



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**METABÓLITOS ESPECIAIS ISOLADOS DE MADEIRA DE *Simira
grazielae* (RUBIACEAE) E ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

Volume 1

MIRZA NALESSO GOMES SANCHES

Sob a Orientação do Professor

Dr. Raimundo Braz-Filho

e Co-Orientação do professor

Dr. Mário Geraldo de Carvalho

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Orgânica

Seropédica, RJ
Outubro de 2013

547
S211m
T Sanches, Mirza Nalesso Gomes, 1988-
Metabólitos especiais isolados de
madeira de Simira grazielae (Rubiaceae) e
atividades biológicas / Mirza Nalesso Gomes
Sanches. - 2013.
67 f.: il.

Orientador: Raimundo Braz-Filho.
Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Química, 2013.
Bibliografia: f. 58-67.

1. Química orgânica - Teses. 2. Simira
grazielae - Teses. 3. Plantas - Análise -
Teses. 4. Rubiácea - Teses. I. Braz Filho,
Raimundo, 1935-. II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-
Graduação em Química. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

MIRZA NALESSO GOMES SANCHES

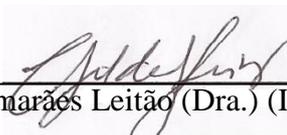
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química, área de Concentração em Química Orgânica.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 04/10/2013

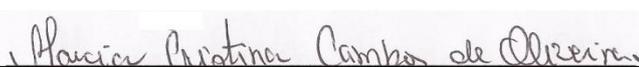


Raimundo Braz Filho (Dr.) DEQUIM-UFRRJ/LCQUI-UENF
(Orientador)

Mário Geraldo de Carvalho (Dr.) DEQUIM-UFRRJ



Gilda Guimarães Leitão (Dra.) (INPPN-UFRRJ)



Márcia Cristina Campos de Oliveira (Dra.) DEQUIM-UFRRJ

Leda Mathias (Dra.) LCQUI-CCT-UENF

Luciano Ramos Suzart (Dr.) DEQUIM-UFRRJ

*Aos meus pais e irmã, meus grandes amores, pelos
esforços, carinho e incentivos, na conquista de mais
uma etapa.*

*“Se sou fiel no pouco, ele me confiará mais,
Se sou fiel no pouco, meus passos guiará.”*

Daniel Poli

AGRADECIMENTOS

Com o coração aberto, quero agradecer a todos que colaboram para a realização deste trabalho, em particularmente:

À Deus o senhor da minha vida, que sempre me ilumina mostrando o caminho a seguir.

À minha família, meus pais Carlos André e Rita de Cácia e minha irmã Lorraine Nalesso, que são o meu porto seguro, pessoas que sempre estão ao meu lado, apoiando minhas decisões e torcendo pela minha vitória, dos quais me orgulho muito de fazerem parte da minha vida.

Ao prof. Dr. Raimundo Braz Filho pela dedicada orientação acadêmica e da vida, pela paciência e humildade ao transmitir seus conhecimentos, pelos conselhos e amizade, uma pessoa que admiro muito, um grande exemplo de profissional e pessoa a seguir.

Ao prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho pelo apoio, incentivo e transmissão de grandes conhecimentos.

Aos amigos Débora Ramos, Jeferson Correa, Juliana Puing, Lilian Cristina, Renata Duarte, Viviane Magalhães que sempre me apoiaram nos momentos difíceis acolhendo minhas lágrimas, aos momentos que puxaram minha orelha para o meu crescimento e aos dias de grande felicidade que me proporcionaram.

Ao Alan Franco, uma pessoa muito especial de que Deus presenteou-me, que me faz muito feliz e a cada dia me ajuda crescer profissionalmente e pessoalmente.

Aos meus amigos do LQPN-UFRRJ, Almir Ribeiro, Ana Paula de Oliveira, Geovany Amorim, Ilzenaide Neves, Lisieux de Santana, Queli Fidelis, Rafaela Oliveira, Tarcila Rocha, Tereza Ribeiro e Thamiris Texeira, pelo companheirismo.

Ao amigo Marcelo Araujo, pela ajuda na obtenção do material de estudo.

Às alunas de iniciação que me auxiliaram na realização deste trabalho Michele Gargano e Rayane Caldas.

Aos professores e técnicos do Departamento de Química (DEQUIM) da UFRRJ que me auxiliaram nas atividades desenvolvidas, transmitiram seus conhecimentos e por suas amizades.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos e ao CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro.

RESUMO

SANCHES, Mirza Nalesso Gomes. **Metabólitos Especiais Isolados da Madeira de *Simira grazielae* (Rubiaceae) e Atividades Biológicas**. 2013. 67p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica, Química de Produtos Naturais). Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ) Departamento de Química (DEQUIM) Instituto de Ciências Exatas (ICE), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ, 2013.

Este trabalho descreve o isolamento e a determinação estrutural de metabólitos especiais de *Simira grazielae*, família Rubiaceae. Este é o primeiro estudo fitoquímico dessa espécie. O material para o estudo foi coletado na Reserva Florestal do Vale do Rio Doce, Linhares- ES. As substâncias descritas nesta investigação fitoquímica foram isoladas através de partição com solventes orgânicos *n*-hexano (C₆H₁₄), diclorometano (CH₂Cl₂) e acetato de etila (AcOEt) e técnicas cromatográficas clássicas do extrato metanol (MeOH) obtido através de maceração a frio. O fracionamento cromatográfico e análise das frações conduziram ao isolamento e identificação de 18 substâncias e 1 derivado. Dentre os metabólitos especiais foram isoladas uma mistura de hidrocarbonetos, mistura de hidrocarboneto insaturado, mistura dos esteroides β-sitosterol e estigmasterol, 3-*O*-β-D-glicopiranosil-sitosterol; o aldeído siringaldeído; o composto fenólico 3,4,5-trimetoxifenol e 6'-*O*-vaniloiltachioside; a lignana siringaresinol; as cumarinas isofraxidina (7-hidroxi-6,8-dimetoxicumarina), escopoletina (7-hidroxi-6-metoxicumarina), 7-hidroxi-8-metoxicumarina, umbeliferona (7-hidroxycumarina), trimetoxycumarina, 5,7-dimetoxycumarina; o alcaloide β-carbolínico harmana (1-metil-9H-pirido[3,4-β]indol), marcador quimiotaxonômico do gênero, os alcaloides ofiorina e N-acetil-serotonina. Na determinação estrutural foram utilizadas técnicas de RMN¹H e RMN¹³C (1D e 2D), ESI-HRMS e CG-EM. O extrato MeOH e as frações obtidas por partições com solventes orgânicos foram submetidas à avaliação de atividade antioxidante com DPPH e potencial antinociceptiva, verificando-se elevadas atividades.

Palavras-chave: *Simira grazielae*, Rubiaceae, alcaloides, lignana, cumarinas, dados espectrais

ABSTRACT

SANCHES, Mirza Nalesso Gomes. **Phytochemical Study of *Simira grazielae* (Rubiaceae), and Biological Activities**. 2013. 67p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica, Química de Produtos Naturais). Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ). Departamento de Química (DEQUIM). Instituto de Ciências Exatas (ICE), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ, 2013.

This work describes the isolation and structural determination of special metabolites isolated from the wood of *Simira grazielae* species (Rubiaceae). This is the first phytochemical study of a specimen of *S. grazielae*. The material for study was collected in the Reserva Florestal do Vale do Rio Doce, Linhares- ES. The compounds described in this phytochemistry investigation were isolated by solvents partition with *n*-hexane (C₆H₁₄), dichloromethane (CH₂Cl₂) and ethyl acetate (EtAcO) and classical chromatographic techniques of the extracts obtained by maceration at room temperature with methanol. Chromatographic fractionation and analysis of the fractions led to the isolation and identification of 18 substances and 1 derivative. Among the special metabolites are isolated: a mixture of hydrocarbons; a mixture of unsaturated hydrocarbons, a mixture of β -stosterol and stigmasterol, 3-O- β -D-glucopyranosyl sitosterol; the phenolic compound 3,4,5-trimetoxifenol and -6'-O-vaniloiltachioside; the aldeide syringaldehyde; the lignan syringaresinol; the coumarins isofraxidine (7-hydroxy-6,8-dimethoxycoumarin), escopoletina (7-hydroxy-6-methoxycoumarin), umbelliferone (7-hydroxycoumarin), trimethoxycoumarin and 5,7-dimethoxycoumarin and the alkaloids β -carboline harman (1-methyl-9H-pyrido[3,4- β]indole, chemotaxonomic character of the genus), ofiorine alkaloids and N-acetyl serotonin . The structural determination was based on the ¹H and ¹³C NMR (1D and 2C) and ESI-HRMS and GC-MS analysis. The MeOH extract and fractions obtained by partition with organic solvents were submitted to evaluation of antioxidant activity with DPPH and potential antinociceptive, revealing expressive activities.

Keywords: *Simira grazielae*, Rubiaceae, alkaloids, lignan, coumarin, spectral data

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos metabólitos especiais vincristina, vimblastina e o taxol.	2
Figura 2. Metabólitos especiais isolados das espécies da família Rubiaceae(Continua)	5
Figura 3. Metabólitos especiais isolados de espécies do gênero <i>Simira</i>	8
Figura 4. Imagem de espécie de <i>Simira grazielae</i>	9
Figura 5. Efeito antinociceptivo do extrato e partições da madeira de <i>Simira grazielae</i> na dose de 100 mg/kg e morfina (3 mg/kg) na 1° fase do modelo de formalina. Os tratamentos foram realizados por via oral. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do tempo de lambedura. A significância estatística (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina, extrato e partições, por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo Teste de Bonferroni.....	53
Figura 6 - Efeito antinociceptivo do extrato e partições da madeira de <i>Simira grazielae</i> na dose de 100 mg/kg e morfina (3 mg/kg) na 2° fase do modelo de formalina. Os tratamentos foram realizados por via oral. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do tempo de lambedura. A significância estatística (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina, extrato e partições, por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Bonferroni.	53
Figura 7. Estabilização do radical livre do DPPH.....	54
Figura 8. Curva de concentração -% de inibição dos radicais DPPH para o extrato SGM e das partições SGMD, SGMac e SGMB de <i>S. grazielae</i>	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de RMN ¹³ C-DEPTQ (125 MHz, em CDCl ₃) da mistura das substâncias SGMH-1A e SGMH-1B comparados com dados da literatura para o β-sitosterol e o estigmasterol (KOJIMA et al., 1990). Deslocamentos químicos em δ _C (ppm).	20
Tabela 2. Dados de RMN ¹³ C-DEPTQ (125 MHz) em CDCl ₃ / MeOD de SGMH-3 comparados com dados da literatura para o 3-O-β-D-glicopiranosil sitosterol (KOJIMA et al., 1990).	22
Tabela 3. Dados espectrais de RMN ¹ H (500 MHz) e RMN- ¹³ C DEPTQ (125 MHz) inclusive resultados obtidos por HSQC e HMBC da substância de SGMD-2A , em CDCl ₃ , comparados com valores da literatura COSTA et al. 2012. Deslocamentos (δ _H [mult., <i>J</i> (Hz)] e δ _C , ppm).	25
Tabela 4. Dados espectrais de RMN ¹ H (500 MHz) e RMN- ¹³ C-DEPTQ (125 MHz) inclusive resultados obtidos por HSQC e HMBC da substância de SGMD-3A , em D ₃ CCOCD ₃ , comparados com valores da literatura (ZOLEK, et al., 2003; LIU, et al., 2004). Deslocamentos (δ _H [mult., <i>J</i> (Hz)] e δ _C , ppm).	28
Tabela 5. Dados espectrais de RMN ¹ H (500 MHz) e RMN- ¹³ C-DEPTQ (125 MHz) inclusive resultados obtidos por HSQC e HMBC da substância de SGMD-3B , em D ₃ CCOCD ₃ , comparados com valores da literatura JEREZANO et al., 2011. Deslocamentos (δ _H [mult., <i>J</i> (Hz)] e δ _C , ppm).....	29
Tabela 6. Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e de RMN- ¹³ C-DEPTQ (125 MHz), inclusive resultados obtidos por HSQC e HMBC, da substância SGMD-4 , em CDCl ₃ , comparados com valores da literatura (MONTEIRO et al., 2007). Deslocamentos (δ _H [mult., <i>J</i> (Hz)] e δ _C , ppm).	34
Tabela 7. Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e de RMN- ¹³ C-DEPTQ (125 MHz), inclusive resultados obtidos por HMBC, do derivado SGMD-4a , em CDCl ₃ , comparados com valores do siringaresinol (SGMD-4). Deslocamentos (δ _H [mult., <i>J</i> (Hz)] e δ _C , ppm).	36
Tabela 8. Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e de RMN- ¹³ C-DEPTQ (125 MHz), inclusive resultados obtidos por HMBC, do derivado SGMD-5 , em MeOD, comparados com valores da literatura (BASTOS, 2001). Deslocamentos (δ _H [mult., <i>J</i> (Hz)] e δ _C , ppm).	39

Tabela 9. Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e de RMN- ¹³ C-DEPTQ (100 MHz), inclusive resultados obtidos por HMBC, do derivado SGMH-4 , em MeOD, comparados com valores da literatura (BASTOS, 2002). Deslocamentos (δ_H [mult., J (Hz)] e δ_C , ppm).....	41
Tabela 10. Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e de RMN- ¹³ C-DEPTQ (125 MHz), inclusive resultados obtidos por HMBC, do derivado SGMAc-1A , em MeOD, comparados com valores da literatura (GUERREIRO, et al., 1993). Deslocamentos (δ_H [mult., J (Hz)] e δ_C , ppm).....	44
Tabela 11. Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e de RMN- ¹³ C-DEPTQ (125 MHz), inclusive resultados obtidos por HMBC, do derivado SGMAc-1B , em MeOD, comparados com valores da literatura (YANG, et al., 2007). Deslocamentos (δ_H [mult., J (Hz)] e δ_C , ppm).....	46
Tabela 12. Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e de RMN- ¹³ C-DEPTQ (125 MHz), da substância SGMD-6A , em CD ₃ OCCD ₃ , comparados com valores da literatura (PARAMAR, et al., 1996). Deslocamentos (δ_H [mult., J (Hz)] e δ_C , ppm).....	48
Tabela 13. Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e de RMN- ¹³ C-DEPTQ (125 MHz), da substância SGMD-6B , em CD ₃ OCCD ₃ , comparados com valores da literatura (PARAMAR, et al., 1996). Deslocamentos (δ_H [mult., J (Hz)] e δ_C , ppm).....	50
Tabela 14. Atividades antioxidantes do extrato metanólico e das partições diclorometano, acetato de etila e butanol da madeira de <i>S. grazielae</i>	55

LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1. Importância e interdisciplinaridade de substâncias bioorgânicas produzidas pelo metabolismo secundário	1
Esquema 2. Fracionamento do extrato metanólico do material vegetal.....	11
Esquema 3. Proposta do mecanismo da reação de acetilação de SGMD-4A.....	14
Esquema 4. Resultados obtidos do fracionamento de <i>S. grazielae</i>	15
Esquema 5. Proposta biossintética dos esteróides (KONGDUANG et al., 2008).....	18
Esquema 6. Proposta biossintética das cumarinas (DEWICK, 2009)	23
Esquema 7. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos no EMBR da substância SGMD-2A , com as abundâncias relativas.....	26
Esquema 8. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos no EMBR da substância SGMD-2B , com as abundâncias relativas.....	26
Esquema 9. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos no EMBR da substância SGMD-3A , com as abundâncias relativas	30
Esquema 10. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos no EMBR da substância SGMD-3B , com as a abundâncias relativas.....	30
Esquema 11. Proposta de fragmentação usando como exemplo a 5,6,7- trimetox-cumarina para justificar os principais picos no EMBR da substância SGMD-3C , com as abundâncias relativas	31
Esquema 12. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos no EMBR da substância SGMD-3D , com as abundâncias relativas.....	31
Esquema 13. Proposta biossintética dos metabólitos especiais C ₆ C ₃ (DEWICK, 2009).....	33
Esquema 14. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos no EMBR da substância SGMD-4 , com as abundâncias relativas.....	35
Esquema 15. Proposta biossintética de alcaloides indólicos (DEWICK, 2009).....	37
Esquema 16. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos no EMBR da substância SGMD-5 , com as abundâncias relativas.....	39
Esquema 17. Estruturas para os diferentes picos apresentados no ESI-MS, [M+Na ⁺] e [M+H ⁺] da substância SGMH-4	42
Esquema 18. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos no EMBR da substância SGMAc-1A , com as abundâncias relativas.	44

Esquema 19. Espectro de massas de alta resolução ESI-MS registrado no modo negativo ([M-H ⁺]) da substância SGMAc-1B	46
Esquema 20. Proposta biossintética dos metabólitos especiais C ₆ C ₃ (DEWICK, 2009)	47
Esquema 21. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos no EMBR da substância SGMD-6A , com as abundâncias relativas.	48
Esquema 22. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos observados no EMBR da substância SGMD-6B , com as abundâncias relativas	50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Espécies de <i>Simira</i> com estudo fitoquímico	7
Quadro 2. Classificação botânica da espécie de <i>S. grazielae</i> (Public Data Portal).....	9
Quadro 3. Material vegetal de <i>Simira grazielae</i>	11
Quadro 4. Frações obtidas do extrato metanólico do material vegetal da madeira de <i>Simira grazielae</i>	12
Quadro 5. Constituintes químicos isolados da madeira de <i>Simira grazielae</i>	16

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

δ	deslocamento químico (ppm)
δ_H	deslocamento químico de Hidrogênio
δ_C	deslocamento químico de Carbono
λ	comprimento de onda
J	constante de acoplamento (medida em Hertz)
ν	estiramento
AcOEt	acetato de etila
°C	graus Celsius
CC	cromatografia em coluna (pressão atmosférica)
CCDA	cromatografia em camada delgada analítica
$CDCl_3$	clorofórmio Deuterado
$CHCl_3$	clorofórmio
CH_2Cl_2	diclorometano
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas
cm^{-1}	centímetro recíproco (unidade de número de onda)
COSY	correlated spectroscopy
D_3CCOCD_3	acetona deuterado
d	dubleto
DMSO-d6	dimetilsulfóxido deuterado
dd	duplo dubleto
DEPTQ	distortionless enhancement by polarization transfer quantum
eV	elétron volt
EM	espectrometria de massas
EMBR	espectro de massas de baixa resolução
ESI-MS	electrospray Ionization Mass Spectrometry
g	grama
HCl	ácido clorídrico
HMBC	heteronuclear multiple bondcorrelation
HSQC	heteronuclear multiple quantum coherence
Hz	hertz
I.E.	impacto de elétrons
Kg	kilograma
m	multiplete
MeOD	metanol deuterado
mg	miligrama
min	minutos
mm	milímetro
mult	multiplicidade
m/z	relação carga/massa
MeOH	metanol
m	metro
MHz	megahertz
mL	mililitro
n-ButOH	n-butanol
Na_2SO_4	sulfato de sódio
nm	nanômetro

P.A.	pro analyse
ppm	parte por milhão
RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono-13
<i>s</i>	singleto
<i>sl</i>	singleto largo
SGMH	<i>Simira grazielae</i> madeira hexano
SGMD	<i>Simira grazielae</i> madeira diclorometano
SGMAc	<i>Simira grazielae</i> madeira acetato de etila
SGMB	<i>Simira grazielae</i> madeira n-butanol
SGMR	<i>Simira grazielae</i> madeira resíduo
<i>t</i>	triplete
TMS	tetrametilsilano
T _R	tempo de retenção
UV- Vis	ultravioleta no visível
Vol.	volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Família Rubiaceae	4
3.2 Gênero <i>Simira</i>	6
3.3 <i>Simira grazielae</i>	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1 Reagentes e equipamentos	10
4.2 Coleta e identificação do material vegetal	10
4.3 Preparação e fracionamento dos extratos brutos de <i>Simira grazielae</i>	11
4.4 Isolamento e purificação dos constituintes químicos	12
4.4.1 Estudo fitoquímico da fração n-hexânica da madeira de <i>Simira grazielae</i>	12
4.4.2 Estudo fitoquímico da fração em CH ₂ Cl ₂ da madeira de <i>Simira grazielae</i>	13
4.4.3 Estudo fitoquímico da fração em acetato de etila da madeira de <i>Simira grazielae</i>	13
4.5 Preparação de derivado	14
4.5.1 Acetilação de SGMD-4 com anidrido acético na presença de piridina	14
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5.1 Determinação estrutural da substância SGMD-1	17
5.2 Determinação estrutural da substância SGMH-2	17
5.3 Determinação estrutural dos esteroides	18
5.3.1 Determinação estrutura da mistura de SGMH-1	19
5.3.2 Determinação estrutural da substância SGMH-3	20
5.4 Determinação estrutural das cumarinas	23
5.4.1 Determinação estrutural da substância SGMD-2	24
5.4.2 Determinação estrutural da mistura de SGMD-3	26
5.5 Determinação estrutural de lignanas	32
5.5.1 Determinação estrutural da substância SGMD- 4	33
5.5.2 Derivado acetilado do siringaresinol SGMD-4a.	35
5.6 Determinação estrutural do alcaloide	36
5.6.1 Determinação estrutural da substância SGMD-5	37
5.6.2 Determinação estrutural da substância SGMH-4	39

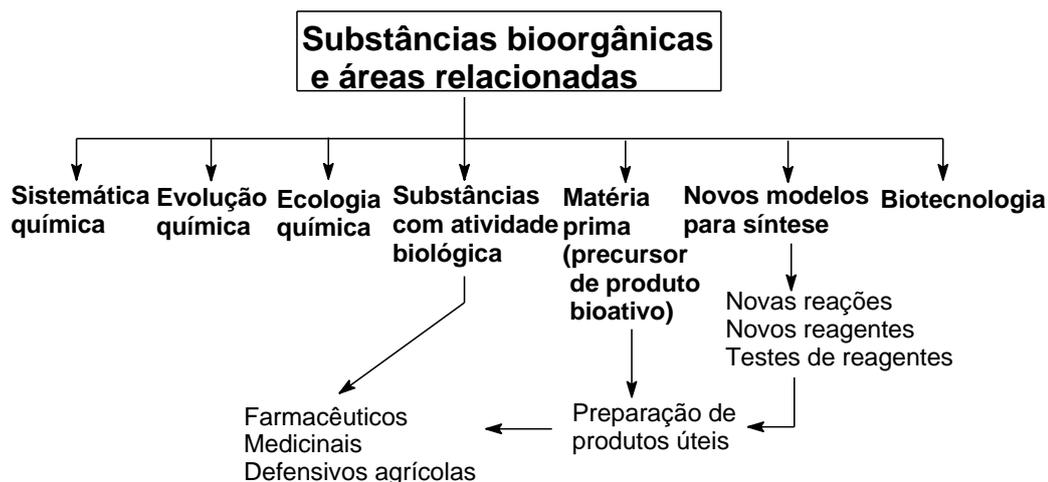
5.6.3 Determinação estrutural da mistura de SGMAc-1.	42
5.6.3.1 Determinação estrutural de SGMAc -1A	43
5.6.3.2 Determinação estrutural de SGMAc -1B	45
5.7 Determinação estrutural dos metabólitos C ₆ C ₁	47
5.7.1 Determinação estrutural da mistura de SGMD-6	47
5.7.1.1. Determinação estrutural de SGMD-6A	48
5.7.1.2 Determinação estrutural de SGMD-6B	49
6. ATIVIDADES BIOLÓGICAS	51
6.1 Atividade antinociceptiva	51
6.1.1 Procedimento experimental	51
6.1.2 Resultados e discussão	52
6.2 Avaliação do potencial antioxidante	54
6.2.1 Procedimento experimental	55
6.2.2 Resultado e discussão	55
7. CONCLUSÃO	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento sustentável de um país depende essencialmente de uma política consistente de educação, ciência, tecnologia e inovação, sustentada na preservação da natureza, na biodiversidade e na exploração racional de fontes naturais necessárias para alimentação, avanço social e econômico, num cenário que assegura a manutenção da saúde e a cura de doenças (BRAZ-FILHO, 2010). Atividades fitoquímicas podem contribuir significativamente para a concretização de tal programação através da investigação da flora e seu quimismo, da divulgação e geração de novos conhecimentos e da formação de recursos humanos qualificados, onde se dedica principalmente à caracterização estrutural, avaliação de propriedades e investigações biossintéticas de substâncias naturais produzidas pelo metabolismo especial de organismos vivos (TORSSSEL, 1997).

As plantas superiores constituem uma das fontes mais importantes de novas substâncias, aplicadas em várias áreas. Podem ser utilizadas diretamente como agentes medicinais, como fonte de fármacos e protótipos, servindo de modelo para modificações estruturais, otimização das propriedades farmacológicas e bioquímicas (ALVES, 2010), na agroquímica pelo fornecimento de fungicidas e inseticidas naturais como as rotenonas; alimentícias, para a obtenção de substâncias naturais usadas para sabor e cor dos alimentos como o mentol e ácido benzoico, também são aplicadas em cosméticos, pela necessidade de perfumes naturais como a cânfora, cumarina e linalol (BRAZ-FILHO, 1994).

Podem ser utilizados como marcadores para classificação (sistemática química, aliando-se à morfológica), para investigação de processos evolutivos (evolução química) e para compreensão da convivência no sistema ambiental (ecologia química) dos organismos vivos (BRAZ-FILHO, 2007). Além disso, elas são inspirações para os químicos orgânicos, estimulando-os a enfrentar desafios na construção sintética de novas arquiteturas moleculares naturais (BRAZ-FILHO, 2010) (Esquema 1).



Esquema 1. Importância e interdisciplinaridade de substâncias bioorgânicas produzidas pelo metabolismo secundário.

Estima-se que aproximadamente 80% da população mundial empregam frequentemente as medicinas indígenas ou tradicionais em suas necessidades primárias de saúde, especialmente aquelas que se utilizam de terapias que envolvem o uso de fitoterápicos (BAGETTA et al., 2010).

Podem ser citadas diferentes classes de substâncias que resultaram na descoberta de importantes fármacos de distintas categorias terapêuticas. A quinina, principal componente da casca de *Cinchona officinalis*, que inspirou a síntese de diversos derivados antimaláricos do grupo das aminoquinolinas; a vincristina e a vimblastina (Figura 1), alcaloides indol-monoterpênicos isolados de *Catharanthus roseus*, empregados no tratamento de linfomas e leucemia infantil; a papaverina, largamente utilizada como vasodilatador cerebral, isolada de *Papaver somniferum*; como fonte dos hipnoanalgésicos tem-se a morfina isolada de *Papaver somniferum* e codeína; e o taxol, uma das mais importantes descobertas, para o tratamento de neoplasias malignas (WALL; WANI, 1996); digitoxigenina, um cardiotônico isolado de espécies de *Digitalis*; a atropina, espasmolítica, isolada de *Atropa belladonna* com atividade antitumoral (HOSTETTMANN et al., 2003).

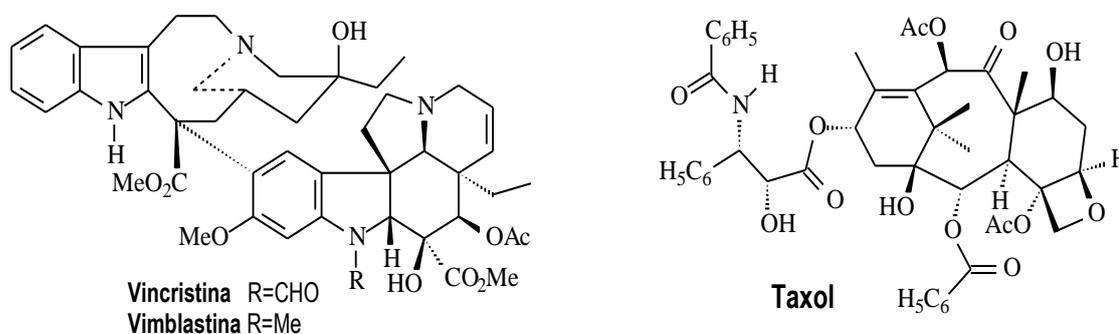


Figura 1. Estrutura dos metabólitos especiais vincristina, vimblastina e taxol.

A descoberta de novas substâncias com atividades biológicas através do estudo fitoquímico constitui uma necessidade urgente, pois o aparecimento de resistência a antibióticos e outras drogas têm sido um dos grandes problemas da medicina. Por isso, há justificativas para o desenvolvimento desse trabalho, sendo conduzindo por isolamento, purificação, determinação estrutural e avaliação da atividade biológica da espécie de *Simira grazielae*, família Rubiaceae.

2. OBJETIVOS

- Isolar, purificar e identificar metabólitos especiais presentes no extrato orgânico da madeira de *Simira grazielae*, pela utilização de técnicas cromatográficas e métodos espectrométricos de RMN ^1H e ^{13}C (1D e 2D), de espectrometria de massas (EM).
- Contribuir para o conhecimento da composição química da família Rubiaceae e do gênero *Simira*.
- Avaliar preliminarmente atividades biológicas (atividade antinociceptiva e antioxidante).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Família Rubiaceae

Entre as Angiospermas, a mais representativa é a família Rubiaceae, sendo a quarta maior família botânica (CONSOLARO, 2008) depois de Orchidaceae, Asteraceae e Leguminosae. Segundo Govaerts et al. (2007), através de uma lista mundial relatou a existência de 611 gêneros e 13.100 espécies. Suas espécies são encontradas em regiões tropicais e subtropicais, e também pode atingir as regiões temperadas e frias da Europa e do norte do Canadá. Nas Américas, a família Rubiaceae é representada por 217 gêneros e 5.000 espécies (PESSOA, 2009) e, no Brasil tem-se cerca de 118 gêneros e 1347 espécies, correspondendo a uma das principais famílias de nossa flora porém, um grande número de espécies ainda permanece sem quaisquer estudos químico e biológico (BARBOSA et al., 2012).

Esta família está presente em quase todas as formações naturais: Floresta, Cerrado, Caatinga, banco de areia, floresta tropical, altitude da montanha, bandeijas, dunas e campos abertos (PINA, 2012). Os principais ecossistemas de Rubiaceae no Brasil estão na Amazônia, Cerrado e Floresta Atlântica (BOLZANI et al., 2001). A c se destaca entre as mais diversificadas do Nordeste brasileiro, com 66 gêneros e cerca de 310 espécies (BARBOSA et al., 2011). Pode ser encontrada em todos os tipos de hábitos, como ervas, arbustos, cipós, e árvores que tem suas dimensões variando de 5 mm de altura (*Spermacoce* spp.) a 55 m de altura (*Chimarrhis* spp.) (DELPRETE; JARDIM, 2012). Muitas são cultivadas por suas madeiras leves (PEREIRA, 2006), sendo que 80% dos seus gêneros são constituídos por espécies lenhosas (CALLADO; NETTO, 2003).

Durante os últimos 15 anos, muitos estudos filogenéticos moleculares foram publicados com a intenção de esclarecer a subfamília, tribos e gêneros de Rubiaceae, chegando hoje com base na filogenia publicada por Bremer e Eriksson (2009) a divisão em três subfamílias: Cinchonoideae, Ixoroideae e Rubioideae e 44 tribos, onde a subfamília Antirheoideae foi retirada da classificação (DELPRETE; JARDIM, 2012).

A família tem importância econômica expressiva, decorrente de suas espécies empregadas na área alimentar como o *Coffea arabica* (café), uma das bebidas mais apreciadas e consumidas em todo mundo, produzidas a partir de seus frutos. O jenipapeiro (*Genipa americana* L.) também muito usado, com o qual se faz doce, compotas e licores, consumo do fruto fresco (ARAUJO, 2013) ou ainda como corantes, através da extração dos seus frutos imaturos (NASCIMENTO; DAMIÃO-FILHO, 1998). A espécie *Psychotria viridis* é muito difundida entre os indígenas e os adeptos do movimento religioso Santo Daime, quando utilizada em associação com o cipó malpighiáceo *Banisteriopsis caapi*, obtém-se uma bebida conhecida como ayahuasca, sendo um alucinógeno consumido em seus rituais (ARAUJO, 2013). Suas plantas são empregadas também em ornamentação como a *Gardenia*, *Rubia*, *Mitchella*, *coprosma* (WATSON; DALLWITZ, 1992), por suas folhas serem decorativas e as flores perfumadas. LORENZI (2002) cita em sua publicação algumas espécies de Rubiaceae que podem ser utilizadas para exploração da madeira, como a *Amaioua guianensis* na construção civil e fabricação de móveis e a *Calycophyllum multiflorum* empregadas na construção de peças flexíveis e vergadas.

Apesar de grande parte das espécies dessa família apresentarem toxidez e frequentemente causarem intoxicações ao gado, como a *Ixora* conhecida como erva-de-rato, entre outras (WATSON; DALLWITZ, 1992), elas são amplamente utilizadas na medicina popular e na fabricação de fitofármacos e fitoterápicos como por exemplo a *Uncaria tomentosa* conhecida como unha de gato (OLIVEIRA, 2009). Plantas do gênero *Diodia* são

empregadas na medicina popular e tradicional como agente antirreumático, antidiarréico, antiofídico, laxativo e emético, e também no tratamento de úlceras gástricas, urticárias, dores de ouvido, dores abdominais e gastrites (MOURA et al., 2006). A espécie *Uncaria quianensis* é uma planta que tem sido usada pelos indígenas peruanos e brasileiros há centenas de anos, com relatos de suas curas nos últimos trinta anos onde são indicadas popularmente como imuno-estimulantes e anti-inflamatórios (SILVA et al., 2002 apud PEREIRA et al., 2006). Atualmente, essa espécie vem sendo submetida à extração indiscriminada e intensiva, o que poderá levá-la à diminuição da variabilidade genética ou até mesmo à sua extinção (PEREIRA et al., 2006).

Assim, plantas da família Rubiaceae revelaram atividades biológicas com propriedades analgésicas e anti-inflamatórias, usadas comumente no tratamento de reumatismo, propriedades antinociceptiva e antitussígena (GAZDA, 2004), hipotensora (SIMÕES et al., 2004), hipoglicemiante (GUERRERO-ANALCO et al., 2007), fototóxica (CASTANEDA et al., 1991), antimalárica (SUN et al., 2008), antioxidante (FRAGOSO et al., 2008), antiviral e efeitos em doenças vasculares (HEITZMM, 2005), do sistema nervoso central (DÉCIGA-CAMPOS et al., 2006), atividade antimicrobiana (JAYASINGHE et al., 2002) e atividade analgésica (ALVES et al., 2001).

Mesmo apresentando uma grande quantidade de gêneros e espécies, essa família possui uma composição química pouco variável, destacando-se os iridoides, as antraquinonas e os alcaloides indólicos considerados marcadores quimiotaxonômicos de Rubiaceae e que se apresentam sob um perfil químico diferente e típico para cada subfamília (GAZDA, 2004; CARDOSO et al., 2008). Os triterpenos também são frequentes em diversas espécies, porém, ainda não são considerados como marcadores taxonômicos (CARDOSO et al., 2008). Diversos constituintes químicos como flavonoides e outros derivados fenólicos e terpenoides (diterpenos) são encontrados nesta família (BOLZANI et al., 2001). Algumas substâncias isoladas de espécies de Rubiaceae estão descritas na Figura 2, p. 5-6.

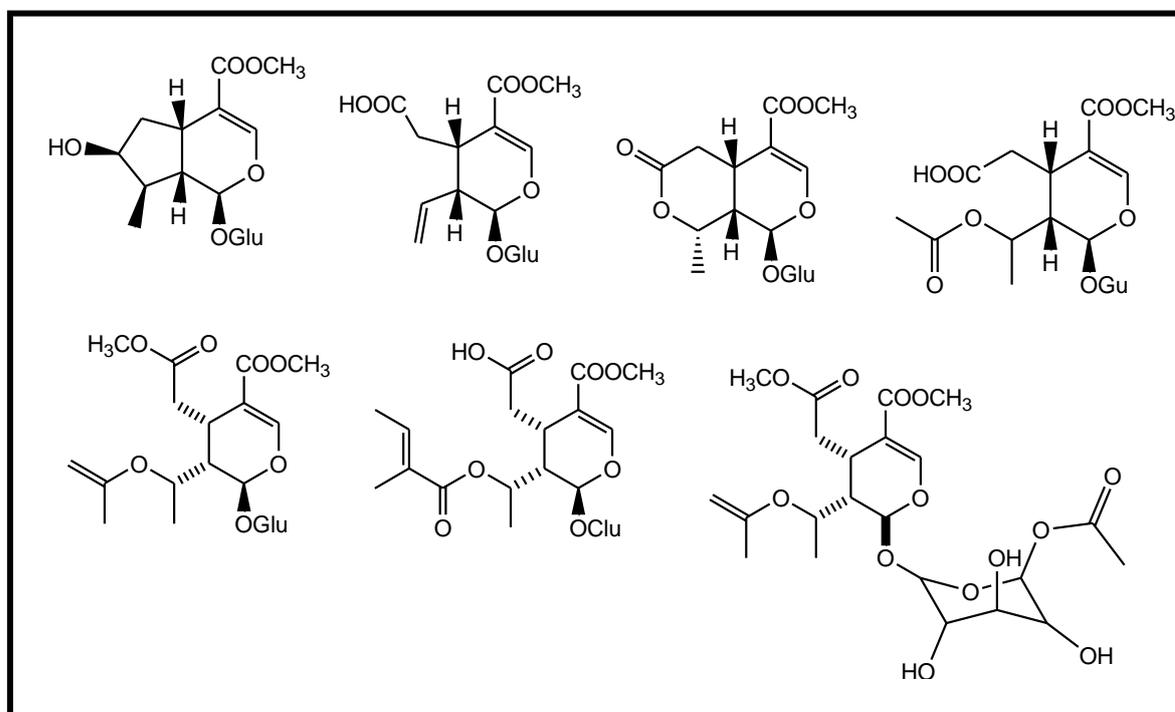


Figura 2. Metabólitos especiais isolados das espécies da família Rubiaceae (Continua).

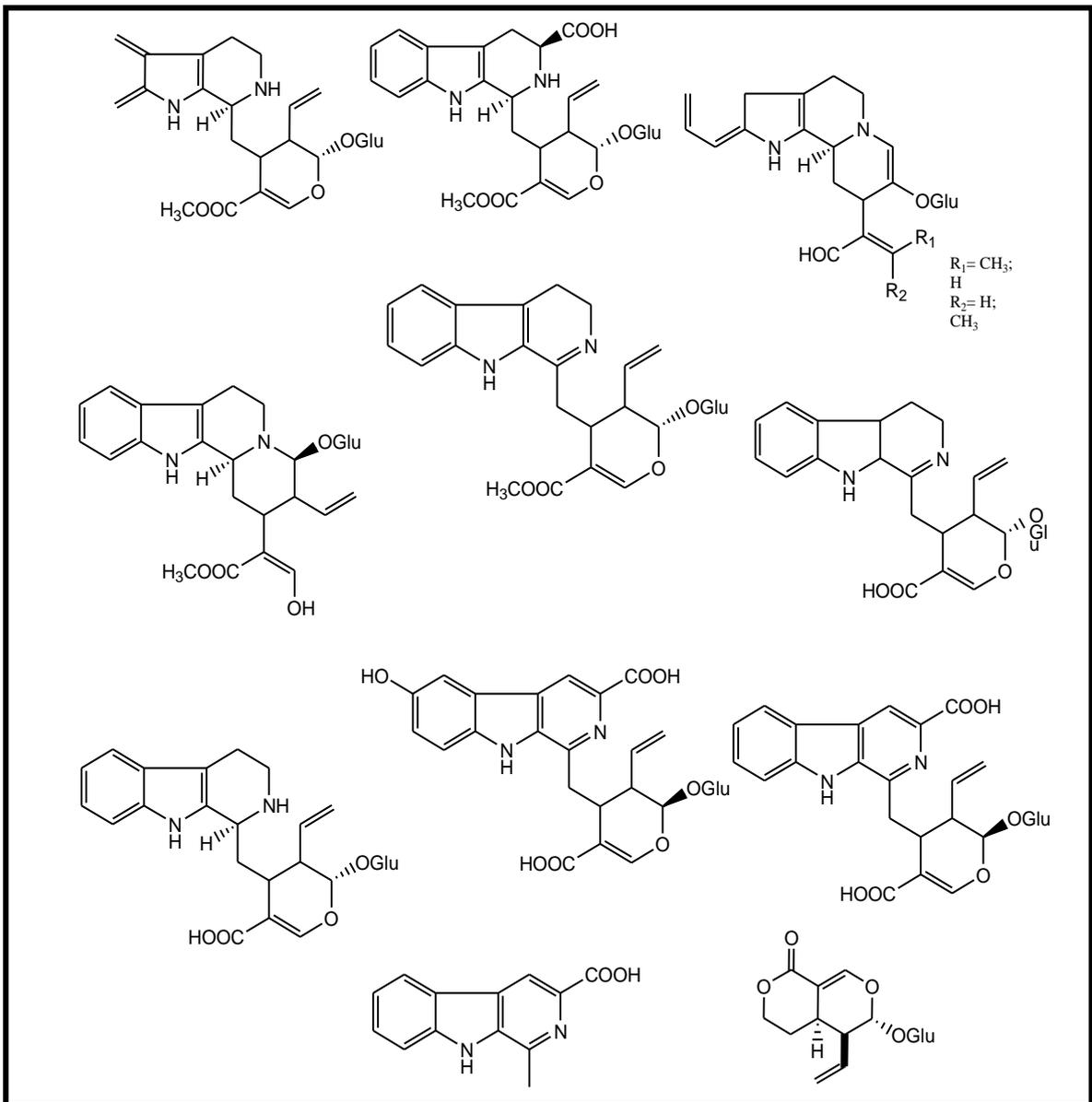


Figura 2. Continuação.

Os iridoides são descritos como marcadores quimiotaxonômicos exclusivos na subfamília Ixoroideae, os alcaloides indólicos em Cinchonoideae e as antraquinomas na Rubioideae. (BOLZANI et al., 2001).

3.2. Gênero *Simira*

O gênero *Simira*, foi classificado com base em dados morfológicos na subfamília Cinchonoideae e na tribo Rondeletieae (Robbrecht em 1988 apud MORAES, 2009) e mais recentemente foi inserido na tribo Simireae dentro da subfamília Ixoroideae para atender resultados de estudo na filogenética molecular, (Rova et al., 2002). Este gênero envolve 41 espécies distribuídas pela região neotropical, das quais 16 ocorrem no Brasil habitando os estados do Amazonas, Pará, Goiás, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina e inseridas também na Mata Atlântica (SILVA NETO, 2000). No Brasil, espécies de *Simira* são conhecidas como araribá, araribá-vermelha, araribá-rosa, araribá-branca, quina-

rosa, canela-samambaia, maiate e marfim e caracteriza-se por apresentar cerne marrom ou acinzentado, alborno amarelado ou acinzentado quando recém cortado, adquirindo geralmente coloração vermelha, rósea ou violácea quando exposto ao ar e/ou à luminosidade (MAINIERI; CHIMELO, 1989) e que desaparece alguns meses após a coleta (CALLADO; NETO, 2003).

O gênero possui árvores de pequeno a grande porte (PEIXOTO, 1982), com espécies de interesse econômico, reconhecidas pelo valor tintorial, madeireiro, artesanal e paisagístico para a arborização de ruas (CÔRREA, 1978). Seu estudo vem despertando interesse principalmente devido as suas atividades biológicas, sendo usadas como tônicas, fototóxicas e antifebris com base em resultados farmacológicos apresentadas por alguns metabólitos especiais isolados (ALVES, et al., 2001), e pelas informações etnomédicas sobre o tratamento de manchas na cavidade oral e dentária com cascas frescas de *S. rubescens* (LEWIS, 1984).

Silva (2001) em um estudo sobre medicina popular em mercados do Rio de Janeiro identificou a espécie de *Simira glaziovii*, com o nome popular de quina-rosa, sendo utilizada como chá através da fervura das suas cascas em água. Sendo utilizadas principalmente em problemas relacionados ao sangue: “combate a anemia”, “limpar o sangue” e também para “inflamações” e “queda de cabelo”. São aplicadas também a inflamações em geral, impotência, bem como para o sangue.

Espécies deste gênero são caracterizadas do ponto de vista fitoquímico pela bioprodução de alcaloides, triterpenos, esteroides, esteroides glicosilados, policetídeos, e outros metabólitos especiais, sendo os alcaloides β -cabolínico harmana, maxonina e strictosamida os mais comuns no gênero *Simira* (BASTOS et al., 2002). Alguns de seus metabólitos são fototóxicas, atuando também no sistema nervoso central, contribuem para o mecanismo de defesa da planta e causam fotodermatites em humanos e animais (ARNASON et al., 1983). Há uma procura significativa pelas cascas de espécies do gênero, devido principalmente a problemas relacionados ao sangue: “combate a anemia”, “limpar o sangue”, “queda-de-cabelo”, para inflamações em geral e impotência. Apresentam também atividades como tônicos (fortificantes), antifebris, antifebrífugo e antimalárico (SILVA, 2001).

No âmbito fitoquímico, até o momento apenas as espécies *S. maxonii* (HASBUN et al., 1989; CASTRO; LÓPEZ, 1986), *S. mexicana* (CASTANEDA et al., 1991), *S. salvadorensis* (ARNASON et al., 1983), *S. rubra* (ARNASON et al., 1983), *S. glaziovii* (BASTOS et al., 2002; ALVES et al., 2001; ARAÚJO, 2011) e *S. eliezeriana* (ARAÚJO, 2011) foram estudadas (Quadro 1 e Figura 3, p.8).

Quadro 1. Espécies de *Simira* com estudo fitoquímico.

Espécies	Material	Substância
<i>S. maxonii</i>	Raiz	7, 8
<i>S. salvadorensis</i>	Casca da madeira	7
<i>S. glaziovii</i>	Casca da madeira Madeira	7,9-19 1-6, 20-22, 28-30
<i>S. eliezeriana</i>	Madeira	7, 20-27

3.3. *Simira grazielae*

O nome específico (*grazielae*) da *Simira grazielae* (Figura 4) representa homenagem à botânica brasileira Graziela Maciel Barroso. Esta espécie é encontrada em floresta alta de terra firme (PEIXOTO, 1982), distribuída geograficamente no Brasil nas regiões nordeste (Bahia) e sudeste (Espírito Santo) (BARBOSA, 2010), aparecendo como árvores em floresta estacional semidecidual (BARBOSA, 2013).



Figura 4. Imagem de espécie de *Simira grazielae*
Fonte: ZipcodeZoo.com, 2012.

Essa espécie é popularmente conhecida como arariba-vermelha (PEIXOTO, 1982).

Este é o primeiro estudo fitoquímico envolvendo esta espécie, verificando-se também relativa escassez de trabalhos em outras áreas da ciência. Tal situação serviu como estímulo adicional para a investigação fitoquímica desta espécie.

A classificação taxonômica da espécie encontra-se resumida no Quadro 2.

Quadro 2. Classificação botânica da espécie de *S. grazielae* (Public Data Portal).

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophita
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Gentianales
Família	Rubiaceae
Subfamília	Cinchonoideae
Gênero	<i>Simira</i>
Espécie	<i>Simira grazielae</i>

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reagentes e equipamentos

Solventes de grau P.A. das marcas Isofar e Vetec foram utilizados.

A destilação dos solventes dos extratos foi efetuada em pressão reduzida usando-se evaporadores rotativos Büchi B-480 e Fisatom 802.

Para cromatografia em coluna a pressão normal utilizou-se como fase estacionária gel de sílica (70-230 mesh) e para coluna rápida (flash) gel de sílica 230-400 mesh, ambas das marcas Vetec e Silicycle e Sephadex LH-20 Sigma-Aldrich.

Utilizou-se como agente dessecante: Na₂SO₄ anidro Vetec.

Nas análises comparativas através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) utilizou-se cromatofolhas de alumínio 20x20 cm com 60 F₂₅₄ Merck e 60 F₂₅₄ Marcherey-nagel. Como método de revelação não destrutivo das amostras analisadas nas CCDA foi utilizada irradiação com a lâmpada ultravioleta nos comprimentos de onda de λ_{\max} 254 e 356 nm. Como métodos de revelação destrutivos das amostras analisadas por CCDA foram utilizados reagentes cromogênicos: Solução de vanilina sulfúrica (1% de vanilina em solução com 45 mL de água, 45 mL de etanol e 10 mL ácido sulfúrico) (MATOS, 1997) e vapores de iodo.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e de Carbono (RMN ¹³C), incluindo experimentos em 2D (¹H-¹H-COSY, ¹H-¹³C-COSY- ⁿJ_{CH}, n=2 - HSQC, e n=3 - HMBC) foram obtidos em espectrômetros Bruker Advance II 9,4 T (400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C), 11,5 T (500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C). A escolha dos solventes deuterados baseou-se na solubilidade das amostras: CDCl₃ (clorofórmio deuterado), MeOD, (metanol deuterado) e D₃CCOD₃C (acetona deuterada). O TSM (tetrametilsilano) foi usado como referência interna. Os deslocamentos químicos (δ) foram indicados em ppm e as constantes de acoplamento (*J*) em Hertz (Hz).

O programa ACD/Labs (versão 12.0) foi utilizado para processamento da maioria dos dados obtidos nos experimentos de RMN. Os espectros de RMN ¹H e ¹³C gerados para comparação com valores de deslocamentos químicos, foram registrados no programa ChemDraw Ultra.

As análises CG/EM (cromatógrafo a gás, acoplado a um espectrômetro de massas) foram registradas com analisador de íons quadrupolo e com modo de ionização por impacto de elétrons (70 eV) em um aparelho CG-EM da Varian Saturn 2000 e Shimadzu QP2010 Plus. A análise em CL-EM-IES (cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas equipado com fonte de ionização de elétron-spray) foi realizada na USP de Ribeirão Preto em um aparelho da Bruker Daltonics. Os espectros de massas foram postulados pela biblioteca GCMS Postrun Analysis da Shimadzu.

As leituras da atividade antioxidante foram realizadas no aparelho UV mini 1240 (UV-Vis spectrophotometer, Shimadzu). O programa de estatística foi o POLO PC.

A leitura do desvio da luz polarizada foi obtida em um polarímetro Perkin-Elmer 343.

4.2. Coleta e identificação do material vegetal

A madeira de *Simira graziellae* foi coletada na reserva florestal da Companhia Vale do Rio Doce CVRD, em Linhares-ES, em novembro de 2007. O reconhecimento botânico foi realizado através de comparação com exsicata n^o 357 arquivada no herbário da companhia

com a colaboração do identificador botânico Domingos Antônio Folli, funcionário da companhia.

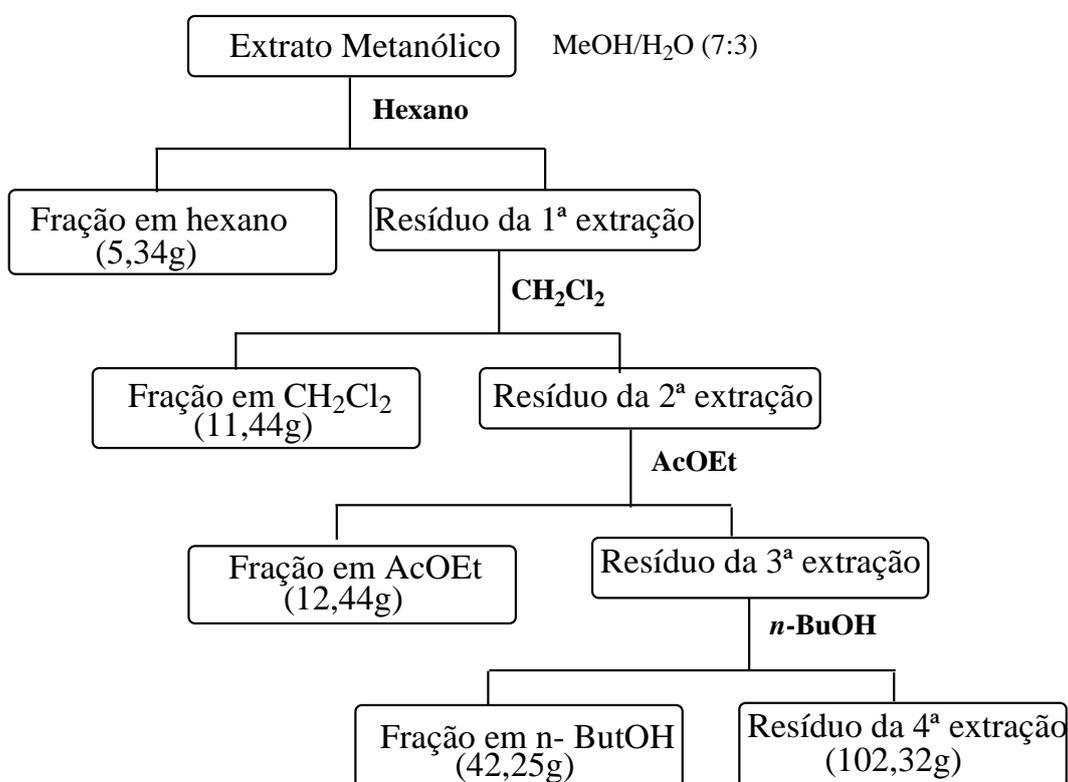
4.3. Preparação e fracionamento dos extratos brutos de *Simira grazielae*

O material (Quadro 3) de *Simira grazielae* foi seco em temperatura ambiente, triturado em liquidificador caseiro e em seguida submetido a processo de extração por maceração exaustiva com MeOH em temperatura ambiente (27°C). O solvente foi destilado em um evaporador rotatório a 40°C, sob pressão reduzida, obtendo-se 271,63 g de resíduo.

Quadro 3. Material vegetal de *Simira grazielae*

Espécie	Material Vegetal	Massa do Material vegetal (Kg)	Massa total de resíduo (g)
<i>Simira grazielae</i>	Madeira	4,500	271,63

O resíduo obtido do extrato MeOH (235,13 g) da madeira de *S. grazielae* foi solubilizado em MeOH/H₂O (7:3) e a solução submetida a extrações sucessivas em funil de decantação com os solventes *n*-C₆H₁₄ (*n*-hexano), CH₂Cl₂, AcOEt e *n*-BuOH (Esquema 2), obtendo-se 5 frações (Quadro 4 , p.12).



Esquema 2. Fracionamento do extrato metanólico do material vegetal.

Quadro 4. Frações obtidas do extrato metanólico do material vegetal da madeira de *Simira grazielae*.

<i>Simira grazielae</i>			
Material	Frações	Código	Massa (g)
Madeira	<i>n</i> -C ₆ H ₁₄	SGMH	5,34
	CH ₂ Cl ₂	SGMD	11,44
	AcOEt	SGMA	12,44
	<i>n</i> -BuOH	SGMB	42,25
	Resíduo metanólico	SGMR	102,32
SGMH- <i>Simira grazielae</i> Madeira Hexano, SGMD- <i>Simira grazielae</i> Madeira Diclorometano, SGMAc- <i>Simira grazielae</i> Madeira Acetato de Etila, SGMB- <i>Simira grazielae</i> Madeira <i>n</i> -Butanol, SGMR- <i>Simira grazielae</i> Madeira Resíduo.			

4.4. Isolamento e purificação dos constituintes químicos

Após o fracionamento, as frações foram analisadas através da CCDA (cromatografia de camada delgada analítica) para identificar as que possuíam maior diversidade de substâncias. O conjunto de informações obtido nesta etapa orientou a iniciação do fracionamento cromatográfico das frações: SGMH, SGMD e SGMAc.

4.4.1. Estudo fitoquímico da fração *n*-hexânica da madeira de *Simira grazielae*

Da fração **SGMH** (*Simira grazielae* Madeira **Hexano**) foram separados 2,0 g para análises biológicas e o restante submetido a cromatográfica clássica em coluna usando gel de sílica como fase estacionária e eluição com gradiente de polaridade. Utilizou-se hexano como eluente inicial, aumentando-se gradativamente a polaridade dos solventes, passando por CH₂Cl₂, AcOEt, e MeOH (*n*-C₆H₁₄/AcOEt, AcOEt/MeOH e MeOH/H₂O), fornecendo 60 frações de 40 mL cada. Os solventes foram removidos através da destilação a pressão reduzida e os resíduos obtidos analisadas em CCDA, reunidas com base no perfil cromatográfico e submetidas a técnicas adicionais de purificação.

A fração *n*-C₆H₁₄/AcEtO (9:1) de 1-3 (50 mg) obtida da eluição, apresentou-se como um sólido branco de aspecto resinoso. A análise por CCDA desta fração exibiu um perfil cromatográfico que indicou metabólitos de baixa polaridade. Também exibiu uma mancha característica (arroxeadada quando revelada com vanilina sulfúrica) que ao ser comparado com um padrão de mistura de esteroides exibiu mesmo perfil. Desta forma, foi determinada juntamente com a técnica de RMN ¹H e ¹³C, uma mistura dos esteroides, β-sitosterol (**SGMH-1A**) e estigmasterol (**SGMH-1B**).

A fração *n*-C₆H₁₄/AcEtO (8:2) 4 (15 mg) com aspecto relativamente oleoso de coloração amarelada foi submetida a técnica de RMN ¹H e ¹³C-DEPTQ, fornecendo sinais com indicação da presença de um hidrocarboneto insaturado (**SGMH-2**).

A fração *n*-C₆H₁₄/AcEtO (2:8) 10 (10 mg) após análise por CCDA mostrou-se com pequenas impurezas e, conseqüentemente, foi submetida a processo de purificação em gel de sílica fornecendo a substância saponina, β-sitosterol-glicosilado (**SGMH-3**).

A fração *n*-C₆H₁₄/AcOEt (2:8) 25 (20 mg) apresentou-se pura pela análise de CCDA, sendo submetida a análise por técnicas de RMN¹H e ¹³C (1D e 2D) e ESI-MS, que permitiram a caracterização estrutural como o alcaloide ofiorina (**SGMH-4**).

4.4.2. Estudo fitoquímico da fração em CH₂Cl₂ da madeira de *Simira grazielae*

Da fração **SGMD** (*Simira grazielae* Madeira Diclorometano) separou-se 3,0 g para análises biológicas e o restante foi submetida à coluna cromatográfica clássica usando gel de sílica como fase estacionária e eluída com gradiente de polaridade *n*-C₆H₁₄/AcOEt, AcOEt/MeOH e MeOH/H₂O. Foram coletadas 130 frações de 50 mL e numeradas de acordo com o gradiente de solvente utilizado. Os solventes foram retirados por rota-vapor a pressão reduzida e os materiais analisadas em CCDA e reunidos com base na comparação dos perfis cromatográficos.

A fração *n*-C₆H₁₄/AcOEt (8:2) de 1-5 (15 mg) apresentou-se como material oleoso de baixa polaridade. A análise por RMN ¹H e ¹³C revelou somente sinais característicos de substâncias alifáticas (hidrocarbonetos, **SGMD-1**). Assim, esta fração não foi submetida a estudo adicional.

A fração *n*-C₆H₁₄ /AcOEt (7:3) 1 (30 mg) foi solubilizada em MeOH e submetida a peneiramento molecular em coluna por exclusão (Sephadex LH-20) e, forneceu uma mistura das cumarinas (0,13 mg) umbeliferona (**SDMD-3A**), trimetox-cumarina (**SGMD-3B**), 5,7-dimetox-cumarina (**SGMD-3C**), isofraxidina (**SGMD-3D**), trimetox-fenol (**SGMD-6A**) e aldeído sirígico (**SGMD-6B**) caracterizadas pela análise por CG-EM auxiliada por RMN ¹H e ¹³C (1D e 2D).

A fração C₆H₁₄/AOcEt (7:3) de 16-20 (60mg) foi submetida a purificação em coluna cromatográfica usando gel de sílica como fase estacionaria e como fase móvel *n*-C₆H₁₄/acetato de etila (9:1), fornecendo 12 mg de cumarina denominada escopoletina (7-hidroxi-11-metoxcumarina) (**SGMD-2A**) e seu isômero, 7-hidroxi-8-metoxicumarina (**SGMD-2B**).

A fração *n*-C₆H₁₄/AcEtO (6:4) de 21-28 (31mg) foi purificada pelo fracionamento em coluna por exclusão (Sephadex LH-20) usando metanol como eluente, fornecendo 15 mg de um sólido amarelado, que através das técnicas analíticas e pela derivatização por acetilação, caracterizada como a lignana siringaresinol (**SGMD-4**).

A fração *n*-C₆H₁₄/AcOEt (6:4) de 29-62 (52mg) apresentou duas manchas na análise por CCDA e foi submetida ao fracionamento em coluna por exclusão (Sephadex LH-20), sendo solubilizada e eluída em metanol, fornecendo o alcaloide harmana (**SGMD-5**, 25mg) de aspecto amarelo caramelizado.

A fração *n*-C₆H₁₄ /AcOEt (7:3) de 1-10 (20mg) foi solubilizada em metanol e submetida ao fracionamento em coluna por exclusão (Sephadex LH-20) usando metanol como eluente, fornecendo a mistura contendo o trimetox-fenol (**SGMD-6A**) e o aldeído sirígico (**SGMD-6B**) (15mg).

4.4.3. Estudo fitoquímico da fração em acetato de etila da madeira de *Simira grazielae*

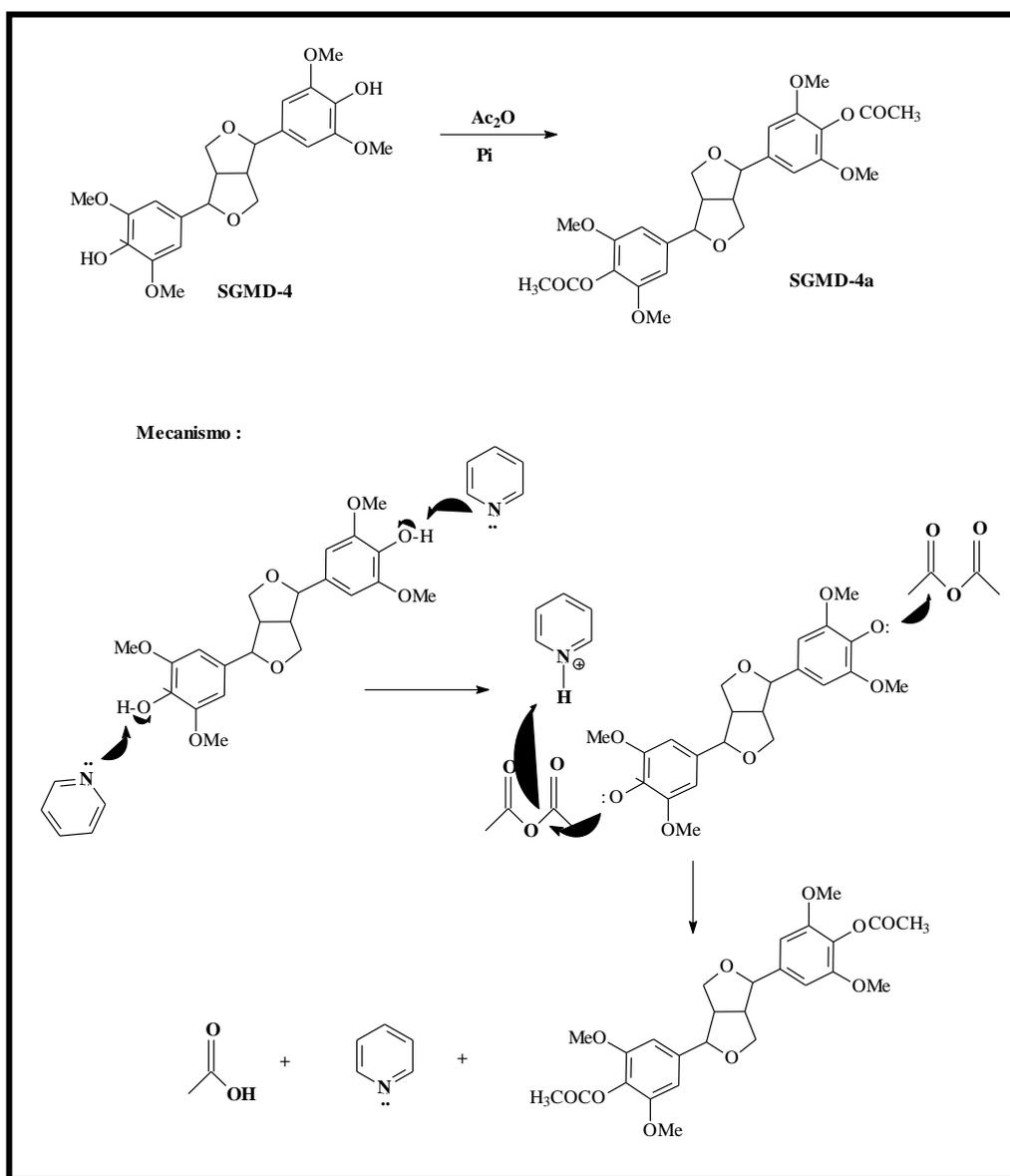
Da fração **SGMAc** (*Simira grazielae* Madeira Acetato de Etila) foram separados 3,0 g para análises biológicas o restante foi submetida a coluna cromatográfica usando gel de sílica como fase estacionária e como eluentes *n*-C₆H₁₄, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH/H₂O com eluição em modo gradiente de polaridade. Foram coletadas 45 frações de 50 mL, onde os solventes foram removidos através de destilação a pressão reduzida e analisadas em CCDA e através do perfil cromatográfico as frações foram reunidas.

A fração *n*-C₆H₁₄ /AcOEt (7:3) de 1-10 (30 mg) de aspecto sólido foi analisada por CCDA e mostrou-se com impurezas, sendo assim submetida a processo de purificação em Sephadex LH-20 fornecendo a mistura de N-acetil-serotonina **SGMAc-1A** e 6'-O-vaniloiltachiosideo (**SGMAc-1B**) (15mg).

4.5. Preparação de derivado

4.5.1. Acetilação de SGMD-4 com anidrido acético na presença de piridina

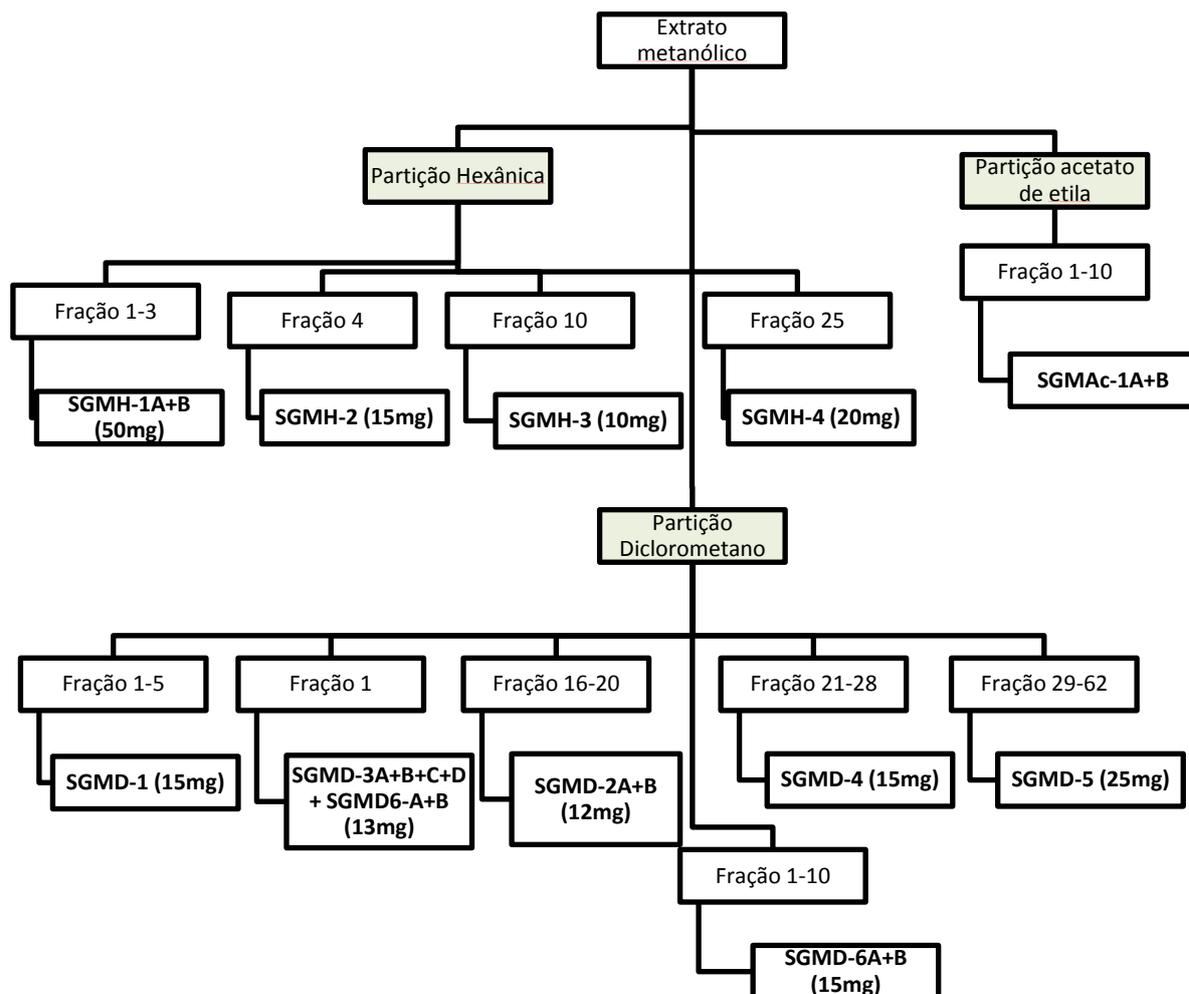
A substância **SGMD-4** (10 mg) foi tratada com uma solução anidrido acético e piridina na proporção de 1:1 e mantida em agitação e refluxo por 24 horas. Após esse período adicionou-se água destilada gelada até o turvamento e em seguida foi realizada a extração com CHCl_3 (3 vezes), esta fase orgânica (solução clorofórmica) foi lavada com HCl (10%) até o total desaparecimento do odor de piridina. Depois o material foi seco com sulfato de sódio anidro e teve o solvente retirado em rota vapor sob vácuo. Foi submetida a técnicas de análise que confirmou a acetilação do siringaresinol (**SGMD-4a**). A proposta do mecanismo da reação de acetilação de **SGMD-4** está esquematizada no Esquema 3.



Esquema 3. Proposta do mecanismo da reação de acetilação de **SGMD-4**.

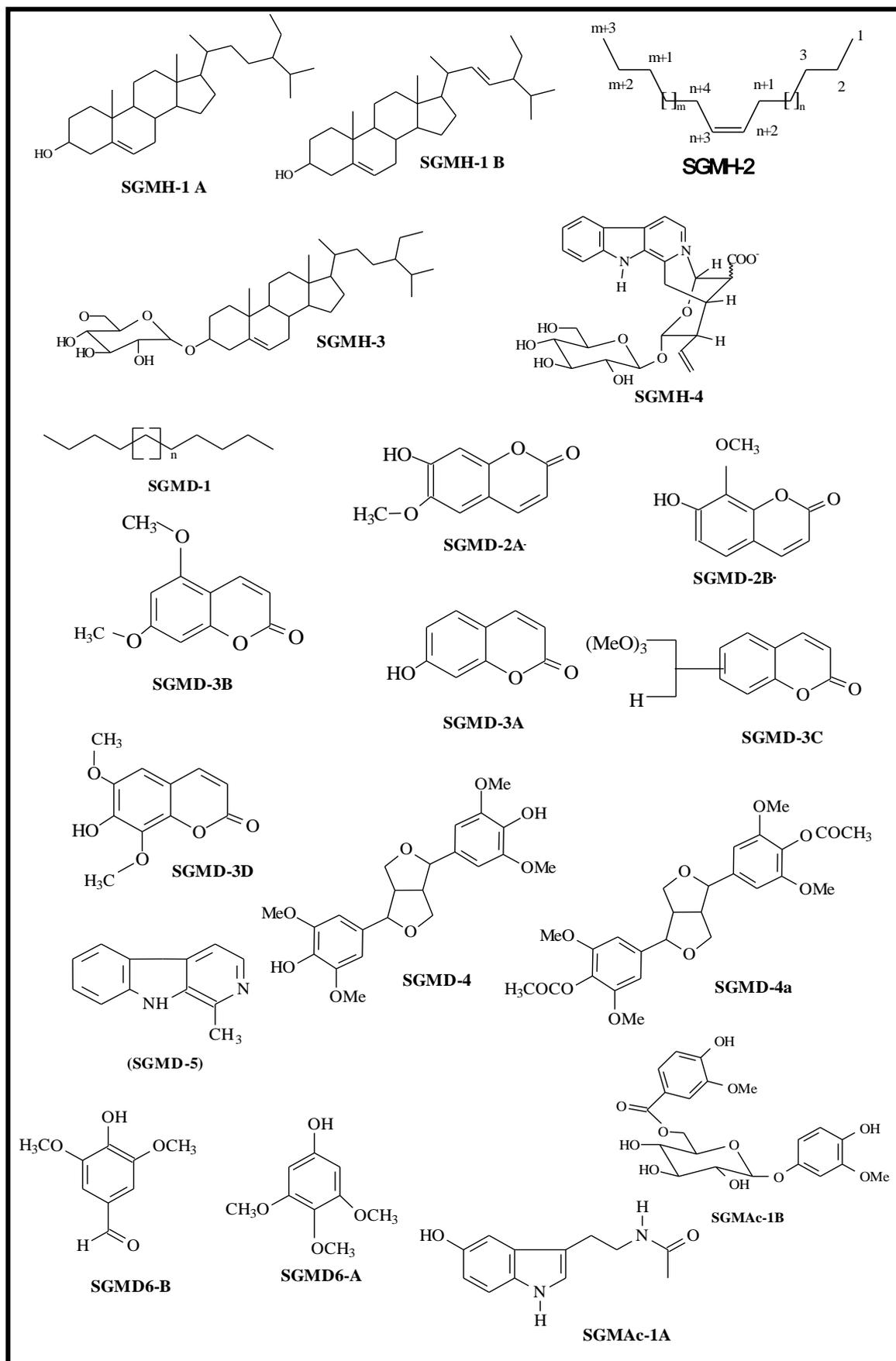
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo fitoquímico do extrato em MeOH da madeira de *S. grazielae* através de fracionamento com hexano, CH₂Cl₂, e AcOEt resultou no isolamento e na caracterização de 18 substâncias e 1 derivado (Esquema 4, Quadro 5, p.16). Para a discussão da elucidação estrutural, as substâncias foram divididas de acordo com a classe de metabólito especial em que se enquadram, onde foram apresentadas também as propostas de biossíntese.



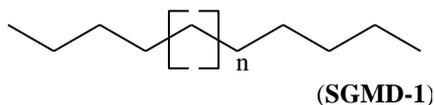
Esquema 4. Resultados obtidos do fracionamento de *S. grazielae*.

Quadro 5. Constituintes químicos isolados da madeira de *Simira grazielae*.



5.1. Análise estrutural da amostra SGMD-1

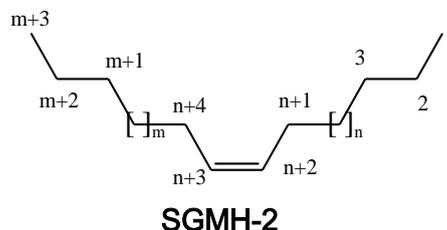
A amostra **SGMD-1** (10 mg), apresentou-se como um sólido marrom solúvel em CHCl_3 . Os componentes hidrocarbonetos, desta mistura foram revelados através da análise dos espectros de RMN ^1H (Espectro 1, Vol.2, p.1), RMN ^{13}C -DEPTQ (Espectro 2, Vol.2, p.2) e CG-EM.



O cromatograma da análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) exibiu picos majoritários com tempo de retenção (T_R , em minutos) 19.627, 20.249, 20.920, 21.685 e 22.563 (Espectro 3, Vol.2, p.3). O espectro de massas de cada pico mostrou correspondência à fragmentação característica de hidrocarboneto de cadeia longa não ramificada, apresentando-se como um padrão identificável com relativa facilidade, com pico representante do íon molecular ausente ou com reduzida abundância (Espectro 4, Vol.2, p.3).

5.2. Determinação estrutural da substância SGMH-2

A substância **SGMH-2** (10 mg) apresentou-se como um óleo pastoso amarelo solúvel em CHCl_3 e foi identificada através da análise dos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C -DEPTQ, envolvendo comparação com valores de deslocamentos químicos registrados no programa ChemDraw Ultra (Espectro 6 e 8, Vol.2, p.6), como um hidrocarboneto insaturado (**SGMH-2**).



O espectro de RMN ^1H (Espectro 5, Vol.2, p.4) da substância apresentou multipletos, um em δ_H 5.35 ($J = 7.8$ Hz, o que lhe confere a configuração *cis*) (ligação dupla sem localização definida), atribuído aos hidrogênios dos carbonos olefínicos, e outro em δ_H 2.00 referente aos hidrogênios dos carbonos metilênicos alílicos ($2\text{H}(n+1)/2\text{H}(n+4)$) e os demais pelo sinal intenso em δ_H 1,25 (m). O tripleto em δ_H 0.88 foi correlacionado com os hidrogênios metílicos ($3\text{H}-1/3\text{H}(m+3)$). Os demais sinais observados, de menor intensidade, que estão relacionados a impureza.

O espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ (Espectro 6, Vol.2, p.5) da amostra apresentou sinais de deslocamentos químicos em δ_c 130.33 e δ_c 128.19 correspondentes aos carbonos olefínicos $\text{CH}(n+2)$ e $\text{CH}(n+3)$, 32.20 ($\text{CH}_2-3/\text{CH}_2-(m+1)$), 27,10 ($\text{CH}_2-(n+1); \text{CH}_2-(n+4)$), 22.44 ($\text{CH}_2-2/\text{CH}_2-(m+2)$) e entre 29,61 – 29,17 ($[\text{CH}_2]_n/[\text{CH}_2]_m$). O sinal de carbono metílico em δ_c 13.87 foi atribuído $\text{CH}_3-1/\text{CH}_3-(m+3)$.

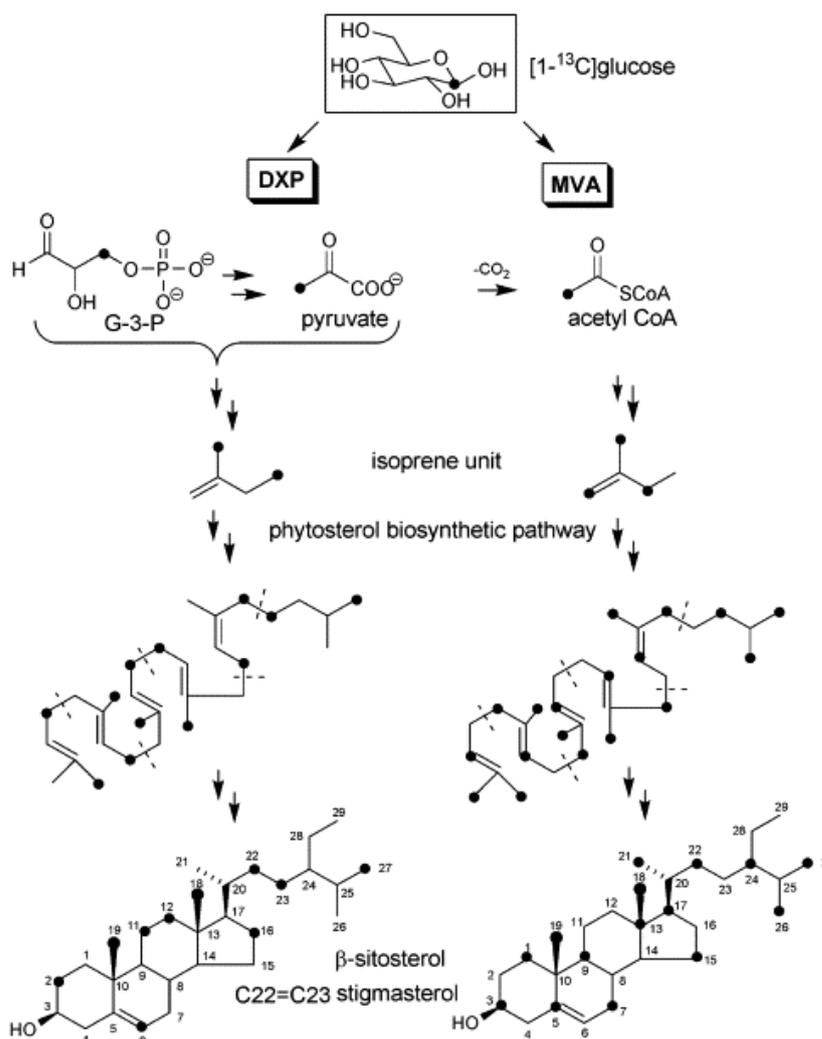
5.3. Determinação estrutural dos esteroides

Os esteroides constituem um grupo de produtos naturais de origem vegetal ou animal. Estes organismos possuem capacidade metabólica para produzir uma variedade de substâncias naturais, tais como esteróis, ácidos biliares, sapogeninas, hormônios sexuais e adrenocordical, alguns alcaloides e outros grupos de substâncias.

A diversidade das substâncias naturais incluídas neste grupo resulta principalmente da variação dos seus constituintes laterais, em segundo lugar, das diferentes substituições nuclear e do grau de insaturação (GROS et al., 1985).

Biogeneticamente tais substâncias são bioproduzidas via pirofosfato de isopentanila originando o esqualeno, estrutura que contém duas unidades de farnesil pirofosfato ligadas cauda-cauda. O esqualeno epoxidado (óxido de esqualeno) assume forma cadeira-bote-cadeira-bote para ciclização, após vários rearranjos do tipo 1,2, forma o lanosterol, triterpeno com estrutura contendo 30 átomos de carbono. O lanosterol após a clivagem oxidativa com eliminação dos grupos metílicos dos carbonos C-4 e C-14 fornece o colesterol como esqueleto básico dos esteroides (DEWICK, 1998.) (Esquema 5).

Os esteroides mais comuns, β -sitosterol, campesterol e estigmasterol, podem ocorrer na forma livre, esterificada ou glicosilada. (MANN, 1994).



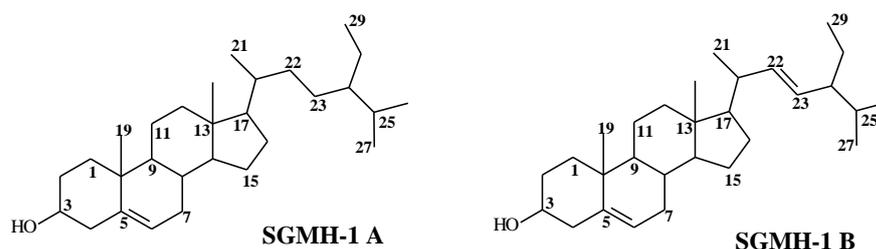
Esquema 5. Proposta biossintética dos esteroides (KONGDUANG et al., 2008).

Devido às suas propriedades químicas e físicas, muito semelhantes, tais esteroides revelam dificuldades de purificação durante os processos de separação.

O estudo fitoquímico da fração hexânica resultou no isolamento e identificação de dois esteroides (**SGMH-1 A e B**) e um esteroide glicosilado (**SGMH-3**).

5.3.1. Determinação estrutura da mistura de SGMH-1

A mistura das substâncias **SHMH-1 A e SGMH-1B** (20 mg), apresentou-se como um sólido branco solúvel em CHCl_3 e os seus componentes foram identificados como β -sitosterol (**SGMH-1A**) e estigmasterol (**SGMH-1B**) através da análise dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C -DEPTQ e comparação com dados descritos na literatura (KOJIMA et al., 1990).



O espectro de RMN ^1H (Espectro 9, Vol.2, p.7) da amostra apresentou um multipeto em δ_{H} 3.55 atribuído ao hidrogênio do carbono carbinólico H-3 e em δ_{H} 5.35 um singlete largo referente ao hidrogênio olefínico H-6 dos dois componentes da mistura. Os diversos sinais presentes na região de δ_{H} (0.68 a 2.26 ppm) foram atribuídos aos hidrogênios dos grupos metílicos, metilênicos e metínicos do esqueleto esteroidal, incluindo os sinais de hidrogênios alílicos. Os dois duplos dupletos em δ_{H} 5.03 (dd, $J=14.8$ e 8.7 Hz) e 5.15 (dd, $J=14.8$ e 8.5 Hz) como representantes H-22 e H-23 respectivamente, ligados aos carbonos olefínicos da cadeia lateral da estrutura do estigmasterol (**SGMH-1B**). A relação *trans* destes dois átomos hidrogênio foi indicada pela constante de acoplamento $J=14.8$ Hz.

Os espectros de RMN ^{13}C -DEPTQ da mistura (Espectros 10-12, Vol.2, p.8-10) (Tabela 1, p.20), apresentou sinais para o β -sitosterol (**SGMH-1A**) e estigmasterol (**SGMH-1B**) em δ_{C} 121.46 (CH-6) e 140.46 (C-5) correspondentes aos carbonos olefínicos CH-6 e C-5 e em δ_{C} 71.55 foi assinalado ao carbono carbinólico metínico CH-3. A diferenciação entre as duas substâncias destaca-se pela ligação dupla entre CH-22 (δ_{C} 138.06) e CH-23 (δ_{C} 128.98, revelando efeito γ dos três grupos metílicos CH_3 -26, CH_3 -27 e CH_3 -29) pertencentes ao estigmasterol. Enquanto no β -sitosterol os sinais dos grupos metilênicos CH_2 -22 e CH_2 -23 foram observados em δ_{C} 33.43 e 25.75 (SEO et al., 1988).

Estudos indicam que o estigmasterol pode ser útil na prevenção de certos câncros, incluindo os do ovário, da próstata, da mama e do cólon. Possui também propriedades anti-inflamatórias, anti-catabólico (GBAY, 2010), inibitória da tireoide e de insulina (PANDA et al., 2009). Em termos gerais, β -sitosterol é usado como antioxidante e antidiabético (KARAN et al., 2012), é usado no tratamento de alargamento da próstata (DUFOOUR, 1984). Apresenta também atividades anti-inflamatório e antipirético (GUPTA et al., 1980), desempenha também um papel importante em várias fases no tratamento do HIV e regulação do sistema imunológico (KOTWAL, 2008).

Tabela 1. Dados de RMN ^{13}C -DEPTQ (125 MHz, em CDCl_3) da mistura das substâncias **SGMH-1A** e **SGMH-1B** comparados com dados da literatura para o β -sitosterol e o estigmasterol (KOJIMA et al., 1990). Deslocamentos químicos em δC (ppm).

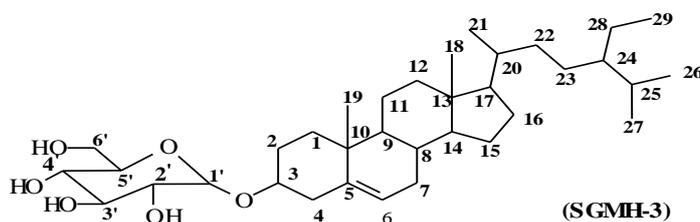
C	Substâncias		Literatura	
	SGMH-1A	SGMH-1B	β -Sitosterol	Estigmasterol
	δC	δC	(δC)	(δC)
5	140.46	140.46	140.7	140.7
10	36.22	36.22	36.5	36.5
13	*	*	42.3	42.2
CH				
3	77.55	71.55	71.8	71.8
6	121.46	121.46	121.7	121.47
8	31.61	31.61	31.9	31.9
9	49.84	49.84	50.1	50.1
14	55.65	55.99	56.3	56.8
17	56.58	56.48	56.0	55.9
20	35.88	40.24	36.1	40.5
22	-	138.06	-	138.3
23	-	128.98	-	129.2
24	45.54	50.93	45.8	51.2
25	28.84	31.61	29.1	31.9
CH₂				
1	36.97	36.97	37.2	37.2
2	31.25	31.25	31.6	31.6
4	42.00	42.00	42.3	42.3
7	31.69	31.69	31.9	31.9
11	20.80	20.80	21.1	21.1
12	39.40	39.40	39.8	39.7
15	24.03	24.03	24.3	24.4
16	27.98	27.98	28.2	28.9
22	33.43	-	33.9	-
23	25.75	-	26.0	-
28	22.77	25.15	23.0	25.4
CH₃				
18	11.58	11.77	11.9	12.0
19	19,26	19,26	19.4	19.4
21	17.97	19.56	18.8	21.2
26	19.13	20.95	19.8	21.1
27	18.50	18.50	19.0	19.0
29	11.99	11.71	12.0	12.3

* Sinais não observados. Para observá-los seria necessário maior tempo de máquina registrando

5.3.2. Determinação estrutural da substância SGMH-3

A substância **SGMH-3** (9 mg) apresentou-se como um sólido branco, solúvel em uma mistura de $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ e foi identificada através da análise dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C -DEPTQ como 3-*O*- β -D-glicopiranosil-sitosterol, envolvendo também comparação

dos valores de deslocamentos químicos com dados descritos na literatura (KOJIMA et al., 1990).



O espectro de RMN ^1H (Espectro 13, Vol.2, p.11) apresentou sinais característicos com perfil de esteroide. A presença do singlete em δ_{H} 0.69 e um sinal δ_{H} 0.80 foram atribuídos aos hidrogênios 3H-29 e 3H-18, respectivamente. A série de sinais entre 0.69 e 2.84 caracterizam os hidrogênios ligados a carbonos metílicos e metilênicos do esqueleto esteroidal. A presença do sinal simples em δ_{H} 5.35 (3.8Hz) foi atribuída ao hidrogênio olefínico H-6. A comparação com os dados dos espectros da mistura dos esteroides **SGMH-1** (Tabela 1, p.20), (revelando a ausência dos dois sinais em δ_{H} 5.0-5.1 correspondentes aos hidrogênios da ligação dupla entre os carbonos CH-22 e CH-23 do estigmasterol) foi usada para confirmação da presença do β -sitosterol na estrutura.

Os sinais entre δ_{H} 3.15-4.40 indicam a presença de hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos característicos de glicosídeo. O sinal em δ_{H} 4.37 foi atribuído ao hidrogênio do carbono anomérico (H-1') e os sinais com deslocamentos em δ_{H} 3.35, 3.34, 3.26, 3.84 e 3.67 foram correlacionados aos hidrogênios H-3', H-4', H-5', H-6'a e H-6'b, respectivamente da unidade glicosídica.

O espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ (Espectros 14 e 15, Vol.2, p. 12 e 13; Tabela 2, p. 22) mostrou sinais em δ_{C} 139.96 e δ_{C} 121.18 correspondentes aos carbonos olefínicos C-5 e CH-6 da unidade aglicônica esteroidal. O sinal em δ_{C} 78.21 foi atribuído ao carbono carbinólico CH-3 e δ_{C} 100.64 ao carbono anomérico da unidade glicopiranosila ligada ao CH-3. A confirmação da unidade glicopiranosila foi obtida pelos deslocamentos químicos dos sinais dos carbonos metínicos em δ_{C} 76.19 (CH-3'), 75.80 (CH-5'), 73.20 (CH-2'), 69.78 (CH-4') e o metilênico em δ_{C} 61.03 (CH₂-6'). A análise dos demais sinais do espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ e a comparação com dados da literatura, inclusive a observação do deslocamento do carbono CH-3 (δ_{C} 78.21) decorrente do efeito β justificando a ligação com a unidade de açúcar (sendo em torno δ_{C} 71 com OH livre) e a atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios da substância realizada através da análise do espectro de correlação heteronuclear a uma ligação HSQC (Espectro 16, Vol.2, p. 14) permitiram identificar a **SGMH-3** como 3-O- β -D-glicopiranosil- β -sitosterol.

Pode-se citar a atuação do 3-O- β -D-glicopiranosil- β -sitosterol, no combate de tumores (GURVANA et al., 1999).

Tabela 2. Dados de RMN ^{13}C -DEPTQ (125 MHz) em $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ de **SGMH-3** comparados com dados da literatura para o 3-O- β -D-glicopiranosil- β -sitosterol (KOJIMA et al., 1990).

SGMH-3		Literatura*
C	δ_{C}	δ_{C}
5	139.96	140.0
10	36.10	37.0
13	41.71	42.6
CH		
3	78.21	78.3
6	121.18	122.0
8	31.39	32.1
9	49.79	50.4
14	56.29	57.0
17	55.56	56.3
20	35.60	36.5
24	45.39	46.1
25	28.53	29.5
CH₂		
1	36.74	37.6
2	29.02	30.3
4	37.97	39.4
7	31.30	32.2
11	20.43	21.4
12	39.28	40.0
15	23.58	24.6
16	27.59	28.7
22	33.32	34.3
23	25.36	26.4
28	22.39	23.4
CH₃		
18	10.82	12.0
19	18.31	19.3
21	17.78	19.1
26	18.68	19.5
27	17.89	20.1
29	10.82	12.2
Gli		
1'	100.64	102.6
2'	73.20	75.4
3'	75.88	78.7
4'	69.78	71.7
5'	76.19	78.5
6'	61.03	62.9

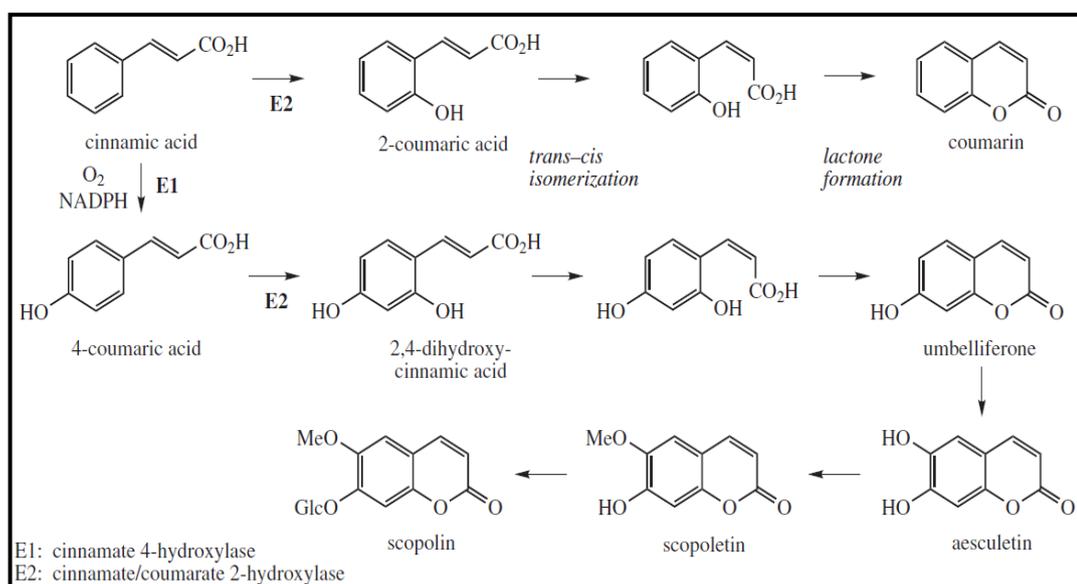
*100MHz, D_5N_5

5.4. Determinação estrutural das cumarinas

As cumarinas destacam-se como substâncias amplamente distribuídas no reino vegetal, podendo também ser encontradas em fungos e bactérias, já foram identificadas mais de 1300 estruturas (HOULT et al., 1988). Classificadas em benzo- α -pironas, podem ter origem natural ou sintética.

Foram primeiramente isoladas de uma espécie de feijão em 1820, combinadas com glicose, sendo que a primeira síntese foi realizada em 1868, pelo químico inglês Sir William Henry Perkin (MIRANDA, 2001).

As cumarinas são biossintetizadas de ácidos cinâmicos e seus derivados (DEWICK, 2009) através da oxidação (hidroxilação) do ácido cinâmico ou derivados em *orto*, seguido de diversas sequências reacionais até à formação de um anel δ -lactônico α,β -insaturado (ARAUJO, 2011) (Esquema 6).



Esquema 6. Proposta biossintética das cumarinas (DEWICK, 2009).

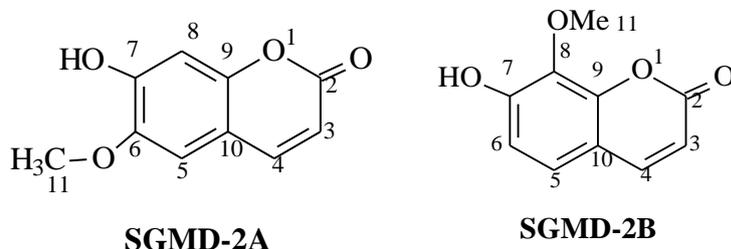
As cumarinas são muito utilizadas, devido principalmente ao seu grande potencial de atividade biológica. Suas características odoríferas promovem o uso na fabricação de perfumes e agentes flavorizantes, bem como repelente de insetos. Atuam na inibição da germinação de alguns tipos de sementes (MIRANDA, 2001). Respondem por uma grande variedade de atividades biológicas, como a ação antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, antiespasmódica, antitumoral e antioxidante, dentre outras (HOULT et al., 1988). Em aplicações tecnológicas, podem ser utilizadas para aumentar a aparência branca dos tecidos e algodão na indústria têxtil. Há evidências de que algumas cumarinas respondem por efeito carcinogênico (MIRANDA, 2001 e ROBERTS, 1965) e potencial hepatotóxico. Assim, as aplicações desses compostos estão superando os aspectos negativos.

Esta classe de metabólito especial possui mais uma característica importante: na sua identificação cromatográfica observa-se forte fluorescência azul quando analisadas por CCDA e exposta à luz ultravioleta (λ_{\max} 254 nm) (MULSEN, 1970).

O estudo fitoquímico da fração em diclorometano (SGMD) resultou no isolamento e identificação das cumarinas codificadas como **SGMD-2A**, **SGMD-2B**, **SGMD-3A**, **SGMD-3B**, **SDMD-3C** e **SGMD-3D**.

5.4.1. Determinação estrutural da mistura de SGMD-2

A mistura de **SGMD-2A** e **SGMD-2B**, foi isolada como sólido cristalino amarelado (9 mg), solúvel em CHCl_3 e identificada através da análise dos espectros de RMN 1D e 2D e CG-EM, como escopoletina e 7-hidroxi-8-metoxi-cumarina, respectivamente.



O espectro de RMN¹H (Espectros 17 e 18, Vol. 2, p. 15 e 16) apresentou sinais dos hidrogênios em δ_{H} 6.28 (*d*, $J=9.4$ Hz, H-3A) e 7.62 (*d*, $J=9.4$ Hz, H-4A) da insaturação conjugada com carbonila, sendo o valor da constante acoplamento (*d*, $J=9.4$ Hz) observado nos dois dupletos indicativo da relação *cis* entre eles. A conjugação da ligação dupla com a carbonila gera um efeito mesomérico apresentando uma estrutura canônica que deixa o hidrogênio ligado ao carbono- β desprotegido (H-4A); este efeito produz um sinal em frequências mais altas que o hidrogênio ligado ao carbono- α (H-3A). A integração de três hidrogênios do singlete em δ_{H} 3.98 representa a presença de apenas uma metoxila.

O espectro de correlação homonuclear, COSY (Espectros 20 e 21, Vol.2, p.18 e 19), revelou claramente o acoplamento entre os hidrogênios H-3A e H-4A.

O espectro de RMN¹³C- DEPTQ (Espectro 19, Vol.2, p.17) apresentou sinal com deslocamento químico em δ_{C} 161.76 referente ao carbono carbonílico da lactona (C-2A). A metoxila foi confirmada pelo sinal em δ_{C} 56.64. Os demais sinais estão descritos na Tabela 3, p.25.

O espectro bidimensional (2D) HSQC de correlação heteronuclear de carbono e hidrogênio através de uma ligação ($^1J_{\text{CH}}$) (Espectro 22, Vol.2, p.20) auxiliou na atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos, assim observados, dos carbonos e respectivos hidrogênios na estrutura.

O espectro HMBC de correlação heteronuclear através de duas e três ($^nJ_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3) ligações, (Espectros 23 e 24, Vol.2, p. 21 e 22) possibilitou atribuição também dos deslocamentos químicos de carbonos não hidrogenados da substância, auxiliou na confirmação da posição da MeO (CH₃-11A), através do acoplamento J^3 H-11A/C-6A além de confirmar outros deslocamentos químicos dos carbonos na substância.

Adicionalmente, o espectro de massas obtido a 70 eV (Espectro 25, Vol.2, p.23), registrou o íon molecular ($[\text{M}^+]$), em m/z 192 D com tempo de retenção no cromatograma (Espectro 26, Vol.2, p.23) em Tr 14,228 minutos e 86.50 % de área relativa, verificando-se uma diferença de 46 D em relação à cumarina (C₉H₆O₂), o que levou à confirmação da presença dos grupos OH e OCH₃ no anel aromático e definiu a fórmula molecular C₁₀H₈O₄ para o composto, escopoletina (7-hidroxi-6-metox-cumarina) (**SGMD-2A**). Os picos relativamente intenso em m/z 177 e 164 foram atribuídos aos fragmentos formados pela eliminação de radical metila (CH₃) e monóxido de carbono (CO), respectivamente, onde esses são fragmentos mais comuns para essa classe de metabólito especial (BUDZIKIEWICZ et al., 1964). As propostas de fragmentação para justificar os principais picos observados no EM foram resumidas no Esquema 7, p.26. O cromatograma registrou também um segundo pico com 13.50% e Tr 15.107, com espectro de massas (Espectro 27, Vol.2, p. 23) com um

outro íon molecular ($[M^+]$) em m/z 192 D, apresentando a maioria dos picos correspondentes aos fragmentos semelhantes da cumarina já proposta, porém com intensidades diferentes, o que pode ser justificado como sendo um isômero de posição da escopoletina, as fragmentações estão ilustradas no Esquema 8, p.26. Os sinais em δ_H em torno de 7.28 (d, H-5B) e 6.81 (H-6B) observados nos espectros de RMN¹H 1D (Espectro 18, Vol.2, p. 16) e 2D (¹H-¹H-COSY, Espectro 21, Vol.2, p. 19) e em torno de δ_C 127.63 (CH-5B), 115.50 (CH-6B) e 61.59 (MeO-11B, metoxila impedida estericamente) no espectro de RMN¹³C (Espectro 19, Vol.2, p.17) permitiram cogitar a 7-hidroxi-8-metoxicumarina (**SGMD-2B**). Não foi possível avançar além desta dedução devido a baixa intensidade dos sinais observados nos espectros de RMN1D e 2D como consequência da quantidade relativamente pequena.

Estudos indicaram que escopoletina possui muitos efeitos biológicos, tais como no tratamento de artrite reumática, inibição da função da tireoide (hipertiroismo) e hiperglicemia sem causar hepatotoxicidade, apresenta atividade anti-oxidante (PANDA, 2006), atividade hiperuricêmico (DING et al., 2005), antiinflamatória (SILVAN et al., 1996) e causa inibição da proliferação de células da próstata humana (LIU, 2002). A substância 7-hidroxi-8-metoxi-cumarina, apesar de pouco estudada já vem apresentando atividades como a antifibrótica (SHIN et al., 2011).

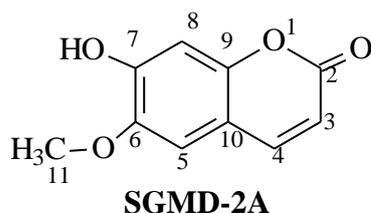
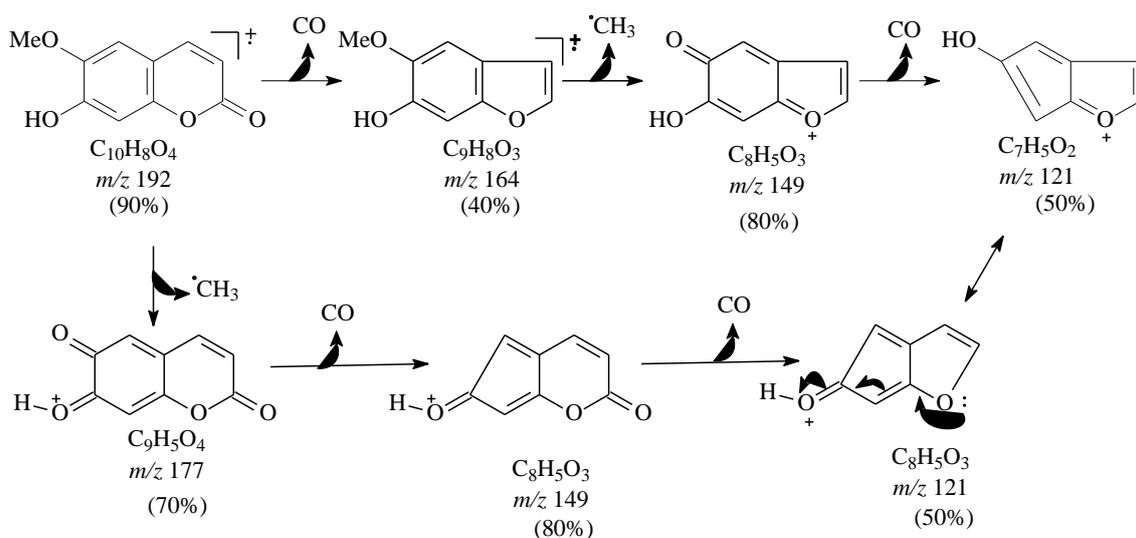
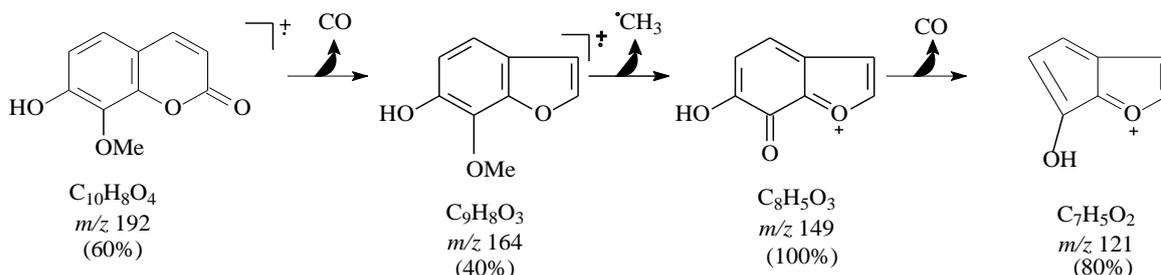


Tabela 3. Dados espectrais de RMN¹H (500 MHz) e RMN¹³C-DEPTQ (125 MHz) inclusive resultados obtidos por HSQC e HMBC da substância de **SGMD-2A**, em CDCl₃, comparados com valores da literatura COSTA et al. 2012. Deslocamentos (δ_H [mult., J (Hz)] e δ_C , ppm).

SGMD-2 ^a					Literatura	
C	δ_C	δ_H	² J_{CH}	³ J_{CH}	δ_C	δ_H
2	161.76	-	H-3	H-4	161.40	-
6	144.23	-		H-8; H-11	144.10	-
7	150.45	-	H-8	H-5	150.37	-
9	149.92	-	H-8	H-5; H-4	149.82	-
10	111.72	-		H-3; H-8	111.56	-
CH						
3	113.60	6.28 (d, 9.4 Hz)			113.48	6.25 (d, 9.5Hz)
4	143.59	7.62 (d, 9.4 Hz)		H-5	143.26	7.58 (d, 9.5 Hz)
5	107.69	6.85 (s)		H-4	107.68	6.84 (s)
8	103.41	6.92 (s)			103.28	6.91 (s)
OCH₃						
11	56.64	3.96 (s)			56.49	3.96 (s)
OH						
	-	6.18 (s)			-	6.17 (s)



Esquema 7. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos no EMBR da substância **SGMD-2A**, com as abundâncias relativas.

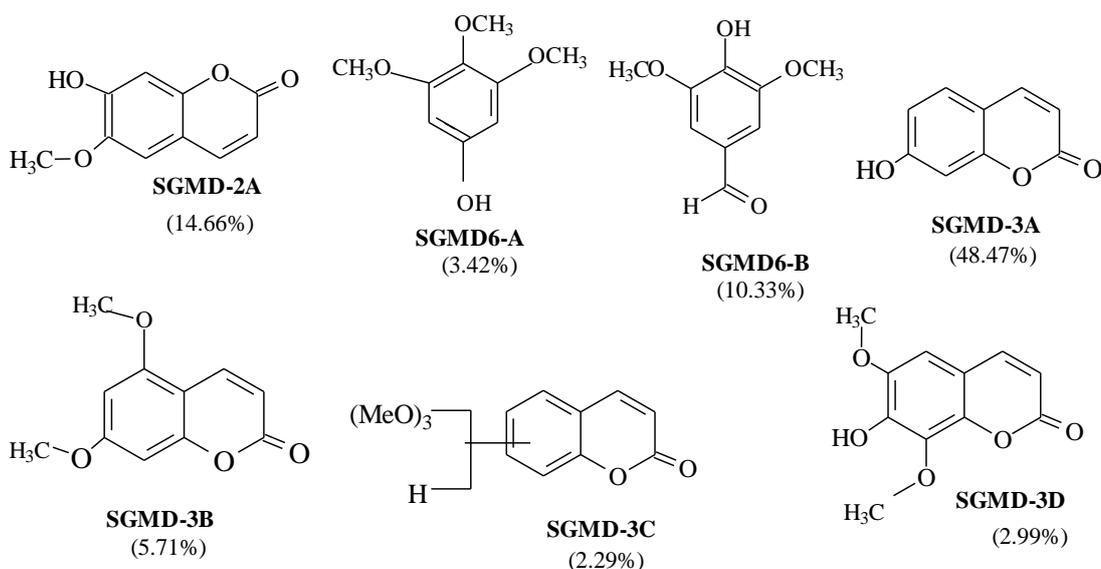


Esquema 8. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos no EMBR da substância **SGMD-2B**, com as abundâncias relativas.

5.4.2. Determinação estrutural da mistura de SGMD-3

Uma mistura (13 mg) das substâncias **SGMD-3A**, **SGMD-3B**, **SGMD-3C**, **SGMD-3D**, apresentou-se como sólido cristalino, solúvel em acetona. Foi observado também nesta amostra sinais que correspondem às substâncias **SGMD-6A** e **SGMD-6B**, que serão descrita nas páginas seguintes, e a **SGMD-2A** já determinada (Tabela 3, p. 25). As substâncias foram identificadas através da análise dos espectros de RMN 1H , RMN ^{13}C -DEPTQ e CG-EM como as cumarinas umbeliferona (**SGMD-3A**), 5,7-dimetoxycumarina (**SGMD-3B**), trimetoxycumarina (**SGMD-3C**), onde não foi possível determinar as reais posições das metoxilas e a isofraxidina (**SGMD-3D**).

A mistura de cumarinas (**SGMD-3**) foi analisada principalmente pela análise por CG-EM, que apresenta maior sensibilidade, sendo detectado no RMN (1H e ^{13}C -DEPTQ) apenas as cumarinas **SGMD-3A** e **SGMD-3B** o trimetoxifenol **SGMD-6A** e o aldeído **SGMD-6B**.

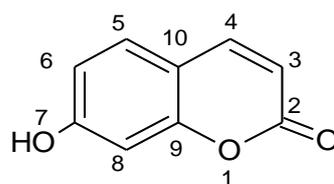


O espectro de RMN¹H (Espectros 28 e 29, Vol. 2, p. 24-25) da **SGMD-3A** apresentou dupletos em δ_H 6.16 e 7.85 ($J=9.5$ Hz, acoplamento *cis*) referente ao H-3A e H-4A, respectivamente, que através do espectro bidimensional de correlação homonuclear, COSY (Espectros 32 e 33, Vol.2, p.28 e 29), observou-se o acoplamento entre si; também foi evidenciado o acoplamento dos dupletos em δ_H 7.52 ($J=8.3$ Hz, H-5A) e 6.84 ($J=8.3$ Hz, H-6A). O singlete em δ_H 6.74, foi atribuído ao H-8. A confirmação da atribuição dos sinais (Tabela 4, p.28) apresentados pelo espectro de RMN¹³C- DEPTQ (Espectros 30 e 31, Vol.2, p.26 e 27) foi feita através do espectro bidimensional de correlação heteronuclear a uma ligação, HSQC (Espectros 34 e 35, Vol.2, p.30 e 31). Os sinais dos carbonos quaternários não foram observados, provavelmente pela pequena massa da amostra, visto que o tempo de relaxação desses carbonos exigem maiores tempos de acumulação para que se tenha uma boa visualização de seus sinais em pequenas quantidades de amostras.

Os pontos de ligação de cada grupo na molécula foram confirmados através da interpretação do espectro bidimensional HMBC de correlação heteronuclear a longa distância, a duas ($^2J_{CH}$) e três ($^3J_{CH}$) ligações (Espectros 36-38, Vol.2, p. 32-34).

Adicionalmente, o espectro de massas obtido a 70 eV (Espectro 45, Vol.2, p. 37), registrou o íon molecular ($[M^+]$), em m/z 162 D com tempo de retenção no cromatograma (Espectro 39, Vol.2, p.35) em Tr 13.281 minutos e 48.47% de área relativa, confirmando a fórmula molecular C₉H₆O₃ para o composto umbeliferona (7-hidroxi-cumarina). As propostas de fragmentação foram resumidas no Esquema 9, p.30, justificando-se os principais picos observados nos espectro de massa da substância.

A umbeliferona é conhecida por ter um amplo efeito farmacêutico, incluindo antioxidante (HOULT; PAYA, 1996), antidiabético, anti-hiperglicemiante e anti-inflamatórias (RAMESH; PUGALENDI, 2006). É utilizada na síntese de medicamentos, especialmente em medicamentos anticancerígenos, no tratamento de alergias e asma, atua também como sonda fluorescente (KOTWAL, 2008).



SGMD-3A

Tabela 4. Dados espectrais de RMN¹H (500 MHz) e RMN¹³C -DEPTQ (125 MHz) inclusive resultados obtidos por HSQC e HMBC da substância **SGMD-3A**, em D₃CCOCD₃, comparados com valores da literatura (ZOLEK, et al., 2003; LIU, et al., 2004). Deslocamentos (δ_H [mult., J (Hz)] e δ_C , ppm).

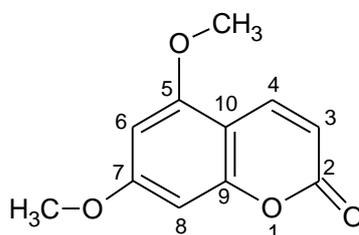
SGMD-3A					Literatura	
C	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C	δ_H
2	~162	-			165.1	-
7	*	-			162.8	-
9	~155	-	H-8	H-4; H-5	154.6	-
10	*	-	H-5	H-4; H-8	110.2	-
CH						
3	113.34	6.15 (<i>d</i> , 9.5)	H-4		111.8	6.14 (<i>d</i> , 9.2)
4	145.18	7.85 (<i>d</i> , 9.5)		H-5	147.4	7.85 (<i>d</i> , 9.2)
5	130.91	7.50 (<i>d</i> , 8.3)		H-4	130.5	7.48 (<i>d</i> , 8.4)
6	114.25	6.84 (<i>d</i> , 8.3)		H-8	101.7	6.82 (<i>dd</i> , 8.4 e 2.3)
8	103.75	6.74 (<i>s</i>)		H-6	101.7	6.73 (<i>d</i> , 2.3)

O espectro de RMN¹H (Espectros 28 e 29, Vol. 2, p. 24 e 25) **SGMD-3B**, apresentou sinais dos hidrogênios em δ_H 6.05 (*d*, H-3B) e 7.98 (*d*, H-4B) da ligação dupla conjugada com carbonila como dupletos (*d*, $J=9.8$ Hz), indicando uma relação *cis* correspondente ao acoplamento existente entre esses dois hidrogênios, que foi confirmada pelo espectro bidimensional de correlação homonuclear, COSY (Espectros 32 e 33, Vol.2, p.28 e 29). O singleto em δ_H 6.40 e 6.34 foram atribuídos aos hidrogênios H-8B e H-6B respectivamente. A ausência de demais acoplamentos no espectro do COSY justifica juntamente com o espectro de HMBC as posições das metoxilas.

O espectro de RMN¹³C-DEPTQ (Espectros 30 e 31, Vol.2, p.26 e 27) contribuiu com os deslocamentos químicos do CH-3B (δ_C 111.25), CH-4B (δ_C 139.79) CH-8B e CH-6B (δ_C 96.34) e OCH₃ (56.99 e 57.12) (Tabela 5, p.29). O espectro de massas obtido a 70 eV (Espectro 46, Vol.2, p.37), registrou o íon molecular ($[M^+]$), em m/z 206 ($[M]^+$ D com tempo de retenção Tr.14.07 min no cromatograma e 5.71% de área relativa, confirmando a fórmula molecular C₁₁H₁₀O₄ para o composto, 5,7-dimetox-cumarina (citropten). As propostas de fragmentação estão ilustradas no Esquema 10, p.30, justificando os principais picos observados no espectro de massas da substância. Essa cumarina vem sendo utilizada em produtos cosméticos de bronzamento (MAKKI, 1991), também possui propriedades antifúngica (SIMONSEN et al., 2004), antibacteriana, anticoagulante (ROSSELLI et al., 2007) e apresenta uma potência fotomutagênica (RAQUET et al., 2009).

As demais substâncias foram evidenciadas pela análise por CG-EM, onde **SGMD-6A**,

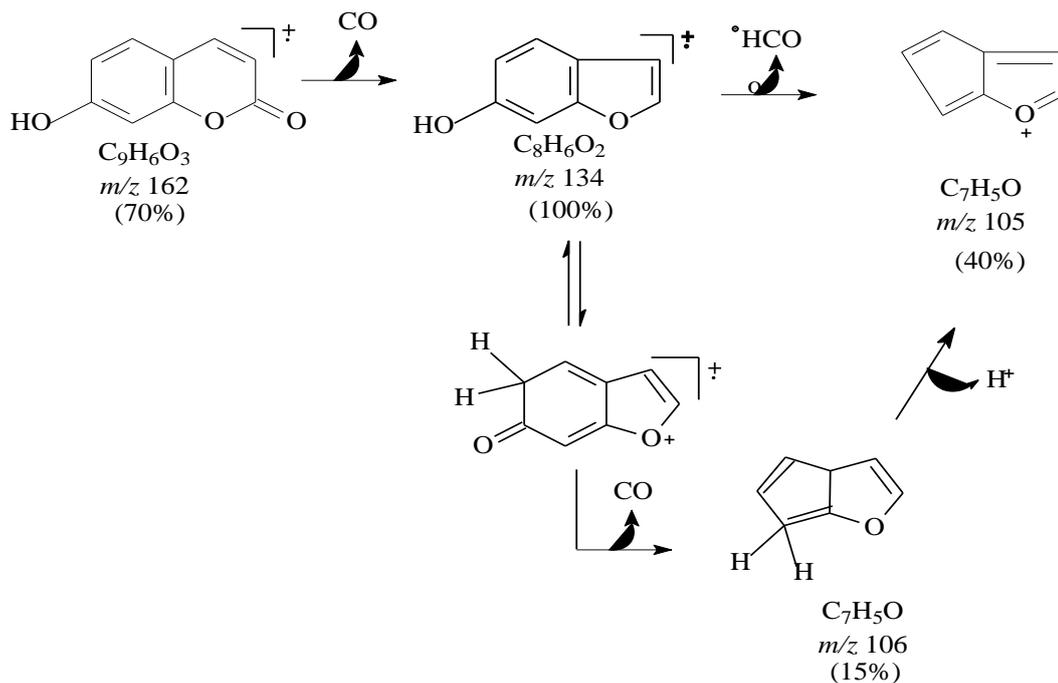
apresentou Tr 10.02 min e área 3.42% e espectro de massas com íon molecular em m/z 184 ($[M]^+$)($C_9H_{12}O_4$) (Espectro 40, Vol.2, p.35), que foi comparada com dados da biblioteca GCMS Postrun Alalysis (Espectro 41, Vol.2, p.35), **SGMD-6B** apresentou Tr 10.53 min e área 10.33% e espectro de massas com íon molecular em m/z 182 ($[M]^+$)($C_9H_8O_4$) (Espectro 42, Vol.2, p.36), que foi comparada com dados da biblioteca GCMS Postrun Alalysis (Espectro 43, p.36). **SGMD-2A** revelou o Tr 15.78 min, área 14.66 % e EM com m/z 192 ($[M]^+$)($C_{10}H_8O_4$)(Espectro 44, Vol.2, p. 36). A substância **SGMD-3C** revelou Tr 14,52 min, área 2.29%, e espectro de massas com pico em m/z 236 ($[M]^+$)($C_{12}H_{12}O_5$)(Espectro 47, Vol.2, p.38). **SGMD-3D** revelou o Tr 14.23 min, área 2.99% e espectro de massas com pico em m/z 222 ($[M]^+$)($C_{11}H_{10}O_5$) (Espectro 48, Vol.2, p. 38). As propostas de fragmentação que justificam as possíveis estruturas deduzidas e condizentes com as fórmulas moleculares de **SGMD-3C** e **SGMD-3D** foram resumidas no Esquema 11, p.31, e Esquema 12, p.31, respectivamente.



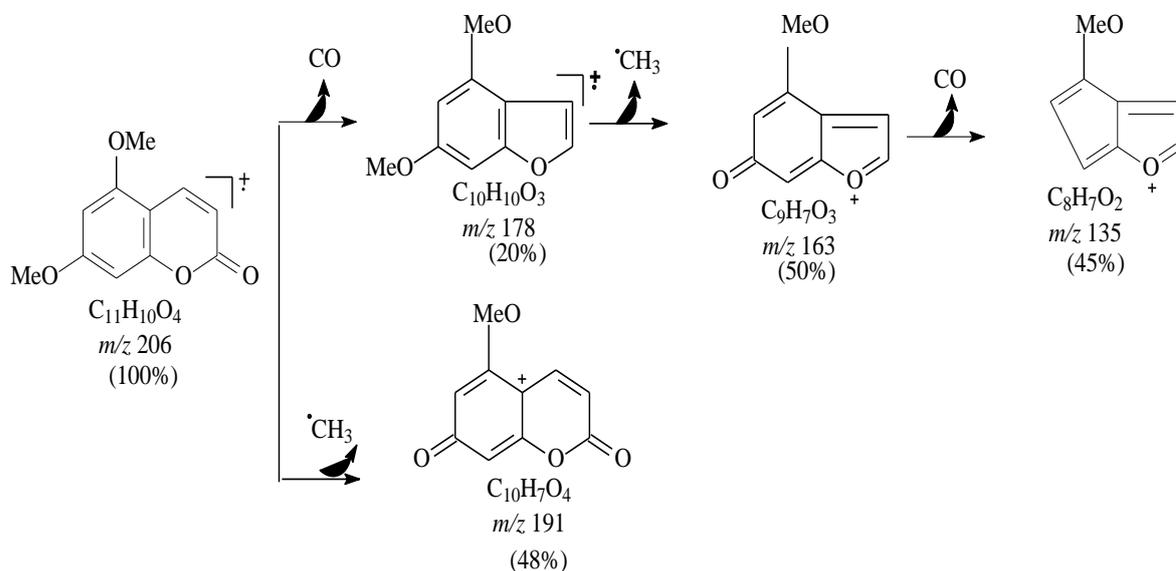
SGMD-3B

Tabela 5. Dados espectrais de RMN¹H (500 MHz) e RMN¹³C -DEPTQ (125 MHz) inclusive resultados obtidos por HSQC e HMBC da substância de **SGMD-3B**, em D₃CCOCD₃, comparados com valores da literatura JEREZANO et. al., 2011. Deslocamentos (δ_H [mult., J (Hz)] e δ_C , ppm).

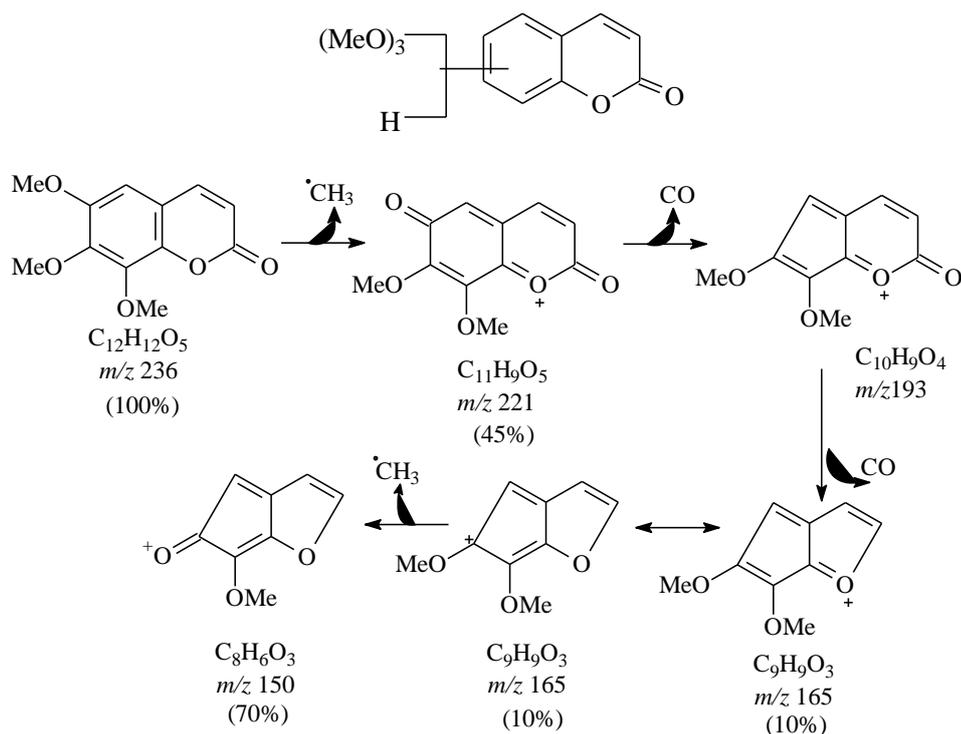
SGMD-3B					Literatura	
C	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C	δ_H
2	~161	-	H-3		161.5	-
7		-			163.7	-
9	~154	-		H-4	156.8	-
5		-			157.0	-
10		-	H-4		*	-
CH						
3	111.25	6.05 (<i>d</i> , 9.7)	H-2		110.9	6.14 (<i>d</i> , 10.0)
4	139.79	7.98 (<i>d</i> , 9.7)			138.7	7.95 (<i>dd</i> , 10.0)
6	96.34	6.34 (<i>s</i>)		H-8	94.8	6.29 (<i>d</i> , 2.4)
8	96.34	6.40 (<i>s</i>)		H-6	92.8	6.42 (<i>d</i> , 2.4)
OCH₃						
5	57.12	3.91 (<i>s</i>)			55.9	3.88 (<i>s</i>)
7	56.99	3.73 (<i>s</i>)			55.8	3.85 (<i>s</i>)



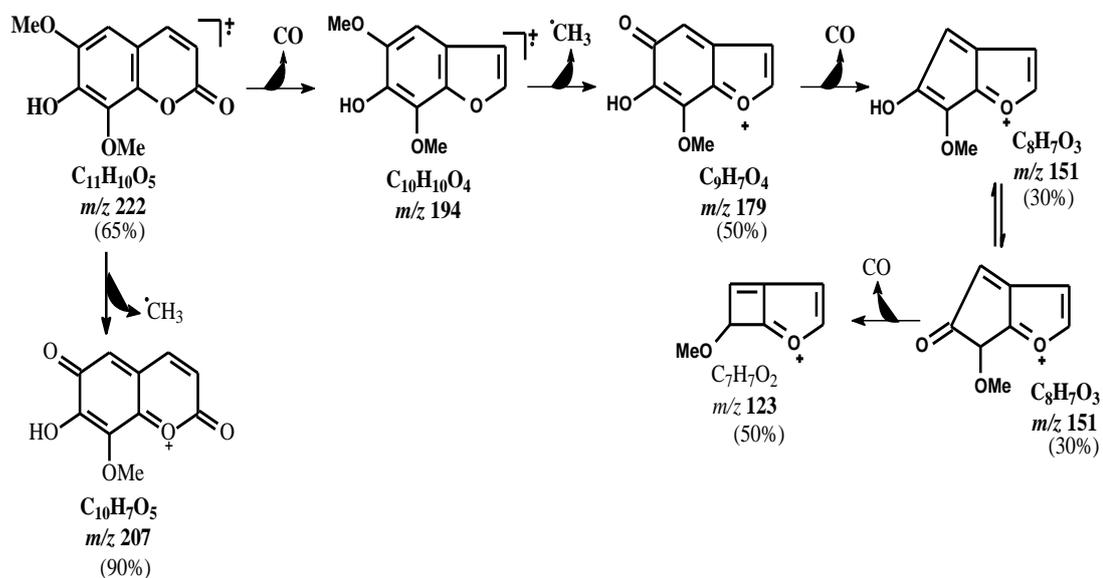
Esquema 9. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos no EMBR da substância **SGMD-3A**, com as abundâncias relativas.



Esquema 10. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos no EMBR da substância **SGMD-3B**, com as abundâncias relativas.



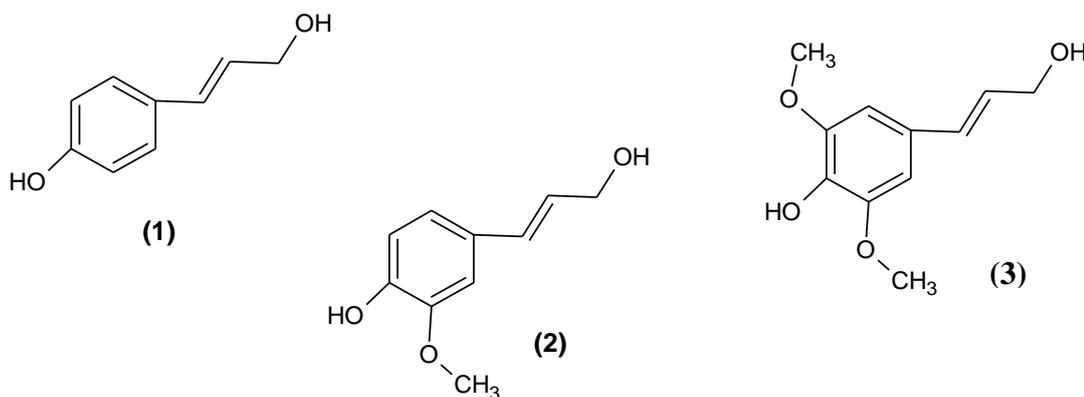
Esquema 11. Proposta de fragmentação usando como exemplo a 5,6,7- trimetox-cumarina para justificar os principais picos no EMBR da substância **SGMD-3C**, com as abundâncias relativas.



Esquema 12. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos no EMBR da substância **SGMD-3D**, com as abundâncias relativas.

5.5. Determinação estrutural de lignanas

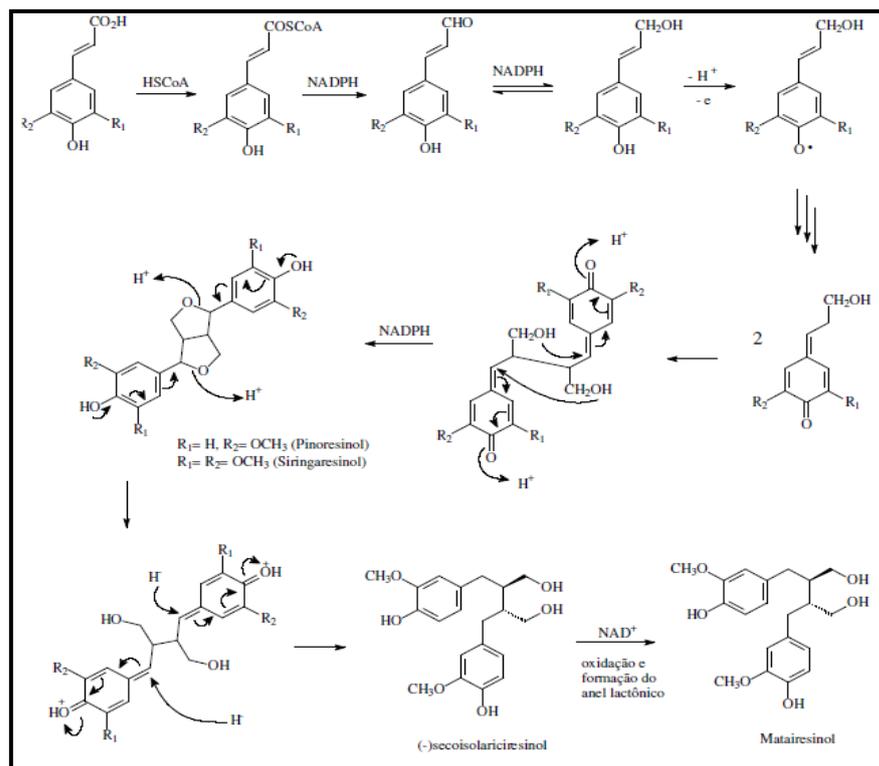
As lignanas são definidas como dímeros formados por unidades C_6C_3 de alcoóis arilpropanóides. Inicialmente verifica-se o acoplamento oxidativo entre os carbonos (CH-8) das unidades monoméricas, sendo os precursores mais importantes os alcoóis 4-hidróxi-cinamoil (álcool *p*-cumárico (1)), o coniferil (2) e o sinapil (3) (DEWICK, 2009).



Lignanas podem variar substancialmente em nível de oxidação, padrão de substituição, bem como a estrutura química de sua estrutura básica de carbono. Além de uma diversidade estrutural, esses metabólitos mostram uma considerável diversidade em termos de composição enantiomérica, biossíntese e distribuição filogenética (UMEZAWA, 2003).

A diversidade estrutural das lignanas se deve principalmente à formação de anéis tetrahidronaftalenos e os diferentes graus de oxidação dos três carbonos da cadeia, que permite formar heterociclos oxigenados (GROS et al., 1985). Um ataque nucleofílico de ambos grupos hidroxil promove a ciclização produzindo estruturas diversificadas (Esquema 13, p.33). Esse tipo de ciclização conduz a estruturas furânicas, que podem ser determinadas através do espectro de RMN 1H por exibirem sinais de hidrogênios ligados a carbonos oximetínicos e oximetilênicos na região de δ_H 3.5-4.5 ppm, além da presença de dois hidrogênios metínicos na região de δ_H 2.9-3.1 ppm, provenientes dos hidrogênios ligados aos carbonos que compõe a ponte entre os dois anéis furânicos. Os anéis aromáticos podem apresentar três padrões de substituição formando os sistemas AA'BB', ABC ou AB, o que torna a elucidação destas substâncias menos laboriosa (ARAUJO, 2011).

Nos vegetais as lignanas podem ser encontradas acumuladas em madeiras como resposta a ferimentos mecânicos ou a invasão de fungos ou bactérias. Estudos relatam várias propriedades benéficas das lignanas, incluindo tripanocida (BASTOS et al., 1999), analgésica, anti-inflamatória (BASTOS et al., 2001), leishmanicidas (BODIWALA et al. 2007; BARATA et al., 2000) e anti-proliferativa (YAM et al., 2008), antifúngica (ZACCHINO et al., 1997), antioxidante (KÓNYA et al., 2001) esquistossomicida (ALVES et al., 1998), malária (SILVA FILHO et al., 2001), inseticida (CHAURET et al., 1996), antitumoral e atividade antimicrobiana (SOUZA et al., 2012).

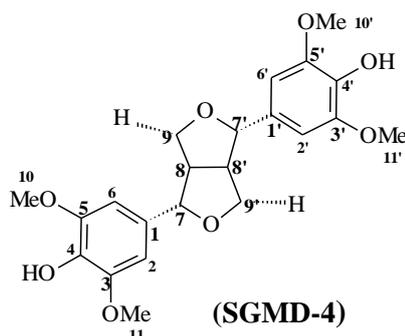


Esquema 13. Proposta biossintética dos metabólitos especiais C₆C₃ (DEWICK, 2009).

O estudo fitoquímico da fração em diclorometano (**SGMD**) resultou no isolamento e identificação da lignana codificada em **SGMD-4**.

5.5.1. Determinação estrutural da substância SGMD- 4

A substância **SGMD-4** (15 mg) apresentou-se em forma de cristais amarelo, solúvel em clorofórmio. A substância foi identificada através da análise dos espectros de RMN (1D e 2D) e de CG-EM como a lignana siringaresinol.



O espectro de RMN¹H (Espectro 49, Vol.2, p.39) apresentou sinais com deslocamentos químicos das unidades furofurânicas em δ_H 4.74 (*sl*, H-7/H-7'), 4.29 (*dd*, H-9a/H-9a'), sinal encoberto em torno de 3.91 (*dd*, H-9b/H-9b') e 3.10 (*m*, H-8/H-8'). O singlete intenso em δ_H 3.90, revelando integração compatível com 12 hidrogênios, conduziu à determinação de quatro grupos metoxila. A semelhança dos sinais dos hidrogênios do anel aromático, apresentando apenas um singlete em δ_H 6.59 foi usada para postular a presença de um plano de simetria na molécula. O espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹H-

¹H COSY (Espectro 51, Vol.2, p.41), confirmou a unidade furofurânica pelos acoplamentos de H-8/H-8' com ambos H-7/H-7' e 2H-9/2H-9'.

O espectro de RMN-¹³C-DEPTQ (Espectro 50, Vol.2, p.40), apresentou-se bastante simples, revelando apenas oito sinais, cada um correspondendo a dois carbonos, devido à simetria da molécula. A comparação dos deslocamentos químicos (Tabela 6) com os dados descritos na literatura conduziu à fórmula estrutural da siringaresinol, lignana proveniente do acoplamento oxidativo entre duas unidades C₆C₃ do álcool sinapil (MONTEIRO et al., 2007). A atribuição inequívoca de cada deslocamento químico foi completada após análise dos espectros bidimensionais HSQC (¹J_{CH}, de correlação através de uma ligação (Espectro 52, Vol.2, p. 42) e HMBC (²J_{CH} e ³J_{CH}, correlação a longa distância).

A posição de ligação de cada grupo funcional na molécula foram determinados também através da interpretação do espectro bidimensional HMBC de correlação heteronuclear a longa distancia, a duas (²J_{CH}) e três (³J_{CH}) ligações (Espectro 53, Vol.2, p. 43), sendo possível identificar principalmente a posição dos grupos metoxilas, o que corroborou com a análise dos espectros de RMN-¹³C-DEPTQ e de ¹H.

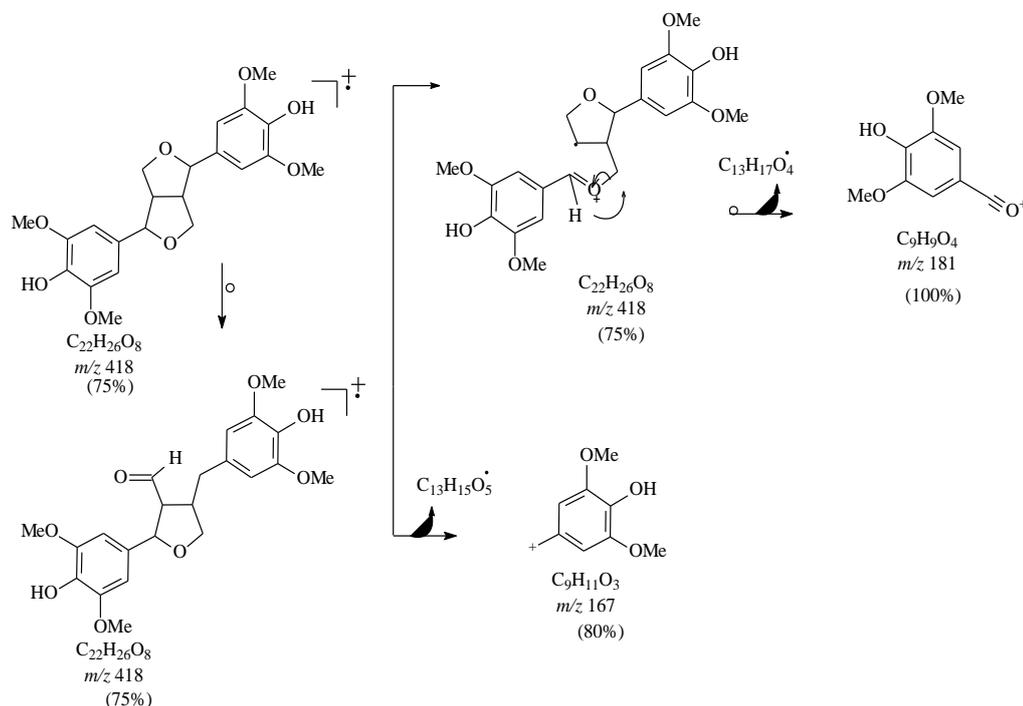
A análise por cromatografia gasosa apresentou um cromatograma com impurezas (ftalatos) e um sinal de maior porcentagem, com 31.85 % de área, com pico de Tr 33.65 minutos (Espectro 54, Vol.2, p.44). O espectro de massas (70 eV, Espectro 55, Vol.2, p. 44), apresentou pico do íon molecular em *m/z* 418 (M⁺), compatível com a fórmula molecular C₂₂H₂₆O₈. As propostas de fragmentação (Esquema 14, p. 35) justificaram os principais picos observados no espectro de massas da lignana **SGMD-4**.

A presença de carbono quiral na substância conduziu a análise do desvio da luz polarizada que apresentou [α]_D²⁵ = +0,0071 (MeOH).

Várias atividades biológicas foram relatadas para o siringaresinol, como atividades antifúngicas (MONTEIRO et al., 2007), antiinflamatória e antinociceptiva (JUNG et al., 2003). Park et al. (2008) evidenciaram a atuação da lignana na regulação do ciclo celular em células de HL-60 de leucemia, e sugerem que essa possui um grande potencial de agente quimioterapêutico para o tratamento de cancro.

Tabela 6. Dados de RMN¹H (500 MHz) e de RMN¹³C-DEPTQ (125 MHz), inclusive resultados obtidos por HSQC e HMBC, da substância **SGMD-4**, em CDCl₃, comparados com valores da literatura (MONTEIRO et al., 2007). Deslocamentos (δ_H [mult., *J* (Hz)] e δ_C, ppm).

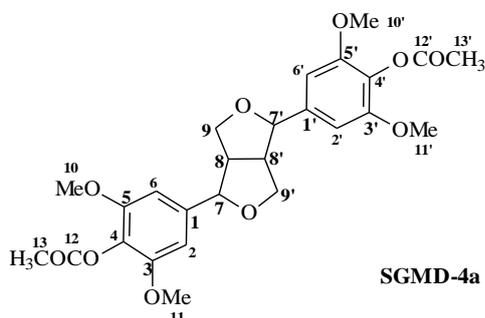
		SGMD-4			Literatura	
C	δ _C	δ _H	² J _{CH}	³ J _{CH}	δ _C	δ _H
1/1'	132.01	-			134.7	-
3/3'5/5'	147.09	-		H-10/10'; OH	147.9	-
4/4'	134.19	-	OH-4/4'	H-2/2'; H-6/6'	131.4	-
CH						
2/2'6/6'	102.59	6.59 (<i>s</i>)		H-7/7'	103.6	6.59 (<i>s</i>)
7/7'	86.04	4.74(<i>d</i> , 5.0)		H-6/6'; H-2/2'	85.3	4.61(<i>d</i> , 4)
8/8'	54.29	3.10 (<i>m</i>)	H-7/7'		53.6	3.04 (<i>m</i>)
CH₂						
9a/9a'	71.76	4.29 (<i>dd</i>)		H-7/7'	71.0	4.15(<i>dd</i> , 5 e 7)
9b/9b'	71.76					3.77(<i>dd</i> , 3.5 e 7)
MeO						
10/10'/11/11'	56.02	3.90 (<i>s</i>)			56.6	3.89 (<i>s</i>)
OH						
4/4'	-	5.55 (<i>s</i>)			-	8.23



Esquema 14. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos no EMBR da substância **SGMD-4**, com as abundâncias relativas.

5.5.2. Derivado acetilado do siringaresinol **SGMD-4a**

O derivado **SGMD-4a** (10mg), obtido por reação da **SGMD-4** com anidrido acético na presença de piridina, apresentou-se em forma semelhante à substância original **SGMD-4**, com solubilidade em clorofórmio. O derivado acetilado confirmou a estrutura da substância através da análise dos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C -DEPTQ e HMBC.



Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C -DEPTQ apresentaram o perfil semelhante ao **SGMD-4**, exceto pela presença do sinal do grupamento acetato que foi incorporado na substância e a ausência do singlete largo em δ_{H} 5.5 referente a hidroxila na posição 4/4'.

O espectro de RMN ^1H (Espectro 56 e 57, Vol.2, p.45 e 46), além dos sinais característicos do siringaresinol, apresentou um singlete em δ_{H} 2.39 (3H-13/13') com integração para seis hidrogênios, conferindo a presença de duas metilas ligadas as carbonilas

(C=O) do grupo acetato. A presença das carbonilas (C-12/12') foi confirmada pelo espectro de RMN-¹³C-DEPTQ (Espectro 58, Vol.2, p.47) através dos deslocamentos químicos em δ_C 168.87, valor típico de carbonilas de ésteres, aparecendo o sinal das metilas (CH₃-13/13') em δ_C 20.48, A comparação dos demais sinais do derivado e do siringaresinol encontram-se descritos na Tabela 7.

A posição de ligação de cada grupo na molécula foi confirmada através da interpretação dos espectros bidimensionais HSQC (¹J_{CH}) e HMBC (²J_{CH} e ³J_{CH}, Espectro 59 Vol.2, p. 48), corroborando também para análise correta dos espectros de RMN-¹³C-DEPTQ e de ¹H.

Como esperado, a acetilação dos hidroxílicos localizadas nos átomos de carbono 4 e 4' atenua a capacidade de doação de elétrons nos átomos de carbono orto e para como se pode observar na Tabela 7.

Tabela 7. Dados de RMN¹H (500 MHz) e de RMN-¹³C-DEPTQ (125 MHz), inclusive resultados obtidos por HMBC, do derivado **SGMD-4a**, em CDCl₃, comparados com valores do siringaresinol (**SGMD-4**). Deslocamentos (δ_H [mult., *J* (Hz)] e δ_C , ppm).

		SGMD-4a			SGMD-4	
C	δ_C	δ_H	² J _{CH}	³ J _{CH}	δ_C	δ_H
1/1'	139.57	-	H-2/2'/6/6'		132.01	-
3/3'5/5'	152.23	-	H-2/2'/6/6'	H-	147.09	-
4/4'	127.80			10/10'/11/11'		
12/12'	168.87	-	H-13/13'	H-2/2'/6/6'	134.19	-
CH						
2/2'/6/6'	102.62	6.60 (<i>s</i>)		H-7/7'	102.59	6.59 (<i>s</i>)
7/7'	85.81	4.79 (<i>d</i> , 4.1)		H-2/2'/6/6'	86.04	4.74(<i>d</i> , 5.0)
8/8'	54.36	3.10 (<i>m</i>)	H-		54.29	3.10 (<i>m</i>)
			9a/a'/9b/b';			
			H-7/7'			
CH₂						
9a/9a'	72.07	4.32(<i>dd</i>)			71.76	4.29
9b/9b'	72.07	3.96 (<i>dd</i>)			71.76	
MeO						
10/10'/11/11'	56.19	3.84 (<i>s</i>)			56.02	3.90 (<i>s</i>)
CH₃						
13/13'	20.48	2.35 (<i>s</i>)			-	-
OH						
4/4'	-	-			-	5.55 <i>s</i>)

5.6. Determinação estrutural do alcaloide

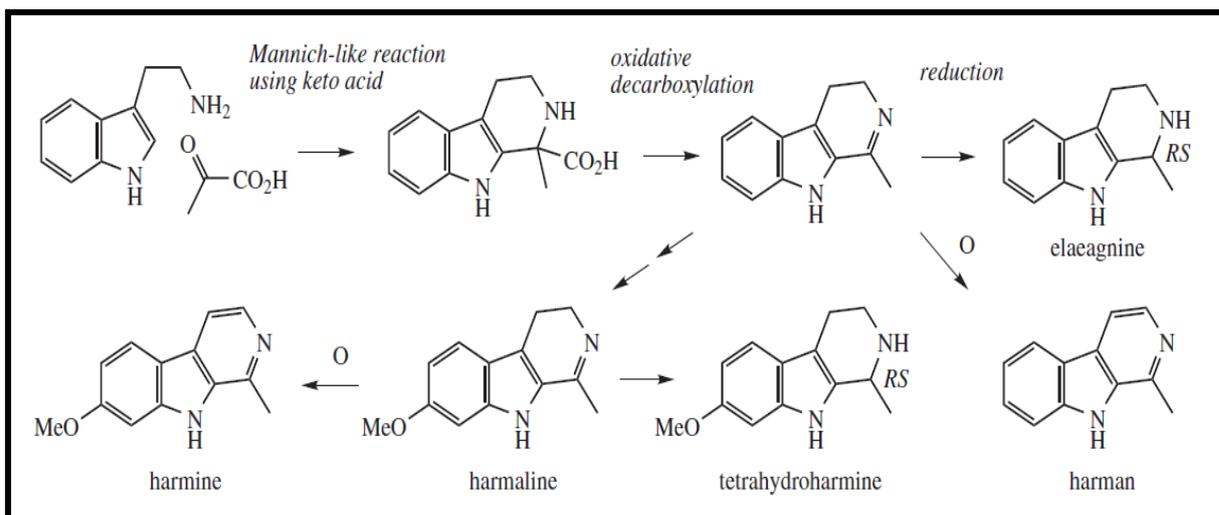
Os alcaloides são compostos naturais contendo nitrogênios encontrados principalmente em vegetais, mas também, em menor grau, em microorganismos e animais; mais de 27000 estruturas diferentes de alcaloides foram caracterizados, sendo 21000 a partir de plantas (DEWICK, 2009). Apresentam propriedade alcalina devido à presença do nitrogênio amínico e importantes atividades químicas e farmacológicas (GROS et al., 1985).

Os alcaloides β -carbolínicos são substâncias oriundas da via metabólica do chiquimato, que utilizam como precursor o ácido antranílico. Este, após sucessivas etapas reacionais, gera o aminoácido triptofano que irá dar origem aos diversos alcaloides β -carbolínicos (Esquema 15) (DEWICK, 1998).

Os alcaloides β -carbolínicos são baseados em um sistema β -carbolina, também conhecidos como alcaloides do tipo harmano. Possuem o anel indólico derivado do triptofano e são considerados alcaloides indólicos simples. São moléculas tricíclicas que compreendem outro átomo nitrogênio em um de seus ciclos laterais de seis membros normalmente substituídos com uma metila (DEWICK, 1998; MACHADO, 2006).

A presença dos alcaloides β -carbolínicos pode ser visualizada pela fluorescência de coloração azul intensa quando analisada por CCDA submetida à radiação UV a 254 nm. Nas análises por RMN¹H apresentam sinais na região de hidrogênios aromáticos entre δ_H 7.20-8.50 com diferenciação na multiplicidade de acordo com o padrão de substituição do anel benzênico. A presença de sinais entre δ_H 2.40-2.80 é característico das metilas dos alcaloides β -carbolínicos simples e um sinal simples, pouco intenso em δ_H 9.00-9.80, é atribuído ao hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio de alcaloides que não se apresentam como amins terciárias (ARAÚJO, 2011).

A diversidade de atividades apresentadas por esses tipos de metabólitos especiais é extensa, tendo uma importância significativa na descoberta de fármacos. Pode ser citados as: Quinina (antimalário), Papaverina (antidifusão erétil), Reserpina (antiarritmico), Vincristina (anticâncer) e Galantamina (AntiAlzheimer) (BARREIROS e BOLZAN, 2009) dentre outros.

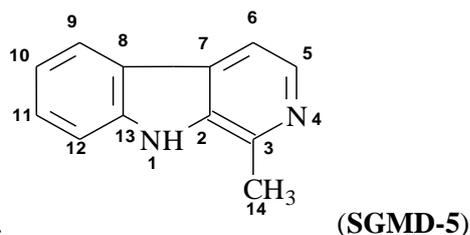


Esquema 15. Proposta biossintética de alcaloides indólicos (DEWICK, 2009).

O estudo fitoquímico da fração em hexano (SGMH) e diclorometano (SGMD) resultaram no isolamento e identificação dos alcaloides **SGMH-4**, **SGMD-4** e **SGMAc1-A**.

5.6.1 Determinação estrutural da substância SGMD-5

A substância **SGMD-5** apresentou-se como um sólido amarelado cristalino (25 mg), solúvel em metanol. A substância foi identificada como o alcaloide β -carbolínico, harmana (**SGMD-5**) através da análise dos espectros de RMN ¹H, RMN¹³C-DEPTQ e de CG-EM envolvendo consulta na Library Nist 08 acoplada ao aparelho da Shimadzu.



O espectro de RMN¹H (Espectro 60-62, Vol.2, p. 49-51), apresentou sinais característicos de hidrogênios ligados ao anel aromático entre δ_H 7.14-8.02. Os sinais de hidrogênio foram atribuídos com auxílio do espectro de RMN 2D (¹H-¹H-COSY) (Espectro 64 e 65, Vol.2, p.53 e 54), que permitiu identificar as interações de acoplamento entre o tripleto em δ_H 7.14 (H-10) com os sinais em δ_H 7.44 (H-11, *t*) e δ_H 7.95 (H-9, *d*) e do acoplamento entre si dos dupletos em δ_H 8.02 (H-5, *J*=5.4) e δ_H 7.68 (H-6, *J*=5.4). O singlete largo de pouca intensidade foi observado em δ_H 11.05 caracterizando a presença de uma ligação (N-H) do esqueleto indólico. Os hidrogênios do grupo metila ligado ao anel piridínico foi exibido em um singlete intenso em δ_H 2.68.

O espectro de RMN ¹³C-DEPTQ (Espectro 63, Vol.2, p.52), exibiu sinais em δ_C 20.12 justificando a metila ligada ao anel piridínico, seis sinais na região de δ_C 113.23-138.01, atribuídos aos carbonos sp² metínicos, sendo os sinais em δ_C 138.01 e 114.42 correspondentes aos carbonos do anel piridínico CH-5 e CH-6, respectivamente. Os demais sinais de carbonos sp² metínicos foram assinalados para os carbonos do anel aromático dissubstituído da unidade indólica. Os sinais em fase negativa situados entre δ_C 122.97 a 143.27 estão relacionados aos carbonos não hidrogenados (Tabela 8, p.39). A análise inequívoca dos sinais foi realizada através da análise dos espectros de correlações (*J*¹) HSQC (Espectro 66, Vol.2. p.55) e (*J*² e *J*³) HMBC (Espectro 67 e 68, Vol.2, p.56 e 57.).

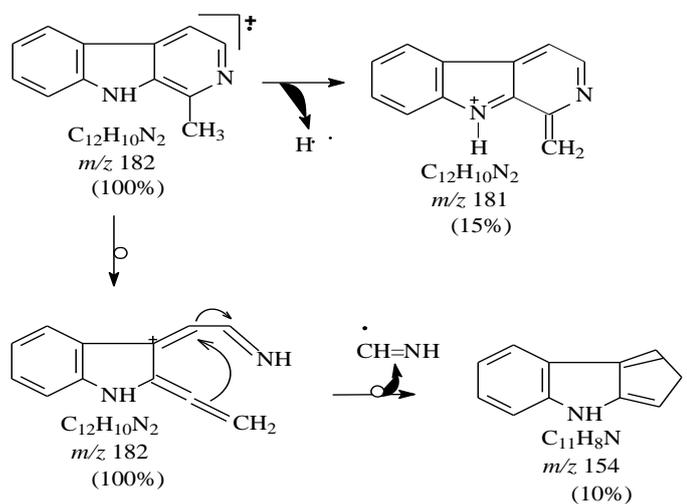
O cromatograma (CG) (Espectro 69, p.58) com tempo de retenção em Tr.13.58 e área de 100%, revelou o grau de pureza dessa amostra. O espectro de massas (70 eV, Espectro 70, p. 58) forneceu o pico do íon molecular em *m/z* 182 ([M].+), compatível com a fórmula molecular C₁₂H₁₀N₂. As propostas de fragmentação para justificar os principais picos observados no EM foram resumidas no Esquema 16, p.39.

A análise do conjunto de dados comparados com a literatura conduziu à identificação da substância **SGMD-5** como alcaloide harmana sendo este o marcador quimiotaxonômico encontrado nas espécies estudadas do gênero e em grandes quantidades (BASTOS, et. al., 2002).

Trabalhos demonstraram que a harmana atua na reversão de quadros de estresse (ABELAIRA, et. al, 2013), apresenta atividade antioxidante (SUSANNA et al., 1991), antiviral, antifúngicas (CANÇÃO et al., 2014), antidepressivo (FARZIN; MANSOURI, 2006). Estudos comportamentais documentaram uma série de efeitos diversos para a harmana, como convulsiva ou anticonvulsivante, tremorogenesis (BAHR; CHEMLI, 1910).

Tabela 8. Dados de RMN¹H (500 MHz) e de RMN-¹³C-DEPTQ (125 MHz), inclusive resultados obtidos por HSQC e HMBC, da substância **SGMD-5**, em MEOD, comparados com valores da literatura (BASTOS, 2001). Deslocamentos (δ_H [mult., J (Hz)] e δ_C , ppm).

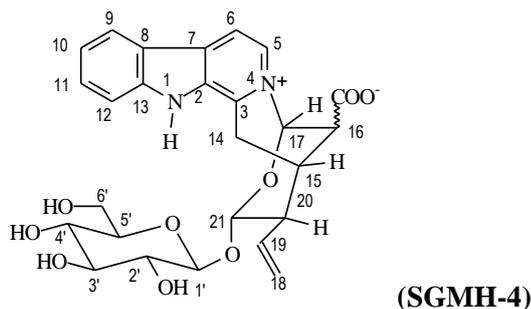
Substância SGMD-5					Literatura	
C	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C	δ_H
2	136.54	-		H-6;H-14	134.7	-
3	143.27	-	H-5;H-14		141.4	-
7	130.01	-		H-5	128.3	-
8	122.97	-		H-6;H-10;H-12	121.8	-
13	142.84	-	H-12	H-9;H-11	140.8	-
CH						
5	138.01	8.02 (d, 5.4)			138.3	8.25 (d, 5.2)
6	114.42	7.68 (d, 5.4)	H-5		113.4	7.85 (d, 5.2)
9	122.99	7.95 (d, 8.0)	H-11		121.8	8.20 (d)
10	121.08	7.14 (t, 14.8)	H-11	H-12	120.0	7.20 (t)
11	129.72	7.44(t, 14.8)	H-10	H-9	128.2	7.51 (t)
12	113.23	7.48 (d, 8.2)		H-10	111.6	7.59 (d)
CH₃						
14	20.13	2.68 (s)			20.3	2.77 (s)
NH						
1		11.05 (s)				10.65



Esquema 16. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos no EMBR da substância **SGMD-5**, com as abundâncias relativas.

5.6.2. Determinação estrutural da substância SGMH-4

A substância **SGMH-4** (20 mg) apresentou-se como um sólido caramelo, solúvel em metanol. Esse metabólito especial foi identificado através da análise dos espectros de RMN¹H, RMN¹³C-DEPTQ (1D e 2D) e ESI-MS como o alcaloide ofiorina (**SGMH-4**).



O espectro de RMH ^1H (Espectro 71-74, Vol.2, p. 59-62) mostrou sinais de seis hidrogênios na região de aromáticos referente à unidade β -carbolinica, que foram confirmados pelas interações de acoplamento presentes no espectro de RMN 2D ^1H - ^1H -COSY (Espectro 78-81, Vol.2, p.66-69). Picos transversais correspondência às interações heteronucleares de átomos de carbono e hidrogênio observados nos 2D HSQC (Espectro 82 e 83, Vol.2, p. 70 e 71) e HMBC (Espectro 84 e 85, Vol.2, p. 72 e 73) permitiram identificar os sinais dos carbonos hidrogenados e quaternários desta unidade aromática ($\text{C}_{11}\text{H}_6\text{N}_2$), que se assemelha com o alcaloide harmana (**SGMD-5**, Tabela 8, p.39) já identificada neste trabalho.

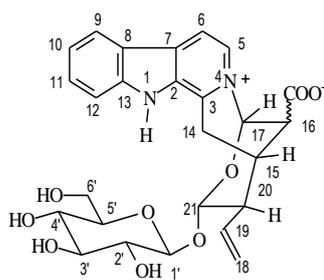
A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (Espectro 75-77, Vol.2 p.63-65)(1D e 2D) conduziu a presença do grupo vinila, reconhecida pelos sinais dos carbonos : metilênico CH_2 -18 (δ_{C} 119.14 e δ_{H} 5.35 e 5.32) e metínico CH -19 (δ_{C} 136.44 e δ_{H} 5.96).

A unidade de glicose foi proposta através dos sinais dos átomos de carbono oxigenados metínicos CH -1' [δ_{C} 96.16 e δ_{H} 4.80 (*d*, 9.8 Hz, H-1' em posição axial)] carbono anomérico, CH -2' (δ_{C} 74.76 e δ_{H} 3.12), CH -3' (δ_{C} 77.98 e δ_{H} 3.26), CH -4' [δ_{C} 71.75 e δ_{H} 3.10 (*m*)] e CH -5' (δ_{C} 78.28 e δ_{H} 3.01) e o carbono metilênico CH_2 -6' [δ_{C} 62.75 e δ_{H} 3.60 e δ_{H} 3.36 (*m*)].

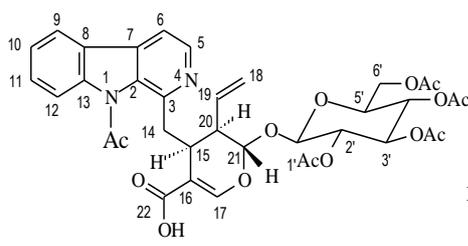
A comparação destes dados espectrométricos com valores registrados na literatura (BASTOS et. al., 2002; AIMI et al., 1985) para alcalóides β -carbolinicos glicosilados contendo grupo vinila, permitiu destacar a presença de sinais remanescentes nos espectros de RMN ^{13}C referentes aos carbonos CH -20, CH -16 e CH -15 com deslocamentos químicos em δ_{C} 49.15, 47.93 e 31.99 respectivamente; foi observado também dois sinais de carbonos carbinólicos CH -21 (δ_{C} 100.50, CH ligado a dois átomos de oxigênio = carbono cetálico), CH -17 (δ_{C} 90.93, CH ligado a átomo de oxigênio e nitrogênio suportando carga positiva) e um sinal em δ_{C} 174.53, assinalado a carbonila (C-13) e compatível para presença de ácido carboxílico. Estes dados revelaram-se semelhantes aos deslocamentos químicos descritos para os alcaloides ofiorinas A e B (Tabela 9, p. 41).

O espectro ESI-HRMS permitiu deduzir o íon molecular m/z 512.1762 ($[\text{M}]^+$) e a fórmula molecular $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_9$ através dos picos $[\text{M}+\text{H}^+]$ em m/z 513.1873 ($\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_9$, calc. m/z 513.1873) (Espectro 86, Vol.2, p.74) e $[\text{M}+\text{Na}^+]$ em m/z 536.1729 ($\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{NaO}_9$, calc. m/z 536.1771) (Espectro 87, Vol.2, p.74), em pleno acordo com à estrutura da ofiorina. A representação da estrutura de **SGMH-4** com os picos $[\text{M}+\text{H}^+]$ e $[\text{M}+\text{Na}^+]$ estão no Esquema 17, p. 42.

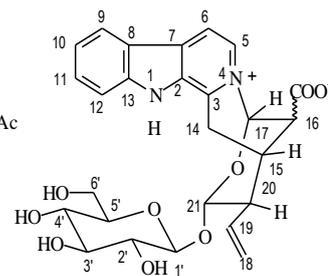
Esse alcaloide glucoindole apresenta algumas atividades registradas na literatura como: antiinflamatória, antiespasmódico, analgésica (CAPASSO et al., 2002).



SGMH-4



Mo-01



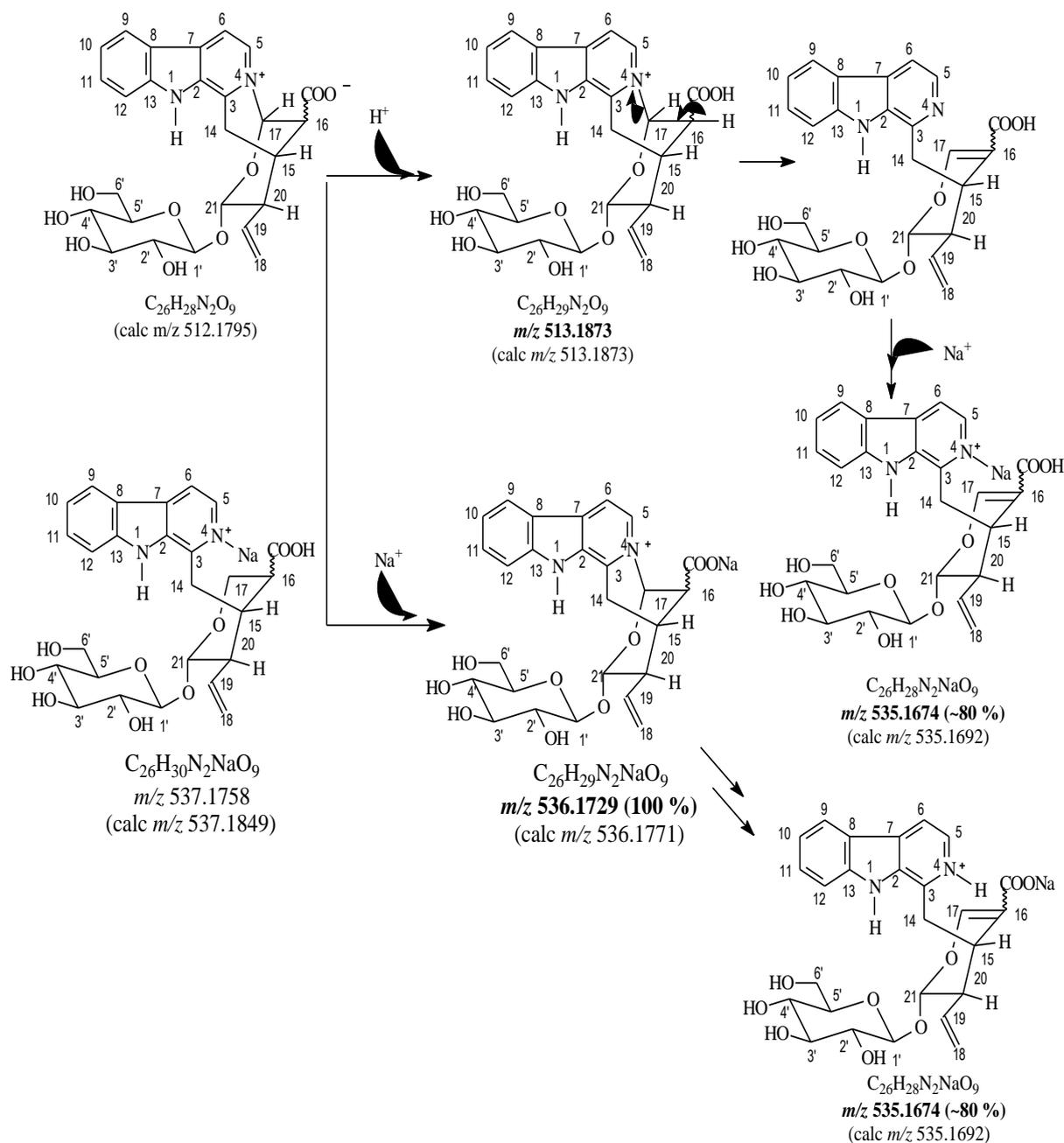
Mo-02

Tabela 9. Dados de RMN¹H (400 MHz) e de RMN-¹³C-DEPTQ (100 MHz), inclusive resultados obtidos por HSQC e HMBC, da substância **SGMH-4**, em MeOD, comparados com valores da literatura (BASTOS et al., 2002). Deslocamentos químicos em δ (δ_H [mult., *J* (Hz)] e δ_C , ppm).

SGMH-4				Mo-01		Mo-02	
C	δ_C	δ_H	³ <i>J</i> _{CH}	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
2	135.05	--	H-6; 2H-14	134.7	--	135.9	--
3	140.00	--	H-5	144.3	--	138.8	--
7	133.81	--	H-5; H-9	133.4	--	130.2	--
8	121.50	--	H-10; H-12	124.7	--	119.2	--
13	145.89	--	H-9; H-11	140.7	--	144.1	--
16	-	-	-	114.6	--	-	--
22	174.53	--	-	167.7	--	175.6	--
CH							
5	134.86	8.55 (d, 6.6 Hz)		143.1	8.56 (d, 4.8)	133.3	8.6 (d, 6.8)
6	117.60	8.50 (d, 6.6 Hz)		113.2	7.45 (d, 4.8)	118.0	8.3 (d, 6.8)
9	124.47	8.33 (d, 8.3 Hz)	H-11	120.8	7.99 (t, 8.0)	123.4	8.1 (d, 8.0)
10	123.40	7.43 (t)	H-12	124.6	7.44 (t, 8.0)	122.7	7.1 (t, 8.0)
11	133.37	7.77 (t)		130.2	7.61 (t, 8.0)	132.6	7.4 (t, 8.0)
12	114.04	7.70 (d, 8.5 Hz)	H-10	118.5	8.58 (l, 8.0)	113.3	7.6 (d, 8.0)
15	31.99	3.20 (m)		34.8	4.50 (ddd, 4.2, 3.2)	31.0	3.0 (m)
16	47.93	3.43 (m)		-	-	46.6	3.3
17	90.97	6.60 (sl)	H-5	147.6	6.93 (d, 2.8)	89.0	6.6 (sl)
19	136.44	5.96 (m)		131.5	5.42 (ddd, 16.0, 10.0, 8.0)	134.7	5.7 (dd)
20	49.15	2.87 (m)	H-1'; H-16	42.9	5.04 (dd, 8.0, 2.0)	47.6	2.8 (m)
21	100.50	4.43 (d, 7.8 Hz)		95.5	2.97 (DM, 6.0)	94.2	4.6 (d, 9.6)
CH₂							
14	30.96	3.73		33.9	2.20 (m)	24.0	3.5
18	119.14	5.35		120.4	5.40 (m)	120.9	5.3 (d, 17.2)
		5.32			5.30 (dd, 16, 2.0)		5.2 (d, 10.8)
Açúcar							
1'	96.16	4.80 (d, 9.8)	H-21	95.8	4.96 (d, 8.0)	99.7	4.4 (d, 8.8)
2'	74.75	3.12		70.3	5.04 (t, 8.0)	73.5	2.9 (t, 8.8)
3'	77.76	3.26		72.2	5.30 (t, 9.6)	76.6	3.1 (m)
4'	71.75	3.10		68.2	5.13 (t, 9.0)	69.8	3.0 (m)
5'	78.28	3.01 (m)		72.3	3.80 (dd, 12.8, 2.4)	77.0	2.8(m)
6'a	62.75	3.60(m)		61.7	4.37 (dd, 12.8, 4.50)	60.6	3.5 (m)
6'b	62.75	3.36 (m)		61.7	4.30 (dd, 12.8, 2.4)	60.6	3.3(m)

CH₃-C=O δ_C 20.9, 20.7, 20.6, 20.5, 17.8; 170.6, 170.0, 169.7, 169.5, 169.3

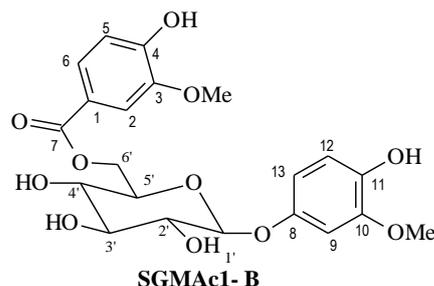
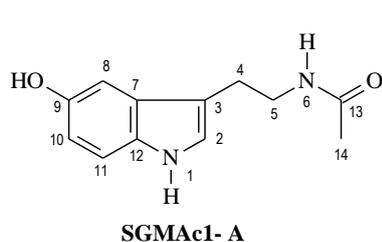
δ_H 2.36, 2.23, 2.10, 2.08, 1.84



Esquema 17. Estruturas para os diferentes picos apresentados no ESI-MS, $[M+Na^+]$ e $[M+H^+]$ da substância **SGMH-4**.

5.6.3. Determinação estrutural da mistura de **SGMac-1**.

A mistura de **SGMac-1A** e **SGMac-1B** (10 mg) foi solúvel em metanol. Tais componentes foram identificados através da análise dos espectros 1D e 2D de RMN 1H , RMN ^{13}C -DEPTQ, CG-EM e de ESI-MS como a N-acetil-serotonina e 6'-O-vaniloiltachioside, respectivamente.



5.6.3.1. Determinação estrutural de SGMAc -1A

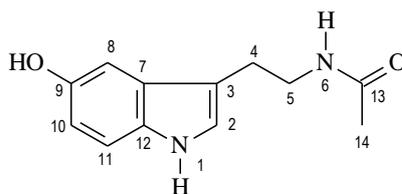
O espectro de RMH ^1H (Espectro 88-90, Vol.2, p.75-77) mostrou sinais de hidrogênios na região de aromáticos constituindo um sistema ABC referente à unidade β -carbolínica, com a presença de um singlete largo (sl) em δ_{H} 6.52 (CH-8A), 6.68 (dd, $J=8.4$ e $J=2.2$, CH-10A) e 7.15(d, $J= 8.4$), que foram confirmados pelas interações de acoplamento reveladas pelo espectro de RMN 2D ^1H - ^1H -COSY (Espectro 95-97, Vol.2, p. 82-84). Picos transversais correspondência às interações heteronucleares de átomos de carbono e hidrogênio observados nos 2D HSQC (Espectro 98-100, Vol.2, p. 85-87) e HMBC (Espectro 101-103, Vol.2, p. 88-90) permitiram identificar os sinais dos carbonos hidrogenados e quaternários desta unidade aromática (Tabela 10, p. 44).

O singlete em δ_{H} 7.02 correlacionado com o carbono δ_{C} 122.81 através do HSQC e o carbono quaternário em δ_{C} 112.61 foram atribuídos ao carbonos CH-2A e C-3A do anel pirrólico.

Os carbonos metilenos CH₂-4A e CH₂-5A revelaram seus sinais em δ_{H} 2.87, t, $J= 7.2$ / δ_{C} 26.36 e δ_{H} 3.26/ δ_{C} 41.57, respectivamente. Suas posições foram determinadas através do espectro de RMN 2D ^1H - ^1H -COSY, com acoplamento entre si, CH₂-4A e CH₂-5A, pela multiplicidade do sinal e pelo espectro 2D HMBC, onde esse conferiu que CH₂-4A, estava ligada ao anel pirrólico na posição CH-3, através do acoplamento J^2 para C-3A/ 2H-4A e J^3 C-3/2H-5A.

O grupamento amida, foi reconhecido pela presença de um singlete em δ_{H} 1.87 e δ_{C} 22.74 referente a metila (CH₃-14A) e pelo sinal do carbono carbonílico em δ_{C} 173.43 do espectro de RMN- ^{13}C -DEPTQ (Espectro 91-94, vol.2, p. 78-81)

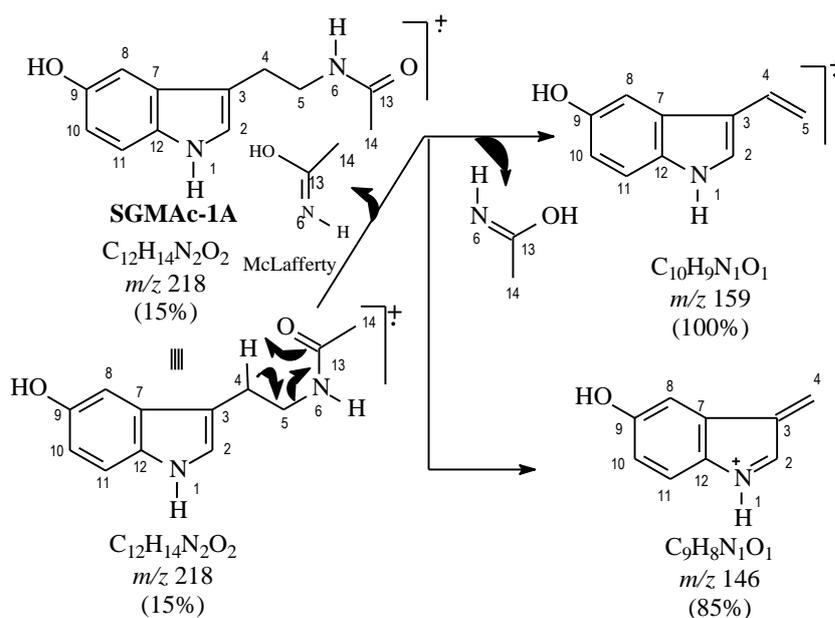
O cromatograma (CG) (Espectro 104, p.91) apresentou dois picos com tempo de retenção Tr.18.174 e área de 81.76% (**SGMAc-1A**) e outro em Tr. 18.24, sendo uma impureza(ftalato). O espectro de massas (70 eV, Espectro 105, p.91) forneceu o pico do íon molecular em m/z 218 ([M].+), compatível com a fórmula molecular C₁₂H₁₄N₂O₂, em acordo com a estrutura da N-acetil-serotonina. As propostas de fragmentação para justificar os principais picos observados no EM foram resumidas no Esquema 18, p.44.



SGMac1-A

Tabela 10. Dados de RMN¹H (500 MHz) e de RMN-¹³C-DEPTQ (125 MHz), inclusive resultados obtidos por HSQC e HMBC, da substância **SGMac-1A**, em MeOD, comparados com valores da literatura (GUERRIERO, et al., 1993). Deslocamentos químicos em δ [δ_H [mult., J em Hz]] e δ_C , (ppm).

SGMac1-A					Literatura	
C	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C	δ_H
3	112.61	-	H-4	H-5; H-8	114.06	-
7	129.58	-		H-2; H-4; H-11	131.03	-
9	151.21	-		H-11	152.69	-
12	133.20	-		H-2; H-8; H-10	134.90	-
13	173.43	-	H-14	2H-5	174.82	-
CH						
2	122.81	7.02 (<i>sl</i>)		H-4	125.74	7.01 (<i>s</i>)
8	103.76	6.92(<i>sl</i>)		H-10	105.02	6.91 (<i>dd</i> , 2.4 e 0.6)
10	112.47	6.68 (<i>dd</i> , 8.4, 2.2)		H-8	113.90	6.65 (<i>dd</i> , 8.7 e 2.4)
11	112.80	7.15 (<i>d</i> , 8.)			114.19	7.15 (<i>dd</i> , 8.7 e 0.6)
CH₂						
4	26.36	2.87 (<i>t</i> , 7.2)	H-5		27.8	2.85 (<i>t</i> , 7.5)
5	41.57	3.29	H-4		43.02	3.43 (<i>t</i> , 7.5)
CH₃						
14	22.74	1.87 (<i>s</i>)			24.15	1.92 (<i>s</i>)



Esquema 18. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos no EMBR da substância **SGMac-1A**, com as abundâncias relativas.

5.6.3.2. Determinação estrutural de SGMac -1B

O espectro de RMN ^1H (Espectro 88-90, Vol.2, p.75-77) evidenciou a presença de dois anéis benzênicos 1,3,4-trissubstituído, com sinal (δ_{H} 6.55) revelando integração para 2 hidrogênios, atribuídos a H-12B e H-13B através da correlação heteronuclear no espectro 2D HSQC (Espectro 98-100, Vol.2, p. 85-87) com os respectivos sinais dos átomos CH-12B (δ_{C} 116,03/ δ_{H} 6.55) e CH-13B (δ_{C} 110.13/ δ_{H} 6.55). O sinal do H-9B apresentou-se como um singlete largo (sl) em δ_{H} 7. 70 (CH-9B: (δ_{C} 104,15/ δ_{H} 7,70). A atribuição inequívoca desses carbonos se baseou também no espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMBC ($^nJ_{\text{CH}}$, n=2 e 3) através do acoplamento J^{β} H-9B/CH-13B (Espectro 101-103, Vol.2, p. 88-90).

O grupamento vaniloil foi deduzido pelo RMN ^1H : através dos dupletos em δ_{H} 6.69 ($J= 8.5$ Hz, H-5b) e 7.57 ($J=8.5$, H-6B), que estão acoplados *orto* entre si, interação confirmada pelo espectro de correlação homonuclear, COSY (Espectro 95-97, Vol.2, p. 82-84), além de um singlete largo em δ_{H} 7.00 (H-2B). O espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ apresentou sinais de dois grupos metoxílicos em δ_{C} 56,41 (MeO-3B) e 56,56 (MeO-10B), além de sinais em δ_{C} 116.11, 125.34, 148.91, 153.30, 122.51 e 168.06 CH-5B, CH-6B, C-4B, C-3B, C-1B e C-7B (C=O). A presença do grupo carboxílico (C-7B) responde pela maior desproteção dos átomos de hidrogênio H-2B e H-6B devido ao efeito anisotrópico da ligação dupla da carbonila.

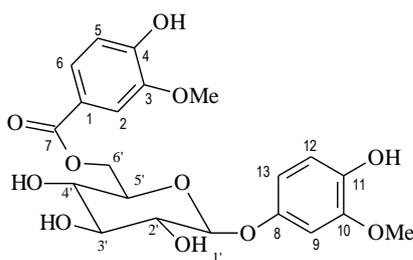
A unidade glicopiranosídica foi caracterizada pelos sinais de átomos de carbono oxigenados, correlacionados com os respectivos átomos de hidrogênio no HSQC: CH-1B' anomérico [δ_{C} 103.60/ δ_{H} 4.78 (*d*, 7.55 Hz), H-1B' em posição axial], CH-2B' (δ_{C} 75.06/ δ_{H} 3.48), CH-3'B (δ_{C} 77.07/ δ_{H} 3.50), CH-4'B [δ_{C} 70.65/ δ_{H} 3.44 (*m*)], CH-5'B (δ_{C} 75.70/ δ_{H} 3.73) e CH₂-6'B [δ_{C} 65.33/ δ_{H} 4.70 (*d*, 11.35) e δ_{H} 4.36 (*dd*, 11.7, 7.6).

A configuração anomérica β para a glicose foi deduzida com base no valor da constante de acoplamento de valor $J = 7.5$ Hz de CH-1'B. A ligação do grupo vaniloil, com a unidade glicosídica foi confirmada pela correlação heteronuclear a longa distância revelada pelo HMBC ($^3J_{\text{CH}}$) de 2H-6'B(δ_{H} 4.70 e 4.36) da glicose com C-7B (δ_{C} 168.06).

A posição de ligação de cada grupo na molécula foi confirmada através da interpretação dos espectros bidimensionais HSQC ($^1J_{\text{CH}}$) e HMBC ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$) corroborando também para análise correta dos espectros de RMN- ^{13}C -DEPTQ e de ^1H (Tabela 11, p.46).

O CG-EM não detectou essa substância, devido sua característica polar (provavelmente não saiu da coluna), ficando retida na coluna cromatográfica, com isso ela foi analisada por ESI-MS, e o espectro permitiu deduzir o íon molecular m/z 452.1311 ($[\text{M}]^+$) e a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$ através do pico $[\text{M}-\text{H}^+]$ em m/z 451.1277 ($\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_{11}$, calc. m/z 451.1240) (Espectro 106, Vol.2, p.91), em pleno acordo com à estrutura do 6'-O-vaniloiltachioside . A representação da estrutura de **SGMac-1B** com o pico $[\text{M}-\text{H}^+]$ está no Esquema 19, p.46.

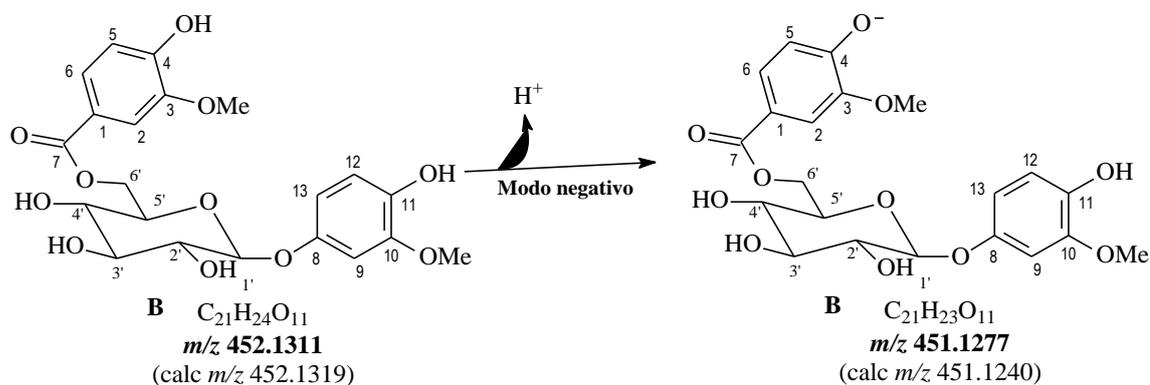
Dentre atividades biológicas relatadas para esse glucosídeo, pode-se citar a de antioxidante. (BAI, et al., 2012)



SGMac-1 B

Tabela 11. Dados de RMN¹H (500 MHz) e de RMN-¹³C-DEPTQ (125 MHz), inclusive resultados obtidos por HSQC e HMBC, da substância **SGMAc-1B**, em MeOD, comparados com valores da literatura (YANG et al., 2007). Deslocamentos químicos em δ (δ_H [mult., *J* (Hz)] e δ_C , ppm).

SGMAc-1B					Literatura	
C	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	δ_C	δ_H
1	122.51	-		H-5	122.1	-
3	148.91	-		H-5; MeO-3	149.2	-
4	153.30	-	H-5	H-2; H-6	152.5	-
7	168.06	-		H-2; H-6, 2H-6'	167.9	-
8	152.12	-	H-9; H-13	H-1'; H-12	152.5	-
10	149.31	-	H-9	H-12; MeO-10	149.2	-
11	143.91	-		H-9; H-13	143.2	-
CH						
2	113.75	7.53 (s)		H-6	113.7	7.54 (s)
5	116.11	6.68 (d, 8.5)		H-2	115.9	8.86 (d, 8.2)
6	125.34	7.57 (d, 8.5)			125.3	7.56 (d, 8.3)
9	104.15	6.70 (s)		H-13	104.2	6.70 (s)
12	116.03	6.55 (d)	H-13		115.9	6.55 (s)
13	110.13	6.55 (d)		H-9	110.2	6.55 (s)
CH₃						
MeO-3	56.41	3.68 (s)			56.3	3.70 (s)
MeO-10	56.56	3.84 (s)			56.3	3.86 (s)
Açúcar						
1'	103.60	4.78 (d, 7.55)			103.7	4.76 (d, 7.5)
2'	75.06	3.48			75.0	3.42 (m)
3'	77.07	3.50			77.9	3.46 (m)
4'	70.65	3.44			72.1	3.39 (m)
5'	75.70	3.73			75.6	3.73 (m)
6'a	65.33	4.70 (d, 11.35)			65.2	4.70 (d, 11.0)
6'b	65.33	4.36 (dd, 11.7, 7.6)			65.2	4.37dd, 11.6, 7.4)



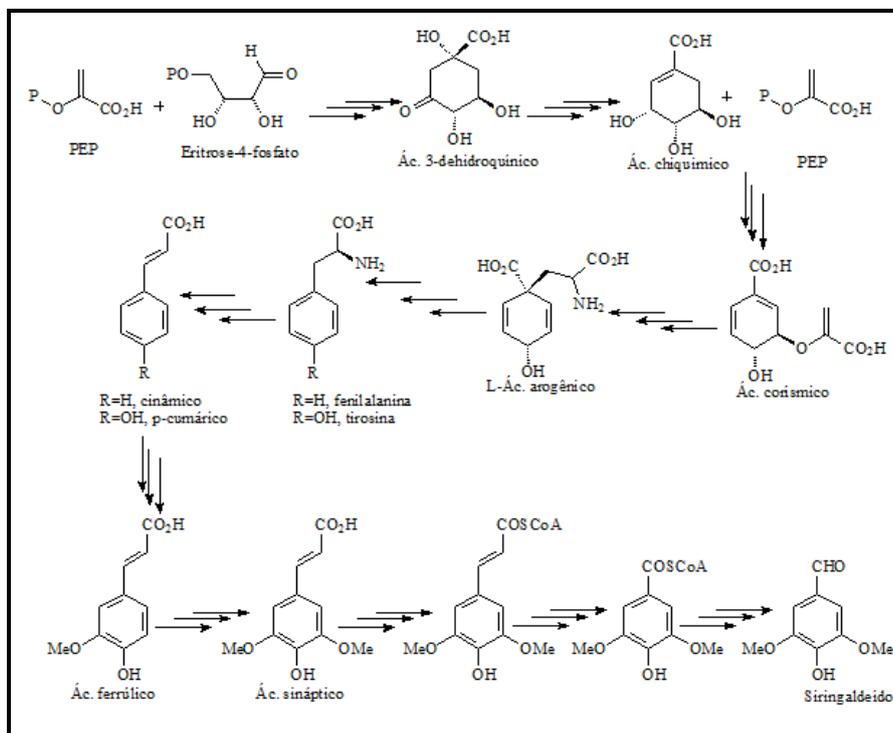
Esquema 19. Espectro de massas de alta resolução ESI-MS registrado no modo negativo ([M-H⁺]) da substância **SGMAc-1B**.

5.7. Determinação estrutural dos metabólitos C₆C₁.

Os metabólitos com estrutura C₆C₁ são oriundos da degradação da cadeia lateral dos ácidos cinâmico ou *p*-cumárico, onde esses são formados pela via metabólica dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina (com esqueleto C₆C₃), sendo precursores de uma série de metabólitos especiais que usualmente possuem um padrão de substituição característico (principalmente *p*-hidróxi, 3,4-dihidróxi ou 3,4,5-trihidróxi). A etapa inicial de formação desses metabólitos é a eliminação de amônia gerando o ácido cinâmico *trans* (*E*). Quando o aminoácido de partida é a fenilalanina terá a formação do ácido cinâmico, porém, se o aminoácido for à tirosina, a eliminação de amônia produzirá o ácido 4-hidróxi-cinâmico (ácido *p*-cumárico) (ARAUJO, 2010).

A formação dos aldeídos cinâmicos se dá com a substituição do grupo carboxilato pelo grupo SCoA, que, em seguida, sofre uma redução por ação de NADPH gerando aldeídos cinâmicos (TORSSELL, 1997; DEWICK, 2009) (Esquema 20).

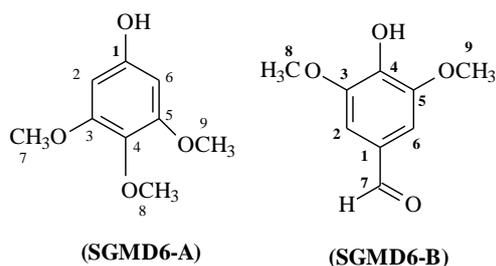
O estudo fitoquímico da fração em diclorometano (SGMD) resultou no isolamento e identificação de dois metabólitos secundário denominadas **SGMD-6A** e **SGMD-6B**.



Esquema 20. Proposta biossintética dos metabólitos especiais C₆C₃ (DEWICK, 2009).

5.7.1 Determinação estrutural da mistura de SGMD-6

As substâncias **SGMD-6A** e **SGMD-6B** apresentaram-se majoritariamente em uma mistura (20 mg) de sólido amarelado, solúvel em acetona e foram identificadas como 3,4,5-trimetox-fenol (**SGMD-6A**) e o siringaldeído (**SGMD-6B**). Nesta mistura em uma proporção menor, foi detectada através do cromatograma (Espectro 109, p.94), cumarinas que já foram relatadas neste trabalho. As determinações estruturais foram propostas através da análise dos espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C-DEPTQ e CG-EM.



5.7.1.1 Determinação estrutural de SGMD -6A

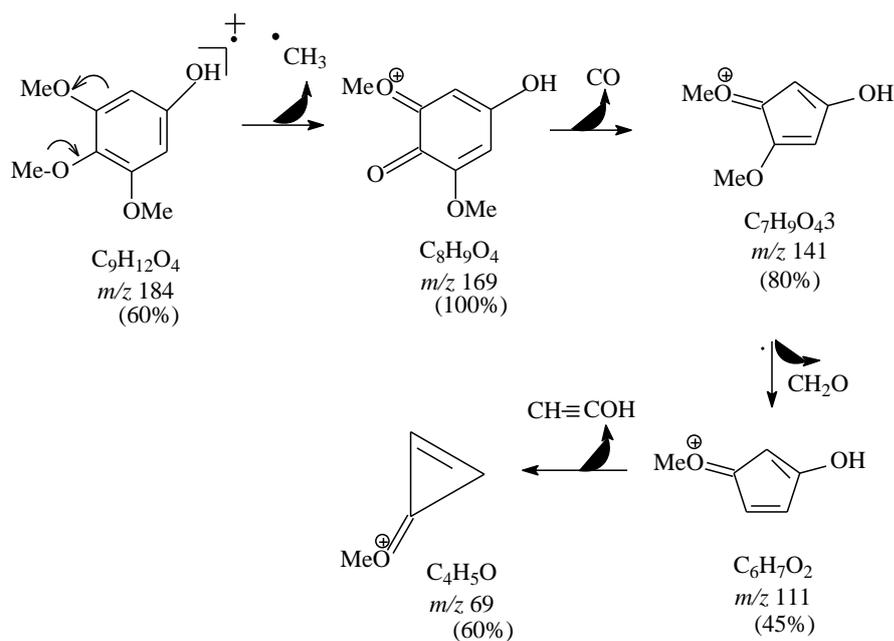
O espectro de RMN ^1H **SGMD-6A** (Espectro 107, Vol.2, p.92) apresentou dois singletos finos e intensos em δ_{H} 3.74 (MeO-7A e MeO-9A) e 3.91 (MeO-8A) característicos dos hidrogênios dos grupos metoxilas. O deslocamento químico em δ_{H} 6.13 refere-se aos dois hidrogênios do anel aromático H-2A e H-6A (Tabela 12).

O espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ (Espectro 108, Vol.2, p.93) possibilitou a identificação dos valores de deslocamento químico dos carbonos metínicos em δ_{CH} 94.16 (CH-2A/CH-6A), metoxílicos em δ_{C} 56.38 (MeO-7A e MeO-9A) e 60.85 (MeO-8A). A comparação dos dados obtidos com valores da literatura (Tabela 12), permitiu a confirmação da substância como sendo o 3,4,5-trimetox-fenol (**SGMD-6A**).

No espectro de massas (70 eV, Espectro 110, Vol.2, p.94) observou-se o pico do íon molecular em m/z 184 ($[\text{M}]^+$) correspondente a esse componente, com Tr 10.263 min., condizente com a fórmula molecular $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$. As propostas de fragmentação para justificar os principais picos observados no EM de baixa resolução foram resumidas no Esquema 21, p.49.

Tabela 12. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e de RMN ^{13}C -DEPTQ (125 MHz) da substância **SGMD-6A**, em CD_3OCCD_3 , comparados com valores da literatura (PARAMAR, et al., 1996). Deslocamentos químicos em δ (δ_{H} [mult.] e δ_{C} , ppm).

SGMD-6A			Literatura	
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	155.00	-	152.44	
3/5	153.93	-	153.76	-
4	132.61	-	131.85	-
CH				
2/6	94.16	6.13 (s)	93.04	6.10 (s)
OCH₃				
7/9	56.38	3.74 (s)	55.98	3.75
8	60.85	3.91 (s)	61.03	3.75
OH				5.15 (s)



Esquema 21. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos no EMBR da substância **SGMD-6A**, com as abundâncias relativas.

5.7.1.2 Determinação estrutural da substância SGMD6-B

O espectro de RMN¹H (Espectro 107, Vol.2, p.92) apresentou um singlete em δ_H 9.82 característico do hidrogênio de aldeído. Outro singlete em δ_H 7.22 foi atribuído aos dois hidrogênios do sistema do anel aromático (H-2B/H-6B). Os hidrogênios dos grupos metoxilas foram revelados também como um singlete em δ_H 3.61 (MeO-3B/MeO-5B). O aparecimento de apenas três sinais no espectro de RMN¹H sugeriu um plano de simetria para justificar a equivalência magnética dos hidrogênios do anel aromático e dos hidrogênios dos grupos metoxilicos.

O espectro de RMN ¹³C- DEPTQ (Espectro 108, Vol.2, p.93) possibilitou a identificação dos valores de deslocamento químico dos carbonos metínicos em δ_{CH} 106.93, metoxílicos em δ_{CH} 55.80 e da carbonila aldeídica em δ_C em 190.05. A comparação dos dados espectrais discutidos com valores existentes na literatura (Tabela 13, p. 50), permitiram a confirmação da substância **SGMD-6B**, caracterizando-se como sendo o aldeído siríngico (4-dihidro-3,5-dimetoxibenzaldeído) (PETTIT, 2009).

No espectro de massas (70 eV, Espectro 111, Vol.2, p.94) desta substância (Tr 10,72 min) observou-se o pico correspondente ao íon molecular em m/z 182 ($[M^+]$), compatível com a fórmula molecular $C_9H_{10}O_4$. As propostas de fragmentação para justificar os principais picos observados foram resumidas no Esquema 22, p.50.

Esse metabólito especial apresenta atividade antiinflamatória (HUANG, et al., 2013), antioxidante, antibacteriana,, antialérgico e efeitos anticancer (LI, et al., 2013).

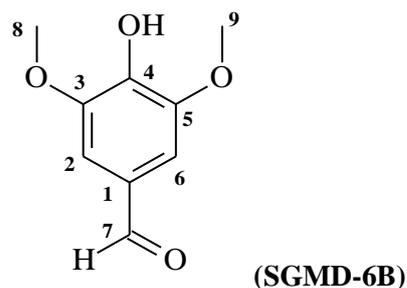
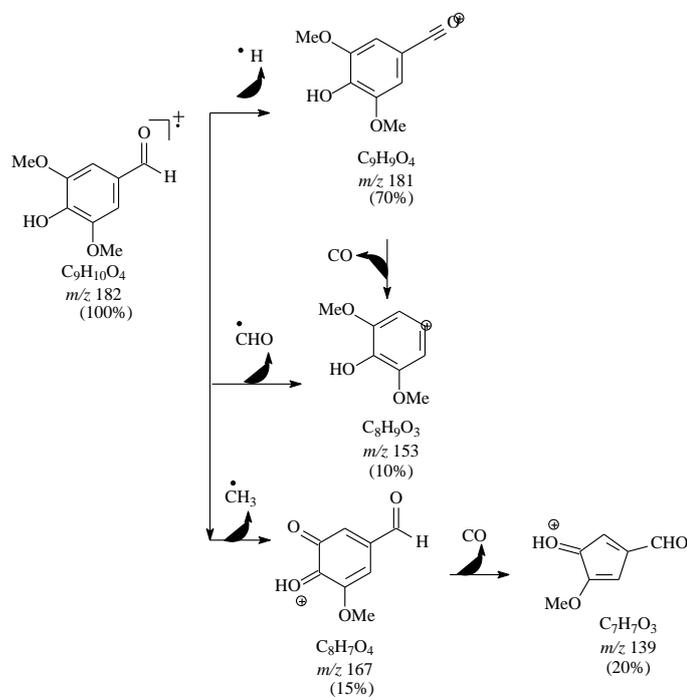


Tabela 13. Dados de RMN¹H (500 MHz) e de RMN-¹³C-DEPTQ (125 MHz) da substância **SGMD-6A**, em CD₃OCCD₃, comparados com valores da literatura (FIDELIS, 2011). Deslocamentos químicos em δ (δ_H [mult.,] e δ_C , ppm).

SGMD-6B			Literatura*	
C	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1		-	128.,3	-
3/5	148.22	-	147.3	-
4	143.56	-	140.8	-
CH				
2/6	106.93	7.22 (s)	106.6	7.15(s)
7	190.05	9.82 (s)	190.7	9.82 (s)
OCH₃				
8/9	55.80	3.61(s)	56.4	3.97(s)

* CDCl₃



Esquema 22. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos observados no EMBR da substância **SGMD-6B**, com as abundâncias relativas.

6. ATIVIDADES BIOLÓGICAS

A biodiversidade dos países tropicais, um recurso valioso, com grande variedade de espécies de plantas está sendo pouco explorada. Informações obtidas na medicina folclórica (etnofarmacologia) vêm contribuindo para a seleção de plantas a serem estudadas, na busca de extratos e metabólitos especiais com potencial promissor para atuarem como fitoterápicos ou fitofármacos.

Diante desta situação, fitoquímicos trabalham em conjunto com pesquisadores de diversas áreas da saúde, visando à aplicabilidade dos metabólitos isolados e extratos buscando de forma incessante substâncias que possam atuar de forma ativa à evolução genética dos microrganismos.

O extrato e as partições de *S. grazielae* foram submetidos a ensaios biológicos, em parceria com outros grupos de pesquisa da UFRRJ.

6.1. Atividade antinociceptiva

A dor é um sinal de alarme que o Sistema Nervoso Central utiliza para sinalizar um processo de agressão ao organismo, com risco para sua integridade física. Esse alarme desencadeia um conjunto de reações de adaptação, de ordem psicofisiológica, autônoma e motora, visando afastar o organismo do agente agressor. A percepção da dor também é chamada de nocicepção, sendo um alerta individual de percepção ou sensação de dor (CHAPMAN et al., 1999; GOZZANI, 2002).

Fisiopatologicamente, a dor também pode ser classificada em nociceptiva, neuropática e idiopática. A dor nociceptiva é o resultado de um estímulo (p.ex., térmico, químico) nos receptores de dor, podendo ser somática, se sua origem for a pele, ossos ou músculos, ou pode ser visceral se for originada nos órgãos abdominais e torácicos. A dor neuropática resulta da lesão no sistema nervoso central ou periférico. Já a dor idiopática, é uma dor inespecífica de origem desconhecida (GALLUZZI, 2007).

O teste da formalina é o modelo mais preditivo da dor tônica englobando mecanismos inflamatórios, neurogênicos e centrais de nocicepção. A injeção de formalina a 1% na pata do camundongo é um evento bifásico. A primeira fase (dor neurogênica) é causada pela estimulação química direta de nociceptores. A segunda fase (dor inflamatória) é acionada por uma combinação de estímulos, incluindo a inflamação dos tecidos periféricos. (YUVARAJ et al., 2013).

Dessa forma, esse modelo representa uma ferramenta farmacológica muito interessante para o estudo de novas drogas antinociceptivas. Além do mais, a dor induzida pela formalina possui vários aspectos que a tornam de interesse, quando comparada com outros modelos de dor, sendo o mais relevante, sua semelhança com a dor clínica (HUNSKAA; HOLE, 1987).

Visando identificar as partições que possam ser potencialmente antinociceptivas e para estudos de isolamento e identificação estrutural de substâncias bioativas, fez-se o ensaio antinociceptivo do extrato metanólico e das partições da madeira de *Simira grazielae*, visto que estudos de espécies da família Rubiaceae tem conduzido à observação de propriedades farmacológicas anti-inflamatórias (GAZDA, 2004) e antinociceptivas (DÉCIGA-CAMPOS et al., 2006).

6.1.1 Procedimento experimental

O procedimento experimental biológico foi realizado no laboratório de Farmacologia do Departamento de Ciências Fisiológicas- UFRRJ, sob orientação do professor Dr. Bruno Guimarães Marinho.

Animais

Foram utilizados camundongos suíços machos, com peso de 20-24g. O protocolo para este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Pesquisa (COMEP – UFRRJ) sob o número: 23083.005047/2011-53. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12h. Água e alimentação foram mantidas à disposição dos animais ao longo do estudo, porém a alimentação foi retirada 8 h antes da administração oral dos compostos.

Teste da formalina

Este modelo é utilizado para avaliação da dor inflamatória e não-inflamatória (HUNSKAAR; HOLE, 1987). Injetou-se 0,02 ml de uma solução de formalina à 2,5% em uma das patas traseiras dos camundongos. A morfina, o veículo (solução de DMSO à 5%) e o extrato e as partições foram administrados por via oral 1h antes da injeção da solução de formalina. Posteriormente, mediu-se o tempo (em segundos) que o animal permaneceu lambendo a pata em que foi administrada a solução. A medida do tempo foi feita em duas fases: a primeira chamada neurogênica, entre 0 e 5 minutos após a injeção da formalina e a segunda fase chamada inflamatória, entre 15 e 30 minutos após a injeção.

6.1.2. Resultados e discussão

A análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni, concluiu que os resultados obtidos para o extrato metanólico (**SGM**), partição de acetato de etila (**SGMAc**), e da morfina na fase do modelo 1, foram os que apresentaram diferença estatisticamente significativa (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$), no tempo de lambidas e/ou mordidas na pata injetada em relação ao controle (Figura 5, p.53).

Na segunda fase do modelo de formalina, o **SGM**, **SGMAc**, morfina e **SGMD**, foram que obtiveram melhores resultados estatisticamente (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$) (Figura 6, p. 53). É importante também ressaltar que o **SGM**, **SGMAc**, diminuíram significativamente o tempo de lambidas e/ou mordidas da pata injetada com formalina, tanto na fase neurogênica, como na fase inflamatória, o que demonstra claramente a existência de efeito analgésico.

O efeito antinociceptivo do extrato e partições pode estar associado à presença de classes de metabólitos especiais, como cumarinas (HOULT et al, 1988) e lignanas (BASTOS et al., 2001) e os alcaloides (CARVALHO, 2008), que foram isolados nessa pesquisa, visto que há muitos relatos na literatura descrevendo tal ação antinociceptiva.

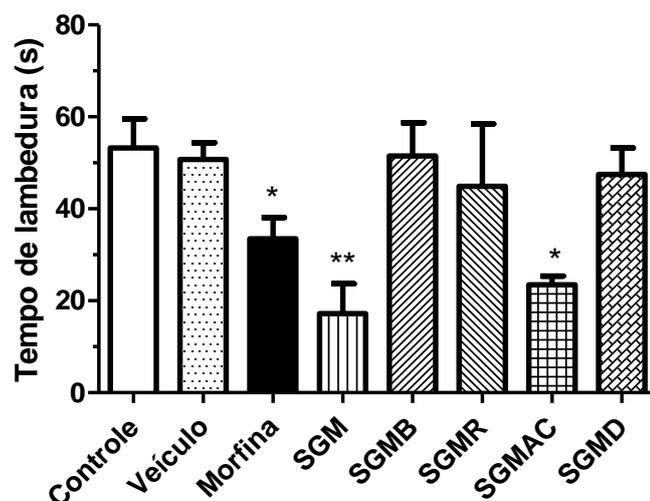


Figura 5. Efeito antinociceptivo do extrato e partições da madeira de *Simira grazielae* na dose de 100 mg/kg e morfina (3 mg/kg) na 1ª fase do modelo de formalina. Os tratamentos foram realizados por via oral. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. (n = 6) do tempo de lambertura. A significância estatística (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina, extrato e partições, por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Bonferroni.

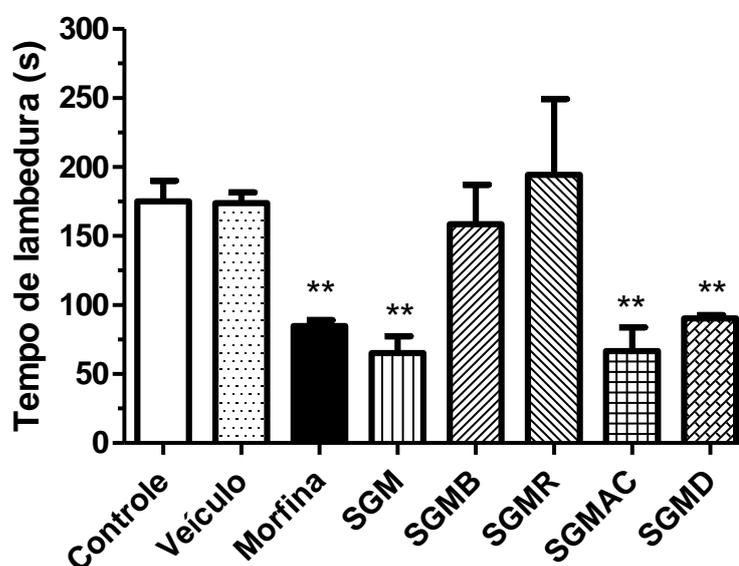


Figura 6 - Efeito antinociceptivo do extrato e partições da madeira de *Simira grazielae* na dose de 100 mg/kg e morfina (3 mg/kg) na 2ª fase do modelo de formalina. Os tratamentos foram realizados por via oral. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. (n = 6) do tempo de lambertura. A significância estatística (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina, extrato e partições, por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Bonferroni.

6.2. Avaliação do potencial antioxidante

Atualmente existe um grande interesse no estudo das substâncias com propriedades antioxidantes, principalmente, às descobertas sobre os efeitos prejudiciais dos radicais livres no organismo (ALVES, et. al., 2010), quando em excesso, esses radicais podem causar danos no DNA, proteínas e organelas celulares e promovem a peroxidação dos lipídios de membrana gerando artrite, envelhecimento precoce, choque hemorrágico, doenças cardiovasculares, catarata, disfunções cognitivas e câncer (BABIOR, 2000; BARREIROS et al., 2006).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo humano e, desse modo, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais livres possuem espécies que apresentam elétrons desemparelhados principalmente nos átomos de oxigênio e nitrogênio sendo classificados pelas siglas ERO (Espécies Reativas de Oxigênio) e ERN (Espécies Reativas de Nitrogênio) (BARREIROS et al., 2006), que atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações químicas.

Uma proposta para a redução dos níveis excessivos de radicais livres no organismo é a ingestão de substâncias antioxidantes que podem ser obtidas por alimentos em uma dieta. Antioxidantes são substâncias que atuam por mecanismos que dificultam ou retardam a oxidação de outras substâncias, dificultando desse modo o início da propagação de reações em cadeia. (BERGMAN, 2001). Esses mecanismos incluem: a complexação com metais; o sequestro de oxigênio; a decomposição de hidroperóxidos para formação de espécie não radical e a absorção da radiação ultravioleta ou desativação do oxigênio singlete (RAMALHO; JORGE, 2006).

A molécula de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um radical livre estável devido à deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização é responsável pela coloração violeta (SALGUEIRO, 2012).

O método DPPH (BRAND-WILLIANS et.al., 1995) é baseado na captura do radical DPPH^{\cdot} por antioxidantes que agem como doadores de hidrogênio, reduzindo-o a hidrazina (Figura 7). Esse processo leva a um decréscimo da absorbância a 520 nm causado pela mudança na coloração de violeta a amarelo claro.

A atividade do antiradicalar expressa pelo parâmetro CE_{50} é definida como a quantidade do antioxidante necessária para diminuir 50 % da concentração do DPPH^{\cdot} inicial.

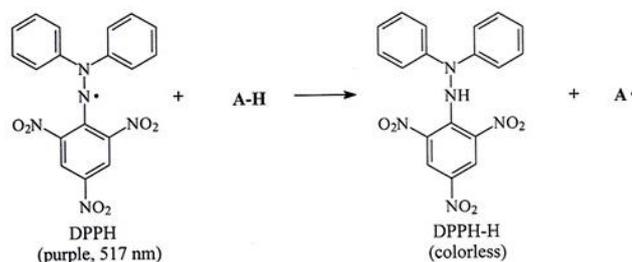


Figura 7. Estabilização do radical livre do DPPH.

Estudos envolvendo relação estrutura vs atividade demonstram que o potencial antioxidante é elevado quando as substâncias oxidadas apresentam a capacidade de dispersão do radical livre através de estruturas canônicas. A dispersão do elétron desemparelhado diminui a reatividade característica dos radicais livres e desta forma, os mesmos são excretados do organismo sem que ocorram reações de oxidação em substâncias que compõem o sistema biológico.

Espécies de Rubiaceae vem apresentando potenciais antioxidantes significativos, (FRAGOSO et al.,2008), inclusive o gênero *Simira* (ARAÚJO, 2011), devido a presença de metabólitos especiais que apresentam tais efeitos nos radicais como são os exemplos das cumarinas (HOULT et al, 1988), lignanas (KÓNYA et al., 2001) e alcaloides (SOARES, et al., 2005).

6.2.1. Procedimento experimental

A análise foi realizada no Laboratório de Química de Produtos Naturais (Fitoquímica) e de Fotoquímica ambas na UFRRJ, com auxílio da doutoranda Ilzenayde de Araújo Neves do programa de pós-graduação desta instituição.

A atividade sequestradora de radicais livres foi realizada com os extrato bruto metanólico da madeira (**SGM**) e das partições **SGMH**, **SGMAc** e **SGMB** onde foram preparadas soluções de cada material em metanol a 10 mg/mL. Quantidades apropriadas (0,1 ; 3 ; 12,5 ; 50 ; 100 ; 200 ; 400 e 600 µ/L) destas partições foram transferidas para vidros de penicilina âmbar contendo 1mL da solução de DPPH (0,3mM em MetOH) fornecendo as concentrações finais . Cada concentração foi feita em triplicata. Após 30 minutos a quantidade de radicais de DPPH foi registrada em aparelho UV-Vis. no comprimento de onda de 518 nm (SILVIA et. al., 2006). A percentagem da atividade sequestradora foi calculada pela equação:

$$\%AA = 100 - [(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100 / Abs_{controle}]$$

6.2.2. Resultados e discussão

Os resultados foram expressos através da CE₅₀ (I.C. 95%) (I.C.= Intervalo de confiança), que representa a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais DPPH (Tabela 14, Figura 8, p.56).

Tabela 14. Atividades antioxidantes do extrato metanólico e das partições diclorometano, acetato de etila e butanol da madeira de *S. grazielae*.

DPPH	GL	Equação	CE ₅₀ (µg/mL)	χ ²
SGM	4	Y=4,3+1,0logx	21,6	5,7
SGMD	4	Y=4,6+1,0logx	11,0	7,9
SGMAc	4	Y=4,5+1,1logx	12,9	9,3
SGMB	3	Y=4,4+1,0logx	18,2	7,1
Ácido Ascórbico	10	Y=6,2+1,4logx	7,1	5,0

GL=Grau de liberdade; CE concentração efetiva; χ² chi-quadrado;

O extrato **SGM** apresentou atividade contra os radicais livres de DPPH com CE₅₀ de 21,6 µg/mL. Em geral as partições apresentaram uma melhor atividade quando comparada com o extrato bruto. Pode-se afirmar que as partições que mais contribuíram para a estabilização dos radicais de DPPH foram as com diclorometano (11,0 µg/mL) e a de acetato de etila (12,9 µg/mL), seguidas da partição butanólica (18,2 µg/mL), porém ambas as amostras testadas apresentaram CE₅₀ inferiores ao controle posito ácido ascórbico (7,1 µg/mL), apesar disso pode-se considerar promissoras as que apresentaram concentrações

inferiores a 15,0 µg/mL devido à proximidade com o valor do controle. Os coeficientes angulares (CA) (Tabela 14, p. 55) para a partição acetato (1,1) foi maior que o do extrato bruto, das partições diclorometano e butanol (1,0). O valor maior do Coeficiente angular da curva de concentração -% de inibição dos radicais de DPPH observado para a partição acetato, mesmo que não tão expressiva, indica um elevado grau de sensibilidade e correlação entre a % de inibição de radicais DPPH e a concentração do produto. Os valores para **SGMD** e **SGMac** obtidos podem ser justificados pela presença de substâncias identificadas na fração (lignanais e cumarinas) que são substâncias que possuem grupos fenólicos que ao serem oxidados convertendo-se em radicais livres apresentam estabilidade pela conjugação que apresentam no anel.

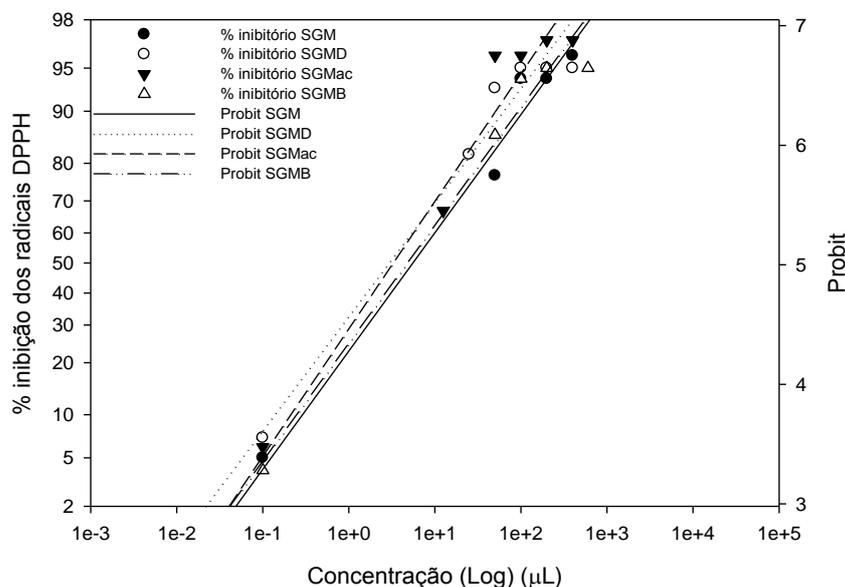


Figura 8. Curva de concentração -% de inibição dos radicais DPPH para o extrato **SGM** e das partições **SGMD**, **SGMac** e **SGMB** de *S. grazielae*.

Esses resultados podem justificar a característica de espécies do gênero *Simira* que apresentam coloração vermelha intensa do cerne e da casca da madeira após sofrerem injúrias. Esta característica pode estar associada à ação do ar em provocar oxidação dos metabólitos especiais. Este efeito produz substâncias que apresentam transições eletrônicas de menor energia promovendo deslocamento batocrômico. Este deslocamento promove a emissão de cor complementar que neste caso é a vermelha.

7. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico da espécie *S. grazielae* permitiu o isolamento e identificação de 18 substâncias sendo todas inéditas para essa espécie, algumas das quais estão sendo relatadas pela primeira vez no gênero. Este trabalho contribuiu significativamente para o conhecimento e confirmação dos metabólitos especiais do gênero, assinalando a diversidade de metabólitos que o gênero possui.

O alcaloide harmana, isolado em grandes quantidades, e onipresente em todas as frações de baixa e média polaridade, confirmou-se como marcador quimiotaxonômico do gênero.

Os ensaios biológicos mostraram resultados bastante significativos que assinalaram as frações mais promissoras para estudos futuros. Os resultados obtidos na avaliação do potencial antioxidante podem ser atribuídos às substâncias fenólicas (cumarinas, lignanas e aldeídos) que possivelmente estão associados à característica das espécies que adquirem coloração vermelho intenso quando o caule é cortado. O estudo do efeito antinociceptivo do extrato e de algumas partições mostram relevância, isso pode ser justificado pela presença de alcaloides indólicos, que atuam no sistema nociceptivo. Tendo em vista que essa espécie apresentou essa classe de metabólito especial, outros testes sequenciais serão realizados.

Dentre as técnicas espectroscópicas para elucidação estrutural destaca-se a análise por CG-EM, que possibilitou propor as estruturas da mistura de cumarinas, devido a sua alta sensibilidade, e que foi facilitada pelo ao padrão de substituição dos compostos.

A fração em diclorometano foi a que apresentou maior diversidade de metabólitos, sendo assim um material interessante para realização de vários testes biológicos, já que cumarinas e lignanas apresentam uma diversidade em relação a atividades biológicas na literatura científica.

A característica fitoquímica apresentada pela espécie vegetal *S. grazielae*, pode favorecer a quem interesse a proposição de melhores técnicas de cultivo guiado resultando na obtenção de matéria-prima de qualidade e manejo sustentável, favorecendo a preservação desta espécie e do meio ambiente.

8.REFEÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELAIRA, H. M.; REUS, G. Z.; SCAINI, G.; STRECK, E. L.; CRIPPA, J. A.; QUEVEDO, J. Harmine β -Carboline reverses the effects induced by stress on behavior and citrate synthase activity in the prefrontal cortex of rats. **Acta Neuropsychiatrica**. v.25, n.6, p.328-333, 2013.
- AIMI, N.; TSUYUKI, T.; MURAKAMI, H.; SAKAI, S.; HAGINIWA, J. **Tetrahedron Lett**. v. 26, p. 5299, 1985.
- ALVES, C. N.; BARROSO, L. P.; SANTOS, L. S.; JARDIM, I. N. Structure-Activity Relationship of Compounds which are Anti-Schistosomiasis Active. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 9, n. 6, p. 577 1998.
- ALVES,C.C.S.;CRANCHI,D.C.;CARVALHO,M.G.;SILVA,S.J.**Floresta e Ambiente**.v.8, n.1,p.174,2001.
- ALVES, C. Q.; DAVIDI, J. M; DAVID, J. P; BAHIA, M. V; ROSANE, M.; AGUIAR, R.M Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ALVES, L. F. **Plantas Medicinais e Fitoquímicas no Brasil**. Uma Visão histórica. Pharmabooks. ed. 1, 2010. p. 412
- ARAÚJO, M. F. **Metabólitos Especiais Isolados da Madeira de *Simira glaziovii* e *Simira eliezeriana* (Rubiaceae), das Folhas de *Ouratea parviflora* (Ochnaceae) e Atividades Biológicas**. 2011. 168p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- ARNASON, T.; MORAND, P.; SALVADOR, J.; REYES, I.; LAMBERT, J.; TOWERS, N. Phototoxic substances from *Flaveria trinervis* and *Simira salvadorensis*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 594-595, 1983.
- BABIOR, B.M. Phagocytes and Oxidative Stress. **The Am. J. Med.**. p. 33-44, 2000.
- BAGETTA, G.; MORRONE, L. A.; ROMBOLA, L.; AMANTEA, D.; RUSSO, R.; BERLIOCCHI, L.; SAKURADA, S.; SAKURADA, T.; ROTIROTI, D. Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. **Fitoterapia**.v. 81, n. 6, p. 453-61, 2010.
- BARATA, L.E.S.; SANTOS, L.S.; FERRI, P.H.; PHILLIPSON, J.D.; PAINE, A.; CROFT, S.L. Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**, v. 55, n.6, p. 589-595, 2000.
- BARBOSA, M. R. ***Simira in*** Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB014291>>, Acesso em: 20/10/2010.

BAI, J.;FANG, J.F.;CHEN, H.; YU, S.S.; ZHANG, D.;WEI, H. L.;MA, S. G.;LI, Y.;QU, J.; XU, S.; REN, J.H.; ZHAO,F.;ZHAO, N.; LIU, J.H. Antioxidant phenolic glycosides from the roots of *Illicium dunnianum*. **Carbohydrate Research**. v.361, p.206-211, 2012.

BARBOSA, M. R. V.; SOUZA, E. B.; JARDIM, J. G. 2011. **Rubiaceae**. In: Checklist das Plantas do Nordeste (Versão 1.5). Disponível em: <<http://www.cnip.org.br/bdnpn/checklistNE.pdf>>, Acesso em: 20/01/ 2011.

BARREIRO, E. J; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 681, 2009.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BASTOS, A. B. F. D. O.; CARVALHO, M. G. de; VELANDIA, J. R.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos isolados de *simira glaziovii* (k. schum) steyer. e a atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio do alcalóide ofiorina e seus derivados. **Quim. Nova**, v. 25, n. 2, p. 241-245, 2002.

BASTOS, A. B. F. D. O. **Constituintes Químicos Isolados das Cascas de Simira glaziovii**. 2011. 86p. Tese (Mestrado em Ciências), Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

BASTOS, J. K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M. L. A. Avaliação da actividade tripanocida de lignanas isolado a partir das folhas de *Zanthoxylum naranjillo*. **Planta Medica**, v. 65, p. 541-544, 1999.

BASTOS, J. K; CARVALHO, J. C. T.; SOUZA, G. H. B; PEDRAZZI, A. H. P.; SARTI, S. J. A actividade anti-inflamatória dos cubebina, um lignano das folhas de *Zanthoxyllum naranjillo* Griseb. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 279-282 2001.

BERGMAN, M.; VARSHAVSKY, L.; GOTTLIEB, E.H.; GROSSMAN, S. The antioxidant activity of aqueous spinach extract: chemical identification of active fractions. **Phytochemistry**. v. 58, p. 143-152, 2001.

BODIWALA, H. S.; SINGH, G.; SINGH, R.; DEY, C. S.; SHARMA, S. S.; BHUTANI, K. K.; SINGH, I. P. Amidas leishmanicidas e lignanas de *Piper cubeba* e *Piper retrofractum*. **Jornal de medicamentos naturais**, v. 61, p. 418-421, 2007.

BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. R.; ARAÚJO, A. R.; DILVA, D. H. S.; LOPES, M. N. Secondary Metabolites from Brazilian Rubiaceae Plant Species: Chemotaxonomical and biological significance. **Recent Research Development in Phytochemistry**, v. 5, p. 19-31, 2001.

BRAND-WILLIANS.; CUVELIER, M.E.;BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**. v.28, p.25-30, 1995.

BRAZ-FILHO, R. Importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. **Quím. Nova**, v. 17, n. 5, p. 405-445, 1994.

BRAZ-FILHO, R. In: DE MORAIS, S M. & BRAZ-FILHO, R. **Produtos Naturais- Estudos Químicos e Biológicos** (Org.). Fortaleza: EdUECE, 2007. p. 13-46

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Quím. Nova**, v. 33, n. 1, 2010.

BREMER, B. & ERIKSSON, O. Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamily, and tribes. **International Journal of Plant Science**, v. 170 p. 766-793, 2009.

BUDZIKIEWICZ, H.; WILLIAMS, D.H.; DJERASSI, C. **Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry. Vol. II: Steroids, triterpenoids, sugars and miscellaneous classes.** Holden-Day, INC. San Francisco, London, Amsterdam. p. 262-263, 1964.

CALLADO, C. H.; NETO, S. J. S. Anatomia do lenho de três espécies do gênero *Simira* Aubl. (Rubiaceae) da Floresta Atlântica no estado do Rio de Janeiro. **Rodriguésia**, v. 54, n. 83, 2003.

CAPASSO, A.; AQUINO, R.; TOMMASI N DE.; PIACENTE, S.; RASTRELLI, L.; PIZZA, C. Neuropharmacology Activity of Alkaloids from South American Medicinal Plants. **Curr. Med. Chem.** v. 2, p. 1-15 1, 2002.

CANÇÃO, H.; LIU, Y.; YUXIU, L.; WANG, L. Synthesis and Antiviral and Fungicidal Activity Evaluation of β -Carboline, Dihydro- β -carboline, Tetrahydro- β -carboline Alkaloids, and Their Derivatives. **J. Agric. Food Chem.** v.6, n.5, p. 1010-1018, 2014.

CARDOSO, C.L.; SILVA, D.H.S.; YOUNG, M.C.M.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V.S. Indole monoterpene alkaloids from *Chimarrhis turbinata* DC Prodr.: a contribution to the chemotaxonomic studies of the Rubiaceae family. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 26-29, 2008.

CARVALHO, F. I. **Atividade antinociceptiva, em dores agudas, de um novo fator opióide da secreção cutânea de *Rhinella schneideri*.** 2008.92p. (Dissertação em Ciências Fisiológicas), do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará Fortaleza-Ceará.

CASTANEDA, P.; ALBOR, C.; MATAR, R.; BYE, R.; LINARES, E. Alkaloids from *Simira mexicana*. **Fitoterapia**, v. 62, n. 4, p. 366, 1991.

CASTRO, O.; LÓPEZ, J. V. Harman, alcalóide mayoritario de la raíz de *Simira maxonii* Standley (Rubiaceae). **Ingeniería & Ciencia Química**, v. 10, n. 3-4, p. 56-57, 1986.

CHAPMAN, C.R.; GAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **The Lancet**, v.353, n.9171, p.2233-2237,1999.

CONSOLARO, H. N. **A distilia em espécies de Rubiaceae do bioma cerrado.** 115 f. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Ecologia. Brasília-DF, 2008.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro: Min. Agricultura, v. 3, 1978. p. 646

COSTA, T. de O. G.; ALMEIDA, R. A. de; KOOLEN; H. H. F; SILVA; F. M. A. da; PINTO; A. C. Constituintes químicos do caule de *Protium hebetatum* (Burseraceae) **Acta Amazonica**. v. 42, n.4, p. 557 – 560.2012.

DÉCIGA-CAMPOS, M.; GUERRERO-ANALCO, J.A.; QUIJANO, L.; MATA, R. Antinociceptive activity of 3-O- β -D-glucopyranosyl-23, 24-dihydrocucurbitacin F from *Hintonia standleyana* (Rubiaceae). **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 83, n. 2, p. 342–348, 2006.

DELPRETE, P. G; JARDIM, J. G. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. **Rodriguésia**, v. 63, n.1, p.101-128, 2012.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**, 2nd edition, John Wiley & Sons. 1998.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**, 3rd edition, John Wiley & Sons, 2009.

DUFOUR, B. The effectiveness of beta-sitosterol from an extract of African pygeum, on the functional symptoms of prostatic adenoma. **J Ann Urol** v.18, p.193-5,1984.

EL BAHRI, L.; CHEMLI, R. *Peganum harmala* L: a poisonous plant of North Africa **Vet. Hum. Toxicol.** n.33, p. 276–277, 1991.

FARZIN, D.; MANSOURI. N. Antidepressant-like effect of harmaline and other beta-carbolines in the mouse forced swim test. **Eur. Neuropsychopharmacol.** v.16, p. 324–328. 2006.

FIDELIS, Q.C; **Metabólitos Especiais Isolados de folhas e galhos de *Ouatea ferruginea* Engl. (Ochnaceae)**. 2011, 189p. (Dissertação em Ciências) Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

FRAGOSO, V.; NASCIMENTO, N. C.; MOURA, D. J.; SILVA, A. C. R.; RICHTER, M. F.; SAFFI, J.; FETT-NETO, A. G. Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 3, p. 559–566, 2008.

GABAY, O.; SANCHEZ, C.; SALVAT, C.; BRETON, M.; NOURISSAT, G.; WOLF C.; JACQUES C.; BERENBAUM F. Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. **Am. J. Clin. Nutr.** v.18, n1, p.106–116, 2010.

GALLUZZI, K.E. Managing neuropathic pain. **JAOA**, v.107, n.10, s.6, p.39-48, Nov. 2007.

GAZDA, V. E. **Abordagem química e estudo da atividade biológica das raízes de *Chiocca alba* (L.) Hitchc. (Rubiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D. G.; RUHSAM, M.; BRIDSON, D. M. & DAVIS, A. P. **World checklist & bibliography of Rubiaceae**. The Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew, 2007.

GOZZANI, J.L. **Fisiopatologia da dor**. In: TURAZZI, J.C. et al. Curso de Educação à distância em Anestesiologia (SBA). São Paulo: Office Editora e Publicidade LTDA, 115-131, 2002.

GUERREIRO-ANALCO-, J.; MEDINA-CAMPOS, O.; BRINDIS, F.; BYE, R.; CHAVERRI-PEDREZA, J.; NAVARRET, A.; MATA, R. Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family. **Phytochemistry**. v.68, n.15, p.2087-2095, 2007.

GUERRIERO, A.; D'AMBROSIO, M.; PIETRA, F.; Peridines, sterols, and indole derivatives from the lithistid sponge *Corallistes undulates* of the Coral Sea. **Journal of Natural Products**, v. 56, n.11, p.1962-1970, 1993.

GUEVARA, A. P.; VARGAS, C.; SAKURAO, H.; FUJIWARA, Y.; HASHIMOTO, ; MAOKA, T.; KOZUKA, M.; ITO, Y.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. **Mutation Research/Genetic toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 440, n. 2, p.181-188, 1999.

GUPTA, M. B.; NATH, R.; SRIVASTAVA, N.; SHANKER, K.; KISHOR, K.; BHARGAVA, K. P. Anti-inflammatory and antipyretic activities of betasitosterol. **Planta Med**. v.39, n.2, p.157-63, 1980.

GROS, E. G.; POMILIO, A. B.; SELDES, A. M.; BURTON, G. **Introduccion al Estudio de los Productos Naturales**, 1985. p.100

HASBUN, C. P.; CALDERON, M.; CASTRO, O.; GÁCS-BAITZ, E.; MONACHE, G. D.; MONACHE, F. D. Maxonine, A novel alkaloid from *Simira maxonii*. **Tetrahedron Letters**, v. 30, n. 45, p. 6199-6202, 1989.

HEITZMM, M.E. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 66, p.5-29, 2005.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, F. E.; VIEIRA, C. P. **Princípio Ativo de Plantas Superiores**. São Carlos: Ed.UFSCar, v. IV, 2003. p. 9-44

HOULT , J. R. S.; PAYA, M. the pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **Gen Pharmacol**, v.27, p. 713-722, 1996.

HUANG, G. J.; DENG, J. S.; HUANG, S.S.; WANG, S. W.; CHANG, Y. S.; KUO, Y. S. Bioassay Guided Isolation and Identification of Anti-inflammatory Active Compounds from the Root of *Ficus formosana*. **J. Agric. Food Chem**. v.61, n.46, p.11008–11015, 2013.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103–14, 1987.

JACONODINO, C. B.; AMESTOY, S. C.; THOFEHRN, M. B. A utilização de terapias alternativas por pacientes em tratamento quimioterápico. **Cogitare Enfermagem**, v. 13, n. 1, p. 61-66, 2008.

JAYASINGHE, U. L. B.; JAYASOORIYA, C. P.; BANDARA, B. M. R.; EKANAYAKE, S. P.; MERLINI, L.; ASSANTE, G. Antimicrobial activity of some Sri Lankan Rubiaceae and Meliaceae. **Fitoterapia**, v. 73, n. 5, p. 424-427, 2002.

JEREZANO, A.; JIMENEZ, F.; CRUZ, M. del C.,; MONTEL, I.; DELGADO, F.; TAMIRIZ, J. New Approach for the Construction of the Coumarin Frame and Application in the Total Synthesis of Natural Products. **Helv. Chim. Acta**, v.94, p.185-198, 2011.

JUNG, H. J.; PARK, H.J.; KIM, R.G.; SHIN, K.M.; HA, J. H.; CHOI, J.W. *ET AL.* **In vivo anti-inflammatory and antinociceptive effects of liriiodendrin isolated from the stem bark of *Acanthopanax senticosus***. *Planta Med.* v.69, p. 610–616, 2003.

KARAN, S. K.; MISHRA, S. K.; PAL, D.K.; MONDAL, A. Isolation of β - sitosterol and evaluation of antidiabetic activity of *Aristolochia indica* in alloxan induced diabetic mice with reference to *in-vitro* antioxidant activity. **J Med. Plant Res.** v.6, n.7, p.1219-1223, 2012.

KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Sterol Glucosides from *Prunella vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2351-2355. 1990.

KONGDUAN, D.; WUNGSINTAWEEKUL, J.; DE-EKNAMKUL, W. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol proceeds exclusively via the mevalonate pathway in cell suspension cultures of *Croton stellatopilosus*. **Tetrahedron Letters**. v.49, n.25, p.4067-4072, 2008.

KÓNYA, K.; VARGA, Z.; ANTUS, S. Antioxidant properties of 8.0.4'-neolignans. **Phytomedicine**, v. 8, p. 454, 2001.

KOTWAL, G. J. Genetic diversity-independent neutralization of pandemic viruses (e.g. HIV), potentially pandemic (e.g. H5N1 strain of influenza) and carcinogenic (e.g. HBV and HCV) viruses and possible agents of bioterrorism (variola) by enveloped virus neutralizing compounds (EVNCs), **Vaccine** .v.26, n.24, p.3055-3058, 2008.

LEWIS, W.H.; ELVIN-LEWIS, M. P. F. Em Plants and Dental Care Among the Jivaro of the Upper Amazon Basin. *Advances in Economic Botany Ethnobotany in the Neotropics.* **Botanical Garden Bronx**, v. 1, p. 53, 1984.

LI, S.; LI, S. K.; GAN, R. Y.; SONG, F. L.; KUANG, L.; LI, H.B. Antioxidant capacities and total phenolic contents of infusions from 223 medicinal plants. **Industrial Crops and Products**. v.51, p. 289–298, 2013.

LIU, X. L.; ZHANG, L.; FU, X. L.; CHEN, K.; QIAN, B. C. **Acta Pharmacol.** v.22, p. 929, 2001.

LIU, Z.; TIAN, X. The components of *Cacalia tangutica*. **Bul Korean Chem. Soc.**, v. 25, n. 7, p. 1078-1080, 2004.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 2ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MACHADO, M. W. **Efeito da adição do triptofano em calos de *Passiflora alata* Curtis**. 2006. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, 2006.

MAINIERI, C. & CHIMELO, J. P. **Ficha de Característica das Madeiras Brasileiras**. São Paulo. Instituto de Pesquisas Tecnológicas. 1989. 420 p.

MANN, J. **Chemical aspects of biosynthesis**, 1ST ed. Oxford University press Inc., New York. 1994.

MATOS, F. J. A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: Editora UFC, 1997.

MIRANDA, 2001. Dissertação sobre as cumarinas. HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. **Gen. Pharmac.**, v. 27, n. 4, p. 713, 1988. (Dissertação Miranda, 2001)

MONTEIRO, M. C. M.; LEPTOKARYDIS, I. H.; SILVA, G. H.; SILVA, V. C. da; BOLZANI, V. S; YOUNG, M. C. M.; LOPES, M. N. Constituintes químicos isolados dos caules de *Michelia champaca* L. (Magnoliaceae). **Eclet. Quim.**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 13-18. 2007.

MOURA, M. de M. et al. Constituintes químicos de *Galianthe brasiliensis* (Rubiaceae). **Quim. Nova**, v. 29, n. 3, p.452-455, 2006.

MORAES, T. M. S.; BARROS, C. F.; SILVA-NETO, S. J. da; GOMES, V. M.; CUNHA, M. da. **Leaf blade anatomy and ultrastructure of six *Simira* species (Rubiaceae) from the Atlantic Rain Forest, Brazil**. Biocell, v. 33, n. 3, p. 155-165, 2009.

MULSEN, B. E. **Coumarins of Umbeliferous plantas**. Copenhagen the Royal Danish School of Pharmacy. Chemical laboratory B, Copenhagen, 1970.

NASCIMENTO, W. M. O. do; DAMIÃO-FILHO, C. P. Caracterização morfológica de sementes e plântulas de jenipapeiro (*Genipa americana* L.-Rubiaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n.1, p.143-147, 1998.

OLIVEIRA, P. L. de **Contribuição ao estudo de espécies da família Rubiaceae: fitoquímica da espécie *Amaioua guianensis* Aubl**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química. Goiânia, 2009.

PANDA, S.; JAFRI, M.; KAR, A.; MEHETA, B.K. Thyroid inhibitory, antiperoxidative and hypoglycemic effects of stigmasterol isolated from *Butea monosperma*. **Fitoterapia**. v. 80, n.2, p.123–126, 2009.

PANDA, S.; KAR, A. **Phyther. Res.**, v. 20, p. 1103. 2006.

PARK, B.Y.; OH, S-R.; KYUNG-SEOP, A.; LEE, H.K.. (-)-Syringaresinol inhibits proliferation of HL-60 human promyelocytic leukemia through G1 arrest and apoptosis. **Internacional Immunopharmacology**. v.8, n.7, 2008.

PARMAR, V.S.; GUPTA, S.; KIRPAL, S. B.; MUKHERJEE, BOLL, P. M.; ERRINGTON, W. Synthesis and X-Ray Structure of 2-(3-Methyl-2-butenyl)- 3,4,5-trimethoxyphenol: a Potent Anti-Invasive Agent Against Solid Tumours. **Acta Chem. Scand**. v.50, p.558-560, 1996.

PEIXOTO, A. L. The species of Simira (Rubiaceae, Rondeletieae) of northern Espírito Santo State, Brazil. **Arq. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**. v. 5, n. 2, p. 115-128, 1982.

PEREIRA, R. de C. A. et al. Germinação, avaliação do ácido giberélico e posição do explante no alongamento *in vitro* de *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin Rubiaceae (Unha-de-gato). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 4, p. 637-642, 2006.

PESSOA, M. C. R 2009. **Diversidade e riqueza da família Rubiaceae Juss. no Cariri paraibano**. 83 f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco.

PINA, E. M. L.; ARAÚJO, F. W. C.; SOUZA, I. A.; BASTOS, I. V. G. A.; SILVA, T. G.; NASCIMENTO, S. C.; MILITÃO, G. C. G.; SOARES, L. A. L.; XAVIER, H. S.; MELO, S. J. Triagem farmacológica e toxicidade aguda de raízes casca de *Guettarda platypoda*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 22 n. 6, 2012.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAMALINGAM, R.; VAIYAPUR, M. Effects of umbelliferone on lipid peroxidation and antioxidant capacity in diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. **J. Med. Aguda**. v.3, n.3, p.73-82, 2013.

RAMESH, B.; PUGALENDI, K.V. Antidiabetic effect of umbelliferone in STZ-diabetic rats. **J. Med. Food**. V.9, p. 562-566, 2006.

RAQUET, N.; LOUR, C.; SCHRENK, D.; Relative Photomutagenic Potency of Furocoumarins and Limettin. **Toxicology Letters**. v.189, p.S237-S238, 2009.

ROBBRECHT, E. Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions. Contributions to a new subfamilial classification. **Opera Botanica Belgica**, v. 1, p. 1-271, 1988.

ROBERTS, J. D.; CASERIO, M. C. In **Basic Principles of Organic Chemistry**, W.A. Benjamin, Inc. New York, 1965. 1025 p.

ROSSELLI, S.; MAGGIO, A.; BELLONE, G.; FORMISANO, C.; BASILE, A.; CICALA, C.; ALFIERI, A.; MASCOLO, N.; BRUNO¹, M. Antibacterial and Anticoagulant Activities of Coumarins Isolated from the Flowers of *Magydaris tomentosa*. **Planta Med.** v.73, n.2, p.116-120.2007.

SALGUEIRO, F. B. **Caracterização de mês brasileiros: físico-química, perfil de substâncias polares, atividade antioxidante e quimiometria.** 124 f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2012.

SHIN, E.; LEE, C.; SUNG, S.H.; CHOONG, K.; HWANG, Y.; LEE, M. K. Antifibrotic activity of coumarins from *Cnidium monnieri* fruits in HSC-T6 hepatic stellate cells. **Journal of Natural Medicines.** v.65, n.2, p.370-374, 2010.

SILVA, S. R.; BUITRÓN, X.; OLIVEIRA, L. H.; MARTINS, M. V. M. **Plantas Medicinais do Brasil: Aspectos gerais sobre legislação e comércio.** Quito: TRAFFIC/IBAMA, 2001. p. 52

SILVA FILHO, A. A.; COSTA, E. S.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; NANAYAKKARA, N. P. D.; BASTOS, J. K. *In vitro* antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). **Phytother. Res.**, v. 22, n. 10, p. 1307–1310, 2008.

SILVA NETO, S. J. **O gênero *Simira* Aubl. (Rubiaceae, Rondeletieae) no Brasil extra-amazônico.** 80 f. Dissertação Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFRJ, 2000.

SILVAN, A. M.; ABAD, M.J.; BERMEJO, P.; SOLLHUBER, M. A. Atividade anti-inflamatória de cumarinas de *Santolina oblongifolia*. **J Nat Prod.** v.59, p.5-1183-5, 1996.

SIMONSEN, H. T.; ADSERSEN, H.; BREMNER, P.; HEINRICH, M.; SMITT, U. W.; JAROSZEWSK, J. W. **Antifungal constituents of *Melicope borbonica*.** Phytotherapy Research. v.18, n.7, p. 542-545, 2004.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura. *Saccharomyces cerevisiae*. **Braz. J. Harm. Sci.**, v. 41, n. 1, 2005.

SOUZA, E. C. Bactérias ultra-resistentes. **Ciência Hoje**, v. 23, n. 138, p. 26-35, 1998.

SOUZA, V. A.; NAKAMURA, C. V.; CORRÊA, A. G. Atividade Antichagásica de Lignanas e Neolignanas. **Rev. Virtual Quim.** v. 4, n.3, p. 197-207. 2012.

SUN, J.; LOU, H.; DAI, S.; XU, H.; ZHAO, F.; LIU, K. Indole alkaloids from *Nauclea officinalis* with weak antimalarial activity. **Phytochemistry**, v. 69, n. 6, p. 1405–1410, 2008.

TORSSELL, K. B. G. **Natural Product Chemistry: A mechanistic, biosynthetic and ecological approach**, 2nd edition. Apotekarsocieteten-Swedish Pharmaceutical Society, Stockholm, 1997.

TSE SUSANNA, Y. H.; I-TONG, M. I.; DICKENS, B. F.; Antioxidative properties of harmana and b-carboline alkaloids. **Biochemical Pharmacology**. v.42, n.3, p.459-464, 1991.

YAM, J.; KREUTER, M.; DREWE, J. *Piper cubeba* alvos múltiplos aspectos da via de sinalização de andrógeno. A fitoterapia potencial contra o crescimento do câncer de próstata. **Planta Medica**, v. 74, p. 33-38, 2008.

YANG, X. W.; WANG, J. S.; MA, Y. L.; XIAO, H. T.; ZUO, Y. Q.; LIN, H.; HE, H. P.; LI, L.; HAO, X. J. Bioactive Phenols from the Leaves of *Baccaurea ramiflora*. **Natural Product Chemistry**. New York. v. 73, n.13, p.1415-1417, 2007.

YUVARAJ, N.; KANMANI, P.; SATISHKUMAR, R.; PAARI, A.; PATTUKUMAR, V.; Venkatesan ARUL, V. Antinociceptive and antiinflammatory activities of Sargassum wightii and Halophila ovalissulfatadas polysaccharides in experimental animal models. **J. Med. Food**, v.16, n.8, p. 740-748, 2013.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **J. Ethnopharmacol.**, v. 51, p. 239-254, 1996.

WATSON, L.; DALLWITZ, M.J.; **As famílias de plantas com flores: descrições, ilustrações, identificação e recuperação de informações**, 1992. Disponível em: <<http://delta-intkey.com>>, Acesso em: 26/08/13.

ZACCHINO, S. RODRIGUEZ, G.; PEZZENATI, G.; ORELLANA, G. Avaliação in vitro de propriedades antifúngicas de 8.O.4'.-neolognanas. **J. Nat. Prod.**, v.60, n.7, p. 659, 1997.

ZOLEK, T.; PARADOWSKA, K.; WAWER, I. ¹³C CP MAS NMR and GIAO-CHF calculations of coumarins. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 23, ed.1-2, p. 77-87, 2003.