

## CRASSIFLORINA, UMA ACETOGENINA TETRA-HIDROFURÂNICA CITOTÓXICA DE *ANNONA CRASSIFLORA* (ARATICUM)

Lúcia Pinheiro Santos, Maria Amélia D. Boaventura

Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas - UFMG - Cx. Postal 702 - 31270-901 - Belo Horizonte - MG

Alaíde Braga de Oliveira\*

Faculdade de Farmácia - UFMG - Av. Olegário Maciel 2360 - 30180-112 - Belo Horizonte - MG

Recebido em 29/3/94

The structure of crassiflorin, a tetrahydroxy-di-tetrahydrofuran fatty acid  $\gamma$ -lactone (acetogenin) isolated from a petrol extract of *Annona crassiflora* seeds was determined by spectral analysis. The step by step identification is reported aiming to show in details the methodology for the structure elucidation of Annonaceous acetogenins. The *in vitro* cytotoxicities of crassiflorin were measured against human lung carcinoma A-549, human colon adenocarcinoma HT-29, human breast carcinoma MCF-7, human CNS carcinoma U-251 and melanoma RPMI-7951 cell lines and compared with adriamycin.

Keywords: *Annona crassiflora*; Annonaceae; acetogenin; crassiflorin.

### INTRODUÇÃO

A família Annonaceae compreende cerca de 120 gêneros e mais de 2000 espécies<sup>1</sup>. Segundo Panichpol & Waterman<sup>2</sup> pouco se conhece da fitoquímica desta família, provavelmente devido ao grande número de espécies, aliado ao fato que a maioria dos estudos realizados centralizaram-se em alcalóides, cuja presença é marcante em Annonaceae<sup>1</sup>.

Em 1982, na procura de plantas com atividade antineoplásica, Jolad e colaboradores<sup>3</sup> testaram o extrato etanólico das raízes de *Uvaria accuminata* e dele isolaram uma substância de natureza graxa, a uvaricina. Esta nova substância apresentou atividade antitumoral no sistema PS (leucemia linfocítica em ratos) *in vivo*, sendo esta a primeira acetogenina bis-tetra-hidrofurânica, com um anel  $\gamma$ -lactônico, isolada. Desde então mais de 30 novas acetogeninas foram descritas. Esta nova classe, conhecida como acetogeninas tetra-hidrofurânicas de Anonáceas, é constituída por substâncias de origem policetídica que se caracterizam por apresentarem um esqueleto constituído de 35 a 37 átomos de carbono, contendo um anel  $\gamma$ -lactônico, geralmente  $\alpha,\beta$ -insaturado e um ou dois anéis tetra-hidrofurânicos, que podem ser ou não adjacentes<sup>4</sup>.

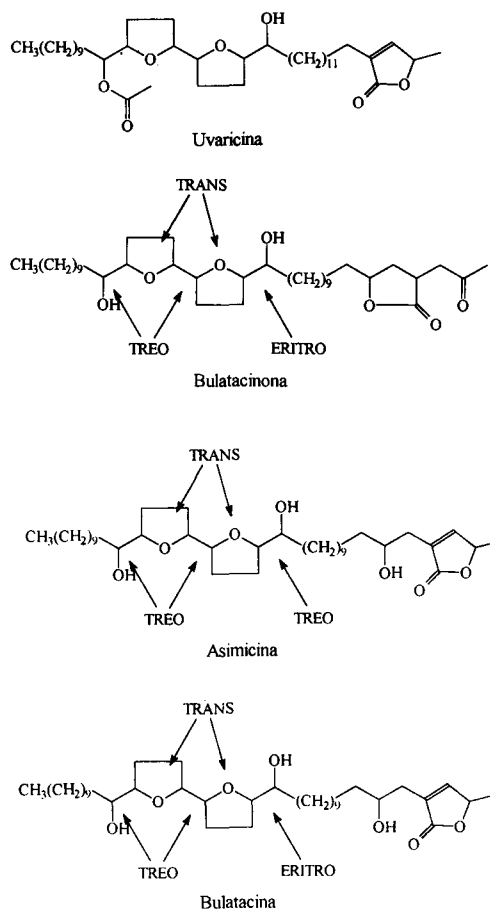
A grande maioria das substâncias isoladas apresentou atividade antitumoral em testes *in vitro* contra diferentes linhagens de células. Algumas delas foram também testadas *in vivo* destacando-se a bulatacinona, que se mostrou bastante seletiva, bem como a asimicina e a bulatacina.

A anonacina e a gigantecina foram relatadas como antimetabólicas (9 ASK), sendo sugerido um mecanismo de inibição da tubulina, o qual ainda não foi, no entanto, comprovado<sup>4</sup>.

A cherimolina e a desidrocherimolina foram relatadas como antimicrobianas. Asimicina, anonacina e goniotalamicina apresentaram atividade antimalárica<sup>4</sup>.

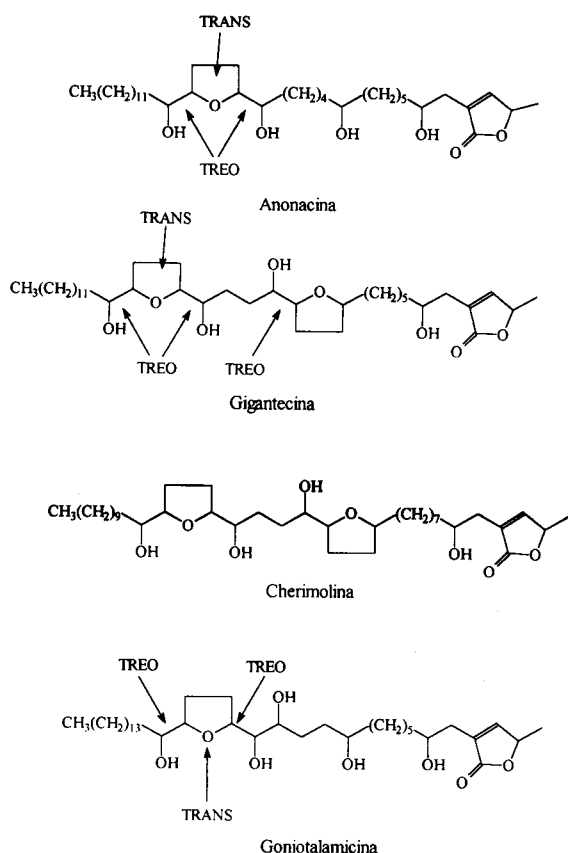
É também de grande interesse a atividade pesticida apresentada por algumas destas substâncias. Em 1988, Mikolajczak e colaboradores<sup>5</sup> registraram uma patente para todo o grupo de acetogeninas de *Annonaceae*, como pesticidas. A asimicina foi a primeira e é a principal acetogenina possuindo esta atividade.

Até o momento foram isoladas acetogeninas mono- ou bis-tetra-hidrofurânicas apenas de cinco gêneros da família



Annonaceae: *Annona*, *Asimina*, *Goniothalamus*, *Rollinia* e *Uvaria*<sup>4</sup>.

A elucidação estrutural das acetogeninas lineares tetra-hidrofurânicas é feita através dos métodos clássicos de espectroscopia tais como UV, IR, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C e espectrometria de massas, sendo este último essencial para a localização



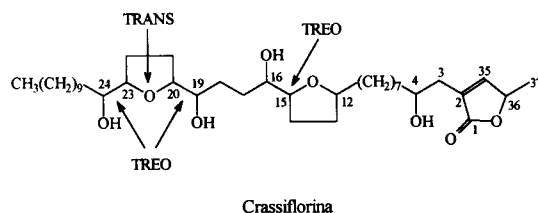
dos anéis tetra-hidrofurânicos na cadeia hidrocarbônica. Os espectros de massas por impacto eletrônico (EMIE) de acetogeninas são muitas vezes irreprodutíveis, devido à formação de produtos de pirólise e rearranjos térmicos. A identificação segura de uma acetogenina requer, deste modo, a preparação de derivados do tipo trimetilsilila e acetila. O primeiro permite a observação, no espectro de massas, dos fragmentos correspondentes às fissões  $\alpha$  aos carbonos carbinólicos. O derivado acetilado é de grande importância na definição da estereoquímica dos centros quirais das acetogeninas. A região dos anéis tetra-hidrofurânicos contém seis ou mais centros quirais permitindo assim a existência de um grande número de diastereoisômeros. A principal metodologia utilizada na definição das relações estereoquímicas entre os átomos de carbono hidroxilados estereogênicos e os carbonos adjacentes dos anéis bis-tetra-hidrofurânicos foi descrita por Hoye e colaboradores<sup>6</sup> e envolve a comparação entre os deslocamentos químicos nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do derivado acetilado da acetogenina e àqueles obtidos de doze modelos sintéticos de bis-tetra-hidrofuranos dibutildiacetilados. Pequenas variações nos deslocamentos químicos são importantes na diferenciação entre dois diastereoisômeros e para isto é necessário que se obtenham espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de alta resolução.

Técnicas de RMN de dupla dimensão (COSY, HETERO-COR) e experimentos de desacoplamento homonuclear têm contribuído para uma rápida identificação dos tipos de subunidades  $\gamma$ -lactona e anéis tetra-hidrofurânicos presentes na molécula.

Este trabalho descreve o isolamento e a determinação estrutural de uma acetogenina isolada das sementes de *Annona crassiflora* Mart., popularmente conhecida como araticum. As sementes desta espécie são usadas, popularmente no tratamento de ferimentos e contra picadas de cobra<sup>7</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

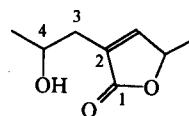
O extrato, em éter de petróleo, das sementes de *A. crassiflora* foi submetido a partição entre hexano e metanol aquoso (9:1). A fração metanólica (FM/H) foi cromatografada em coluna de sílica gel, tendo sido coletadas 335 frações. Da fração FM/H 273-4, eluída com acetato de etila/metanol 9:1, precipitou um sólido branco que, após recristalização em acetato de etila, foi submetido às análises espectroscópicas usuais que indicaram tratar-se de uma acetogenina bis-tetra-hidrofurânica a qual foi denominada crassiflorina<sup>8</sup>.



A fórmula molecular da crassiflorina foi definida como  $\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_8$  a partir do EMBAR (3-NBA,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  639,60, calculado para  $\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_8$ , 638,93). A perda sequencial de quatro moléculas de água, observada no espectro de massas ( $m/z$  621,59; 603,58; 585,56; 567,54), sugeriu a presença de quatro hidroxilas alcoólicas, o que foi confirmado pelos sinais dos carbonos carbinólicos no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$  69,98(C-4); 74,07(C-19); 74,26 (C-24) e 74,41(C-16).

A presença de lactona  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada foi sugerida pela forte absorção de grupo carbonila, no espectro IV (1745  $\text{cm}^{-1}$ ), e pelos sinais, no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , em  $\delta$  7,16(1H, d, H-35); 5,04(1H, m, H-36); 1,41(3H, d, H-37) e no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  174,57(C-1); 151,76(C-35); 131,22(C-2); 77,94(C-36) e 19,11(C-37). Os sinais dos carbonos olefínicos da  $\gamma$ -lactona em  $\delta$  151,76(C-35) e 131,22(C-2), sugerem a presença de hidroxila em C-4. Em ausência desta o sinal de C-35 é observado em menor frequência ( $\delta$  148,0)<sup>9</sup>. A presença da hidroxila em C-4 foi também confirmada pelos sinais correspondentes a H-3 no espectro de RMN  $^1\text{H}$ : um duplo duplo para H-3a, em  $\delta$  2,51 ( $J=14,95$  Hz), um duplo duplo para H-3b em  $\delta$  2,37 ( $J=14,95$ ; 8,19 Hz) e um multiplo para H-4, em  $\delta$  3,80, e pelos deslocamentos químicos de C-3 ( $\delta$  33,37) e C-4(69,98) no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ . As atribuições destes sinais foram confirmadas pelos espectros bidimensionais de correlação heteronuclear e homonuclear. Este último permitiu estabelecer uma correlação de H-3a e H-3b com o H-4.

O EMIE-AR mostrou um pico de  $m/z$  141,0542755 sinal este correspondente ao fragmento  $\text{C}_7\text{H}_9\text{O}_3$  (calc. 141,0552), originado pela quebra em  $\alpha$  a C-4. Da mesma forma um pico de  $m/z$  213,9, no EMBAR do derivado sililado, indicou a presença da subunidade A.



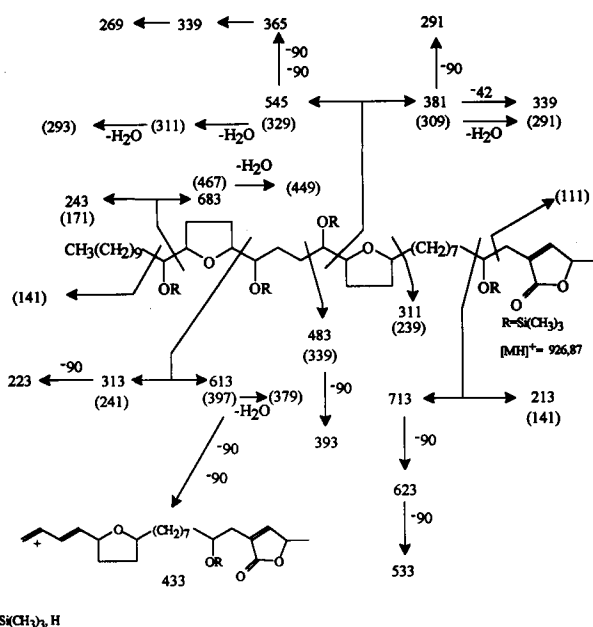
Subunidade A

A presença de dois anéis tetra-hidrofurânicos não adjacentes foi deduzida por comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  com aqueles de compostos modelo<sup>4</sup>. Os três sinais no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  79,33(C-12); 81,7(C-15) e 82,97 (C-20, C-23) correspondem aos carbonos oxigenados dos anéis tetra-hidrofurânicos. O sinal em  $\delta$  79,33 indica que um carbono oxigenado do anel tetra-hidrofurânico não possui grupo hidroxila no carbono adjacente<sup>4,5</sup> e é de valor diagnóstico para acetogeninas do tipo bis-tetra-hidrofurânicas

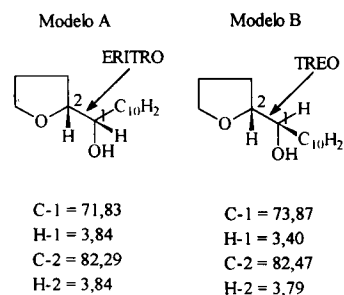
não adjacentes. Os sinais em  $\delta$  74,04; 74,26 e 74,40 referem-se a carbonos hidroxilados secundários e estão correlacionados no espectro bidimensional de correlação heteronuclear ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -COSY) ao sinal em  $\delta$  3,40 (m, 3H). Os sinais dos carbonos oxigenados dos anéis tetra-hidrofurânicos (C-12, C-15, C-20 e C-23) se correlacionam com aqueles em  $\delta$  3,80-3,88(5H) correspondentes aos prótons carbinólicos destes anéis.

A análise das fragmentações observadas nos espectros de massas da crassiflorina e de seu derivado siliado permitiu a localização dos anéis tetra-hidrofurânicos, bem como dos grupos hidroxila na cadeia hidrocarbônica, (Esquema 1). O EMIE-AR da crassiflorina apresentou sinais razoavelmente intensos de  $m/z$  309, 379 e 449, os quais estão associados às fissões  $\alpha$  aos carbonos carbinólicos. O sinal de  $m/z$  309,2096 (51%) ( $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{O}_4$ ; calc. 309,2065) corresponde à fissão entre C-15 e C-16 e dá a indicação da presença de uma cadeia com 7 carbonos ligando a subunidade A ao primeiro anel tetra-hidrofurânico. O sinal de  $m/z$  329 é complementar aquele de  $m/z$  309, mas não é observado no espectro. No entanto, a presença daquele de  $m/z$  311,2592 (5%) ( $\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{O}_3$ ; calc. 311,2586), relativo à perda de  $\text{H}_2\text{O}$  a partir de  $m/z$  329, confirma a outra parte da molécula. O tamanho da cadeia hidrocarbônica lateral foi confirmado pelos picos de  $m/z$  449,2907 (11%) ( $\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{O}_6$ ; calc. 449,2903) e 169,1590 (4%) ( $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{O}$ ; calc. 169,1592), o primeiro, referente à quebra entre C-23 e C-24, acompanhado de perda de água, e, o segundo, à mesma fissão, sendo este sinal correspondente à parte lateral da crassiflorina, menos  $\text{H}_2$ . O sinal de  $m/z$  243,23 no EMBAR do derivado siliado confirma este segundo fragmento; aquele de  $m/z$  379,2482 (40%) ( $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{O}_5$ ; calc. 379,2484) corresponde à quebra entre C-19 e C-20 e à perda de água. Os fragmentos contendo o grupo trimetilsilila muitas vezes não são evidentes pois frequentemente sofrem perda de 90u.m.a. dando origem a novos íons, que sofrem outras fragmentações e são estes, aqueles de fato, observados<sup>1,4,5</sup>. A medida da massa exata pelo EMIE-AR confirmou os fragmentos propostos.

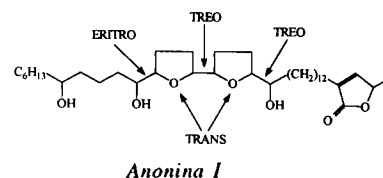
A estereoquímica relativa dos anéis tetra-hidrofurânicos foi determinada utilizando-se duas metodologias descritas na



Esquema 1. Fragmentos observados no EMBAR para o derivado siliado da crassiflorina e fragmentos observados no EMIE para a crassiflorina (entre parênteses).



literatura<sup>4,9,10</sup>. A primeira segue o modelo de Born e colaboradores<sup>9</sup> onde os deslocamentos químicos nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  de dois modelos A e B indicam pequenas diferenças para as estereoquímicas **eritro** e **treo**. Assim para o isômero **eritro** os deslocamentos químicos de C-1 e C-2 (modelo A) são menores que aqueles correspondentes no isômero **treo** (modelo B). Já para H-1 e H-2, estes apresentam equivalência de deslocamentos químicos no primeiro caso, e para o segundo, H-1 apresenta valor menor para o deslocamento químico que H-2. Estes valores são compatíveis com aqueles observados para a anonina I, cuja estereoquímica foi definida por cristalografia de raios X. Essa metodologia é aplicável para às acetogeninas das classes mono-tetra-hidrofurânicas e àquelas bis-não adjacentes-tetra-hidrofurânicas, como a crassiflorina.



A segunda metodologia, relatada por Jossang e colaboradores<sup>10</sup>, também estabelece um modelo no qual a configuração relativa entre os carbonos oxigenados dos anéis tetra-hidrofurânicos e os carbonos carbinólicos em  $\alpha$  aos mesmos pode ser definida pelos deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e RMN  $^1\text{H}$  para os carbonos carbinólicos  $\alpha$  ao anel tetra-hidrofurânico, e para o hidrogênio situado neste mesmo carbono. Segundo este modelo, os sinais destes nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  são  $\delta$  3,80 e  $\delta$  72,0 quando a estereoquímica é **eritro**, e  $\delta$  3,40 e  $\delta$  74,0 quando ela é **treo**. Com base nestas duas observações concluiu-se que a crassiflorina possui a estereoquímica relativa **treo**, **treo** e **treo** entre C-15/C-16, C-19/C-20 e C-23/C-24, respectivamente, uma vez que os deslocamentos químicos para estes são  $\delta$  74,41 (3,40); 74,26 (3,40) e 74,07 (3,40).

O padrão **trans** de substituição no anel tetra-hidrofurânico foi estabelecido através da comparação dos deslocamentos químicos dos dois carbonos oxigenados do anel<sup>10</sup> que apresenta grupos hidroxila nos carbonos adjacentes. Para o isômero **cis** tem-se  $\Delta\delta=2$  e para o **trans**  $\Delta\delta<1,5$ . Para a crassiflorina observou-se um  $\Delta\delta_{20,23}=0$ , indicando a configuração **trans** para este anel. As configurações dos centros quirais em C-4, C-12 e C-36 permanecem indefinidas uma vez que até o momento não foi estabelecida uma metodologia ou um modelo para sua determinação.

O esqueleto carbônico da crassiflorina mostrou-se idêntico àquele da silvaticina<sup>5</sup> e da bulatalicina<sup>11</sup>. No entanto, elas diferem na estereoquímica relativa entre C-15/C-16, C-19/C-20 e C-23/C-24. Para a silvaticina tem-se a configuração **treo-eritro-treo**, enquanto que para a bulatalicina esta é **eritro-treo-treo**. A crassiflorina é, portanto, um isômero totalmente **treo** da bulatalicina e da silvaticina.

A determinação estrutural da crassiflorina foi apresentada, pela primeira vez, na sessão de painéis do XII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, ocorrido no período de 15 a 17 de setembro de 1992, em Curitiba-PR<sup>8</sup>. No início de 1993, Gu *et al.*<sup>12</sup> e Cortes *et al.*<sup>13</sup> publicaram, simultaneamente, o isolamento e determinação estrutural da bulatanocina e da cherimolina-2, respectivamente, que se mostraram, ambas, idênticas à crassiflorina, como se pode deduzir pela comparação dos dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (Tabelas 1 e 2).

Quanto à atividade citotóxica, a crassiflorina mostrou-se ativa contra linhagens de células tumorais humanas. Os mesmos resultados foram obtidos para a bulatanocina<sup>12</sup> (Tabela 3). A cherimolina-2 somente foi testada em células KB (carcinoma humano de nasofaringe), mostrando significante citotoxicidade<sup>13</sup>.

## CONCLUSÃO

Crassiflorina, bulatanocina e cherimolina-2 são denominações diferentes para uma mesma substância que representa o primeiro estereoisômero totalmente *treo* da bulatalicina<sup>11</sup> e da silvaticina<sup>5</sup>. Esta substância foi isolada, em três países diferentes: Brasil, Estados Unidos da América do Norte e França, a partir de espécies do gênero *Annona*, a saber *A. crassiflora*, *A. bullata*<sup>11</sup> e *A. cherimolia*<sup>13</sup>, respectivamente. A bulatanocina foi extraída da madeira do caule de *A. bullata*; a crassiflorina e a cherimolina-2, das sementes. A atividade citotóxica da crassiflorina desperta um gran-

**Tabela 1.** Comparação dos dados de RMN <sup>1</sup>H de crassiflorina, cherimolina-2 e bulatanocina.

	Crassiflorina (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	Cherimolina-2 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) <sup>13</sup>	Bulatanocina (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) <sup>12</sup>
3a	2,51 ddd	2,48	2,53 dddd
3b	2,37 dd	2,34	2,40 dddd
4	3,88-3,80m	3,78	3,87m
5-11	1,72-1,47m	1,42	1,71-1,21
12	3,88-3,80m	3,82	3,87m
13-14	2,08-1,98	1,94-1,24	1,99-1,37
15	3,88-3,80m	3,74	3,80
16	3,40m	3,38	3,41m
17-18	1,72-1,47m	1,94-1,24	1,71-1,37
19	3,40m	3,38	3,41m
20	3,88-3,80m	3,74	3,80m
21-22	2,08-1,98m	1,94-1,24	1,99-1,33
23	3,88-3,80m	3,74	3,80m
24	3,40m	3,38	3,41m
25-33	1,72-1,47m	1,94-1,24	1,71-1,21
34	0,86t	0,82	0,89t
35	7,16d	7,16	7,19q
36	5,04q	5,00	5,06qq
37	1,42d	1,39	1,42d

**Tabela 3.**

	BST <sup>a</sup> DL50 (µg/ml)	A-549 <sup>b</sup> ED50 (µg/ml)	MCF-7 <sup>c</sup> ED50 (µg/ml)	HT-29 <sup>d</sup> ED50 (µg/ml)	RPMI-7951 <sup>e</sup> ED50 (µg/ml)	U-251 <sup>f</sup> ED50 (µg/ml)
Adriamicina	8,0x10 <sup>-2</sup>	4,02x10 <sup>-4</sup>	2,72x10 <sup>-2</sup>	5,13x10 <sup>-4</sup>	N.T. <sup>g</sup>	N.T.
Bulatanocina	4,33x10 <sup>-1</sup>	<10 <sup>-8</sup>	6,09x10 <sup>-1</sup>	<10 <sup>-8</sup>	N.T.	N.T.
Adriamicina	N.T.	2,0	3,0x10 <sup>-1</sup>	2,0	4,0x10 <sup>-1</sup>	3,0x10 <sup>-1</sup>
Crassiflorina	N.T.	8,0x10 <sup>-3</sup>	3,0x10 <sup>-3</sup>	2,0x10 <sup>-2</sup>	4,0x10 <sup>-3</sup>	>3,0x10 <sup>-3</sup>

a=BST: brine shrimp lethality test; b=A-549: carcinoma humano de pulmão; c=MCF-7: câncer de mama; d=HT-29: adenocarcinoma de cólon; e=RPMI-7951: melanona; f=U-251: carcinoma do SNC; g=N.T.: não testado.

**Tabela 2.** Comparação dos dados de RMN <sup>13</sup>C de crassiflorina, cherimolina-2 e bulatanocina.

	Crassiflorina (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	Cherimolina-2 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) <sup>13</sup>	Bulatanocina (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) <sup>12</sup>
1	174,57	174,53	174,44
2	131,22	130,88	130,95
3	33,37	33,04	37,31-25,52
4	69,98	69,52	69,74
5-11	37,40-29,32	37,14-25,35	37,31-25,52
12	79,33	79,14	79,21
13-14	28,73-32,38	29,53-25,35	37,31-25,52
15	81,98	81,84	82,67
16	74,41	74,21	74,33
17-18	35,57-33,48	35,39-33,11	37,31-25,52
19	74,07	74,10	74,21
20	82,70	82,50	82,65
21-22	28,73-28,40	29,53-25,35	37,31-25,52
23	82,70	82,58	81,97
24	74,26	73,93	74,00
25-32	37,40-29,32	32,14-25,35	37,31-25,52
33	22,67	22,46	22,64
34	14,09	13,91	14,10
35	151,75	151,69	151,68
36	77,94	77,79	77,88
37	19,11	18,87	19,07

de interesse por *A. crassiflora* (araticum), planta que ocorre em região de cerrado, como uma possível fonte de potenciais agentes antineoplásicos naturais.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Procedimentos Experimentais Gerais

Os espectros na região do IV foram registrados em espectrômetro Shimadzu IR 408, usando pastilhas de KBr. Os espectros de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) e RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) foram obtidos em espectrômetro AM-500 da Bruker. Os espectros de massas foram determinados em VG Instruments 70-250 Mass spectrometer.

**Planta.** Os frutos de *A. crassiflora* foram coletados em Itatiaçu e Curvelo, Minas Gerais. O material botânico foi identificado pelo Prof. J. L. Pedersoli, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.

**Ensaio Biológico.** O extrato bruto, as frações e o composto puro isolado foram avaliados quanto à sua atividade citotóxica em cinco linhagens de células tumorais humanas tendo a adriamicina como controle. Estes testes de citotoxicidade foram realizados na Ohio State University pelo Prof. Dr. Ralph Stephens e pelo pós-graduando Jeff Sneddon.

**Extração e Isolamento.** As sementes de *A. crassiflora* (1,25

kg) foram secas, trituradas e submetidas a extração em extrator de Soxhlet, com éter de petróleo e, a seguir, com etanol aquoso a 75%. O extrato em éter de petróleo foi submetido a partição entre hexano e metanol aquoso a 90%. A fração metanólica foi concentrada sob vácuo, obtendo-se um xarope denso (5g), que foi chamado MH. Este foi incorporado a 12g de celite e cromatografado em coluna de sílica gel (197g), empacotada com hexano. Um gradiente de hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt, MeOH foi utilizado para eluição da coluna, coletando-se frações de 150-200 ml. Da fração MH 273-4, eluída com AcOEt/MeOH 9:1, após concentração parcial, precipitou um sólido branco (13mg), que foi recristalizado em AcOEt (p.f.= 107,3-108,8°C). A análise dos dados espectroscópicos levou à identificação da crassiflorina.

**Crassiflorina.** cristais brancos, p.f. 107,3-108,8°C (AcOEt); IV (KBr)  $\nu$  max cm<sup>-1</sup>: 3350(OH), 2900, 2840, 1745 (C=O), 1650 (C=C), 1460, 1320, 1200, 1065, 950, 720; EM-BAR m/z [MH]<sup>+</sup> 639,90; EM-IE: Esquema 1; RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 1; RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Tabela 2.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Dr. John M. Cassidy (Department of Medicinal Chemistry, College of Pharmacy, OSU, Ohio-USA) pelo estágio de três meses e pelo suporte financeiro concedidos a L.P. Santos; ao Dr. Liu Yong-Long pelas valiosas discussões dos espectros; ao Dr. Ralph Stephens e ao pós-graduando Jeff Sneddon pela realização dos testes de citotoxicidade. Ao CNPq, pelas bolsas de doutorado (L.P.S.) e de pesquisador IA (A.B.O.); à FINEP pelo apoio financeiro institucional.

#### REFERÊNCIAS

1. Leboeuf, M.; Cavé, A.; Bhaumik, P. K.; Mukherjee, B. e Mukherjee, R., *Phytochemistry* (1982), **21**, 2783.
2. Panichpol, K. e Waterman, P. G., *Phytochemistry* (1978), **17**, 1363.
3. Jolad, S. D.; Hoffmann, J. J.; Schram, K. H. e Cole, J. R., *J. Org. Chem.* (1982), **47**, 3151.
4. Rupprecht, J. K.; Hui, Y.-H.; McLaughlin, J. L., *J. Nat. Prod.* (1990) **53**, 237.
5. Mikolajczak, K. J.; Madrigal, R. V.; Rupprecht, J. K.; Hui, Y.-H.; Liu, V.-M.; Smith, D. L.; McLaughlin, J. L., *Experientia* (1990), **46**, 324.
6. Hoye, T. R.; Zhuang, Z.-P., *J. Org. Chem.* (1988), **53**, 5578.
7. Rizzini, C. T., Pereira, N. A., Mors, W. B., *Revisão das plantas brasileiras tidas como ativas contra peçonhas animais, especialmente cobras*. NPPN/UFRJ, 1986.
8. Santos, L. P.; Boaventura, M. A. D.; de Oliveira, A. B., Livro de Resumos do XII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Curitiba, (1992), número 169.
9. Born, L.; Lieb, F.; Lorentzen, J. P.; Moeschler, H.; Nonfon, M.; Sollner, R.; Wendisch, D., *Planta Med.* (1990), **56**, 312.
10. Jossang, A.; Dubaele, B. e Cavé, A., *Tetrahedron Lett.* (1990), **31**, 1861.
11. Hui, Y.-H.; Rupprecht, J. K.; Anderson, J. E.; Liu, Y.-M.; Chang, C.-J.; Smith, D. L.; McLaughlin, J. L., *Tetrahedron* (1989), **45**, 6941.
12. Gu, Z.-M.; Fang, X.-P.; Rieser, M. J.; Hui, Y.-H.; Miesbauer, L. R.; Smith, D. L.; Wood, K. V.; McLaughlin, J. L., *Tetrahedron* (1993), **49**, 747.
13. Cortes, D.; Myint, S. H.; Dupont, B.; Davoust, D., *Phytochemistry* (1993), **32**, 1475.