

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

TESE

Metabólitos Especiais Isolados de Madeira de *Simira eliezeriana* e *Simira glaziovii* (Rubiaceae), de Folhas de *Ouratea parviflora* (Ochnaceae) e Atividades Biológicas

Marcelo Francisco de Araújo

2011



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

METABÓLITOS ESPECIAIS ISOLADOS DE MADEIRA DE *Simira eliezeriana* E *Simira glaziovii* (RUBIACEAE), DE FOLHAS DE *Ouratea parviflora* (OCHNACEAE) E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

MARCELO FRANCISCO DE ARAÚJO

Sob a Orientação do Professor
Dr. Mário Geraldo de Carvalho

e Co-Orientação do professor
Dr. Raimundo Braz-Filho

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

Seropédica, RJ
Novembro de 2011

547

A663m

T

Araújo, Marcelo Francisco de, 1981-
Metabólitos especiais isolados de
madeira de simira eliezeriana e
simira glaziovii (Rubiaceae), de
folhas de ouratea parviflora
(Ochnaceae) e atividades biológicas
/Marcelo Francisco de Araújo - 2011.
175 f.: il.

Orientador: Mário Geraldo de
Carvalho.

Tese(doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Curso de Pós-Graduação em Química.

Bibliografia: f. 164-174.

1. Química orgânica - Teses. 2.
Madeira - Análise - Teses. 3.
Madeira - Química - Teses. 4.
Diterpenos - Teses. I. Carvalho,
Mário Geraldo de. II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro.
Curso de Pós-Graduação em Química.
III. Título.

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

MARCELO FRANCISCO DE ARAÚJO

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

TESE APROVADA EM ----/----/-----

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

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

Dra. Maria Auxiliadora Coelho Kaplan (NPPN-UFRJ)

Dra. Dorila Piló Veloso (DQ-ICEx-UFMG)

Dra. Marise Malek de Oliveira Cabral (UNIV. SEV. SOMBRA)

Dr. Artur Eugen Kummerle (DEQUIM-UFRRJ)

Dra. Maria Raquel Figueiredo (Suplente, FIOCRUZ)

*À minha esposa Débora Contagem de Queiroz Araújo
Pelo amor, companherismo, e incentivo necessário para vencer este desafio.
À minha irmã Márcia Araújo por sempre me incentivar a ir à busca dos meus sonhos.*

*Aos meus pais,
Francisco Elias de Araújo (In Memoriam) e Maria Silva de Araújo (In Memoriam)
Por em vida terem sempre incentivado e batalhado para minha formação.*

... Se pude ver mais longe, foi por ter subido nos ombros de gigantes ...
(Sir Isaac Newton, cientista, 1643-1727)

AGRADECIMENTOS

Quero deixar a sincera gratidão a todos que colaboraram de certa forma na produção deste trabalho.

Primeiramente a Deus por iluminar minha vida e me dar forças para suportar os obstáculos do dia-a-dia;

Ao Professor Dr. Mário Geraldo de Carvalho pela orientação segura e conhecimentos transmitidos, por sua atenção e paciência durante o desenvolvimento desse trabalho e principalmente por sua amizade da qual não me esquecerei;

Ao professor Raimundo Braz-Filho pelo constante apoio, incentivo, ensinamentos e principalmente pela amizade, mais uma vez minha sincera gratidão;

A professora Maria Raquel Garcia Vega pela amizade, carinho e pelos ensinamentos valiosos;

Ao professor Ivo José Curcino Vieira pela amizade e pelas colaborações valiosas durante o trabalho;

Aos amigos do LQPN-UFRuralRJ, Teresa, Renata, Ana Paula, Almir, Daniel, Claudiana, pela amizade e pelos momentos de descontração que passamos juntos;

Ao amigo Eduardo Aragão (Ceará) pela amizade sincera a qual nunca irei esquecer, além das trocas de idéias;

A todos os colegas do PPGQ, em especial aos amigos Breno, Daniel, Letícia, Rodney e Vinícius, pelos bons momentos vividos durante este período;

Aos professores do PPGQ pela formação e evolução profissional;

Aos funcionários do ICE-UFRRJ, Carlão, Eli, Fábio, Frances, Maurício, Osmar e Victor;

À UFRRJ, pela oportunidade e acolhimento;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos e ao CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro aos projetos do nosso grupo de pesquisa;

Ao professor Olney Vieira da Motta pela colaboração e ensinamentos em microbiologia

À professora Maria Teresa Villela Romanos CCS-UFRJ-LEDAC, pela colaboração nos ensaios antivirais

Aos amigos que compõe o grupo de pesquisa de produtos naturais LCQUI-UENF e que fazem a rotina do laboratório ser menos estressante, Amanda, Elaine, Eloísa, Jéssika, Jucimar, Lara, Marina, Milena, Moema, Vinícius, Virginia e Wagner

Aos técnicos do LCQUI Marta e Roberto pelos espectros de IV e RMN

Aos técnicos do LSA Lurdes e Gina pela ajuda nos ensaios antifúngicos e antibacterianos

Aos colegas da UFES prof. Adilson Costa, Patrícia, pela utilização do CG-EM para análises além da amizade e convívio profissional.

RESUMO

ARAÚJO, M.F. **Metabólitos Especiais Isolados da Madeira de *Simira glaziovii* e *Simira eliezeriana* (Rubiaceae), das Folhas de *Ouratea parviflora* (Ochnaceae) e Atividades Biológicas.** 2011. 168p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

Este trabalho descreve o estudo fitoquímico das frações em diclorometano do extrato metanólico da madeira de duas espécies de *Simira* (*S. eliezeriana* e *S. glaziovii*), família Rubiaceae, além do extrato em diclorometano das folhas de *Ouratea parviflora* (Ochnaceae). Este é o primeiro estudo de âmbito fitoquímico de um espécime de *S. eliezeriana*. Foram isoladas e identificadas 17 substâncias das duas espécies de *Simira* sendo três inéditas na literatura. No extrato em diclorometano das folhas de *O. parviflora* foram isoladas 6 substâncias além da identificação por CLAE-EM de 15 compostos fenólicos de *O. parviflora*. Dentre as substâncias isoladas das espécies de *Simira* estão: a mistura de esteróides sitosterol, estigmasterol e campesterol, 3-*O*-glicopiranosil-(6→1)-acil-sitosterol; os triterpenos lupeol, lupenona e 1 β ,3 β -dihidróiolean-12-eno (epímero do castanopsol) inédito na literatura; os aldeídos coniferaldeído e siringaldeído; as lignanas siringaresinol e pinicebrina; as cumarinas isofraxidina, escopoletina e dimetilfratexina; o alcalóide β -carbolínico harmana (marcador quimiotaxonômico do gênero) e os diterpenos eritroxilenos inéditos na literatura, (5R,6R,8R,9R,10S,11S,13S)-6 β ,11 β -dihidroxi-2,4(18),15-eritroxilatrien-1-ona denominado de **simirano A** e (5S,8R,9R,10S,11S,13S)-11 β -hidroxi-2,4(18),15-eritroxilatrien-1-ona **simirano B**. O extrato em diclorometano das folhas de *O. parviflora* forneceu as substâncias: misturas de esteróides, o terpeno hidroquinônico α -tocoferol (vitamina E); friedelina; biflavonóides amentoflavona, agatisflavona e 7''-Metil-*O*-agatisflavona e a proposta de outros flavonóides como componentes de mistura em duas frações analisadas por CLAE-EM. No isolamento das substâncias foram utilizadas técnicas cromatográficas clássicas. Na determinação estrutural foram utilizadas técnicas de RMN de ^1H e de ^{13}C a uma e duas dimensões, espectrometria de massas de alta resolução, CG-EM, infravermelho, ultravioleta e dicroísmo circular que foi usado na definição da configuração absoluta dos diterpenos. As frações das duas espécies de *Simira* foram submetidas a avaliação de toxidez frente a larvas de *Artemia salina* além de avaliação do potencial antimicrobiano, antiviral e antioxidante. As frações em média polaridade mostraram-se ativas para maioria dos microrganismos. As frações de *Simira* e os flavonóides de *O. parviflora* foram submetidos à avaliação do potencial antiviral contra os vírus da herpes simplex 1 e 2 mostrando elevada atividade.

Palavras-chave: *Simira*, Diterpenos eritroxilanos, *Ouratea parviflora*

ABSTRACT

ARAÚJO, M.F. **Special Metabolites Isolated from Wood of *Simira glaziovii* and *Simira eliezeriana* (Rubiaceae), from Leaves of *Ouratea parviflora* (Ochnaceae) and Biological Activities.** 2011. 168p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

This work describes the phytochemical study of the dichlorometane fractions of the methanolic extract from the wood of two *Simira* species, *S. eliezeriana* and *S. glaziovii* (Rubiaceae), and the dichlorometane extract of the leaves from *Ouratea parviflora* (Ochnaceae). This is the first phytochemical study of the context of a specimen of *S. eliezeriana*. It provided the isolation and identification of 17 from two *Simira* species with three new in the literature. In the dichlorometane extract of the leaves from *O. parviflora* were isolated 6 compounds and identified 15 phenolic compounds by HPLC-MS. Among the compounds isolated of *Simira* are: a mixture of stosterol, campesterol and stigmasterol, 3-*O*-D-glucopiranosyl-(1→6)-acyl-sitosterol; the triterpenes lupeol, lupenone and 1 β ,3 β -dihydroxyolean-12-ene (epimere of castanopsol) new in the literature; the aldeides coniferaldehyde and syringaldehyde; the lignans syringaresinol and pinocebrine; the coumarins isofraxidine, escopoetine and dimethylfratexine; the β -carboline alkaloid harman (Chemotaxonomic character of the genus) and the erythroxylenes diterpenes new in the literature (5R,6R,8R,9R,10S,11S,13S)-6 β ,11 β -dihydroxy-2,4(18),15-erythroxyatrien-1-one **simirane A** and (5S,8R,9R,10S,11S,13S)-11 β -hydroxy-2,4(18),15-erythroxyatrien-1-one **simirane B**. The dichlorometane extract from the leaves from *O. parviflora* provided the compounds: mixture of steroids; the hidroquinonic terpenoid α -thocopherol (vitamin E), friedelin; the biflavonoids amenthoflavone, agathisflavone and 7''-*O*-methyl-agathisflavone and the other proposed of flavonoids as components of a mixture of two fractions analyzed on HPLC-MS. In the isolation of the substances used were classical chromatographic techniques. The structural determination was based on the ¹H and ¹³C (1D and 2D) NMR, high-resolution mass spectroscopy, GC-MS, infrared, ultraviolet and circular dichroism that was used to define the absolute configuration of the diterpenes. The fractions of the two species of *Simira* were toxicity evaluated against *Artemia salina* larvae as well as evaluation of potential antimicrobial, antiviral and antioxidant. The fractions of polarity medium were actives. The partitions and flavonoids from *O. parviflora* were evaluated the antiviral potential were very active. The fractions of *Simira* and flavonoids of *O. parviflora* were submitted the evaluation of the antiviral potential against simplex 1 and 2 virus showing high activity.

Key-words: *Simira*; erythroxylenes diterpenes; *Ouratea parviflora*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Substâncias naturais utilizadas como fitofármacos.	2
FIGURA 2. Distribuição dos principais constituintes químicos nas quatro subfamílias	4
FIGURA 3. Metabólitos especiais isolados de espécies do gênero <i>Simira</i>	6
FIGURA 5. Cromatograma cg da mistura de esteróides.	32
FIGURA 6. Espectro de massas 70 eV do campesterol	32
FIGURA 7. Espectro de massas 70 eV do estigmasterol	33
FIGURA 8. Espectro de massas 70 eV do sitosterol	34
FIGURA 9. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura de esteróides.	35
FIGURA 10. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) da mistura de esteróides...	36
FIGURA 11. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) da mistura de esteróides (região de 12 a 58 ppm).	37
FIGURA 12. Espectro no infravermelho da substância SGMD-12	40
FIGURA 13. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) com ampliações da substância SGMD-12	41
FIGURA 14. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) com ampliações da substância SGMD-12	42
FIGURA 15. Efeito dos substituintes sobre o deslocamento químico de CH-3, 5' e CH2-6'.	42
FIGURA 16. Espectro HMQC da substância SGMD-12	43
FIGURA 17. Espectro HMBC da substância SGMD-12	44
FIGURA 18. Cromatograma CG da substância SGMD-04	46
FIGURA 19. Espectro de massas 70 eV da substância SGMD-04	46
FIGURA 20. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância SGMD-04	47
FIGURA 21. Cromatograma CG da substância SGMD-05	48
FIGURA 22. Espectro de massas 70 eV da substância SGMD-05	48
FIGURA 23. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com ampliações da substância SGMD-05	50
FIGURA 24. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) com ampliações da substância SGMD-05	51
FIGURA 25. Cromatograma CG da substância SGMD-06	54
FIGURA 26. Espectro no infravermelho da substância SGMD-06	54
FIGURA 27. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) com ampliações da substância SGMD-06	55
FIGURA 28. Espectro ^1H - ^1H COSY da substância de SGMD-06	56
FIGURA 29. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância SGMD-06	57
FIGURA 30. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (0-60 ppm) substância SGMD-06	57
FIGURA 31. Espectro HSQC da substância SGMD-06	58
FIGURA 32. Ampliações do espectro HSQC da substância SGMD-06	58
FIGURA 33. Espectro HMBC da substância SGMD-06	59
FIGURA 34. Ampliação do espectro HMBC da substância SGMD-06	59
FIGURA 35. Espectro de massas 70 eV da substância SGMD-06	60
FIGURA 36. Espectros de RMN de ^1H e NOEDIFF da substância SGMD-06	61
FIGURA 37. Cromatograma CG da substância OPFM-01	62
FIGURA 38. Espectro de massas 70 eV da substância OPFM-01	62
FIGURA 39. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância OPFM-01	64
FIGURA 40. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da substância OPFM-01	64
FIGURA 42. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância SEMD-04	68
FIGURA 43. Espectro de massas 70 eV da substância SEMD-04	69

FIGURA 44. Espectro de RMN DE ^1H (400 MHz, CDCl_3) das substâncias SEMD-04+05 ..	70
FIGURA 45. Plano de simetria da substância SEMD-05 .	71
FIGURA 46. Cromatograma CG das substâncias SEMD-04+05 .	71
FIGURA 47. Espectro de massas 70 eV da substância SEMD-05 .	71
FIGURA 48. Cromatograma CG da substância OPFD-05 .	73
FIGURA 49. Espectro de massas 70 eV da substância OPFD-05 .	73
FIGURA 51. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância OPFD-05 .	75
FIGURA 52. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135 (100 MHz, CDCl_3) da substância OPFD-05 .	75
FIGURA 53. Alcoóis monoméricos C_6C_3 precursores das lignanas.	76
FIGURA 54. Configurações possíveis do C-7 e 7' do sistema furofurânico de lignanas.	77
FIGURA 56. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância SEMD-06 .	79
FIGURA 57. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135 (100 MHz, CDCl_3) da substância SEMD-06 .	79
FIGURA 58. Espectro HSQC da substância SEMD-06 .	80
FIGURA 59. Espectro HMBC da substância SEMD-06 .	81
FIGURA 60. Cromatograma de CG da substância SEMD-06 .	82
FIGURA 61. Espectro de massas 70 eV da substância SEMD-06 .	82
FIGURA 62. Cromatograma de CG da substância SGMD-08 .	84
FIGURA 63. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância SGMD-08 .	85
FIGURA 64. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância SGMD-08 .	85
FIGURA 65. Espectro HMQC da substância SGMD-08 .	86
FIGURA 66. Espectro HMBC da substância SGMD-08 .	87
FIGURA 67. Espectro de massas 70 eV da substância SGMD-08 .	87
FIGURA 68. Cromatograma CG da SGMD-09 .	90
FIGURA 69. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância SGMD-09 .	91
FIGURA 70. Espectro HMBC da substância SGMD-09 .	92
FIGURA 71. Espectro de massas 70 eV da substância SGMD-09 .	92
FIGURA 72. Cromatograma CG das substâncias SGMD-10 e 11 .	93
FIGURA 73. Espectro de massas 70 eV da substância SGMD-10 .	94
FIGURA 74. Espectro de massas 70 eV da substância SGMD-11 .	95
FIGURA 75. Bandas de absorção do esqueleto flavonoídico	97
FIGURA 76. Ruptura do anel A e B por fragmentação do tipo retro-Diels Alder.	97
FIGURA 77. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, Acetona- d_6) da substância OPFM-D-01 .	98
FIGURA 78. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância OPFM-D-01 . (Região de 6,0 a 8,5 ppm)	99
FIGURA 79. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, Acetona- d_6) da substância OPFM-D-02 .	100
FIGURA 80. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância OPFM-D-02 . (região de 6,0 a 8,5 ppm)	100
FIGURA 81. Espectro de RMN de ^1H - ^1H NOESY da substância OPFM-D-02 .	101
FIGURA 82. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, Acetona- d_6) da substância OPFM-D-03 .	102
FIGURA 83. Cromatograma CLAE-EM da fração F-4 .	104
FIGURA 84. Espectro de massas (EM2 íon 284,3316).	104
FIGURA 85. Espectro de massas (EM2 íon 419,2768).	105
FIGURA 86. Espectro de massas (EM2 íon 553,1136).	105
FIGURA 87. Espectro de massas (EM2 íon 453,3362).	106
FIGURA 88. Espectro de massas (EM2 íon 463,3034).	107
FIGURA 89. Cromatograma CLAE-EM da fração F-5 .	108

FIGURA 90. Espectro de massas (EM2 íon 271,0614).....	108
FIGURA 91. Espectro de massas (EM2 íon 375,3373).....	109
FIGURA 92. Espectro de massas (EM2 íon 403,3689).....	110
FIGURA 93. Espectro de massas (EM2 íon 539,0975).....	111
FIGURA 94. Espectro de massas (EM2 íon 475,3262).....	112
FIGURA 96. Espectro de massas 70 eV da substância SEMD-09	115
FIGURA 97. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância SEMD-09	116
FIGURA 98. Espectro de RMN ^1H - ^1H COSY (400 MHz, CDCl_3) da substância SEMD-09	116
FIGURA 99. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) da substância SEMD-09	117
FIGURA 100. Espectro na região do infravermelho da substância SEMD-07	122
FIGURA 101. Cromatograma CG da substância SEMD-07	122
FIGURA 102. Espectro de massas 70 eV da substância SEMD-07	123
FIGURA 103. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) e ampliações da substância SEMD-07	123
FIGURA 104. Espectro de RMN ^1H - ^1H COSY da substância SEMD-07	124
FIGURA 105. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) e ampliações da substância SEMD-07	125
FIGURA 106. Espectro de RMN HMQC da substância SEMD-07	126
FIGURA 107. Espectro de RMN HMBC da substância SEMD-07	126
FIGURA 108. Ampliação do espectro RMN HMBC da substância SEMD-07	127
FIGURA 109. Espectro de massas de alta resolução da substância SEMD-07	127
FIGURA 110. Espectro de RMN ^1H e NOEDIFF da substância SEMD-07	129
FIGURA 111. Interação espacial dos núcleos de hidrogênio observado nos espectro NOEDIFF do Simirano B	129
FIGURA 113. Cromatograma CG da substância SEMD-08	131
FIGURA 114. Espectro de massas 70 eV da substância SEMD-08	133
FIGURA 115. Espectro de massas de alta resolução da substância SEMD-08	134
FIGURA 116. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) e ampliações da substância SEMD-08	134
FIGURA 117. Espectro de RMN ^1H - ^1H COSY da substância SEMD-08	135
FIGURA 118. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância SEMD-08	136
FIGURA 119. Espectro de RMN HSQC da substância SEMD-08	137
FIGURA 120. Espectro de RMN HMBC da substância SEMD-08	138
FIGURA 121. Ampliação do espectro RMN HMBC da substância SEMD-08	139
FIGURA 122. Espectro de RMN ^1H e NOEDIFF da substância SEMD-08	140
FIGURA 123. Interação espacial dos núcleos de hidrogênio observado nos espectro NOEDIFF da substância SEMD-08	140
FIGURA 124. Natureza ondulatória da luz.	141
FIGURA 125. Luz plano polarizada: campo elétrico (E) em função do tempo (t).	141
FIGURA 126. Luz circularmente polarizada à direita (ed) e à esquerda (ee).	142
FIGURA 127. Equação de Fresnel.	142
FIGURA 128. Polarização elíptica da luz devido à refração e à absorção distintas dos componentes vetoriais.	143
FIGURA 129. Diferença de absorção da luz circularmente polarizada – dicroísmo circular.	143
FIGURA 131. (a) Orientação da ciclohexanona no diagrama do octante; (b) Regra do octante para a carbonila e sinais de contribuição de cada face do octante.....	144
FIGURA 132. Projeções do quadrante para aromático da codeína e espectros de DC.....	145
FIGURA 133. Projeção de enonas.....	146

FIGURA 134. Espectros UV dos diterpenos Simirano A e B	146
FIGURA 135. Espectros de DC dos diterpenos Simirano A e B	147
FIGURA 136. a,b) Projeções no modelo quadrante do anel aromático. c) Projeção da carbonila dos diterpenos Simirano A e B	148

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1. Fração dos extratos metanólico dos materiais vegetais.....	19
ESQUEMA 2. Fracionamento cromatográfico e isolamento dos constituintes da fração em CH ₂ Cl ₂ da madeira de <i>S. eliezeriana</i>	22
ESQUEMA 3. Fracionamento cromatográfico e isolamento dos constituintes da fração em CH ₂ Cl ₂ da madeira de <i>S. eliezeriana</i>	23
ESQUEMA 4. Fracionamento cromatográfico da fração em diclorometano frações A e B	24
ESQUEMA 5. Fracionamento cromatográfico da fração em diclorometano fração C . 25	
ESQUEMA 6. Fracionamento cromatográfico do extrato em diclorometano das folhas de <i>Ouratea parviflora</i>	26
ESQUEMA 7. Fracionamento cromatográfico do extrato em metanol das folhas de <i>Ouratea parviflora</i>	27
ESQUEMA 8. Propostas de fragmentação do campesterol	33
ESQUEMA 9. Propostas de fragmentação do stigmasterol	33
ESQUEMA 10. Propostas de fragmentação do sitosterol	34
ESQUEMA 11. Propostas de fragmentação da substância SGMD-04	46
ESQUEMA 12. Propostas de fragmentação da substância SGMD-06	60
ESQUEMA 13. Proposta de fragmentação para substância SEMD-04	69
ESQUEMA 14. Proposta de fragmentação para substância SEMD-05	72
ESQUEMA 15. Proposta de fragmentação para substância OPFD-05	74
ESQUEMA 16. Proposta de fragmentação da substância SEMD-06	83
ESQUEMA 17. Proposta de fragmentação da substância SGMD-08	88
ESQUEMA 18. Proposta de fragmentação da substância SGMD-09	93
ESQUEMA 19. Proposta de fragmentação da substância SGMD-10	94
ESQUEMA 20. Proposta de fragmentação da substância SGMD-11	95
ESQUEMA 21. Proposta de estrutura e fragmentação para íon M ⁺ 284,3316 D.	104
ESQUEMA 22. Proposta de estrutura e fragmentação para íon M ⁺ 419,2768D.	105
ESQUEMA 23. Proposta de estrutura e fragmentação para íon M ⁺ 553,1136D.	106
ESQUEMA 24. Proposta de estrutura e fragmentação para íon M ⁺ 453,3362D.	107
ESQUEMA 25. Proposta de estrutura e fragmentação para íon M ⁺ 463,3034D.	107
ESQUEMA 26. Proposta de estrutura e fragmentação para íon M ⁺ 271,0614D.	109
ESQUEMA 27. Proposta de estrutura para íon M ⁺ 375,3373D.	110
ESQUEMA 28. Proposta de estrutura e fragmentação para íon M ⁺ 403,3689D.	110
ESQUEMA 29. Proposta de estrutura e fragmentação para íon M ⁺ 539,0975D.	111
ESQUEMA 30. Proposta de estrutura e fragmentação para íon M ⁺ 475,3262D.	112
ESQUEMA 31. Proposta de estrutura para a substância SEMD-09	115
ESQUEMA 32. Proposta de fragmentação para a substância SEMD-07	128
ESQUEMA 33. Proposta de fragmentação para a substância SEMD-08	133
ESQUEMA 34. Procedimento experimental da avaliação do potencial antioxidante.151	

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Espécies de <i>Simira</i> com estudo fitoquímico.	5
QUADRO 2. Espécies de <i>Simira</i> situadas na floresta da CVRD.	6
QUADRO 3. Classificação botânica das espécies <i>S. eliezeriana</i> e <i>S. glaziovii</i>	7
QUADRO 4. Distribuição dos flavonóides isolados nas partes das espécies de <i>Ouratea</i>	11
QUADRO 5. Classificação botânica de <i>O. parviflora</i>	16
QUADRO 6. Material vegetal das espécies de <i>Simira</i> e <i>Ouratea</i>	18
QUADRO 7. Partições obtidas do extrato metanólico do material vegetal das três espécies estudadas.	20
QUADRO 8. Constituintes químicos isolados da madeira de <i>S. eliezeriana</i>	28
QUADRO 9. Constituintes químicos isolados da madeira de <i>S. glaziovii</i>	29
QUADRO 10. Constituintes químicos isolados das folhas de <i>O. parviflora</i>	29
QUADRO 11. Compostos fenólicos propostos como constituintes das folhas de <i>O. parviflora</i> . frações analisadas por CLAE-EM.	30
QUADRO 12. Proposta biossintética dos fitosteróides.	31
QUADRO 13. Proposta biossintética dos triterpenos pentacíclicos	45
QUADRO 14. Comparação de modelos da literatura com a substância SGMD-06	53
QUADRO 15. Proposta biossintética dos metabólitos especiais C ₆ C ₁ e C ₆ C ₃	67
QUADRO 16. Proposta biossintética dos tocoferóis.	72
QUADRO 17. Proposta biossintética das lignanas.	76
QUADRO 18. Proposta biossintética das cumarinas.	89
QUADRO 19. Proposta biossintética das sub-classes dos flavonóides.	96
QUADRO 20. Íons de possíveis flavonóides detectado na análise por CLAE-EM. ...	103
QUADRO 21. Proposta biossintética dos alcalóides indólicos.	113
QUADRO 22. Divisão estrutural dos alcalóides β -carbolínicos.	114
QUADRO 23. Proposta biossintética dos diterpenos	118
QUADRO 24. Proposta biossintética dos diterpenos eritroxilenos.	119
QUADRO 25. Mecanismo de ação do dpph frente a substâncias fenólicas.	149
QUADRO 26. Relação estrutura <i>versus</i> atividade antioxidante de flavonóides.	150

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Dados espectrais de RMN de ^{13}C e ^1H da substância SGMD-12 em CDCl_3	39
TABELA 2. Dados espectrais de RMN de ^{13}C e ^1H da substância SGMD-05 em CDCl_3	49
TABELA 3. Dados espectrais de RMN de ^{13}C e ^1H da substância SGMD-06 em CDCl_3	53
TABELA 4. Dados espectrais de RMN de ^{13}C e ^1H da substância OPFM-01 em CDCl_3 .63	
TABELA 5. Dados espectrais de RMN de ^{13}C e ^1H da substância SEMD-06 em CDCl_3 .78	
TABELA 6. Dados de RMN ^{13}C de (100 MHz) e ^1H (400 MHz) do diterpeno SIMIRANO B em CDCl_3	121
TABELA 7. Dados de RMN ^{13}C de (100 MHz) e ^1H (400 MHz) do diterpeno SIMIRANO A em CDCl_3	132
TABELA 8. Porcentagens de atividade antioxidante (%AAO) e CE_{50} das partições dos galhos e madeira das espécies de <i>Simira</i>	152
TABELA 9. Nível de toxidez das partições de <i>S. glaziovii</i> e <i>S. eliezeriana</i> frente às larvas de <i>A. salina</i>	154
TABELA 10. Atividade antimicrobiana do fenol e derivados (coeficiente fenólico). 155	
TABELA 11. Fungos utilizados no ensaio.	156
TABELA 12. Resultados do teste antifúngico. halos de inibição em centímetros.	157
TABELA 13. Resultados do teste antibacteriano. Halos de inibição em centímetros. 158	
TABELA 14. Percentual de inibição dos extratos e compostos contra os vírus HSV-1 e 2 e Adenovírus 19.	162

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA%	Porcentagem de Atividade Antioxidante
Abs	Absorbância
APT	<i>Attached Proton Test</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Ax	Axial
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CE ₅₀	Concentração Efetiva a 50%
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
cm ⁻¹	Centímetro recíproco (unidade de número de onda)
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
DC	Dicroísmo Circular
DL ₅₀	Dose Letal suficiente para 50% da população testada
δ	Deslocamento químico (ppm)
<i>d</i>	Sinal duplo ou duplete
<i>dd</i>	Duploduplete
<i>dl</i>	Sinal duplo largo ou duplete largo
EM	Espectro de Massas
eq	Equatorial
eV	Elétron volt
Glc	Glicose
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento (medida em Hertz)
λ	Comprimento de Onda
<i>m</i>	Sinal múltiplo ou multiplete
nm	Nanômetro
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
OPFD	<i>Ouratea parviflora</i> Folhas Diclorometano
OPFM-D	<i>Ouratea parviflora</i> Folhas Metanol- Diclorometano
OPFM-A	<i>Ouratea parviflora</i> Folhas Metanol-Acetato de etila
OPFM-R	<i>Ouratea parviflora</i> Folhas Metanol-Resíduo
ppm	Parte por milhão
RDA	Rearranjo do tipo Diels-Alder
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
SGCMD	<i>Simira glaziovii</i> Casca da Madeira Diclorometano
SGCMA	<i>Simira glaziovii</i> Casca da Madeira Acetato de etila
SGCMB	<i>Simira glaziovii</i> Casca da Madeira n-Butanol
SGCMR	<i>Simira glaziovii</i> Casca da Madeira Resíduo
SGMD	<i>Simira glaziovii</i> Madeira Diclorometano
SGMA	<i>Simira glaziovii</i> Madeira Acetato de etila
SGMB	<i>Simira glaziovii</i> Madeira n-Butanol
SGMR	<i>Simira glaziovii</i> Madeira Resíduo
SECMD	<i>Simira eliezeriana</i> Casca da Madeira Diclorometano

SECMA	<i>Simira eliezeriana</i> Casca da Madeira
SECMB	<i>Simira eliezeriana</i> Casca da Madeira
SECMR	<i>Simira eliezeriana</i> Casca da Madeira
SEMD	<i>Simira eliezeriana</i> Madeira Diclorometano
SEMA	<i>Simira eliezeriana</i> Madeira Acetato de etila
SEMB	<i>Simira eliezeriana</i> Madeira n-butanol
SEMR	<i>Simira eliezeriana</i> Madeira Resíduo
SERD	<i>Simira eliezeriana</i> Raiz Diclorometano
SERA	<i>Simira eliezeriana</i> Raiz Acetato de etila
SERB	<i>Simira eliezeriana</i> Raiz n-Butanol
SERR	<i>Simira eliezeriana</i> Raiz Resíduo
<i>s</i>	Sinal simples ou simpleto
<i>sl</i>	Sinal largo ou simpleto largo
<i>t</i>	Sinal triplo tripleto
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Família Rubiaceae	3
2.2. Gênero <i>Simira</i>	4
2.3. As espécies <i>Simira eliezeriana</i> e <i>glaziovii</i>	7
2.4. Família Ochnaceae e o gênero <i>Ouratea</i>	8
2.5. A espécie <i>Ouratea parviflora</i>	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Equipamentos e Reagentes	17
3.2. Coleta e identificação do material vegetal.....	18
3.3. Preparação dos extratos brutos	18
3.4. Isolamento e Purificação dos constituintes químicos.....	21
3.4.1. Estudo fitoquímico da fração em CH ₂ Cl ₂ da madeira de <i>Simira eliezeriana</i>	21
3.4.2. Estudo fitoquímico da fração em CH ₂ Cl ₂ da madeira de <i>Simira glaziovii</i>	23
3.4.3. Estudo fitoquímico do extrato em CH ₂ Cl ₂ das folhas de <i>Ouratea parviflora</i>	25
3.4.4. Estudo fitoquímico do extrato em metanol das folhas de <i>Ouratea parviflora</i>	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Determinação estrutural dos Fitosteróis	31
4.1.1. Sitosterol, estigmasterol e campesterol	32
4.1.2. 3- <i>O</i> -glicopiranosil-(6→1)-acil- β -sitosterol.....	38
4.2. Determinação estrutural dos Triterpenos.....	45
4.2.1. Lupeol.....	45
4.2.2. Lupen-3-ona	48
4.2.3. 1 β , 3 β -dihidroxi-olean-12-eno	52
4.2.4. Friedelina.....	62
4.3. Determinação estrutural dos metabólitos C ₆ C ₃ e C ₆ C ₁	66
4.3.1. Coniferaldeído	67
4.3.2. Coniferaldeído + Siringaldeído	69
4.3.3. Tocoferol	72
4.4. Determinação estrutural das Lignanás.....	76
4.4.1. Pinoresinol.....	77
4.4.2. Siringaresinol.....	83
4.5. Determinação estrutural das Cumarinas	89
4.5.1. 6,7,8-Trimetóxicumarina.....	89
4.5.2. Escopoletina+Isofraxidina.....	93
4.6. Determinação estrutural dos Flavonóides.....	96
4.6.1. Agatisflavona.....	98
4.6.2. 7'-metil-agatisflavona	99
4.6.3. Amentoflavona	101
4.6.4. Identificação de flavonoides com Análise por CLAE DAD-EM-EM.....	102
4.7. Alcalóide β -Carbólico	113
4.7.1. Harmana	114
4.8. Diterpenos.....	118
4.8.1. Diterpenos eritroxilenos	119
4.8.2. 11 β -hidroxi-2,4(18), 15-eritroxilatrien-1-ona.....	119
4.8.3. 6 β , 11 β -dihidroxi-2,4(18),15-eritroxilatrien-1-ona.....	130
4.9. Propriedades Quirópticas.....	141
4.9.1. Natureza da luz	141

4.9.2. Dicoísmo Circular	143
4.9.3. Determinação da Configuração Absoluta dos DITEPENOS	146
5. ENSAIOS BIOLÓGICOS	148
5.1. Avaliação do potencial antioxidante.....	149
5.1.1. Procedimento experimental	150
5.1.2. Resultados e Discussão.....	151
5.2. Bioensaio de letalidade contra as larvas de <i>Artemia salina</i> Leach.....	152
5.2.1. Procedimento Experimental	153
5.2.2. Resultados e Discussão.....	153
5.3. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	154
5.3.1. Procedimento Experimental	155
5.3.2. Resultados e Discussão.....	156
5.4. Atividade antiviral	159
5.4.1. Procedimento Experimental	159
5.4.2. Resultados e Discussão.....	161
CONCLUSÃO.....	163
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	164

1. INTRODUÇÃO

As plantas superiores têm sido uma rica fonte para obtenção de substâncias para serem exploradas terapêuticamente. As técnicas de extração, isolamento, identificação e determinação estrutural de substâncias oriundas do metabolismo especial de plantas superiores têm sido a principal preocupação das áreas relacionadas às ciências químicas, farmacêuticas e outras áreas de conhecimentos relacionadas à biodiversidade como agronomia, meio ambiente, etc. As substâncias produzidas pelo metabolismo especial como ácidos benzóicos simples, ácidos cinâmicos, cumarinas, arilpropanóides, lignanas, neolignanas, flavonóides, flavolignanas, xantonas, alcalóides, antraquinonas, terpenóides são frequentemente características de grupos biológicos, como família ou gênero. Os caminhos biossintéticos responsáveis pela gênese dos metabólitos secundários como chiquimato, acetato e mevalonato, envolvem um número relativamente pequeno de bioreações conhecidas pelos químicos orgânicos. Como exemplos podem ser destacadas as reações de alquilação, substituição e adição eletrofílica, rearranjo de Wagner-Meerwein, reações de condensação aldólica e de Claisen, reação de Schiff e Mannich, transaminação, reações de carboxilação e descarboxilação, reações de oxidação, (inclusive Baeyer-Villiger, redução, além de acoplamento oxidativo e reações de glucosilação (TORSSELL, 1997 & DEWICK, 1998).

A química do metabolismo secundário é estudada pelos químicos orgânicos, frequentemente reconhecidos como químicos de produtos naturais que se dedicam ao isolamento, identificação, elucidação estrutural, além de explorar o entendimento da biossíntese e propriedades físicas e químicas desses metabólitos. Este trabalho envolve seleção, coleta e classificação de plantas ou outras fontes naturais, a utilização de técnicas de isolamento, determinação estrutural. Utilizam as informações da composição química das espécies procurando correlação com a ecologia química, evolução química, sistemática bioquímica (quimiotaxonomia) e biossíntese dos metabólitos. Outra contribuição extremamente relevante dos trabalhos desses profissionais é a criação de desafios para o profissional que trabalha com síntese de substâncias orgânicas e inorgânicas que desenvolvem metodologias para síntese ou semissínteses de substâncias com importância econômica e industrial, entre outras. Assim, a investigação dos produtos produzidos pelo metabolismo secundário proporciona o surgimento de novos conhecimentos científicos, descobertas de substâncias orgânicas inéditas, além de contribuir para o avanço de outras disciplinas como botânica, ecologia, medicina humana e veterinária.

A razão mais frequente usada na justificativa de desenvolvimento de trabalhos com produtos naturais é a busca de substâncias com atividades biológicas. No Brasil 20 % da população consomem 63 % dos medicamentos alopáticos, o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente as plantas, uma fonte alternativa de medicação (WHO, 2002). Além de ser o país que detém a maior parcela da biodiversidade, em torno de 15 a 20% do total mundial conhecido, com destaque para as plantas superiores, mais precisamente as angiospermas, nas quais detém aproximadamente 20% da biodiversidade (LEWINSOHN & PRADO, 2004). A relativa facilidade de coleta, o potencial para desenvolvimento sustentável e a diversidade estrutural de seus constituintes apontam as plantas terrestres como a principal fonte renovável para a descoberta e o desenvolvimento de novas drogas. Além de outros bioprodutos que podem ser produzidos a partir dessas fontes como cosméticos, inseticidas, fertilizantes, etc. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar da maioria não ter seus constituintes químicos isolados, identificados e muito menos o entendimento do mecanismo de ação da droga (MACIEL *et al.*, 2002).

A descoberta de novas substâncias com atividades biológicas constitui uma necessidade urgente, pois o aparecimento de resistência a antibióticos e outras drogas têm sido um dos grandes problemas da medicina, pois é causado pelo que há de mais natural e essencial para a origem e evolução dos microrganismos: “mutação espontânea e recombinação de genes (reprodução), que criam variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural, dando vantagem aos mais aptos” (SOUZA, 1998). Dentre as principais drogas de origem natural pode-se destacar a digitoxigenina, (1), um cardiotônico, isolado de espécies de *Digitalis*; a morfina (2), analgésico, isolado de *Papaver Somniferum*; a quinina (3), antimalárico, isolado de espécies da *Cinchona*; a atropina (4), espasmolítica, isolada de *Atropa belladonna* e a vimblastina e vincristina (5 e 6), antumorais, isoladas de *Catharanthus roseus* (Figura 1) (HOSTETTMANN *et al.* 2003); entre outros.

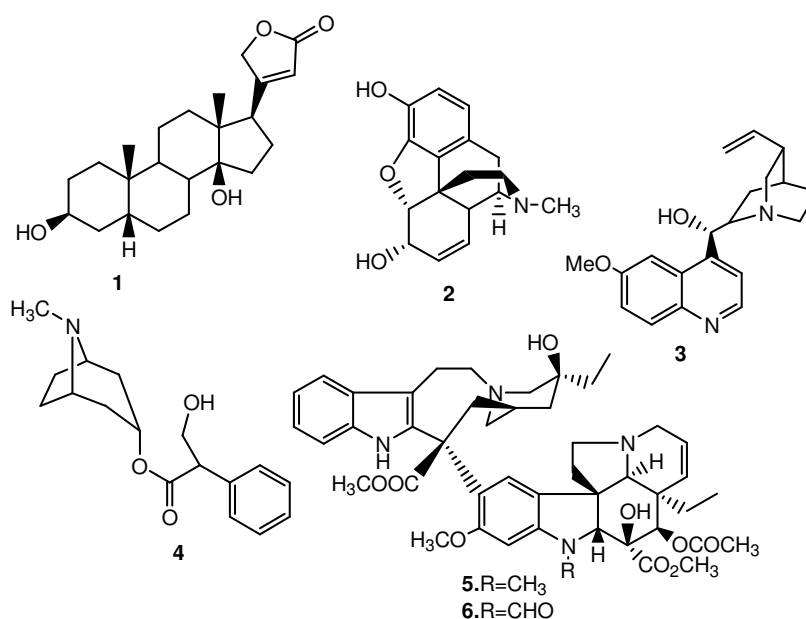


FIGURA 1. Substâncias naturais utilizadas como fitofármacos.

As razões relacionadas acima revelam alguns fatos importantes na justificativa do desenvolvimento de trabalhos relacionados com o estudo fitoquímico de plantas. Neste sentido, foram escolhidas algumas espécies para desenvolver estudo fitoquímico conduzindo trabalhos de isolamento, purificação e determinação estrutural e avaliação da atividade biológica como antioxidante, antimicrobiana e antiviral de extratos e substâncias isoladas. Utilizaram-se duas espécies do gênero *Simira* família Rubiaceae, *S. glaziovii* e *S. elierezeriana*, e uma espécie de Ochnaceae, *O. parviflora*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família Rubiaceae

A família Rubiaceae está situada entre as quatro maiores famílias angiospermas perdendo apenas para as Asteraceae, Orchidaceae e Fabaceae (Leguminosae). Segundo ROBBRECHT (1988 *apud* PEREIRA & BARBOSA, 2004), esta família engloba cerca de 637 gêneros e aproximadamente 10.700 espécies, classificadas em quatro subfamílias (Antirheoideae, Cinchonoideae, Ixoroideae e Rubioideae) e 44 tribos essencialmente tropicais. Na América, esta família está representada por aproximadamente 229 gêneros e 520 espécies com ampla distribuição geográfica (DELPRETE, 1999).

Segundo TOMAZ e colaboradores (2008), espécies dessa importante família têm sido exploradas como alimento e também na indústria farmacêutica. Apesar de algumas de suas espécies serem mencionadas popularmente como tóxicas são, às vezes incluídas na medicina popular. Muitas são cultivadas pelos frutos comestíveis, para extração de tintura e de tanino, como ornamentais. Muitas são cultivadas por suas madeiras leves (PEREIRA, 2006), sendo que 80% dos seus gêneros são constituídos por espécies lenhosas (CALLADO & NETO, 2003), ocorrendo como árvores e arbustos (MONGRAND *et al.*, 2005).

Diversos gêneros são endêmicos da região neotropical apresentando cerca de 4.555 espécies. O gênero *Psychotria* L. é o maior da família, representado mundialmente por cerca de 1.650 espécies (PEREIRA & BARBOSA, 2004).

No Brasil ainda são poucos os tratamentos taxonômicos para a família Rubiaceae, sendo os mais completos aqueles elaborados para a Flora *Brasiliensis*, idealizada e coordenada por Karl Friederich Philipp von Martius, sendo o maior projeto florístico realizado no seu tempo, entre os anos de 1840 e 1906 (PEREIRA & BARBOSA, 2004). As plantas dessa família podem ser de porte arbóreo, arbusto, subarbusto ou ervas perenes ou anuais, menos frequentemente lianas. Apresentam folhas simples, opostas ou verticiladas, com estípulas interpeciouladas (WATSON & DALLWITZ, 1992).

Entre suas espécies, encontra-se o café (*Coffea arabica*), com o qual se pode produzir a partir de seus frutos uma das bebidas mais apreciadas no mundo; espécies ornamentais, *Ixora*, *Gardenia*, *Pentas*, *Mussaendas*, espécies invasoras, *Cephaelis ipecacuanha*, e algumas medicinais. Grande parte das espécies dessa família apresenta toxidez e frequentemente causam intoxicações ao gado, como por exemplo, a *Ixora* conhecida como erva-de-rato, entre outras (WATSON & DALLWITZ, 1992).

Esta vasta família possui uma química pouco variável, mas com potencial farmacológico muito significativo. Dentre essas classes destacam-se os iridóides, as antraquinonas e os alcalóides indólicos considerados marcadores quimiotaxonômicos de Rubiaceae e que se apresentam sob um perfil químico diferente e típico para cada subfamília (GAZDA, 2004; CARDOSO *et al.*, 2008). Os triterpenos também são frequentes em diversas espécies, porém, ainda não são considerados como marcadores taxonômicos (CARDOSO *et al.*, 2008). Diversos constituintes químicos como flavonóides e outros derivados fenólicos e terpenóides (diterpenos), também são encontrados nesta família, como mostra a Figura 2, página 4 (BOLZANI *et al.*, 2001).

Na subfamília Ixoroideae, os iridóides são encontrados como marcadores quimiotaxonômicos exclusivos, enquanto que em Cinchonoideae os alcalóides indólicos são predominantes e, em Rubioideae, as antraquinomas estão presentes como a principal classe de metabólitos secundários. Já na subfamília Antirheoideae não há a ocorrência de nenhum destes marcadores químicos (BOLZANI *et al.*, 2001).

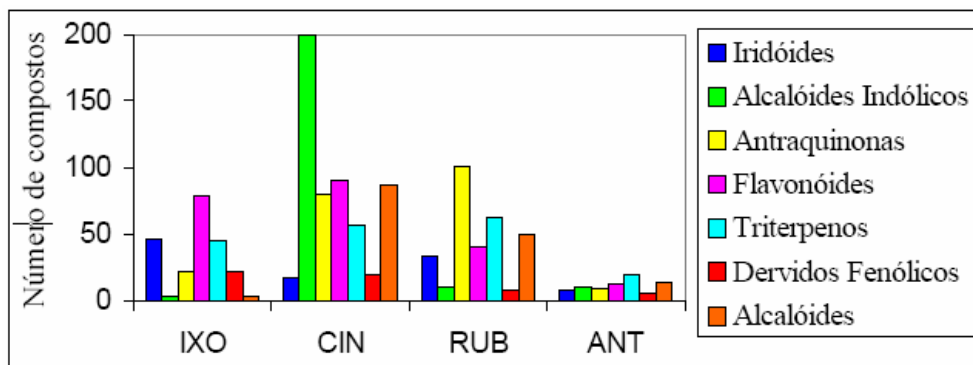


FIGURA 2. Distribuição dos principais constituintes químicos nas quatro subfamílias: Ixoroideae (IXO), Cinchonoideae (CIN), Rubioideae (RUB) e Antirrhoideae (ANT) pertencentes à família Rubiaceae (BOLZANI *et al.*, 2001).

No que se refere à distribuição dos principais metabólitos secundários em Rubiaceae, os alcalóides indólicos foram os marcadores quimiotaxonômicos mais intensamente estudados até agora. Foram encontrados estudos químicos que revelaram várias correlações entre tribos e subfamílias de Rubiaceae e a sua variabilidade estrutural e distribuição restrita (CARDOSO *et al.*, 2008). Essa classe de metabólitos especiais ativos, muitas vezes respondem pelas propriedades analgésicas e antiinflamatórias, sendo usadas comumente no tratamento de reumatismo (GAZDA, 2004), propriedades antinociceptiva e antitussígena (MATSUMOTO *et al.*, 1996 *apud* GAZDA, 2004; DÉCIGA-CAMPOS *et al.*, 2006) e hipotensora (SIMÕES *et al.*, 2004). A variedade de constituintes químicos detectados em espécies desta família tem conduzido à observação de outras propriedades como: hipoglicemiante (GUERRERO-ANALCO *et al.*, 2007), fototóxica (CASTANEDA *et al.*, 1991; CASTRO & LÓPEZ, 1986; MONTOYA *et al.*, 2008), antimalárica (SUN *et al.*, 2008), antioxidante (FRAGOSO *et al.*, 2008), antiviral, antiinflamatória e efeitos em doenças vasculares (HEITZMM, 2005), do sistema nervoso central (DÉCIGA-CAMPOS *et al.*, 2006), atividade antimicrobiana (JAYASINGHE *et al.*, 2002) e atividade analgésica (ALVES *et al.*, 2001).

2.2. Gênero *Simira*

O gênero *Simira* pertencente à família Rubiaceae, sub-família Cinchonoideae, e engloba aproximadamente 41 espécies distribuídas pela região neotropical (SILVA NETO, 2000). O nome *Simira* é popular na Guiana. No Brasil, espécies desse gênero são conhecidas como araribá, araribá-vermelha, araribá-rosa, araribá-branca, quina-rosa, canela-samambaia, maiate e marfim, sendo representado por aproximadamente 16 espécies distribuídas entre os estados do Amazonas, Pará, Goiás, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, inseridas na Mata Atlântica (SILVA NETO, 2000). Quatro espécies do gênero são conhecidas como “araribás” no Estado do Espírito Santo. Uma das características que leva a serem reconhecidas pelo mesmo nome popular “quineiras ou araribás” é o fato de seu córtex tornar-se vermelho ou rosado quando exposto ao ar (PEIXOTO, 1982).

Outro aspecto que, também, deve ser levado em consideração é a associação das propriedades assinaladas pela etnofarmacologia ao nome popular. Por exemplo, (RIZZINI & MORS, 1995) afirmam que as propriedades amargas de uma casca sugerem, de modo geral, ao homem leigo, supostas qualidades febrífugas e antimaláricas. Vem daí que muitos vegetais amargos recebem o nome de quina, embora não tenham sempre ação antimalárica. Estes autores englobam sob a expressão “falsa-quina” espécies de *Coutarea*, *Randia* e *Remijia*

(Rubiaceae) bem como espécies de outras famílias. HOEHNE (1920) tratando de pseudo-quininas, menciona como tônicas (fortificantes) e antifebris as espécies brasileiras do gênero *Simira*, conhecidas também, segundo ele, como araribás.

Em um levantamento sobre a etnobotânica e medicina popular em mercados na cidade do Rio de Janeiro realizado por SILVA (2001), foi identificado uma espécie de *Simira* com nome popular de quina-rosa. Este nome popular, apesar de estar relacionado principalmente ao uso antifebrífugo e/ou antimalárico, a procura pelas cascas de quina-rosa, identificada como *Simira glaziovii*, deve-se principalmente à problemas relacionados ao sangue: “combate a anemia”, “limpar o sangue” e também para “inflamações” e “queda-de-cabelo”. O modo de preparo indicado para a quina-rosa é na forma de chá, colocando-se em fervura, em um litro de água, por alguns minutos dois pedaços de casca de aproximadamente 10 cm. “Pode ser tomado duas a três vezes ao dia”. A espécie faz parte também de garrafadas, que são preparadas e vendidas em mercados. São utilizadas para inflamações em geral, impotência, bem como para o sangue e, neste caso, a inclusão das cascas de *Simira glaziovii* é considerada essencial (SILVA, 2001).

O gênero é representado por árvores de pequeno a grande porte, com espécies de interesse econômico reconhecidas pelo valor tintorial, madeireiro, artesanal e paisagístico para arborização de ruas (CORRÊA, 1978; PEIXOTO, 1982). É caracterizado por apresentar cerne marrom ou acinzentado quando recém cortado, adquirindo coloração vermelha, rósea ou violácea quando exposto ao ar ou à luminosidade que desaparece após alguns meses da coleta (PEIXOTO, 1982).

Do ponto de vista fitoquímico, espécies do gênero são caracterizadas pela bioprodução de alcalóides, triterpenos, esteróides glicosilados e outros metabólitos especiais, sendo o alcalóide β -cabolínico harmana o mais comum no gênero. Até o momento apenas as espécies *S. maxonii*, *S. salvadorensis*, *S. rubra* e *S. glaziovii* foram estudadas no âmbito fitoquímico (Quadro 1 e Figura 3, páginas 5 e 6) (BASTOS *et al.*, 2002; ALVES *et al.*, 2001; CASTANEDA *et al.*, 1991; HASBUN *et al.*, 1989; CASTRO & LÓPEZ, 1986; ARNASON *et al.*, 1983). Como citado acima, esse gênero vêm despertando interesse para estudo devido às atividades farmacológicas encontradas em algumas espécies sendo usadas como tônicas, fototóxicas, antifebrís e também pelas informações etnomédicas de *S. rubencens* cujas cascas são utilizadas no tratamento de manchas dentárias (ALVES *et al.*, 2001; LEWIS & ELVIN-LEWIS, 1984).

Espécies	Material	Subst.	Referências
<i>S. maxonii</i>	Raiz	7, 8	CASTRO & LÓPEZ, 1986 HASBUN <i>et al.</i> , 1989
<i>S. salvadorensis</i>	Casca da madeira	7	ARNASON <i>et al.</i> , 1983
<i>S. rubra</i>	Casca da madeira	7	ARNASON <i>et al.</i> , 1983
<i>S. glaziovii</i>	Casca da madeira	7,9-19	BASTOS <i>et al.</i> , 2002 ALVES <i>et al.</i> , 2001

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

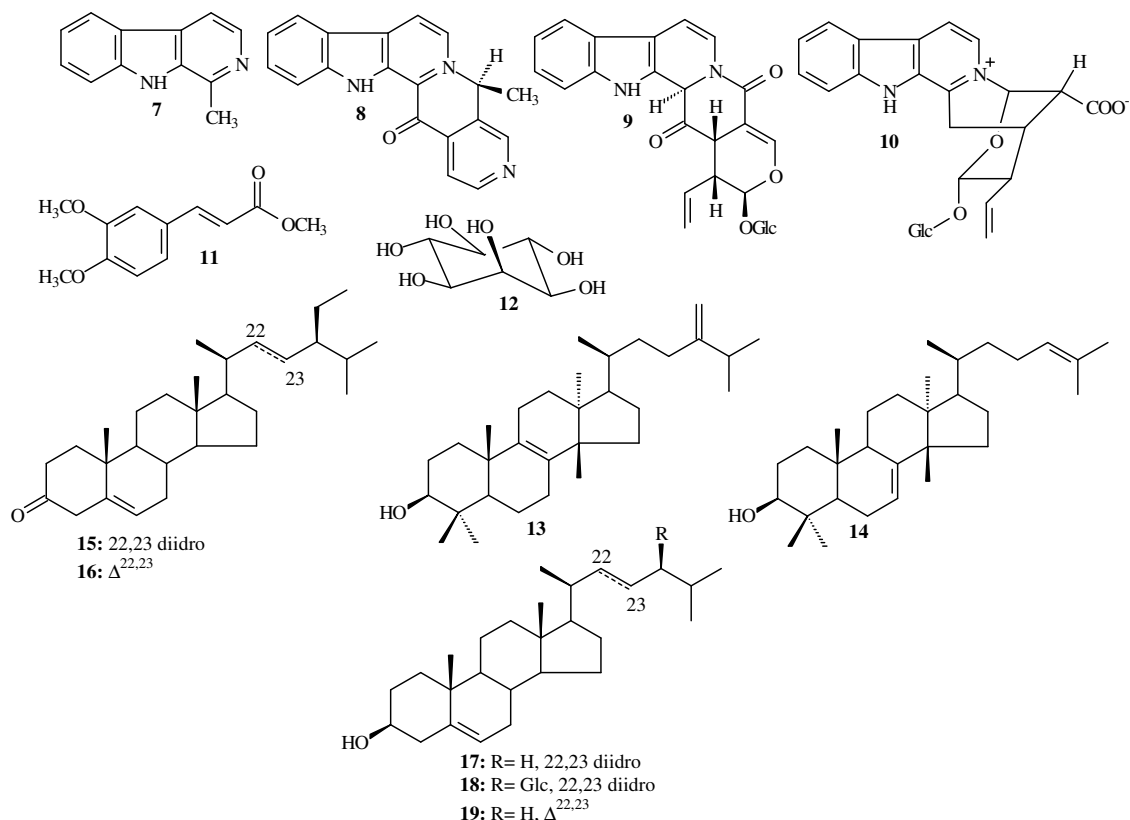


FIGURA 3. Metabólitos especiais isolados de espécies do gênero *Simira*.

Um levantamento recente da composição florística e arbórea de um fragmento de floresta da Mata Atlântica, situada na reserva florestal da companhia Vale do Rio Doce (CVRD), em Linhares no Espírito Santo, indicou a presença de quatro espécies do gênero *Simira* em sua composição (Quadro 2) . [www.cvrld.com.br\(2007\)](http://www.cvrld.com.br(2007)).

Nomes científicos	Nomes populares	Uso popular	Registro no herbário da CVRD
<i>S. elierezeriana</i> Peixoto	Maiate	Arborização, construção	5000
<i>S. glaziovii</i> (K. Schum.) Steyermark	Arariba	Arborização, construção	5004
<i>S. grazielae</i> A.L. Peixoto	Arariba vermelha	Arborização, construção	357
<i>S. sampaioana</i> (Standl.) Steyerm	Arariba ovo	Artesanato, arborização, construção	8610

QUADRO 2. Espécies de *Simira* situadas na floresta da CVRD.

2.3. As espécies *Simira eliezeriana* e *glaziovii*

O nome *S. glaziovii* é uma homenagem ao francês A. F. M. Glaziou que, na segunda metade do século XIX, trabalhou como botânico paisagista no Brasil, tendo coletado o material que serviu de base para a descrição da espécie. No Brasil, a área de ocorrência desta espécie, se resume aos estados do Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. Os termos araiaba (RJ, ES), quina-rosa (MG), arariba-vermalha (RJ, ES, MG) são nomes populares dados a esta espécie. Apresenta sinonímia: *Sickingia glaziovii* e *S. erytroxylon*. Possuem até 30 m de altura com diâmetro de caule de até 56 cm, ramos cilíndricos, glabros. Floresce predominantemente de dezembro a janeiro e frutifica cerca de seis meses após a floração. Destaca-se pela magnitude de exemplares arbóreos com ocorrência em mata alta (PEIXOTO, 1982).

O nome específico *S. eliezeriana* foi dado em homenagem a Eliezer Batista da Silva, que foi uns dos primeiros incentivadores da criação da Reserva Florestal da Cia. Vale do Rio Doce e que têm sido desde a criação dessa reserva, um dos incentivadores da sua preservação. São árvores com até 8 m de altura com diâmetro de caule de até 15 cm, casca áspera e cinza. Floresce em novembro e dezembro e frutifica seis meses após a floração. Destaca-se por ser de menor porte e vegetar em terreno areno-argiloso, onde a vegetação é menos pujante. Apresenta também folhas grandes e intenso perfume nas flores (PEIXOTO, 1982).

São pertencentes a um gênero que apresenta como característica a presença de alcalóides β -carbolínicos, que estão presentes em plantas conhecidas por afetar o sistema nervoso central. Outra característica do gênero *Simira* é a presença de substâncias fototóxicas, que funcionam como mecanismo de defesa para a planta, causando fotodermatites em humanos e animais predadores. Esta propriedade confere uma vantagem evolutiva às plantas que possuem essas substâncias (ARNASON *et al.*, 1983). A classificação taxonômica de ambas as espécies estão ilustradas no Quadro 3.

Reino	Plantae
Classe	Angiospermae
Subclasse	Dicotyledoneae
Ordem	Gentianales
Família	Rubiaceae
Subfamília	Cinchonoideae
Tribo	Rondeletieae
Gênero	<i>Simira</i>
Espécies	<i>S. eliezeriana</i> Peixoto; <i>S. glaziovii</i> (K.Schum.) Steyerl.

QUADRO 3. Classificação botânica das espécies *S. eliezeriana* e *S. glaziovii*.

2.4. Família Ochnaceae e o gênero *Ouratea*

A família Ochnaceae pertence à ordem Theales e compreende 27 gêneros e cerca de 600 espécies, de ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. No Brasil são encontrados 13 gêneros com aproximadamente 120 espécies (BARROSO *et al.*, 2002; AMARAL, 1991; SOUZA & LORENZI, 2005). São plantas essencialmente arbóreas ou arbustivas, raramente herbáceas (*Sauvagesia*), com folhas em geral simples, de distribuição alterna e com estípulas. Apresentam flores amarelas, alvas ou avermelhadas e com sementes com ou sem albúmen. (BARROSO *et al.*, 2002).

Estudos químicos demonstram que espécies desta família são capazes de biossintetizar flavonóides e biflavonóides, sendo os gêneros *Ochna*, *Lophira*, *Luxemburgia* e *Ouratea* os mais estudados. Investigações sobre a composição química de espécies do gênero *Ouratea*, levaram ao isolamento de vários biflavonóides. A frequência e a diversidade estrutural dos biflavonóides em espécies desses gêneros permitem que sejam utilizados como marcadores taxonômicos (SUZART *et al.*, 2007).

O gênero *Ouratea*, endêmico da região neotropical, é o maior de família com cerca de 120 espécies. Ocorre em todo território Nacional, destacando-se no Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraíba, Bahia e Pernambuco. Algumas espécies do gênero *Ouratea* incluindo a *O. grandifolia*, ocorrem na Restinga da Marambaia, Corcovado e Campo Grande (Limeirão)/RJ. (BARROSO *et al.*, 2002).

As espécies de *Ouratea* são caracterizadas pelas flores geralmente vistosas, frequentemente de coloração amarela. No Nordeste as espécies de *Ouratea* são conhecidas como batiputá, as sementes de batiputá fornecem a “Manteiga de batiputá”, óleo adocicado e aromático, utilizado em conservas e temperos, tornando-se rançoso com facilidade. As espécies de *Ouratea* espalhadas pelo país recebem designações específicas como Angelim (*O. vaccinoides*), Caju Bravo (*O. floribunda* e *O. salicifolia*) e Coração de Bugre (*O. parviflora*). As *O. floribunda* e *O. castanaefolia* são empregadas em ornamentação urbana (SUZART *et al.*, 2007). São utilizadas na medicina popular como adstringentes, tônicas, estomáquicas, vermífugas (BRAGA, 1960), em distúrbios gástricos e reumatismo (MBING *et al.*, 2003) e útil na cura de paralisias, erisipela, feridas no útero e úlceras, distúrbios gástricos e na cicatrização de feridas (BARROSO *et al.*, 2002).

Entre os estudos com espécies do gênero *Ouratea*, podemos destacar os que mostraram atividade antitumoral contra células do carcinoma Ehrlich (CARVALHO *et al.*, 2002), inibição das DNA topoisomerases (GRYNBERG *et al.*, 2002), efeitos antiproliferativos e ativação da apoptose em células de tumor Ehrlich (GRYNBERG *et al.*, 1998). O extrato hidroetanólico e a fração acetato de etila de *Ouratea semisserrata* apresentaram efeito vasodilatador dependente do endotélio (CORTES *et al.*, 2002) e atividade anti-hipertensiva, inibindo a conversão da enzima angiotensina I (ACE) (CASTRO *et al.*, 2000). Os extratos metanólicos de *O. elongata*, *O. flava* e *O. sulcata*, demonstraram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus hirae* e *Candida albicans* (GANGOUE-PIEBOJI *et al.*, 2006). Também apresentou atividade antimicrobiana o óleo da fruta de *O. parviflora* Baill extraído com hexano (PAULO, *et al.*, 1986). O extrato metanólico das folhas de *O. cuspidata* revelou atividade antiparasitária frente a *Leishmania braziliensis*, bioproteção contra radicais livres e ação antiinflamatória (SUZART, 2007).

Estudos químicos realizados em espécies deste gênero revelaram que são bioprodutores de flavonóides sendo alguns glicosilados (SUZART *et al.*, 2007) e biflavonóides (SUZART *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2008) (Quadro 4, páginas 9-11, Figura 4, Páginas 12-14).

Espécie	Material estudado	Flavonóide	referência
<i>O. castaneifolia</i>	Folhas	Amentoflavona (20)	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2008
		4',4''',7,7''-tetrametóxiamentoflavona (21)	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2008
		7,7''-dimetóxiamentoflavona (22)	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2008
		Heveaflavona (23)	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2008
		5,7,4'-trimetóxiisoflavona (24)	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2008
<i>O. elongata</i>	Madeira	4',5-dihidróxi-3',5',7-trimetóxiiflavona (25)	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2008
	Folhas	Podocarpusflavona A (26)	NGONO BIKOBO <i>et al.</i> , 2009
		Bilobetina (27)	NGONO BIKOBO <i>et al.</i> , 2009
		Sequoieflavona (28)	NGONO BIKOBO <i>et al.</i> , 2009
		Lofirona A (29)	NGONO BIKOBO <i>et al.</i> , 2009
<i>O. flava</i>	Madeira	Amentoflavona (20)	NGONO BIKOBO <i>et al.</i> , 2009
		Calodenina B (30)	NGO MBING, <i>et al.</i> , 2003
		Calodenina C (31)	NGO MBING, <i>et al.</i> , 2003
		Flavumona A (32)	NGO MBING, <i>et al.</i> , 2003
		Flavumona B (33)	NGO MBING, <i>et al.</i> , 2003
		Lofirona A (29)	NGO MBING, <i>et al.</i> , 2003
<i>O. gilgiana</i>	Folhas	4',5-dimetóxi - 6,7- metilenodióxi-isoflavona (34)	NGO MBING, <i>et al.</i> , 2003
		Amentoflavona (20)	BA NJOCK <i>et al.</i> , 2010
		6''-O-acetilvitexina (35)	BA NJOCK <i>et al.</i> , 2010
<i>O. hexasperma</i>	Casca da madeira	Hexaspermona B (36)	MOREIRA, <i>et al.</i> , 1994
		Hexaspermona C (37)	MOREIRA, <i>et al.</i> , 1994
		4',5,7-trimetóxiisoflavona (38)	MOREIRA, <i>et al.</i> , 1994
	Raiz	Hexaspermona A (39)	MOREIRA, <i>et al.</i> , 1994
	Folhas	7''-metóxiagatisflavona (40)	MOREIRA, <i>et al.</i> , 2002
		7,7''-dimetóxilanaflavona (41)	DANIEL, <i>et al.</i> , 2005
		7''-metóxiagastiflavona (40)	DANIEL, <i>et al.</i> , 2005
		Agastiflavona (42)	DANIEL, <i>et al.</i> , 2005
		Epicatequina (43)	DANIEL, <i>et al.</i> , 2005
		6-C-glicopiranosil-luteolina (44)	DANIEL, <i>et al.</i> , 2005
3-O-glicopiranosil-quercetina (45)		DANIEL, <i>et al.</i> , 2005	

QUADRO 4. Distribuição dos flavonóides isolados nas partes das espécies de *Ouratea*

	Galhos	8-C- β -D-glicopiranosil 2''-O- β -D- glicopiranosil-luteolina (46) 7-O- β -D-glicopiranosil-6-(3-metilbut-2-enil)-5,4'- dihidróxilavanonol (47) 7-O- β -D-glicopiranosil-6-(3-metilbut-2-enil)-3,5,4'- trihidróxilavona (48)	DANIEL, <i>et al.</i> , 2005 CARVALHO <i>et al.</i> , 2008 CARVALHO <i>et al.</i> , 2008
<i>O. microdonta</i>	Folhas	7''-metóxiagatisflavona (40) Agatisflavona (42) Amentoflavona (20) Amentoflavona (20) 3-Hidróxi-4',5,7-trimetóxilavona-(6 \rightarrow 8'')-3''-hidróxi-3''',4''',5'',7''- tetrametóxilavona (49)	CARVALHO <i>et al.</i> , 2008 CARVALHO <i>et al.</i> , 2008 CARVALHO <i>et al.</i> , 2008 FELÍCIO <i>et al.</i> , 2001 FELÍCIO <i>et al.</i> , 2001
<i>O. multiflora</i>	Folhas	Heveaflavona (23) 7'',4'''-dimetóxiamentoflavona (50) Podocarpusflavona A (26) Amentoflavona (20)	CARBONEZI <i>et al.</i> , 2007 CARBONEZI <i>et al.</i> , 2007 CARBONEZI <i>et al.</i> , 2007 CARBONEZI <i>et al.</i> , 2007
<i>O. nigroviolacea</i>	Folhas	Ouratina A (51) Ouratina B (52) Agatisflavona (42)	NGO MBING <i>et al.</i> , 2006 NGO MBING <i>et al.</i> , 2006 NGO MBING <i>et al.</i> , 2006
<i>O. parviflora</i>	Galhos	7,7''-dimetóxiagastiflavona (53)	FELICIO <i>et al.</i> , 2004
	Folhas	Amentoflavona (20)	FELICIO <i>et al.</i> , 2004
<i>O. semisserata</i>	Galhos	3',6,8-Tricloro-4',5-dihidróxi-7-metóxiisoflavona (54) 3',5',6,8-Tetracloro-4',5-dihidróxi-7-metóxiisoflavona (55)	VELANDIA <i>et al</i> 2002 VELANDIA <i>et al</i> 2002
	Folhas	5,7-Dihidróxilavona-(4' \rightarrow O \rightarrow 8'')- 4''',5'',7''-trihidróxilavona (56) 5-Hidróxi-7-metóxilavona-(4' \rightarrow O \rightarrow 8'')-4''',5'',7''-trihidróxilavona (57) 5-Hidróxi-7-metóxilavona-(4' \rightarrow O \rightarrow 8'')-5'',7''-dihidróxi-4'''- metóxilavona (58)	VELANDIA <i>et al</i> 2002 VELANDIA <i>et al</i> 2002 VELANDIA <i>et al</i> 2002
<i>O. semisserata</i>		Podocarpusflavona A (26) Rutina (59)	VELANDIA <i>et al</i> 2002 VELANDIA <i>et al</i> 2002
	Folhas e galhos	Amentoflavona (20)	VELANDIA <i>et al</i> 2002
<i>O. spectabilis</i>	Folhas	6,6''- Bigenkwanina (60)	FELICIO <i>et al.</i> , 2005

<i>O. staudtii</i>	Folhas	7,7"- dimetóxiagatisflavona (53)	FELICIO <i>et al.</i> , 2008
		Lofirona A (29)	ZINTCHEM <i>et al.</i> , 2007
		Ochnaflavona (61)	ZINTCHEM <i>et al.</i> , 2007
		Amentoflavona (20)	ZINTCHEM <i>et al.</i> , 2007
		Bilobetina (27)	ZINTCHEM <i>et al.</i> , 2007
		Podocarpusflavona A (26)	ZINTCHEM <i>et al.</i> , 2007
		Agatisflavona (42)	ZINTCHEM <i>et al.</i> , 2007
		Sulcatona A (62)	PEGNYEMB <i>et al.</i> , 2005
<i>O. sulcata</i>	Folhas	3-hidroxi-2,3-diidroapigenil-[I-4',O,II-3']-diidrokaempferol (62)	PEGNYEMB <i>et al.</i> , 2005
		Agatisflavona (42)	PEGNYEMB <i>et al.</i> , 2005
		Lofirona A (29)	PEGNYEMB <i>et al.</i> , 2005
<i>O. turnerae</i>	Folhas	Amentoflavona (20)	PEGNYEMB <i>et al.</i> , 2005
		4',5-dimetoxi-6,7-metilenedioxiisoflavona (34)	NGO MBING <i>et al.</i> , 2009
		Lofirona A (29)	NGO MBING <i>et al.</i> , 2009
<i>O. zenkeri</i>	Folhas	Lanceolona (64)	NGO MBING <i>et al.</i> , 2009
		2"-O-acetil-7-O-metil vitexina	NGO MBING <i>et al.</i> , 2009
		Amentoflavona (20)	NGO MBING <i>et al.</i> , 2009
		Lofirona A (29)	NGO MBING <i>et al.</i> , 2009
		Zenkerina A (65)	NGO MBING <i>et al.</i> , 2009
Zenkerina B (66)	NGO MBING <i>et al.</i> , 2009		
Rusflavona (68)	NGO MBING <i>et al.</i> , 2009		

QUADRO 4. Distribuição dos flavonóides isolados nas partes das espécies de *Ouratea* (continuação).

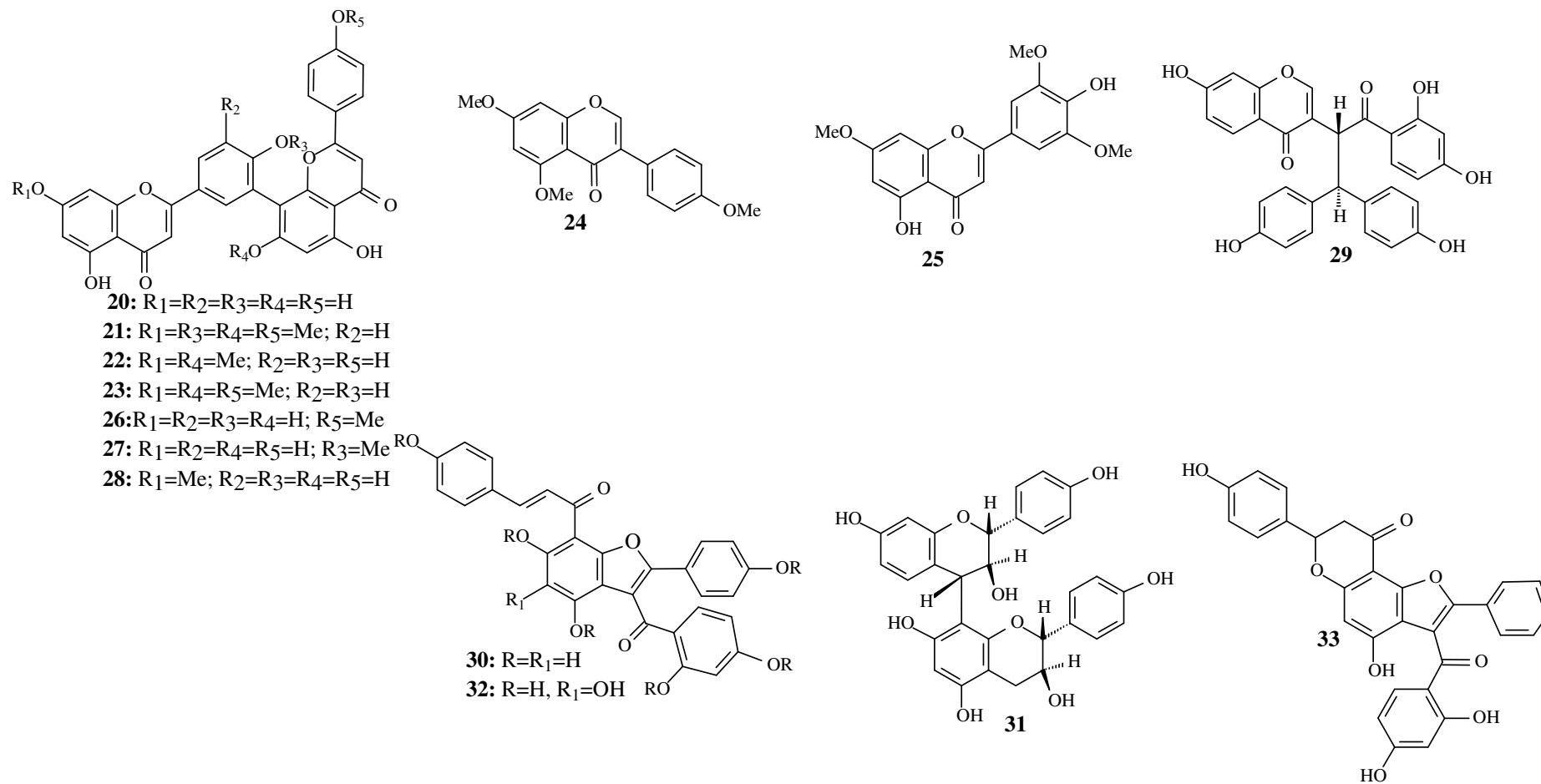


FIGURA 4. Flavonóides isolados de espécies de *Ouratea*

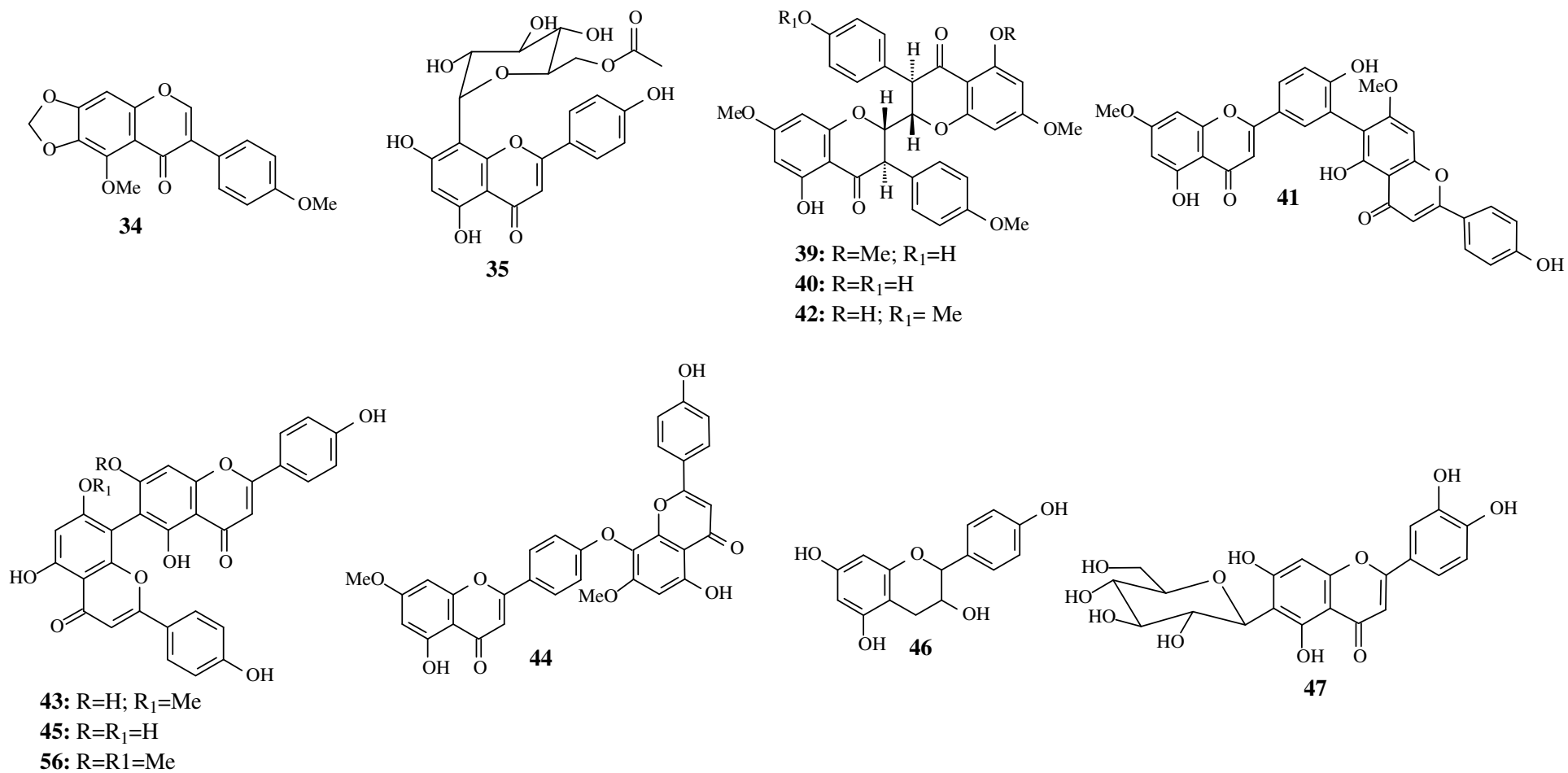


FIGURA 4. Flavonóides isolados de espécies de *Ouratea* (continuação)

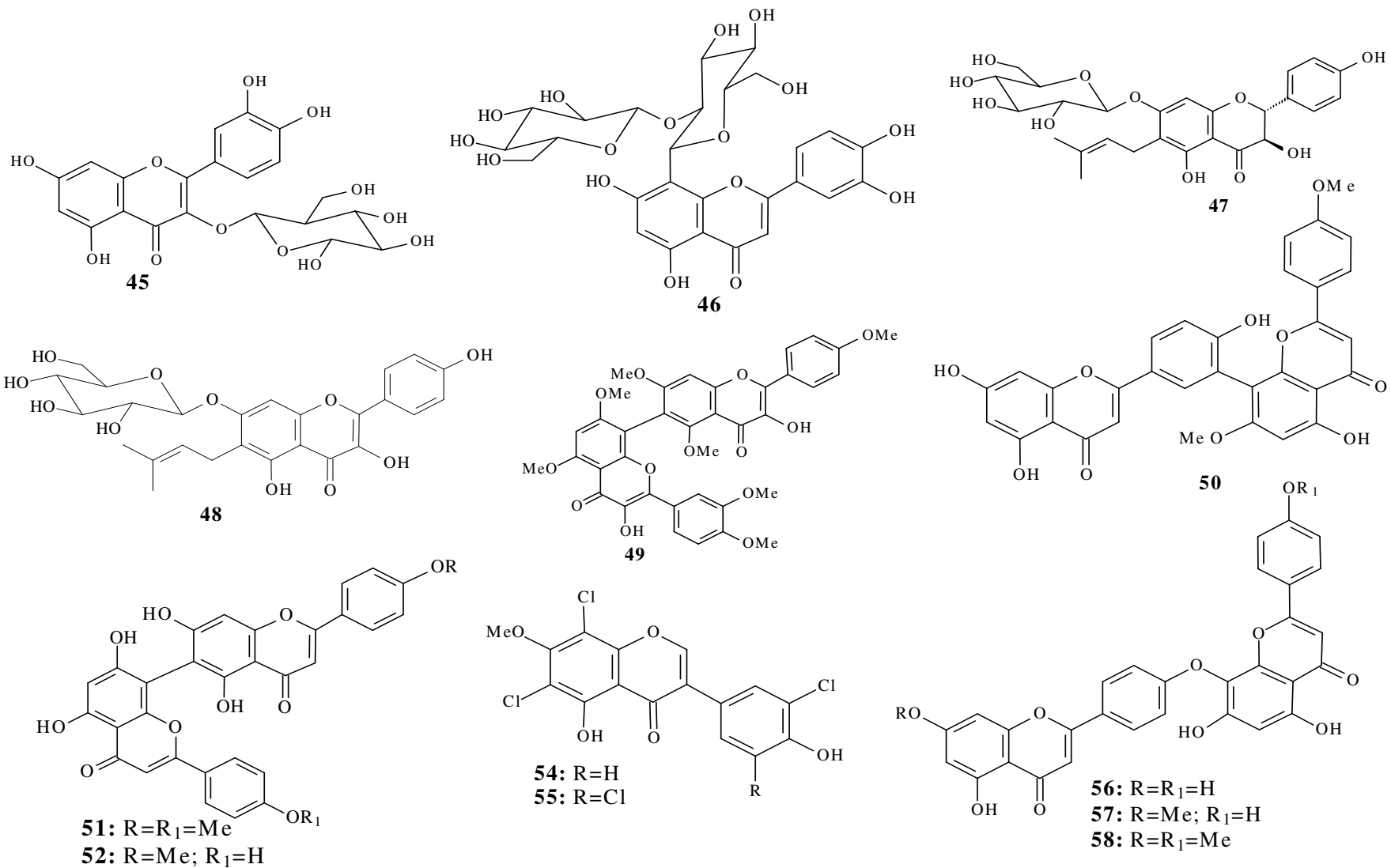


FIGURA 4. Flavonóides isolados de espécies de *Ouratea* (continuação)

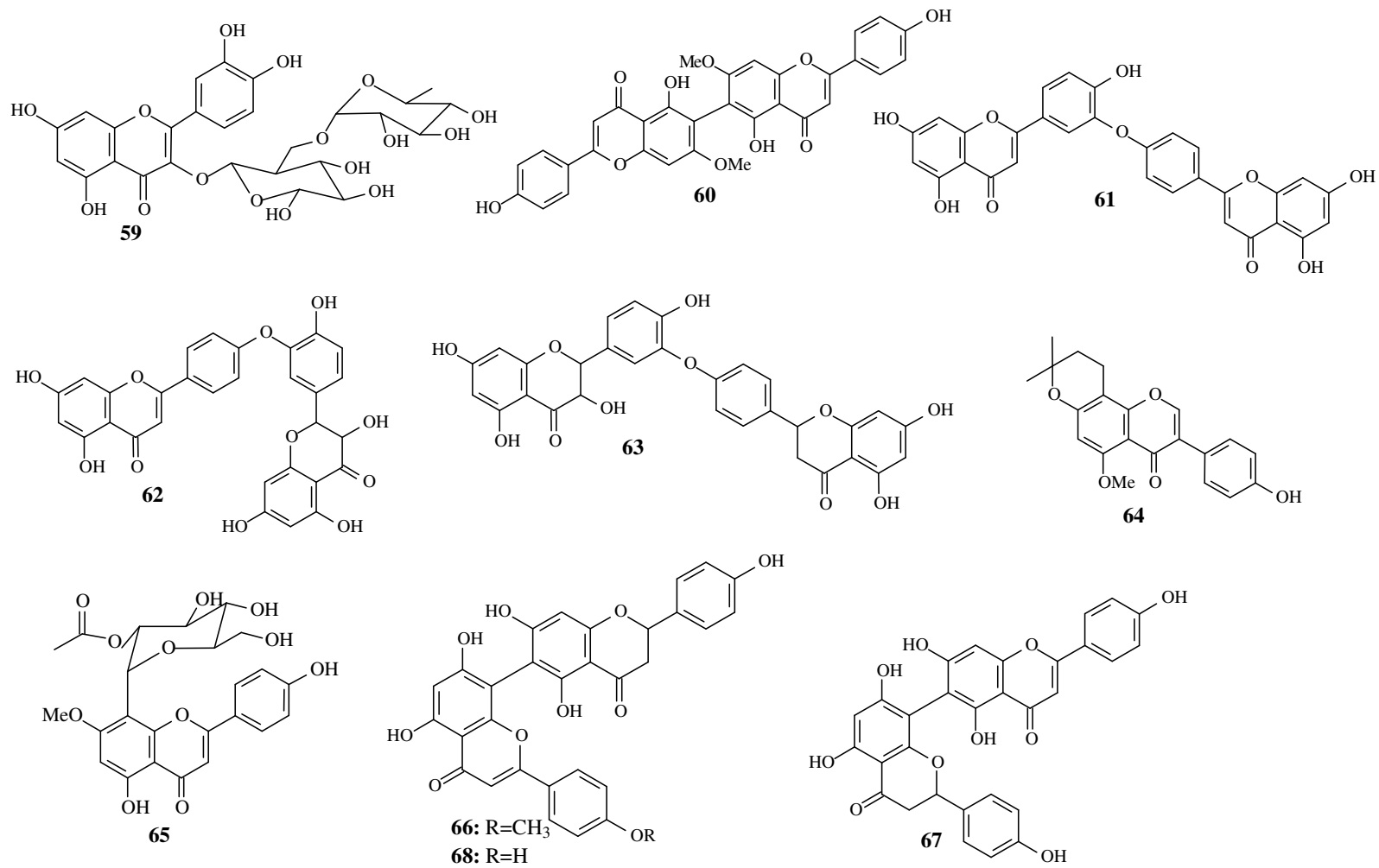


FIGURA 4. Flavonóides isolados de espécies de *Ouratea* (continuação).

Além de flavonóides e biflavonóides, ocorrem no gênero outras classes de substâncias como norisoprenóides (VELANDIA *et al.*, 1998), diterpenos (VELANDIA *et al.*, 1998; FELÍCIO *et al.*, 2004), triterpenos, (MBING *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2008), esteróides (CARVALHO *et al.*, 2008), lignanas (VELANDIA *et al.*, 1998), hidrocarbonetos e ésteres alifáticos (MOREIRA *et al.*, 1994; PAULO *et al.*, 1986; ESTEVAM *et al.*, 2005) além de derivado do ácido benzóico (CARVALHO *et al.*, 2008).

2.5. A espécie *Ouratea parviflora*

Esta espécie apresenta-se como árvore com 10 m de altura quando adulta. É conhecida popularmente como “coração de bugre e batiputá” apresenta folhas de comprimento maior que três vezes a largura. Ocorre nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e no Sul do Brasil (GUIMARÃES & PEREIRA, 1966; SALVADOR *et al.*, 2005). Floresce quase todos os meses (exceto novembro) sendo mais frequente no mês de fevereiro, frutifica de dezembro a agosto. A classificação taxonômica da espécie pertencente à família Ochnaceae está ilustrada no Quadro 5. Existem relatos da utilização do óleo dos frutos no combate a processos inflamatórios e enfermidades localizadas na pele além de tônico e adstringente (MARCAL *et al.*, 1988; CORTES *et al.*, 2002).

No âmbito fitoquímico a espécie é caracterizada pela produção de flavonóides e biflavonóides sendo estes últimos considerados como marcadores quimiotaxonômicos do gênero, além de terpenóides e esteróides (FELÍCIO *et al.*, 2004). O estudo fitoquímico desta espécie desperta o interesse principalmente pelas propriedades biológicas encontradas em extratos de representantes do gênero como: antimicrobiana (MARCAL *et al.*, 1988), antitumoral (GRYNBERG *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2001), atividade inibitória sobre a enzima aldose redutase (FELÍCIO, *et al.*, 1995).

Reino	Plantae
Classe	Angiospermae
Subclasse	Dicotyledoneae
Ordem	Malpighiales
Família	Ochnaceae
Gênero	<i>Ouratea</i>
Espécie	<i>Ouratea parviflora</i> (DC.) Baill.

QUADRO 5. Classificação botânica de *O. parviflora*

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Equipamentos e reagentes

No processo de extração, fracionamento e purificação foram utilizados os seguintes materiais:

- Na etapa de extração bem como no fracionamento e purificação foram utilizados solventes Synth e Vetec;
- A evaporação por pressão reduzida dos solventes dos extratos foi efetuada em evaporadores rotativos, Büchi B-480 e Fisatom 802;
- Nas etapas de fracionamento e purificação foram utilizados gel de sílica 60G (0,063-0,200 mm) Merck, gel de sílica 60 (0,040-0,063 mm) e Sephadex LH-20 Pharmacia;
- Utilizou como agente dessecante: Na₂SO₄ anidro Vetec;
- Nas análises comparativas através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) utilizaram-se cromatofolhas de gel de sílica 60 F₂₅₄ e RP-18 F₂₅₄ Merck;
- A cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foi feita sobre suporte de vidro de 20x20 cm usando gel de sílica 60 PF₂₅₄, Merck e Vetec como fase estacionária;
- Como método de revelação não destrutivo das amostras analisadas nas cromatografias em camada delgada analítica foi utilizada irradiação na região do ultravioleta ($\lambda = 254$ e 356 nm);
- Como métodos destrutivos das amostras analisadas nas cromatografias em camada delgada analítica foram utilizados reagentes cromogênicos:
 - Dragendorff (solução de nitrato básico de bismuto II em ácido acético diluído com iodeto de potássio), reagente para alcalóides (MATOS, 1997);
 - Liebermann Burchard (20 mL de anidrido acético e 20 mL de ácido sulfúrico diluídos em 200 mL de etanol, em banho de gelo), seguido de aquecimento, reagente para terpenos e esteróides (MATOS, 1997);
 - Soluções de AlCl₃-EtOH (1%), seguido de aquecimento, reagente para flavonóides. (VENNAT *et al.*, 1992);
 - Solução de vanilina sulfúrica (1% de vanilina em solução com 45 mL de água, 45 mL de etanol e 10 mL ácido sulfúrico) (MATOS, 1997);

No processo de análise espectroscópica das substâncias isoladas foram utilizados os seguintes materiais:

- Os pontos de fusão foram determinados em placa de aquecimento MEL-TEMP II, Laboratory Devices USA, utilizando capilar e em um equipamento Microquímica MQRPF o qual utilizaram-se lâminas de vidro, em ambos os valores foram obtidos sem correção;
- Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetros Perkin-Elmer 1600/1605 FT-IR e FT-IR modelo VERTEX 70 da Bruker em pastilhas de KBr;
- Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear RMN de ¹H e de ¹³C (incluindo experimentos em 2D), foram obtidos em espectrômetros Bruker Advance II 9,4 T (¹H: 400 e ¹³C: 100 MHz), 11,5 T (¹H: 500 MHz e ¹³C: 125 MHz) e Jeol Eclipsi 9,4 T (¹H: 400 e ¹³C: 100 MHz). Como padrão interno foi usado tetrametilsilano;
- Os programas Delta (versão 4.3) do espectrômetro Jeol Eclipse +400 e ACD/Labs (versão 6.0) foram utilizados para processamento dos dados obtidos nos experimentos de RMN;

- Os espectros de massas de baixa resolução foram registrados em equipamentos de cromatografia a gás que possuem como detector espectrômetro de massas com analisador de íons quadrupolo e com modo de ionização por impacto de elétrons, 70 eV da Varian Saturn 2000 e CG/EM-QP2010 Plus da Shimadzu, ambos da UFRRJ;
- As análises em CL-EM-IES foram realizadas na Universidade Federal do Ceará, no Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste – LEMANOR, em aparelho Shimadzu CL-EM-TOF (225-07100-34) equipado com fonte de ionização de elétron-spray;
- Os espectros de dicroísmo circular (DC) foram obtidos em espectropolarímetro J-815 Circular Dichroism da JASCO;
- O desvio da luz polarizada foi obtido em um polarímetro Perkin-Elmer 343;
- Os espectros de UV foram obtidos em espectrômetro UV-1601 PC Shimadzu.

3.2. Coleta e identificação do material vegetal

As espécies *S. glaziovii* e *S. eliezeriana* foram coletadas na reserva florestal da Companhia Vale do Rio Doce CVRD, em Linhares-ES, em novembro de 2007. O reconhecimento botânico foi realizado através de comparação com exsiccatas presentes no herbário da companhia com a colaboração do identificador botânico, Domingos Antônio Folli, funcionário da companhia. As mesmas apresentam registro no herbário sob nº 5004 e 5000 respectivamente.

A espécie *O. parviflora* foi coletada em Ouro Preto, Minas Gerais. A identificação botânica foi realizada pela Dra. Elsie F. Guimarães. Uma exsicata do espécime foi depositada no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, JBRJ com registro sob nº RB 44334.

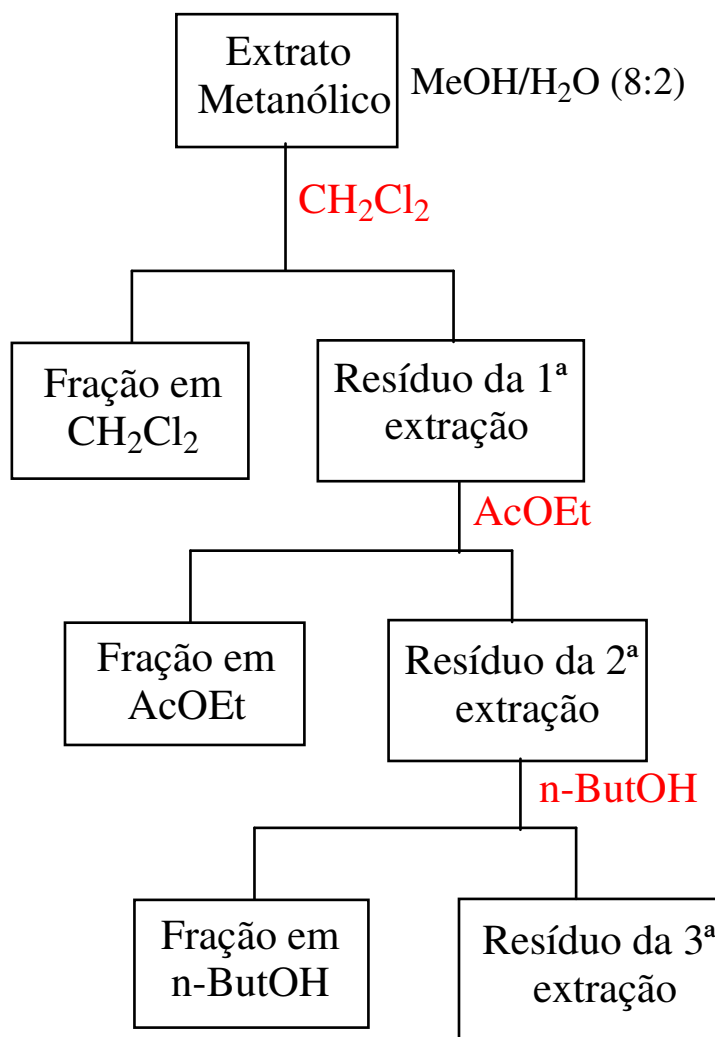
3.3. Preparação dos extratos brutos

O material das espécies (Quadro 6), após serem pulverizados e definidos as massas, foram submetidos a processo de extração por maceração exaustiva com metanol.

Espécies	Material vegetal	Massa de material vegetal (Kg)	Massa total de extrato (Kg)
<i>S. glaziovii</i> (K. Schum.) Steyermark	Casca da madeira	3,700	0,3900
	Madeira	5,830	0,4300
<i>S. eliezeriana</i> Peixoto	Casca da madeira	1,920	0,3000
	Madeira	5,950	0,5000
	Raiz	1,000	0,1300
<i>Ouratea Parviflora</i>	Folhas	0,8210	0,3310

QUADRO 6. Material vegetal das espécies de *Simira* e *Ouratea*.

Após retirada do solvente por evaporação em um evaporador rotatório, metade da massa de cada extrato, aproximadamente, foi solubilizada em MeOH/H₂O (8:2) e submetidas a partição com hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e n-ButOH com exceção a *O. parviflora* que os extratos foram obtidos realizando-se primeiramente uma extração com CH₂Cl₂ e posterior extração com metanol. Em seguida este último foi submetido à partição de forma análoga aos extratos de *Simira* utilizando apenas CH₂Cl₂, AcOEt (Esquema 1).



ESQUEMA 1. Partição dos extratos metanólicos dos materiais vegetais.

A realização da partição dos extratos metanólicos dos materiais das três espécies forneceu 23 frações. A massa das mesmas estão ilustradas no Quadro 7, página 20.

<i>Simira glaziovii</i>			
Material	Frações	Código	Massa (g)
Casca da madeira	Diclorometano	SGCD	28,6
	Acetato de etila	SGCA	12,5
	n-Butanol	SGCB	30,2
	Resíduo metanólico	SGCR	75,5
Madeira	Diclorometano	SGMD	10,3
	Acetato de etila	SGMA	5,90
	n-Butanol	SGMB	33,0
	Resíduo metanólico	SGMR	70,3
<i>Simira eliezeriana</i>			
Material	Frações	Código	Massa (g)
Casca da madeira	Diclorometano	SECD	43,1
	Acetato de etila	SECA	13,5
	n-Butanol	SECB	74,2
	Resíduo	SECR	99,3
Madeira	Diclorometano	SEMD	24,5
	Acetato de etila	SEMA	4,62
	n-Butanol	SEMB	1,21
	Resíduo	SEMR	23,0
Raiz	Diclorometano	SERD	2,27
	Acetato de etila	SERA	1,54
	n-Butanol	SERB	8,00
	Resíduo	SERR	10,0
<i>Ouratea parviflora</i>			
Material	Frações	Código	Massa (g)
Folhas	Diclorometano	OPFD	5,00
	Diclorometano	OPFM-D	7,50
	Acetato de etila	OPFM-A	31,87
	Resíduo	OPFM-R	5,59

SGCMD-*Simira glaziovii* Casca da Madeira Diclorometano, SGCA-*Simira glaziovii* Casca da Madeira Acetato de etila, SGCB-*Simira glaziovii* Casca da Madeira n-Butanol, SGCR-*Simira glaziovii* Casca da Madeira Resíduo, SGMD-*Simira glaziovii* Madeira Diclorometano, SGMA-*Simira glaziovii* Madeira Acetato de etila, SGMB-*Simira glaziovii* Madeira n-Butanol, SGMR-*Simira glaziovii* Madeira Resíduo, SECD-*Simira eliezeriana* Casca da Madeira Diclorometano, SECA-*Simira eliezeriana* Casca da Madeira Acetato de etila, SECB-*Simira eliezeriana* Casca da Madeira n-Butanol, SECR-*Simira eliezeriana* Casca da Madeira Resíduo, SEMD-*Simira eliezeriana* Madeira Diclorometano, SEMA-*Simira eliezeriana* Madeira Acetato de etila, SEMB-*Simira eliezeriana* Madeira n-butanol, SEMR-*Simira eliezeriana* Madeira Resíduo, SERD-*Simira eliezeriana* Raiz Diclorometano, SERA-*Simira eliezeriana* Raiz Acetato de etila, SERB-*Simira eliezeriana* Raiz n-Butanol, SERR-*Simira eliezeriana* Raiz Resíduo, OPFD-*Ouratea parviflora* Folhas Diclorometano, OPFM-D-*Ouratea parviflora* Folhas Metanol- Diclorometano, OPFM-A-*Ouratea parviflora* Folhas Metanol-Acetato de etila OPFM-R-*Ouratea parviflora* Folhas Metanol-Resíduo

QUADRO 7. Partições obtidas do extrato metanólico do material vegetal das três espécies estudadas.

Após a obtenção das frações, as mesmas foram analisadas primeiramente por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) para se identificar as partições com maior diversidade de substâncias. Após análise por CCDA foi concluído que as frações de baixa polaridade apresentaram maior diversidade. As frações de média e alta polaridade apresentaram na CCDA pouca diversidade de substâncias além de exigirem sistemas de eluentes mais polares e fases estacionárias como sílica de fase reversa (C₁₈). O conjunto de informações obtidos nesta etapa conduziu ao início do fracionamento cromatográfico das frações de baixa polaridade priorizando a espécie *S. eliezeriana* por ser o primeiro estudo de âmbito fitoquímico realizado.

3.4. Isolamento e purificação dos constituintes químicos

A análise das frações possibilitou selecionar as que apresentaram maior diversidade de substâncias a serem submetidas ao estudo fitoquímico. Sendo assim, as frações trabalhadas foram: *S. eliezeriana* (CH₂Cl₂), *S. glaziovii* (CH₂Cl₂) ambas da madeira e *O. parviflora* (CH₂Cl₂) folhas.

3.4.1. Estudo fitoquímico da fração em CH₂Cl₂ da madeira de *Simira eliezeriana*

Da fração **SEMD** (*Simira eliezeriana* Madeira Diclorometano) (24,5 g, Quadro 7, página 21) foram separados aproximadamente (5,0 g) para análises biológicas o restante foi submetido a coluna cromatográfica usando gel de sílica como fase estacionária e como eluentes hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH com eluição em modo gradiente de polaridade fornecendo 29 frações de 100 mL. Os solventes foram removidos através de destilação a pressão reduzida e analisadas em CCDA e através do perfil cromatográfico foram reunidas na seguinte ordem: **1-2** (2,67 g); **3-6** (4,20 g); **7-9** (1,67 g); **10-13** (3,02 g); **14-17** (2,16 g); **18-21** (1,54 g); **22-25** (2,00 g); **26-29** (1,09 g) (Esquema 2, página 22).

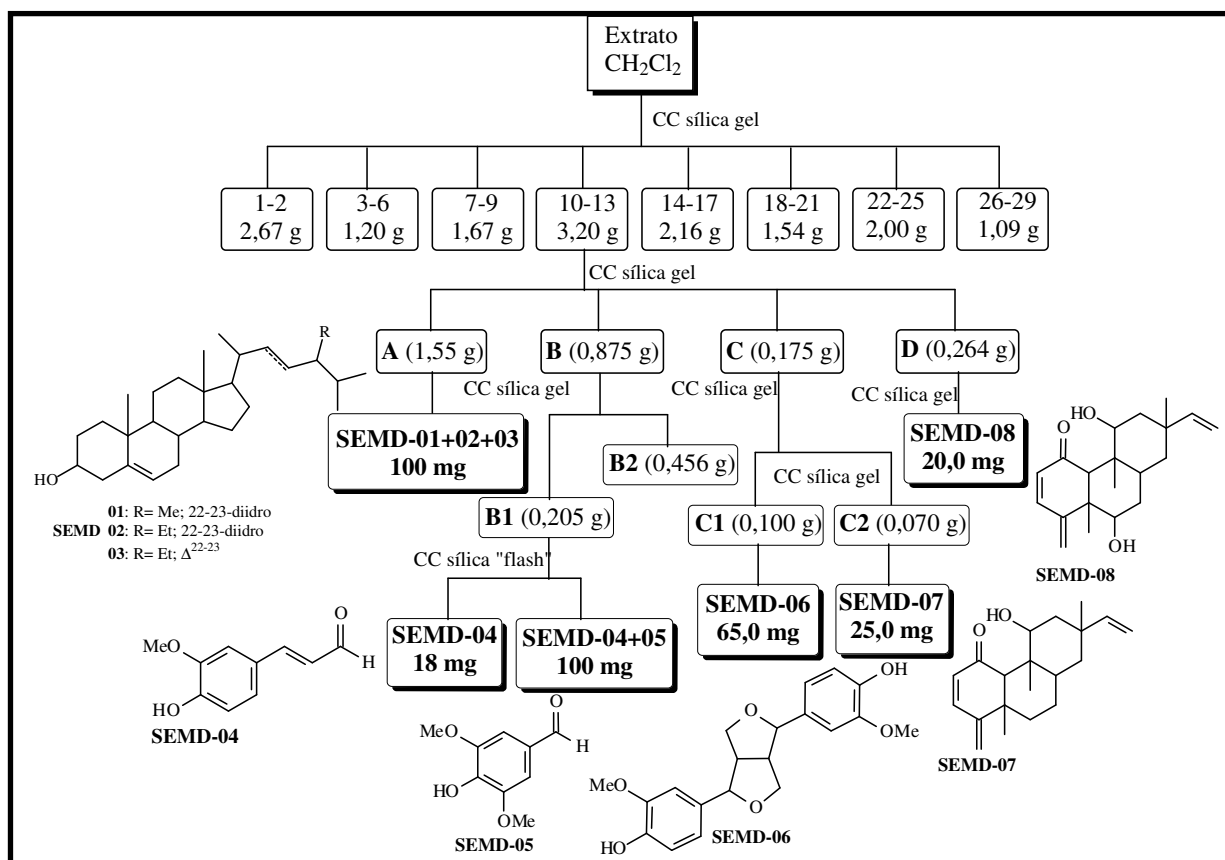
As frações **1-2** (2,67 g) e **3-6** (4,20 g), apresetaram-se como material oleoso que ao serem analisadas por CCDA exibiram baixa polaridade. A análise por RMN de ¹H destas exibiu sinais exclusivamente de substâncias alifáticas (alcoóis, hidrocarbonetos e ácidos graxos), sendo assim, estas frações não foram submetidas a fracionamento cromatográfico.

A fração **7-9** (1,67 g) apresentou-se como um sólido amarelo de aspecto resinoso. A análise por CCDA desta exibiu um perfil cromatográfico que indicou grande quantidade de metabólitos de baixa polaridade análogos às frações anteriores. Também exibiu uma mancha que ao ser comparado com um padrão de mistura de esteróides exibiu mesmo perfil. Baseado nestas observações, as primeiras frações não foram trabalhadas.

A fração **10-13** (3,02 g) foi submetida à cromatografia em coluna usando como fase estacionária gel de sílica e como eluentes hexano, CH₂Cl₂ e AcOEt com eluição em modo gradiente de polaridade até 100% de AcOEt obtendo assim, 34 sub-frações de 25 mL. Após análise por CCDA as sub-frações foram reunidas de acordo com semelhança do perfil cromatográfico resultando nas frações **A-D**: **A** (1,55 g), **B** (0,875 g), **C** (0,175 g) e **D** (0,264 g). A fração **A** (1,55 g) após fracionamento em coluna com gel de sílica forneceu um sólido cristalino (100 mg) que após análise por CG-EM e RMN de ¹H foi possível determinar uma mistura de três substâncias (**SEMD-01+02+03**), respectivamente, Esquema 2, página 22.

A sub-fração **B** (0,875 g) foi submetida a cromatografia em coluna com gel de sílica resultando em 35 frações que foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico após análise por CCDA recebendo os códigos **B1** (0,205 g) e **B2** (0,456 g). O tratamento cromatográfico em coluna de gel de sílica “flash” da fração **B1** (0,205 g) usando éter de petróleo/AcOEt (9:1) com eluição em sistema isocrático resultou no isolamento de **SEMD-04** (18 mg) e 100 mg de uma mistura (**SEMD-04+05**) (Esquema 2, página 22).

A sub-fração **C** (0,175 g) após tratamento cromatográfico em coluna com gel de sílica forneceu 28 frações. A avaliação do perfil cromatográfico obtido em CCDA das frações permitiu que as mesmas fossem reunidas em duas frações que receberam os códigos **C1** (0,100 g) e **C2** (0,070 g). A fração **C1** (0,100 g) foi cromatografada em coluna com gel de sílica usando como eluentes hexano e acetona com eluição em modo gradiente de polaridade fornecendo 65 mg de um sólido amorfo (**SEMD-06**). A fração **C2** (0,070 g) foi submetida ao mesmo procedimento descrito para a fração **C1** fornecendo 25 mg de um material amarelo oleoso (**SEMD-07**) (Esquema 2). O fracionamento cromatográfico da sub-fração **D** (0,264 g) em coluna aberta usando como fase estacionária gel de sílica e como fase móvel hexano e acetona em modo gradiente de eluição conduziu ao isolamento de uma substância com (20 mg) de característica física verde oleoso (**SEMD-08**) (Esquema 2).

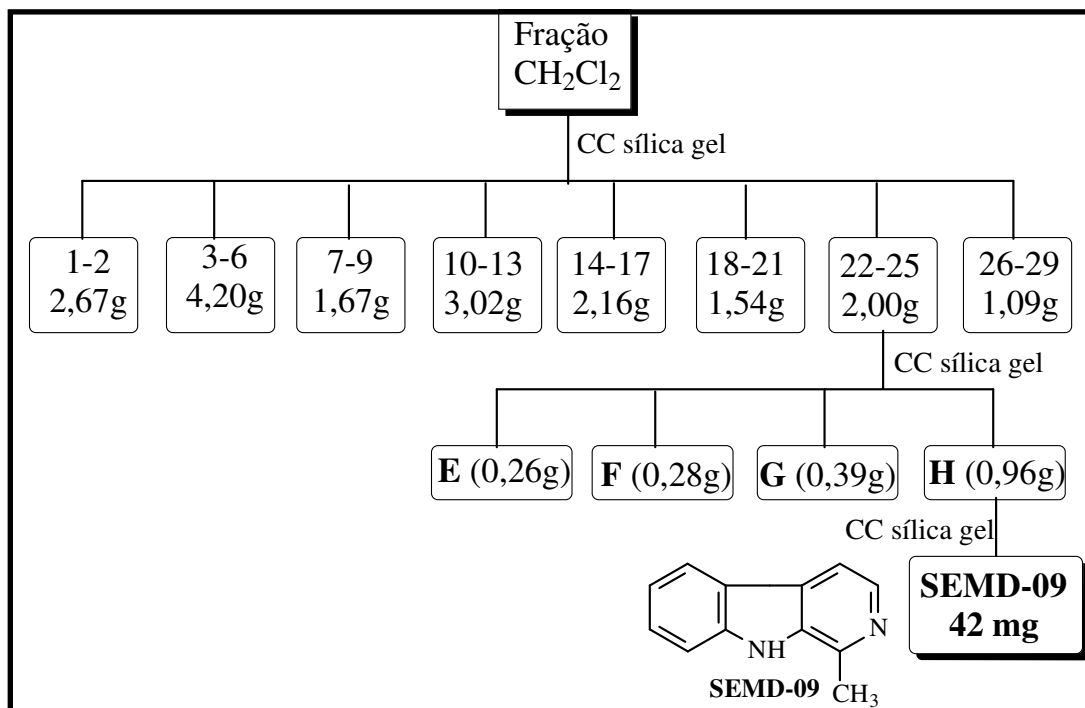


ESQUEMA 2. Isolamento dos constituintes da fração em CH_2Cl_2 da madeira de *S. eliezeriana*.

As frações **14-17** (2,16 g) e **18-21** (1,54 g) após analisadas por CCDA e estas serem submetidas a radiação UV a 254 nm exibiram fluorescência intensa. Ao borrifar reagente de dragendorff (indicativo de alcalóide) exibiram cor de laranja. Porém, quando reveladas com vanilina sulfúrica, a CCDA, exibiu muitas impurezas logo, não foram trabalhadas.

A fração **22-25** (2,00 g) proveniente da fração em CH_2Cl_2 foi submetida a cromatografia em coluna usando como fase estacionária gel de sílica e como eluentes CH_2Cl_2 , AcOEt e MeOH com eluição em modo gradiente de polaridade até AcOEt/MeOH (90:10), resultando em 30 frações. As mesmas foram analisadas por CCDA e reunidas de acordo com o perfil cromatográfico, (Esquema 3, página 23). Dentre as sub-frações reunidas, a que apresentou menos impurezas foi a sub-fração 90-107 (0,960 g). Esta foi seguidamente

cromatografada em coluna com gel de sílica até obtenção de um sólido cristalino (42 mg), que apresentou cor de laranja em CCDA quando revelado com solução de dragendorff. A após análise por CG-EM, RMN de ^1H e comparação com dados da literatura foi confirmado como o alcalóide **SEMD-09** (BASTOS *et al.*, 2002) (Esquema 3). As demais frações exibiram também a substância, porém, com bastantes impurezas.



ESQUEMA 3. Isolamento dos constituintes da fração em CH_2Cl_2 da madeira de *S. eliezeriana*.

A fração **26-29** (1,09 g) exibiu apenas impurezas em forma de rastro na CCDA e em polaridade alta.

3.4.2. Estudo fitoquímico da fração em CH_2Cl_2 da madeira de *Simira glaziovii*

A fração **SGMD** (10,3 g) (*Simira glaziovii* Madeira Diclorometano) (Quadro 7, página 20) foi submetida ao mesmo procedimento de **SEMD**. Antes do fracionamento cromatográfico, foi separado aproximadamente (3,5 g) para análises biológicas e o restante foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica usando gel de sílica como fase estacionária e como eluentes hexano, CH_2Cl_2 , AcOEt e MeOH com eluição em modo gradiente de polaridade fornecendo 25 frações de 100 mL. Após evaporação à temperatura ambiente, as frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em quatro frações denominadas de **Fr.A** (1,6 g); **Fr.B** (1,2 g); **Fr. C** (1,5 g) e **Fr.D** (1,9 g), Esquema 4, página 24.

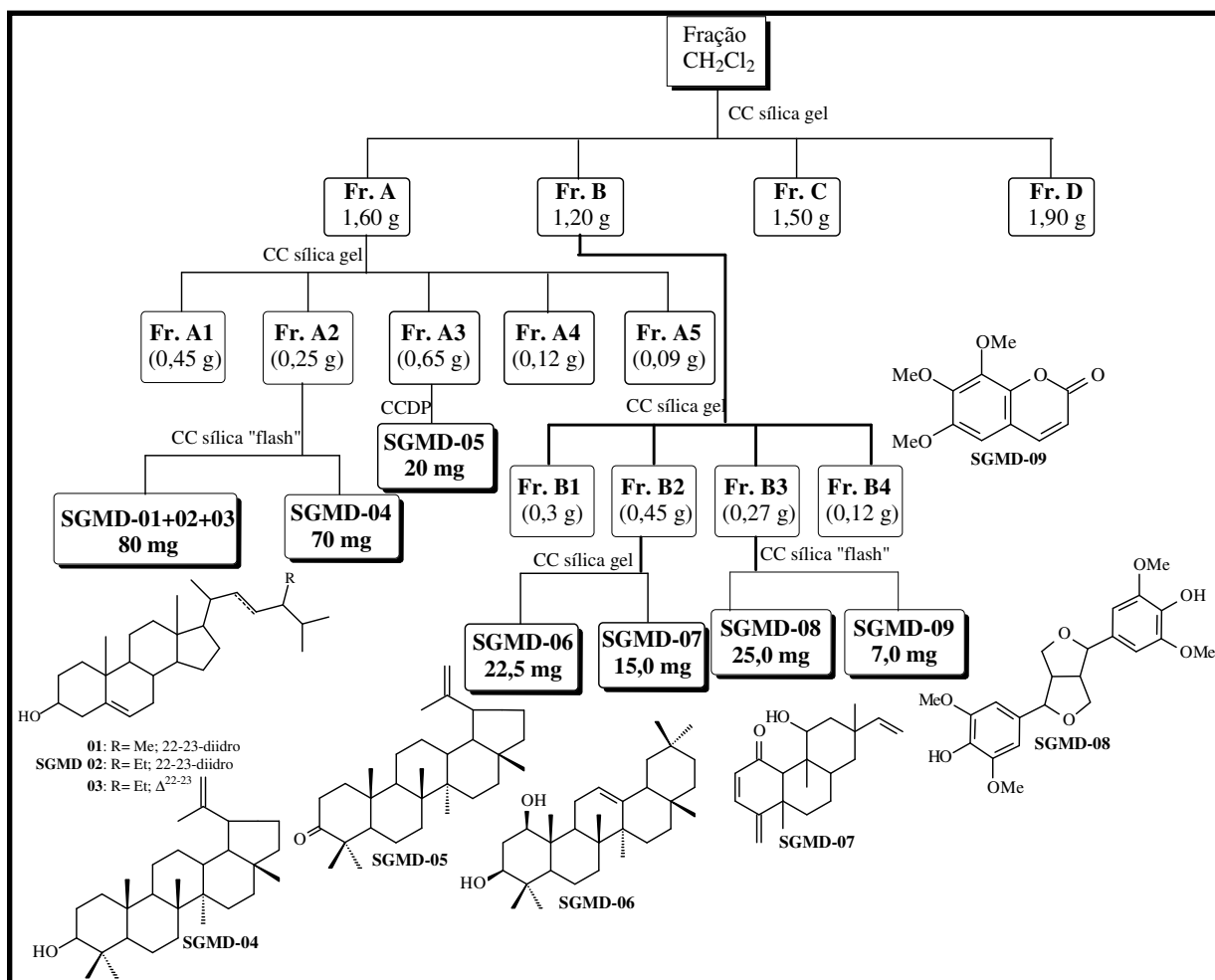
O fracionamento de **Fr.A** (1,6 g) em coluna usando gel de sílica como fase estacionária e como fase móvel hexano/acetato de etila com eluição em modo gradiente de polaridade até 100% AcOEt forneceu 20 frações. As mesmas foram analisadas por CCDA e reunidas por semelhança cromatográfica em **Fr.A1** (0,45 g); **Fr.A2** (0,25 g); **Fr.A3** (0,65 g); **Fr.A4** (0,12 g) e **Fr.A5** (0,09 g) Esquema 4, página 24. A fração **Fr.A1** (0,45 g) apresentou grande concentração de ácidos graxos.

A fração **Fr.A2** (0,25 g) foi submetida a coluna cromatográfica usando gel de sílica tipo “flash” e como fase móvel hexano/acetona (9:1) em modo de eluição isocrático fornecendo as substâncias **SGMD-01+02+03** (80 mg) e **SGMD-04** (70 mg) Esquema 4.

A fração **Fr.A3** (0,65 g) foi solubilizada em CH₂Cl₂ e uma alíquota foi submetida a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) usando como eluente hexano/acetona (9,5:05) fornecendo a substância **SGMD-05** (20 mg) (Esquema 4). As frações **Fr.A4** (0,12 g) e **Fr.A5** (0,09 g) não foram trabalhadas devido apresentarem semelhança cromatográfica com as demais sendo estas apresentando grande concentração de impurezas.

A fração **Fr.B** (1,2 g) após ser submetida a fracionamento cromatográfico usando sílica comum como fase estacionária e hexano/acetato como fase móvel em modo gradiente forneceu 30 frações de 100 mL. Após as mesmas serem evaporadas foram analisadas por CCDA que conduziu a reunir as frações de acordo com o perfil cromatográfico resultando em quatro sub-frações **Fr. B1** (0,3 g); **Fr. B2** (0,45 g); **Fr. B3** (0,27 g) e **Fr. B4** (0,12 g).

A sub-fração **Fr. B2** (0,45 g) após sucessivos fracionamentos em coluna aberta usando gel de sílica conduziu ao isolamento das substâncias **SGMD-06** (22,5 mg) e **SGMD-07** (15 mg). A análise da sub-fração **Fr. B3** (0,27 g) por CCDA visando escolha de eluentes para fracionamento cromatográfico apresentou como melhor sistema hexano/acetona (9:1). Este, conduziu para utilização de fase estacionária gel de sílica “flash”, técnica que prioriza sistema de eluição isocrático e trabalha-se sobre pressão superior à atmosférica. Deste modo, o fracionamento possibilitou isolar as substâncias **SGMD-08** (25 mg) e **SGMD-09** (7,0 mg) Esquema 4.

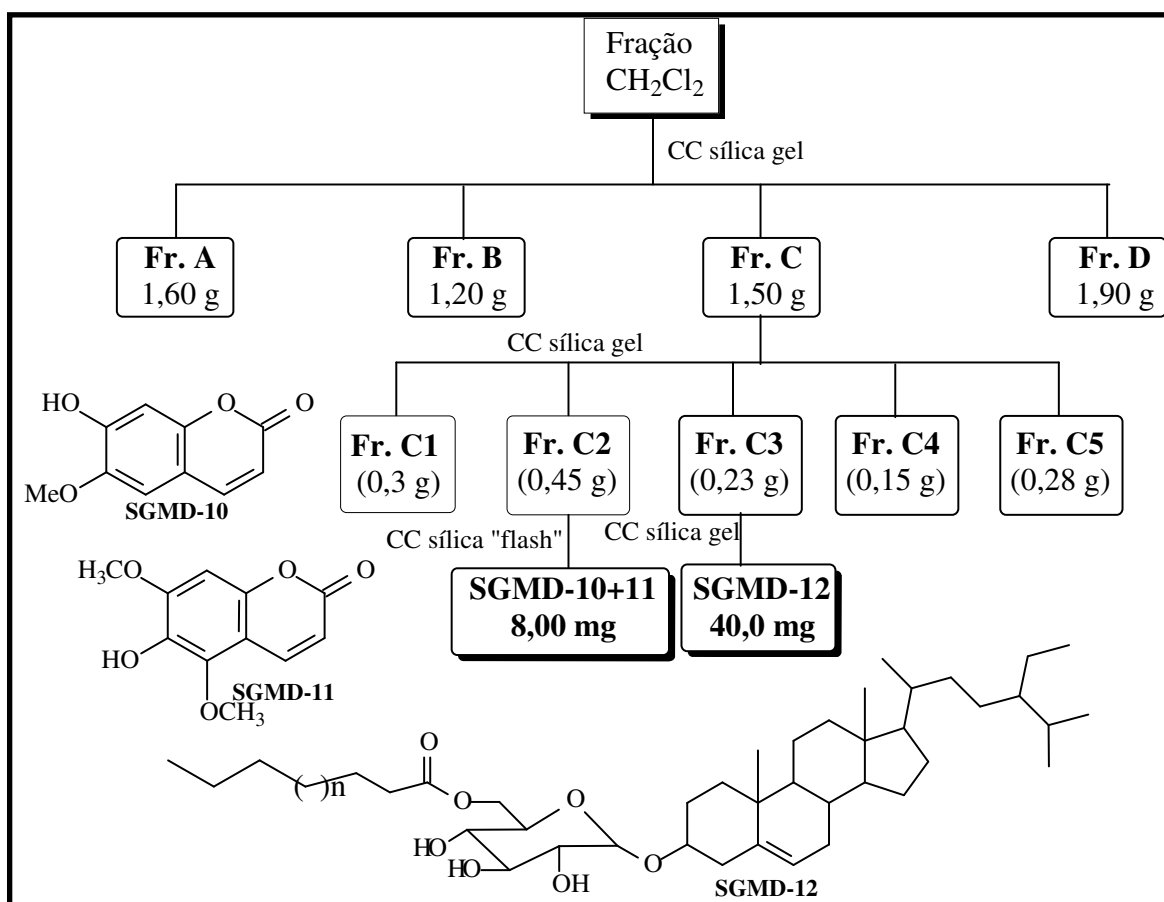


ESQUEMA 4. Isolamento dos contituíntes das frações **Fr. A** e **Fr. B**.

A fração **Fr. C** (1,5 g) após fracionamento em coluna com gel de sílica usando como eluentes hexano/acetona com eluição em modo gradiente de polaridade até 100% de acetona forneceu 40 frações de 50 mL as quais foram analisadas por CCDA e reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em cinco grupos **Fr. C1** (0,3 g); **Fr. C2** (0,45 g); **Fr. C3** (0,23 g); **Fr. C4** (0,15 g) e **Fr. C5** (0,28 g). O fracionamento cromatográfico de **Fr. C2** (0,45 g) em coluna com gel de sílica tipo “flash” eluída em hexano/acetona (9:1) forneceu as substâncias **SGMD-10+11** (8,00 mg). A fração **Fr. C3** (0,15 g) após análise por CCDA mostrou-se com pequenas impurezas e sendo assim, uma alíquota desta fração (60,0 mg) foi submetida a processo de purificação em gel de sílica fornecendo a substância **SGMD-12** (40 mg) (Esquema 5).

A fração **Fr. D** quando analisada por CCDA e submetida a revelação com reagente de Dragendorff apresentou indicativo de alcalóide. A comparação por CCDA com o alcalóide isolado na fração trabalhada de *S. eliezariana* mostrando mesmo perfil confirmando a presença deste alcalóide neste extrato.

Após a confirmação do alcalóide nesta fração, as demais frações foram analisadas confirmando a onipresença com exceção dos resíduos.



ESQUEMA 5. Isolamento dos constituintes da fração **Fr. C**.

3.4.3. Estudo fitoquímico do extrato em CH_2Cl_2 das folhas de *Ouratea parviflora*

O extrato **OPFD** (5,00 g; Quadro 7, página 20) (*Ouratea parviflora* Folhas Diclorometano), após reservar aproximadamente (1,30 g) do extrato para ensaios biológicos o mesmo foi analisado por CCDA e em seguida submetido à cromatografia em coluna usando gel de sílica eluída inicialmente com hexano e aumento gradativo da polaridade até 100% metanol. Foram coletadas 44 frações de aproximadamente 50 mL, que foram reunidas por

semelhança de perfil cromatográfico segundo análise em CCDA, obtendo-se desta forma, as seguintes subfrações: **Fr.1** (1,03 g); **Fr.2** (371,0 mg); **Fr.3** (480,0 mg); **Fr.4** (363,0 mg); **Fr.5** (565,0 mg) e **Fr.6** (780,5 mg) Esquema 6.

A sub-fração **Fr.1** (1,03 g), após análise por CCDA, por espectroscopia no infravermelho e cromatografia a gás acoplada a detector de espectrometria de massas CG-EM foi possível identificar grande quantidade de ácidos graxos, alcoóis alifáticos e clorofila e sendo assim, a mesma não foi submetida a processo de isolamento e purificação.

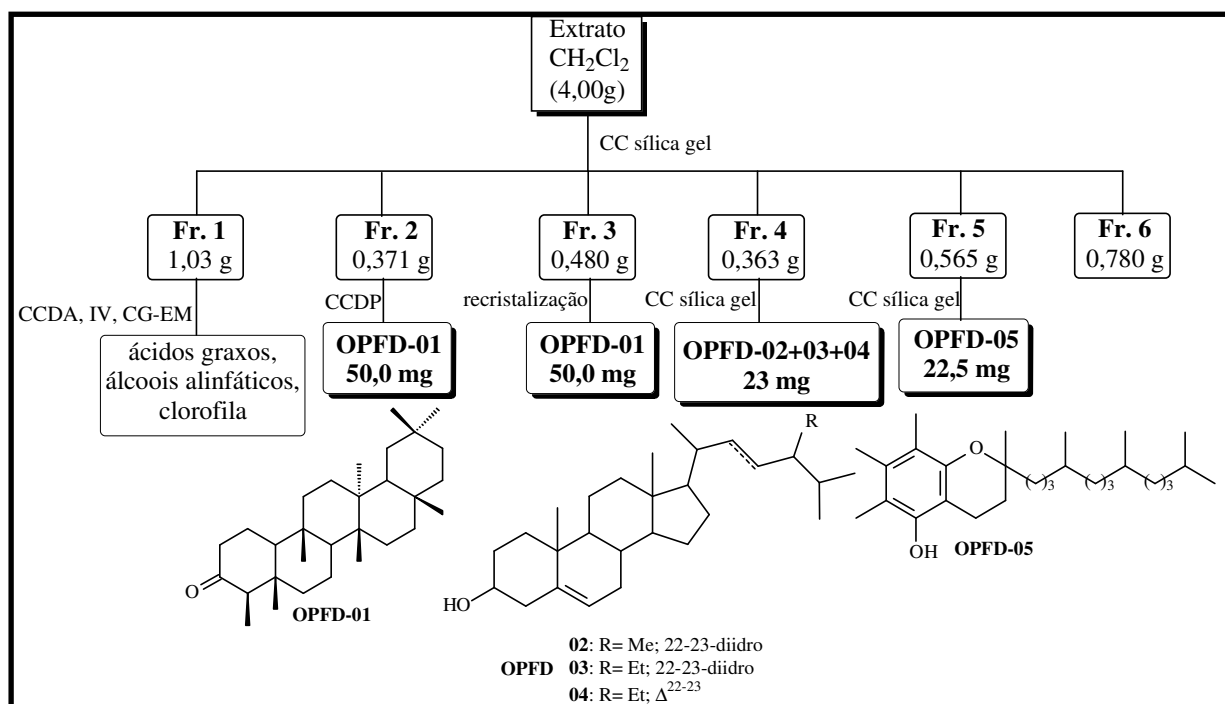
A análise da sub-fração **Fr.2** (371,0 mg) por CCDA com diversos sistemas de eluentes possibilitou chegar ao sistema hexano/AcOEt (4:1) sendo este o que proporcionou melhor fator de separação e sendo assim, uma alíquota desta subfração foi submetida a CCDP, resultando no isolamento da substância **OPFD-01** (50 mg).

Uma alíquota da sub-fração **Fr.3** foi submetida a processo de recristalização com acetona fornecendo grande quantidade de cristais. Estes após análises por CCDA e por CG-EM possibilitaram identificar a substância **OPFD-01**.

A sub-fração **Fr.4** (363,0 mg) após ser cromatografada em coluna usando gel de sílica usando como eluentes em hexano, CH₂Cl₂ e AcOEt com eluição em modo gradiente de polaridade até 100% AcOEt forneceu a mistura de substâncias **OPFD-02+03+04** (23,0 mg) Esquema 6.

A sub-fração **Fr.5** (565,0 mg) foi submetida a coluna usando gel de sílica como fase estacionária eluída com hexano/AcOEt em modo gradiente até 100% AcOEt este procedimento forneceu a substância **OPFD-05** (22,5 mg) Esquema 6.

A análise do perfil cromatográfico em CCDA das demais frações e comparação com as substâncias isoladas indicou-se como substâncias majoritárias **OPFD-01** e a mistura **OPFD-02+03+04** além de grande quantidade de clorofila e ácidos graxos, sendo assim, as mesmas não foram trabalhadas.



ESQUEMA 6. Isolamento dos constituintes do extrato em CH₂Cl₂ das folhas de *O. parviflora*.

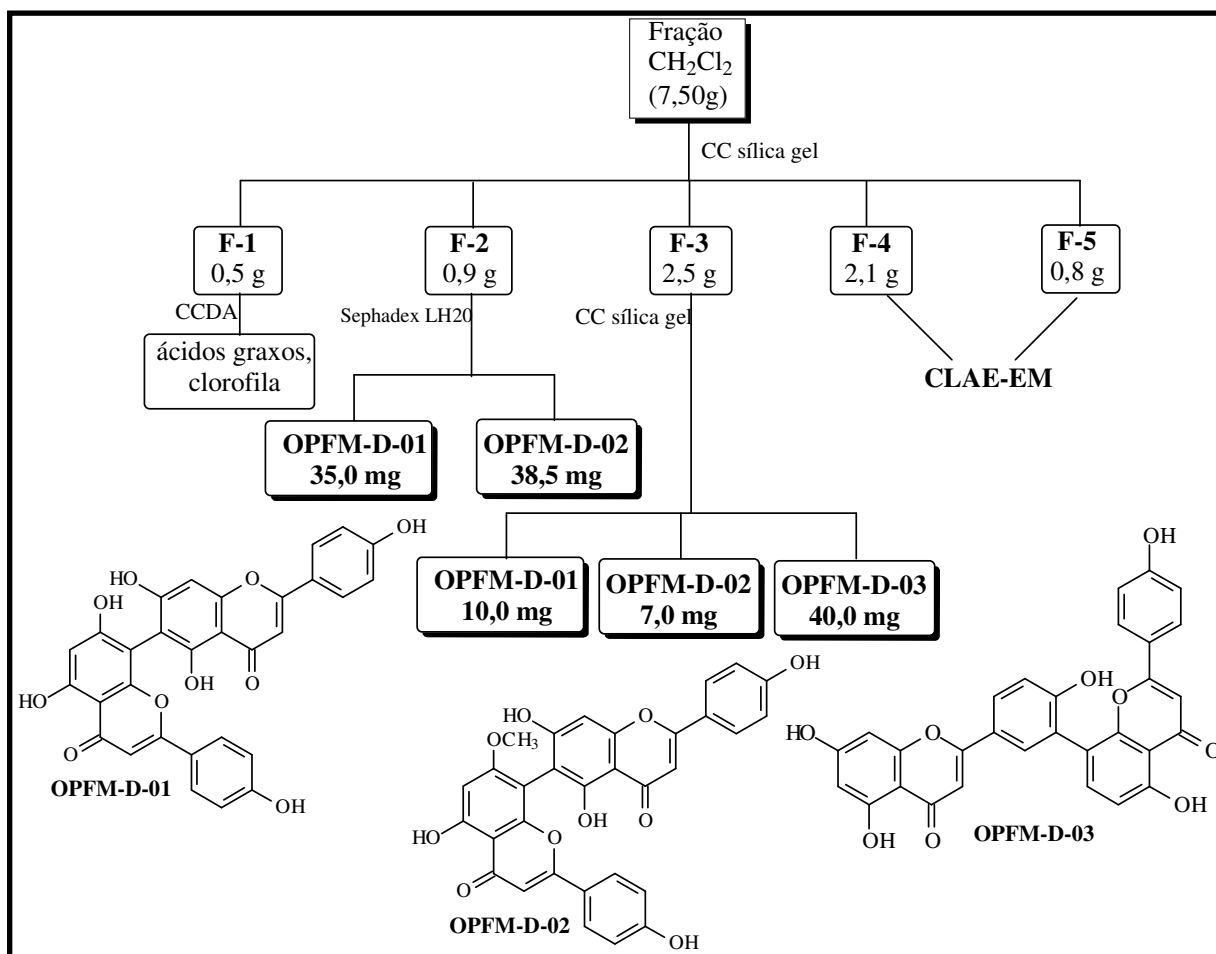
3.4.4. Estudo fitoquímico do extrato em metanol das folhas de *Ouratea parviflora*

Uma alíquota do extrato metanólico das folhas **OPFM** (50,0 g) foi solubilizado em MeOH/H₂O (80:20) e submetido a partição líquido-líquido com diclorometano e AcOEt. A fração em CH₂Cl₂ **OPFM-D** foi obtido uma massa de (7,50 g; Quadro 7, página 23). Após separar aproximadamente (0,50 g) para ensaios biológicos, o restante da fração foi submetido ao mesmo procedimento cromatográfico aplicado ao extrato em diclorometano **OPFD**. As frações obtidas nesta etapa foram analisadas através de CCDA e reunidas de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico em cinco sub-frações denominadas: **F-1** (0,50 g), **F-2** (0,90 g), **F-3** (2,50 g), **F-4** (2,10 g) e **F-5** (0,80 g).

A filtração em Sephadex LH20 usando MeOH com fase móvel da fração **F-2** (0,9 g) resultou no isolamento de duas substâncias **OPFM-D-01** (35,0 mg) e **OPFM-D-02** (38,5 mg), Esquema 7.

O fracionamento cromatográfico da fração **F-3** (2,5 g) em coluna aberta usando como fase estacionária gel de sílica e como eluentes CH₂Cl₂/MeOH com eluição em modo gradiente de polaridade forneceu a substância **OPFM-D-03** (40,0 mg) além das substâncias **OPFM-D-01** (10,0 mg) e **OPFM-D-02** (7,0 mg), Esquema 7.

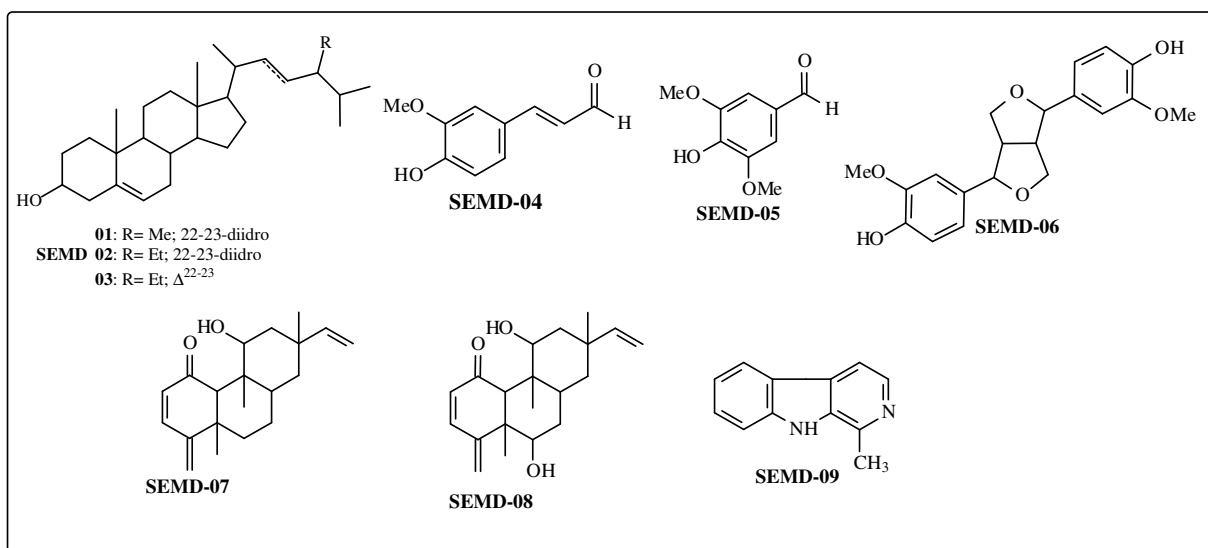
A análise das frações **F-4** e **F-5** por CLAE UV-DAD-EM possibilitou identificar as substâncias fenólicas já isoladas e também propor a estrutura para mais 12 substâncias fenólicas. As estruturas foram propostas baseado nas substâncias já isoladas do gênero *Ouratea*. As estruturas destas substâncias estão ilustradas no Quadro 11, página 30.



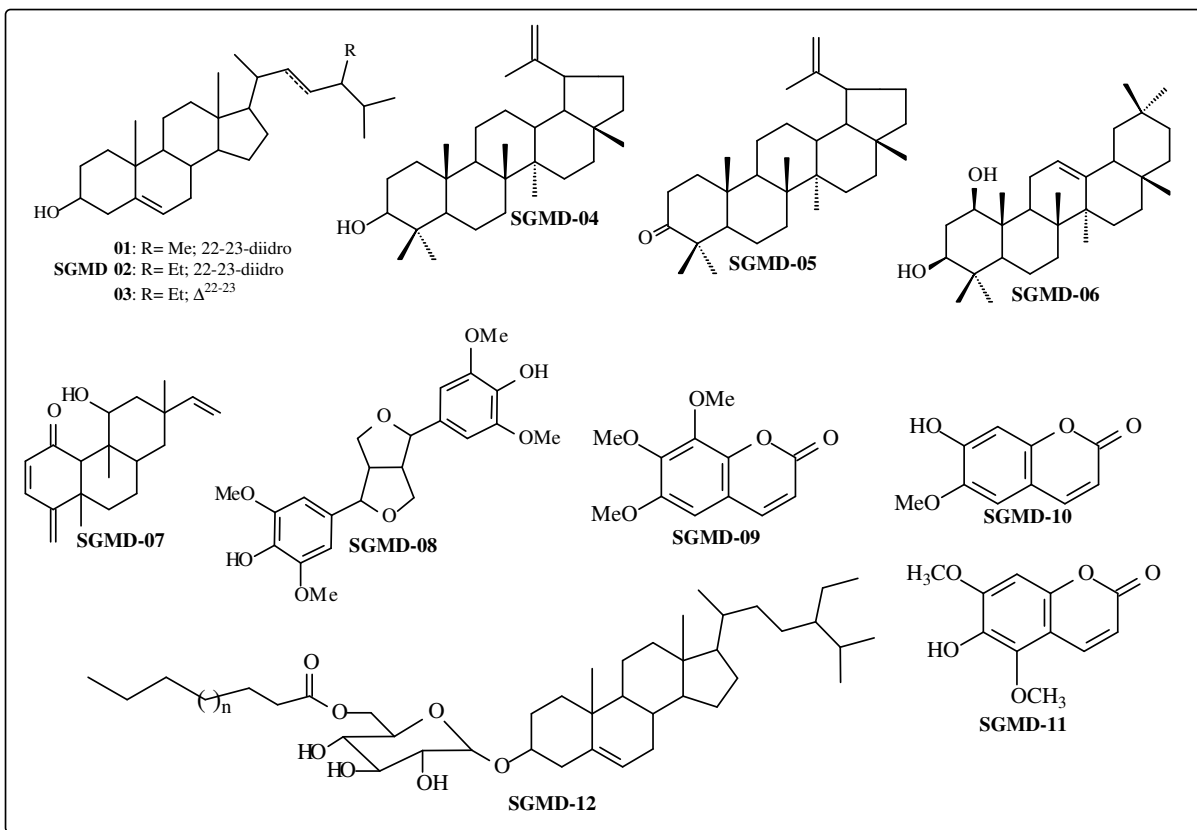
ESQUEMA 7. Isolamento dos constituintes da fração em CH₂Cl₂ do extrato metanólico das folhas de *O. parviflora*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

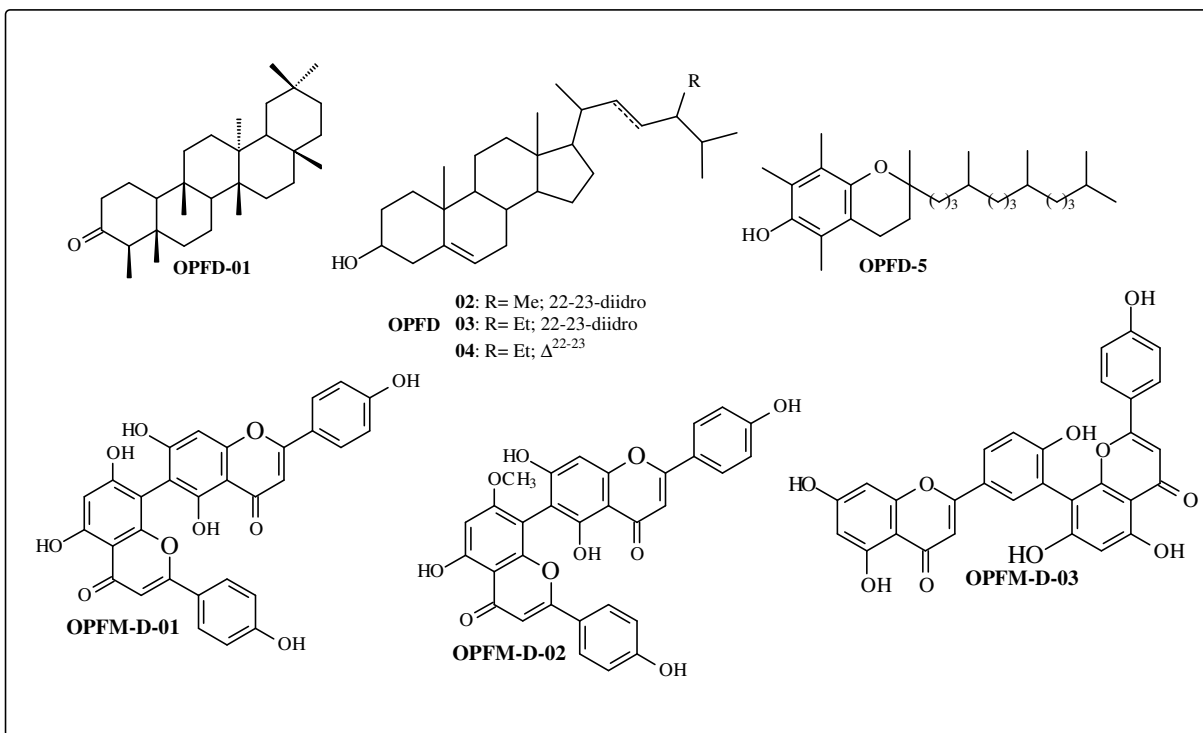
O estudo fitoquímico das frações em CH_2Cl_2 da madeira de *S. eliezeriana*, *S. glaziovii* e do extrato em CH_2Cl_2 e da fração em CH_2Cl_2 do extrato em MeOH das folhas de *O. parviflora* resultou no isolamento e na identificação de 22 substâncias sendo destas, três inéditas na literatura, Quadros 8-10, páginas 29 e 30. A análise de duas frações ricas em substâncias fenólicas provenientes da fração em CH_2Cl_2 de *O. parviflora* por CLAE-EM possibilitou, através do conhecimento dos metabólitos especiais desta classe juntamente com análise dos espectros de massas, propor a estrutura de 15 substâncias fenólicas sendo 14 flavonóides (Quadro 11, página 31). Para a discussão da elucidação estrutural, as substâncias foram divididas de acordo com a classe de metabólito especial em que se enquadram. De acordo com o código da fração que forneceu a substância, pode-se identificar de qual espécie a substância foi isolada **SEMD** (*Simira eliezeriana* Madeira Diclorometano), **SGMD** (*Simira glaziovii* Madeira Diclorometano), **OPFD** (*Ouratea parviflora* Folhas Diclorometano) e **OPFM-D** (*Ouratea parviflora* Folhas Metanol-Diclorometano).



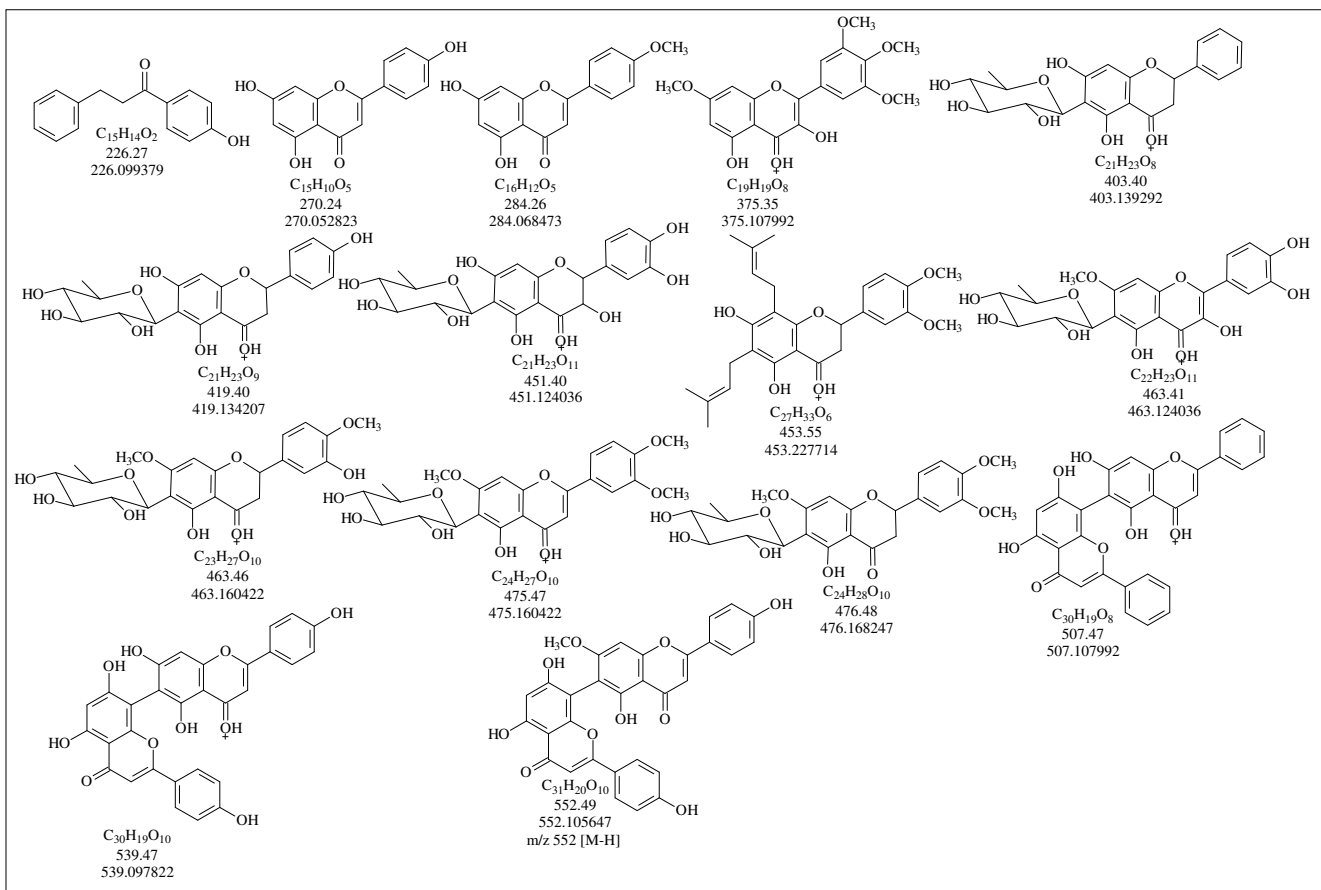
QUADRO 8. Constituintes químicos isolados da madeira de *S. eliezeriana*.



QUADRO 9. Constituintes químicos isolados da madeira de *S. glaziovii*.



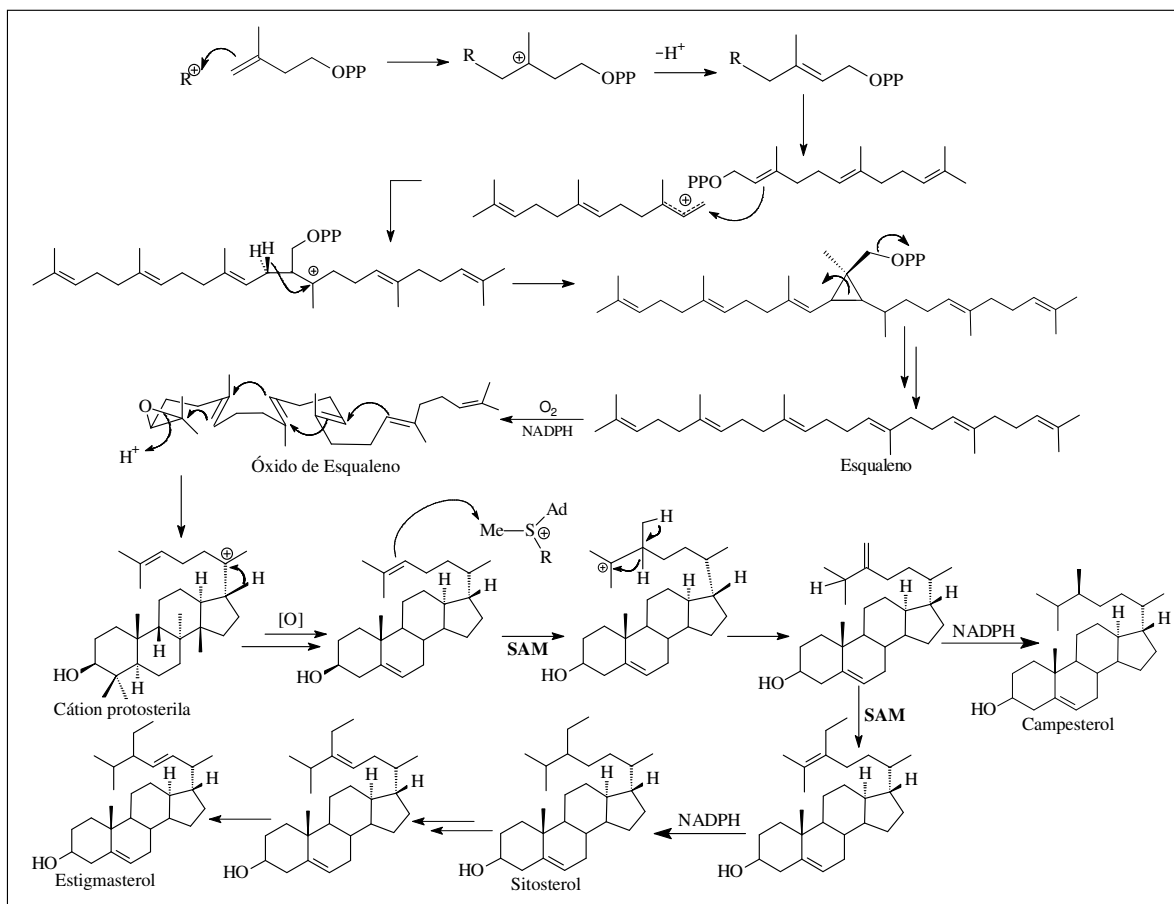
QUADRO 10. Constituintes químicos isolados das folhas de *O. parviflora*.



QUADRO 11. Propostas de fórmulas estruturais de substâncias fenólicas como constituintes das folhas de *O. parviflora*. Frações analisadas por CLAE-EM.

4.1. Determinação estrutural dos fitosteróis

O fitosterol é, no reino vegetal, o equivalente ao colesterol entre mamíferos. Portanto, são substâncias derivadas alcoólicas do ciclopentanoperhidrofenantreno, essenciais na formação e estabilização da estrutura da membrana celular dos vegetais (MORAIS & BRAZ-FILHO, 2007). São distribuídos em três categorias: 4-desmetilesteróis, 4-monometilesteróis e 4,4-dimetilesteróis (IFST, 2001). Os fitosteróis mais encontrados são os 4-desmetilesteróis denominados, sitosterol, campesterol e estigmasterol (Quadro 12). Podem ocorrer na forma livre, esterificada ou glicosilada (MANN, 1994).



QUADRO 12. Proposta biossintética dos fitosteróis (DEWICK, 1998).

Assim como os ácidos graxos, eles também aparecem em mistura de difícil separação, pois apresentam propriedades químicas e físicas, inclusive espectroscópicas, muito semelhantes.

Misturas contendo estigmasterol são facilmente identificadas nos espectros de RMN de ^1H , pelos sinais referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos olefínicos (H-22 e H-23) que apresentam sinais com multiplicidade de dois duplos dupletos entre δ_{H} 5,00-5,20 ppm. Na determinação do número de fitosteróis em uma mistura, bem como na identificação, a técnica de CG-EM é mais adequada.

4.1.1. Sitosterol, estigmasterol e campesterol

A análise por CG de um material cristalino presente em todos os extratos trabalhados das três espécies apresentou cromatograma com três sinais (Figura 5) que ao serem analisados por EM apresentaram como íon molecular m/z 400, 412 e 414 sendo estes atribuídos aos fitosteróis campesterol, estigmasterol e sitosterol respectivamente (Figuras 6, 7 e 8, páginas 32-34).

Esta afirmação foi sustentada pela análise do espectro de RMN de ^1H do material, que apresentou um sinal largo em δ_{H} 3,52 ppm atribuído ao hidrogênio do carbono carbinólico H-3 e em δ_{H} 5,34 ppm referente ao hidrogênio olefínico H-6 (Figura 9, página 35). Os diversos sinais presentes na região de δ_{H} (0,67 a 2,27 ppm) foram atribuídos aos hidrogênios dos grupos metílicos, metilênicos e metínicos do esqueleto esteroidal, incluindo os sinais de hidrogênios alílicos. Os dois duplos dupletos em δ_{H} 5,01 (*dd*, $J= 8,08$; 14,5 Hz, H-22) e 5,15 (*dd*, $J= 8,4$; 14,8 Hz, H-23) foram atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos olefínicos da cadeia lateral da estrutura do estigmasterol.

O espectro de RMN de ^{13}C -APT da mistura (Figuras 10-11, páginas 36-37), possibilitou distinguir entre os fitosteróis sitosterol e estigmasterol através dos sinais em δ_{C} (121,80 e 140,83) (CH-6 e CH-5) presentes no sitosterol e no estigmasterol e δ_{C} (129,35 e 138,41) (CH-23 e CH-22), presente apenas no estigmasterol (SEO *et al.*, 1988).

O outro esteróide detectado na mistura, o campesterol, que apresentou grande semelhança com o sitosterol, com a exceção da ausência de um grupo metilênico em CH_2 -24 na cadeia lateral, o que torna praticamente indistinguível do sitosterol no espectro de RMN de ^1H . A distinção entre as substâncias foi feita principalmente pela análise por CG e dos espectros de massas, cujas propostas de fragmentação estão ilustradas nos esquemas 8, 9 e 10, páginas 33 e 34. Com isso, foi possível determinar estes fitosteróis nas três espécies com os códigos de **SEMD-01+02+03**; **SGMD-01+02+03** e **OPFD-02+03+04**.

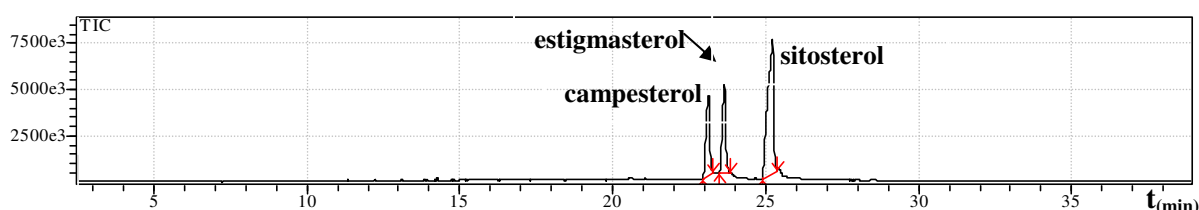


FIGURA 5. Cromatograma CG da mistura de esteróides.

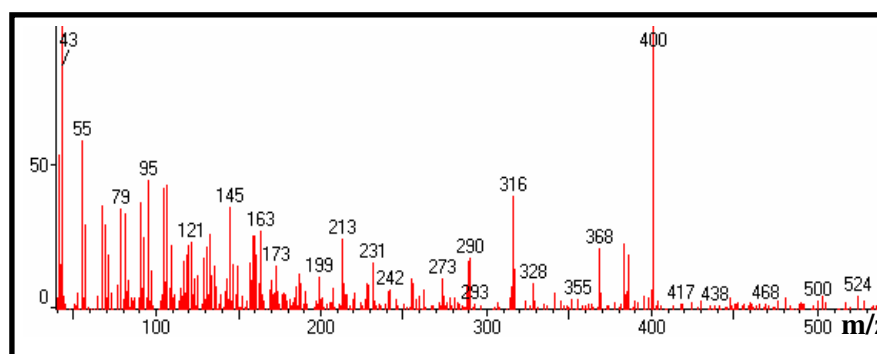
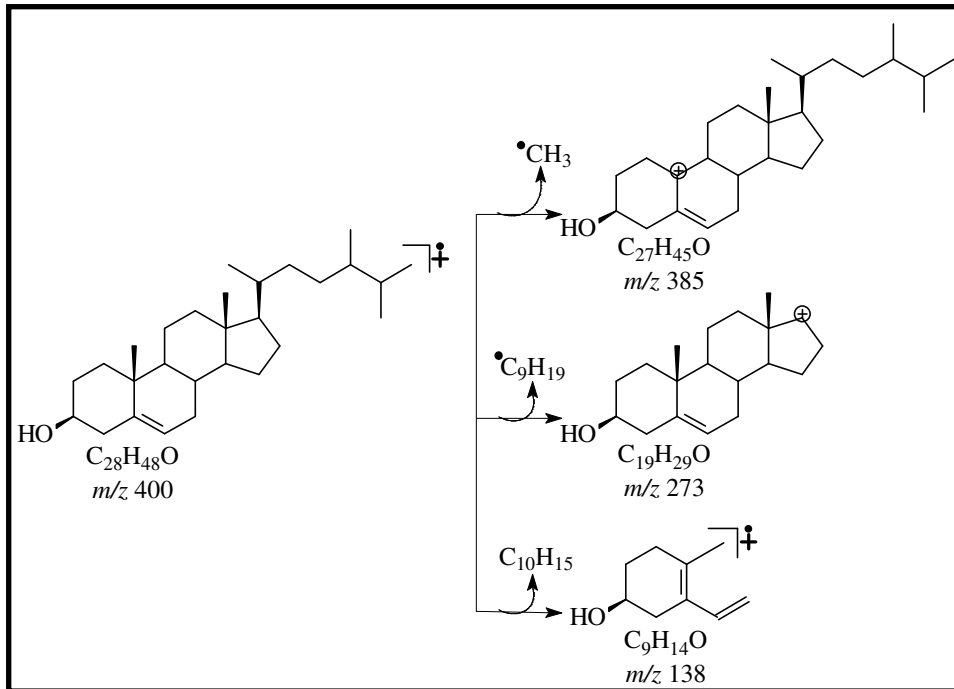


FIGURA 6. Espectro de massas 70 eV do campesterol.



ESQUEMA 8. Propostas de fragmentação do **campesterol**.

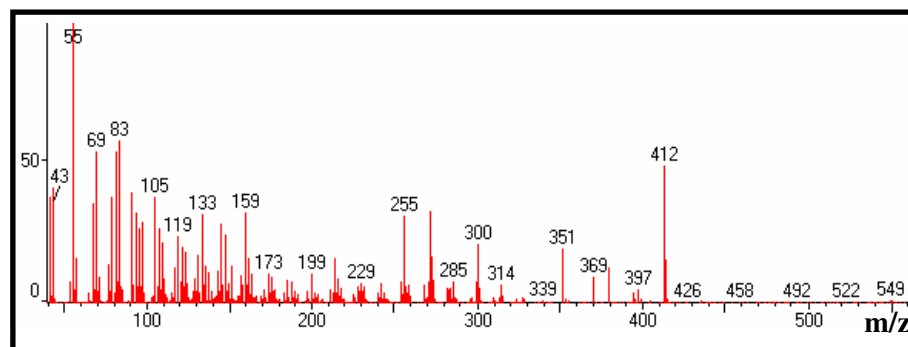
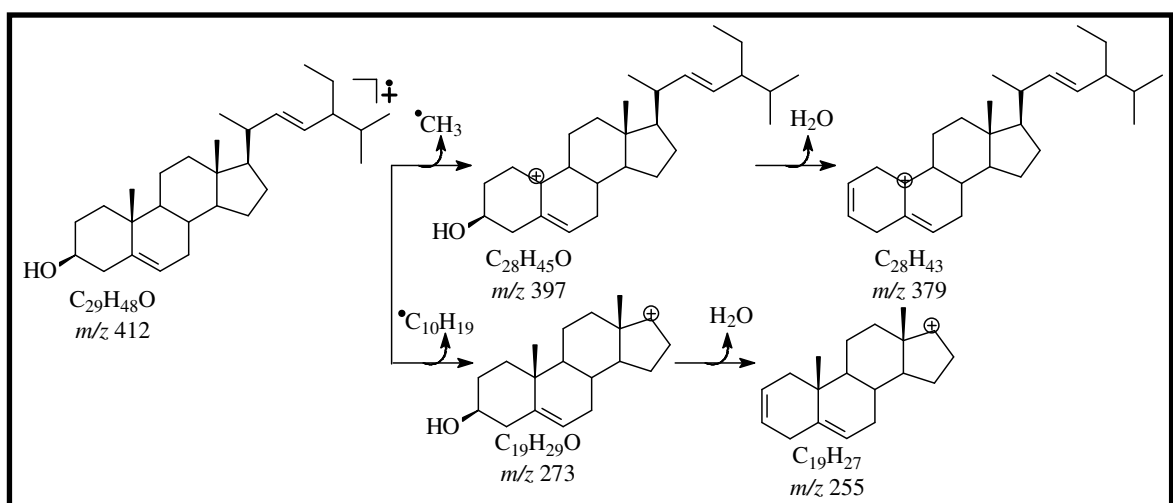


FIGURA 7. Espectro de massas 70 eV do **stigmasterol**.



ESQUEMA 9. Propostas de fragmentação do **stigmasterol**.

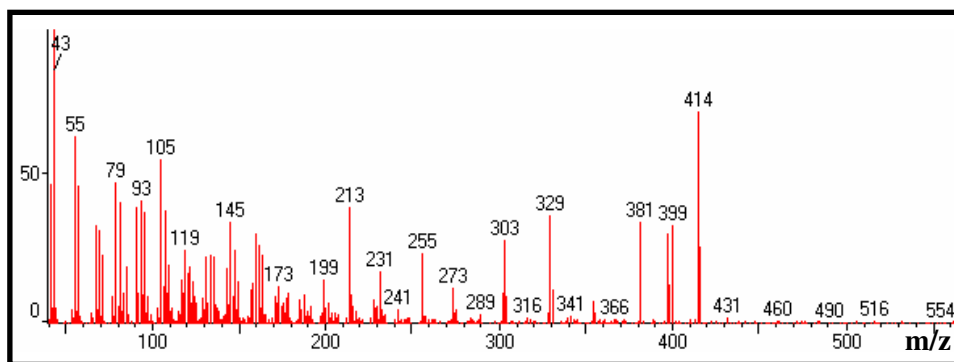
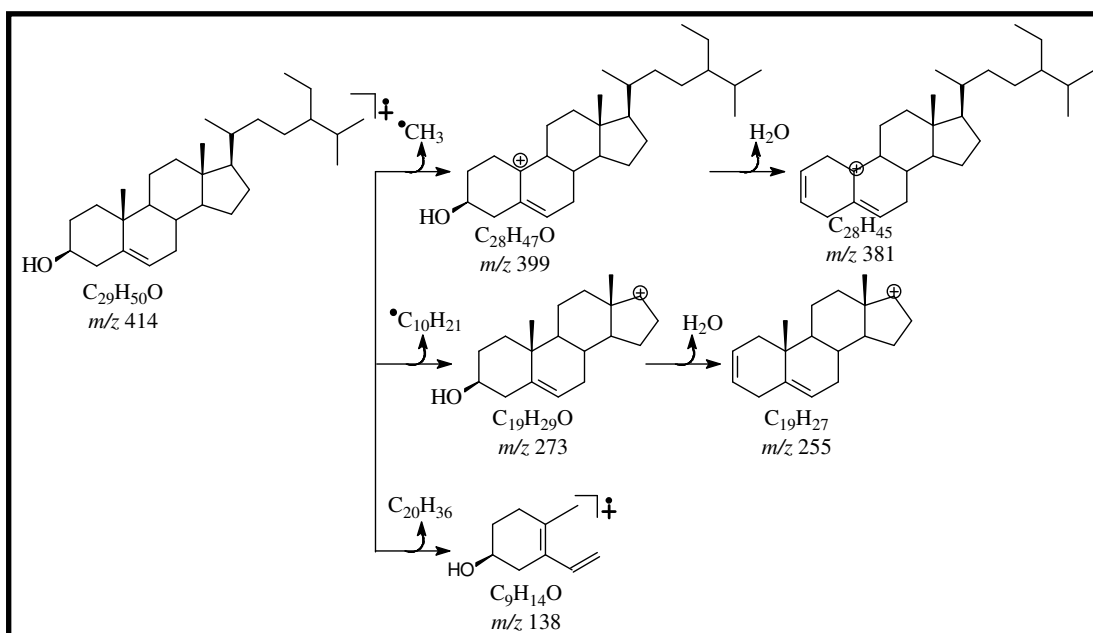


FIGURA 8. Espectro de massas 70 eV do **sitosterol**.



ESQUEMA 10. Propostas de fragmentação do **sitosterol**.

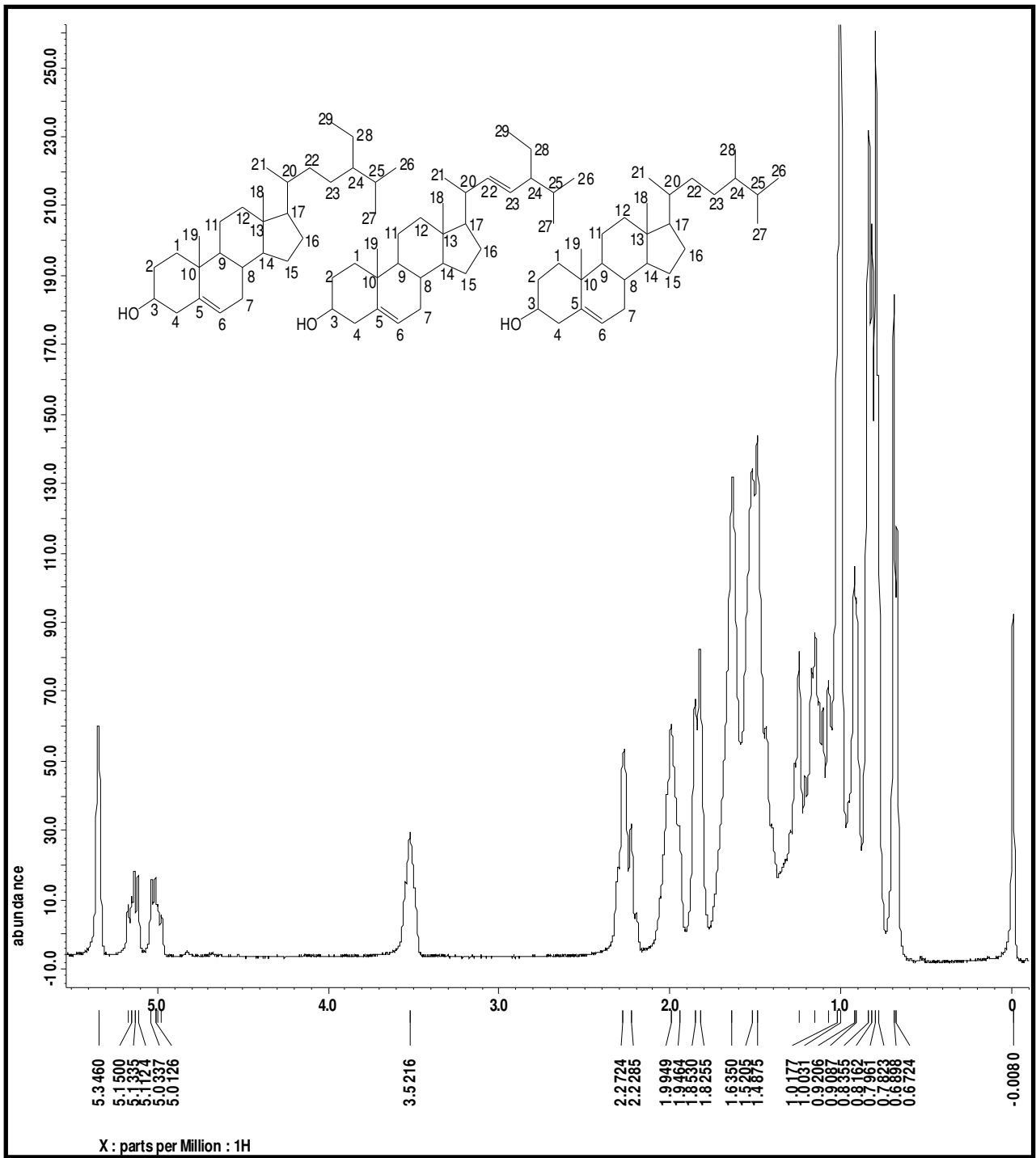


FIGURA 9. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da mistura de esteróides.

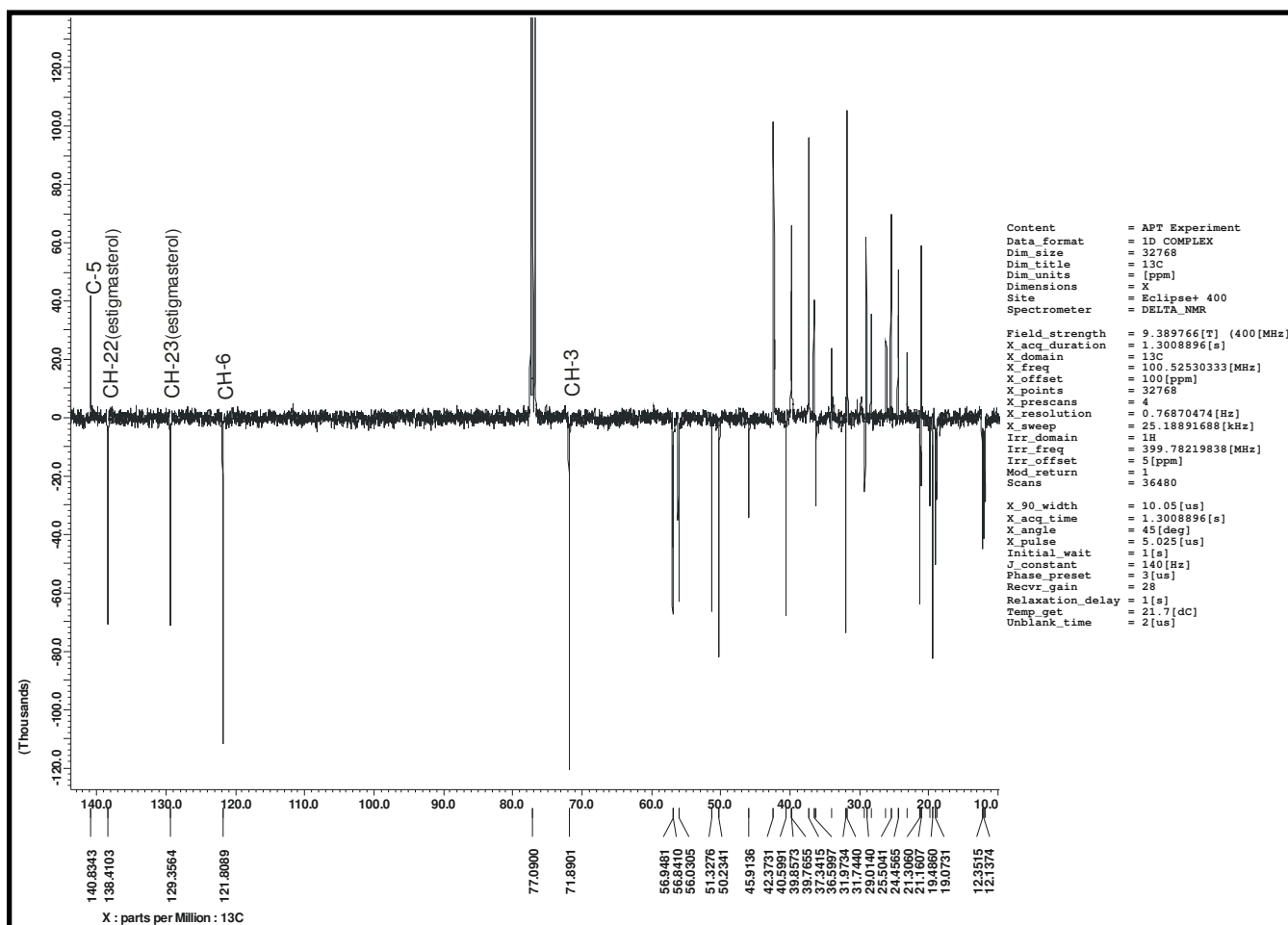
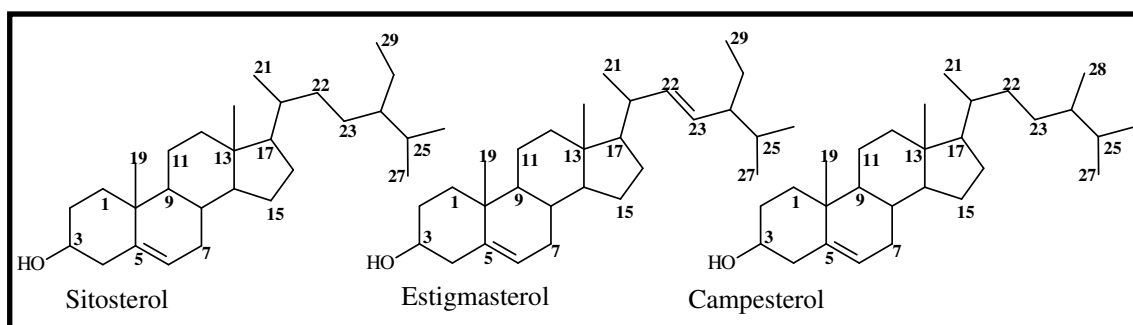


FIGURA 10. Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) da mistura de esteróides.



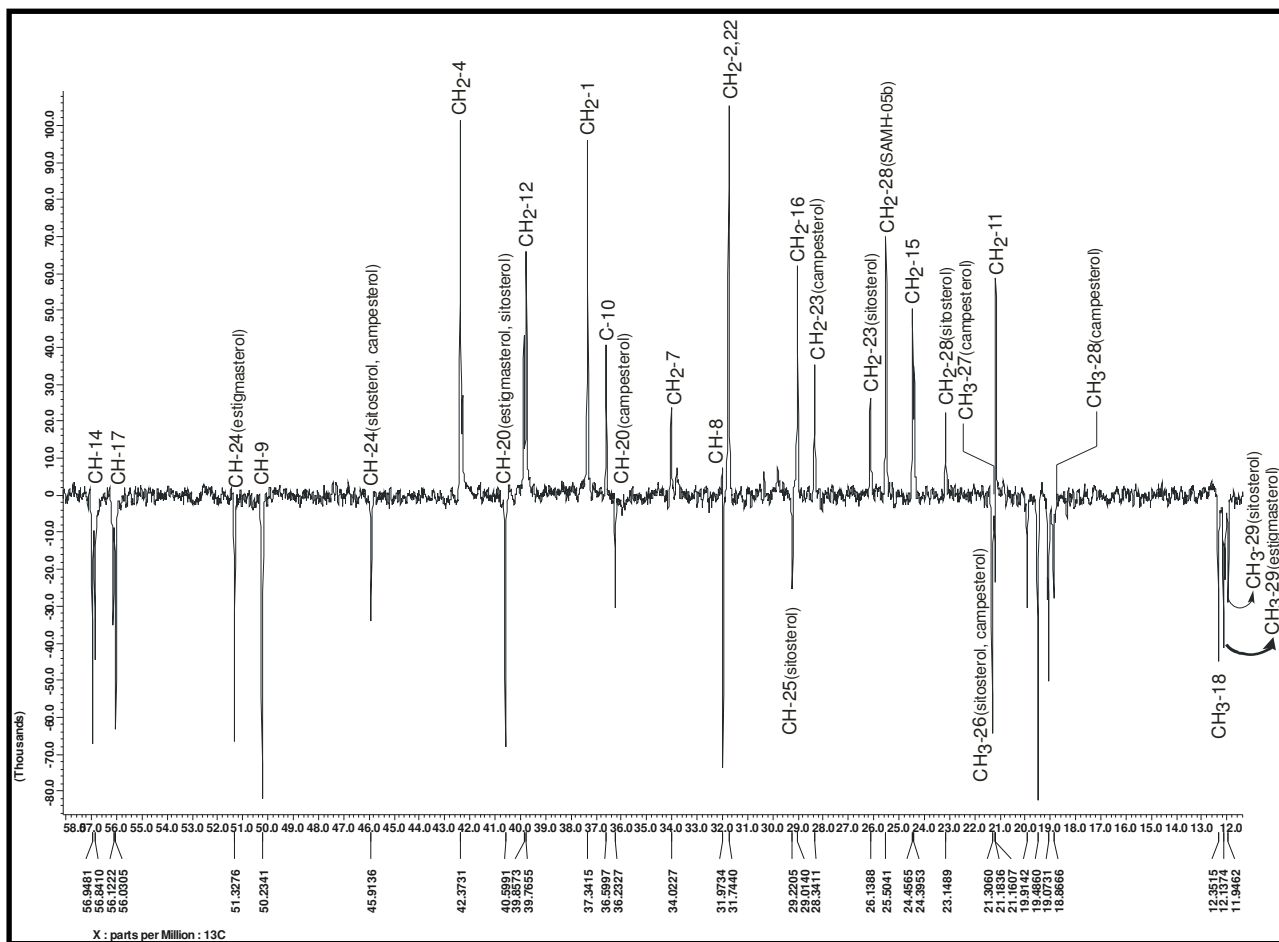
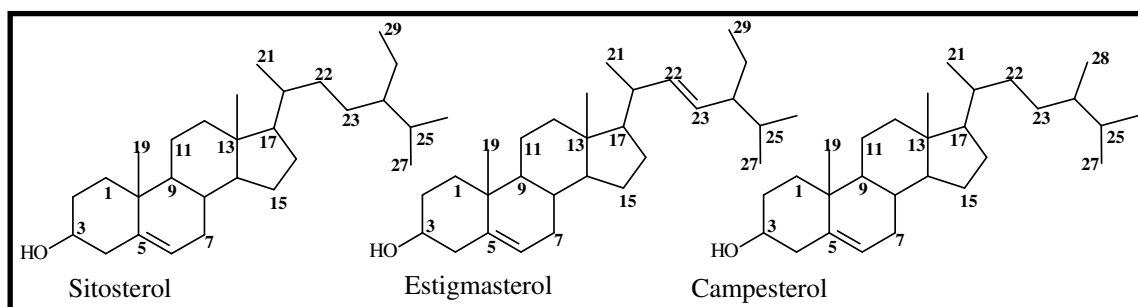


FIGURA 11. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) da mistura de **esteróides** (região de 12 a 58 ppm).



4.1.2. 3-O-glicopiranosil-(6→1)-acil-sitosterol

O tratamento cromatográfico da fração **Fr. C3** (0,15 g) do extrato em diclorometano da madeira de *S. glaziovii* forneceu a substância **SGMD-12** (40 mg) (Esquema 5, página 26). Um sólido branco amorfo solúvel em metanol.

O espectro no IV (Figura 12, página 40) mostrou bandas características de estiramentos de grupos hidrocarbonetos em ν_{CH_3} 2935, 1454 ν_{CH_2} 2875, uma banda aguda atribuída a hidroxilas livres em ν_{OH} 3580 cm^{-1} . A banda intensa em $\nu_{\text{C=O}}$ 1687 foi atribuída ao grupo carbonila de éster e a banda em $\nu_{\text{C-O}}$ 1045 cm^{-1} atribuída ao estiramento de ligação C-O (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 13, página 41) apresentou sinais característicos com perfil de fitoesteróis. A comparação deste com o espectro da mistura de fitoesteróis (Figura 9, página 36) possibilitou atribuir alguns sinais, sendo dois simpletos em δ_{H} 0,66 e 0,98 atribuídos aos hidrogênios 3H-18 e 3H-19 respectivamente. A sobreposição de sinais entre esses dois simpletos caracterizam os hidrogênios ligados a carbonos metílicos e metilênicos do esqueleto esteroidal. A presença do sinal simples em δ_{H} 5,35 atribuído ao hidrogênio H-6 e ausência dos sinais em 5,0-5,1 ppm confirmam a estrutura do sitosterol.

Os sinais entre δ_{H} 3,32-4,37 indicam a presença de hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos característicos de glicosídeo. O duplete em δ_{H} 4,37 (*d*, 8,2 Hz) foi atribuído ao hidrogênio do carbono anomérico da unidade glicosídica. O valor observado da constante de acoplamento indica que esta unidade está em conformação β (LAMBERT *et al.*, 1987). Os sinais em δ_{H} 2,32 (*t*, 7,6 Hz), 1,60 e 1,24-1,29 ppm foram assinalados para uma unidade acila presente na molécula.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 14, página 42) contribuiu para a elucidação da estrutura da substância sustentando a proposta baseada nos espectros de IV e RMN de ^1H com sinais em: δ_{C} 174,57 atribuído à carbonila da unidade acila, em δ_{C} 101,29 do carbono anomérico da unidade glicosídica, além dos demais sinais mostrando feição do sitosterol glicosilado ligado a uma unidade acila pelo carbono metilênico da glicose CH₂-6', justificando o valor δ_{CH_2} 63,49. Esta proposta é sustentada através da comparação dos dados obtidos da literatura, mostrando uma variação do deslocamento químico do carbono metínico da glicose CH-5' δ_{CH} 73,94 quando a unidade glicosídica está acilada, concluindo que ocorre um efeito γ -gauche que promove uma proteção deste carbono (MIZUSHINA *et al.*, 2006) (Figura 15, página 42). Também é observado um deslocamento para frequência alta do carbono CH-3 da aglicona decorrente do efeito β , o que justifica a ligação com a unidade de açúcar.

A atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios da substância foi realizada com a análise do mapa de correlação heteronuclear a uma ligação HMQC (Figura 16, página 43) e os dados estão ilustrados na Tabela 1, página 39.

O mapa de correlação heteronuclear a duas e três ligações HMBC corrobora a proposta estrutural para a substância com as correlações entre H-1' δ_{H} 4,36 (*d*, 8,2 Hz) e CH-3 δ_{C} 79,75 e entre 2H-2'' em δ_{H} 2,32 (*t*, 7,6 Hz) e C-1'' em δ_{C} 174,47 ppm. As demais correlações observadas estão ilustradas na Figura 17, página 44.

A análise do conjunto de dados juntamente com comparação dos mesmos com a literatura conduziu a determinação estrutural de **SGMD-12** como sendo **3-O-glicopiranosil-(6→1)-acil-sitosterol**, citado pela primeira vez no gênero *Simira*.

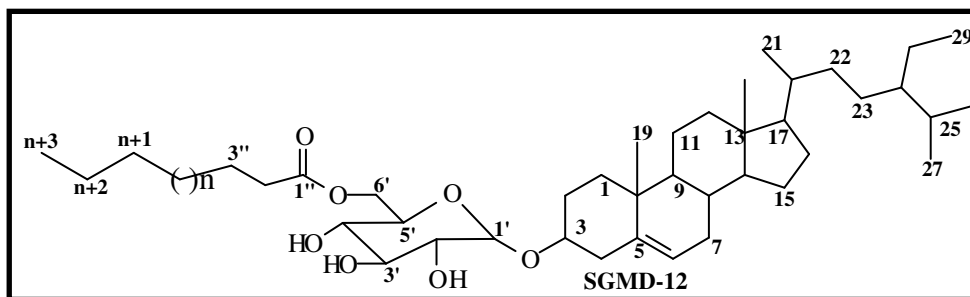


TABELA 1. Dados espectrais de RMN de ^{13}C e de ^1H da substância **SGMD-12** em CDCl_3 .
Deslocamentos químico em ppm

C	HMQC		MIZUSHINA <i>et al.</i> , 2006	JUNG <i>et al.</i> , 2005
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
5	140,39	-	140,96	140,4
8	31,95	-	32,10	31,9
10	36,80	-	36,97	36,2
13	42,41	-	42,53	42,3
CH				
3	79,72		78,16	79,8
6	122,21	5,35 (<i>sl</i>)	121,96	122,0
9	50,25		50,39	50,1
14	56,85		56,87	56,8
17	56,19		56,29	56,2
20	36,80		36,43	36,7
24	45,92		46,09	45,8
25	29,25		29,51	26,2
CH ₂				
1	37,36		37,52	37,3
2	28,33		30,30	29,7
4	38,97		39,39	39,0
7	34,03		32,22	31,9
11	21,16		21,33	21,0
12	39,85		39,99	39,8
15	24,38		24,55	24,3
16	27,29		28,58	
22	34,03		34,26	34,0
23	26,21		26,44	
28	23,15		23,44	23,0
CH ₃				
18	11,94	0,66 (<i>s</i>)	12,02	11,8
19	19,44	0,98 (<i>s</i>)	19,26	19,4
21	18,87	0,91	19,05	19,0
26	19,90	0,87-0,79	19,46	18,8
27	19,11	0,87-0,79	20,02	19,8
29	12,06	0,87-0,79	12,20	11,9
1'	101,29	4,36 (<i>d</i> , 8,2)	102,62	101,3
2'	73,63	3,34 (<i>t</i> , 8,8)	75,38	73,3
3'	76,21	3,94	78,65	76,3
4'	70,32	3,36 (<i>t</i> , 9,4)	71,75	70,5

5'	73,94	3,53 (m)	78,55	73,7
6'	63,49		62,88	63,7
1''	174,57	-	-	174,1
2''	34,35	2,32 (t, 7,6)	-	34,3
3''	25,06	1,58-1,60 (m)	-	25,0
(CH ₂) _n	29,83-29,25	1,35-1,10	-	29,5-29,9
(n+1)	32,01	1,35-1,10	-	
(n+2)	22,78	1,35-1,10	-	22,7
(n+3)	14,20		-	14,1

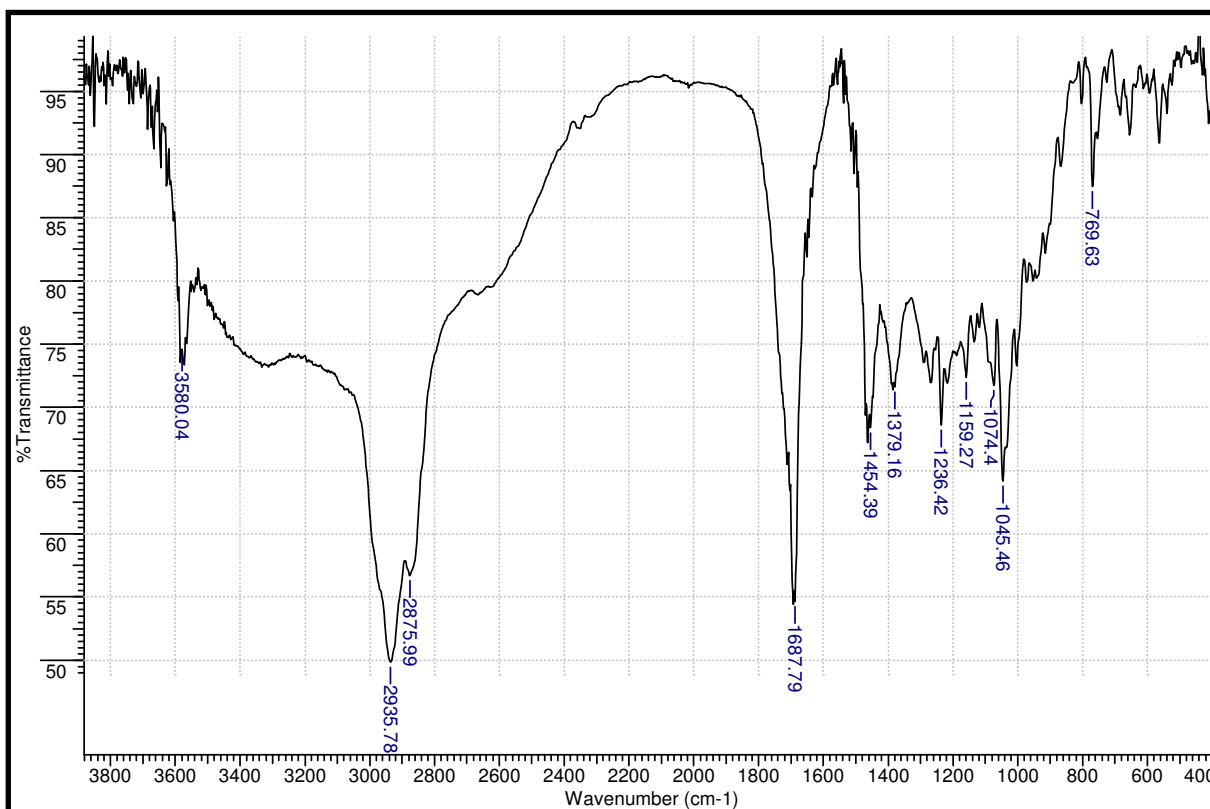
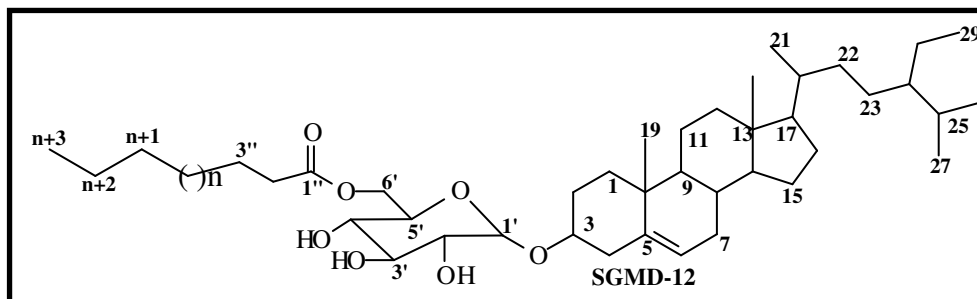


FIGURA 12. Espectro no infravermelho da substância SGMD-12.



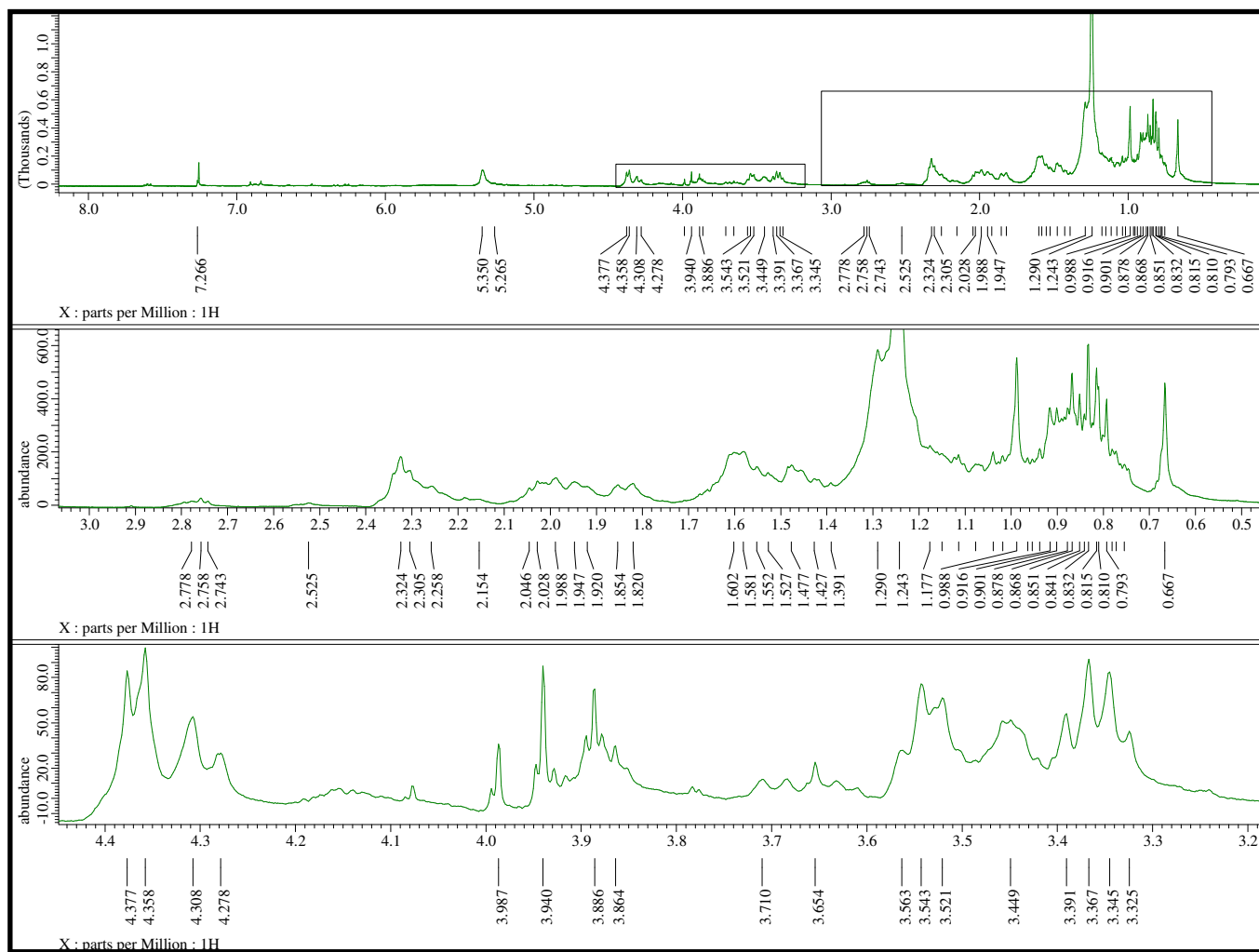
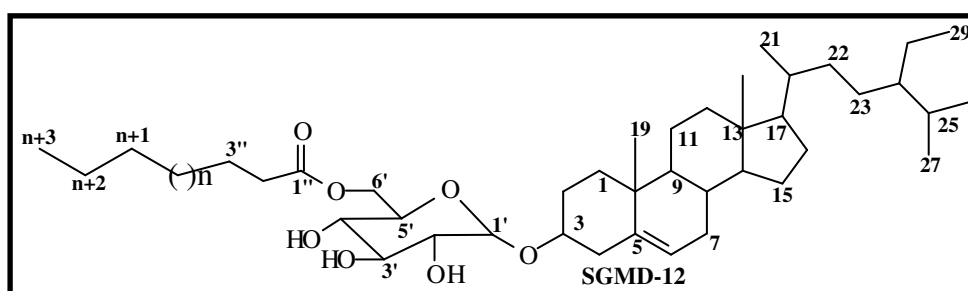


FIGURA 13. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) com ampliações da substância SGMD-12.



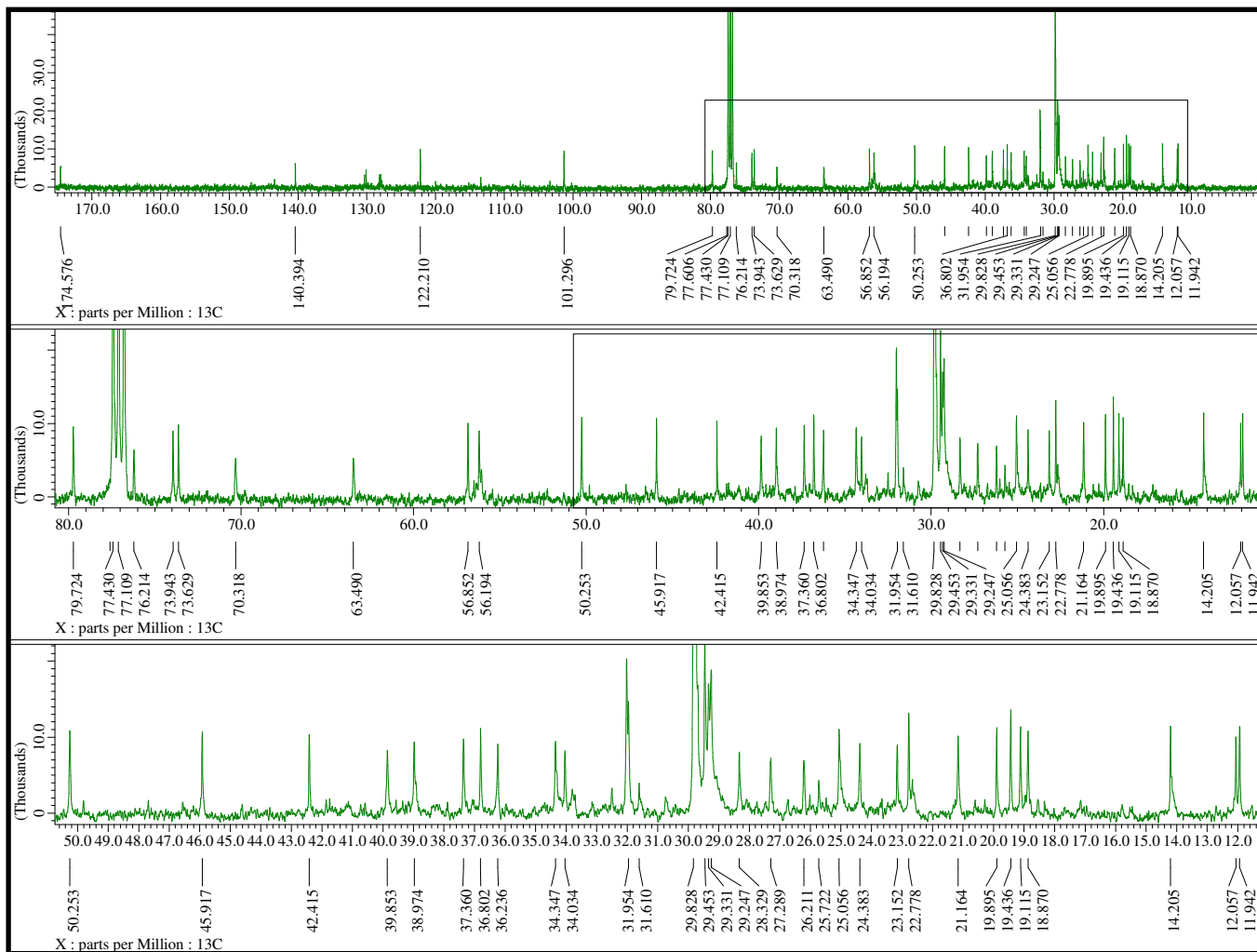


FIGURA 14. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) com ampliações da substância **SGMD-12**.

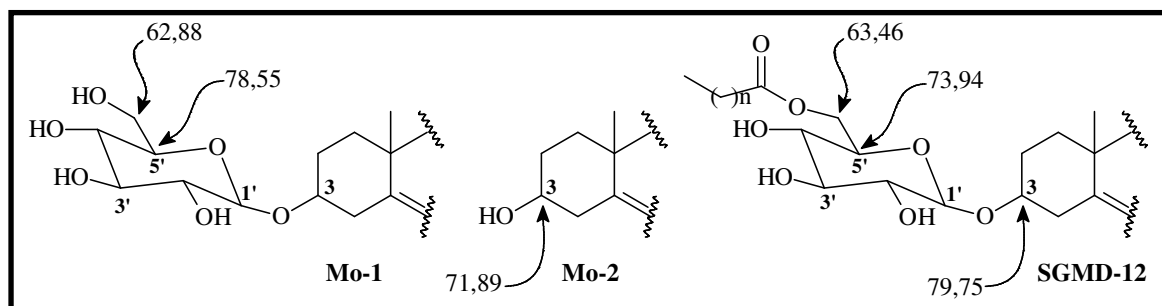


FIGURA 15. Efeito dos substituintes sobre o deslocamento químico de CH-3, 5' e CH2-6'.

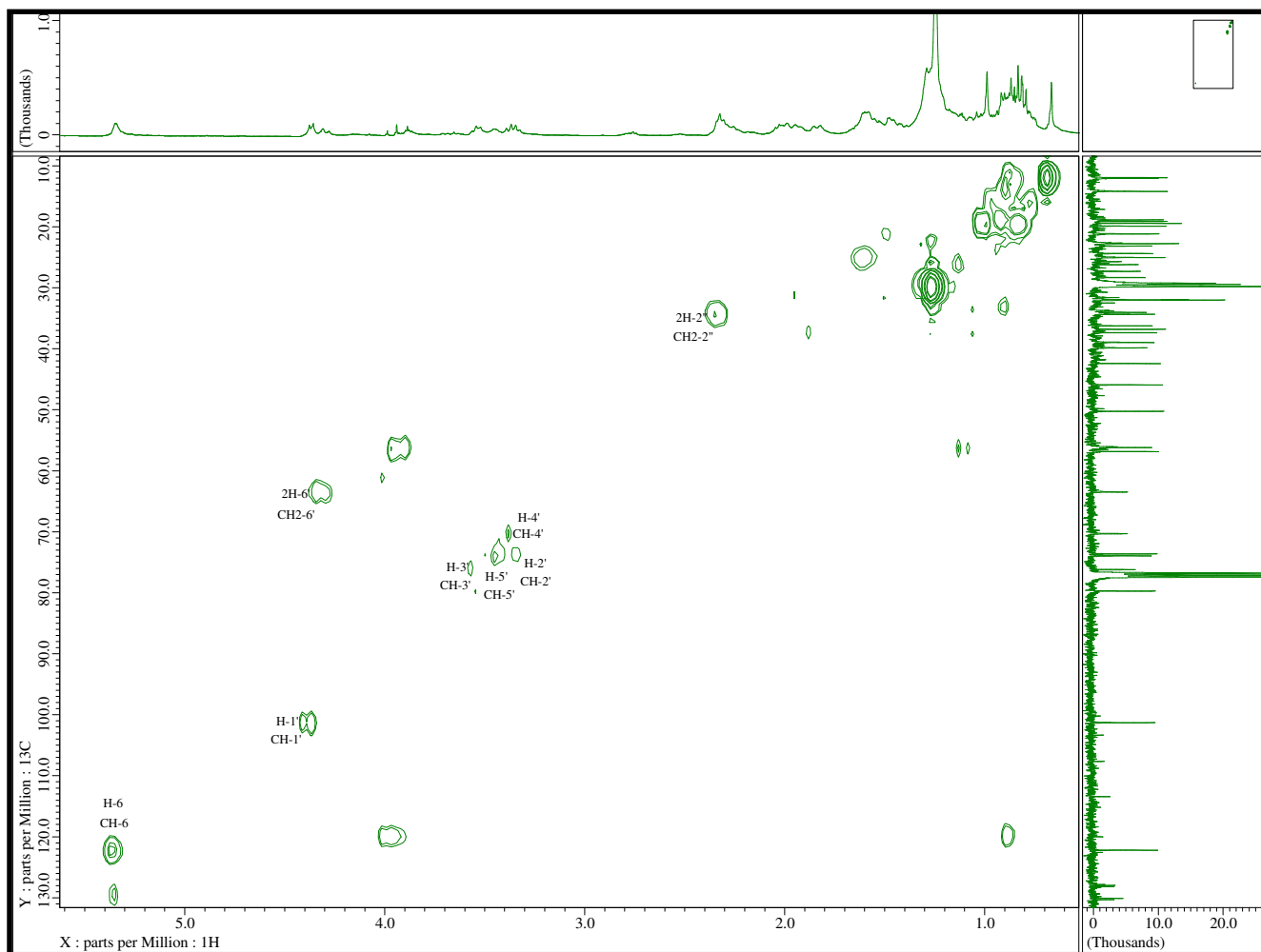
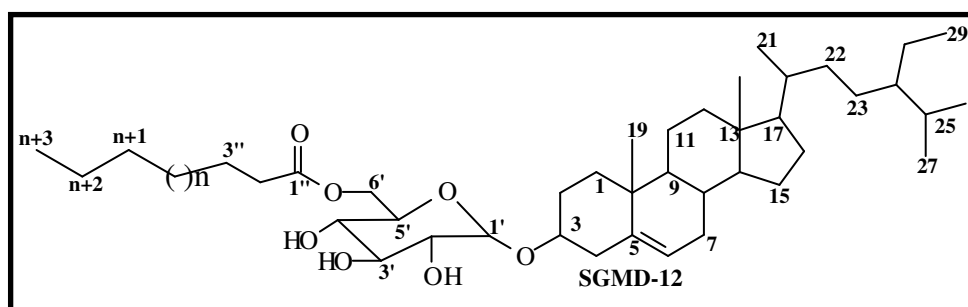


FIGURA 16. Espectro HMQC da substância SGMD-12.



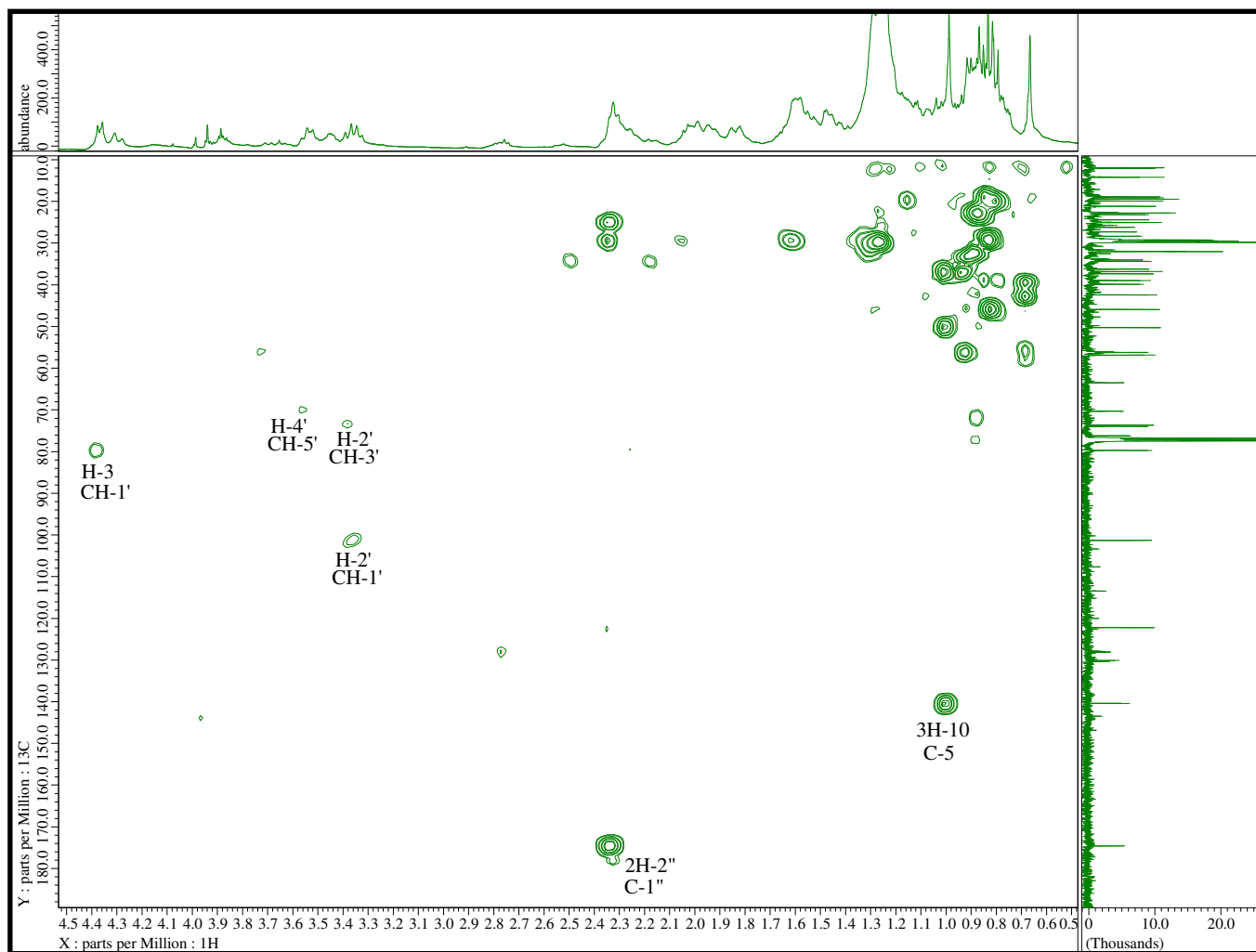
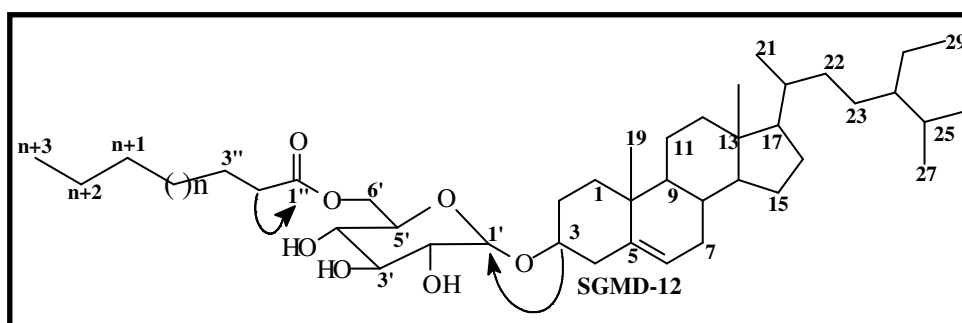
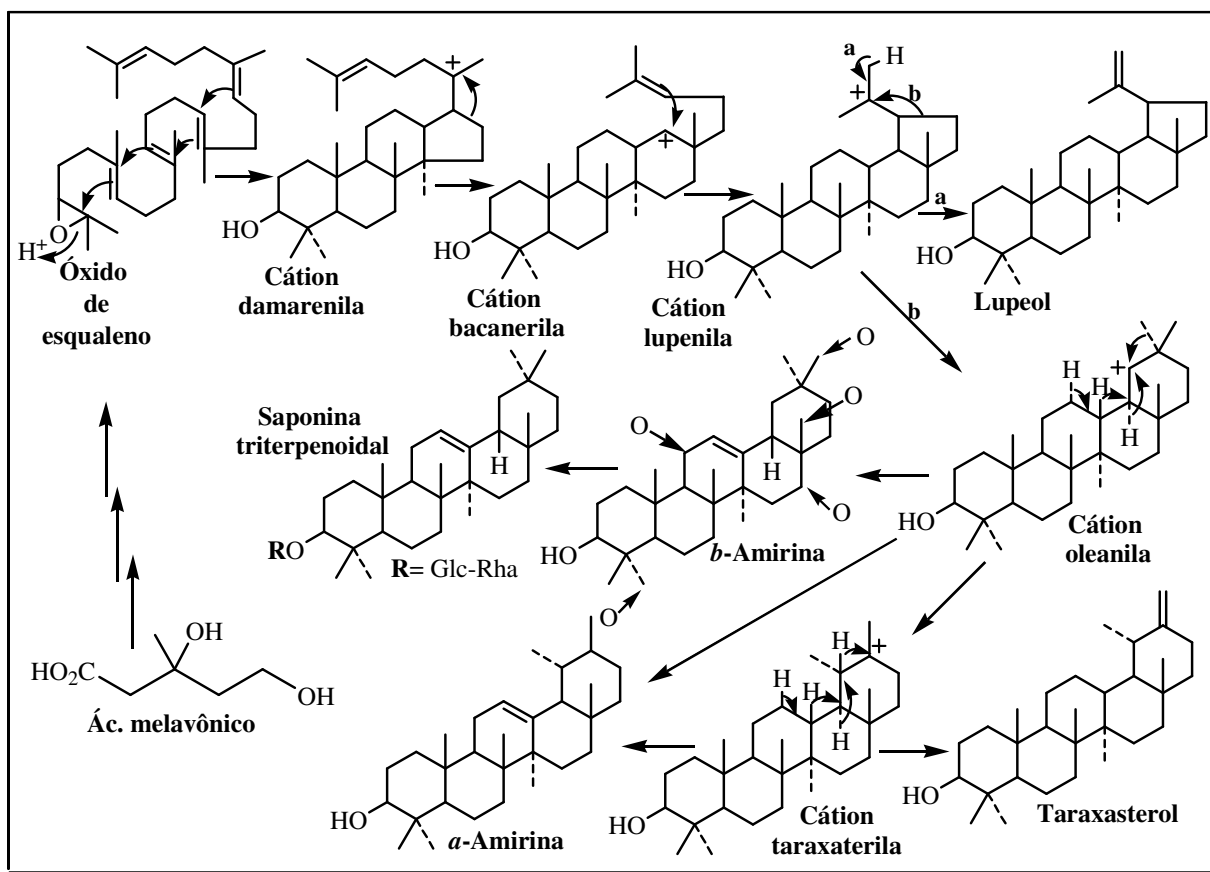


FIGURA 17. Espectro HMBC da substância SGMD-12.



4.2. Determinação estrutural dos triterpenos

São metabólitos especiais de ocorrência na flora e fauna terrestre e marinha. Podem ser encontrados na forma livre bem como na forma de éteres, ésteres ou glicosídeos. Utiliza como precursores cinco unidades isoprênicas gerando um total de trinta átomos de carbono formando estruturas que podem ser acíclica, mono, di, tri, tetra ou pentacíclica (Quadro 13). Os triterpenos pentacíclicos são os constituintes dominantes desta classe sendo amplamente investigada (MAHATO *et al.*, 1994).



QUADRO 13. Proposta biossintética dos triterpenos pentacíclicos (DEWICK, 1998).

O estudo fitoquímico das espécies *S. glaziovii* e *O. parviflora* possibilitaram o isolamento de quatro triterpenos pentacíclicos: lupeol (SGMD-04), lupenona (SGMD-05), 1 β ,3 β -dihidroxi-olean-12-eno (SGMD-06) e friedelina (OPFM-01).

4.2.1. Lupeol

O tratamento cromatográfico da fração **Fr.A2** (Esquema 4, página 24) de *S. glaziovii* resultou no isolamento de um sólido branco amorfo, solúvel em CHCl₃. A comparação por perfil cromatográfico em CCDA desta com padrões de triterpenos e fosteróis possibilitou identificar semelhança com o triterpeno lupeol. A análise por cromatografia gasosa resultou em um cromatograma que apresentou um sinal majoritário com tempo de retenção de 27,7 minutos (Figura 18, página 46). O espectro de massas 70 eV (Figura 19, página 46) exibiu como íon molecular o pico M⁺ 426 compatível com a fórmula molecular C₃₀H₅₀O. A análise dos demais sinais e propostas de fragmentações (Esquema 11, página 46) compatíveis com a literatura, conduziu a estrutura do triterpeno lupeol (BUDZIKIEWICZ *et al.*, 1964).

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 20, página 47) possibilitou identificar a presença de simpletos na região de δ_{H} 0,78-1,70 atribuídos aos hidrogênios de carbonos metílicos característicos deste triterpeno. Além desses, foi observado a presença dos sinais em δ_{H} 3,18 (*m*, H-3) atribuído ao hidrogênio ligado a carbono carbinólico; 4,55 (*sl*, H-29b) e 4,67 (*sl*, H-29a) devido aos hidrogênios de carbono de uma vinilidina e o sinal em δ_{H} 1,67 correspondente a metila ligada a dupla ligação. A comparação destes dados com os dados de lupeol isolados de outras espécies confirma **SGMD-04** como sendo o triterpeno lupeol (ARAÚJO, 2007; QUEIROZ, 2008).

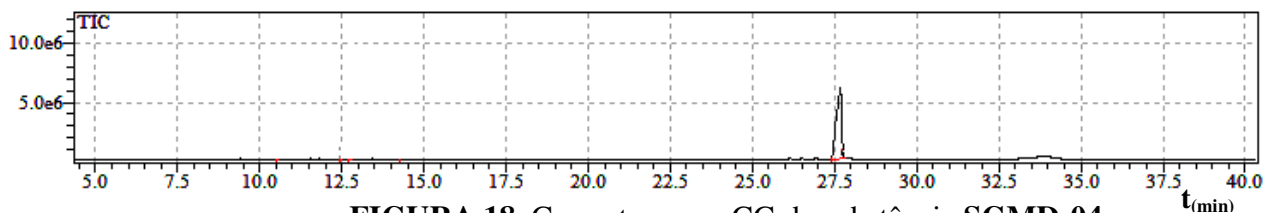


FIGURA 18. Cromatograma CG da substância **SGMD-04**.

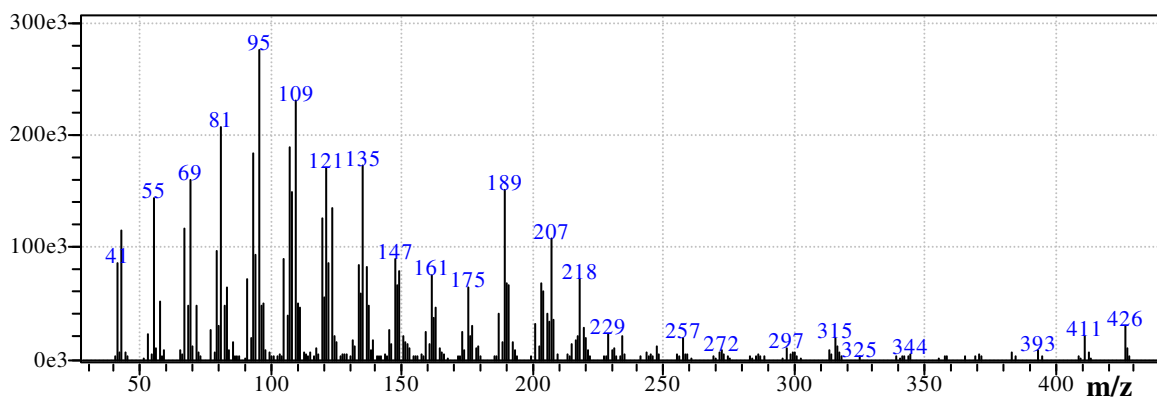
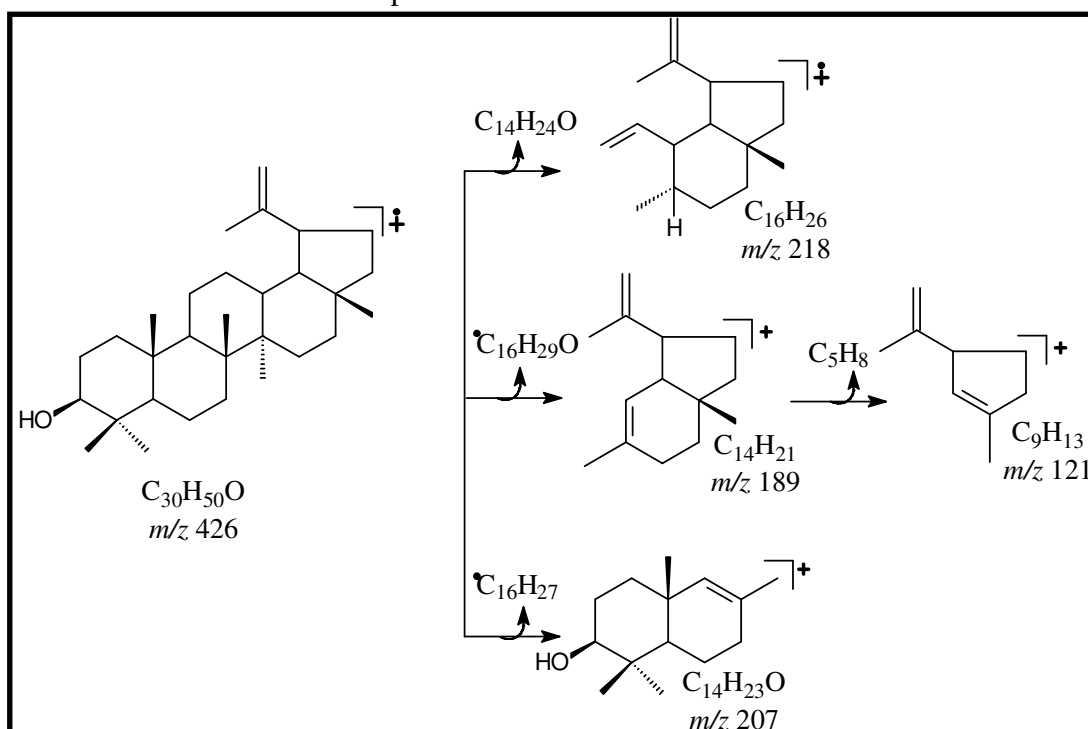


FIGURA 19. Espectro de massas 70 eV da substância **SGMD-04**.



ESQUEMA 11. Propostas de fragmentação da substância **SGMD-04**.

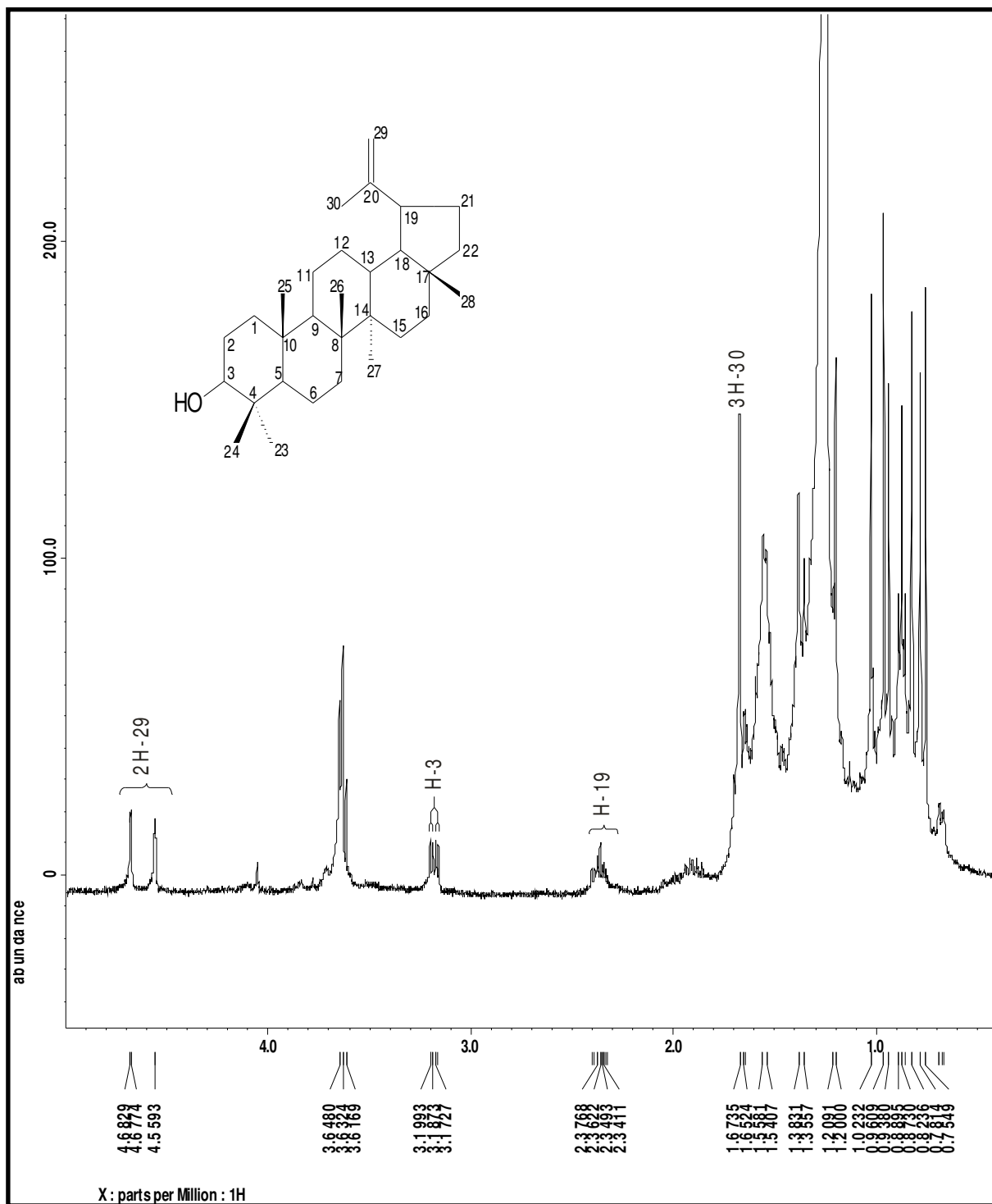


FIGURA 20. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da substância SGMD-04.

4.2.2. Lupen-3-ona

O tratamento cromatográfico da fração **Fr.A3** do extrato em diclorometano de *S. glaziovii* (Esquema 4, página 24), resultou no isolamento de um sólido branco amorfo e solúvel em CHCl_3 . A análise realizada em cromatografia a gás exibiu um cromatograma com pequenas impurezas e um sinal muito intenso em 27,30 minutos (Figura 21). O espectro de massas 70 eV deste sinal em 27,30 minutos exibiu como íon molecular o sinal em M^+ 424 D, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$ (Figura 22). A comparação deste com a literatura apontou para estrutura do triterpeno lupe-3-ona (BUDZIKIEWICZ *et al.*, 1964).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 23, página 50), mostrou bastante semelhança com o espectro do lupeol com exceção do sinal referente ao hidrogênio do carbono carbinólico (H-3).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 24, página 51), apresentou sinais que justificam a proposta estrutural da lupe-3-ona para **SGMD-05**. A presença dos sinais em δ_{C} 218,23 C-3, δ_{C} 150,92 C-20 e δ_{CH_2} 109,49 CH_2 -29 são característicos do esqueleto lupano com carbonila em C-3 (MAHATO *et al.*, 1994). Observa-se um efeito β nos carbonos α -carbonila, quando comparados com os dados do lupeol contribuindo para elucidação da estrutura (Tabela 2, página 49) (MAHATO *et al.*, 1994).

A análise deste conjunto de dados conduziu à confirmação de **SGMD-05** como o triterpeno lupe-3-ona, citado pela primeira vez no gênero.

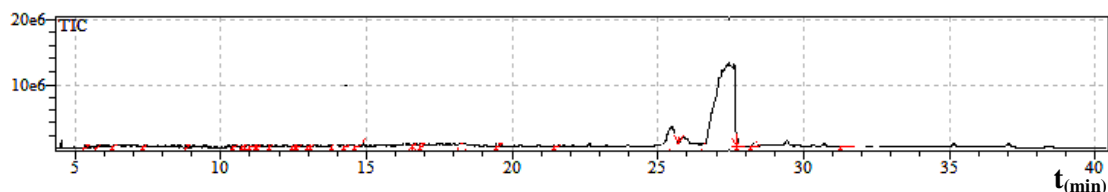


FIGURA 21. Cromatograma CG da substância SGMD-05.

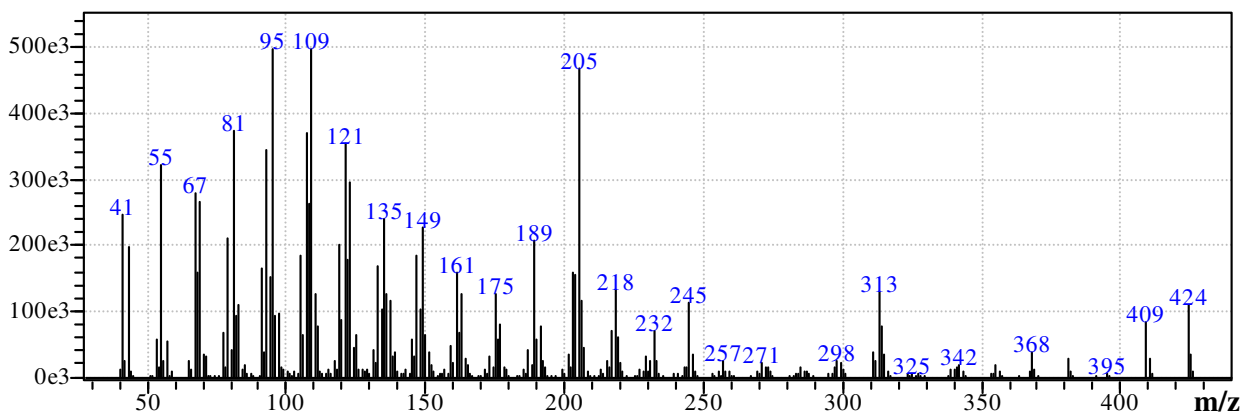


FIGURA 22. Espectro de massas 70 eV da substância SGMD-05.

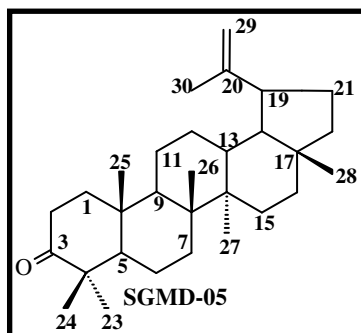


TABELA 2. Dados espectrais de RMN de ^{13}C e de ^1H da substância **SGMD-05** em CDCl_3 . Deslocamentos químico em ppm.

C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C} literatura*	δ_{C} literatura**	Efeito β de lupe-3-ona para lupeol
3	-	218,24	217,90	78,9	
4	-	47,42	47,24	38,8	+8,62
8	-	40,88	40,73	40,7	
10	-	36,98	36,83	37,1	
14	-	43,08	42,84	42,7	
17	-	43,09	42,93	42,9	
20	-	150,92	150,70	150,8	
CH					
5		55,03	54,88	55,2	
9		49,89	49,75	50,3	
13		38,27	38,14	38,0	
18		48,35	48,21	48,2	
19		48,05	47,89	47,9	
CH₂					
1	1,91-1,85 (m)	39,71	39,56	38,6	
2	2,47-2,36 (m)	34,23	34,07	27,3	+6,93
6		19,78	19,63	18,2	
7		33,67	33,53	34,2	
11		21,57	21,43	20,9	
12		25,25	25,12	25,0	
15		27,79	27,39	27,4	
16		35,62	35,48	35,5	
21		29,92	29,79	29,8	
22		40,08	39,93	39,9	
29	4,68 (sl); 4,56 (sl)	109,49	109,36	109,3	
CH₃					
23	1,25 (s)	26,63	26,61	27,9	
24	1,06 (s)	21,13	20,98	15,3	+5,80
25	0,92 (s)	16,05	15,90	16,1	
26	1,02 (s)	15,88	15,74	15,9	
27	0,95 (s)	14,57	14,43	14,5	
28	0,79 (s)	18,10	17,97	17,9	
30	1,67 (s)	19,40	19,27	19,2	

*Dados de RMN ^{13}C da Lupe-3-ona. **Dados de RMN ^{13}C do Lupeol (MAHATO *et al.*, 1994).

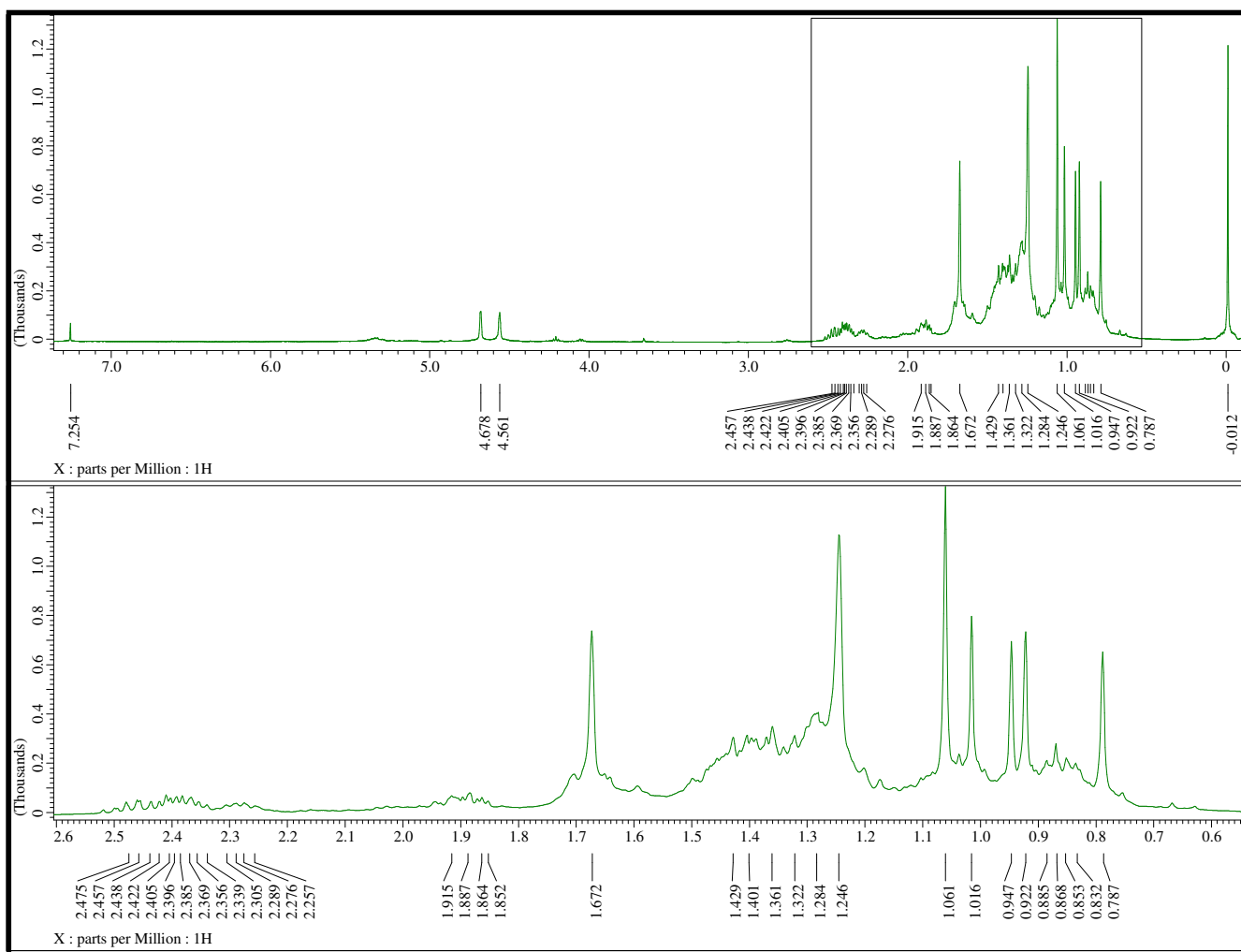
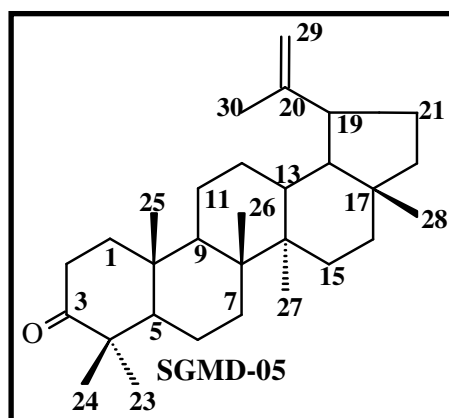


FIGURA 23. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) com ampliações da substância **SGMD-05**.



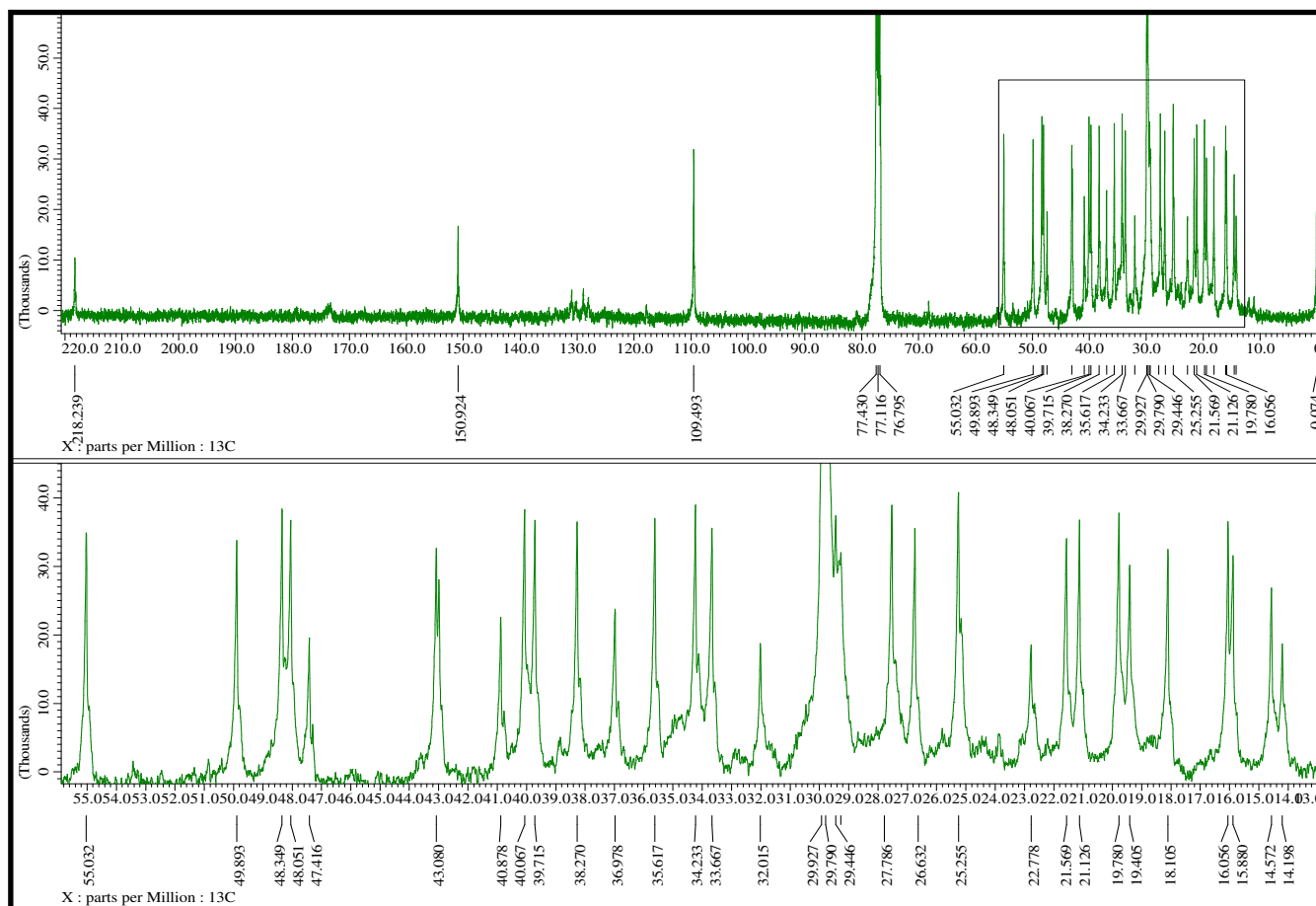
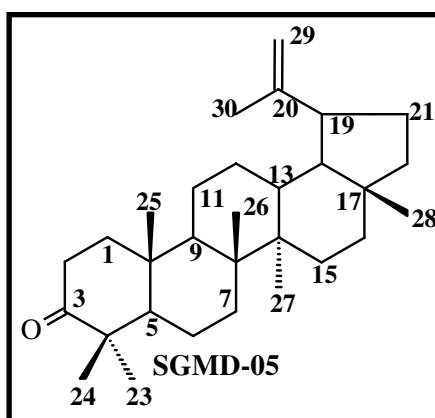


FIGURA 24. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) com ampliações da substância **SGMD-05**.



4.2.3. 1 β , 3 β -hidroxi-olean-12-eno

O tratamento cromatográfico da sub-fração **Fr. B2** (Esquema 4, página 24) de *S. glaziovii* resultou no isolamento de um sólido branco amorfo, solúvel em CHCl₃.

A análise por cromatografia a gás exibiu um cromatograma com apenas um sinal em 25,30 minutos o que garantiu o grau de pureza da amostra (Figura 25, página 54).

O espectro no infravermelho (Figura 26, página 54) apresentou bandas que foram atribuídas a estiramento OH em ligação de hidrogênio ν_{OH} 3437 cm⁻¹, estiramento simétrico e assimétrico de grupos metílicos e metilênicos em ν_{CH_2} 2854 e 2923 cm⁻¹, sendo confirmada pela absorção em 1382 cm⁻¹. Uma banda em ν_{CH_3} 1462 cm⁻¹ foi atribuída aos grupos metila presentes na molécula. O estiramento $\nu_{C=C}$ 1639 cm⁻¹ foi atribuído a dupla ligação presente na substância (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

O espectro de RMN de ¹H (Figura 27, página 55) apresentou sinais simples na região de δ_H 0,77-1,24 que caracteriza a natureza triterpênica da molécula. A presença do sinal em δ_H 5,17 (*t* 7,6 Hz; H-12) foi atribuído ao hidrogênio ligado a carbono sp². Os sinais em δ_H 3,43 (*dd* 11,7; 5,8 Hz) e 3,29 (*dd* 12,3; 6,2 Hz) foram atribuídos aos hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos, justificando os dados obtidos na interpretação do espectro no IV.

A análise do mapa de correlação homonuclear ¹H-¹H COSY (Figura 28, página 56) possibilitou identificar os principais acoplamentos entre H-3 δ_H 3,43 (*dd* 11,6; 4,8 Hz) e δ_H 1,58 (*m*) H-2b e 1,73 (*m*) H-2a e entre H-1 δ_H 3,27 (*dd* 12,4; 5,2 Hz) e os hidrogênios H-2a e H-2b, assinalando a possível posição dos carbonos carbinólicos na substância.

A análise do espectro de RMN de ¹³C (Figuras 29-30, página 57) comparada com a literatura confirma a estrutura de um triterpeno da classe dos oleananos (MAHATO *et al.*, 1994). A presença dos sinais em δ_{CH} 122,22 CH-12 e 144,44 C-13 de dupla trissubstituída, sinais de grupos metílicos juntamente com δ_{CH} 75,93 e 79,57 de carbonos carbinólicos CH-3 e CH-1 apresentam semelhança com o triterpeno castanopsol (PLANT & RASTOGI, 1977). A comparação dos dados de RMN de ¹³C da substância com a β -amirina apontam um efeito γ sobre a metila CH₃-25 δ_{CH_3} 11,2 com ($\Delta\delta_{CH_3}$ = -4,1 ppm) e um efeito β em C-10 δ_C 43,0 com ($\Delta\delta_C$ = +6,0 ppm) (Quadro 14, Tabela 3, página 53).

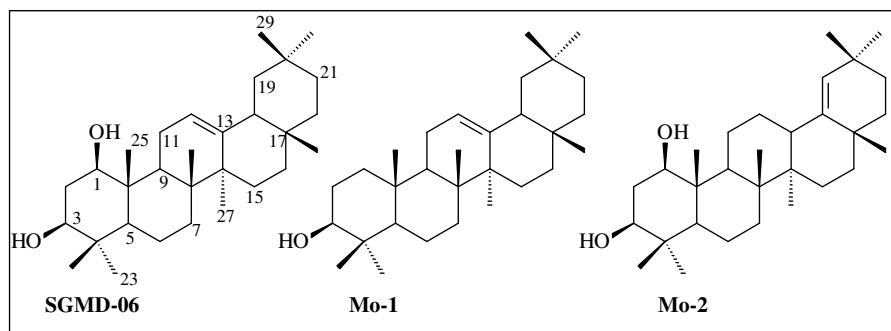
O mapa de correlação heteronuclear a uma ligação, HSQC (Figuras 31-32, página 58), auxiliou na atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos, assim observados, dos carbonos e respectivos hidrogênios na estrutura.

O mapa de correlação heteronuclear a duas e três ligações HMBC auxiliou na determinação dos pontos de ligação na substância, principalmente na posição dos grupos hidroxila em 3H-25 δ_H 0,98 (*s*) com CH-1 δ_{CH} 80,3 além das correlações de CH₃-23 δ_H 0,77 (*s*) e CH₃-24 δ_{CH_3} 0,98 (*s*) com CH-3 76,1 confirmando a presença das hidroxilas em CH-1 e CH-3. As demais correlações estão ilustradas nas Figuras 33 e 34, página 59 e na Tabela 3, página 53.

O espectro de massas 70 eV da substância exibiu como íon molecular M⁺ 424, condizente com a perda de H₂O na molécula (Figura 35, página 60). As propostas de fragmentação que justificam os sinais apresentados no espectro estão ilustradas no Esquema 12, página 60.

A presença de NOE entre H-3 e H-5; entre H-1 e H-3; em H-1 e H-2a e entre H-3 e H-2a sugere a conformação β para ambos grupos hidroxilas foi proposta após análise do experimento de NOEDIFF, (Figura 36, página 61). Assim, ao irradiar em H-3 foi observado NOE em H-1, 3H-23 e H-5 e quando irradiado em H-3 foi observado NOE em H-3, H-2a, e H-5.

A análise do conjunto de dados aliada à comparação com a literatura conduziu para proposta estrutural da substância **SGMD-06** como sendo a **1 β ,3 β -dihidroxi-olean-12-eno** um epímero do triterpeno castanopsol relatado pela primeira vez na literatura.



QUADRO 14. Comparação de modelos da literatura com a substância **SGMD-06**

TABELA 3. Dados espectrais de RMN de ^{13}C e de ^1H da substância **SGMD-06** em CDCl_3 . Deslocamentos químico em ppm.

C	HSQC		HMBC		Mo-1*	Mo-2*
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$	$^3J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$	δ_{C}	δ_{C}
1	79,6	3,43 (dd, 11,6; 4,8)		3H-25	75,7	33,0
2	38,7	1,73(m); 1,58 (m)			25,2	39,0
3	75,9	3,27 (dd 12,4; 5,2)		3H-23; 3H-24	76,2	79,5
4	37,6	-	3H-23; 3H-24		37,4	38,4
5	52,9	0,61 (d, 10,8)	3H-23; 3H-24; 3H-25		48,9	53,4
6	18,0				18,3	18,0
7	32,5				32,5	34,6
8	41,4	-	3H-26	3H-27	40,0	41,4
9	48,4			3H-25; 3H-26	47,4	52,4
10	43,0	-	3H-25		37,0	43,8
11	22,7				23,4	23,9
12	122,2	5,17 (t, 7,6)			121,8	26,2
13	144,4	-		3H-27	145,2	38,1
14	40,3	-	3H-27		41,8	43,5
15	25,9			3H-27	26,1	27,5
16	27,5			3H-28	26,9	37,8
17	31,0	-	3H-28		32,5	34,4
18	46,7	2,36-2,30 (m)	3H-28		47,2	142,7
19	46,9			3H-29; 3H-30	46,8	129,7
20	29,7	-	3H-29; 3H-30		31,3	32,4
21	34,8			3H-29; 3H-30	34,7	33,5
22	37,1			3H-28	37,2	37,5
23	27,9	0,98 (s)		3H-24	28,3	28,0
24	15,2	0,77 (s)		3H-23	22,3	16,5
25	11,2	0,98 (s)			15,3	12,7
26	17,0	0,99 (s)			16,8	16,2
27	25,9	1,13 (s)			26,1	14,5
28	23,6	0,83 (s)			28,4	25,3
29	32,6	0,87 (s)		3H-30	33,3	31,3
30	28,3	0,87 (s)		3H-29	23,7	29,3

*Dados de RMN ^{13}C de **Mo-1** e **Mo-2** (MAHATO *et al.*, 1994).

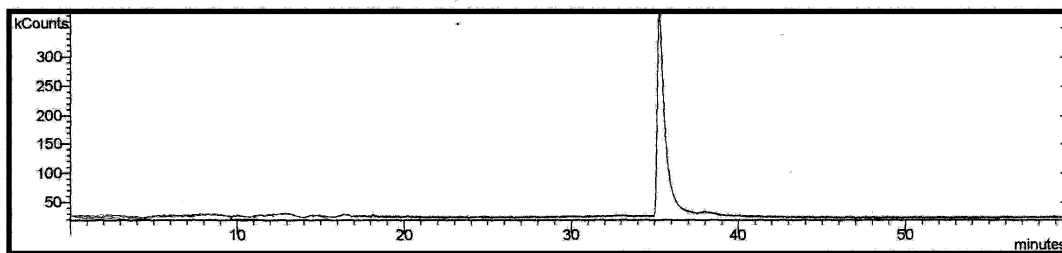


FIGURA 25. Cromatograma CG da substância SGMD-06.

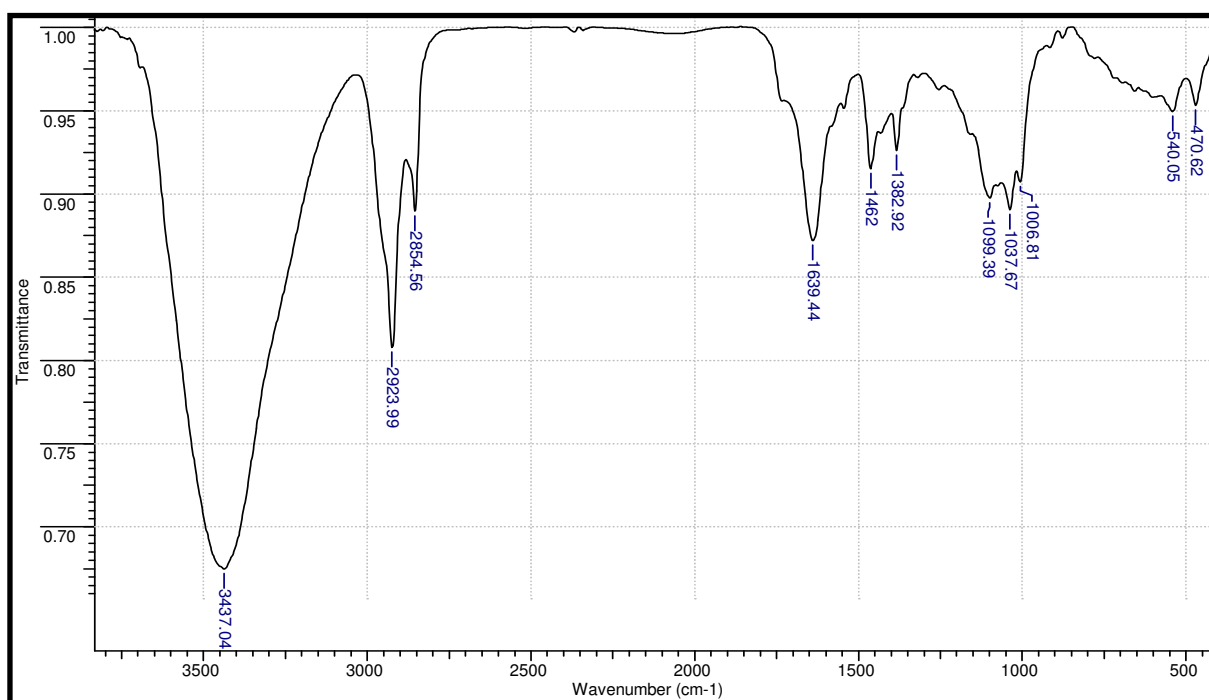
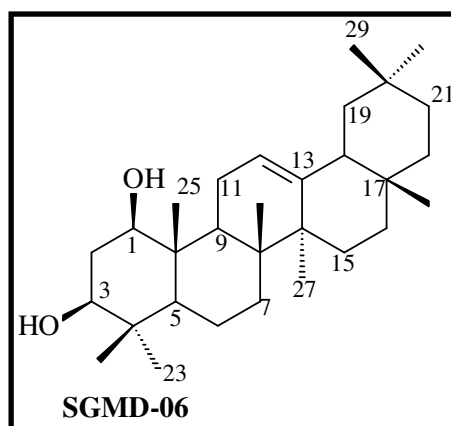


FIGURA 26. Espectro no infravermelho da substância SGMD-06.

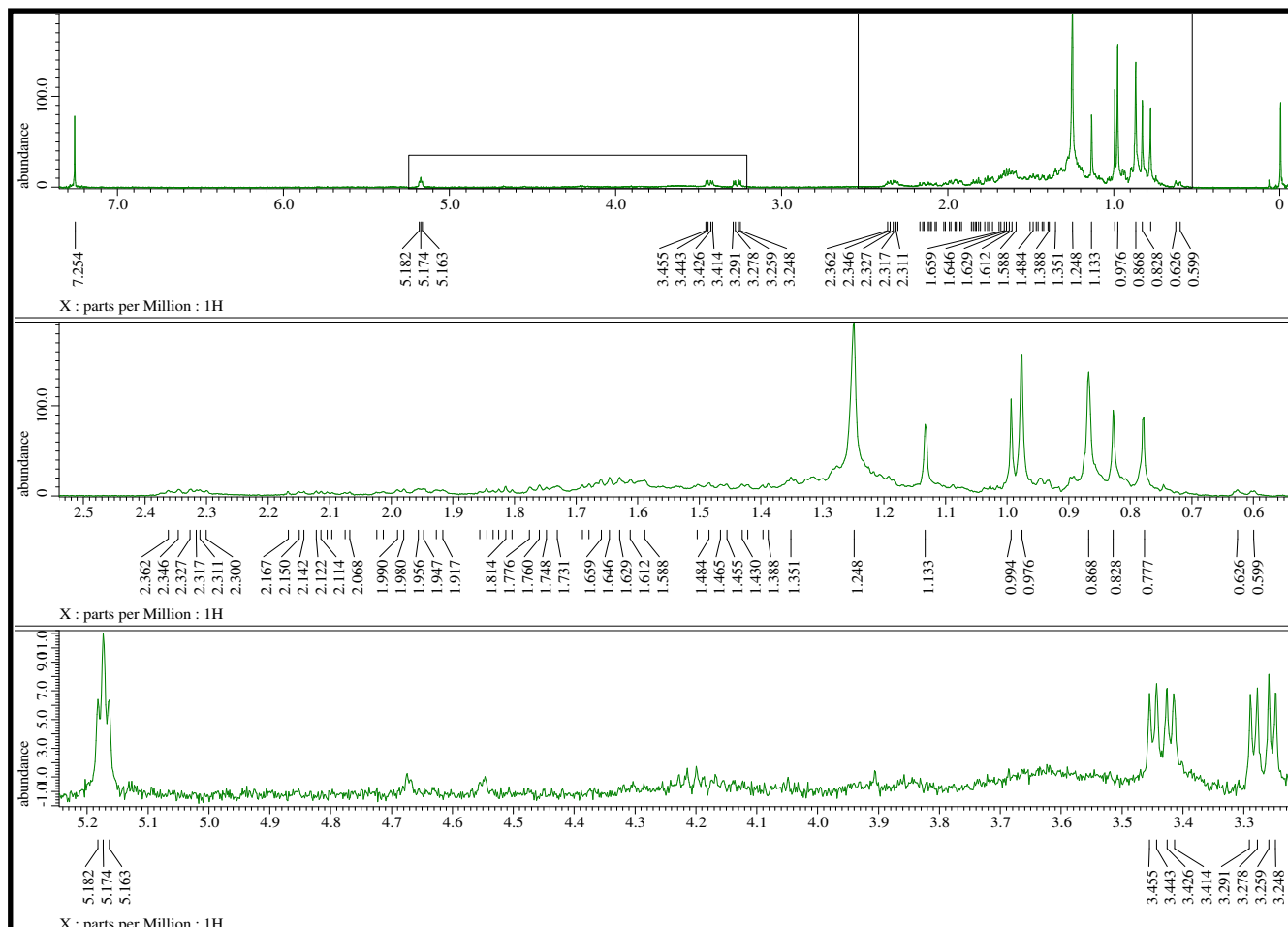
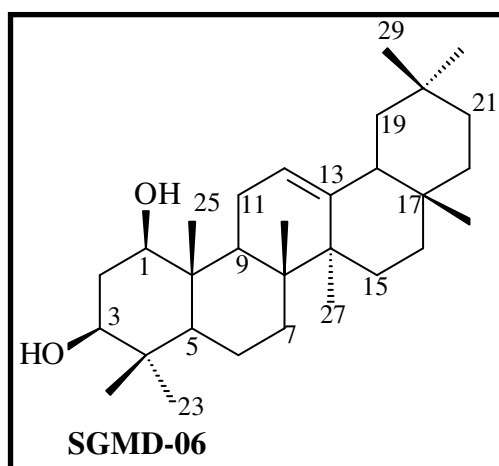


FIGURA 27. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) com ampliações da substância **SGMD-06**.



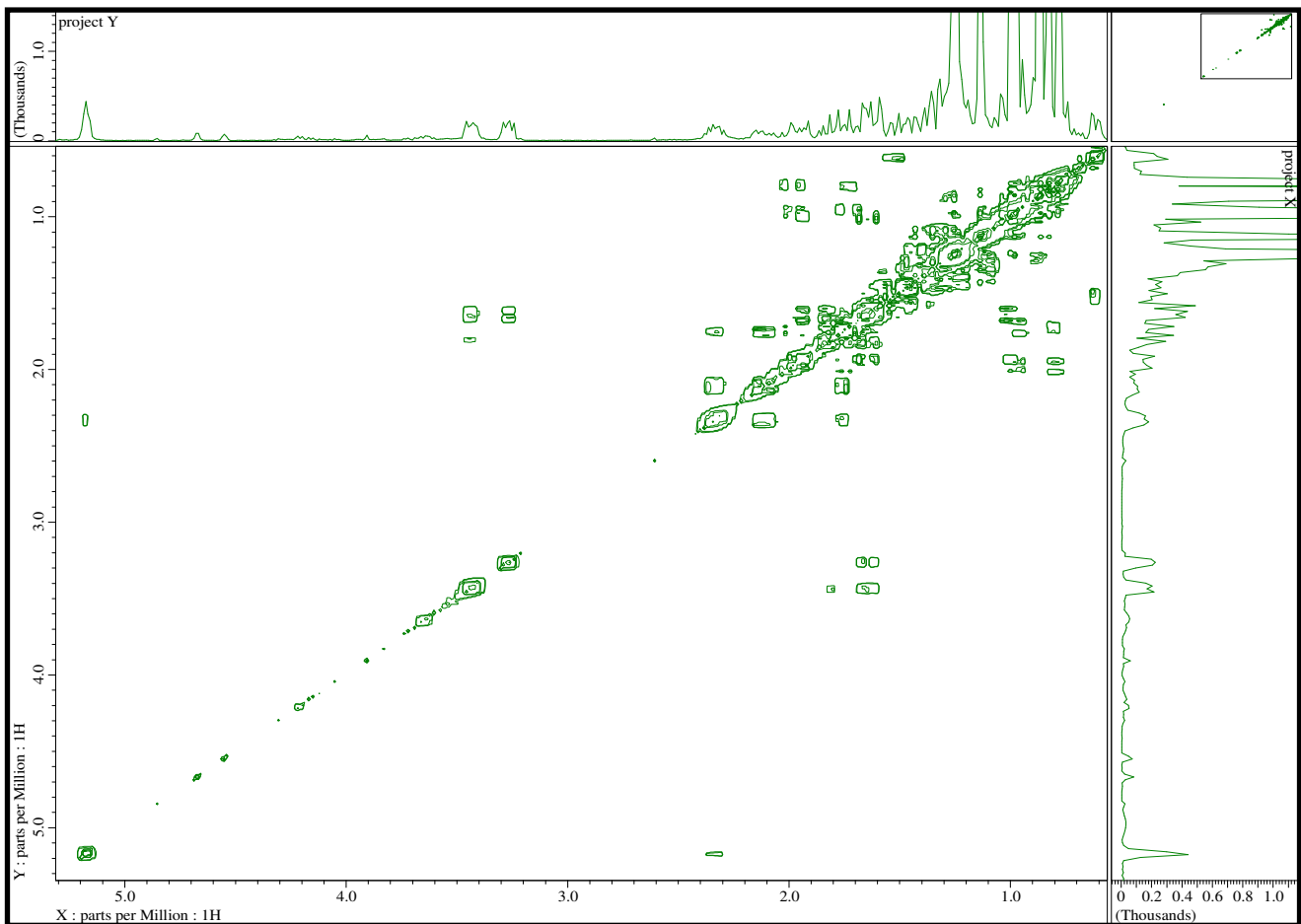
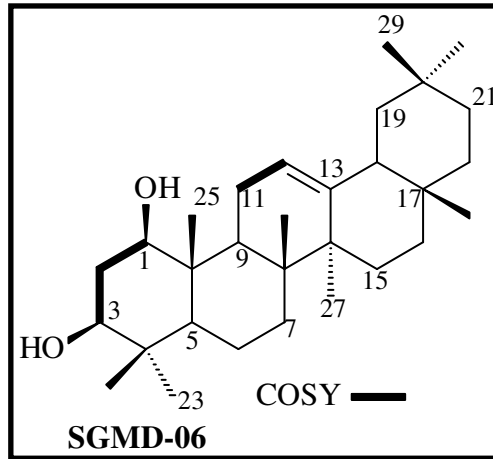


FIGURA 28. Espectro ^1H - ^1H COSY da substância de **SGMD-06**.

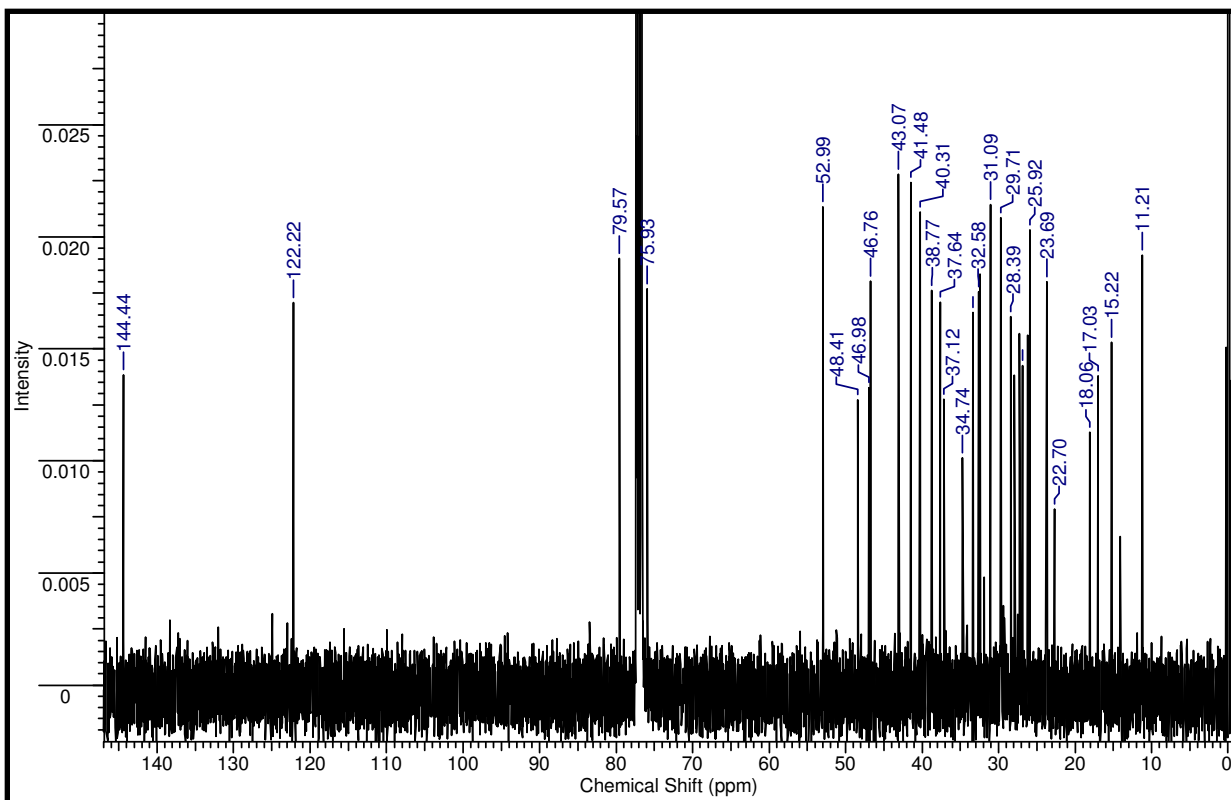


FIGURA 29. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância SGMD-06.

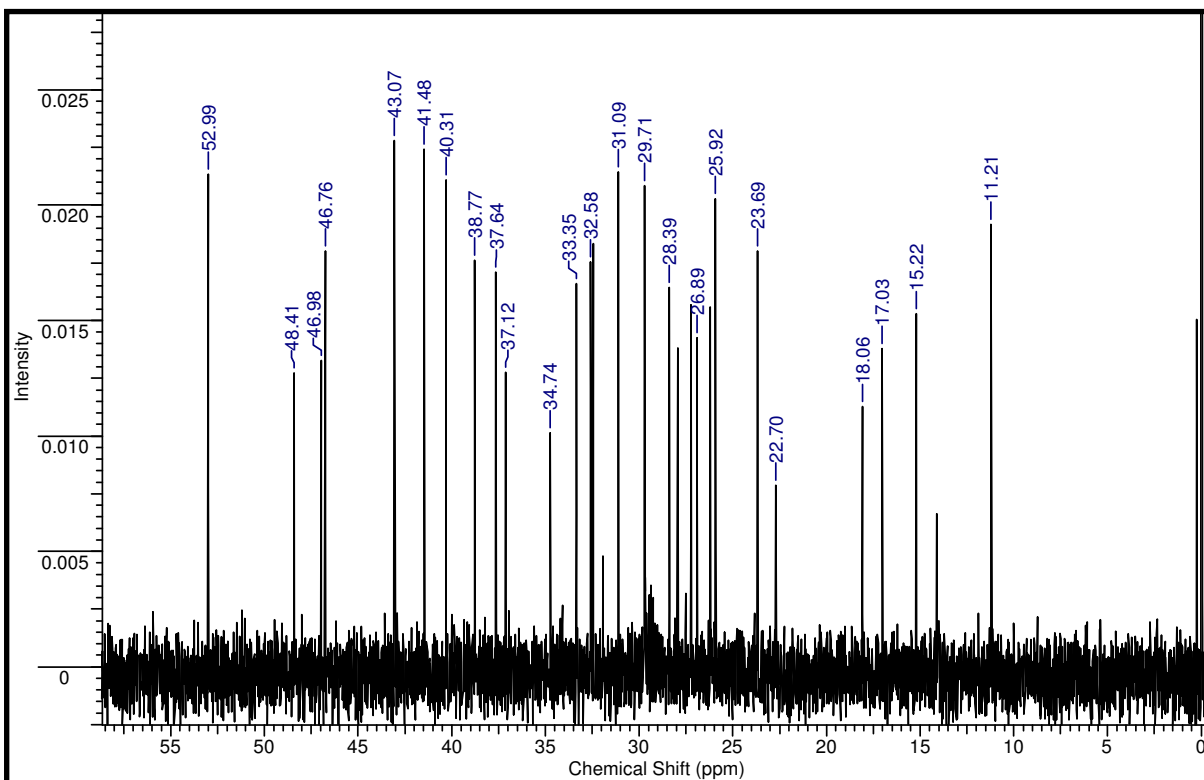


FIGURA 30. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (0-60 ppm) substância SGMD-06.

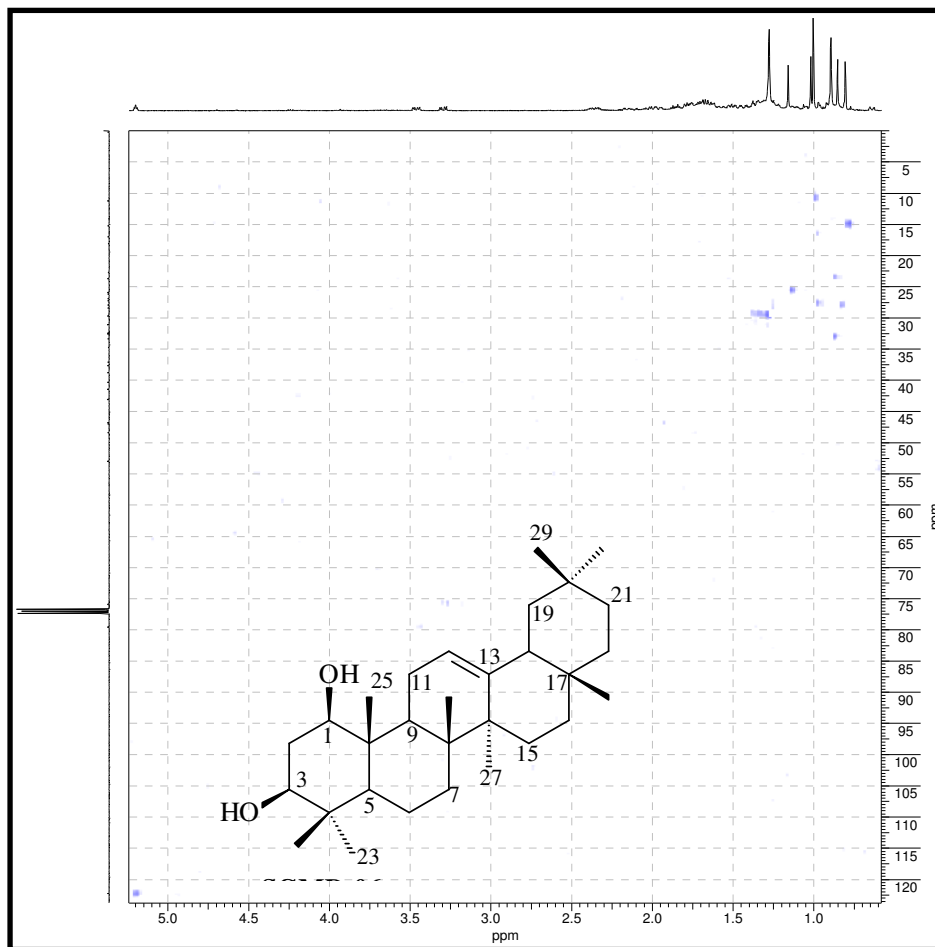


FIGURA 31. Espectro HSQC da substância SGMD-06.

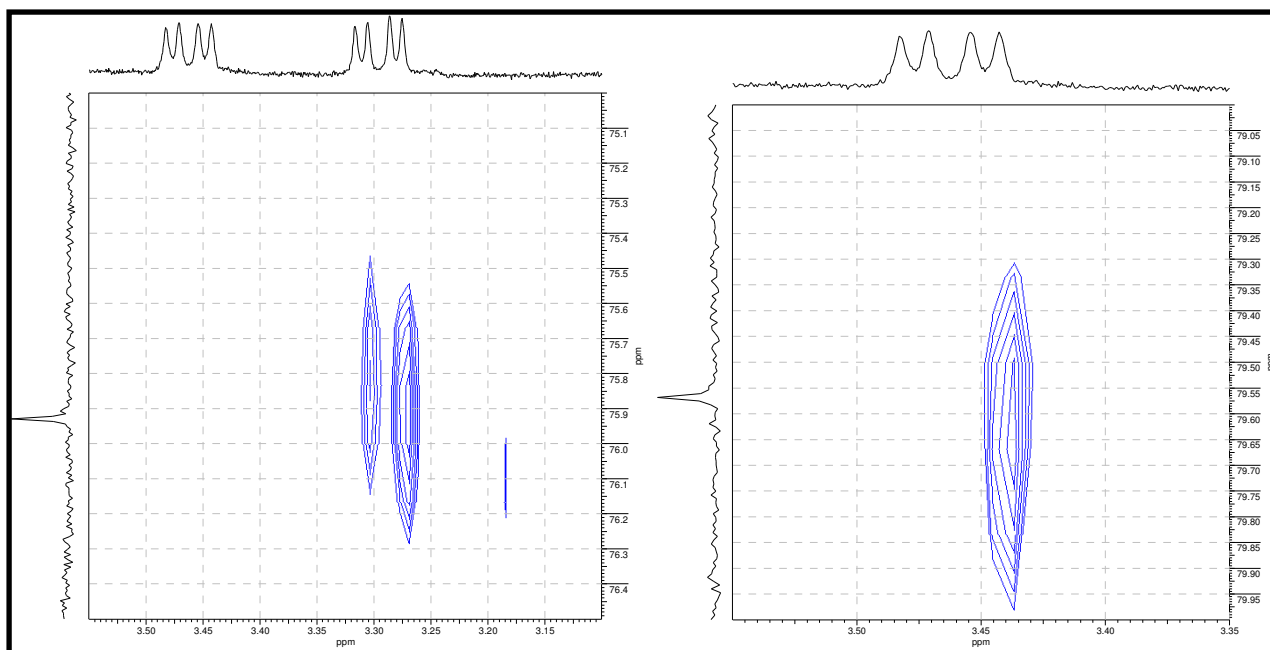


FIGURA 32. Ampliações do espectro HSQC da substância SGMD-06.

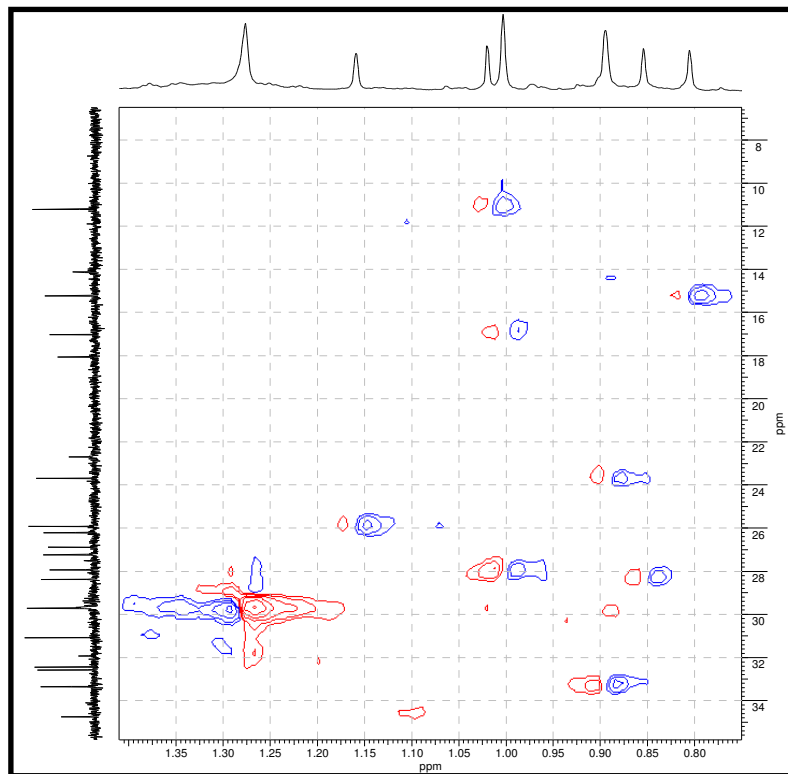


FIGURA 33. Espectro HMBC da substância SGMD-06.

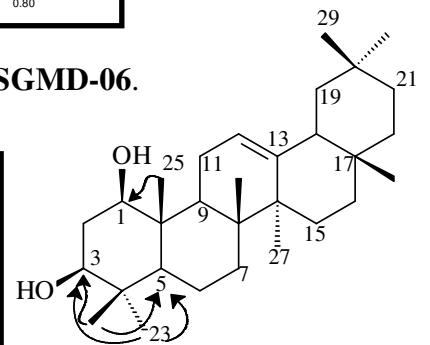
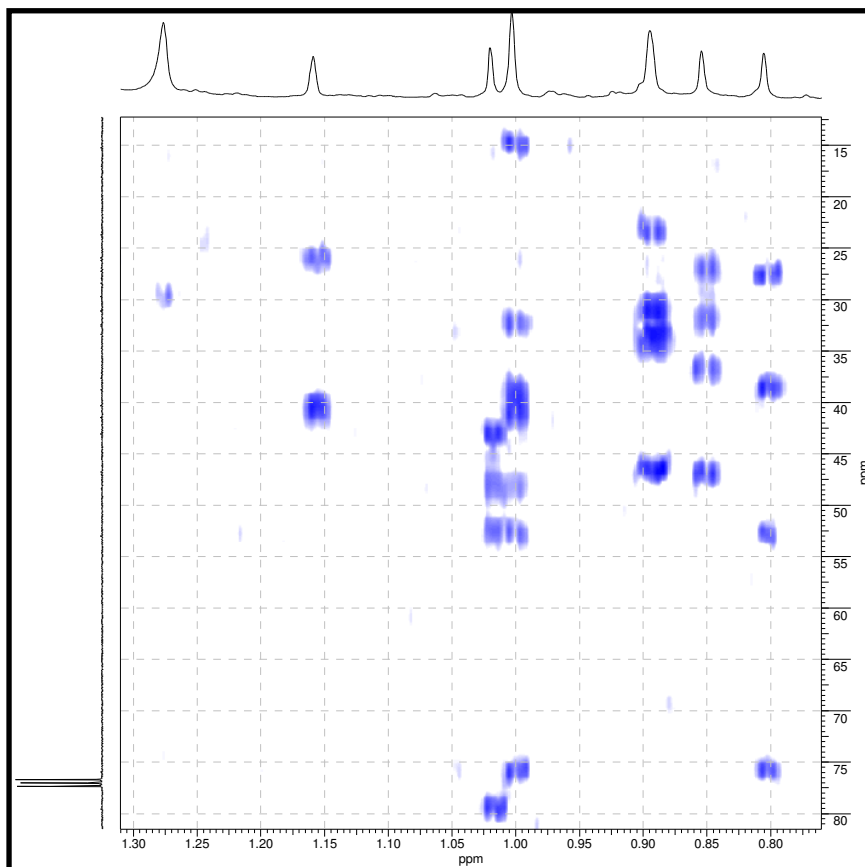


FIGURA 34. Ampliação do espectro HMBC da substância SGMD-06.

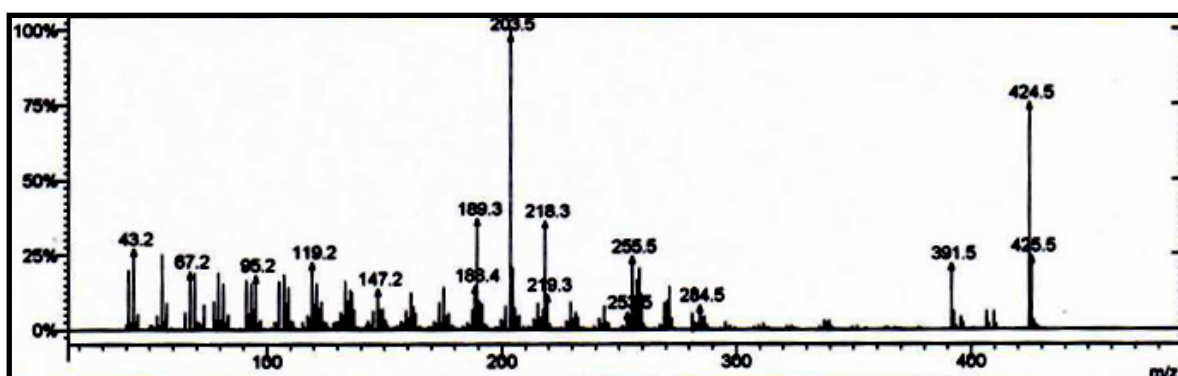
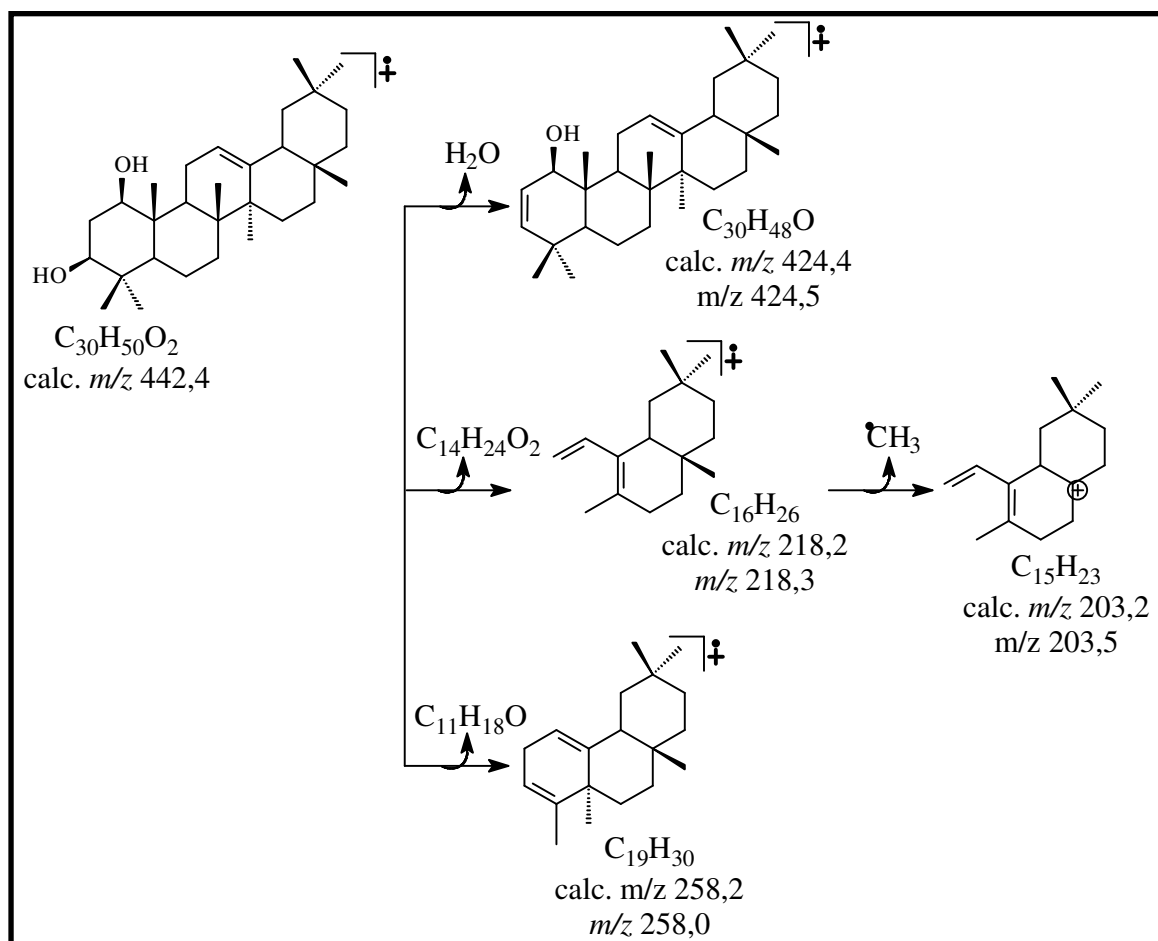


FIGURA 35. Espectro de massas 70 eV da substância SGMD-06.



ESQUEMA 12. Propostas de fragmentação da substância SGMD-06.

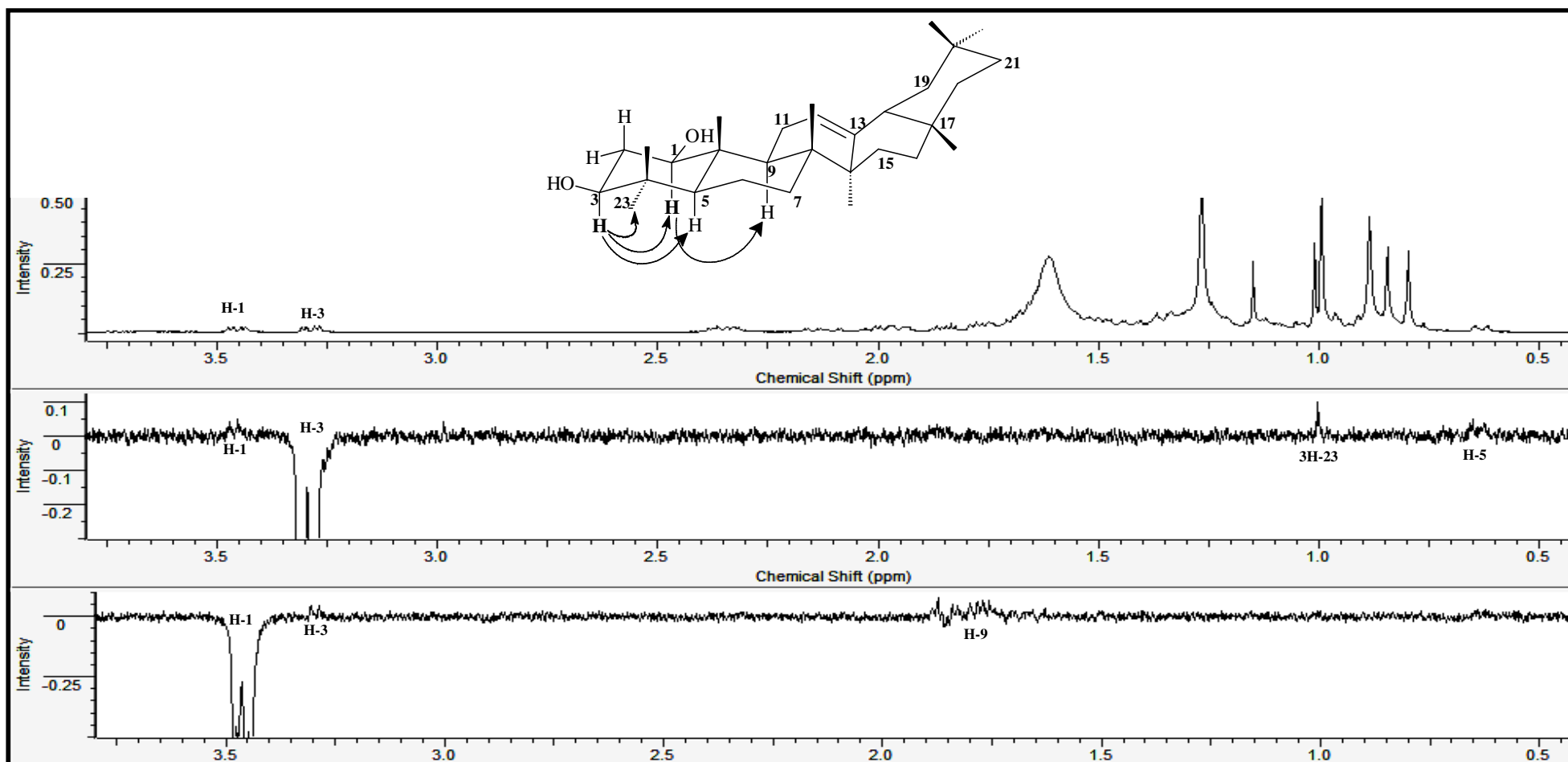


FIGURA 36. Espectros de RMN de ^1H e NOEDIFF da substância SGMD-06.

4.2.4. Friedelina

O tratamento cromatográfico, CCDP hexano/AcOEt (4:1), da fração **Fr.2** proveniente do extrato em CH₂Cl₂ das folhas de *O. parviflora* (Esquema 6, página 27) conduziu ao isolamento de um sólido branco cristalino, Pf (240-242 °C), solúvel em CHCl₃.

A análise por CCDA da substância mostrou mesmo perfil cromatográfico com padrão do triterpeno friedelina. O cromatograma obtido através da análise por CG apresentou um sinal majoritário em 54,3 minutos (figura 37). O espectro de massas 70 eV (figura 38) deste sinal exibiu como pico íon molecular M⁺ 426, compatível com a fórmula molecular C₃₀H₅₀O.

O espectro de RMN de ¹H (Figura 39, página 64) exibiu sinais com feição de triterpeno apresentando seis simpletos na região entre δ_H 0,73-1,18 atribuídos aos hidrogênios ligados a carbonos metílicos, além de um tripleto em δ_H 2,27 (*t*, 6,0 Hz) condizente com a ressonância de hidrogênios em posição α -carbonila (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

O espectro de RMN de ¹³C (Figuras 40-41, páginas 64-65), apresentou 30 sinais confirmando a natureza triterpênica da substância. As atribuições dos sinais estão apresentadas na Tabela 4, página 63. A análise dos espectros aliados à comparação com dados da literatura conduziu a elucidação estrutural da substância como sendo o triterpeno friedelina (MAHATO *et al.*, 1994). Os sinais em δ_C 213,4 C-3, δ_{CH_3} 6,84 CH₃-23, além dos demais sinais confirmam a proposta estabelecida da amostra **OPFM-01** como sendo o triterpeno friedelina.

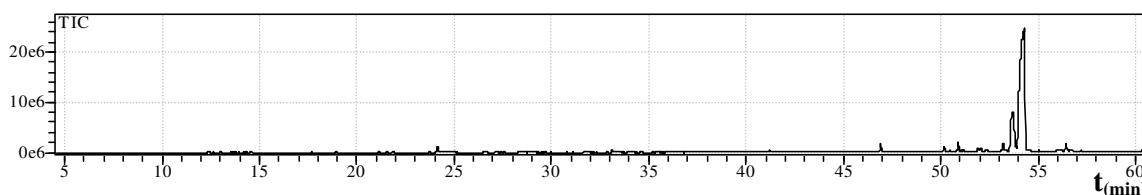


FIGURA 37. Cromatograma CG da substância **OPFM-01**.

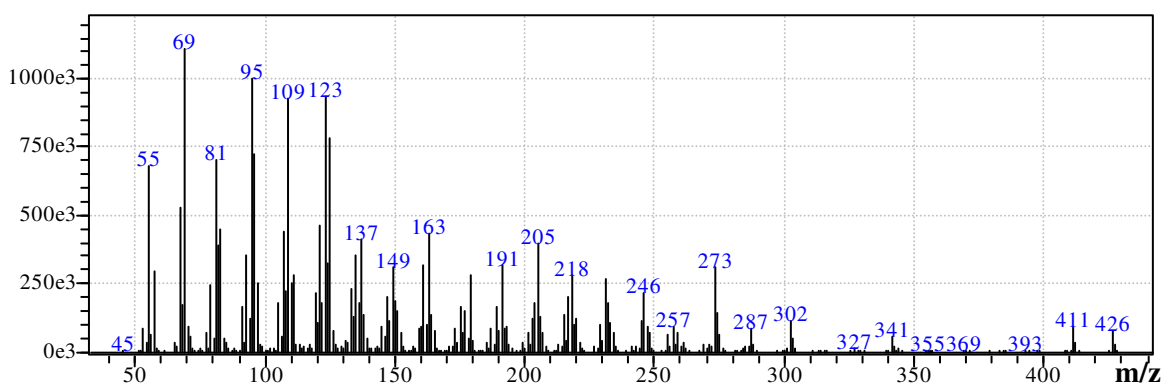


FIGURA 38. Espectro de massas 70 eV da substância **OPFM-01**.

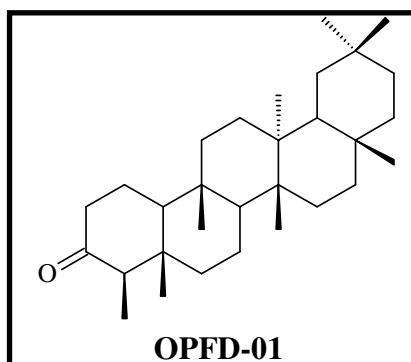


TABELA 4. Dados espectrais de RMN de ^{13}C e de ^1H da substância **OPFM-01** em CDCl_3

C	Friedelina (OPFM-01)		Literatura*
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
1		22,3	22,3
2	2,27 (t, 6,0)	41,5	41,6
3	-	213,3	213,0
4		58,2	58,3
5	-	42,1	42,2
6		41,3	41,3
7		18,2	18,2
8		53,1	53,1
9	-	37,4	37,5
10		59,4	59,5
11		35,6	35,7
12		30,5	30,5
13	-	39,7	38,2
14	-	38,3	38,3
15		32,4	32,4
16		36,0	36,0
17	-	29,9	30,0
18		42,7	42,8
19		35,3	35,4
20	-	28,2	28,2
21		32,7	32,7
22		39,2	39,3
23	0,87	6,84	6,90
24	0,73 (s)	14,6	14,6
25	0,96 (s)	17,9	18,2
26	1,01 (s)	20,2	20,3
27	1,01 (s)	18,6	18,7
28	1,18 (s)	32,1	32,2
29	1,05 (s)	35,0	35,4
30	1,05 (s)	31,8	31,8

Deslocamentos químicos em ppm. (MAHATO *et al.*, 1994)*

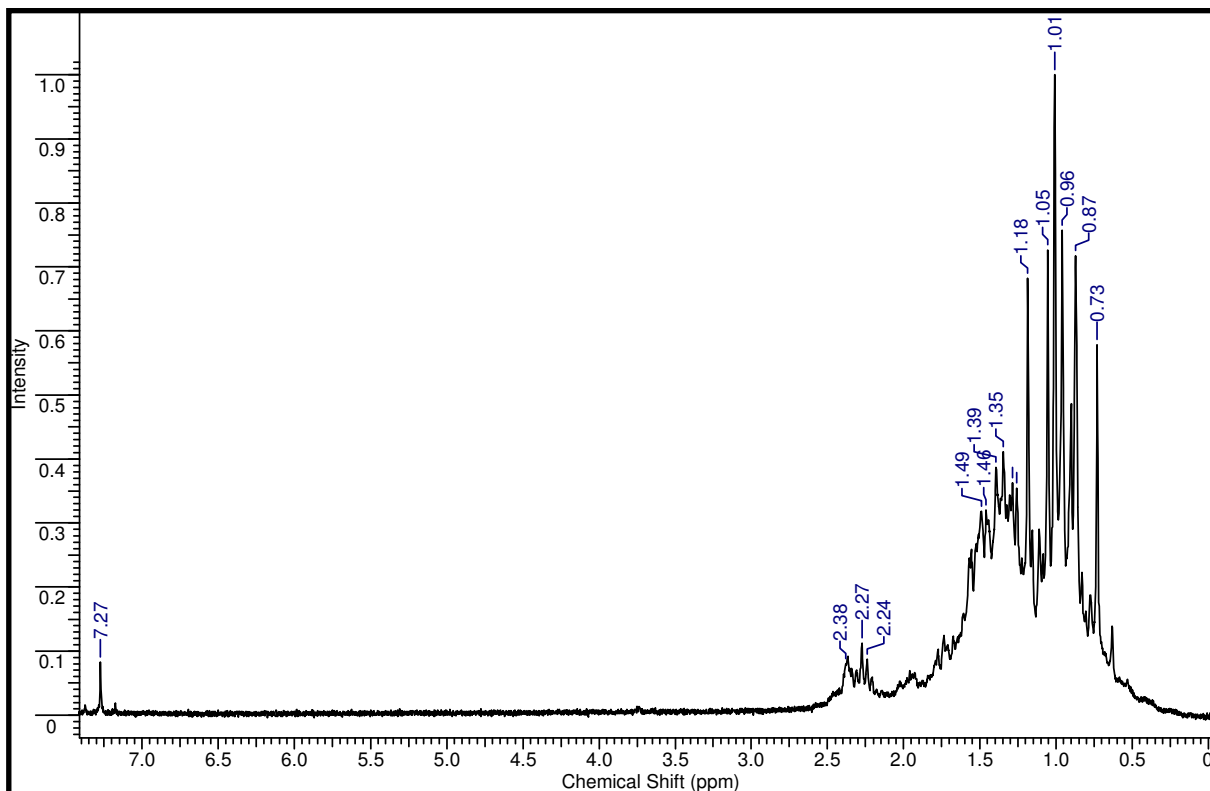


FIGURA 39. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **OPFM-01**.

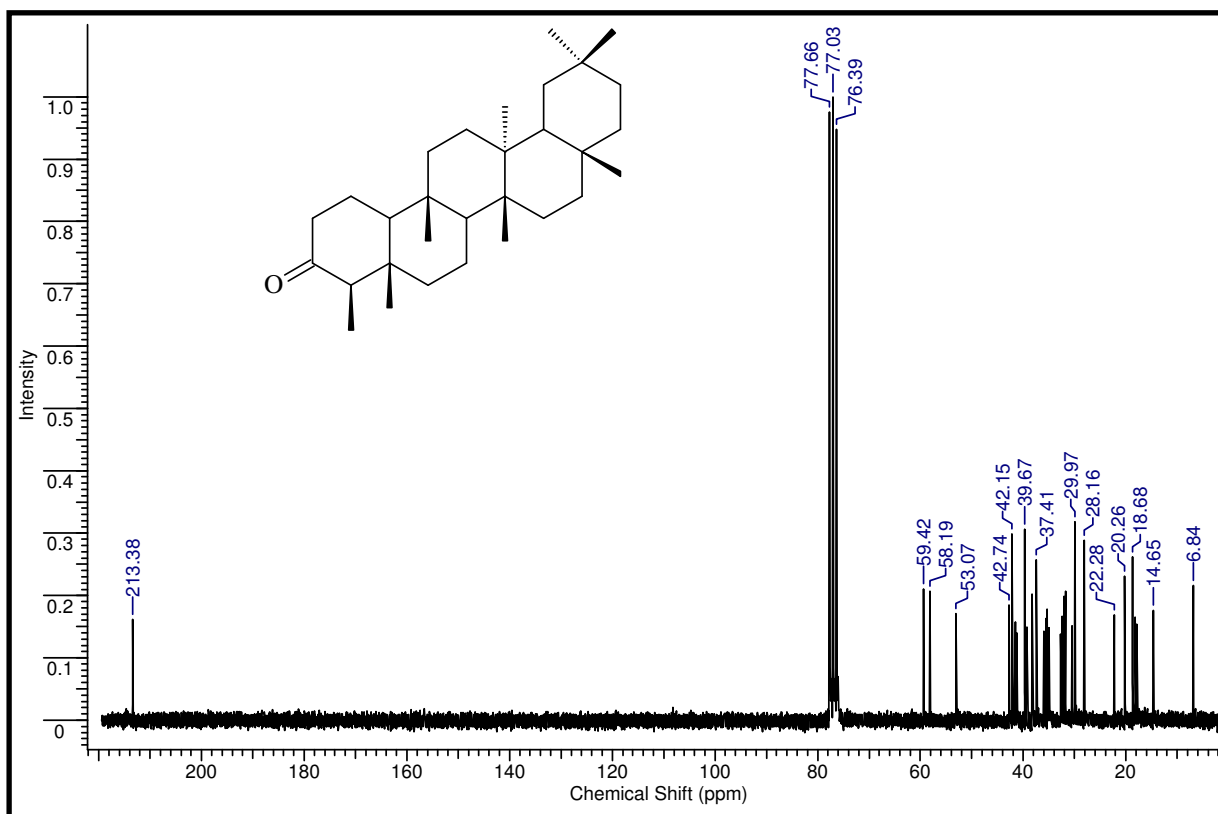


FIGURA 40. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da substância **OPFM-01**.

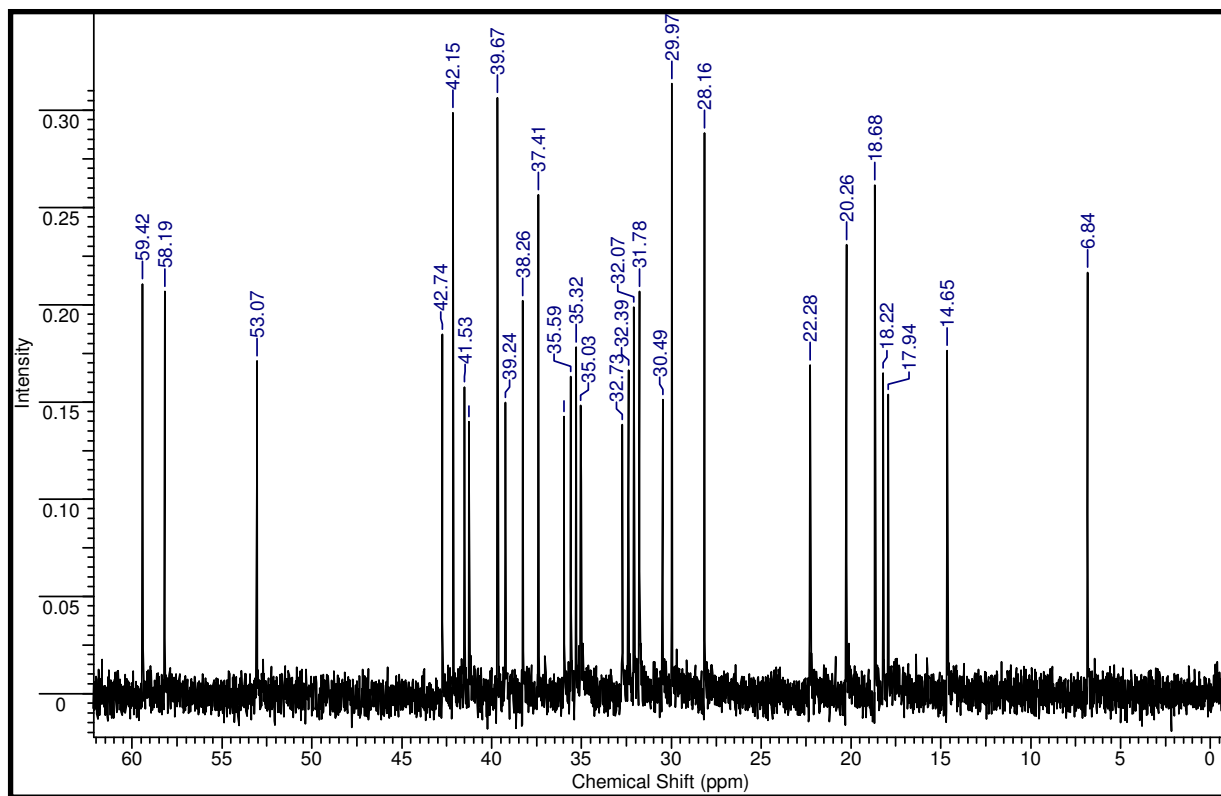
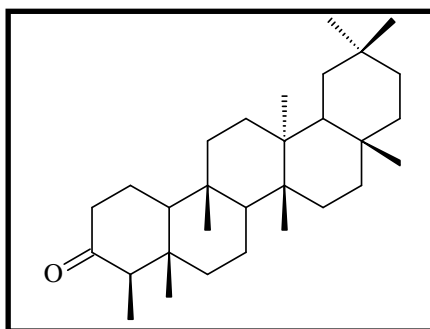


FIGURA 41. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (0-60 ppm) substância SGMD-06.



4.3. Determinação estrutural dos metabólitos C₆C₃ e C₆C₁.

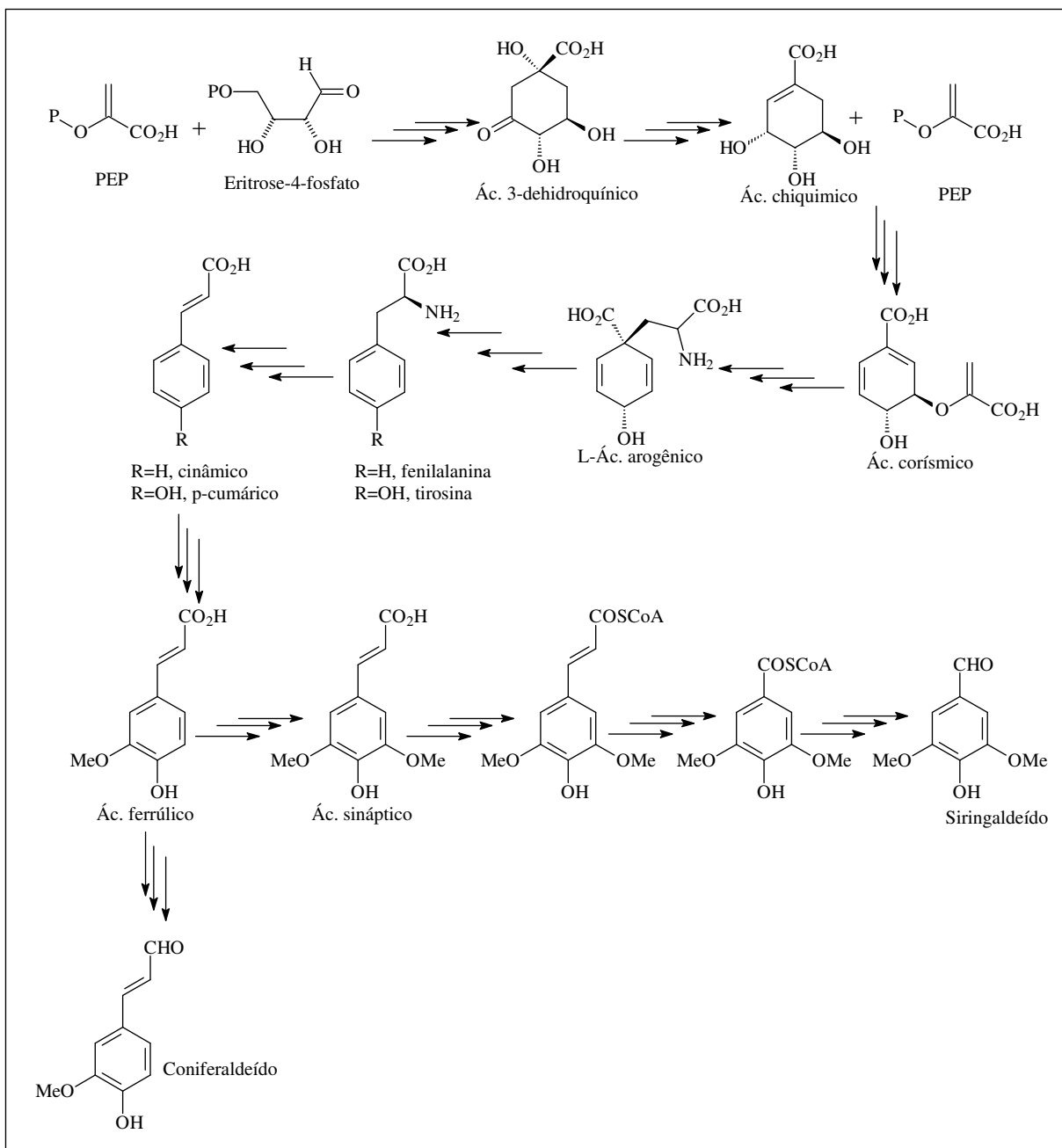
Oriundos da via metabólica dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina são caracterizados por apresentarem um esqueleto C₆C₃, sendo precursores de uma série de metabólitos especiais que usualmente possuem um padrão de substituição característico (*p*-hidróxi, 3,4-dihidróxi ou 3,4,5-trihidróxi). A etapa inicial de formação desses metabólitos é a eliminação de amônia gerando o ácido cinâmico *trans* (*E*). Sendo a fenilalanina o aminoácido de partida, irá formar o ácido cinâmico, no entanto, se for a tirosina o aminoácido de partida, a eliminação de amônia produzirá o ácido 4-hidróxi-cinâmico (ácido *p*-cumárico). Os metabólitos com estrutura C₆C₁ são derivados desta rota sendo formados via degradação da cadeia lateral dos ácidos cinâmico ou *p*-cumárico (Quadro 15, página 67).

Os aldeídos são formados em uma etapa de substituição do grupo carboxilato pelo grupo SCoA que, em seguida, sofre uma redução por ação de NADPH gerando aldeídos cinâmicos (TORSSELL, 1997 & DEWICK, 1998) (Quadro 15, página 67).

As estruturas dos aldeídos C₆C₃ são facilmente determinadas por RMN de ¹H por apresentarem um sistema de acoplamento AMX entre o hidrogênio do grupo aldeído, apresentando um duplete na região de δ_H 9,55-9,65, com constante de acoplamento (*J*) entre 7,5-8,0 Hz. Os hidrogênios ligados a carbonos olefínicos com geometria *trans* geram dois sinais, um na região de δ_H 6,3-6,7 apresentado como duplo duplete, com *J*= 7,5 e 15 Hz aproximadamente. O terceiro sinal apresenta-se como duplete em δ_H 7,3-7,5 com constante de acoplamento *J*= 15-17 Hz, que caracteriza a conformação dos grupos ligados aos carbonos olefínicos em *trans*.

Por apresentar um padrão de substituição pouco variado, o anel aromático dessas substâncias exibe sinais com perfis bem característicos, geralmente apresentando sistema de acoplamento AA'BB', ABC ou A₂.

O estudo fitoquímico da madeira de *S. eliezeriana* conduziu ao isolamento de dois aldeídos provenientes da rota metabólica C₆C₃ (coniferaldeído-SEMD-04) e C₆C₁ (siringaldeído-SEMD-05) Quadro 15, página 67.



QUADRO 15. Proposta biossintética dos metabólitos especiais C₆C₁ e C₆C₃ (DEWICK, 1998).

4.3.1. Coniferaldeído

A análise por CCDA possibilitou identificar o isolamento de um sólido amarelo amorfo proveniente do tratamento cromatográfico da fração **B1** do extrato em CH₂Cl₂ de *S. eliezariana* (Esquema 2, página 22).

O espectro de RMN de ¹H do material (Figura 42, página 68) exibiu um perfil característico de arilpropanóides (C₆C₃) com um duplete em δ_H 9,64 (*d*, 7,6 Hz, H-9) característico de hidrogênio de grupo aldeído acoplado a hidrogênio apresentando um duplo duplete em δ_H 6,59 (*dd*, 16,0 e 8,0 Hz, H-8) e este acoplado com outro hidrogênio apresentando um duplete em δ_H 7,40 (*d*, 16,0 Hz, H-7). As multiplicidades dos sinais

juntamente com os valores de constante de acoplamento sugerem um acoplamento do hidrogênio do grupo aldeído com hidrogênios olefínicos em conformação *trans* gerando um sistema AMX.

Os sinais em δ_H 6,95 (*d*, 8,0 Hz, H-6); 7,06 (*s*) H-2 e 7,12 (*d*, 8,0 Hz, H-5) foram atribuídos aos hidrogênios do anel aromático em um sistema ABC, condizente com um padrão de substituição 3,4 oxidados característico da biogênese desses metabólitos. O sinal simples e intenso em δ_H 3,94 após ser integrado apresentou proporção para três hidrogênios, quando comparado com os demais sinais. Esta análise juntamente com o deslocamento característico possibilitou a atribuição a um grupo metoxila na substância.

O espectro de massas 70 eV (Figura 43, página 69) apresentou íon molecular m/z 179 [M+1] e como pico base M^+ 178, condizente com a fórmula molecular (C₁₀H₁₀O₃). Os demais sinais observados no espectro são justificados pelas propostas de fragmentações que estão ilustradas no Esquema 13, página 69. O conjunto de dados obtidos e analisados juntamente com comparação com dados da literatura (SY & BROWN, 1999), conduziu à identificação estrutural da substância **SEMD-04** como o coniferaldeído isolado pela primeira vez no gênero *Simira*.

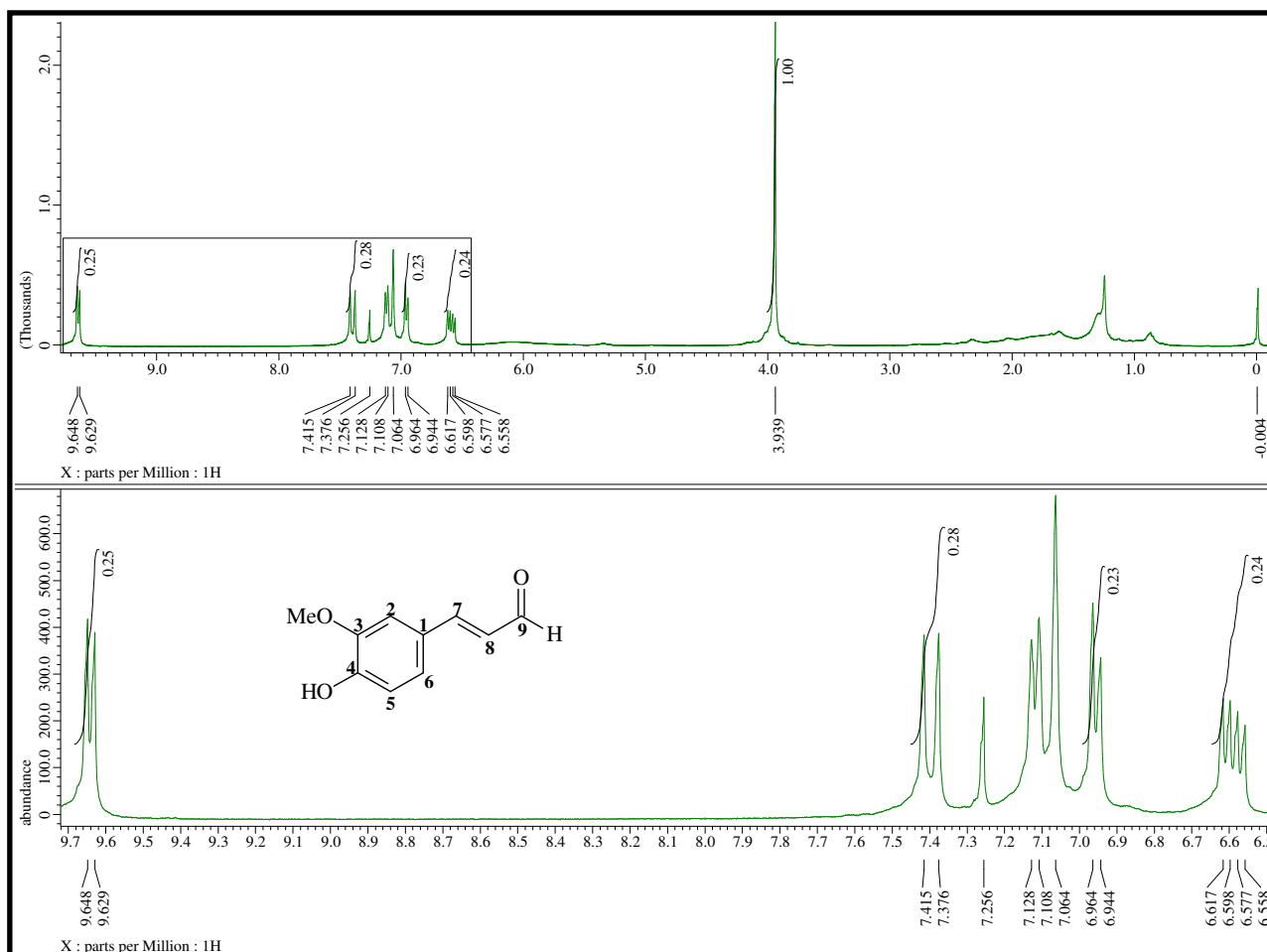


FIGURA 42. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da substância **SEMD-04**.

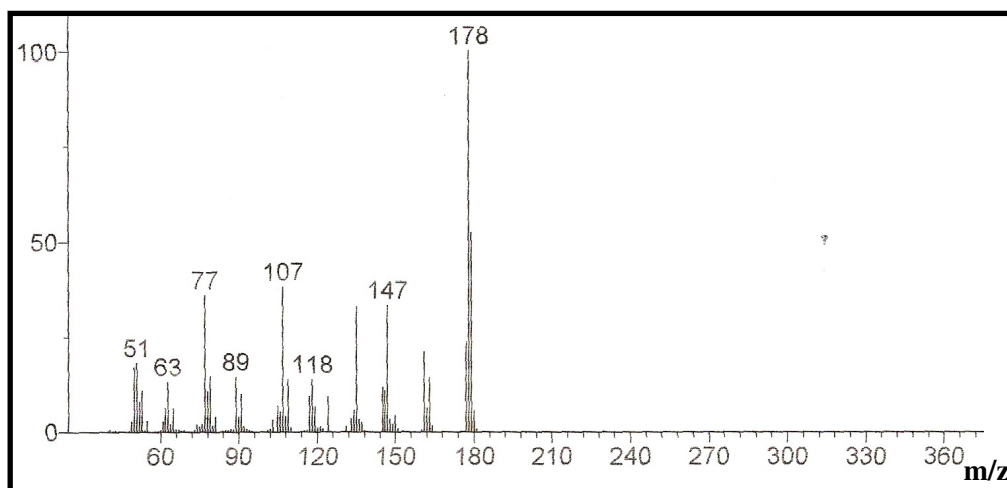
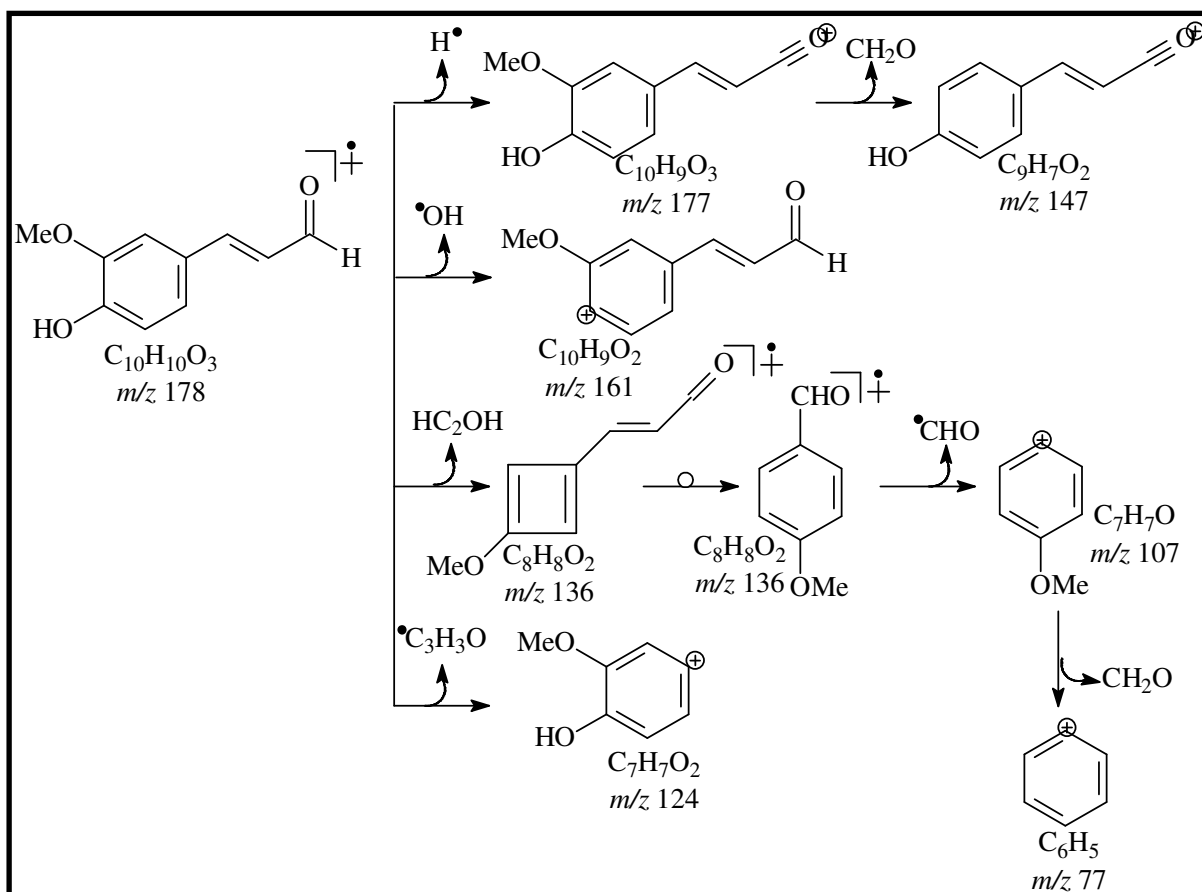


FIGURA 43. Espectro de massas 70 eV da substância SEMD-04.



ESQUEMA 13. Proposta de fragmentação para substância SEMD-04.

4.3.2. Coniferaldeído + Siringaldeído

O tratamento cromatográfico da fração **B1** (Esquema 2, página 22), além de fornecer o coniferaldeído resultou no isolamento de um sólido verde amorfo solúvel em CHCl_3 .

O espectro de RMN de ^1H (Figura 44, página 70) da amostra apresentou sinais semelhantes aos da substância SEMD-04 que evidenciou a presença desta na amostra. A

substância **SEMD-05** foi elucidada por exclusão dos sinais do coniferaldeído, restando um sinal simples em δ_H 7,06 atribuído aos hidrogênios do anel aromático, um sinal simples em δ_H 9,94 característico de hidrogênio de grupo aldeído e o sinal intenso em δ_H 3,94 que foi atribuído à presença de dois grupos metoxila. O assinalamento de apenas três sinais para os hidrogênios da substância foi auxiliado pela integração dos sinais que resultou na proporção de 1:2:6 respectivamente. Esta observação mostra a presença de um plano de simetria na substância o que indica a equivalência magnética dos hidrogênios do anel aromático e dos hidrogênios dos grupos metoxila justificando a presença de apenas dois sinais (Figura 45, página 71).

A análise da amostra por CG-EM apresentou dois sinais majoritários no cromatograma (Figura 46, página 71). Os respectivos espectros de massas apresentaram como íon molecular m/z 183 [M+1] e m/z 179 [M+1] (Figura 47, página 71). O íon molecular m/z 183 e a análise dos dados do espectro de RMN de 1H sustentam a proposta de fórmula estrutural atribuída à substância **SEMD-05**. As propostas de fragmentação da substância **SEMD-05** estão ilustradas no Esquema 14, página 72. O conjunto de dados analisados e comparados com a literatura (CARVALHO *et al.*, 2011) conduziu à determinação estrutural de **SEMD-05** identificado como 4-Hidróxi-3,5-dimetóxi-benzaldeído, conhecido com siringaldeído, isolado pela primeira vez do gênero *Simira*.

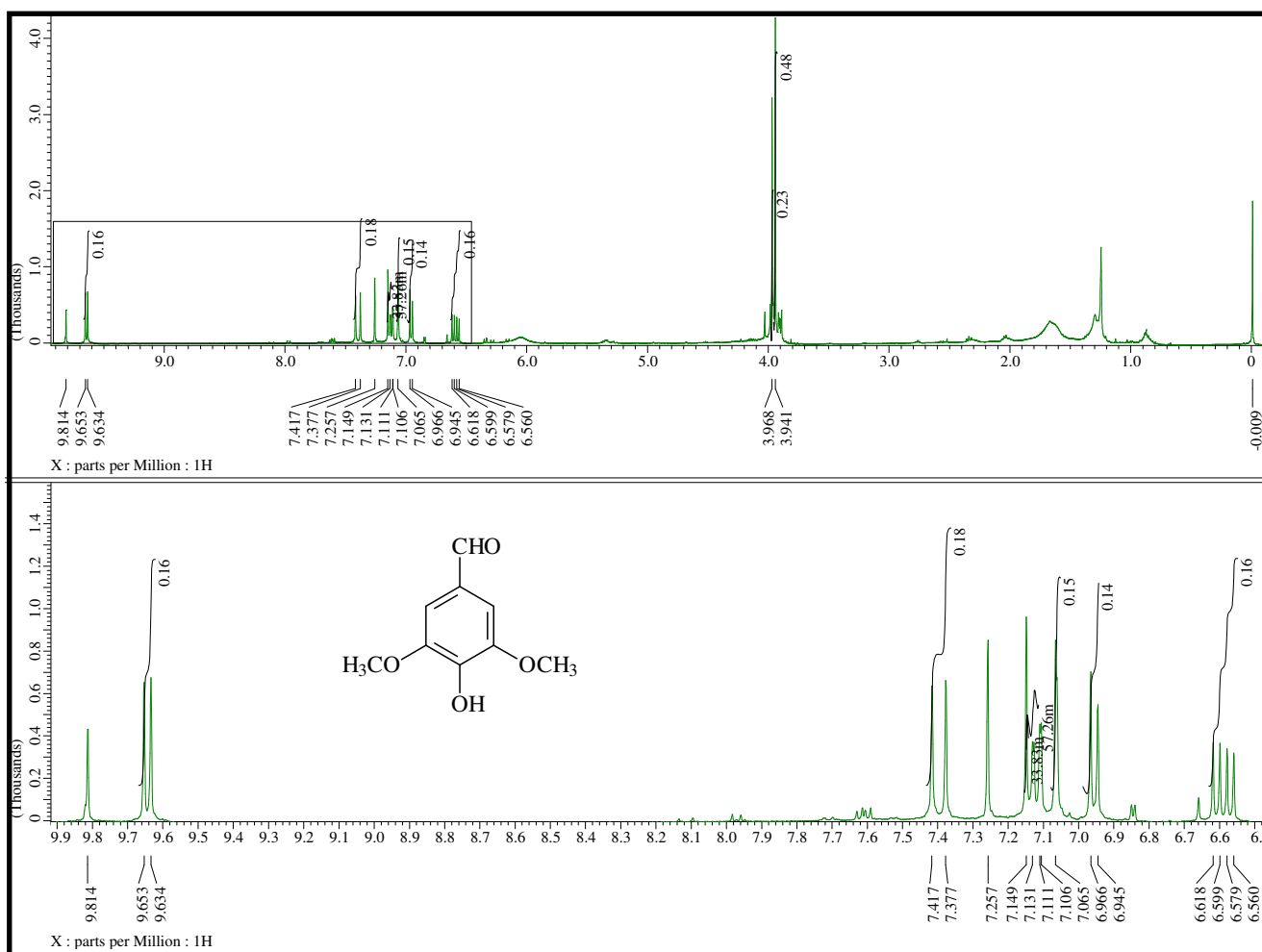


FIGURA 44. Espectro de RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) das substâncias **SEMD-04+05**.

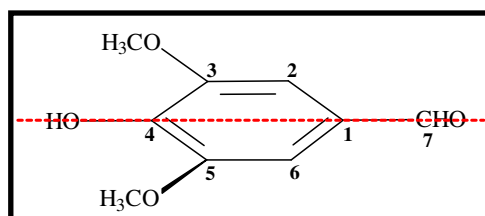


FIGURA 45. Plano de simetria da substância SEMD-05.

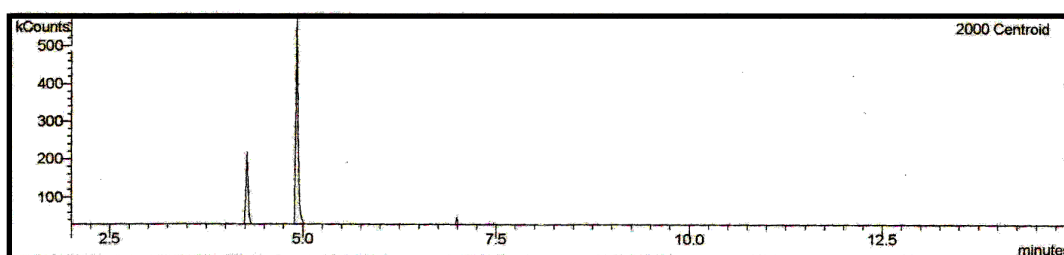


FIGURA 46. Cromatograma CG das substâncias SEMD-04+05.

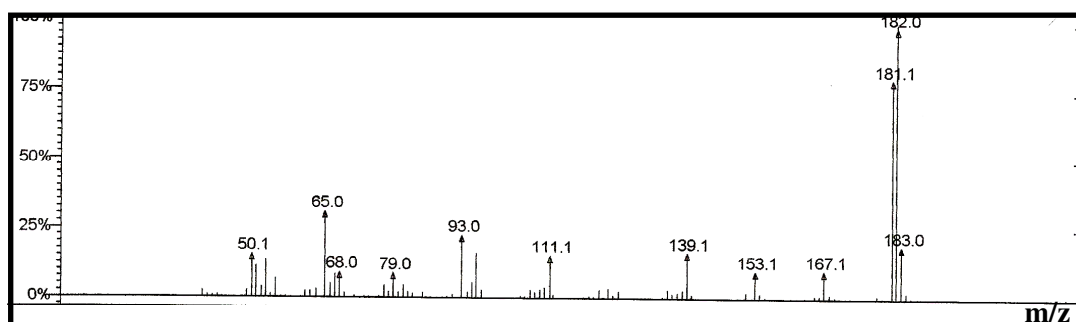
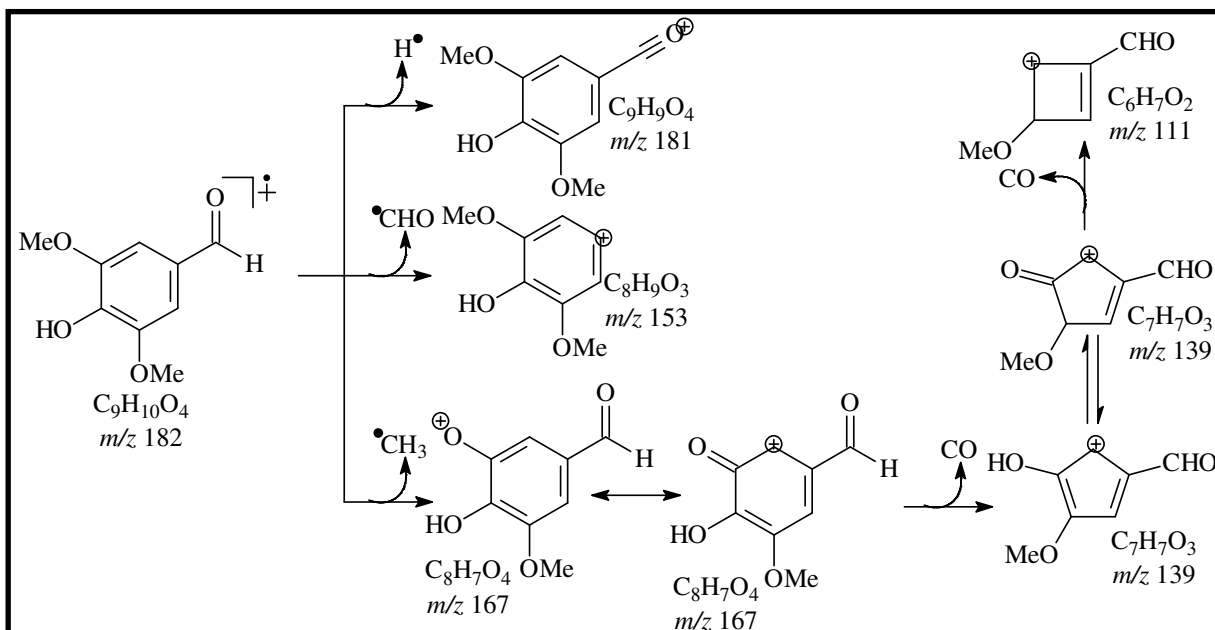


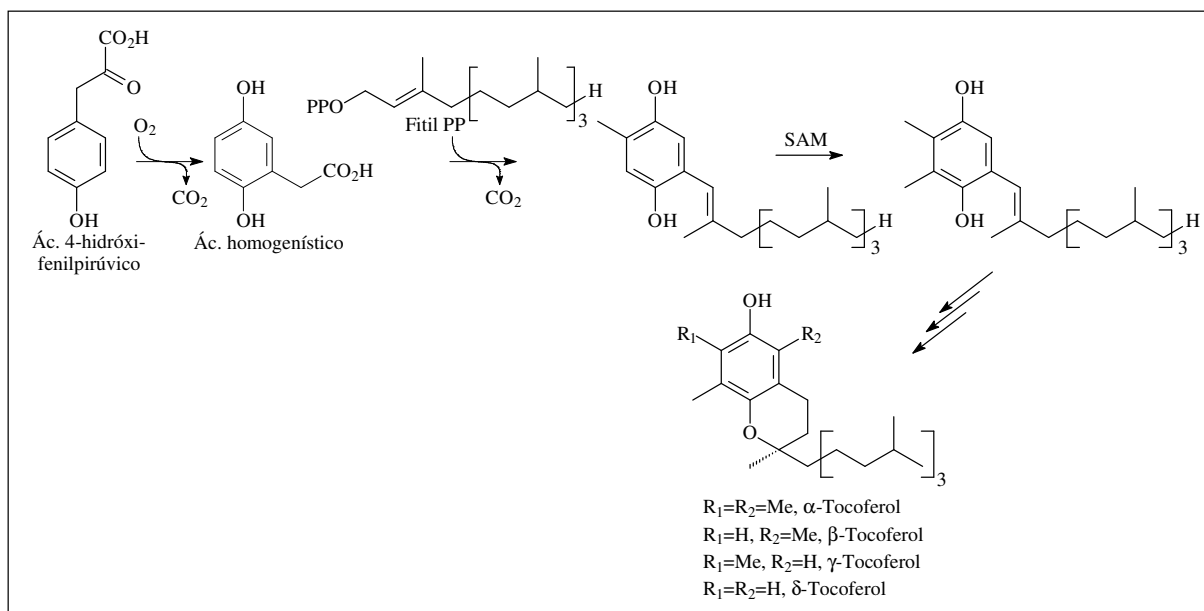
FIGURA 47. Espectro de massas 70 eV da substância SEMD-05.



ESQUEMA 14. Proposta de fragmentação para substância SEMD-05.

4.3.3. Tocoferol

Outros derivados da via do chiquimato são os tocoferóis. Metabólitos especiais formados por um fragmento oriundo da via do chiquimato e outra do mevalonato (Quadro 16). São frequentemente encontrados em plantas, especificamente nos cloroplastos sendo também conhecidos como vitaminas E. Apresentam funções bioquímicas importantes como o integrante do sistema de transporte de elétrons para a fotossíntese (TORSSELL, 1997 & DEWICK, 1998).



QUADRO 16. Proposta biossintética dos tocoferóis (DEWICK, 1998).

O tratamento cromatográfico da subfração Fr.5 proveniente do extrato em CH₂Cl₂ das folhas de *O. parviflora* (Esquema 6, página 27), forneceu 22,5 mg de um óleo amarelo solúvel em CH₂Cl₂. A análise por CG-EM apresentou cromatograma com um sinal majoritário

(Figura 48). O espectro de massas (EM) deste sinal apresentou íon molecular $[M+1]$ 431D e ao ser comparado com a biblioteca do equipamento mostrou semelhança com o tocoferol $C_{29}H_{50}O_2$ (Figura 49). As propostas de fragmentação para a substância estão ilustradas no Esquema 15, página 74.

O espectro de RMN de 1H apresentou sinais característicos de um α -tocoferol com três simpletos em δ_H 1,98; 2,02; e 2,10 atribuídos as metilas ligadas ao anel hidroquinônico. Os sinais entre δ_H 0,84-0,90 são característicos dos grupos metilas da cadeia lateral. O tripleto em δ_H 2,60 (t , 6,0 Hz) foi atribuído aos hidrogênios do carbono metilênico do anel cromano ligado ao anel hidroquinônico (Figura 50, página 74).

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinais que fortalecem a proposta do α -tocoferol para a substância. Os sinais em δ_C 143,3; 140,5; 126,7; 124,9; 122,9 e 117,3 foram atribuídos ao anel hidroquinônico. O sinal em δ_C 75,0 foi atribuído ao carbono oxidado do anel cromônico (Figura 51, página 75).

O espectro de RMN DEPT 135 apresentou de forma didática os sinais dos carbonos metílicos e metínicos em fase positiva e os metilênicos em fase negativa podendo assim, assinalar os sinais em δ_{CH_3} 11,8; 12,1 e 12,9 para os carbonos metílicos ligados ao anel hidroquinônico, além das metilas da cadeia lateral (Figura 52, página 75). O conjunto de dados analisados e comparados com a literatura conduziu a elucidação estrutural de **OPFD-05** como sendo o α -tocoferol.

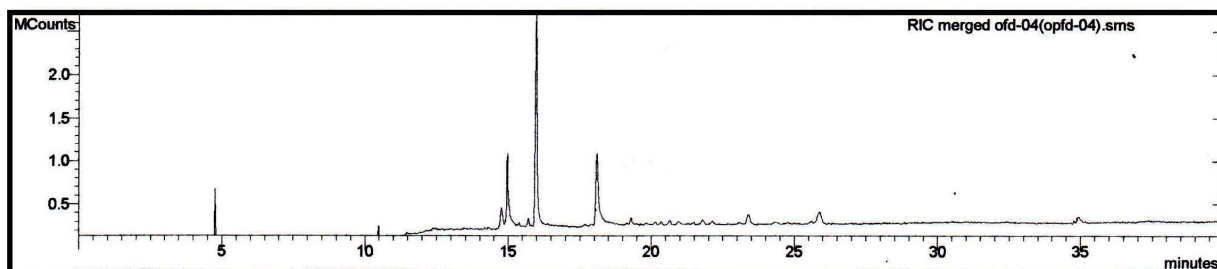


FIGURA 48. Cromatograma CG da substância **OPFD-05**.

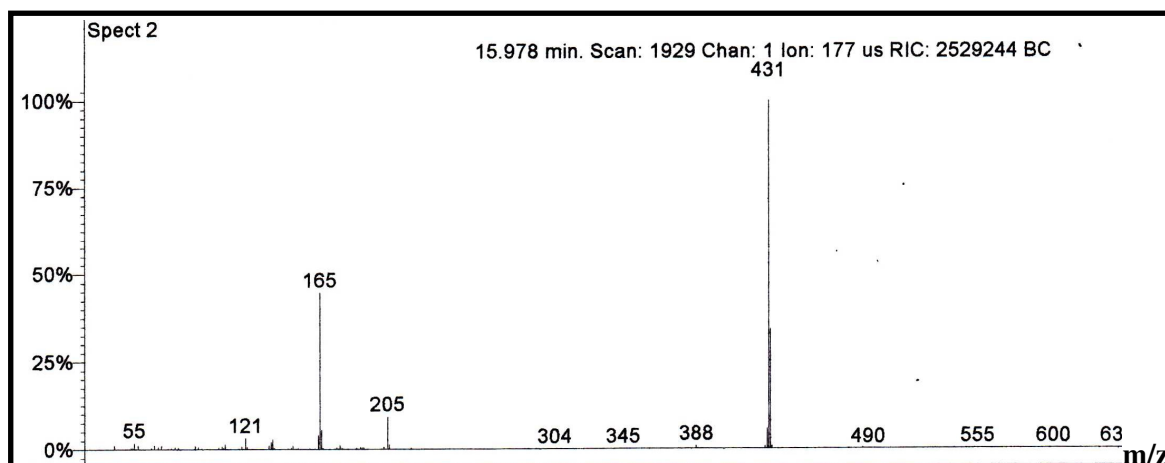
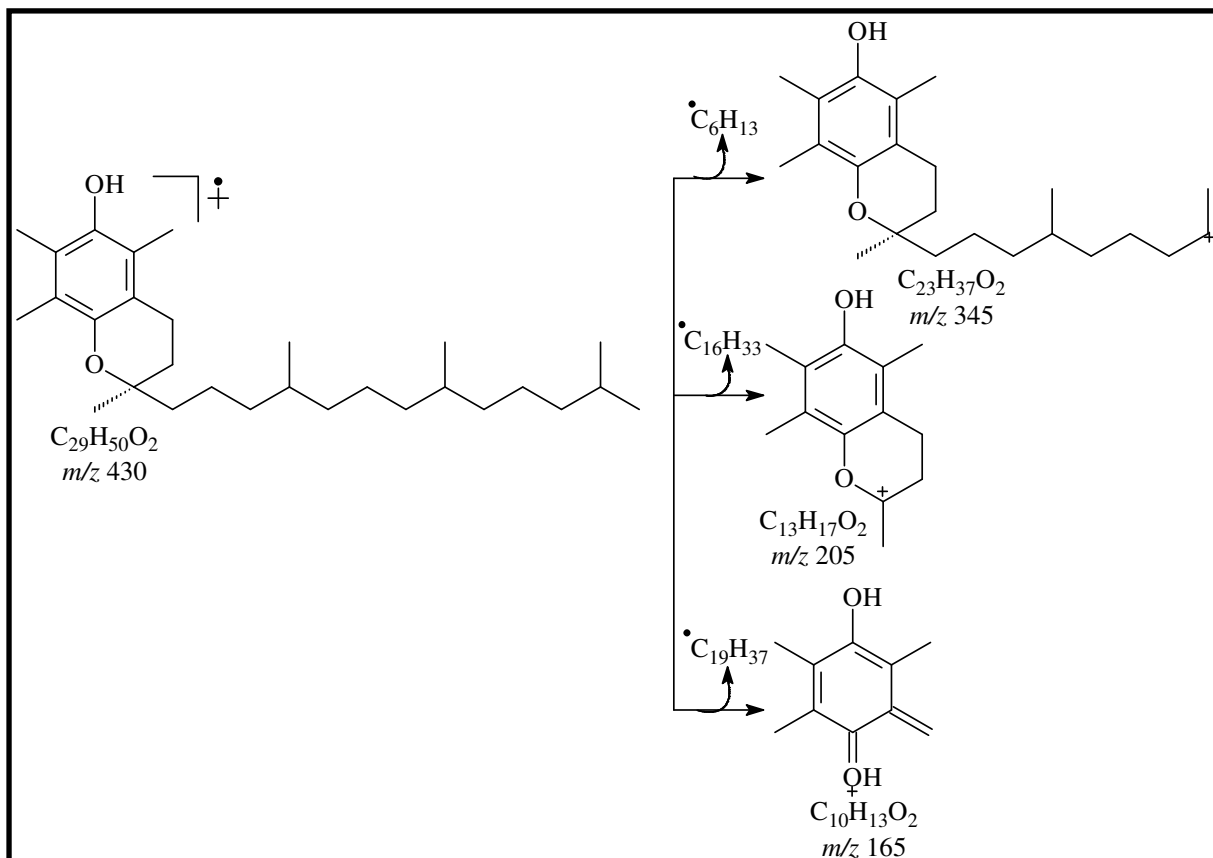


FIGURA 49. Espectro de massas 70 eV da substância **OPFD-05**.



ESQUEMA 15. Proposta de fragmentação para substância **OPFD-05**.

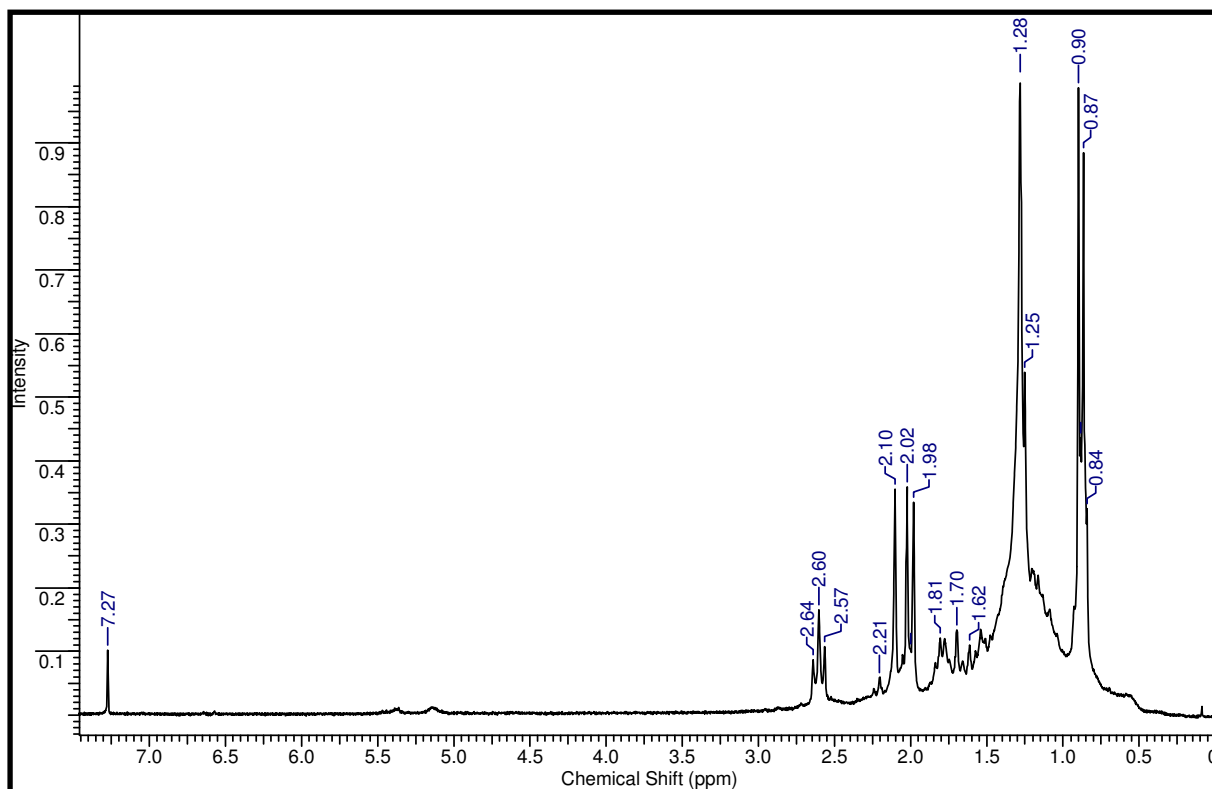


FIGURA 50. Espectro de RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) da substância **OPFD-05**.

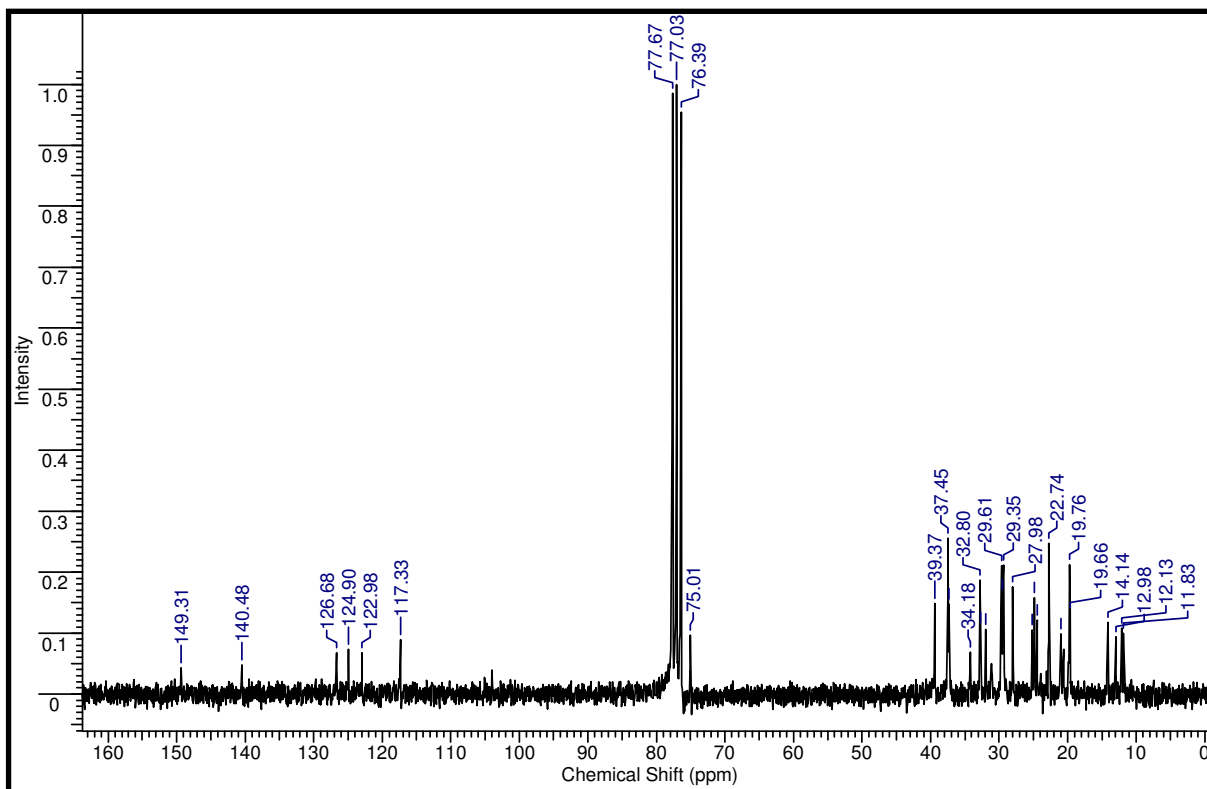


FIGURA 51. Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) da substância **OPFD-05**.

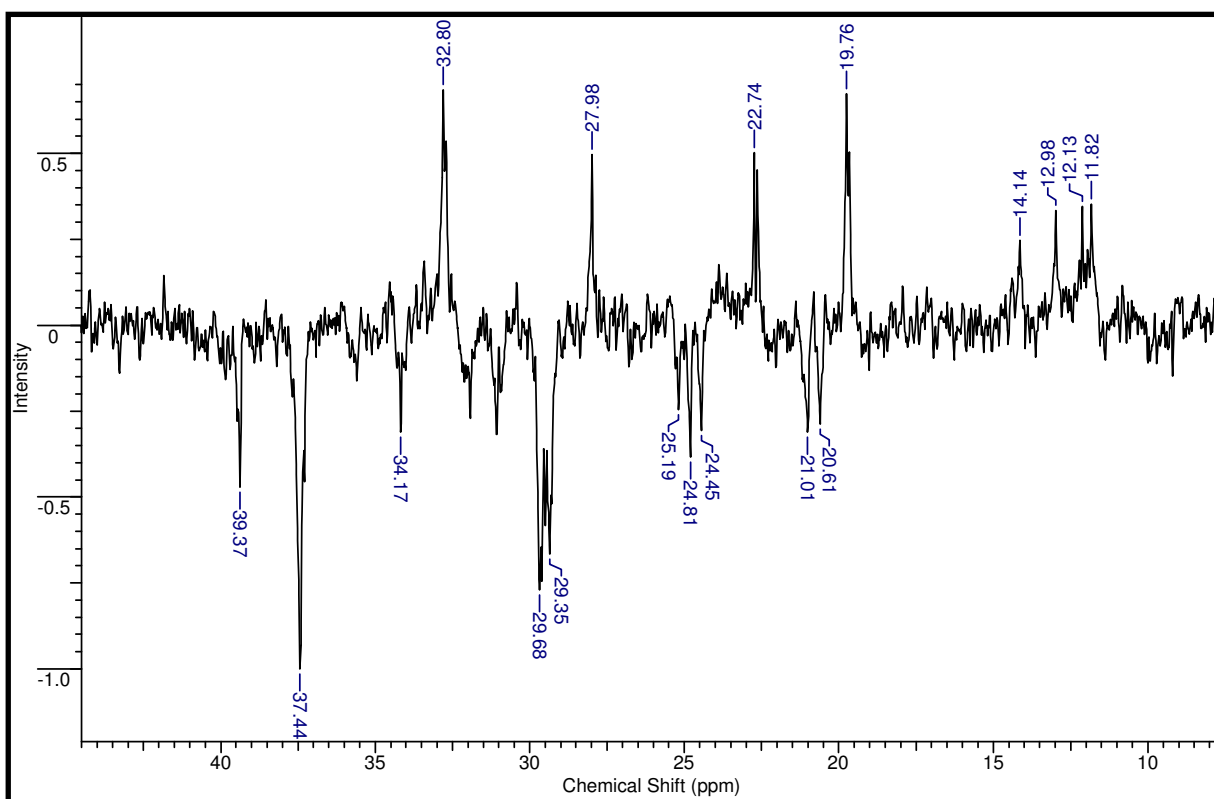


FIGURA 52. Espectro de RMN de ¹³C-DEPT 135 (100 MHz, CDCl₃) da substância **OPFD-05**.

4.4. Determinação estrutural das lignanas.

Definidas como dímeros formados por unidades C_6C_3 de alcoóis de arilpropanóides, as lignanas são formadas inicialmente por acoplamento oxidativo entre os carbonos (CH-8) das unidades monoméricas sendo estas mais importantes os álcoois 4-hidróxi-cinamoil (álcool *p*-cumárico), o coniferil e o sinapil (Figura 53).

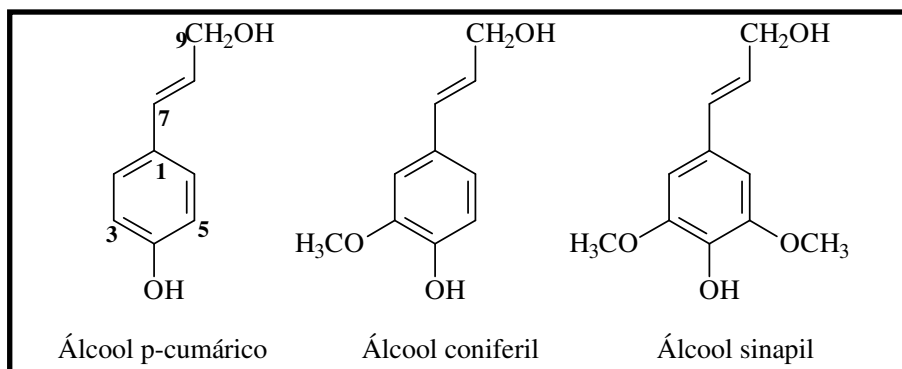
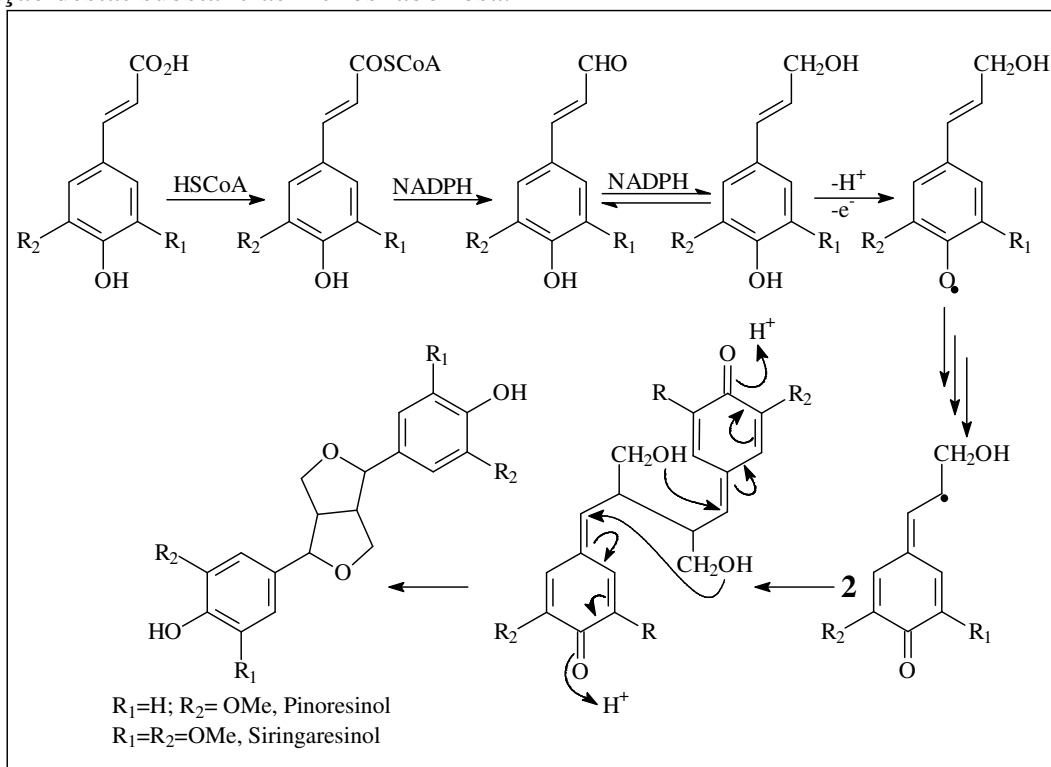


FIGURA 53. Alcoóis monoméricos C_6C_3 precursores das **lignanas**.

Um ataque nucleofílico de ambos grupos hidroxil promove a ciclização produzindo estruturas diversificadas (Quadro 17). Esse tipo de ciclização conduz a estruturas furânicas que podem ser determinadas através do espectro de RMN de 1H por exibirem sinais de hidrogênios ligados a carbonos oximetínicos e oximetilênicos na região de δ_H 3,5-4,5 ppm além da presença de dois hidrogênios metínicos na região de δ_H 2,9-3,1 ppm, provenientes dos carbonos que compõe a ponte entre os dois anéis furânicos. Os anéis aromáticos podem apresentar três padrões de substituição com os sistemas AA'BB', ABC ou AB, o que torna a elucidação destas substâncias menos laboriosa.



QUADRO 17. Proposta biossintética das lignanas (DEWICK, 1998).

O estudo fitoquímico do extrato em CH₂Cl₂ da madeira de *S. eliezeriana* e *glaziovii* conduziu ao isolamento de duas lignanas conhecidas pinoresinol (**SEMD-06**) e pinocebrina (**SGMD-08**).

4.4.1. Pinoresinol

O tratamento cromatográfico em coluna de gel de sílica da fração **C1** (110 mg) proveniente da sub-fração **C** (0,175 g) do extrato em CH₂Cl₂ de *S. eliezeriana* forneceu (65,0 mg) de um sólido amarelo amorfo (Esquema 2, página 22).

O espectro de RMN de ¹H exibiu um duplete em δ_H 4,77 (*d*, 3,5 Hz) correspondente aos hidrogênios oximetínicos H-7/7' dos anéis furânicos (Figura 55, página 78). A semelhança magnética destes hidrogênios confirma a orientação conformacional dos grupos fenílicos, pois apresentando orientação distinta os mesmos apresentarão deslocamentos químicos diferentes (Figura 54) (GREGER & HOFER, 1980).

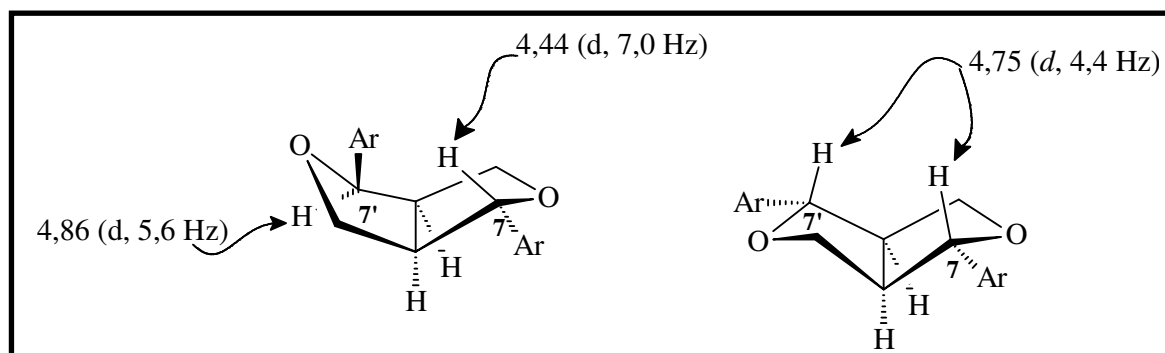


FIGURA 54. Configurações possíveis do C-7 e 7' do sistema furofurânico de lignanas.

A presença dos sinais em δ_H 4,27 (2H-9, *d*, 7,0 Hz) e 3,97 (2H-9', *d*, 8,8 Hz) e 3,13 (*sl*) preenchem as demais atribuições referentes aos hidrogênios dos sistemas furofurânico (VIEIRA, 1995). Os simpletos em δ_H 3,92 e 5,72 confirmam a presença de grupos metoxila e hidroxila. Os sinais em δ_H 6,91 (2H-2/2', *s*), 6,89 (2H-5/5', *d*, 8,0 Hz) e 6,69 (2H-6/6', *d*, 8,0 Hz) referentes a hidrogênios dos anéis aromáticos indicam um sistema AA'B em ambos anéis (Figura 55, página 78). Este padrão de substituição dos anéis justifica, inclusive, um plano de simetria para a molécula.

A análise do espectro de RMN de ¹³C sustenta esta proposta de simetria para a molécula devido à presença de apenas dez sinais (Figura 56, página 79). O espectro de RMN de ¹³C DEPT 135 (Figura 57, página 79) indicou a presença de um carbono metilênico, cinco carbonos metínicos e um carbono metílico (Tabela 5, página 78). A atribuição inequívoca dos sinais foi realizada através da análise dos mapas de correlações (¹J) HSQC e (²J e ³J) HMBC. Os dados estão apresentados na Tabela 5, Figuras 58 e 59, páginas 78, 80-81.

A análise por cromatografia gasosa exibiu um cromatograma com pequenas impurezas e com um sinal intenso em 21,51 minutos (Figura 60, página 82). O espectro de massas 70 eV apresentou como íon molecular o pico M⁺ 358 D consistente com a fórmula molecular C₂₀H₂₂O₆ (Figura 61, página 82). As propostas de fragmentação para justificar os valores dos sinais observados no espectro estão ilustradas no Esquema 16, página 83.

A interpretação de todos os dados em conjunto e comparados a literatura (GREGER & HOFER, 1980; VIEIRA, 1995), conduziu a confirmação estrutural da lignana conhecida como pinoresinol para a substância **SEMD-06**, descrita pela primeira vez no gênero *Simira*.

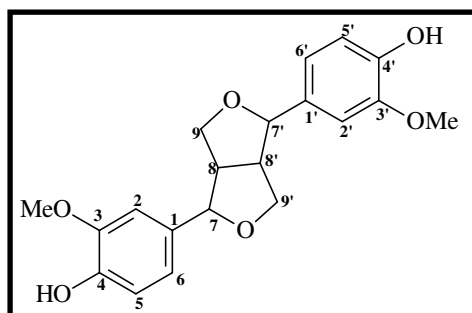


TABELA 5. Dados espectrais de RMN ^{13}C e ^1H da substância **SEMD-06** em CDCl_3

C	HSQC		HMBC		Literatura*
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	
1/1'	132,89	-	H-2/H-2'; H-6/H-6'	H-5/H-5'	133,3
3/3'	146,72	-		H-5/H-5'; MeO-3/MeO-3'	147,1
4/4'	145,25	-	HO-4/HO-4'	H-2/H-2'; H-6/H-6'	145,6
CH					
2/2'	108,62	6,92		H-6/H-6'	109,0
5/5'	114,29	6,91		HO-4/HO-4'	114,7
6/6'	118,97	6,84		H-2/H-2'	119,4
7/7'	85,88	4,76		H-2/H-2'; H-6/H-6'; 2H-9/2H-9'	86,3
8/8'	54,15	3,13			54,5
CH₂					
9/9'	71,66	4,26; 4,11		H-7/H-7'	72,1
CH₃					
(MeO) ₂ -3/3'	55,96	3,93 (s)			56,3
(HO) ₂ -4/4'	-	5,70 (s)			

Deslocamentos químicos em ppm. *(VIEIRA, 1995)

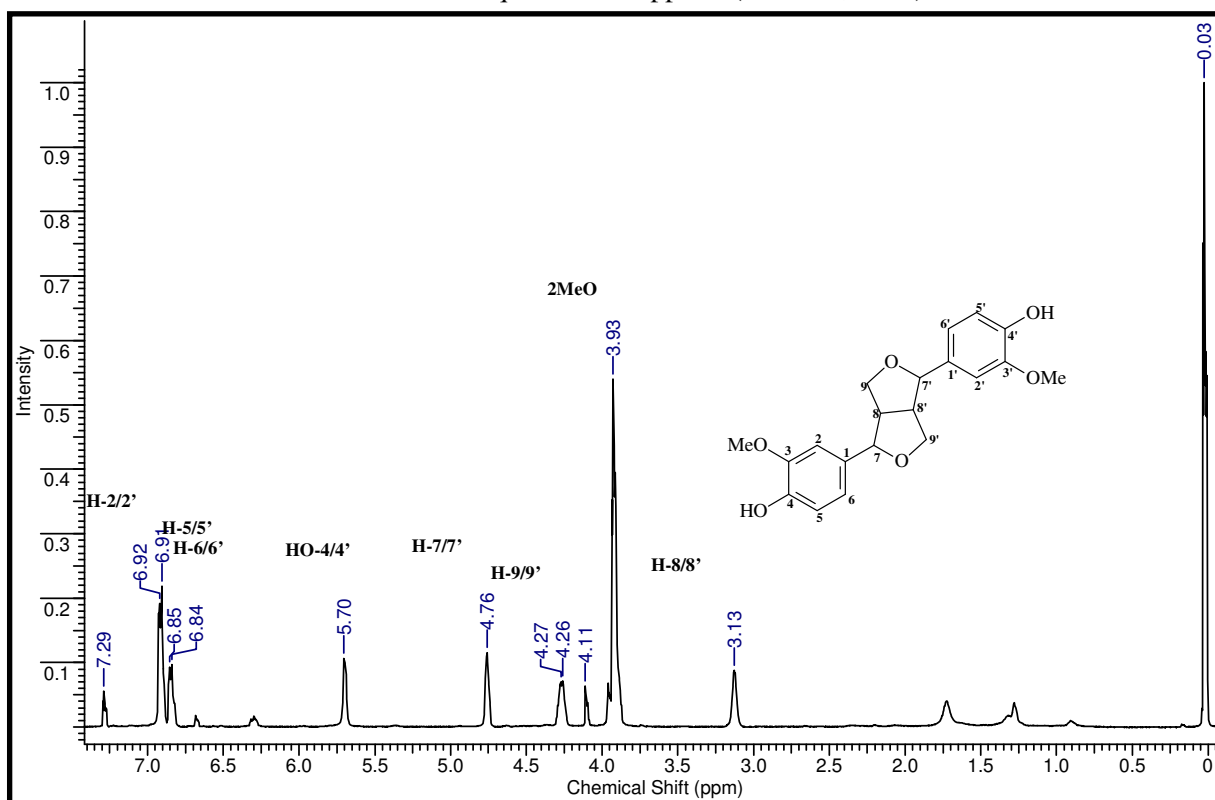


FIGURA 55. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **SEMD-06**.

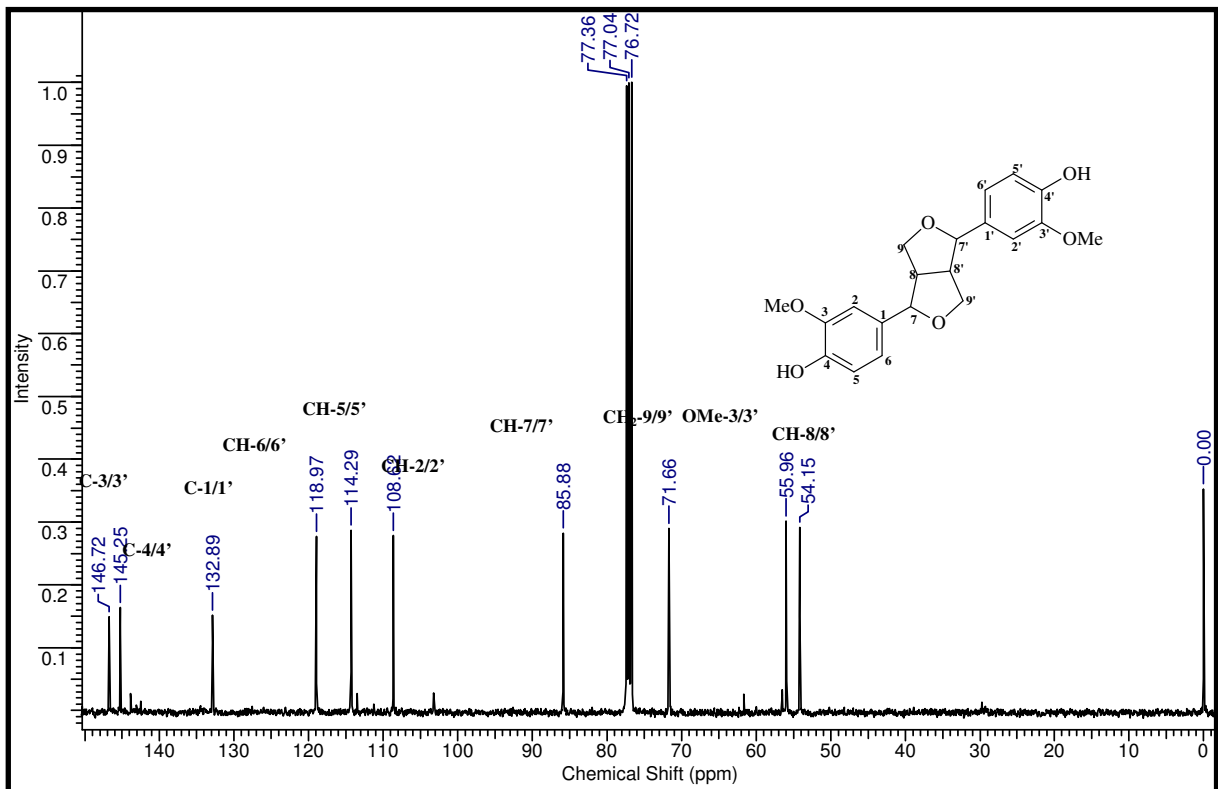


FIGURA 56. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **SEMD-06**.

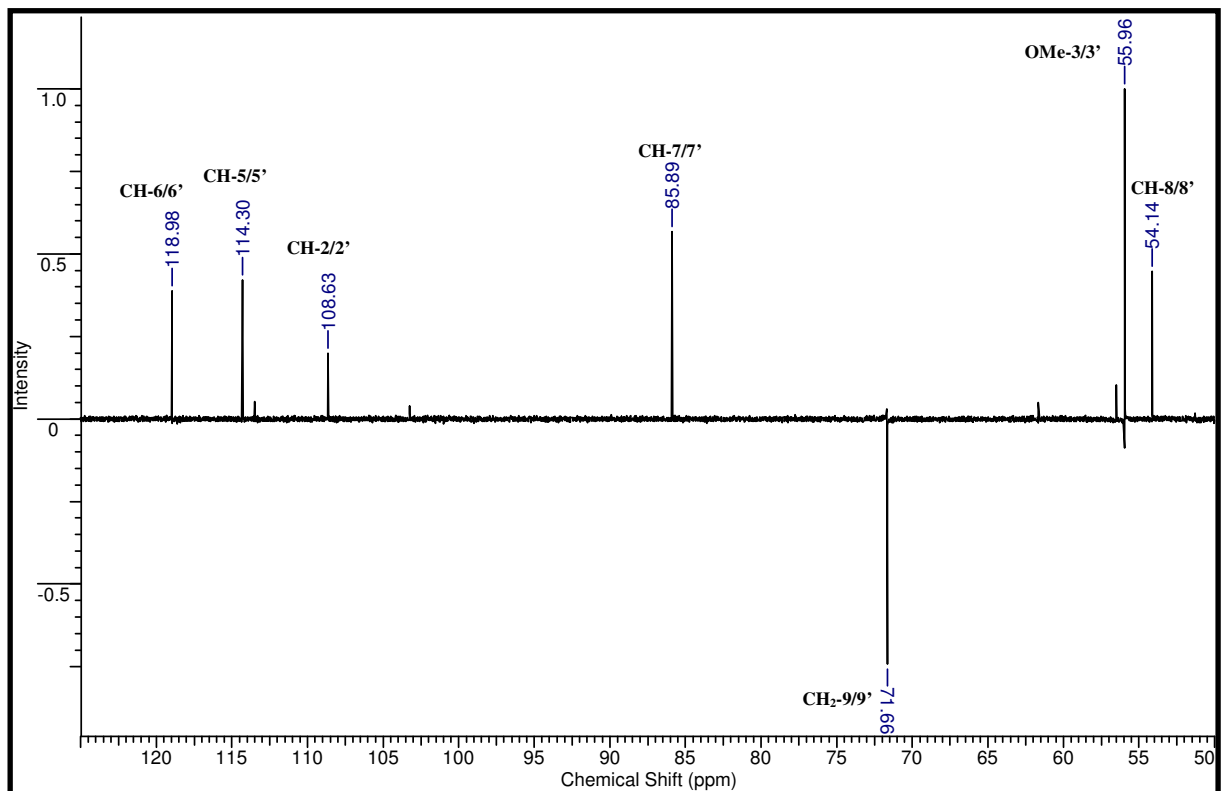


FIGURA 57. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135 (100 MHz, CDCl_3) da substância **SEMD-06**.

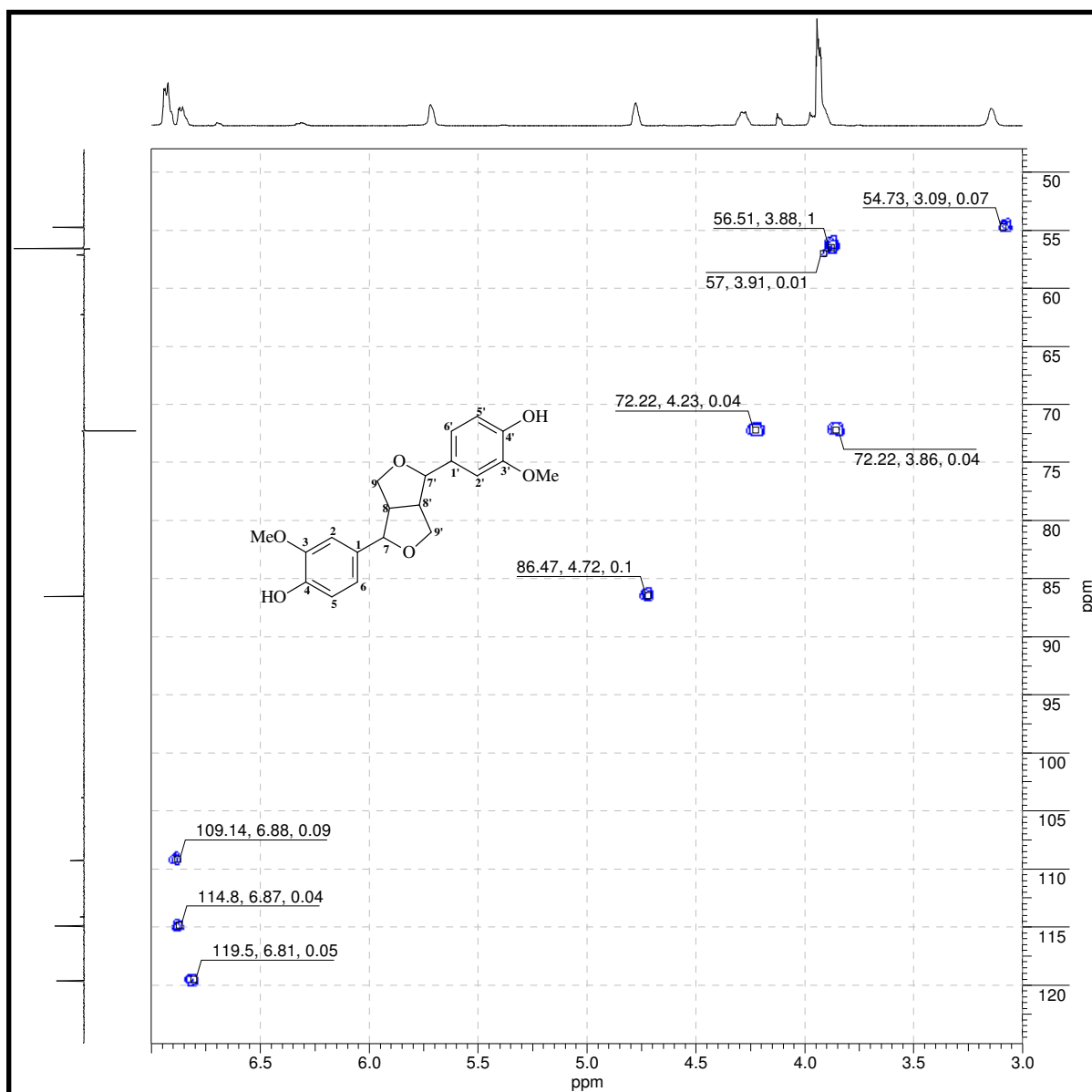


FIGURA 58. Espectro HSQC da substância SEMD-06.

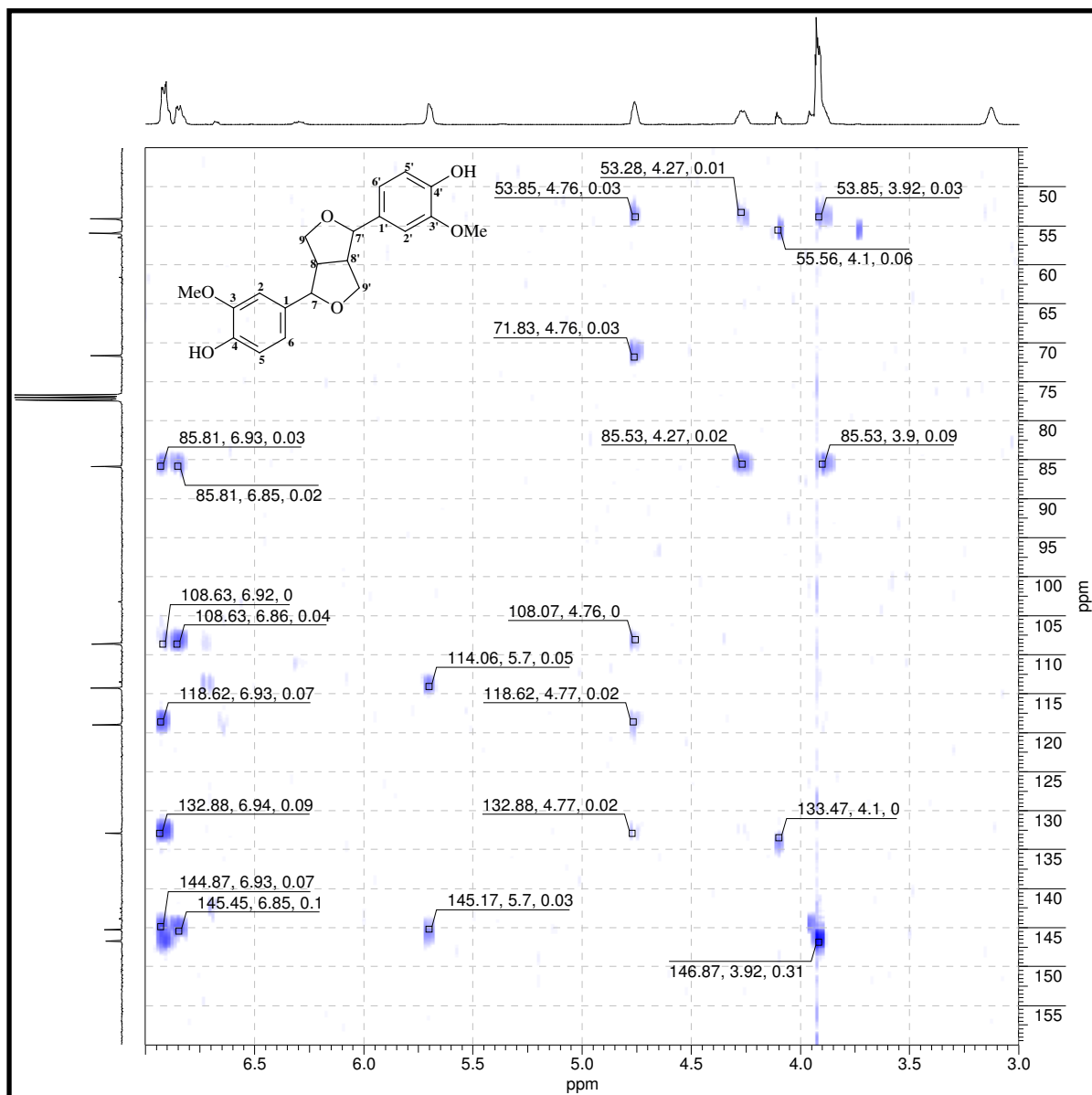


FIGURA 59. Espectro HMBC da substância SEMD-06.

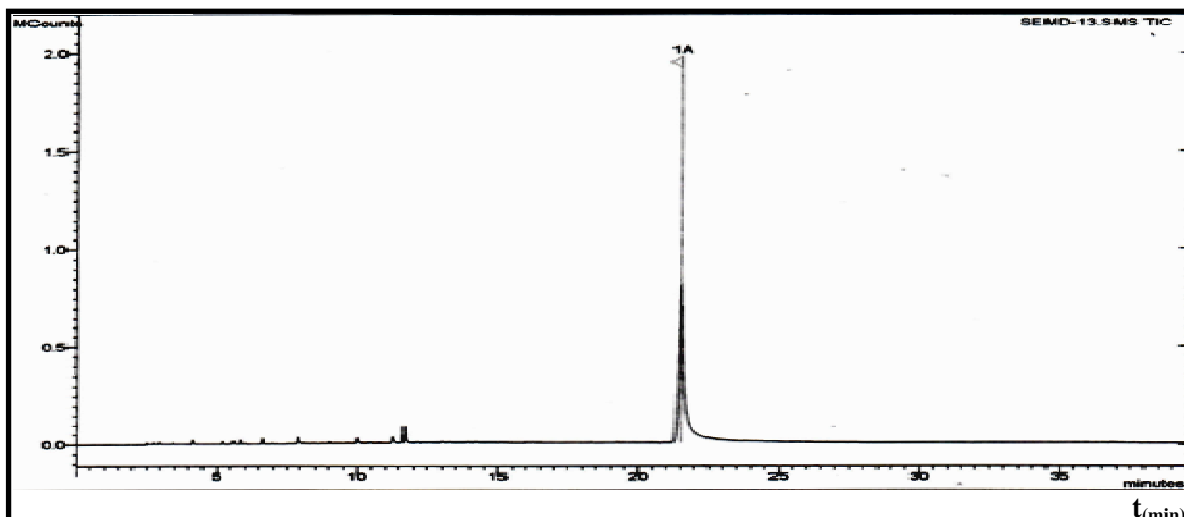


FIGURA 60. Cromatograma de CG da substância SEMD-06.

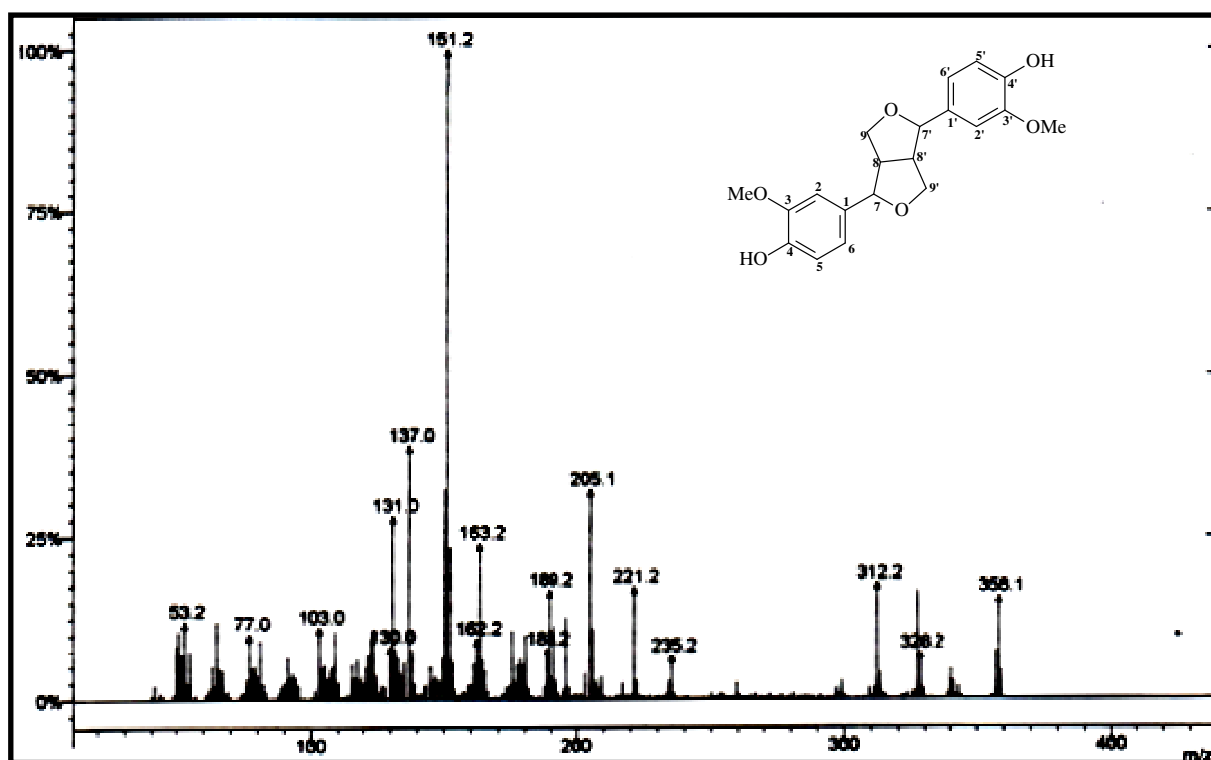
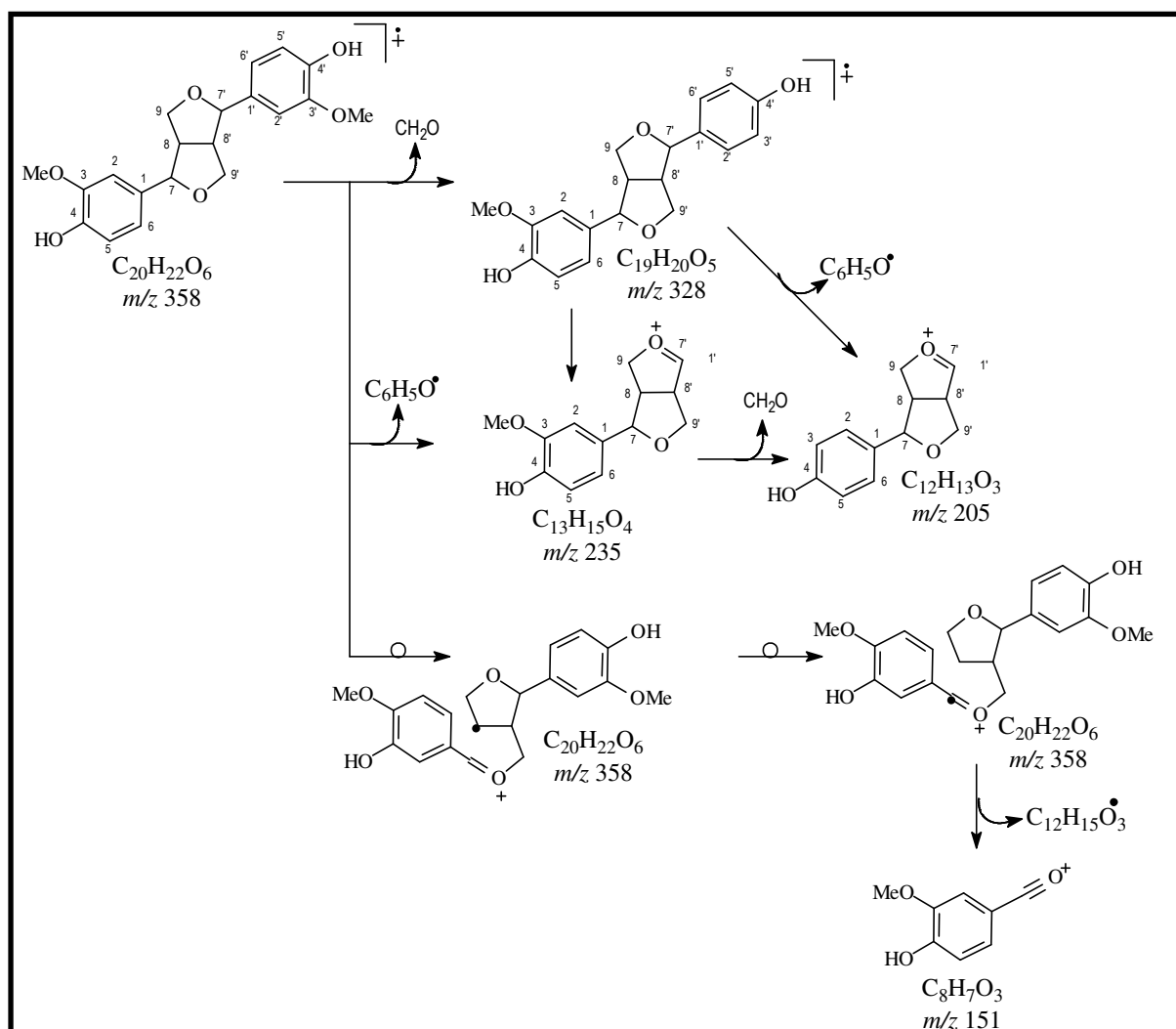


FIGURA 61. Espectro de massas 70 eV da substância SEMD-06.



ESQUEMA 16. Proposta de fragmentação da substância SEMD-06.

4.4.2. Siringaresinol

A substância **SGMD-08** foi isolada da fração em CH_2Cl_2 da madeira de *S. glaziovii* após o tratamento cromatográfico de **Fr. B3** com gel de sílica para cromatografia tipo flash. A substância apresentou-se como um sólido amorfo de coloração vermelho claro e com solubilidade em CHCl_3 (Esquema 4, página 24).

A análise por cromatografia gasosa apresentou um cromatograma com pequenas impurezas e um sinal intenso em 32,6 minutos (Figura 62, página 84).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 63, página 85), exibiu sinais com perfil muito semelhante aos do pinoresinol, principalmente os sinais atribuídos aos hidrogênios dos anéis

furânicos em δ_H 5,50 (*sl*, 2H-7/7''), 4,73 (*sl*, 2H-9a/9'a), 4,28 (*sl*, 2H-9b/9'b) e 3,09 (*sl*, 2H-8a/8'). O simpleto em δ_H 3,89 integrado para 12 hidrogênios conduziu à determinação de quatro grupos metoxila. A semelhança magnética observada para os hidrogênios do anel aromático apresentando apenas um sinal em δ_H 6,58 (*s*) indica a presença de um plano de simetria na molécula.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 64, página 85), apresentou-se bastante simples, com apenas oito sinais semelhantes aos observados para pinosresinol (Figura 56, página 79). A comparação dos deslocamentos químicos com os observados na literatura conduziu à fórmula estrutural da siringaresinol, lignana proveniente do acoplamento oxidativo entre duas unidades C_6C_3 do álcool sinapil (FERREIRA *et al.*, 2009) (Figura 53, página 76).

A atribuição inequívoca de cada deslocamento químico foi determinada após análise do mapa de correlação a uma ligação HMQC (Figura 65, página 86).

Os pontos de ligação de cada grupo na molécula foram determinados através da interpretação do mapa de correlação heteronuclear a duas e três ligações HMBC, sendo possível indentificar principalmente a posição dos grupos metoxilas, o que corrobora a análise dos espectros de RMN 1D de ^{13}C e de 1H (Figura 66, página 87).

O espectro de massas 70 eV (Figura 67, página 87) exibiu como íon molecular M^+ 418 D sugerindo a fórmula molecular $C_{22}H_{26}O_8$ compatível com a proposta de estrutura para a substância. As propostas de fragmentação que justificam os sinais no espectro de massas estão ilustradas no Esquema 17, página 88.

O conjunto de dados analisados e comparados com a literatura (MONTEIRO *et al.*, 2007), conduziu à determinação estrutural de SGMD-08, identificando-a como a lignana siringaresinol, isolada pela primeira vez no gênero *Simira*.

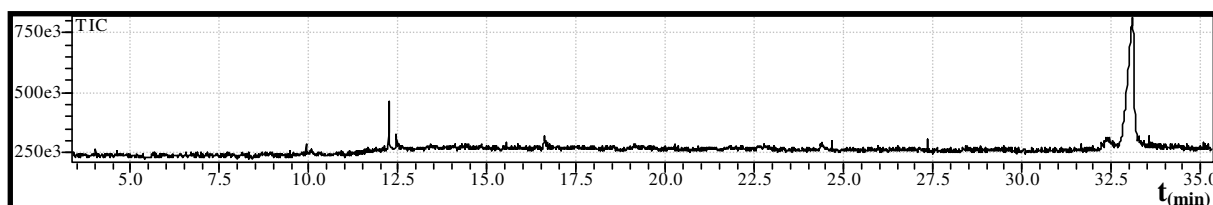


FIGURA 62. Cromatograma de CG da substância **SGMD-08**.

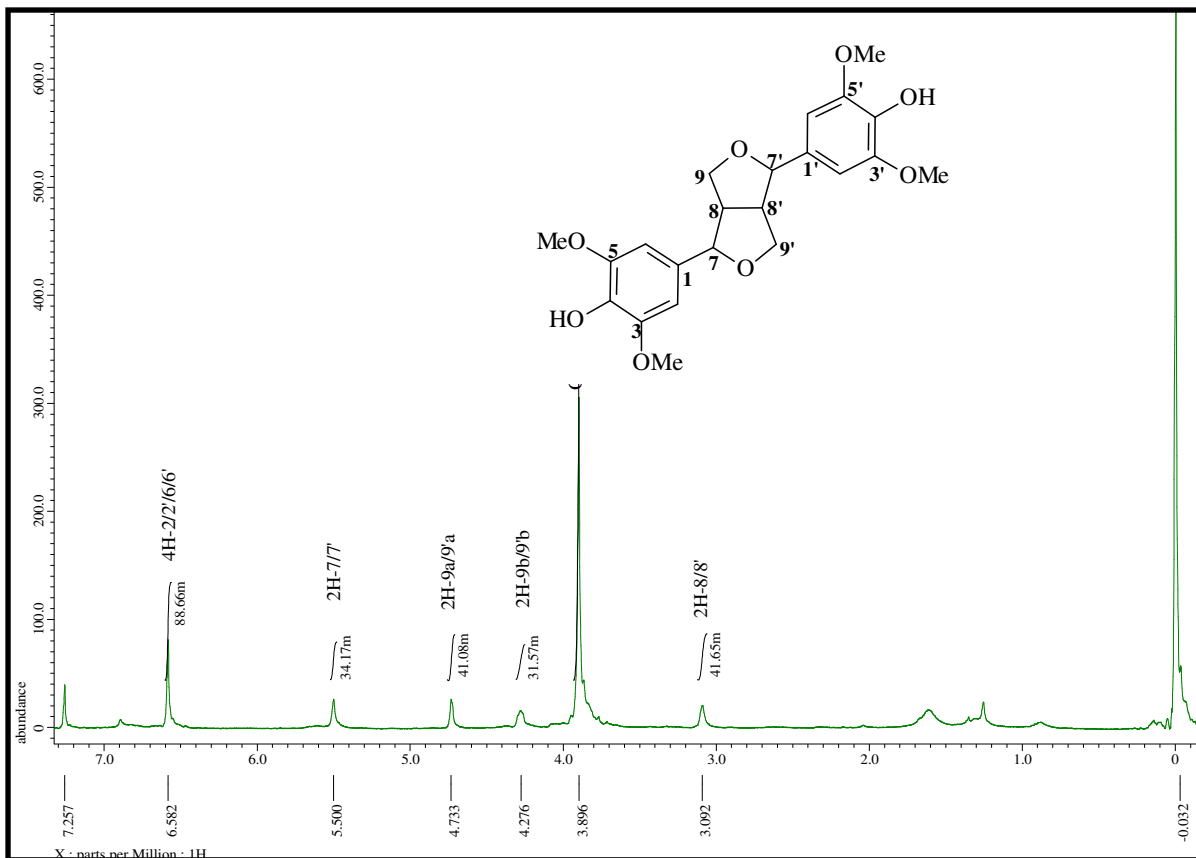


FIGURA 63. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância SGMD-08.

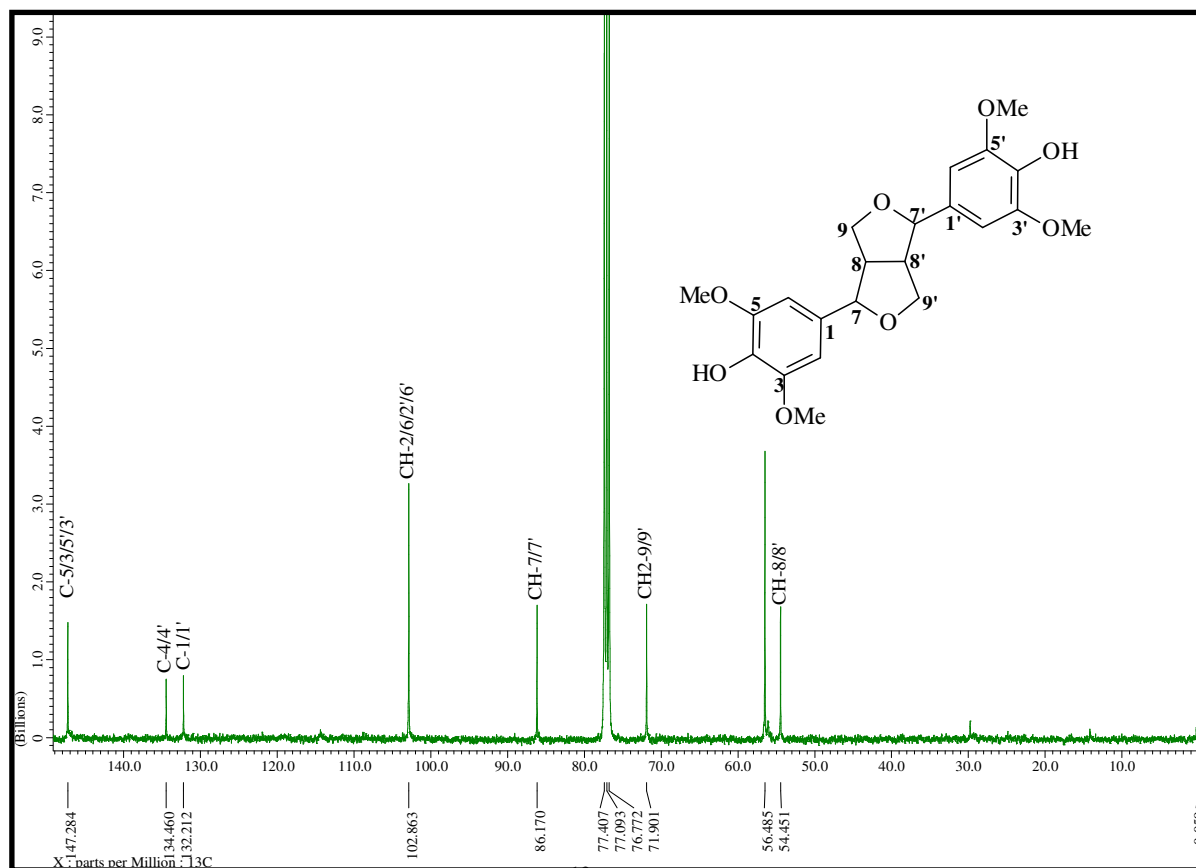


FIGURA 64. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância SGMD-08.

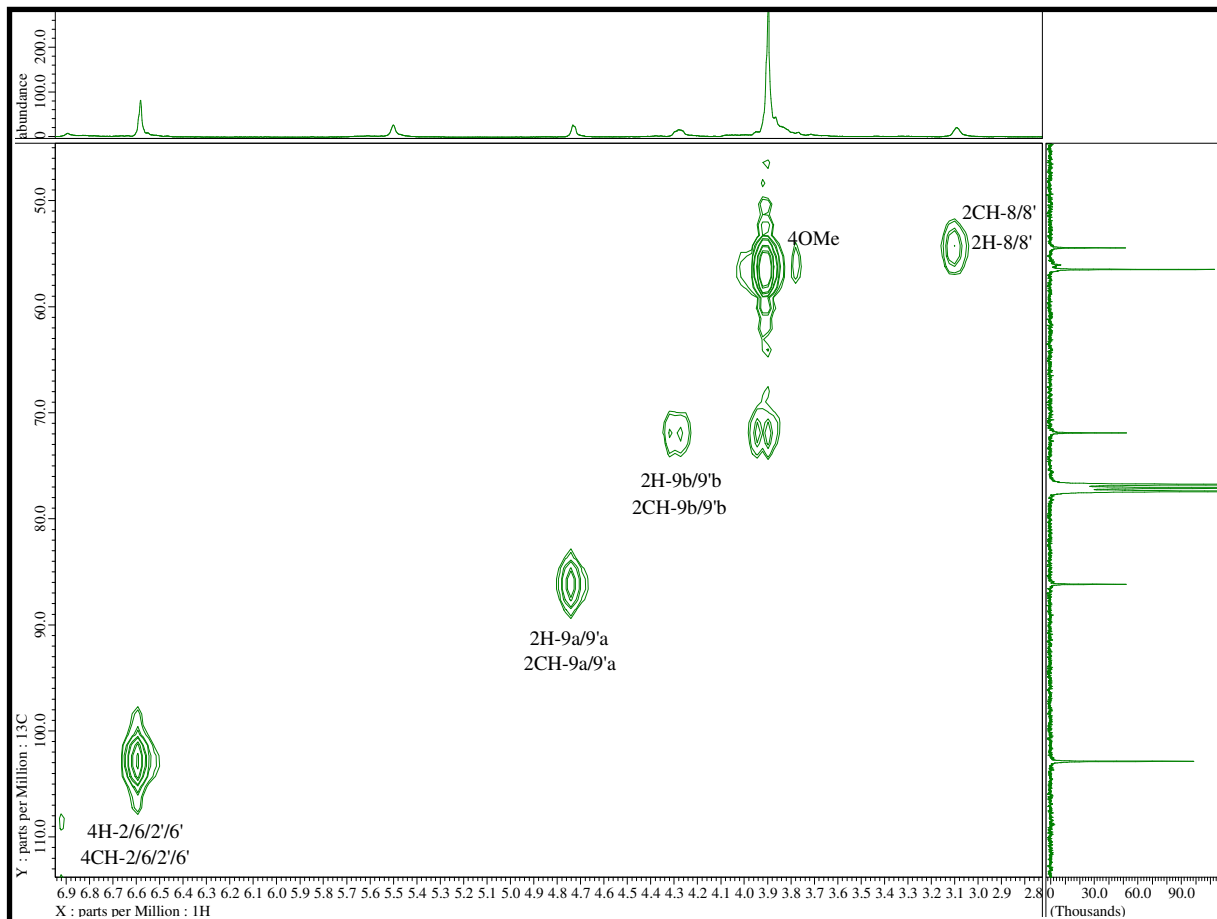
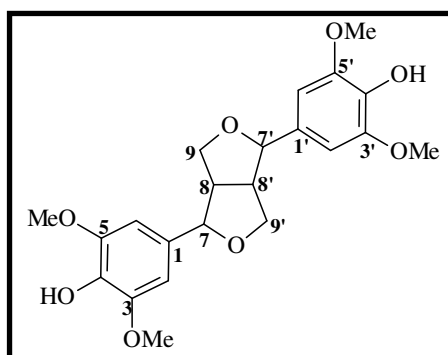


FIGURA 65. Espectro HMQC da substância SGMD-08.



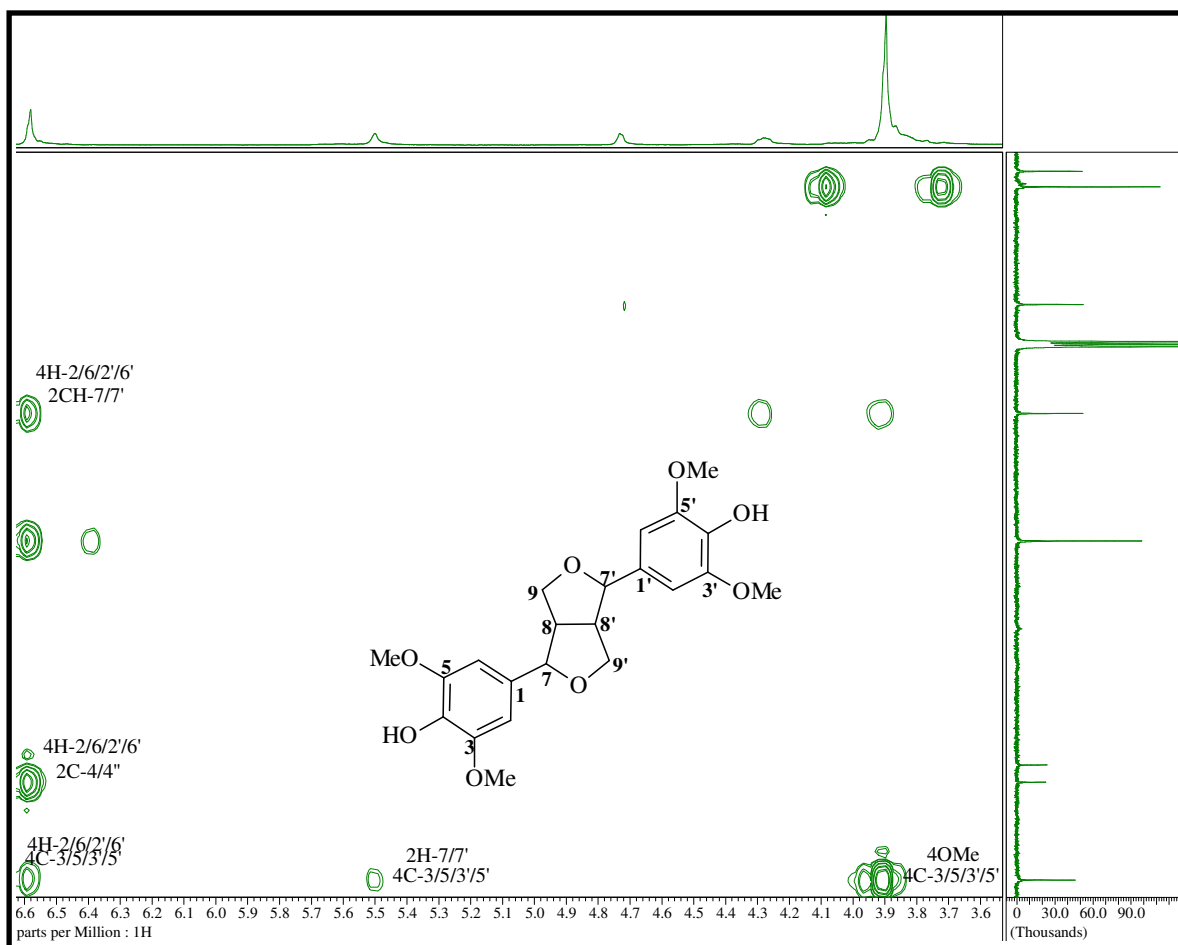


FIGURA 66. Espectro HMBC da substância SGMD-08.

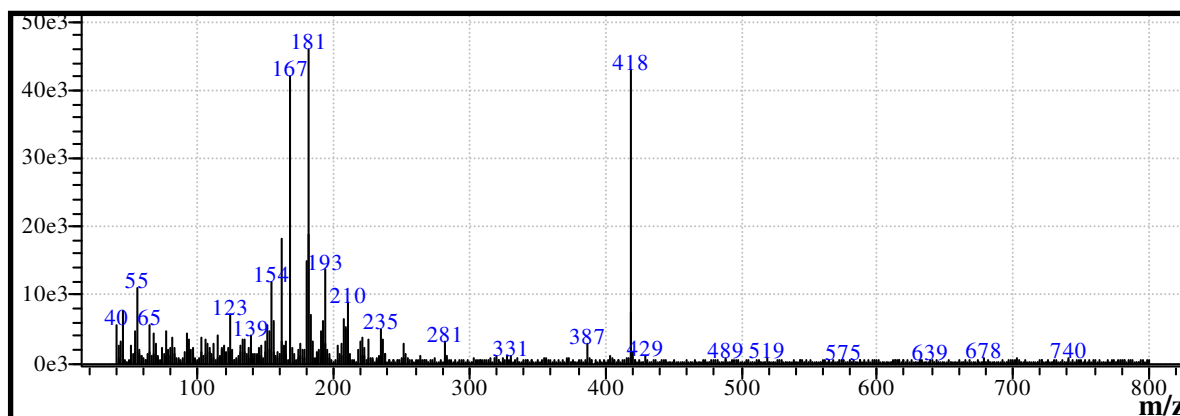
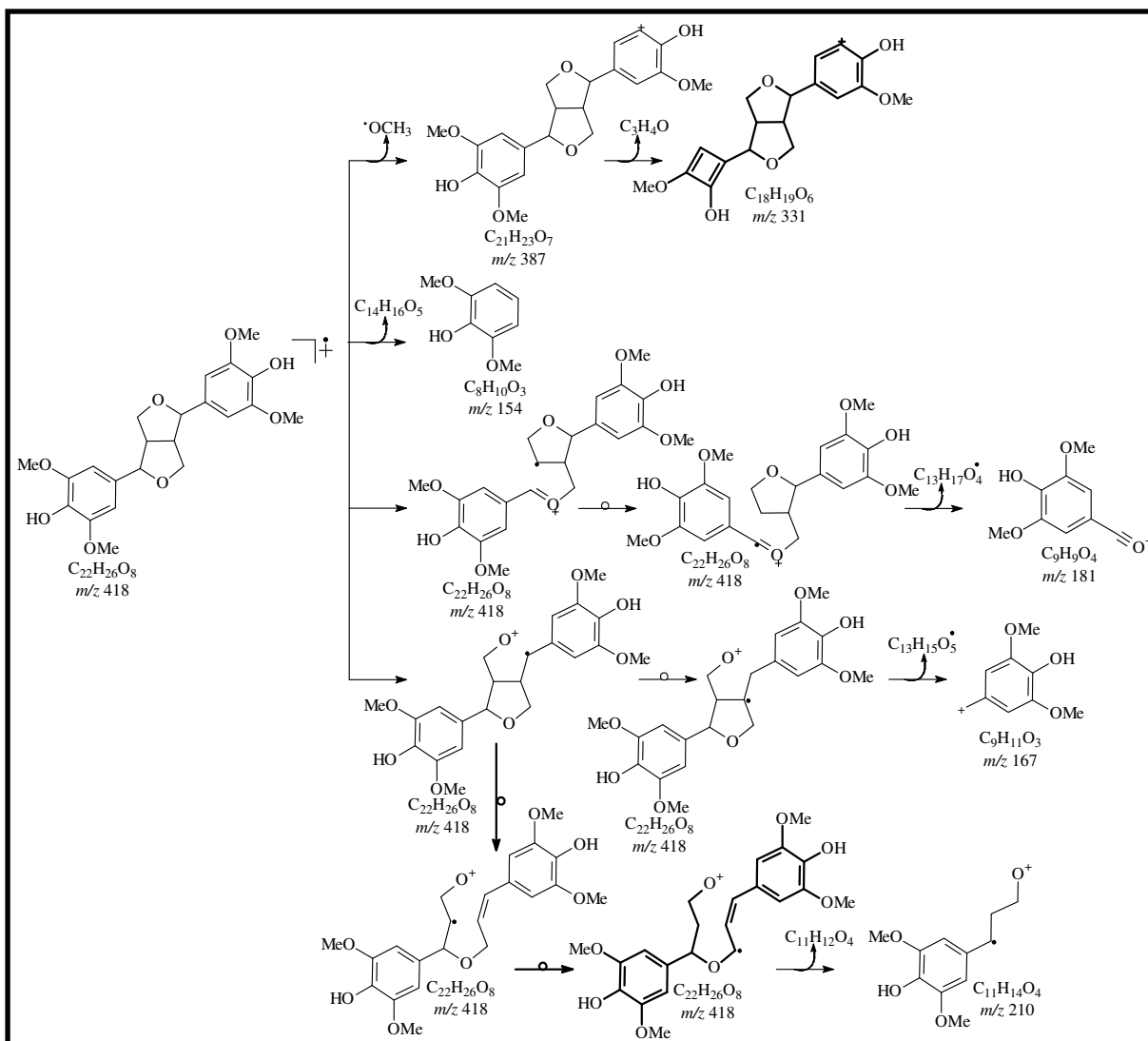


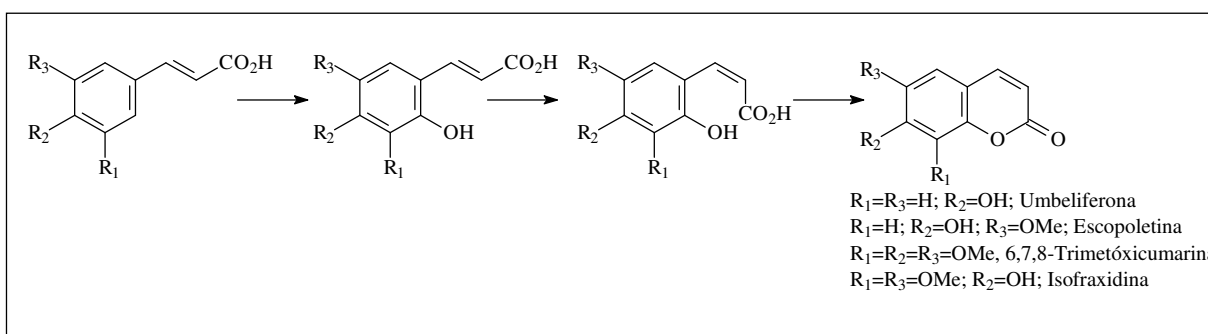
FIGURA 67. Espectro de massas 70 eV da substância SGMD-08.



ESQUEMA 17. Proposta de fragmentação da substância SGMD-08.

4.5. Determinação estrutural das cumarinas

São substâncias de ampla ocorrência no reino vegetal. Assim como as lignanas, as cumarinas apresentam como precursores o ácido cinâmico e derivados (DEWICK, 1998). Uma proposta plausível de formação destas substâncias é iniciada pela oxidação (hidroxilação) do ácido cinâmico ou derivados em *orto*, seguido de diversas sequências reacionais até à formação de um anel δ -lactônico α,β -insaturado (Quadro 18).



QUADRO 18. Proposta biossintética das cumarinas (DEWICK, 1998).

Uma característica importante na identificação cromatográfica desta classe de metabólito especial é a forte fluorescência azul quando analisadas por CCDA e exposta à luz ultravioleta (254 nm) (MULSEN, 1970).

No espectro de RMN de ¹H apesar de se apresentar bastante semelhante aos dos arilpronanóides, pode ser observadas algumas características importantes como:

- i. Sinais dos hidrogênios da insaturação na cadeia lateral, sendo esta com junção *cis*, exibem dupletos com constante de acoplamento ($J \approx 9-12$ Hz);
- ii. A conjugação da ligação dupla com a carbonila gera um efeito mesomérico apresentando uma estrutura canônica que deixa o hidrogênio ligado ao carbono- β desprotegido, este efeito produz um sinal em frequências mais altas que o hidrogênio ligado ao carbono- α ;
- iii. Em cumarinas que apresentam o carbono- α oxidado, o hidrogênio ligado ao carbono- β apresenta sinal em frequência mais elevada entre δ_H 8,00-8,50, decorrente do efeito anisotrópico proveniente da ligação (C-O) e também devido ao efeito de compressão estérica (MURRAY *et al.*, 1982).

No espectro na região do IV observam-se absorções em 1710-1715 e 1620-1630 cm^{-1} que caracterizam o anel δ -lactônico α,β -insaturado (MURRAY *et al.*, 1982).

O estudo fitoquímico da fração em diclorometano resultou no isolamento e identificação de três cumarinas conhecidas como dimetilfratexina **SGMD-09**, escopoletina **SGMD-10** e isofraxidina **SGMD-11**, relatadas pela primeira vez no gênero *Simira*.

4.5.1. 6,7,8-Trimetóxicumarina

O tratamento cromatográfico da sub-fração **Fr. B3** conduziu ao isolamento de 7,00 mg de um sólido cristalino, solúvel em CHCl_3 , que foi denominada de **SGMD-09** (Esquema 4, página 24). O cromatograma obtido por CG (Figura 68, página 90) ilustra o grau de pureza da substância.

O espectro de RMN de ¹H (Figura 69, página 91) da amostra apresentou apenas cinco sinais: dois dupletos em δ_H 7,97 (*d*, 9,9 Hz) e 6,16 (*d*, 9,9 Hz) e um simpleto em δ_H 6,33, compatíveis com absorções de hidrogênios ligados a carbonos sp^2 . A integração dos sinais

possibilitou atribuir para os sinais em δ_H 3,96 (s) e 3,91 (s) três e seis hidrogênios respectivamente, indicando a presença de três grupos metoxila.

O mapa de correlação heteronuclear a duas e três ligações, HMBC, possibilitou atribuir identificar os pontos de ligação na substância, além de fornecer os deslocamentos químicos dos carbonos na substância, que comparados com a literatura (VIEIRA, 1995; ESHIETT & TAYLOR, 1968), conduziram à estrutura de uma cumarina trimetoxilada em C-6, 7 e 8 Figura 70, página 92.

O espectro de massas 70 eV (Figura 71, página 92), apresentou como íon molecular M^+ 236 D, condizente com a fórmula molecular $C_{12}H_{12}O_5$. As propostas de fragmentação representando os principais sinais estão ilustradas no Esquema 18, página 93. Nesta classe de metabólito especial os fragmentos mais comuns são devidos à perda de metilas (CH_3) e perdas de (CO) (BUDZIKIEWICZ *et al.*, 1964).

A interpretação dos dados obtidos, juntamente com comparação com a literatura, (VIEIRA, 1995; ESHIETT & TAYLOR, 1968) conduziu à elucidação estrutural de **SGMD-09** como sendo a cumarina conhecida dimetilfratexina, relatada pela primeira vez no gênero *Simira*.

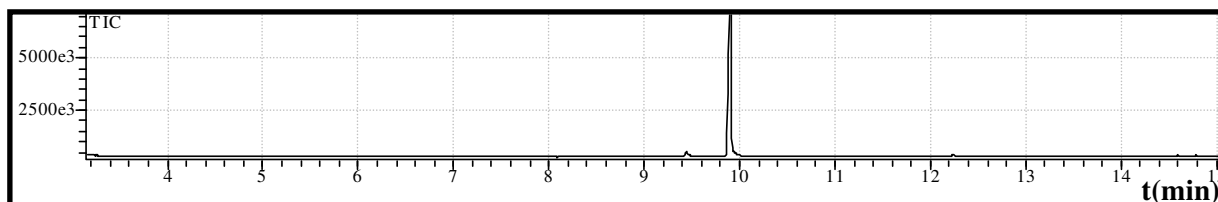


FIGURA 68. Cromatograma CG da SGMD-09.

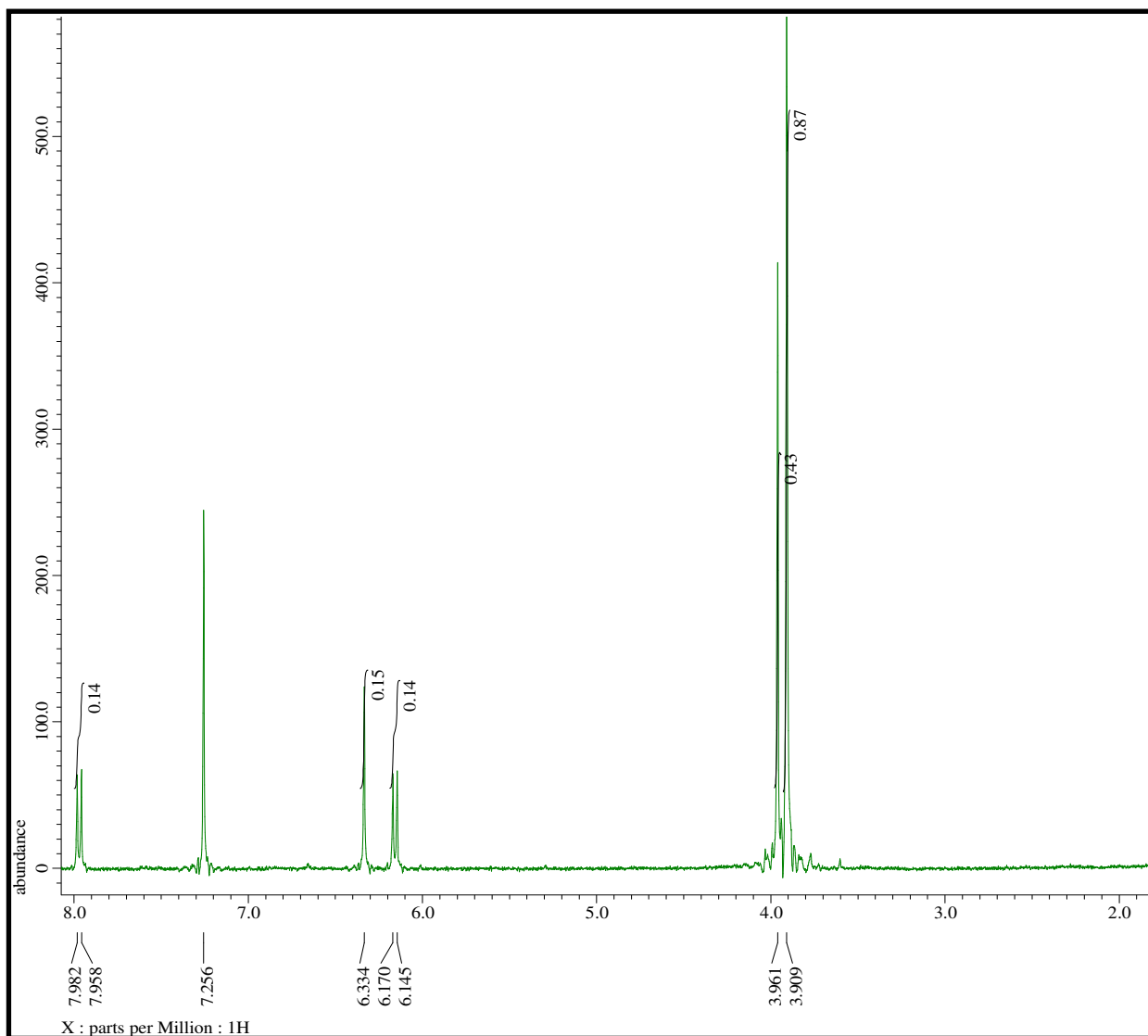


FIGURA 69. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da substância **SGMD-09**.

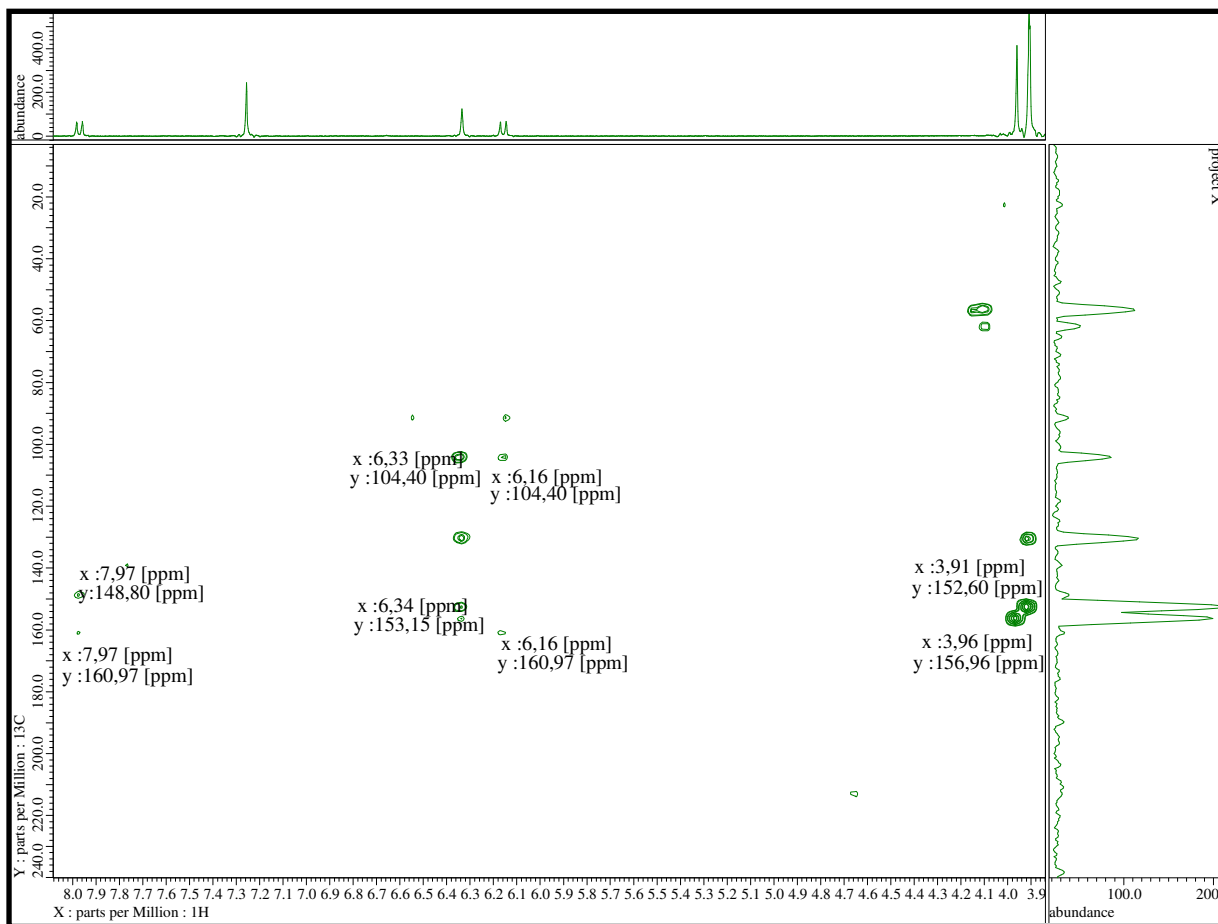


FIGURA 70. Espectro HMBC da substância SGMD-09.

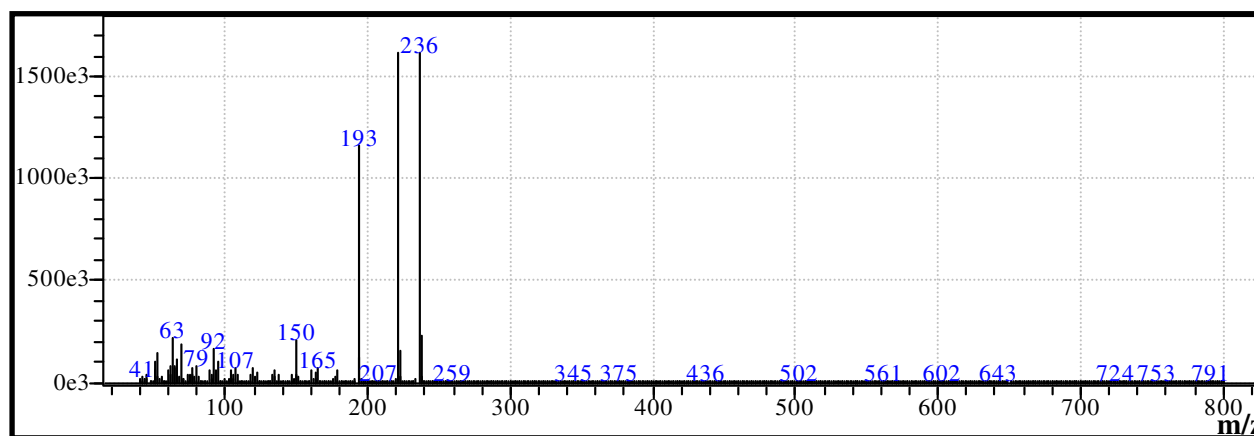
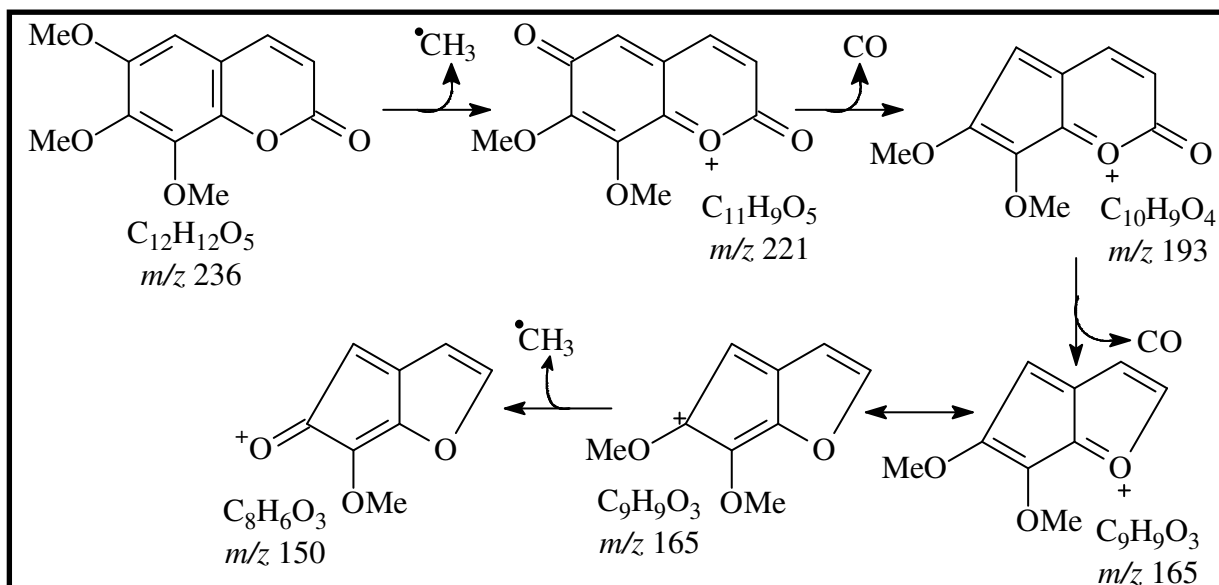


FIGURA 71. Espectro de massas 70 eV da substância SGMD-09.



ESQUEMA 18. Proposta de fragmentação da substância **SGMD-09**.

4.5.2. Escopoletina+isofraxidina

O tratamento cromatográfico da fração Fr C2 de *S. glaziovii* forneceu (8,00 mg) de um sólido verde solúvel em CHCl₃ (Esquema 5, página 25). A análise do material por CCDA e exposição em luz ultravioleta (254 nm) apresentou duas manchas fluorescentes de coloração azul intensa característica de cumarinas.

Devido à pequena quantidade em massa, a amostra não foi submetida a técnicas clássicas de isolamento e purificação. A amostra foi submetida à análise por CG-EM, apresentando dois sinais no cromatograma com tempos de retenção de 12,83 e 14,18 minutos (Figura 72). O espectro de massas 70 eV de cada sinal apresentou como íon molecular M⁺ 192 e 222 D, condizentes com as fórmulas moleculares C₁₀H₁₁O₄ e C₁₁H₁₀O₅ respectivamente (Figuras 73 e 74, páginas 94 e 95). A comparação destes dados com a literatura (VUL'FSON *et al.*, 1963), possibilitou propor as fragmentações que justificam a fórmula molecular e elaboração da estrutura para as substâncias (Esquemas 19 e 20, páginas 94 e 95). Como relatado anteriormente, esta classe de metabólito especial apresenta propostas de fragmentação bastante comuns como devido à perda de metilas (•CH₃) e perda de (CO) (BUDZIKIEWICZ *et al.*, 1964). Desta forma foi possível identificar na amostra a mistura de cumarinas **SGMD-11+12** conhecidas na literatura como escopoletina e isofraxidina relacionadas pela primeira no gênero *Simira*.

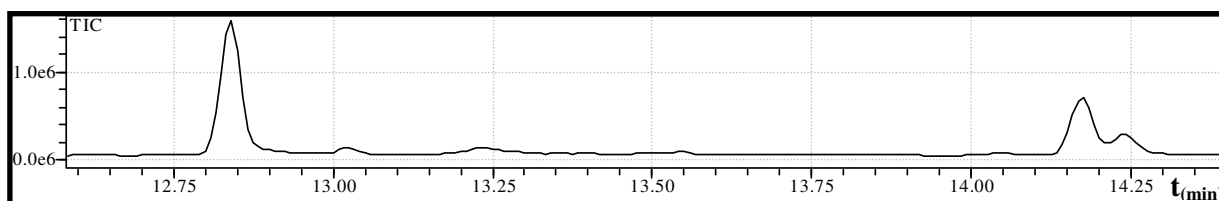


FIGURA 72. Cromatograma CG das substâncias **SGMD-10** e **11**.

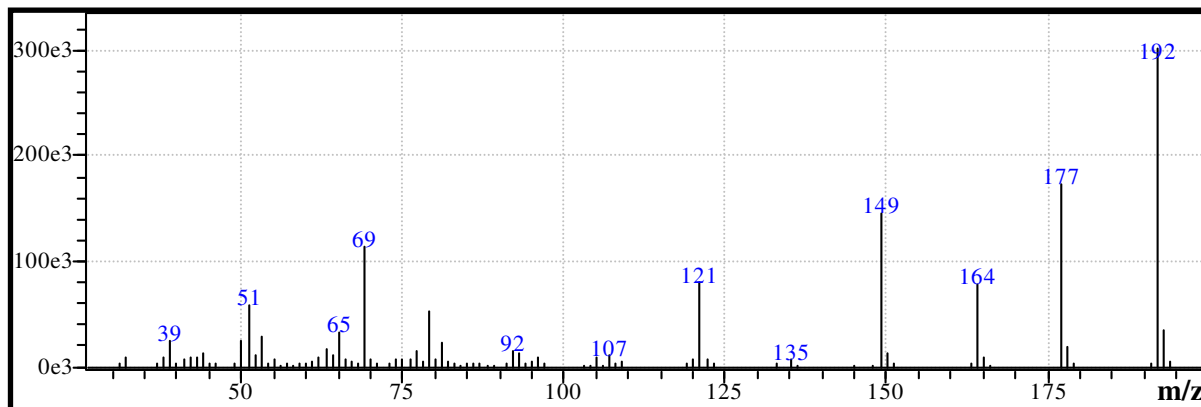
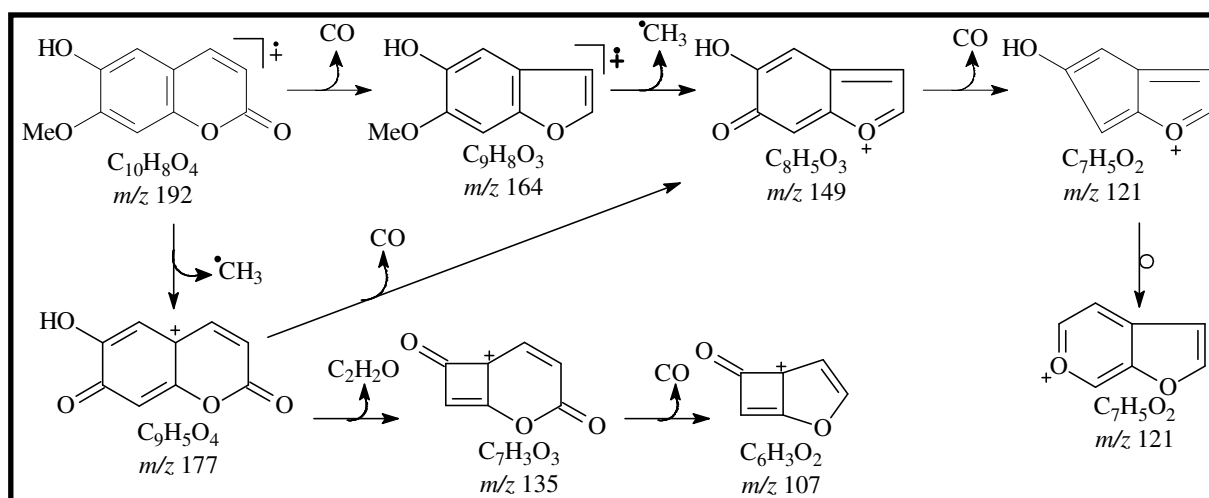


FIGURA 73. Espectro de massas 70 eV da substância SGMD-10.



ESQUEMA 19. Proposta de fragmentação da substância SGMD-10.

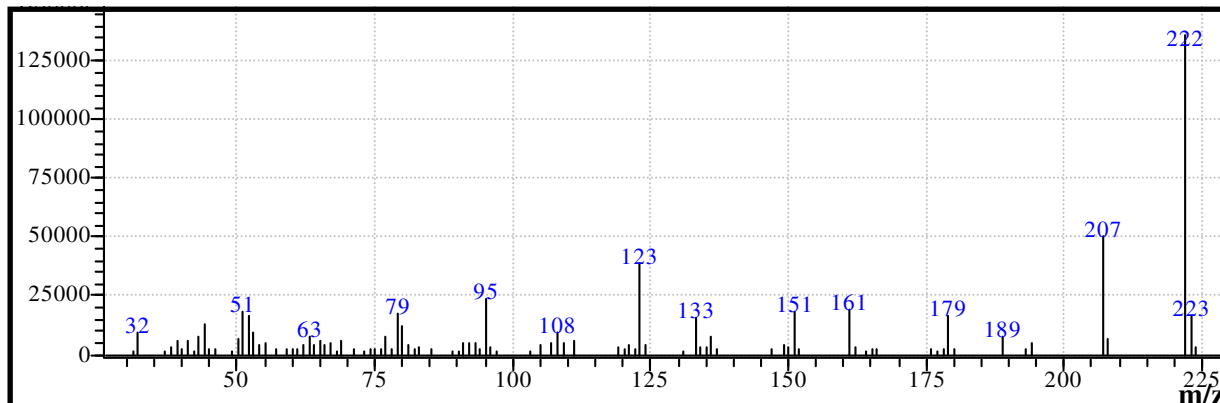
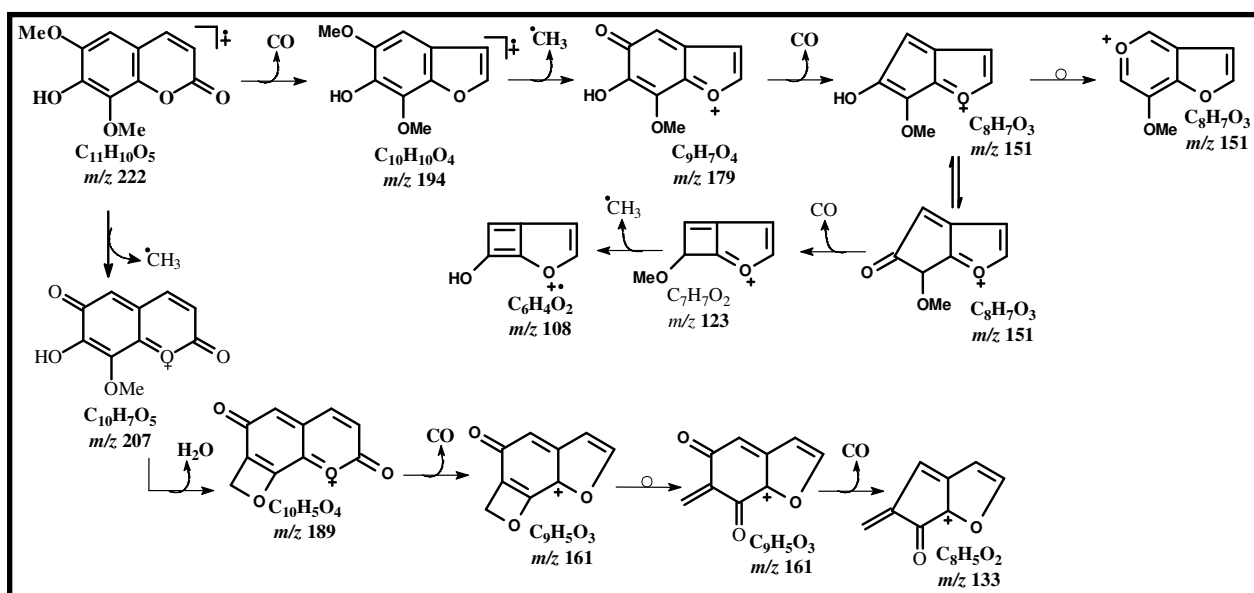


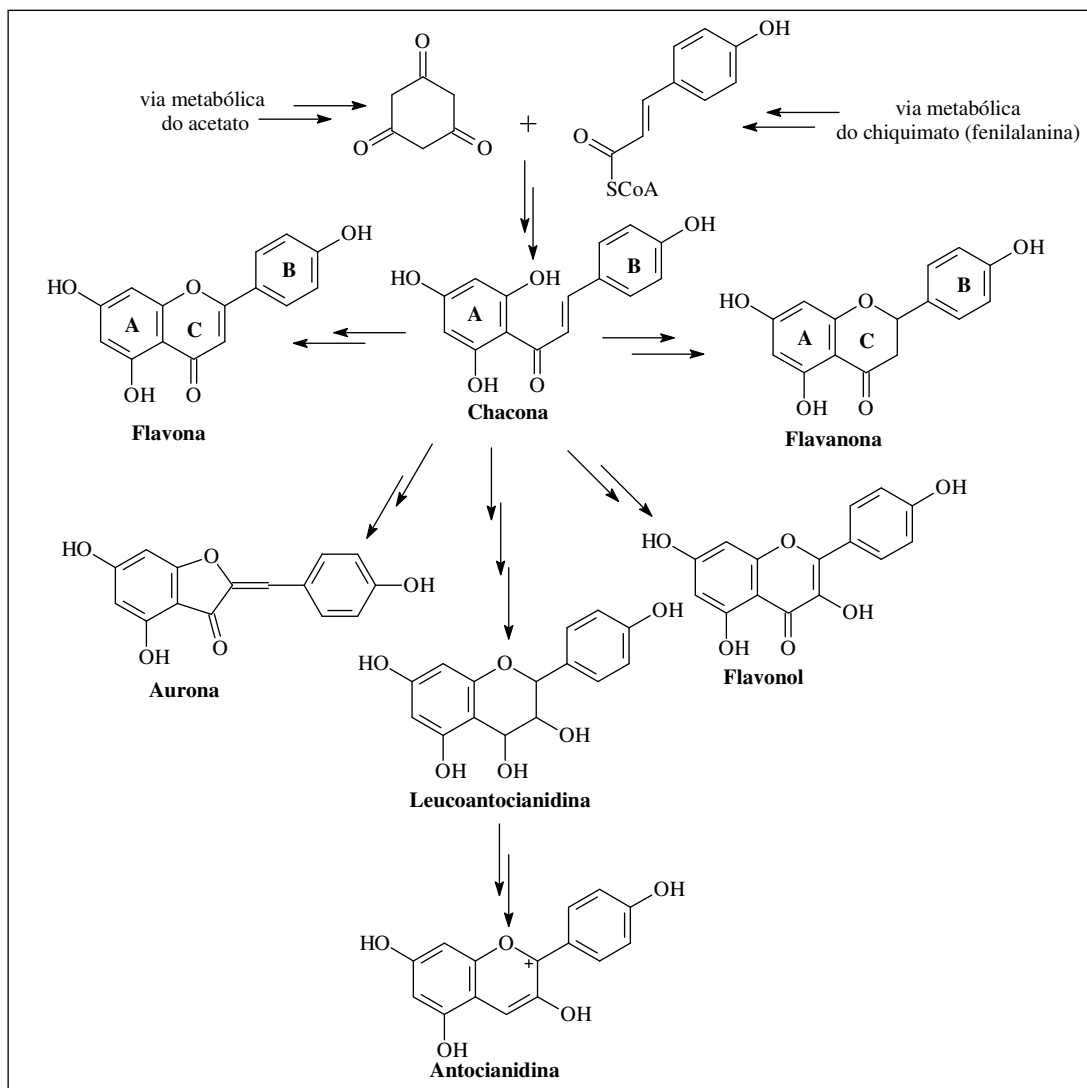
FIGURA 74. Espectro de massas 70 eV da substância SGMD-11.



4.6. Determinação estrutural dos flavonóides

É uma das classes de metabólitos especiais com maior diversidade estrutural, ocupando uma posição proeminente entre as substâncias fenólicas de origem natural. A ampla distribuição nas plantas, além de sua alta estabilidade química e facilidade de ser identificada, têm atribuído a esta classe de substância o papel de marcador quimiotaxonômico na classificação de plantas (AGRAWAL *et al.*, 1989).

São metabólitos biossintetizados por duas via metabólicas distintas: chiquimato (fenilalanina) e acetato. A via metabólica do acetato participa com a condensação de Claysen de três unidades de malonil-CoA seguidas de descarboxilações gerando o anel **A**. A via metabólica do chiquimato contribui para a formação destas substâncias, com o éster *p*-cumaril CoA formando o anel **B**. A junção das duas unidades se dá pela substituição nucleofílica à carbonila na unidade *p*-cumaril CoA através de um enolato formado no anel **A**. Esta junção gera a primeira sub-classe de flavonóides denominada de chalconas. A adição de Michael 1,4 ao carbono do sistema carbonílico α,β insaturado gera a segunda sub-classe, as flavanonas com formação do anel **C**. Sucessivas reações produzem a demais sub-classes relatadas na literatura (DEWICK, 1998; AGRAWAL *et al.*, 1989) (Quadro 19).



QUADRO 19. Proposta biossintética das sub-classes dos flavonóides (AGRAWAL *et al.*, 1989).

A proposta de formação dos bis e biflavonóides pode ser comparada ao processo mecanístico de formação das flavolignanas, que é decorrente de acoplamento oxidativo formando ligações C-C ou C-O.

A junção destas duas unidades gerando os anéis **A**, **B** e **C** formam substâncias com um sistema de conjugação que é facilmente caracterizado por espectroscopia na região do ultravioleta. Esse apresenta duas bandas de absorção em 240-285 nm denominada de **banda II**, atribuída à absorção do anel **A**, e 300-550 nm denominada de **banda I** sendo atribuída à absorção do anel **B** (Figura 75). Os comprimentos de onda referentes à absorção máxima de ambas as bandas estão atribuídas aos grupos funcionais presentes na estrutura base da substância (AGRAWAL *et al.*, 1989).

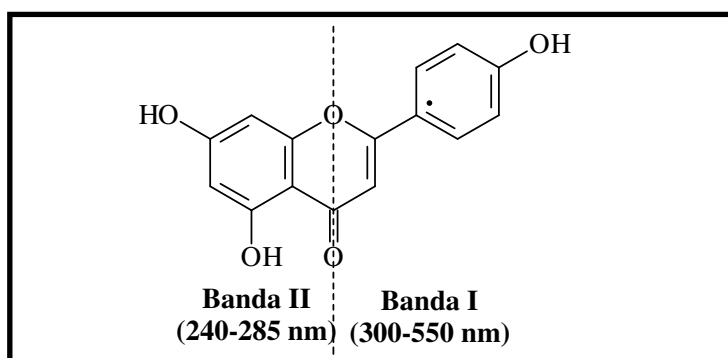


FIGURA 75. Bandas de absorção do esqueleto flavonoídico.

A utilização de reagentes de deslocamento como acetato de sódio, ácido bórico, cloreto de alumínio, ácido clorídrico, metóxido de sódio auxiliam na determinação de hidroxilação em posições distintas da biogênese das substâncias com o deslocamento do comprimento de onda da substância (AGRAWAL *et al.*, 1989).

A espectroscopia de massas tem sido uma grande ferramenta para determinação estrutural destas substâncias. Por apresentarem uma estrutura base com 15 átomos de carbono e basicamente cinco pontos de oxidação é possível se deduzir a massa molecular de acordo com a sub-classe do flavonóide. Um dos fragmentos característicos envolve a ruptura dos anéis **A** e **B** através de uma reação de retro-Diels Alder (AGRAWAL *et al.*, 1989) (Figura 76).

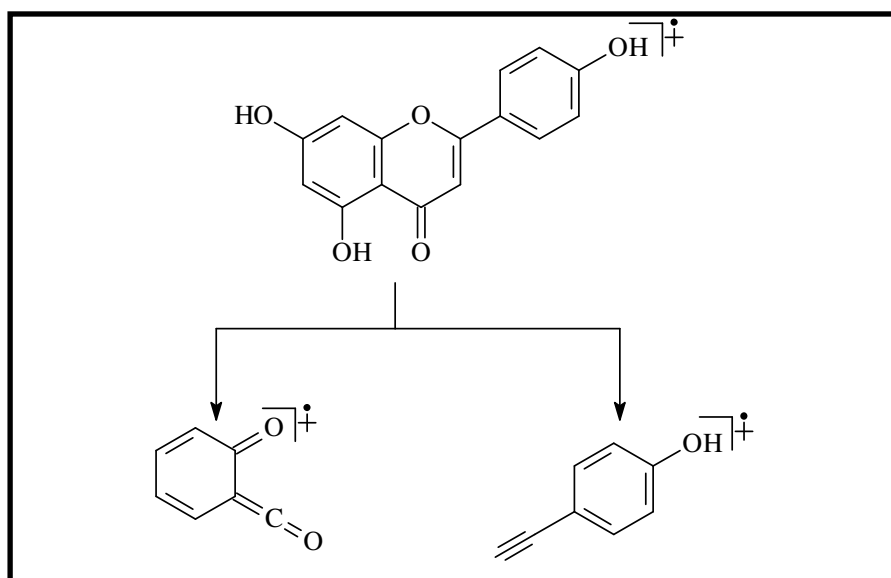


FIGURA 76. Ruptura do anel A e B por fragmentação do tipo retro-Diels Alder.

A análise por RMN de ^1H é um dos grandes recursos para a determinação estrutural destas substâncias. Como já relatado, conhecendo a biogênese destas substâncias pode-se prever o perfil dos sinais. Observam-se dois sinais em δ_{H} 6,7-7,2 e 7,8-8,5 atribuídos aos hidrogênios do anel **B** e em δ_{H} 6,0-6,5 referentes aos hidrogênios do anel **A** e **C**. A multiplicidade dos sinais bem como a constante de acoplamento determina o padrão de substituição principalmente do anel **B**. Os sinais em frequências menores são atribuídos à presença ou não de oxidação (insaturação) no anel **C**, sendo determinante para identificar a sub-classe de flavonóide (AGRAWAL *et al.*, 1989).

O estudo fitoquímico da fração em diclorometano do extrato metanólico das folhas de *O. parviflora* resultou no isolamento de três biflavonóides: agatisflavona, 7''-metóxi-agatisflavona e amentoflavona (Quadro 10, página 29). A fórmula estrutural das substâncias foram propostas baseado principalmente na análise de espectros de RMN de ^1H e por espectrometria de massas de alta resolução que possibilitou também, após análise de duas frações ricas em compostos fenólicos, propor a estrutura de outros doze flavonóides em mistura com base no M^+ detectado com sistema CLAE-EM (Quadro 11, página 30). Os biflavonóides isolados são considerados marcadores quimiotaxonômicos do gênero *Ouratea*.

4.6.1. Agatisflavona

O tratamento cromatográfico, filtração em sephadex LH20, da fração **F-2** (0,9 g) resultou no isolamento de um sólido amarelo solúvel em metanol que teve o código **OPFM-D-01** (35,0 mg) (Esquema 7, página 28).

A análise por CCDA usando sistema de eluentes $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 5% e comparado com padrão dos biflavonóides agatisflavona, amentoflavona e 7''-metóxi-agatisflavona apresentou mesmo perfil cromatográfico da agatisflavona e da amentoflavona.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 77 e 78, página 99) da amostra apresentou sinais em δ_{H} 7,98 (*d*, 8 Hz), 7,67 (*d*, 8 Hz), 7,05 (*d*, 8 Hz), 6,84 (*d*, 8 Hz) característicos sistemas AA'BB', atribuídos a dois sistemas parasubstituídos. Os simpletos em δ_{H} 6,38 e 6,63 foram atribuídos aos hidrogênios H-3'' e H-3' respectivamente. Os demais simpletos foram atribuídos aos hidrogênios H-6'' δ_{H} 6,69 e H-8 δ_{H} 6,74. A análise destes dados juntamente com comparação com a literatura resultou na elucidação da substância **OPFM-D-01** como o biflavonóide agatisflavona (MABRY, *et al.*, 1970, FERNANDES, 2008).

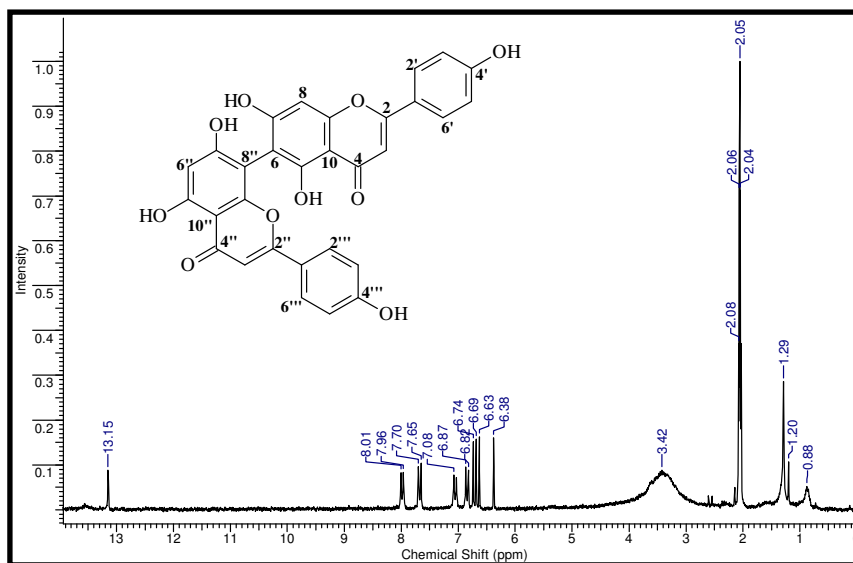


FIGURA 77. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da substância **OPFM-D-01**.

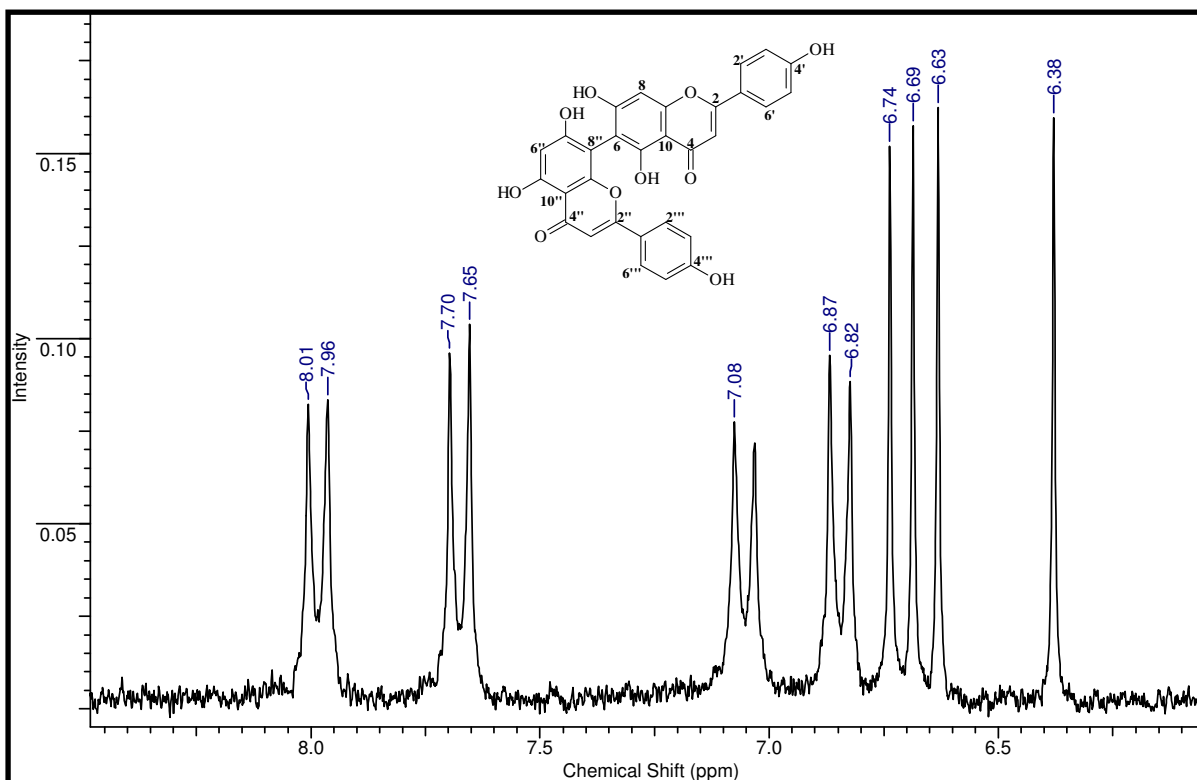


FIGURA 78. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância **OPFM-D-01**. (Região de 6,0 a 8,5 ppm)

4.6.2. 7''-Metóxi-agatisflavona

O mesmo procedimento cromatográfico que resultou no isolamento da agatisflavona, filtração em sephadex LH20 da fração **F-2** (0,9 g), conduziu também ao isolamento de outra substância de cor amarela e solúvel em acetona (Esquema 7, página 28).

A substância foi submetida à análise por CCDA com os mesmos padrões que a agatisflavona e apresentou perfil cromatográfico idêntico ao da 7''-metóxi-agatisflavona.

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figuras 79 e 80, página 100) da substância comparado com o espectro da agatisflavona possibilitou identificar os sinais referentes à aglicona da agatisflavona, porém, com um sinal em δ_{H} 3,88 (s) atribuído ao grupo metoxila. A confirmação da estrutura foi estabelecida após análise do mapa de interação espacial NOESY, que exibiu NOE entre os hidrogênios do grupo metila com o hidrogênio H-6'' (Figura 81, página 101).

As informações obtidas e analisadas juntamente com comparação com a literatura, conduziu a elucidação da estrutura da substância **OPFM-D-02** como a 7''-metóxi-agatisflavona (MABRY, *et al.*, 1970, FERNANDES, 2008).

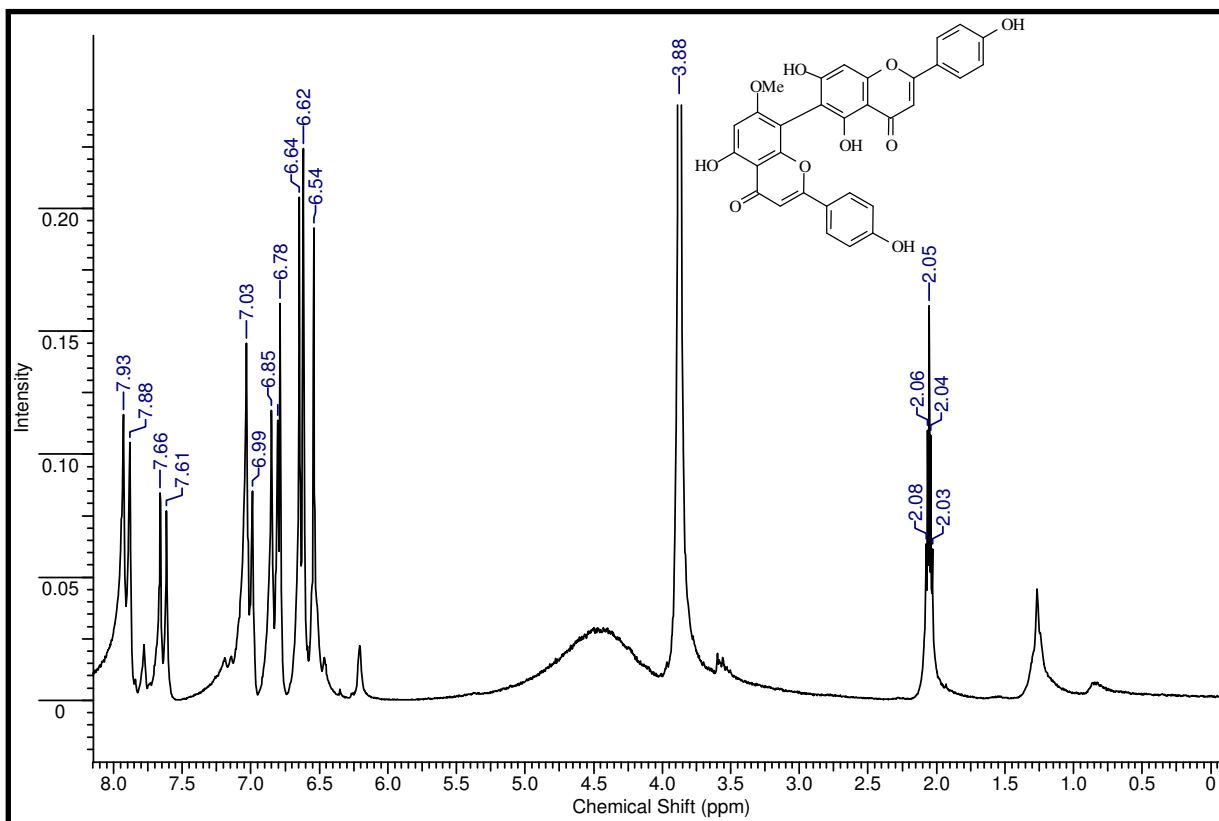


FIGURA 79. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da substância **OPFM-D-02**.

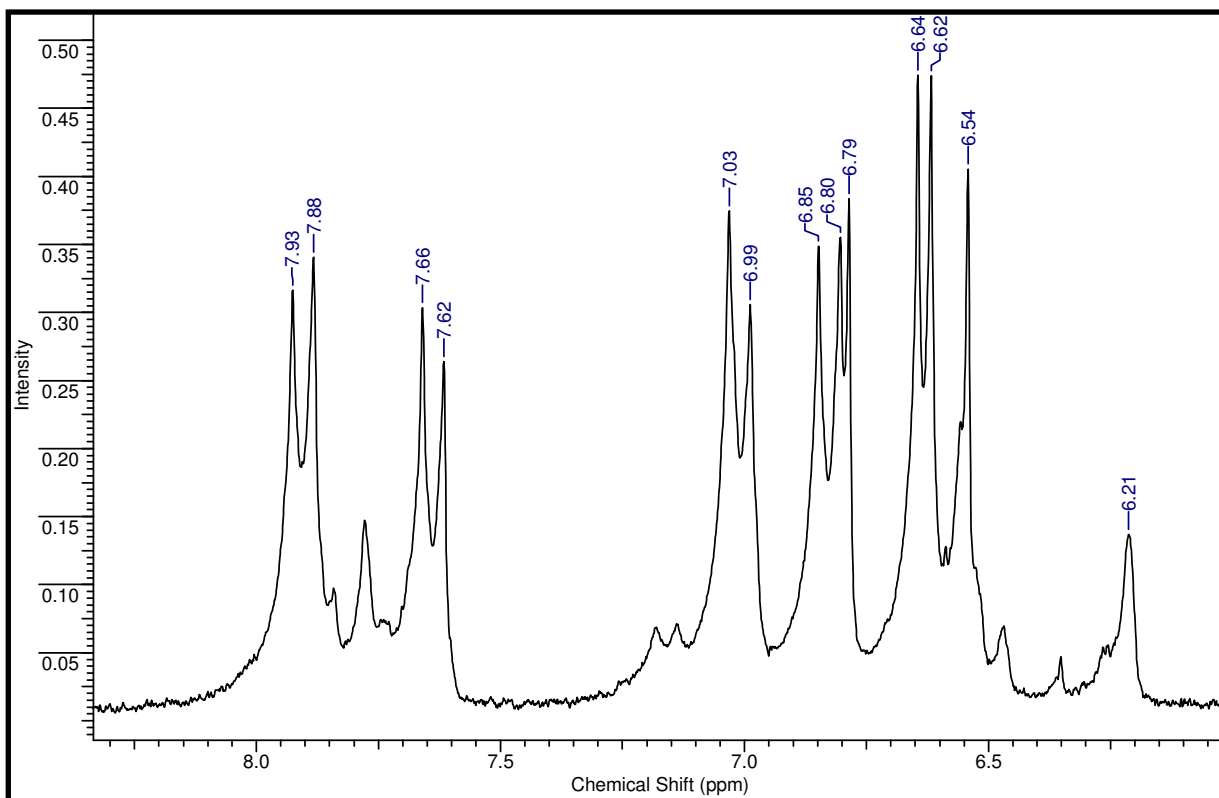


FIGURA 80. Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância **OPFM-D-02**. (Região de 6,0 a 8,5 ppm)

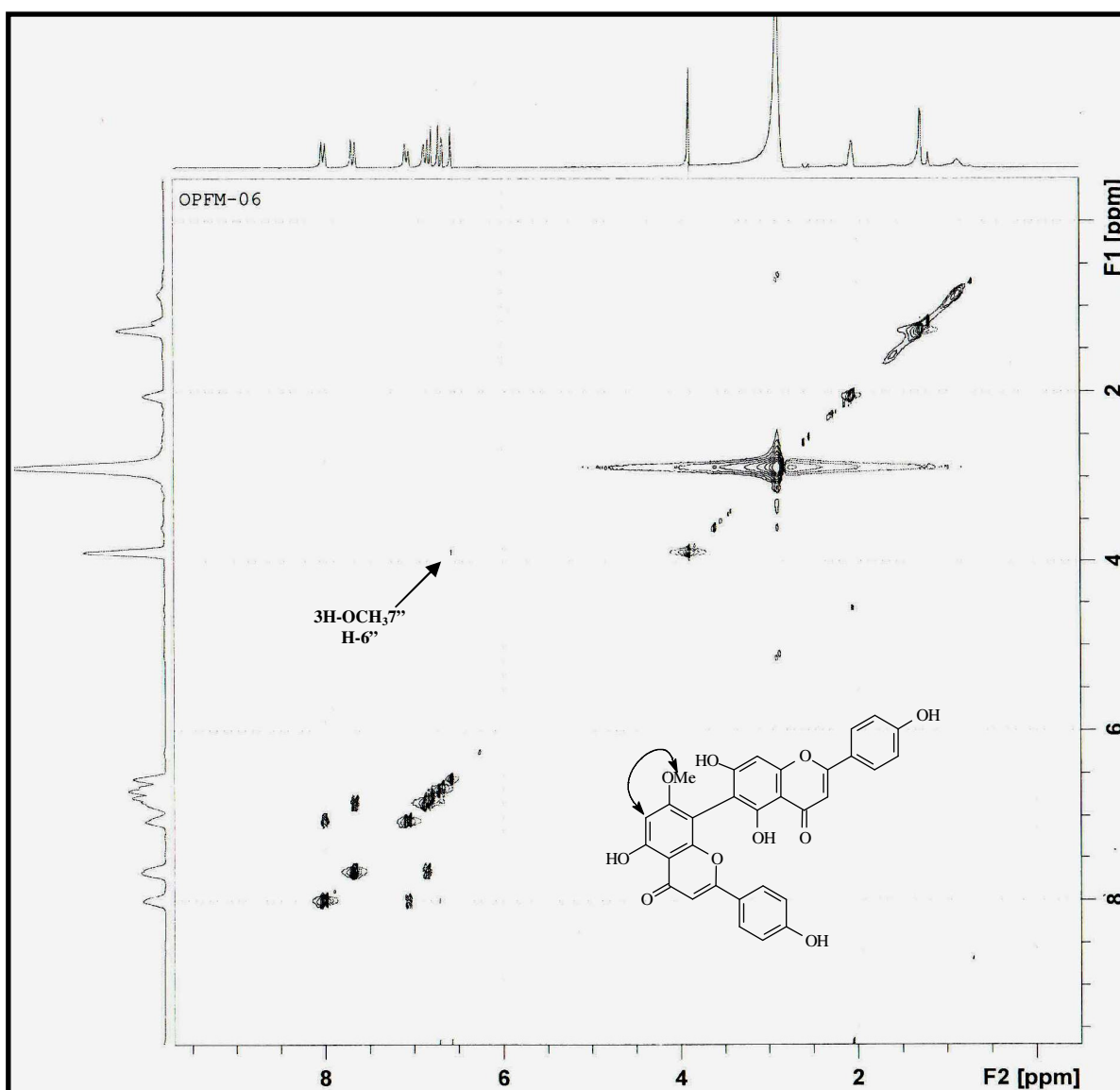


FIGURA 81. Espectro de RMN de ¹H-¹H NOESY da substância **OPFM-D-02**.

4.6.3. Amentoflavona

O tratamento cromatográfico da fração **F-3** (2,5 g) em coluna com gel de sílica forneceu a substância **OPFM-D-03** (40,0 mg) (Esquema 7, página 28). A análise por CCDA utilizando padrões dos biflavonóides já relatados (página 98), exibiu mesmo perfil cromatográfico da amentoflavona.

O espectro de RMN de ¹H (Figura 82, página 102) apresentou um perfil característico do biflavonóide amentoflavona, marcador quimiotaxonômico do gênero, com um sistema AA'BB' em δ_H 8,05 (*d*, 8,8 Hz) e 7,13 (*d*, 8,8 Hz) e um sistema ABC em δ_H 7,26 (*d*, 8,4 Hz) e 7,88 (*d*, 1,2 Hz) atribuídos ao sistema de substituição dos anéis B da substância. Os simpletos em δ_H 6,24 (H-6), 6,26 (H-3), 6,54 (H-3'), 6,69 (H-8) e 6,71 (H-6'') foram atribuídos a aos hidrogênios dos anéis A e C da substância. A comparação dos dados com a literatura conduziu a identificação de **OPFM-D-03** como sendo a amentoflavona.

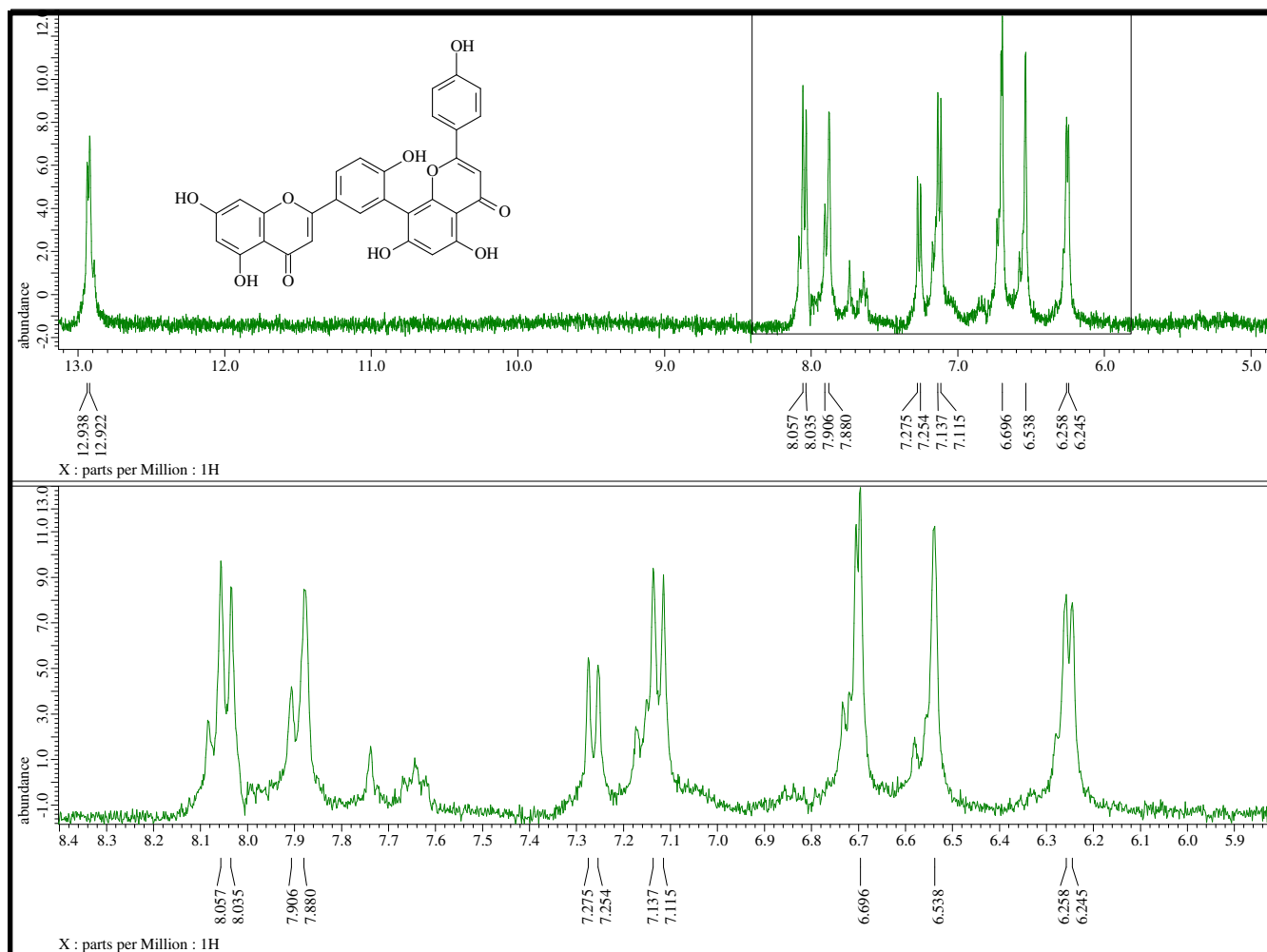


FIGURA 82. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-*d*₆) da substância **OPFM-D-03**.

4.6.4. Identificação de flavonoides com Análise por CLAE DAD-EM-EM

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das técnicas de separação mais importantes e aplicadas na separação de componentes em pequenas quantidades de misturas complexas. A alta pressão associada a colunas cromatográficas empacotadas com fase estacionária com granulometria extremamente pequena garante um alto poder de separação, além da vantagem de não necessitar de grandes quantidades de amostras. Uma das grandes vantagens que esta apresenta, comparada com as técnicas cromatográficas clássicas, é a possibilidade de utilizar métodos analíticos hifenados que dão informações a composição química da mistura além de dados espectroscópicos de análise orgânica das substâncias que foram separadas. Dentre as técnicas de determinação estrutural que são hifenadas ao CLAE, destacam-se a espectroscopia na região do ultravioleta especificamente com arranjos de fotodiodos (DAD). Esta é usada especificamente para amostras que apresentam um grupo cromóforo. Também usa-se, espectrometria de massas de alta resolução, infravermelho, dicroísmo circular e a mais recente com ressonância magnética nuclear (RMN). Alguns equipamentos apresentam mais de uma técnica hifenada, facilitando a determinação estrutural das substâncias detectadas, sendo elas conhecidas ou desconhecidas podendo, assim, abrir mão do uso de padrões para comparação cromatográfica se o objetivo é apenas a determinação estrutural.

Ao realizar o estudo fitoquímico de *O. parvilifera* utilizando técnicas cromatográficas clássicas foram identificados componentes em pequena quantidade sendo de difícil separação e análise com os métodos físicos para propor as estruturas. Sendo assim, algumas frações foram pré-purificadas e submetidas à análise cromatográfica utilizando CLAE-DAD-EM para identificar os componentes em menores quantidades.

Foram selecionadas duas frações ricas em flavonóides para fazer análise com CLAE para tentar identificar os componentes presentes sem o processo de isolamento. Considerando os flavonóides já isolados de espécies de *Ouratea* pode-se, com base nas informações dos espectros de massas, sugerir a presença do flavonóide. Ficando, certamente, a necessidade de análises adicionais como a comparação com padrões para certificação da proposta, já que neste processo foi utilizado apenas uma técnica para determinação estrutural.

Os cromatogramas obtidos das duas frações estão ilustrados nas Figuras 83 e 89, páginas 103 e de acordo com íons moleculares detectados. As propostas de fragmentação que justificam os picos no espectro de massas MS-2, constituem um argumento a mais para a indicação da possível presença dos constituintes propostos (Quadro 11, página 30). Propuseram-se as biflavonas: amentoflavona [M+1] m/z 539,0975 (calc. 539,0978; $\Delta=0,003$) e 7''-Metóxi-agatisflavona [M+1] 553,1136 (calc. 553,1135; $\Delta= 0,001$) além da flavona apigenina que exibiu íon molecular tanto em modo positivo [M+1] em m/z 271,0614 (calc. 271,0606, $\Delta=0,008$). No modo negativo [M-H] detectou-se o m/z 269.0456 (calc. 269,0450, $\Delta=0,006$). O espectro MS-2 exibiu picos característicos de fragmentação de flavonas com Retro-Diels Alder (AGRAWAL *et al.*, 1989). Além das três propostas citadas acima foi possível sugerir algumas estruturas de acordo com os valores dos íons moleculares e incluir propostas de fragmentações compatíveis aos espectros de massas (MS2) (Quadro 20).

Fração	Tempo de retenção	Modo de ionização	Íon molecular
F-4	11,40 min.	Positivo	284.3316
	20,0 min.	Positivo	419.2769
	4,20 min.	Positivo	453.3362
	20,0 min.	Positivo	463.3034
	4,20 min.	Positivo	476,3286
	2,40 min.	Positivo	507,3287
	10,70 min.	Positivo	539.0980
	12,60 min.	Positivo	553.1136
	10,00 min.	Negativo	269.0456
F-5	10,00 min.	Positivo	271.0614
	8,90 min.	Positivo	375.3373
	10,40 min.	Positivo	403.3689
	4,70 min.	Positivo	475.3262
	10,70 min.	Positivo	539.0975
	10,90 min.	Positivo	569.1079
	10,00 min.	Negativo	269.0454

QUADRO 20. Íons de possíveis flavonóides detectado na análise por CLAE-MS.

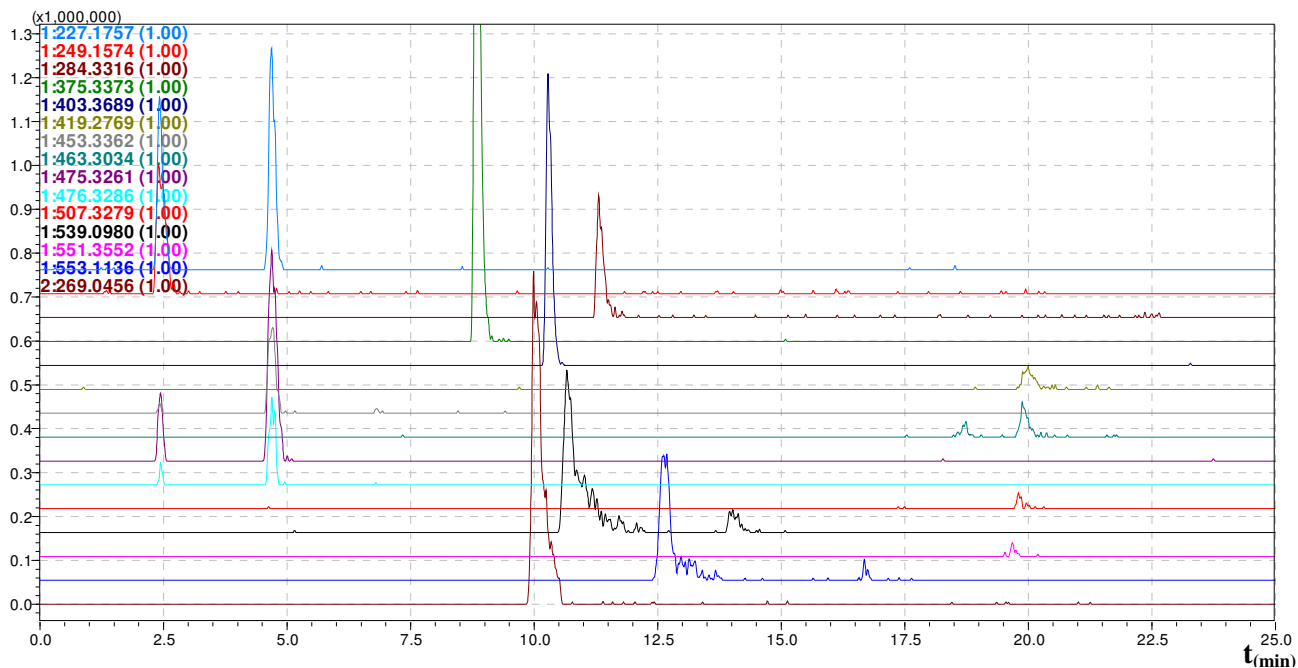


FIGURA 83. Cromatograma CLAE-EM da fração F-4.

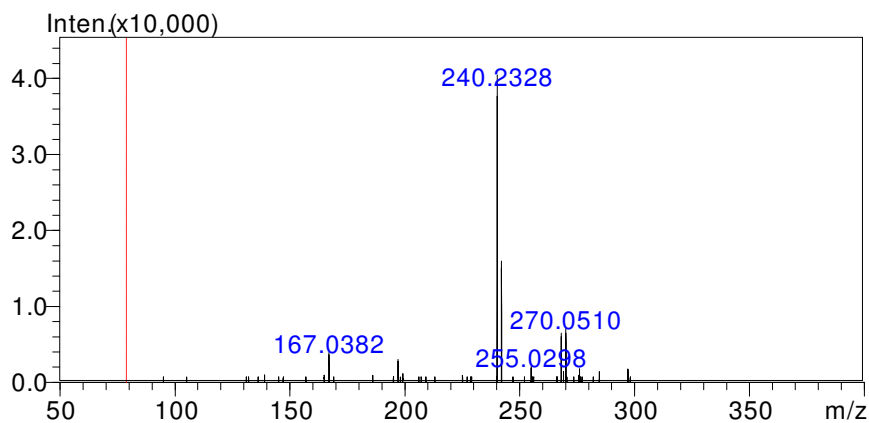
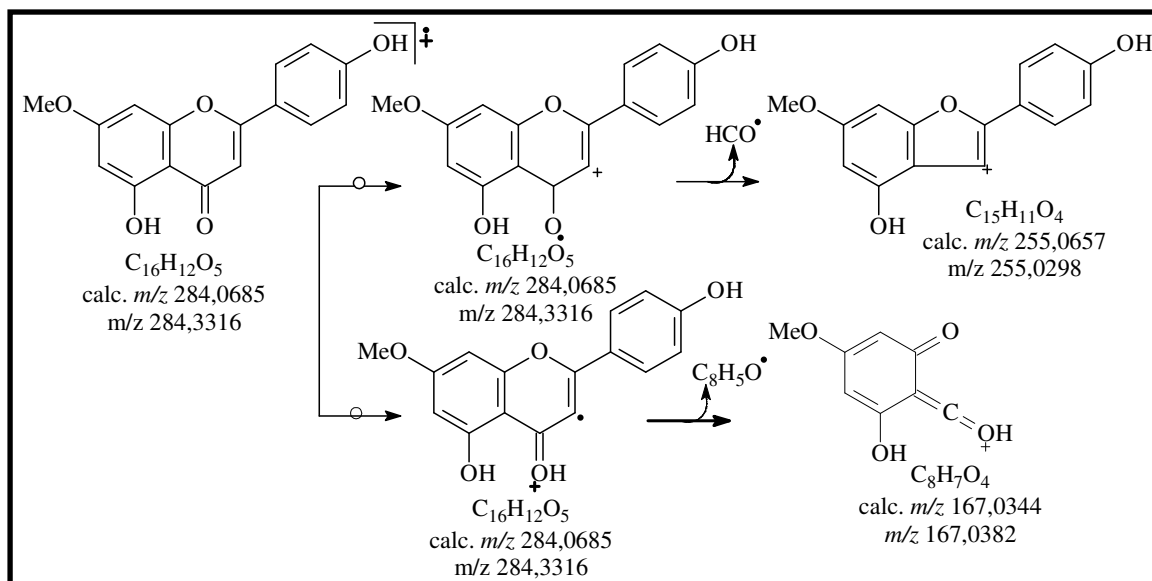


FIGURA 84. Espectro de massas (EM2 ion 284,3316)



ESQUEMA 21. Proposta de estrutura e fragmentação para íon M^+ 284,3316 D.

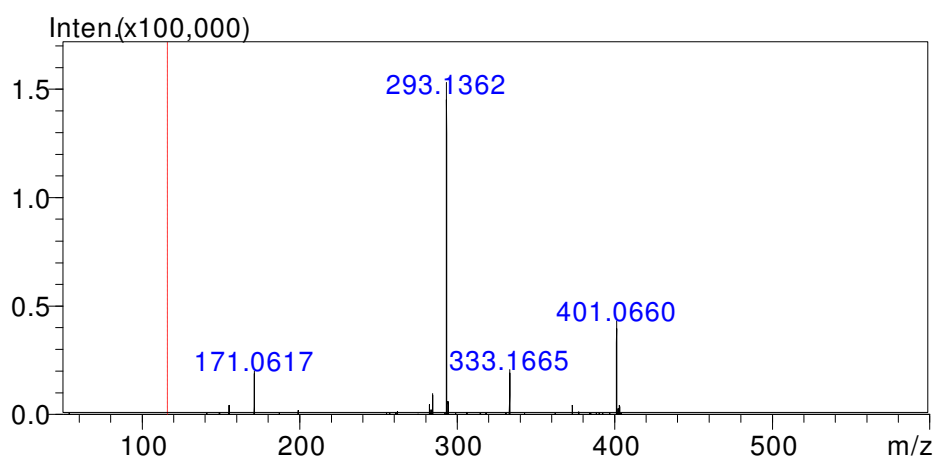
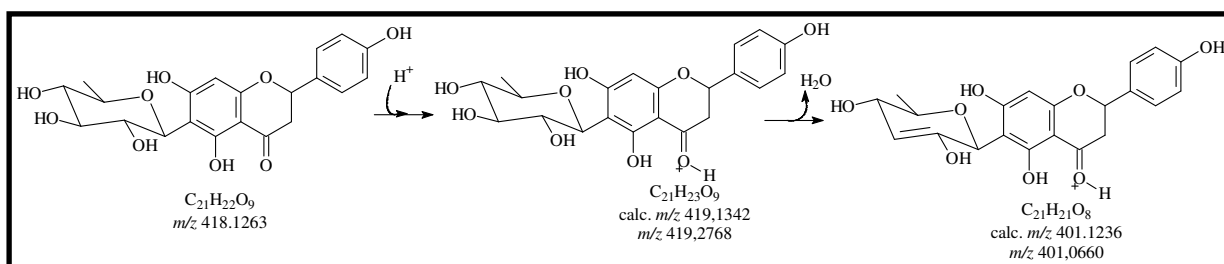


FIGURA 85. Espectro de massas (EM2 ion 419,2768).



ESQUEMA 22. Proposta de estrutura e fragmentação para íon M^+ 419,2768D.

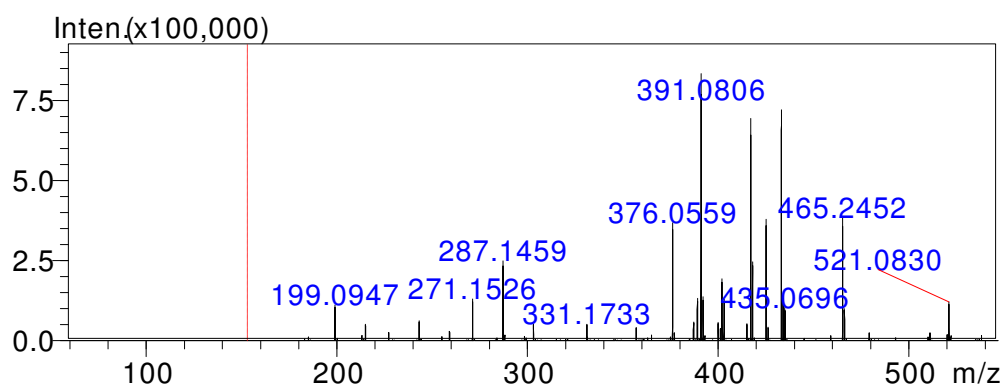
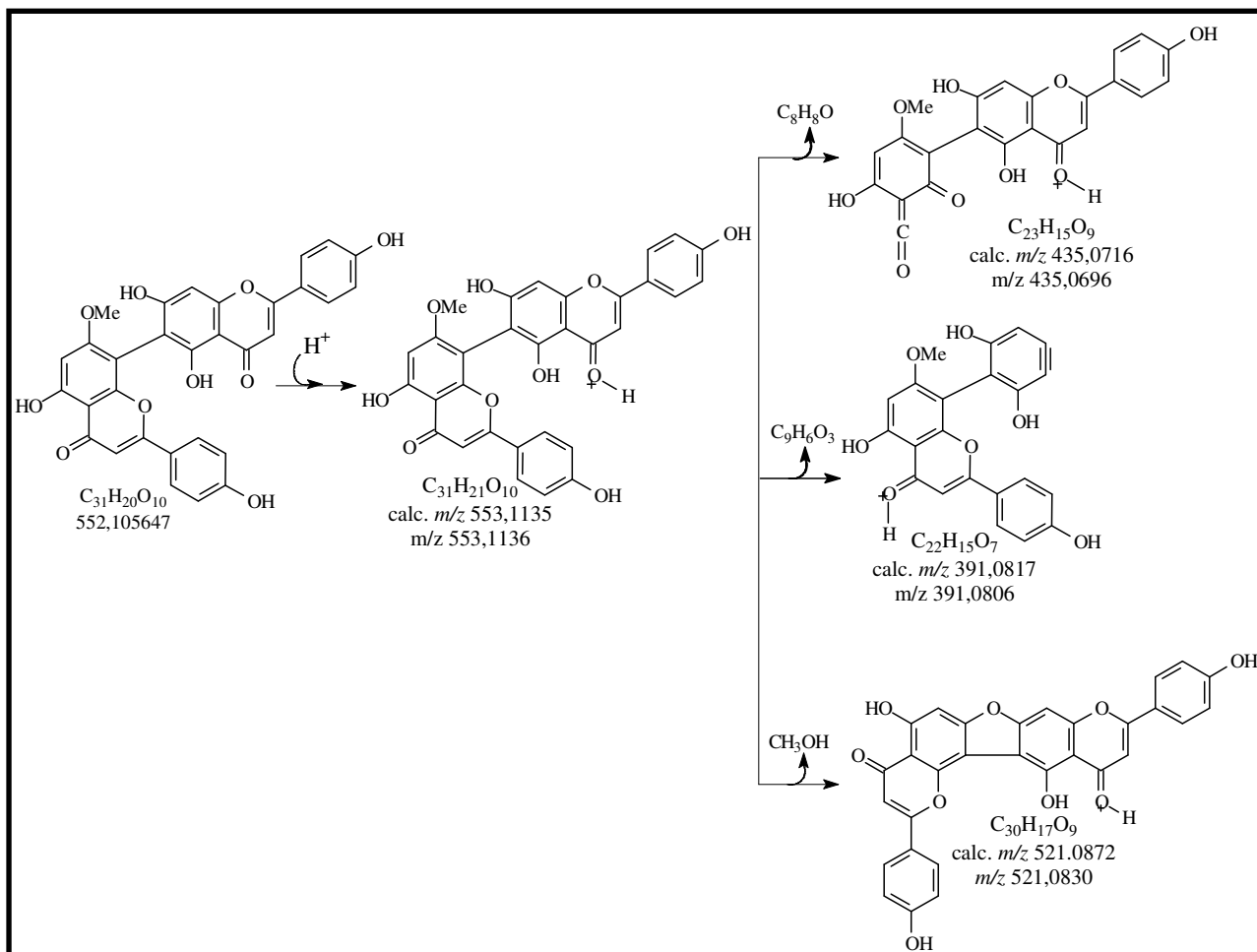


FIGURA 86. Espectro de massas (EM2 ion 553,1136).



ESQUEMA 23. Proposta de estrutura e fragmentação para íon M^+ 553,1136D.

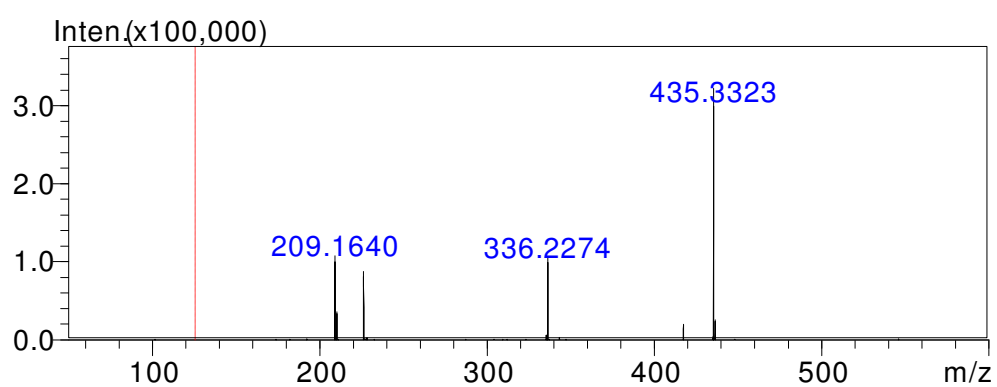
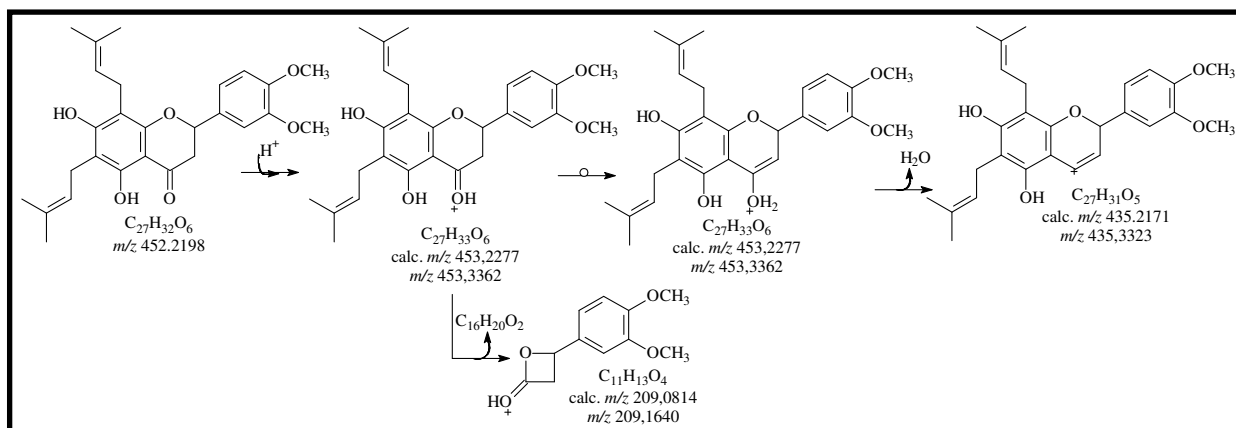


FIGURA 87. Espectro de massas (EM2 ion 453,3362).



ESQUEMA 24. Proposta de estrutura e fragmentação para íon M^+ : 453,3362D.

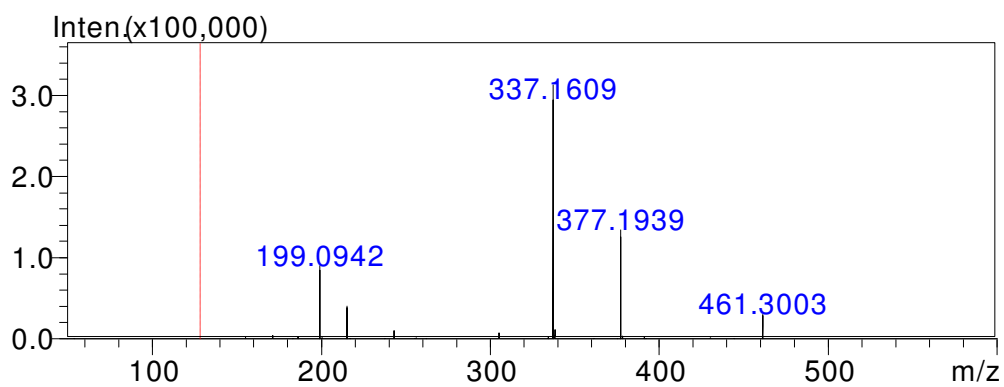
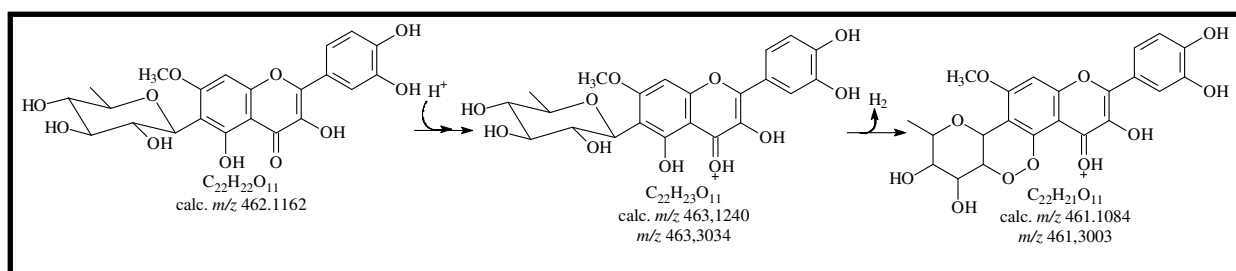


FIGURA 88. Espectro de massas (EM2 ion 463,3034).



ESQUEMA 25. Proposta de estrutura e fragmentação para íon M^+ : 463,3034D.

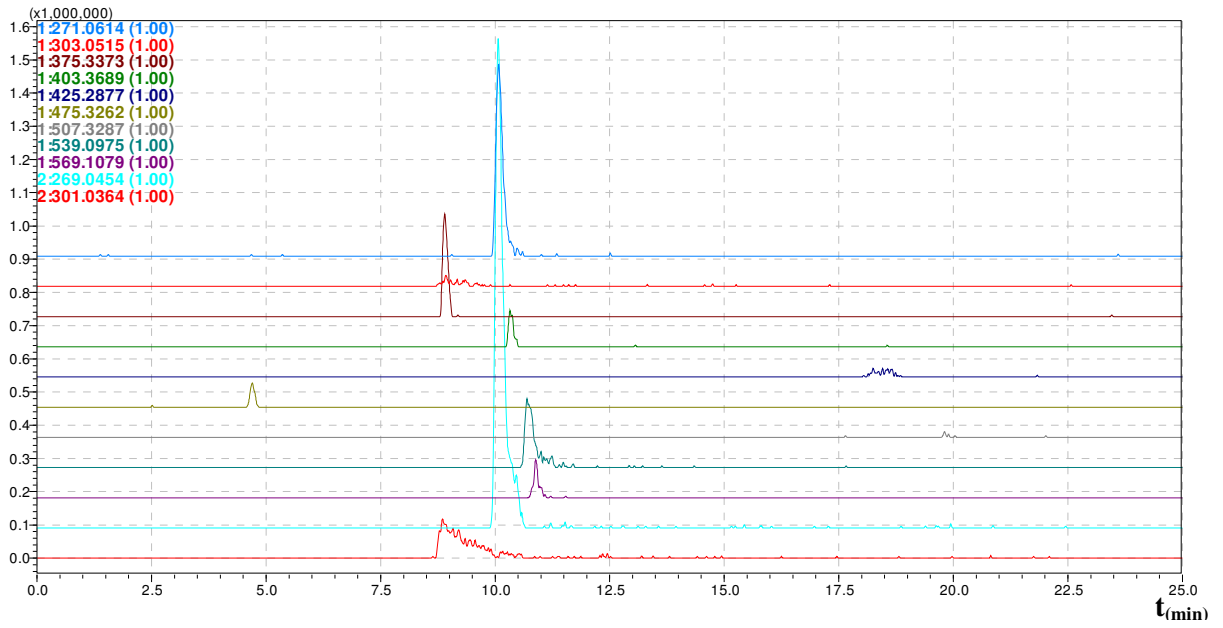


FIGURA 89. Cromatograma CLAE-EM da fração F-5.

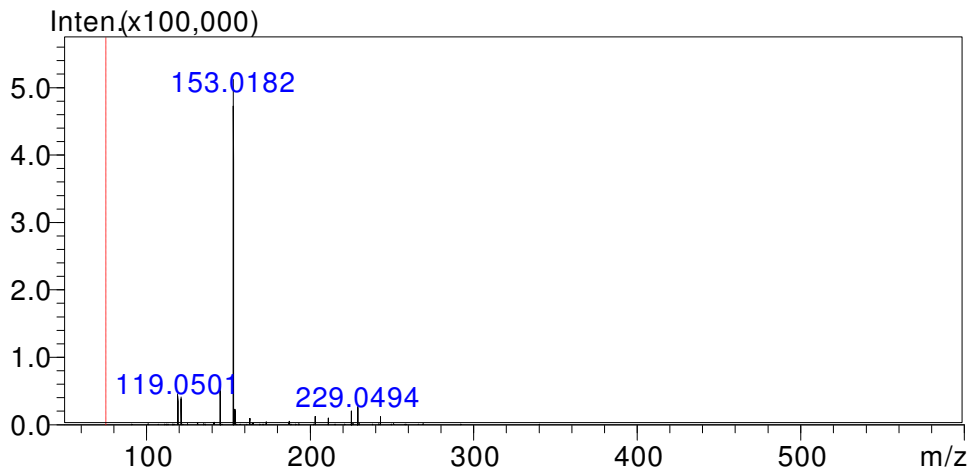
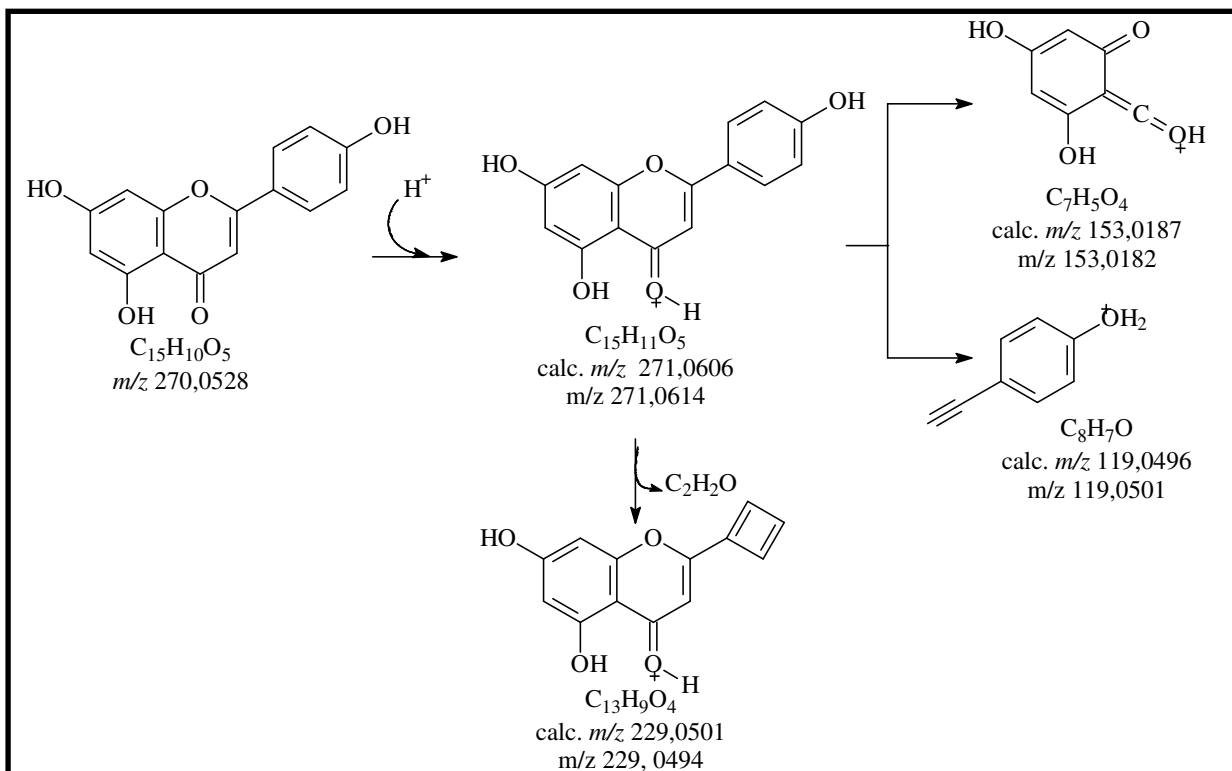


FIGURA 90. Espectro de massas (EM2 ion 271,0614).



ESQUEMA 26. Proposta de estrutura e fragmentação para íon M^+ 271,0614D

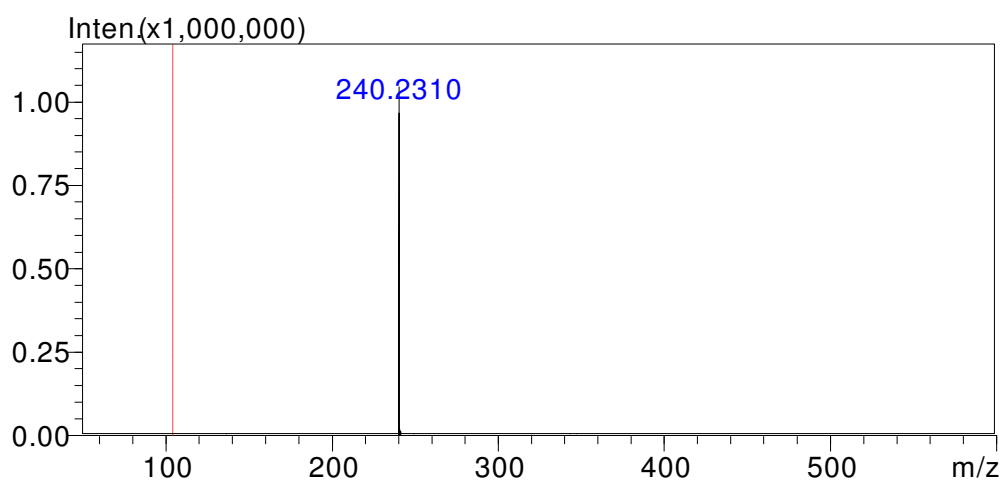
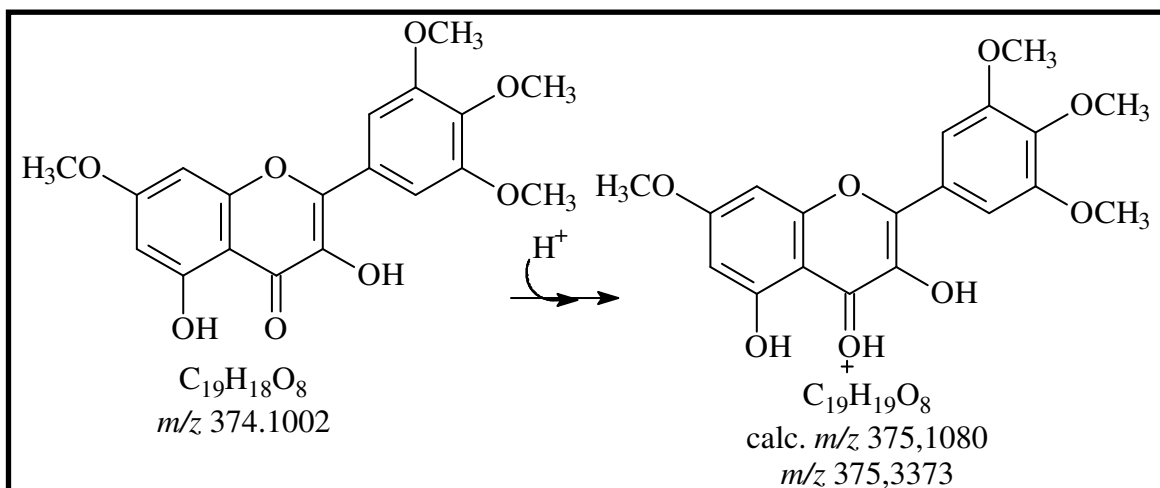


FIGURA 91. Espectro de massas (EM2 ion 375,3373).



ESQUEMA 27. Proposta de estrutura para íon M^+ 375,3373D.

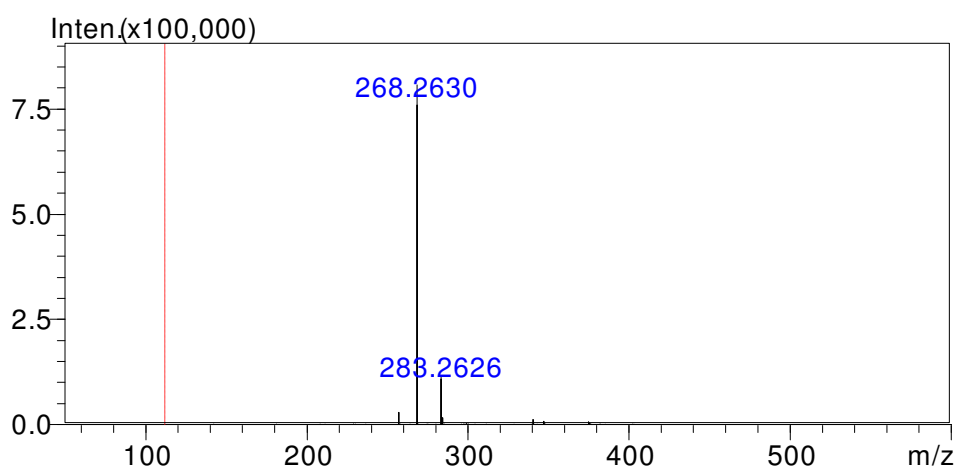
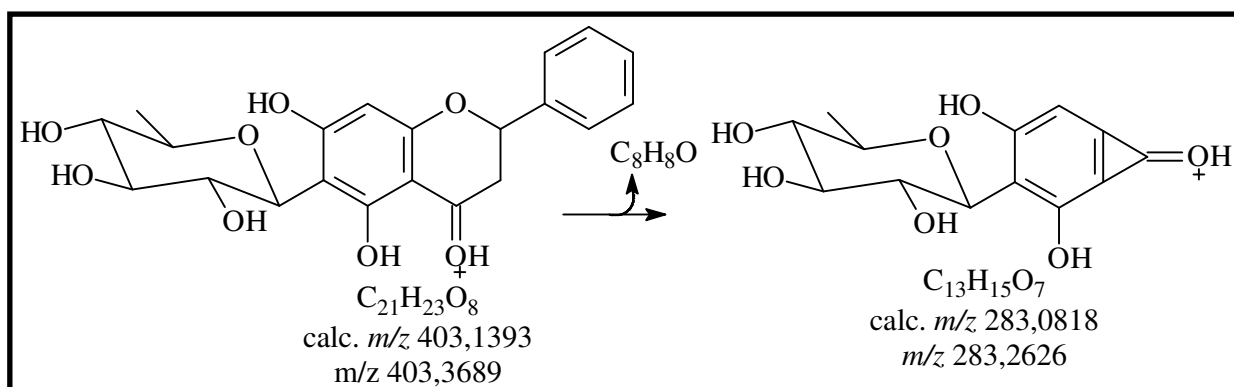


FIGURA 92. Espectro de massas (EM2 ion 403.3689).



ESQUEMA 28. Proposta de estrutura e fragmentação para íon M^+ 403,3689D.

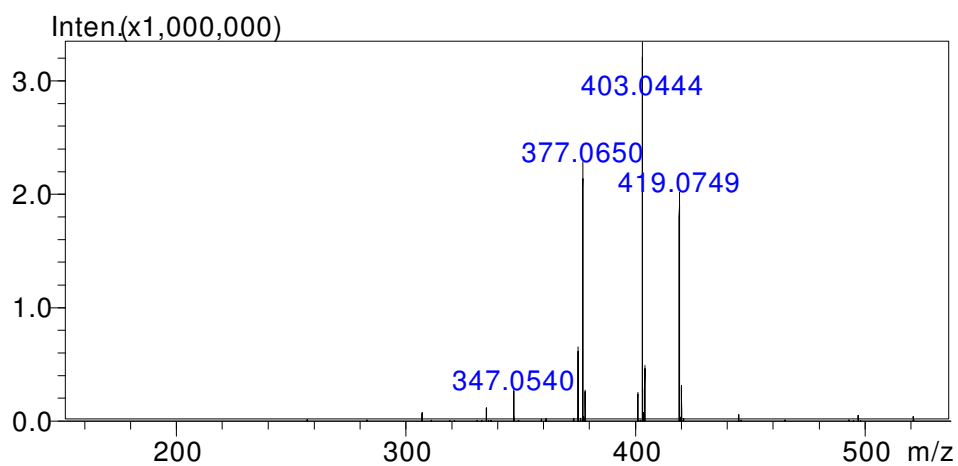
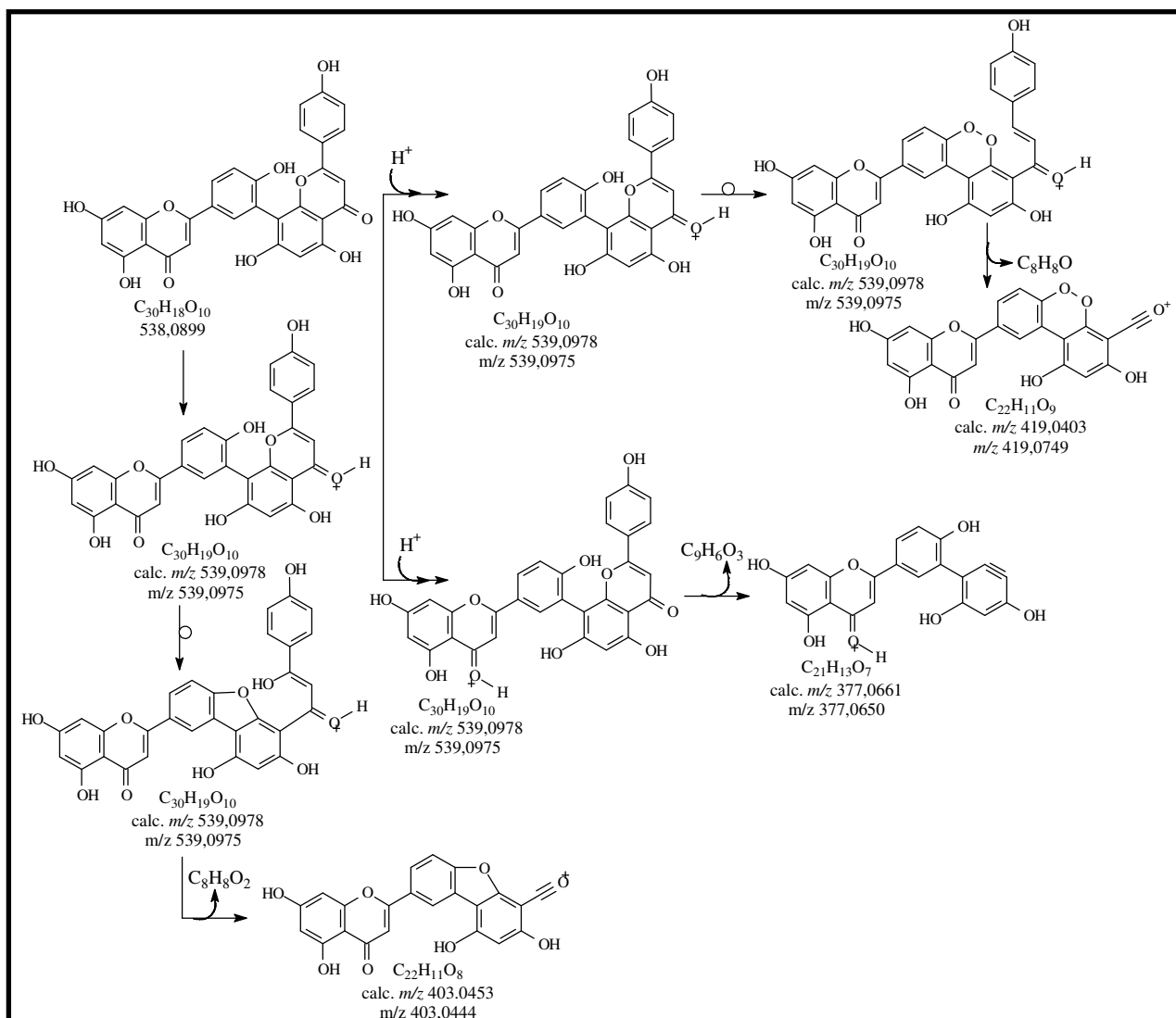


FIGURA 93. Espectro de massas (EM2 ion 539,0975).



ESQUEMA 29. Proposta de estrutura e fragmentação para íon M^+ 539,0975D

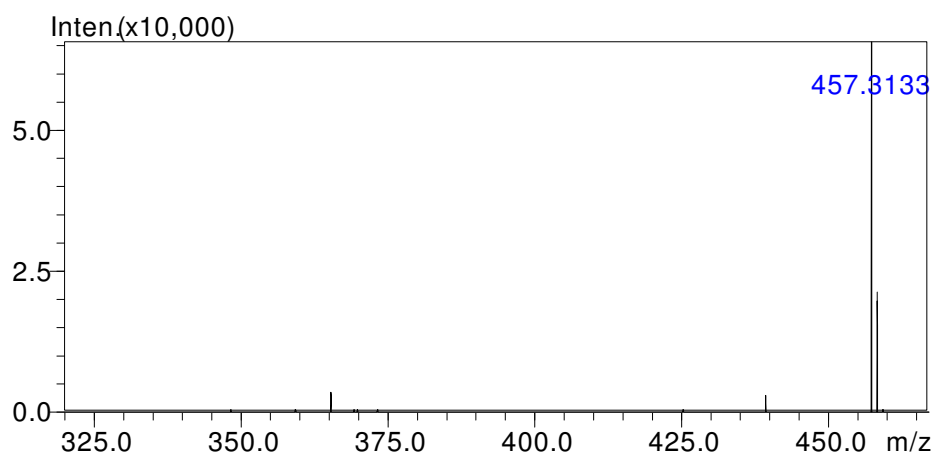
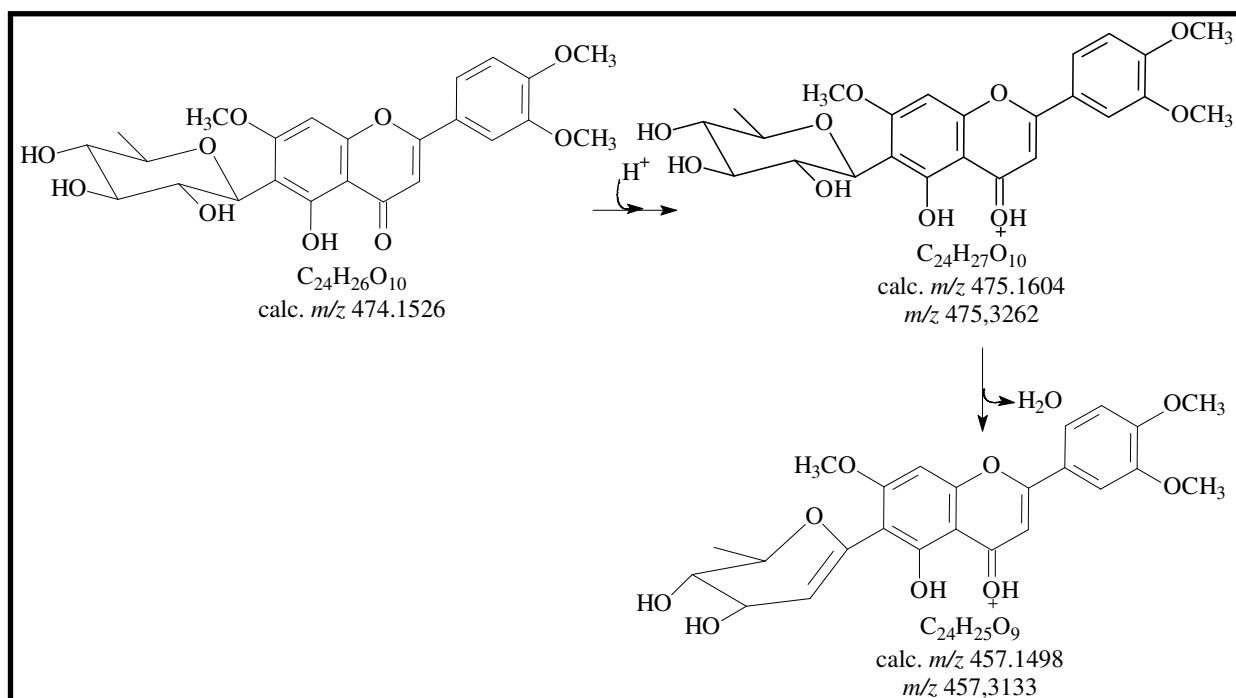


FIGURA 94. Espectro de massas (EM2 ion 475,3262).



ESQUEMA 30. Proposta de estrutura e fragmentação para íon M^+ 475,3262D

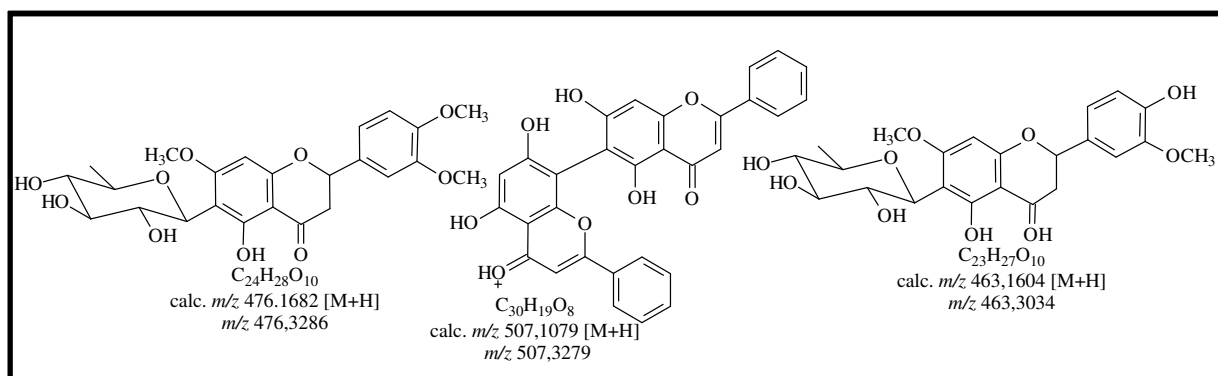
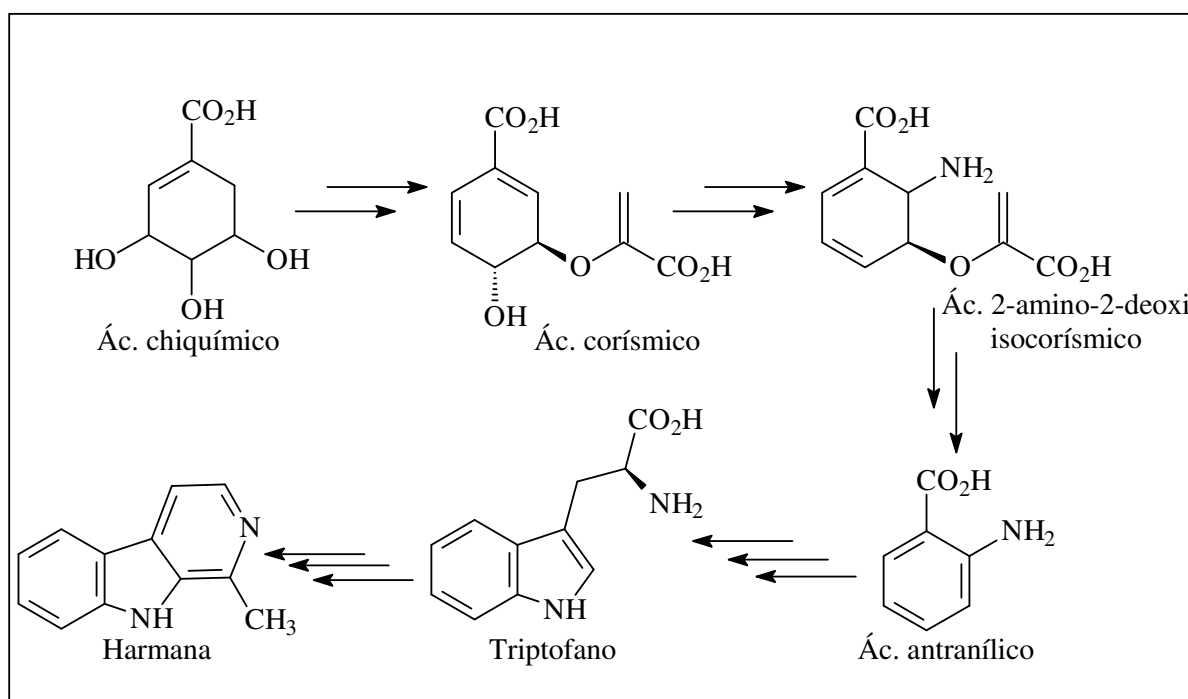


FIGURA 95. Algumas propostas estruturais de possíveis flavonóides para os íons detectados na análise das frações com CLAE-EM.

4.7. Alcalóide β -carbolínico

Os alcalóides β -carbolínicos são substâncias oriundas da via metabólica do chiquimato que utilizam como precursor o ácido antranílico. Este, após sucessivas etapas reacionais, gera o aminoácido triptofano que irá dar origem aos diversos alcalóides β -carbolínicos (Quadro 21) (DEWICK, 1998).

O triptofano é descarboxilado pela enzima triptofano-descarboxilase (TDC) formando a triptamina, atuando dessa forma, como um precursor de uma gama de alcalóides indólicos (SOUZA, 2008).

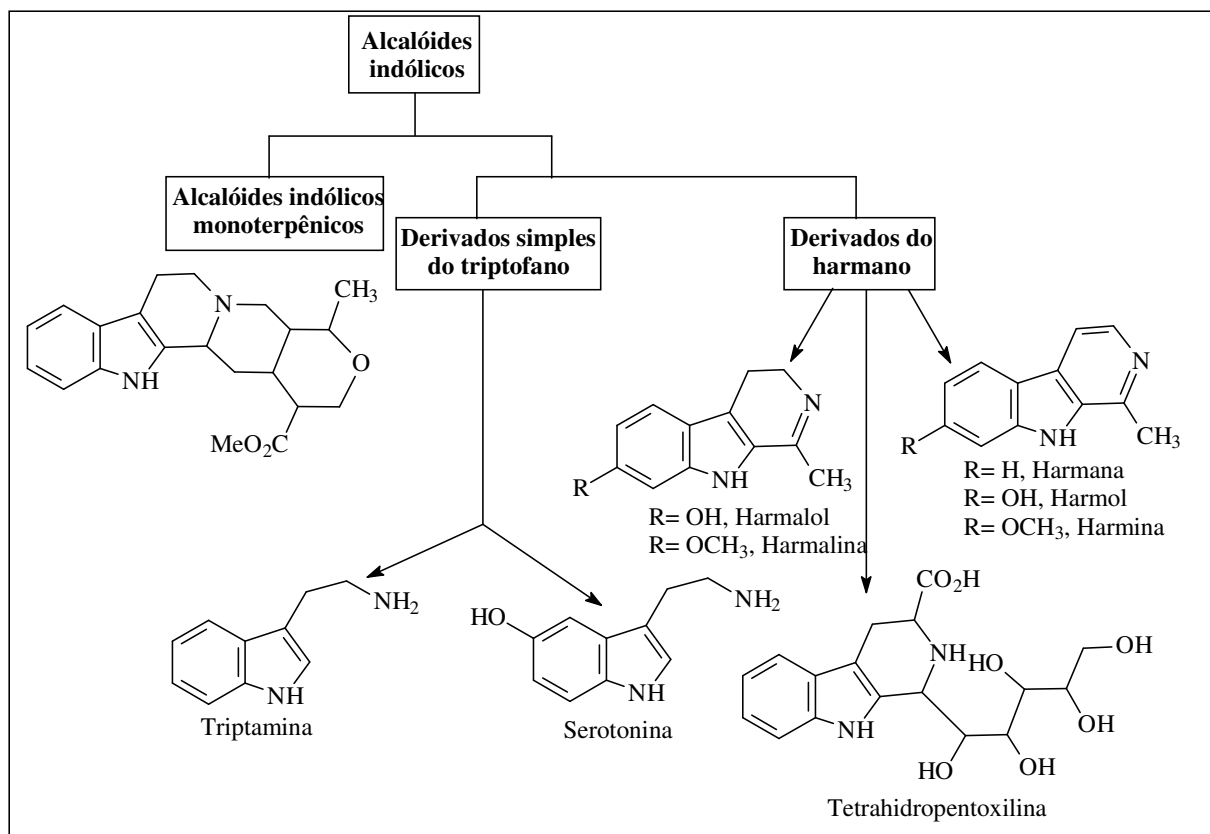


QUADRO 21. Proposta biossintética dos alcalóides indólicos (DEWICK, 1998).

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

Segundo GLENNON e colaboradores (2000) e MOURA e colaboradores (2006), os alcalóides β -carbolínicos simples podem ser divididos estruturalmente em três grupos, dependendo do grau de saturação do anel (Quadro 22, página 114):

- derivados aromáticos similares ao harmano, ou seja, aqueles com um anel piridínico (harmana, harmol, harmina);
- os dihidro ou derivados harmalano (harmalol, hamalina), e
- os derivados tetrahidro, como por exemplo, a tetraidropentoxilina.



QUADRO 22. Divisão estrutural dos alcalóides β -carbolínicos.

Esses alcalóides, β -carbolínicos, apresentam como característica principal a fluorescência de coloração azul intensa quando analisada por CCDA e submetida à radiação UV a 254 nm. Outra característica, porém, não seletiva, mas, que confirma a substância isolada como sendo um alcalóide é a utilização de reagente revelador Dragendorff para CCDA. Quando analisado por RMN de ^1H apresentam sinais na região de hidrogênios aromáticos entre δ_{H} 7,20-8,50 que diferenciam a multiplicidade de acordo com o padrão de substituição do anel benzênico. Outro sinal característico que o espectro apresenta para alcalóides β -carbolínicos simples é o atribuído à metila entre δ_{H} 2,40-2,80. Outro sinal característico, porém, a todos os alcalóides que não apresentam como aminas terciárias, é um sinal simples, pouco intenso em δ_{H} 9,00-9,80 atribuído ao hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio.

4.7.1. Harmana

O tratamento cromatográfico da fração **22-25** proveniente da fração em diclorometano de *S. eliezeriana* (Esquema 3, página 23), forneceu um sólido amarelo cristalino de P.f. 230-231 °C, solúvel em diclorometano e quando analisado por CCDA e submetido à radiação UV 254 nm e revelado com reagente de Dragendorff apresentou coloração azul florescente intensa e cor de laranja respectivamente. Esta substância foi identificada com o código **SEMD-09**.

O espectro de massas 70 eV (Figura 96, página 115), forneceu como íon molecular M^+ 182, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2$. As propostas de fragmentação estão ilustradas no esquema 31, página 115.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 97, página 116), exibiu sinais entre δ_{H} 7,20-8,40 característicos de hidrogênios ligados a anel aromático. O simpleto largo em δ_{H} 9,10 caracteriza a presença de uma ligação (N-H) do esqueleto indólico. O sinal simples e intenso

em δ_H 2,80, característicos dos hidrogênios do grupo metila ligado ao anel piridínico, confirma a proposta de estrutura do alcalóide harmana para a amostra. A atribuição dos sinais foi realizada de forma menos laboriosa ao se analisar o mapa de correlação homonuclear 1H - 1H COSY que mostrou os acoplamentos entre os sinais (Figura 98, página 116).

O espectro de RMN de ^{13}C -APT da amostra (Figura 99, página 117), sustenta a proposta de estrutura com sinais de carbonos metílicos e metínicos em fase negativa e metilênicos e não hidrogenados em fase positiva, apresentando doze sinais. O sinal em δ_{CH_3} 20,0 foi atribuído à metila ligada ao anel piridínico. Os seis sinais na região de δ_{CH} 112,0-138,0 em fase negativa foram atribuídos aos carbonos metínicos, sendo os sinais em δ_{CH} 138,0 e 112,0 atribuídos aos carbonos do anel piridínico. Os demais sinais foram assinalados para os carbonos do anel indólico. Os sinais em fase positiva situados entre δ_C 122,0 a 142,0 foram assinalados para os carbonos não hidrogenados.

A análise do conjunto de dados comparados com a literatura conduziu à identificação da substância **SEMD-09** como o alcalóide harmana sendo este marcador quimiotaxonômico encontrado nas espécies estudadas do gênero e em grandes quantidades (BASTOS, *et. al.*, 2002).

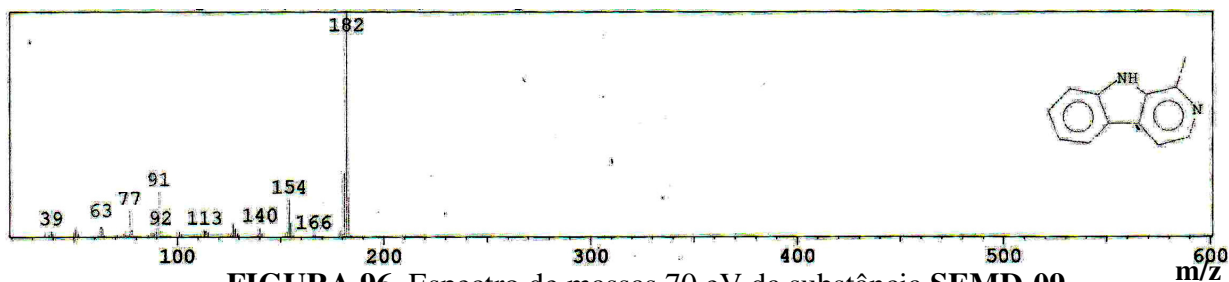
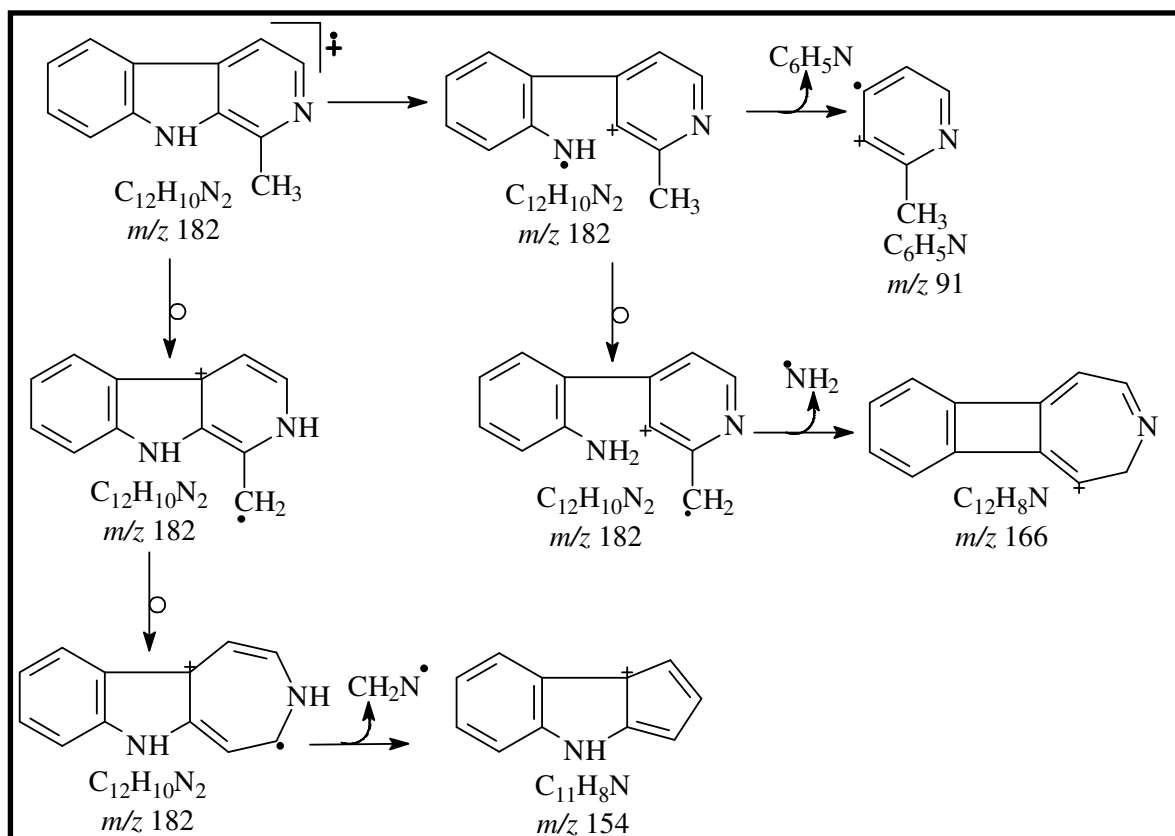


FIGURA 96. Espectro de massas 70 eV da substância SEMD-09.



ESQUEMA 31. Proposta de estrutura para a substância SEMD-09.

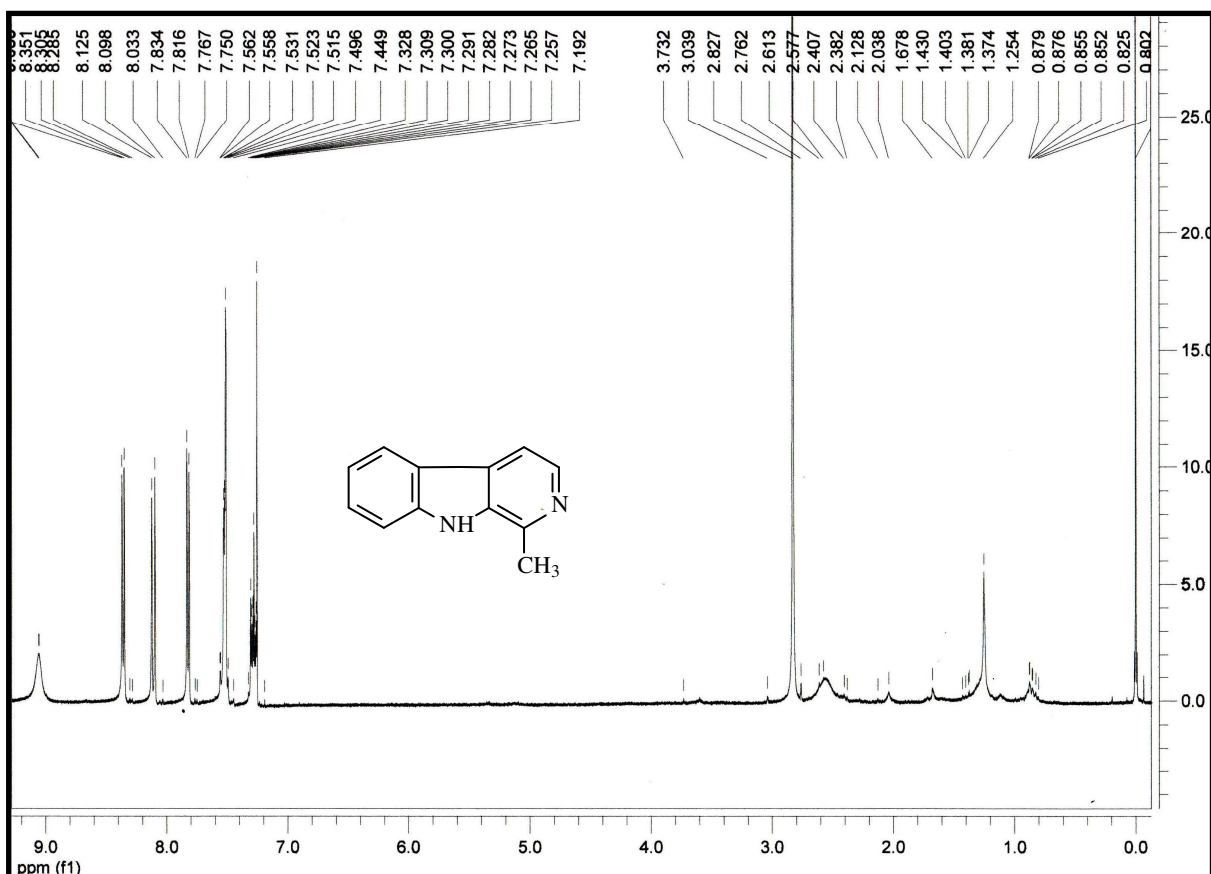


FIGURA 97. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância SEMD-09.

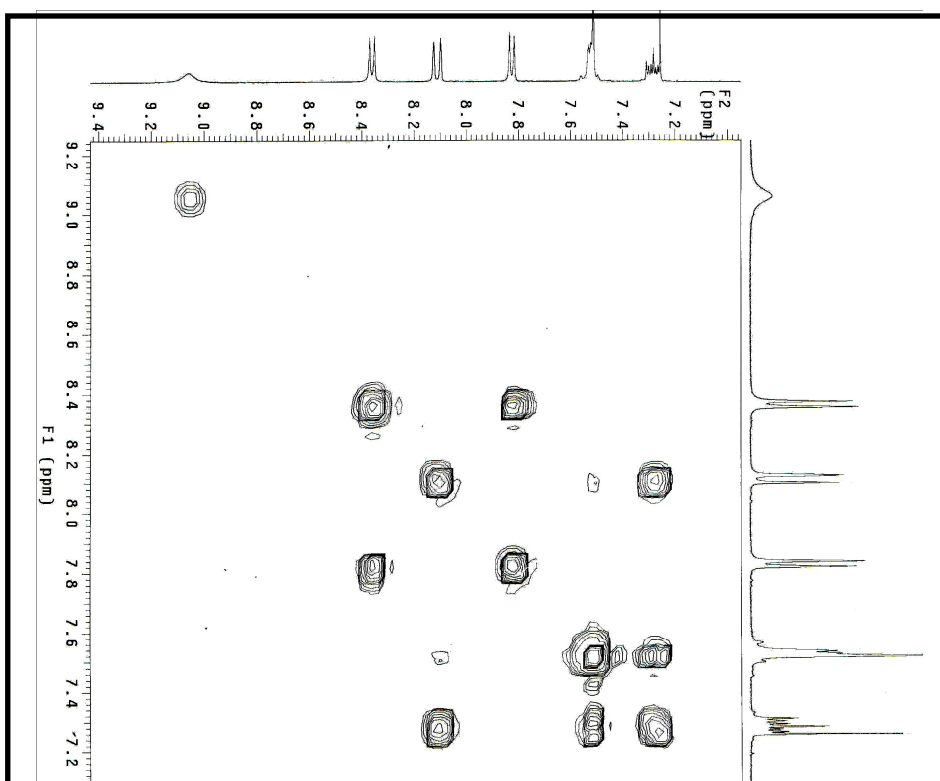


FIGURA 98. Espectro de RMN ^1H - ^1H COSY (400 MHz, CDCl_3) da substância SEMD-09.

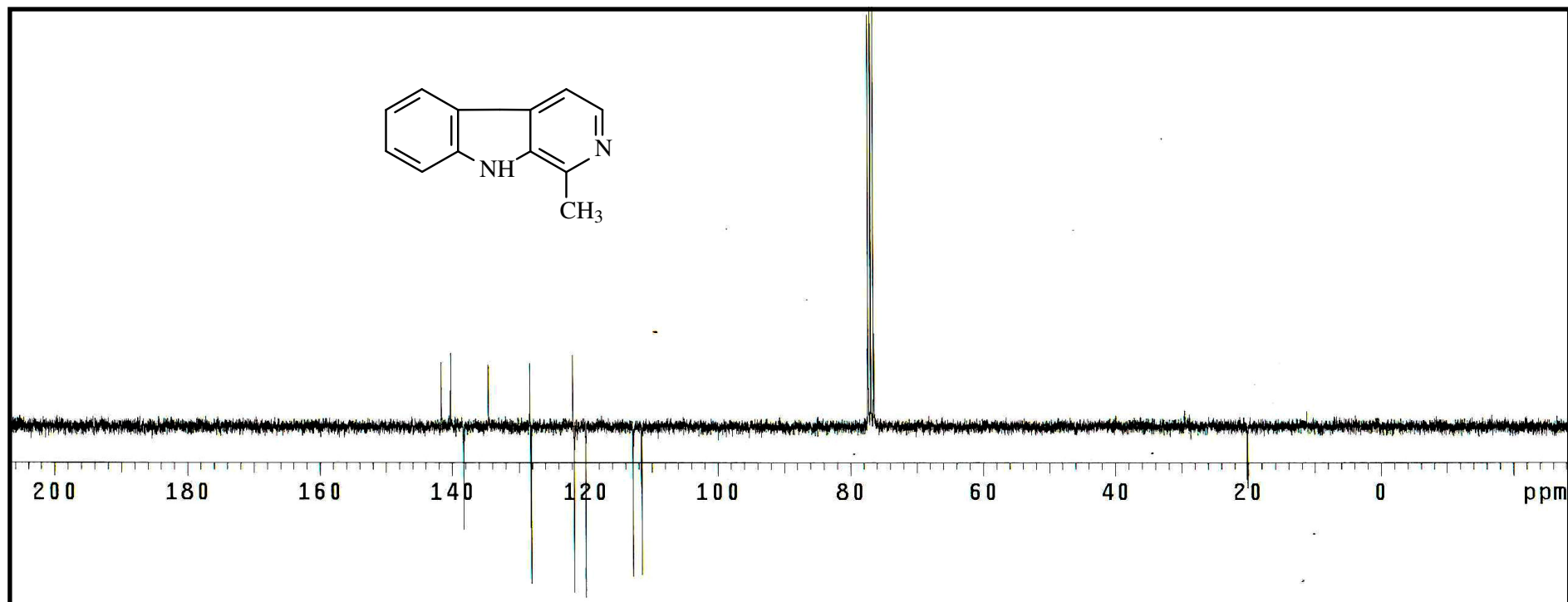
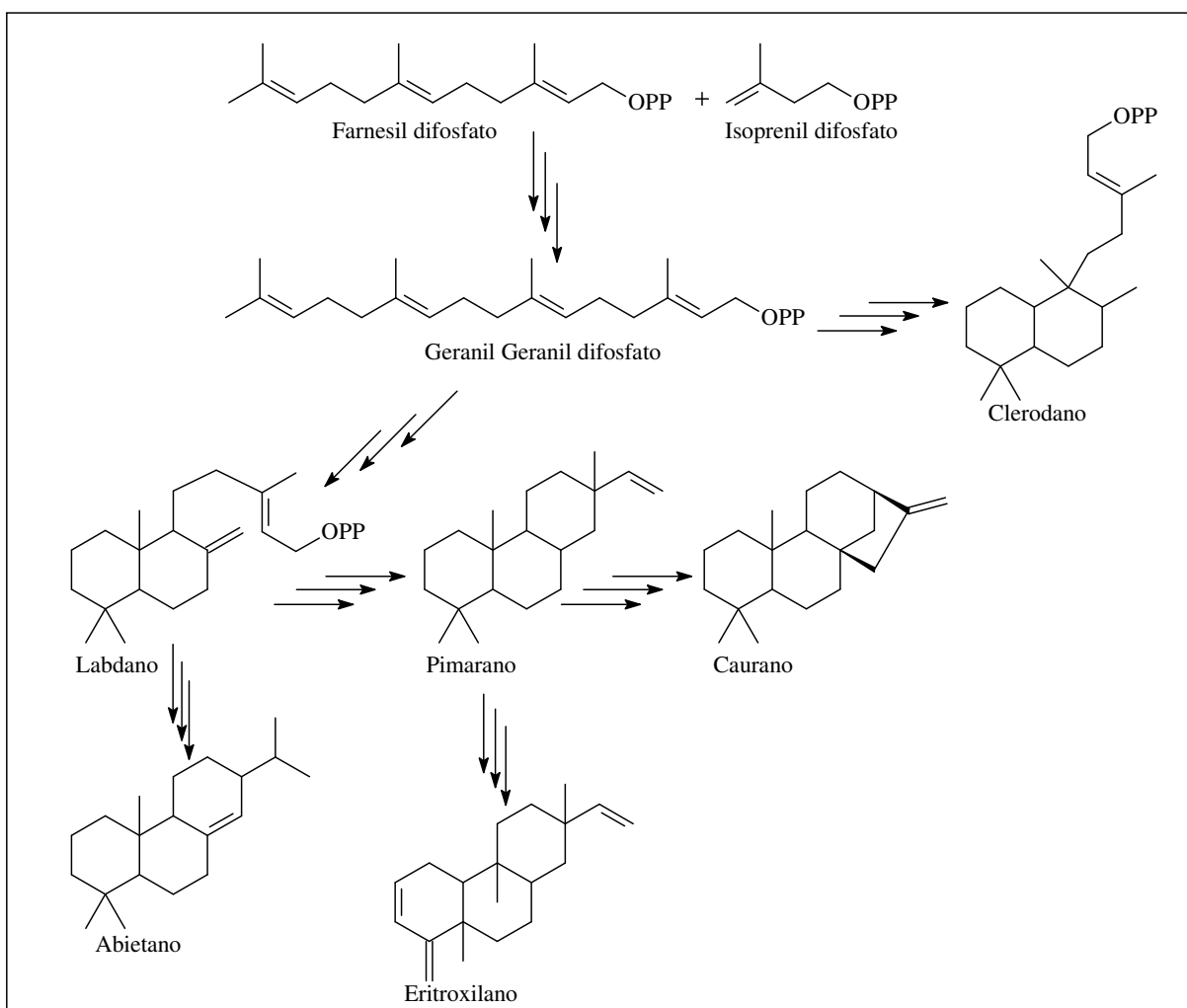


FIGURA 99. Espectro de RMN de ¹³C-APT (100 MHz, CDCl₃) da substância **SEMD-09**.

4.8. Diterpenos

É uma classe de terpenos de grupos amplamente variados que são formados pela fusão de quatro grupos isoprenos. Devido às elevadas temperaturas de ebulição, não são considerados óleos essenciais. Em vez disso, são classicamente considerados como resinas. São formados através da reação de substituição nucleofílica unimolecular seguida de eliminação de próton entre uma unidade de farnesil difosfato e isoprenil difosfato. Esta reação gera o geranyl geraniol difosfato que é um precursor para a síntese das diversas classes de diterpenos como os (labdanos, clerodanos, abietanos, pimaranos, cauranos e eritroxilanos), existentes em organismos vegetais e marinhos. A formação destes são mediante formação de carbocátion do geranyl geraniol seguido de diversos rearranjos de Wagner-Meerwein (Quadro 23).

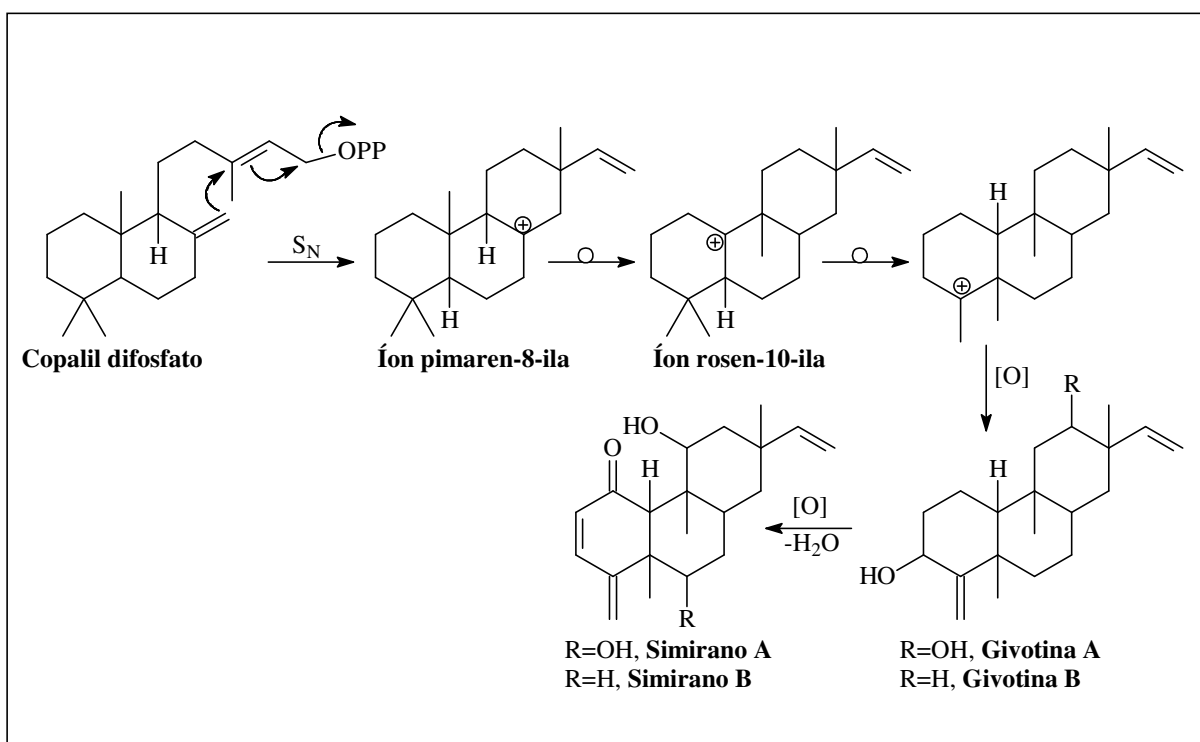


QUADRO 23. Proposta biossintética dos diterpenos (DEWICK, 1998).

4.8.1. Diterpenos eritroxilenos

A proposta de biogênese de substâncias desta classe encontrada na literatura utiliza como precursor o íon pimaren-1-ila, um cátion proveniente do esqueleto pimarano, que sofre uma série de rearranjos de Wagner- Meerwein até chegar às estruturas destes diterpenos (Quadro 24). Trata-se de uma classe pouco conhecida apresentando poucas substâncias relatadas na literatura (GRACE, *et al.*, 2006; KREBS, *et al.*, 2004; NAGAHAMA & TAJIMA, 1996).

A identificação estrutural destas substâncias por RMN de ^1H apresenta como sinais característicos um sistema vinílico, dois sinais referentes aos hidrogênios vicinais ligados ao carbono ($\text{CH}_2\text{-18}$), que é sp^2 , além da presença de apenas três simpletos referentes aos grupos metila.



QUADRO 24. Proposta biossintética dos diterpenos eritroxilenos (GRACE, *et al.*, 2006; KREBS, *et al.*, 2004; NAGAHAMA & TAJIMA, 1996)

4.8.2. 11β -hidroxi-2,4(18), 15-eritroxilatrien-1-ona

O procedimento cromatográfico clássico para isolamento e purificação de metabólitos especiais em que foi submetido à fração **C2** (0,070 g) da fração em diclorometano da madeira de *S. eliezeriana*, conduziu ao isolamento 25 mg de um óleo amarelo solúvel em CH_2Cl_2 que foi atribuído o código **SEMD-07** Esquema 2, página 22.

O espectro na região do IV do material (Figura 100, página 122) exibiu bandas que foram atribuídas a estiramento de grupos metilênicos ν_{CH_2} 2923 cm^{-1} e metínicos ν_{CH} 2854 cm^{-1} , além de uma banda intensa atribuída a grupo hidroxila em ν_{OH} 3446 cm^{-1} . A banda larga e intensa em $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ 1641 cm^{-1} foi atribuída ao grupo carbonila α,β -insaturado. O perfil desta sugere a sobreposição da banda que justifica a presença de ligações duplas na substância. A banda em ν_{CH_3} 1463 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento simétrico de grupo metila.

A análise por CG-EM apresentou um cromatograma com um sinal intenso juntamente com pequenas impurezas (Figura 101, página 122). O espectro de massas 70 eV (Figura 102, página 123) referente a este sinal exibiu como íon molecular M^+ 300 D, compatível com a fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_2$.

O espectro de RMN de 1H (Figura 103, página 123) exibiu sinais característicos de diterpenos da classe eritroxileno com três simpletos em δ_H 1,04 (3H-17); 1,13 (3H-20) e 1,21 (3H-19) atribuídos aos hidrogênios dos grupos metila. Os sinais dos hidrogênios do sistema vinílico da cadeia lateral em δ_H 5,78 (H-15; *dd*, 17,4; 10,4 Hz); 4,94 (H-16b; *d*, 17,4 Hz) e 4,87 (H-16a; *d*, 10,4 Hz) e os dois simpletos largos em δ_H 5,29 (H-18b) e 5,28 (H-18a) caracterizam o esqueleto eritroxileno (KREBS, *et al.*, 2004; NAGAHAMA & TAJIMA, 1996). O tripleto em δ_H 3,49 (*t*, 7,6 Hz) foi atribuído a um hidrogênio ligado a carbono carbinólico. A presença de outra insaturação na molécula foi determinada pela presença dos sinais em δ_H 6,95 (*d*, 10 Hz) e 5,95 (*d*, 10 Hz). A presença do sinal simples em δ_H 2,58 sugere a presença de um hidrogênio ligado a um carbono adjacente a uma carbonila.

O mapa de correlação homonuclear 1H - 1H COSY auxiliou na identificação dos acoplamentos entre os hidrogênios que confirmam os sinais do esqueleto eritroxileno (Figura 104, página 124).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 105, página 125) apresentou vinte sinais justificando a proposta de um diterpeno. A classe da substância como eritroxileno foi confirmada pela presença dos sinais de três grupos metila em δ_{CH_3} 9,04 (CH₃-20); 23,93 (CH₃-17) e 24,68 (CH₃-19). O sistema vinílico da cadeia lateral com sinais em δ_{CH} 149,93 (CH-15) e δ_{CH_2} 109,28 (CH₂-16); além dos carbonos vinílicos em δ_{CH_2} 117,50 (CH₂-18) e δ_C 154,57 (C-4). O sinal em δ_C 205,84 indica a presença de um carbono carbonílico que sustenta a presença do sinal em δ_{CH} 64,61 atribuído a carbono α -carbonila (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000). A presença de um carbono carbinólico foi confirmada pelo sinal em δ_{CH} 76,66. O sistema carbonílico α,β -insaturado foi confirmado pela presença dos sinais em δ_{CH} 128,05 e 149,93.

A atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos na substância foi estabelecida através da análise do mapa de correlação heteronuclear a uma ligação HMQC (Figura 106, página 126). Os pontos de ligação na substância foram estabelecidos de forma inequívoca após análise do mapa de correlação heteronuclear a duas e três ligações HMBC (Figuras 107 e 108, páginas 126 e 127) que possibilitou a identificar da posição da carbonila α,β -insaturada em C-1, a insaturação entre CH-2 e CH-3 conjugada com C-4 e CH₂-18 e o carbono carbinólico em CH-11. As demais correlações estão assinaladas na Tabela 6, página 121.

Outra análise que sustenta a proposta molecular foi o resultado obtido no espectro de massas de alta resolução HRMS-ESI (Figura 109, página 127) que exibiu como íon molecular $M+Na$ 323,1947 (calc. 323,1987), apresentando erro sistemático de $\Delta = 4$ ppm. Este resultado aponta para fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_2$ compatível com o que está sendo sugerido. As propostas de fragmentação estão ilustradas no Esquema 32, página 128.

A configuração relativa dos carbonos quirais foi estabelecida após análise do espectro de NOEDIFF (Figura 110, página 129). Ao irradiar nos hidrogênios do grupo metila 3H-19 foi observado NOE em 3H-20, H-12b. Também foi observado NOE em 3H-19, H-12b ao irradiar nos hidrogênios do grupo metila 3H-20. As demais interações estão ilustradas na Tabela 6, página 121. Esta análise sugere a configuração relativa com o grupo hidroxila em conformação beta (β) Figura 111, página 129.

O conjunto de dados analisado juntamente com comparação de modelos análogos na literatura conduziu, inicialmente, à determinação estrutural do diterpeno da classe eritroxileno, inédito na literatura, como *rel*-11 β -hidroxi-2,4(18),15-eritroxilatrien-1-ona ou rael (5R,8R,9R,10S,11S,13S)-11 β -hidroxi-2,4(18),15-eritroxilatrien-1-ona, denominado como

Simirano B. Para elucidar a estrutura, decidiu-se definir sua estereoquímica absoluta através da análise das propriedades quiróticas, que será discutido no **item 4.9** (página 139), deste diterpeno e do **simirano A**, discutido a seguir.

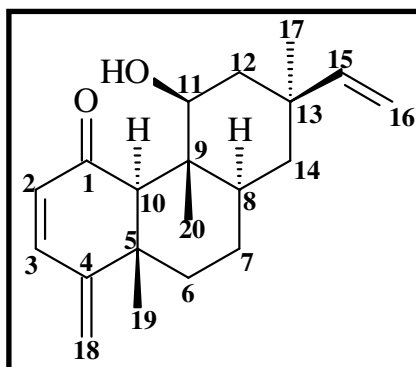


TABELA 6. Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz) e de ^1H (400 MHz) do diterpeno **Simirano B** em CDCl_3 . Deslocamentos químicos em ppm.

C	HSQC		HMBC		NOEDIFF
	δ_c	δ_H (J em Hz)	$^2J_{(H \rightarrow C)}$	$^3J_{(H \rightarrow C)}$	
C					-
1	205,85	-	-	-	-
4	154,57	-	-	-	-
5	43,34	-	-	-	-
9	43,55	-	-	-	-
13	39,07	-	-	-	-
CH					
2	128,05	5,95 (<i>d</i> , 10)	-	4	-
3	145,59	6,95 (<i>d</i> , 10)	-	1, 5, 18	-
8	41,12	1,88 (<i>m</i>)	-	-	-
10	64,61	2,58 (<i>s</i>)	1, 9	19, 20	-
11	76,66	3,49 (<i>t</i> , 7.6)	-	10, 20	H-10, 3H-17
15	149,93	5,79 (<i>dd</i> , 17,2; 10,8)	-	-	-
CH₂					
6	37,92	1,38; 1,41	7	8	-
7	24,71	1,20-1,00 (<i>m</i>)	-	-	-
12	41,48	1,54 (<i>d</i> , 7,6)	11	9, 14, 17	-
14	36,45	1,41 (<i>t</i> , 12,3)	-	-	-
16	109,28	4,90 (<i>d</i> , 17,2); 4,85 (<i>d</i> , 10,8)	-	13	-
18	117,50	5,29 (<i>s</i>); 5,28 (<i>s</i>)	-	-	-
CH₃					
17	23,93	1,03 (<i>s</i>)	13	14, 15	H-8, H-12a, H-11
19	24,68	1,21 (<i>s</i>)	5	4, 6, 10	3H-20
20	9,04	1,13 (<i>s</i>)	9	8, 10, 11	3H-19, H-12b

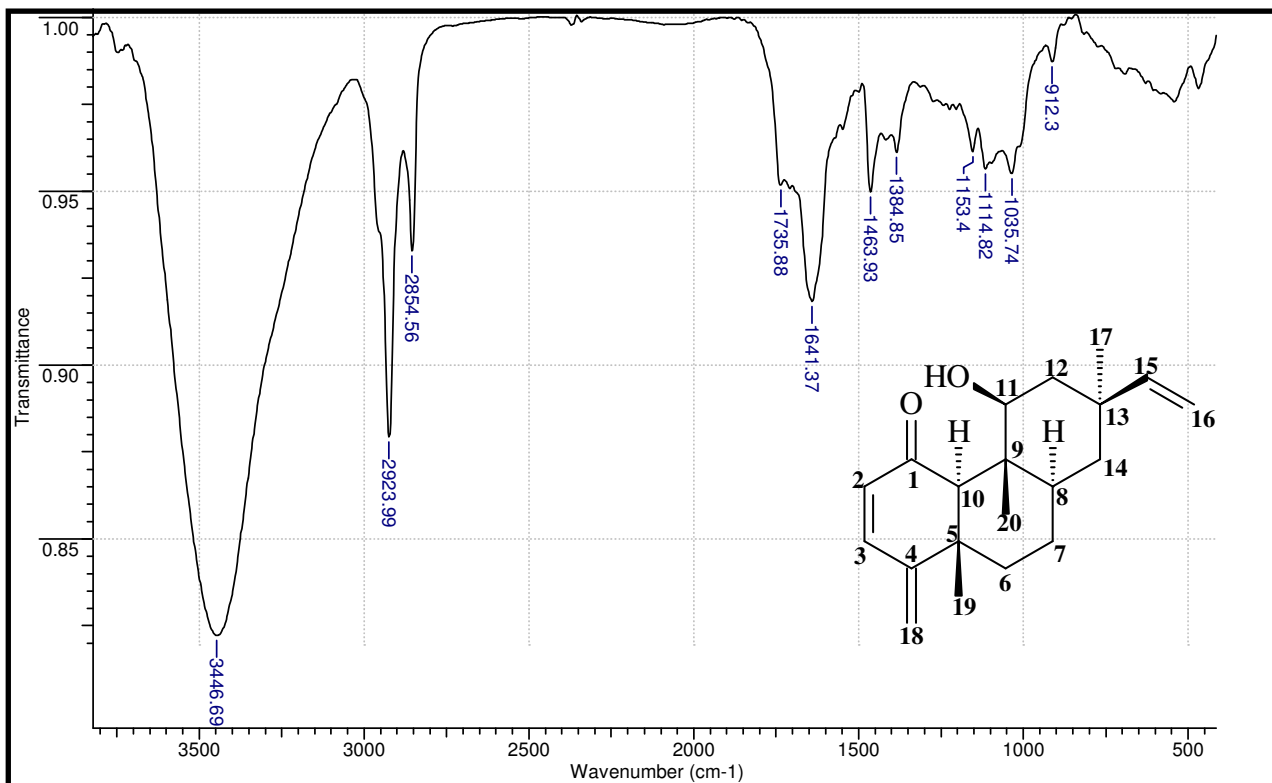


FIGURA 100. Espectro na região do infravermelho da substância SEMD-07.

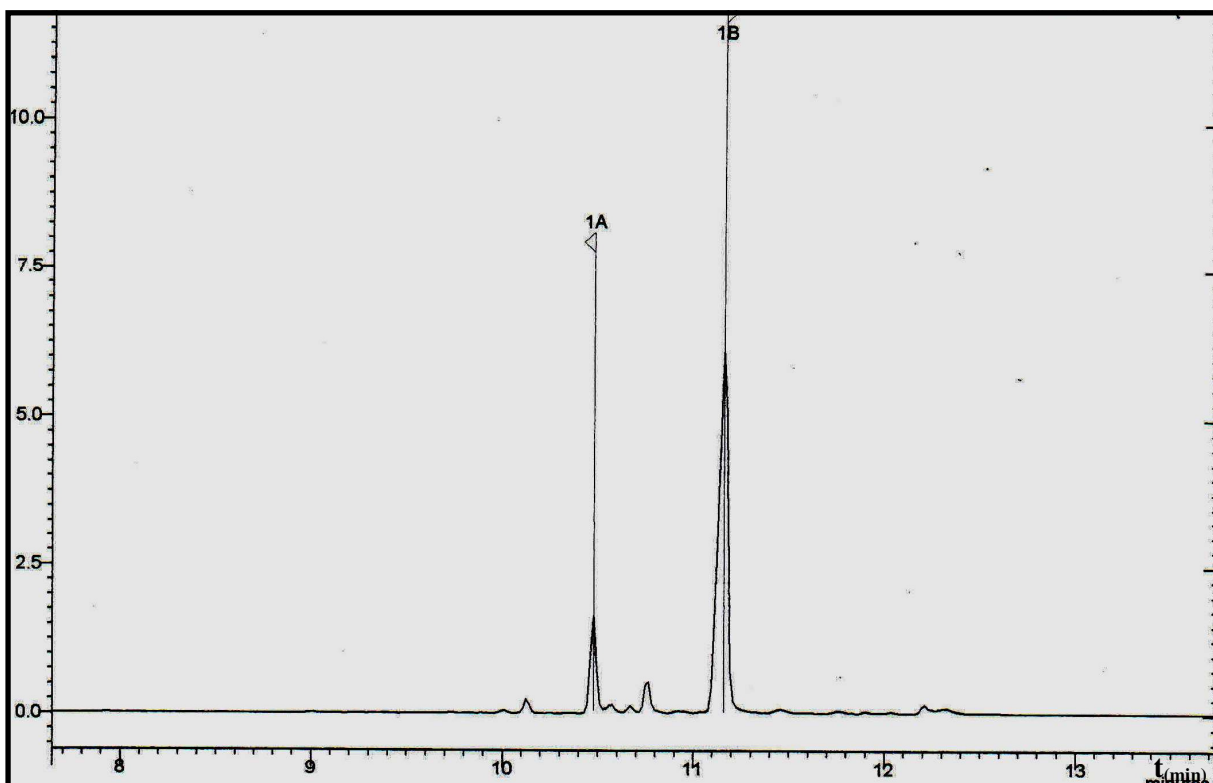


FIGURA 101. Cromatograma CG da substância SEMD-07.

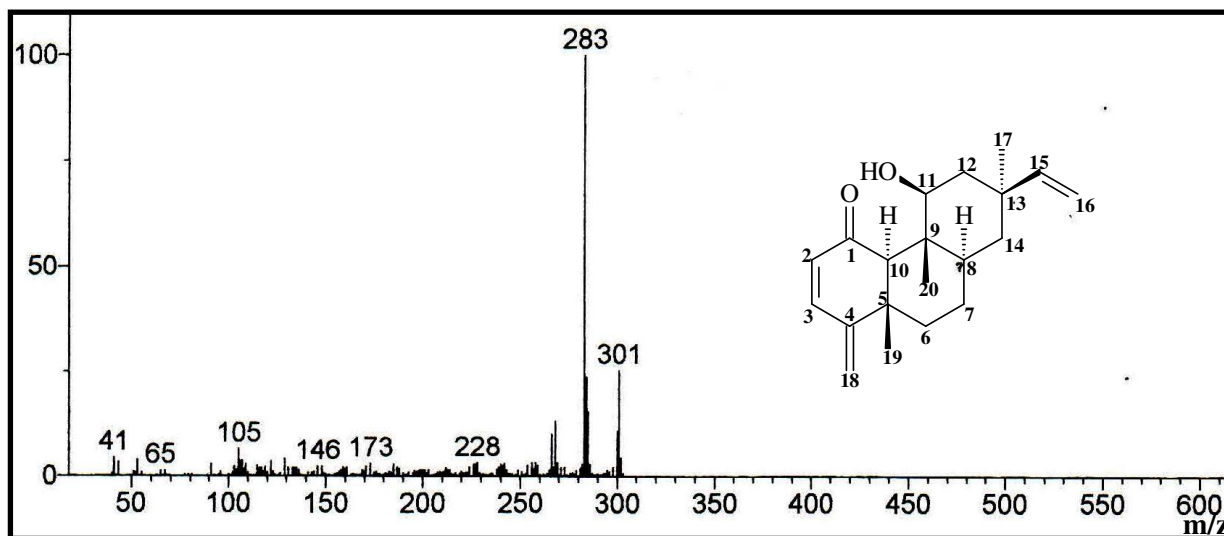


FIGURA 102. Espectro de massas 70 eV da substância SEMD-07.

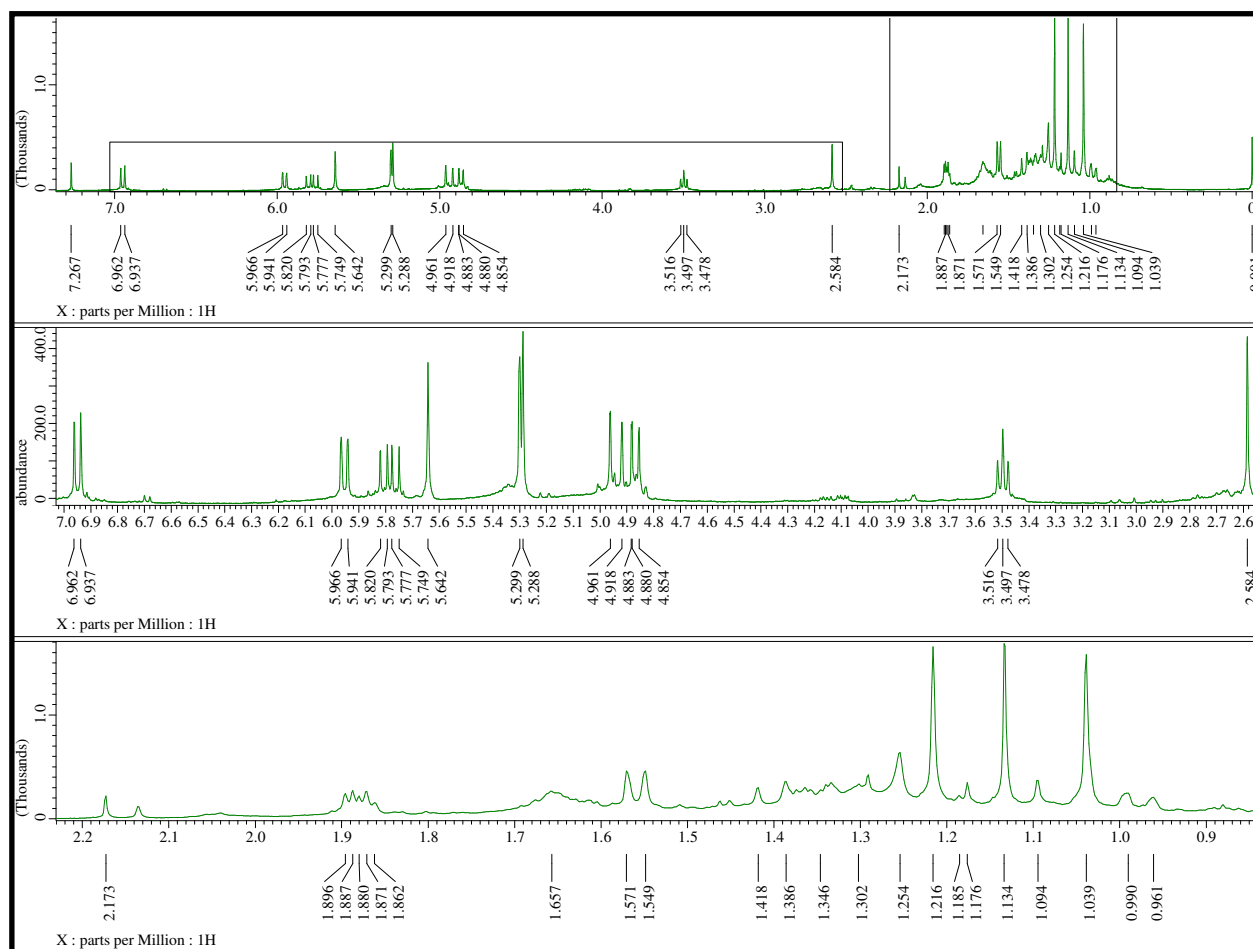


FIGURA 103. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) e ampliações da substância SEMD-07.

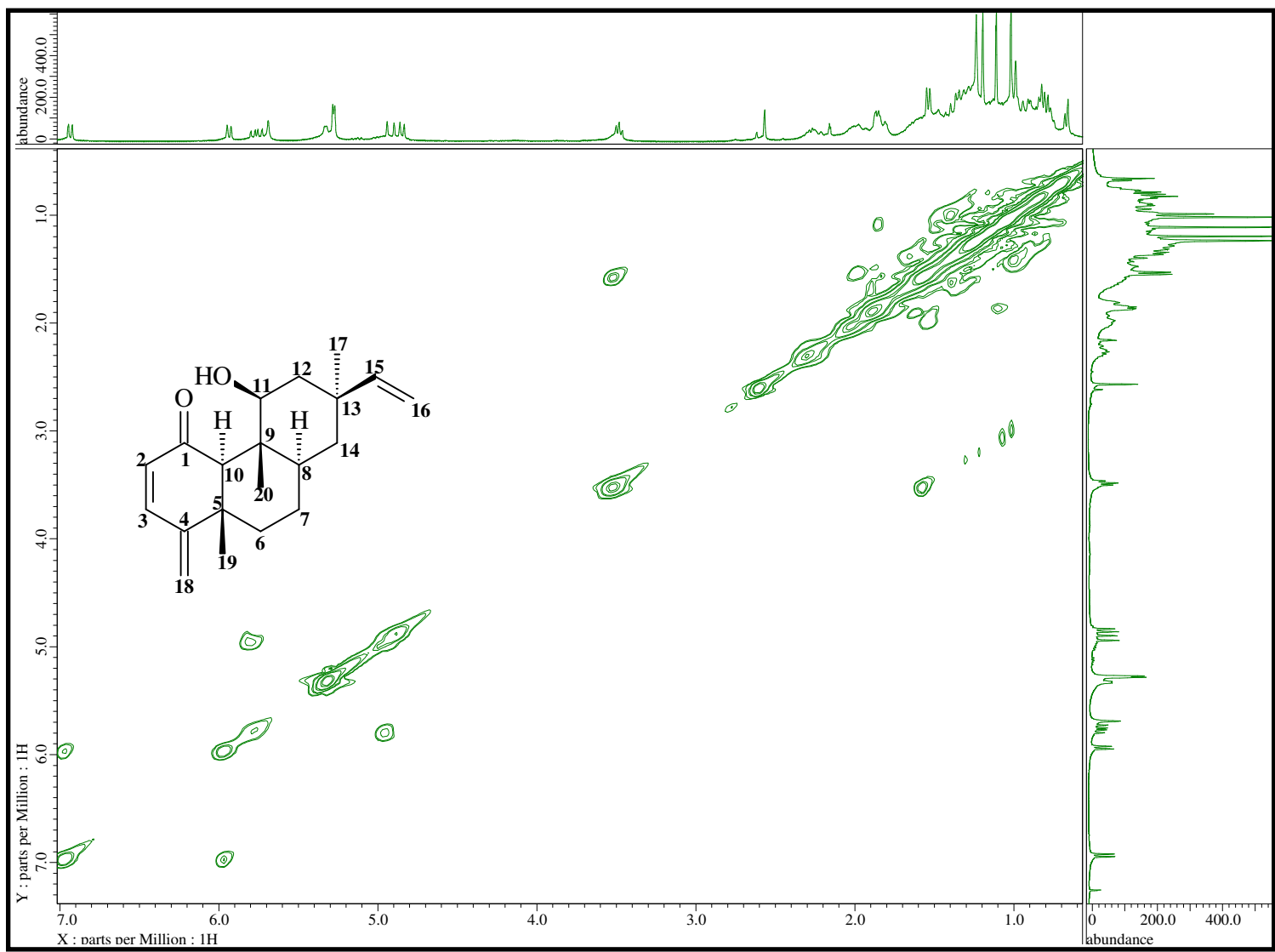


FIGURA 104. Espectro de RMN ^1H - ^1H COSY da substância SEMD-07.

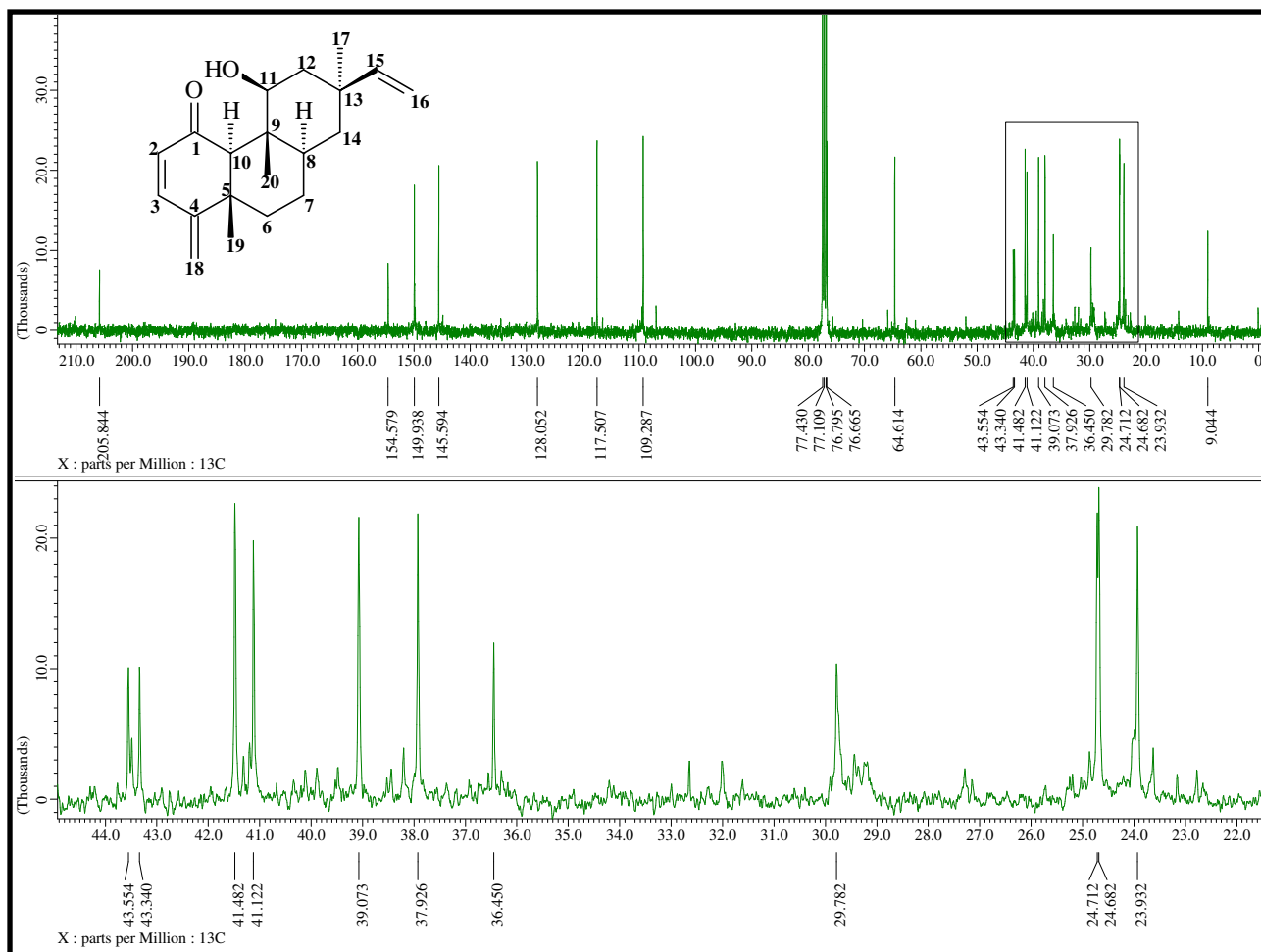


FIGURA 105. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) e ampliações da substância **SEMD-07**.

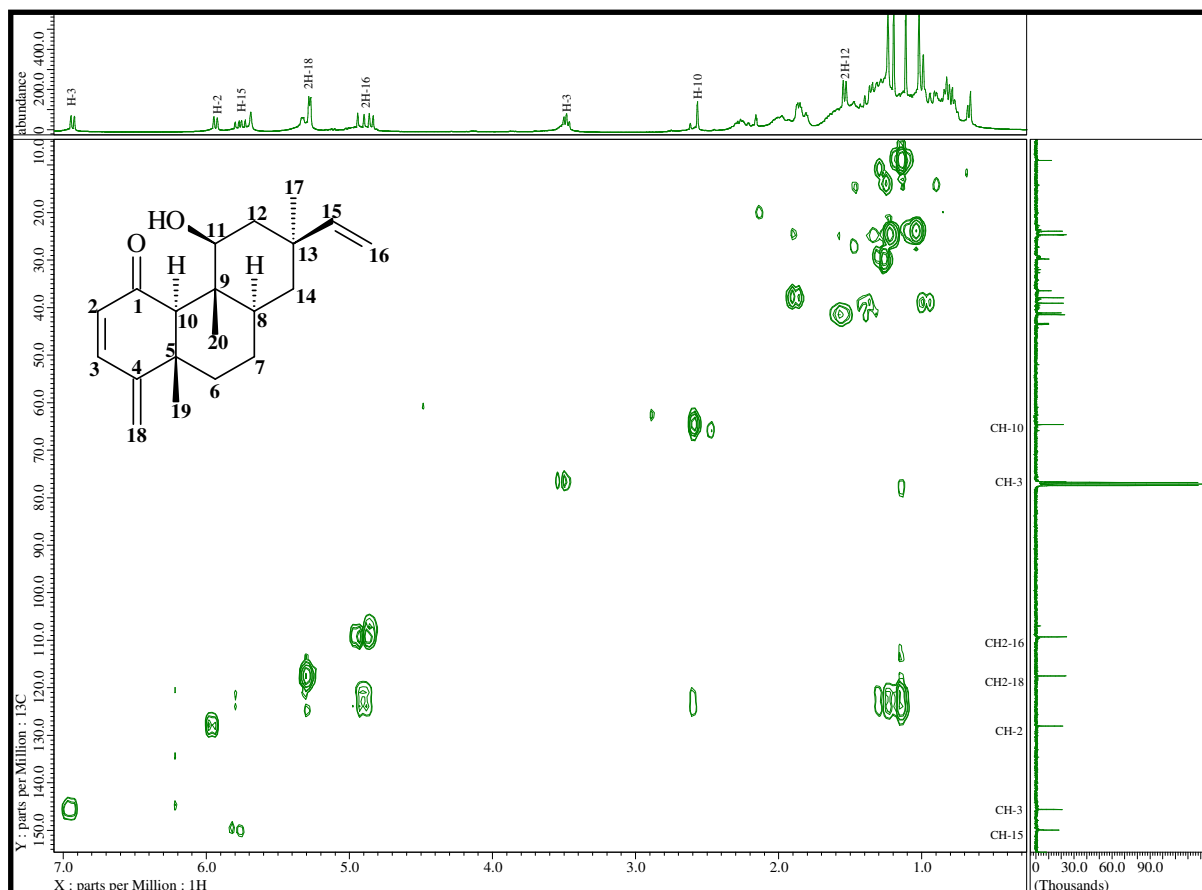


FIGURA 106. Espectro de RMN HMQC da substância SEMD-07.

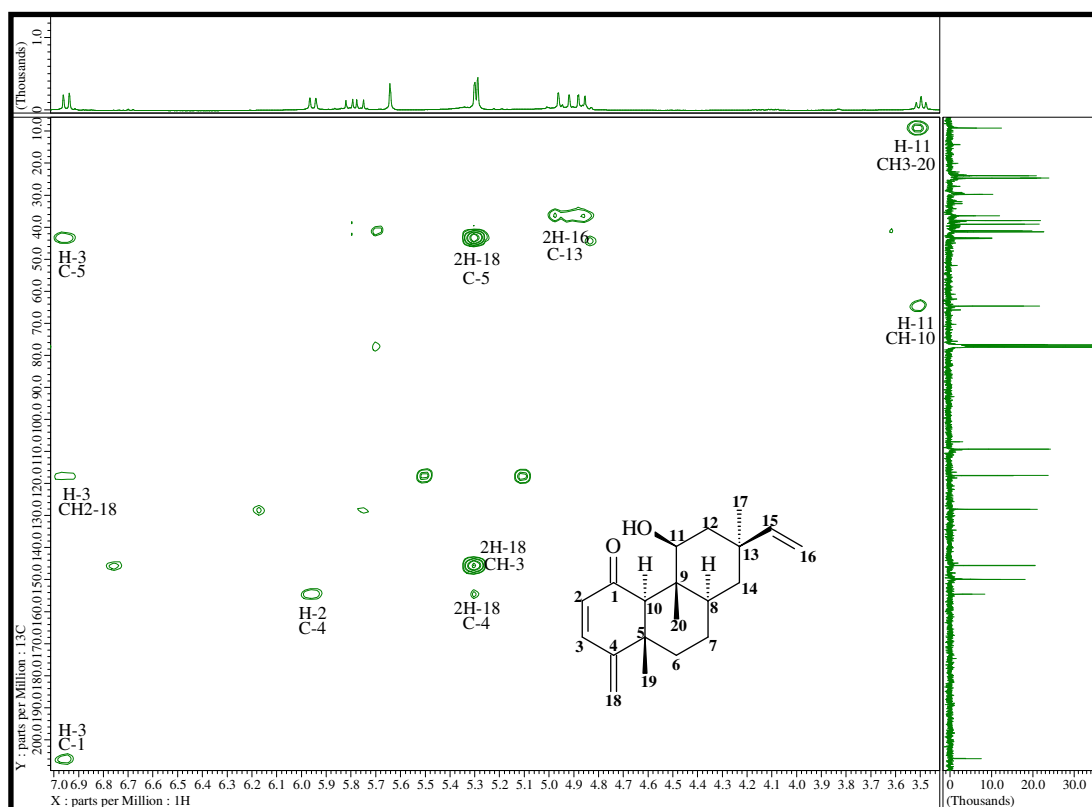


FIGURA 107. Espectro de RMN HMBC da substância SEMD-07.

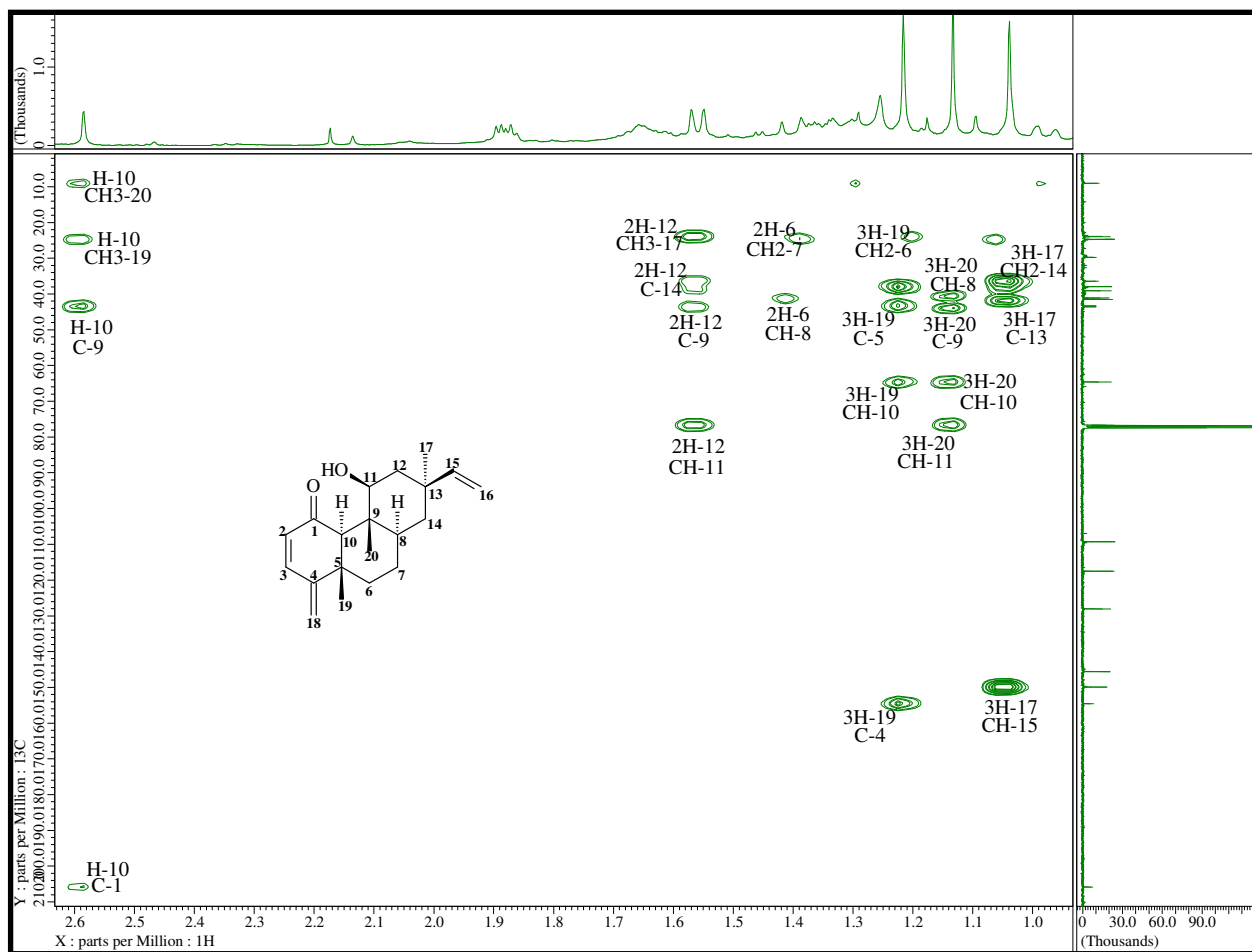


FIGURA 108. Ampliação do espectro RMN HMBC da substância SEMD-07.

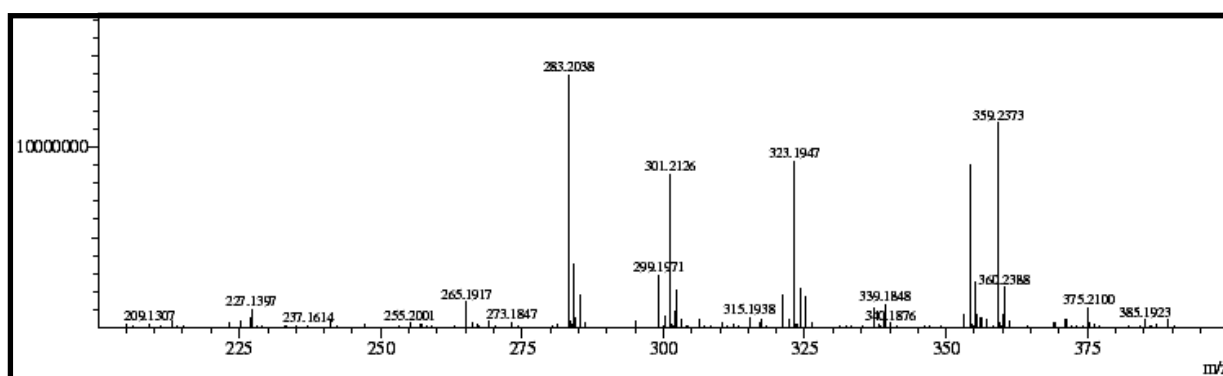
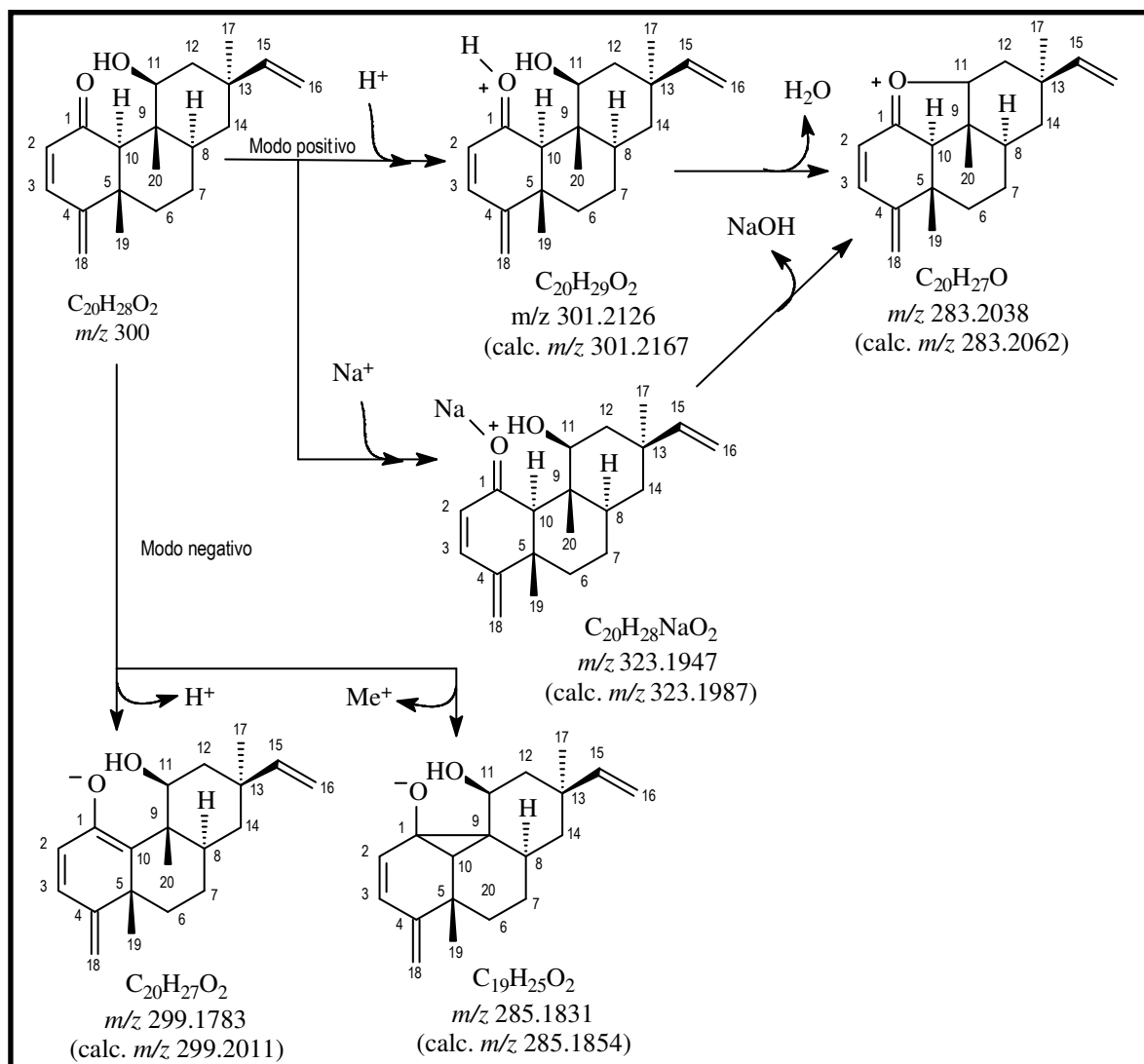


FIGURA 109. Espectro de massas de alta resolução da substância SEMD-07.



ESQUEMA 32. Proposta de fragmentação para a substância SEMD-07.

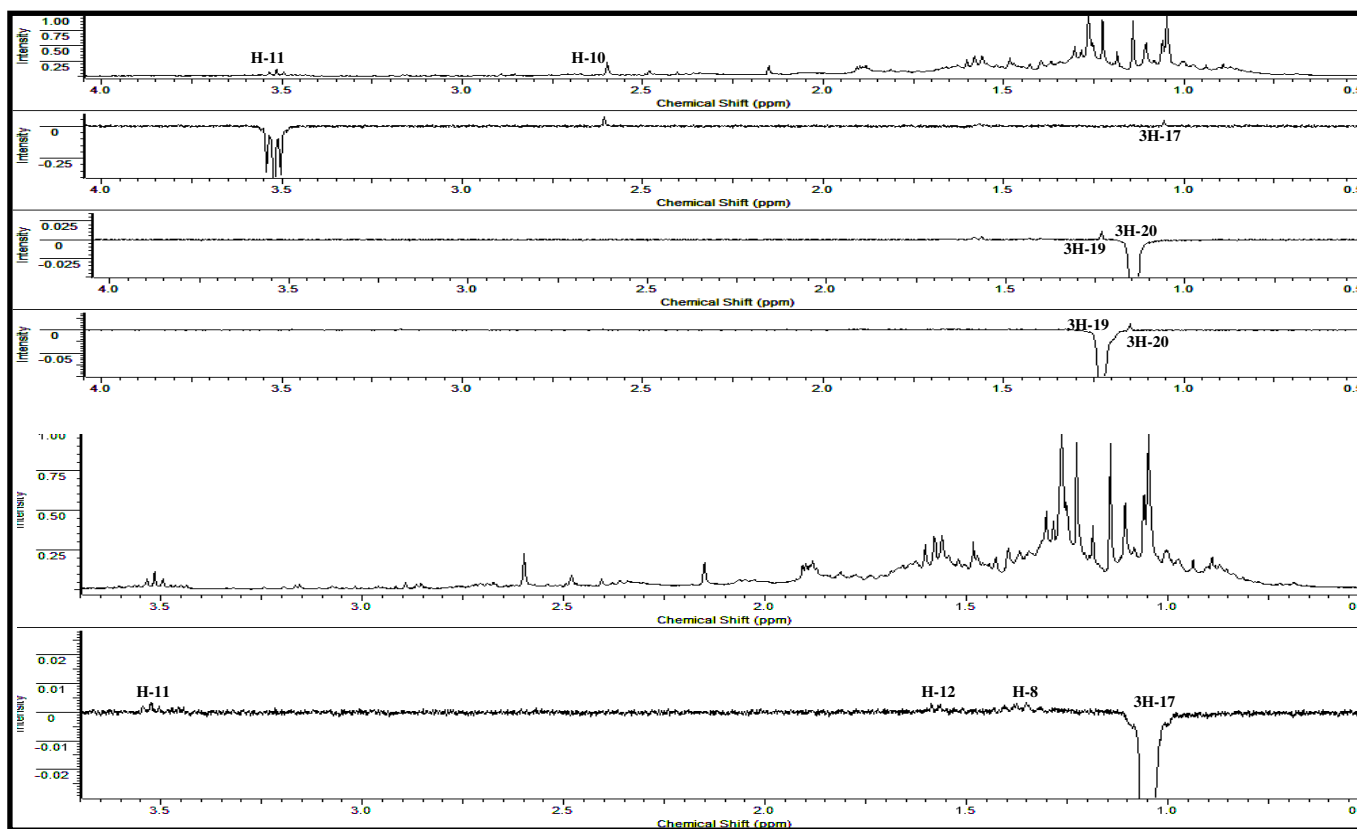


FIGURA 110. Espectro de RMN ^1H e NOEDIFF da substância SEMD-07.

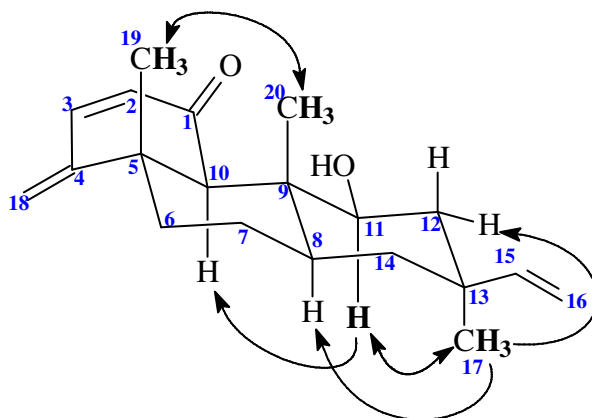


FIGURA 111. Interação espacial dos núcleos de hidrogênio observado nos espectro de NOEDIFF do Simirano B. Átomos em negrito foram irradiados.

4.8.3. 6 β , 11 β -dihidroxi-2,4(18),15-eritroxilatrien-1-ona

O tratamento cromatográfico o qual a sub-fração **D** (264,0 mg), proveniente da fração em diclorometano da madeira de *S. eliezeriana* (Esquema 2, página 22), foi submetido forneceu um óleo de coloração verde (20,0 mg), solúvel em diclorometano que foi atribuído o código **SEMD-08**.

O espectro na região do IV (Figura 112, página 131) exibiu perfil semelhante ao diterpeno **SEMD-07** com uma banda de absorção larga em ν_{OH} 3410 cm^{-1} atribuída a grupo hidroxila, estiramentos atribuídos a grupos metilênicos e metínicos em ν_{CH_2} 2972 e ν_{CH} 2927 cm^{-1} respectivamente. A presença de uma banda em $\nu_{C=O}$ 1649 cm^{-1} foi atribuída a presença de um grupo carbonila α,β -insaturada. O perfil desta indica a possível sobreposição com a banda que representa o estiramento das ligações duplas na substância. As bandas em ν_{CH_2} 1465, ν_{CH_3} 1380 cm^{-1} foram atribuídas aos dobramentos dos grupos metilênicos e metílicos e ν_{C-O} 1130 e 1161 cm^{-1} atribuídos a estiramentos de ligação C-O.

A análise por CG-EM forneceu um cromatograma um sinal intenso em 12,95 min e pequenas impurezas (Figura 113, página 131). O espectro de massas 70 eV (Figura 114, página 133), referente a esse sinal forneceu como íon molecular M^+ 316 D e como pico base M^+ 299 D, sugerindo a perda de um grupo hidroxila. Esta e as demais propostas de fragmentação estão ilustradas no Esquema 33, página 133.

O espectro de massas de alta resolução HRMS-ESI (Figura 115, página 134) exibiu como íon molecular M-H 315,1931 (calc. 315,1987) apresentando erro sistemático de $\Delta = 4$ ppm. Este resultado aponta para fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_2$.

O espectro de RMN de 1H (Figura 116, página 134) mostrou muita semelhança com o obtido para o diterpeno **SEMD-07**, confirmando principalmente a classe eritroxileno. A principal diferença foi a presença de um sinal em δ_H 4,16 (*dd*, 11,8; 4,8 Hz) característico de hidrogênio ligado a carbono carbinólico, justificando o acréscimo de 16 unidades, no íon molecular observado no espectro de massas. Os valores de deslocamento químico bem como as multiplicidades dos demais sinais estão ilustrados na Tabela 7, página 132.

O mapa de correlação homonuclear 1H - 1H COSY confirmou a semelhança observada no espectro de RMN de 1H com o diterpeno **SEMD-07**, exibindo mesmos acoplamentos entre os núcleos (Figura 117, página 135).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 118, página 136) foi fundamental para a determinação estrutural desta substância. Ao comparar este espectro com o de **SEMD-07** foi confirmado a estrutura de um diterpeno eritroxileno semelhante. A comparação dos espectros das substâncias mostrou uma diminuição do deslocamento químico da metila CH_3 -17 em δ_{CH_3} 17,46 (Δ_{CH_3} -7,11) possivelmente atribuída ao efeito γ -gauche proveniente do grupo hidroxila, que nesta situação estaria posicionada no carbono C-6.

O mapa de correlação heteronuclear a uma ligação, HSQC, (Figura 119, página 137) auxiliou na atribuição inequívoca dos sinais aos respectivos átomos na substância podendo verificar principalmente a atribuição dos hidrogênios carbinólicos em δ_H 4,16 (*dd*, 11,8; 4,8 Hz) ligado ao carbono em δ_{CH} 73,95 e δ_H 3,46 (*dd*, 10,0; 6,2 Hz) ligado ao carbono em δ_{CH} 76,64 as demais atribuições estão ilustradas na Tabela 7, página 132.

A análise do mapa de correlação heteronuclear a duas e três ligações, HMBC, (Figuras 120 e 121, páginas 138 e 139) possibilitou identificar os pontos de ligação na substância e estabelecer a fórmula estrutural de forma inequívoca. Desta forma, foi possível propor uma estrutura semelhante ao diterpeno **SEMD-07** com a adição de um grupo hidroxila em CH-6. A posição deste grupo foi confirmada com a correlção entre CH-6 em δ_{CH} 73,94 e 3H-19 em δ_H 1,22. As demais correlações estão ilustradas na Tabela 7, página 132.

O experimento de NOEDIFF (Figura 122, página 140) possibilitou atribuir a configuração relativa à substância, pois, ao irradiar em **H-11** δ_H 3,46 (*dd*, 10,0; 6,2 Hz) foi observado NOE em **H-10** δ_H 2,62 (*s*), **3H-17** δ_H 1,03 (*s*) e **H-8** δ_H 1,58. Ao irradiar em **H-10** δ_H 2,62 (*s*) observou-se NOE em **H-6** δ_H 4,16 (*dd*, 11,8; 4,8 Hz), **H-11** δ_H 3,46 (*dd*, 10,0; 6,2 Hz), e **H-8** δ_H 1,58. Estes resultados conduziram à atribuição da conformação beta (β) para os grupos hidroxilas situados em CH-6 e CH-11 (Figura 123, página 140).

A análise do conjunto de dados juntamente com a comparação de informações obtidas na literatura, conduziu à elucidação estrutural de **SEMD-08** como um diterpeno eritroxileno *rel-6\beta*, 11 β -dihidroxi-2,4(18),15-eritroxilatrien-1-ona inédito na literatura sendo atribuído o nome de **Simirano A**.

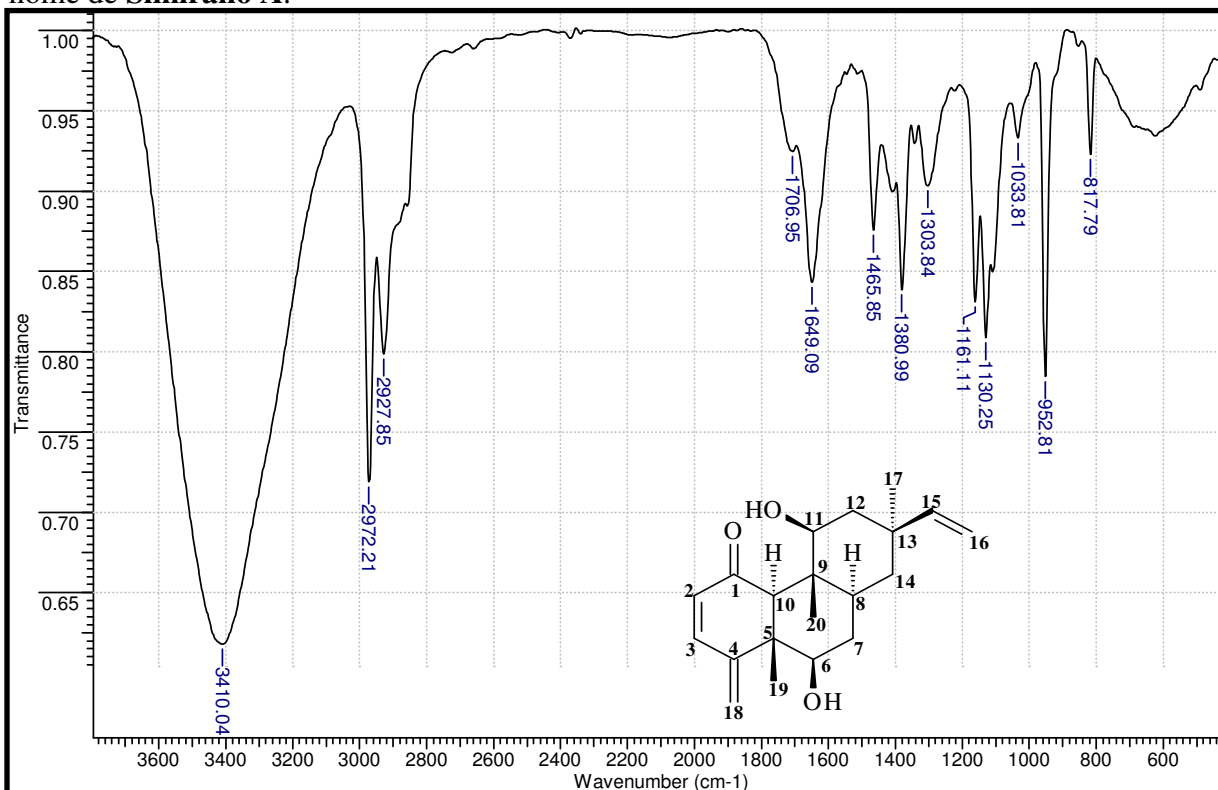


FIGURA 112. Espectro de infravermelho da substância SEMD-08.

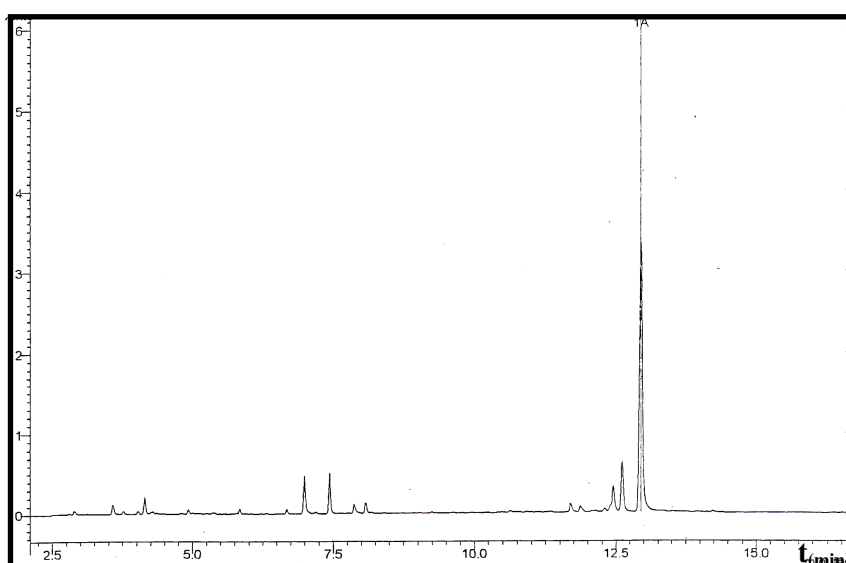


FIGURA 113. Cromatograma CG da substância SEMD-08.

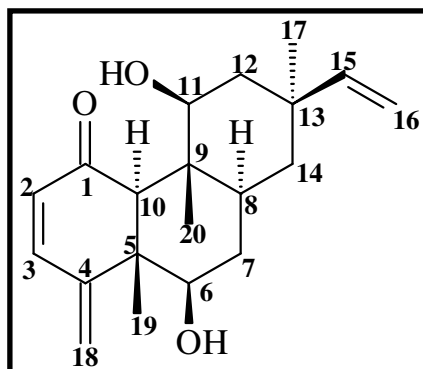


TABELA 7. Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz) e de ^1H (400 MHz) do diterpeno **Simirano A** em CDCl_3 . Deslocamentos químicos em ppm.

C	HSQC		HMBC		NOEDIFF	Simirano B	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$	$^3J_{\text{H}\rightarrow\text{C}}$		δ_{C}	δ_{H}
1	204,54	-	-	-		205,85	-
4	151,97	-	-	-		154,57	-
5	48,67	-	-	-		43,34	-
9	43,47	-	-	-		43,55	-
13	39,58	-	-	-		39,07	-
CH							
2	128,19	5,95 (<i>d</i> , 10,0)	3	-		128,05	5,95 (<i>d</i> , 10)
3	147,14	6,94 (<i>d</i> , 10,0)	4	-		145,59	6,95 (<i>d</i> , 10)
6	73,94	4,16 (<i>dd</i> , 11,8; 4,8)	-	-			
8	37,96	1,58				41,12	1,88 (<i>m</i>)
10	65,02	2,62	1, 5, 9	4, 6, 19, 20	H-11, 6, 12a	64,61	2,58 (<i>s</i>)
11	75,19	3,46 (<i>dd</i> , 10,0; 6,2)	-	20	H-10, 12a, 17	76,66	3,49 (<i>t</i> , 7,6)
15	149,14	5,77 (<i>dd</i> , 17,2; 10,8)	13	-		149,93	5,79 (<i>dd</i> , 17,2; 10,8)
CH₂							
6	-	-	-	-		37,92	1,38; 1,41
7	38,60	1,14; 1,24	6, 8	5, 9		24,71	1,20-1,00 (<i>m</i>)
12	41,99	1,05; 1,60	7, 11, 14	-		41,48	1,54 (<i>d</i> , 7,6)
14	34,74	1,75; 1,60				36,45	1,41 (<i>t</i> , 12,3)
16	109,61	4,94 (<i>d</i> , 17,2); 4,88 (<i>d</i> , 10,8)	-	-		109,28	4,90 (<i>d</i> , 17,2); 4,85 (<i>d</i> , 10,8)
18	120,39	5,37 (<i>s</i>); 5,29 (<i>s</i>)	-	3, 5		117,50	5,29 (<i>s</i>); 5,28 (<i>s</i>)
CH₃							
17	23,78	1,03 (<i>s</i>)	-	-	H-11, 12	23,93	1,03 (<i>s</i>)
19	17,46	1,22 (<i>s</i>)	-	-		24,68	1,21 (<i>s</i>)
20	8,92	1,12 (<i>s</i>)	-	-	3H-19	9,04	1,13 (<i>s</i>)

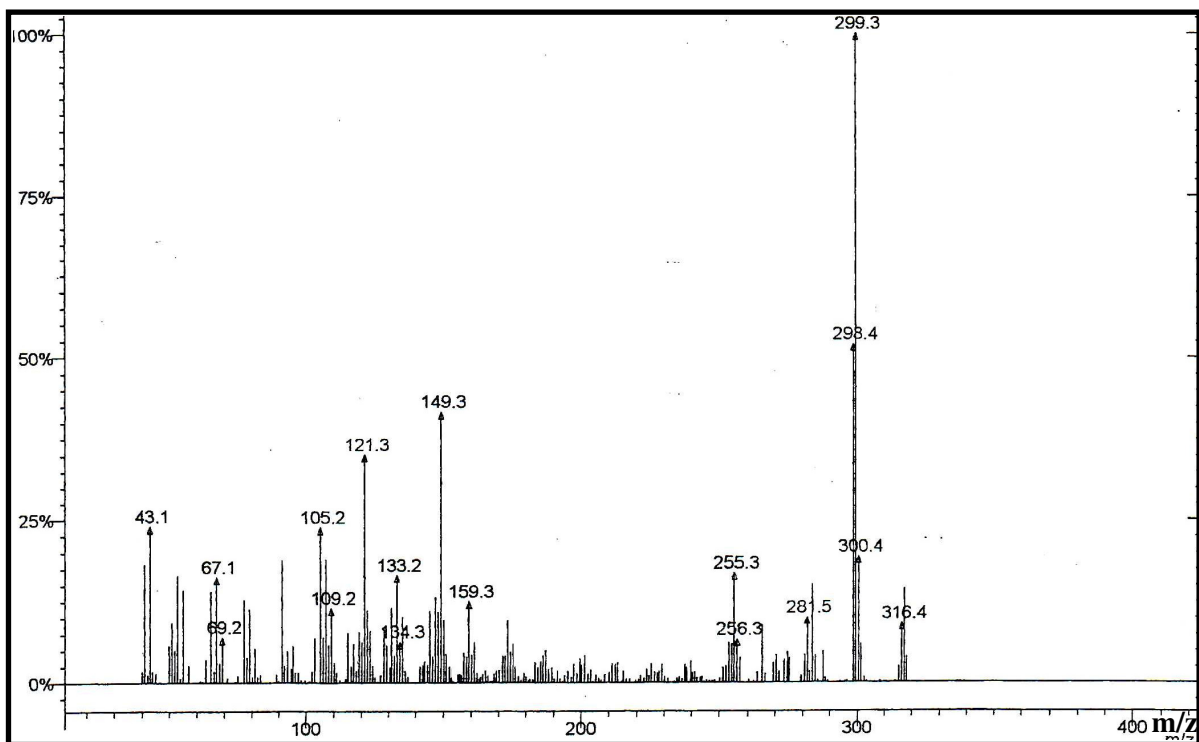
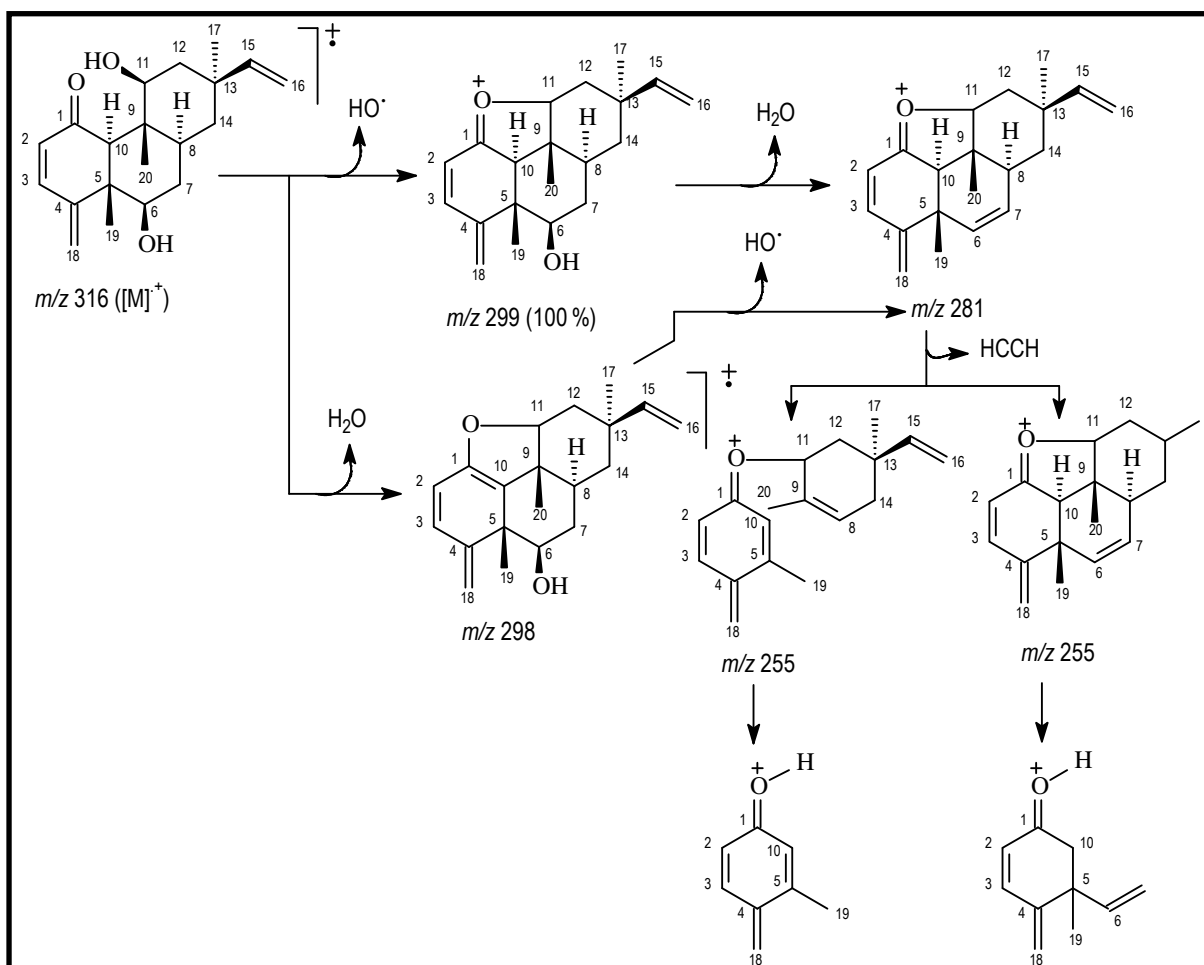


FIGURA 114. Espectro de massas 70 eV da substância SEMD-08.



ESQUEMA 33. Proposta de fragmentação para a substância SEMD-08.

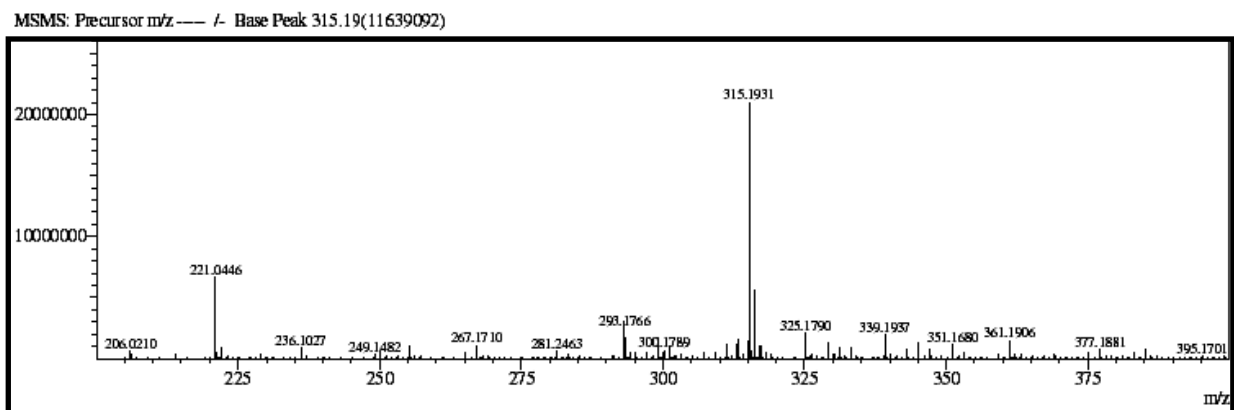


FIGURA 115. Espectro de massas de alta resolução da substância SEMD-08.

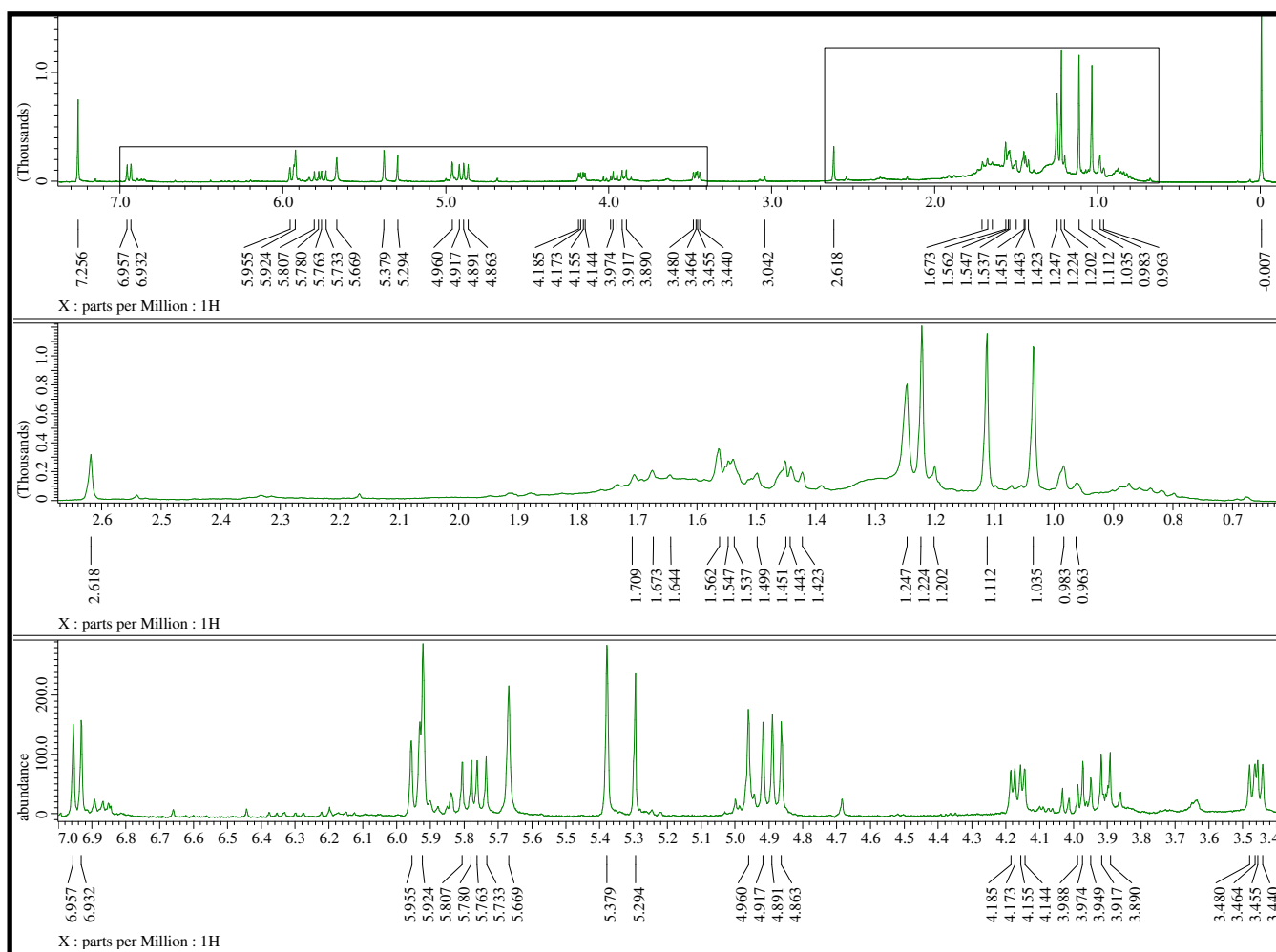
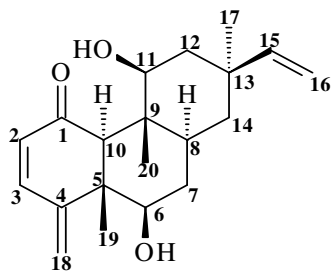


FIGURA 116. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) e ampliações da substância SEMD-08.



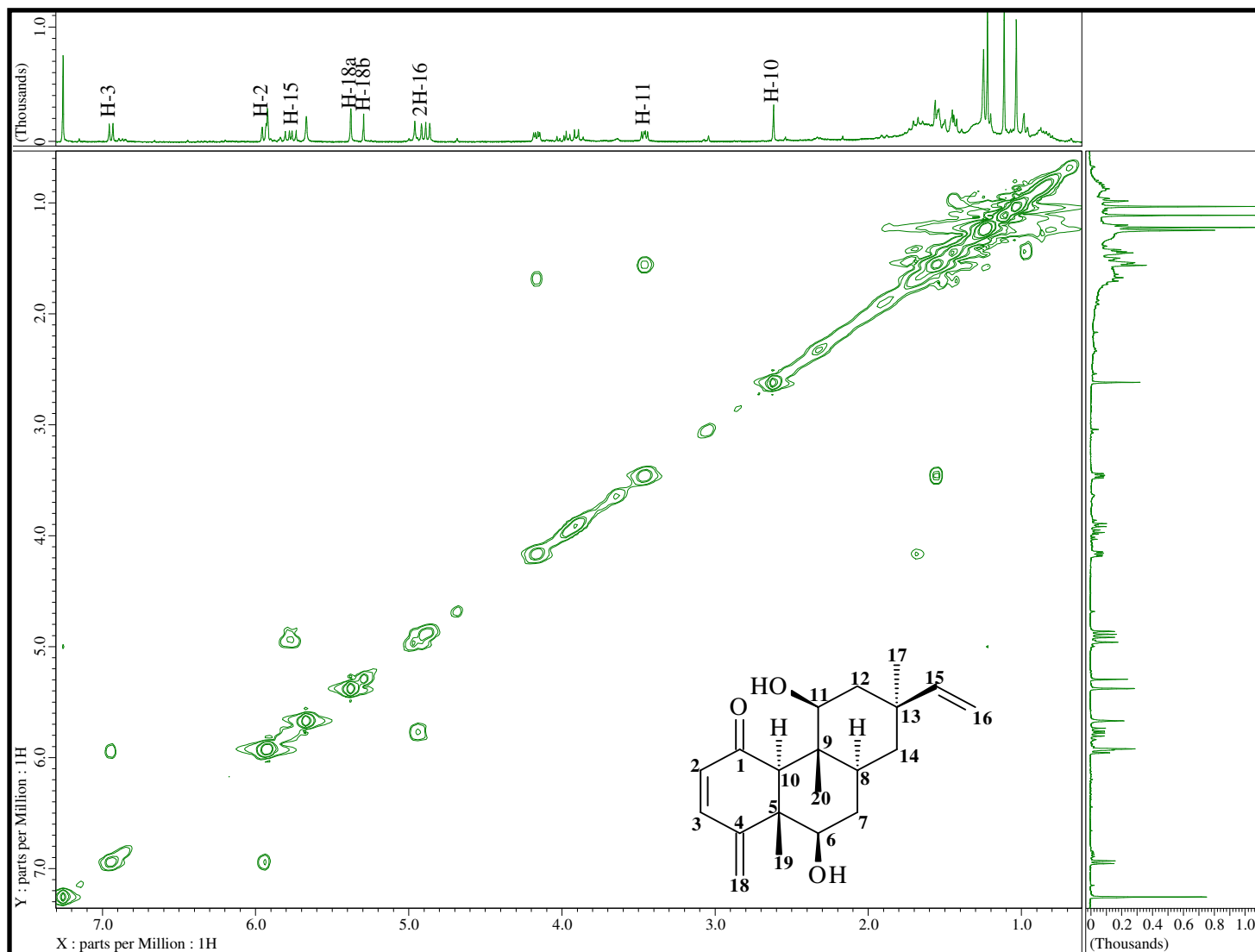


FIGURA 117. Espectro de RMN ^1H - ^1H COSY da substância SEMD-08.

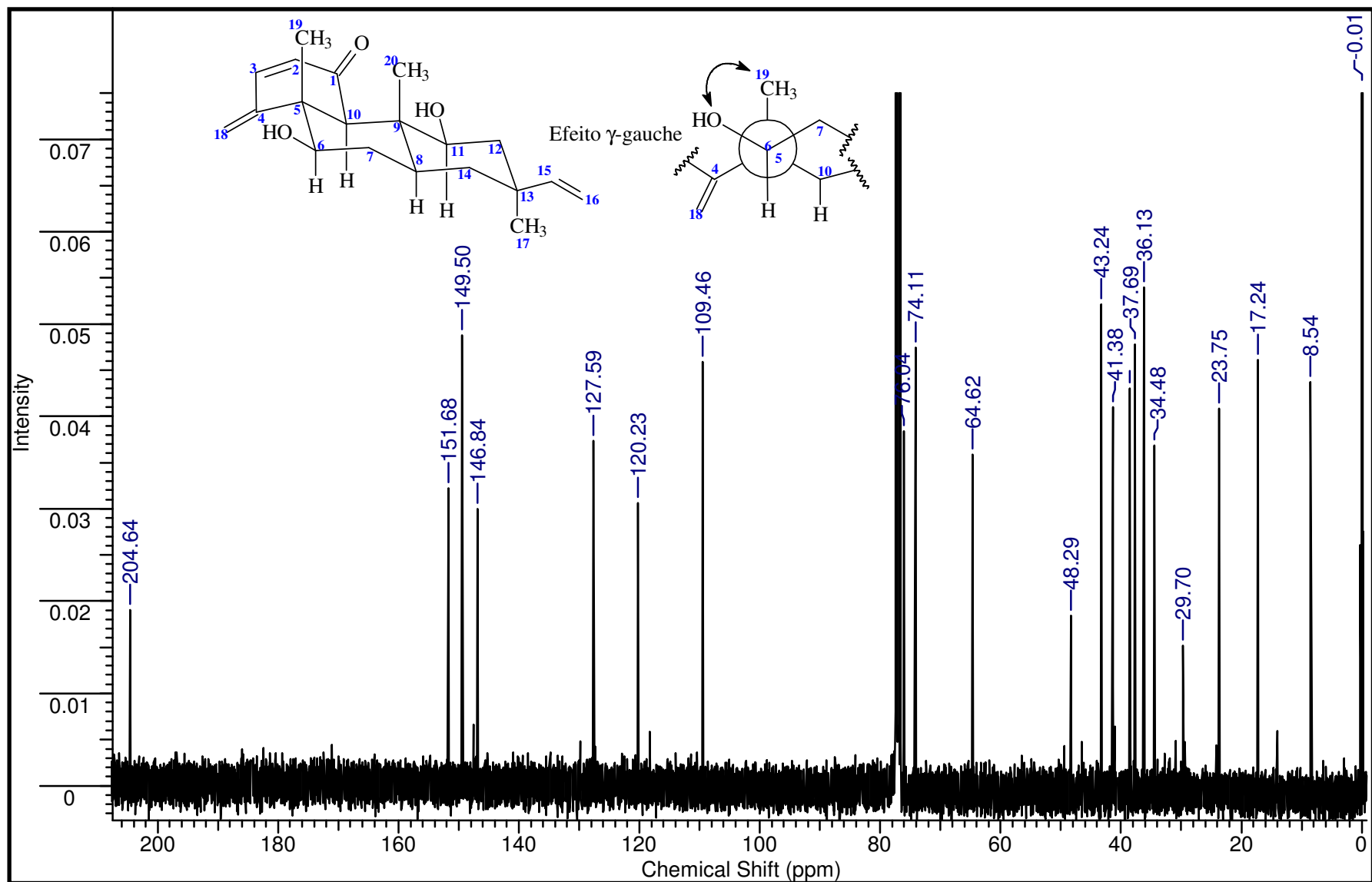


FIGURA 118. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância SEMD-08.

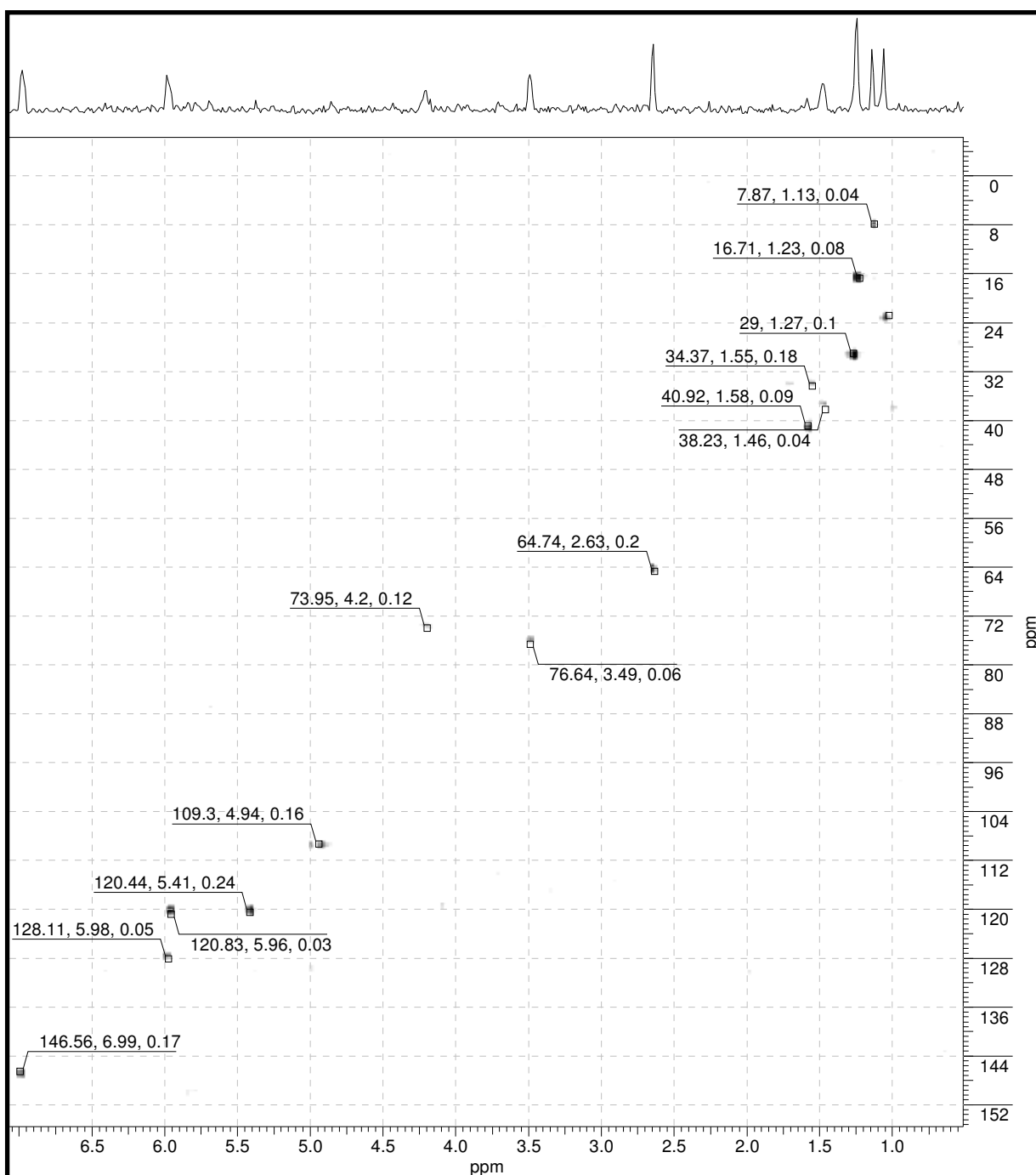
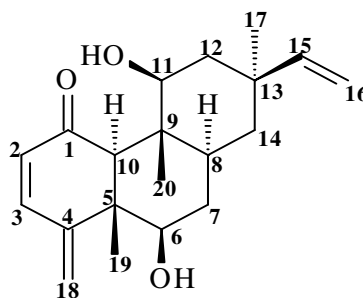


FIGURA 119. Espectro de RMN HSQC da substância SEMD-08.



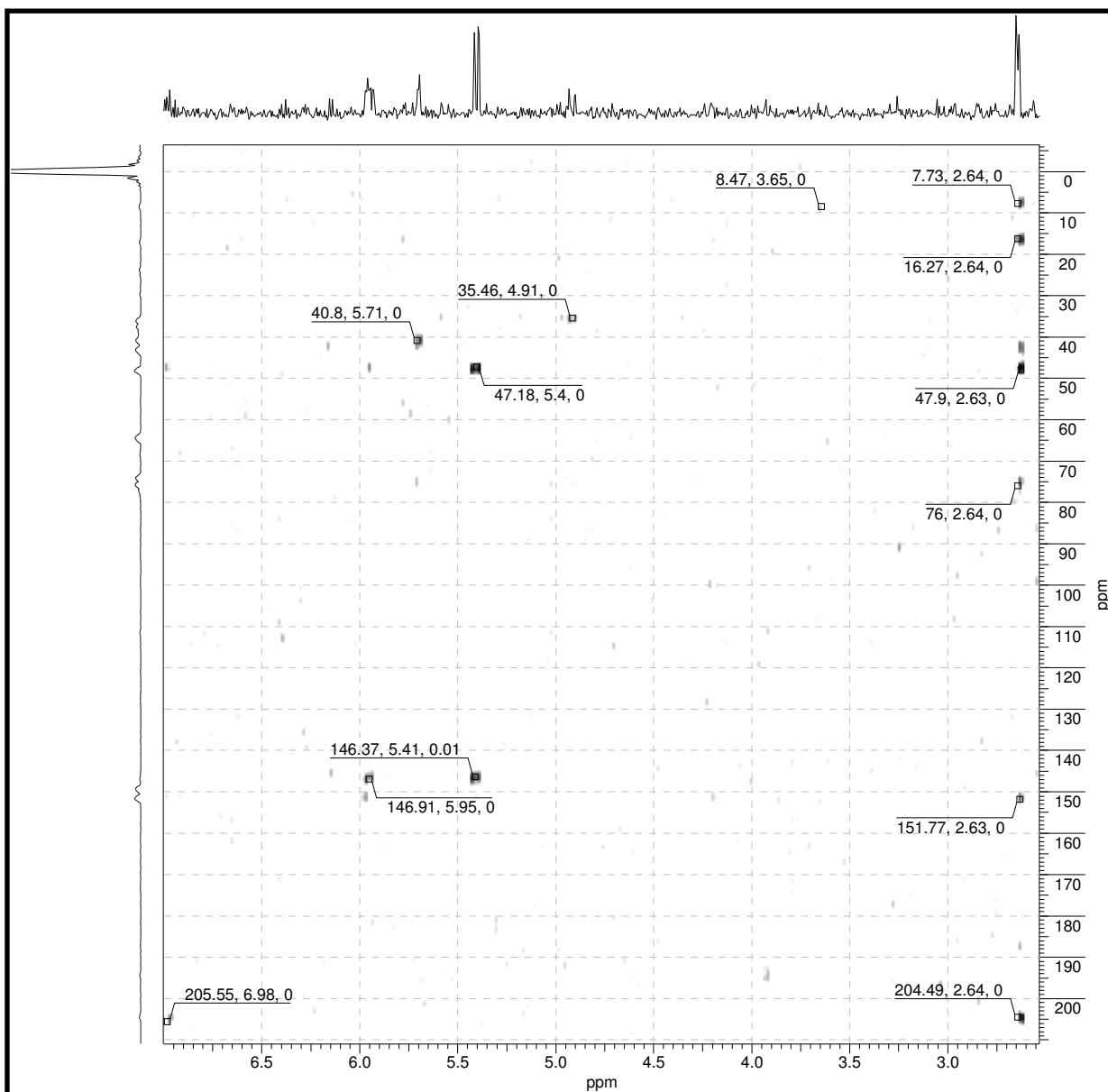
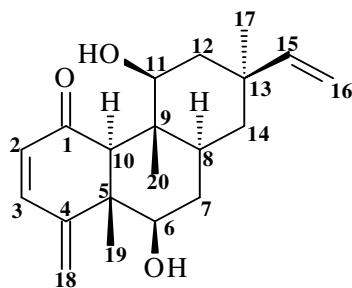


FIGURA 120. Espectro de RMN HMBC da substância SEMD-08.



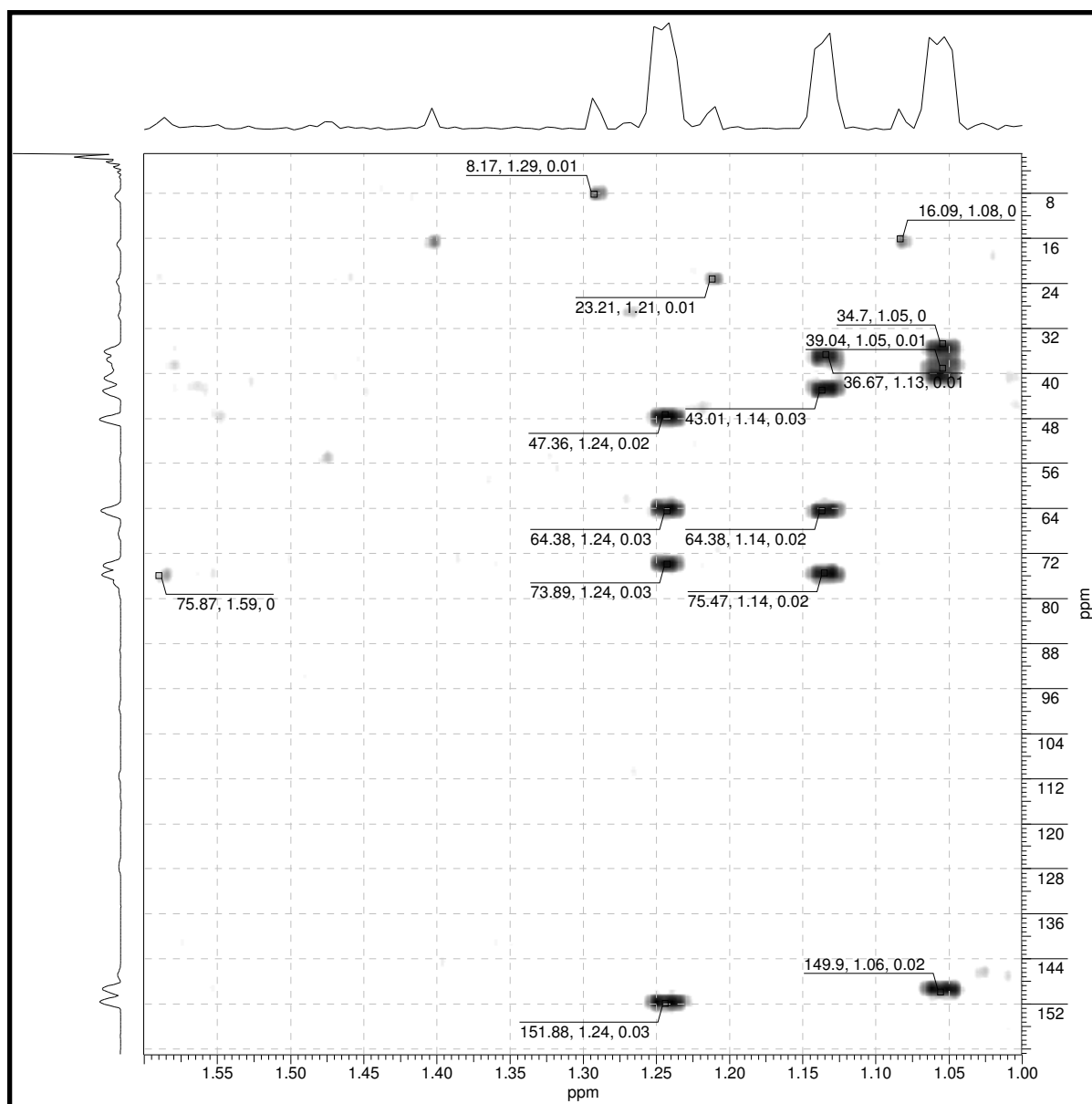
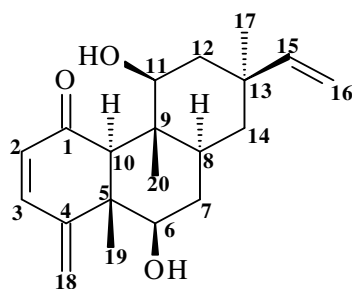


FIGURA 121. Ampliação do espectro RMN HMBC da substância SEMD-08.



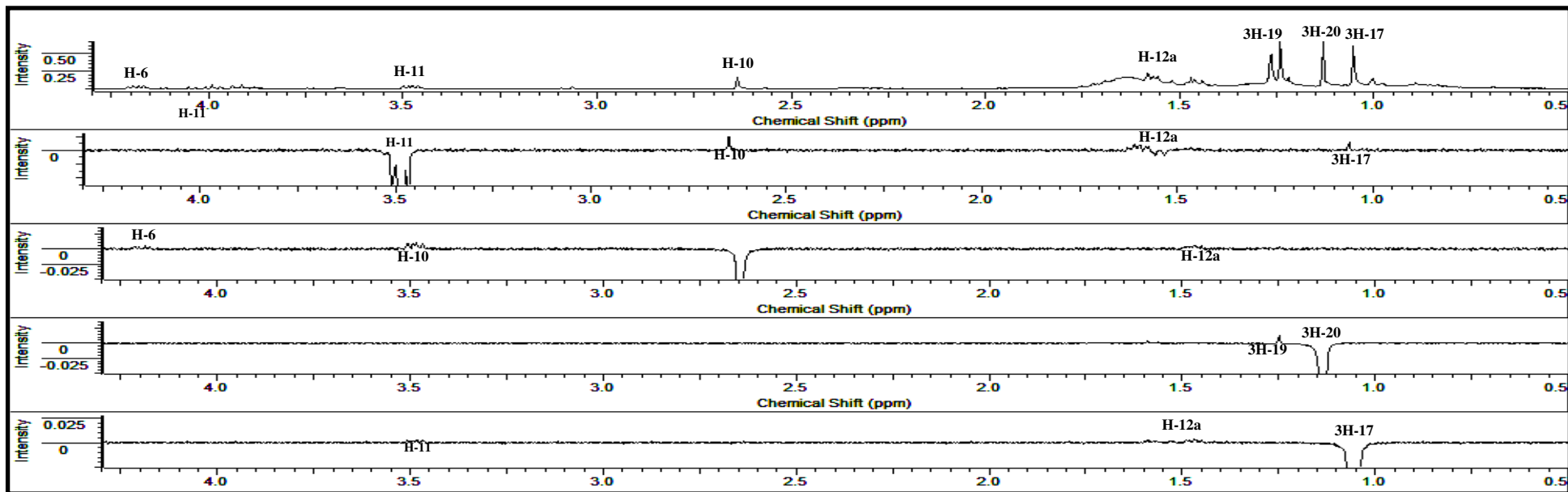


FIGURA 122. Espectro de RMN ^1H e NOEDIFF da substância SEMD-08.

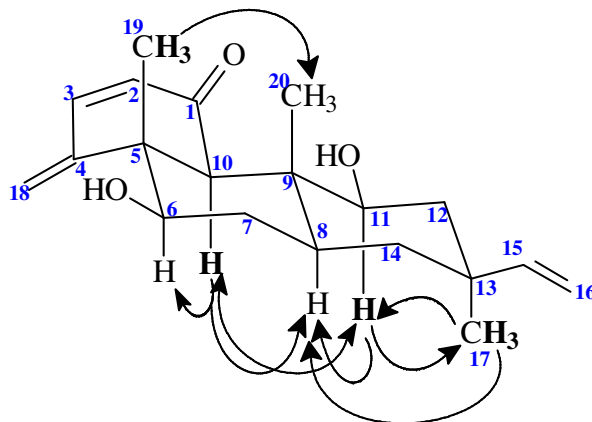


FIGURA 123. Interação espacial dos núcleos de hidrogênio observado nos espectros NOEDIFF da substância SEMD-08. Átomos em negrito foram irradiados.

4.9. Propriedades quirópticas

Propriedade quirópticas de uma substância provém das interações não destrutivas com a radiação anisotrópica (luz polarizada), que podem diferenciar duas substâncias que são enantiômeros. O termo foi introduzido por Lord Kelvin em 1894, que engloba as manifestações espectroscópicas clássicas de quiralidade que são: atividade óptica, que não necessita da presença de cromóforo na molécula, dispersão óptica rotatória e dicroísmo circular cujos efeitos são percebidos com a presença de cromóforo e com um centro assimétrico vizinho ao mesmo.

4.9.1. Natureza da luz

A luz possui propriedades corpusculares e ondulatórias sendo constituída por ondas eletromagnéticas que oscilam por todos os planos do espaço. Uma onda eletromagnética possui dois campos: campo elétrico e o campo magnético. Estes campos fluem em planos perpendiculares um em relação ao outro e em direção à propagação do feixe de luz (Figura 124). Nas espectroscopias relatadas acima, leva-se em consideração apenas os efeitos associados com a componente elétrica da radiação (plano vertical) (ELIEL & WILEN, 1994).

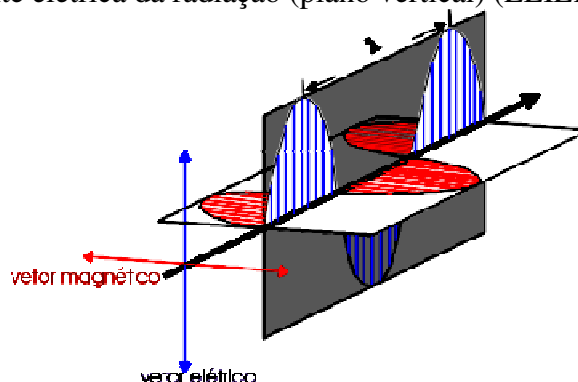


FIGURA 124. Natureza ondulatória da luz.

Sabe-se que a luz é composta de diferentes comprimentos de onda vibrantes em muitos planos diferentes. A absorção de luz monocromática em um determinado comprimento de onda por uma substância produz transições eletrônicas em grupos na substância que apresentam como resposta uma curva de absorção *versus* comprimento de onda, denominado espectro de absorção no ultravioleta.

Com a utilização de um filtro polarizador é possível selecionar ondas que oscilam em um único plano, conhecidas como luz plano-polarizada (Figura 125).

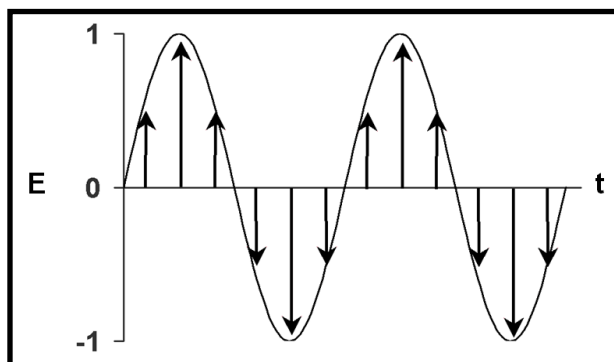


FIGURA 125. Luz plano polarizada: campo elétrico (E) em função do tempo (t).

A polarização circular da luz resulta da sobreposição de duas ondas com a mesma amplitude, linearmente polarizadas, em planos perpendiculares, com diferença de fase entre si de 90° ou -90° (Figura 126).

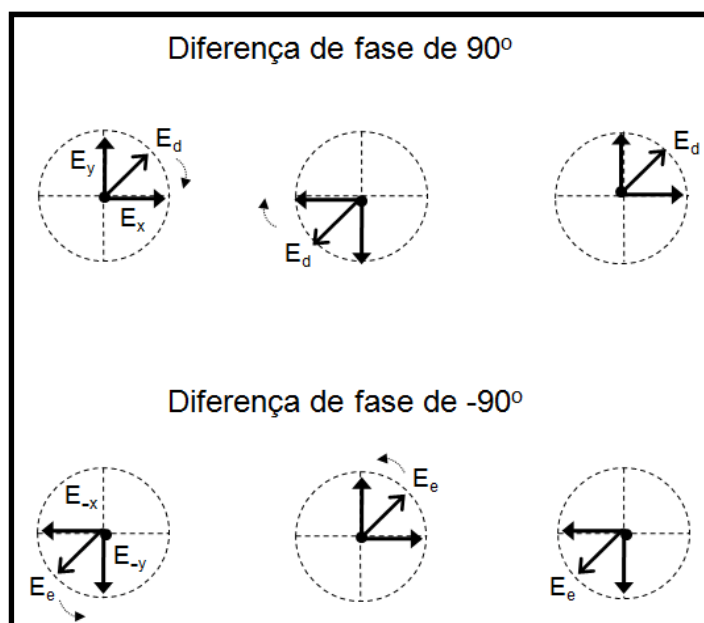


FIGURA 126. Luz circularmente polarizada à direita (E_d) e à esquerda (E_e).

Os enantiômeros possuem a propriedade de interagir de formas diferenciadas à luz circularmente polarizada à esquerda e a luz circularmente polarizada à direita. Se um feixe de luz plano-polarizada incidir sobre uma molécula que possui um centro opticamente ativo (quiral), os átomos ou grupos ligados a este centro que apresentam maior polarizabilidade irão promover uma variação da velocidade com que os componentes vetoriais atravessam o meio. A esta propriedade dá-se o nome de birrefringência circular. O ângulo de rotação é obtido pela equação de Fresnel, onde n_d e n_e são os índices de refração do meio em relação aos componentes vetoriais dextrógiro (direita) e levógiro (esquerda) e λ é o comprimento de onda empregado na análise. Se $n_d \neq n_e$ a molécula exibe atividade óptica (Figura 127) (ELIEL & WILEN, 1994).

$$\alpha = \frac{\pi}{\lambda} (n_d - n_e)$$

FIGURA 127. Equação de Fresnel.

Ou seja, ao incidir luz circular polarizada sobre um enantiômero e este promover o retardamento da componente vetorial, por exemplo, da esquerda mais que da direita, este enantiômero será definido como dextrógiro.

Se a substância opticamente ativa apresenta na estrutura um grupo cromofórico, esta é capaz de absorver luz circular polarizada e, sendo assim, irá produzir uma absorção desigual dos componentes vetoriais. O vetor resultante descreverá uma elipse alargada e se diz que a luz emergente está elipticamente polarizada (Figura 128, página 143). O valor medido de absorção de luz elipticamente polarizada dextrógira (A_d) ou levógira (A_e) é conhecido como dicroísmo circular (DC).

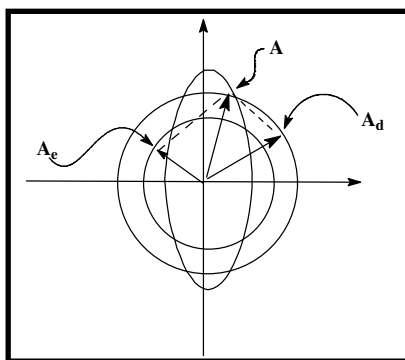


FIGURA 128. Polarização elíptica da luz devido à refração e à absorção distintas dos componentes vetoriais.

O valor de DC é calculado pela diferença de absorção entre a luz elipticamente polarizada à esquerda (A_e) e a elipticamente polarizada à direita (A_d) em certo comprimento de onda (Figura 129) (ZHANG *et al.*, 2004).

$\Delta A = A_E - A_D$	A = absorbância
$\Delta \varepsilon = \varepsilon_e - \varepsilon_d = \frac{\Delta A}{c l}$	ε = Absortividade molar;
	c = concentração molar da amostra (mol.L ⁻¹)
	l = comprimento do caminho ótico da cela (cm)

FIGURA 129. Diferença de absorção da luz circularmente polarizada – Dicroísmo Circular.

4.9.2. Dicroísmo circular

A origem da palavra dicroísmo vem do grego *dikhroos*, cor-de-dois, e refere-se a qualquer dispositivo ótico que possa dividir um feixe de luz em dois feixes com diferentes comprimentos de onda. Esse fenômeno foi inicialmente observado pelo austríaco Wilhelm Carl Ritter von Haidinger em 1847 em cristais de quartzo ametista. Posteriormente, esse fenômeno foi observado em substâncias opticamente ativas, mais especificamente em soluções de tartarato de cobre e cromo, pelo francês Aimé Cotton (BEROVA *et al.*, 2000).

O espectro de DC de uma molécula quiral é representado pela $\Delta\varepsilon$ em função do comprimento de onda (λ ; Figura 130). As bandas máximas e mínimas de absorção são conhecidas como efeito Cotton (EC). A intensidade e o λ das bandas são característicos para cada enantiômero (BEROVA *et al.*, 2000). O sinal de $\Delta\varepsilon$ define o sinal do DC.

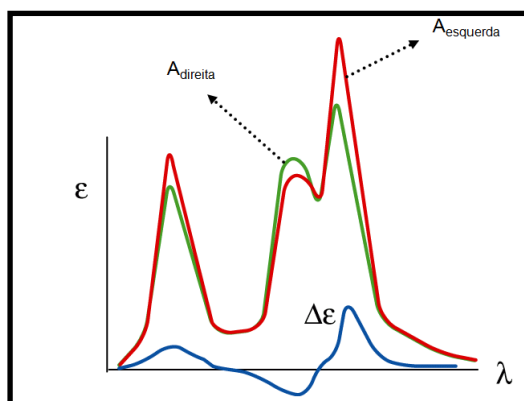


FIGURA 130. Espectro de dicroísmo circular (DC).

A principal aplicação do dicroísmo circular (DC) ou dispersão óptica rotatória (DOR) é o assinalamento da configuração absoluta de um centro quiral vizinho a um cromóforo ou da conformação de um sistema bicromofórico que gera anomalia na curva ou diferença de absorção das componentes apenas pela atropoisomeria. Há duas maneiras de fazer estas análises. Uma maneira é utilizar regras empíricas que se baseiam na comparação de sinal do efeito de padrões cromofóricos através de propostas de disposição espacial que normalize a definição de centros quirais vizinhos aos cromóforos. A disposição espacial dos centros estereogênicos vizinhos ao cromóforo pode conduzir à previsão do sinal a ser proposto para substâncias capaz de se locarem na regra. Podem ser usados para determinar a configuração absoluta se a configuração relativa da molécula é conhecida.

Exemplos:

- a) **Regra do octante.** Baseia-se na disposição do grupo carbonila em um sistema de oito áreas (octantes). De acordo com a disposição dos grupos em relação a esta projeção do grupo carbonila, pode haver interferência no valor do efeito Cotton para mais (+) ou menor (-). Para isso, o espaço ao redor do grupo carbonila se divide em oito partes considerando os eixos X, Y e Z (Figura 131a). O plano A intersecciona o átomo de oxigênio da carbonila e os carbonos 1 e 4. O plano B é perpendicular ao plano A e intersecciona o átomo de oxigênio e os carbonos 1, 2 e 6. O plano C é perpendicular a ambos os planos A e B e intersecciona a dupla ligação. Os três planos dividem o espaço circundante do cromóforo carbonila em oito partes (octantes), a Figura 131b ilustra a atribuição dos sinais nos octantes da parte frontal e de trás. O octante ocupado pelo grupo que promove a perturbação é que irá determinar o sinal da rotação da luz circular polarizada proveniente da transição $n \rightarrow \pi^*$ (BEROVA *et al.*, 2000). Grupos que estão sobre os planos, bem como grupos que se apresentam em lados opostos dos planos de simetria de um octante, não contribuem para o efeito observado no espectro.

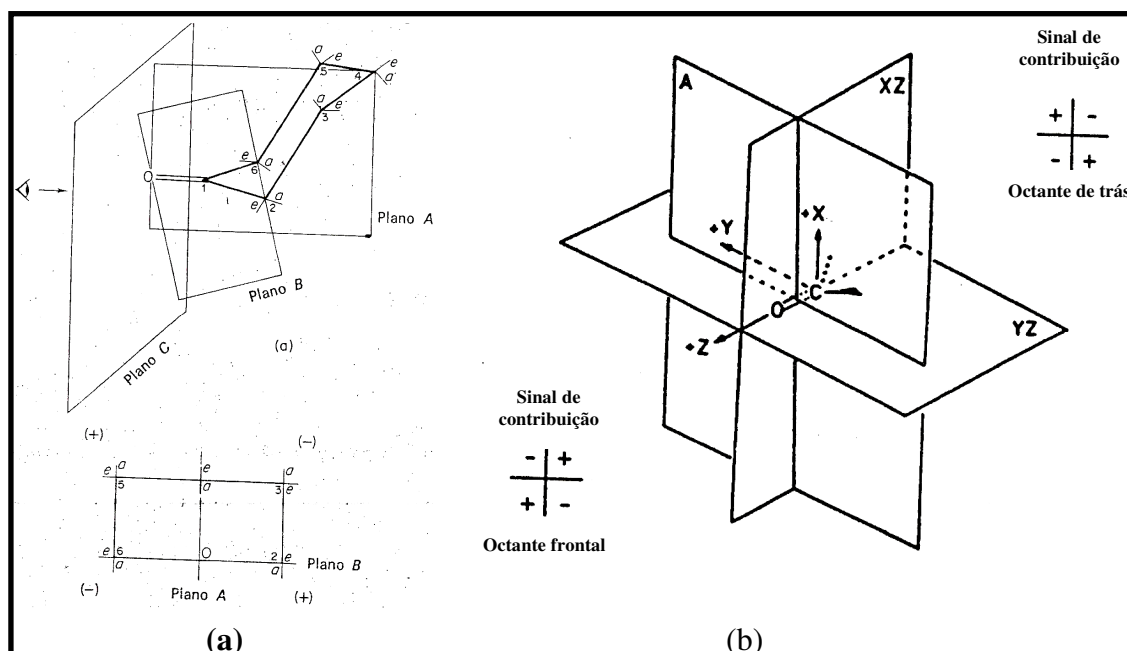


FIGURA 131. (a) Orientação da ciclohexanona no diagrama do octante; (b) regra do octante para a carbonila e sinais de contribuição de cada face do octante (BEROVA *et al.*, 2000).

- b) **Regra do quadrante para aromático.** Esta regra tem como base a simetria do sistema rígico e plano sob interferência de um centro quiral. DE ANGELIS e

WILDMAN (1977) usaram exemplos de alcalóides como derivados da morfina, benzilisoquinolínicos e etanofeandridínicos. Como exemplo de aplicação da regra do quadrante para aromático está ilustrado na Figura 132 a projeção da codeína com configuração R no carbono benzílico. Nesta representação verifica-se a localização dos grupos nos quadrantes contribuindo para efeito Cotton (EC) positivo em 240 nm como descrito por DE ANGELIS e WILDMAN (1977). A Figura 133 exibe algumas projeções mostrando as disposições dos grupos do sistema nos quadrantes cujos EC previsto pela regra do quadrante estão de acordo com os observados em 240 nm. Átomos no 1° e 4° quadrantes contribuem para efeito Cotton positivo e os outros para sinal negativo.

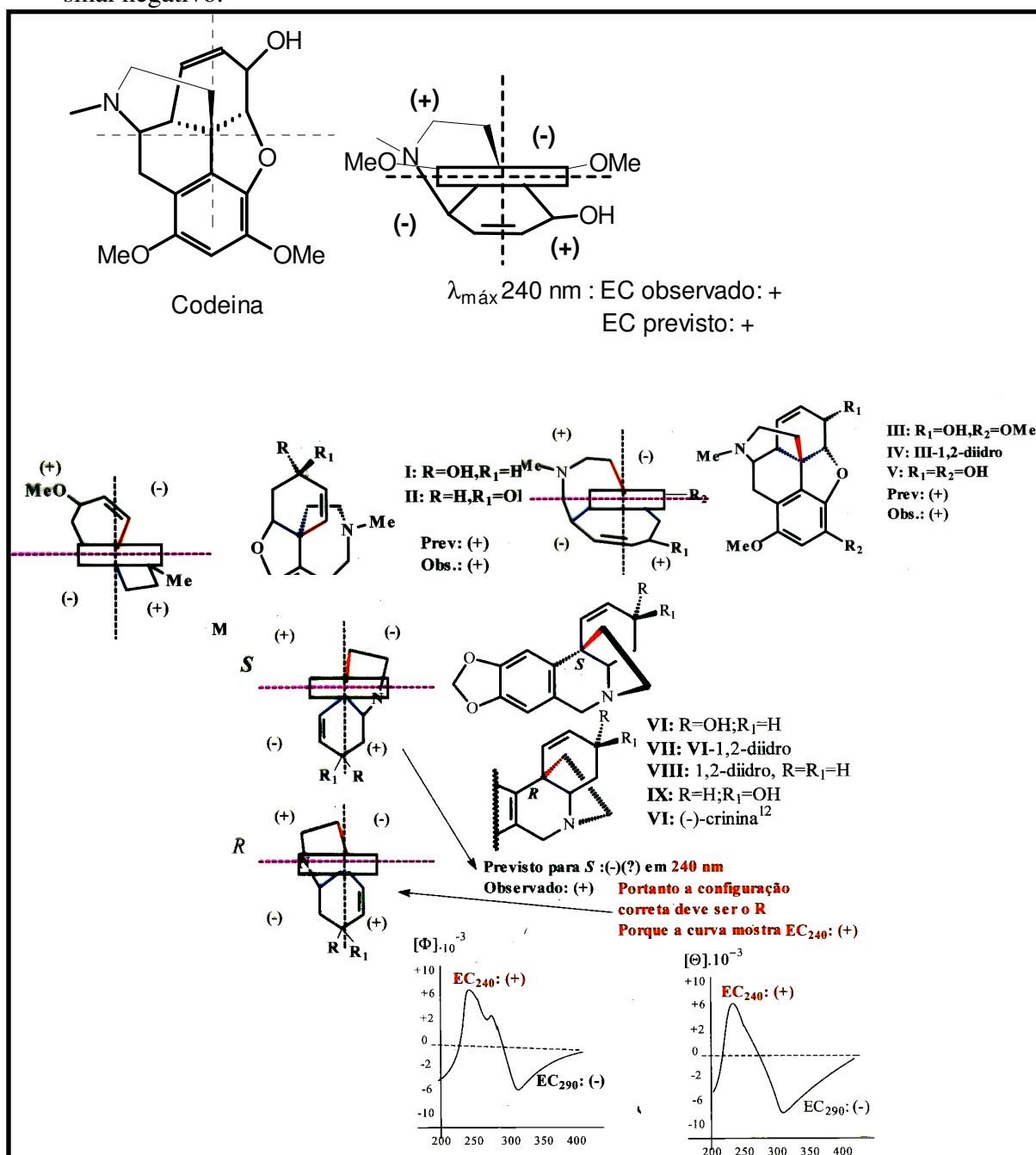


FIGURA 132. Projeções do quadrante para aromático da codeína e espectros de DC.

- c) **Sistemas rígidos de enonas:** Neste caso há interação de dois cromóforos aquirais alqueno e carbonila. Desta interação resulta um cromóforo inerentemente quiral. A regra do octante não serve para este caso, pois ela é aplicada a cromóforo inerentemente aquiral (carbonila). No sistema enônico pode-se considerar as hélices de cada cromóforo isolado. Fazendo a projeção da carbonila na horizontal, de acordo com a posição da dupla, as hélices podem se encontrar no sentido horário ou anti-horário. Sendo a transição $n \rightarrow \pi^*$ com EC (+) para a hélice no sentido horário, como representado na Figura 134.

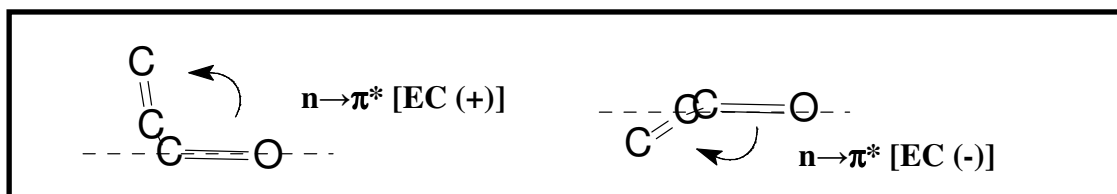


FIGURA 133. Projeção de enonas.

4.9.3. Determinação da configuração absoluta dos diterpenos

O espectro na região do ultravioleta de ambas as substâncias apresentou dois máximos de absorção em referentes às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ que foram atribuídos aos grupos dieno e carbonila respectivamente (Figura 135).

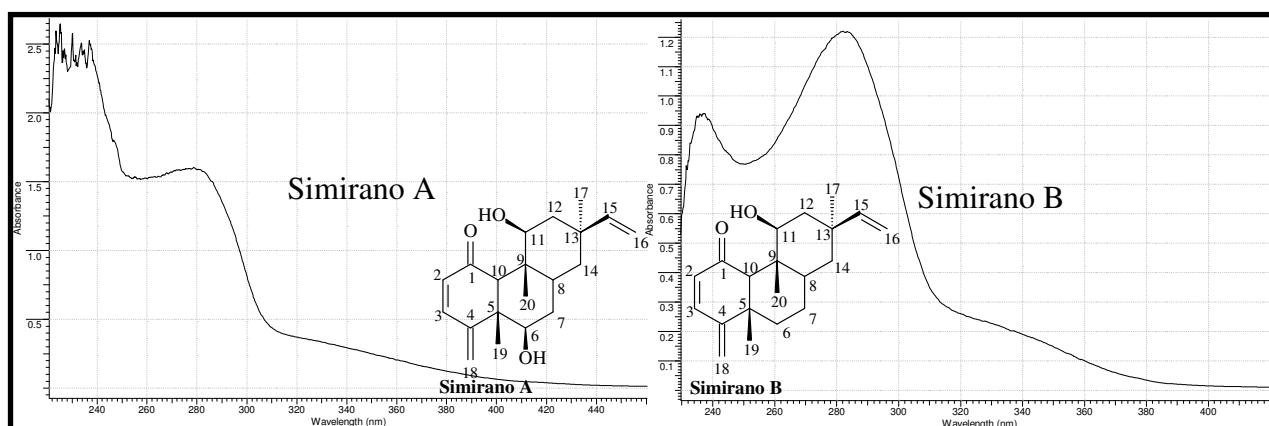


FIGURA 134. Espectros UV dos diterpenos **Simirano A** e **B**.

A presença de carbonos quirais nas substâncias conduziu a análise do desvio da luz polarizada que apresentaram $[\alpha]_D^{25} = +1,7$ (CHCl_3 , c 0,25) Simirano A e $[\alpha]_D^{25} = +6,2$ (CHCl_3 , c 0,25) Simirano B. A presença de um grupo cromóforo próximo aos carbonos quirais nas substâncias motivou a submeter as substâncias a análise por dicroísmo circular para determinar a configuração absoluta destes centros quirais.

Os espectros de DC de ambas as substâncias exibiram curva dicróica com três bandas de absorção λ_{max} nm(\ominus): [\ominus]₂₂₆+1569, [\ominus]₂₈₀+4240, [\ominus]₃₃₀-2259 **Simirano A** e [\ominus]₂₃₂+2941, [\ominus]₂₇₃+3819, [\ominus]₃₂₂-2974 **Simirano B** (Figura 136, página 147).

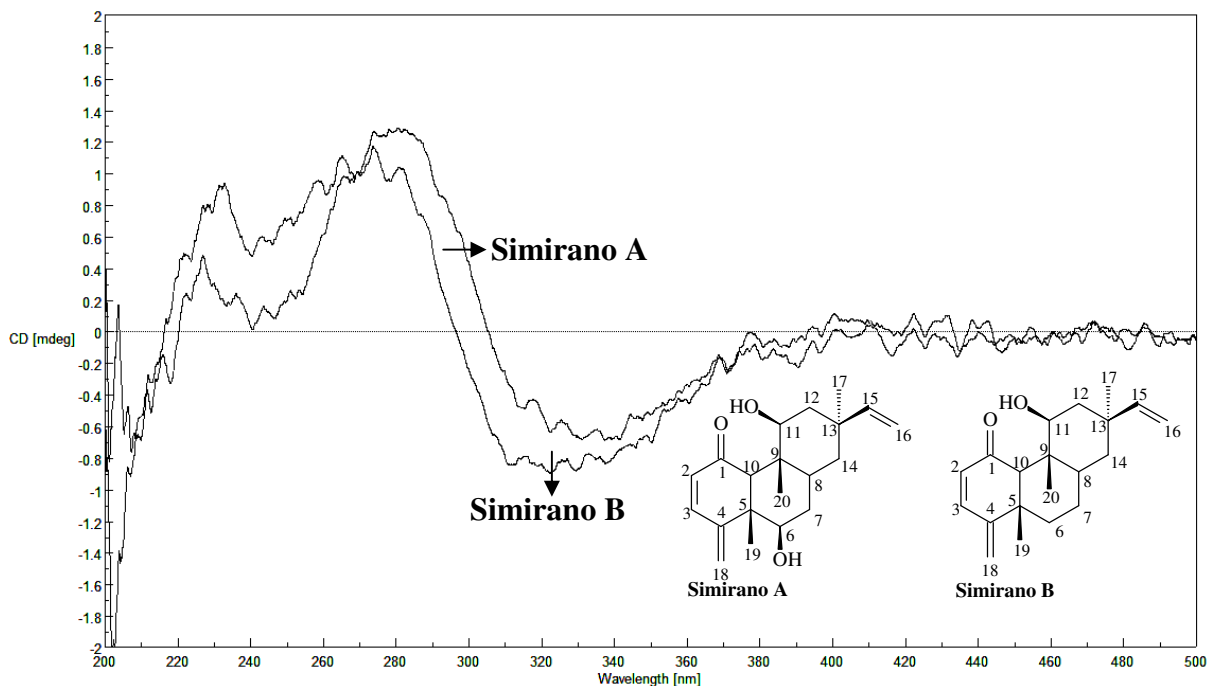


FIGURA 135. Espectros de DC dos diterpenos **Simirano A** e **B**.

Considerando os EC em 280 e 273 nm responsáveis pela transição $\pi \rightarrow \pi^*$ e em 330 e 322 nm responsáveis pela transição $n \rightarrow \pi^*$ nas respectivas substâncias, pode-se definir a configuração absoluta do C-5 alílico em relação ao dieno e do C-10 à carbonila. Seria suficiente a comparação destas curvas com os respectivos EC de um cromóforo idêntico contendo a enona com extensão de conjugação com uma vinilidina. Entretanto, não há na literatura este tipo de cromóforo com análise quiróptica, daí não foi possível este tipo de análise. Desta forma, tivemos que definir a configuração absoluta pela primeira vez com este cromóforo contido nos diterpenos **simiranos A** e **B**. Neste caso a maneira de criar a primeira definição estereoquímica do cromóforo foi aplicando parâmetros empíricos. Para este caso específico não há uma regra empírica de projeção para a definição da configuração (ARAÚJO *et al*, 2011).

Essas regras são sempre usadas para criar coerências nas definições futuras para substâncias semelhantes. Sendo assim, considerou-se oportuna uma adequação da regra do quadrante para aromático, que considera um sistema plano com um carbono benzílico quiral contendo um grupo em axial no plano vertical da projeção (Figuras 132 e 133, página 145). Nestes casos onde não há modelos na literatura para simples comparação das curvas obtidas no espectro de DC, a adequação com qualquer regra empírica para determinar a configuração absoluta, se torna fundamental a determinação da configuração relativa. Desta forma, pode-se introduzir a conformação à regra empírica e determinar a configuração absoluta.

Supondo o plano do dieno na frente do C-5 (*R*) com a metila em axial no plano vertical (Figura 137a e 137b) tem-se um sistema semelhante para aplicação da regra do quadrante para aromático. As projeções das substâncias sobre o quadrante permitiu verificar que há predominância de grupos que contribuem para EC positivo. Sendo definida configuração relativa de C-5, através da interpretação do espectro de NOEDIFF (Figuras 110, 111, 122 e 123, páginas 129 e 140), foi possível concluir as estereoquímica dos demais centros quirais para ambas as substâncias. Ao fazer uma projeção em um plano horizontal da ligação C2-C1=O (Figuras 137a, b, c), verifica-se que a ligação dupla α -carbonila C2-C3 se posiciona abaixo deste o que revela uma contribuição para EC negativo, observado pela transição $n \rightarrow \pi^*$ em 320 nm. Desta forma foi possível determinar a configuração absoluta para

todos os centros quirais em ambas as substâncias e baseado nesta análise obteve-se o nome sistemático das substâncias como (5R,6R,8R,9R,10S,11S,13S)-6 β ,11 β -dihidroxi-2,4(18),15-eritroxilatrien-1-ona (**Simirano A**) e (5S,8R,9R,10S,11S,13S)-11 β -hidroxi-2,4(18),15-eritroxilatrien-1-ona (**Simirano B**).

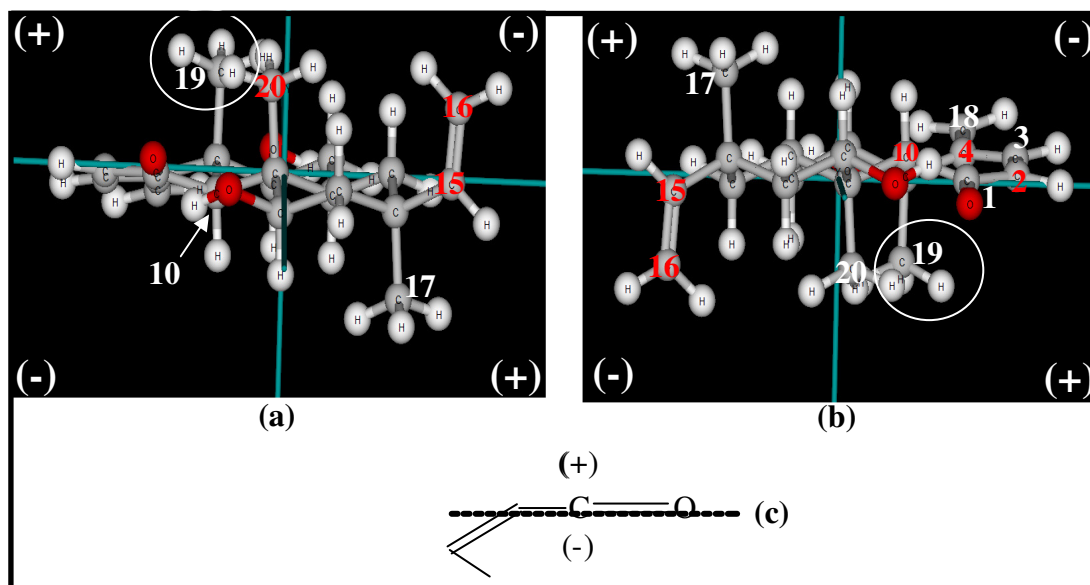


FIGURA 136. a,b) Projeções no modelo quadrante do anel aromático. c) Projeção da carbonila dos diterpenos **Simirano A** e **B**.

5. ENSAIOS BIOLÓGICOS

A biodiversidade dos países tropicais do terceiro mundo, um recurso valioso, com grande variedade de espécies de plantas está sendo pouco explorada. Informações obtidas na medicina folclórica (etnofarmacologia) vêm contribuindo para a seleção de plantas a serem estudadas buscando extratos e metabólitos especiais com potencial promissor para atuarem como extratos fitoterápicos, substâncias fitofármacos e até mesmo modelos para desenvolvimento de fármacos.

Diante desta situação, um dos objetivos de muitos fitoquímicos das nações do terceiro mundo é trabalhar em conjunto com pesquisadores de áreas diversas da saúde visando à aplicabilidade dos metabólitos isolados e extratos buscando de forma incessante substâncias que possam atuar de forma ativa à evolução genética dos microrganismos.

O emprego de bioensaios sensíveis para estudar, fracionar e isolar novos protótipos de fármacos é um dos objetivos do químico de produtos naturais da atualidade, o qual combina três técnicas essenciais para este trabalho que são: técnicas de separação (cromatografia), métodos de elucidação estrutural e bioensaios simples.

Com o objetivo de identificar extratos e substâncias isoladas com atividade biológica realizou-se ensaios químico e biológico paralelo ao estudo fitoquímico das espécies *S. glaziovii*, *S. eliezeriana* e *O. parviflora*.

5.1. Avaliação do potencial antioxidante

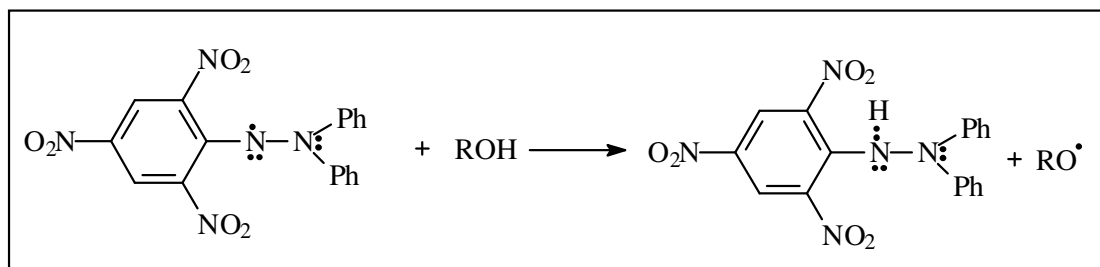
O uso de plantas com fins terapêuticos parece ser tão antigo quanto à própria espécie humana. Entretanto, o conhecimento de suas propriedades antioxidantes é relativamente recente, especialmente nas últimas décadas, observou-se um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo.

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

Essas espécies apresentam diversas funções bioquímicas como a produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular e síntese de substâncias biológicas. Porém, a produção excessiva de radicais livres apresenta efeitos prejudiciais, tais como: peroxidação de lipídios de membranas, de enzimas, carboidratos e DNA. A ocorrência desses efeitos acarreta várias patologias tais como: artrite, choque hemorrágico, doenças cardiovasculares, catarata, disfunções cognitivas e câncer (BABIOR, 2000; BARREIROS *et al.*, 2006).

Uma proposta para a redução dos níveis excessivos de radicais livres no organismo é a ingestão de substâncias antioxidantes que podem ser obtidas por alimentos em uma dieta. Antioxidantes são substâncias que dificultam ou retardam a oxidação de outras substâncias, dificultando desse modo o início da propagação de reações em cadeia. Constituem uma larga gama de substâncias incluindo nitrogenadas, fenóis, carotenóides, terpenóides, entre outras. Existem vários relatos sobre a correlação de substâncias antioxidantes com outros efeitos biológicos como: ação antibacteriana, prevenção a doenças coronarianas, antiviral, envelhecimento precoce (BERGMAN, 2001; YUNES & CALIXTO, 2001).

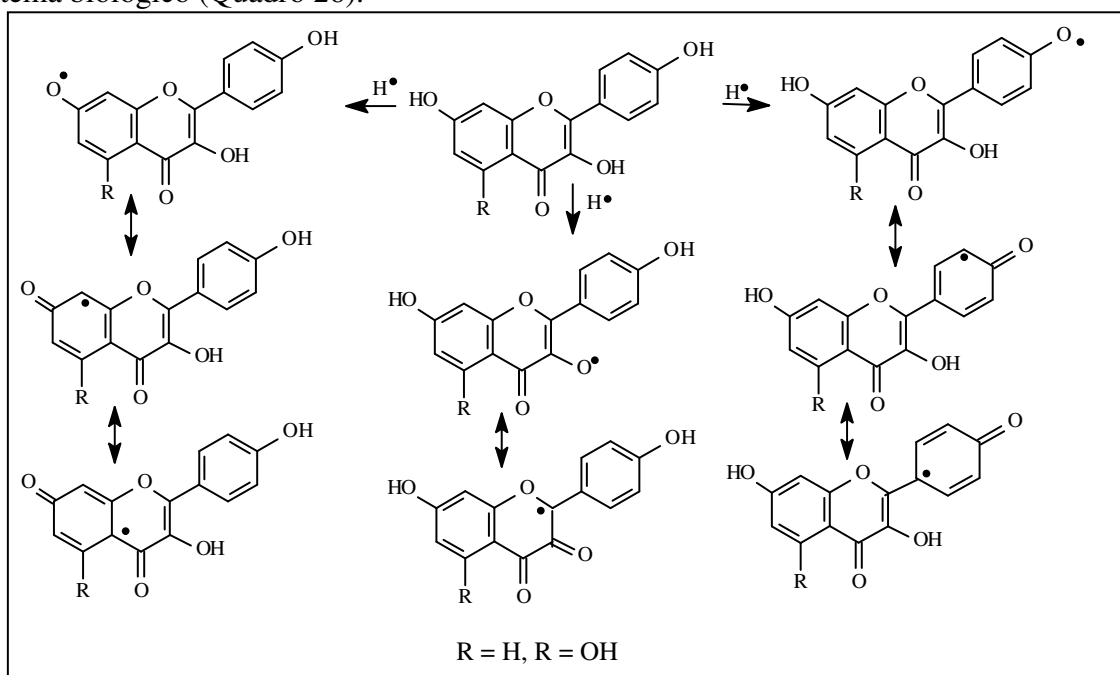
A técnica para avaliação do potencial antioxidante, que utiliza o DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) como radical livre, baseia-se em um ensaio qualitativo e quantitativo do grau da atividade antioxidante e na habilidade das substâncias de agirem como sequestrantes de radicais livres. O DPPH é um radical livre estável à temperatura ambiente com produção de uma solução de coloração violeta em etanol (MENSOR *et al.*, 2001). Devido ao seu elétron ímpar, a solução etanólica de DPPH exibe uma forte banda de absorção na faixa de 515-518 nm. A função deste radical livre no ensaio é a captura de elétrons promovendo a oxidação de substâncias estáveis. O percentual de atividade antioxidante é avaliado relacionando a estabilidade da substância que sofreu oxidação (Quadro 25).



QUADRO 25. Mecanismo de ação do DPPH frente a substâncias fenólicas.

Estudos envolvendo relação estrutura vs atividade demonstram que o potencial antioxidante é elevado quando as substâncias oxidadas apresentam a capacidade de dispersão do radical livre através de estruturas canônicas. A dispersão do elétron desemparelhado

diminui a reatividade característica dos radicais livres e desta forma, os mesmos são excretados do organismo sem que ocorram reações de oxidação em substâncias que compõem o sistema biológico (Quadro 26).



QUADRO 26. Relação estrutura versus atividade antioxidante de flavonóides.

5.1.1. Procedimento experimental

As análises foram realizadas no Laboratório de Química de Produtos Naturais (Fitoquímica) e Química Analítica LCQUI-UENF.

Uma solução estoque de concentração 1,0 mg/mL foi preparada com 10,0 mg de amostra em 10,0 mL de etanol, a qual foi submetida a uma série de diluições de: 25,0; 50,0; 125 e 250 µg/mL. A análise foi realizada reagindo-se 1,00 mL de uma solução etanólica 0,30 mM de DPPH com 2,50 mL de cada concentração das amostras em triplicata. Após 30 minutos, fez-se a leitura em um espectrofotômetro de luz ultravioleta a 518 nm (Esquema 34, página 151).

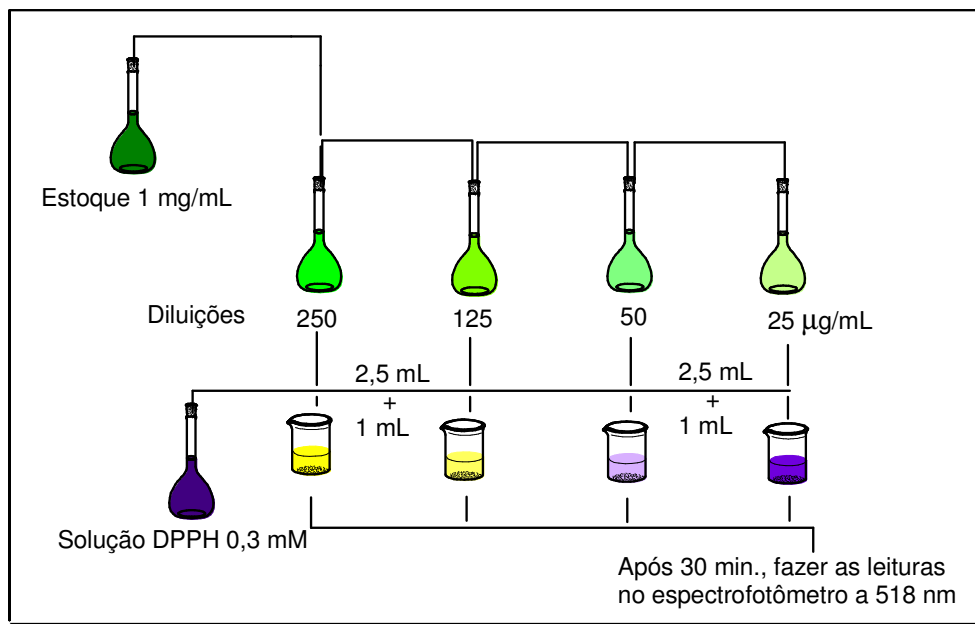
Os valores das absorbâncias foram convertidos para porcentagem de Atividade Antioxidante (AA%) usando a seguinte fórmula:

$$AA\% = 100 - \left\{ \frac{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100]}{Abs_{controle\ negativo}} \right\}$$

O valor da concentração efetiva necessária para reduzir 50% do radical livre (CE₅₀) foi obtido através de uma regressão linear para cada extrato, onde a abscissa representa as concentrações das amostras e a ordenada a porcentagem de Atividade Antioxidante (AA%).

Como controle positivo utilizou-se o flavonóide rutina Merk[®], substância com elevado potencial antioxidante, que foi submetido ao mesmo procedimento realizado para as amostras. O valor de CE₅₀ obtido para o flavonóide será comparado com os resultados das amostras. Desta forma, obtém-se um valor parâmetro que irá indicar as amostras com maior e menor potencial antioxidante. Quanto menor for a CE₅₀, maior será o potencial antioxidante.

O controle negativo foi 1,0 mL de solução de DPPH e 2,5 mL de etanol. A leitura do branco foi feita com 2,5 mL de cada diluição das amostras acrescida de 1,0 mL de etanol.



ESQUEMA 34. Procedimento experimental da avaliação do potencial antioxidante.

5.1.2. Resultados e Discussão

A análise de variância ANOVA seguido do teste de *t*-student, concluiu que os resultados obtidos de CE_{50} para as partições não apresentaram diferença estatisticamente significativa a um nível de 95% ($p < 0,05$) quando comparado com o controle positivo. Foram considerados para obter os valores CE_{50} apenas regressões que apresentaram coeficiente de correlação (r^2) de até 0,8500.

Dentre as 15 frações analisadas, apenas cinco apresentaram concentrações efetivas inferiores ao controle positivo com destaque para a fração em acetato de etila da casca da madeira de *S. eliezeriana* CE_{50} $12,03 \pm 0,07$ µg/mL (Tabela 8, página 152). Dentre as frações que foram submetidas ao estudo fitoquímico (SEMD e SGMD), apenas a última apresentou resultado inferior ao controle positivo CE_{50} $23,91 \pm 0,15$ µg/mL. Este valor obtido pode ser justificado pela presença de substâncias identificadas na fração (lignanas e cumarinas) que são substâncias que possuem grupos fenólicos que ao serem oxidados convertendo-se em radicais livres apresentam estabilidade pela conjugação que apresentam no anel. Apesar das demais frações não apresentarem CE_{50} inferiores ao controle positivo pode-se considerar promissoras as que apresentaram concentrações inferiores a 30,0 µg/mL devido à proximidade com o valor do controle. Em geral os resultados foram satisfatórios, pois apenas um extrato apresentou CE_{50} acima de 100 µg/mL. Esses resultados justificam a característica de espécies do gênero *Simira* de apresentarem coloração vermelha intensa do cerne e da casca da madeira após sofrerem injúrias. Esta característica pode estar associada à ação do ar em provocar oxidação dos metabólitos especiais. Este efeito produz substâncias que apresentam transições eletrônicas de menor energia promovendo deslocamento batocrômico. Este deslocamento promove a emissão de cor complementar que neste caso é a vermelha.

Tabela 8. Porcentagens de Atividade Antioxidante (%AAO) e CE₅₀ das frações da casca da madeira e madeira das espécies de *Simira*

		<i>Simira glaziovii</i>				
		Porcentagens de Atividade Antioxidante (%AAO)				
Concentrações (µg/mL)		250	125	50	25	CE ₅₀ (µg/mL)
Frações						
Casca da Madeira	SGCMD	76,75± 0,80	62,04± 1,20	49,41± 0,84	44,13± 0,67	23,42± 0,30
	SGCMA	81,37± 3,15	64,73± 1,92	48,70± 1,63	22,71± 1,68	38,67± 0,75
	SGCMB	93,00± 0,29	71,49± 0,98	52,57± 0,73	45,72± 1,84	28,88± 0,10
	SGCMR	66,06± 0,80	53,08± 0,38	43,40± 0,70	40,19± 0,64	21,48± 0,30
Madeira	SGMD	90,93± 0,54	75,60± 0,11	61,83± 0,45	50,37± 0,24	23,91± 0,15
	SGMA	49,56± 0,21	49,13± 1,49	36,29± 0,20	20,88± 1,22	302,6± 0,11
	SGMB	94,28± 0,08	56,43± 2,34	34,59± 2,27	38,65± 1,83	40,60± 0,05
Partições		<i>Simira eliezeriana</i>				
Casca da Madeira	SECMD	71,52± 1,50	39,72± 3,70	20,93± 3,17	11,6± 4,47	55,19± 1,60
	SECMA	88,26± 0,94	87,89± 3,46	81,91± 0,36	68,73± 2,20	12,03± 0,07
	SECMB	80,50± 0,25	87,15± 4,51	75,78± 4,23	40,19± 3,94	26,45± 1,05
	SECMR	71,61± 1,80	56,22± 3,36	39,21± 1,47	32,21± 6,05	28,57± 2,08
Madeira	SEMD	37,92± 3,61	17,64± 1,58	10,30± 4,61	8,36± 4,19	58,5± 9,16
	SEMA	83,88± 0,78	70,61± 2,11	33,01± 0,92	27,53± 1,93	40,35± 0,41
	SEMB	72,98± 3,46	44,20± 4,88	20,51± 5,76	22,81± 6,16	47,86± 2,88
	SEMRM	68,05± 1,57	38,93± 1,41	22,58± 0,87	19,58± 0,93	45,32± 1,45
Controle Rutina		62,53± 0,40	60,09± 0,16	55,53± 0,80	25,36± 3,36	26,96 ± 0,19

SGCMD-*Simira glaziovii* Casca da Madeira Diclorometano, SGCMA-*Simira glaziovii* Casca da Madeira Acetato de etila, SGCMB-*Simira glaziovii* Casca da Madeira n-Butanol, SGCMR-*Simira glaziovii* Casca da Madeira Resíduo, SGMD-*Simira glaziovii* Madeira Diclorometano, SGMA-*Simira glaziovii* Madeira Acetato de etila, SGMB-*Simira glaziovii* Madeira n-Butanol, SECMD-*Simira eliezeriana* Casca da Madeira Diclorometano, SECMA-*Simira eliezeriana* Casca da Madeira Acetato de etila, SECMB-*Simira eliezeriana* Casca da Madeira n-Butanol, SECMR-*Simira eliezeriana* Casca da Madeira Resíduo, SEMD-*Simira eliezeriana* Madeira Diclorometano, SEMA-*Simira eliezeriana* Madeira Acetato de etila, SEMB-*Simira eliezeriana* Madeira n-butanol, SEMR-*Simira eliezeriana* Madeira Resíduo

5.2. Bioensaio de letalidade contra as larvas de *Artemia salina* leach

A. salina é um microcrustáceo de água salgada que é utilizado como alimento para peixes. Em lojas de piscicultura podem-se obter os ovos e também as larvas, porém, já mortas. Este bioensaio foi proposto por McLaughlin e utiliza os ovos de *A. salina* que são eclodidos em água salgada avaliando-se a DL₅₀ (Dose Letal para 50% da população de larvas submetidas ao ensaio em µg/mL). É caracterizado como um bioensaio simples para determinar o nível de toxidez para substâncias puras e extratos. (MCLAUGHLIN *et al.*, 1995).

A praticidade e simplicidade que envolve o bioensaio favorecem sua utilização sistemática dentro de um laboratório de pesquisa. A técnica tem a vantagem de apresentar baixo custo, rapidez e não exigir técnicas assépticas (MEYER *et al.*, 1982).

O teste baseia-se no princípio de que substâncias e extratos apresentem nível de toxidez em pequenas doses. Deste modo, a mortalidade *in vivo* de organismo de maior simplicidade na escala zoológica pode indicar a bioatividade do material analisado. Na literatura há vários trabalhos que relacionam a toxidez sobre as larvas de *A. salina* com

atividades biológicas, tais como: antifúngica, viruscida, antimicrobiana e parasiticida (SIQUEIRA *et al.*, 1998).

A literatura também mostra a correlação existente entre a toxicidade sobre o crustáceo e a citotoxicidade para células cancerosas do tipo P-388 (MEYER *et al.*, 1982). Segundo McLaughlin, valores de $DL_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$ são considerados ativos para extratos brutos e $DL_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$, ativos para substâncias puras.

Então, com o objetivo de se avaliar o nível de toxidez, as partições das espécies de *Simira* foram submetidas ao bioensaio frente às larvas de *A. salina*.

5.2.1. Procedimento Experimental

As análises foram realizadas no Laboratório de Química de Produtos Naturais (Fitoquímica) LCQUI-UENF.

Na análise foram utilizados 50 mg de cada fração que foram diluídos em um volume de 5 mL no seguinte sistema de solventes: [H₂O:DMSO (3:2)], formando soluções estoque de 10 mg/mL.

Foram adicionados em tubos de ensaio alíquotas de: 50, 100, 200, 300 e 500 μL que foram diluídas a um volume final de 5 mL com água do mar artificial. As concentrações finais das alíquotas foram de: 100, 200, 400, 600 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. O teste foi realizado em triplicata.

Em cada tubo foram adicionadas 15 larvas de *A. salina* juntamente com as diluições descritas acima e após 24 horas em presença de luz foi realizada a contagem dos indivíduos vivos e mortos. A quantificação dos resultados foi obtida através do método estatístico Finney Probit que forneceu a DL_{50} de cada fração analisada.

O controle positivo utilizado foi uma solução de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇), nas mesmas concentrações das frações. No controle negativo foi utilizado o sistema de solventes H₂O/DMSO (3:2) a uma concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

5.2.2. Resultados e discussão

Segundo McLaughlin, valores de $DL_{50} \leq 10^3 \mu\text{g/mL}$ são considerados ativos para extratos brutos e frações. Os resultados obtidos no ensaio estão ilustrados na Tabela 9, página 154 e dentre as 15 frações analisadas apenas quatro apresentaram valores de DL_{50} abaixo de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

As frações em diclorometano de ambas as partes das plantas apresentaram atividade, com destaque para as frações da casca da madeira e madeira de *S. eliezeriana* (SECMD, $DL_{50} = 169,71 \mu\text{g/mL}$) e (SEMD, $DL_{50} = 203,64 \mu\text{g/mL}$). O alto nível de toxidez pode estar associado à presença de classes de metabólitos especiais como cumarinas e terpenóides isolados das frações trabalhadas, além do alcalóide β -carbolínico harmana, presente nessas frações. Metabólitos especiais destas classes apresentam elevado potencial antitumoral, larvicida, antimicrobiano relatado na literatura (SIQUEIRA *et al.*, 1998).

Estes resultados justificam a implantação deste ensaio simples, rápido e de baixo custo como um teste preliminar de extratos que pode direcionar posteriormente para avaliação de atividades biológicas e farmacológicas mais específicas.

TABELA 9. Nível de toxidez das frações de *S. glaziovii* e *S. eliezeriana* frente às larvas de *A. salina*

Material vegetal	<i>Simira glaziovii</i>		
	Frações	DL ₅₀ (µg/mL)	Limite de Confiança a 95%
Casca da Madeira	SGCMD	561,4	398,3-860,3
	SGCMA	>1000	-
	SGCMB	>1000	-
	SGCMR	>1000	-
Madeira	SGMD	330,9	232,4-503,1
	SGMA	>1000	-
	SGMB	>1000	-
<i>Simira eliezeriana</i>			
Casca da Madeira	SECMD	169,71	(115,42 – 265,60)
	SECMA	> 1000	-
	SECMB	> 1000	-
	SECMR	987,44	(598,16 – 2023)
Madeira	SEMD	203,64	(156,33 – 267,82)
	SEMA	> 1000	-
	SEMB	> 1000	-
	SEMR	> 1000	-

SGCMD-*Simira glaziovii* Casca da Madeira Diclorometano, SGCMA-*Simira glaziovii* Casca da Madeira Acetato de etila, SGCMB-*Simira glaziovii* Casca da Madeira n-Butanol, SGCMR-*Simira glaziovii* Casca da Madeira Resíduo, SGMD-*Simira glaziovii* Madeira Diclorometano, SGMA-*Simira glaziovii* Madeira Acetato de etila, SGMB-*Simira glaziovii* Madeira n-Butanol, SECMD-*Simira eliezeriana* Casca da Madeira Diclorometano, SECMA-*Simira eliezeriana* Casca da Madeira Acetato de etila, SECMB-*Simira eliezeriana* Casca da Madeira n-Butanol, SECMR-*Simira eliezeriana* Casca da Madeira Resíduo, SEMD-*Simira eliezeriana* Madeira Diclorometano, SEMA-*Simira eliezeriana* Madeira Acetato de etila, SEMB-*Simira eliezeriana* Madeira n-butanol, SEMR-*Simira eliezeriana* Madeira Resíduo

5.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

Nas últimas duas décadas houve um considerável aumento nos casos de infecções causadas por microrganismos, que pode ser associado a imunodeficiências causadas pelo HIV, quimioterapias e transplantes. Diversos microrganismos são patógenos aos seres vivos. Nos homens, esses microrganismos causam várias doenças e até mesmo pode levar a óbito.

A descoberta de novas substâncias com atividade antimicrobiana constitui uma necessidade urgente devido ao aumento da incidência de enfermidades infecciosas novas e re-emergentes e também, devido à alta capacidade dos microrganismos de desenvolverem resistência aos antibióticos usados clinicamente (MALLAVARAPU, 2001). Um relatório de 1994 do *Centers for Disease Control*, EUA, salienta a preocupação não só sobre a possibilidade de uma "época probiótica", mas também, a nossa fraca capacidade de detectar, conter e prevenir as doenças emergentes. Além da resistência aos antibióticos, a incidência de infecções oportunistas continua a aumentar rapidamente devido ao crescente número de pacientes imunocomprometidos, e isso tem criado necessidade de uma terapia mais eficaz para esses patógenos.

O surgimento de micróbios com progressiva resistência aos antibióticos estabelecidos promove um grande incentivo para a descoberta de novos agentes antimicrobianos, enfatizando aqueles de origem vegetal, uma vez que o Brasil apresenta a maior parcela da biodiversidade do planeta. A utilização de plantas como recurso a busca de novas substâncias

mais eficazes é uma das mais antigas armas empregadas. Dados da Organização Mundial de Saúde mostram que cerca de 80% da população mundial faz uso de algum tipo de planta na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável (WHO, 2002).

Dentre uma classe de substâncias que confirmadamente apresenta atividade antimicrobiana estão os fenóis. É uma classe de substâncias que se caracteriza como anti-sépticos pelo fato de lesionarem as células microbianas pela alteração da permeabilidade seletiva da membrana citoplasmática, causando o extravasamento das substâncias intracelulares vitais (PELCZAR *et al.*, 1997) (Tabela 10).

TABELA 10. Atividade antimicrobiana do fenol e derivados (coeficiente fenólico)

Microrganismos/substâncias	<i>Salmonella typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Fenol	1,0	1,0	1,0
o-Cresol	2,3	2,3	2,0
m-Cresol	2,3	2,3	2,0
p-Cresol	2,3	2,3	2,0
Etilfenol	6,3	6,3	7,8
2,4-Dimetilfenol	5,0	4,4	5,0

5.3.1. Procedimento Experimental

As análises foram realizadas no Laboratório de Sanidade Animal LSA-UENF sob supervisão do professor Olney Vieira da Motta.

Para a realização deste ensaio, foi empregada a técnica de difusão em ágar (HADACECK & GREGER, 2000).

Como meio de cultura para as leveduras foi utilizado o Ágar Sabouraud dextrose e para as bactérias foi utilizado ágar Mueller Hinton ambos da (Acumedia, EUA) que foram adicionados em placas de Petri de 14 cm de diâmetro até atingir uma espessura de 5 mm de meio de cultura. Com o auxílio de um suabe foi semeada sobre o meio uma alíquota de 100µL do inoculo dos microrganismos (Tabela 11, página 156) previamente preparada com uma suspensão de células em solução salina NaCl 0,89% (*m/v*) e padronizadas pelo Densimat (Bio Mérieux) na Escala de McFarland nº 0,5 ($1,5 \times 10^8$ células/mL).

Após a semeadura do microrganismo, foram feitas perfurações (poços no meio de cultura), que receberam um volume de 50 µL das amostras analisadas. Foi utilizada uma concentração de 25 mg/mL para cada fração.

Como controle positivo foi utilizada uma solução 20 µg/mL de Nitrato de Miconazol (Vodol[®] lote 606401, União Química, Brasil) para as leveduras e o antibiótico gentamicina (Sigma cell culture) para as bactérias. O controle negativo foi apenas o solvente utilizado para solubilizar as amostras DMSO 2% (*v/v*) em água.

Após aplicação das amostras e dos controles, as placas foram incubadas em estufa por um período de 24-36 h à 37 °C.

Uma distância de aproximadamente 1,5 cm foi mantida para que não ocorresse sobreposição dos halos. A leitura dos resultados foi realizada medindo-se o diâmetro dos halos de inibição. O ensaio foi realizado em triplicata.

TABELA 11. Microrganismos utilizados no ensaio

Espécies	Descrição
<i>Candida albicans</i>	ATCC 36802
<i>Candida inconspícua</i>	ATCC 16783
<i>Candida glabrata</i>	ATCC 2001
<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 13803
<i>Candida krusei</i>	ATCC 34135
<i>Candida guilliermondii</i>	ATCC 6260
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019
<i>Candida lusitaniae</i>	ATCC 34449
<i>Candida spp.</i>	ATCC 34147
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25932
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 10832
<i>Staphylococcus aureus</i>	RN6390B
<i>Staphylococcus intermedius goia</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	leite
<i>Staphylococcus aureus</i>	humanos pele
<i>Staphylococcus aureus</i>	381
<i>S. epidermidis</i>	ATCC1228
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATTC29212
Enterococcus Folha	78
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922
<i>Pseudomonas Lazy</i>	-

5.3.2. Resultados e discussão

Os resultados obtidos no ensaio estão listados nas Tabelas 12 e 13 páginas 157 e 158. Das 17 frações testadas, apenas sete apresentaram inibição para pelo menos um microrganismo. Destacam-se as partições de *S. glaziovii* inibição frente à maioria dos microrganismos submetidos ao ensaio.

Dentre os resultados obtidos para as frações da casca da madeira de *S. glaziovii* os que apresentaram maiores halos de inibição de crescimento quando comparados com o controle positivo gentamicina, foram às frações em acetato de etila ($22 \pm 0,6$ mm) e diclorometano ($21 \pm 1,6$ mm) para a cepa *Staphylococcus intermedius goia*. Nas frações da madeira de *S. glaziovii*, a fração em acetato de etila foi o que apresentou maior atividade ($17 \pm 0,6$ mm) frente à cepa *Staphylococcus aureus* RN6390B (Tabela 13, página 158).

O potencial inibitório das frações da casca da madeira e madeira de *S. eliezeriana*, mostrou a cepa de *Escherichia coli* como a mais sensível à fração em diclorometano da casca da madeira ($14 \pm 0,6$ mm) e a *Staphylococcus aureus* ATCC10832 foi mais sensível a fração em acetato de etila da madeira ($17 \pm 0,6$ mm).

Foi observado que dentre as 12 cepas submetidas à análise que as dos gêneros *Staphylococcus* e *Escherichia* foram as mais susceptíveis às frações, enquanto as cepas de *Enterococcus* e *Pseudomonas* foram resistentes.

Ao se analisar o comportamento inibitório das frações frente às cepas de leveduras do gênero *Candida*, observa-se grande resistência das cepas na concentração testada. Destacam-se as frações em diclorometano e acetato de etila da madeira de *S. glaziovii*. As demais não apresentaram inibição do crescimento das leveduras. Dentre as nove cepas testadas destacam-se a suscetibilidade de *C. inconspícua* frente a ambas as frações (Tabela 12, página 157).

TABELA 12. Resultados do teste antifúngico

Bactérias	<i>Simira glaziovii</i>		Controle positivo
	Madeira		Nitrato de miconazol
	SGMD	SGMA	
<i>Candida guilliermondii</i>	12± 0,04	-	39± 0,3
<i>Candida lusitaniae</i>	10± 0,06	13± 0,5	42± 0,2
<i>Candida parapsilosis</i>	-	-	37± 0,6
<i>Candida krusei</i>	10± 0,06	-	24± 0,06
<i>Candida spp.</i>	-	-	33± 0,01
<i>Candida inconspícua</i>	17± 0,06	20± 0,1	37± 0,3
<i>Candida glabrata</i>	10± 0,01	10± 0,01	33± 0,3
<i>Candida tropicalis</i>	14± 0,1	-	27± 0,2
<i>Candida albicans</i>	10± 0,3	10± 0,1	39± 0,2

SGMD-*Simira glaziovii* Madeira Diclorometano, SGMA-*Simira glaziovii* Madeira Acetato de etila

Halos de inibição em milímetros

TABELA 13. Resultados do teste antibacteriano.

Bactérias	<i>Simira glaziovii</i>			<i>Simira eliezeriana</i>				Controle positivo
	Casca da Madeira		Madeira	Casca da Madeira		Madeira		
	SGCMD	SGCMA	SGMD	SECMD	SECMA	SEMA	SEMB	Gentamicina
<i>S. aureus</i> ATCC 25932	14,0± 0,6	-	-	-	-	14,0± 0,01	10,0± 0,01	26,0± 0,01
<i>S. aureus</i> ATCC 10832	20,0± 0,01	14,0± 0,6	12,0± 0,6	-	14,0± 0,01	17,0± 0,6	-	37,0± 0,6
<i>S. aureus</i> RN6390B	13,0± 0,6	-	13,0± 1,5	-	17,0± 0,6	8,00± 0,6	-	27,0± 0,6
<i>S. intermedius</i> goia	21,0± 1,6	22,0± 0,6	10,0± 0,01	-	13,0± 0,6	10,0± 1,5	12,0± 1,0	36,0± 1,0
<i>S. aureus</i> leite	16,0± 0,6	14,0± 0,01	10,0± 0,6	11,0± 1,6	10,0± 0,6	-	-	34,0± 0,01
<i>S.aureus</i> humanos pele	15,0± 0,6	15,0± 0,6	10,0± 0,6	-	11,0± 0,01	10,0± 1,0	-	33,0± 1,0
<i>S. aureus</i> 381	16,0± 0,01	11,0± 1,6	10,0± 0,6	-	11,0± 0,6	-	-	31,0± 1,0
<i>S. epidermidis</i> ATCC1228	17,0± 0,6	12,0± 0,6	10,0± 0,01	-	11,0± 0,6	-	-	30,0± 1,0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATTC29212	-	-	-	-	-	-	-	25,0± 0,01
<i>Enterococcus</i> Folha 78	-	-	-	-	-	-	-	23,0± 0,01
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	14,0± 0,6	20,0± 0,6	12,0± 0,6	14,0± 0,6	15,0± 0,0	-	-	28,0± 1,0
<i>Pseudomonas Lazy</i>	-	-	-	-	-	-	-	27± 0,6

SGCMD-*Simira glaziovii* Casca da Madeira Diclorometano, SGCMA-*Simira glaziovii* Casca da Madeira Acetato de etila, SGMD-*Simira glaziovii* Madeira Diclorometano, SECMD-*Simira eliezeriana* Casca da Madeira Diclorometano, SECMA-*Simira eliezeriana* Casca da Madeira Acetato de etila, SEMA-*Simira eliezeriana* Madeira Acetato de etila, SEMB-*Simira eliezeriana* Madeira n-butanol

Halos de inibição em milímetros.

5.4. Atividade antiviral

A maioria das doenças infecciosas que afetam o homem e os animais é causada por vírus. Estas doenças ainda constituem um sério problema principalmente em relação aos indivíduos infectados. As diversas medidas sanitárias adotadas envolvem o controle das doenças através do uso de vacinas. Porém, com o passar do tempo esses organismos passam a adquirir resistência e os fármacos e vacinas deixam de ser eficazes havendo a necessidade de se buscar novas substâncias mais potentes ao organismo agora geneticamente modificado por decorrência da seleção natural.

A descoberta de substâncias antivirais pode ser comparada a revolução ocorrida na época do desenvolvimento dos antibióticos e anuncia uma nova era na medicina atual. As doenças virais epidêmicas já causaram muitas mortes no passado como a gripe espanhola e em nossos dias como no caso da pneumonia asiática ou SARS ("*severe acute respiratory syndrome*"), continua causando mortalidade (SIMONI, 2003). A disponibilidade de alternativas aos tratamentos convencionais colabora para o controle das doenças causadas por vírus. Nenhuma outra doença causa tanta debilidade como as causadas por vírus e até recentemente essas doenças são tratadas apenas pelo alívio dos sintomas do que pelo ataque ao vírus propriamente dito (SIMONI, 2003).

Visando identificar frações que possam ser potencialmente antivirais para estudos de isolamento e identificação estrutural de substâncias bioativas, fez-se o ensaio antiviral das frações de *S. glaziovii*, *S. eliezeriana* e *O. parviflora* além das substâncias isoladas desta última.

5.4.1. Procedimento Experimental

O experimento foi realizado no laboratório de Virologia do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes-CCS-UFRJ sob supervisão da professora 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 37⁰C em ambiente com 5% de CO₂.

As amostras de vírus herpes simplex tipos 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2) pertencem à coleção do LEDAC (Laboratório Experimental de Drogas Antivirais e Citotóxicas).

As amostras virais foram caracterizadas pelo Laboratório de Viroses Respiratórias, Entéricas e Oculares (LAVIREO) como sendo dos tipos 1 e 2.

Avaliação do nível de toxidez

Para a avaliação da atividade antiviral das frações, é 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 frações 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) sendo utilizada para os estudos antivirais.

b. Verificação da viabilidade celular

A citotoxidez de substâncias e frações pode ser determinada através de técnica denominada “*dye-uptake*” (BORENFREUND & 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 da droga) – (DO do controle de células)]/[DO do Vermelho Neutro) – (DO do Controle de células)] x 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-Concentração Mínima Não Tóxica (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) 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):

$$\text{IIV} = B - A$$

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

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

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

5.4.2. Resultados e discussão

Os resultados estão listados na Tabela 14, página 162, que mostra os resultados obtidos em percentual de inibição dos vírus herpes simplex tipo 1 e 2 e adenovírus responsável pela conjuntivite (**Adv19**). Por ser a etapa inicial de análise nesta triagem são consideradas com potencial antiviral apenas amostras que apresentam percentual de inibição superior a 85%. Dentre as 16 frações analisadas, as provenientes de *S. glaziovii* apresentaram melhores resultados frente aos vírus do herpes. As frações provenientes de *S. eliezeriana* apresentaram percentuais elevados apenas para frações polares com destaque para as butanólicas da casca da madeira SECMB (98,4 e 99,9%) e madeira SEMB (99 e 97,8%). O percentual de inibição das frações frente o adenovírus **Adv19** foi discreto com apenas duas frações com níveis considerados satisfatórios, o resíduo metanólico da madeira de *S. glaziovii* SGMR (94,4%) e a fração em diclorometano da casca da madeira de *S. eliezeriana* SEGD (96,8%).

Dentre as frações de *O. parviflora* analisadas, todas apresentaram atividade antiviral. Somente a fração em diclorometano não apresentou percentual de inibição para o vírus herpes 2. Dentre as substâncias isoladas de *O. parviflora* destacam-se os flavonóides com percentuais elevados de inibição de ambos os vírus da herpes. Destaca-se o resíduo metanólico como a única fração com percentual inibitório do adenovírus tipo 19 (**Adv 19**) associado a conjuntivite (ARAÚJO *et al.*, 2011).

Partindo dos resultados deste experimento puderam-se selecionar as frações mais promissoras para serem submetidas à avaliação do mecanismo de ação que está sendo realizado bem como a avaliação da citotoxicidade para as frações mais promissoras.

TABELA 14. Percentual de Inibição dos extratos e substâncias contra os vírus HSV-1 e 2 e adenovírus 19.

% de inibição dos vírus				% de inibição dos vírus				% de inibição dos vírus			
<i>S. glaziovii</i>				<i>S. eliezeriana</i>				<i>O. parviflora</i>			
Frações	HSV-1	HSV-2	AdV19	Frações	HSV-1	HSV-2	AdV19	Frações	HSV-1	HSV-2	AdV19
SGCMD	99,9	99,9	0	SECMD	87,4	82,2	96,8	OPFM	99,9	99,9	42,5
SGCMA	99,9	99,9	0	SECMA	77,6	77,6	55,3	OPFM-D	93	0	20,6
SGCMB	98,2	90	20,6	SECMB	98,4	99,9	27,5	OPFM-R	95,4	98,6	90
SGCMR	82,2	0	0	SECMR	98,7	94,4	20,6	OPFM-A	99,9	99,9	36,9
SGMD	60,2	82,2	0	SEMD	77,6	43,8	0	Agatisflavona	94,4	85,9	36,9
SGMA	99,9	99,3	0	SEMA	99,9	85,9	0	7''metil-agatisflavona	82,2	95,5	55,3
SGMB	99	93	0	SEMB	99	97,8	0	Lupeol	68,4	0	55,3
SGMR	96	68,4	94,4	SEMR	68,4	0	0	-	-	-	-

SGCMD-*Simira glaziovii* Casca da Madeira Diclorometano, SGCMA-*Simira glaziovii* Casca da Madeira Acetato de etila, SGCMB-*Simira glaziovii* Casca da Madeira n-Butanol, SGCMR-*Simira glaziovii* Casca da Madeira Resíduo, SGMD-*Simira glaziovii* Madeira Diclorometano, SGMA-*Simira glaziovii* Madeira Acetato de etila, SGMB-*Simira glaziovii* Madeira n-Butanol, SGMR-*Simira glaziovii* Madeira Resíduo, SECMD-*Simira eliezeriana* Casca da Madeira Diclorometano, SECMA-*Simira eliezeriana* Casca da Madeira Acetato de etila, SECMB-*Simira eliezeriana* Casca da Madeira n-Butanol, SECMR-*Simira eliezeriana* Casca da Madeira Resíduo, SEMD-*Simira eliezeriana* Madeira Diclorometano, SEMA-*Simira eliezeriana* Madeira Acetato de etila, SEMB-*Simira eliezeriana* Madeira n-butanol, SEMR-*Simira eliezeriana* Madeira Resíduo, OPFM-*Ouratea parviflora* Folhas Metanol, OPFM-D-*Ouratea parviflora* Folhas Metanol- Diclorometano, OPFM-R-*Ouratea parviflora* Folhas Metanol-Resíduo, OPFM-A-*Ouratea parviflora* Folhas Metanol-Acetato de etila

CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico das espécies *S. eliezerana* e *S. glaziovii* permitiu o isolamento e identificação de 17 substâncias sendo destas, três inéditas na literatura e 12 inéditas no gênero. Este trabalho contribuiu significativamente para o conhecimento e credenciamento dos metabólitos especiais do gênero, assinalando a grande diversidade de metabólitos que o gênero possui.

Os ensaios biológicos mostraram resultados bastante significativos que assinalaram as frações mais promissoras para estudos futuros. Os resultados obtidos na avaliação do potencial antioxidante podem ser atribuídos as substâncias fenólicas (cumarinas, lignanas e aldeídos) que possivelmente estão associados à característica das espécies que adquirem coloração vermelho intenso quando o caule é cortado. O alcalóide harmana, isolado em grandes quantidades, e onipresente em todas as frações de baixa e média polaridade, confirmou-se como marcador quimiotaxonômico do gênero. Os diterpenos eritroxilenos, que foram confirmados como inéditos na literatura, apresentaram em ambas as espécies estudadas e de acordo com a sinonímia da espécie *S. glaziovii* (*S. erithroxylon*) há possibilidade de também serem marcadores quimiotaxonômicos do gênero. Esta informação será avaliada futuramente para encontrar possível correlação e a possibilidade de atribuir estes diterpenos como marcadores do gênero.

Dentre as técnicas espectroscópicas para elucidação estrutural destaca-se a análise por dicroísmo circular que aliada aos experimentos de RMN principalmente, NOEDIFF, possibilitou determinar a configuração absoluta dos dois diterpenos eritroxilenos Simirano A e Simirano B.

O estudo fitoquímico de *O. parviflora* contribuiu de forma significativa confirmando os biflavonóides amentoflavona, agatisflavona e 7''-metil-*O*-agatisflavona como marcadores quimiossistemáticos do gênero.

A análise das frações ricas em substâncias fenólicas por CLAE-EM possibilitou atribuir a fórmula estrutural para 15 substâncias fenólicas sendo 14 flavonóides. Outras análises destas frações devem ser realizadas para confirmação das propostas.

Os resultados obtidos no ensaio antiviral frente aos vírus da herpes simplex 1 e 2 e adenovírus da conjuntivite mostraram-se bastante significativos destacando os resultados dos biflavonóides agatisflavona e 7''-metil-*O*-agatisflavona contra os vírus da herpes simplex 1 e 2. A próxima etapa do trabalho será a determinação do mecanismo de ação para melhor elucidação da atividade das substâncias frente aos vírus. Os resultados obtidos com as frações frente o adenovírus da conjuntivite Adv19, mostraram como significativos apenas aqueles que obtiveram percentual de inibição até 90%. As frações com estes resultados serão submetidas a fracionamento cromatográfico para identificação dos metabólitos especiais responsáveis pela atividade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, P. K.; BANSAL, M. C.; PORTER, L. J.; FOO, L. Y. Carbon-13 NMR of flavonoids – *studies in organic chemistry 39*; ed; Elsevier Science Publishers B. V.: Amsterdam. v. 39, p.201, **1989**.
- ALVES, C.C.S.; CRANCHI, D.C.; CARVALHO, M.G.; SILVA, S.J. Triterpenos, esteróide glicosilado e alcalóide isolado de *Simira glaziovii*. *Floresta e Ambiente*. v. 8, n. 1, p. 174-179, **2001**.
- AMARAL, M.C.E. Phylogenetische systematik der Ochnaceae. *Botanische Jahrbuecher Fuer Systematik*. v.113, n. 1, p.105-196, **1991**.
- ARAÚJO, M.F. *Estudo fitoquímico e avaliação biológica de Swartzia apetala var. glabra*. 2007. 168 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais)-Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes. **2007**.
- ARAÚJO, M.F.; VIEIRA, I.J.C.; BRAZ-FILHO, R.; CARVALHO, M.G. Simiranes A and B: erythroxylenes diterpenes and other compounds from *Simira eliezeriana* (Rubiaceae). *Natural Product Research*, v. 25, n. 3, p. 1713-1719, **2011**.
- ARAÚJO, M.F.; CARVALHO, M.G.; SANTOS, C.B.; CAVALCANTI, J.F.; PEREIRA, F.S.; MENDES, G.S.; WERLE, A.A.; ROMANOS, M.T.V.; CARVALHO, M.G. Proposed active compounds from *Ouratea parviflora*. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 5, n. 12, p. 2489-2493, **2011**.
- ARNASON, T.; MORAND, P.; SALVADOR, J.; REYES, I.; LAMBERT, J.; TOWERS, N. Phototoxic substances from *Flaveria trinervis* and *Simira salvadorensis*. *Phytochemistry*, v. 22, p. 594-595, **1983**.
- BA NJOCK, G.B.; BARTHOLOMEUSZ, T.A.; FOROOZANDEH, M.; PEGNYEMB, D.E.; CHRISTEN, P.; JEANNERAT, D. NASCA-HMBC, a New NMR Methodology for the Resolution of Severely Overlapping Signals: Application to the Study of Agathisflavone. *Phytochemical Analysis*, **2011**.
- BABIOR, B.M. Phagocytes and Oxidative Stress. *The American Journal of Medicine*. p. 33-44, **2000**.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. v. 29, n. 1, p. 113-123, **2006**.
- BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F.; COSTA, C.G.; GUIMARÃES, E.T. *Sistemática de Angiosperma do Brasil*, UFV-MG, 2.ed. **2002**.
- BASTOS, A.B.F.D.O.; CARVALHO, M.G.; VELANDIA J.R.; BRAZ-FILHO, R.; Constituintes químicos isolados de *Simira glaziovii* e a atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio do alcalóide ofiorina e seus derivados, *Química Nova*, v. 25, n.2, p. 241-245, **2002**.

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

BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY, R. W. *Circular dichroism: principles and applications*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 877 p., **2000**.

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

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*, v. 24, p. 119-124, **1985**.

BRAGA, R. *Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará*. Fortaleza: Imprensa Oficial. **1960**.

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

CALLADO, C.H.; NETO, S.J.S. Anatomia do lenho de três espécies do gênero *Simira* Aubl. (Rubiaceae) da Floresta Atlântica no estado do Rio de Janeiro. *Rodriguésia*, v. 54, n. 83, p. 23-33, **2003**.

CARBONEZI, C.A.; HAMERSKI, L.; GUNATILAKA, A.A.L.; CAVALHEIRO, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D.H.S.; FURLAN, M.; YOUNG, M.C.M.; LOPES, M.N.; BOLZANI, V.S. Bioactive flavone dimers from *Ouratea multiflora* (Ochnaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 3, p. 319-324, **2007**.

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

CARVALHO, M.G.; GOMES, M.S.R.; OLIVEIRA, M.C.C.; SILVA, C.J.; CARVALHO, A.G.; Chemical constituents from *Piptadenia rígida* "angico". *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 21, n. 3, p. 397-401, **2011**.

CARVALHO, M.G.; ALBUQUERQUE, L.R.M.; MENDES, L.S.; GUILHON, G.M.S. P.; RODRIGUES, S.T. Biflavonoids and Terpenoids Isolated from the leaves of *Ouratea icrodonta* Engl. (Ochnaceae). *Revista Latinoamericana de Química*, v. 36, n. 3, **2008**.

CARVALHO, M.G.; ALVES, C.C.F.; SILVA, K.G.S.; EBERLIN, M.N.; WERLE, A.A.; Luxenchalcone, a new bichalcone and other Constituents from *Luxemburgia octandra*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 15, n. 1, p. 146-149, **2004**.

CARVALHO M.G.; VELANDIA, J.R.; de OLIVEIRA J.C.C.; ECHEVARRIA, A.; BRAZ-FILHO, R.; GRYNBERG, N.F. Chemical Structure, Cytotoxic and Antitumour Activities of

Biflavonoids from Brazilian *Ouratea* (Ochnaceae). In *Phytochemical and Pharmacology II of the Series "Recent Progress in Medicinal Plants"*, Majumdar, D.K.; Govil, J.N.; Singh, V.K. eds., SCI Tech Publishing LLC: Texas, USA, 8, p 77-92, **2002**.

CARVALHO G.J.; CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R.; Terpenos, triterpenos e esteroides de flores de *Wedelia paludosa*, *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 24-26, **2001**.

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

CASTRO, F.B.; BRAGA, A.O.; LOMBARDI, J.A.; WAGNER, H. Screening the Brazilian flora for antihypertensive plant species for *in vitro* angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. *Phytomedicine*, v. 7, n. 3, p. 245-250, **2000**.

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

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

CORTES, S.F.; VALADARES, M.Y.; OLIVEIRA, A.B.; LEMOS, S.V.; BARBOSA, M.P.T.; BRAGA, F.C.; Mechanism of endothelium-dependent vasodilation induced by proanthocyanidin-rich fraction from *Ouratea semisserata*, *Planta Medica* v. 68, n. 5, p. 412-415, **2002**.

DANIEL, J.F.S.; CARVALHO, M.G.; CARDOSO, R.S.; AGRA, M.F.; EBERLIN, M. N.; Others flavonoids from *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*. v.16, p. 634, **2005**.

DE ANGELIS, G.G.; WILDMAN, W.C. Absolute conf. of organic molecules. *Atlas of Stereochemistry*, v. 1, p. 143, **1977**.

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

DELPRETE P.G. Rondeletieae (Rubiaceae). *Flora Neotropica*. Monograph 77. The New York Botanical Garden, New York. p. 226, **1999**.

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

ELIEL, E. L.; WILEN, S. H. *Stereochemistry of organic compounds*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, **1994**.

ESHIETT, I.T.; TAYLOR, D.A.H. The isolation and structure elucidation of some derivatives of dimethylallyl-coumarin, chromone, quinoline, and phenol from *Fagara* species, and from *Cedrelopsis grevei*. *Journal of Chemistry Society C*. p.481-484, **1968**.

ESTEVAM, C. S.; OLIVEIRA, F. M.; CONSERVA, L. M.; LIMA, L. DE F. C.O.; BARROS, E. C.P.; BARROS, A. C.P.; ROCHA, E. M.M. ; ANDRADE, E.H.A. Constituintes químicos e avaliação preliminar *in vivo* da atividade antimalárica de *Ouratea nitida* Aubl (Ochnaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. v. 15, n. 3, p. 195-198, **2005**.

FELÍCIO, J. D.; ROSSI, M. H.; BRAGGIO M. M.; GONÇALZ, E., PAK, A.; CORDEIRO, I.; FELÍCIO; R. C.; Chemical constituents from *Ouratea paviflora*, *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 32, n. 1, p. 79-81, **2004**.

FELICIO, J. D.; ROSSI, M. H.; PARK, H. R; GONÇALEZ, E.; BRAGGIO, M. M.; DAVID, J. M.; CORDEIRO, I. Biflavonoids from *Ouratea multiflora*. *Fitoterapia*, v. 72, p. 453-455, **2001**.

FELICIO, J. D.; GONÇALEZ, E.; BRAGGIO, M. M.; COSTANTINO, L.; ALBASINI, A.; LINS, A. P. Inhibition of Lens Aldose Reductase by biflavones from *Ouratea spectabilis*. *Planta Medica*, v. 61, n. 3, p. 217-220, **1995**.

FERNANDES, R. D. *Estudo químico e atividades biológicas de Ouratea hexasperma var. planchonii* Engl. (Ochnaceae). 118 f. 2008. Dissertação (Mestrado em Química)- Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. **2008**.

FERREIRA, R.O.; NASCIMENTO, J.C.; PAULA, V.F.; CORREIA, S.J. Constituintes Químicos da Raiz de *Chondrodendron platyphyllum* (Menispermaceae). Resumo da 32º RASBQ, **2009**.

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

GANGOUE-PIEBOJI, J.; PEGNYEMB, D. E.; NIYITEGEKA, D.; NSANGOU, A.; EZE, N.; MINYEM, C.; MBING, J. N.; NGASSAM, P.; TIH, R. G.; SODENGAM, B. L.; BODO, B. The in-vitro antimicrobial activities of some medicinal plants from Cameroon. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 100(3), 237-43, **2006**.

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

GLENNON, R.A.; DUKAT, M.; GRELLA, B.; SEOUNG-SOO, H.; CONSTATINO, L.; TEITLER, M.; SMITH, C.; EGAN, C.; DAVIS, K.; MATTASON, M.V. Binding of β -carbolines and related agents at serotonin (5-HT₂ and 5HT_{1A}), dopamine (D₂) and benzodiazepine receptors. *Drug and Alcohol Dependence*, v. 60, p. 121-132, **2000**.

GRACE, M.H., JIN, Y., WILSON, G.R., COARES, R.M. Structures, biogenetic relationships, and cytotoxicity of pimarane-derived diterpenes from *Petalostigma pubescens*. *Phytochemistry*. n. 67, p. 1708, **2006**.

GREGER, H.; HOFER, O. New unsymmetrically substituted tetrahydrofurofuran lignans from *Artemisia absinthium*. *Tetrahedron*, v. 36, p. 3551, **1980**.

GRYNBERG, N.F.; CARVALHO, M.G.; VELANDIA, J.R.; OLIVEIRA, M.C.; MOREIRA, I.C.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. DNA topoisomerase inhibitors: biflavonoids from *Ouratea* species. *Brazilian Journal Medicinal and Biological Research*. v. 35, n. 7, p. 819-822, **2002**.

GRYNBERG, N.F.; BRIOSO, P.S.T.; VELANDIA, J.R.; ECHEVARRIA, A.; CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R. *Antiproliferative effects and activation of apoptosis on Ehrlich tumour cells by flavones*, Proceedings of the XVII International Cancer Congress, p. 317-320, **1998**.

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

GUIMARÃES, E.F.; PEREIRA, J.M.C. Ochnaceae no Estado da Guanabara. *Rodriguésia*. v. 25, n. 37, p. 59-65, **1966**.

HADACECK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*. v. 11, p. 137-147, **2000**.

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

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

HOEHNE, F.C. O que vendem os hervanários da cidade de São Paulo. Serviço Sanitário do estado de São Paulo, São Paulo, 247, **1920**.

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

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY (IFST). Phytosterol esters (plat sterol and stanol esters). 2001. Disponível em: <[hyyp://www.ifst.org/hotspot29.htm](http://www.ifst.org/hotspot29.htm)>. Acesso em: 10 jul. **2001**.

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

JONES, P.J.; RAEINI-SARJAZ, M.; NTANIOS, F.Y.; VANSTONE, C.A.; FENG, J.Y.; PARSONS, W.E. Modulations of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phutostrol versus phytostol esters. *The Journal of Lipid Research*, v. 41, p. 697-704, **2000**.

JUNG, K.; CHIN, Y.W.; KIM, Y.C.; KIM, J. Potentially Hepatoprotective Glycolipid Constituents of *Lycium chinense* Fruits. *Archives of Pharmacal Research*, v. 28, n. 12, p. 1381-1385, **2005**.

KREBS, H.C.; DUDDECK, H.; MAILIK, S.; BEIL, W.; RASOANAIVO, P.; ANDRIANARIJAONA, M. Chemical Composition and Antitumor Activities from *Givotia madagascariensis*. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 59b, p. 58-62, **2004**.

LAGROTA, M.H.C. Atividade antiviral in vitro de substâncias sintéticas e naturais. Rio de Janeiro, UFRJ (Dissertação de Mestrado). **1978**.

LAMBERT J. B.; SHURVELL H. F.; LIGHTNER D.; COOKS R. G. *Introduction to Organic Spectroscopy*. Macmillan Publishing Company, New York, **1987**.

LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. *Biodiversidade Brasileira: Síntese do Estado Atual do Conhecimento*. 2. Ed. - São Paulo: Contexto. p.1-10, **2004**.

LEWIS, W.H.; ELVIN-LEWIS, M.P.F. In Plants and Dental Care Among the Jivaro of the Upper Amazon Basin. *Advances in Economic Botany Ethnobotany in the Neotropics*, G. T., France & J.A. Kallunki Eds. New York, Botanical Garden Bronx, NY, v.1: p. 53-61. **1984**.

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

MABRY, T.J., MARKHAM, K.R., THOMAS, M.B. The Systematic Identification of Flavonoids. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag p. 268, **1970**.

MACIEL M.A.M., PINTO C.A., VEIGA Jr F.V., GRYNBERG F.N., ECHEVARRIA A. Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. *Química Nova*. v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAHATO, S.R.; KUNDU. A. ¹³C NRM Spectra of Pentacyclic Triterpenoids- A Compilation and Some salient Features. *Phytochemistry*. v. 37, n 6. p. 1317-1575. **1994**.

MALLAVARAPU, G.O. Contribution of medicinal plants to modern medicine. *Journal of Medicinal Plants to Modern Medicine*. v. 22, p. 572-578, **2001**.

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

MARCAL, P.Q.; LIMA, E.O.; MAIA, R.F.; XAVIER, L.F. Antimicrobial active of the oil of the fruit of *Ouratea parviflora* Baill (Ochnaceae). *Laboratório de Tecnologia Farmac.*, UFPB CCS, v. 8 n.3 19-21, **1986**. Resumo do *Chemical Abstracts* vol 108: 91748n, p. 399, **1988**.

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

MBING, J.N.; PEGNYEMB, D.E.; TIH, R. GHOGOMU T.R.; SONDEMGAM, B. L.; BLOND A.; BODO, B.; Two biflavonoids from *Ouratea flava* stem bark; *Phytochemistry*, v. 63, p. 427-431, **2003**.

MCLAUGHLIN, J.L.; COLMAN-SAIZARBITORIA, T.E.; ANDERSON, J.E.; Três bioensayos Simples para Químicos de Productos Naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Química*, v. 18, p. 13-18, **1995**.

MENSOR, L.L.; MENEZES, S.F.; LEITÃO, G.G.; REIS, S.A.; DOS SANTOS, C.T.; COUBE, S.C.; LETÃO, G.S. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, v. 15, n. 127, **2001**.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.F.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine Shrimp a Convenient Genera Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, v. 45, p. 31, **1982**.

MIZUSHINA, Y.; NAKANISHI, R.; KURIYAMA, I.; KAMIYA, K.; SATAKE, T.; SHIMAZAKI, N.; KOIWAI, O.; UCHIYAMA, Y.; YONEZAWA, Y.; TAKEMURA, M.; SAKAGUCHI, K.; YOSHIDA, H. β -Sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside: A eukaryotic DNA polymerase λ inhibitor. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 99, p. 100-107, **2006**.

MONGRAND, S.; BADO, A.; PATOUILLE, B.; LACOMBLEZ, C.; CHAVENT, M.; BESSOULE, J.J. Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition. *Phytochemistry*, v. 66, p. 549-559, **2005**.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 105-111, **2001**.

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

MONTOYA, N.S.C.; COMINI, L.R.; VITTAR, R.B.; FERNÁNDEZ, I.M.; RIVAROLA, V.A.; CABRERA, J.L. Phototoxic effects of *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). *Toxicon*, v. 51, p. 1409-1415, **2008**.

MORAIS, S.M.; BRAZ FILHO, R. Produtos Naturais – Estudos Químicos e Biológicos. Fortaleza: EdUECE, p.194, **2007**.

MOREIRA, I.C.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A.; DNA topoisomerase inhibitors: biflavonoids from *Ouratea* species, *Brazilian Journal Medicinal and Biological Research*. v.35, n. 7, p. 819-822, **2002**.

MOREIRA, I. C.; SOBRINHO, D. C.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R. Isoflavanone dimers hexaspermone A, B and C from *Ouratea hexasperma*. *Phytochemistry*, v. 35, n. 6, p. 1567-1572, **1994**.

MOURA, D.J.; RORIG, C.; VIEIRA, D.L.; HENRIQUES, J.A.; ROESLER, R.; SAFFI, J.; BOEIRA, J.M. Effects of β -carbolines alkaloids on the object recognition task in mice. *Life Sciences*, v. 79, p. 2099 -2104, **2006**.

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

MURRAY, R.D.H.; MENDEZ, J.; BROWN, S.A. The natural coumarins: occurrence, chemistry and biochemistry. John Willey, p. 21. **1982**.

NAGAHAMA, S., TAJIMA, M. Diterpene Hydrocarbons from the Leaf Oil of *Thyopsis dolabrata* var. *dolabrata*. *Biochemical Systematics and Ecology*. v. 24, n 1, p.49-52. **1996**.

NASCIMENTO, L.A.S.; GUILHON, G.M.S.P.; ARRUDA, M.S.P.; SANTOS, L.S.; ARRUDA, A.C.; MÜLLER, A.H.; SILVA, M.N.; RODRIGUES, S.T.; CARVALHO, M.G. Biflavones and triterpenoids isolated from *Ouratea castaneifolia* (DC.) Engl., Ochnaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 19, n. 4, p. 823-827. **2009**.

NGO MBING, J.; PEGNYEMB, D.E.; TIH, R.G.; SONDEGAM, B.L.; BLOND, A.; BODO, B. Two biflavonoids from *Ouratea flava* stem bark. *Phytochemistry*. v. 63, p. 427-431, **2003**.

NGO MBING, J.; ENGUEHARD-GUEIFFIER, C.E.; ATCHADÉ, A.T.; ALLOUCHI, H.; GANGOUÉ-PIÉBOJI, J.; MBAFOR, J.T.; TIH, R.G.; POTHIER, J.; PEGNYEMB, D.E.; GUEIFFIER, A. Two biflavonoids from *Ouratea nigroviolacea*. *Phytochemistry*, v. 67, p. 2666–2670, **2006**.

NGO MBING, J.; NDONGO, J.T.; ENGUEHARD-GUEIFFIER, C.; ATCHADÉ, A.T.; PIÉBOJI, J.G.; TIH, R.G.; POTHIER, J.; PEGNYEMB, D.E.; GUEIFFIER, A. Flavonoids from the leaves of *Ouratea zenkeri* and *Ouratea turnerae*. *Asian Chemistry Letters*. v. 13, n. 1,2; p. 81-88, **2009**.

NGONO BIKOBO, D.S.; ATCHADE, A.T.; TIH, R.G.; PIÉBOJI, J.G.; BLOND, A.; PEGNYEMB, D.E.; BODO, B. Antimicrobial Activities of some *Ouratea* Species (Ochnaceae) and Biflavonoids from *Ouratea elongata*. *Asian Chemistry Letters*. v. 13, n. 1,2; p. 59-66, **2009**.

NISHIMURA, T.; TAKU, K.; FUKUIASHA, H. Antiviral compounds. XII. Antiviral activity of aminohydrazone of alkoxyphenyl substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and mice. *Kitasato Archives of Experimental Medicine*, v. 50, p. 39-46, **1977**.

PAULO, M.Q.; LIMA, E.O.; MAIA, R.F.; XAVIER FILHO, L. Antimicrobial activity of the oil of the fruit of *Ouratea parviflora* Baill (Ochnaceae). *CCS* 8: p.19-21, **1986**.

PEIXOTO, A.L. As espécies de *Simira* (Rubiaceae, Rondeletieae) do Norte do Estado do Espírito Santo. Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. v. 5, p. 115-128, **1982**.

PELCZAR JR.; CHAN, M.J.; KRIEG, N.P. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2ª Ed., v. 1. Editora Pearson Education. p. 213, **1997**.

PEREIRA, R. C. A.; LOPES, J. V. M. Aspectos Botânicos, etnobotânicos, agronômicos e fitoquímicos de Unha-de-Gato. Fortaleza: *Embrapa Agroindústria Tropical*, **2006**.

PEREIRA, M.S.; BARBOSA, M.R.V. A família Rubiaceae na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. Subfamílias Antirhoeidae, Cinchonoideae e Ixoroideae. *Acta botânica brasileira*. v. 18, n. 2, p. 305-318, **2004**.

PLANT, P.; RASTOGI, R.P. Castanopsone and Castanopsol two new triterpenoids from *Castanopsis Indica*. *Phytochemistry*. v. 16, n. 11, p. 1787-1789, **1977**.

QUEIROZ, D. C. *Constituintes químicos e avaliação citotóxica e antioxidante de folha de Clitoria fairchildiana Howard: uma contribuição a química do gênero Clitoria (Fabaceae)*. 214 f. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais)-Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes. **2008**.

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

RIZZINI, C.T.; MORS, W.B. *Botânica Econômica Brasileira*. 2ª ed. Rio de Janeiro, Brasil: Âmbito Cultural. **1995**.

SALVADOR, G.S.; SANTOS, E.P.; CERVI A.C. Flórua do Morro dos Perdidos, Serra de Araçatuba, Estado do Paraná, Brasil: Ochnaceae DC. *Estudos de Biologia*. v. 27, n. 61, p. 13-17, **2005**.

SEO, S., UOMORI, A., YOSHIMURA, Y., TAKEDA, K., SETO, H., EBIZUKA, Y., NOGUHI, H., SANKAVA, V. Biosyntheses of sitosterol, cycloartenol, an 24-methylenecycloartenol in tissue cultures of higher and of ergosterol in yeast from [1,2-¹³CH₂] and [2-¹³CH₃] acetate and [5-¹³CH₂]. *Journal Chemistry Society*. Perkin. Trans. I, p. 2407-2412, **1988**.

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

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

SILVERSTEIN, R.M., WEBSTER, F.X. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 6ª Edição, Editora LTC, **2000**.

SIMÕES *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, **2004**.

SIMONI, I.C. Tratamentos Antivirais. *Biológico*. v. 65, n. 1/2, p. 41-44, **2003**.

SIQUEIRA, M.J.; BOMM, D.M.; PEREIRA, G.F.N.; GARCEZ, S.W.; BOAVENTURA, D.A.M. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii*-Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*. v. 21, n. 5, **1998**.

SOUZA, W. M. Estudo químico e das atividades biológicas dos alcalóides indólicos de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae – (Agoniada). 2008. 173 f. Tese (Doutor em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, **2008**.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para a identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Editora Plantarum, Nova Odessa. **2005**.

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

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

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*. 187 f. 2007 Tese (Doutorado em Química)- Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, **2007**.

SUZART, L. R.; DANIEL, J. F. DE S.; CARVALHO, M. G. Biodiversidade Flavonoídica e Aspectos Farmacológicos em Espécies dos Gêneros *Ouratea e Luxemburgia* (OCHNACEAE) *Química Nova*, v. 30, n. 4, p. 984-987, **2007**.

SY, L.K.; BROWN, G.D. Coniferaldehyde derivatives from tissue culture of *Artemisia annua* and *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry*, v. 50, p. 781-785, **1999**.

TOMAZ, A.C.A.; NOGUEIRA, R.B.S.S.; PINTO, D.S.M.; AGRA, M.F.; SOUZA, M.F.V.; DA-CUNHA, E.V.L. Chemical constituents from *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud. (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 1, p. 47-52, **2008**.

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

VELANDIA J. R.; DE CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; WERLE A A; Biflavonoids and glucopyranoside derivative from *Ouratea semiserrata*. *Phytochemical Analysis*. v. 13, p. 283-292, **2002**.

VELANDIA, J.R.; CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R. Novel trichloro and tetrachloroisoflavone isolated from *Ouratea semiserrata*. *Natural Product Letters*. v. 12, n. 3, p. 191-198, **1998**.

VENNAT, B. et al. *Hamamelis virginiana*: Identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. *Pharmaceutica Acta Helvetica*, v. 67, n. 1. p. 11-14, **1992**.

VIEIRA, I.J.C. Uma contribuição à Química da Família Simaroubaceae, Tese de Doutorado, PPGQ, CCET-DQ-UFSCar, 81-117, **1995**.

VUL'FSON, N.S.; ZARETSKII, V.I.; ZAIKIN, V.G. Mass-Spectrometric Investigation of Natural Coumarins. v.12, p.2215-2218, **1963**.

WATSON, L.; DALLWITZ, M.J. The Families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification, Information Retrieval. Site: [http:// delta-inkey.com/angio/](http://delta-inkey.com/angio/) acessado em: 05/03/2007. **1992**.

WHO. *Report on infectious diseases*. World Health Organization, Geneva, Switzerland, **2002**.

www.cvrld.com.br acessado em **08/10/2007**.

YUNES, R.S.; CALIXTO, J.B. *Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna*. UNOESC, SC- Chapecó, ARGOS Editora Universitária, **2001**.

ZHANG, Y.; WATTS, W.; NOGLE, L.; McCONNELL, O. Rapid method development for chiral separation in drug discovery using multi-column parallel screening and circular dichroism signal pooling. *Journal of Chromatography A*, v. 1049, n. 1-2, p. 75-84, **2004**.