

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

**Estudo fitoquímico de *Zanthoxylum rigidum* Humb. Bonpl. ex
Willd (Rutaceae), das raízes de *Luxemburgia nobilis* Eichl
(Ochnaceae) e Atividades Biológicas**

Tereza Auxiliadora Nascimento Ribeiro

2012



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

Estudo fitoquímico de *Zanthoxylum rigidum* Humb. Bonpl. ex Willd (Rutaceae), das raízes de *Luxemburgia nobilis* Eichl (Ochnaceae) e Atividades Biológicas

TEREZA AUXILIADORA NASCIMENTO RIBEIRO

Sob a Orientação do Professor

Dr. Mário Geraldo de Carvalho

Co-Orientação do professor

Dr. Paulo Teixeira de Sousa Júnior

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

**Seropédica, RJ
Agosto de 2012**

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

TEREZA AUXILIADORA NASCIMENTO RIBEIRO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Química, área de Concentração em Química Orgânica.

TESE APROVADA EM 28/08/2012

Dr. Mário Geraldo de Carvalho (DEQUIM-UFRRJ)
(Presidente, Orientador)

Dr. Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha (CCS/ UEPB)

Dra. Gilda Guimarães Leitão (NPPN-UFRJ)

Dr. Davydson de Lima Moreira (FIOCRUZ-RJ)

Dra. Patrícia Fampa Negreiros de Lima (IB-UFRRJ)

Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves (DEQUIM-UFRRJ)/(Suplente)

Dra. Lisieux de Santana Julião (DEQUIM-UFRRJ)/(Suplente)

*Aos meus pais pelo amor,
carinho e incentivo*

“Nada na vida deve ser receado. Tem apenas que ser compreendido”.

Marie Curie

“A felicidade não se resume na ausência de problemas, mas sim na sua capacidade de lidar com eles”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

- Ao prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho pela orientação, dedicação e amizade durante este trabalho. Uma pessoa que admiro muito.
- Ao prof. Dr. Paulo Teixeira de Sousa Júnior pela co-orientação, ensinamentos e amizade;
- Ao prof. Dr. Raimundo Braz-Filho pelos ensinamentos, conselhos, amizade e momentos de muita descontração e alegria no laboratório. Um exemplo a ser seguido.
- À prof^a. Dr^a. Rosane Nora Castro pela colaboração nos trabalhos realizados com CLAE, sempre pronta a ajudar no que fosse preciso;
- Ao Prof. Dr. Luciano Ramos Suzart, grande amigo, pelo auxílio em minhas “tempestades de idéias”; pelos momentos de descontração dentro e fora do laboratório;
- À amiga prof^a. Dr^a. Virgínia Cláudia da Silva (DQ-UFMT), desencadeadora de todo esse processo, quem me apresentou ao Prof. Mário. Uma pesquisadora incansável!
- Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química;
- Aos amigos do LQPN-UFRRJ Aaron, Almir, Alisson, Ana Paula, Daniel, Dayane, Débora Barbosa, Débora Oliviera, Denisson, Eduardo (Ceará), Geovany, Giuliano, Ilzenaide, Letícia, Lisieux, Lucineli, Luiza, Marcelo, Mariana, Mirza, Priscila, Queli, Rafaela, Renata, Roberta, Tarsila e Tiago.
- Às alunas de iniciação científica que me auxiliaram na realização deste trabalho Débora Mattos Barbosa e Letícia Ricette da Silva;
- A todos os alunos da pós-graduação sem exceção, especialmente à aluna Aline Lira pela amizade, auxílio e companheirismo nestes anos;
- Aos amigos Queli e Eduardo (Ceará) por compartilhar das alegrias e pelos incentivos nos momentos mais difíceis;
- À amiga Dra. Sally Moccelini, que mesmo a distância sempre torceu por mim, pelas frações das raízes de *Zanthoxylum rigidum*;
- Aos funcionários do ICE-UFRRJ Anderson, Aldir, Carlão, Eli, Fábio, Frances, Gil, Márcio, Maurício, Osmar, Paulo, Pedro, Renato, Vitor.
- À Dra. Alcení Augusta Werle e Jorge José da Silva da Universidade Federal de Ouro Preto pela coleta e de *Luxemburgia nobilis*;
- À prof^a. Dr^a. Patrícia Fampa Negreiros de Lima (IB-UFRRJ) e sua aluna Evelyne Nery (IC) e à pós-doutoranda Dr^a. Marcela Figueiredo pelos ensaios com *T. cruzi*;
- À prof^a. Dr^a. Maria Teresa Romanos (CCS-UFRJ) pelos ensaios antivirais;
- À MSc. Paloma Martins Mendonça (FIOCRUZ-RJ) pelo ensaio inseticida;
- Ao prof. Dr. Darí Cesarin-Sobrinho e seus alunos MSc. Leonardo Barros, Flávia Teixeira e Veridiana Silva pelos ensaios de difração circular e interação com albumina sérica;
- À banca examinadora, pelas sugestões e correções sugeridas neste trabalho.
- A CAPES pela concessão da bolsa de estudos e ao CNPq, FAPERJ, CPP e INAU pelo apoio financeiro;
- A todos, que de alguma forma, me ajudaram na realização deste trabalho.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE FIGURAS..... | iv |
| LISTA DE TABELAS..... | xvi |
| LISTA DE ESQUEMAS..... | xvii |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS..... | xix |
| RESUMOS..... | xx |
| ABSTRACT..... | xxi |
| 1- INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2- OBJETIVO..... | 2 |
| 3- REVISÃO DA LITERATURA..... | 3 |
| 3.1- Algumas considerações sobre a família Rutaceae e o gênero <i>Zanthoxylum</i> | 3 3 |
| 3.1.1- Ciclopeptídeos..... | 7 |
| 3.1.2- Ciclopeptídeos de Rutaceae..... | 10 |
| 3.2- Considerações sobre a família Ochnaceae e o gênero <i>Luxemburgia</i> | 12 |
| 4- PARTE EXPERIMENTAL..... | 17 |
| 4.1. Reagentes e equipamentos..... | 17 |
| 4.2- Material vegetal de <i>Zanthoxylum rigidum</i> | 18 |
| 4.2.1- Preparação e fracionamento dos extratos brutos de <i>Zanthoxylum</i> <i>rigidum</i> | 18 18 |
| 4.2.2- Fracionamento do extrato ZRFRE (extrato etanólico dos frutos)..... | 19 |
| 4.2.3- Fracionamento do ZRGM (extrato metanólicos dos galhos)..... | 20 |
| 4.2.4- Fracionamento do extrato ZRFLM (extrato metanólico das folhas).... | 21 |
| 4.2.4.1- Reação da substância 16 com Reagente de Marfey (L- FDAA)..... | 23 |
| 4.2.5- Fracionamento dos extratos das raízes (hexânico e metanólico)..... | 26 |
| 4.3- Material vegetal de <i>Luxemburgia nobilis</i> | 27 |
| 4.3.1- Preparação e fracionamento dos extratos brutos de <i>Luxemburgia</i> <i>nobilis</i> | 27 27 |
| 4.3.2- Fracionamento do extrato LNRM (extrato metanólico das raízes)..... | 27 |
| 4.3.3- Preparação e Fracionamento do extrato LNFM (extrato metanólico das folhas) | |

| | |
|---|-----|
| 4.3.3.1- Metilação da substância 26 | 30 |
| 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO | 31 |
| 5.1- Propostas Biossintéticas..... | 31 |
| 5.1.1- Esteroides..... | 31 |
| 5.1.2- Triterpenos..... | 32 |
| 5.1.3- Derivados cinâmicos (C ₆ C ₃)..... | 33 |
| 5.1.4- Lignanas..... | 34 |
| 5.1.5- Flavonoides..... | 35 |
| 5.1.6- Alcaloides quinolínicos..... | 36 |
| 5.1.7- Alcalóides benzofenantridínicos..... | 37 |
| 5.2- Substâncias identificadas de <i>Zanthoxylum rigidum</i> neste trabalho..... | 38 |
| 5.2.1a- Identificação das substâncias 1A a 1E | 40 |
| 5.2.1b- Identificação das substâncias 1A , 1C , 1F e 1G | 42 |
| 5.2.2- Identificação das substâncias 2 , 3 e 4 | 43 |
| 5.2.3- Identificação da substância 5 | 49 |
| 5.2.4- Identificação da substância 6 | 53 |
| 5.2.5- Identificação das substâncias 7 e 8 | 56 |
| 5.2.6- Identificação das substâncias 9 , 10 e 11 | 65 |
| 5.2.7- Identificação das substâncias 12 , 13 , 14 e 15 | 83 |
| 5.2.8- Identificação da substância 16 | 91 |
| 5.2.9- Identificação da substância 17 | 108 |
| 5.2.10- Identificação da substância 18 | 115 |
| 5.2.11- Identificação da substância 19 | 124 |
| 5.2.12- Identificação da substância 20 | 125 |
| 5.2.13- Identificação da substância 21 | 131 |
| 5.2.14- Identificação da substância 22 | 132 |
| 5.3- Substâncias identificadas de <i>Luxemburgia nobilis</i> neste trabalho..... | 145 |
| 5.3.1- Identificação das substâncias 2 , 3 , 4 e 23 | 146 |
| 5.3.2- Identificação da substância 24 | 148 |
| 5.3.3- Identificação da substância 25 | 161 |
| 5.3.4- Identificação da substância 26 | 172 |
| 5.3.5- Identificação da substância 26a | 174 |

| | |
|---|------------|
| 6- ATIVIDADES BIOLÓGICAS..... | 175 |
| 6.1- Atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> | 175 |
| 6.2- Efeito dos alcaloides <i>N</i> -metilatanina (19) e 6-acetonildiidroqueleritrina (21) na alimentação de triatomíneos..... | 177 |
| 6.3- Atividade antiviral..... | 178 |
| 6.4- Atividade inseticida frente às larvas de <i>Chrysomya putoria</i> (Diptera Calliphoridae)..... | 181 |
| 7- ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DA INTERAÇÃO DE LOPHIRONA B (LPB) COM ALBUMINA SÉRICA BOVINA (ASB)..... | 183 |
| 8- CONCLUSÃO..... | 186 |
| 9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 187 |
| ANEXOS..... | 194 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estruturas de <i>Zanthoxylum</i> (Tabela 1)..... | 3 |
| Figura 2. Estruturas de ciclopeptídeos bioativos de plantas (Tabela 2)..... | 8 |
| Figura 3. Estruturas de ciclopeptídeos de Rutaceae..... | 10 |
| Figura 4. Estruturas das substâncias isoladas de <i>L. nobilis</i> e <i>L. octandra</i> | 15 |
| Figura 5. Foto de <i>Zanthoxylum rigidum</i> (fonte: autora)..... | 18 |
| Figura 6. Reação de hidrólise de 16 e produtos derivados com reagente de Marfey (L-FDAA) | 24 |
| Figura 7. Reações do reagente de Marfey (L-FDAA) com os padrões de AA... | 25 |
| Figura 8. Foto de <i>Luxemburgia nobilis</i> Eichl (Fonte: autora)..... | 27 |
| Figura 9. Reação de metilação de 26 com diazometano para obtenção de 7, 4', 7''-trimetóxi-2'', 3''-diidroochnaflavona (26a)..... | 30 |
| Figura 10. Cromatograma por CG da mistura 1A a 1E | 40 |
| Figura 11. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de 1A | 40 |
| Figura 12. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de 1B | 40 |
| Figura 13. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de 1C | 41 |
| Figura 14. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de 1D | 41 |
| Figura 15. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de 1E | 41 |
| Figura 16. Cromatograma por CG da mistura 1A+1C+1F+1G | 42 |
| Figura 17. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de 1F | 42 |
| Figura 18. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de 1G | 42 |
| Figura 19. Espectro no IV da mistura das substâncias 2+3+4 | 45 |
| Figura 20. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) das substâncias 2+3+4 ... | 45 |
| Figura 21. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) das substâncias 2+3+4 .. | 46 |
| Figura 22. Expansão do espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) das substâncias 2+3+4 , entre δ33,0-59,0 ppm..... | 46 |
| Figura 23. Expansão do espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) das substâncias 2+3+4 , entre δ11,0-33,0 ppm..... | 47 |
| Figura 24. Cromatograma por CG da mistura das substâncias 2+3+4 | 47 |
| Figura 25. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância 2 | 48 |
| Figura 26. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância 3 | 48 |

| | |
|---|----|
| Figura 27. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância 4 | 48 |
| Figura 28. Espectro no IV da substância 5 em KBr..... | 49 |
| Figura 29. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 5 | 51 |
| Figura 30. Espectro de RMN DEPTQ (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 5 .. | 51 |
| Figura 31. Expansão do espectro de RMN DEPTQ (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância de 5 , entre δ_C 12,0-40,0 ppm..... | 52 |
| Figura 32. Espectro no IV da substância 6 em KBr..... | 53 |
| Figura 33. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) da substância 6 | 54 |
| Figura 34. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) da substância 6 | 55 |
| Figura 35. Espectro de RMN de HSQC (400/100 MHz, CD ₃ OD) da substância 6 | 55 |
| Figura 36. Espectro no IV das substâncias 7+8 em KBr..... | 58 |
| Figura 37. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) das substâncias 7+8 | 58 |
| Figura 38. Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) das substâncias 7+8 , entre δ_H 6,45-6,85 ppm..... | 59 |
| Figura 39. Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) das substâncias 7+8 , entre δ_H 3,65-4,30 ppm..... | 59 |
| Figura 40. Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) das substâncias 7+8 , entre δ_H 2,45-3,05 ppm..... | 60 |
| Figura 41. Espectro de RMN DEPTQ (125 MHz, CDCl ₃) das substâncias 7+8 | 60 |
| Figura 42. Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl ₃) das substâncias 7+8 | 61 |
| Figura 43. Expansão do espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl ₃) das substâncias 7+8 [43A : entre δ_H 6,35-6,95 ppm 43B : entre δ_H 2,00-4,50]... | 61 |
| Figura 44. Expansão do espectro de RMN HSQC (400/100 MHz, CDCl ₃) das substâncias 7+8 , entre δ_H 6,47-6,87 δ_C 105,0-124,0 ppm..... | 62 |
| Figura 45. Expansões do espectro de RMN de HSQC (400/100 MHz, CDCl ₃) das substâncias 7+8 [45A : entre δ_H 3,78-4,20 δ_C 48,0-77,0 ppm 45B : entre δ_H 2,45-3,05 δ_C 31,0-50,0 ppm]..... | 62 |

| | |
|--|----|
| Figura 46. Cromatograma por CG da mistura das substâncias de 7+8 | 63 |
| Figura 47. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de 7 | 63 |
| Figura 48. Proposta de fragmentação para a substância 7 | 63 |
| Figura 49. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de 8 | 64 |
| Figura 50. Proposta de fragmentação para a substância 8 | 64 |
| Figura 51. Espectro no IV das substâncias 9+10+11 em KBr | 68 |
| Figura 52. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) das substâncias 9+10+11 . | 68 |
| Figura 53. Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) das substâncias 9+10+11 , entre δ _H 6,40-6,95 ppm..... | 69 |
| Figura 54. Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) das substâncias 9+10+11 , entre δ _H 3,75-4,35 ppm..... | 69 |
| Figura 55. Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) das substâncias 9+10+11 , entre δ _H 2,30-3,20 ppm..... | 70 |
| Figura 56. Espectro de RMN ¹³ C (400 MHz, CDCl ₃) das substâncias 9+10+11 | 70 |
| Figura 57. Expansão do espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) das substâncias 9+10+11 , entre δ _C 146,0-149,5 ppm..... | 71 |
| Figura 58. Expansão do espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) das substâncias 9+10+11 , entre δ _C 120,0-132,5 ppm..... | 71 |
| Figura 59. Expansão do espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) das substâncias 9+10+11 , entre δ _C 100,0-112,5 ppm..... | 72 |
| Figura 60. Expansão do espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) das substâncias 9+10+11 , entre δ _C 54,0-56,4 ppm..... | 72 |
| Figura 61. Expansão do espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) das substâncias 9+10+11 , entre δ _C 34,0- 47,0 ppm..... | 73 |
| Figura 62. Espectro de RMN DEPT 135 (100 MHz, CDCl ₃) das substâncias 9+10+11 | 73 |
| Figura 63. Expansão do espectro de RMN DEPT 135 (100 MHz, CDCl ₃) das substâncias 9+10+11 , entre δ _C 99,0-124,0 ppm..... | 74 |
| Figura 64. Expansão do espectro de RMN DEPT 135 (100 MHz, CDCl ₃) das substâncias 9+10+11 , entre δ _C 34,0-47,5 ppm..... | 74 |

| | |
|--|----|
| Figura 65. Expansão do espectro de RMN COSY (400 MHz, CDCl ₃) das substâncias 9+10+11 , entre δ_H 2,45-4,25 ppm..... | 75 |
| Figura 66. Expansão do espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl ₃) das substâncias 9+10+11 , entre δ_H 6,35-6,95 ppm..... | 75 |
| Figura 67. Espectro de RMN HSQC (400/100 MHz, CDCl ₃) das substâncias 9+10+11 | 76 |
| Figura 68. Expansão do espectro de RMN HSQC (400/100 MHz, CDCl ₃) das substâncias 9+10+11 , entre δ_H 2,30-3,20 δ_C 30,0-75,0..... | 76 |
| Figura 69. Expansão do espectro de RMN HSQC (400/100 MHz, CDCl ₃) das substâncias 9+10+11 , entre δ_H 6,40-6,80 δ_C 105,5-113,0 ppm..... | 77 |
| Figura 70. Expansão do espectro de RMN HSQC (400/100 MHz, CDCl ₃) das substâncias 9+10+11 , entre δ_H 6,40-6,75 e δ_C 118,0-124,0 ppm..... | 77 |
| Figura 71. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/100 MHz, CDCl ₃) das substâncias 9+10+11 , entre δ_H 2,45-4,50 e δ_C 30,0-73,0 ppm..... | 78 |
| Figura 72. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/100 MHz, CDCl ₃) de 9+10+11 [72A : entre δ_H 6,45-6,65 e δ_C 31,0-42,0 ppm. 72B : δ_H 2,50-4,20 e δ_C 174,0-182,0 ppm]..... | 78 |
| Figura 73. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/100 MHz, CDCl ₃) das substâncias 9+10+11 , entre δ_H 2,40-3,10 e δ_C 103,8-136,0 ppm..... | 79 |
| Figura 74. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/100 MHz, CDCl ₃) de 9+10+11 [74A : entre δ_H 3,82-3,90 e δ_C 140,0-156,0 ppm 74B : entre δ_H 6,30-7,50 e δ_C 138,0-158,0 ppm]..... | 79 |
| Figura 75. Cromatograma por CG das substâncias 9+10+11 | 80 |
| Figura 76. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância 9 | 80 |
| Figura 77. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância 10 | 80 |
| Figura 78. Proposta de fragmentação para as substâncias 9 e 10 | 81 |
| Figura 79. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância 11 | 82 |
| Figura 80. Proposta de fragmentação para a substância 11 | 82 |
| Figura 81. Espectro no IV das substâncias 12+13+14+15 em KBr..... | 84 |
| Figura 82. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ COCD ₃) das substâncias 12+13+14+15 | 85 |

| | |
|---|----|
| Figura 83. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3COCD_3) das substâncias 12+13+14+15 , entre δ_{H} 6,2-7,7 ppm..... | 85 |
| Figura 84. Espectro de RMN DEPT Q (100 MHz, CD_3COCD_3) das substâncias 12+13+14+15 , entre δ_{H} 6,2-7,7 ppm..... | 86 |
| Figura 85. Expansão do espectro de RMN COSY (400 MHz, CD_3COCD_3) das substâncias 12+13+14+15 , entre δ_{H} 6,2-7,9 ppm..... | 86 |
| Figura 86. Espectro de RMN HMQC (400/100 MHz, CD_3COCD_3) das substâncias 12+13+14+15 | 87 |
| Figura 87. Expansão do espectro de RMN HMQC (400/100 MHz, CD_3COCD_3) das substâncias 12+13+14+15 , entre δ_{C} 106,0..... | 87 |
| Figura 88. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/100 MHz, CD_3COCD_3) das substâncias 12+13+14+15 , entre δ_{C} 110,0..... | 88 |
| Figura 89. Cromatograma por CG da mistura das substâncias 12+13+14+15 | 88 |
| Figura 90. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância 12 | 88 |
| Figura 91. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância 13 | 89 |
| Figura 92. Proposta de fragmentação para as substâncias 12 e 13 | 89 |
| Figura 93. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância 14 | 89 |
| Figura 94. Proposta de fragmentação para substância 14 | 90 |
| Figura 95. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância 15 | 90 |
| Figura 96. Proposta de fragmentação para substância 15 | 90 |
| Figura 97. Espectros no IV da substância 16 em KBr..... | 94 |
| Figura 98. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da substância 16 | 94 |
| Figura 99. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da substância 16 , entre δ_{H} 7,0-8,8 ppm..... | 95 |
| Figura 100. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO | 95 |
| Figura 101. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO | 96 |
| Figura 102. Espectro de RMN DEPTQ (100 MHz, DMSO | 96 |
| Figura 103. Expansão do espectro de RMN DEPTQ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da substância 16 , entre δ_{C} 123,0-177,0 ppm..... | 97 |
| Figura 104. Expansão do espectro de RMN DEPTQ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da substância 16 , entre δ_{C} 10,0-60,0 ppm..... | 97 |

| | |
|---|-----|
| Figura 105. Espectro de RMN HMQC (400/ 100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 16 | 98 |
| Figura 106. Expansão do espectro de RMN HMQC (400/ 100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 16 , entre δ_C 10,0-60,0 e δ_H 0,5-4,5 ppm..... | 98 |
| Figura 107. Espectro de RMN COSY (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 16 | 99 |
| Figura 108. Expansão do espectro de RMN COSY (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 16 , entre δ_H 0,5-4,5 ppm..... | 99 |
| Figura 109. Espectros de TOCSY (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 16 | 100 |
| Figura 110. Espectro de RMN HMBC (400/ 100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 16 | 101 |
| Figura 111. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/ 100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 16 , entre δ_C 10,0-60,0 e δ_H 0,5-4,5 ppm..... | 101 |
| Figura 112. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/ 100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 16 , entre δ_C 168,5-174,0 e δ_H 1,0-4,9 ppm..... | 102 |
| Figura 113. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/ 100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 16 , entre δ_C 14,0-28,0 e δ_H 0,5-5,0 ppm..... | 102 |
| Figura 114. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/ 100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 16 , entre δ_C 34,0-59,0 e δ_H 0,5-7,5 ppm..... | 103 |
| Figura 115. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/ 100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 16 , entre δ_C 124,0-141,5 e δ_H 2,5-7,5 ppm..... | 103 |
| Figura 116. Espectro de RMN NOESY (400/ 100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 16 | 104 |
| Figura 117. Principais correlações de NOESY da substância 16 | 104 |
| Figura 118. Espectro de massas de alta resolução EM-IES com ionização elétron spray (IES) e detecção de íons detecção de íon positivo de 16 | 105 |
| Figura 119. Propostas de fragmentação para substância 16 | 106 |
| Figura 120. Cromatograma dos padrões de ácidos aminados das séries D e L | 107 |
| Figura 121. Cromatograma dos ácidos aminados do ciclopeptídeo hidrolisado (16) | 107 |
| Figura 122. Espectro no IV da substância 17 em KBr..... | 110 |
| Figura 123. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 17 | 110 |

| | |
|---|-----|
| Figura 124. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) da substância 17 , entre δ_{H} 5,0-8,0 ppm..... | 111 |
| Figura 125. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) da substância 17 , entre δ_{H} 2,9-3,8 ppm..... | 111 |
| Figura 126. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) da substância 17 | 112 |
| Figura 127. Espectro de RMN COSY (400 MHz, DMSO- d_6) da substância 17 | 112 |
| Figura 128. Expansão do espectro de RMN COSY (400 MHz, DMSO- d_6) da substância 17 , entre δ_{H} 2,6-4,1 ppm..... | 113 |
| Figura 129. Expansão do espectro de RMN HMQC (400/ 100 MHz, DMSO- d_6) da substância 17 , entre δ_{H} 5,0-8,0 ppm e δ_{C} 85,0-130,0 ppm..... | 113 |
| Figura 130. Expansão do espectro de RMN HMQC (400/ 100 MHz, DMSO- d_6) da substância 17 , entre δ_{H} 2,7-3,8 ppm e δ_{C} 51,0-84,0 ppm..... | 114 |
| Figura 131. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/ 100 MHz, DMSO- d_6) da substância 17), entre δ_{H} 6,0-8,0 ppm e δ_{C} 85,0-170,0 ppm..... | 114 |
| Figura 132. Espectro no IV da substância 18 em KBr..... | 117 |
| Figura 133. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da substância 18 | 117 |
| Figura 134. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da substância 18 , entre δ_{H} 6,00-7,05 ppm..... | 118 |
| Figura 135. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da substância 18 , entre δ_{H} 4,35-5,65 ppm..... | 118 |
| Figura 136. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da substância 18 , entre δ_{H} 2,70-3,90 ppm..... | 119 |
| Figura 137. Espectro de RMN DEPTQ (125 MHz, DMSO- d_6) da substância 18 | 119 |
| Figura 138. Expansão do espectro de RMN DEPTQ (125 MHz, DMSO- d_6) da substância 18 , entre δ_{C} 68,0-79,5 ppm..... | 120 |
| Figura 139. Expansão do espectro de RMN COSY (500 MHz, DMSO- d_6) da substância 18 , entre δ_{H} 1,00-5,70 ppm..... | 120 |
| Figura 140. Espectro de RMN de HMQC (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância 18 | 121 |

| | |
|---|-----|
| Figura 141. Expansões do espectro de RMN de HMQC (500/125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 18 [141A : δ_H 4,00-7,50 e δ_C 74,0-125,0 ppm 141B : δ_H 2,70-4,20 e δ_C 82,0-62,0 ppm]..... | 121 |
| Figura 142. Expansões do espectro de RMN de HMBC (500/ 125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 18 [142A : δ_H 2,65-3,60 e δ_C 195,5-199,0 ppm 142B : δ_H 1,05-1,21 e δ_C 66,5-75,0 ppm 142C : δ_H 3,00-3,50 e δ_C 98,5-102,0 ppm]..... | 122 |
| Figura 143. Expansão do espectro de RMN de HMBC (500/ 125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 18 , entre δ_H 3,00-12,30 e δ_C 145,0-168,0 ppm..... | 122 |
| Figura 144. Expansão do espectro de RMN de HMBC (500/ 125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 18 , entre δ_H 3,00-12,30 e δ_C 94,0-135,0 ppm..... | 123 |
| Figura 145. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 19 | 124 |
| Figura 146. Espectro no IV da substância 20 em KBr..... | 125 |
| Figura 147. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, D ₃ CCOCD ₃) da substância 20 | 126 |
| Figura 148. Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, D ₃ CCOCD ₃) da substância 20 , entre δ_H 6,0-7,4 ppm..... | 127 |
| Figura 149. Espectro de RMN DEPTQ (100 MHz, D ₃ CCOCD ₃) da substância 20 | 127 |
| Figura 150. Espectro de RMN HMQC (400/ 100 MHz, D ₃ CCOCD ₃) da substância 20 | 128 |
| Figura 151. Espectro de RMN HMBC (400/ 100 MHz, D ₃ CCOCD ₃) da substância 20 | 128 |
| Figura 152. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/ 100 MHz, D ₃ CCOCD ₃) da substância 20 , entre δ_H 3,5-7,5 ppm e δ_C 122-133,0 ppm..... | 129 |
| Figura 153. Cromatograma por CG de 20 | 129 |
| Figura 154. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância 20 | 129 |
| Figura 155. Proposta de fragmentação para substância 20 | 130 |
| Figura 156. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância 21 | 131 |
| Figura 157. Espectro no IV da substância 21 em KBr..... | 133 |
| Figura 158. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 22 | 135 |

| | |
|--|-----|
| Figura 159. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da substância 22 , entre δ_{H} 2,75-5,30 ppm..... | 135 |
| Figura 160. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da substância 22 , entre δ_{H} 0,69-2,00 ppm..... | 136 |
| Figura 161. Espectro de RMN DEPTQ (125 MHz, DMSO- d_6) da substância 22 | 136 |
| Figura 162. Expansão do espectro de RMN DEPTQ (125 MHz, DMSO- d_6) da substância 22 , entre δ_{C} 37,0-48,0 ppm..... | 137 |
| Figura 163. Expansão do espectro de RMN DEPTQ (125 MHz, DMSO- d_6) da substância 22 , entre δ_{C} 16,0-35,0 ppm..... | 137 |
| Figura 164. Expansão do espectro de RMN COSY (500 MHz, DMSO- d_6) da substância 22 , entre δ_{H} 0,60-5,50 ppm..... | 138 |
| Figura 165. Expansão do espectro de RMN COSY (500 MHz, DMSO- d_6) da substância 22 , entre δ_{H} 0,50-2,20 ppm..... | 138 |
| Figura 166. Expansão do espectro de RMN HMQC (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância 22 , entre δ_{H} 2,45-5,30 e δ_{C} 35,0-130,0 ppm..... | 139 |
| Figura 167. Expansão do espectro de RMN HMQC (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância 22 , entre δ_{H} 0-2,40 e δ_{C} 12,0-30,0 ppm..... | 139 |
| Figura 168. Expansão do espectro de RMN HMQC (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância 22 , entre δ_{H} 0,30-2,10 e δ_{C} 28,0-58,0 ppm..... | 140 |
| Figura 169. Expansão do espectro de RMN HMBC (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância 22 , entre δ_{H} 0,70-3,0 e δ_{C} 115,0-185,0 ppm..... | 140 |
| Figura 170. Expansão do espectro de RMN HMBC (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância 22 , entre δ_{H} 0,65-5,20 e δ_{C} 58,0-89,0 ppm..... | 141 |
| Figura 171. Expansão do espectro de RMN HMBC (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância 22 , entre δ_{H} 0,50-2,0 e δ_{C} 10,0-36,0 ppm..... | 141 |
| Figura 172. Expansão do espectro de RMN HMBC (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância 22 , entre δ_{H} 0,65-1,95 e δ_{C} 35,0-58,0 ppm..... | 142 |
| Figura 173. Expansão do espectro de RMN NOESY (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância 22 , entre δ_{H} 1,50-3,50 ppm..... | 142 |
| Figura 174. Principais correlações do NOESY da substância 22 | 143 |

| | |
|---|-----|
| Figura 175. Espectro de massas de alta resolução da substância 22 com detecção de íons negativos..... | 143 |
| Figura 176. Proposta de fragmentação para substância 22 | 144 |
| Figura 177. Cromatograma por CG da mistura das substâncias 2+3+4+23 | 146 |
| Figura 178. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância 23 | 146 |
| Figura 179. Proposta de fragmentação para substância 23 | 147 |
| Figura 180. Estrutura da lophirona B e projeção dos centros quirais α_2 e β_2 de 24 | 149 |
| Figura 181. Espectro no IV da substância 24 em KBr..... | 151 |
| Figura 182. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3COCD_3) da substância 24 | 151 |
| Figura 183. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3COCD_3) da substância 24 , entre $\delta_{\text{H}}7,28-8,10$ ppm..... | 152 |
| Figura 184. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3COCD_3) da substância 24 , entre $\delta_{\text{H}}4,50-6,90$ ppm..... | 152 |
| Figura 185. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3COCD_3) da substância 24 | 153 |
| Figura 186. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3COCD_3) da substância 24 , entre $\delta_{\text{C}}142,0-194,0$ ppm..... | 153 |
| Figura 187. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3COCD_3) da substância 24 , entre $\delta_{\text{C}}100,0-134,0$ ppm..... | 154 |
| Figura 188. Expansão do espectro de RMN COSY (400 MHz, CD_3COCD_3) da substância 24 , entre $\delta_{\text{H}}4,00-6,25$ ppm..... | 154 |
| Figura 189. Expansão do espectro de RMN COSY (400 MHz, CD_3COCD_3) da substância 24 , entre $\delta_{\text{H}}6,30-8,10$ ppm..... | 155 |
| Figura 190. Espectro de RMN de HMQC (400/ 100 MHz, CD_3COCD_3) da substância 24 | 155 |
| Figura 191. Expansão do espectro de RMN de HMQC (400/ 100 MHz, CD_3COCD_3) da substância 24 , entre $\delta_{\text{H}}6,25-6,90$ e $\delta_{\text{C}}99,0-120,0$ ppm..... | 156 |
| Figura 192. Expansão do espectro de RMN de HMQC (400/ 100 MHz, CD_3COCD_3) da substância 24 , entre $\delta_{\text{H}}7,15-8,10$ e $\delta_{\text{C}}114,0-146,0$ ppm..... | 156 |
| Figura 193. Expansão do espectro de RMN de HMBC (400/ 100 MHz, CD_3COCD_3) da substância 24 , entre $\delta_{\text{H}}6,20-8,20$ e $\delta_{\text{C}}154,0-169,0$ ppm..... | 157 |

| | |
|---|-----|
| Figura 194. Expansão do espectro de RMN de HMBC (400/ 100 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substância 24 , entre δ_H 5,90-8,20 e δ_C 98,0- 120,0 ppm..... | 157 |
| Figura 195. Expansão do espectro de RMN de HMBC (400/ 100 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substância 24 , entre δ_H 6,60-7,80 e δ_C 122,0- 146,5 ppm..... | 158 |
| Figura 196. Expansões dos espectro de RMN de HMBC (400/ 100 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substância 24 [196A entre δ_H 4,00-8,00 e δ_C 180,0-194,0 ppm 196B entre δ_H 4,40-8,20 e δ_C 45,0-85,0 ppm]..... | 158 |
| Figura 197. Espectro de massas de alta resolução da substância 24 com detecção de íons negativos..... | 159 |
| Figura 198. Propostas de fragmentação para da substância 24 | 159 |
| Figura 199. Espectro de DC e projeção dos centros quirais α 2 e β 2 de 24 | 160 |
| Figura 200. Espectro de DC da 6''-hidroxi lofirona B (modelo) (KAEWAMATAWONG <i>et al.</i> , 2002)..... | 160 |
| Figura 201. Espectro no IV da substancia 25 em KBr..... | 164 |
| Figura 202. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substancia 25 | 164 |
| Figura 203. Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substância 25 , entre δ_H 5,95-7,15 ppm..... | 165 |
| Figura 204. Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substância 25 , entre δ_H 7,80-8,20 ppm..... | 165 |
| Figura 205. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substância 25 .. | 165 |
| Figura 206. Expansão do espectro de RMN ¹ H (100 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substância 25 , entre δ_H 6,95-7,15 ppm..... | 166 |
| Figura 207. Expansão do espectro de RMN ¹ H (100 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substância 25 , entre δ_H 6,95-7,15 ppm..... | 166 |
| Figura 208. Espectro de RMN de COSY (500 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substância 25 , entre δ_H 5,90-8,40 ppm..... | 167 |
| Figura 209. Expansão do espectro de RMN de COSY (500 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substância 25 , entre δ_H 7,80-8,05 ppm..... | 167 |
| Figura 210. Expansão do espectro de RMN HMQC (400/ 100 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substância 25 , entre δ_H 8,25-7,70 e δ_C 110,0-149,0 ppm..... | 168 |
| Figura 211. Expansão do espectro de RMN HMQC (400/ 100 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substância 25 , entre δ_H 5,90-7,20 e δ_C 90,0-135,0 ppm..... | 168 |

| | |
|---|-----|
| Figura 212. Expansão do espectro de RMN de HMBC (400/ 100 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substância 25 , entre δ_H 5,70-8,30 e δ_C 187,0-202,0 ppm..... | 169 |
| Figura 213. Expansão do espectro de RMN de HMBC (400/100 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substância 25 , entre δ_H 5,80-8,20 e δ_C 140,0-174,0 ppm..... | 169 |
| Figura 214. Expansão do espectro de RMN de HMBC (400/ 100 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substância 25 , entre δ_H 5,80-8,20 e δ_C 85,0-135,0 ppm..... | 170 |
| Figura 215. Espectro de massas de alta resolução da substância 25 com detecção de íons positivos..... | 170 |
| Figura 216. Proposta de fragmentação para substância 25 com detecção de íons positivos..... | 171 |
| Figura 217. Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substancia 26 , entre δ_H 7,28-8,10 ppm..... | 172 |
| Figura 218. Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substancia 26 , entre δ_H 6,60- 7,95 ppm..... | 173 |
| Figura 219. Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substancia 26 , entre δ_H 5,50-6,55 ppm..... | 173 |
| Figura 220. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do derivado 26a | 174 |
| Figura 221. Gráficos de crescimento dos epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratados com a substância 26 nas concentrações de 15, 30, 45 e 60 μ g/mL..... | 176 |
| Figura 222. Gráficos de viabilidade celular de linfócitos e macrófagos tratados com a substância 26 | 177 |
| Figura 223A. Espectro de absorção no UV-Vis de LPB em solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4), C _{ASB} = 1,00 x 10 ⁻⁵ mol/L | |
| Figura 223B. Espectro de supressão da emissão de fluorescência (λ_{exc} = 280 nm) da ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) C _{ASB} = 1,00 x 10 ⁻⁵ mol/L por LPB a T = 293K..... | 184 |
| Figura 224A. Sobreposição entre os espectros de emissão/absorção para o sistema LPB/ASB | |
| Figura 224B. Espectro de dicroísmo circular de LPB em ASB (pH = 7,4), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:LPB , C _{ASB} = 1,00 x 10 ⁻⁶ mol/L... | 184 |
| Figura 225. Curvas de Stern-Volmer e Stern-Volmer modificado nas temperaturas de 296, 303 e 310K (gráficos a, b e c) e Vant' Hoff (gráfico d) para o processo de supressão de fluorescência da ASB pela LPB..... | 185 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1: Constituintes de <i>Zanthoxylum</i> e atividades biológicas..... | 3 |
| Tabela 2. Exemplos de ciclopeptídeos bioativos de plantas..... | 8 |
| Tabela 3: Constituintes químicos isolados de <i>L. nobilis</i> e <i>L. octandra</i> | 13 |
| Tabela 4. Dados de RMN ¹³ C (100 MHz) em CDCl ₃ de 2+3 comparados com dados da literatura para o .β-sitosterol e o estigmasterol (KOJIMA <i>et al.</i> , 1990)..... | 44 |
| Tabela 5. Dados de RMN DEPTQ (125 MHz) em DMDO- <i>d</i> ₆ de 5 comparados com dados da literatura para o 3-O-β-D-glicopiranosil sitosterol (KOJIMA <i>et al.</i> , 1990)..... | 50 |
| Tabela 6: Dados de RMN de ¹³ C (100 MHz) e ¹ H (400 MHz) em CD ₃ OD de 6 comparados a literatura para a arbutina (HISATOMI <i>et al.</i> 2000)..... | 54 |
| Tabela 7. Dados de RMN ¹³ C (100 MHz) e ¹ H (400 MHz) de 7 em CDCl ₃ comparados com dados da literatura para a <i>trans</i> -dimetilmatairesinol (HELENO <i>et al.</i> 2006))..... | 57 |
| Tabela 8. Dados de RMN ¹ H (400 MHz) em CDCl ₃ de 9 e 10 comparados com dados da literatura para a lignana metilpluviatolido (HELENO <i>et al.</i> , 2006)..... | 66 |
| Tabela 9. Dados de RMN ¹³ C (100 MHz) em CDCl ₃ de 9 e 10 comparados com dados da literatura para a lignana metilpluviatolido (HELENO <i>et al.</i> , 2006)..... | 67 |
| Tabela 10. Dados de RMN de DEPTQ (100 MHz) e ¹ H (400 MHz) em CD ₃ COCD ₃ de 12 comparados a literatura para o 4-hidroxicinamato de metila (SILVA <i>et al.</i> , 2001)..... | 84 |
| Tabela 11. Dados de RMN ¹ H (400 MHz), DEPTQ (100 MHz) e HMBC (400/ 100 MHz) em DMSO- <i>d</i> da substância 16 | 93 |
| Tabela 12 Dados de RMN ¹³ C (100 MHz) e ¹ H (400 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 17 comparados com dados da literatura para a isoquercetina (ELDAHSHAN <i>et al.</i> , 2011)..... | 109 |
| Tabela 13. Dados de RMN ¹³ C (100 MHz) e ¹ H (400 MHz) em DMSO- <i>d</i> ₆ de 18 comparados com dados da literatura para a hesperidina (MOCCELINI <i>et al.</i> , 2009)..... | 116 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 14. Dados de RMN de DEPTQ (100 MHz) e ^1H (400 MHz) em CD_3COCD_3 de 20 comparados com dados da literatura para o álcool <i>p</i> -cumarílico (WHITAKER <i>et al.</i> , 2001; JALALLI-HERAVI <i>et al.</i> , 2000)..... | 126 |
| Tabela 15. Dados de RMN DEPTQ (125 MHz) e ^1H (500 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ de 22 comparados com dados da literatura para o ácido 2 α , 3 β , 24-triidroxiolean-12-en-oico (JIN <i>et al.</i> , 2009)..... | 134 |
| Tabela 16. Dados de RMN ^{13}C (100 MHz) e ^1H (400 MHz) em CD_3COCD_3 de 24 comparados com dados da literatura para a lophirona B (GHOGOMU TIH <i>et al.</i> , 1989)..... | 150 |
| Tabela 17. Dados de RMN ^{13}C (100 MHz) e ^1H (400 MHz) de 25 em D_3CCOCD_3 comparados com dados da literatura para a lophirona K (MESSANGA <i>et al.</i> , 1994)..... | 163 |
| Tabela 18. Percentual de inibição das substancias 19 , 26 e 26a contra os vírus HSV-1 e 2 e AdV19..... | 180 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | |
|---|-----|
| Esquema 1. Procedimento geral de fracionamento dos frutos de <i>Z. rigidum</i> | 20 |
| Esquema 2. Procedimento geral de fracionamento dos galhos de <i>Z. rigidum</i> | 21 |
| Esquema 3. Procedimento geral de fracionamento das folhas de <i>Z. rigidum</i> | 22 |
| Esquema 4. Procedimento geral de fracionamento das raízes de <i>Z. rigidum</i> | 26 |
| Esquema 5. Procedimento geral de fracionamento das raízes de <i>L. nobilis</i> | 28 |
| Esquema 6. Procedimento geral de fracionamento das folhas de <i>L. nobilis</i> | 29 |
| Esquema 7 . Proposta biossintética dos esteroides (Dewick, 2002)..... | 31 |
| Esquema 8. Proposta biossintética dos triterpenos (Dewick, 2002)..... | 32 |
| Esquema 9. Proposta biossintética dos metabólitos C ₆ C ₃ (Adaptado de DEWICK, 2002) | 33 |
| Esquema 10. Proposta biossintética de lignanas (Adaptado de DEWICK, 2002)..... | 34 |
| Esquema 11. Proposta biossintética de flavonoides (Adaptado de DEWICK, 2002) | 35 |
| Esquema 12. Proposta biossintética de alcaloides quinolínicos (DEWICK, 2002) | 36 |
| Esquema 13. Proposta biossintética de alcaloides benzofenatrídínicos (DEWICK, 2002)..... | 37 |
| Esquema 14. Esquema geral das propostas de fragmentação para substância 16 ... | 105 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|---------------------|---|
| δ | Deslocamento químico (ppm) |
| J | Constante de acoplamento em Hertz |
| ν | Estiramento |
| AcOEt | Acetato de etila |
| AcOH | Ácido acético |
| Ala | Alanina |
| CC | Cromatografia em coluna (pressão atmosférica) |
| CCDP | Cromatografia em camada delgada preparativa |
| CCD | Cromatografia em camada delgada |
| CRP | Cromatografia radial preparativa |
| CG-EM | Cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas |
| COSY | C orrelated s pectroscopy |
| DCM | Diclorometano |
| d | Dubleto |
| dd | Duplo dubleto |
| DEPT | D istortionless E nhancement by P olarization T ransfer |
| DEPTQ | D istortionless E nhancement by P olarization T ransfer Q uantum |
| eV | elétron volt |
| EM | Espectrometria de massas |
| Gli | Glicina |
| hex | hexano |
| HMBC | H eteronuclear M ultiple B ond C orrelation |
| HMQC | H eteronuclear M ultiple Q uantum C oherence |
| Hz | Hertz |
| IE | Impacto de elétrons |
| IV | Infravermelho |
| Leu | Leucina |
| m | Multiplete |
| m/z | Relação carga/massa |
| MeOH | Metanol |
| MHz | Megahertz |
| NOESY | N uclear O verhauser E ffect C orrelation S pectroscopy |
| Phe | Fenilalanin a |
| RMN ^1H | Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio |
| RMN ^{13}C | Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13 |
| s | Singleto |
| sl | Singleto largo |
| t | Triplete |
| t_R | Tempo de retenção |

RESUMO

Ribeiro, Tereza Auxiliadora Nascimento. **Estudo fitoquímico de *Zanthoxylum rigidum* Humb. Bonpl. ex Willd (Rutaceae), das raízes de *Luxemburgia nobilis* Eichl (Ochnaceae) e Atividades Biológicas.** Tese (Doutorado em Ciências, Química Orgânica). PPGQO, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, Brasil. 2012. 193p.

Este trabalho descreve os isolamento e determinação estrutural de metabólitos especiais de *Zanthoxylum rigidum* (Rutaceae) (frutos, galhos, folhas e raízes), coletada no Pantanal mato-grossense, e raízes de *Luxemburgia nobilis* (Ochnaceae), coletada em Ouro Preto-MG. O fracionamento cromatográfico e análise das frações dos extratos de *Z. rigidum* conduziu ao isolamento de mistura de hidrocarbonetos e mistura de ésteres graxos, β -sitosterol, estigmasterol, campesterol, 3-O- β -D-glicopiranosil sitosterol, arbutina, dimetilmatairesinol, 3'', 4''-dimetoxibenzil-3', 4', 5'-trimetoxibenzilbutirolactona, *trans* e *cis*-metilpluviatolideo, kaerofilina, *trans* e *cis*-4-hidroxicinamato de metila, 4-hidroxibenzoato de metila, 4-hidroxifenilacetato de metila, isoquercetina, hesperidina, *N*-metilatanina, 6-acetonildiidroqueleritrina, 2 α , 3 β , 24-triidroxiolean-12-en-28-óico e um novo ciclopeptideo, ciclo(-Phe-Gly-Ala¹-Leu-Ala²-), denominado ciclozanthoxylano A. De *L. nobilis* isolaram-se β -sitosterol, estigmasterol, campesterol, β -sitostenona, 3-O- β -D-glicopiranosil sitosterol, lophirona B, lophirona K e 2'',3''-diidrochnaflavona. Na determinação estrutural foram utilizadas técnicas de RMN de ¹H e ¹³C (1D e 2D), espectrometria de massas de alta resolução, CG-EM, IV, e dicroísmo circular na definição da configuração absoluta da lophirona B. A configuração absoluta dos amino ácidos constituintes no ciclopeptideo foi definida através da adaptação do método de Marfey, uso do reagente *L*-FDAA (*N* α -(2,4-dinitro-5-fluorfenil)-*L*-alaninamida) e análise com CLAE. Além do estudo espectroscópico da interação entre o biflavonoide lophirona B e a albumina sérica bovina, realizaram-se testes biológicos como antialimentar de triatomíneos com *N*-metilatanina e 6-acetonildiidroqueleritrina; tripanocida com 2'',3''-diidrochnaflavona e seu derivado metilado; inseticida em *Chrysomya putoria* com a lophirona K; antiviral frente *Herpes simplex* tipo I e II e adenovirus 19 do alcalóide *N*-metilatanina, 2'', 3''-diidrochnaflavona e seu derivado metilado.

Palavras-chave: *Zanthoxylum rigidum*, ciclozanthoxylano A, *Luxemburgia nobilis*, biflavonoides.

ABSTRACT

Ribeiro, Tereza Auxiliadora Nascimento. **Phytochemical study of *Zanthoxylum rigidum* Humb. Bonpl. ex Willd (Rutaceae), and roots of *Luxemburgia nobilis* Eichl (Ochnaceae), and Biological Activities.** Tese (Doutorado em Ciências, Química Orgânica). PPGQO, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, Brasil. 2012. 201p.

This work describes the isolation and structural determination of special metabolites isolated from *Zanthoxylum rigidum* (Rutaceae) (fruits, branches, leaves and roots), collected in the Pantanal mato-grossense, and roots of *Luxemburgia nobilis* (Ochnaceae), collected in Ouro Preto-MG. From *Zanthoxylum rigidum* were obtained a mixture of hydrocarbons and mixture of fatty ester, β -sitosterol, stigmasterol, campesterol, 3-O- β -D-glucopyranosyl sitosterol, arbutin, dimethylmatairesinol, 3",4"-dimethoxybenzyl-3',4',5'-trimethoxybenzylbutyrolactone, *trans* and *cis*-methylpluviatolide, kaerophyllin, methyl (*E*)-4-hydroxycinnamate, methyl (*Z*)-4-hydroxycinnamate, methyl 4-hydroxybenzoate, methyl 4-hydroxyphenylacetate, isoquercetin, hesperidin, *N*-methylatanine, the alkaloid 6-acetyldihydrochelerythrine, 2 α ,3 β ,24-trihydroxy-olean-12-en-28-oic acid, and a new cyclopeptide, cyclo(-Phe-Gly-Ala¹-Leu-Ala²-), named cyclozanthoxylane A. From the *Luxemburgia nobilis* were isolated β -sitosterol, stigmasterol, campesterol, β -sitostenone, 3-O- β -D-glucopyranosyl sitosterol, lophirone B, lophirone K and 2",3"-dihydrochonaflavone. The structural determination was based on the 1D and 2D ¹H and ¹³C NMR, high-resolution mass spectroscopy, GC-MS, IR, circular dichroism, used to define the absolute configuration of the lophirone B. The absolute configurations of the amino acids present in the cyclozanthoxylane A were determined by the adapted Marfey method (using the *L*-FDAA (*N* α -(2,4-dinitro-5-fluorophenyl)-*L*-alaninamide) reagent and HPLC analysis. Besides the spectroscopic study of the interaction between the biflavonoide lophirone B and the bovine seric albumine, some biological activity were evaluated, such as antifeedant of Triatomines with *N*-methylatanine, 6-acetyldihydrochelerythrine, tripanocidal with 2",3"-dihydrochonaflavone and its methyl derivative, insecticide in *Chrysomya putoria* with lophirone K, antiviral against *Herpes simplex* type I and II and adenovirus 19 with *N*-methylatanine, 2",3"-dihydrochonaflavone and its methyl derivative.

Palavras-chave: *Zanthoxylum rigidum*, cyclozanthoxylane A, *Luxemburgia nobilis*, biflavonoids.

1- INTRODUÇÃO

O estudo dos constituintes químicos produzidos pelo metabolismo especial dos organismos vivos continua proporcionando a descoberta de diversas substâncias orgânicas. Além da caracterização química da fonte natural devem-se descobrir propriedades destes compostos, mesmo os já registrados na literatura. Estas propriedades poderão responder a muitas questões que relacionadas ao entendimento da biossíntese e a determinadas ambições do ser humano. Um exemplo mais freqüente é a avaliação da atividade biológica das mesmas que inclui investigações farmacológicas, toxicológicas e medicinais, merecendo atenção especial as substâncias isoladas de plantas utilizadas na medicina popular.

As plantas desenvolvem naturalmente, processos vitais de biossíntese que são responsáveis pela formação, acúmulo e degradação de inúmeras substâncias orgânicas no interior das células que formam seus tecidos. Na química de produtos naturais, uma das principais aplicações é direcionada para a descoberta de novas substâncias medicamentosas, através do estudo de extratos de plantas ou por meio da síntese de substâncias análogas que possam ser, em ambos os casos, produzidos em escala industrial (MATOS, 2007).

A ciência vem analisando e estudando os efeitos terapêuticos das plantas, comparando e classificando as diversas propriedades para agrupar as plantas de efeitos similares, identificarem os princípios ativos, determinar suas estruturas químicas, para sintetizar ou produzir derivados semi-sintéticos, propor modificações estruturais em busca de uma maior atividade e/ou reduzir sua toxicidade (LOCK DE UGAZ, 1994).

Os metabólitos especiais também 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).

Do ponto de vista quimiossistemático, a diversidade de produtos naturais está ligada à evolução das plantas e por este motivo as Angiospermas são detentoras de enorme variedade de metabólitos especiais com atividade biológica (GOTTLIEB, 1987).

Entre os diferentes critérios de seleção a quimiotaxonomia pode conduzir a informações importantes. Algumas classes de substâncias são características de uma determinada família botânica ou de um gênero. O conhecimento das propriedades de determinado produto natural pode responder a questões relacionadas a uma fonte natural. Pode ser uma doença, um efeito alelopático, e inclusive uma propriedade biológica detectada. Por isso, mesmo o isolamento e identificação de constituintes conhecidos, de material não estudado, deve ser considerado relevante para diversas áreas do conhecimento. Se um produto natural apresenta atividade terapêutica interessante, será possível encontrar substâncias análogas em uma espécie do mesmo gênero ou da mesma família (HOSTETTSMANN *et al.*, 2003).

Sob estes pontos de vista escolheram-se as espécies *Z. rigidum* (Rutaceae) e *L. nobilis* (Ochnaceae) para serem estudadas. O capítulo 3 deste trabalho relata algumas propriedades de espécies destas famílias revelando a importância das estruturas nas mesmas. A família Rutaceae é reconhecidamente uma das mais ricas em relação à de classes de metabólitos especiais (3.1), e a família Ochnaceae tem como característica principal a bioprodução de flavonoides e biflavonoides (3.2).

2- OBJETIVOS

- Isolar e identificar metabólitos especiais de e *Zanthoxylum rigidum* (frutos, galhos, folhas e raízes) e *Luxemburgia nobilis* (raízes);
- Avaliar as atividades biológicas de substâncias isoladas das espécies em estudo;
- Preparar derivados dos metabólitos isolados para auxiliar na elucidação estrutural e submeter a ensaios biológicos.

3- REVISÃO DE LITERATURA

3.1- Algumas considerações sobre a família Rutaceae e o gênero *Zanthoxylum*

A família Rutaceae é composta de aproximadamente 155 gêneros e 1600 espécies amplamente distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo. No Brasil, a família está representada por cerca de 29 gêneros e 250 espécies (NEGI *et al.* 2011; BARROSO *et al.*, 1984). Dentre os gêneros mais destacados na literatura tem-se *Ruta*, *Dictamus*, *Borania*, *Pilocarpus*, *Aegle*, *Citrus*, *Helietta*, *Esenbeckia* e *Zanthoxylum* (WEBER 2005).

O gênero *Zanthoxylum* é formado por arbustos e árvores que tem muita importância etnobotânica e é usado como fonte de matéria-prima farmacêutica e cosmética. Várias espécies são utilizadas como carminativo, anti-helmíntico, para tratamento de dor de dente e estômago, tosse, febre, reumatismo e dispepsia (SINGH & SINGH, 2011).

A presença de alcaloides e óleo essencial em espécies de *Zanthoxylum* é uma das explicações para que as mesmas possuam vários tipos de atividades biológicas como larvicida, anti-inflamatória, analgésica, antinociceptiva, antioxidante, antibiótica, hepatoprotetora, antiplasmódica, citotóxica, antiviral e antifúngica. (NEGI *et al.*, 2011).

Quimicamente este gênero é caracterizado pela presença de alcaloides, cumarinas, lignanas, flavonoides e terpenos (MOCCELINI *et al.* 2009). Na Tabela 1 (p. 4) são listados alguns exemplos de constituintes das classes de metabólitos citados acima, bem como atividade revelada pelos mesmos. Outra classe de metabólito que tem sido detectada em Rutaceae é a de ciclopeptídeos, e por serem considerados uma classe peculiar de metabólitos, resolvemos destacá-los no item 3.1.1 (p. 7).

A escolha da espécie *Zanthoxylum rigidum* para estudo foi motivada pela escassez de trabalhos com a mesma (há apenas um na literatura, MOCCELINI *et al.* 2009) e pela diversidade de metabólitos especiais já relatados no gênero, muitos dos quais com atividade biológica comprovada (Tabela 1, p. 4; Figura 1, p. 5).

Tabela 1: Constituintes de *Zanthoxylum* e atividades biológicas

| Substância*/Classe | Atividade | Ref. |
|---|------------------|---------------------------------|
| Atanina (I) (alcaloide quinolínico) | Anti-helmíntica | PARRETE & WITHFIELD, 1995 |
| Pteleina (II) (alcaloide quinolínico) | Antitumoral | MICHAEL 2008 |
| Esquimianina (III) (alcaloide quinolínico) | Leishmanicida | DOS SANTOS <i>et al.</i> , 2011 |
| Platidesmina (IV) (alcaloide quinolínico) | Antiviral | MICHAEL 2008 |
| Flindersine (V) (alcaloide quinolínico) | Antifúngica | MICHAEL 2008 |

*Figura 1

Tabela 1: Constituintes de *Zanthoxylum* e atividades biológicas (cont.)

| | | |
|---|---|--|
| Nitidina (VI) (alcaloide benzofenantridínico) | Antileucêmica | LEWIS, 1983 |
| Fagaronina (VII) (alcaloide benzofenantridínico) | Antileucêmica | LEWIS, 1983 |
| Queleritrina (VIII) (alcaloide benzofenantridínico) | Antibacteriana, antifúngica | WEBER., 2005 |
| 6-acetonildiidroavicina (IX) (alcaloide benzofenantridínico) | Antibacteriana, antifúngica | NISSANKA <i>et al.</i> , 2001 |
| 6-acetonildiidronitidina (X) (alcaloide benzofenantridínico) | Antibacteriana, antifúngica | AJITH <i>et al.</i> , 2001 |
| Cubebina(XI) (lignana) | Anti-inflamatória | BASTOS <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>trans</i> -metilpluviatolido(XII) (lignana) | Tripanocida | DA SILVA <i>et al.</i> , 2008 |
| Arctigenina(XIII) (lignana) | Antiviral | SCHRÖDER <i>et al.</i> , 1990 |
| Traquelogenina(XIV) (lignana) | Antiviral | SCHRÖDER <i>et al.</i> , 1990 |
| Quercetina(XV) (flavonoide) | Anti-inflamatória | XIONG <i>et al.</i> , 1995 |
| Rutina(XVI) (flavonoide) | Antioxidante e anti-inflamatória | GUARDIA <i>et al.</i> , 2001; XIONG <i>et al.</i> , 1995 |
| 3,5-diacetiltambulina (XVII) (flavonoide) | Antibacteriana | SINGH & SINGH, 2011 |
| Hesperidina(XVIII) (flavonoide) | Antibacteriana; anti-inflamatória | ALAPONT <i>et al.</i> , 2000; GALATI <i>et al.</i> , 1994 |
| Psoraleno (XIX) (cumarina) | Inibição de germinação, fototóxica | GRAY, 1978 |
| Bergapteno(XX) (cumarina) | Anti-inflamatória | SINGH & SINGH, 2011 |
| Xantotoxina(XXI) (cumarina) | Inibição de germinação, fototóxica | GRAY, 1978 |
| Aurapteno(XXII) (cumarina) | Inibidor de agregação plaquetária, ciotóxica | CHEN <i>et al.</i> , 1995; TANAKA <i>et al.</i> , 2000 |
| β -sitosterol(XXIII) (terpeno) | Gastroprotetora | NAVARRETE <i>et al.</i> , 2002 |
| Lupeol (XXIV) (terpeno) | Citotóxica, anti-inflamatória | GALLO & SARACHINE, 2009 |
| Lupenona (XXV) (terpeno) | Antiviral | AKIHISA <i>et al.</i> , 2001 |
| Friedelina(XXVI) (terpeno) | Anti-inflamatória | GEISSBERG <i>et al.</i> , 1991 |
| Linalol(XXVII) (terpeno) | Antifúngica; anti-inflamatória | SINGH & SINGH, 2011 |

*Figura 1

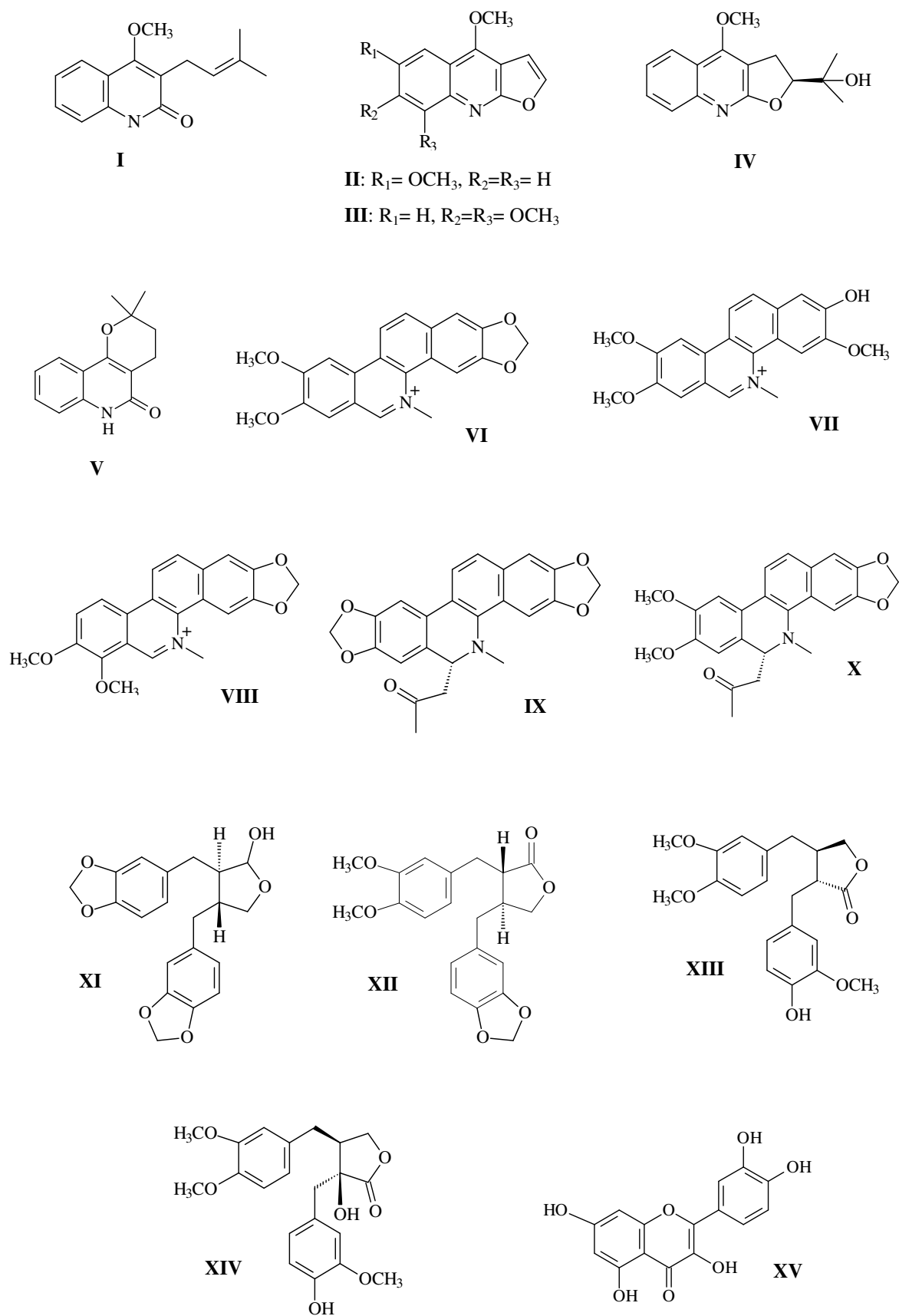


Figura 1. Estrutura das substâncias isoladas de *Zanthoxylum* (Tabela 1)

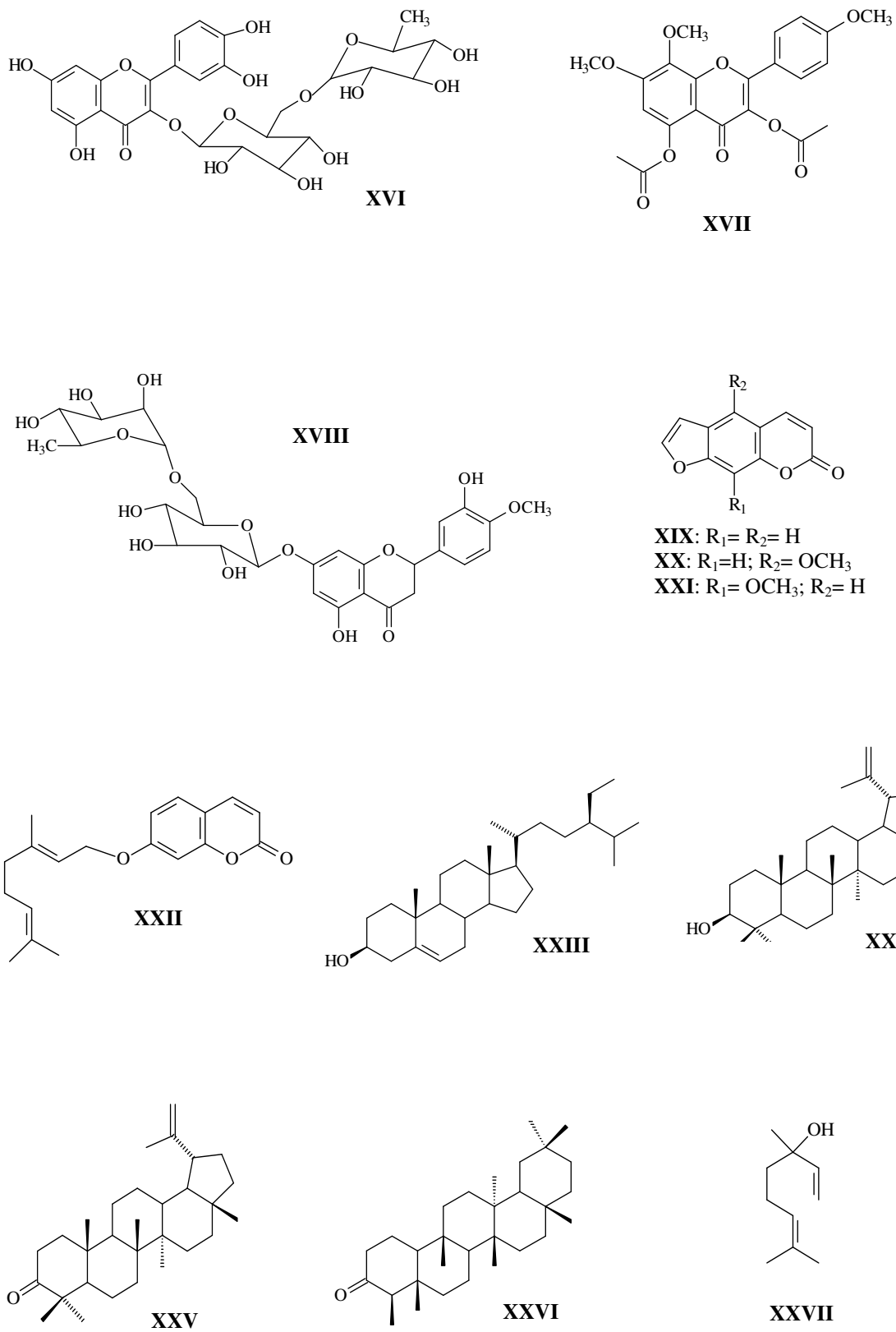


Figura 1. Estrutura das substâncias isoladas de *Zanthoxylum* (Tabela 1) (cont.)

3.1.1- Ciclopeptídeos

Ciclopeptídeos constituem um grupo bioativo especial de peptídeos cujos anéis foram gerados a partir de peptídeos acíclicos, com formação de uma amida, éster, elo com dissulfeto ou uma nova ligação carbono-carbono, carbono-nitrogênio, nitrogênio-oxigênio ou carbono-enxofre (POMILIO *et al.*, 2006).

Este tipo de peptídeos tem sido encontrado principalmente em plantas das seguintes famílias: Annonaceae, Caryophyllaceae, Linaceae, Rhamnaceae, Rubiaceae, e também em Araliaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Labiatae, Olacaceae, Rutaceae, Schizandraceae, Solanaceae e Violaceae (POMILIO *et al.*, 2006). Embora os estudos sobre funções e propriedades farmacológicas de peptídeos de origem animal e microbiana sejam expressivos, os peptídeos de origem vegetal ainda são pouco estudados. No Brasil, os primeiros trabalhos com peptídeos cíclicos de origem vegetal começaram a ser desenvolvidos recentemente (PICCHI *et al.*, 2009).

Peptídeos com cadeias lineares exibem características físico-químicas muito distintas quando comparados com os seus análogos ciclizados. A ciclização elimina as extremidades N- e C- terminal, que atuam como pontos de reconhecimento para ataque de enzimas proteolíticas, restringe a rotação das ligações e retém a conformação dessas moléculas, aumentando a afinidade e seletividade aos seus receptores (MORITA & TAKEYA, 2010). Geralmente estes compostos possuem atividade citotóxica, inseticida, antimalárica, sedativa, nematicida, antimicrobiana, imunossupressora e inibição enzimática (Tabela 2, p. 8; Figura 2, p. 8) (POMILIO *et al.*, 2006).

Os procedimentos de isolamento dos peptídeos vegetais são muito diferentes dos empregados para outras matrizes biológicas, pois a biomassa vegetal é complexa, composta por muitas outras classes de substâncias (pigmentos, açúcares, gorduras, taninos etc).

Picchi e colaboradores (2009) classificam os peptídeos cíclicos, formados por ciclização “cabeça-cauda” em ciclotídeos e euciclopeptídeos (2-12 ácidos aminados). Dados sobre as rotas biossintéticas dos produtos naturais tornam a classificação mais próxima da organização natural. Entretanto, poucas informações sobre a biossíntese da maior parte desses peptídeos de origem vegetal estão descritos na literatura (PICCHI *et al.*, 2009).

Os ciclopeptídeos podem ser formados por L- α -ácidos aminados e também pelo isômero D e ácidos aminados não-protéicos (POMILIO *et al.*, 2006). Aparentemente, os euciclopeptídeos encerram em sua estrutura apenas α -ácidos aminados, os quais podem sofrer modificações (metilação, hidroxilação e epimerização) ao longo da via biossintética. No entanto, o completo desconhecimento da biossíntese desses compostos é um complicador para as tentativas de classificação dos peptídeos cíclicos vegetais e também para estudos de manipulação genética (PICCHI *et al.*, 2009).

Algumas das características químicas dos euciclopeptídeos, como tamanho da cadeia peptídica, resíduos modificados e sua distribuição nas famílias vegetais, indicam que a sua síntese segue o esquema não-ribossomal, ou seja, ocorre via um complexo multienzimático com domínios distintos para cada resíduo da cadeia peptídica a ser formada (PICCHI *et al.*, 2009).

Tabela 2. Exemplos de ciclopeptídeos bioativos de plantas

| Ciclopeptídeo* | Espécie (Família) | Atividade | Ref. |
|--|---|-----------------------|-----------------------------------|
| Mahafaciclina A (XXVIII) | <i>Jatropha mahafalensis</i> (Euphorbiaceae) | Antimalárica | BARAGUEY <i>et al.</i> , 2000 |
| Integerrimida A (XXIX) | <i>Jatropha integerrima</i> (Euphorbiaceae) | Antitumoral | MONGKOLVISUT <i>et al.</i> , 2006 |
| Glaucaciclopeptídeo A (XXX) | <i>Annona glauca</i> (Annonaceae) | Citotóxica | WÉLÉ <i>et al.</i> , 2005 |
| Cicloesquamosina B (XXXI) | <i>Annona squamosa</i> (Annonaceae) | Vasorelaxante | MORITA & TAKEYA, 2010 |
| Astina A (XXXII) | <i>Aster tartaricus</i> (Asteraceae) | Antitumoral | MORITA & TAKEYA, 2010 |
| Astina B (XXXIII) | <i>Aster tartaricus</i> (Asteraceae) | Antitumoral | MORITA & TAKEYA, 2010 |
| Segetalina G (XXXIV) | <i>Vaccaria segetalis</i> (Caryophyllaceae) | Vasorelaxante | MORITA & TAKEYA, 2010 |
| Diantina A (XXXV) | <i>Dianthus superbus</i> (Caryophyllaceae) | Citotóxica | PICCHI <i>et al.</i> , 2009 |
| Ciclolinopeptídeo A (XXXVI) | <i>Linum usitatissimum</i> (Linaceae) | Imunossupres- sora | MORITA & TAKEYA, 2010 |
| Ciclolinopeptídeo B (XXXVII) | <i>Linum usitatissimum</i> (Linaceae) | Imunossupres- sora | MORITA & TAKEYA, 2010 |
| Ciclonatsudamina (XXXVIII) | <i>Citrus natsudaidai</i> (Rutaceae) | Vasodilatadora | MORITA & TAKEYA, 2010 |

*Figura 2

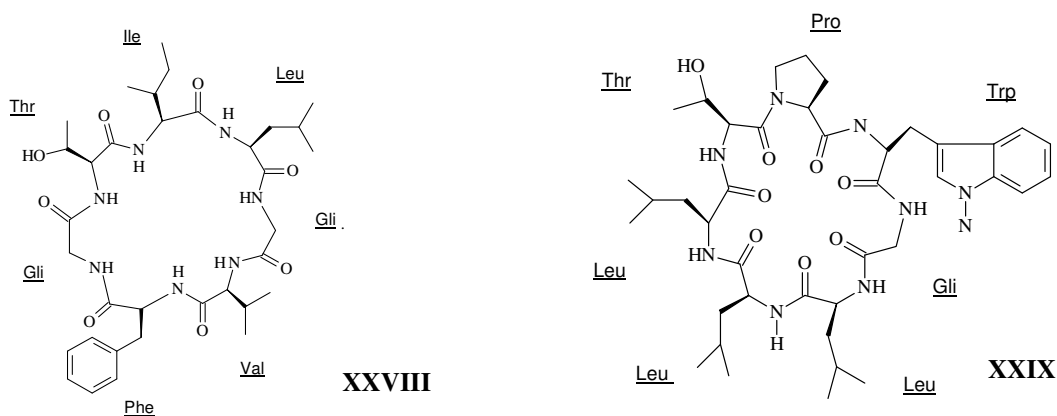


Figura 2. Estruturas de ciclopeptídeos bioativos de plantas (Tabela 2)

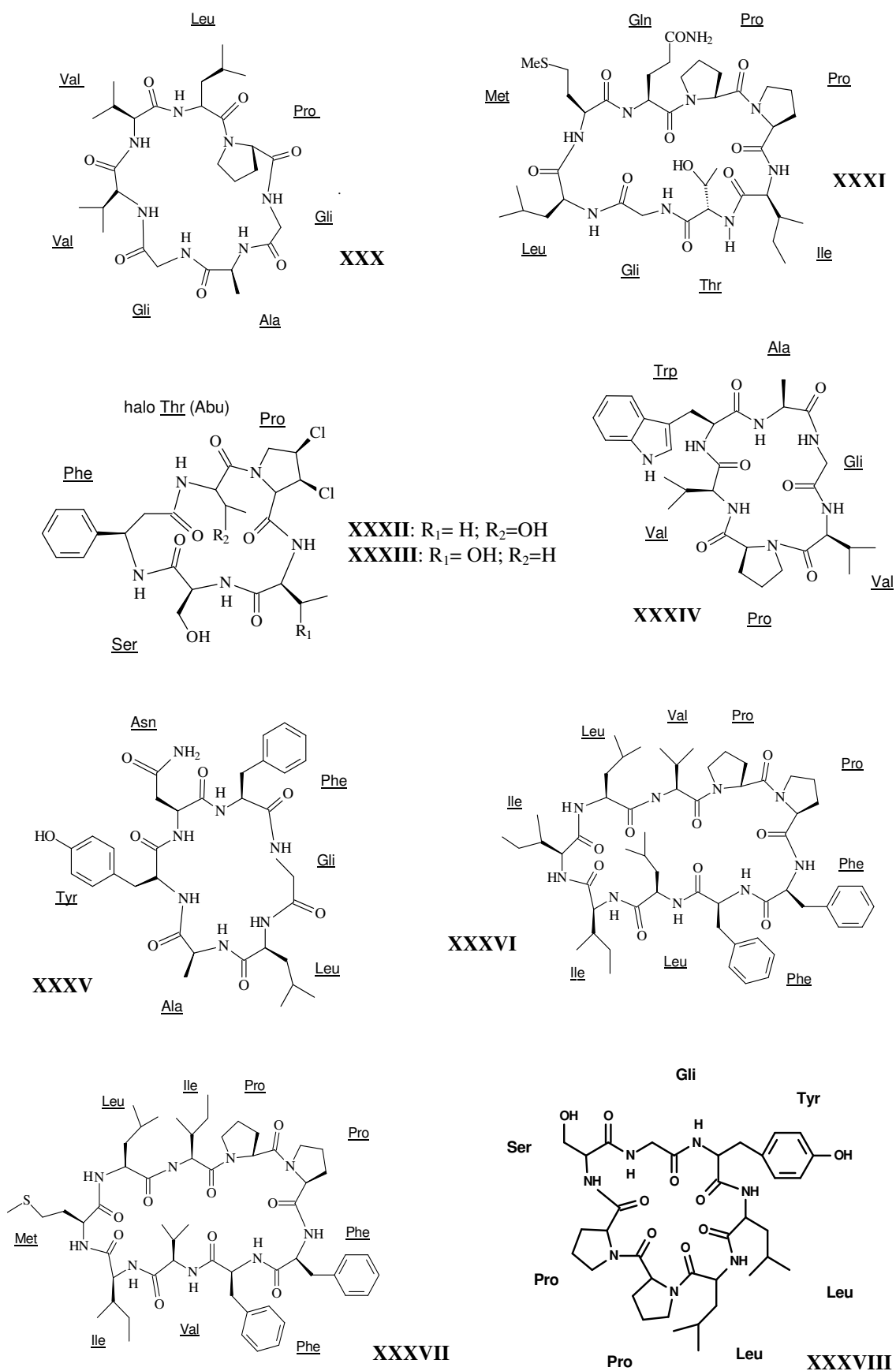


Figura 2. Estruturas de ciclopeptídeos bioativos de plantas (Tabela 2) (cont.)

3.1.2- Ciclopeptídeos de Rutaceae

Na família Rutaceae os ciclopeptídeos estão relatados apenas nos gêneros *Citrus*, *Evodia*, *Clausena* e *Zanthoxylum* (descrito neste trabalho). De várias espécies de *Citrus* isolaram-se cliclonatsudamina (**XXXVIII**) e citrusinas I a X (**XXXIX-XLVIII**) (MORITA *et al.*, 2010); de *Evodia xanthoxyloide*, evolidina (**XLIX**) (EGGLESTON *et al.*, 1991); de *Clausena anisum-olens* clausenaina I (**L**) (WANG *et al.*, 2005) e clausenaina B (**LI**) (WANG *et al.*, 2009); de *Zanthoxylum rigidum* um novo ciclopeptídeo denominado ciclozanthoxylano A (**LII**), isolado das folhas desta espécie e relatado neste trabalho (Figura 3, p. 10; item 4.2.4, p. 21; item 5.2.8, p. 91) (RIBEIRO *et al.*, 2012).

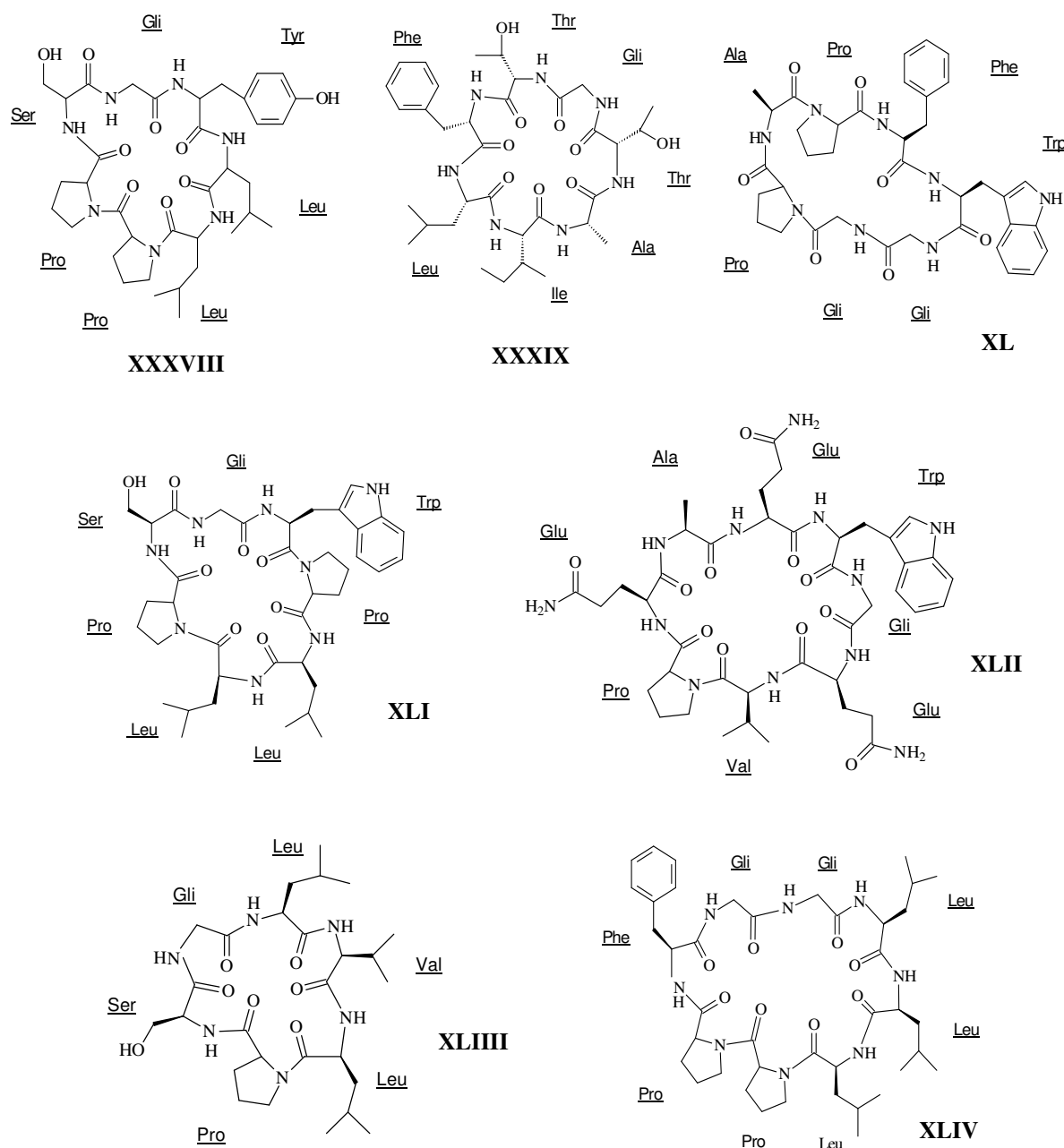


Figura 3. Estruturas de ciclopeptídeos de Rutaceae

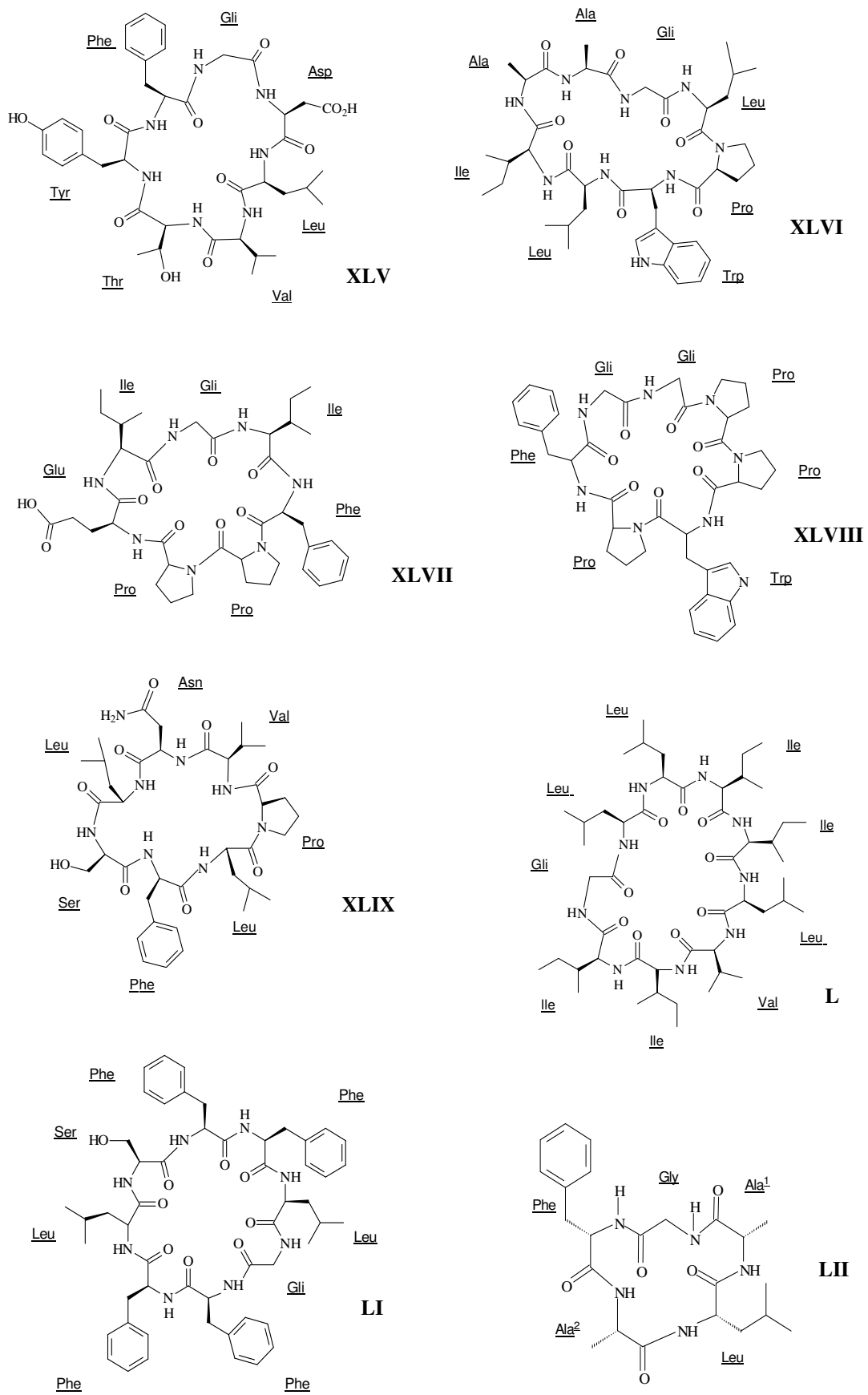


Figura 3. Estruturas de ciclopeptídeos de Rutaceae (cont.)

3.2- Considerações sobre a família Ochnaceae e o gênero *Luxemburgia*

A família Ochnaceae é constituída por cerca de 40 gêneros e 600 espécies de árvores ou arbustos, distribuídas por zonas tropicais e subtropicais no mundo (HEYWOOD, 1978). A mesma tem espécies que são utilizadas como medicinais em varios países africanos no tratamento de infecções respiratórias, dor de cabeça, disenteria, desordens gástricas e úlceras (PEGNYEMB *et al.*, 2005; BANDI *et al.*, 2012).

Estudos químicos demonstram que espécies desta família são capazes de biossintetizar flavonoides e biflavonoides, sendo os gêneros *Ochna*, *Lophira*, *Luxemburgia* e *Ouratea* os mais estudados. A frequência e a diversidade estrutural dos biflavonoides em espécies desses gêneros permitem que sejam utilizados como marcadores taxonômicos. *Luxemburgia* é próximo aos gêneros *Ochna* e *Lophira*, os quais metabolizam com frequência os dímeros de chalconas, enquanto que *Ouratea* tem tendência em metabolizar os dímeros de flavonas (SUZART *et al.*, 2007a).

O gênero *Luxemburgia* é exclusivamente brasileiro e constituído por 18 espécies (FERES, 2001), e apenas as espécies *L. nobilis* e *L. octandra* apresentam algum tipo de estudo químico ou biológico descrito na literatura. Na Tabela 3 (p. 13) são mostradas as substâncias isoladas e as referências relacionadas às estruturas químicas destas espécies (Figura 4, p. 15).

Com relação às atividades biológicas, há também escassez de dados sobre o gênero e apenas algumas foram testadas. Os extratos AcOEt e EtOH das folhas de *L. octandra* foram avaliados o seu potencial anti-helmíntico em camundongos infectados com *Aspiculures tetraptera* e *Vampirolepis nana*. Ambos apresentaram aumento na eliminação de cestoide de 34,4 e 38,5%, respectivamente, sobre *V. nana*, mas o efeito não foi observado sobre *A. tetraptera*. (CUNHA E SILVA *et al.*, 2005). O biflavonoide 2'', 3''-diidrochnaflavona (LXXIV) exibiu citotoxicidade contra carcinoma de Erlich, células de leucemia humana K562 e inibição das DNA topoisomerasas I e II- α . Os derivados metilado e acetilado deste biflavonoide também mostraram atividade frente às DNA topoisomerasas (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Outro biflavonoide, a luchenchalcona (LXXX), revelou atividade citotóxica em células cancerígenas de cólon, rins, mama, ovário e pulmão (DANIEL *et al.*, 2007). Flavonoides isolados de flores de *L. octandra* (LXXIV, LXXXI- LXXXIV) foram avaliados frente à atividade anti-inflamatória de edema de orelha em ratos. Os flavonoides LXXXI e LXXXII mostraram boa atividade com inibição de 59,8 e 55,6 %, respectivamente (DA SILVA *et al.*, 2011).

Dando continuidade aos estudos com a espécie *L. nobilis*, foram coletadas as raízes e folhas da mesma para este trabalho.

Tabela 3: Constituintes químicos isolados de *L. nobilis* e *L. octandra*

| Espécie | Substância | Parte | Ref. |
|------------------------------------|--|--------------------------------|--|
| <i>L. nobilis</i> | Ácido hexadecanoico (LIII) | galhos | DE CARVALHO <i>et al.</i> 2000 |
| | Ácido eicosanoico (LIV) | folhas | DE OLIVEIRA <i>et al.</i> 2002 |
| | Ácido tetraeicosanoico (LV) | galhos/ folhas | DE CARVALHO <i>et al.</i> 2000; DE OLIVEIRA <i>et al.</i> 2002 |
| | Ácido hexaeicosanoico (LVI) | galhos | DE CARVALHO <i>et al.</i> 2000 |
| | Ácido linoléico (LVII) | galhos | DE CARVALHO <i>et al.</i> 2000 |
| | 14-metilpentadecanoato de metila (LVIII) | galhos | DE CARVALHO <i>et al.</i> 2000 |
| | 2,3-dihexadecanoil-1- <i>cis</i> , <i>cis</i> -8, 11-eicosadienoil glicerol (LIX) | galhos | DE CARVALHO <i>et al.</i> 2000 |
| | 2,3-dihexadecanoil-1- <i>cis</i> , <i>cis</i> -6, 9-octadecadienoil glicerol (LX) | galhos | DE CARVALHO <i>et al.</i> 2000 |
| | Óxido de 13-epimonoila (LXI) | galhos | DE CARVALHO <i>et al.</i> 2000 |
| | Atranorina (LXII) | galhos | DE CARVALHO <i>et al.</i> 2000 |
| | β -sitosterol (LXIII) | galhos/ folhas/ raízes* | DE CARVALHO <i>et al.</i> 2000; DE OLIVEIRA <i>et al.</i> 2002; RIBEIRO <i>et al.</i> 2010 |
| | Estigmasterol (LXIV) | galho/ raízes* | DE CARVALHO <i>et al.</i> 2000; RIBEIRO <i>et al.</i> 2010 |
| | Campesterol (LXV) | raízes* | RIBEIRO <i>et al.</i> 2010 |
| | β -sitostenona (LXVI) | raízes* | RIBEIRO <i>et al.</i> 2010 |
| | Ácido betulínico (LXVII) | galhos | DE CARVALHO <i>et al.</i> 2000 |
| | 3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosil sitosterol (LXVIII) | galhos/ raízes* | DE OLIVEIRA <i>et al.</i> 2002 RIBEIRO <i>et al.</i> 2010 |
| | Friedelina (LXIX) | folhas | DE OLIVEIRA <i>et al.</i> 2002 |
| | Friedelinol (LXX) | folhas | DE OLIVEIRA <i>et al.</i> 2002 |
| | Lupeol (LXXI) | galhos | DE OLIVEIRA <i>et al.</i> 2002 |
| α -amirina (LXXII) | galhos | DE OLIVEIRA <i>et al.</i> 2002 | |
| β -amirina (LXXIII) | galhos | DE OLIVEIRA <i>et al.</i> 2002 | |

*obtido neste trabalho

Tabela 3: Constituintes químicos isolados de *L. nobilis* e *L. octandra*.(cont.)

| Espécie | Substância | Parte | Ref. |
|--------------------|---|-------------------|--|
| <i>L. nobilis</i> | 2'',3''-diidrochnaflavona (LXXIV) | folhas | DE OLIVEIRA <i>et al.</i> 2002 |
| | Amentoflavona (LXXV) | folhas | DE OLIVEIRA <i>et al.</i> 2002 |
| | Robustaflavona (LXXVI) | folhas | DE OLIVEIRA <i>et al.</i> 2002 |
| | Epicatequina (LXXVII) | galhos | DE OLIVEIRA <i>et al.</i> 2002 |
| | Isoliquiritigenina (LXXVIII) | galhos | DE OLIVEIRA <i>et al.</i> 2002 |
| | 3'-hidroxiisoliquiritigenina (LXXIX) | galhos | DE OLIVEIRA <i>et al.</i> 2002 |
| | Rutina (LXXX) | galhos | DE OLIVEIRA <i>et al.</i> 2002 |
| | Lophirona B (LXXXI) | raízes* | RIBEIRO <i>et al.</i> 2010 |
| | Lophirona K (LXXXII) | raízes* | MENDONÇA <i>et al.</i> 2011 |
| <i>L. octandra</i> | β-sitosterol (LXIV) | galhos | DE CARVALHO <i>et al.</i> 2004 |
| | Estigmasterol (LXV) | galhos | DE CARVALHO <i>et al.</i> 2004 |
| | Lupeol (LXXI) | galhos | DE CARVALHO <i>et al.</i> 2004 |
| | Ácido betulínico (LXVII) | galhos | DE CARVALHO <i>et al.</i> 2004 |
| | 2'',3''-diidrochnaflavona (LXXIV) | folhas/ flores | DE CARVALHO <i>et al.</i> 2004; DA SILVA <i>et al.</i> 2011 |
| | Isoliquiritigenin (LXXVIII) | folhas | DE CARVALHO <i>et al.</i> 2004 |
| | 3'-hidroxiisoliquiritigenina (LXXIX) | folhas | DE CARVALHO <i>et al.</i> 2004 |
| | Luxenchalcona (LXXXIII) | galhos | DE CARVALHO <i>et al.</i> 2004 |
| | Orientina (LXXXIV) | flores | DA SILVA <i>et al.</i> 2011 |
| | 7-O-metilorientina (LXXXV) | flores | DA SILVA <i>et al.</i> 2011 |
| | 2''-O-glucosídeo orientina (LXXXVI) | flores | DA SILVA <i>et al.</i> 2011 |
| | Catequina (LXXXVII) | flores | DA SILVA <i>et al.</i> 2011 |

*obtido neste trabalho

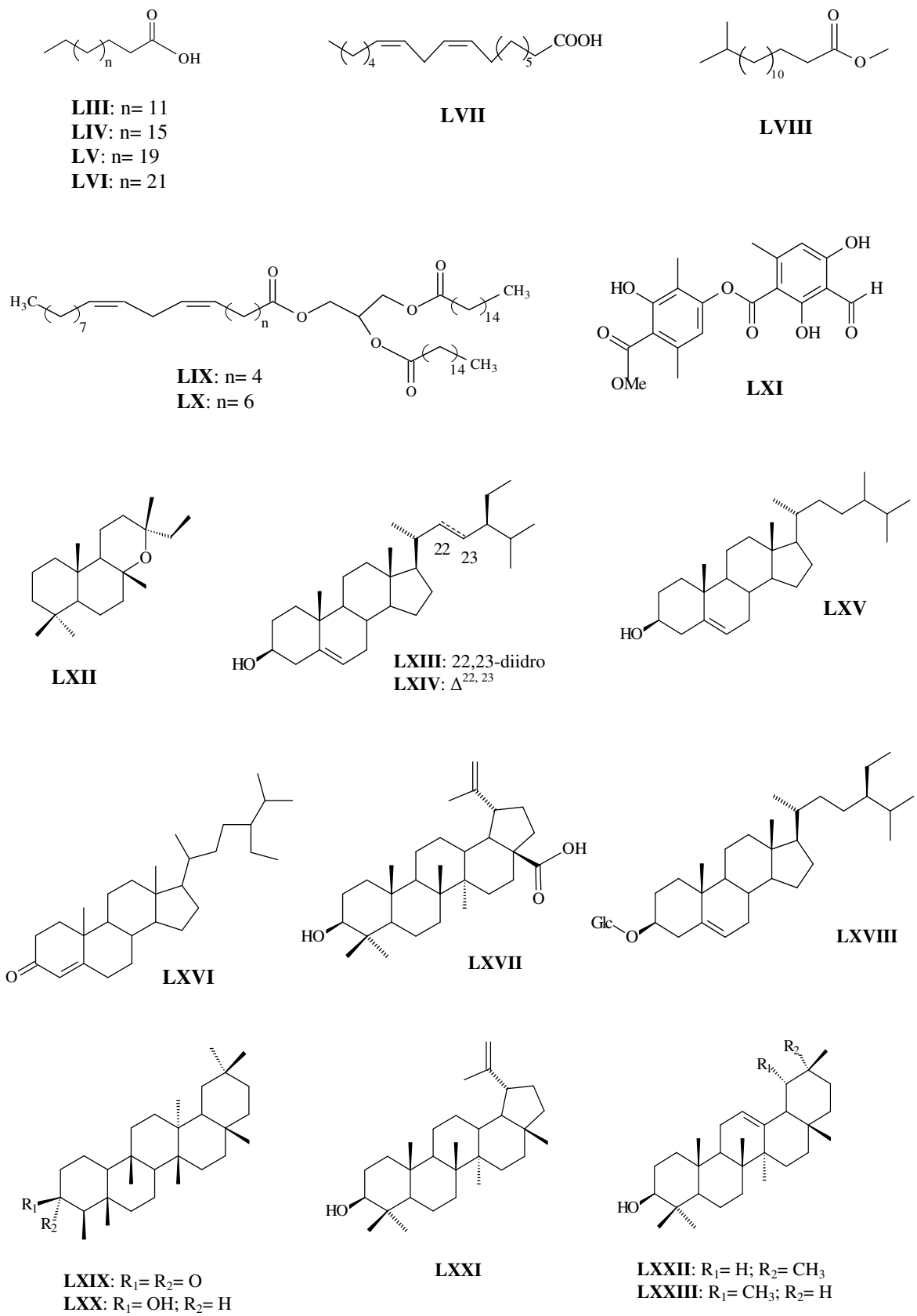


Figura 4. Estruturas das substâncias isoladas de *L. nobilis* e *L. octandra* (Tabela 2)

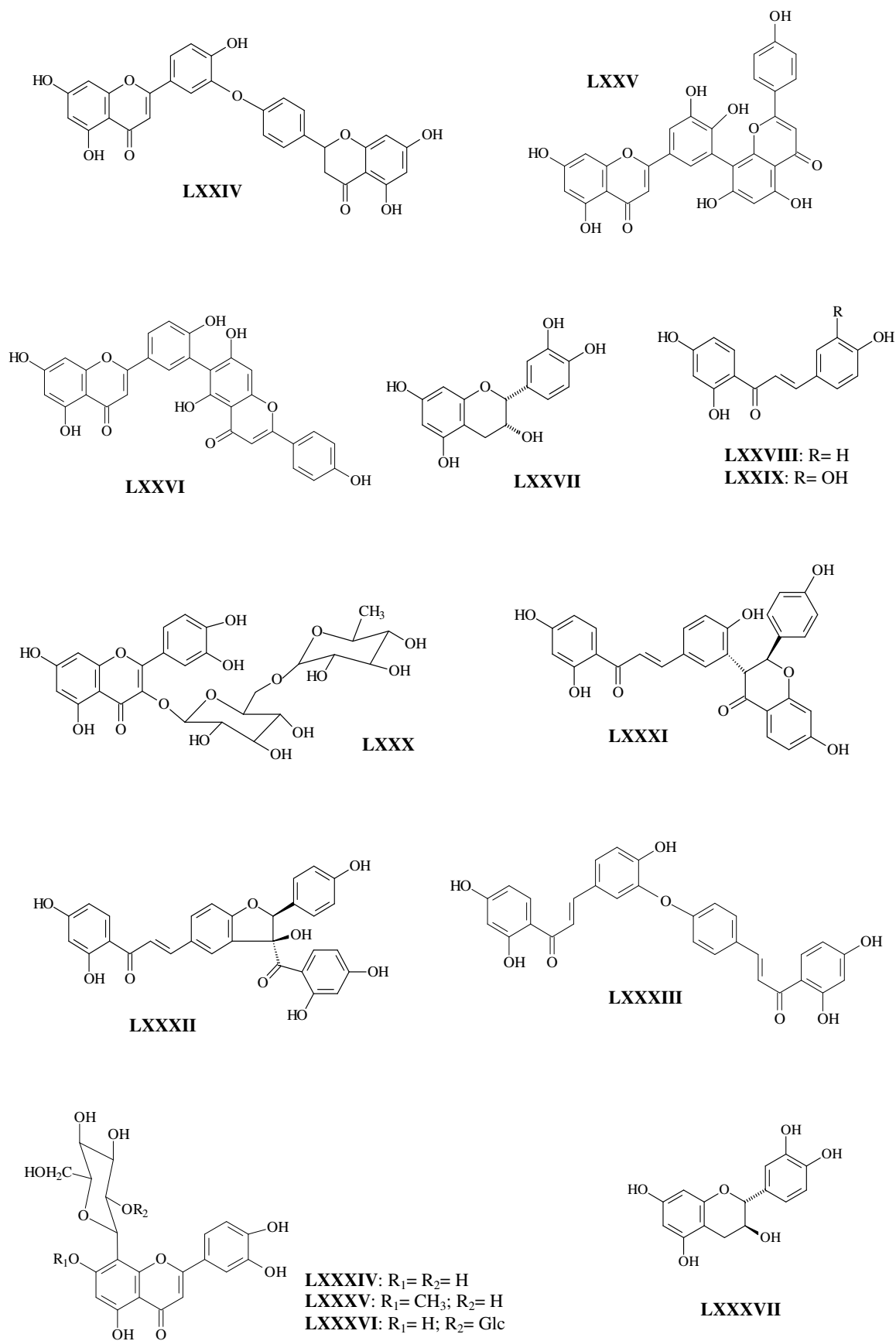


Figura 4. Estruturas das substâncias isoladas de *L. nobilis* e *L. ctandra* (Tabela 2) (cont.)

4- EXPERIMENTAL

4.1. Reagentes e equipamentos

As análises em cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas em cromatofolhas de alumínio 20x20 cm com gel de sílica 60 F254, da Merck ou Whatman. As substâncias foram visualizadas através de irradiação com lâmpada ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm e/ou reveladas com os seguintes reagentes cromogênicos: vanilina sulfúrica; vapores de iodo; reagente de Dragendorff (para alcalóides), solução de $\text{AlCl}_3\text{-EtOH}$ 1% (para compostos fenólicos);

Para reação de determinação da configuração absoluta foram utilizados reagente de Marfey, D-alanina, D-leucina e D-fenilalanina da Sigma-Aldrich, e glicina, L-alanina, L-leucina e L-fenilalanina da Vetec.

Para cromatografia em coluna foi usada como fase estacionária gel de sílica 70–230 mesh, e para cromatografia em coluna rápida (flash) foi usada gel de sílica 230-400 mesh, ambas das marcas Vetec e Silicycle. A cromatografia radial preparativa (Chromatotron®) foi realizada empregando-se gel de sílica 60 PF 254, da Merck, com espessura de 1 mm.

Os solventes e reagentes utilizados foram de grau P.A. das marcas Vetec e Isobar.

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho Mel–Temp II do Laboratory devices U.S.A., utilizando capilar, sem correção dos valores.

Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro FT-IR modelo VERTEX 70 da Bruker em pastilhas de KBr.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono-13 (RMN ^{13}C), incluindo experimentos em 2D, foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance II-400 (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C) e Bruker Avance II-500 (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C). Os solventes utilizados foram clorofórmio deuterado (CDCl_3), metanol deuterado (D_3COD) e dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$), acetona deuterada (D_3CCOCD_3) e como referência interna o tetrametilsilano (TMS) ou resíduo do solvente utilizado. Os deslocamentos químicos (δ) são indicados em ppm e as constantes de acoplamentos (J) em Hertz (Hz).

As análises por CLAE foram realizadas em equipamento Shimadzu Prominence LC-20AT, equipado com detector de conjunto fotodiodos (DAD), coluna C-18 (4.6 x 250 mm, 5 μm ; Thermo); UV data (λ em nm); t_R em minuto (min.).

Os espectros de massas foram registrados em um cromatógrafo com fase gasosa, acoplado a um espectrômetro de massas com ionização por impacto de elétrons (70 eV) das marcas Varian, modelo Saturn 2000 e Shimadzu QP2010 Plus. Os espectros de dicroísmo circular (DC) foram obtidos em espectropolarímetro J-815 Circular Dichroism da JASCO.

As análises em CL-EM-IES foram realizadas na UFC, no Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste (LEMANOR) em aparelho Shimadzu CL-EM-TDV equipado com fonte de ionização de elétron-spray e no equipamento da USP de Ribeirão Preto, no Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais e Sintéticos em aparelho Bruker Daltonics.

4.2- Material vegetal de *Zanthoxylum rigidum*

As folhas, caules, frutos de *Zanthoxylum rigidum* (Figura 5, p. 21) foram coletadas na Fazenda Nossa Senhora de Fátima, localizada na estrada Poconé-Porto Cercado, km 8, município de Poconé/MT, no dia 11/06/2008. A ratificação taxonômica foi realizada pela Dra. Rosilene Rodrigues Silva, responsável pelo Herbário Central da Universidade Federal do Mato Grosso, onde está depositada uma exsicata de nº 38648.



Figura 5. Foto de *Zanthoxylum rigidum* (fonte: autora)

4.2.1- Preparação e fracionamento dos extratos brutos de *Zanthoxylum rigidum*

Após secagem de todo material botânico, o mesmo foi triturado e submetido separadamente a extração através de maceração com solvente. Os solventes das extrações foram concentrados em evaporador rotatório a 40°C, sob pressão reduzida, para obtenção dos extratos.

Os frutos (210 g) foram extraídos com etanol, em maceração a frio, obtendo-se o **ZRFRE** (13,57 g). As folhas (1300 g) foram extraídas com hexano e posteriormente MeOH, em aparelho de Soxhlet, obtendo-se respectivamente os extratos **ZRFLH** (46,59 g) e o **ZRFLM** (170,94 g). Os galhos (2700 g) foram extraídos com MeOH, e posteriormente com a mistura MeOH/H₂O (8:2), também em maceração a frio, obtendo-se, respectivamente, os extratos **ZRGM** (156,80 g) e **ZRGMH** (98,10 g).

4.2.2- Fracionamento do extrato ZRFRE (extrato etanólico dos frutos)

O extrato **ZRFRE** (10,0 g) foi suspenso em 50 mL da mistura EtOH/H₂O (7:3) e submetido a partição líquido-líquido com os solventes hexano, CHCl₃ e AcOEt, obtendo-se as respectivas frações: hexano- **ZRFREH** (2,1 g), CHCl₃- **ZRFREC** (1,6 g), AcOEt- **ZRFREA** (0,4 g), além do resíduo hidrometanólico- **ZRFREResíduo** (4,6 g) (Esquema 1, p. 20).

A fração **ZRFREH** (1,9 g) foi submetido a fracionamento em CC com gel de sílica e eluída com gradientes de hexano/CHCl₃ e CHCl₃/MeOH, sendo obtidas 148 frações de 10 mL.

As frações 1-3 (24 mg), obtidas como um ppt branco de aspecto ceroso, reunidas após análises por CCDA, foram identificadas através de CG-EM, como uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos, tendo como componentes majoritários o heptacosano (**1A**), octacosano (**1B**), nonacosano (**1C**), o triacontano (**1D**) e o hentriacontano (**1E**). As frações 4-6 (30 mg), também obtidas como um ppt branco de aspecto ceroso, reunidas após análises por CCDA, foram identificadas através de CG-EM, contendo majoritariamente uma mistura dos ésteres hexadecanoato de octila (**1F**) e acetato de tetradecanoila (**1G**), e dos hidrocarbonetos heptacosano (**1A**) e nanocosano (**1C**).

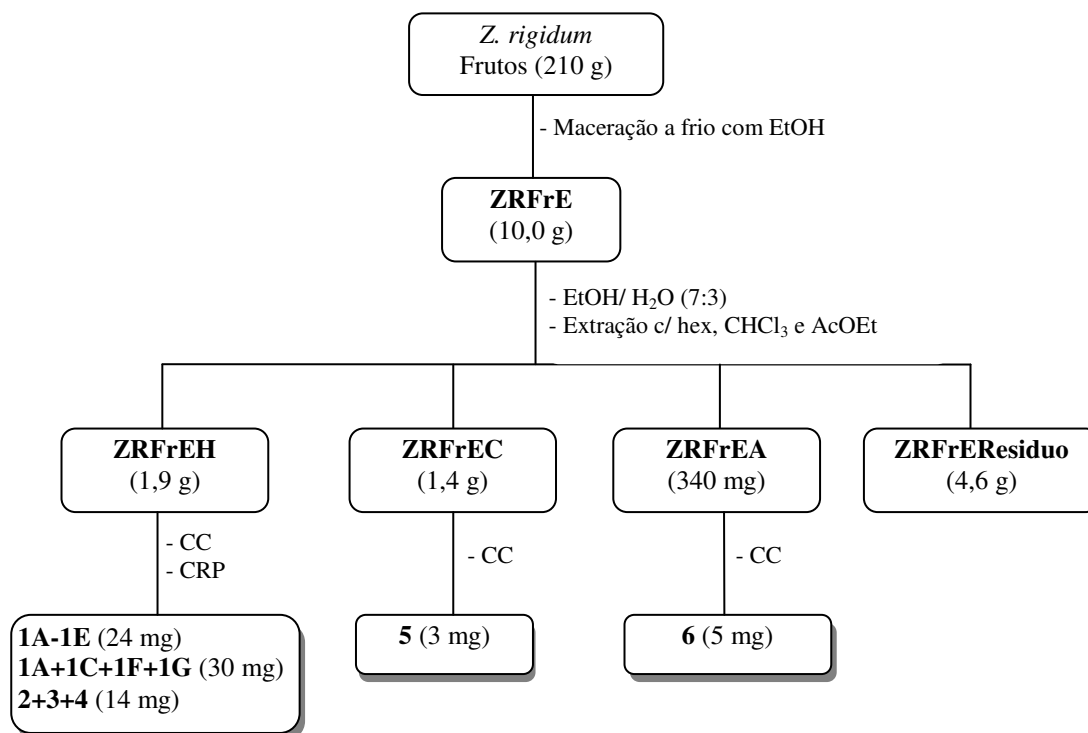
O grupo de frações 30-62 (600 mg) foi fracionada em CC com gel de sílica e eluída com hexano/CHCl₃ (gradiente), CHCl₃/AcOEt (gradiente), AcOEt/MeOH (1:1) e MeOH (100%), sendo recolhidas 127 frações de 10 mL. As frações 51-60 (90 mg), desta última coluna, foi submetida a cromatografia radial preparativa, sendo utilizado como eluentes CHCl₃, CHCl₃/AcOEt (9,5:0,5), (9:1), (8:2). Foram recolhidas 38 frações de 10 mL. As frações 16 a 22 (14 mg), reunidas após CCDA, apresentaram-se como um sólido branco, o qual foi submetido a análises espectroscópicas de IV, RMN de ¹H e ¹³C (BBD e DEPT) e determinação do ponto de fusão (p.f.) e identificada como a mistura dos esteróides β-sitosterol (**2**), estigmasterol (**3**) e campesterol (**4**).

A fração **ZRFREC** (1,4 g) foi fracionada em CC com gel de sílica e eluída em polaridade crescente com CHCl₃/AcOEt e AcOEt/MeOH, obtendo-se 180 frações de 15 mL.

As frações 127-154 (340 mg) foi novamente fracionada em CC com gel de sílica eluída com CHCl₃/MeOH em polaridade crescente, obtendo-se 55 frações de 10 mL. Na fração 16 (15 mg) houve formação de um precipitado branco, que foi lavado com MeOH, obtendo-se a 3 mg da saponina 3-*O*-β-D-glicopiranosil-sitosterol (**5**), identificada por análises espectroscópicas de IV, RMN de ¹H e ¹³C (BBD e DEPT).

A fração **ZRFREA** (340 mg) foi fracionado em CC com gel de sílica, eluída em polaridade crescente com CHCl₃/MeOH, coletando-se 94 frações de 10 mL. As frações 5-45 (131 mg) foram novamente fracionadas em CC com gel de sílica flash, eluída em polaridade crescente com CHCl₃/AcOEt e AcOEt/MeOH, obtendo-se 41 frações de 10 mL.

As frações 19-26 (70 mg) foi fracionada em CC com gel de sílica flash, eluída em polaridade crescente com CHCl₃/AcOEt, coletando-se 40 frações de 10 mL. As frações 17-18 (8 mg) foi filtrada em gel de sílica flash com os eluentes CHCl₃, CHCl₃/MeOH (9:1), (8:2), (7:3) e (1:1), respectivamente, sendo recolhidas 18 frações de 8 mL. A fração 8, após a evaporação do solvente, resultou em 5 mg de um sólido incolor em forma de agulhas, que depois de análises espectroscópicas de RMN de ¹H e ¹³C (BBD e DEPT) e HSQC foi identificado como a hidroquinona 4-hidroxifenil-β-D-glicopiranosídeo, também conhecida como arbutina (**6**).

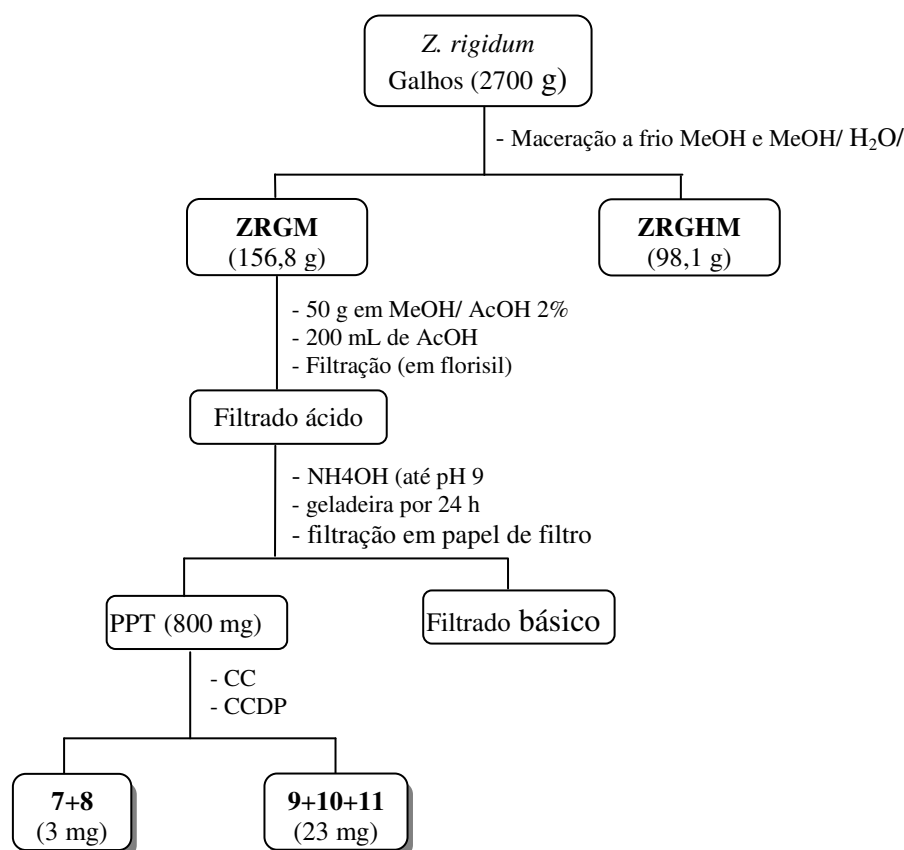


Esquema 1. Procedimento geral de fracionamento dos frutos de *Z. rigidum*

4.2.3- Fracionamento do ZRGM (extrato metanólicos dos galhos)

O extrato **ZRGM** (50,0 g) foi solubilizado em 200 mL da solução de MeOH/AcOH 2%, sendo adicionado mais 200 mL de solução aquosa de AcOH 10%. Essa mistura foi deixada em repouso na geladeira e depois filtrada à vácuo com uma camada de florisil. Como houve retenção de material no florisil, foram passados os solventes hexano, CH₂Cl₂ e MeOH, cada um recolhido separadamente. O filtrado ácido foi alcalinizado com NH₄OH até pH 9 e deixado em repouso na geladeira por uma noite. O precipitado formado (**ZRGMppt**) foi separado por filtração. Esta extração foi efetuada com objetivo de obtenção de alcaloides, isto porque as análises por CCDA do extrato, quando reveladas com reagente de Dragendorff apresentaram manchas alaranjadas, indicando a presença de alcaloides no mesmo.

O **ZRGMppt** (800 mg) foi fracionado em CC com gel de sílica e eluída com CHCl₃/MeOH com aumento gradual de polaridade, da qual foram coletadas 118 frações de 10 mL. As frações 4-19 (183 mg) foram novamente fracionadas em CC com os solventes DCM/AcOEt (gradiente) e AcOEt/MeOH (9:1) e (7:3), sendo coletadas 36 frações de 15 mL. As frações 17-35 (57 mg) foram submetidas a CCDP no sistema CH₂Cl₂/AcOEt (9:1) sendo recolhidas duas faixas denominadas Fx. 2 e Fx. 4 (23 mg). A Fx.2 (3 mg) após análises por RMN 1D e 2D foi identificada como sendo a lignana dimetilmatairesinol (**7**). A análise por CG-EM mostrou, ainda, a presença de mais uma substância com o mesmo padrão de fragmentação, a qual foi identificada como a lignana 3'', 4''-dimetoxibenzil-3', 4', 5'-trimetoxibenzilbutirolactona (**8**). A Fx.4 (23 mg) após análises por RMN 1D e 2D foi identificada como sendo a lignana *trans*-metilpluviatolido (**9**). A análise por CG-EM desta amostra demonstrou, ainda, a presença de mais duas lignanas: a *cis*-metilpluviatolido (**10**) e a kaerofilina (**11**) (Esquema 2, p. 21).



Esquema 2. Procedimento geral de fracionamento dos galhos de *Z. rigidum*

4.2.4- Fracionamento do extrato ZRFLM (extrato metanólico das folhas)

Uma parte do extrato **ZRFLM** (100,0 g) foi suspenso em 400 mL da mistura MeOH/H₂O (7:3) e submetido a partição líquido-líquido com os solventes hexano, CHCl₃ e AcOEt, obtendo-se as respectivas frações: hexano-**ZRFLMH** (35,8 g), CHCl₃-**ZRFLMC** (1,7 g), AcOEt- **ZRFLMA** (3,1 g), além do resíduo hidrometanólico-**ZRFLMResíduo** (58,1g) (Esquema 3, p. 22).

A fração **ZRFLMC** (1,5 g) foi fracionada em CC com gel de sílica, eluída com DCM/AcOEt e AcOEt/MeOH (gradiente), sendo coletadas 68 frações de 50 mL. As frações 5-6 (80 mg) foram fracionadas em gel de sílica, eluída com DCM/AcOEt (gradiente), sendo coletadas 24 frações de 50 mL. As frações 4-8 (30 mg) foram submetidas a CC em gel de sílica, eluída com DCM/MeOH (gradiente), sendo coletadas 27 frações de 10 mL. Nas frações 13-19 (6 mg), após evaporação do solvente houve formação de um precipitado branco, que após análises de RMN 1D, 2D e CG-EM, foi identificado como uma mistura das substâncias (*E*)-4-hidroxicinamato de metila (**12**), (*Z*)-4-hidroxicinamato de metila (**13**), 4-hidroxibenzoato de metila (**14**) e 4-hidroxifenilacetato de metila (**15**).

A fração 11 (5 mg) foi filtrada em CC com gel de sílica, com o eluente CHCl₃/MeOH (95:5), coletando-se 10 frações de 10 mL. Nas frações 7-8 (3 mg), após evaporação do solvente, obteve-se um sólido levemente esverdeado, que após análise de RMN 1D, 2D e CG-EM, foi identificado como uma mistura das lignanas e *trans* e *cis*-metilpluviatolido (**11+12**).

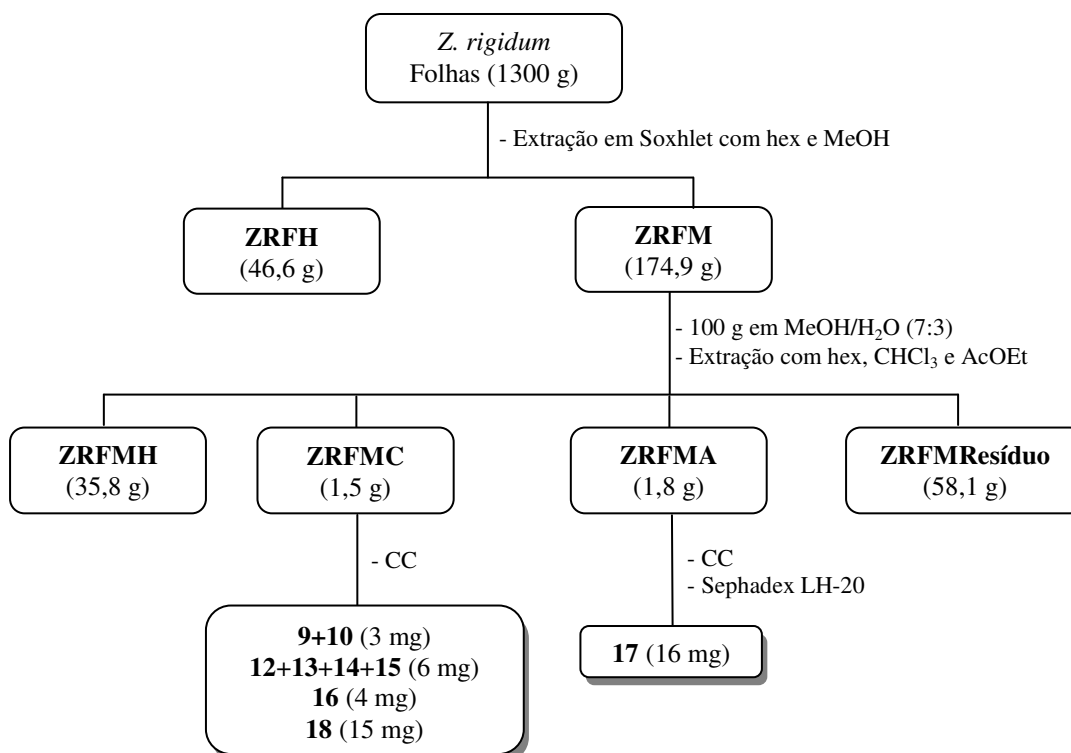
As frações 44-47 (526 mg) foram fracionadas em gel de sílica, eluída com DCM/MeOH (gradiente), sendo coletadas 50 frações de 50 mL. Nas frações 9 e 10, após evaporação do solvente, houve a formação de um ppt branco. Essas frações foram solubilizadas em MeOH e o ppt branco obtido (4 mg), após análises de RMN 1D, 2D e CL-EM foi identificado como um novo ciclopeptídeo, denominado ciclozanthoxylano A (**16**).

A fração **ZRFLMA** (1,8 g) foi fracionada em CC com gel de sílica, eluída com CHCl₃/AcOEt e AcOEt/MeOH (gradiente), sendo coletadas 168 frações de 10 mL.

As frações 74-86 (523 mg) foram fracionadas em CC com gel de sílica, eluída com CHCl₃/MeOH (gradiente), sendo coletadas 97 frações de 15 mL. As frações 59-76 (219 mg), provenientes desta última CC, foram fracionadas também em CC com gel de sílica, eluída com CHCl₃/MeOH (gradiente), sendo coletadas 73 frações de 10 mL. As frações 17-26 (47 mg) foram purificadas em CC com sephadex LH-20 e eluída com MeOH, obtendo-se 4 frações de 10 mL. A fração 4 (16 mg) resultou em um sólido amarelo, que após análise de RMN 1D e 2D, foi identificado como o flavonoide isoquercetina (**17**).

Outra parte do extrato **ZRFLM** (60,0 g) foi suspenso em 300 mL da mistura MeOH/H₂O (7:3) e submetido a partição líquido-líquido com os solventes hexano, CHCl₃ e AcOEt, obtendo-se as respectivas frações: hexano-**ZRFLMH-2** (15,4 g), CHCl₃-**ZRFLMC-2** (6,4 g), AcOEt- **ZRFLMA-2** (0,9 g), além do resíduo hidrometanólico-**ZRFLMResíduo-2** (36,1 g).

A fração **ZRFLMC-2** (6,0 g) foi fracionada em CC com gel de sílica, eluída com DCM/AcOEt e AcOEt/MeOH (gradiente), sendo coletadas 78 frações de 75 mL. As frações 49-54 (1,7 g) foram fracionadas em gel de sílica, eluída com DCM/AcOEt (gradiente), sendo coletadas 56 frações de 50 mL. As frações 43-51 (40 mg) após evaporação do solvente, houve formação de um ppt amarelo claro que após análises de RMN 1D e 2D foi identificado como o flavonoide hesperidina (**18**).



Esquema 3. Procedimento geral de fracionamento das folhas de *Z. rigidum*

4.2.4.1- Reação da substância 16 com Reagente de Marfey (L-FDAA)

O reagente de Marfey (*N* α -(5-flúor-2,4-dinitrofenil)-L-alaninamida), é utilizado na derivatização de ácidos aminados para a determinação da configuração absoluta dos mesmos (MARFEY, 1984). A hidrólise de peptídeos ou proteínas seguidos da reação dos ácidos aminados com o reagente de Marfey gera produtos altamente cromofóricos, detectáveis no UV quando analisados por CLAE analítica. Os tempos de retenção dos produtos são comparados com os tempos de retenção de padrões de ácidos aminados derivatizados D e L.

O reagente de Marfey possui um átomo de flúor altamente reativo, onde ocorre o ataque nucleofílico do nitrogênio do ácido aminado, resultando na formação de diastereoisômeros que podem ser separados por CLAE analítica com coluna de fase reversa porque os derivados L-diastereoisômeros eluem antes dos D-diastereoisômeros. Uma explicação para esse comportamento é a ligação de hidrogênio intramolecular ser mais forte no diastereoisômeros D que no L. É esperado que o átomo de hidrogênio da carboxila faça uma ligação de hidrogênio com o grupo nitro situado na posição *orto* (formando um anel de nove membros), ou com o oxigênio da carbonila do L-Ala-NH₂, situado na posição *meta* (formando um anel de 12 membros). Desta forma, no diastereoisômero D há formação de uma molécula mais hidrofóbica, o que pode causar uma maior interação com a fase reversa da coluna, e assim um tempo de retenção maior que do diastereoisômero L.

O ciclopeptídeo ciclozanthoxylano A (**16**, 1 mg) foi dissolvido em HCl 6N (1 mL) e aquecido a 110 °C por 14 h em um vial reacional. Depois de resfriada a solução foi evaporada sob pressão reduzida e redissolvida em 100 μ L de água (Figura 6, p. 24).

A 50 μ L de solução de padrão de ácidos aminados (ou 50 μ L da solução do ciclopeptídeo hidrolisado) foi adicionado 100 μ L da solução do reagente de Marfey 1 % (m/v) em acetona e 20 μ L de solução de NaHCO₃ 1M, sendo então a mistura incubada por 1 h a 40 °C. A reação foi parada com a adição de 10 μ L de solução de HCl 2N (Figura 7, p. 25). Os solventes foram evaporados até a *secura* e o resíduo foi redissolvido em MeOH. Uma alíquota (20 μ L) foi analisada em CLAE analítica com coluna de fase reversa C-18 (4,6 x 250 mm, 5 μ m), gradiente linear de MeCN (A) e solução ácida de CF₃COOH (pH= 3,1) de 28% a 55% (A) por 35 minutos, fluxo de 1 mL/minuto e detecção em 340 nm. Os picos obtidos no cromatograma foram identificados por comparação dos tempos de retenção com os derivados L-FDAA dos ácidos aminados padrões (Figuras 120 e 121, p. 104).

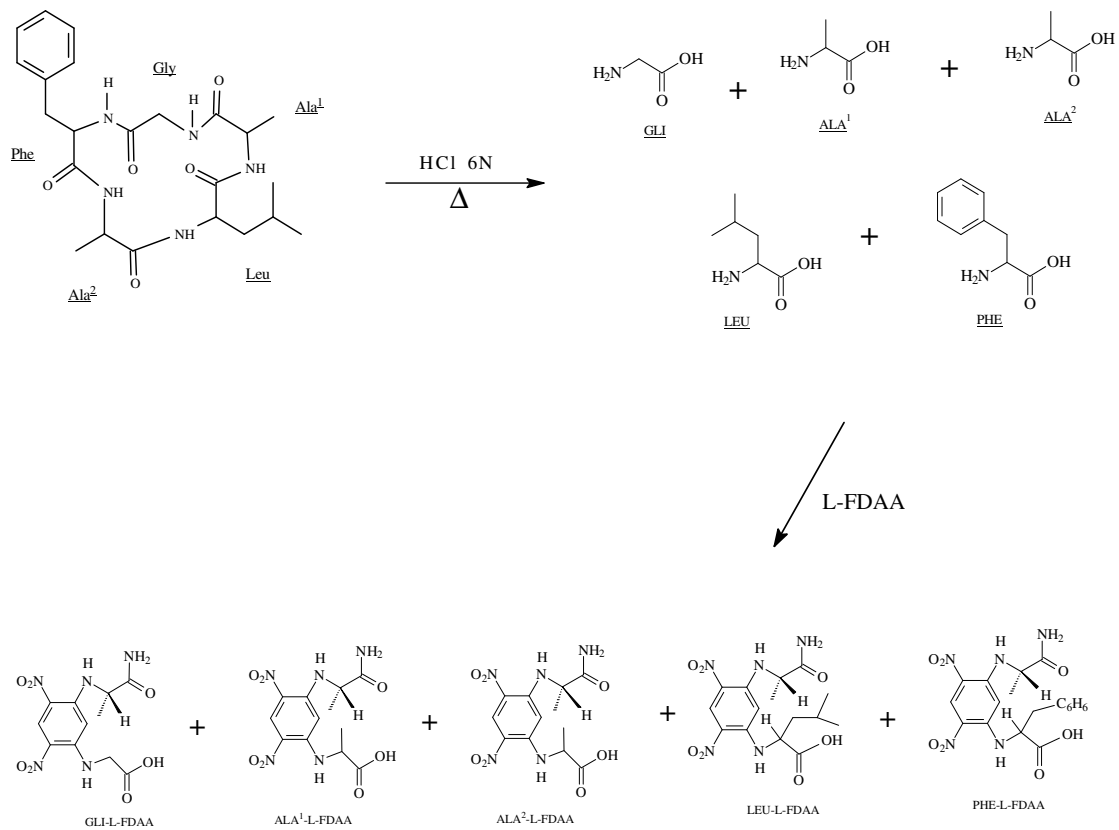


Figura 6. Reação de hidrólise de **16** e produtos derivados com reagente de Marfey (L-FDAA)

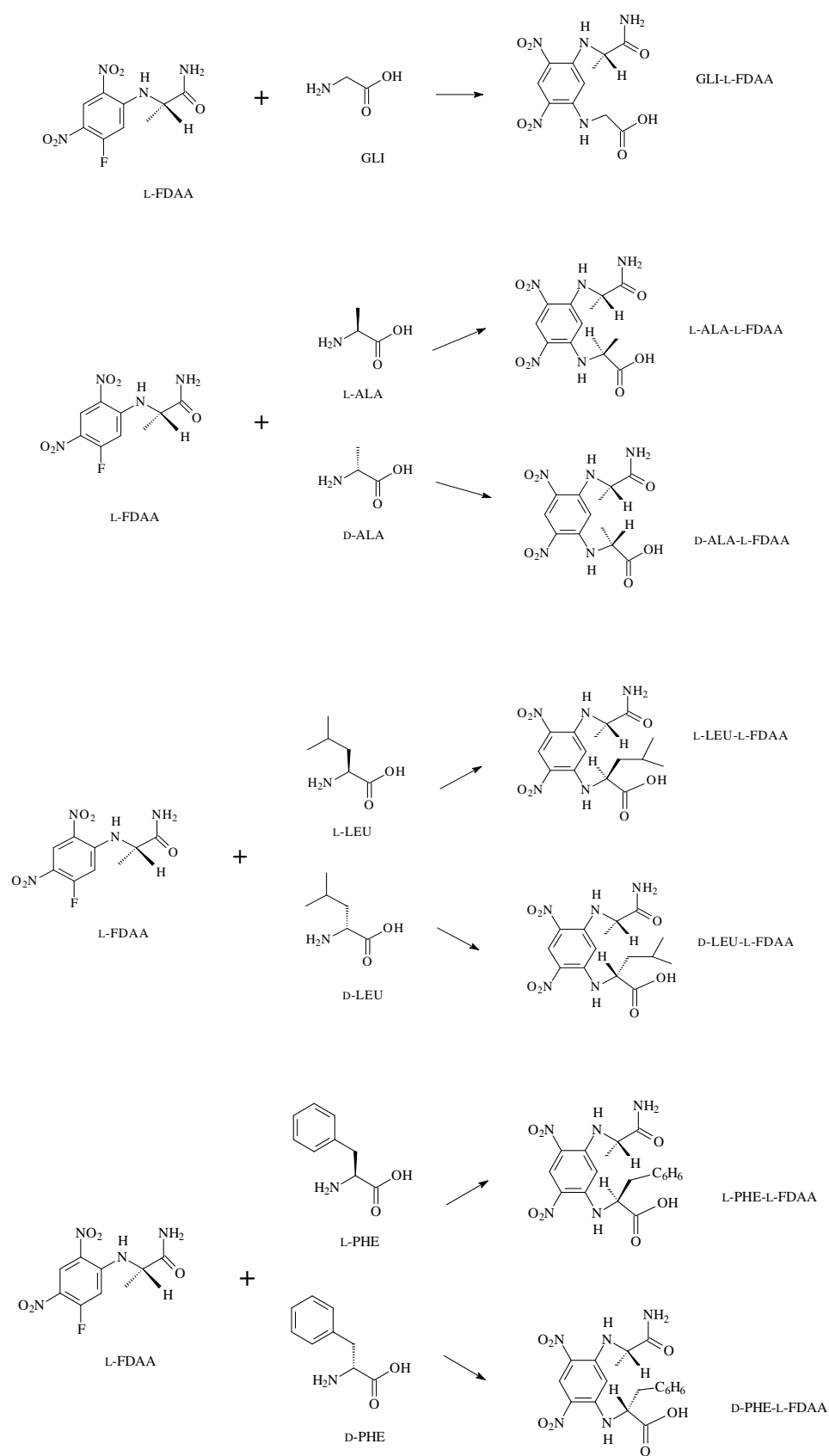


Figura 7. Reações do reagente de Marfey (L-FDAA) com os padrões de ácidos aminados

4.2.5- Fracionamento dos extratos das raízes (hexânico e metanólico)

As frações das raízes citadas nesta tese são materiais remanescentes do trabalho de Mestrado da aluna Sally Moccelini e a obtenção do mesmo está descrito em MOCCELINI *et al.* 2009.

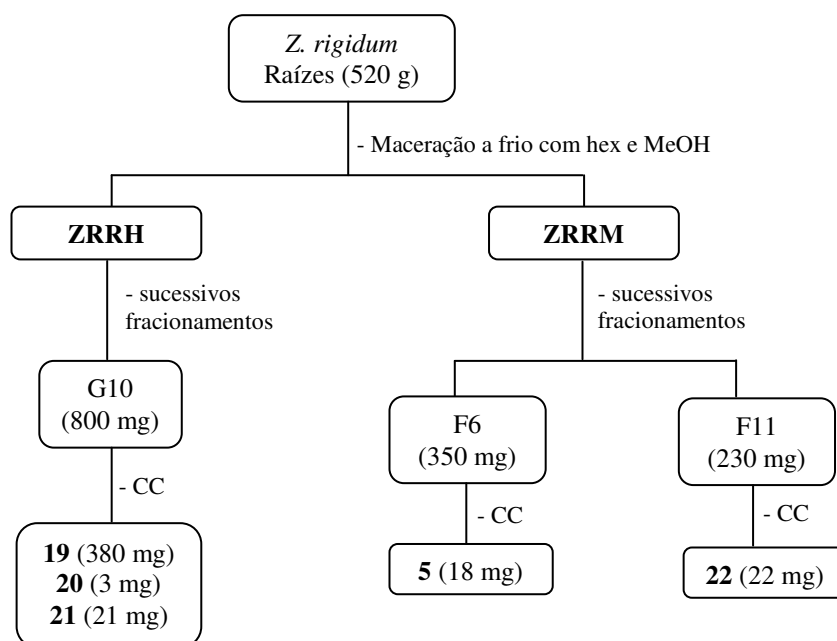
A fração G10 (800 mg), proveniente do extrato hexânico, foi fracionada em CC com gel de sílica, eluída com DCM/AcOEt e AcOEt/MeOH (gradiente), sendo coletadas 34 frações de 50 mL. As frações 4-7 (537 mg) foram fracionadas em gel de sílica, eluída com hexano/AcOEt (gradiente), sendo coletadas 34 frações de 50 mL. A fração 7, após evaporação do solvente, forneceu 380 mg de um óleo alaranjado, que após análise de ^1H foi identificado como o alcalóide *N*-metilatanina (**19**).

As frações 14-19 (23 mg), após adição de MeOH, forneceu 3 mg de um sólido incolor em forma de agulhas, que após análise de RMN 1D e 2D foi identificado como o álcool *p*-cumarílico (**20**).

À fração G11 (35 mg) foi adicionado MeOH, o que acarretou a precipitação de 21 mg de um sólido marrom claro, que após análise de ^1H foi identificado como o alcalóide 6-acetonildiidroqueleritrina (**21**).

A fração 6 (350 mg), originária do extrato metanólico, foi fracionada em CC com gel de sílica, eluída com AcOEt/MeOH (gradiente), sendo coletadas 120 frações de 12 mL. As frações 82-84, após evaporação do solvente, forneceu 18 mg de um sólido branco, que após análise de ^1H foi identificado como a saponina 3-*O*- β -D-glicopiranosilsterol (**5**).

A fração 11 (230 mg), também do extrato metanólico, foi fracionada em CC com gel de sílica, eluída com AcOEt/MeOH (gradiente), sendo coletadas 98 frações de 12 mL. As frações 71-73, após evaporação do solvente, forneceu 22 mg de um sólido branco, que após análise de RMN 1D e 2D, e espectrometria de massas foi identificado como o triterpeno ácido 2 α , 3 β , 24-trihidroxi-olean-12-en-28-oico, também conhecido como ácido hiptático A (**22**) (Esquema 4, p. 26).



Esquema 4. Procedimento geral de fracionamento das raízes de *Z. rigidum*

4.3- Material vegetal de *Luxemburgia nobilis*

As raízes de *Luxemburgia nobilis* (Figura 8, p 27) foram coletadas no Morro de São Sebastião, município de Ouro Preto/MG, em abril de 2009, pelo técnico Jorge L. Silva. Uma exsicata sob n° 6737 está depositada no herbário José Badini, do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.



Figura 8. Foto de *Luxemburgia nobilis* Eichl (Fonte: autora)

4.3.1- Preparação e fracionamento dos extratos brutos de *Luxemburgia nobilis*

Após secagem, as raízes (370 g) foram trituradas e extraídas com MeOH e posteriormente com a mistura MeOH/H₂O (8:2), em maceração a frio, obtendo-se, respectivamente, os extratos **LNRM** (33,1 g) e **LNRMH** (5,8 g). As folhas (600 g) foram extraídas com DCM e posteriormente MeOH, também em maceração a frio, obtendo-se, respectivamente, os extratos **LNFD** (50,0 g) e **LNFM** (80,1 g).

4.3.2- Fracionamento do extrato LNRM (extrato metanólico das raízes)

O extrato **LNRM** (30,0 g) foi suspenso em 150 mL da mistura MeOH/H₂O (7:3) e submetido a partição líquido- líquido com os solventes hexano, CHCl₃ e AcOEt, obtendo-se as respectivas frações: hexano- **LNRMH** (637 mg), CHCl₃- **LNRMC** (1,2 g), AcOEt- **LNRMA** (626 mg), além do resíduo hidrometanólico-**LNRResíduo** (24,4 g) (Esquema 5, p. 28).

A fração **LNRMH** (600 mg) foi fracionada em CC com gel de sílica, eluída com hexano/CHCl₃ (gradiente), CHCl₃/MeOH (9:1), (8:2) e MeOH 100%, sendo coletadas 107 frações de 10 mL. As frações 99-100 (106 mg) apresentou um precipitado branco, o qual foi

lavado com MeOH, obtendo-se 75 mg da mistura dos esteroides, β -sitosterol (**2**), estigmasterol (**3**), campesterol (**4**) e β -sitostenona (**23**) identificados por análise em CG-EM.

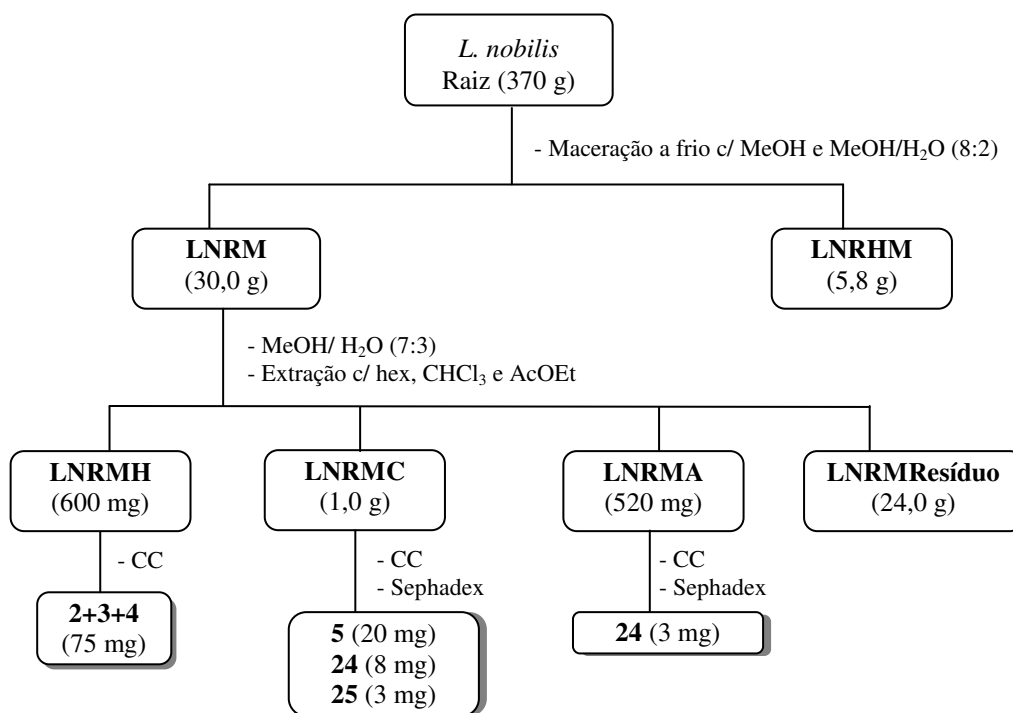
A fração **LNRMC** (1,0 g) foi fracionada em CC com gel de sílica, eluída em polaridade crescente com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, sendo recolhidas 35 frações de 50 mL.

As frações 8-12 (170 mg) foram fracionadas em CC com sephadex LH-20, eluída com MeOH, sendo recolhidas 9 frações de 10 mL. A fração 7 (6 mg), apresentou-se como um sólido amarelo, o qual foi submetido a análise por RMN 1D, 2D e CL-EM e identificado como o biflavonoide lophirona B (**24**).

As frações 13-15 (110 mg), após secagem do solvente apresentou um precipitado branco, o qual foi lavado com MeOH, obtendo-se 20 mg da saponina 3-O- β -D-glicopiranosil sitosterol (**5**), identificada por análise espectroscópica de RMN de ^1H e CCDA.

As frações 16-19 (160 mg) foram fracionada em CC com sephadex LH-20, eluída com MeOH, sendo recolhidas 12 frações de 10 mL. As frações 9-12 apresentaram um sólido amarelo (3 mg), o qual foi submetido a análise por RMN 1D, 2D e CL-EM e foi identificado como o biflavonoide lophirona K (**25**).

A fração **LNRMC** (520 mg) foi fracionada em CC com gel de sílica, eluída com DCM/ MeOH (gradiente), sendo coletadas 62 frações de 12 mL. As frações 6-15 (120 mg) foram fracionadas em CC com gel de sílica, eluída com $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (gradiente), sendo coletadas 70 frações de 10 mL. As frações 55-67 (25 mg) foram submetidas a CCDP com o sistema $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1) sendo recolhida uma faixa amarela a qual após análise de RMN 1D e 2D foi identificada como o biflavonoide lophirona B (**24**).



Esquema 5. Procedimento geral de fracionamento das raízes de *L. nobilis*

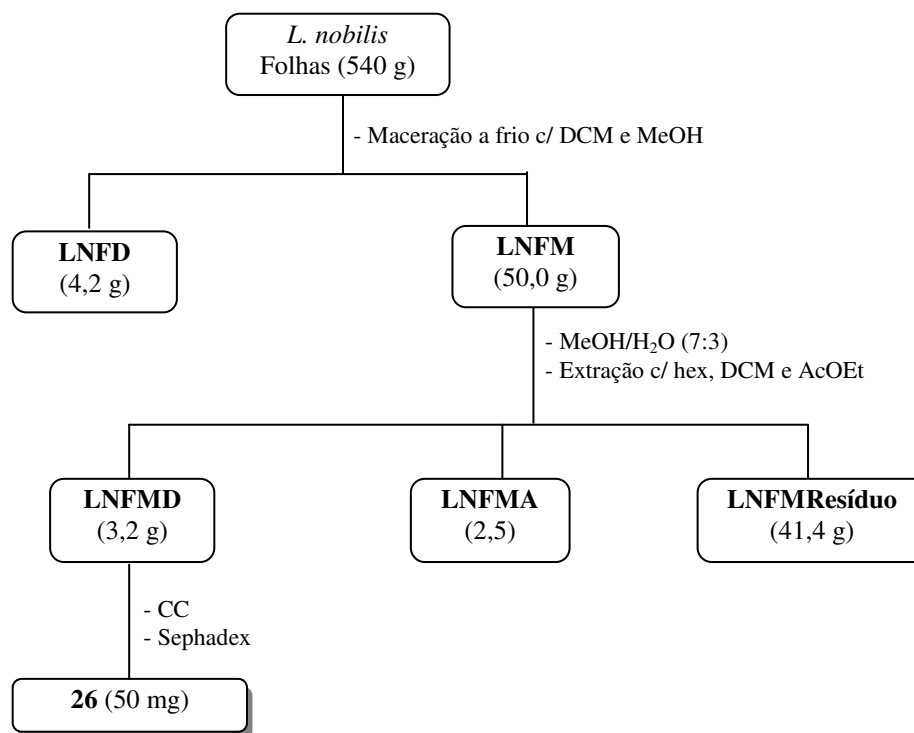
4.3.3- Fracionamento do extrato LNFM (extrato metanólico das folhas)

As folhas de *L. nobilis* já foram estudadas anteriormente (Oliveira *et al.* 2002). Desta forma, a obtenção e fracionamento dos extratos foi com o objetivo de isolar o biflavonoide 2'', 3''-diidrochnaflavona. A obtenção dos extratos das folhas de *L. nobilis* foi feita pela aluna de apoio técnico Lucineli Tavares.

O extrato **LNFM** (50,0 g) foi suspenso em 150 mL da mistura MeOH/H₂O (7:3) e submetido a partição líquido- líquido com os solventes DCM e AcOEt, obtendo-se as respectivas frações: DCM- **LNFMD** (3,2 g), AcOEt- **LNFMA** (2,5 g), além do resíduo hidrometanólico- **LNFMResíduo** (41,4 g) (Esquema 6, p. 29).

Parte da fração **LNRMC** (1,5 g) foi fracionada em CC com gel de sílica, eluída em polaridade crescente com CHCl₃/MeOH, sendo recolhidas 45 frações de 50 mL.

As frações 8-9 (150 mg) foram fracionadas em CC com sephadex LH-20, eluída com MeOH, sendo recolhidas 15 frações de 40 mL. As frações 3-8, após evaporação do solvente, apresentaram-se como um sólido amarelo (50 mg), o qual foi submetido a análise por RMN ¹H e identificado como o biflavonoide 2'', 3''-diidrochnaflavona (**26**).



Esquema 6. Procedimento geral de fracionamento e obtenção de **26** das folhas de *L. nobilis*

4.3.3.1- Metilação da substância 26

Parte da substância **26** (10 mg) foi submetida a metilação com diazometano, obtendo-se 12 mg da substância 7, 4', 7''-trimetóxi-2'', 3''-dihidrochnaflavona (**26a**).

A solução de diazometano foi preparada de acordo com a metodologia experimental descrita na literatura (DE CARVALHO *et al.*, 2006; VOGEL, 1989). Adicionou-se a solução etérea do diazometano em excesso à substância (**26**) dissolvida em metanol. O derivado metilado foi obtido após evaporação do solvente (Figura 9, p. 30).

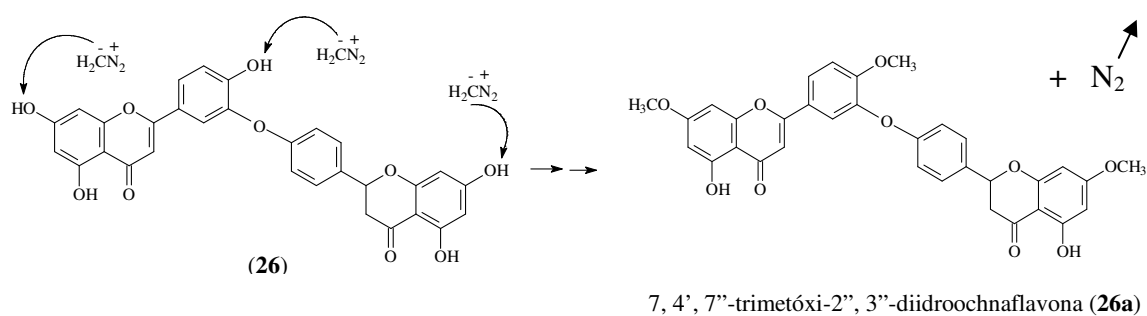


Figura 9. Reação de metilação de **26** com diazometano para obtenção de 7, 4', 7''-trimetóxi-2'', 3''-dihidrochnaflavona (**26a**)

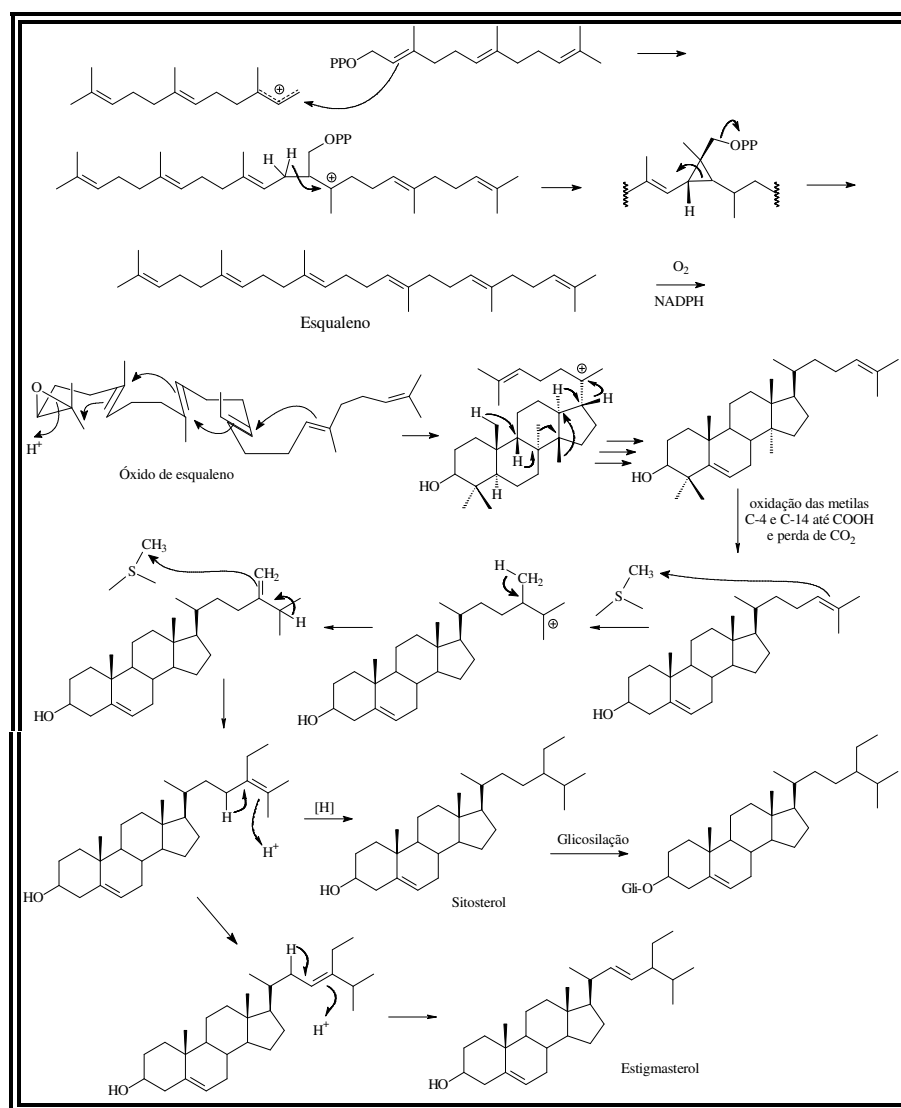
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- PROPOSTAS BIOSINTÉTICAS

No estudo químico e determinação estrutural de produtos naturais deve-se levar em consideração o conhecimento dos precursores das substâncias isoladas. Desta forma, são apresentadas as propostas de biossíntese das classes de substâncias isoladas das espécies estudadas neste trabalho (*Zanthoxylum rigidum* e *Luxemburgia nobilis*).

5.1.1-ESTEROIDES

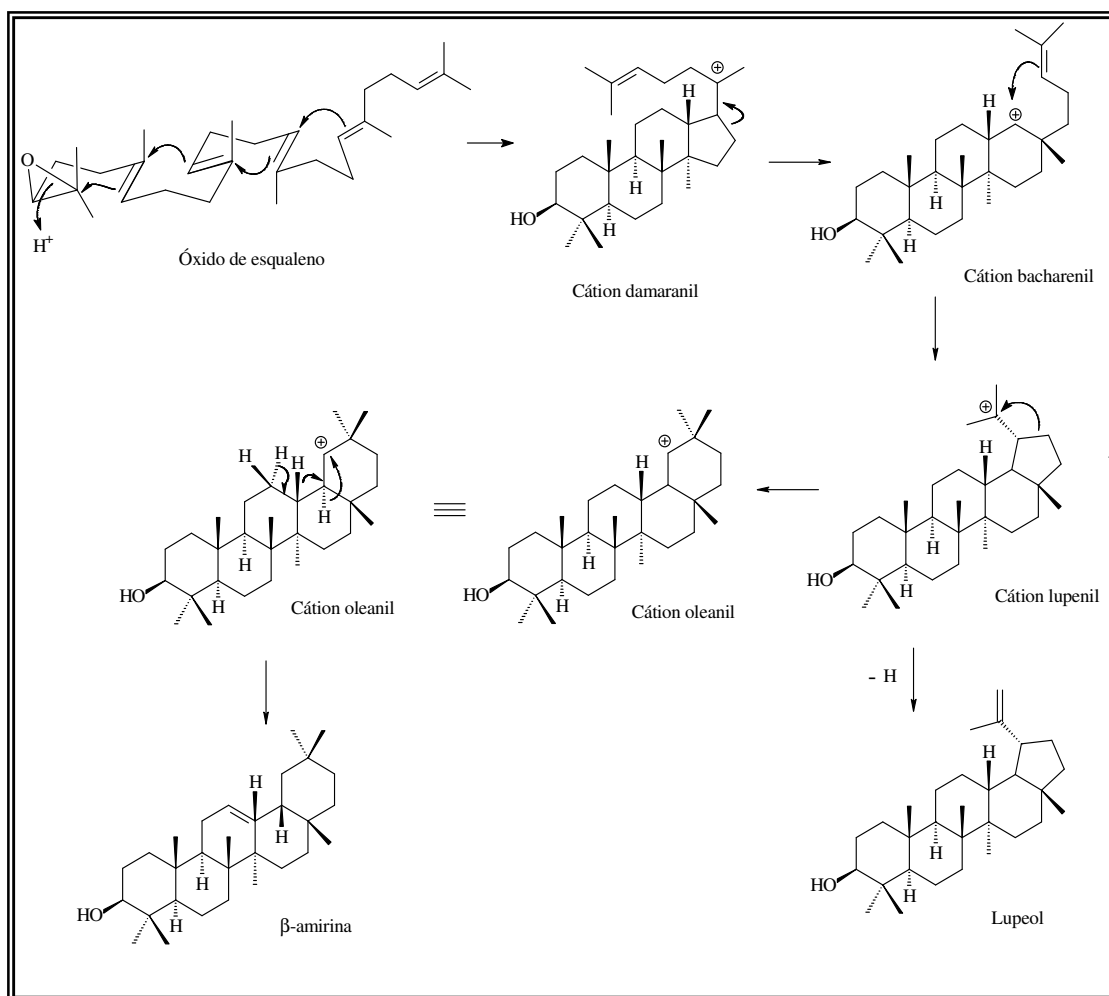
Biogeneticamente formam-se via pirofosfato de isopentenila originando o esqualeno, estrutura que contém duas unidades de farnesil pirofosfato ligadas cauda-cauda. O esqualeno epóxi (óxido de esqualeno), em sua forma cadeira-bote-cadeira-bote, cicliza após vários rearranjos do tipo 1,2 formando o cicloartenol, estrutura que contém 24 carbonos. O cicloartenol após clivagem oxidativa de três metilas forma os esteroides (DEWICK, 2002) (Esquema 7, p. 31).



Esquema 7. Proposta biossintética dos esteroides (Dewick, 2002)

5.1.2-TRITERPENOS

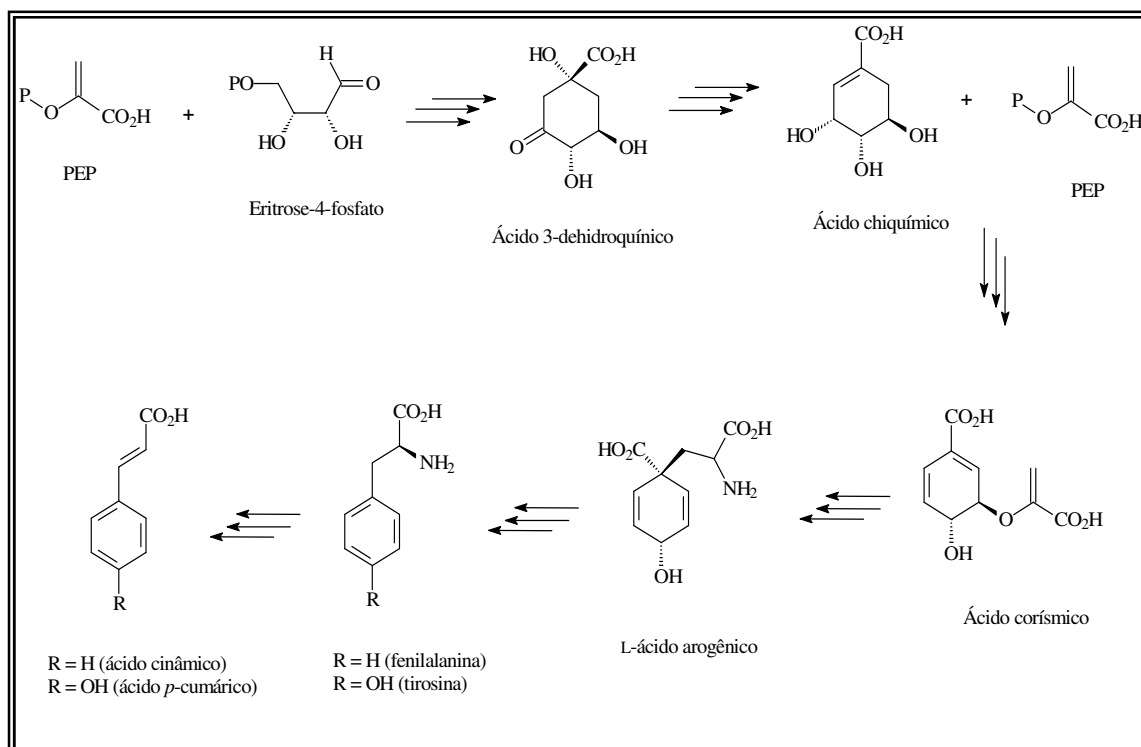
Os triterpenos também são substâncias provenientes da via pirofosfato de isopentenila, que da mesma forma que os esteróides, da origem ao esqualeno pela fusão cauda-cauda de duas moléculas de farnesil pirofosfato. No caso dos terpenos o óxido de esqualeno em sua forma cadeia-cadeira-cadeira-bote é ciclizado para gerar o cátion dammaranil e, conseqüentemente, o cátion lupenil. O cátion lupenil também pode ser estabilizado pela formação do anel de 6 membros, gerando o cátion oleanil. Esse é estabilizado com migração de hidrogênio e rearranjo do tipo Wagner-Meerwein gerando o núcleo básico β -amirina (Esquema 8, p 32) (DEWICK, 2002).



Esquema 8. Proposta biossintética dos triterpenos (Dewick, 2002)

5.1.3- DERIVADOS CINÂMICOS (C₆C₃)

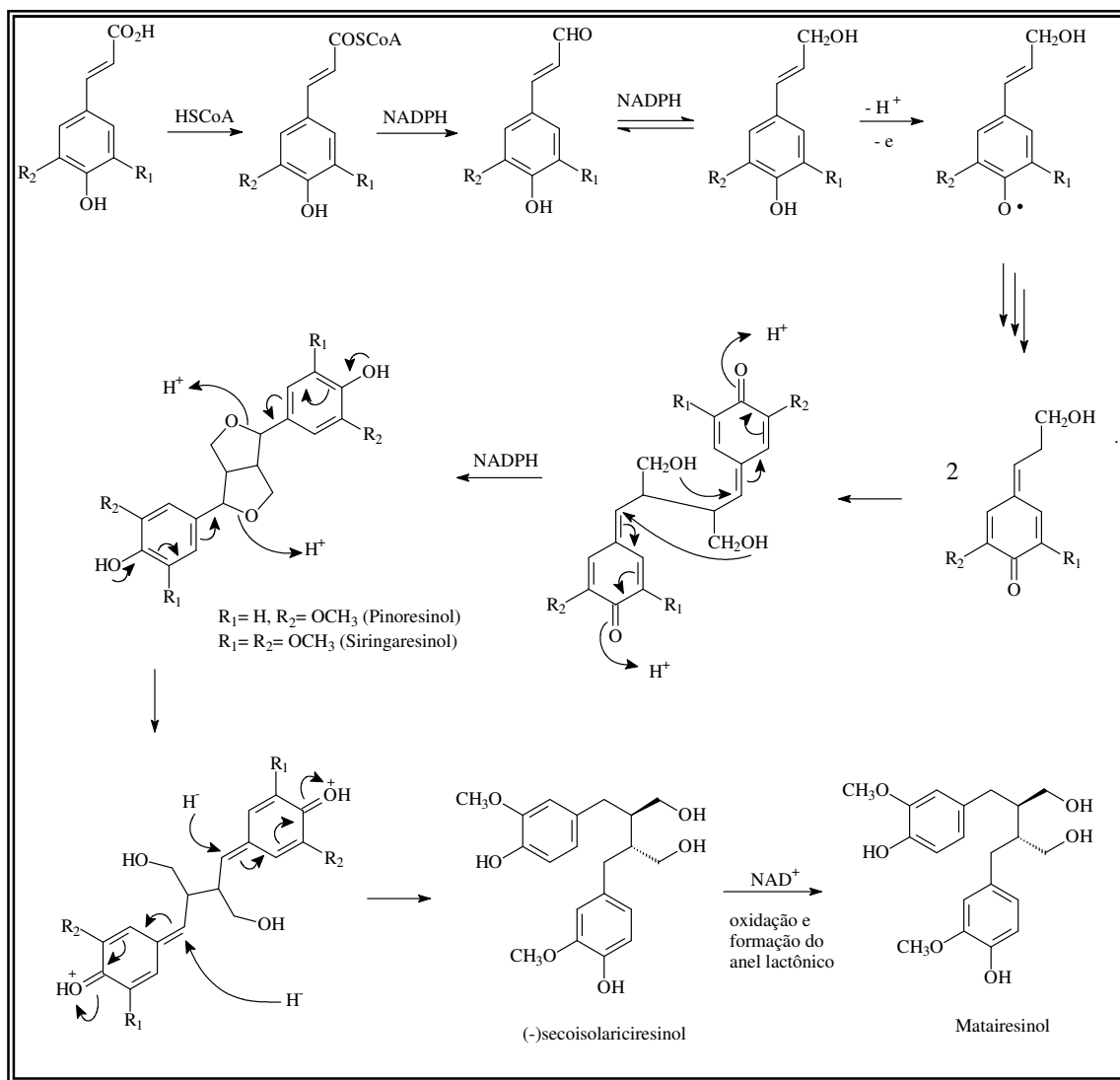
Essas substâncias são provenientes da via metabólica dos ácidos aminados aromáticos fenilalanina e tirosina são caracterizados por apresentar um esqueleto C₆C₃, sendo precursores de uma serie de metabólitos especiais que usualmente possuem um padrão de substituição característico (*p*-hidroxi, 3,4-dihidroxi ou 3,4,5-trihidroxi). A etapa inicial de formação desses metabólitos é a eliminação de amônia gerando o ácido cinâmico *trans* (*E*). Sendo a fenilalanina o aminoácido de partida, ira formar o ácido cinâmico, no entanto, se for a tirosina o aminoácido de partida, a eliminação de amônia produzira o acido ácido *p*-cumárico (Esquema 9, p. 33) (adaptado DEWICK, 2002).



Esquema 9. Proposta biossintética dos metabólitos C₆C₃ (Adaptado de DEWICK, 2002)

5.1.4- LIGNANAS

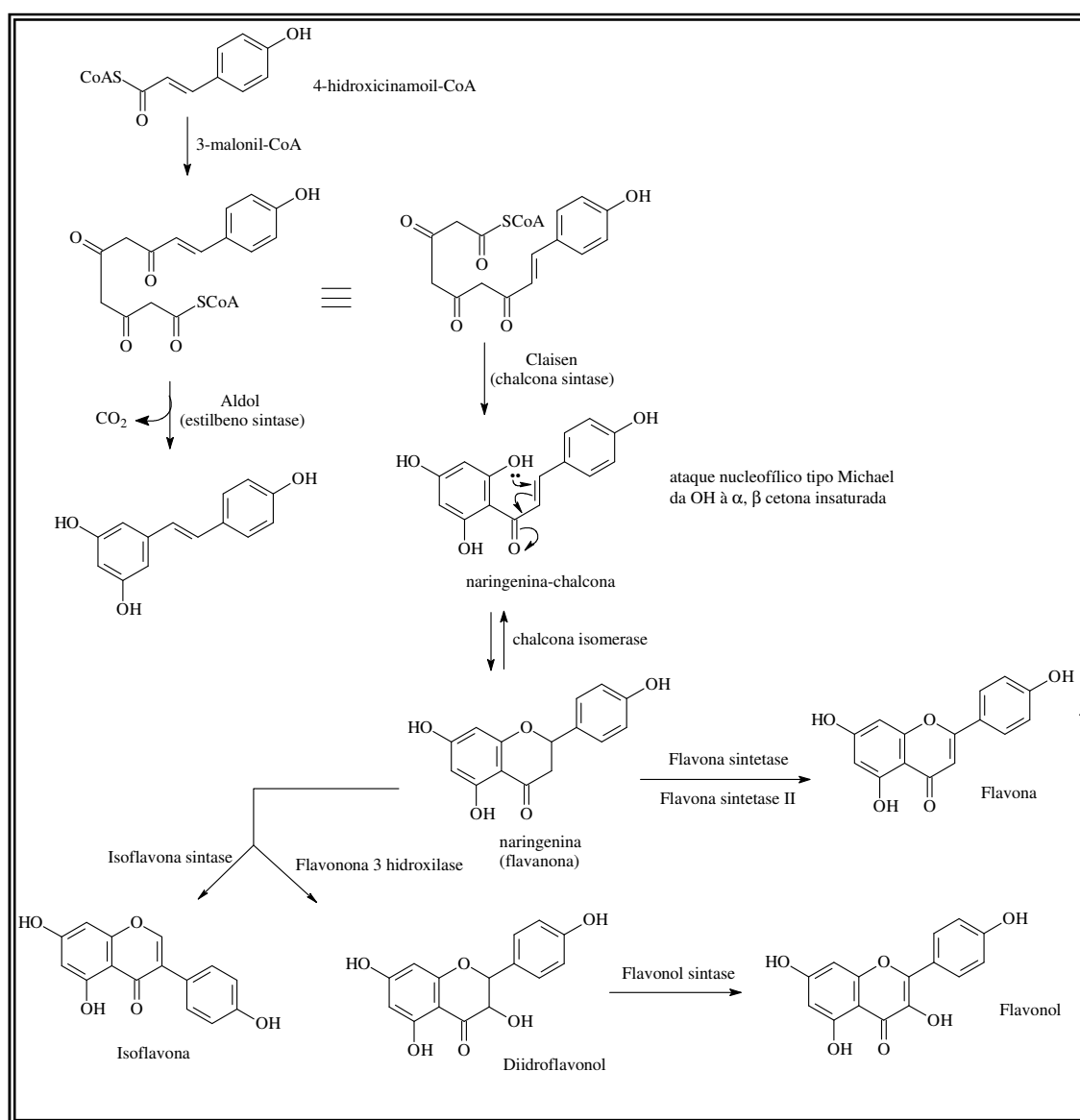
As lignanas podem ser definidas como dímeros formados por unidades C_6C_3 de alcoóis de arilpropanoides. São formadas inicialmente por acoplamento oxidativo entre os carbonos (CH-8) das unidades monoméricas, sendo mais importantes os alcoóis 4-hidroxi-cinamoil (álcool *p*-cumarílico), o coniferil e o sinapil (Esquema 10, p. 34) (DEWICK, 2002).



Esquema 10. Proposta biossintética de lignanas (Adaptado de DEWICK, 2002)

5.1.5- FLAVONÓIDES

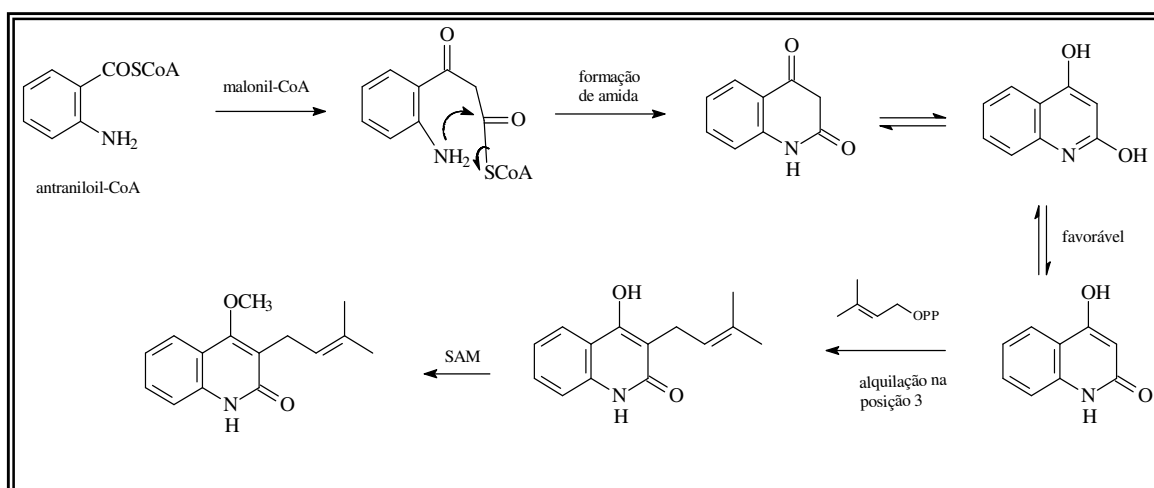
São metabolitos biossintetizados por duas via metabólicas distintas chiquimato (fenilalanina) e acetato. A via metabólica do acetato participa com a condensação de Claisen de três unidades de malonil-CoA seguidas de descarboxilações gerando o anel A dos flavonoides. A via metabólica do chiquimato contribui para a formação destes compostos com o éster *p*-cumaril CoA contribuindo com o anel B. A junção das duas unidades se dá pela substituição nucleofílica a carbonila no *p*-cumaril CoA através do enolato do anel A. Esta junção gera a primeira sub-classe de flavonoides denominadas de chalconas. A adição de Michael 1,4 ao carbono do sistema carbonílico α,β -insaturado gera a segunda sub-classe flavanonas com formação do anel C. Sucessivas reações produzem a demais classes relatadas na literatura (Esquema 11, p. 35) (DEWICK, 2002).



Esquema 11. Proposta biossintética de flavonoides (Adaptado de DEWICK, 2002)

5.1.6- ALCALOIDES QUINOLÍNICOS

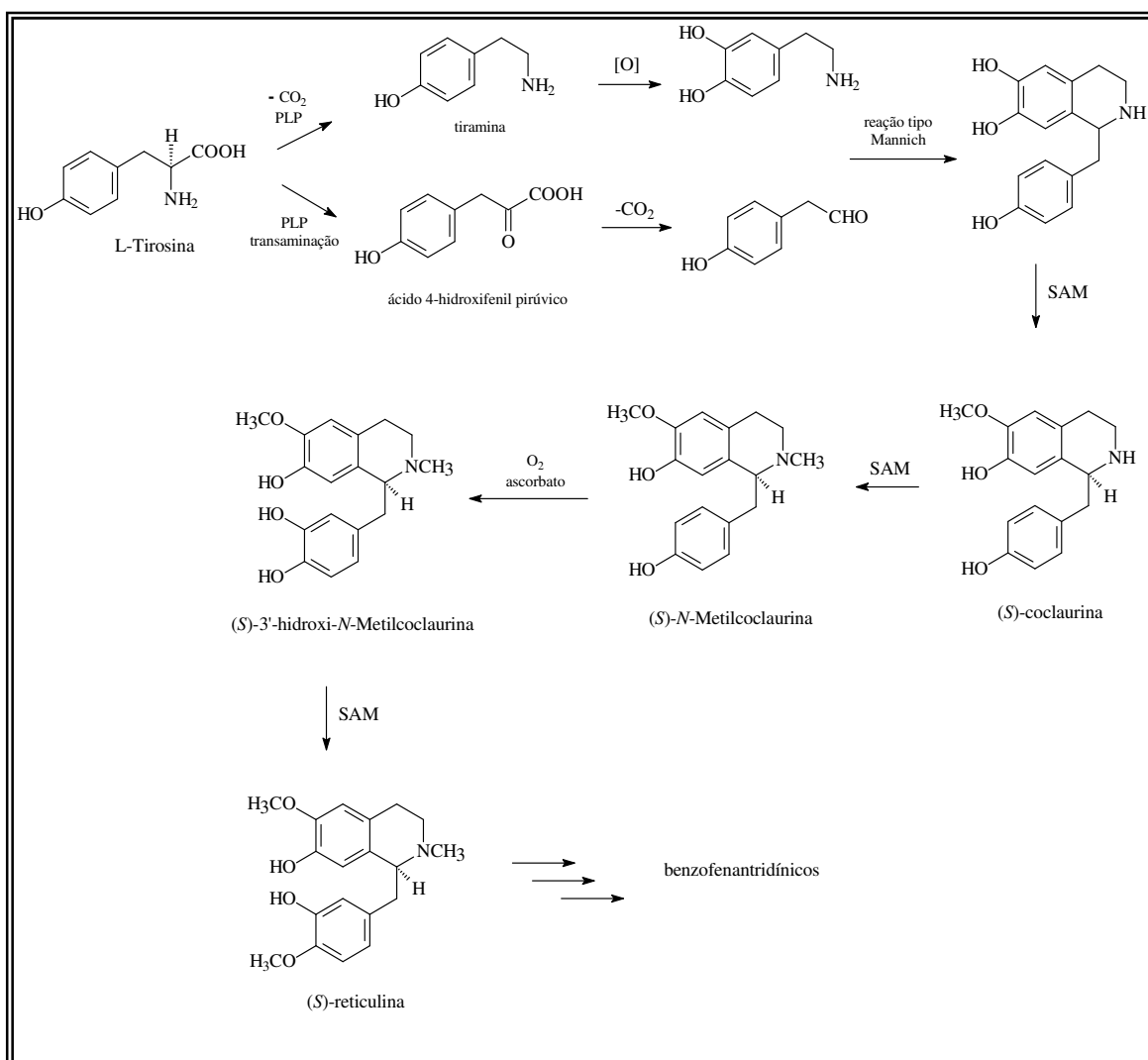
São alcaloides derivados do ácido antranílico. Este tipo de alcalóide ocorre em abundância em espécies da família Rutaceae. A rota mais direta para formação do anel quinolínico é a combinação do ácido antranílico com malonato. Desta forma, o antraniloil-CoA age como unidade de partida para extensão da cadeia via uma unidade de malonil-CoA, com formação de amida gerando um sistema heterocíclico. A posição 3 é altamente nucleofílica, podendo sofrer alquilação com dimetilalildifosfato (Esquema 12, p. 36) (DEWICK, 2002).



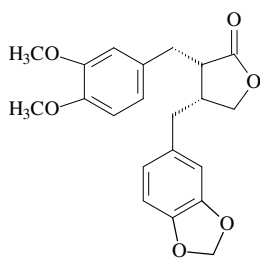
Esquema 12. Proposta biossintética de alcaloides quinolínicos (DEWICK, 2002)

5.1.7- ALCALOIDES BENZOFENANTRIDÍNICOS

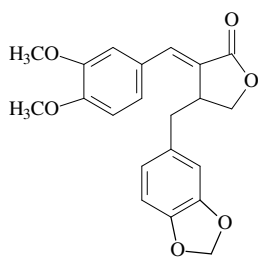
São alcaloides derivados de duas moléculas de tirosina. Uma das moléculas produzirá a dopamina e a outra o 4-hidroxifenilacetaldeído. A dopamina e o 4-hidroxifenilacetaldeído se condensarão com formação de base de Schiff, seguida por fechamento do anel por reação tipo Mannich que produz um alcalóide *S*. O alcalóide é então modificado pela enzima *N*-metiltransferase e 4'-*O*-metiltransferase, dando origem a *S*-reticulina. Após uma sequência de transformações forma-se o esqueleto benzofenatridínico (DEWICK, 2002) (Esquema 13, p. 37).



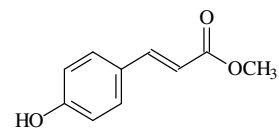
Esquema 13. Proposta biossintética de alcaloides benzofenatridínicos (DEWICK, 2002)



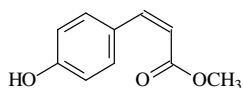
10: *cis*-metilpluviatolida



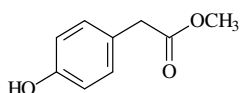
11: kaerofilina



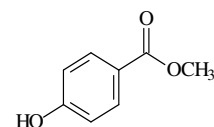
12: *E*-4-hidroxicianamato de metila



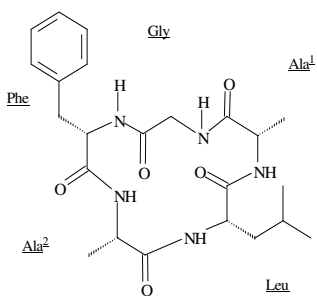
13: *Z*-4-hidroxicianamato de metila



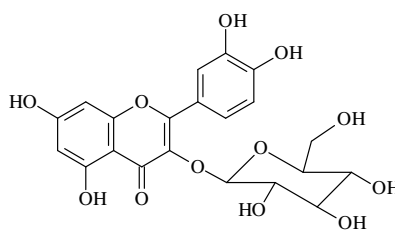
14: 4-hidroxibenzoato de metila



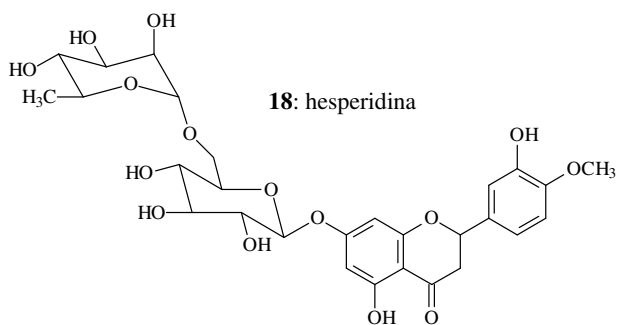
15: 4-hidroxifenilacetato de metila



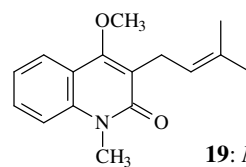
16: ciclozanthoxylano A



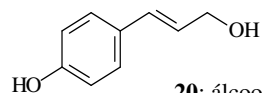
17: isoquercetina



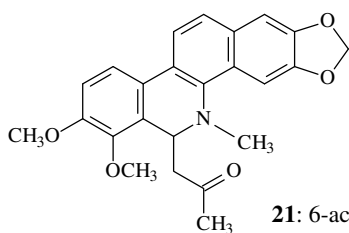
18: hesperidina



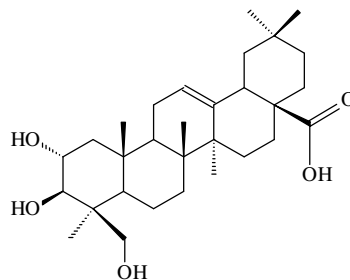
19: *N*-metilatanina



20: álcool *p*-cumarílico



21: 6-acetonildiidroqueleritina



22: ácido hiptático A

5.2.1a- Identificação das substâncias 1A a 1E

As substâncias **1A**, **1B**, **1C**, **1D** e **1E** foram obtidas em mistura e identificados através da análise por CG-EM como os hidrocarbonetos heptacosano, octacosano, nonacosano, triacontano, hentriacontano, respectivamente. O cromatograma da análise por CG-EM exibiu picos mais intensos em t_R 15,65 (**1E**), 14,28 (**1D**), 13,28 (**1C**), 12,16 (**1B**) e 11,33 minutos (**1A**) (Figura 10, p. 40). O espectro de massas de cada pico (Figuras 11 a 15, p. 40 e 41) mostrou fragmentação característica de hidrocarboneto de cadeia longa não ramificada, apresentando um padrão de fragmentação facilmente identificável, com pico de íon molecular muito pequeno e com abundância máxima em torno de C_3 e C_4 (TAGHIZADEH, 2001).

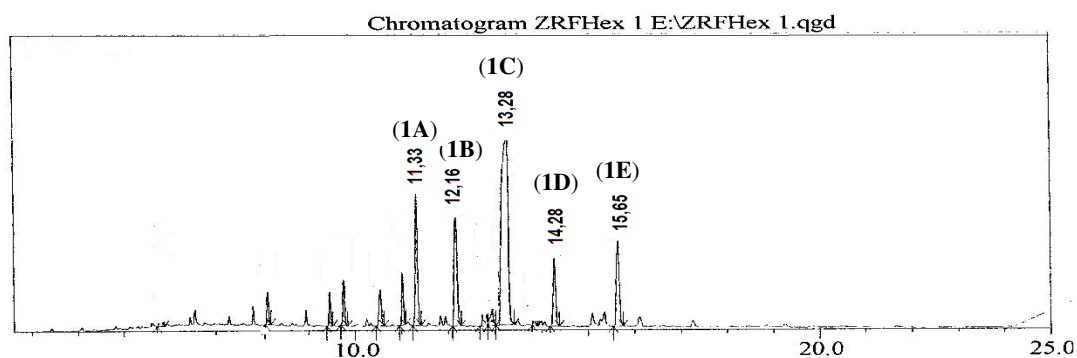


Figura 10. Cromatograma por CG da mistura 1A a 1E

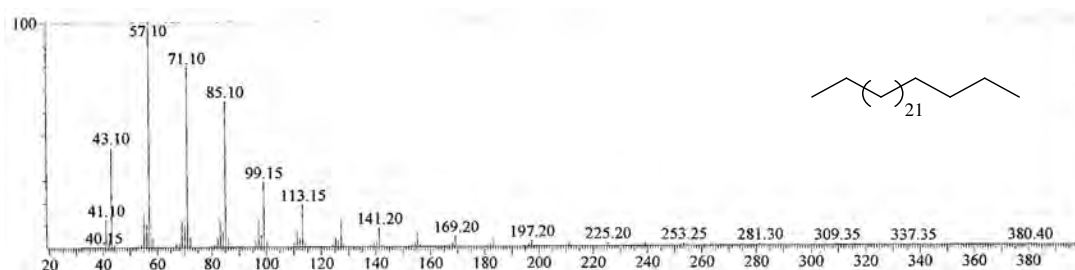


Figura 11. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de 1A

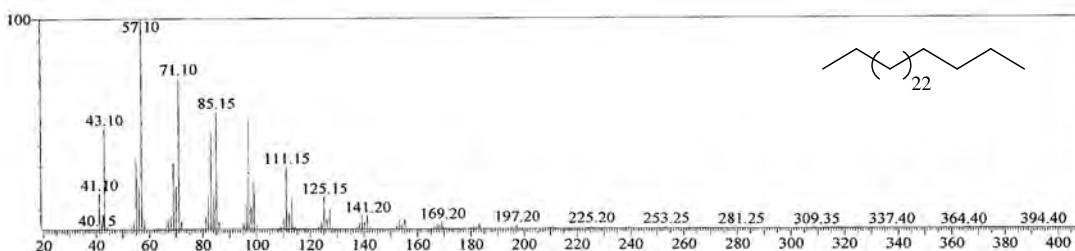


Figura 12. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de 1B

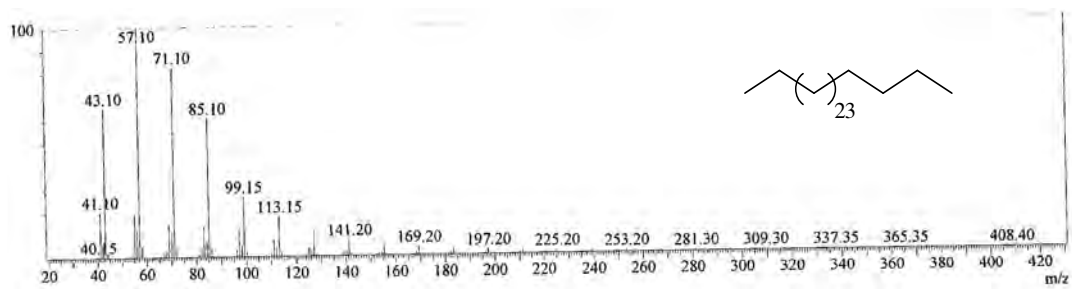


Figura 13. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de **1C**

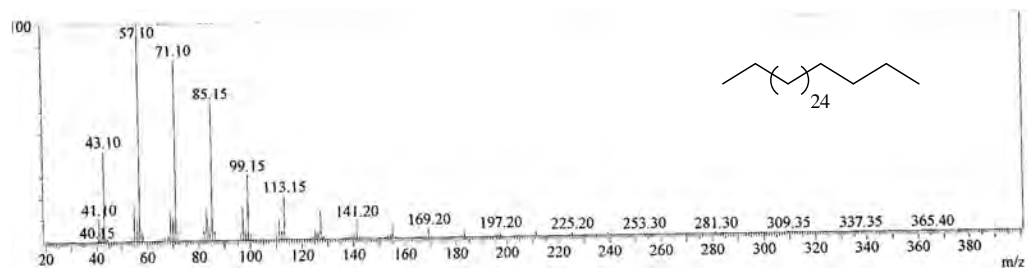


Figura 14. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de **1D**

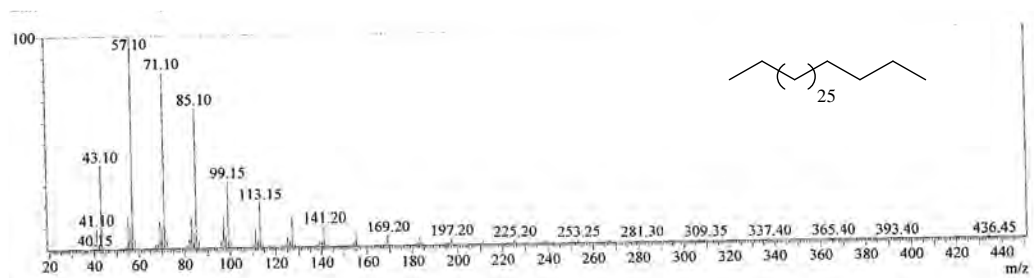


Figura 15. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de **1E**

5.2.1b- Identificação das substâncias 1A, 1C, 1F e 1G

As substâncias **1A**, **1C**, **1F** e **1G** foram obtidas em mistura e identificadas através da análise por CG-EM como os hidrocarbonetos heptacosano, nonacosano e os ésteres hexadecanoato de octila e tetracosanoato de etila, respectivamente. O cromatograma da análise por CG-EM exibiu picos mais intensos em t_R 13,18 (**1C**), 12,14 (**1G**), 11,32 (**1A**), 10,36 (**1F**) (Figura 16, p. 42). As substâncias **1A** e **1C** tiveram sua identificação já discutida no item 5.2.1a (p. 40). O espectro de massas de **1F** e **1G** mostrou fragmentação compatível com as propostas estruturais para os ésteres sugeridos (Figuras 17 e 18, p 42) (TAGHIZADEH, 2001).

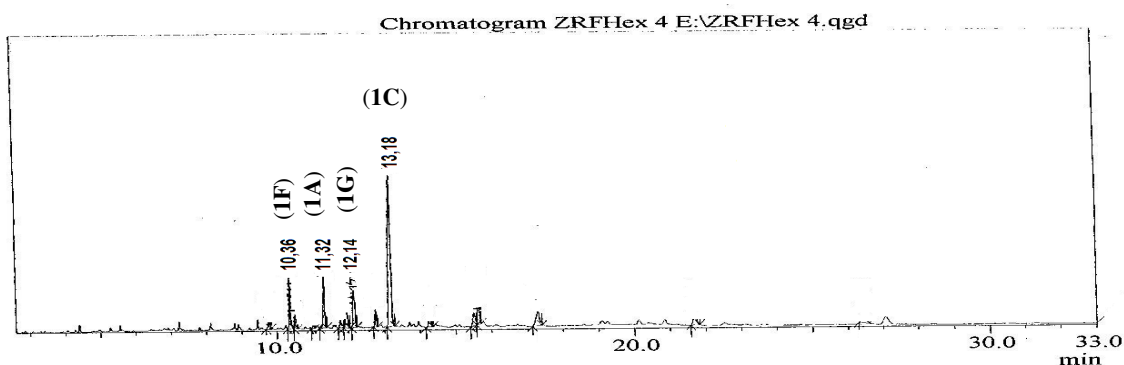


Figura 16. Cromatograma por CG da mistura **1A+1C+1F+1G**

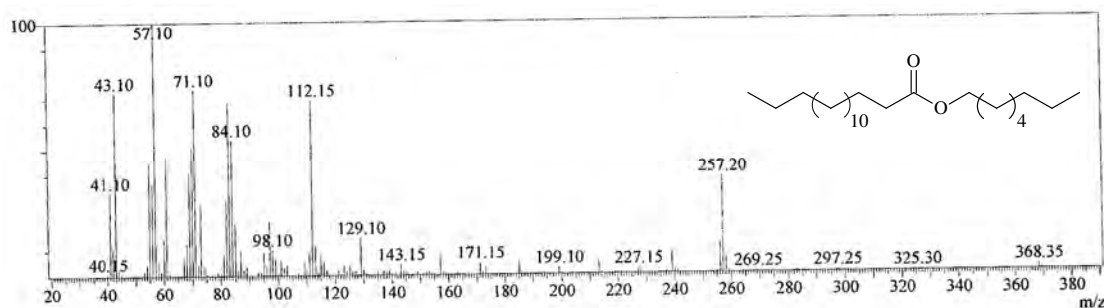


Figura 17. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de **1F**

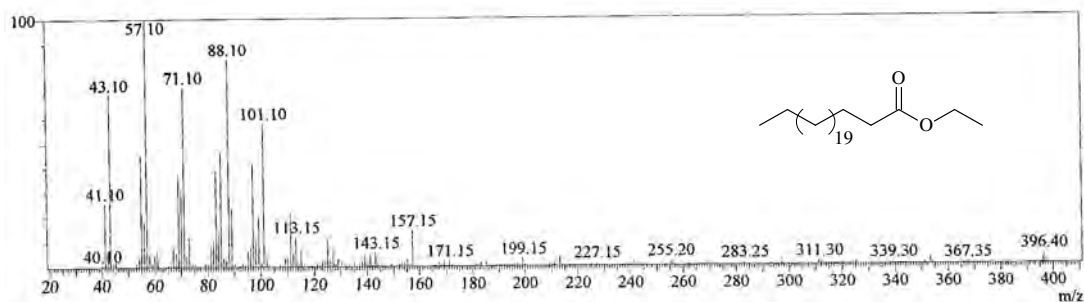
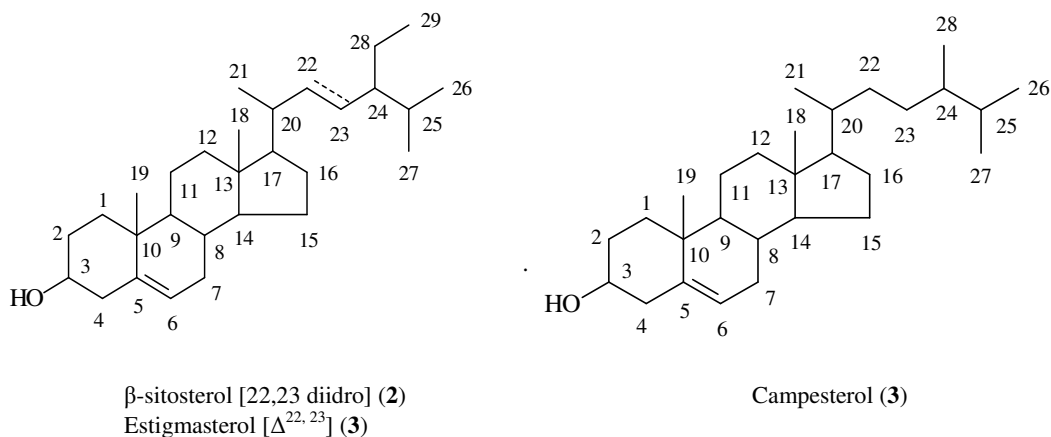


Figura 18. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de **1G**

5.2.2- Identificação das substâncias 2, 3 e 4

O sólido branco isolado foi identificado inicialmente como a mistura dos esteróides β -sistosterol (**2**) e estigmasterol (**3**), através da análise dos seus espectros de RMN ^1H , ^{13}C comparados com dados da literatura (KOJIMA *et al.* 1990). Submeteu-se, ainda, este sólido a análise por CG-EM o que permitiu constatar um terceiro esteróide na mistura, o campesterol (SUZART, 2007b).



O espectro no IV (Figura 19, p. 45) revelou absorções ($\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$) em 3427 (ν_{OH}), 2943, 2862, 1458 e 1375 (ν_{CH}), 1651 ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$), 1056 ($\nu_{\text{C-O}}$).

O espectro de RMN ^1H (Figura 20, p. 45) mostrou sinais entre δ 0,69-1,17 correspondentes às metilas. O multipeto de δ 3,50-3,58 corresponde ao hidrogênio carbinólico; o singlete largo em δ 5,37 representa o hidrogênio olefínico H-6 e os duplos dupletos em δ 5,02 e 5,16 que estão associados a H-22 e H-23 para o estigmasterol.

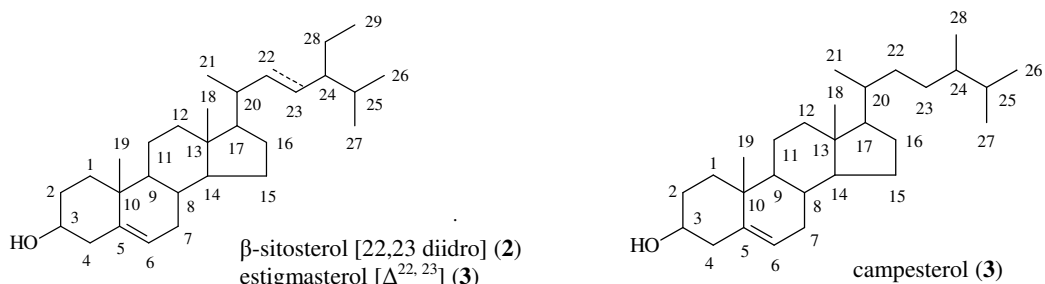
Os espectros de RMN ^{13}C (Figuras 21 e 22, p. 46; Tabela 4, p. 44) mostraram sinal de carbono olefínico C-6 (δ 121,7), um carbono quaternário olefínico atribuído ao C-5 (δ 140,7) e um carbono carbinólico C-3 (δ 71,8). A diferença entre as duas moléculas está em uma insaturação entre C-22 e C-23. No estigmasterol estes sinais aparecem em δ 138,3 e 129,2, respectivamente, já no β -sitosterol os sinais destes carbonos são em δ 26,04 e 39,80 (Figura 23, p. 47).

Tendo em vista o isolamento da mistura de esteróides já descritos nesta espécie, decidiu-se fazer análise adicional de CG-EM (Figura 24, p. 47). Esta análise permitiu detectar, além do β -sitosterol (**2**) e estigmasterol (**3**), o terceiro componente da mistura, o campesterol (**4**). Os espectros de massas de cada substância (Figuras 25 a 27, p. 48) mostram os valores de m/z de fragmentos, inclusive o íon molecular M^+ , do β -sitosterol (t_{R} 23,47 minutos, M^+ 414), do estigmasterol (t_{R} 21,88 minutos, M^+ 412) e do. campesterol (t_{R} 21,28 minutos, M^+ 400).

Tabela 4. Dados de RMN ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 de **2+3** comparados com dados da literatura para o β -sitosterol e o estigmasterol (KOJIMA *et al.*, 1990).

| Substâncias 2+3 | | Literatura* | |
|-----------------|---------------------|---|---------------------------------------|
| C | δ_{C} | β -sitosterol (δ_{C}) | Estigmasterol (δ_{C}) |
| 1 | 37,2 | 37,2 | 37,2 |
| 2 | 31,6 | 31,6 | 31,6 |
| 3 | 71,8 | 71,8 | 71,8 |
| 4 | 42,3 | 42,3 | 42,3 |
| 5 | 140,7 | 140,7 | 140,7 |
| 6 | 121,7 | 121,7 | 121,7 |
| 7 | 31,9 | 31,9 | 31,9 |
| 8 | 31,9 | 31,9 | 31,9 |
| 9 | 50,1 | 50,1 | 50,1 |
| 10 | 36,5 | 36,5 | 36,5 |
| 11 | 21,0 | 21,1 | 21,1 |
| 12 | 39,6/ 39,7 | 39,8 | 39,7 |
| 13 | 42,3 | 42,3 | 42,2 |
| 14 | 56,7/ 56,8 | 56,3 | 56,8 |
| 15 | 24,3 | 24,3 | 24,4 |
| 16 | 28,2/ 28,9 | 28,2 | 28,9 |
| 17 | 56,0/ 55,9 | 56,0 | 55,9 |
| 18 | 11,8/ 11,9 | 11,9 | 12,0 |
| 19 | 19,4 | 19,4 | 19,4 |
| 20 | 36,1/ 40,5 | 36,1 | 40,5 |
| 21 | 18,7/ 21,2 | 18,8 | 21,2 |
| 22 | 33,9/ 138,3 | 33,9 | 138,3 |
| 23 | 26,0/ 129,2 | 26,0 | 129,2 |
| 24 | 45,8/51,2 | 45,8 | 51,2 |
| 25 | 29,1/ 31,9 | 29,1 | 31,9 |
| 26 | 19,8/ 21,0 | 19,8 | 21,1 |
| 27 | 18,9 | 19,0 | 19,0 |
| 28 | 23,0/ 25,4 | 23,0 | 25,4 |
| 29 | 12,0/ 12,2 | 12,0 | 12,3 |

*100 MHz, CDCl_3



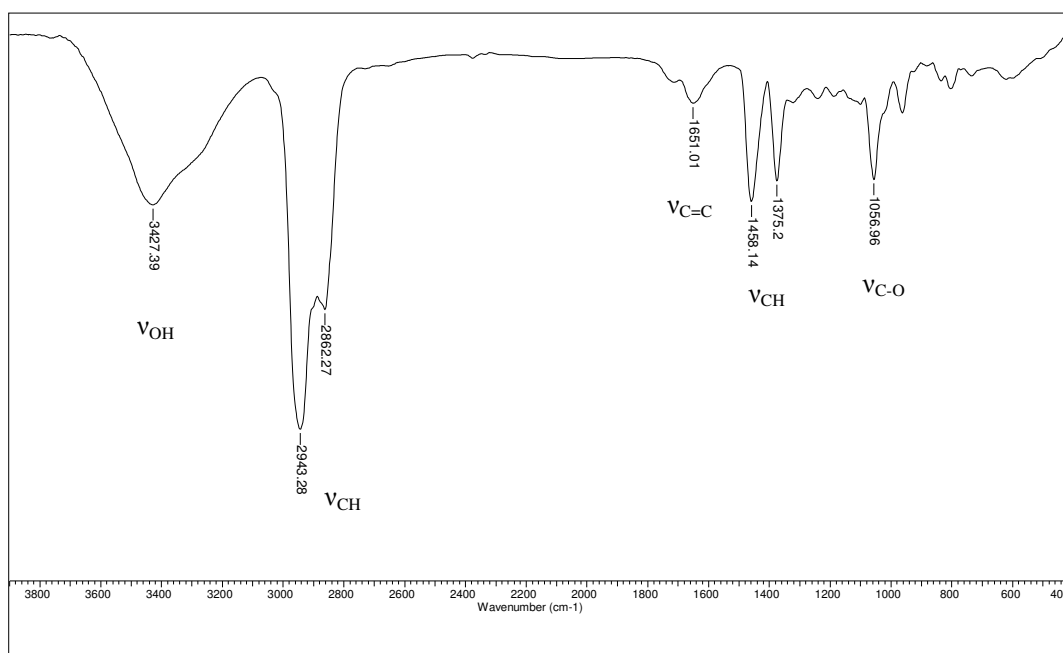


Figura 19. Espectro no IV da mistura das substâncias 2+3+4

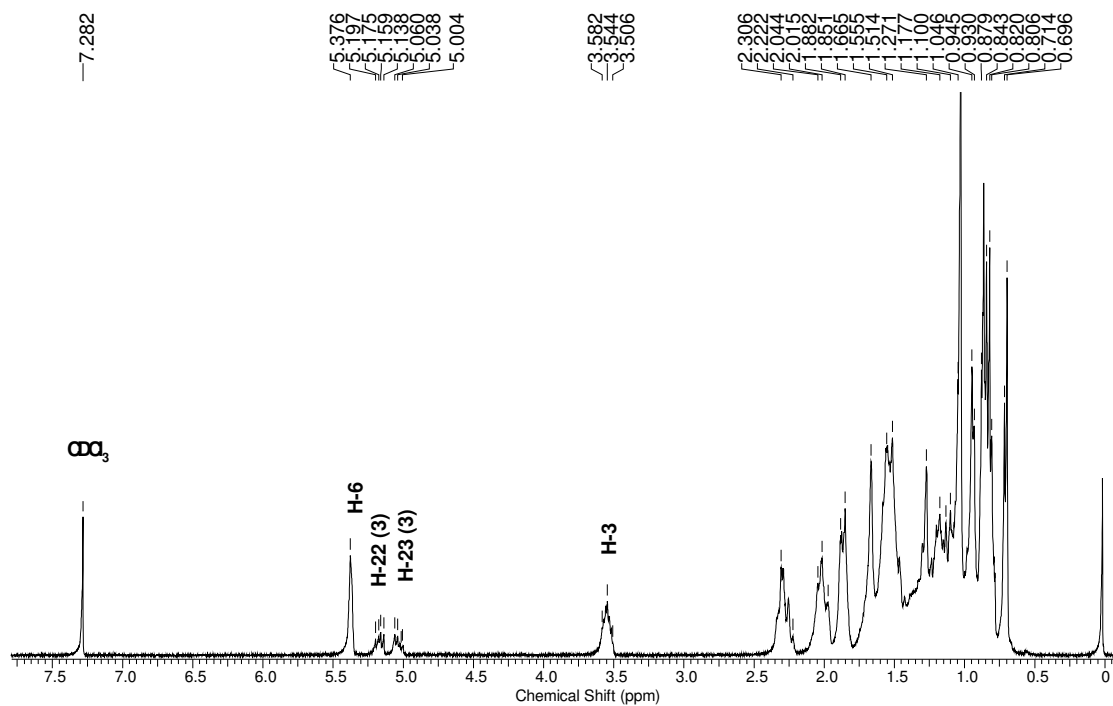


Figura 20. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) das substâncias 2+3+4

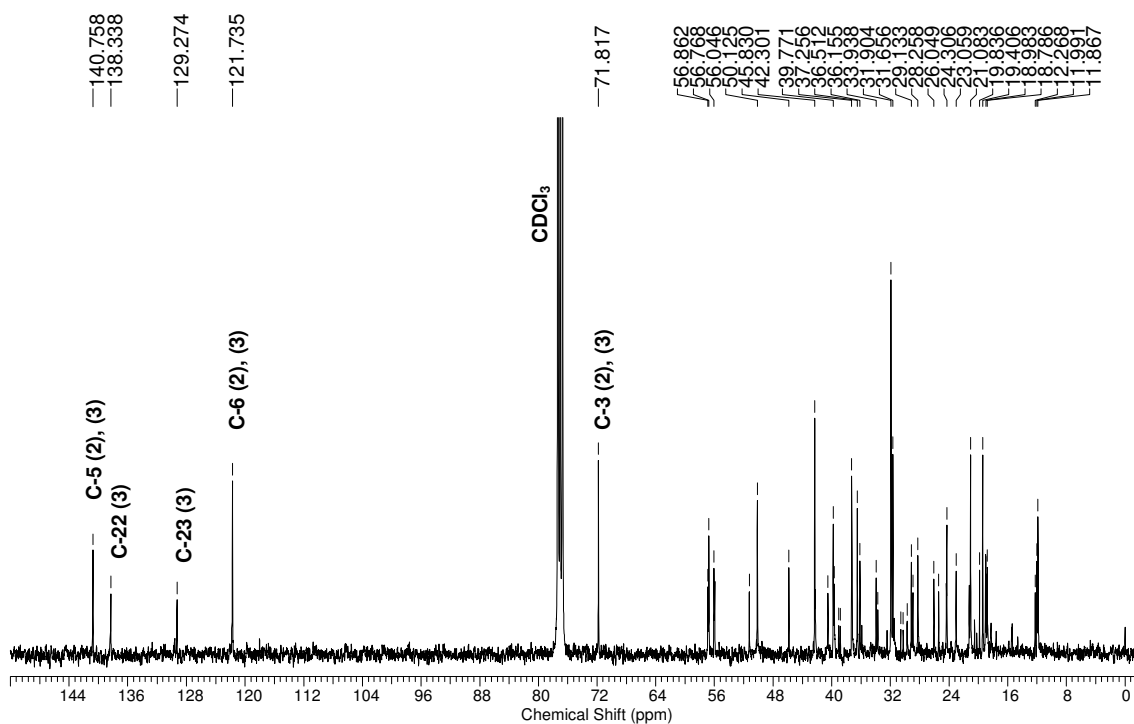


Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias 2+3+4

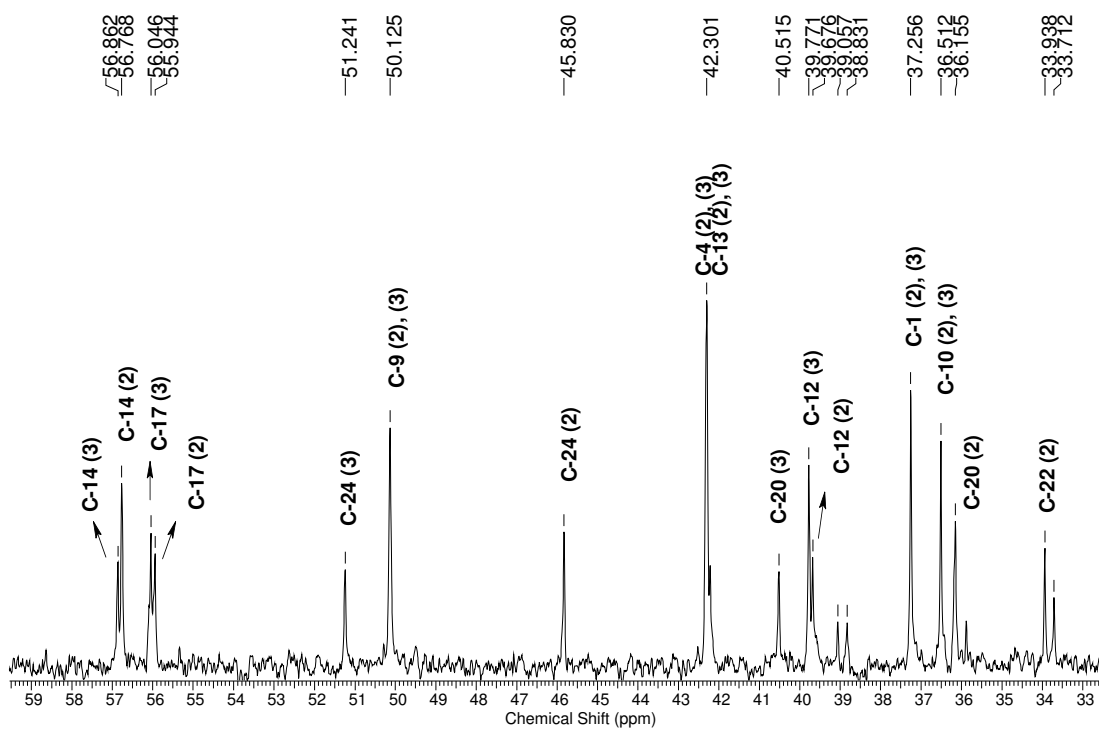


Figura 22. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias 2+3+4, entre 59,0-33,0 ppm

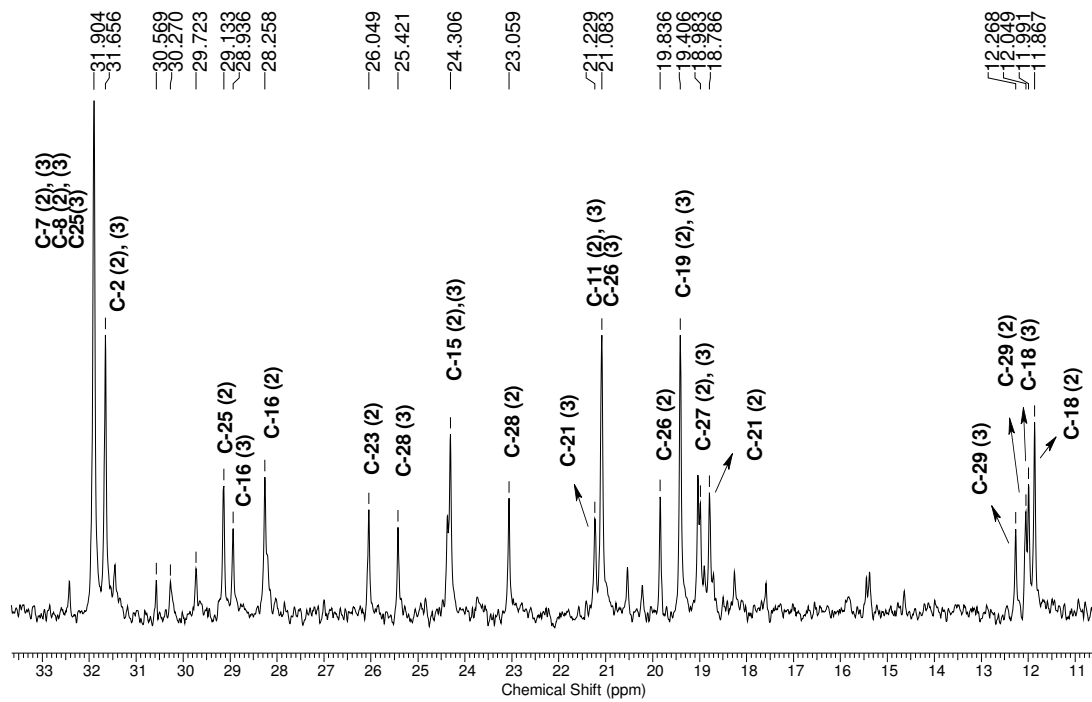


Figura 23. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias **2+3+4**, entre δ 11,0-33,0 ppm

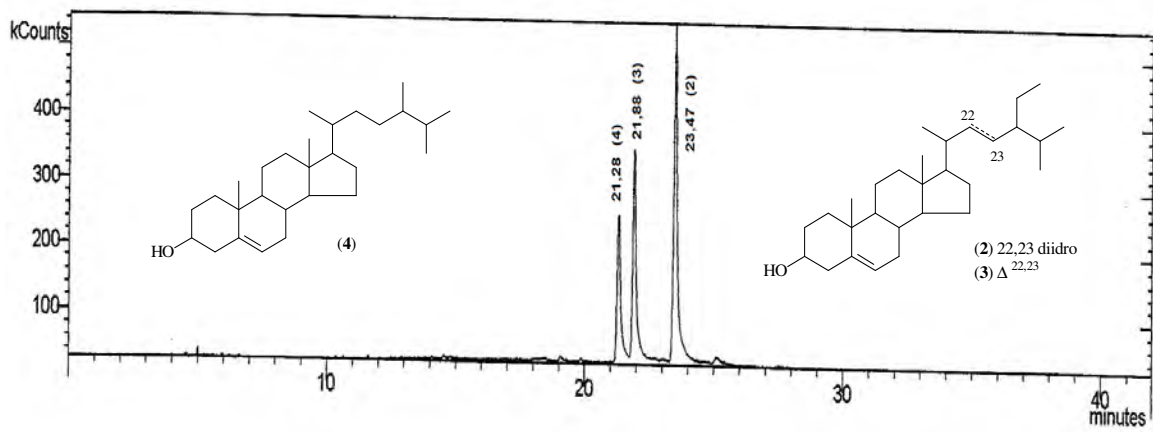


Figura 24. Cromatograma por CG da mistura das substâncias **2+3+4**

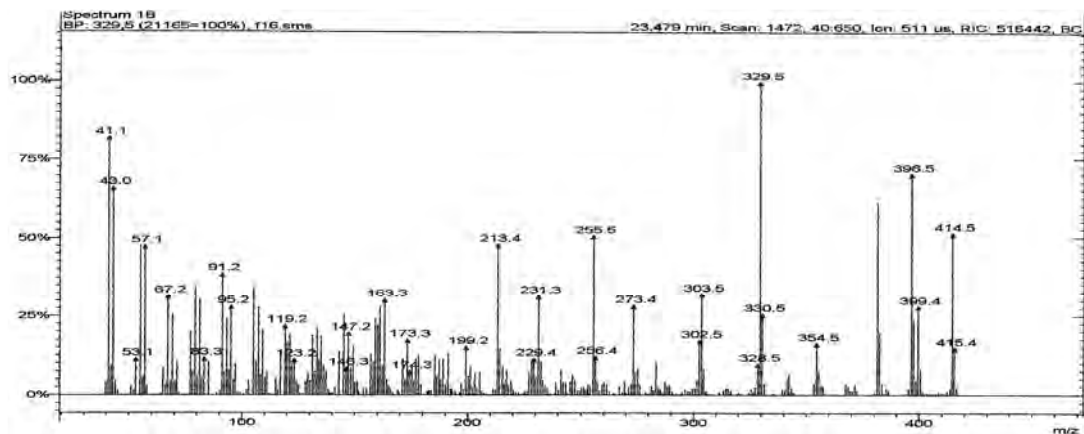


Figura 25. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância 2

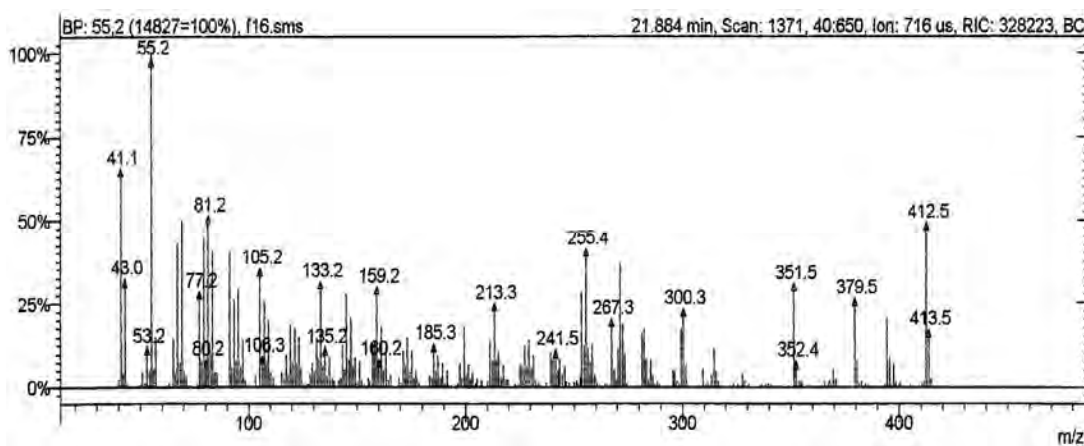


Figura 26. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância 3

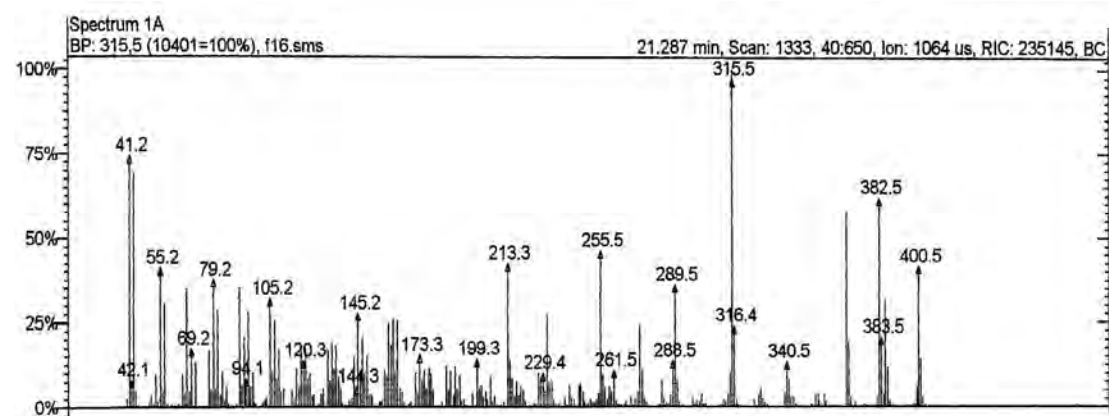
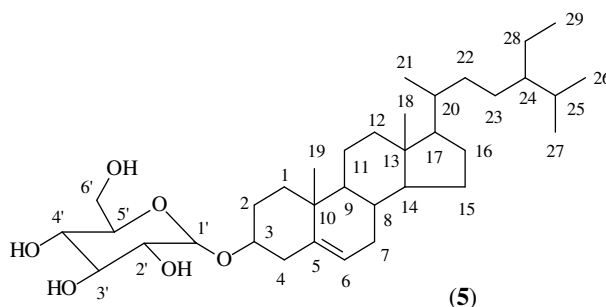


Figura 27. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância 4

5.2.3- Identificação da substância 5

A substância **5** apresentou-se como um sólido branco e foi identificada através da análise dos espectros de RMN ^1H e DEPTQ como a saponina 3-*O*- β -D-glicopiranosil sitosterol, quando comparada com dados descritos na literatura (KOJIMA *et al.*, 1990).



O espectro no IV (Figura 28, p. 49) revelou absorções ($\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$) em 3429 (ν_{OH}), 2931, 2866, 1458 e 1373 (ν_{CH}), 1637 ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$), 1068 e 1022 ($\nu_{\text{C-O}}$).

O espectro de RMN ^1H (Figura 29, p. 51) mostrou um duplete em δ_{H} 5,33 atribuído ao hidrogênio olefínico H-6, em 4,22, associado ao hidrogênio anomérico (H-1') e um conjunto de sinais entre δ_{H} 2,88-3,65 compatíveis com a unidade de carboidrato. A aparência da série de sinais entre 2,9 e 0,66 é compatível com o esqueleto de esteróide. O espectro de RMN DEPTQ (Figura 30, p. 51; Tabela 5, p. 50) mostrou sinais em δ_{C} 140,9 e δ 121,7 correspondentes aos carbonos olefínicos C-5 e C-6 de esteróide, um sinal em δ_{C} 77,2 que foi atribuído ao carbono carbinólico, C-3, e o sinal em δ 101,2 representante do carbono anomérico da unidade de açúcar ligada ao esteróide. Esta unidade foi identificada como glicose devido aos deslocamentos químicos dos carbonos metínicos em δ_{C} 77,23, 73,94, 70,56, e o sinal em 61,57 do carbono metilênico C-6'. A análise dos demais sinais do espectro de RMN DEPTQ (Figura 31, p. 52) e comparação com dados da literatura permitiram confirmar que a substância **5** tratava-se de 3-*O*- β -D-glicopiranosil sitosterol.

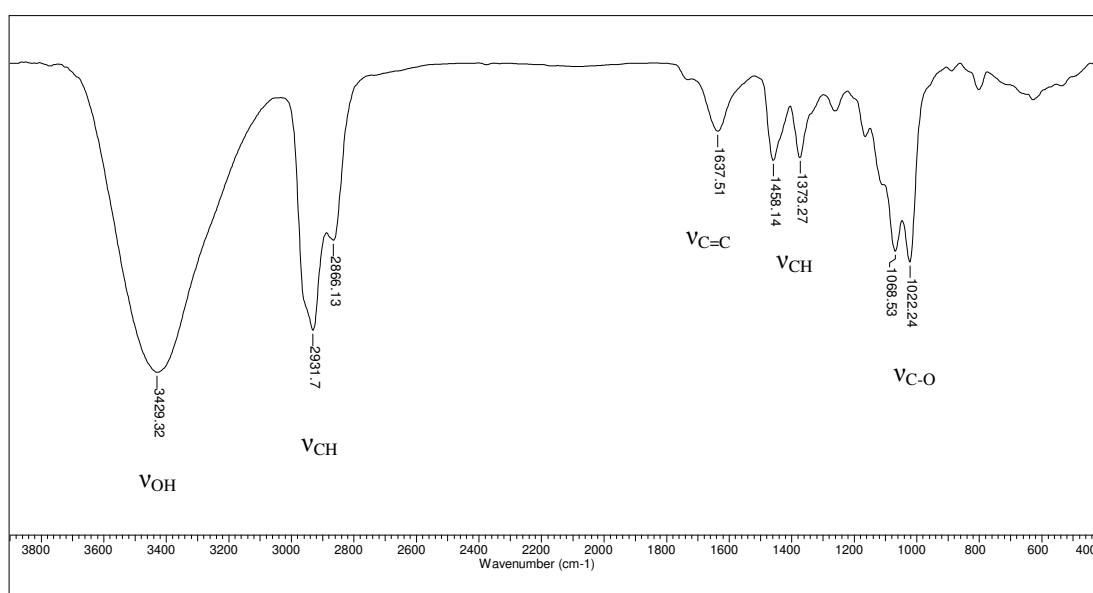
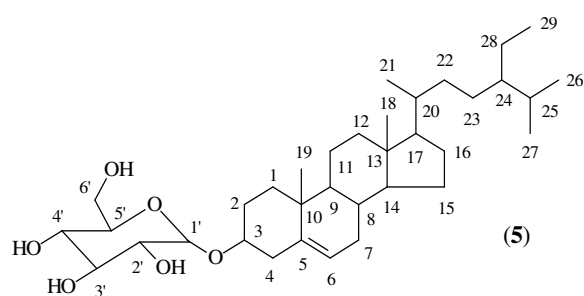


Figura 28. Espectro no IV da substância **5** em KBr

Tabela 5. Dados de RMN DEPTQ (125 MHz) em DMSO-*d*₆ de **5** comparados com dados da literatura para o 3-O-β-D-glicopiranosil sitosterol (KOJIMA *et al.*, 1990).

| Substância 5 | | Literatura* |
|---------------------|----------------|----------------|
| C | δ _C | δ _C |
| 1 | 37,3 | 37,6 |
| 2 | 29,7 | 30,3 |
| 3 | 77,2 | 78,3 |
| 4 | 38,7 | 39,4 |
| 5 | 140,9 | 140,0 |
| 6 | 121,7 | 122,0 |
| 7 | 31,8 | 32,2 |
| 8 | 31,9 | 32,1 |
| 9 | 50,0 | 50,4 |
| 10 | 36,7 | 37,0 |
| 11 | 21,0 | 21,4 |
| 12 | 40,0 | 40,0 |
| 13 | 42,3 | 42,6 |
| 14 | 56,6 | 57,0 |
| 15 | 24,3 | 24,6 |
| 16 | 28,2 | 28,7 |
| 17 | 55,9 | 56,3 |
| 18 | 12,1 | 12,0 |
| 19 | 19,5 | 19,3 |
| 20 | 35,9 | 36,5 |
| 21 | 19,4 | 19,1 |
| 22 | 33,8 | 34,3 |
| 23 | 25,9 | 26,4 |
| 24 | 45,6 | 46,1 |
| 25 | 29,1 | 29,5 |
| 26 | 19,1 | 19,5 |
| 27 | 20,2 | 20,1 |
| 28 | 23,1 | 23,4 |
| 29 | 12,2 | 12,2 |
| 1' | 101,2 | 102,6 |
| 2' | 73,9 | 75,4 |
| 3' | 77,2 | 78,7 |
| 4' | 70,6 | 71,7 |
| 5' | 77,2 | 78,5 |
| 6' | 61,5 | 62,9 |

*100 MHz, C₅D₅N



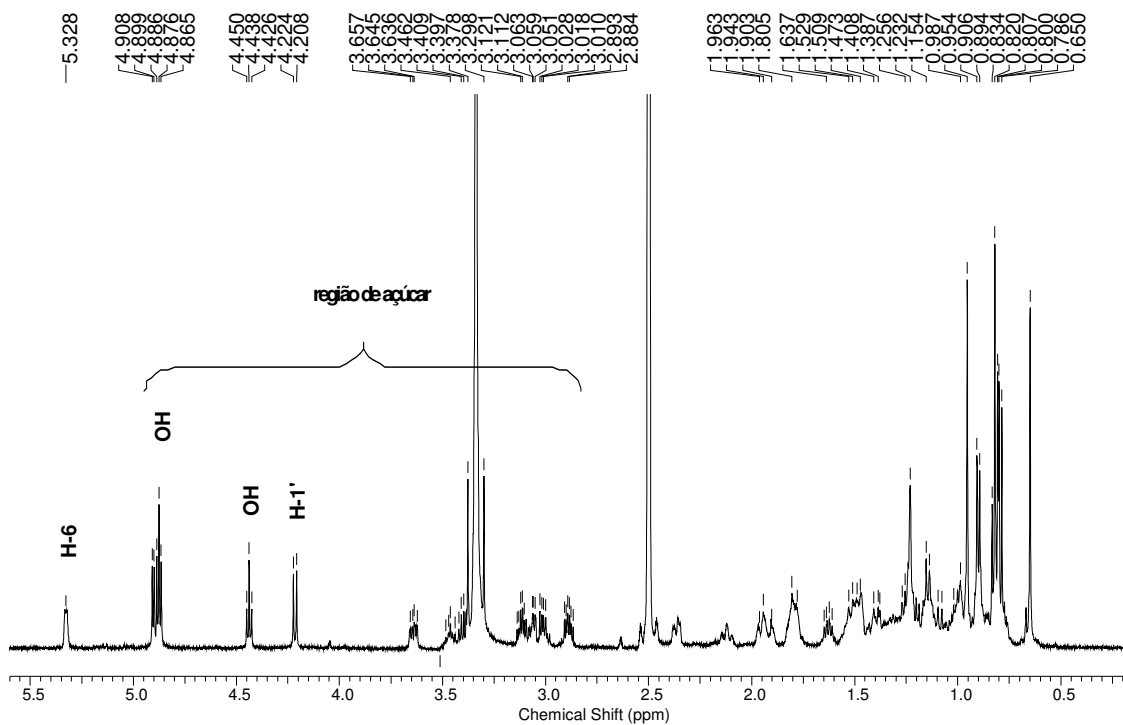


Figura 29. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância 5

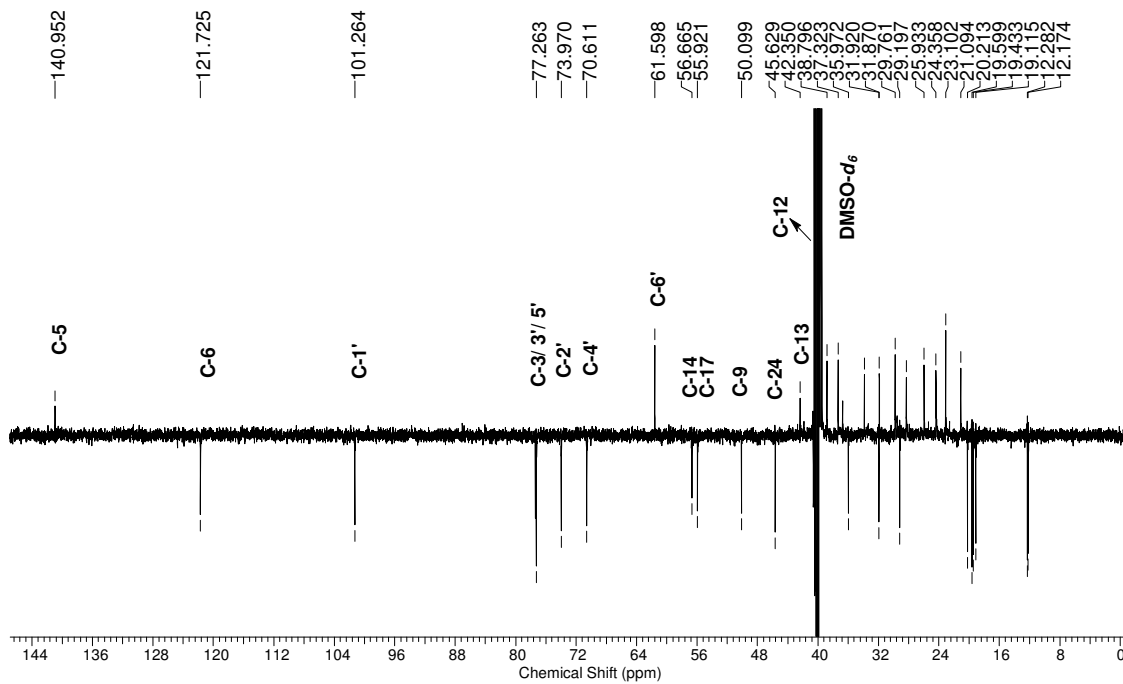


Figura 30. Espectro de RMN DEPTQ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância 5

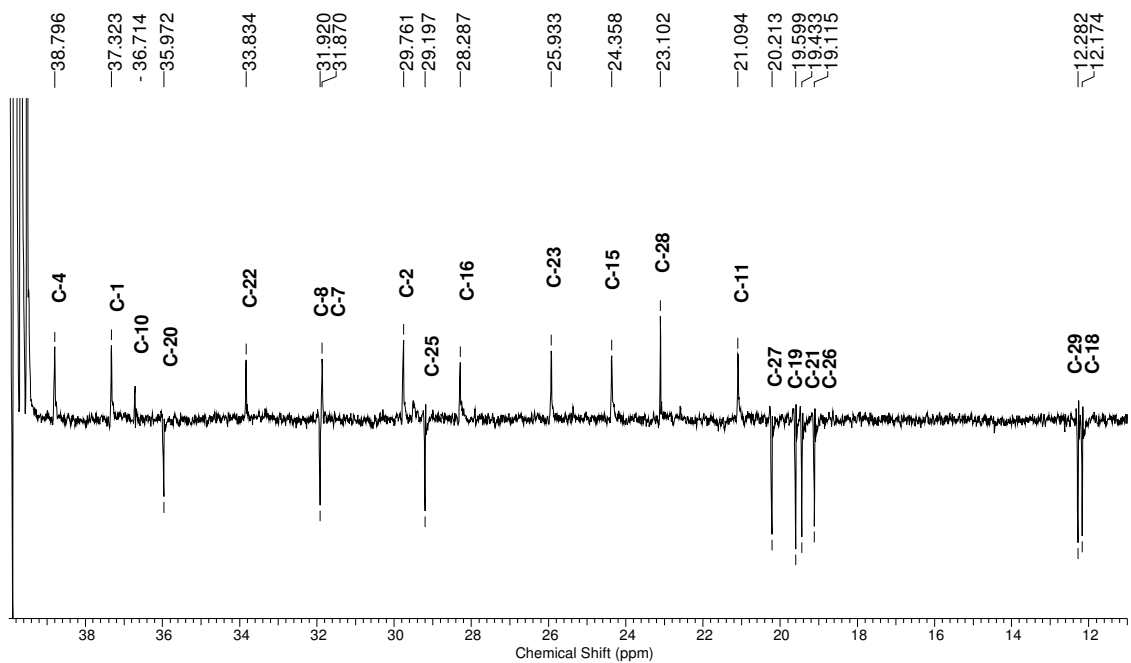
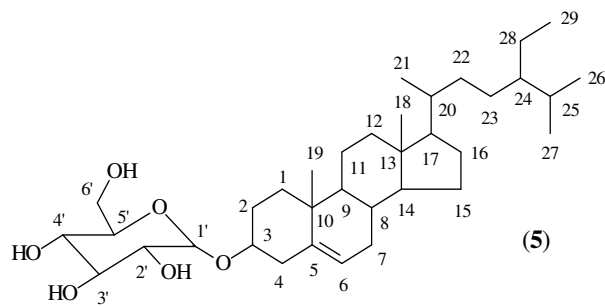
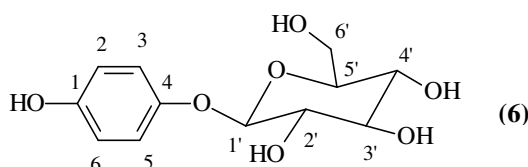


Figura 31. Expansão do espectro de RMN DEPTQ (125 MHz, DMSO- d_6) da substância de **5**, entre δ_C 12,0-40,0 ppm



5.2.4- Identificação da substância 6

A substância **6** foi isolada como um cristal incolor e após análise dos espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C e HSQC, comparados com dados da literatura, foi identificada como sendo uma hidroquinona glicosilada, o 4-hidroxifenil- β -D-glicopiranosídeo, também conhecida como arbutina (HISATOMI *et al.* 2000).



O espectro no IV (Figura 32, p. 53) revelou absorções ($\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$) em 3406 (ν_{OH}), 2923, 2856, 1514 (ν_{CH}), 1639, 1514 e 1217 ($\nu_{\text{C=C}}$) e 1010 ($\nu_{\text{C-O}}$).

O espectro de RMN ^1H (Figura 33, p.54) na região de hidrogênios de sistema aromáticos demonstrou dois dupletos em δ_{H} 6,90 ($J= 9,2 \text{ Hz}$; 2H) e 6,63 ($J= 8,8 \text{ Hz}$; 2H), sugerindo um anel benzênico *p*-substituído. Esta proposta foi confirmada pelo espectro de RMN ^{13}C que exibiu sinais em δ_{C} 152,4, 151,0, 117,9 e 115,2 (Figura 34, p. 55). Os sinais no RMN ^1H entre δ_{H} 3,30 – 3,83 e ^{13}C em δ_{C} 102,2, 76,6, 73,6, 70,0 e 61,1 apontam a presença de uma unidade de açúcar. O duplete em δ_{H} 4,67 ($J= 7,2 \text{ Hz}$) refere-se ao hidrogênio do carbono anomérico e o valor de J indica o açúcar com configuração β . O espectro de HSQC (Figura 35, p. 55) permitiu atribuir inequivocadamente os deslocamentos de carbono e hidrogênio do anel benzênico e do carboidrato (Tabela 6, p. 54).

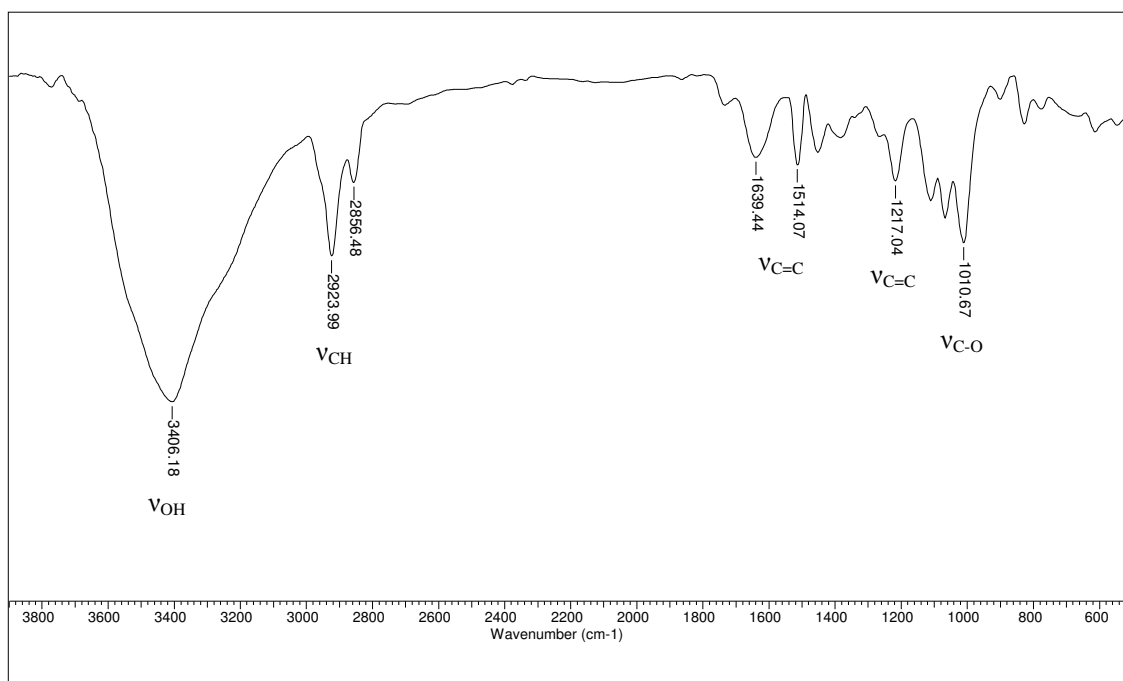


Figura 32. Espectro no IV da substância **6** em KBr

Tabela 6: Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz) e ^1H (400 MHz) em CD_3OD de **6** comparados a literatura para a arbutina (HISATOMI *et al.* 2000).

| Substancia 6 | | | Literatura | |
|--------------|---------------------|-------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| C | δ_{C} | δ_{H} [mult., J (Hz)] | δ_{C}^* | δ_{H} [mult., J (Hz)]** |
| 1 | 152,4 | ----- | 153,8 | ----- |
| 2 | 117,9 | 6,90 (d, J= 9,2) | 119,4 | 6,96 (d, J= 8,9) |
| 3 | 115,2 | 6,63 (d, J= 8,8) | 116,6 | 6,68 (d, J= 9,2) |
| 4 | 151, | ----- | 152,4 | ----- |
| 5 | 115,2 | 6,63 (d, J= 8,8) | 116,6 | 6,68 (d, J= 9,2) |
| 6 | 117,9 | 6,90 (d, J= 9,2) | 119,4 | 6,96 (d, J= 8,9) |
| 1' | 102,2 | 4,67 (d, J= 7,2) | 103,6 | 4,72 (d, J= 7,6) |
| 2' | 73,6 | 3,30 – 3,35 (m) | 75,0 | 3,37 – 3,41 (m) |
| 3' | 76,6 | 3,30 – 3,35 (m) | 78,0 | 3,37 – 3,41 (m) |
| 4' | 70,0 | 3,30 – 3,35 (m) | 71,4 | 3,37 – 3,41 (m) |
| 5' | 76,6 | 3,30 – 3,35 (m) | 78,0 | 3,37 – 3,41 (m) |
| 6' | 61,1 | 3,81 (d, J= 12,0) 3,61-3,65 (dl) | 62,5 | 3,88 (d, J= 11,9) 3,67 – 3,70 (dl) |

*100 MHz, CD_3OD ; ** 270 MHz, CD_3OD

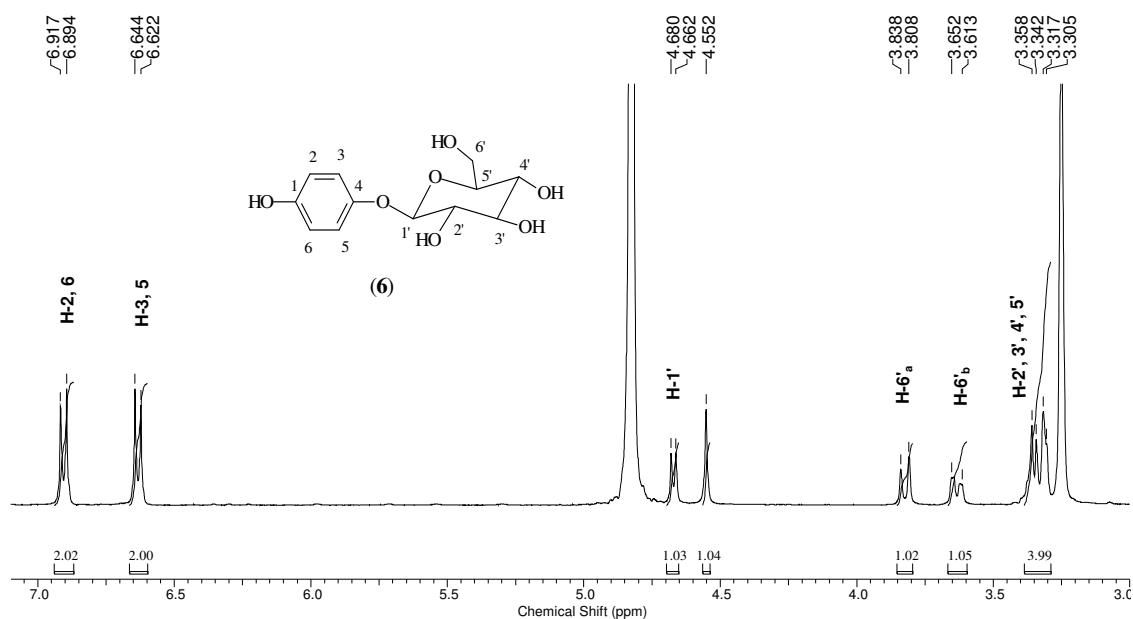


Figura 33. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da substância **6**

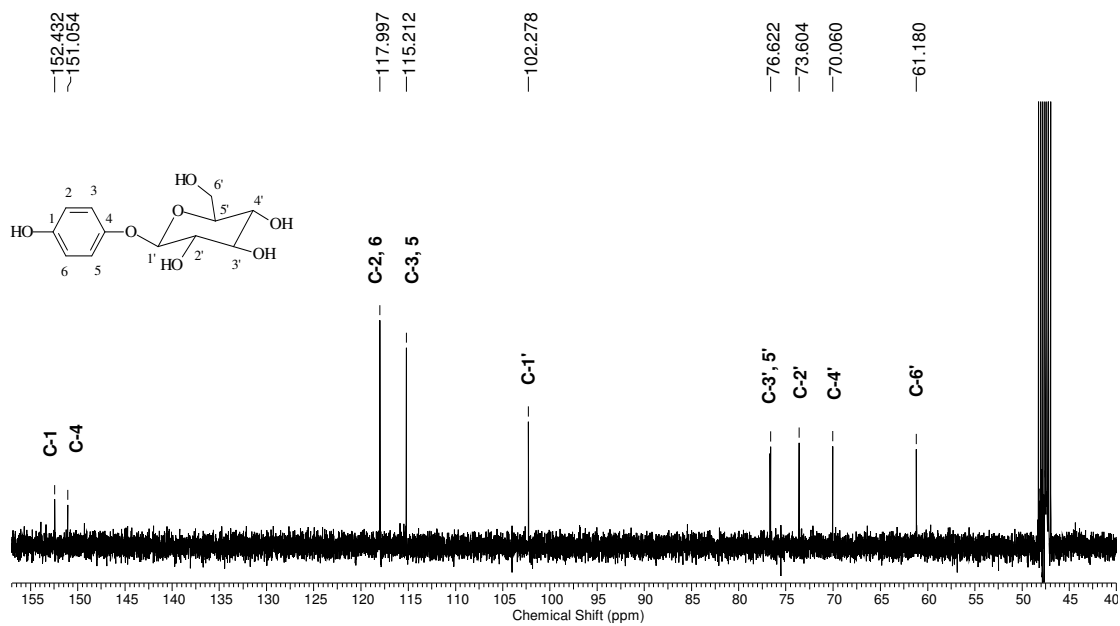


Figura 34. Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) da substância 6

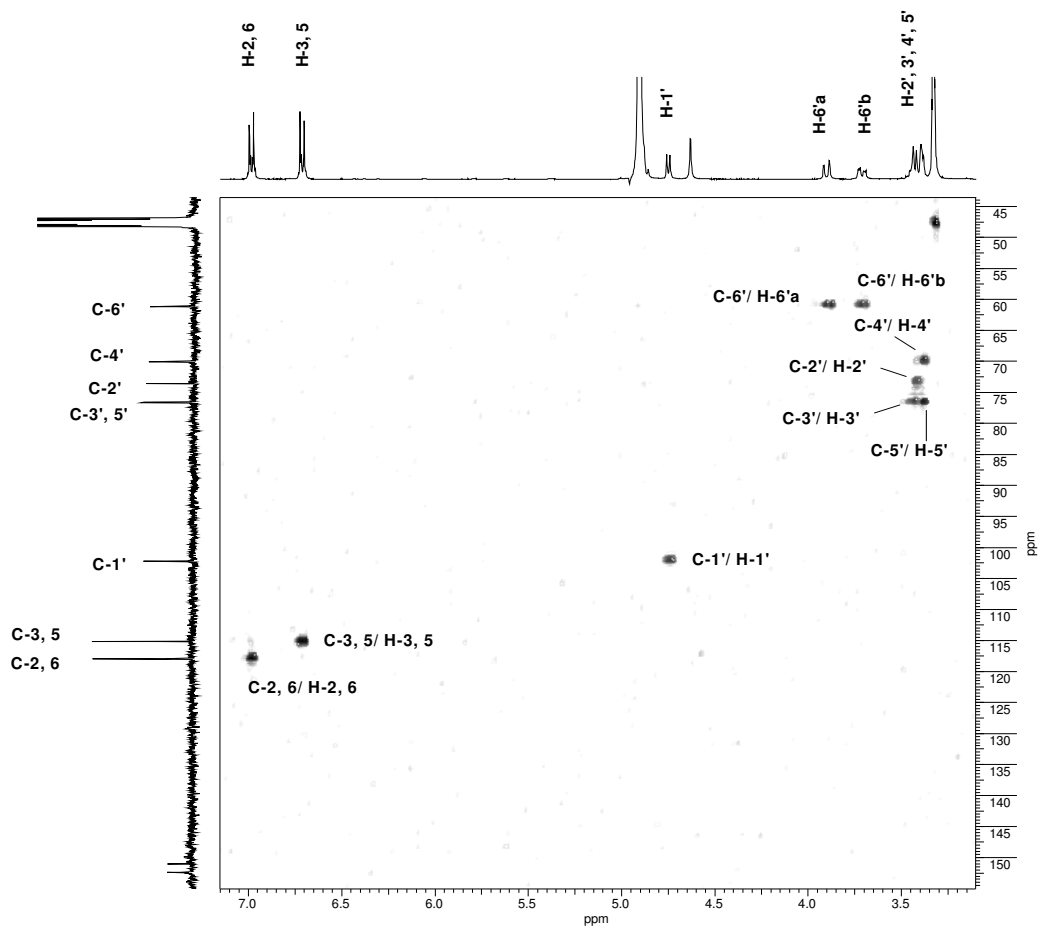
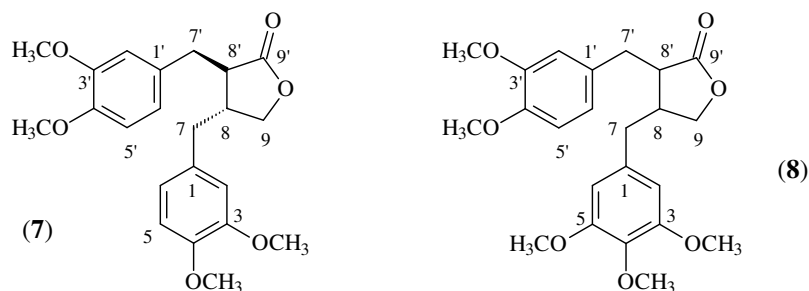


Figura 35. Espectro de RMN de HSQC (400/100 MHz, CD₃OD) da substância 6

5.2.5- Identificação das substâncias 7 e 8

A substância **7** foi identificada como a lignana dimetilmatairesinol após análise dos espectros de RMN 1D e 2D, além de CG-EM, e comparação com a literatura (HELENO *et al.*, 2006; WEBER, 2005). Os espectros mostram sinais apenas para **7**, mas a análise por CG-EM demonstrou a presença de mais uma substância com o mesmo padrão de fragmentação de **7**, sugerindo tratar-se de outra lignana, a 3',4'-dimetoxibenzil-3,4,5-trimetoxibenzilbutirolactona (**8**) (NISHIBE *et al.* 1981).



O espectro no IV (Figura 36, p. 58) apresentou absorções (ν_{\max} cm^{-1}) em 2922, 2854, 1598 (ν_{CH}), 1768 ($\nu_{\text{C=O}}$ de carbonila de lactona), 1508 e 1247 ($\nu_{\text{C=C}}$) e 1028 ($\nu_{\text{C-O}}$).

O espectro de RMN de ^1H mostrou quatro dupletos em δ_{H} 6,79 ($J= 8,0$ Hz), 6,77 ($J= 8,0$ Hz), 6,70 ($J= 2,0$ Hz) e 6,50 ($J= 2,0$ Hz) os quais foram associados a H-5', H-5, H-2'- H-2, respectivamente (Figuras 37 e 38, p. 58 e 59). Observaram-se, também, dois duplo dupletos em δ_{H} 6,68 ($J= 8,4; 2,0$ Hz; H6') e 6,57 ($J= 8,2; 2,0$ Hz; H-6). Estes sinais caracterizam a presença de dois sistemas 1,3,4 trissubstituído na molécula. O acoplamento entre esses átomos puderam ser confirmados pelo espectro de COSY (Figura, 42 e 43A, p. 61).

No espectro de RMN de ^1H foram observados, ainda, quatro singletos em δ_{H} 3,89, 3,88, 3,86 e 3,84, com integração para doze hidrogênios, o que permitiu sugerir a presença de quatro metoxilas na estrutura (Figura 39, p. 59).

Através do espectro de RMN DEPTQ (Figura 41, p. 60 Tabela 7, p. 57) foi possível a detecção de um carbono carbonílico em δ_{C} 176,0, característico de lactona com cinco membros, além de um sinal em δ_{C} 71,2 atribuído a um carbono cabinólico. Este último foi relacionado aos multipletos em δ_{H} 4,13-4,17 (H-9a) e 3,90-3,92 (H-9b) pelo espectro de HSQC (Figuras 44 e 45A, p. 62).

Os multipletos em δ_{H} 2,51-2,53 e 2,59-2,64 (Figura 40, p. 60) foram associados aos carbonos metínicos em δ_{C} 46,5 (C-8') e 41,0 (C-8), respectivamente, pelo espectro de HSQC (Figura 39, p. 59), bem como os carbonos metilênicos C-7' em δ_{H} 2,96-2,98 (*m*; H-7') e C-7 em δ_{H} 2,67 (*d*, $J= 7,4$ Hz, H-7a) e 2,56 (*d*, $J= 8,4$ Hz, H-7b). O espectro de COSY auxiliou na confirmação dos acoplamentos entre H-7a e H-7b além de H-7' e H-8' (Figura 43B, p. 61).

A análise do espectro de HSQC (Figuras 44 e 45, p. 62) permitiu atribuir inequivocadamente os deslocamentos de carbono e hidrogênio para a lignana **7**.

Esta lignana pode apresentar configuração *cis* ou *trans* entre os carbonos C-8 e C-8'. Esta configuração é definida com base nos sinais dos hidrogênios H-9a e H-9b. Quando há equivalência entre as constantes de acoplamento entre H-9a e H-9b com H-8, a configuração é *cis*, enquanto que a não equivalência é *trans*. Isso ocorre devido ao fato da configuração *cis* formar um ângulo diedro entre H-9a e H-9b com H-8, onde não há acoplamento entre H-9a e H-9b com H-8, originando no RMN ^1H apenas um singletto largo (LOPES *et al.*, 1983). Assim, como foram atribuídos a esses hidrogênios (H-9a e H-9b) dois multipletos, a configuração relativa foi definida como *trans* para a lignana **7**.

A análise por CG-EM de **7** (Figura 46, p. 63) forneceu um pico em 26,92 e outro em 28,8 minutos. O primeiro exibiu o espectro de massas cujo pico do íon-molecular em m/z 386 (M^+) e o pico base em m/z 151, mostraram estar de acordo com fórmula molecular $C_{22}H_{26}O_6$ (Figura 47, p. 62). O pico em 28,8 minutos forneceu espectro de massas com íon-molecular em m/z 416 (M^+), compatível com a fórmula molecular $C_{23}H_{28}O_7$. Os picos adicionais em m/z 182 e 151 confirmam a proposta estrutural para a lignana **8** (Figuras 49, p. 64). As fragmentações sugeridas reforçam a proposta estrutural para ambas (Figuras 48 e 50, p. 63 e 64).

Tabela 7. Dados de RMN ^{13}C (100 MHz) e 1H (400 MHz) de **7** em $CDCl_3$ comparados com dados da literatura para a *trans*-dimetilmatairesinol (HELENO *et al.* 2006).

| Substância 7 | | | Literatura* | |
|--------------|---------------------|------------------------------------|-------------|--|
| C | δ_C DEPTQ | δ_H [mult., J (Hz)] | δ_C | δ_H [mult., J (Hz)] |
| 1 | 130,1 | ----- | 131,58 | ----- |
| 2 | 111,7 | 6,50 (d) J= 2,0 | 108,75 | 6,33 (d) J= 2,1 |
| 3 | 149,0 | ----- | 146,35 | ----- |
| 4 | 149,0 | ----- | 147,87 | ----- |
| 5 | 111,2 | 6,77 (d) J= 8,0 | 108,28 | 6,59 (d) J= 8,1 |
| 6 | 120,5 | 6,57 (dd) J= 8,2; 2,0 | 121,56 | 6,40 (d) J= 8,1; 2,1 |
| 7 | 38,1 | 2,67 (d) J= 7,4 2,56 (d) J= 8,4 | 38,33 | 2,32 (dd) J= 13,4; 5,8 2,05 (dd) J= 13,4; 8,0 |
| 8 | 41,0 | 2,51-2,53 (m) | 41,05 | 2,20(ddddd) J= 9,1; 8,2; 8,0; 7,3; 5,8 |
| 9 | 71,2 | 4,13-4,17 (m) 3,90-3,92 (m) | 71,18 | 3,74 (dd) J= 8,8; 7,3 3,40 (dd) J= 8,8; 8,2 |
| 10 | 55,8 | 3,89 (s) | 56,20 | 3,55 (s) |
| 11 | 55,8 | 3,88 (s) | 56,16 | 3,50 (s) |
| 12 | 55,8 | 3,86 (s) | 56,13 | 3,46 (s) |
| 13 | 55,8 | 3,84 (s) | 56,16 | 3,52 (s) |
| 1' | 130,4 | ----- | 130,1 | ----- |
| 2' | 112,3 | 6,70 (d) J= 2,0 | 112,09 | 6,70 (d) J= 2,0 |
| 3' | 149,0 | ----- | 149,04 | ----- |
| 4' | 149,0 | ----- | 147,92 | ----- |
| 5' | 111,0 | 6,79 (d) J= 8,0 | 111,04 | 6,61 (d) J= 8,3 |
| 6' | 121,3 | 6,68 (dd) J= 8,4; 2,0 | 121,34 | 6,69 (dd) J= 8,3; 2,0 |
| 7' | 34,4 | 2,96-2,98 (m) | 34,62 | 2,95 (dd) J= 14,0; 6,3 2,91 (dd) J= 14,0; 5,6 |
| 8' | 46,5 | 2,59-2,64 (m) | 46,52 | 2,26 (ddd) J= 9,1; 6,3; 5,6 |
| 9' | 174,4 | ----- | 178,66 | ----- |

* 400 MHz, C_6D_6

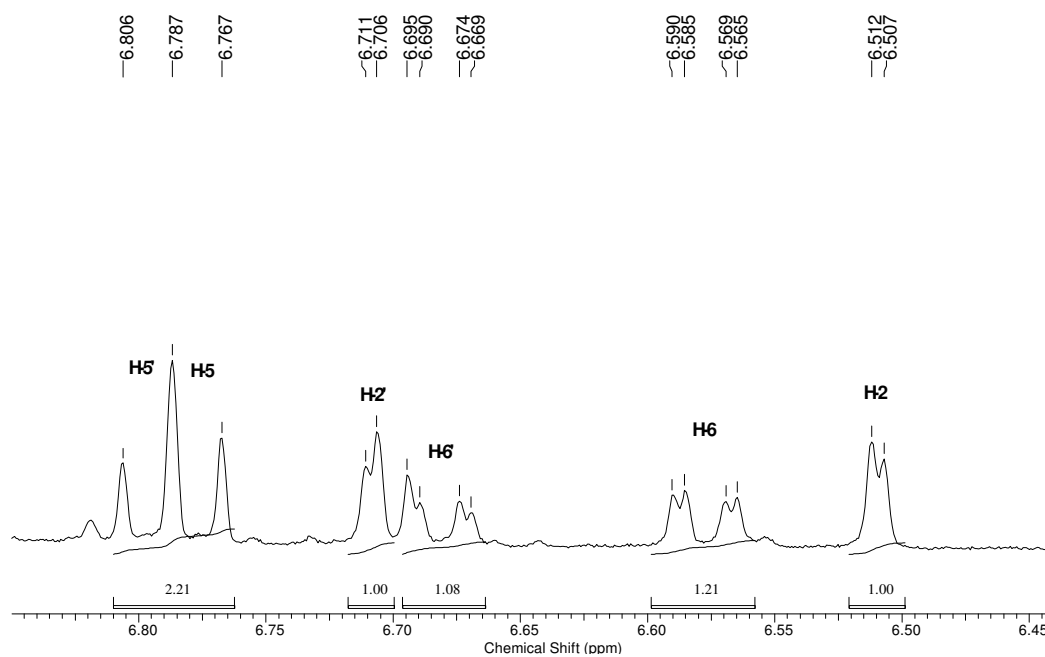


Figura 38. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) das substâncias **7+8**, entre δ_{H} 6,45-6,85 ppm

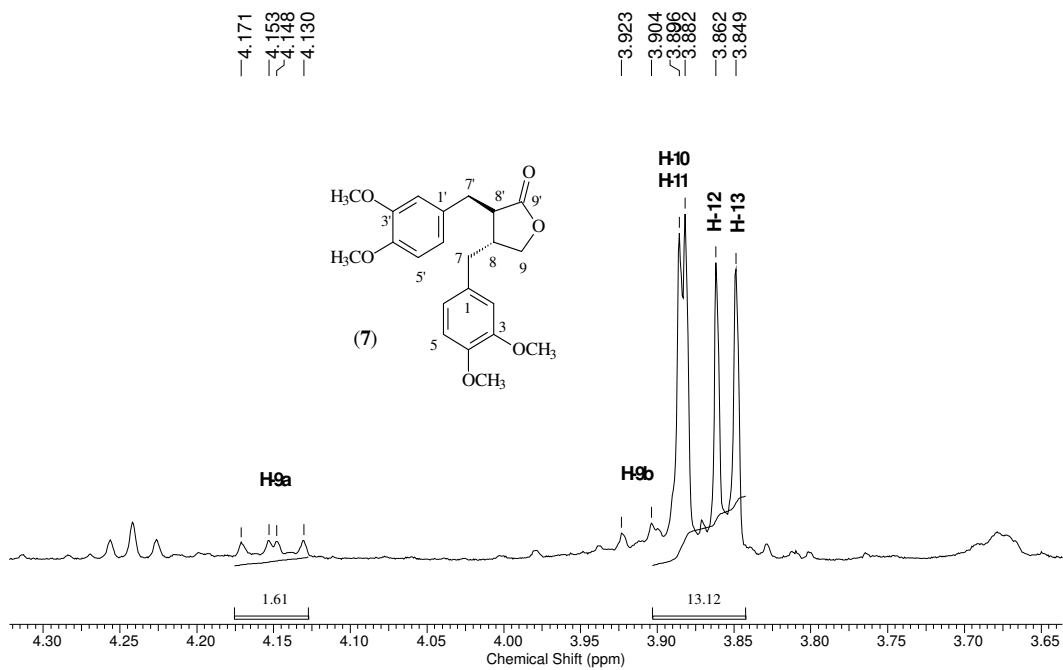


Figura 39. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) das substâncias **7+8**, entre δ_{H} 3,65-4,30 ppm

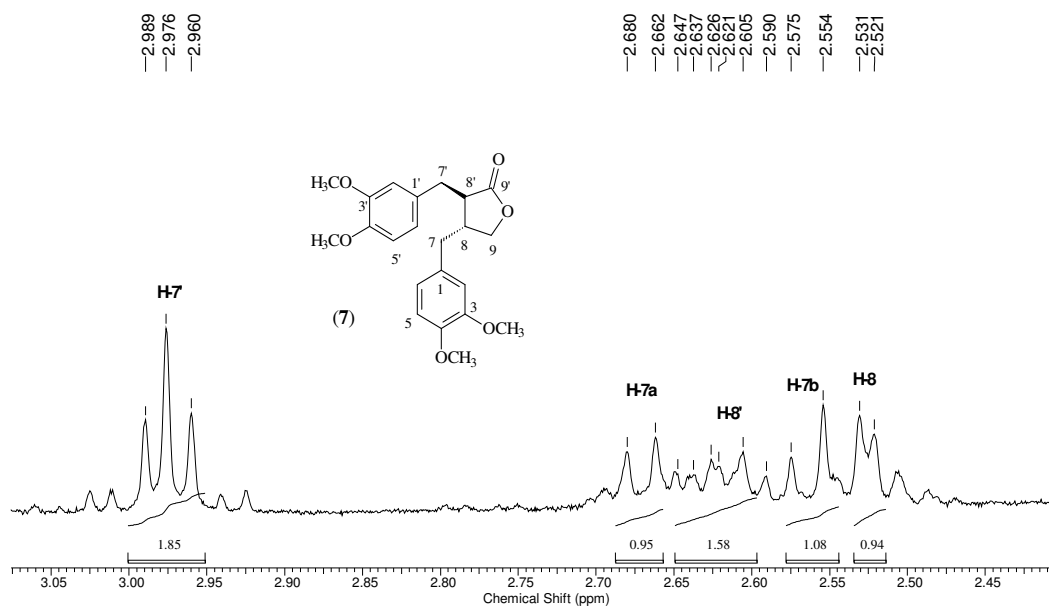


Figura 40. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) das substâncias **7+8**, entre δ_{H} 2,45-3,05 ppm

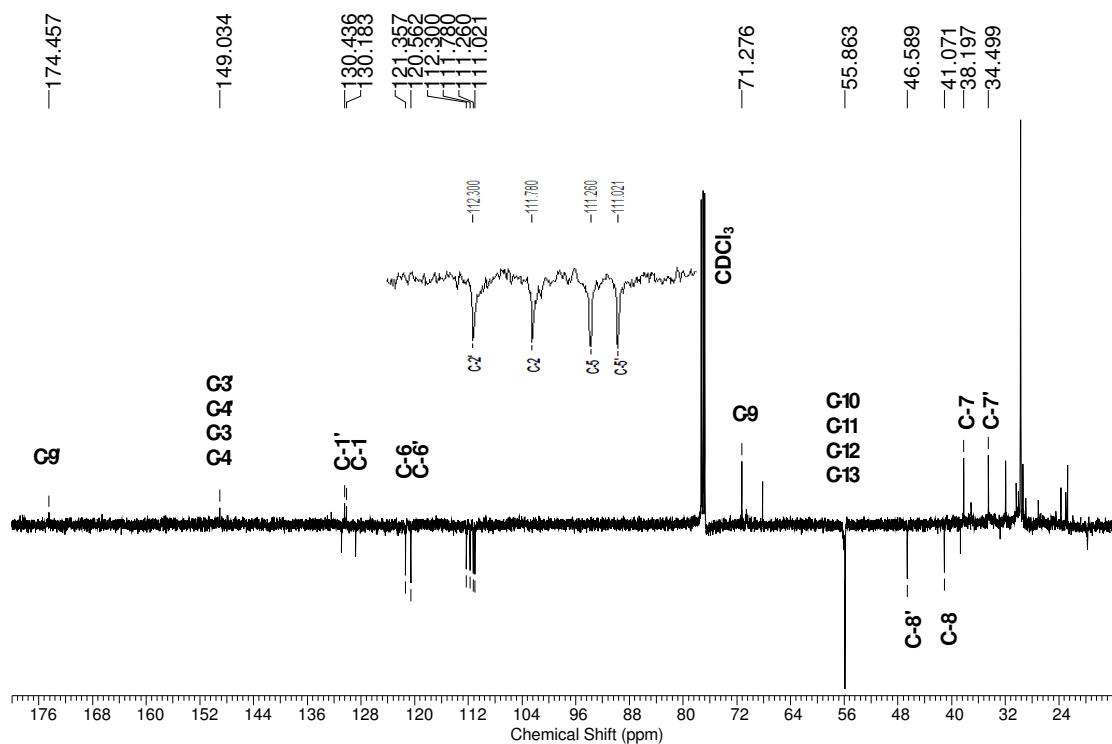


Figura 41. Espectro de RMN DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) das substâncias **7+8**

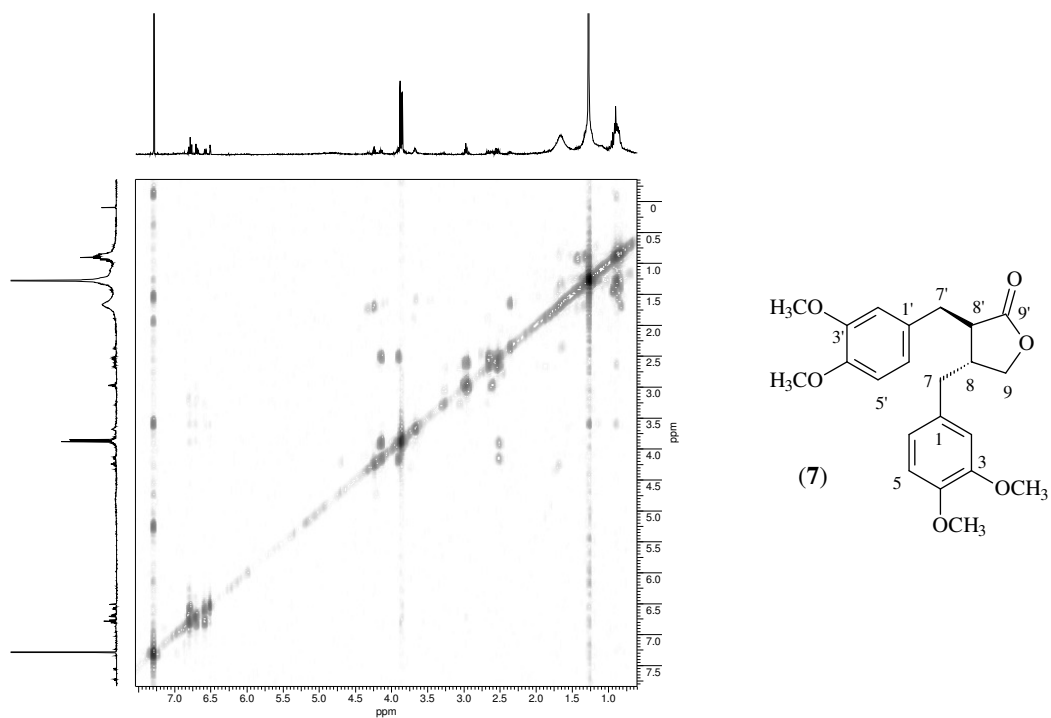


Figura 42. Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl₃) das substâncias 7+8

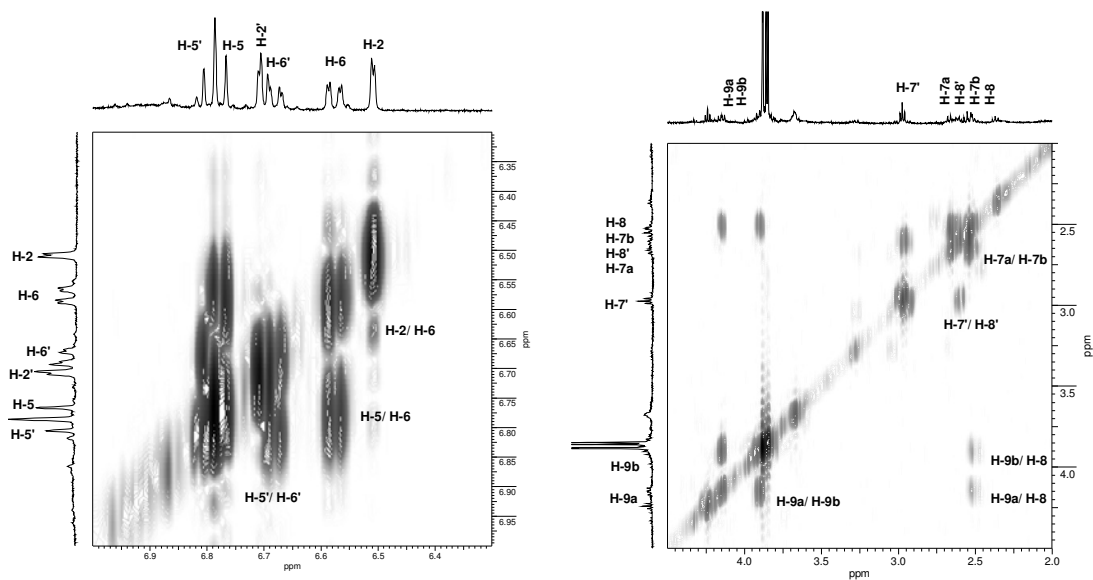


Figura 43. Expansão do espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl₃) das substâncias 7+8
 43A: entre δ_H 6,35-6,95 ppm 43B: entre δ_H 2,00-4,50

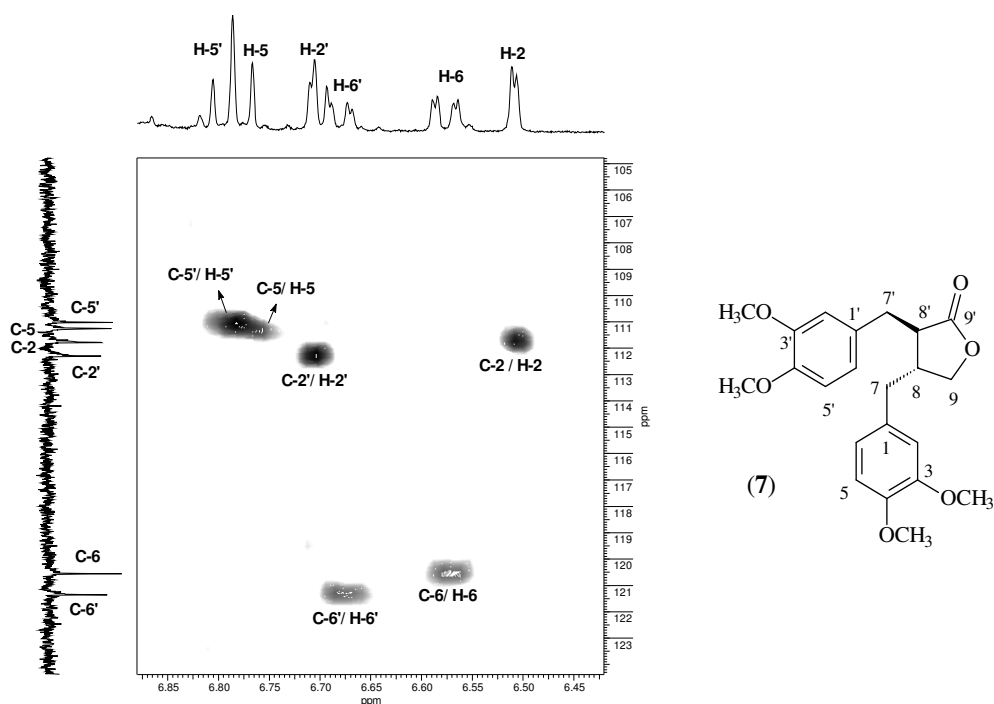


Figura 44. Expansão do espectro de RMN HSQC (400/100 MHz, CDCl_3) das substâncias **7+8**, entre δ_{H} 6,47-6,87 δ_{C} 105,0-124,0 ppm

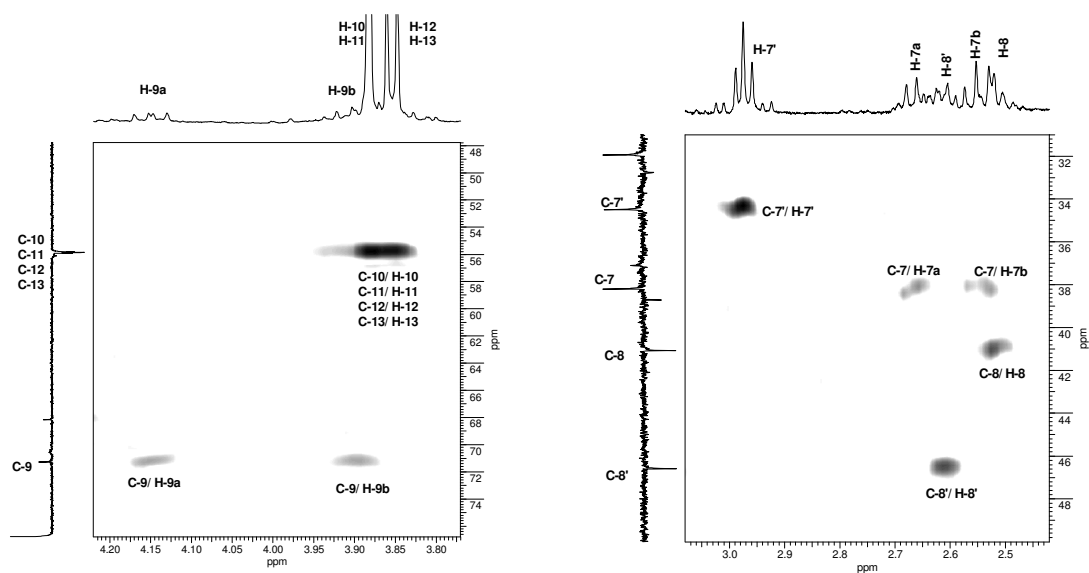


Figura 45. Expansões do espectro de RMN de HSQC (400/100 MHz, CDCl_3) das substâncias **7+8**
45A: entre δ_{H} 3,78-4,20 δ_{C} 48,0-77,0 ppm **45B:** entre δ_{H} 2,45-3,05 δ_{C} 31,0-50,0 ppm

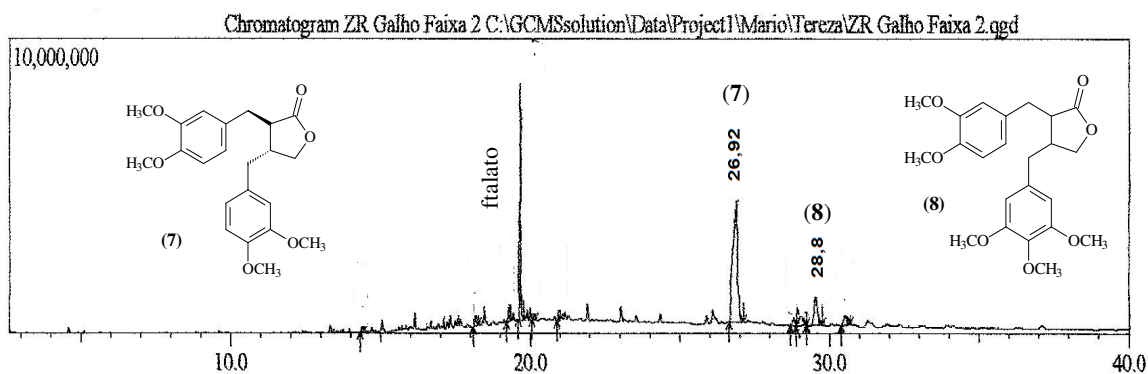


Figura 46. Cromatograma por CG da mistura das substâncias de 7+8

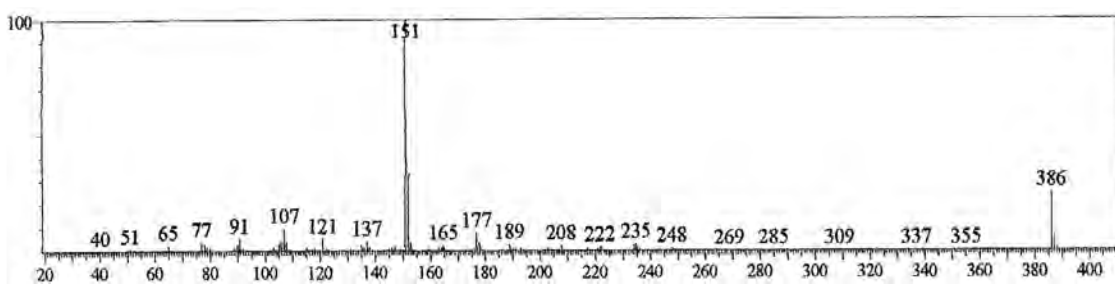


Figura 47. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de 7

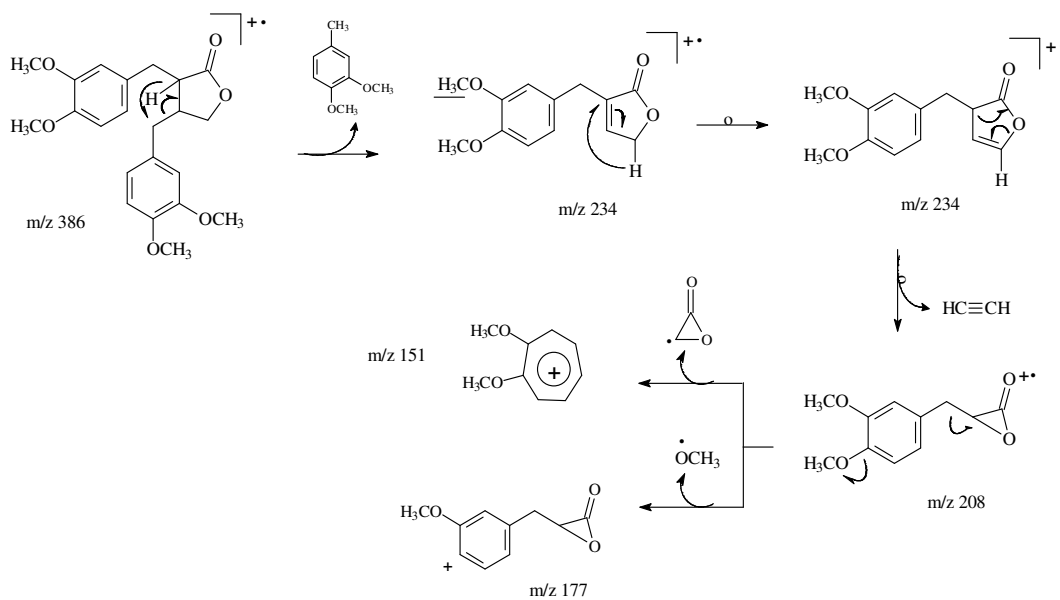


Figura 48. Proposta de fragmentação para a substância 7

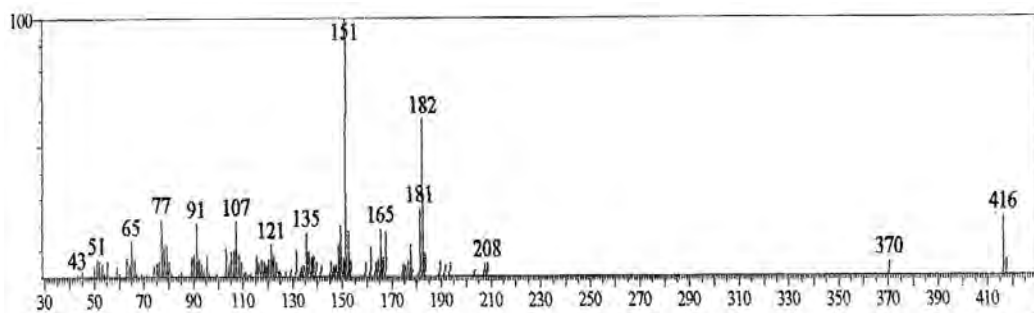


Figura 49. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de **8**

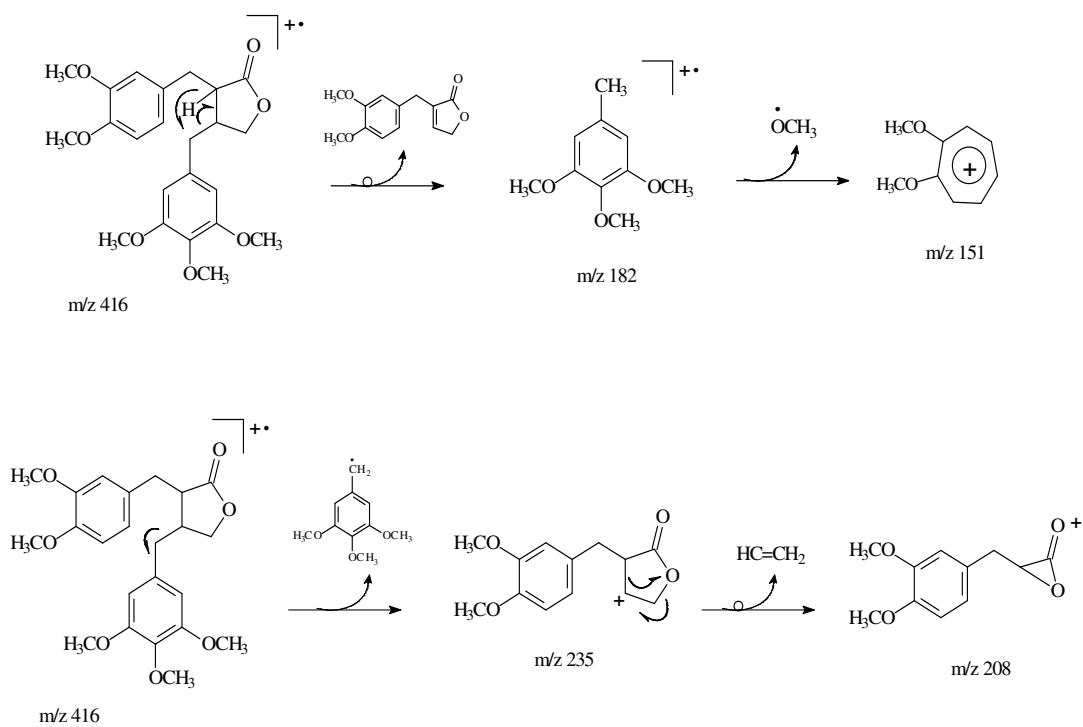
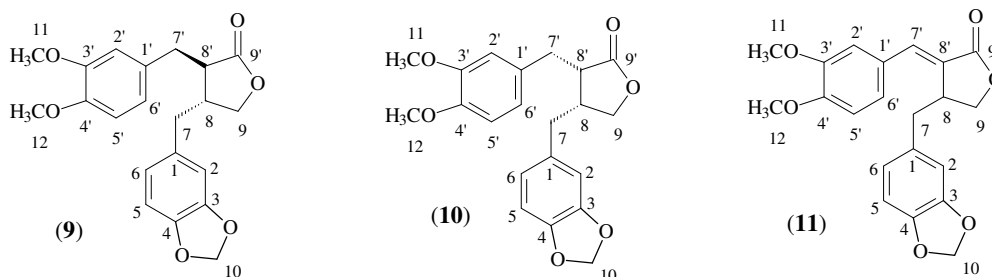


Figura 50. Proposta de fragmentação para a substância **8**

5.2.6- Identificação de 9, 10 e 11

A mistura codificada Fx.4 foi identificada como uma mistura de 3 lignanas, sendo elas a *trans*-metilpluviatolido (**9**), *cis*-metilpluviatolido (**10**) e a kaerofilina (**11**). A análise dos espectros de RMN 1D e 2D e comparação com a literatura (HELENO *et al.*, 2006), mostraram-se compatíveis sinais para a lignana **9** e alguns sinais para **10** (RIBEIRO *et al.*, 2012). A outra foi identificada através de CG-EM devido às fragmentações características de lignanas quando comparados com a literatura (WEBER, 2005; KHADGA *et al.*, 1993).



O espectro no IV (Figura 51, p. 68) apresentou absorções (ν_{\max} cm^{-1}) em 2950, 2839, 1593 (ν_{CH}), 1760 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$ de carbonila de lactona), 1516 e 1251 ($\nu_{\text{C=C}}$) e 1024 ($\nu_{\text{C-O}}$).

O espectro de RMN de ^1H de **9** mostrou sinais na região de hidrogênios de sistemas aromáticos entre δ_{H} 6,50 a 6,78 (Figuras 52 e 53, p. 68 e 69). Os dupletos em δ_{H} 6,50 ($J=2,0$ Hz), 6,78 ($J=8,0$ Hz) e 6,58 ($J=2,0$ Hz) foram atribuídos a H-2, H-5 e H-6, respectivamente. Já os sinais em δ_{H} 6,61 (*s*), δ_{H} 6,73 (*d*, $J=8,0$ Hz) e 6,59-6,60 (*m*) foram relacionados a H-2', H-5' e H-6', caracterizando a presença de dois anéis aromáticos com sistema 1,3,4 trissubstituído. Esses acoplamentos também puderam ser observados pelo espectro de COSY (Figuras 65 e 66, p. 75).

O espectro de RMN de ^1H aponta, ainda, dois multipletos em δ_{H} 4,15-4,19 (H-9a) e 3,90-3,92 (H-9b), os quais foram relacionados a um carbono carbinólico em δ_{C} 71,2 (C-9), pelo espectro de HSQC (Figura 68, p. 76). Como visto anteriormente (item 5.2.5), quando os hidrogênios H-9a e H-9b não apresentam equivalência entre suas constantes de acoplamento, a configuração da molécula é *trans*.

Nota-se dois singletos em δ_{H} 3,87 (H-11) e 3,84 (H-12), com integração para 6 hidrogênios, sugerindo a presença de duas metoxilas na estrutura (Figura 54, p. 69). Observou-se o pelo espectro de HMBC acoplamento (3J) destas metoxilas com os carbonos C-3' (149,1) e C-4' (147,9), definindo em qual anel aromático as mesmas estavam ligadas (Figura 74A, p. 79).

Os dupletos em δ_{H} 2,63 ($J=8,0$ Hz; H-7a) e 2,56 ($J=8,0$ Hz; H-7b) e os duplo dupletos em δ_{H} 2,98 ($J=14,0$ e 5,2 Hz; H-7'a) e 2,87 ($J=14,0$ e 6,8 Hz; H-7'b) foram associados aos carbonos metilênicos C-7 (δ_{C} 38,3) e C-7' (δ_{C} 34,8), respectivamente, com o auxílio do espectro de HSQC (Figura 68, p. 76), assim como, os sinais em δ_{H} 2,50 (*d*, $J=3,2$ Hz; H-8) e δ_{H} 2,57-2,61 (*m*; H-8') aos carbonos metínicos C-8 (δ_{C} 41,2) e C8' (δ_{C} 46,4). O acoplamento entre esses hidrogênios puderam ser confirmados pelo espectro de COSY (Figura 65, p. 75).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 56 a 61, p. 70 a 73) e DEPT 135 (Figuras 62 a 64, p. 73 e 74) indicaram 21 sinais de carbono para lignana **9**, sendo um carbonílico em δ_{C} 178,4, característico de lactona de 5 átomos, e um em δ_{C} 101,0 atribuído ao carbono do grupo metilenodioxido. Este último foi associado aos hidrogênios com sinal em δ_{H} 5,95 (*d*, $J=1,2$ Hz) pelo HSQC (Figura 67, p. 76).

A análise do espectro de HMBC permitiu atribuir corretamente os carbonos quaternários, além de definir os sinais pertencentes a cada anel aromático (Figuras 71 a 74, p. 78 e 79). As tabelas 8 e 9 (p. 66 e 67) demonstram as atribuições dos sinais de hidrogênio e carbono das lignanas **9** e **10** e comparação com os dados da literatura (HELENO *et al.*, 2006).

A análise por CG-EM (Figura 75, p. 80) da fração contendo as lignanas forneceu o cromatograma com picos em t_R 26,90, 28,80 e 30,30 minutos. O espectro de massas da primeira em 26,90 (Figura 76, p. 80) demonstrou pico do íon-molecular em m/z 370 (M^+) e pico base em m/z 135, estando de acordo com a fórmula molecular $C_{21}H_{22}O_6$ e confirmando a proposta estrutural de **9** (Figura 78, p. 81). O componente com t_R 28,8 minutos exibiu em seu espectro de massas (Figura 77, p. 80) pico do íon-molecular em m/z 370 (M^+) e mesma fragmentação que a substância **9**, compatível com a fórmula $C_{21}H_{22}O_6$ indicando a mesma tratar-se da lignana *cis*-metilpluviatolido (**10**) (Figura 78, p. 81).

A lignana **11**, sugerida para o componente com t_R 30,30, também apresentou algumas fragmentações semelhantes às duas lignanas anteriores (**9** e **10**), só que com pico do íon molecular em m/z 368 (M^+), compatível com a fórmula $C_{21}H_{20}O_6$ (Figuras 79 e 80, p. 82). A comparação com a literatura (WEBER, 2005; KHADGA *et al.*, 1993), apresentou padrão de fragmentação igual ao da lignana kaerofilina, onde a única diferença estrutural com a metilpluviatolido é a presença de uma insaturação entre C-7' e C-8'.

Tabela 8. Dados de RMN 1H (400 MHz) em $CDCl_3$ de **9** e **10** comparados com dados da literatura para a lignana metilpluviatolido (HELENO *et al.*, 2006).

| | 9 | 10 | Literatura* |
|----------|--|------------------------------|--|
| H | δ_H [mult., J (Hz)] | δ_H [mult., J (Hz)] | δ_H [mult., J (Hz)] |
| 2 | 6,50 (<i>d</i>) $J= 2,0$ | 6,68 (<i>dl</i>) $J= 2,0$ | 6,32 (<i>d</i>) $J= 1,6$ |
| 5 | 6,78 (<i>d</i>) $J= 8,4$ | ** | 6,61 (<i>d</i>) $J= 7,9$ |
| 6 | 6,58 (<i>dl</i>) $J= 2,0$ | 6,70 (<i>sl</i>) | 6,18 (<i>d</i>) $J= 7,9; 1,6$ |
| 7a | 2,63 (<i>d</i>) $J= 8,0$ | 2,66 (<i>m</i>) | 2,19 (<i>dd</i>) $J= 13,2; 6,0$ |
| 7b | 2,56 (<i>d</i>) $J= 8,0$ | n.d. | 1,90 (<i>dd</i>) $J= 13,2; 8,0$ |
| 8 | 2,50 (<i>d</i>) $J=3,2$ | 2,46-2,48 (<i>m</i>) | 2,10 (<i>dddd</i>) $J= 15,2; 8,0; 7,8; 7,3; 6,0$ |
| 9a | 4,15-4,19 (<i>m</i>) | 4,22-4,29 (<i>m</i>) | 3,65 (<i>dd</i>) $J= 8,8; 7,3$ |
| 9b | 3,90-3,92 (<i>m</i>) | n.d. | 3,29 (<i>dd</i>) $J= 8,8; 7,8$ |
| 10 | 5,96 (<i>d</i>) $J= 1,6$ 5,94 (<i>d</i>) $J= 1,2$ | 5,96-5,98 (<i>m</i>) | 5,45 (<i>d</i>) $J= 1,4$ 5,42 (<i>d</i>) $J= 1,4$ |
| 11 | 3,87 (<i>s</i>) | 3,88 (<i>s</i>) | 3,48 (<i>s</i>) |
| 12 | 3,84 (<i>s</i>) | 3,86 (<i>s</i>) | 3,40 (<i>s</i>) |
| 2' | 6,61 (<i>s</i>) | 6,45 (<i>m</i>) | 6,67 (<i>d</i>) $J= 1,9$ |
| 5' | 6,73 (<i>d</i>) $J= 8,0$ | ** | 6,61 (<i>d</i>) $J= 8,6$ |
| 6' | 6,59-6,60 (<i>m</i>) | 6,47 (<i>m</i>) | 6,67 (<i>dd</i>) $J= 8,6; 1,9$ |
| 7'a | 2,98 (<i>dd</i>) $J= 14,0; 5,2$ | 2,94 (<i>d</i>) | 2,89 (<i>dd</i>) $J= 13,9; 5,3$ |
| 7'b | 2,87 (<i>dd</i>) $J= 14,0; 6,8$ | n.d. | 2,84 (<i>dd</i>) $J= 13,9; 6,5$ |
| 8' | 2,57-2,61 (<i>m</i>) | n.d. | 2,15 (<i>ddd</i>) $J= 15,2; 6,5; 5,3$ |

*400 MHz, C_6D_6

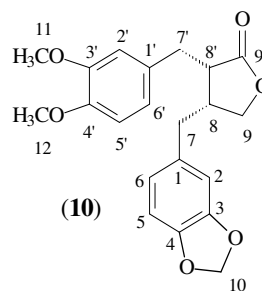
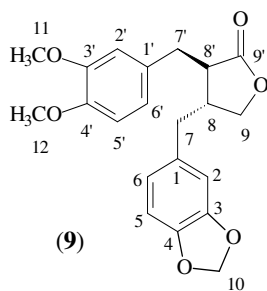
**encoberto por outro sinal

n.d.: não detectado

Tabela 9. Dados de ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 de **9** e **10** comparados com dados da literatura para a lignana metilpluviatolido (HELENO *et al.*, 2006)

| | 9 | 10 | Literatura* |
|----------|---------------------|---------------------|---------------------|
| C | δ_{C} | δ_{C} | δ_{C} |
| 1 | 130,4 | 130,2 | 131,58 |
| 2 | 111,8 | 112,2 | 108,75 |
| 3 | 146,5 | 146,4 | 146,35 |
| 4 | 147,92 | 147,11 | 147,87 |
| 5 | 111,4 | 111,2 | 108,28 |
| 6 | 120,6 | 121,3 | 121,56 |
| 7 | 38,31 | 38,38 | 38,33 |
| 8 | 41,2 | 41,1 | 41,05 |
| 9 | 71,2 | 71,7 | 71,18 |
| 10 | 101,04 | 101,07 | 101,07 |
| 11 | 55,9 | 56,0 | 55,86 |
| 12 | 55,8 | 55,9 | 55,80 |
| 1' | 131,4 | 131,6 | 130,1 |
| 2' | 109,4 | 108,7 | 112,09 |
| 3' | 149,1 | n.d. | 149,04 |
| 4' | 147,9 | 147,1 | 147,92 |
| 5' | 108,1 | 108,3 | 111,04 |
| 6' | 122,2 | 121,5 | 121,34 |
| 7' | 34,8 | 34,6 | 34,62 |
| 8' | 46,4 | 46,5 | 46,52 |
| 9' | 178,4 | 178,6 | 178,66 |

*100 MHz, C_6D_6



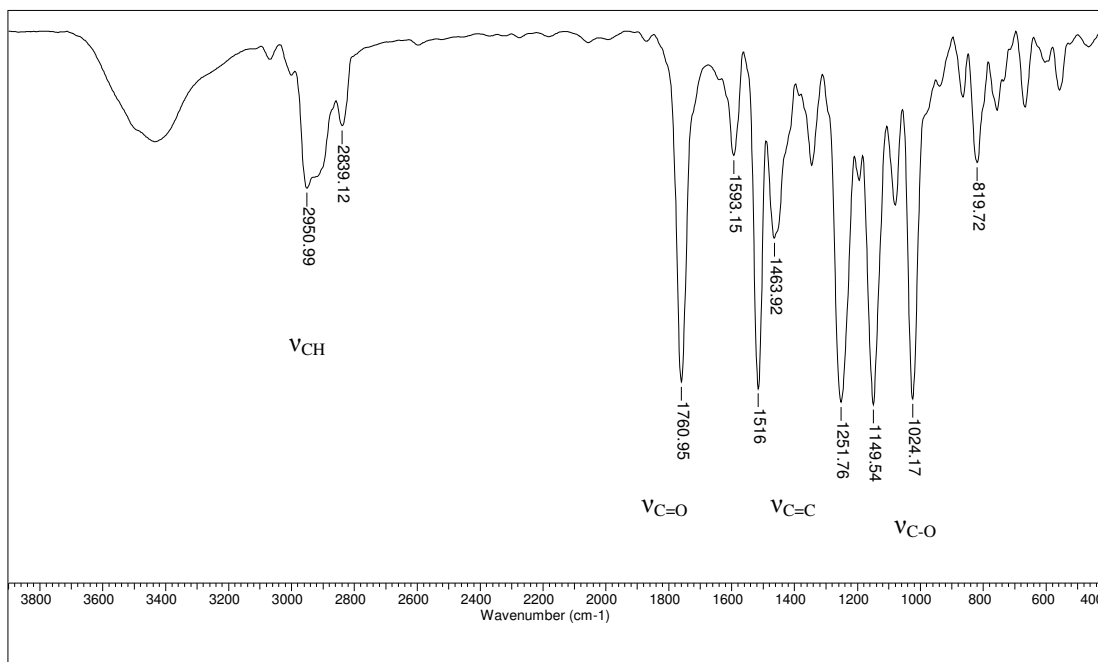


Figura 51. Espectro no IV das substâncias **9+10+11** em KBr

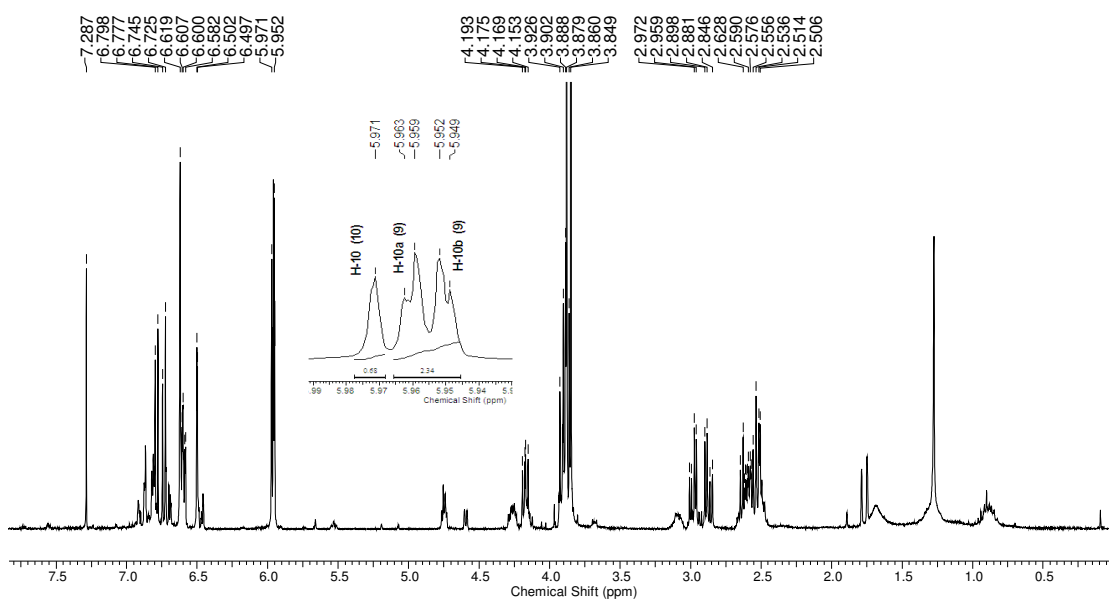


Figura 52. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) das substâncias **9+10+11**

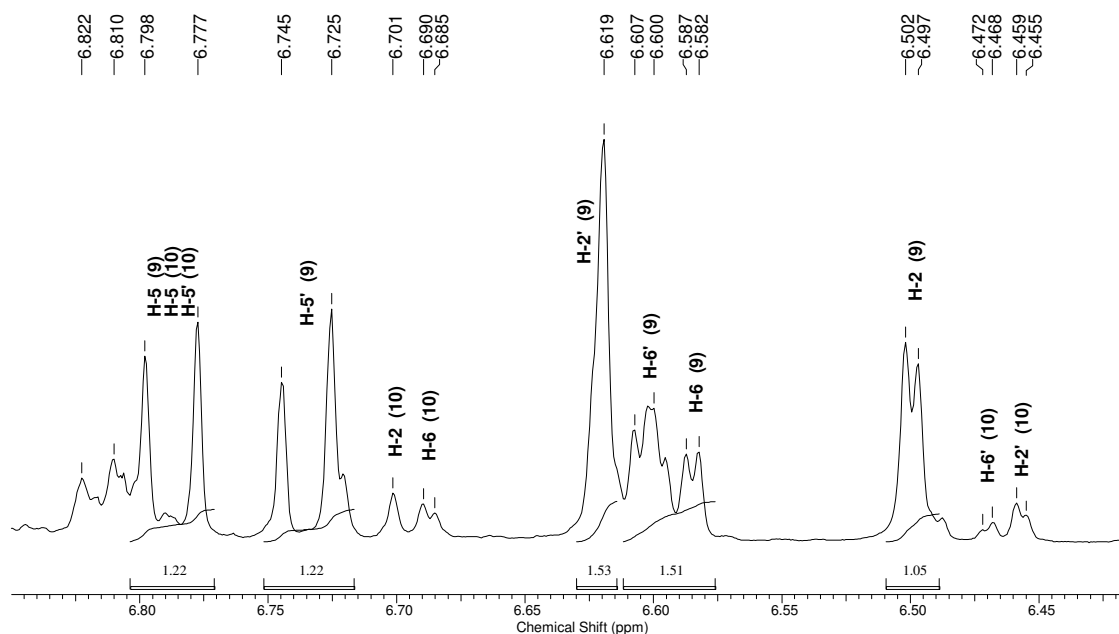


Figura 53. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) das substâncias **9+10+11**, entre δ_{H} 6,40-6,95 ppm

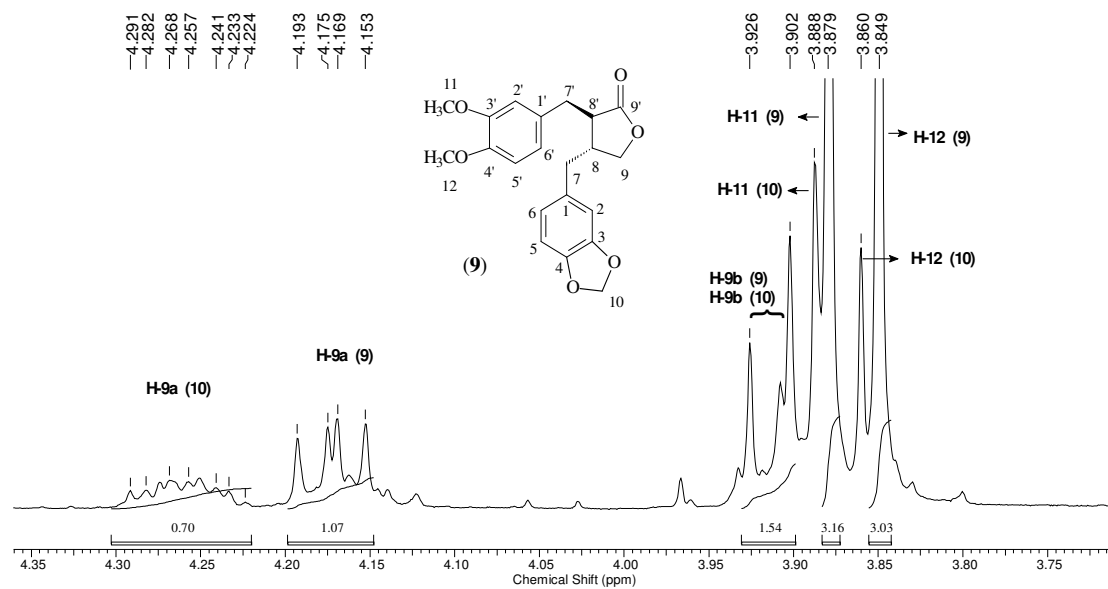


Figura 54. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) das substâncias **9+10+11**, entre δ_{H} 3,75-4,35 ppm

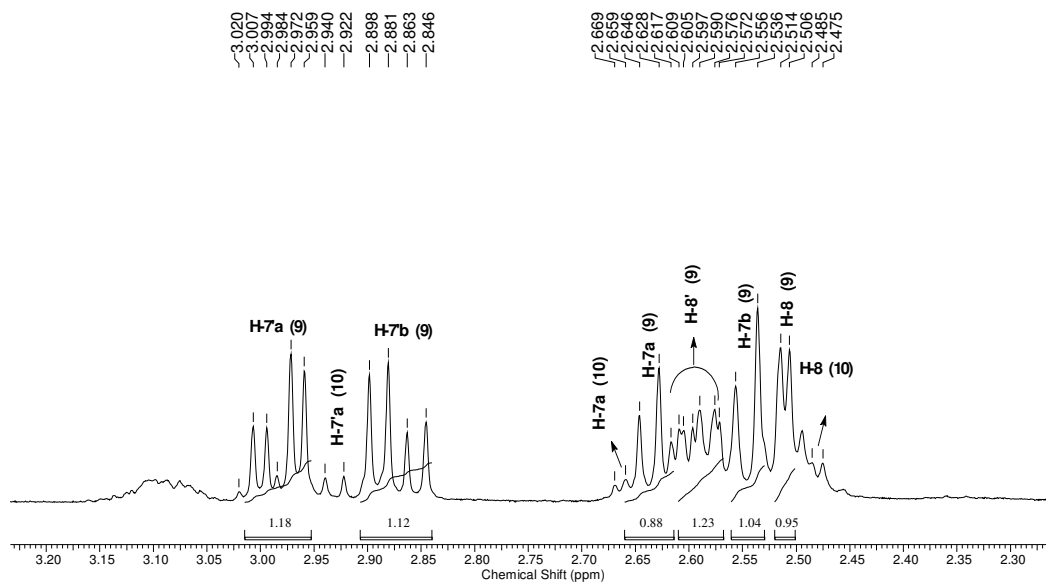


Figura 55. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) das substâncias **9+10+11**, entre δ_{H} 2,30-3,20 ppm

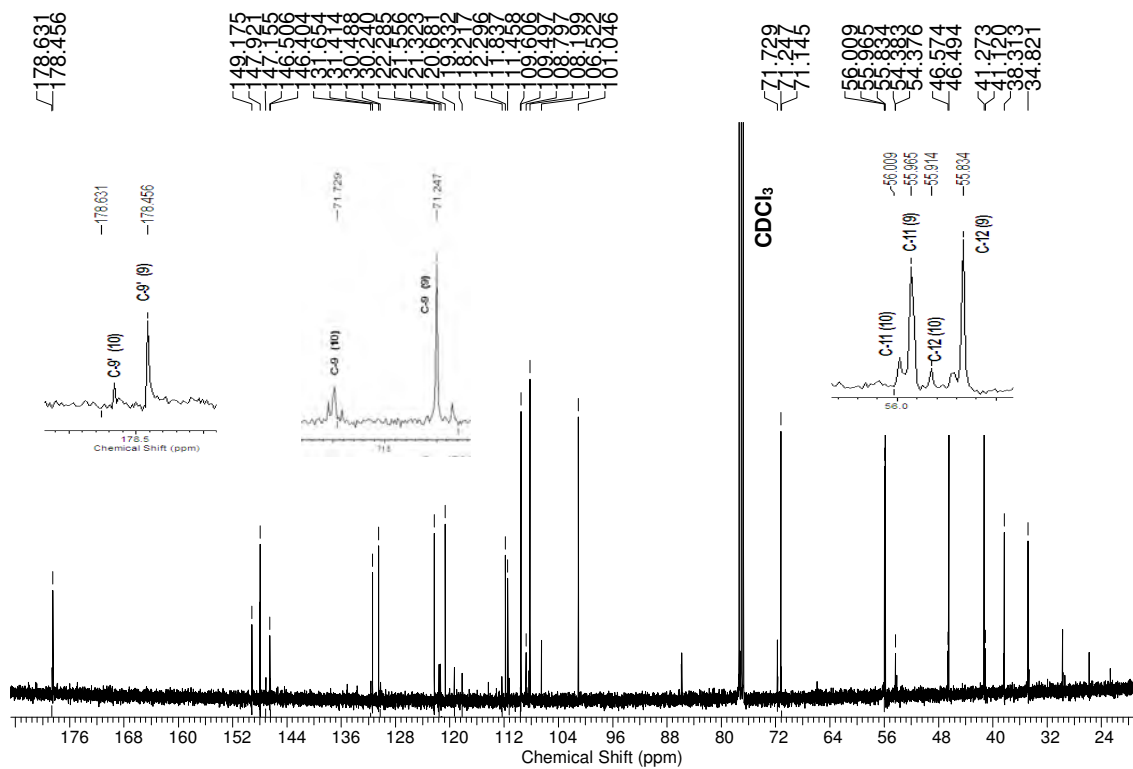


Figura 56. Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) das substâncias **9+10+11**

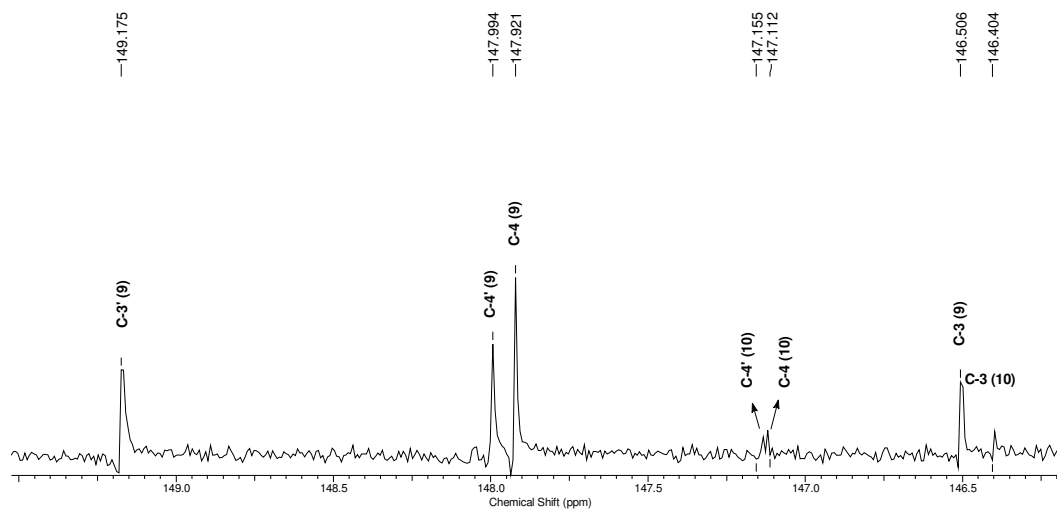


Figura 57. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias **9+10+11**, entre δ_{C} 146,0-149,5 ppm

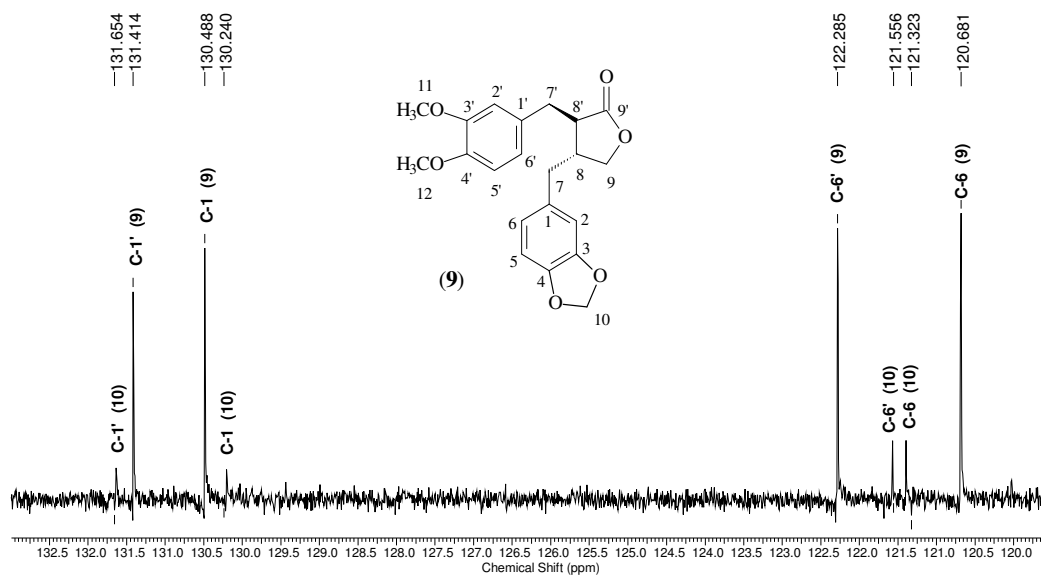


Figura 58. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias **9+10+11**, entre δ_{C} 120,0-132,5 ppm

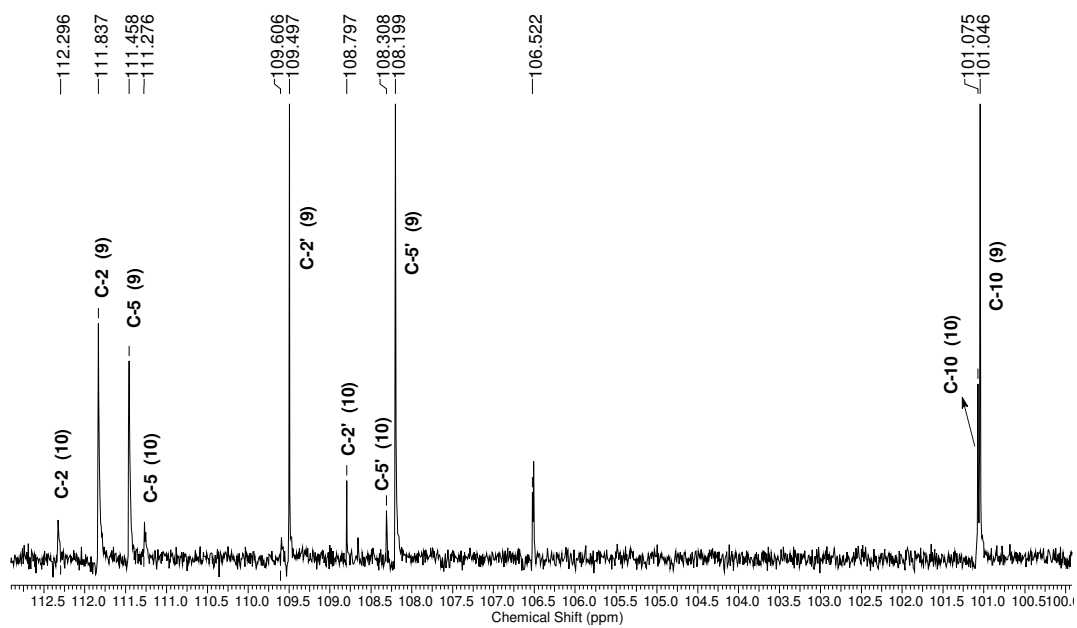


Figura 59. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias **9+10+11**, entre δ_{C} 100,0-112,5 ppm

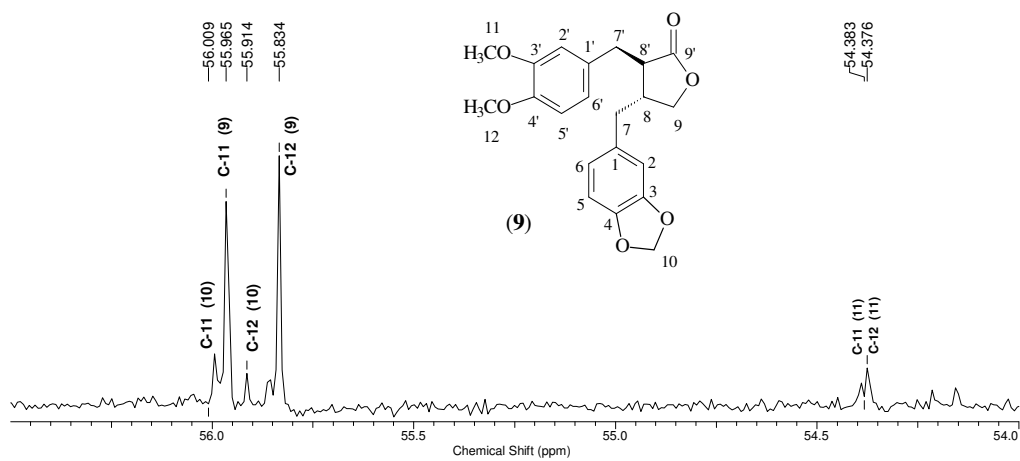


Figura 60. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias **9+10+11**, entre δ_{C} 54,0-56,4 ppm

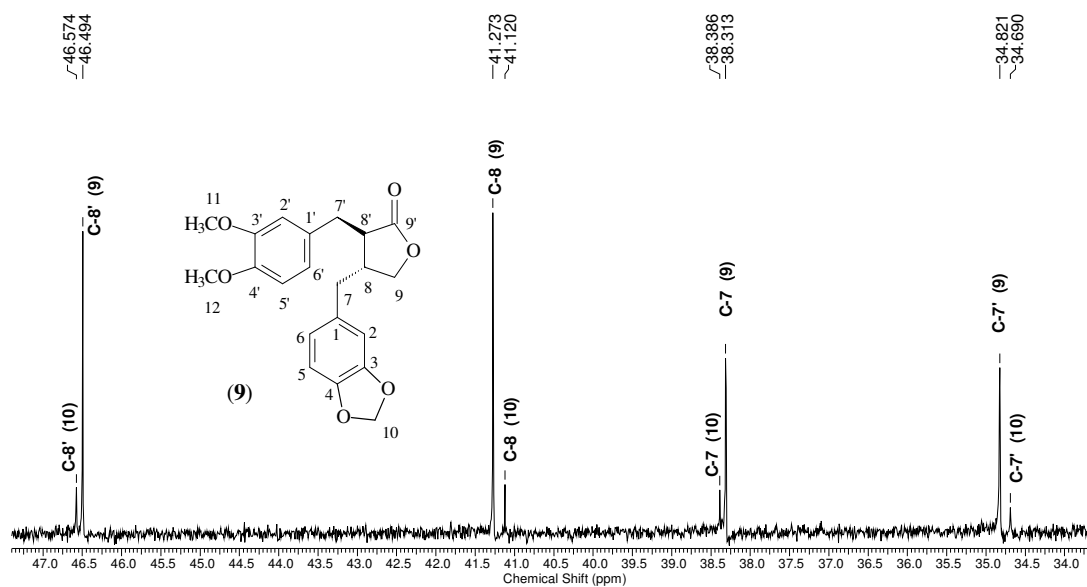


Figura 61. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) das substâncias **9+10+11**, entre δ_{C} 34,0- 47,0 ppm

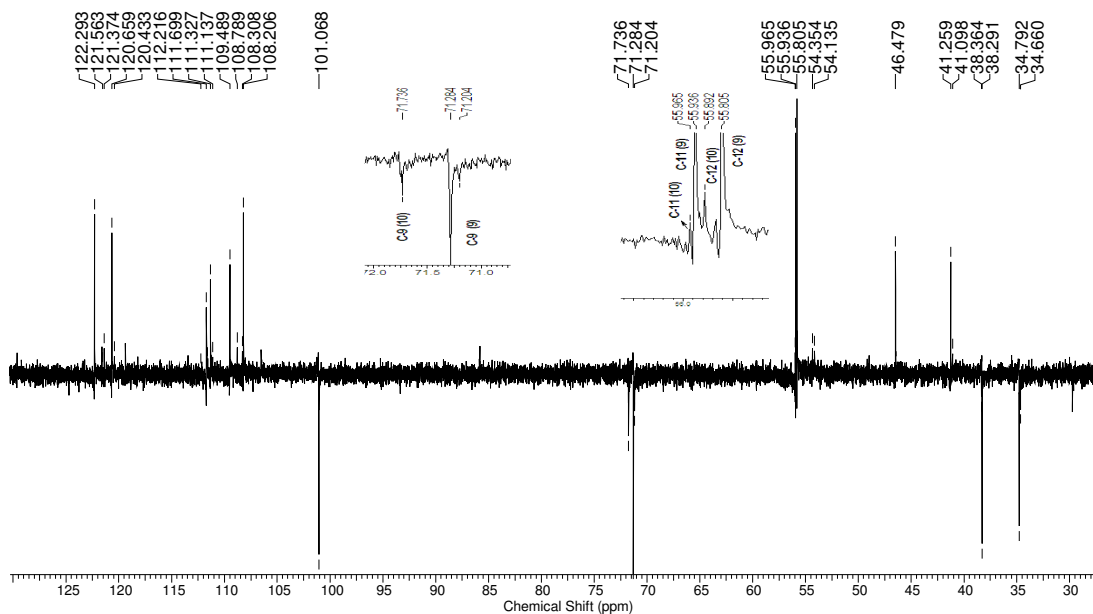


Figura 62. Espectro de RMN DEPT 135 (100 MHz, CDCl_3) das substâncias **9+10+11**

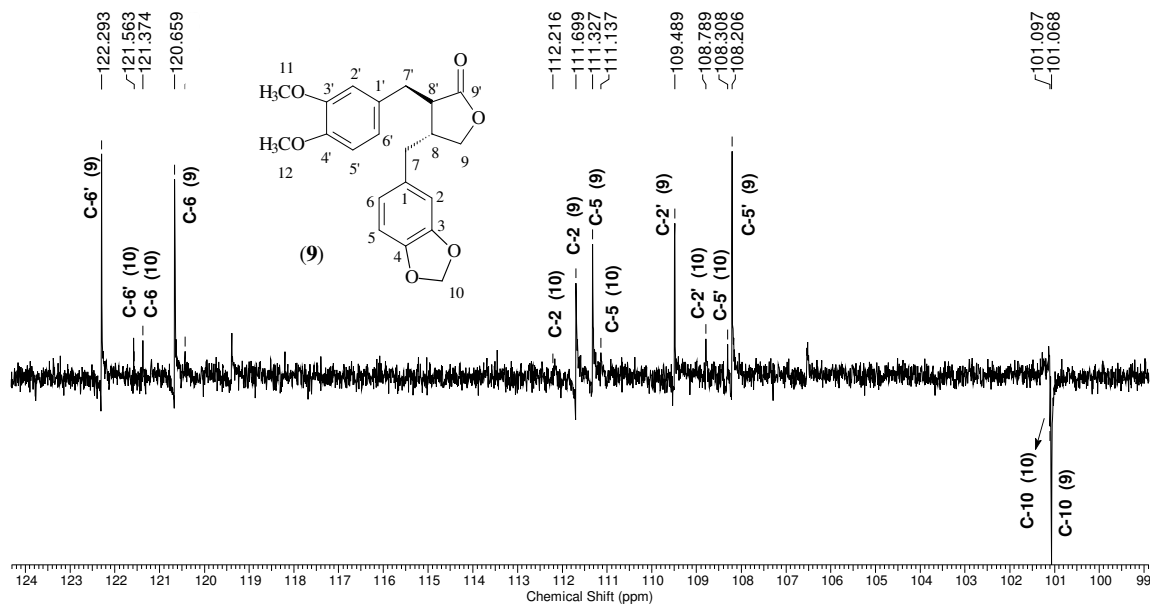


Figura 63. Expansão do espectro de RMN DEPT 135 (100 MHz, CDCl_3) das substâncias **9+10+11**, entre δ_C 99,0-124,0 ppm

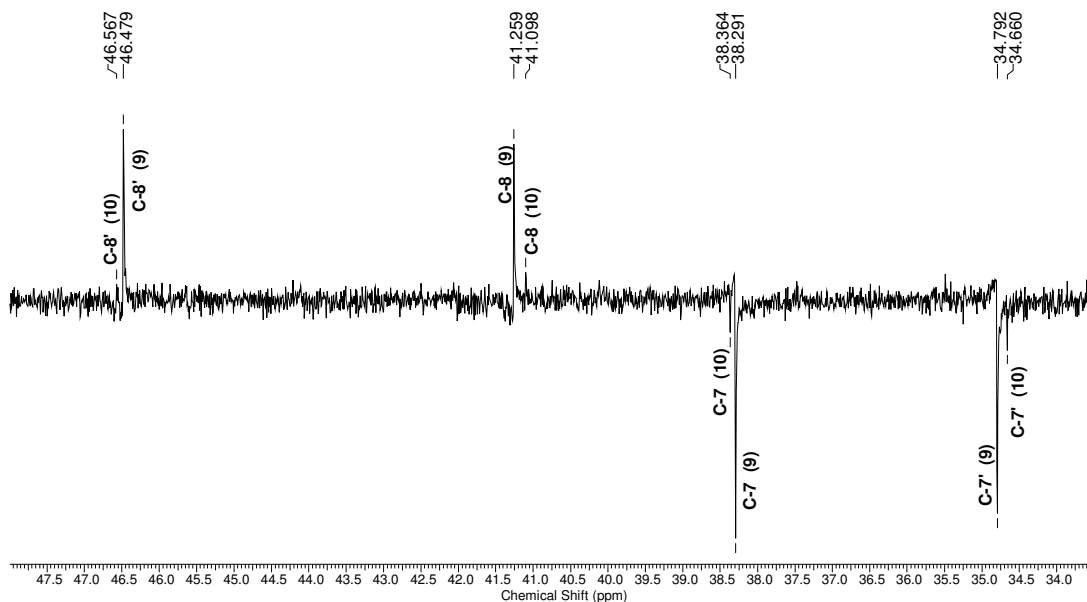


Figura 64. Expansão do espectro de RMN DEPT 135 (100 MHz, CDCl_3) das substâncias **9+10+11**, entre δ_C 34,0-47,5 ppm

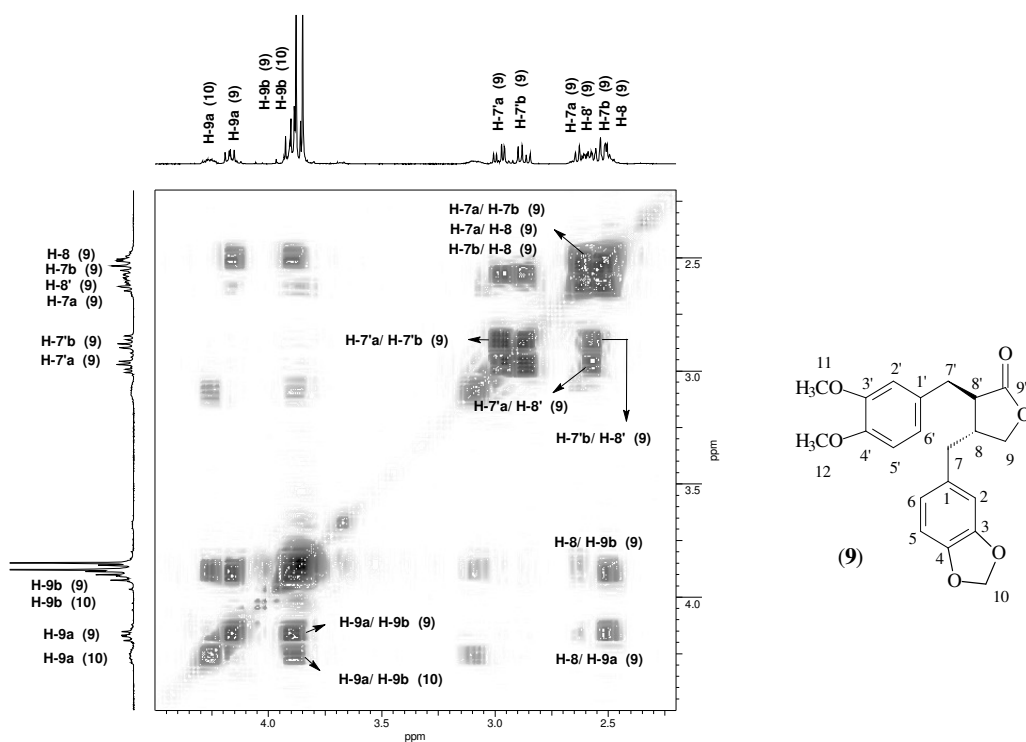


Figura 65. Expansão do espectro de RMN COSY (400 MHz, CDCl₃) das substâncias **9+10+11**, entre δ_H 2,45-4,25 ppm.

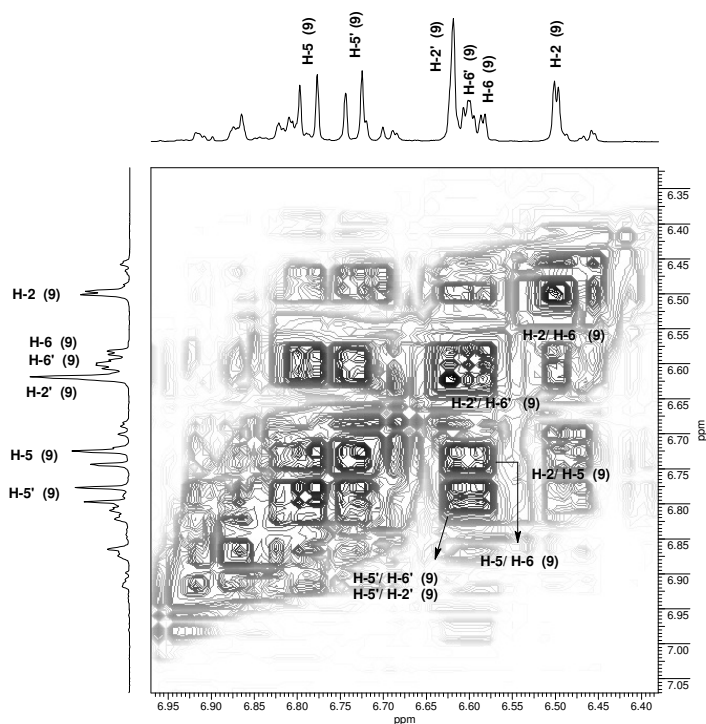


Figura 66. Expansão do espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl₃) das substâncias **9+10+11**, entre δ_H 6,35-6,95 ppm.

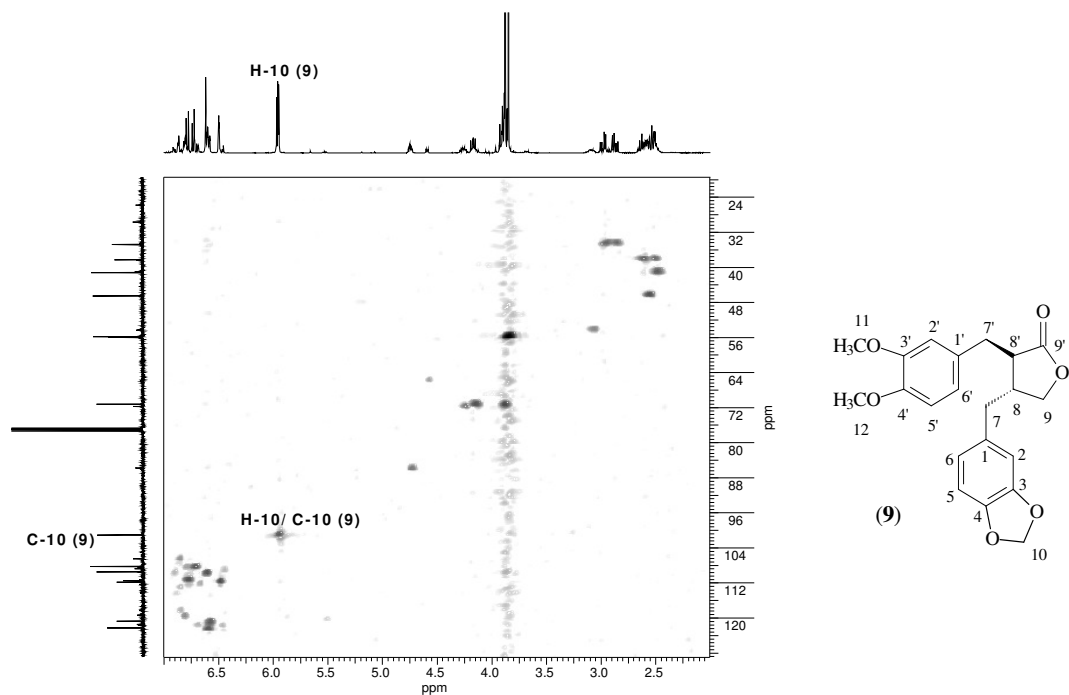


Figura 67. Espectro de RMN HSQC (400/100 MHz, CDCl_3) das substâncias **9+10+11**

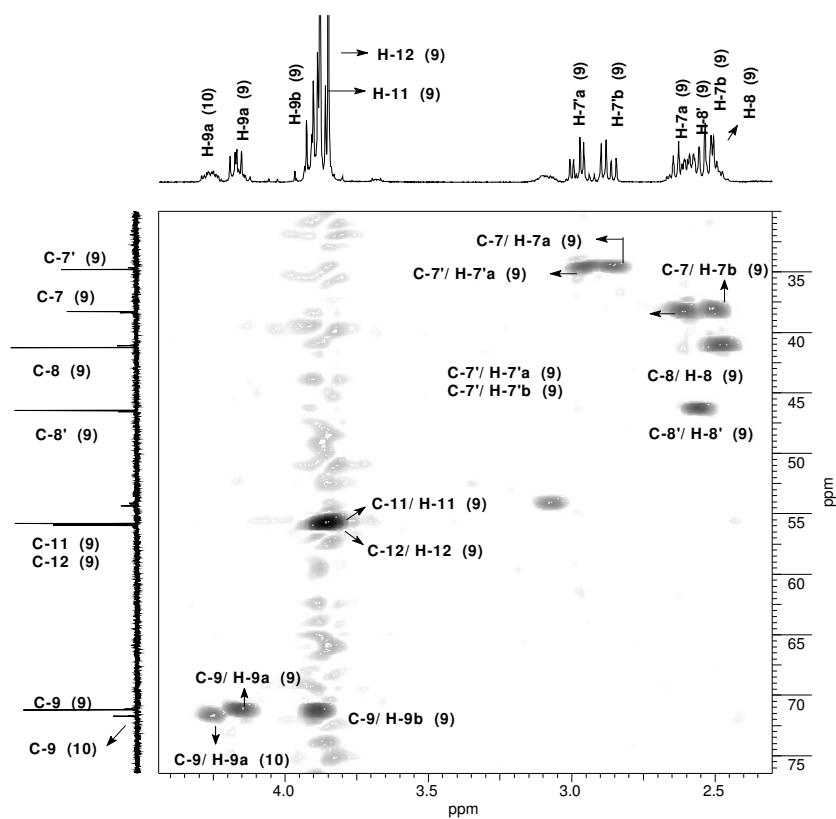


Figura 68. Expansão do espectro de RMN HSQC (400/100 MHz, CDCl_3) das substâncias **9+10+11**, entre δ_{H} 2,30-3,20 δ_{C} 30,0-75,0

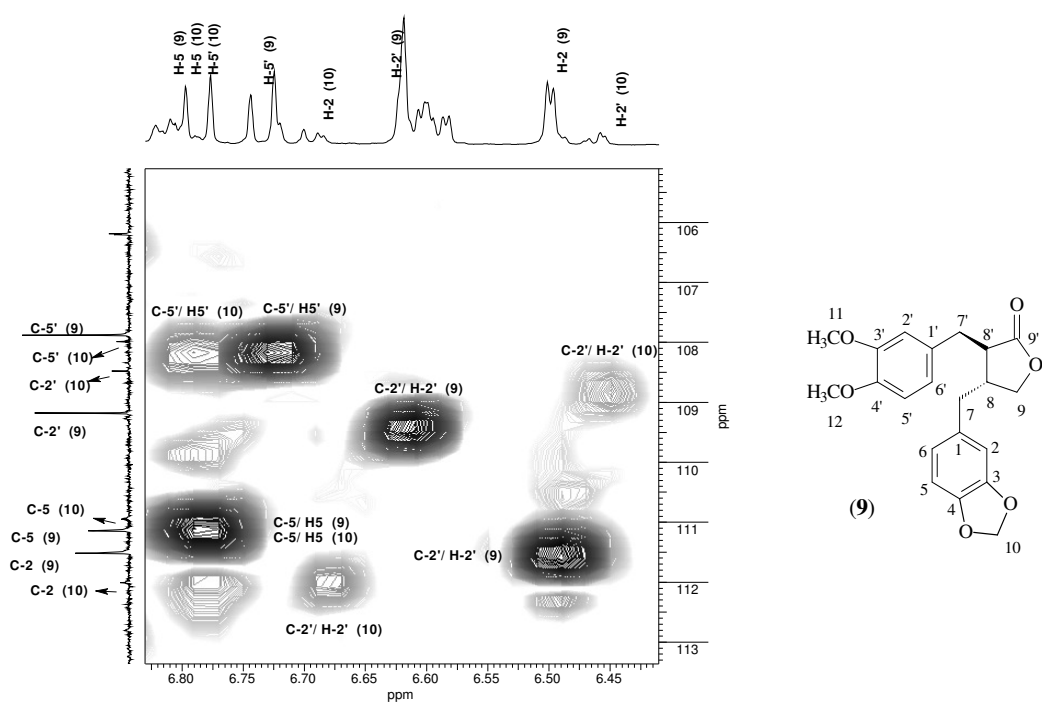


Figura 69. Expansão do espectro de RMN HSQC (400/100 MHz, CDCl_3) das substâncias **9+10+11**, entre δ_{H} 6,40-6,80 δ_{C} 105,5-113,0 ppm.

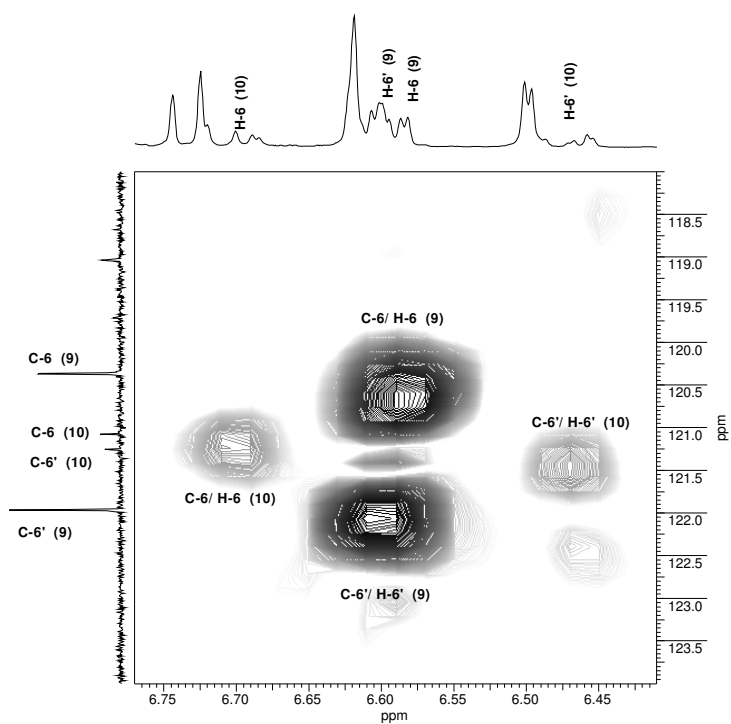


Figura 70. Expansão do espectro de RMN HSQC (400/100 MHz, CDCl_3) das substâncias **9+10+11**, entre δ_{H} 6,40-6,75 e δ_{C} 118,0-124,0 ppm.

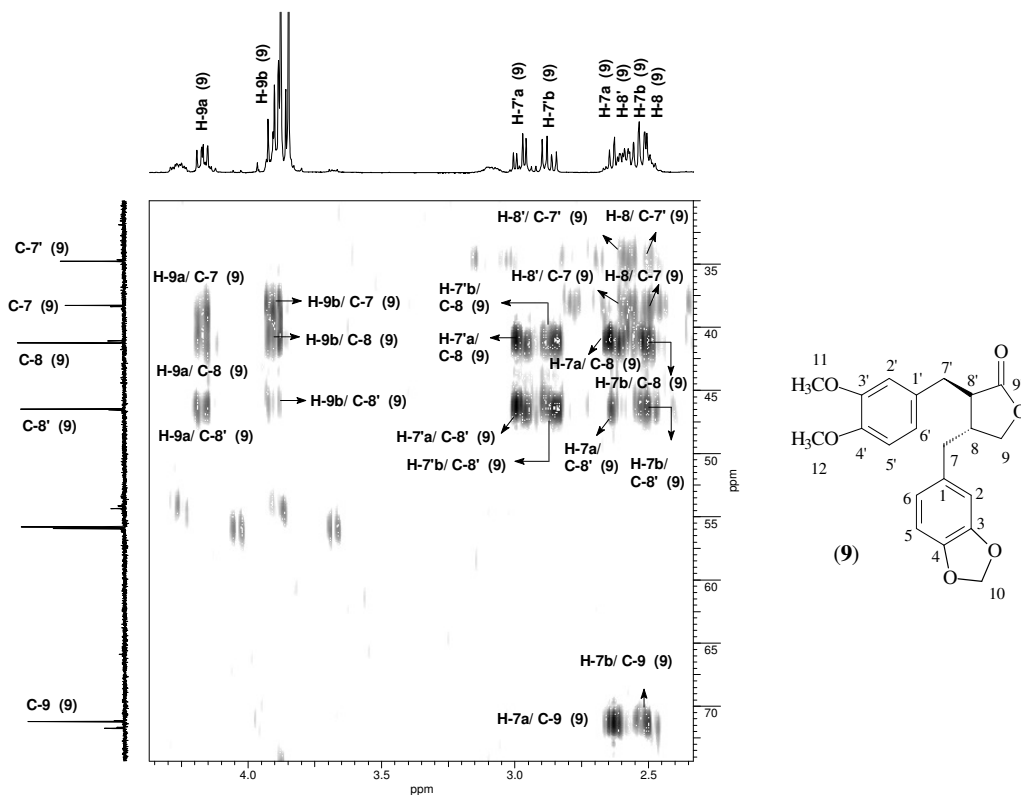


Figura 71. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/100 MHz, CDCl_3) das substâncias **9+10+11**, entre δ_{H} 2,45-4,50 e δ_{C} 30,0-73,0 ppm.

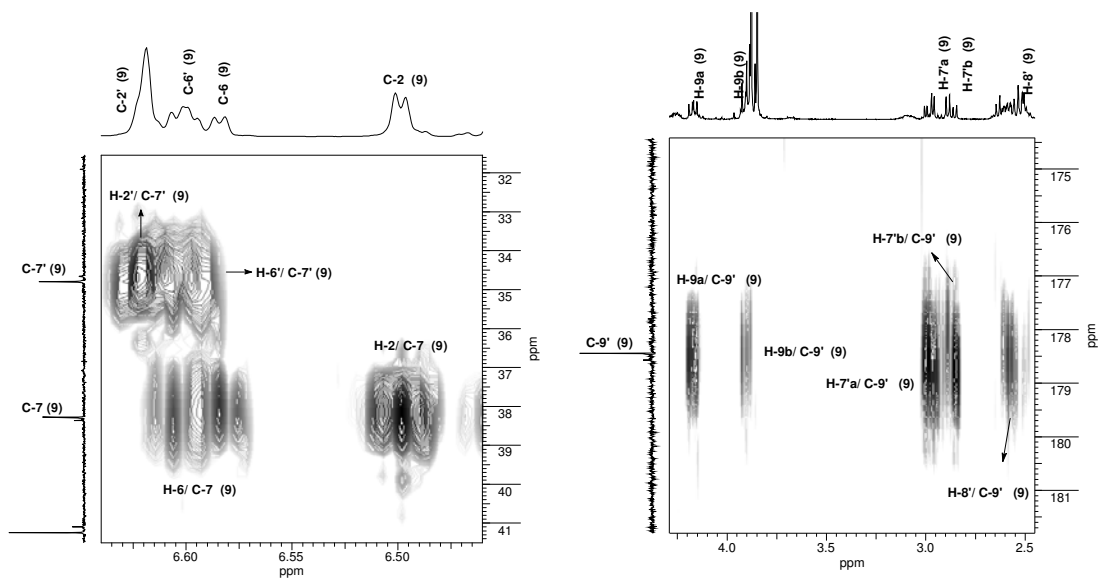


Figura 72. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/100 MHz, CDCl_3) de **9+10+11**
72A: entre δ_{H} 6,45-6,65 e δ_{C} 31,0-42,0 ppm. **72B:** δ_{H} 2,50-4,20 e δ_{C} 174,0-182,0 ppm

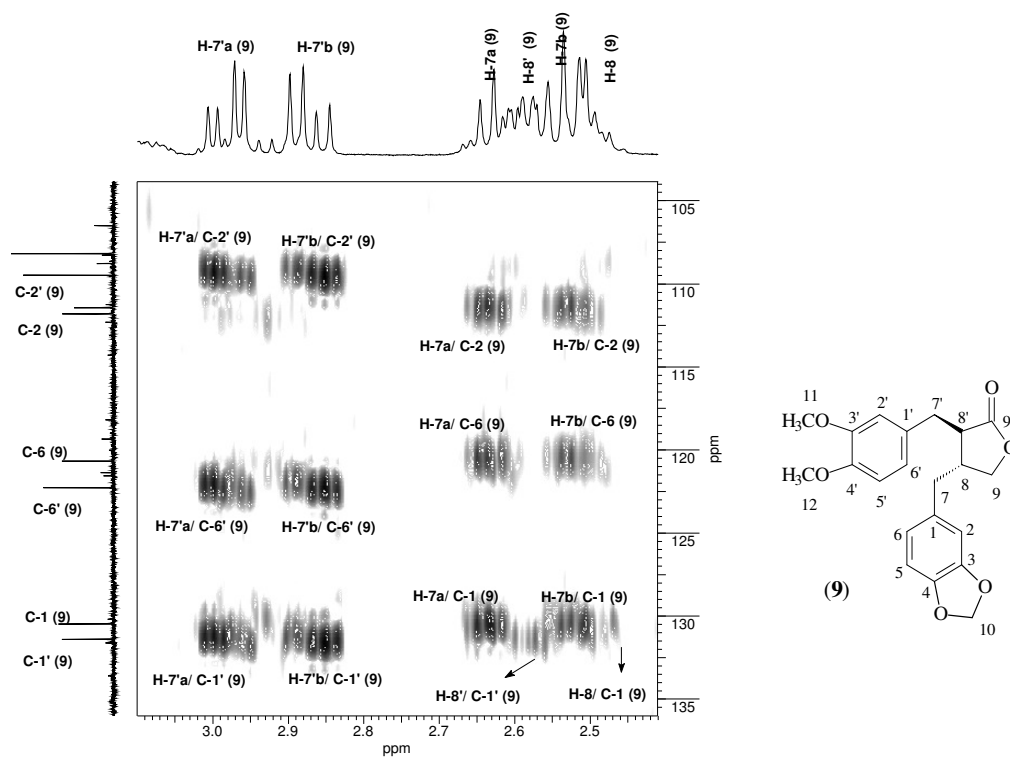


Figura 73. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/100 MHz, CDCl_3) das substâncias **9+10+11**, entre δ_{H} 2,40-3,10 e δ_{C} 103,8-136,0 ppm.

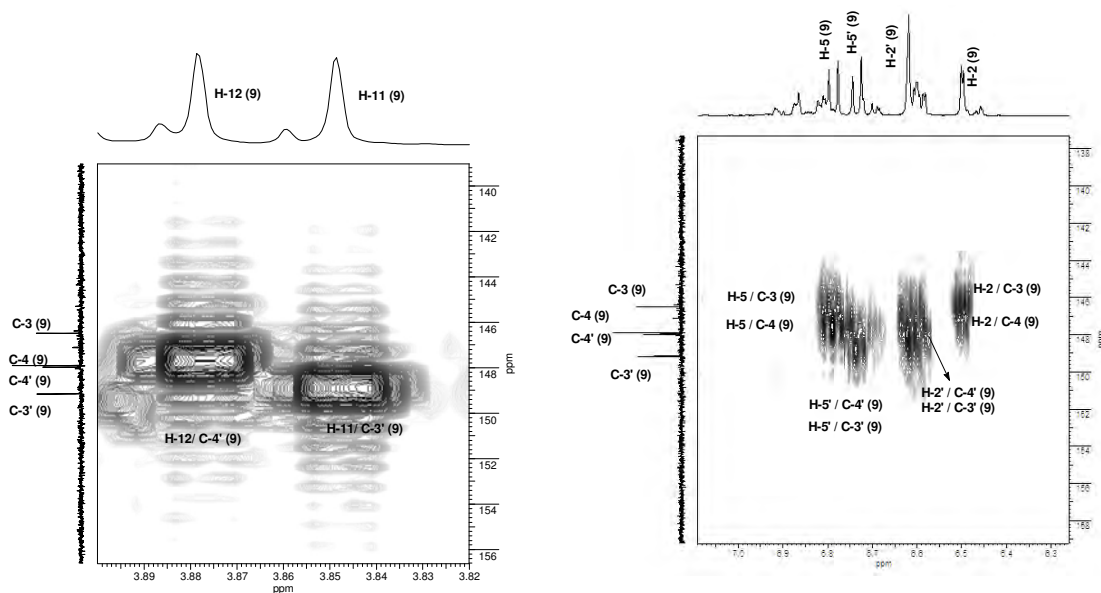


Figura 74. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/100 MHz, CDCl_3) de **9+10+11**
74A: entre δ_{H} 3,82-3,90 e δ_{C} 140,0-156,0 ppm **74B:** entre δ_{H} 6,30-7,50 e δ_{C} 138,0-158,0 ppm

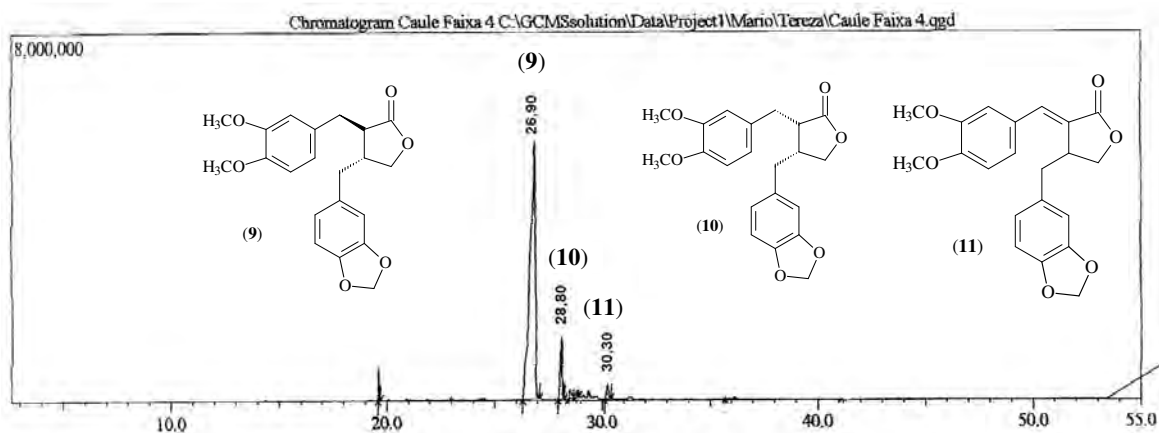


Figura 75. Cromatograma por CG das substâncias 9+10+11

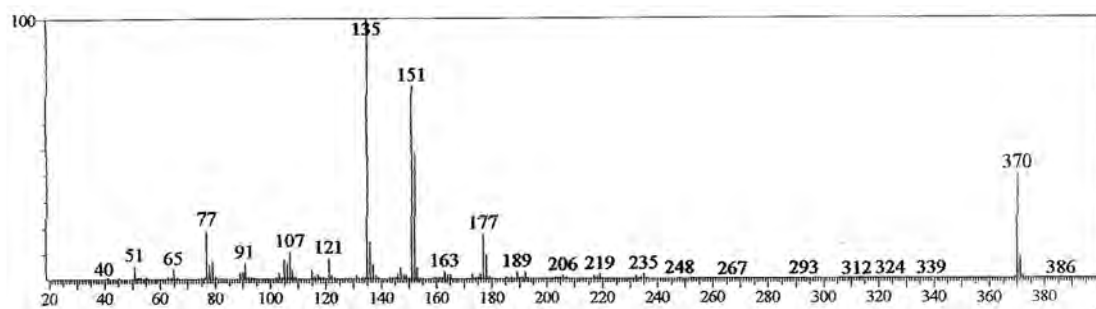


Figura 76. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância 9

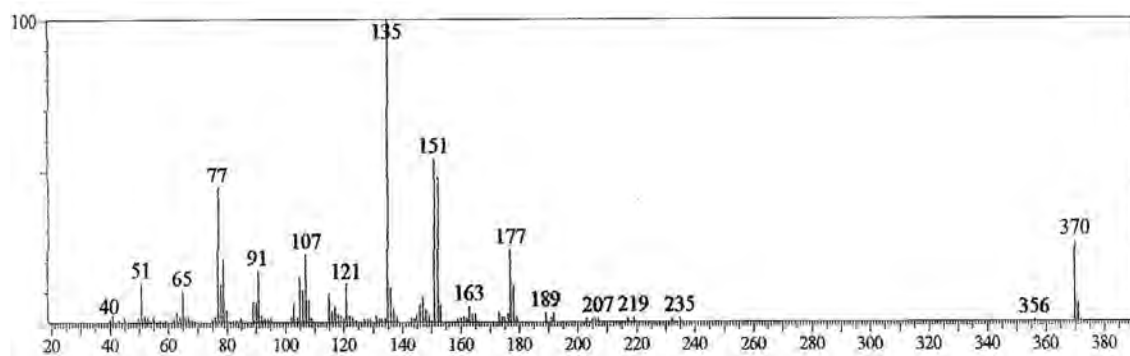


Figura 77. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância 10

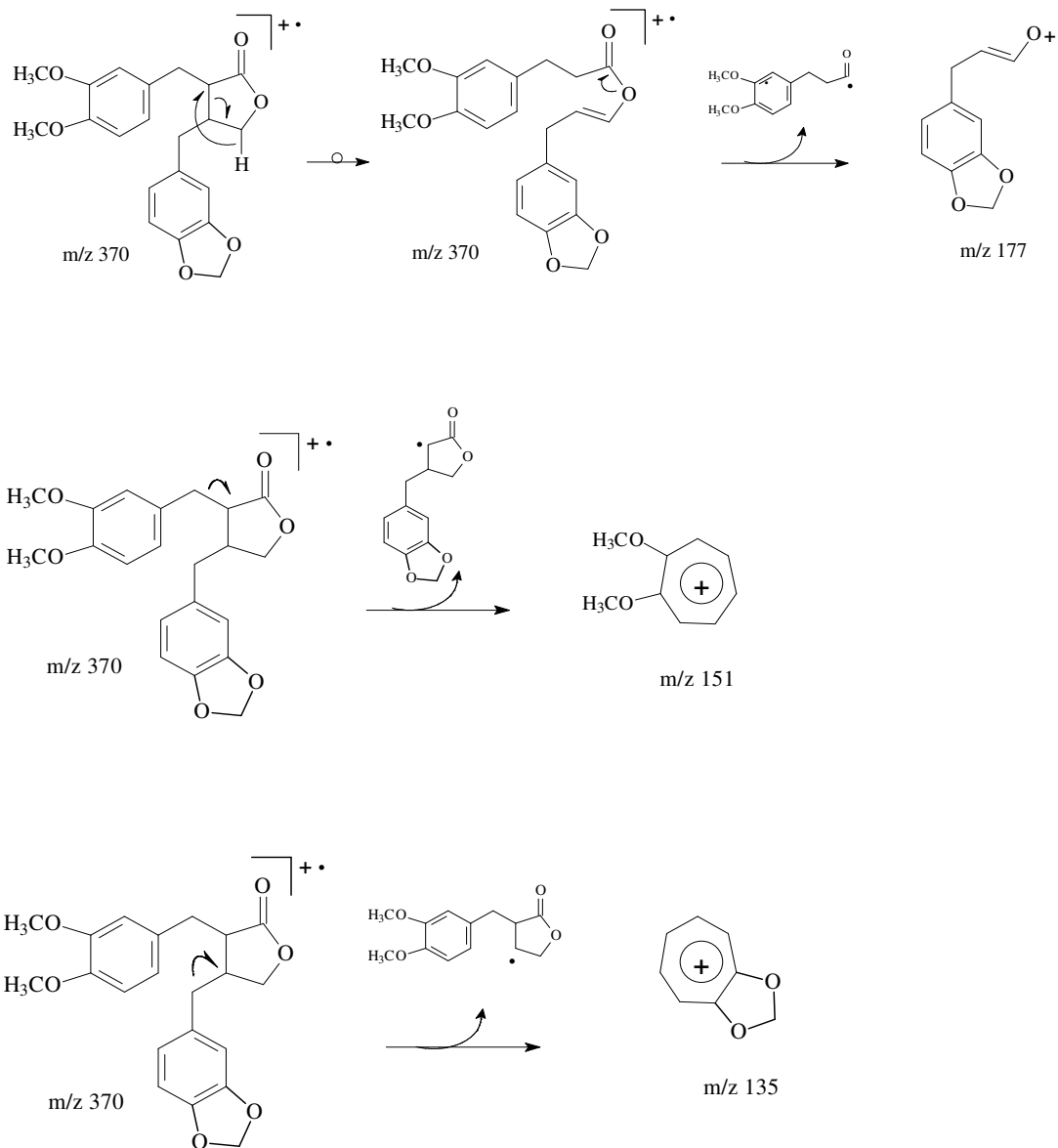


Figura 78 . Proposta de fragmentação para as substâncias **9** e **10**

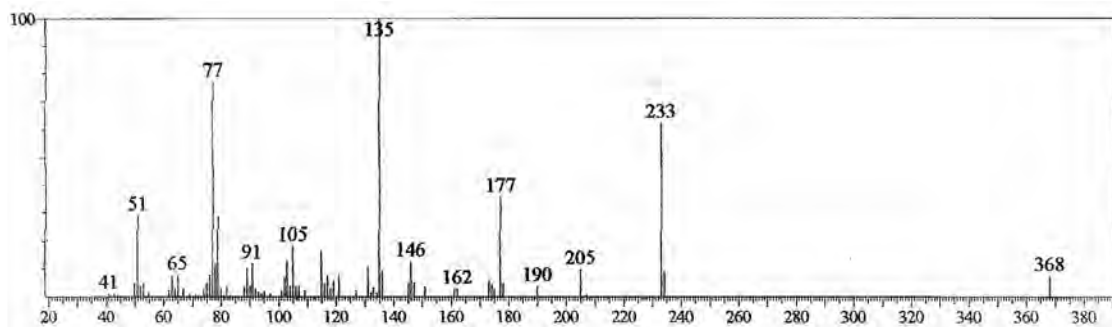


Figura 79. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância **11**

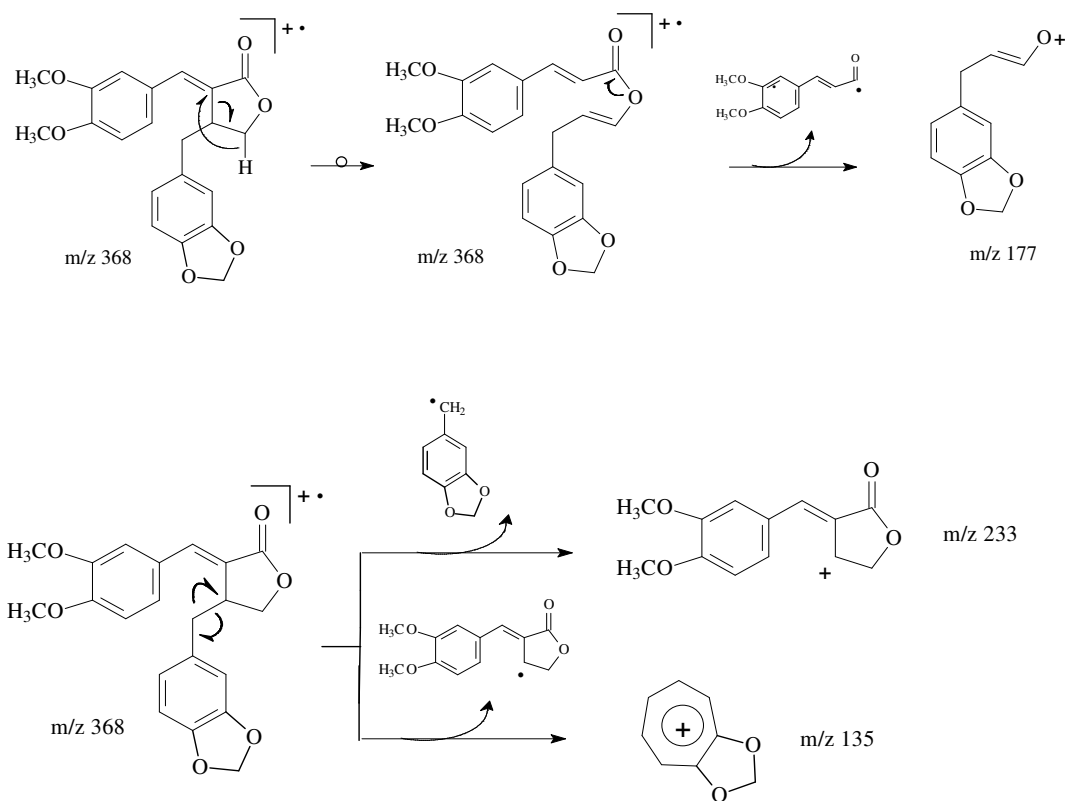
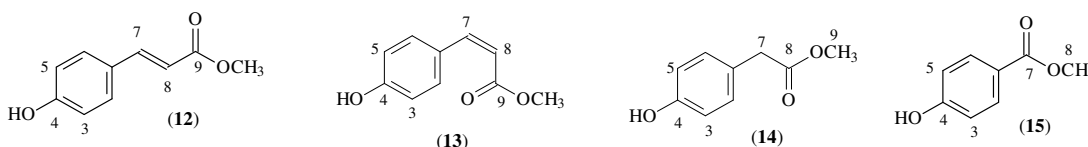


Figura 80. Proposta de fragmentação para a substância **11**

5.2.7- Identificação das substâncias 12, 13, 14 e 15

As substâncias **12**, **13**, **14** e **15** foram isoladas em mistura e identificadas após análise de RMN 1D, 2D e principalmente através de CG-EM (RIBEIRO *et al.*, 2012). Os espectros de RMN 1D e 2D quando comparados com a literatura (SILVA *et al.*, 2001), mostraram que a maioria dos sinais eram da substância **12** (*E*-4-hidroxicinamato de metila). As outras três, **13** (*Z*-4-hidroxicinamato de metila), **14** (4-hidroxifenilacetato de metila) e **15** (4-hidroxibenzoato de metila), foram identificadas através de CG-EM e análises adicionais de RMN. A identificação foi possível devido às fragmentações características destes derivados de ácido cinâmico e benzóico, quando comparados com a literatura (LEE *et al.*, 2005; BROOKS *et al.*, 1999).



O espectro no IV (Figura 81, p. 84) apresentou absorções (ν_{\max} cm^{-1}) em 3381 (ν_{OH}), 2925, 2858 (ν_{CH}), 1691 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$ de carbonila de éster), 1597, 1440 ($\nu_{\text{C=C}}$) e 1168 ($\nu_{\text{C-O}}$).

O espectro de RMN ^1H apresentou dois dupletos em δ_{H} 7,57 ($J= 8,0$ Hz) e 6,91 ($J= 8,8$ Hz), cada um integrando para dois hidrogênios, indicando tratar-se de um sistema AA'BB' de um anel aromático (Figuras 82 e 83, p. 85). Os sinais em δ_{H} 7,64 ($d, J= 15,6$ Hz) e 6,36 ($d, J= 16$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios H-7 e H-8, e devido ao alto valor da constante de acoplamento sua configuração foi definida como *trans*. Esses acoplamentos foram confirmados pelo espectro de COSY (Figura 85, p. 86). Observou-se, ainda, no espectro de RMN ^1H um singlete largo em δ_{H} 3,73 (3H), indicando a presença de uma metoxila, e um singlete em 8,97 (1H) atribuído ao hidrogênio da hidroxila do anel aromático.

O espectro de DEPTQ (Figura 84, p. 86; Tabela 10, p. 84) exibiu 10 sinais de carbono, sendo três quaternários em δ_{C} 167,0 (C-9), 159,7 (C-4) e 126,0 (C-1), uma metoxila em δ_{C} 50,6, dois olefínicos em δ_{C} 144,4 (C-7) e 114,3 (C-8), além de carbonos do anel aromático em δ_{C} 130,0 (C-2 e C-6) e 115,8 (C-3 e C-5).

A análise dos espectros de RMN HSQC (Figuras 86 e 87, p. 87) e HMBC (Figura 88, p. 88) ajudou na comprovação da estrutura de **12** como sendo o éster *E*-4-hidroxicinamato de metila.

O cromatograma da análise por CG-EM apontou picos em t_{R} 8,6, 8,9, 11,0 e 12,3 minutos (Figura 89, p. 88). O espectro de massas do pico em 12,3 (Figura 90, p. 88) mostrou pico do íon molecular em m/z 178 (M^+) e pico base em m/z 147, estando de acordo com a fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$, confirmando a proposta estrutural para **12**. A substância **13** (t_{R} 11,0 minutos) também apresentou em seu espectro de massas (Figura 91, p.89) pico do íon molecular em m/z 178 (M^+) e a mesma fragmentação de da substância **12**, sendo compatível com a fórmula $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$ e indicando tratar-se do éster *Z*-4-hidroxicinamato de metila. As fragmentações de ambas reforçam as estruturas das mesmas (Figura 92, p. 89).

A substância **14** (t_{R} 8,9 minutos) mostrou em seu espectro de massas pico do íon molecular m/z 166 (M^+) e pico base em m/z 107, estando de acordo com a fórmula molecular $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$ e sugerindo a proposta estrutural de **14** como sendo 4-hidroxifenilacetato de metila. (Figuras 93 e 94, p. 89 e 90).

A substância **15** (t_{R} 8,6 minutos) mostrou em seu espectro de massas pico do íon molecular 152 (M^+) e pico base em m/z 121, estando de acordo com a fórmula molecular $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ e confirmando a proposta estrutural de **15** como sendo 4-hidroxibenzoato de metila. (Figuras 95 e 96, p. 90).

Tabela 10. Dados de RMN de DEPTQ (100 MHz) e ¹H (400 MHz) em CD₃COCD₃ de **12** comparados a literatura para o 4-hidroxicinamato de metila (SILVA *et al.*, 2001).

| Substância 12 | | | Literatura* | |
|--------------------|-------------------------|--------------------------------|----------------|--|
| C | DEPTQ δ _C | δ _H [mult., J (Hz)] | δ _C | 4-hidroxicinamato de metila δ _H [mult., J (Hz)] |
| 1 | 126,0 | ----- | 126,9 | ----- |
| 2 | 130,0 | 7,60 (d) J= 8,0 | 131,1 | 7,44 (d) J= 8,8 |
| 3 | 115,8 | 6,91 (d) J= 8,8 | 114,7 | 6,78 (d) J= 8,8 |
| 4 | 159,7 | ----- | 161,6 | ----- |
| 5 | 115,8 | 6,91 (d) J= 8,8 | 114,7 | 6,78 (d) J= 8,8 |
| 6 | 130,0 | 7,60 (d) J= 8,0 | 131,1 | 7,44 (d) J= 8,8 |
| 7 | 144,5 | 7,62 (d) J= 15,6 | 146,6 | 7,60 (d) J= 16,0 |
| 8 | 114,3 | 6,37 (d) J= 16,0 | 116,9 | 6,31 (d) J= 16,0 |
| 9 | 167,0 | ----- | 169,8 | ----- |
| 9-OCH ₃ | 50,6 | 3,73 (sl) | 52,0 | 3,74 (s). |
| 4-OH | ----- | 8,97 (s) | ----- | n.a. |

*100 MHz, CD₃COCD₃ ; 400MHz

n.a.: não atribuído

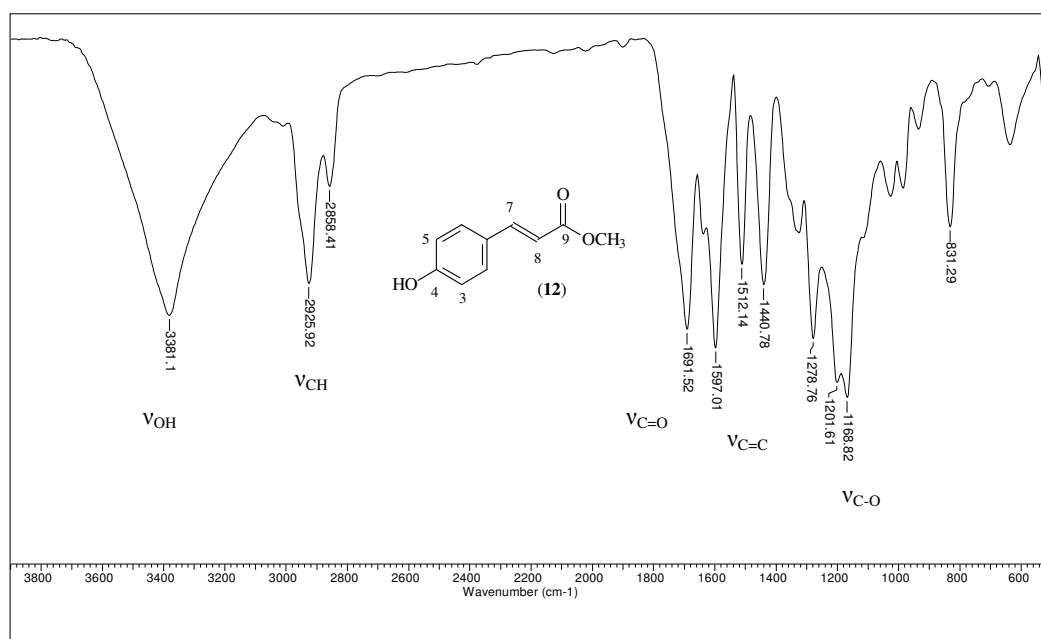


Figura 81. Espectro no IV das substâncias **12+13+14+15** em KBr

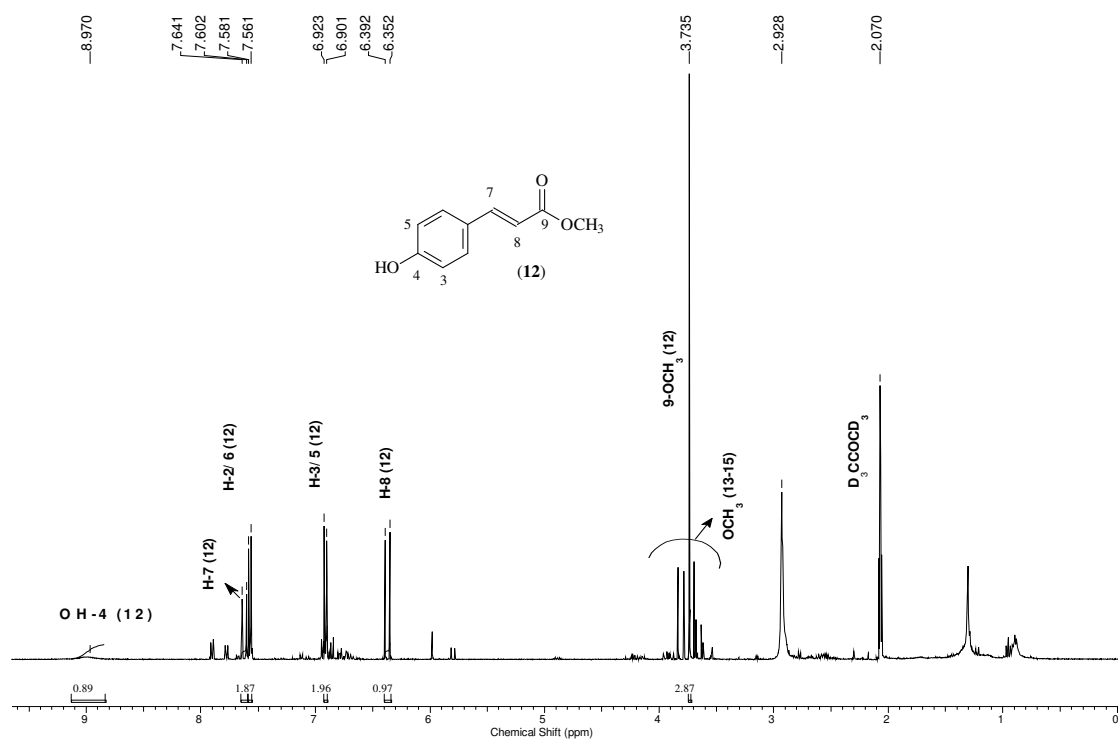


Figura 82. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3COCD_3) das substâncias **12+13+14+15**

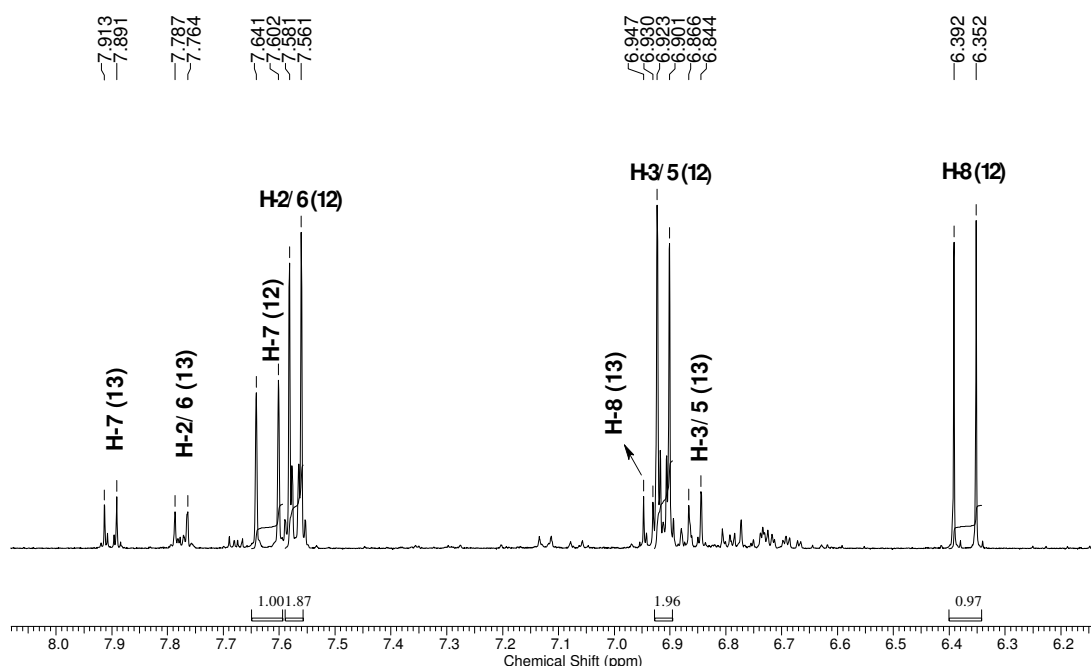


Figura 83. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3COCD_3) das substâncias **12+13+14+15**, entre δ 6,2-7,7 ppm

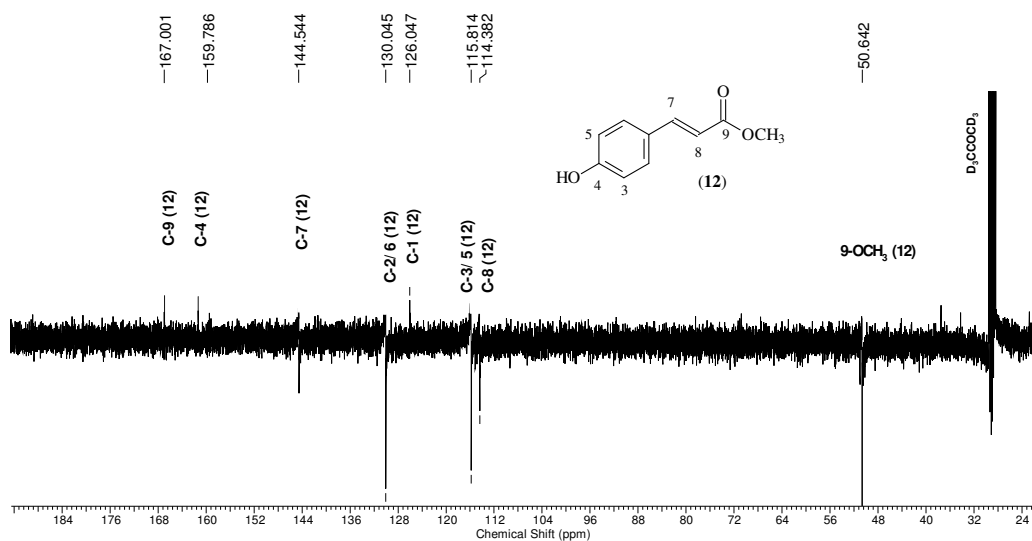


Figura 84. Espectro de RMN DEPT Q (100 MHz, CD₃COCD₃) das substâncias 12+13+14+15, entre δ6,2-7,7 ppm

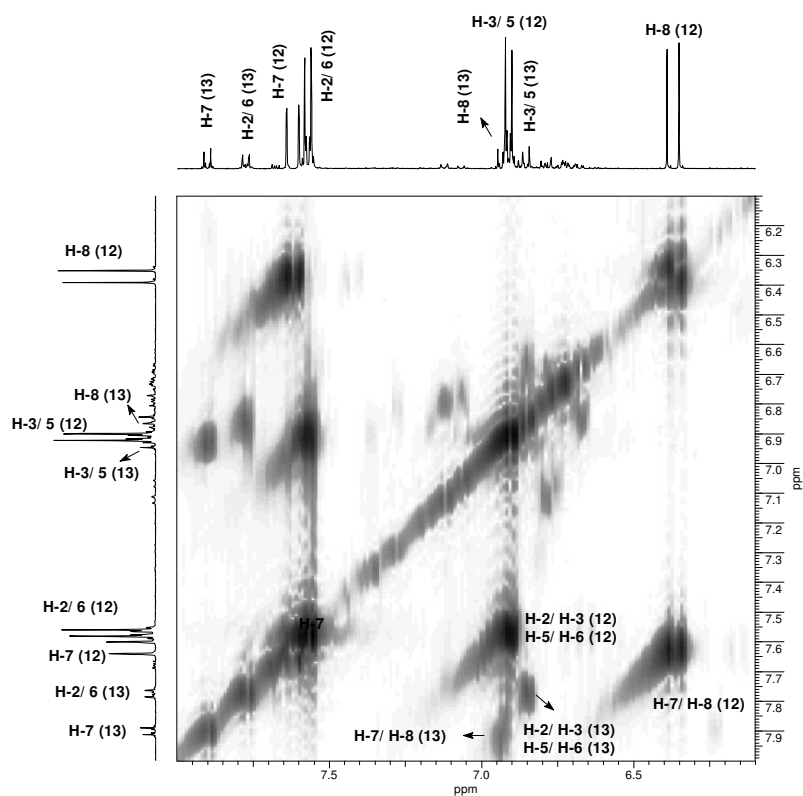


Figura 85. Expansão do espectro de RMN COSY (400 MHz, CD₃COCD₃) das substâncias 12+13+14+15, entre δ6,2-7,9 ppm

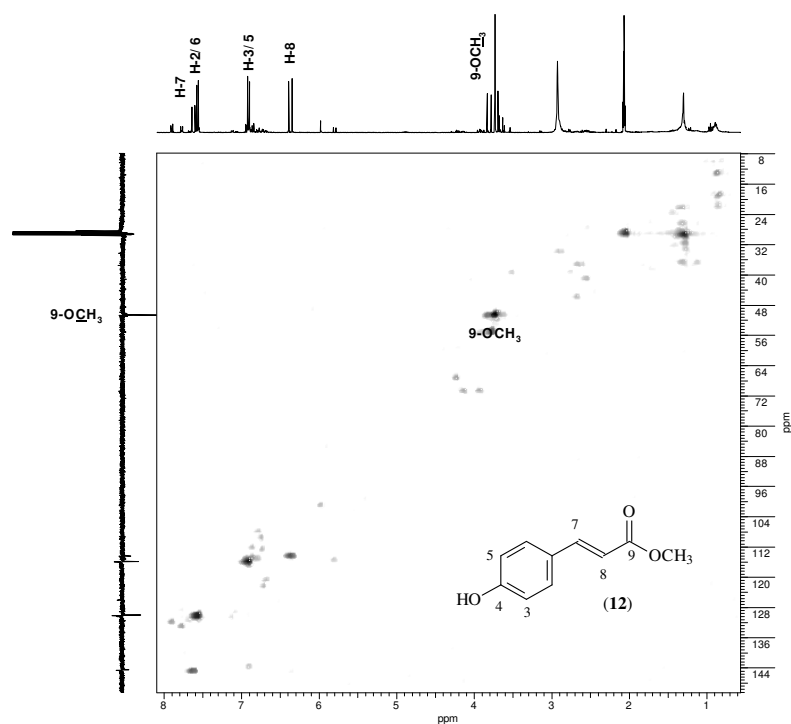


Figura 86. Espectro de RMN HMQC (400/100 MHz, CD₃COCD₃) das substâncias 12+13+14+15

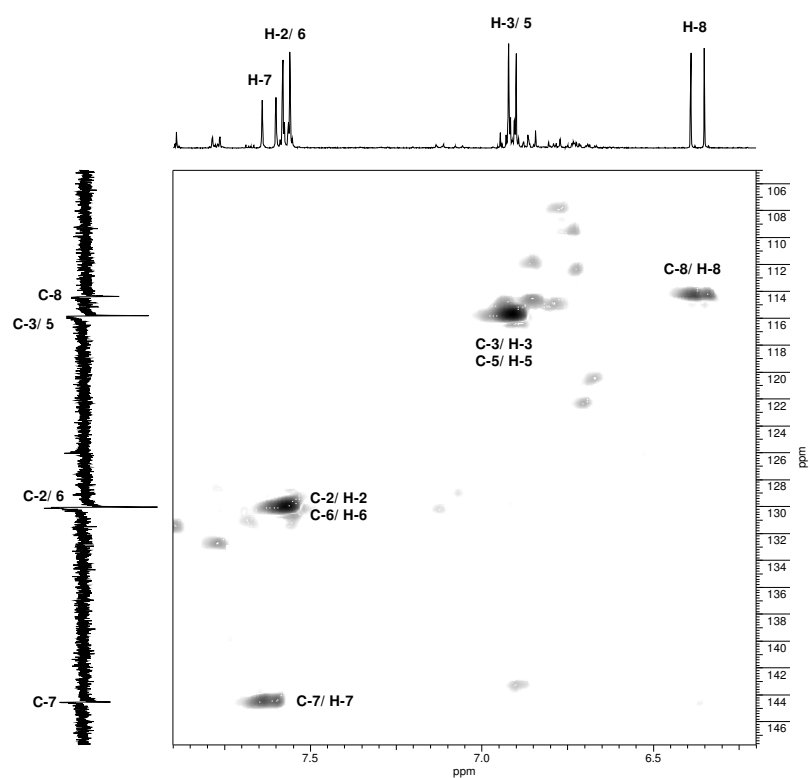


Figura 87. Expansão do espectro de RMN HMQC (400/100 MHz, CD₃COCD₃) das substâncias 12+13+14+15, entre δ106,0- 146,0 e δ6,0-6,2-8,2 ppm

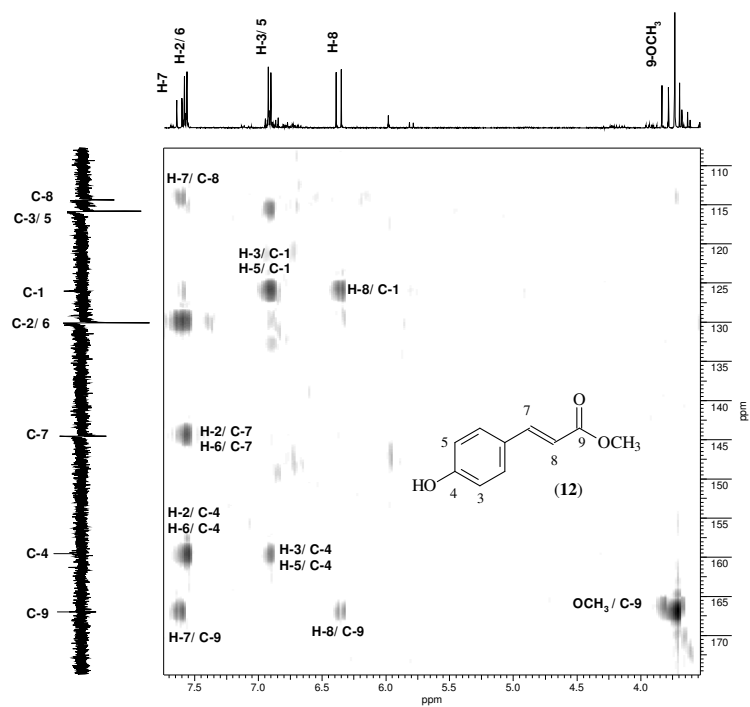


Figura 88. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/100 MHz, CD_3COCD_3) das substâncias **12+13+14+15**, entre δ 110,0- 172,5 e δ 3,5-7,6 ppm

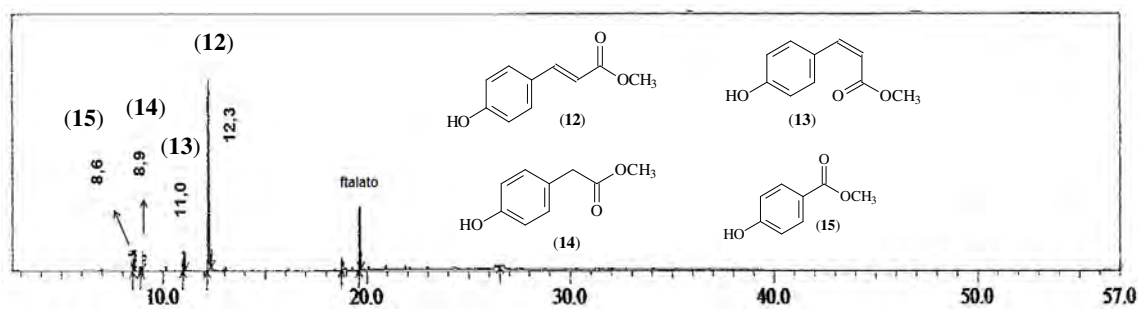


Figura 89. Cromatograma por CG da mistura das substâncias **12+13+14+15**

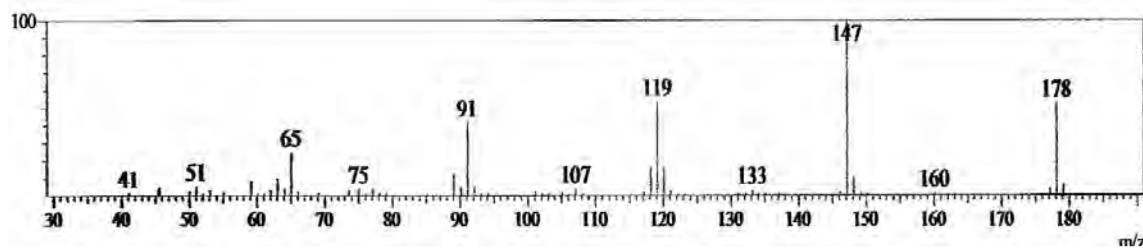


Figura 90. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância **12**

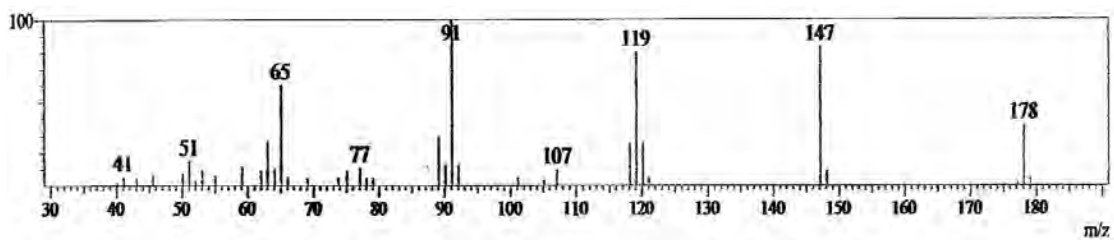


Figura 91. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância 13

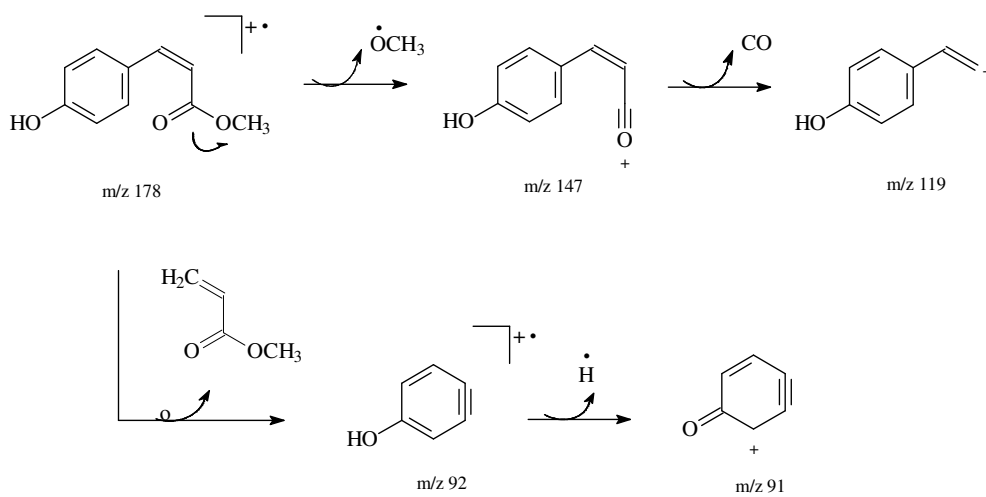


Figura 92. Proposta de fragmentação para as substâncias 12 e 13

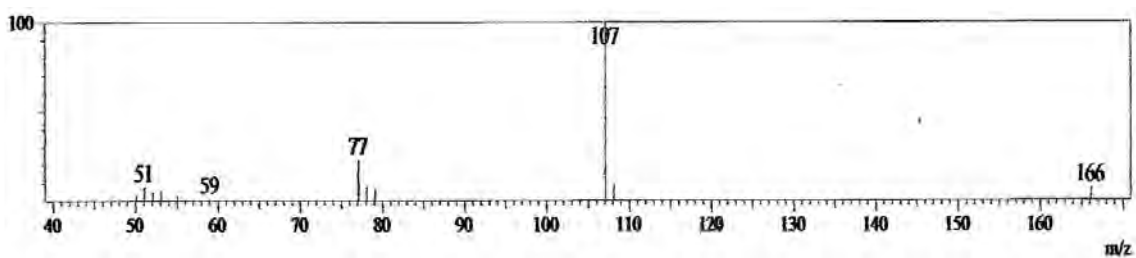


Figura 93. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância 14

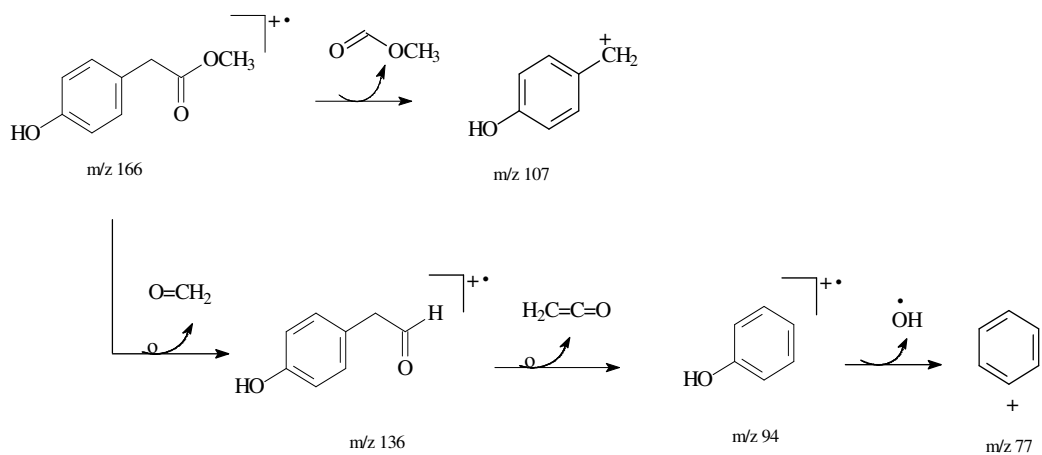


Figura 94. Proposta de fragmentação para substância 14

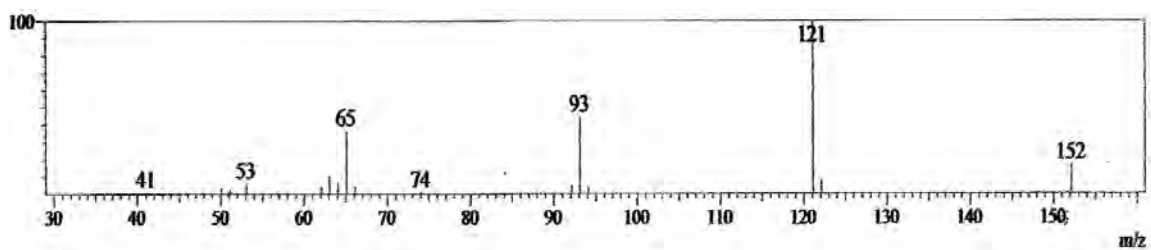


Figura 95. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância 15

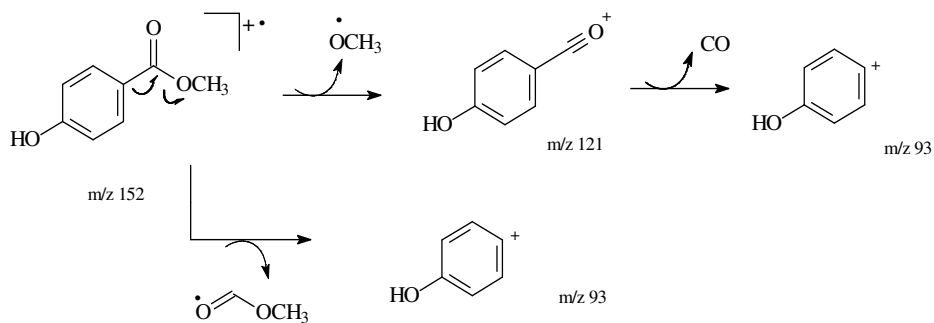
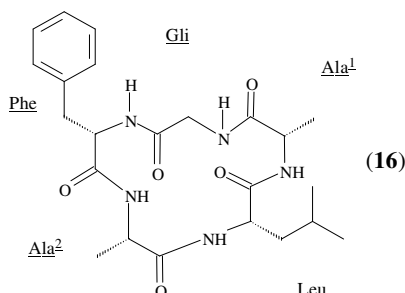


Figura 96. Proposta de fragmentação para substância 15

5.2.8- Identificação da substância 16

A substância **16**, obtida como um sólido branco e amorfo, foi identificada com um novo pentaciclopeptídeo após análises dos espectros de RMN 1D e 2D e CL-EM-EM. Este novo ciclopeptídeo foi denominado de ciclozanthoxylano A (RIBEIRO *et al.*, 2012).



O espectro no IV mostrou sinais de vibração molecular características de grupo NH de amida em 3306 cm^{-1} e 1652 cm^{-1} de grupo carboxila de amida (Figura 97, p. 94).

O espectro de RMN ^1H (Figuras 98 e 99, p. 94 e 95) apresentou cinco sinais em δ_{H} 8,67 (*t*, 1H), 8,21 (*d*, 1H), 8,02 (*d*, 1H) e um multipletto em 7,95 (2H). Pelo espectro de RMN HMQC (Figura 105, p. 98) nota-se que estes sinais não estão ligados a carbono, indicando tratar-se de hidrogênios ligados a heteroátomo (sendo mais comum o oxigênio e o nitrogênio).

Os sinais entre δ_{H} 2,7- 4,5 foram relacionados a carbonos metínicos e metilênicos que foram associados aos carbonos com deslocamento químico entre δ_{C} 37-55 sendo esses valores compatíveis com carbonos ligados a nitrogênio. Se esses carbonos fossem carbinólicos teriam valores de deslocamento químico em torno de 70 ppm.

O espectro de DEPTQ exibiu cinco sinais de carbonila de amida em δ_{C} 173,2, 172,5, 171,9, 170,6, 169,6, quatro carbonos metínicos em δ_{C} 55,7, 54,3, 50,1, 48,4 e um metilênico em δ_{C} 43,9 (Figuras 102 a 104, p. 96 e 97; Tabela 11, p. 93).

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C aliados ao HMQC e COSY permitiu assinalar os sinais dos dupletos em δ_{H} 1,20 e 1,31 à duas metilas da alanina e os dupletos em δ_{H} 0,91 e 0,86 às metilas do grupo R da leucina. Isto foi confirmado pelo acoplamento dos sinais das metilas com os hidrogênios de CH- α da alanina e CH₂- β da leucina (Figuras 106 e 108, p. 98 e 99).

A fenilalanina foi identificada pelos sinais do sistema aromático monossustituído (δ_{H} 7,17-7,30 (*m*)) e dos hidrogênios CH₂- β (δ_{H} 3,12 e 2,85) que acoplam com hidrogênio do multipletto em δ_{H} 4,34-4,40 (CH- α) (Figuras 107 e 108, p. 99).

A glicina foi sugerida com base no δ_{CH_2} em 43,8 ligado a hidrogênios em δ_{H} 3,89 e 3,24 que acoplam com H-N (δ 8,67) revelado pelo espectro de COSY (Figura 108, p. 99). Destas análises pode-se propor que a estrutura constituída pelos ácidos aminados glicina, fenilalanina, leucina e duas alaninas.

A ausência de sinal de carboxila em torno de 180 ppm e de hidrogênio ligado a nitrogênio com integração de 2H, indicou que a sequência dos ácidos aminados era cíclica. A análise dos espectros de TOCSY (Figura 109, p. 100) permitiu verificar os sinais dos núcleos acoplados em sequência e confirmar os ácidos aminados propostos.

O espectro de HMBC semi-seletivo da região das carbonilas (Figura 111, p. 101) apresentou acoplamento dos sinais em δ 169,6 (Gli) com N-H (Phe) and N-CH₂ (Gli); 170,5 (Phe) com N-H (Ala¹) and H₂C (Phe); 171,9 (Ala²) com N-H (Leu), HC-N (Ala²) e H₃C (Ala²); 172,5 (Leu) com N-H (Ala¹); 173,2 (Ala¹) com N-H (Gli), H₂C-N (Gli), HC-N (Ala¹), e H₃C (Ala¹) (Tabela 11, p. 93).

Estes dados e análises adicionais dos espectros de HMBC (110-115, p. 101 a 103), NOESY (Figuras 116 e 117, p. 104) e do espectro de massas (Figura 118, p. 105) foram usadas para confirmar a sequência dos ácidos aminados da estrutura como sendo ciclo(-Phe-Gli-Ala¹-Leu-Ala²-).

O espectro de massas de alta resolução obtido com análise de detecção de íons positivos em sistema elétron spray, exibiu pico do íon molecular em m/z 460 [M+H]⁺, compatível com a fórmula molecular C₂₃H₃₃N₅O₅, além de uma série de picos que permitiram confirmar a sequência de ácidos aminados propostos para o ciclopeptídeo **16**. As fragmentações sugeridas estão apresentadas na Figura 119 (p. 106) e resumidas no Esquema 14 (p. 105).

A determinação da configuração absoluta dos ácidos aminados de **16** foi efetuada através do método de Marfey (MARFEY, 1984; item 4.3.4.1, p. 23). A análise por CLAE forneceu os cromatogramas (Figuras 120 e 121, p. 107) em que os t_R dos derivados de ácidos aminados obtidos da hidrólise de **16** (Figura 7, p. 24) em comparação com t_R dos padrões de ácidos aminados das séries D e L, indicou que os ácidos aminados constituintes de **16** eram todos da série L, sendo assim identificados como glicina, L-fenilalanina, L-leucina e L-alanina. Desta forma, o ciclopeptídeo ciclozanthoxylano A foi definido como ciclo(-L-alanil-L-leucil-L-alanil-glicil-L-fenilalanil-).

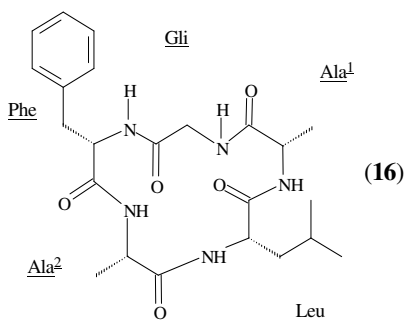


Tabela 11. Dados de RMN ^1H (400 MHz), DEPTQ (100 MHz) e HMBC (400/ 100 MHz) em DMSO-*d* da substância **16**.

| | Posição | δ_{H} [mult., J (Hz)] | DEPTQ δ_{C} | HMBC | |
|------------------|------------------------------|--|----------------------------------|--|--|
| Gly | CH ₂ (α) | 3,89 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 14,4, 6,4) 3,24 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 14,4, 5,2) | 43,8 (<i>t</i>) | CO(Ala ¹), CO(Gly) | |
| | NH | 8,67 (<i>t</i> , <i>J</i> = 5,6) | | CO(Ala ¹), | |
| | CO | | 169,6 (<i>s</i>) | | |
| Ala ¹ | CH (α) | 4,19-4,24 (<i>m</i>) | 48,4 (<i>d</i>) | CO(Ala ¹), CO(Leu) | |
| | Me (β) | 1,20 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,2) | 18,2 (<i>q</i>) | CO(Ala ¹), CH α (Ala ¹) | |
| | NH | 7,93-7,96 (<i>m</i>) | | CO(Ala ¹), CO(Leu) | |
| | CO | | 173,2 (<i>s</i>) | | |
| Leu | CH (α) | 3,98-4,03 (<i>m</i>) | 54,2 (<i>d</i>) | CO(Leu) | |
| | CH ₂ (β) | 1,68-1,75 (<i>m</i>) 1,47-1,53 (<i>m</i>) | 40,0 (<i>t</i>) | CO(Leu) | |
| | CH (γ) | 1,56-1,61 (<i>m</i>) | 25,0 (<i>d</i>) | | |
| | Me (δ) | 0,91 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,0) | 23,2 (<i>q</i>) | CH ₂ β (Leu) | |
| | Me (δ') | 0,86 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,4) | 22,0 (<i>q</i>) | CH ₂ β (Leu) | |
| | NH | 8,02 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,6) | | CO(Ala ²) | |
| | CO | | 172,5 (<i>s</i>) | | |
| Phe | CH (α) | 4,34-4,40 (<i>m</i>) | 55,6 (<i>d</i>) | CO(Phe), CO(Gly) | |
| | CH ₂ (β) | 3,12 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 14,0, 5,2) 2,85 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 14,2, 10,0) | 37,2 (<i>t</i>) | CO(Phe), CH α -Phe, C- 1',2',6' | |
| | 1' | | 138,2 (<i>s</i>) | | |
| | 2', 6' | 7,18-7,30 (<i>m</i>) | 129,3 (<i>d</i>) | | |
| | 3', 5' | 7,18-7,30 (<i>m</i>) | 128,6 (<i>d</i>) | | |
| | 4' | 7,18-7,30 (<i>m</i>) | 126,8 (<i>d</i>) | | |
| | NH | 8,21 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,8) | | CO(Gly) | |
| | CO | | 170,5 (<i>s</i>) | | |
| | Ala ² | CH (α) | 4,19-4,24 (<i>m</i>) | 50,1 (<i>d</i>) | CO(Ala ²), CO(Phe) |
| | | Me (β) | 1,31(<i>d</i> , <i>J</i> = 7,2) | 17,5 (<i>q</i>) | CO(Ala ²), CH α (Ala ²) |
| NH | | 7,93-7,96 (<i>m</i>) | | CO(Phe) | |
| CO | | | 171,9 (<i>s</i>) | | |

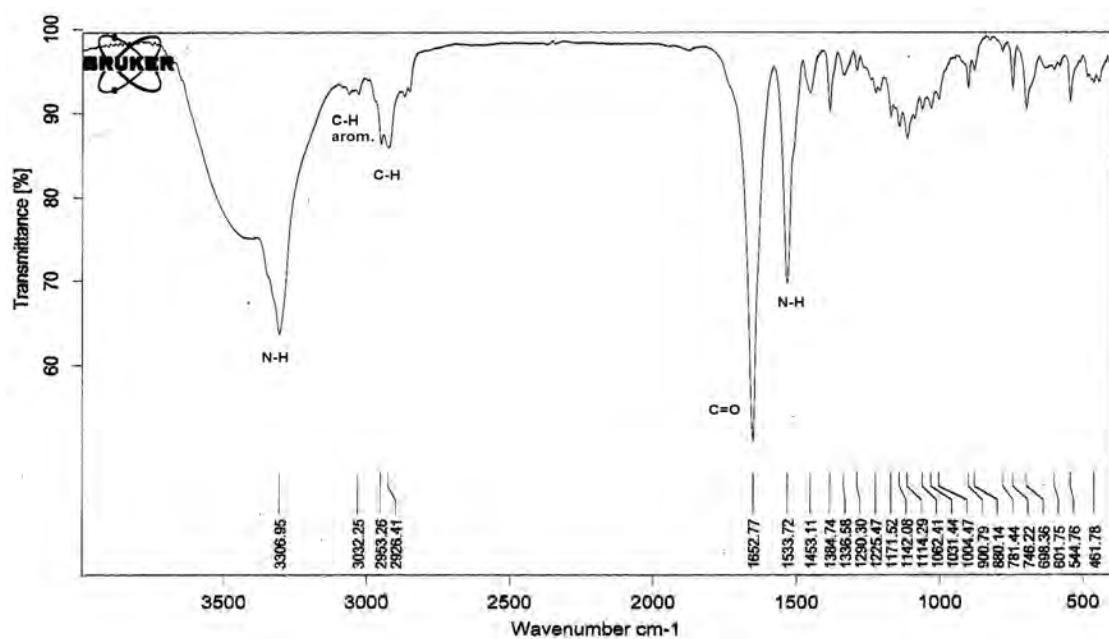


Figura 97. Espectros no IV da substância 16 em KBr

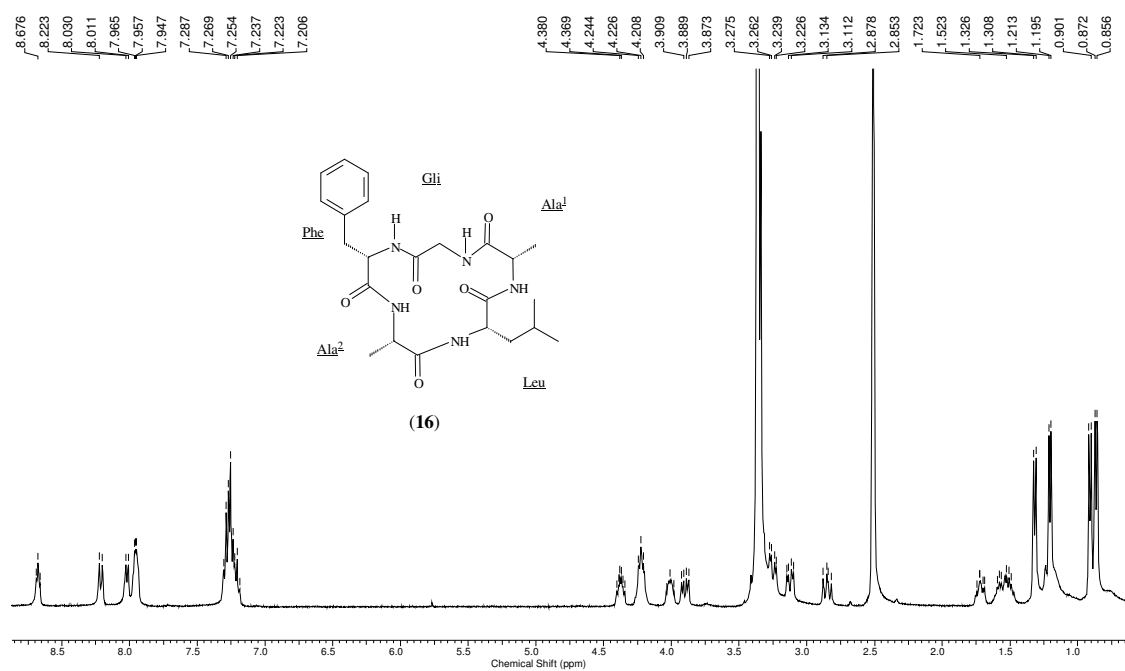


Figura 98. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância 16

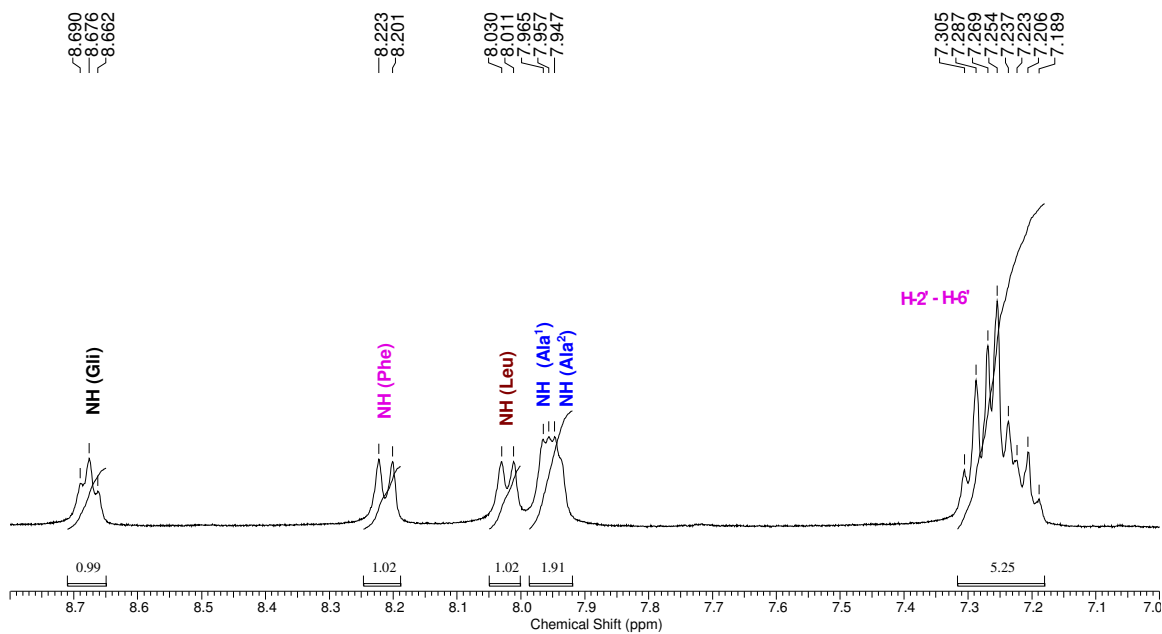


Figura 99. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **16**, entre δ_{H} 7,0-8,8 ppm

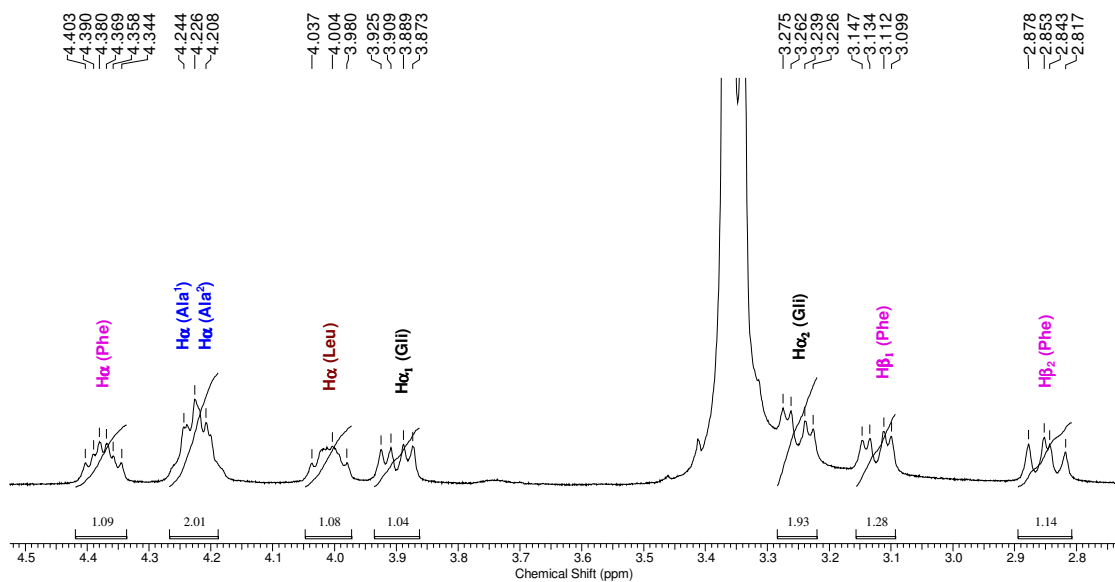


Figura 100. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **16**, entre δ_{H} 2,8-4,5 ppm

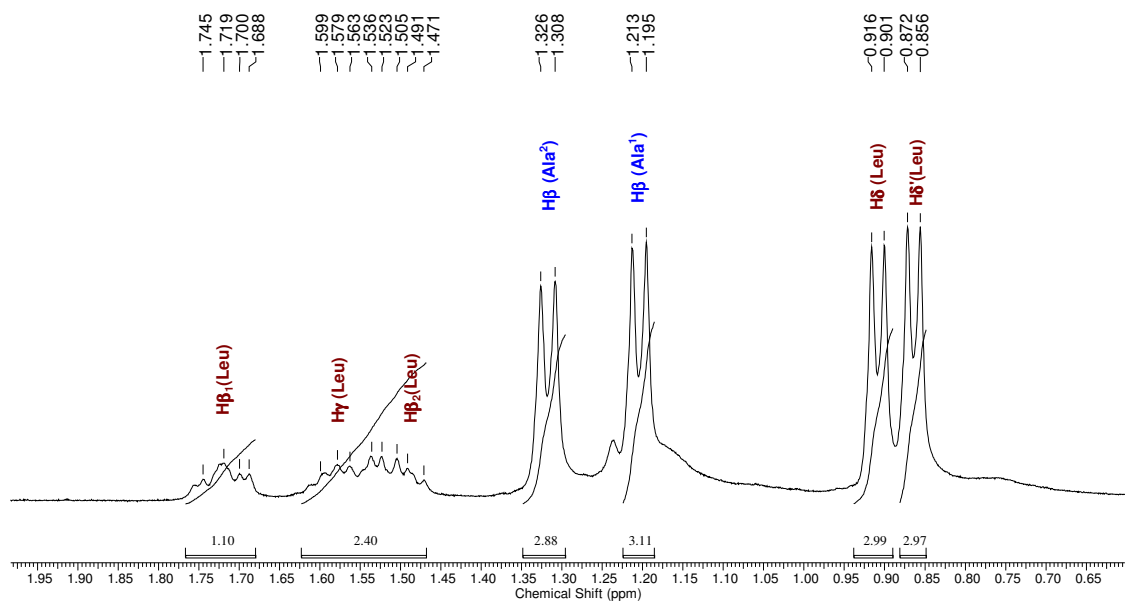


Figura 101. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **16**, entre δ_{H} 0,6-1,9 ppm

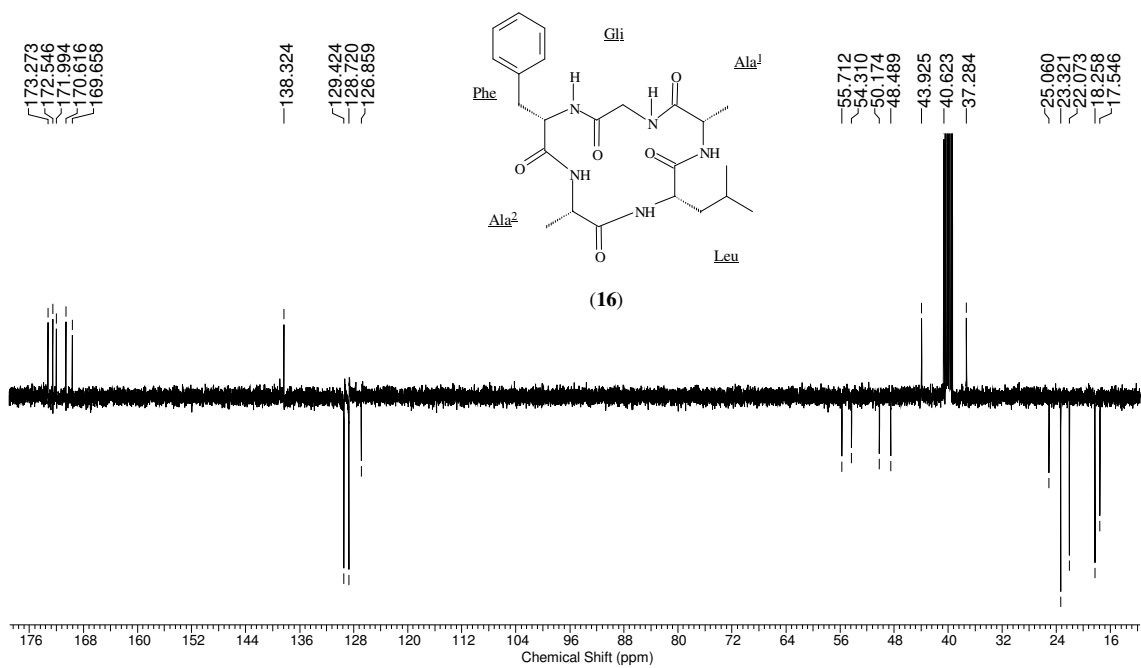


Figura 102. Espectro de RMN DEPTQ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **16**

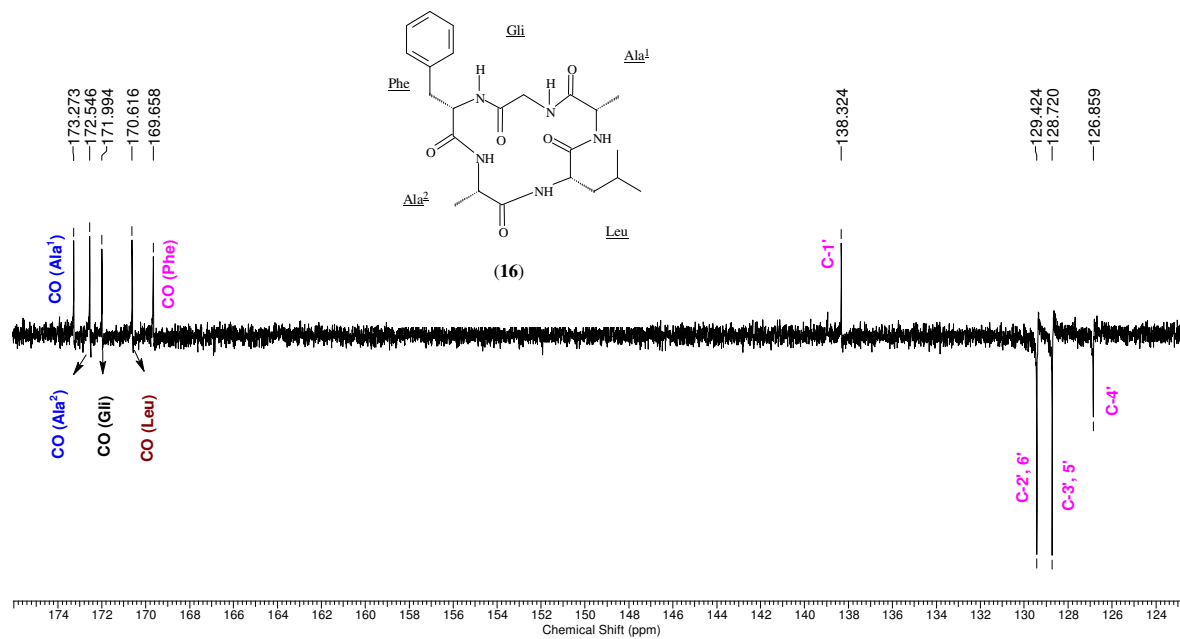


Figura 103. Expansão do espectro de RMN DEPTQ (100 MHz, DMSO-*d*₆) da substância **16**, entre δ_C 123,0-177,0 ppm

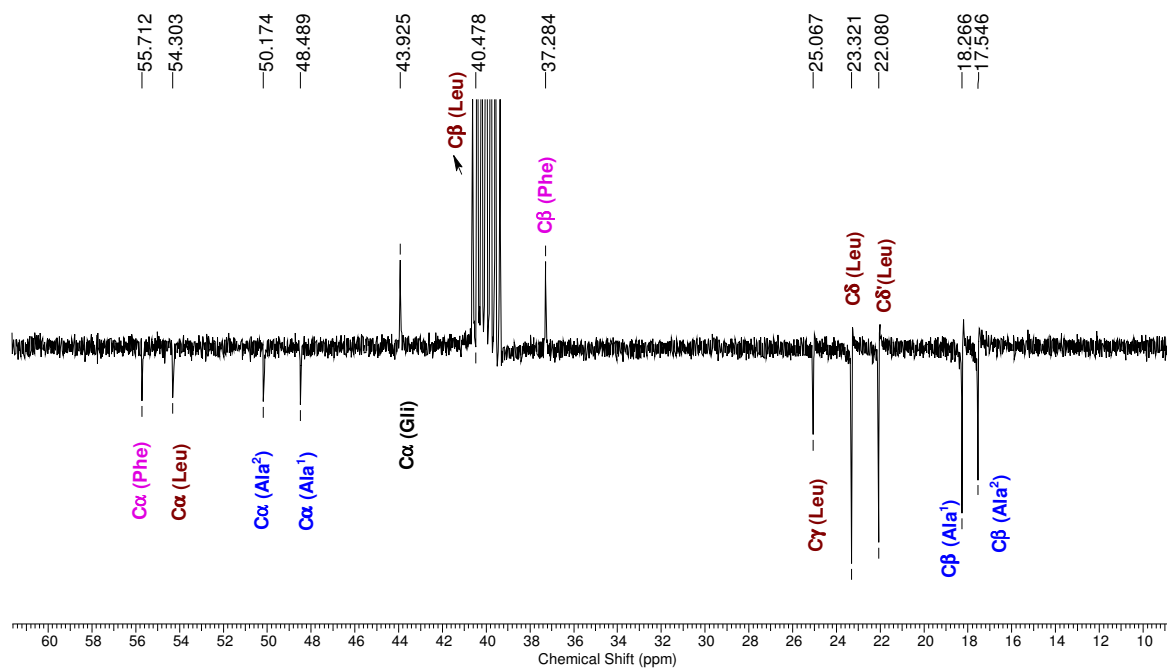


Figura 104. Expansão do espectro de RMN DEPTQ (100 MHz, DMSO-*d*₆) da substância **16**, entre δ_C 10,0-60,0 ppm

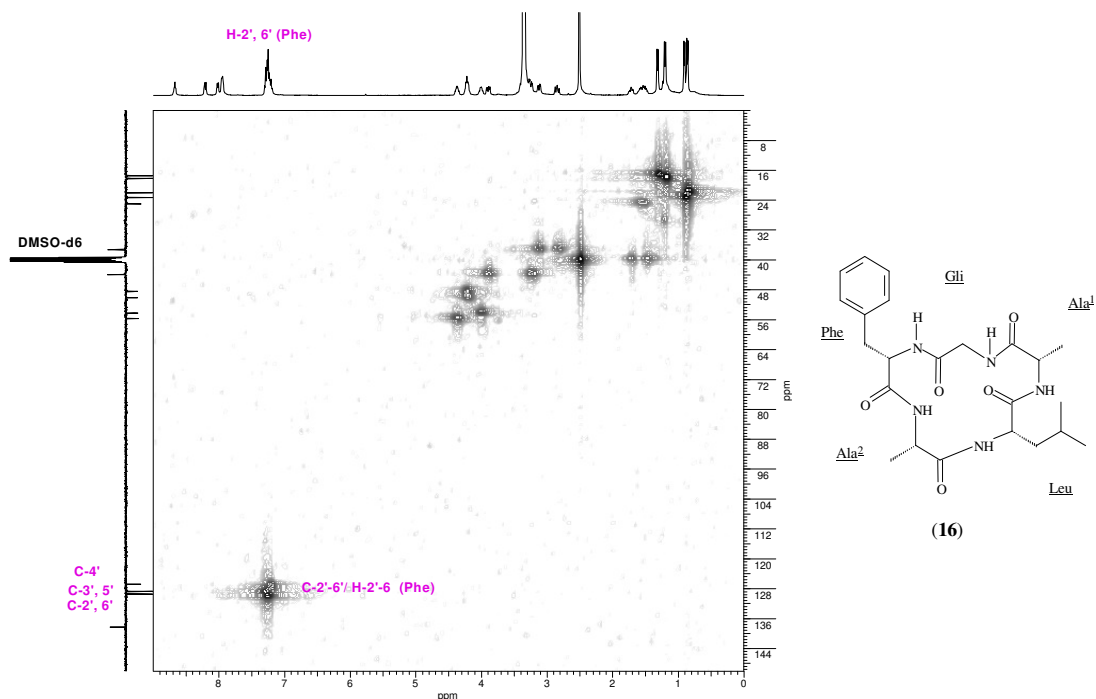


Figura 105. Espectro de RMN HMQC (400/ 100 MHz, DMSO- d_6) da substância **16**

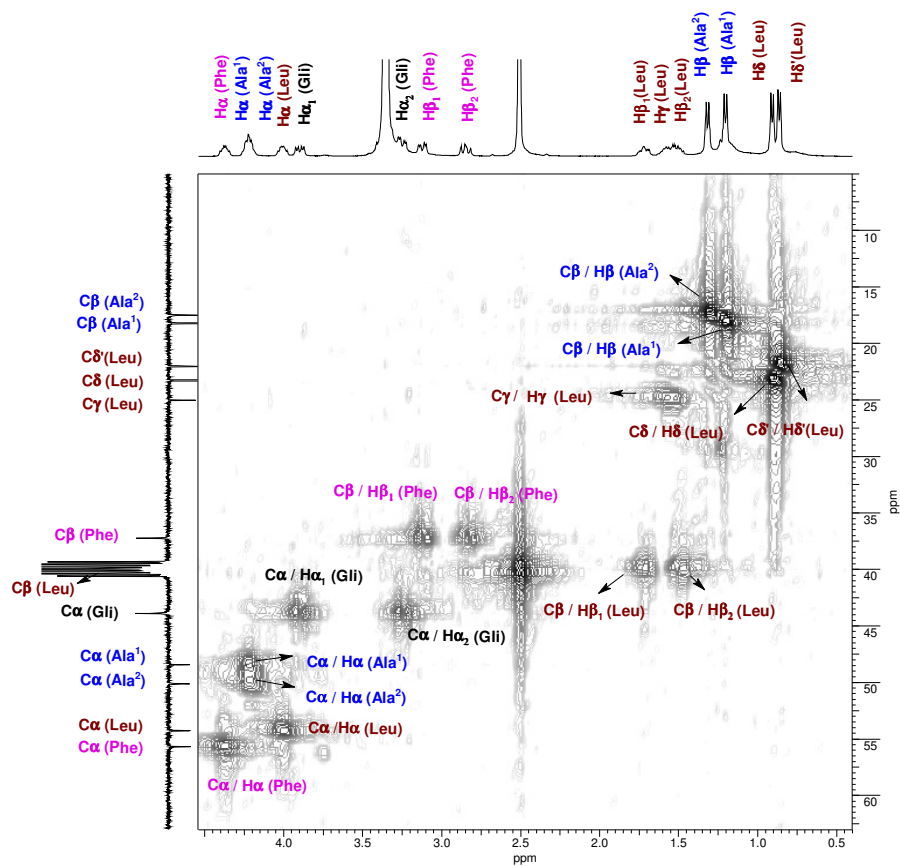


Figura 106. Expansão do espectro de RMN HMQC (400/ 100 MHz, DMSO- d_6) da substância **16**, entre δ_C 10,0-60,0 e δ_H 0,5-4,5 ppm

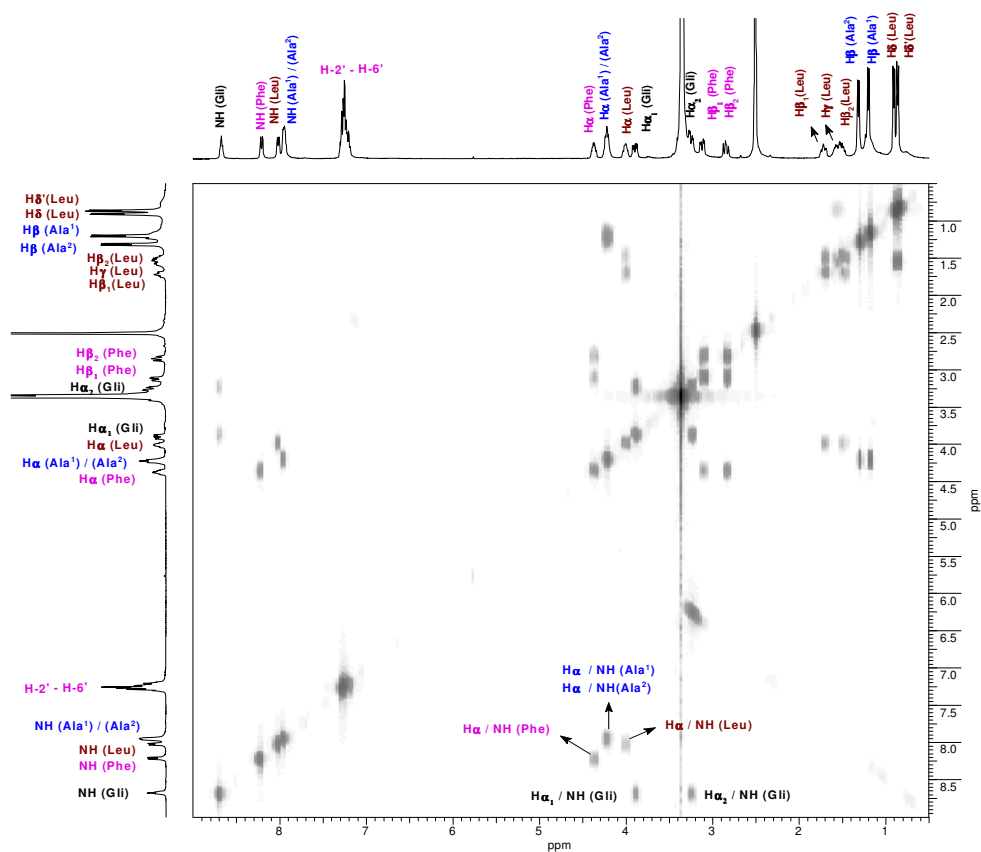


Figura 107. Espectro de RMN COSY (400 MHz, DMSO- d_6) da substância 16

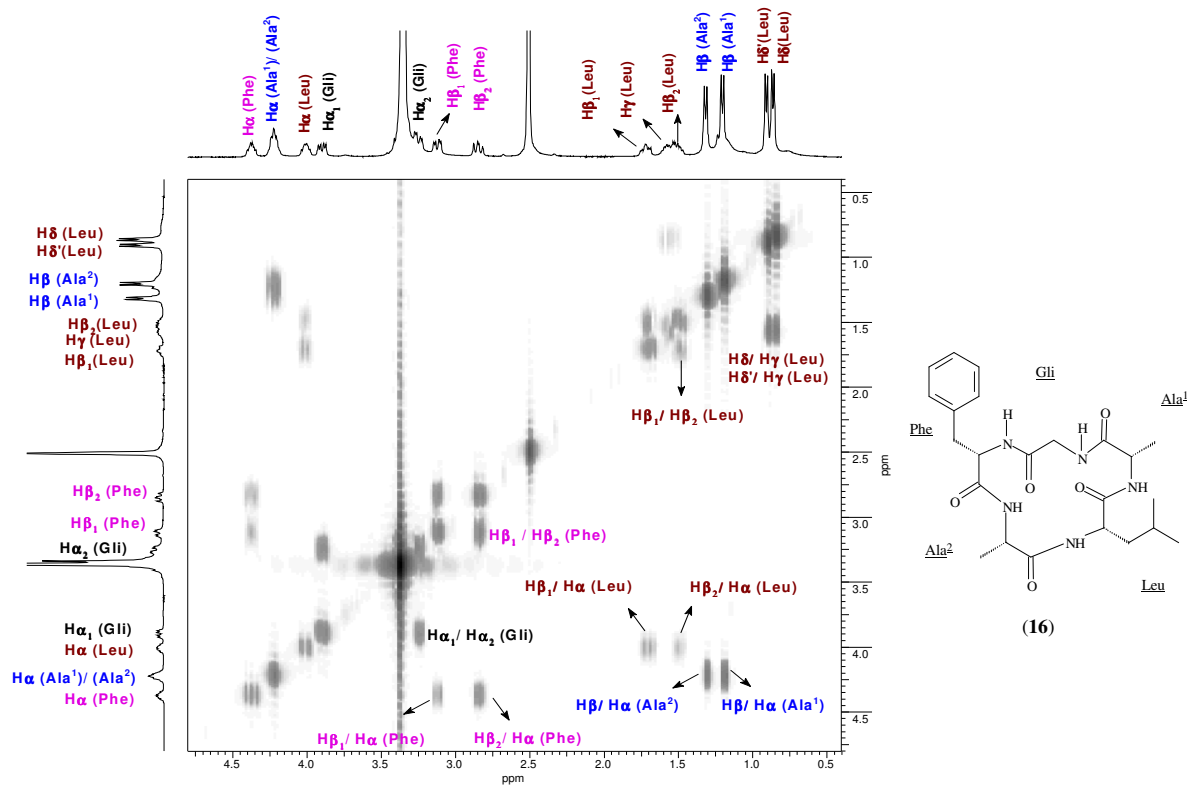
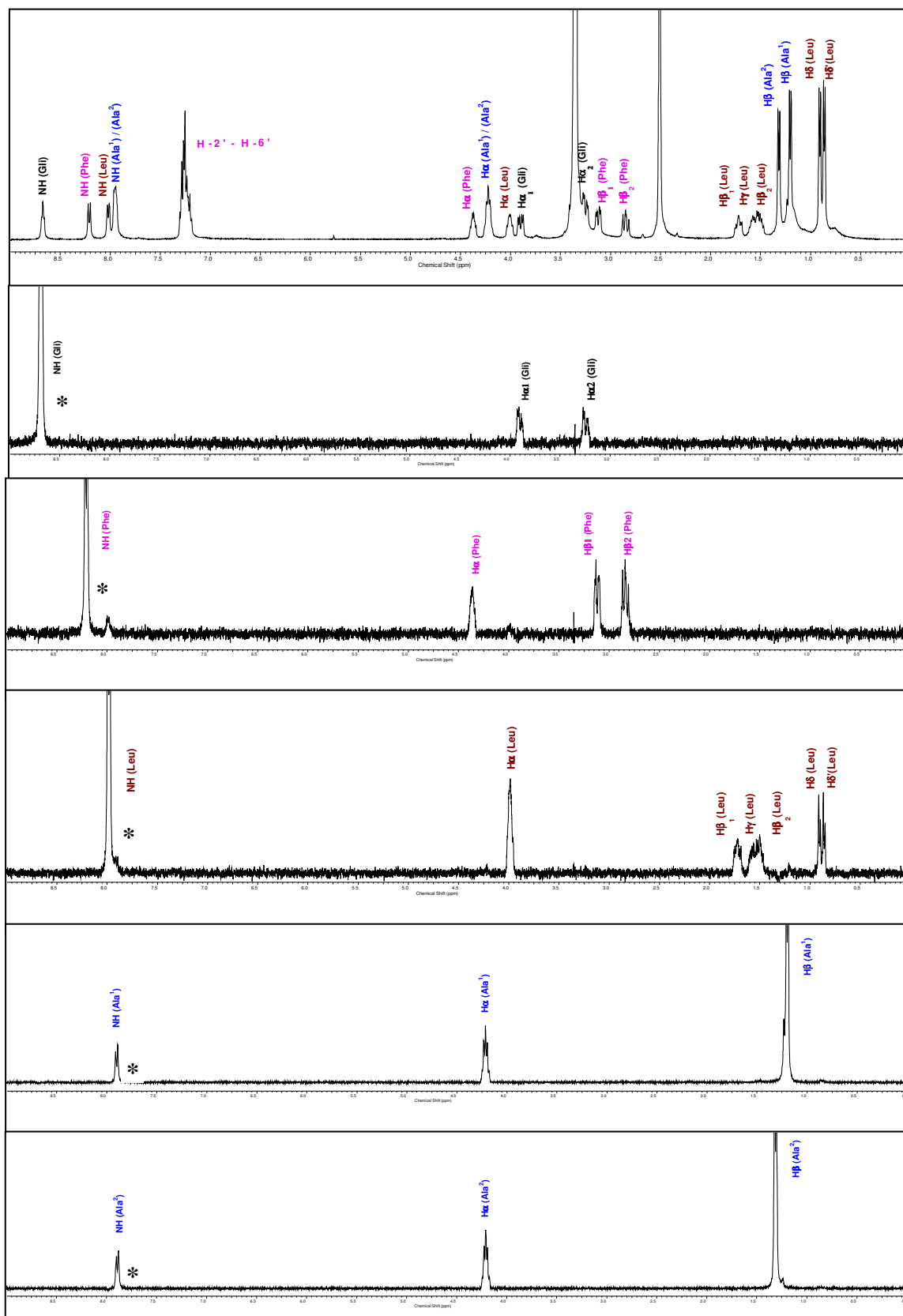


Figura 108. Expansão do espectro de RMN COSY (400 MHz, DMSO- d_6) da substância 16, entre δ_H 0,5-4,5 ppm



* H irradiado

Figura 109. Espectros de TOCSY (400 MHz, DMSO-*d*₆) da substância 16

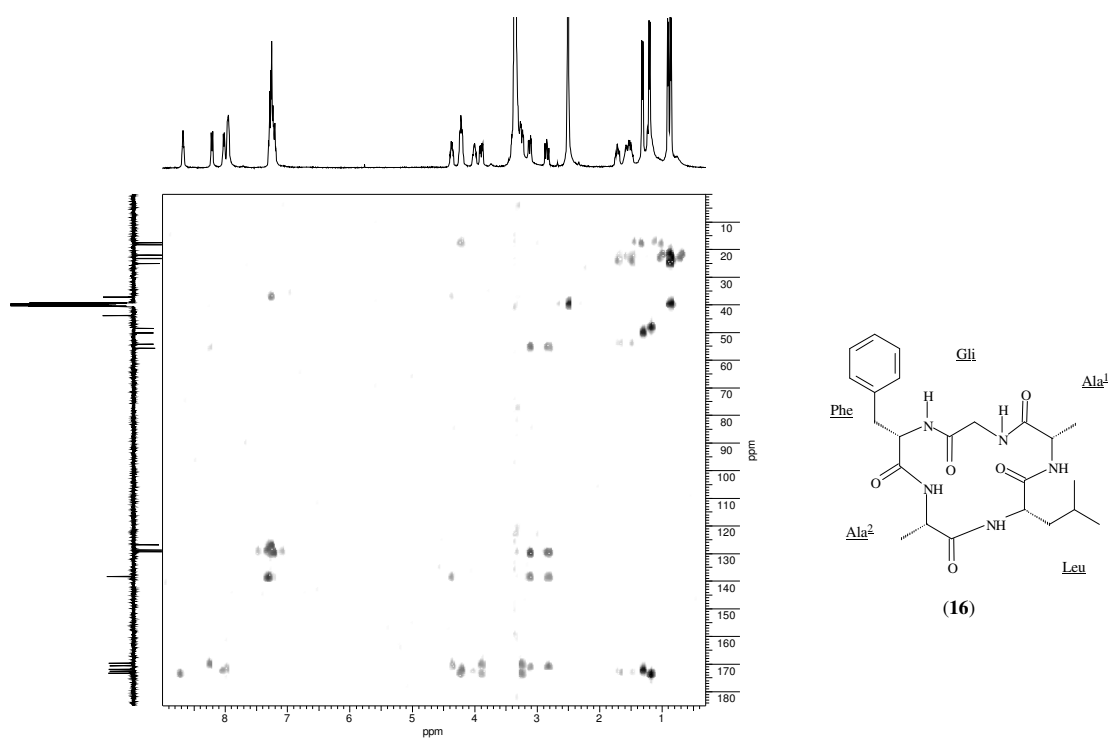


Figura 110. Espectro de RMN HMBC (400/ 100 MHz, DMSO- d_6) da substância 16

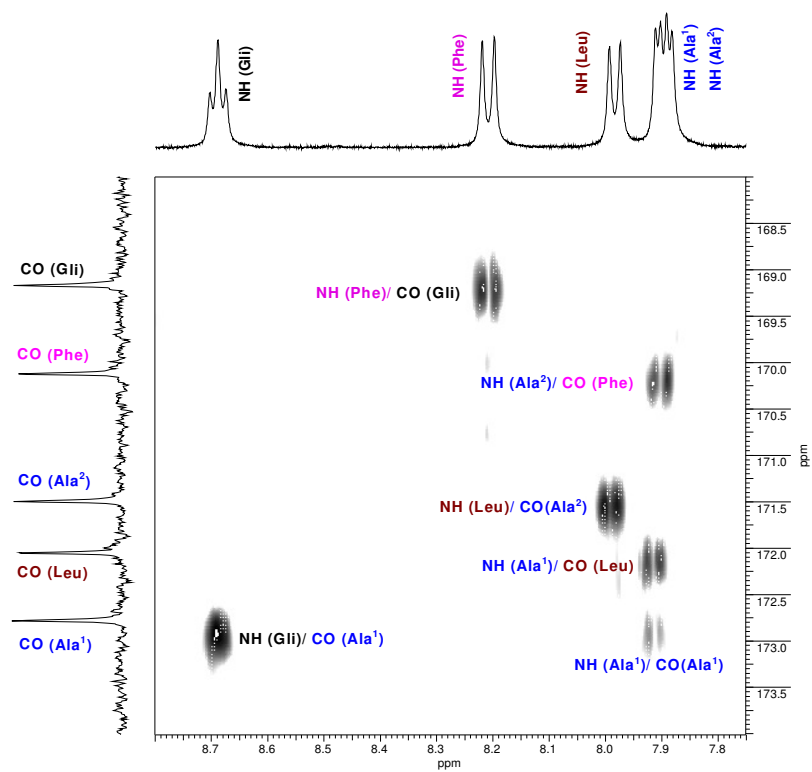


Figura 111. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/ 100 MHz, DMSO- d_6) da substância 16, entre δ_C 10,0-60,0 e δ_H 0,5-4,5 ppm

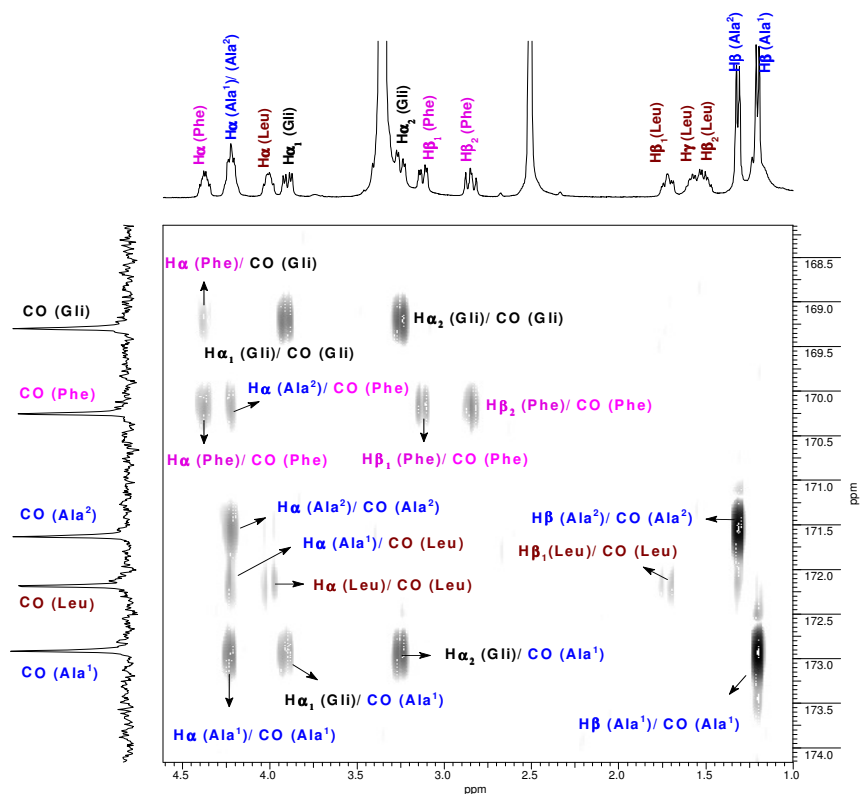


Figura 112. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/ 100 MHz, DMSO- d_6) da substância **16**, entre δ_C 168,5-174,0 e δ_H 1,0-4,9 ppm

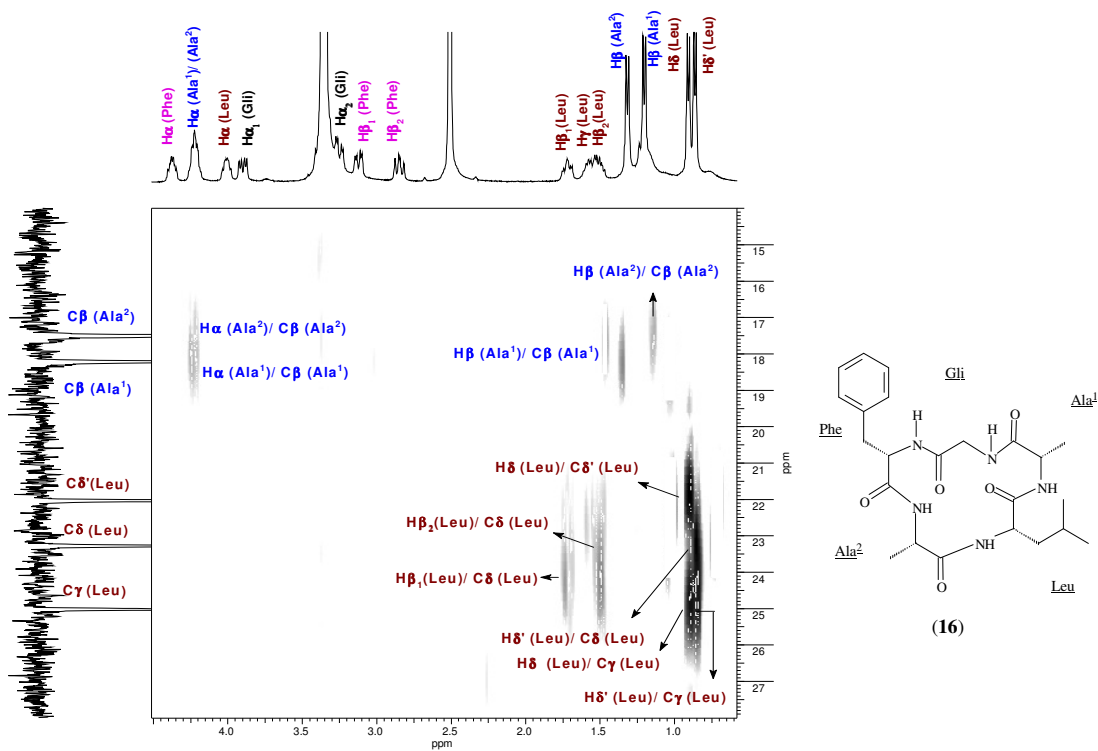


Figura 113. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/ 100 MHz, DMSO- d_6) da substância **16**, entre δ_C 14,0-28,0 e δ_H 0,5-5,0 ppm

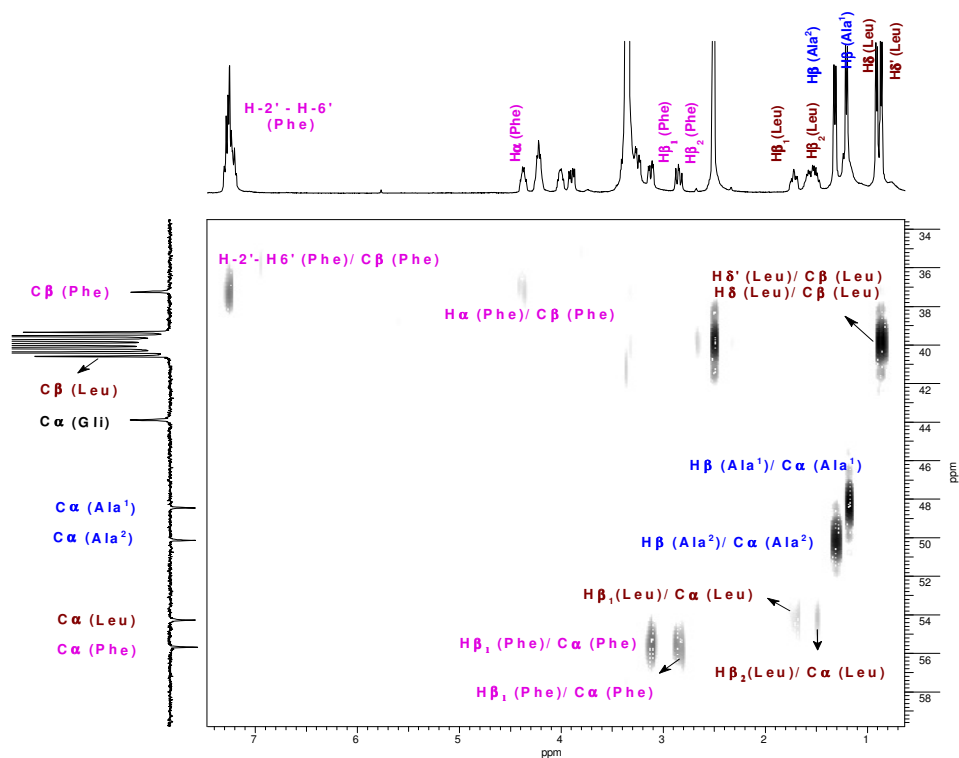


Figura 114. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/ 100 MHz, DMSO- d_6) da substância **16**, entre δ_C 34,0-59,0 e δ_H 0,5-7,5 ppm

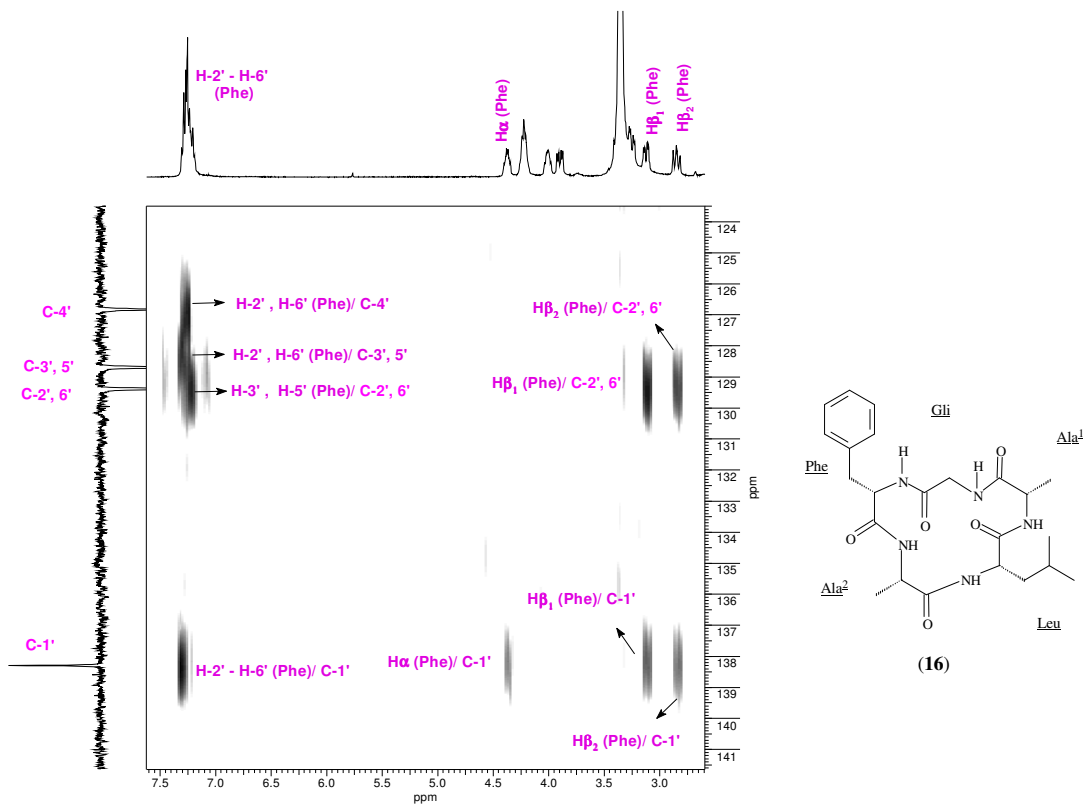


Figura 115. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/ 100 MHz, DMSO- d_6) da substância **16**, entre δ_C 124,0-141,5 e δ_H 2,5-7,5 ppm

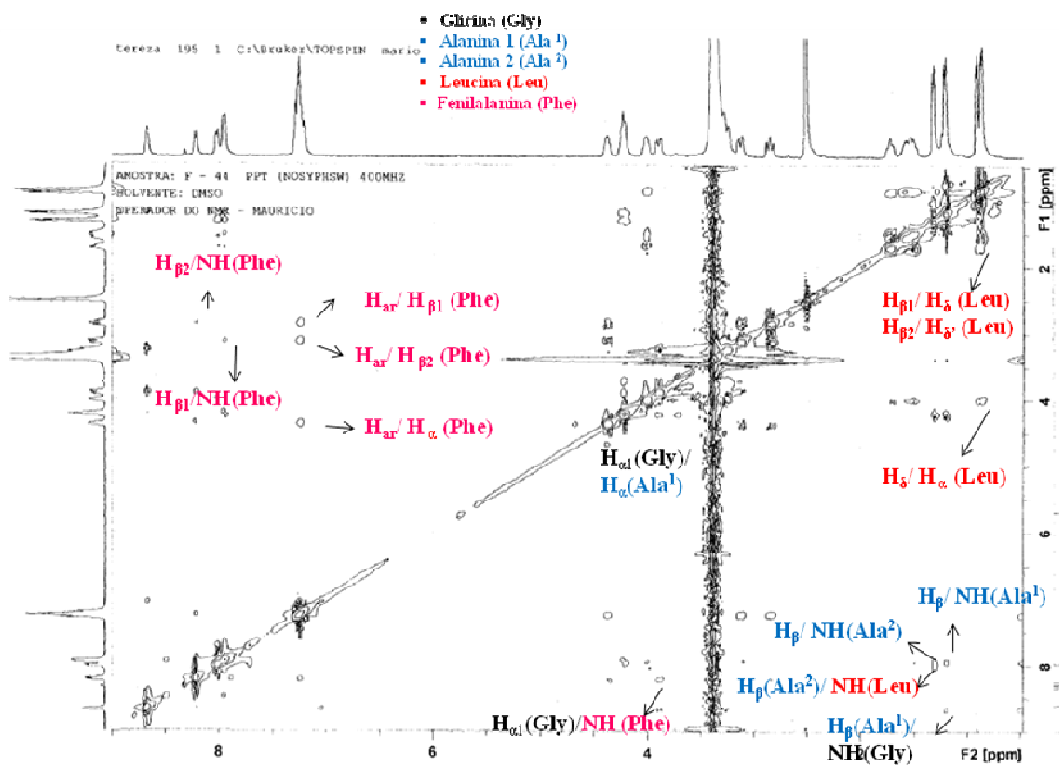


Figura 116. Espectro de RMN NOESY (400/ 100 MHz, DMSO- d_6) da substância 16

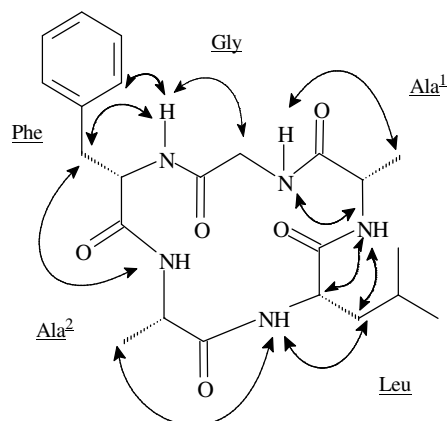


Figura 117. Principais correlações de NOESY da substância 16

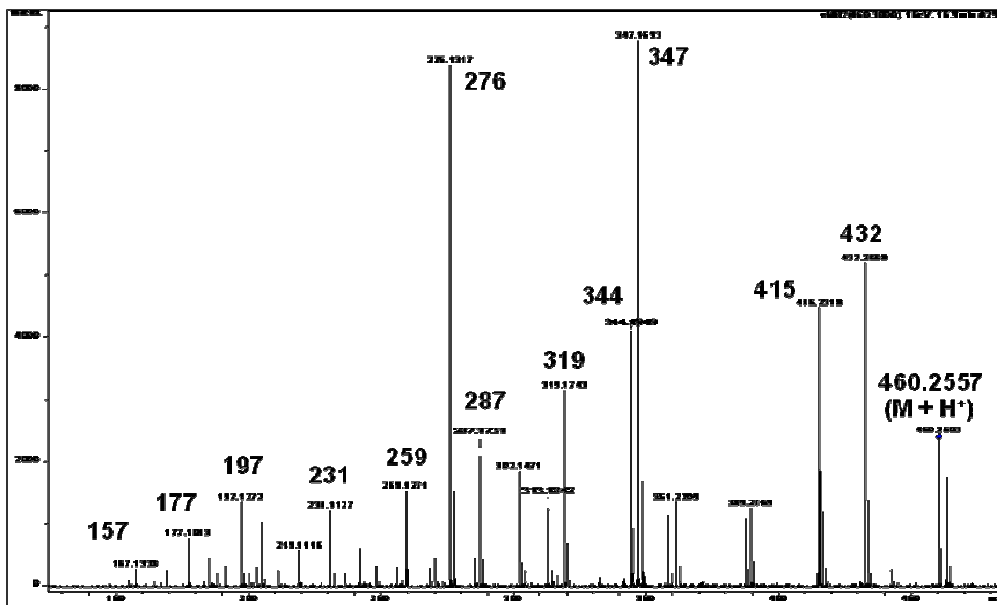
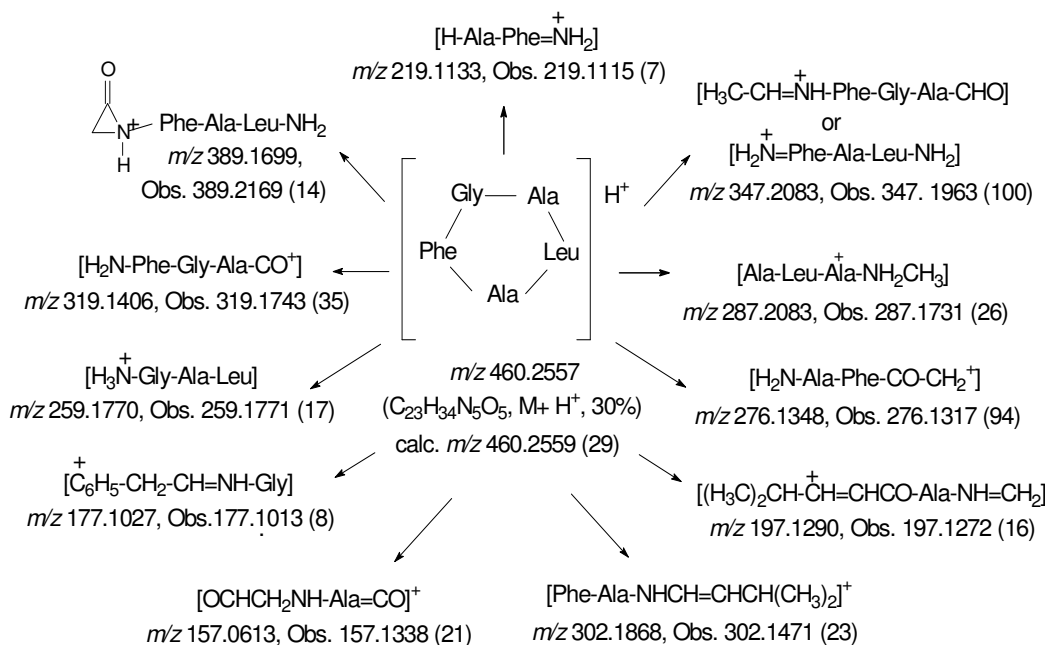


Figura 118. Espectro de massas de alta resolução EM-IES com ionização elétron spray (IES) e detecção de íons de carga positiva de 16



Esquema 14. Esquema geral das propostas de fragmentação para substância 16

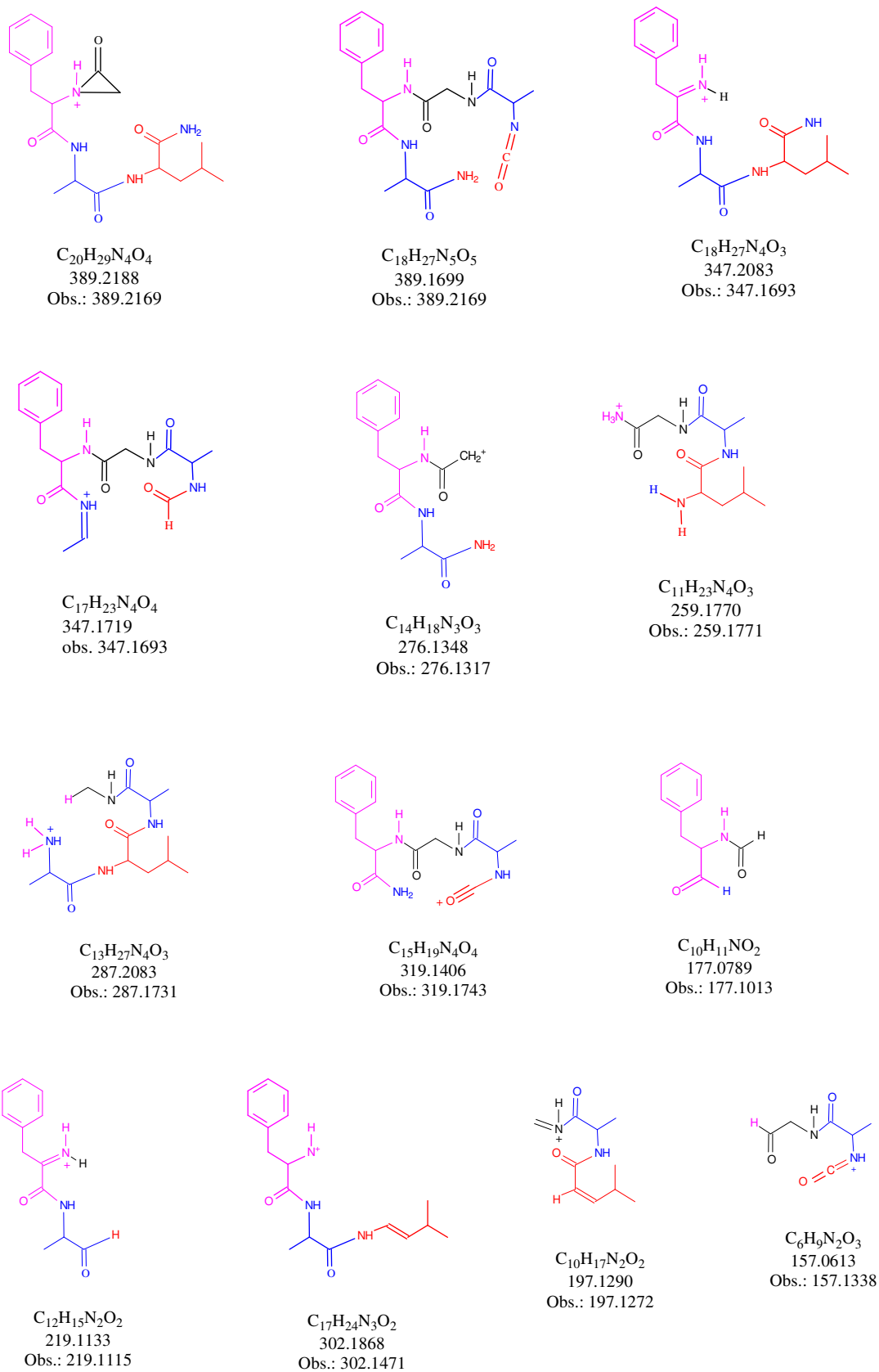


Figura 119. Propostas de fragmentação para substância 16

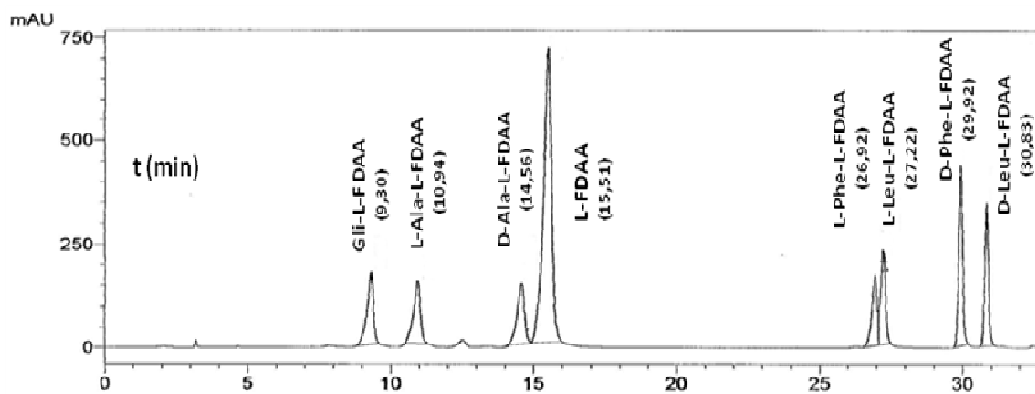


Figura 120. Cromatograma dos padrões de ácidos aminados das séries D e L

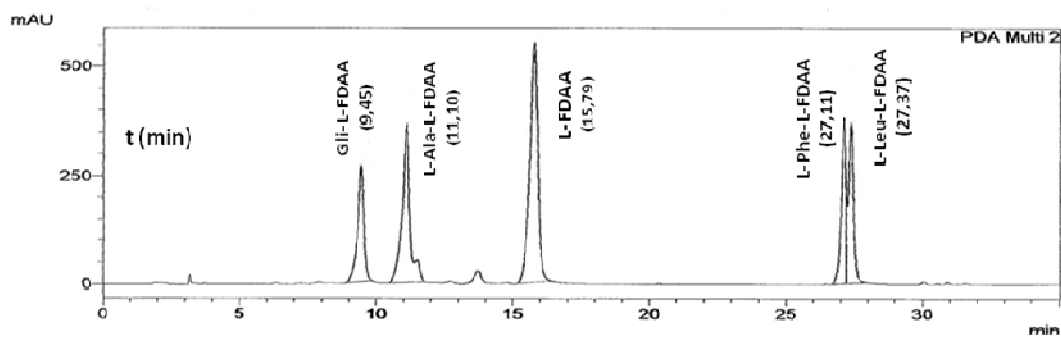
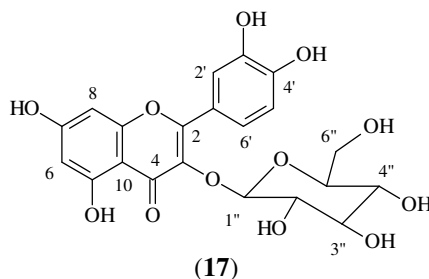


Figura 121. Cromatograma dos ácidos aminados do ciclopeptídeo hidrolisado (16)

5.2.9- Identificação da substância 17

A substância **17** foi isolada como um sólido amarelo e identificada como o flavonóide isoquercetina após análises por RMN 1D e 2D e comparação com os dados da literatura (ELDAHSHAN *et al.*, 2011).



O espectro no IV (Figura 122, p. 110) exibiu bandas de absorção em 3394 cm^{-1} (estiramento O-H), 1656 cm^{-1} (estiramento C=O de carbonila conjugada), 1606 cm^{-1} (estiramento de ligação dupla conjugada à carbonila).

O espectro de RMN ^1H mostra sinais na região de hidrogênios de sistema aromático entre $\delta_{\text{H}} 6,17$ e $7,59$ (Figuras 123 e 124, p. 110 e 111). Os sinais em $\delta_{\text{H}} 7,57$ (*d*, $J= 2,0\text{ Hz}$; H-2), $\delta_{\text{H}} 6,83$ (*d*, $J= 8,8\text{ Hz}$; H-5) e $\delta_{\text{H}} 7,59$ (*m*, H-6) permitiu propor um sistema ABC, no anel B da substância **17**. Esses acoplamentos puderam ser confirmados pelo espectro de RMN COSY (Figura 127, p.112). Os dois singletos em $\delta_{\text{H}} 6,37$ e $\delta_{\text{H}} 6,15$ foram relacionados a H-8 e H-6. Um conjunto de sinais na região entre $\delta_{\text{H}} 3,09$ - $3,59$ (Figura 125, p. 111) e um duplete em $\delta_{\text{H}} 5,46$ ($J= 7,6\text{ Hz}$) ligado a um carbono em $\delta_{\text{C}} 101,3$, evidenciaram a presença de uma unidade de carboidrato (Figura 129, p. 113). A ausência de um singlete relacionado a C-3 nos permitiu inferir que esta unidade de carboidrato estaria ligada neste carbono.

O espectro de RMN ^{13}C apresentou 21 sinais (Figura 126, p.112), incluindo uma carbonila em $\delta_{\text{C}} 177,7$ e 6 carbonos do açúcar em $\delta_{\text{C}} 78,6$, $76,9$, $74,5$, $70,8$ e $61,4$ (Figura 130, p. 114). Através do espectro de COSY (Figura 128, p. 113) os hidrogênios do açúcar tiveram seus acoplamentos determinados.

O espectro de RMN HMBC (Figuras 131, p. 114) permitiu a atribuição inequívoca dos carbonos quaternários. Na Tabela 12 (p. 109) são apresentadas as atribuições dos deslocamentos químicos dos núcleos desta molécula e comparação com valores da literatura.

Tabela 12 Dados de RMN ^{13}C (100 MHz) e ^1H (400 MHz) em DMSO- d_6 de **17** comparados com dados da literatura para a isoquercetina (ELDAHSHAN.*et al.*, 2011).

| Substância 17 | | | Literatura | |
|---------------|---------------------|--|-----------------------|---|
| C | δ_{C} | δ_{H} [mult., J (Hz)] | δ_{C}^* | δ_{H} [mult., J (Hz)] ^{**} |
| 2 | 156,4 | _____ | 156,1 | _____ |
| 3 | 133,7 | _____ | 133,3 | _____ |
| 4 | 177,7 | _____ | 177,7 | _____ |
| 5 | 161,6 | _____ | 161,2 | _____ |
| 6 | 99,3 | 6,15 (<i>s</i>) | 98,9 | 6,20 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz) |
| 7 | 165,3 | _____ | 164,6 | _____ |
| 8 | 94,0 | 6,37 (<i>s</i>) | 93,6 | 6,41 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz) |
| 9 | 156,8 | _____ | 156,4 | _____ |
| 10 | 104,1 | _____ | 103,7 | _____ |
| 1' | 121,5 | _____ | 121,1 | _____ |
| 2' | 116,5 | 7,56-7,57 (<i>m</i>) | 115,2 | 7,76 (<i>d</i> , $J = 2,5$ Hz) |
| 3' | 145,3 | _____ | 144,8 | _____ |
| 4' | 149,0 | _____ | 148,5 | _____ |
| 5' | 115,6 | 6,83 (<i>d</i> , $J = 8,8$ Hz) | 116,2 | 6,82 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz) |
| 6' | 122,0 | 7,58-7,59 (<i>m</i>) | 121,6 | 7,54 (<i>dd</i> , $J = 8,5$ e $2,5$ Hz) |
| 1'' | 101,3 | 5,46 (<i>d</i> , $J = 7,6$ Hz) | 100,9 | 5,34 (<i>d</i> , $J = 7,5$ Hz) |
| 2'' | 74,5 | 3,20-3,24 (<i>m</i>) | 74,1 | 3,08 – 3,88 (<i>m</i>) |
| 3'' | 76,9 | 3,20-3,24 (<i>m</i>) | 76,5 | 3,08 – 3,88 (<i>m</i>) |
| 4'' | 70,3 | 3,06-3,09 (<i>m</i>) | 69,9 | 3,08 – 3,88 (<i>m</i>) |
| 5'' | 78,0 | 3,06-3,09 (<i>m</i>) | 77,5 | 3,08 – 3,88 (<i>m</i>) |
| 6'' | 61,4 | 3,58 (<i>d</i> , $J = 11,2$ Hz) 3,31-3,34 (<i>m</i>) | 61,0 | 3,08 – 3,88 (<i>m</i>) |
| 5-OH | ----- | 12,62 (<i>sl</i>) | ----- | n.a. |

*300 MHz, DMSO- d_6 ; **75 MHz, DMSO- d_6

n.a.: não atribuído

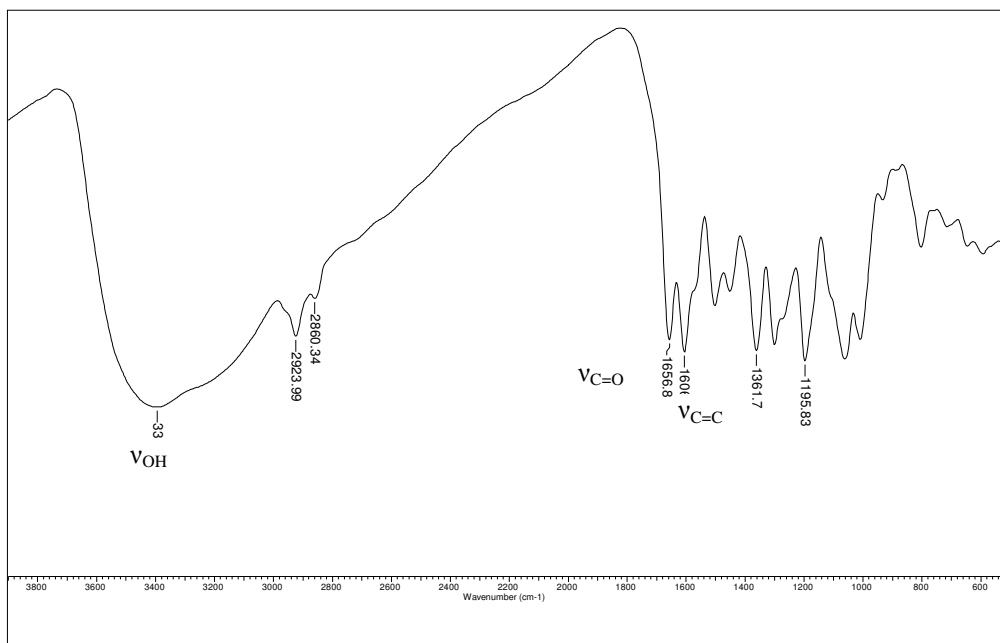


Figura122. Espectro no IV da substância 17 em KBr

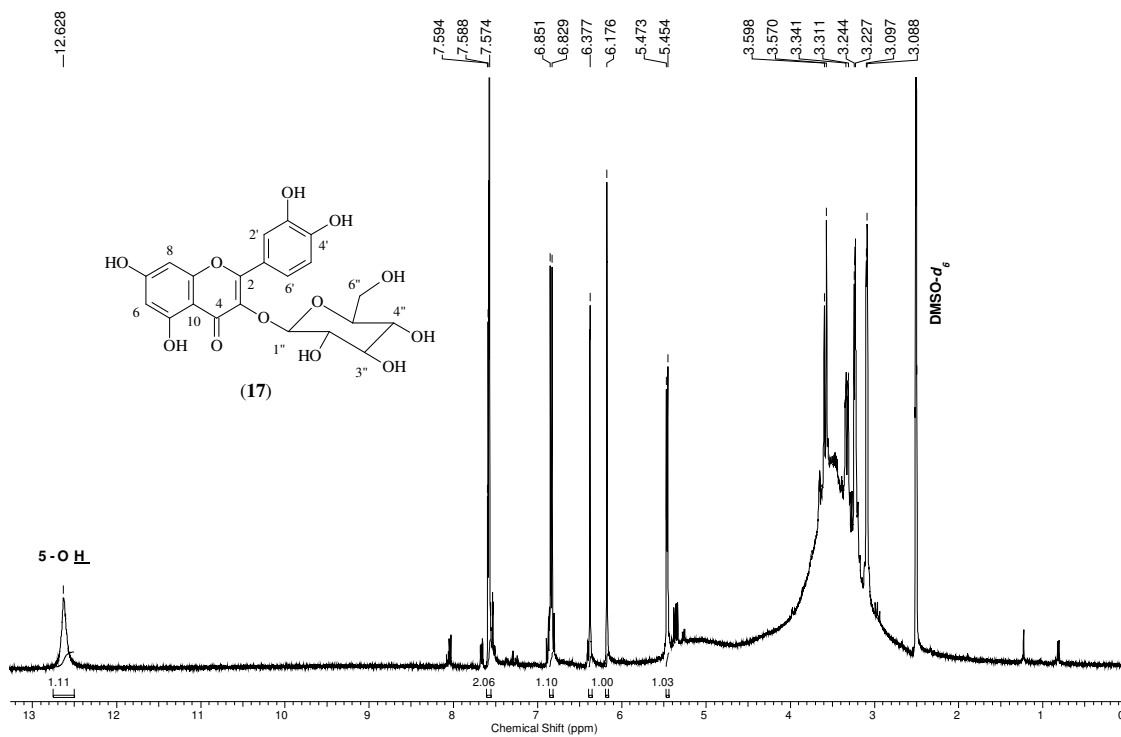


Figura 123. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) da substância 17

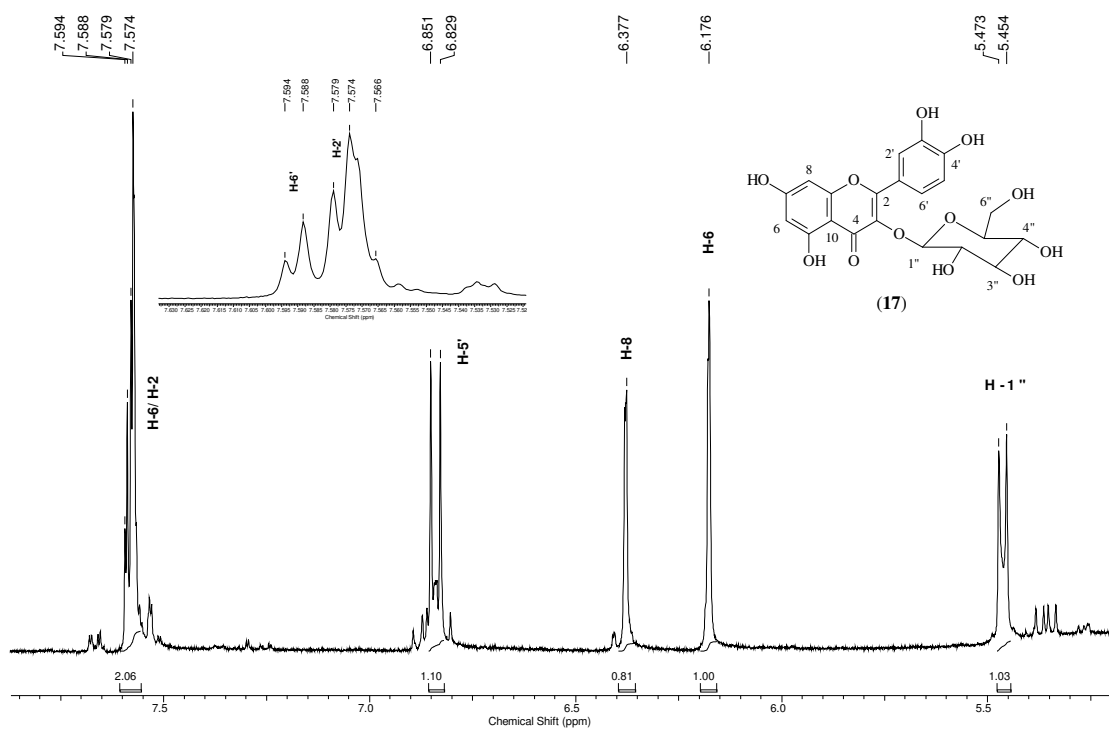


Figura 124. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da substância **17**, entre δ_{H} 5,0-8,0 ppm

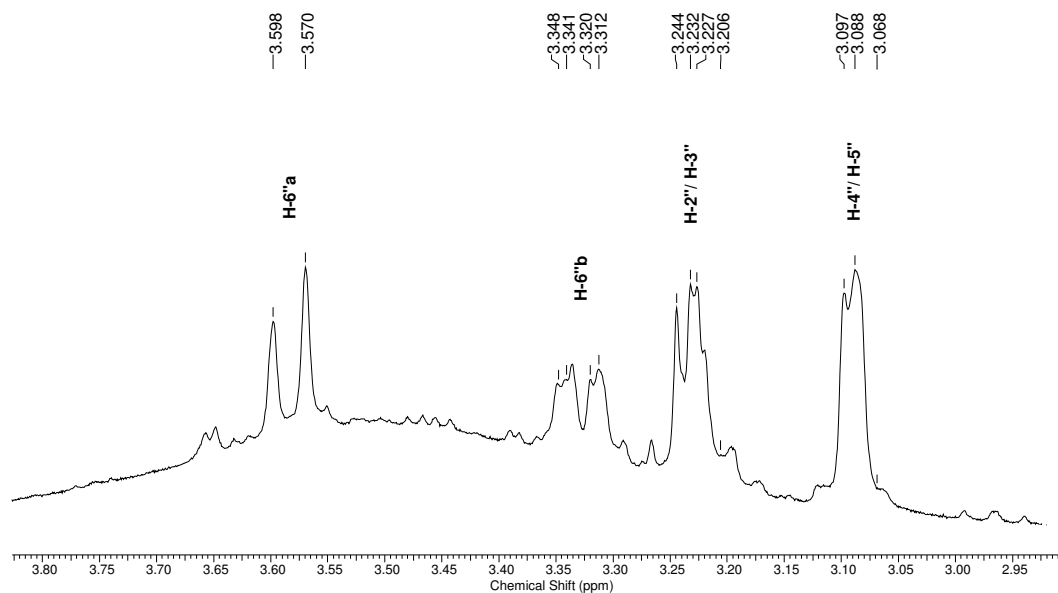


Figura 125. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da substância **17**, entre δ_{H} 2,9-3,8 ppm

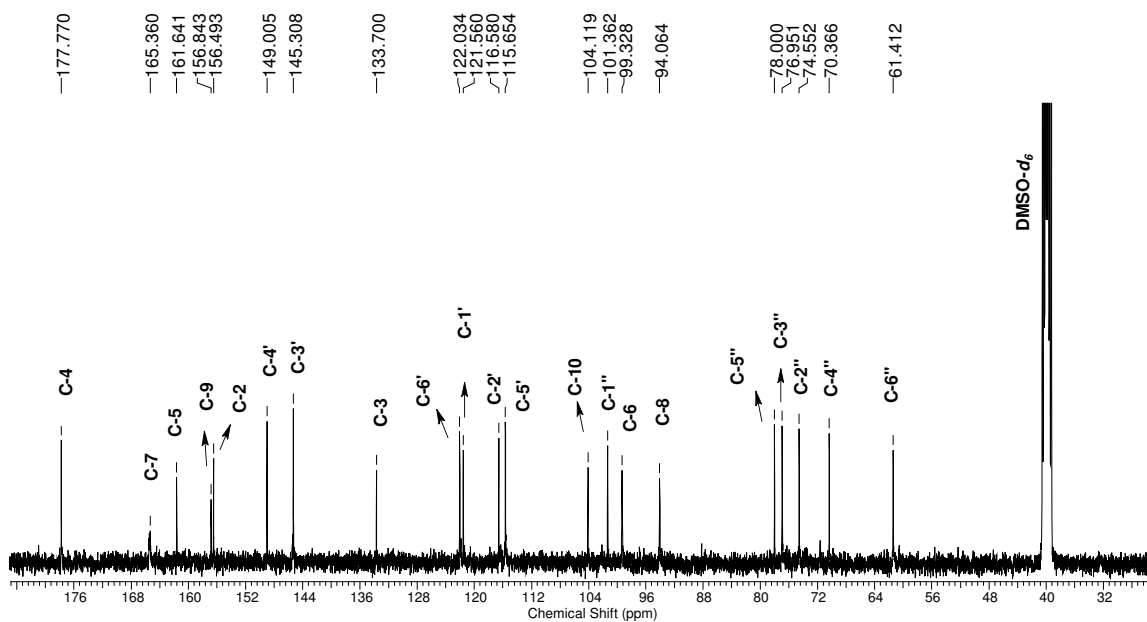


Figura 126. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância 17

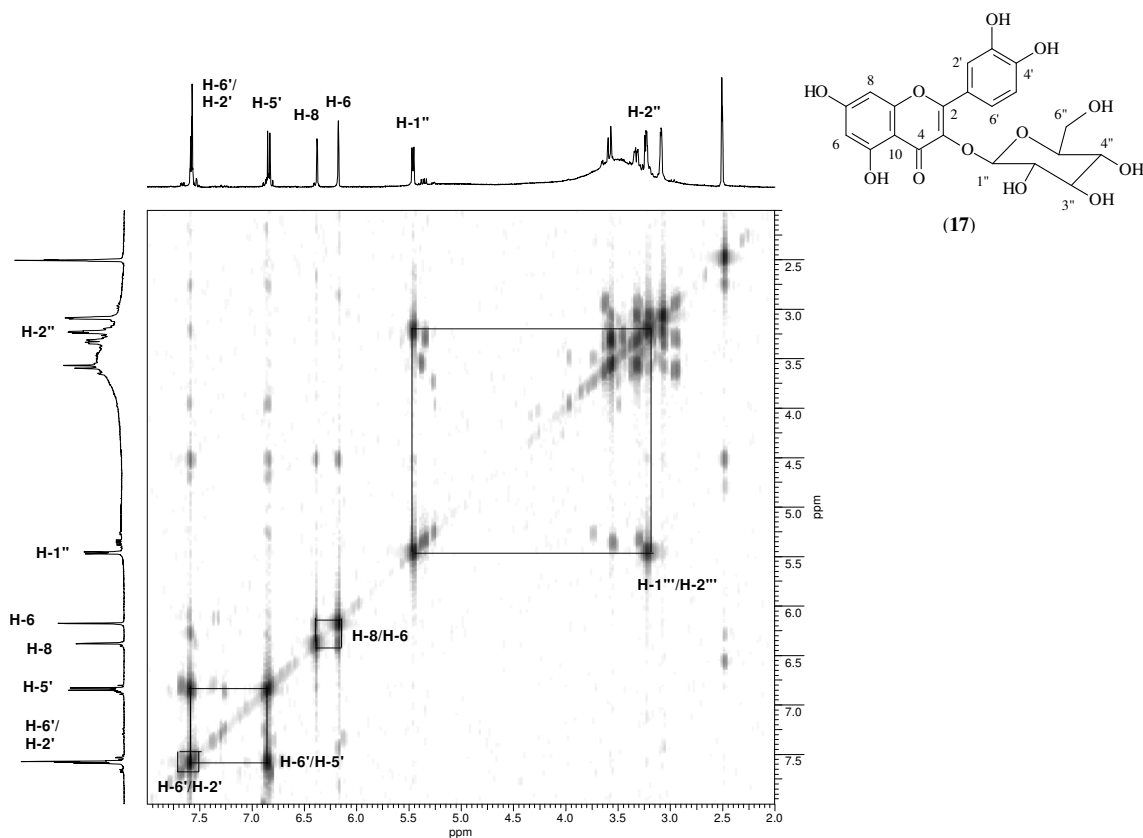


Figura 127. Espectro de RMN COSY (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância 17

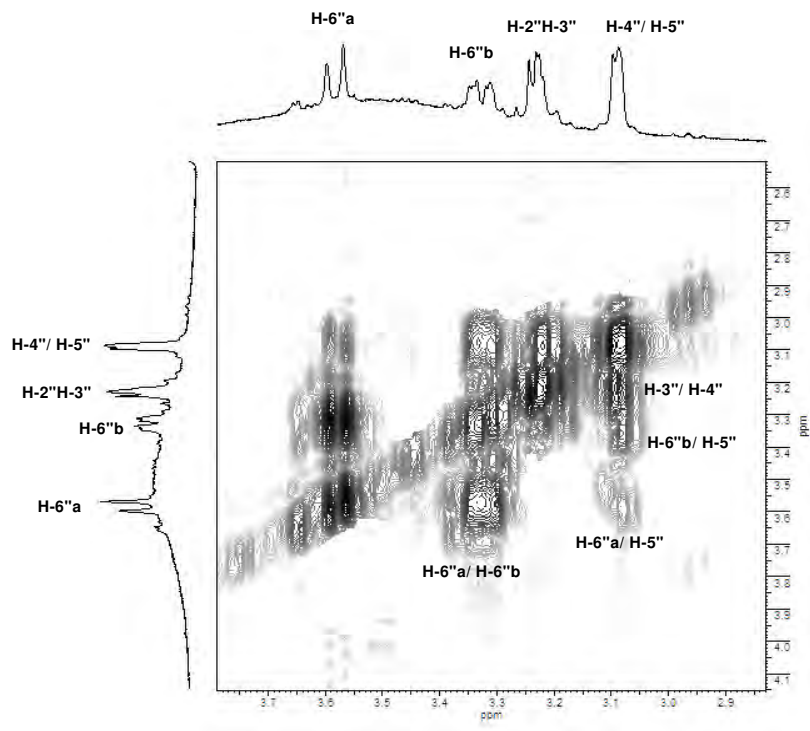


Figura 128. Expansão do espectro de RMN COSY (400 MHz, DMSO-*d*₆) da substância **17**, entre δ_H 2,6-4,1 ppm

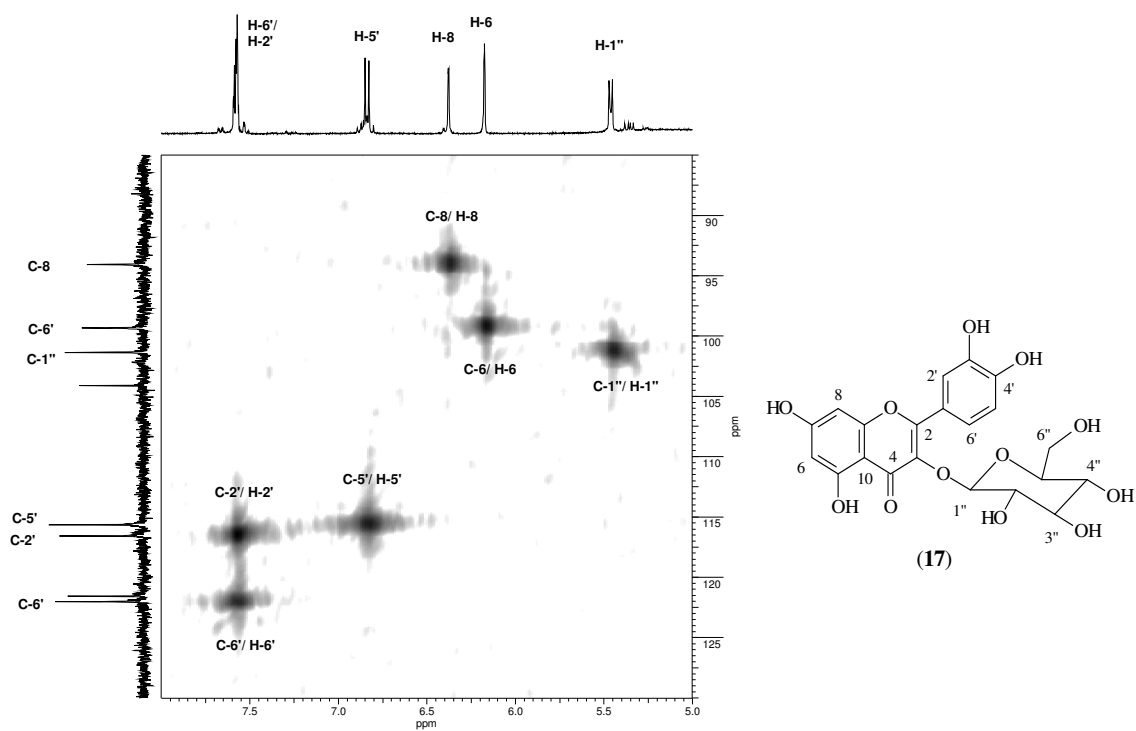


Figura 129. Expansão do espectro de RMN HMQC (400/ 100 MHz, DMSO-*d*₆) da substância **17**, entre δ_H 5,0-8,0 ppm e δ_C 85,0-130,0 ppm

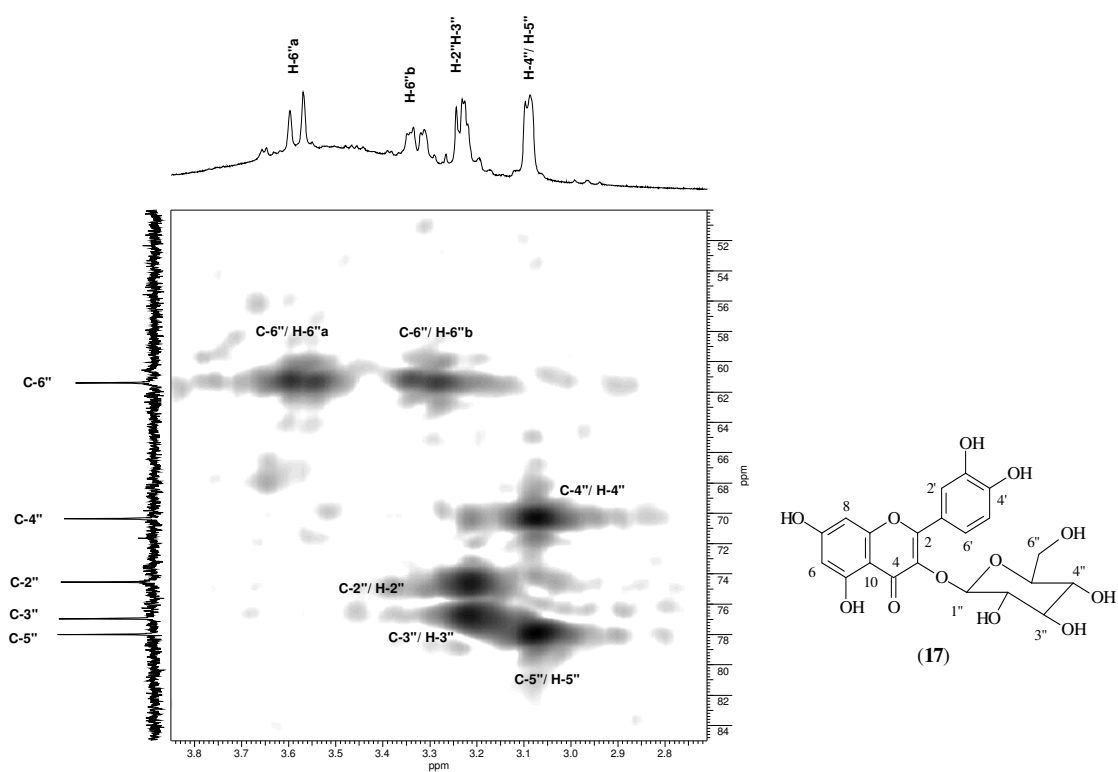


Figura 130. Expansão do espectro de RMN HMQC (400/ 100 MHz, DMSO- d_6) da substância **17**, entre δ_H 2,7-3,8 ppm e δ_C 51,0-84,0 ppm

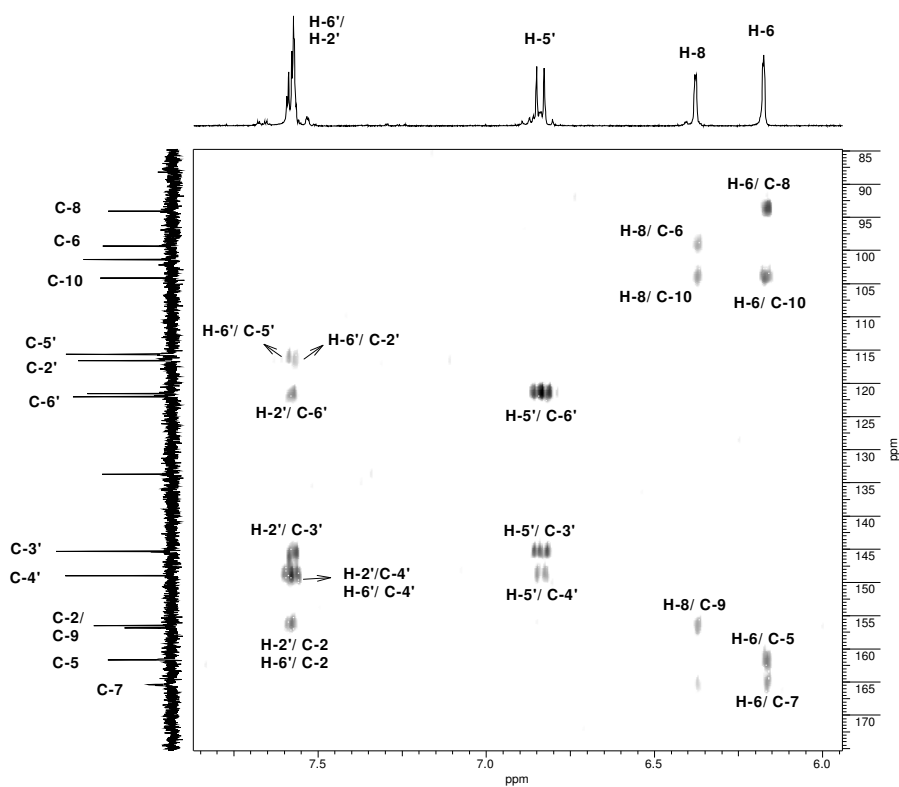
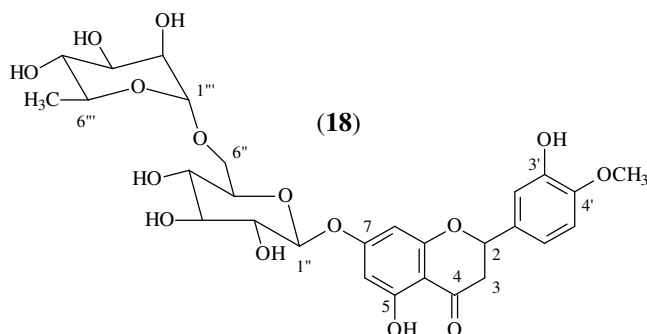


Figura 131. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/ 100 MHz, DMSO- d_6) da substância **17**, entre δ_H 6,0-8,0 ppm e δ_C 85,0-170,0 ppm

5.2.10- Identificação da substância 18

A substância **18** foi isolada como um sólido bege e identificada como o flavonóide hesperidina após análises dos espectros de RMN 1D e 2D comparados com os dados da literatura (MOCCELINI *et al.*, 2009).



O espectro no IV (Figura 132, p. 117) exibiu absorções (ν_{\max} cm^{-1}) em 3435 (ν_{OH}), 2960, 2929 (ν_{CH}), 1728 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1101 ($\nu_{\text{C-O}}$).

O espectro de RMN ^1H exibiu dois singletos em δ_{H} 12,04 (5-OH) e δ_{H} 9,12 (3'-OH), um multipletto em δ_{H} 6,91-6,97 (H-2', H-5' e H-6') e dois dupletos em δ_{H} 6,15 ($J= 2,5$ Hz; H-6) e δ_{H} 6,14 ($J= 2,0$ Hz; H-8) (Figuras 133 e 134, p. 117 e 118).

Na região entre δ_{H} 3,1 e 5,50 observam-se vários sinais referentes aos hidrogênios das hidroxilas das duas unidades de carboidrato do flavonóide (Figuras 135 e 136, p. 118 e 119). Isto foi confirmado pelo espectro de HMQC tendo em vista que estes sinais não se relacionavam a nenhum carbono (Figura 140 e 141B, p. 121). Ainda nessa região, notam-se os sinais de dois carbonos anoméricos em δ_{H} 4,99 (d , $J= 7,5$ Hz, H-1'') e 4,53 (s , H-1''') (Figura 141A, p. 121).

Na análise do espectro de COSY (Figura 139, p. 120) observa-se que o sinal em δ_{H} 5,52 (dd , $J= 12,0$ e 3,0 Hz) associado a H-2, acoplava com os sinais em δ_{H} 3,20-3,25 (m, H-3a) e δ_{H} 2,78 (dd , $J= 17,5$ e 3,0 Hz, H-3b). A multiplicidade desses hidrogênios confirma este flavonóide tratar-se de uma flavanona.

O espectro de DEPTQ mostrou 28 sinais de carbono (Figuras 137 e 138, p. 119 e 120), valendo ressaltar o de carbonila em δ_{C} 197,5 (C-4), de metoxila em δ_{C} 56,1 (4'-OCH₃) e uma metila da ramnose em δ_{C} 18,2 (C-6''). Entre δ_{C} 68 e 77 observam-se os carbonos característicos de açúcar (Figura 141B, p. 121). O espectro de HMBC permitiu a atribuição inequívoca dos carbonos quaternários (Figuras 142 a 144, p. 122 e 123).

A Tabela 13 (p. 116) demonstra as atribuições dos hidrogênios e carbonos desta flavanona e comparação com dados da literatura.

Tabela 13. Dados de RMN ^{13}C (100 MHz) e ^1H (400 MHz) em DMSO- d_6 de **18** comparados com dados da literatura para a hesperidina (MOCCELINI *et al.*, 2009).

| Substância 18 | | | Literatura* | |
|-----------------------------|---------------------|---|---------------------|---|
| C | δ_{C} | δ_{H} [mult., J (Hz)] | δ_{C} | δ_{H} [mult., J (Hz)] |
| 2 | 78,8 | 5,52 (<i>dd</i> , J= 12,0 e 3,0) | 78,4 | 5,49 (<i>dd</i> , J= 3,11 e 15,11) |
| 3 | 42,5 | 2,78 (<i>dd</i> , J= 17,5 e 3,0) 3,20-3,30 (<i>m</i>) | 42,1 | 2,77 (<i>dd</i> , J= 3,11 e 15,11) 3,07 (<i>dd</i> , J= 13,8 e 12,0) |
| 4 | 197,5 | _____ | 197,0 | _____ |
| 5 | 163,5 | _____ | 163,1 | _____ |
| 6 | 96,8 | 6,15 (<i>d</i>) J= 2,5 | 96,4 | 6,15 (<i>sl</i>) |
| 7 | 165,6 | _____ | 165,2 | _____ |
| 8 | 96,0 | 6,13 (<i>d</i>) J= 2,0 | 95,6 | 6,12 (<i>sl</i>) |
| 9 | 162,9 | _____ | 162,5 | _____ |
| 10 | 103,8 | _____ | 103,3 | _____ |
| 1' | 131,3 | _____ | 130,9 | _____ |
| 2' | 114,6 | 6,91-6,97 (<i>m</i>) | 114,2 | 6,92 (<i>m</i>) |
| 3' | 146,9 | _____ | 146,5 | _____ |
| 4' | 148,4 | _____ | 147,9 | _____ |
| 5' | 112,5 | 6,91-6,97 (<i>m</i>) | 112,0 | 6,92 (<i>m</i>) |
| 6' | 118,4 | 6,91-6,97 (<i>m</i>) | 117,9 | 6,92 (<i>m</i>) |
| 1'' | 99,0 | 4,99 (<i>d</i> , 7,5) | 100,6 | 4,52 (<i>d</i> , 7,8) |
| 2'' | 73,4 | 3,26-3,32 (<i>m</i>) | 73,0 | 3,09-3,86 (<i>m</i>) |
| 3'' | 76,4 | 3,26-3,32 (<i>m</i>) | 76,3 | 3,09-3,86 (<i>m</i>) |
| 4'' | 70,0 | 3,12-3,18 (<i>m</i>) | 69,6 | 3,09-3,86 (<i>m</i>) |
| 5'' | 75,9 | 3,40-3,46 (<i>m</i>) | 75,5 | 3,09-3,86 (<i>m</i>) |
| 6'' | 66,4 | 3,80-3,82 (<i>m</i>) 3,26-3,32 (<i>m</i>) | 66,1 | 3,09-3,86 (<i>m</i>) |
| 1''' | 101,0 | 4,53 (<i>sl</i>) | 99,5 | 4,97 (<i>s</i>) |
| 2''' | 70,7 | 3,40-3,46 (<i>m</i>) | 70,3 | 3,09-3,86 (<i>m</i>) |
| 3''' | 71,1 | 3,26-3,32 (<i>m</i>) | 70,7 | 3,09-3,86 (<i>m</i>) |
| 4''' | 72,5 | 3,12-3,18 (<i>m</i>) | 72,1 | 3,09-3,86 (<i>m</i>) |
| 5''' | 68,7 | 3,26-3,32 (<i>m</i>) | 68,3 | 3,09-3,86 (<i>m</i>) |
| 6''' | 18,2 | 1,10 (<i>d</i> , 6,0) | 17,8 | 1,08 (<i>d</i> , 6,0) |
| <u>OH</u> -5 | _____ | 12,04 (<i>s</i>) | _____ | 12,06 (<i>s</i>) |
| <u>OH</u> -3' | _____ | 9,12 (<i>s</i>) | _____ | 9,11 (<i>s</i>) |
| 4'- <u>OCH</u> ₃ | 56,1 | 3,79 (<i>s</i>) | 55,7 | 3,77 (<i>s</i>) |

* ^1H 200 MHz; ^{13}C 50 MHz, DMSO- d_6

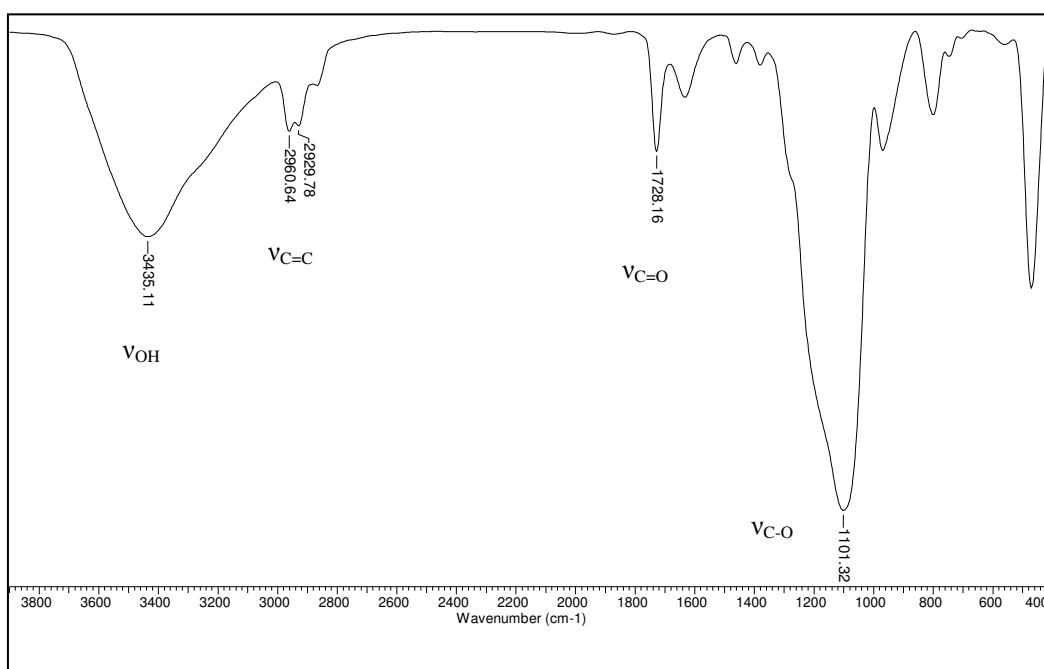


Figura 132. Espectro no IV da substância 18 em KBr

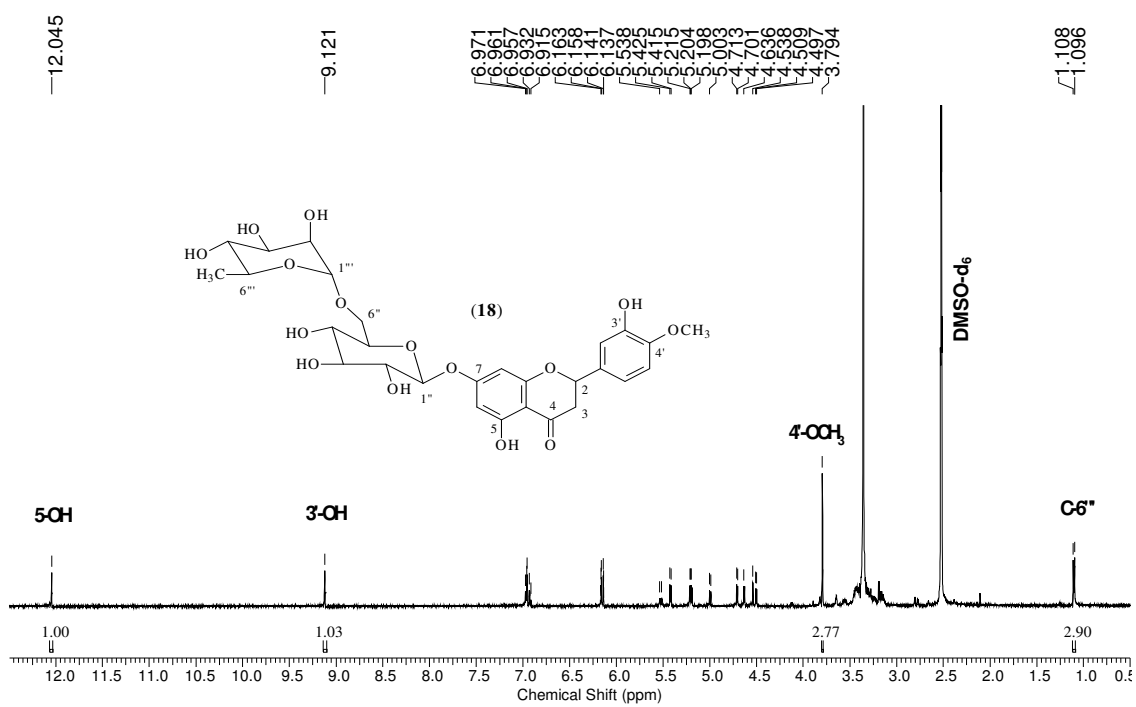


Figura 133. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) da substância 18

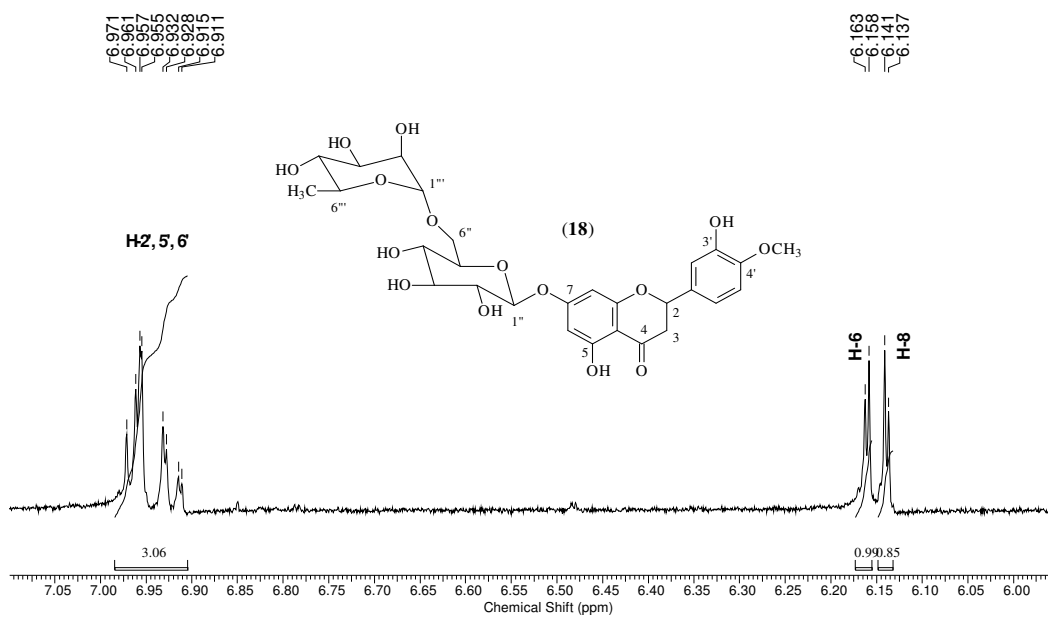


Figura 134. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **18**, entre δ_{H} 6,00-7,05 ppm

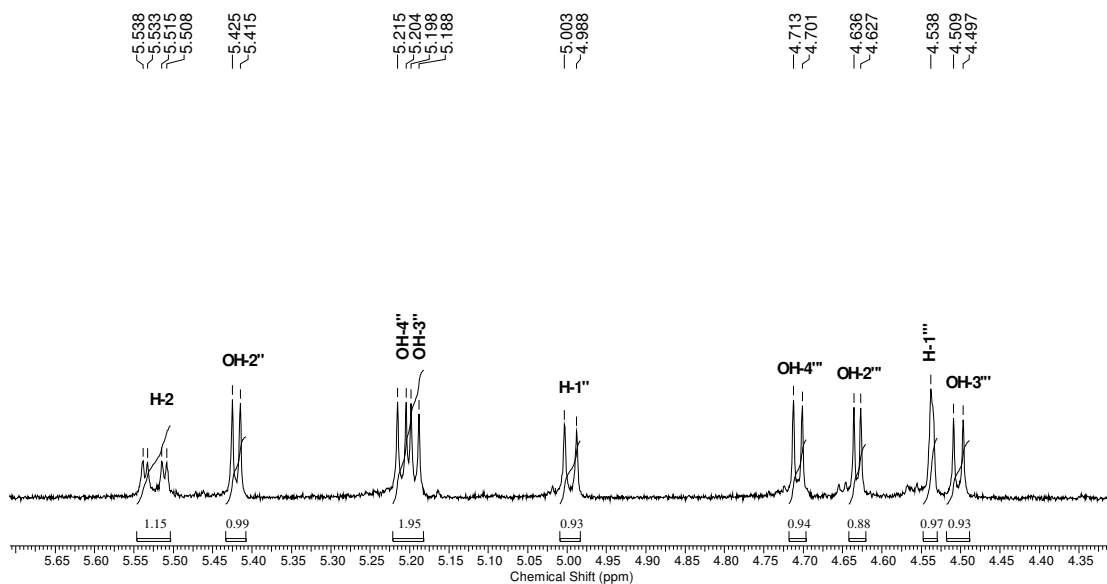


Figura 135. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **18**, entre δ_{H} 4,35-5,65 ppm

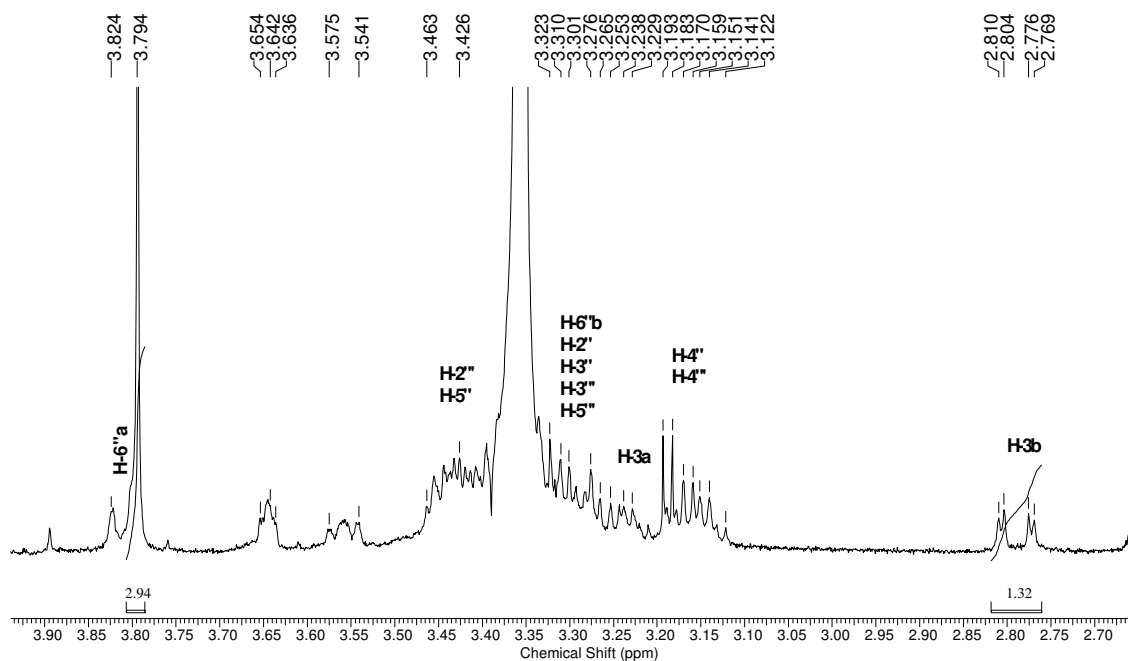


Figura 136. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **18**, entre δ_{H} 2,70-3,90 ppm

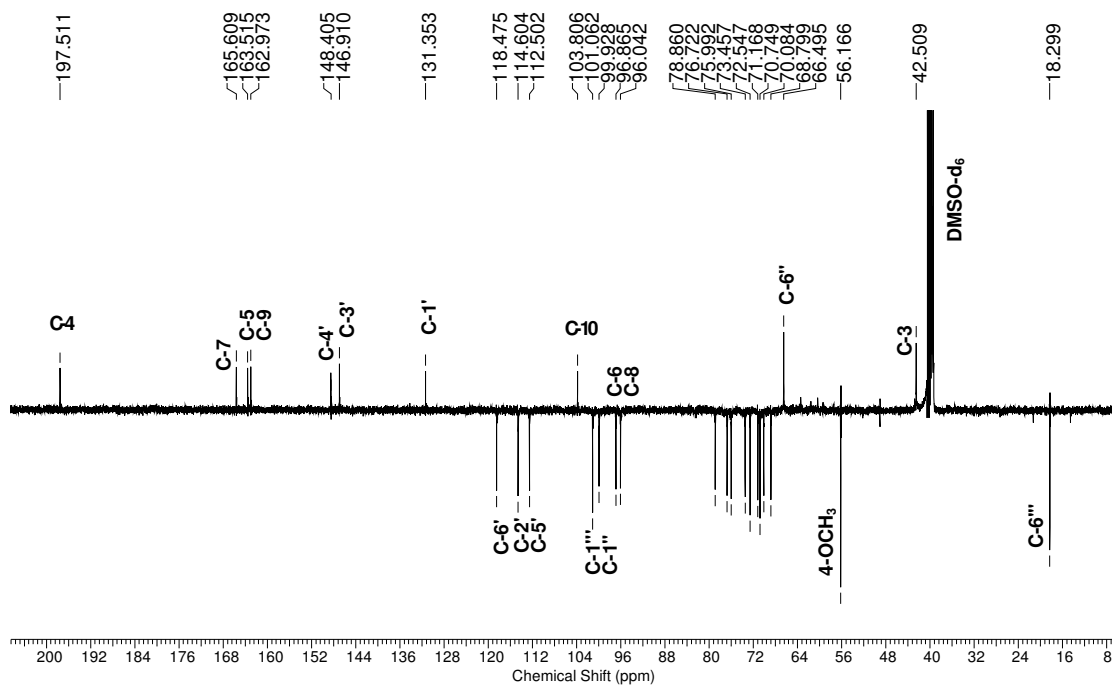


Figura 137. Espectro de RMN DEPTQ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **18**

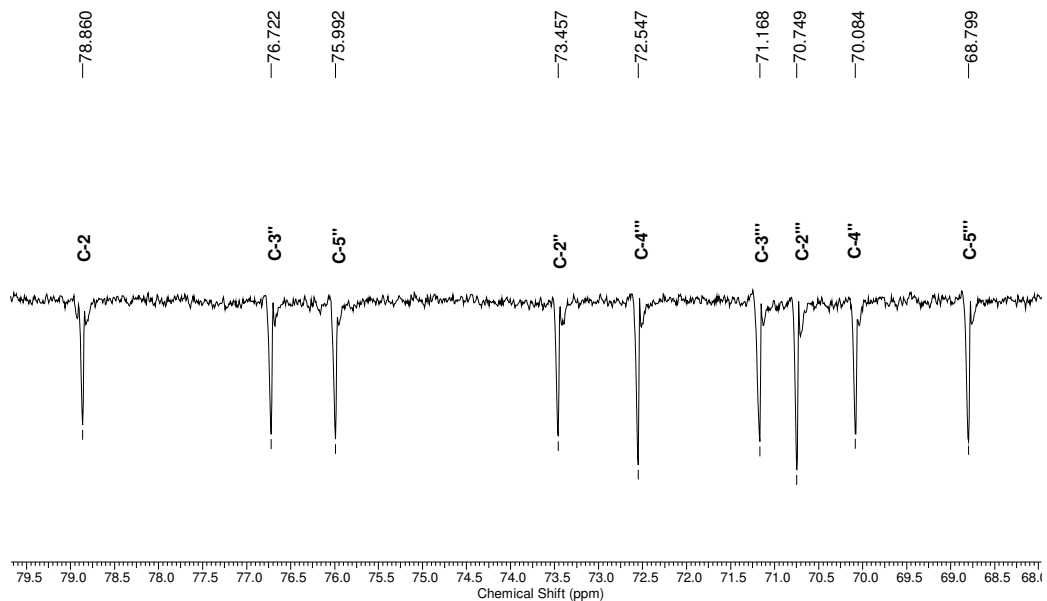


Figura 138. Expansão do espectro de RMN DEPTQ (125 MHz, DMSO- d_6) da substância **18**, entre δ_C 68,0-79,5 ppm

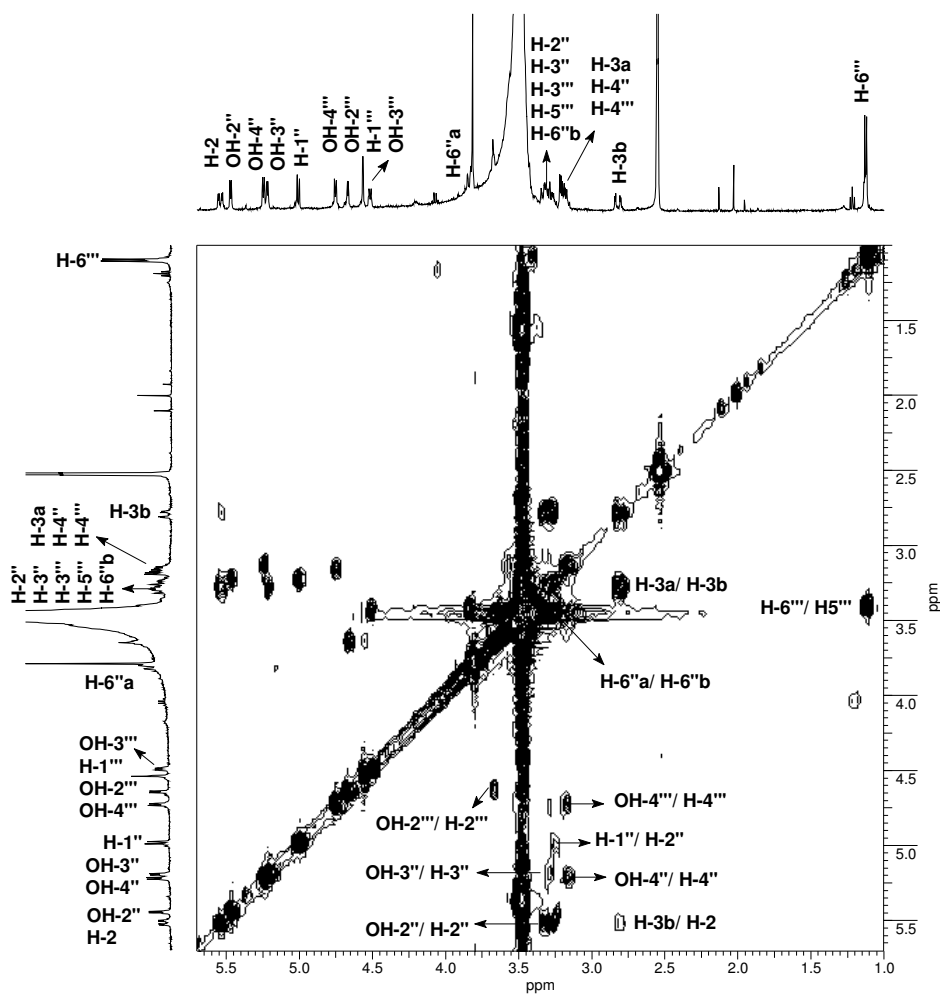


Figura 139. Expansão do espectro de RMN COSY (500 MHz, DMSO- d_6) da substância **18**, entre δ_H 1,00-5,70 ppm

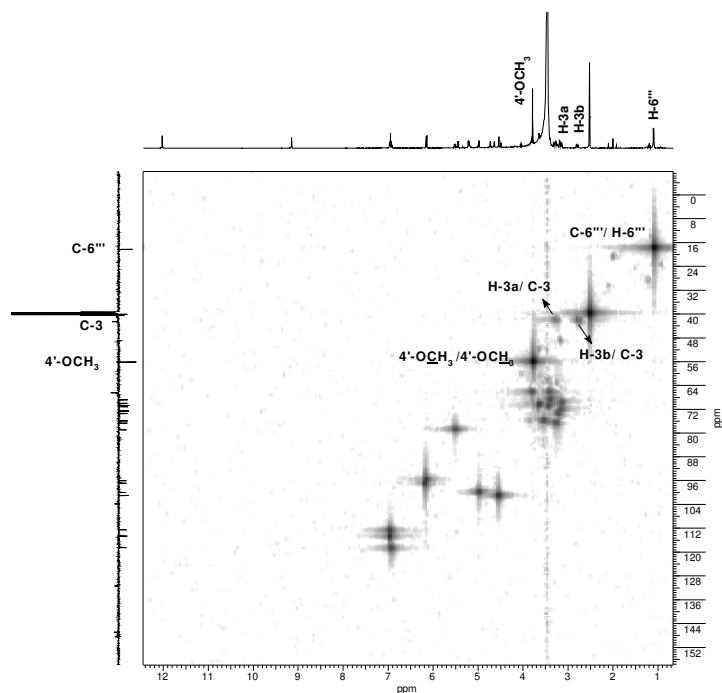


Figura 140. Espectro de RMN de HMQC (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância **18**

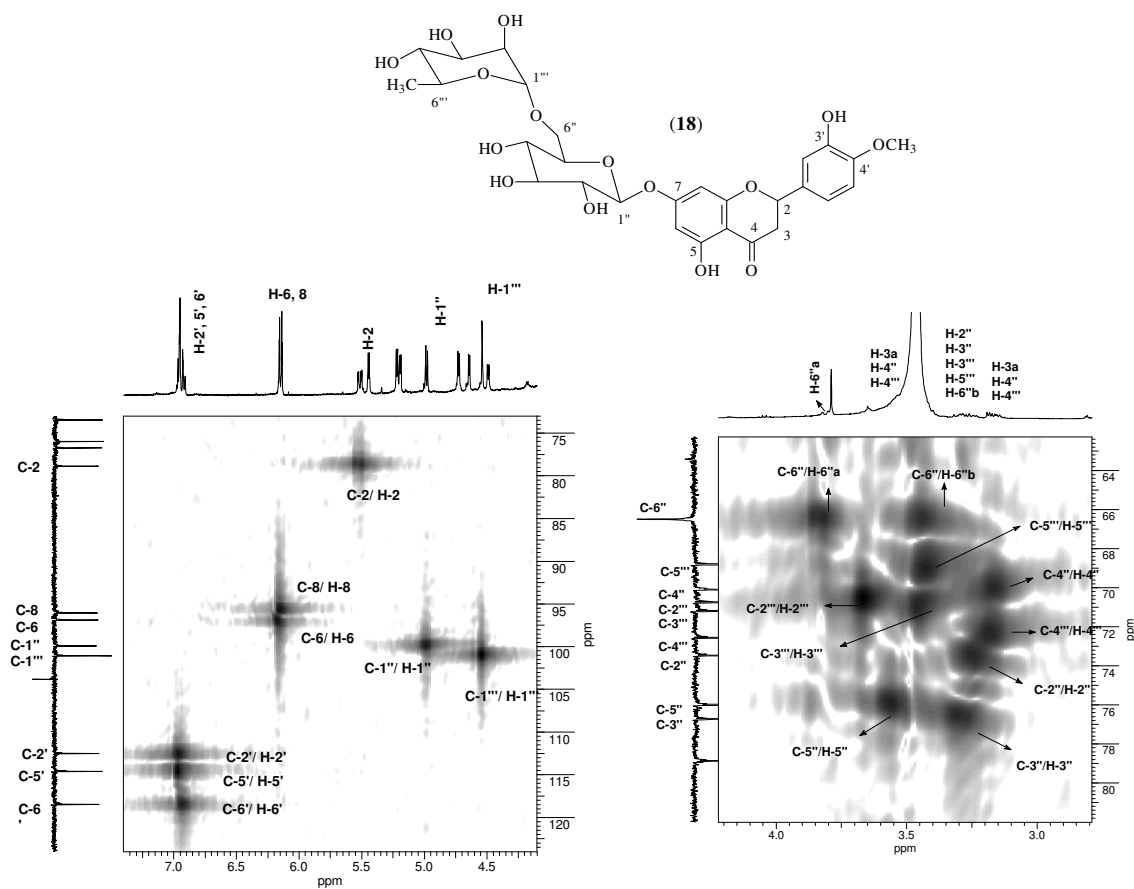


Figura 141. Expansões do espectro de RMN de HMQC (500/125 MHz, DMSO- d_6) da substância **18**
141A: δ_H 4,00-7,50 e δ_C 74,0-125,0 ppm
141B: δ_H 2,70-4,20 e δ_C 82,0-62,0 ppm

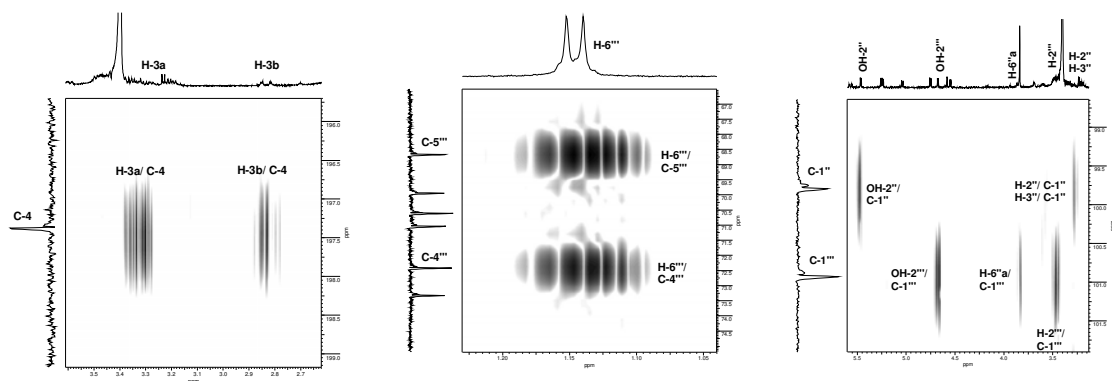


Figura 142. Expansões do espectro de RMN de HMBC (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância **18**
142A: δ_H 2,65-3,60 e δ_C 195,5-199,0 ppm
142B: δ_H 1,05-1,21 e δ_C 66,5-75,0 ppm
142C: δ_H 3,00-3,50 e δ_C 98,5-102,0 ppm

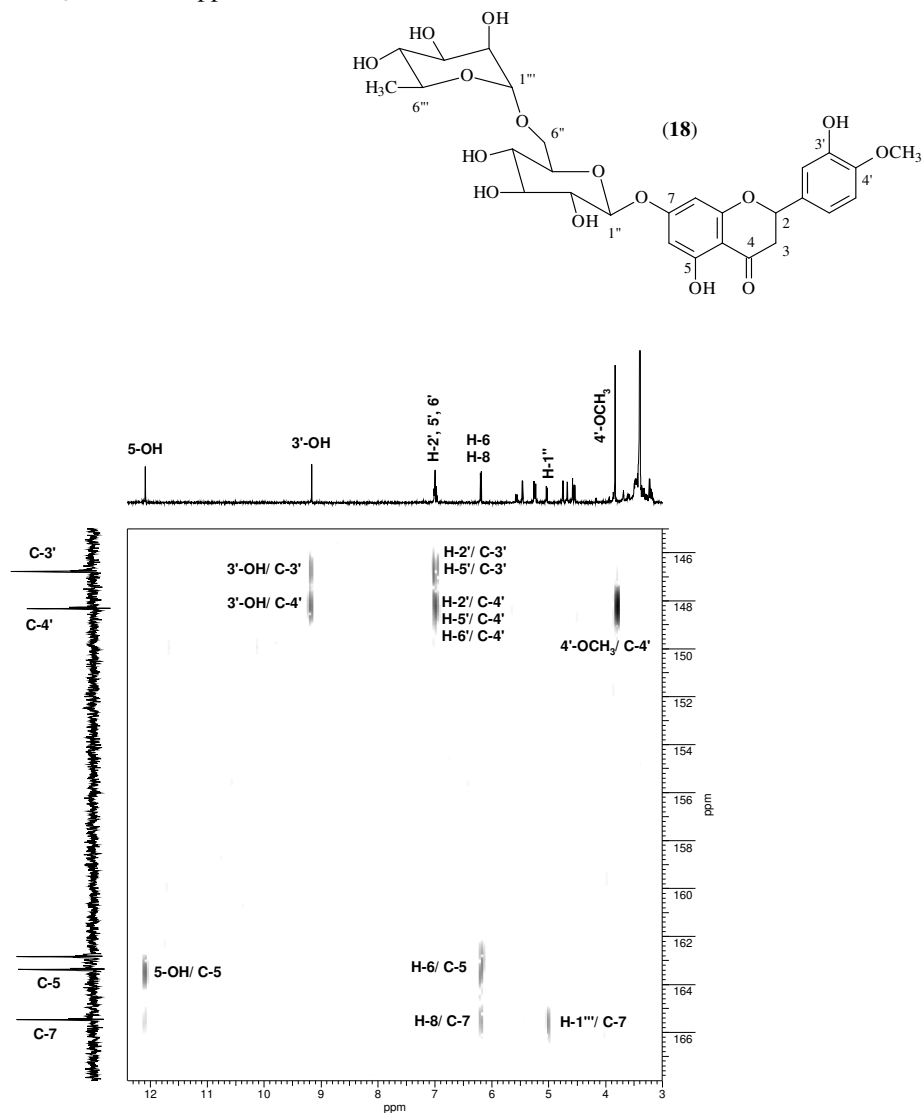


Figura 143. Expansão do espectro de RMN de HMBC (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância **18**, entre δ_H 3,00-12,30 e δ_C 145,0-168,0 ppm

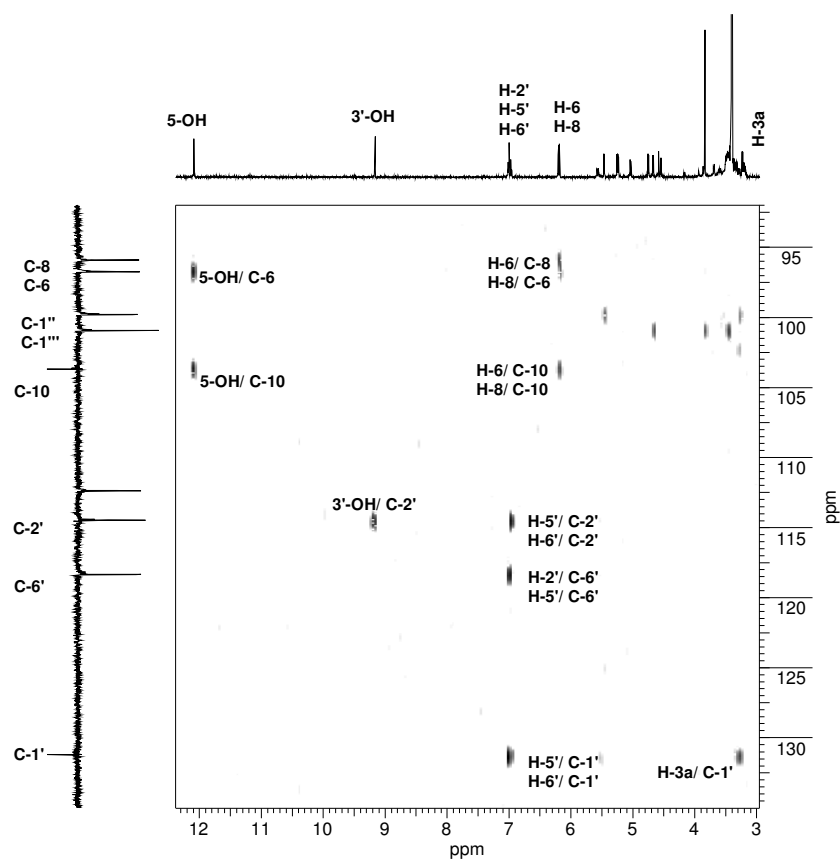
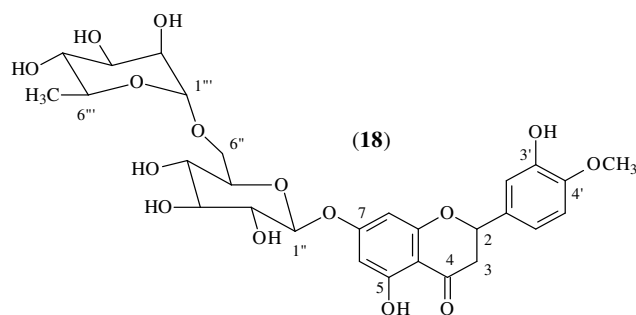


Figura 144. Expansão do espectro de RMN de HMBC (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância **18**, entre δ_H 3,00-12,30 e δ_C 94,0-135,0 ppm



5.2.11- Identificação da substância 19

A substância **19** foi isolada como um óleo alaranjado e identificada como o alcalóide *N*-metilatanina após análise do espectro de RMN ^1H , comparação com dados da literatura (MOCCELINI *et al.*, 2009) e comparação por CCD com uma amostra autêntica. Esta substância já havia sido isolada das raízes desta planta anteriormente. O reisolamento da mesma serviu para avaliação de atividade biológica. Sendo assim, a análise espectroscópica da mesma não foi aprofundada.

O espectro de RMN ^1H mostrou sinais na região de sistema aromáticos em δ_{H} 7,85 (*dd*, $J= 8,0$ e $1,5$ Hz, H-5), 7,54-7,57 (*m*, H-7), 7,38 (*d*, $J= 8,5$, H-8) e 7,85 (*d*, $J= 7,0$, H-6). Observa-se, ainda, quatro singletos em δ_{H} 1,84 e δ_{H} 1,71, associados às metilas 5' e 4', em 3,94 da metoxila ligada a C-4 e δ_{H} 3,74 da metila ligado ao nitrogênio. O multipletto em δ_{H} 5,26-5,30 é relacionado ao hidrogênio metínico sp^2 H-2' e o dupletto em δ_{H} 3,43 ($J= 7,0$ Hz), ao hidrogênio metilênico H-1' (Figura 145, p. 124).

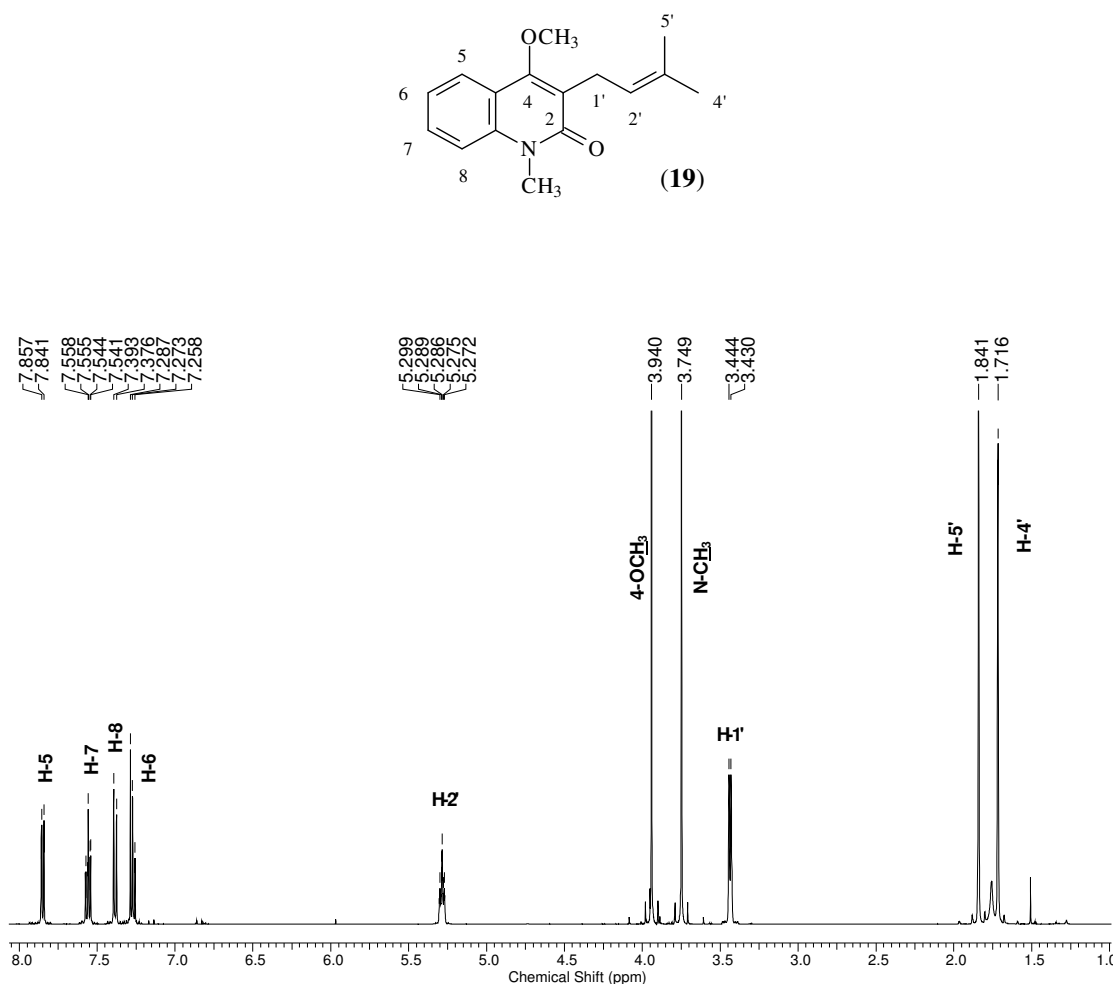
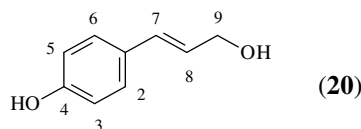


Figura 145. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **19**

5.2.12- Identificação da substância 20

A substância **20** foi isolada como um sólido incolor em forma de agulhas e identificada como o álcool *p*-cumarílico após análises por RMN 1D e 2D (HMQC e HMBC) comparados com os dados da literatura (WHITAKER et al., 2001).



O espectro no IV (Figura 146, p. 125) apresentou absorções (ν_{\max} cm^{-1}) em 3435 (ν_{OH}), 2923, 2856 (ν_{CH}), 1620 ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$) e 1091 ($\nu_{\text{C-O}}$).

O espectro de ^1H dois dupletos em δ_{H} 7,26 (H-2, 6) e δ_{H} 6,80 (H-3,5) ($J= 8,8$) cada um integrando para dois hidrogênios (Figuras 147 e 148, p. 126 e 127) sugerindo tratar-se de um sistema *p*-substituído. Os sinais em δ_{H} 6,51 (*d*, $J= 15,6$ Hz, H-7) e 6,22 (*dt*, $J= 16,0$ e 5,6 Hz, H-8), foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos, e devido ao alto valor de J , a configuração desses hidrogênios foi determinada como *trans*. O sinal em δ_{H} 4,20 (*td*, $J= 5,6$ e 1,6 Hz) foi associado ao hidrogênio metilênico H-9.

O espectro de RMN DEPT Q exibiu nove sinais, sendo dois carbonos quaternários, seis metínicos (dois sobrepostos) e um metilênico (Figura 149, p. 127; Tabela 14 ,p. 126).

Observou-se um singlete em δ_{H} 8,55 (1H) que pode ser atribuído ao OH ligado ao carbono C-4, e um tripleto em δ_{H} 3,85 (1H) que foi relacionado ao OH ligado ao carbono C-9, isto porque os mesmos não apresentaram correlação ($^1J_{\text{CH}}$) com nenhum sinal de carbono no espectro de HMQC (Figura 150, p. 128). Pelo espectro de RMN HMBC (Figuras 151 e 152, p. 128 e 129) confirmaram-se as posições dessas hidroxilas através de acoplamentos a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) entre 4-OH (δ_{H} 8,55) e os carbonos C-3 e C-5 (δ_{C} 115,3), e de 9-OH (δ_{H} 3,85) e o carbono C-8 (δ_{C} 126,9).

A análise de **20** por CG-EM mostrou um cromatograma com um pico intenso com t_{R} 11,1 minutos (Figura 153, p. 129). O espectro de massas deste componente exibiu pico do íon molecular em 150 (M^+) e pico base em m/z 107, compatível com a fórmula $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2$ (Figuras 154 e 155, p. 129 e 130).

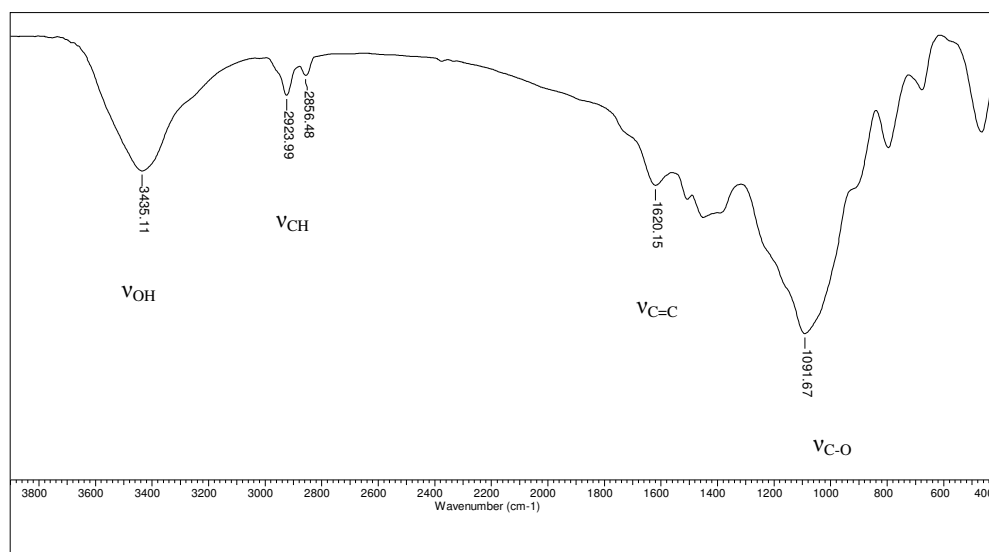


Figura 146. Espectro no IV da substância **20** em KBr

Tabela 14. Dados de RMN de DEPTQ (100 MHz) e ^1H (400 MHz) em CD_3COCD_3 de **20** comparados com dados da literatura para o álcool *p*-cumarílico (WHITAKER *et al.*, 2001; JALALLI-HERAVI *et al.*, 2000)

| Substância 20 | | | literatura | |
|---------------|------------------------------|--|-----------------------|--|
| C | DEPTQ δ_{C} | δ_{H} [mult., <i>J</i> (Hz)] | δ_{C}^* | δ_{H} [mult., <i>J</i> (Hz)]** |
| 1 | 128,8 | ----- | 129,73 | ----- |
| 2 | 127,4 | 7,27 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,8) | 128,33 | 7,22 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,7) |
| 3 | 115,3 | 6,80 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,8) | 116,19 | 6,71 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,7) |
| 4 | 157,0 | ----- | 157,78 | ----- |
| 5 | 115,3 | 6,80 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,8) | 116,19 | 6,71 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,7) |
| 6 | 127,4 | 7,28 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,8) | 128,33 | 7,22 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,7) |
| 7 | 129,2 | 6,51 (<i>d</i> , <i>J</i> = 15,6) | 130,29 | 6,51 (<i>d</i> , <i>J</i> = 15,9) |
| 8 | 126,9 | 6,22 (<i>dt</i> , <i>J</i> = 16,0 e 5,6) | 127,67 | 6,15 (<i>dt</i> , <i>J</i> = 15,9 e 6,1) |
| 9 | 62,5 | 4,20 (<i>td</i> , <i>J</i> = 5,6 e 1,6) | 63,47 | 4,17 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,1) |
| 4-OH | ----- | 8,55 (<i>s</i>) | ----- | n.a. |
| 9-OH | ----- | 3,85 (<i>t</i> , <i>J</i> = 6,0) | ----- | n.a. |

*75 MHz, CD_3CD (JALALLI-HERAVI *et al.*, 2000)

**300 MHz, CD_3CD (WHITAKER *et al.*, 2001)

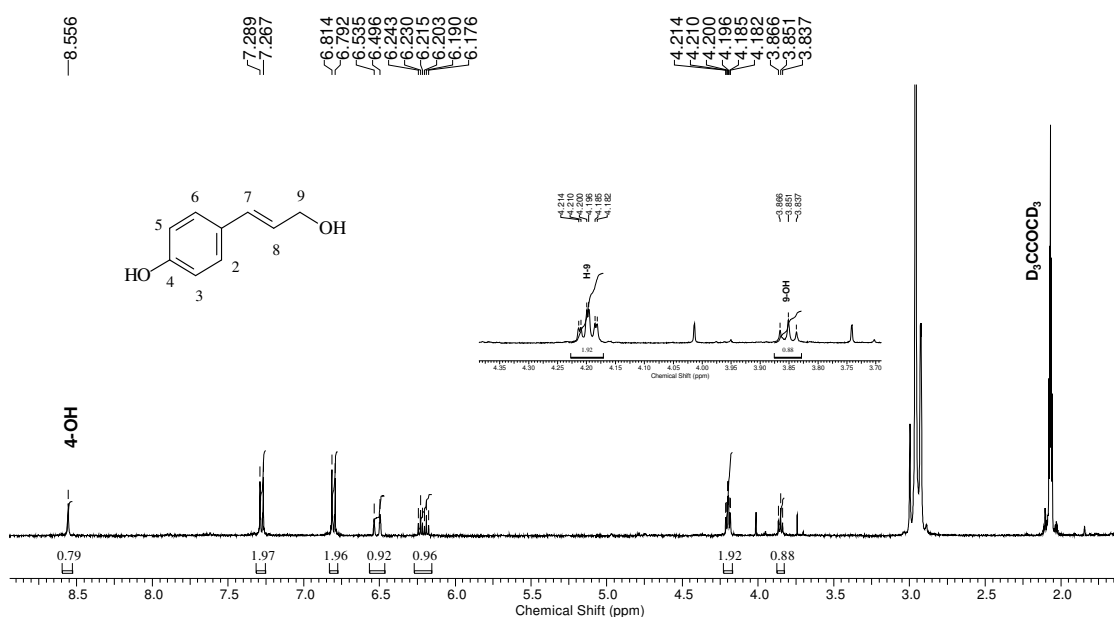


Figura 147. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, D_3CCOCD_3) da substância **20**

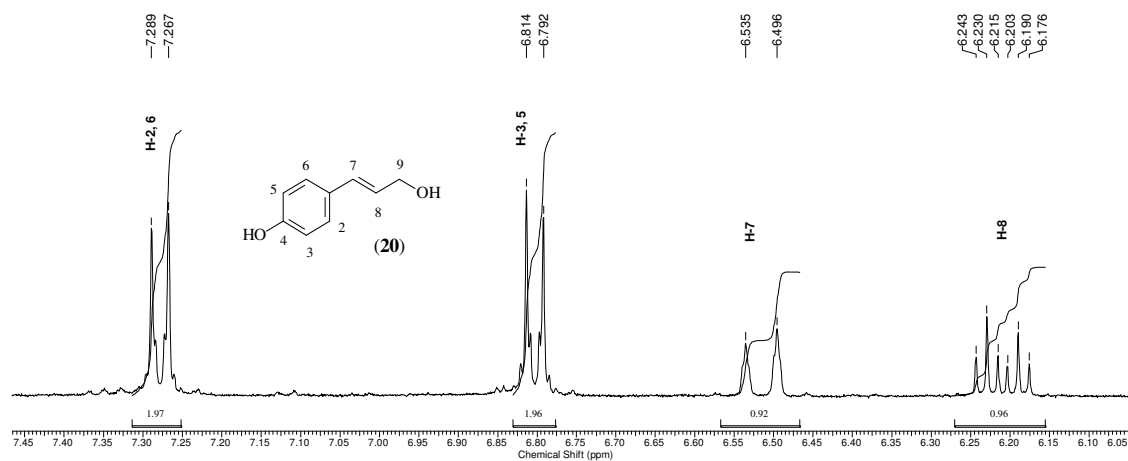


Figura 148. Expansão do espectro de RMN 1H (400 MHz, D_3CCOCD_3) da substância **20**, entre δ_H 6,0-7,4 ppm

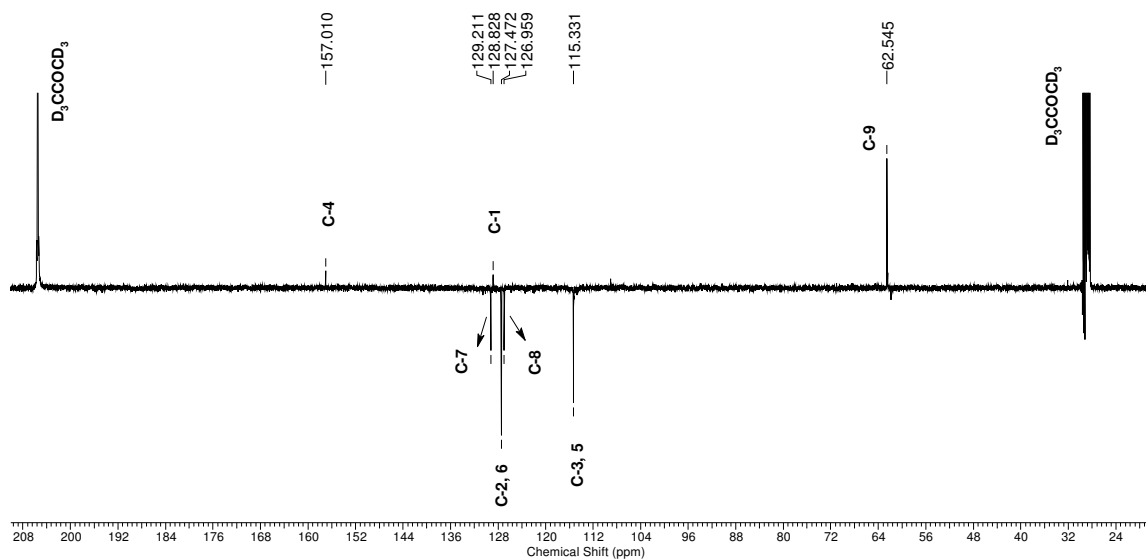


Figura 149. Espectro de RMN DEPTQ (100 MHz, D_3CCOCD_3) da substância **20**

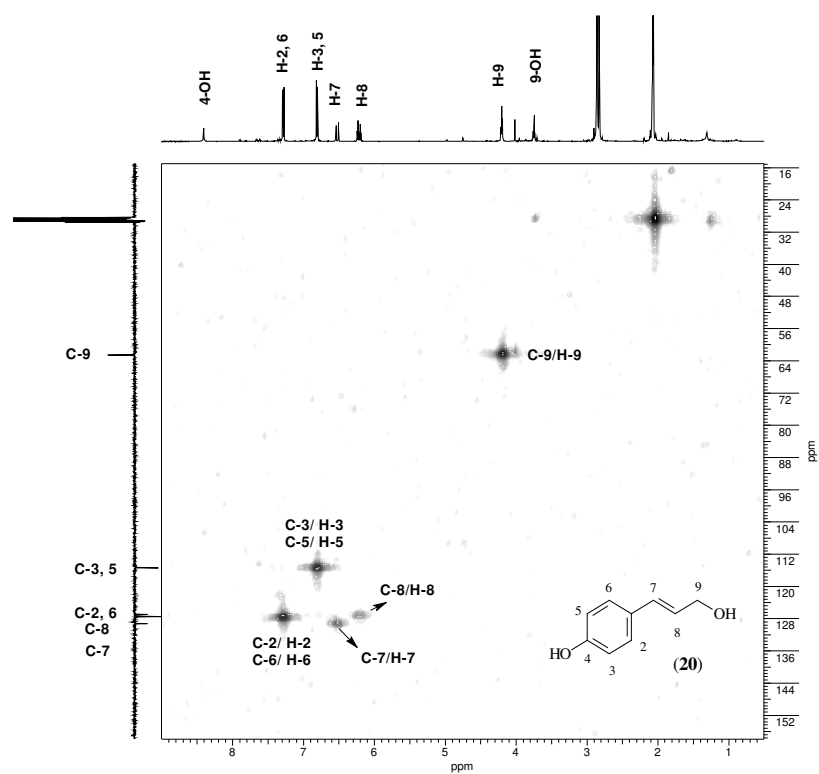


Figura 150. Espectro de RMN HMQC (400/ 100 MHz, D_3CCOCD_3) da substância **20**

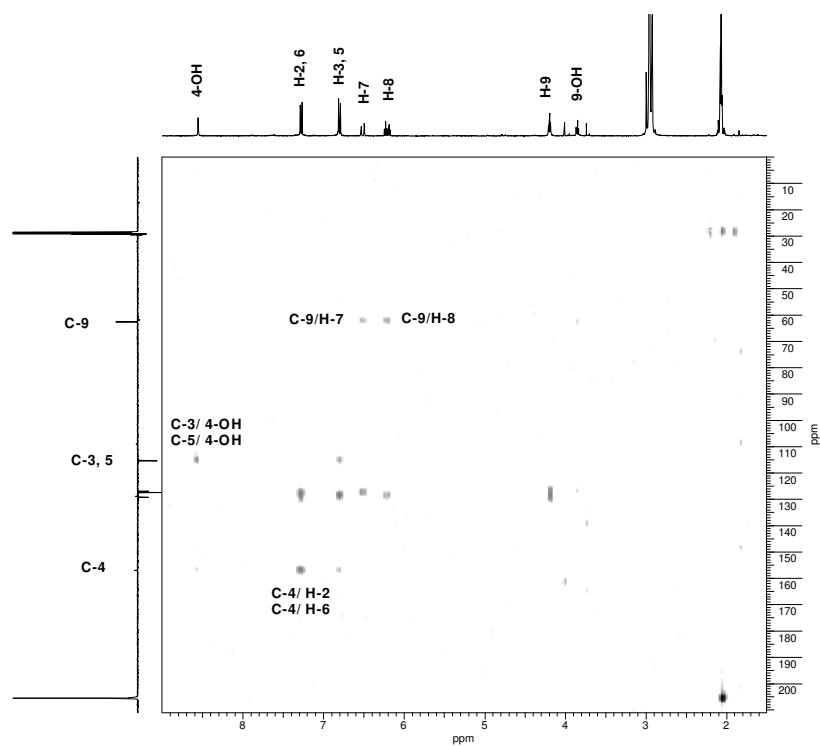


Figura 151. Espectro de RMN HMBC (400/ 100 MHz, D_3CCOCD_3) da substância **20**

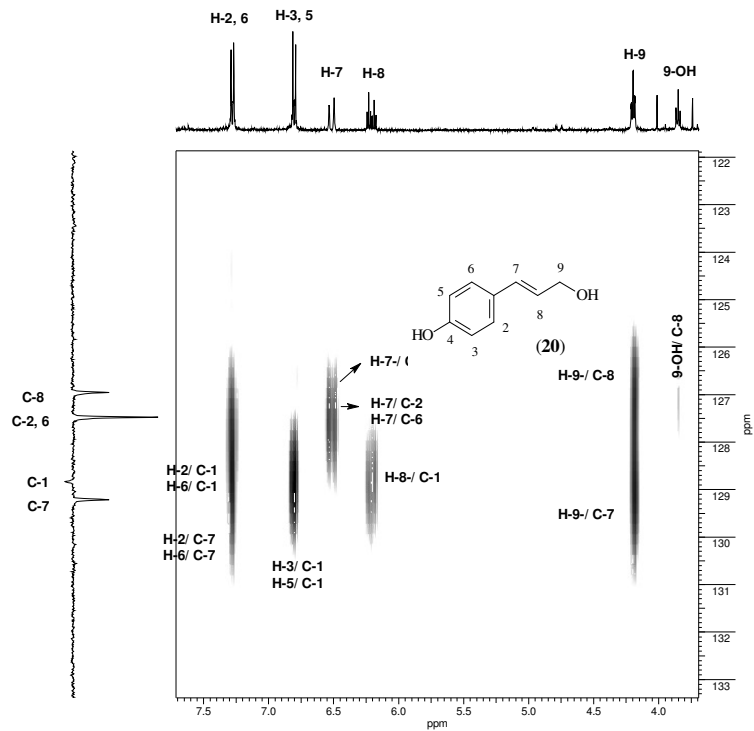


Figura 152. Expansão do espectro de RMN HMBC (400/ 100 MHz, D_3CCOCD_3) da substância **20**, entre δ_H 3,5-7,5 ppm e δ_C 122-133,0 ppm

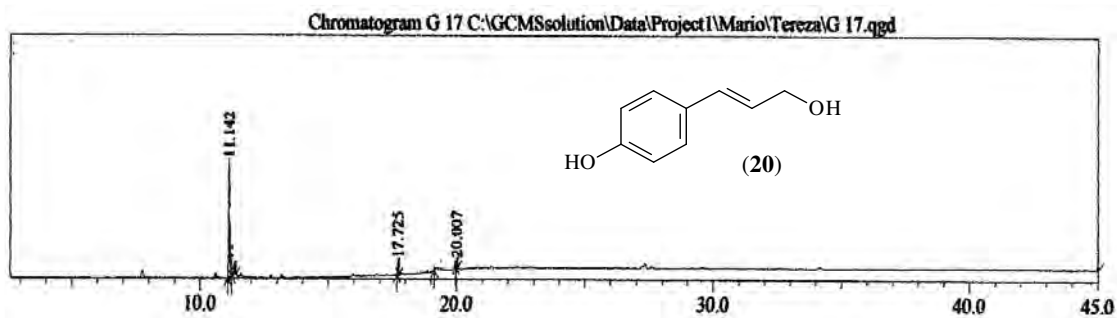


Figura 153. Cromatograma por CG de **20**

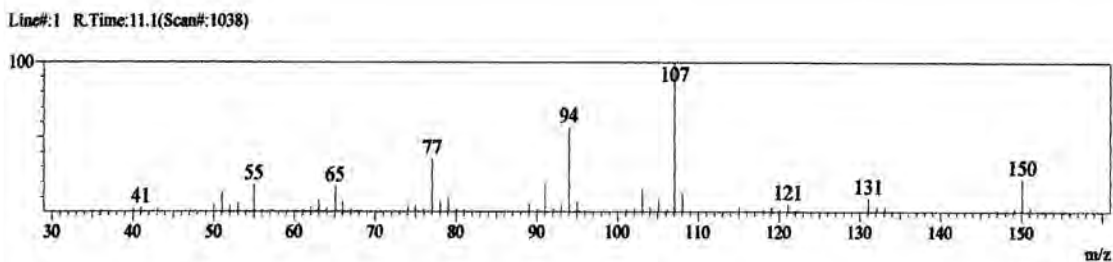


Figura 154. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância **20**

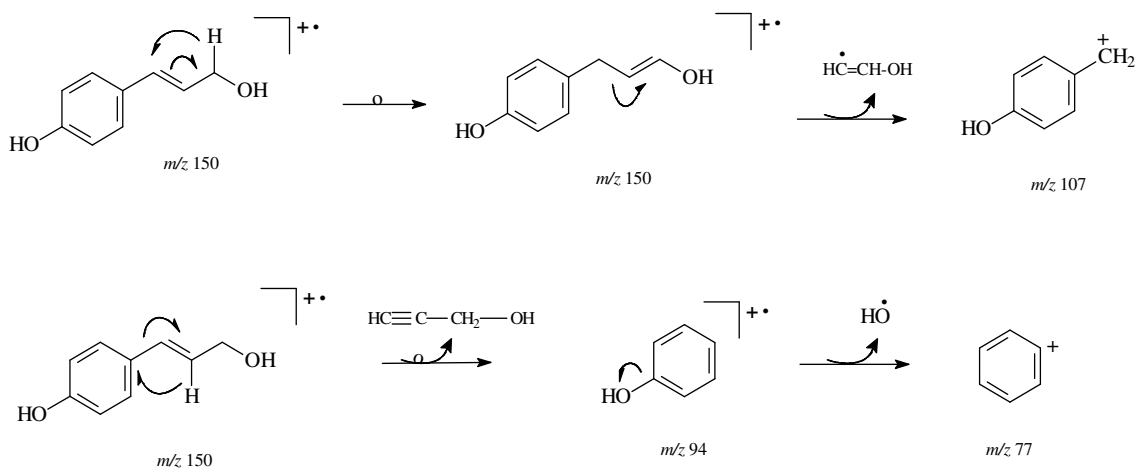


Figura 155. Proposta de fragmentação para substância 20

5.2.13- Identificação da substância 21

A substância **21** foi isolada como um sólido alaranjado e identificada como o alcalóide 6-acetonildiidroqueleritrina após análise do espectro de RMN ^1H , comparação com dados da literatura (MOCCELINI *et al.*, 2009) e comparação por CCD com uma amostra autêntica. Esta substância já havia sido isolada das raízes desta planta anteriormente e seu reisolamento serviu para avaliação de atividade biológica. Sendo assim, a análise espectroscópica de **21** não foi aprofundada.

O espectro de RMN ^1H mostrou sinais na região de hidrogênios de sistema aromáticos em δ_{H} 7,74 (*d*, $J= 8,8$ Hz, H-11), 7,56 (*d*, $J= 8,8$ Hz, H-10), 7,56 (*s*, H-1), 7,50 (*d*, $J= 8,4$, H-12), 7,12 (*s*, H-4) e 6,98 (*d*, $J= 8,4$, H-9). Notam-se, ainda, sinais do metilenodióxido em δ_{H} 6,06 (*s*), do hidrogenio metínico H-6 em δ_{H} 5,07 (*dd*, $J= 11,4$ e 3,2 Hz), de metoxilas em δ_{H} 3,98 (*s*, 8-OCH₃) e 3,95 (*s*, 7-OCH₃) e de metilas em δ_{H} 2,68 (*s*, N-CH₃) 2,08(*s*, H-3') (Figura 156, p. 131).

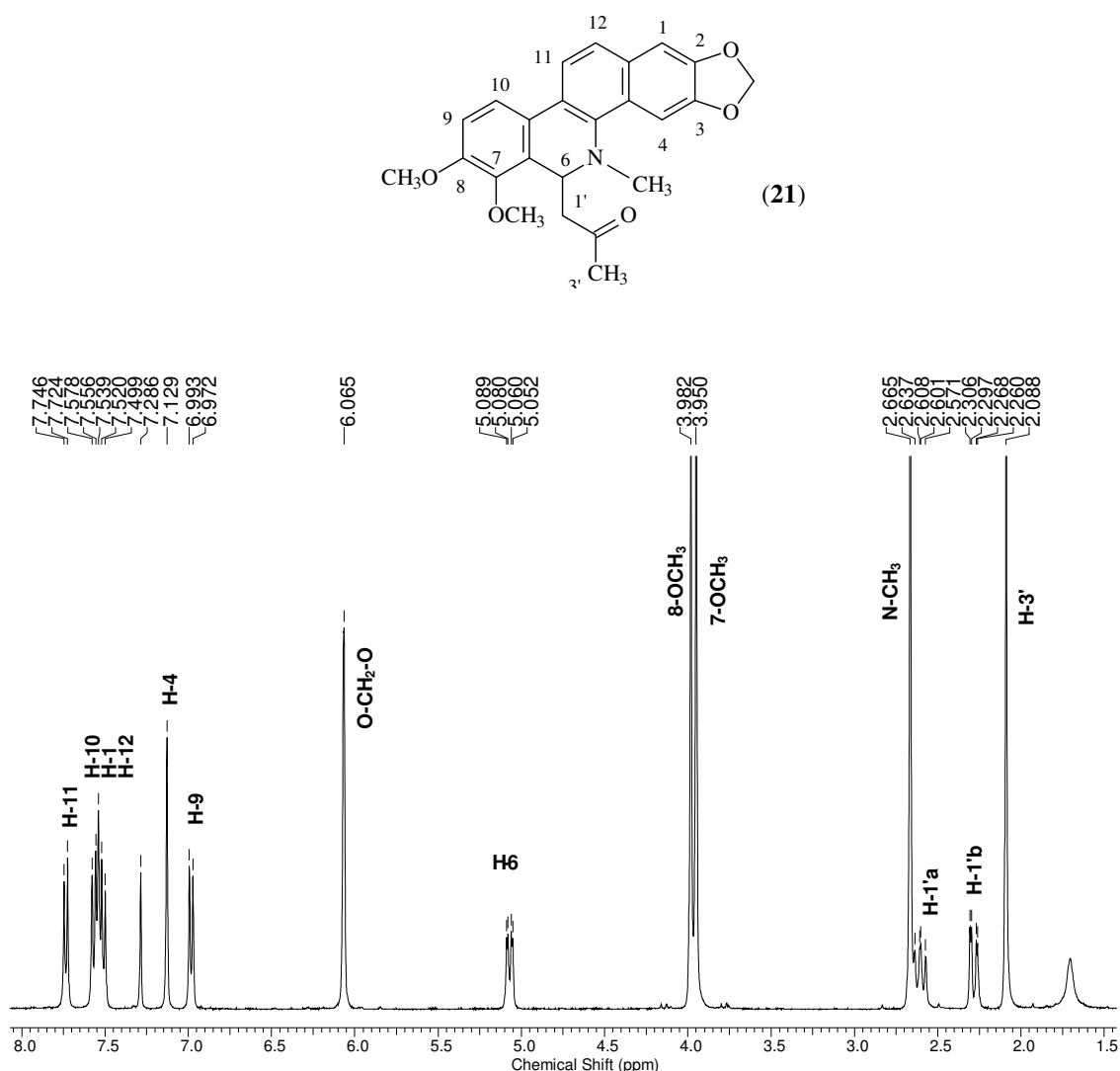
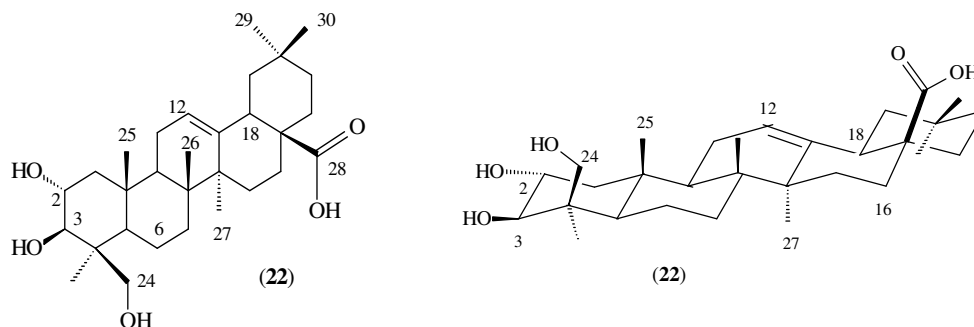


Figura 156. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl₃) da substância **21**

5.2.14- Identificação da substância 22

A substância **22** foi isolada como um sólido branco amorfo e identificada como o triterpeno 2 α , 3 β , 24-triidroxiolean-12-em-28-óico, conhecido como ácido hiptático A após análises por RMN 1D e 2D e EM-EM comparados com os dados da literatura (JIN *et al.*, 2009).



O espectro no IV (Figura 157, p. 133) revelou absorções (ν_{\max} cm^{-1}) em 3427 (ν_{OH}), 2992, 2862 (ν_{CH}), 1691 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1045 ($\nu_{\text{C-O}}$).

O espectro de RMN ^1H exibiu singletos em δ_{H} 12,02 (28-OH), 5,18 (H-12), 5,03 (3-OH), 4,42 (2-OH) e 4,10 (23-OH) (Figuras 158 e 159, p. 135). A região de metilas mostrou singletos em δ_{H} 0,70, 0,89 (x2), 0,92 e 1,10 (x2) que foram associados a seis metilas (Figura 160, p. 136), o que foi confirmado pela análise do espectro HMQC (Figuras 166 e 168, p. 139 e 140).

Na análise do DEPTQ (Figura 161 a 163; p. 136 e 137) observam-se sinais que foram atribuídos a trinta carbonos, sendo evidenciada a presença do carbono carboxílico em δ_{C} 179,0 (C-28), metínico (sp^2) em δ_{C} 121,8 (C-12) e os carbinólicos em δ_{C} 84,3 (C-3), δ_{C} 67,4 (C-2) e δ_{C} 64,3 (C-23).

O valor dos deslocamentos químicos da dupla ligação C-13 (δ_{C} 144,3) e o sinal de C-18 (δ_{C} 41,2) indicaram que o triterpeno **22** pertence à classe dos oleananos. Nesse caso não há efeito γ de uma metila ligada ao C-19 sobre o C-13 e o efeito β da mesma sobre o C-18.

O alto valor de C-3 (84,3 ppm) indicou que OH-3 tem configuração β , isto devido a ausência de efeito γ (proteção) da metila C-23 e a presença de efeito β (desproteção) de OH-2. O valor do J (8,0 Hz) de H-3 justifica a relação *trans* entre H-3 e H-2.

O espectro de COSY (Figuras 164 e 165, p. 138) permitiu identificar os principais acoplamentos entre H-2 [δ_{H} 3,54-3,63 (m)] e H-3 [δ_{H} 2,88 (*d*, 8,0 Hz)]; H-23a [δ_{H} 3,75 (*d*, 8,0 Hz)] e H-23b [δ_{H} 3,28-3,32 (*m*)]; H-5 [δ_{H} 0,83-0,85 (*m*)] e H-6b [δ_{H} 1,32-1,48 (*m*)].

O espectro de HMBC auxiliou na atribuição dos carbonos quaternários e dos vários hidrogênios metilênicos da região de δ_{H} 0,7-1,85 (Figuras 169 a 172, p. 140 a 142).

Na análise do espectro de NOESY detectou-se NOE entre as hidroxilas 3-OH com 2-OH e 23-OH, mostrando que as mesmas estão próximas espacialmente entre si (Figuras 173 e 174, p. 142 e 143).

A análise usando injeção em sistema quadrupolo e análise com tempo de voo (TDV) e ionização com elétron spray com detecção de íons negativo, forneceu o espectro de massas cujo pico m/z 487,3514 (100; M-H) massa calculada de 487,3429 ($\Delta\text{D}= 0,009$), é compatível para a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_5$, confirmando a proposta estrutural para **22**. (Figuras 175 e 176, p 143 e 144).

A Tabela 15 (p. 134) mostra a atribuição dos deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H de **22** e comparação com dados da literatura para o ácido hyptático. Este triterpeno foi isolado a primeira vez de *Hyptis capitata* (Labiatae) (YAMAGISHI *et al.*, 1988), sendo este o primeiro registro no gênero *Zanthoxylum*.

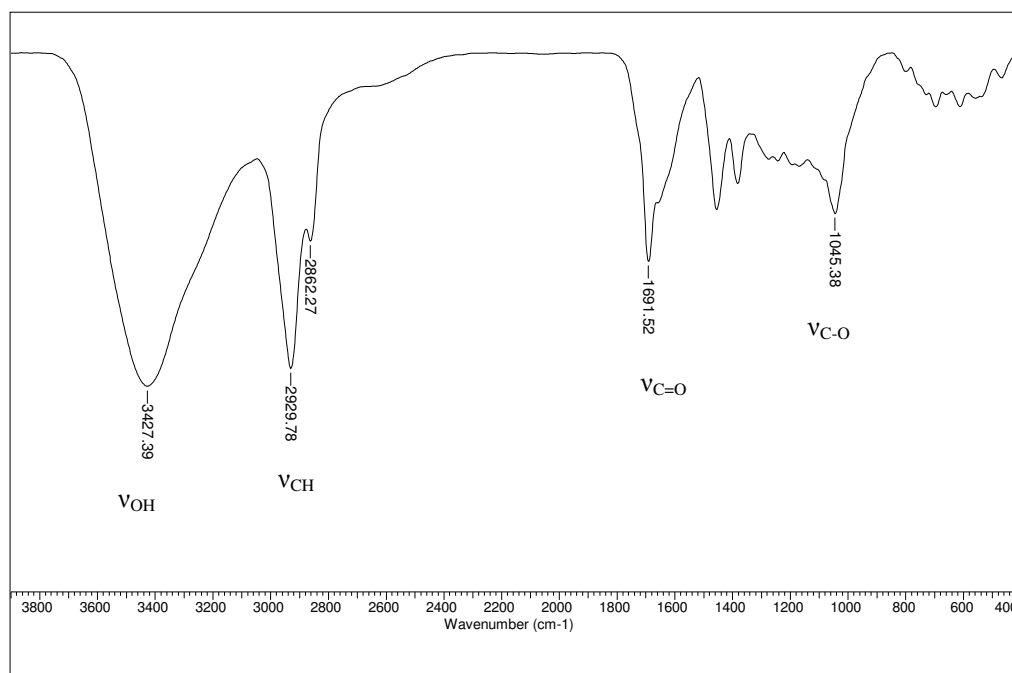


Figura 157. Espectro no IV da substância **21** em KBr

Tabela 15. Dados de RMN DEPTQ (125 MHz) e ^1H (500 MHz) em DMSO- d_6 de **22** comparados com dados da literatura para o ácido 2 α , 3 β , 24-triidroxiolean-12-en-oico (JIN *et al.*, 2009).

| Substância 23 | | | Literatura | |
|---------------|------------------------------|---|---------------------|--|
| C | DEPTQ δ_{C} | δ_{H} (mult., J em Hz) | δ_{C} | δ_{H} (mult., J em Hz) |
| 1 | 47,4 | 0,73-0,81 (<i>m</i>) 1,76-1,80 (<i>m</i>) | 48,3 | n.a |
| 2 | 67,4 | 3,54-3,63 (<i>m</i>) | 68,6 | 4,43 (<i>m</i>) |
| 3 | 84,3 | 2,88 (<i>d</i>) $J= 8,0$ | 85,8 | 3,54 (<i>d</i>) $J= 6,0$ |
| 4 | 43,7 | ----- | 44,0 | ----- |
| 5 | 55,8 | 0,83-0,85 (<i>m</i>) | 56,5 | n.a |
| 6 | 19,3 | 1,32-1,48 (<i>m</i>) 1,51-1,55 (<i>m</i>) | 19,2 | n.a |
| 7 | 33,8 | 1,23-1,29 (<i>m</i>) 1,14-1,19 (<i>m</i>) | 33,3 | n.a |
| 8 | 39,3 | ----- | 39,8 | ----- |
| 9 | 47,6 | 1,51-1,55 (<i>m</i>) | 48,3 | n.a |
| 10 | 37,9 | ----- | 38,4 | ----- |
| 11 | 23,7 | 1,84-1,85 (<i>m</i>) | 24,1 | n.a |
| 12 | 121,8 | 5,18 (<i>s</i>) | 122,4 | 5,46 (<i>s</i>) |
| 13 | 144,3 | ----- | 144,9 | ----- |
| 14 | 41,7 | ----- | 42,5 | ----- |
| 15 | 27,6 | 1,59-1,67 (<i>m</i>) 0,99-1,01 (<i>m</i>) | 28,3 | n.a |
| 16 | 23,1 | 1,32-1,48 (<i>m</i>) | 23,7 | n.a |
| 17 | 45,9 | ----- | 46,6 | ----- |
| 18 | 41,2 | 2,76 (<i>d</i>) $J= 10$ | 42,0 | 2,62 (<i>d</i>), $J= 11,4$ |
| 19 | 46,2 | 1,59-1,67 (<i>m</i>) 1,04-1,06 (<i>m</i>) | 46,6 | n.a |
| 20 | 30,9 | ----- | 30,9 | ----- |
| 21 | 33,2 | 1,32-1,48 (<i>m</i>) | 34,2 | n.a |
| 22 | 32,6 | 1,59-1,67 (<i>m</i>) | 33,2 | n.a |
| 23 | 23,9 | 1,10 (<i>s</i>) | 24,1 | 1,59 ^a |
| 24 | 64,3 | 3,75 (<i>d</i>) $J= 10,5$ 3,28-3,32 (<i>m</i>) | 65,6 | 4,29 (<i>d</i>) $J= 10,6$ 3,76 (<i>d</i>) $J= 10,6$ |
| 25 | 17,0 | 0,92 (<i>s</i>) | 17,2 | 1,03 ^a |
| 26 | 17,1 | 0,70 (<i>s</i>) | 17,3 | 1,05 ^a |
| 27 | 26,1 | 1,10 (<i>s</i>) | 26,1 | 1,27 ^a |
| 28 | 179,0 | ----- | 180,2 | ----- |
| 29 | 33,3 | 0,89 (<i>s</i>) | 33,2 | 1,18 ^a |
| 30 | 23,9 | 0,89 (<i>s</i>) | 23,7 | 0,98 ^a |
| COOH | ----- | 12,0 (<i>sl</i>) | ----- | n.a |
| 2-OH | ----- | 4,42 (<i>sl</i>) | ----- | n.a |
| 3-OH | ----- | 5,03 (<i>sl</i>) | ----- | n.a |
| 23-OH | ----- | 4,10 (<i>sl</i>) | ----- | n.a |

* ^1H 500 MHz; ^{13}C 125 MHz, C_3D_5

^a intercambiáveis

n.a: não atribuído

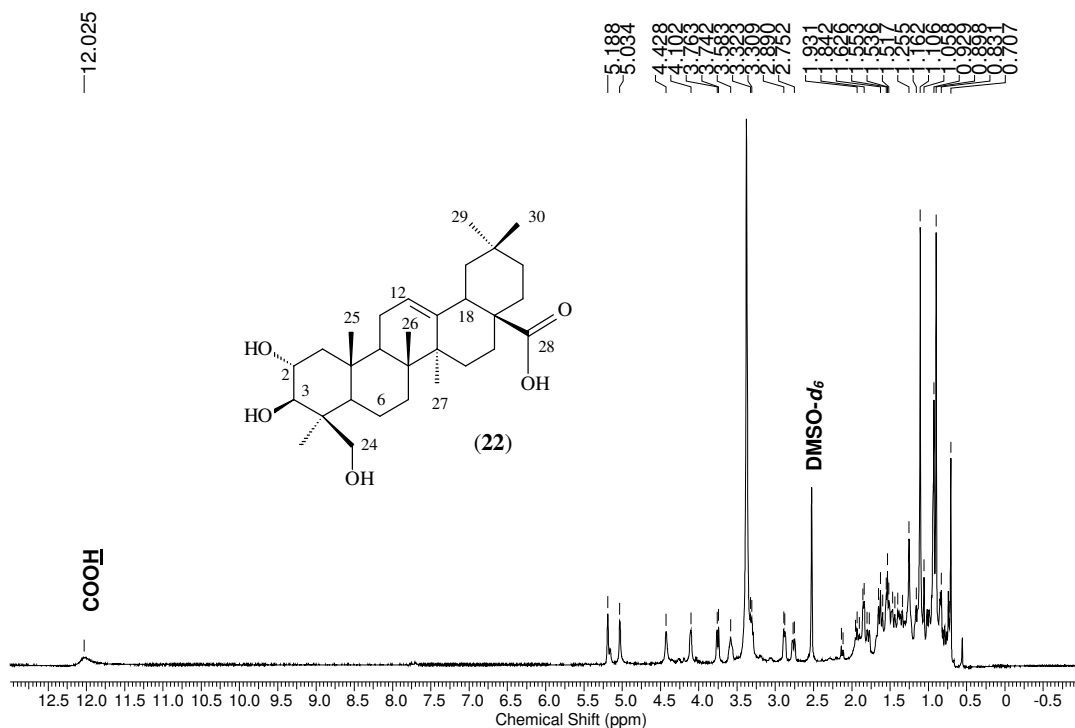


Figura 158. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **22**

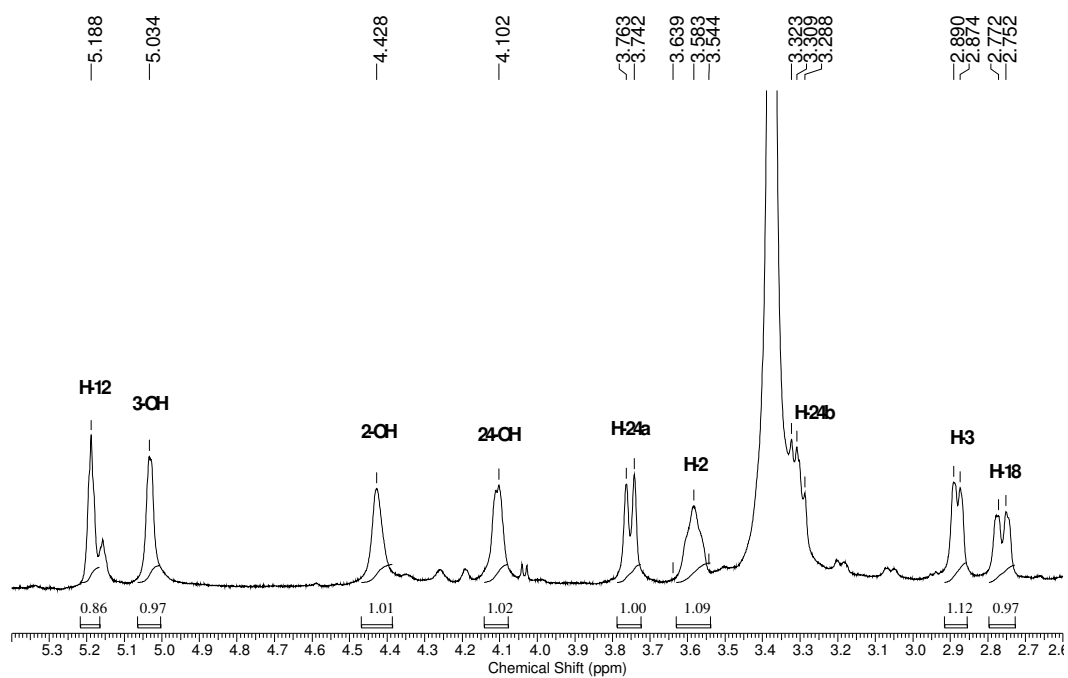


Figura 159. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **22**, entre δ_{H} 2,75-5,30 ppm

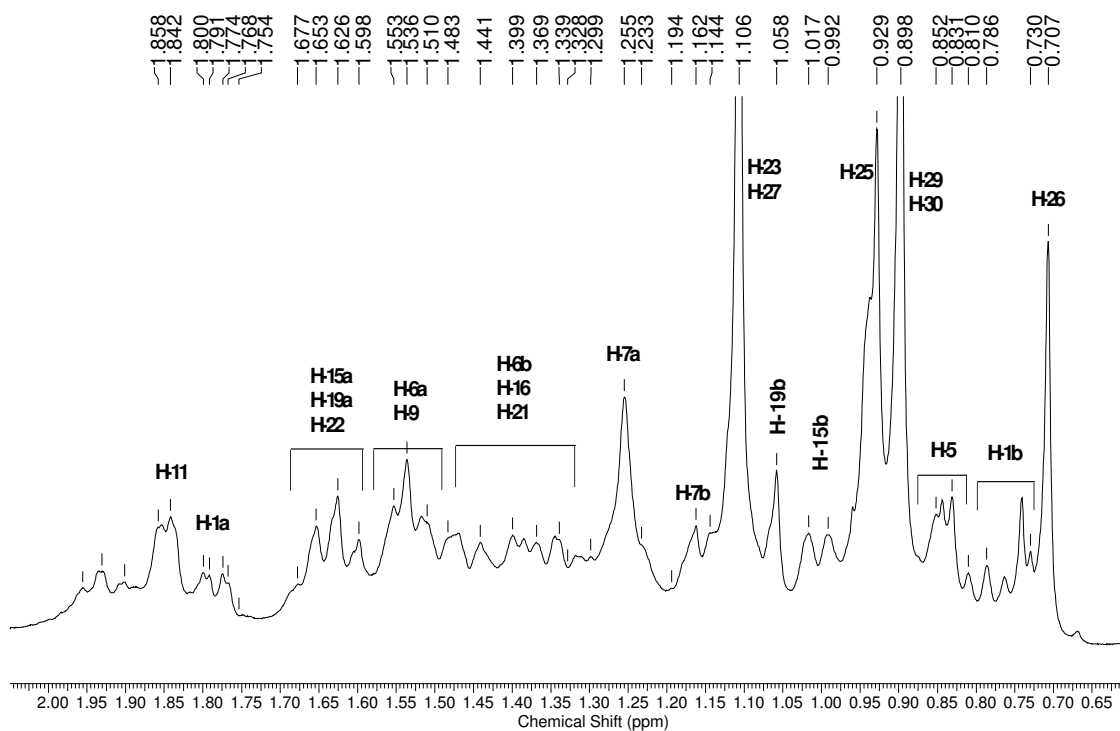


Figura 160. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da substância **22**, entre δ_{H} 0,69-2,00 ppm

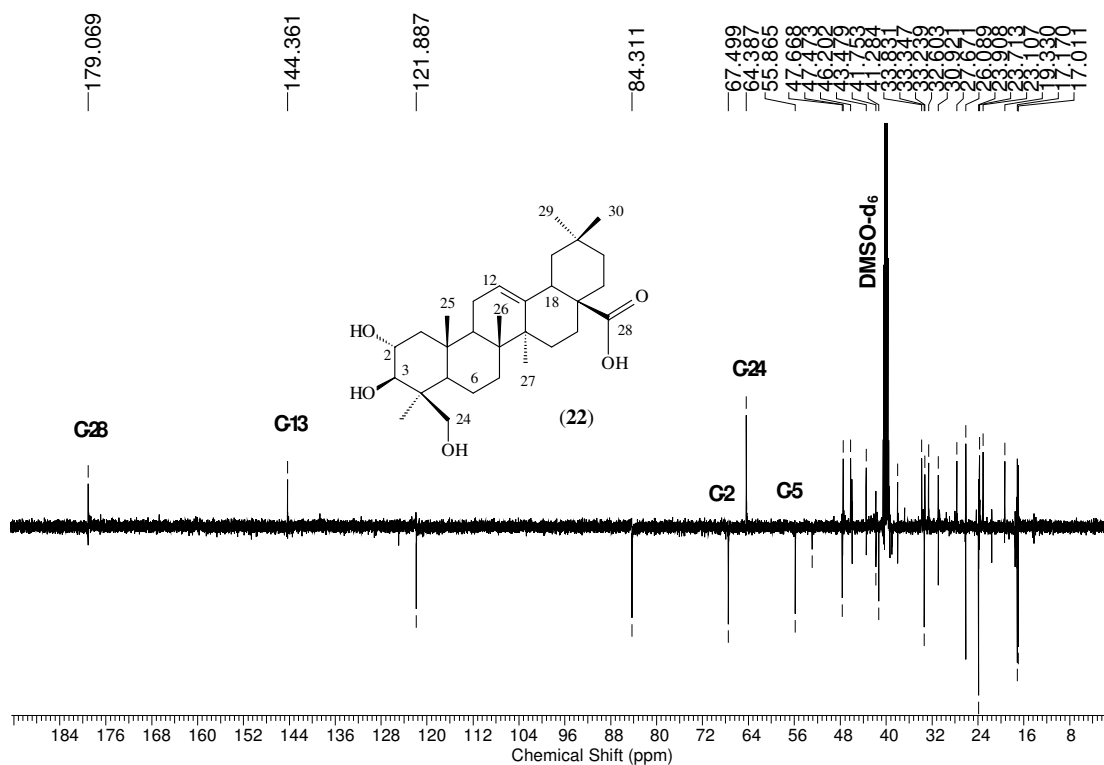


Figura 161. Espectro de RMN DEPTQ (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da substância **22**

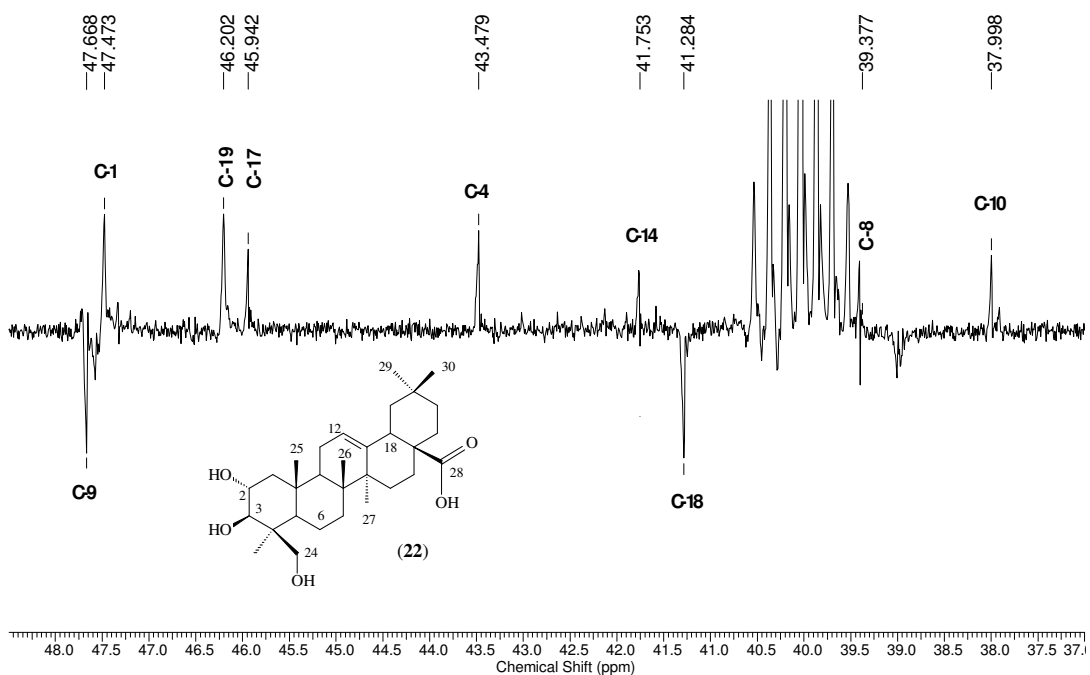


Figura 162. Expansão do espectro de RMN DEPTQ (125 MHz, DMSO- d_6) da substância **22**, entre δ_C 37,0-48,0 ppm

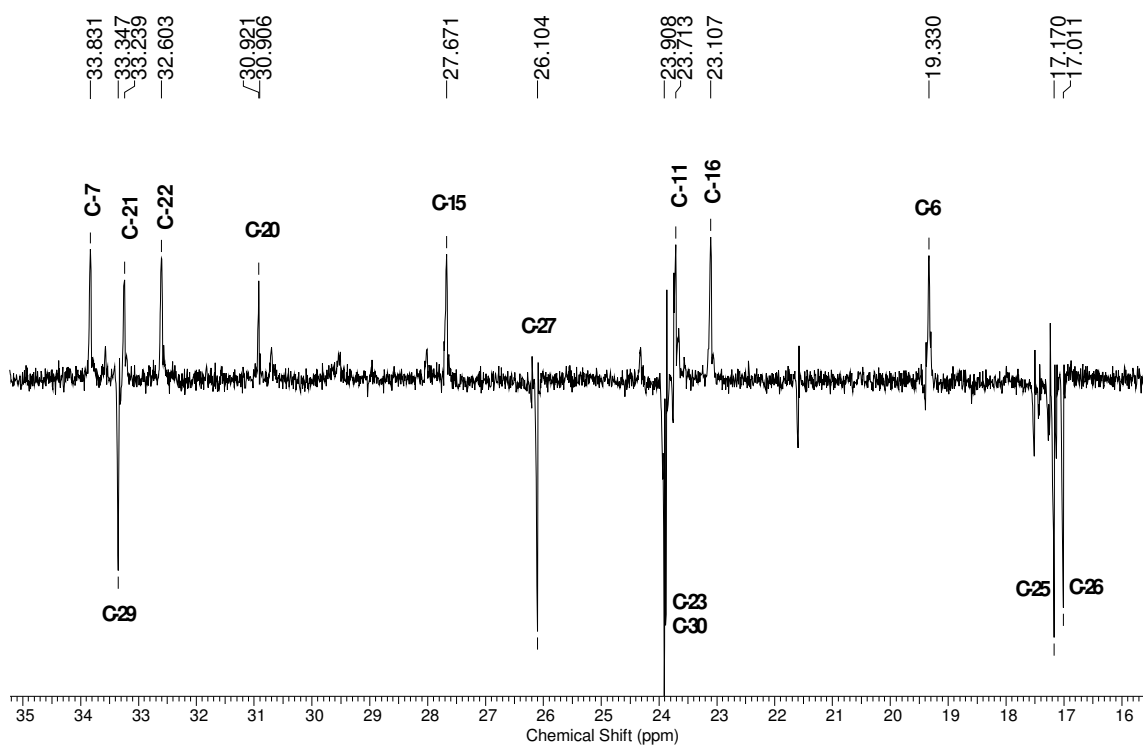


Figura 163. Expansão do espectro de RMN DEPTQ (125 MHz, DMSO- d_6) da substância **22**, entre δ_C 16,0-35,0 ppm

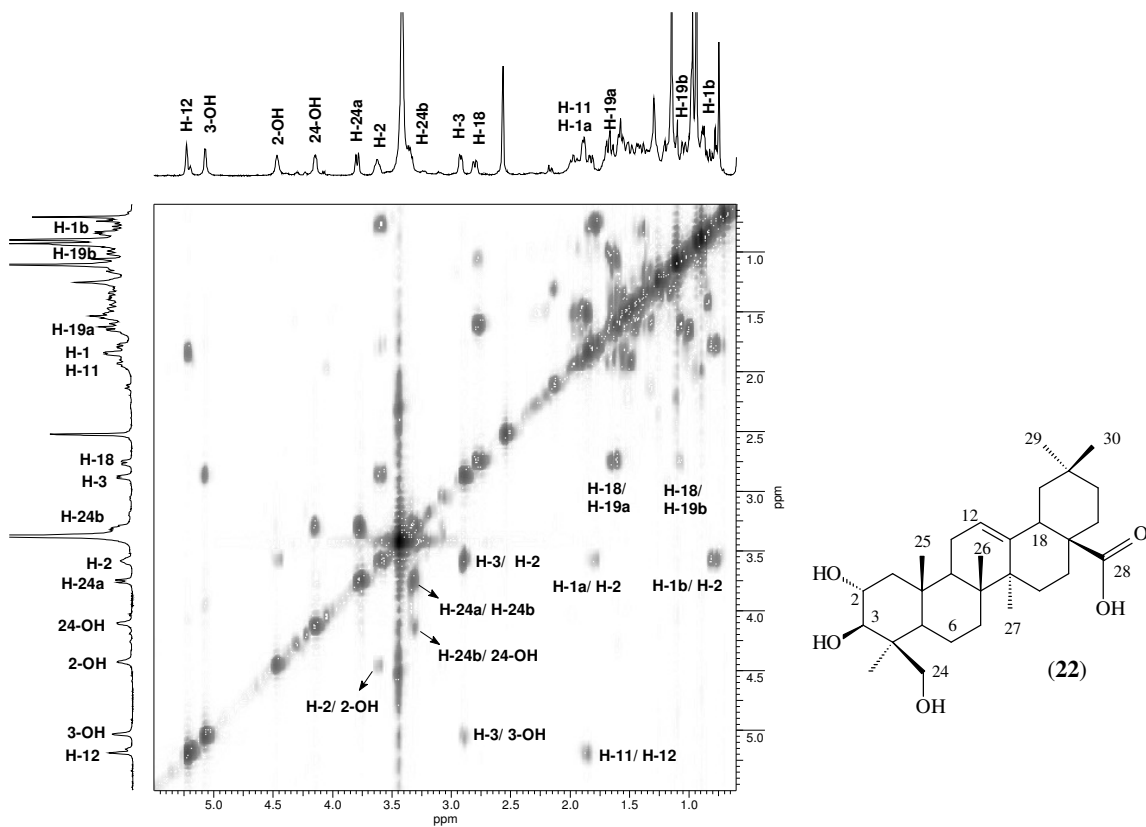


Figura 164. Expansão do espectro de RMN COSY (500 MHz, DMSO- d_6) da substância **22**, entre δ_H 0,60-5,50 ppm

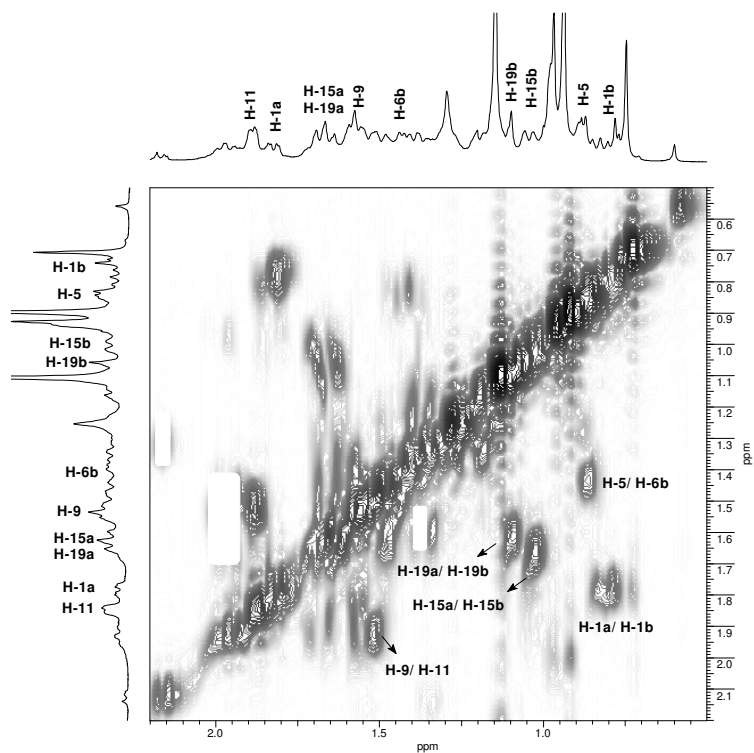


Figura 165. Expansão do espectro de RMN COSY (500 MHz, DMSO- d_6) da substância **22**, entre δ_H 0,50-2,20 ppm

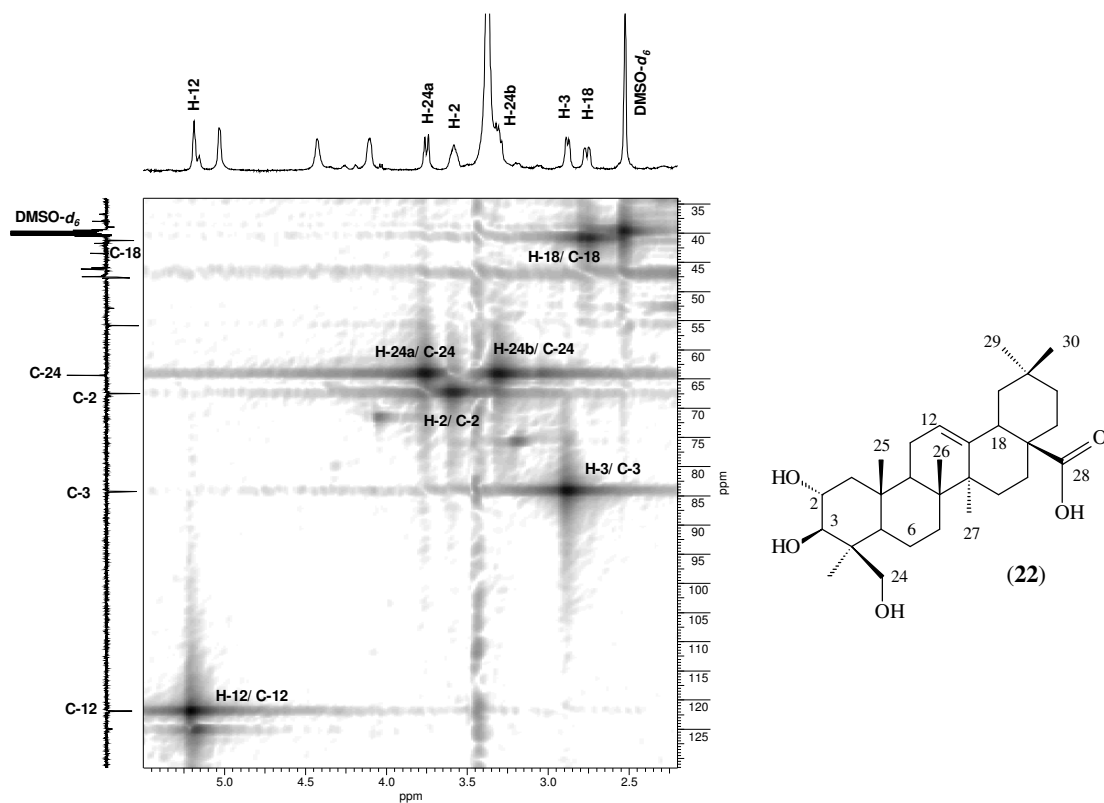


Figura 166. Expansão do espectro de RMN HMQC (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância **22**, entre δ_H 2,45-5,30 e δ_C 35,0-130,0 ppm

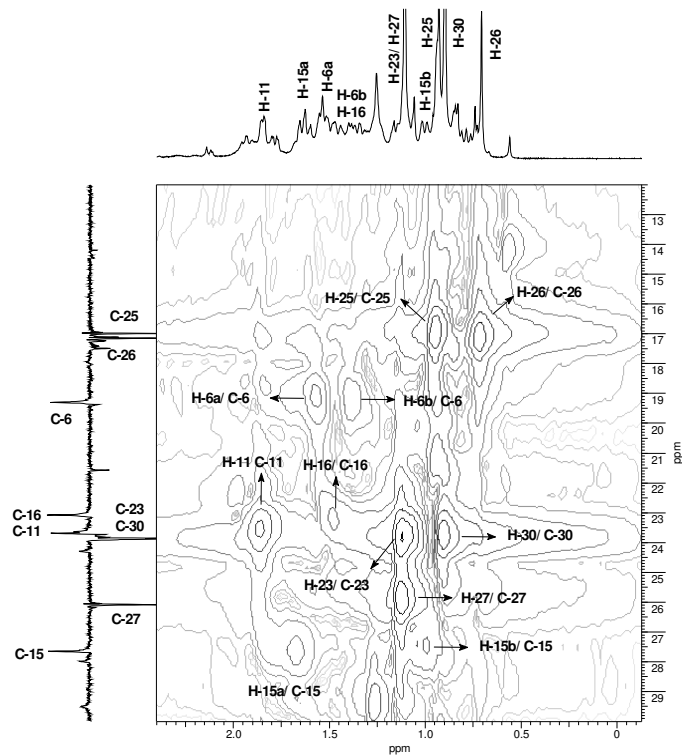


Figura 167. Expansão do espectro de RMN HMQC (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância **22**, entre δ_H 0-2,40 e δ_C 12,0-30,0 ppm

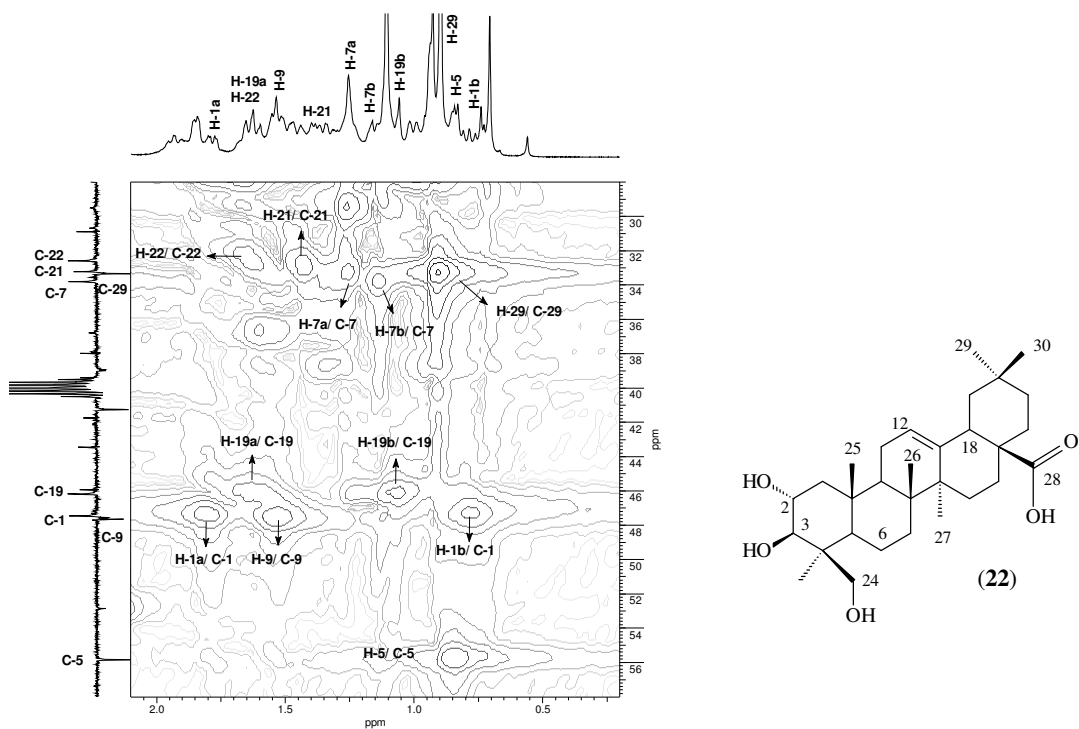


Figura 168. Expansão do espectro de RMN HMQC (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância **22**, entre δ_H 0,30-2,10 e δ_C 28,0-58,0 ppm

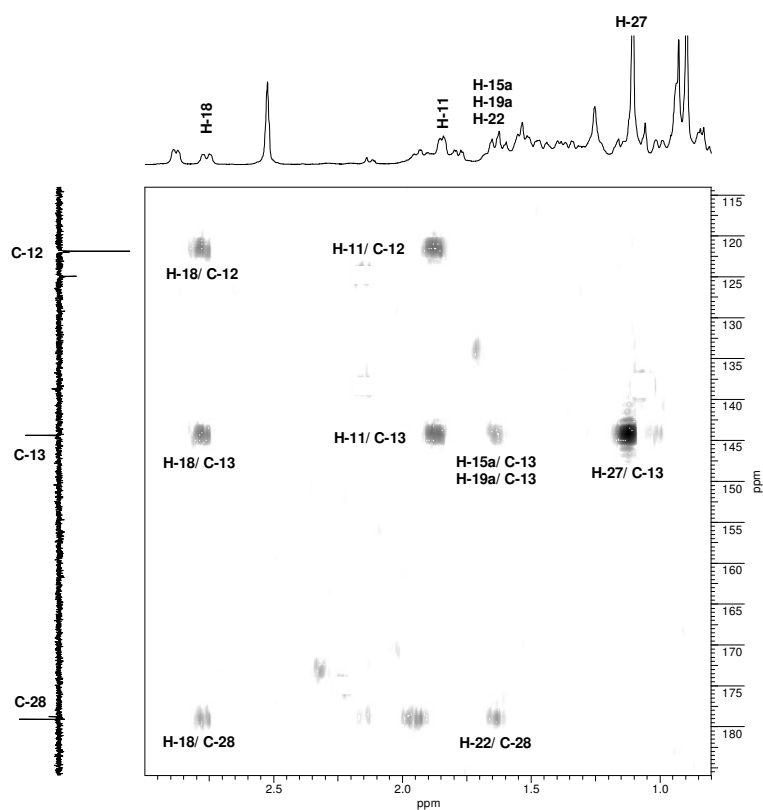


Figura 169. Expansão do espectro de RMN HMBC (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância **22**, entre δ_H 0,70-3,0 e δ_C 115,0-185,0 ppm

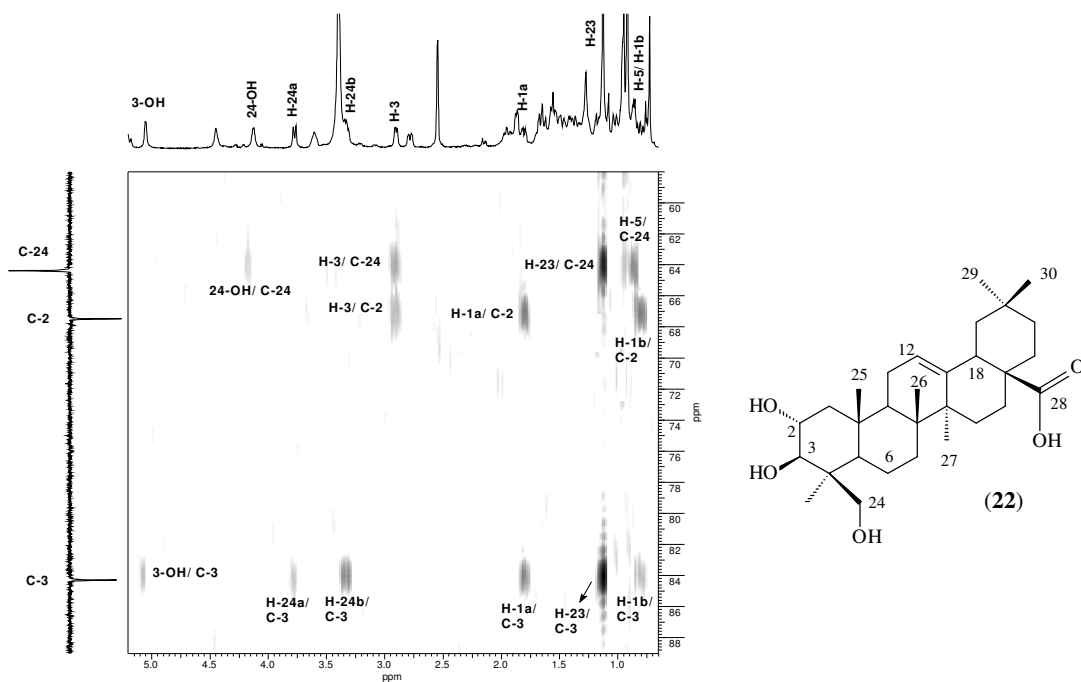


Figura 170. Expansão do espectro de RMN HMBC (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância **22**, entre δ_H 0,65-5,20 e δ_C 58,0-89,0 ppm

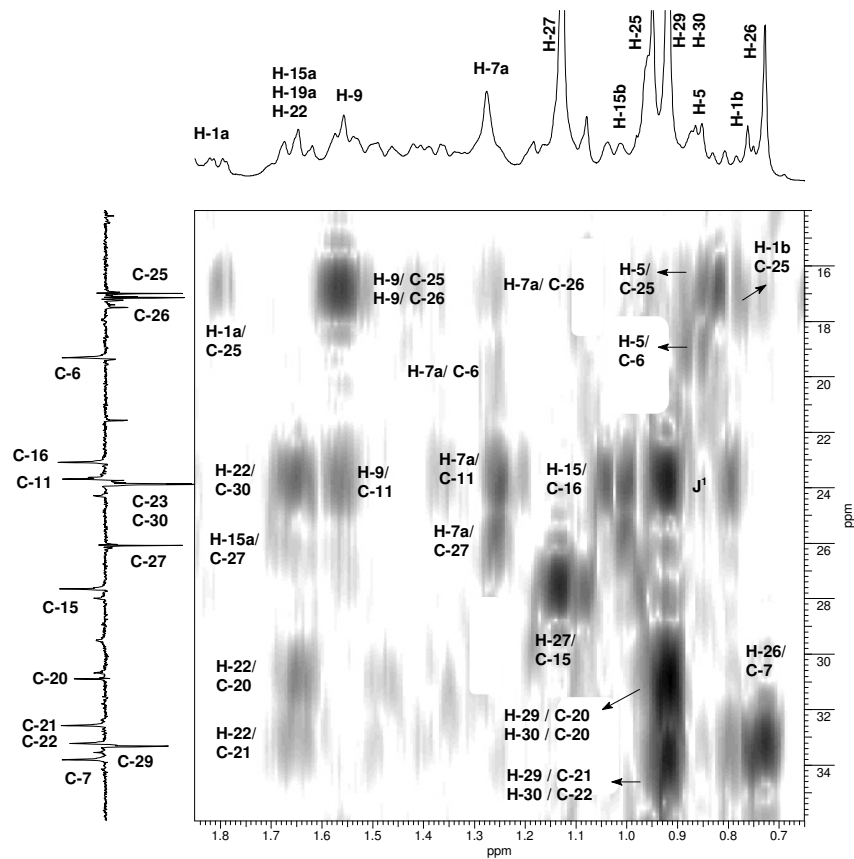


Figura 171. Expansão do espectro de RMN HMBC (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância **22**, entre δ_H 0,50-2,0 e δ_C 10,0-36,0 ppm

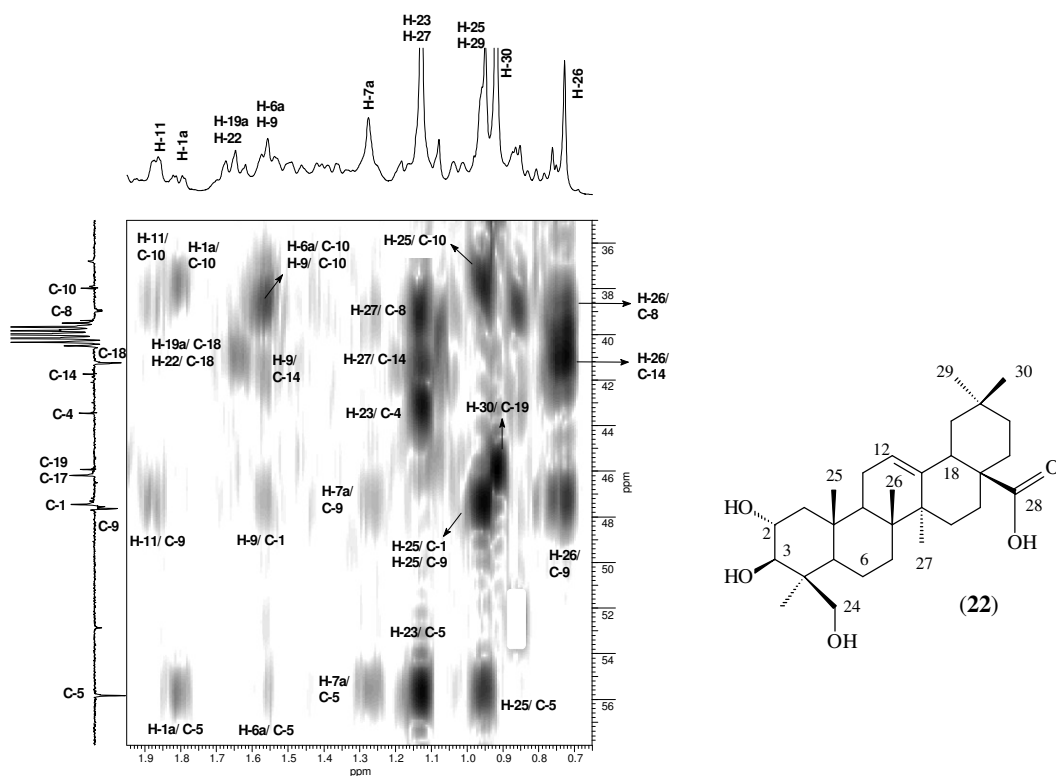


Figura 172. Expansão do espectro de RMN HMBC (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância **22**, entre δ_H 0,65-1,95 e δ_C 35,0-58,0 ppm

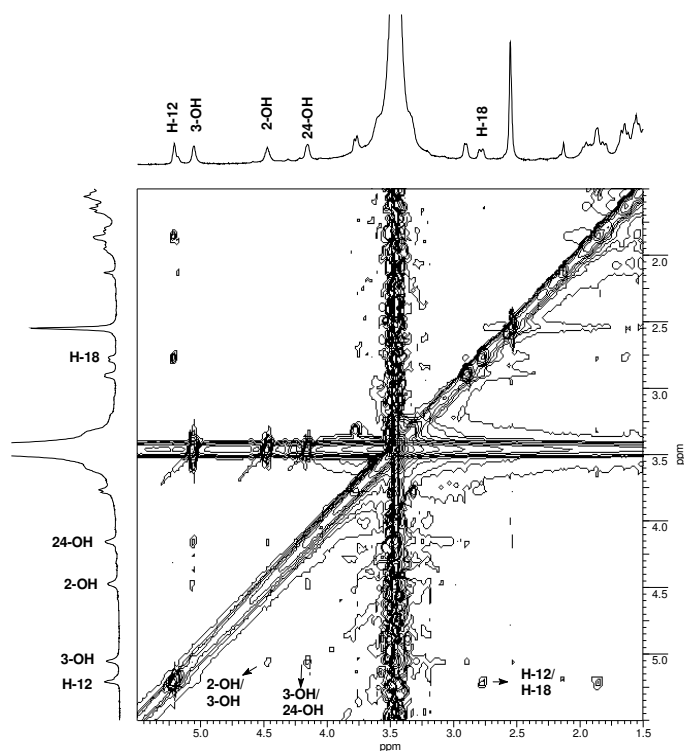


Figura 173. Expansão do espectro de RMN NOESY (500/ 125 MHz, DMSO- d_6) da substância **22**, entre δ_H 1,50-3,50 ppm

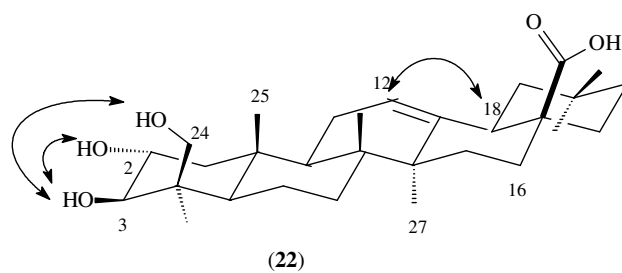


Figura 174. Principais correlações do NOESY da substância **22**

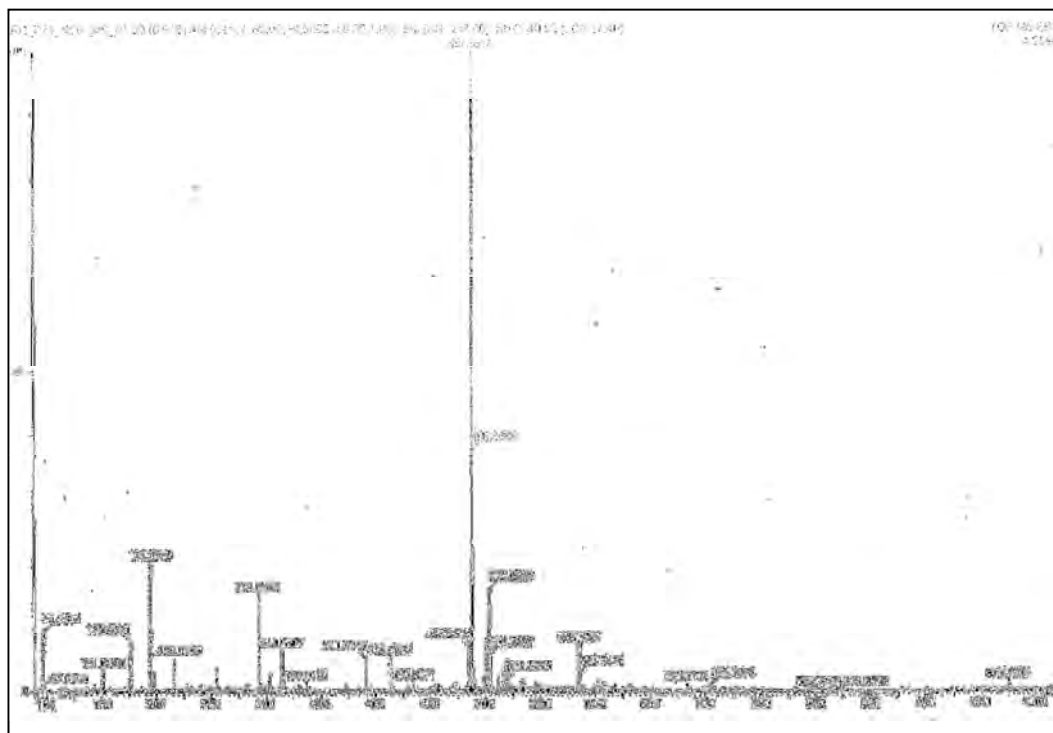


Figura 175. Espectro de massas de alta resolução da substância **22** com detecção de íons negativos

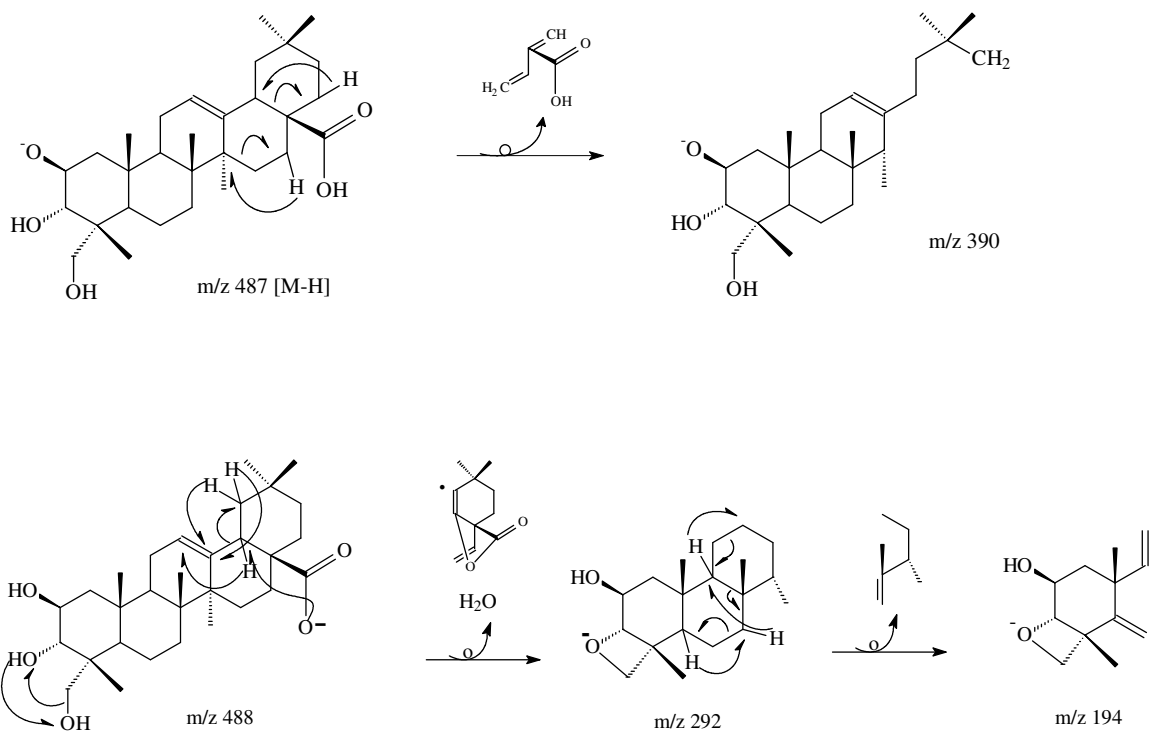
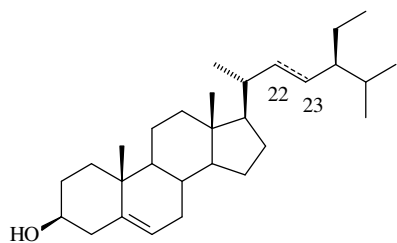


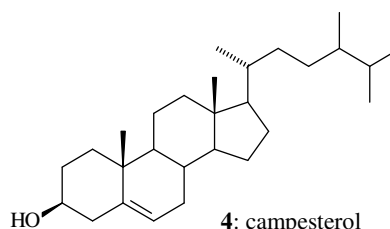
Figura 176. Proposta de fragmentação para substância 22

5.3- Substâncias identificadas de *Luxemburgia nobilis* neste trabalho

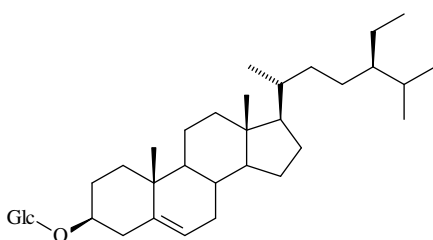


2: β -sitosterol: (22,23 diidro)

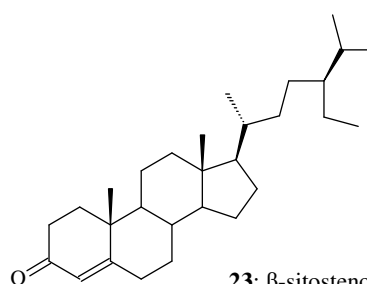
3: estigmasterol ($\Delta^{22,23}$)



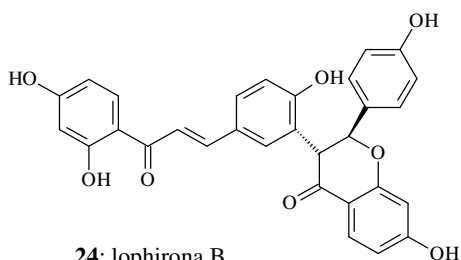
4: campesterol



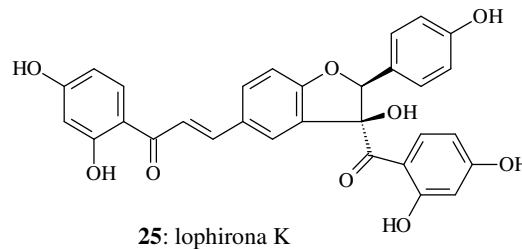
5: 3-O- β -D-glicopiranosil sitosterol



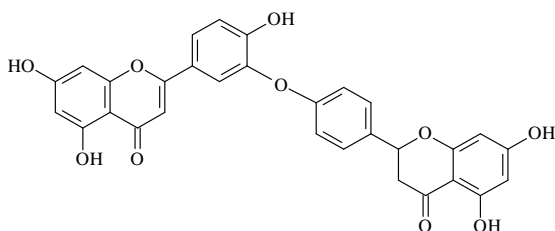
23: β -sitostenona



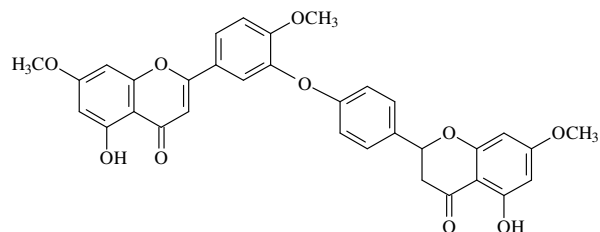
24: lophirona B



25: lophirona K



26: 2'', 3''-diidrochonaflavona



26a: 2'', 3''-diidrochonaflavona metilada

5.3.1-Identificação das substâncias 2, 3, 4, 23

As substâncias **2**, **3**, **4** e **23** foram isoladas em mistura e identificadas após análise de RMN ^1H , ^{13}C , e principalmente através de CG-EM e comparação com dados da literatura (KOJIMA *et al.* 1990). A identificação das substâncias **2**, **3** e **4** já foi discutida no item 5.1.2 (p. 38). A análise por CG-EM (Figura 177, p. 146) permitiu detectar além de **2**, **3** e **4** um quarto componente da mistura, a β -sitostenona (**23**) com t_R 22,14 min. O espectro de massas de **23** (Figura 178, p. 146).mostrou pico do íon-molecular em m/z 412 (M^+) e o pico base em m/z 124, sendo compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$. As fragmentações sugeridas reforçaram a proposta estrutural para **23** (Figura 179, p. 147).

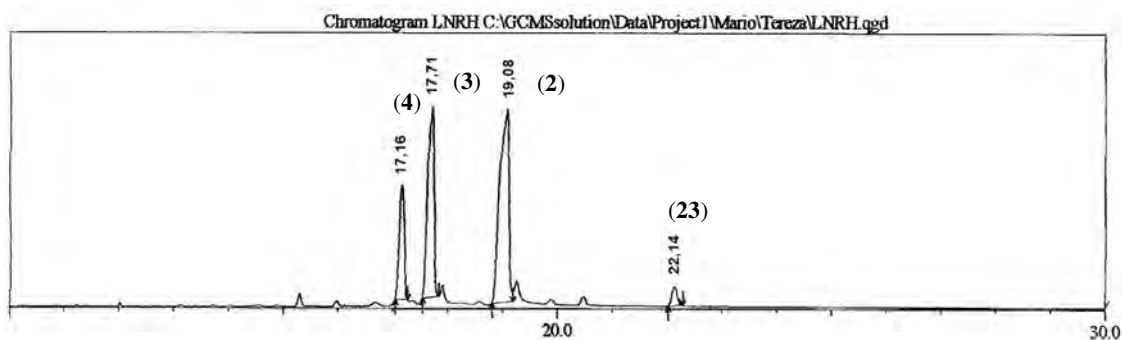
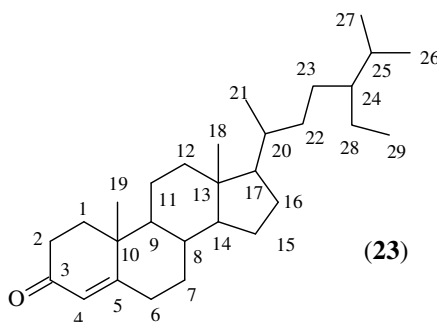


Figura 177. Cromatograma por CG da mistura das substâncias 2+3+4+23

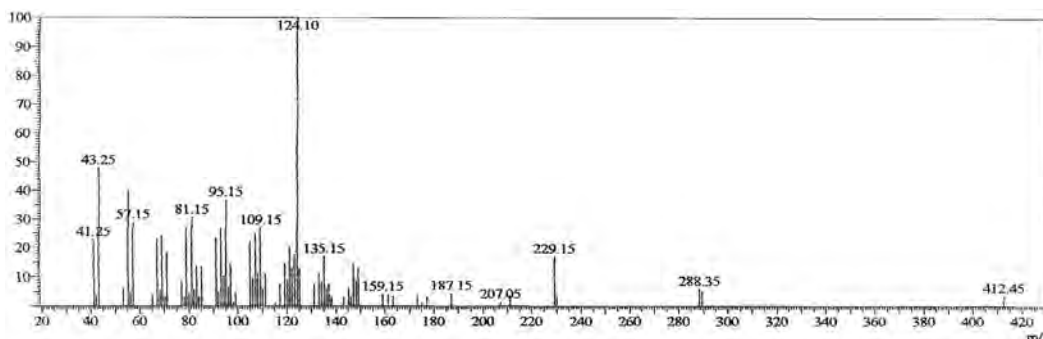


Figura 178. Espectro de massas por I.E. (70 eV) da substância 23

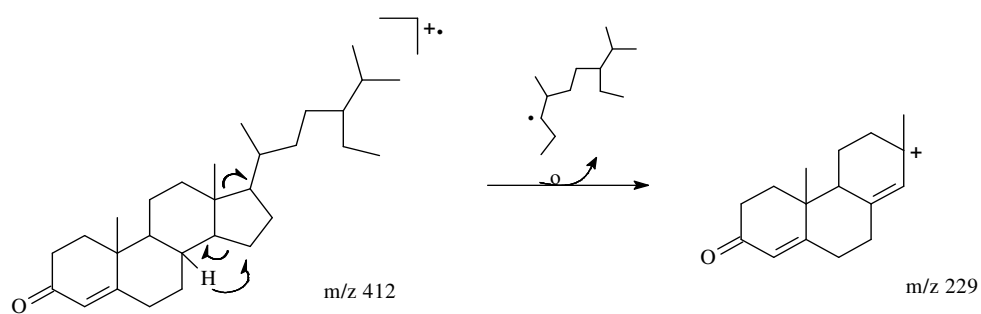
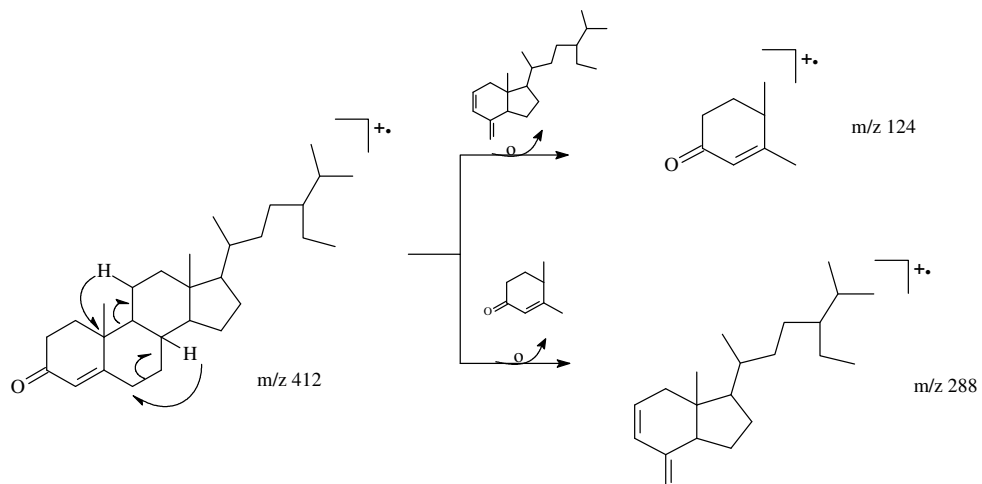
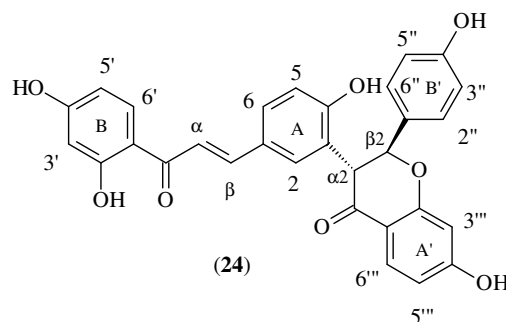


Figura 179. Proposta de fragmentação para substância **23**

5.3.2-Identificação da substância 24

A substância **24**, obtida como um sólido amarelo, foi identificada como o biflavonóide lophirona B após análise por RMN 1D, 2D e CL-EM, e comparação com dados da literatura (GHOGOMU TIH *et al.*, 1989).



O espectro no IV (Figura 181, p. 150) exibiu entre outros sinais, bandas de absorção em 3429 cm^{-1} (estiramento O-H), 1605 cm^{-1} (estiramento C=O de carbonila conjugada).

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 182 e 183, p. 151 e 152) apresentou sinais de hidrogênios olefínicos típicos de chalcona em δ_{H} 7,72 (*d*, $J= 15,6\text{ Hz}$; H- α) e 7,66 (*d*, $J= 15,2\text{ Hz}$; H- β), além de hidrogênios de sistema saturado característicos de flavanona em δ_{H} 4,55 (*d*, $J= 12,4\text{ Hz}$; H- α_2) e 5,92 (*d*, $J= 12,0\text{ Hz}$; H- β_2). Estes sinais nos permitiram inferir que o biflavonóide é formado por uma chalcona ligada a uma flavanona. Os anéis A e B da chalcona apresentaram padrão de substituição do tipo 1,2,4-trissubstituído. Observaram-se sinais em δ_{H} 7,52 (*d*, $J= 2,4\text{ Hz}$, H-2), 6,84 (*d*, $J= 8,4\text{ Hz}$, H-5) e 7,54 (*m*, H-6), associados aos hidrogênios do anel A, e os sinais em δ_{H} 6,36 (*d*, $J= 2,4\text{ Hz}$, H-3'), 6,44 (*d*, $J= 2,0\text{ Hz}$, H-5') e 8,03 (*d*, $J= 2,0\text{ Hz}$, H-6') foram atribuídos ao anel B (Figuras 184, p. 152).

A flavanona apresentou o anel B' com um sistema AA'BB' e o anel A' também com substituição 1,2,4-trissubstituído. Os sinais em δ_{H} 7,31 (*d*, $J= 8,8\text{ Hz}$, H-2'' e H-6'') e 6,74 (*d*, $J= 8,4\text{ Hz}$, H-3'' e H-5''), cada um com integração para dois hidrogênios, foram relacionados ao anel B', enquanto que os sinais em δ_{H} 6,46 (*d*, $J= 2,0\text{ Hz}$, H-3'''), 6,64 (*dd*, $J= 8,8\text{ e }2,0\text{ Hz}$, H-5''') e 7,81 (*d*, $J= 8,4\text{ Hz}$, H-6''') foram atribuídos ao sistema ABC do anel A' da flavanona. Esses acoplamentos puderam ser confirmados pelo espectro de RMN de COSY (Figuras 188 e 189, p. 154 e 155).

O espectro RMN de ^{13}C mostrou 30 sinais, sendo dois de carbonila, dois de metínicos alifáticos e 26 de carbono sp^2 (Figuras 186 a 188, p. 152 e 153). O espectro de HMQC (Figuras 190 a 192, p. 155 e 156) e possibilitou ainda a atribuição dos hidrogênios aos respectivos carbonos e o HMBC dos carbonos quaternários (Figuras 184 a 187, p. 153 e 154).

A análise de **24** usando injeção em sistema quadrupolo e tempo de voo (Q-TOF) e ionização com elétron spray com detecção de íons negativos, forneceu o espectro de massas cujo pico em m/z 509,1177 (100; M-H) massa calculada de 509,1236 ($\Delta\text{D}= 0,0059$), foi compatível para a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{21}\text{O}_8$ (Figura 197, p. 159). Estes dados e a proposta de fragmentação confirmam a estrutura sugerida como sendo a lophirona B (**24**) (Figura 198, p. 159).

Os valores das constantes de acoplamento detectados nos sinais de H- α_2 e H- β_2 permitiu propor uma configuração relativa *trans* entre ambos. A configuração absoluta de **24** foi determinada comparando seu espectro de DC (dicroísmo circular) com o da substância [(2*S*,3*R*)-naringenina-(3 *β* ,3)-4,2',4'-trihidrochalcona], também chamada de 6'''-hidroxilophirona B ($[\theta]_{323,1} = +5,5 \cdot 10^3$ na transição $n \rightarrow \pi^*$ e $[\theta]_{288,2} = -3,7 \cdot 10^4$ na transição $\pi \rightarrow \pi^*$)

(Figura 200, p. 160) (KAEWAMATAWONG *et al.*, 2002). A substância **24** apresentou dados de DC semelhantes aos da 6'''-hidroxi lophirona B, com efeito Cotton positivo em 325 nm ($[\theta] = +3,8$ na transição $n \rightarrow \pi^*$) e negativo em 298 nm ($[\theta] = -5,3$ na transição $\pi \rightarrow \pi^*$) (Figura 199, p. 160). Esta análise permitiu definir a configuração absoluta dos centros assimétricos da lophirona B (**24**) como α_2S, β_2R . Desta forma, a substância **24** foi definida como (2*S*,3*R*)-3-(4,2'-dihidroxichalcona)-4',7-dihidroflavanona. Esta é a primeira vez que está sendo verificada a configuração absoluta da lophirona B.

A Tabela 16 (p. 150) mostra as atribuições dos sinais de carbono e hidrogênios de **24** e comparação com valores da literatura descritos para a lophirona B (GHOGOMU TIH *et al.*, 1989). Esta substância só havia sido isolada anteriormente de *Lophira lanceolata*, sendo a primeira vez identificada no gênero *Luxemburgia*.

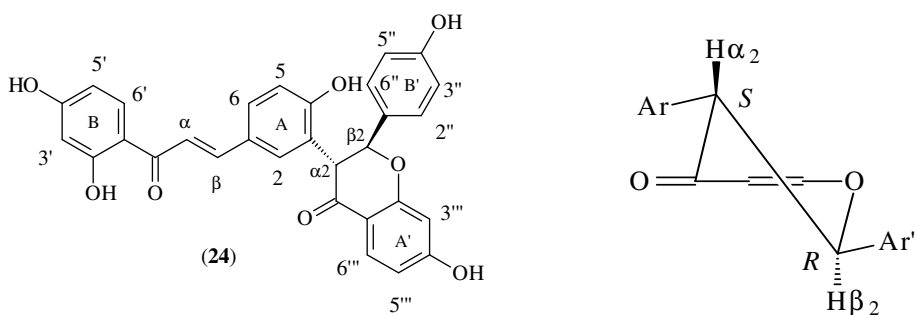


Figura 180. Estrutura da lophirona B e projeção dos centros quirais α_2 e β_2 de **24**

Tabela 16. Dados de RMN ^{13}C (100 MHz) e ^1H (400 MHz) em CD_3COCD_3 de **24** comparados com dados da literatura para a lophirona B (GHOGOMU TIH *et al.*, 1989).

| Substância 24 | | | Literatura * | |
|---------------|---------------------|-------------------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| C | δ_{C} | δ_{H} [mult., J (Hz)] | δ_{C} | δ_{H} [mult., J (Hz)] |
| 1' | 113,6 | _____ | 114,54 | _____ |
| 2' | 166,2 | _____ | 167,48 | _____ |
| 3' | 102,7 | 6,36 (d) J= 2,4 | 103,80 | 6,35 (d) J=2,2 |
| 4' | 164,5 | _____ | 165,58 | _____ |
| 5' | 107,7 | 6,44 (d) J= 2,0 | 108,80 | 6,43 (dd) J= 9,0 e 2,2 |
| 6' | 132,3 | 8,03 (d) J= 8,8 | 133,10 | 8,00 (d) J= 9,0 |
| c1 | 191,8 | _____ | 192,80 | _____ |
| α 1 | 117,4 | 7,66 (d) J= 15,2 | 118,42 | 7,64 (d) J= 15,4 |
| β 1 | 144,2 | 7,72 (d) J= 15,6 | 145,13 | 7,71 (d) J= 15,4 |
| 1 | 126,6 | _____ | 124,83 | _____ |
| 2 | 129,4 | 7,52 (d) J= 2,4 | 133,83 | 7,51 (d) J= 2,1 |
| 3 | 123,9 | _____ | 130,28 | _____ |
| 4 | 157,8 | _____ | 158,53 | _____ |
| 5 | 115,5 | 6,84 (d) J= 8,4 | 116,70 | 6,83 (d) J= 8,1 |
| 6 | 133,0 | 7,54 (m) | 130,43 | 7,50 (dd) J= 8,1 e 2,1 |
| 1''' | 114,3 | _____ | 115,20 | _____ |
| 2''' | 163,4 | _____ | 164,44 | _____ |
| 3''' | 102,6 | 6,46 (d) J= 2,0 | 103,70 | 6,45 (d) J= 2,2 |
| 4''' | 164,4 | _____ | 165,37 | _____ |
| 5''' | 110,3 | 6,64 (dd) J= 8,8 e 2,0 | 111,44 | 6,62 (dd) J= 8,6 e 2,2 |
| 6''' | 129,4 | 7,81 (d) J= 8,4 | 130,07 | 7,80 (d) J= 8,6 |
| c2 | 190,0 | _____ | 191,37 | _____ |
| α 2 | 54,8 | 4,55 (d) J= 12,4 | 55,93 | 4,53 (d) J= 12,2 |
| β 2 | 83,0 | 5,92 (d) J= 12,0 | 83,90 | 4,93 (d) J= 12,2 |
| 1'' | 129,2 | _____ | 127,57 | _____ |
| 2'' | 129,0 | 7,31 (d) J= 8,8 | 129,82 | 7,30 (m) |
| 3'' | 114,7 | 6,74 (d) J= 8,4 | 115,80 | 6,72 (m) |
| 4'' | 157,4 | _____ | 158,84 | _____ |
| 5'' | 114,7 | 6,74(d) J= 8,4 | 115,80 | 6,72 (m) |
| 6'' | 129,0 | 7,31 (d) J= 8,8 | 129,82 | 7,30 (m) |
| OH | _____ | 13,63 (s) | _____ | 13,62 (s) |

*300 MHz; 75 MHz; CD_3COCD_3

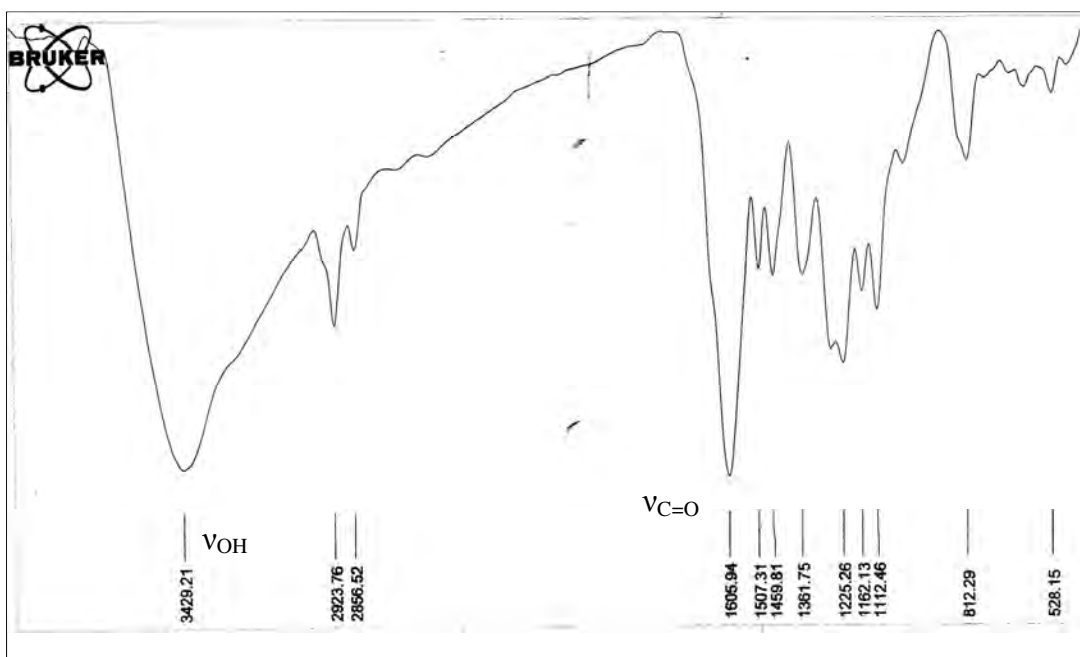


Figura 181. Espectro no IV da substância **24** em KBr

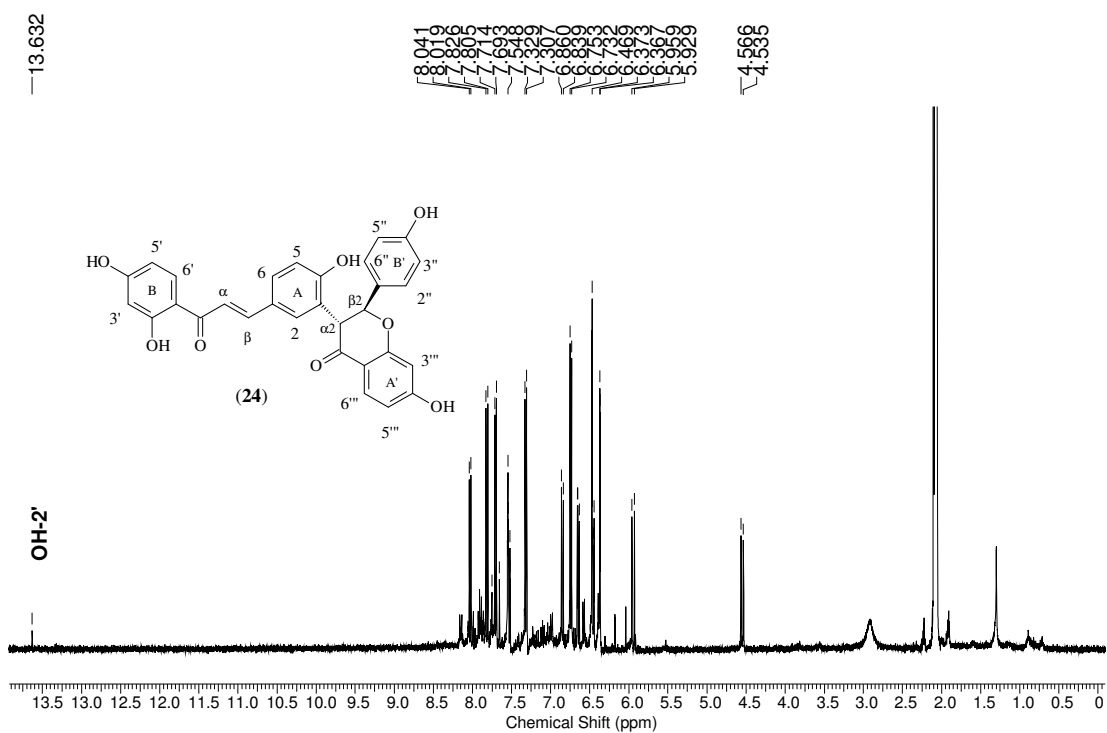


Figura 182. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3COCD_3) da substância **24**

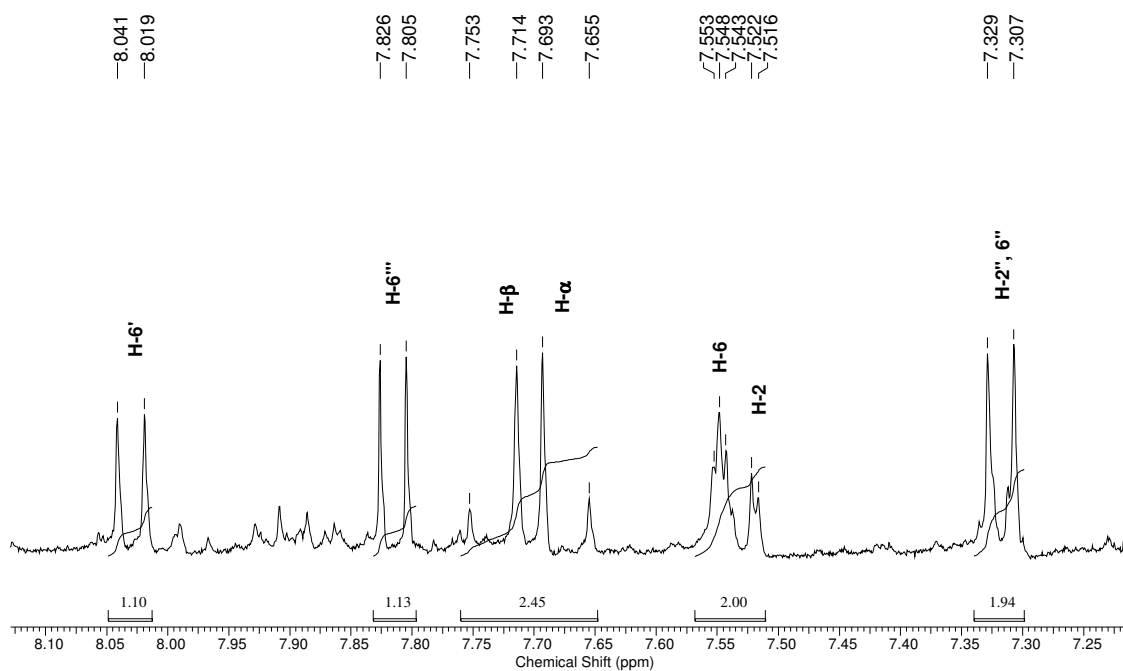


Figura 183. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3COCD_3) da substância **24**, entre $\delta_{\text{H}} 7,28-8,10$ ppm

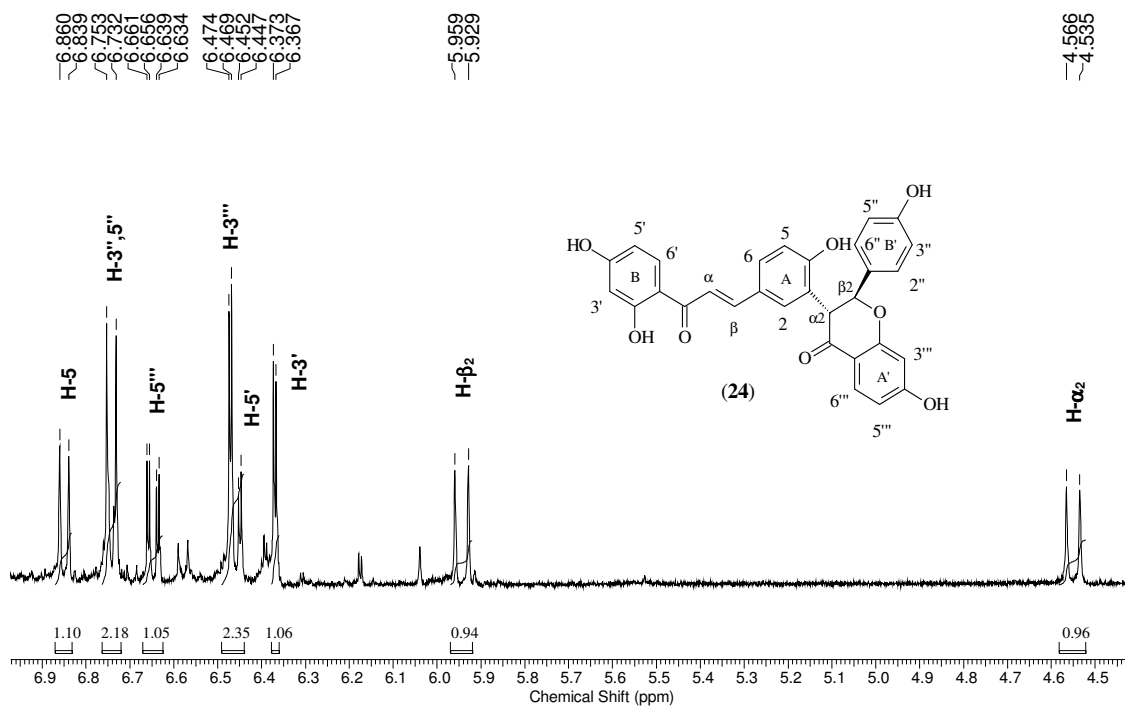


Figura 184. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3COCD_3) da substância **24**, entre $\delta_{\text{H}} 4,50-6,90$ ppm

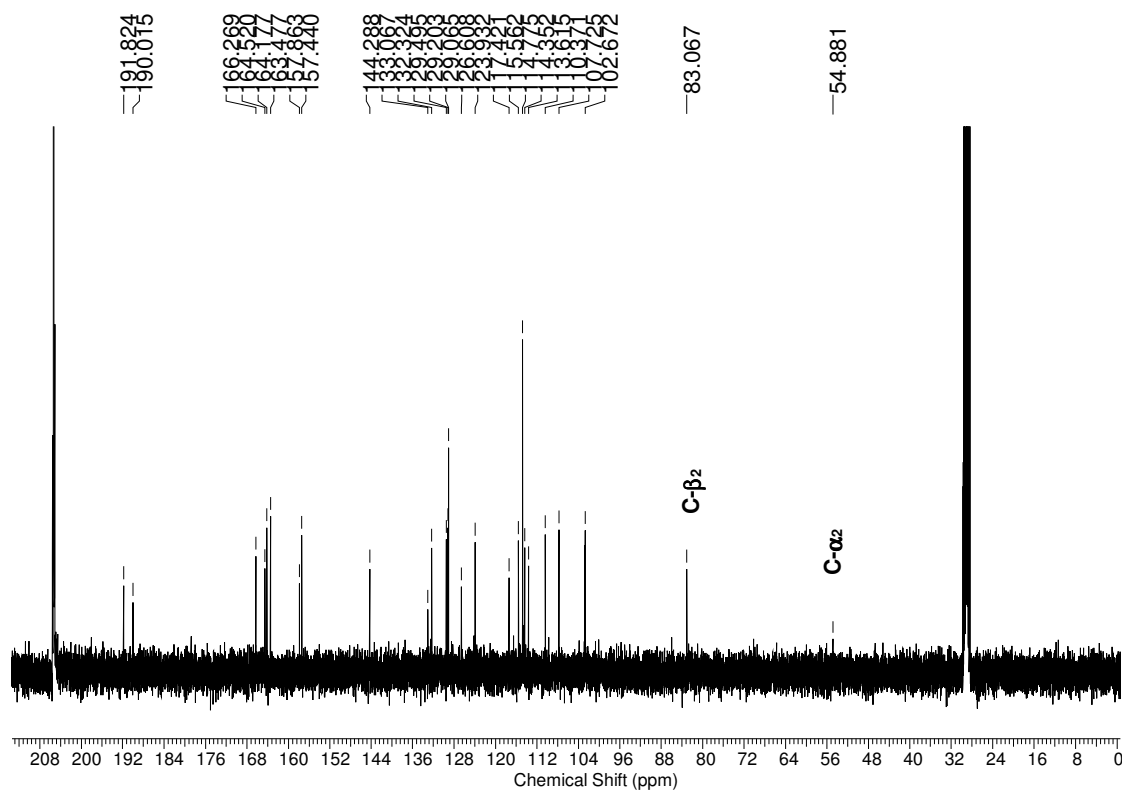


Figura 185. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3COCD_3) da substância **24**

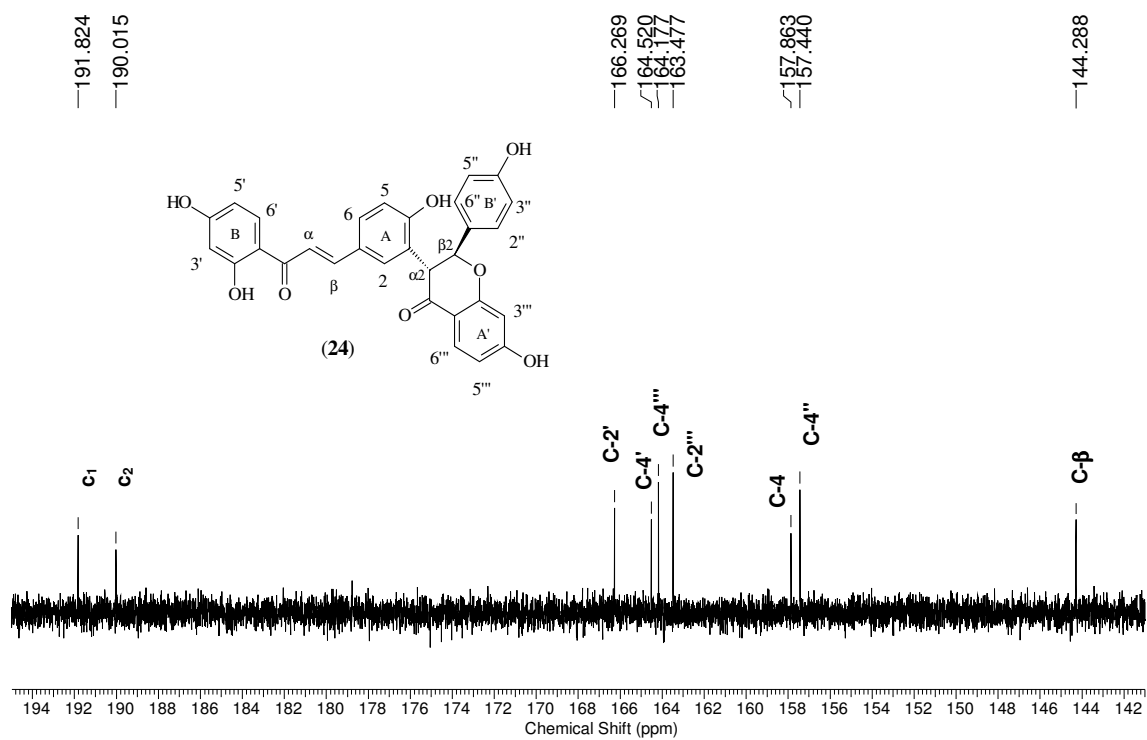


Figura 186. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3COCD_3) da substância **24**, entre $\delta_{\text{C}}142,0\text{-}194,0$ ppm

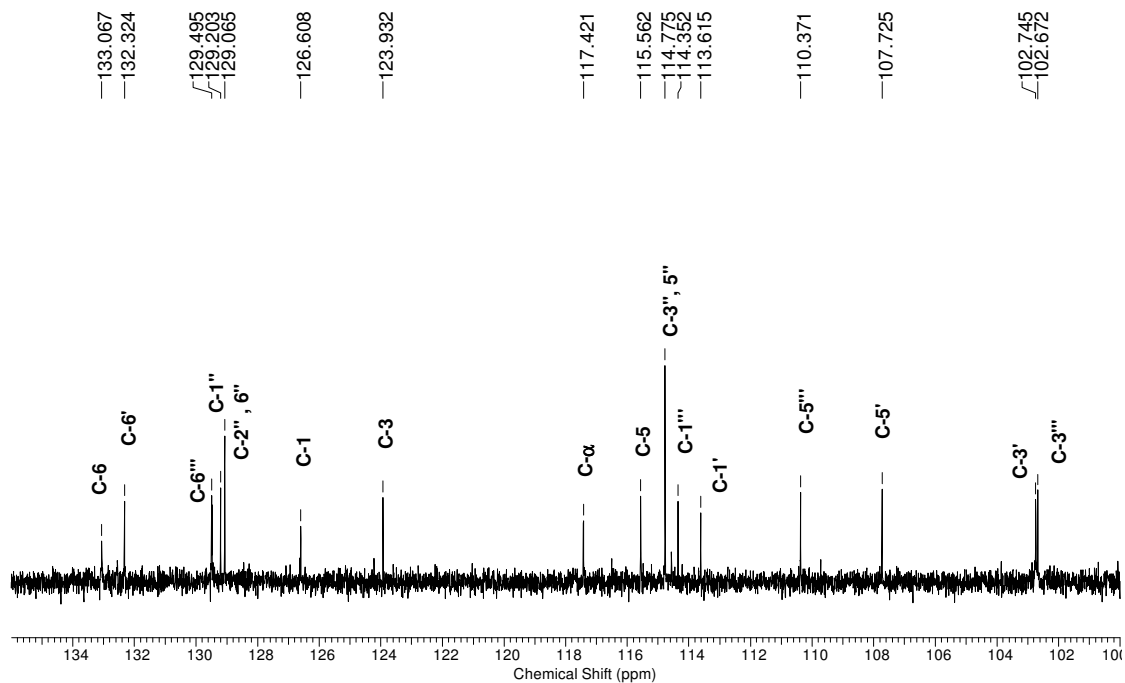


Figura 187. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3COCD_3) da substância **24**, entre $\delta_{\text{C}}100,0\text{-}134,0$ ppm

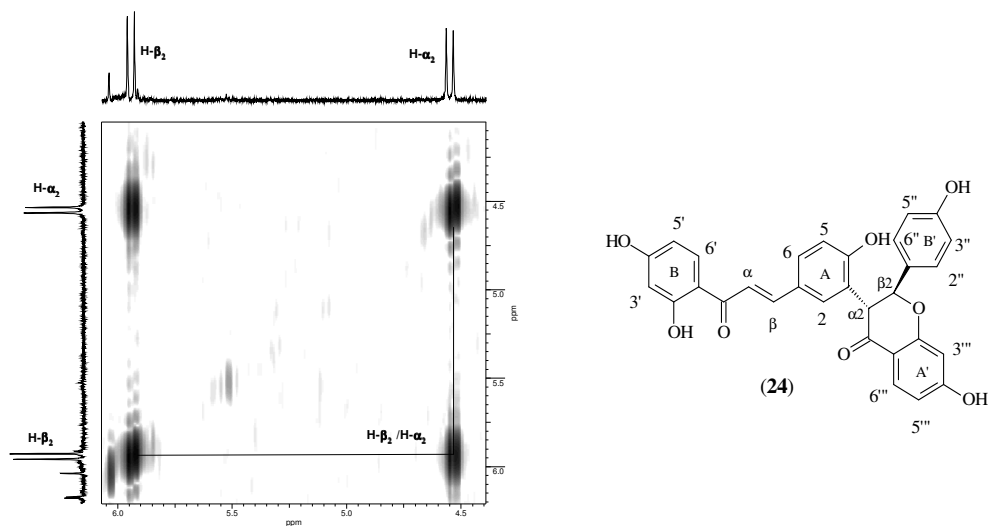


Figura 188. Expansão do espectro de RMN COSY (400 MHz, CD_3COCD_3) da substância **24**, entre $\delta_{\text{H}}4,00\text{-}6,25$ ppm

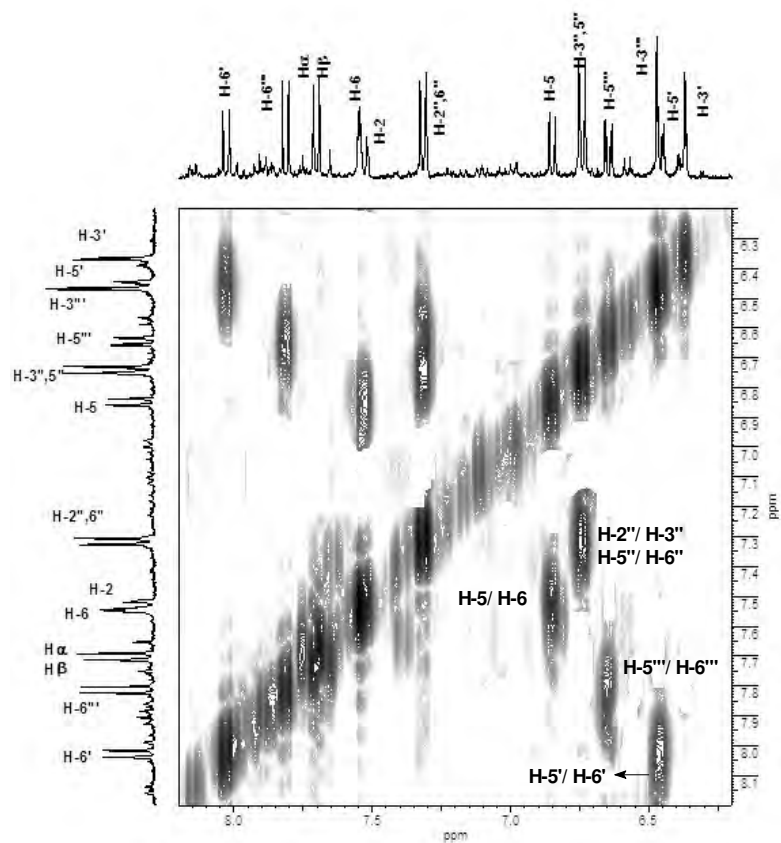


Figura 189. Expansão do espectro de RMN COSY (400 MHz, CD_3COCD_3) da substância **24**, entre δ_{H} 6,30-8,10 ppm

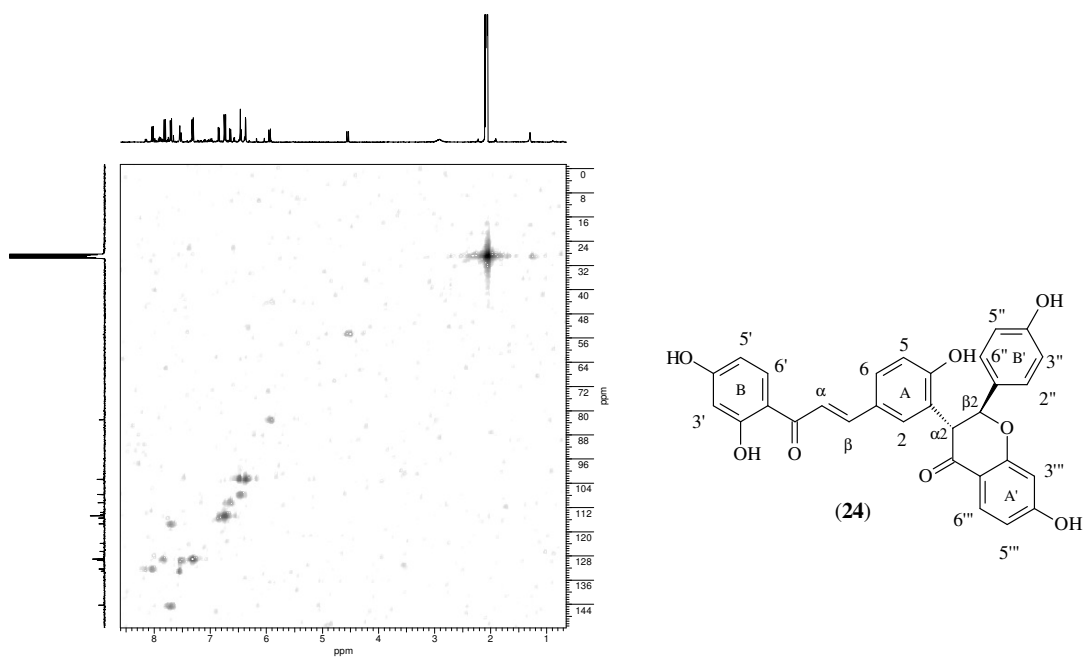


Figura 190. Espectro de RMN de HMQC (400/ 100 MHz, CD_3COCD_3) da substância **24**

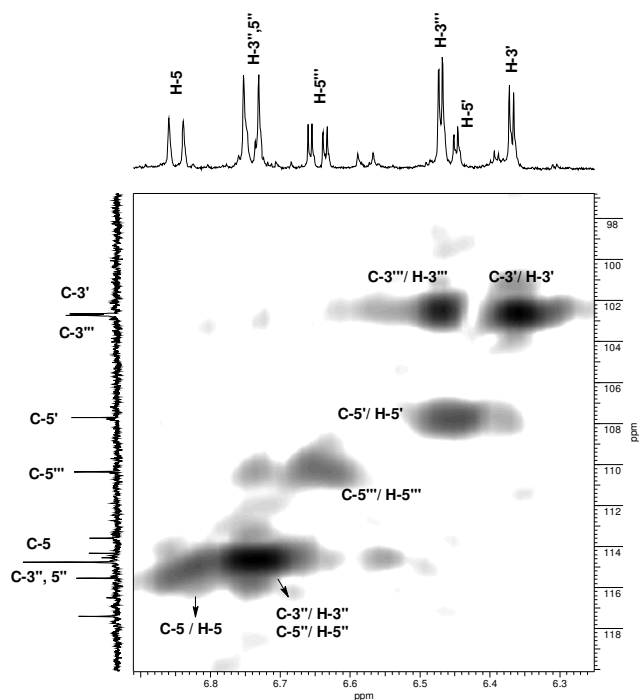


Figura 191. Expansão do espectro de RMN de HMQC (400/ 100 MHz, CD_3COCD_3) da substância **24**, entre $\delta_{\text{H}}6,25\text{-}6,90$ e $\delta_{\text{C}}99,0\text{-}120,0$ ppm

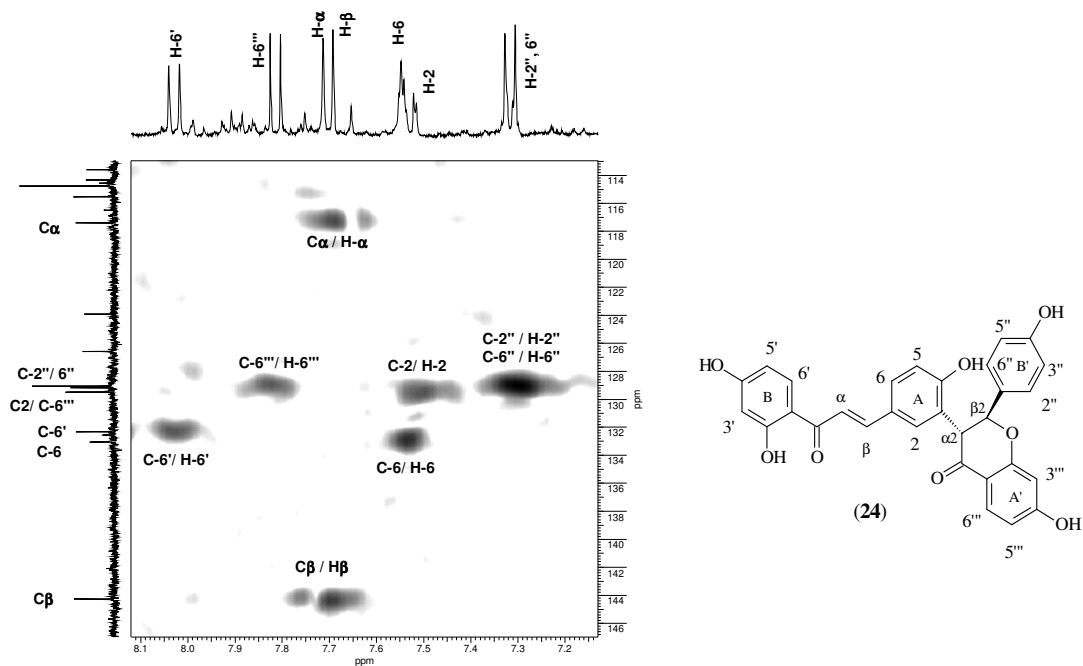


Figura 192. Expansão do espectro de RMN de HMQC (400/ 100 MHz, CD_3COCD_3) da substância **24**, entre $\delta_{\text{H}}7,15\text{-}8,10$ e $\delta_{\text{C}}114,0\text{-}146,0$ ppm

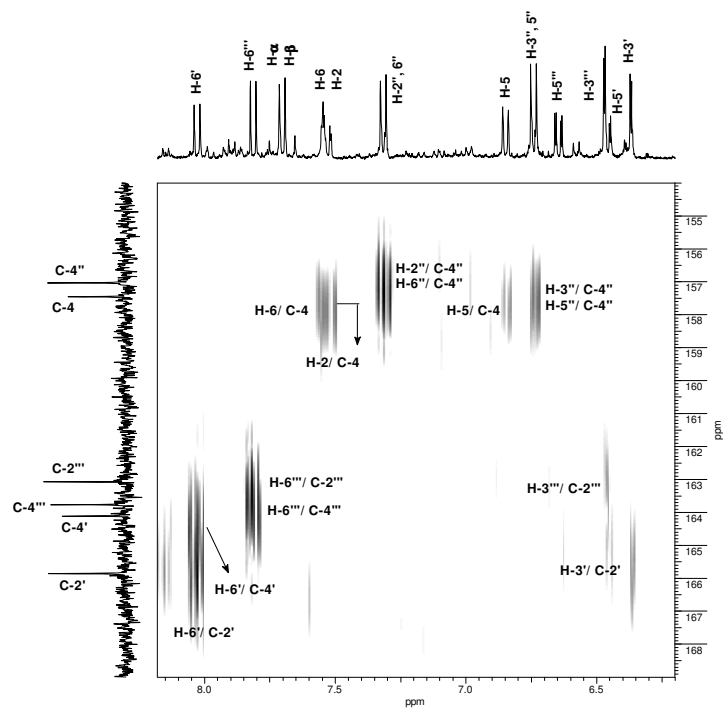


Figura 193. Expansão do espectro de RMN de HMBC (400/ 100 MHz, CD_3COCD_3) da substância **24**, entre $\delta_{\text{H}}6,20\text{-}8,20$ e $\delta_{\text{C}}154,0\text{-}169,0$ ppm

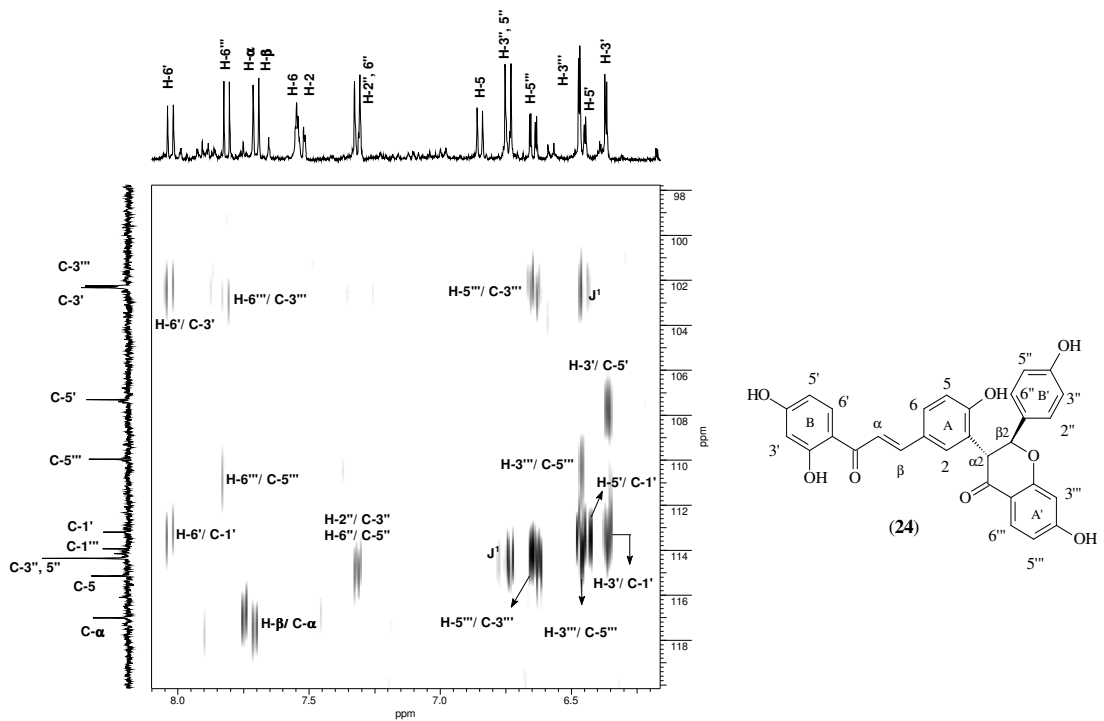


Figura 194. Expansão do espectro de RMN de HMBC (400/ 100 MHz, CD_3COCD_3) da substância **24**, entre $\delta_{\text{H}}5,90\text{-}8,20$ e $\delta_{\text{C}}98,0\text{-}120,0$ ppm

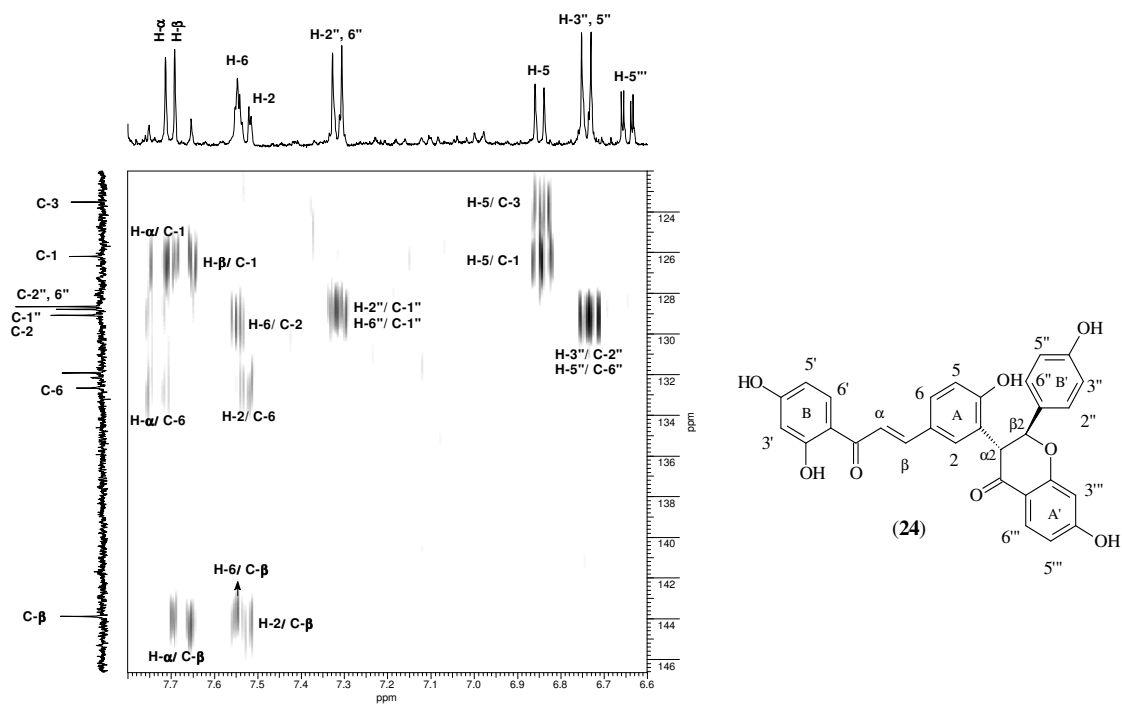


Figura 195. Expansão do espectro de RMN de HMBC (400/ 100 MHz, CD_3COCD_3) da substância **24**, entre $\delta_{\text{H}}6,60\text{-}7,80$ e $\delta_{\text{C}}122,0\text{-}146,5$ ppm

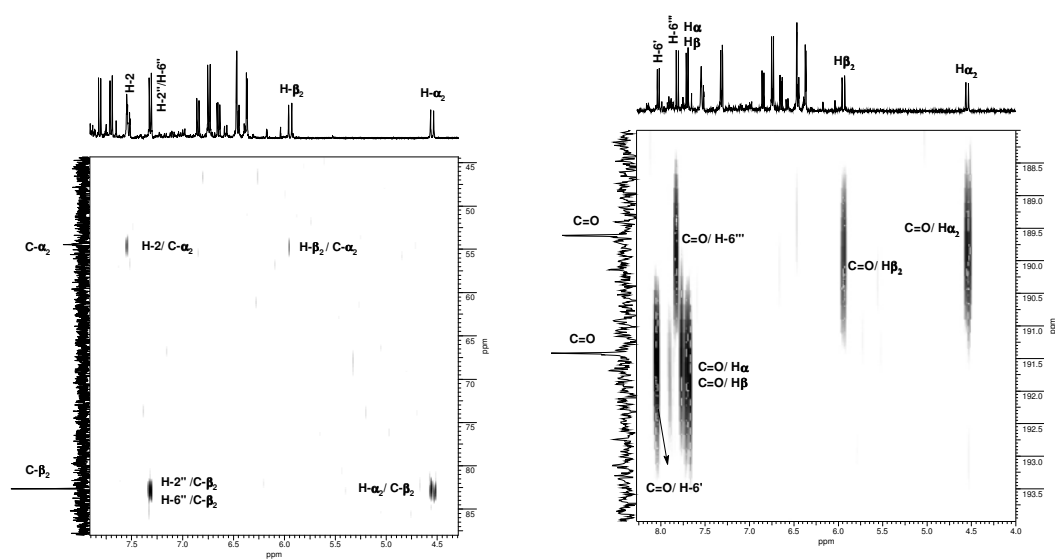


Figura 196. Expansões do espectro de RMN de HMBC (400/ 100 MHz, CD_3COCD_3) da substância **24** **196A** entre $\delta_{\text{H}}4,00\text{-}8,00$ e $\delta_{\text{C}}180,0\text{-}194,0$ ppm **196B** entre $\delta_{\text{H}}4,40\text{-}8,20$ e $\delta_{\text{C}}45,0\text{-}85,0$ ppm

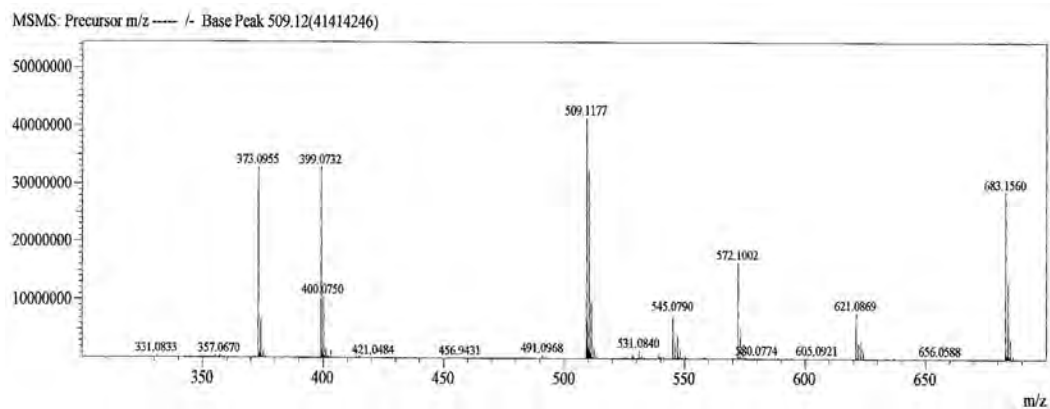


Figura 197. Espectro de massas de alta resolução da substância **24** com detecção de íons negativos

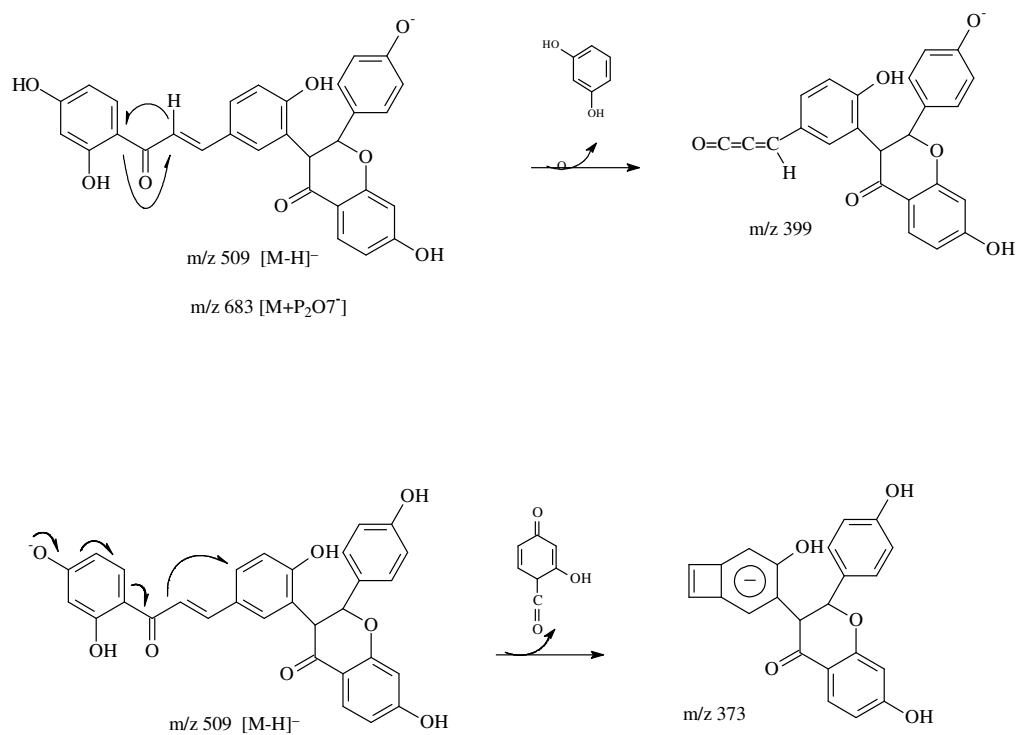


Figura 198. Propostas de fragmentação para da substância **24**

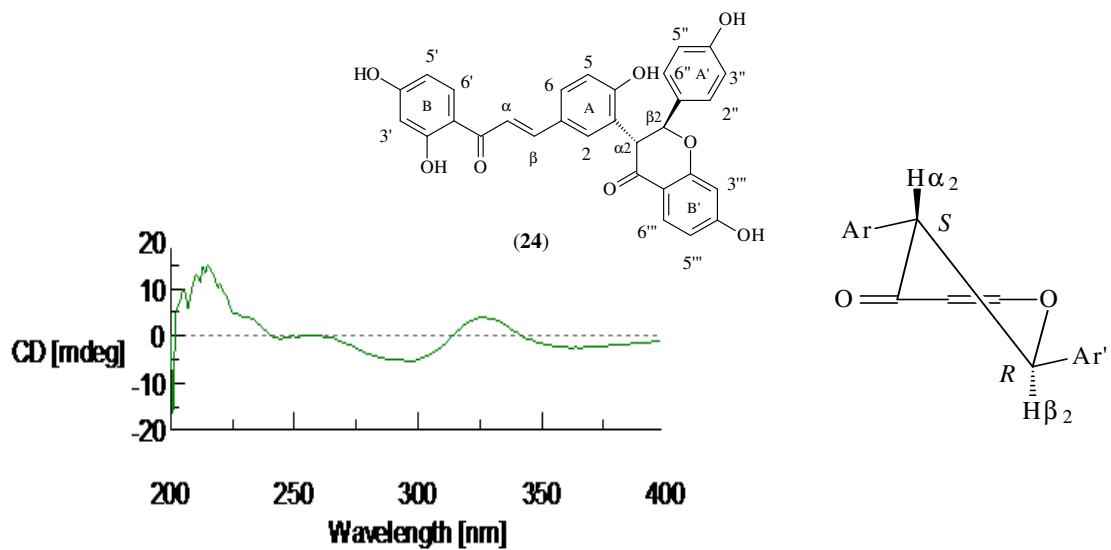


Figura 199. Espectro de DC e projeção dos centros quirais α_2 e β_2 de 24

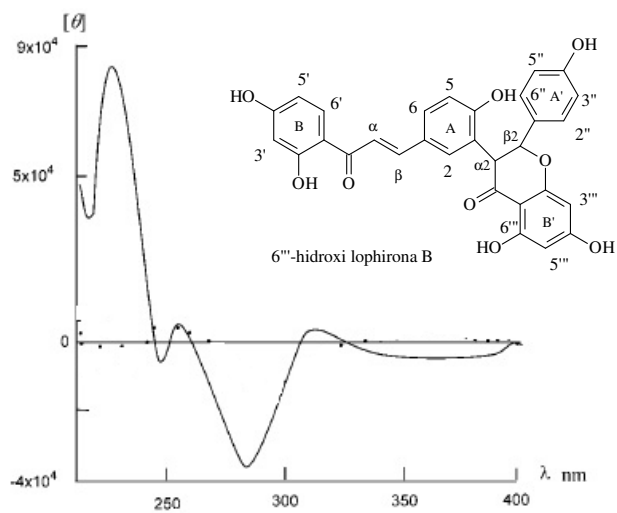
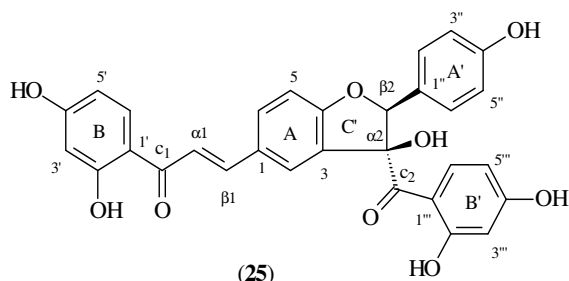


Figura 200. Espectro de DC da 6'''-hidroxi lofirona B (modelo) (KAEWAMATAWONG *et al.*, 2002)

5.3.3-Identificação da substância 25

A substância **25**, obtida como um sólido amarelo, foi identificada como o biflavonóide lophirona K após análise por RMN 1D, 2D e CL-EM, e comparação com dados da literatura (MESSANGA *et al.*, 1994).



O aspecto geral dos espectros de RMN de **25** mostra semelhança com o de **24**, o que nos permitiu inferir que uma das unidades de flavonóide de **25** também correspondia a uma chalcona com o mesmo padrão de substituição de **24**.

O espectro no IV (Figura 201, p. 164) exibiu entre outros sinais, bandas de absorção em 3433 cm^{-1} (estiramento O-H), 1641 e 1606 cm^{-1} (estiramento C=O de carbonila).

O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais de hidrogênios olefínicos típicos de chalcona em $\delta_{\text{H}} 7,92$ (*d*, $J = 15,4$ Hz; H- β_1) e $7,89$ (*d*, $J = 15,4$ Hz; H- α_1). Os anéis A e B da chalcona apresentaram padrão de substituição do tipo 1, 2, 4-trissubstituído (Figuras 202 e 204, p. 164 e 165). Observaram-se sinais em $\delta_{\text{H}} 7,98\text{-}7,99$ (*m*, H-2), $7,08$ (*d*, $J = 8,0$ Hz, H-5) e $\delta_{\text{H}} 7,88\text{-}7,91$ (*m*, H-6), associados aos hidrogênios do anel A, e os sinais em $\delta_{\text{H}} 6,38$ (*d*, $J = 2,4$ Hz, H-3'), $6,47$ (*dd*, $J = 8,6$ e $2,4$ Hz, H-5') e $8,13$ (*d*, $J = 8,8$ Hz, H-6') foram atribuídos ao anel B (Figura 203, p. 165).

A outra unidade do biflavonoide **25** foi determinada como sendo outra chalcona que sofreu uma condensação no anel A, ficando com um sistema benzofurano. Isto foi confirmado pela análise dos espectros de RMN ^{13}C e HMQC com o sinal de carbono quaternário em $\delta_{\text{C}} 90,3$ (C- α_2) e o carbono metínico em $\delta_{\text{C}} 95,6$ (C- β_2) que esta associado ao singlete em $\delta_{\text{H}} 6,03$ (H- β_2) (Figura 211, p.168).

A segunda unidade de chalcona apresentou o anel A' com um sistema AA'BB' e o anel B' também com substituição 1, 2, 4-trissubstituído. Os dupletos em $\delta_{\text{H}} 6,99$ ($J = 8,4$ Hz, H-2'' e H-6'') e $\delta_{\text{H}} 6,57$ ($J = 8,8$ Hz, H-3'' e H-5''), cada um com integração de dois hidrogênios, foram relacionados ao anel A'. Os sinais em $\delta_{\text{H}} 6,12$ (*d*, $J = 2,8$ Hz, H-3'''), $6,34\text{-}6,37$ (*m*, H-5''') e $7,88\text{-}7,91$ (*m*, H-6'''). Esses acoplamentos do sistema ABC do segundo anel desta unidade puderam ser confirmados pelo RMN de COSY (Figuras 208 e 209, p. 167).

O espectro RMN de ^{13}C mostrou 30 sinais (Figuras 205 a 207, p. 165 e 166), sendo que os de carbonos metínicos hidrogenado foram relacionados aos respectivos hidrogênios com o espectro de RMN HMQC (Figuras 210 e 211, p. 168), e os quaternários, especialmente as carbonilas, atribuídas com o auxílio do espectro de RMN HMBC (Figuras 212 a 214, p. 169 e 170).

A análise de **25** usando injeção em sistema quadrupolo com análise de tempo de vôo (Q-TDV) e ionização com elétron spray usando detecção de íons positivos, forneceu o espectro de massas cujo pico em $m/z 527,1304$ (100; M+H) massa calculada de $527,1263$ ($\Delta D = 0,0041$), foi compatível para a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{23}\text{O}_9$ (Figura 215, p. 170). Estes dados e a proposta de fragmentação confirmam a estrutura sugerida para **25** como sendo a lophirona K (Figura 216, p. 171).

A Tabela 17 (p. 163) mostra as atribuições dos deslocamentos químicos de **25** e comparação com dados da literatura para a lophirona K. Considerando que os valores de deslocamento químico detectados para alguns carbonos são relativamente menores dos relacionados na literatura, justificando o efeito γ de proteção do HO-3, pode-se propor a configuração relativa *cis* entre este grupo e o p-hidroxifenil da α -hidroxichalcona. Esta substância foi isolada anteriormente de *Ochna calodendron* (MESSANGA *et al.*, 1994), e está sendo identificada pela primeira vez no gênero *Luxemburgia*.

Tabela 17. Dados de RMN ^{13}C (100 MHz) e ^1H (400 MHz) de **25** em D_3CCOCD_3 comparados com dados da literatura para a lophirona K (MESSANGA *et al.*, 1994).

| Substância 25 | | | Literatura* | |
|---------------|---------------------|-------------------------------------|---------------------|---|
| C | δ_{C} | δ_{H} [mult., J (Hz)] | δ_{C} | Lophirona K δ_{H} [mult., J (Hz)] |
| 1 | n.d. | _____ | 129,4 | _____ |
| 2 | 128,1 | 7,98-7,99 (<i>m</i>) | 128,7 | 7,96 (<i>d</i>) $J=1,7$ |
| 3 | n.d. | _____ | 132,0 | _____ |
| 4 | n.d. | _____ | 163,7 | _____ |
| 5 | 110,2 | 7,08 (<i>d</i>) $J= 8,0$ | 111,3 | 7,07 (<i>d</i>) $J=8,4$ |
| 6 | 132,0 | 7,88-7,91 (<i>m</i>) | 133,4 | 7,88 (<i>dd</i>) $J=8,4$ e 1,7 |
| $\alpha 1$ | 117,9 | 7,92 (<i>d</i>) $J= 15,4$ | 119,2 | 7,86 (<i>d</i>) $J=15,3$ |
| $\beta 1$ | 143,9 | 7,89 (<i>d</i>) $J= 15,4$ | 144,9 | 7,91 (<i>d</i>) $J=15,3$ |
| c1 | 192,3 | _____ | 192,8 | _____ |
| 1' | n.d. | _____ | 114,5 | _____ |
| 2' | n.d. | _____ | 167,5 | _____ |
| 3' | 102,9 | 6,38 (<i>d</i>) $J= 2,0$ | 103,7 | 6,36 (<i>d</i>) $J=2,2$ |
| 4' | n.d. | _____ | 165,7 | _____ |
| 5' | 107,9 | 6,46 (<i>dd</i>) $J= 9,0$ e 2,8 | 108,1 | 6,45 (<i>dd</i>) $J=8,9$ e 2,2 |
| 6' | 131,8 | 8,13 (<i>d</i>) $J= 8,8$ | 133,4 | 8,11 (<i>d</i>) $J= 8,9$ |
| 1'' | 126,6 | _____ | 127,5 | _____ |
| 2'' | 128,0 | 6,99 (<i>d</i>) $J= 8,4$ | 129,3 | 6,97 (<i>m</i>) |
| 3'' | 114,2 | 6,57 (<i>d</i>) $J= 8,8$ | 115,5 | 6,52 (<i>m</i>) |
| 4'' | 157,0 | _____ | 158,4 | _____ |
| 5'' | 114,2 | 6,57 (<i>d</i>) $J= 8,8$ | 115,5 | 6,52 (<i>m</i>) |
| 6'' | 128,0 | 6,99 (<i>d</i>) $J= 8,4$ | 129,3 | 6,97 (<i>m</i>) |
| $\alpha 2$ | 90 | _____ | 91,1 | _____ |
| $\beta 2$ | 95,7 | 6,03 (<i>s</i>) | 96,7 | 6,01 (<i>s</i>) |
| C=O | 199,8 | _____ | 200,8 | _____ |
| 1''' | 113 | _____ | 112,8 | _____ |
| 2''' | n.d. | _____ | 167,5 | _____ |
| 3''' | 102,4 | 6,12 (<i>d</i>) $J= 2,8$ | 103,1 | 6,14 (<i>d</i>) $J=2,3$ |
| 4''' | n.d. | _____ | 165,5 | _____ |
| 5''' | 107,0 | 6,34-6,37 (<i>m</i>) | 108,1 | 6,35 (<i>dd</i>) $J= 7,5$ e 2,3 |
| 6''' | 132,0 | 7,88-7,91 (<i>m</i>) | 136,8 | 8,28 (<i>d</i>) $J= 7,5$ |
| 2'-OH | _____ | 13,62 (<i>s</i>) | _____ | 13,52 (<i>s</i>) |
| 2'''-OH | _____ | n.d. | _____ | 12,54 |

^1H 300 MHz ; ^{13}C 75 MHz, D_3CCOCD_3

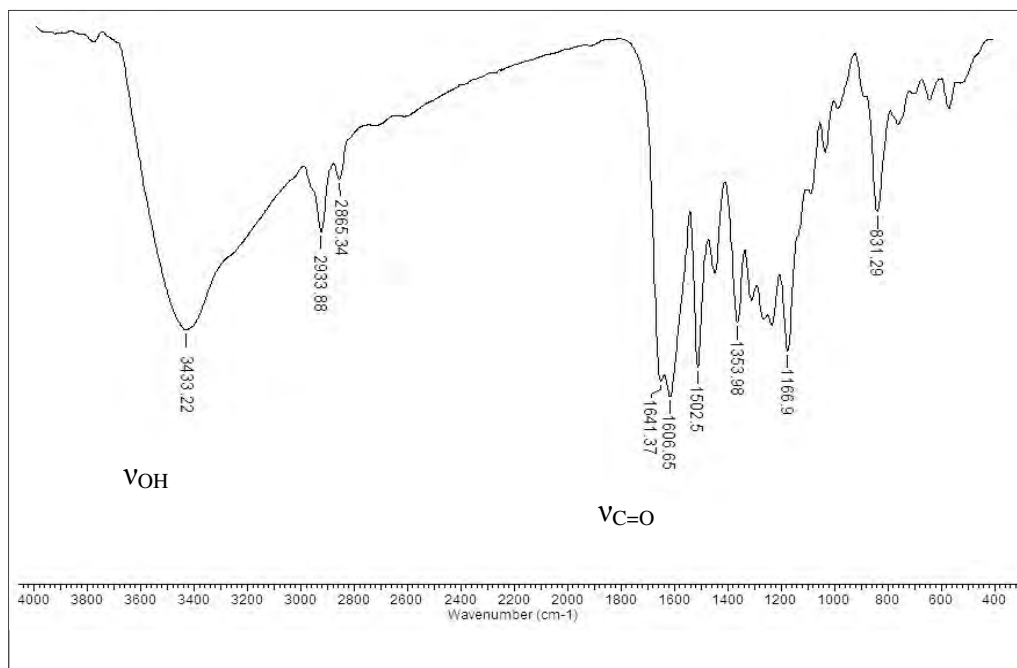


Figura 201. Espectro no IV da substancia 25 em KBr

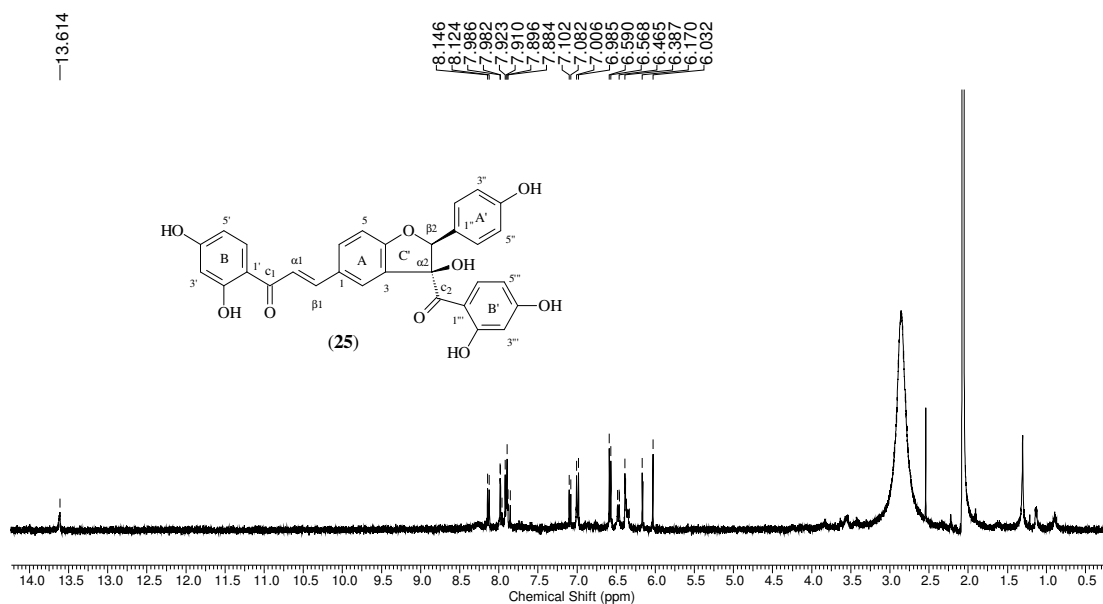


Figura 202. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CD₃COCD₃) da substancia 25

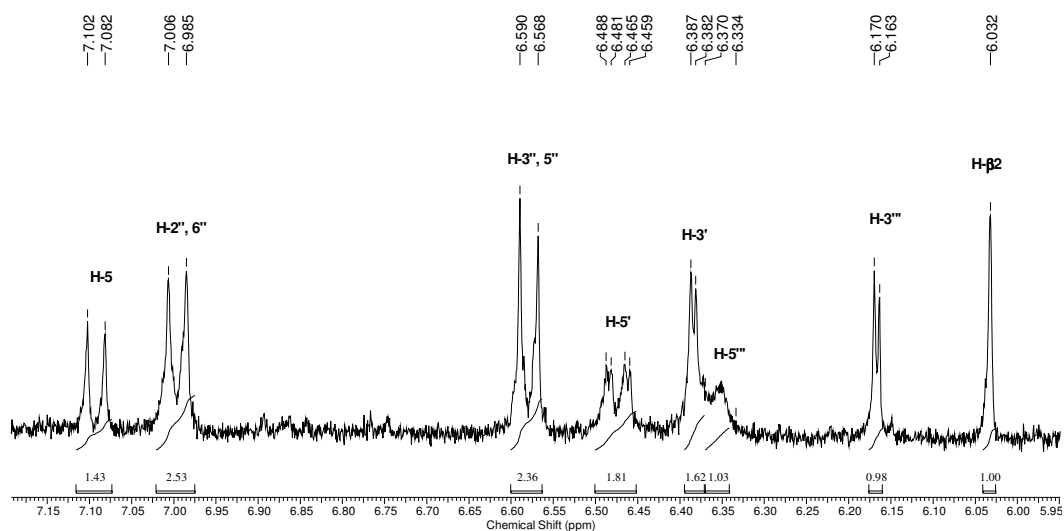


Figura 203. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3COCD_3) da substância **25**, entre δ_{H} 5,95-7,15 ppm

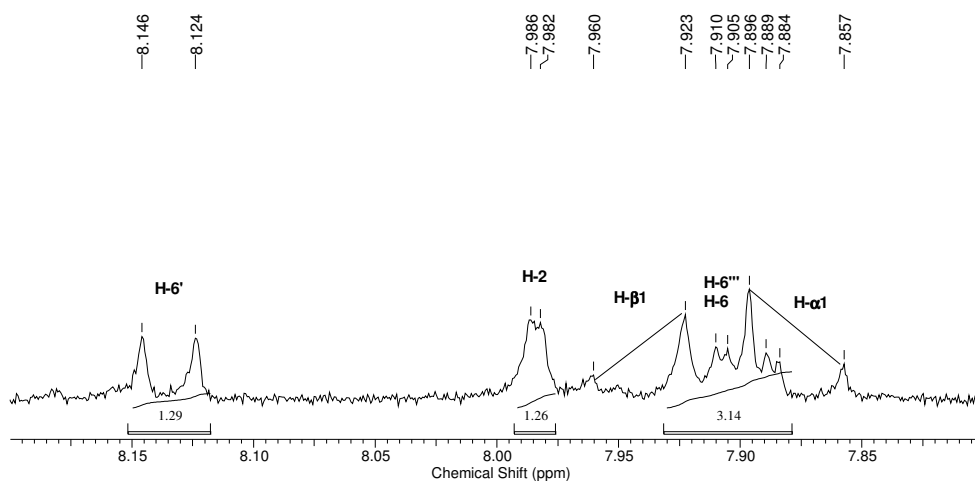


Figura 204. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3COCD_3) da substância **25**, entre δ_{H} 7,80-8,20 ppm

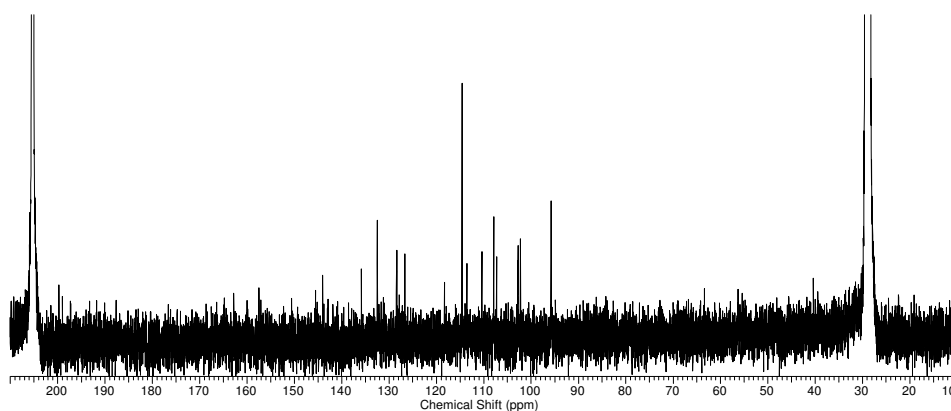


Figura 205. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3COCD_3) da substância **25**

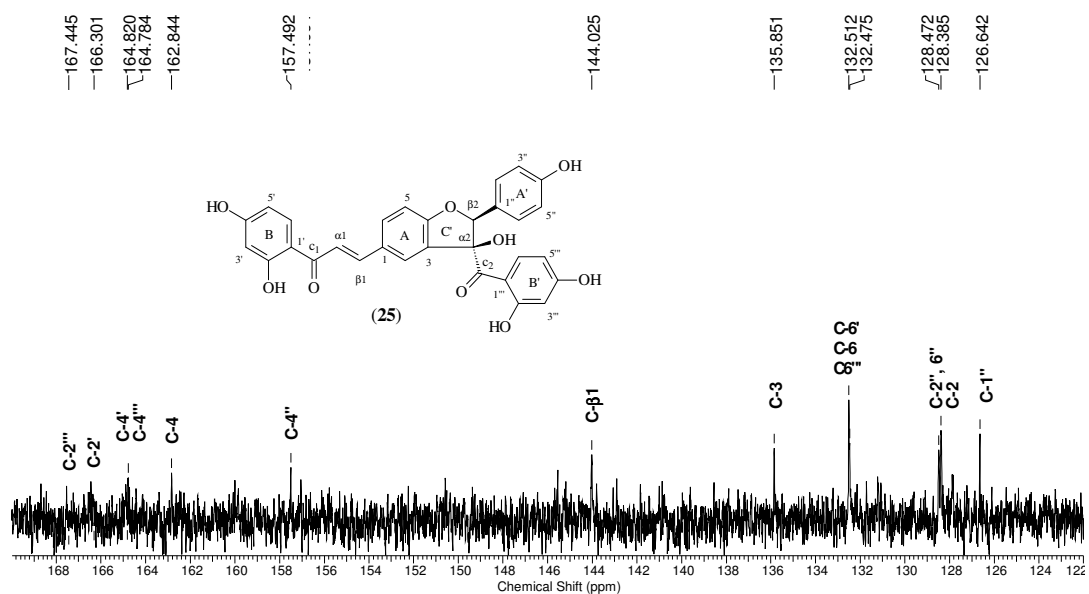


Figura 206. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3COCD_3) da substância **25**, entre δ_{H} 6,95-7,15 ppm

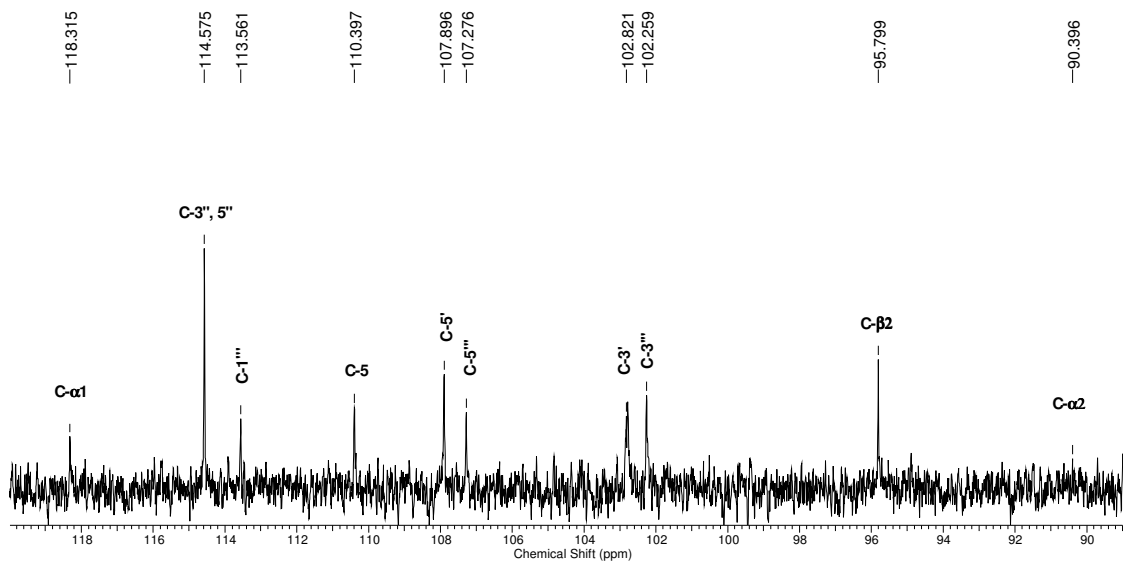


Figura 207. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3COCD_3) da substância **25**, entre δ_{H} 6,95-7,15 ppm

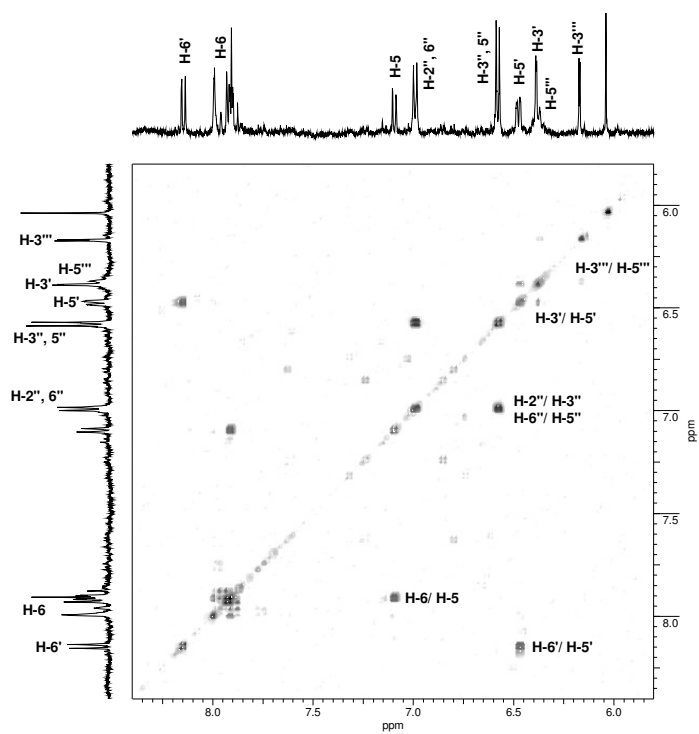


Figura 208. Espectro de RMN de COSY (500 MHz, CD_3COCD_3) da substância **25**, entre δ_{H} 5,90-8,40 ppm

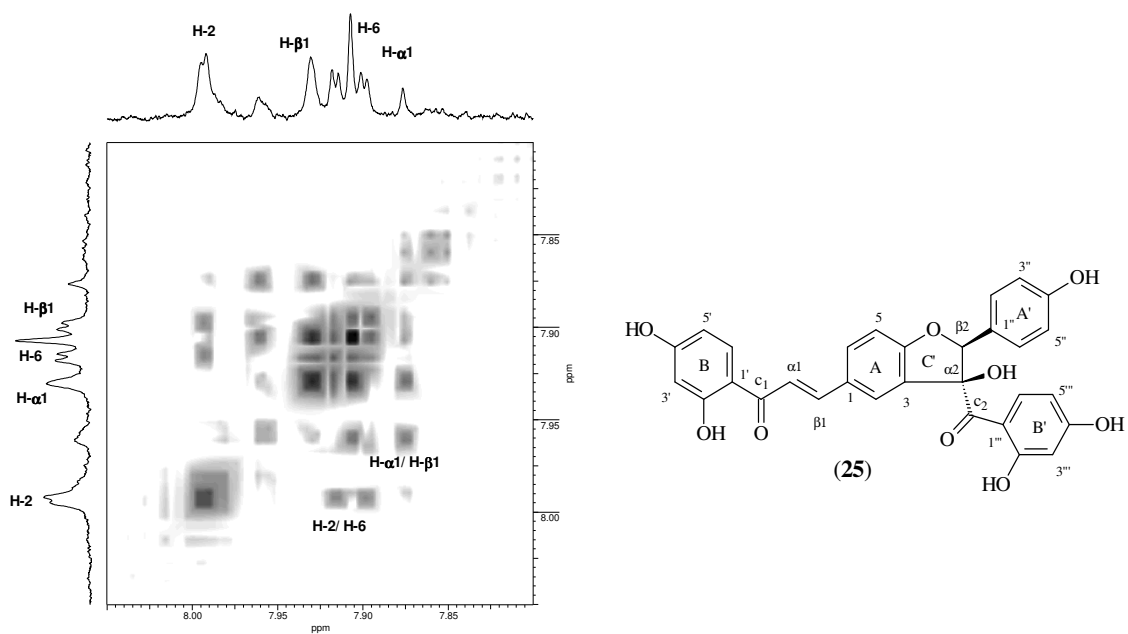


Figura 209. Expansão do espectro de RMN de COSY (500 MHz, CD_3COCD_3) da substância **25**, entre δ_{H} 7,80-8,05 ppm

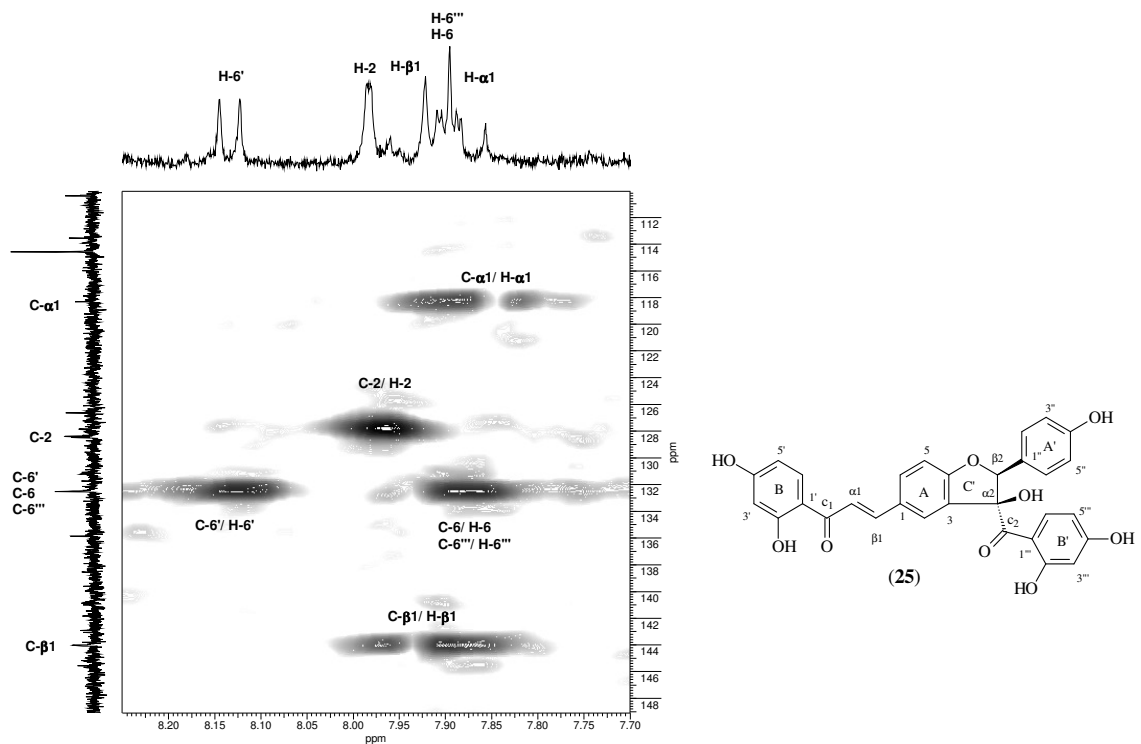


Figura 210. Expansão do espectro de RMN HMQC (400/ 100 MHz, CD_3COCD_3) da substância **25**, entre δ_{H} 8,25-7,70 e δ_{C} 110,0-149,0 ppm

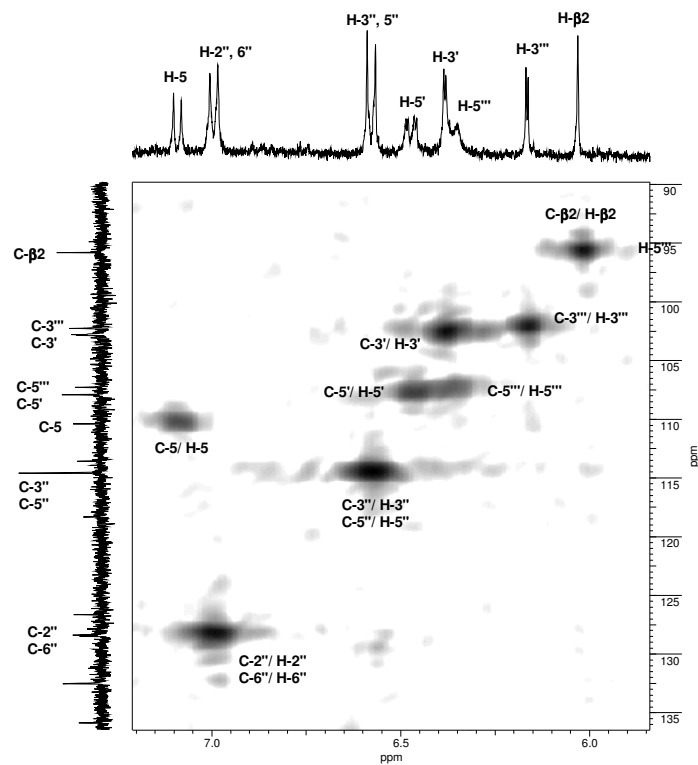


Figura 211. Expansão do espectro de RMN HMQC (400/ 100 MHz, CD_3COCD_3) da substância **25**, entre δ_{H} 5,90-7,20 e δ_{C} 90,0-135,0 ppm

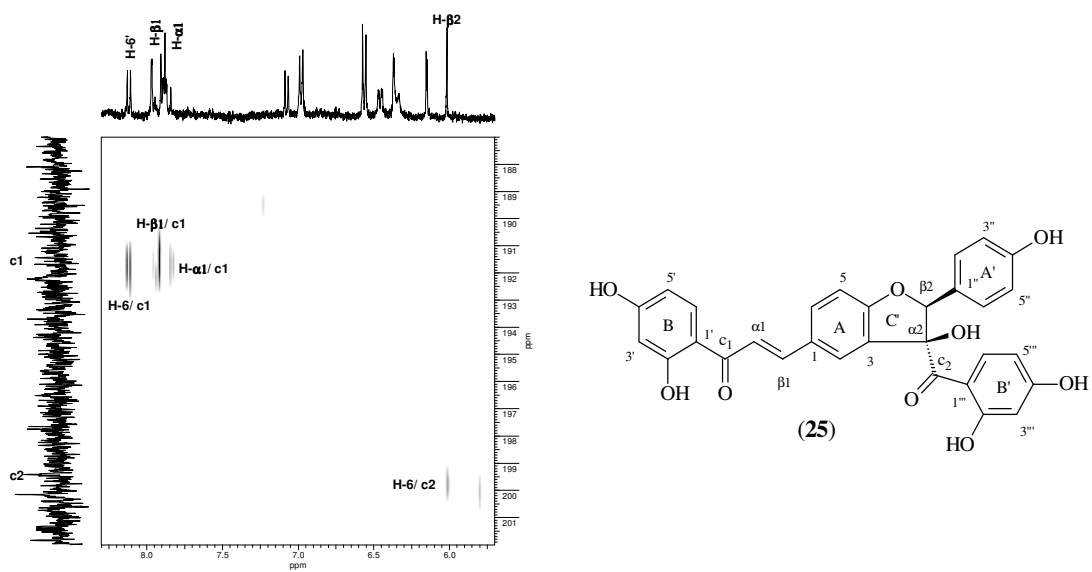


Figura 212. Expansão do espectro de RMN de HMBC (400/ 100 MHz, CD_3COCD_3) da substância **25**, entre δ_{H} 5,70-8,30 e δ_{C} 187,0-202,0 ppm

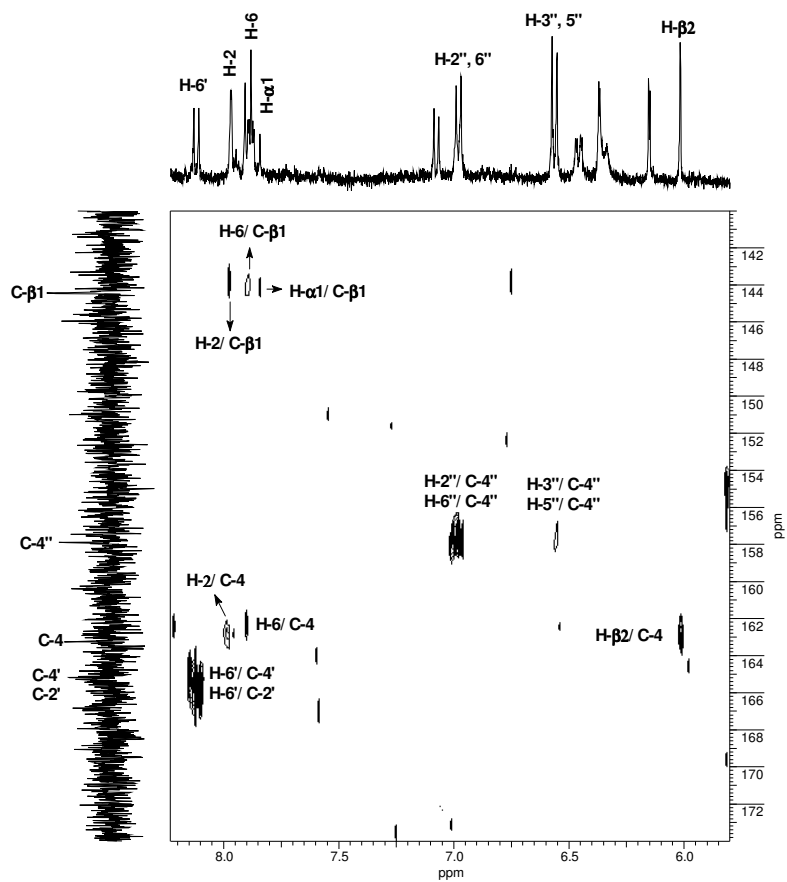


Figura 213. Expansão do espectro de RMN de HMBC (400/100 MHz, CD_3COCD_3) da substância **25**, entre δ_{H} 5,80-8,20 e δ_{C} 140,0-174,0 ppm

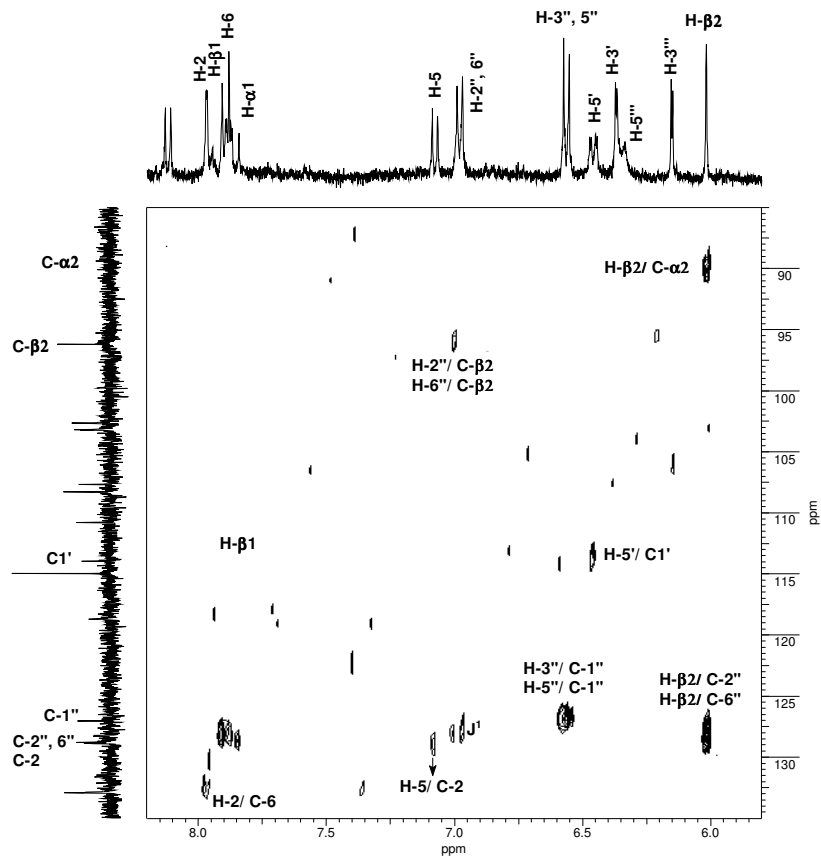


Figura 214. Expansão do espectro de RMN de HMBC (400/ 100 MHz, CD_3COCD_3) da substância **25**, entre δ_{H} 5,80-8,20 e δ_{C} 85,0-135,0 ppm

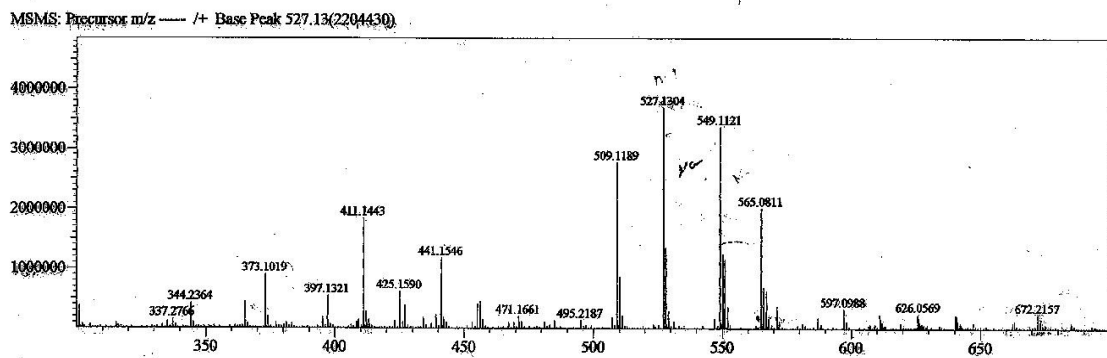
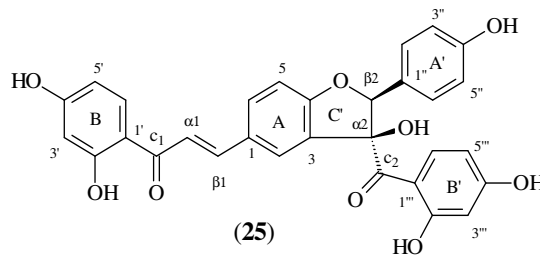


Figura 215. Espectro de massas de alta resolução da substância **25** com detecção de íons positivos

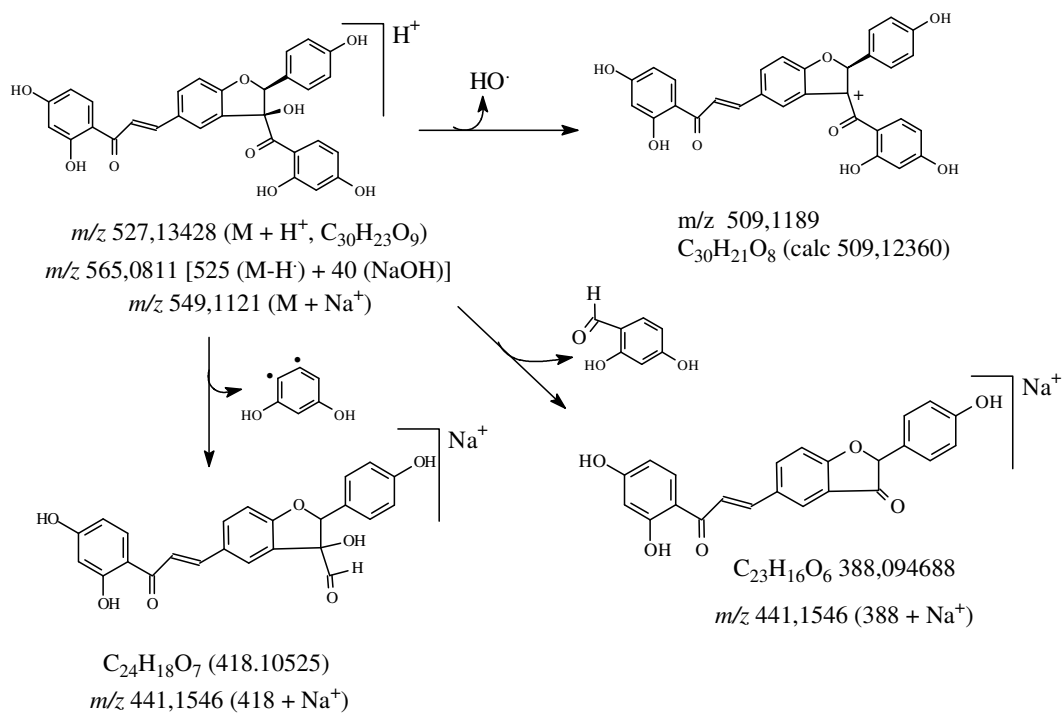


Figura 216. Proposta de fragmentação para substância **25** com detecção de íons positivos

5.3.4-Identificação da substância 26

A substância **26** foi isolada como um sólido amarelo e identificado como o biflavonoide 2'', 3''-diidroochnaflavona após análise do espectro de RMN ¹H e comparação com dados da literatura (DE CARVALHO *et al.*, 2002). Esta substância já havia sido isolada das folhas de *L. nobilis* anteriormente. O reisolamento da mesma e a preparação de seu derivado metilado (item 4.4.3 e 4.4.3.1, p. 29 e 30) serviram para avaliação de atividade biológica. Sendo assim, a análise espectroscópica das mesmas não foi aprofundada.

O espectro de RMN ¹H da substância **26** mostrou sinais na região de hidrogênios de sistema aromático para a unidade da flavona em δ_H 7,80 (*dd*, $J= 8,8$ e $2,4$ Hz, H-6'), 7,70 (*d*, $J= 2,4$ Hz, H-2'), 7,20 (*d*, $J= 8,8$ Hz, H-5'), 6,64 (*s*, H-3), 6,45 (*d*, $J= 2,0$ Hz, H-8) e 6,21 (*d*, $J= 2,0$ Hz, H-6) (Figuras 218 e 219, p. 173). Observa-se, ainda, sinais da unidade da flavanona em δ_H 7,53 (*d*, $J= 8,4$ Hz, H-2'',6''), 7,05 (*d*, $J= 8,8$ Hz, H-3'',5''), 5,97 (*d*, $J= 2,0$ Hz, H-8''), 5,92 (*d*, $J= 2,4$ Hz, H-6'') e duplo dupletos em δ_H 5,55 ($J= 11,2$ e $3,6$ Hz, H-2''), 3,16 ($J= 17,2$ e $11,2$ Hz, H-3''a) e 2,88 ($J= 17,2$ e $3,6$ Hz, H-3''b) (Figura 217, p. 172).

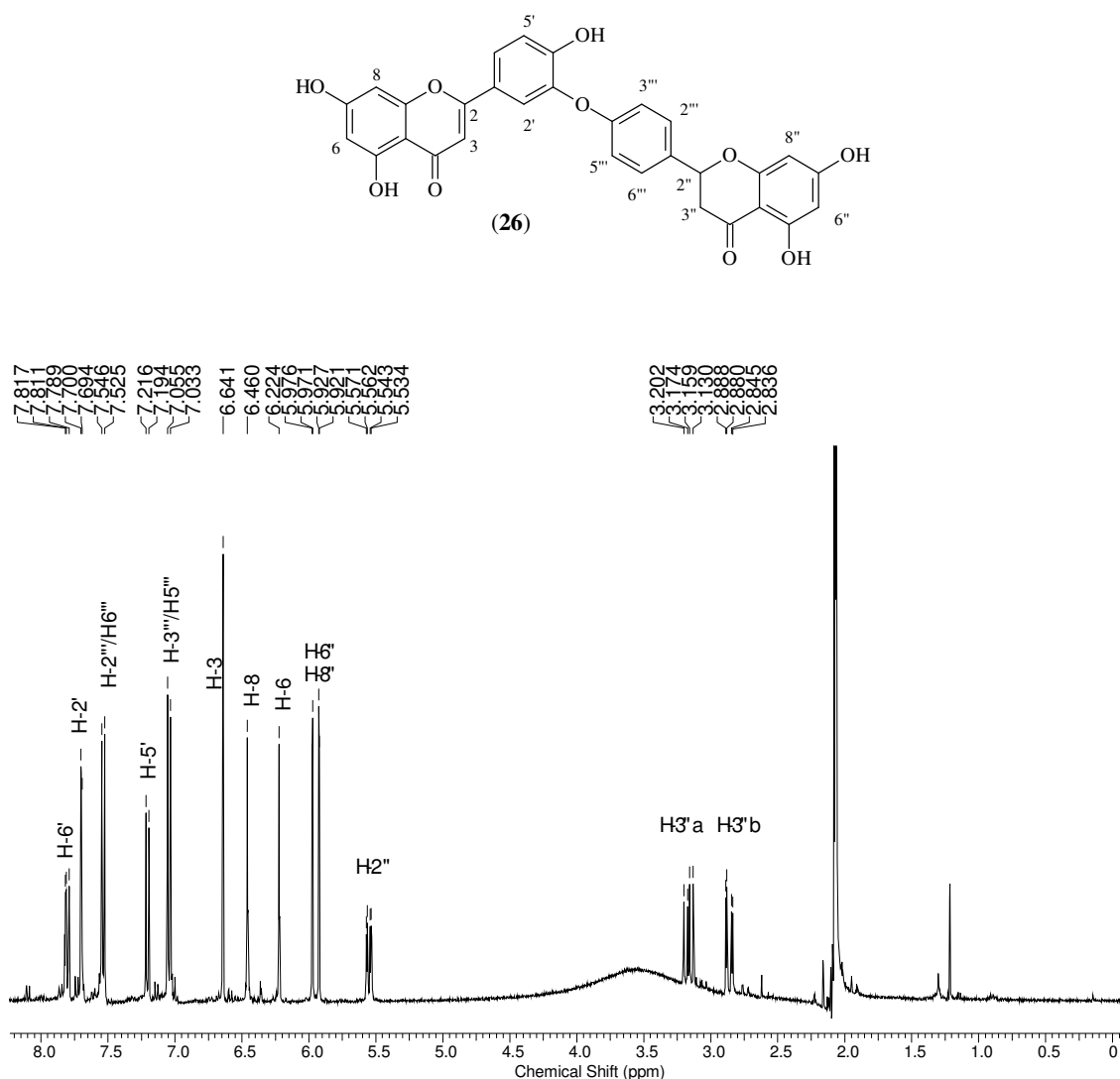


Figura 217. Expansão do espectro de RMN ¹H (400 MHz, CD₃COCD₃) da substância **26**, entre δ_H 7,28-8,10 ppm

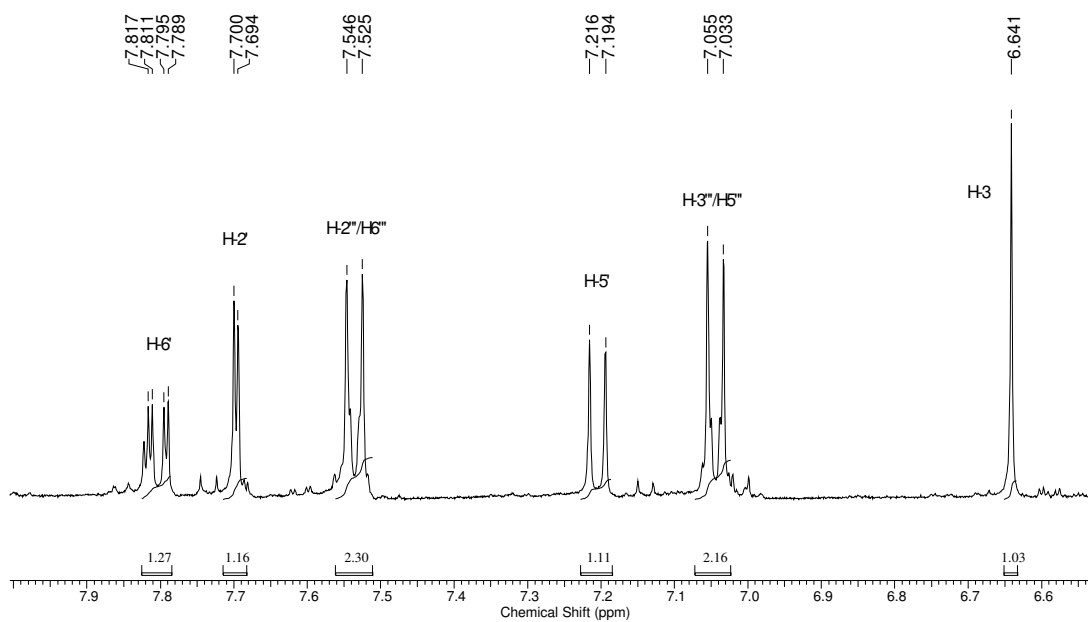


Figura 218. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3COCD_3) da substância **26**, entre δ_{H} 6,60- 7,95 ppm

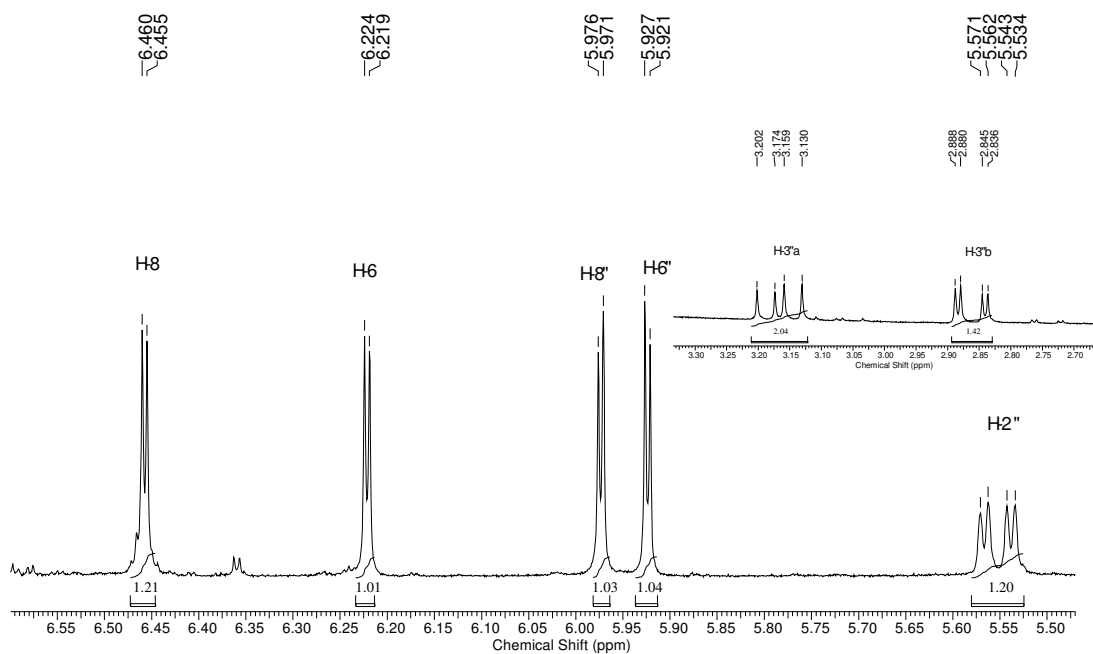


Figura 219. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3COCD_3) da substância **26**, entre δ_{H} 5,50-6,55 ppm

5.3.5-Identificação da substância 26a

A substância **26** foi submetida à reação de metilação com diazometano (item 4.4.3.1, p. 30) obtendo-se o derivado 7, 4', 7''-trimetóxi-2'', 3''-diidroochnaflavona (**26a**). O espectro de RMN de ^1H do derivado **26a** mostrou sinais em δ_{H} 3,95, 3,89 e 3,83, cada um com integração para três hidrogênios, associados às metoxilas 7, 4' e 7'' respectivamente, indicando que a reação de metilação realmente ocorreu (DE CARVALHO *et al.*, 2002) (Figura 220, p. 174).

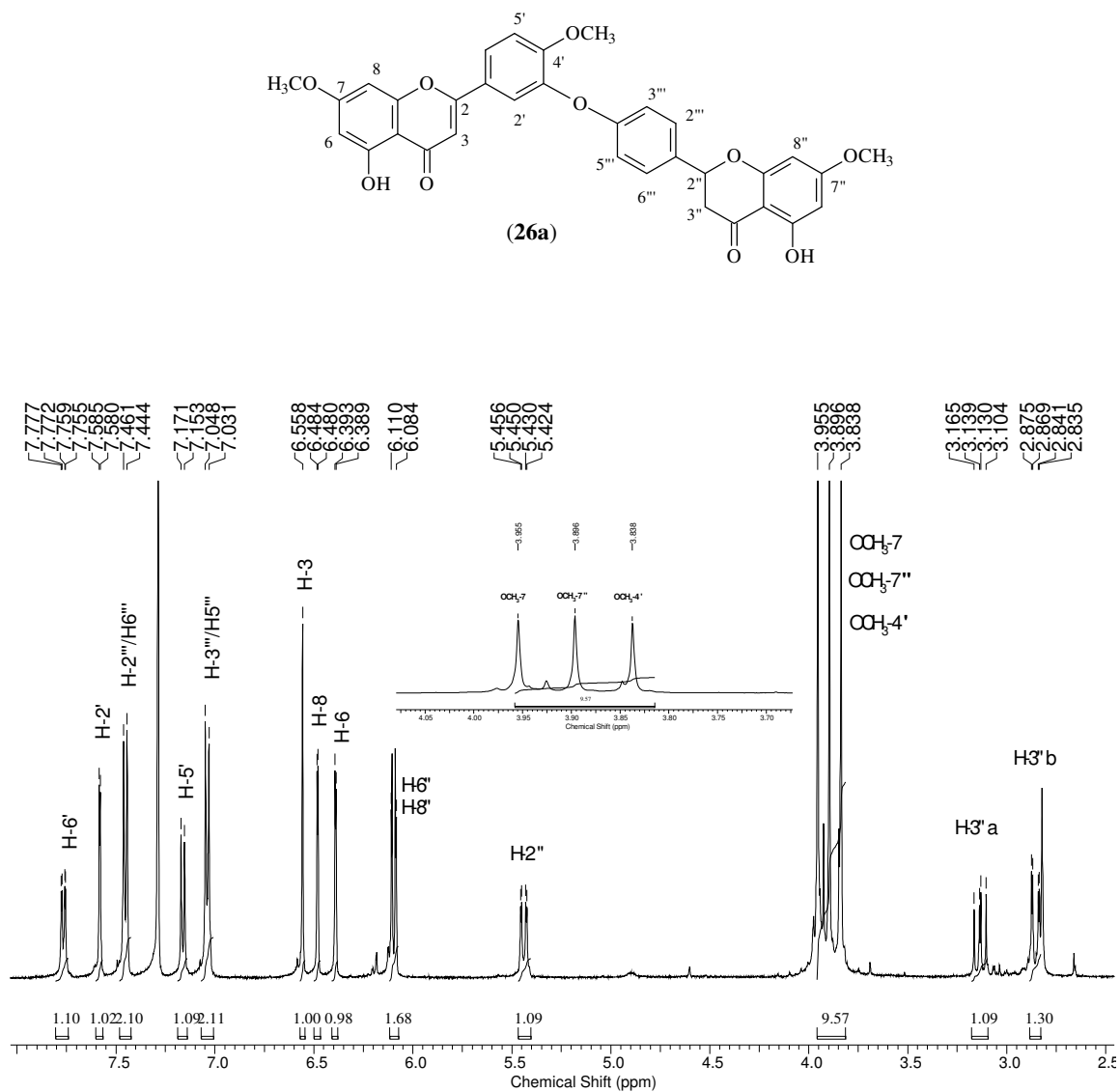


Figura 220. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl₃) do derivado **26a**

6-ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Algumas substâncias isoladas neste trabalho das espécies *Z. rigidum* e *L. nobilis* foram submetidas a ensaios biológicos. Esses ensaios foram efetuados por outros grupos de pesquisa que trabalham em parceria com o Laboratório de Química de Produtos Naturais(UFRRJ). Na escolha das substâncias a serem testadas levou-se em consideração a quantidade isolada da mesma e a quantidade utilizada nos testes.

6.1- Atividade anti-*Trypanosoma cruzi*.

Os ensaios de atividade tripanocida foram realizados no Laboratório de Biologia (IB-UFRRJ) pela aluna de iniciação científica Eveliny Tomas Nery (IB-UFRRJ), sob orientação da Profa. Dr^a Patrícia Fampa Negreiros Lima (IB-UFRRJ) e Profa. Dr^a Débora Decote Ricardo de Lima (IV-UFRRJ).

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, apresenta ciclo de vida heteroxênico alternado entre insetos vetores triatomíneos e hospedeiros mamíferos. No inseto vetor, formas replicativas do parasita, denominadas epimastigotas, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos. Os tripomastigotas são infectivos para o hospedeiro vertebrado. Nos mamíferos hospedeiros, os parasitas apresentam-se nas formas amastigotas intracelulares obrigatórias, que se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos. O parasita é transmitido pelas fezes dos triatomíneos depositadas na pele durante a alimentação sanguínea, e a infecção ocorre através do ferimento causado pela picada.

A doença de Chagas afeta 18 milhões de pessoas na América Latina (WHO, 2005). Estima-se que, especificamente no Brasil, cerca de 6 milhões de pessoas encontram-se nesse momento infectadas com o *T. cruzi*. Segundo a Funasa e a FIOCRUZ, o número de óbitos anual é de aproximadamente 5 mil. No entanto, é provável que esse número esteja subestimado, devido à precariedade do sistema de notificação da doença de Chagas no país. Assumindo-se uma taxa de óbitos estimada na literatura de 0,5%, pode-se calcular uma mortalidade aproximada de 30.000 óbitos/ano. A fase crônica da doença ocorre muitos anos após infecção e é caracterizada por patologias cardíacas e gastrointestinais severas. Infelizmente, mesmo após comemorarmos 100 anos da descoberta da doença por Carlos Chagas, e apesar dos enormes avanços ocorridos nas áreas de bioquímica, parasitologia e biologia molecular, ferramentas que bloqueiem a transmissão da doença de Chagas ainda não foram disponibilizadas.

Não obstante intensa investigação para o desenvolvimento de novas drogas que sejam seguras e eficientes como quimioterapia para a doença de Chagas (URBINA, 2001, 2010), apenas duas drogas para tratamento humano estão disponíveis: benznidazol (BZ; Rochagan, Rodanil [Roche]) e nifurtimox (Lampit; Bayer). Esses nitrofuranos são usados em tratamentos de longa duração e causam importantes reações adversas, que interferem na continuidade do tratamento. Os resultados da quimioterapia são mais bem-sucedidos durante a fase aguda da doença, e aproximadamente 40 a 76% de cura parasitológica podem ser observados. A eficácia do tratamento na fase crônica é baixa ou nula, e a cura parasitológica obtida é de 0 a 20% nos pacientes tratados (RODRIGUES *et al.* 2002, GUEDES *et al.*, 2006).

Sendo assim, no presente projeto investigou-se a atividade anti-*T. cruzi* de 2",3"-dihidroochnaflavona (**26**) sobre formas epimastigotas e tripomastigotas intracelulares de *T. cruzi in vitro*. Avaliaremos ainda os efeitos imunomoduladores destas substâncias sobre células do sistema imune do hospedeiro mamífero.

Efeito do biflavonóide 2'',3''-diidroochnaflavona (**26**) sobre o crescimento de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Neste ensaio foi testado efeito de **26** sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). As formas epimastigotas do parasita, presentes em cultura, são naturalmente encontradas no inseto vetor, não sendo infectivas para os hospedeiros vertebrados. No entanto, são ainda assim muito importantes para triagem de novos componentes com atividade potencial contra doença de Chagas.

Para isso, parasitas após 3 dias em cultura foram plaqueados em placas de 96 poços numa concentração final de 2×10^5 parasitas por poço a 27°C em meio BHI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Foram divididos em grupos: controle (crescido somente em meio e não tratados com a droga); controle DMSO (tratados apenas com o diluente do biflavonóide. O volume de DMSO usado corresponde ao volume da maior concentração da droga utilizada no experimento); grupos tratados com diferentes concentrações do biflavonóide (1 a 150 $\mu\text{g/mL}$). Os poços de cada grupo, em triplicata, foram contados diariamente durante 4 dias pós tratamento com o objetivo de se obter a curva de crescimento dos parasitas. As curvas obtidas mostram que a droga foi capaz de interferir no crescimento do parasita, mesmo em doses baixas (Figura 221, p 176).

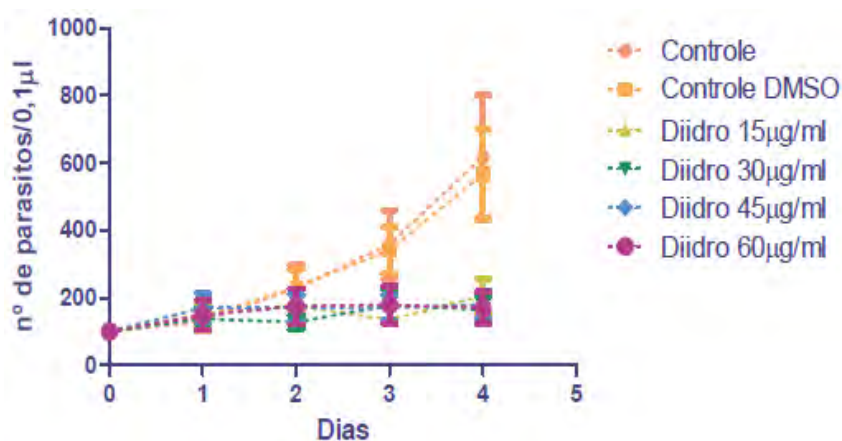
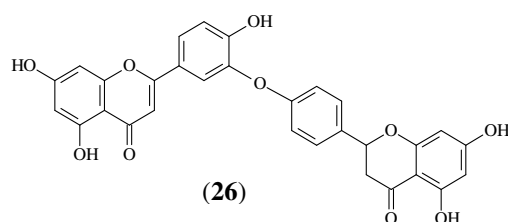


Figura 221. Gráficos de crescimento dos epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratados com a substância **26** nas concentrações de 15, 30, 45 e 60 $\mu\text{g/mL}$



Teste de toxicidade de 2'',3'' diidroochnaflavona (26) sobre macrófagos e linfócitos

O ideal é que a droga afete o parasita, mas não células do hospedeiro. Macrófagos peritoneais de camundongo da linhagem BALB/c foram plaqueados em placa de 96 poços numa concentração final de 5×10^5 células por poço em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37 °C e 5% de CO₂. No dia seguinte foram divididos em grupos e tratados: controle negativo (não tratado com a droga); controle DMSO (tratados apenas com o diluente do biflavonóide. O volume de DMSO usado corresponde ao volume da maior concentração da droga utilizada no experimento); grupos tratados com diferentes concentrações do biflavonóide (5, 15, 30 e 50 µg/mL); controle positivo (tratado com azida, que é reconhecidamente tóxica para essas células). Após dois dias de tratamento, os poços de cada grupo, em triplicata, foram submetidos ao teste de viabilidade do XTT. A porcentagem de células viáveis para cada grupo foi obtida considerando a viabilidade do controle não tratado como 100%.

O mesmo procedimento foi realizado com linfócitos isolados de baços de camundongos BALB/c, que foram plaqueados numa concentração final de 2×10^5 células por poço em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37 °C e 5% de CO₂. O teste do XTT foi realizado nos linfócitos submetidos aos diferentes tratamentos (como descrito acima), no dia seguinte ao plaqueamento.

Como podemos observar na Figura 222 (p. 177), o tratamento com a substância 26 afetou a viabilidade das células.

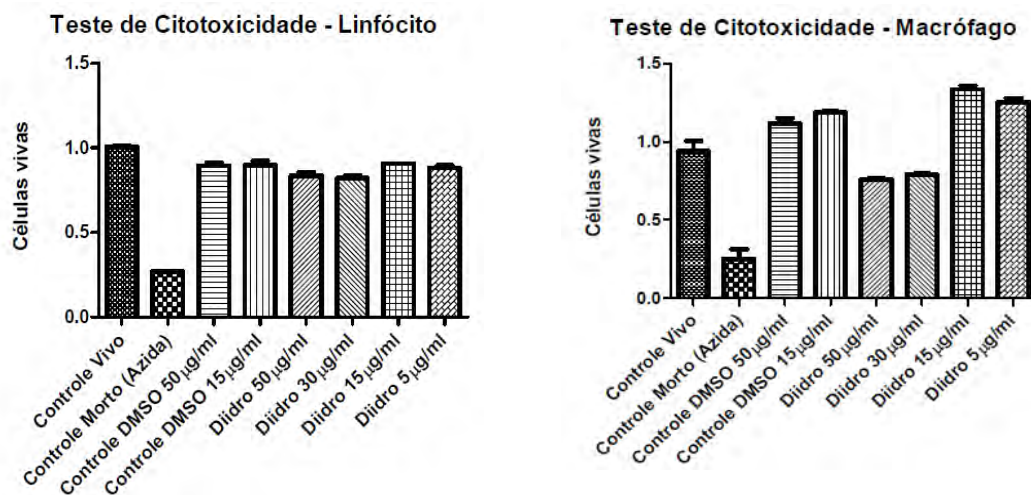


Figura 222. Gráficos de viabilidade celular de linfócitos e macrófagos tratados com a substância 26

6.2- Efeito dos alcaloides *N*-metilatanina (19) e 6-acetonildiidroqueleritrina (21) na alimentação de triatomíneos

Os ensaios de atividade fagorepelência de triatomíneos foram realizados Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz pela pós-doutoranda Dra. Marcela Figueiredo (DEQUIM-UFRRJ).

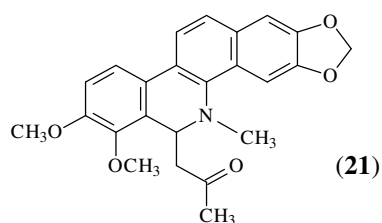
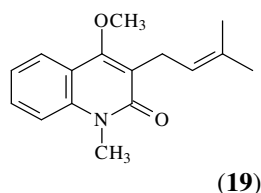
Foram utilizadas ninfas de quinto estágio de *R. prolixus* provenientes de colônia mantida em condições controladas de temperatura e umidade (27°C ± 2 e 65% ± 5) e

alimentadas periodicamente com sangue desfibrinado de coelho, em sistema artificial de membrana. As ninfas são coletadas aleatoriamente após a muda e mantidas em jejum por 15 a 20 dias. Após este período, serão alimentadas no mesmo sistema, em sangue contendo ou não as substâncias a serem testadas.

Ninfas de 5º estágio foram alimentadas com sangue contendo 1, 10 e 100 µg/mL dos alcalóides 6-acetonildiidroqueleritrina (**21**) ou *N*-metilatanina (**19**) diluídos em DMSO. Os insetos foram pesados imediatamente após a alimentação bem como três dias após a alimentação para determinar se houve efeito de fagoinibição (diminuição da quantidade de sangue ingerido) em relação ao controle.

Observou-se que a menor dose da substância **21** (1 µg/mL) levou à fagorepêlência inibindo a ingestão de sangue tratado pelos insetos quando comparado ao controle. Sendo assim, as doses maiores não foram testadas.

Com relação a substância **19** foi observado que a administração oral das três doses consideradas (1, 10 e 100 µg/mL) não levou à fagorepêlência, não havendo alteração na excreção e muda dos insetos tratados.



6.3- Atividade antiviral

O ensaio antiviral foi realizado no laboratório de Virologia do Instituto de Microbiologia Paulo de Goes-CCS-UFRJ sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Villelas Romanos.

Células e Vírus

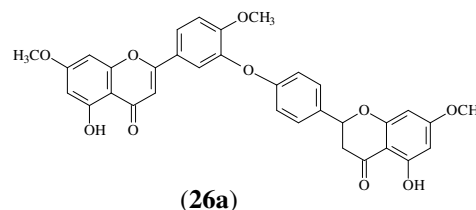
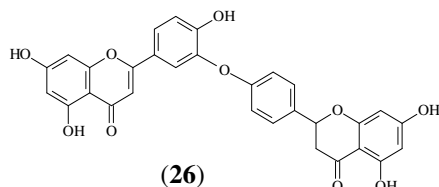
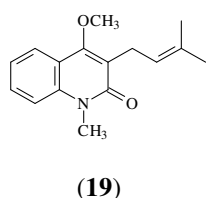
Células Vero (rim de macaco *Cercopitheccus aethiops*) foram mantidas em meio mínimo essencial de Eagle (MEM-Eagle) acrescido de 0,03 mg/ml de glutamina, 50 µg/mL de gamicina, 2,5 mg/ml de fungizona, solução de bicarbonato de sódio a 0,25%, HEPES 10 mM e 10% de soro fetal bovino (SFB) (meio de crescimento) e sem SFB (meio de manutenção). As culturas de células foram incubadas a 37°C em ambiente com 5% de CO₂.

As amostras de vírus herpes simplex tipos 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2) pertencem a coleção do LEDAC (Laboratório Experimental de Drogas Antivirais e Citotóxicas). As amostras virais foram caracterizadas pelo Laboratório de Virose Respiratórias, Entéricas e Oculares (LAVIREO) como sendo dos tipos 1 e 2.

Citotoxicidade

Para a avaliação da atividade antiviral das substâncias *N*-metilatanina (**19**), 2'',3''-diidrochnaflavona (**26**) e 7,4',7''-trimetóxi-2'',3''-diidrochnaflavona (**26a**), foi necessária a

determinação da toxidez para os sistemas hospedeiros empregados. A citotoxidez pode ser determinada baseando-se na alteração morfológica e na viabilidade celular.



a- Observação da alteração morfológica celular

As substâncias **19**, **26** e **26a** foram submetidas a diluições seriadas, na razão 2, utilizando-se meio de manutenção de células como diluente (MEM), e colocadas em contato com as monocamadas de células confluentes. Em seguida, as células foram incubadas durante 48h a 37°C em ambiente contendo 5% de CO₂, sendo examinadas diariamente ao microscópio óptico invertido e comparadas com o controle, na ausência da substância. O efeito citotóxico é detectado pelo aparecimento de células morfológicamente alteradas, presença de vacúolos e/ou descolamento da monocamada da superfície suporte. A maior concentração da substância que não apresenta efeito citotóxico é denominada de concentração máxima não tóxica (CMNT) e é utilizada para os estudos antivirais.

b- Verificação da viabilidade celular

A citotoxidez de substâncias e extratos pode ser determinada através de técnica denominada “dye-uptake” (BOREFREUND & PUEUNER, 1985). A técnica consiste na incorporação do corante vermelho neutro pelas células vivas e sua posterior quantificação por leitura em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 492 nm. A percentagem de células viáveis é obtida pela fórmula: $[(DO \text{ da droga}) - (DO \text{ do controle de células})] / [(DO \text{ do Vermelho Neutro}) - (DO \text{ do Controle de células})] \times 100$, sendo calculada a concentração citotóxica para 50% das células em cultura (CC₅₀).

Titulação dos vírus

A titulação viral é realizada para se estabelecer a TCID₅₀/ml (dose que produz efeito citopático - CPE em 50% das culturas de células). Isso é feito de acordo com um cálculo estatístico estabelecido por REED & MUENCH (1938). Foram realizadas diluições logarítmicas decimais (10⁻¹ até 10⁻⁷) das suspensões virais, utilizando-se o meio de manutenção celular como diluente. Cada diluição foi inoculada em monocamadas de células confluentes (6 poços/diluição, em microplaca de 96 poços). As células inoculadas foram incubadas durante 48h a 37°C em ambiente contendo 5% de CO₂. Após a incubação foi feita a leitura em microscópio óptico invertido.

Avaliação da Atividade Antiviral (triagem)

Redução do título viral

As suspensões virais foram inoculadas em cultura de células (100 TCID50/mL) na presença da substância na CMNT (teste) e na ausência da substância (controle de vírus). As culturas de células foram incubadas durante 48h a 37°C em ambiente contendo 5% de CO₂. Ao final deste período foram determinados os títulos dos vírus (usando o cálculo estatístico de REED & MUENCH, 1938) a partir dos sobrenadantes das células que foram inoculadas na presença e na ausência das substâncias para sabermos se houve redução no título viral. O grau de atividade antiviral é expresso em índice de inibição viral (IIV) e percentagem de inibição (PI).

O IIV foi obtido pela fórmula proposta por LAGROTA (1978):

$$IIV = B - A$$

Onde: B= título do vírus na cultura de células sem substância (controle).

A= título do vírus na cultura de células com substância.

A PI foi calculada de acordo com a fórmula proposta por NISHIMURA *et al.*, (1977):

$$PI = [1 - (\text{antilog } T / \text{antilog } C)] \times 100$$

Onde: T= unidades infecciosas na cultura de células tratadas com substância.

C= unidades infecciosas na cultura de células não tratadas (controle)

Resultados

Os resultados estão listados na tabela 18 que mostra os resultados obtidos em percentual de inibição dos vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2) e adenovírus 19 responsável pela conjuntivite (AdV19). Observa-se que a substância **19** apresentou um percentual elevado de inibição para o adenovírus AdV19.

Tabela 18. Percentual de inibição das substâncias **19**, **26** e **26a** contra os vírus HSV-1 e 2 e AdV19

| Substância | % de inibição (PI) | | |
|------------|--------------------|-------|-------|
| | HSV-1 | HSV-2 | AdV19 |
| 19 | 29,2 | 29,2 | 97,5 |
| 26 | 0 | 0 | 0 |
| 26a | 0 | 29,2 | 0 |

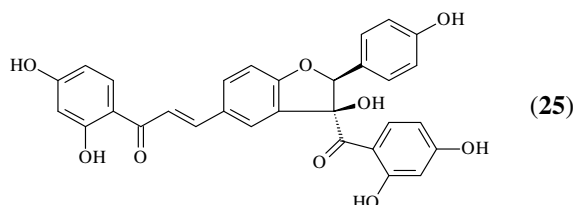
6.4- Atividade inseticida frente as larvas de *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae)

O ensaio de atividade inseticida foi realizado no Laboratório de Transmissores de Leishmanioses – Setor de Entomologia Médica e Forense da Fundação Oswaldo Cruz pela MSc Paloma Martins Mendonça.

Moscas são um grupo de invertebrados que merecem atenção especial devido ao fato de produzirem larvas de insetos em animais domésticos, podendo invadir, ainda, tecidos necrosados. As larvas são capazes de se desenvolverem em vários substratos, incluindo fezes, lixo e cadáver (QUEIROZ *et al.*, 1999; QUEIROZ *et al.*, 1999; GUIMARAES *et al.*, 1978).

Espécies do gênero *Chrysomya* são consideradas os primeiros invertebrados a alimentar-se de matéria orgânica em decomposição. *Chrysomya putoria* está distribuída em todo o país e esta espécie desperta interesse porque é um vetor em potencial de vírus, bactérias e outros patógenos (GREENBERG 1973; GREENBERG 1971; FURLANETTO *et al.*, 1984).

Este ensaio visou a avaliação da atividade inseticida do biflavonoide lophirona K (**25**), observando seu efeito no desenvolvimento pós-embrionário das larvas da mosca *Chrysomya putoria*.



As moscas de *C. putoria* foram coletadas no campus da Fundação Oswaldo Cruz (RJ) e mantidas no Setor de Entomologia Médica e Forense da mesma instituição. A substância lophirona K (**25**) foi diluída em MeOH e testada nas concentrações de 0,5 e 0,25% (m/v).

As larvas de moscas de primeiro instar (neolarvas) foram colocadas sobre papel de filtro em placa de Petri. A substância foi aplicada topicamente em cada neolarva usando grupos de 50 specimens (1 μ L/larva), com quatro repetições para cada concentração, além do grupo controle (água e MeOH). Depois do tratamento o papel com as larvas foi transferido e inoculado com carne bovina podre (50 g), na proporção de 1g de carne por larva, para garantir a alimentação máxima no desenvolvimento.

Ao chegar a maturidade as larvas são pesadas individualmente e transferidas para um tubo de ensaio contendo substrato para pupação. O experimento foi mantido em câmara climatizada a 27 \pm 1 °C e 70 \pm 10% (umidade relativa), com observações diárias até a fase adulta.

Foram analisadas a duração e viabilidade larval, pupal e neolarval ao período adulto, assim como o peso da larva madura e o sexo dos adultos. Os resultados foram analisados pelo ANOVA (p < 0,05) e os valores obtidos foram comparados pelo teste de Tukey-Kramer no nível de significância 0,05 (SOKAL & ROHLF, 1979).

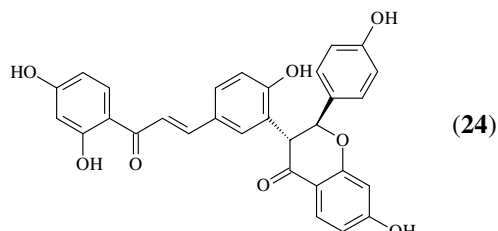
No ensaio realizado observou-se que o período larval foi menor no grupo controle (4,84 \pm 0,54 dias) enquanto que a substância **25** na concentração de 0,5% aumentou esse período (5,42 \pm 0,58 dias). No período neolarval a adulto, também na concentração de 0,5%, houve aumento da duração (10,62 \pm 0,66 dias) quando comparado aos controles de água (9,13 \pm 0,51 dias) e MeOH (9,18 \pm 0,40 dias). No do período pupal não foram observadas diferenças entre os controles e as concentrações testadas do biflavonoide.

As larvas do controle com água foram as menos pesadas ($46,54 \pm 5,60$ mg) e as com MeOH as mais pesadas ($54,99 \pm 4,20$ mg). Não houve diferença estatística na proporção do sexo para todos os grupos.

Esses resultados, apesar de discretos, indicam que a substância **25** afeta o desenvolvimento da mosca *C. putoria* na fase larval e no período neolarval a adulto.

7- ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DA INTERAÇÃO DE LOPHIRONA B (LPB) COM ALBUMINA SÉRICA BOVINA (ASB)

Os estudos espectroscópicos com a lophirona B (**24**) foram realizados no Laboratório de Fotoquímica pelas alunas de iniciação científica Flávia da Silva M. Teixeira e Veridiana A. da Silva sob supervisão do Prof. Dr. Darí Cesarin-Sobrinho (DEQUIM-UFRRJ).



A albumina sérica é a proteína mais predominante no plasma sanguíneo, e por isso, é uma das proteínas mais estudadas [ZSILA *et al.* (2003) e TAKEHARA *et al.* (2009)]. Muitos pesquisadores têm estudado a estrutura e as propriedades da albumina sérica e suas interações com outras proteínas com o intuito de compreender todas as suas funções no organismo.

Albuminas séricas (ASs (em português) ou SAs (em inglês, serum albumin)) são proteínas de maior solubilidade, constituintes do sistema circulatório e têm muitas funções fisiológicas, incluindo a manutenção da pressão osmótica [HE & CARTER, 1992; SUGIO *et al.*, 1999; CUI *et al.*, 2008; YUE *et al.* (2008)] e controle do pH, além da sua ação como transportadoras, distribuidoras e metabolizadoras de inúmeros ligantes endógenos e exógenos (por exemplo, fármacos, metabólitos, ácidos graxos, amino ácidos (geralmente triptofano e cisteína), hormônios, esteróides, cátions e ânions, metais (como cálcio, cobre, zinco, níquel, mercúrio, prata e ouro etc.) resultando no aumento de solubilidade de compostos bioativos no plasma, diminuindo a sua toxicidade, e/ou protegendo contra a oxidação da ligação do ligante (composto bioativo).

A ligação entre ligantes (compostos bioativos) e ASs é um fator determinante e importante para a farmacodinâmica e farmacocinética da droga, dependendo da concentração de droga administrada, podendo afetar a distribuição e a eliminação da droga (HE *et al.*, 2005; CUI *et al.*, 2007; YUE *et al.*, 2008; STAN *et al.* 2009)

Neste trabalho decidiu-se estudar o comportamento fotofísico da substância **24**, lophirona B (LPB) frente a uma solução de albumina (carreador de moléculas) sérica bovina (ABS) ($1,0 \times 10^{-5}$ mol/L) tamponada com PBS (pH = 7,4), utilizando UV-vis, fluorescência e dicroísmo.

A Figura 223A (p. 184), mostra que a ASB apresenta uma banda de absorção intensa em torno de 208 nm, assim como uma segunda banda de absorção em torno de 280 nm. A Figura 223B (p. 184), mostra que a supressão da fluorescência da ASB pela LPB como consequência do aumento da concentração da LPB é acompanhado de um deslocamento batocrômico no $\lambda_{(em)}$, indicando à possível interação LPB/ASB. A Figura 224A (p. 184), mostra a integral de sobreposição entre os espectros de emissão/absorção do sistema LPB/ASB, utilizado para calcular o raio de Forster (r), o valor de $r = 4,26$ nm ($r < 7$ nm), sugere que ocorreu, um processo de supressão estática o que é sustentado pelo alto valor encontrado para a constante de supressão ($K_q = 1,57 \text{ E}+13$).

Os espectros de dicroísmo circular (Figura 224B, p. 184) mostram que a adição da LPB à ASB influenciou na sua elipticidade, levando a uma diminuição da % de α -hélice da estrutura secundária da proteína (ASB), sendo isso um indicativo do processo de interação entre LPB/ASB.

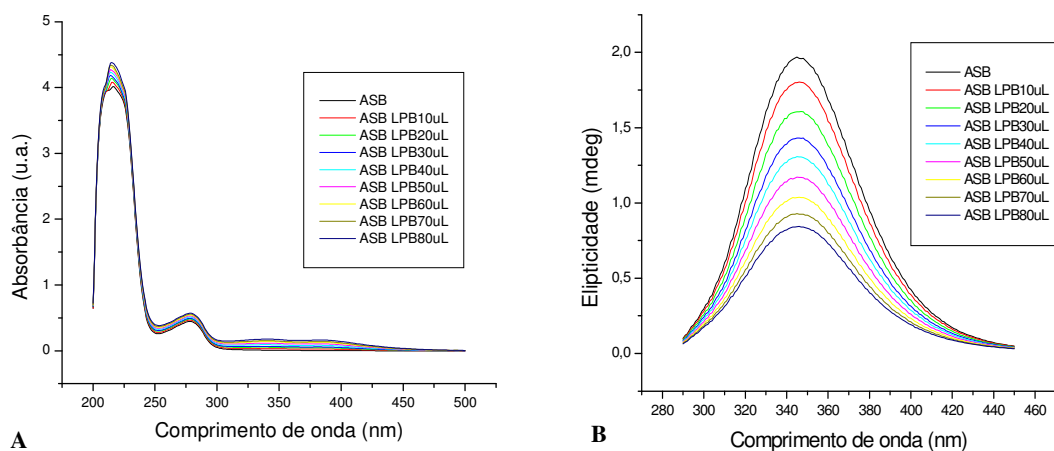


Figura 223A. Espectro de absorção no UV-Vis de LPB em solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L

Figura 223B. Espectro de supressão da emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) da ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L por LPB a $T = 293K$

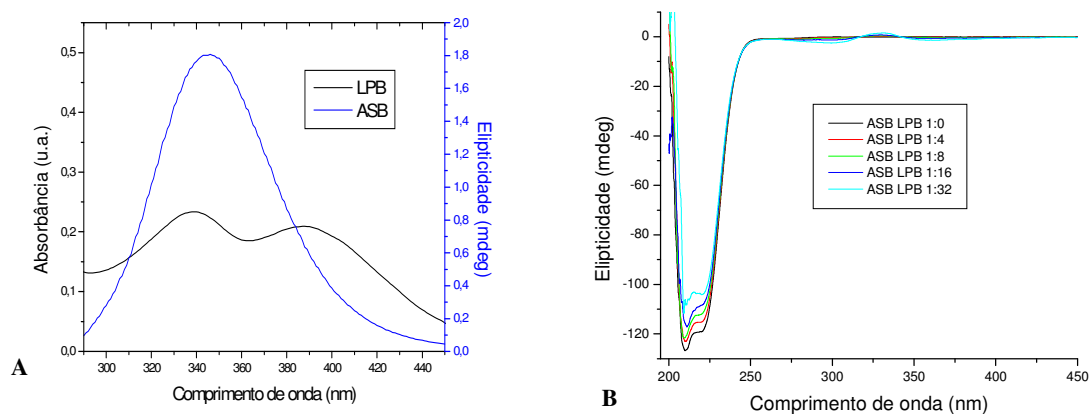


Figura 224A. Sobreposição entre os espectros de emissão/absorção para o sistema LPB/ASB

Figura 224B. Espectro de dicroísmo circular de LPB em ASB (pH = 7,4), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:LPB, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L

A Figura 225 (p. 185) mostra os resultados obtidos para os estudos de supressão de fluorescência da albumina ASB pela LPB, calculados a partir da equação de Stern-Volmer, Stern-Volmer modificada e vant'Hoff, permitindo assim obter informações sobre os valores termodinâmicos de ΔG^o (-28, 5 kJ/mol), ΔH^o (14,2, kJ/mol) e ΔS^o (41,7 kJ/mol).

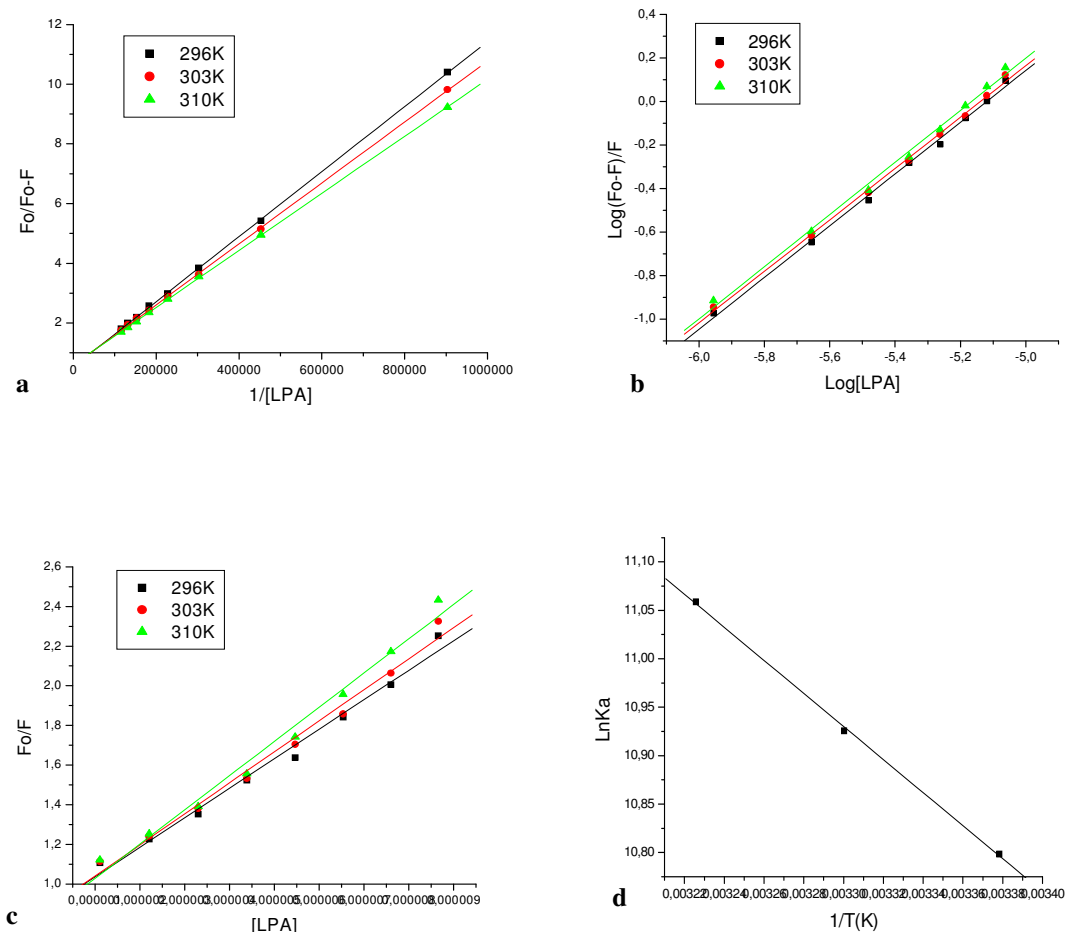


Figura 225. Curvas de Stern-Volmer e Stern-Volmer modificado nas temperaturas de 296, 303 e 310K (gráficos a, b e c) e Vant' Hoff (gráfico d) para o processo de supressão de fluorescência da ASB pela LPB

Através dos resultados obtidos experimentalmente ($\Delta G^o < 0$), pode-se concluir que ocorre uma boa interação entre a LPB/ASB, sugerindo que a ASB pode atuar como um bom carregador sanguíneo para a LPB, sendo o fator entrópico o processo predominante para esse processo.

8-CONCLUSÃO

O estudo químico de *Zanthoxylum rigidum* confirmou a diversidade de classes de metabólitos especiais encontrados em espécies da família Rutaceae. Foram isoladas 27 substâncias, algumas das quais estão sendo relatada pela primeira vez no gênero, além de um novo ciclopeptídeo, ciclo(-Phe-Gli-Ala¹-Leu-Ala²-), denominado ciclozanthoxylano A.

O estudo das raízes de *Luxemburgia nobilis* levou ao isolamento de 6 substâncias. As folhas e caule desta espécie possuem estudo fitoquímico, porém os biflavonóides isolados da raiz são relatos a primeira vez no gênero. O isolamento de lophirona B (**24**) e lophirona K (**25**) confirma a proximidade do gênero *Luxemburgia* com os gêneros *Ochna* e *Lophira*, tendo em vista que lophironas são mais comuns nestes dois últimos gêneros.

A atividade tripanocida testada com os biflavonoides 2'',3''-diidroochnaflavona (**26**) e mostrou que a mesma foi capaz de interferir no crescimento do parasita, mesmo em doses baixas. No ensaio com triatomíneos observou-se que o alcalóide 6-acetonildiidroqueleritrina (**21**) levou a fagorepelência, inibindo a ingestão de sangue. O teste inseticida em larvas de mosca *Chrysomya putoria* com o biflavonoide lophirona K apresentou resultado discreto, afetando pouco o desenvolvimento das larvas. Na atividade antiviral frente a *Herpes simplex* tipo I e II e adenovírus 19 foram testados os biflavonoides 2'', 3''-diidroochnaflavona (**26**) e seu derivado metilado (**26a**) e o alcalóide *N*-metilatanina (**19**). O resultado obtido no ensaio com Adenovírus 19 mostrou-se bastante significativo com o alcaloide **19**.

O estudo espectroscópico da interação entre o biflavonoide lophirona B (**24**) e a albumina sérica bovina demonstrou que ocorre uma boa interação entre ambas, indicando que a albumina pode agir como um bom carreador sanguíneo para a lophirona B.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIHISA, T., OGIHARA, J., KATO, J., YASUKAWA, K., UKIYA, M., YAMANOUCHI, S., OISHI, K. Inhibitory Effects of Triterpenoids and Sterols on Human Immunodeficiency Virus-1 Reverse Transcriptase. *Lipids*, v. 36, n. 5, p. 507-512, **2001**.
- ALAPONT, C. G., GARCIA-DOMENECH, R., GÁLVEZ, J., ROS, M. J., WOLSKI, S., GARCÍA, M. D. Molecular Topology: A Useful Tool for the Search of New Antibacterials. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 10, p. 2033-2036, **2000**.
- BANDI, A. K. R., LEE, D., GHOGOMU TIH, R., GUNASEKAR, D., BODO, B. Phytochemical and biological studies of *Ochna* species. *Chemistry & Biodiversity*, v. 9, p. 251-271, **2012**.
- BARAGUEY, C., BLOND, A., CORREIA, I., POUSSET, J., BERNARD BODO, B., AUVIN-GUETTE, C. Mahafacyclin A, a cyclic heptapeptide from *Jatropha mahafalensis* exhibiting β -bulge conformation. *Tetrahedron Letters*, v. 41, p. 325-329, **2000**.
- BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASO, C.L.F.; GUIMARÃES E.F. & LIMA, H.C. de. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, v.2, 250p., **1984**.
- BASTOS, J. K., CARVALHO, J. C. T., DE SOUZA, G. H. B, PEDRAZZI A. H. P., SARTI, S. J., Anti-inflammatory activity of cubebin, a lignan from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo* Griseb. *J. of Ethnopharmacology*, 75, 279-282, **2001**.
- BASTOS, J.K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M.L.A. Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*. *Planta Med* .v. 65, p. 541-544, **1999**.
- BORENFREUND. E.; PUERNER, J. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*. v. 24, p. 119-124, **1985**.
- BRAZ-FILHO, R. In: DE MORAIS, S M. & BRAZ-FILHO, R. Produtos Naturais- Estudos Químicos e Biológicos (Org.). Fortaleza: EdUECE, p. 13-46. **2007**
- CHEN, I, CHEN, T., CHANG, Y, TENG, C., LIN, W. Chemical Constituents and Biological Activities of the Fruit of *Zanthoxylum integrifoliolum*. *J. Nat. Prod.*, v. 62, p. 833-837, **1999**.
- CHEN, I., LIN, Y., TSAI, I., TENG, C., KO, F., ISHIKAWA, T. ISHII, H. Coumarins and anti-platelet aggregation constituents from *Zanthoxylum schinifolium*. *Phytochemistry*, v. 39, n. 5, p. 1091-1097, **1995**.
- CHEN, J., WANG, T., HWANG, T. Neolignans, a Coumarinolignan, Lignan Derivatives, and a Chromene: Anti-inflammatory Constituents from *Zanthoxylum a Wicennae*. *J. Nat. Prod.*, 71, p. 212–217. **2008**.
- CUI, F. L.; QIN, L. X., GUI-SHENG ZHANG, G. S.; YAO, X. J.; DU, J. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 42, 221, **2008**.

CUNHA E SILVA, S. L., ALVES, C. C. F., BORBA, H. R., DE CARVALHO, M. G., BOMFIM, T. C. B. Avaliação da atividade anti-helmíntica de extratos de *Luxemburgia octandra* St. Hill. em camundongos naturalmente infectados com *Aspiculuris tetraptera* e *Vampirolepis nana*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 14, n. 3, p. 106-108, **2005**.

DA SILVA, J. SARAIVA, S. DE ALBUQUERQUE, C. CURTI, P.M. DONATE, T.N.C. BIANCO, J.K. BASTOS, M.L.A. SILVA. Trypanocidal structure–activity relationship for *cis*- and *trans*-methylpluviatolide. *Phytochemistry*, v. 69, p. 1890–1894., **2008**.

DA SILVA, V. C., SOUSA JÚNIOR, DALL’OGLIO, E. L., DE CARVALHO. Anti-inflammatory activities of flavonoids from *Luxemburgia octandra* flowers. *Chemistry of Nat. Comp.*, v. 46, n. 6, p. 961-963, **2011**.

DANIEL, J. F. DE S., ALVES, C. C. F., GRIVICICH, I., DA ROCHA, A. B., DE CARVALHO, M. G. Antitumor activity of biflavonoids from *Ouratea* and *Luxemburgia* on human cancer cell lines. *Indian Journal Pharmacol.*, v. 39, p. 184-186, **2007**.

DE CARVALHO, M. G., ROCHA JÚNIOR, J. G., SUZART, L.R., CORNELIUS, M. T. F., SILVA, V. C., CARDOSO, M. A. R. Determinação estrutural de flavonoides com análise de espectros de RMN de ^1H 1D e reação com diazometano. *Rev. Univ. Rural, Sér. Ci. Exatas e da Terra*. Seropédica: EDUR, v. 25, n. 1-2, p. 46-59, **2006**.

DE CARVALHO, M. G., OLIVEIRA, M. C. C., WERLE, A. A. Chemical constituents from *Luxemburgia nobilis* (Eichl). *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 11, n. 3, p. 232-236, **2000**.

DEWICK, P.M. *Medicinal Natural Products-A Biosynthetic Approach*. 2nd ed., John Wiley & Sons LTD: England, 507p., **2002**.

DOS SANTOS, R. A. N., BATISTA JÚNIOR, J., ROSA, S. G., TORQUATO, H. F., BASSI, C. L., RIBEIRO, T. A. N., SOUSA JÚNIOR, P. T., SILVA BESSERA, A. M. S., FONTES, C. J. F., DA SILVA, L. E., PIUVEZAM, M. R. Leishmanicidal effect of *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae) and its isolated alkaloid skimmianine occurs by a nitric oxide dependent mechanism. *Parasitology*, v. 138, p. 1224–1233, **2011**.

EGGLESTON, D. S., BAURES, P. W., PEISHOFF, C. E., KOPPLE, K. D. Conformations of cyclic heptapeptides: crystal structure and computational studies of evolidine. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 113, p. 4410-4416, **1991**.

ELDAHSHAN., O. A. Isolation and Structure Elucidation of Phenolic Compounds of Carob Leaves Grown in Egypt. *Current Research Journal of Biological Sciences*, v. 3, n. 1, p. 52-55, **2011**.

FERES, F. O gênero *Luxemburgia* A. St. Hil. (Ochnaceae) – Revisão taxonômica e estudo cladístico. Dissertação, IB, UNICAMP, **2001**.

FURLANETTO, S. M. P.; CAMPOS, M. L. C., HÁRSI, C.M.; BURALLI, G. M., ISHIHATA, G. K. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. *Revista de Microbiologia*, v. 15, n. 3, p. 170-174, **1984**.

GALATI, E. M.; MONFORTE, M. T.; KIRIJAVANEIN, S.; FORESTIERI, A. M.; TROVATO, A.; TRIPODO, M. M. *Il Farmaco*, v. 49, p. 709–714, **1994**.

GALLO, M. B. C., SARACHINE, M. J. Biological activities of lupeol. *Intl J. Biomed. Pharma. Sci.*, v. 3, p. 46-66, **2009**.

GEISSBERGER, P., SÉQUIN, U. Constituents of *Bidens pilosa* L.: Do the components found so far explain the use of this plant in traditional medicine? *Acta Tropica*, v. 48, p. 251-261, **1991**.

GHOOGOMU TIH, R., SONDEGAM, B. L., MARTIN, M. T., BODO, B. Structure of lophirones B and C, biflavonoids from the bark of *Lophira lanceolata*. *Phytochemistry*, v. 28, n. 5, p. 1557-1559, **1989**.

GOTTLIEB, O. R., Evolução química vegetal. *Ciência e Cultura*, v. 39, p. 357-360, **1987**.

GREENBERG, B. *Flies and Disease. vol 2: Biology and disease transmission*. Princeton: Princeton University Press, **1973**.

GREENBERG, B. Flies and diseases. *Ecology, classification and biotic association*. Princeton: Princeton University 856p, **1971**.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. O.; PELZER, L. E. Antiinflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il Farmaco*, v. 56, p. 683–687, **2001**.

GUIMARÃES, J. H.; PRADO, A. P., LINHARES, A. X. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 22, n. 1, p. 53-60, **1978**.

HE, W.; LI, Y.; XUE, C.; HU, Z.; CHEN, X.; SHENG, F. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 13, p. 1837. **2005**.

HE, X. M.; CARTER, D. C. *Nature*, v. 358, p. 209, **1992**.

HELENO, V. C. G., SILVA R., PEDERSOLI, S., ALBUQUERQUE, S. DE, BASTOS, J. K, ANDRADE E SILVA, M. L, DONATE, P. M. , DA SILVA, G. V. J., LOPES, J. L. C. Detailed ¹H and ¹³C NMR structural assignment of three biologically active lignan lactones. *Spectrochimica Acta Part A*, 63, p. 234–239, **2006**.

HISATOMI, E., MATSUI, M., KOBAYASHI, A., KUBOTA, K. Antioxidative Activity in the Pericarp and Seed of Japanese Pepper (*Xanthoxylum piperitum* DC). *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, p. 4924-4928, **2000**.

HOSTETTMANN, K., QUEIROZ, E. F., VIEIRA, P. C. Principios ativos de plantas superiores. São Carlos: EdUFSCar, 152p, **2003**.

- JALALI-HERAVI, M., MASOUM, S., SHAHBAZIKHAH, P. Simulation of ^{13}C nuclear magnetic resonance spectra of lignin compounds using principal component analysis and artificial neural networks. *J. Magn. Reson.*, v. 171, p. 176-185, **2004**.
- JIN, Q. I., HU, Z. F., LIU, Z., J., YU, B. Y. Triterpenes from *Prunella vulgaris*. *Chin. J. Nat. Med.*, v. 7, n. 6, p. 421-424, **2009**.
- KAEWAMATAWONG, R., LIKHITWITAYAWUID. K., RUANGRUNGSI, N., TAKAYAMA, H., KITAJIMA, M., AIMI, N. Novel biflavonoids from the stem bark of *Ochna integerrima*. *J. Nat. Prod.*, v. 65, 1027-1029, **2002**.
- KHETWAL, K. S., HARBOLA, S., CAI, P., SNYDER, J. K., NEWTON, M. G., PELLETIER, S. W., JOSHI, B. S. X-ray crystal structure and absolute configuration of kaerophyllin (chaerophyllin). *J. Nat. Prod.*, v. 56, n. 3, p. 318-328, **1993**.
- KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Sterol Glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry*, v. 29, n. 7, p. 2351-2355. **1990**.
- LAGROTA, M.H.C. Atividade antiviral in vitro de substâncias sintéticas e naturais. Rio de Janeiro, UFRJ (Dissertacao de Mestrado). **1978**.
- LEWIS, J. R. In: WATERMAN, P.G., GRUNDON, M. F. (Eds). Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales. London: Academic Press,. cap. 11, p. 301-318, **1983**.
- LI, F. F., GUO, Z. Q., CHAI, X. Y., TU, P. F. Triterpenoids from the stems of *Casearia velutina* Bl. *J. Chin. Pharm. Sci.*, v. 21, p. 273-277, **2012**.
- LOCK DE UGAZ, O. Investigación fitoquímica - métodos en el estudio de productos naturales. 2 ed. Lima: PUCP, 300 p., **1994**.
- LOPES, L. M.X, YOSHIDA, M., GOTTLIEB, O. R. Dibenzylbutyrolactone Lignans from *Viola sebifera*. *Phytochemistry*, v. 22, n. 6, p. 1516-1518, **1983**.
- MARFEY, P. Determination of D-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene. *Carlsberg Res. Commun.*, v. 49, p. 591-596, **1984**.
- MATOS, F. J. A. In: DE MORAIS, S M. & BRAZ-FILHO, R. Produtos Naturais- Estudos Químicos e Biológicos (Org.). Fortaleza: EdUECE, Cap. 5, p.105-121, **2007**.
- MENDONÇA, P. M., PINTO, Z. T., RIBEIRO, T. A. N., DE CARVALHO, M. G., QUEIROZ, M. M. C. Efectos de biflavonoides de *Luxemburgia nobilis* (Malpighiales: Ochnaceae) sobre el desarrollo de *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae), em laboratório. Livro de Resumos do Congresso Internacional de Entomologia & Congresso Sudamericano de entomologia, p. 121, **2011**.
- MESSANGA, B., GHOGOMU TIH, R., SONDEGAM, B., MARTIN, M., BODO, B. Biflavonoids from *Ochna calodendron*. *Phytochemistry*, v. 35, n. 3, p. 791-794, **1994**.
- MICHAEL, J. Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*,v. 25, p. 166-187, **2008**.

MOCCELINI, S. K., DA SILVA, V. C., NDIAYE, E. A., SOUSA JR, P. T., VIEIRA, P. C. Estudo fitoquímico das cascas das raízes de *Zanthoxylum rigidum* Humb. & Bonpl. ex Willd (Rutaceae). *Quím. Nova*, v. 32, n. 1, p. 131-133, **2009**.

MONGKOLVISUT, W., SUTTHIVAIYAKIT, S., LEUTBECHER, H., MIKA, S., KLAIBER, I. MÖLLER, W., RÖSNER, H., BEIFUSS, U., CONRAD, J. Integerrimides A and B, cyclic heptapeptides from the latex of *Jatropha integerrima*. *J. Nat. Prod.*, v. 69, p. 1435-1441, **2006**.

MORITA, H., TAKEYA, K. Bioactive cyclic peptides from higher plants. *Heterocycles*, v. 80, p. 739-764, **2010**.

NAVARRETE, A., TREJO-MIRANDA J. L., REYES-TREJO L. Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 79, p. 383-388, **2002**.

NEGI, J. S., BISHT, V. K., BHANDARI, A. K., SINGH, P., SUNDRIYAL, R. C. Chemical constituents and biological activities of the genus *Zanthoxylum*: A review. *African J. of Pure and Applied Chemistry*, v. 5, n. 12, p. 412-416, **2011**.

NISHIBE, S., OKABE, K., HISADA, S. Isolation of phenolic compounds and spectroscopic analysis of a new lignin from *Trachelospermum asisticum* var. *intermedium*. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 29, n. 7, p. 2078-2082, **1981**.

NISSANKA, A. P. K., KARUNARATNE, V., BANDARA, B. M. R., KUMAR, V., NAKANISHI, T., NISHI, M., INADA, A., TILLEKERATNE, L. M. V., WIJESUNDARA, D. S. A., GUNATILAKA, A. A. L. Antimicrobial alkaloids from *Zanthoxylum tetraspermum* and *caudatum*. *Phytochemistry*, v. 56, p. 857-861, **2001**.

OLIVEIRA, M. C. C., DE CARVALHO, M. G., DA SILVA, C. J., WERLE, A. A. New biflavonoid and other constituents from *Luxemburgia nobilis* (Eichl). *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 13, p. 119-123, **2002**.

OLIVEIRA, M. C. C., DE CARVALHO, M. G., GRYNBERG, N. F., BRIOSO, P. S. A Biflavonoid from *Luxemburgia* as inhibitor of DNA Topoisomerase. *Planta Medica*, v. 71, p. 561-563, **2005**.

PARRET, S., WHITFIELD, P. J. Atanine (3-dimethylallyl-4-methoxy-2-quinolone), an alkaloid with anthelmintic activity from the Chinese medicinal plant, *Evodia rutaecarpa*. *Planta medica*, v. 61, n.3, p. 276-278, **1995**.

PEGNYEMB, D. E., MBING, J. N., ATCHADÉ, A. T., GHOGOMU TIH, R., SONDEGAM, B. L., BLOND, A., BODO, A. Antimicrobial biflavonoids from the aerial parts of *Ouratea sulcata*. *Phytochemistry*, v. 66, p. 1922-1926, **2005**.

PICCHI, D. G., ALTEI, W. F., SAITO, M. S., BOLZANI, V. S., CILLI, E. M. Peptídeos cíclicos de biomassa vegetal: características, diversidade, biossíntese e atividades biológicas. *Quím. Nova*, v. 32, n. 5, p. 1262-1277, **2009**.

POMILIO, A. B., BATTISTA, M., VITALE, A. A. Naturally-Occurring Cyclopeptides: Structures and Bioactivity. *Current Organic Chemistry*, v. 10, p. 2075-2121, **2006**.

QUEIROZ, M. M. C., NORBERG, N. A., MAURE, E. A. P., TOLEDO, R. F., GAZÊTA, G. S., DUTRA, A. E. A., RODRIGUES-GUIMARÃES, R. Veiculação de bactérias patogênicas por moscas sinantrópicas coletadas em restaurantes, hospitais e feiras da Baixada Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil. XIV Congresso Latinoamericano de Parasitologia. Acapulco, Guerrero; México, **1999**.

QUEIROZ, M. M. C., MELLO, R. P., FREIRE, M.S. The effect of different proportions the *Chrysomya albiceps* (Wiedemann 1819) (Diptera, Calliphoridae) biotic potential and longevity under laboratory conditions. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro .91: p. 243-247, **1996**.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percents endpoints. *American Journal of Hygiene*, v. 27, p. 493-497, **1938**.

RIBEIRO, T. A. N., BARBOSA, D. M., WERLE, A. A., DE CARVALHO, M. G. Lophirona B e outros metabólitos isolados de raízes de *Luxemburgia nobilis* (Eichl). Livro de Resumos do Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, **2010**.

RIBEIRO, T. A. N., DA SILVA, L. R., SOUSA JÚNIOR, P. T., CASTRO, R. N., DE CARVALHO, M. G. A new cyclopeptide and other constituents from the leaves of *Zanthoxylum rigidum* Humb. & Bonpl. ex Willd. (Rutaceae). *Helv. Chim. Acta*, v. 95, n. 6, p. 935-939, **2012**.

SCHRÖDER, H. C., MERZ, H., STEFFEN, R., MÜLLER, W. E., SARIN, P. S., TRUMM, S., SCHULZ, J., EICH, E. Differential in vitro anti-HIV activity of natural lignans. *Z. Naturforsch C*, v. 45, p. 1215-1221, **1990**.

SILVA, A.M.S., ALKORTA I., ELGUERO J., SILVA V.L.M. A ¹³C NMR study of the structure of four cinnamic acids and their methyl esters. *J Mol Struct*, v. 595, p. 1-6, **2001**.

SINGH, T. P., SINGH, O., M., Phytochemical and pharmacological profile of *Zanthoxylum armanatum* DC. – An overview. *Indian J. of Natural Products Resources*, v. 2, n. 3, p. 275-285, **2011**.

SOKAL, R. R., ROHLF, F. J, Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. W. H. Freeman and Co., San Francisco. 249p.,**1979**.

STAN, D.; MATEI, I.; MIHAILESEU, C; SAVIN, M.; MATAACHE, M; HILLEBRAND, M.; BACIU, I. *Mol.*, v. 14, p. 1614, **2009**.

SUGIO, S.; KASHIMA, A.; MOCHIZUKI, S.; NODA, M.; KOBAYASHI, K. *Protein Eng.*, v. 12, p. 439, **1999**.

SUZART, L. R., DANIEL, J. F. DE S., DE CARVALHO, M. G., KAPLAN, M. A. Biodiversidade flavonoídica e aspectos farmacológicos em espécies dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* (Ochnaceae). *Quim. Nova*, v. 30, n. 4, p. 984-987, **2007a**.

SUZART, L. R. Considerações sobre os gêneros *ouratea* e *luxemburgia*, estudo químico de duas espécies de Ochnaceae: *Ouratea hexasperma* St. Hil E *Ouratea cuspidata* St. Hil e atividades biológicas. Tese. ICE, UFRRJ. **2007b**.

TAGHIZADEH, T. Identificação de substâncias voláteis de insetos através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. In: FERREIRA, J. T. B., CORRÊA, A. G., VIEIRA, P. C. (org.) Produtos Naturais no Controle de Insetos. Ed. UFSCar, 176p, **2001**.

TAKEHARA, K.; YURI, K.; SHIRASAWA, M.; YAMASAKI, S.; YAMADA, S. *Anal. Sci.*, v. 25, 115, **2009**.

TANAKA, T., Kohno, H., Murakami, M., Kagami, S., El-Bayoumy, K. . Suppressing effects of dietary supplementation of the organoselenium 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate ant Citrus antioxidant auraptene on lung metastasis of melanoma cells in mice. *Cancer Res.*, v. 60, n. 14, p. 3713-3716, **2000**.

VOGEL, A. I. Vogel's Textbook of practical organic chemistry, 5 th, England, Longman, p. 433, **1989**.

WANG, Y., HE, H., YANG, J., SHEN, Y., ZHOU, J., HAO, X. A new cyclopeptide from *Clausena anisum-olens*. *Helv. Chim. Acta*, v. 88, p. 2345-2348, **2005**.

WANG, Y., HE, H., YANG, J., DI, Y., TAN, N., HAO, X. Clausenain B, a phenylalanine-rich cyclic octapeptide from *Clausena anisum-olens*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 20, n. 3, p. 478-481, **2009**.

WEBER, A. D. Estudo Fitoquímico e da Atividade Biológica de *Zanthoxylum rhoifolium*. Dissertação, CCNE, UFSM. **2005**.

WÉLÉ, A., NDOYE, I., ZHANG, Y., BROUARD, J., POUSSET, J., BODO, B. Glauccyclopeptide A from the seeds of *Annona glauca*. *Phytochemistry*, v. 66, p. 1154-1157, **2005**.

WHITAKER, B. D., SCHMIDT, W. F., KIRK, M. C., BARNES, S. Novel fatty acid esters of *p*-coumaryl alcohol in epicuticular wax of apple fruit. *J. Agric. Food Chem.*, v. 49, p. 3787-3792, **2001**.

XIONG, Q., SHI, D., MIZUNO, M. Flavonol glucosides in pericarps of *Zanthoxylum bungeanum*. *Phytochemistry*, v. 39, n. 3, p. 723-725, **1995**.

YAMAGISHI, T., ZHANG, D.C., CHANG, J. J., MCPHAIL, D. R., MCPHAIL, A. T., LEE, K. H. The cytotoxic principles of *hyptis capitata* and the structures of the new triterpenes hyptatic acid-A and -B. *Phytochemistry*, v. 27, n. 10, p. 3213-3216, **1998**.

YUE, Y.; ZHANG, Y.; LI, Y.; ZHU, J.; QIN, J.; CHEN, X. *J. Luminesc.*, v. 128, p. 513, **2008**.

ZSILA, F.; BIKÁDI, Z.; SIMONYI, M. *Biochem. Pharmacol.*, v. 65, p. 447, **2003**.

ANEXOS

APRESENTAÇÃO EM EVENTOS E CONGRESSOS

- IV Fórum da Pós-Graduação (UFRRJ, 2009)
Estudo Químico e Avaliação de Atividade Farmacológica de *Zanthoxylum rigidum* Humb. Bonpl. ex. Willd (Rutaceae).
Tereza A. N. Ribeiro, Paulo T. de Sousa Jr., Mario G. de Carvalho
- Simpósio Ibero-Americano de Plantas Mediciniais (Cuiabá-MT, 2009)
Constituintes químicos dos frutos de *Zanthoxylum rigidum* Humb & Bonpl. ex Willd.
Tereza A. N. Ribeiro, Débora Mattos Barbosa, Aristany K. Kayser, Paulo T. de Sousa Jr., Mário G. de Carvalho
- XII SBQ-RIO (Rio de Janeiro-RJ, 2009)
Constituintes químicos e avaliação larvicida preliminar de extrato de frutos de *Zanthoxylum rigidum*.
Tereza A. N. Ribeiro, Débora Mattos Barbosa, Katherina Coumendouros, Suelen S. S. Francisco, Paulo T. de Sousa Jr., Mário G. de Carvalho.
- Jornada de iniciação científica 2010 (UFRRJ)
Estudo químico e atividade antioxidante do extrato metanólico das folhas de *Zanthoxylum rigidum* Humb & Bonpl. ex Willd.
Débora Mattos Barbosa, Tereza A. N. Ribeiro, Aline F. Lira, Mário G. de Carvalho.
- V Fórum da Pós-Graduação (UFRRJ, 2010)
Lophirona B e outros metabólitos isolados de raízes de *Luxemburgia nobilis* (Eichl)
Tereza A. N. Ribeiro, Mário G. de Carvalho.
- 21º Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil (João Pessoa-PB, 2010)
Lophirona B e outros metabólitos isolados de raízes de *Luxemburgia nobilis* (Eichl)
Tereza A. N. Ribeiro, Débora Mattos Barbosa, Alceni A. Werle, Mário G. de Carvalho.

- Jornada de iniciação científica 2011 (UFRRJ)
Lignanas Isoladas dos Galhos de *Zanthoxylum rigidum*.
Letícia Ricette da Silva, Tereza A. N. Ribeiro, Mário Geraldo Carvalho.

- VI Fórum da Pós-Graduação (UFRRJ, 2011)
Novo ciclopeptídeo e outros constituintes das folhas de *Zanthoxylum. rigidum* Humb. Bonpl. ex. Willd
Tereza A. N. Ribeiro, Paulo T. de Sousa Jr., Mário Geraldo Carvalho.

- XIII SBQ-RIO (Rio de Janeiro-2011)
Lignanas Isoladas dos Galhos de *Zanthoxylum rigidum*.
Tereza A. N. Ribeiro, Letícia Ricette da Silva, Paulo T. de Sousa Jr., Mário Geraldo de Carvalho.

- 3º Brazilian Conference of Natural Products (Ouro Preto-MG, 2011) – Paineis e Oral
New cyclopeptide and other constituents from the leaves of *Zanthoxylum. rigidum* Humb. Bonpl. ex. Willd.
Tereza A. N. Ribeiro, Letícia R. da Silva, Paulo T. Sousa Jr, Mário G. de Carvalho

- II Jornada Fluminense de Produtos Naturais (Arraial do Cabo-RJ, 2012)
Configuração absoluta do peptídeo ciclozanthoxylano A de *Zanthoxylum rigidum*
Tereza A. N. Ribeiro, Letícia R. da Silva, Rosane Nora Castro, Paulo T. Sousa Jr., Mário G. de Carvalho.

- 35ª SBQ (Águas de Lindóia-SP, 2012) – Painel Premiado
Estudo da interação de Lophirona B (LPB) com albumina sérica bovina (ASB)
Tereza Auxiliadora N. Ribeiro, Flávia da Silva M. Teixeira, Veridiana A. da Silva, Mário Geraldo de Carvalho, Dari Cesarin-Sobrinho.

- 22º Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil (Bento Gonçalves, 2012)
Outros metabólitos isolados das cascas das raízes de *Zanthoxylum rigidum*
Letícia R. da Silva, Tereza A. N. Ribeiro, Sally K. Moccelini, Paulo T. Sousa Jr., Mário G. de Carvalho.

- **ARTIGO PUBLICADO**

**A New Cyclopeptide and Other Constituents from the Leaves of
Zanthoxylum rigidum HUMB. & BONPL. ex WILLD. (Rutaceae)**

by Tereza Auxiliadora Nascimento Ribeiro^{a)}, Leticia Ricette da Silva^{a)},
Paulo Teixeira de Sousa Júnior^{b)}, Rosane Nora Castro^{a)}, and Mário Geraldo de Carvalho^{a)c)}

^{a)} Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 07, CEP: 23890-000-Seropédica-RJ, Brasil
(phone/fax: + 55-21-26822807; e-mail: terezaribeiro20@gmail.com)

^{b)} Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de Mato Grosso, Avenida Fernando Corrêa n° 2367, 78060-900 Cuiabá-MT, Brasil

^{c)} Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Bloco H, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro-RJ, Brasil

- **ARTIGO SUBMETIDO**

The Effect of Latex of *Parahancornia amapa* and a Biflavonoid of *Luxemburgia nobilis* on *Chrysomya putoria* (Wiedemann: 1818) (Diptera, Calliphoridae)

Rebecca Leal Caetano, Paloma Martins Mendonça, Zeneida Teixeira Pinto, Mariana Gomes Lima, Tereza A. N. Ribeiro, Luis R.M. Albuquerque, Mario G. Carvalho, Margareth Maria de Carvalho Queiroz