que ao decorrer do ciclo da planta a qualidade, como também o teor do óleo essencial tem um comportamento cíclico que varia de 0,01% a 0,13% na folha e até 0,34% na inflorescência (figura 37). Nas folhas a produção de artemisinina cresceu até atingir um teor máximo (0,4%). Ao ocorrer o florescimento da planta observou-se que a produção do óleo aumentou linearmente em detrimento do teor de artemisinina 13 (figura 40).

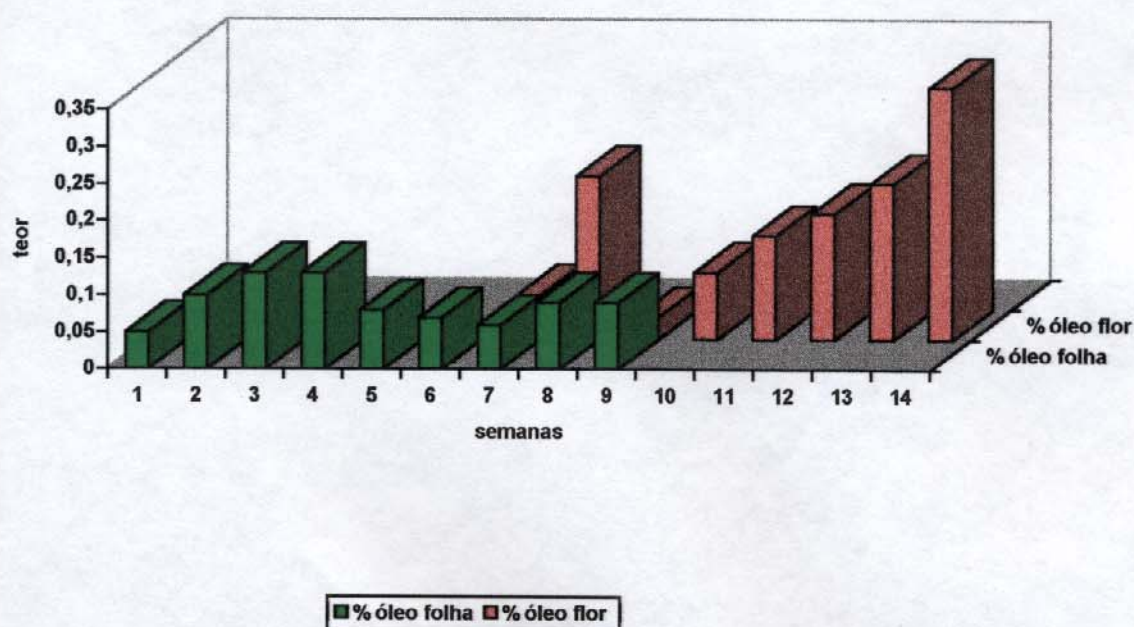


Figura 37: Comportamento sazonal do óleo essencial de *Artemisia annua* L. cultivada no Brasil

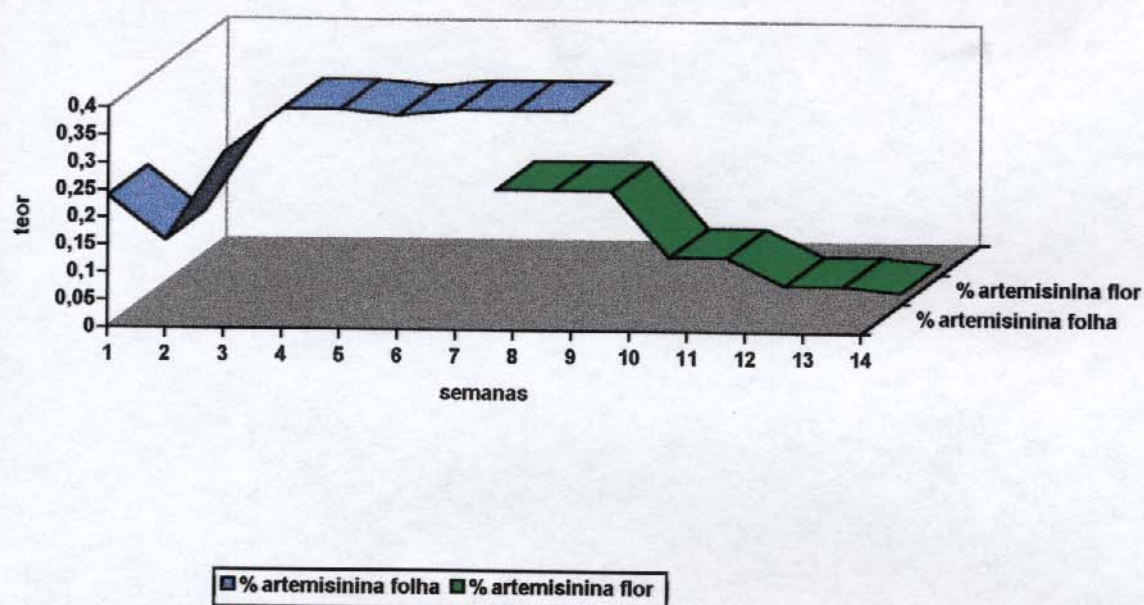


Figura 38: Variação sazonal da artemisinina 13

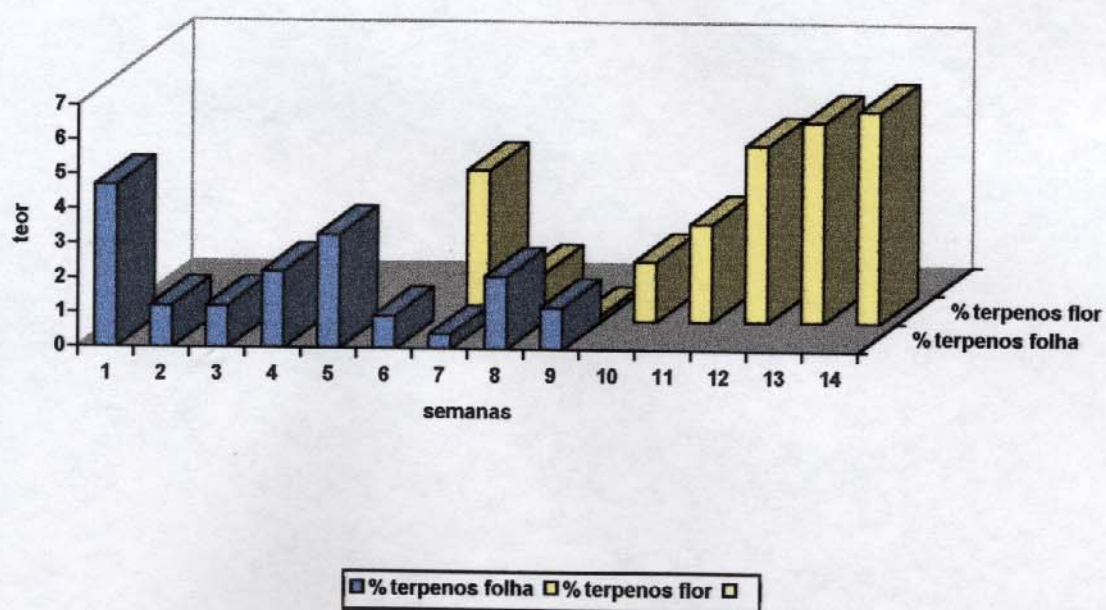


Figura 39: Variação sazonal da relação de terpenos

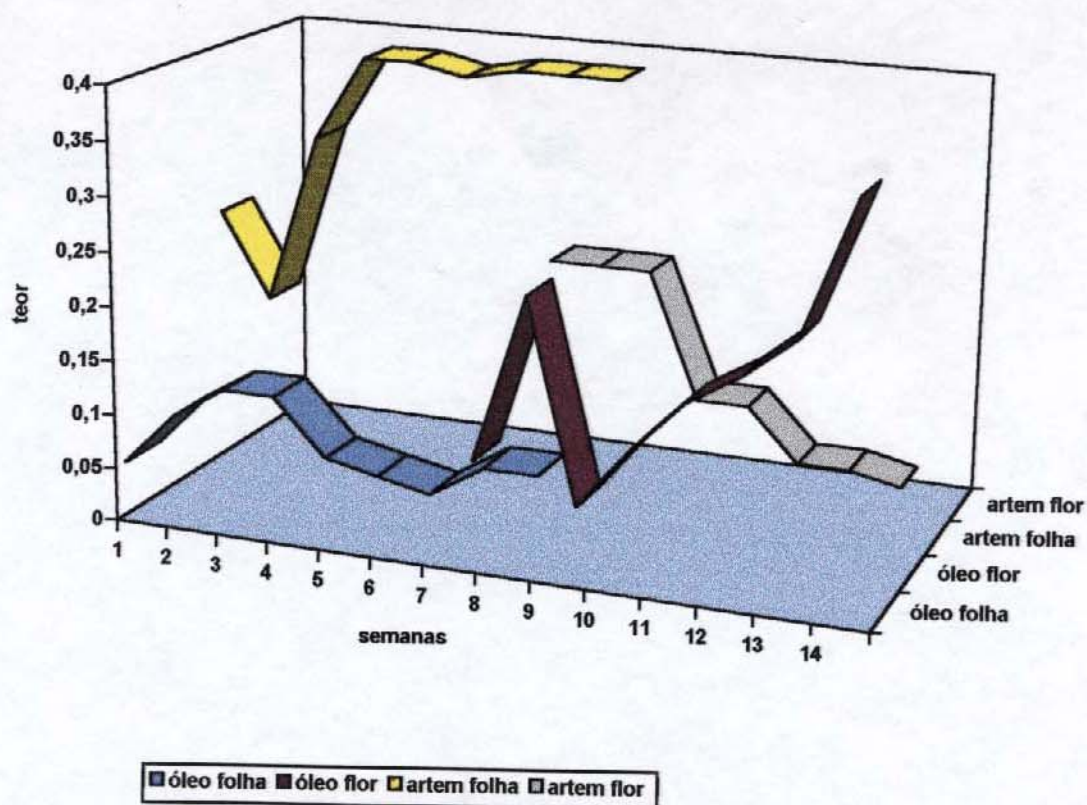


Figura 40: Comportamento sazonal de *Artemisia annua* L. cultivada no Brasil

Este estudo revelou que o perfil cromatográfico do óleo essencial da *Artemisia annua* L. adaptada ao clima do Brasil se assemelha a composição da variedade Vietnamita descrita na literatura /36/. Concomitantemente confirmamos que a melhor época de colheita de *Artemisia annua* L. para fins de produção do princípio ativo 13 é o período que antecede a floração (Figura 40). Uma vez florida, a *Artemisia annua* L. produz um óleo essencial no qual predominam os aromas de monoterpenos demonstrando que a planta tem viabilidade econômica em ambas as fases da planta.

Foram determinados no óleo essencial a presença de 49 componentes pelo uso de padrões comerciais e padrões obtidos através de transformações químicas. Detectou-se um novo esqueleto carbônico no óleo essencial que ainda não foi descrito na literatura (composto 125). Também tivemos indicação da presença de mais dois compostos (127 e 128) com este esqueleto carbônico que deverão ser confirmados oportunamente.

Conclusões

Os objetivos propostos no estudo da *Artemisia annua* L. aclimatada no Brasil permitiram fornecer uma melhor compreensão do comportamento desta *Asteracea*.

A caracterização espectroscópica dos amorfanos 12, 21, 22, 30, 112, 113 e 114 contribuiu com dados para a literatura especializada, possibilitando a elucidação de novas estruturas análogas.

O estudo dos constituintes voláteis da planta permitiu determinar quarenta e nove componentes no óleo essencial. Determinou-se um componente minoritário no óleo essencial, o composto 2 - ciclopente-1-nona, 2-[2,2-dimetil-3-(3-butanona)ciclopropil)]. Este esqueleto carbônico revelou ser inédito, não tendo sido descrito anteriormente em plantas. A partir deste trabalho constatamos que a constituição dos voláteis da *Artemisia annua* L. adaptada ao clima do Brasil se assemelha àquela descrita para a variedade vietnamita.

Constatamos que a planta pode ser aproveitada tanto para produção de artemisinina 13, como para obtenção de óleo essencial com um aroma de monoterpenos. Conseguiu-se, até o momento, produzir o princípio ativo 13, num custo global de onze dólares e cinquenta centavos por grama de composto.

Parte Experimental
Material e Métodos

Utilizou-se reagentes e solventes das marcas Aldrich, Carlo Erba, Fischer, Fluka e Merck, todos P.A. Quando necessário, os solventes foram destilados e tratados segundo técnicas descritas por Perrin et al. /63/.

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram efetuadas em sílica gel G e PF₂₅₄ da Merck (na proporção 1:1), sobre suporte de vidro (espessura 0,25 mm) ou em cromatofolhas prontas da Merck artigo 5554. A detecção dos compostos foi feita por irradiação com lâmpada UV a 254 nm e pulverizada com solução ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído (50:1:0,5) seguido de aquecimento /64/.

Nas cromatografias em camada espessa preparativa (CCEP), foram utilizadas placas de vidro 20 x 20 cm com uma camada de sílica gel PF₂₅₄ ou GF₂₅₄ (espessura 1 mm) da Merck. A detecção foi feita por irradiação com lâmpada ultravioleta a 254 nm.

As cromatografias em coluna foram realizadas em sílica gel 60 (0,06-0,02 mm) da Merck. A proporção de sílica gel utilizada foi aproximadamente 50 vezes o peso do produto bruto que foi purificado. As colunas de filtração prévias que se fizeram necessárias foram realizadas utilizando sílica precipitada (Zeozil 175 Rhodia).

Os espectros de absorção no infravermelho foram registrados em espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo 399B, em pastilhas de KBr para sólidos (1-2% da amostra) ou em filmes sobre ceda de KBr para líquidos, utilizando como referência a absorção em 1601 cm⁻¹ de um filme de poliestireno.

O material vegetal utilizado foi seco a uma temperatura de 40°C em estufa marca Fabbe, modelo 170.

O material vegetal seco foi moído em um triturador de facas marca Stephen, modelo UM 40.

Para separar as graxas dos extratos vegetais utilizou-se uma centrífuga de baixa temperatura modelo Sorvall RC-5B da DuPont Instruments.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de próton foram registrados em espectrômetro Varian Gemini (300 MHz) ou Bruker modelo AC 300P, utilizando-se clorofórmio deuterado como solvente, tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) são indicados em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em hertz (Hz).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono-treze foram registrados em espectrômetro Varian Gemini 300 (75,5 MHz) ou Bruker modelo AC 300 (75,5 MHz),

utilizando-se clorofórmio deuterado como solvente, tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) são indicados em ppm.

A interpretação dos dados de RMN¹³C foi realizada com ajuda da técnica DEPT 135° (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), onde: CH₃/CH = sinal positivo (+), CH₂ = sinal negativo (-), C (não ligado ao H) = sinal de C_{quart.} = sinal ausente, intensidade zero; e DEPT 90° que indicou os CH.

Os espectros de ultra-violeta (UV) foram registrados em um espectrômetro DU-70 Beckman.

As análises por GC/MS foram realizadas num cromatógrafo HP 5890 com detetor de massas HP 5970. A coluna utilizada foi uma de fase ligada de 25m de comprimento x 0,2 mm de diâmetro x 0,33 μ m de espessura de marca Hp ultra-2 (5% difenilpolisiloxano e 95% dimetilpolisiloxano). Para análise dos óleos foi utilizado como gás de arraste He (1 ml/min.) com uma velocidade linear de 30 cm/s. A injeção foi da ordem de 1 μ l de solução etérea da amostra com “split ratio” de 10:1. Nas cromatografias que se utilizou detetor de ionização de chama (FID) utilizou-se como gás de arraste He, e para a queima ar sintético, H₂ e N₂. Os programas de temperatura utilizados foram dois:

Os índices de retenção (IR) foram obtidos através da co-injeção do óleo essencial com uma mistura padrão de hidrocarbonetos C₁₁-C₃₀, Coluna capilar HP ultra-2 com a programação 1 descrita a seguir e aplicação da equação de Van den Dool e Kratz /54/.

$$IR = [(T_s - T_{C_{n-1}}) / (T_{C_n} - T_{C_{n-1}}) \times 100] + 100 \times C_{n-1}$$

onde:

T_s: tempo de retenção da substância analisada

T_{cn}: tempo de retenção do n-alceno que elui após a substância analisada

T_{cn-1}: tempo de retenção do n-alceno que elui antes da substância analisada

C_{n-1}: n-alceno que elui antes da substância analisada

Programação 1:

– temperatura do injetor e do detetor -250°C. Forno 40°C (2 min)-2°C/min - 240°C (10 min)

Programação 2:

- temperatura do injetor e do detetor -250°C. Forno 110°C (2 min) - 5°C/min - 240°C (10 min)

Para o cálculo dos índices de retenção utilizou-se como padrão uma mistura de hidrocarbonetos C₉-C₂₂, coluna HP Ultra-2 e programa de temperatura 1. Para analisar os óleos essenciais foi utilizado o Programa 1. Para analisar os produtos das reações de interconversão foi utilizado o Programa 2.

Os valores de rotação ótica $[\alpha]_D$ foram determinados num polarímetro Polarmat A - Polarímetro Automático de Rutina Carl Zeiss com lâmpada de mercúrio com precisão de 0,05°, utilizando CHCl₃ como solvente.

O cálculo da rotação ótica específica em função do comprimento de onda de sódio, foi obtido segundo as relações abaixo recomendadas pelo fabricante.

$$[\alpha]_{Hg}^{20} = 1,17543[\alpha]_{Na}$$

$$[\alpha]_D = [\alpha]_{Na} / c(g/ml) \times l(dm)$$

$$[\alpha]_D = [\alpha]_{Hg}^{20} / 1,17543c \times l$$

onde:

$[\alpha]_D$ = rotação específica

$[\alpha]_{Hg}^{20}$ = rotação lida no aparelho

c(g/ml) = concentração da amostra

l(dm) = comprimento da cela (0,5)

Os pontos de fusão foram determinados num aparelho digital marca Eletrothermal. Os pontos de fusão não foram corrigidos.

Os solventes empregados na preparação dos extratos foram de grau técnico.

O material botânico empregado provem do campo experimental do CPQBA cultivada pela Divisão de Agrotecnologia. Foram empregadas as partes aéreas de *Artemisia annua* L. colhidas na fase que antecede a floração.

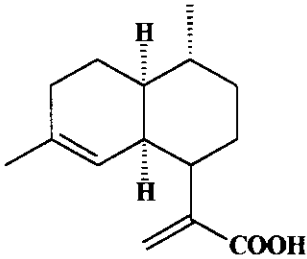
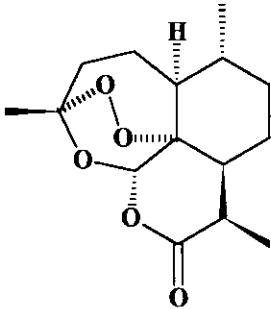
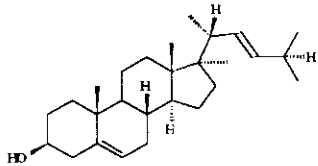
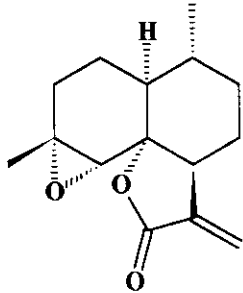
As sementes utilizadas para o cultivo da *Artemisia annua* L. utilizada na obtenção dos amorfanos foram fornecidas pelo Prof. Dr. James McChesney (Mississippi-EUA) sementes

provenientes da China. As sementes utilizadas no cultivo da *Artemisia annua* L. para utilizar no processo de otimização da extração da artemisinina **13** como no estudo sazonal do óleo essencial foram originárias de clonagens de sementes Chinesas e Vietnamitas (SI/FI e SII/FII) , as quais foram fornecidas pela MEDIPLANT (CENTRE DE RECHERCHES SUR LES PLANTES MÉDICINALES ET AROMATIQUES - Suíça) responsável pelo trabalho de melhoramento das sementes.

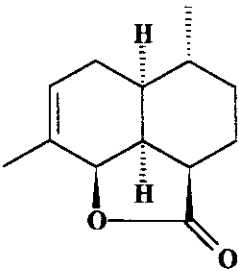
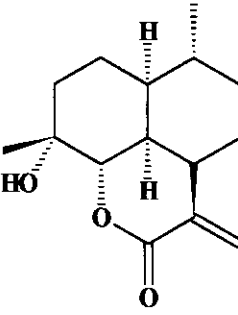
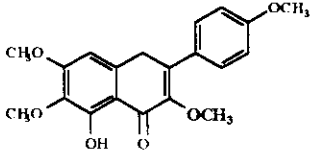
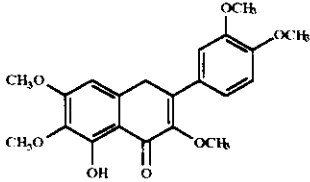
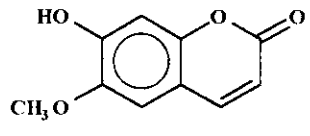
Obtenção de amorfanos a partir da *Artemisia annua* L.

A extração da *Artemisia annua* L. foi realizada como esquematizado no fluxograma da Figura 11. Foi preparado um extrato etanólico de *Artemisia annua* L. a partir de 90 Kg de folhas secas sob maceração dinâmica com etanol 96° G.L. durante 24 horas (foram realizadas 3 bateladas de 30 Kg cada). Obteve-se 1575L de extrato que foram concentrados sob vácuo num concentrador vertical, em vidro, tendo capacidade média sob vácuo de 20 L/h para o álcool etílico 96° G.L. resultando em 11,1 Kg de extrato seco. Fez-se uma coluna filtrante com 20 Kg de Zeozil 125 ® eluindo com hexano e depois um gradiente crescente de hexano/acetato de etila totalizando um total de 120 L de hexano e 68 L de acetato de etila. As frações hexânicas puras enriquecidas com ácido artemisinínico **30** foram separadas e processadas conforme descrito no fluxograma da Figura 11 através de uma extração básica. A artemisinina **13** saiu nas frações eluídas com hexano/acetato de etila 2% com impurezas. Esta fração foi concentrada e ressuspensa em 22,2 L de éter de petróleo faixa 40-60° onde cristalizou a artemisinina **13**. A recristalização do composto **13** foi feita dissolvendo os cristais em 0,5 L de metanol resultando em 135g do produto puro. Quando verificou-se que não saia mais artemisinina **13** da coluna lavou-se a coluna com acetato de etila e concentrou-se o extrato obtendo-se 8,4 Kg de resíduo. Tomou-se 30 g deste resíduo para passar em coluna cromatográfica conforme descrito no fluxograma da Figura 11 para obtenção dos componentes utilizados neste trabalho. Para esta coluna cromatográfica utilizou-se 1,5 Kg de sílica-gel 60 (0,06 - 0,02 mm) marca Merck e eluiu-se com gradientes crescentes de hexano /acetato de etila. Deste fracionamento foram separadas 30 frações que foram agrupadas em sete frações conforme as polaridades de seus componentes e repurificadas conforme descrito na Tabela 14.

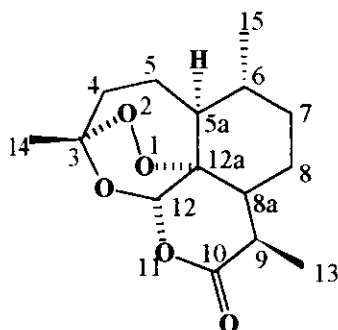
Tabela 14: Compostos isolados da *Artemisia annua* L. cultivada no Brasil

Frações	Massa (g)	Procedimento	Identificação	Composto
1-5	23,60	recristalização em 30 ml de metanol	TLC, GC/MS	 30 (1,7g)
6-9	0,16	filtração em sílica	TLC, GC/MS RMN ¹ H e ¹³ C, IR	 13 (0,12g)
10-14	2,60	recristalização em metanol	TLC, IR, RMN ¹ H	 81 (1,9g)
15-20	0,97	recristalização em pentano	TLC, GC/MS, RMN ¹ H e ¹³ C, IR	 22 (0,68g)

continua

Frações	Massa (g)	Procedimento	Identificação	Composto
21-23	0,58	coluna cromatográfica e recristalização em metanol	TLC, GC/MS, RMN ¹ H e ¹³ C, IR	 21 (0,40g)
24-27	0,47	coluna cromatográfica e recristalização em pentano	TLC, GC/MS, RMN ¹ H e ¹³ C, IR	 12 (0,33g)
28-30	1,60	coluna cromatográfica e recristalização em pentano	TLC, IR, RMN ¹ H	 80 (0,36g)  48 (0,35g)  87 (0,19g)

Composto 13: Artemisinina - *Qinghaosu*- octahidro-3,6,9-trimetil-[3R-(3 α , 5 $\alpha\beta$, 6 β , 8 $\alpha\beta$, 9 α , 12 β , 12 α R*)]-3,2-Epoxi-12H-pirano[4,3-j]-1,2 benzodioxepin-10(3H)-ona /39/



Rf 0,65 (eluente CHCl₃ / MeOH 1,5%)

IR 1956,7 (programação I)

pf. 154-155 (MeOH); lit./39/ 153-154

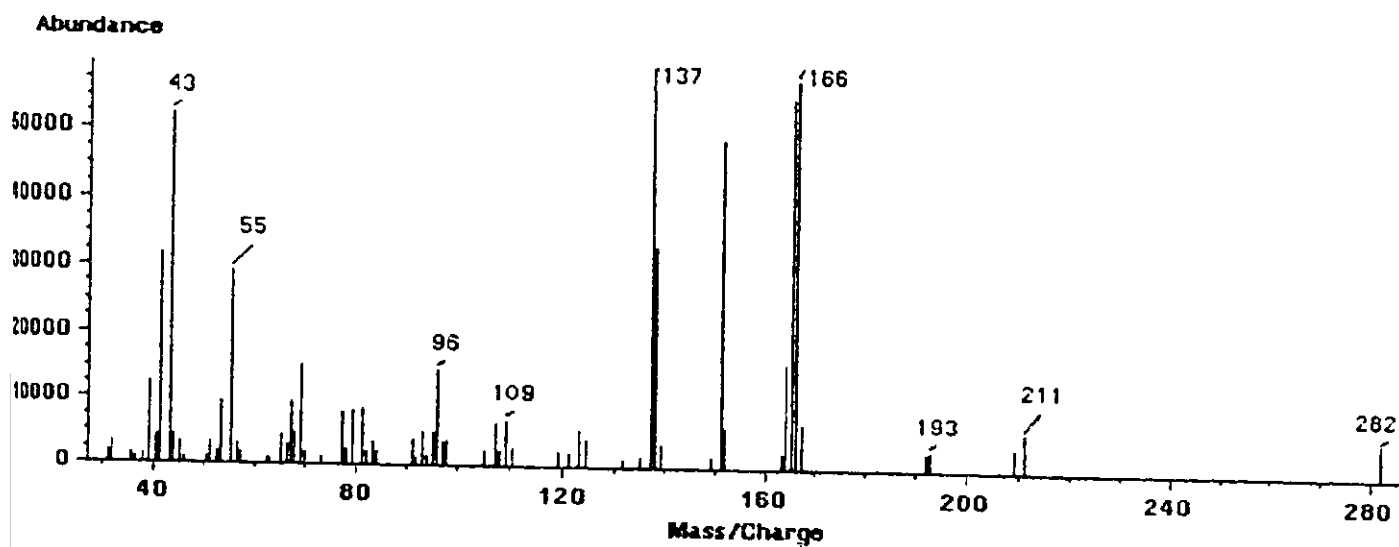
[α]_D= 80,93 (c.0,025g/ml,CHCl₃); lit/39/. α^{17} 66,3 (0,02g/ml,CHCl₃)

EM(70eV):m/z(%) 282(M⁺, 10), 165(100), 152(79), 137(93), 96(24), 81(14), 69(240, 55(38), 43(69)

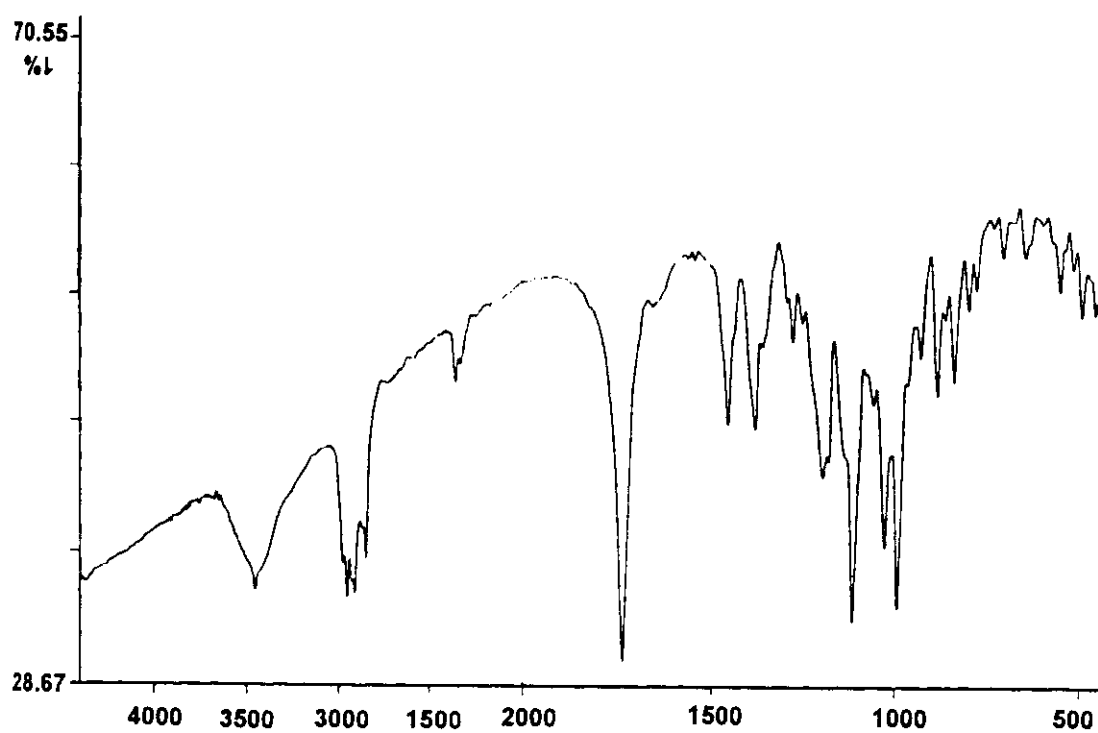
IVTF(KBr):v(cm⁻¹) 1745(C=O)

RMN¹H(300MHz, CDCl₃): δ 0,99(d,H₁₅,J=6Hz), 1,21(d,H₁₃,J=3Hz), 1,44(s, H₁₄), 1,42(d,H₆,J=6Hz), 3,40(d, H₉, J=3Hz), 1,37(m,H_{5a}), 1,75(m,H_{8a}), 1,87(m,H₈), 1,12(m,H₈), 1,08(m, H₇), 1,79(m,H₇), 1,47(m,H₅), 2,01(m,H₅), 2,05(m,H₄), 2,43(m,H₄), 5,87(s,H₁₂)

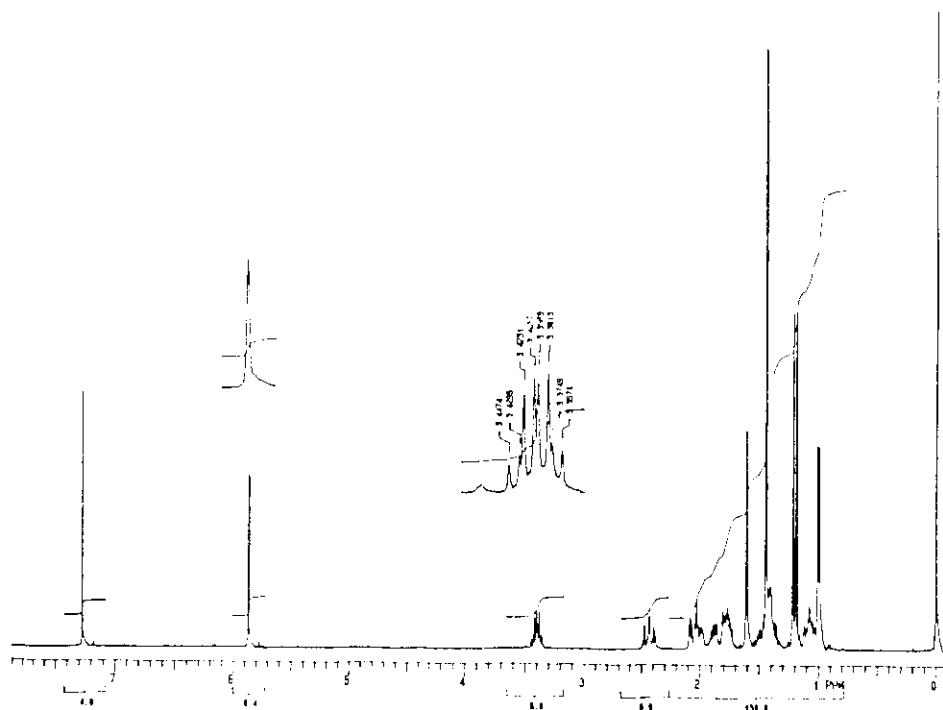
RMN¹³C(75,5MHz,CDCl₃): δ 12,47(C₁₃), 19,74(C₁₅), 23,32(C₈), 24,79(C₅), 25,10(C₁₄), 32,78(C₉), 33,45(C₇), 35,77(C₄), 37,42(C₆), 44,80(C_{8a}), 49,90(C_{5a}), 79,38(C_{12a}), 93,62(C₁₂), 105,22(C₃), 171,92(C₁₀)



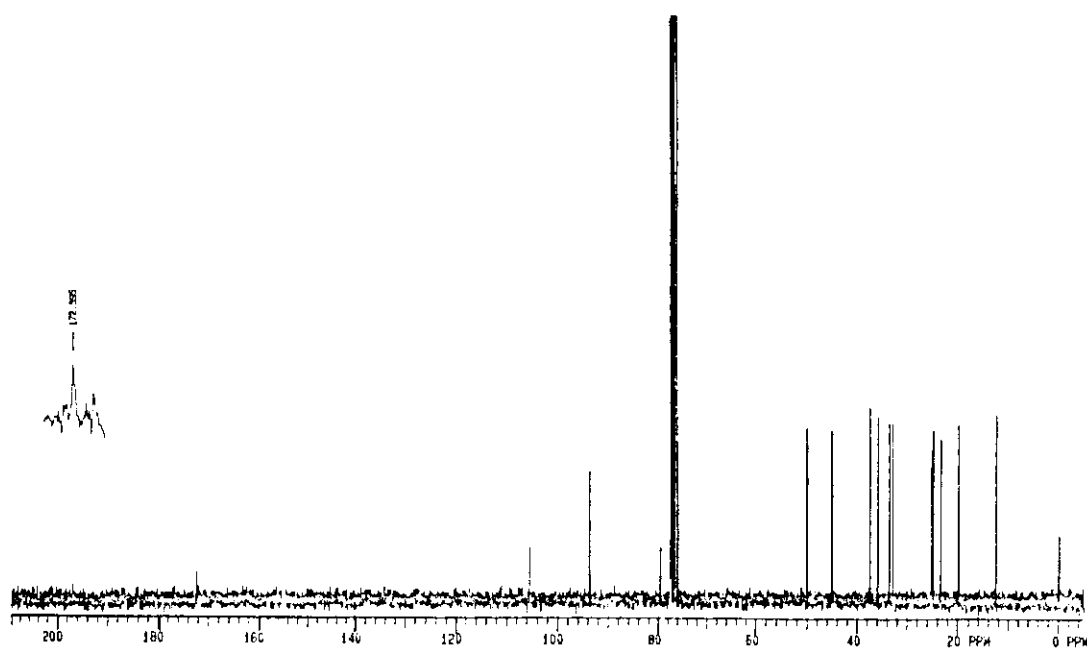
E-13.1: ESPECTRO DE MASSAS DA ARTEMISININA 13



E-13.2: ESPECTRO NO INFRA-VERMELHO DO COMPOSTO 13

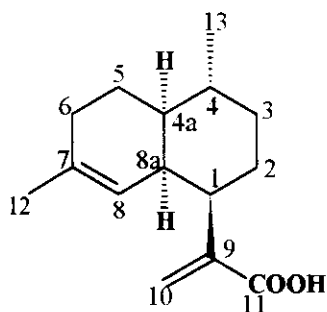


E-13.3: ESPECTRO DE RMN¹H (300MHz,CDCl₃) DO COMPOSTO 13



E-13.4: ESPECTRO DE RMN¹³C (75,5MHz,CDCl₃) DO COMPOSTO 13

Composto 30: Ácido artemisinínico - *Qinghaosu acid*- Ácido 1,2,3,4,4a,5,6,8a- octahidro-4,7-dimetil- α - metileno[1R-(1 α ,4 β ,4a β ,8a β)]-1- Naphthaleno acético /39/



pf. 129,5-130 (MeOH); lit/40/ 131

Rf 0,33 (eluente CHCl₃/MeOH 1,5%)

IR 1918,6 (programação I)

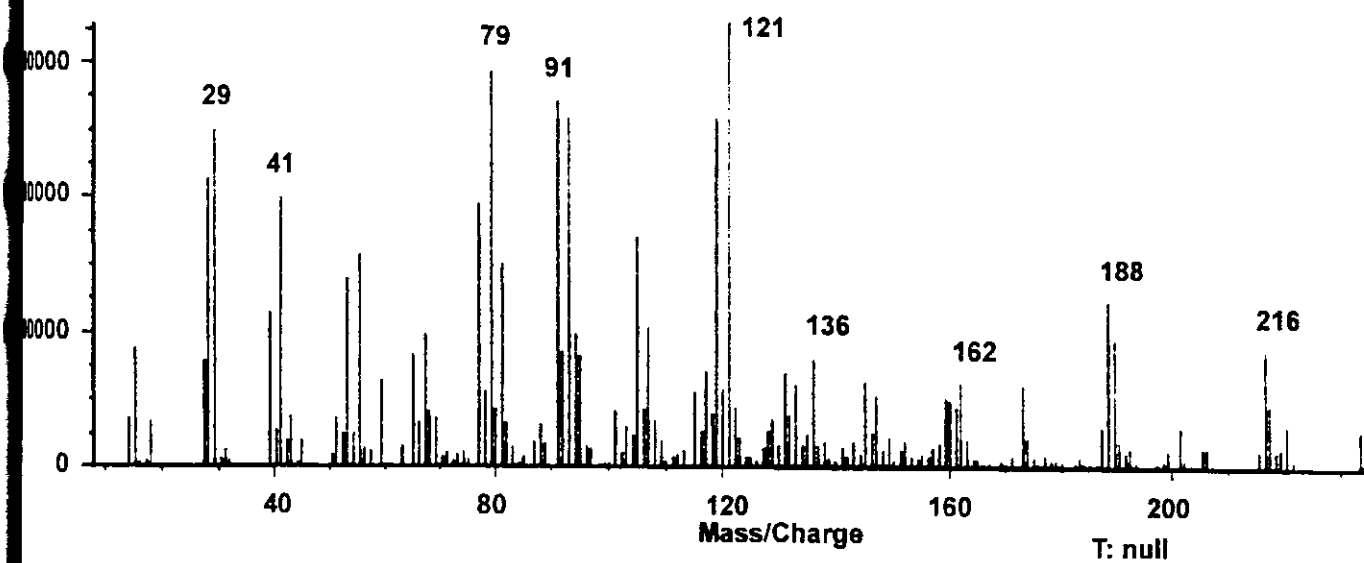
[α]_D = 29,39 (c.0,052g/ml, CHCl₃)

EM(70eV):m/z 234 (M⁺, 7), 216(21), 188(31), 162(16), 121(100), 91(79), 79(83), 41(69)

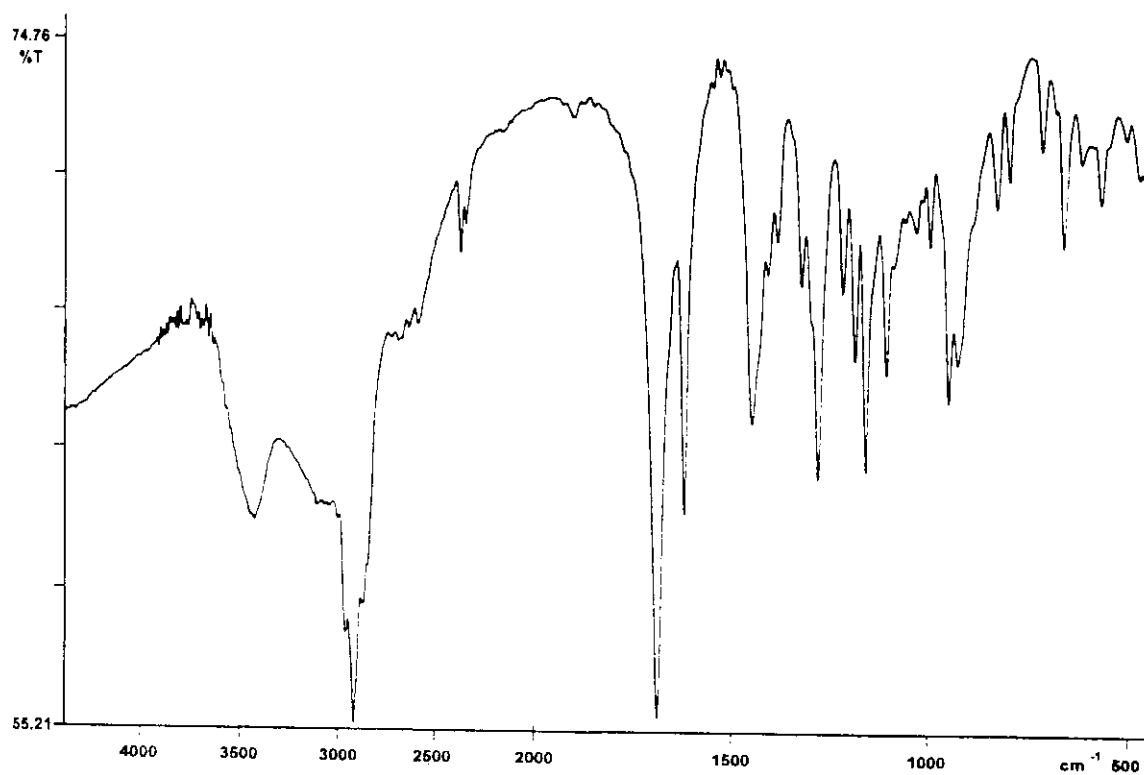
IVTF(KBr):v(cm⁻¹) 3500(OH), 1680(C=O)

RMN¹H(300MHz, CDCl₃): δ 0,90(d,H₁₃, J=6Hz), 1,59(s,H₁₂), 1,30 e 1,45(m,H₆), 1,40(m,H₂), 1,55(m,H₄), 1,59(s,H₁₂), 1,87 e 1,45(m,H₅), 1,70 e 1,80(m,H₃), 2,60(sl,H₁₁), 2,69(m,H₁), 4,98(sl,H₈), 5,56(s,H₁₀), 6,47(s,H₁₀)

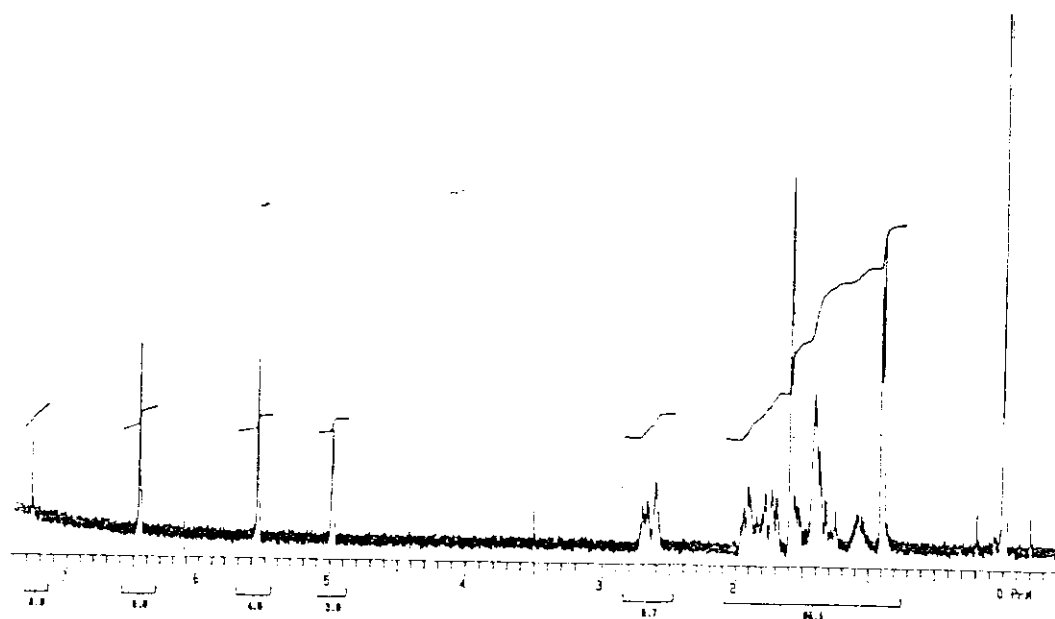
RMN¹³C(75,5MHz,CDCl₃): δ 19,9(C₁₃), 23,7(C₁₂), 25,5(C₅), 25,9(C₂), 26,3(C₆), 27,5(C₄), 35,2(C₃), 37,8(C_{8a}), 41,3(C_{4a}), 42,0(C₁), 120,1(C₈), 126,6(C₁₀), 134,9(C₇), 142,5(C₉), 172,3(C₁₁)



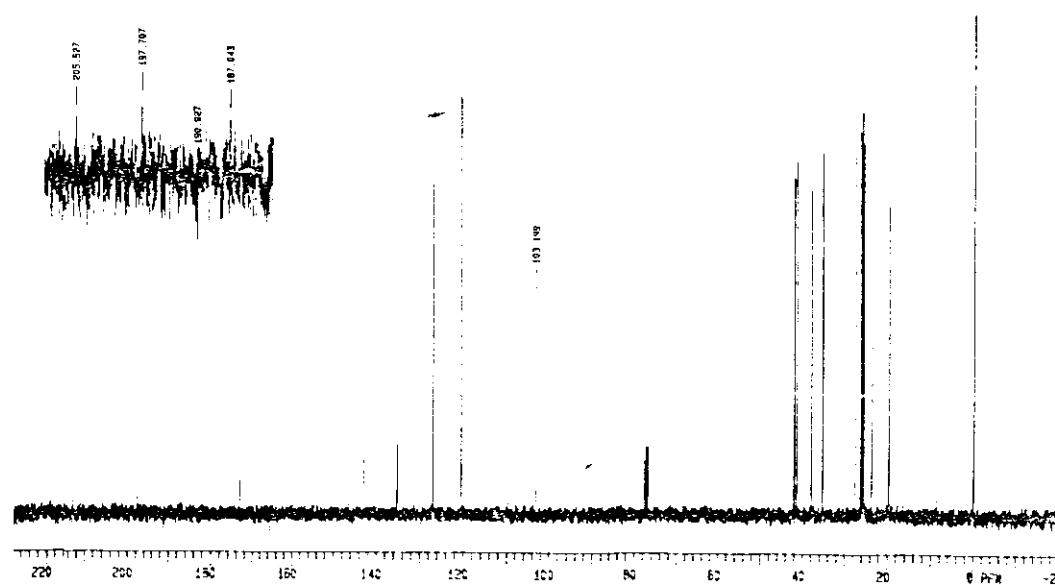
E-30.1: ESPECTRO DE MASSAS DO ÁCIDO ARTEMISINÍNICO 30



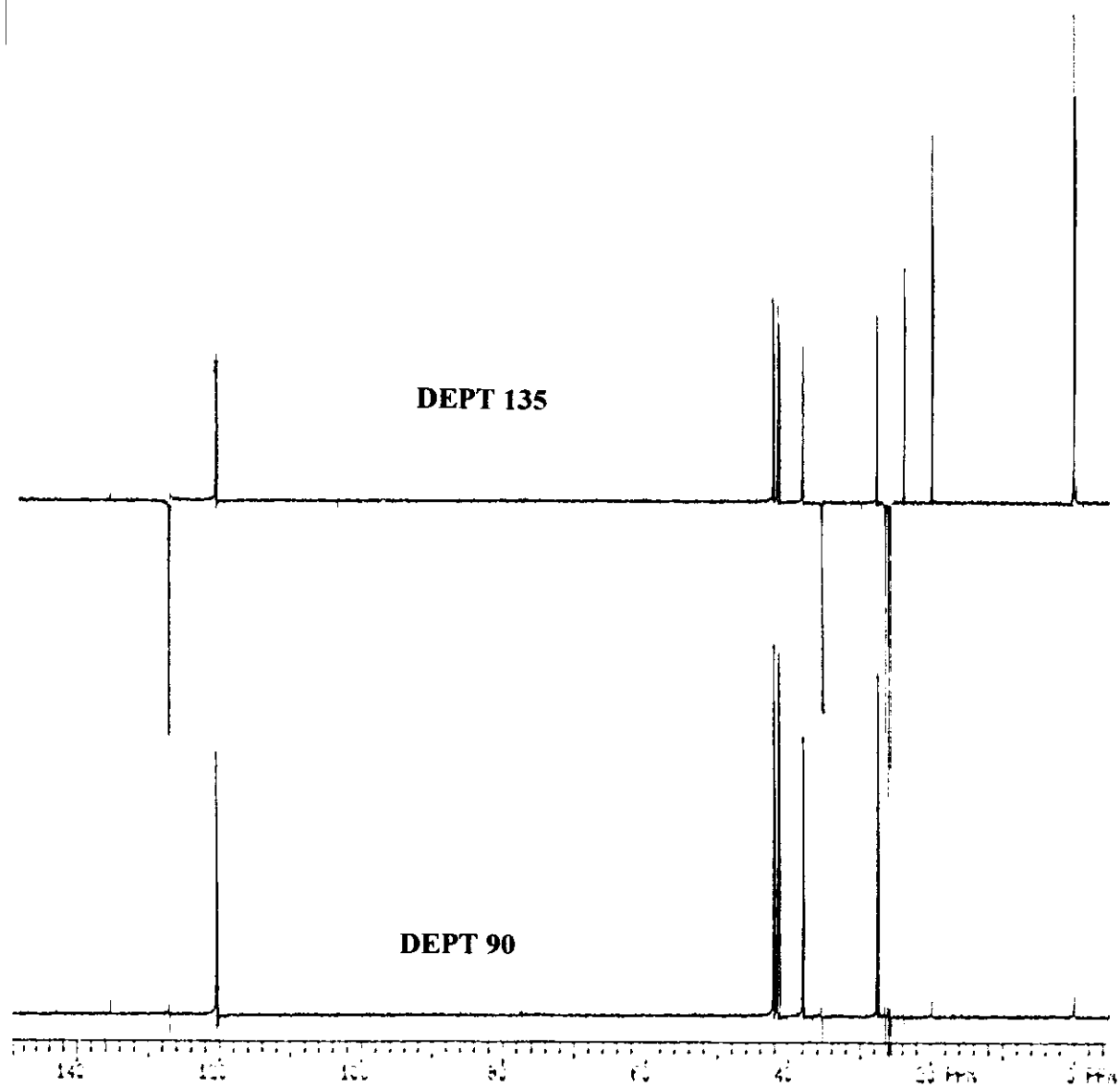
E-30.2: ESPECTRO NO INFRA-VERMELHO DO COMPOSTO 30



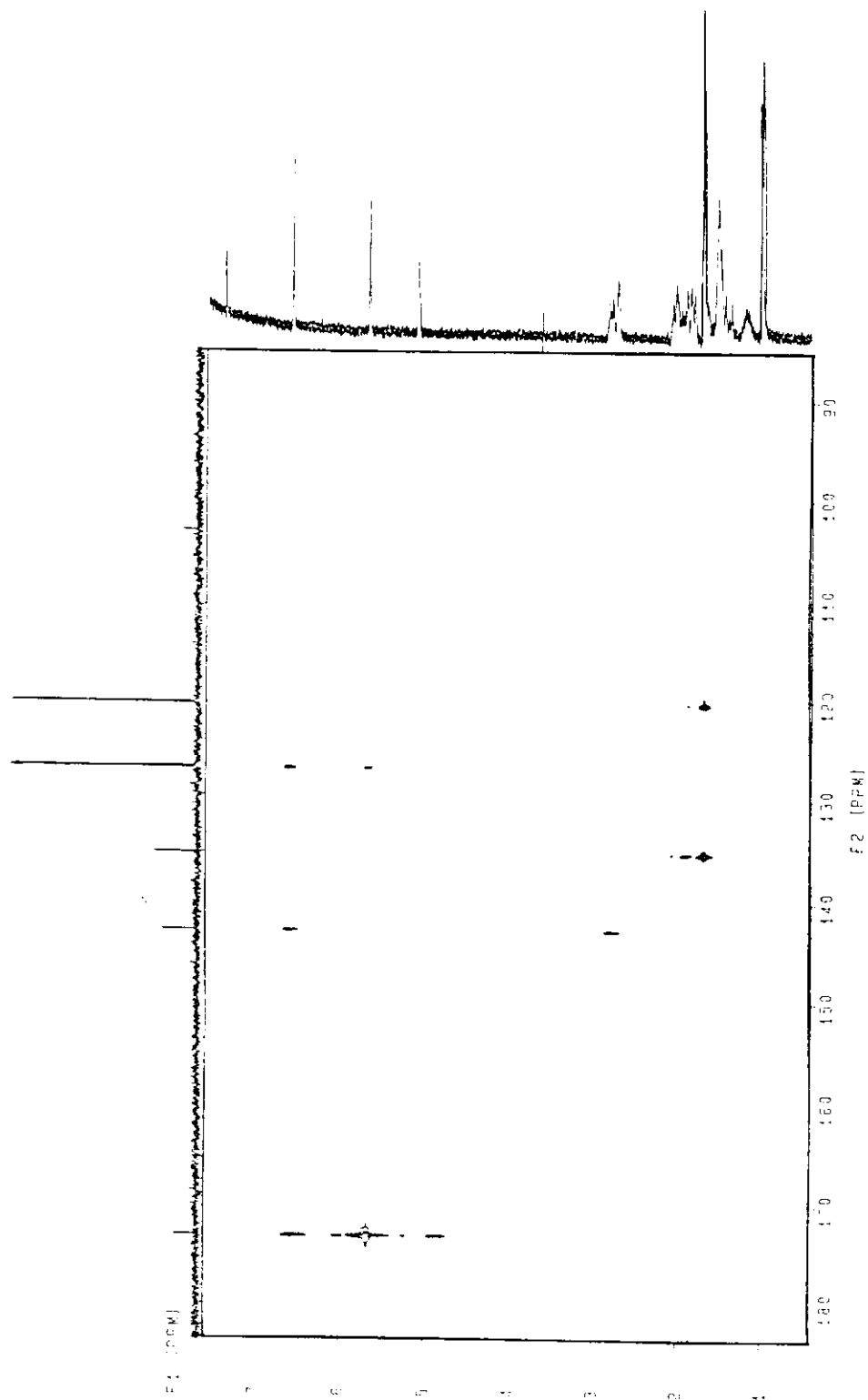
E-30.2: ESPECTRO DE RMN¹H(300MHz,CDCl₃) DO COMPOSTO 30



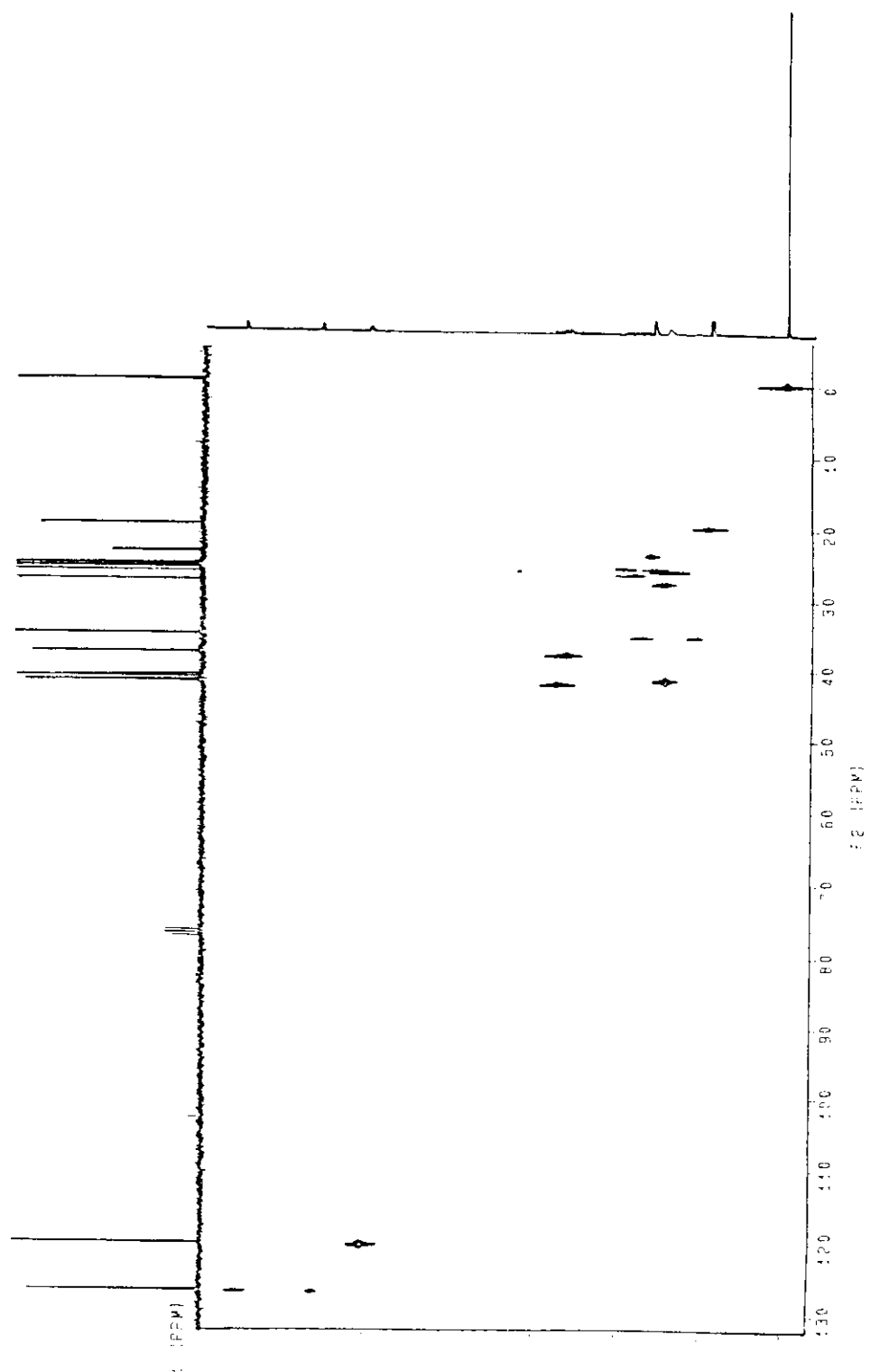
E-30.4: ESPECTRO DE RMN¹³C (75.5 MHz,CDCl₃) DO COMPOSTO 30



E-30.5: ESPECTRO DEPT DO COMPOSTO 30

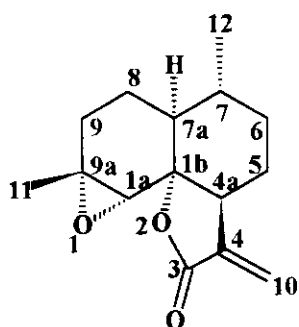


E-30.7: ESPECTRO COLOC DO COMPOSTO 30



E-30.6: ESPECTRO HETCOR DO COMPOSTO 30

Composto 22: Artenuína b- *Quinghaosu II*- decahydro-7,9a-dimethyl-4-metilenol[1aR-(1 $\alpha\alpha$,1bR*,4a β ,7 β ,7a β ,9a α)] 3H- oxireno [7,8] Nafto [8a,1-b] furan-3-ona, /39/



pf. 151-153 (pentano); lit/39/ 153

Rf 0,57 (eluente CHCl₃/MeOH 1,5%)

IR 2396,8 (programação I)

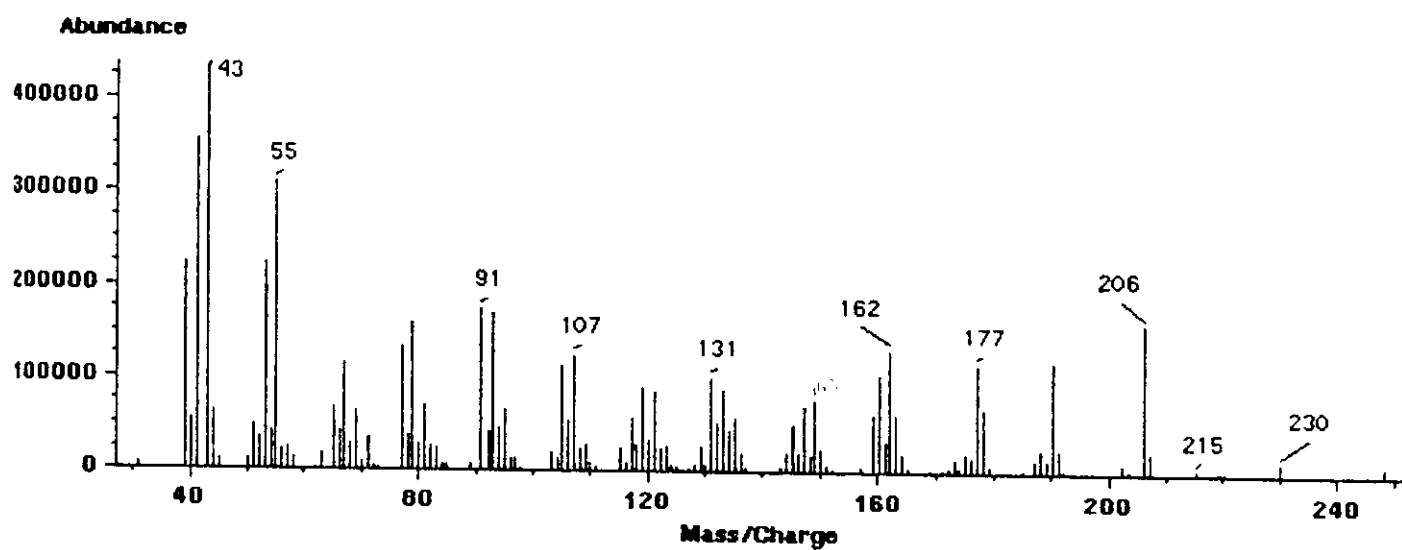
[α]_D = -73,22 (c.0,0056g/ml, CHCl₃) lit./39/ -73,50 (c. 0.02g/ml, CHCl₃)

EM(70eV):m/z(%): 248 (M⁺, 2), 230(48), 215(17), 188(17), 162(100), 121(31), 91(48), 79(43), 41(48)

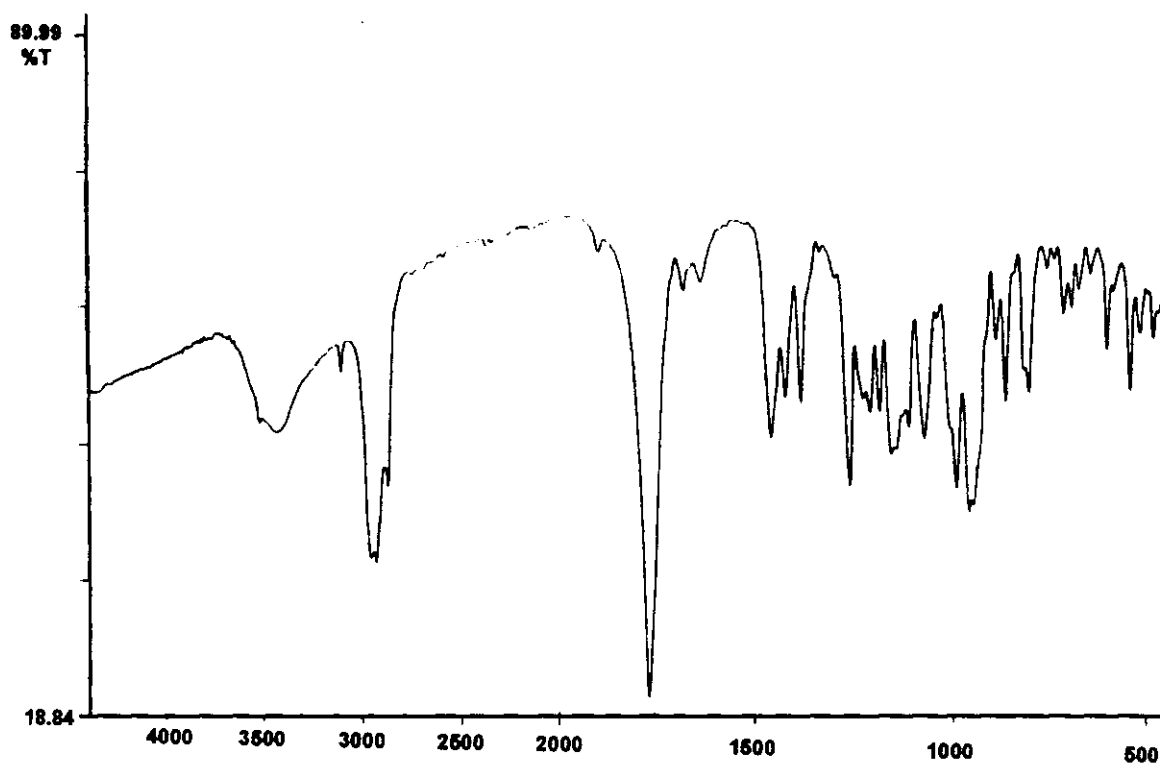
IVTF(KBr): ν (cm⁻¹)2830(C-H); 1770(C=O)

RMN¹H(300MHz,CDCl₃): δ 0,99(d, H₁₂, J=6Hz), 1,34(s,H₁₁), 2,68(s,H_{1a}), 2,74(m,H_{4a}), 5,43(d, H₁₀, J=3Hz), 6,16(d, H₁₀, J=3Hz), 1,48(m,H₇ e H_{7a}), 1,26 e 1,90(m, H₆), 1,76 e 1,93(m, H₉), 1,40 e 2,06(m, H₅), 1,56(m,H₈)

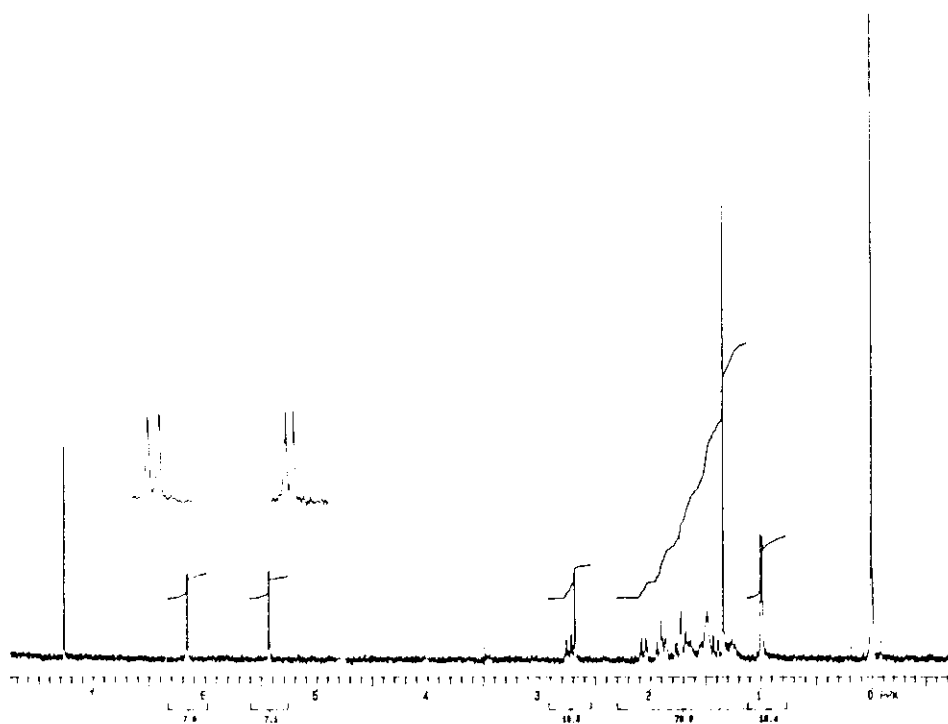
RMN¹³C(75,5MHz,CDCl₃): δ 170,2(C₃), 138,8(C₄), 81,2(C_{1b}), 58,4(C_{9a}), 58,7(C_{1a}), 52,8(C_{4a}), 43,7(C_{7a}), 30,7(C₇), 117,8(C₁₀), 33,9(C₆), 24,3(C₉),21,7(C₅), 16,3(C₈), 22,8(C₁₁), 18,6(C₁₂)



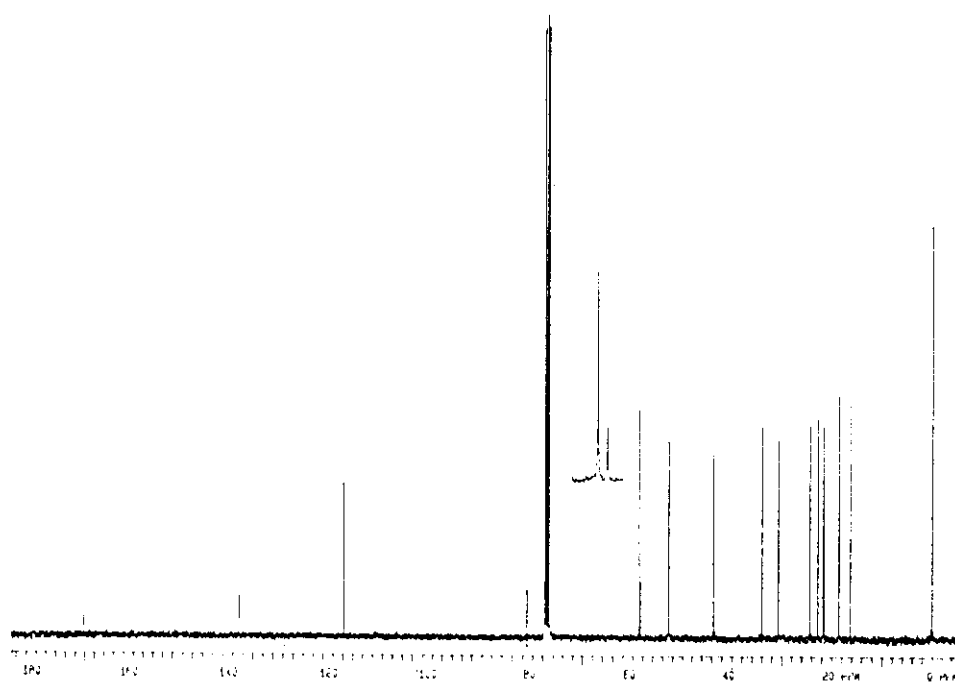
E-22.1: ESPECTRO DE MASSAS DA ARTENUINA B 22



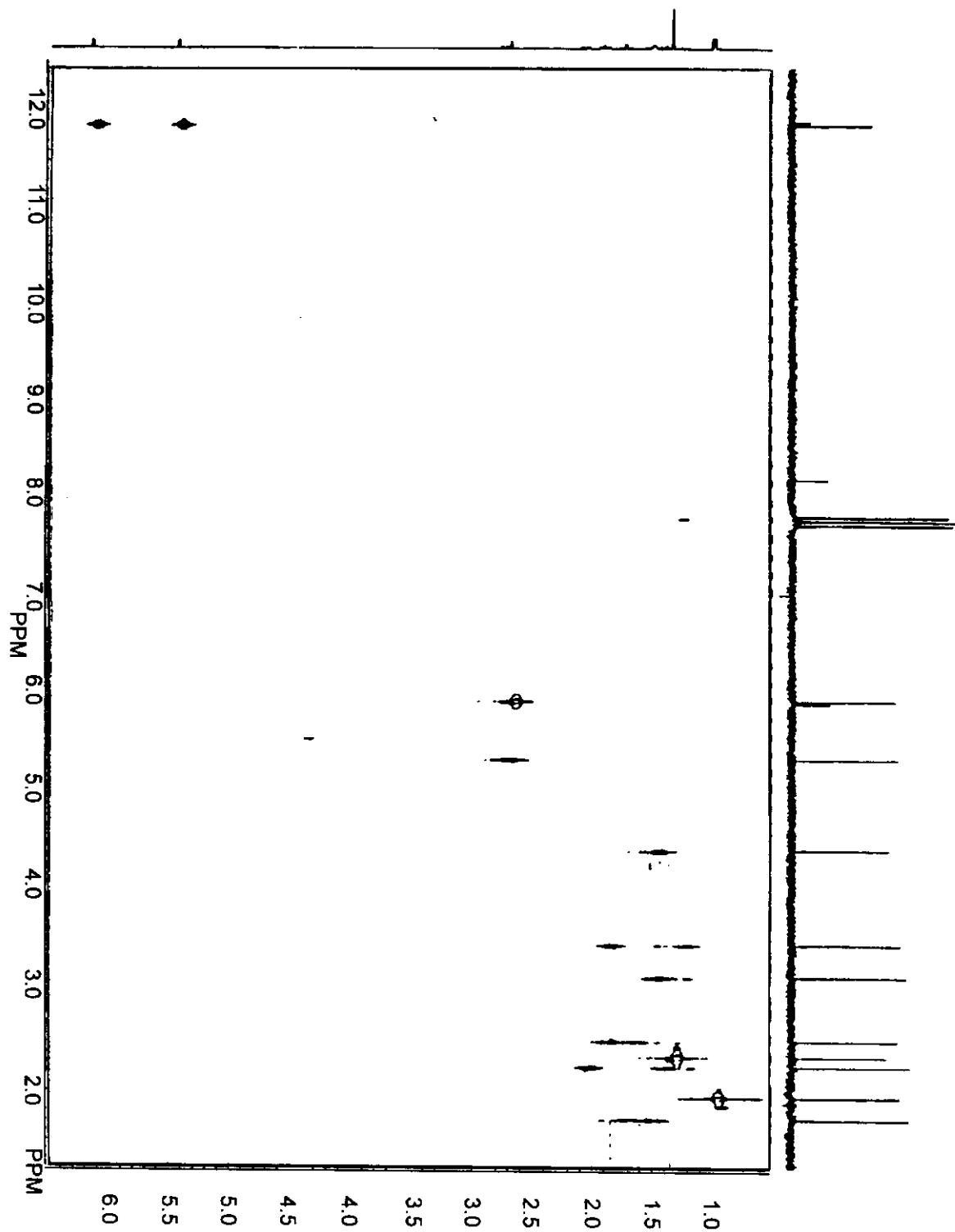
E-22.2: ESPECTRO NO INFRA-VERMELHO DO COMPOSTO 22



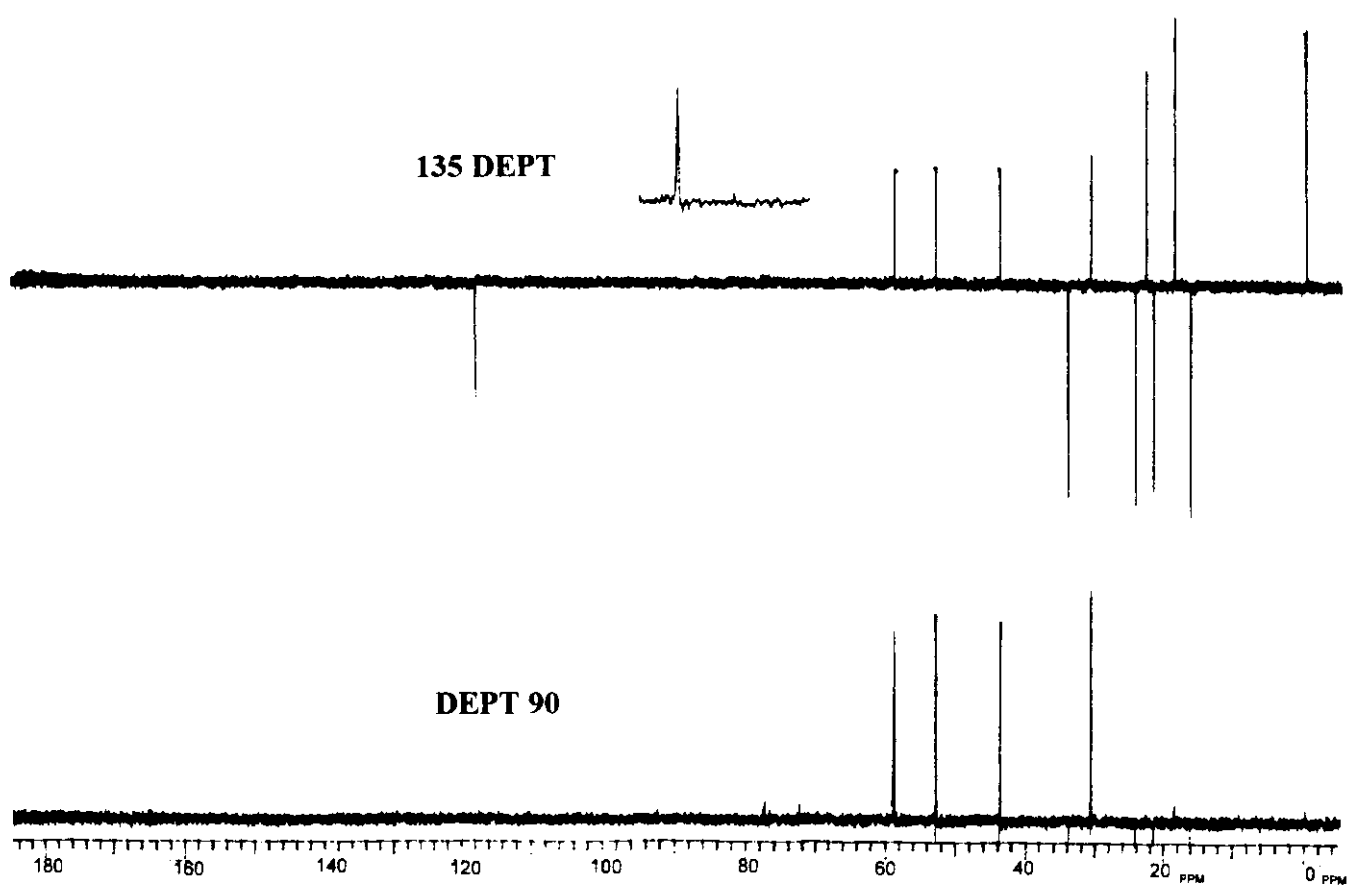
E-22.3: ESPECTRO DE RMN¹H (300MHz,CDCl₃) DO COMPOSTO 22



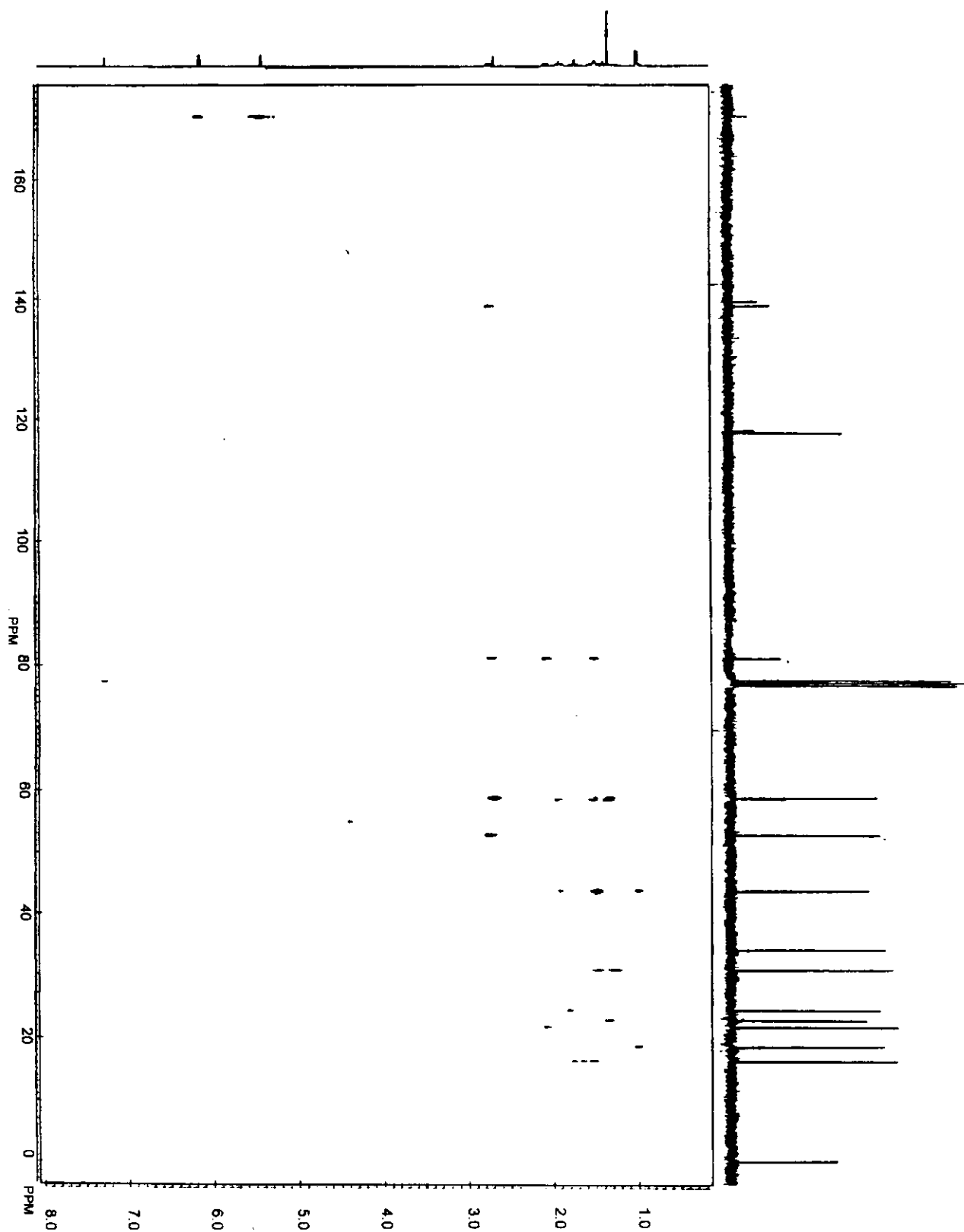
E-22.4: ESPECTRO DE RMN¹³C (75.5MHz,CDCl₃) DO COMPOSTO 22



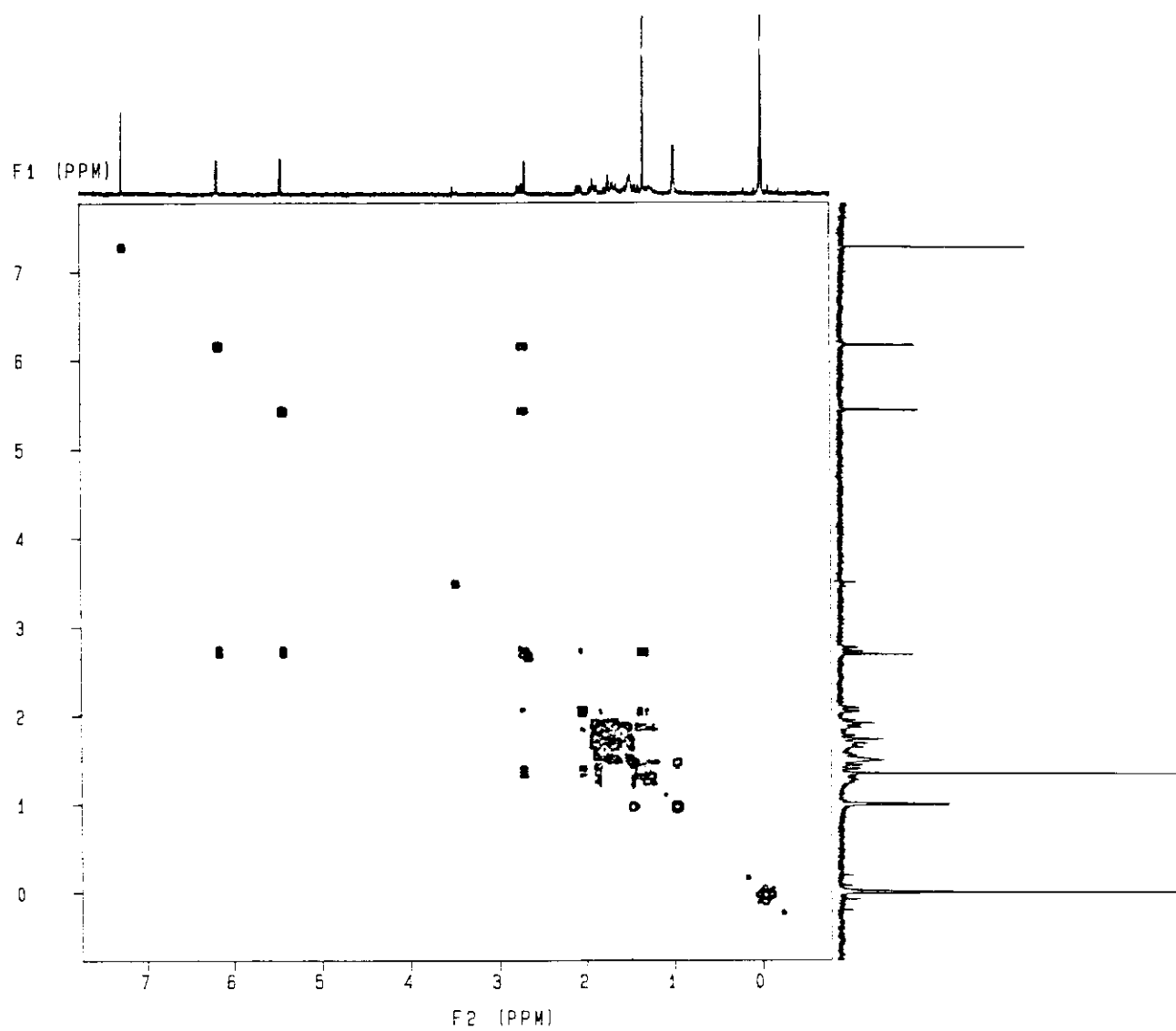
E-22.5: ESPECTRO HETCOR DO COMPOSTO 22



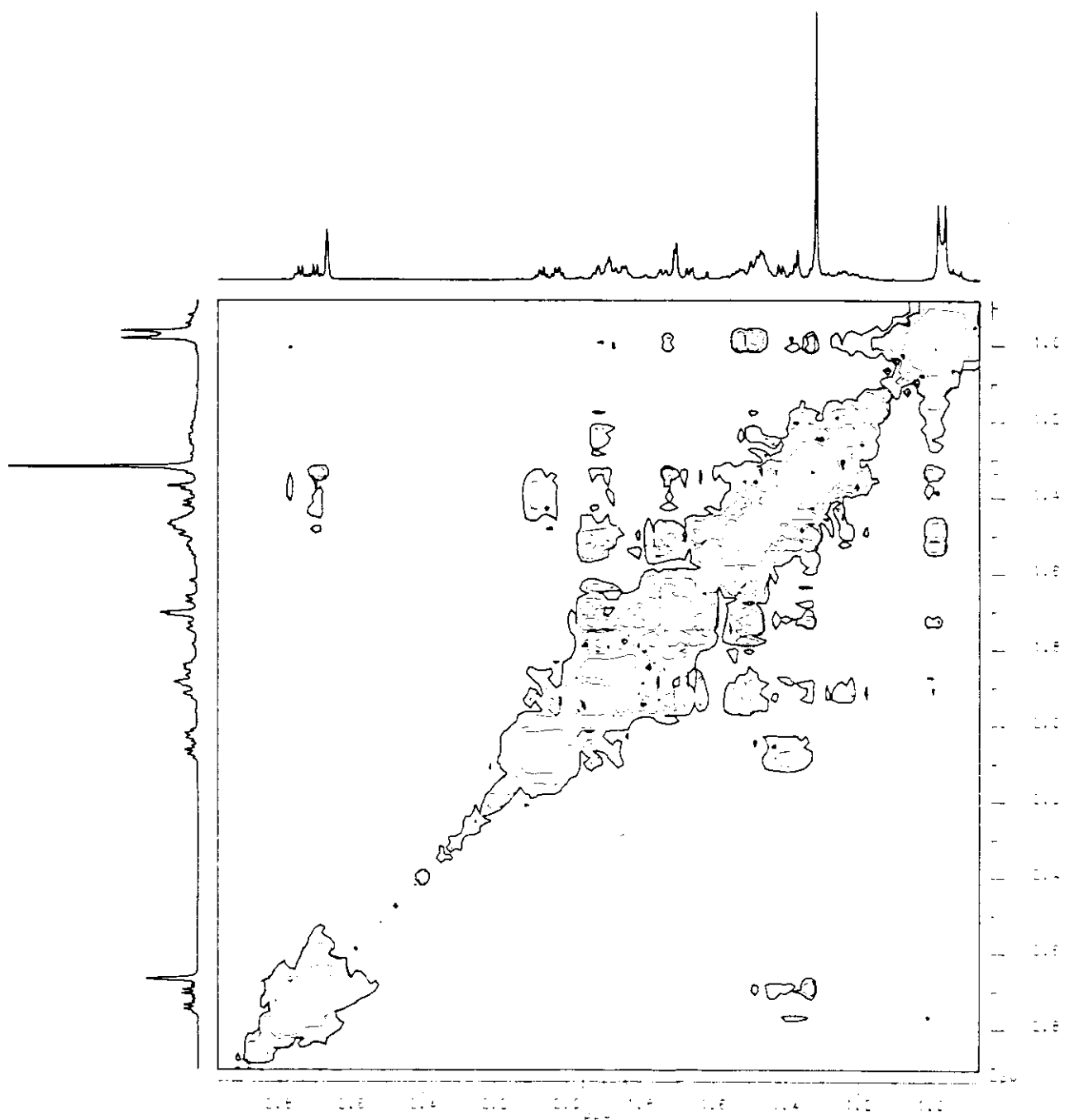
E-22.6: ESPECTRO DEPT DO COMPOSTO 22



E-22.7: ESPECTRO COLOC DO COMPOSTO 22

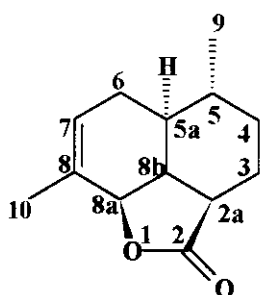


E-22.8: ESPECTRO COSY DO COMPOSTO 22



E-22.9: ESPECTRO NOESY DO COMPOSTO **22**

Composto 21: *Quinghaosu I-* 2a,3,4,5,5a,6,8a,8b-octahidro-5,8-dimetil-2H-Nafto [1.8-bc] furan-2-ona, /65/



pf. 190-191(MeOH); lit/65/ 190-191

Rf 0,64 (eluente CHCl₃/MeOH 1,5%)

IR 1957,0 (programação I)

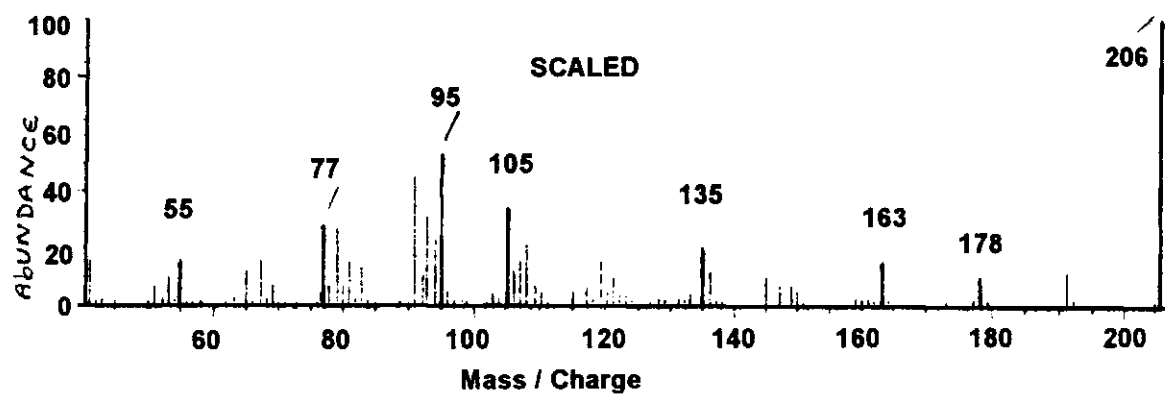
[α]_D²⁰ = -50 (c.0,0051g/ml,CHCl₃); α ¹⁰ -50 (C. 0,02g/ml,CHCl₃)

EM(70eV): m/z(%) 206 (M⁺, 92), 191(8), 178(8), 163(18), 135(30), 119(30), 105(55),95(100), 77(55), 55(52), 41(68)

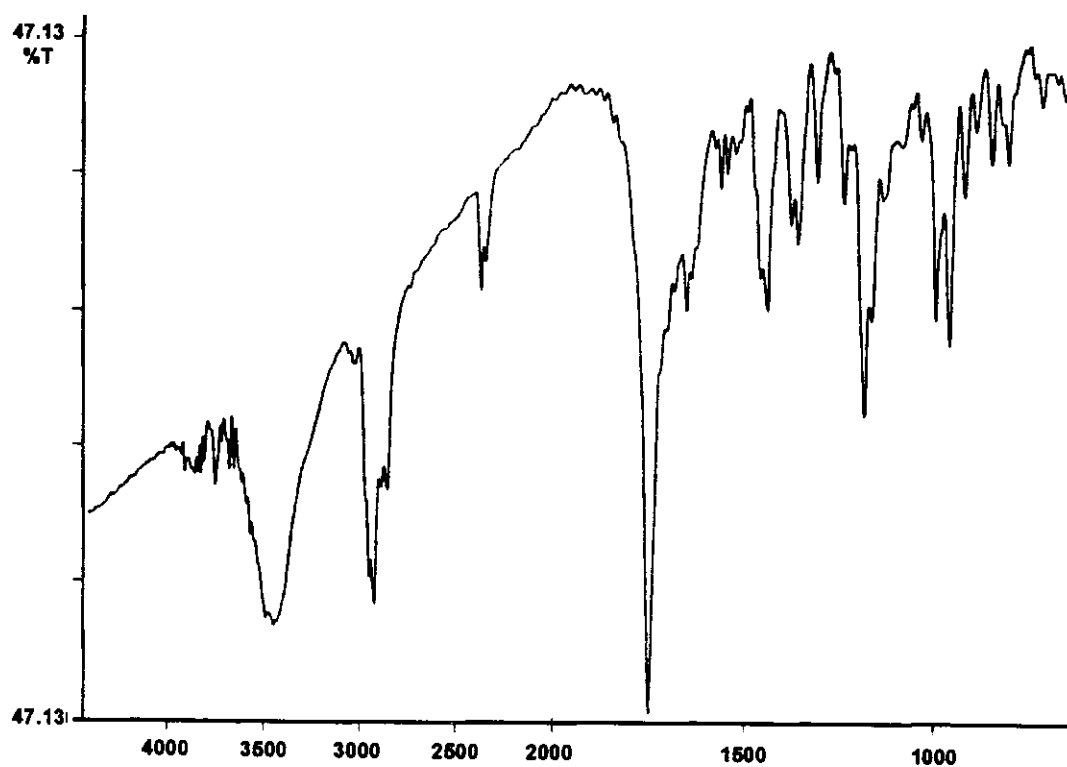
IVTF: ν (cm⁻¹) 2990(C-C), 1744(C=O), 1243(C-O)

RMN¹H(300MHz, CDCl₃): δ 0,78(d, H₉, J=6Hz); 1,86(s,H₁₀), 2,85(ddd, H_{8b}, J_{8b,2a}=10,2Hz, J_{8a,8b}=7,2Hz, J_{8b,5a}=5,7Hz)), 2,96(ddd,H_{2a},J_{2a,8b}=10,2Hz, J_{2a,3}=4Hz), 4,67(dl, H_{8a}, J_{8a,8b}=7,2Hz), 5,65(dd, H₇, J_{7,6}=6,5Hz,J_{7,6}=3Hz), 1,54(m,H₅ e H_{5a}), 1,10 e 1,80(m, H₄), 2,00 e 2,20 (m, H₆)

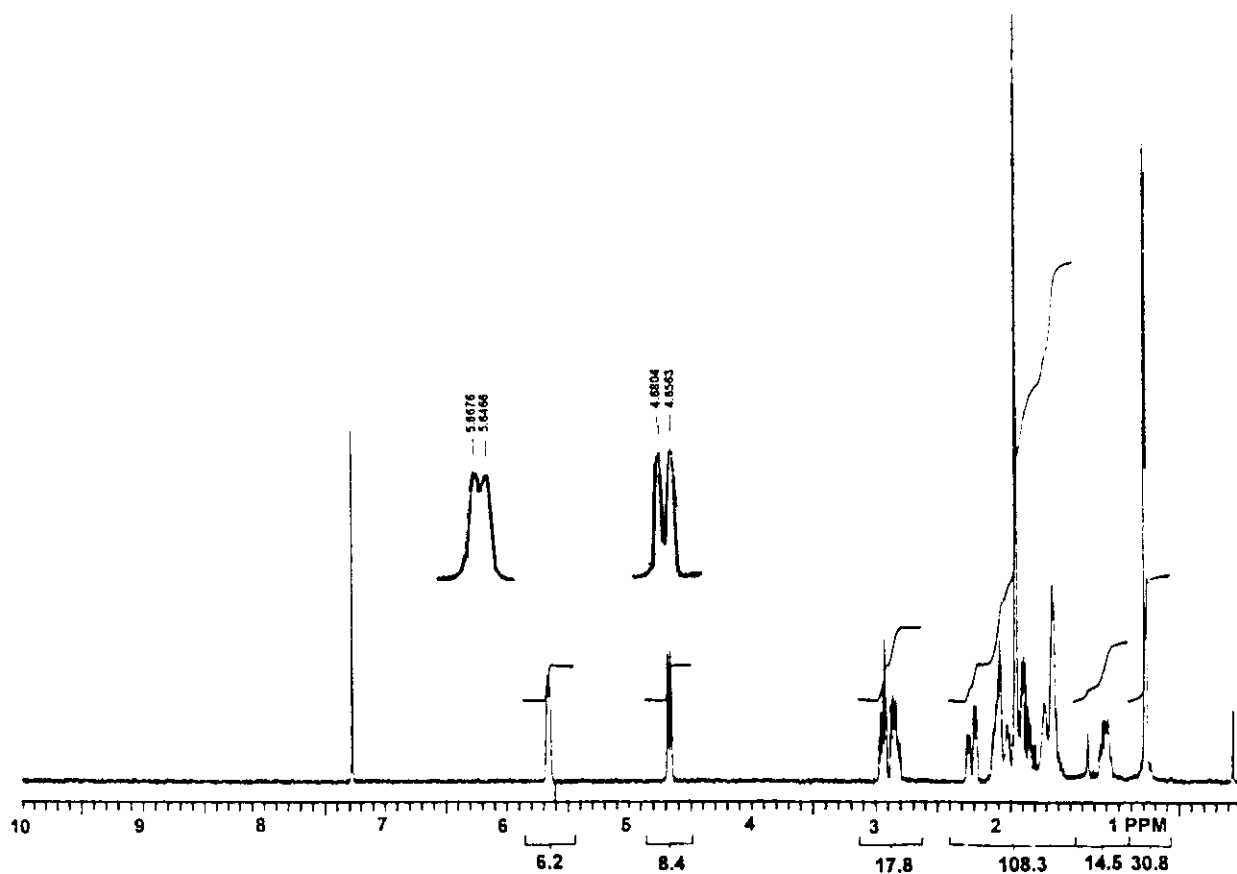
RMN¹³C(75,5MHz,CDCl₃): δ 179,5(C₂), 131,1(C₈), 124,8(C₇), 77,4(C_{8a}), 39,1(C_{2a}), 37,0(C_{8b}), 32,8(C_{5a}), 25,2(C₅), 27,2(C₄), 25,1(C₆), 18,5(C₃), 20,4(C₁₀), 19,8(C₉)



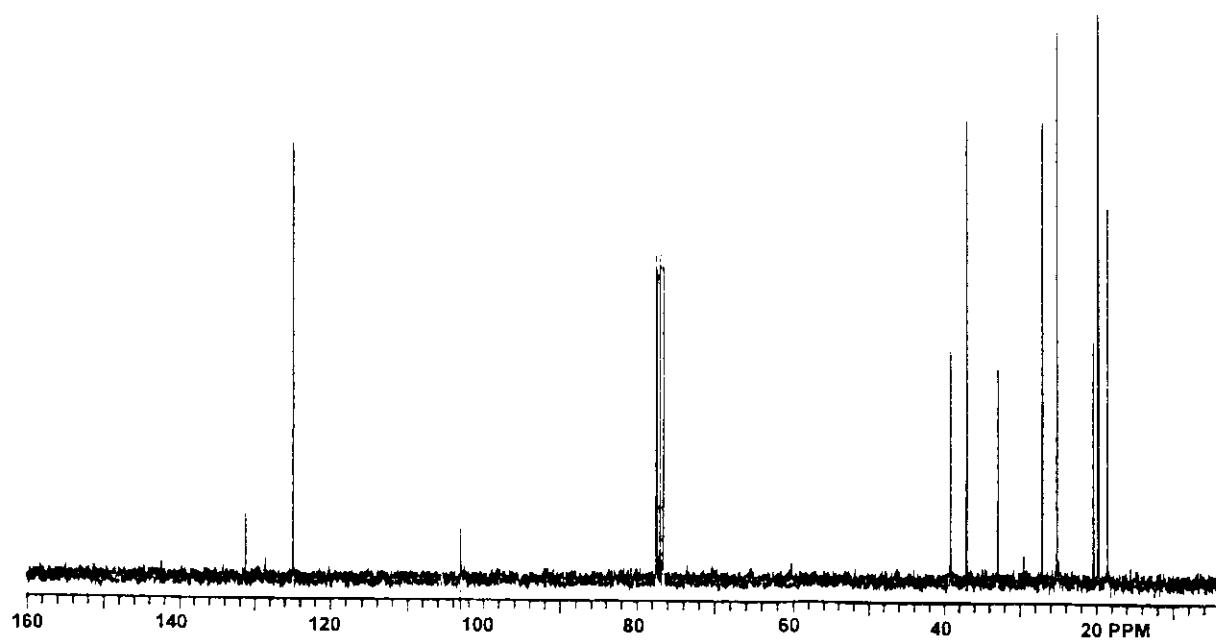
E-21.1: ESPECTRO DE MASSAS DO QUINGHAOSU I 21



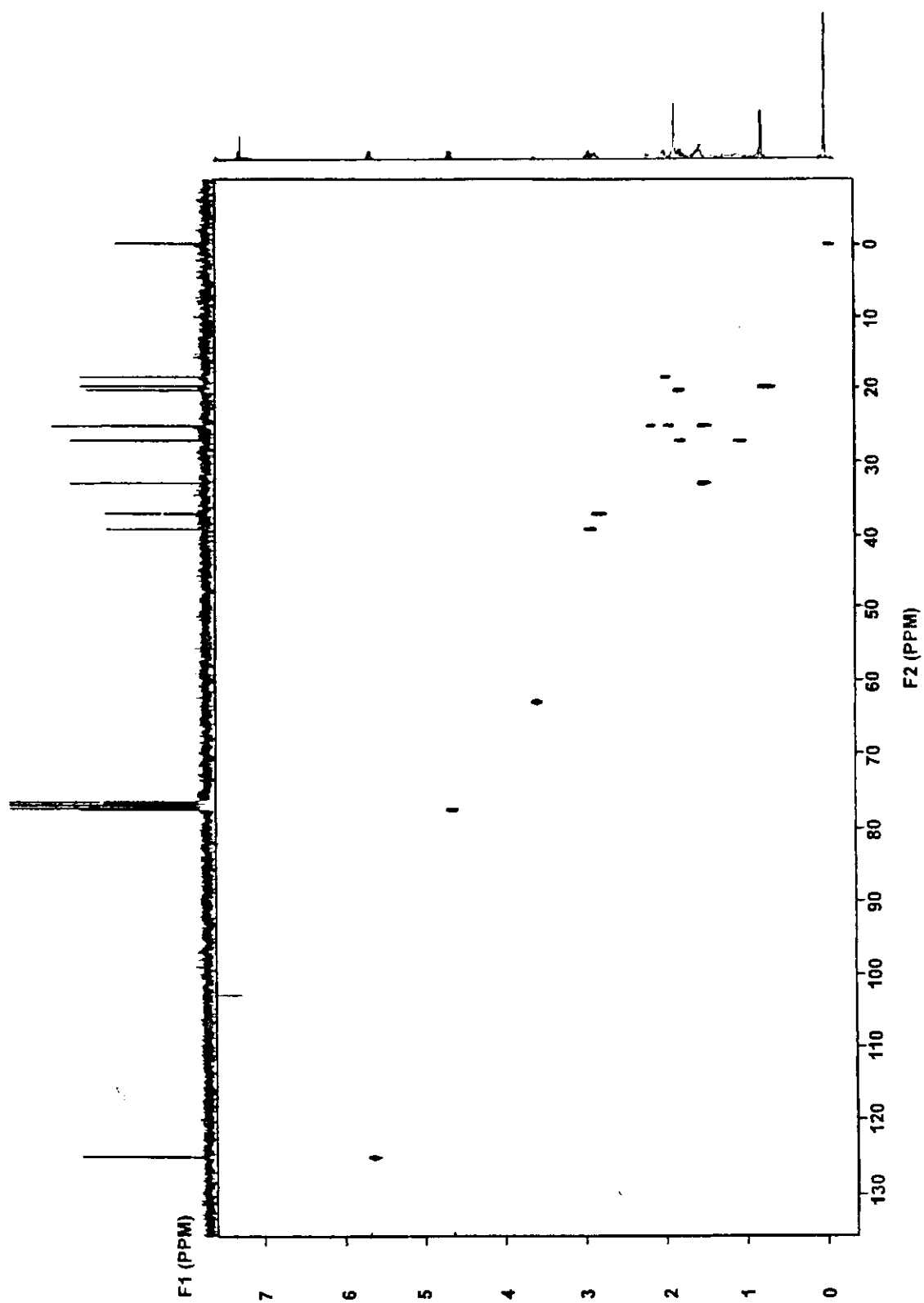
E-21.2: ESPECTRO NOINFR-VERMELHO DO COMPOSTO 21



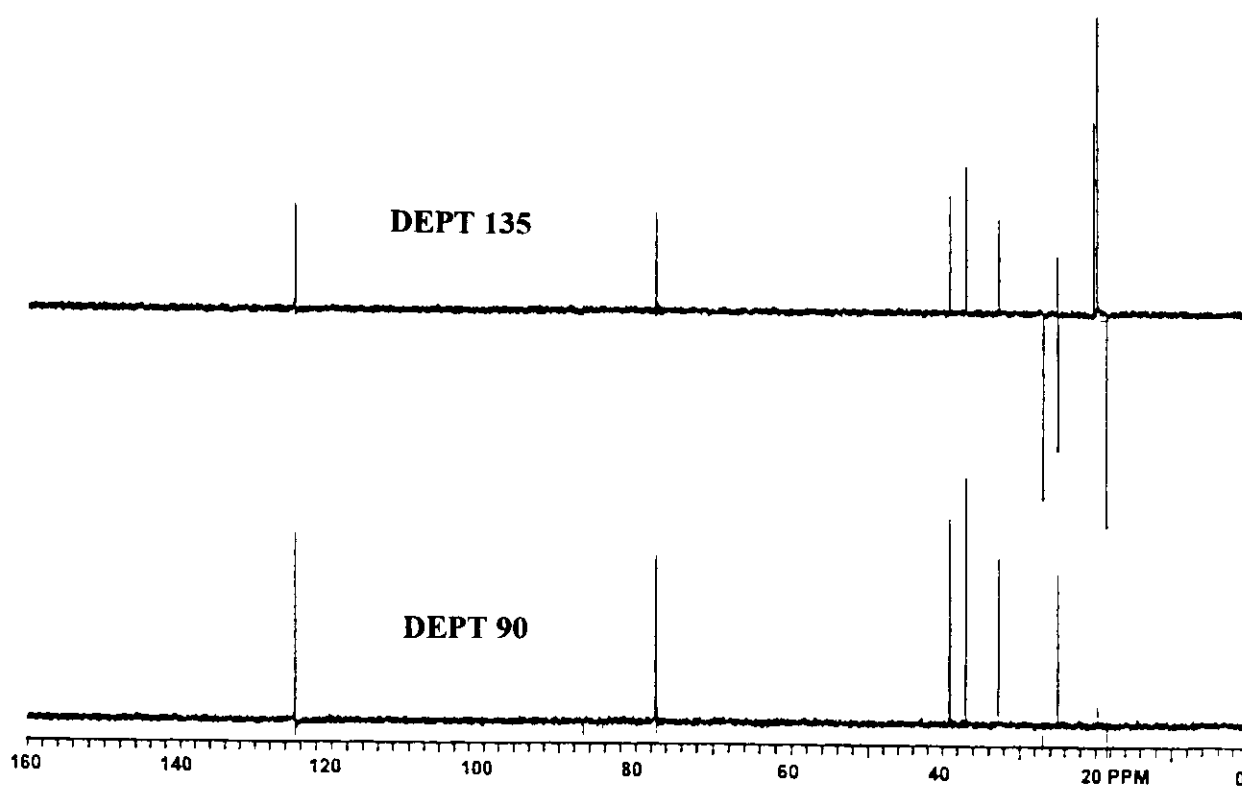
E-21.3: ESPECTRO DE RMN¹H (300MHz,CDCl₃) DO COMPOSTO **21**



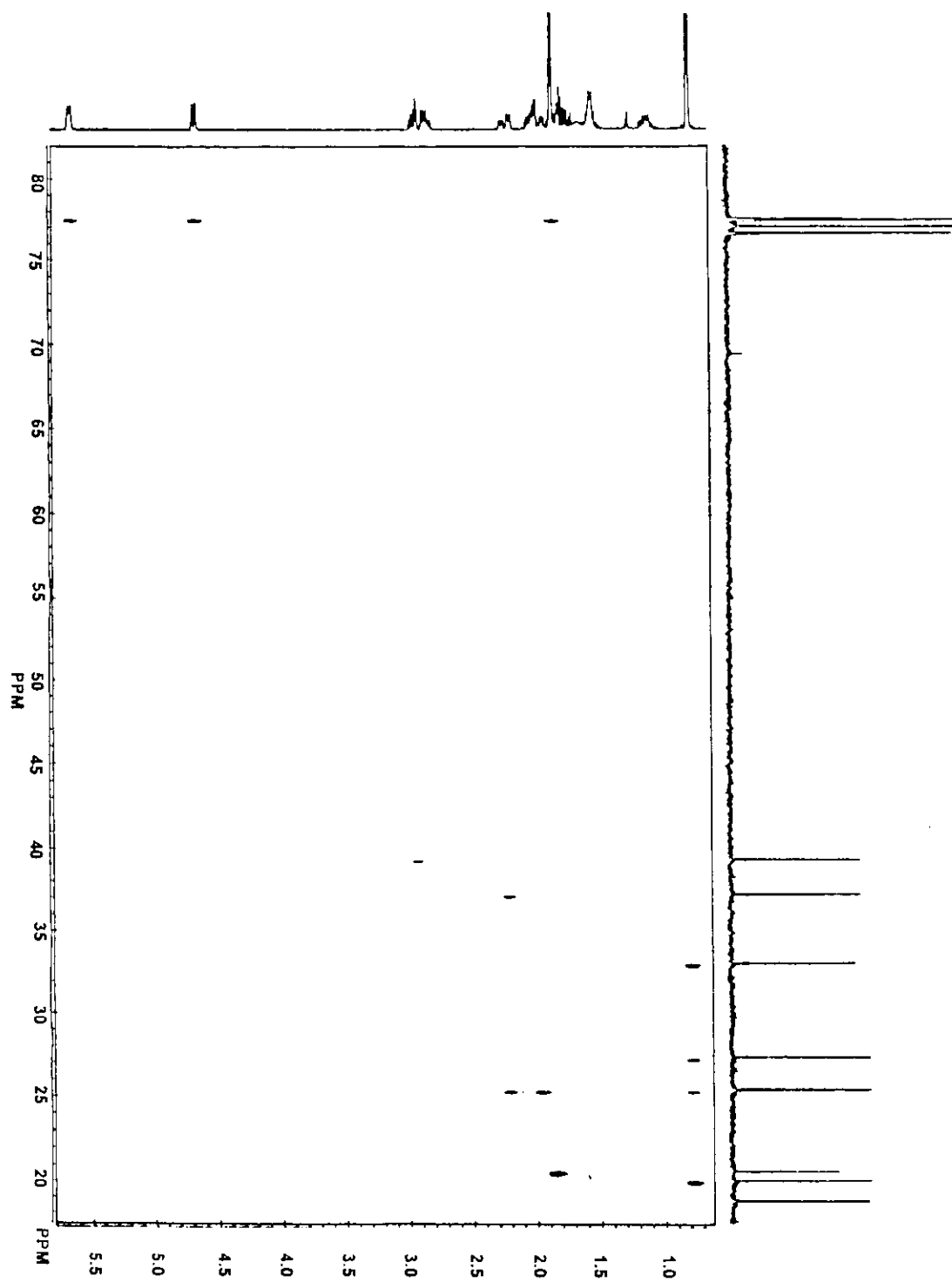
E-21.4: ESPECTRO DE RMN¹³C (75,5MHz,CDCl₃) DO COMPOSTO **21**



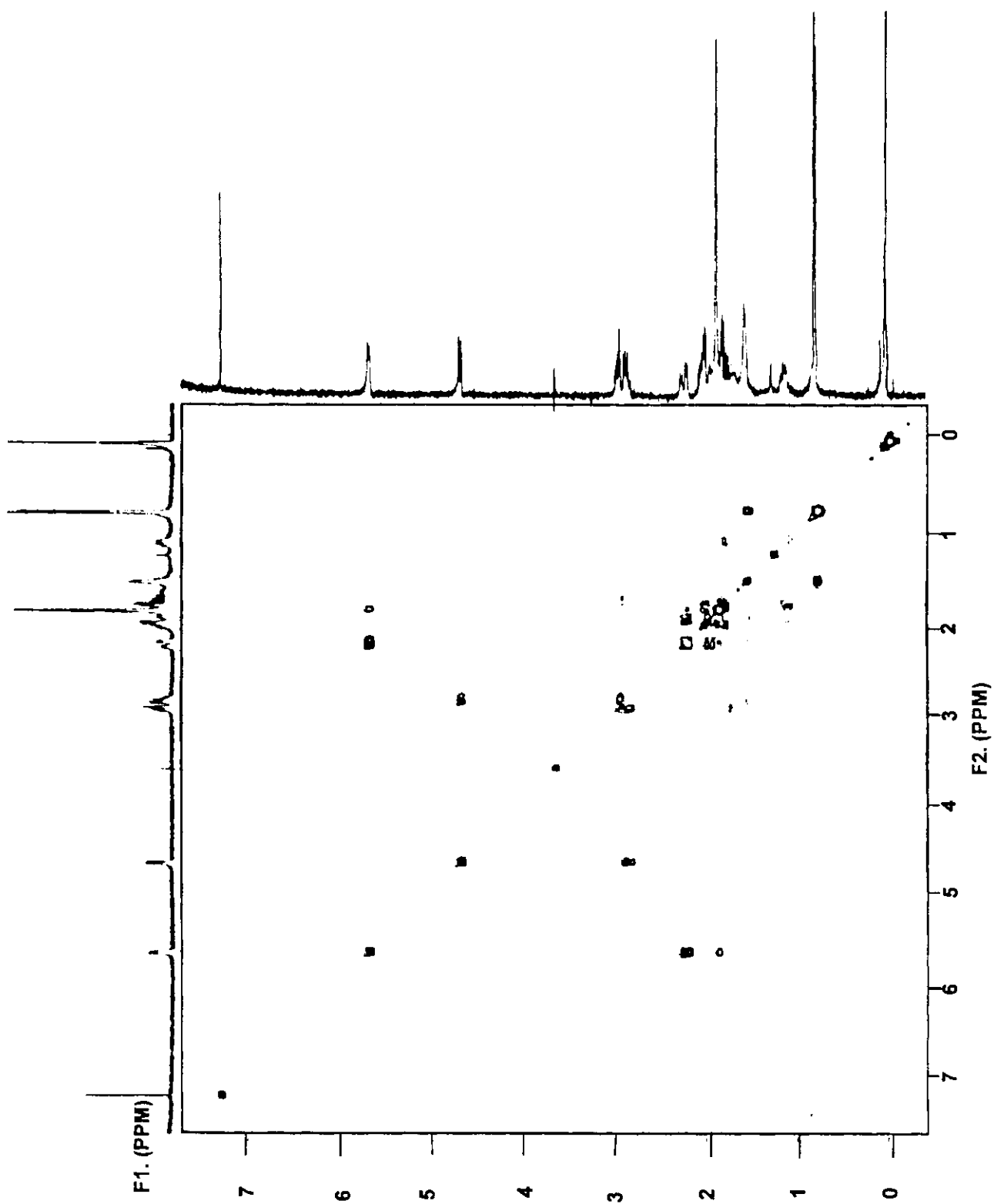
E-21.5: ESPECTRO HETCOR DO COMPOSTO 21



E-21.6: ESPECTRO DEPT DO COMPOSTO 21

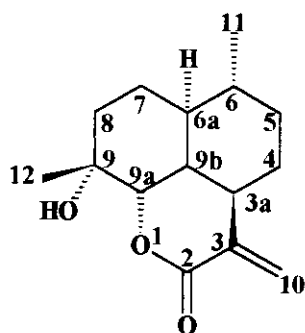


E-21.7: ESPECTRO COLOC DO COMPOSTO 21



E-21.8: ESPECTRO COSY DO COMPOSTO 21

Composto 12: Artemisinolactone-*QuinghaosuV*- decahidro-9-hidroxi-6,9-dimetil-3-metileno [3aR-(3a α ,6 α , 6a α , 9 α ,9a α ,9b α)] Nafto[1.8-bc] pirano-2(3H)-ona, /51/



pf. 145-146 (pentano)

Rf 0,27 (eluente CHCl₃/MeOH 1,5%)

IR 2239,3 (programação I)

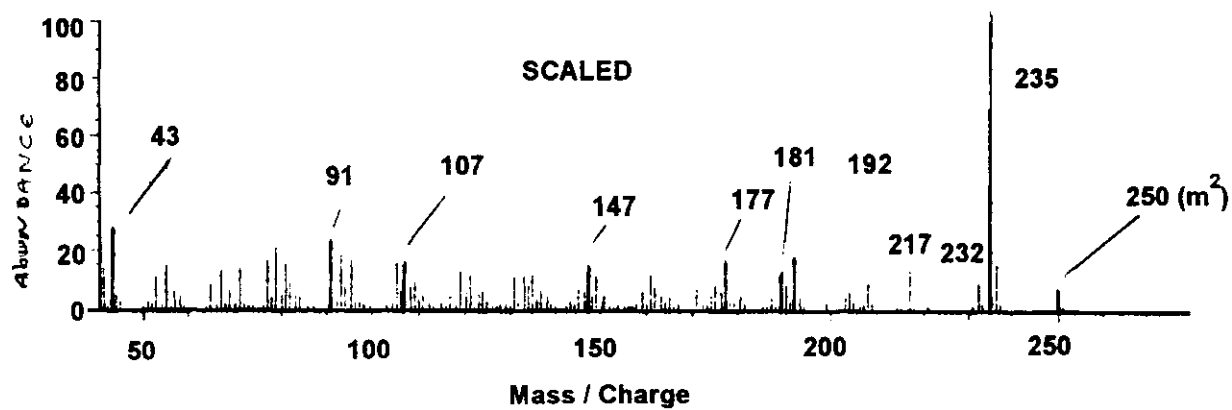
[α]_D = 11,76 (c.0,005, CHCl₃)

EM(70eV):m/z(%) 250(M⁺, 3), 217(8), 192(15), 177(15), 161(11), 147(13), 121(11), 91(30), 79(30), 55(34), 43(100)

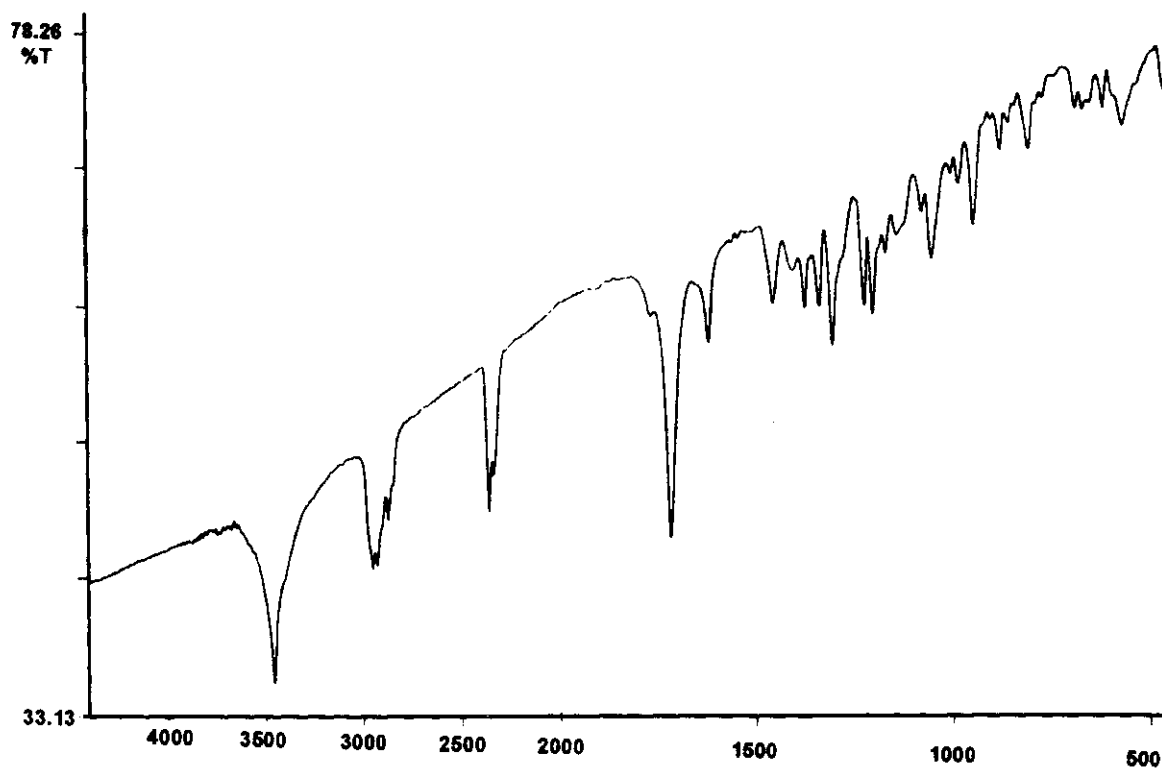
IVTF(KBr): ν (cm⁻¹) 3470(OH), 1722(C=O)

RMN¹H(300MHz,CDCl₃): δ 0,88(d, H₁₁, J=6Hz), 1,36(s,H₁₂), 2,36(ddd,H_{9b}, J_{9b,9a}=11,6Hz, J_{9b,3a}=J_{9b,6a}=4,4Hz), 2,66(ddd, H_{3a}, J_{3a,4ax}=11,9Hz, J_{3a,9b}=J_{3a,4e}=4,4Hz), 4,37(d, H_{9a}, J_{9b,9a}=11,6Hz), 1,43(m, H_{6a}), 1,48(m, H₆), 5,62(dd, H₁₀, J_{10,10'}=J_{10,4ax}=1,5Hz), 1,14 e 1,80(dddd, H₅, J_{5a,5e}=13,2Hz, J_{5e,6a}=J_{5e,4e}=J_{5e,4ax}=3,5Hz), 1,47 e 1,66 (m, H₈), 1,37 e 1,66 (m, H₇), 1,86 e 1,66 (m, H₄)

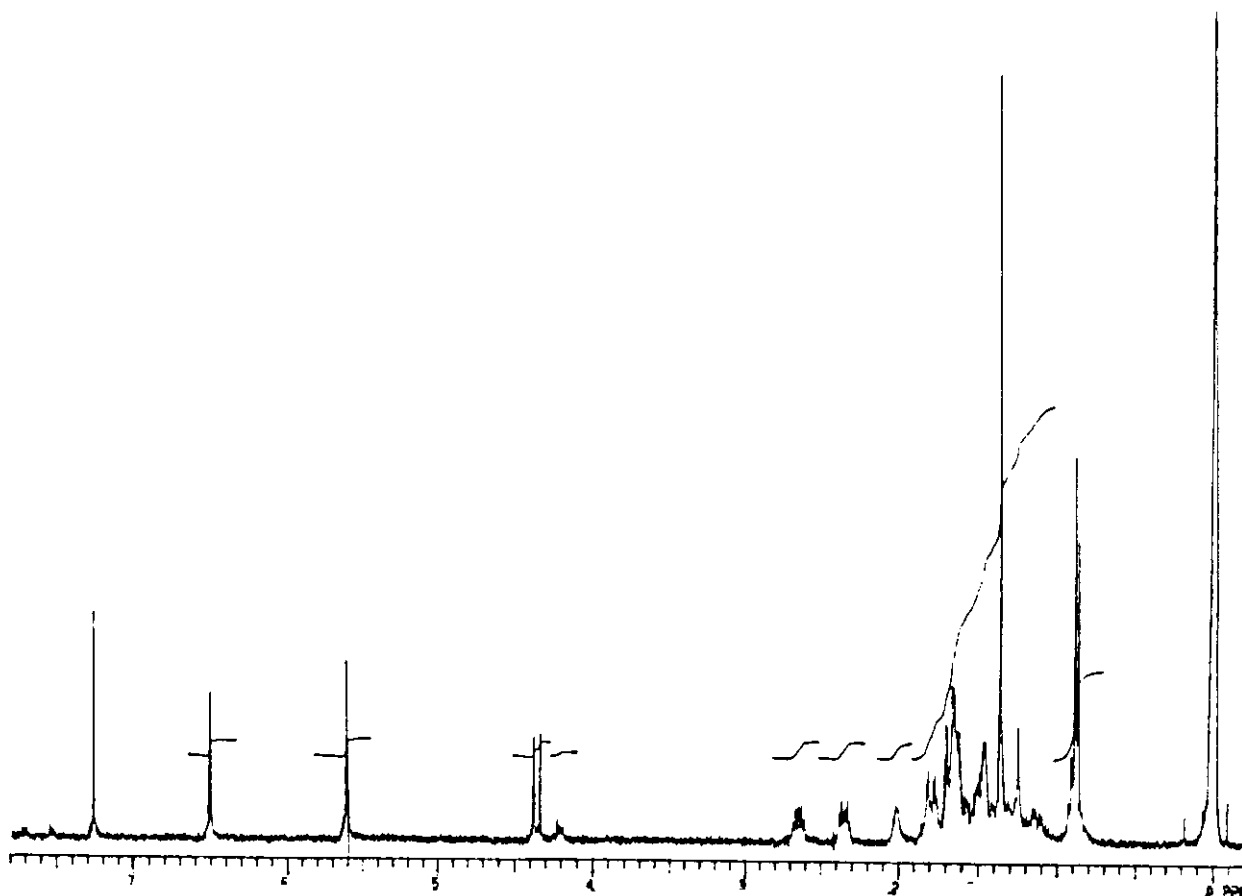
RMN¹³C(75,5MHz,CDCl₃): δ 166,2 (C₂), 139,4 (C₃), 70,3 (C₉), 80,1 (C_{9a}), 42,3(C_{6a}), 39,6 (C_{3a}), 35,9 (C_{9b}), 27,5 (C₆), 129,6 (C₁₀), 34,9 (C₅), 32,2 (C₈), 30,8 (C₇), 21,9 (C₄), 27,4 (C₁₂), 20,0 (C₁₁)



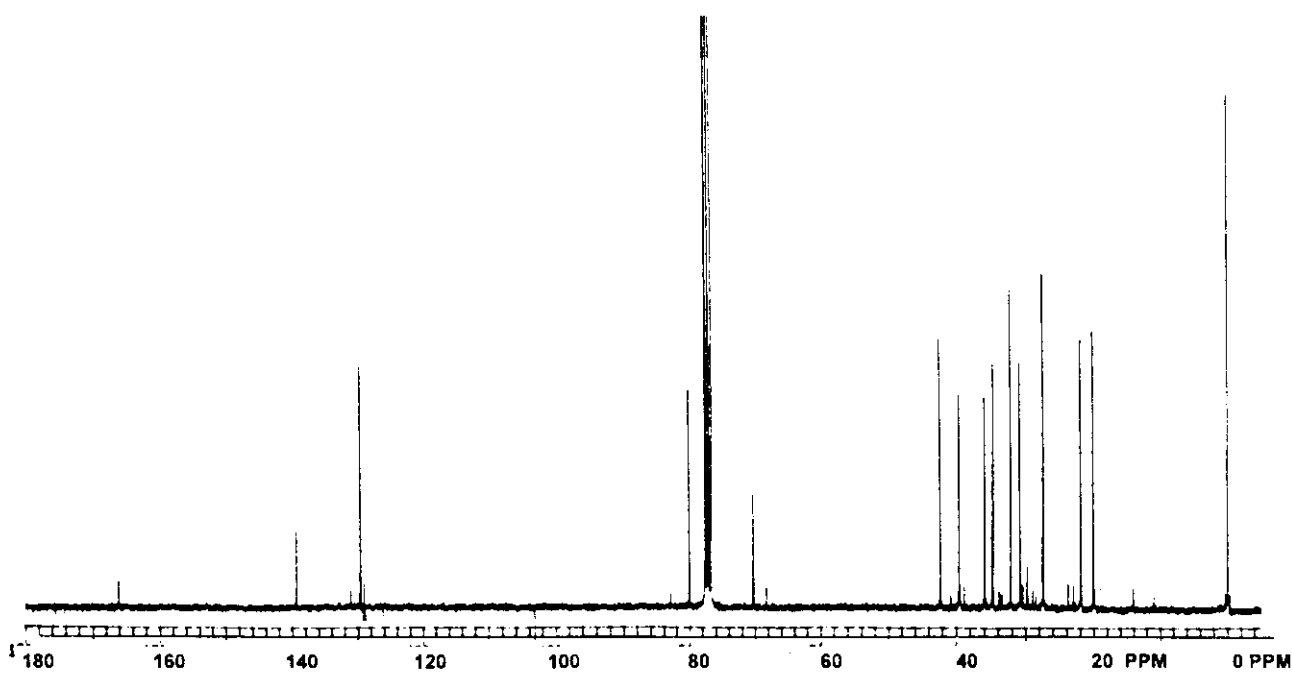
E-12.1: ESPECTRO DE MASSAS DA QUINGHAOSU V 12



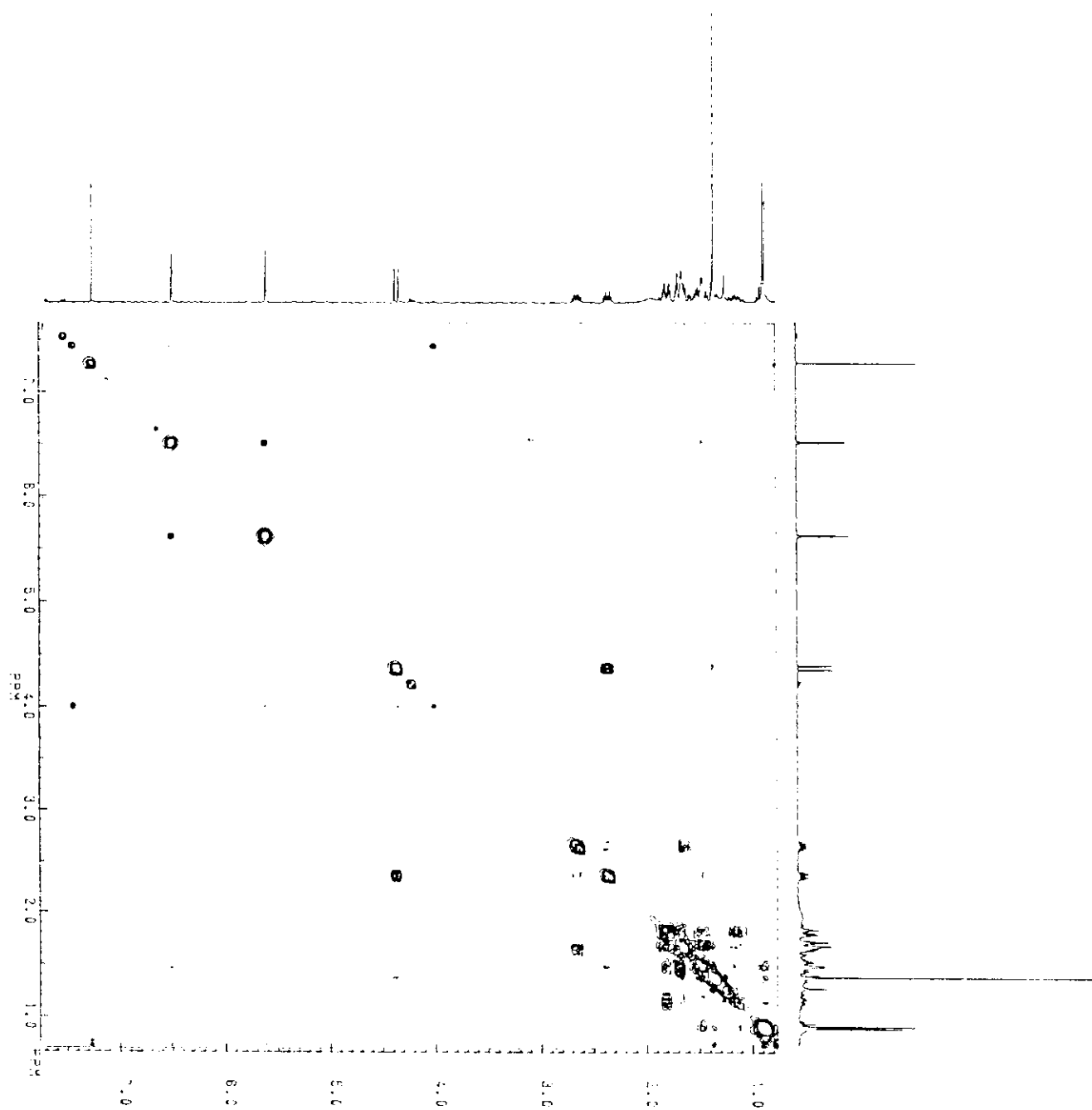
E-12.2: ESPECTRO NO INFRA-VERMELHO DO COMPOSTO 12



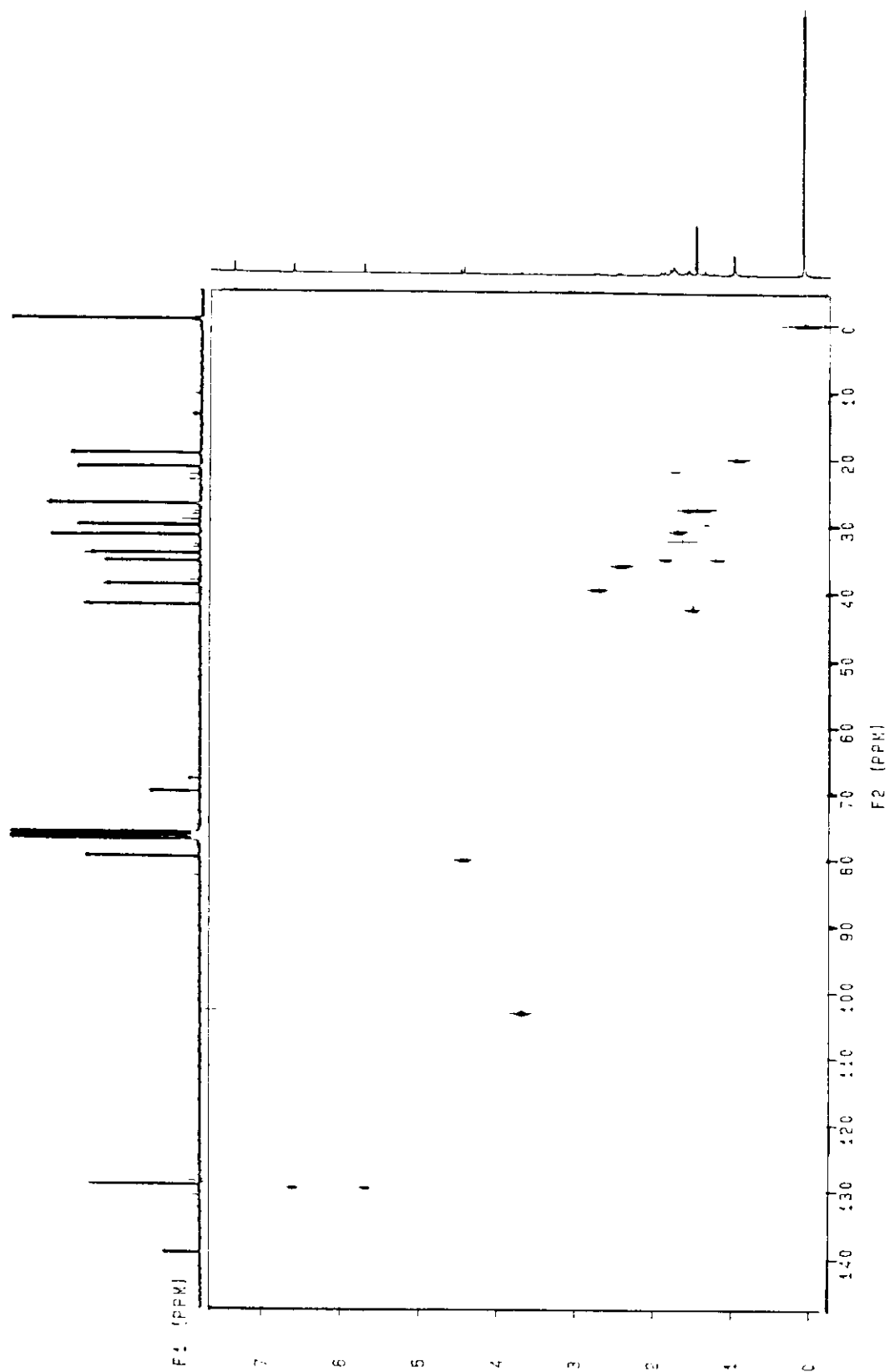
E-12.3: ESPECTRO DE RMN¹H (300MHz,CDCl₃) DO COMPOSTO 12



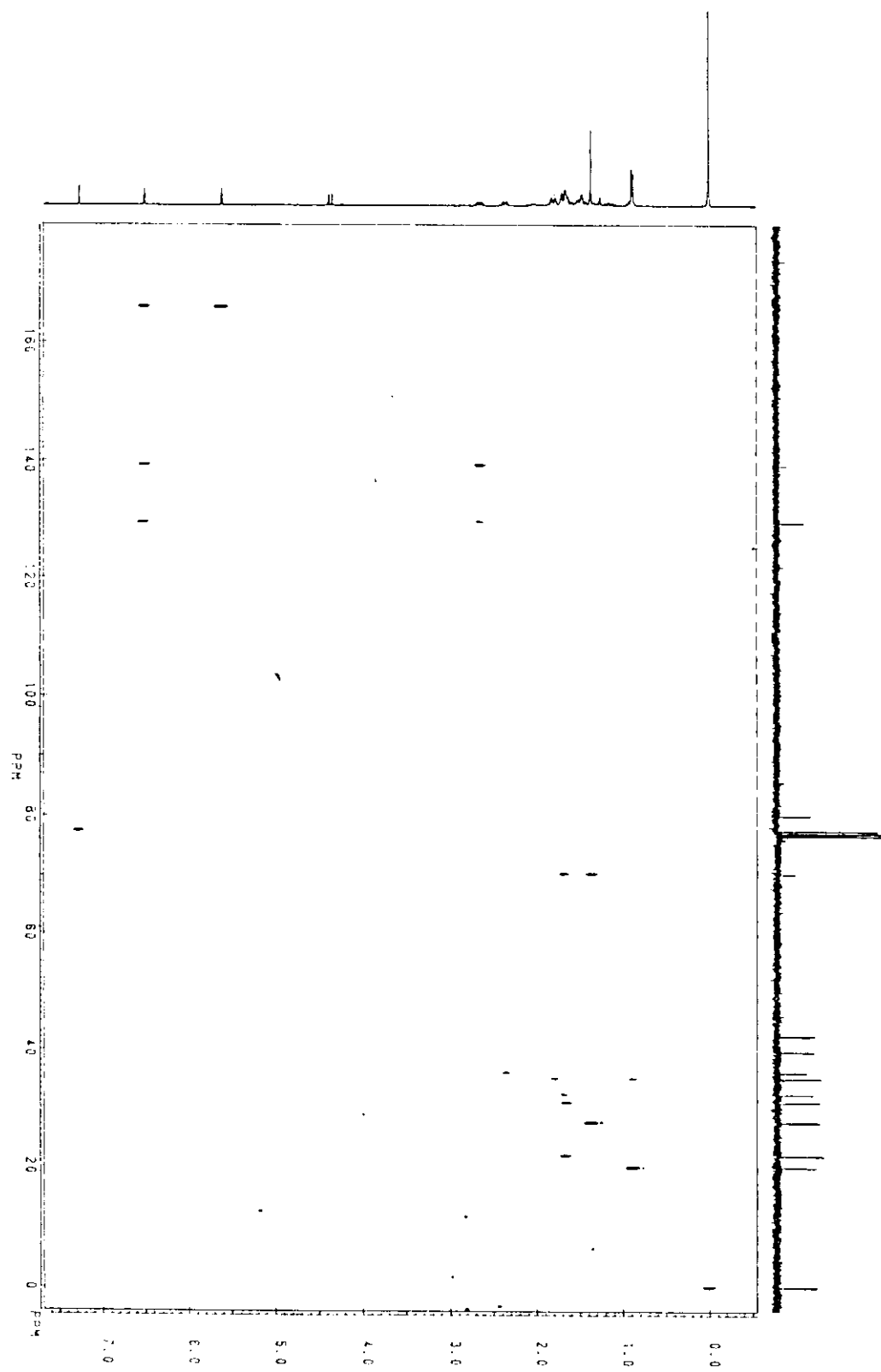
E-12.4: ESPECTRO DE RMN¹³C (75,5MHz,CDCl₃) DO COMPOSTO 12



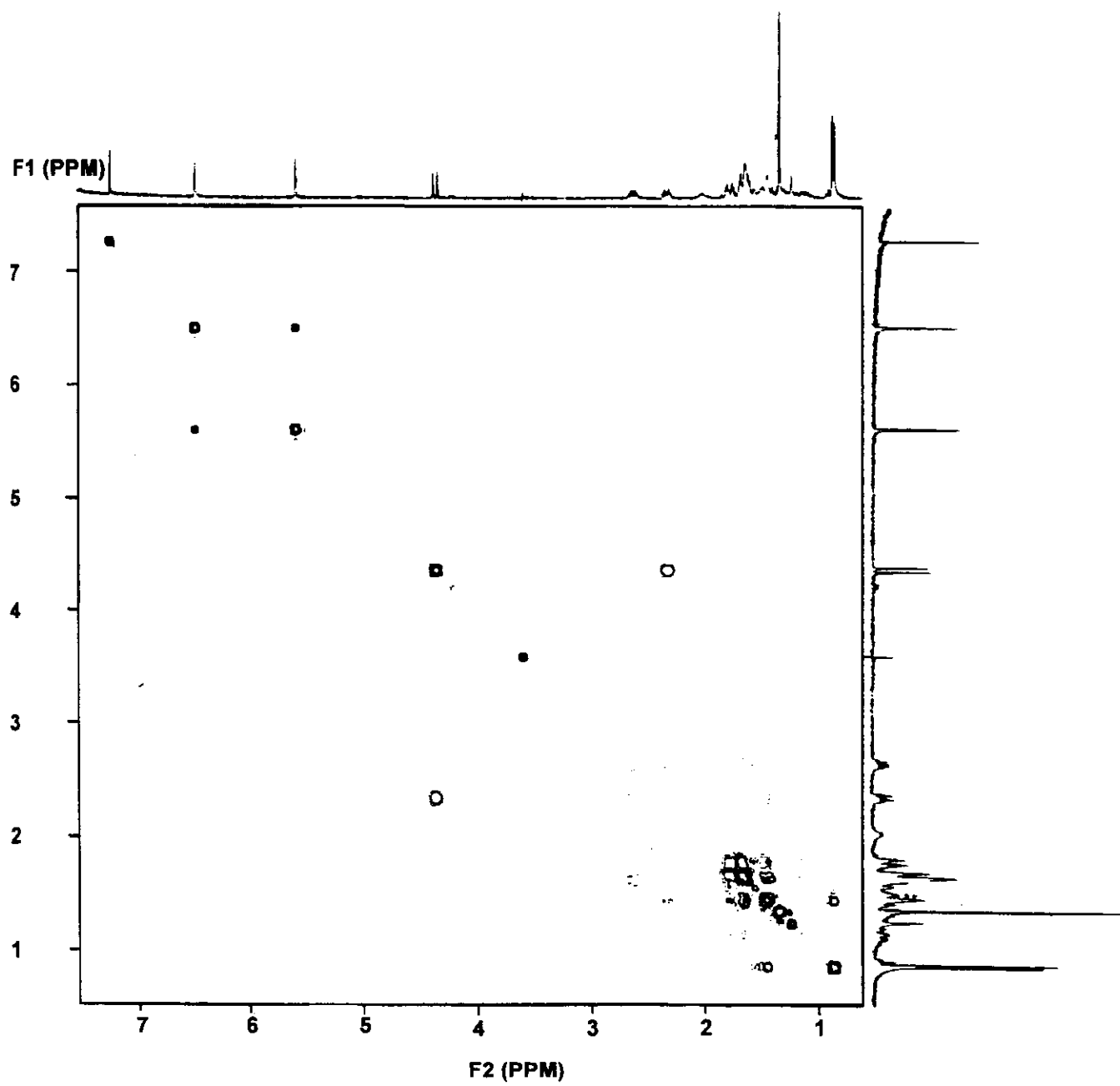
E-12.5: ESPECTRO NOESY DO COMPOSTO 22



E-12.6: ESPECTRO HETCOR DO COMPOSTO **12**

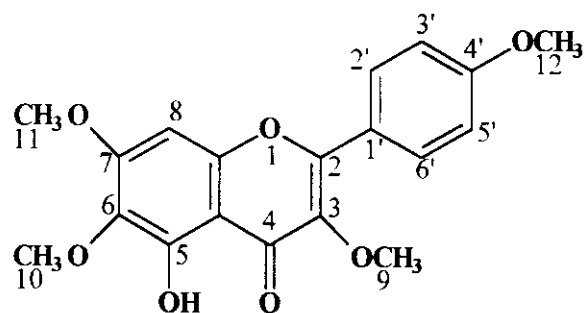


E-12.7: ESPECTRO COLOC DO COMPOSTO **12**



E-12.8: ESPECTRO COSY DO COMPOSTO 12

Composto 80: 5 - Hydroxy-3,6,7,4'-tetramethoxy flavone /66/

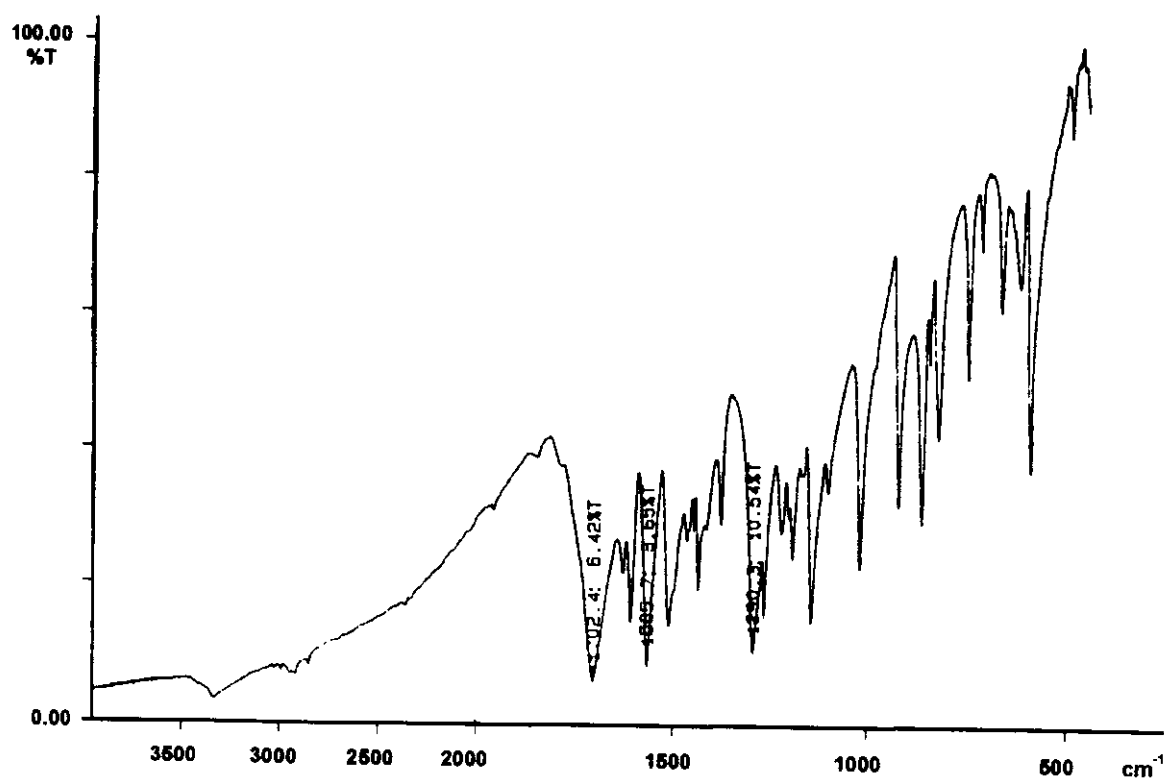


Rf 0,13 (eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1,5%)

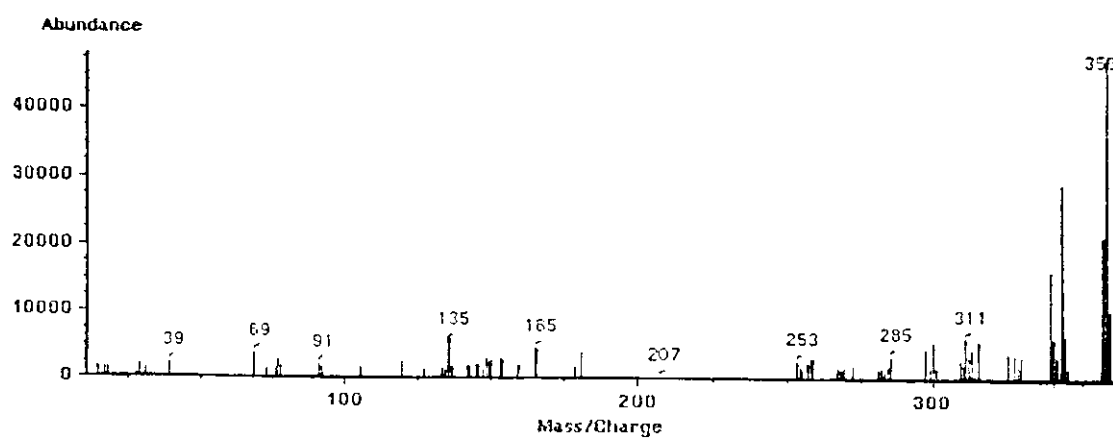
EM(70eV): m/z (%) 358(M^+ ,100), 343(60), 311(11), 285(6), 253(6), 165(9)

IVTF (KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3418(OH), 2930(CH), 1681(C=O)

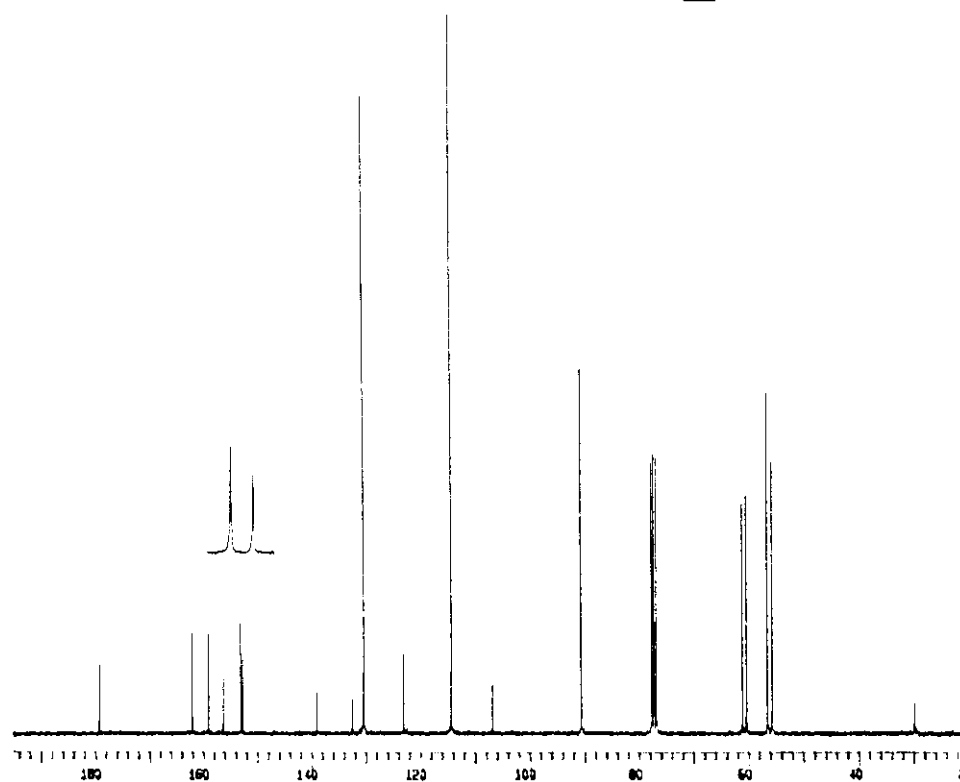
$\text{RMN}^1\text{H}(300\text{MHz}, \text{DMSO})$: δ 3,71-3,74(4s, $\text{H}_{9,10,11,12}$), 6,3(s, H_8), 6,8(d, $\text{H}_{2',6'}$, $J=10\text{Hz}$), 7,8(d, $\text{H}_{3',5'}$, $J=10\text{Hz}$)



E-80.1: ESPECTRO NO INFRA-VERMELHO DO COMPOSTO 80

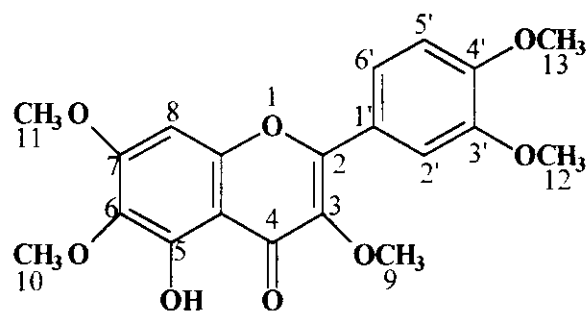


E-80.2: ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO **80**



E-80.3: ESPECTRO DE RMN^1H (300MHz, CDCl_3) DO COMPOSTO **80**

Composto 48: Artemetina- 5 Hydroxy-3,6,7,3',4'-pentamethoxy flavone /66/

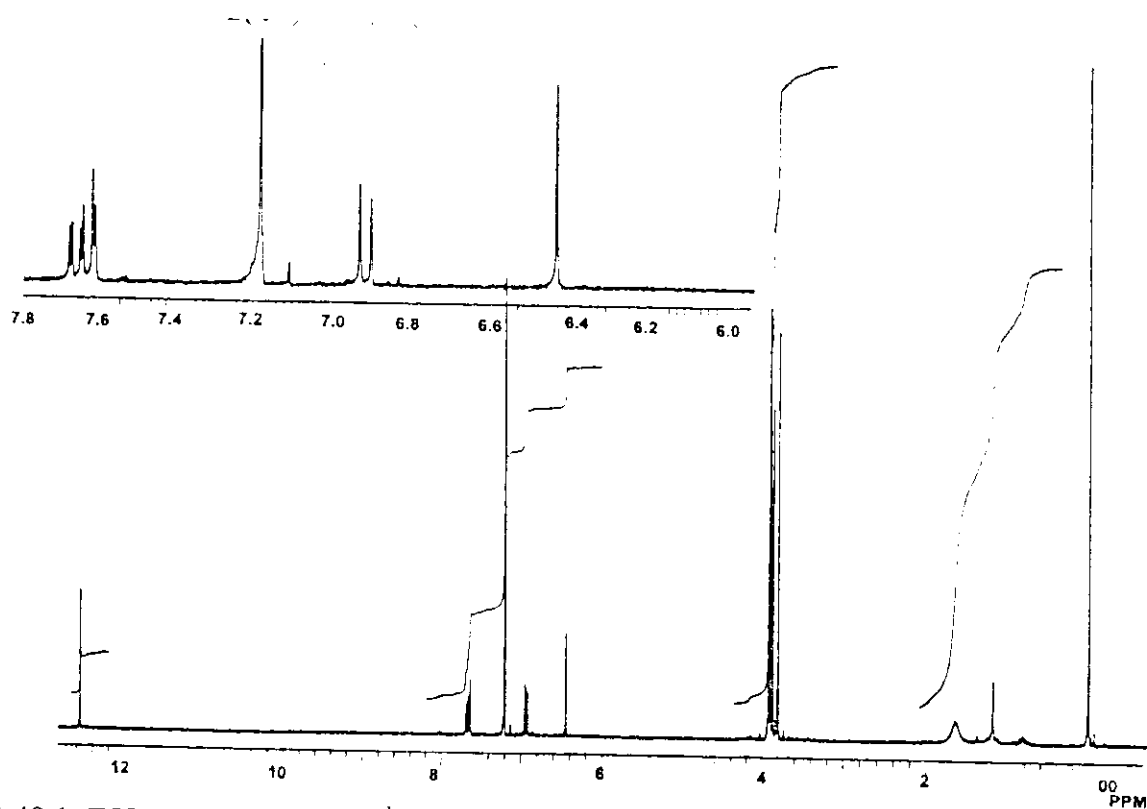


pf 154-155 (pentano)

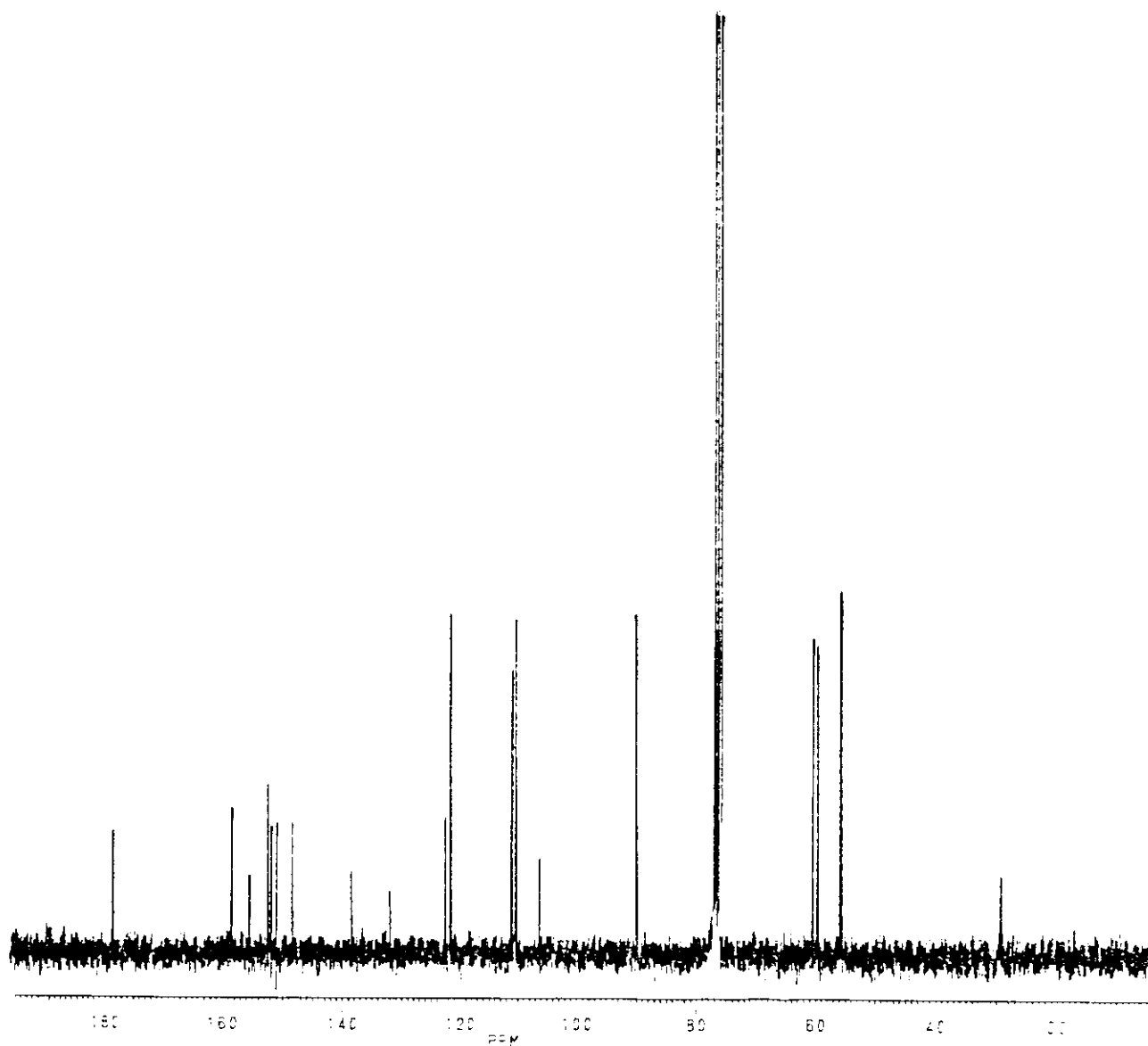
Rf 0,12 (eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1,5%)

RMN¹H(300MHz,CDCl₃): δ 3,87-3,98(s, $\text{H}_{9,10,11,12,13}$); δ 6,52(s, H_8); δ 7,00(d, H_2 , $J=10\text{Hz}$); δ 7,73(dd, $\text{H}_{5,6}$, $J=10\text{Hz}$)

RMN¹³C(75,5MHz,CDCl₃): δ 56,00; δ 56,09; δ 56,33; δ 60,19; δ 60,89($\text{C}_{9,10,11,12,13}$); δ 90,33(C_8); δ 110,85(C_5); δ 111,29(C_6); δ 122,14(C_2); δ 106,59(C_{4a}); δ 122,90($\text{C}_{1'}$); δ 132,29(C_3); δ 148,82(C_{8a}); δ 151,40(C_4); δ 152,76($\text{C}_{3'}$); δ 155,88(C_6); δ 158,76(C_7); δ 178,87(C_4)

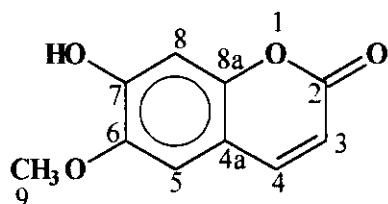


E-48.1: ESPECTRO DE RMN¹H (300 MHz, CDCl₃)



E-48.2: ESPECTRO DE RMN ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3) DO COMPOSTO **48**

Composto 87: Scopoletina- 7 Hidroxi-6-metoxi-2H-1-benzopirano-2-ona /67/



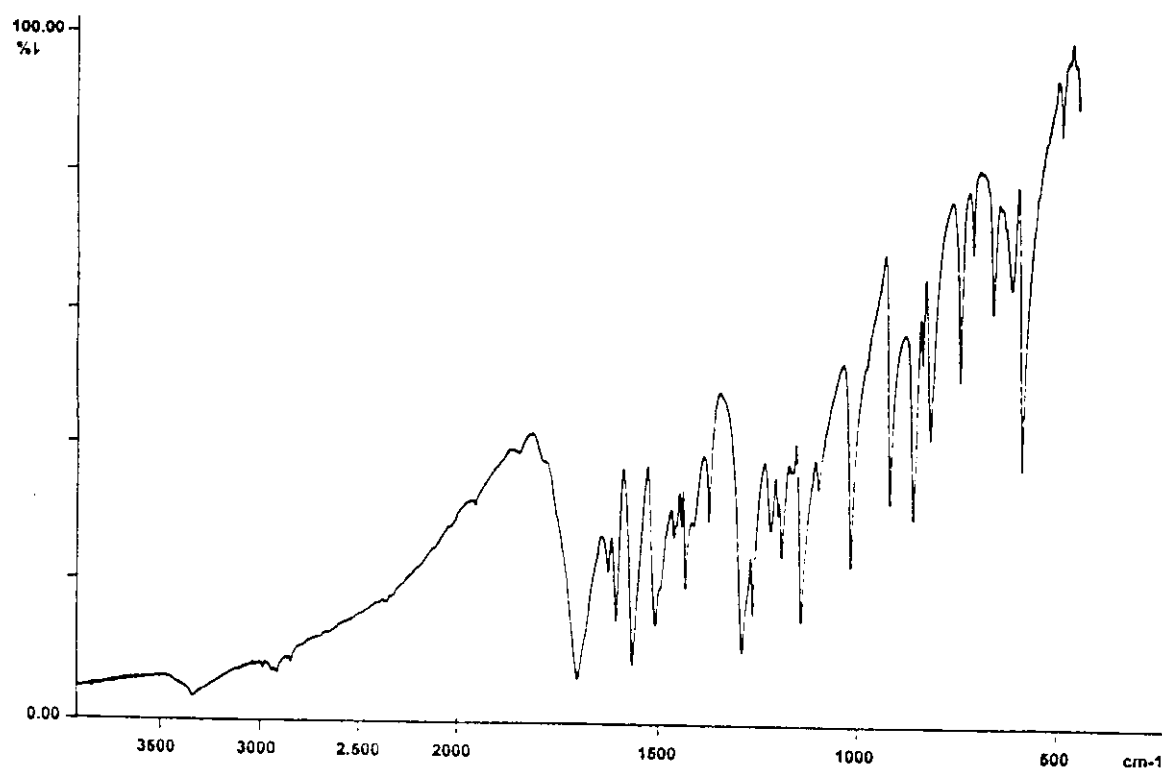
p.f 203-204

Rf 0,17(eluente CHCl₃/MeOH 1,5%)

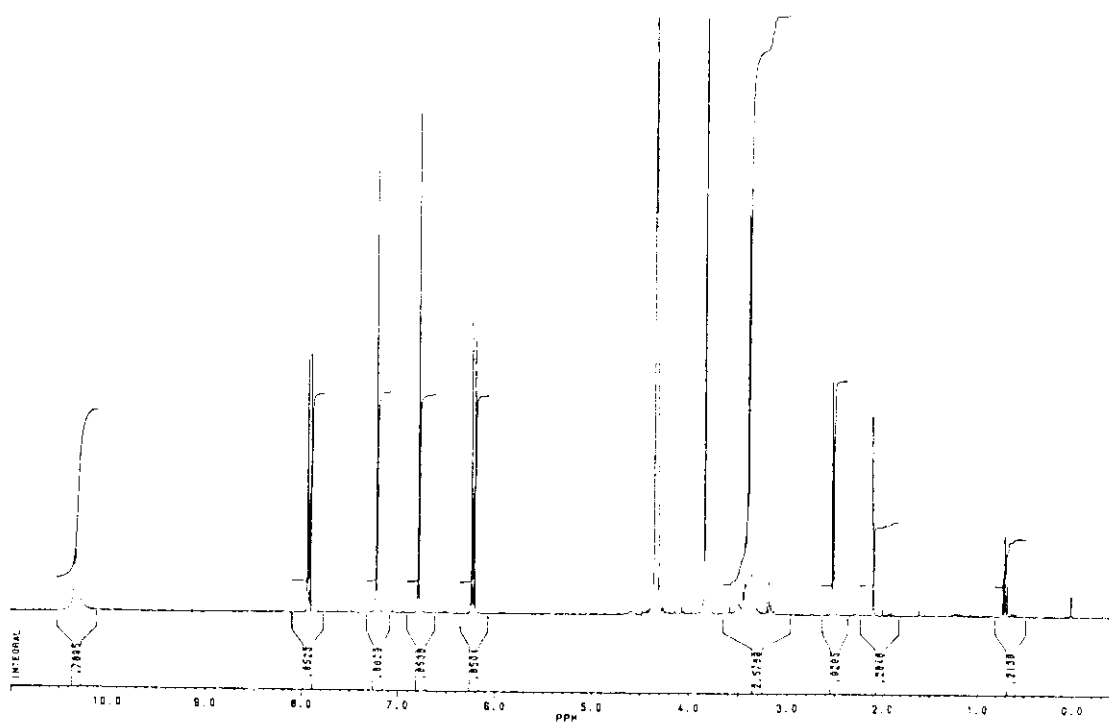
IVTF(KBr):v (cm⁻¹) 3300 (OH), 1700 (C=O), 1575 (C=C)

RMN¹H(300MHz, D₂O):δ 3,4(s,3H),6,20(d,H₉,J=10Hz), 6,77(s,H₅), 7,2(s,H₈), 7,9(d,H_{3,4}, J=10Hz)

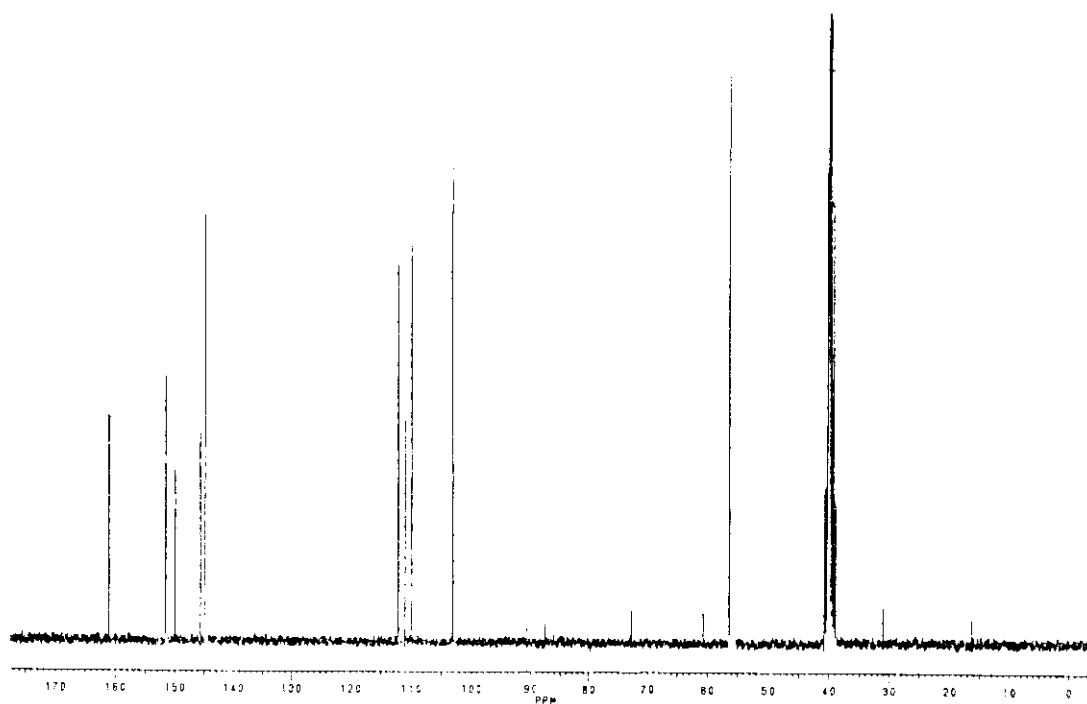
RMN¹³C (75,5MHz, D₂O):855,98(C₉), 102,76(C₈), 109,56(C₅), 110,53(C_{4A}), 111,68(C₃), 144,47(C₇), 145,25(C₄), 149,49(C_{8A}), 151,12(C₆), 160,67(C₂)



E-87.1: ESPECTRO INFRA-VERMELHO DA SCOPOLETINA 87



E-87.2: ESPECTRO DE RMN¹H (300MHz,D2O) DO COMPOSTO 87



E-87.3: ESPECTRO DE RMN¹³C (75,5MHz,D2O) DO COMPOSTO 87

Amostras de óleo essencial para estudo sazonal

As amostras de óleo essencial foram preparadas a partir de folhas frescas coletadas no período diurno no campo experimental do CPQBA, num lote destinado especificamente para este ensaio.

Duzentos gramas de planta fresca foram colocadas em um balão de fundo redondo de 250 ml. Adicionou-se 100 ml de água destilada sobre as folhas e montou-se um sistema de destilação no qual o balão coletor de 100 ml continha 20 ml de acetato de etila. Após uma hora de destilação, lavou-se o material recolhido com três porções de acetato de etila em funil de separação de 250 ml. A fase orgânica foi concentrada sob vácuo até eliminação total do solvente obtendo-se a fração de óleo essencial.

As amostras de óleo essencial foram analisadas por cromatografia (conforme descrito no material e métodos), e avaliado seu teor em relação a planta fresca (Tabela 15). Paralelamente foi determinado o teor de artemisinina em amostras de folhas coletadas no mesmo dia, porém secas em estufa à 40°C, conforme método descrito a seguir (Tabela 15).

Metodologia analítica semi-quantitativa para dosagem de artemisinina /68/

Preparação dos padrões

a) Soluções

Solução padrão de artemisinina:

Pesou-se cerca de 10,0 mg de artemisinina e diluiu-se em 50,0 ml de tolueno (1), em balão volumétrico. Retirou-se uma alíquota de 5,0 ml de (1) com pipeta volumétrica e diluiu-se com tolueno em balão volumétrico de 25 ml (0,04 µg/l)

b) Extrato

Pesou-se 50 mg de planta seca e pipetou-se 2 ml de tolueno, macerou-se em almofariz por 2 min. e recolheu-se o extrato em balão volumétrico de 2 ml utilizando micropipeta com algodão (como filtro). Fez-se o extrato em duplicata.

c) Aplicação

Utilizou-se cromatoplaça de sílica-gel 60 F₂₅₄ (Merck artigo 5554) dividindo ao meio (10 cm de altura).

As aplicações das soluções foram feitas com micro-seringa de 10 µl.

Padrões de artemisinina em µl	Valor correspondente em µg
2	0,08
4	0,16
6	0,24
10	0,4

Extratos

Aplicou-se 3,0 e 6,0 µl dos extratos (em duplicata)

As aplicações foram realizadas a 0,8 cm da borda inferior da cromatofolha, espaçadas de 0,7 cm entre elas. O diâmetro das aplicações não ultrapassou 0,5 cm.

d) Eluição

As cromatografias foram eluídas numa mistura de solventes de diclorometano/metanol 98,5%/1,5% (v/v).

e) Revelação

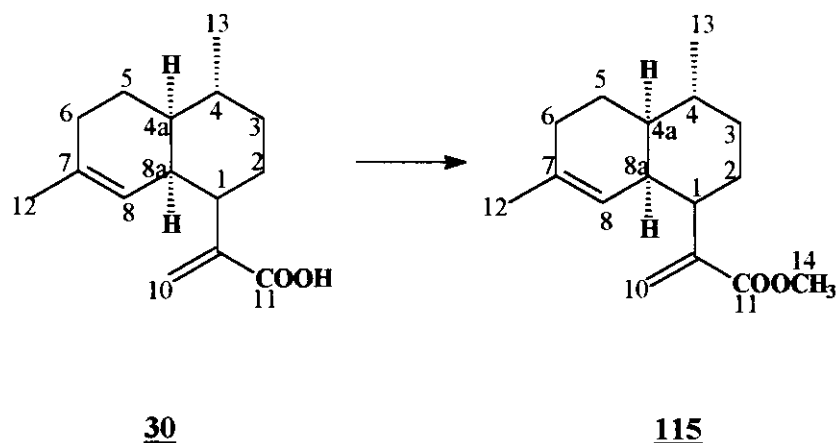
Colocou-se a cromatoplaça em uma placa de Petri contendo revelador de anisaldeído (50 ml de ácido acético glacial; 1 ml de ácido sulfúrico concentrado; 0,5 ml de anisaldeído), por 10s, aqueceu-se em chapa e observou-se a artemisinina com coloração amarela passando a lilás.

Tabela 15: Teor de Óleo Essencial e Teor de Artemisinina 13

Amostra	% óleo	% artemisinina <u>13</u>
1	0,04	0,24
2	0,10	0,16
3	0,13	0,32
4	0,13	0,40
5	0,08	0,40
6	0,07	0,39
7	0,06	0,40
8	0,06	0,20
9	0,09	0,40
10	0,22	0,20
11	0,09	0,40
12	0,03	0,20
13	0,09	0,08
14	0,14	0,08
15	0,17	0,03
16	0,21	0,03
17	0,34	0,02

Transformações químicas para obtenção de amorfanos

1) Metilação do ácido artemisinínico /69/



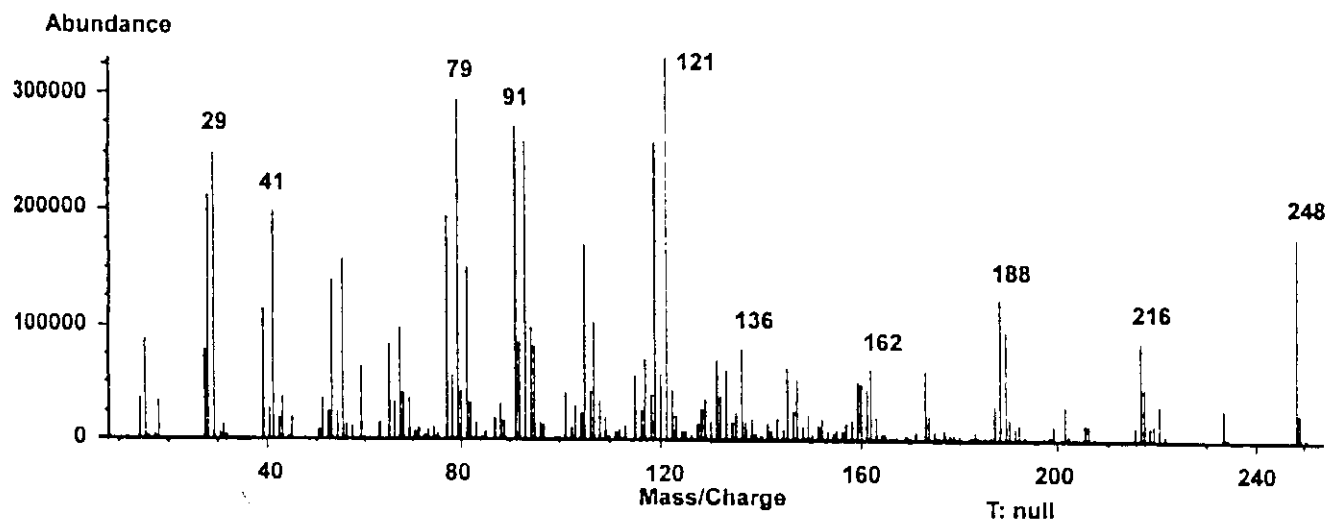
A uma solução de ácido artemisinínico **30** (1g, 4,03 mmol) dissolvido em éter etílico (100 ml) à 0°C adicionou-se uma solução de diazometano gota a gota até o desaparecimento da coloração amarela. Constatou-se a formação do produto por TLC (eluente: hexano/acetato de etila 35%) com $R_f = 0,89$. Evaporou-se o solvente orgânico obtendo-se 1,06 g (100% rend) de um óleo amarelado. No GC/MS utilizou-se a programação 2 observando-se um pico em 16,20 min.

R_f 0,89 (eluente hexano/acetato de etila 35%)

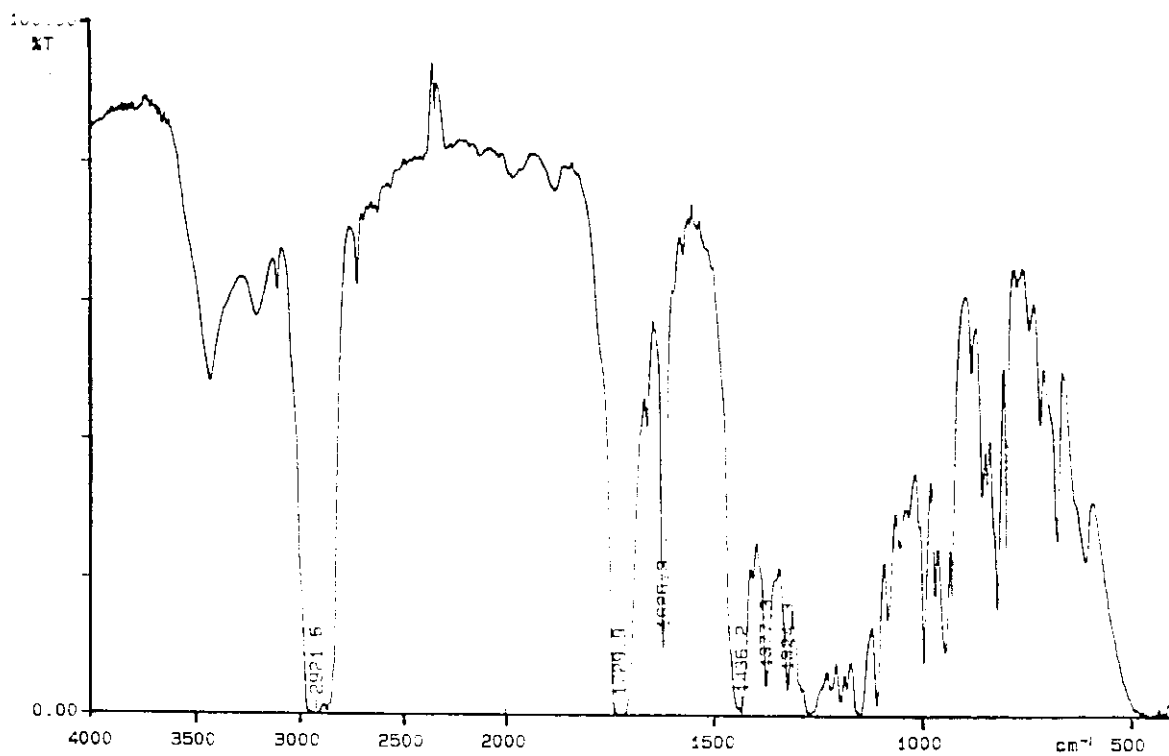
EM(70eV):m/z(%)248(19), 216(14), 188(17,5),162(16),136(24), 121(100), 93(63), 79(35).

IVTF(KBr):v(cm⁻¹)2921,6(CH);1729,9(C=O);1625,3(C=CH₂);1436,2(C=C)

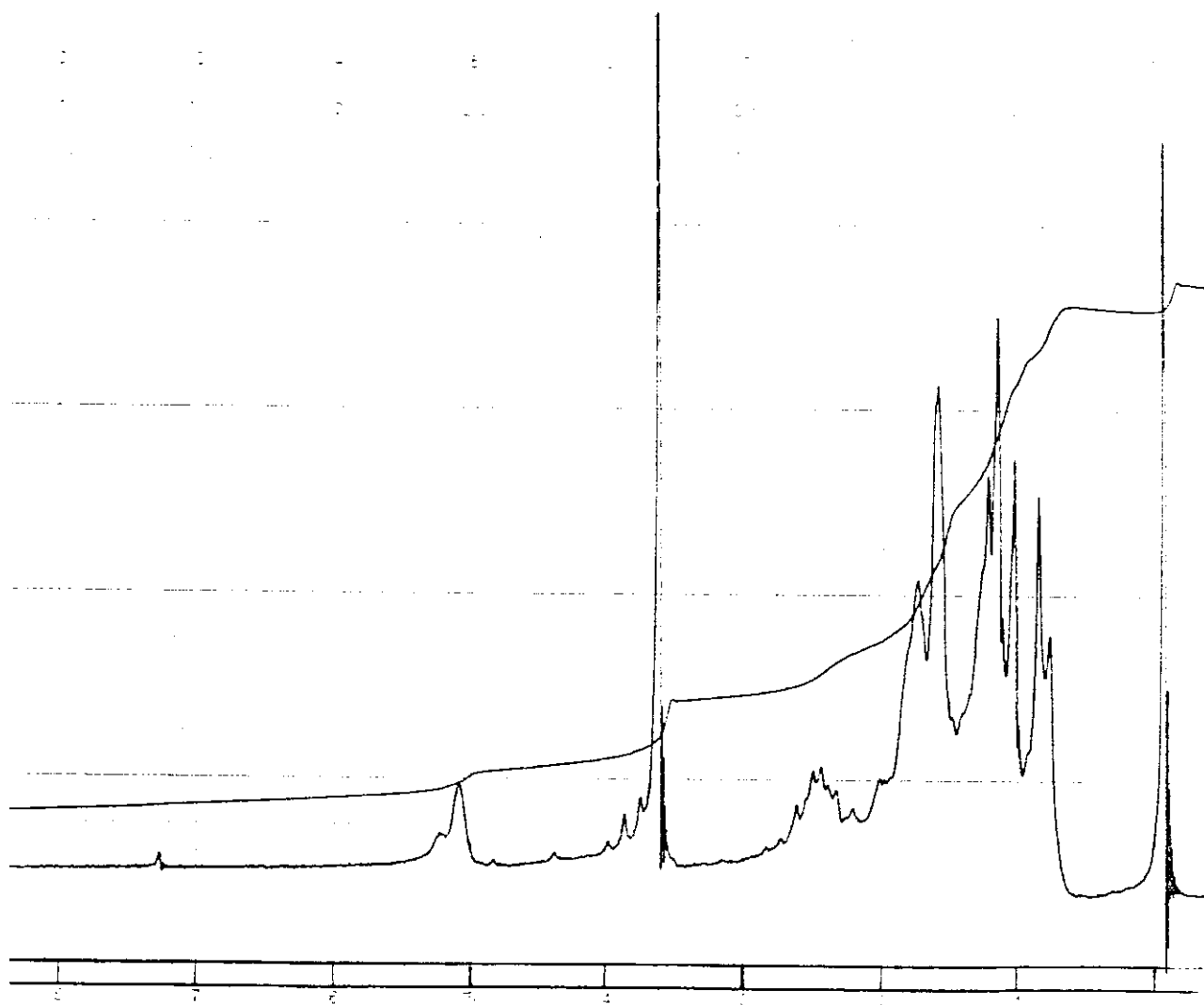
RMN¹H(300MHz, CDCl₃): δ 0,82(d, H₁₃, J=0,08); 1,62(s, H₁₂); 3,7(s, H₁₄); 4,92(sl, H₈); 5,4 e 6,3(s, H₁₀)



E-115.1: ESPECTRO DE MASSAS DA COMPOSTO 115

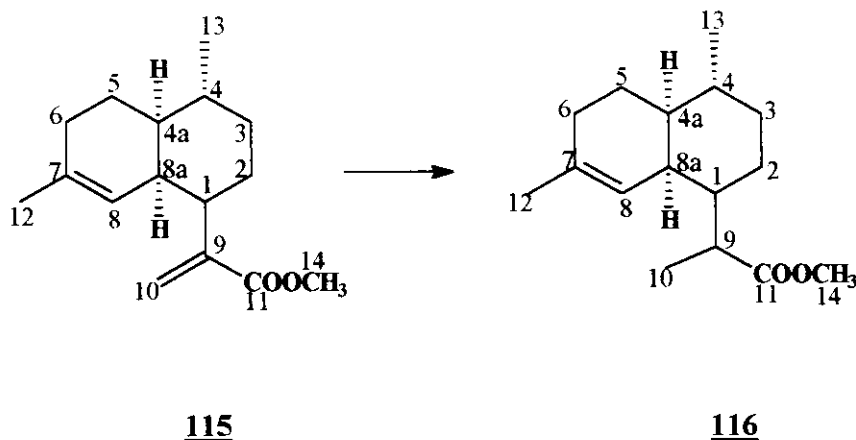


E-115.2: ESPECTRO NO INFRA-VERMELHO DO COMPOSTO 115



E-115.3: ESPECTRO DE RMN^1H (60MHz, CDCl_3) COMPOSTO **115**

2) Redução da dupla terminal /70/



Dissolveu-se o composto **115** (1g; 4,0 mmol) em metanol tratado (50 ml). Abaixou-se a temperatura da mistura até 0°C e adicionou-se NiCl₂ (35,4 mg; 2,73 mmol). Aos poucos adicionou-se NaBH₄ (478,35 mg; 9,9 mmol) e deixou-se reagindo durante 8 horas a temperatura ambiente. Destruíu-se o meio de reação utilizando HCl 1N (até ficar esbranquiçado) e extraiu-se com éter etílico (3 x 50 ml). A fração orgânica foi seca sobre Na₂SO₄ anidro, filtrado e evaporado fornecendo 806 mg de um óleo (80% rendimento). A formação do composto **116** foi confirmado por CG/MS, utilizando a programação 2, observou-se dois picos com tempo de retenção 15,4 e 16,3 com a mesma fragmentação (numa proporção de 0,77:1 respectivamente):

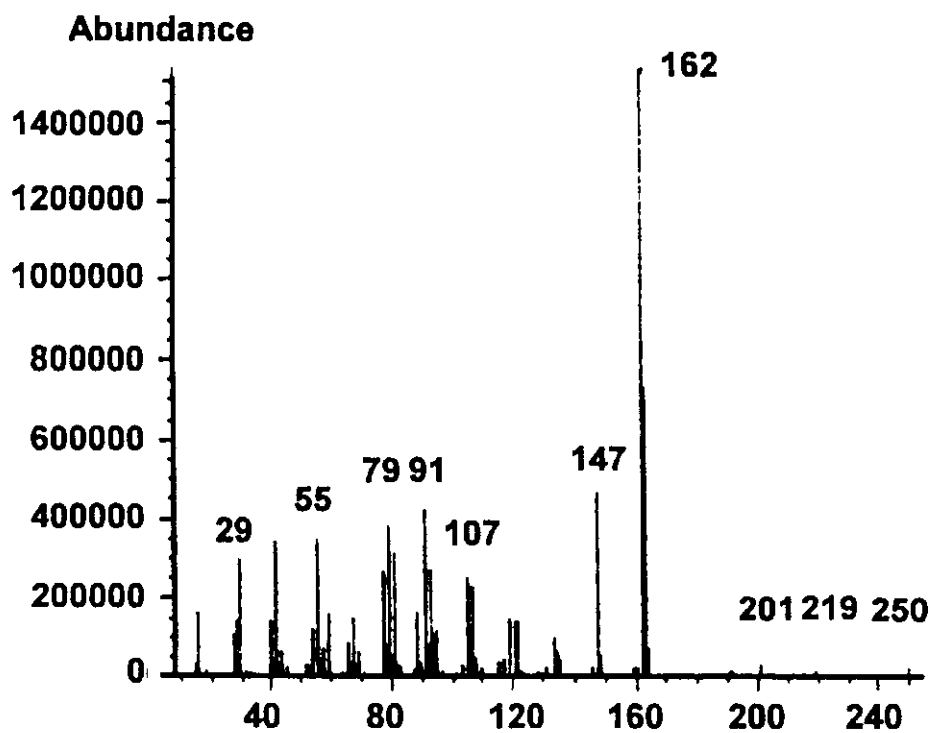
Rf 0,87 (eluente Hexano/acetato de etila 35%)

IR 2026,0 e 2059,9 (diastereoisômeros R e S sem o grupo éster)

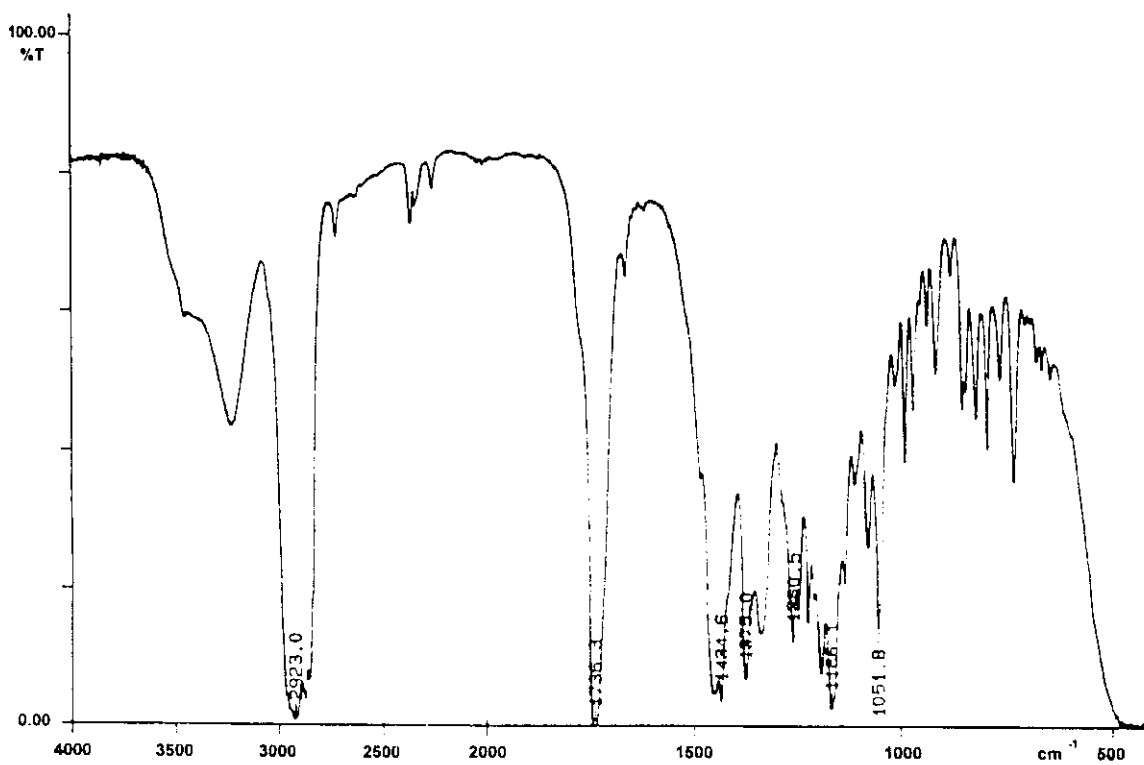
EM(70eV):m/z(%) 250(1.5), 162(100), 147(18), 121(18),91(15), 79(17).

IVTF(KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$ 2923(C-H), 1736.3(C=O), 1434,6(C=C); 1375(C-O); 1260(C-O); 1051.8(C-O)

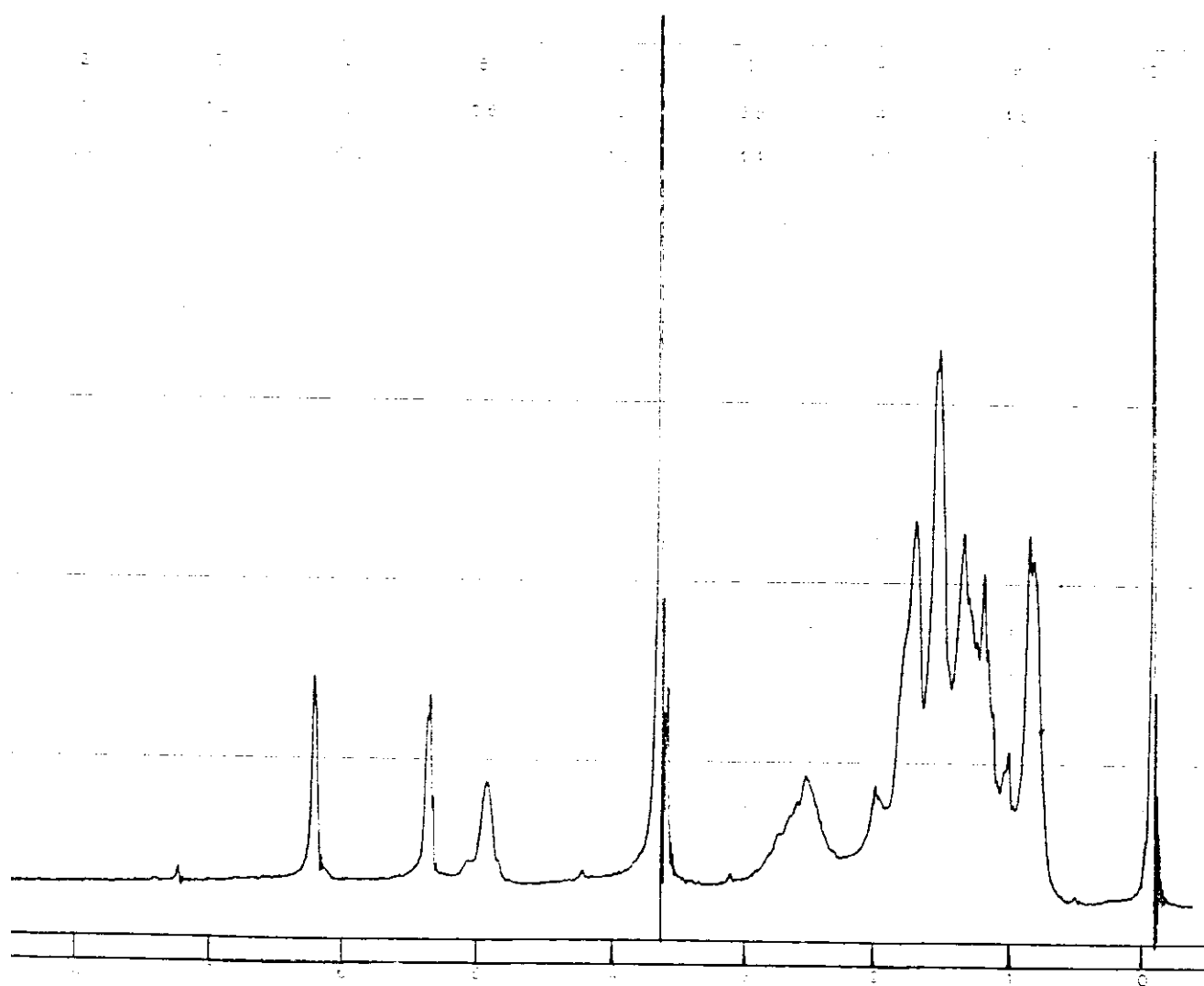
RMN¹H(300MHz,CDCl₃): δ 0,82(d, H₁₃, J=0,08); 1,1(d, H₁₁₀, J=0,08); 1,62(s, H₁₂); 3,6(s, H₁₄)



E-116.1: ESPECTRO DE MASSAS DA COMPOSTO **116**

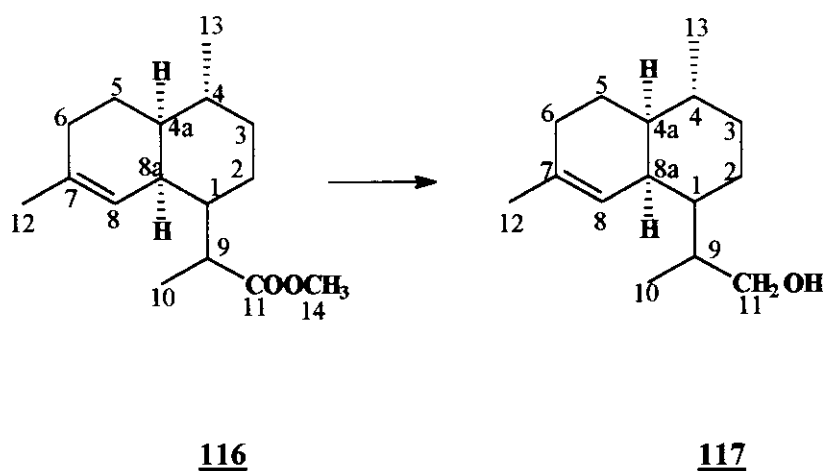


E-116.2: ESPECTRO NO INFRA-VERMELHO DO COMPOSTO **116**



E-116.3: ESPECTRO DE RMN ^1H (60MHz, CDCl_3) COMPOSTO **116**

3) Redução do éster **116** /71/



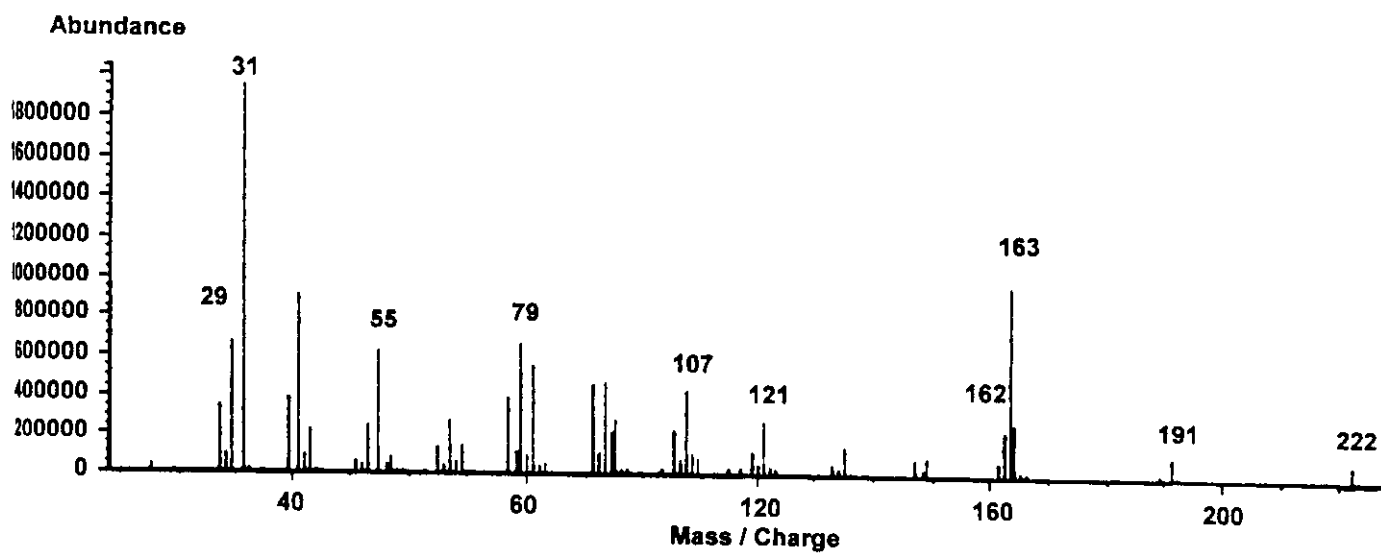
Ao composto **116** (800 mg, 3,2 mmol) dissolvido em THF tratado, sob atmosfera de N₂ a 0°C adicionou-se LiAlH₄ (644 mg, 16,9 mmol) lentamente durante uma hora. Após deixou-se reagindo durante aproximadamente quatro horas a temperatura ambiente. Ao final deste tempo destruiu-se o LiAlH₄ utilizando inicialmente etanol e após água. Extraiu-se a reação com éter etílico, secou-se sobre NaSO₄ anidro e evaporou-se o solvente obtendo-se 710 mg do composto **117** (100% de rendimento) sob forma de óleo. Confirmou-se a formação do produto por CG/MS utilizando a programação 2, observando-se um pico em 16,9 min.

RF 0,21 (eluente Hexano/acetato de etila 35%)

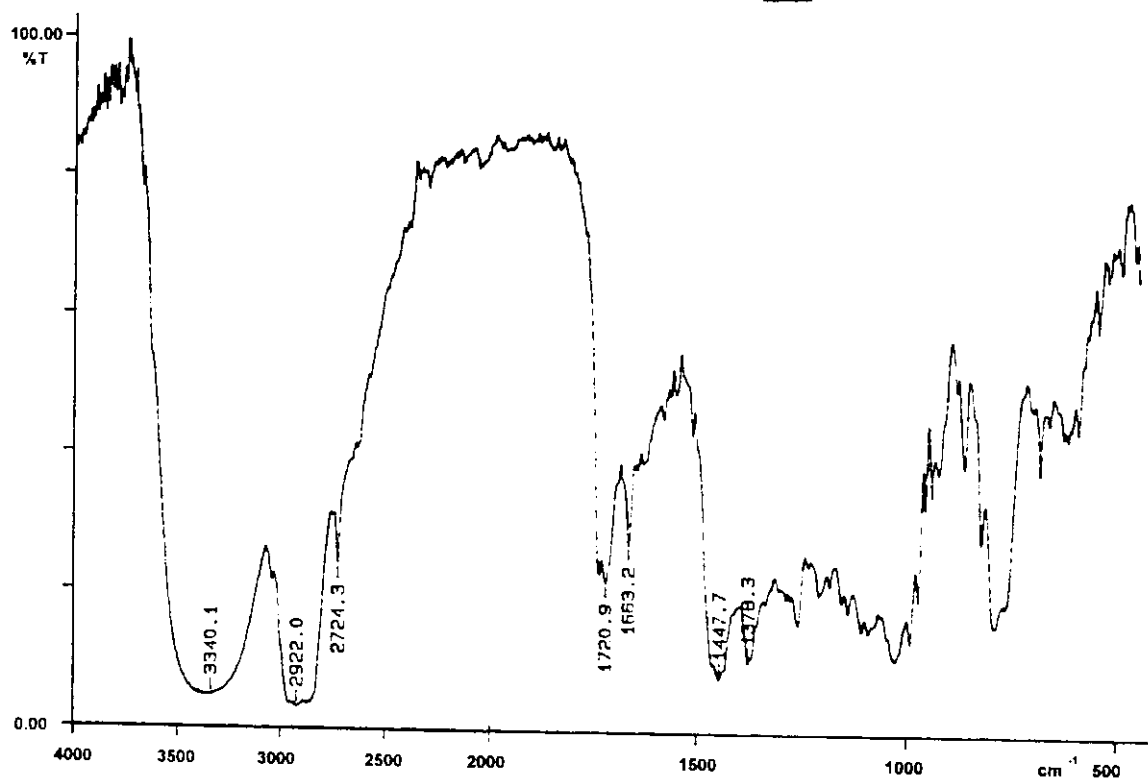
EM(70eV):m/z(%)222(6.8), 191(11), 163(100), 149(9), 121(13), 107(45), 79(64).

IVTF(KBr):v(cm⁻¹)3360,5(OH);2920,2868,4(C-H);1448(C=C);1238(C-O);1027,7(C-O)

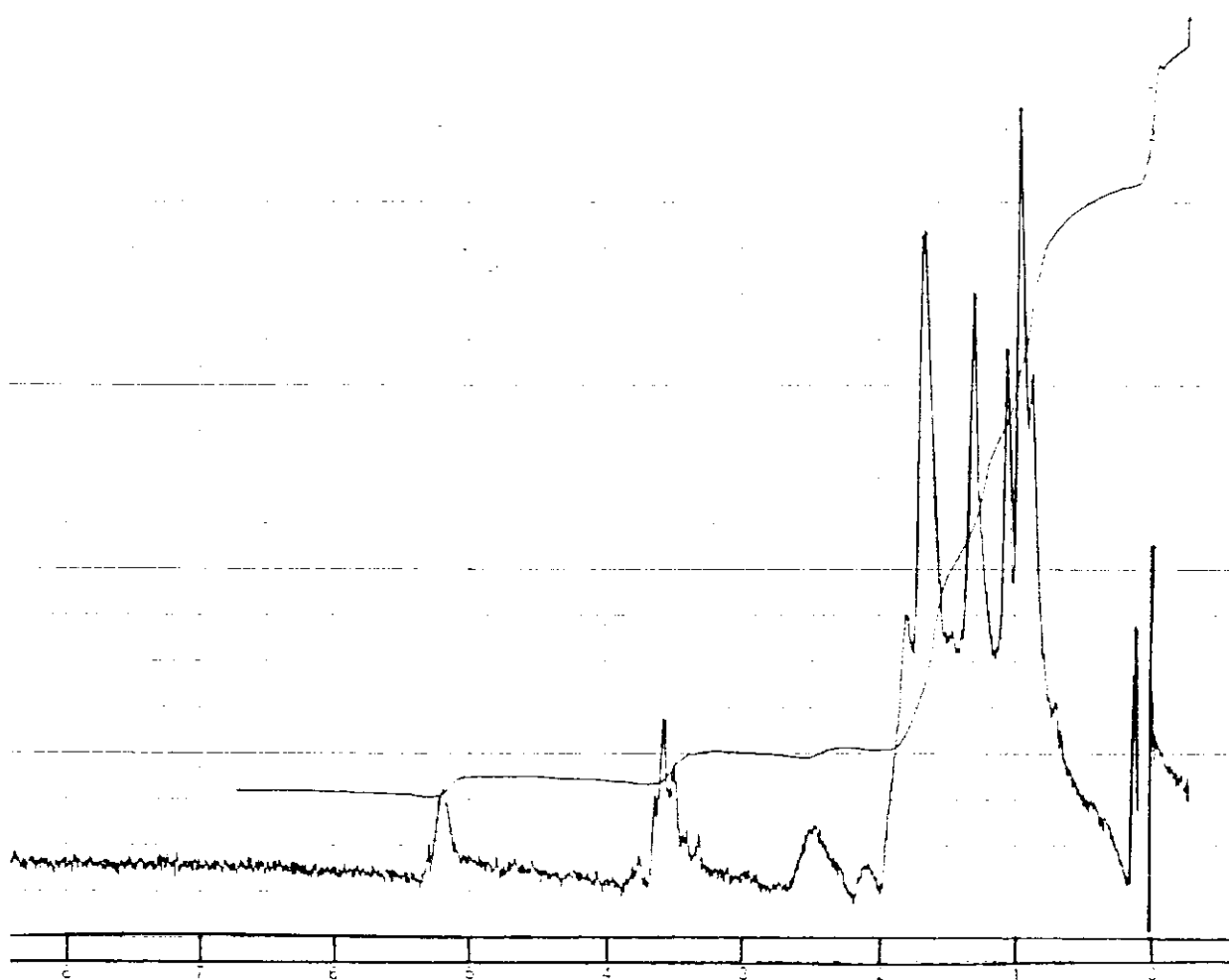
RMN¹H(300MHz,CDCl₃):δ0,80(d,H₁₃,J=0,08);0,98(d,H₁₀,J=0,08);1,63(s,H₁₂);3,55 e 3,65(m,H₁₁)



E-117.1: ESPECTRO DE MASSAS DA COMPOSTO 117

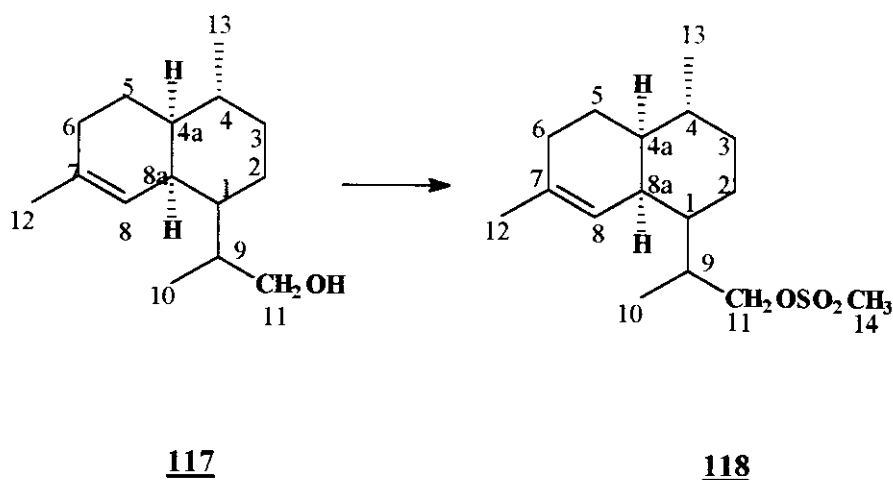


E-117.2: ESPECTRO NO INFRA-VERMELHO DO COMPOSTO 117



E-117.3: ESPECTRO DE RMN ^1H (60MHz, CDCl_3) COMPOSTO **117**

4) Reação de mesilação /72/



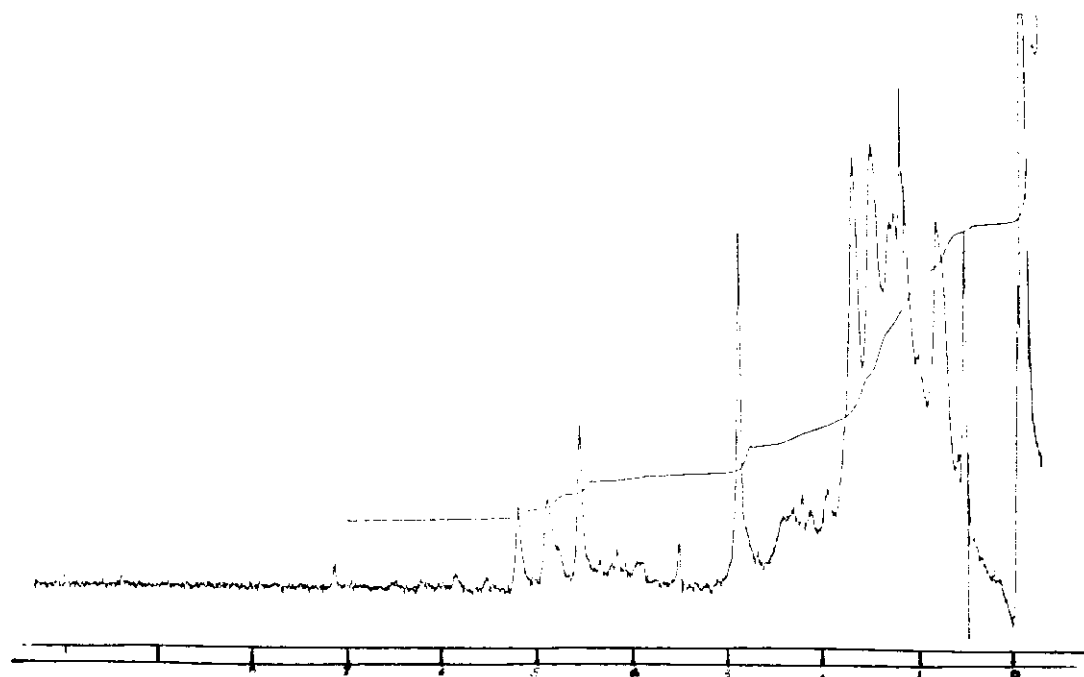
Adicionou-se ao composto **117** (710 mg, 3,1 mmol) dissolvido em CH_2Cl_2 (31,3 ml) a 0°C trietilamina (27,2 gotas) e em seguida cloreto de mesila (14 gotas) previamente destilados. Deixou-se reagindo 10 min, verteu-se sobre gelo e adicionou-se HCl 10% (30 ml) e extraiu-se, após extraiu-se com solução saturada de bicarbonato de sódio e em seguida com água. Secou-se sobre NaSO_4 anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente obtendo-se 768 mg (76% de rendimento) do composto **118**.

Rf 0,20 (eluente Hexano/acetato de etila 35%)

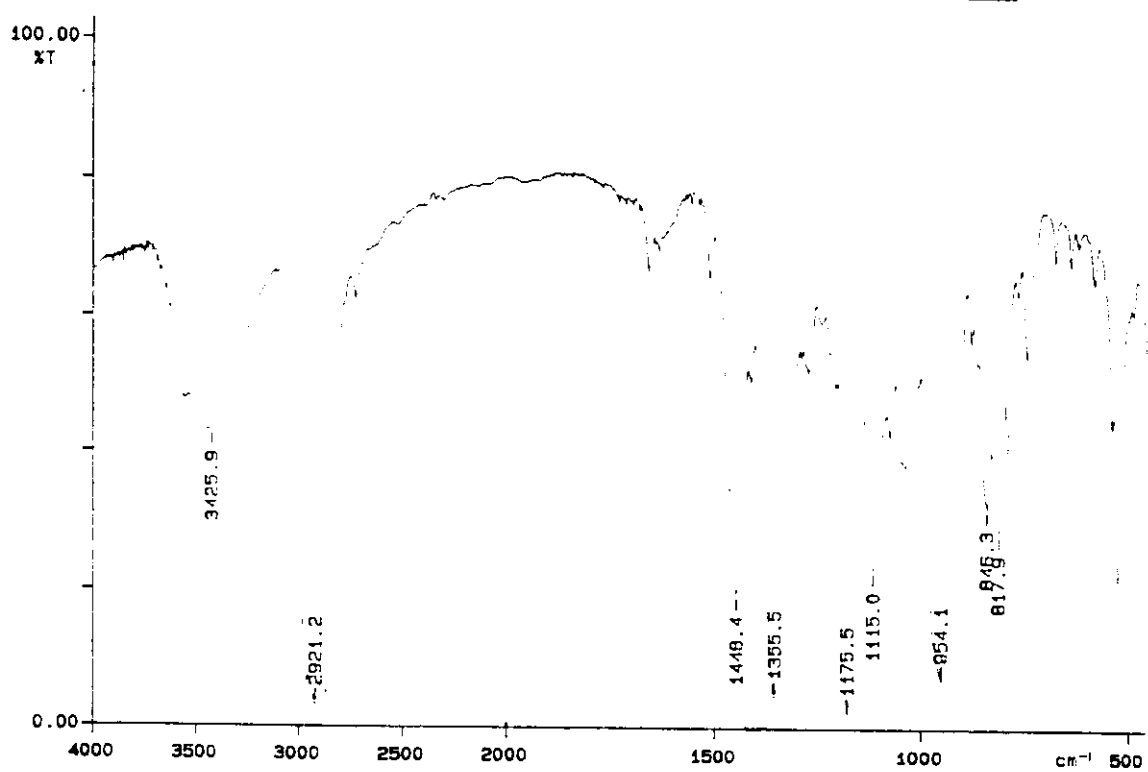
IVTF(KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$ 2920,5, 2868,6 (C-H); 1448,5 (C=C);

1355,2 (S=O); 1176,6 (S=O)

RMN¹H(300MHz,CDCl₃): δ 0,82(d, H_{13} , $J=0,08$); 0,98(d, H_{10} , $J=0,08$); 1,64(s, H_{12}); 3,0(s, H_{14}); 5,3(m, H_8)

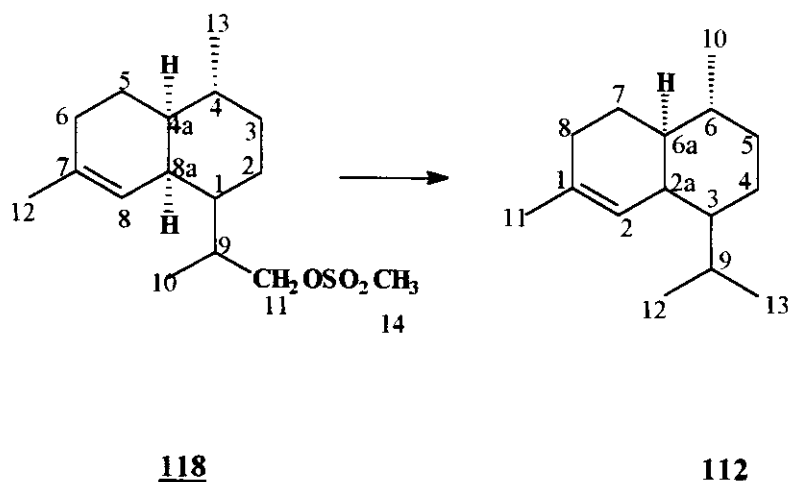


E-118.1: ESPECTRO DE RMN¹H (60MHz,CDCl₃) DA COMPOSTO **118**



E-118.2: ESPECTRO DE INFRA-VERMELHO DO COMPOSTO **118**

5) Redução do composto **118** /71/



Ao composto **118** (768 mg, 2,4 mmol) previamente preparado, dissolvido em THF e sob atmosfera de N₂ a 0°C, adicionou-se LiAlH₄ (873 mg, 23 mmol) aos poucos e deixou-se reagir a temperatura ambiente durante uma noite. Destruí-se o hidreto utilizando etanol e após água. Extraíu-se a reação com éter etílico (3 x 50 ml). Secou-se sobre Na₂SO₄ anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente obtendo-se 300 mg de um óleo **112** (60% de rendimento) após a purificação em coluna cromatográfica impregnada com AgNO₃ 10% observou-se por CG/MS, utilizando a programação 2, um pico em 9,8 min.

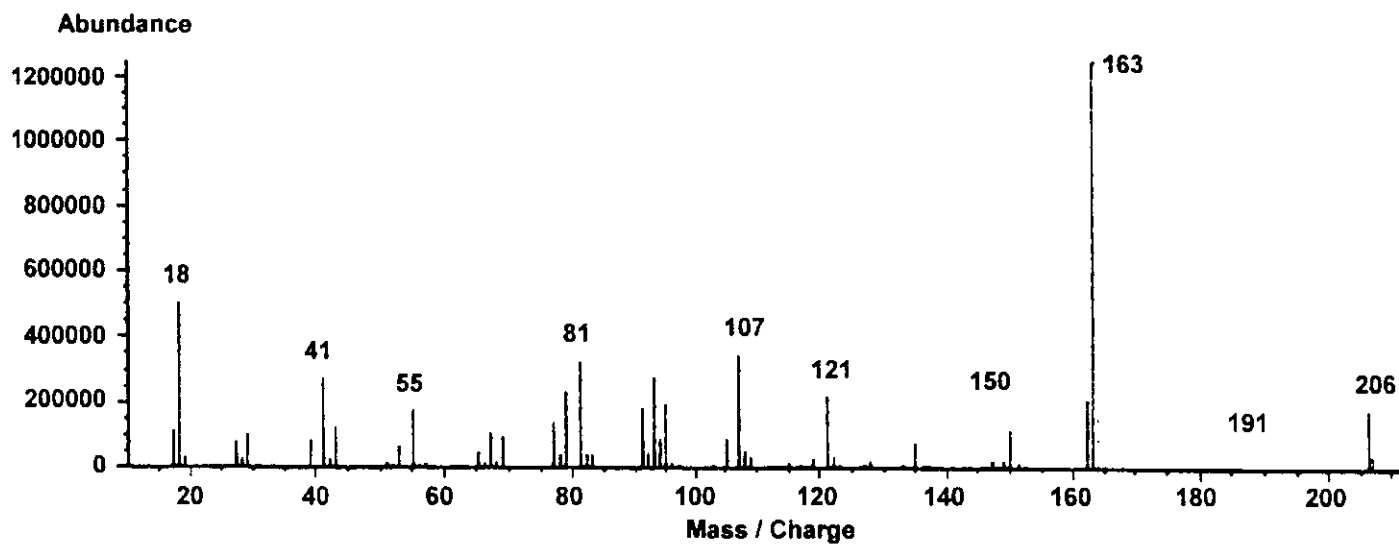
Rf 0,84 (eluente Hexano/acetato de etila 20%)

EM(70eV):m/z(%) 206(14,3), 163(100), 150(7), 121(16), 107(25), 81(14,3)

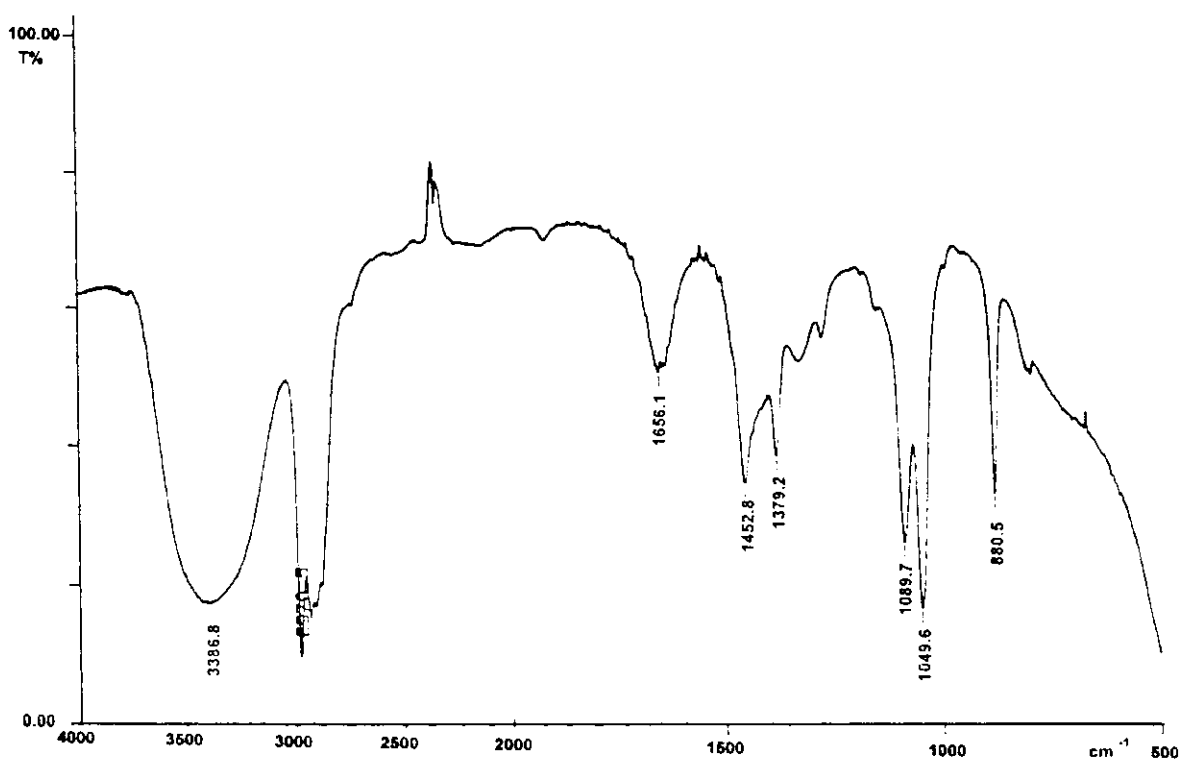
IVTF(KBr):ν(cm⁻¹) 3018,6, 2926,4(C-H); 1460,2(C=C)

RMN¹H(300MHz,CDCl₃): δ 0,79(d, H₁₀, J=0,41); 0,82(d, H₁₂ ou ₁₃, J=0,41); 0,84(d, H₁₂ ou ₁₃, J=0,41)

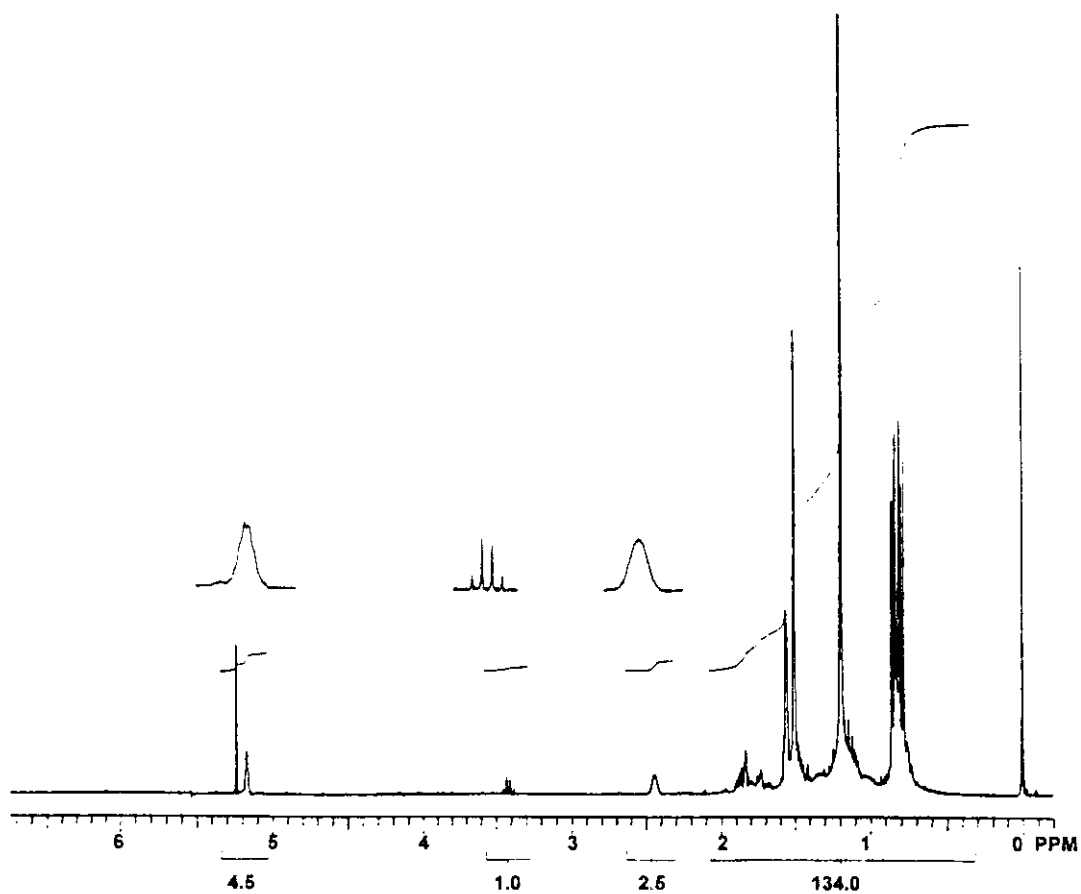
RMN¹³C (75,5MHz,CDCl₃): δ 18,9(C₁₂), 20,8(C₁₃), 26,7(C₉), 47,7(C₃), 24,9(C₄), 35,0(C₅), 27,8(C₆), 19,7(C₁₀), 41,2(C_{6a}), 25,8(C₇), 25,5(C₈), 133,9(C₁), 120,3(C₂), 22,9(C₁₁)



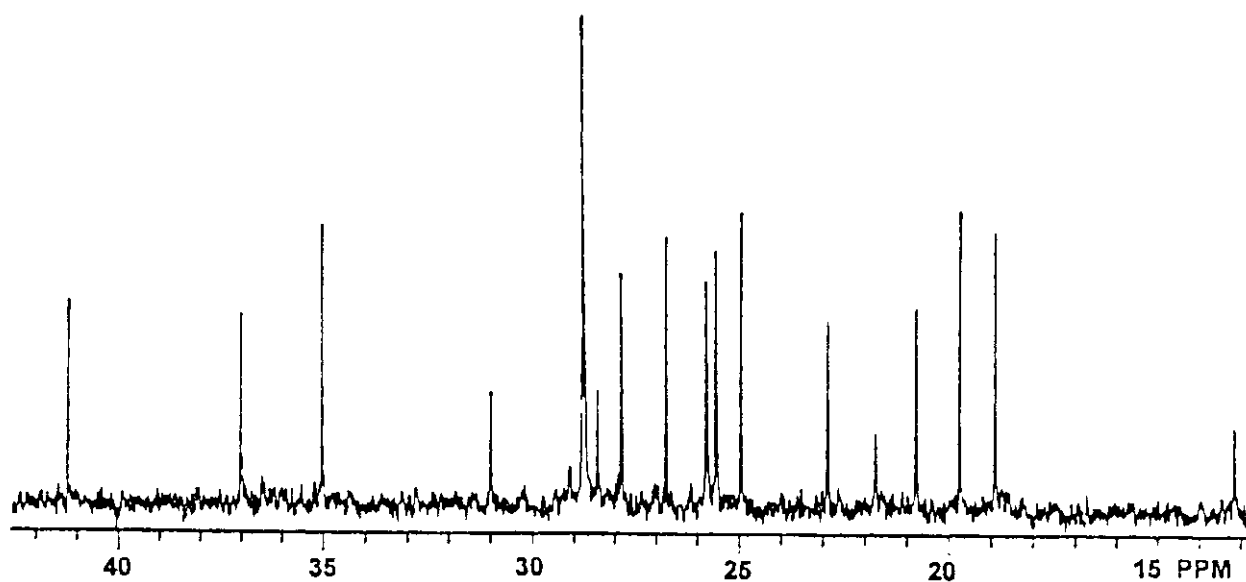
E-112.1: ESPECTRO DE MASSAS DA COMPOSTO 112



E-112.2: ESPECTRO NO INFRA-VERMELHO DO COMPOSTO 112

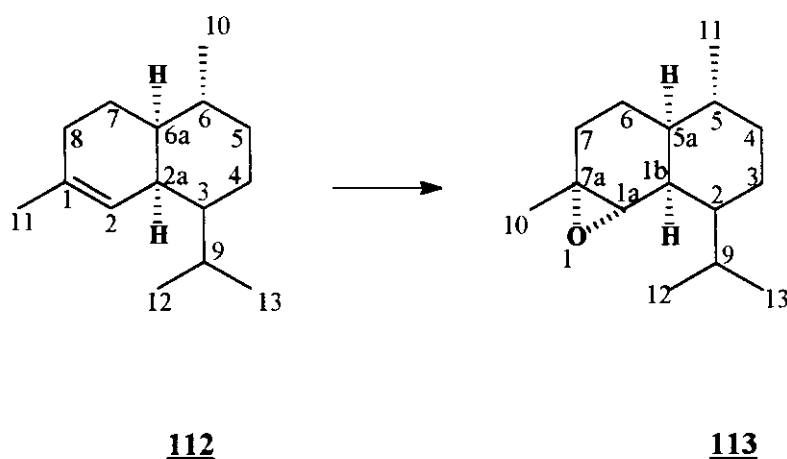


E-112.3: ESPECTRO DE RMN¹H (300MHz,CDCl₃) DO COMPOSTO **112**



E-112.4: ESPECTRO DE RMN¹³C (75,5MHz,CDCl₃) DO COMPOSTO **112**

6) Reação de epoxidação do composto **112** /73/



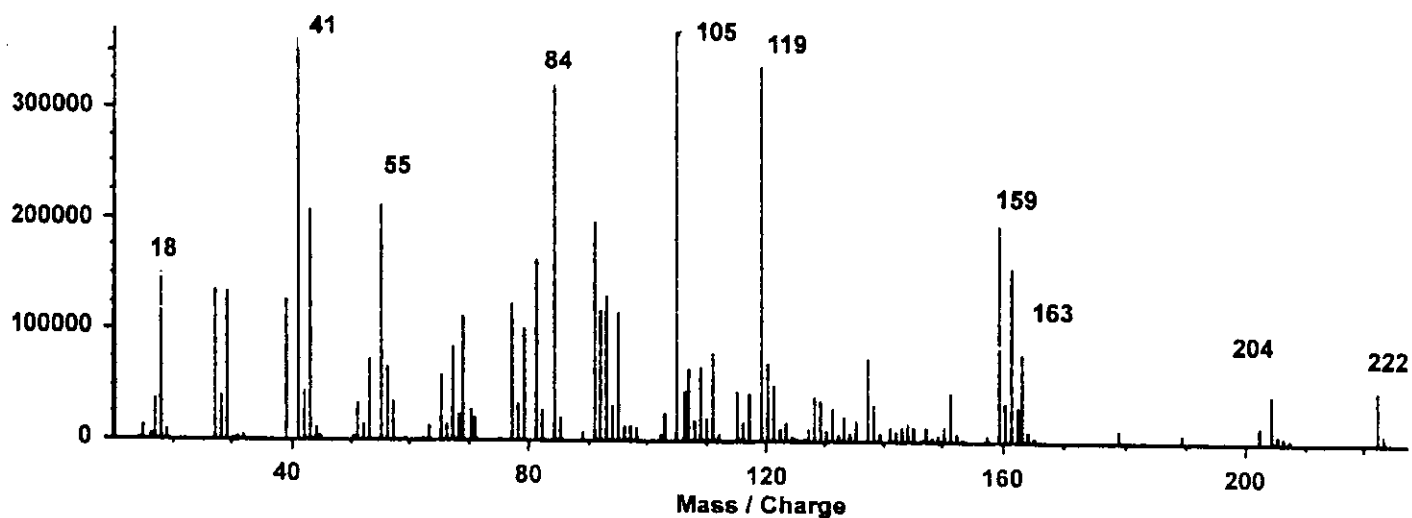
Dissolveu-se o composto **112** (300 mg, 1,45 mmol) em CH_2Cl_2 (5 ml). Adicionou-se ácido meta-cloro-perbenzóico (472 mg, 2,73 mmol) e deixou-se reagindo a temperatura ambiente durante 4 horas. Após este tempo lavou-se a fase orgânica com NaOH 1N, água, secou-se sobre Na_2SO_4 anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. O produto resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel fornecendo 240 mg do composto **113** (74% de rendimento) sob forma de um cristal amorfo. Por CG/MS, utilizando a programação 2, observou-se um pico em 11,57 min.

R_f 0,74 (eluente Hexano/acetato de etila 20%)

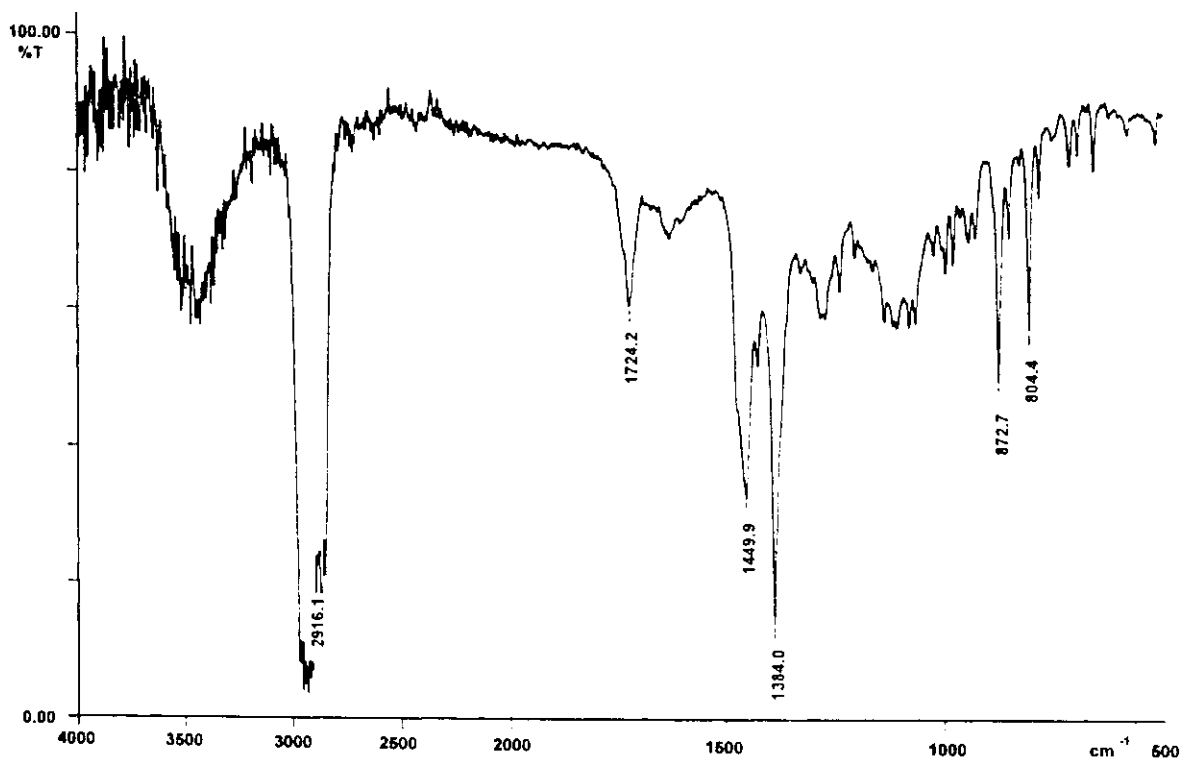
EM(70eV):m/z(%) 222(1,8), 179(100), 161(25), 121(19,6), 95(41)

RMN¹H(300MHz,CDCl₃): δ 0,78(d,H₁₀,J=0,57), 0,89(d,H₁₃,J=0,57), 0,93(d,H₁₂,J=0,57), 0,95 (d,H₂,J=0,57), 1,60 (m,H₉ e 7), 1,78 e 1,72 (m,H₃), 0,87 e 1,66 (m,H₄), 1,18(m,H₅), 0,91(m,H_{5a}), 1,26 e 1,53 (m,H₆), 1,60 e 1,84 (m,H₇), 2,63 (d,H_{1a},J=0,14), 1,24 (s,H₁₁)

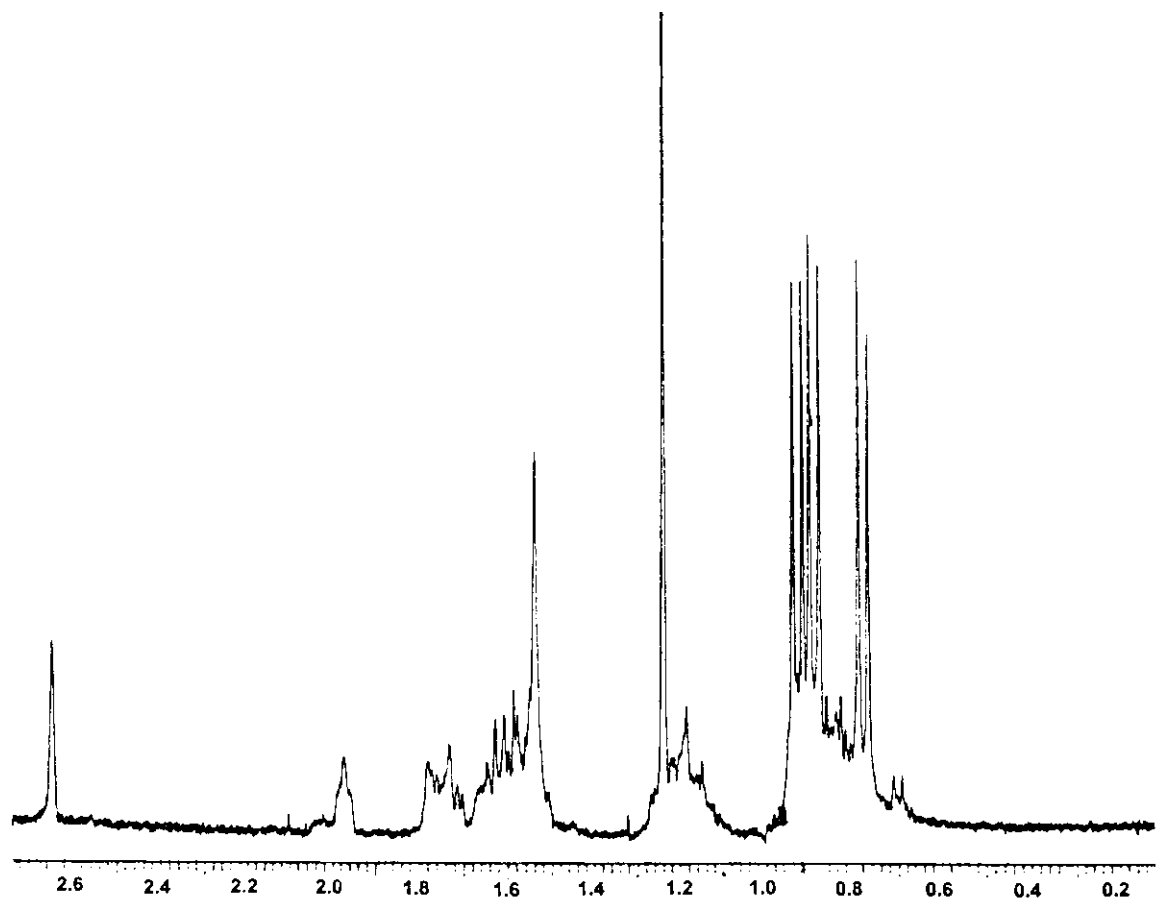
RMN¹³C (75,5MHz,CDCl₃): δ 59,6(C_{1a}), 39,4(C_{1b}), 47,4(C₂), 27,7(C₃), 35,4(C₄), 29,5(C₅), 40,5(C₆), 24,9(C₇), 57,5(C_{7a}), 29,0(C₉), 19,1(C₁₀), 23,6(C₁₁), 20,9(C₁₂), 21,5(C₁₃)



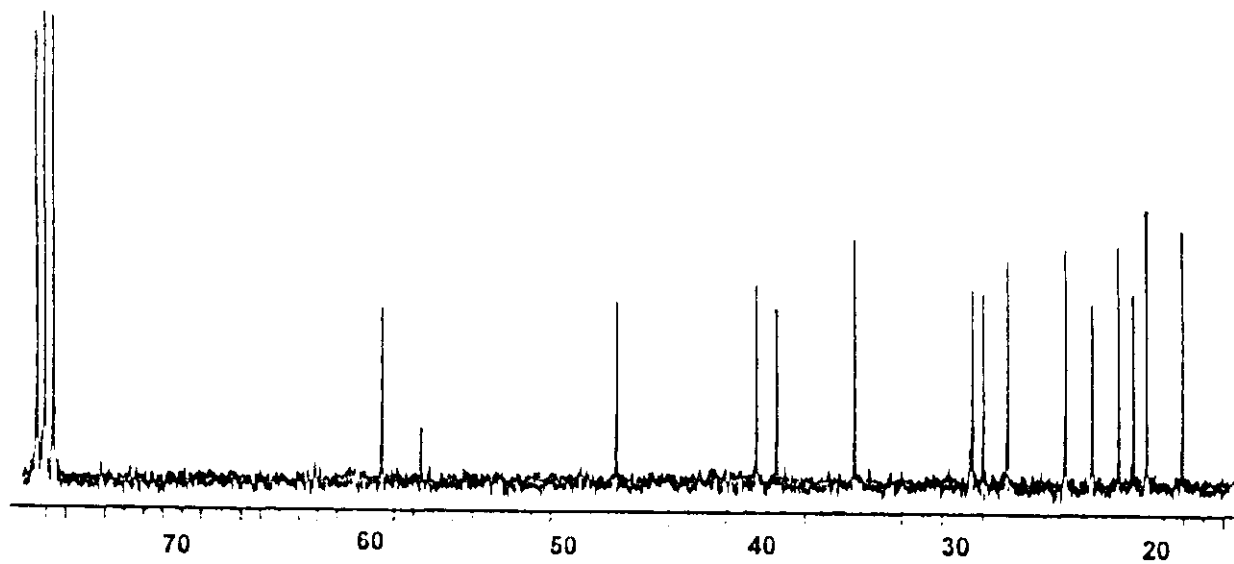
E-113.1: ESPECTRO DE MASSAS DA COMPOSTO 113



E-113.2: ESPECTRO NO INFRA-VERMELHO DO COMPOSTO 113



E-113.3: ESPECTRO DE RMN¹H (300MHz,CDCl₃) DO COMPOSTO 113

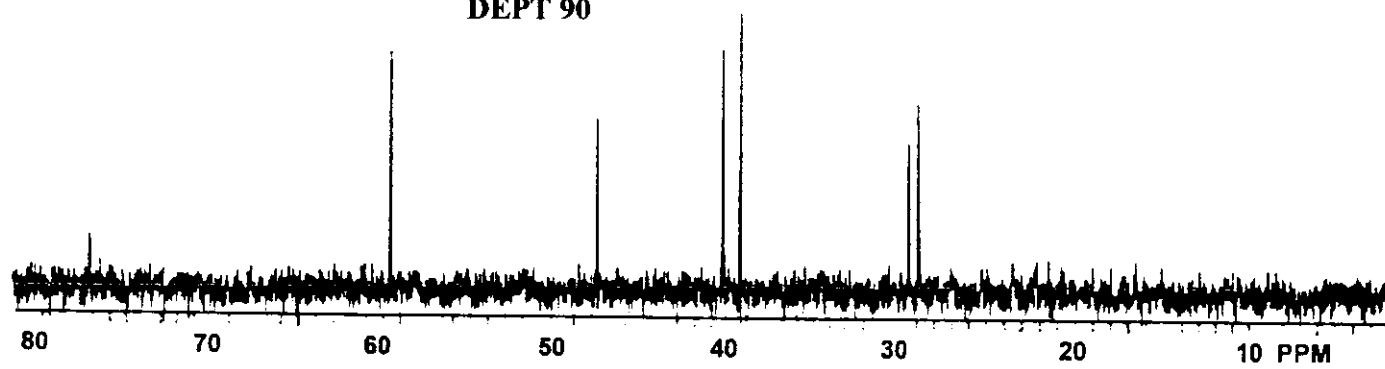


E-113.4: ESPECTRO DE RMN¹³C (75,5MHz,CDCl₃) DO COMPOSTO 113

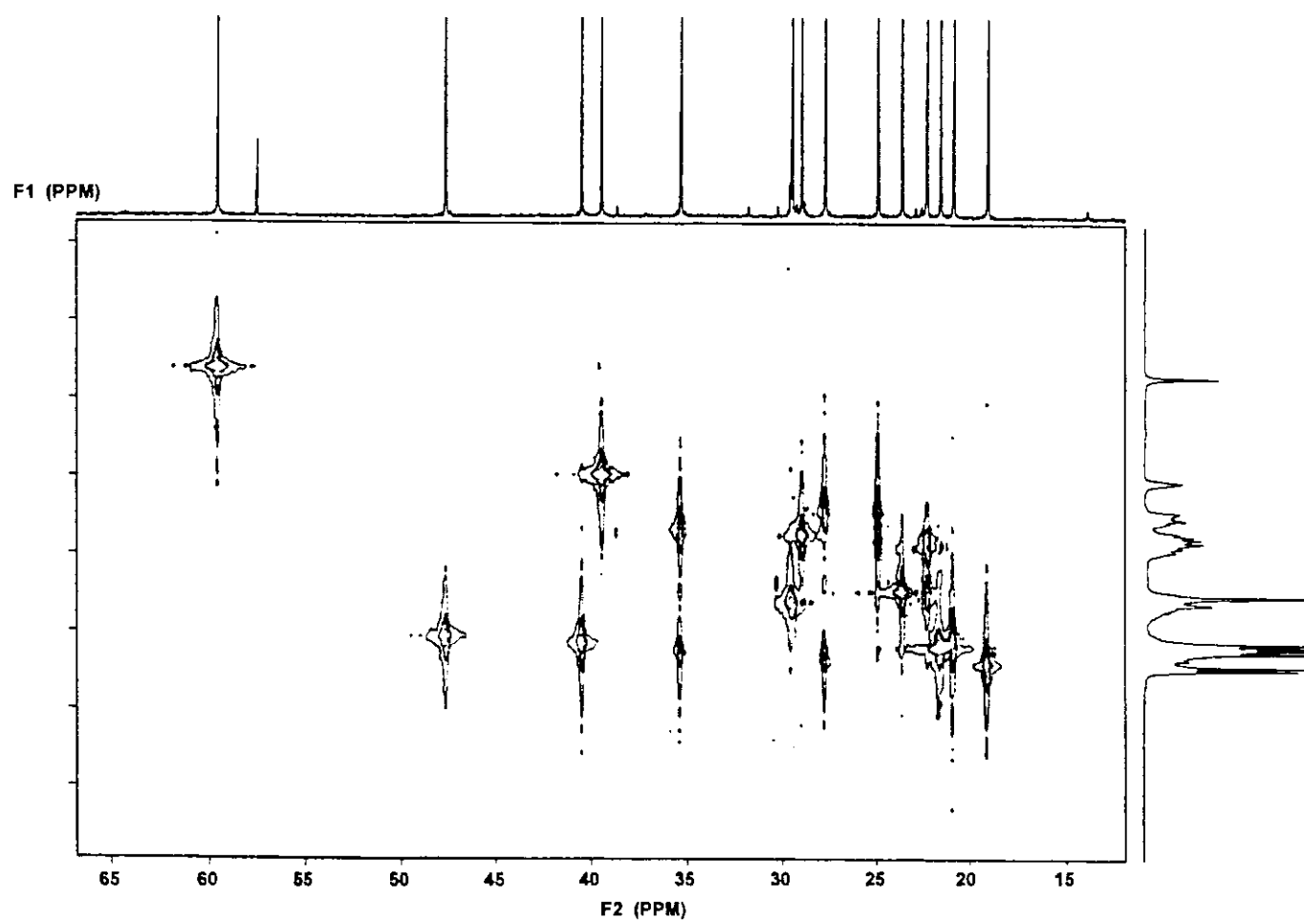
DEPT 135



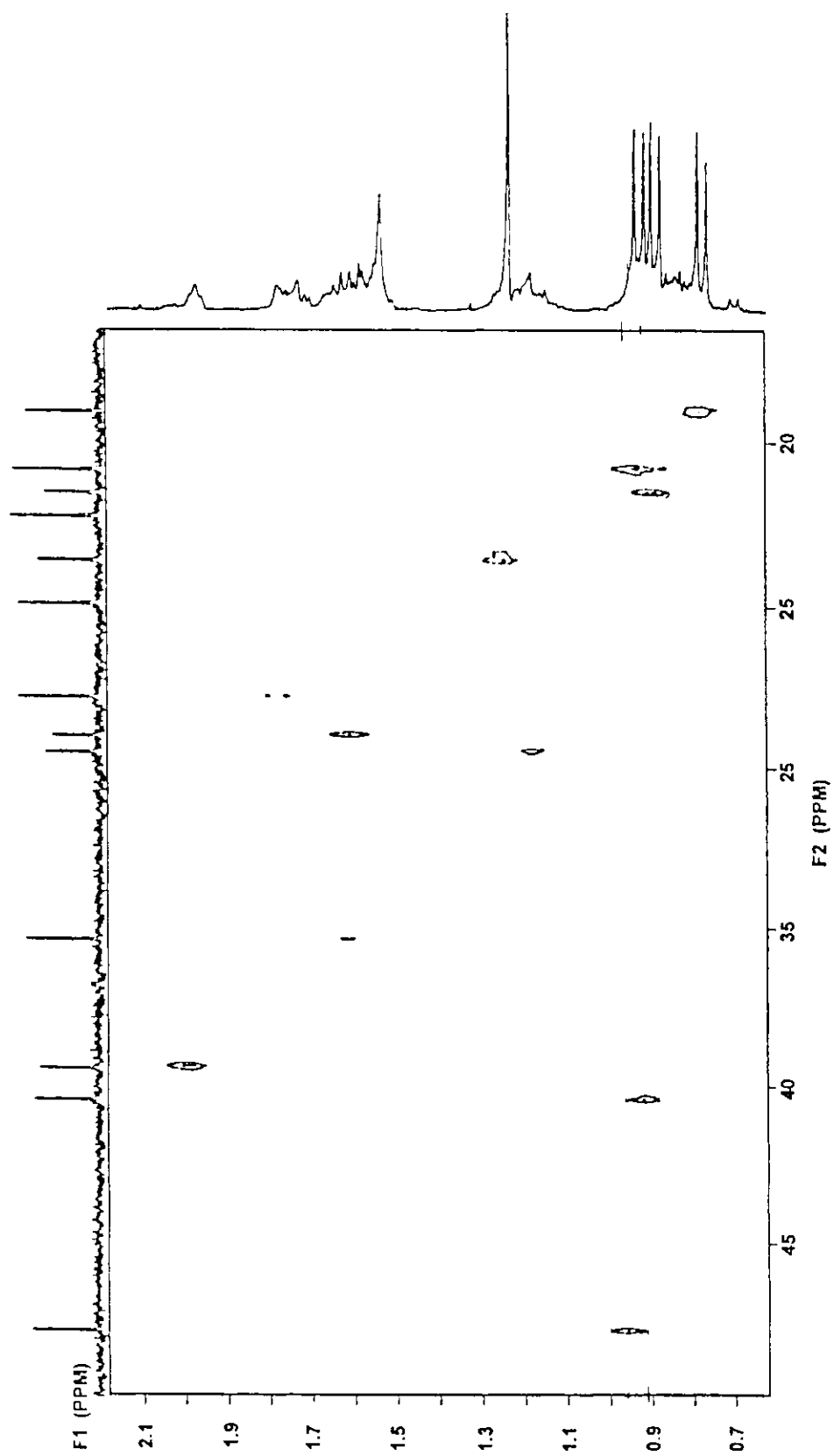
DEPT 90



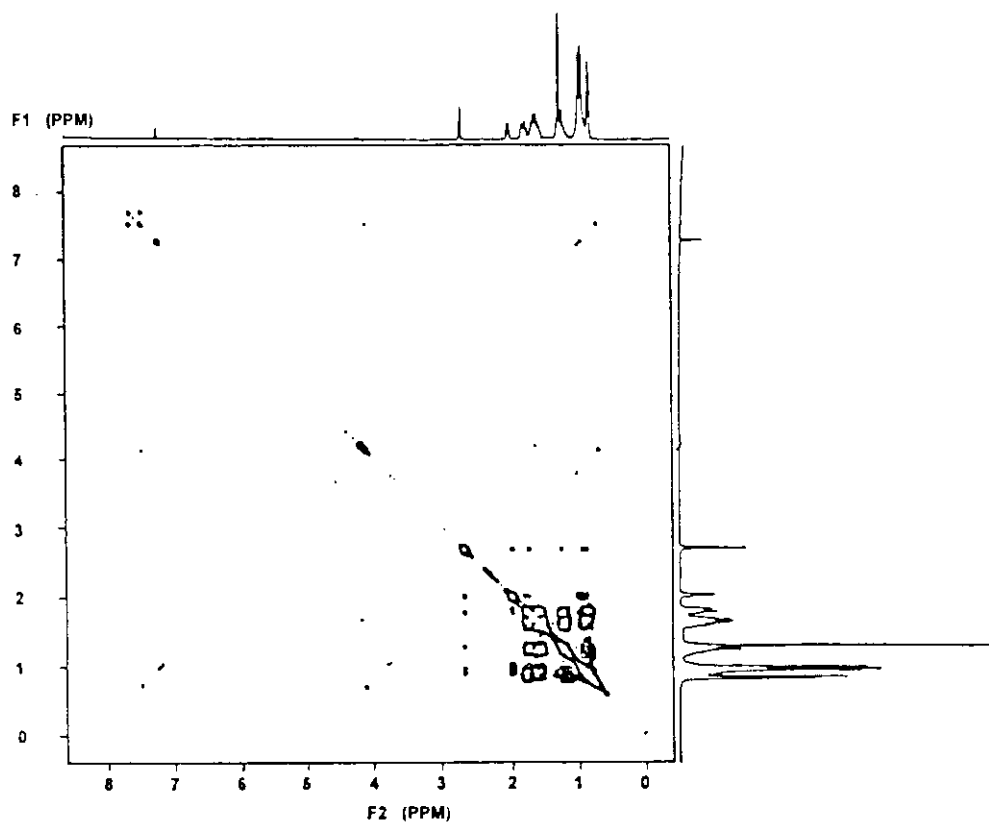
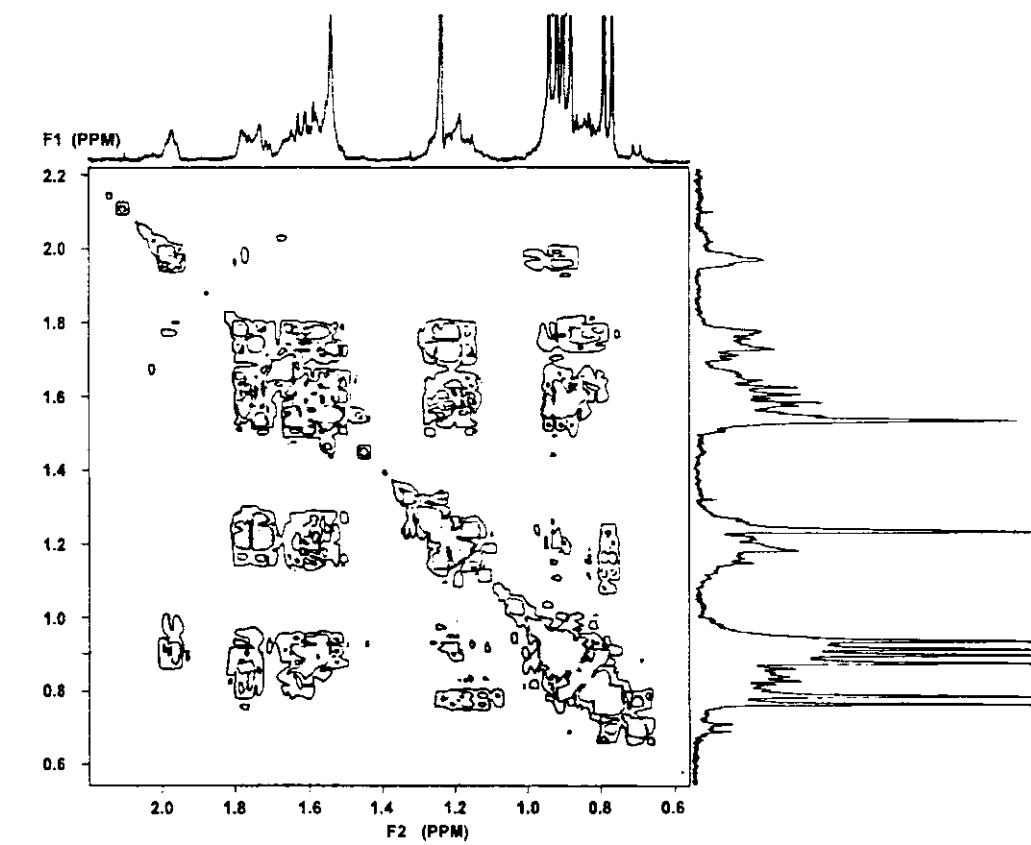
E-113.5: ESPECTRO DEPT DO COMPOSTO 113



E-113.6: ESPECTRO HETCOR DO COMPOSTO 113

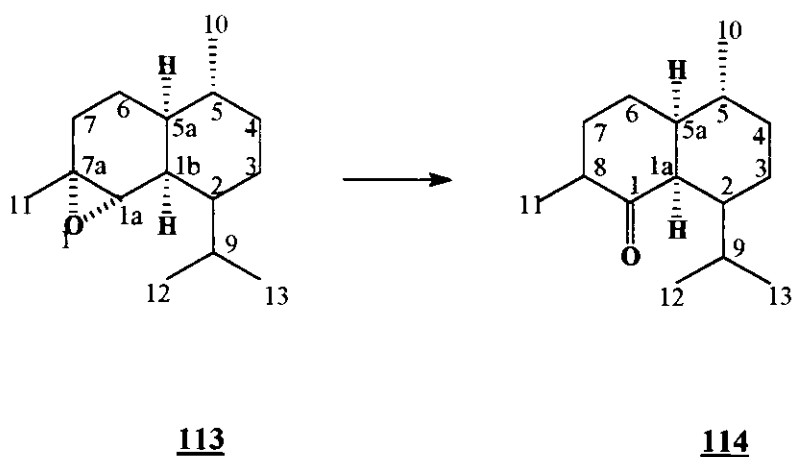


E-113.7: ESPECTRO COLOC DO COMPOSTO 113



E-113.8: ESPECTRO COSY DO COMPOSTO 113

7) Formação da cetona **114** /74/



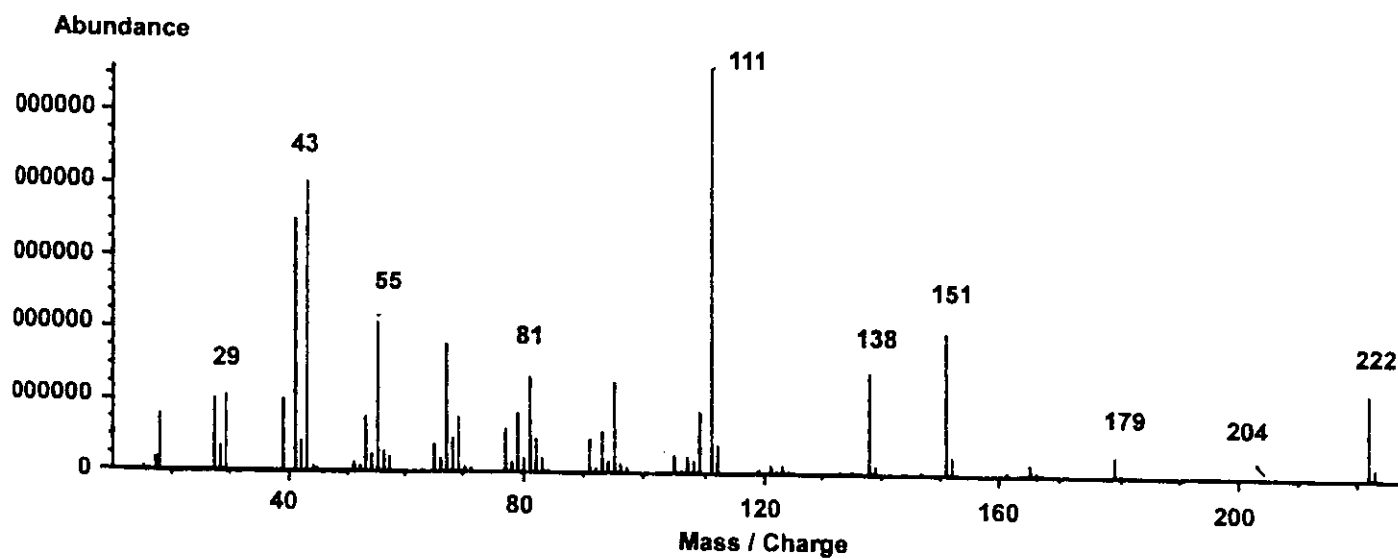
Ao composto **113** (240 mg, 1,08 mmol) dissolvido em éter etílico (20 ml) à 0°C adicionou-se BF₃ previamente destilado (10 ml) gota a gota. Deixou-se reagindo a temperatura ambiente durante 12 horas. Evaporou-se o solvente e passou-se o bruto da reação numa coluna filtrante de sílica-gel para separar o BF₃. Obteve-se 72 mg de um óleo (30%), a cetona **114**, a qual foi confirmada por CG/MS, utilizando a programação 2, com um pico em 12,7 min.

RF 0,33 (eluente Hexano/acetato de etila 20%)

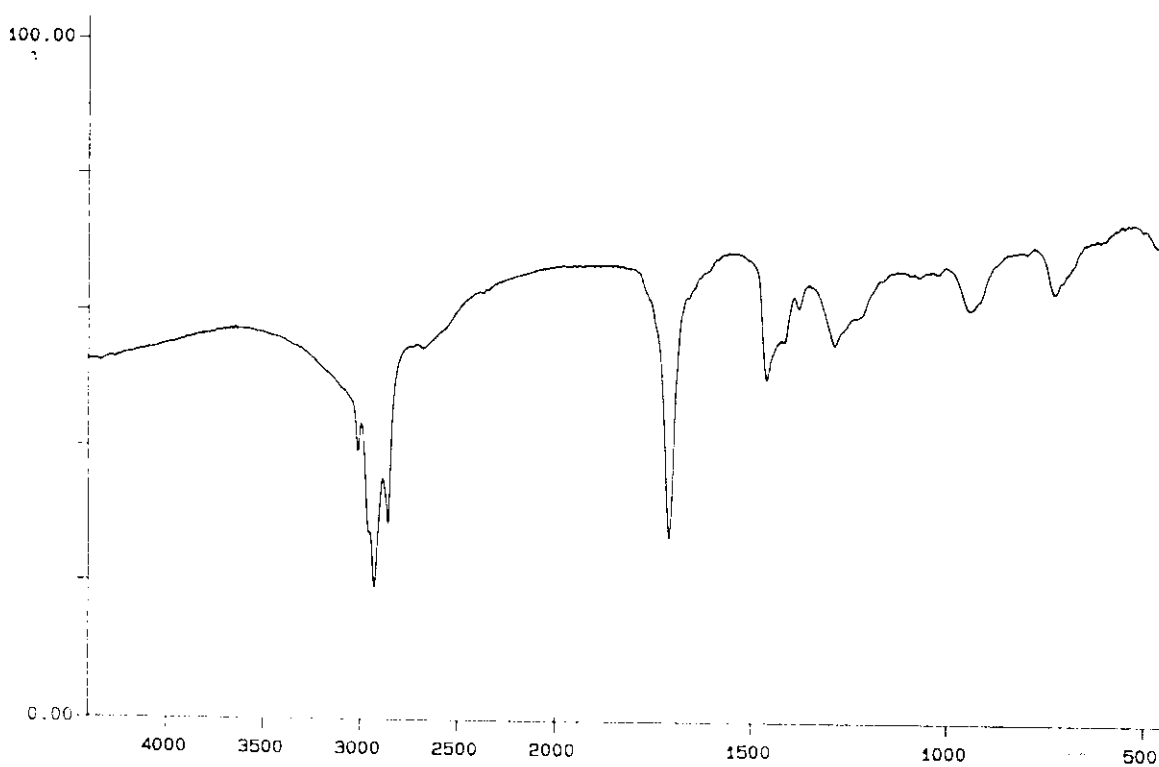
EM(70eV): m/z(%) 222(26,8), 179(7,1), 151(41), 138(32), 111(100), 81(23), 43(55)

RMN¹H(300MHz,CDCl₃): δ 0,68(d,H₁₂,J=0,76), 0,81(d,H₁₃,J=0,76), 0,80 (ddd,H₂, J_{2,1a}=J_{2,3}=4,J_{2,9}=11), 0,75(d,H₁₀,J=7), 1,96(m,H₉), 1,54 (m,H_{5a}), 0,87(m,H₄), 1,15(d,H₁₁,J_{11,8}=7), 1,18(m,H₅), 1,68(m,H₆) 1,88(m,H₆), 1,60(m,H₇), 2,32(dd,H₈,J_{8,11}=7,J_{8,7a}=3), 2,99(dd,H_{1a},J_{1a,5a}=J_{1a,2}=4)

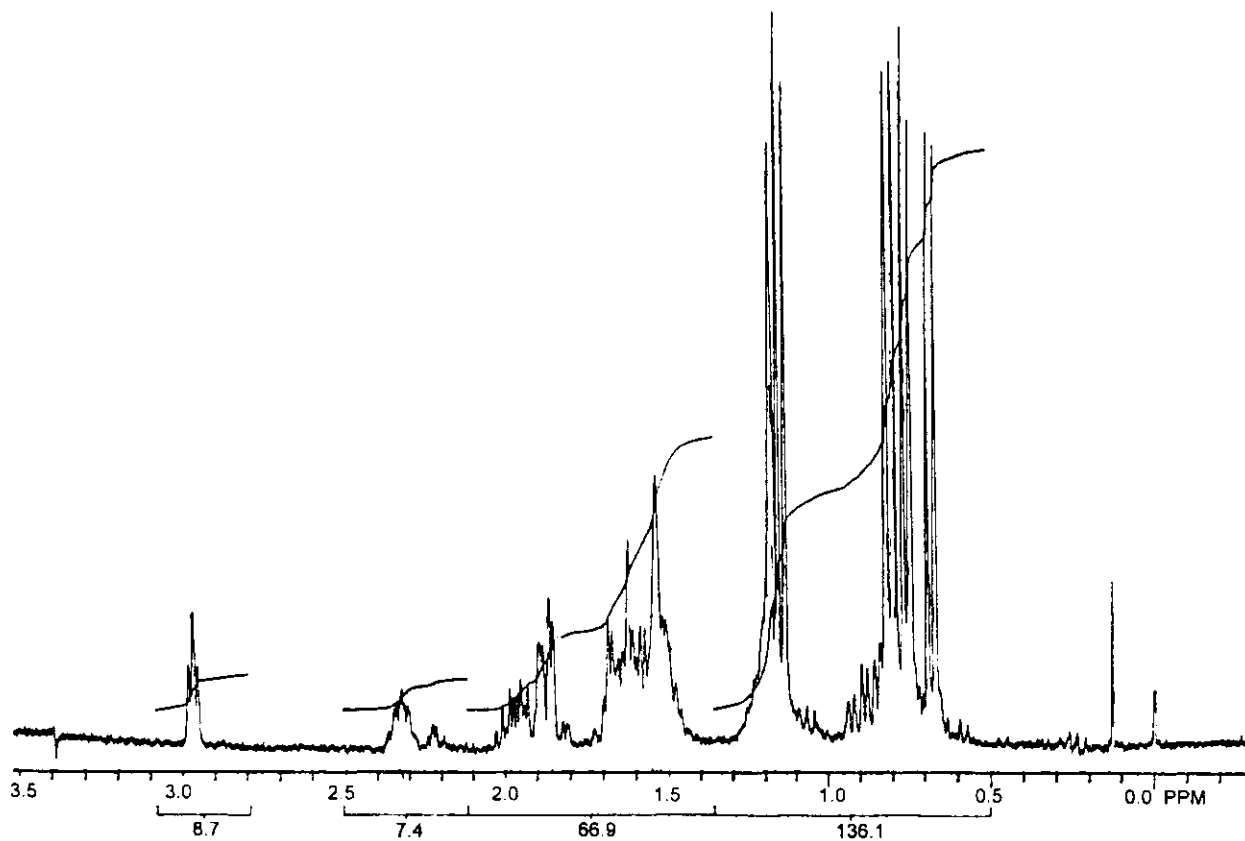
RMN¹³C (75,5MHz,CDCl₃): δ 217,2(C₁), 47,1(C_{1a}), 47,8(C₂), 28,3(C₃), 36,1(C₄), 30,8(C₅), 48,7(C_{5a}), 23,1(C₆), 25,8(C₇), 46,3(C₈), 29,0(C₉), 19,1(C₁₀), 17,5(C₁₁), 20,8(C₁₂), 21,9(C₁₃)



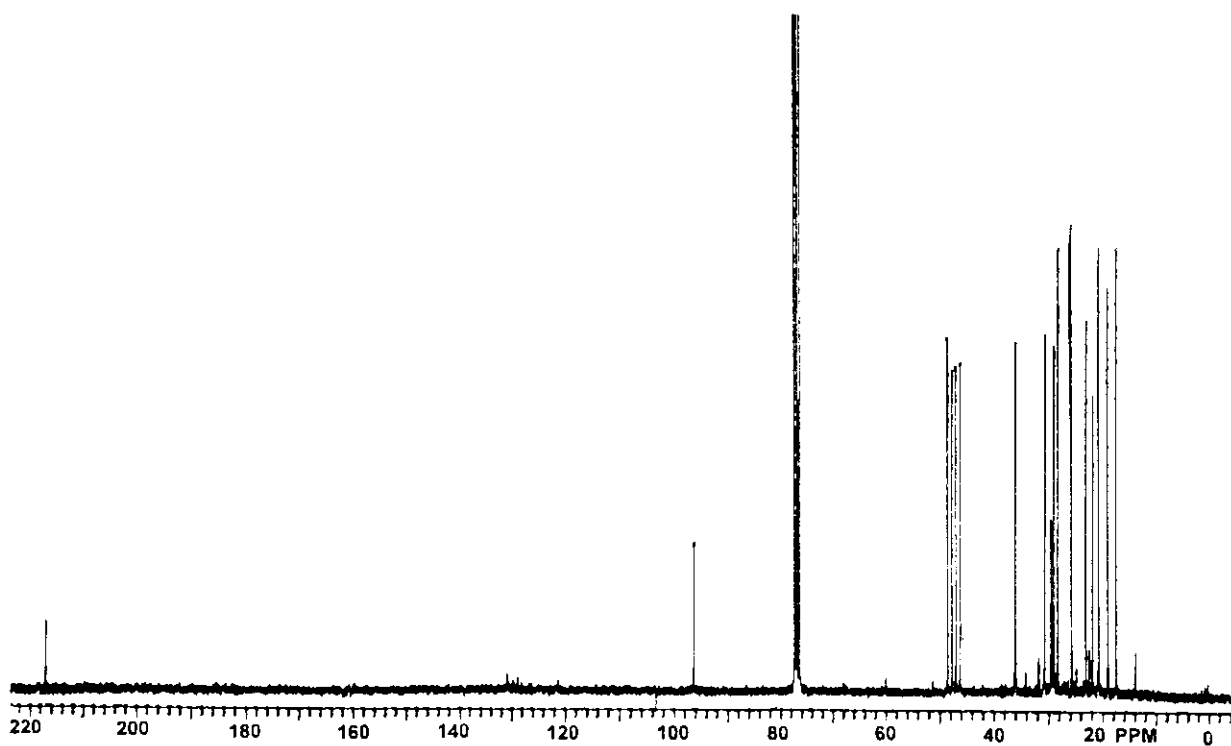
E-114.1: ESPECTRO DE MASSAS DA COMPOSTO 114



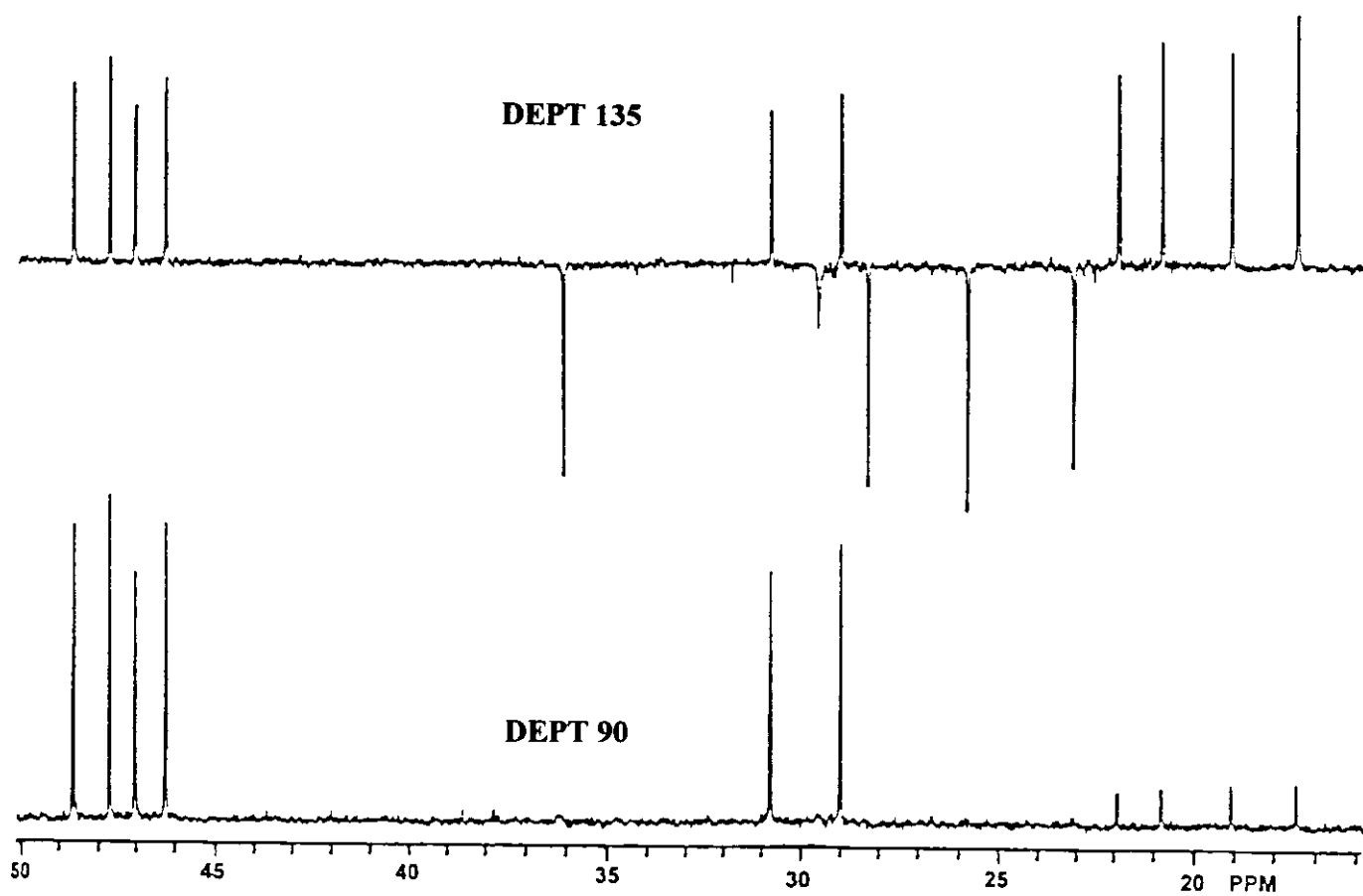
E-114.2: ESPECTRO NO INFRA-VERMELHO DO COMPOSTO 114



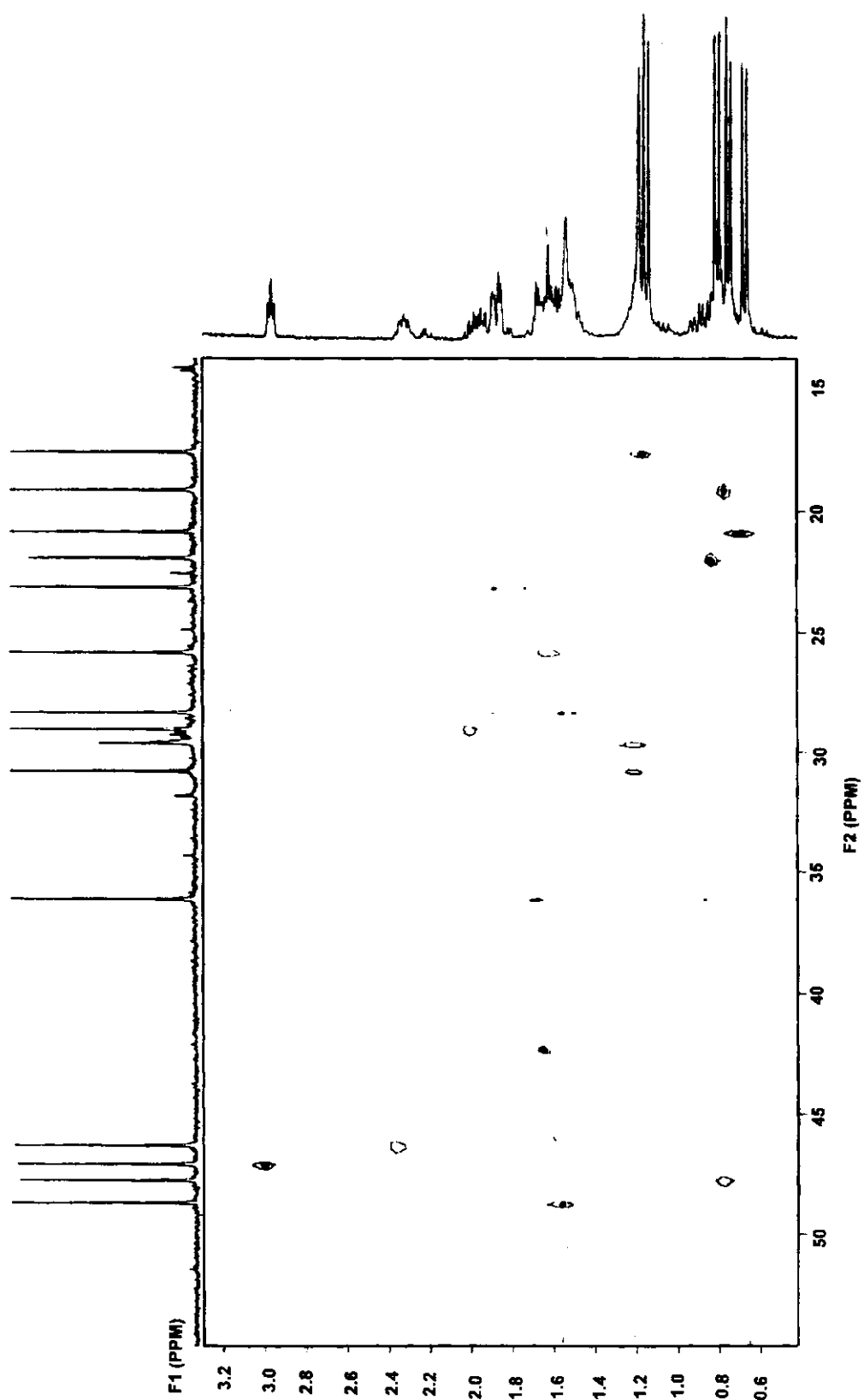
E-114.3: ESPECTRO DE RMN¹H (300MHz,CDCl₃) DO COMPOSTO **114**



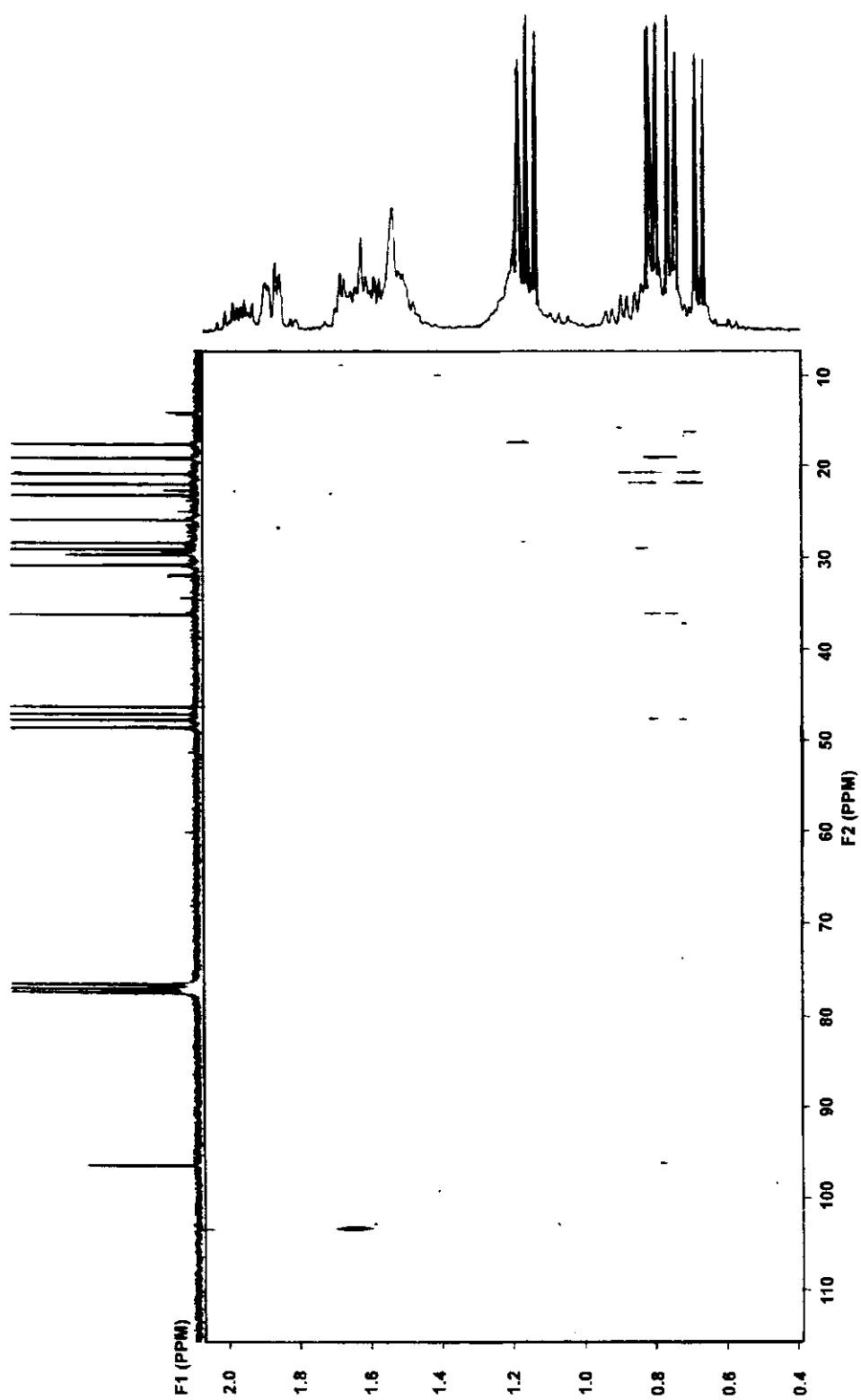
E-114.4: ESPECTRO DE RMN¹³C (75,5MHz,CDCl₃) DO COMPOSTO **114**



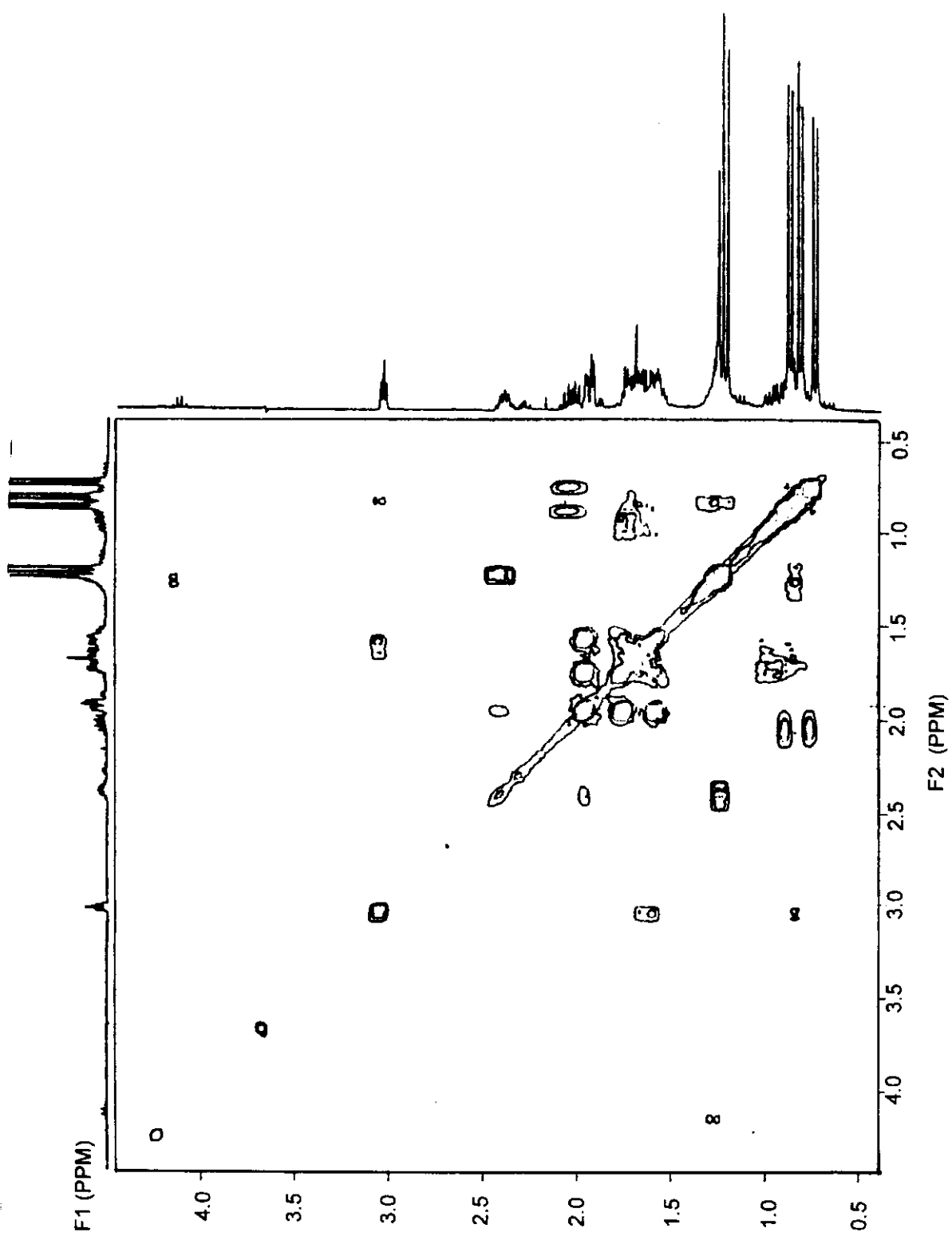
E-114.5: ESPECTRO DEPT DO COMPOSTO 114



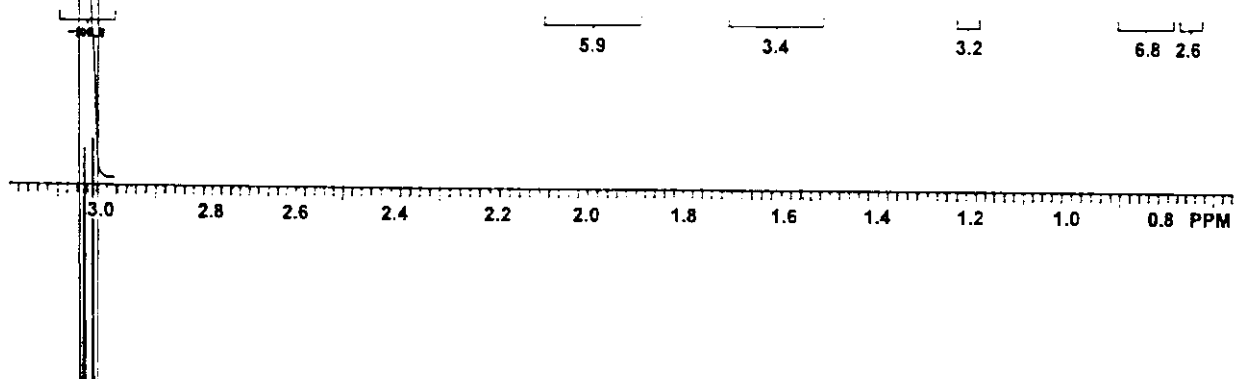
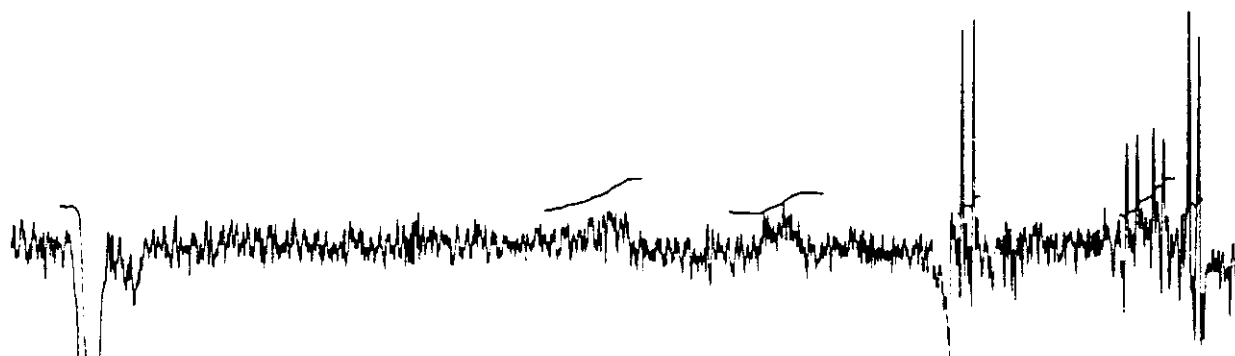
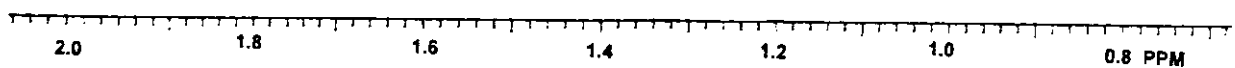
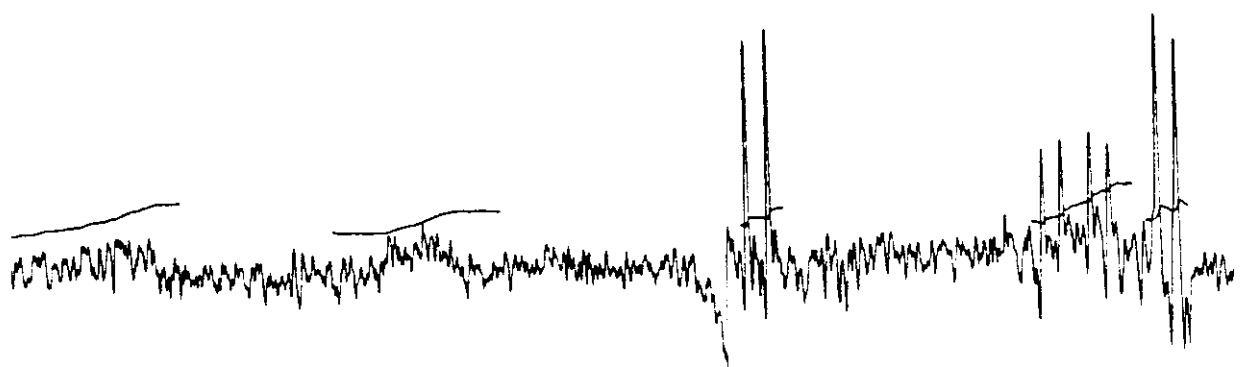
E-114.6: ESPECTRO HETCOR DO COMPOSTO 114



E-114.7: ESPECTRO COLOC DO COMPOSTO 114



E-114.8: ESPECTRO COSY DO COMPOSTO 114



E-114.9: ESPECTRO "NOE" DO COMPOSTO 114

Referências Bibliográficas

- /1/ Ding, G.S.; **Clinical Therapeutics**; (1987); **9**; 345-357
- /2/ Ding, G.S.; **Drugs of Today**; (1987); **23**; 467-476
- /3/ Ding, G.S.; **Int. Pharmacy Journal**;(1987); **11**; 11-14
- /4/ Xiao, P.G.; **Bull. Chim. Materia Medica**; (1981); **6**; 40-46; Wang, Y.Z.; **Chim. Pharm. Bull.**; (1984); **19**; 579-582
- /5/ Boulos, M.; **Isto É**; (1991); 36
- /6/ Sanz, J.F.; Merco, J.A.; **Phytochemistry**; (1990); **29(9)**; 2919
- /7/ kelsey, R.G.; Shafizaleh, F.; **Phytochemistry**; (1979); **18**; 1591-1611
- /8/ Klayman, D.L.; **Science**; (1985); **228**; 1049-1055
- /9/ Klayman, D.L.; Acton, N.; **J. Nat. Prod.**; (1984); **4**; 715
- /10/ Sharma, A.; Bindra, R.L.; Tewari, R.; **CIMAP**; (1991); **46**; 46-61
- /11/ China Cooperative Research Group on qinghaosu and Its Deravatives ; **Acta Pharm. Sinica**; (1981); **6**; 429-439
- /12/ Hase, Y.; **JCPE News**; **2**; (1990); Program P.O 35
- /13/ Jahn, C.A.; Dissertação Tese- Estudo Botânico Da *Artemisia annua* L.; (1988)
- /14/ China Coopertive Research Group On Qinghasu And Its Derivatives; **J. Trad. Chinese Medicine**; (1982); **2**; 9-16
- /15/ Ding, G.S.; **Int. Jou. Exp. Clin. Chem.**; (1988); **1(2)**; 9-22
- /16/ Meshnick, S.R.; Thomas, A.; Ranz, A.; Xu, C.M.; **Mol. Bio. Par.**; (1991); **49**; 181-190
- /17/ Woerdenbag, H.J.; Moskal, T.A.; **J. Nat. Prod.**; (1993); **56(6)**; 849-856
- /18/ Posner, G.H.; Ho Oh, C.; Wang, D.; **J. AM. CHEM. SOC.**; (1995); **117**; 5885-5886
- /19/ Ahmad, A.; Misra, L.N.; **Phytochemistry**; (1994); **37(1)**; 183-186
- /20/ Posner, G.H.; McGarvey, J.; Ho Oh,C.; Kumar, N.; Meshnick, S. R.; Asawamahasadka, W.; **J. Med. Chem.**; (1995); **38**; 607-612
- /21/ Wei, Z.X.; Pan, J.P.; Li, Y.; **Planta Med.**; (1992); **58**; 300
- /22/ Brown, G.D.; **J. Nat. Prod.**; (1992); **55**; 1756-1760
- /23/ Ranasinghe, A.; Sweatlock, J.D.; Cooks, R.G.; **J. Nat. Prod.**; (1993); **56(4)**; 552-563

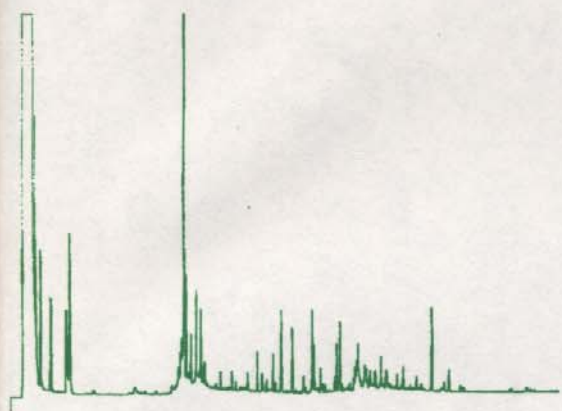
- /24/ Misra, L.N.; Ahmad, A.; Thakur, R.S.; Jakupovic, J.; **Phytochemistry**; (1993); **33**(6); 1461-146
- /25/ Misra, L.N.; **Phytochemistry**; (1986); **25**(12); 2892-2893
- /26/ Bordoloi, M.; Shukla, V.S.; Nath, S.C.; Sharma, P.R.; **Phytochemistry**; (1989); **28**(8); 2007-2037
- /27/ Woerdenbag, H.J.; Lugt, C.B.; Pras, N.; **Phar. Week. Scie. Ed.**; (1990); **12**(5); 169-181
- /28/ Brown, G.D.; **Phytochemistry**; (1994); **36**(6); 1553-1554
- /29/ Manns, D.; Hartmann, R.; **J. Nat. Prod.**; (1992); **55**(1); 29-32
- /30/ Zheng, G.Q.; **Planta Med.**; (1994); **60**; 54-57
- /31/ Yang, S.Y.; Roberts, M.F.; O'Neil, M.J.; Bucar, F.; Phillipson, J.D.; **Phytochemistry**; (1995); **38**(1); 255-257
- /32/ Akhila, A.; Rani, K.; Thakur, R.; **Phytochemistry**; (1990); **29**(4); 2129-2132
- /33/ Sangwan, R.S.; Agawal, K.; Luthra, R.; **Phytochemistry**; (1993); **34**(5); 1301-1302
- /34/ Nair, M.S.R.; Basile, D.V.; **J.Nat.Prod.**; (1993); **56**(9); 1559-1566
- /35/ Brown, G.O.; **Phytochemistry**; (1994); **36**(3); 637-641
- /36/ Toleva, P.D.; ognyanov, I.V.; Karova, E.A.; Geogiev, E.V.; **Rivista Italiana EPPOS**; (1975); **57**; 620; Tsankova, E.; Ognyanov, I.V.; **Rivista Italiana EPPOS**; (1976); **58**; 502
- /37/ Woerdenberg, H.J.; **Flavour and Fragrance Journal**; (1993); **8**; 131-137; Lawrence, B.M.; **Perf. Flav.**; (1995); **20**; 52-54
- /38/ Blasko, G.; Cordell, G.A.; **J.Nat.Prod.**; (1988); **51**(6); 1273-1276
- /39/ Liu, J.M.; Ni, M.Y.; Fan, I.F.; Tu, Y.Y.; Wu, Z.H.; Zhou, W.S.; **Acta Chimica Sinica**; (1979); **37**; 129
- /40/ Misra, L.N.; Ahmad, A.; Thakur, R.S.; **J.Nat.Prod.**; (1993); **56**(2); 215-219

- /41/ Charles, D.J.; Simon, J.E.; Wood, K.V.; Heinstein, P.; **J.Nat.Prod.**; (1990); **53(1)**; 157-160; b) Shishan, Z.; Mei-Yi,Z.; **Anal. Chem.**; (1986); **58**; 289-292; c) ElSohly, H.N.; Croom, E.M.; ElSohly, M.A.; **Pharm. Research**; (1987); **4(3)**; 258-260; d) Ferreira, J.F.S.; Charles, D.J.; Wood, K.; Janick, J.; Simon, J.E.; **Phytochemical Analysis**; (1994); **5**; e) Sipahimalani, A.T.; Fulzele, D.P.; Heble, M.R.; **J. Chrom.**; (1991); **538**; 475-476; Jeremic, D.; Jokic, A.; behbud, A.; Stefonovic, M.; **Tetrahedron Lett.**; (1973); 3039; Pras, N.; Visser, J.F.; batterman, H.J.; Woerdenbag, H.J.; Malingré, T.M.; Lugts, C.B.; **Phytochemical Analysis**; (1991); **2**; 80-83
- /42/ Rodrigues, R.A.; Foglio, M.A.; Sarkis, R.; Broschard, R.; Grupo de Fitoquímica CPQBA-UNICAMP; (1994)
- /43/ Elsohly, H.N.; Croom Jr., E.M.; **J.Nat.Prod.**; (1990); **53(6)**; 1560-1564
- /44/ Roth, R.J.; Acton, N.; **J.Chem. Ed.**; (1989); **66**; 349-350
- /45/ Shilin, Y.; Roberts, M.F.; Phillipson, J.D.; **Phytochemistry**; (1989); **28(5)**; 1509-1511
- /46/ Hase, Y.; **J.C.P.E. News**; (1990); **2**; Program P.035
- /47/ Allinger, N.L.; **J. AM. CHEM. SOC.**; (1977); **99**; 8127-40; Allinger, N.L.; Yuh, Y.M.; **Q.C.P.E.**; (1980); **11**; 395
- /48/ Allinger, N.L.; Kok, R.A.; Iman, M.R.; **J.Comp.Chem.**; (1988); **9**; 591
- /49/ Gerald, C.F.G.C.; "Ressonância Magnética Nuclear, Fundamentos, Métodos e Aplicações"; (1987); Fundação Calouste Gulbenkian Lisboa; 703
- /50/ Martin, G.E.; Zekter, A.S.; **Two Dimensional NMR Methods For Establishing Molecular Connectivities**; VCH; N.Y.; (1988); Breitmaier, E.; Oetter, V.W.; **Carbon-13 NMR Spectroscopy**; VCH; N.Y.; (1987)
- /51/ Tu You-you, Ni Mu-Yun, Zhon yu-tong, Li Lan-na, Cui Shu-Lian, Zhang Mu-qun, Wang Xiu-Zhen and Liang XiāoTian, **Planta Medica**, (1982), **44**, 143-45
- /52/ Wiley Database HP 59943b; (1986); John Wiley & Sons Inc.; Lincsed To Hewlett Packard Company s/n 3032A46256
- /53/ Adams, R.P.; "Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy"; (1995); Allured Publ. Com.; USA; pg 1-14
- /54/ Van Den Dool, H.; Kratz, P.D.J.; **J. Chrom.**; (1963); **11**; 463-471

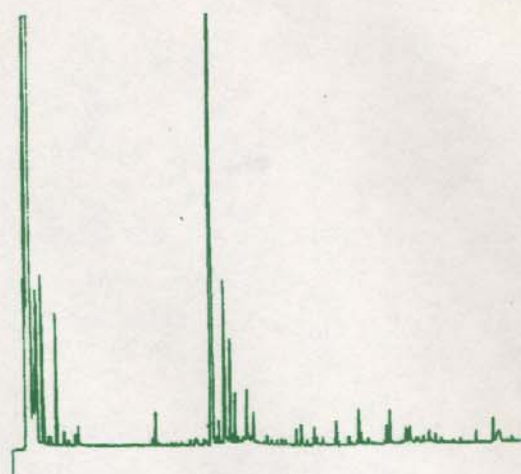
- /55/ Hayashi, S.; Sato, H.; Hayashi, N.; Okude, N.; Matura, T.; **J. Sci. Hiroshima Uni.Ser. A II**; (1967); **31(3)**; 217-231; Hanvise, J.; Puttemans, J.P.; Smolder, R.R.; **J.Chem.Soc.(C)**; (1968); 93-101
- /56/ March, J.; **Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure**; (1977); 956; McGraw-Hill, Inc.; Carey, S.; **Advanced Organic Chemistry**; (1984); **B**; 428; Plenum Press; N.Y.
- /57/ Kim, S.; Choi, **J.Nat.Prod.**; (1993); **56(6)**; 857-863
- /58/ March, J.; **Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure**; (1977); 708; McGraw-Hill, Inc.
- /59/ Wiestein, S.; Lucas,H.J.; **J. AM. CHEM. SOC.**; (1938); **60**; 836-847
- /60/ March, J.; **Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure**; (1977); 984; McGraw-Hill, Inc.
- /61/ Sales *et. al.*; **Sintese de Artemisinina e Seus Derivados-** Grupo de pesquisas do CPQBA/UNICAMP; Universidade Estadual de Campinas; c.p. 6171; Paulinia-S.P.
- /62/ Khand, I.U.; Knox, G.R.; Pauson,P.L.; Watts, W.E.; JCS Perkin Trans I;(1973); 975; Pauson, P.L.;**Organometllics in Organic Synthesis**; (1988); Springer, Berlin; Schore, N.E.; **Org.React.**; (1991); **40**; 1-89; a) Ferracini, V.L.; Tese de Doutorado; (1995); Unicamp
- /63/ Perrin, D.D.; Armarego, W.L.F.; Perrim, D.R.; **Purification of Laboratory Chemical**; (1980); Pergamon Press; Oxford
- /64/ **“Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography”**Merck; Darmstadt; (1971); pg 7
- /65/ Tu, Y.Y.; Ni, M.Y.; Fan, I.F.; Cui, S.T.; Zhang, M.Q.; Wang, X.Z.; Liang, X.T.; **Acta Pharm. Sinica**; (1981); **16**; 366
- /66/ Shilin, Y.; Roberts, M.F.; Phillipson, J.D.; **Phytochemistry**; (1989); **28(5)**; 1509-1511
- /67/ Desai, D.; **J.Indian Chem. Soc.**; (1963); **40**; 456
- /68/ Neeman, M.; Johnson, W.S.; **Org. Synth.**; (1973); **5**; 245; Arndt, T.F.; **Org. Synth.**; (1943); **2**; 165
- /69/ Rickborn, B.; Wuesthoff, M.T.; **J. AM. CHEM. SOC.**; (1970); **92**; 6894
- /70/ Rickborn, B; Lamke, W.E.; **J. ORG. CHEM.**; (1967); **32**; 537

- /71/ Corey, E.J.; Erickson, B.N.; **J. ORG. CHEM.**; (1970); **35**(9); 3195-3196
- /72/ Scheidegger, W.; Schaffner, K.; Jagger, O.; **Helv. Chim. Acta**; (1962); **45**; 400; Grant, T.P.; Weaver, S.R.; **Tetrahedron**; (1974); **30**; 2385
- /73/ Borowitz, I.J.; Parnes, H.; **J. ORG. CHEM.**; (1967); **32**; 3560
- /74/ Yandovskii, P.; Ershov, R.; **Russ. Chem. Rev.**; (1972); **41**; 403-410

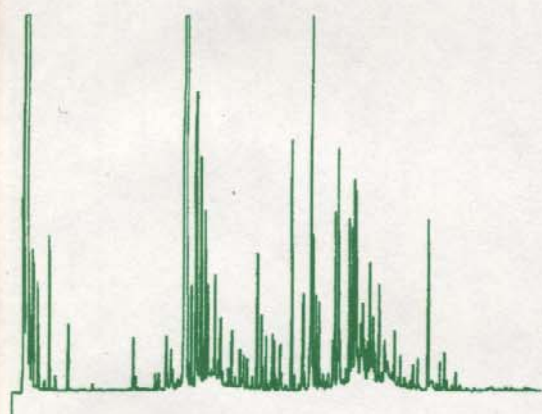
Perfil Cromatográfico do comportamento sazonal do óleo essencial de folhas de *Artemisia annua* L.



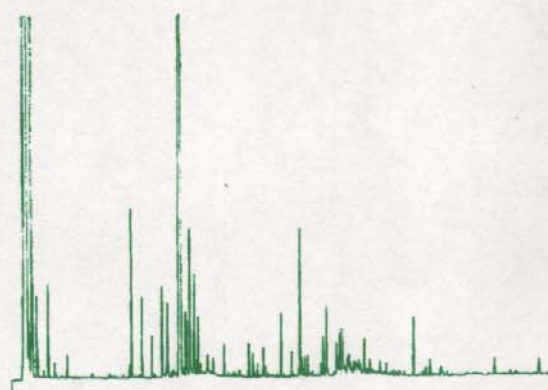
Perfil da 1ª semana



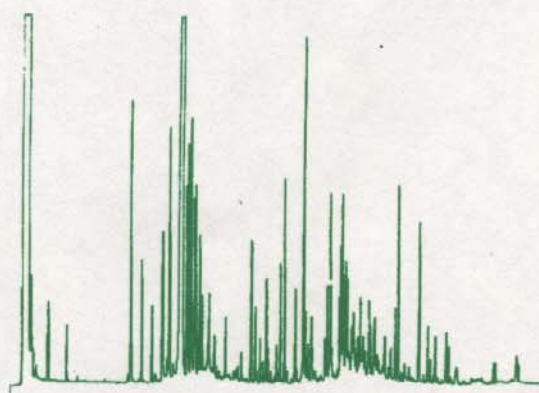
Perfil da 5ª semana



Perfil da 6ª semana

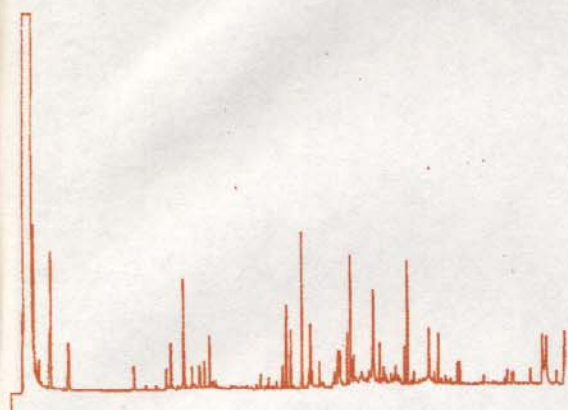


Perfil da 8ª semana

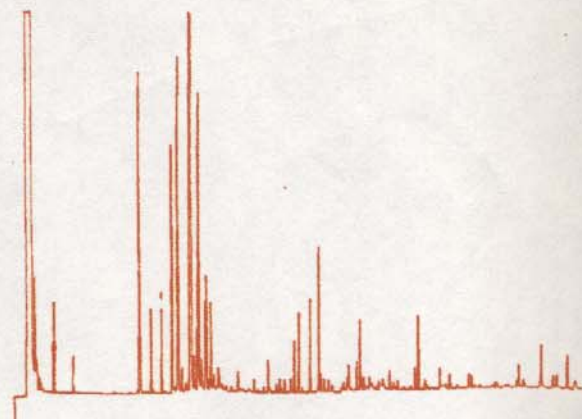


Perfil da 9ª semana

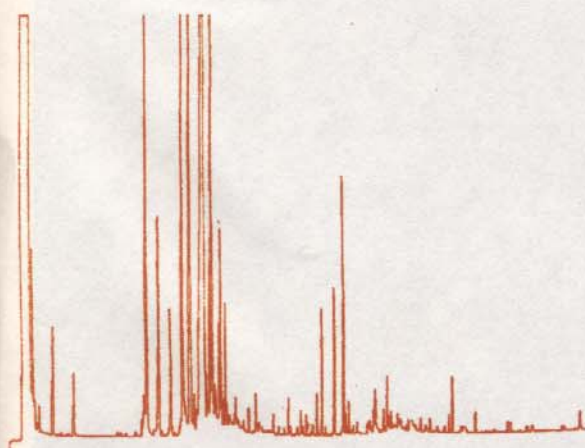
Perfil Cromatográfico do comportamento sazonal do óleo essencial de flores de *Artemisia annua* L.



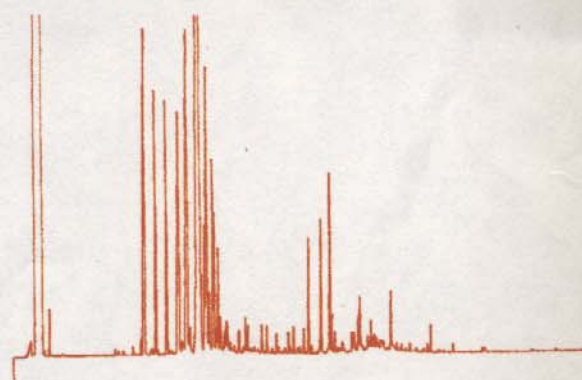
Perfil da 12ª semana



Perfil da 14ª semana



Perfil da 15ª semana



Perfil da 16ª semana