

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

TESE

METABÓLITOS ESPECIAIS ISOLADOS DE *Ouratea hexasperma*
(Ochnaceae), *Dipladenia martiana* (Apocynaceae) e de *Caesalpinia*
peltophoroides (Leguminosae)

JULIANA FEIJÓ DE SOUZA DANIEL

Seropédica, Rio de Janeiro
Dezembro de 2004



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

**METABÓLITOS ESPECIAIS ISOLADOS DE *Ouratea hexasperma*
(Ochnaceae), *Dipladenia martiana* (Apocynaceae) e de *Caesalpinia*
peltophoroides (Leguminosae)**

JULIANA FEIJÓ DE SOUZA DANIEL

Sob a Orientação do Professor **Dr. Mário Geraldo de Carvalho**
Co-Orientação da Professora **Dra. Dalva Trevisan Ferreira**

Tese submetida como requisito
parcial para a obtenção do **grau**
de Doutora em Ciências. Área de
Concentração em Química
Orgânica

Seropédica, Rio de Janeiro
Dezembro de 2004

547.71

D184m

T

Daniel, Juliana Feijó de Souza, 1976-
Metabólitos especiais isolados de
Ouratea hexasperma (Ochnaceae), Dipladenia
martiana (Apocynaceae) e de Caesalpinia
peltophoroides (leguminosae) / Juliana
Feijó de Souza Daniel. - 2004.
291f. : il.(color.)

Orientador: Mário Geraldo de Carvalho.
Tese(doutorado) - Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Instituto de
Ciências Exatas.

Bibliografia: f.

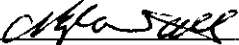
1. Terpenios - Teses. 2. Bioflavonóides
- Teses. 3. Ouratea - Análise - Teses. I.
Carvalho, Mário Geraldo de, 1952-. II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Instituto de Ciências Exatas.
III. Título.

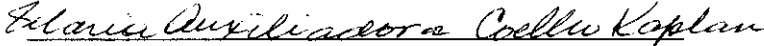
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

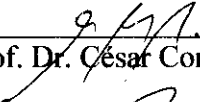
JULIANA FEIJÓ DE SOUZA DANIEL

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica, como requisito parcial para a obtenção do grau de doutora em Ciências em Química Orgânica, área de concentração em Química de Produtos Naturais.

TESE APROVADA EM 17/12/2004

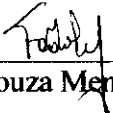

Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho (ICE-DQ-UFRRJ)
(Orientador e Presidente)


Prof. Dra. Maria Auxiliadora C. Kaplan (NPPN – UFRJ)


Prof. Dr. César Cornélio Andrei (DQ-UEL)


Prof. Dr. Ronald Bastos Freire (IB-UFRRJ)


Prof. Dra. Márcia C. Campos de Oliveira (ICE-DQ-UFRRJ)


Prof. Dr. Fábio de Souza Menezes (Faculdade de Farmácia - UFRJ) (Suplente)


Prof. Dr. Marco Edilson Freire de Lima (ICE-DQ-UFRRJ) (Suplente)

Dedico esta tese ao meu maravilhoso esposo Vanderley Daniel pelo amor, compreensão e pelo incentivo necessário para enfrentar este desafio. A meus pais Alice Feijó de Souza e Waldomiro Bernardes de Souza, pelo apoio, incentivo e fé transmitida em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, presente em todos os momentos firmes e trêmulos, responsável pela força necessária para que eu possa seguir meu caminho.

-Ao Professor Dr. Mário Geraldo de Carvalho, pelos ensinamentos, compreensão, amizade e orientação neste trabalho, meu sincero respeito, reconhecimento e gratidão.

- A Professora Dra. Dalva Trevisan Ferreira pela amizade, incentivo, conselhos e pelo exemplo de justiça e determinação.

- Ao Professor Dr. Raimundo Braz-Filho pela ajuda, conselhos e pelo exemplo de integridade e sabedoria.

- A UFRRJ, pela oportunidade e acolhimento.

- À Professora Dra. Áurea Echevarria (ICE-UFRRJ), pela ajuda e incentivo constantes, também pela realização dos testes biológicos.

- À Professora Dra. Rosane Nora Castro (ICE-UFRRJ), que esteve sempre disponível para me auxiliar.

- À Professora Dra. Halha O. Saridakis (MIB-UEL) pela realização dos testes microbiológicos, juntamente com o aluno de Mestrado Wanderlei Schmitz.

- Ao Professor Dr. Ronald Bastos Freire (LATAI-UFRRJ), pelos testes antioxidantes, juntamente dos alunos de iniciação científica Kelly Zolli Alves e Fernando Marcelo Loureiro.

- À Professora Dra. Ivana Grivicich e á Adriana Brondani (LMEC-ULBRA) pela realização dos testes antitumorais.

- Ao Professor Dr. Milton Faccione e ao César Andrei, e aos técnicos Jurandir Pereira Pinto e Celso Magri (DEQUIM-UEL) pelo acolhimento junto ao laboratório de pesquisa da UEL, incentivo e a disposição para me auxiliar. Ao Jurandir Pereira Pinto pela ajuda na realização das análises de CG-EM.

- Ao Professor Dr. Marcos N. Eberlin (IQ-Universidade Estadual de Campinas), pelos espectros de EMAR.

- A todos os técnicos do ICE-UFRRJ, Eli, Carlão, Áurea Tatagiba, Conceição, Fábio, Rui, Francis, Maurício, e Aldir.

- Aos alunos de Iniciação Científica que me acompanharam durante a realização deste trabalho, André e Renata.

- Aos colegas de laboratório, cujo incentivo e colaborações me ajudaram bastante, Tânia, Cássia, Patrícia, Ildomar, Marli, Kelly, Virgínia, Luciano, Mário Sérgio, Rute, Luiz. Em especial os amigos Cássia, Ildomar, Tânia, Virginia e Marli.

- Aos colegas da pós-graduação, todos, sem exceção, em especial meus amigos de Turma, Ari, Ildomar e Myrtes, companheiros na aprendizagem das disciplinas.

- À turma da sexta, Heloísa, Tânia, Rosane, Braz, Áurea, Maronci e Valdô.

- A todos que, de algum modo, me ajudaram na realização deste trabalho.

- Aos meus pais, Alice Feijó de Souza e Waldomiro Bernardes de Souza, que tudo fizeram para meus estudos e são os grandes incentivadores dos meus projetos.

- Aos meus irmãos, Tiago e Rodrigo, que sempre me apoiaram e são queridos e amados.

- Á minha avó e madrinha, Vó Rosa (Rosa Feijó de Souza), por acreditar e incentivar meus estudos.

- Aos meus sobrinhos que amo muito, Rafaela, Bárbara e Diego.

- A todos os meus familiares, por acreditarem em mim.

- As amigas do coração Carla, Cristiana e Kelly, que sempre me deram força e apoio nos trabalhos.

- Ao Leo A. Schoof, por me ceder as raízes de *Pfaffia glomerata* e ás Dras. Tânia Sarmiento e á Professora Dra. Maria de Fátima Agra (LTF-UFPB), que me cederam a espécie *Ouratea hexaspema* os para estudos.

- A Universidade Estadual do Norte Fluminense pela obtenção dos espectros de RMN, em especial ao Prof. Jan Schripsema pela obtenção dos espectros.

- Desde já, à banca examinadora, pelas sugestões e correções sugeridas a este trabalho.

- A CAPES, CNPq e FAPERJ pelos auxílios e bolsas concedidas.

- E por fim agradeço especialmente ao meu esposo Vanderley Daniel pela colaboração, apoio e acompanhamento dos meus trabalhos.

[...] talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,
mas lutamos para que o melhor fosse feito [...]
Não somos o que deveríamos ser,
mas graças a Deus não somos o que éramos.
(M. Luther King)

SUMÁRIO

ÍNDICE GERAL	x
ÍNDICE DE TABELAS, ESQUEMAS E FIGURAS	xiii
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xxi
RESUMO	xxiii
ABSTRACT	xxiv

Índice.....	Pág.
1. Introdução Geral.....	1
2. Objetivos.....	2
3. Parte Experimental Geral.....	3
3.1. Equipamentos e reagentes.....	3
3.2. Derivações.....	3
3.2.1. Metilação.....	3
a) Diazometano.....	3
b) Sulfato de metila.....	4
3.2.2. Acetilação com anidrido acético e piridina.....	4
4. Referências Gerais.....	5
5. Substâncias isoladas.....	6
5.1. <i>Ouratea hexasperma</i>	6
5.2. <i>Dipladenia martiana</i>	7
5.3. <i>Caesalpinia peltophoroides</i>	8
5.4. Derivados obtidos através.....	9
CAPÍTULO I.....	10
ESTUDO QUÍMICO DE <i>Ouratea hexasperma</i>	10
I.1. Introdução.....	11
I.2. Flavonóides isolados de espécies dos gêneros <i>Ouratea</i> e <i>Luxemburgia</i> (Ochnaceae).....	12
a) Literatura.....	12
c) Substâncias isoladas de <i>Ouratea hexasperma</i>	19
CONSIDERAÇÕES RELEVANTES DO ESTUDO DESSA ESPÉCIE.....	21
I.3. Parte experimental.....	21
I.3.1. Material vegetal.....	21
I.3.2. Isolamento e purificação dos constituintes das folhas de <i>O. hexasperma</i>	22
I.4. Determinação estrutural dos constituintes isolados de <i>O. hexasperma</i>	24
I.4.1. Alcanos.....	24
I.4.2. Epicatequina.....	24
I.4.3. Biflavonóides.....	30
a) 7,7'' - <i>O</i> -dimetillanaroflavona.....	30
b) 7,7'' - <i>O</i> -dimetil-5, 5'',4''' -triacetillanaroflavona.....	34
c) Lanaroflavona permetilada.....	36
d) 7''- <i>O</i> -metilagatisflavona.....	75
e) Tetrametilagatisflavona e tetrametil-diacetil agatisflavona.....	84
f) Agatisflavona.....	101
g) I.4.4. 2''- <i>O</i> -β-D-glicopiranosil-8-C-β-D-glicopiranosil luteolina.....	106
I.5. Referências- Capítulo I.....	117
CAPÍTULO II.....	122
ESTUDO QUÍMICO DE <i>Dipladenia martiana</i>	122
II.1. Introdução	123
II.2. Substâncias isoladas de espécies da família Apocynaceae.....	124
a) Literatura.....	124
b) Substâncias isoladas de <i>Dipladenia martiana</i>	128
II.3. Parte experimental.....	130
II.3.1. Material vegetal.....	130
II-3.2. Isolamento e purificação dos constituintes.....	130

II.4. Determinação estrutural dos constituintes isolados de <i>D. martiana</i>	132
II-4.1. Triterpenos.....	132
II-4.1.1. Ácido pomólico, ácido ursólico, ácido oleanólico e derivados.....	132
II-4.1.2. Lupeol.....	153
II-4.2. Saponina esteróidica.....	156
II-4.3. Monossacarídeos derivados.....	160
II-4.4. Flavonóides.....	163
II.4.4.1. Epicatequina.....	163
I.4.4.2. Quercetina e Canferol.....	167
II.4.4.3 Flavonóides glicosilados.....	174
a) 3- b - <i>O</i> -D-glicopiranosilcanferol.....	174
b) 7- b - <i>O</i> -D-glicopiranosilquercetina e 7- b - <i>O</i> -D-galactopiranosilquercetina.....	179
II.5- Referências- Capítulo II.....	190
CAPÍTULO III.....	193
ESTUDO QUÍMICO DE <i>Caesalpinia peltophoroides</i>	193
III.1. Introdução.....	194
III.2. Substâncias isoladas de espécies de <i>Caesalpinia</i> (Leguminosae).....	194
a) Literatura.....	194
b) Substâncias isoladas de <i>Caesalpinia peltophoroides</i>	198
III.3. Parte experimental.....	200
III.3.1. Material vegetal.....	200
III-3.2. Isolamento e purificação dos constituintes.....	200
III.4. Determinação estrutural dos constituintes isolados de <i>C. peltophoroides</i>	202
III-4.1. Esteróides.....	202
a) β -Sitosterol.....	202
b) Sitosterol glicosilado.....	205
III-4.2. Esqualeno.....	207
III-4.3. Ésteres alifáticos.....	212
III-4.4. Mistura de glicerídeos.....	216
III-4.5. 5-hidroximetilfurfural.....	224
III-4.6. Ácido gálico e Galato de etila.....	232
III-4.7. Luteolina.....	244
III-4.8. Brevifolato de etila.....	250
III.5- Referências-Capítulo III.....	263
CAPÍTULO IV.....	266
USO DE CLAE NA IDENTIFICAÇÃO DE BIFLAVONÓIDES EM FOLHAS INTEIRAS E MOÍDAS DE <i>Ouratea semisserata</i> (OCHNACEAE).....	266
IV.1- Objetivos.....	267
IV.2. Experimental.....	267
IV.2.1. Instrumental.....	267
IV.2.2. Material vegetal	267
IV.2.2.1. Elaboração dos extratos.....	267
IV.2.3. Reagentes e flavonóides padrões.....	268
IV.3- Resultados e discussão.....	268
IV.3.1- Perfil dos flavonóides padrões por CLAE.....	268
IV.3.2- Perfil cromatográfico dos extratos de <i>Ouratea</i> e identificação das substâncias.....	271

IV.3.4. Conclusões.....	274
IV.4- Referências-Capítulo IV.....	275
CAPÍTULO V.....	276
ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	276
V.1- Objetivos.....	277
V.2- Avaliação da toxicidade geral com <i>Artemia salina</i> Leach.....	277
V.3- Avaliação da atividade antibacteriana	278
V.3.1. Introdução.....	278
V.3.2. Materiais e Métodos.....	278
V.3.3. Resultados.....	279
V.4- Avaliação da atividade antioxidante.....	280
V.4.1. Introdução.....	280
V.4.2. Materiais e métodos.....	281
V.4.2.1. Preparação dos extratos.....	281
V.4.2.2. Procedimento Experimental.....	281
V.4.4. Resultados.....	282
V.5- Atividade antitumoral de biflavonóides isolados de <i>O. hexasperma</i>	282
V.5.1. Materiais e métodos.....	282
V.5.1.1. Obtenção dos biflavonóides.....	282
V.5.1.2. Procedimento Experimental.....	283
V.5.2. Resultados.....	284
V.6. Conclusões.....	287
V.7- Referências- Capítulo V.....	288
VI- CONCLUSÕES.....	290
ANEXO.....	291

Índice de Esquemas.....	Pág.
Esquema 1: Biossíntese da 2'', 3''-diidroocnaflavona, via chalconas.....	16
Esquema I.3.1. Marcha para o isolamento das substâncias das folhas de <i>Ouratea hexasperma</i>	23
Esquema I.4.1. Mecanismo de fragmentação proposto para justificar os picos resultantes da ionização do <i>m/z</i> 565 e íons negativos detectados de 2.....	47
Esquema I.4.2. Mecanismo de fragmentação proposto para justificar os picos no espectro de massas de alta resolução [EMAR-IES (1)] e baixa resolução [EMBR-IES EM/EM 2 (2a-2e)] do biflavonóide 4.....	63
Esquema I.4.3. Obtenção do novo derivado da 7''- <i>O</i> -metilagatisflavona e conformação de menor energia de 7.....	86
Esquema I.4.4. Modelo MOPAC do derivado 7 (tetrametildiacetilagatisflavona).....	87
Esquema II.1- Marcha para o isolamento das substâncias dos galhos de <i>Dipladenia martiana</i>	138
Esquema II.4.1. Comparação entre dados espectrométricos de 11, 13 e 15.....	133
Esquema II.4.2. Mecanismo de fragmentação proposto para justificar os picos detectados no espectro de massas de 11 (ác. pomólico), 13 (ac. ursólico) e 15 (ác. oleanólico).....	152
Esquema II.4.3. Interpretação do espectro de massas de 1.....	164
Esquema III.1- Marcha para o isolamento das substâncias das flores de <i>C. peltophoroides</i>	201
Esquema III.2. Esqualeno.....	207
Esquema III.3. Biossíntese de triterpenos e esteróides.....	208
Esquema III.4. Estruturas propostas permitem justificar os demais picos presentes nos respectivos espectros de massas.....	212
Esquema III.5. Mecanismo de fragmentação proposto para justificar os picos detectados no espectro de massas do M^+ 396 da mistura de ésteres graxos.....	215
Esquema III.6. Propostas estruturais e deslocamentos químicos da mistura de glicerídeos.....	216
Esquema III.7. Mecanismo de fragmentação proposto para justificar os picos detectados no espectro de massas de 30.....	231
Esquema III.8. Biossíntese do ácido gálico, via ácido chiquímico.....	233
Esquema III.9. Mecanismo de fragmentação proposto para justificar os picos detectados no espectro de massas de 33.....	247
Esquema III.10. Mecanismo de fragmentação proposto para justificar os picos detectados no espectro de massas de 32.....	245
Esquema III.11. Proposta biossintética para 36 (brevifolato de etila).....	252

Índice de Figuras.....	Pág.
Figura 1. Estruturas dos flavonóides, encontrados em espécies de <i>Ouratea</i> e <i>Luxemburgia</i>	13
Figura 1.1: Estruturas dos flavonóides glicosilados, isolados de espécies de <i>Ouratea</i> e <i>Luxemburgia</i>	15
Figura I.3.1: Fotografia da espécie <i>O. hexasperma</i> , coletada em João Pessoa, Paraíba.....	21
Figura I.4.1. Espectro de IV da fração OFD-1, material alifático de <i>O. hexasperma</i>	25
Figura I.4.2. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDC ₃) da fração OFD-1, material alifático de <i>O. hexasperma</i>	25

Figura I.4.3. Cromatograma da fração OFD-1, material alifático.....	26
Figura I.4.4. Espectro de massas dos alcanos alifáticos isolados de <i>O. hexasperma</i>	26
Figura I.4.5. Espectro de infravermelho de 1 (epicatequina).....	27
Figura I.4.6. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz) em DMSO-D ₆ de 1.....	27
Figura I.4.7. Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz) em DMSO-D ₆ de 1 isolada de <i>O. hexasperma</i>	28
Figura I.4.8. Espectro de DEPT 90 e 135° (50 MHz) em DMSO-D ₆ de 1.....	29
Figura I.4.9. Espectro de IV do biflavonóide 2 (7,7'' - <i>O</i> -dimetillanaroflavona) isolado de <i>O. hexasperma</i>	41
Figura I.4.10. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-D ₆) do biflavonóide 2.....	42
Figura I.4.11. Espectro de ¹ H- ¹ H-COSY (200 MHz, DMSO-D ₆) do biflavonóide 2.....	43
Figura I.4.12. Espectro de RMN ¹³ C e APT (100 MHz, DMSO-D ₆) de 2.....	44
Figura I.4.13. Espectro de NOE (200 MHz, DMSO-D ₆) do biflavonóide 2.....	45
Figura I.4.14. Espectro de massas de alta resolução do biflavonóide 2, obtido com Ionização elétron spray (IES) e detecção de íon negativo.....	46
Figura I.4.15. Espectro de massas de baixa resolução do pico <i>m/z</i> 565 do biflavonóide 2, obtido com Ionização <i>elétron spray</i> (IES).....	46
Figura I.4.16. Espectro de RMN-2D HMQC (400 MHz, DMSO-D ₆) de 2 ampliado em 3,7-8,2 ppm para ¹ H.....	48
Figura I.4.17. Espectro de RMN-2D HMBC (400 MHz, DMSO-D ₆) ampliado em 3,8-4,5 ppm de 2.....	49
Figura I.4.18. Espectro de RMN-2D HMBC (400 MHz, DMSO-D ₆) ampliado em 6,3-8,2 ppm de 2.....	50
Figura I.4.19. Espectro de RMN-2D HMBC (400 MHz, DMSO-D ₆) ampliado em 12,76-12,98 ppm de 2.....	51
Figura I.4.20. Espectro de RMN-2D HMBC (400 MHz, DMSO-D ₆) ampliado em 12,83-12,96 ppm de 2.....	52
Figura I.4.21. Espectro de RMN-2D HMBC (400 MHz, DMSO-D ₆) ampliado em 6,1-8,3 ppm de 2.....	53
Figura I.4.22. Espectro de IV de 4 (7,7''- <i>O</i> -dimetil-5, 5'',4''' -triacetillanaroflavona).....	54
Figura I.4.23. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDC ₃) do biflavonóide 4.....	55
Figura I.4.24. Espectro de ¹ H- ¹ H-COSY (400 MHz, CDC ₃) do biflavonóide 4.....	56
Figura I.4.25. Espectro de NOEDIFF (200MHz, CDC ₃) do biflavonóide 4.....	57
Figura I.4.26. Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz) e APT (100 MHz) em CDC ₃ do biflavonóide 4.....	58
Figura I.4.27. Espectro de massas de alta resolução do biflavonóide 4, obtido com Ionização <i>elétron spray</i> (IES).....	59
Figura I.4.28a. Espectro de massas de baixa resolução do pico <i>m/z</i> 693 (2a) do biflavonóide 4, obtido com Ionização <i>elétron spray</i> (IES).....	60
Figura I.4.28b. Espectro de massas de baixa resolução do pico <i>m/z</i> 443 (2b) do biflavonóide 4, obtido com Ionização <i>elétron spray</i> (IES).....	60
Figura I.4.28c. Espectro de massas de baixa resolução do pico <i>m/z</i> 401 (2c) do biflavonóide 4, obtido com Ionização <i>elétron spray</i> (IES).....	61
Figura I.4.28d. Espectro de massas de baixa resolução do pico <i>m/z</i> 361 (2d) do biflavonóide 4, obtido com Ionização <i>elétron spray</i> (IES).....	61
Figura I.4.28e. Espectro de massas de baixa resolução do pico <i>m/z</i> 301 (2e) do biflavonóide 4, obtido com Ionização <i>elétron spray</i> (IES).....	62
Figura I.4.29. Espectro HMBC (400 MHz, CDC ₃) ampliado na região de 145-180 ppm de 4.....	64
Figura I.4.30. Espectro HMBC (400 MHz, CDC ₃) ampliado na região de 145-180 ppm	

de 4.....	65
Figura I.4.31. Espectro de NOESY (400 MHz, CDC ₃) de 4.....	66
Figura I.4.32. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDC ₃) do biflavonóide 3 (lanaroflavona permetilada).....	67
Figura I.4.33. Espectro de ¹ H- ¹ H-COSY (200 MHz, CDC ₃) do biflavonóide 3.....	68
Figura I.4.34. Espectro de RMN ¹³ C e APT (100 MHz, CDC ₃) do biflavonóide 3.....	69
Figura I.4.35. Espectro de APT (100 MHz, CDC ₃) do biflavonóide 3.....	70
Figura I.4.36. Espectro de RMN-2D HMQC (400 MHz, CDC ₃) ampliado na região de 55-60 ppm de 3.....	71
Figura I.4.37. Espectro de RMN-2D HMBC (400 MHz, CDC ₃) ampliado na região de 155-166 ppm de 3.....	72
Figura I.4.38. Espectro de RMN-2D HMBC (400 MHz, CDC ₃) ampliado na região de 90-130 ppm de 3.....	73
Figura I.4.39. Espectro de RMN-2D HMBC (400 MHz, CDC ₃) ampliado na região de 90-130 ppm 3.....	74
Figura I.4.40. Espectro de IV do biflavonóide 5 (7''- <i>O</i> -metilagatisflavona).....	78
Figura I.4.41. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, D ₃ CCOCD ₃) do biflavonóide 5.....	79
Figura I.4.42. Espectro de ¹ H- ¹ H-COSY ampliado (200 MHz, D ₃ CCOCD ₃) do biflavonóide 5.....	80
Figura I.4.43. Espectro de RMN ¹³ C e DEPT 90° e 135° (50 MHz, DMSO-D ₆) do biflavonóide 5.....	81
Figura I.4.44. Espectro de NOEDIFF (200 MHz, D ₃ CCOCD ₃) do biflavonóide 5.....	82
Figura I.4.45. Espectro de HETCOSY ¹ H- ¹³ C (200 MHz, D ₃ CCOCD ₃) do biflavonóide 5.....	83
Figura I.4.46. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, D ₃ CCOCD ₃) do biflavonóide 6 (tetrametilgatisflavona).....	88
Figura I.4.47. Espectro de ¹ H- ¹ H-COSY (200 MHz, D ₃ CCOCD ₃) de 6.....	89
Figura I.4.48. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDC ₃) do biflavonóide 7 (tetrametil diacetilgatisflavona).....	90
Figura I.4.49. Espectro de RMN ¹ H ampliado (400 MHz, CDC ₃) de 7.....	91
Figura I.4.50. Espectro de NOEDIFF (200 MHz, CDC ₃) do biflavonóide 7.....	92
Figura I.4.51. Espectro de NOEDIFF (200 MHz, CDC ₃) do biflavonóide 7.....	93
Figura I.4.52. Espectro de NOESY (400 MHz, CDC ₃) do biflavonóide 7.....	94
Figura I.4.53. Espectro de NOESY ampliado (400 MHz, CDC ₃) de 7.....	95
Figura I.4.54. Espectro de RMN ¹³ C e APT (100 MHz, CDC ₃) de 7.....	96
Figura I.4.55. Espectro de RMN-2D HMQC (400 MHz, CDC ₃) de 7.....	97
Figura I.4.56. Espectro de RMN-2D HMQC ampliado (400 MHz, CDC ₃) de 7.....	98
Figura I.4.57. Espectro de RMN-2D HMBC ampliado (400 MHz, CDC ₃) de 7.....	99
Figura I.4.58. Espectro de RMN-2D HMBC ampliado (400 MHz, CDC ₃) de 7.....	100
Figura I.4.59. Espectro de infravermelho do biflavonóide 8 (agatisflavona).....	102
Figura I.4.60. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, Metanol-D ₄) de 8.....	103
Figura I.4.61. Espectro de RMN ¹³ C 90 e 135° (50 MHz, Metanol-D ₄) de 8.....	104
Figura I.4.62. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-D ₆) do flavonóide 9.....	108
Figura I.4.63. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-D ₆) do flavonóide 9.....	109
Figura I.4.64. Espectro de RMN ¹³ C e APT (100 MHz, DMSO-D ₆) de 9.....	110
Figura I.4.65. Espectro de RMN ¹³ C e APT ampliado (100 MHz, DMSO-D ₆) do flavonóide 9.....	111
Figura I.4.66. Espectro de HMQC (400 MHz, DMSO-D ₆) do flavonóide 9.....	112
Figura I.4.67. Espectro de HMQC (400 MHz, DMSO-D ₆) do flavonóide 9.....	113
Figura I.4.68. Espectro de HMBC (400 MHz, DMSO-D ₆) do flavonóide 9.....	114

Figura I.4.69. Espectro de HMBC ampliado (400 MHz, DMSO-D ₆) de 9.....	115
Figura I.4.70. Espectro de HMBC ampliado (400 MHz, DMSO-D ₆) de 9.....	116
Figura II.4.1. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) em DMSO-D ₆ da mistura de triterpenos 11 (ácido pomólico) e 13 (ácido ursólico).....	136
Figura II.4.2. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) em CDC ₃ do triterpeno 12 (pomolato de metila).....	136
Figura II.4.3. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) em CDC ₃ da mistura de triterpenos 14 [B] (ursolato de metila) e 15 [C] (ácido oleanólico).....	137
Figura II.4.4. Espectro de RMN ¹ H ampliado (400 MHz) em CDC ₃ de 12.....	138
Figura II.4.5. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz) em CDC ₃ de 12.....	139
Figura II.4.6. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz) em CDC ₃ 14 (ursolato de metila) e 15 (oleanato de metila).....	140
Figura II.4.7. Espectro de DEPT (100 MHz) em CDC ₃ de 14 [B] e 15 [C].....	141
Figura II.4.8. Espectro de DEPT (100 MHz) em DMSO-D ₆ de 11 [A] (ác. pomólico), 13 [B] (ac. ursólico) e 15 [C] (ác. oleanólico).....	142
Figura II.4.9. Espectro de DEPT (100 MHz) em CDC ₃ de 14 [B] e 15 [C].....	142
Figura II.4.10. Espectro de HMQC (400 MHz) em DMSO-D ₆ de 11[A], 13[B] e 15[C].....	143
Figura II.4.11. Espectro de HMQC (400 MHz, DMSO-D ₆) de 11[A], 13[B] e 15[C].....	144
Figura II.4.12. Espectro de HMQC (400 MHz, CDC ₃) de 12 (pomolato de metila).....	145
Figura II.4.13. Espectro de HMQC (400 MHz, CDC ₃) de 12.....	146
Figura II.4.14. Espectro de HMBC (400 MHz, CDC ₃) de 12.....	147
Figura II.4.15. Espectro de HMBC (400 MHz, CDC ₃) de 12.....	148
Figura II.4.16. Espectro de HMBC (400 MHz, CDC ₃) de 12.....	149
Figura II.4.17. Espectro de HMBC (400 MHz, CDC ₃) de 12.....	150
Figura II.4.18. Espectro de massas (FAB) de 11[A], 13[B] e 15[C].....	151
Figura II.4.19. Espectro de IV do triterpeno 10 (lupeol).....	153
Figura II.4.20. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDC ₃) de 10.....	155
Figura II.4.21. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, CDC ₃) de 10.....	155
Figura II.4.22. Espectro de RMN ¹ H de 19 (3-O-β-D-glicopiranosilsterol) em DMSO-D ₆	158
Figura II.4.23. Espectro de RMN ¹³ C de 19 em DMSO-D ₆	158
Figura II.4.24. Espectro de RMN ¹ H de 20 (3-O-β-D-tetraacetilglicopiranosilsterol) em CDC ₃	159
Figura II.4.25. Espectro de RMN ¹³ C de 20 em CDC ₃	159
Figura II.4.26. Espectro de RMN ¹ H, Metanol-D ₄ do quebracitol (17) e sorbitol (16).....	161
Figura II.4.27. Espectro de RMN ¹³ C de 17 e 16, em Metanol-D ₄	161
Figura II.4.28. Espectro de massas do quebracitol (18) e sorbitol (16a) acetilados.....	162
Figura II.4.29. Espectro de massas (FAB) de 1 (epicatequina) isolada de <i>D. martiana</i>	164
Figura II.4.30. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) em Metanol-D ₄ de 1 isolada de <i>D. martiana</i>	165
Figura II.4.31. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz) e DEPT em Metanol-D ₄ de 1.....	166
Figura II.4.32. Espectro de IV do flavonol 21.....	169
Figura II.4.33. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, Acetona-D ₆) do flavonol 21 (quercetina).....	169
Figura II.4.34. Espectro de IV do flavonol 22 (canferol).....	170
Figura II.4.35. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, Acetona-D ₆) do flavonol 22.....	170
Figura II.4.36. Espectro de ¹ H- ¹ H-COSY (400 MHz, Metanol-D ₄) do flavonol 22.....	171

Figura II.4.37. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, Metanol-D ₄) do flavonol 22.....	172
Figura II.4.38. Espectro de massas do flavonol 22.....	173
Figura II.4.39. Espectro de RMN ¹ H de 23 em Metanol-D ₄	176
Figura II.4.40. Espectro de ¹ H- ¹ H-COSY de 23 em Metanol-D ₄	177
Figura II.4.41. Espectro de RMN ¹³ C do flavonóide glicosilado 23 (3- b-O-D -glicopiranosilcanferol) em Metanol-D ₄	178
Figura II.4.42. Espectro de RMN ¹ H e ¹ H- ¹ H COSY de 24 e 25 (7- b-O-D -glicopiranosilquercetina e 7- b-O-D -galactopiranosilquercetina) em DMSO-D ₆	181
Figura II.4.43. Espectro de ¹ H- ¹ H-COSY ampliado de 24 e 25 (7- b-O-D -glicopiranosilquercetina e 7- b-O-D -galactopiranosilquercetina) em DMSO-D ₆	182
Figura II.4.44. Espectro de NOEDIFF de 24 e 25 em DMSO-D ₆	182
Figura II.4.45. Espectro de RMN ¹³ C de 24 e 25 em DMSO-D ₆	183
Figura II.4.46. Espectro de HMQC, ampliado 5,0-5,3 ppm, dos flavonóides glicosilados 24 e 25 em DMSO-D ₆	184
Figura II.4.47. Espectro de HMQC, ampliado de 6,0-8,0 ppm, dos flavonóides glicosilados 24 e 25 em DMSO-D ₆	185
Figura II.4.48. Espectro de HMBC, ampliado 6,0-8,0 ppm, dos flavonóides glicosilados 24 e 25 em DMSO-D ₆	186
Figura II.4.49. Espectro de HMBC, ampliado 6,0-8,0 ppm, dos flavonóides glicosilados 24 e 25 em DMSO-D ₆	187
Figura II.4.50. Espectros de HMBC de 24 e 25 em DMSO-D ₆	188
Figura II.4.51. Espectro de massas FAB dos flavonóides glicosilados 24 e 25.....	189
Figura III.4.1. Espectro de IV do esteróide 29 (sitosterol).....	202
Figura III.4.2. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDC ₃) do esteróide 29.....	203
Figura III.4.3. A, B: cromatograma e espectro de massas do esteróide 29 (sitosterol) e C: Resultado da pesquisa na biblioteca do cromatógrafo.....	204
Figura III.4.4. Espectro de IV do esteróide 29 (sitosterol).....	205
Figura III.4.5. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDC ₃) do esteróide 20 (sitosterol glicosilado).....	206
Figura III.4.6. Espectro de IV da substância 27.....	209
Figura III.4.7. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDC ₃) de 27.....	209
Figura III.4.8. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDC ₃) de 27.....	210
Figura III.4.9. A: espectro de massas e cromatograma da substância 27 (esqualeno) obtida no CG-EM e B: Biblioteca do cromatógrafo.....	211
Figura III.4.10. Espectro de IV da mistura de 28 (ésteres alifáticos).....	213
Figura III.4.11. Espectro de RMN ¹ H (200MHz, CDC ₃) da mistura de ésteres alifáticos (28).....	213
Figura III.4.12. Espectro de massas de 28, obtido no CG-EM.....	214
Figura III.4.13. Espectro de IV de 26 (mistura de glicerídeos).....	217
Figura III.4.14. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDC ₃) de 26.....	217
Figura III.4.15. Espectros ampliados de RMN ¹ H (400 MHz, CDC ₃) de 26.....	218
Figura III.4.16. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDC ₃) de 26.....	219
Figura III.4.17. Espectro de HETCOSY (100 MHz, CDC ₃) de 26.....	220
Figura III.4.18. Espectro de COSY- ¹ H- ¹ H (200 MHz, CDC ₃) de 26.....	221
Figura III.4.19. Espectros de massas obtido no CG-EM (A: Tempo de retenção: 42,60-42,65 e B: 24,35-24,38) da mistura de glicerídeos (26).....	222
Figura III.4.20. Espectros de massas obtido no CG-EM (C: Tempo de retenção: 31,42-31,62 e D: 42,77-42,82) da mistura de glicerídeos (26).....	223
Figura III.4.21. Espectro de IV de 30 (5-hidroximetilfurfural).....	225
Figura III.4.22. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDC ₃) de 30.....	225

Figura III.4.23. Espectro de RMN ¹ H com D ₂ O (200 MHz, CDCl ₃) de 30.....	226
Figura III.4.24. Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) de 30.....	226
Figura III.4.25. Espectro de DEPT 90° e 135° (50 MHz, CDCl ₃) de 30.....	227
Figura III.4.26. Espectro de COSY ¹ H- ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de 30.....	228
Figura III.4.27. Espectro de HETCOSY (50 MHz, CDCl ₃) de 30.....	229
Figura III.4.28. Cromatograma de 30 (5-hidroxiacetilfurfural), Coluna: CP-SIL8CB (30mx25x0,25mm), Ionização: EI (70eV).....	230
Figura III.4.29. Espectro de massas de 30.....	230
Figura III.4.30. Espectro de IV de 33 (ácido gálico).....	245 234
Figura III.4.31. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, Metanol-D ₄) de 33.....	245 234
Figura III.4.32. Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, Metanol-D ₄) de 33.....	246 235
Figura III.4.33. Espectro de DEPT 90° e 135° (200 MHz, Metanol-D ₄) de 33.....	235
Figura III.4.34. A: cromatograma e B: espectro de massas de 33 (ácido gálico).....	236
Figura III.4.35. Espectro de HETCOSY (50 MHz, Metanol-D ₄) de 33.....	248 237
Figura III.4.36. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, Acetona-D ₆) de 34 (ácido gálico metilado).....	238
Figura III.4.37. Espectro de RMN ¹³ C (400 MHz, Metanol-D ₄) de 34.....	239
Figura III.4.38. Espectro de IV de 35 (galato de etila).....	240
Figura III.4.39. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, Metanol-D ₄) de 35.....	240
Figura III.4.40. Espectro de COSY ¹ H- ¹ H (200 MHz, Metanol-D ₄) de 35.....	241
Figura III.4.41. Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, Metanol-D ₄) de 35.....	242
Figura III.4.42. Espectro de DEPT 90° e 135° (50 MHz, Metanol-D ₄) de 35.....	243
Figura III.4.43. Espectro IV de 31 (luteolina).....	246
Figura III.4.44. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, Acetona-D ₆) de 31.....	246
Figura III.4.45. Espectro de RMN ¹ H com D ₂ O (200 MHz, Acetona-D ₆) de 31.....	247
Figura III.4.46. Espectro de COSY ¹ H- ¹ H com D ₂ O (200 MHz, Acetona-D ₆) de 31.....	247
Figura III.4.47. Espectro de IV de 32 (7, 3', 4' trimetiluteolina).....	248
Figura III.4.48. Espectro de massas do flavonóide 32.....	248
Figura III.4.49. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) do flavonóide 32.....	249
Figura III.4.50. Espectro de IV de 36 (brevifolato de etila).....	254
Figura III.4.51. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-D ₆) de 36.....	255
Figura III.4.52. Espectro de RMN ¹ H ampliado (400 MHz, DMSO-D ₆) de 36.....	256
Figura III.4.53. Espectro de RMN ¹ H ampliado (400 MHz, DMSO-D ₆) de 36.....	257
Figura III.4.54. Espectro de RMN ¹³ C e APT (100 MHz, DMSO-D ₆) de 36.....	258
Figura III.4.55. Espectro de HMQC (400 MHz, DMSO-D ₆) de 36.....	259
Figura III.4.56. Espectro de HMQC ampliado (400 MHz, DMSO-D ₆) de 36.....	260
Figura III.4.57. Espectro de HMBC (400 MHz, DMSO-D ₆) de 36.....	261
Figura III.4.58. Espectro de HMBC ampliado (400 MHz, DMSO-D ₆) de 36.....	262
Figura IV.3.1. Cromatogramas e espectros de UV dos flavonóides padrões A) agatisflavona, B) 7''-metilagathisflavona, C) amentoflavona, D) podocarpusflavona, E) 2'',3''-diidroochnaflavona e F) luxenchalcona.....	270
Figura IV.3.2. Cromatogramas e espectros de UV dos extratos metanólicos de <i>O. semiserrata</i> , sendo NI: picos não identificados.....	273
Figura V.1. Elementos estruturais para a atividade antioxidante dos flavonóides.....	281
Figura V.2. Estrutura dos biflavonóides.....	283
Figura V.3: Porcentagem de inibição das células: adenocarcinoma de cólon humano HT-29 (?), carcinoma de pulmão e não pequenas células NCI-H460 (?), carcinoma renal RXF-393 (◆), adenocarcinoma de mama MCF-7 (■), e adenocarcinoma de ovário OVCAR-3 (▼) depois 72 horas de tratamento com 7,7''-O-dimetillanaroflavona..	285

Figura V.4: Porcentagem de inibição das células: adenocarcinoma de cólon humano HT-29 (?), carcinoma de pulmão e não pequenas células NCI-H460 (?), carcinoma renal RXF-393 (◆), adenocarcinoma de mama MCF-7 (■), e adenocarcinoma de ovário OVCAR-3 (▼) depois 72 horas de tratamento com 7"-metilagatisflavona..... 285

Figura V.5: Porcentagem de inibição das células: adenocarcinoma de cólon humano HT-29 (?), carcinoma de pulmão e não pequenas células NCI-H460 (?), carcinoma renal RXF-393 (◆), adenocarcinoma de mama MCF-7 (■), e adenocarcinoma de ovário OVCAR-3 (▼) depois 72 horas de tratamento com OFMHE-6, mistura de agatisflavona e 7"-metilagatisflavona.....301 286

Figura V.6: Porcentagem de inibição das células: adenocarcinoma de cólon humano HT-29 (?), carcinoma de pulmão e não pequenas células NCI-H460 (?), carcinoma renal RXF-393 (◆), adenocarcinoma de mama MCF-7 (■), e adenocarcinoma de ovário OVCAR-3 (▼) depois 72 horas de tratamento com agatisflavona.....301 286

Índice de Tabelas.....	Pág.
Tabela 1. Ocorrência de flavonóides em espécies do <i>Ouratea</i> e <i>Luxemburgia</i> , família Ochnaceae.....	18
Tabela I.4.1. Dados de RMN ¹ H (200 MHz) e ¹³ C (50 MHz) da substância 1 em DMSO-D ₆ , comparados com a literatura.....	30
Tabela I.4.2. Dados de RMN ¹ H (400 MHz), e ¹³ C (100 MHz) da substância 2 (DMSO-D ₆) e dos derivados metilado 3 e acetilado 4 (CDC ₃)	39
Tabela I.4.3. Dados espectrais de NOEDIFF (200 MHz) de 2 em DMSO-D ₆ e do derivado acetilado 4 em CDC ₃	40
Tabela I.4.4. Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e RMN ¹³ C (100 MHz) 2D de 2 (DMSO-D ₆), 3 e 4 (CDC ₃).....	40
Tabela I.4.5. Dados espectrais de NOEDIFF (200 MHz) de 5 em Acetona-D ₆	76
Tabela I.4.6. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C das substâncias 5 (D ₃ CCOCD ₃ , ¹ H e D ₃ CSOCD ₃ , ¹³ C), 6 (D ₃ CCOCD ₃ , ¹ H e MOREIRA <i>et al.</i> , 1999, ¹³ C) e 7 (CDC ₃)	77
Tabela I.4.7. Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e RMN ¹³ C (100 MHz) 1D e 2D de 7 (tetrametildiacetil agatisflavona) (CDC ₃).....	85
Tabela I.4.8. Dados de RMN ¹ H (200 MHz) e ¹³ C (50 MHz) em Metanol-D ₄ , da substância 8 (agatisflavona).....	105
Tabela I.4.9. Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e RMN ¹³ C (100 MHz) de 9.....	107
Tabela 2. Alguns constituintes químicos isolados de Apocynaceae.....	125
Tabela II.4.1. Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) das substâncias 11, 13 e 15 e dos derivados metilados 12, 14 e 15a (CDC ₃).....	134
Tabela II.4.2. Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e RMN ¹³ C (100 MHz) 1D e 2D do derivado metilado 12 (CDC ₃).....	135
Tabela II.4.3. Dados de RMN ¹ H (200 MHz) e ¹³ C (50 MHz) de 10 em CDC ₃	154
Tabela II.4.4. Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) de 19 (3- <i>O</i> -β-D-glicopiranosilsterol) em DMSO-D ₆ e 20 em CDC ₃	157
Tabela II.4.5. Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) de quebracitol (17) e sorbitol (16) e seus derivados acetilados 16a e 18.....	160
Tabela II.4.6. Dados de ¹ H- ¹ H-COSY (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) do canferol (22) em Acetona-D ₆	168
Tabela II.4.7. Dados de RMN ¹ H (200 MHz) da quercetina (21) em Acetona-D ₆	168
Tabela II.4.8. Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) do flavonóide glicosilado 23 (3- <i>b</i> - <i>O</i> -D-glicopiranosilcanferol) em Metanol-D ₄	175

Tabela II.4.9. Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) 1D e 2D dos flavonóides glicosilados 24 e 25 (7- b -O-D-glicopiranosilquercetina e 7- b -O-D-galactopiranosilquercetina) em DMSO-D ₆	180
Tabela III.1. Ocorrência de alguns constituintes bioproduzidos por espécies do gênero <i>Caesalpinia</i> , família Leguminosae.....	195
Tabela III.4.1 Dados de RMN ¹ H (200 MHz) e ¹³ C (50 MHz) da substância 30 (5-hidroximetilfurfural) em CDCl ₃	224
Tabela III.4.2. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C do ácido gálico (33), ácido gálico metilado (34) e galato de etila (35) em Metanol-D ₄ e (RMN ¹ H, 34) em Acetona-D ₆	233
Tabela III.4.4. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (1D e 2D) de 36 (brevifolato de etila) em DMSO-D ₆	244
Tabela V.1. Atividade antibacteriana de extratos e substâncias das flores de <i>Caesalpinia peltophoroides</i>	279
Tabela V.2. Valores de IC50 (μM; n ≥ 3) dos biflavonóides sobre o crescimento das células tumorais. As respostas celulares foram avaliadas imediatamente após tratamento 72 horas usando o ensaio SRB.....	284

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	deslocamento químico (ppm)
M^+	pico do íon molecular
Ac	acetila
Ac ₂ O	anidrido acético
AcOEt	acetato de etila
AcOH	ácido acético
aq	aquoso
APT	<i>Attached Proton Test</i>
ATCC	American Type Culture Collection
ax	axial
BBD	<i>Band Broad Decoupled</i>
CC	cromatografia em coluna (pressão atmosférica)
CCD	cromatografia em camada delgada
CCDA	cromatografia em camada delgada analítica
CG-EM	cromatografia com fase gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
COLOC	<i>Correlation Spectroscopy via Long-range Couplings</i>
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
d	dubleto
dd	duplo dubleto
dl	dubleto largo
DAD	Diode array detector
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO _{D6}	dimetilsulfóxido deuterado
EI	<i>Electronic impact</i>
EM	espectrometria de massas
EMAR	espectrometria de massas de alta resolução
EMBR	espectrometria de massas de baixa resolução
eq	equatorial
EtOH	etanol
Ext.	extrato
HBBD	<i>Hydrogen Broad Band Decoupled</i>
HETCOR	<i>Heteronuclear Chemical Shift Correlation</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence</i>
HRESIMS	Espectro de massas de alta resolução com ionização elétron spray
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
IES	Ionização elétron spray
J	constante de acoplamento em Hertz
m	multiplete
MeOH	metanol
MHz	megahertz
MS/MS	Espectrometria de massas tandem
m/z	relação massa/carga
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Correlation Spectroscopy</i>
Pf	Ponto de fusão

PND	<i>Proton Noise Decoupling</i>
q	quarteto
Rf	Fator de Retenção
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
s	singleto
sl	singleto largo
t	triplete
tl	triplete largo
UV	Ultra-Violeta

OBS: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

RESUMO

DANIEL, Juliana Feijó de Souza. **Metabólitos especiais isolados de *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae), *Dipladenia martiana* (Apocynaceae) e de *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae)**. Seropédica: UFRRJ, 2004. 291p. (Tese, Doutorado em Química Orgânica).

O fracionamento cromatográfico dos extratos das folhas de *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae), dos galhos de *Dipladenia martiana* (Apocynaceae), das flores de *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae) e análise das frações através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas conduziu ao isolamento e a identificação de constituintes de diferentes classes de metabólitos especiais. Das folhas de *O. hexasperma* foram isolados uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos, o flavonóide epicatequina, um glicosilflavonóide, 2''-*O*- β -D-glicopiranosil-8-C- β -D-glicopiranosil luteolina, e três biflavonóides, 5-hidroxi-7-metoxiflavona-(4'-*O*-8'')-5'',4''-diidroxí-7''-metoxiflavona, a 4',5,7-triidroxiflavona-(6 \rightarrow 8'')-4''',5''-diidroxí-7''-metoxiflavona e a 4',5,7-triidroxiflavona-(6 \rightarrow 8'')-4''',5''-7''-triidroxiflavona. Dos galhos de *D. martiana* foram isolados quatro triterpenóides lupeol, os ácidos pomólico, ursólico e oleanólico, dois carboidratos sorbitol e quebracitol, uma saponina esteroidal, 3-*O*- β -D- β -glicopiranosilsitosterol e os flavonóides epicatequina, quercetina, canferol, 3-*O*-***b***-D-glicopiranosilcanferol, 7-*O*-***b***-D-glicopiranosilquercetina e a 7-*O*-***b***-D-galactopiranosilquercetina. Das flores de *C. peltophoroides* foram isolados uma mistura de glicérides, o squaleno, uma mistura de ésteres graxos, sitosterol, 3-*O*- β -D- β -glicopiranosilsitosterol, 5-hidroximetilfurfural, o flavonóide luteolina, ácido gálico, galato de etila e o brevifolato de etila.

Os extratos das folhas de *Ouratea semisserrata* foram analisados por CLAE usando padrões de biflavonóides o que permitiu identificar biflavonóides não isolados anteriormente.

A estruturas foram identificadas através da análise de espectros IV, massas e RMN ^1H e ^{13}C , incluindo técnicas especiais 1D e 2D das substâncias naturais e derivados.

Este estudo revelou a presença de duas biflavonas naturais novas no gênero *Ouratea*, a 7,7''-*O*-dimetillanaroflavona e a agatisflavona. A biflavona 7,7''-*O*-dimetillanaroflavona, seu derivado triacetil éster e o derivado 4',4''',7,7''-tetra-*O*-metil-5,5''-diacetil-agatisflavona são novos na literatura. Fez-se primeiro registro dos dados de RMN ^{13}C da pentametillanaroflavona.

Realizaram-se os testes farmacológicos: toxicidade com *Artemia salina*, atividade antibacteriana e antioxidante de *Caesalpinia*. Atividade citotóxica contra diferentes linhagens de células tumorais foram realizados com os biflavonóides de *Ouratea*.

Palavras chaves: Biflavonóides, terpenóides, compostos fenólicos

ABSTRACT

DANIEL, Juliana Feijó de Souza. **Special Metabolites isolated from *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae), *Dipladenia martiana* (Apocynaceae) and from *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae)**. Seropédica: UFRRJ, 2004. 291p. (Tese, PhD in Organic Chemistry).

The chromatographic fractionation of the *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae), *Dipladenia martiana* (Apocynaceae) and from *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae) extracts led to the isolation of some chemical constituents belonging different classes of special metabolites. From the leaves of *Ouratea hexasperma* were identified flavone dimer 5-hydroxy-7-methoxyflavone-(4'-O-8'')-5'',4'''-dihydroxy-7''-methoxyflavone (7,7''-dimethylanaroflavone), 4',5,7-trihydroxyflavone-(6→8'')-4''',5''-7''-trihydroxyflavone (agathisflavone), 4',5,7-trihydroxyflavone-(6→8'')-4''',5''-dihydroxy-7''-methoxyflavone (7''-methylagathisflavone), epicatechin and 2''-O-β-D-glucopyranosyl-8-C-β-D-glucopyranosyl luteolin. From the branches of *Dipladenia martiana* were identified sorbitol, quebrachitol, 3β-O-β-D-glucopyranosylsitosterol, pomolic acid, ursolic acid, oleanolic acid, epicatechin, kaempferol, quercetin, 3-O-β-D-glucopyranosyl kaempferol, 7-O-β-D-glucopyranosyl quercetin and 7-O-β-D-galactopyranosyl quercetin. The ethanolic extract of the flowers of *Caesalpinia peltophoroides* afforded the ethyl brevifolin carboxylate, 5-hydroxymethylfurfural, the flavonoid luteolin, gallic acid, ethyl gallate, sitosterol, 3β-O-β-D-glucopyranosylsitosterol and esqualene. The structures were established by IR, MS and NMR spectral data analysis, including 2D NMR experiments of the natural substances and the acetyl and methyl derivatives. Besides the identification of the new biflavonoid, 7,7''-O-dimethyl-anaroflavone, the new derivatives, 7,7''-O-dimethyl-5,5'',4'''-triacyllanaroflavone and 4',4''',7,7''-tetra-O-metil-5,5''-diacetyl-agathisflavone were also prepared. The analysis of biflavonoids by HPLC was carried out with of leaves *Ouratea semiserrata* (Ochnaceae) extracts led to identification of the 7''-methylagathisflavone in this specie for the first time. Biological tests were realized: the general toxicity against *Artemia salina*, antibacterial, antioxidant from *Caesalpinia*, cytotoxic and the antitumor activities from *Ouratea* biflavonoids.

Key words: Biflavonoids, terpenoids, phenolic compounds

1. Introdução Geral

O conhecimento dos constituintes químicos especiais das plantas gera informações que não se limitam á descoberta de atividades farmacológicas e, desta forma, contribui para estudos adicionais nas áreas de química, ecologia química, botânica, farmacologia, quimiotaxonomia, genética, bioquímica e etnofarmacologia e, portanto, para conhecermos melhor nossa biodiversidade.

A variedade dos metabólitos especiais das plantas tem sido o principal motivo para o desenvolvimento da pesquisa na Química de Produtos Naturais (QPN) que gera informações para o entendimento e utilização nas diversas áreas de conhecimento.

O estudo das substâncias macromoleculares, proteínas, ácidos nucleicos, etc., é desenvolvido pelos bioquímicos que ultimamente tem usado informações geradas dos estudos desenvolvidos pelos Químicos de Produtos Naturais. Apesar dos profissionais da área de QPN darem maior atenção ao estudo das substâncias micromoleculares: alcalóides, flavonóides, terpenóides, lignóides, etc., os pesquisadores envolvidos na área têm produzido trabalhos com estruturas mais complexas não se limitando às substâncias elaboradas via processos metabólicos especiais. O avanço dos conhecimentos, criando ligações entre os trabalhos dos Químicos de Produtos Naturais, bioquímicos e farmacologistas tem sido motivado principalmente pelo surgimento de equipamentos com recursos que facilitam os trabalhos de detecção, isolamento e determinação estrutural de produtos naturais.

O que mais chama atenção da mídia em relação à química de plantas é a descoberta de material que resolva de forma imediata os problemas relacionados à saúde humana. Essa relação tem sido tão forte que quaisquer credices populares servem de subsídio para noticiários e, inclusive, com citações em inglês, a ponto de convencer a população de propriedades curativas sem qualquer embasamento científico. Isto não significa que a procura de constituintes bioativos não considere o uso em medicina popular, através de conhecimento acumulado e específico, de acordo com a situação sócio-cultural de comunidades ou grupos étnicos (MING, 1994), portanto, só pode ser considerado com embasamento científico. O fundamental é que a população seja orientada sobre o uso do material natural, após os conhecimentos adquiridos pela farmacognosia, aliada aos estudos etnofarmacológicos e, assim, fazer uma melhor seleção de plantas para, previamente, serem avaliadas clinicamente (ELISABETSKY & WANNMACHER, 1993).

As indústrias farmacêuticas aumentam cada vez mais seus investimentos em pesquisa de fitoterápicos, onde inúmeros fármacos são obtidos de plantas e empregados em forma de produtos naturais, derivados ou sintetizados. Como exemplo pode-se citar o caso de *Catharanthus roseus* G. Don (Apocynaceae), originado de Madagascar. Essa espécie é fonte de pelo menos 60 alcalóides, sendo a vincristina e vimblastina, efetivos no tratamento da leucemia infantil. De *Taxus brevifolia* Nutt., é extraído o diterpenóide taxol, que apresenta atividade anti-cancerígena, sendo útil no tratamento de tumores de ovários e seios (SIMÕES, 2001). Outra classe de constituintes ativos é a dos alcalóides, que podem ser usados como anti-hipertensivos (*Rauwolfia serpentina*, reserpina), colinérgicos (*Pilocarpus jaborandi*, pilocarpina), antimalariais (alcalóides de *Cinchona*), anestésicos (*Erythroxylum coca*, cocaína), relaxantes musculares (*Chondrodendron tomentosum* ou curare), além dos glicosídeos cardiotônicos, como a digitoxina que é encontrada em espécies de *Digitalis* (BRUNETON, 1993).

Como pode-se verificar nos exemplos citados acima, a contribuição do estudo químico de espécies de diferentes famílias de plantas brasileiras tem sua relevância, não só no sentido de detectar os constituintes majoritários na espécie estudada, como detectar as classes de substâncias que permitam considerar a espécie como de importância farmacológica, além de gerar informações a serem utilizadas nas diversas áreas de conhecimento.

2. Objetivos

- a) Isolar e identificar os principais metabólitos especiais das folhas de *Ouratea hexasperma*, das partes aéreas de *Dipladenia martiana* e das flores de *Caesalpinia peltophoroides*.
- b) Avaliar algumas atividades biológicas de extratos e/ou das substâncias isoladas das diferentes partes das plantas estudadas ou de seus derivados.
- c) Preparar derivados dos constituintes isolados e fazer a completa atribuição de dados espectrométricos das substâncias naturais isoladas e derivados.

3. Parte Experimental Geral

3.1. Equipamentos e reagentes

Os pontos de fusão foram determinados em placa de aquecimento MEL-TEMP II, Laboratory Devices USA, utilizando capilar, sem correção dos valores obtidos. Os espectros de infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin-Elmer 1600/1605 FT-IR em KBr e/ou filmes de NaCl. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear, ^1H e ^{13}C (incluindo experimentos em 2D) foram registrados em espectrômetros Bruker AC-200 (^1H : 200 e ^{13}C : 50 MHz) e JEOL JNM-GX-400 (^1H : 400 e ^{13}C : 100 MHz). Como padrão interno foi usado tetrametilsilano ou resíduo do solvente CHCl_3 (δ_{H} 7.24) e o pico central do tripleto em δ_{C} 77.00 do CDCl_3 . O espectro de massas de alta resolução foi obtido por ionização *elétron spray* (HRESIMS) em um espectrômetro VG 7070E-HF (UNICAMP). Os espectros de massas de baixa resolução foram registrados em cromatógrafo com fase gasosa HP-5880A acoplado a espectrômetro de massas computadorizado HP-5897A de analisador de íons quadrupolo e ionização por impacto de elétrons, 70 eV; CG/EM Varian Saturn 2000; CG/EM HP-5989A, CLAE Shimadzu LC 6AD e LC 10AD com detector de fotoiodo (PDA), com coluna Betasil C18 (250mm x 4,6 mm x 5 μm).

As cromatografias em coluna foram realizadas tendo como suporte gel de sílica (230-400 e 70-230 mesh, Vetec), Sephadex LH-20 (Sigma, USA) e amberlite XAD-4 (20-50 mesh, Fluka). A cromatografia em camada preparativa (CCP) foi feita em placas de gel de sílica 60 PF₂₅₄, Merck e Vetec, sobre suporte de vidro e espessura de 1mm. As substâncias foram detectadas por irradiação na região do ultravioleta (254 e 366 nm). Foram usadas placas em folha de alumínio de gel de sílica 60 PF₂₅₄ Merck para cromatografia em camada fina (CCF) e como reveladores foram utilizados, além da detecção por irradiação ultravioleta (254 e 366 nm), reagente de Mayer e Liebermann-Burchard; Iodo; soluções de AlCl_3 -EtOH (1%) e sulfato cérico (1%)- H_2SO_4 (10%) (DOMÍNGUEZ, 1973 e MATOS, 1988). Alguns solventes comerciais foram destilados antes de serem utilizados.

3.2. Derivações

A preparação de derivados das substâncias isoladas das espécies *Ouratea hexasperma*, *Dipladenia martiana* e *Caesalpinia peltophoroides* serviu para realização de testes biológicos dos mesmos e em alguns casos facilitou a análise dos dados espectrométricos, devido ao aumento da solubilidade em clorofórmio e, fazer análises com algumas técnicas especiais de RMN.

3.2.1. Metilação

a) Diazometano

A solução de diazometano foi preparada de acordo com a metodologia experimental descrita na literatura (VOGEL, 1989). Adicionou-se a solução etérea do diazometano em excesso às substâncias dissolvidas em CHCl_3 ou MeOH. O solvente foi evaporado, fornecendo as substâncias metiladas.

b) Sulfato de dimetila

Para a permetilação de flavonóides com sulfato de dimetila, dissolve-se a substância em acetona e adiciona-se 1 eq. de K_2CO_3 e 1 eq. de sulfato de dimetila para cada hidroxila livre. A mistura resultante foi agitada durante 2h a temperatura ambiente com monitoramento usando placa cromatográfica em camada fina. Após a reação, o solvente foi removido em rotavapor sob pressão reduzida e o resíduo obtido foi suspenso em água (cerca de 50 mL), adicionado 5 mL de solução de hidróxido de amônio concentrado e extraído com 3 vezes 15 mL de CH_2Cl_2 . As frações orgânicas reunidas foram secas com sulfato de sódio anidro e o solvente removido em rotavapor (BEKKER *et al.*, 1999).

Substâncias metiladas Sulfato de metila, Diazometano, Peso.	1- 2-	Derivados obtidos Peso	Espectros da substância
1- 7,7'-O-dimetillanaroflavona 20,0 mg	2	pentametillanaroflavona 12,0 mg	I.4.32-I.4.39
2- 7''-O-metilagatisflavona 40,0 mg	5	7'',7,4',4'''-O- tetrametilagatisflavona 25,0 mg	I.4.46-I.4.47
2-Ácido pomólico (15,0 mg -mistura 11, 13 e 15)	11	pomolato de metila 4,2 mg	II.4.4-II.4.5; II.4.12-II.4.18
2-Ácido ursólico (15,0 mg -mistura 11, 13 e 15)	13	ursolato de metila 8,1 mg	-
2-Ácido ursólico e ácido oleanólico (15,0 mg -mistura 11, 13 e 15)	13 e 15	ursolato de metila e ácido oleanólico 2,7 mg	II.4.6-II.4.11; II.4.3;II.4.18
2- Ácido gálico 20,0 mg	33	Metil (tri-O- metil) galato 21,0 mg	III.4.36;III.4.37
2- Luteolina 2,5 mg	31	7, 3', 4' trimetil luteolina 3,0 mg	III.4.47-III.4.49

3.2.2. Acetilação com anidrido acético e piridina

A reação de acetilação das substâncias foi feita adicionando-se piridina/anidrido acético (1:1, v:v) nas amostras. Após repouso de 48 horas a temperatura ambiente foi adicionada água gelada formando um precipitado. O precipitado foi extraído com clorofórmio (3x) e a solução clorofórmica lavada com HCl (10%) para eliminar a piridina, e em seguida, lavou-se várias vezes com água destilada. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e evaporada em rotavapor, obtendo-se as substâncias acetiladas.

4. Referências Gerais

BEKKER, R.; BRANDT, E. V.; FERREIRA, D. Biflavonoids. Part 4. Structure and Stereochemistry of Novel Flavanone- and the First Isoflavanone-benzofuranone Biflavonoids. *Tetrahedron*, **55**, 10005-100012, 1999.

BRUNETON, J (1993) "Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants", Lavoisier Publ. Inc., New York, USA. 2nd ed.; Translated by C.K. Hatton (1995).

DOMÍNGUEZ, A. X.; Métodos de investigación fitoquímica, 139, 149, 211, Ed. Editorial Limusa, México, 1973.

ELISABETSKY, E.; WANNMACHER, L. The status of ethnopharmacology in Brazil. *Journal of Ethnopharmacol.*, **38**, 137-143, 1993.

MATOS, F. J. A. Introdução a fitoquímica experimental, Ed. Edições UFC, Fortaleza, 121, 1988.

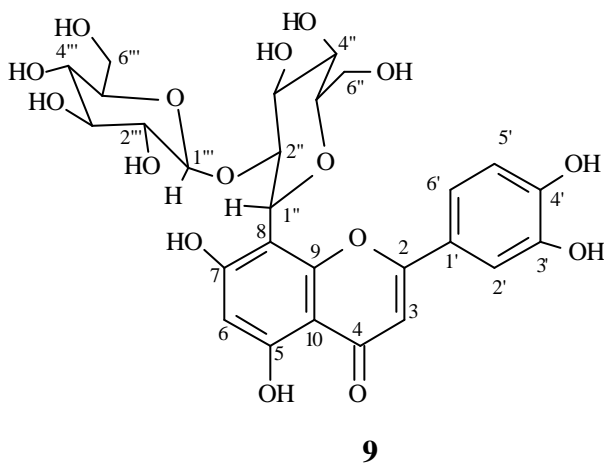
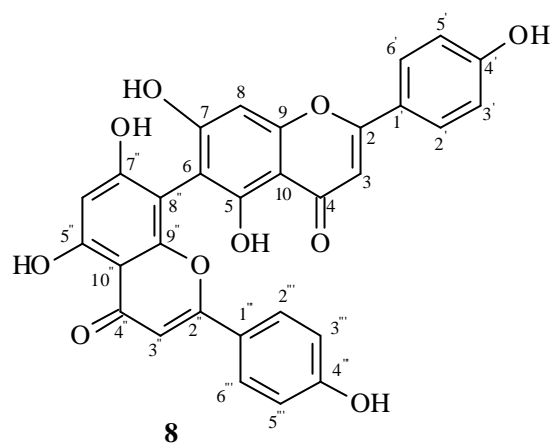
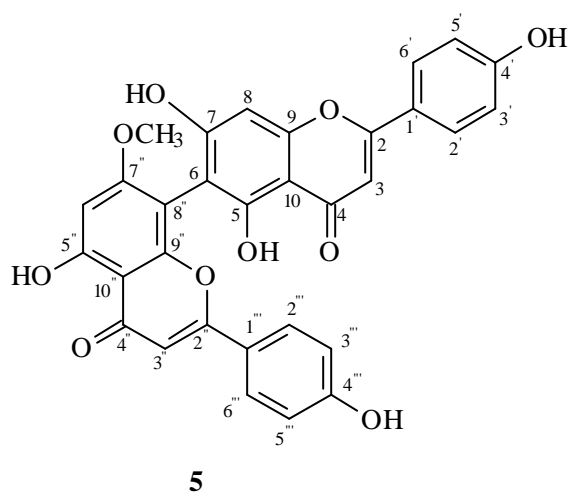
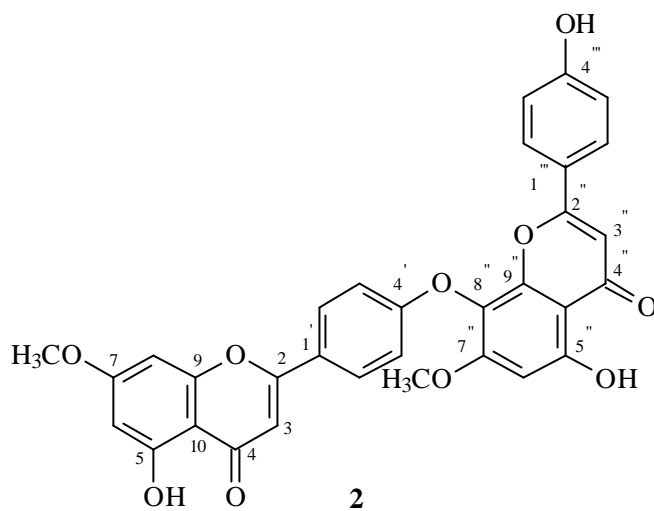
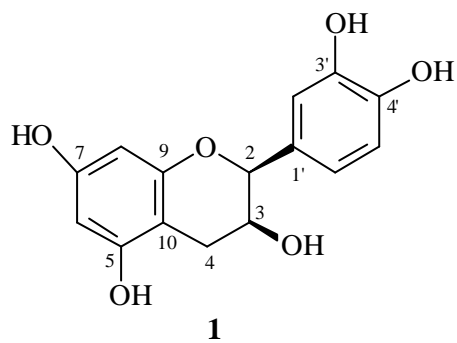
MING, C. L. Estudo e pesquisa de plantas medicinais na agronomia. *Hort. Bras.*, **12** (1), 1-9, 1994.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento. *UFSC/UFRGS*, 2001.

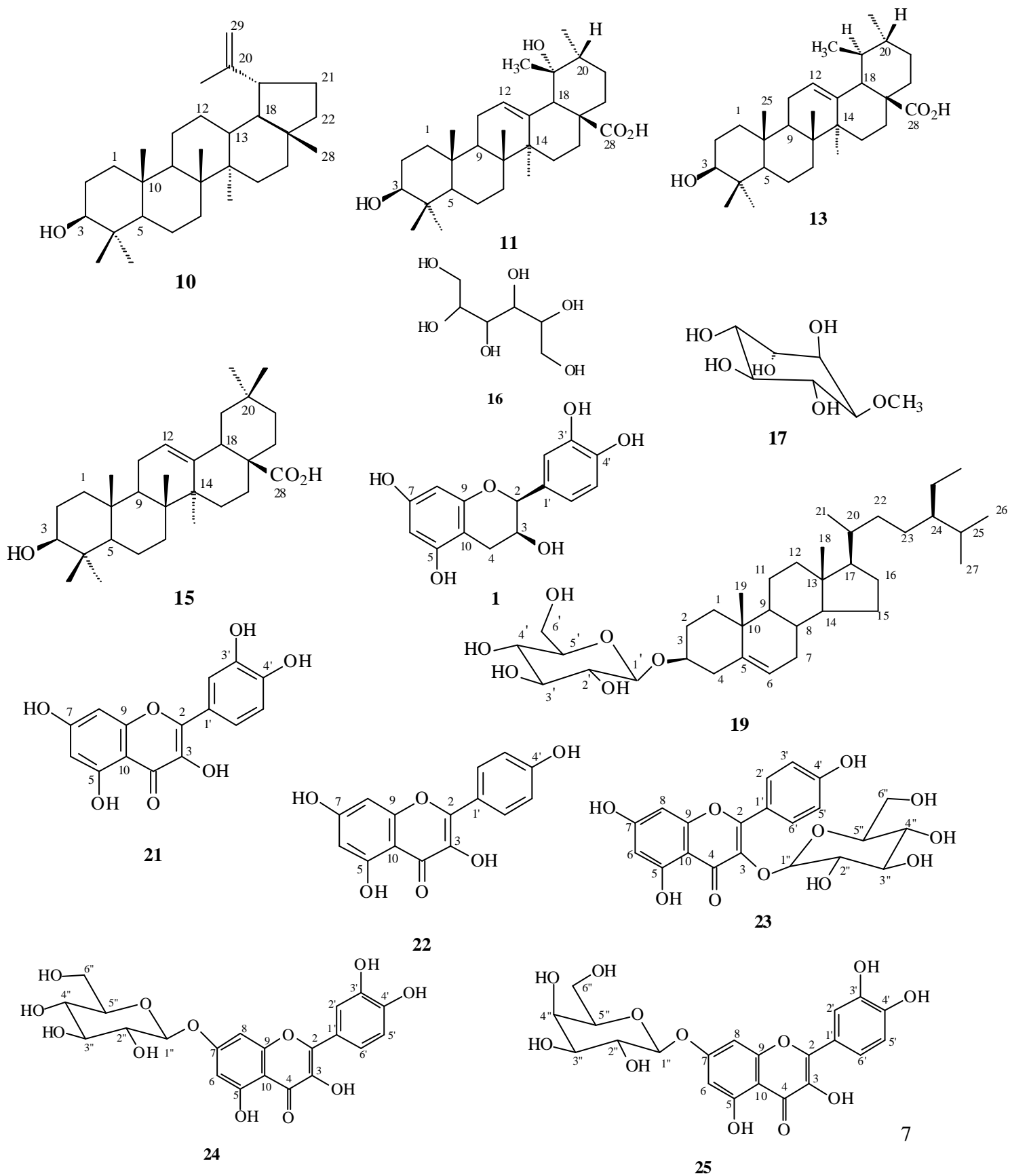
VOGEL, A. I. Vogel's Textbook of practical organic chemistry, 5th ed., *Longman*, England, 433, 1989.

5. Substâncias isoladas:

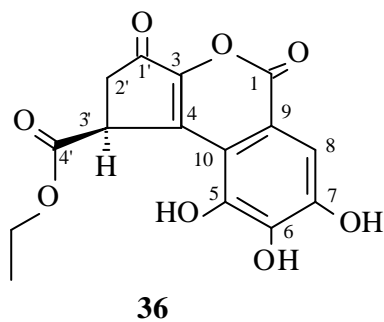
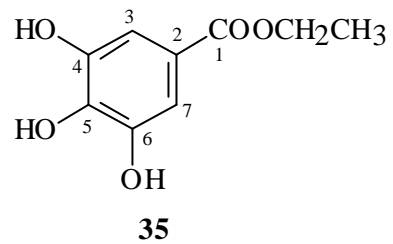
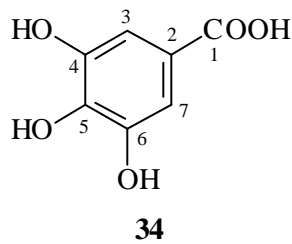
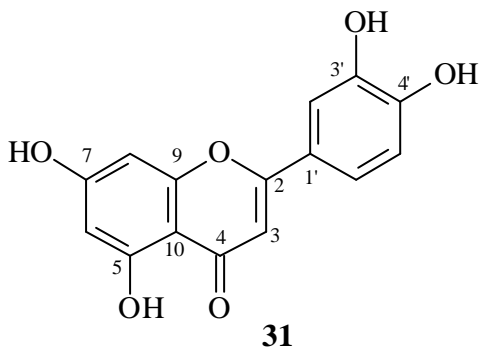
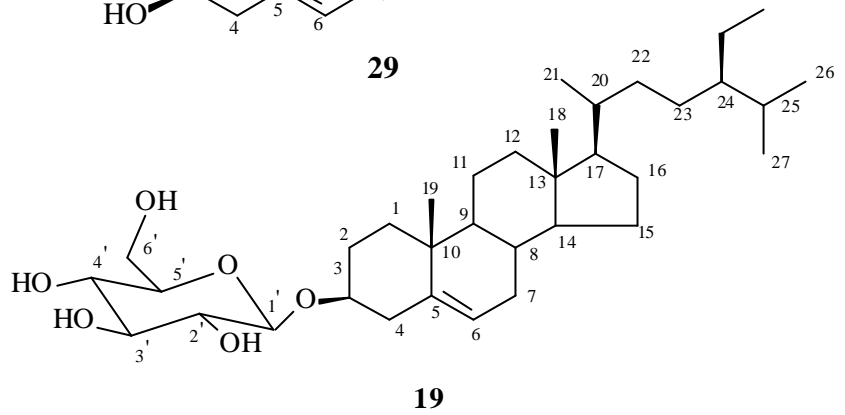
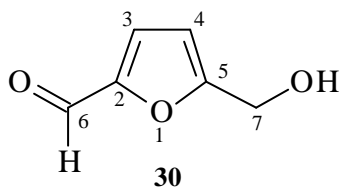
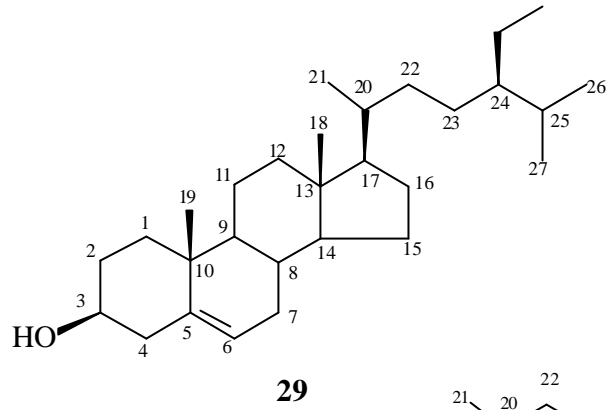
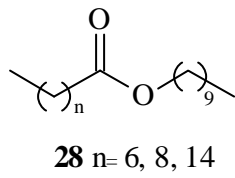
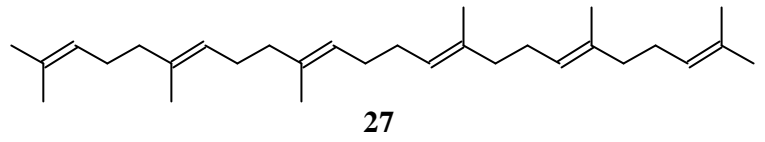
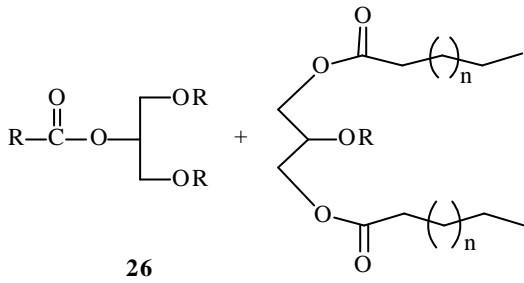
5.1. *Ouratea hexasperma*



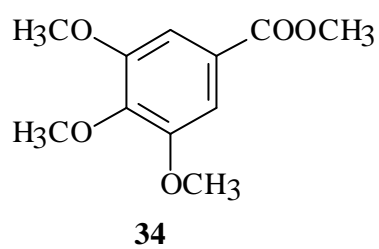
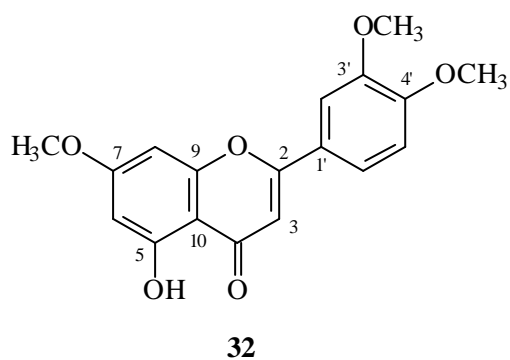
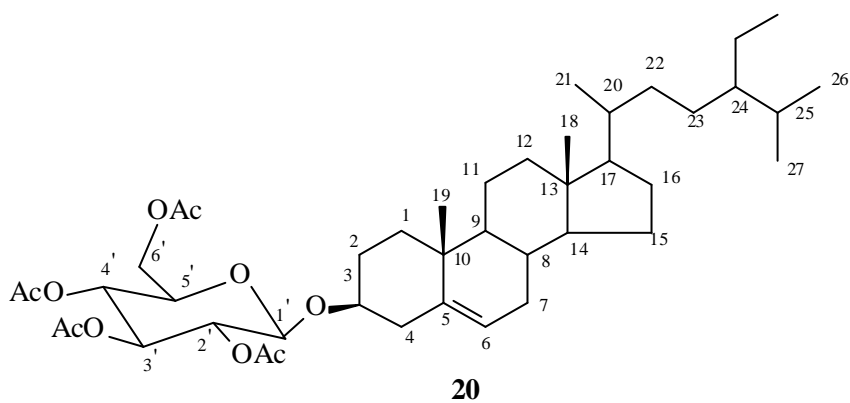
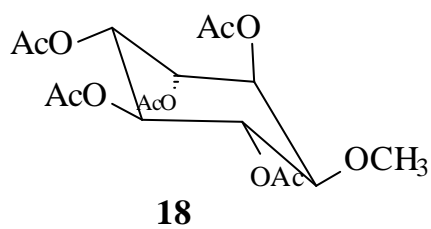
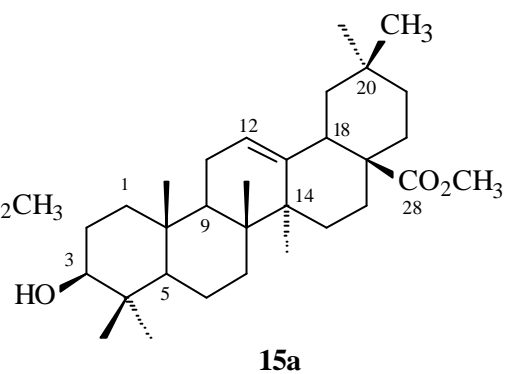
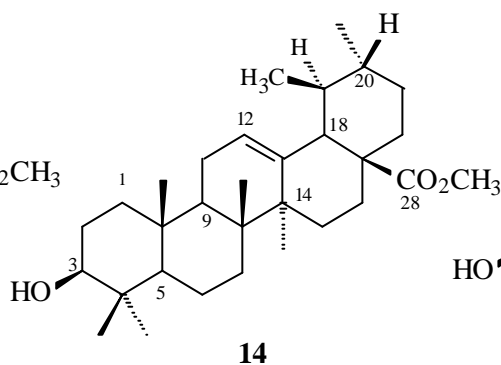
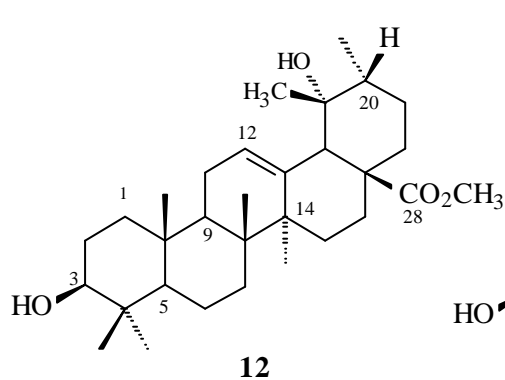
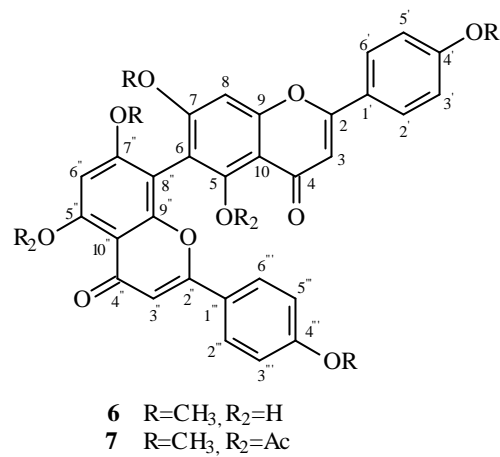
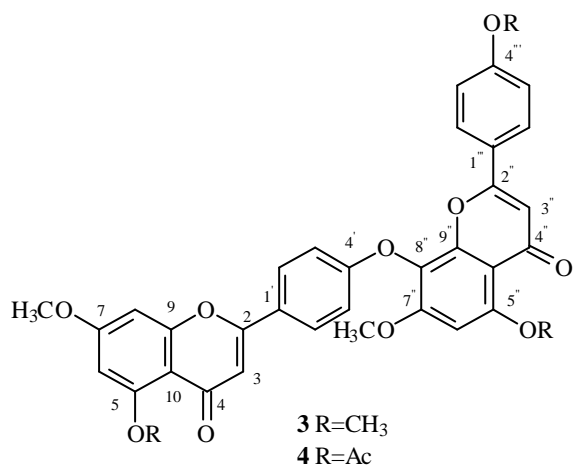
5.2. *Dipladenia martiana*



5.3. *Caesalpinia peltophoroides*



5.4. Derivados obtidos através deste trabalho:



CAPÍTULO I
ESTUDO QUÍMICO DE *Ouratea hexasperma*

I.1. Introdução

A família Ochnaceae compreende cerca de 28 gêneros e 400 espécies de ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. No Brasil ocorrem aproximadamente 9 gêneros com 105 espécies (BARROSO, 1986). São plantas essencialmente arbóreas ou arbustivas, folhas em geral inteiras, de distribuição alterna, com estípulas, raramente herbáceas (*Sauvagesia*). As espécies são caracterizadas pelas flores geralmente vistosas, freqüentemente de coloração amarela. No Nordeste as espécies de *Ouratea* são conhecidas como batiputá. Além de *Ouratea* e *Luxemburgia* (Tabela 1, pág. 19) foram encontrados flavonóides em outros gêneros dessa família. O gênero *Ochna* consiste em mais de 85 espécies distribuídas por toda África (PEGNYEMB *et al.*, 2003), principalmente na região de Camarões. O estudo das espécies forneceu triflavonóides: caloflavanas A e B (MESSANGA *et al.*, 2002), biflavonóides (KAMIL *et al.*, 1987): calodeninas A e B e lophironas K e C (MESSANGA *et al.*, 1994; PEGNYEMB *et al.*, 2001). Biflavonóides, isoflavona e flavona C-glicosilada foram isolados de *O. squarrosa*. Esta espécie é utilizada no tratamento de indigestão, complicações menstruais e contra asma (RAO & GUNASEKAR, 1989). O extrato etanólico e os biflavonóides isolados do caule de *O. macrocalyx* mostraram atividades citotóxicas e antibacterianas (TANG *et al.*, 2003). Outro gênero muito destacado é o *Lophira*, comumente encontrado na região tropical da África, onde é conhecido pelos seus usos medicinais (GHOGOMU *et al.*, 1987). As espécies mais estudadas são *L. alata* e *L. lanceolata*. Foram isolados flavonóides, biflavonóides, dímeros de chalconas (lophironas F, G e H) (TIH GHOGOMU *et al.*, 1989a; TIH GHOGOMU *et al.*, 1989b; TIH GHOGOMU *et al.*, 1990; TIH *et al.*, 1992a; TIH *et al.*, 1992b; TIH *et al.*, 2003).

Os biflavonóides são geralmente encontrados em grande quantidade em diferentes plantas e muitos tecidos vegetais. Apresentam várias propriedades, como proteção contra raios ultravioleta nas folhas, antifúngico e alimento para insetos (SIMÕES *et al.*, 2001). As atividades farmacológicas conhecidas são, estimulantes cardíacos, antivirais, antimicrobianas, anti-inflamatórias e anti-hepatotóxicas (SIMÕES *et al.*, 2001, LIN *et al.*, 1999). Além de atividades citadas, podemos destacar as propriedades detectadas com espécies do gênero *Ouratea* e *Luxemburgia*. O extrato aquoso de *Ouratea sp.*, contendo pro-antocianidina, mostrou atividade antitumoral contra o Carcinossarcoma de Walker 256 e Sarcoma 180 em ratos (SAMPAIO & OLIVEIRA, 1975; OLIVEIRA *et al.*, 1972). O óleo do extrato hexânico dos frutos de *O. parviflora* apresentou atividade antibacteriana e antifúngica (MARCAL *et al.*, 1986). Biflavonóides isolados de espécies *Ouratea* e *Luxemburgia* mostraram atividade antitumoral contra células do carcinoma Ehrlich (CARVALHO *et al.*, 2002), inibição das DNA topoisomerasas (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 *O. 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 biflavonóides isolados de *O. spectabilis*, *O. multiflora* e *O. parviflora* mostraram inibição da produção de aflatoxina por *Aspergillus flavus* (GONÇALEZ *et al.*, 2001) e os isolados de *O. spectabilis* inibiram a enzima aldose redutase (FELICIO *et al.*, 1995). Essas informações, principalmente as atividades antitumorais detectadas para os biflavonóides isolados de *Ouratea* (CARVALHO *et al.*, 2002), tem motivado o GQPN-UFRRJ a continuar estudando espécies dessa família e, nesse contexto, resolveu-se repetir o estudo de *O. hexasperma* coletada na mata Atlântica.

Características do gênero *Ouratea*:

Distribuição geográfica: Ocorrência em todo território Nacional, destacando-se Rio de Janeiro, Nordeste e Minas Gerais. Algumas espécies do gênero *Ouratea* incluindo a *O. grandifolia* ocorrem na Restinga da Marambaia, Corcovado e Campo Grande (Limeirão)/RJ. (BARROSO, 1986).

Importância econômica: No Nordeste do país, 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. Essas espécies são utilizadas como anti-reumático, útil na cura de paralisias, erisipela, feridas no útero e úlceras, distúrbios gástricos e na cicatrização de feridas (BARROSO, 1986).

Nomes locais: são conhecidas com diversos nomes populares: Angelim, Caju bravo, Coração de bugre.

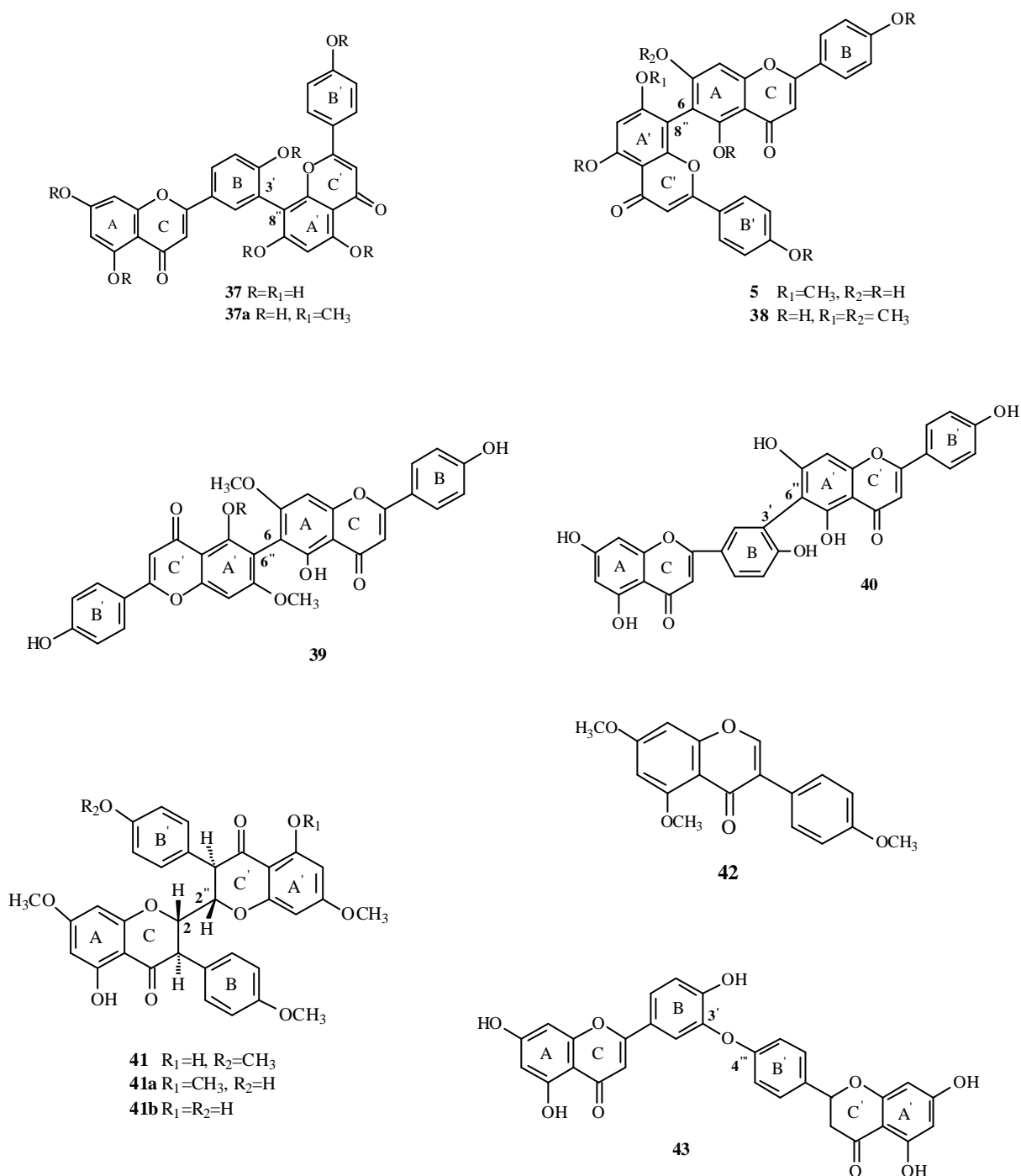
I.2. Flavonóides isolados de espécies de *Ouratea* e *Luxemburgia* (Ochnaceae)

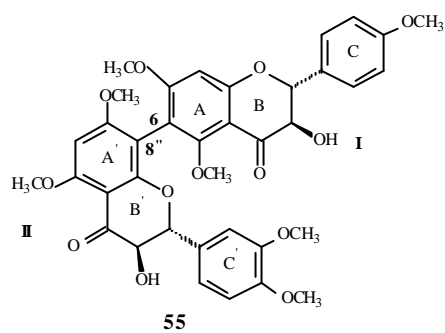
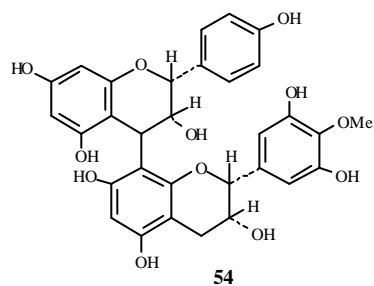
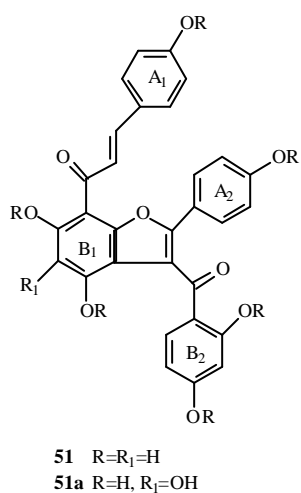
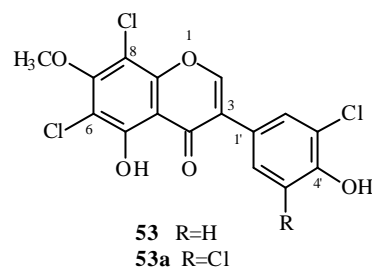
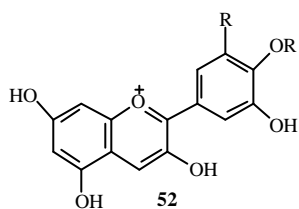
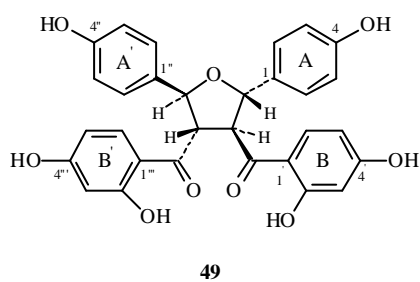
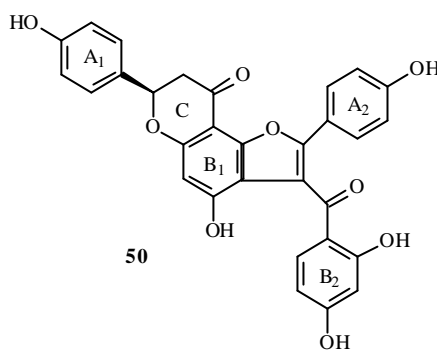
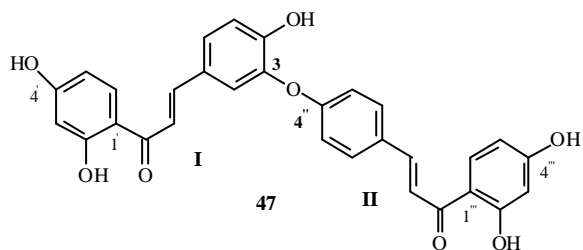
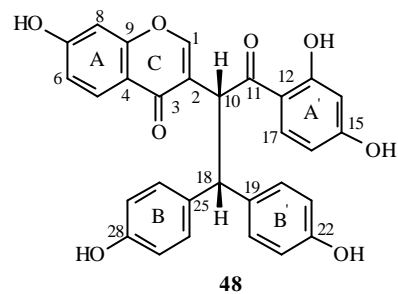
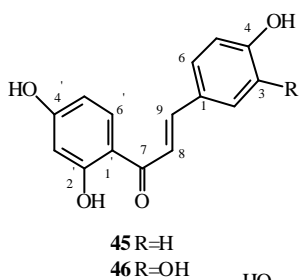
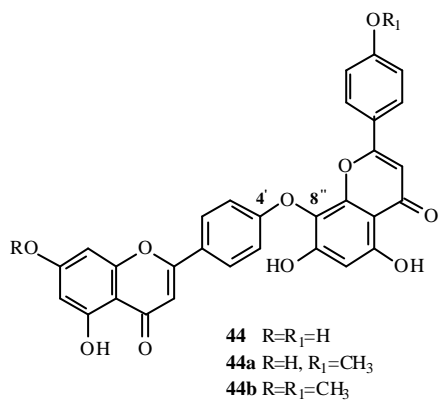
A) Literatura:

As espécies destes gêneros são bioprodutoras de diversas classes de metabólitos como triterpenos, diterpenos, ácidos graxos, triglicerídeos, além de flavonóides e biflavonóides. Entre estas classes de substâncias os biflavonóides recebem destaque na literatura, devido à frequência, diversidade estrutural e diferentes formas de ligações entre seus monômeros. Sendo utilizados como protótipos para vários testes farmacológicos.

A maioria dos biflavonóides isolados de plantas apresenta ligação C-C entre seus monômeros, e o anel A está frequentemente envolvido na ligação (CHARI *et al.*, 1977). As combinações entre os monômeros dão origem aos derivados da amentoflavona **37** e **37a** (I-3'-II-8''), agatisflavona **5** e **38** (I-6-II-8''), genkanina **39** (I-6-II-6''), robustaflavona **40** (I-3'-II-6'') e cupressuflavona (I-8-II-8'') (CHARI *et al.*, 1977), **Figura 1**. As junções de isoflavonas originaram derivados de hexaspermona **41**, **41a** e **41b** (I-2-II-2'') (MOREIRA *et al.*, 1994). Do gênero *Ouratea* foram isolados os biflavonóides **5**, **37-39**, **41**, **42**, **44**, **48-55**. A ligação tipo C-O-C é característica das ochnaflavonas **43** (I-3'-O-II-4'') (CHARI *et al.*, 1977) e lanaraflavonas **44**, **44a** e **44b** (I-4'-O-II-8'') (DORA & EDWARDS *et al.*, 1991, OLIVEIRA *et al.*, 2002), o grupo das ochnaflavonas tem sido mais frequentes em espécies de *Luxemburgia*. Isolaram-se desse gênero as conhecidas chalconas, que são representadas pelos monômeros **45** e **46** (OLIVEIRA *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2004) e a bichalcona **47** (I-3-O-II-4'') (CARVALHO *et al.*, 2004), **Figura 1**. Outros biflavonóides identificados no gênero *Ouratea* são os derivados de lophironas **48** e **49** (GHOGOMU *et al.*, 1987), calodeninas **51** (MESSANGA *et al.*, 1994; MESSANGA *et al.*, 2002) e flavumonas **50** e **51a** (MBING *et al.*, 2003b) (**Figura 1**). Além dos biflavonóides há ocorrência de antocianidinas, como exemplo os derivados da cianidina **52** e proantocianidina **54** (MONACHE *et al.*, 1968a,b; GARTLAN *et al.*, 1980) (**Figura 1**).

Figura 1: Estruturas dos flavonóides, encontrados em espécies de *Ouratea* e *Luxemburgia*.





Uma característica semelhante, entre os dímeros de flavonóides dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia*, é a ligação entre seus monômeros, sendo mais abundantes as ligações (I-3'-II-8'') e (I-6-II-8''), diferindo somente no padrão de metilação. No caso dos derivados da agatisflavona (I-6-II-8'') são majoritariamente metilados na posição 7. Com ligações C-O-C, foram isolados os dímeros I-4'-O-II-8'' e I-3'-O-II-4''', incluindo a ligação entre os monômeros das bichalconas, isolado de *Luxemburgia octandra* (CARVALHO, *et al.*, 2004). A presença de luxenchalcona (**47**) e diidroochnaflavona (**43**) em *Luxemburgia* permite propor uma seqüência biossintética de formação do biflavonóide diidroochnaflavona (**43**) a partir da ciclização da bichalcona (**Esquema 1**) considerando, inclusive, que em *L. nobilis* não foi encontrada a bichalcona, entretanto, os respectivos monômeros estão presentes. O estudo de duas espécies de *Ouratea* conduziu ao isolamento de derivados de lanaroflavona (**44**) (I-4'-O-II-8'') com diferentes padrões de metilação. Esses exemplos mostram que os biflavonóides apresentam precursores biogênicos comuns e podem ser usados como marcadores quimiotaxonômicos.

Deve-se levar em consideração os casos cujo estudo fitoquímico não conduziu à identificação de flavonóides. Esses casos são *Ouratea floribunda* (St. Hil) Eng. sendo isolados triterpenos e depsídeo (CARVALHO *et al.*, 2000) e *Ouratea reticulata* (P. Beauv) Engl. fornecendo dois 7,8-diidrobenzofuranonas (MANGA *et al.*, 2001).

As flavonas e flavonóis (3-oxiflavonas) glicosilados são descritos como bioprodutos de espécies desse gênero. São geralmente derivados da luteolina (5,7,3',4'tetraidroxiflavona) e quercetina (3,5,7,3',4'pentaidroxiflavona), podendo ser, inclusive, metilados. A rutina **56** (3-*O*-rutinosídeo-quercetina) foi isolada de *Luxemburgia nobilis* (OLIVEIRA *et al.*, 2002) e de *Ouratea semisserrata* (VELANDIA *et al.*, 2002). Das flores de *Luxemburgia octandra* foram isolados dois flavonóides 8-*C*-glicosilados **57** e **58** (ALVES *et al.*, 2003). A glicose aparece como o único carboidrato encontrado até o momento, entre os flavonóides *C*-glicosilados já isolados desses dois gêneros.

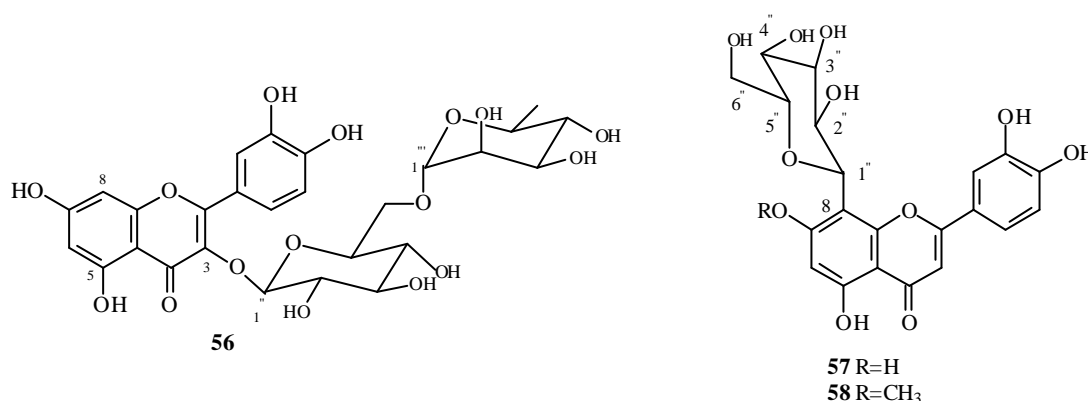
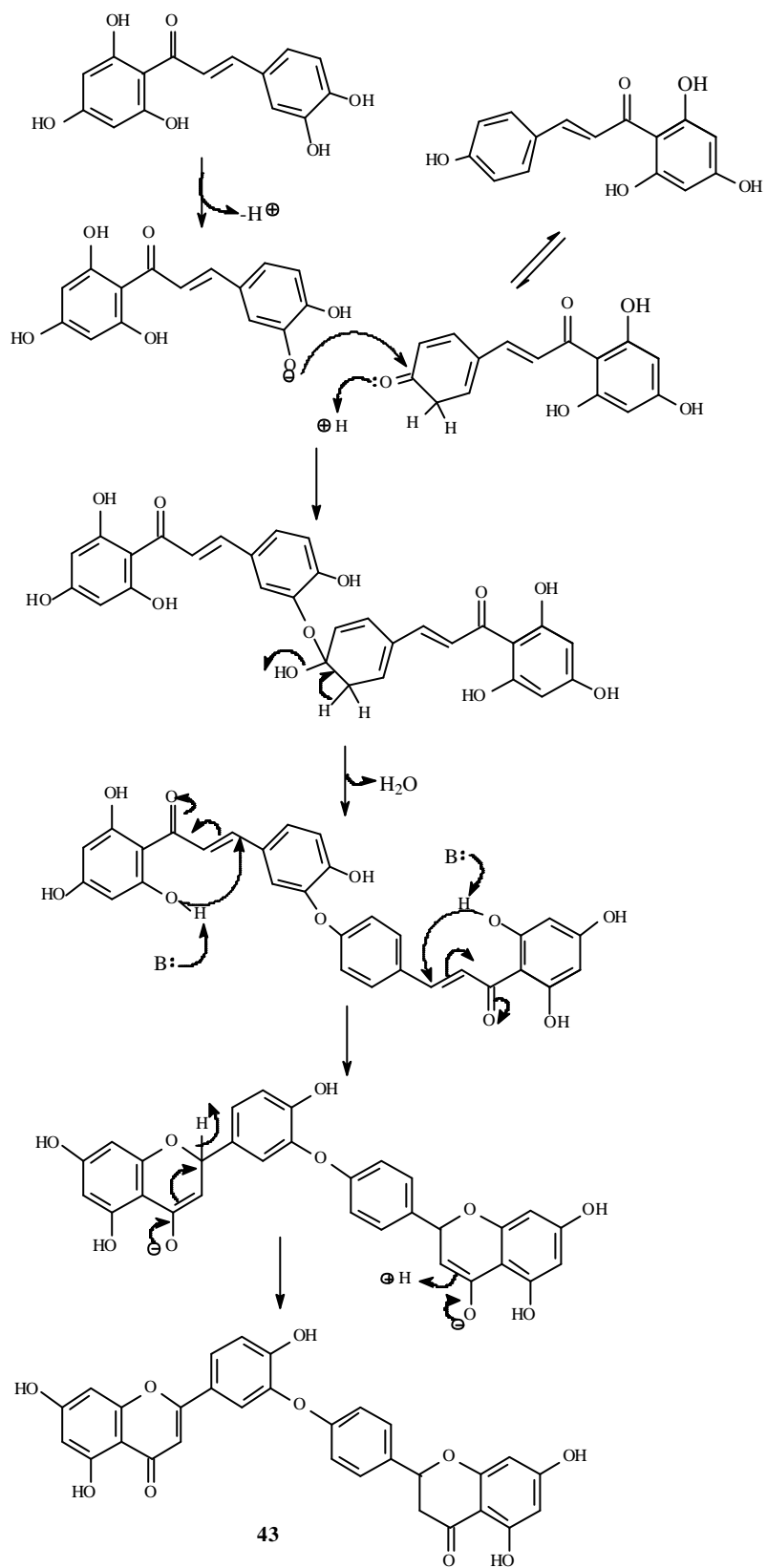


Figura 1.1: Estruturas dos flavonóides glicosilados, isolados de espécies de *Ouratea* e *Luxemburgia*.



Esquema 1: Proposta biossintética da 2'', 3''-dihidrochalcona, via chalconas.

Estudos anteriores de *Ouratea hexasperma*, coletada no cerrado da Amazônia, conduziu ao isolamento de hidrocarbonetos, de biisoflavonóides: hexaspermona A, B, C e da biflavona 7''-metilagatisflavona (MOREIRA *et al.*, 1994; MOREIRA, *et al.*, 1999).

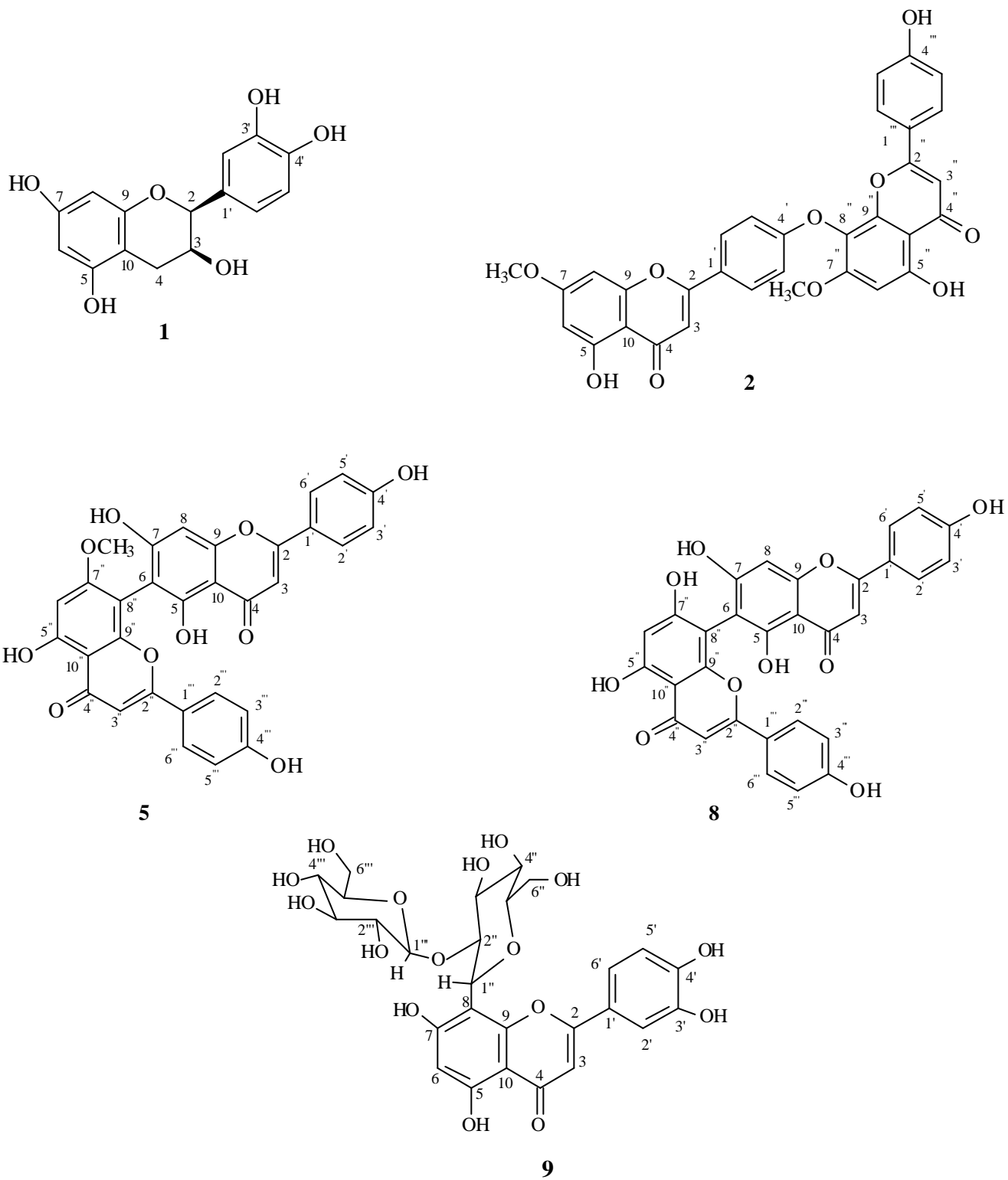
Neste trabalho é descrito o estudo fitoquímico desta espécie, coletada na mata atlântica no nordeste do Brasil e, até o momento, isolaram-se hidrocarbonetos, epicatequina (**1**) e, além de confirmar a abundância da 7''-metilagatisflavona (**5**) nas folhas desta espécie, isolaram-se biflavonóides que não foram isolados anteriormente desta espécie, sendo um deles novo na literatura (DANIEL, *et al.*, 2004).

A **Tabela 1** descreve os flavonóides detectados em *Ouratea* e *Luxemburgia* (primeira coluna), com os nomes químicos das substâncias isoladas (coluna 2) mostrando as variações dos esqueletos básicos citados (**Figura 1**) e as referências relacionadas com o estudo das espécies destes gêneros.

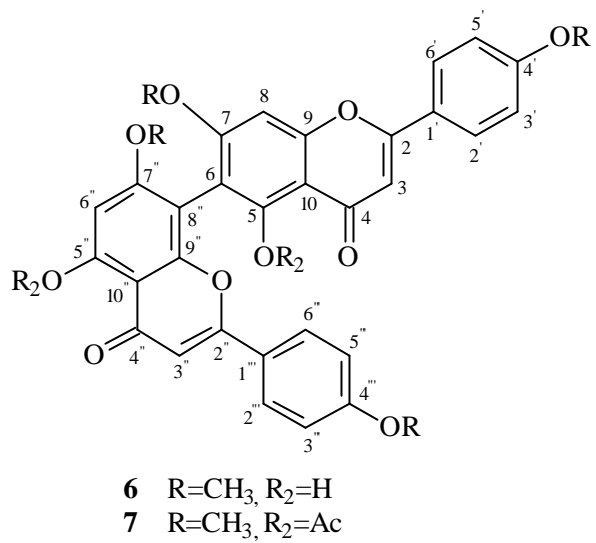
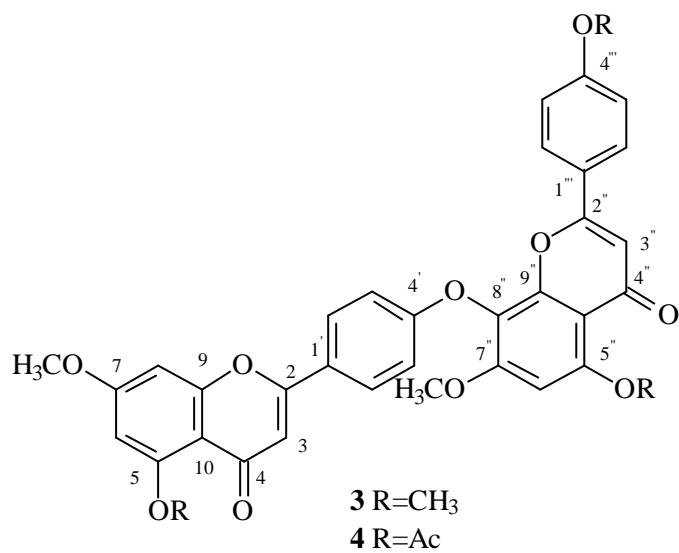
Tabela 1. Ocorrência de flavonóides em espécies do *Ouratea* e *Luxemburgia*, família Ochnaceae.

Espécies	Flavonóide	Referência
<i>O. sp.</i>	proantocianidina 54 catequina	MONACHE <i>et al.</i> , 1968a; MONACHE <i>et al.</i> , 1968b
<i>O. affinis</i> Engl.	cianidina 52	GARTLAN <i>et al.</i> , 1980
<i>O. calantha</i> Gilg.	cianidina 52	GARTLAN <i>et al.</i> , 1980
<i>O. multiflora</i> Pohl	amentoflavona (3'-C-8'') 37 3-hidroxi-4',5,7-trimetoxiflavona-(6→8'')- 3''-hidroxi-3''',4''',5'',7''-tetrametoxiflavona 55	FELICIO <i>et al.</i> , 2001
<i>O. hexasperma</i> (St. Hill) Bail	5-hidroxi-4',7-dimetoxi-2,3- <i>trans</i> -isoflavanona-(2→2'')- 5''-hidroxi-4'',7''-dimetoxi-2'',3''- <i>trans</i> -isoflavanona 41 5-hidroxi-4',7-dimetoxi-2,3- <i>trans</i> -isoflavanona-(2→2'')- 4''-hidroxi-5'',7''-dimetoxi-2'',3''- <i>trans</i> -isoflavanona 41a 5-hidroxi-4',7-dimetoxi-2,3- <i>trans</i> -isoflavanona-(2→2'')- 4''',5'''-diidroxio-7''-metoxi-2'',3''- <i>trans</i> -isoflavanona 41b 5,7,4'-trimetoxiisoflavona 42 4',5,7-triidroxiflavona-(6→8'')-4''',5'''-diidroxio-7''- metoxiflavona 5	MOREIRA <i>et al.</i> , 1994 MOREIRA <i>et al.</i> , 1999; DANIEL <i>et al.</i> , 2004
<i>O. semisserata</i> (Mart.) Engl.	3,6,8-tricloro-4',5-diidroxio-7-metoxiisoflavona 53 3',5',6,8-tetracloro-4',5-diidroxio-7-metoxiisoflavona 53a 5,7-diidroxiflavona-(4'→O→8'')-4'',5'',7''- triidroxiflavona 44 5-hidroxi-7-metoxiflavona-(4'→O→8'')-4'',5'',7''- triidroxiflavona 44a 5-hidroxi-7-metoxiflavona-(4'→O→8'')-5'',7''- diidroxio-4'''-metoxiflavona 44b amentoflavona (3'-C-8'') 37 podocarpusflavona (3'-C-8'') 37a rutina 56	VELANDIA <i>et al.</i> , 1998 VELANDIA <i>et al.</i> , 2002
<i>O. parviflora</i> Ball	7,7'-dimetilagastiflavona (6-C-8'') 38 amentoflavona (3'-C-8'') 37	FELICIO <i>et al.</i> , 2004
<i>O. spectabilis</i> (Mart.) Engl.	6,6'',bigenkanina (6-C-6'') 39 7,7'-dimetilagastiflavona (6-C-8'') 38	FELICIO <i>et al.</i> , 1995
<i>O. flava</i> Schum e Thon.	lophirona A 48 lophirona G 49 calodeninas B (51) e C 4,5-dimetoxi-6,7-metilenodioxioisoflavona flavumonas A (51a) e B 50	MBING <i>et al.</i> , 2003a MBING <i>et al.</i> , 2003b
<i>L. octandra</i> St. Hill	isoliquiritigenina (chalcona) 45 3-hidroxiisoliquiritigenina (chalcona) 46 4',5,7-triidroxiflavona-(3'→O→4'')-5'',7''- diidroxiflavanona 43 luxenchalcona (3-O-4'') 47 5,7,3',4'-tetraidroxio-8-C-glicopiranosil-flavona 57 5,3',4'-triidroxio-7-metoxi-8-C-glicopiranosil-flavona 58	CARVALHO <i>et al.</i> , 2004 ALVES, 2003
<i>L. nobilis</i> (Eichl)	isoliquiritigenina 45 3-hidroxiisoliquiritigenina 46 epicatequina amentoflavona (3'-C-8'') 37 robustaflavona (3'-C-6'') 40 4',5,7-triidroxiflavona-(3'→O→4'')-5'',7''- diidroxiflavanona 43 rutina 56	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2002

B) Substâncias isoladas de *O. hexasperma*:



Derivados obtidos:



CONSIDERAÇÕES RELEVANTES DO ESTUDO DESSA ESPÉCIE

- O isolamento dos constituintes das plantas permitiu o uso de técnicas especiais de RMN e massas dos mesmos e de alguns derivados;
- O estudo de plantas coletadas em diferentes locais (clima, solo etc.), assim como, diferentes partes (folha, raiz, caule, semente) e períodos fornecem constituintes químicos diferentes;
- O isolamento de maior quantidade de 7"-metilagatisflavona permitiu fazer novas avaliações de atividade antitumoral e preparar novos derivados de agatisflavona.

I.3. Parte experimental

I-3.1. Material vegetal:

As folhas de *Ouratea hexasperma* St.-Hil (Ochnaceae) foram coletados em outubro de 2002, no Município de João Pessoa e identificados pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra. Uma excicata desta espécie (Nº 3497) está depositada no herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB-21438), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

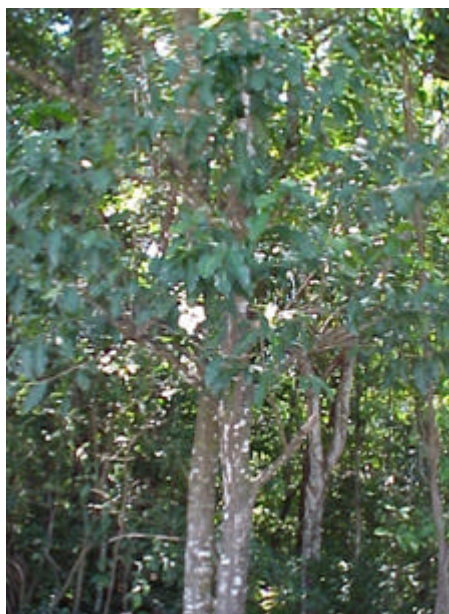
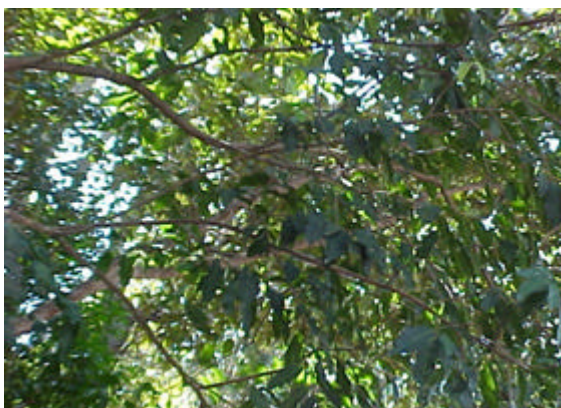
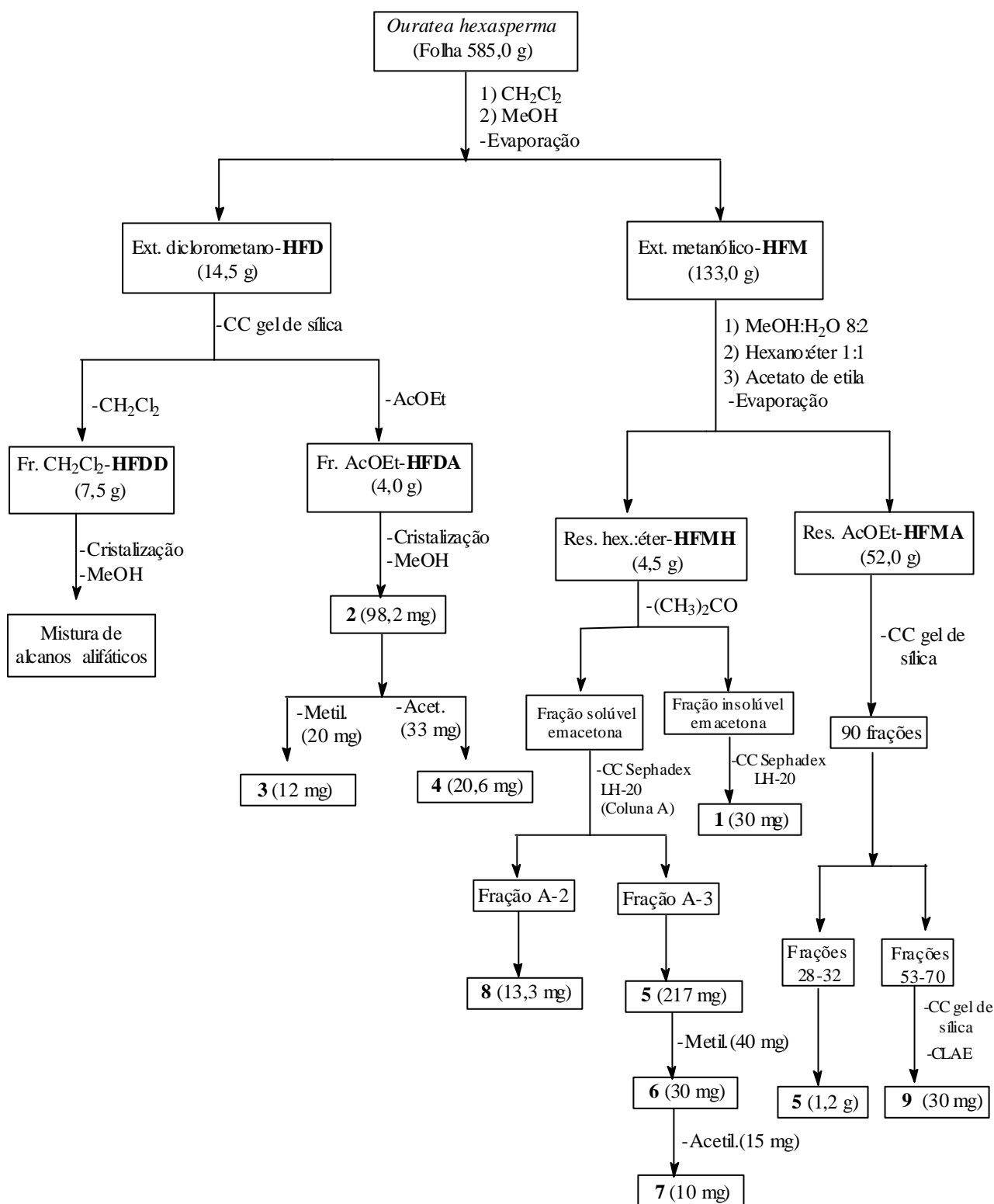


Figura I.3.1: Fotografia da espécie *O. hexasperma*, coletada em João Pessoa, Paraíba.

I-3.2. Isolamento e purificação dos constituintes das folhas de *O. hexasperma*:

O material seco e moído (585,0 g) foi extraído exaustivamente sucessivamente por maceração, com diclorometano (8,0 L) e metanol (15,0 L), a temperatura ambiente. As soluções extrativas foram concentradas em rotavapor a 40-80 °C, sob pressão reduzida, e obtiveram-se os extratos de diclorometano (**HFD**, 14,5 g) e o extrato metanólico (**HFM**, 133,0 g). O extrato **HFD** foi filtrado em coluna de gel de sílica usando diclorometano (2,0 L), acetato de etila (3,0 L) e metanol (3,0 L) conforme o **Esquema I.3.1**. As frações, eluídas em CH₂Cl₂, foram denominadas **HFDD** (7,5 g), forneceram um precipitado branco, que foi identificado como uma mistura de alcanos alifáticos. A fração eluída com AcOEt (**HFDA**, 4,0 g) foi cristalizada em metanol, fornecendo cristais amarelos, solúveis em DMSO, Rf em camada fina de sílica 0,52 com o eluente (CHCl₃/CH₃COCH₃, 8:2). Este material foi identificado como sendo a substância **2** (P.F.: 325-328 °C; 98,2 mg). O extrato metanólico (**HFM**, 100,0g) foi suspenso em metanol:água (8:2, 700 mL) e submetido à partição com hexano/éter 1:1 (3 L), AcOEt (6 L). Adicionou-se acetona no resíduo obtido com hexano/éter (**HFMH**, 4,5 g) e a parte solúvel foi filtrada em Sephadex LH-20 (Coluna A) com MeOH/CHCl₃ 1:1, fornecendo 5 frações. As frações A2 e A-3 forneceram um material amarelo que, após análise dos dados espectrométricos, foram identificados os biflavonóides **8** (P.F.: > 350 °C; 13,3 mg), solúvel em MeOH, e **5** (P.F.: 226-228 °C; 217,0 mg), solúvel em acetona, Rf = 0,61 (CHCl₃/CH₃COCH₃, 7,5:2,5). O biflavonóide **5** foi metilado com diazometano (40,0 mg) e posteriormente a purificação foi acetilado (25,0 mg) fornecendo a substância metilada **6** (P.F.: 170 °C; 30,0 mg), solúvel em acetona, Rf 0,61 em CCDA de sílica e fase móvel (CHCl₃/CH₃COCH₃, 0,5:9,5), e o biflavonóide **7** (material amorfo; 18,0 mg), solúvel em clorofórmio, Rf = 0,35 na mesma CCDA e eluente (Hexano/AcOEt, 2:8). O resíduo em hexano/éter (**HFMH**) insolúvel em acetona foi solubilizado em metanol, e submetido à filtração em coluna de Sephadex LH-20 originando um material pastoso de coloração marron. Esse material foi identificado como epicatequina **1** (30,0 mg). O resíduo em AcOEt (**HFMA**, 52,0 g) foi cromatografado em coluna de gel de sílica, usando mistura de clorofórmio/metanol, com aumento gradual de polaridade até metanol 100%. Foram coletadas 90 frações, a fração 28-32 foi cristalizada com metanol dando origem novamente ao biflavonóide **5** (P.F.: 226-228 °C; 1,2 g). A fração 53-70 (400,0 mg) foi cromatografada em coluna de sílica gel e, posteriormente eluída em coluna preparativa Betasil C18 (LC-6AD) usando CLAE, com sistema isocrático de H₂O/metanol/ácido acético (60:39:1), em 240 nm. Obtiveram-se cristais marrons, solúveis em metanol e DMSO, Rf = 0,68 em placa de gel de sílica e eluente (CHCl₃:CH₃COCH₃:MeOH:AcOH 3:3:3:1). A análise dos dados espectrométricos deste material conduziu a identificação do flavonóide glicosilado **9** (material amorfo; 30,0 mg).



Esquema I.3.1- Marcha para o isolamento das substâncias das folhas de *Ouratea hexasperma*.

I-4. Determinação estrutural dos constituintes isolados de *O. hexasperma*

I-4.1. Alcanos

O espectro de IV da mistura de alcanos (Figura I.4.1) revela bandas de absorção em 2918 e 2848 cm^{-1} relativas a estiramentos de grupos CH_3 e CH_2 , sugerindo a presença de uma longa cadeia carbônica. As bandas em 1466 cm^{-1} (deformação angular de C-H), e 723 cm^{-1} confirmam esta atribuição. O espectro de RMN ^1H (Figura I.4.2) apresenta sinais em δ_{H} 0,87, 1,25 e 1,56 de cadeia normal hidrocarbônica. A análise dos cromatogramas (Figura I.4.3; Figura I.4.4) e espectros obtidos com CG-EM permitiram identificar dois picos correspondentes a dois componentes majoritários na mistura. Os picos em m/z 57 [C_4H_9] $^+$, m/z 71 [C_5H_{11}] $^+$, m/z 85 [C_6H_{13}] $^+$, m/z 113 [C_8H_{17}] $^+$, estão de acordo com a mistura de hidrocarbonetos de cadeia carbônica normal. A ausência do M^+ não permitiu propor a estrutura dos componentes da mistura.

I-4.2. Epicatequina

O espectro de IV (Figura I.4.5) revela bandas de absorção para grupo hidroxila (3751-3414 cm^{-1} , estiramento O-H), C=C (1620-1518 cm^{-1}) de anel aromático e 1282 cm^{-1} do estiramento de C-O. A análise dos espectros de RMN ^1H (Figura I.4.6) e ^{13}C (BBD e DEPT) e comparação com modelos da literatura permitiu propor estrutura de um flavanol para a substância **1**. Os sinais do CH carbinólicos e os de CH aromáticos em 95,3 e 94,3 ppm do C-6 e C-8 do anel A e 114,94 (2C) e 118,16 do C-2', 5' e 6' do anel B juntamente com os duplos dubletos (dd) em δ_{H} 3,05 ($J=4,2$; 16,4 Hz) e 2,85 ($J=2,9$; 16,4 Hz) que podem ser atribuídos ao hidrogênios H4 axial e H4 equatorial, respectivamente, justificam esta proposta. O singleto largo em δ_{H} 5,10 foi atribuído ao H-2 e o tripleto largo em δ_{H} 4,38 foi atribuído ao H-3. Os sinais em δ_{H} 6,09 (d) e 6,26 (d) foram atribuídos aos H-6 e H-8 do anel A. O anel B está representado pelos sinais δ_{H} 7,26 (sl), δ_{H} 7,03 (sl) e δ_{H} 7,03 (sl), atribuídos a hidrogênios nas posições 2', 5' e 6'. A comparação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbono-13 (Figura I.4.7) de **1** com valores da literatura (HARBORNE & MABRY, 1982; HARBORNE, 1994) permitiram confirmar a estrutura da epicatequina para **1**. A Tabela I.4.1 apresenta as atribuições dos deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono-13 de **1**. Os valores de deslocamentos químicos dos carbonos não hidrogenados, δ_{C} 156,9, 156,6, 156,2, 144,8x2, 131,0, 98,9, foram identificados pela comparação dos espectros de e RMN ^{13}C -HBBD e RMN ^{13}C -DEPT e comparação com dados da literatura para **1** (AGRAWAL, 1989) Tabela I.4.1.

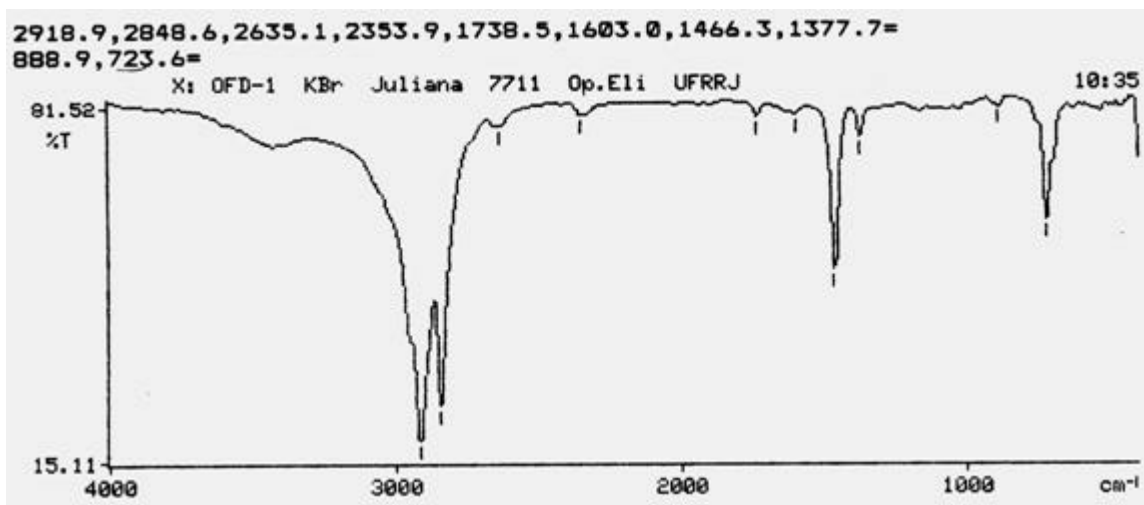


Figura I.4.1. Espectro de IV da fração OFD-1, material alifático de *O. hexasperma*.

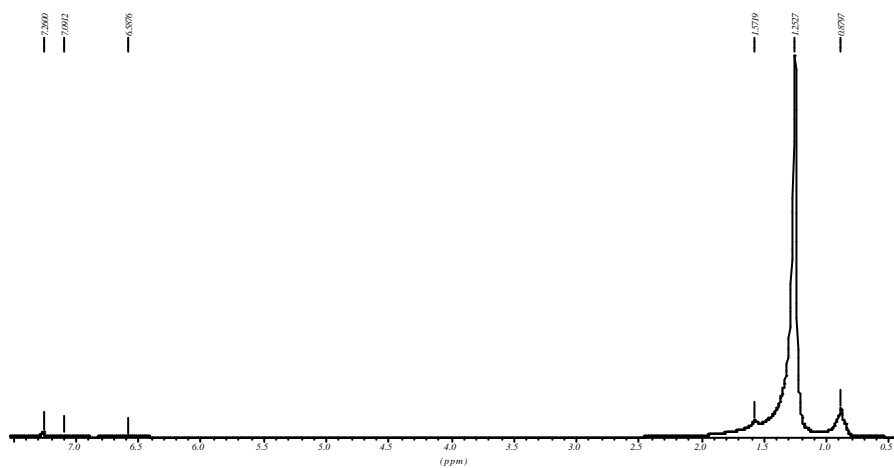


Figura I.4.2. Espectro de RMN¹H (200 MHz, CDCl₃) da fração OFD-1, material alifático de *O. hexasperma*.

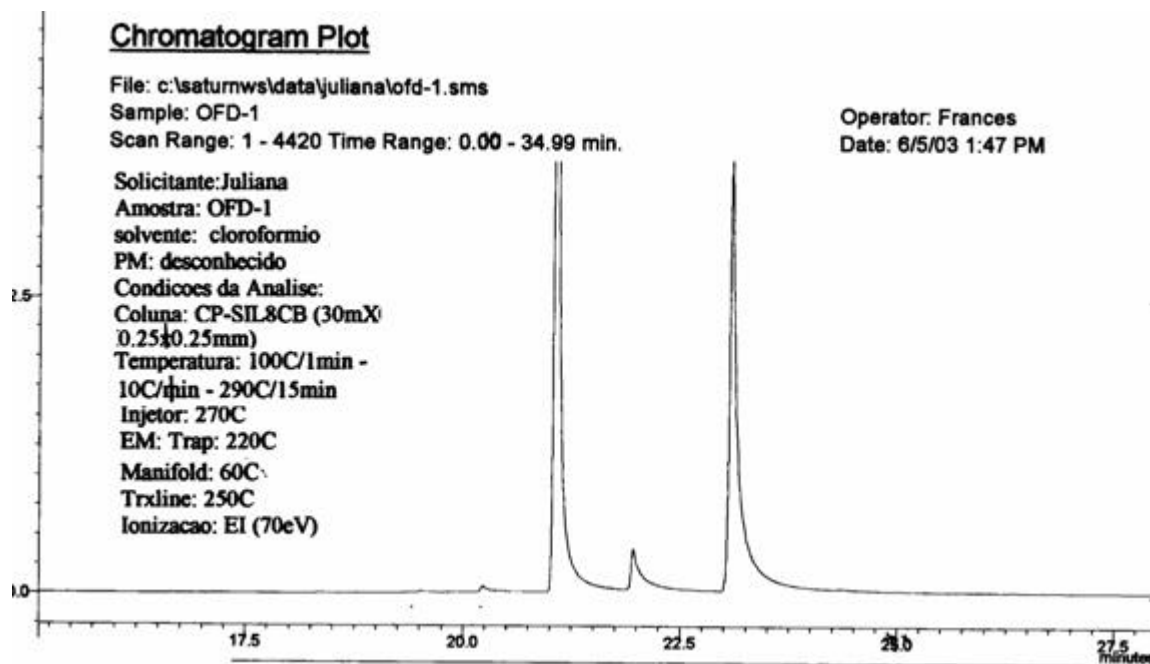


Figura I.4.3. Cromatograma da fração OFD-1, material alifático.

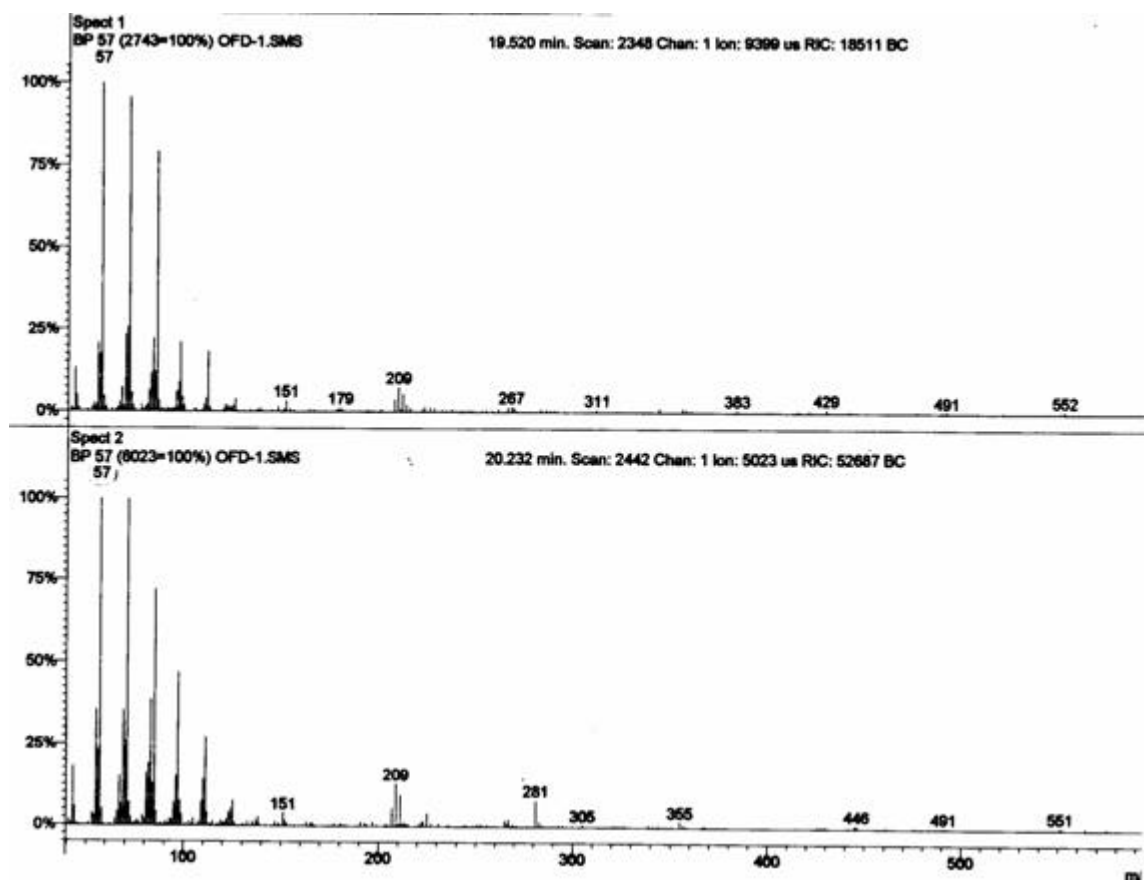


Figura I.4.4. Espectro de massas dos alcanos alifáticos isolados de *O. hexasperma*.

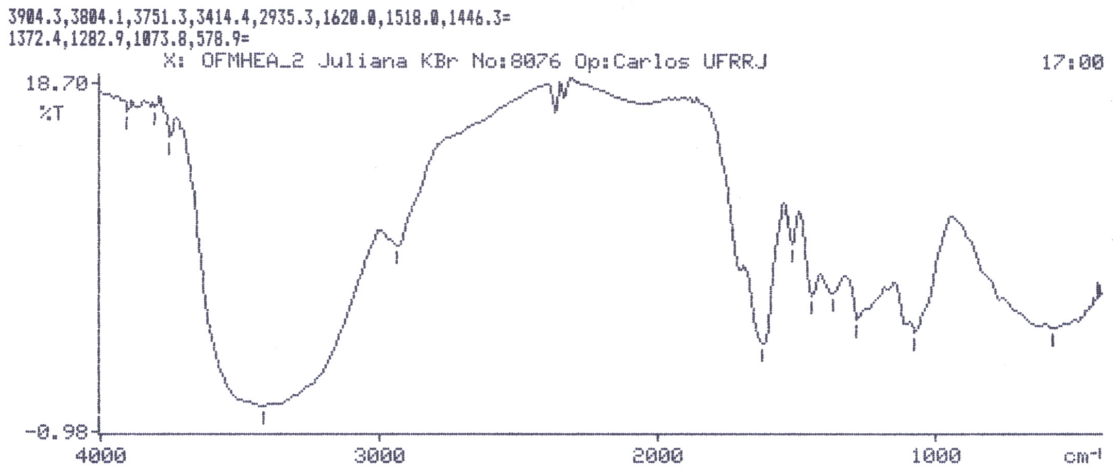


Figura I.4.5. Espectro de infravermelho de **1** (epicatequina).

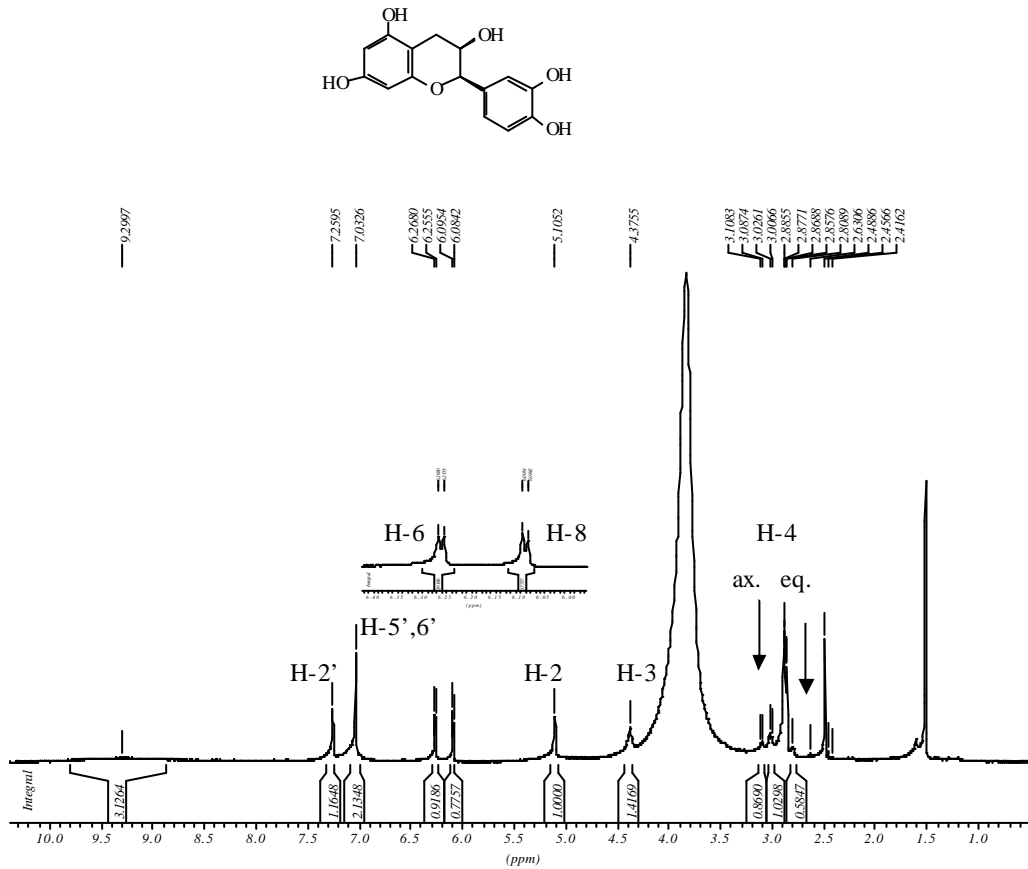


Figura I.4.6. Espectro de RMN ¹H (200 MHz) em DMSO-D₆ de **1** (epicatequina).

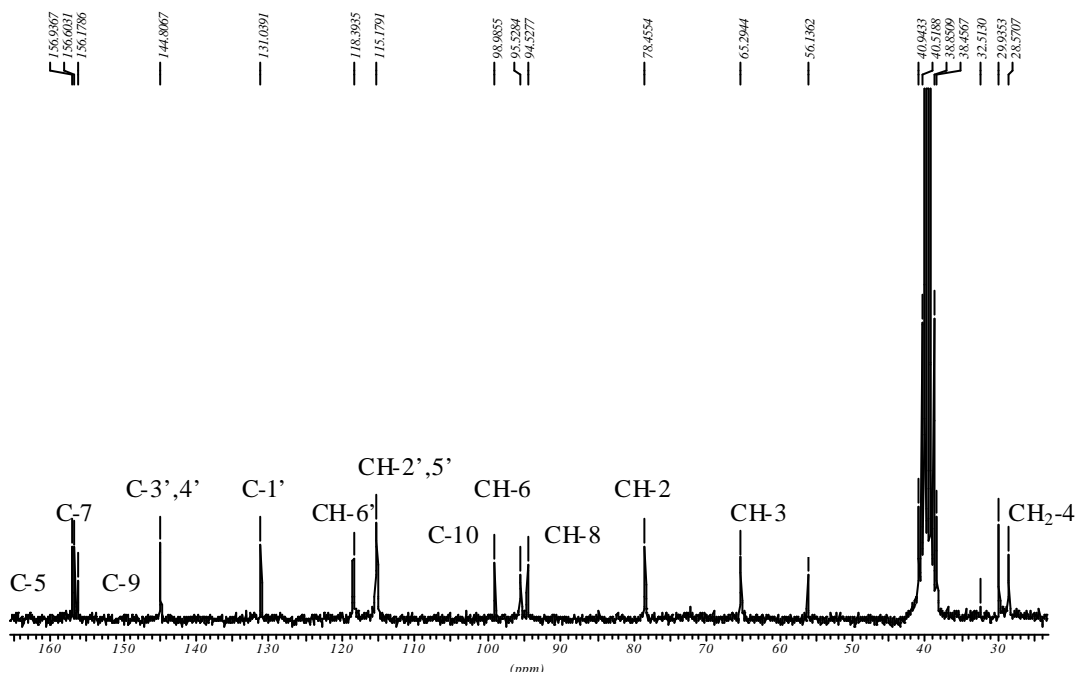


Figura I.4.7. Espectro de RMN¹³C (50 MHz) em DMSO-D₆ de **1** isolada de *O. hexasperma*.

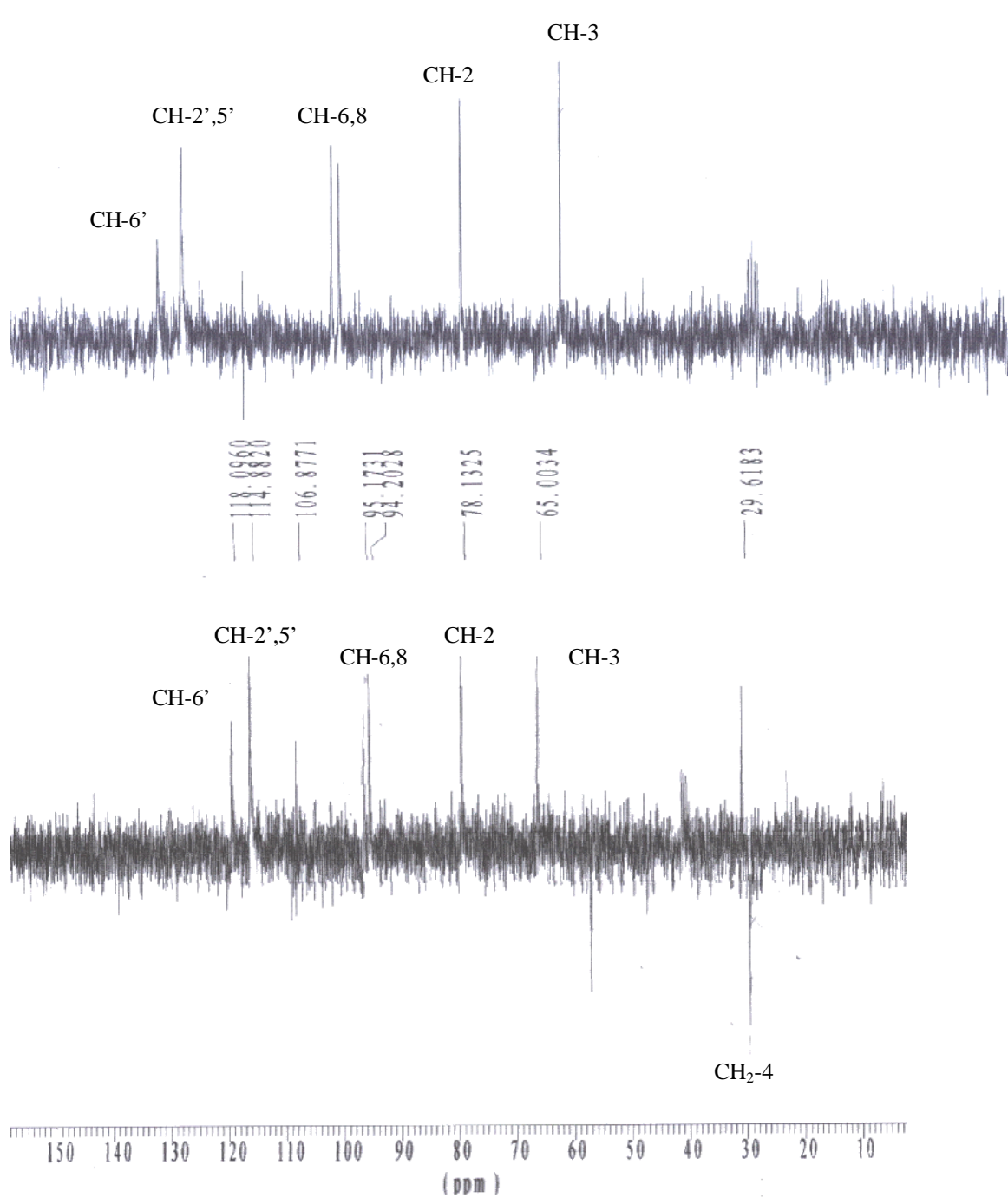
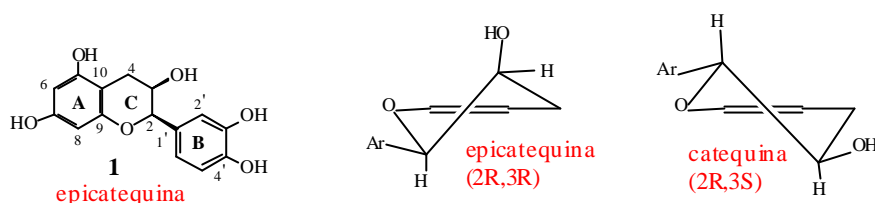


Figura I.4.8. Espectro de DEPT 90 e 135° (50 MHz) em DMSO-D_6 de **1** isolada de *O. hexasperma*.

Tabela I.4.1. Dados de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) da substância **1** (epicatequina) em $\text{DMSO-}D_6$, comparados com a literatura (HARBORNE & MABRY, 1982; HARBORNE, 1994; AGRAWAL,1989).



C	d_C		d_H		
	1	Epicatequina (AGRAWAL,1989)	1	Literatura- catequina	Literatura- epicatequina
2	78,5	79,1	5,1 (<i>sl</i>)	ax;4,49 (<i>d</i> ;3,4)	Ax; 4,74 (<i>d</i> ,-)
3	65,3	66,8	4,4 (<i>m</i>)	ax,3,83(<i>ddd</i> ;-;7,4,-)	Eq; 4,01 (<i>ddd</i> ,-)
4	28,6	28,6	3,05 (<i>dd</i> ;4,2;16,4)	2,67 (<i>dd</i> ;5,4,16,0)	2,79(<i>dd</i> ;4,2,16,3)
			2,85 (<i>dd</i> ;2,9;16,4)	2,36 (<i>dd</i> ;8,0,16,0)	2,48(<i>dd</i> ;3,3,16,3)
5	156,9	157,1	-	-	-
6	95,5	96,8	6,25 (<i>d</i> ;2,5)	5,7 (<i>d</i> ;2,1)	5,72 (<i>d</i> ;1,7)
7	156,6	156,7	OH	OH	-
8	94,5	96,0	6,08 (<i>d</i> ;2,2)	5,9 (<i>d</i> ;2,1)	5,89 (<i>d</i> ;1,7)
2'	115,2	115,4	7,26 (<i>s</i>)	6,73 (<i>d</i> ;1,7)	6,90 (<i>s</i> ,-)
3'	144,8	145,0	-	-	-
4'	144,8	145,2	-	-	-
5'	115,2	116,4	7,06 (<i>sl</i>)	6,7 (<i>d</i> ;8,1)	6,66 (<i>d</i> ;8,7)
6'	118,4	119,6	7,06 (<i>sl</i>)	6,60 (<i>dd</i> ;-;-)	6,66 (<i>dd</i> ;-;8,7)
1'	131,0	131,8	-	-	-
9	156,2	156,7	-	-	-
10	98,9	100,3	-	-	-

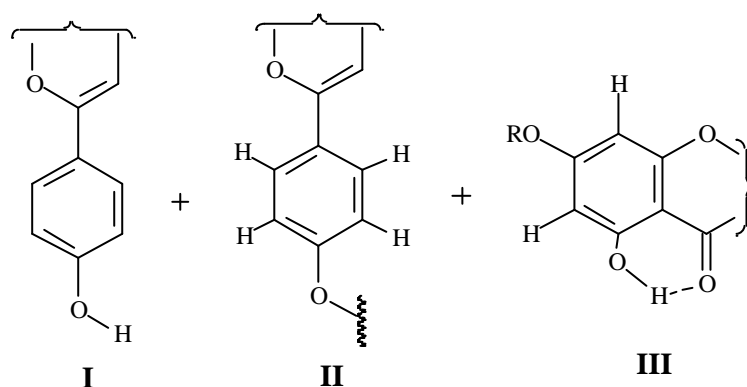
I-4.3. Biflavonóides

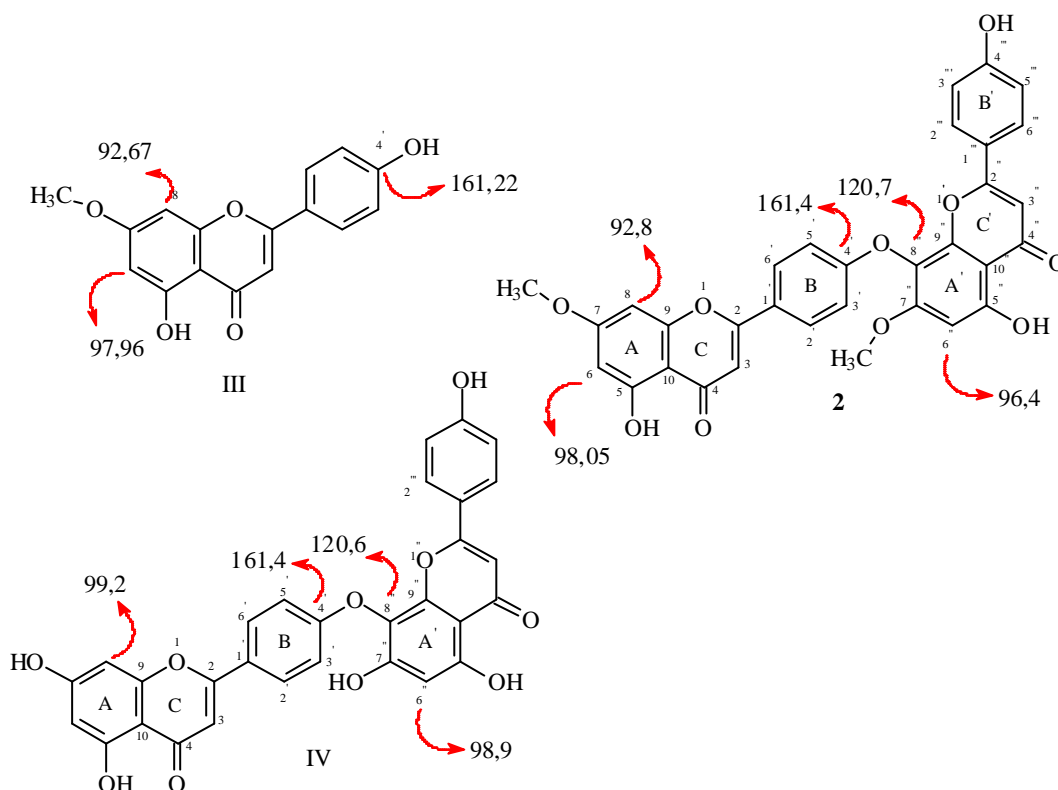
a) 7,7'' - O-dimetillanaroflavona (substância 2)

O biflavonóide natural **2** é um derivado da lanaroflavona isolada de *Lanaria lanata* (I-4'-O-II-8'') (DORA & EDWARDS *et al.*, 1991), sendo formada pela ligação de duas flavonas (apigenina). A substância **2** possui duas metoxilas nas posições 7 (anel A da primeira unidade) e 7'' (anel A da segunda unidade). O primeiro registro deste biflavonóide na literatura foi realizado por DANIEL e colaboradores (no prelo), juntamente com seus derivados triacetil

éster e o registro dos dados de RMN ^{13}C do derivado permetilado (DORA & EDWARDS *et al.*, 1991).

O espectro de IV de **2** (Figura I.4.9, pág. 41) revela bandas de absorção para grupo hidroxila (3422 cm^{-1} , estiramento O-H), grupamentos C=O (1658 cm^{-1}) de carbonila conjugada e C=C (1607 cm^{-1} , 1503 cm^{-1} , 1440 cm^{-1}) de anel aromático. Estes dados são compatíveis para flavonóides conforme detectado através de reveladores químicos (cloreto de alumínio) em CCDA. O pico $565,1215$ (60%, $\text{M}^+ - \text{H}$) demonstrado no HRESIMS (modo negativo) e análise dos de RMN ^1H e ^{13}C (APT) foram usados para deduzir a fórmula molecular $(\text{C}=\text{O})_2\text{C}_{15}(\text{CH})_{13}(\text{OMe})_2(\text{OH})_3\text{O}_3 = \text{C}_{32}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ que foi compatível com um esqueleto de um biflavonóide. O espectro de RMN de ^1H (Figura I.4.10, pág. 42) apresenta um sinal de δ_{H} 10,39 de um grupo hidroxila livre, dois grupos hidroxilas em ligação de hidrogênio com a carbonila, δ_{H} 12,87 e 12,92, os dois grupos metoxilas (δ_{H} 3,87 e 3,91, *s*, 3H), quatro dubletos em δ_{H} 8,06 ($J= 8,47$), 7,51 ($J= 8,7$), 7,18 ($J= 8,47$) e 6,76 ($J= 8,7$), correspondendo a dois sistemas AA' BB' em dois anéis aromáticos *para* substituídos e dois dupletos em $\delta_{\text{H}-6,8}$ 6,36 e 6,77 ($J=2,0\text{ Hz}$). O acoplamento detectado no espectro de ^1H , ^1H -COSY (Figura I.4.11, pág. 43) envolvendo os sinais δ_{H} 8,06 ($J= 8,47$) com 7,18 ($J= 8,47$) e do 7,51 ($J= 8,7$) com 6,76 ($J= 8,7$) confirma os dois sistemas AA'BB'. Estes dados permitem propor as unidades **I**, **II** e **III**. Além dos sinais citados acima o espectro de RMN ^1H apresenta três singletos em δ_{H} : 6,94, 6,86 e 6,76 (*s*), com integração para um hidrogênio cada um, que são compatíveis com os sinais de deslocamento químico de dois hidrogênios H-3 e um H-6 de flavonas. Isto permite sugerir que uma das unidades possui o C-8 ocupado com a ligação entre as unidades, estando, entretanto de acordo com esqueleto de lanaraflavonas registrados na literatura.





A análise dos espectros de RMN ^{13}C (APT, Figura I.4.12, pág. 44) permitiu identificar os deslocamentos químicos dos carbonos metoxílicos, metínicos, quaternários e confirmar a proposta feita com base dos dados espectrométricos de RMN ^1H . Os sinais de CH em 128,7x2, 115,4x2, 128,2x2 e 115,8x2 estão de acordo com os dois sistemas AA'BB' que, aliados aos demais valores em δ 104,3, 104,1, 98,5, 92,7 e 96,3 confirmaram os sistemas **I**, **II** e **III** propostos, atribuindo-os aos carbonos 3, 3'', 6, 8 e 6''. O valor 96,3 para o C-6'' está de acordo com o maior efeito protetor do grupo metoxila em 7'' vizinho a um grupo oxigenado. A presença de quatro sinais de carbono não hydrogenado em 104,3, 104,7, 124,6 e 121,6 representantes dos carbonos 10, 10'', 1' e 1'', respectivamente, e o valor adicional em 120,6 que deve ser atribuído ao C-8'' com um grupo oxigenado em *ipso* e dois oxigênios em *orto* confirmam a proposta de lanaroflavona (4'-O-8''). Essa ligação entre as unidades é confirmada pela ausência de um δ_{CH} em 93,0 ppm. Essas atribuições foram facilitadas com a comparação dos valores de deslocamentos químicos dos carbonos de **2** com os da apigenina (**III**, SARMENTO, 2002). As comparações dos dados de RMN ^{13}C do biflavonóide 7-O-metillanaroflavona registrado na literatura para C-6'' (δ_{C} 99,44) (VELANDIA, *et al.*, 2002) e da lanaroflavona (modelo IV) C-6'' (δ_{C} 98,9) e C-6 (δ_{C} 99,2) (DORA & EDWARDS, 1991), revelam que a presença dos grupamentos metoxilas na substância **2**, em C-7 e C-7'' que conduzem os carbonos metínicos para menor deslocamento químico C-6'' (δ_{C} 96,3) e C-6 (δ_{C} 98,1) devido ao efeito γ de proteção das metoxilas. Os sinais dos carbonos dos dois anéis B

foram facilmente assinalados, usando os efeitos dos substituintes sobre os deslocamentos químicos e a simetria promovida pela presença de um único substituinte nos anéis aromáticos. Os demais sinais em δ_C 181,9 são referentes as duas carbonilas, para o C-7 (δ_C 166,6) e C-7'' (δ_C 158,3) com $\Delta\delta_C=8$ e para C-5 (δ_C 162,1) e C-5'' (δ_C 159,2) com $\Delta\delta_C=2,9$. Essas diferenças de deslocamentos químicos são atribuídas ao efeito de proteção mesomérica do oxigênio em 8'' sobre os carbonos 7'' e 5''. Da mesma forma o C-9'' encontra-se 11,0 ppm mais protegido em relação carbono 9. Os carbonos C-10 e C-10'' não são afetados por esse efeito por essa razão apresentam uma pequena proteção de $\Delta\delta_C=0,5$ (Tabela I.4.2, pág. 39).

O uso de experimentos com irradiação dupla e subtração de espectros permitiu obter espectros 1D contendo apenas os sinais devido ao NOE gerado pela transferência de polarização entre os núcleos vizinhos espacialmente durante a dupla irradiação. O espectro resultante $^1\text{H}\{-^1\text{H}\}$ -NOE (Figura I.4.13, pág. 45) de **2** mostra que: com irradiação no hidrogênio da H_3CO -7 (δ_H 3,87) gerou NOE (2%) no H-8 em (6,77, *d*, 2,0 Hz) e (4%) no H-6 (6,36 *d*, 2,0 Hz) e irradiação na frequência do H_3CO -7'' (δ_H 3,91) gerou NOE (5%) no H-6'' [6,76, (*s*)]. A ausência de NOE nos dubletos dos H-3',5' e 3''',5''' significa que as posições 4' e 4''' não possuem ligação com grupos metoxilas. O mesmo tipo de experimento foi realizado com o derivado acetilado **4** e serviu para confirmar essas atribuições e confirmar a conexão entre as unidades de flavonas. A irradiação nas frequências dos singletos atribuídos aos hidrogênios H-3, 3'' e 6'' foi útil da correlação dos sinais dos respectivos sistemas AA'BB' e o anel C de cada unidade Figura I.4.13, pág. 45. Além das irradiações nas frequências das metoxilas fez-se irradiação nas frequências das acetoxilas revelou NOE nos hidrogênios 6'' e 3''',5''', Tabela I.4.3, pág. 40.

O espectro de massas de alta resolução com ionização *elétron spray*, EMAR-IES, (Figura I.4.14, pág. 46) apresentou o sinal em m/z 565.1215 [M^+ - H, 60% (calculado 565.1135)] para $\text{C}_{32}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$, confirmando a proposta estrutural para o biflavonóide **2**. O espectro MS/MS do íon m/z 565(40) foi realizado no modo de ionização negativo, utilizando-se 45 eV de energia de gás de colisão argônio, obtendo-se o grau de fragmentação e os picos majoritários observados na Figura I.4.15: 550.06 (60), 283.03 (100), 255.01 (50). O mecanismo de fragmentação proposto para justificar os picos no EMAR-IES e MS/MS do íon m/z 565 é representado no Esquema I.4.1, pág. 48.

As aplicações das técnicas de HMQC e HMBC permitiram fazer a correlação inequívoca dos δ_H e δ_C da substância natural e de seus derivados. HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) é um experimento bidimensional (2D ^1H - ^{13}C) através de uma ligação ($^1J_{\text{CH}}$) e HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*) também é um experimento bidimensional (2D ^1H - ^{13}C), mas detecta acoplamentos de duas ($^2J_{\text{CH}}$) e três ($^3J_{\text{CH}}$) ligações. O espectro de HMQC (Figura I.4.16, pág. 49) permitiu estabelecer as correlações diretas ($^1J_{\text{CH}}$): OCH_3 -7 [δ_H/δ_C 3,87/56,05], OCH_3 -7'' [δ_H/δ_C 3,91/56,79], CH-6 [δ_H/δ_C 6,36/98,05], 2CH-3''',5''' [δ_H/δ_C 6,76/115,89], CH-6'' [δ_H/δ_C 6,76/96,30], CH-8 [δ_H/δ_C 6,77/92,77], CH-3'' [δ_H/δ_C 6,86/104,14], CH-3 [δ_H/δ_C 6,94/104,33], 2CH-3',5' [δ_H/δ_C 7,18/ 115,46], 2CH-2''',6''' [δ_H/δ_C 7,51/128,15], 2CH-2',6' [δ_H/δ_C 8,06/128,65].

Os deslocamentos químicos dos carbonos não hidrogenados foram estabelecidos pelos espectros de HMBC (Figuras I.4.17, I.4.18, I.4.19, I.4.20 e I.4.21, pág. 50-54): MeO-7/C-7, $^3J_{\text{CH}}$ [δ_H/δ_C 3,87/166,6], MeO-7''/C-7'', $^3J_{\text{CH}}$ [δ_H/δ_C 3,91/158,32]; OH-5/C-5, $^2J_{\text{CH}}$ [δ_H/δ_C 12,87/162,1]; OH-5''/C-5'', $^2J_{\text{CH}}$ [δ_H/δ_C 12,92/159,2]; OH-5/CH-6, $^3J_{\text{CH}}$ [δ_H/δ_C 12,87/98,05]; OH-5''/CH-6'', $^3J_{\text{CH}}$ [δ_H/δ_C 12,92/96,30]; OH-5/C-10, $^3J_{\text{CH}}$ [δ_H/δ_C 12,87/104,75]; OH-5''/C-10'',

$^3J_{CH}$ [δ_H/δ_C 12,91/104,33]; 2H-3''', 5'''/C-1''', $^3J_{CH}$ [δ_H/δ_C 6,76/121,68]; 2H-3',5'/C-1', $^3J_{CH}$ [δ_H/δ_C 7,18/124,64]; H-6''/C-8'', $^3J_{CH}$ [δ_H/δ_C 6,76/120,6]; 2H-2''',6'''/C-4''', $^3J_{CH}$ [δ_H/δ_C 7,51/161,9]; 2H-2',6'/C-4', $^3J_{CH}$ [δ_H/δ_C 8,06/161,7]; 2H-2''',6'''/C-2'', $^3J_{CH}$ [δ_H/δ_C 7,51/164,6]; 2H-2',6'/C-2, $^3J_{CH}$ [δ_H/δ_C 8,06/161,4] (Tabela I.4.4, pág. 40). A preparação dos derivados acetilado (**4**) e metilado (**3**) serviu para confirmar a proposta estrutural de **2** e fazer a atribuição dos deslocamentos químicos de carbono-13 e hidrogênio destes novos derivados que foram divulgados recentemente no *J. Braz. Chem. Soc.* (Others flavonoids from *Oureatea hexasperma* (Ochnaceae). JBCS-77/115-04, DANIEL *et al*, 2004, (no prelo).

b) 7,7''- O-dimetil-5, 5'',4'''-triacetillanaroflavona (Derivado 4)

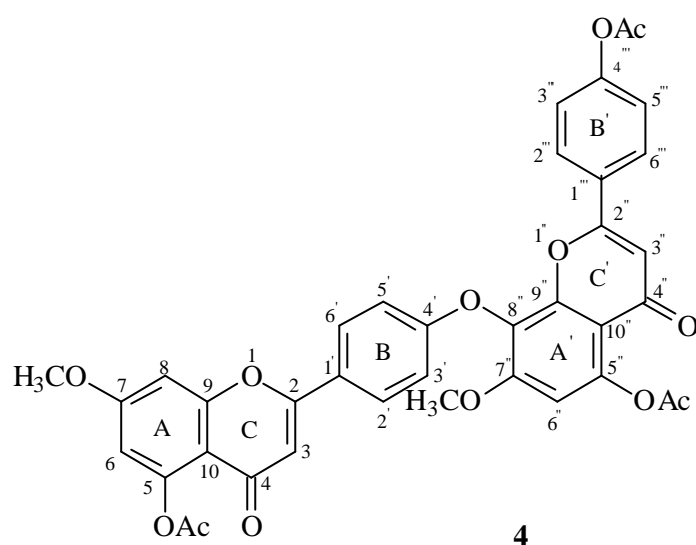
A análise dos espectros de IV, RMN 1H e ^{13}C e de massas do derivado **4** serviram para confirmar a proposta estrutural de **2**. O espectro de IV apresenta bandas de absorção para carbono sp^3 (2923 e 2852 cm^{-1} , estiramento C-H), grupamentos C=O (1722 cm^{-1}) de éster, confirmando a formação das acetoxilas (Figura I.4.22, pág. 55).

A substituição do grupo hidroxila por um substituinte acetoxila, permitiu confirmar a presença de três grupos HO em **2**. Esses grupos são representados no espectro de RMN pelos sinais em δ_H 2,26, 2,41 e 2,46; δ_{CH_3} 21,1 (3x) e $\delta_{C=O}$ 168,84 e 169,7 (2x).

Os espectros de RMN de 1H (1D e 2D, 1H - 1H -COSY) (Figura I.4.23, pág. 56 e Figura I.4.24, pág. 57) revelam sinais dos hidrogênios dos dois sistemas AA'BB' (anéis B) e do sistema AB do anel A. Não foi possível perceber as esperadas mudanças nos deslocamentos químicos dos hidrogênios devido o efeito dos grupos acetoxílicos diminuindo o efeito protetor dos grupos hidroxílicos porque os espectros de **2** foram registrados em DMSO- D_6 e os derivados em $CDCl_3$. A Tabela I.4.2, pág. 39 mostra as atribuições dos deslocamentos químicos dos hidrogênios que foram deduzidos com base na análise dos espectros 1D, COSY e, inclusive, com as informações obtidas com experimentos de NOEDIFF (Figura I.4.25, pág. 58; Tabela I.4.3, pág. 40). O sistema AB representado pelos hidrogênios H-6 (δ_H 6,59, 2,4 Hz) acoplado com H-8 (δ_H 6,84, 2,4 Hz) ambos vizinhos à metoxila do carbono 7 (δ_H 3,89); os sistemas AA'BB' representados pelos hidrogênios 2H-2',6' (δ_H 7,82) com 2H-3',5' (δ_H 7,09), do anel C da unidade contendo o H-3 (δ_H 6,52) e 2H-2''',6''' (δ_H 7,45) com 2H-3''',5''' (δ_H 7,05) do anel C da unidade contendo o H-3'' (δ_H 6,54) e sustentando um grupo acetoxílica. Esta afirmação se baseia no NOE (apenas 0,5%) detectado com irradiação na frequência do singlete em δ_H 2,26 (4'''-OCOCH $_3$). O outro sistema, entretanto, pertence ao anel que contém a função éter da ligação entre as unidades. Os sinais em 2,46 e 2,41 foram atribuídos aos grupos acetoxilas ligados nos carbonos 5'' e 5 com base nos NOE observados nos hidrogênios H-6''(6,78, *s*) e H-6 (6,59, *d*, 2,4 Hz), respectivamente. O outro sinal de grupo metoxila (δ_H 3,93) correspondente ao MeO-7'' cuja atribuição foi confirmada com o NOE no H-6'' (6,78, *s*).

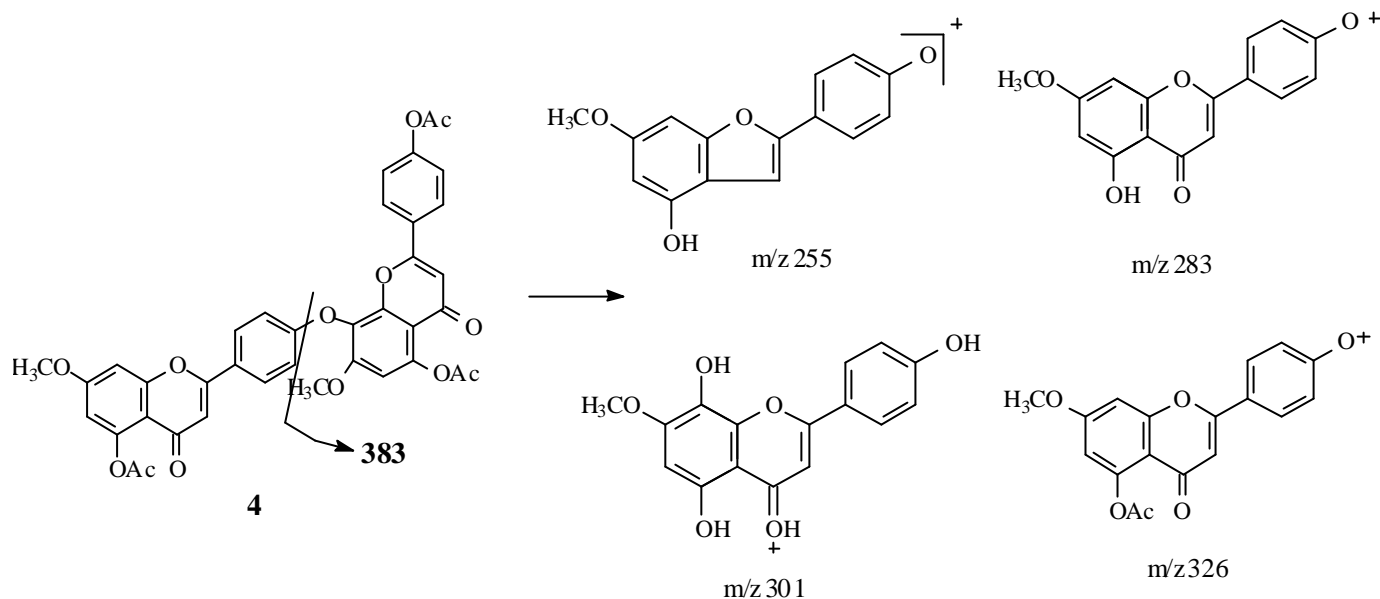
Após as atribuições dos deslocamentos químicos dos hidrogênios, foi fácil atribuir todos os deslocamentos químicos dos carbonos metínicos (CH) e metoxílicos (OCH $_3$) da molécula, através da interpretação dos espectros de RMN ^{13}C 1D (APT) e de RMN 2D [$^1Hx^{13}C$ -COSY ($^1J_{CH}$)]. O espectro (Figura I.4.26, pág. 59) revela modificações significativas nos deslocamentos dos átomos de carbonos metínicos e quaternários com substituinte acetoxila no lugar do grupo hidroxila (Tabela I.4.2, pág. 39). Os carbonos *ipso* são fortemente

protegidos, sofrendo mudança no deslocamento químico para campo mais baixo em relação ao fenol original, devido á blindagem desses carbonos pelos efeitos γ exercidos pelo átomo de oxigênio carbonílico e pelo grupamento metila do grupo acetoxila (Tabela I.4.2, pág. 39). Pelo contrário, os carbonos das posições *orto* e *para* são fortemente desprotegidos, sofrem mudança de deslocamento químico para campo mais alto em relação ao fenol original, devido à atenuação da capacidade de blindagem resultante do efeito mesomérico, doador de elétrons, do átomo de oxigênio nessas posições. A mudança de deslocamento para os carbonos *ipso* 5, 5'', 4''' ($\Delta\delta_C = -11,6, -8,7$ e $-8,7$ ppm, respectivamente), nos carbonos *orto* 10, 10'', 6, 6'', 3''' e 5''' ($\Delta\delta_C = +6,67, +7,21, +9,88, +8,58$ e $+6,39$, respectivamente) e nos carbonos *para* 8, 8'', 1''' ($\Delta\delta_C = +6,3, +4,9$ e $+6,63$, respectivamente) pode ser observada na Tabela I.4.2, pág. 39.



O espectros de massas de alta EMAR-IES (Figura I.4.27, pág. 60) e baixa EMBR-IES (Figura I.4.28a-I.4.28e, pág. 61-63) resolução foram realizados com ionização *eléttron spray* sendo a amostra dispersa em solução contendo ácido fórmico, metanol e água. O espectro EMAR-IES apresentou o sinal em m/z 693.1554 [$M^+ + H$, 70% (calculado 693.1608)] para $C_{38}H_{28}O_{13}$, confirmando a proposta estrutural para o derivado acetilado **4**. Os espectros MS/MS (Figura I.4.28a, pág. 61) foram realizados no modo de ionização positivo utilizando-se 20 eV de energia de gás de colisão argônio, permitindo detectar os fragmentos de massas da molécula. O MS/MS do m/z 693 (30%), (Figura I.4.28a, pág. 61) forneceu os picos em m/z : 651 (100%, $M^+ - H_2CCO$), 609 (90%, $M^+ - 2x H_2CCO$) e 567 (6%, $M^+ - 3x H_2CCO$) justificando a perda dos grupamentos acetilas. O espectro MS/MS (Figura I.4.28b, pág. 61) do íon m/z 443 (100%) revelou picos que com m/z 255 e 283 que permitiu propor para 443 um “aduto” das espécies: $[255 + (HCO_2H)_3 + H_3COH + H_2O]^+$ ou $[283 + (HCO_2H)_2 + H_3COH + (H_2O)_2]^+$, (Esquema I.4.2, pág. 64). Para o pico m/z 401 (40%), (Figura I.4.26c, pág. 62) o conjunto de espécies: $[359 (326 + H_3COH + H) + H_2C=CO]^+$ ou $[373 (326 + HCO_2H + H) + CO]^+$; m/z 361 (80%) (Figura I.4.28d, pág. 62): $[301 (100\%) + H_4C_2O_2 (de HCO_2H + H_3COH - H_2O)]^+$ ou $[283 (20\%) + HCO_2H + H_3COH]^+$ ou $[255 (40\%) + HCO_2H + H_4C_2O_2]$; e para m/z 301 (95%) (Figura I.4.28e, pág. 63) o sistema: $[255 (100\%) + (HCO_2H)]^+$ ou $[283 (15\%)$

+ H₂O]⁺. As estruturas ou conjunto de espécies (“adutos”) representantes dos picos registrados no EMAR-IES (1) e MS/MS (2) com *m/z* 693 (2a), 443 (2b), 401 (2c), 361 (2d) e 301 (2e) estão contidos no Esquema I.4.2, pág. 64. Os fragmentos *m/z* 255, 283, 301 e 326 estão representados abaixo:



Os deslocamentos químicos dos carbonos não hidrogenados foram estabelecidos pelos espectros de HMBC (Figuras I.4.29, I.4.30, pág. 65-66): MeO-7/C-7, ³J_{CH} [δ_H/δ_C 3,89/163,5]; MeO-7"/C-7", ³J_{CH} [δ_H/δ_C 3,93/156,1]; H₃CCO-4"/H₃CCO-4'", ²J_{CH} [δ_H/δ_C 2,26/168,8]; H₃CCO-5/H₃CCO-5', ²J_{CH} [δ_H/δ_C 2,41/169,7]; H₃CCO-5"/H₃CCO-5"', ²J_{CH} [δ_H/δ_C 2,46/169,7]; H-6/C-5, ²J_{CH} [δ_H/δ_C 6,59/150,5]; 2H-2"',6"/C-4"', ³J_{CH} [δ_H/δ_C 7,45/153,2]; 2H-3"',5"/C-4"', ²J_{CH} [δ_H/δ_C 7,45/153,2]; 2H-2',6'/C-4', ³J_{CH} [δ_H/δ_C 7,82/160,4]; 2H-3',5'/C-4', ²J_{CH} [δ_H/δ_C 7,09/160,4]; 2H-2"',6"/C-2"', ³J_{CH} [δ_H/δ_C 7,45/161,5]; H-3"/C-2"', ²J_{CH} [δ_H/δ_C 6,54/161,5]; H-3'/C-2', ²J_{CH} [δ_H/δ_C 6,52/161,2]; H-6"/C-7", ²J_{CH} [δ_H/δ_C 6,78/156,1]; H-8/C-7, ²J_{CH} [δ_H/δ_C 6,84/163,5]; H-6'/C-7, ²J_{CH} [δ_H/δ_C 6,59/163,5] (Tabela I.4.4, pág. 40).

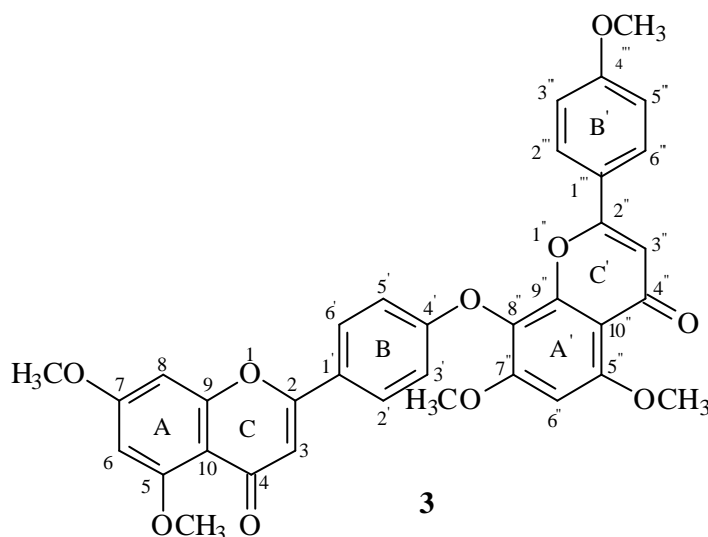
O espectro de NOESY (Figura I.4.31, pág. 67) confirma a localização das metoxilas em C-7 e C-7", pelas interações espaciais com os hidrogênios H-6 (δ_H 6,59), H-8 (δ_H 6,84) e H-6" (δ_H 6,78), respectivamente, como descrito acima com interpretação dos experimentos com NOEDIFF.

c) Lanaroflavona permetilada (Derivado 3)

O tratamento de 2 (7,7'- O-dimetillanaroflavona) com sulfato de metila formou o derivado permetilado 3, que apresenta cinco metoxilas, sendo três delas obtidas pela incorporação de grupos metilas nas hidroxilas fenólicas.

O ponto de fusão do derivado **3** (PF: 265°C) e os deslocamentos químicos dos hidrogênios são semelhantes aos apresentados na literatura (DORA & EDWARDS, 1991). A análise dos espectros deste derivado (Figura I.4.32-I.4.39, pág. 68-75) permitiu o completo assinalamento de deslocamento químico de carbono-13 que não se encontrava na literatura.

Os espectros de RMN de ^1H (1D e 2D ^1H - ^1H -COSY) (Figura I.4.32, pág. 68, Figura I.4.33, pág. 69 e Tabela I.4.2, pág. 39) mostram sinais para os átomos de hidrogênio H-3',5' (d_{H} 7,08, d , $J=8,8$), H-2',6' (d_{H} 7,84, d , $J=8,8$), H-3''',5''' (d_{H} 6,83, d , $J=8,76$), H-2''',6''' (7,45, d , $J=8,76$), atribuídos aos dois sistemas AA'BB' (anéis B e B'''), H-6 (6,37, d , $J=2,2$) e H-8 (d_{H} 6,54, d , $J=2,2$) para o anel A e H-6'' (6,54, s) do anel A'' e dois singletos dos hidrogênios H-3 (d_{H} 6,60) e H-3'' (d_{H} 6,57). Além destes sinais estão presente os sinais correspondentes aos deslocamentos químicos dos grupos metoxílicos em 3,78 (3H, s), 3,89 (3H, s), 3,95 (3H, s), 3,97 (3H, s) e 4,05 ppm (3H, s).



Os espectros de RMN ^{13}C (APT) deste derivado (**3**, Figura I.4.34 e I.4.35, pág. 70-71), quando comparados com os da substância natural **2**, permitem observar que não gerou modificações significativas nos deslocamentos químicos nos carbonos *ipso* que sustentam as metoxilas, fato que pode ser explicado pela variação no uso de solventes na obtenção dos espectros de RMN ^{13}C , podendo haver um deslocamento para campo mais alto de d_{C} 0,5 ppm pela substituição de CDCl_3 por DMSO-D_6 (AGRAWAL, 1989). Nos carbonos *orto* 6, 6'', 3''' e 5''' ocorreu, como esperado, uma proteção ($\Delta d_{\text{C}} = -1,92$, $-3,84$ e $-1,56$ respectivamente), já nos carbonos 10, 10'' não houve essa proteção. Os sinais das metoxilas são de d_{C} 55,42, 55,74, 56,44, 56,53 e 56,68 ppm (Tabela I.4.2, pág. 39).

O espectro de HMQC (Figura I.4.36, pág. 72) permitiu estabelecer as correlações diretas ($^1J_{\text{CH}}$): OCH_3 -7 [$d_{\text{H}}/d_{\text{C}}$ 3,89/55,74], OCH_3 -7'' [$d_{\text{H}}/d_{\text{C}}$ 4,05/56,68], OCH_3 -5 [$d_{\text{H}}/d_{\text{C}}$ 3,97/56,44], OCH_3 -5'' [$d_{\text{H}}/d_{\text{C}}$ 3,95/55,53] e OCH_3 -4''' [$d_{\text{H}}/d_{\text{C}}$ 3,78/55,42] para as metoxilas, e CH-6'' [$d_{\text{H}}/d_{\text{C}}$ 6,54/92,46], CH-8 [$d_{\text{H}}/d_{\text{C}}$ 6,44/92,83], CH-3'' [$d_{\text{H}}/d_{\text{C}}$ 6,57/108,1], CH-3 [$d_{\text{H}}/d_{\text{C}}$ 6,60/107,1]. As interações entre os CH_3 das metoxilas e os carbonos quaternários oxigenados, que sustentam estes grupos, foram observadas através do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY, $^2,^3J_{\text{CH}}$, HMBC: Figuras I.4.37, I.4.38 e I.4.39, pág. 73-75) que

mostram sinais de acoplamento a longa distância. Neste caso o acoplamento através de três ligações (${}^3J_{CH}$) como: δ_H/δ_C 3,89/164,0, MeO-7/C-7; δ_H/δ_C 4,05/157,9, MeO-7''/C-7''; δ_H/δ_C 3,95/160,9, MeO-5/C-5; δ_H/δ_C 3,97/156,3, MeO-5''/C-5''; δ_H/δ_C 3,78/162,3, MeO-4'''/C-4'''.

Outras correlações foram observadas permitindo confirmar as atribuições dos deslocamentos químicos dos carbonos não hidrogenados, C-10, 10'', 1, 1''', 4''', 4', 2 e 2'': H-6/C-10, ${}^3J_{CH}$ [δ_H/δ_C 6,37/109,2]; H-6''/C-10'', ${}^3J_{CH}$ [δ_H/δ_C 6,54/109,16]; 2H-3''',5'''/C-1''', ${}^3J_{CH}$ [δ_H/δ_C 6,83/123,23]; 2H-3',5'/C-1', ${}^3J_{CH}$ [δ_H/δ_C 7,08/125,59]; 2H-2''',6'''/C-4''', ${}^3J_{CH}$ [δ_H/δ_C 7,45/162,3]; 2H-2',6'/C-4', ${}^3J_{CH}$ [δ_H/δ_C 7,84/160,3]; H-3''/C-2'', ${}^2J_{CH}$ [δ_H/δ_C 6,57/160,7]; 2H-2',6'/C-2', ${}^3J_{CH}$ [δ_H/δ_C 7,84/160,78] (Tabela I.4.4, pág. 40).

Tabela I.4.2. Dados de RMN ^1H (400 MHz), e ^{13}C (100 MHz) da substância **2** (D_3CSOCD_3) e dos derivados metilado **3** e acetilado **4** (CDCl_3).

C	2		3		4	
	δC	$\delta\text{H}(\text{mult, Hz})^a$	δC	$\delta\text{H}(\text{mult, Hz})^a$	δC	$\delta\text{H}(\text{mult, Hz})^a$
2	164,11	-	160,78	-	161,20	-
4	181,90	-	177,87	-	176,11	-
5	162,10	-	160,94	-	150,52	-
7	166,62	-	164,01	-	163,50	-
9	159,10	-	159,83	-	158,80	-
10	104,70	-	109,23	-	111,50	-
1	124,60	-	125,59	-	128,31	-
4	161,71	-	160,30	-	160,40	-
2	164,62	-	160,70	-	161,53	-
4	181,90	-	177,54	-	176,50	-
5	159,20	-	156,30	-	150,50	-
7	158,33	-	157,91	-	156,11	-
8	120,60	-	124,08	-	125,51	-
9	148,22	-	151,39	-	147,20	-
10	104,30	-	109,16	-	111,50	-
1	121,61	-	123,23	-	128,30	-
4	161,90	-	162,30	-	153,20	-
$\text{H}_3\text{CCO}-4'''$	-	-	-	-	168,84	-
$\text{H}_3\text{CCO}-5,5'''$	-	-	-	-	169,67x2	-
CH						
3	104,33	6,94 (s)	107,14	6,60 (s)	108,81	6,52 (s)
6	98,05	6,36(d, 2,0)	96,13	6,37 (d, 2,2)	107,90	6,59(d, 2,4)
8	92,77	6,77 (d, 2,0)	92,82	6,54 (d, 2,2)	99,07	6,84 (d, 2,4)
2,6	128,65	8,06 (d, 8,47)	127,77	7,84 (d, 8,8)	128,01	7,82 (d, 8,8)
3,5	115,46	7,18 (d, 8,47)	115,36	7,08 (d, 8,8)	115,61	7,09 (d, 8,8)
3	104,14	6,86 (s)	108,13	6,57 (s)	108,30	6,54 (s)
6	96,30	6,76 (s)	92,46	6,54 (s)	104,90	6,78 (s)
2,6	128,15	7,51 (d, 8,7)	127,50	7,45 (d, 8,76)	128,30	7,45 (d,8,8)
3,5	115,89	6,76 (d, 8,7)	114,33	6,83 (d, 8,76)	122,30	7,05 (d,8,8)
CH_3						
MeO-7	56,05	3,87 (s)	55,74	3,89 (s)	55,90	3,89 (s)
MeO-7	56,79	3,91 (s)	56,68	4,05 (s)	56,80	3,93 (s)
MeO-5	-	-	56,44	3,97 (s)	-	-
MeO-5	-	-	56,53	3,95 (s)	-	-
MeO-4	-	-	55,42	3,78 (s)	-	-
$\text{H}_3\text{CCO}_2-4''',5$	-	-	-	-	21,10, 21,10	2,26(s), 2,41(s)
$\text{H}_3\text{CCO}_2-5''$	-	-	-	-	21,10	2,46(s)
HO-5,5'', 4''	-	12,87, 12,92, 10,39(s)	-	-	-	-

^aEspectro 2D- $^1\text{H}-^1\text{H}$ -COSY foram usados para a atribuição dos assinalamentos.

Tabela I.4.3. Dados espectrométricos de $^1\text{H}\{^1\text{H}\}$ -NOE de **2** em DMSO-D_6 e do derivado acetilado **4** em CDCl_3 .

Irradiação			NOE	
^1H	δ_{H}		H; δ_{H} { % }	
	2	4	2	4
AcO-4''	-	2,26	-	3'',5''; 7,05{0,5}
AcO-5	-	2,41	-	6; 6,59{0,5}
AcO-5''	-	2,46	-	6''; 6,78{0,2}
MeO-7	3,87	3,89	6; 6,36{4,0} 8; 6,77{2,0}	6; 6,59{11,0} 8; 6,84{13,0}
MeO-7'	3,91	3,93	6''; 6,76{5,0}	6''; 6,78{10,0}
3	-	6,52	-	2,6; 7,82{20,0}
3	-	6,54	-	2,6; 7,45{25,0}

Tabela I.4.4. Dados de RMN^1H (400 MHz) e RMN^{13}C (100 MHz) 2D de **2** (DMSO-D_6), **3** e **4** (CDCl_3).

C	^{13}C	$^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}\text{-HMBC-}^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$	^{13}C	$^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}\text{-HMBC-}^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$	^{13}C	$^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}\text{-HMBC-}^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$			
	2			3			4		
	d_{C}	$^2d_{\text{CH}}$	$^3d_{\text{CH}}$	d_{C}	$^2d_{\text{CH}}$	$^3d_{\text{CH}}$	d_{C}	$^2d_{\text{CH}}$	$^3d_{\text{CH}}$
7	166,6		$\text{CH}_3\text{O-7}$	164,0		$\text{CH}_3\text{O-7}$	163,5	H-6,H-8	$\text{CH}_3\text{O-7}$
7''	158,3		$\text{CH}_3\text{O-7''}$	157,9		$\text{CH}_3\text{O-7''}$	156,1	H-6''	$\text{CH}_3\text{O-7''}$
5	162,1	OH-5		160,9		$\text{CH}_3\text{O-5}$	150,5	H-6	
5''	159,2	OH-5''		156,3		$\text{CH}_3\text{O-5''}$	150,5		
10	104,8		OH-5	109,2		H-6	111,5		
10''	104,3		OH-5''	109,1		H-6''	111,5		
1'''	121,7		H-3''',5'''	123,2		H-3''',5'''	128,3		
1'	124,6		H-3',5'	125,6		H-3',5'	128,3		
8''	120,6		H-6''	124,1			125,5		
4'''	161,9		H-2''',6'''	162,3		$\text{CH}_3\text{O-4'''}$, H-2''',6'''	153,2	H-3''',5'''	H-2''',6'''
4'	161,7		H-2',6'	160,3		H-2',6'	160,4	H-3',5'	H-2',6'
2''	164,6		H-2''',6'''	160,7	H-3''		161,5	H-3''	H-2''',6'''
2	161,4		H-2',6'	160,8		H-2',6'	161,2	H-3	
9	159,1			151,4			158,8	H-8	
$\text{H}_3\text{CCO-4'''}$							168,8	$\text{H}_3\text{CCO-4'''}$	
$\text{H}_3\text{CCO-5,5''}$							169,7	$\text{H}_3\text{CCO-5,5''}$	
CH									
6	98,05		OH-5	96,1			107,9		
6''	96,3		OH-5''	92,5			104,9		

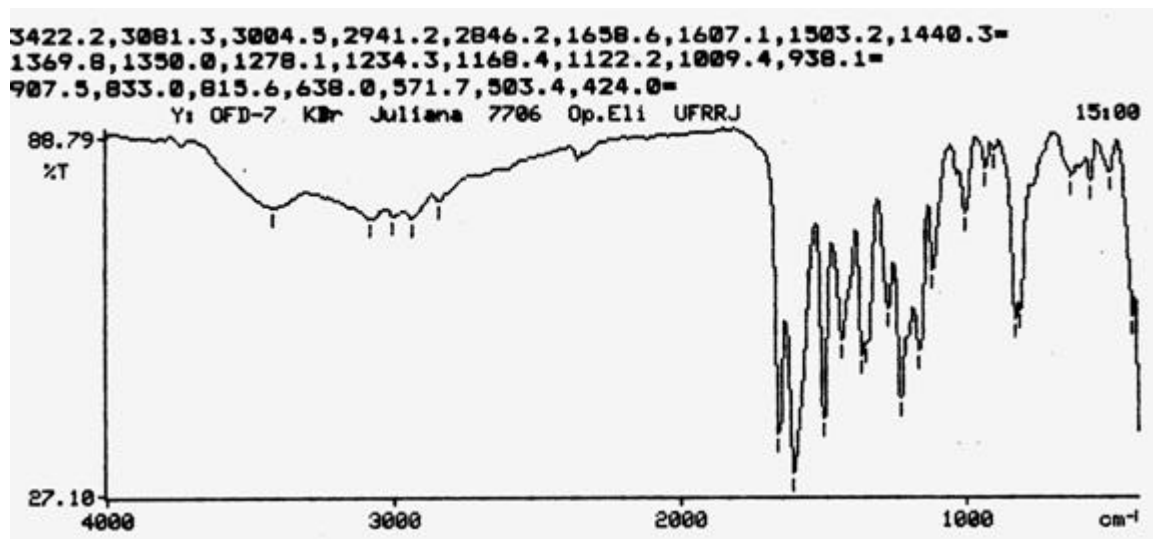
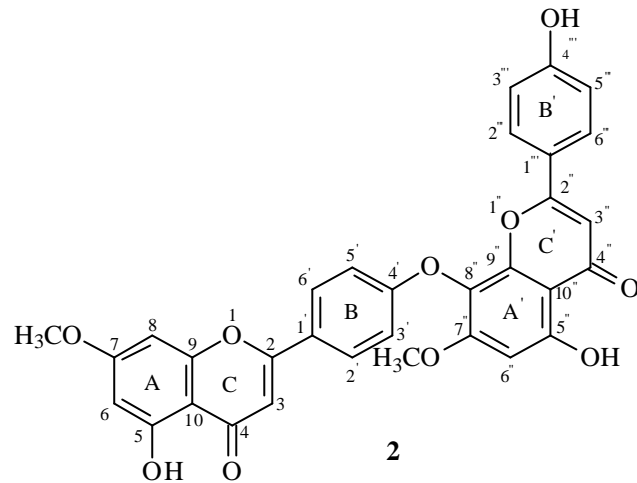


Figura I.4.9. Espectro de IV do biflavonóide **2** (7,7'-O-dimetillanaroflavona) isolado de *O. hexasperma*

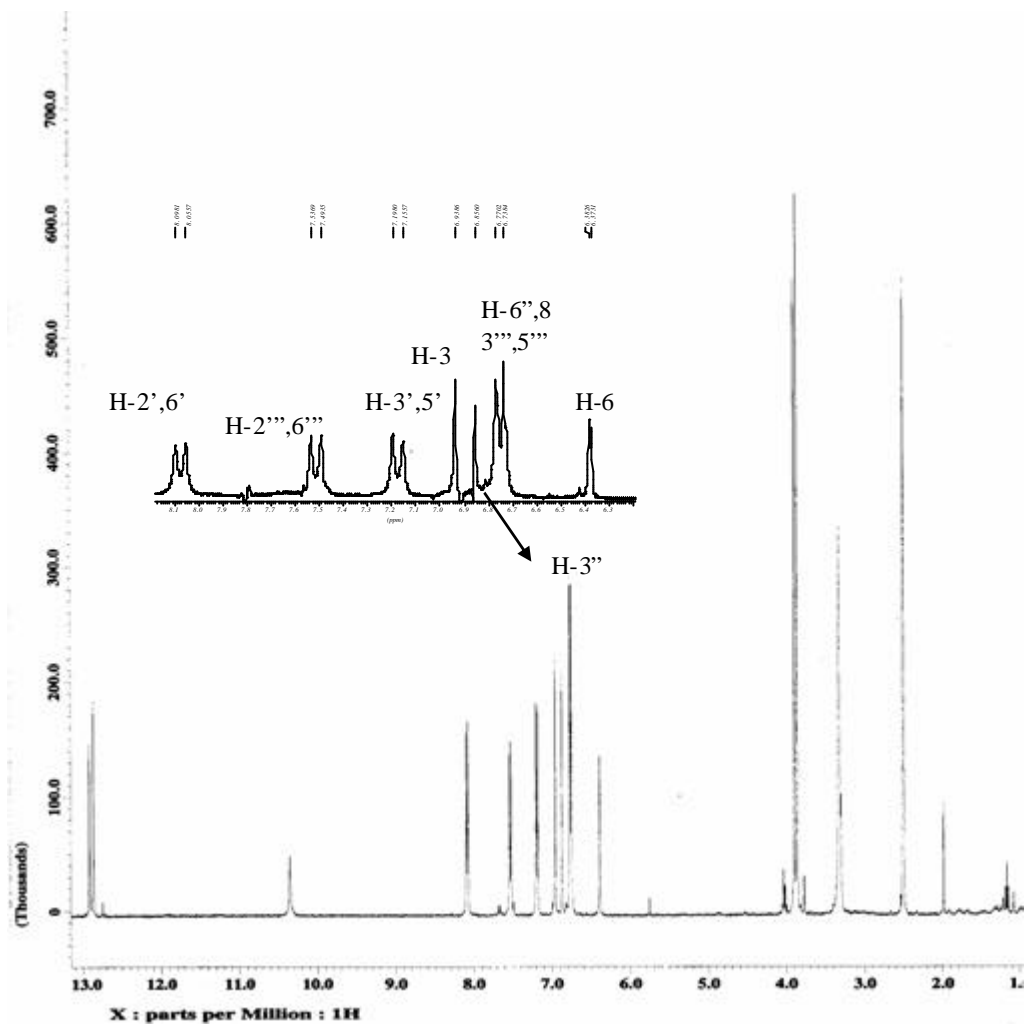


Figura I.4.10. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) do biflavonóide 2 (7,7'-*O*-dimetillanaroflavona).

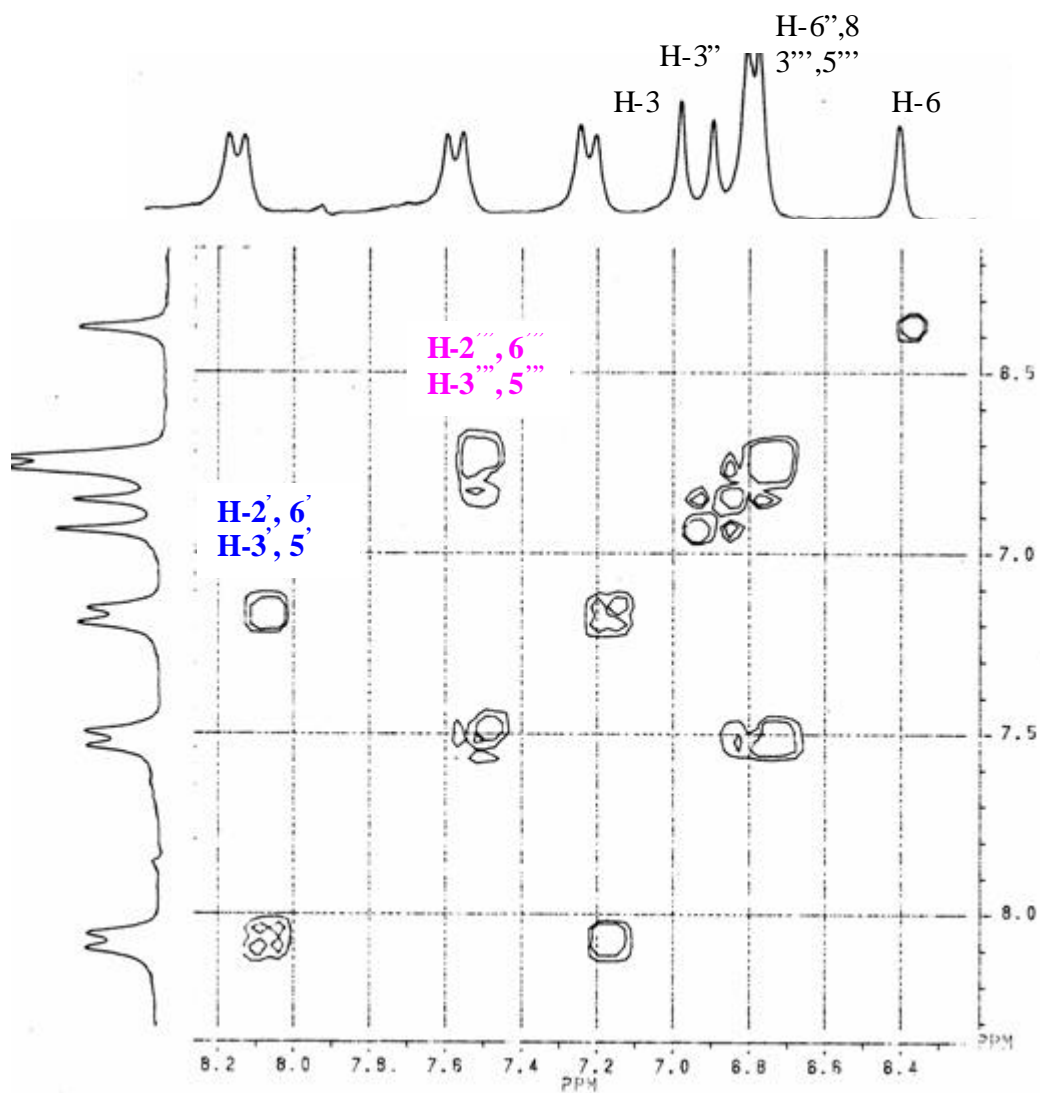


Figura I.4.11. Espectro de ^1H - ^1H -COSY (200 MHz, DMSO-D_6) do biflavonóide 2 (7,7'-*O*-dimetillanaroflavona).

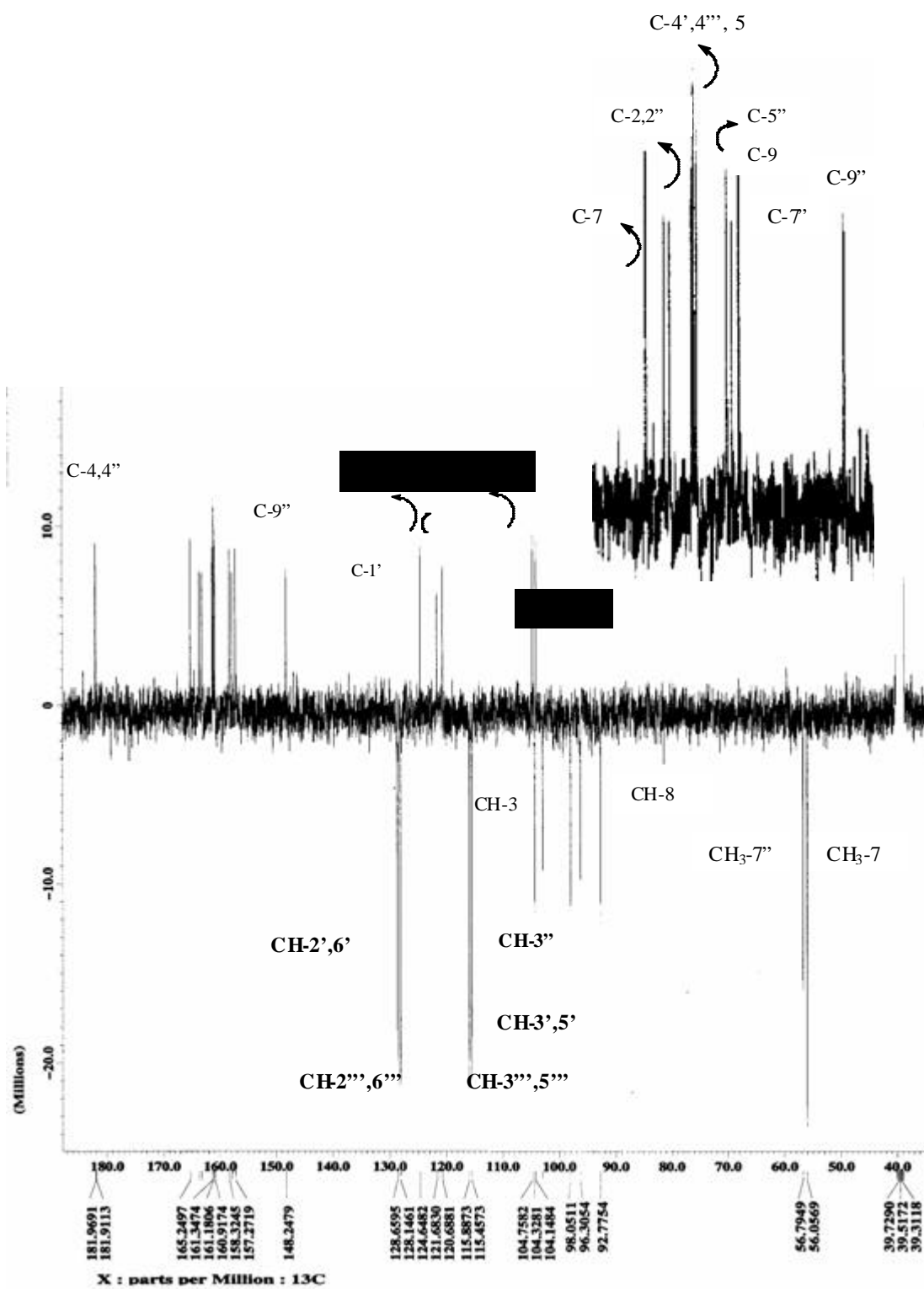


Figura I.4.12. Espectro de RMN ^{13}C e APT (100 MHz, DMSO- D_6) do biflavonóide 2 (7,7' - O-dimetillanaroflavona).

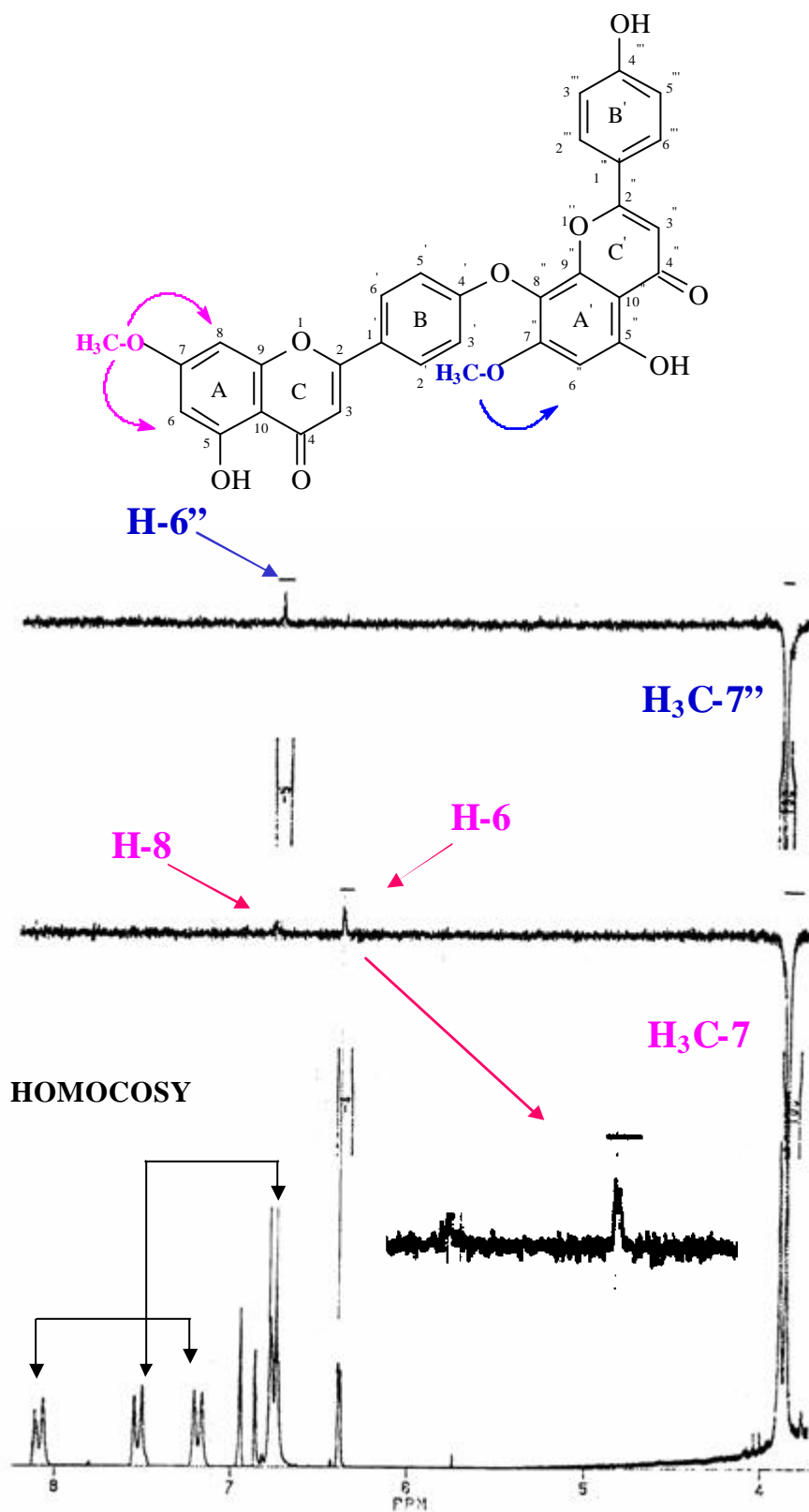


Figura I.4.13. Espectro de NOE (200 MHz, D₃CSOCD₃) do biflavonóide 2 (7,7'-O-dimetillanaroflavona).

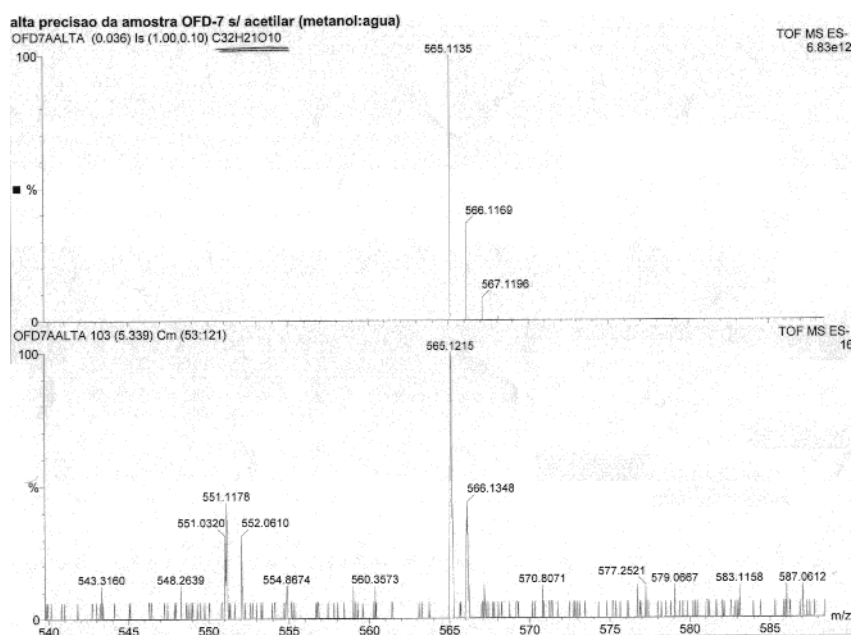


Figura I.4.14. Espectro de massas de alta resolução do biflavonóide **2**, obtido com Ionização *elétron spray* (IES) e detecção de íons negativos.

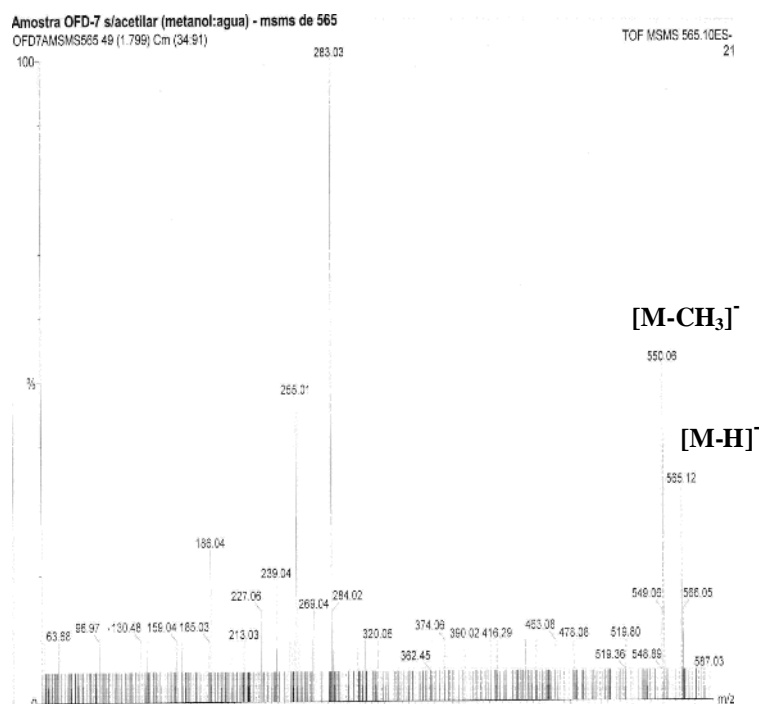
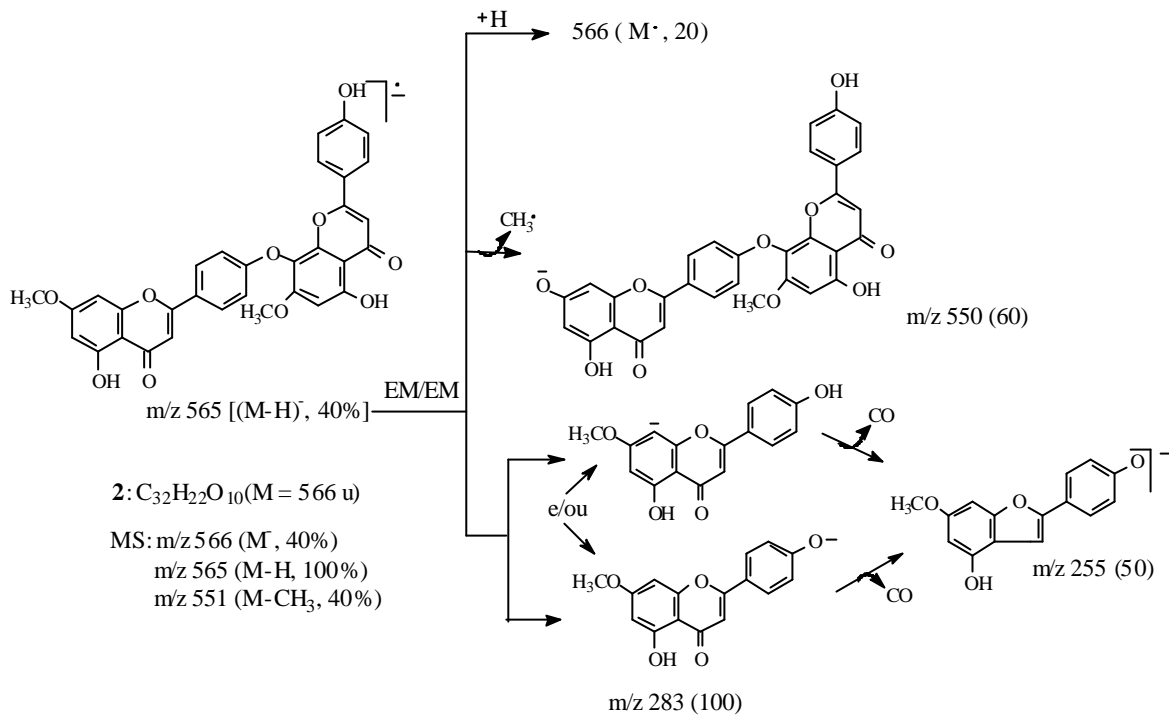


Figura I.4.15. Espectro de massas de baixa resolução (EM/EM) do pico m/z 565 do biflavonóide **2**, obtido com Ionização *elétron spray* (IES) e detecção de íons negativos.



Esquema I.4.1. Mecanismo de fragmentação proposto para justificar os picos resultantes da ionização do m/z 565 e íons negativos detectados de **2**.

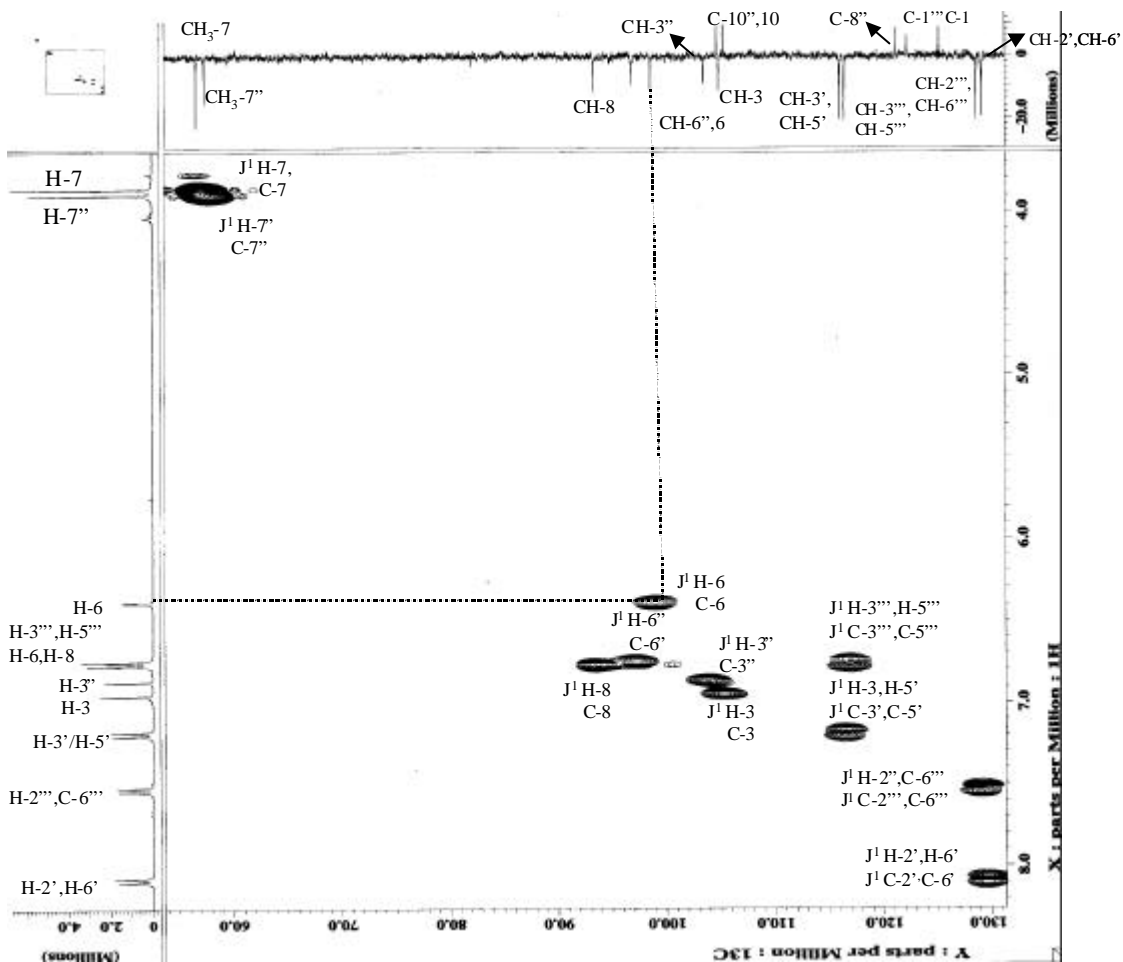


Figura I.4.16. Espectro de RMN -2D HMQC (400 MHz, $\text{D}_3\text{C SOCD}_3$), ampliado em 3,7-8,2 ppm para ^1H , 2 (7, 7''-*O*-dimetillanarflavona).

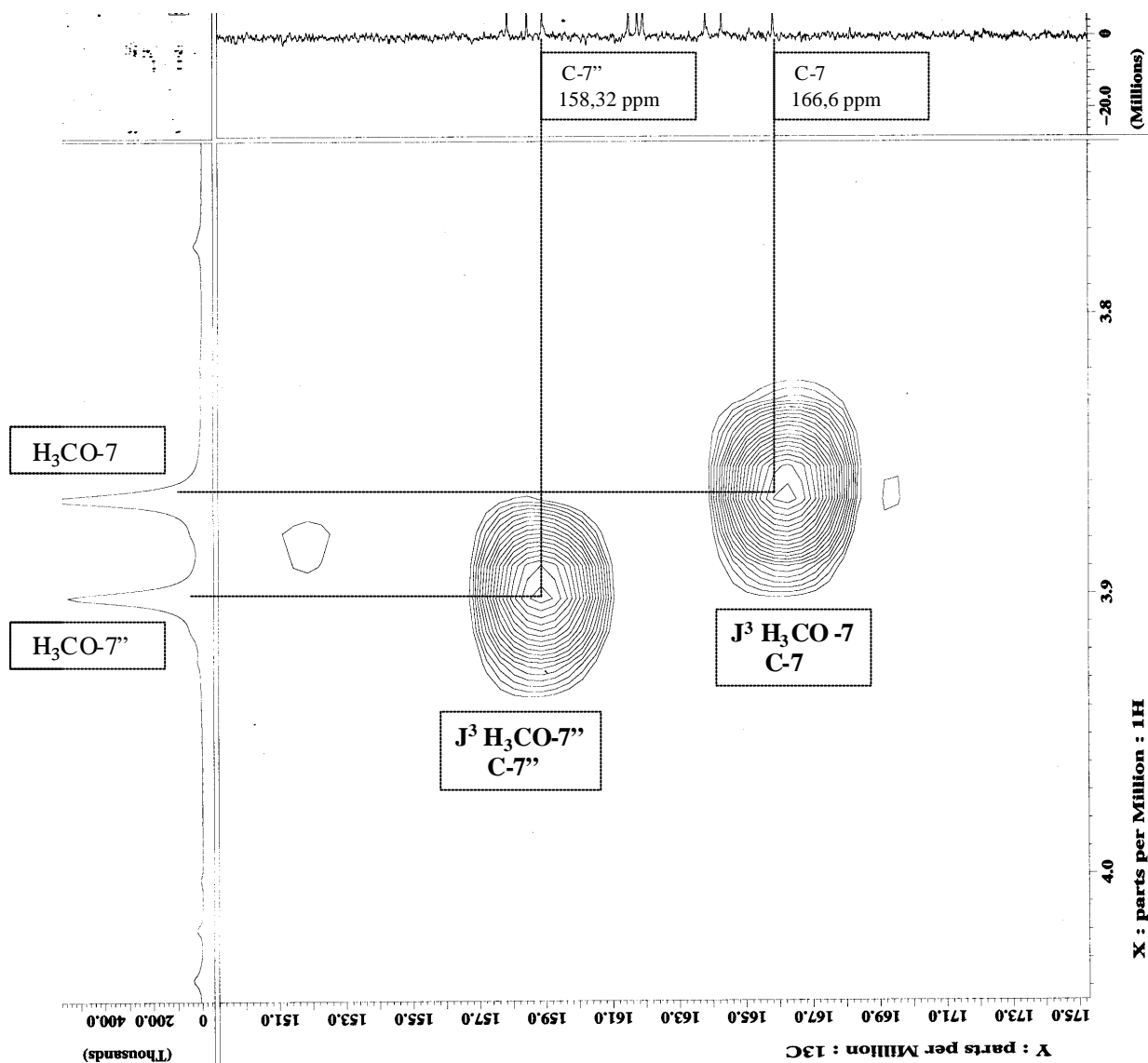


Figura I.4.17. Espectro de RMN-2D HMBC (400 MHz, D_3CSOCD_3), ampliado em 3,8-4,5 ppm de 2 (7, 7''-*O*-dimetillanaraflavona).

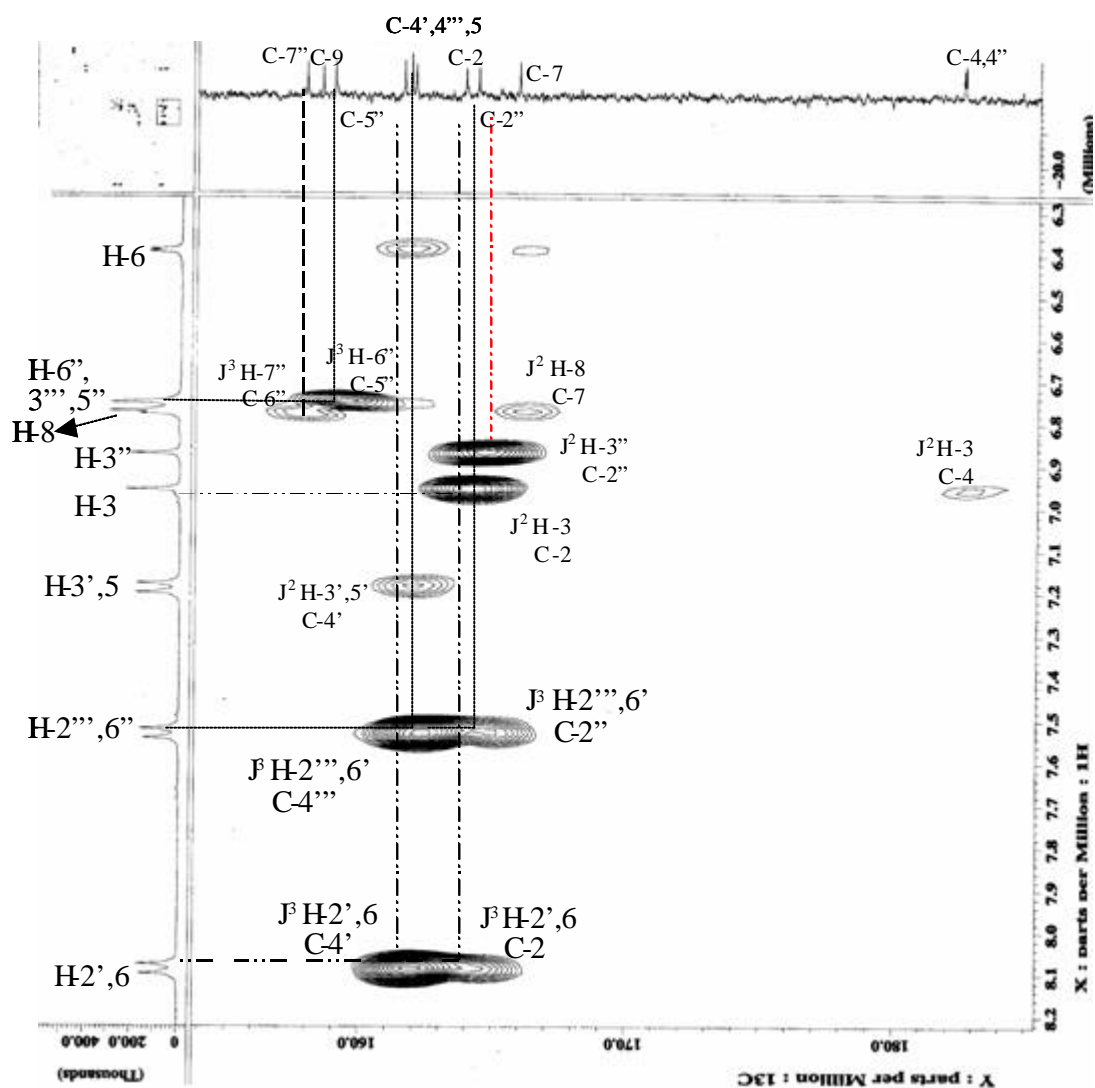


Figura I.4.18. Espectro de RMN-2D HMBC (400 MHz, D₃C SOCD₃), ampliado em 6,3-8,2 ppm de 2 (7, 7''-O-dimetillanaravflavona).

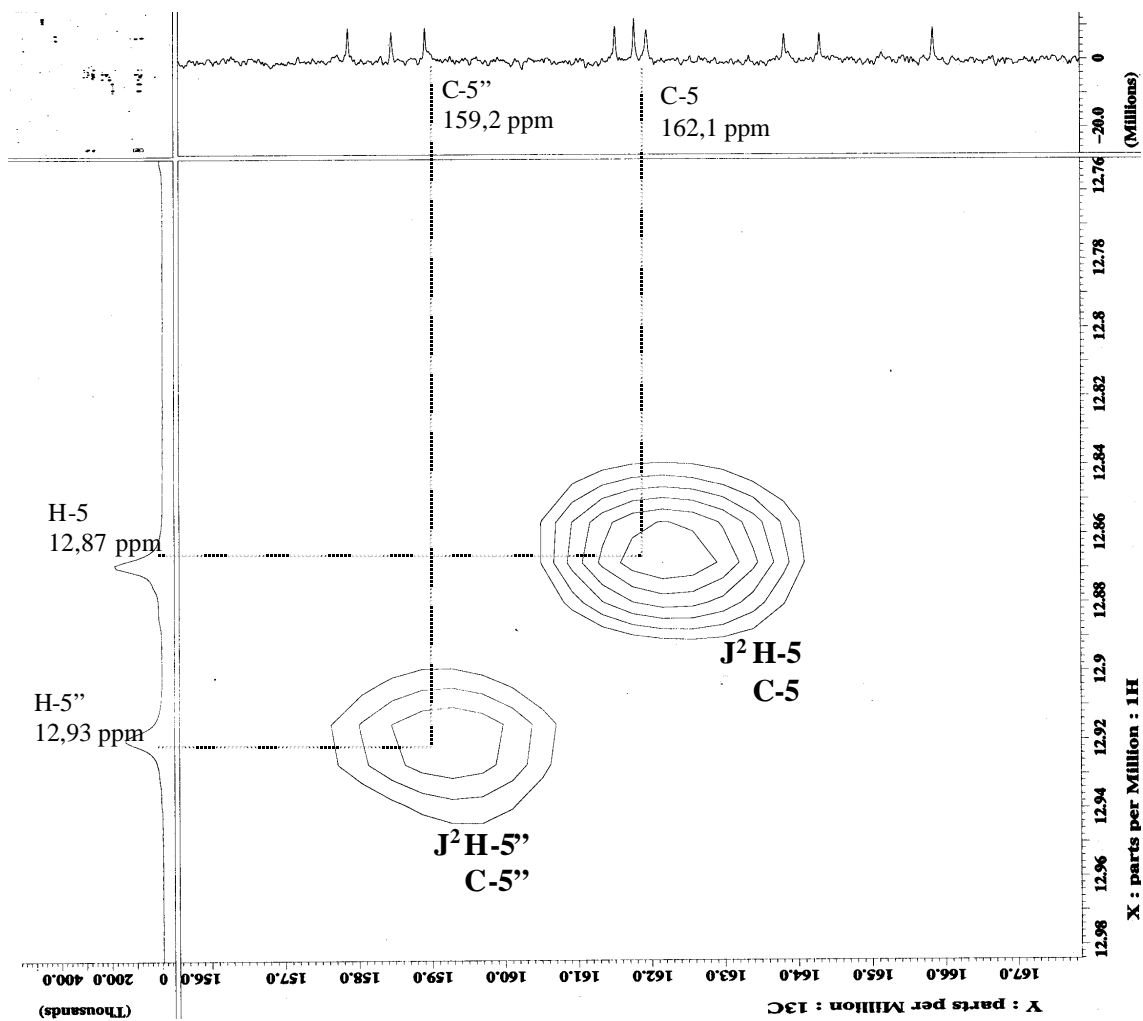


Figura I.4.19. Espectro de RMN-2D HMBC (400 MHz, D_3CSOCD_3) ampliado em 12,76-12,98 ppm de 2.

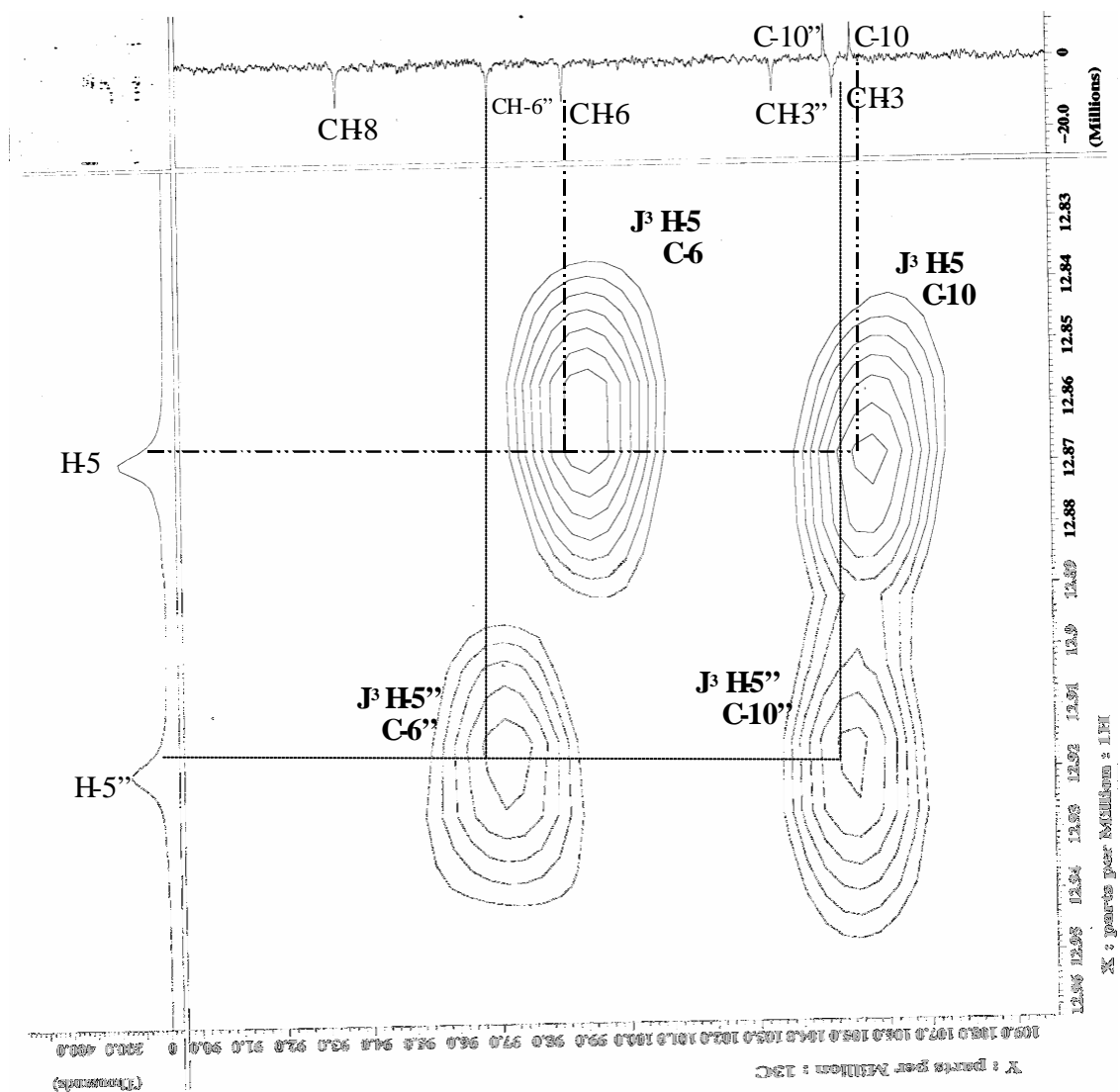


Figura I.4.20. Espectro de RMN-2D HMBC (400 MHz, D_3CSOCD_3), ampliado e m 12,83-12,96 ppm de 2 (7, 7''-O-dimetillanaraflavona).

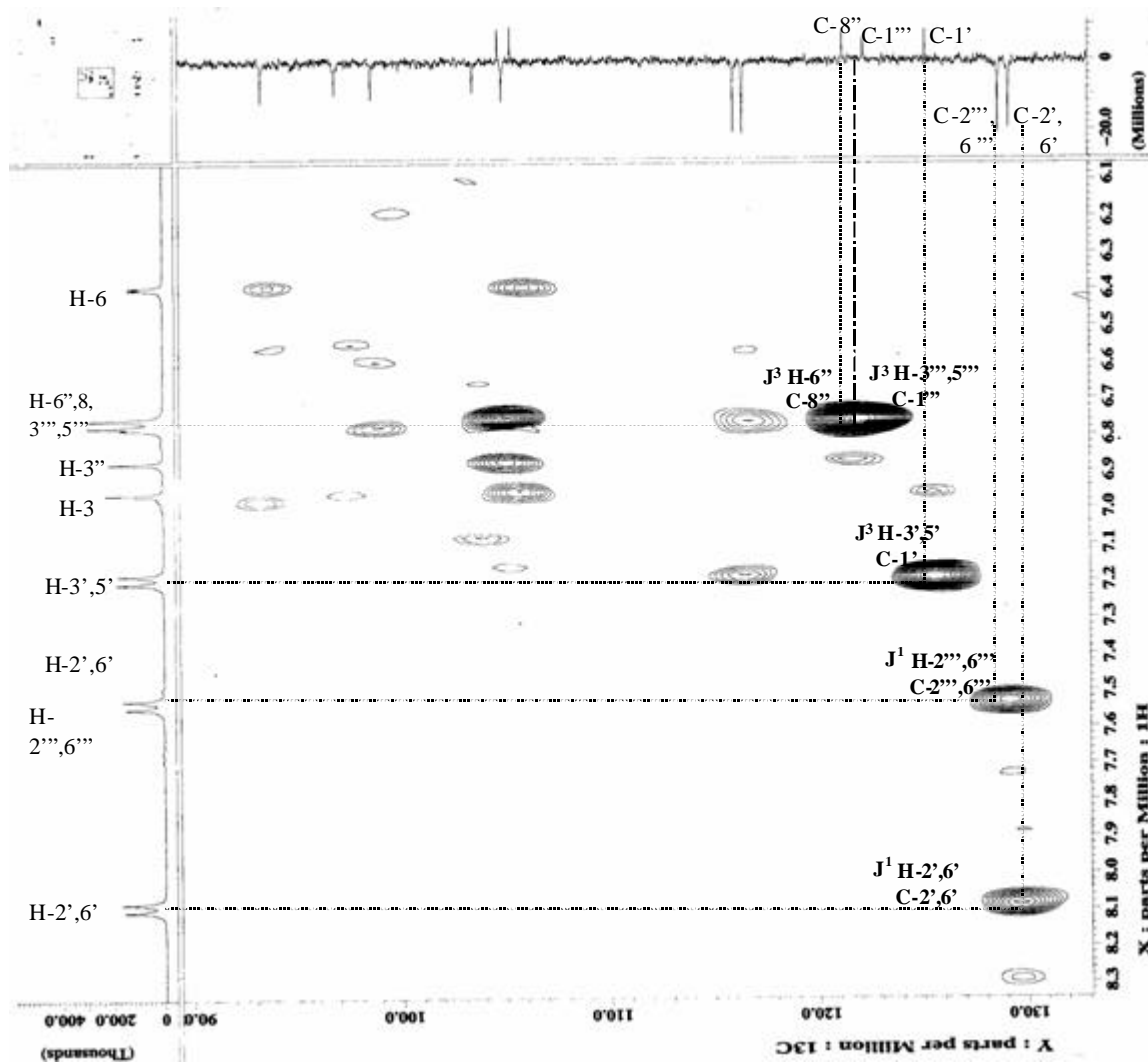


Figura I.4.21. Espectro de RMN-2D HMBC (400 MHz, D_3CSOCD_3), ampliado em 6,1-8,3 ppm de **2** (7,7''-*O*-dimetillanaraflavona).

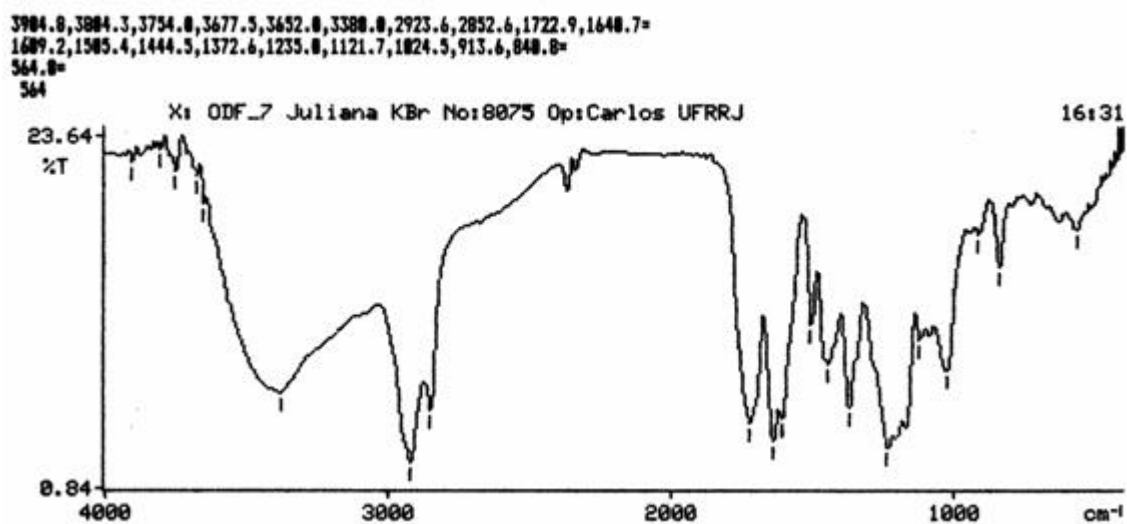
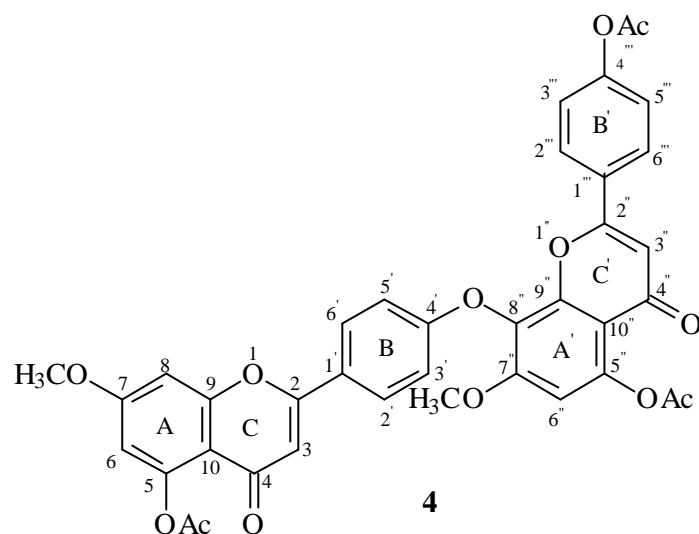


Figura I.4.22. Espectro de IV de **4** (7,7' - *O*-dimetil-5, 5'',4''-triacetillanaroflavona).

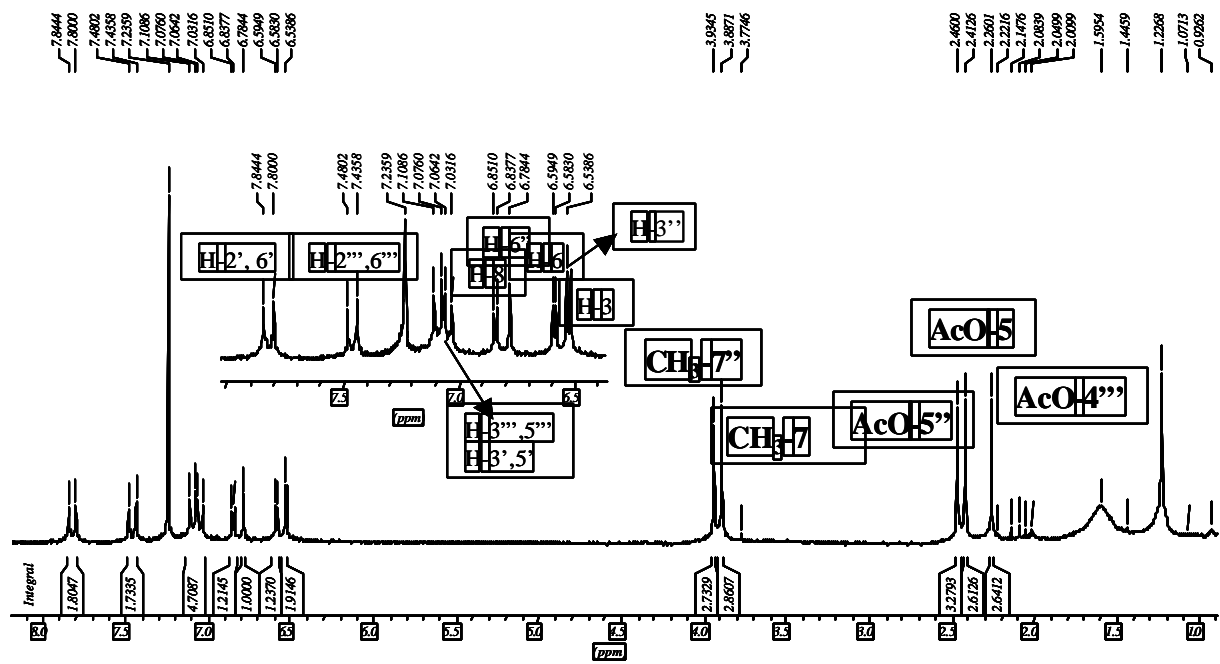


Figura I.4.23. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do biflavonóide 4 (7,7' - O-dimetil-5, 5'',4'''-triacetillanaroflavona).

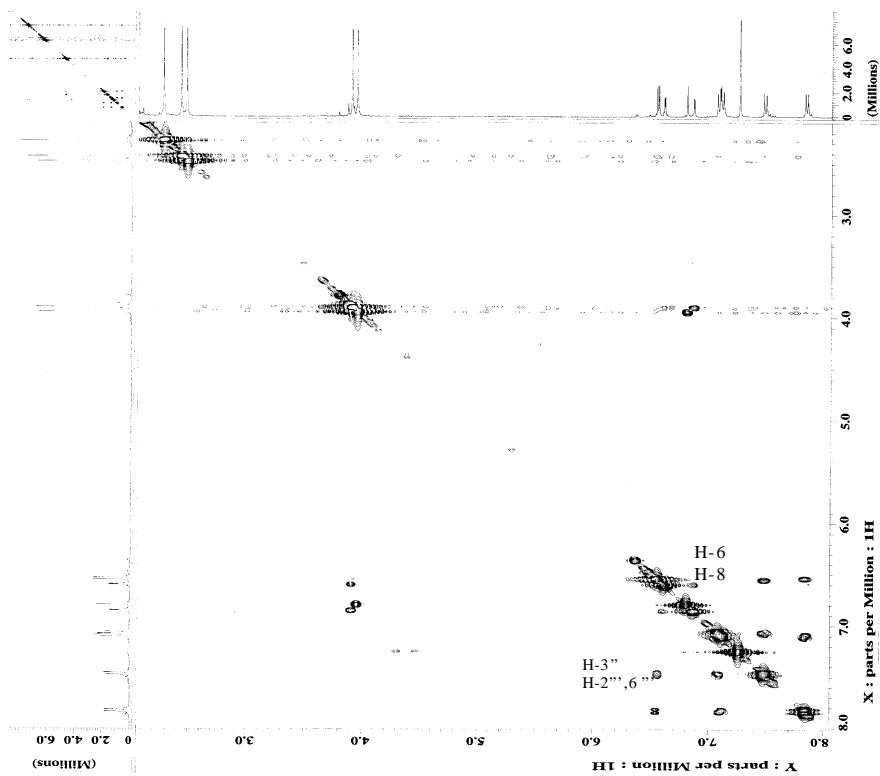
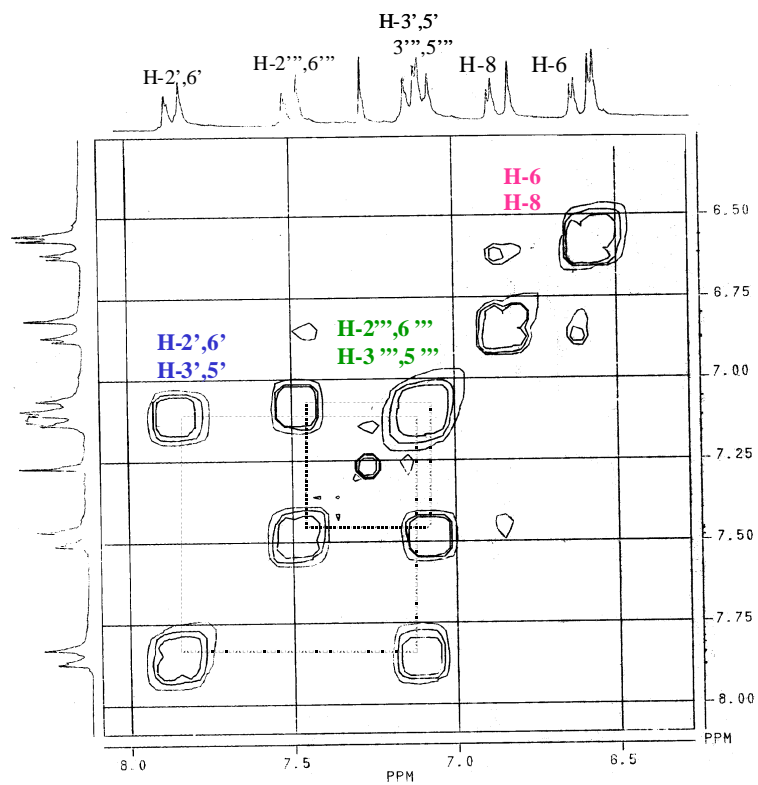


Figura I.4.24. Espectro de ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CDCl_3) do biflavonóide 4 (7,7'-*O*-dimetil-5,5'',4'''-triacetillanaroflavona).

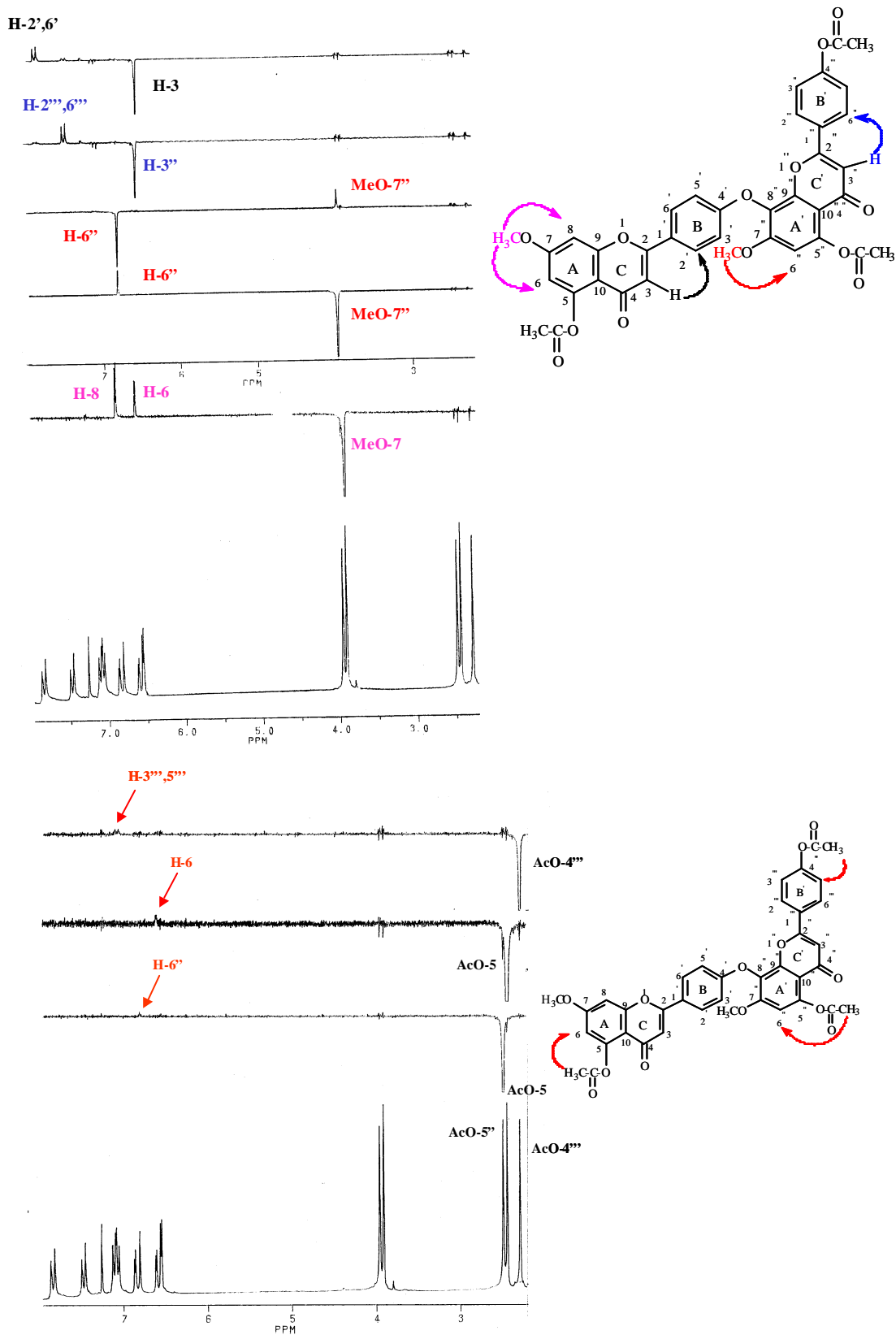


Figura I.4.25. Espectro de NOE (200MHz, CDCl_3) do biflavonóide 4 (7,7'-*O*-dimetil-5,5'',4''-triacetillanaroflavona).

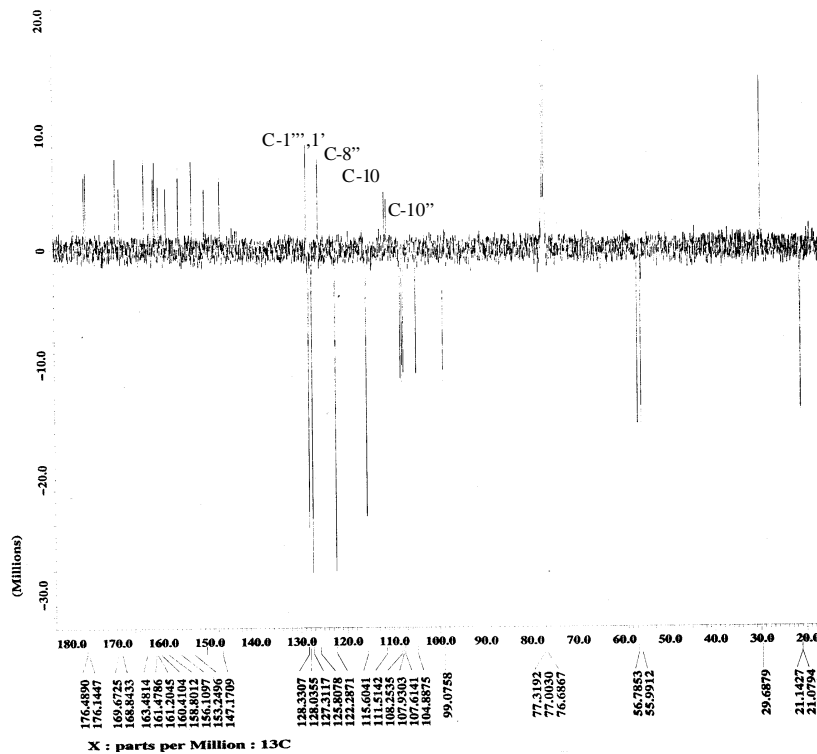
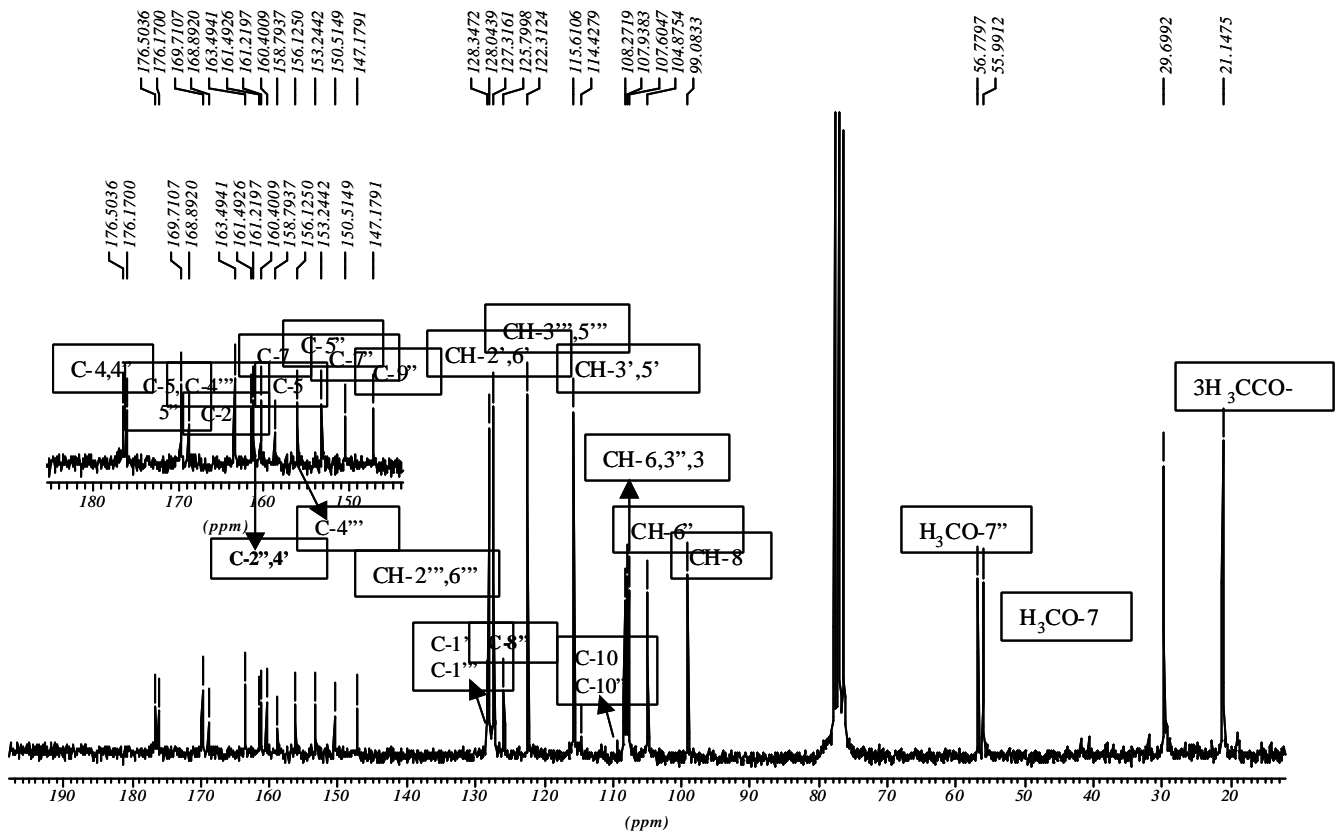


Figura I.4.26. Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz) e APT (100MHz) em CDCl_3 do biflavonóide **4** (7,7''-O-dimetil-5,5'',4''-triacetillanaroflavona).

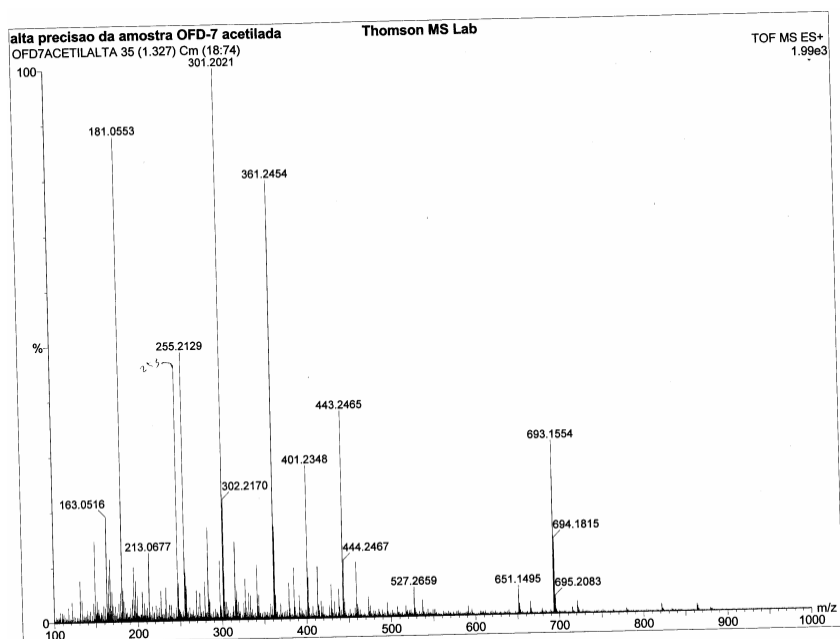
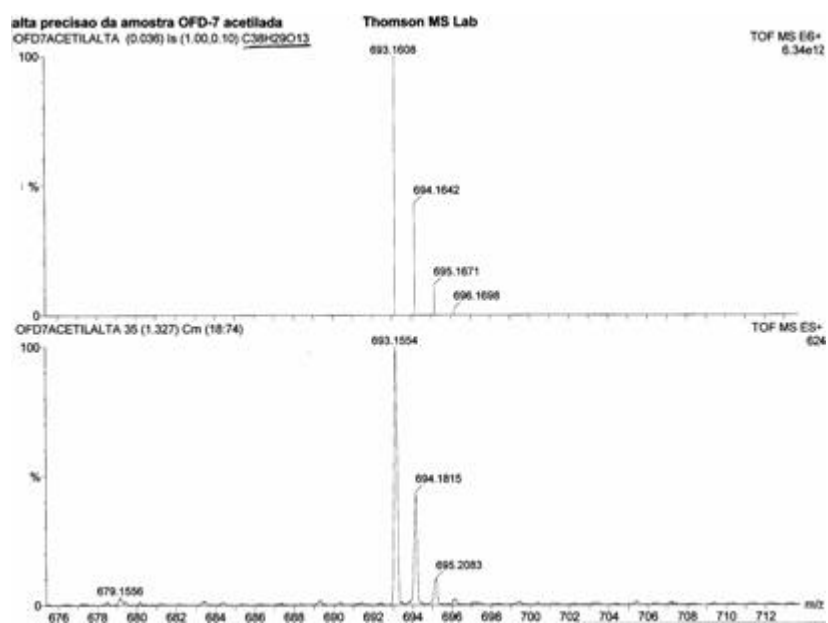


Figura I.4.27. Espectro de massas de alta resolução do biflavonóide **4**, obtido com Ionização *elétron spray* (IES) e detecção de íons positivos.

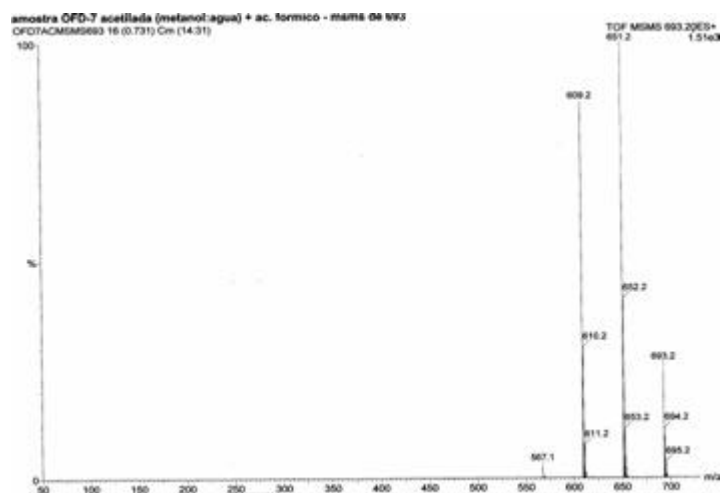


Figura I.4.28a. Espectro de massas de baixa resolução MS/MS do pico m/z 693 (**2a**) do biflavonóide **4**, obtido com Ionização *elétron spray* (IES) e detecção de íons positivos.

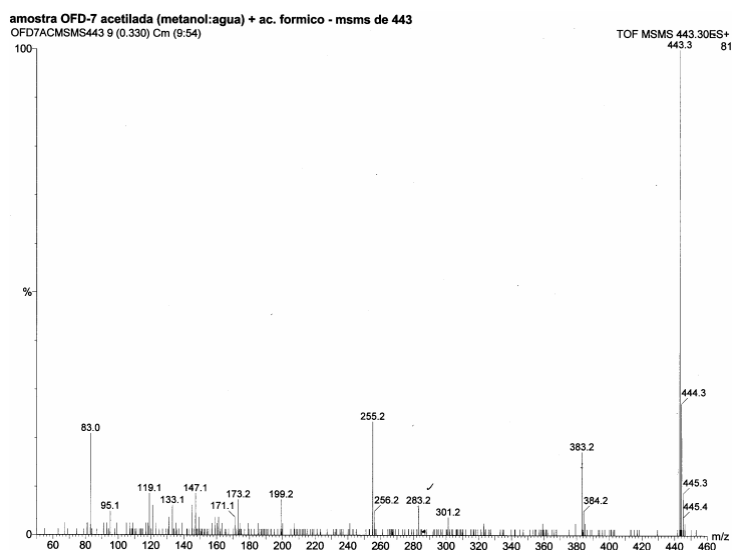


Figura I.4.28b. Espectro de massas de baixa resolução MS/MS do pico m/z 443 (**2b**) do biflavonóide **4**, obtido com Ionização *elétron spray* (IES) e detecção de íons positivos.

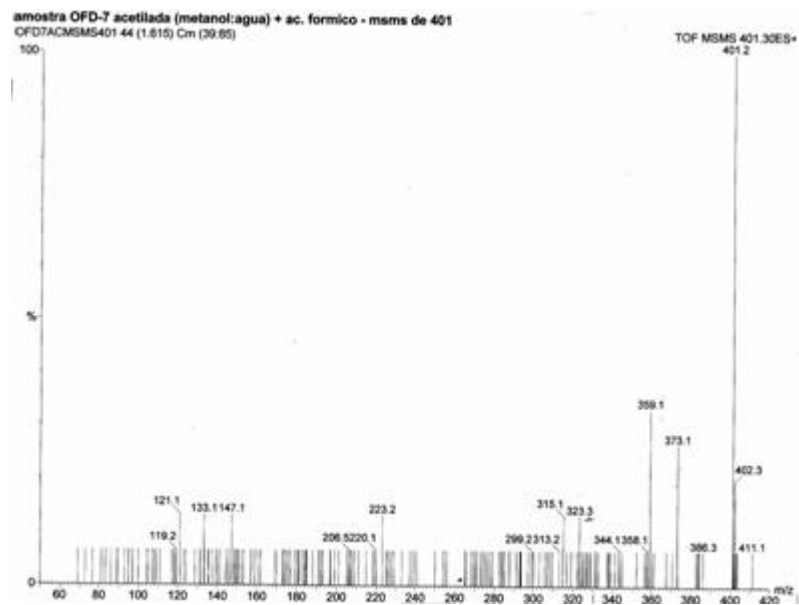


Figura I.4.28c. Espectro de massas de baixa resolução MS/MS do pico m/z 401 (**2c**) do biflavonóide **4**, obtido com Ionização *elétron spray* (IES) e detecção de íons positivos.

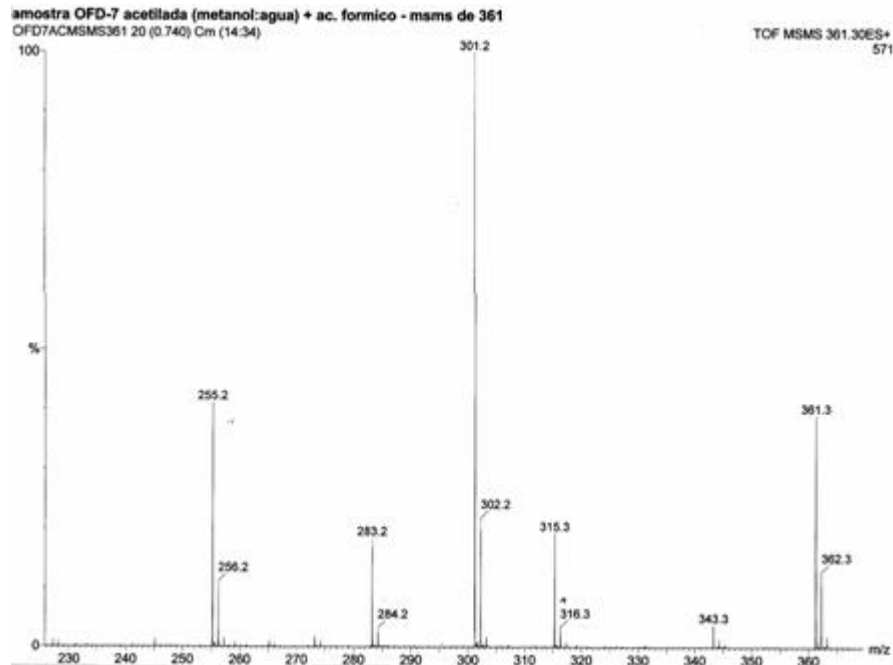


Figura I.4.28d. Espectro de massas de baixa resolução MS/MS do pico m/z 361 (**2d**) do biflavonóide **4**, obtido com Ionização *elétron spray* (IES) e detecção de íons positivos.

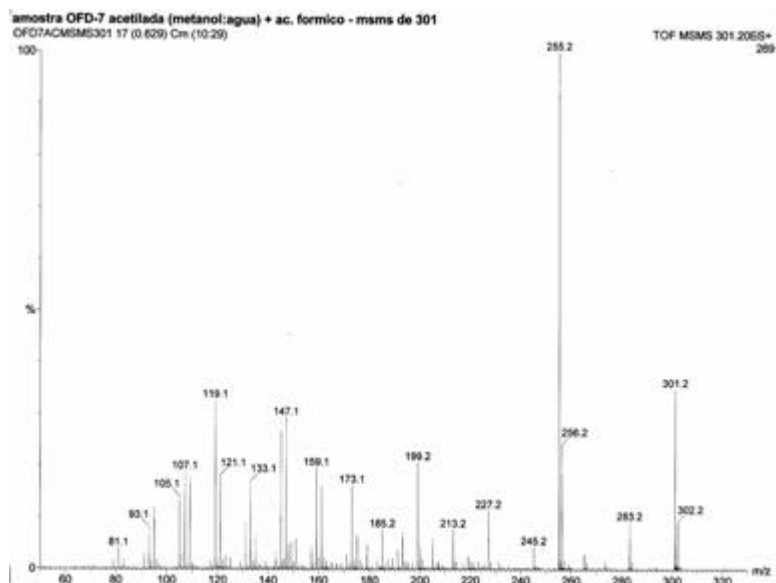
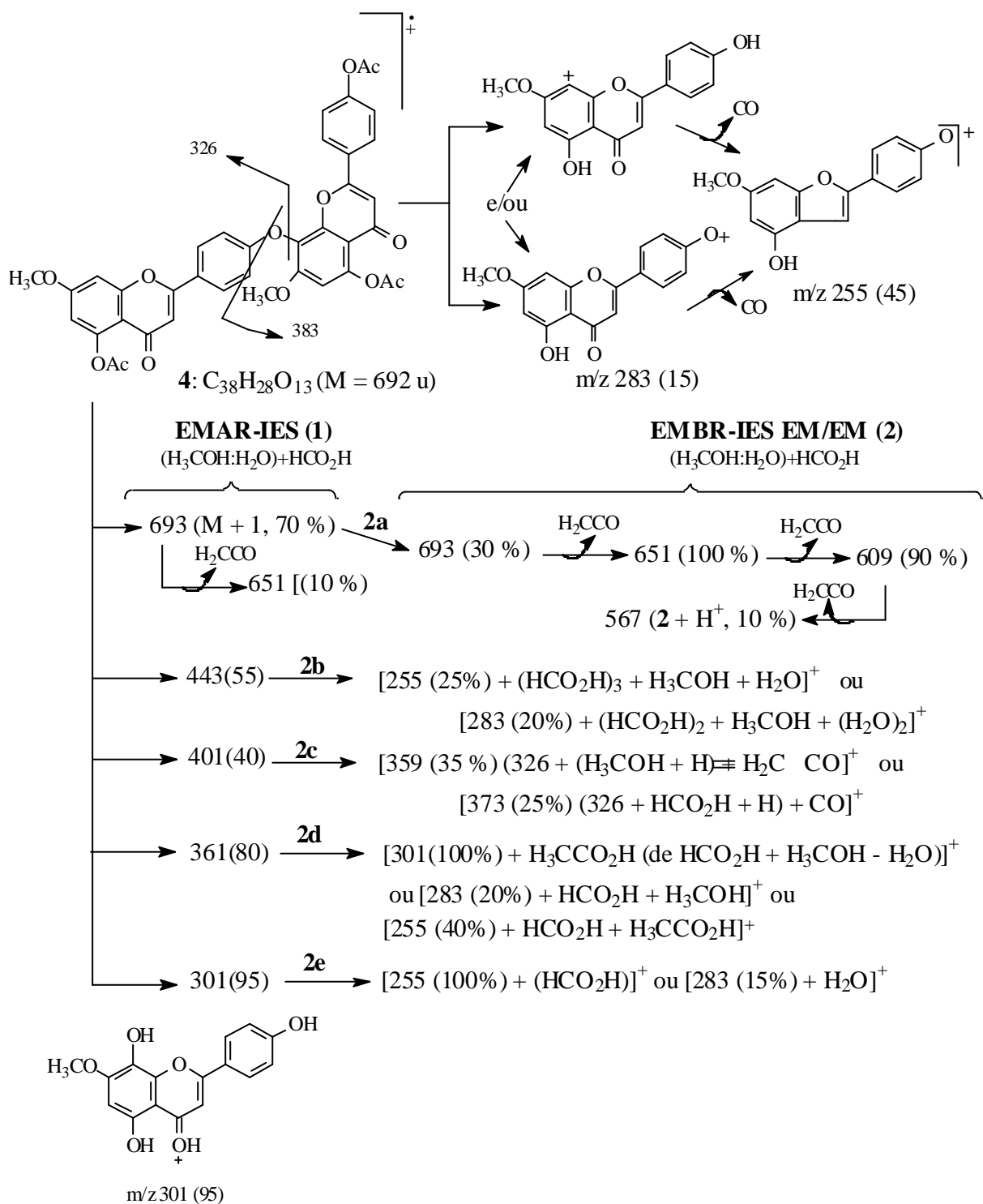


Figura I.4.28e. Espectro de massas de baixa resolução MS/MS do pico m/z 301 (**2e**) do biflavonóide **4**, obtido com Ionização *eléttron spray* (IES) e detecção de íons positivos.



Esquema I.4.2. Mecanismo de fragmentação proposto para justificar os picos no espectro de massas de alta resolução com detector de íons positivos [EMAR-IES (1)] e baixa resolução [EMBR-IES MS/MS 2 (2a-2e)] do biflavonóide 4.

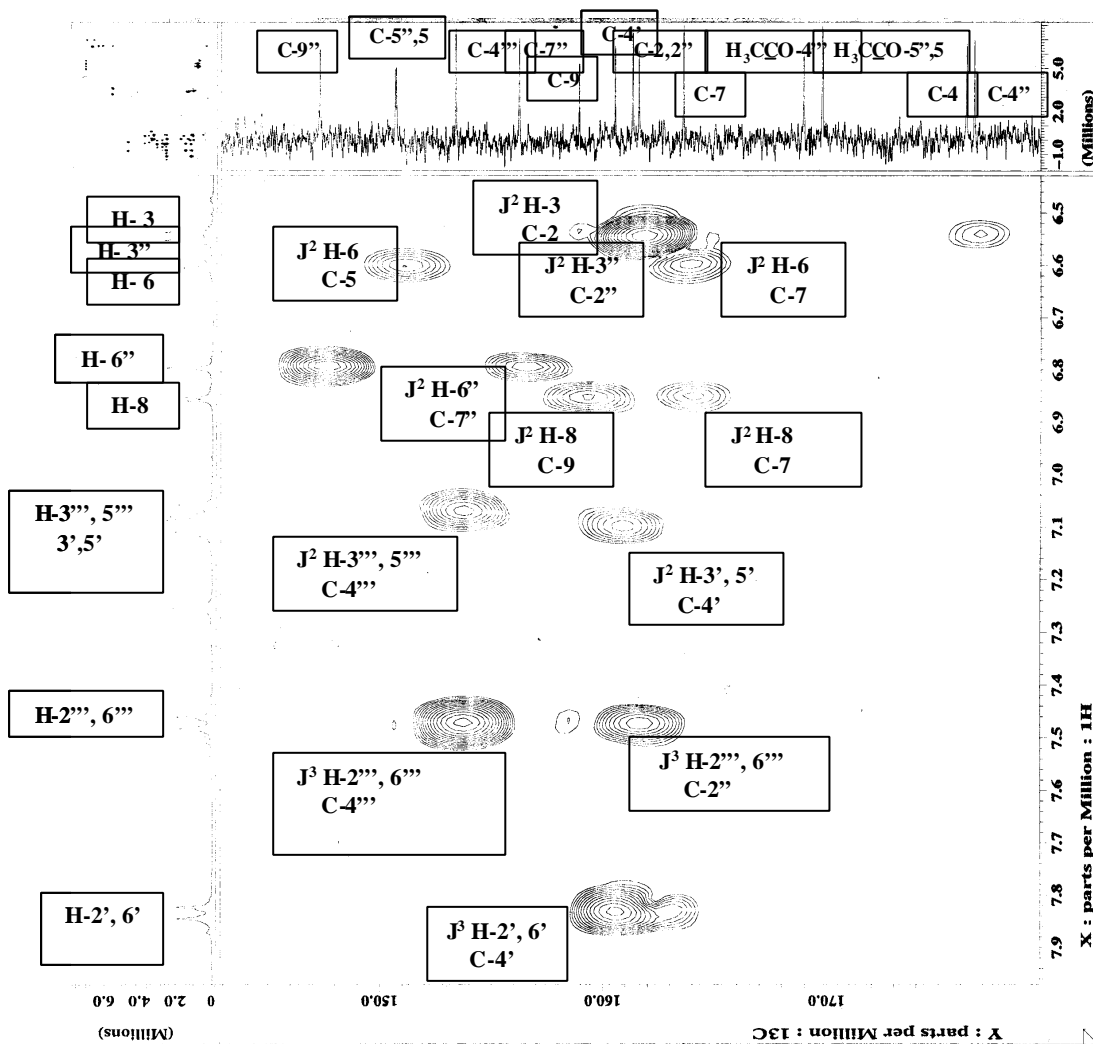
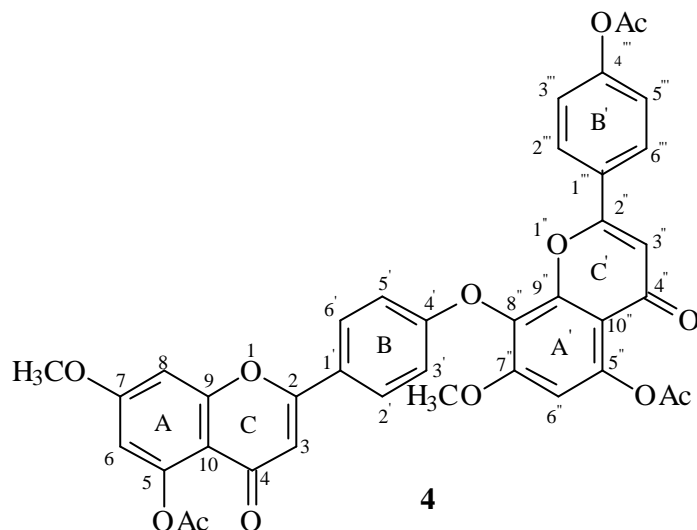


Figura I.4.29. Espectro HMBC (400 MHz, CDCl_3) ampliado na região de 145-180 ppm de **4** (7,7'-O-dimetil-5,5'',4'''-triacetillanaroflavona). 64

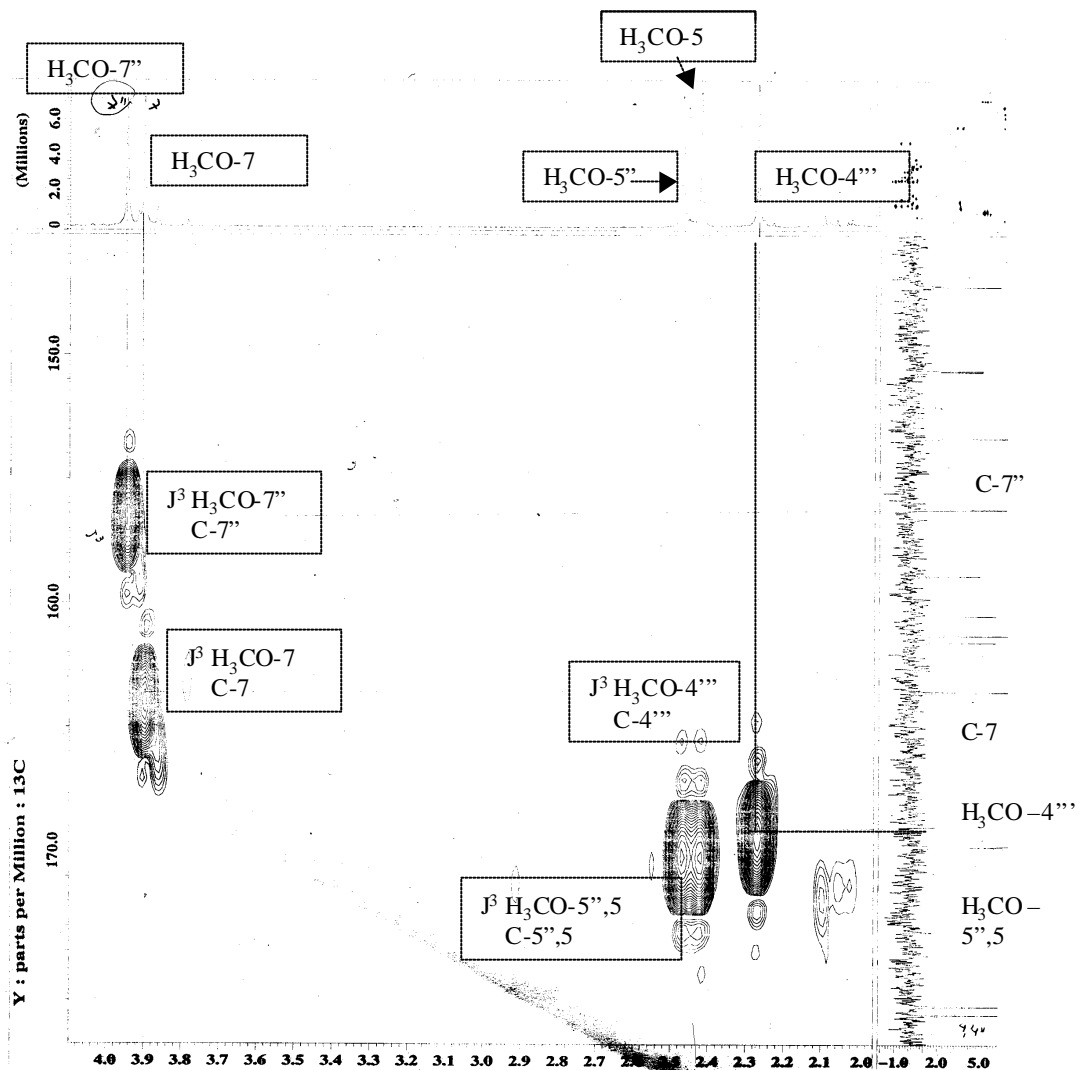


Figura I.4.30. Espectro HMBC (400 MHz, CDCl₃) ampliado na região de 145-180 ppm de 4(7,7'-O-dimetil-5,5'',4'''-triacetilflavona).

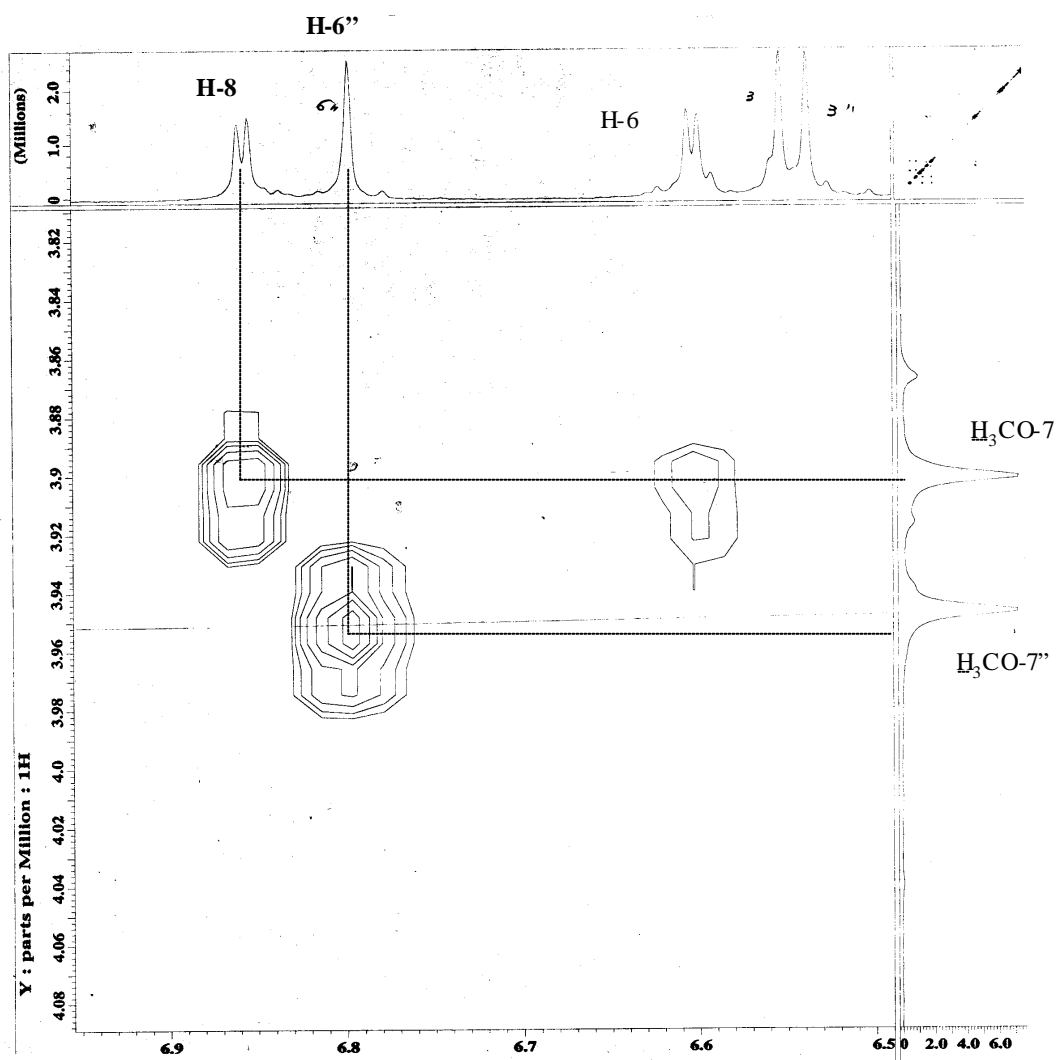
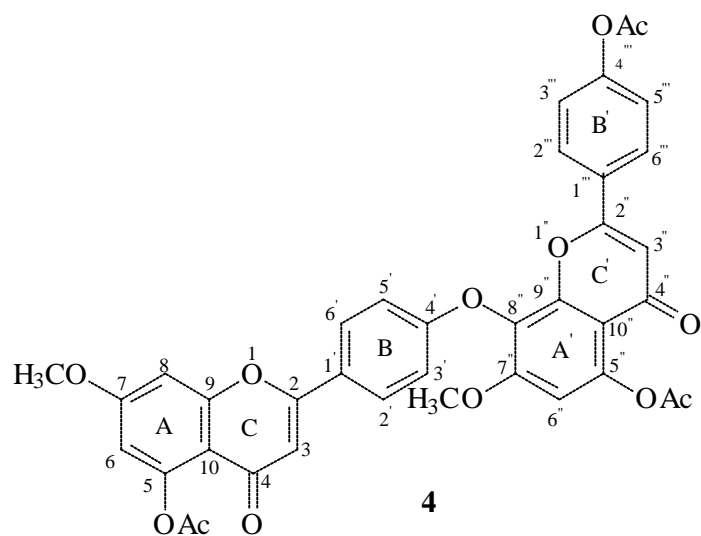


Figura I.4.31. Espectro de NOESY (400 MHz, CDCl_3) de **4** (7,7'-*O*-dimetil-5, 5'',4''-triacetillanaroflavona).

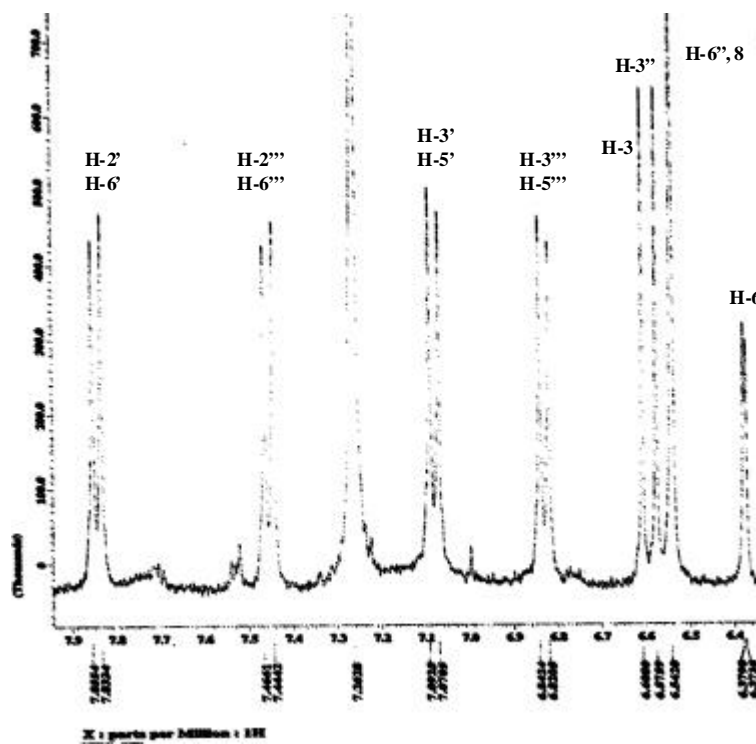
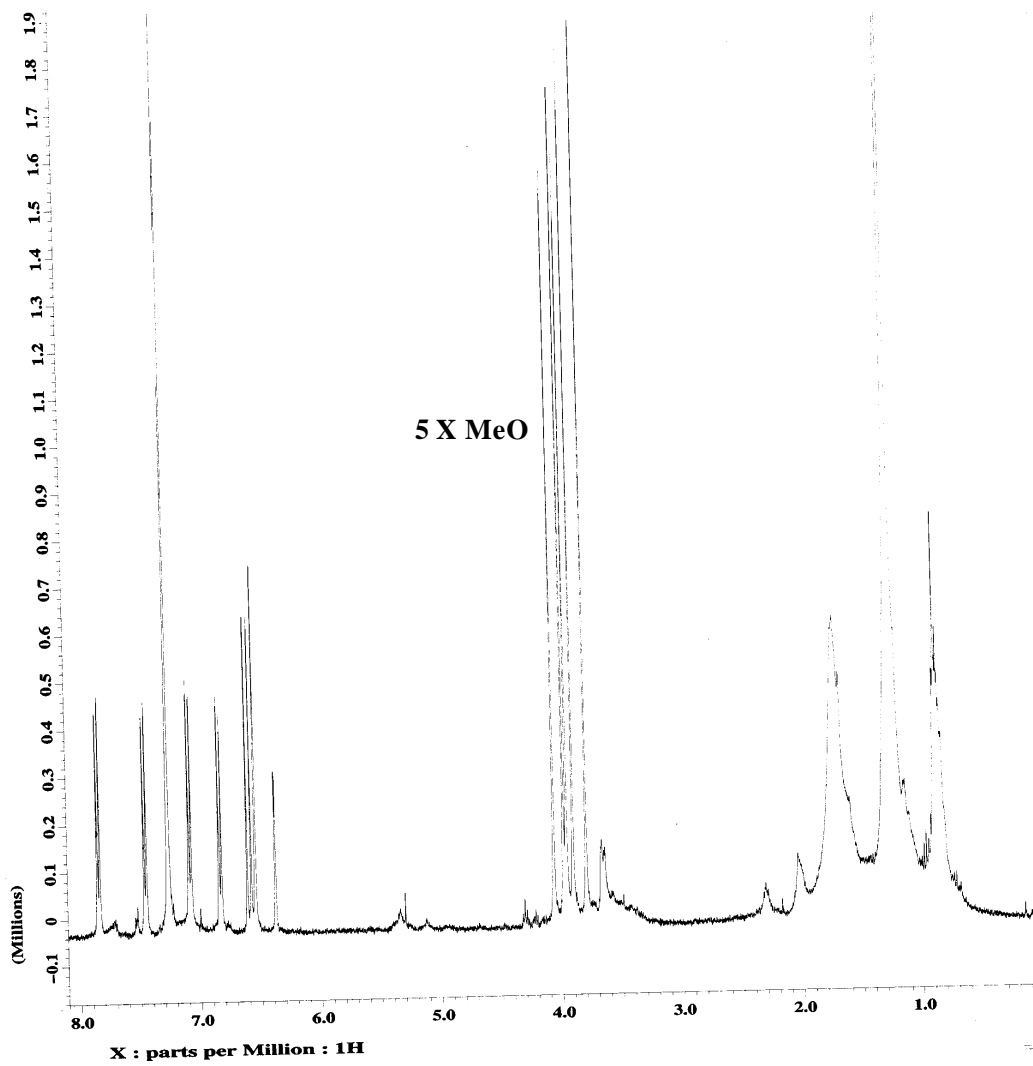


Figura I.4.32. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do biflavonóide 3 (lanaroflavona permetilada).

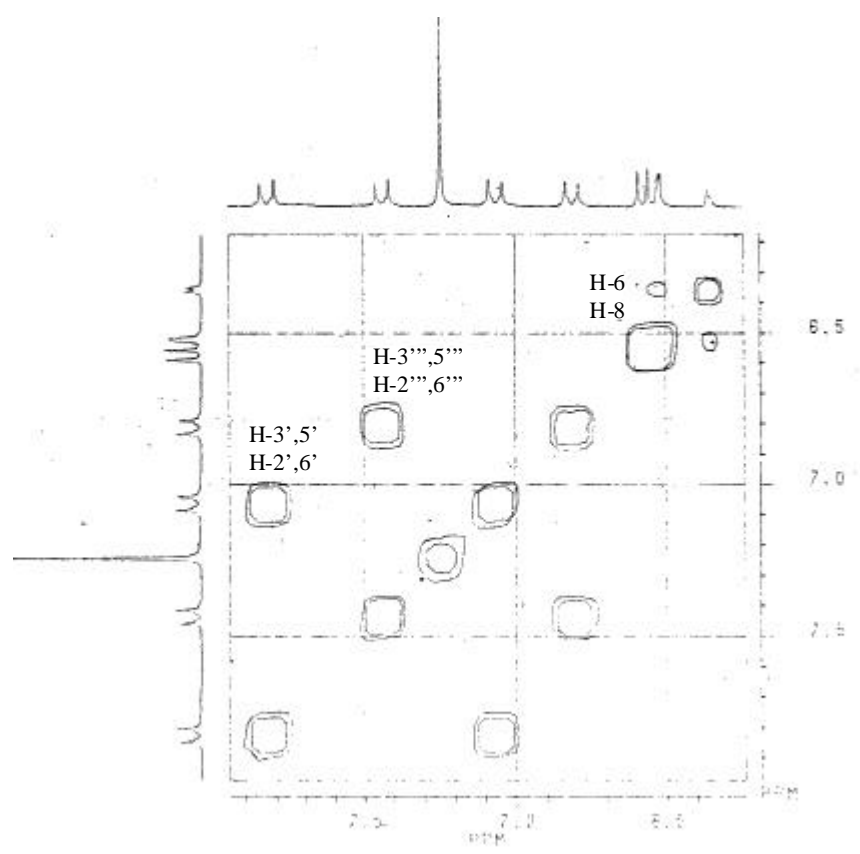
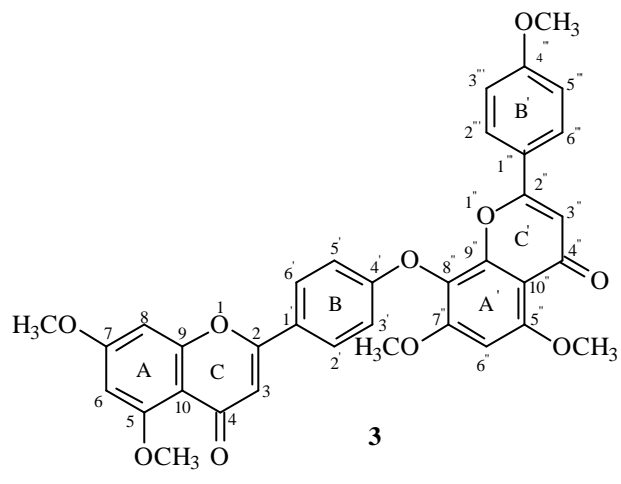


Figura I.4.33. Espectro de ^1H - ^1H -COSY ampliado (200 MHz, CDCl_3) do biflavonóide **3** (lanaroflavona permetilada).

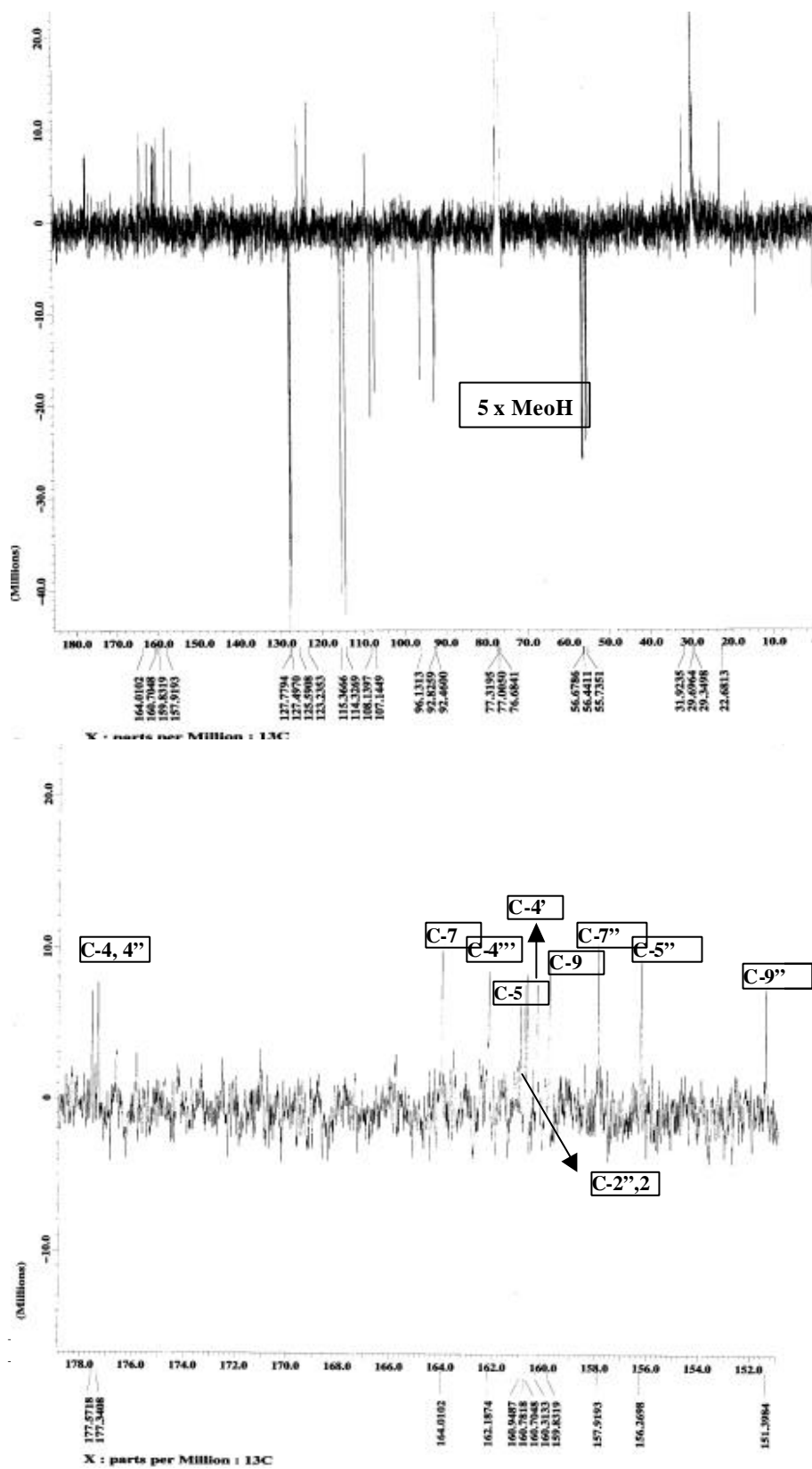


Figura I.4.34. Espectro de RMN ^{13}C e APT (100 MHz, CDCl_3) do biflavonóide 3 (lanaroflavona permetilada).

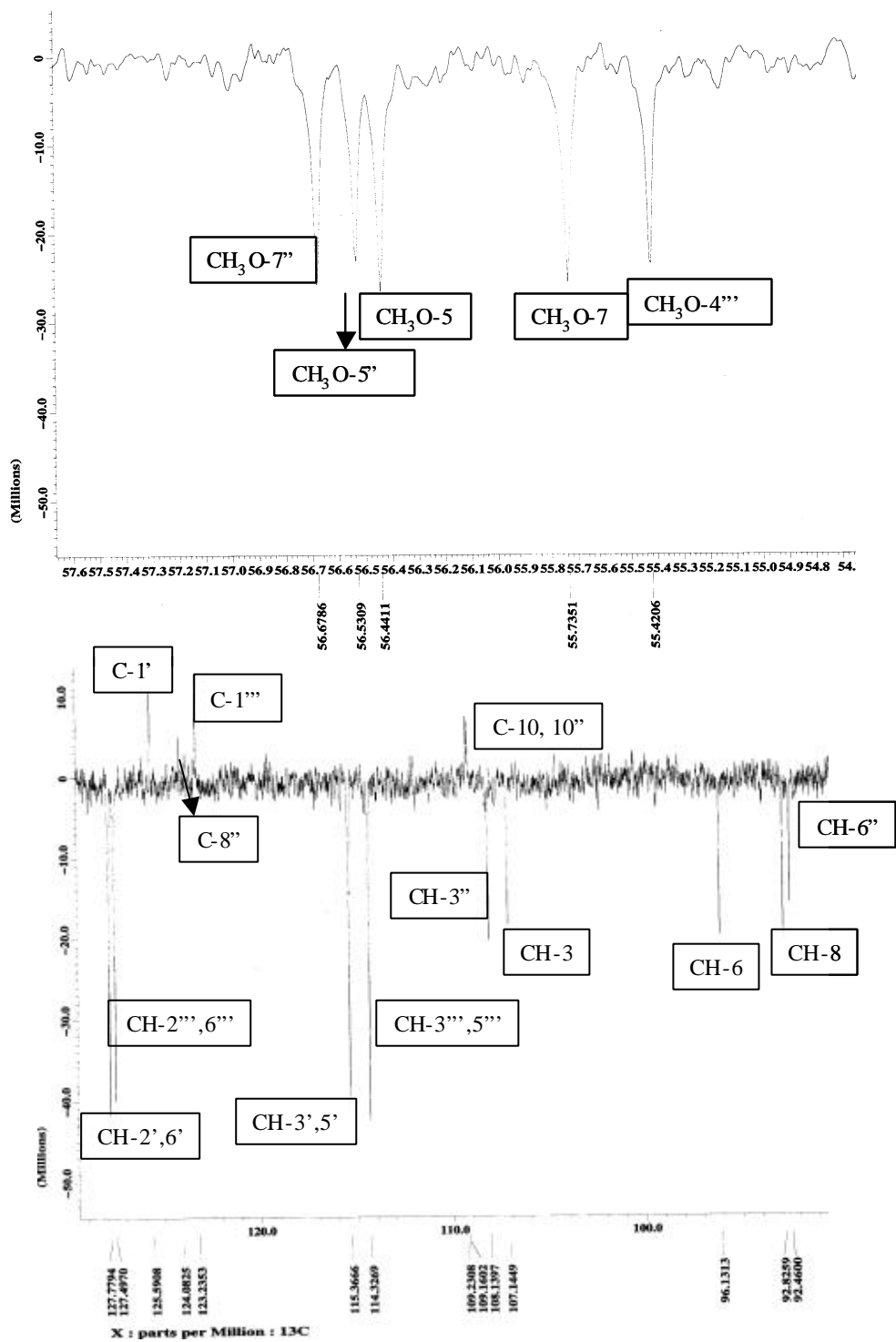


Figura I.4.35. Espectro de APT (100 MHz, CDC₃) do biflavonóide 3 (lanaroflavona permetilada).

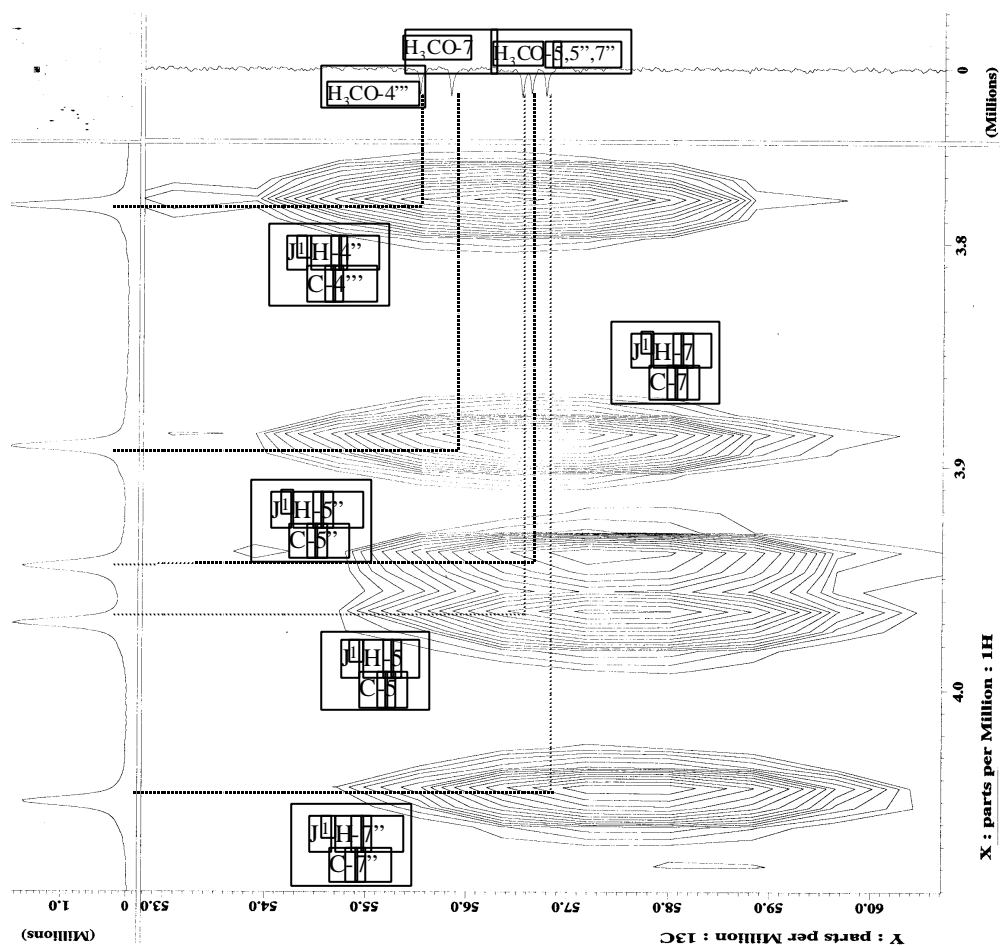
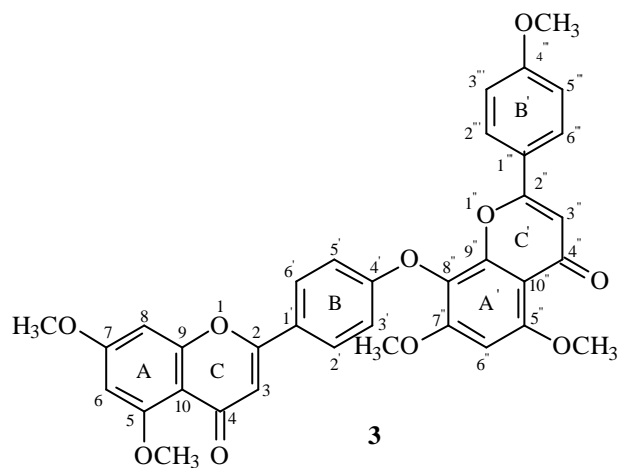


Figura I.4.36. Espectro de RMN-2D HMQC (400 MHz, CDCl_3) ampliado na região de 55-60 ppm de **3** (lanaraflavona permetilada).

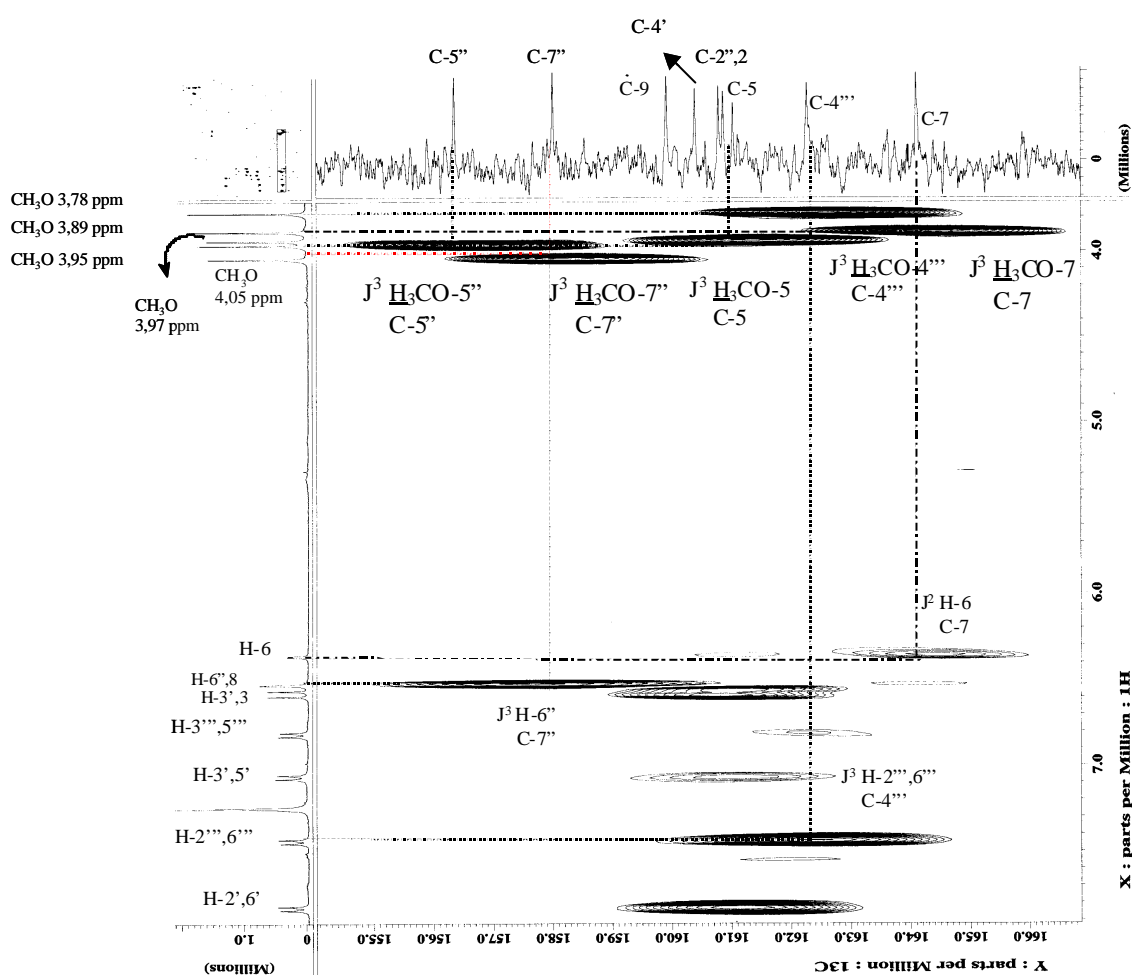
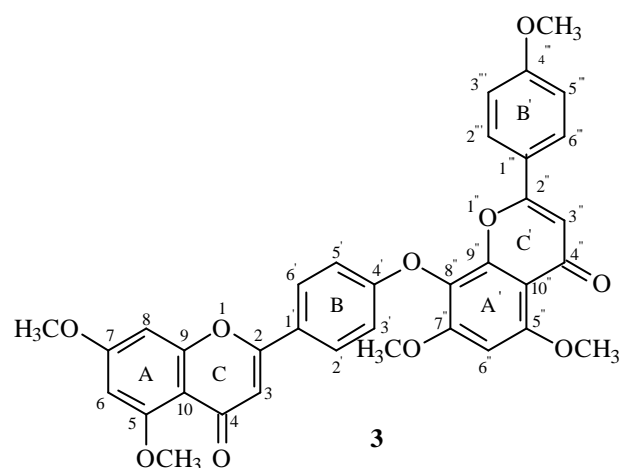


Figura I.4.37. Espectro de RMN-2D HMBC (400 MHz, CDCl_3) ampliado na região de 155-166 ppm de **3** (lanaraflavona permetilada).

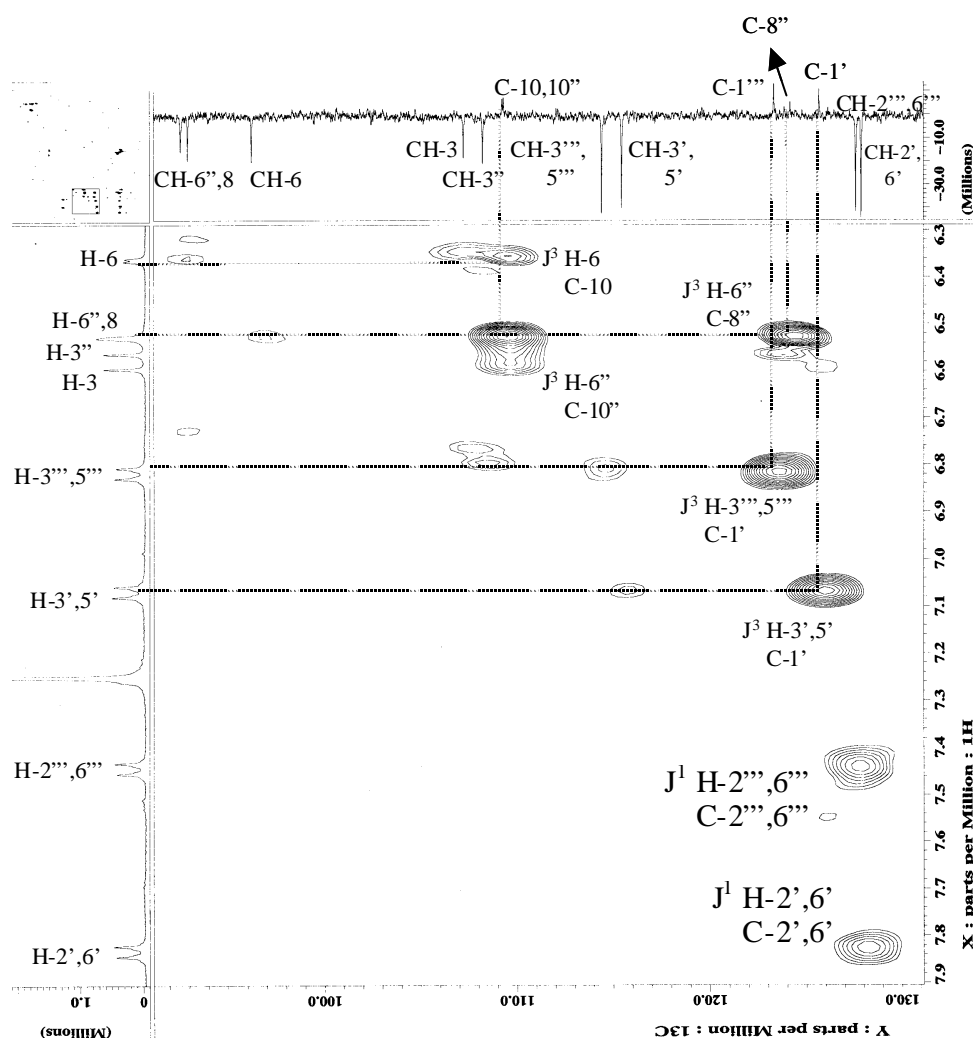


Figura I.4.38. Espectro de RMN-2D HMBC (400 MHz, CDCl_3) ampliado na região de 90-130 ppm de **3** (lanaraflovona permetilada).

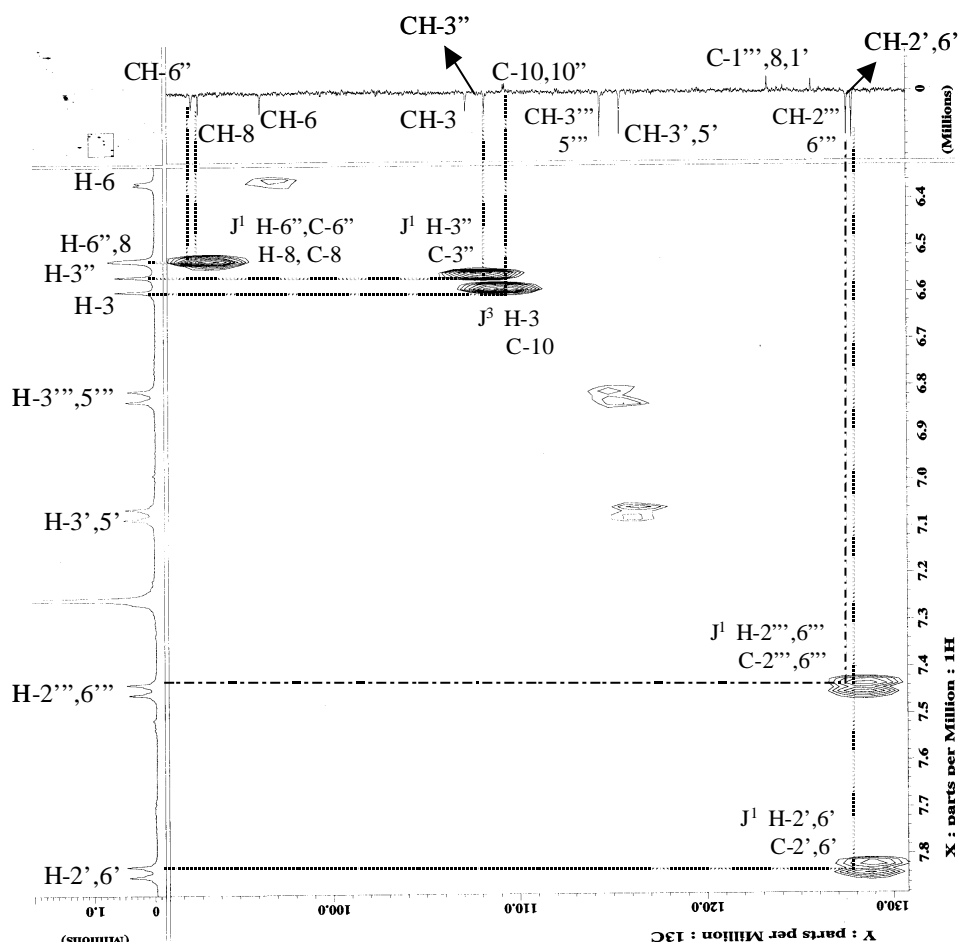
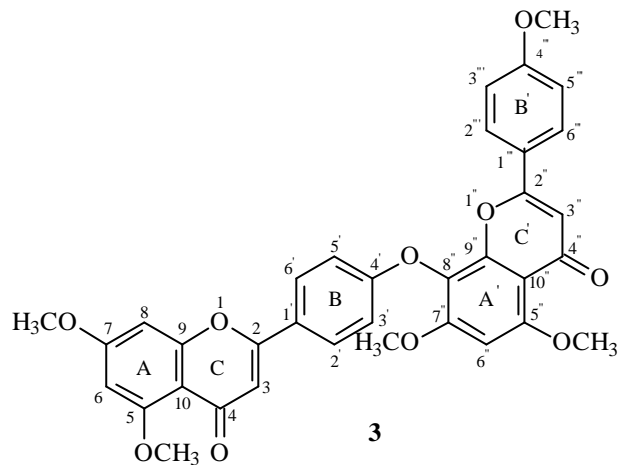


Figura I.4.39. Espectro de RMN-2D HMBC (400 MHz, CDCl_3) ampliado na região de 90-130 ppm **3** (lanaraflavona permetilada).

d) 7''-O-metilagatisflavona (Substância 5)

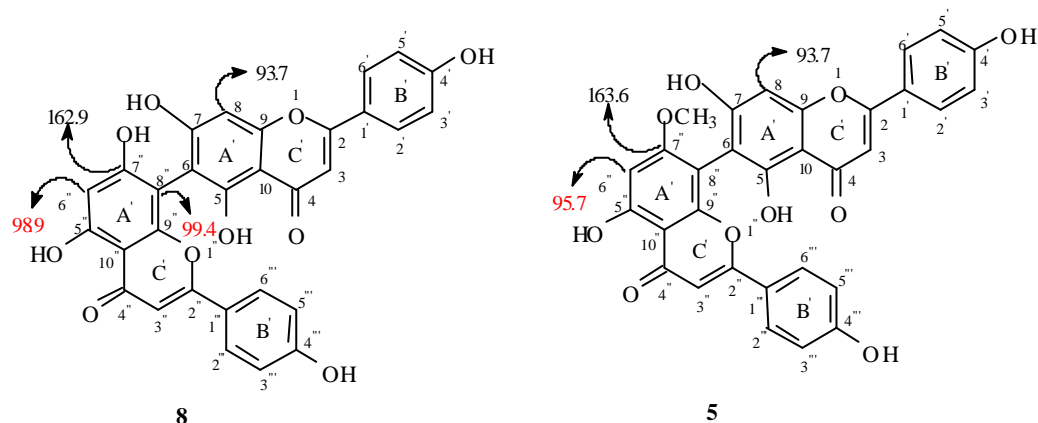
O biflavonóide natural **5** é um derivado da agatisflavona **8** (I-6-C-II-8''), com a presença de um grupamento metoxila na posição C-7'.

O espectro no IV da substância **5** (Figura I.4.40, pág 78) revela bandas de absorção para grupo hidroxila (3174 cm^{-1} , estiramento O-H), grupamentos C=O (1649 cm^{-1}) de carbonila conjugada e C=C (1600 cm^{-1} , 1504 cm^{-1} , 1444 cm^{-1}) de anel aromático. Os espectros de RMN ^1H (1D e 2D) (Figuras I.4.41, I.4.42, pág 79-80) mostram sinais de átomos de hidrogênios atribuídos a dois sistemas AA'BB' dos anéis C e C'' d_{H} 7,94 (2H, $J= 8,54\text{ Hz}$), 7,65 (2H, $J= 8,56\text{ Hz}$), 7,04 (2H, $J= 8,54\text{ Hz}$) e 6,84 (2H, $J= 8,56\text{ Hz}$), quatro singletos atribuídos a H-3, 8, 3'' e 6'' com d_{H} 6,70, 6,77, 6,65 e 6,56, respectivamente (com integração de 1 H) e uma metoxila (d_{H} 3,88, s , com integração para 1 MeO, 3H). Os sinais em d_{H} 9,15 para hidroxila livre e d_{H} 13,26 e 13,42 para os dois grupos hidroxilas em ligação de hidrogênio com carbonila. O espectro de $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY com sinais de interação de acoplamento entre H-2', 6' (d_{H} 7,94) com H-3', 5' (d_{H} 7,04) e H-2'', 6'' (d_{H} 7,65) com H-3'', 5'' (d_{H} 6,84).

O espectro de RMN ^{13}C (BBD e DEPT, Figura I.4.43, pág 81) da substância **5** mostra os valores de deslocamentos dos carbonos metínicos CH-8 (d_{C} 93,8) e CH-6'' (d_{C} 95,7), e para os carbonos quaternários 6 e 8'' d_{C} 103,7 e 100,4 ppm. Os valores dos deslocamentos químicos indicam que os carbonos 6 e 8'' estão envolvidos na ligação interflavonoídica, a comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos de **5** (Tabela I.4.6, pág 77) com agatisflavona (CHARI *et al.*, 1977; AGRAWAL, 1989) e 7''-O-metilagatisflavona (MOREIRA, *et al.*, 1999) confirmam a proposta estrutural de **5**.

O grupo metoxila poderia estar localizado em outra posição sem causar alteração significativa nos espectros e, assim não garante a identificação entre **5** e 7''-O-metilagatisflavona registrado na literatura. Fez-se experimentos de NOEDIFF (Figura I.4.44, pág. 82) para garantir a posição da metoxila.

O espectro de NOE obtido com irradiação dupla e subtração de espectro permitiu



garantir as vizinhanças entre os núcleos substituintes. Observaram-se NOE em sinais que não foram identificados anteriormente (MOREIRA, *et al.*, 1999). A figura I.4.44, pág. 82 mostra que irradiação na frequência da metoxila (d_{H} 3,88, s) gerou NOE (11%) no sinal de H-6'' (d_{H} 6,56). Irradiação na frequência de absorção de H-6'' (d_{H} 6,56) gerou NOE (15%) no sinal de MeO-7'' (d_{H} 3,88, s) e no sinal de HO-5'' (d_{H} 13,26, s). Esses dados asseguram que a metoxila está próxima do singlete em d_{H} 6,56 e este vizinho do hidrogênio em ligação de hidrogênio d_{H}

13,26. A confirmação dos deslocamentos químicos dos singletos 3, 3'', 8 e dos dubletos 2',6' e 2'', 6'' foi feita através dos dados revelados no espectro de NOE com irradiações nos sinais simples (Figura I.4.44, pág. 82; Tabela I.4.5). A ausência de NOE quando irradiou-se na frequência do singlete H-8 (d_H 6,77) comprovou que não se encontra próximo a metoxila. A Tabela I.4.6 mostra a completa atribuição dos dados de **5** e comparação com os derivados **6** e **7**.

Tabela I.4.5. Dados espectrais de ¹H{¹H}-NOE diferencial de **5** (7''-*O*-metilagatisflavona) em Acetona-D₆.

Irradiação		NOE
¹ H	δ _H	H; δ _H { % }
MeO-7''	3,88	6'';6,56 {11,0}
6''	6,56	MeO-7'';3,88 {15,0} HO-5'';13,26 {2,0}
3''	6,65	2''',6''';7,65 {27,0}
3	6,70	2',6';7,94 {24,0}
8	6,77	-

O biflavonóide 7''-*O*-metilagatisflavona **5** já foi isolado no estudo anterior de *O. hexasperma* coletada no cerrado da Amazônia (MOREIRA, *et al.*, 1999). Este trabalho confirma a abundância desta biflavona nessa espécie (0,24% P/p das folhas) e fornece mais material para a preparação do derivado **7** (tetrametil-diacetil agatisflavona) que está sendo registrado pela primeira vez na literatura.

Tabela I.4.6. Dados de RMN¹H (200 MHz, CDCl₃) e ¹³C (50 MHz, CDCl₃) das substâncias **5** (D₃CCOCD₃, ¹H e D₃CSOCD₃, ¹³C), **6** (D₃CCOCD₃, ¹H e MOREIRA *et al.*, 1999, ¹³C) e **7** (CDCl₃).

5			6		7	
C	δC	δ _H (mult, Hz)	δC (MOREIRA <i>et al.</i> , 1999)	δ _H (mult, Hz)	δC	δ _H (mult, Hz)
2	164,07	-	163,96	-	162,30	-
4	182,57	-	182,85	-	176,50	-
5	159,77	-	159,41	-	155,71	-
6	103,19	-	105,50	-	111,22	-
7	161,77	-	163,54	-	161,80	-
9	157,04	-	157,78	-	158,80	-
10	103,70	-	104,41	-	111,20	-
1	121,53	-	123,27	-	123,70	-
4	161,47	-	162,63	-	162,22	-
2	164,22	-	163,96	-	161,31	-
4	182,11	-	182,40	-	176,91	-
5	162,80	-	162,33	-	150,90	-
7	163,59	-	163,36	-	161,01	-
8	100,49	-	98,08	-	107,10	-
9	154,16	-	154,47	-	158,80	-
10	104,40	-	105,17	-	110,90	-
1	121,53	-	123,57	-	123,71	-
4	161,47	-	162,33	-	162,20	-
H ₃ CCO-5	-	-	-	-	168,70	-
H ₃ CCO-5' CH	-	-	-	-	169,61	-
3	103,22	6,70 (s)	104,42	6,81 (s)	107,40	6,60 (s)
8	93,76	6,77 (s)	89,96	6,99 (s)	97,01	7,01 (s)
2,6	129,04	7,94 (d, 8,54)	127,98	8,11 (d, 8,54)	127,82	7,89 (d, 8,8)
3,5	116,26	7,04 (d, 8,54)	114,49	7,16 (d, 8,5)	114,51	7,05 (d, 8,8)
3	103,20	6,65 (s)	103,53	6,69 (s)	106,40	6,57 (s)
6	95,70	6,56 (s)	95,47	6,57 (s)	103,70	6,73 (s)
2,6	128,48	7,65 (d, 8,56)	127,73	7,69 (d, 8,5)	127,80	7,44 (d, 8,8)
3,5	116,26	6,84 (d, 8,56)	114,36	6,94 (d, 8,5)	114,50	6,84 (dl, 8,8)
CH ₃ MeO-7	56,67	3,88 (s)	56,25	3,87* (s)	56,30	3,84 (s)
MeO-4'	-	-	55,47	3,92* (s)	56,30	3,91 (s)
MeO-4''	-	-	56,38	3,79* (s)	55,40	3,78 (s)
MeO-7	-	-	56,16	3,87* (s)	55,50	3,81 (s)
HO-4',4'',7	-	9,27(s)	-	-	-	-
HO-5,5''	-	13,42*, 13,26*(s)	-	13,24, 13,27*(s)	-	-
H ₃ CCO-5	-	-	-	-	21,20	2,49 (s)
H ₃ CCO-5'	-	-	-	-	20,90	2,14 (sl)

* Os valores podem ser trocados.

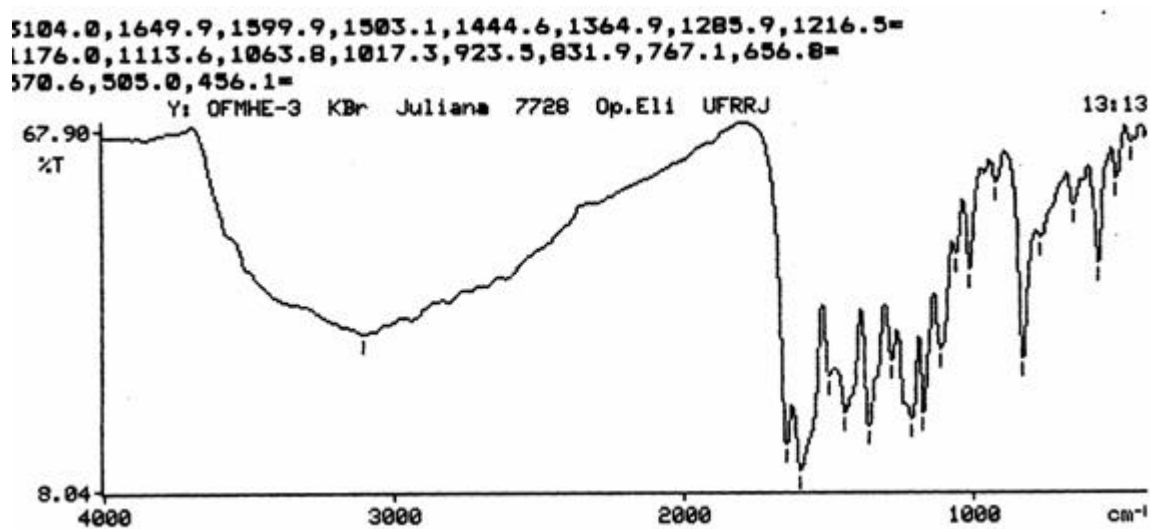
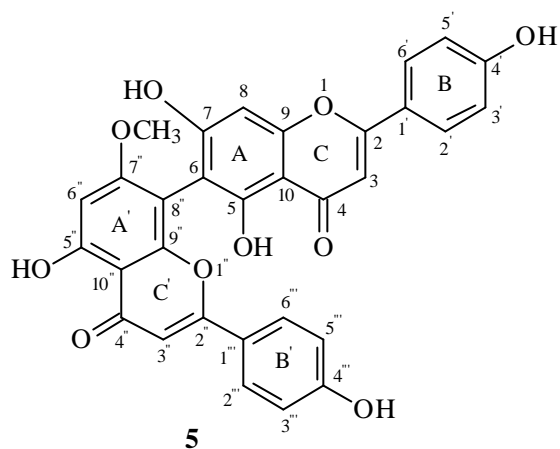


Figura I.4.40. Espectro de IV do biflavonóide 5 (7''-O-metilagatisflavona).

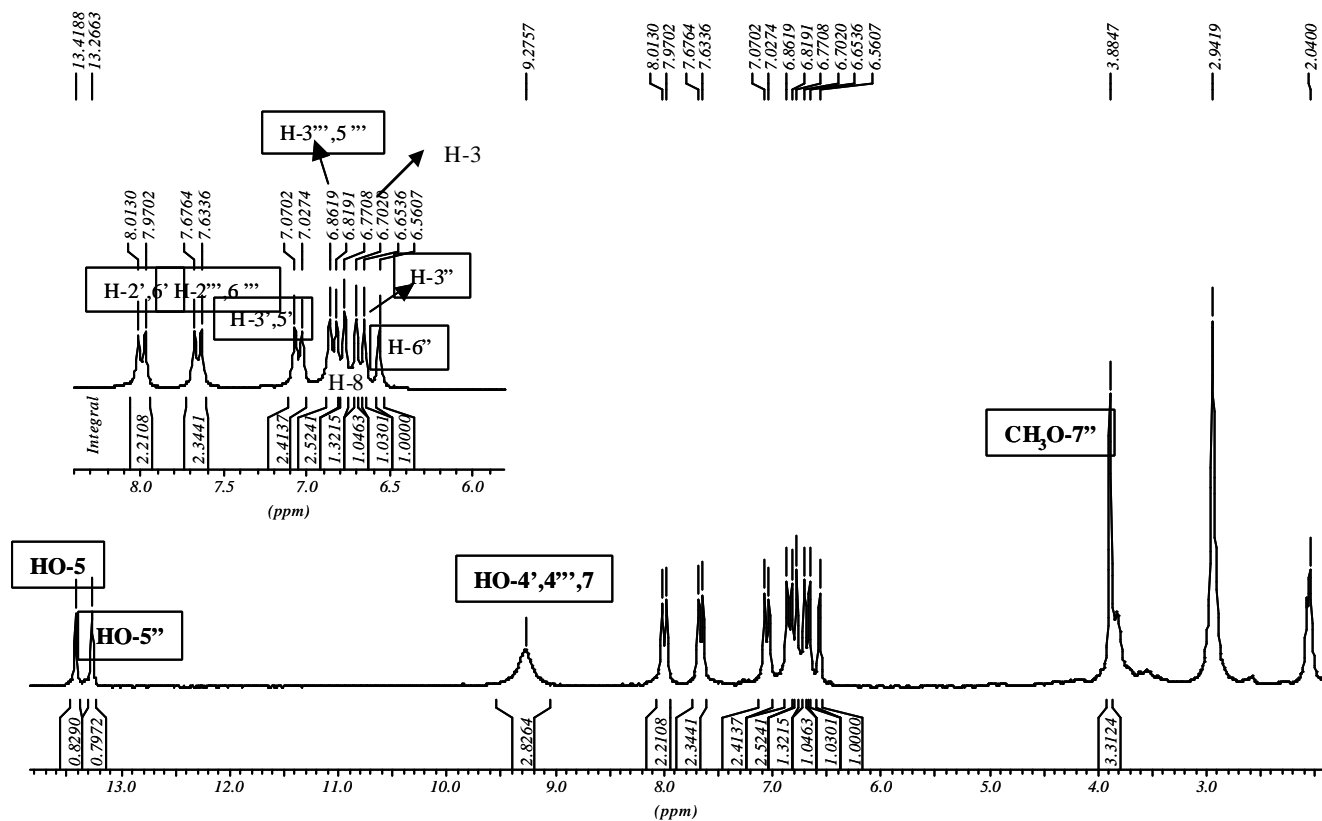


Figura I.4.41. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, D_3CCOCD_3) do biflavonóide **5** (7''-O-metilagatisflavona).

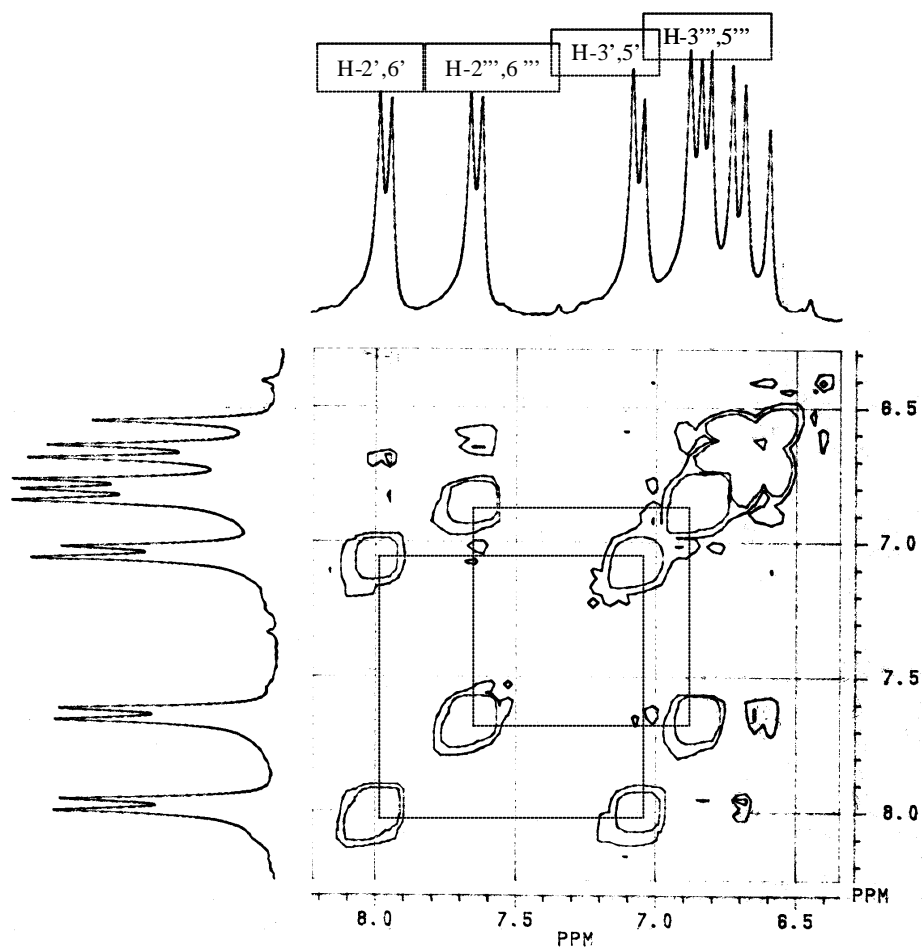
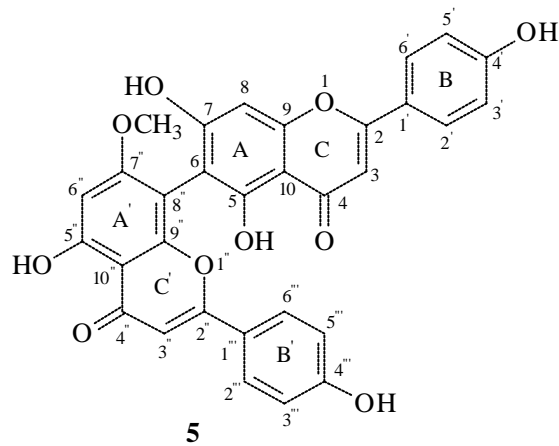


Figura I.4.42. Espectro de ^1H - ^1H -COSY ampliado (200 MHz, D_3CCOCD_3) do biflavonóide **5** (*7''-O*-metilagatisflavona).

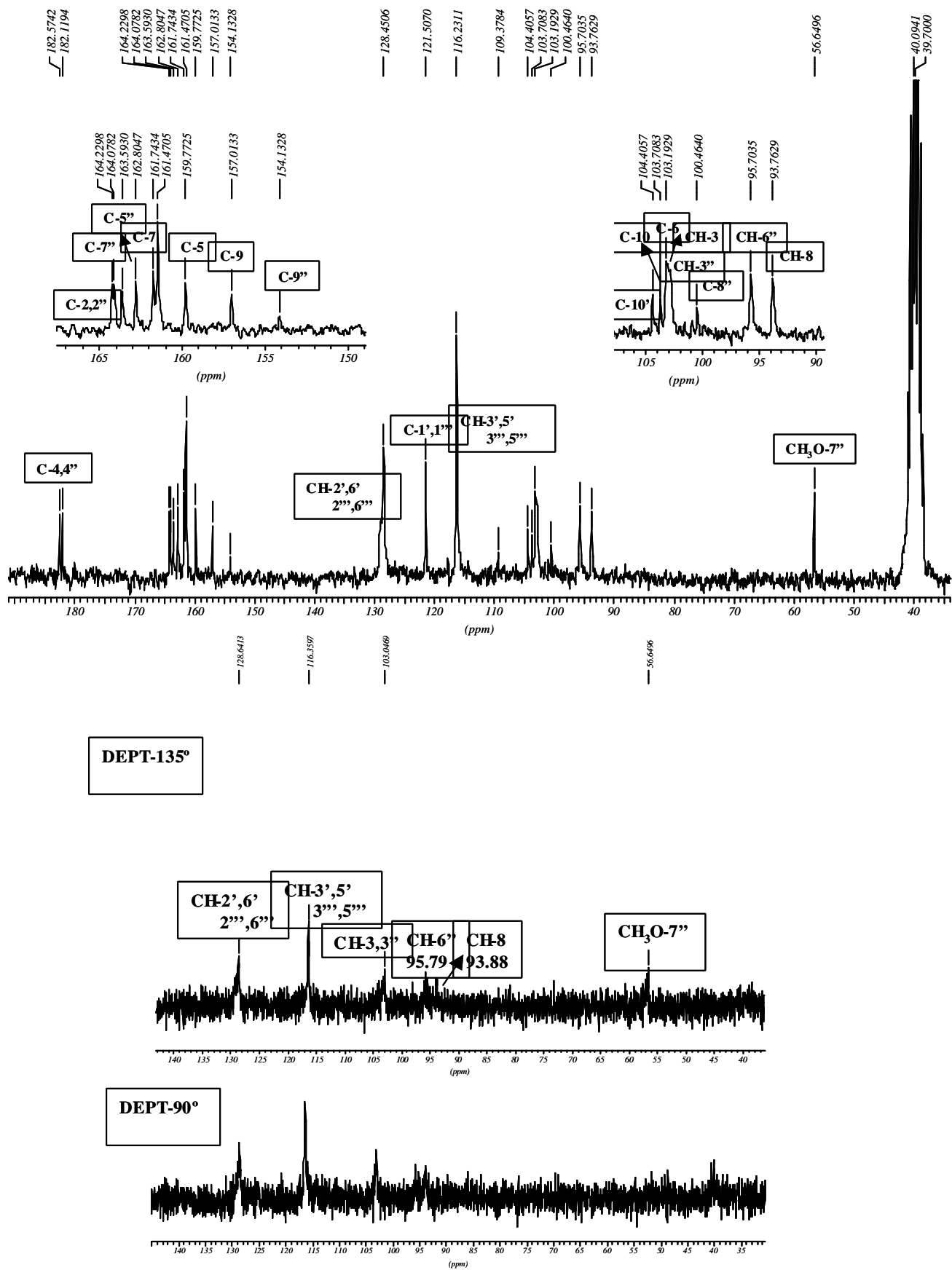


Figura I.4.43. Espectro de RMN ^{13}C e DEPT 90° e 135° (50 MHz, D_3CSOCD_3) do biflavonóide **5** (7''-O-metilagatisflavona).

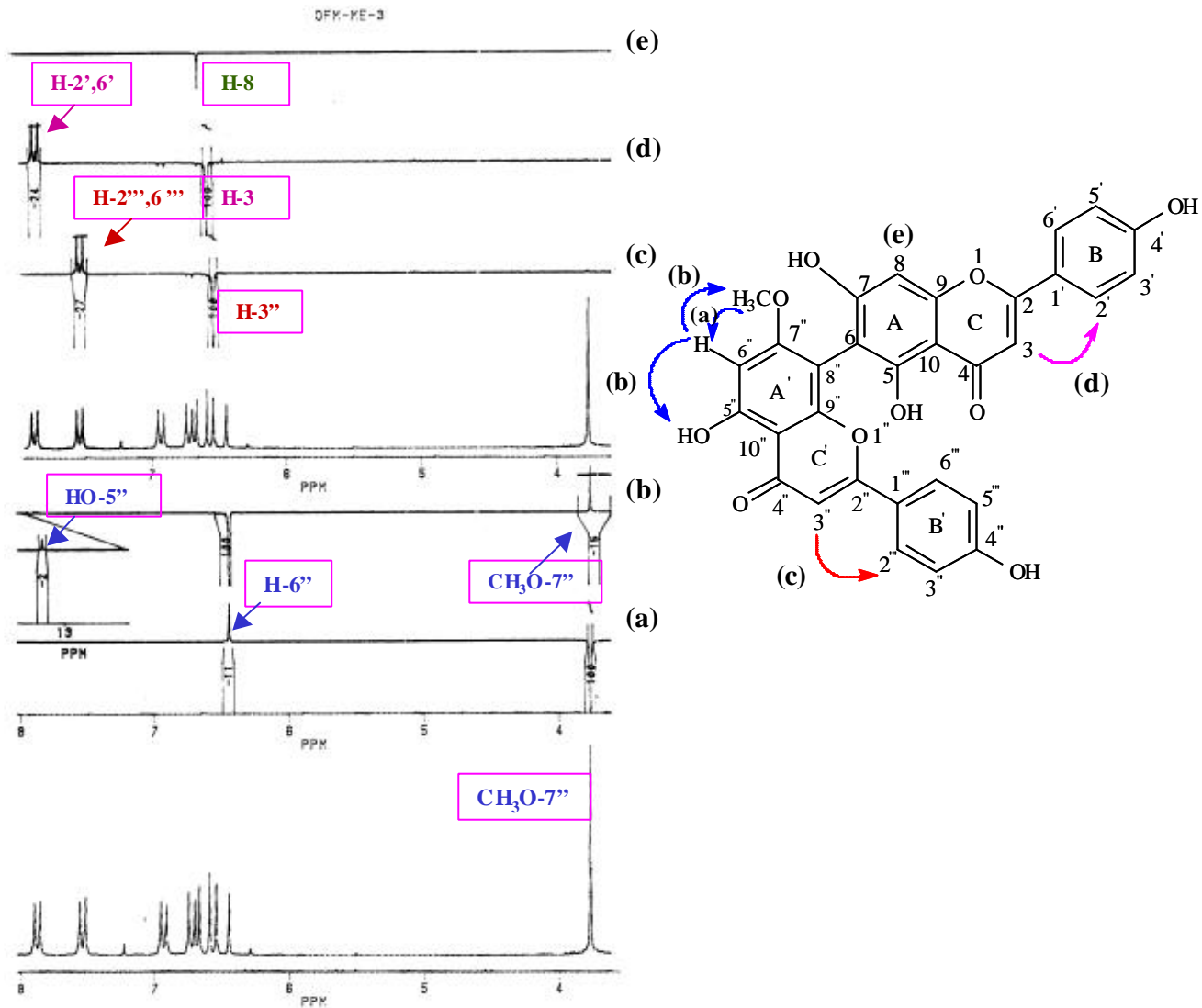


Figura I.4.44. Espectro de NOE (200 MHz, D₃CCOCD₃) do biflavonóide **5** (7''-O-metilagatisflavona).

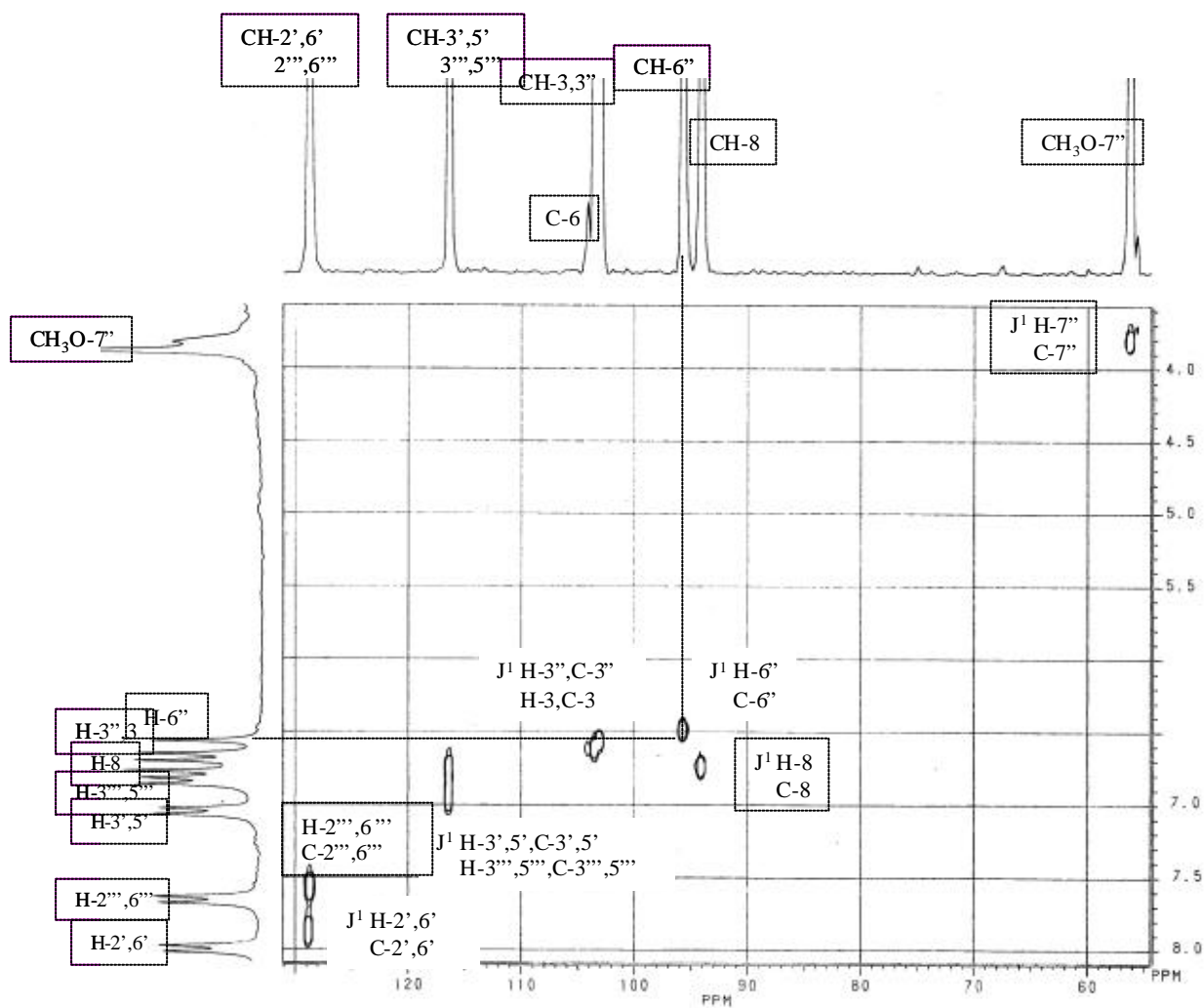


Figura I.45. Espectro de HETCOR ^1H - ^{13}C (200 MHz, D_3CCOCD_3) do biflavonóide 5 (7''-*O*-metilagatisflavona).

e) Tetrametilagatisflavona e tetrametil-diacetil agatisflavona (Derivados 6, 7)

A reação de metilação de 7''-*O*-metilagatisflavona com diazometano forneceu o derivado tetrametilado **6**, através da incorporação de grupos metilas nas posições 7, 4' e 4'''. O ponto de fusão do derivado **6** (PF: 170 °C) e os dados de RMN ¹H foram compatíveis com dados da literatura (MOREIRA, *et al.*, 1999) A mudança significativa no espectro de RMN ¹H de **6**, quando comparada com o biflavonóide natural **5** (7''-*O*-metilagatisflavona), foi o aparecimento de três sinais de metoxilas.

Os espectros de RMN ¹H (1D e 2D ¹H-¹H-COSY) (Figura I.4.46, pág. 88; Figura I.4.47, pág. 89) revelam sinais para os átomos de hidrogênios H-3''',5''' (δ_H 6,94, *d*, *J*=8,5) acoplado com H-2''',6''' (δ_H 7,69, *d*, *J*=8,5) e H-3',5' (δ_H 7,16, *d*, *J*=8,5) acoplado com H-2',6' (δ_H 8,11, *d*, *J*=8,5), correspondentes a dois sistemas AA'BB'. Os hidrogênios H-6'',3'',3 e 8 estão representados pelos sinais simples de δ_H 6,57, δ_H 6,69, δ_H 6,81 e δ_H 6,99, respectivamente. Os sinais das metoxilas 7, 7'', 4' e 4''' aparecem no espectro em δ_H 3,79, 2x 3,87 e 3,92 ppm. Os sinais em 13,24 e 13,27 ppm (2 x OH em ligação de hidrogênio) confirma o fraco caráter ácido destes fenóis. A atribuição dos dados de RMN ¹H e ¹³C (MOREIRA, *et al.*, 1999) desse derivado está relacionado na Tabela I.4.6, pág. 77. Considerando que o tetrametil diacetil agatisflavona não consta na literatura, fez-se o tratamento do derivado **6** com anidrido acético e piridina para a incorporação de acetilas nas duas hidroxilas em ligação de hidrogênio.

O espectro de RMN ¹H (Figura I.4.48, pág. 90) de **7** mostra o desaparecimento dos sinais dos hidrogênios em ligação de hidrogênio em torno de 13 ppm e o aparecimento dos sinais de duas metilas dos grupos acetoxilas em δ_H 2,49 e 2,14. Os valores dos deslocamentos dos hidrogênios 3, 8, 3'' e 6'' em δ_H 6,60, δ_H 7,01, δ_H 6,57 e δ_H 6,73, respectivamente, sofreram alterações devido ao efeito retirador de elétrons das acetoxilas em C-5 e C-5'' e diminuição da proteção que o grupo hidroxila exerce sobre o hidrogênio *orto* H-6'' e para H-8''. Os espectros obtidos com NOESY e ¹Hx¹H COSY (Figura I.4.52, pág. 94; Figura I.4.53, pág. 95) e NOEDIFF (Figura I.4.50, pág. 92; Figura I.4.51, pág. 93) permitiram fazer a completa atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios de **7** (Tabela I.4.7, pág. 85).

O espectro de RMN ¹³C de **7** (Figura I.4.54, pág. 96) foi comparado com o espectro de ¹³C de **6** contido na literatura (MOREIRA *et al.*, 1999), revelando diferença nos deslocamentos dos átomos de carbonos *ipso*, *orto* e *para* ao grupamento acetoxila. Os carbonos *ipso* (5 e 5'') são fortemente protegidos : (δ_C = -3,71 e -11,4, respectivamente) pelo efeito γ exercido pelo átomo de oxigênio carbonílico e pelo grupamento metila do grupo acetoxila. Como esperado, os carbonos *orto* e *para* estão fortemente desprotegidos, pela atenuação da capacidade de blindagem que o átomo de oxigênio da hidroxila exerce sobre esses carbonos. A mudança nos deslocamentos dos carbonos *orto* 6, 10, 6'' e 10'' (δ_C = +5,51, +6,79, +8,23 e +5,73 respectivamente), e os carbonos *para* (8 e 8'', δ_C = +7,04 e +9,02 respectivamente) ao grupo acetoxila confirmam estes efeitos. O aparecimento dos sinais das carbonilas e das metilas dos grupamentos acetoxilas em δ_C 169,7, 168,7, 20,9 e 21,3 e a alteração dos deslocamentos químicos das carbonilas (δ_C 176,5 e 176,9) confirmam a acetilação da tetrametil agatisflavona **6** e a estrutura proposta. A tabela I.4.6 apresenta os deslocamentos químicos de ¹H e ¹³C deste derivado.

Os espectros de HMQC (Figuras I.4.55, pág. 97 e I.4.56, pág. 98) permitiram estabelecer as correlações diretas (¹J_{CH}) e os deslocamentos dos carbonos não hidrogenados do

derivado **7** foram estabelecidos pelos espectros de HMBC através ($^2,3J_{CH}$) (Figuras I.4.57, pág. 99 e I.4.58, pág. 100), tabela I.4.7, pág. 85.

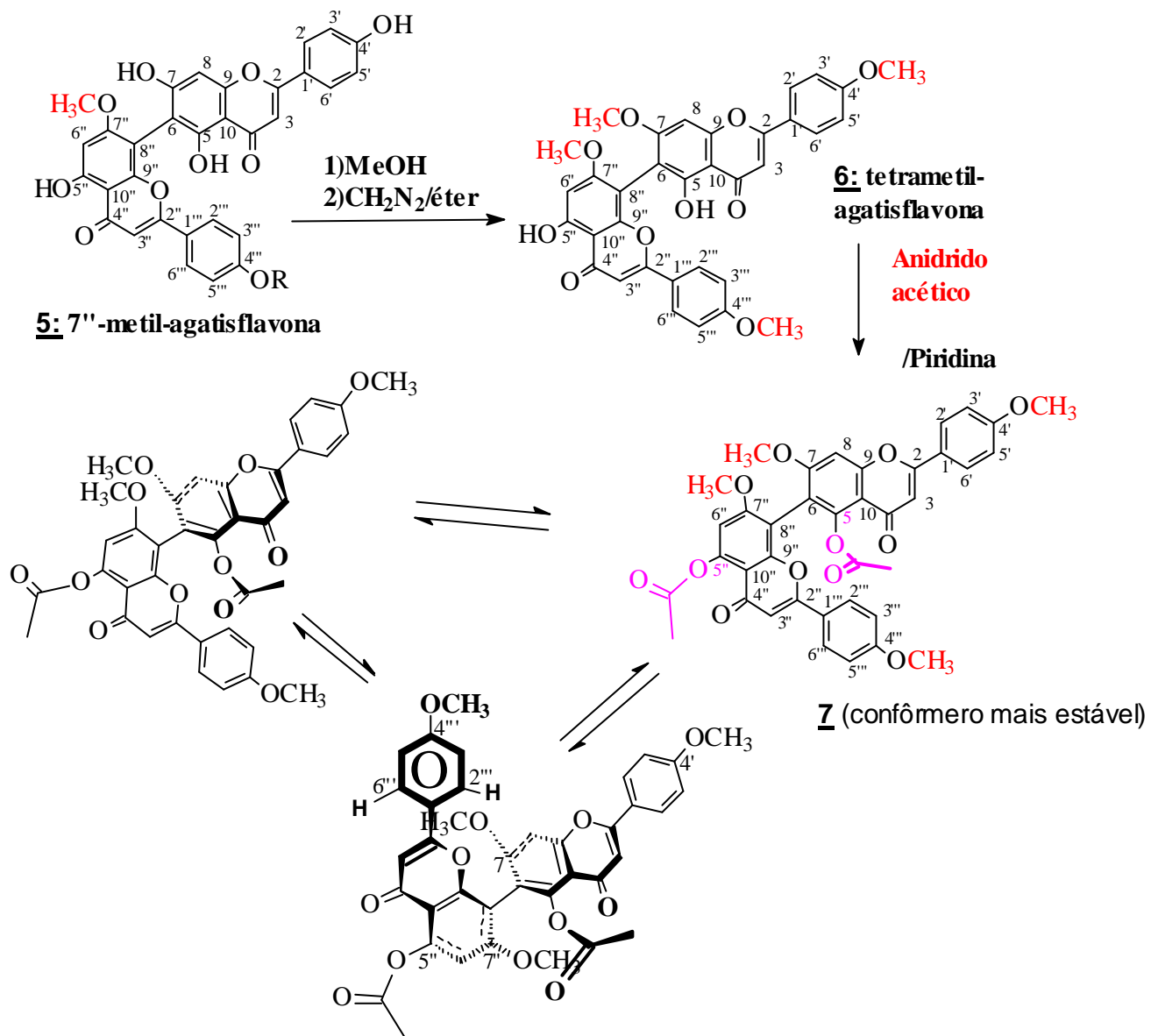
Os sinais de interações espaciais detectados no espectro NOESY (Figura I.4.53, pág. 95) permitiu confirmar as localizações e os respectivos deslocamentos químicos: MeO-4' com interação espacial com H-3',5' (δ_H 7,05), MeO-4''' com interação espacial com H-3''',5''' (δ_H 6,84), MeO-7 com interação espacial com H-8 (δ_H 7,01) e MeO-7'', pela interação espacial com H-6'' (δ_H 6,73) (Tabela I.4.6, pág. 77; Figura I.4.52-53, pág. 94-95).

As feições dos sinais dos hidrogênios H-2''',6''' e H₃C-CO-5 apresentam diferenças dos demais. Esta deformação dos sinais pode ser justificada pela organização conformacional da molécula permitindo aproximações entre Ac-5 e o anel B' da outra unidade. Isto gera interações anisotrópicas entre unidades de H alternando o ambiente químico das mesmas, e assim gerando deformações nos sinais. Foram feitos cálculos de modelagem molecular e verificou-se que o confômero de menor energia permite estas interações (Esquema I.4.3-4, pág. 86-87).

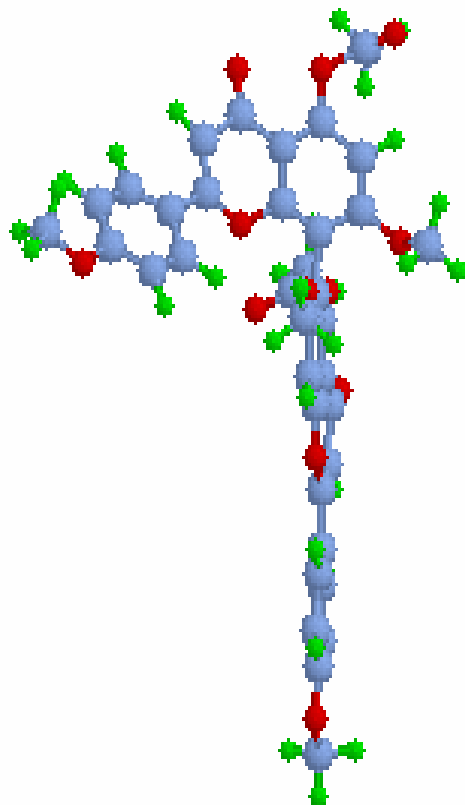
Tabela I.4.7. Dados de RMN¹H (400 MHz) e RMN¹³C (100 MHz) 1D e 2D de **7** (CDCl₃).

CH	HMQC- ($^1J_{CH}$)		HMBC ($^2J_{C-H}$)	HMBC ($^3J_{C-H}$)	NOE
	d _c	d _H (mult, Hz)			
3	107,4	6,60 (s)	C-2,C-4	C-10,C-1'	H-2',6'
3''	106,4	6,57 (s)	C-2'',C-4''	C-10'',C-1'''	H-2''',6'''
6''	103,7	6,73 (s)	C-5, C-8''	C-10'',C-8''	H ₃ C-O-7''
8	97,0	7,01 (s)	C-9	C-10	H ₃ C-O-7
2',6' ^a	127,7	7,89 (d, 8,8)	C-3',5'	C-4'	H-3',5' ^a ; H-3
2''',6'''	127,8	7,44 (d, 8,8)		C-4'''	H-3''',5''' ^b ; H-3
3',5' ^a	114,5	7,05 (d, 8,8)	C-4'	C-1'	H ₃ C-O-4'
3''',5''' ^b	114,4	6,84 (dl, 8,8)	C-4'''	C-1'''	H ₃ C-O-4'''
H ₃ CO/ H ₃ CCO					
H ₃ CO-4'	56,4	3,91 (s)		C-4'	H-3',5'
H ₃ CO-4'''	56,3	3,78 (s)		C-4'''	H-3''',5'''
H ₃ CO-7	55,4	3,81 (sl)		C-7	H-8
H ₃ CO-7''	55,3	3,84 (sl)		C-7''	H-6''
H ₃ CCO-5	20,9	2,14 (sl)	-CO-O-5		
H ₃ CCO-5	168,7	-			
H ₃ CCO-5''	21,2	2,40 (s)	-CO-O-5''		H-6''
H ₃ CCO-5'''	169,6	-			

^a e ^b: sinais de acoplamento observados no espectro ¹H x ¹H-COSY.



Esquema I.4.3. Obtenção do novo derivado da 7''-O-metilagatisflavona e conformação de menor energia de **7**.



Esquema I.4.4. Modelo MOPAC do derivado novo tetrametil-diacetil-agatisflavona (7).

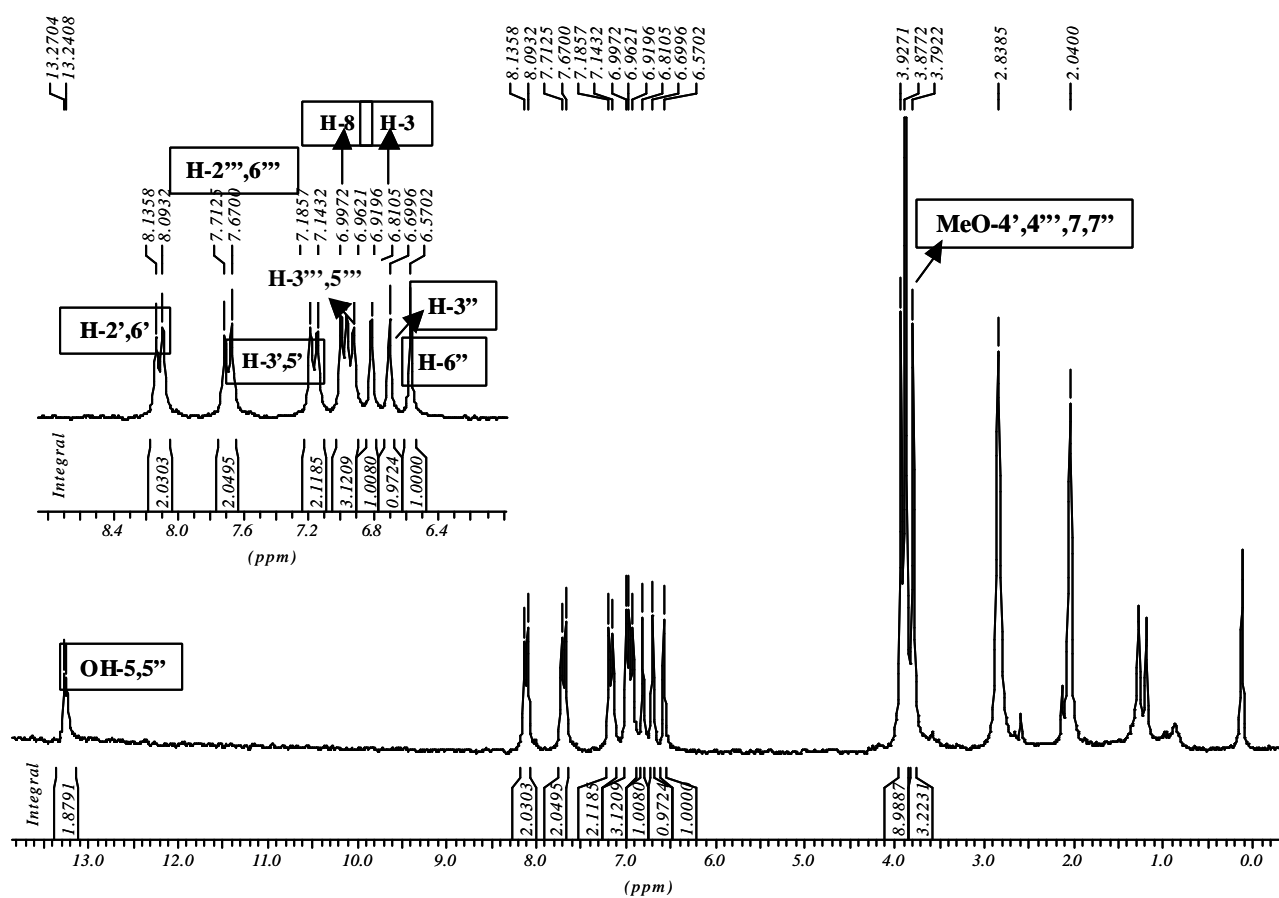
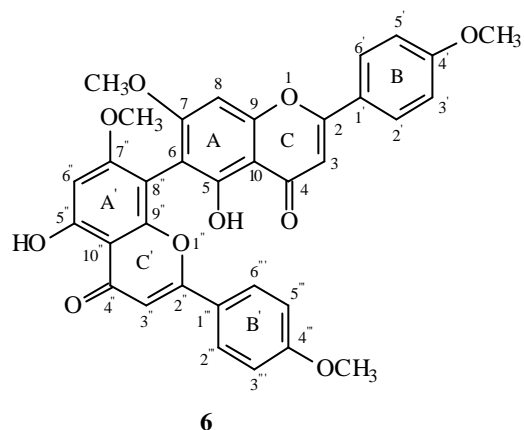


Figura I.4.46. Espectro de RMN ¹H (200 MHz, D₃CCOCD₃) do biflavonóide **6** (tetrametilgatisflavona).

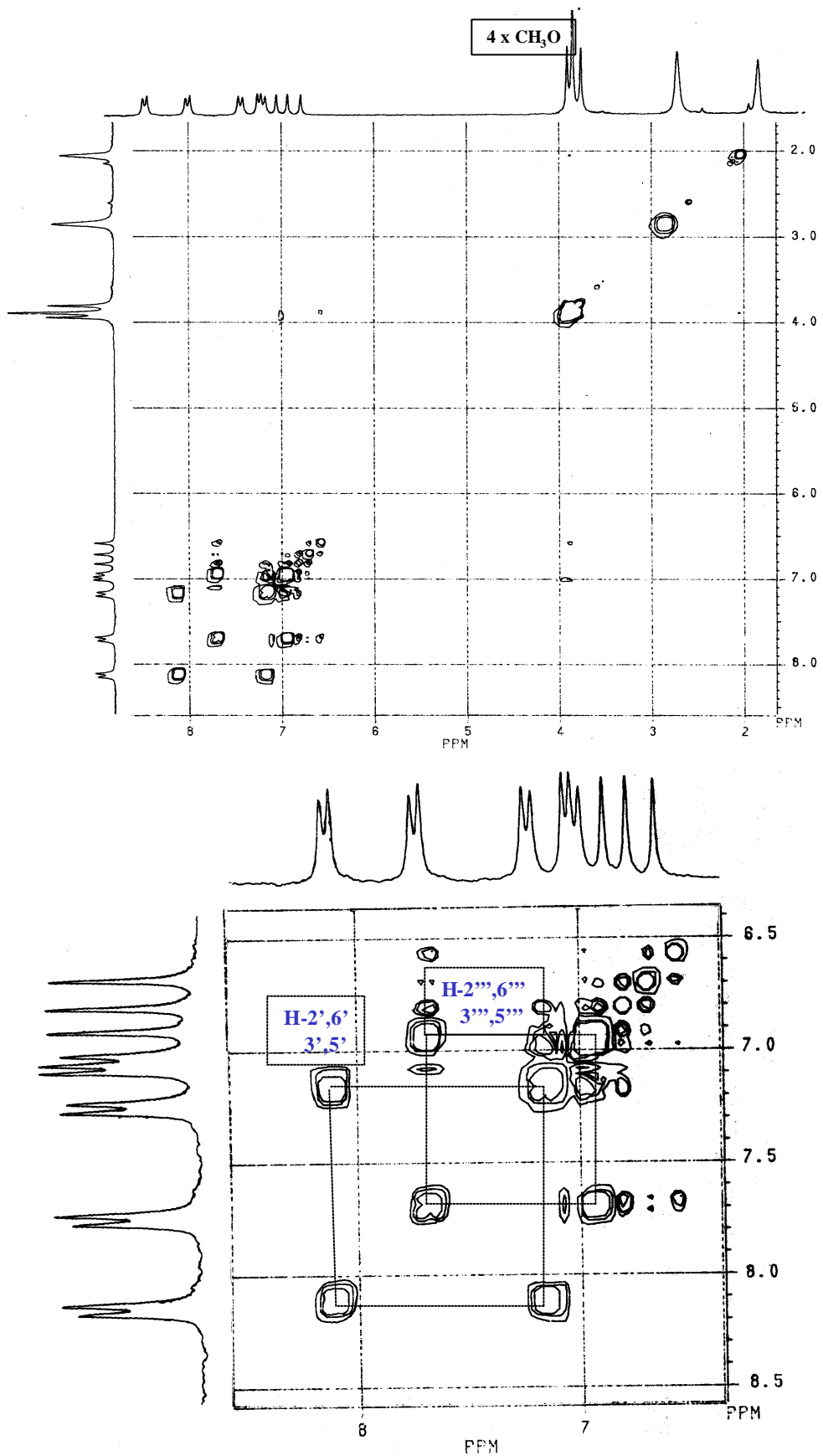


Figura I.4.47. Espectro de ^1H - ^1H -COSY (200 MHz, D_3CCOCD_3) do biflavonóide **6** (tetrametilagatisflavona).

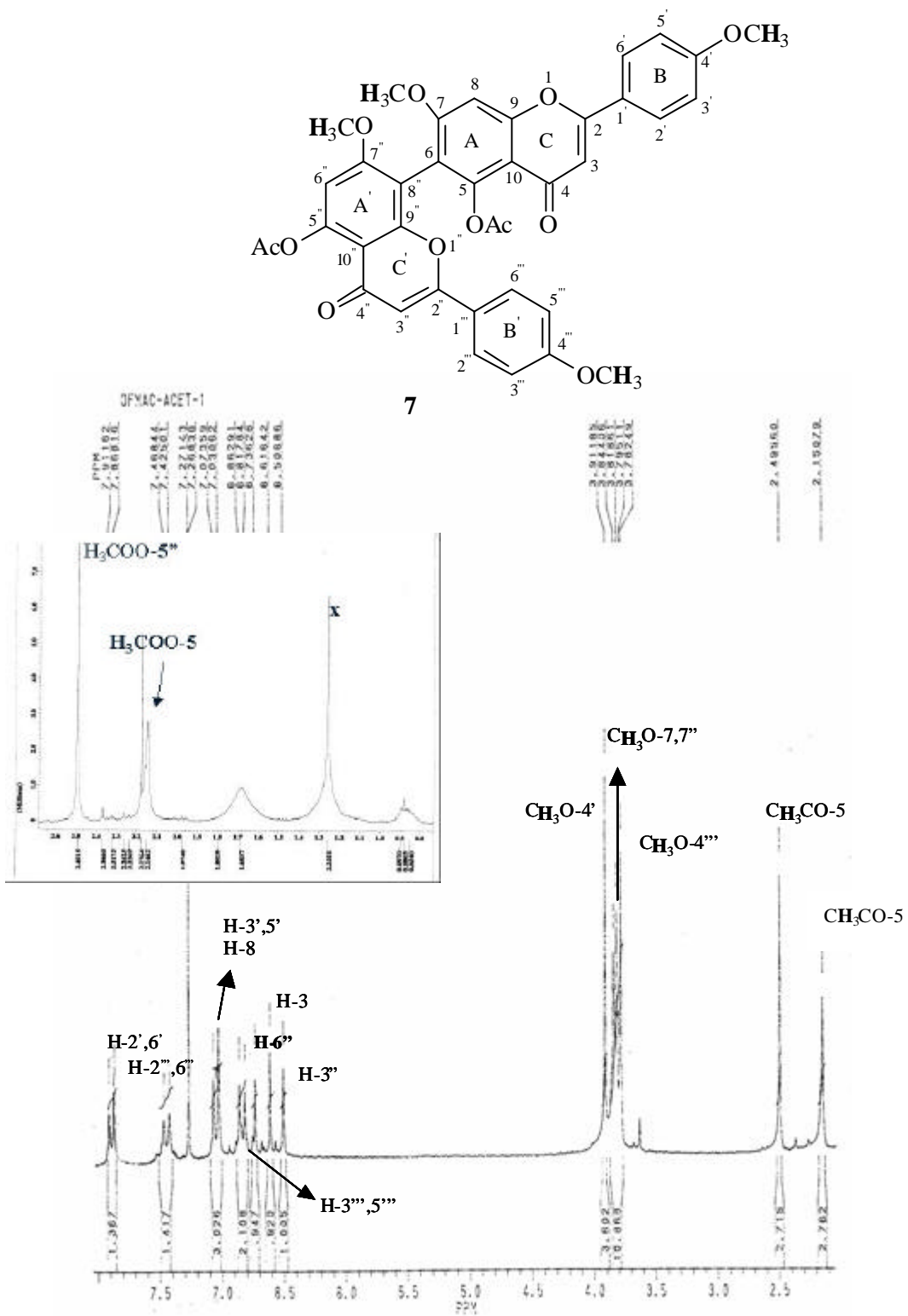


Figura I.4.48. Espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) do biflavonóide **7** (tetrametil diacetil agatisflavona).

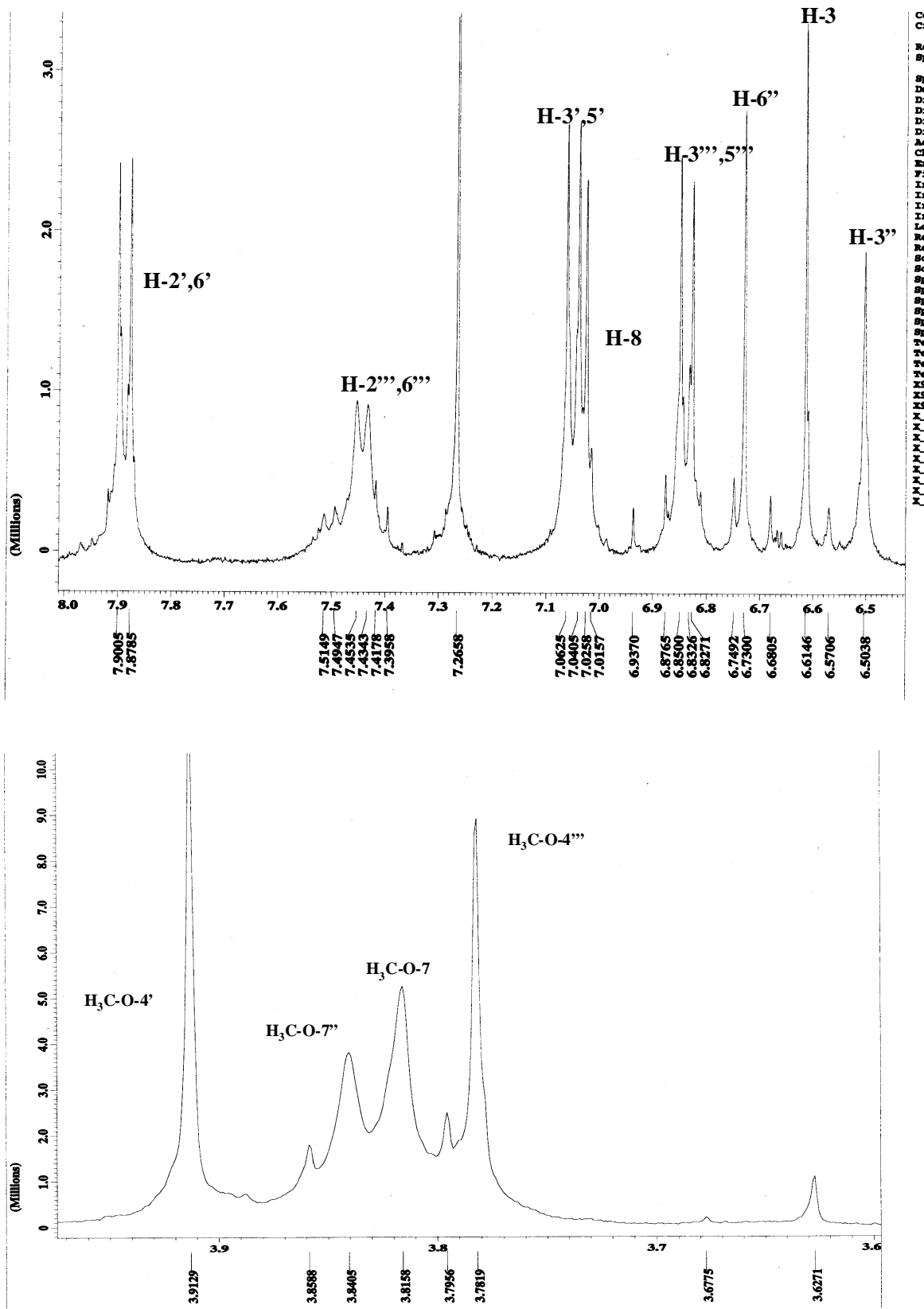


Figura I.4.49. Espectro de RMN ¹H ampliado (400 MHz, CDC₃) do biflavonóide 7 (tetrametil diacetil agatisflavona).

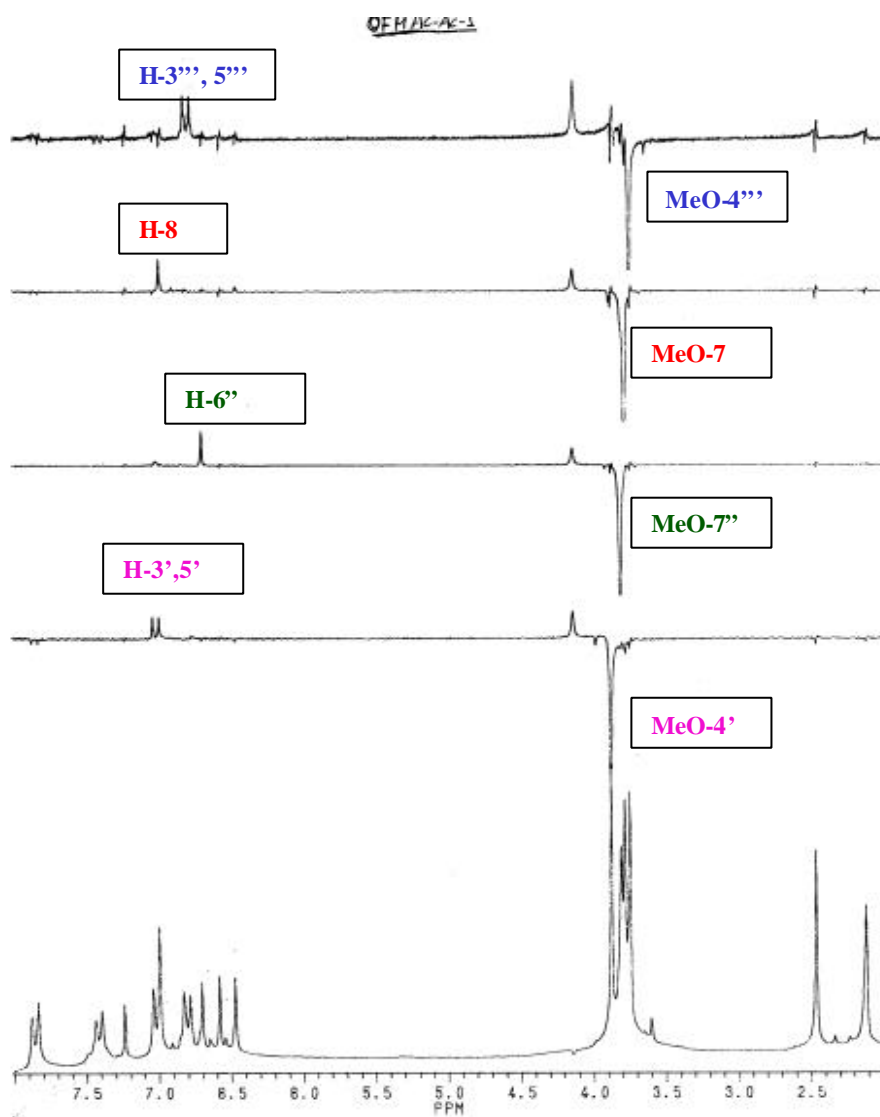
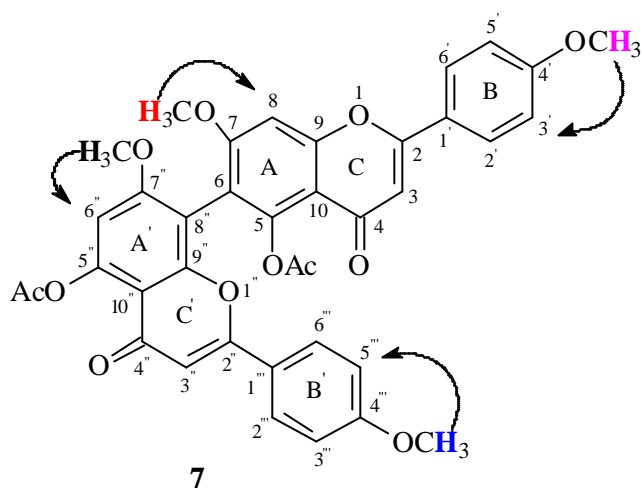
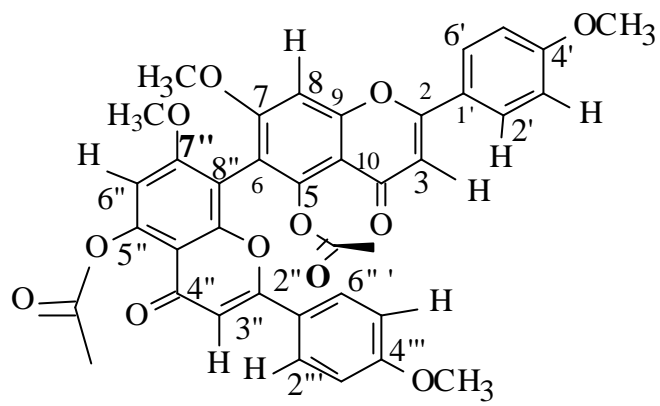


Figura I.4.50. Espectro de NOE (200 MHz, CDCl_3) do biflavonóide **7** (tetrametil diacetil agatisflavona).



7

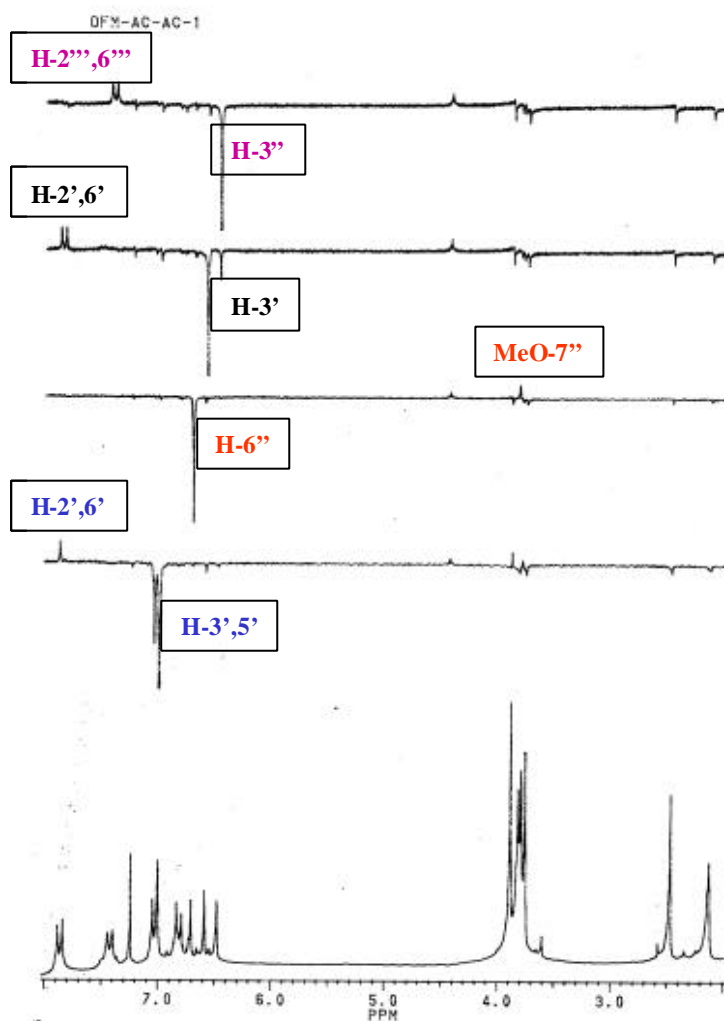


Figura I.4.51. Espectro de NOE (200 MHz, CDCl_3) do biflavonóide **7** (tetrametil diacetil agatisflavona).

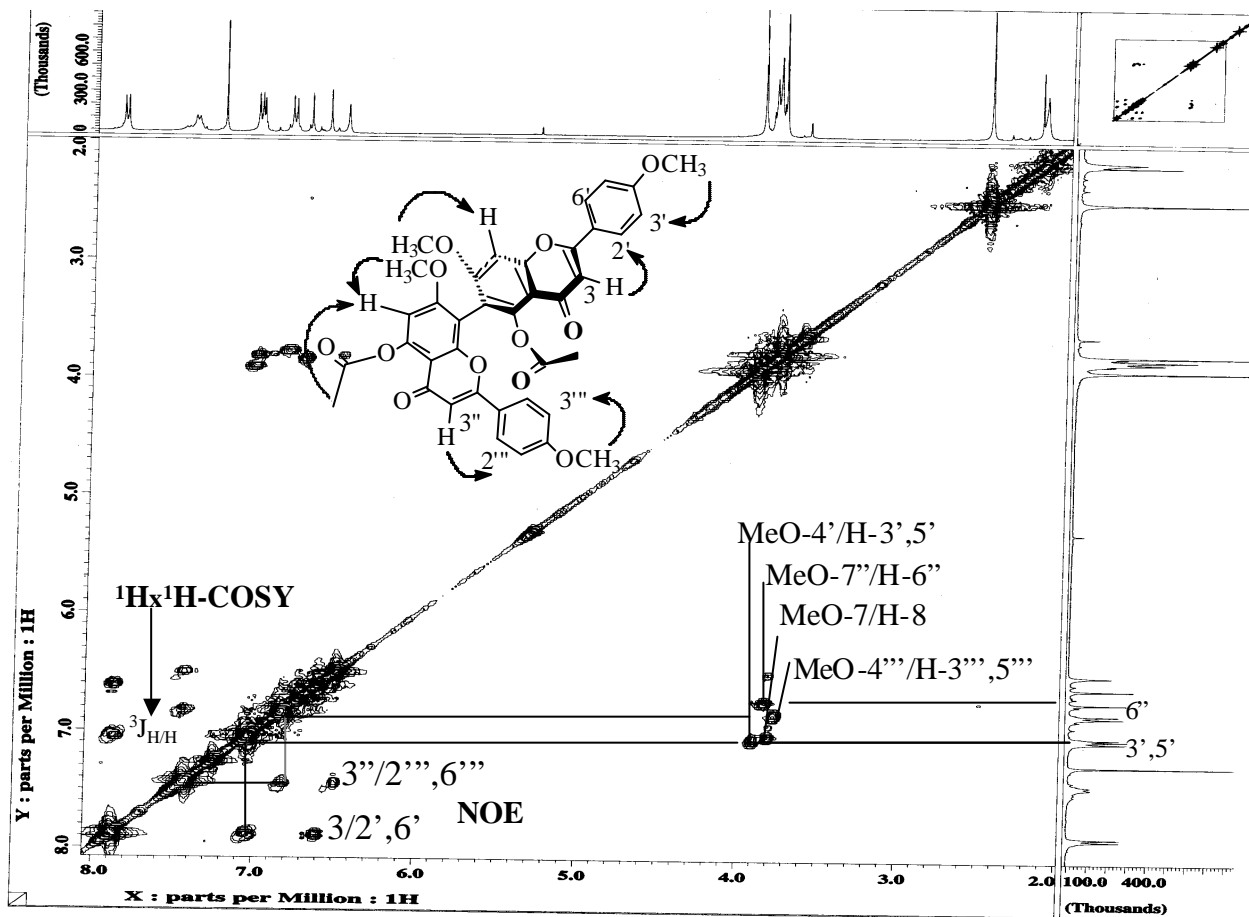


Figura I.4.52. Espectro de NOESY (400 MHz, CDCl_3) do biflavonóide 7 (tetrametil diacetil agatisflavona).

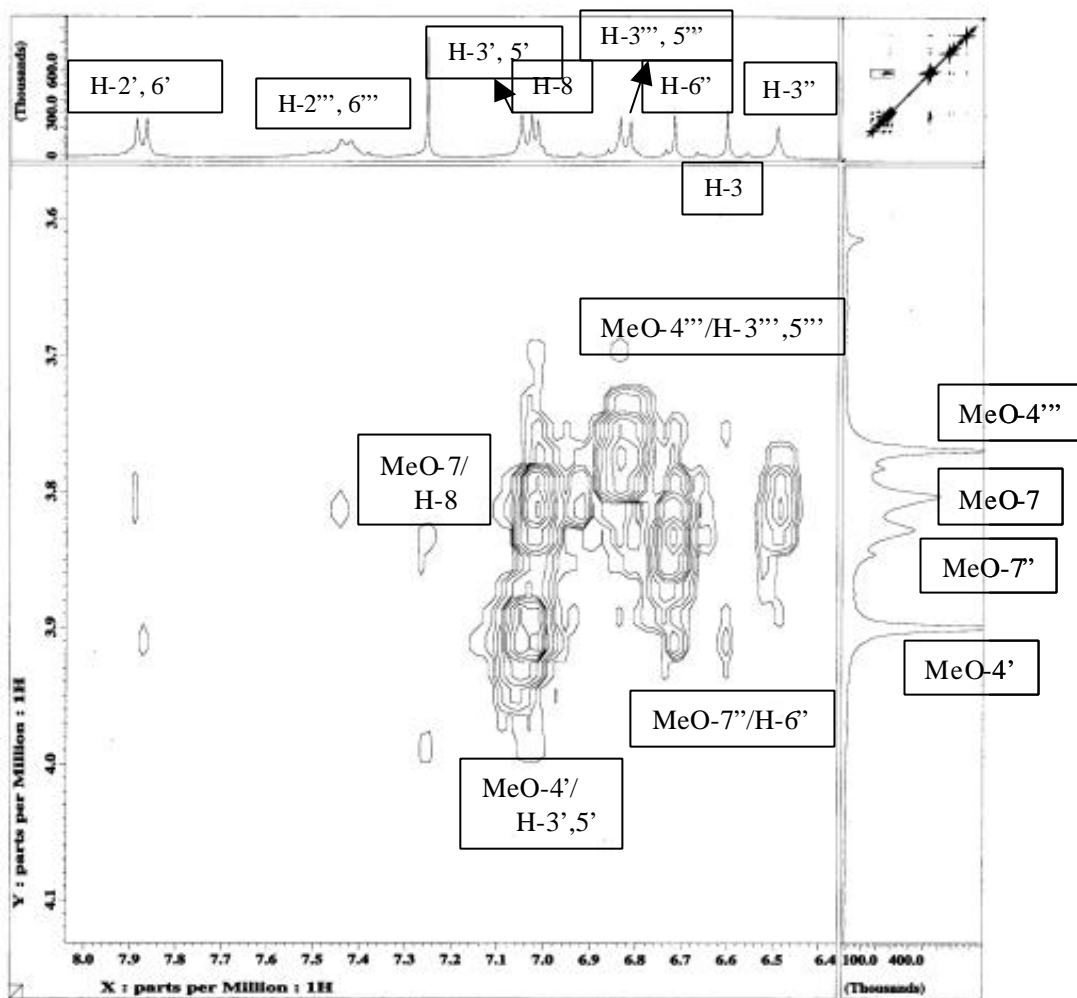


Figura I.4.53. Espectro de NOESY ampliado (400 MHz, CDCl_3) do biflavonóide **7** (tetrametil diacetil agatisflavona).

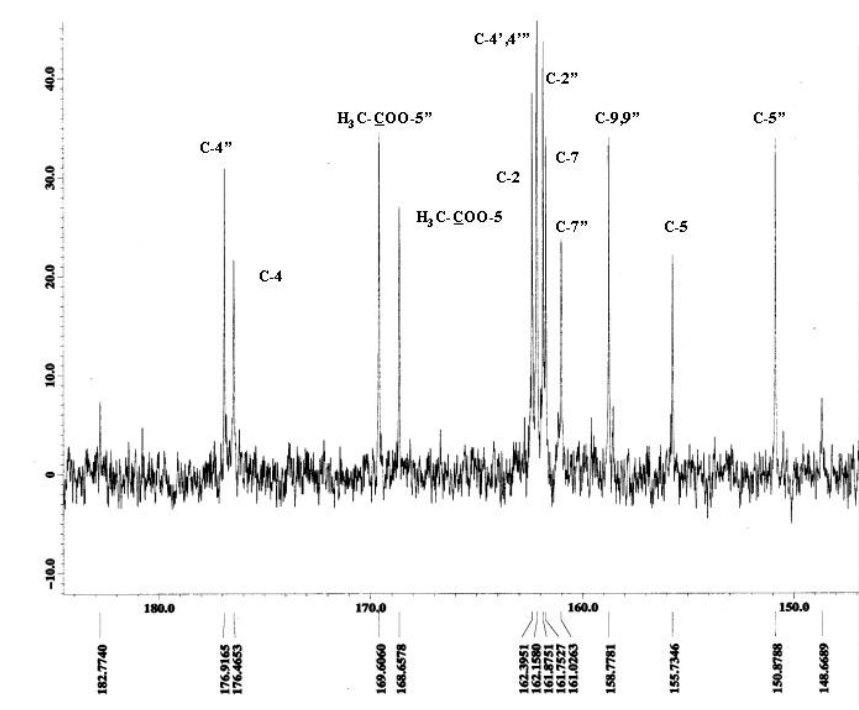
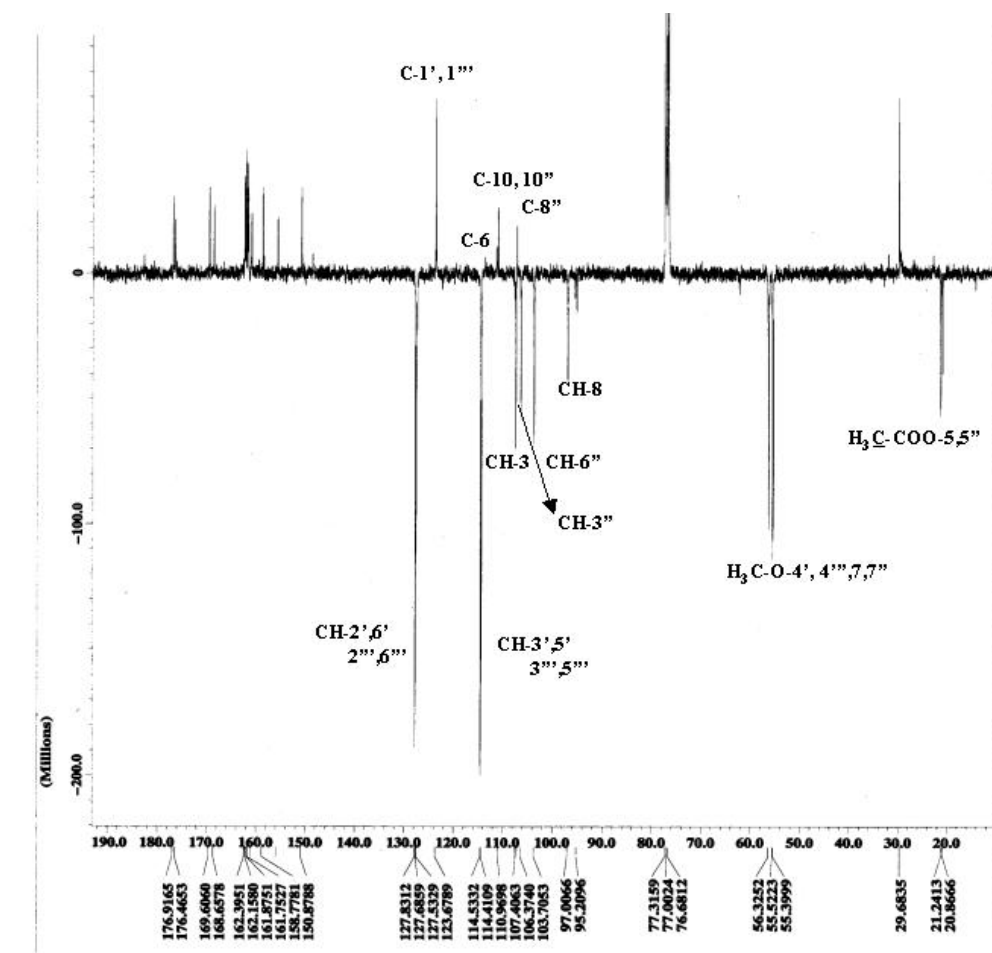


Figura I.4.54. Espectro de RMN ^{13}C e APT (100 MHz, CDCl_3) do biflavonóide 7 (tetrametil diacetil agatisflavona).

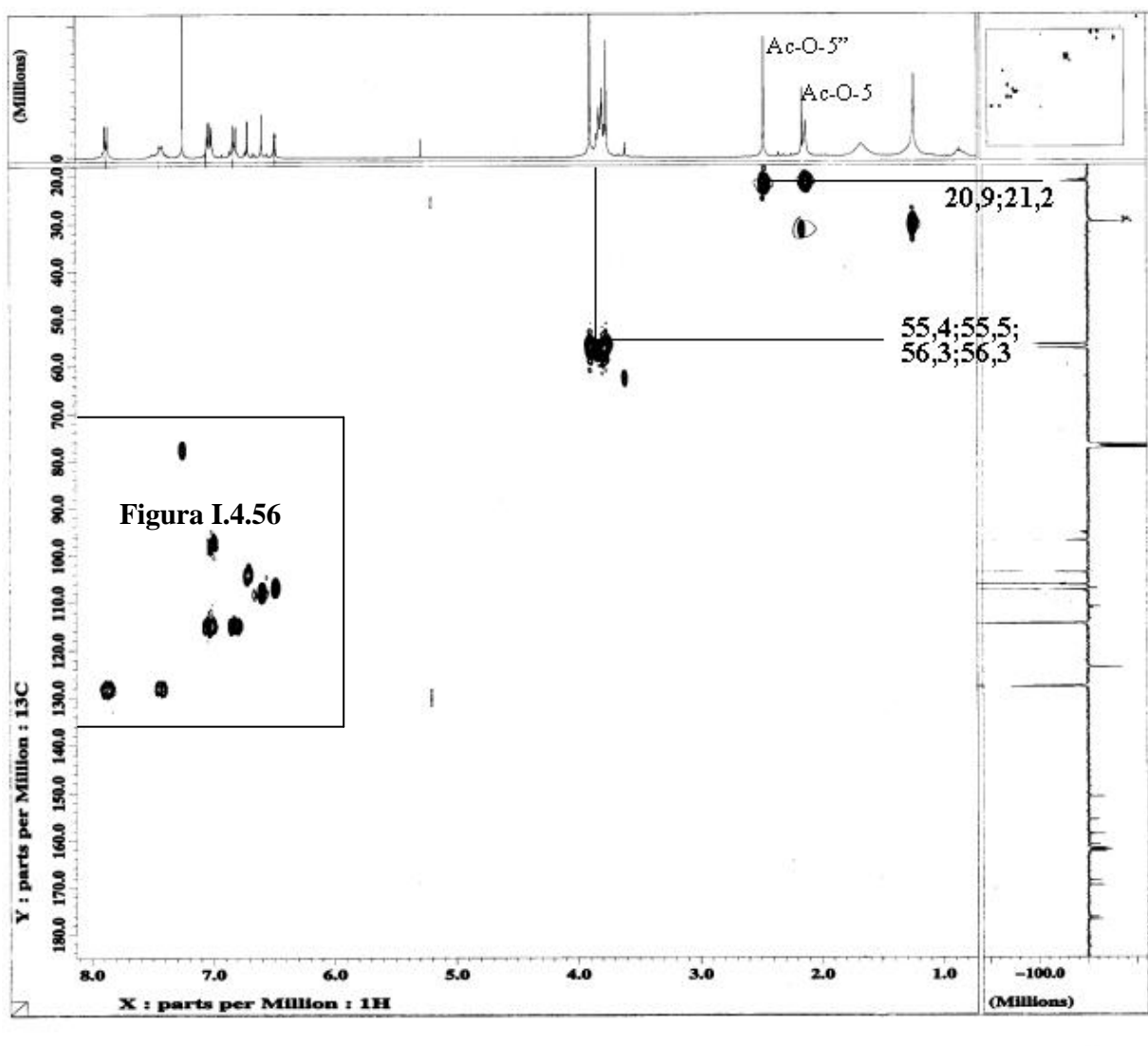


Figura I.4.55. Espectro de RMN-2D HMQC (400 MHz, CDCl_3) do biflavonóide 7 (tetrametil diacetil agatisflavona).

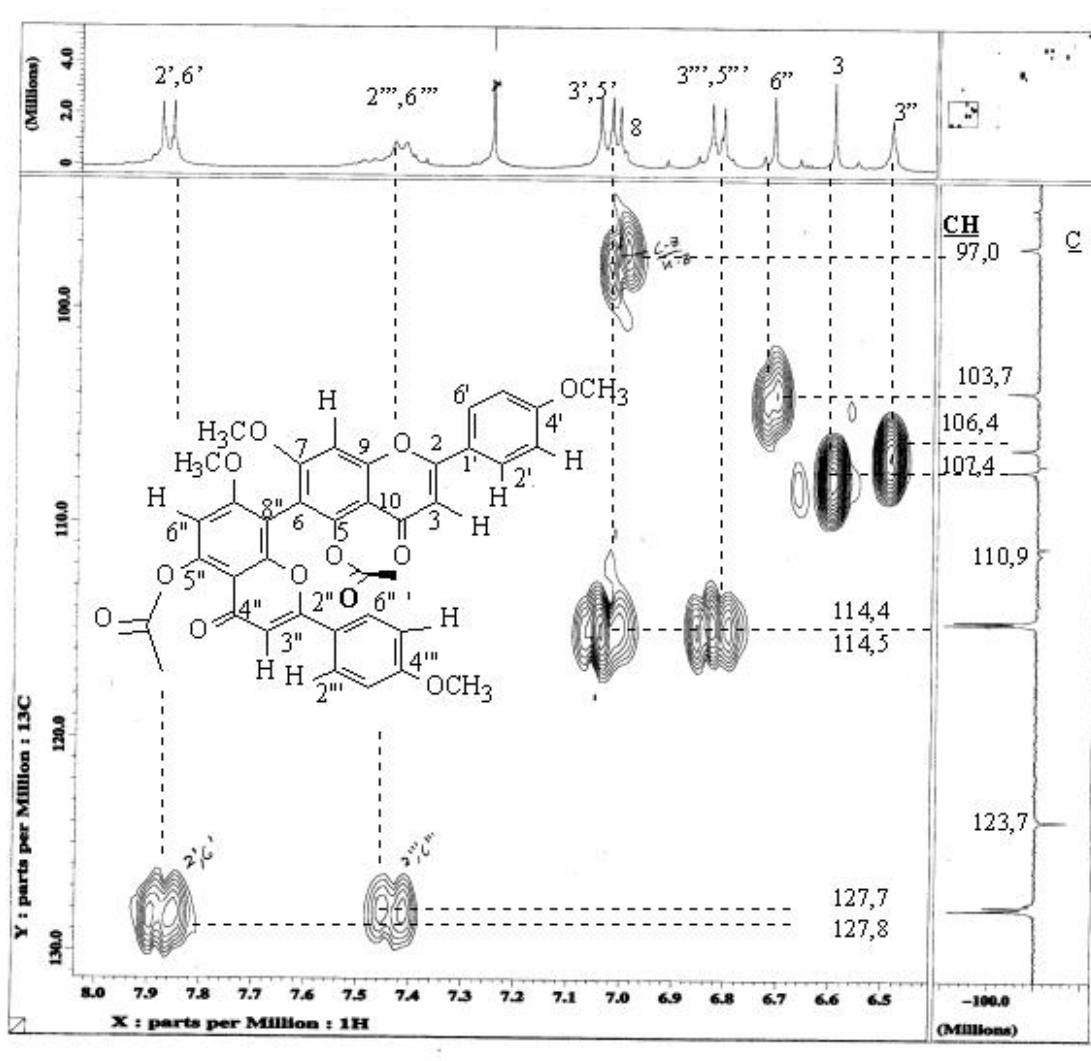


Figura I.4.56. Espectro de RMN-2D HMQC ampliado (400 MHz, CDCl_3) do biflavonóide 7 (tetrametil diacetil agatisflavona).

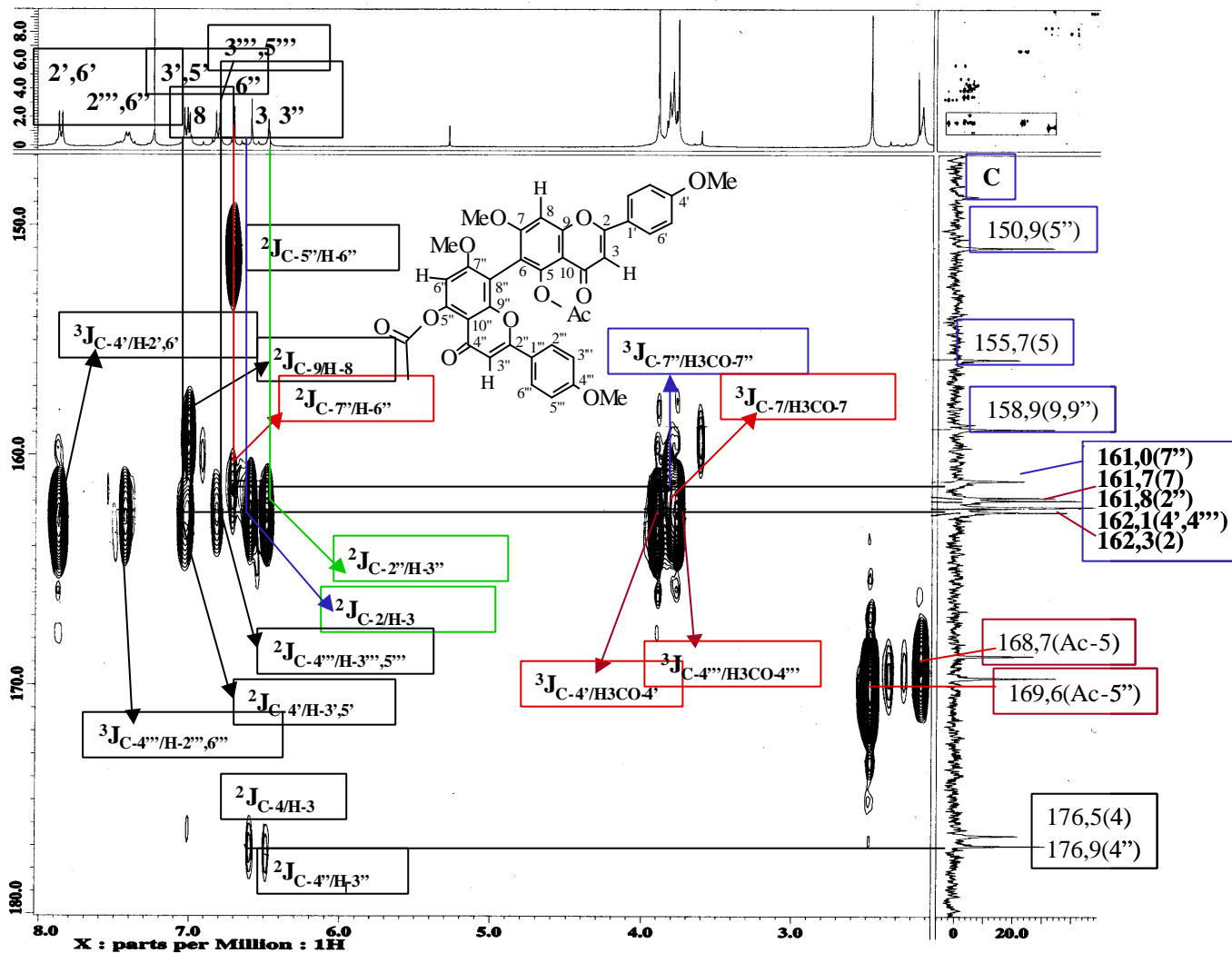


Figura I.4.57. Espectro de RMN-2D HMBC ampliado (400 MHz, $CDCl_3$) do biflavonóide 7 (tetrametil diacetil agatisflavona).

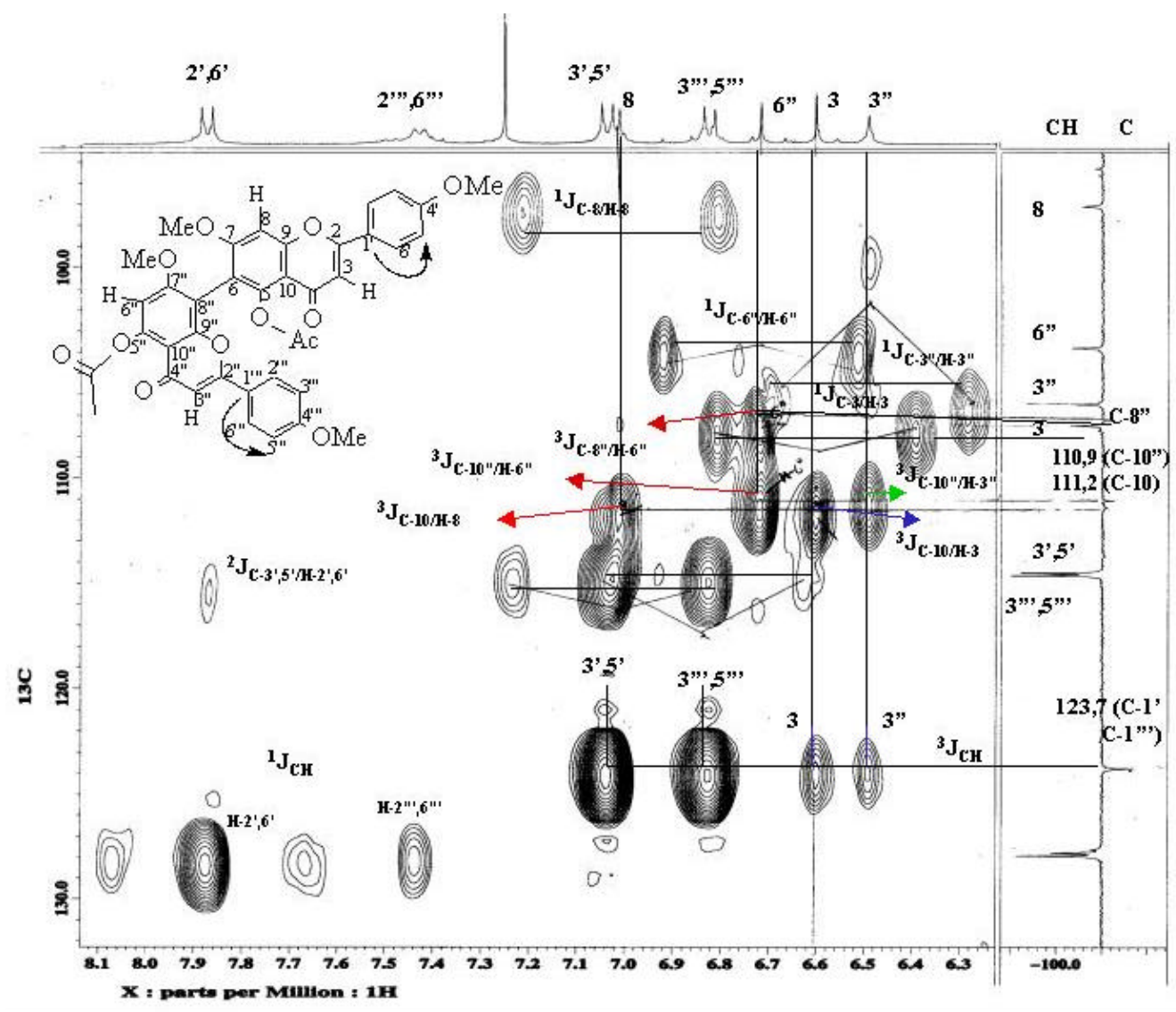


Figura I.4.58. Espectro de RMN-2D HMBC ampliado (400 MHz, CDCl_3) do biflavonóide 7 (tetrametil diacetil agatisflavona).

f) Agatisflavona (Substância 8)

O espectro no IV de **8** (Figura I.4.59, pág 102) evidência bandas de absorção em 3425 cm^{-1} (estiramento O-H), 1651 cm^{-1} (estiramento de carbonila conjugada) e 1605 cm^{-1} (estiramento C=C de anel aromático) e 1367 cm^{-1} (estiramento C-O).

O espectro de RMN ^1H (Figura I.4.60, pág 103) possui sinais típicos de biflavonóide, sinais de dois sistemas AA'BB' $\{(\text{d}_\text{H} 7,88 (2\text{H}, J= 7,9 \text{ Hz}), 7,56 (2\text{H}, J= 7,9 \text{ Hz}), 6,93 (2\text{H}, J= 7,9 \text{ Hz}) \text{ e } 6,72 (2\text{H}, J= 7,9 \text{ Hz})\}$, quatro singletos em $\text{d}_\text{H} 6,38, 6,57, 6,62 (2\text{x})$, atribuídos aos hidrogênios H-6'', 8, 3 e 3''. Os sinais de hidroxilas fenólicas livres (OH-4', 4'', 7 e 7'') e em ligação de hidrogênio com carbonila (OH-5 e 5'') não foram observados neste espectro porque foi usado Metanol-D₄ como solvente. O sinal de $\delta_{\text{C=O}}$ (183,74 e 184,26) verificado no espectro de ^{13}C estão compatíveis com as carbonilas em ligação de hidrogênio.

O espectro de RMN ^{13}C (BBD e DEPT, Figura I.4.61, pág 104) mostra os valores de deslocamentos dos carbonos metínicos em $\text{d}_\text{C} 95,9, 101,06, 103,1 \text{ e } 103,5$ que são compatíveis com os carbonos 8, 6, 3 e 3'', respectivamente. A multiplicidade dos sinais dos hidrogênios 8 e 6'' e o número de sinais CH aromáticos compatíveis com o anel A de flavonóides com oxidações biossintéticas. Sendo assim, os carbonos 6 e 8'' estão envolvidos na ligação entre as unidades de flavonas. A comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos da agatisflavona registrados na literatura (CHARI *et al.*, 1977; AGRAWAL, 1989) e 7''-O-metilagatisflavona (MOREIRA, *et al.*, 1999) confirmam a proposta da 5,7,4'-triidroxiflavona-(6->8'')-5'',7'',4''-triidroxiflavona para **8**. A Tabela I.4.8, pág 105 evidencia as atribuições dos deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H . A agatisflavona foi isolada anteriormente de *Agathis spp.* e *Rhus spp.* (BUCKINGHAM, *et al.*, 1994), *Agathis alba* (MASHIMA, *et al.*, 1970), *Rhus succedanea* (MEEI & CHEN, 1974) e está sendo registrado pela primeira vez em *Ouratea*.

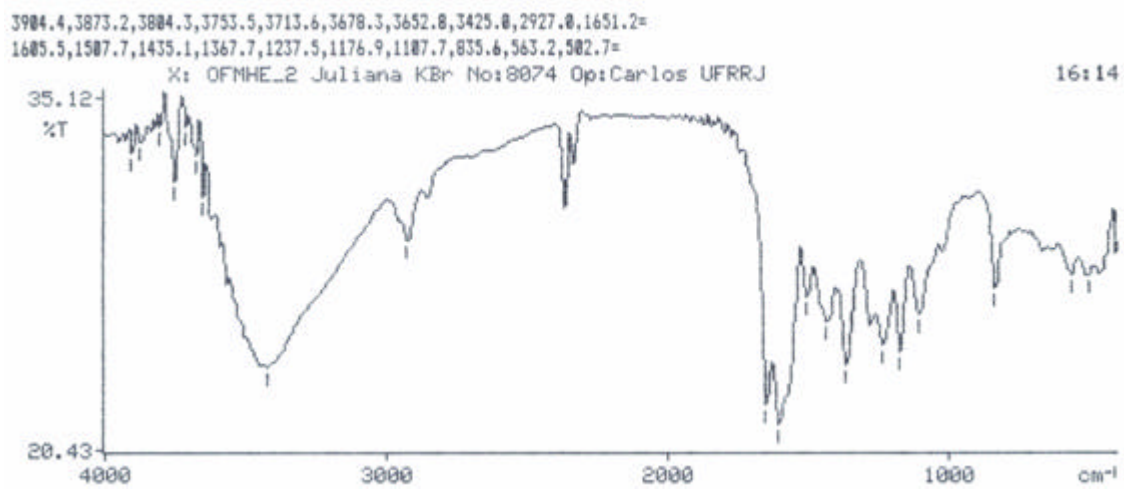
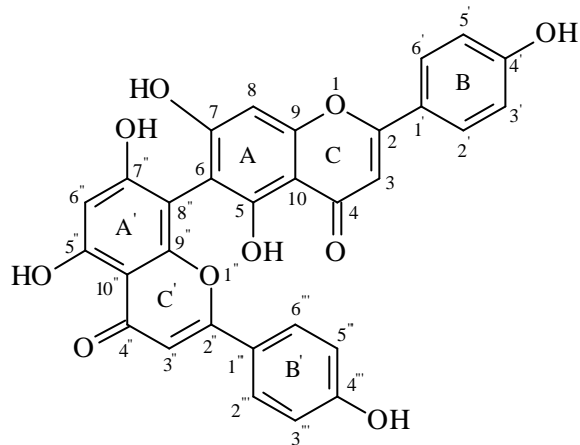


Figura I.4.59. Espectro de infravermelho do biflavonóide **8** (agatisflavona).

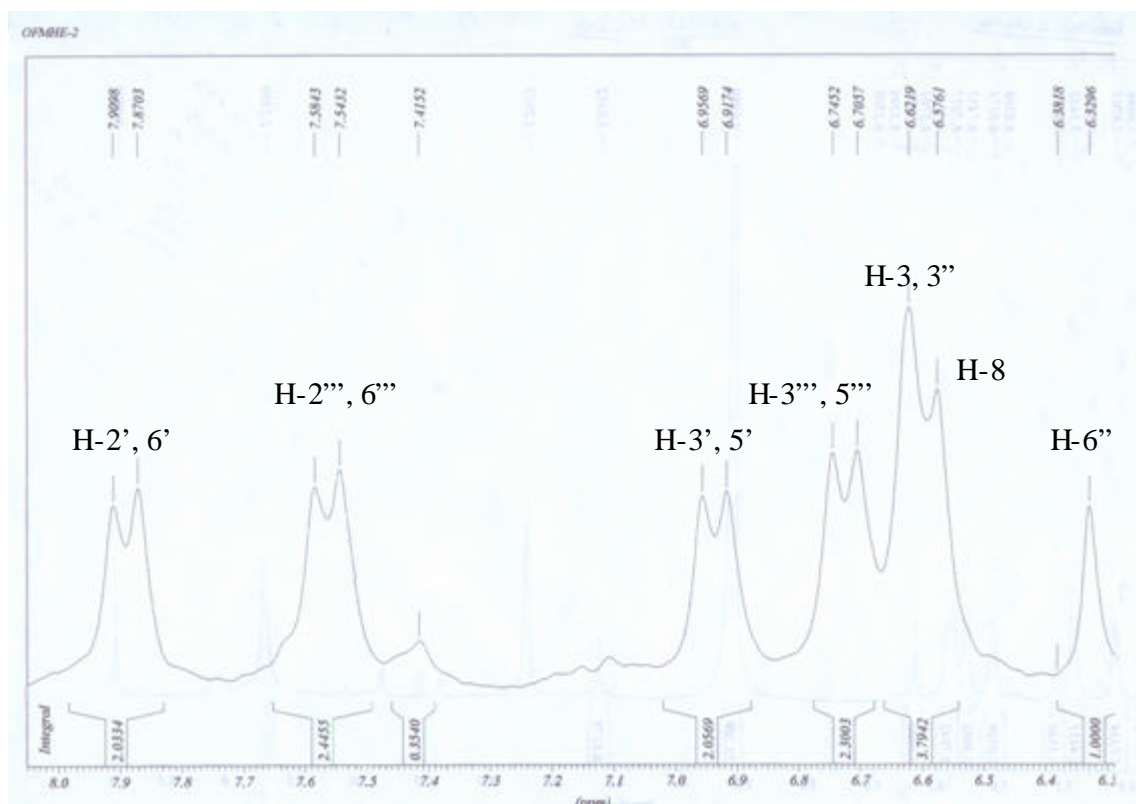
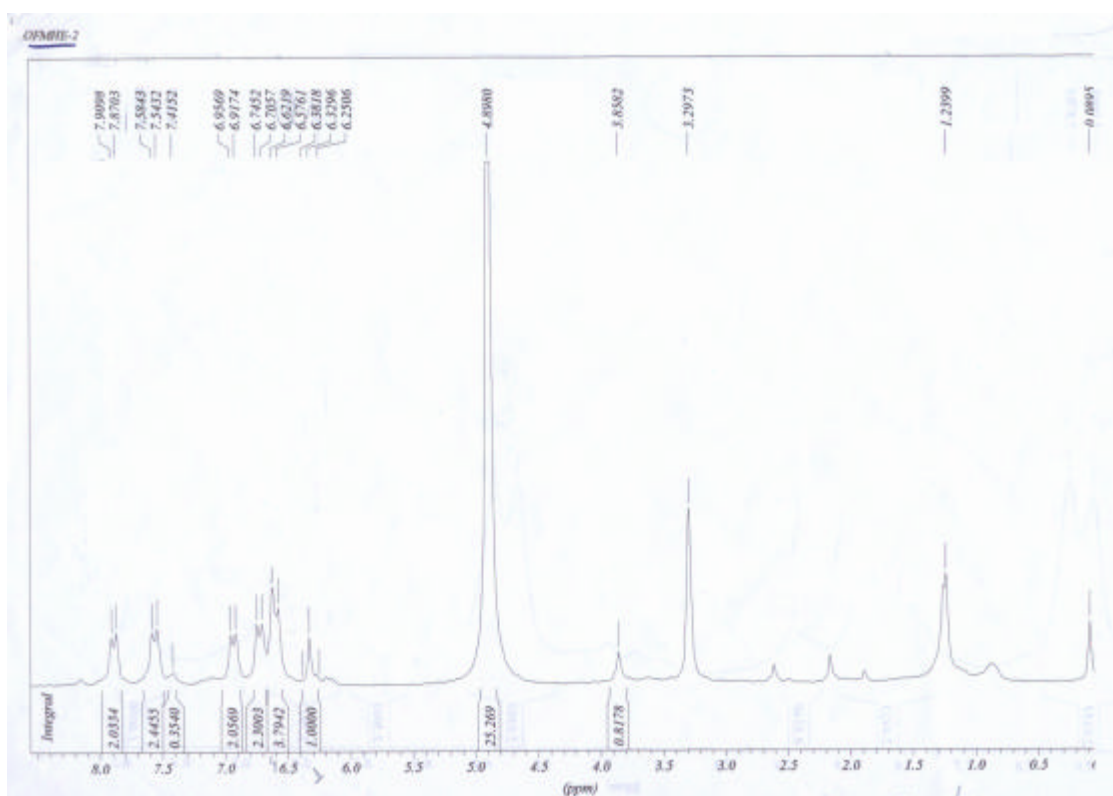


Figura I.4.60. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, Metanol- D_4) do biflavonóide **8** (agatisflavona).

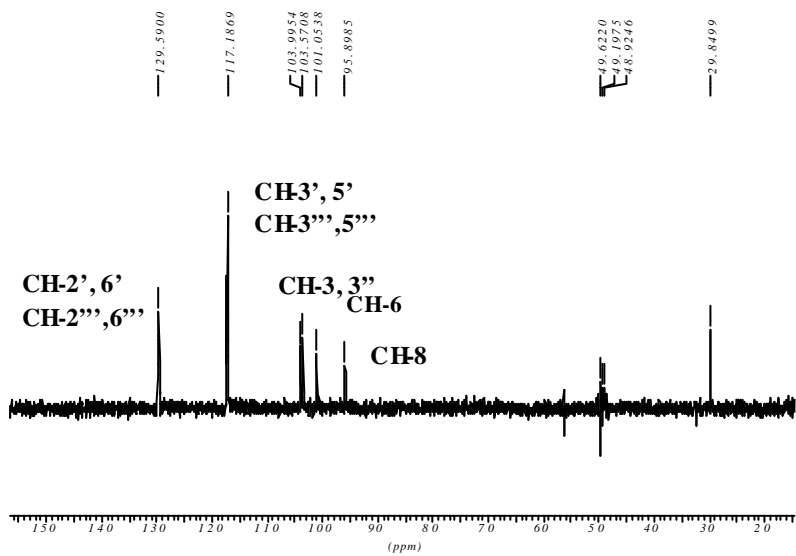
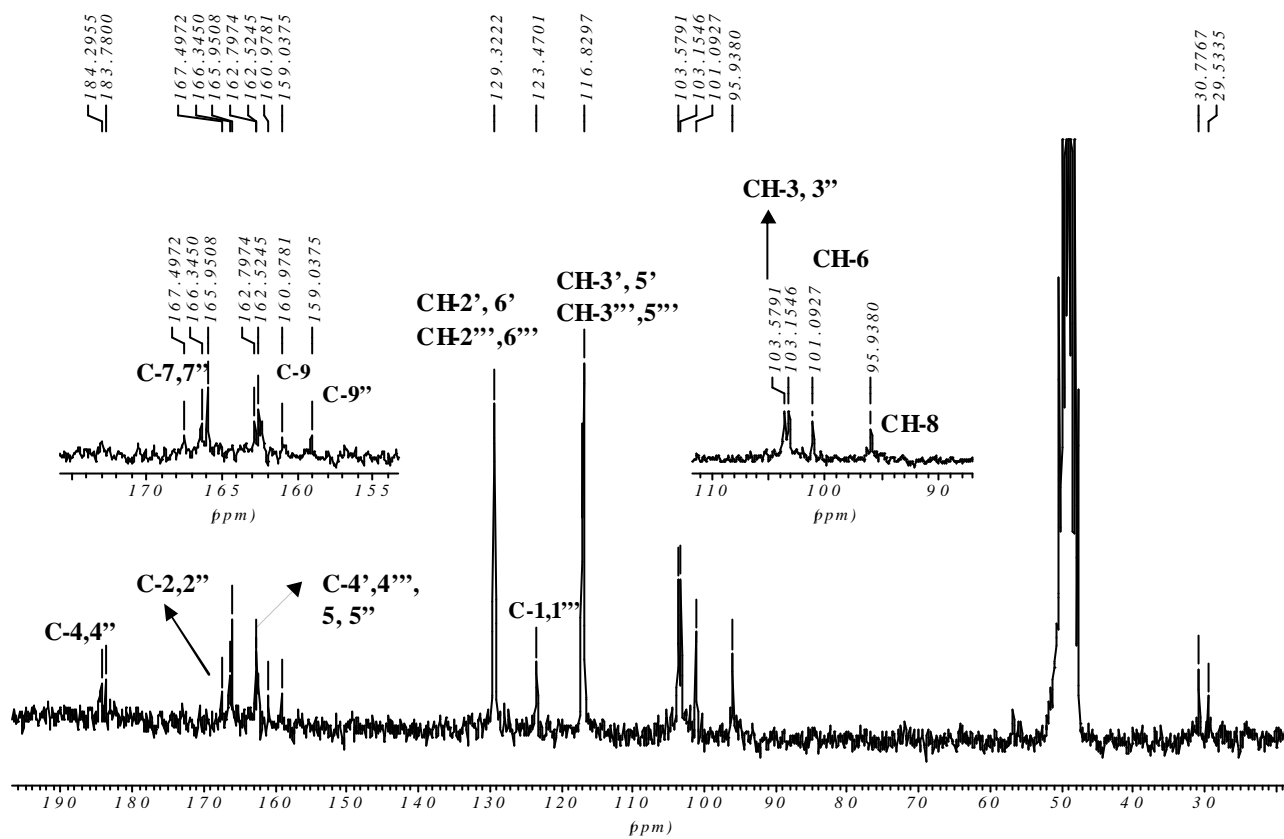
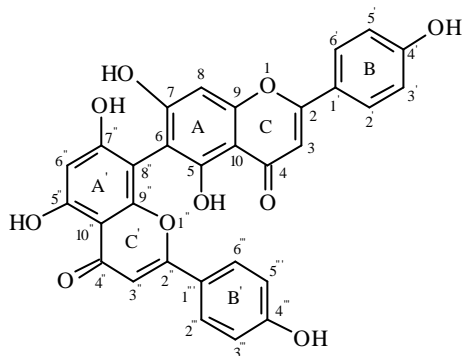


Figura I.4.61. Espectro de RMN ^{13}C e DEPT 90 e 135° (50 MHz, Metanol- D_4) do biflavonóide **8** (agatisflavona).

Tabela I.4.8. Dados de RMN¹H (200 MHz) e ¹³C (50 MHz) em Metanol-D, (AGRAWAL, 1989) da substância **8** (agatisflavona).

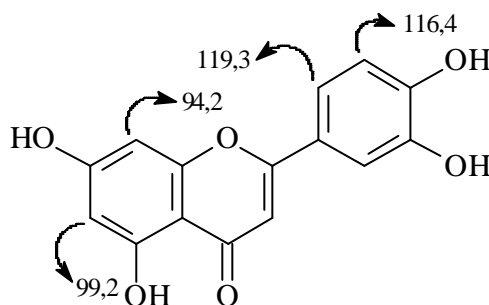


C	δ_C (Metanol- D ₄)	δ_C (literatura- DMSO-D ₆)	δ_H (mult, Hz)
2	167,5	164,1	-
4	184,3	182,3	-
5	162,5	160,0	-
6	103,1	103,6	-
7	165,9	162,9	-
9	160,9	157,0	-
10	103,5	103,8	-
1	123,4	121,5	-
4	162,7	161,3	-
2	166,3	163,9	-
4	183,7	182,0	-
5	162,5	160,9	-
7	166,3	162,7	-
8	101,1	99,4	-
9	159,0	155,1	-
10	103,5	104,0	-
1	121,4	121,7	-
4	162,5	161,2	-
CH			
3	103,1	103,1	6,62 (s)
8	95,9	93,7	6,57 (s)
2,6	129,6	128,6	7,88 (d, 7,9)
3,5	117,2	116,2	6,93 (d, 7,9)
3	103,5	102,8	6,62 (s)
6	101,1	98,9	6,38 (s)
2,6	129,6	128,2	7,56 (d, 7,9)
3,5	117,2	116,2	6,72 (d, 7,9)
HO-5,5''	-	-	-
HO-7,7'',4',4'''	-	-	-

I.4.4. 2''-O-b-D-glicopiranosil-8-C-b-D-glicopiranosil luteolina (Substância 9)

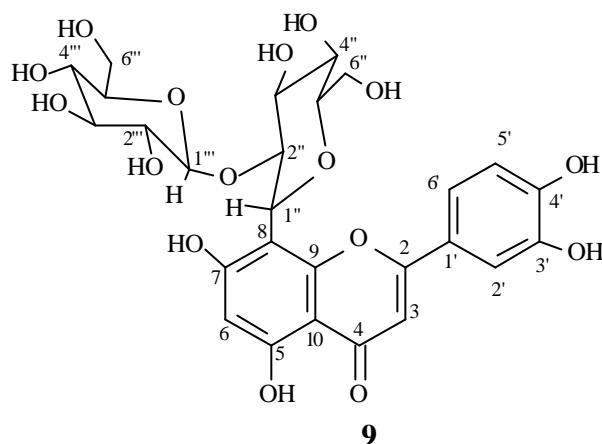
O espectro de RMN¹H da substância **9** (Figura I.4.62, pág. 108; Figura I.4.63, pág. 109) apresenta sinais característicos de um flavonóide glicosilado, pelo aparecimento de sinais na região aromática, juntamente com hidrogênios na região de 35 ppm das unidades de carboidrato. O anel A de **9** mostra um singlete em δ 6,22 (*s*) referente a H-6. O sinal em δ_{H} 13,10 é atribuído a HO-5 em ligação de hidrogênio com a carbonila C-4. O anel B do flavonóide apresenta um dubleto em δ_{H} 7,49 (H-6'; $J=7,6$ Hz), dubleto largo em δ_{H} 6,88 (H-5') e singlete largo em δ_{H} 7,44 (H-2'). O sinal de absorção no espectro de RMN ¹H correspondente as duas unidades de açúcar são representados pelos sinais de hidrogênio ligados em carbonos carbinólicos, sendo o sinal em δ_{H} 4,84 (*d*, 9,52 Hz, H-1'') e δ_{H} 3,93 (*d*, 7,72 Hz, H-1''') dos hidrogênios anoméricos das unidades dos açúcares. A análise nos espectros de RMN ¹³C (Figura I.4.64, pág. 110; Figura I.4.65, pág. 111) e comparação com a literatura (AGRAWAL, 1989; HARBORNE, 1982), confirma a proposta para um flavonóide 8-C-glicosilado. Pela ausência de um carbono em torno de 94 ppm para CH-8 e aparecimento de um C quaternário em 103,7 ppm, desprotegido em ($\delta\Delta$ 9,5). Realmente o carbono metínico aromático sofre uma desproteção em torno de 9,8 ppm no sinal de absorção do carbono que sofre a C-glicosilação (HARBORNE, 1982). A proteção foi verificada nos carbonos *orto* a posição glicosilada, C-7 ($\delta\Delta$ 1,8) e C-9 ($\delta\Delta$ 1,6) quando comparados com a luteolina **31** (AGRAWAL, 1989). As duas unidades de açúcares foram propostas como sendo a β -D-glicose pelo valor de $J=9,52$ Hz e $J=7,72$ Hz apresentado pelos hidrogênios anoméricos H-1'' e H-1''' e comparação com valores da literatura para 2''-O- β -D-glicopiranosil orientina (AGRAWAL, 1989; MARKHAM, *et al.*, 1984).

Os espectros de HMQC (Figura I.4.66, pág. 112; Figura I.4.67, pág. 113; Tabela I.4.9, pág. 107) permitiram estabelecer as correlações diretas (J_{CH}), destacando-se CH-1'' [$\delta_{\text{H}}\delta_{\text{C}}$ 4,84/71,6]; CH-1''' [$\delta_{\text{H}}\delta_{\text{C}}$ 3,93/105,2]; CH-3 [$\delta_{\text{H}}\delta_{\text{C}}$ 6,67/102,6] e CH-6 [$\delta_{\text{H}}\delta_{\text{C}}$ 6,22/98,9] que foram importantes para descartar a presença das unidades do açúcar nestas posições e definir os hidrogênios anoméricos. A ligação entre as duas unidades de glicose (Gli-2''-O-1'''-Gli) e a ligação desses no flavonóide foram estabelecidas pelos espectros de HMBC (Figura I.4.68, pág. 114; Figura I.4.69, pág. 115; Figura I.4.70, pág. 116; Tabela I.4.9, pág. 107): H-1''/C-8, ² J [$\delta_{\text{H}}\delta_{\text{C}}$ 4,84/103,7]; H-1''/C-7, ³ J [$\delta_{\text{H}}\delta_{\text{C}}$ 4,84/162,9]; H-1''/C-9, ³ J [$\delta_{\text{H}}\delta_{\text{C}}$ 4,84/156,3]; H-1''/C-2'', ² J [$\delta_{\text{H}}\delta_{\text{C}}$ 4,84/81,9]; H-2''/C-1''', ³ J [$\delta_{\text{H}}\delta_{\text{C}}$ 4,1/105,2].



31

Tabela I.4.9. Dados de RMN¹H (400 MHz) e RMN¹³C (100 MHz) de **9** em DMSO-D₆.



C	9				9 (AGRAWAL, 1989)
	¹ H- ¹³ C-HMQC- ¹ J _{CH}		¹ H- ¹³ C-HMBC- ⁿ J _{CH}		
	d _C	d _H (J Hz)	² J _{CH}	³ J _{CH}	
2	164,0	-	H-3	H-6''	163,9
4	182,0	-	H-3	-	181,8
5	160,7	-	-	-	160,6
7	162,9	-	-	H-1''	163,5
8	103,7	-	H-1''	H-6	105,2
9	156,3	-	-	H-1''	156,0
10	103,8	-	-	H-3	103,7
1'	122,1	-	-	H-3	121,9
3'	145,9	-	H-2'	-	146,0
4'	149,8	-	-	H-6'	150,1
CH					
3	102,6	6,67 (s)	-	-	102,5
6	98,9	6,22 (s)	-	-	98,5
2'	114,0	7,44 (sl)	-	H-6'	114,0
5'	115,8	6,88 (dl)	-	-	115,9
6'	119,3	7,49 (d,7,6)	-	H-2'	119,3
1''	71,6	4,84 (d, 9,52)	H-2''	-	71,6
2''	81,9	4,1 (t, 9,0)	H-1''	-	82,0
3''	78,5	3,5 (m)	H-2''	H-1''	78,6
4''	70,4	2,9-3,1 (m)	-	-	70,5
5''	81,2	-	-	-	81,4
1'''	105,2	3,93(d,7,72)	-	H-2''	103,7
2'''	74,4	-	-	-	74,4
3'''	76,0	-	-	-	76,3
4'''	69,5	2,9-3,5 (m)	-	-	69,5
5'''	76,5	-	-	-	76,1
CH ₂					
6''	61,5	3,8-3,9 (m)	-	-	61,5
6'''	60,5	3,0-3,4 (m)	-	-	60,5
HO-5	-	13,1(s)	-	-	

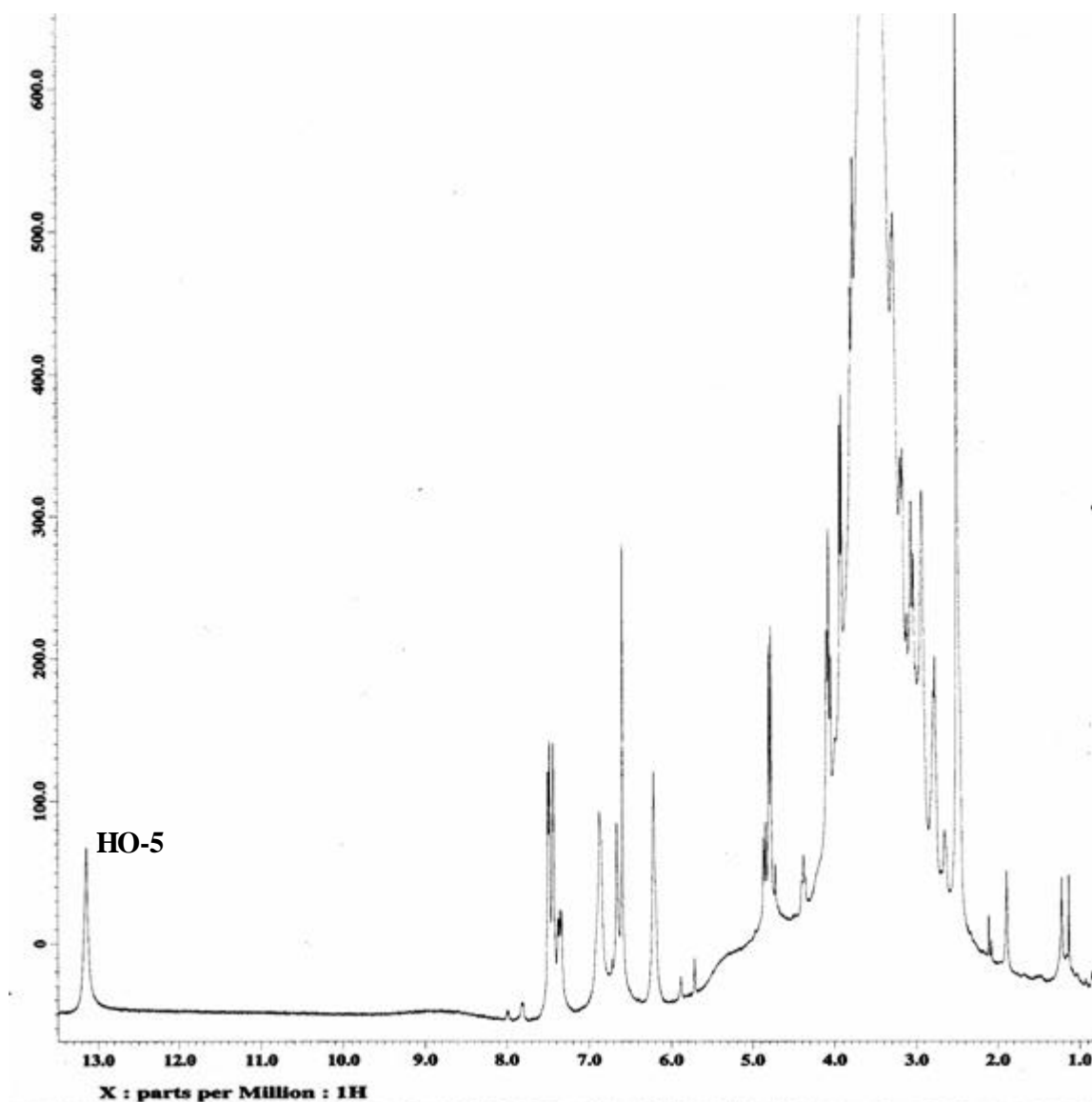


Figura I.4.62. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, D_3CSOCD_3) do flavonóide **9** (2''-O-b-D-glicopiranosil orientina).

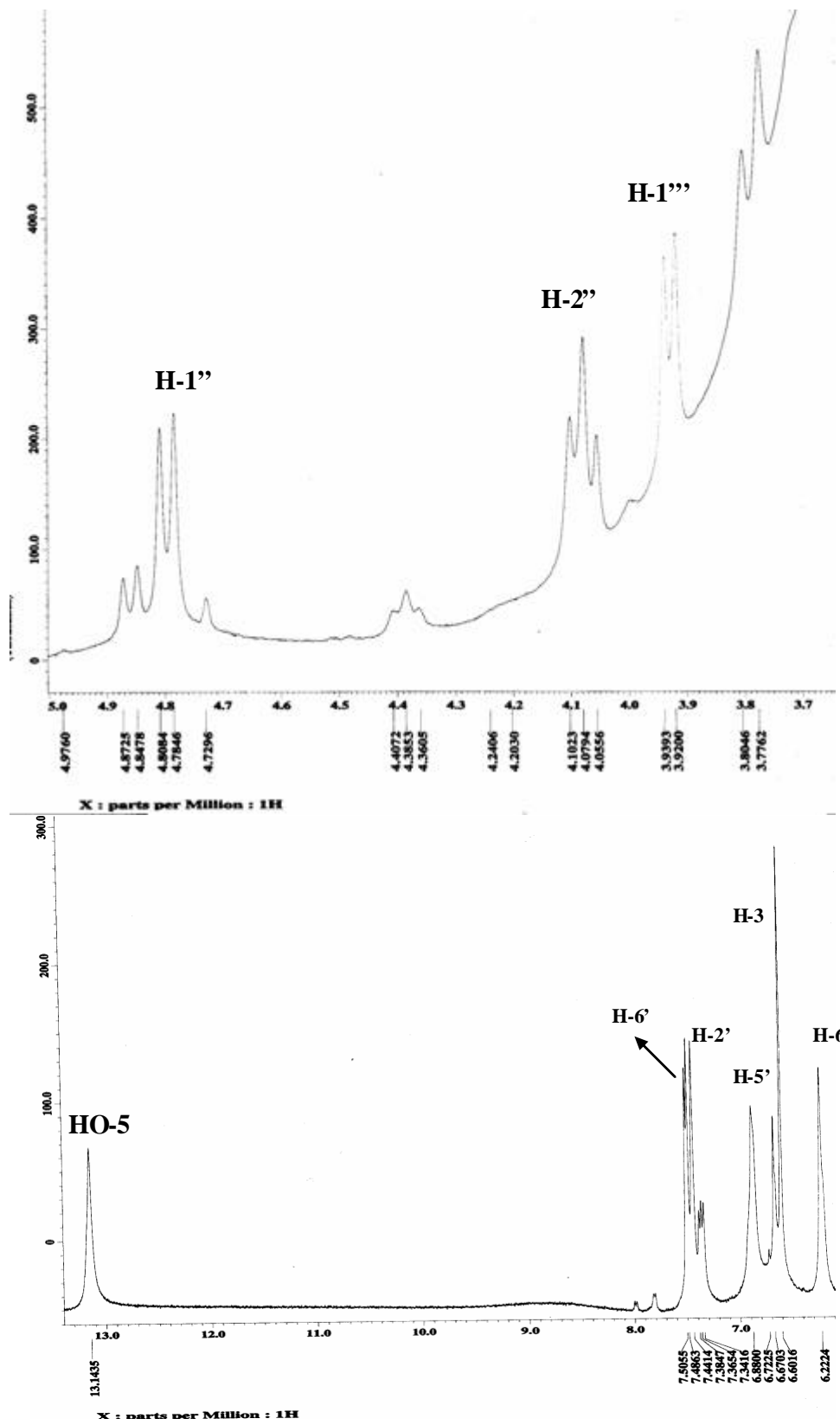


Figura I.4.63. Espectro de RMN ¹H ampliado (400 MHz, D₃CSOCD₃) do flavonóide **9** (2''-O-₁₀₉ b-D-glicopiranosil orientina).

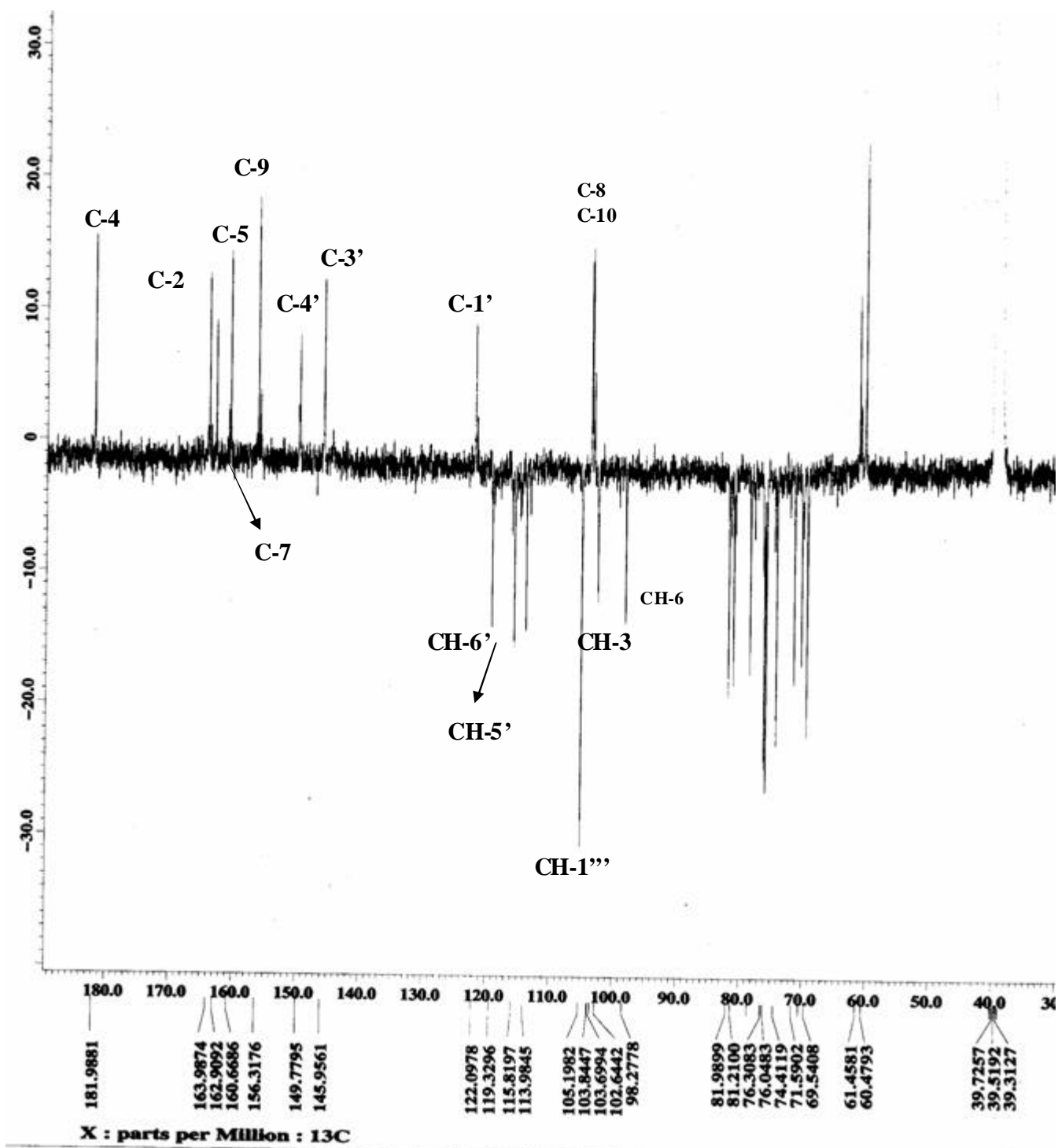


Figura I.4.64. Espectro de RMN ^{13}C e APT (100 MHz, D_3CSOCD_3) do flavonóide **9** ($2''\text{-O-b-D-glicopiranosil orientina}$).

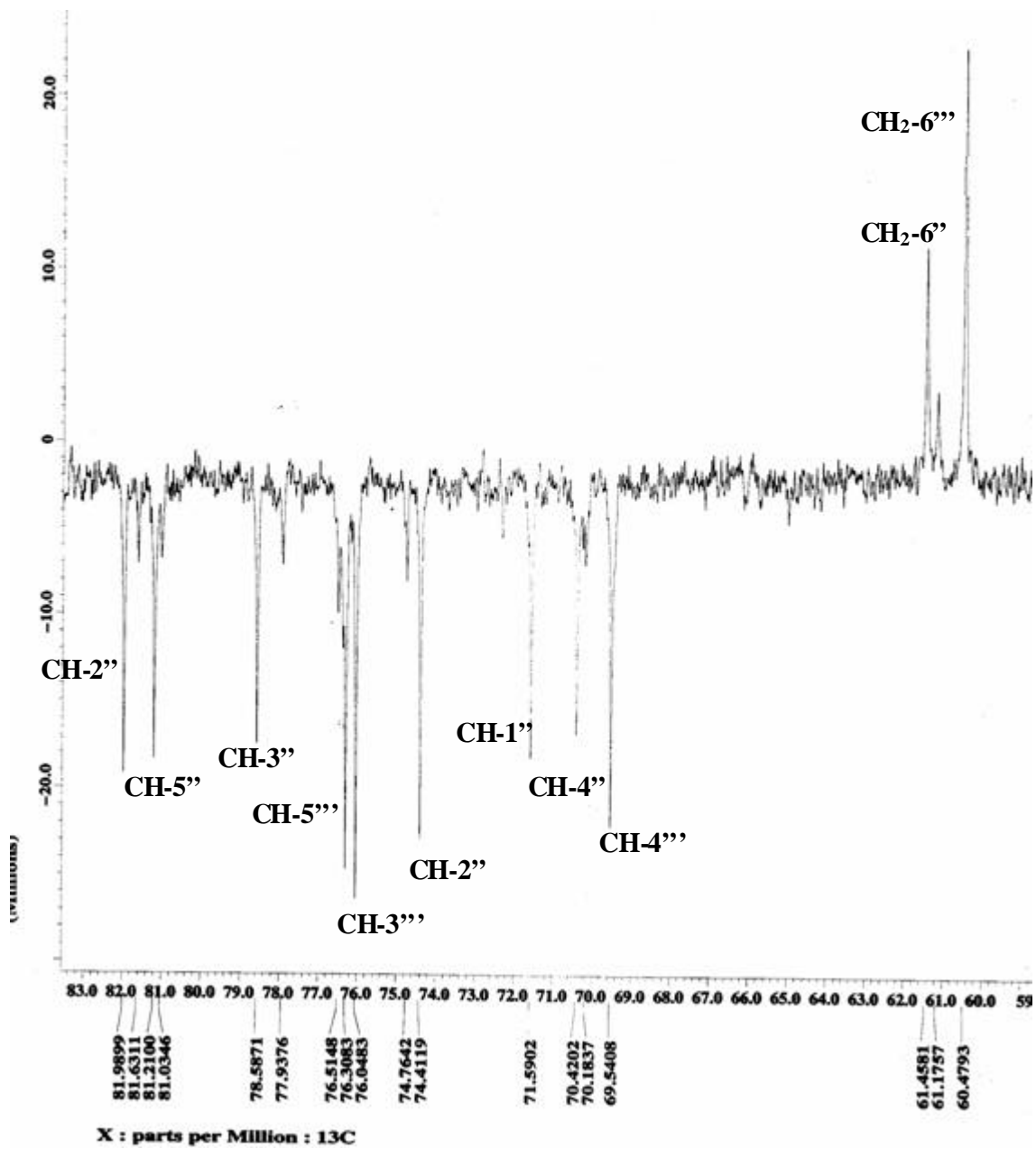


Figura I.4.65. Espectro de RMN ^{13}C e APT ampliado (100 MHz, D_3CSOCD_3) do flavonóide **9** (2''-O-b-D-glicopiranosil orientina).

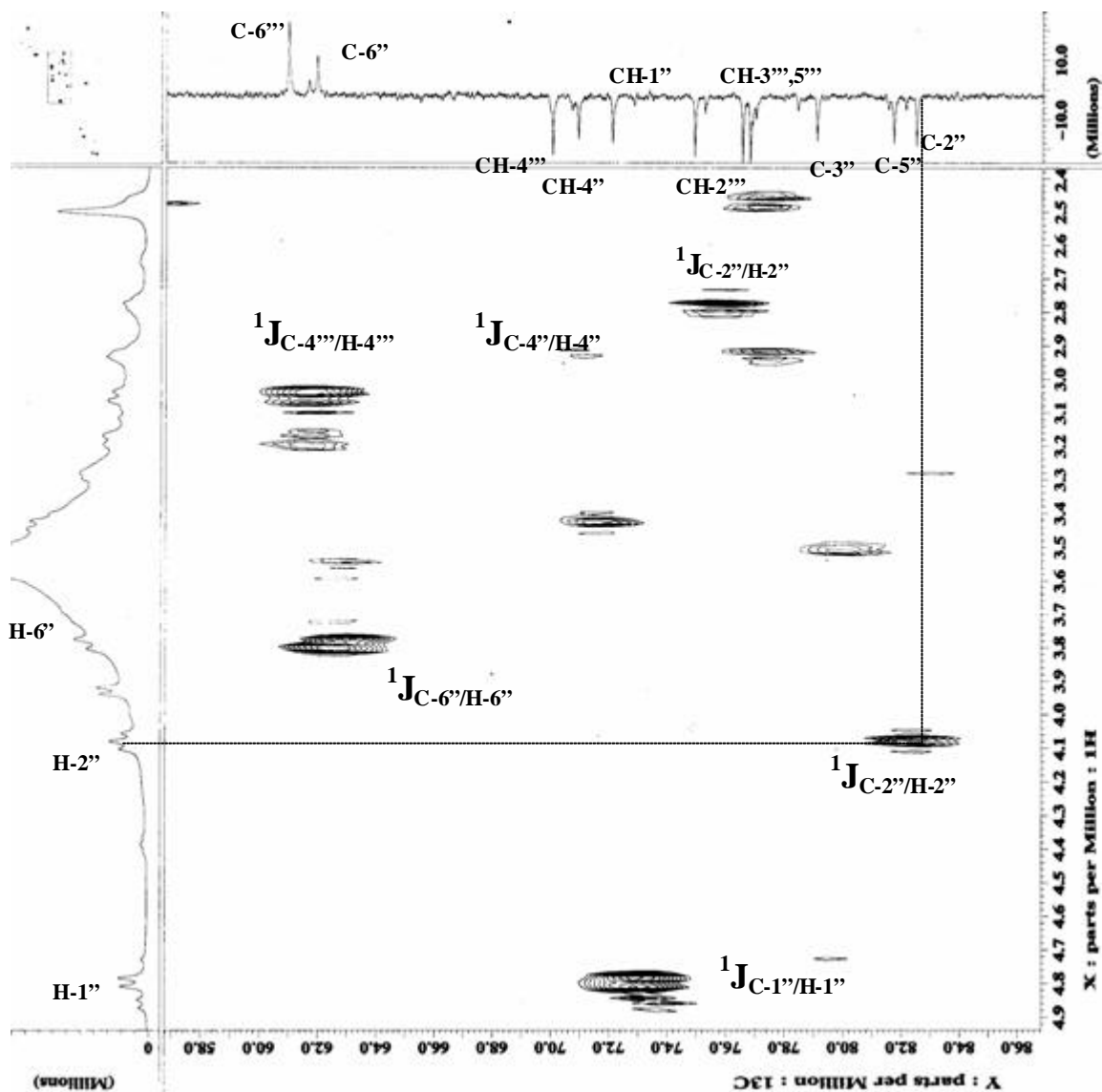


Figura I.4.66. Espectro de HMQC (400 MHz, D_3CSOCD_3) do flavonóide **9** (2''-O-b-D-glicopiranosil orientina).

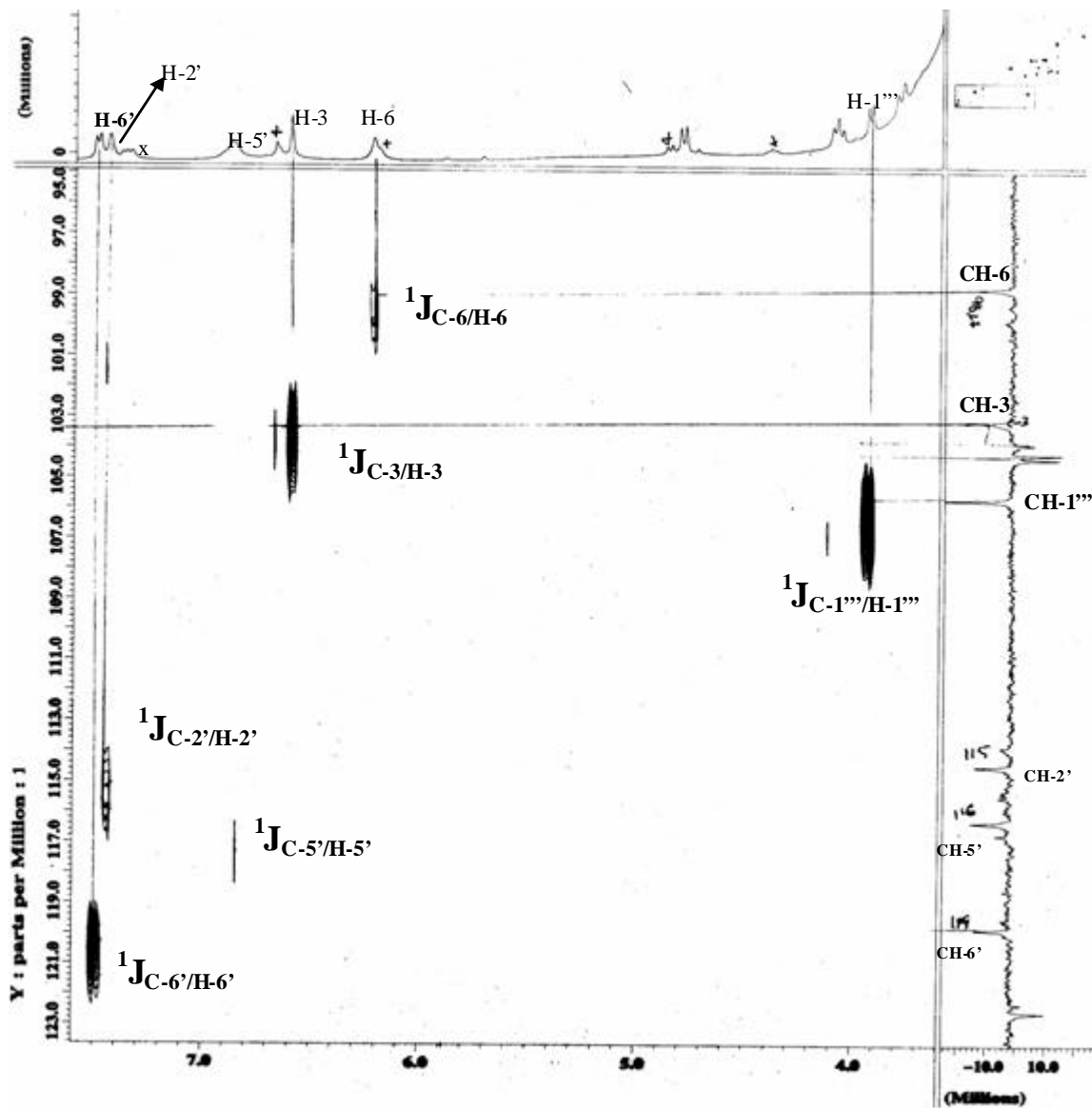


Figura I.4.67. Espectro de HMQC (400 MHz, D_3CSOCD_3) do flavonóide 9 (2''-O-b-D-glicopiranosil orientina).

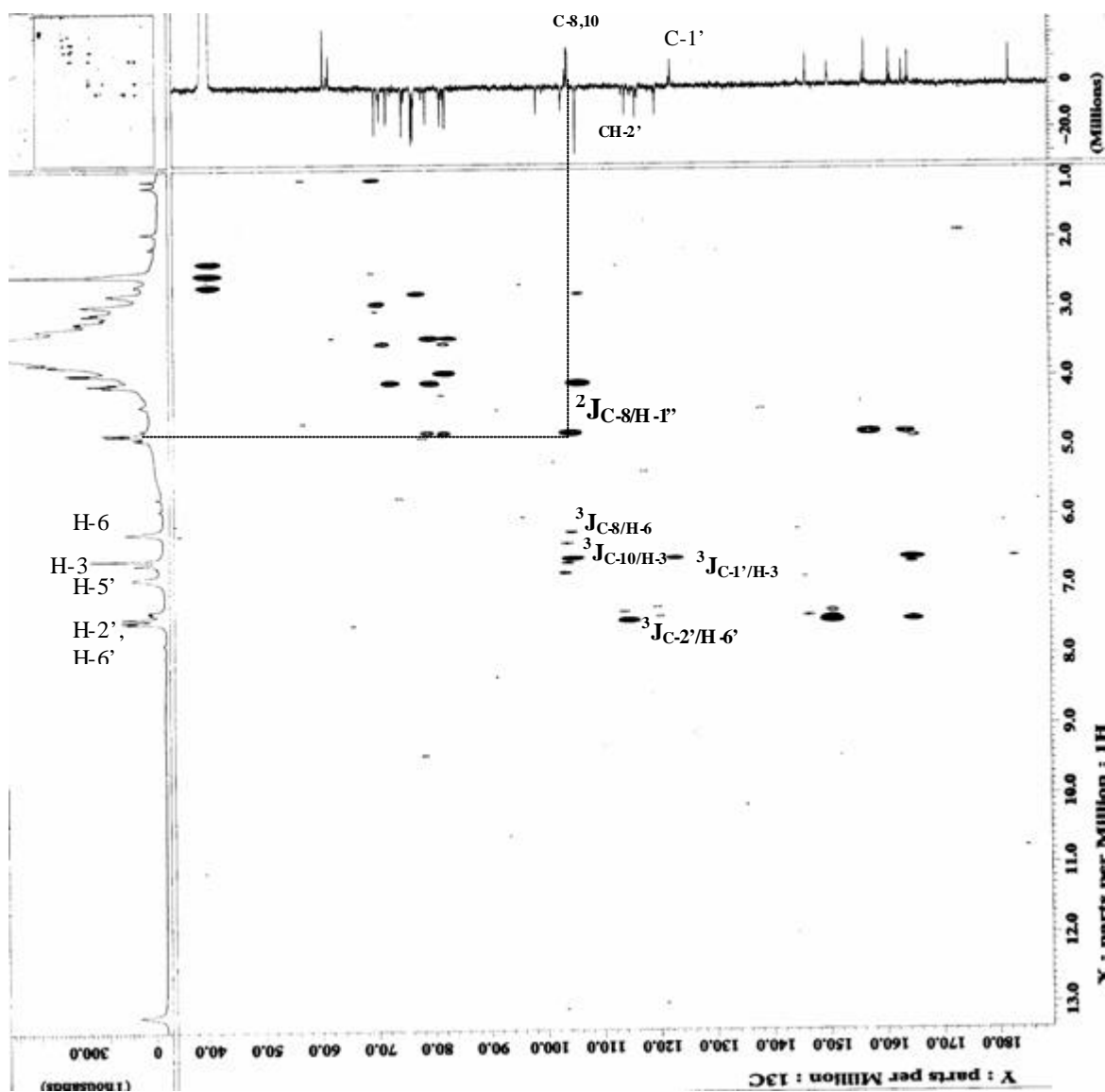


Figura I.4.68. Espectro de HMBC (400 MHz, D_3CSOCD_3) do flavonóide **9** (2''-O-b-D-glicopiranosil orientina).

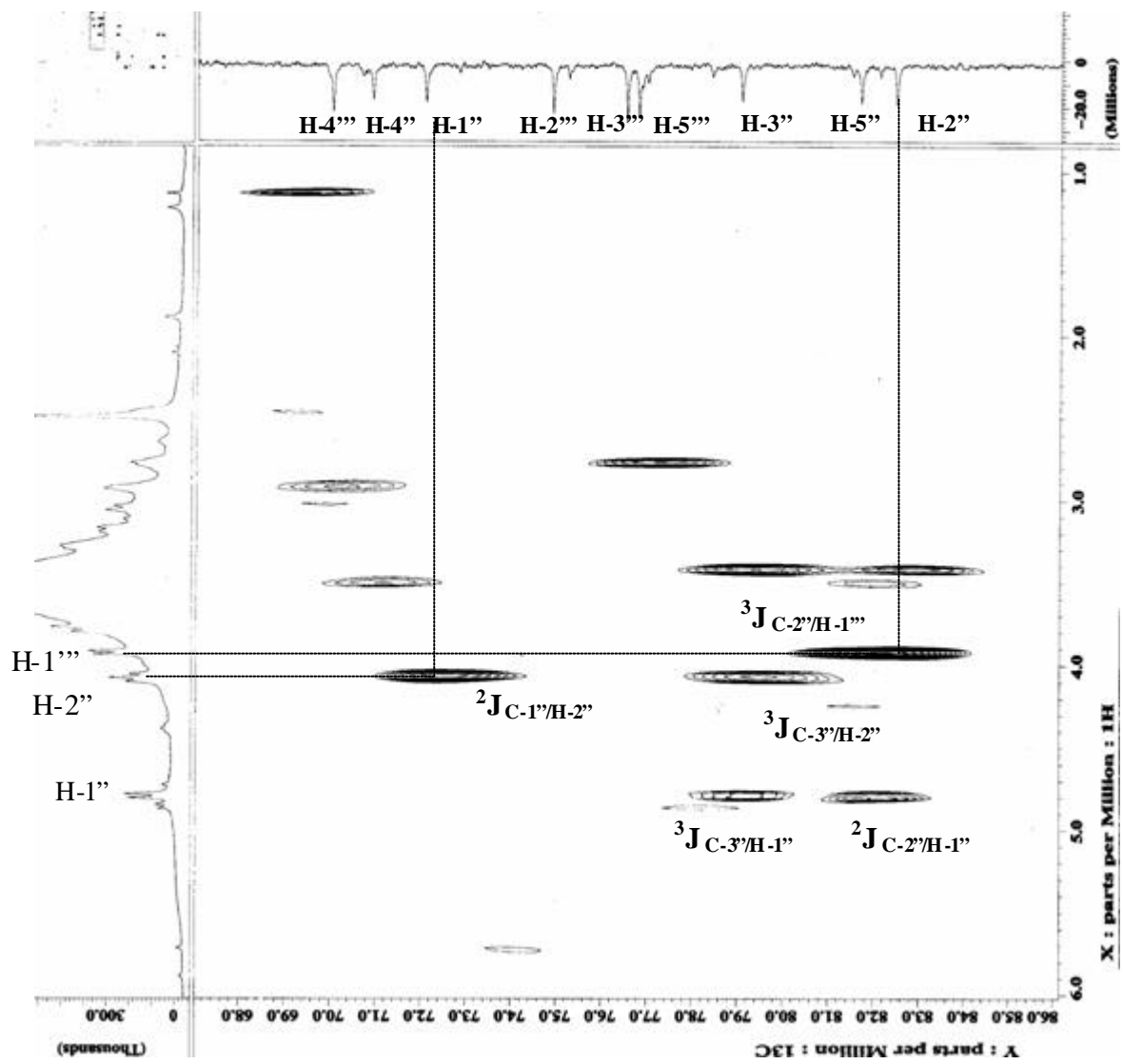


Figura I.4.69. Espectro de HMBC ampliado (400 MHz, D_3CSOCD_3) do flavonóide **9** (2''-O-b-D-glicopiranosil orientina).

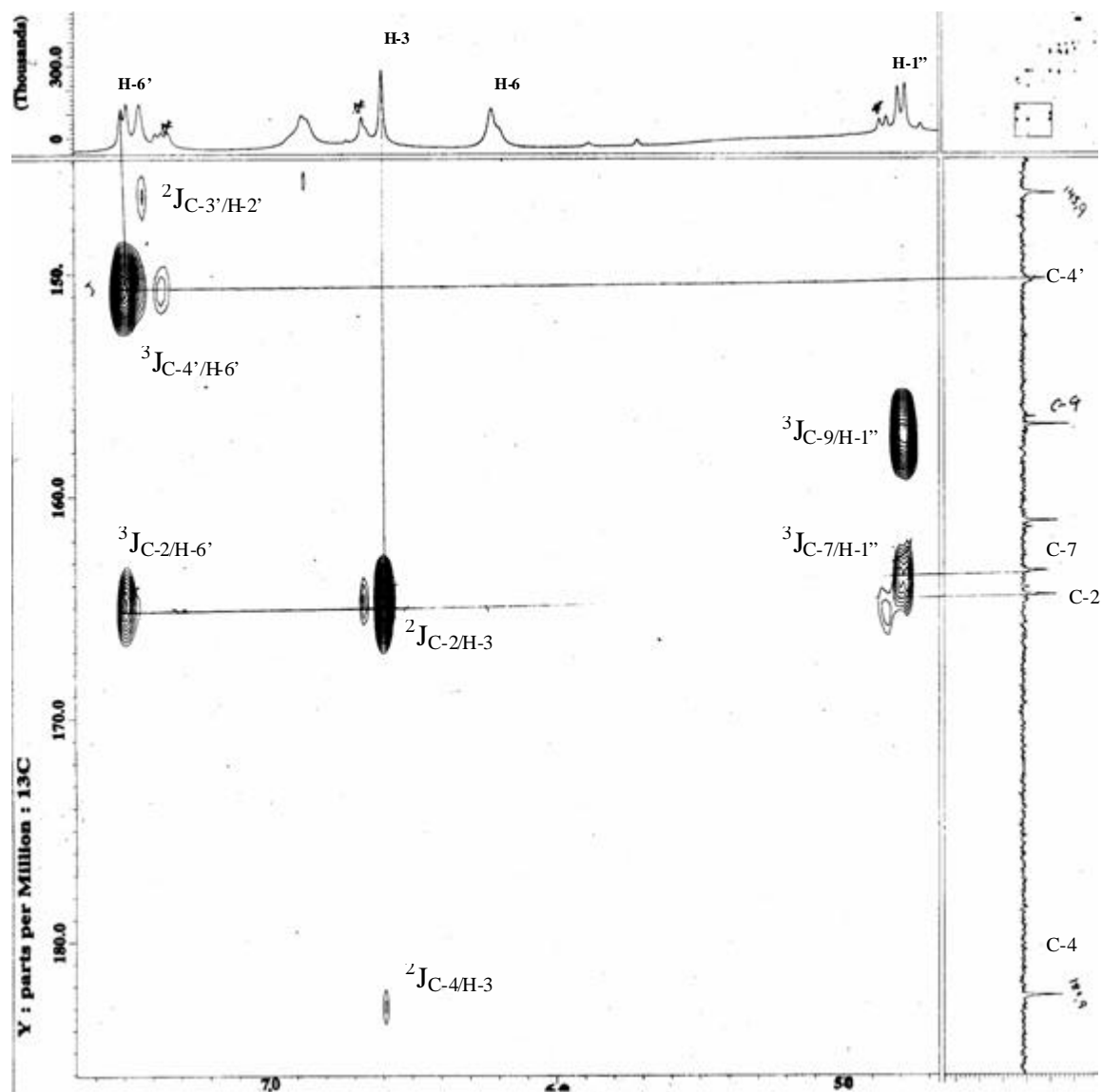


Figura I.4.70. Espectro de HMBC ampliado (400 MHz, D_3CSOCD_3) do flavonóide **9** (2''-O-b-D-glicopiranosil orientina).

I-5. Referências- Capítulo I

AGRAWAL. K. P.; BANSAL. M.C.; PORTER. L.J.; FOO. L. Y. Flavonoid glycosides e
AGRAWAL. K. P.; BANSAL. M.C. Flavonoides in Carbon-13 NMR of Flavonoids. *Agrawal
PK* (ed.), Elsevier: New York-USA, 283-364 e 432-496, 1989.

ALVES, C. C. F. METABÓLITOS ESPECIAIS ISOLADOS DE *Luxemburgia octandra*
(Ochnaceae), *Laseguea erecta* (Apocynaceae), DO LÁTEX DE *Parahancornia amapa*
(Apocynaceae) e de *Solanum crinitum* (Solanaceae). Tese de doutorado – Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2003.

BARROSO, G. M.; Sistemática de Angiosperma do Brasil, *UFV-MG*, 130, 1986.

BUCKINGHAM. V. *Dictionary of Natural products*. Chapman & Hall; London, 103, 1994.

CARVALHO, M. G. de, CARVALHO, G. J. A. de; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents
from *Ouratea floribunda*: Complete ¹H and ¹³C NMR assignments of Atranorin and its new
acetyl derivative. *J. Braz. Chem. Soc.*, **11** (2), 143-147, 2000.

CARVALHO, M. G. de; VELANDIA, J. R.; OLIVEIRA, M. C. C. de; ECHEVARRIA, A.;
BRAZ-FILHO, R.; GRYNBERG, N. F. Chemical Structure, Cytotoxic and Antitumours
Activities of Biflavonoids from Brazilian *Ouratea* (Ochnaceae). In: GOVIL, J. N.; CENTRE,
Res. Book. (Org.). Recent Progress in Medicinal Plants, Phytochemistry & Pharmacology II.
New Dehli, v. 08, 77-92, 2002.

CARVALHO, M. G. de; ALVES, C. C. F.; SILVA, K. G. S.; EBERLIN, M. N.; WERLE, A.
A. Luxenchalcone, a new bichalcone and other constituents from *Luxemburgia octandra*. *J.
Braz. Chem. Soc.*, **15** (1), 146-149, 2004.

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-Jena.*, **7** (3), 245-250, 2000.

CHARI. V. M.; CHEN. F.; CHEN. L.; ILYAS. M.; LIN. Y. C.; LIN. Y. M.; NESZMÉLY. A.;
WAGNER. H. ¹³C-NMR Spectroscopy of biflavonoids *Phytochemistry*, **16**, 1273-1278, 1977.

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

DANIEL. J.F. de S.; CARVALHO. M. G. de; CARDOSO. R. DA S.; EBERLIN. M. N.
Others flavonoids from *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, 2004 (aceito).

DORA. G.; EDWARDS. J. M. Taxonomic status of *Lanaria lanata* and isolation of a novel
biflavone. *J. Nat. Products*. **54** (3), 796-801, 1991.

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*, **61**, 217-220, 1995.

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

FELICIO, J. D.; ROSSI, M. H.; BRAGGIO, M. M.; GONÇALEZ, E.; PAK, A.; CORDEIRO, I.; FELICIO, R. C. Chemical constituents *Ouratea parviflora*. *Biochem. Syst. Ecol.*, **32**, 79-81, 2004.

GARTLAN, S.; MCKEY, D. B.; WATERMAN, P. G.; MBI, C. N.; STRUHSAKER, T. T. A Comparative Study of the Phytochemistry of Two African Rain Forests. *Biochem. Syst. Ecol.*, **8**, 401-422, 1980.

GHOOGOMU, R.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Lophirone A, a biflavonoid with unusual skeleton from *Lophira lanceolata*. *Tetrahedron Lett.*, **28** (26), 2967-2968, 1987.

GONÇALEZ, E.; FELICIO, J. D.; PINTO, M. M. Biflavonoids inhibit the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **34**, 1453-1456, 2001.

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

GRYNBERG, N. F.; CARVALHO, M. G. de; VELANDIA, J. R.; OLIVEIRA, M. C.; MOREIRA, I. C.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. DNA topoisomerase inhibitors: biflavonoids from *Ouratea* species. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **35** (7), 819-822, 2002.

HARBORNE. J. B. The Flavonoids; Adv. In Research since 1986. Chapman and Hall, New York, 1994.

HARBORNE. J. B; MABRY T. J. The Flavonoids: Adv. In Research. Chapman and Hall, New York, 1982.

KAMIL, M.; KHAN, N. A.; ALAM, M. S.; ILYAS, M. A biflavone from *Ochna pumila*. *Phytochem.*, **26** (4), 1171-1173, 1987.

LIN, Y. M.; FLAVIN, M. T.; SCHURE, R.; CHEN, F. C.; SIDWELL, R.; BARNARD, D. L.; HUFFMAN, J. H.; KERN, E. R. Antiviral activities of biflavonoids. *Planta Med.*, **65** (2), 120-125, 1999.

MANGA, S. S. E.; MESSANGA, B. B.; SONDEGAM, B. L. 7,8-Dihydrobenzofuranones from *Ouratea reticulata*. *Fitoterapia*, **72**, 706-708, 2001.

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

MARKHAM, K. R.; WEBBY, R. F.; VILAIN, C. 7-O-Methyl-(2R:3R)-Dihydroquercetin 5-O- β -D-glucoside and other flavonoids from *Podocarpus nivalis*. *Phytochem.*, **23** (9), 2049-2052, 1984.

MASHIMA, T.; OKIGAWA, M.; KAWANO, N.; KHAN, N. U.; ILYAS M.; RAHMAN, W. On the bisflavones in the leaves of *agathis alba* foxworthy. *Tetrahedron Letters*. **11** (33), 2937-2940, 1970.

aMBING, J. N.; BASSOMO, M. Y.; PEGNYEMB, D. E.; TIH, R. G.; SONDEMGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Constituents of *Ouratea flava*. *Biochem. Syst. Ecol.*, **31**, 215-217, 2003.

bMBING, J. N.; PEGNYEMB, D. E.; GHOGOMU TIH, R.; SONDEGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Two biflavonoids from *Ouratea flava* stem bark. *Phytochem.*, **63**, 427-431, 2003.

MEEI, Y. L.; CHEN, F. C. Agathisflavone from the drues of *Rhus succedanea*. *Phytochem.*, 657-658, 1974.

MESSANGA, B.; TIH, G. R.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Biflavonoids from *Ochna calodendron*. *Phytochem.*, **35** (3), 791-794, 1994.

MESSANGA, B. B.; KIMBU, S. F.; SONDEGAM, B. L.; BODO, B. Triflavonoids of *Ochna calodendron*. *Phytochem.*, **59**, 435-438, 2002.

aMONACHE, F. D.; ALBUQUERQUE, I. L. de; FERRARI, F.; BETOLLO, G. B. M. A new catechin and a dimeric proantocyanidin from *Ouratea* species. *Tetrahedron Letters*, **8** (43), 4211-4214, 1967. Resumo do Chemical Abstracts, vol.68:104905u, pg. 10120, 1968.

bMONACHE, F. D.; ALBUQUERQUE, I. L. de; FERRARI, F.; BETOLLO, G. B. M. A new proantocyanidin dimer from *Ouratea*. *Ann. Chim.*, **57** (11), 1364-1371, 1967. Resumo do Chemical Abstracts, vol.68:114366h, pg. 11018, 1968.

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

- MOREIRA, I. C.; CARVALHO, M. G. de; BASTOS, A. B. F. O.; BRAZ-FILHO, R. A flavone dimer from *Ouratea hexasperma*. *Phytochem.*, **51**, 833-838, 1999.
- OLIVEIRA, M. C. C.; CARVALHO, M. G. de; SILVA, C. J.; WERLE, A. A. New biflavonoid and Other constituents from *Luxemburgia nobilis* (EICHL). *J. Braz. Chem. Soc.*, **13** (1), 119-123, 2002.
- OLIVEIRA, M. M. de; SAMPAIO, M. P.; SIMON, F.; GILBERT, B.; MORS, W. B. Antitumor Activity of Condensed Flavanols. *An. Acad. Bras. Cienc.*, **44** (1), 41-43, 1972.
- PEGNYEMB, D. E.; TIH, G. R.; SONDEGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Biflavonoids from *Ochna afzelii*. *Phytochem.*, **57**, 579-582, 2001.
- PEGNYEMB, D. E.; TIH, G. R.; SONDEGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Flavonoids from leaves of *Ochna afzelii*. *Biochem. Syst. Ecol.*, **31**, 219-221, 2003.
- SAMPAIO, M. P.; DE OLIVEIRA, M. M. Triagem de Substâncias e Extratos de Origem Vegetal no Carcinossarcoma de Walker 256. *An. Acad. Bras. Cienc.*, **47** (1), 149-153, 1975.
- SARMENTO, T. ESTUDO QUÍMICO DE ESPÉCIES DE *Solanum*. Tese de Doutorado – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2002.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento. *UFSC/UFRGS*, 2001.
- RAO, C. V.; GUNASEKAR, D. Squarrosin, a new isoflavone from *Ochna squarrosa* (Linn.). *Indian Journal of Chemistry*, **28 B**, 780-781, 1989.
- TANG, S.; BREMNER, P.; KORTENKAMP, A.; SCHLAGE, C.; GRAY, A.; GIBBONS, S.; HEINRICH, M. Biflavonoids with cytotoxic and antibacterial activity from *Ochna macrocalyx*. *Planta Med.*, **69** (3), 247-253, 2003.
- aTIH GHOGOMU, R.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Structures of Isombamichalcone and Lophirochalcone, bi- and tetra-flavonoids from *Lophira lanceolata*. *Tetrahedron Lett.*, **30** (14), 1807-1810, 1989.
- bTIH GHOGOMU, R.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Structure of Lophirone B and C, Biflavonoids from the bark of *Lophira lanceolata*. *Phytochem.*, **28** (5), 1557-1559, 1989.
- TIH GHOGOMU, R.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Structure of the chalcone dimers Lophirone F, G and H from *Lophira lanceolata* stem bark. *Phytochemistry*, **29** (7), 2289-2293, 1990.
- TIH, A. E.; GHOGOMU, R. T.; SONDEGAM, B. L.; CAUX, C.; BODO, B. Constituents of *Lophira alata* leaves. *Biochem. Syst. Ecol.*, **31**, 549-551, 2003.

aTIH, A.; MARTIN, M. T.; TIH GHOGOMU, R.; VUIDEPOT, I.; SONDEGAM, B. L.; BODO, B. Lophiroflavans B and C, Tetraflavonoids of *Lophira alata*. *Phytochemistry*, **31** (10), 3595-3599, 1992.

bTIH, A.; TIH GHOGOMU, R.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Tetraflavonoids of *Lophira alata*. *Phytochem.*, **31** (3), 981-984, 1992.

VELANDIA, J. R.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R. Novel trichloro and tetrachloroisoflavone isolated from *Ouratea semiserrata*. *Nat. Prod. Lett.*, 12 (3), 191-198, 1998.

VELANDIA, J. R.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R.; WERLE, A. A. Biflavonoids and a glucopyranoside derivative from *Ouratea semiserrata*. *Phytochem. Anal.*, 13, 283-292, 2002.

CAPÍTULO II
ESTUDO QUÍMICO DE *Dipladenia martiana*

II. 1. Introdução

A família Apocynaceae, atualmente, apresenta 424 gêneros e cinco sub-famílias: Rauvolfioideae, Apocynoideae, Periplocoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae. Apresentam-se como árvores, arbustos ou trepadeiras, raramente, ervas e com látex presente (MIDDLETON, 2002). Do ponto de vista econômico as plantas dessa família são altamente venenosas, e muitas são utilizadas como medicinais. Os gêneros *Catharanthus*, *Rauvolfia* e *Strophanthus* fornecem respectivamente, fármacos antileucêmicos, anti-hipertensivos e utilizados no tratamento de ataque cardíaco (JUDD *et al.*, 1999). Há gêneros com importância ornamental como: *Allamanda*, *Amsonia*, *Asclepias*, *Carissa*, *Catharanthus*, *Hoya*, *Plumeria*, *Stapelia*, *Trachelospermum* e *Vinca* (JUDD *et al.*, 1999). Entre as espécies dos gêneros arbóreos destaca-se *Aspidosperma*, conhecida no Norte como pau-pereira e perobeira, que fornecem excelente madeira avermelhada, como a peroba, que é utilizada na carpintaria; *Hancornia* espécies que no Norte da Amazônia são conhecidas como mangaba, e *Plumeria*, com lindas flores brancas ou róseas, conhecidas como jasmim-manga. As mais comuns entre as trepadeiras são as do gênero *Allamanda*, com flores grandes e amarelas. Entre as espécies de porte baixo com caule erecto e anual pode-se citar o gênero *Mandevilla* (= *Dipladenia*); com diversos representantes campestres com flores róseas até vermelhas (RIZZINI, 1971).

O gênero *Dipladenia* era conhecido antigamente como *Mandevilla*, é ainda pouco estudado química e farmacologicamente. O estudo de *Mandevilla velutina* revelou a presença triterpenóides bioativos que agem inibindo a bradicinina na contração do útero de ratas, e revelou que os constituintes da fração hemicelulósica da parede celular são predominantemente os açúcares D-Glicose, L-Raminose e D-Xilose (MARASCHIN *et al.*, 1999). A química do gênero *Dipladenia* ainda é desconhecida, e, entretanto resolveu-se realizar o estudo fitoquímico dos galhos de *Dipladenia martiana*, coletados na Mata Atlântica em Ouro Preto-MG.

O trabalho publicado sobre o estudo químico desta espécie (CARVALHO *et al.*, 2001a) descreve o isolamento de triterpenos, flavonóides e flavonóides glicosilados. Os flavonóides glicosilados apresentam funções como antifúngicos, agindo como fitoalexinas (MCNALLY, *et al.*, 2003) e atividade antioxidante (BALDI, *et al.*, 1995).

As espécies família da Apocynaceae apresentam folhas geralmente opostas, algumas vezes alternadas ou cruzadas. As flores podem ser pequenas ou grandes e vistosas, geralmente radiais, tipicamente pentâmeras e hermafroditas. Fruto seco capsular ou indeiscente, ou então dois frutículos (cada um resultante do desenvolvimento de um carpelo), secos e deiscentes. Sementes aladas (*Aspidosperma*), pilosas (*Nerium*) ou não (*Allamanda*) (JUDD *et al.*, 1999; RIZZINI, 1971).

Distribuição geográfica: A família Apocynaceae encontra-se difundida nas regiões tropicais e subtropicais, com relativamente poucas espécies em climas temperados (CRONQUIST, 1981).

Nomes locais: Espécies do gênero *Dipladenia* são conhecidas vulgarmente como jalapa-do-campo ou rosa-do-campo (RIZZINI, 1971).

II. 2. Substâncias isoladas de espécies da família Apocynaceae

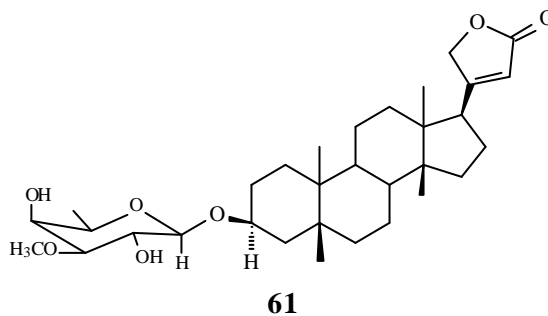
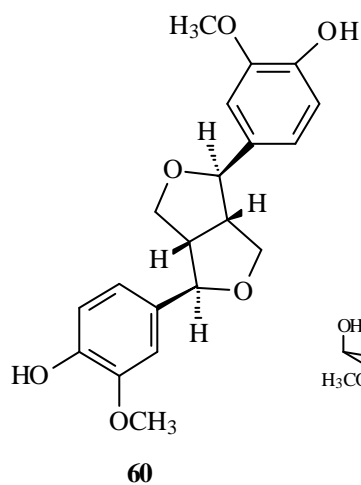
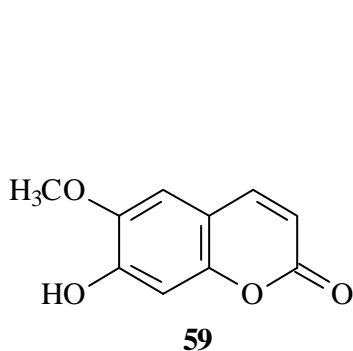
A) Literatura:

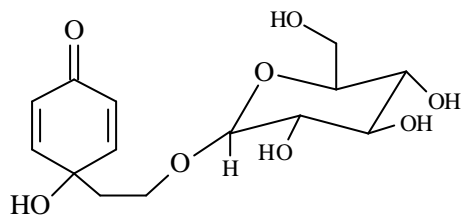
Essa família caracteriza-se como representante das espécies bioprodutoras alcalóides, principalmente indólicos, terpenóides, diversos tipos de iridóides (SIDDQUI & BEGUM, 1999; CRONQUIST, 1981), glicosídeos cardiotônicos, esteróides, algumas vezes glicosídeos cianogênicos e raramente saponinas (CRONQUIST, 1981). O estudo das folhas de *Rhazya stricta* forneceu flavonóides glicosilados (robinina e derivados novos de isorhamnetina) (ANDERSEN *et al.*, 1987), e do extrato da casca do caule de *Plumeria rubra* foi isolado um flavonol glicosilado (plumerubrosida). Esses trabalhos demonstram a presença de flavonóides glicosilados nos extratos polares em espécies de Apocynaceae. O grupo de produtos naturais da UFRRJ tem estudado espécies dessa família, como: *Himatanthus articulata* (BARRETO *et al.*, 1998), *Laseguea erecta*, *Parahancornia amapa* (ALVES, 2003; CARVALHO *et al.*, 2001b; SOBRINHO *et al.*, 1991).

A **Tabela 2** descreve algumas espécies da família Apocynaceae primeira coluna e a classe de das substâncias isoladas (coluna 2).

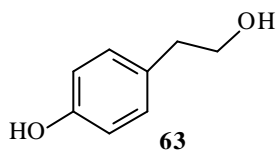
Tabela 2: Alguns constituintes químicos isolados das espécies de Apocynaceae.

Espécies de Apocynaceae e/ou parte estudada	Classe das substâncias	Referências
<i>Laseguea erecta</i> (caule)	cumarina (escopoletina) 59 , lignóide pinoresinol 60 e saponina digitoxigenina 61	(ALVES, 2003)
<i>Parahancornia amapa</i> (látex)	feniletanóides 62-65 e ésteres acil-lupeol 66-69	(ALVES, 2003)
<i>Allamanda catartica</i> , <i>Himatanthus fallas</i>	iridóides 70-71	(ABDEL-KADER <i>et al.</i> , 1997)
<i>Himatanthus articulata</i>	iridóide glicosilado 72	(BARRETO <i>et al.</i> , 1998)
<i>Himatanthus phagedaenicus</i>	iridóide 73	(VELOSO <i>et al.</i> , 1999)
<i>Himatanthus sucuuba</i>	iridóide 74 , triterpenos 75-77	(SILVA <i>et al.</i> , 1998)
<i>Plumeria rubra</i>	triterpeno 78	(AKHTAR & MALIK, 1993)
<i>Plumeria rubra</i>	iridóide 79	(KARDONO <i>et al.</i> , 1990)
<i>Thevetia peruviana</i>	iridóide 80	(ABE <i>et al.</i> , 1995)
<i>Plumeria acutifolia</i>	iridóide 81	(ABE <i>et al.</i> , 1988)
<i>Plumeria lancifolia</i>	alcalóide indólico 82	(FRANÇA <i>et al.</i> , 2000)
<i>Parahancornia amapa</i>	ésteres 3 β -O-acil lupeóis 83-85	(CARVALHO <i>et al.</i> , 2001b)
<i>Parahancornia Amapa</i>	ésteres 3 β -O-acil lupeóis e triterpenos pentacíclicos 86-89	(SOBRINHO <i>et al.</i> , 1991)
<i>Rhazya stricta</i>	flavonóides glicosilados 90-92	(ANDERSEN <i>et al.</i> , 1987)
<i>Plumeria rubra</i>	flavan-3-ol glicosilado 93	(KARDONO <i>et al.</i> , 1990)

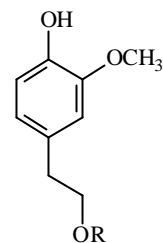




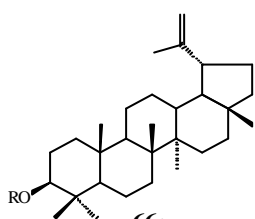
62



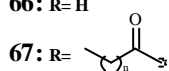
63



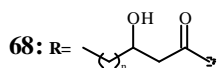
64: R=H
65: R=glucose



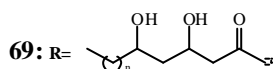
66: R=H



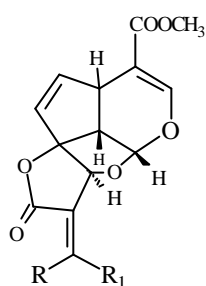
67: R=



68: R=

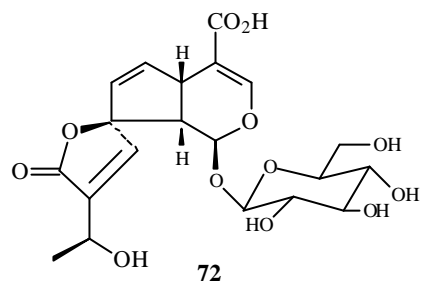


69: R=

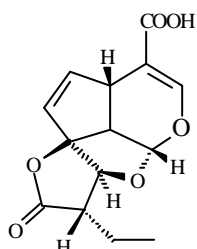


70: R=H, R₁=CH₃

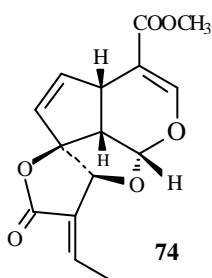
71: R=CH₃, R₁=H



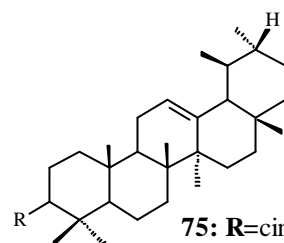
72



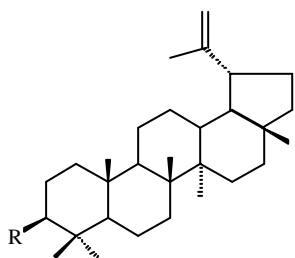
73



74

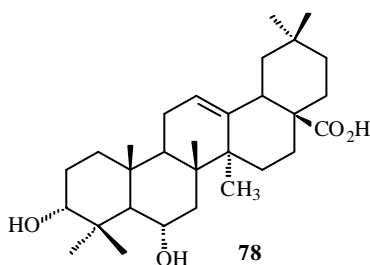


75: R=cinamoil

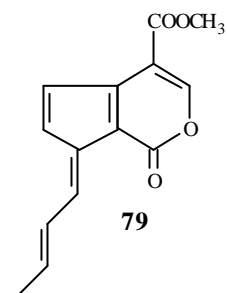


76: R= cinamoil

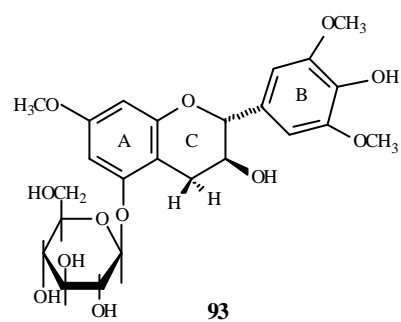
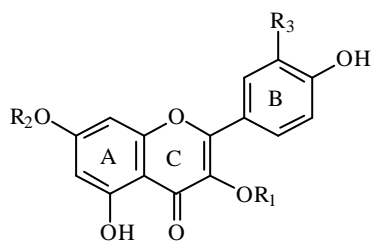
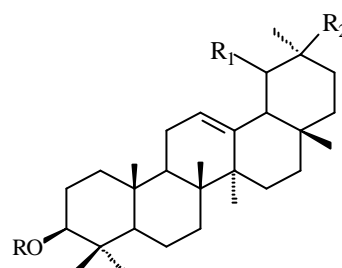
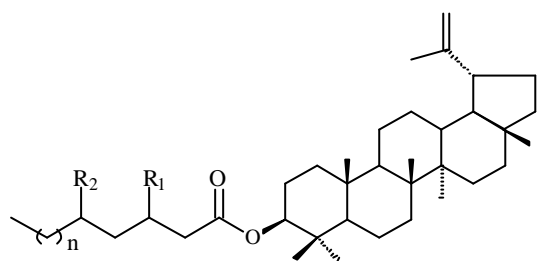
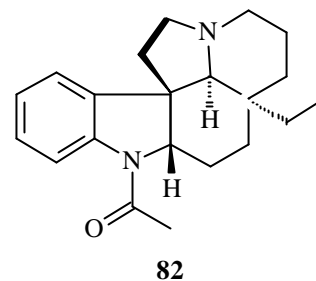
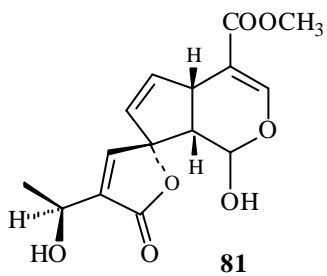
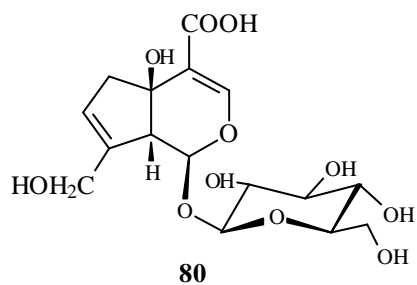
77: R=CH₃COO



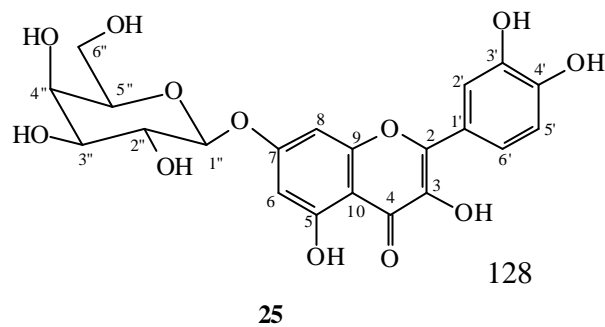
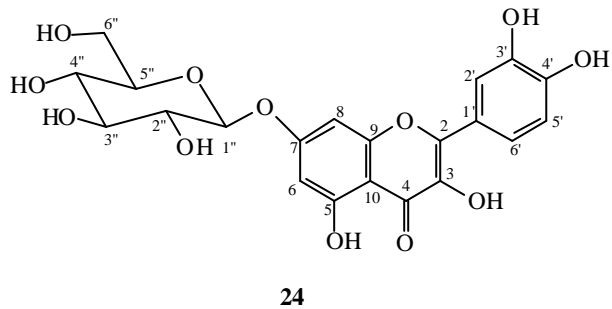
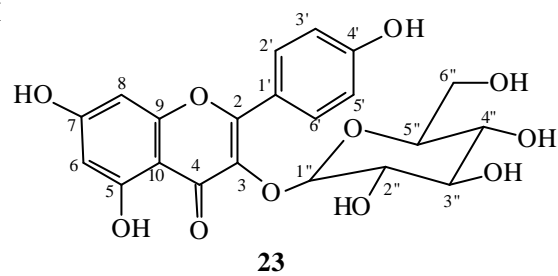
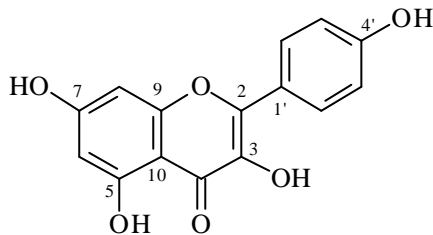
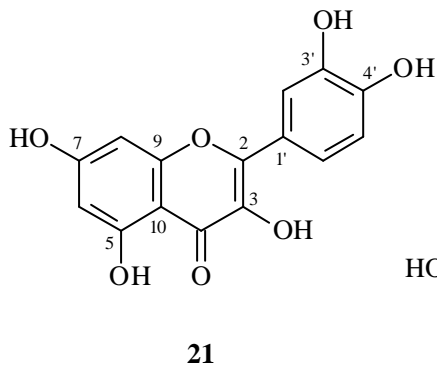
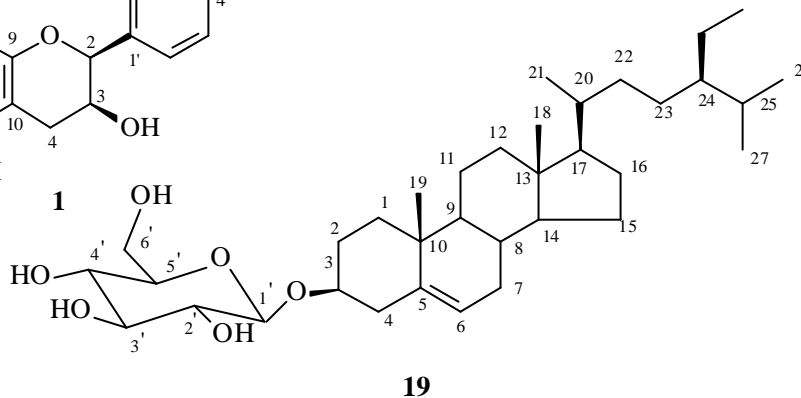
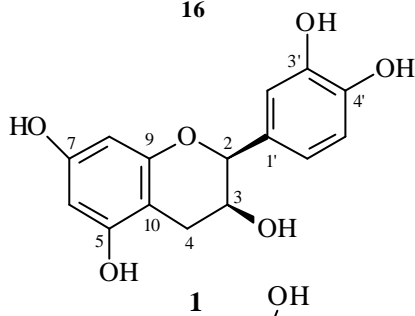
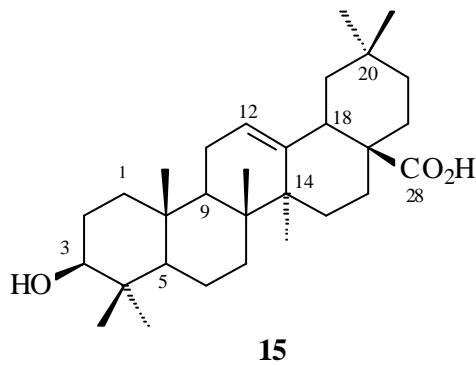
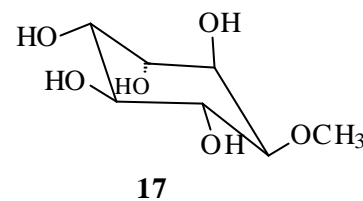
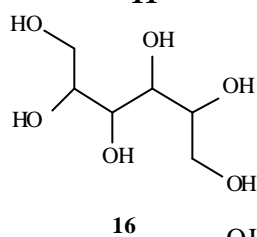
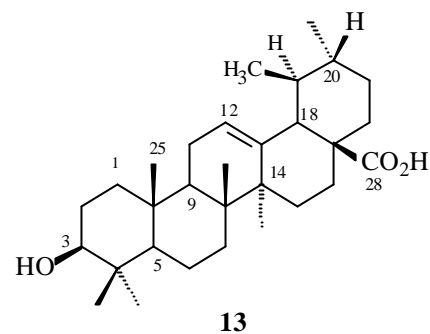
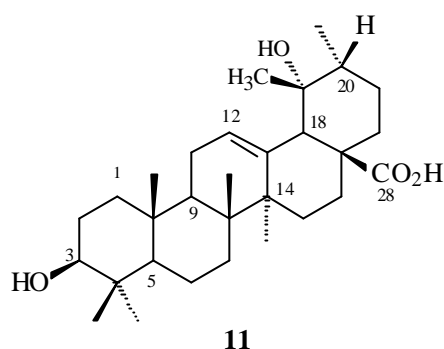
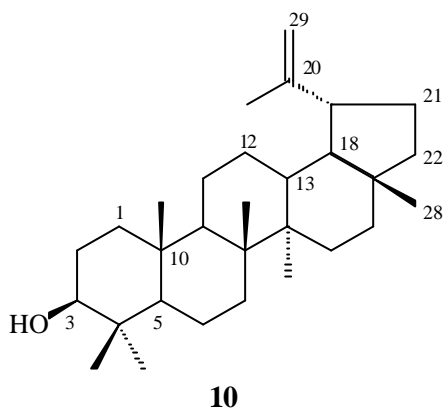
78



79

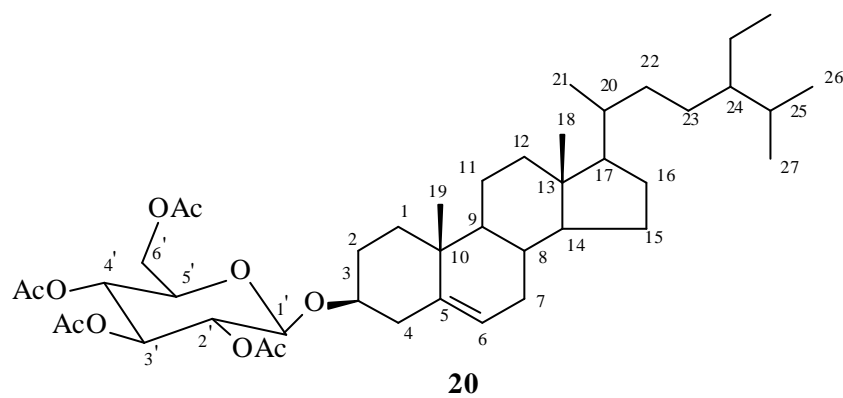
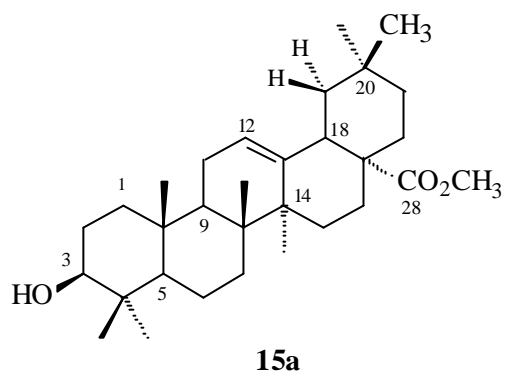
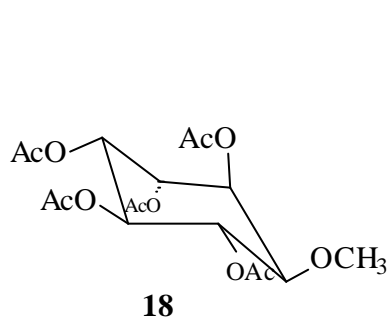
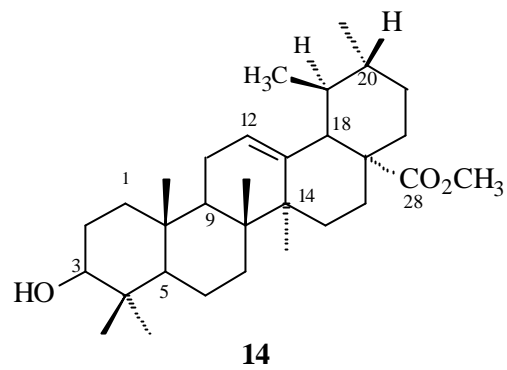
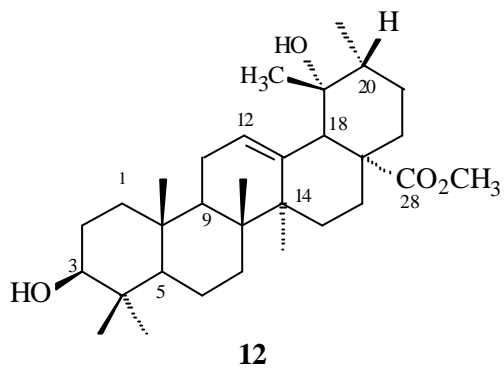


B) Substâncias isoladas de *Dipladenia martiana*:



128

Derivados obtidos através deste trabalho:



II.3. Parte experimental

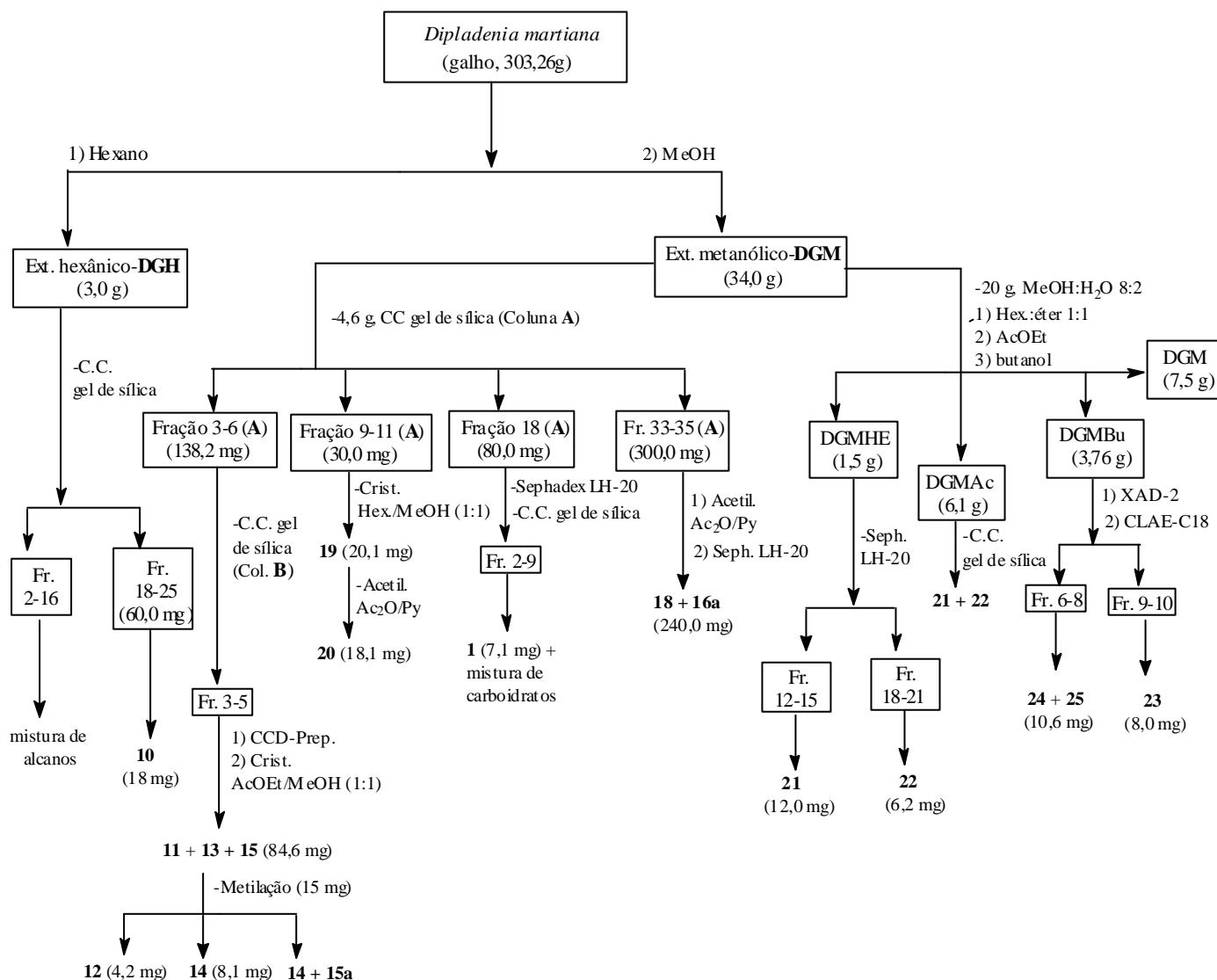
II-3.1. Material vegetal:

Os galhos *Dipladenia martiana* foram coletados em Comarinho, Minas Gerais. Uma exsicata desta espécie (Nº 422) está depositada no herbário José Badini, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

II-3.2. Isolamento e purificação dos constituintes:

O material seco e pulverizado (303,3 g) foi submetido à maceração, sucessivamente com hexano e metanol a temperatura ambiente. As soluções extrativas foram concentradas em rotavapor a 40°C sob pressão reduzida, fornecendo o extrato metanólico **DGM** (34,0 g) e o extrato hexânico **DGH** (3,0 g). Esses extratos foram analisados por TLC. 4,6 g de **DGM** foi submetido à coluna gel de sílica (A), eluídos com mistura de solventes CHCl_3 e MeOH, com aumento gradual de polaridade $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1) até metanol/água (9:1), Esquema II.1, pág. 131. Foram coletadas 56 frações. As frações 3-6 (138,2 mg) foram fracionadas em coluna gel de sílica (Coluna B), com $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1), e as frações 3-5 dessa coluna foram purificados por cromatografia preparativa usando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1) e cristalização em AcOEt/MeOH (1:1), fornecendo a mistura de três triterpenos (**11** + **13** + **15**, 84,6mg). 15,0 mg da fração que continha a mistura **11** + **13** + **15**, foi metilada com diazometano e purificada por cromatografia em camada preparativa hexano/ AcOEt /acetona (8:1:1). Desse tratamento obtiveram-se as substâncias puras: pomolato de metila **12** (4,2 mg, pf 139 °C) e ursolato de metila **14** (8,1 mg, 229 °C) e uma fração contendo mistura ursolato de metila com oleanato de metila **15a**. As frações A 9-11 (30,0 mg) foram cristalizadas com hexano/metanol (1:1), fornecendo 3-*O*-glicopiranosilsterol **19** (20,1 mg, pf 303 °C) que, posteriormente foi submetida a acetilação com anidrido acético e piridina, fornecendo o derivado **20** (18,1 mg, pf 170 °C). A fração A-18 (80,0 mg, da coluna A), foi filtrada em coluna de Sephadex LH-20 usando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1) e em coluna gel de sílica (coluna C), com $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ (8:2). Da fração 2-9 foi isolada a epicatequina **1** (pastoso, 7,1 mg) e das frações C-10-15 isolou-se uma mistura de carboidratos (80 mg). As frações A-33-35 foram analisadas com espectros de RMN ^{13}C , e constatou-se a presença de carboidratos (goma, 300,0 mg). Este material foi acetilado com anidrido acético e piridina, e após a purificação identificou-se o quebracitol **17** e sorbitol **16** a partir dos derivado acetilados **18** + **16a** (goma, 240,0 mg). 20,0g de **DGM** foi submetido à partição com hexano/éter (1:1), AcOEt e butanol. O extrato hexano/éter (**DGMHE**, 1,5g) foi filtrado em Sephadex LH-20, usando $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ (8:2). As frações 12-15 e 18-21 foram novamente filtradas em Sephadex e originando e quercetina **21** (12 mg, 310°C) e canferol **22** (6,2 mg, 276°C), respectivamente. O extrato AcOEt (**DGMAc**, 6,1 g) foi cromatografado em coluna gel de sílica, usando mistura de clorofórmio/metanol, com aumento gradual de polaridade até metanol 100%, e a fração 10 forneceu novamente as substâncias **21** e **22**. O extrato butanólico (**DGMBu**, 3,76 g) foi filtrado em coluna de XAD-2 com água, metanol e acetato de etila, obtendo 10 frações. As frações 6-10 foram filtradas em Sephadex LH-20 com $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (8:2) e analisadas em CCDA e RMN e constatou-se a mistura

de flavonóides glicosilados. Este material foi fracionado em CLAE usando coluna C-18, com MeOH:H₂O (6:4), fluxo de 1.0 mL/min. Deste fracionamento obteve-se 7-O-*b*-D-glicopiranosilquercetina com 7-O-*b*-D-galactopiranosilquercetina **24+25** (10,6 mg) e a 3-O-*b*-D-glicopiranosilcanferol pura **23**, 8,0 mg). O extrato **DGH** foi cromatografado em coluna gel de sílica usando CH₂Cl₂ (100%) com metanol até MeOH (100%). As frações 2-16 originaram uma mistura de alcanos e as frações 18-25 (60,0 mg) forneceram o lupeol **10** (18 mg).



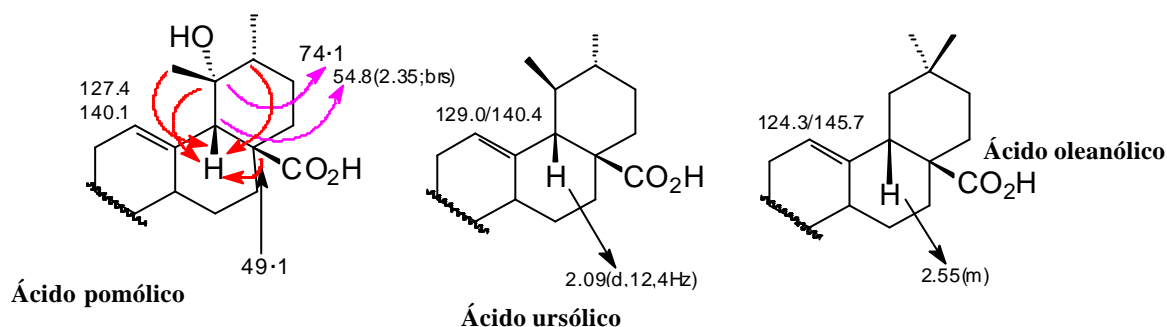
Esquema II.1- Marcha para o isolamento das substâncias dos galhos de *Dipladenia martiana*.

II-4. Determinação estrutural dos constituintes isolados de *D. martiana*

II-4.1. Triterpenos

II-4.1.1. Ácido pomólico (11), ácido ursólico (13), ácido oleanólico (15) os derivados pomolato de metila (12), ursolato de metila (14) e oleanato de metila (15a)

As estruturas dos triterpenos pentacíclicos, ácido pomólico **11**, ursólico **13** e oleanólico **15** foram determinados através da análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura (Tabela II.4.1, pág. 134) (MAHATO & KUNDU, 1994; OHTANI *et al.*, 1990). O espectros de RMN ^1H (Figura II.4.1; Figura II.4.2; Figura II.4.3; Figuras II.4.4, pág. 136-138) mostram sinais de metilas entre δ_{H} 0,8 e 1,5 característicos de triterpenos; sinais hidrogênicos ligados a dupla ligação, H-12 com δ_{H} 5,35, (**11**), 5,20 (**13**), 5,28 (**15**) e o sinal do hidrogênio do carbono carbinólico oxigenado, δ_{H} 3,23 (*dd*, $J= 10,8; 4,8$ Hz) de **11**, **13** e **15**. O sinal do hidrogênio do carbono metínico (H-18) permitiu identificar os três componentes da mistura δ_{H} : 2,09 (*d*, $J= 10,8$ Hz) de **13**, 2,35 (*s*) de **11** e 2,86 (*dd*) representando o H-18 de **15** (Figura II.4.1, pág 136). O espectro de RMN ^{13}C (PND e DEPT, pág. 139-142) apresenta sinais correspondentes com a presença de três triterpenos. As comparações dos dados espectrométricos do ácido pomólico, ursólico e oleanólico com dados da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994; Tabela II.4.1, pág. 134) demonstram que além sinais de CH_3 , CH_2 protegidos que podem ser distribuídos para cada componente, pode-se destacar os sinais que são característicos de cada componente. Com o objetivo de confirmar os componentes da mistura, fez-se os derivados metilados através da reação com diazometano. No espectro de RMN ^{13}C e DEPT do derivado **12** (Figura II.4.5, pág. 139) o sinal do carbono oxigenado C-19 é δ_{C} 73,2, enquanto que em **14** e **15a** (Figuras II.4.6-7, pág. 140-141) o sinal do CH-19 ocorre em δ_{C} 39,03, essa diferença de deslocamento químico se deve pela presença da hidroxila desprotegendo por efeito indutivo o C-19 em **12**. O Esquema II.4.1, pág. 133 mostra os deslocamentos químicos dos C-12, C-13 e C-18 com δ_{C} 127,4, 140,4 e 54,5 para **11**, δ_{C} 129,0, 140,4 e 52,8 para **13** e δ_{C} 124,3, 145,7 e 46,7 para **15**, respectivamente. Os dados revelam que a presença da metila em C-19 provoca um efeito protetor no carbono C-13 da ligação dupla, e no hidrogênio H-18, nos derivados **12** e **14**. A presença do grupamento ácido no C-17 em **11**, **13** e **15** foi confirmado pelos sinais em 51,6 ppm (metila) e δ_{C} 178,3 (carbonila) dos derivados **12**, **14** e **15a**.

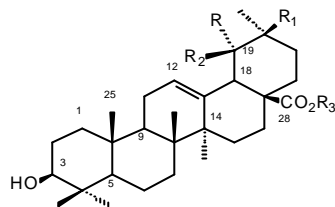


Esquema II.4.1: Comparação entre dados espectrométricos de **11**, **13** e **15** (MAHATO & KUNDU, 1994).

Os espectros de HMQC estabelecem as correlações através de uma ligação ($^1J_{CH}$) (Figuras II.4.10-13, pág.143-146) e HMBC os detectar acoplamentos de duas ($^2J_{CH}$) e três ($^3J_{CH}$) ligações (Figuras II.4.14-17, pág.147-150), Tabela II.4.2., pág. 135. O éster de metila **12** possui os seguintes acoplamentos: $^1J_{CH}$: CH-18 [δ_H/δ_C 2,60/52,3]; $^2J_{CH}$: H-18/C-17 [δ_H/δ_C 2,60/47,8]; H18/C-19 [δ_H/δ_C 2,60/73,2]; H18/C-13 [δ_H/δ_C 2,60/138,0]; $^3J_{CH}$: H-18/CH-12 [δ_H/δ_C 2,60/129,2]; H-18/CH₃-30 [δ_H/δ_C 2,60/27,4]; H-18/CH-20 [δ_H/δ_C 2,60/41,0]; H-18/C-28 [δ_H/δ_C 2,60/178,3]; H-24/CH-3 [δ_H/δ_C 0,8/80,2]; H-23/CH-3 [δ_H/δ_C 1,0/80,2] (Tabela II.4.2, pág.135). Esses dados indicam a localização do grupo hidroxila em C-19. A comparação dos dados do deslocamento de ^{13}C de **12**, **14** e **15** com valores da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994; OHTANI, *et al.*, 1990) e os pontos de fusão de **14** [Pf: 229°C, liter. 230°C (BUCKINGNAM, 1994)] e **12** [Pf: 130°C, liter. 130-131°C (POUCHERT & BEHNKE, 1993)] confirmam as estruturas propostas. Os dados de ^{13}C do pomolato de metila foram registrados pela primeira vez na literatura (CARVALHO, *et al.*, 2001b).

O espectro de massas (Figura II.4.18, pág.151) apresenta os valores de picos m/z 472 [M^+], $C_{30}H_{48}O_4$ para o ácido pomólico (**11**) e m/z 456 [M^+], $C_{30}H_{48}O_3$ para os ácidos ursólico (**13**) e oleanólico (**15**). O mecanismo de fragmentação proposto para justificar os principais picos no espectro de massas dos triterpenos está presente no Esquema II.4.2, pág. 152.

Tabela II.4.1. Dados de RMN¹H (400 MHz) e ¹³C (100 MHz) das substâncias **11**, **13** e **15** e dos derivados metilados **12**, **14** e **15a** (CDCl₃), comparados com a literatura (MAHATO & KUNDU, 1994; OHTANI, *et al.*, 1990).



- 11: R=OH, R₁=R₃=H, R₂=CH₃
 12: R=OH, R₁=H, R₂=R₃=CH₃
 13: R=R₁=R₃=H, R₂=CH₃
 14: R=R₁=H, R₂=R₃=CH₃
 15: R=R₂=R₃=H, R₁=CH₃

C	Ácido pomólico Modelo [1] (MAHATO & KUNDU, 1994)	Ácido oleanólico (OHTANI, <i>et al.</i> , 1990)	Ursol. de metila (MAHATO & KUNDU, 1994)	12 [A] d _C /d _H (mult, Hz)	14 [B] d _C /d _H (mult, Hz)	15a [C] d _C /d _H (mult, Hz)
1	38,7	38,6	38,8	38,4	38,8	38,8
2	28,0	24,5	27,3	27,2	28,2	24,2
3	78,2	80,2	78,8	79,1/3,23 (<i>dd</i> , 10,8; 4,8)	79,0/3,23 (<i>dd</i> , 10,8; 4,8)	79,0/3,23 (<i>dd</i> , 10,8; 4,8)
4	39,3	38,6	38,8	38,7	38,7	38,7
5	55,8	55,6	55,4	55,1/0,74 (<i>d</i> , 11,4)	55,2	55,2
6	18,9	18,3	18,4	18,4	18,3	18,3
7	33,6	32,1	33,0	32,7	32,9	32,2
8	40,3	40,3	39,6	39,9	39,5	39,5
9	47,7	47,4	47,5	47,2/1,75 (<i>dd</i>)	47,5	47,5
10	37,3	35,4	37,0	36,9	36,9	36,9
11	24,0	24,5	23,3	23,7/1,97 (<i>m</i>)	23,3	23,3
12	128,1	124,3	125,5	129,2/5,35 (<i>m</i>)	125,5/ 5,25 (<i>m</i>)	123,9
13	139,9	145,7	138,0	138,0	138,1	144,0
14	42,1	41,5	42,0	41,4	41,9	41,9
15	29,2	26,9	28,2	26,0	27,2	27,2
16	26,6	27,6	24,3	24,5	27,8	27,8
17	48,2	32,3	48,1	47,8	48,1	33,0
18	54,5	46,7	52,8	53,2/2,6 (<i>s</i>)	52,1/2,09 (<i>d</i> , 10,8)	47,5/2,72(<i>dd</i>)
19	72,7	40,5	39,1	73,2	39,03	38,2
20	42,3	46,7	38,8	41,0	39,01	45,9
21	27,0	29,3	30,7	29,2	30,5	30,5
22	37,4	34,8	36,7	37,4	35,63	34,2
23	28,7	28,4	28,2	28,1/0,99 (<i>s</i>)	28,1	28,1
24	16,7	17,1	15,5	15,5/0,78 (<i>s</i>)	17,0	17,0
25	15,5	16,5	15,7	15,2/0,91 (<i>s</i>)	15,1	15,1
26	17,1	16,8	16,9	16,2/0,68 (<i>s</i>)	16,9	16,9
27	24,6	25,8	23,6	24,2/1,25 (<i>s</i>)	23,6	25,9
28	180,6	182,1	177,7	178,3	178,1	178,1
OCH ₃	-	-	-	51,6/3,6 (<i>s</i>)	51,5/3,6 (<i>s</i>)	51,5
29	26,8	28,4	16,9	27,4 / 1,21 (<i>d</i> , 6,8)	15,4	28,1
30	16,4	22,1	21,2	16,1/0,94 (<i>s</i>)	21,2	21,2

Tabela II.4.2. Dados de RMN¹H (400 MHz) e RMN¹³C (100 MHz) 1D e 2D do derivado metilado **12** (CDCl₃).

		¹³ C	¹ H- ¹³ C-HMBC- ² J _{CH}	
12				
C	d_C	²d_{CH}	³d_{CH}	
1	38,4		H-25	
3	79,1		H-24; H-23	
4	38,7	H-24; H-23		
7	32,7		H-26	
8	39,9		H-27	
10	36,9	H-25		
12	129,2		H-18	
13	138,0	H-18		
14	41,4	H-27	H-18; H-12; H-26	
16	24,5		H-18	
17	47,8	H-18		
19	73,2	H-18; H-29	H-30	
20	41,0		H-18; H-29	
21	26,0		H-30	
23	28,1		H-3; H-24	
24	15,5		H-3; H-23	
28	178,3		H-18; H-16	
29	27,4		H-18	

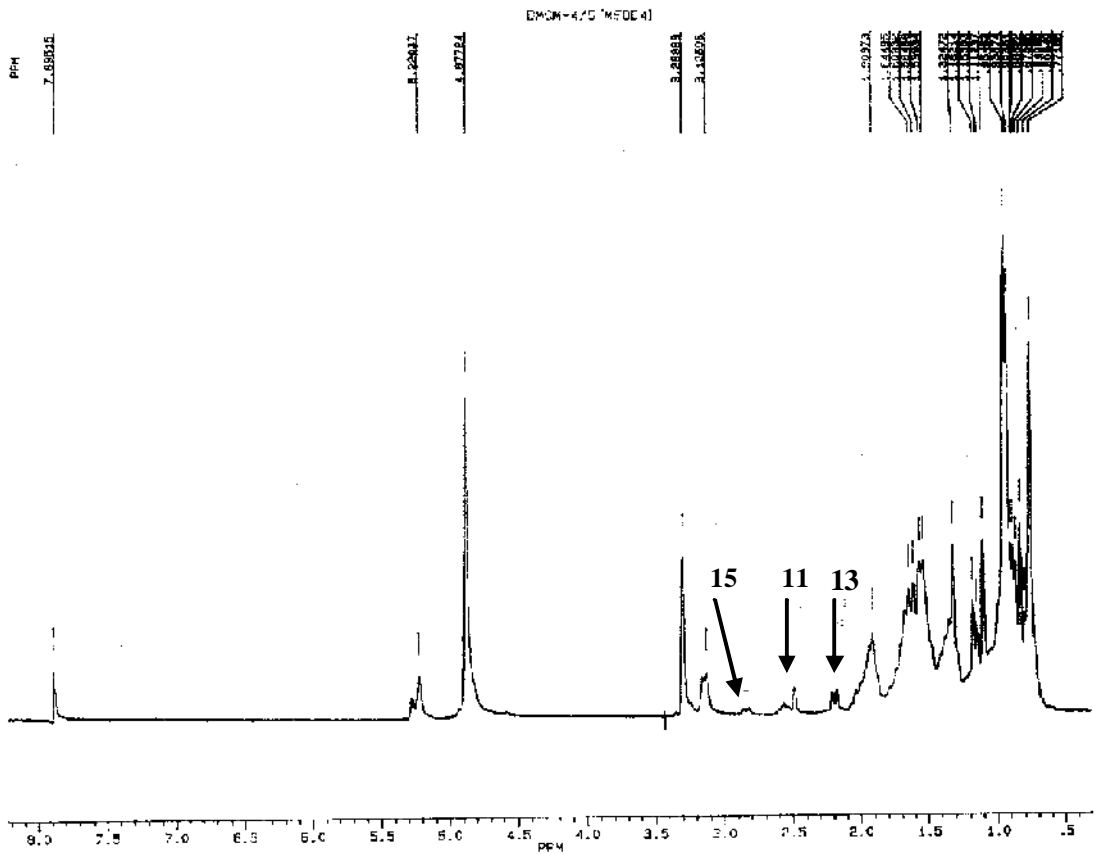


Figura II.4.1. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) em MeOD_4 da mistura de triterpenos **11** (ácido pomólico), **13** (ácido ursólico) e **15** (ácido oleanólico).

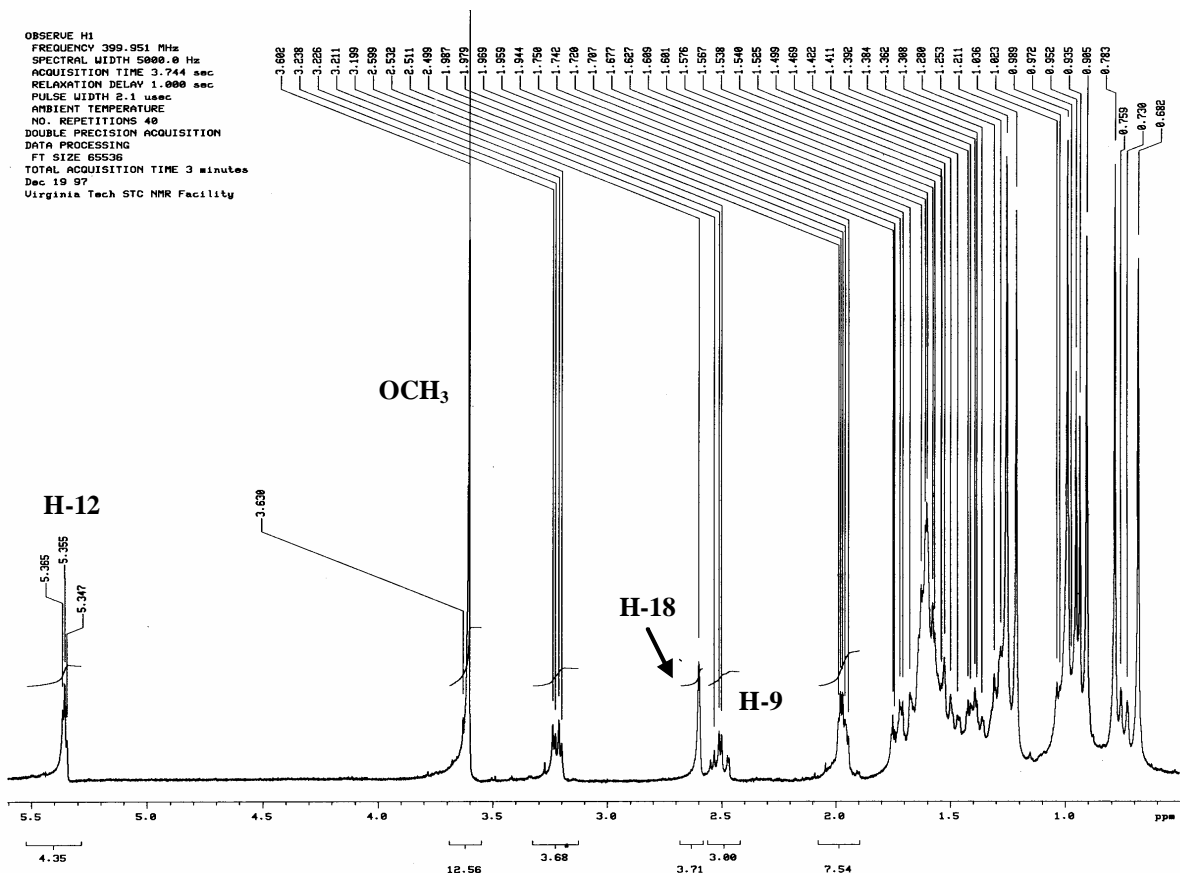


Figura II.4.2. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) em CDCl_3 do triterpene **12** (pomolato de metila).

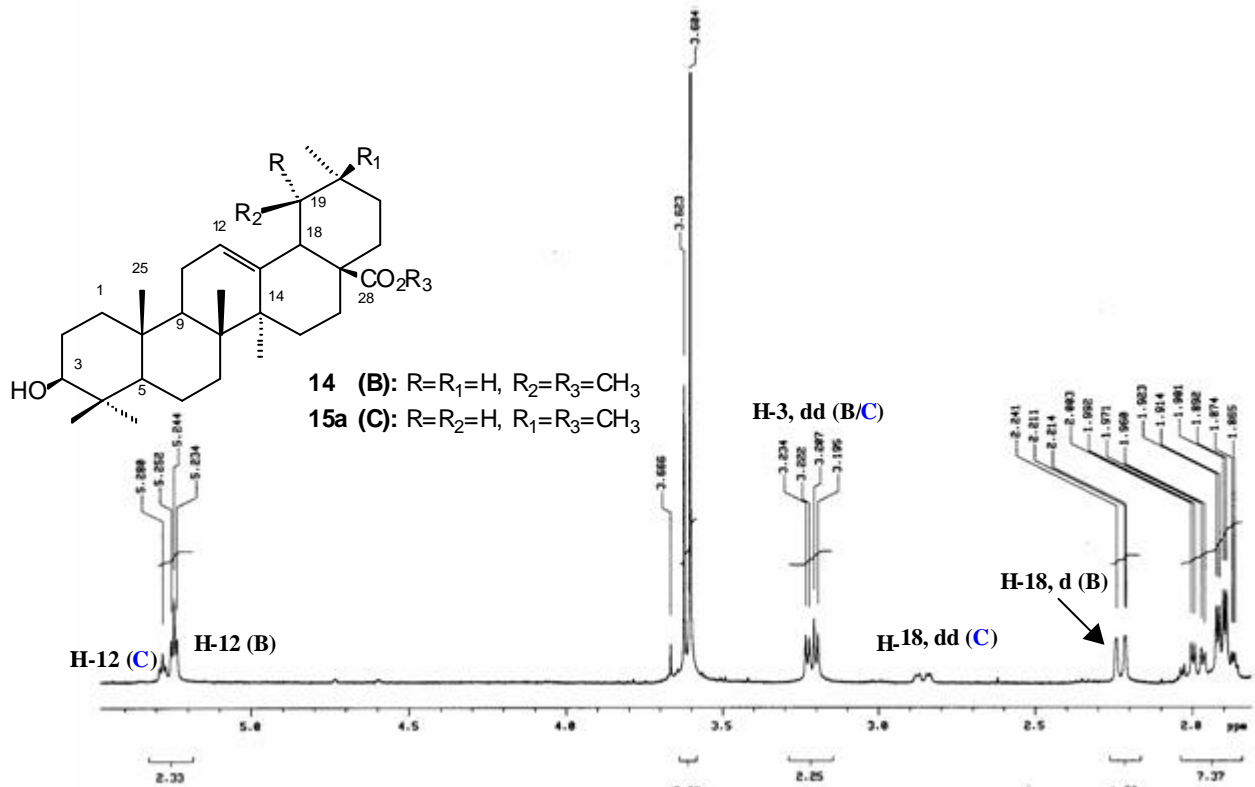
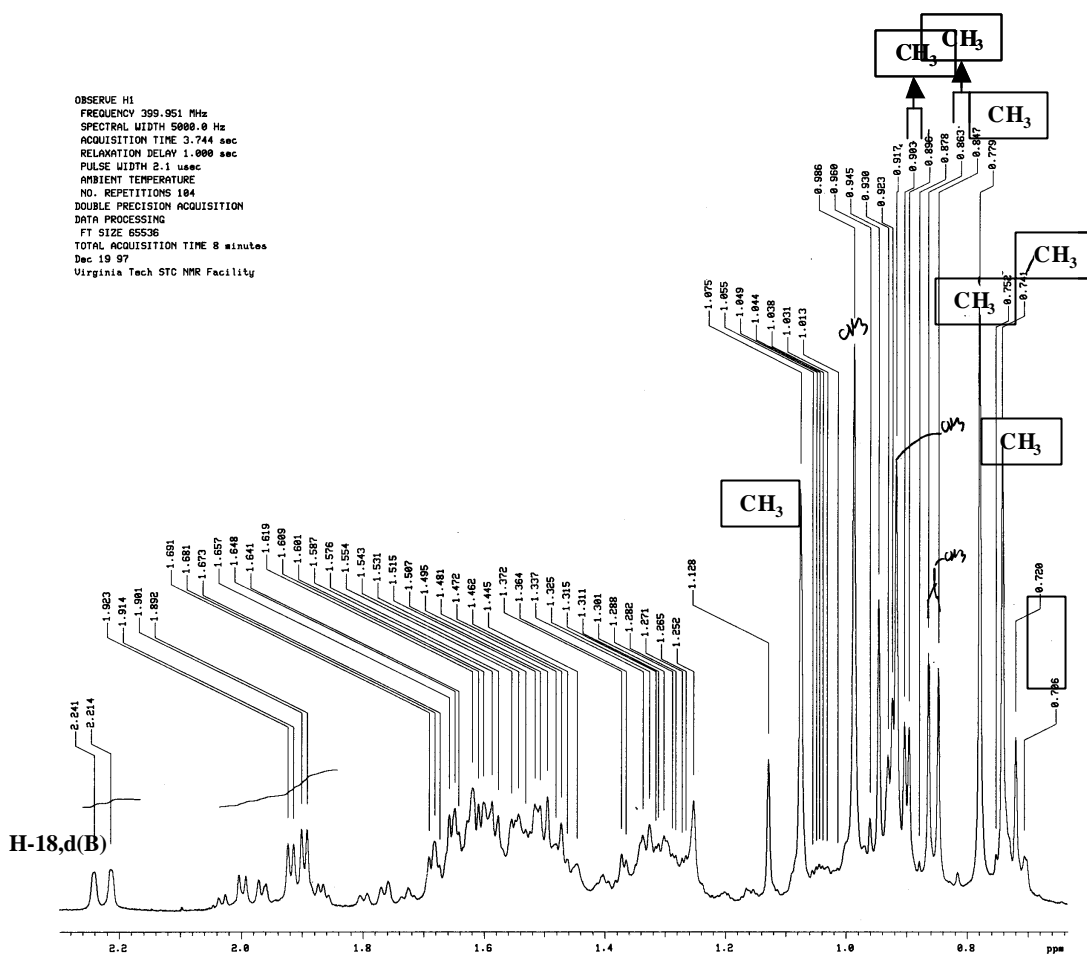


Figura II.4.3. Espectro de RMN ¹H (400 MHz) em CDCl₃ da mistura de triterpenos **14** [B] (ursolato de metila) e **15a** [C] (oleanato de metila).

OBSERVE H1
 FREQUENCY 399.951 MHz
 SPECTRAL WIDTH 5000.0 Hz
 ACQUISITION TIME 3.744 sec
 RELAXATION DELAY 1.000 sec
 PULSE WIDTH 2.1 usec
 AMBIENT TEMPERATURE
 NO. REPEATITIONS 48
 DOUBLE PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 FT SIZE 65536
 TOTAL ACQUISITION TIME 3 minutes
 Dec 19 97
 Virginia Tech STC NMR Facility

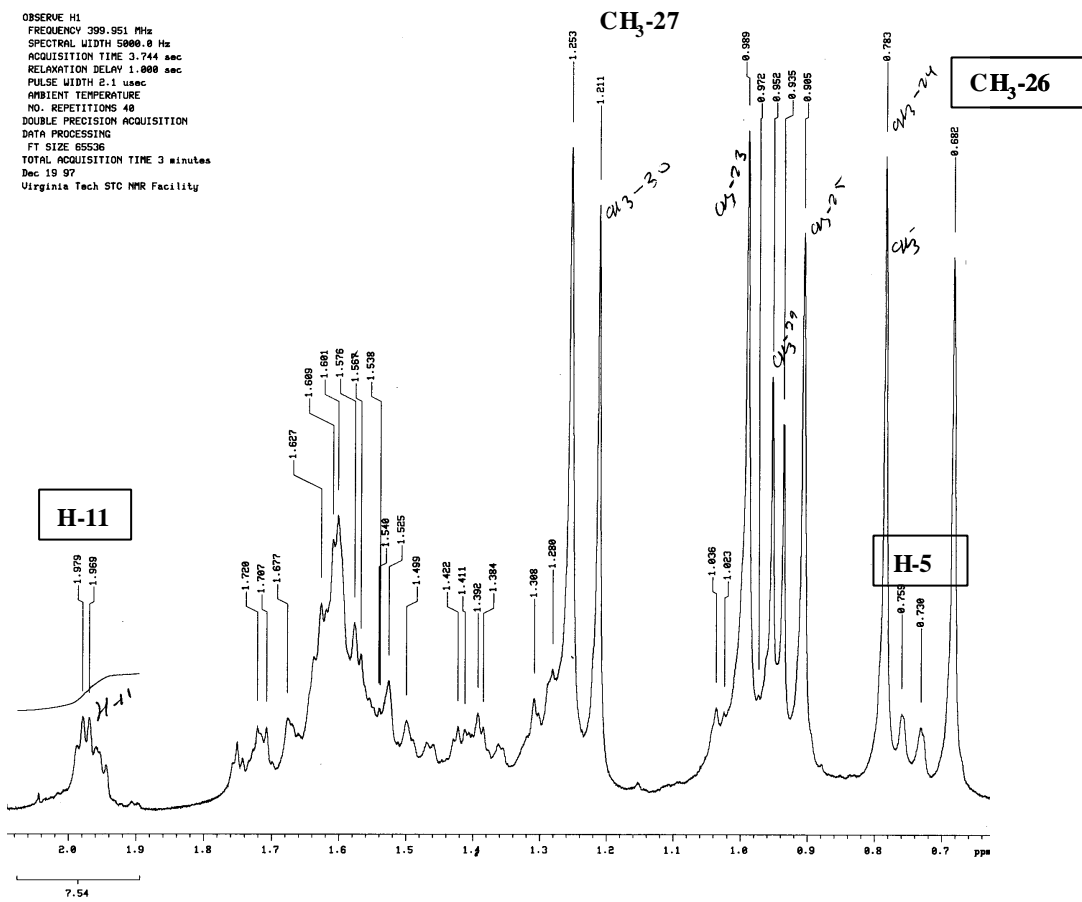
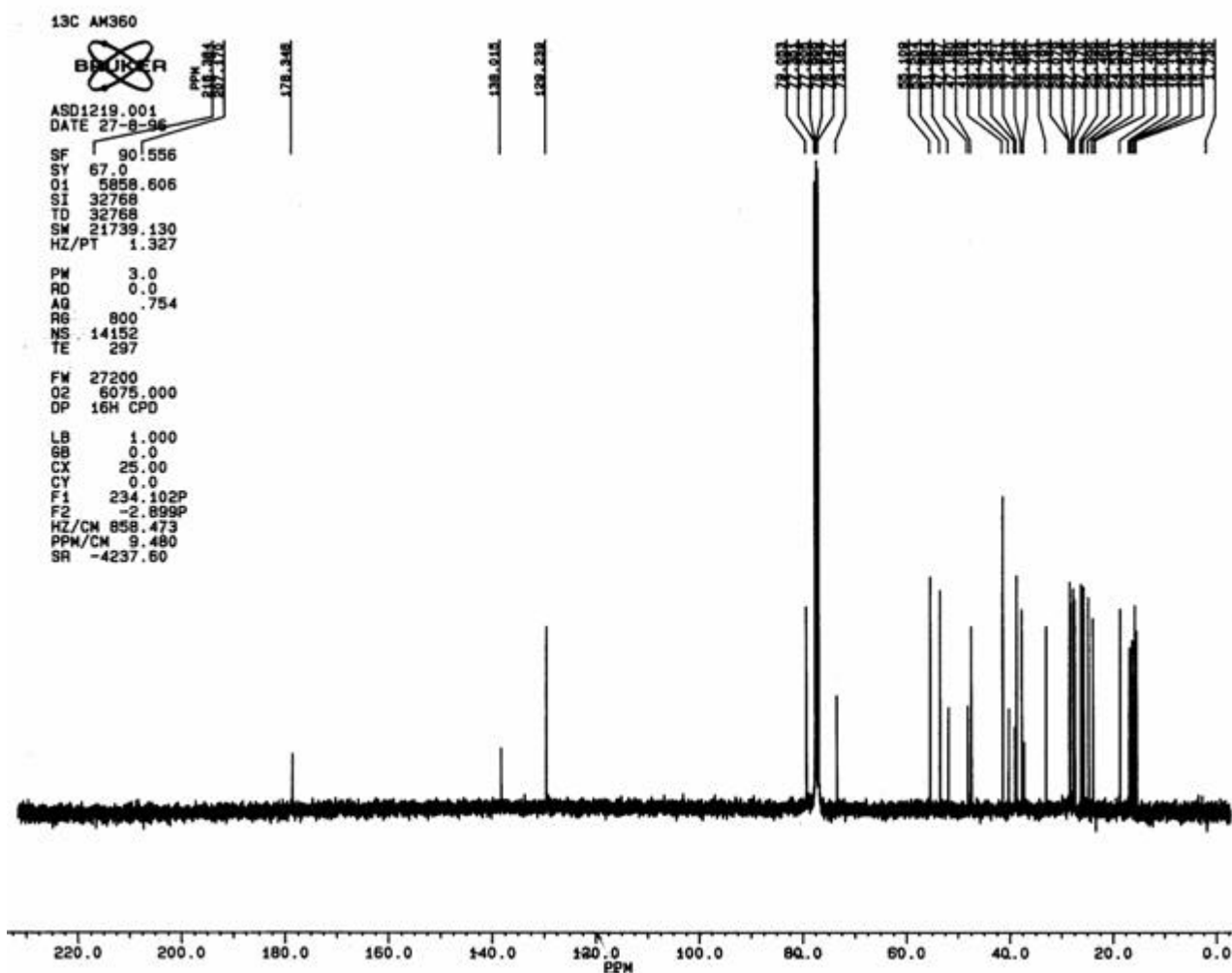


Figura II.4.4. Espectro de RMN¹H ampliado (400 MHz) em CDCl₃ de 12 (pomolato de metila).



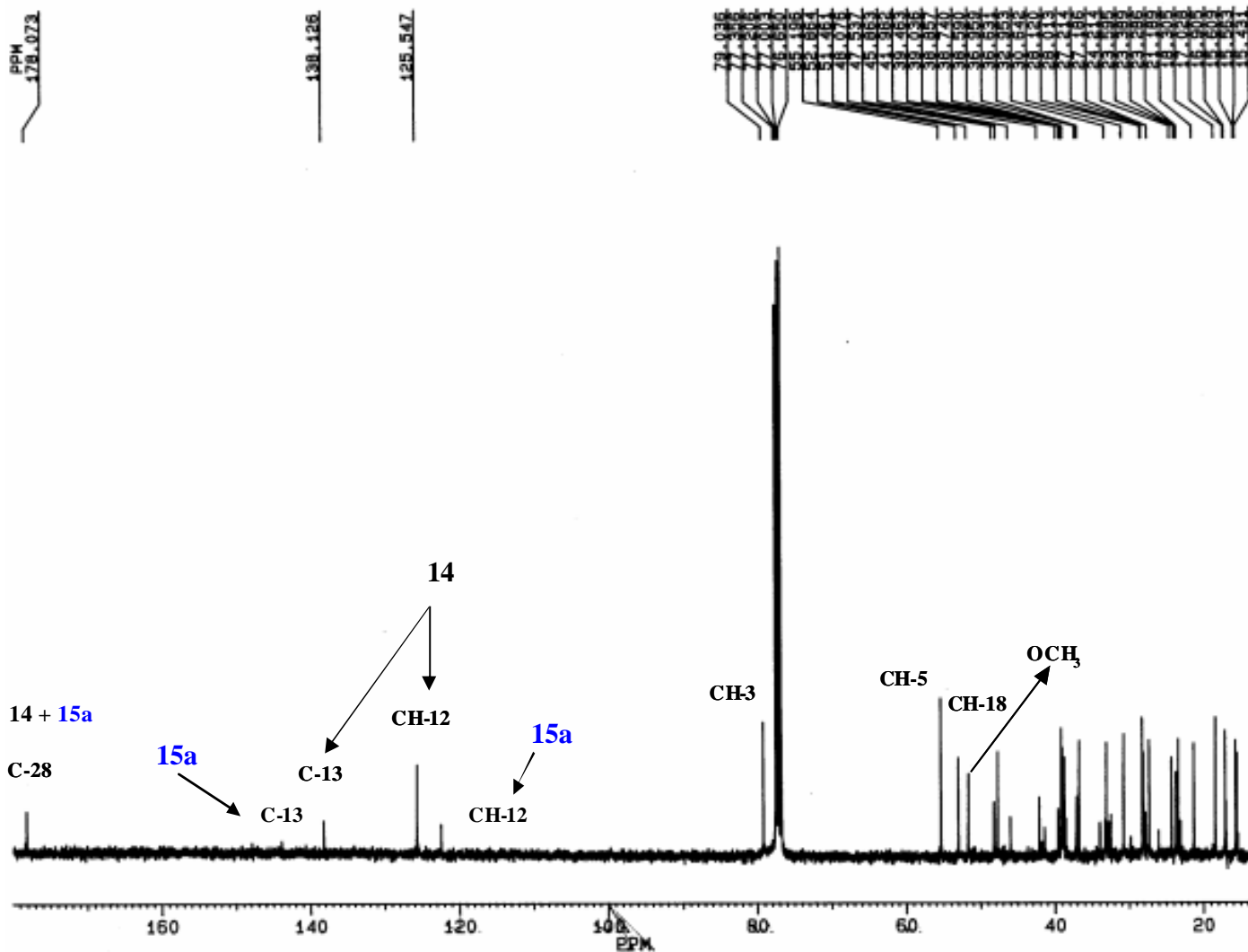


Figura II.4.6. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) em CDCl_3 14 (ursolato de metila) e 15a (oleanato de metila).

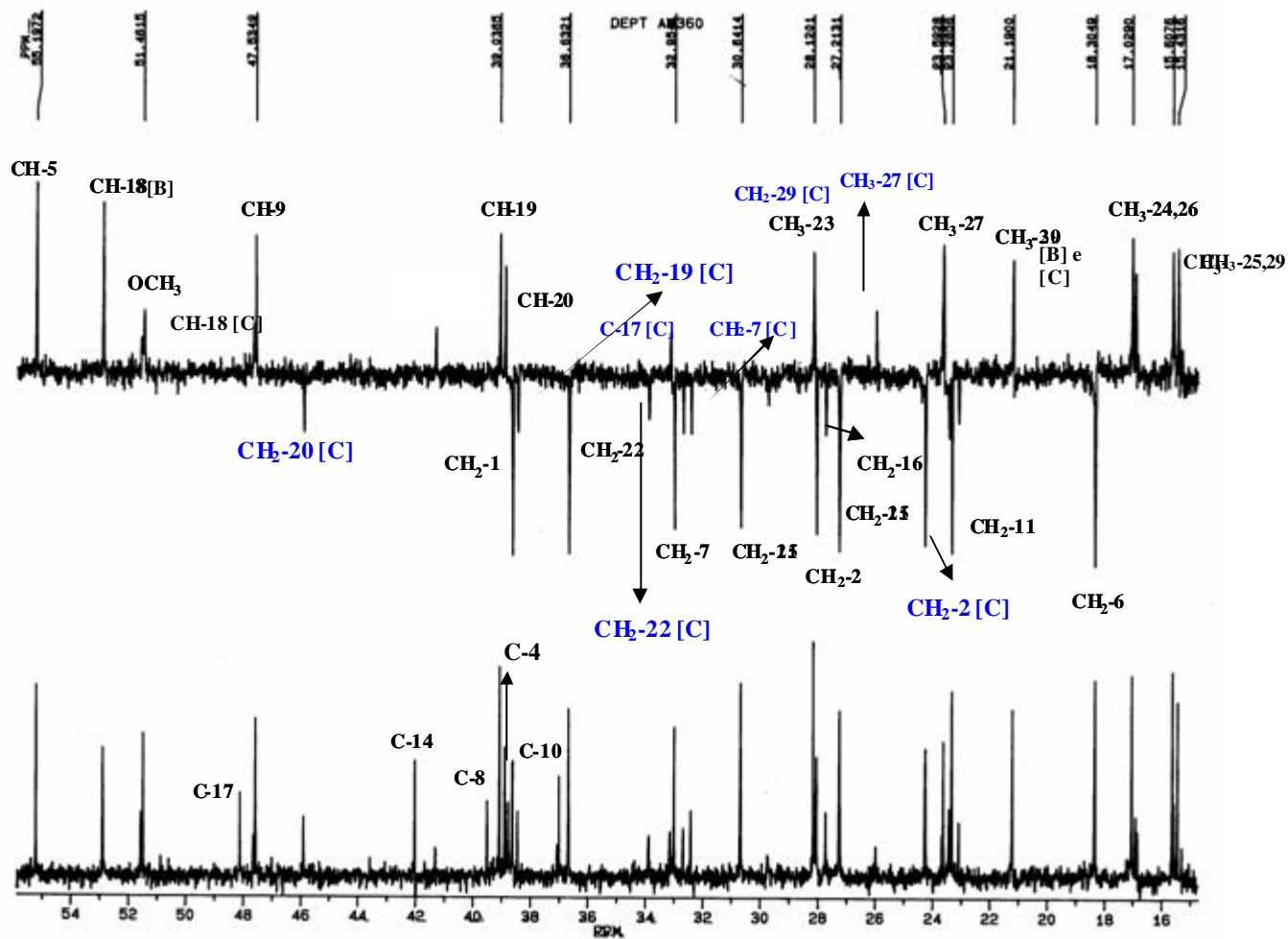


Figura II.4.7. Espectro de DEPT (100 MHz) em CDCl_3 de 14 [B] (ursolato de metila) e 15a [C] (oleanato de metila).

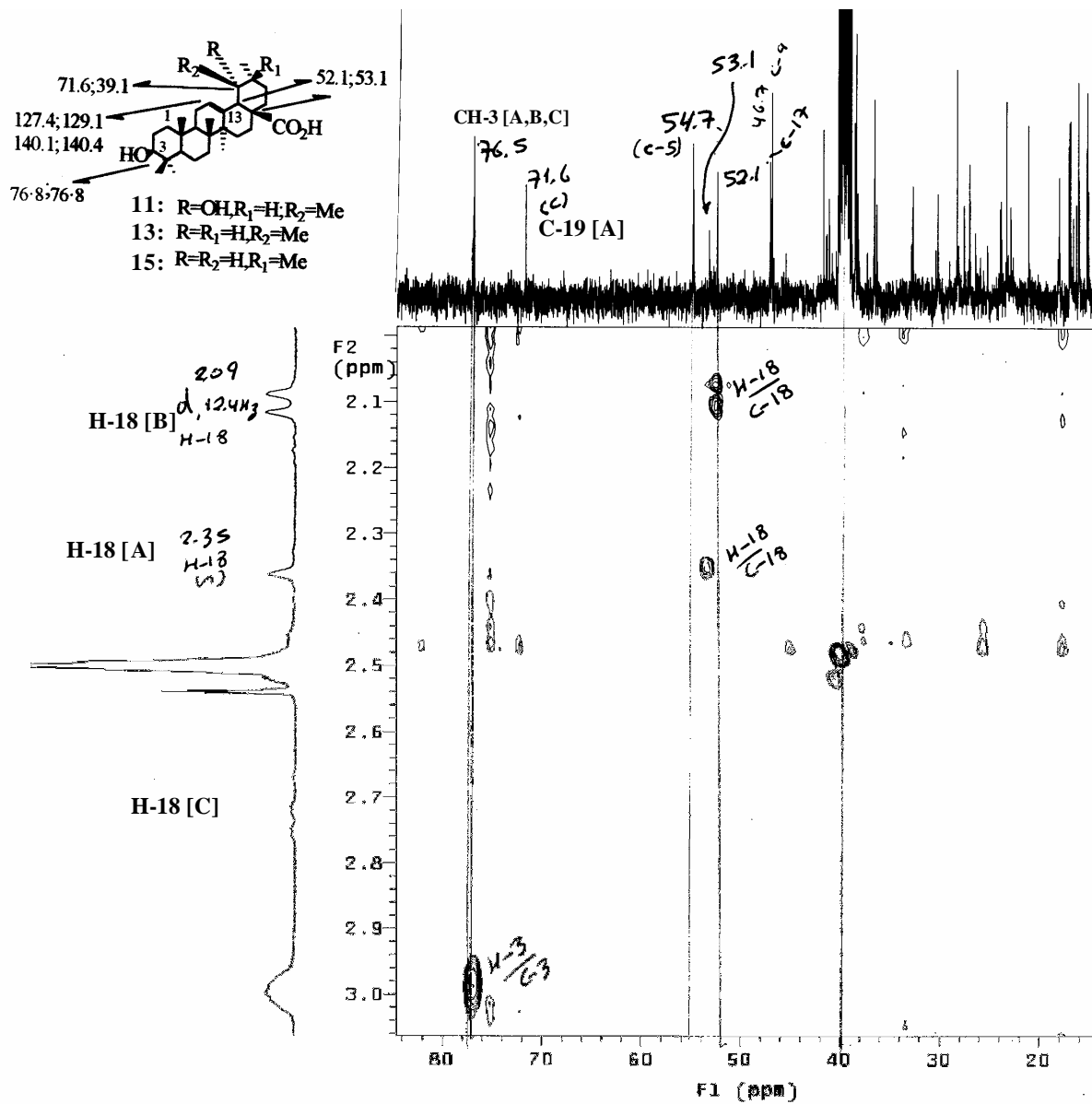


Figura II.4.10. Espectro de HMQC (400 MHz) em DMSO-D₆ de 11 [A] (ác. pomólico), 13 [B] (ác. ursólico) e 15 [C] (ác. oleanólico).

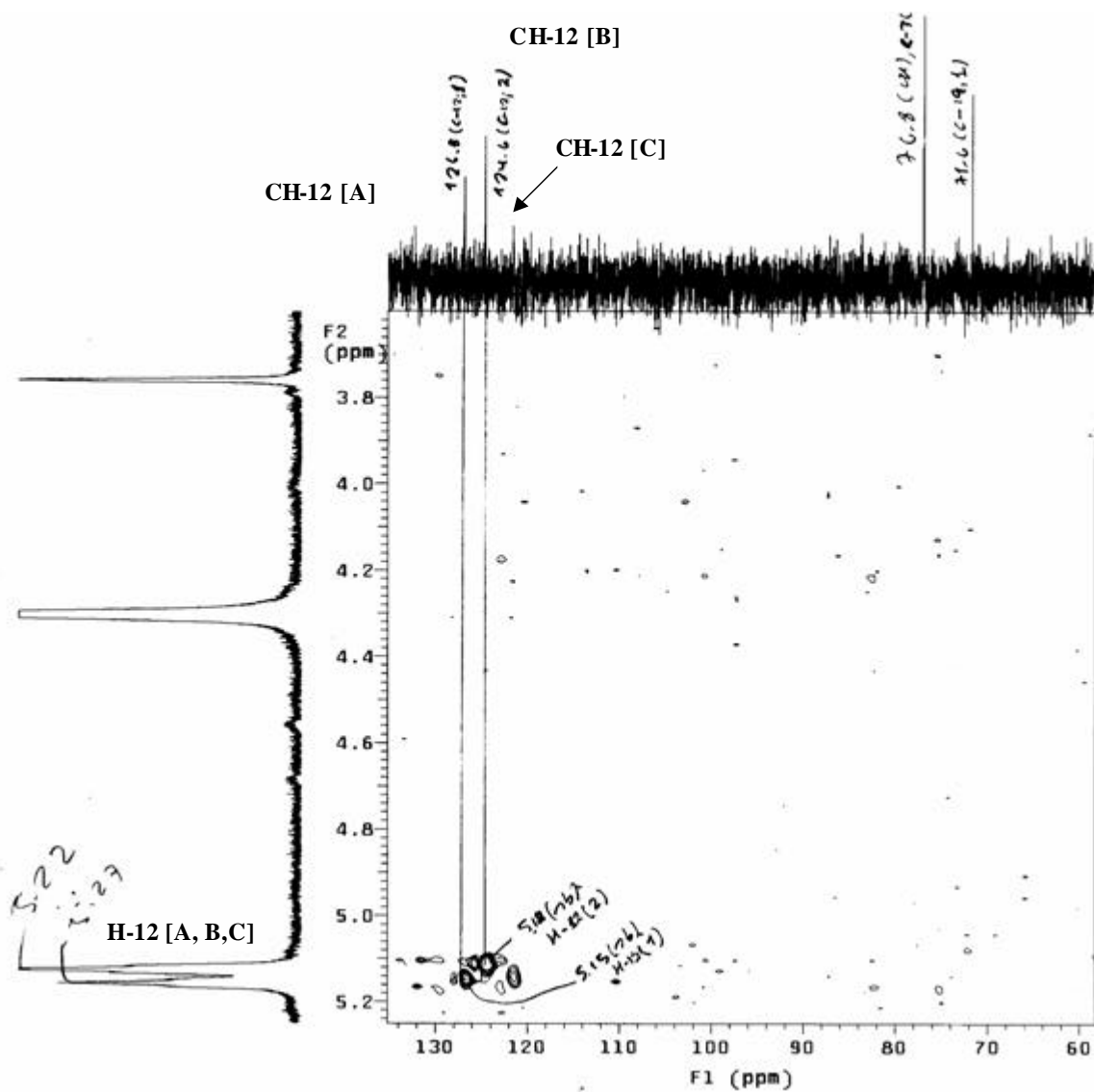


Figura II.4.11. Espectro de HMQC (400 MHz) em MeOD_4 de 11 [A] (ác. pomólico), 13 [B] (ac. ursólico) e 15 [C] (ác. oleanólico).

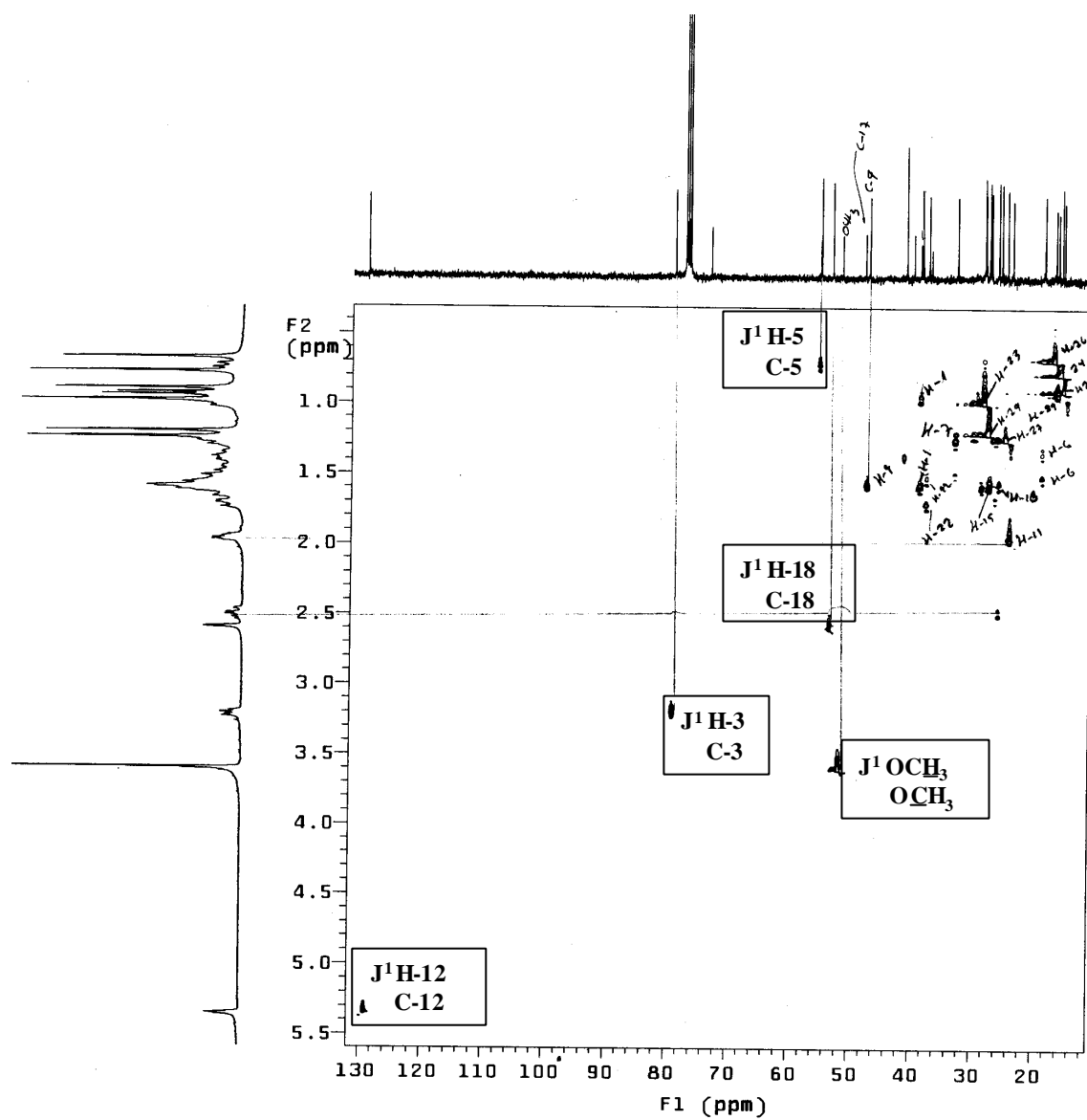


Figura II.4.12. Espectro de HMQC (400 MHz) em CDCl_3 de 12 (pomolato de metila).

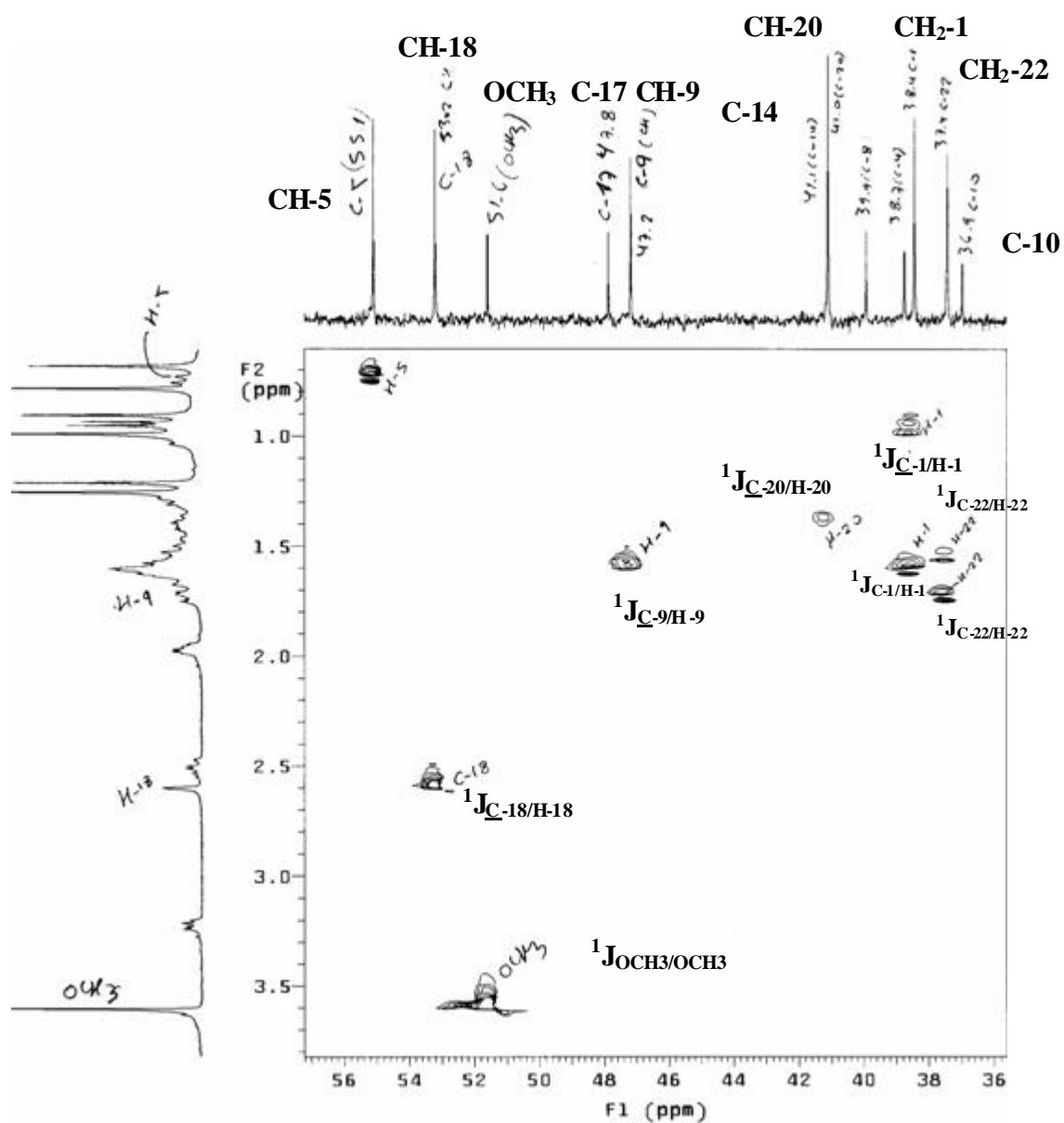


Figura II.4.13. Espectro de HMQC (400 MHz) em CDCl_3 de 12 (pomolato de metila).

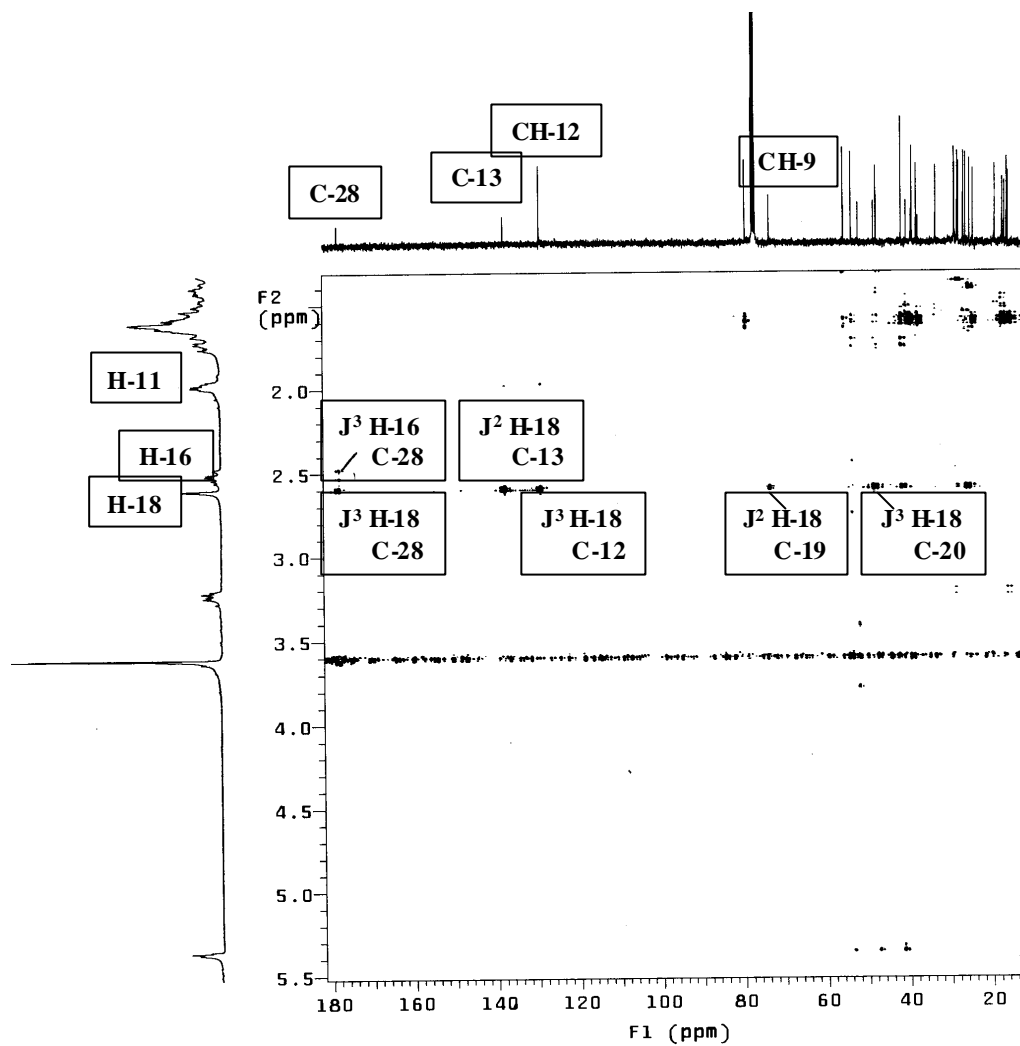


Figura II.4.14. Espectro de HMBC (400 MHz) em CDCl_3 de **12** (pomolato de metila).

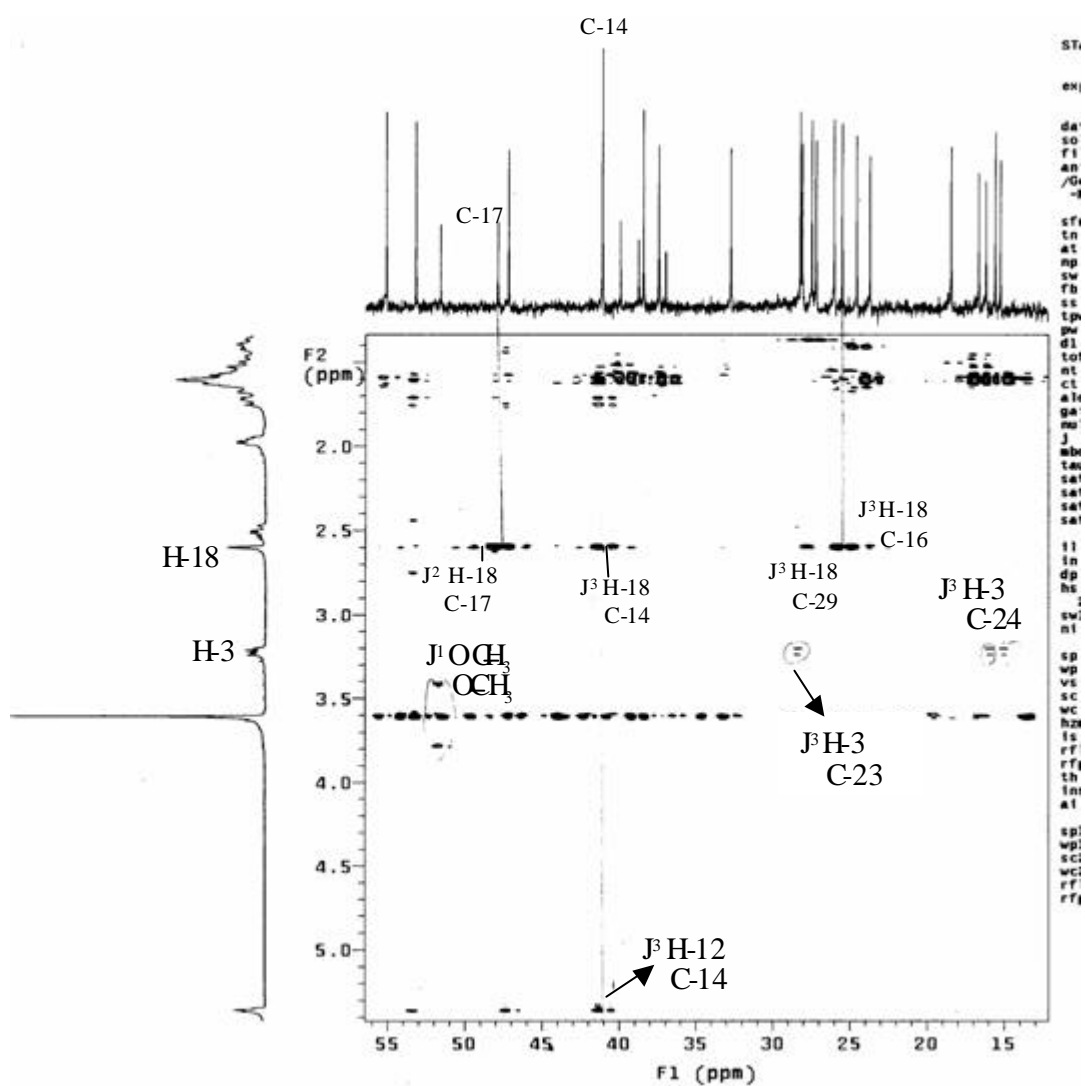


Figura II.4.15. Espectro de HMBC (400 MHz) em CDCl_3 de 12 (pomolato de metila).

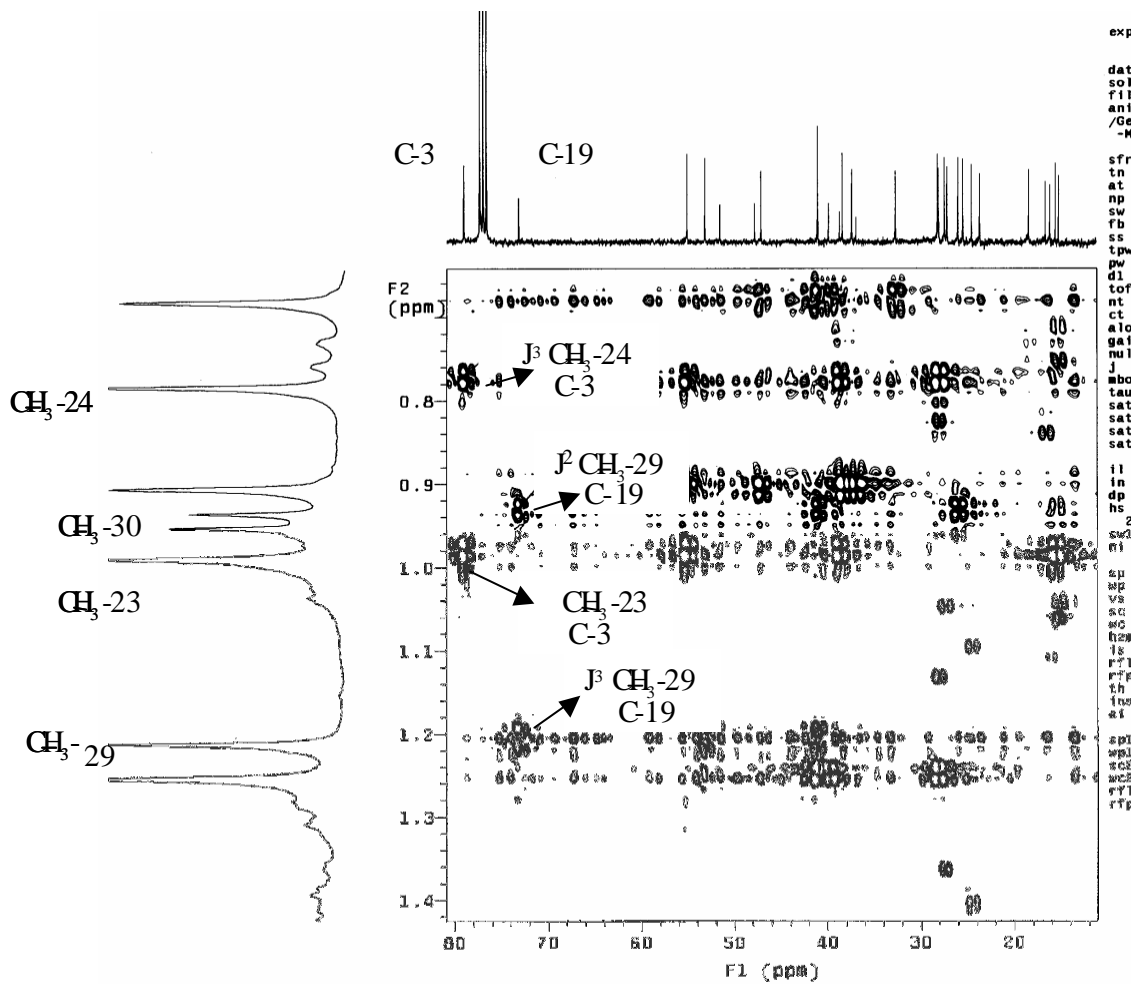


Figura II.4.16. Espectro de HMBC (400 MHz) em CDCl_3 de 12 (pomolato de metila).

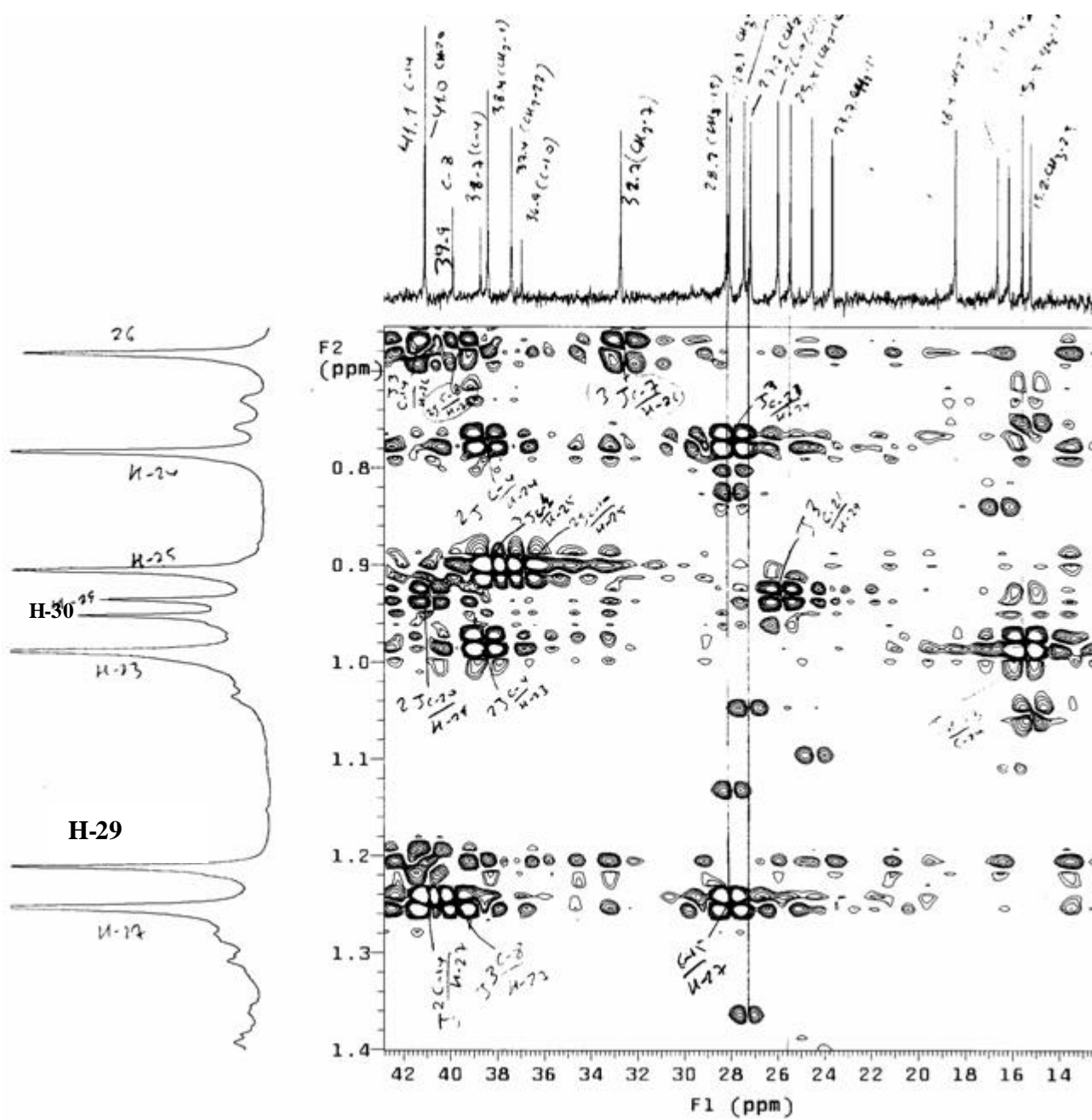


Figura II.4.17. Espectro de HMBC (400 MHz) em CDCl_3 de **12** (pomolato de metila).

DMCM-4/5
VG Quattro
KH7411 48 (3.305) Cm (42:53)

14:59:54
Scan Cl+
1.52e4

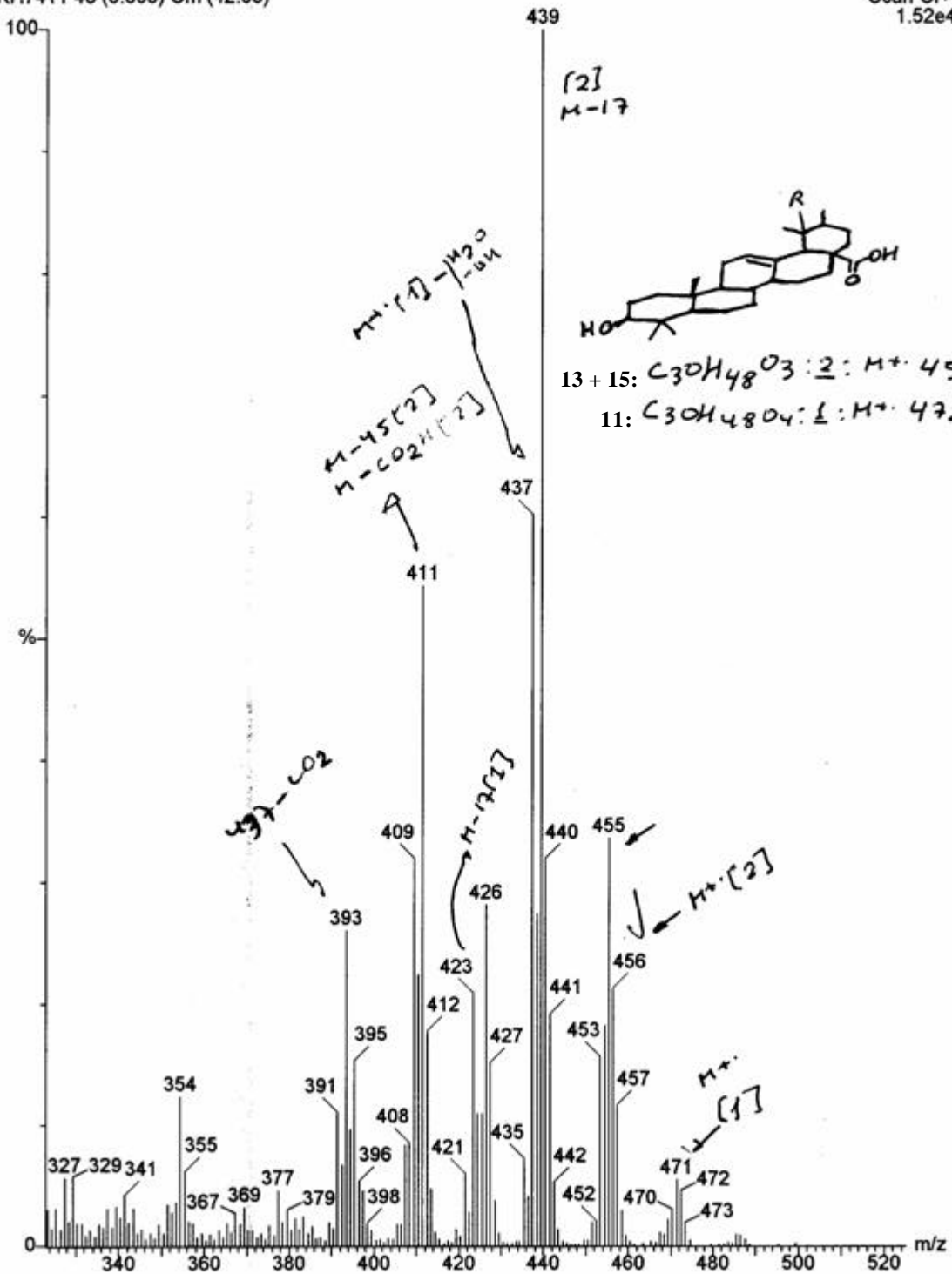
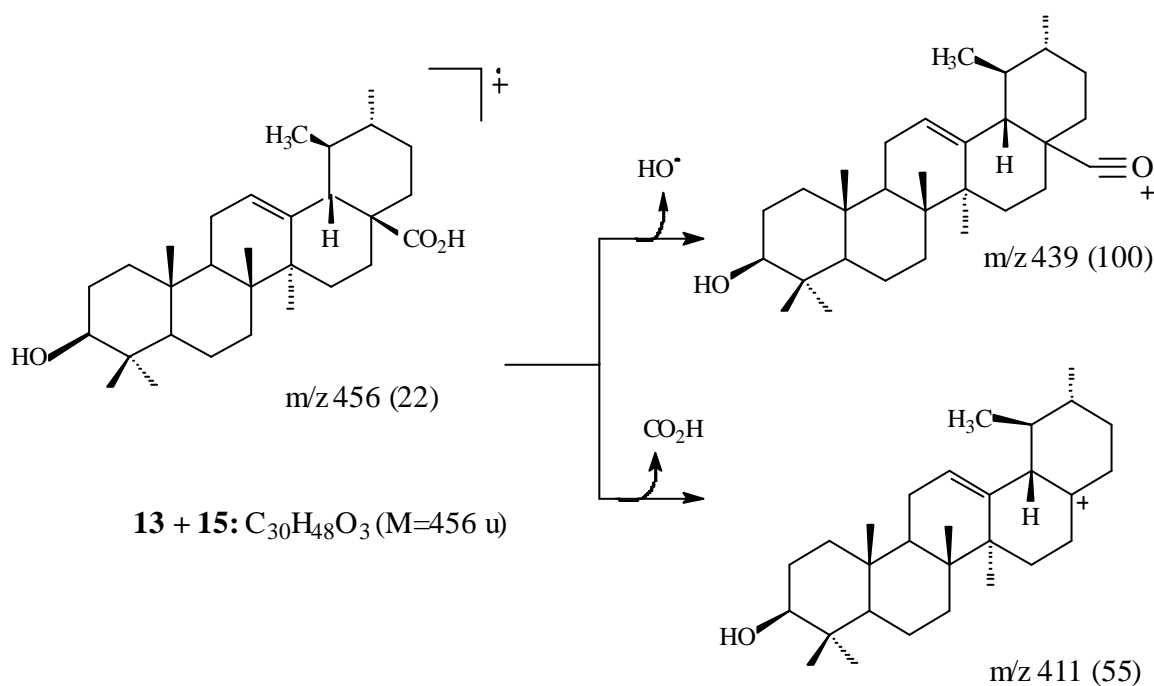
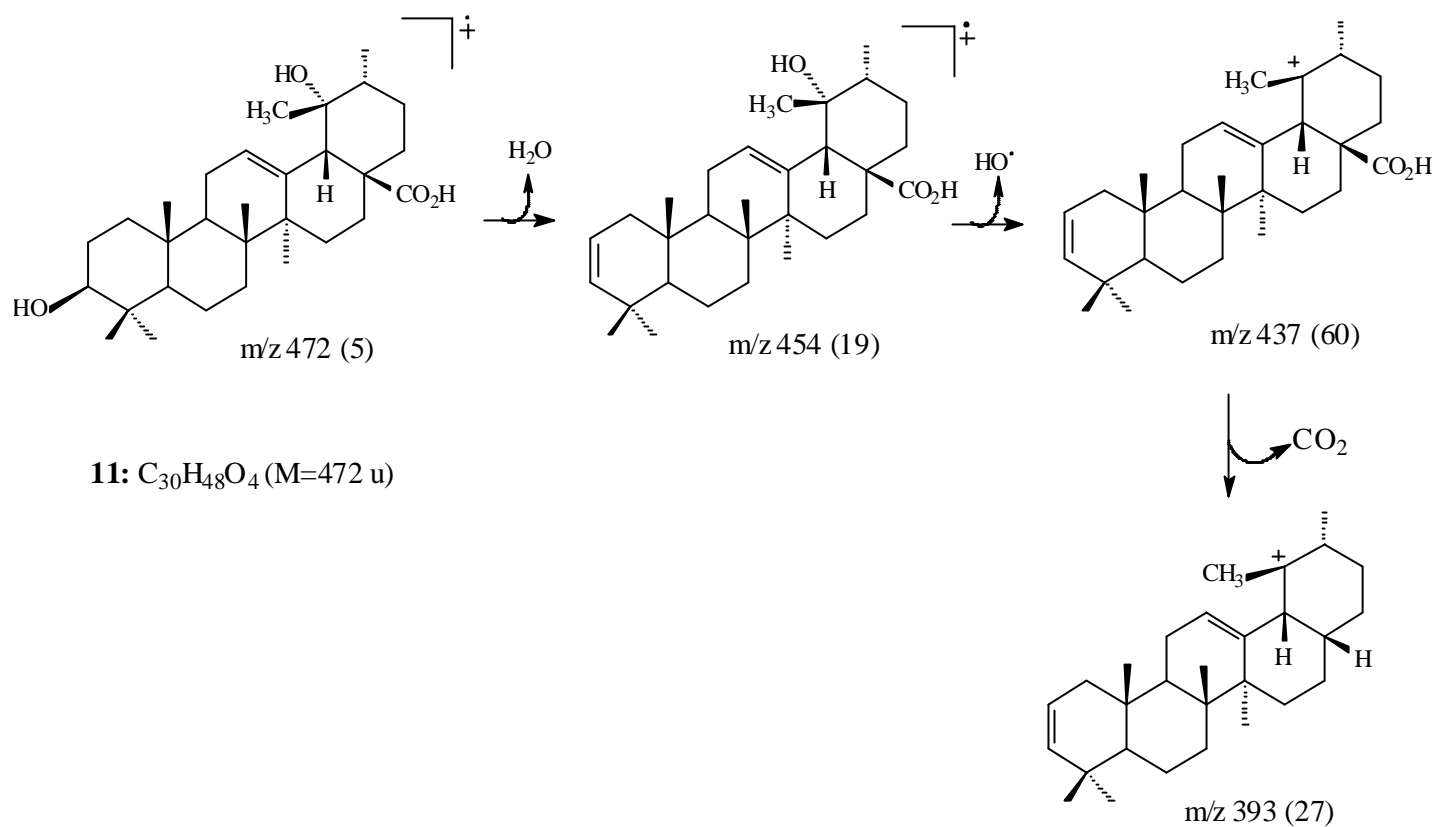


Figura II.4.18. Espectro de massas de 11 [A] (ác. pomólico), 13 [B] (ac. ursólico) e 15 [C] (ác. oleanólico).



Esquema II.4.2. Mecanismo de fragmentação proposto para justificar os picos detectados no espectro de massas de **11** (ác. pomólico), **13** (ac. ursólico) e **15** (ác. oleanólico).

II-4.1.2. Lupeol (Substância 10)

A análise do espectro registrado na região de IV de **10** (Figura II.4.19, pág. 153) revela absorções características de estiramentos de C-H de carbono sp^3 em 2928 cm^{-1} e 2855 cm^{-1} , sinais de estiramento de álcool (3420 cm^{-1}), C-O (1192 cm^{-1}) deformação de CH_2 e estiramento C=C (1460 cm^{-1}). O espectro de RMN ^1H (Figura II.4.20, pág. 155) mostra os sinais de metilas: δ_{H} 1,23, 1,00, 0,95, 0,92, 0,77, 0,74 e um sinal em d_{H} 1,66 (ζ) correspondente à frequência de metila ligada a carbono sp^2 . Os sinais referentes aos hidrogênios vinílicos estão representados por dois singletos largos em d_{H} 4,53 e 4,56, o sinal em δ_{H} 3,15 representa o hidrogênio do carbono metínico oxigenado (H-3), Tabela II.4.3, pág. 154. O espectro de RMN ^{13}C deste triterpeno (Figura II.4.21, pág. 155) possui o sinal do carbono carbinólico em δ_{CH} 79,00 correspondente ao 3 e os sinais representantes do grupo vinila, C-20 e C-29, com δ 150,90 e 109,32, respectivamente. Este triterpeno é comum no reino vegetal e é conhecido como lupeol (**10**). Os assinalamentos dos deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono-13 (Tabela II.4.3, pág. 154) são semelhantes aos da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994).

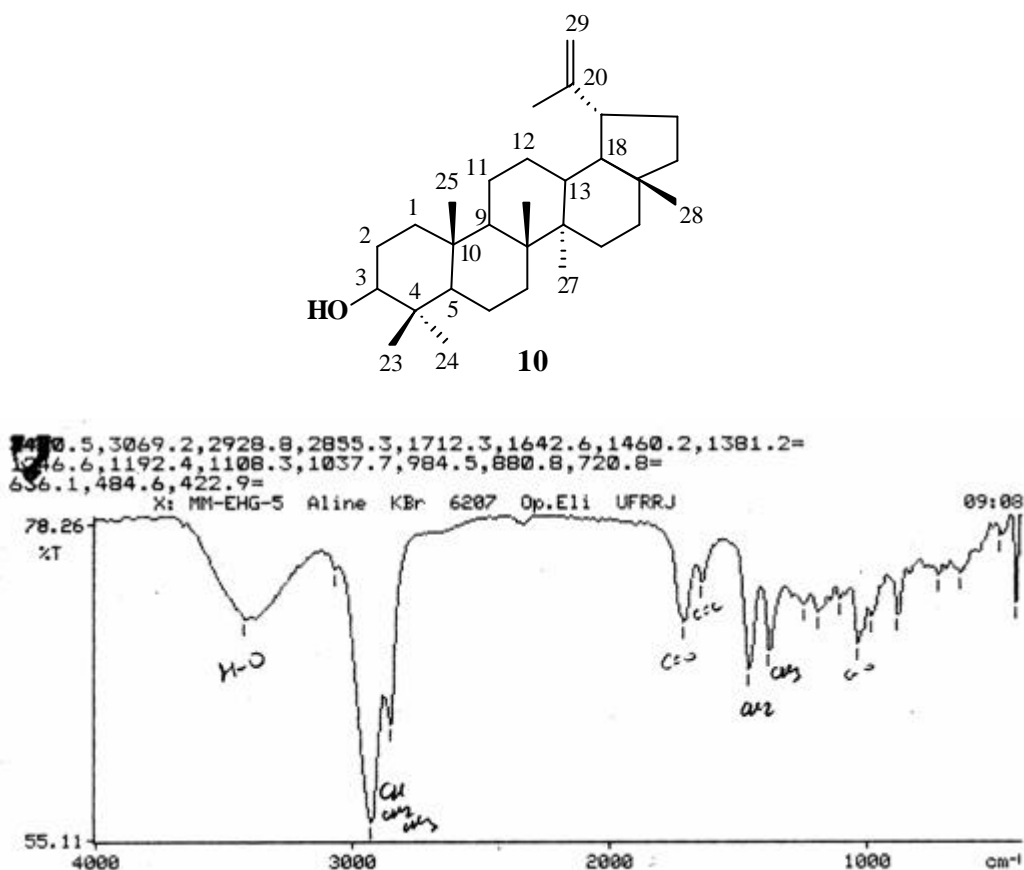


Figura II.4.19. Espectro de IV do triterpeno **10** (lupeol).

Tabela II.4.3. Dados de RMN ^1H (200 MHz) e RMN ^{13}C (50,2 MHz) de **10** (lupeol) em CDCl_3 .

10		
C	δ_{C}	δ_{H} (mult)
4	38,8	-
8	40,8	-
10	37,1	-
14	42,8	-
17	43,0	-
20	150,9	-
CH		
3	79,0	3,18 (<i>dd</i>)
5	55,3	
9	50,4	1,65 (<i>sl</i>)
13	38,0	
19	47,9	2,37 (<i>m</i>)
18	48,3	1,9 (<i>m</i>)
CH ₂		
1	38,7	
2	27,4	
6	18,3	1,36
7	34,3	1,39
11	20,9	1,85
12	25,1	
15	27,4	1,33
16	35,5	
21	29,9	
22	40,0	
29	109,3	4,53 (<i>sl</i>); 4,56 (<i>sl</i>)
CH ₃		
23	28,0	1,23 (<i>s</i>)
24	15,4	0,77 (<i>s</i>)
25	16,1	0,95 (<i>s</i>)
26	16,0	0,92 (<i>s</i>)
27	14,6	0,74 (<i>s</i>)
28	18,0	1,00 (<i>s</i>)
30	19,3	1,66 (<i>s</i>)

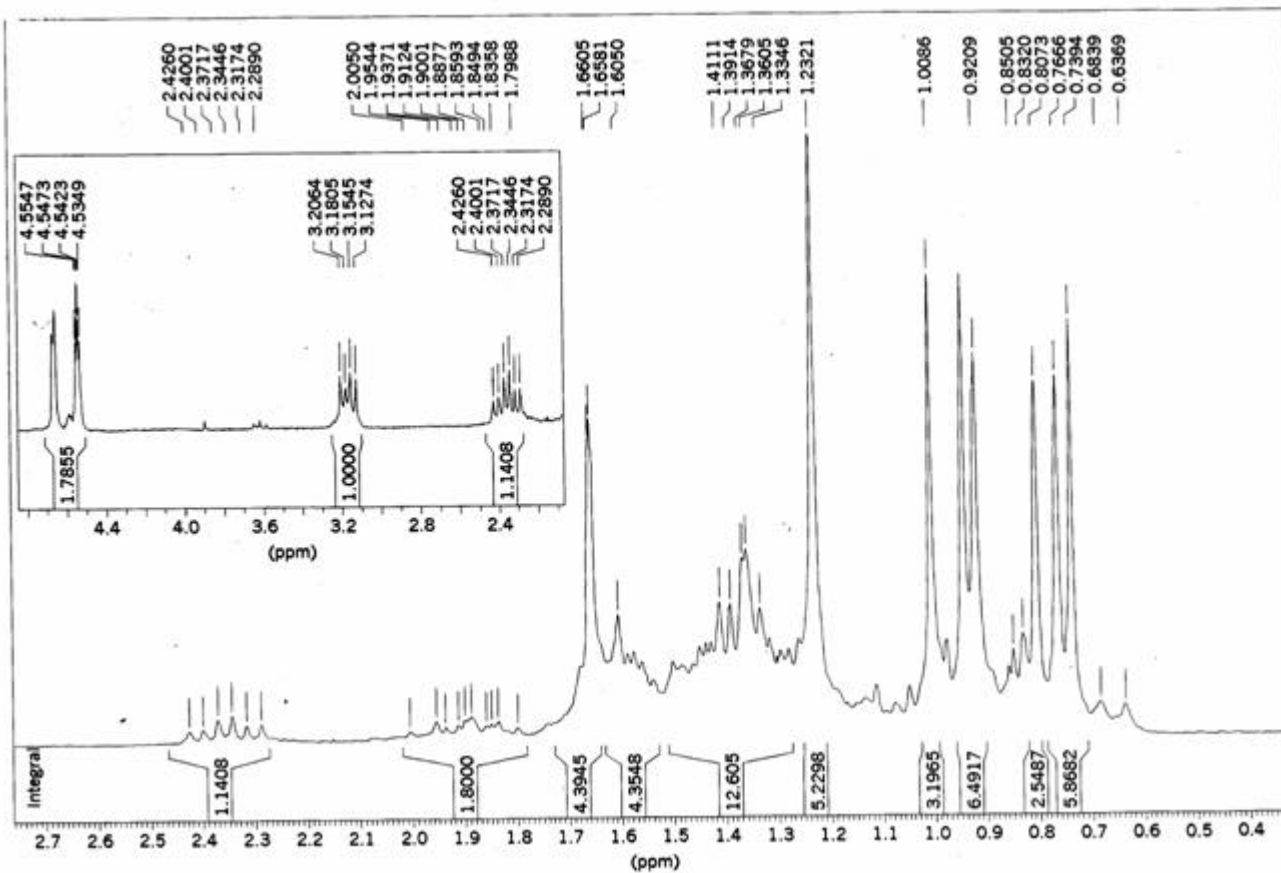


Figura II.4.20. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância 10 (lupeol).

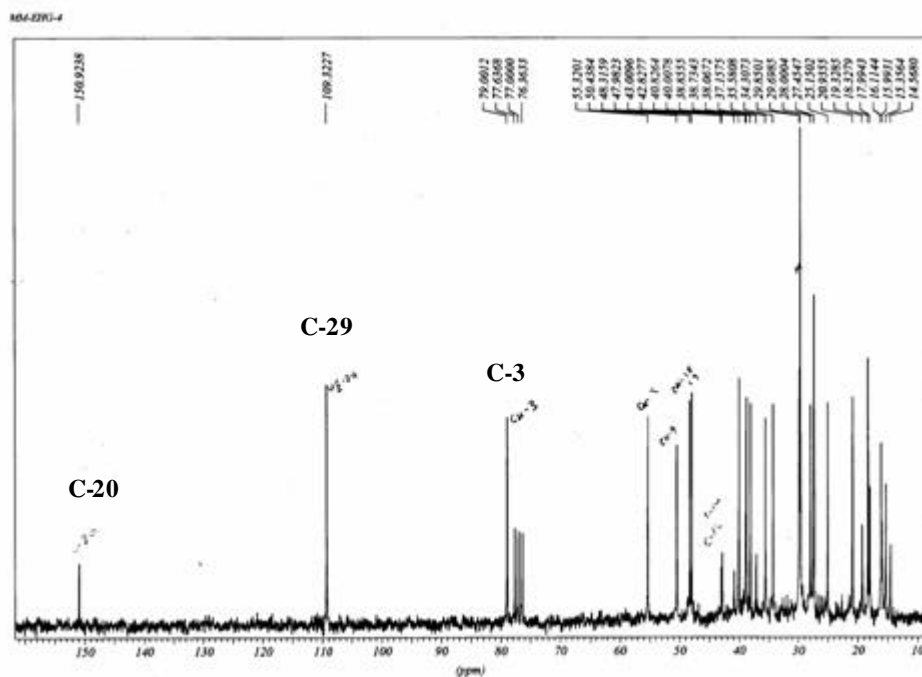
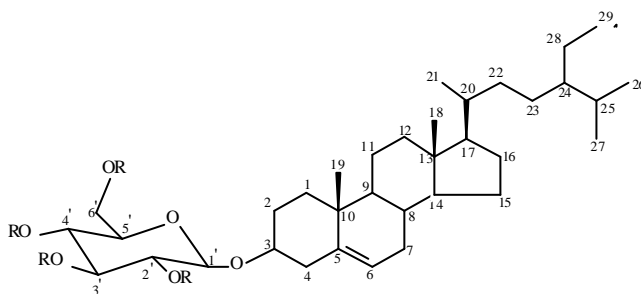


Figura II.4.21. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da substância 10 (lupeol).

II-4.2. Saponina esteroídica (Substância 19)

O espectro de RMN ^1H da saponina **19** (Figura II.4.22, pág. 158) apresenta sinais de metilas entre δ_{H} 0,63 e δ_{H} 0,90, de hidrogênio vinílico em δ_{H} 5,31 (*d* largo), típico de H-6 de fitosteróides. Além dos sinais da parte da aglicona aparecem sinais em δ_{H} 3,60 (*m*, H-5'), 4,19 (*d*, H-1'), 4,41 (*tl*, H-2',4') e 4,85 (*tl*, H-3') que podem ser atribuídos aos hidrogênios do carboidrato. Esta unidade de açúcar pode ser atribuída como β -glicose devido a presença do dubleto em δ 4,19 ($J=8$ Hz) que representa o hidrogênio anomérico (H-1') acoplando com o hidrogênio H-2' *trans*-diaxial. Os demais valores dos sinais de H-3', 4', 5' e 6' estão assinalados na Tabela II.4.4, pág. 157. Obteve-se o derivado **20** (3-*O*- β -D-tetraacetilglicopiranosilsterol) através da reação de acetilação com anidrido acético e piridina. O ponto de fusão do derivado **20** (Pf: 170 °C) e os deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C estão de acordo com a literatura (KOJIMA et al., 1990; CARVALHO, 2000). O espectro de RMN ^1H deste derivado mostra o desdobramento dos sinais dos hidrogênios do açúcar com $\delta_{\text{H-6}}$ 4,27 (*dd*, 4,0; 12,0); 4,11 (*dl*, 12,0), duplete do hidrogênio anomérico $\delta_{\text{H-1'}}$ 4,60 ($J=8$ Hz) e os $\delta_{\text{H-5'}}$ 3,69 (*m*), $\delta_{\text{H-2'}}$ 4,96 (*tl*), $\delta_{\text{H-4'}}$ 5,02 (*tl*) e $\delta_{\text{H-3'}}$ 5,21 (*tl*) (Figura II.4.24, pág. 159; Tabela II.4.4, pág. 157). Os espectros de RMN ^{13}C (Figura II.4.23, pág. 158; Figura II.4.25, pág. 159) de **19** e **20** apresentam 4xCH e um CH₂ da glicose, sendo um com δ 100,76 (**19**) e δ 99,62 (**20**) de CH anomérico. Na parte da aglicona temos δ_{C} 79,89 (**19**) e δ_{C} 80,07 (**20**) do CH-3. Os sinais dos carbonos sp^2 em $\delta_{\text{C-5}}$ 140,43 (**19**) e $\delta_{\text{C-5}}$ 140,34 (**20**) e $\delta_{\text{C-6}}$ 121,19 (**19**) e $\delta_{\text{C-6}}$ 122,17 (**20**), são compatíveis com a ligação dupla em 5-6 do sitosterol. A comparação dos valores de ^1H e ^{13}C com os da literatura (KOJIMA et al., 1990; CARVALHO, 2000) confirmaram a estrutura **19** como sendo o produto natural 3-*O*- β -D-glicopiranosilsterol.



19: R=H, 3-*O*- β -D-glicopiranosil sitosterol

20: R=Ac, 3-*O*- β -D-tetraacetil glicopiranosil sitosterol

Tabela II.4.4. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de **19** (3-*O*- β -D-glicopiranosilsitosterol) em $\text{DMSO-}D_6$ e **20** (3-*O*- β -D-tetraacetilglicopiranosilsitosterol) em CDCl_3 .

C	19		20	
	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H (mult)
5	140,43	-	140,34	-
10	36,83	-	36,12	-
13	40,13	-	42,30	-
CH				
3	79,89	3,36 (<i>m</i>)	80,07	3,46 (<i>m</i>)
6	121,19	5,31 (<i>dl</i>)	122,17	5,37 (<i>dl</i>)
8	31,41		31,91	
9	49,58		50,11	
14	56,16		56,73	
17	55,41		56,02	
20	36,20		36,04	
22	33,33		35,11	
23	29,25		29,12	
24	45,12		45,81	
25	28,69		29,59	
1'	100,76	4,19 (<i>d</i> , 8,0)	99,62	4,60 (<i>d</i> , 8,0)
2'	73,45	4,41 (<i>tl</i>)	71,66	4,96 (<i>tl</i>)
3'	76,74	4,85 (<i>tl</i>)	72,90	5,21 (<i>tl</i>)
4'	70,08	4,41 (<i>tl</i>)	68,83	5,02 (<i>tl</i>)
5'	76,74	3,60 (<i>m</i>)	71,66	3,69 (<i>m</i>)
CH ₂				
6	61,01		62,06	4,27 (<i>dd</i> , 4,0; 12,0) 4,11 (<i>dl</i> , 12,0)
1	35,48		37,85	
2	29,25		29,35	
4	41,84		38,84	1,90 (<i>sl</i>)
7	28,69		31,85	
11	20,59		21,03	
12	38,93		39,11	
15	23,85		24,26	
16	27,79		28,16	
28	22,60		24,25	
CH ₃				
18	11,78	0,63 (<i>s</i>)	11,81	0,67 (<i>s</i>)
19	18,61	0,94 (<i>s</i>)	18,69	0,93 (<i>s</i>)
21	18,93		19,35	1,94
26	19,71	0,89 (<i>s</i>)	19,80	0,88 (<i>s</i>)
27	19,09	0,78 (<i>sl</i>)	19,01	0,79 (<i>sl</i>)
29	11,78	0,82 (<i>sl</i>)	11,95	0,81 (<i>sl</i>)
H ₃ C-CO	-	-	21,03-20,63	2,23
H ₃ C-CO	-	-	170,36-169,41	-

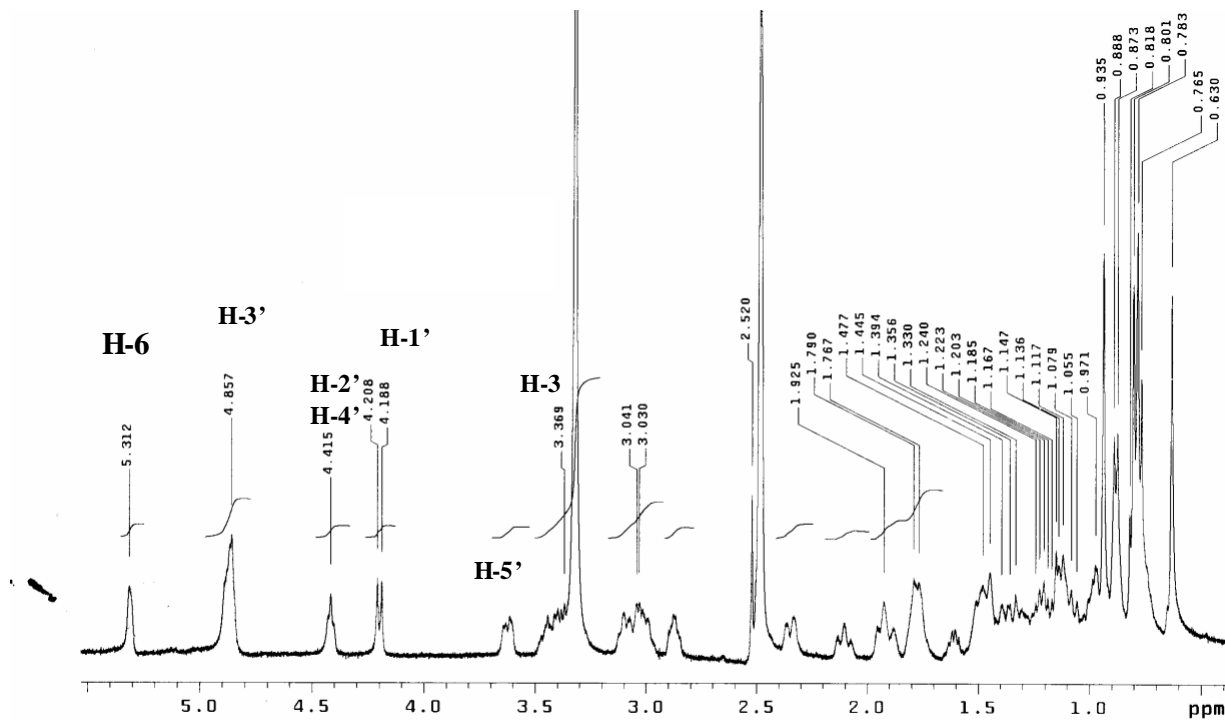


Figura II.4.22. Espectro de RMN ^1H de **19** (3-O-b-D-glicopiranosilsterol) em DMSO-D₆.

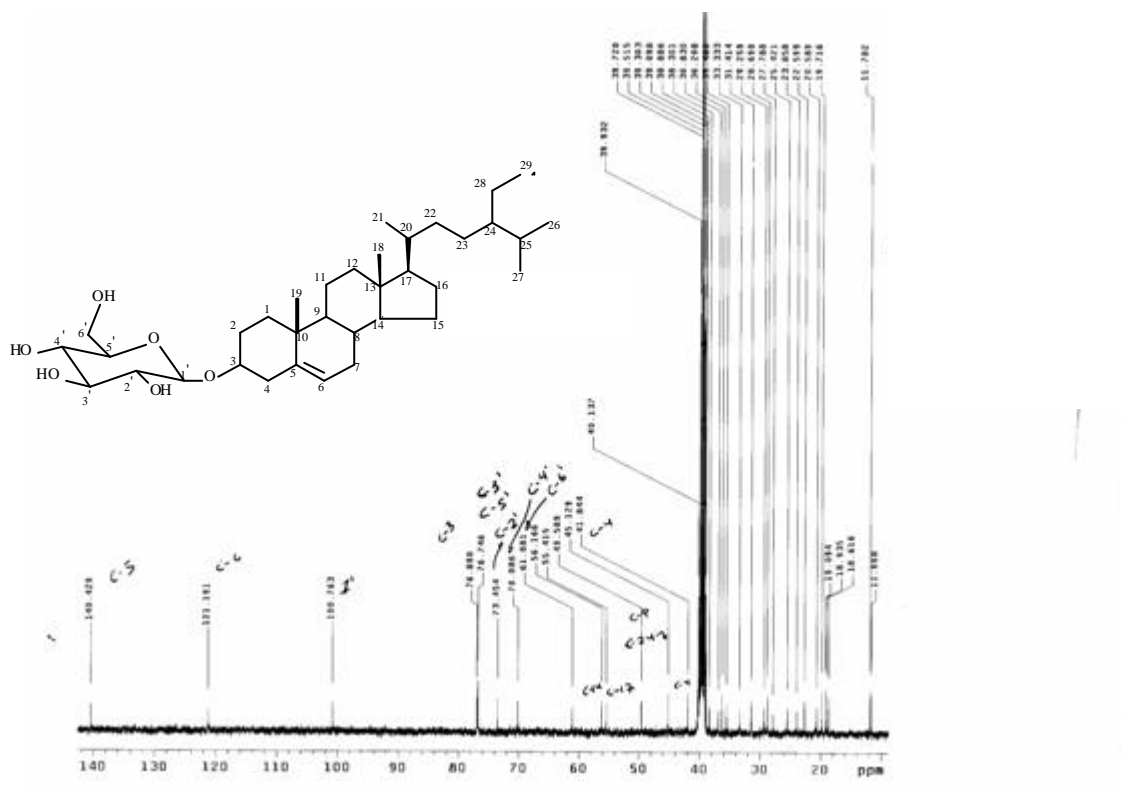


Figura II.4.23. Espectro de RMN ^{13}C de **19** (3-O-b-D-glicopiranosilsterol) em DMSO-D₆.

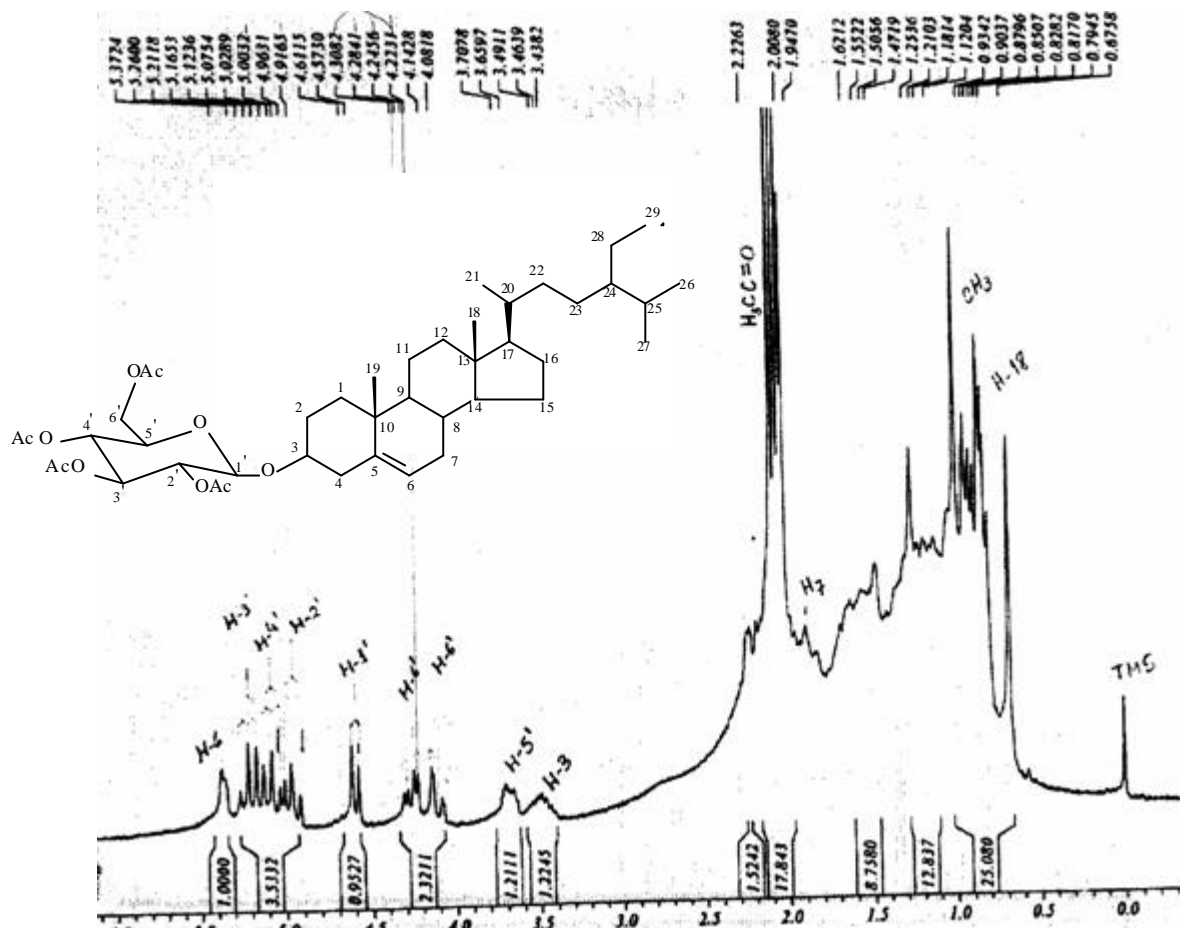


Figura II.4.24. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de **20** em CDCl_3 .

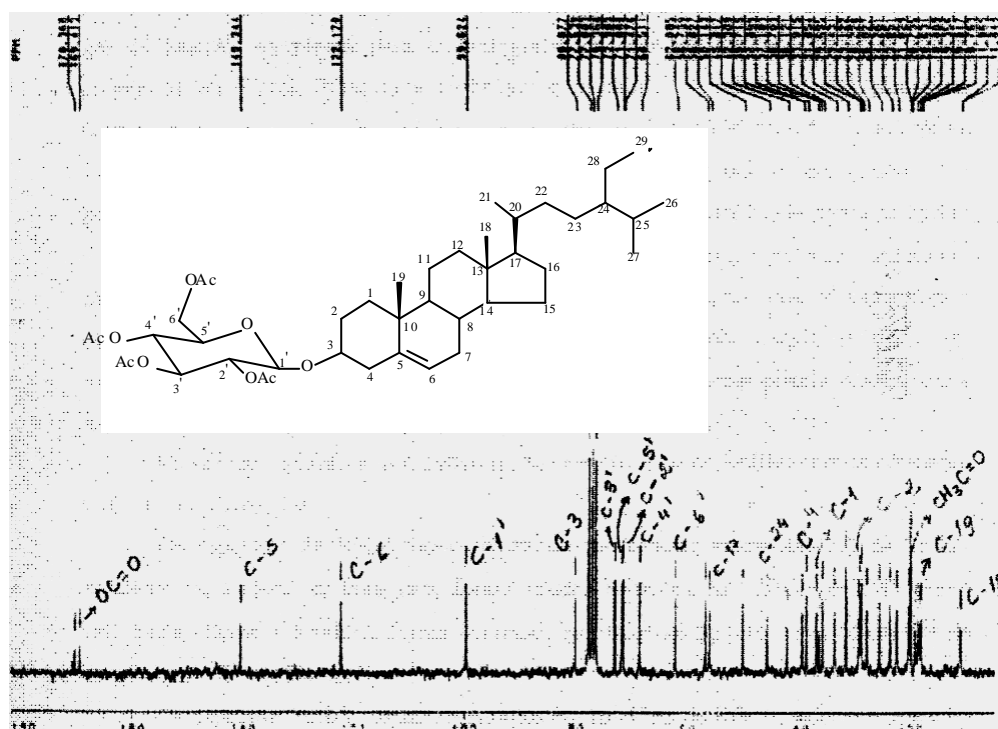


Figura II.4.25. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) de **20** (3-O-b-D-tetraacetilglicopiranosil sitosterol) em CDCl_3 .

II-4.3. Monossacarídeos derivados (Substâncias 16 e 17)

O sorbitol (**16**) e a substância **17** foram identificados em mistura. A fração que continha essa mistura de monossacarídeos foi submetida à reação de acetilação, fornecendo os derivados **16a** e **18**. O espectro de RMN ^1H (Figura II.4.26, pág. 161) de **16** e **17** mostra sinais em 2,80-3,66 ppm compatíveis com deslocamentos químicos de hidrogênio da mistura de monossacarídeos. O singlete em 3,30 ppm que pode ser atribuído a grupo metoxila de **17**. Os espectros de RMN ^{13}C (PND e DEPT, Figura II.4.27, pág. 161) de **16** e **17** possui sinais (HC-O) em 69,67, 73,3, 73,5, 74,16, 73,46 e 83,06 e de OCH_3 em 57,84 ppm que são compatíveis com o quebracitol **17** e 65,14 (CH_2), (4xCH) δ_{C} 71,28 (2x) e 73,00 (2x) que foram atribuídos a **16**, (Tabela II.4.5, pág.160). A identificação dessas substâncias **16** e **17** foi feita através de comparação com dados da literatura (POUCHERT & BEHNKE, 1993). O espectro de massas (Figura II.4.28, pág. 162) dos derivados acetilados **16a** e **18** revela os picos m/z (% dos sinais): 404 (M^+ , 2), 405 (M^++1 , 9), 375 [$(\text{M}+1) - \text{H}_2\text{CO}$, 40], 345 [$(\text{M}+1) - \text{H}_2\text{CCO}$ e H_2O , 38] para o derivado **18** e os picos: 434 (M^+ , 3), 182 ($\text{M}^+ - 6 \times \text{H}_2\text{CCO}$) para **16a**.

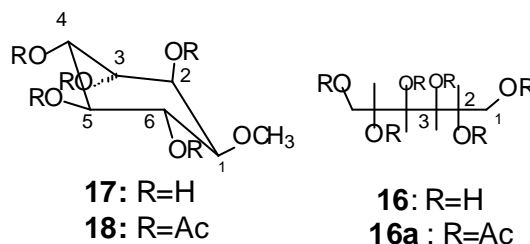


Tabela II.4.5. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de quebracitol (**17**) e sorbitol (**16**) e seus derivados acetilados **16a** e **18**.

C	d_{C}		d_{C} (POUCHERT & BEHNKE, 1993)		d_{C}	
	16	+ 17	16	17	16a	+ 18
1	83,0	73,0/ CH-3	83,9	72,9	76,8	69,2
2	76,4	73,0/ CH-3	75,6	72,9	70,8	69,2
3	74,2	71,3/ CH-2	74,7	72,2	70,7	67,5
4	73,5	71,3/ CH-2	74,3	72,2	68,9	67,5
5	73,3	65,1(CH₂-1)	73,1	66,1(CH₂)	67,1	61,6 (CH₂)
6	69,7	65,1(CH₂-1)	69,9	66,1 (CH₂)	65,9	61,6 (CH₂)
	57,8 (CH₃)		59,7 (CH₃)		57,9 (CH₃)	

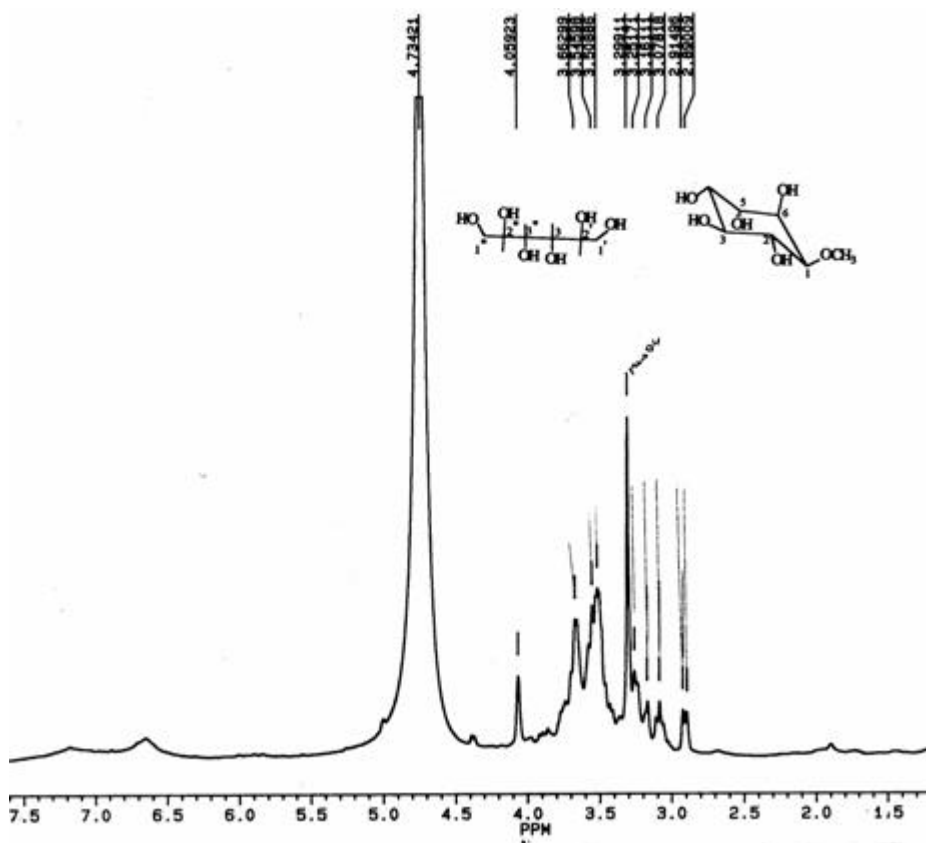


Figura II.4.26. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) do quebracitol (17) e sorbitol (16), em $\text{Metano-}D_4$.

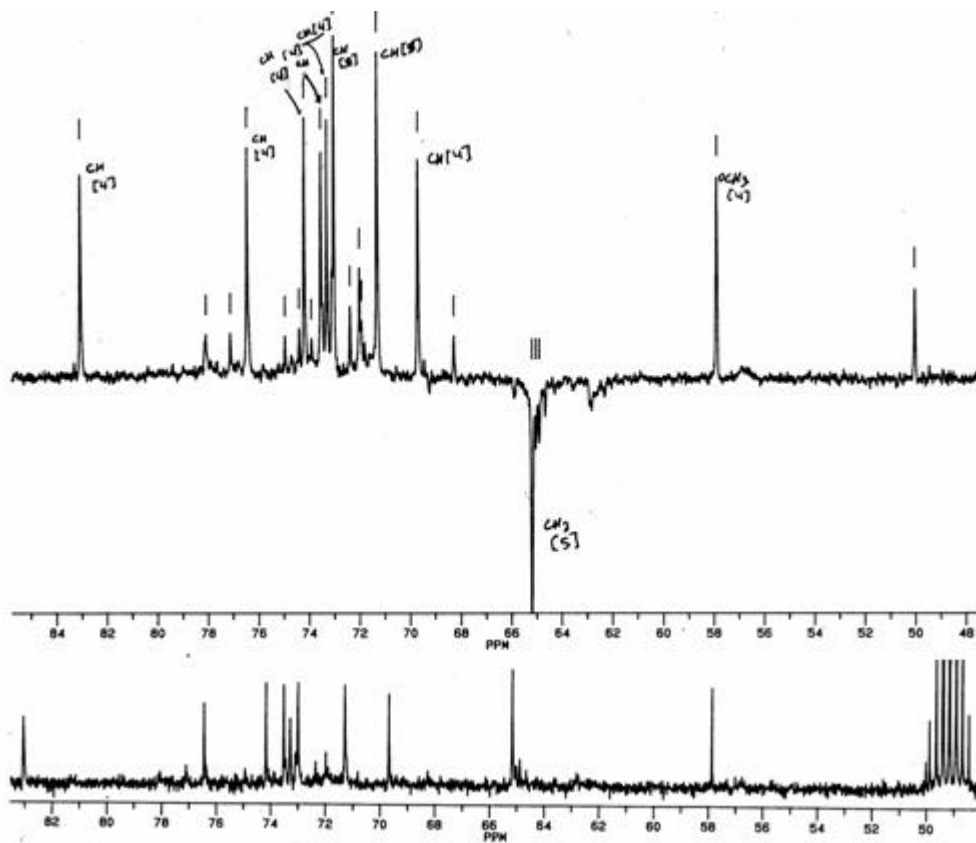


Figura II.4.27. Espectro de RMN ^{13}C e DEPT (100 MHz) do quebracitol (17) e sorbitol (16), em $\text{Metano-}D_4$. 161

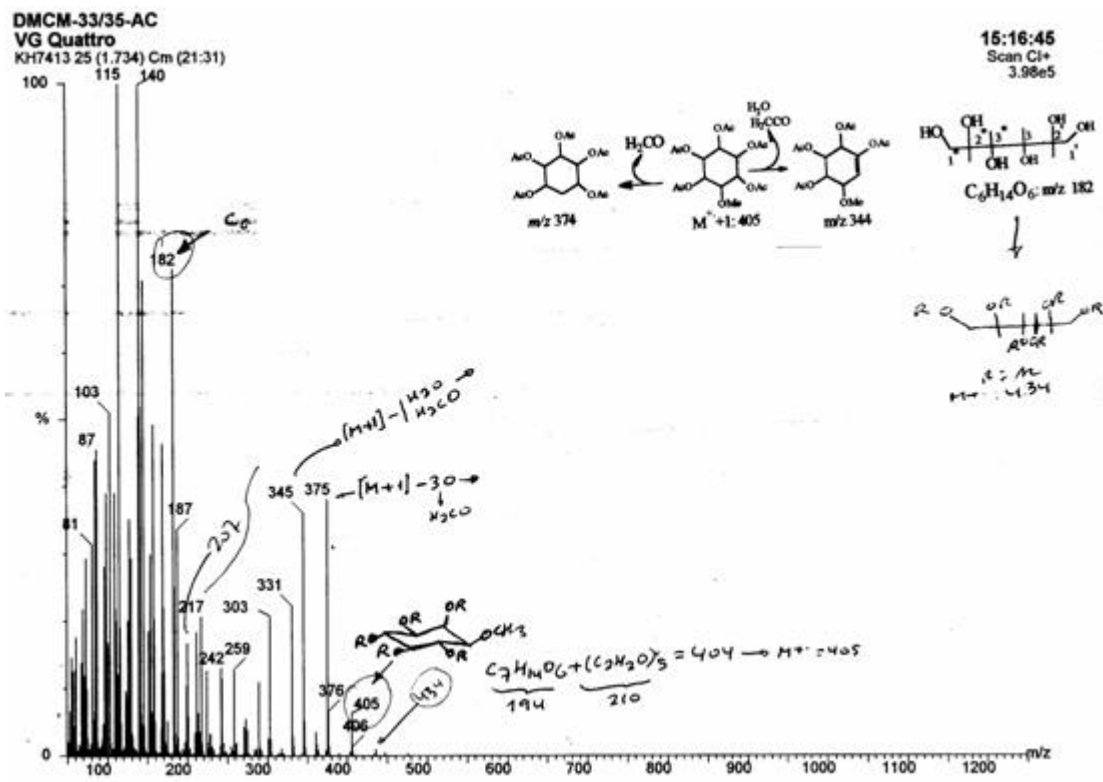


Figura II.4.28. Espectro de massas (FAB) do quebracitol (18) e sorbitol (16a) acetilados usando glicerol como matriz.

II-4.4. Flavonóides

II.4.4.1 Epicatequina (Substância 1)

O pico 291 (100%, $M^+ + 1$) detectado no espectro de massas FAB (Figura II.4.29, pág.164), análise espectrométrica de RMN 1H (Figura II.4.30, pág.165) e ^{13}C (BBD e DEPT) (Figura II.4.31, pág.166) e comparação com modelos da literatura foram usados para definir a fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_6$ para a substância **1**. O espectro de RMN ^{13}C apresenta vários sinais com intensidades diferentes, revelando se tratar de uma mistura. Esta observação pode ser feita com análise de RMN 1H . Os sinais intensos com δ_C : 29,4 de CH_2 , 67,6 e 78,0 de CH carbinólicos estão de acordo com o sistema de $H_2C-HCO-HCO-CH$, observado no espectro de RMN 1H com δ_H : 2,85 (*dd*; 4,4; 16,6), 2,72 (*dd*; 2,9; 16,6), 4,16 (*m*) e 4,78 (*m*). Os demais sinais de CH em 96,9 e 96,4 ppm do C-6 e C-8 do anel A e 115,9, 116,4 e 119,9 ppm do anel B de um flavonóide permitem propor para **1** a estrutura de um flavonol. No anel A, os sinais de C-9 e C-10 foram identificados pela comparação dos espectros de RMN ^{13}C -HBBD e RMN ^{13}C -DEPT, permitindo a distinção entre os carbonos metínicos e quaternários e pela grande diferença de deslocamento químico entre eles, sendo que C-9 é compatível a um carbono quaternário oxigenado de um anel heterocíclico. O assinalamento dos carbonos aromáticos oxigenados C-5 (δ_C 157,8) e C-7 (δ_C 158,2) demonstra uma pequena diferença de deslocamento químico $\Delta\delta_C = 0,4$, e entre os carbonos metínicos CH-6 (δ_C 96,9) e CH-8 (δ_C 96,4) de $\Delta\delta_C = 0,5$, podendo ser justificado pela proximidade do C-7. A atribuição desses carbonos foi feita pela comparação com a literatura (AGRAWAL, 1989).

O valor do pico em m/z 291 [$M^+ + 1$] no espectro de massas é compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_6$ (Figura II.4.29, pág.164) e confirma a proposta de **1**. O pico em m/z 272 [$M-H_2O$] $^+$ está de acordo com a facilidade da perda de água (Esquema II.4.3, pág.164). A Tabela I.4.1 com os dados espectrométricos da epicatequina **1** está contida no capítulo I (pg. 24), juntamente com outras discussões sobre a substância.

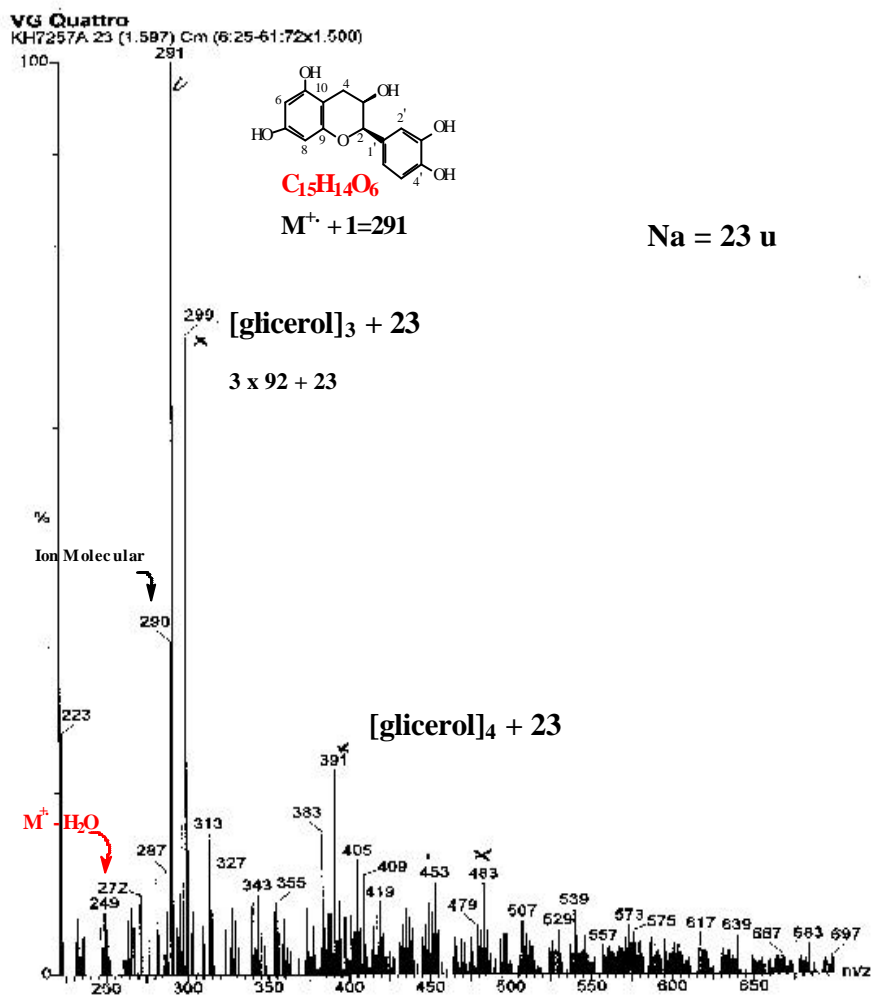
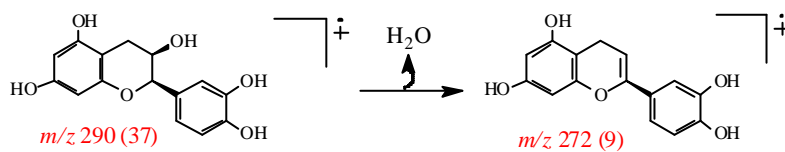


Figura II.4.29. Espectro de massas (FAB) de **1** isolada de *D. martiana*.



Esquema II.4.3. Interpretação do espectro de massas de **1** (epicatequina).

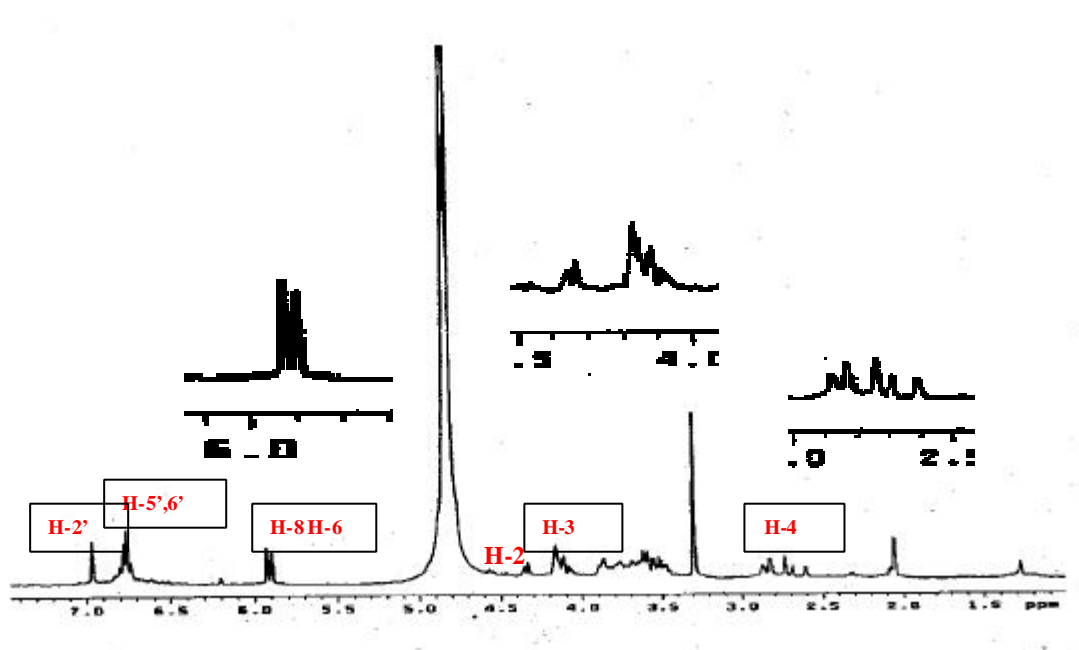
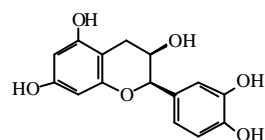


Figura II.4.30. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) em metanol- D_4 de **1** isolada de *D. martiana*.

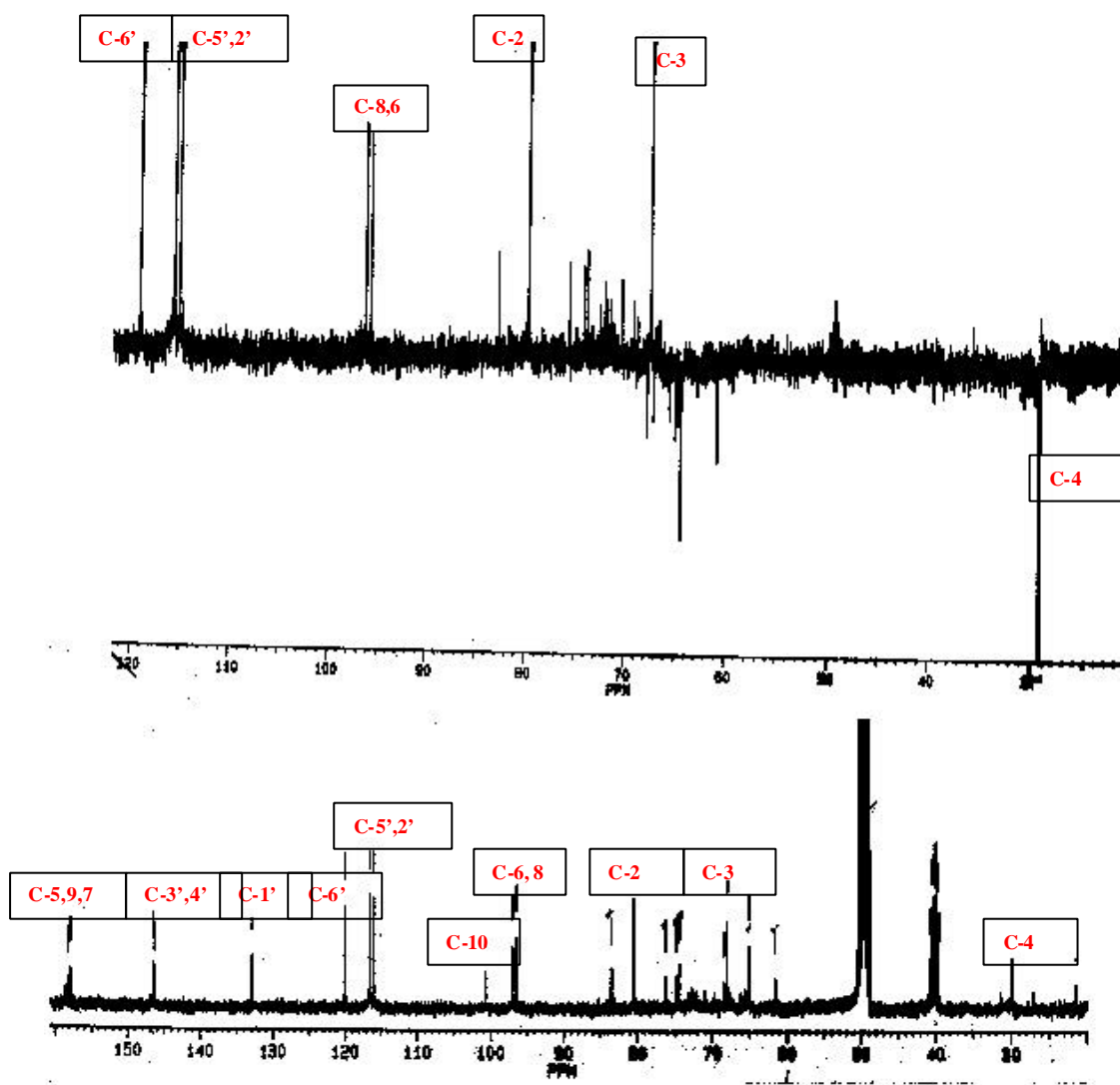


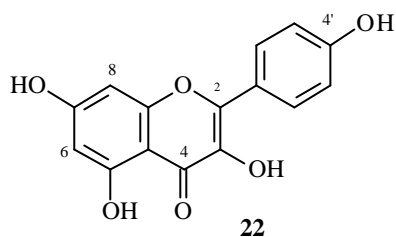
Figura II.4.31. Espectro de RMN ^{15}C (100 MHz) e DEPT em metanol- D_4 de **1** isolada de *D. martiana*.

II.4.4.2 Quercetina e Canferol (Substâncias 21 e 22)

Os espectros de IV dos flavonóis **21** e **22** (Figura II.4.32, pág. 169 e Figura II.4.34, pág. 170) revelam semelhança nas bandas de absorção para o grupo hidroxila (3406 e 3322 cm^{-1} , estiramento de OH), grupamentos C=O (1659 e 1662 cm^{-1}) de carbonila conjugada, C=C (1613 e 1609 cm^{-1} , 1569 e 1562 cm^{-1} , 1450 e 1454 cm^{-1}) de anel aromático. As diferenças nos espectros de RMN ^1H dos flavonóis ocorrem devido a presença de uma função oxigenada a mais no anel B de **21**. Essa hidroxila adicional no C-3' muda o perfil do sistema AA'BB' mostrado nos espectros de **22**, apresentando os sinais em δ_{H} 7,83 (*sl*) referente ao H-2' e os sinais δ_{H} 7,68 (*d*, 7,8 Hz) do H-6' e δ_{H} 6,97 (*d*, 8,2 Hz) do H-5' no flavonol **21** (Figura II.4.33, pág 169; Tabela II.4.7, pág 168). Esses valores de deslocamentos químicos estão de acordo com o modelo da literatura (HARBORNE, 1993) para a quercetina. O sistema AA'BB' é visualizado nos espectros de RMN ^1H (Figura II.4.35, pág 170), COSY- ^1H - ^1H (Figura II.4.36, pág 171) e ^{13}C (Figura II.4.37, pág 172) de **22**. O acoplamento detectado no espectro de COSY- ^1H - ^1H envolvendo os sinais δ_{H} 8,07 (*d*, 8,8 Hz) com 6,89 (*d*, 8,8 Hz) e os sinais intensos de CH no espectro de carbono-13 com δ_{C} 116,4 e 130,8 confirmam a proposta do sistema AA'BB' indicando uma função oxigenada no C-4'. Os sinais de CH em 94,6 e 99,39 ppm revelam que as posições C-6 e 8 do anel A estão livres de substituintes. Os valores de deslocamentos químicos visualizados nos espectros de COSY e RMN ^{13}C quando comparados com a literatura (HARBORNE, 1993) mostram $\Delta\delta$ em torno de 1,5 ppm devido a mudança de solvente de DMSO- D_6 para Metano- D_4 . O sinal da hidroxila em ligação de hidrogênio HO-5 em 12,13 ppm aparece somente quando o espectro é realizado com Acetona - D_6 .

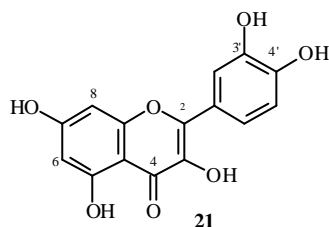
O valor do pico em m/z 287 [$\text{M}^+ + 1$] no espectro de massas é compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$ (Figura II.4.38, pág.173), confirmando a proposta de **22**.

Tabela II.4.6. Dados de ^1H - ^1H -COSY (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) do canferol (**22**) em Acetona- D_6 .



C	d_{H} (mult.)	d_{C}	(HARBORNE, 1993)
2	-	148,1	146,8
3	-	137,2	135,6
4	-	177,4	175,9
5	-	160,6	160,7
6	6,17(<i>d</i> , 2,0 Hz)	99,4	98,2
7	-	162,6	163,9
8	6,38(<i>d</i> , 2,0 Hz)	94,6	93,5
9	-	158,3	156,2
10	-	104,7	103,1
1'	-	123,8	121,7
2',6'	8,07(<i>d</i> , 8,8 Hz)	130,8	129,5
3',5'	6,89(<i>d</i> , 8,8 Hz)	116,4	115,4
4'	-	160,6	159,2
OH	-	-	-

Tabela II.4.7. Dados de RMN ^1H (200 MHz) da quercetina (**21**) em Acetona- D_6 .



C	d_{H} (Acetona- D_6)	d_{H} (DMSO- D_6) (HARBORNE, 1993)
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	6,25 (<i>s</i>)	6,20 (<i>d</i> , 2,1 Hz)
7	-	-
8	6,52 (<i>s</i>)	6,42 (<i>d</i> , 2,1 Hz)
9	-	-
10	-	-
1'	-	-
2'	7,83 (<i>sl</i>)	7,69 (<i>d</i> , 2,1 Hz)
6'	7,68 (<i>d</i> , 7,8Hz)	7,55 (<i>dd</i> , 8,5, 2,1 Hz)
3',4'	-	-
5'	6,97 (<i>d</i> , 8,2Hz)	6,9 (<i>d</i> , 8,5 Hz)
HO-5	12,13 (<i>s</i>)	-
HO-7,3',4'	9,67 (<i>sl</i>)	-

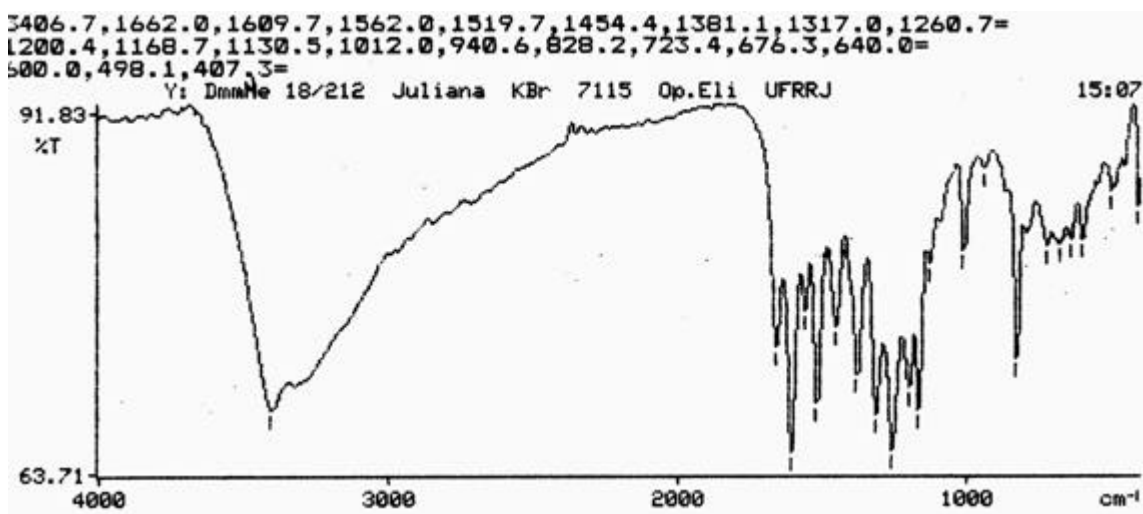


Figura II.4.32 . Espectro de IV do flavonol **21** (quercetina).

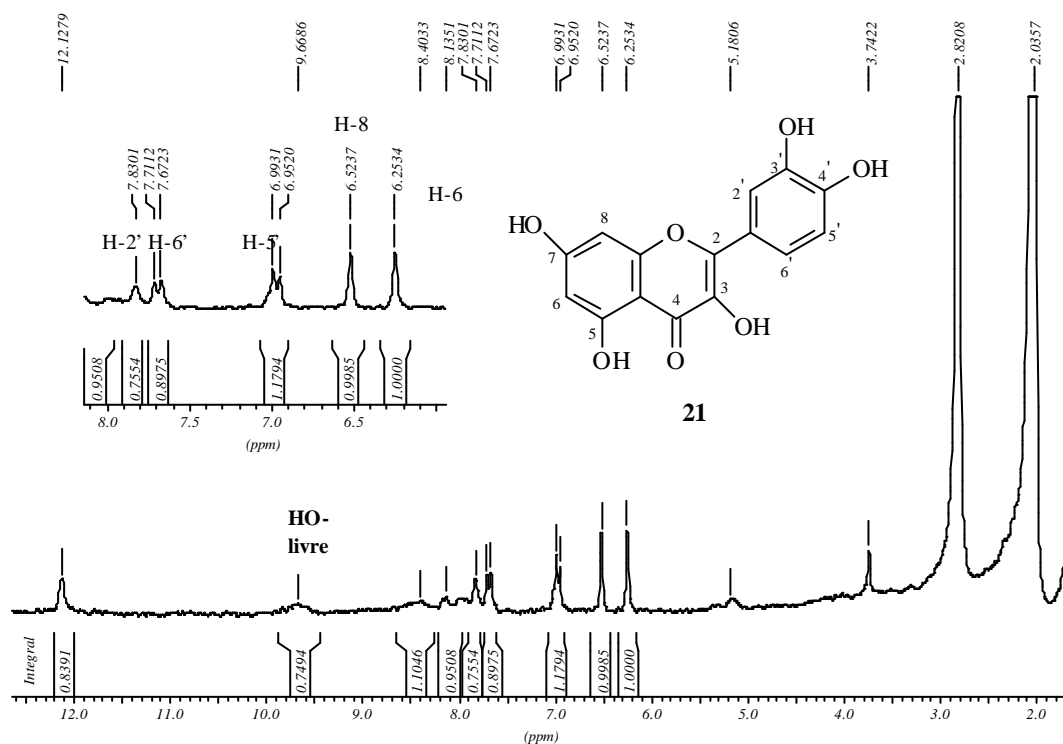


Figura II.4.33 . Espectro de RMN ^1H (200 MHz, D_3CCOCD_3) do flavonol **21** (quercetina).

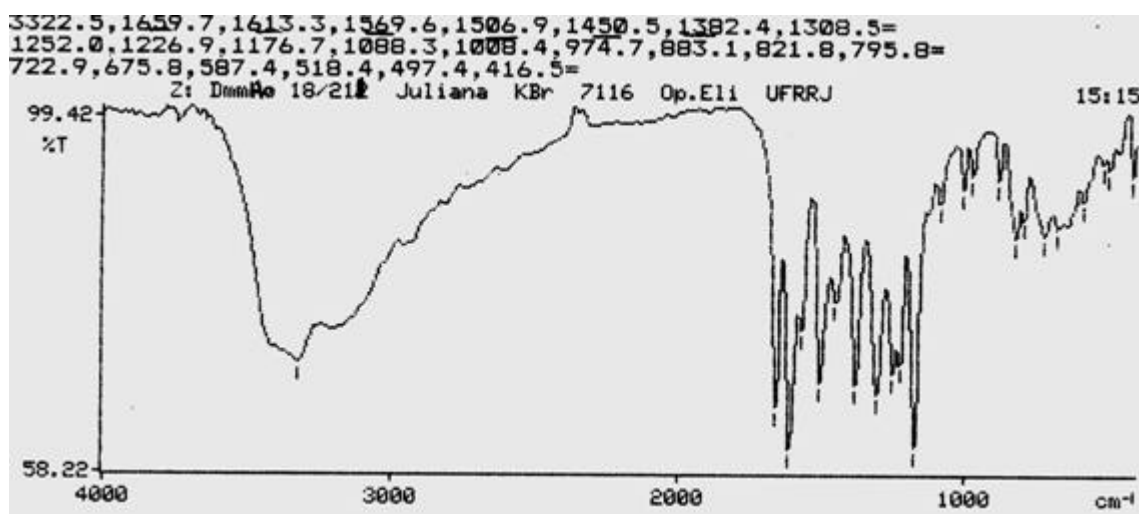


Figura II.4.34. Espectro de IV do flavonol **22** (canferol).

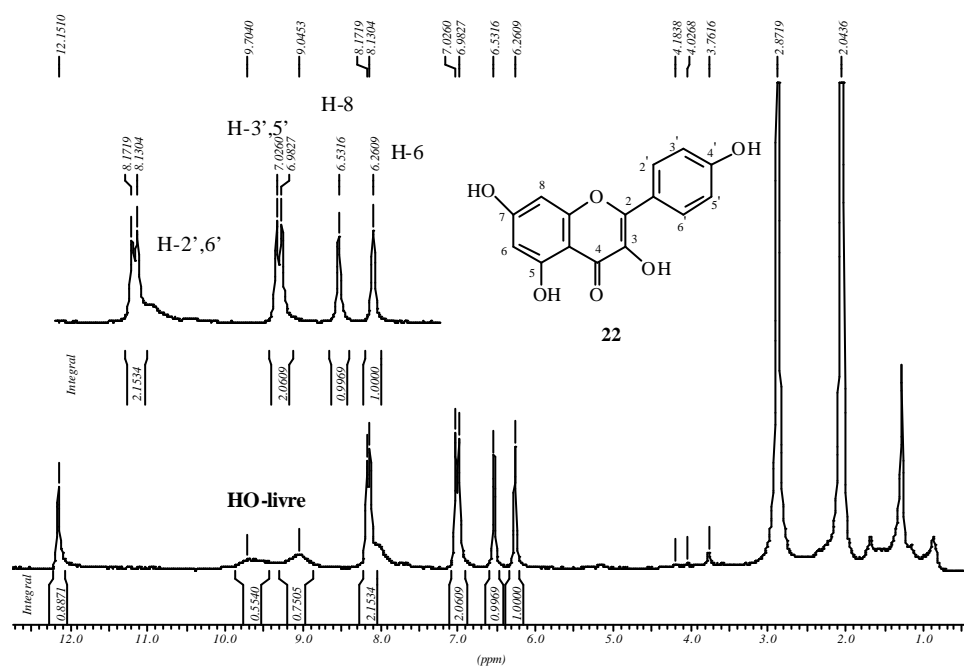


Figura II.4.35. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, L_3CCOCD_3) do flavonol **22** (canferol).

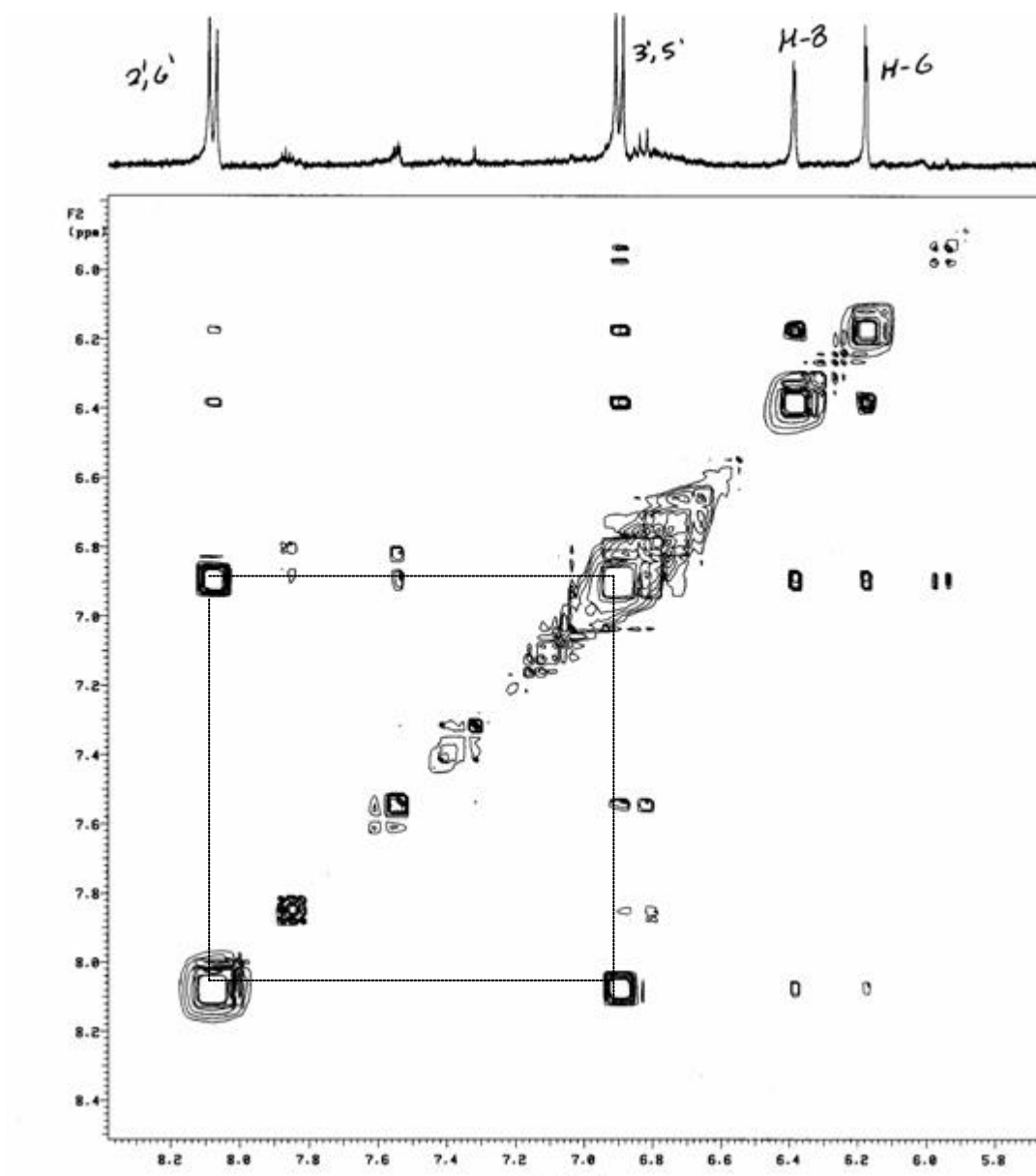


Figura II.4.36. Espectro de ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, Metanol- D_4) do flavonol **22** (canferol).

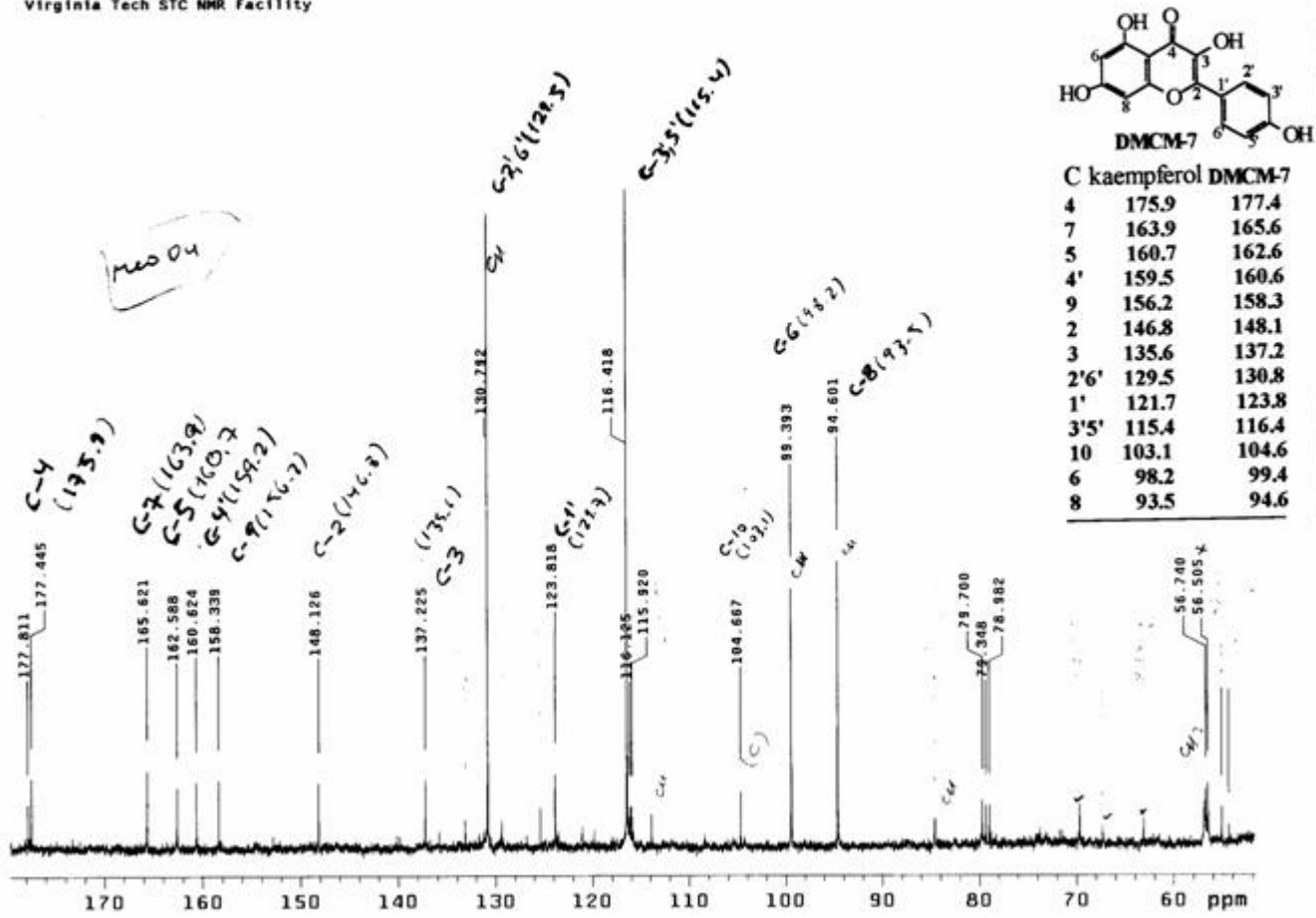


Figura II.4.37. Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, Metanol-D₄) do flavonol 22 (canferol).

DMCM-8A
VG Quattro
KH7484 44 (3.032) Cm (44:50)

16:45:47
Scan Cl+
5.64e5

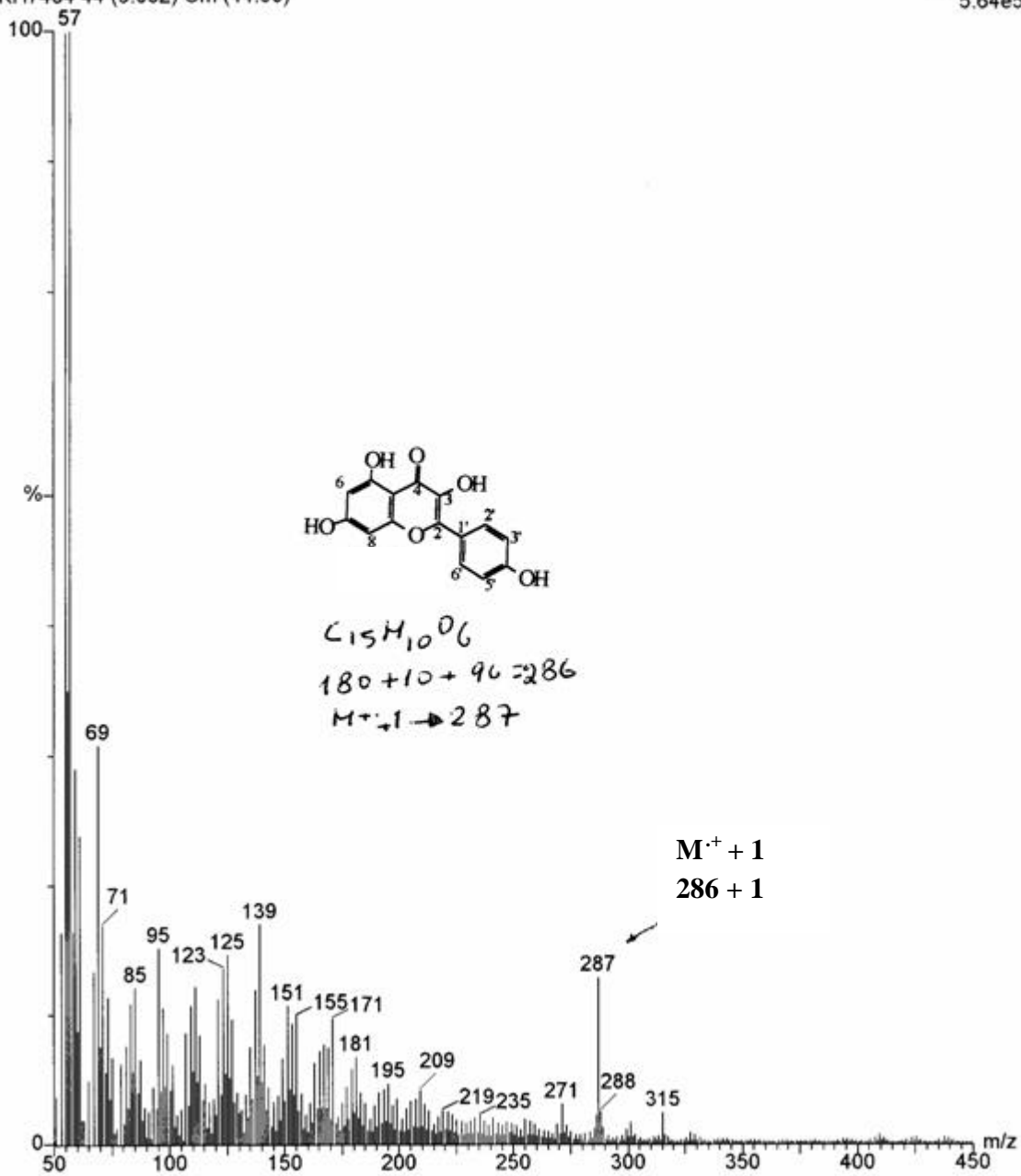


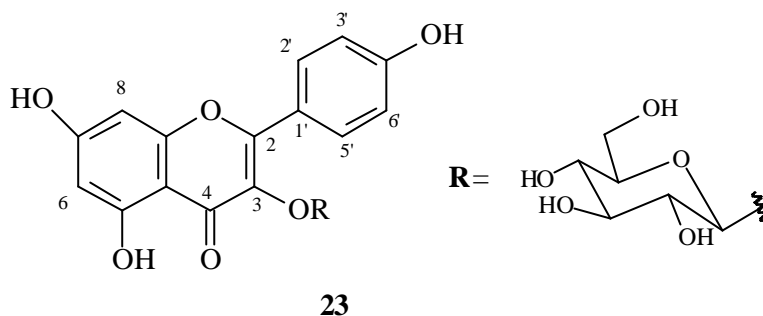
Figura II.4.38. Espectro de massas do flavonol 22 (canferol).

II.4.4.3 Flavonóides glicosilados

a) 3-*b*-O-D-glicopiranosil canferol (Substância 23)

O espectro de RMN ^1H da substância **23** (Figura II.4.39, pág. 176) mostra sinais de um flavonóide com sistema AA'BB' juntamente com sinais de hidrogênios carbinólicos. Os acoplamentos verificados no COSY- ^1H - ^1H (Figura II.4.40, pág. 177) entre os sinais δ 6,5 (*d*, 8,8 Hz), atribuído aos H-3',5', com δ 8,4 (*d*, 8,8 Hz), dos H-2',6', e o acoplamento meta entre δ_{H} 6,1 (*d*, 1,6 Hz), do H-6, com δ_{H} 6,3 (*d*, 1,6 Hz) do H-8 sugerem a proposta do flavonóide canferol. O sinal de absorção do hidrogênio anomérico do açúcar é δ 5,03 (*d*, 8,0 Hz, H-1"). A unidade de carboidrato pode ser localizada no C-3 com base na análise dos valores dos deslocamentos químicos dos carbonos (Figura II.4.41, pág. 178) e comparação com a literatura (AGRAWAL, 1989; HARBORNE, 1993). As desproteções são verificadas nos carbonos C-2 ($\delta\Delta$ 10,5), 2H-2',6' ($\delta\Delta$ 2,9) quando comparados com o canferol (HARBORNE, 1993). A unidade de açúcar foi proposta como sendo a β -D-glicose pelo valor de $J=8,0$ Hz apresentado pelo hidrogênio anomérico H-1" e pelos acoplamentos verificados no ^1H - ^1H -COSY entre δ_{H} 5,03 (H-1") e δ_{H} 3,8 (H-2"). Os flavonóides glicosilados são comuns em várias famílias de plantas, já em Apocynaceae temos poucos representantes dessa classe, este é o primeiro relato da 3-*b*-O-D-glicopiranosil canferol nesta família.

Tabela II.4.8. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) do flavonóide glicosilado **23** (**3-*b*-O-D-glicopiranosil canferol**) em Metanol- D_4 .



C	δ_{C} 23	δ_{H} 23^a	(HARBORNE, 1986)
2	158,6		156,3
3			133,0
4			177,4
5			161,1
6	96,2	6,1 (<i>d</i> , 1,6)	97,7
7			164,1
8	91,1	6,3 (<i>d</i> , 1,6)	93,3
9	155,2		156,3
10	103,7		104,7
1'	122,6		121,0
2',6'	132,4	8,4 (<i>d</i> , 8,8)	130,7
3',5'	116,3	6,5 (<i>d</i> , 8,8)	115,0
4'			159,8
1''	105,7	5,03 (<i>d</i> , 8,0)	101,4
2''	73,2		74,2
3''	77,2		77,2
4''	70,2		69,8
5''	75,3		76,4
6''	62,0		60,8

^aEspectros de ^1H - ^1H -COSY foram usados para atribuição dos dados.

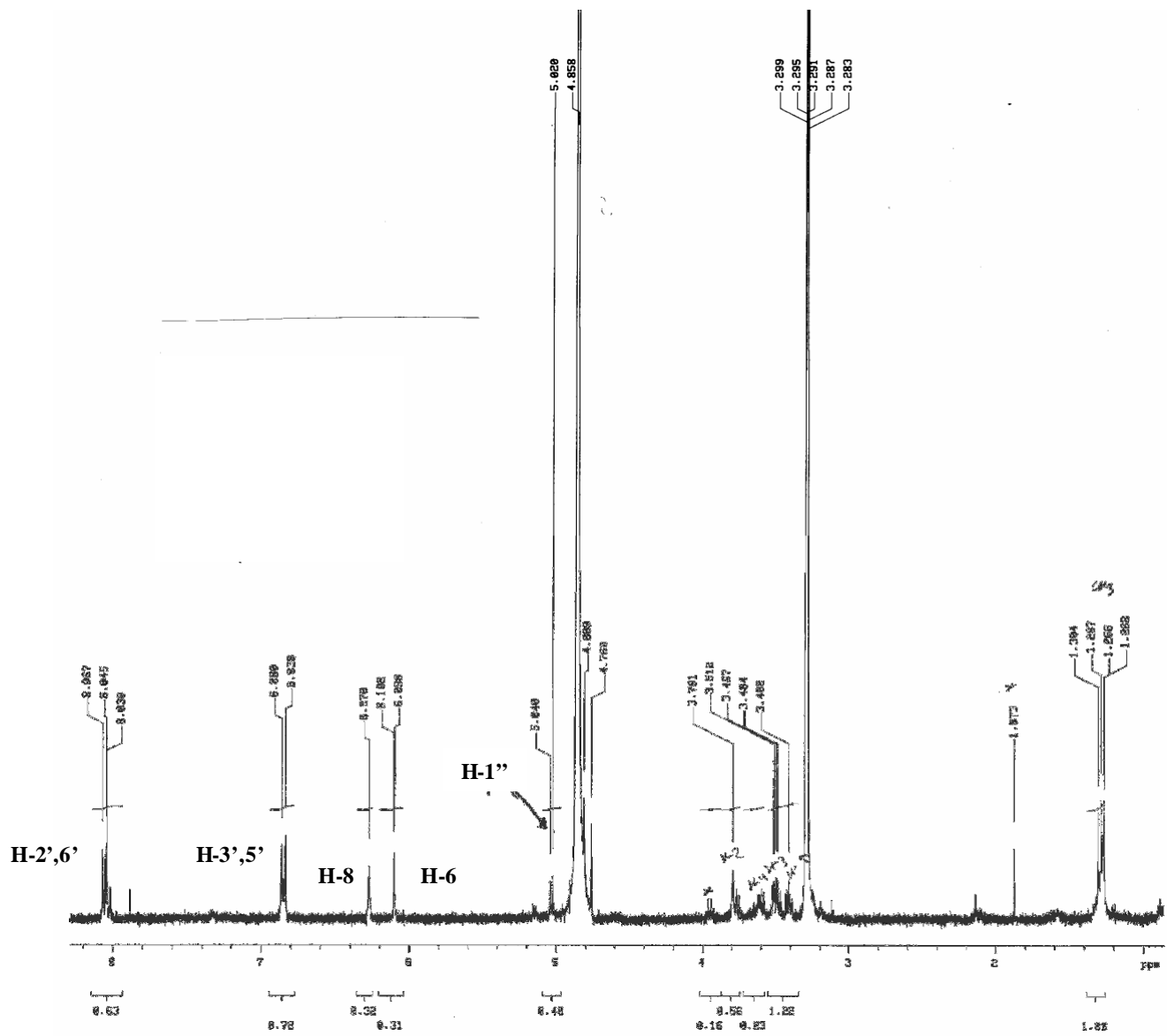


Figura II.4.39. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) do flavonóide glicosilado 23 (3-*b*-O-D-glicopiranosil canferol) em Metano- d_4 .

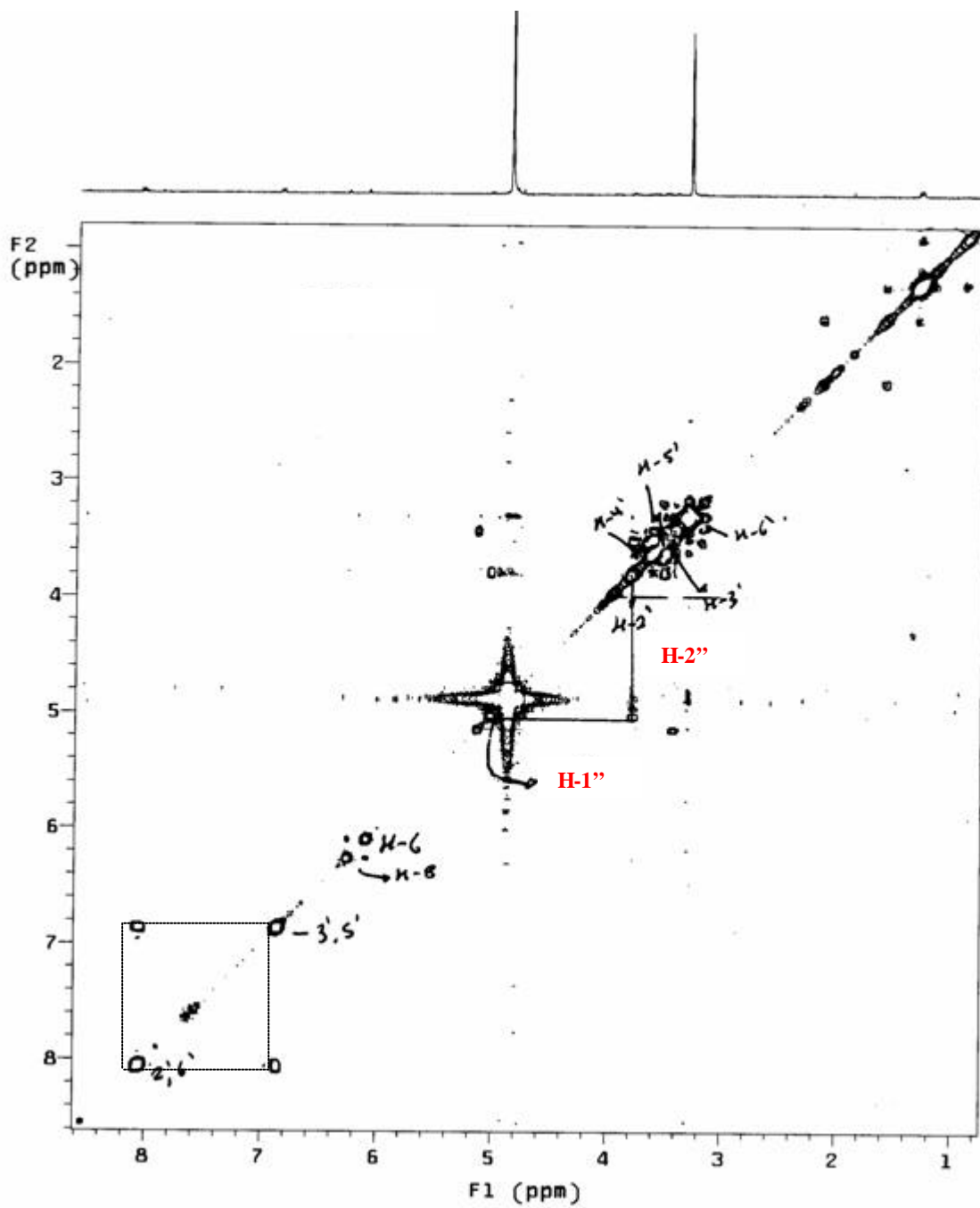


Figura II.4.40. Espectro de ^1H - ^1H -COSY (400 MHz) do flavonóide glicosilado **23** (3-*b*-O-D-glicopiranosil canferol) em Metanol- D_4 .

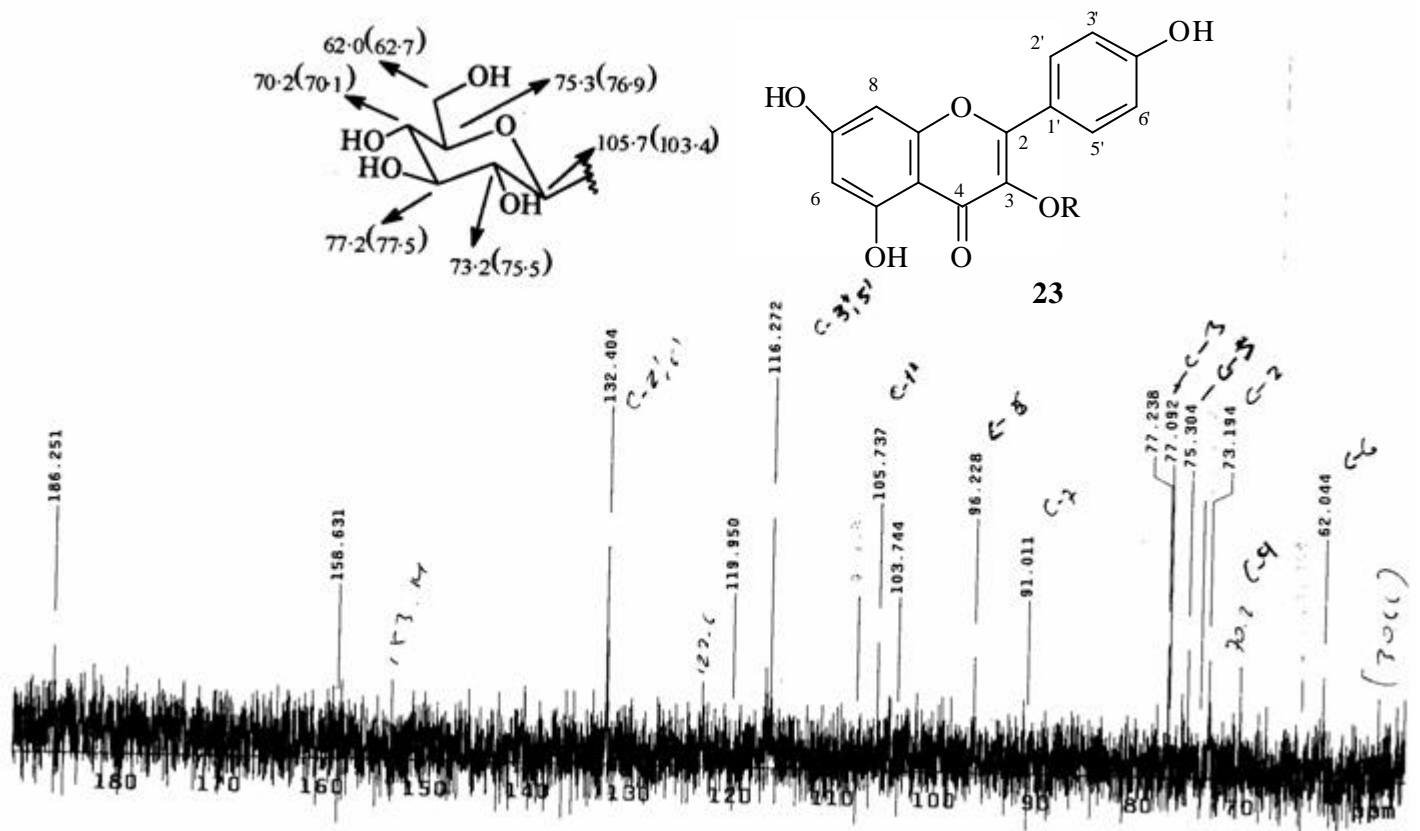
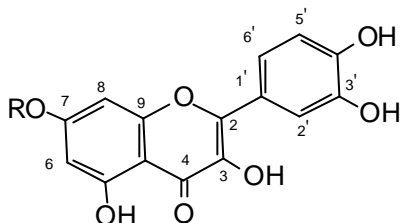


Figura II.4.41. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) do flavonóide glicosilado **23** (3-*b*-O-D-glicopiranosil canferol) em Metanol- D_4 .

b) 7-*b*-O-D-glicopiranosil quercetina e 7-*b*-O-D-galactopiranosil quercetina (Substâncias 24 e 25)

Os flavonóides glicosilados **24** e **25** são derivados da quercetina e estão sendo analisados em mistura devido à dificuldade de separação dos análogos glicosil e galactosil, além da presença de um flavonóide 3-O-glicosil na amostra. Os espectros de RMN ^1H e ^1H - ^1H -COSY das substâncias **24** e **25** (Figura II.4.42, pág. 181; Figura II.4.43, pág. 182) apresentam sinais típicos de substituição para o padrão quercetina. O anel A mostra os dubletos em δ 6,29 ($J=1,6$ Hz) e δ 6,49 ($J=1,6$ Hz) referentes ao H-6 e H-8, respectivamente. O anel B dos dois flavonóides mostra os dubletos em δ 7,5 (**24**) e δ 7,52 (**25**) (H-2'; $J=2,4$ Hz); δ 6,89 ($J=8,4$) (**24**) e δ 6,93 ($J=8,8$ Hz) (**25**) referente ao H-5' e um duplo duplete em δ 7,61 (H-6'; $J=2,4; 8,2$ Hz) (**24**) e um multiplete δ 7,54 (**25**) atribuído ao H-6' (Tabela II.4.9, pág. 180). Os sinais correspondentes as unidades de açúcares são representados pelos sinais de hidrogênios ligados em carbonos carbinólicos. Os hidrogênios anoméricos possuem δ 5,46 (d , 7,6 Hz; H-1'', **24**) e δ 5,55 (d , 7,6 Hz; H-1'', **25**). As localizações das unidades de carboidratos, no C-7, de ambos os flavonóides foram definidas através da análise espectral de NOEDIFF (Figura II.4.44, pág. 182) com irradiação na frequência de ambos os hidrogênios anoméricos [δ 5,46 (d , 7,6 Hz, H-1'', **24**) e δ 5,55 (d , 7,6 Hz, H-1'', **25**)] gerando NOE no sinal de H-6 (6,29, d , 1,6 Hz) e no H-8 (6,49, d , 1,6). Os sinais no espectro de ^{13}C (Figura II.4.45, pág. 183) são compatíveis com as estruturas propostas (Tabela II.4.9, pág. 180). O assinalamento completo foi realizado com o auxílio dos espectros de RMN 2D: HMQC (Figura II.4.46; Figura II.4.47, págs. 184-185), HMBC (Figura II.4.48-Figura II.4.50, pág. 186-188). A comparação com dados da literatura permitiu identificar o flavonóide **24** como sendo 7-*b*-O-D-glicopiranosil quercetina (HARBONE & MABRY, 1986; AGRAWAL, 1989) e **25** como 7-*b*-O-D-galactopiranosil quercetina (AGRAWAL, 1989). O valor do pico em m/z 465 [$M^+ + 1$] no espectro de massas FAB confirma a proposta dos flavonóides **24** e **25**. A matriz utilizada no espectro é glicerol (M: 92), levando o aparecimento dos picos m/z 369 ($4 \times 92 + 1$), m/z 461 ($5 \times 92 + 1$), m/z 391 [$299 (301 - 2H) + 92$] e m/z 361 [$(163 - 2H) + 2 \times 92 - 2H$], conforme Figura II.4.51, pág. 189.

Tabela II.4.9. Dados de RMN ^1H e ^1H - ^1H -COSY (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) em MeOD_4 e 2D em DMSO-D_6 dos flavonóides glicosilados **24** e **25** (**7-b-O-D-glicopiranosil quercetina** e **7-b-O-D-galactopiranosil quercetina**).



24 + 25

C	<u>24 + 25</u>			7-O-glicosil	3-O-galact.
	d_C	d_H (mult., Hz) ($^1J_{CH}$)	HMBC ($^{2,3}J_{CH}$)	(AGRAWAL, 1989)	(AGRAWAL, 1989)
2	158,9		H-6', H-8	147,9	156,2
3	135,9			135,9	133,4
4	179,7			175,9	177,7
5	163,2		H-6	160,3	161,3
6	100,0	6,29 (d, 1,6)	H-8	98,7	98,8
7	166,2		H-6, H-8	162,7	164,2
8	94,8	6,49 (d, 1,6)	H-6	94,5	93,7
9	158,6		H-6, H-8	155,7	156,4
10	105,6		H-6	104,7	104,2
1'	122,9			121,9	121,2
2'	117,9 117,7	7,5/7,52 (d, 2,4)	H-6'	115,3	113,9
3'	146,8		H-5', H-2'	145,0	145,1
4'	150,1		H-6', H-2', H-5'	147,8	147,1
5'	116,2 116,3	6,89(d, 8,4)/6,93(d, 8,8)		115,9	115,3
6'	123,0 123,3	7,54 (m)/7,61 (dd, 2,4; 8,2)	H-5', H-2'	120,1	122,9
1''	105,5	5,46 (d, 7,6)		100,3	
2''	75,8			73,2	
3''	78,5			76,5	
4''	70,1			69,9	
5''	78,5			77,2	
6''	62,7			60,9	
1'' ^a	104,4	5,55 (d, 7,6)			102,0
2'' ^a	73,3				71,5
3'' ^a	75,2				73,4
4'' ^a	71,3				68,1
5'' ^a	77,3				75,9
6'' ^a	61,9				60,4

^a galactopiranosil

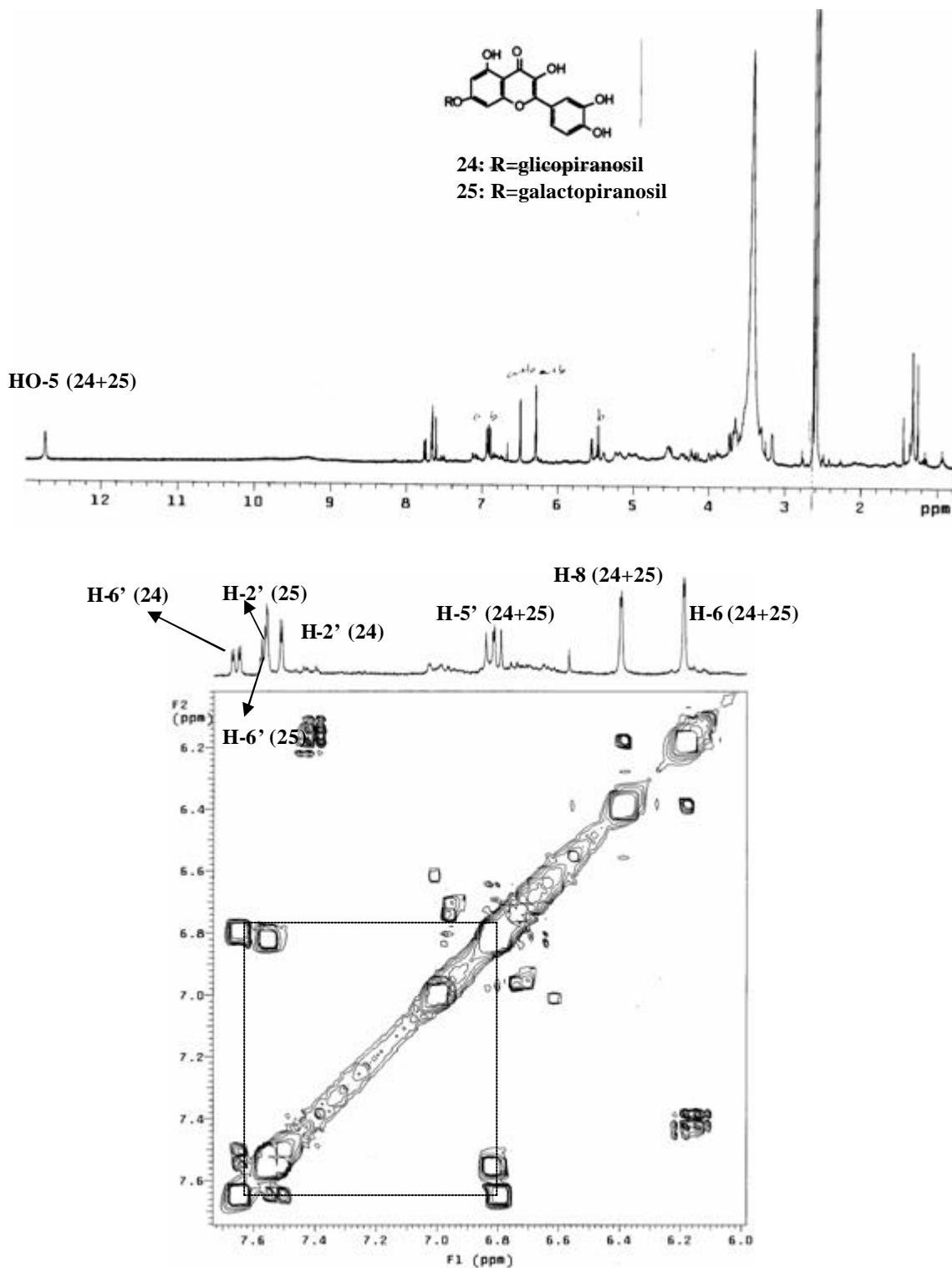


Figura II.4.42. Espectro de RMN ^1H (DMSO-D_6) e ^1H - ^1H -COSY (MeOD_4 400 MHz) dos flavonóides glicosilados **24** e **25** (7-*b*-O-D-glicopiranosil quercetina e 7-*b*-O-D-galactopiranosil quercetina).

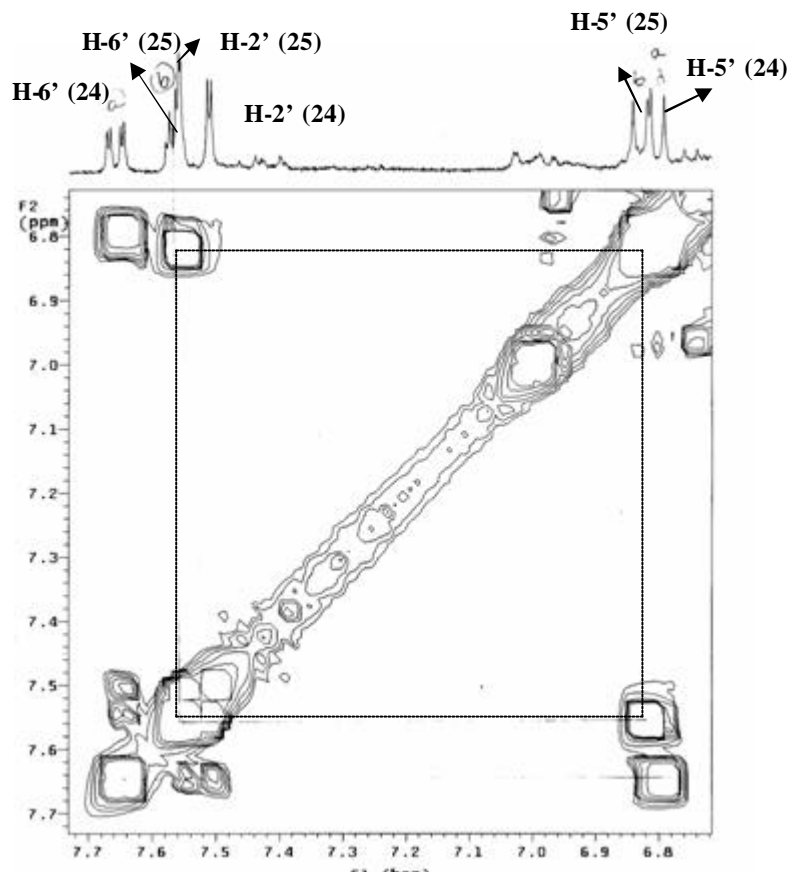


Figura II.4.43. Espectro de ^1H - ^1H -COSY (400 MHz) ampliado de **24** e **25** (7-*b*-O-D-glicopiranosil quercetina e 7-*b*-O-D-galactopiranosil quercetina) em MeOD_4 .

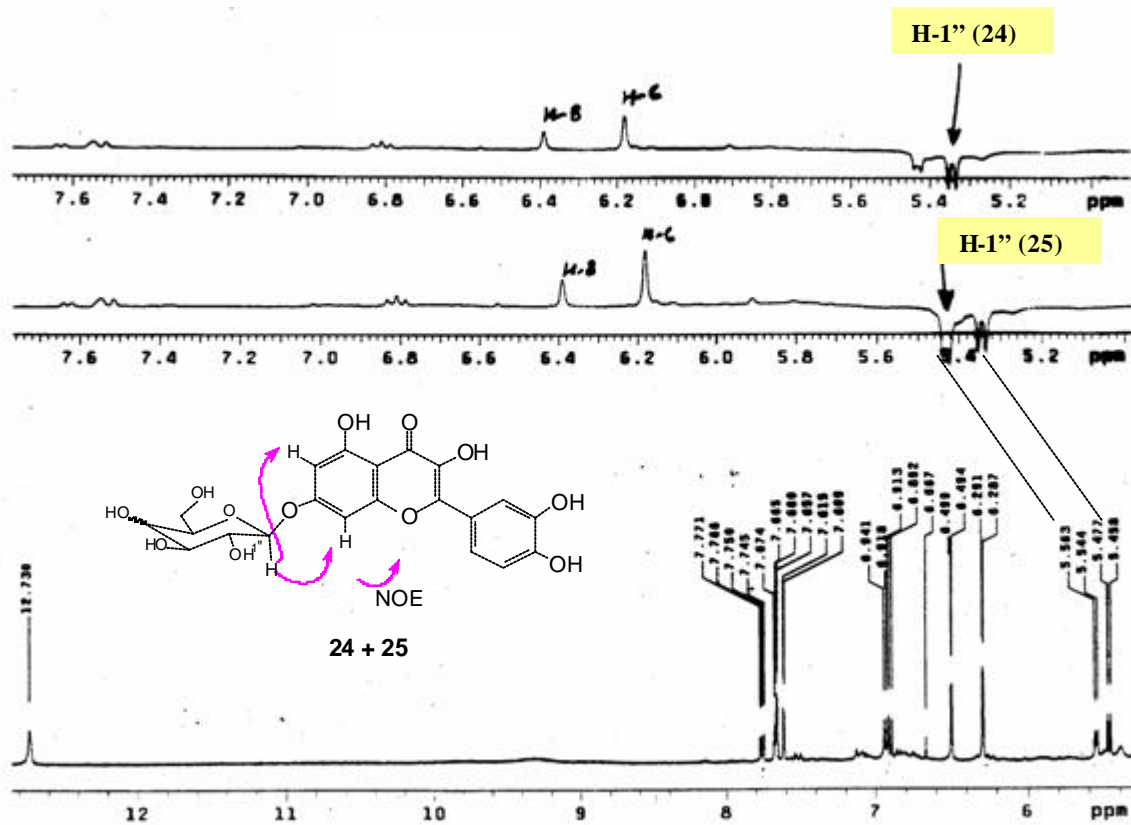
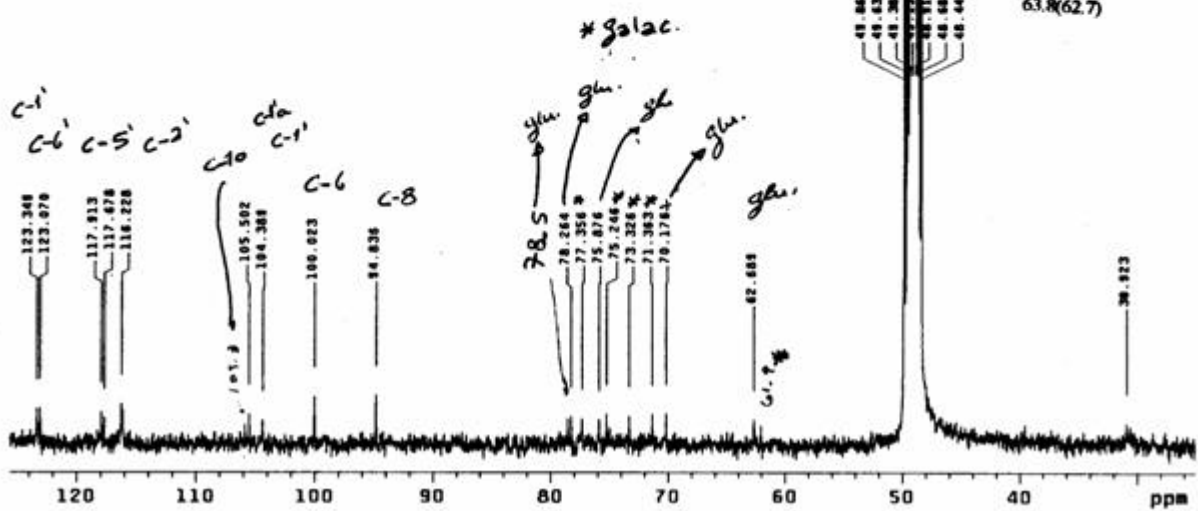
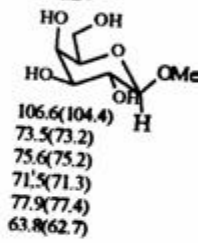
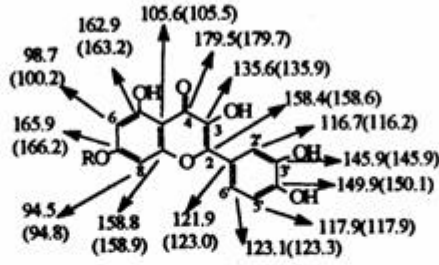


Figura II.4.44. Espectro de NOEDIFF dos flavonóides glicosilados **24** e **25** (7-*b*-O-D- 182 glicopiranosil quercetina e 7-*b*-O-D-galactopiranosil quercetina) em DMSO-D_6 .

dmcb-22-25-8
 PULSE SEQUENCE bruker
 OBSERVE UNKNOWN
 FREQUENCY 99.582 MHz
 SPECTRAL WIDTH 21739.1 Hz
 ACQUISITION TIME 9.754 sec
 RELAXATION DELAY 1.999 sec
 PULSE WIDTH 3.0 usec
 FIRST PULSE WIDTH 12.5 usec
 TEMPERATURE 24.9 deg. C.
 NO. REPETITIONS 19308
 DOUBLE PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 LINE BROADENING 1.0 Hz
 FT SIZE 32768
 TOTAL ACQUISITION TIME 9.4 hours
 09-14-87
 Virginia Tech STC NMR Facility

glycosil	
lit. gluc	lit. galac
104.6->105.5	102.0->104.4
75.2->75.8	71.3->71.3
78.0->78.5	73.1->73.3
71.3->70.2	68.0->70.2
78.9->78.3	75.7->75.3
62.7->62.5	60.3->62.1



C-2 (24+25)

C-4 (24+25)

C-7 (24+25)

C-5 (24+25)

C-4' (24+25)

C-3' (24+25)

C-3 (24+25)

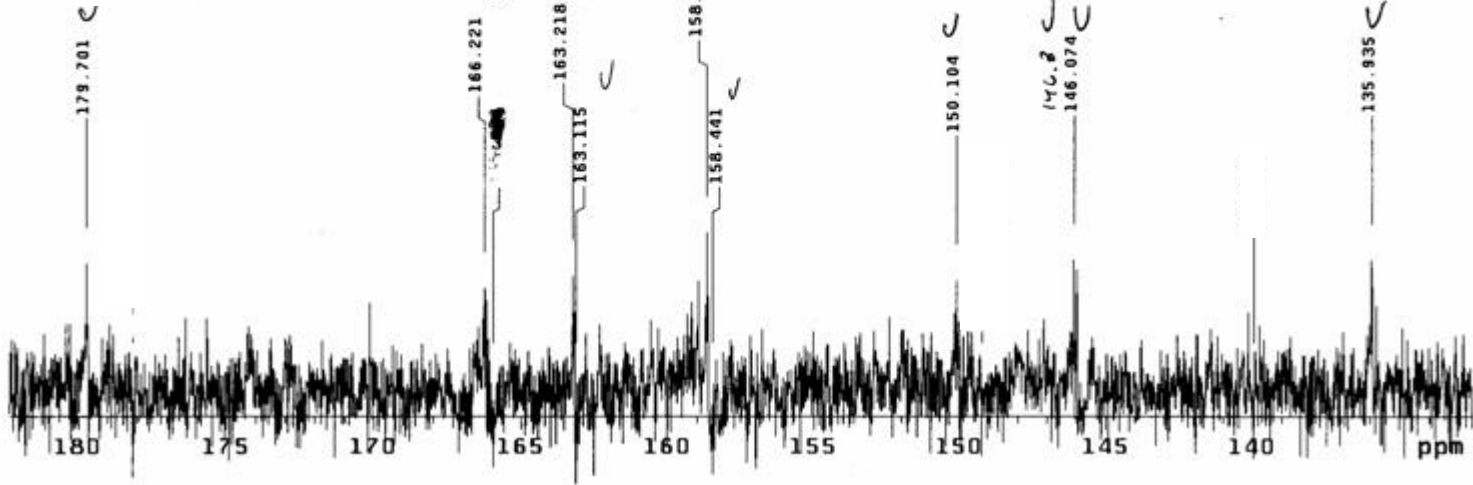


Figura II.4.45. Espectro de RMN ¹³C (100 MHz) dos flavonóides glicosilados 24 e 25 (7-b-O-D-β-glicopiranosil quercetina e 7-b-O-D-galactopiranosil quercetina) em MeOD₄.

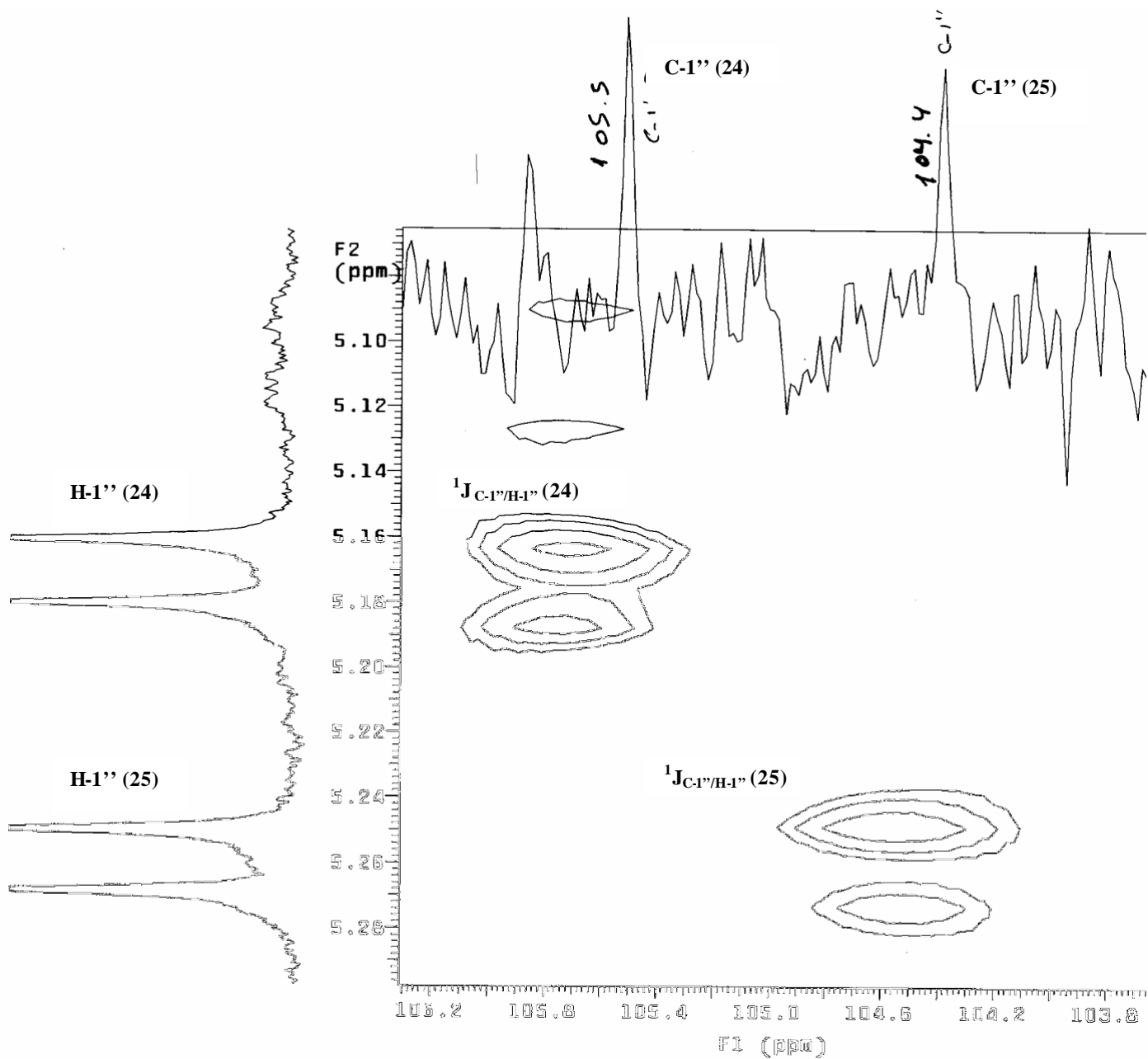


Figura II.4.46. Espectro de HMQC (400 MHz), ampliado 5,0-5,3 ppm, dos flavonóides glicosilados **24** e **25** (*7-b-O-D-glicopiranosil quercetina* e *7-b-O-D-galactopiranosil quercetina*) em DMSO-D_6 .

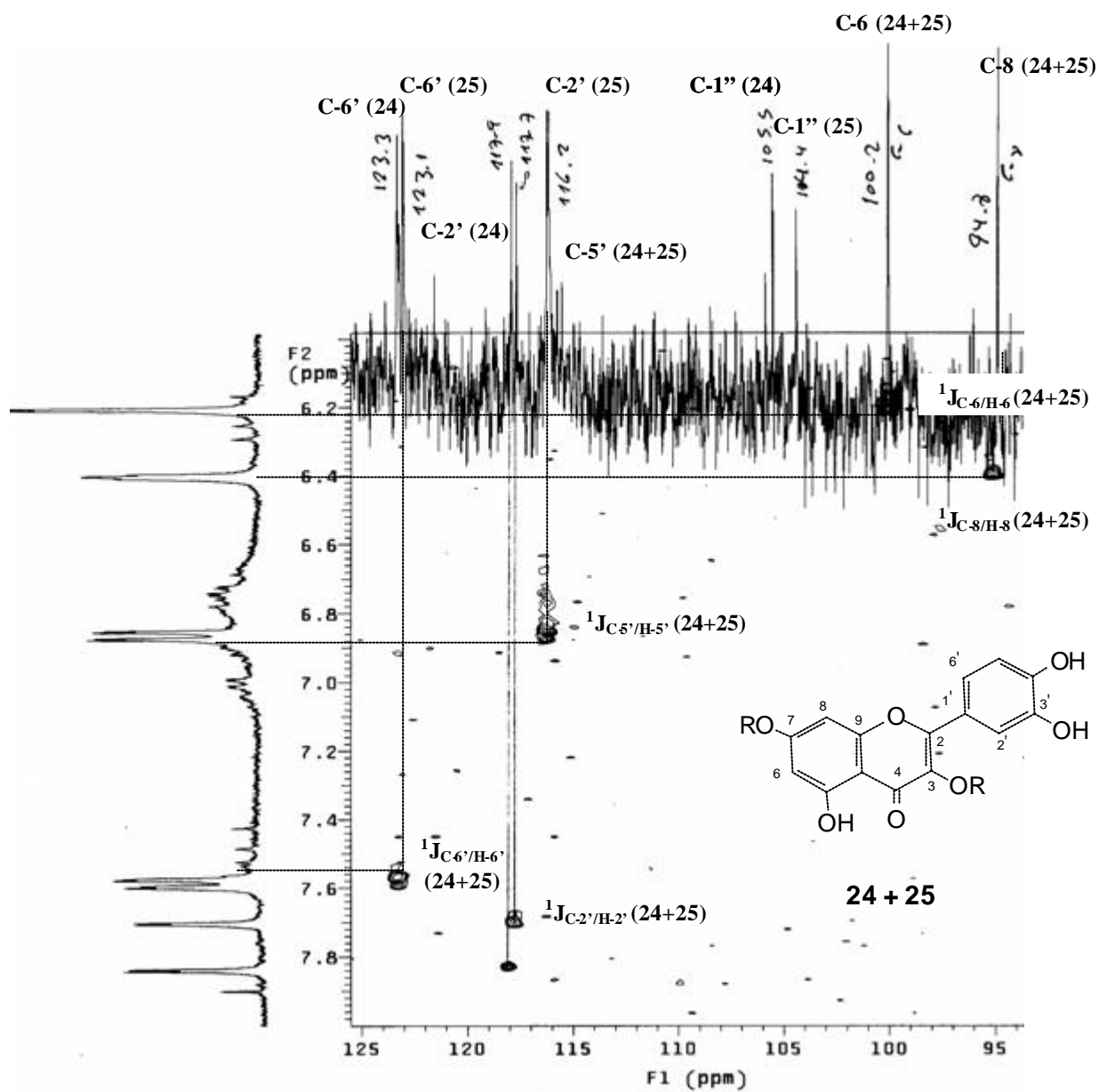


Figura II.4.47. Espectro de HMQC (400 MHz), ampliado de 6,0-8,0 ppm, de **24** e **25** (7-*b*-O-D-glicopiranosil quercetina e 7-*b*-O-D-galactopiranosil quercetina) em DMSO-D₆.

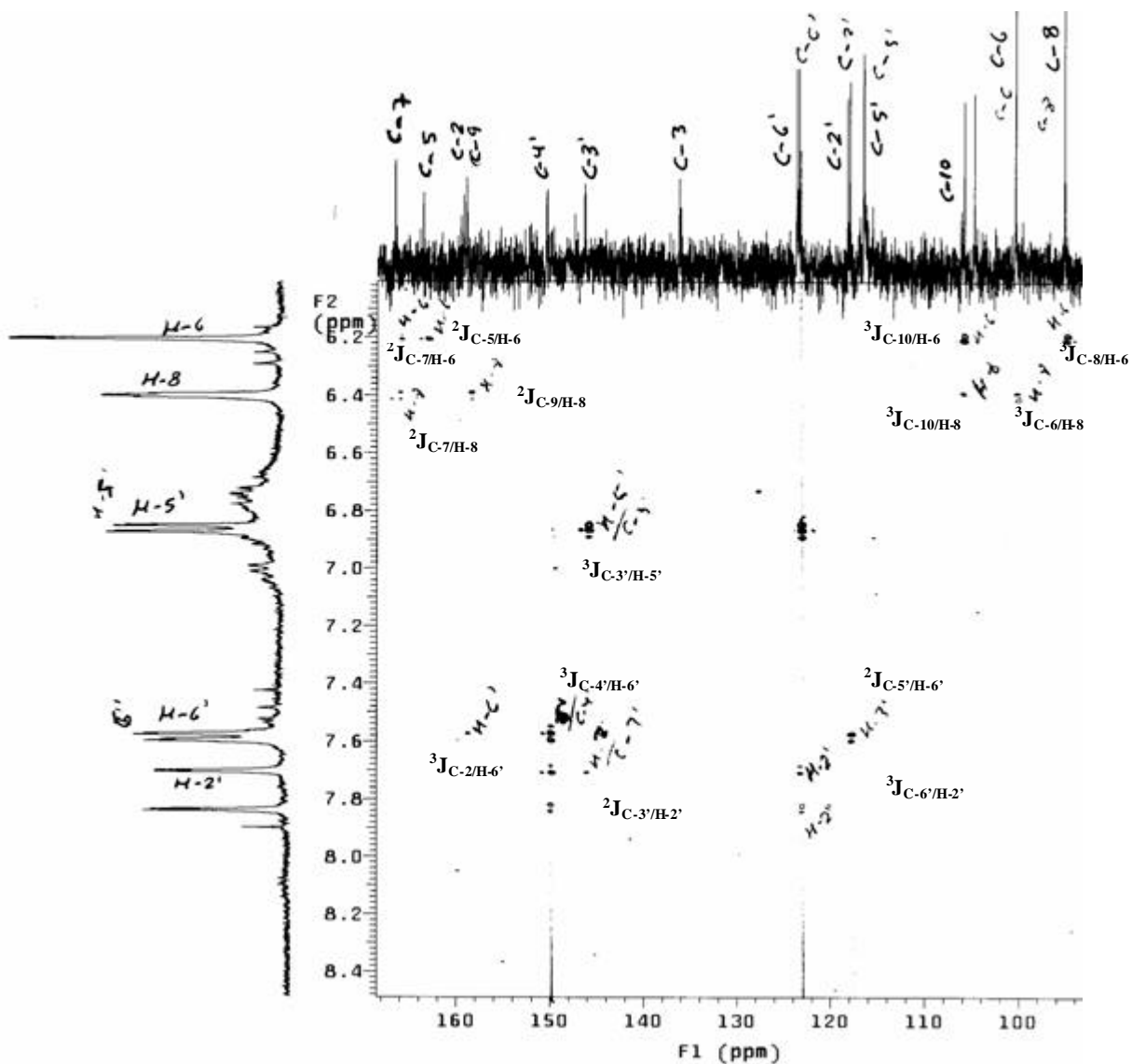


Figura II.4.48. Espectro de HMBC (400 MHz), ampliado 6,0-8,0 ppm, de **24** e **25** (7-*b*-O-D-glicopiranosil quercetina e 7-*b*-O-D-galactopiranosil quercetina) em DMSO-D₆.

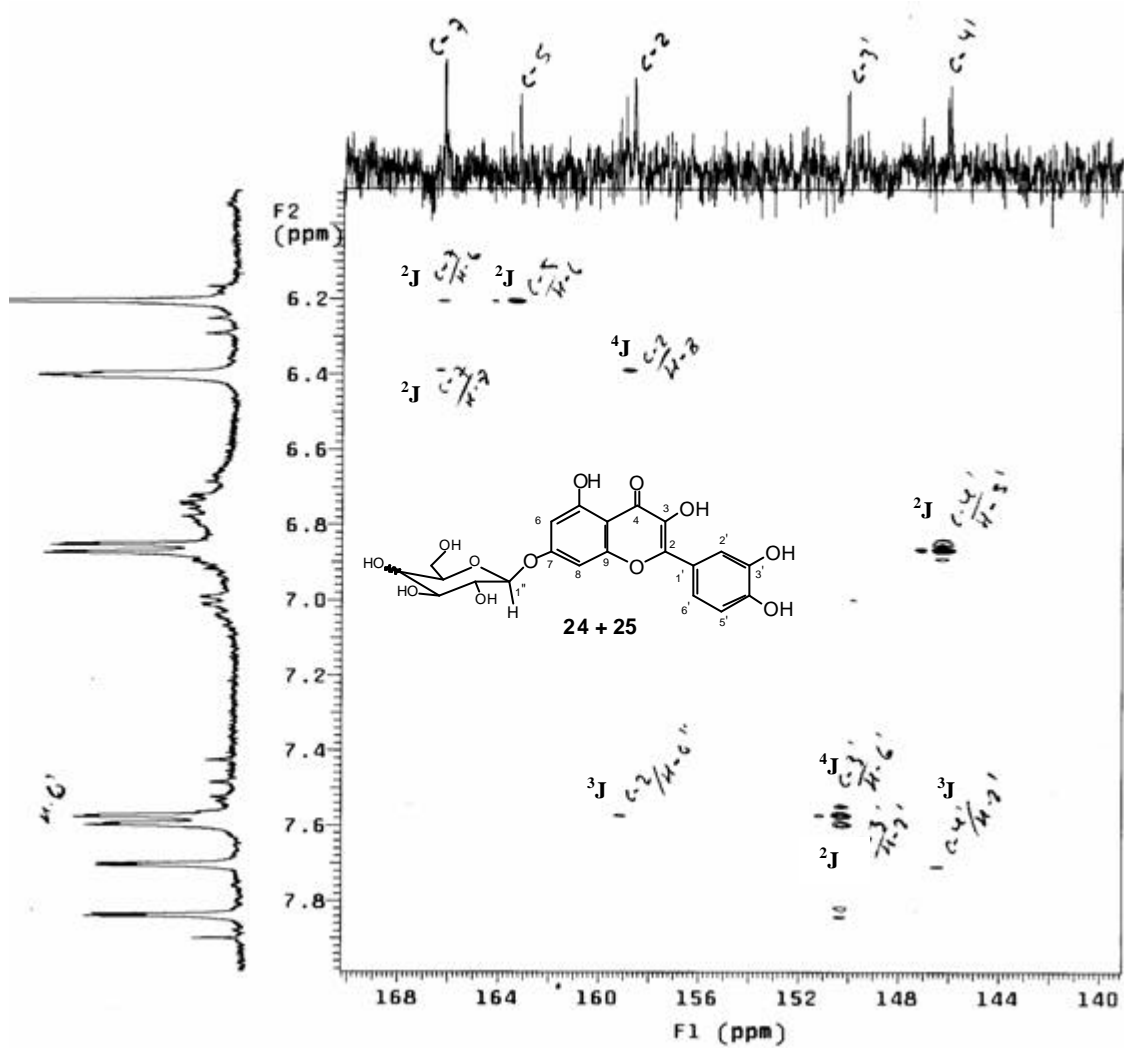


Figura II.4.49. Espectro de HMBC, ampliado 6,0-8,0 ppm, dos flavonóides glicosilados **24** e **25** (7-*b*-O-D-glicopiranosil quercetina e 7-*b*-O-D-galactopiranosil quercetina) em DMSO-D₆.

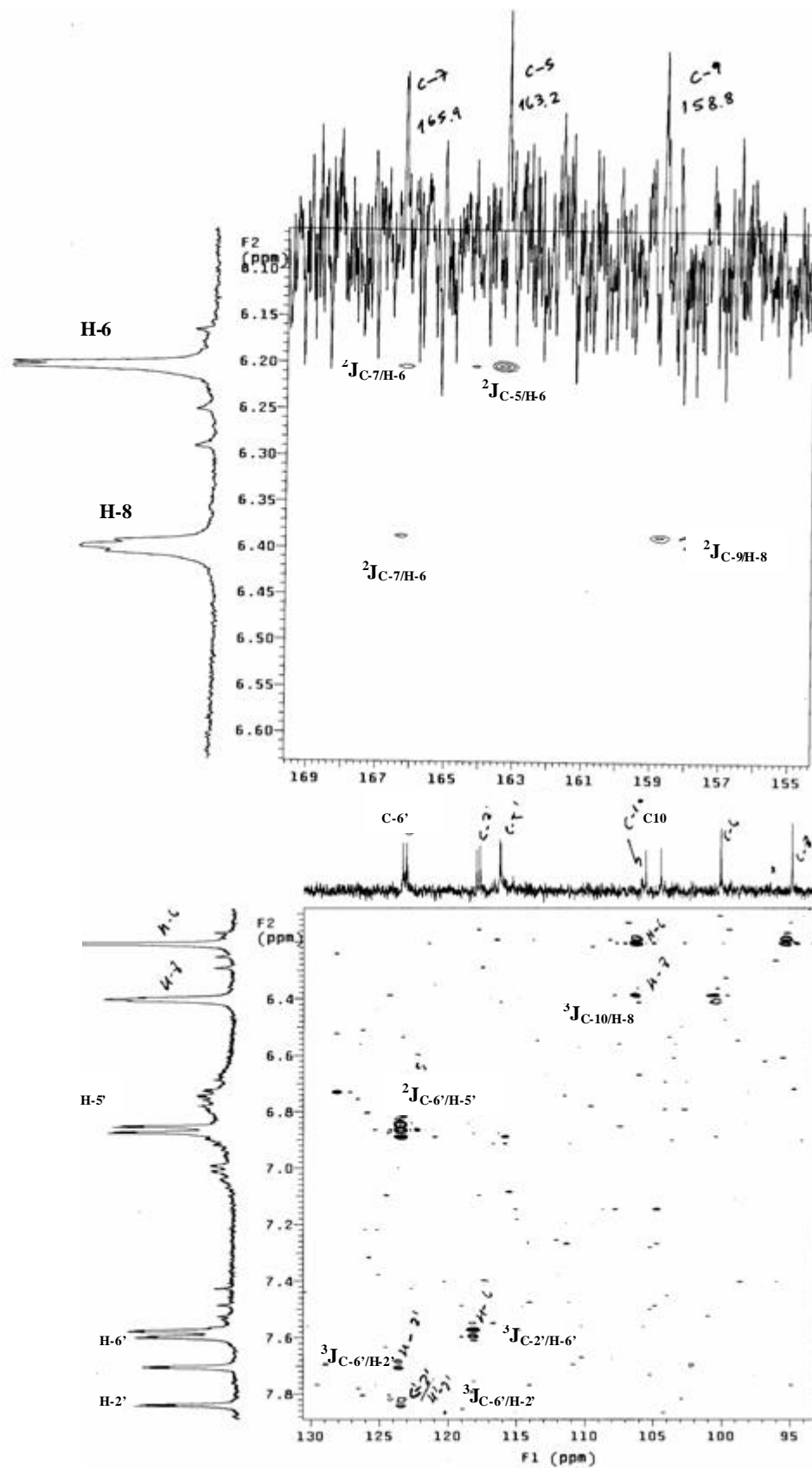


Figura II.4.50. Espectros de HMBC (400 MHz) dos flavonóides glicosilados **24** e **25** (7-*b*-O-D-glicopiranosil quercetina e 7-*b*-O-D-galactopiranosil quercetina), em DMSO-D₆.

DMCM-22/25-8 IN GLYCEROL
 VG Quattro
 KH7362E 1 (0.110)

16:32:44
 Scan FB+
 5.99e4

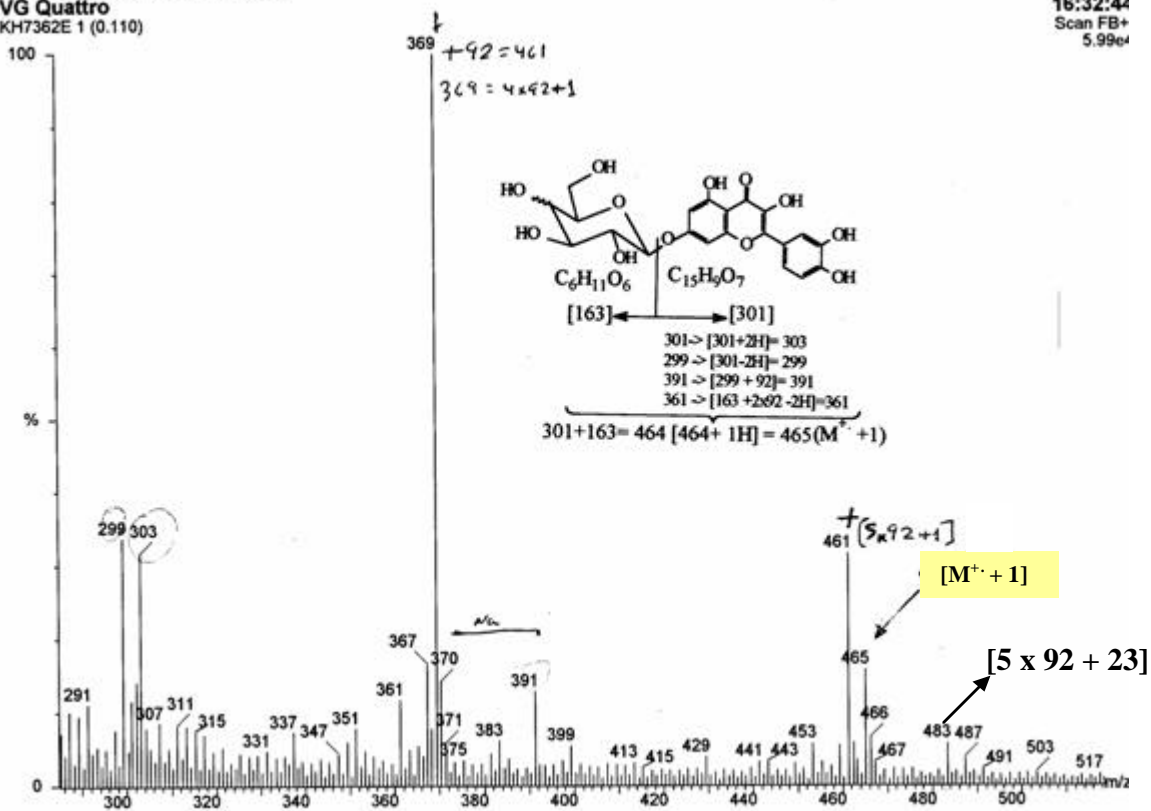


Figura II.4.51. Espectro de massas FAB dos flavonóides glicosilados 24 e 25 (7-b-O-D-glicopiranosil quercetina e 7-b-O-D-galactopiranosil quercetina).

II-5. Referências-Capítulo II

- ABDEL-KADER, M. S.; WISSE, J.; EVANS, R.; WERFF, H. van der, KINGSTON, D. G. I. Bioactive iridoids and a new lignan from *Allamanda cathartica* and *Himatanthus fallax* from the Suriname Rainforest. *J. Nat. Prod.*, **60**, 1294-1297, 1997.
- ABE, F.; CHEN, R. F.; YAMAUCHI, T. Minor iridoids from the Roots of *Plumeria acutifolia*. *Chem. Pharm. Bull.*, 36 (8), 2784-2789, 1988.
- ABE, F.; YAMAUCHI, T.; YAHARA, S.; NOHARA, T. Minor iridoids from *Thevetia peruviana*. *Phytochemistry*, **38** (3), 793-794, 1995.
- AGRAWAL, K. P.; BANSAL, M.C.; PORTER, L.J.; FOO, L. Y.; Flavonoid glycosides e AGRAWAL, K. P.; BANSAL, M.C.; Flavonoides in Carbon-13 NMR of Flavonoids. *Agrawal PK* (ed.), Elsevier: New York-USA, 283-364 e 432-496, 1989.
- AKHTAR, N. & MALIK, A. Oleanene type triterpenes from *Plumeria rubra*. *Phytochemistry*, **32** (6), 1523-1525, 1993.
- ALVES, C. C. F. METABÓLITOS ESPECIAIS ISOLADOS DE *Luxemburgia octandra* (Ochnaceae), *Laseguea erecta* (Apocynaceae), DO LÁTEX DE *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) e de *Solanum crinitum* (Solanaceae). Tese de doutorado – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2003.
- ANDERSEN, W. K.; OMAR, A. A.; CHRISTENSEN, B. Isorhamnentin 3-(2,6-Dirhamnosylgalactoside)-7-Rhamnoside and 3-(6-Rhamnosylgalactoside)-7-Rhamnoside from *Rhazya stricta*. *Phytochem.*, **26** (10), 291-294, 1987.
- BALDI, A.; ROSEN, R. T.; FUKUDA, E. K.; HO, CT. Identification of nonvolatile components in lemon peel by high-performance liquid chromatography with confirmation by mass spectrometry and diode-array detection. *Column liquid chromatography A.*, **718**, 89-97, 1995.
- BARRETO, A. S.; CARVALHO, M. G. de; NERY, I. A.; GONZAGA, L.; KAPLAN, M. A. C. Chemical constituents from *Himatanthus articulata*. *J. Braz. Chem. Soc.*, **9** (5), 430-434, 1998.
- BUCKINGNAM, V. *Dictionary of Natural Products*, Chapman & Hall, London, 1994.
- CARVALHO, G. J. A. Outros constituintes químicos isolados de *Lafloensia glyptocarpa* KOEHNE (Lythraceae) e depsídeo e triterpenos isolados de *Ouratea floribunda* ST. Hill (Ochnaceae), Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2000.

aCARVALHO, M. G. de; CRANCHI, D. C.; KINGSTON, D. G. I., WERLE, A. A. Proposed active constituents of *Dipladenia martiana*. *Phytother. Res.*, **15**, 715-717, 2001.

bCARVALHO, M. G de; VELLOSO, C. R. X.; BRAZ-FILHO, R.; COSTA, W. F. da. Acyl-lupeol Esters from *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, **12** (4), 556-559, 2001.

CRONQUIST, A.; An Integrated System of Classification of Flowering Plants. *Columbia University Press*, New York, 1981.

FRANÇA, O. O.; BROWN, R. T.; SANTOS, C. A. M. Uleine and demethoxyaspidospermine from the bark of *Plumeria lancifolia*. *Fitoterapia*, **71**, 208-210, 2000.

HARBORNE, J. B. The Flavonoides, Advances in Research Since. *Chapman & Hall*; London, 455, 1993.

HARBORNE, J. B; MABRY T. J. The Flavonoides, Advances in Research Since. *Chapman & Hall*, New York, 1986.

KARDONO, L. B. S.; TSAURI, S.; PADMAWINATA, K.; KINGHORN, A. D. A flavan-3-ol glycoside from bark of *Plumeria rubra*. *Phytochem.*, **29** (9), 2995-2997, 1990.

KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Constituents of the Labiateae plants .5. Sterol glucosides from *prunella vulgaris*, *Phytochemistry*, **29**(7), 2351-2355, 1990.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P.F. Plant Systematic: A Phylogenetic Approach. *Sinauer Associates, Inc.* Publishers Sunderland, Massachusetts, U.S.A., 366-369, 1999.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, **37**, 1517-1575, 1994.

MARASCHIN, M.; CAROBREZ, S. G.; PERSIKE, D.; PEIXOTO, M. L.; FERREIRA, A. G.; FERRACIN, R.; VERPOORTE, R.; FONTANA, J. D. *Carbohydr. Polym.*, **41**(1), 55-60, 1999. Resumo do Chemical Abstracts vol. 132:**6088**, pg. 1, 2000.

MCNALLY, D. J.; LABBE, C.; QUIDEAU, S.; BELANGER, R. R. Complex C-glycosyl flavonoid phytoalexins from *Cucumis sativus*. *J. Nat. Prod.*, **66**, 1280-1283, 2003.

- MIDDLETON, D. J. The Apocynaceae of the crocker range national park sabah. *ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC)*, 1-15, Julho-Setembro 2002.
- OHTANI, K.; MIYAJIMA, C.; TAKAHASI, T. A dimeric triterpene-glycoside from *Rubus coreanus*. *Phytochemistry*, **29**, 3275-3279, 1990.
- POUCHERT, C. J.; BEHNKE, J. *The Aldrich Library of ¹³C and ¹H-NMR Spectra*, **1**, 266, 1993.
- RIZZINI, C. T. Árvores e Madeiras úteis do Brasil: Manual dendrologia Brasileira. Editora Edgard & blucher LTDA. São Paulo-Brasil, 560-564, 1971.
- SIDDIQUI, B. S.; BEGUM, F. S. Two triterpenoids from the leaves of *Plumeria obtuse*. *Phytochem.*, **52**, 1111-1115, 1999.
- SILVA, J. R. A.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; PINHEIRO, M. L. B.; CORDEIRO, M. C.; TAMBORINI, E.; YOUNG, C. M.; BOLZANI, V. S. Ésteres triterpênicos de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson. *Química Nova*, **21** (6), 702-704, 1998.
- SOBRINHO, D. C.; HAUPTLI, M. B; APPOLINÁRIO, E. V.; KOLLENZ, C. L. M.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R. Triterpenoids Isolated from *Parahancornia amapa*. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2** (1), 15-20, 1991.
- VELOSO, M. P.; NAGEM, T. J.; OLIVEIRA, T. T. de. β-Dihidroplumericinic acid from *Himatanthus phagedaenicus*. *Biochem. Syst. Ecol.*, **27**, 669-671, 1999.

CAPÍTULO III
ESTUDO QUÍMICO DE *Caesalpinia peltophoroides*

III. 1. Introdução

A família Leguminosae é a segunda maior família das Dicotiledôneas, muito mais significativa economicamente até mesmo que a Asteraceae. As Leguminosae possuem grande importância econômica, porque apresentam várias espécies que são usadas na alimentação humana, corantes, gomas, resinas, taninos, inseticidas, moluscidas, grande número de fármacos, árvores ornamentais, arbustos e ervas. Essa família apresenta distribuição cosmopolita, sendo abundante nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas de ambos os hemisférios (HEGNAUER & GRAYER, 1993). São plantas de hábitos variados, desde grandes árvores das matas tropicais, arbustos, subarbustos, ervas anuais ou perenes e também trepadeiras; vivem nas mais variadas latitudes e altitudes. Essa família possui três subfamílias importantes: Mimosoideae, Caesalpinioideae e Faboideae (Papilionoidae) (JOLY, 1998).

O gênero *Caesalpinia* é bastante heterogêneo apresentando mais de 100 espécies nos países tropicais (CRONQUIST, 1981). Essas espécies são fontes industriais de taninos hidrolizáveis e condensados. A utilização em curtumes diminuiu significativamente, mas por outro lado surgiram outras aplicações como revestimentos protetores, adesivos plásticos, envelhecimento de álcoois e em tintas (BRUNETON, 1991). Os primeiros trabalhos citados de *Caesalpinia* estão relacionados com o doseamento de taninos, como exemplo, análise da vagem de *C. digyna* (FAUST, 1913) e de *C. brevifolia* e da semente de *C. coriaria* (NORTON, 1918), além da descoberta da brasilina, princípio ativo de *C. echinata* (pau-brasil) e *C. sappan*, através de reações histoquímicas (KISSER *et al.*, 1924). A brasilina é utilizada como protótipo para inúmeros testes biológicos (HIKINO *et al.*, 1977; CHOI *et al.*, 1997; CHOI & MOON, 1997; KIM *et al.*, 1995; KHIL *et al.*, 1997).

A atividade moluscida de *C. peltophoroides* contra *Biomphalaria glabrata*, mostrou que os extratos hexânico e etanólico das folhas, etanólicos da casca do caule e raízes foram ativos para caramujos e/ou desovas (MENDES *et al.*, 1984) e os extratos hexânico e etanólico das flores foram inativos para caramujos e desovas (MENDES *et al.*, 1986).

Esse é o primeiro estudo fitoquímico dessa espécie.

C. peltophoroides geralmente apresentam altura de 8-16m, com tronco de 30-40cm de diâmetro. As folhas são compostas, bipinadas de 20-25cm de comprimento, com 17-19 pares de pinas; os folíolos se apresentam em número de 13-27 por pina, de 10-12 mm de comprimento. Esta espécie floresce no final do mês de agosto, prolongando-se até meados de novembro. Os frutos amadurecem desde o final de julho a meados de setembro (LORENZI, 1998).

Distribuição geográfica: A sua verdadeira origem é muito discutível, além da ocorrência na Mata Atlântica do Rio de Janeiro, encontramos exemplares no Sul da Bahia e também no Pantanal Matogrossense (LORENZI, 1998).

Importância econômica: Árvore ornamental (CORRÊA, 1978), com atrativo para as flores amarelas.

Nomes locais: Conhecida como sibipiruna, pau-brasil, sebipira, sepipiruna.

III. 2. Substâncias isoladas de espécies de *Caesalpinia* (Leguminosae)

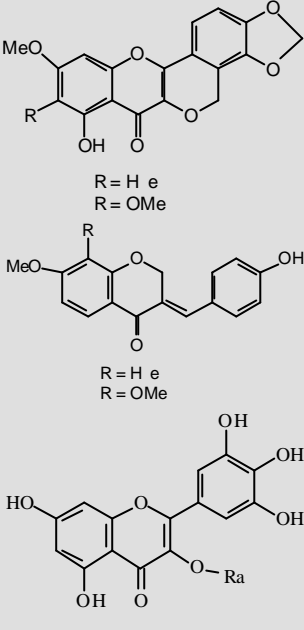
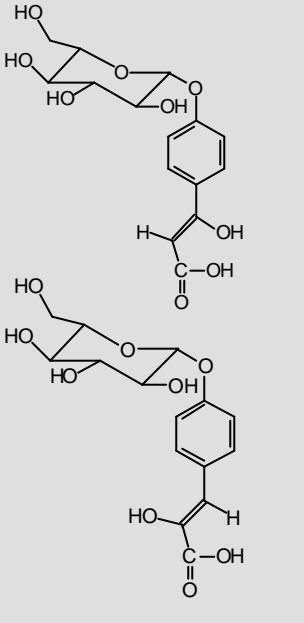
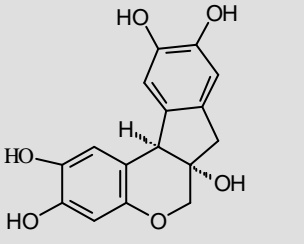
A) Literatura:

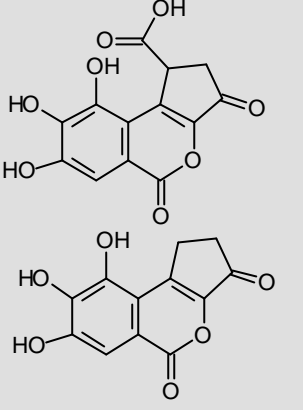
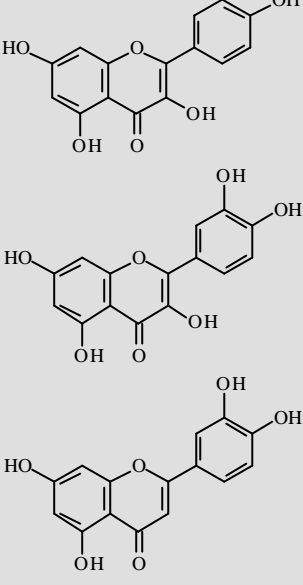
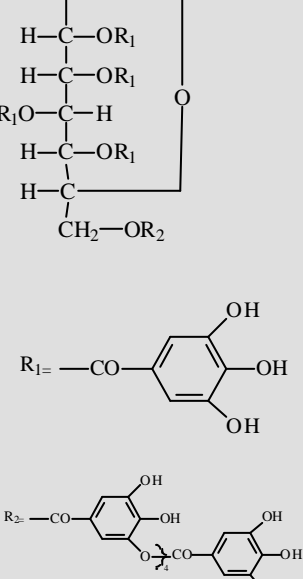
A Tabela III.1, pág. 195 descreve algumas das substâncias isoladas de espécies do gênero *Caesalpinia* (primeira coluna), as estruturas químicas (segunda coluna), as espécies (terceira coluna) e as referências bibliográficas originais das citações referentes às

substâncias. Algumas referências da tabela e de espécies de *Caesalpinia* citadas foram obtidas somente de resumos do *Chemical Abstract*. Além das substâncias fenólicas, foram isolados de espécies do gênero *Caesalpinia*: β -sitosterol (DOMINGUEZ, *et al.*, 1969), ácidos aminados (WATSON & FOWDEN, 1973; EVANS & BELL, 1978), elagitaninos (AWASTHI, *et al.*, 1980), triglicerídeo (RASTOGI, *et al.*, 1996) e triterpenóides (SAEED, *et al.*, 2001).

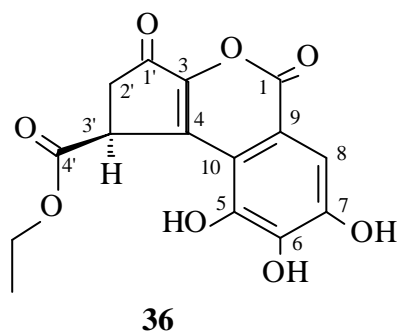
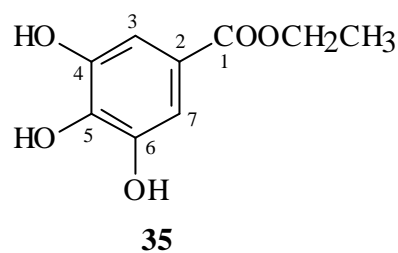
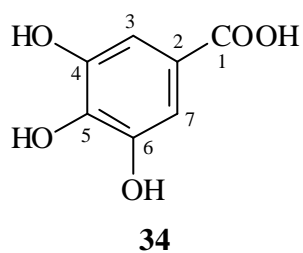
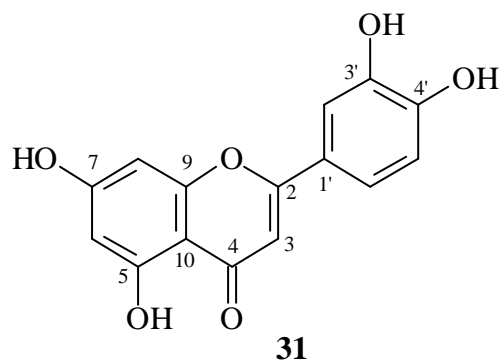
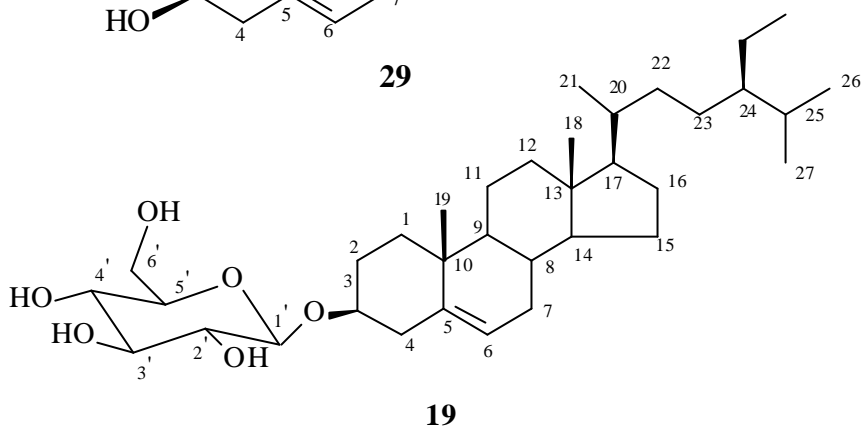
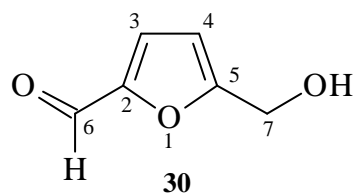
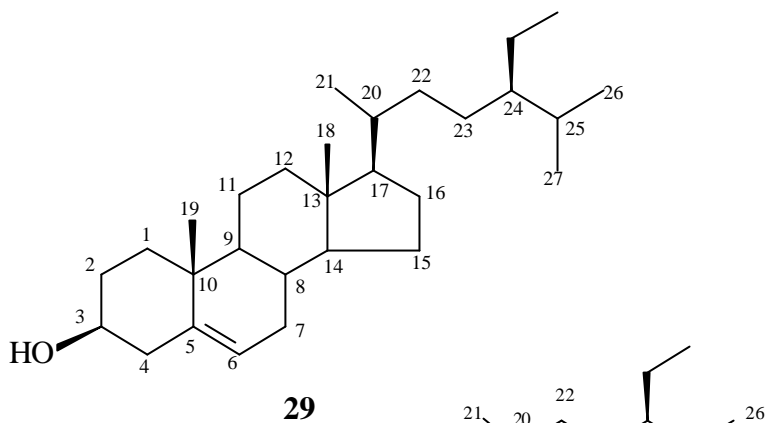
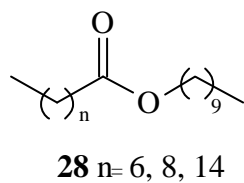
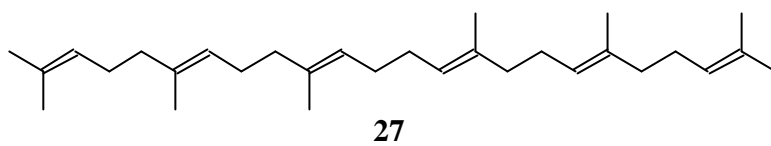
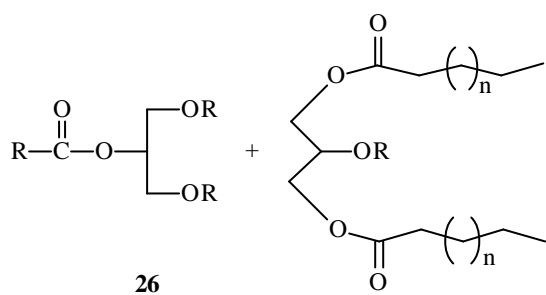
Tabela III.1. Ocorrência de alguns constituintes bioproduzidos por espécies do gênero *Caesalpinia*, família Leguminosae.

Substâncias	Estruturas	Espécies de <i>Caesalpinia</i>	Referência
caesalmin A caesalmin B		<i>Caesalpinia minax</i>	(JIANG <i>et al.</i> , 2001)

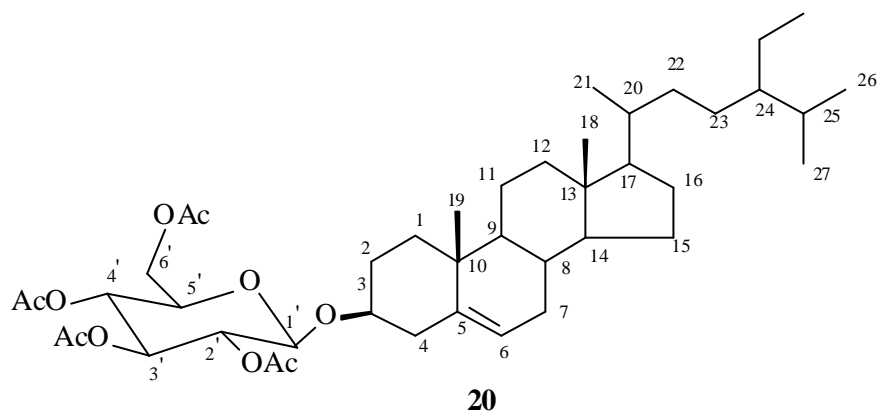
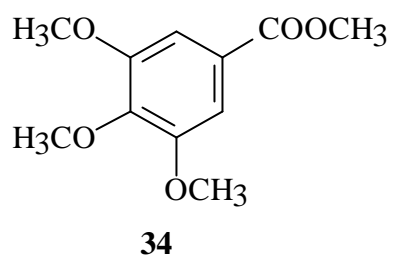
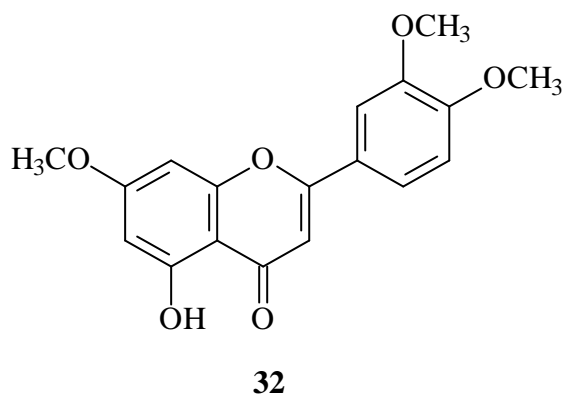
<p>peltoginóides, homoisoflavonóides e 3-O-ram-miricetina</p>	 <p>R = H e R = OMe</p> <p>R = H e R = OMe</p>	<p><i>Caesalpinia pulcherrima</i></p>	<p>(MCPHERSON <i>et al.</i>, 1983; PARIS & DELAVEAU, 1965)</p>
<p>ácidos glicosil fenilprope- nóides</p>		<p><i>Caesalpinia pyramidalis</i></p>	<p>(MENDES <i>et al.</i>, 2000)</p>
<p>brasilina</p>		<p><i>Caesalpinia sappan</i> e <i>echinata</i> (pau-brasil)</p>	<p>(KISSER <i>et al.</i>, 1924)</p>

<p>ácido brevifolínico e brevifolina</p>		<p><i>Caesalpinia brevifolia</i></p>	<p>(SCHMIDT & BERNAUER, 1954; SCHMIDT, <i>et al.</i>, 1967)</p>
<p>flavonóides: canferol, quercetina, luteolina</p>		<p><i>Caesalpinia gilliesii</i></p>	<p>(SUAREZ <i>et al.</i>, 1984)</p>
<p>Galotaninos</p>		<p><i>Caesalpinia brevifolia</i> e <i>coriaria</i></p>	<p>(HASLAM <i>et al.</i>, 1961)</p>

B) Substâncias isoladas deste trabalho:



Derivados obtidos através deste trabalho:



III.3. Parte experimental

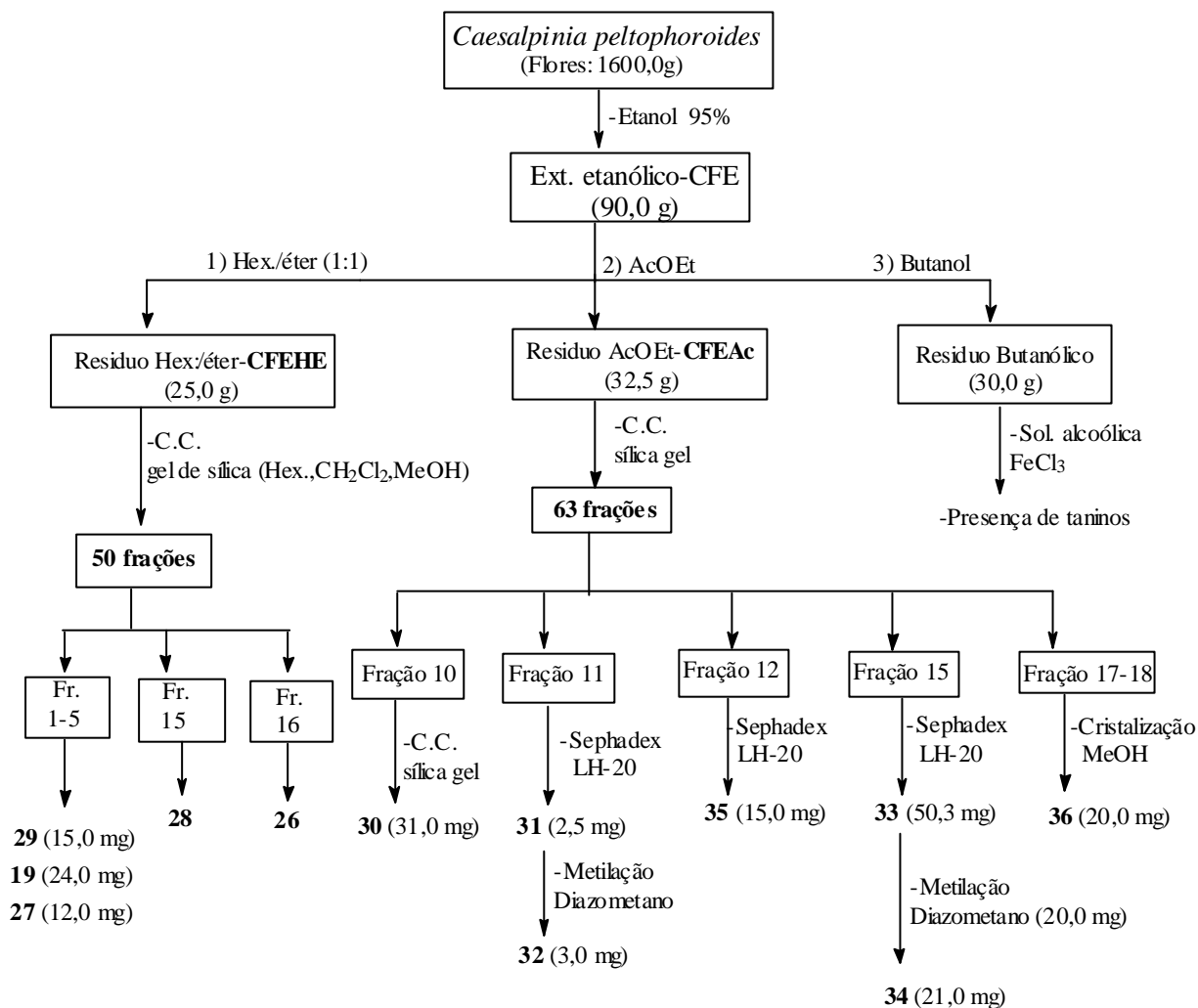
III-3.1. Material vegetal:



As flores de *Caesalpinia peltophoroides* foram coletadas no Campus da Universidade Estadual de Londrina em Outubro de 2000 e identificadas por Flávia A. Coclet. Uma exsicata dessa espécie (N° 29577) está depositada no herbário da Universidade Estadual de Londrina (FUEL), Londrina, Paraná, Brasil.

III-3.2. Isolamento e purificação dos constituintes:

As flores de *C. peltophoroides* (1600,0 g) foram submetidas à maceração com etanol 95%, a temperatura ambiente. A solução extrativa foi concentrada em evaporador rotativo através da retirada de solventes a 40°C sob pressão reduzida. O resíduo obtido correspondeu ao extrato etanólico **CFE** (90,0 g). O extrato foi suspenso em MeOH/H₂O (9:1) e submetido, sucessivamente, à partição com hexano/éter (1:1), AcOEt e butanol, Esquema III.1, pág. 201. O resíduo em hexano/éter (**CFEHE**, 25,0 g) foi cromatografado em coluna de gel de sílica, eluída com hexano, CH₂Cl₂ e MeOH com aumento gradual de polaridade até MeOH 100%. Foram coletadas 50 frações de 250 ml. A análise das frações 1-5 permitiu identificar: β-sitosterol **29** (15,0 mg), 3-O-β-D-glicopiranosil-sitosterol **19** (24,0 mg) e o esqualeno **27** (12,0 mg). A substância **19** (24,0 mg) foi submetida a acetilação com anidrido acético e piridina obtendo-se o derivado **20** (20,0 mg). As frações 15 e 16 forneceram mistura de ésteres alifáticos **28** (30,0 mg) e de glicérides **26** (51,0 mg), respectivamente. O resíduo em AcOEt (**CFEAc**, 32,5 g) foi cromatografado em coluna de gel de sílica, com CH₂Cl₂ e MeOH, com aumento gradual de polaridade até MeOH 100%. Foram coletadas 63 frações de 250 ml. A fração 10 foi recromatografada em coluna de sílica gel, obtendo-se a substância **30** (31,0 mg). As frações 11, 12 e 15 foram filtradas em coluna de Sephadex LH-20 usando MeOH 100%, obtendo-se o flavonóide luteolina **31** (2,5 mg), galato de etila **35** (15,0 mg) e ácido gálico **33** (50,3 mg), respectivamente. As substâncias **31** (2,5 mg) e **33** (20,0 mg) foram solubilizadas em metanol e metiladas com diazometano, fornecendo os derivados **32** (3,0 mg) e **34** (21,0 mg). As frações 17-18 foram cristalizadas com metanol obtendo-se o brevifolato de etila **36** (20,0 mg). O resíduo butanólico (30,0 g) quando analisado em TLC mostrou um rastro amarelo, e apresentou resultado positivo para taninos. O teste para taninos foi realizado com solução alcoólica de FeCl₃ (MATOS, 1997).



Esquema III.1. Marcha para o isolamento das substâncias das flores de *C. peltophoroides*.

III-4. Resultados e discussão

III-4.1 Determinação estrutural dos constituintes de *C. peltophoroides*

III-4.1. Esteróides

a) b-Sitosterol (Substância 29)

O espectro de IV (Figura III.4.1, abaixo) da fração contendo esta substância revela bandas de absorção para grupo hidroxila (3425 cm^{-1} , estiramento O-H), grupamentos CH_2 e CH_3 (2929 cm^{-1} e 2855 cm^{-1}), $\text{C}=\text{C}$ (1647 cm^{-1}) e C-O (1057 cm^{-1}). O espectro de RMN de ^1H (Figura III.4.2, pág. 203) apresenta sinais entre d_{H} 0,6 e 2,0 de grupos metílicos, um multipletto em d_{H} 3,5 para o hidrogênio carbinólico (H-3), singletto largo em d_{H} 5,4 correspondente ao H6, olefínico. Estes valores estão de acordo com os dados da literatura (KOJIMA *et al.*, 1990). A análise no CG-EM (Figura III.4.3, pág. 204) e comparação com padrões da biblioteca do cromatógrafo confirmam a proposta para o sitosterol **29**.

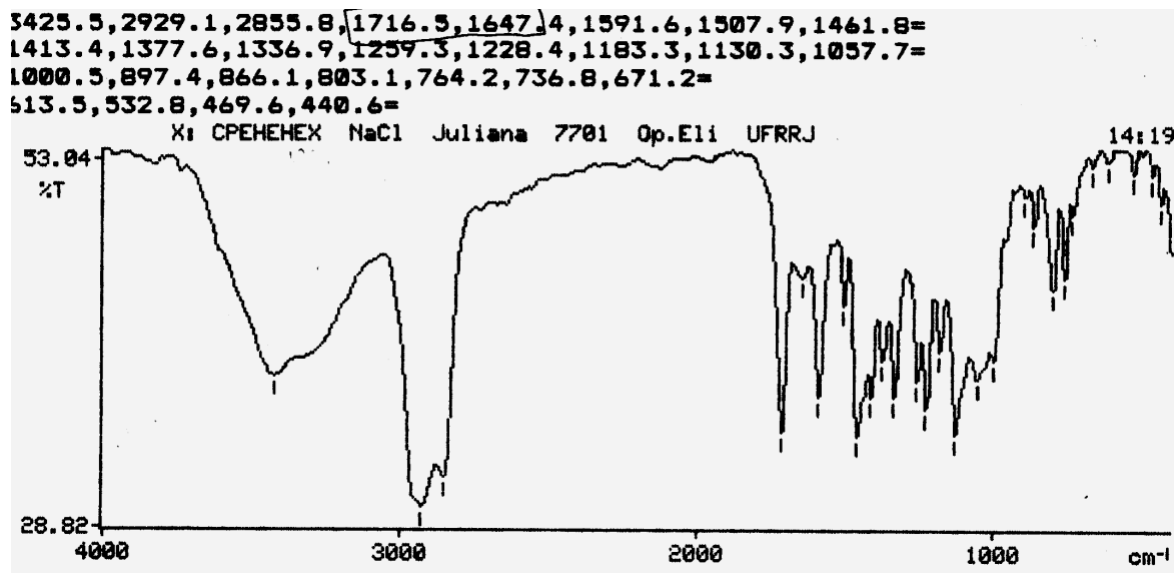


Figura III.4.1. Espectro de IV do esteróide **29** (sitosterol).

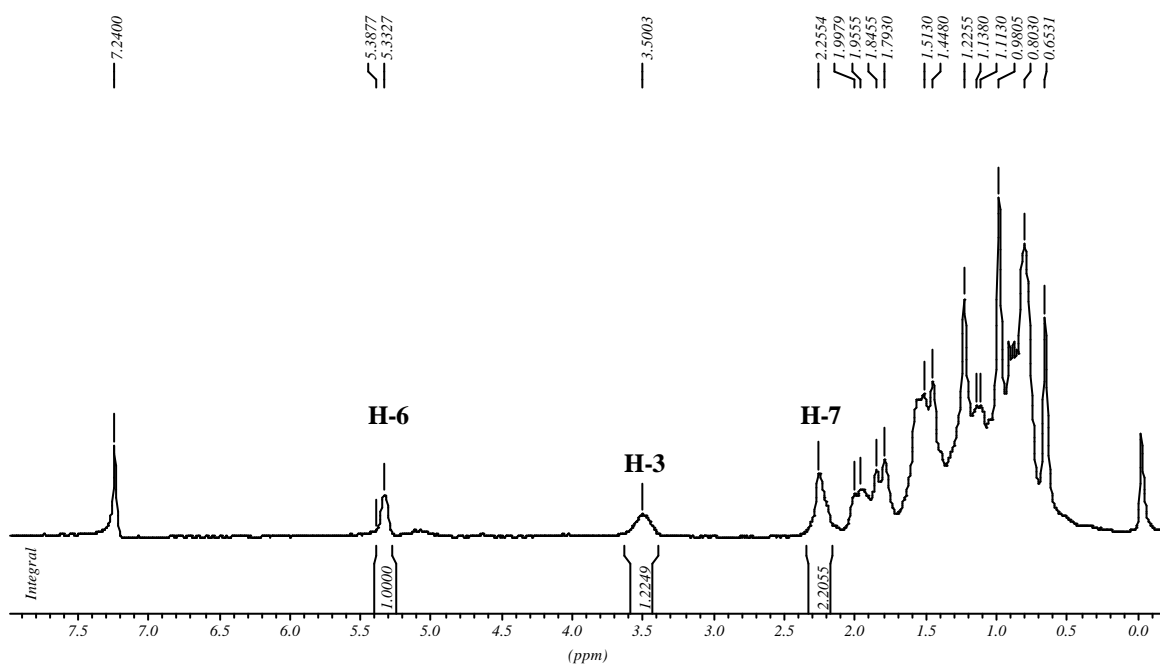
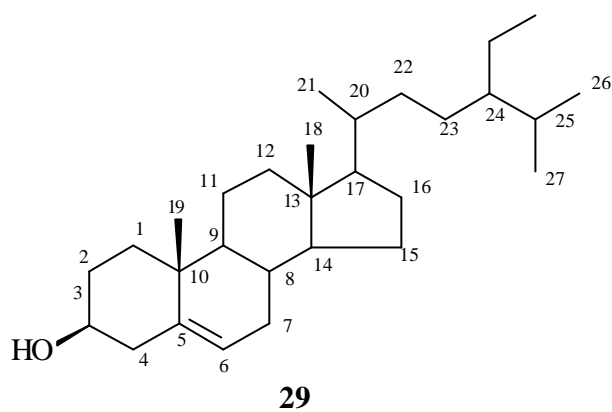
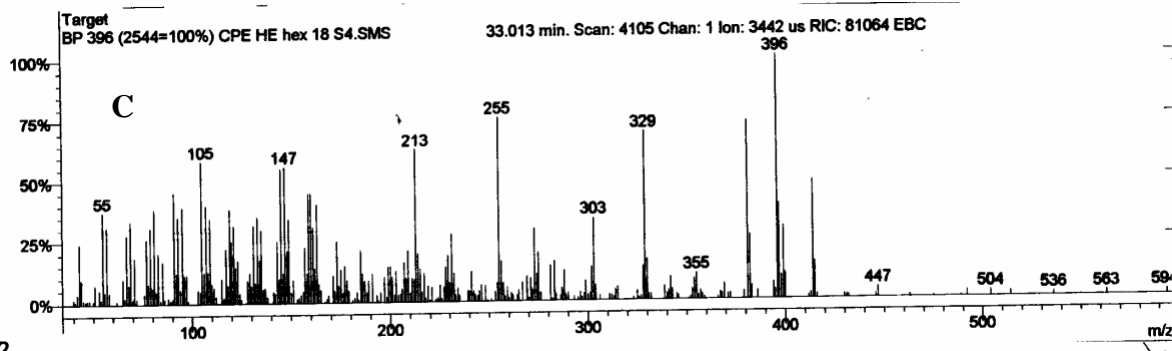
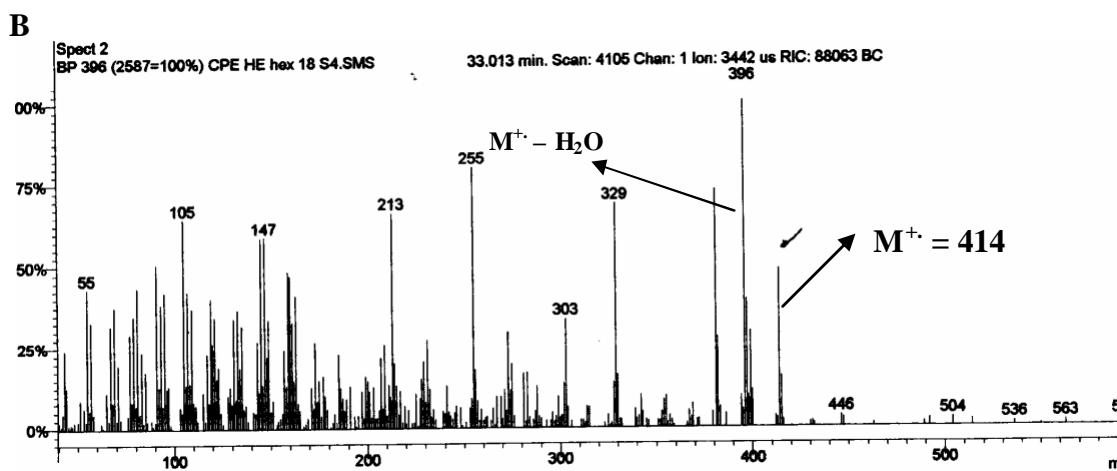
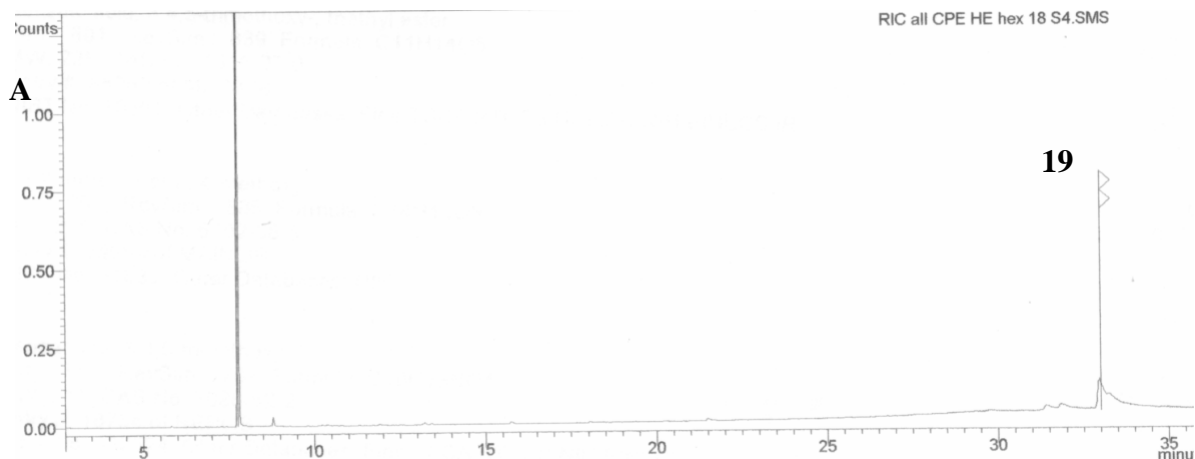


Figura III.4.2. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do esteróide **29** (sitosterol).



2

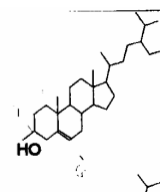
gamma-Sitosterol

Sim.: 677, RevSim.: 836 Formula: C₂₉H₅₀O

MW: 414 CAS No: 83-47-6

Entry #: 5248 of MAINLIB

NIST No: 38773 Other Databases: HODOC EINECS



3

Figura III.4.3. A, B: cromatograma e espectro de massas do esteróide **29** (sitosterol) e C: Resultado da pesquisa na biblioteca do cromatógrafo.

b) Sitosterol glicosilado (Substância 19)

O espectro de IV da saponina **19** (Figura III.4.4, abaixo) revela uma banda larga em 3411 cm^{-1} (estiramento de OH), absorções em 2935 cm^{-1} e 1462 cm^{-1} que são referentes a presença de CH, CH₂ e CH₃ e a banda em 1164 cm^{-1} que pode estar representando o estiramento de C-O de éter. A análise de RMN ¹H (Figura III.4.5, pág. 206) do derivado acetilado **20** confirma a proposta para o sitosterol glicosilado **19**. Os dados espectrométricos estão relacionados na Tabela II.4.4 (pág. 157, Capítulo II) e comparados com dados da literatura (KOJIMA *et al.*, 1990; CARVALHO, 2000).

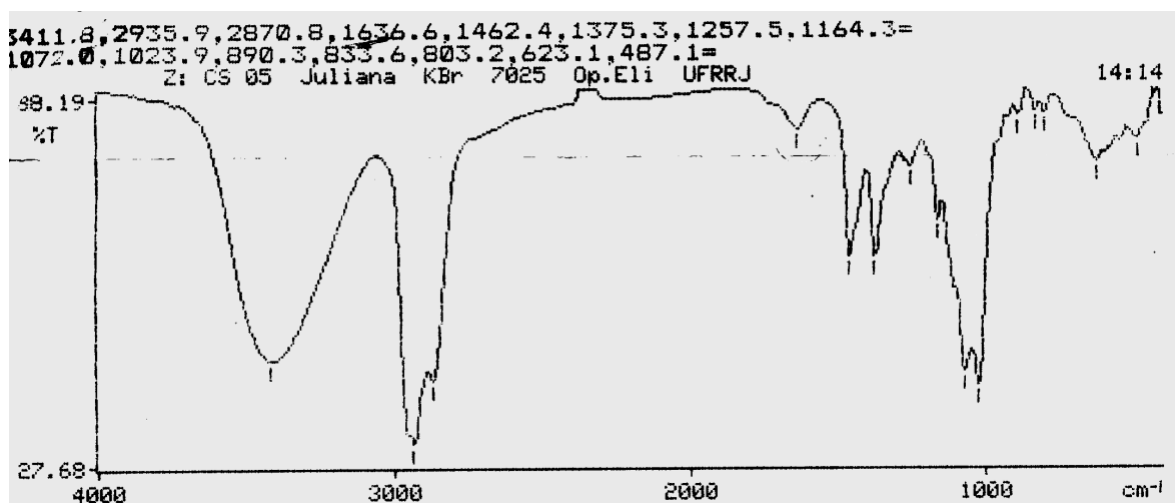
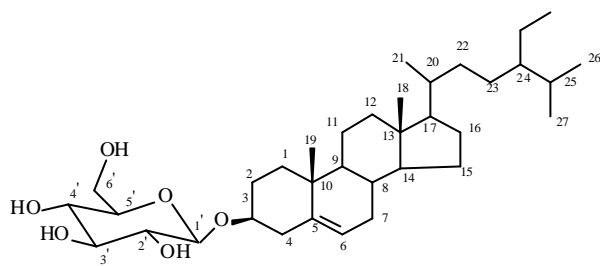


Figura III.4.4. Espectro de IV do esteróide **29** (sitosterol).



19: R=H, 3-*O*-β-D-glicopiranosil sitosterol

20: R=Ac, 3-*O*-β-D-tetraacetil glicopiranosil sitosterol

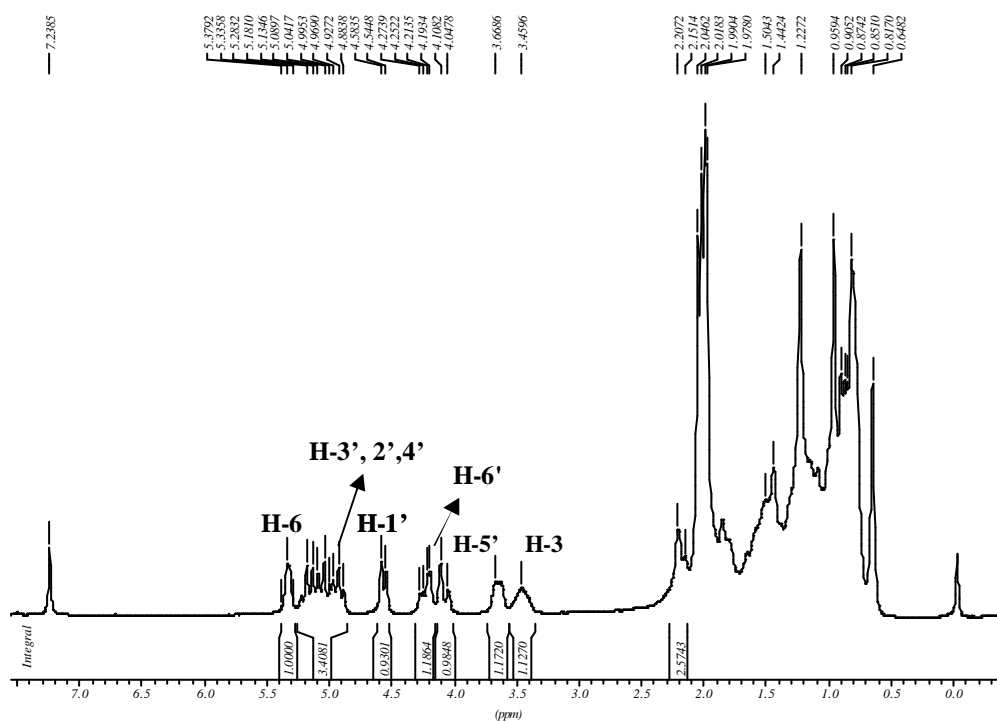
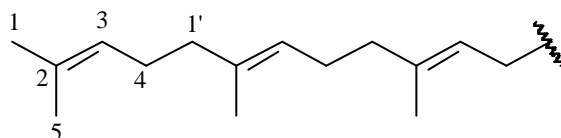


Figura III.4.5. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do esteróide **20** (sitosterol glicosilado).

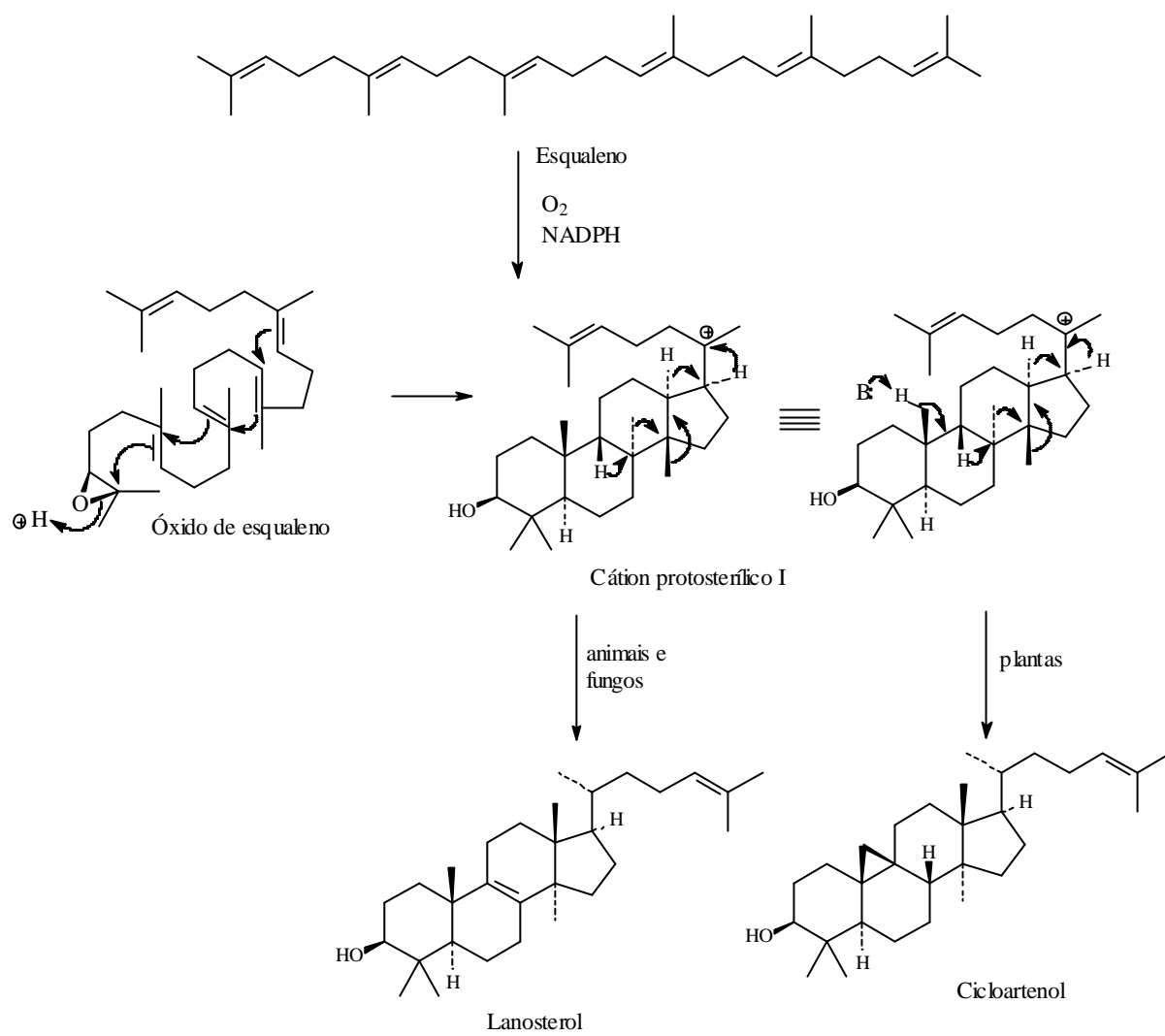
III-4.2. Esqualeno (Substância 27)

O espectro de IV (Figura III.4.6, pág. 209) de **27** apresenta bandas de absorção em 2923 e 2855 cm^{-1} relativas a estiramentos de C-H de grupos CH_3 e CH_2 , confirmadas pela banda em 1447 cm^{-1} . As bandas em 1666 (estiramento de $\text{C}=\text{C}$), 1033 e 835 cm^{-1} (estiramento C-H) permitem sugerir cadeia carbônica insaturada. O espectro de RMN ^1H (Figura III.4.7, pág. 209) apresenta sinais em δ_{H} 0,8-1,6 de grupamentos metilas e metilênicos, sinal simples em 1,7-1,9 ppm correspondente a metila ligada a ligação dupla, e a um tripleto largo em δ_{H} 5,09 correspondente aos hidrogênios olefínicos. O espectro de RMN ^{13}C (Figura III.4.8, pág.210) possui sinais em de ligação dupla trissubstituída d_{C} 131,3 (C-2), d_{C} 124,34 (CH-3), de grupos metílicos e metilênicos em d_{C} 39,7 (CH_2 -1'), d_{C} 25,68 (CH_3 -5) e d_{C} 16,01 (CH_3 -1). A numeração dos carbonos está de acordo com o Esquema III.2, abaixo. A análise do espectro obtido com CG-EM, pág.211, permite identificar o pico do íon molecular em m/z 410 [$\text{C}_{30}\text{H}_{50}$, M^+] que está de acordo com peso molecular do esqualeno. A comparação do espectro de massas com os da biblioteca utilizada no CG-EM confirmou esta proposta. A comparação dos deslocamentos químicos de carbono-13 e hidrogênio registrado na literatura (METZGER, *et al.*, 2002) serviu para confirmar a estrutura proposta para **27**.

O esqualeno é um precursor biossintético de vários triterpenos e esteróides, através de ciclização via intermediário 2,3-óxido, levando a biossíntese de cicloartenol em plantas e lanosterol em animais e fungos (DEWICK, 1997), conforme Esquema III.3, pág.208. No gênero *Caesalpinia* já foi isolado sitosterol (DOMINGUEZ, *et al.*, 1970) e triterpenóides (SAEED, *et al.*, 2001), justificando a presença do esqualeno. A biossíntese dos esteróides têm como etapa principal a síntese do esqualeno, derivado do mevanolato, sendo semelhante em animais, plantas e fungos.



Esquema III.2: Esqualeno



Esquema III.3. Biossíntese de triterpenos e esteróides.

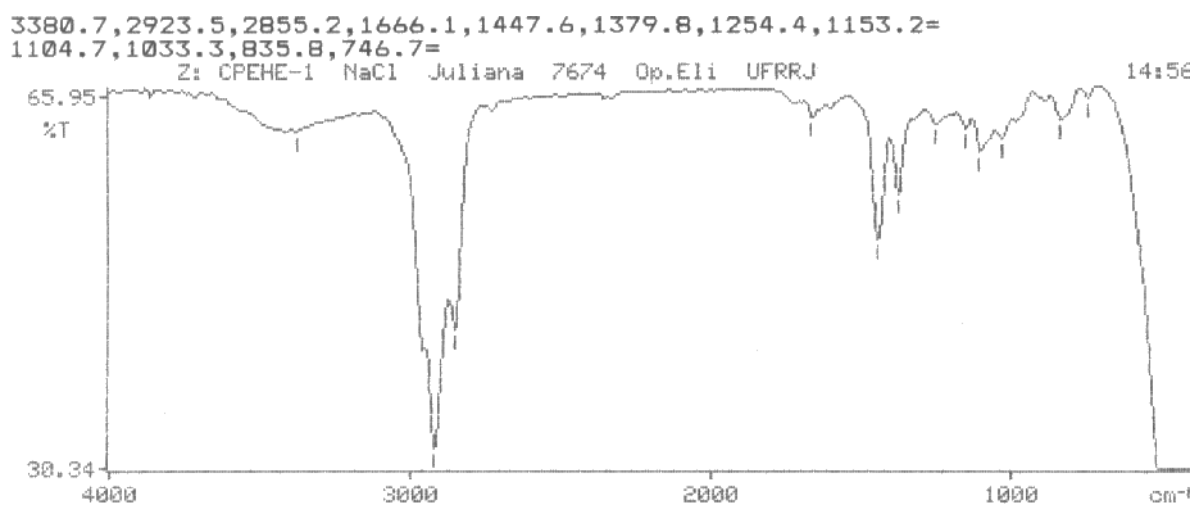


Figura III.4.6. Espectro de IV da substância **27** (esqualeno).

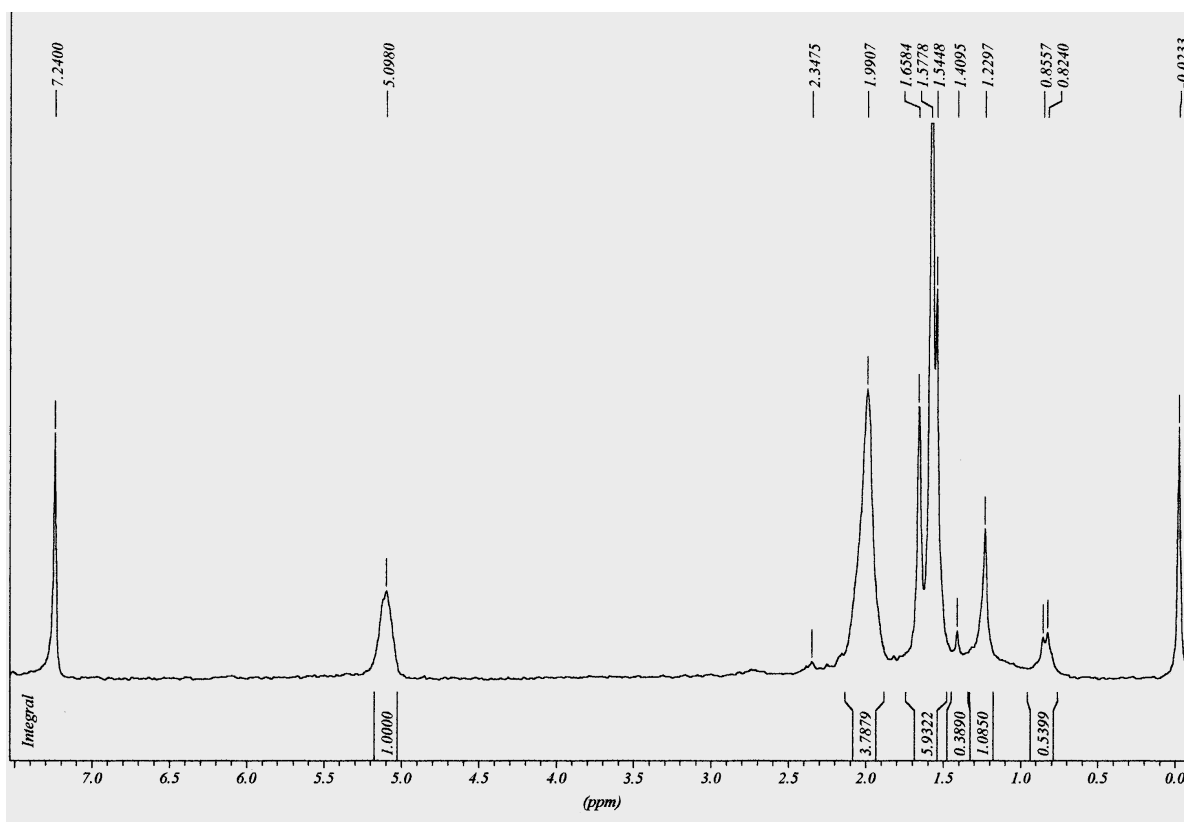


Figura III.4.7. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de **27** (esqualeno).

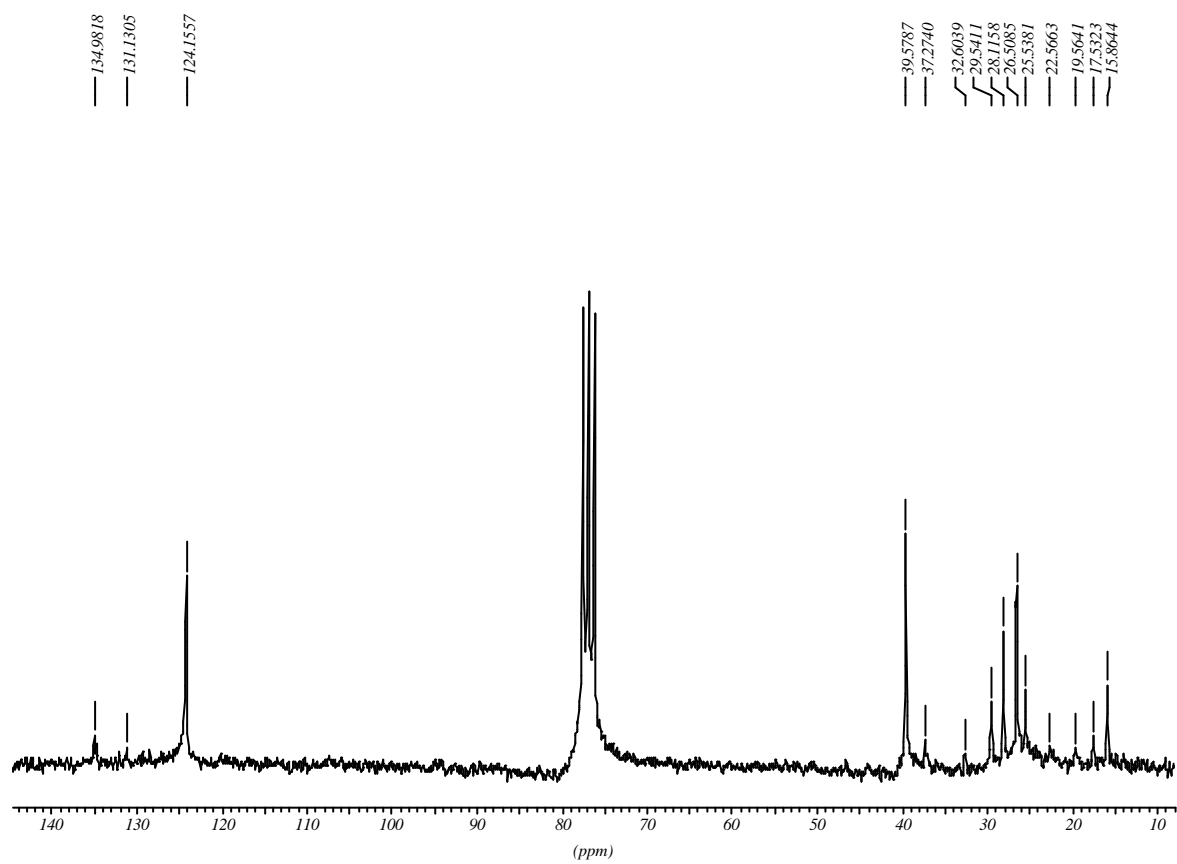
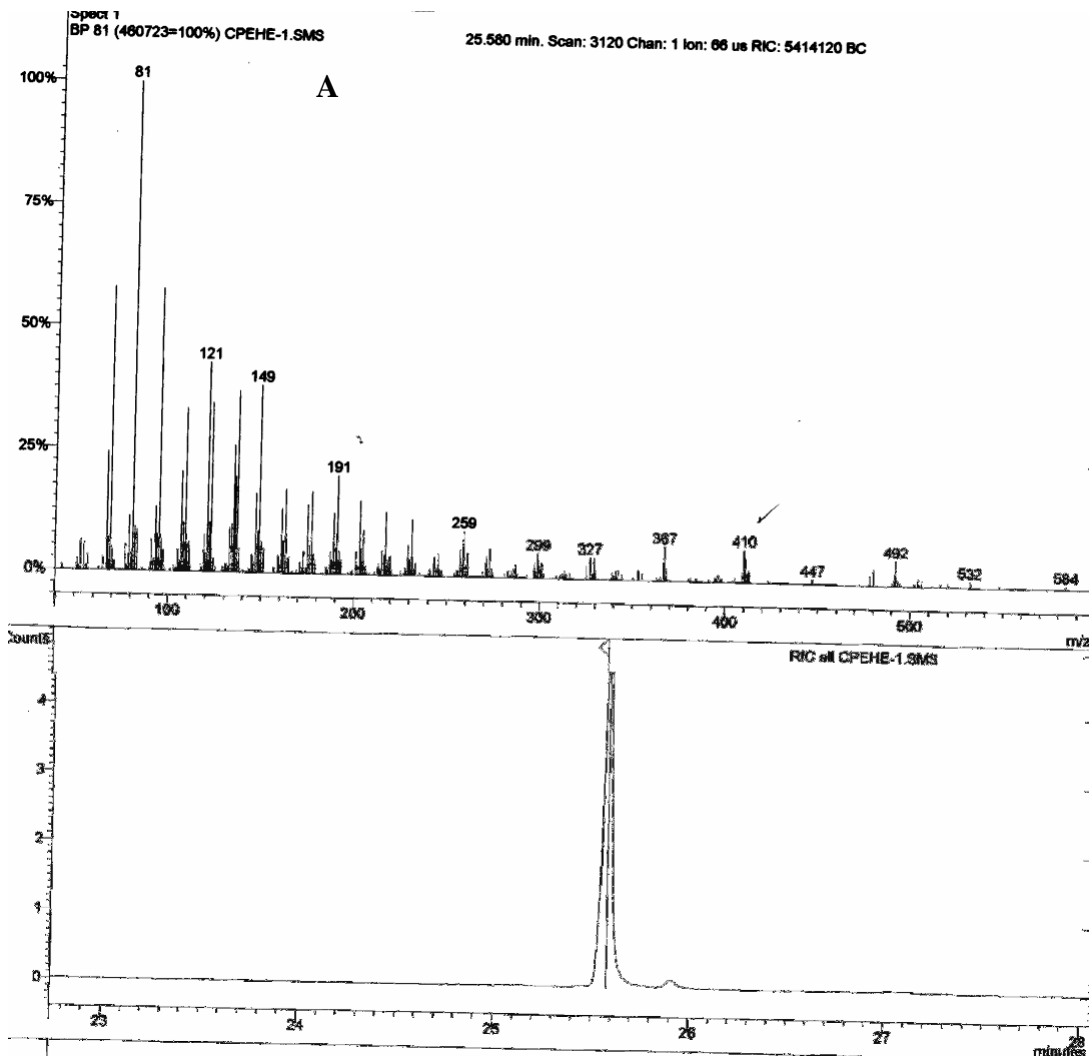


Figura III.4.8. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **27** (esqualeno).



B

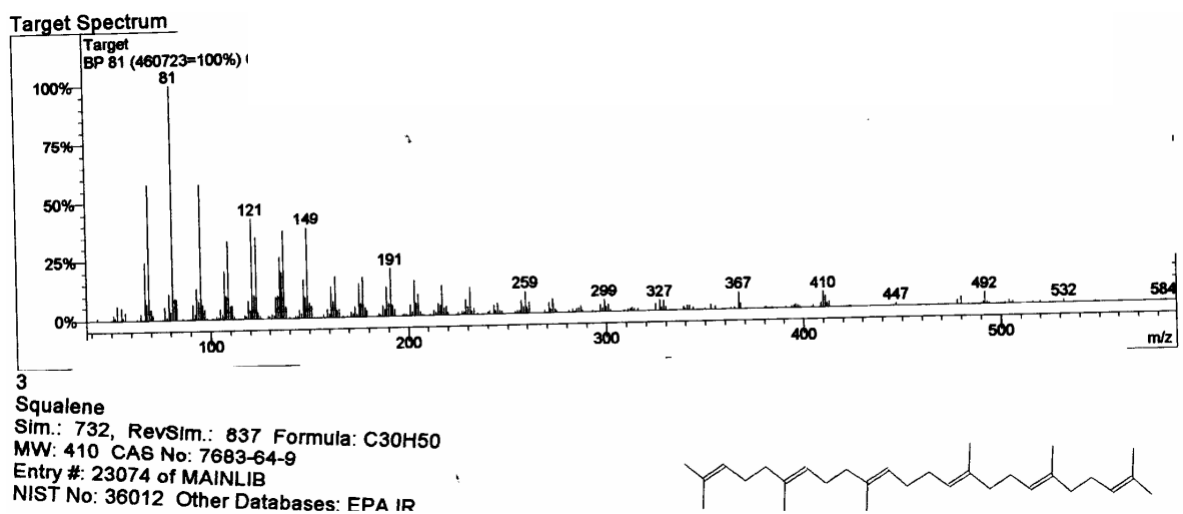


Figura III.4.9. A: espectro de massas e cromatograma da substância 27 (esqualeno) obtida no CG-EM e B: Biblioteca do cromatógrafo.

III-4.3. Ésteres alifáticos (28)

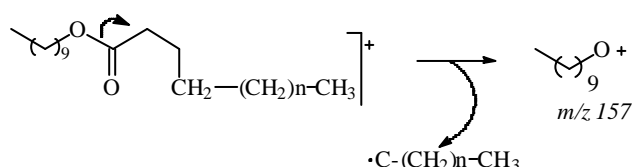
O espectro de IV desta fração (Figura III.4.10, pág. 213) apresenta bandas de absorção intensas em 2919 e 2850 cm^{-1} de deformações axiais de C-H e 724 cm^{-1} que são características de cadeia linear hidrocarbônica longa. As bandas em 1737 cm^{-1} e 1172 cm^{-1} estão de acordo com a presença de carbonila de ésteres alifáticos. O espectro de RMN ^1H (Figura III.4.11, pág. 213) apresenta um singlete intenso em δ_{H} 1,23 atribuído ao grupo $(\text{CH}_2)_n$, um tripleto em δ_{H} 4,03 correspondente ao CH_2 ligado ao oxigênio do éster e um tripleto em δ_{H} 2,26 para o CH_2 alfa a carbonila. Os sinais em δ_{H} 0,84 (t) e 1,54 (m) correspondem aos sinais da metila terminal e grupos metilenos de cadeia carbônica normal. Os tamanhos das cadeias carbônicas dos componentes da mistura foram determinados através da análise dos picos dos M^+ detectados para cada sinal do cromatograma obtido em espectrômetro de massas, CG-EM (Coluna CP-SIL8CB, 30mx0,25x0,25mm e Ionização 70 eV) e comparação dos espectros de massas com padrões da biblioteca. Todos espectros de massas (Figura III.4.12, pág. 214) contêm o pico m/z 157 ($\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_9\text{-O}^+$) que define parte da cadeia do éster. Fazendo a diferença do pico m/z 157 com os picos dos íons moleculares em 396 (M^+ , 100%), 312 (M^+ , 40%) e 284 (M^+ , 25%) permitiu definir o valor de n e, entretanto, o tamanho da cadeia acila dos ésteres componentes **28**. Os ésteres majoritários são: octanoato de decila (**1**), decanoato de decila (**2**) e hexadecanoato de decila (**3**).



$$\text{M}^+ - 157 = m, \text{ onde:}$$

- 1:** n=6 (M^+ 284)
2: n=8 (M^+ 312)
3: n=14 (M^+ 396)

$$\frac{m - 15 (\text{CH}_3) - 28 (\text{CO})}{14} = n$$



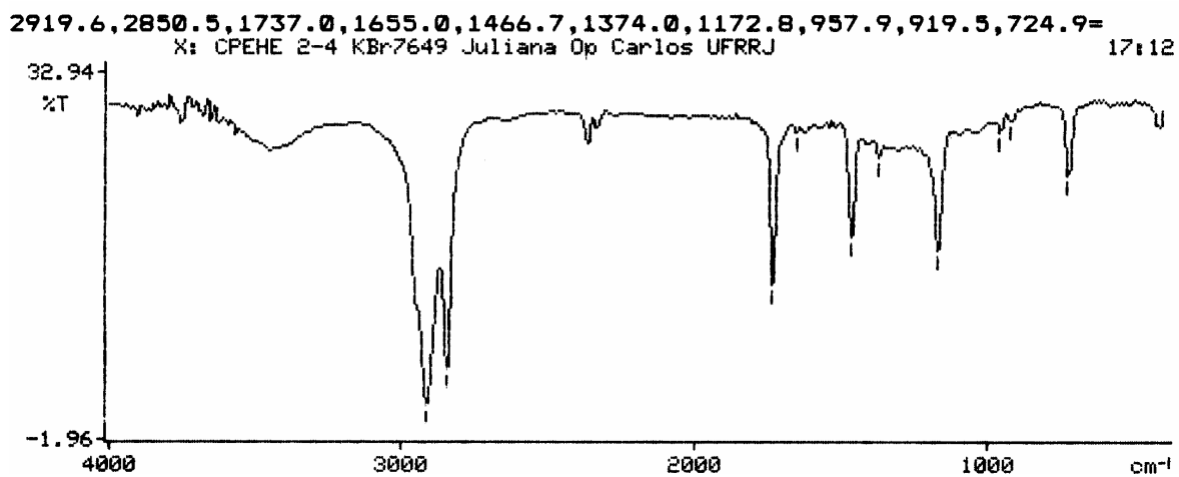


Figura III.4.10. Espectro de IV da mistura de ésteres alifáticos (28).

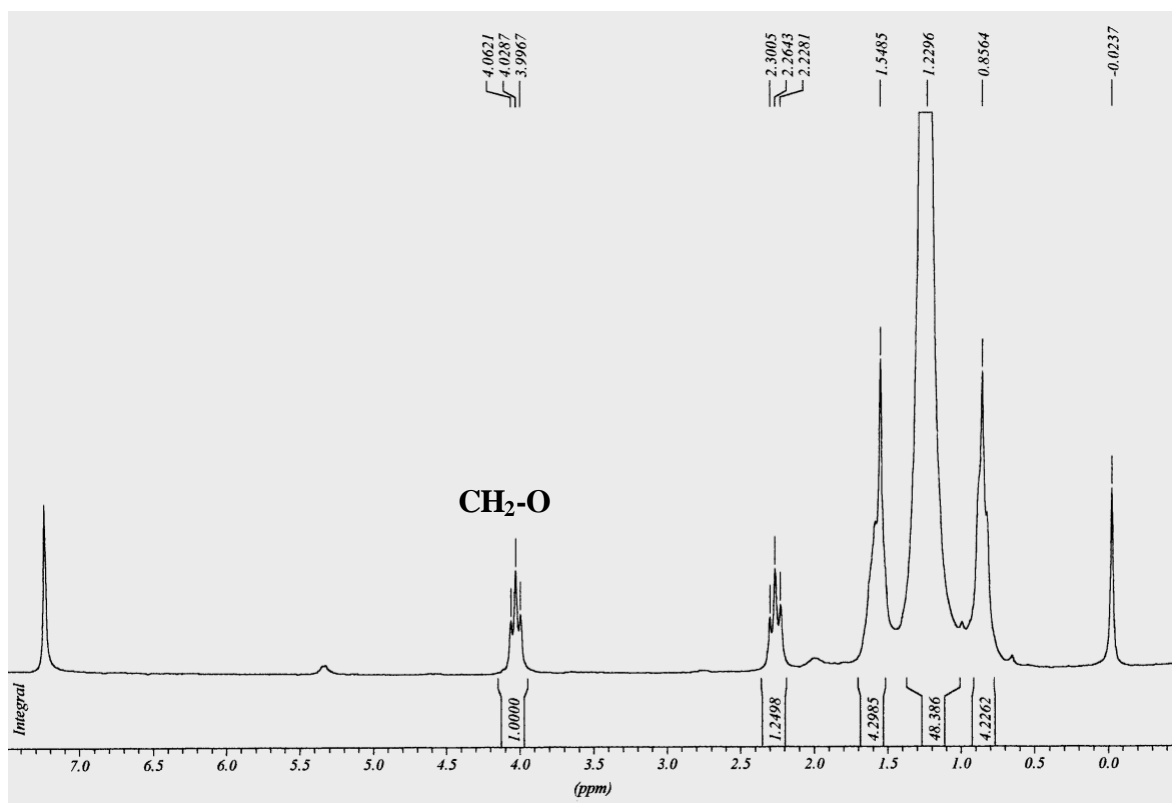


Figura III.4.11. Espectro de RMN ¹H (200MHz, CDC₃) da mistura de ésteres alifáticos (28).

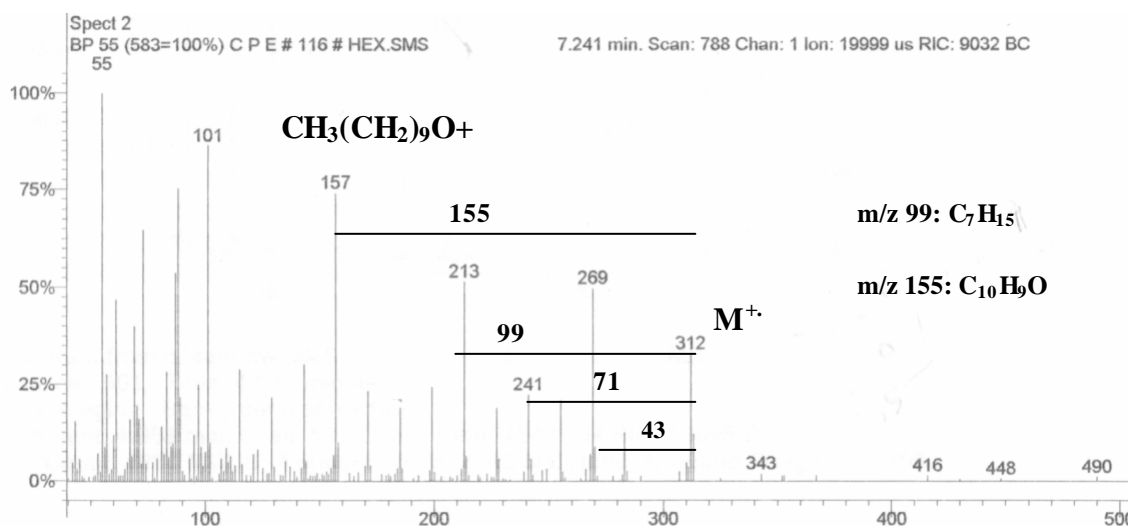
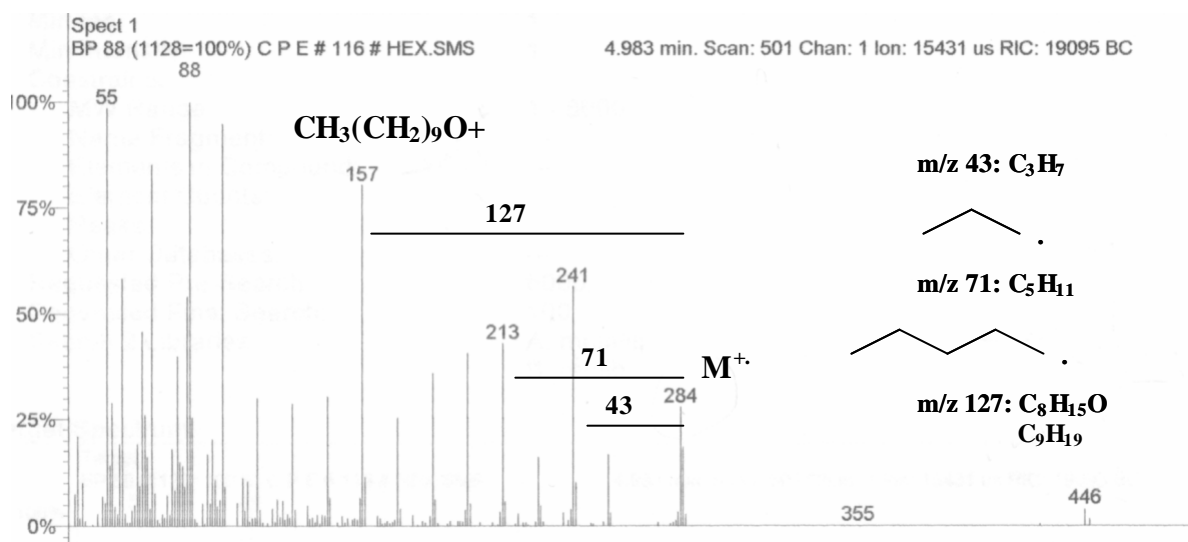
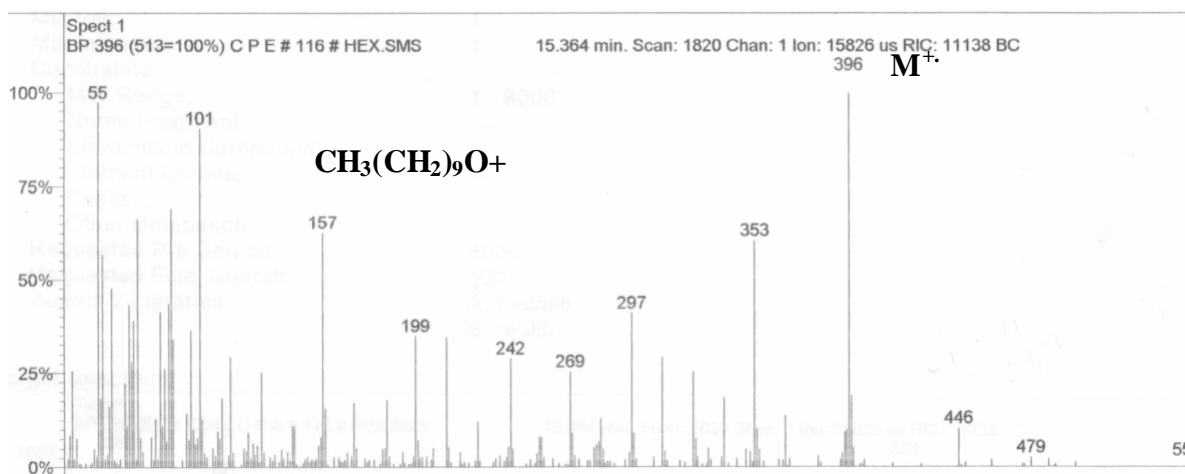
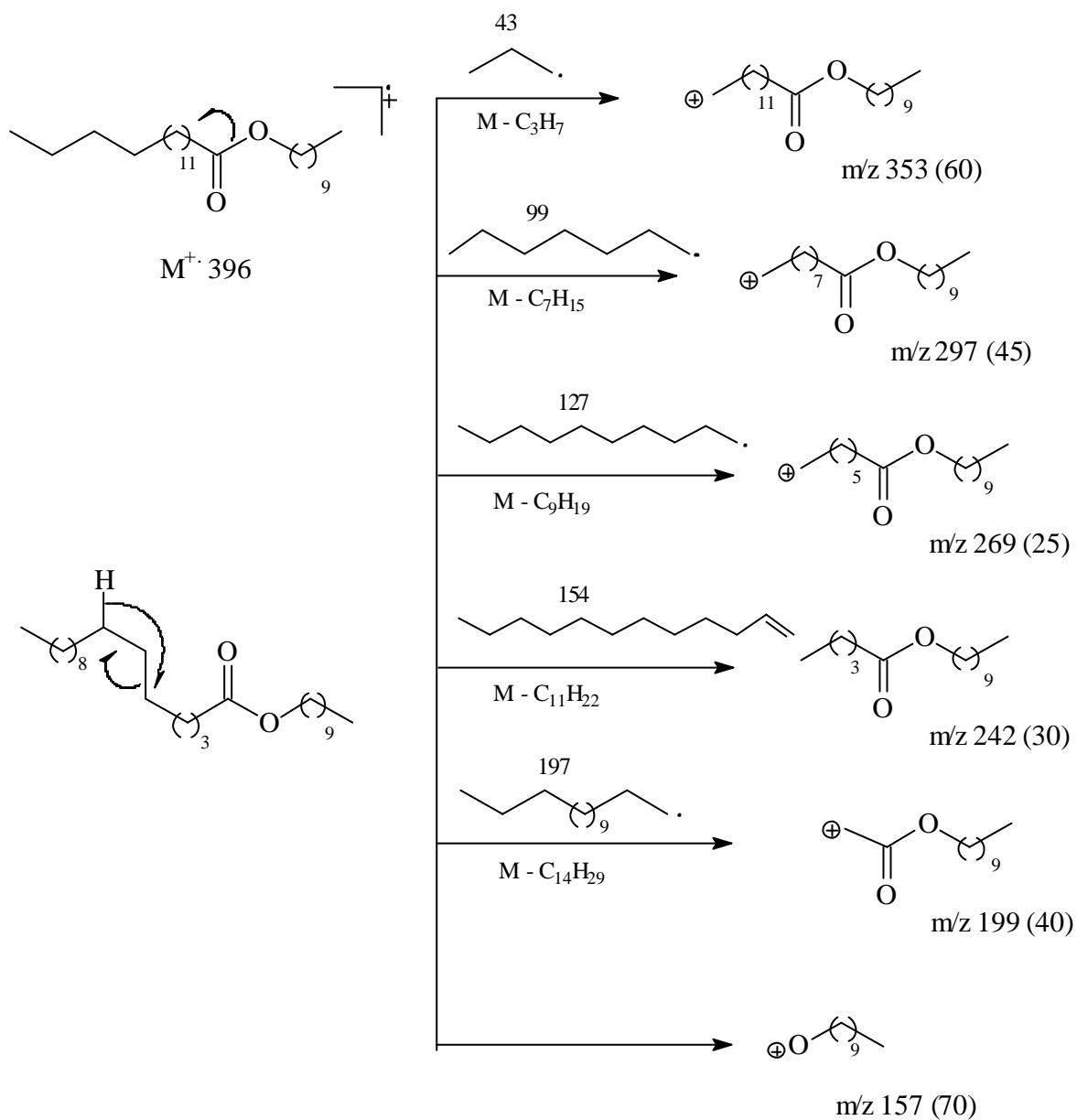


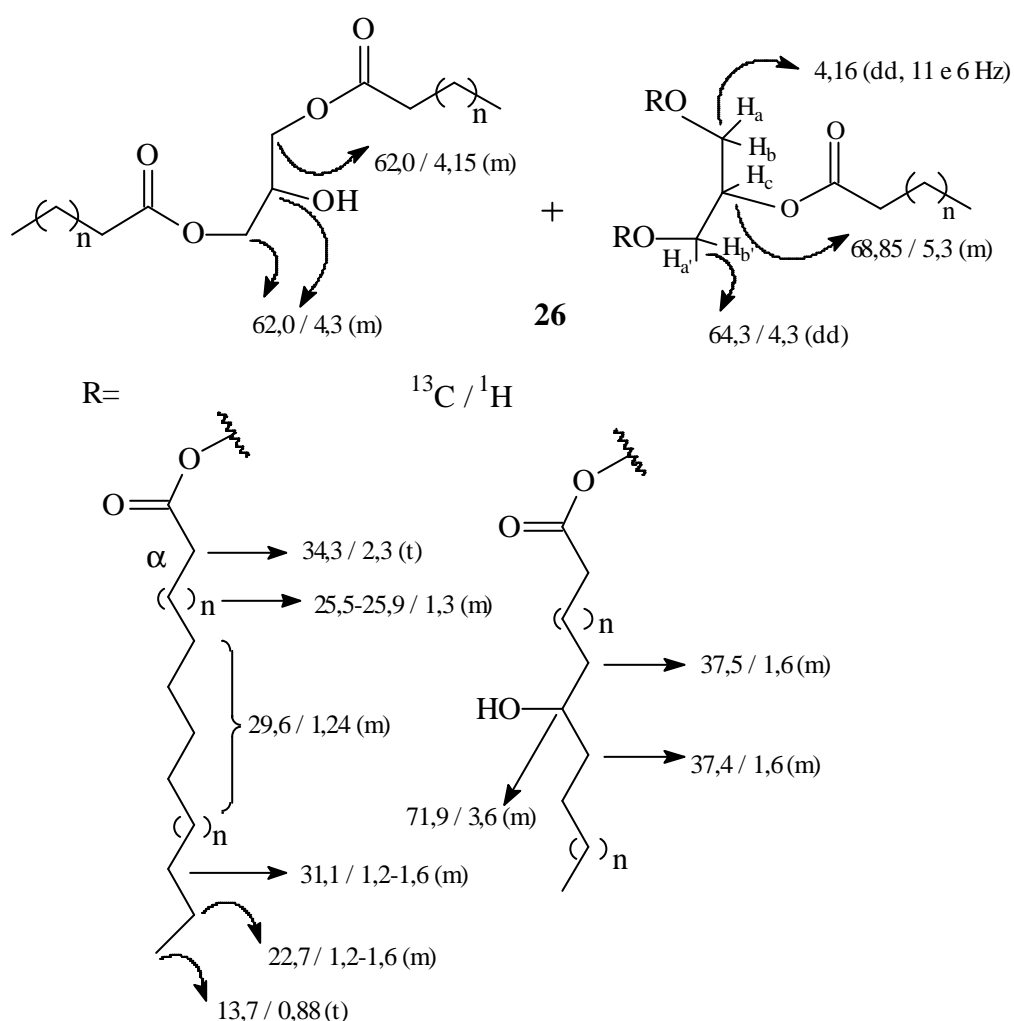
Figura III.4.12. Espectro de massas da mistura de ésteres alifáticos (28) obtido no CG-EM.



Esquema III.5. Mecanismo de fragmentação proposto para justificar os picos detectados no espectro de massas do $M^{\cdot+} 396$ da mistura de ésteres graxos.

III-4.4. Mistura de glicerídeos (26)

O espectro de IV da mistura de glicerídeos (Figura III.4.13, pág. 217) revela bandas de absorção em 3437 cm^{-1} (estiramento OH), 2920 , 2851 e 722 cm^{-1} de cadeia hidrocarbônica e 1733 cm^{-1} (estiramento C=O) de carbonila de éster. A comparação dos dados espectrométricos de RMN ^1H e ^{13}C com dados da literatura sugerem a presença de glicerídeos, formados por cadeia normal hidrocarbônica com a presença de hidroxila em uma ou mais cadeias (CARVALHO *et al.*, 2000), Esquema III.6, abaixo. Os sinais verificados no espectro de RMN ^1H (Figura III.4.14-15, pág. 217-218) com δ_{H} 5,26 (*m*), 4,30 (*dd*, 12,0, 4,0 Hz), 4,15 (*dd*, 12,0, 6,2 Hz), 3,58 (*m*), 2,3 (*m*), 1,6 (*m*) e 1,29-1,21 (*m*) e 0,87 (*t*, 6,6 Hz) juntamente com a ligação nos respectivos carbonos (Figura III.4.17, pág. 220) com δ_{C} 68,85 (CH), δ_{C} 62,0 (CH₂), δ_{C} 62,0 (CH₂), δ_{C} 71,9 (CH), δ_{C} 34,3 (H₂C-CO), δ_{C} 37,43/37,52 (H₂C-COH), δ_{C} 31,9/29,7/25,5/24,0/21,9 (CH₂)_n e δ_{C} 14,08 (CH₃) estão de acordo com a presença de triglicerídeos. Além dos sinais de carbonos (Figura III.4.16, pág. 219) em 172,8, 173,3, 173,8 e 173,8 ppm que foram atribuídos as carbonilas de ésteres. O acoplamento verificado no COSY- ^1H - ^1H (Figura III.4.18, pág. 221) entre os sinais em δ_{H} 3,58 e δ_{H} 1,6 confirma a presença da hidroxila na cadeia lateral do triglicerídeo. A análise do espectro de massas obtido com CG-EM (Figura III.4.19-20, pág. 222-223) permite detectar os picos com *m/z* 239 e 267 referentes às cadeias laterais formadas pelos ésteres palmítico e esteárico, juntamente com picos típicos de hidrólise de cadeias de ésteres, como exemplo *m/z* 83 e 55. A análise dos dados espectrométricos e comparação com a literatura (CARVALHO *et al.*, 2000) permitiu



Esquema III.6 Propostas estruturais e deslocamentos químicos da mistura de glicerídeos.

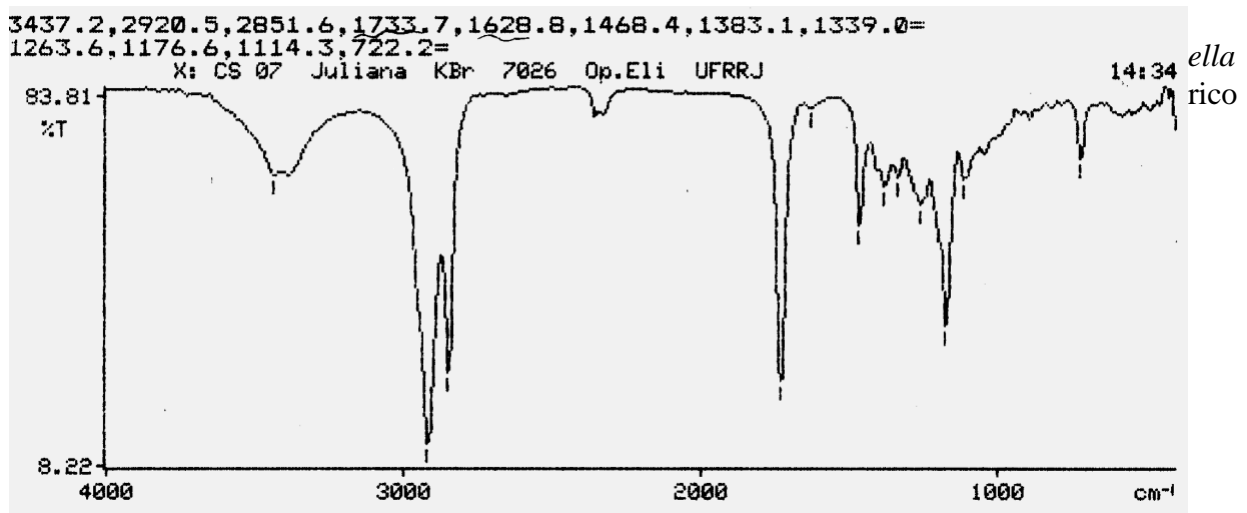


Figura III.4.13. Espectro de IV da mistura de glicerídeos (26).

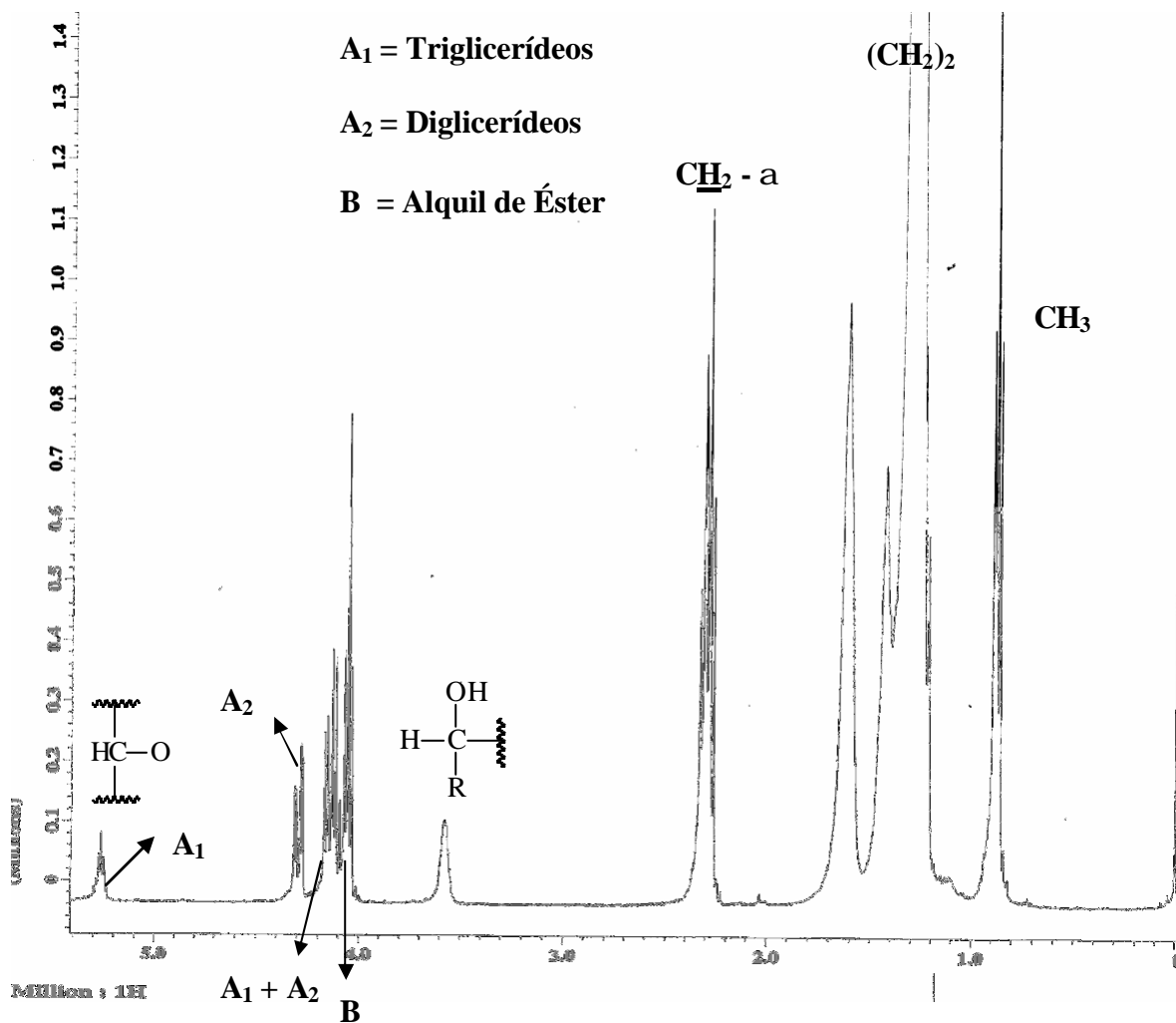


Figura III.4.14. Espectro de RMN ¹H (400MHz, CDC₃) da mistura de glicerídeos (26).

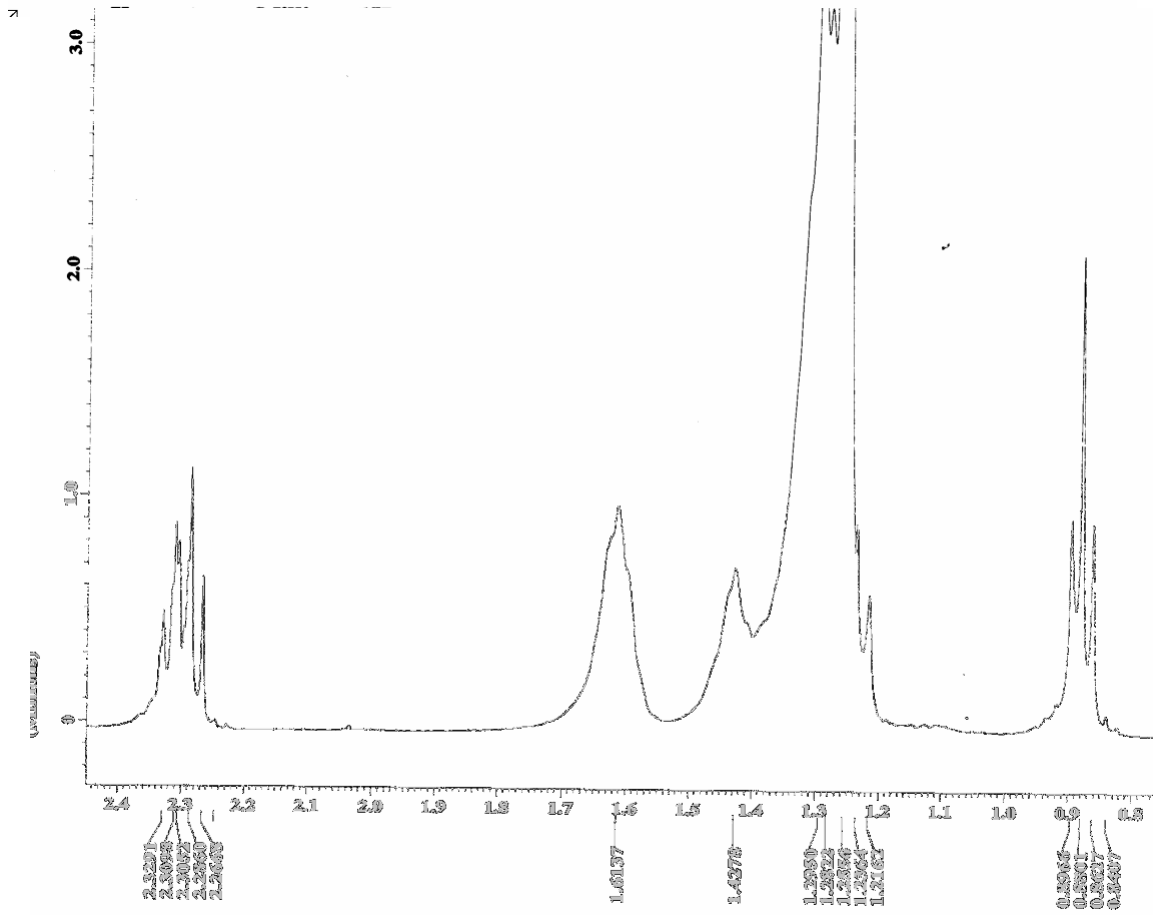
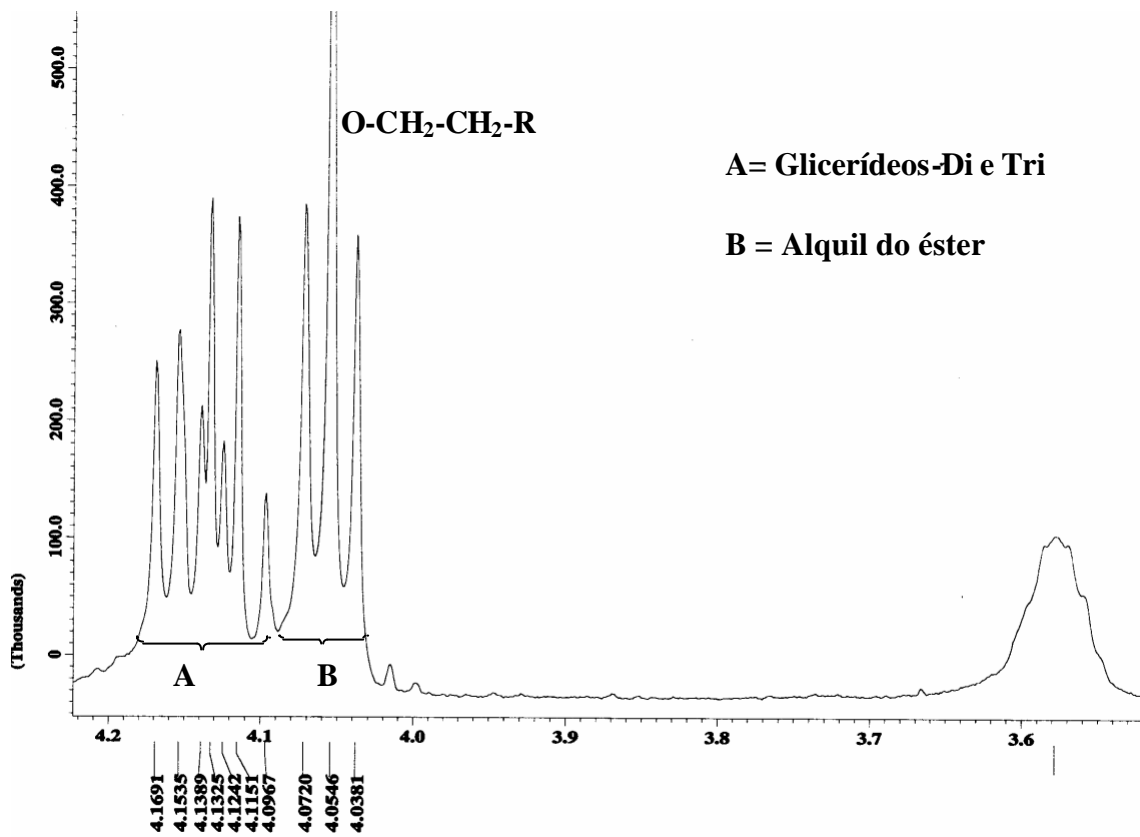


Figura III.4.15. Espectros ampliados de RMN ¹H (400MHz, CDC₃) da mistura de glicerídeos (26).

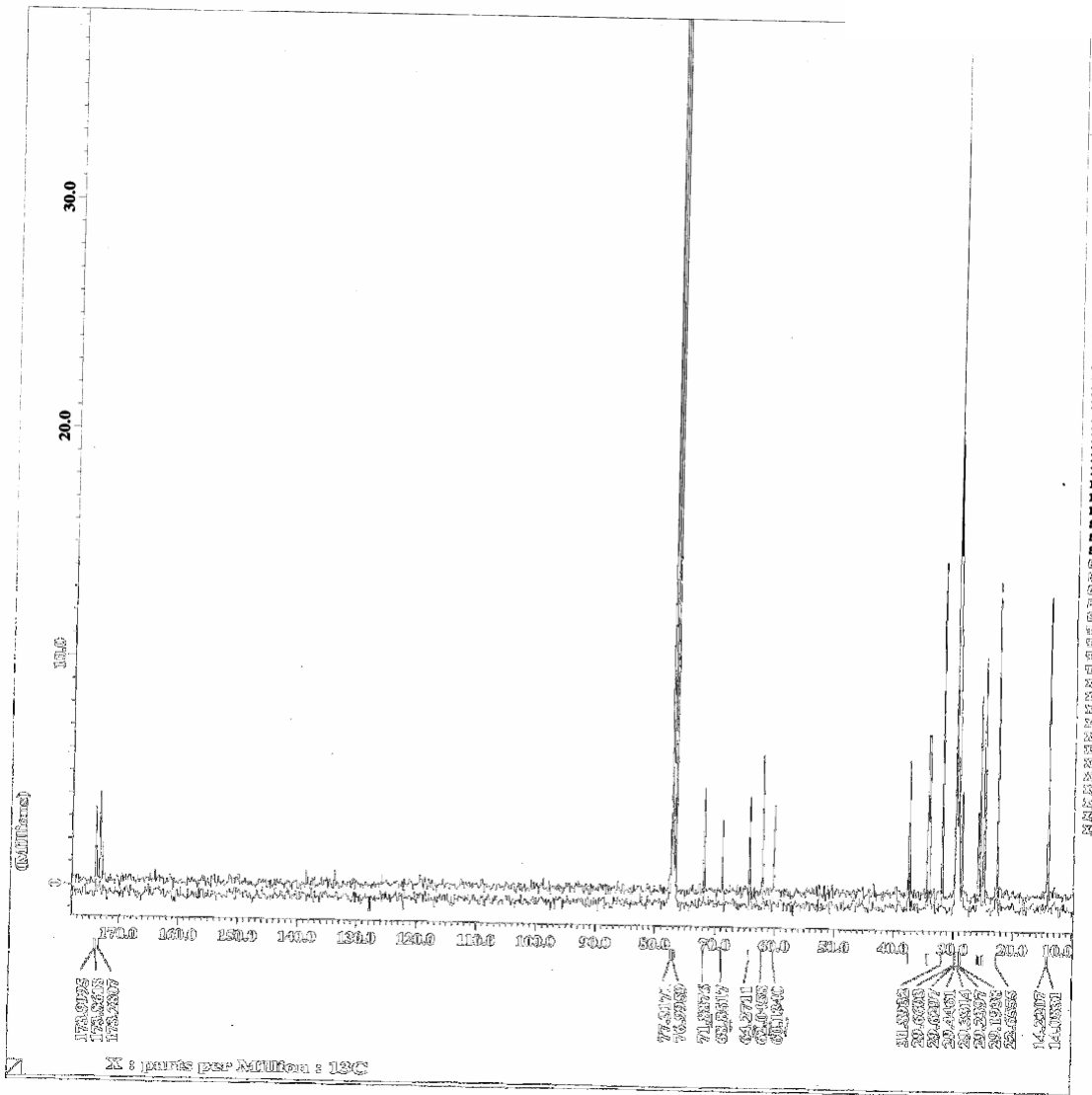


Figura III.4.16. Espectro de RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) da mistura de glicérides (26).

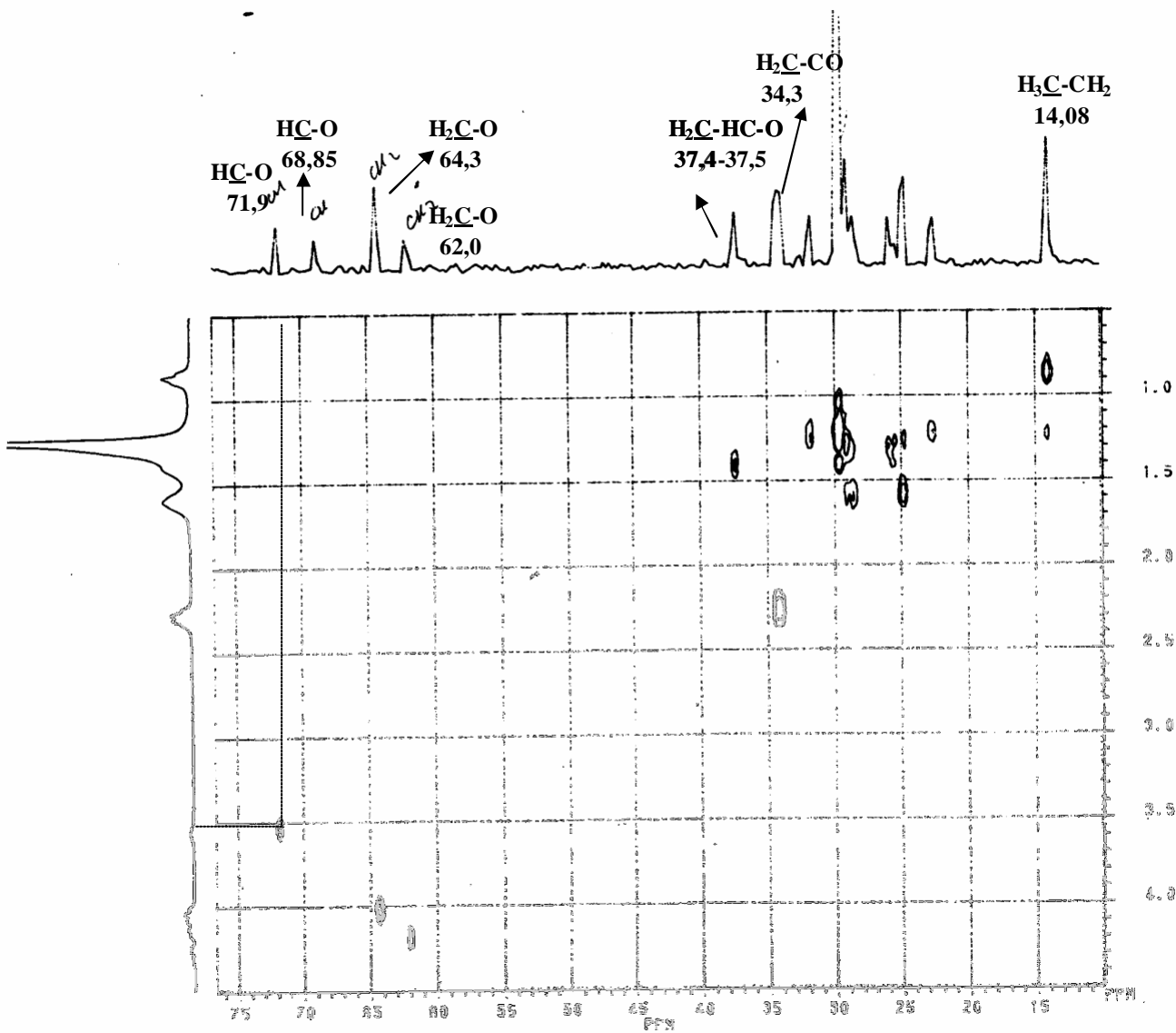


Figura III.4.17. Espectro de HETCOSY (100MHz, CDCl_3) da mistura de glicerídeos (26).

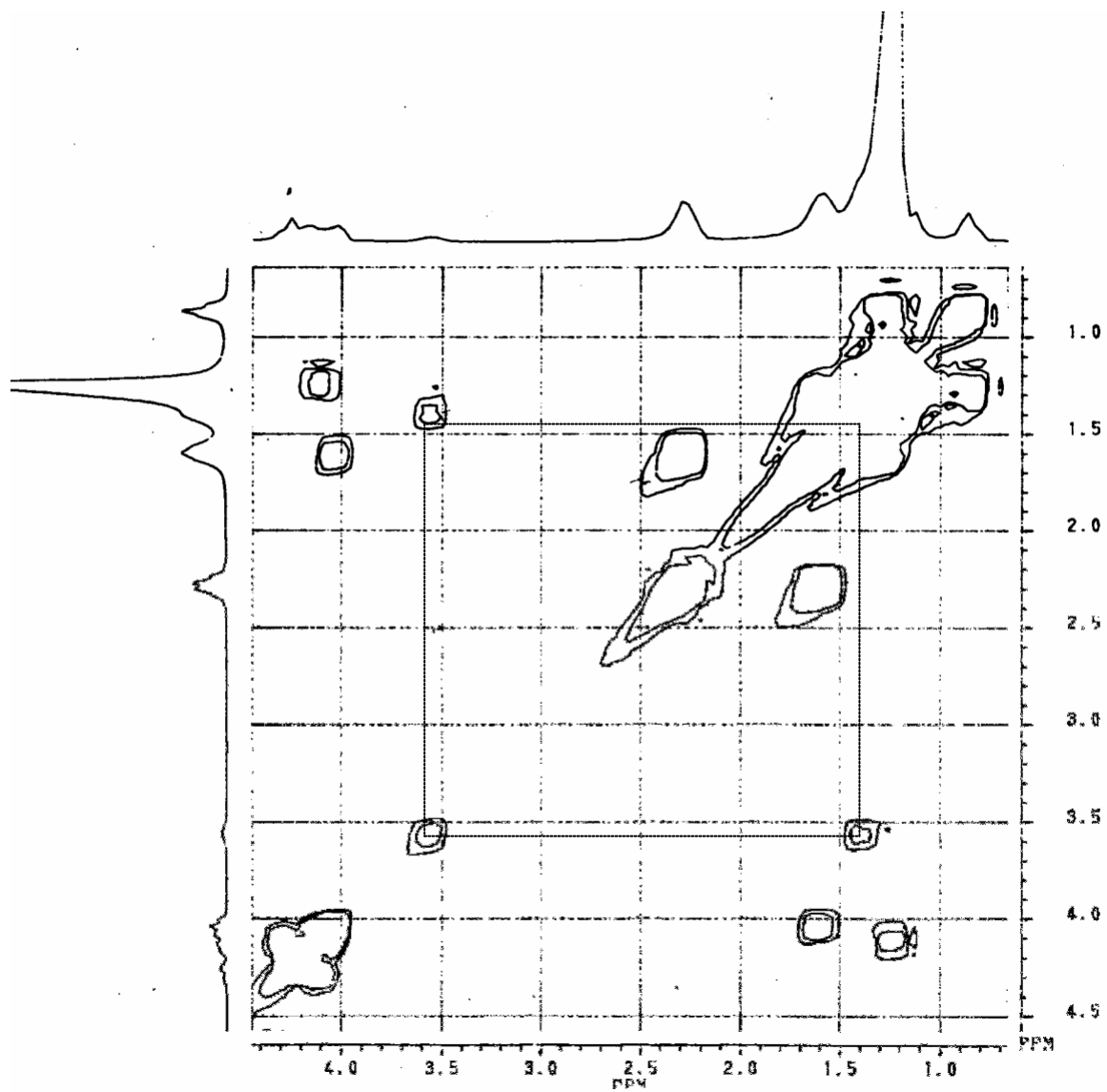


Figura III.4.18. Espectro de COSY-¹H-¹H (200MHz, CDCl₃) da mistura de glicerídeos (26).

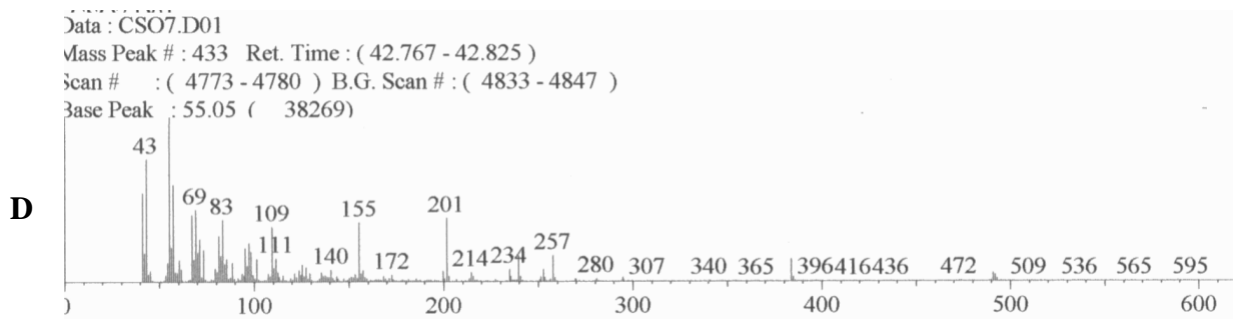
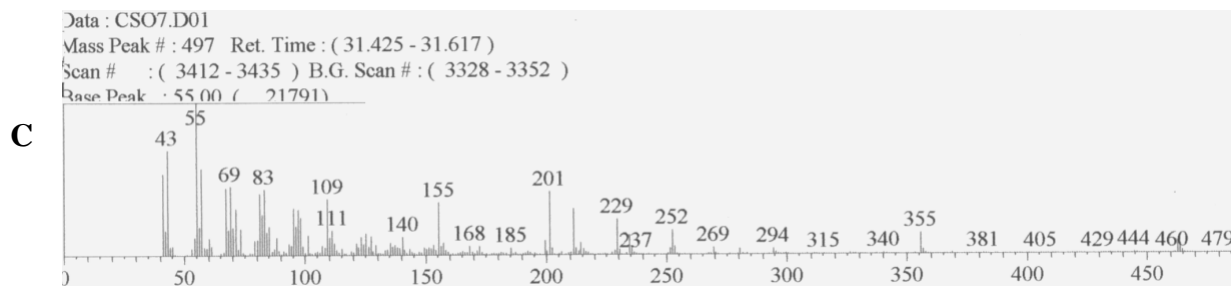


Figura III.4.20. Espectros de massas obtido no CG-EM (C: Tempo de retenção: 31,42-31,62 e D: 42,77-42,82) da mistura de glicerídeos (26).

III-4.5. 5-hidroximetilfurfural (30)

O espectro de IV (Figura III.4.21, pág 225) apresenta bandas de absorção para grupo hidroxila em 3350 cm^{-1} (estiramento O-H), 2854 cm^{-1} (estiramento C-H), 1667 cm^{-1} (estiramento C=O) que pode ser atribuído a aldeído conjugado, 1523 cm^{-1} (estiramento C=C) e 1020 cm^{-1} (estiramento C-O). O sinal δ_{H} 9,55 (s) no espectro de RMN ^1H (Figura III.4.22, pág 225) foi atribuído ao hidrogênio do aldeído e δ_{H} 7,18 e 6,5 (1H, *d*, $J=3,6\text{ Hz}$) para os dois hidrogênios furânicos H-3 e H-4, respectivamente. O valor da constante de acoplamento (3,6 Hz) está de acordo para hidrogênios 3 e 4 de anel furânico. Os hidrogênios oximetilênicos apresentam δ_{H} 4,7 (2H, *s*) e o grupamento hidroxila aparece como um singleto largo em δ_{H} 3,08, o que pode ser comprovado pela adição de D_2O na amostra, levando a troca de hidrogênio por deutério e desaparecimento desse sinal (Figura III.4.23, pág 226). O espectro de COSY ^1H - ^1H (Figura III.4.26, pág 228) confirma o acoplamento entre o H-3 e H-4 do anel furânico. A análise do espectro de RMN ^{13}C e DEPT 90° e 135° (Figura III.4.24-25, pág 226-227) revela os sinais δ_{C} 177,7 (CH) de aldeído α , β insaturado, δ_{C} 152,2 e 160,7 (C), 123,1 (CH) e 109,9 (CH) e um grupamento CH_2 em 57,4 ppm ligado a um grupo OH. O espectro de HETCOR (Figura III.4.27, pág 229) permitiu fazer as correlações inequívocas dos δ_{H} e δ_{C} (Tabela III.4.1, abaixo). O pico verificado no cromatograma do espectro de massas (Figura III.4.28-29, pág 230) com m/z 127 $[(\text{M} + \text{H})^+, 100\%]$ permitiu confirmar a fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$ para **30**. Os picos adicionais em m/z 109 (16%), 97 (50%), 81 (12%) e 69 (25%) estão de acordo com a estrutura do hidroximetilfurfural (Esquema III.7, pág 231). Os dados espectrométricos são semelhantes aos registrados na literatura (KUO et al., 2002) para 5-hidroximetilfurfural.

Tabela III.4.1 Dados de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) da substância **30** (CDCl_3).

30		
C	δ_{C}	δ_{H} (mult,Hz)
2	152,2	-
5	160,7	-
CH		-
3	123,1	7,18 (<i>d</i> , 3,7)
4	109,9	6,5 (<i>d</i> , 3,7)
6	177,7	9,5 (<i>s</i>)
CH_2		
7	57,4	4,65 (<i>s</i>)
OH	-	3,08 (<i>sl</i>)

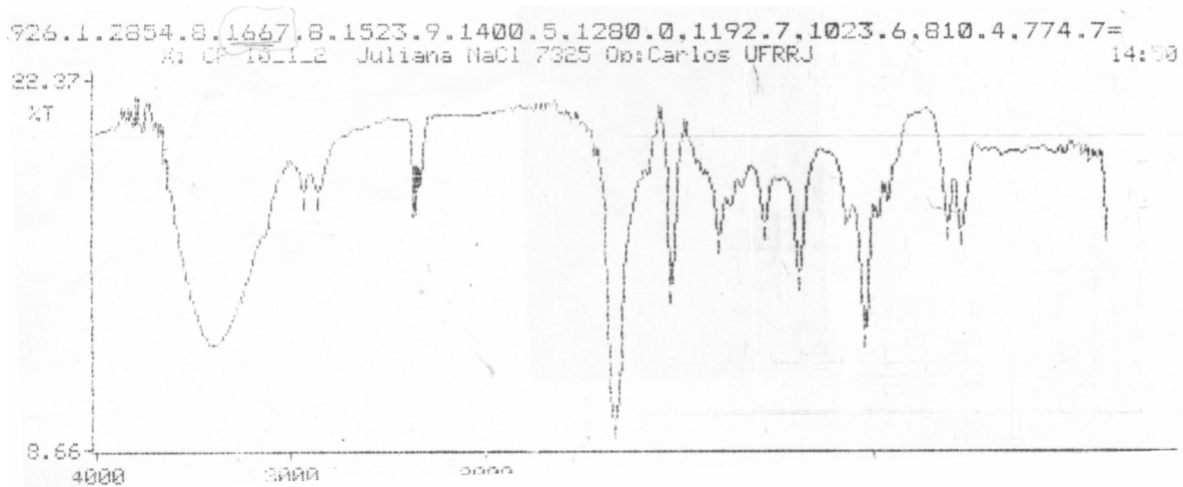


Figura III.4.21. Espectro de IV de 30 (5-hidroximetilfurfural).

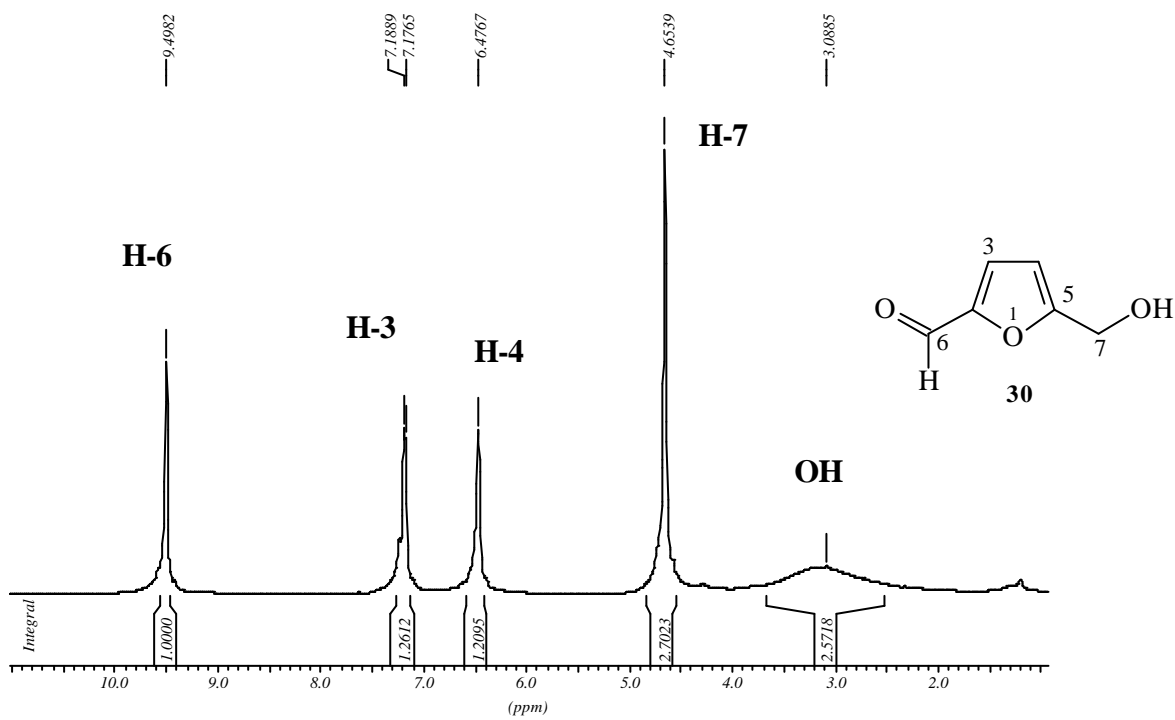


Figura III.4.22. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 30 (5-hidroximetilfurfural).

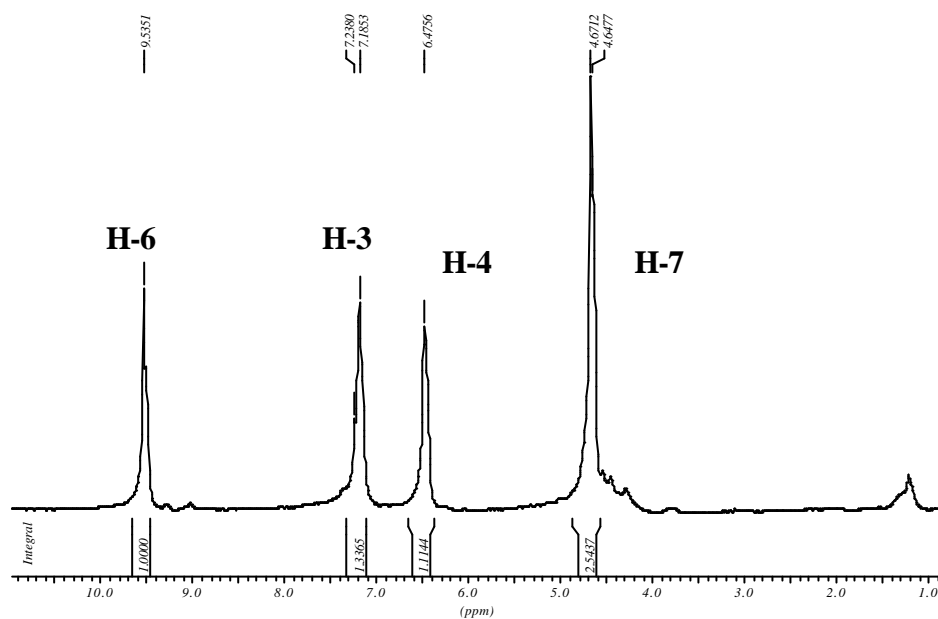


Figura III.4.23. Espectro de RMN ^1H com adição de D_2O (200 MHz, CDCl_3) de **30** (5-hidroximetilfurfural).

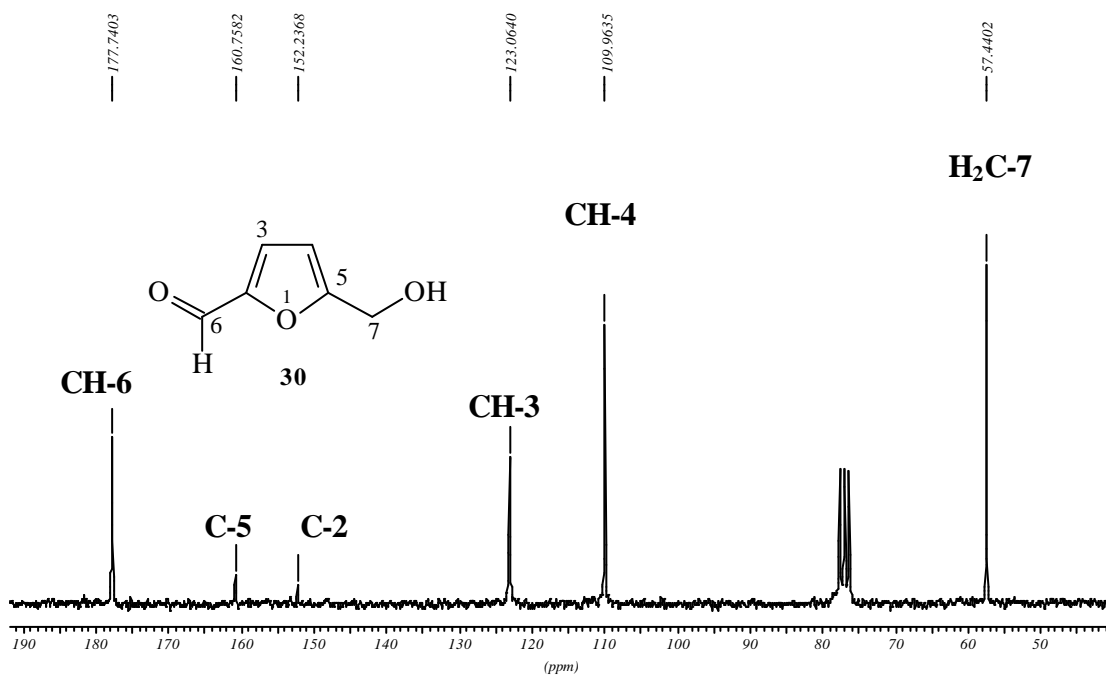


Figura III.4.24. Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de **30** (5-hidroximetilfurfural) 226

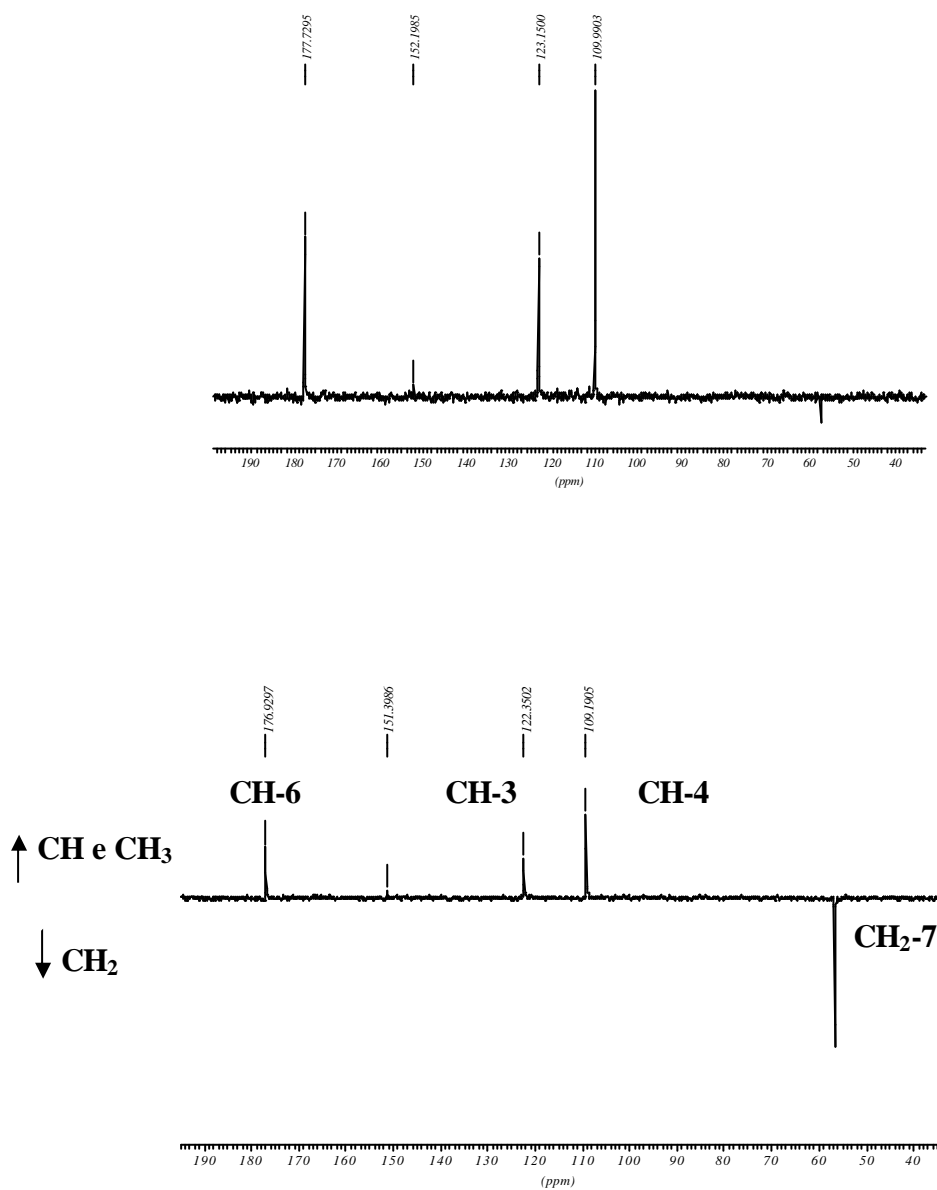


Figura III.4.25. Espectro de DEPT 90° e 135° (50 MHz, CDCl_3) de **30** (5-hidroximetilfurfural).

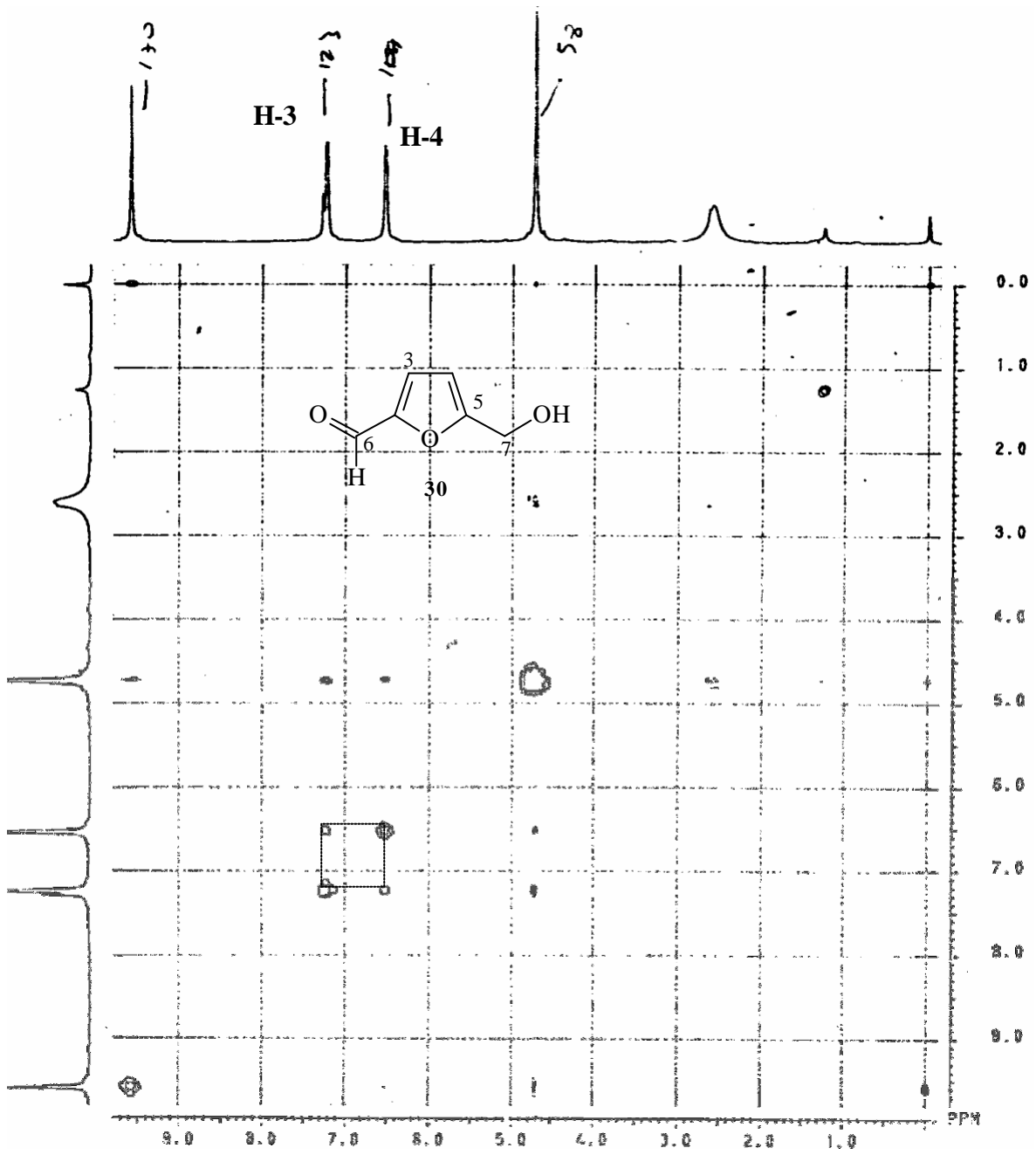


Figura III.4.26. Espectro de COSY ^1H - ^1H (200 MHz, CDCl_3) de **30** (5-hidroximetilfurfural).

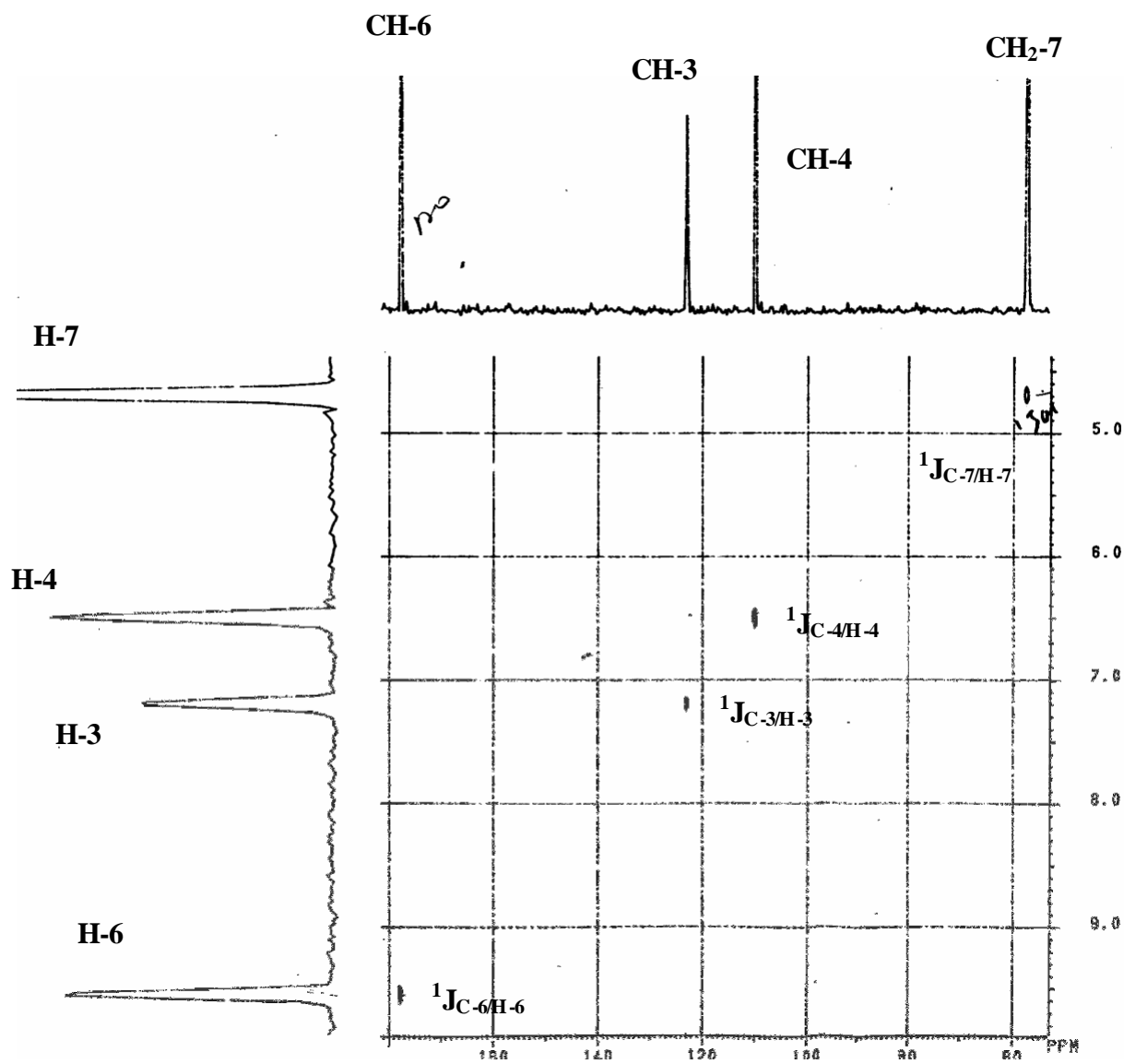


Figura III.4.27. Espectro de HETCOSY (50 MHz, CDCl_3) de 30 (5-hidroximetilfurfural).

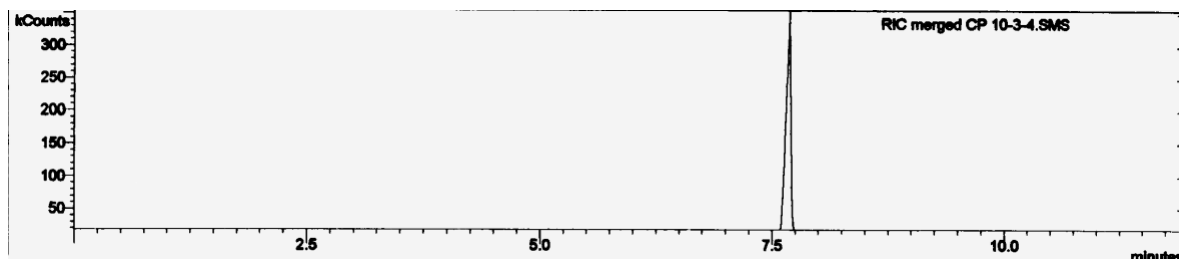


Figura III.4.28. Cromatograma de **30** (5-hidroximetilfurfural), Coluna: CP-SIL8CB (30mx25x0,25mm), Temperatura: 90C/1min-5C/min-200C/10min, Ionização: EI (70eV).

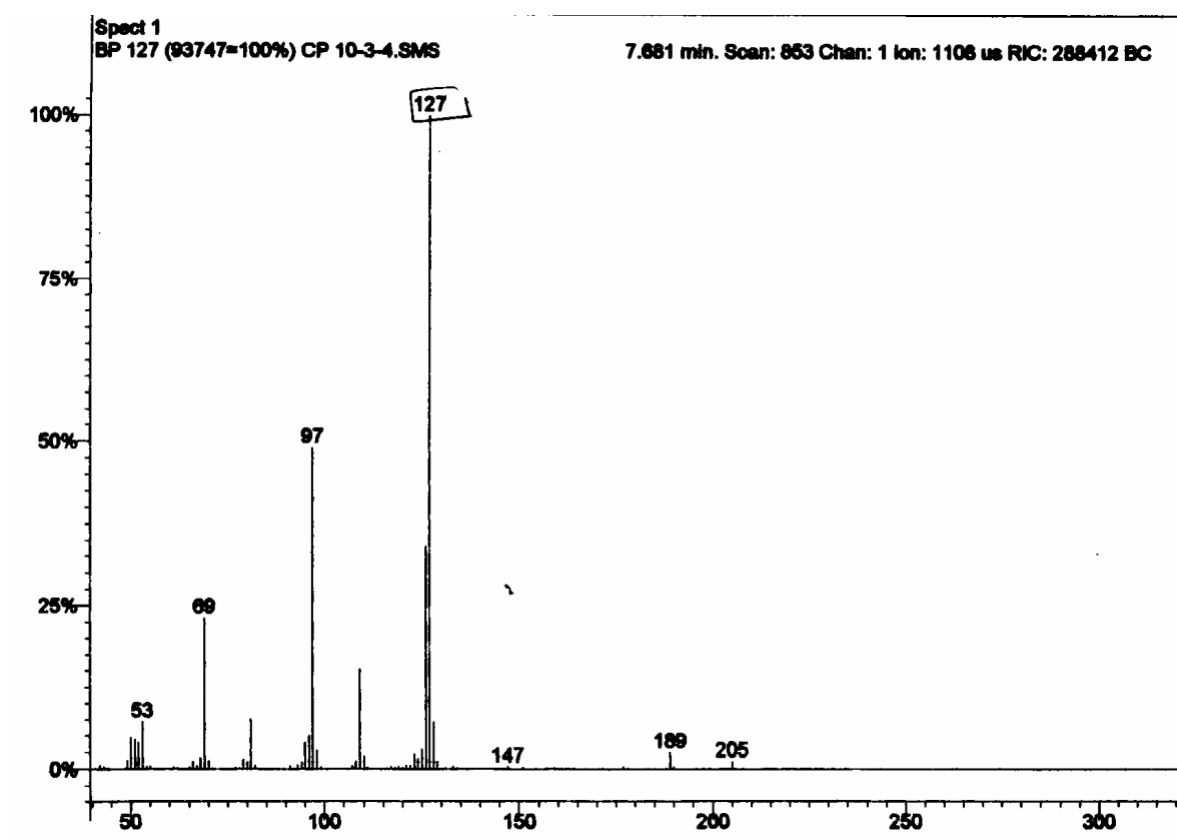
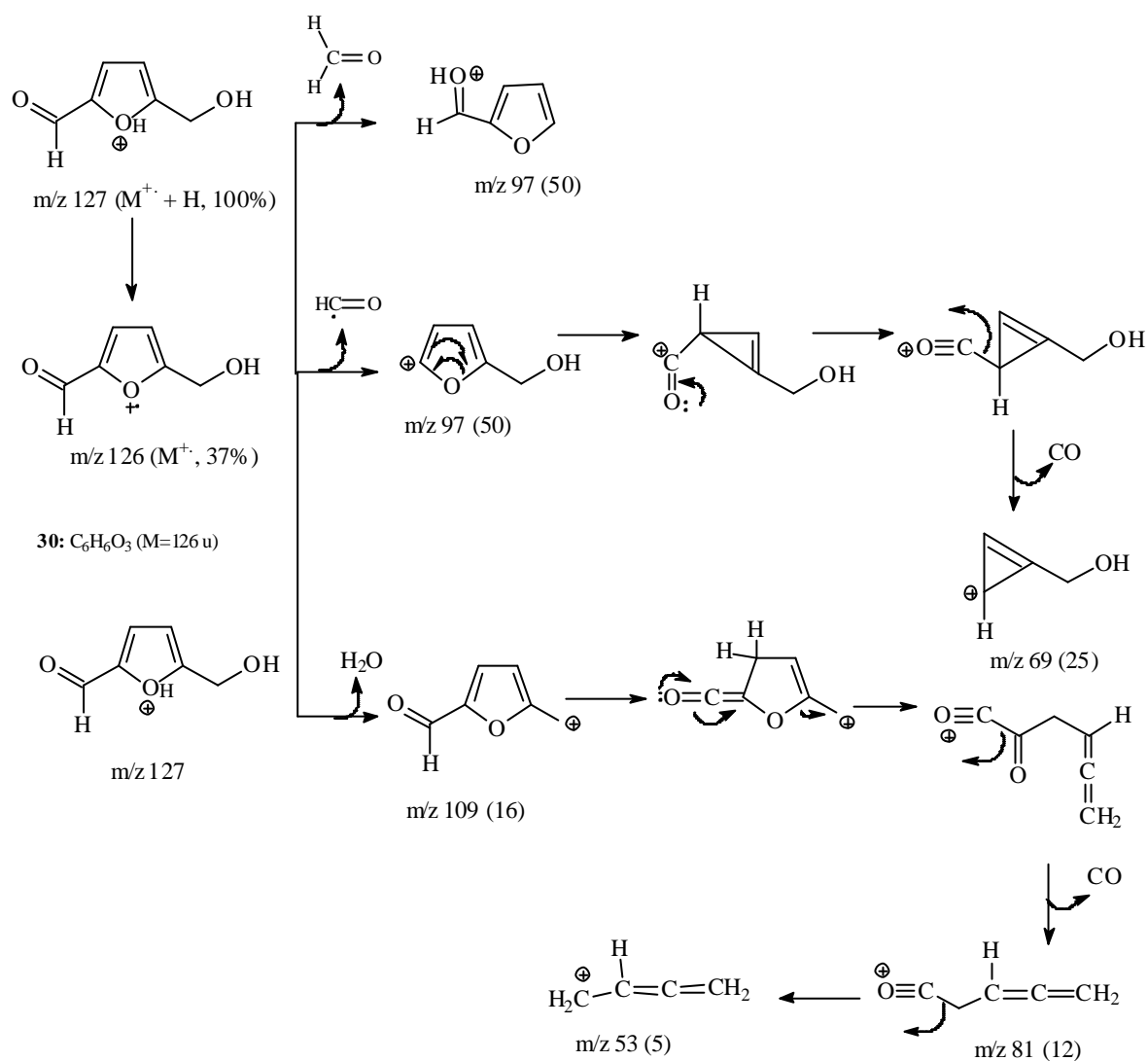


Figura III.4.29. Espectro de massas de **30** (5-hidroximetilfurfural).



Esquema III.7. Mecanismo de fragmentação proposto para justificar os picos detectados no espectro de massas de **30**.

III-4.6. Ácido gálico e Galato de etila (Substâncias 33 e 35)

Os espectros de IV (Figura III.4.30, pág. 234; Figura III.4.38, pág. 239) mostram bandas de absorção características de ácidos fenólicos e de seus derivados.

Substâncias (Região de Absorção-cm ⁻¹ , KBr)		Atribuições
33	35	
3410-2600	3450-3290	estiramento O-H
-	2978	estiramento C-H
1692 e 1618	1696 e 1619	estiramento de carbonila de COOH (33) e COOR (35) conjugados
1333 e 1268	1315 e 1248	estiramento C-O

Os espectros de RMN ¹H (Figura III.4.31, pág. 234; Figura III.4.36 pág. 237; Figura III.4.39, pág. 239) mostram sinais de hidrogênios aromáticos em δ 7,01 (2H, *s*) e δ 9,01 (OH, *sl*) (33), após metilação com diazometano o derivado 34 apresentou sinais em δ _H 7,27 (2H, *s*) e metoxilas em δ _H 3,86 (3 x CH₃) e 3,78 (1 x CH₃). Esses dados comprovam a presença de quatro hidroxilas livres em 33 e dois hidrogênios, de anel aromático. O espectro de 35 revela dois hidrogênios aromáticos em δ _H 7,03 (2H, *s*), um quarteto em δ _H 4,27 (2H) e um tripleto em δ _H 1,3 (3H, *J*=6,92 Hz). O espectro 2D ¹H-¹H-COSY (Figura III.4.40, pág. 240) de 35 mostra o acoplamento entre os sinais em δ _H 4,27 (2H, *q*) e δ _H 1,3 (3H, *t*, *J*=6,92 Hz) correspondente ao grupo etoxila do éster. Os dados espectrométricos de RMN ¹³C (BBD, Figura III.4.32, pág. 235), DEPT (Figura III.4.33, pág. 235) e 2D (HETCOR, Figura III.4.35, pág. 237) e espectro de massas (Figura III.4.34, pág. 236; Esquema III.9, pág. 236) são compatíveis com a estrutura proposta para 33. A análise dos espectros de RMN ¹³C (Figura III.4.37, pág. 239) do derivado 34 e comparação com valores registrados na literatura (JI, *et al.*, 1992) permitiu propor a estrutura do ácido gálico metilado para a substância 34. A tabela III.4.2, pág. 233 mostra os dados identificados nos espectros de RMN ¹H e ¹³C (1D e 2D) de 33, 34 e 35. O espectro de RMN ¹³C e DEPT (Figuras III.4.41-42, pág. 241-242) de 35 apresenta sinais de carbonos quaternários em δ _C 169,5 (carbonila conjugada), δ _C 146,39, δ _C 139,63 (carbonos aromáticos oxigenados), δ _C 121,68 e um sinal intenso de C-H em δ _C 109,94. Esses sinais foram igualmente encontrados nos espectros de ¹³C de 33 e 34, os sinais diferentes foram δ _C 61,67 (CH₂) e δ _C 14,61 (CH₃).

O ácido gálico e galato de etila podem ser formados a partir da hidrólise de taninos (galotaninos e elagitaninos) que são freqüentes em espécies de *Caesalpinia*. Esta observação foi feita no estudo das espécies *C. brevifolia*, *C. coriaria* e *C. spinosa* (HASLAM, *et al.*, 1961). Elagitaninos, ac. gálico, galato de etila e traços de ácido elágico foram isolados da casca de *C. pulcherrima* (AWASTHI, *et al.*, 1980). Nas sementes de *C. gilliesi* também foram detectadas a presença de taninos (AL-YAHYA, *et al.*, 1988). Algumas atividades destes fenóis têm sido citadas na literatura como: o ácido gálico estimula a produção de ácidos cinâmicos, flavonóides e benzofenona e age ativando a PAL (fenilalanina amônia liase) (SIMÕES, 2001). Os galotaninos apresentam duas principais características: plantas ricas em galotaninos são geralmente pobres em produtos fitoquímicos de importância como marcadores em sistemática vegetal e o ác. gálico é um poderoso antioxidante (seqüestrador de radicais), portanto, age inibindo a biossíntese de vários metabólitos especiais (SIMÕES,

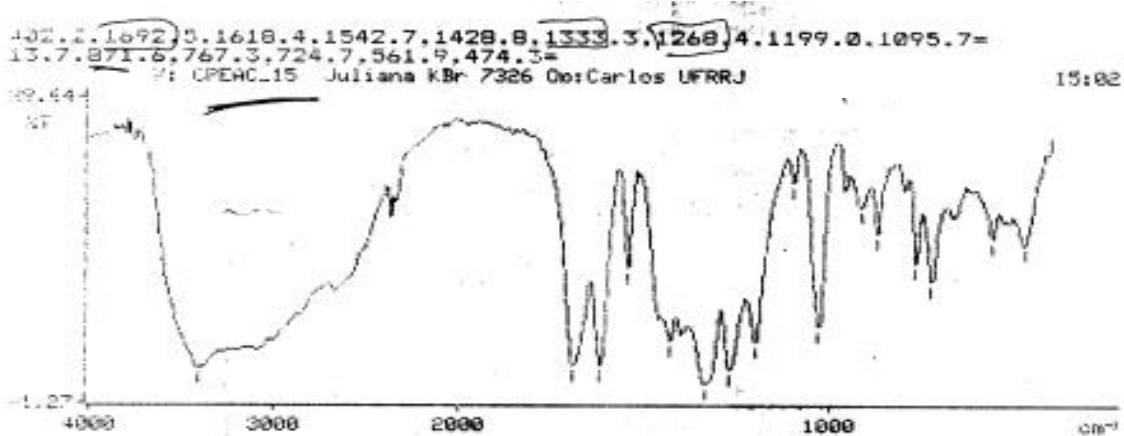


Figura III.4.30. Espectro de IV de 33 (ácido gálico).

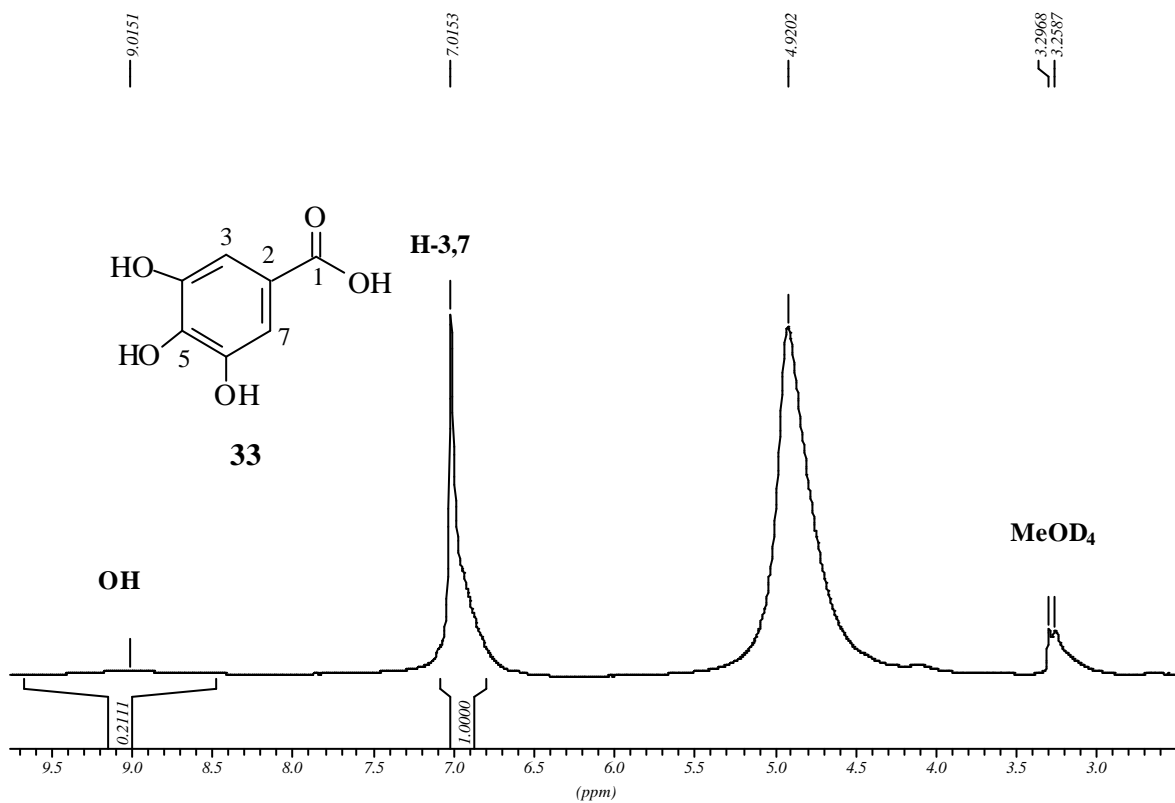


Figura III.4.31. Espectro de RMN ¹H (200 MHz, Metanol-D₄) de 33 (ácido gálico).

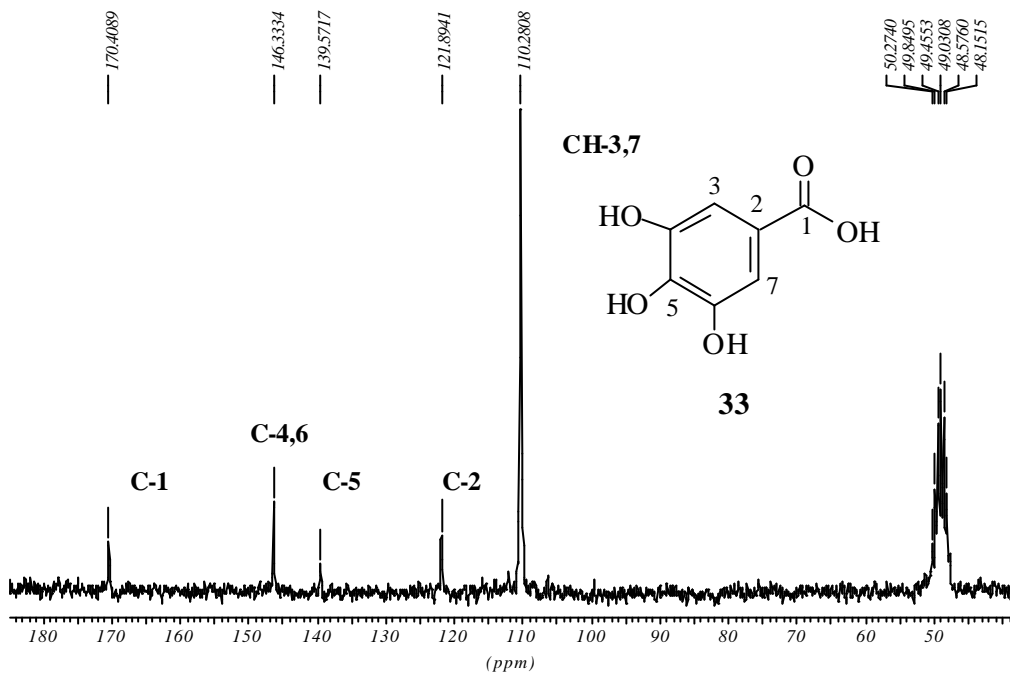


Figura III.4.32. Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, Metanol- D_4) de **33** (ácido gálico).

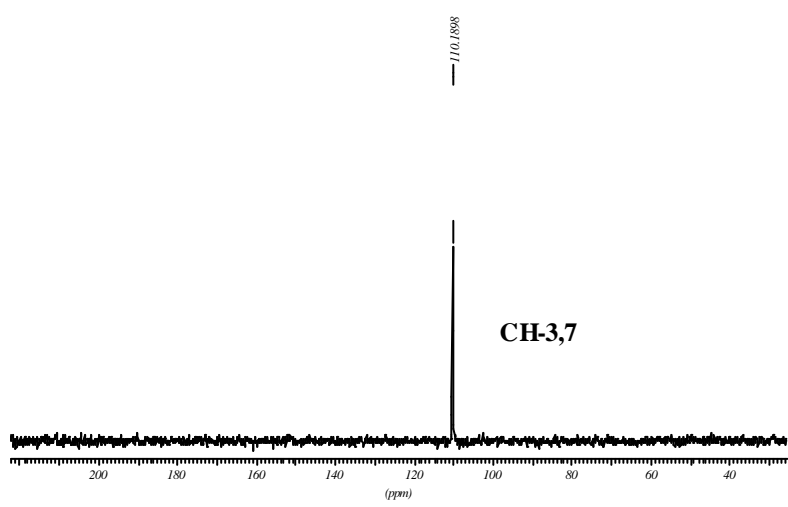
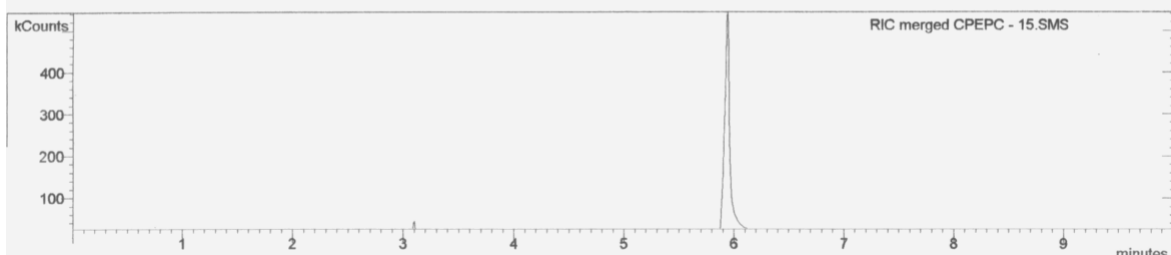


Figura III.4.33. Espectro de DEPT 90° e 135° (200 MHz, Metanol- D_4) de **33** (ácido gálico).

Sample ID:	CPEPC - 15	Operator:	Frances
Instrument ID:	Saturn GC/MS #1	Last Calibration:	None
Acquisition Date:	9/24/02 3:34 PM	Data File:	c:\... \cpepc - 15.sms
Calculation Date:	9/24/02 4:02 PM	Method:	c:\... \joao.mth
Inj. Sample Notes:			

A



B

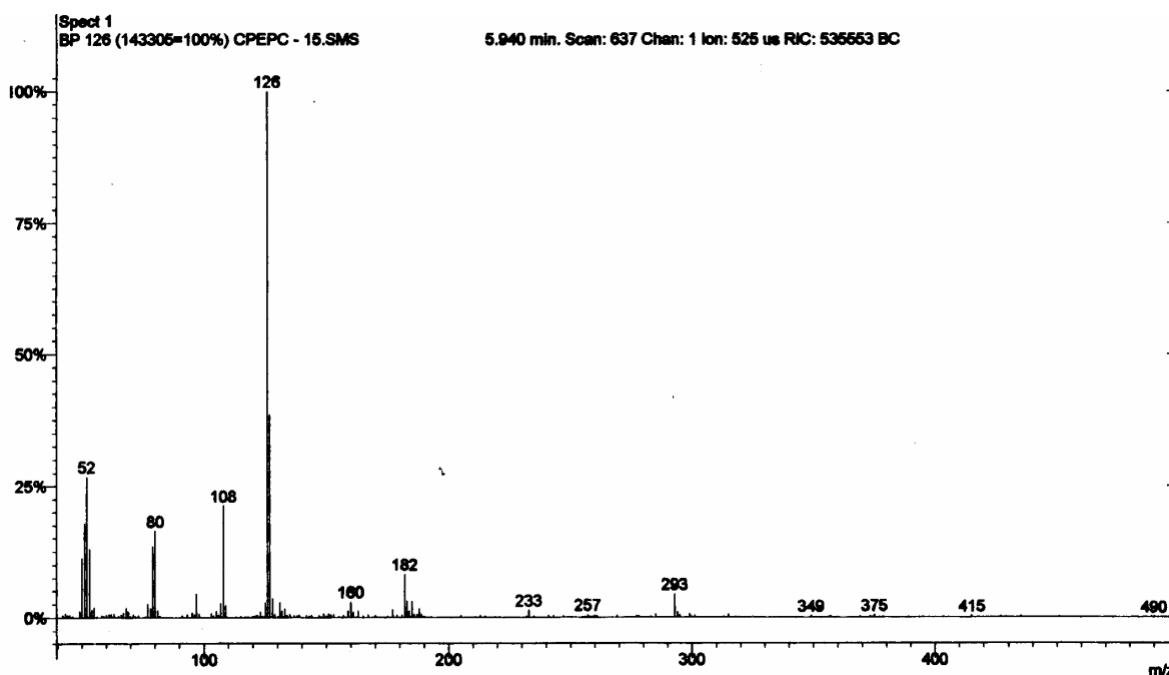
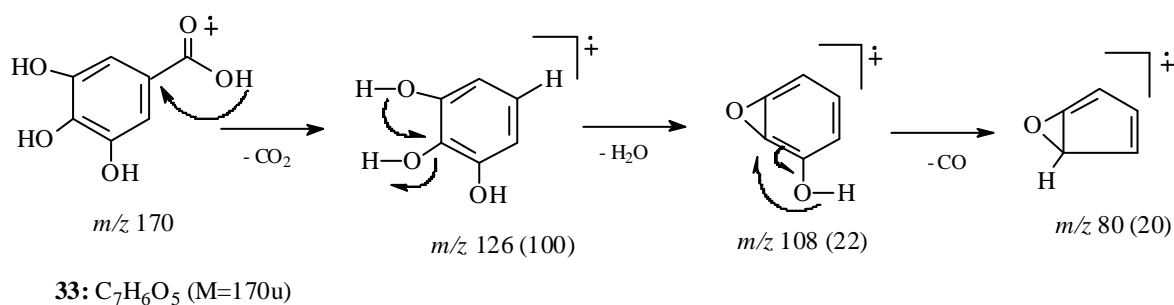


Figura III.4.34. A: cromatograma e B: espectro de massas de **33** (ácido gálico), [Coluna: CP-SIL8CB (30mx0,25x0,25mm), Temperatura: 130C/1min-2C/min-290C/5min, Ionização: EI (70eV)].



Esquema III.8: Mecanismo de fragmentação proposto para justificar os picos detectados no espectro de massas de **33** (ácido gálico), **Figura III.4.34.**

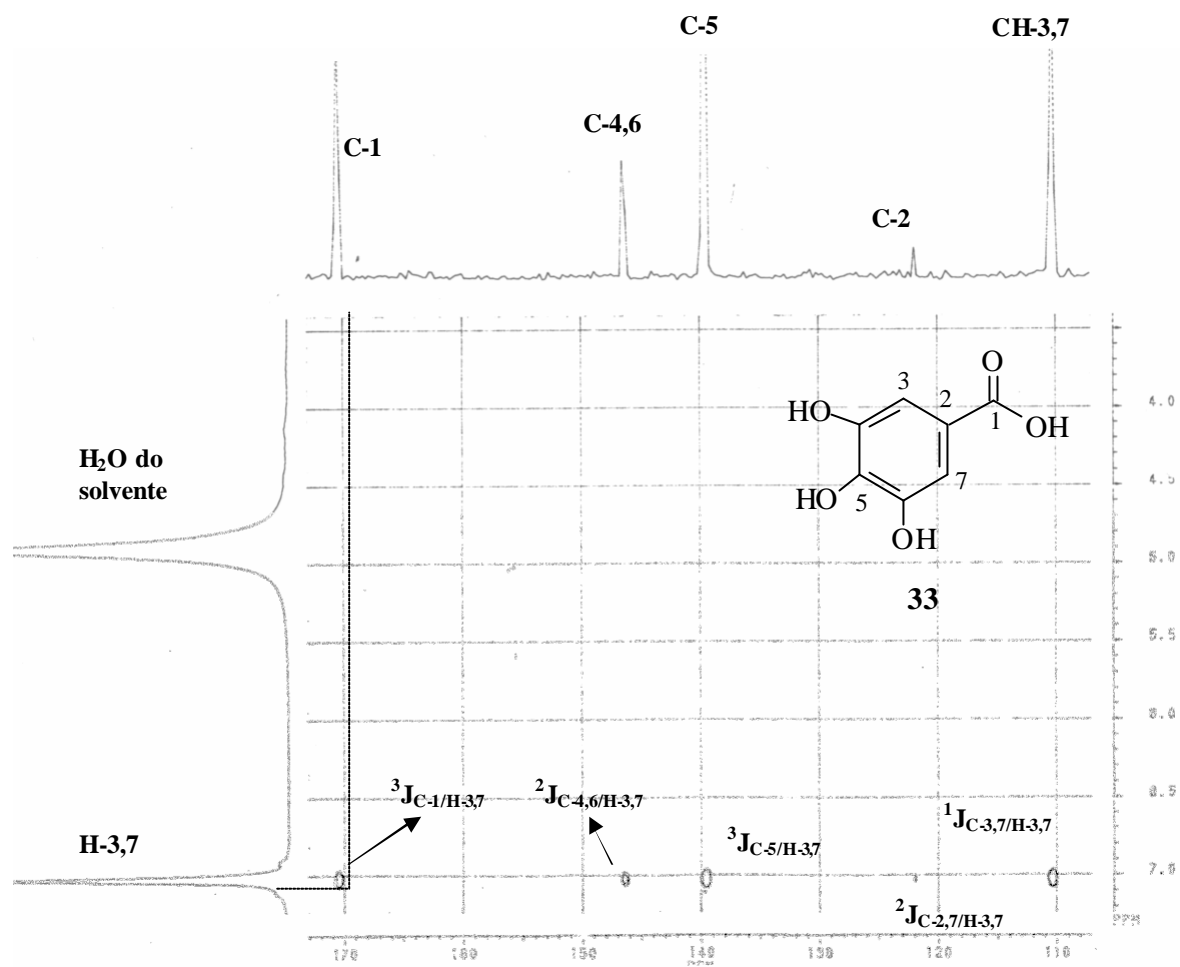


Figura III.4.35. Espectro de HETCOSY (50 MHz, MeOD₄) de 33 (ácido gálico).

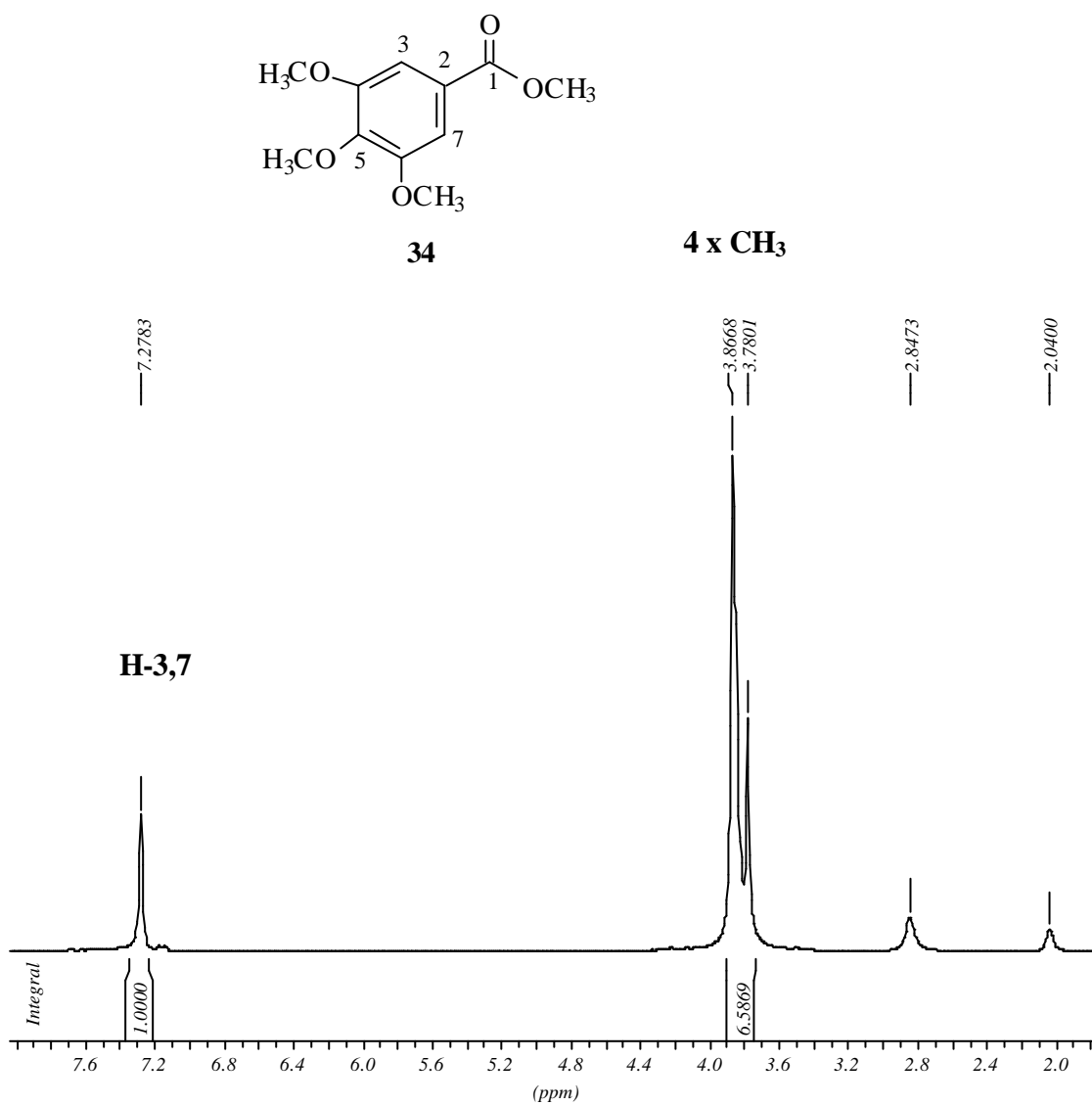


Figura III.4.36. Espectro de RMN ¹H (200 MHz, Acetona-D₆) de **34** (ácido gálico metilado).

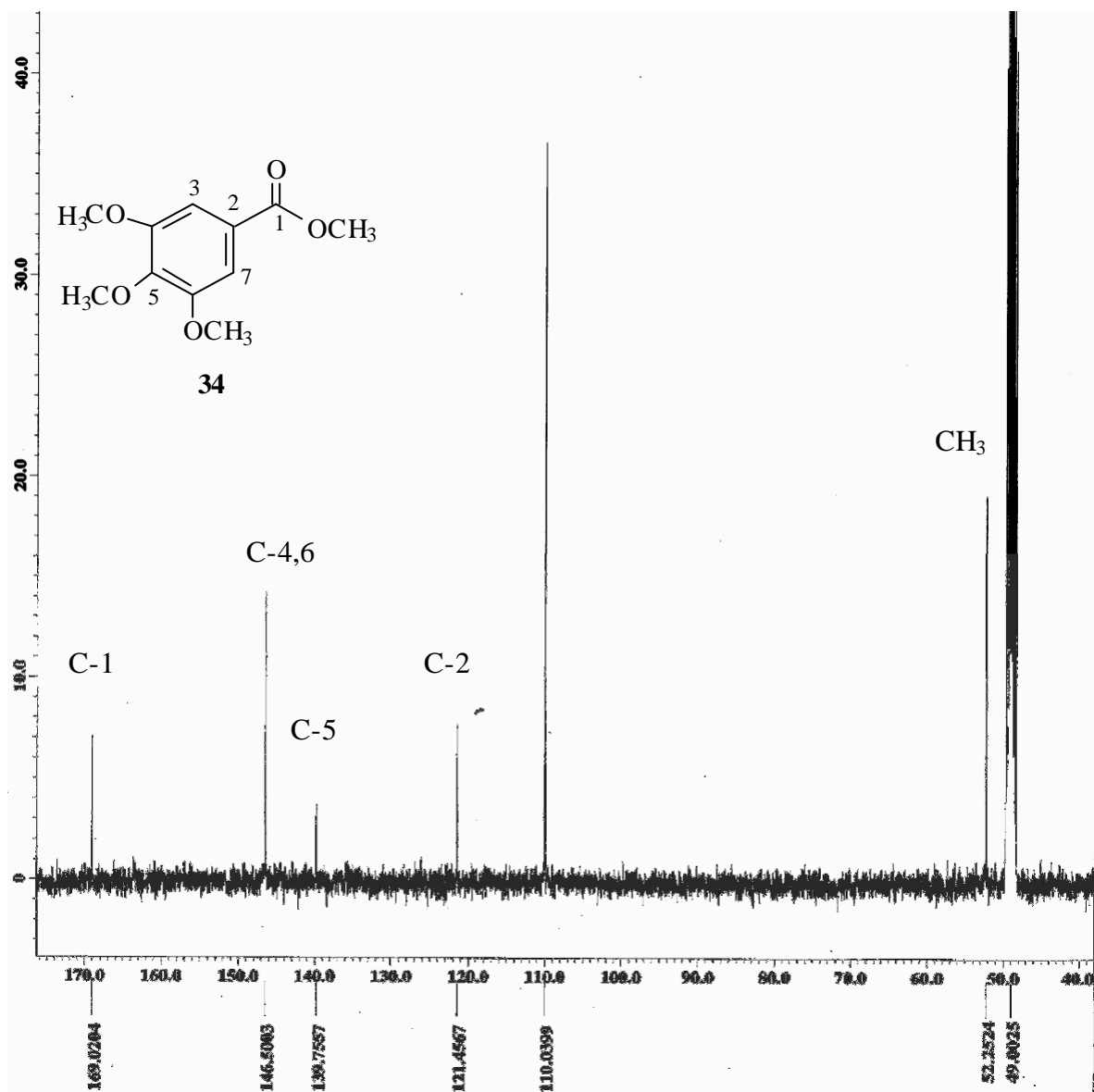


Figura III.4.37. Espectro de RMN ¹³C (400 MHz, Metanol-D₄) de 34 (ácido gálico metilado).

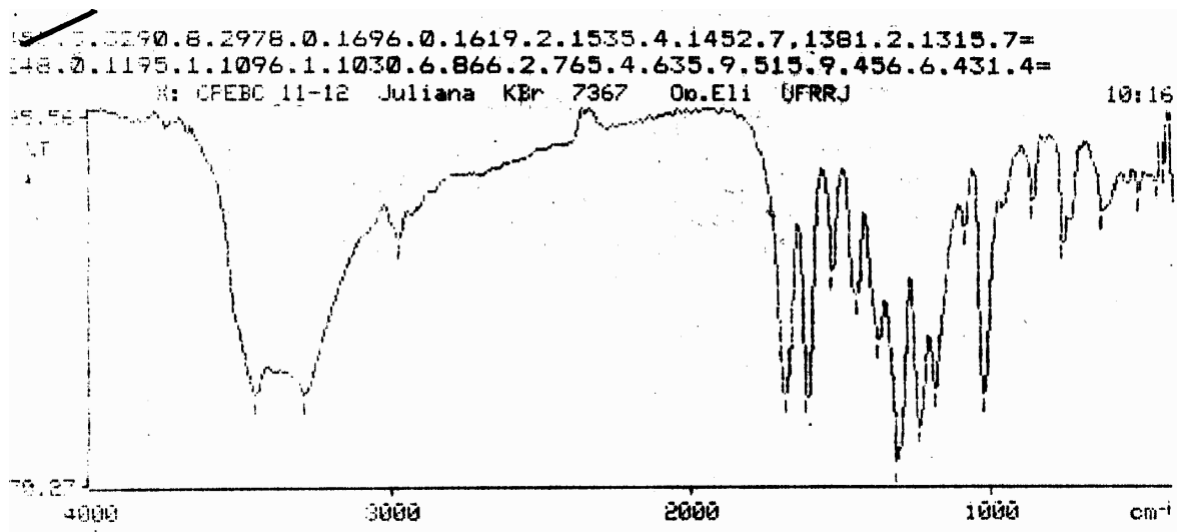


Figura III.38. Espectro de IV de 35 (galato de etila).

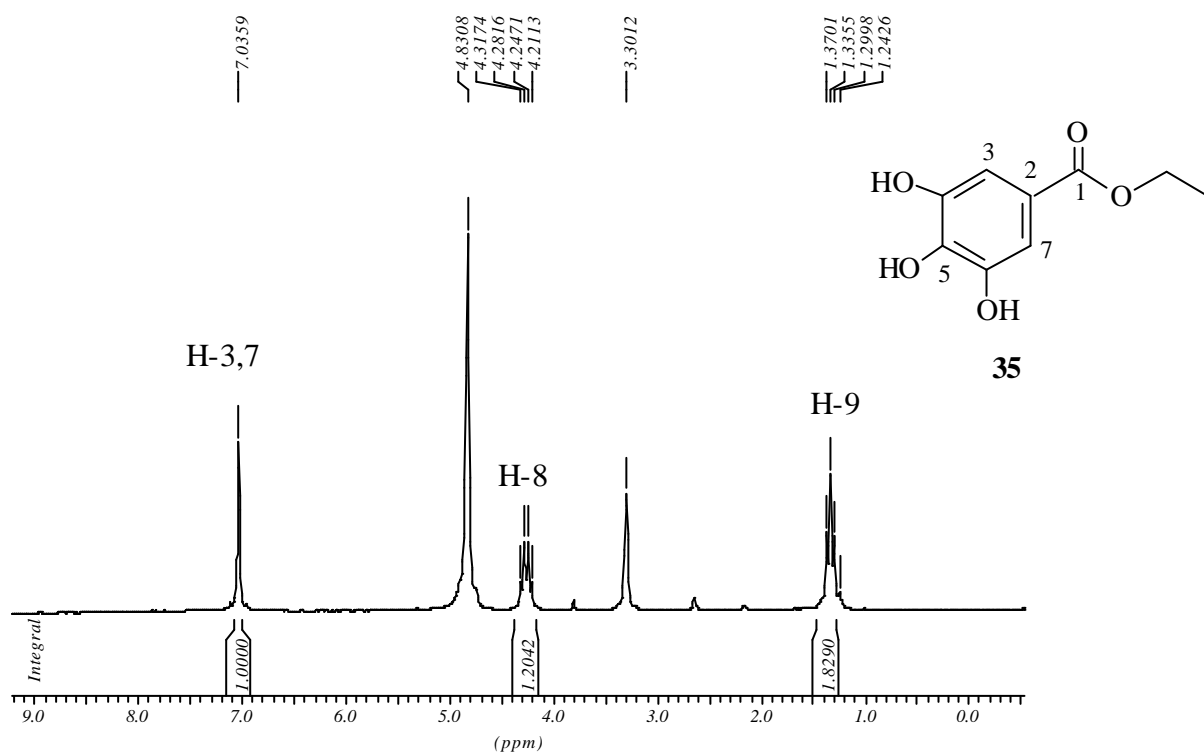


Figura III.439. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, Metanol- D_4) de 35 (galato de etila).

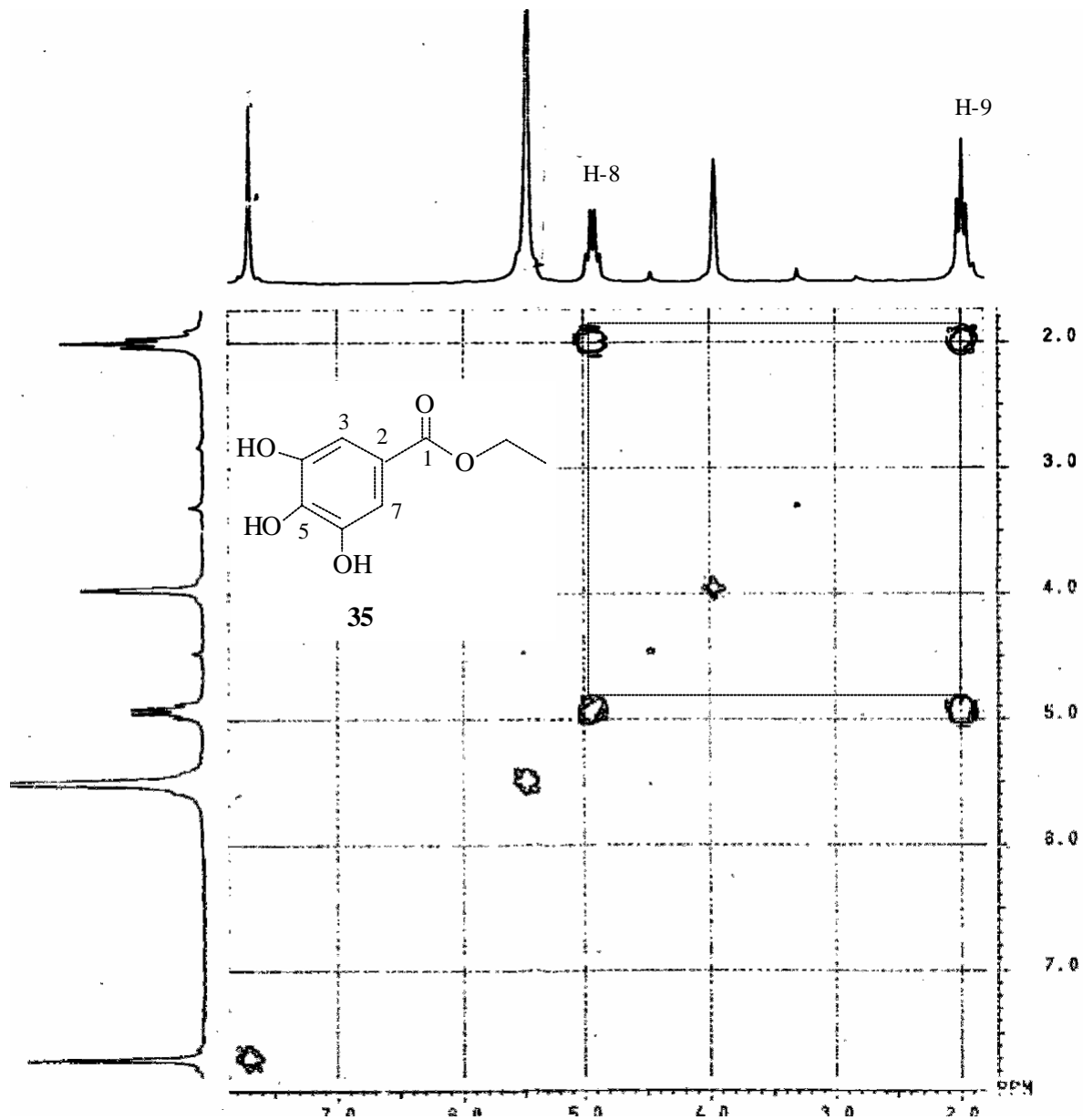


Figura III.4.40. Espectro de COSY ^1H - ^1H (200 MHz, Metanol- D_4) de 35 (galato de etila).

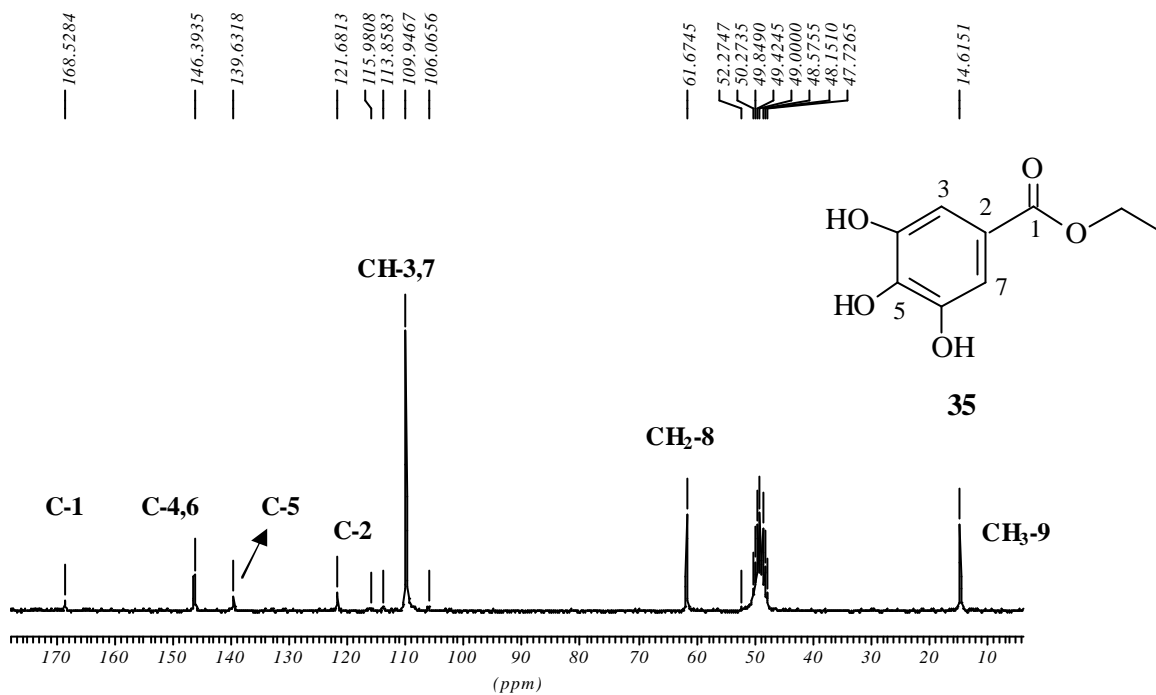


Figura III.4.41. Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, Metanol- D_4) de **35** (galato de etila).

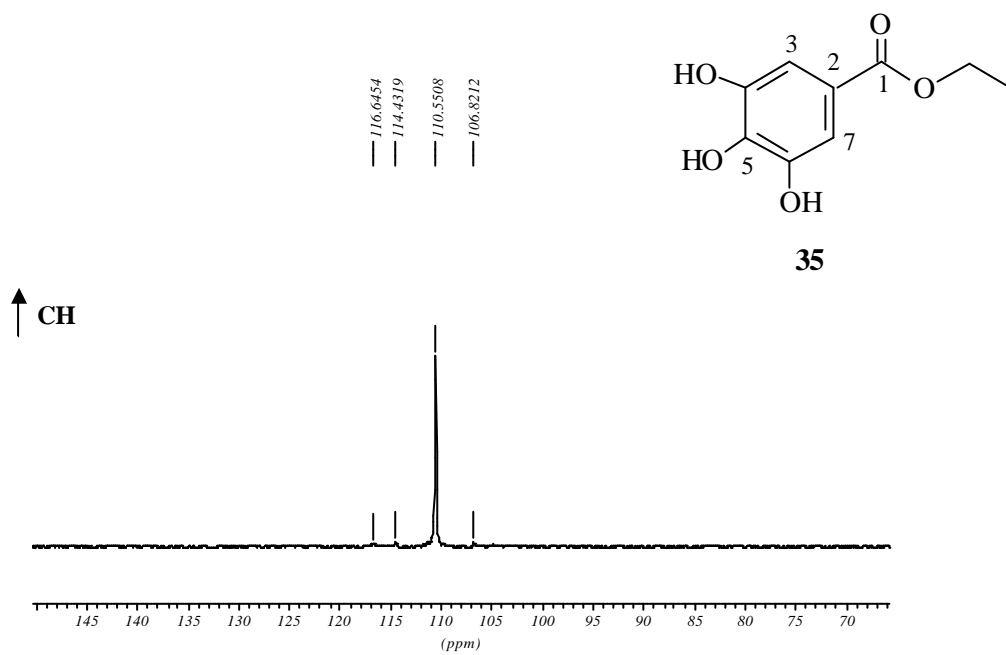
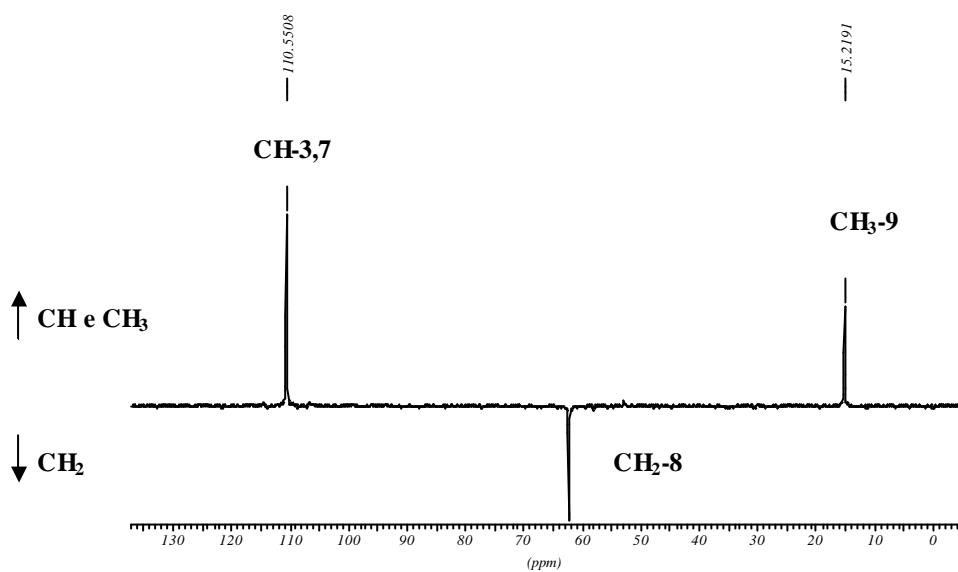


Figura III.4.42. Espectro de DEPT 90° e 135° (50 MHz, Metanol-D₄) de **35** (galato de etila).

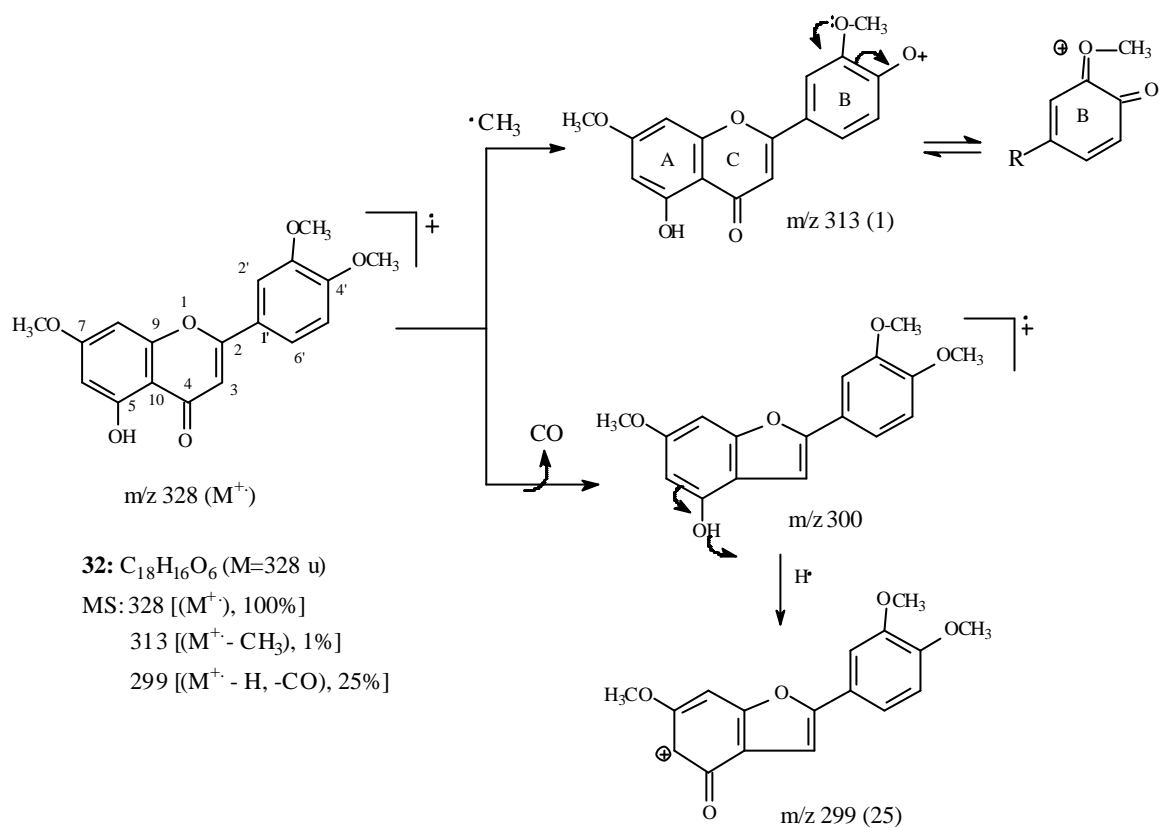
III-4.7. Flavonóide Luteolina (Substância 31)

Os espectros de IV de **31** e de seu derivado metilado **32** (Figura III.4.43, pág. 246 e Figura III.4.47, pág. 248) apresentam semelhanças nas bandas de absorção para o grupo hidroxila (3424 e 3324 cm^{-1} , estiramento de OH), grupamentos C=O (1657 e 1658 cm^{-1}) de carbonila conjugada, C=C (1610 e 1608 cm^{-1} , 1512 e 1505 cm^{-1} , 1449 e 1442 cm^{-1}) de anel aromático. Os espectros de RMN ^1H (Figura II.4.44, pág. 246), COSY- ^1H - ^1H (Figura III.4.46, pág. 247) de **31** demonstram sinais típicos de flavonóide, com o sinal em $13,03$ ppm para o hidrogênio do grupo OH em ponte de hidrogênio. Os singletos em δ_{H} $6,24$, $6,52$ e $6,58$ são referentes aos H-3, 6 e 8, respectivamente, dos anéis A e C. O anel B apresenta δ_{H} $7,49$ (*sl*) do H-2', sinais de H-5' com δ $7,00$ (*d*, $7,8$ Hz) e H-6' com δ $7,48$ (*d*, $7,8$ Hz). O espectro de COSY- ^1H - ^1H apresenta sinais de acoplamento *meta* entre os sinais $\delta_{\text{H-6}}$ $6,52$ (*sl*) com $\delta_{\text{H-8}}$ $6,58$ (*sl*) e acoplamento *orto* envolvendo os sinais $\delta_{\text{H-5'}}$ $7,00$ (*d*, $7,8$ Hz) com $\delta_{\text{H-6'}}$ $7,48$ (*d*, $7,8$ Hz). Com a adição de D_2O na amostra ocorre o desaparecimento do sinal em $13,03$ ppm, devido à troca de H por deutério (Figura III.4.45, pág. 247). O espectro de RMN de ^1H (Figura III.4.49, pág. 249) do derivado metilado (**32**) revela de três metoxilas com δ_{H} em $3,86$, $3,94$ e $3,96$, além dos sinais dos hidrogênios aromáticos com melhor resolução. Os picos 328 [(M⁺), 100%], 313 [(M - CH₃), 1%] e 299 [(M - CO - H), 25%], detectados no espectro de massas deste produto (Figura III.4.48, pág. 248: Esquema III.10, pág. 245) serviu para confirmar a estrutura proposta para a flavona natural. Os dados de RMN ^1H (HARBORNE, 1993) foram comparados com os da luteolina e de seu derivado 7, 3', 4' trimetil luteolina (DEVI *et al.*, 1979). A luteolina já havia sido isolada anteriormente da espécie *Caesalpinia gilliesii* (SUAREZ, *et al.*, 1984).

Tabela III.4.3. Dados de RMN ^1H do flavonóide luteolina (**31**) em Acetona- D_6 e do derivado 7, 3', 4' trimetil luteolina (**32**) em CDCl_3 .

H	31 ^a (Acetona- D_6) d_{H} (mult., Hz)	32 d_{H} (mult., Hz)	31 (HARBORNE, 1993) d_{H} (DMSO- D_6 , mult., Hz)
3	$6,24$ (<i>s</i>)	$6,57$ (<i>s</i>)	$6,69$ (<i>s</i>)
6	$6,52$ (<i>s</i>)	$6,36$ (<i>s</i>)	$6,22$ (<i>d</i> , 2,1)
8	$6,58$ (<i>s</i>)	$6,48$ (<i>s</i>)	$6,47$ (<i>d</i> , 2,1)
2'	$7,49$ (<i>sl</i>)	$7,32$ (<i>sl</i>)	$7,43$ (<i>d</i> , 2,1)
5'	$7,00$ (<i>d</i> , 7,8)	$6,95$ (<i>d</i> , 8,48)	$6,92$ (<i>d</i> , 9,0)
6'	$7,48$ (<i>d</i> , 7,8)	$7,50$ (<i>d</i> , 8,0)	$7,44$ (<i>dd</i> , 2,1; 9,0)
OH-5	$13,03$ (<i>s</i>)	$12,77$ (<i>s</i>)	-
CH₃-7		$3,86$ (<i>s</i>)*	
CH₃-3',4'		$3,94/3,96$ (<i>s</i>)*	

^aO espectro de COSY- ^1H - ^1H foi usado nas atribuições. *Os valores podem ser invertidos.



Esquema III.10. Mecanismo de fragmentação proposto para justificar os picos detectados no espectro de massas de **32** (7, 3', 4' trimetil luteolina).

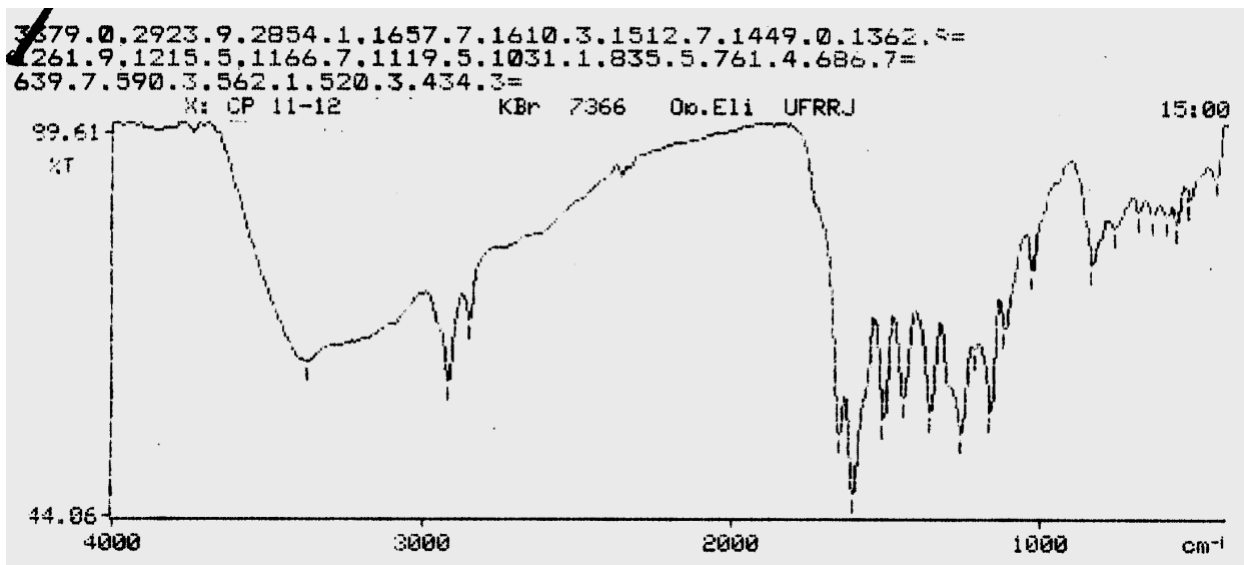


Figura III.4.43. Espectro IV de 31 (luteolina).

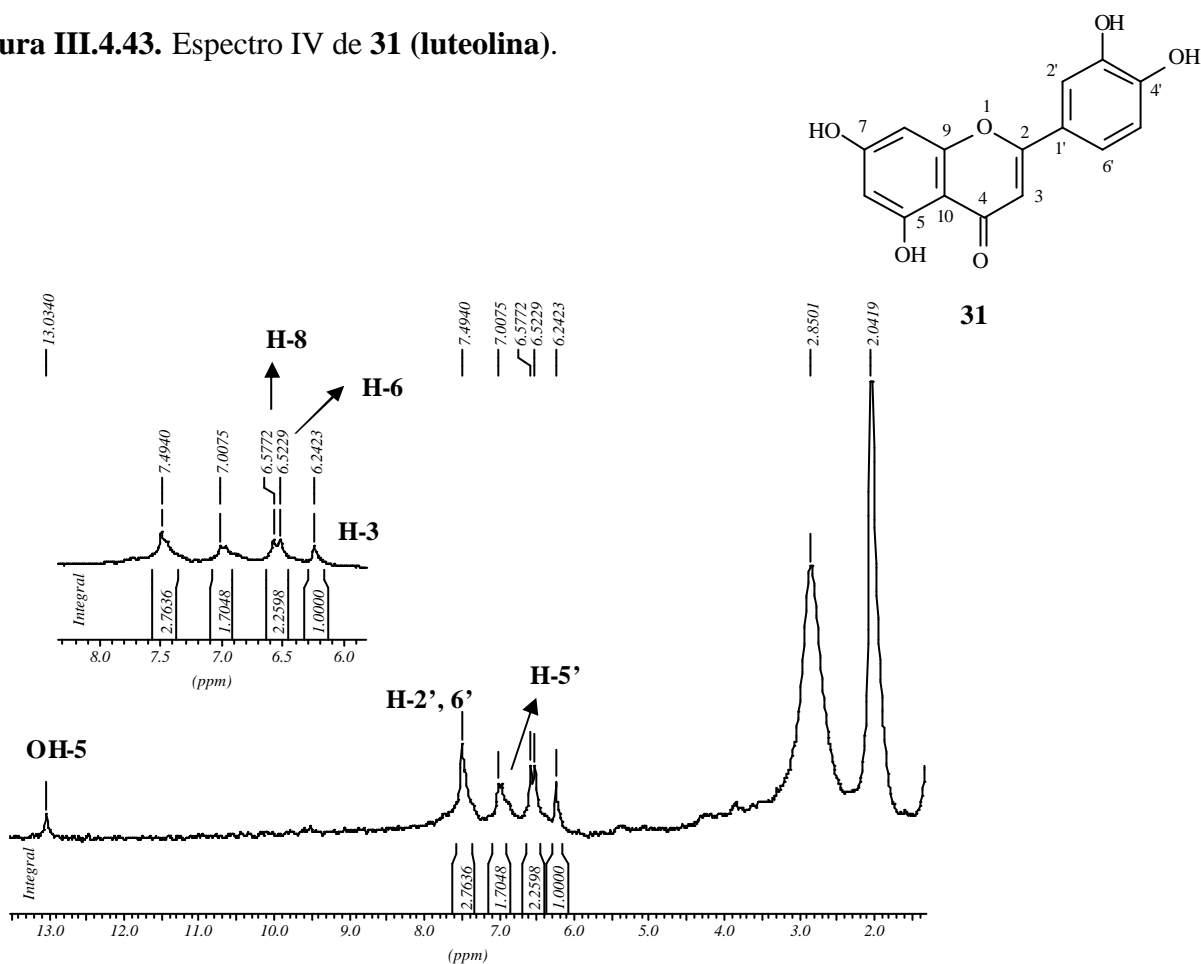


Figura III.4.44. Espectro de RMN ¹H (200 MHz, Acetona-D₆) de 31 (luteolina).

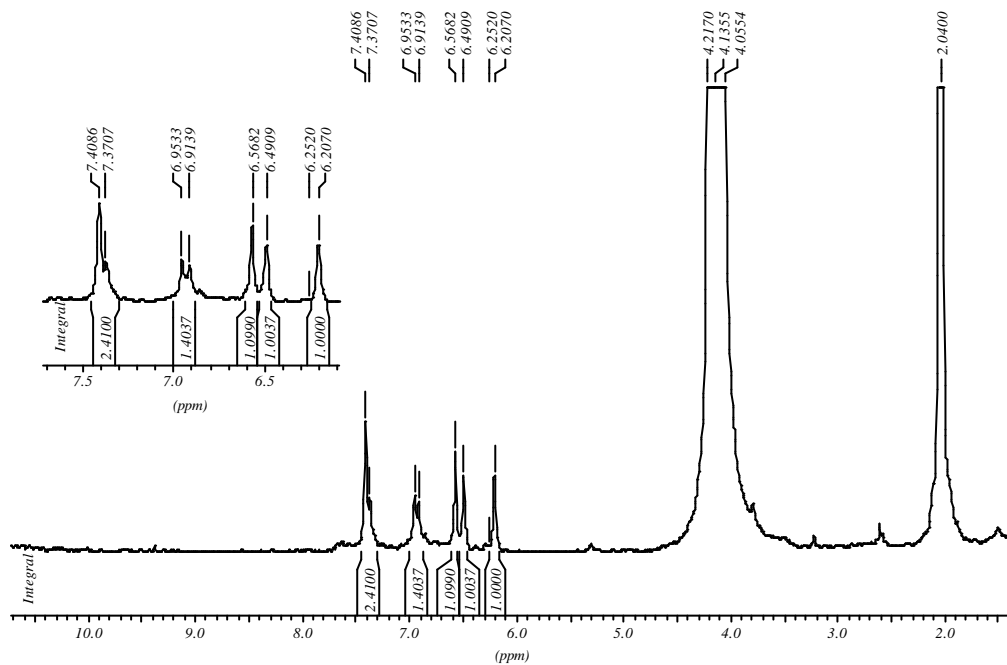


Figura III.4.45. Espectro de RMN ^1H com D_2O (200 MHz, Acetona- D_6) de **31** (luteolina).

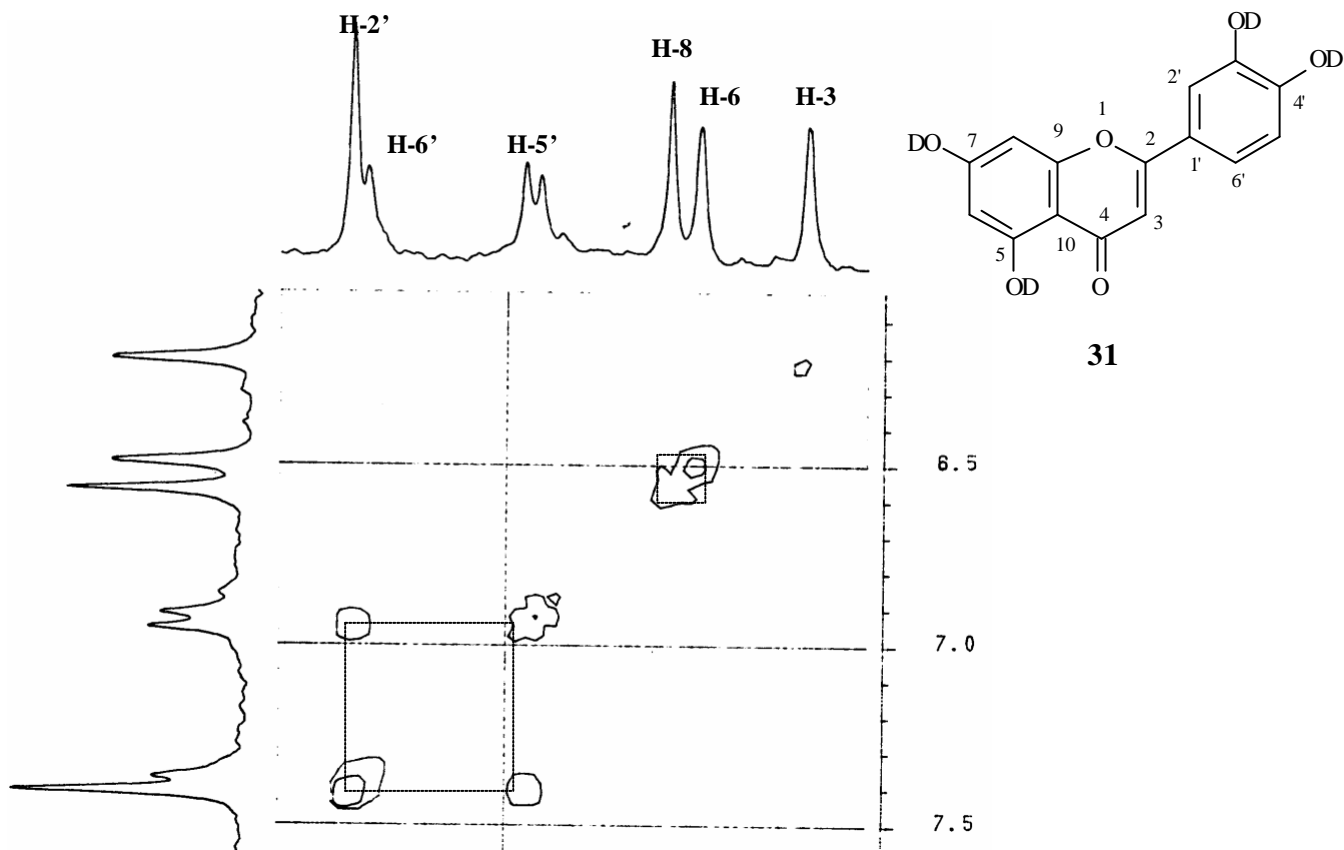


Figura III.4.46. Espectro de COSY ^1H - ^1H com D_2O (200 MHz, Acetona- D_6) de **31** (luteolina).

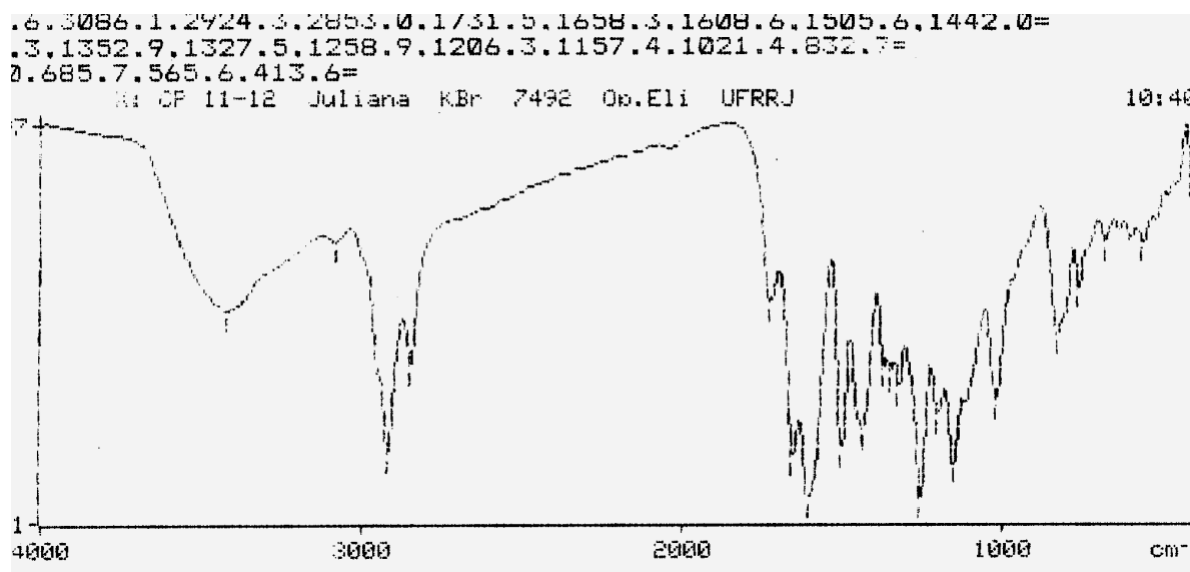
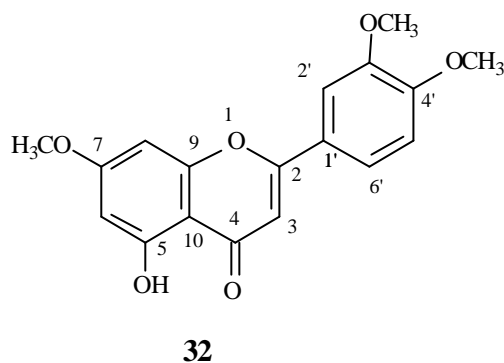


Figura III.4.47. Espectro de IV de 32 (7, 3', 4' trimetil luteolina).



Scan # : (2878 - 2900) B.G. Scan # : 2946
 Mass Peak # : 199 Ret. Time : (27.975 - 28.158)
 Base Peak : 328.05 (641419)

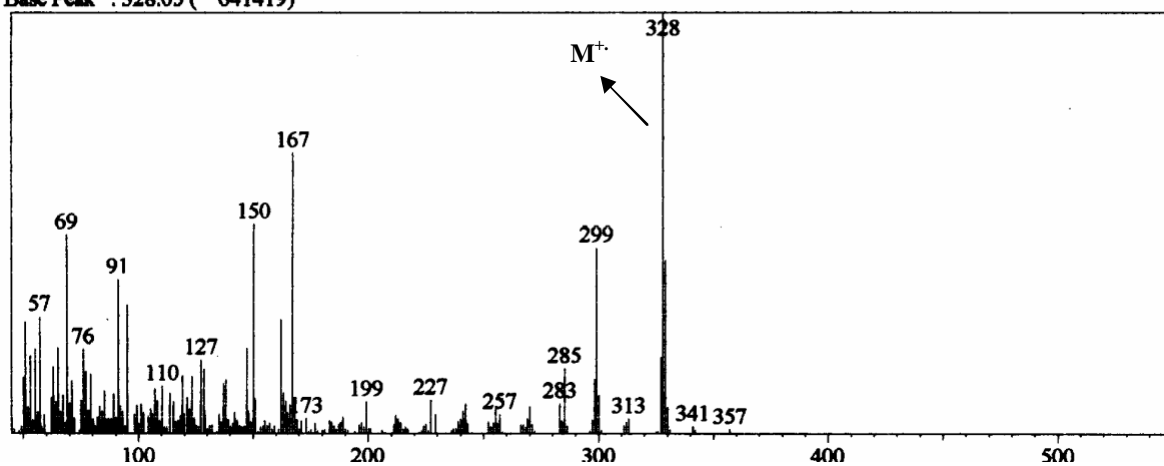


Figura III.4.48. Espectro de massas do flavonóide 32 (7, 3', 4' trimetil luteolina).

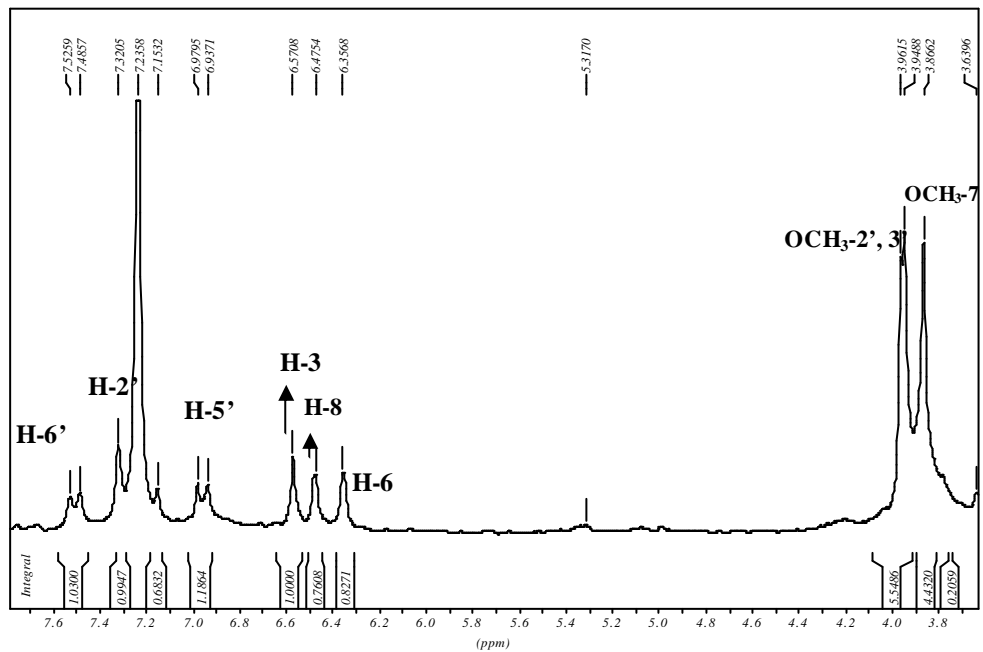
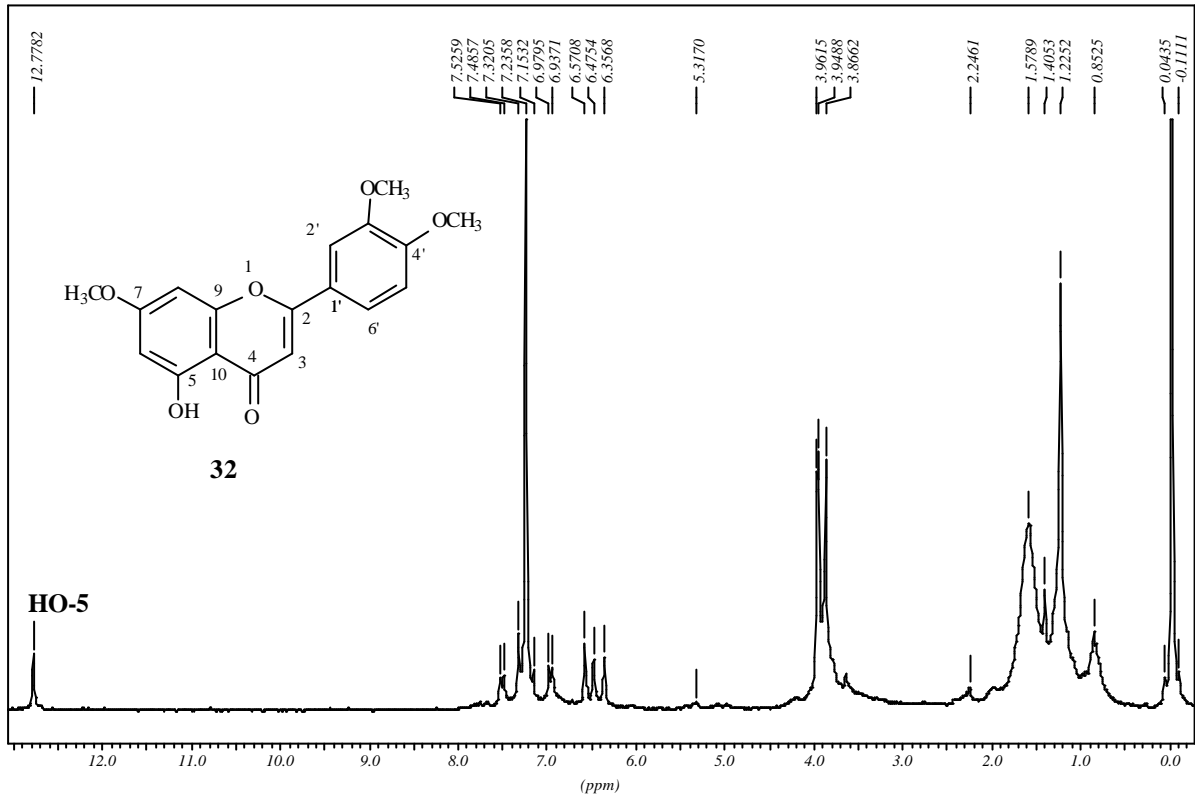
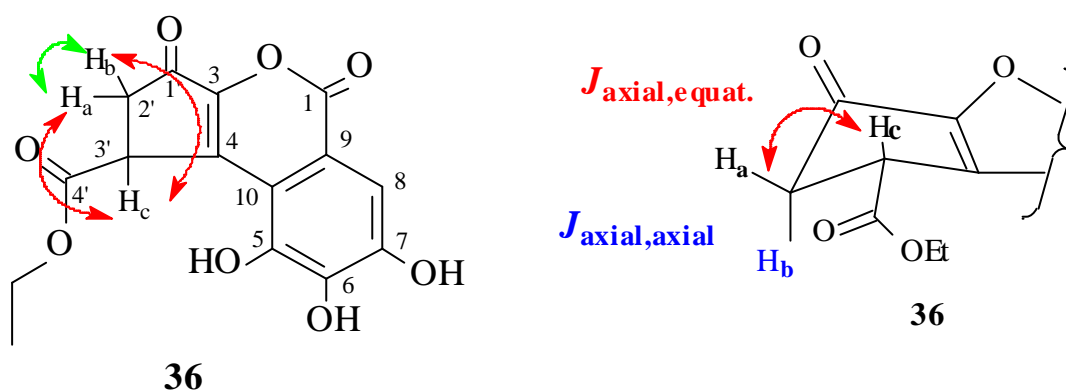


Figura III.4.49. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do flavonóide **32** (7, 3', 4' trimetil luteolina).

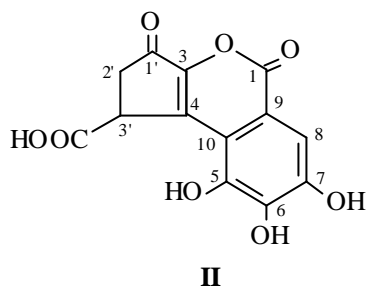
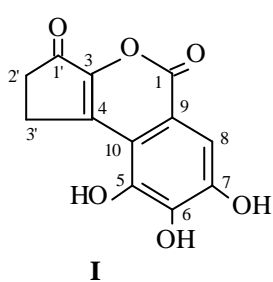
III-4.8. Brevifolato de etila (Substância 36)

O espectro de IV (Figura III.4.50, pág. 254) revela bandas de absorção para grupo hidroxila, $3453, 3228\text{ cm}^{-1}$ (estiramento O-H), $1736, 1695$ e 1667 cm^{-1} (estiramento de C=O de carbonila de éster e lactona α,β insaturada), $1599, 1526\text{ cm}^{-1}$ (estiramento de C=C) e $1391, 1329$ e 1280 cm^{-1} (estiramento C-O). Estes dados estão de acordo com substâncias fenólicas detectadas através de reveladores químicos em camada fina. O espectro de RMN ^1H (Figura III.4.51-53, pág. 255-257) apresenta um tripleto em $\delta_{\text{H}} 1,2$ ($J=7,7$; 3H) atribuído ao grupo metila, um quarteto em $\delta_{\text{H}} 4,08$ ($J=7,0$; 2H) para hidrogênios metilênicos de um grupo etoxila. Os sinais em $\delta_{\text{H}} 2,98$ com $J_{\text{ba}}=18,4$ (geminal), $J_{\text{bc}}=8,04$ (vicinal), $\delta_{\text{H}} 2,42$ com $J_{\text{ab}}=18,4$ (gem.), $J_{\text{ac}}=2,2$ (vic.) e em $\delta_{\text{H}} 4,41$ com $J_{\text{cb}}=8,0$ e $J_{\text{ca}}=2,2$ foram atribuídos a um sistema ABC correspondente aos hidrogênios H-2a', H-2b' e H-3' que estão acoplando entre si, conforme indicado na estrutura **36**. O hidrogênio aromático (H-8) aparece como singlete em $\delta 7,3$.



A análise do espectro de RMN ^{13}C e APT (Figura III.4.54, pág. 258) permitiu confirmar o grupo etoxila com os sinais em $\delta_{\text{C}} 13,9$ (CH₃) e $\delta_{\text{C}} 60,60$ (CH₂-O). O anel de 5 membros é representado pelos carbonos em $\delta 37,05$ (CH₂-2'), $\delta 40,73$ (CH-3') e a carbonila em $\delta 193,07$ (C-1'). A unidade aromática está representada pelos sinais em $108,07$ (CH-8), $112,9$ (C-9), $114,9$ (C-10), $138,55$ (C-3), $140,31$ (C-6), $143,7$ (C-5), $145,8$ (C-4), $149,7$ (C-7), $160,17$ (C-1) e $172,04$ (C-4') presentes no espectro de RMN ^{13}C cuja análise comparativa com o espectro de APT permitiu identificar suas respectivas multiplicidades. A análise dos espectros de HMQC ($^1J_{\text{CH}}$) e HMBC ($^2,^3J_{\text{CH}}$) (Figuras III.4.55-58, pág. 259-262) permitiu confirmar a estrutura proposta **36**. A comparação dos dados de **36** com valores da literatura

(PARVEEN, *et al.*, 1988; GOTTLIEB, *et al.*, 1991) (Tabela III.4.4, pág. 253) para o brevifolato de etila confirmam a proposta estrutural. A brevifolina (modelo **I**) e o ácido brevifolínico (modelo **II**) já haviam sido isolados da espécie *Caesalpinia brevifolia* (SCHMITH & BENAUER, 1954; SCHMITH *et al.*, 1967). Esta é a primeira vez que o brevifolato de etila é registrado no gênero *Caesalpinia*. A proposta da rota biossintética dessa substância está descrita no Esquema III.11, pág. 252. Este constituinte natural junto com outros constituintes fenólicos foram divulgados na literatura (DANIEL, *et al.*, 2004).



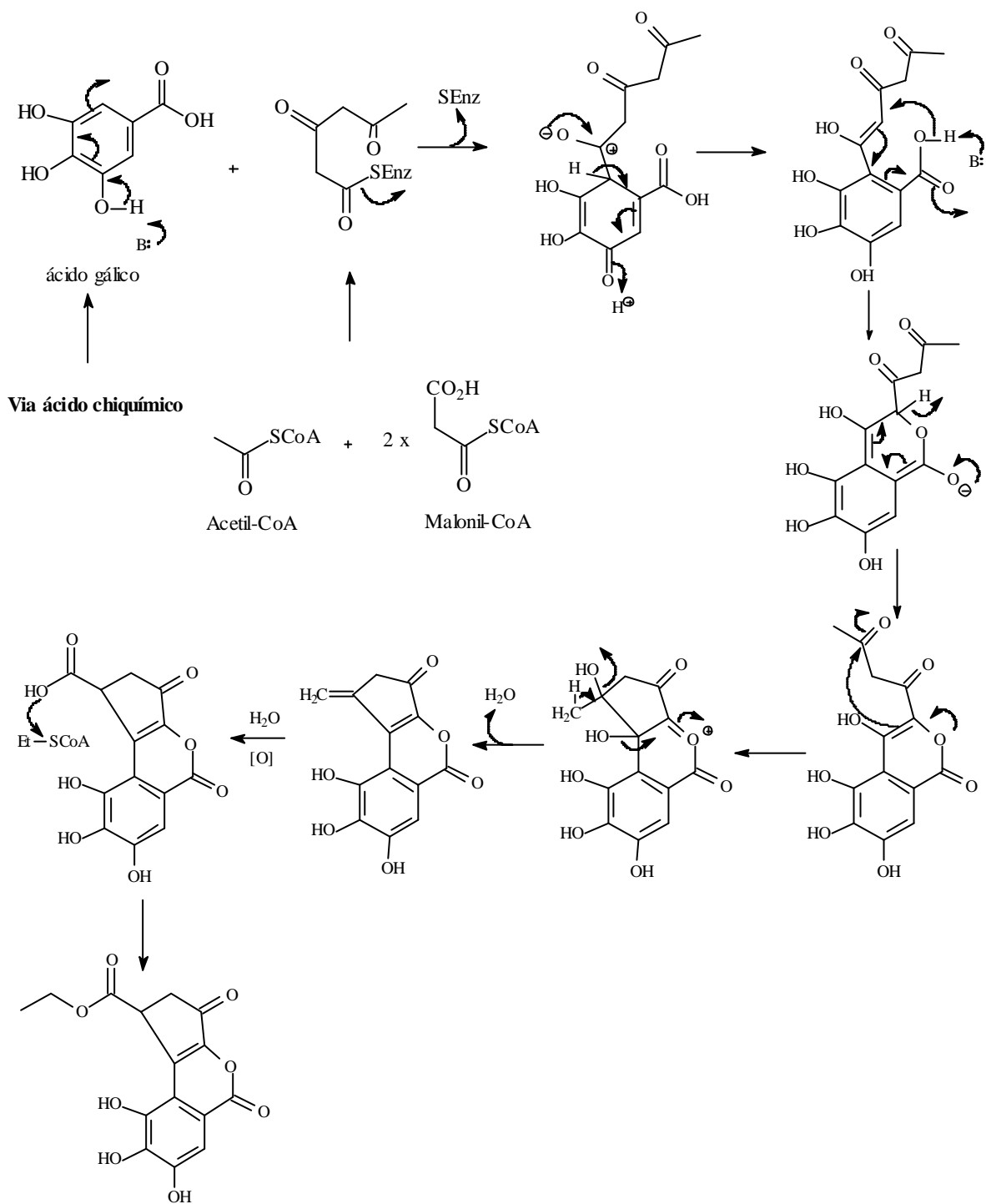


Tabela III.4.4. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (1D e 2D) do brevífolato de etila (**36**) em DMSO- D_6 .

36 ($^1\text{J}_{\text{CH}}$)			36 (HMBC - $^2,^3\text{J}_{\text{CH}}$)		Literatura (GOTTLIEB, <i>et al.</i>, 1991) em piridina-D_5	
C	d_C	d_H (mult., Hz)	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	d_C	d_H
1	160,2	-		H-8	161,41	-
3	138,6	-		H-3'	139,65	-
4	145,8	-	H-3'		147,10	-
5	143,7	-			145,88	-
6	140,3	-		H-8	142,40	-
7	149,7	-			151,43	-
8	108,1	7,3 (s)			109,08	7,91 (s)
9	112,9	-			114,57	-
10	114,9	-		H-8	116,33	-
1'	193,07	-	H-2'		193,18	-
2'	37,1	2,98 (dd; 18,4; 8,04) 2,42 (dd; 18,4; 2,2)	H-3'		38,04	3,19 (dd; 18,5; 8,0) 2,87 (dd; 18,5; 2,0)
3'	40,7	4,41 (dd; 8,0; 2,2)	H-2'		42,18	4,91 (dd; 8,0; 2,0)
4'	172,0	-	H-3'	H-2';CH ₂	172,98	-
CH ₂	60,6	4,08 (q; 7,0)	CH ₃		61,15	4,29 (dq; 11,0; 7,0) 4,20 (dq; 11,0; 7,0)
CH ₃	13,90	1,2 (t; 7,7)	CH ₂		14,18	1,12 (t; 7,0)

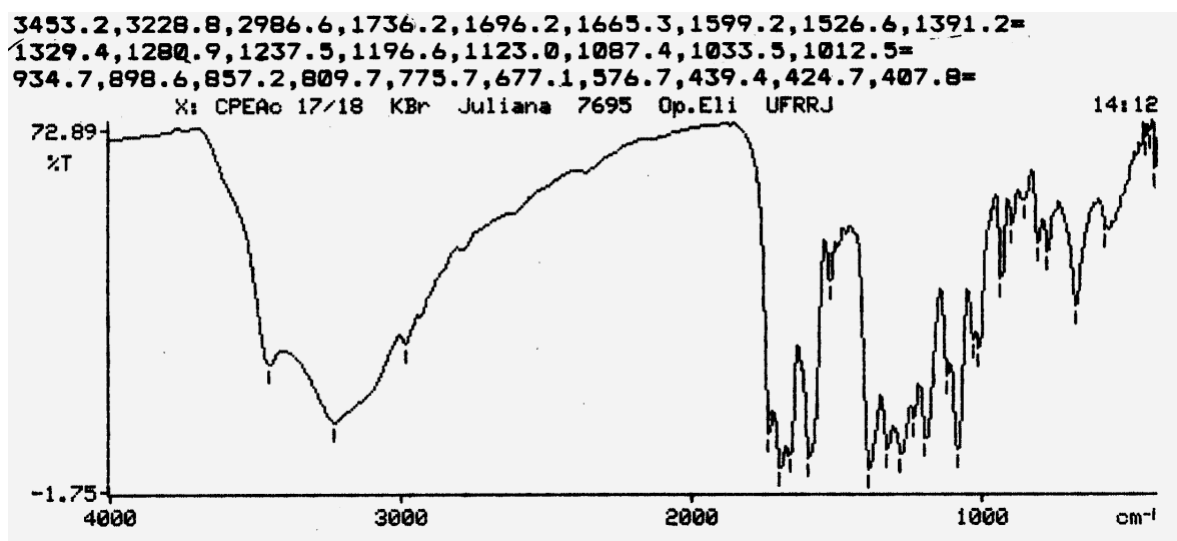
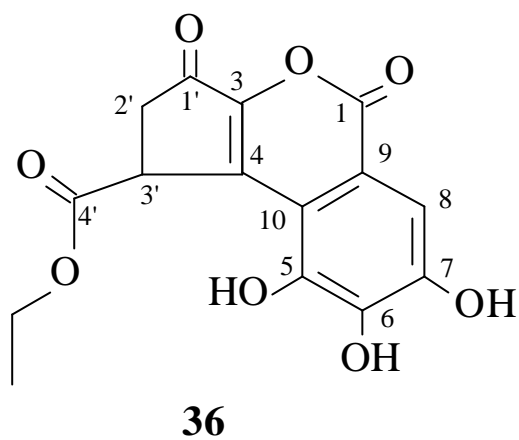


Figura III.4.50. Espectro de IV de 36 (brevifolato de etila).

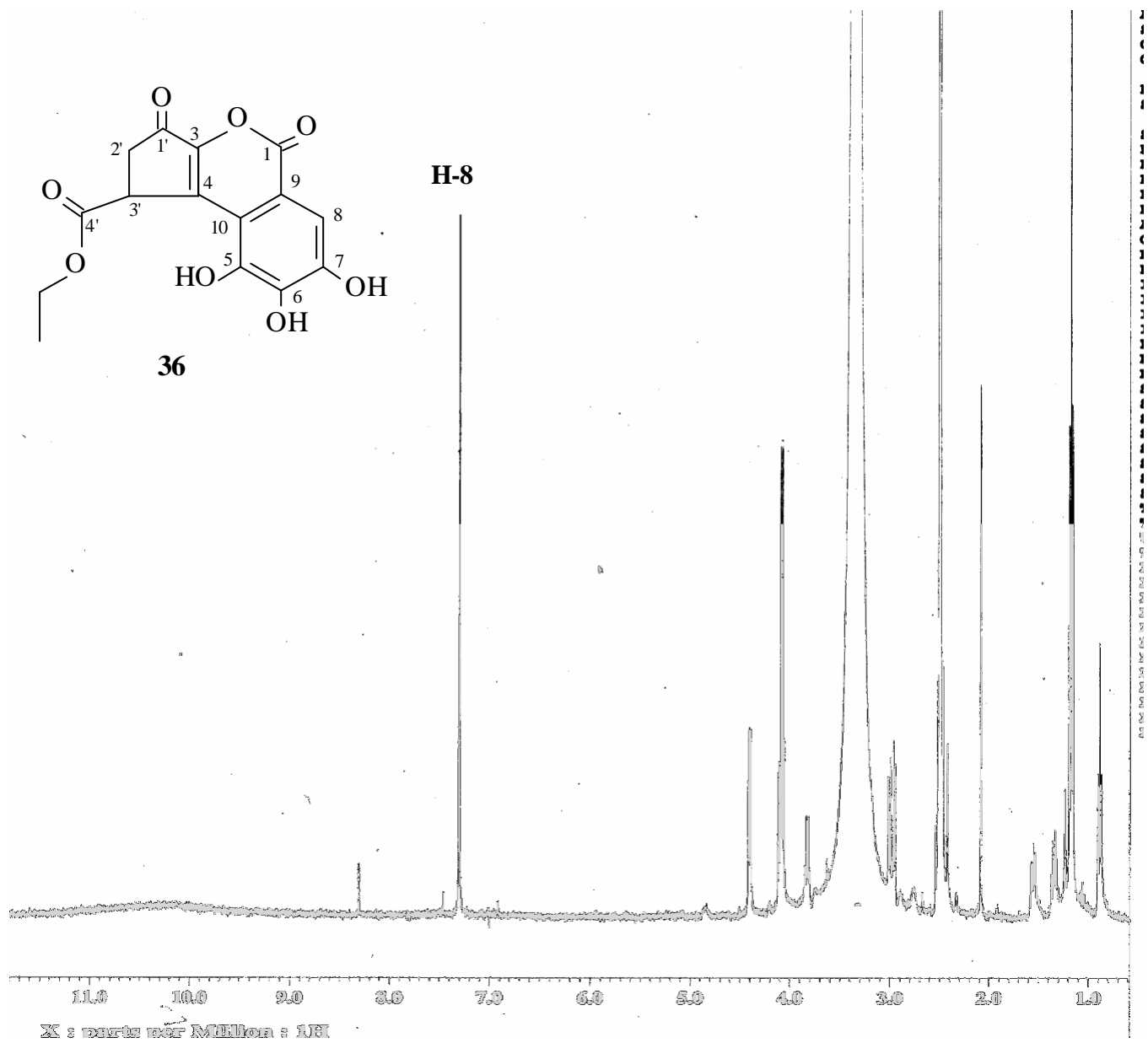


Figura III.4.51. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) de **36** (brevifolato de etila).

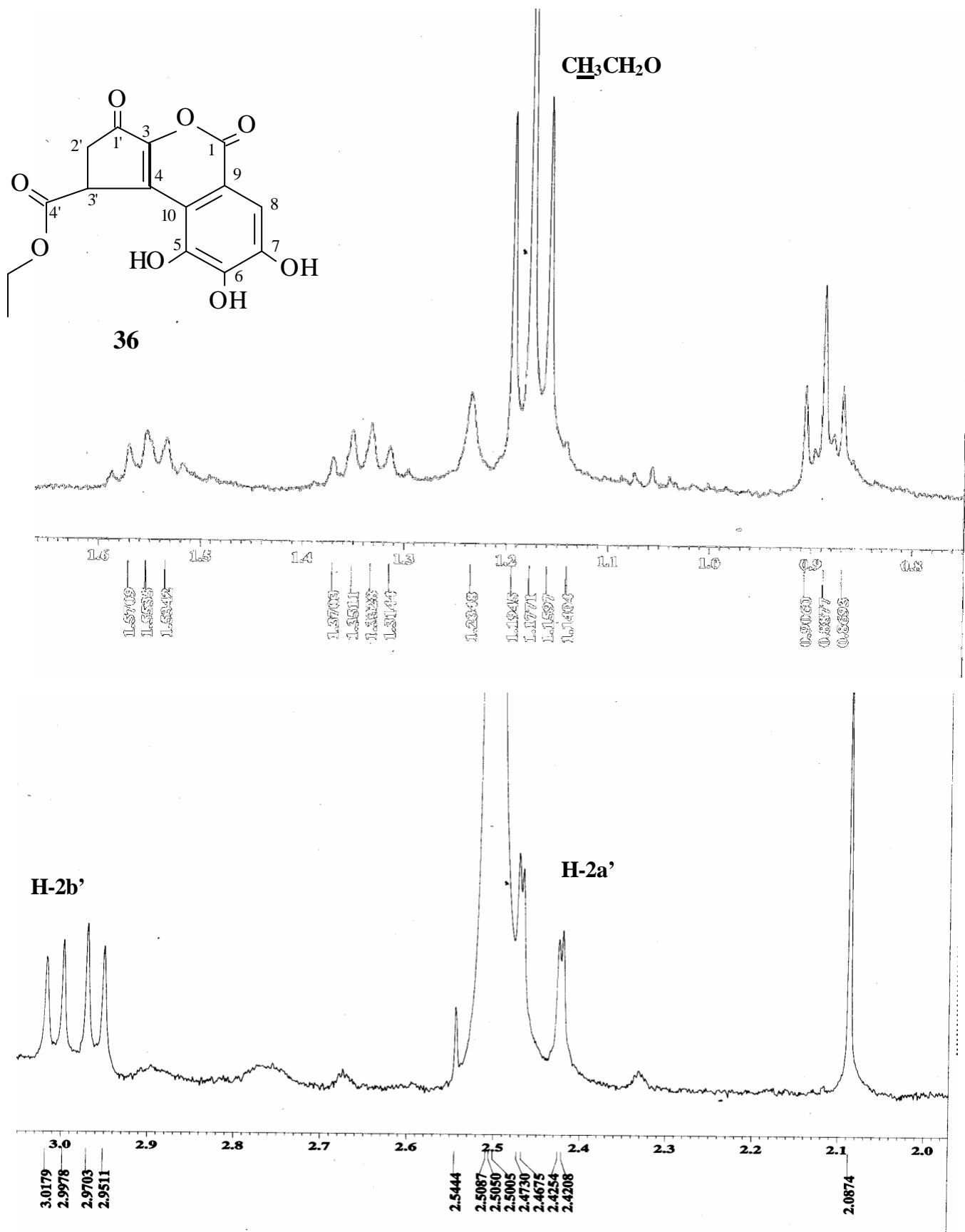


Figura III.4.52. Espectro de RMN ¹H ampliado (400 MHz, DMSO-D₆) de 36 (brevifolato de etila).

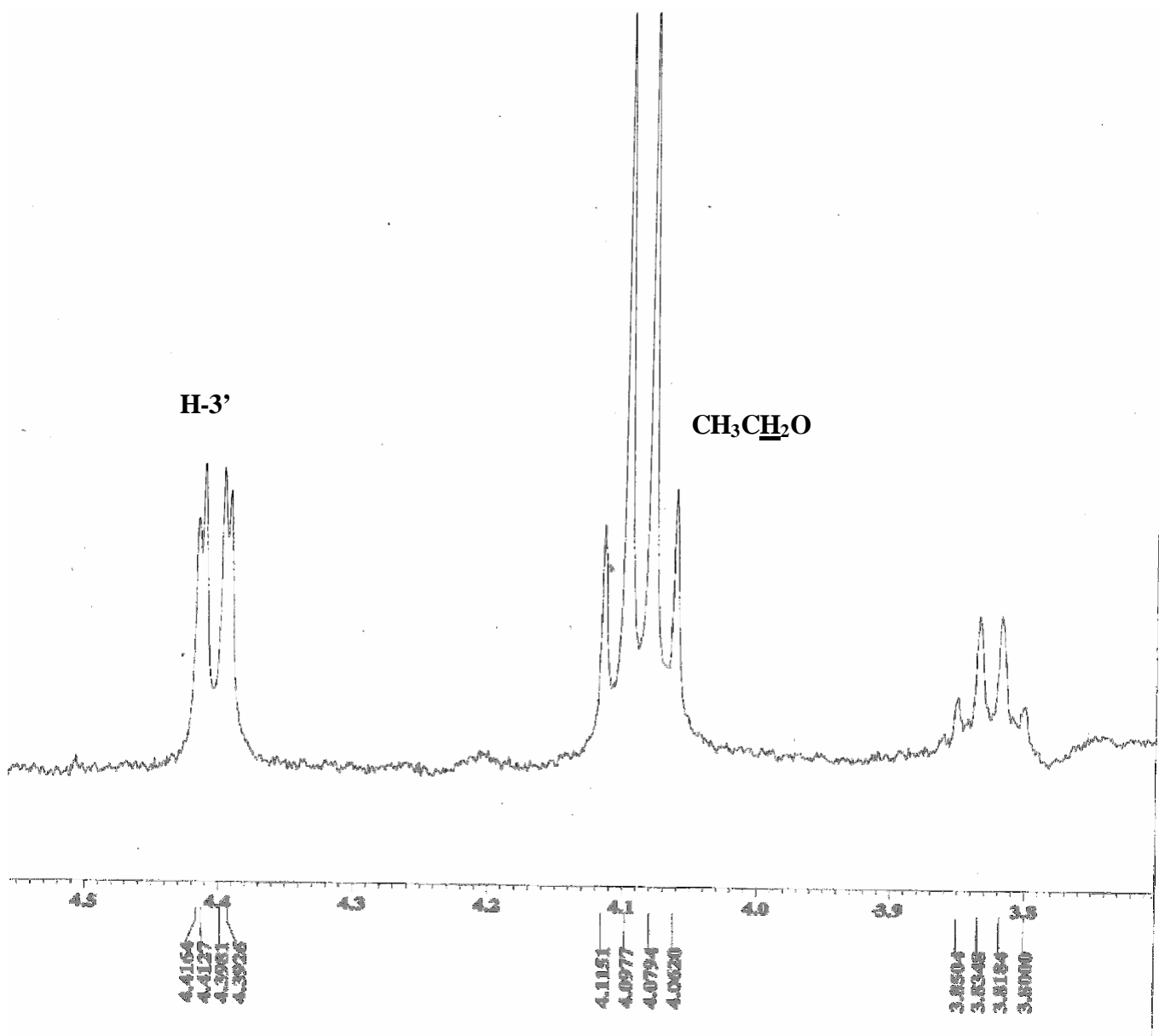


Figura III.4.53. Espectro de RMN ^1H ampliado (400 MHz, DMSO-D_6) de **36** (brevifolato de etila).

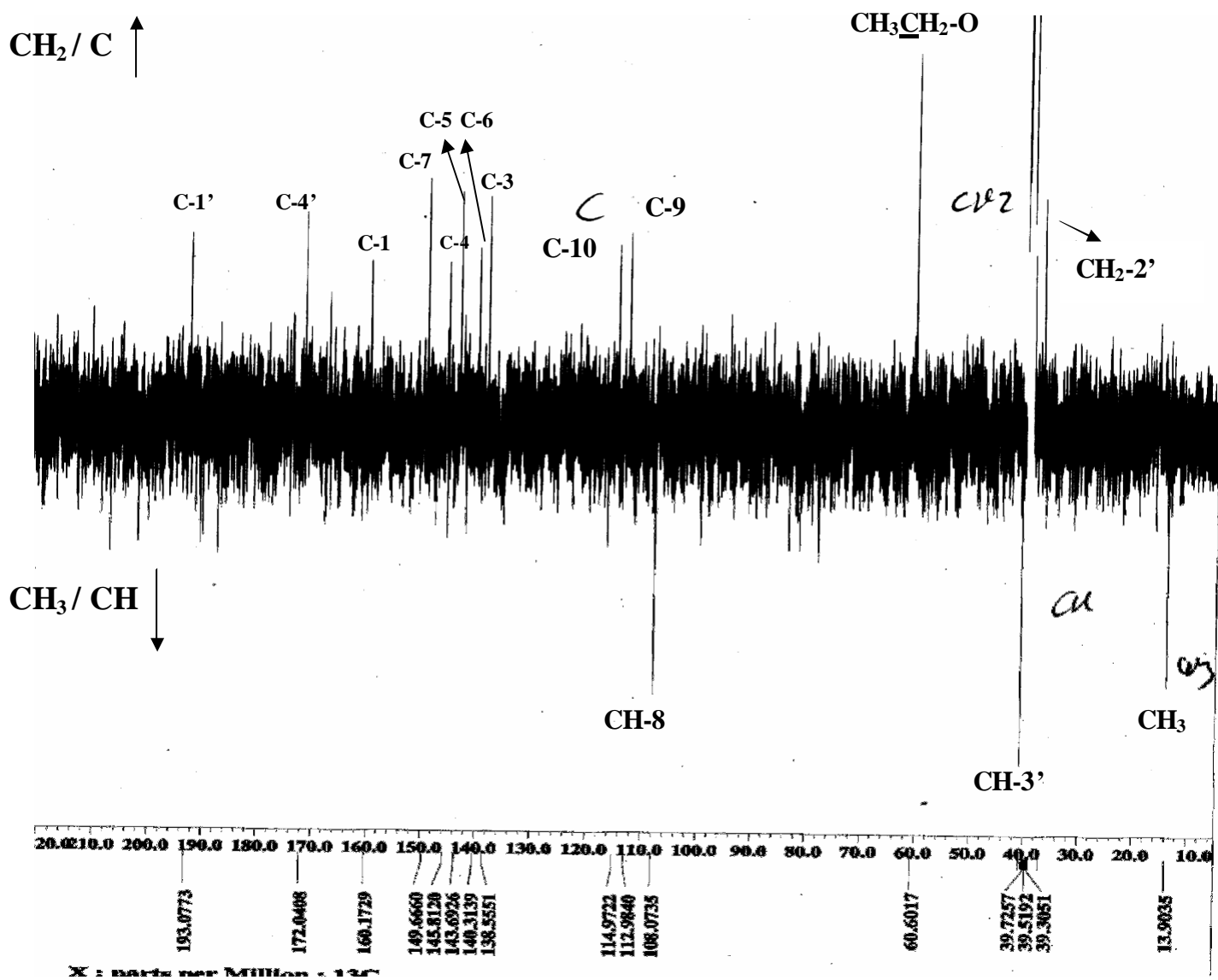
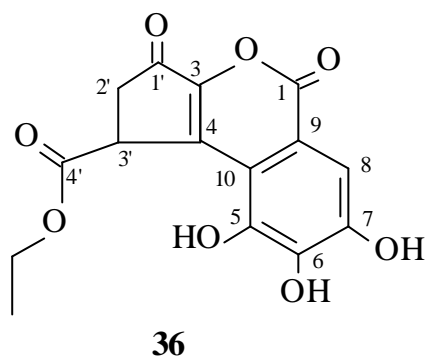


Figura III.4.54. Espectro de RMN ^{13}C e APT (100 MHz, DMSO- D_6) de 36 (brevifolato de etila).

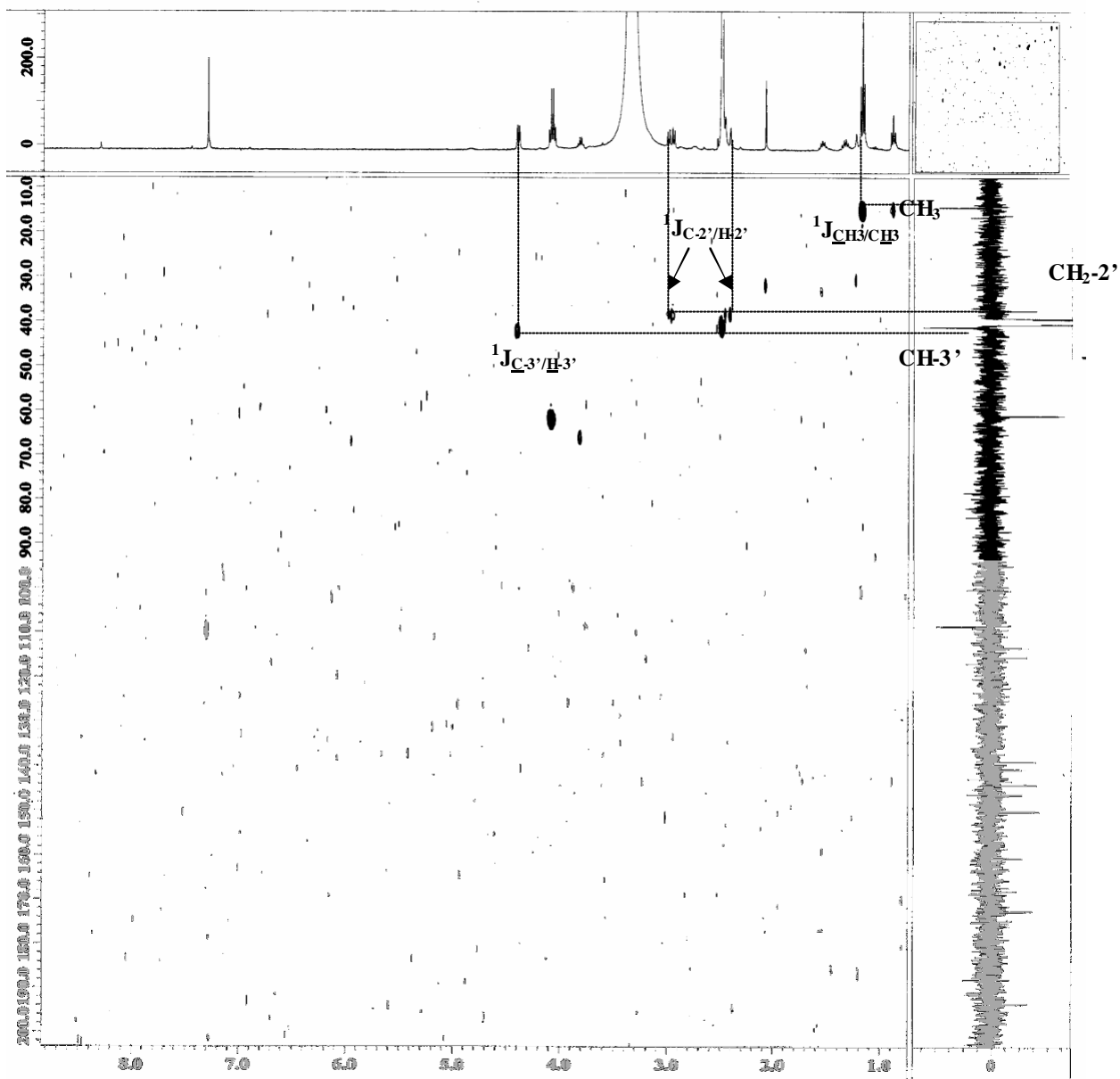


Figura III.4.55. Espectro de HMQC (400 MHz, DMSO- D_6) de 36 (brevifolato de etila).

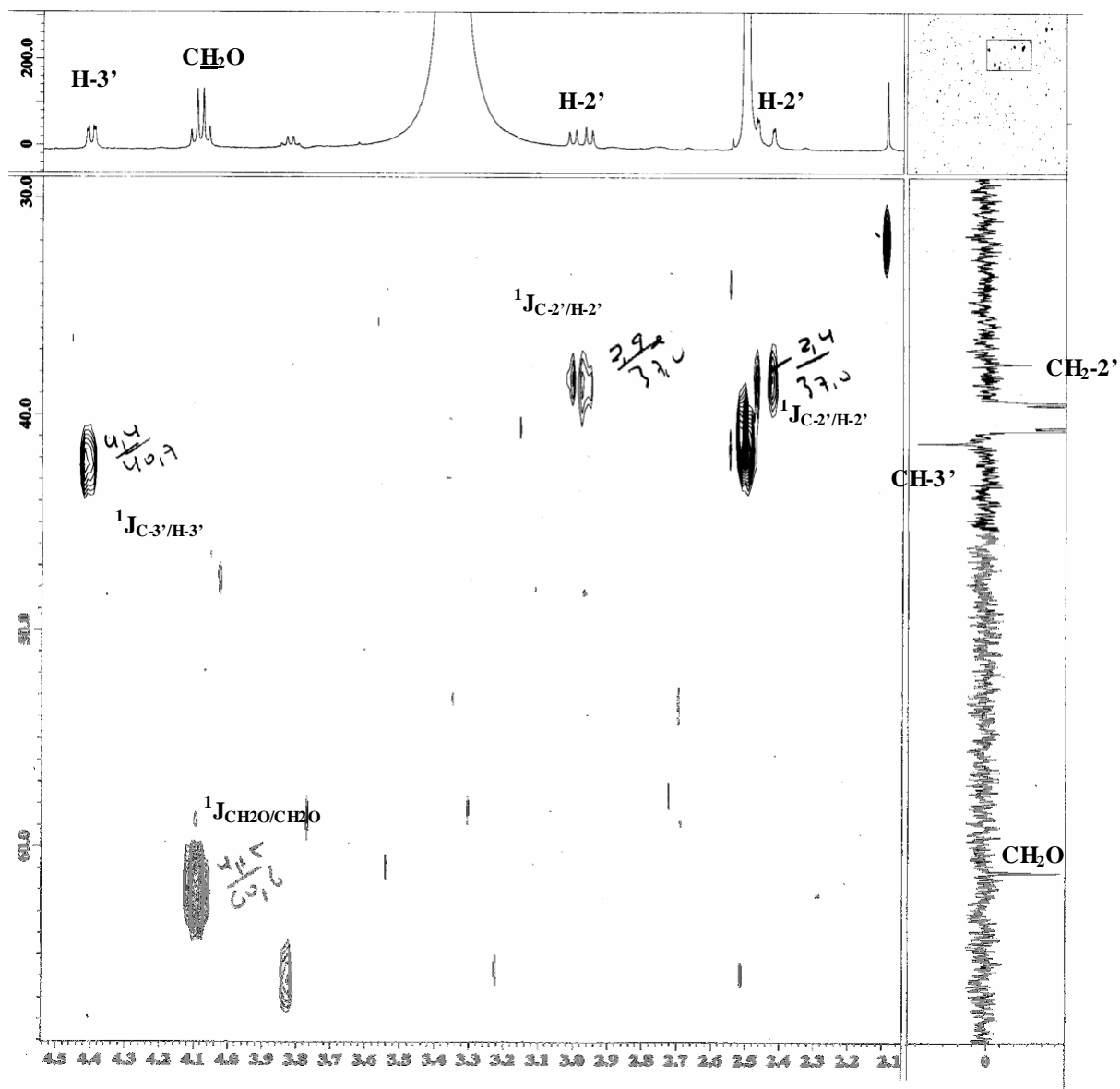


Figura III.4.56. Espectro de HMQC ampliado (400 MHz, DMSO-D₆) de 36 (brevifolato de etila).

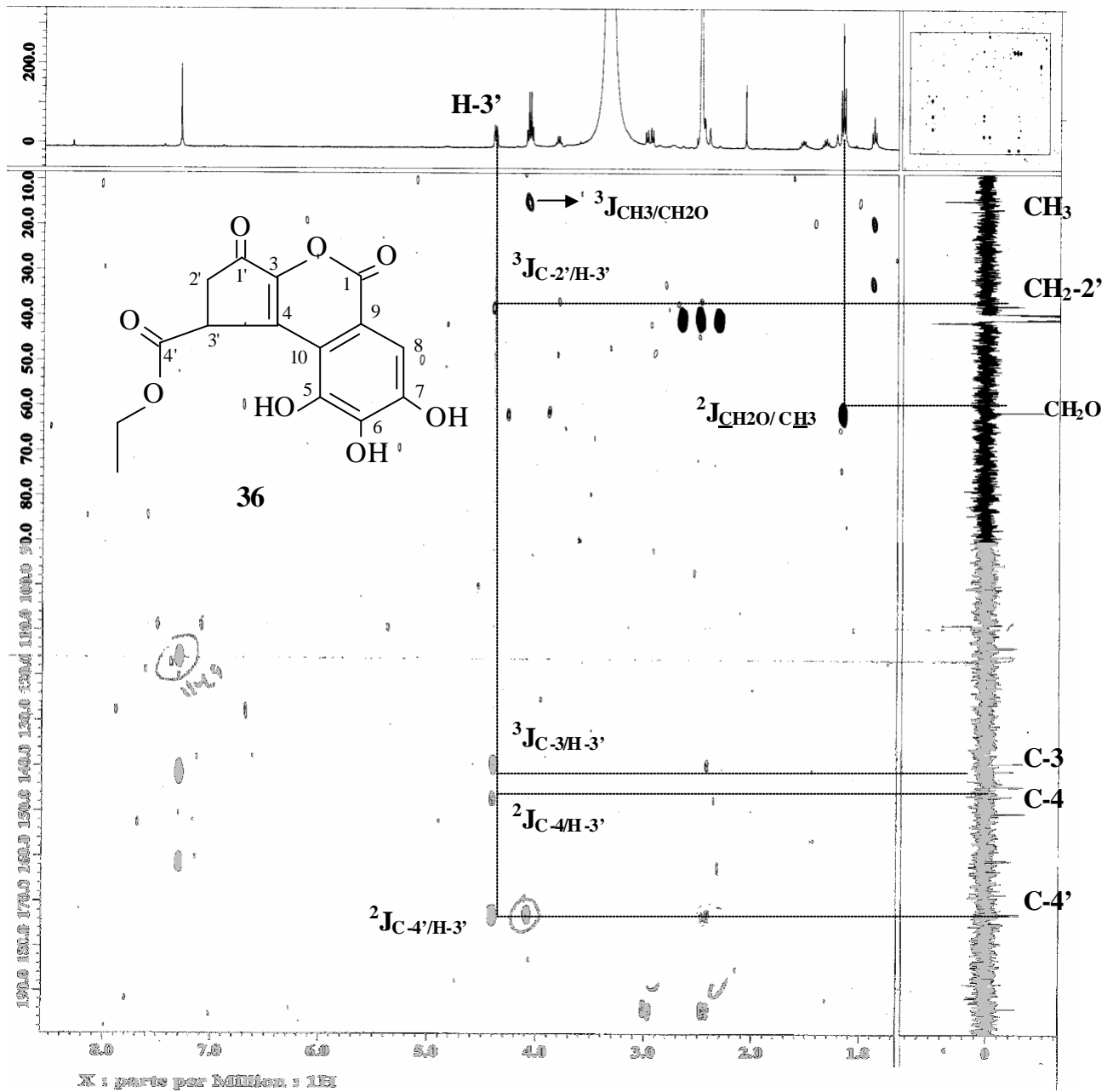


Figura III.4.57. Espectro de HMBC (400 MHz, DMSO-D₆) de 36 (brevifolato de etila).

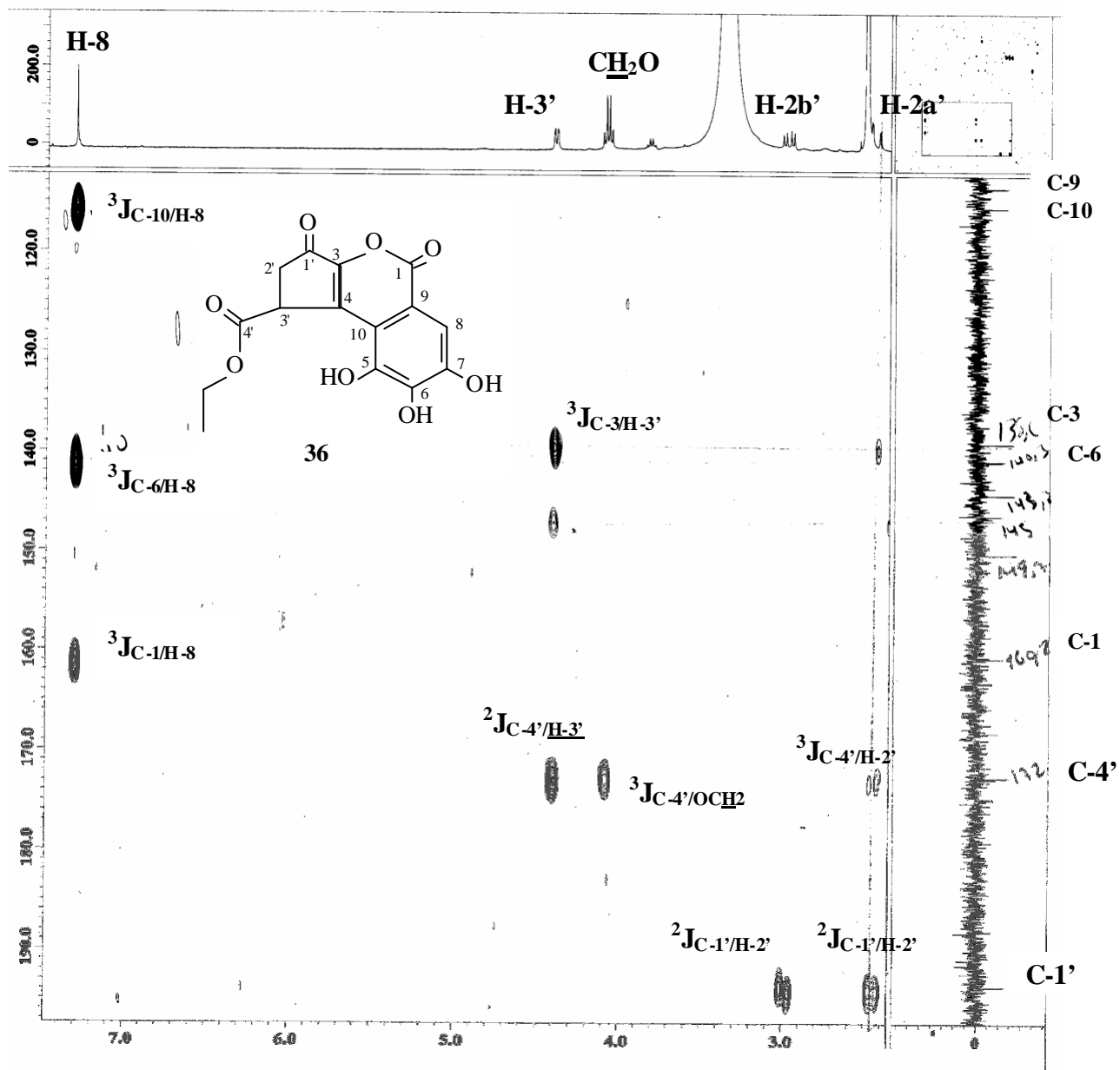


Figura III.4.58. Espectro de HMBC ampliado (400 MHz, DMSO-D₆) de **36** (brevifolato de etila).

III-5. Referências-Capítulo III

Al-YAHYA, M. A. Phytochemical and pharmacological studies on *Caesalpinia gilliesii*. *Fitoterapia*. **LIX** (6), 469-471, 1988.

AWASTHI, K.K.; KUMAR, A.; MISRA, K. Two ellagitannins from the stem bark of *Caesalpinia pulcherrima*. *Phytochem.*, 1995-1997, 1980.

BRUNETON, J.; Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. *Acribia*, 1^a ed, 1991.

CARVALHO, M. G. de; OLIVEIRA, M. C. C. DE; WERLE, A. A. Chemical Constituents from *Luxemburgia nobilis* (EICHL). *J. Braz. Chem. Soc.*, **11** (3), 232-236, 2000.

CHOI, S.Y.; MOON, C.K. Effects of Brazilin on the Altered Immune Functions in the Early phase of Halothane Intoxication of C57BL/6 Mice. *Planta Med.*, **63**, 400-404, 1997.

CHOI, S.Y.; YANG, K.M.; JEON, S.D. Brazilin modulates Immune Function Mainly by Augmenting T Cell Activity in Halothane Administered Mice. *Planta Med.*, **63**, 405-408, 1997.

CORRÊA, M.P.; Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. *Empresa Gráfica Gutenberg Ltda*, Rio de Janeiro, 1978.

CRONQUIST, A.; An Integrated System of Classification of Flowering Plants. *Columbia University Press*, New York, 1981.

DANIEL, J.F. de S.; CARVALHO, M. G. de; FERREIRA, D. T.; SCHMITZ, W.; SARIDAKIS, H. O. Phenolic compounds and hydroxymethylfurfural from the flowers of *Caesalpinia peltophoroides* and their antibacterial activity. *Revis. Latinoamer. Quím.*, **31**(4), 25-29, 2004.

DEVI, G.; KAPIL R. S.; POPLI, S. P. Synthesis of 5-hydroxy-3',4',7,8-Tetramethoxyflavone. *Indian J. Chem. Sect, B*, **17**, 75-76, 1979.

DEWICK, P. M. MEDICINAL NATURAL PRODUCTS - A Biosynthetic Approach. *JOHN WILEY & SONS*, p. 194-200, 1997.

DOMINGUEZ, X. A.; GUTIERREZ, M.; ARMENTA, N. Chemical survey of seventeen medicinal Mexican Plants. *Planta Med.*, **18** (1), 51-54, 1969. Resumo do Chemical Abstracts, vol. 72:51820m, pg. 92, 1970.

EVANS, C. S.; BELL, E. A. 'Uncommon' amino acids in the seeds of 64 species of Caesalpinieae. *Phytochem.*, **17** (7), 1127-1129, 1978. Resumo do Chemical Abstracts, vol.90:36286v, pg. 262, 1979.

FAUST, T. A. *Caesalpinia digyna*. *J. A. Leather Chem.*, **8**, 154-158, 1913. Resumo do Chemical Abstracts, vol. 7, n: 24, pg. 1823, 1913.

- GOTTLIEB, H. E.; KUMAR, S.; SAHAI, M.; RAY, A. B. Ethyl Brevifolin carboxylate from *Flueggea microcarpa*. *Phytochemistry*, **30**(7), 2435-2438, 1991.
- HARBONE, J. B. The Flavonoides, Advances in Research Since. *Chapman & Hall*; London, 455, 1993.
- HASLAM, E.; HAWORTH, R. D.; JONES, K.; ROGERS, H. J. Gallotannins. Part I. Introduction: and the Fractionation of Tannase. *J. Chem. Soc.*, 1829-1835, 1961.
- HEGNAUER, R.; GRAYER, R.J. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the Leguminosae: A chemotaxonomic approach. *Phytochem.*, **34**, 3-16, 1993.
- HIKINO, B.H.; TAGUCHI, T.; FUJIMURA, H.; HIRAMATSU, Y. Antiinflammatory principles of *Caesalpinia sappan* wood and of *Haematotoxylon campechianum* wood. *Planta Med.*, **31**, 214-220, 1977.
- KIM, Y.M.; KIM, S.G.; KHIL, L.Y.; MOON, C.K. Brazilin Stimulates Transport in 3T3-L1 Cells. *Planta Med.*, **61**, 297-310, 1995.
- KISSER, J.; AKAD, S.; WISS, W. Histochemical study of some flavone-bearing colored woods. *Wien*, **132** (I), 19-23, 1923. Resumo do Chemical Abstracts, vol. 18, January-May, pg. 408, 1924.
- KHIL, L.Y.; CHEON, A.J.; CHANG, T.S.; MOON, C.K. Effects of Calcium on Brazilin-Induced Glucose Transport in Isolated Rat Epididymal Adipocytes. *Biochemical Pharmacology.*, **54**, 97-101, 1997.
- KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Constituents of the Labiatae plants. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*, *Phytochemistry*, **29** (7), 2351-2355, 1990.
- KUO, Y.; LEE, P.; WEIN, Y. Four New Compounds the seeds of *Cassia fistula*. *J. Nat. Prod.*, **65**, 1165-1167, 2002.
- JI, S.; SATO, N.; YOKOI, M.; SHIGIHARA, A.; HONDA, T. Galloylcyanidin glycosides from *Acer*. *Phytochem.*, **31** (2), 655-657, 1992.
- JIANG, R. W.; BUT, P. P. H.; MA, S. C.; MARK, T. C. W. Furanoditerpenoid lactones from the seeds of *Caesalpinia minax* Hance. *Phytochem.*, **57**, 517-521, 2001.
- JOLY, A. B.; Botânica Introdução à Taxonomia Vegetal. *Editores Nacional*, 374-376, 1998.
- LORENZI, H.; Manual de identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. *Plantarum*, 2ª edição, Nova Adessa, 1998.
- MATOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. *Edições UFC*, Fortaleza, p. 45, 1997.
- MCPHERSON, D. D.; CORDELL, G. A.; SOEJARTO, D. D. Peltogynoids and Homoisoflavonoids from *Caesalpinia pulcherrima*. *Phytochem.*, **22**, 2835-2838, 1983.

METZGER, P.; RAGER, M.; LARGEAU, L. C. Botryolins A and B, two tetramethylsqualene triethers from the green microalga *Botryococcus braunii*. *Phytochem.*, **59**, 839–843, 2002.

MENDES, N. M.; PEREIRA, J. P.; DE SOUZA, C. P.; OLIVEIRA, M. L. L. Ensaios preliminares em laboratório para verificar a ação moluscicida de algumas espécies da flora brasileira. *Rev. Saúde públ.*, **18**, 348-354, 1984.

MENDES, N. M.; ARAÚJO, N.; DE SOUZA, C. P.; PEREIRA, J. P.; KATZ, N. Atividade moluscicida de alguns produtos naturais sobre *Biomphalaria glabrata*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **81**(1), 87-91, 1986.

MENDES, C. C.; BAHIA, M. V.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Constituents of *Caesalpinia pyramidalis*. *Fitoterapia*. **71**, 205-207, 2000.

NORTON, T. H. Tanning materials of Latin America. *J. Am. Leather Chem. Assoc.* **13**, 441-461, 1918. Resumo do Chemical Abstracts, vol. 7, n: 24, pg. 1823, 1918.

PARIS, R. R., DELAVEAU, P. G. Sur les flavonoides du *Caesalpinia pulcherrima* Sw.: Isolement d'un flavonoside identifié au myricitroside. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **260**, 271-273, 1965.

PARVEEN, N.; KHAN, N.U.; INOUE, T.; SAKURAI, M. Ethyl Brevifolin carboxylate and other constituents from *Acer oblongum*. *Phytochemistry*, **27** (12), 3990-3991, 1988.

RASTOGI, S.; SHAW, A.K.; KULSHRESHTHA, D.K. Characterisation of fatty acids of antifilarial triclyceride fraction from *Caesalpinia bonducella*. *Fitoterapia*, **67** (1), 63-64, 1996.

SAEED, M. A.; SABIR, A. W. Antibacterial activity of *Caesalpinia bonducella* seeds. *Fitoterapia*. **72**, 807-809, 2001.

SCHMIDT, V. O. T.; ECKERT, R.; GÜNTHER, E.; FIESSER, H. Brevifolin-carbonsäure, ihre optisch aktiven Formen und ihre Bindung and Glucose im "Algarobin", einer neuen Kristallisierten Verbindung aus Algarobilla. *Liebigs Ann. Chem.*, **706**, 204-212, 1967.

SCHMIDT, V. O. T.; BERNAUER, K. Brevifolin und Brevifolin-carbonsäure. *Liebigs Ann. Chem.*, **588**, 211-217, 1954.

SIMÕES, C. M. O. FARMACOCNOSIA da planta ao medicamento. *Edições UFSC*, p. 83, 339-364, 2001.

SUAREZ, S. S.; CABRERA, J. L.; JULIANI, H. R. Flavonóides, Aminoácidos e Hidratos de Carbono en *Caesalpinia gilliesi* (Hook.) Benth. (Leguminosas). *An. Asoc. Quím. Argent.*, **72** (3), 261-263, 1984.

WATSON, R.; FOWDEN, L. Amino acids of *Caesalpinia tinctoria* and some allied species. *Phytochem.*, **12** (3), 617-22, 1973. CAN An 1973 vol. 78:121351j, pg. 221.

CAPÍTULO IV
USO DE CLAE NA IDENTIFICAÇÃO DE BIFLAVONÓIDES EM FOLHAS
INTEIRAS E MOÍDAS DE *Ouratea semisserata* (OCHNACEAE)

IV.1. Objetivos

- a) Estabelecer uma metodologia eficiente para a identificação de biflavonóides em espécies de *Ouratea*;
- b) Verificar se os biflavonóides presentes em *Ouratea semisserrata* estão localizados nos extratos metanólicos das folhas inteiras ou moídas;
- c) Identificar se os biflavonóides isolados de espécies de *Luxemburgia* (Ochnaceae) estão presentes *Ouratea*;

IV.2. Experimental

IV.2.1. Instrumental

O sistema de cromatografia com fase líquida de alta eficiência utilizado consiste em uma bomba modelo LC-10AD, equipado com um detector de fotodiodo (PDA) SPD-10VP (Shimadzu) e injetor Rheodyne (1725) com alça de amostragem de 20 µL. O registro dos cromatogramas foi realizado com integrador de dados modelo CLASS-LC10 Shimadzu. A separação cromatográfica foi feita em uma coluna analítica de fase reversa C-18 (250 mm x 4,6 mm x 5µm) Betasil, utilizando um sistema isocrático de metanol/H₂O/acetonitrila/ácido acético (20:40:39:1) como fase móvel e velocidade de fluxo 1 mL.min⁻¹. Os extratos foram monitorados a 240, 254, 290 e 300 nm.

Os sinais cromatográficos foram identificados por comparação com os tempos de retenção e pelos espectros de absorção no UV (PDA) com as substâncias padrão.

IV.2.2. Material vegetal

As folhas de *Ouratea semisserrata* foram coletadas na Cachoeira das Andorinhas, Ouro Preto, Minas Gerais.

IV.2.2.1. Elaboração dos extratos

As folhas secas de *Ouratea semiserrata* (499 g), antes de moer, foram extraídas com hexano e em seguida com metanol/H₂O (9:1), a temperatura ambiente até completa exaustão. As soluções extrativas foram concentradas em rotavapor, sob pressão reduzida fornecendo 3,2 g de extrato hexânico e 12,5 g do extrato metanólico. Após a evaporação do solvente as folhas foram moídas e extraídas novamente com hexano e metanol/H₂O (9:1), obtendo-se 2,0 g de extrato hexânico das folhas moídas e 30,0 g do extrato metanólico das folhas moídas. Os extratos metanólicos antes de moer (800 mg) e moídos (800 mg) foram fracionados com CHCl₃ (100%) e MeOH (100%) em coluna aberta de gel de sílica (5,0 g) com carbonato de cálcio (2,0 g) e carvão ativo (2,0 g) para retirar a clorofila. As frações clorofórmicas e metanólicas foram evaporadas, redissolvidas em MeOH e filtradas em

membrana de nylon (Millipore), antes da análise por CLAE. Na análise por CLAE foram utilizados os extratos metanólicos das folhas inteiras e moídas.

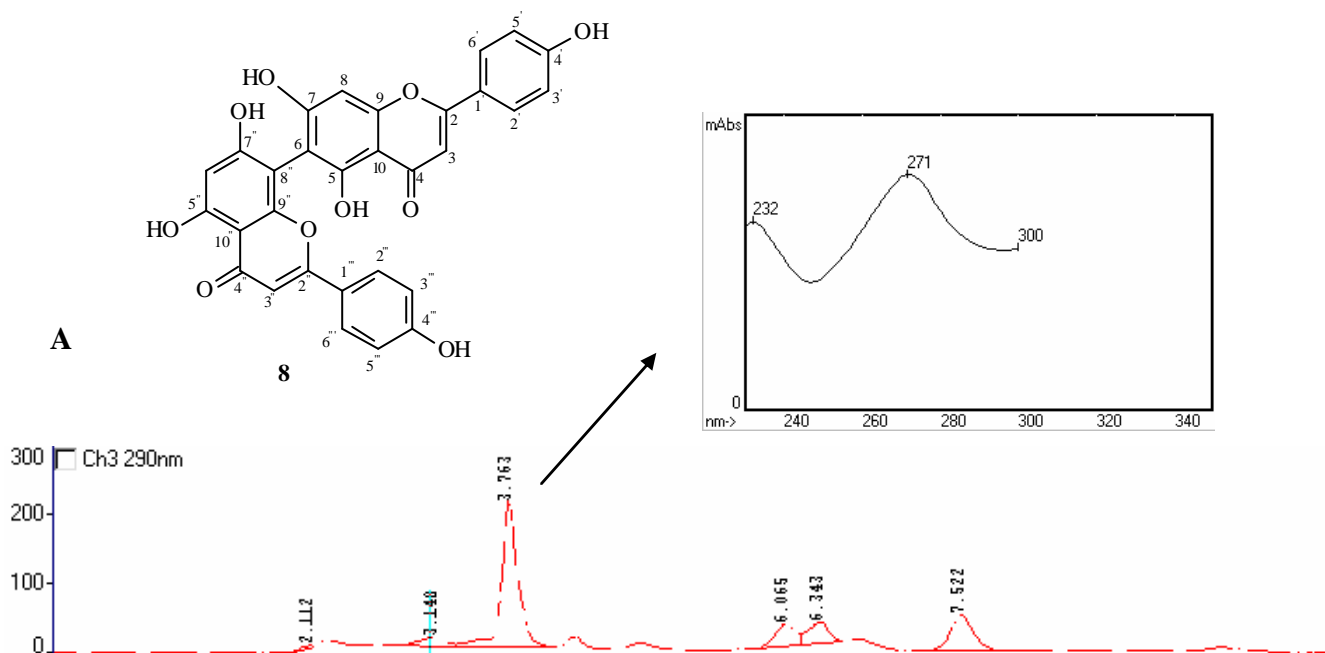
IV.2.3. Reagentes e flavonóides padrões

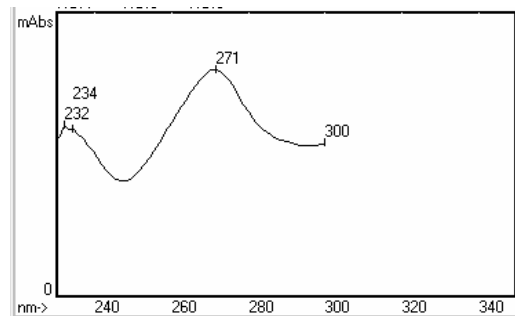
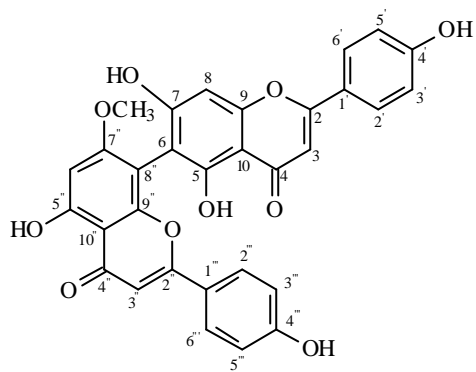
Todos os solventes utilizados foram grau analítico e espectroscópico VETEC (Tedia, Brasil). Os padrões de flavonóides foram: agatisflavona (**8**) e 7''-metilgathisflavona (**5**) isolados de *O. hexasperma* (conforme Capítulo I), amentoflavona (**37**) e podocarpusflavona (**37a**) isolados de *O. semiserrata* (VELANDIA, *et al.*, 2002), 2'',3''-diidrochnaflavona (**43**) isolada de *Luxemburgia nobilis* (OLIVEIRA, *et al.*, 2002) e luxenchalcona (**47**) foi isolada de *L. octandra* (CARVALHO, *et al.*, 2004). Todos os padrões foram solubilizados em MeOH e usados como solução estoque.

IV.3. Resultados e discussão

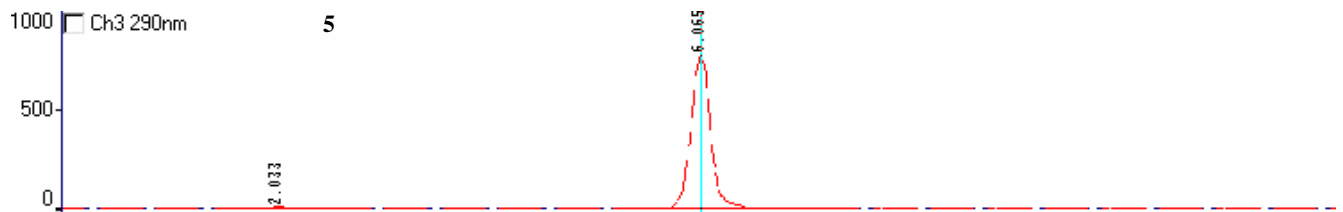
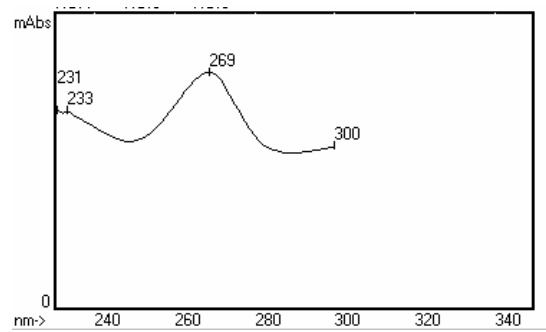
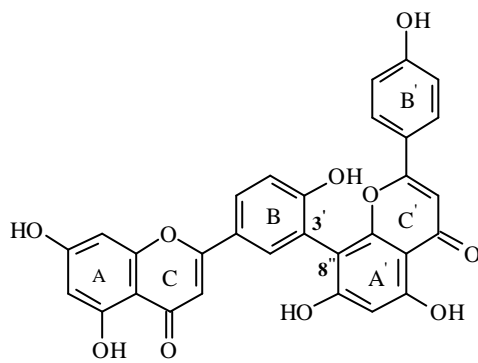
IV.3.1. Perfil dos flavonóides padrões por CLAE

Na Figura IV.3.1, abaixo estão as estruturas dos biflavonóides padrões: agatisflavona (**8**), 7''-metilgathisflavona (**5**), amentoflavona (**37**), podocarpusflavona (**37a**), 2'',3''-diidrochnaflavona (**43**) e luxenchalcona (**47**). Todos foram cromatografados separadamente, para determinação do tempo de retenção e obtenção do espectro de UV. Os cromatogramas e os espectros de obtidos por CLAE são mostrados na Figura IV.3.1.

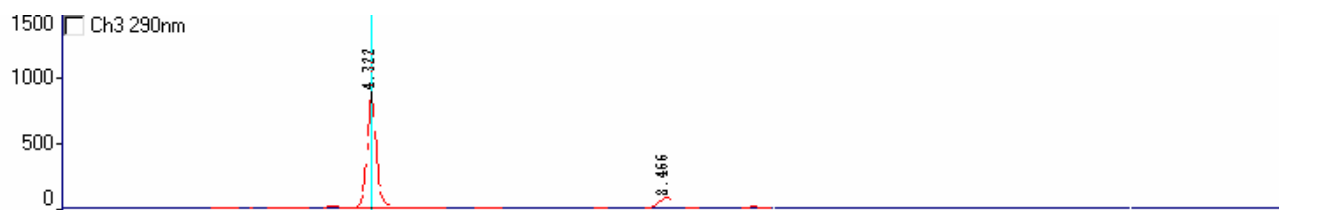
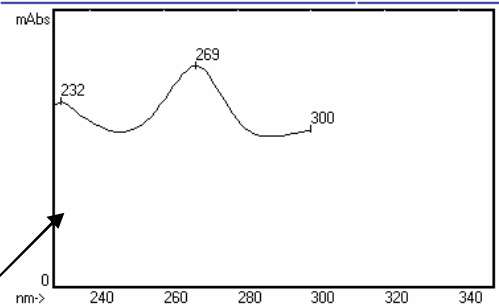
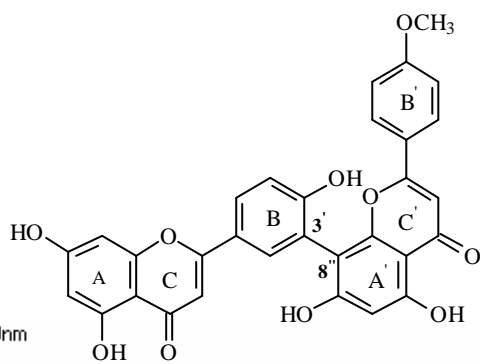


B

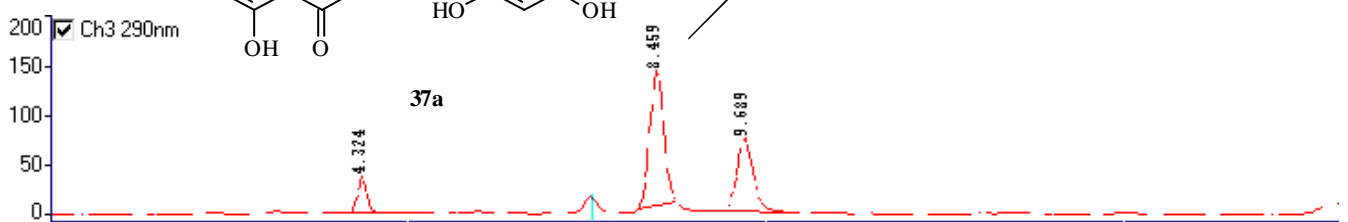
Ch3 290nm

5**C****37**

Ch3 290nm

**D****37a**

Ch3 290nm



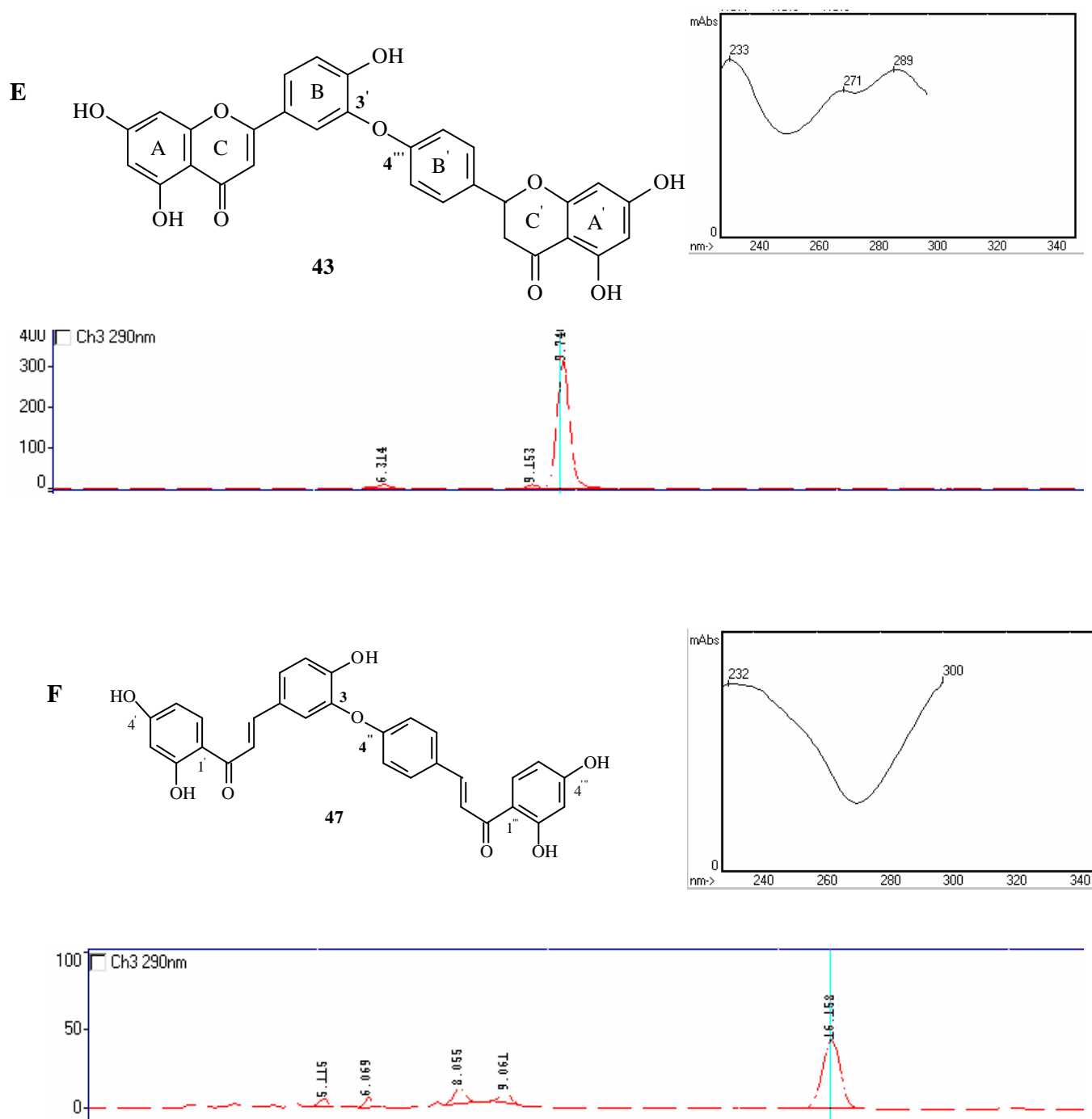
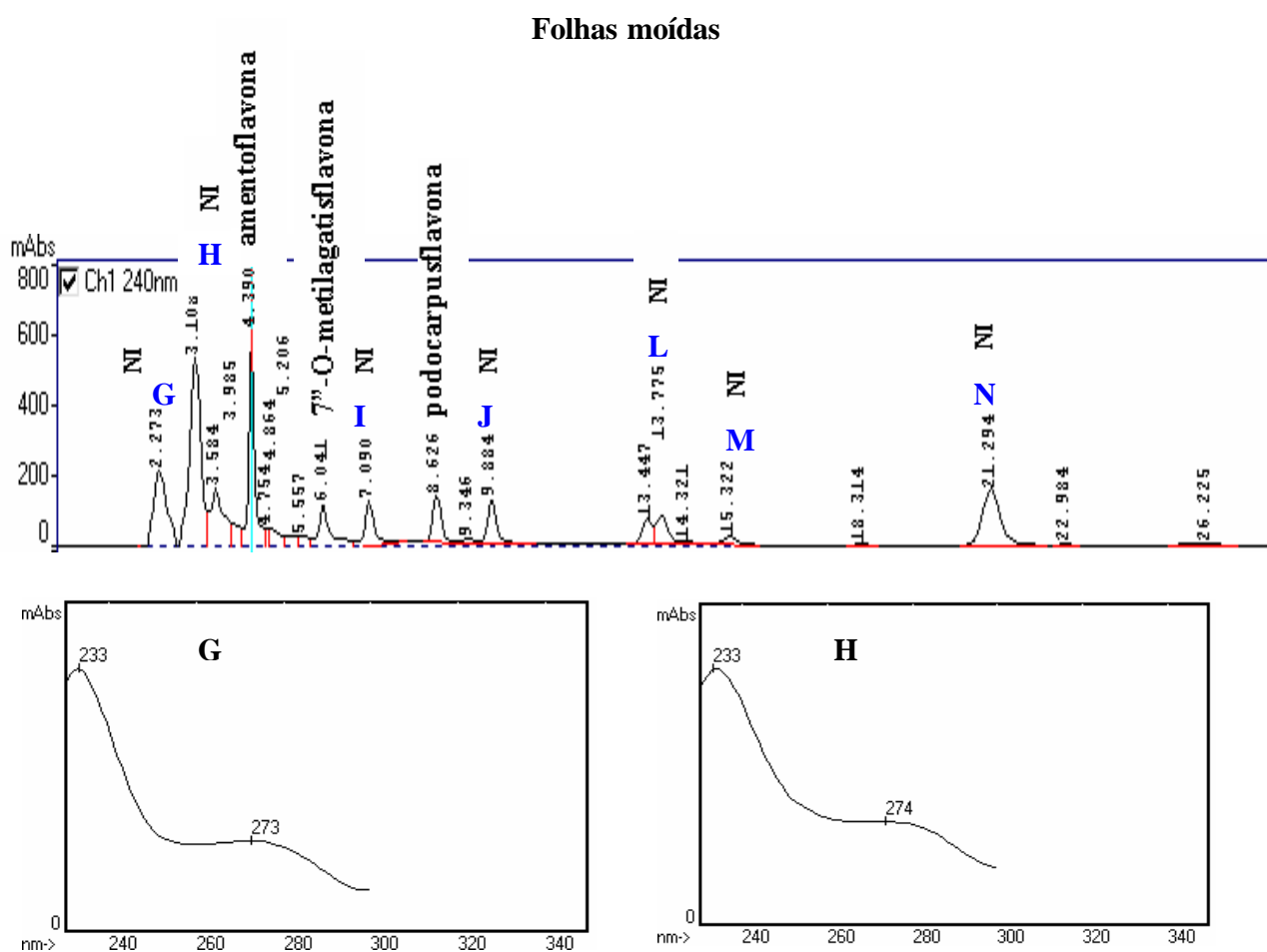


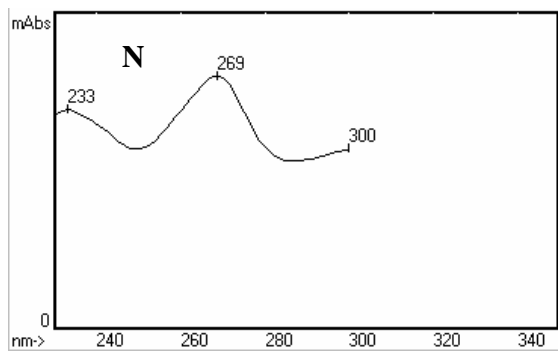
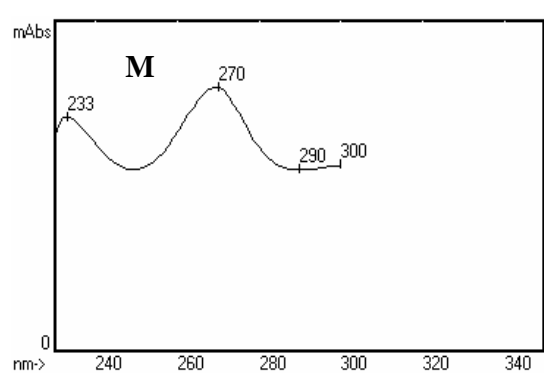
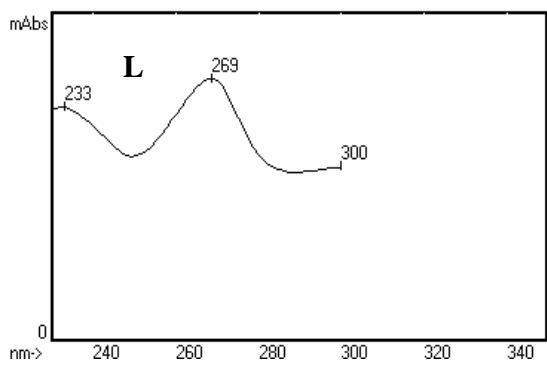
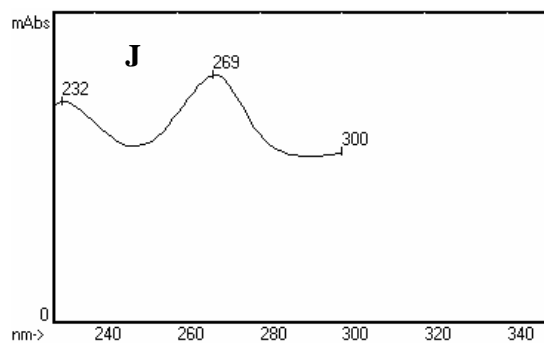
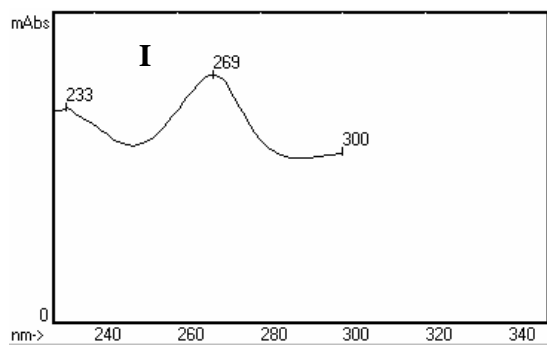
Figura IV.3.1. Cromatogramas e espectros de UV dos flavonóides padrões [Coluna C-18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m) Betasil, eluente metanol/H₂O/acetonitrila/ácido acético (20:40:39:1)]. **A)** agatisflavona, Tempo de retenção: 3,763 **B)** 7''-metilagatisflavona, Tempo de retenção: 6,065 **C)** amentoflavona, Tempo de retenção: 4,322 **D)** podocarpusflavona, Tempo de retenção: 8,459 **E)** 2'',3''-dihidrochnaflavona Tempo de retenção: 9,741 e **F)** luxenchalcon, Tempo de retenção: 16,158.

IV.3.2. Perfil cromatográfico dos extratos de *Ouratea* e identificação das substâncias

As análises por CLAE dos extratos metanólicos das folhas inteiras e moídas de *O. semiserrata* são mostradas na Figura IV.3.2, pág. 272.

A identificação das substâncias nos extratos foi feita por comparação dos tempos de retenção entre os picos desconhecidos e os flavonóides padrões e comparação dos espectros de absorção no UV (detector de fotodiodo), com os flavonóides padrões.





Folhas inteiras

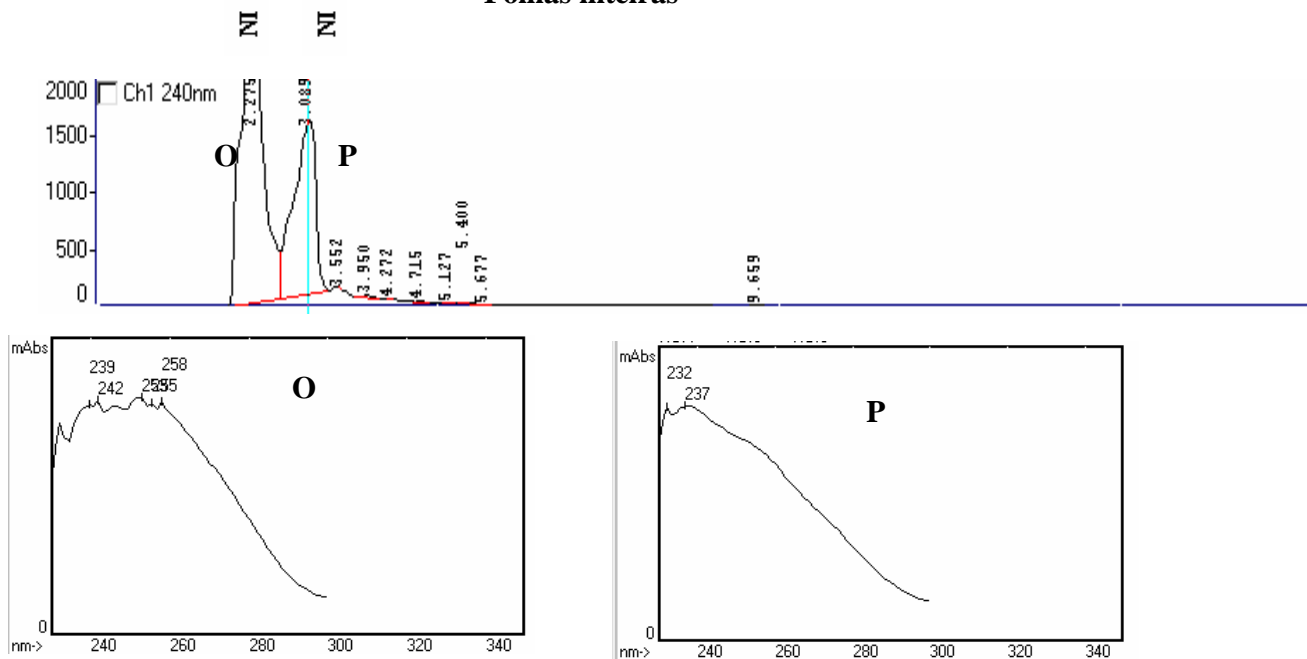


Figura IV.3.2. Cromatogramas e espectros de UV dos extratos metanólicos de *O. semiserrata* [Coluna C-18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m) Betasil, eluente metanol/H₂O/acetonitrila/ácido acético (20:40:39:1)], sendo NI: picos não identificados.

Através da análise do perfil cromatográfico e dos espectros de UV foi possível identificar os biflavonóides: amentoflavona, podocarpusflavona e 7'-*O*-metilagatisflavona no extrato metanólico das folhas moídas de *Ouratea semiserrata*. O estudo fitoquímico realizado, anteriormente, com esta espécie forneceu a podocarpusflavona e amentoflavona (VELANDIA, *et al.*, 2002), porém a 7'-*O*-metilagatisflavona foi isolada somente de *O. hexasperma* (MOREIRA, *et al.*, 1999; DANIEL, *et al.*, 2004). Os biflavonóides não foram detectados no extrato metanólico das folhas inteiras. Foram observados picos adicionais (NI) no extrato metanólico moído, cujos perfis das curvas de UV sugerem a presença de outros flavonóides diferentes dos padrões utilizados. O uso de CLAE semipreparativa foi utilizado por BOSSO (2004) como tentativa de isolamento das substâncias correspondentes a esses picos adicionais.

IV.3.4. Conclusões

A aplicação de cromatografia com fase líquida de alta eficiência é utilizada como um método sensível para a detecção de biflavonóides (MEURER-GRIMES & STEVENSON, 1994). A técnica conduziu a identificação de outros biflavonóides em menor tempo e maior precisão que as técnicas cromatográficas tradicionais.

O método também é eficiente para o monitoramento dos flavonóides nos extratos fornecendo um perfil analítico do material em estudo, e inclusive, como identificação da fração a ser avaliada farmacologicamente.

As substâncias 2'',3''-diidrochnaflavona (43) e luxenchalcona (47) isoladas somente em espécies de *Luxemburgia* (Ochnaceae), não foram identificadas em *Ouratea semiserrata*, confirmando a ausência em espécies de *Ouratea*. Este perfil químico permite propor uma rota biossintética (Cap. I, Esquema 1 pg. 16) que pode ser usada como caminho distinto na formação das biflavonas, tendo como intermediários as chalconas.

IV.4. Referências – Capítulo IV

- BOSSO, A. A. “Identificação de bisflavonóides de *Luxemburgia nobilis* e *Ouratea semiserrata* (Ochnaceae) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.” Seropédica, Programa de Pós graduação em Química Orgânica – UFRRJ, 2004. Dissertação de mestrado.
- CARVALHO, M. G. de; ALVES, C. C. F.; SILVA, K. G. S.; EBERLIN, M. N.; WERLE, A. A. Luxenchalcone, a new bichalcone and other constituents from *Luxemburgia octandra*. *J. Braz. Chem. Soc.*, **15** (1), 146-149, 2004.
- DANIEL, J.F. de S.; CARVALHO, M. G. de; CARDOSO, R. DA S.; EBERLIN, M. N. Others flavonoids from *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, 2004 (aceito).
- MEURER-GRIMES, B.; STEVENSON, D. W. The Biflavones of the Cycadales Revisited: Biflavones in *Stangeria eriopus*, *Chigua restrepoi* and 32 Other Species of Cycadales. *Biochem. Syst. and Ecol.*, **22** (6), 595-603, 1994.
- MOREIRA, I. C.; CARVALHO, M. G. de; BASTOS, A. B. F. O.; BRAZ-FILHO, R. A flavone dimer from *Ouratea hexasperma*. *Phytochem.*, **51**, 833-838, 1999.
- OLIVEIRA, M. C. C.; CARVALHO, M. G. de; SILVA, C. J.; WERLE, A. A. New biflavonoid and Other constituents from *Luxemburgia nobilis* (EICHL). *J. Braz. Chem. Soc.*, **13** (1), 119-123, 2002.
- VELANDIA. J. R.; CARVALHO. M. G. de; BRAZ-FILHO. R.; WERLE. A. A. Biflavonoids and a glucopyranoside derivative from *Ouratea semiserrata*. *Phytochem. Anal.*, **13**, 283-292, 2002.

CAPÍTULO V
ENSAIOS BIOLÓGICOS

V.1. Objetivos

Contribuir para o estudo biológico de *Caesalpinia peltophoroides* e *Ouratea hexasperma*;

Testar a atividade biológica das substâncias isoladas em maior quantidade;

Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos de *Caesalpinia peltophoroides* e algumas substâncias isoladas;

Avaliar a atividade antioxidante dos extratos de *Caesalpinia peltophoroides*;

Avaliar a atividade antitumoral frente a 5 linhagens celulares: HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano), NCI-H460 (carcinoma de pulmão e não pequenas células), RXF-393 (carcinoma renal), OVCAR-3 (adenocarcinoma de ovário) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama) dos biflavonóides: 7,7''-*O*-dimetilanaraflavona (**2**), 7''-*O*-metilagatisflavona (**5**), agatisflavona (**8**) e fração com mistura de 7''-*O*-metilagatisflavona (**5**) e agatisflavona (**8**) isolados de *Ouratea hexasperma*.

V-2. AVALIAÇÃO DE TOXIDADE GERAL COM ARTEMIA SALINA LEACH (SIQUEIRA, *et al.*, 1998).

O bioensaio utilizando *Artemia salina* determina valores de DL₅₀ de substâncias ativas em meio de salmoura. O método é rápido, confiável e barato além de utilizar pequenas quantidades de material, sendo assim uma ótima ferramenta para avaliar a toxicidade de substâncias (MCLAUGHLIN *et al.*, 1991).

Este teste verifica a toxicidade geral dos extratos, frações e de substâncias isoladas, em que são utilizadas larvas de microcrustáceo *A. salina*. Os ovos de *A. salina* (marca *Maramar*) são incubados em água de mar artificial, a 20-30 °C. Os constituintes da água de mar artificial são: 23g NaCl, 11g MgCl₂.6H₂O, 4g Na₂SO₄, 1,3g CaCl₂.2H₂O e 0,7g de KCl em 1000ml de água destilada (PARRA *et al.*, 2001). Para a eclosão dos ovos, no período de 48 horas, é utilizada uma caixa sendo o seu interior separado por uma divisória com microperfurações, de forma a que apenas um dos lados fique iluminado para permitir, por fototropismo, a migração das larvas. Os extratos e/ou substâncias isoladas são dissolvidos em DMSO e posteriormente adicionados em cinco concentrações a tubos de vidro contendo 5ml de água de mar artificial e 10 a 15 larvas de *A. salina*. As análises são realizadas em quadruplicata. As larvas mortas e vivas são contadas após 24 horas e os valores de DL₅₀ (Dose Letal-50%) calculados através de métodos estatísticos de regressão linear (MEYER *et al.*, 1982). Os resultados são considerados bioativos se os valores de DL₅₀ forem inferiores a 1000 µg/ml (MEYER *et al.*, 1982).

Foram realizados os testes de toxicidade geral com extratos de *Caesalpinia peltophoroides* e *Ouratea hexasperma* (a preparação dos extratos testados está descrita nos Capítulos I e III).

Foram avaliados os seguintes extratos de *C. peltophoroides*:

Flores

Extrato etanólico: DL₅₀ = 33,5 µg/mL

Extrato etanólico-Partição AcOEt: DL₅₀= 29,3 µg/mL

Extrato etanólico-Partição Butanólica: DL₅₀= 66,5 µg/mL

Foi avaliado o seguinte extrato de *Ouratea hexasperma*:

Folhas

Extrato metanólico: DL₅₀ = 54,17 µg/mL

O extrato Etanólico-Partição AcOEt de *C. peltophoroides* foi o extrato mais ativo.

V-3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Este experimento foi realizado em colaboração com o Departamento de Microbiologia-MIB, Laboratório de Bacteriologia, Universidade Estadual de Londrina-UEL, pelo grupo de pesquisa da professora Dra. Halha O. Saridakis e com a participação do aluno de mestrado Wanderlei Schmitz.

V.3.1. Introdução

O uso de plantas como fitoterápicos tem aumentado nas últimas três décadas. Na verdade há uma carência de antibióticos na terapia, levando a uma intensa pesquisa de novos fármacos. Os antibióticos constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, produzidos e obtidos a partir de organismos vivos. Essas substâncias apresentam, em pequenas concentrações, as seguintes propriedades: atividade letal ou inibitória contra muitas espécies microbianas, prevenção do desenvolvimento de cepas resistentes, ausência de efeitos indesejáveis ao hospedeiro e estabilidade química (YUNES & CALIXTO, 2001). O estudo da atividade antibacteriana do extrato das flores e substâncias isoladas de *C. peltophoroides* foi o primeiro realizado nessa espécie (DANIEL, *et al.*, 2004). Para avaliar a atividade bactericida/bacteriostática dos extratos e substâncias isoladas são realizados testes de acordo com métodos tradicionais como Técnica de Pour-Plate e Difusão em Ágar (SAEED, *et al.*, 2001).

V.3.2. Materiais e Métodos

Os extratos de *C. peltophoroides* e as substâncias usadas para os testes foram obtidos de acordo com o esquema III.1, descrito no capítulo III.

As bactérias utilizadas para os testes foram: *Acinetobacter baumannii* (isolado clínico), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Salmonella choleraesuis* (ATCC10708), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 23212), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Os testes foram realizados pela dispersão dentro de placas de Petri de um volume conhecido de cada extrato/substância, de modo a obter-se uma concentração necessária por ml do meio. O agar Muller Hinton (M.H.A) após ser fundido e resfriado foi adicionado

sobre o extrato/substância e cuidadosamente homogêneo (Técnica de Pour-Plate). Volumes conhecidos das suspensões bacterianas foram dispostos na superfície seca do agar e incubados à 36°C por 18 a 24 hs. Duas placas controle foram utilizadas para o crescimento bacteriano, uma contendo agar Muller Hinton e 2% EtOH sem o extrato/substância e a segunda somente o M.H.A. Cada teste foi realizado em duplicata, e os resultados obtidos após a evolução ou inibição do crescimento bacteriano, quando comparados com as placas controle.

V.3.3. Resultados

Testes preliminares: o extrato etanólico na concentração de 5 mg/ml inibiu o crescimento de *K. pneumoniae*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* e em 7 mg/ml de *A. baumannii*, *E. coli*, e *S. choleraesuis* (DANIEL, *et al.*, 2002). De acordo com esses resultados, foram testados: o extrato etanólico (2 mg/ml), partição AcOEt (2 mg/ml), 5-hidroximetilfurfural (1 mg/ml), ácido gálico (1 mg/ml) e galato de etila (100 µg/ml) conforme Tabela V.1, abaixo. As bactérias foram testadas devido a sua importância clínica. A partição em acetato de etila mostrou significativa inibição contra todas bactérias testadas.

Tabela V.1. Atividade antibacteriana de extratos e substâncias das flores de *Caesalpinia peltophoroides*

Bactéria – Concentração (M)	Material testado					
	Extrato EtOH 2mg/ml	Partição AcOEt 2mg/ml	Ácido gálico 1mg/ml	Galato de etila 100mg/ml	5-hidroxime- tilfurfural 1mg/ml	
<i>Escherichia coli</i> 10 ⁻⁴ (ATCC 25922)	+ ^a	++++	+++	na	++	
	10 ⁻⁵	+	++++	++++	na	++
<i>Pseudomonas</i> 10 ⁻⁴ <i>aeruginosa</i> 10 ⁻⁵ (ATCC 27853)	++++	++++	++++	na	++++	
	10 ⁻⁵	++++	++++	na	++++	
<i>Staphylococcus</i> 10 ⁻³ <i>aureus</i> 10 ⁻⁴ (ATCC 25923)	+++	++++	na	na	++++	
	10 ⁻⁴	+++	++++	na	++++	
<i>Enterococcus</i> 10 ⁻² <i>faecalis</i> 10 ⁻³ (ATCC 23212)	++++	++++	++++	na	++++	
	10 ⁻³	++++	++++	na	++++	

^a++++= completa inibição do crescimento bacteriano

+++ e ++= inibição parcial

+= inibição não significativa

na= inativo

V-4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Este experimento foi realizado em colaboração com o Laboratório de Toxicologia Ambiental (Imunotoxicologia) - LATAI, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, pelo grupo de pesquisa do Pr. Dr. Ronald Bastos Freire e participação dos graduandos do curso de biologia Kelly Zolli Alves (aluna de iniciação científica) e Fernando Marcelo Loureiro.

V.4.1. Introdução

Em organismos aeróbicos, o oxigênio molecular é o aceptor final de elétrons em diferentes sistemas de transporte, os quais estão presentes nas mitocôndrias. Evidências atuais mostram que os aspectos favoráveis da vida aeróbica estão também ligados a processos potencialmente perigosos ligados ao oxigênio. Várias espécies instáveis, e radicais livres reativos derivados do oxigênio são produzidos durante o metabolismo do oxigênio e processos oxidativos da vida celular. Dentre eles incluem-se o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio têm sido chamadas de “estresse oxidativo” (MARR & MÜLLER, 1995).

O papel dos radicais livres nos processos patológicos, nas doenças, nas intoxicações e no envelhecimento tem se tornado uma área de grande interesse. As espécies reativas de oxigênio (ERO'S), são continuamente formadas no organismo, estimando-se que cerca de 5% de todo oxigênio inspirado transforma-se em ERO'S. Estas espécies químicas, geralmente são inativadas pelas defesas antioxidantes do organismo. Todavia, quando geradas em excesso, seja por um aumento da produção por processos mórbidos ou fatores ambientais, seja por redução da capacidade antioxidante, tornam-se deletérias para todas as estruturas orgânicas. Esta situação é agravada na presença de íons metálicos, tais como ferro e cobre. Os radicais livres têm sido implicados em lesões de células, membranas celulares várias condições clínicas tais como, injúrias da isquemia/reperfusão, enfarte, câncer, artrite, várias doenças sanguíneas, doenças degenerativas, como Parkinson, demência senil entre outras (ARUOMA, 1996a).

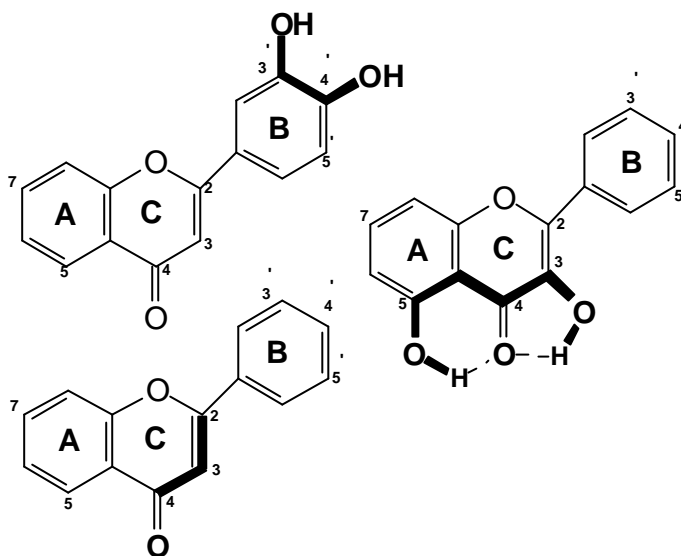
A busca de novos antioxidantes, mais específicos, mais potentes e a compreensão de seus mecanismos de ação tornam esta área muito atraente. Em consequência disso, a pesquisa de drogas que também apresentam efeito antioxidante (ARUOMA, *et al.*, 1991; PUPPO, *et al.*, 1990) e antioxidantes de origem natural, têm progressivamente, assumido um papel de destaque (AKANMU, *et al.*, 1991).

Muitos estudos têm demonstrado a existência de capacidade antioxidante em extratos vegetais. Extratos de plantas que são geralmente empregadas como condimento (alecrim) apresentando excelentes atividades antioxidantes (ARUOMA, 1996a) e antiviral (ARUOMA, *et al.*, 1996b).

O fator importante é a presença da hidroxila fenólica, que confere a capacidade antioxidante da substância. Contudo, a sua eficiência depende da sua localização na molécula, da estrutura e do número de hidroxilas presentes (COTELLE, *et al.*, 1992). A inibição da lipoperoxidação é influenciada por um certo número de características estruturais dos flavonóides: 1) presença de um grupamento hidroxila na posição 3 do anel C; 2) a ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 do anel C; 3) o grupo carbonila na posição 4

do anel C; 4) o padrão e o número de grupos hidroxilas nos anéis A, B e C; 5) a presença de açúcares e 6) a atividade quelante pela associação do grupo carbonila no carbono 4 e uma hidroxila no carbono 3 e/ou 5 **Figura V.1**, abaixo (YUNES & CALIXTO, 2001).

Figura V.1. Elementos estruturais para a atividade antioxidante dos flavonóides;



V.4.2. Materiais e Métodos

V.4.2.1. Preparação dos extratos

Os extratos de *C. peltophoroides* usados para os testes foram obtidos de acordo com o esquema III.1, pág. 201, descrito no capítulo III.

V.4.2.2. Procedimento Experimental:

Neste ensaio, as substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram expressas em termos da concentração de malonil-dialdeído (MDA) e 4-hidroxi-nonenal (4-HNE) em nmol/mL (RIBEIRO, *et al.*, 2002; OHKAWA, *et al.*, 1979), visando a identificação de substâncias capazes de interagir com modelos geradores de radicais livres (RL). Pela sua interação com RL oriundos da lipoperoxidação de membranas eritrocitárias induzida por Fe⁺⁺/ácido ascórbico com formação de MDA ou sistemas não enzimáticos formados por agentes oxidantes, na presença de sulfato ferroso e ácido octanóico, com geração de radicais livres decorrentes da formação de HNE. Os testes foram realizados em quadruplicata. 100 mg dos extratos foram dissolvidos em 0,01 ml de DMSO (veículo). Controles apropriados foram realizados para eliminação de interferências no ensaio. Para o controle positivo foram usados 2000 UI de vitamina E (Tocoferol). Os ensaios foram otimizados para cada amostra e medindo a concentração de MDA e HNE antes e após a

exposição do extrato (KIM, *et al.*, 2002; GAD, 2000; RIBEIRO, *et al.*, 2002; OHKAWA, *et al.*, 1979). A atividade biológica relacionada á geração de radicais livres foi realizada após a incubação a 37 °C de ambos os sistemas durante diferentes intervalos de 30, 60, 90 e 180 minutos, respectivamente, findos os quais, acrescenta-se ácido tiobarbitúrico que após incubação a 92°C durante 10 minutos, desenvolve cor, medidos fotocolorimetricamente a 532 nm.

V.4.4. Resultados

O extrato etanólico e a partição em AcOEt das flores de *C. peltophoroides* foram avaliados frente a sistemas geradores de radicais livres e verificou-se que os extratos aumentaram a concentração de radicais livres nos dois sistemas testados, sendo a partição acetato de etila mais tóxica (dados não publicados). Esses resultados contrariam a presença de substâncias fenólicas isolados nos extratos: ácido gálico, brevifolato de etila, galato de etila, que são potencialmente seqüestradores de radicais livres. A presença dessas substâncias deveria promover uma atividade antioxidante (SOLON, *et al.*, 2000). A ausência do efeito antioxidante pode ser atribuída a concentração na qual o extrato foi testado.

V-5. ATIVIDADE ANTITUMORAL DE BIFLAVONÓIDES ISOLADOS DE *O. hexasperma*

Realizado em colaboração com as Dras. Ivana Grivicich e Adriana Brondani do Órgão Oficial da América do Sul para Desenvolvimento de Drogas Anticâncer (SOAD), Universidade Luterana do Brasil, Laboratório de Marcadores de Estresse Celular, Canoas, RS. Com participação da estagiária Sandra da Matta.

Na tentativa de se obter novos agentes quimioterápicos mais ativos e seletivos e menos tóxicos, são realizados testes com linhagens de células tumorais.

Os biflavonóides isolados de espécies *Ouratea hexasperma*, *O. semiserrata* e *Luxemburgia nobilis* 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). Esses resultados estimularam a continuidade de novas pesquisas.

V.5.1. Materiais e Métodos

V.5.1.1. Obtenção dos biflavonóides

Os biflavonóides testados foram: 7,7''-O-dimetilnaraflavona (2), 7''-O-metilgatisflavona (5), agatisflavona (8) e fração (OFMHE-6) com mistura de 7''-O-

metilagatisflavona (**5**) e agatisflavona (**8**) (Figura V.2). O isolamento dessas substâncias está descrito no Cap. I (Esquema I.3.1, pág. 23).

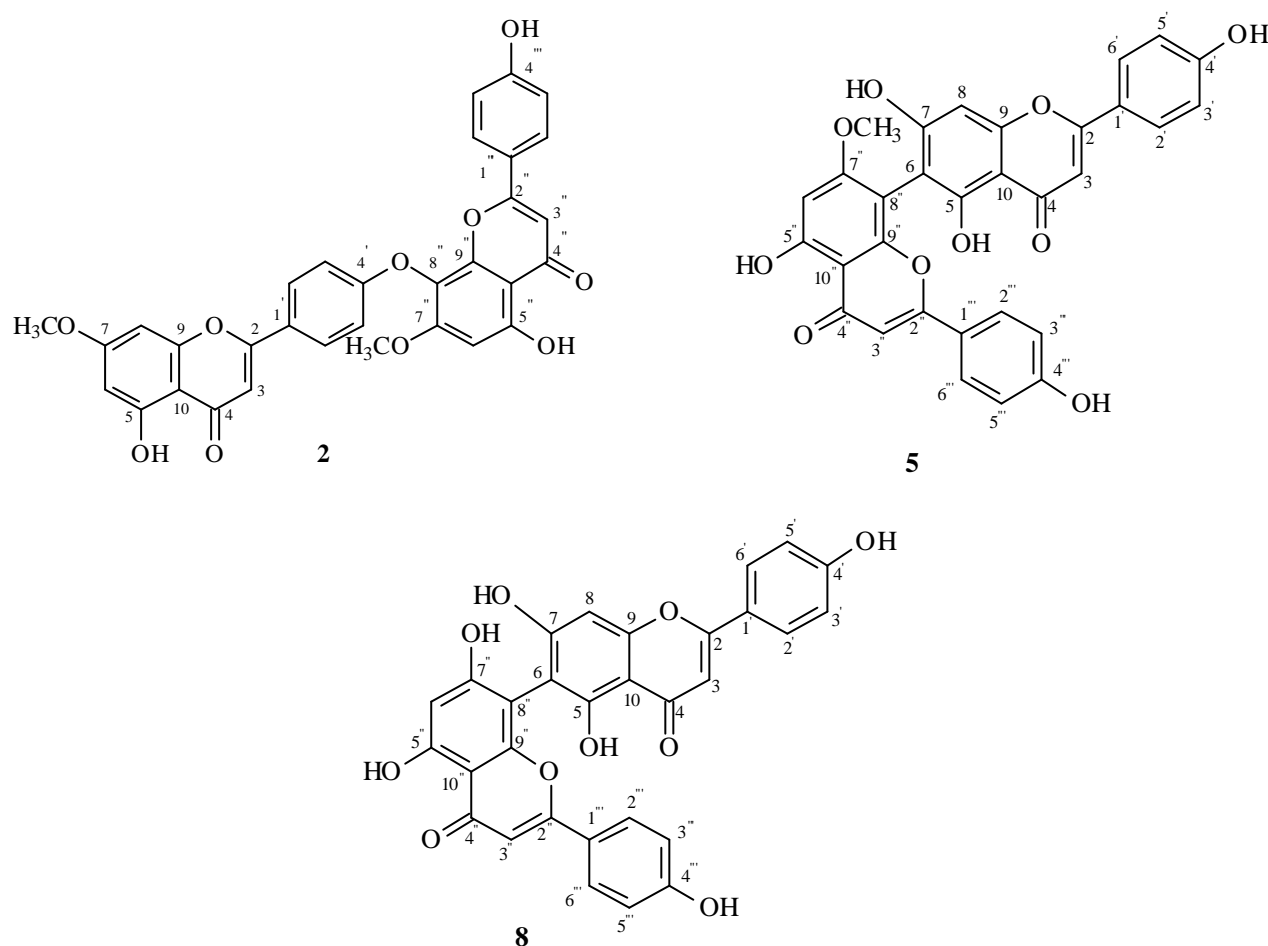


Figura V.2. Estrutura dos biflavonóides

V.5.1.2. Procedimento Experimental:

Manuntenção da linhagem celular

As linhagens de celulares HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano), NCI-H460 (carcinoma de pulmão e não pequenas células), RXF-393 (carcinoma renal), OVCAR-3 (adenocarcinoma de ovário) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama) foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino. Todas as células foram cultivadas a temperatura de 37 °C e pressão atmosférica de 5% de CO₂.

Estudo de inibição do crescimento celular

No ensaio de atividade antiproliferativa, as biflavonas foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO), e adicionadas a diluições de cultura das células dando uma concentração final de 0,25 % (v/v). As células foram incubadas em microplacas de 96 poços. Depois de 24 horas, as culturas foram tratadas com as biflavonas por 72 horas, em triplicata, obtendo um volume final de 200 μ L.

As respostas celulares foram obtidas através do ensaio colorimétrico de sulfordamina B (SRB) (SKEHAN, *et al.*, 1990). As culturas foram fixadas com ácido 50% de tricloroacético (p/v; 50 μ L) e mantidas com 0.4% (pt/vol) SRB. Após a ligação célula-SRB foram solubilizadas por adição de 10 mM Tris base [tris (hidroximetil) aminometano]. Na última etapa, a avaliação colorimétrica foi realizada através a leitura em microplacas por ELISA em 540 nm. As curvas dose resposta (Figura V.3; Figura V.4; Figura V.5; Figura V.6, pág. 284-285) determinam os valores de IC₅₀ (concentração que as biflavonas inibem 50% do crescimento celular) quando comparados com controles sem adição das a mostras.

V.5.2. Resultados

A tabela V.2, abaixo mostra os valores de IC₅₀ dos biflavonóides, demonstrando que todos os biflavonóides testados são citotóxicos e o efeito antiproliferativo depende do tipo de célula tumoral, e apenas a agatisflavona (**8**) não apresentou inibição satisfatória frente às células testadas (dados não publicados).

Tabela V.2. Valores de IC₅₀ (μ M; n \geq 3) dos biflavonóides sobre o crescimento das células tumorais. As respostas celulares foram avaliadas imediatamente após tratamento 72 horas usando o ensaio SRB.

Células tumorais	7,7''-O-dimetilanaflavona	7''-O-metilagatisflavona	agatisflavona	agatisflavona + 7''-O-metilagatisflavona
HT-29	> 50	3,38 \pm 0,42	> 50	8,19 \pm 1,19
NCI-H460	0,77 \pm 0,08	4,36 \pm 0,35	> 50	9,88 \pm 1,57
RXF-393	40,61 \pm 1,44	3,86 \pm 0,64	44,89 \pm 1,84	8,39 \pm 1,48
MCF-7	2,42 \pm 0,22	4,58 \pm 0,22	> 50	9,02 \pm 1,20
OVCAR-3	2,57 \pm 0,32	4,18 \pm 0,82	> 50	10,45 \pm 2,56

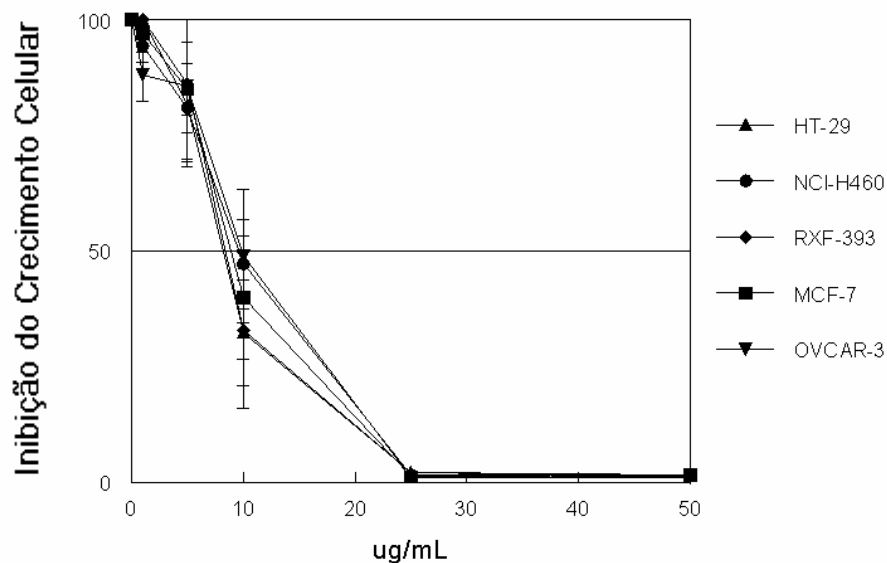


Figura V.3: Porcentagem de inibição das células: adenocarcinoma de cólon humano HT-29 (?), carcinoma de pulmão e não pequenas células NCI-H460 (?), carcinoma renal RXF-393 (◆), adenocarcinoma de mama MCF-7 (■), e adenocarcinoma de ovário OVCAR-3 (▼) depois 72 horas de tratamento com 7,7'-O-dimetillanaro flavona.

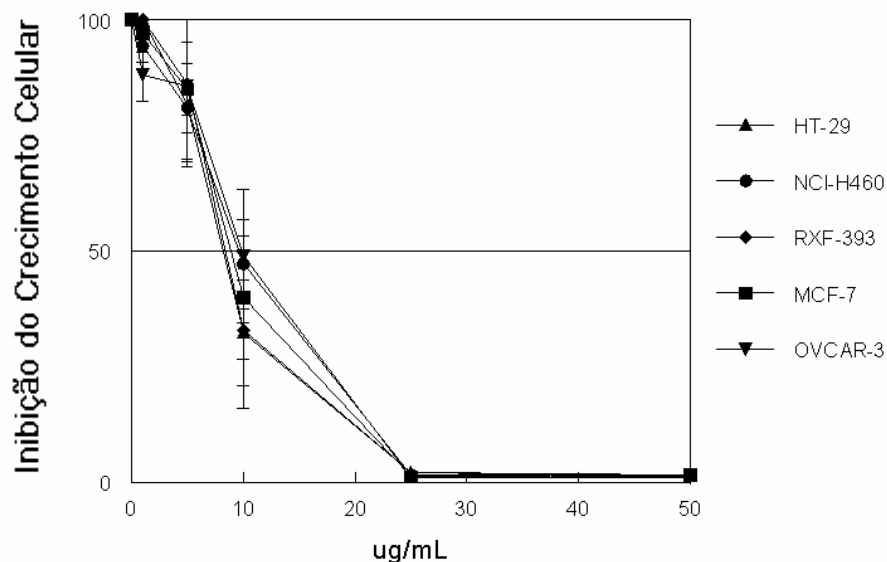


Figura V.4: Porcentagem de inibição das células: adenocarcinoma de cólon humano HT-29 (?), carcinoma de pulmão e não pequenas células NCI-H460 (?), carcinoma renal RXF-393 (◆), adenocarcinoma de mama MCF-7 (■), e adenocarcinoma de ovário OVCAR-3 (▼) depois 72 horas de tratamento com 7'-metilagatisflavona.

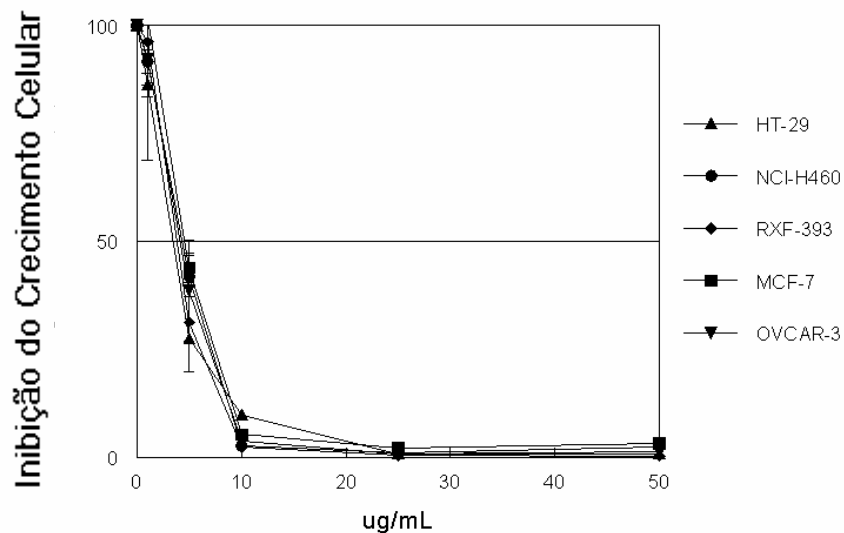


Figura V.5: Porcentagem de inibição das células: adenocarcinoma de cólon humano HT-29 (?), carcinoma de pulmão e não pequenas células NCI-H460 (?), carcinoma renal RXF-393 (◆), adenocarcinoma de mama MCF-7 (■), e adenocarcinoma de ovário OVCAR-3 (▼) depois 72 horas de tratamento com OFMHE-6, mistura de agatisflavona e 7"-metilagatisflavona.

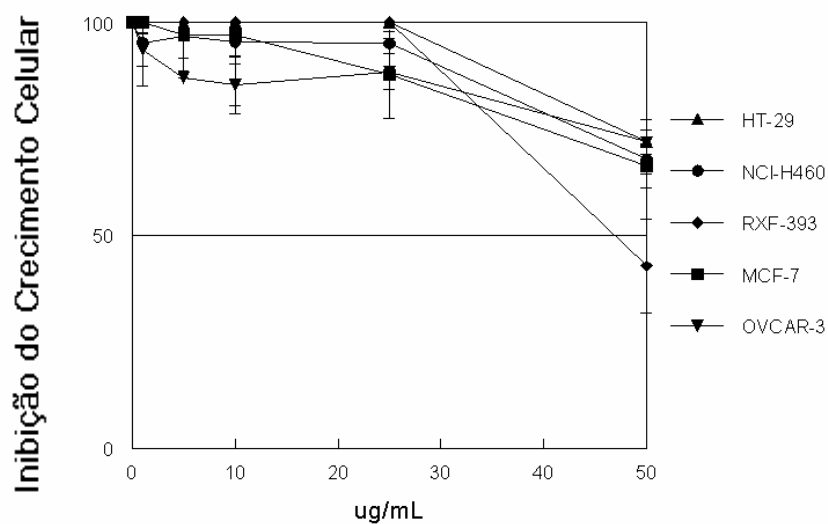


Figura V.6: Porcentagem de inibição das células: adenocarcinoma de cólon humano HT-29 (?), carcinoma de pulmão e não pequenas células NCI-H460 (?), carcinoma renal RXF-393 (◆), adenocarcinoma de mama MCF-7 (■), e adenocarcinoma de ovário OVCAR-3 (▼) depois 72 horas de tratamento com agatisflavona.

V.6. Conclusões

Os ensaios biológicos com os extratos e algumas substâncias isoladas contribuíram para traçar um perfil farmacológico das espécies estudadas fitoquimicamente, e mostrar a importância da interdisciplinaridade entre várias áreas como, microbiologia, biologia, farmacologia e química.

Os resultados do ensaio antibacteriano demonstraram que o extrato de *C. peltophoroides* foi mais ativo que algumas substâncias isoladas, determinando a necessidade de um ensaio preliminar com os diferentes extratos obtidos. Além de mostrar o excelente potencial antibacteriano do extrato, quando testado em baixas concentrações.

O ensaio antioxidante com as flores de *C. peltophoroides* determinou o perfil tóxico do extrato etanólico, restando a continuação dos ensaios com as substâncias isoladas.

Os resultados do ensaio antitumoral com os biflavonóides isolados de *O. hexasperma* confirmam o potencial dessas substâncias para a ação citotóxica, como já comprovado anteriormente contra células do Carcinoma Ehrlich (CARVALHO *et al.*, 2002), e na inibição das DNA topoisomerasas (GRYNBERG *et al.*, 2002).

V.7. Referências – Capítulo V

AKANMU, D.; CECCHINI, R.; ARUOMA, O. I. The antioxidant Action of ergothioneine. *Arch. Biochem. Biophys.* **288** (1), 10-16, 1991.

(a) ARUOMA, O. I. Eat, Drink and be Healthy. *Chemistry in Britain*, 29-31, 1996.

(b) ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; MAHMOOD, N. Evaluation of the antioxidant and antiviral actions of herbal preparations: Rovital and Carciverin V (C1983). *Phytother. Resear.*, **10**, 152-155, 1996.

ARUOMA, O. I.; AKANMU, D.; CECCHINI, R. Evaluation of the ability of the angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril to scavenge reactive oxygen species. *Chem. Biol. Interactions.* **77**, 303-314, 1991.

CARVALHO, M. G. de; VELANDIA, J. R.; OLIVEIRA, M. C. C. de; ECHEVARRIA, A.; BRAZ-FILHO, R.; GRYNBERG, N. F. Chemical Structure, Cytotoxic and Antitumours Activities of Biflavonoids from Brazilian *Ouratea* (Ochnaceae). In: GOVIL, J. N.; CENTRE, Res. Book. (Org.). Recent Progress in Medicinal Plants, *Phytochemistry & Pharmacology II*. New Dehli, **8**, 77-92, 2002.

COTELLE, N.; BERNIER, J. L.; HENICHART, J. P. Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. *Free Rad. Biol. Med.*, **13**, 211-219, 1992.

DANIEL, J. F. de S.; CARVALHO, M. G. de; FERREIRA, D. T.; SCHMITZ, W.; SARIDAKIS, H. O. Phenolic compounds and hydroxymethylfurfural from the flowers of *Caesalpinia peltophoroides* and their antibacterial activity. *Revis. Latinoamer. Quím.*, **31** (4), 25-29, 2004.

DANIEL, J. F. de S.; FRANA, M. T.; CARVALHO, M. G. de; FERREIRA, D. T.; SARIDAKIS, H. O. Atividade antimicrobiana e estudo fitoquímico de *Caesalpinia peltophoroides*. *Anais do XVII Simpósio de Plantas medicinais do Brasil*, FT.082, 2002.

GAD, S. C. In vitro toxicology. New York: Academic Press, 2nd ed., 268, 2000.

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

GRYNBERG, N. F.; CARVALHO, M. G. de; VELANDIA, J. R.; OLIVEIRA, M. C.; MOREIRA, I. C.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. DNA topoisomerase inhibitors: biflavonoids from *Ouratea* species. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **35** (7), 819-822, 2002.

KIM, Y. K.; GUO, Q.; PACKER, L. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicology*, **172**, 149-156, 2002.

MARR, J.; MÜLLER, M. Biochemistry and Molecular Biology of parasites. *Academic Press Limited*, 147-160, 1995.

MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. J.; SMITH, D. L. "Bench-Top" Bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. *Studies in Natural Products Chemistry*. In: Atta-ur-Rahman (Ed.), 387, Ed. Elsevier, Amsterdam, 1991.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, **45**, 31-34, 1982.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGIKI, S. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358, 1979.

PARRA, A.L.; YHEBRA, R.S.; SARDIÑAS, I.G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*. **85** (5), 395-400, 2001.

PUPPO, A.; CECCHINI, R.; ARUOMA, O. I. Scavenging of hypochlorous acid and myoglobin-derived oxidants by the cardioprotective agent mercaptopropionylglycine. *Free Rad. Res. Comms.* **10** (6), 371-381, 1990.

RIBEIRO, L.; TRIBESS, T.; TORRES, M. A.; SOARES, C. H. L.; PEDROSA, R. C.; AGOSTINI, J. D. Oxidative stress in *Oreochromis niloticus* exposed to the tissue-industrial effluent 1. *Ecotoxicology: Perspectives for the XXI secul*, São Carlos, Brazil: Ed Rima., 441-449, 2002.

SAEED, M.A.; SABIR, A.W. Antibacterial activity of *Caesalpinia bonducella* seeds. *Fitoterapia*, **72**, 807-809, 2001.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Nat. Cancer Inst.*, Inst **82**, 1107-1112, 1990.

SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G. GARCEZ, W. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii*- Annonaceae, Biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*, **21** (5), 557-559, 1998.

SOLON, S.; LOPES, L.; SOUSAJR, P. T.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical scavenging activity of *Lafoensia pacari*. *Journal of Ethnopharmacology*. **72** (1-2), 173-178, 2000.

YUNES, R. A., CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. ARGOS editora, 2001.

CONCLUSÕES

- a) O estudo químico das folhas de *Ouratea hexasperma* resultou no isolamento de cinco flavonóides, sendo um flavonol, três biflavonóides e um flavonóide glicosilado, dos quais quatro flavonóides estão sendo registrados pela primeira vez neste gênero e um biflavonóide pela primeira vez na literatura.
- b) O estudo de *Dipladenia martiana*, resultou no isolamento de treze substâncias, novas no gênero, incluindo flavonóides, raros na família Apocynaceae.
- c) O estudo de *Caesalpinia peltophoroides*, conduziu o isolamento de dez substâncias, sendo duas novas neste gênero.
- d) A análise dos padrões de biflavonóides, em extratos das folhas *Ouratea semiserrata*, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) permitiu distinguir as biflavonas presentes no extrato, indicar picos adicionais para posterior isolamento e mostrar a importância do monitoramento de extratos para a identificação de substâncias em diferentes gêneros de plantas.
- e) A avaliação de ensaios biológicos dos extratos de *C. peltophoroides*, *O. hexasperma* e substâncias naturais mostraram resultados promissores para utilização dessas plantas como fonte de fármacos que possam ser usadas na terapêutica como antibióticos e no combate ao câncer, respectivamente.
- f) A preparação de derivados metilados e acetilados dos biflavonóides permitiu obter diferentes derivados e, inclusive, divulgar novos dados espectrométricos.

ANEXO

Cooperação Inter-Institucional

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e a Universidade Estadual de Londrina através de seus Departamentos de Química desenvolveram algumas fases da parte experimental desta Tese em parceria. Este trabalho de cooperação inter-institucional foi cadastrado na CPG-UEL sob nº 17142-300.