

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

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Vellozia graminifolia* (Velloziaceae)

ALEXSANDRO BRANCO

Rio de Janeiro
1997

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

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Vellozia graminifolia* (Velloziaceae)

ALEXSANDRO BRANCO

Sob orientação dos Professores

Dr. Ângelo da Cunha Pinto

Dr. Raimundo Braz-Filho

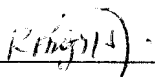
Tese submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências.
Área de concentração em Química Orgânica.

Seropédica, Rio de Janeiro
1997

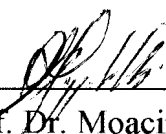
ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Vellozia graminifolia* (Velloziaceae)

ALEXSANDRO BRANCO

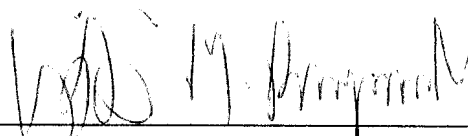
APROVADA EM 27 / 06 / 1997



Prof. Dr. Raimundo Braz Filho
(UENF)



Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti
(UFSC)



Prof. Dr. Victor Marcos Rumjanek
(UFRRJ)



Prof.^a Dr.^a Áurea Echevarria Aznar Neves Lima (Suplente)
(UFRRJ)

Aos meus pais...

... e a DEUS.

B I O G R A F I A

Alexsandro Branco, filho de Onofre Branco e Dalva Aparecida Branco, nasceu em Lages no Estado de Santa Catarina em 30 de abril de 1972.

Graduou-se em Farmácia-habilitação farmacêutico no ano de 1994 pela Universidade Federal de Santa Catarina. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq), quando participou por dois anos do projeto "*Estudos Químicos e farmacológicos Pré-clínicos de Compostos Ativos de algumas Espécies da Família Euphorbiaceae*", realizado nos laboratórios de química e farmacologia da UFSC.

AGRADECIMENTOS

Gratidão aos Professores Ângelo da Cunha Pinto e Raimundo Braz Filho pela orientação, amizade e liberdade concedida.

Ao Amigo e Professor Moacir Geraldo Pizzolatti da Universidade Federal de Santa Catarina pelos ensinamentos e incentivos.

À Coordenadora do Curso de Pós-graduação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Professora Áurea Echevarria, pela colaboração e facilidades oferecidas.

À amiga Áurea Tatagiba por participar de uma importante etapa de minha vida e por tornar muito mais agradável meus dois anos de convívio na UFRRJ, além dos espectros de RMN.

Ao Professor Victor M. Rumjanek, que ao contrário das partidas de futebol, sempre compareceu em vários aspectos na realização deste trabalho.

Aos Professores pertencentes ao Curso de Pós-graduação em Química Orgânica da UFRRJ: Silas Varella Fraiz, Áurea Echevarria, João Batista Neves da Costa, Victor M. Rumjanek, Anselmo Alpande Morais, Marco Edilson Freire de Lima, Leila Vilela Alegrio e Mário Geraldo de Carvalho.

À Professora Nanuza L. de Menezes do Instituto de Botânica da Universidade de São Paulo (IB-USP) pela classificação botânica da planta *Vellozia graminifolia*.

Aos colegas Edson Fernandes da Silva e Darí Sobrinho pelo convívio e amizade.

Às amigas Raquel Garcia e Geize Jane pela amizade.

Aos colegas Valdir Veiga Jr. e Alberto S. Pereira (UFRJ) pela colaboração no decorrer das pesquisas.

Aos amigos e funcionários Osmar Goulart Cunha, Maurício Lemos Matos, Eli Baldez Siqueira, Fábio Oliveira, Aldi Paes de Jesus e Renato "Jabá".

Ao LADETEC pela obtenção dos espectros de massas (CGAR-EM-C).

A Alberto S. Pereira (UFRJ) pelas análises de CGAR-AT e CGAR-EM-AT

A Carlos Kaiser (UFRJ) pelos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , juntamente com as técnicas bidimensionais (300 MHz).

Às Professoras Lígia M. M. Valente e Claudia M. Resende da Universidade Federal do Rio de Janeiro pela colaboração.

À Cristina Miguez do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NPPN) pelos espectros de massas.

Aos demais Professores, Funcionários da UFRRJ que, de uma forma ou outra, participaram de uma importante etapa de minha vida.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo concedida.

“Nós somos todos mais ou menos loucos”

(Baudelaire)

ÍNDICE GERAL

ABREVIATURAS	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS	xvi
ÍNDICE DE TABELAS	xxviii
ÍNDICE DE ESQUEMAS	xxxii
RESUMO	xxxiv
ABSTRACT	xxxvi
CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>Vellozia graminifolia</i> E DERIVADOS	xxxviii
1 INTRODUÇÃO	
1.1 Química de Produtos Naturais	1
1.2 Velloziaceae	5
1.2.1 Flavonóides em Velloziaceae	7
1.2.2 Terpenóides em Velloziaceae	8
1.3 Considerações biossintéticas	15
1.3.1 Flavonóides monoisoprenilados (3, 3a, 4 e 4a)	16
1.3.2 Terpenóides	16
1.3.2.1 Ácido 3 β -hidroxilabd-8(17)-en-15-óico(5)	17
1.3.2.2 Triterpenos pentacíclicos (2a, 2b, 2c e 2d)	17
2 OBJETIVOS	25
3 METODOLOGIA	26

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1	Determinação Estrutural dos Constituintes Químicos	29
4.1.1	Hidrocarbonetos Lineares (1a, 1b e 1c)	29
4.1.2	Lupenona (2a), β -amirona (2b), α -amirona (2c) e lupeol (2d)	35
4.1.3	3,5-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7:2,1-[2-(1-metiletetil)fuoro] flavona (3) e 5-hidroxi-3,3',4'-trimetoxi-6,7:2,1-[2-(1-metil etenil)fuoro] flavona (3a), em mistura	49
4.1.3.1	5-hidroxi-3,3',4'-trimetoxi-6,7:2,1-[2-(1-metil etenil)fuoro] flavona (3a)	80
4.1.4	3,5,3',4'-tetrametoxi-6,7:2,1-[2-(1-metiletetil)fuoro] flavona (4) e 4'-hidroxi-3,5,3'-trimetoxi-6,7:2,1 [2-(1-metiletetil)fuoro] flavona (4a), em mistura	91
4.1.5	Ácido 3 β -hidroxilabd-8(17)-en-15-óico (5)	112
4.1.5.1	Obtenção de 3 β -hidroxilabd-8(17)-en-15-oato de metila (5a)	121
4.1.5.2	Obtenção de 3-oxolabd-8(17)-en-15-oato de metila (5b)	138
4.1.6	Análise da estereoquímica do diterpeno 5	145
4.2	Análise de triterpenos no hexânico de <i>Vellozia graminifolia</i> por CGAR-EM	153
4.3	Análise de flavonóides em <i>Vellozia graminifolia</i> por CGAR-AT-EM	163

5	EXPERIMENTAL	
5.1	Coleta e identificação da planta <i>Vellozia graminifolia</i>	166
5.2	Obtenção dos extratos	166
5.3	Preparação do extrato hexânico para CGAR-EM	167
5.4	Isolamento e purificação dos constituintes químicos	167
5.4.1	Fracionamento do extrato hexânico	168
5.4.2	Fracionamento do extrato acetato de etila	168
5.4.3	Fracionamento do extrato metanólico	168
5.5	Derivatizações	
5.5.1	Metilação usando diazometano	
5.5.1.1	Preparo do diazometano	174
5.5.1.2	Metilação dos flavonóides 3 e 3a, em mistura	174
5.5.1.3	Metilação do diterpeno 5 com diazometano	175
5.5.2	Oxidação com reagente de Jones	
5.5.2.1	Preparo do reagente de Jones	175
5.5.2.2	Oxidação do diterpeno 5a com reagente de Jones	175
5.6	Materiais e equipamentos utilizados	
5.6.1	Solventes e adsorventes	176
5.6.2	Equipamentos	177
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	180

ABREVIATURAS

Ac	Acetila
ADP	Adenosina Difosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
CGAR-EM-C	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada a Espectrometria de Massas Computadorizada
CGAR-AT-EM	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução a Altas Temperaturas Acoplada a Espectrometria de Massas
<i>d</i>	dubleto
<i>dd</i>	duplo dubleto
DEPT	"Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer"
di	diâmetro interno
DMAPP	Pirofosfato de Dimetilalila
EM	Espectro de Massas
Fig.	Figura
HMQC	" ¹ H-Detected Heteronuclear Multiple Quantum Coherence"
HMBC	" ¹ H-Detected Heteronuclear Multiple Bond Connectivity"

IV	Infravermelho
J	constante de acoplamento
<i>m</i>	multipleteo
MHz	Megahertz
min	minutos
NOESY	"Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy"
pf	ponto de fusão
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
<i>s</i>	singleto
<i>sl</i>	singleto largo
<i>t</i>	tripleto
TMS	tetrametilsilano
ν_{\max}	frequência máxima

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Espectro na região do IV de 1a, 1b e 1c, em mistura. Pastilha de KBr	30
FIGURA 2. Espectro de RMN ^1H de 1a, 1b e 1c, em mistura (200 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	31
FIGURA 3. Cromatograma de 1a, 1b e 1c, em mistura. Análise obtida por CGAR.	32
FIGURA 4. Cromatograma de íons totais (CIT) e espectros de massas de 1a, 1b e 1c. Análise obtida por CGAR-EM-C ...	33
FIGURA 5. Espectro na região do IV de 2a, 2b, 2c e 2d, em mistura. Pastilha de KBr	37
FIGURA 6. Espectro de RMN ^1H de 2a, 2b, 2c e 2d, em mistura (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	38
FIGURA 7. Espectro bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio [$^1\text{Hx}^1\text{H}$ -COSY] de 2a, 2b, 2c e 2d, em mistura (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	39

FIGURA 8. Espectro de RMN ^{13}C [PND] de 2a, 2b, 2c e 2d, em mistura (75 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	40
FIGURA 8A. Expansão da região entre 0-60 ppm do espectro de RMN ^{13}C [PND] de 2a, 2b, 2c e 2d, em mistura (75 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	41
FIGURA 9. Espectro de RMN ^{13}C [DEPT $\theta = 135^\circ$] de 2a, 2b, 2c e 2d, em mistura (75 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	42
FIGURA 10. Espectro de RMN ^{13}C [DEPT $\theta = 90^\circ$] de 2a, 2b, 2c e 2d, em mistura (75 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	43
FIGURA 11. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 através de uma ligação [$^1\text{H}_x^{13}\text{C}$ -COSY- $^1J_{\text{CH}} = ^1\text{H}_x^{13}\text{C}$ -HMQC] de 2a, 2b, 2c e 2d, em mistura (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	44
FIGURA 12. Cromatograma de 2a, 2b, 2c e 2d, em mistura. Análise obtida por CGAR	45
FIGURA 13. Cromatograma de íons totais (CIT) e espectros de massas de 2a, 2b, 2c e 2d. Análise obtida por CGAR-EM-C.	46
FIGURA 14. Espectro na região do IV de 3 e 3a, em mistura. Pastilha de KBr	55

FIGURA 15. Cromatograma de 3 (pico b) e 3a (pico a), em mistura.	
Análise obtida por CGAR-AT	56
FIGURA 16. Espectro de RMN ¹³ C-Pendant de 3 e 3a, em mistura	
(75 MHz, CDCl ₃). TMS como referência interna	57
FIGURA 16A. Expansão da região entre 120-180 ppm do espectro de	
RMN ¹³ C-Pendant de 3 e 3a, em mistura	
(75 MHz, CDCl ₃). TMS como referência interna	58
FIGURA 17. Cromatograma de íons totais (CIT) e espectros de massas	
de 3 e 3a. Análise obtida por CGAR-AT-EM.	59
FIGURA 18. Espectro de RMN ¹ H de 3 e 3a, em mistura	
(300 MHz, CDCl ₃). TMS como referência interna	60
FIGURA 19. Expansão da região entre 3.8-4.0 ppm do espectro	
de RMN ¹ H de 3 e 3a, em mistura	
(300 MHz, CDCl ₃). TMS como referência interna	61
FIGURA 20. Expansão da região entre 2.9-3.5 ppm do espectro	
de RMN ¹ H de 3 e 3a, em mistura	
(300 MHz, CDCl ₃). TMS como referência interna	62
FIGURA 21. Expansão da região entre 6.4-8.0 ppm do espectro	
de RMN ¹ H de 3 e 3a, em mistura	
(300 MHz, CDCl ₃). TMS como referência interna	63

FIGURA 22. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 a longa distância [$^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e 3) = $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -HMBC] de 3 e 3a, em mistura (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna 64

FIGURA 23. Expansão das regiões entre 1.5-4.5 e 80-160 ppm do espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 a longa distância [$^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e 3) = $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -HMBC] de 3 e 3a, em mistura (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna 65

FIGURA 24 Expansão das regiões entre 4.5-8.0 e 80-180 ppm do espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 a longa distância [$^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) = $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -HMBC] de 3 e 3a, em mistura (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna 66

FIGURA 25. Expansão das regiões entre 2.9-3.5 e 80-180 ppm do espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 a longa distância [$^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e 3) = $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -HMBC] de 3 e 3a, em mistura (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna 67

FIGURA 26. Expansão das regiões entre 4.5-8.0 e 80-200 ppm do espectro bidimensional de correlação heteronuclear de

hidrogênio e carbono-13 a longa distância [$^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -
COSY- nJ_{CH} ($n = 2$ e 3) = $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -HMBC] de 3 e 3a,
em mistura (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna 68

FIGURA 27. Espectro bidimensional de correlação homonuclear de
hidrogênio [$^1\text{Hx}^1\text{H}$ -COSY] de 3 e 3a, em mistura
(300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna 69

FIGURA 28. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de
hidrogênio e carbono-13 através de uma ligação
[$^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -COSY- $^1J_{\text{CH}} = ^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -HMQC] de 3 e 3a,
em mistura (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna 70

FIGURA 28A. Expansão das regiões entre 4.5-8.0 e 80-130 ppm do
espectro bidimensional de correlação heteronuclear
de hidrogênio e carbono-13 através de uma ligação
[$^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -COSY- $^1J_{\text{CH}} = ^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -HMQC] de 3 e 3a,
em mistura (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna 71

FIGURA 29. Espectro bidimensional de correlação homonuclear
dipolar [$^1\text{Hx}^1\text{H}$ -NOESY] de 3 e 3a, em mistura
(300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna 72

FIGURA 30. Expansão das regiões entre 3.8-5.5 e 3.0-5.5 ppm
do espectro bidimensional de correlação homonuclear
dipolar [$^1\text{Hx}^1\text{H}$ -NOESY] de 3 e 3a, em mistura

	(300 MHz, CDCl ₃). TMS como referência interna	73
FIGURA 31.	Expansão das regiões entre 1.7-1.9 e 2.9-3.5 ppm do espectro bidimensional de correlação homonuclear dipolar [¹ Hx ¹ H-NOESY] de 3 e 3a, em mistura (300 MHz, CDCl ₃). TMS como referência interna	74
FIGURA 32.	Expansão das regiões entre 2.8-3.6 e 5.2-5.5 ppm do espectro bidimensional de correlação homonuclear dipolar [¹ Hx ¹ H-NOESY] de 3 e 3a, em mistura (300 MHz, CDCl ₃). TMS como referência interna	75
FIGURA 33.	Espectro na região do IV de 3a. Pastilha de KBr	82
FIGURA 34.	Espectro de RMN ¹³ C-Pendant de 3a (75 MHz, CDCl ₃). TMS como referência interna	83
FIGURA 34A.	Expansão da região entre 130-190 ppm do espectro de RMN ¹³ C-Pendant de 3a (75 MHz, CDCl ₃). TMS como referência interna	84
FIGURA 35.	Espectro de RMN ¹ H de 3a (300 MHz, CDCl ₃). TMS como referência interna	85
FIGURA 35A.	Expansão da região entre 2.5-6.0 ppm do espectro de RMN ¹ H de 3a (300 MHz, CDCl ₃). TMS como referência interna	86

- FIGURA 35B. Expansão da região entre 6.4-7.8 ppm do espectro de RMN ^1H de 3a (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna. 87
- FIGURA 36. Espectro bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio [$^1\text{H}_x^1\text{H}$ -COSY] de 3a (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna 88
- FIGURA 37. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 através de uma ligação [$^1\text{H}_x^{13}\text{C}$ -COSY- $^1\text{J}_{\text{CH}} = ^1\text{H}_x^{13}\text{C}$ - HMQC) de 3a (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna 89
- FIGURA 38. Espectro na região do IV de 4 e 4a, em mistura. Pastilha de KBr 94
- FIGURA 39. Cromatograma de 4 (pico c) e 4a (pico d), em mistura. Análise obtida por CGAR-AT 95
- FIGURA 40. Espectro de RMN ^{13}C [PND] de 4 e 4a, em mistura. (75 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna 96
- FIGURA 40A. Expansão da região entre 80-200 ppm do espectro de RMN ^{13}C [PND] de 4 e 4a, em mistura. (75 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna 97
- FIGURA 41. Espectro de RMN ^{13}C [DEPT $\theta = 90^\circ$] de 4 e 4a, em mistura (75 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna 98

FIGURA 41A. Expansões das regiões entre 40-70 e 100-140 ppm do espectro de RMN ^{13}C [DEPT $\theta = 90^\circ$] de 4 e 4a, em mistura (75 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	99
FIGURA 42. Espectro de RMN ^{13}C [DEPT $\theta = 135^\circ$] de 4 e 4a, em mistura (75 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna.	100
FIGURA 43. Cromatograma de ions totais (CIT) e espectros de massas de 4 e 4a, em mistura. Análise obtida por CGAR-AT-EM.	101
FIGURA 44. Espectro de RMN ^1H de 4 e 4a, em mistura (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	105
FIGURA 45. Espectro na região do IV de 5. Pastilha de KBr	114
FIGURA 46. Espectro de RMN ^1H de 5 (200 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	115
FIGURA 47. Espectro de RMN ^{13}C [PND e DEPT ($\theta = 90^\circ$ e 135°)] de 5 (50 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	116
FIGURA 48. Espectro de massas de 5 obtido por impacto de elétrons (70 eV)	117
FIGURA 49. Espectro bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio [$^1\text{Hx}^1\text{H}$ -COSY] de 5 (200 MHz, CDCl_3) TMS como referência interna	118

FIGURA 50. Espectro de RMN ^1H de 5a (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	123
FIGURA 50A. Expansão da região entre 0.9-3.7 do espectro de RMN ^1H de 5a (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna.	124
FIGURA 51. Espectro de RMN ^{13}C [PND] de 5a (75 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	125
FIGURA 52. Espectro de RMN ^{13}C [DEPT $\theta = 135^\circ$] de 5a (75 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	126
FIGURA 53. Espectro de RMN ^{13}C [DEPT $\theta = 90^\circ$] de 5a (75 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	127
FIGURA 54. Espectro bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio [$^1\text{H}_x^1\text{H}$ -COSY] de 5a (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	128
FIGURA 54A. Expansões das regiões entre 0-2.5 e 0-2.5 ppm do espectro bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio [$^1\text{H}_x^1\text{H}$ -COSY] de 5a (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	129
FIGURA 55. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 a uma ligação [$^1\text{H}_x^{13}\text{C}$ -COSY- $^1\text{J}_{\text{CH}} = ^1\text{H}_x^{13}\text{C}$ -HMQC] de 5a	

(300 MHz, CDCl₃). TMS como referência interna 130

FIGURA 55A. Expansão das regiões entre 0.5-3.5 e 10-80 ppm do espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 a uma ligação [¹Hx¹³C-COSY-¹J_{CH} = ¹Hx¹³C-HMQC] de 5a

(300 MHz, CDCl₃). TMS como referência interna 131

FIGURA 56. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 a longa distância [¹Hx¹³C-COSY-ⁿJ_{CH} (n = 2 e 3) = ¹Hx¹³C-HMBC)] de 5a

(300 MHz, CDCl₃). TMS como referência interna 132

FIGURA 56A. Expansão das regiões entre 0.6-1.0 e 10-45 ppm do espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 a longa distância [¹Hx¹³C-COSY-ⁿJ_{CH} (n = 2 e 3) = ¹Hx¹³C-HMBC] de 5a

(300 MHz, CDCl₃). TMS como referência interna 133

FIGURA 56B. Expansão das regiões entre 1.2-2.0 e 10-45 ppm do espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 a longa distância [¹Hx¹³C-COSY-ⁿJ_{CH} (n = 2 e 3) = ¹Hx¹³C-HMBC] de 5a

(300 MHz, CDCl₃). TMS como referência interna 134

FIGURA 56C. Expansão das regiões entre 4.4-4.9 e 35-60 ppm do espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 a longa distância [$^1\text{H}_x^{13}\text{C}$ -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e 3)= $^1\text{H}_x^{13}\text{C}$ -HMBC] de 5a (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	135
FIGURA 57. Espectro de RMN ^1H de 5b (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	139
FIGURA 57A. Expansão da região entre 0-2.1 do espectro de RMN ^1H de 5b (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	140
FIGURA 58. Espectro bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio [$^1\text{H}_x^1\text{H}$ -COSY] de 5b (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	141
FIGURA 58A. Expansão das regiões entre 0-2.6 e 0-0.6 ppm do espectro Espectro bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio [$^1\text{H}_x^1\text{H}$ -COSY] de 5b (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	142
FIGURA 59. Espectro de Massas de 5b obtido por impacto de elétrons (70 eV)	143
FIGURA 60. Espectro bidimensional de correlação homonuclear dipolar [$^1\text{H}_x^1\text{H}$ -NOESY] de 5a (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	147

FIGURA 60A. Expansão das regiões entre 0-2.5 e 0-2.5 ppm do espectro bidimensional de correlação homonuclear dipolar [$^1\text{Hx}^1\text{H}$ -NOESY] de 5a (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	148
FIGURA 61. Espectro bidimensional de correlação homonuclear dipolar [$^1\text{Hx}^1\text{H}$ -NOESY] de 5b (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	149
FIGURA 61A. Expansão das regiões entre 0-2.6 e 0-2.6 ppm do espectro bidimensional de correlação homonuclear dipolar [$^1\text{Hx}^1\text{H}$ -NOESY] de 5b (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna	150
FIGURA 62. Cromatograma do extrato hexânico de <i>Vellozia graminifolia</i> . Análise obtida por CGAR	155
FIGURA 63. Cromatograma de íons totais (CIT) e espectros de massas do extrato hexânico de <i>Vellozia graminifolia</i> . Análise obtida por CGAR-EM-C	156
FIGURA 64. Cromatograma obtido através da coeluição entre 3 e 3a e os picos a e b, contidos na mistura de 4 (pico c) + 4a (pico d). Análise obtida por CGAR-AT	165

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA I. Flavonóis C-metilados identificados na família Velloziaceae no período entre 1992-1994	9
TABELAII. Flavonóis prenilados identificados na família Velloziaceae no período entre 1992-1994	10
TABELA III. Furanoflavonóis identificados na família Velloziaceae no período entre 1992-1994	11
TABELA IV. Comparação dos dados de RMN ^{13}C (75 MHz) de 2a e 2b com lupenona e β -amirona descritos na literatura	48
TABELA V. Atribuição dos deslocamentos químicos (δ_{H} e δ_{C}) de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) para os flavonóides 3 e 3a, em mistura (CDCl_3), incluindo os resultados dos experimentos heteronucleares 2D HMQC [$^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -COSY- 1J_{CH}] e HMBC [$^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -COSY- $n\text{J}_{\text{CH},n}$ = 2 e 3]	76

TABELA VI. Dados de $^1\text{Hx}^1\text{H-COSY}$ [acoplamento escalar] e $^1\text{Hx}^1\text{H-NOESY}$ [acoplamento dipolar] para os flavonóides 3 e 3a (300 MHz, CDCl_3, δ)	78
TABELA VII. Atribuição dos deslocamentos químicos (δ_{H} e δ_{C}) de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) para o flavonóide 3a (CDCl_3), incluindo os resultados do experimento heteronuclear 2D HMQC [$^1\text{Hx}^{13}\text{C-COSY-}^1\text{J}_{\text{CH}}$]	90
TABELA VIII. Atribuição dos deslocamentos químicos (δ_{H} e δ_{C}) de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) para os flavonóides 4 e 4a em mistura (CDCl_3)	106
TABELA IX. Comparação dos dados de RMN ^{13}C (75 MHz) de 4 e 4a com o flavonóide 3a descrito no item 4.1.4	108
TABELA X. Atribuição dos deslocamentos químicos (δ_{H} e δ_{C}) de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) para o diterpeno 5 (CDCl_3), incluindo comparações em RMN ^{13}C com estruturas-modelo descritas na literatura	119
TABELA XI. Dados espectrais de (δ_{H} e δ_{C}) de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) para o diterpeno 5a (CDCl_3), incluindo os resultados dos experimentos heteronucleares 2D HMQC [$^1\text{Hx}^{13}\text{C-COSY-}^1\text{J}_{\text{CH}}$] e	

HMBC [$^1\text{H}_x^{13}\text{C}$ -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH},n} = 2$ e 3]	136
TABELA XII. Dados de $^1\text{H}_x^1\text{H}$ -NOESY [acoplamento dipolar] para o diterpeno 5a (300 MHz, CDCl_3, δ)	151
TABELA XIII. Fracionamento do extrato hexânico	171
TABELA XIV. Fracionamento do extrato acetato de etila	172

ÍNDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA	1. Esqueletos diterpênicos isolados de Velloziaceae.	13
ESQUEMA	2. Esqueletos triterpênicos isolados de Velloziaceae.	14
ESQUEMA	3. Proposta biossintética da formação de uma flavanona a partir do ácido chiquímico	19
ESQUEMA	4. Proposta biossintética para 3, 3a, 4 e 4a partindo de uma flavanona	20
ESQUEMA	5. Formação do pirofosfato de dimetilalila a partir do ácido mevalônico	21
ESQUEMA	6. Proposta biossintética do diterpeno 5 partindo do pirofosfato de dimetilalila	22
ESQUEMA	7. Mecanismo para formação do esqualeno a partir da conversão de duas moléculas de pirofosfato de farnesila (PFF)	23

ESQUEMA 8. Proposta biossintética para os triterpenos pentacíclicos 2a, 2b, 2c e 2d	24
ESQUEMA 9. Metodologia aplicada no estudo fitoquímico de <i>Vellozia graminifolia</i>	27
ESQUEMA 10. Prováveis caminhos de fragmentação para justificar os principais picos registrados no espectro de massas de 3 e 3a	79
ESQUEMA 11. Prováveis caminhos de fragmentação para justificar os principais picos registrados no espectro de massas de 4	110
ESQUEMA 12. Prováveis caminhos de fragmentação para justificar os principais picos registrados no espectro de massas de 4a	111
ESQUEMA 13. Prováveis caminhos de fragmentação para justificar os principais picos registrados no espectro de massas de 5	120
ESQUEMA 14. Prováveis caminhos de fragmentação para justificar os principais picos registrados no espectro de massas de 5b	144

ESQUEMA 15. Configuração relativa e as interações dipolares	
observadas no espectro 2D $^1\text{Hx}^1\text{H}$ -NOESY de 5a	152
ESQUEMA 16. Obtenção dos extratos de <i>Vellozia graminifolia</i>	170
ESQUEMA 17. Partição do extrato metanólico por solventes orgânicos	173

RESUMO

Vellozia graminifolia (Velloziaceae) foi coletada na Chapada da Diamantina, em Minas Gerais, e identificada pela professora Nanuza Luiza de Menezes do Instituto de Botânica da Universidade de São Paulo (IB-USP). O estudo fitoquímico do extrato hexânico, obtido a partir de caule, raízes e bainhas de folha, conduziu ao isolamento e a identificação de uma mistura de alcanos alifáticos (1a, 1b e 1c), uma mistura de triterpenos pentacíclicos [lupenona (2a), β -amirona (2b), α -amirona (2c) e lupeol (2d)], dos flavonóides monoisoprenilados 3,5-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7:2,1-[2-(1-metiletênil)furo] flavona (3), 5-hidroxi-3,3',4'-trimetoxi-6,7:2,1-[2-(1-metiletênil) furo] flavona (3a) e do diterpeno ácido 3 β -hidroxilabd-8(17)-en-15-óico (5). O extrato em acetato de etila forneceu uma mistura dos flavonóides monoisoprenilados 3,5,3',4'-tetrametóxi-6,7:2,1-[2-(1-mefiletênil)furo] flavona (4) e 4'-hidroxi-3,5,3'-trimetóxi-6,7:2,1-[2-(1-metiletênil)furo] flavona (4a).

As estruturas destas substâncias naturais foram determinadas com base em dados espectrais, incluindo experimentos de RMN-2D, e em transformações químicas. A estereoquímica relativa do diterpeno 5 foi determinada por NOESY.

O flavonóide monoisoprenilado 3 é descrito aqui pela primeira vez como um composto natural, sendo seus derivados 3-éter metílico (3a) e 3,5-diéter metílico (4) e o flavonóide 4a, também monoisoprenilado, conhecidos. O diterpeno da série labdano (5) é registrado pela primeira vez em Velloziaceae.

Através da aplicação da cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de massas computadorizada (CGAR-EM-C) foi possível caracterizar, no extrato hexânico de *Vellozia graminifolia*, a presença de compostos triterpênicos comuns no gênero *Vellozia*.

O emprego da CGAR a altas temperaturas acoplada a espectrometria de massas mostrou toda a potencialidade desta técnica, como método analítico alternativo, para a identificação de compostos flavonoídicos, mesmos estando estes em mistura.

A B S T R A C T

Vellozia graminifolia (Velloziaceae) was collected at the Chapada da Diamantina, State of Minas Gerais, and identified by Professora Nanuza Luiza de Menezes of the Instituto de Botânica da Universidade de São Paulo (IB-USP). The investigation of the hexane extract of the roots, stems and pods led to the isolation of a mixture of aliphatic alkanes, a mixture of pentacyclic triterpenes (lupenone, α -amirone, β -amirone and lupeol), monoisoprenylated flavonoids 3,5-dihydroxy-3',4'-dimethoxy-6,7:2,1-[2-(1-metyletenyl)furo] flavone, 5-hydroxy-3,3',4'-trymethoxy-6,7:2,1-[2-(1-metyletenyl)furo] flavone and of the diterpene 3 β -hydroxylabd-8(17)-en-15-oic acid. The ethyl acetate extract furnished a mixture of the monoisoprenylated flavonoids 4'-hydroxy-3,5,3'-trymethoxy-6,7:2, 1-[2-(1-methyl ethenyl)furo] flavone and 3,5,3',4'-tetramethoxy-6,7:2,1-[2-(1-methyl ethenyl)furo] flavone.

The structural determination of these natural products was made on the basis of spectral data, including 2D-NMR techniques such as the ¹H-Detected Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence (HMQC), ¹H-Detected Multiple-Bond

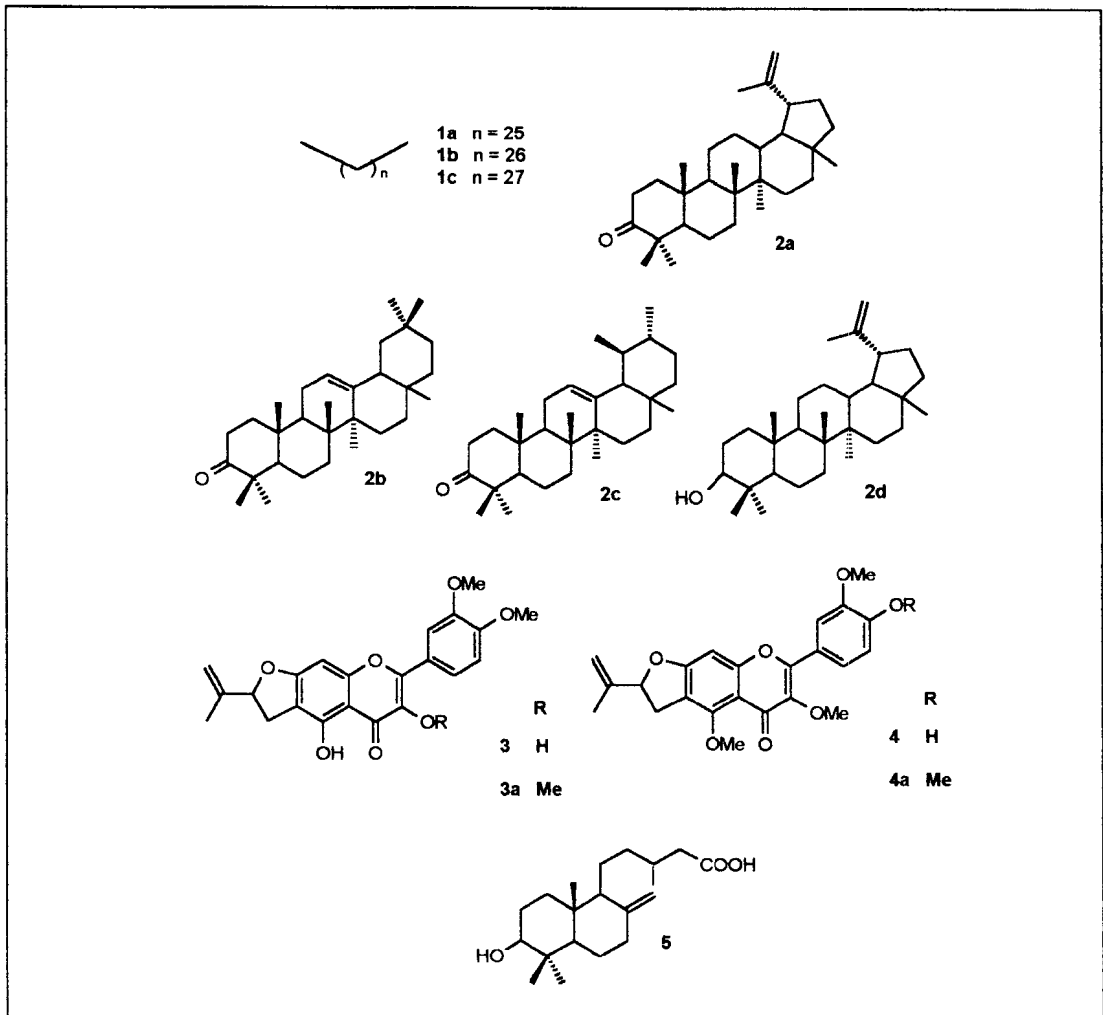
Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence (HMBC) and Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY), together with the aid of chemical analysis.

To the best of our knowledge, 3,5-dihydroxy-3',4'-dimethoxy-6,7:2,1-[2-(1-metyletenyl)furo] flavone is hitherto unreported as a natural product. The diterpene of the labdane series was identified for the first time in Velloziaceae family.

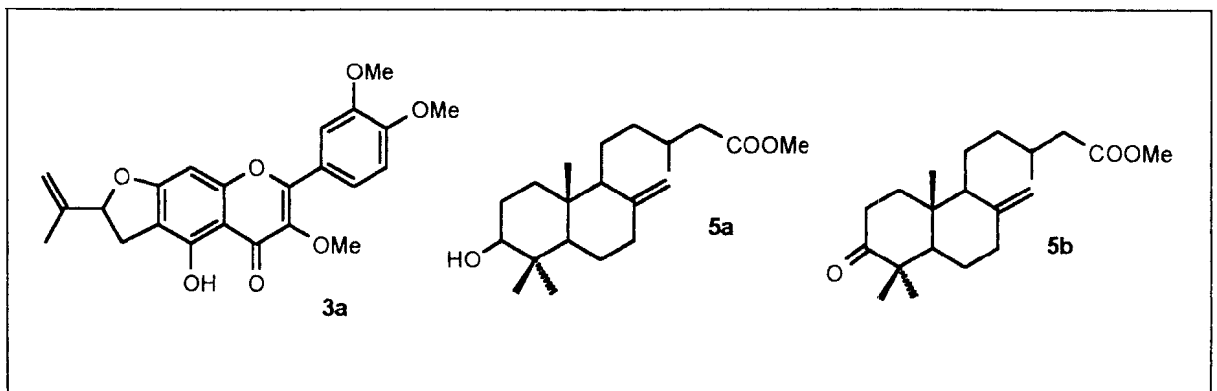
The use of high resolution gas chromatography coupled to mass spectrometry allowed to observe the presence, in the hexane extract of *Vellozia graminifolia*, of triterpenes common to the *Vellozia* genus.

The use of HRGC at high temperatures coupled to mass spectrometry proved to be useful as an alternative method for the identification of flavonoids in mixtures.

CONSTITUÍNTES QUÍMICOS



DERIVADOS



I N T R O D U Ç Ã O

1.1 Química de produtos naturais

O avanço da tecnologia o surgimento de novas moléculas de interesse comercial, as mudanças nos princípios éticos e, principalmente, o grande potencial biológico com seu químismo dinâmico controlando a convivência dos organismos vivos das florestas tropicais são alguns dos motivos que fazem da *Química de Produtos Naturais* uma promissora área de intensa atividade científica¹.

Esta ciência sustenta-se evolutivamente em disciplinas básicas como a seleção e coleção de plantas, técnicas de isolamento, métodos de elucidação estrutural, princípios de evolução biológica, semissíntese e caminhos de biossíntese, que podem ser melhor entendidos e/ou acompanhados através de revistas especializadas, tais como: *Phytochemistry*, *Journal of Natural Products*, *Natural Product Reports*, *Phytochemical Analysis*, *Natural Product Letters*, *Phytotherapy Research*, *Thai Journal of Phytochemistry* e a *International Journal of Pharmacognosy*. Revistas de renome tradicionais como *Phytochemistry* e *Journal of Natural Products*" vem constantemente aumentando o enfoque sobre a atividade farmacológica de Produtos Naturais. Por exemplo, em 1984, o *Journal of Natural Products* publicou em seis números, 1088 páginas, sendo que, em 1994 foram doze números contendo 1787 páginas sobre o assunto, bem como, a avaliação biológica de plantas medicinais publicadas em cada ano².

As estratégias científicas para o estudo e pesquisa de produtos naturais tem sofrido, nas últimas décadas, mudanças substanciais². Uma das mais importantes diretrizes concentra-se no desenvolvimento de novas moléculas com propriedades terapêuticas, pois a natureza tem sido para o homem, ao longo de sua existência, uma fonte essencial no fornecimento de agentes medicinais usados no tratamento de diversas doenças. Na lista seleta de drogas essenciais da Organização Mundial de Saúde (OMS), 11.1% das 252 drogas incluídas em 1985 foram produzidas a partir de fontes vegetais. Este percentual representa um número insignificante diante das

aproximadamente 600.000 espécies existentes no planeta Terra, aonde apenas 10% tiveram algum tipo de estudo científico, seja do aspecto químico ou farmacológico³.

O desenvolvimento de novas técnicas cromatográficas para o isolamento e espectroscópicas para determinação estrutural de produtos naturais, tem facilitado significativamente as investigações fitoquímicas. Algumas técnicas vem sendo aplicadas com sucesso no estudo de extratos considerados complexos, revelando grande habilidade nos processos de separação e purificação de seus constituintes. Podemos citar como exemplo, a cromatografia de gotas em contra-corrente (CGCC), a eletroforese capilar (EC), a cromatografia de rotação locular em contracorrente (CRLCC), a cromatografia de partição centrifugal (CPC) e a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE)².

As pesquisas em produtos naturais enfrentam também o desafio da elucidação estrutural dos produtos bioproduzidos pelo metabolismo secundário. As técnicas básicas para esta tarefa continuam sendo as mesmas dos últimos quinze anos: UV, IV, RMN de ^1H e ^{13}C , EM, raios X, rotação ótica e dicroísmo circular. O que mudou, principalmente como resultado da revolução dos programas computacionais, foi o nível de automatização e de sofisticação dos equipamentos, proporcionando a utilização de novas técnicas experimentais. Neste contexto, a ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono-13 (RMN ^{13}C) alcançaram progresso substancial, permitindo a aplicação de experiências uni-(1D) e bidimensionais (2D), tais como: $^1\text{Hx}^1\text{H}$ -COSY, $^1\text{Hx}^1\text{H}$ -DQF-COSY, HOHAHA, $^1\text{Hx}^1\text{H}$ -NOESY, ROESY,

$^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ -COSY- $^1\text{J}_{\text{CH}}$, HMQC, HMBC, FLOCK, selective INEPT, COLOC e INADEQUATE⁴.

Outra metodologia que vem sendo largamente aplicada na caracterização de classes de compostos é a cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a espectrômetro de massas, envolvendo a coinjeção com padrões adequados e colunas de polaridades diferentes. Rapidez, economia de tempo e a detecção de compostos em baixa concentração numa amostra, no qual seria pouco provável o isolamento por métodos fitoquímicos convencionais, são algumas das vantagens oferecidas por este método^{6,7}.

Para se ter uma idéia da versatilidade desta metodologia, podemos citar como exemplo a aplicação da CGAR na minuciosa investigação de alcalóides terciários em espécies do gênero *Strychnos* obtidas em diversos herbários. A sensibilidade da técnica permitiu detectar em uma única folha seca (183 mg) de *S. nux-vomica*, coletada em 1675, 2.2 mg de alcalóides terciários. Destes alcalóides, 10 foram identificados por este método juntamente com a comparação de suas características espectrais (UV e EM) com padrões autênticos, anteriormente isolados do gênero *Strychnos*⁸.

Velloziaceae

Velloziaceae é uma família de monocotiledôneas com aproximadamente 270 espécies vegetais em forma de arbustos e ervas perenes, apresentando capacidade vital para habitar solos arenosos e rochosos submetidos a alta incidência solar e pouca água. As plantas desta família são encontradas em Madagascar, África e principalmente, no Brasil, sendo a Serra do Cipó e a Chapada da Diamantina (MG) os seus principais centros de diversidade^{9,10}.

Uma ampla discussão tem sido feita sobre as limitações de seus gêneros e subfamílias. Numa série de estudos sobre a morfologia floral e anatomia foliar,

Menezes^{11,12} divide a família Velloziaceae em duas subfamílias: Vellozioidae e Barbacenioidae. Neste sistema a subfamília Vellozioidae apresenta dois gêneros: *Vellozia* (flores com nove ou mais estames e sem coroa) e *Xerophyta* (flores com seis estames e sem coroa), a subfamília Barbacenioidae, apresenta-se constituída por quatro gêneros: *Pleurostima*, *Aylthonia*, *Burlemaxia* e *Barbacenia* (flores de seis estames e coroa). Esta classificação difere da de Smith e Ayensu^{13,14}, que consideram Vellozioidae com os gêneros *Vellozia* e *Nanuzia* e Barbacenioidae com os gêneros *Barbaceniopsis*, *Talbotia*, *Xerophyta* e *Barbacenia*.

A utilização de marcadores quimiotaxonômicos tem contribuído para a classificação de Velloziaceae. Pesquisa realizada com 99 espécies¹⁵ mostrou que 68% continham flavonóis O-glicosilados e 48% flavonas C-glicosiladas, sendo que a subfamília Vellozioidae bioproduz muito mais flavonas no estado livre do que glicosiladas, esta característica a distinguiu da subfamília Barbacenioidae. Entretanto, espécies de *Vellozia* e *Xerophyta* apresentaram padrões flavonoídicos semelhantes, revelando-se de acordo com a classificação de Menezes. A presença de alcanos na superfície foliar de 110 espécies¹⁶ de gêneros diferentes confirmaram o restabelecimento de *Pleurostima* e a formação de *Burlemaxia*, mas não atingiu suporte para o reconhecimento de *Xerophyta* de *Vellozia* e *Aylthonia* de *Barbacenia*. O restabelecimento do gênero *Pleurostima* também é proposto em outro trabalho¹⁷ com base em um distinto grupo de espécies da subfamília Barbacenioidae *sensu* Menezes. Dentro deste gênero uma nova secção é proposta: secção *Graziela*.

1.2.1 Flavonóides em Velloziaceae

A pesquisa de flavonóides na família Velloziaceae começou em 1987 com o isolamento do biflavonóide amentoflavona de *Xerophyta plicata*¹⁸. Este tipo de flavonóide é raramente encontrado em monocotiledôneas. Estas evidências serviram, provavelmente, como estímulo adicional para Harborne e colaboradores a investigarem com mais detalhe a presença destes compostos na família. Espécies de diversos gêneros foram submetidas a investigação onde se fez, além da detecção de compostos inéditos, a utilização dos mesmos como marcadores quimiosistemático¹⁵ na família Velloziaceae¹⁹⁻²⁴.

Entre os anos de 1992-1994 foram isolados 50 novas flavonas e 62 novos flavonóis de fontes vegetais, sendo que 22 destes flavonóides (20%) foram encontrados em espécies pertencentes à família Velloziaceae²⁵. O gênero *Vellozia* vem se destacando nas variações destes compostos, onde pode-se destacar, seis C-metilflavonóis 19-23 [Tabela I] (pag. 9), três flavonóis prenilados 19-21 [Tabela II] (pag. 10) e treze diidrofuroflavonóis^{19,20,22,24}, dos quais três também são C-metilados [Tabela III] (pag. 11).

A família Velloziaceae é sem dúvida uma nova fonte de flavonóis prenilados, sendo que esta classe de flavonóides é encontrada com mais frequência em dicotiledôneas, onde se destaca a família Leguminosae.

1.2.2 Terpenóides em Velloziaceae

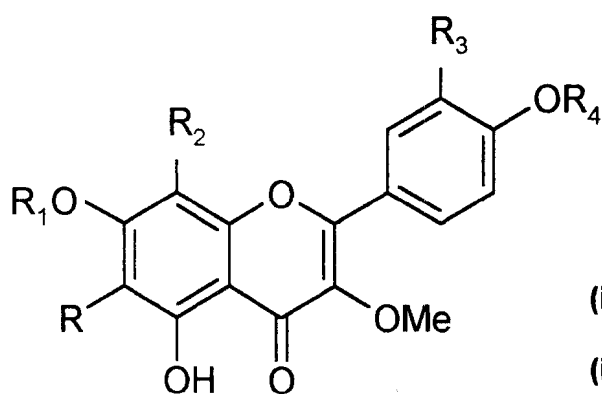
O estudo químico de espécies da família Velloziaceae, pertencentes à flora brasileira, iniciou-se em 1976 no Núcleo de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a coordenação do Prof. Ângelo da Cunha Pinto. Este estudo resultou, até o momento, no isolamento e caracterização de 160 novos diterpenos, distribuídos entre nove diferentes esqueletos [Esquema 1]²⁶⁻⁵⁹ (pag. 13), e 30 triterpenos distribuídos em seis diferentes séries [Esquema 2]⁵⁶⁻⁶² (pag. 14).

A partir destes compostos foi possível estudar a reatividade química de di e triterpenos⁶³, analisar detalhadamente as fragmentações características de isopimaranos oxigenados no carbono C-7 por espectrometria de massas⁶⁴, discutir os efeitos causados pela introdução de grupos substituintes no deslocamento químico de carbono-13 de diterpenos com esqueleto pimarano⁶⁵, entre outros. A ampla distribuição de compostos terpenoídicos na família Velloziaceae contribuiu, também, para a formação de um vasto banco de padrões usados na técnica da co-injeção em CGAR juntamente com colunas de diferentes polaridades⁶⁶.

TABELA I

**C-metilflavonóis identificados na família Velloziaceae,
no período entre 1992-1994**

6-C-metil-3-O-metilquercetina (i)	<i>Vellozia phalocarpa</i>
8-C-metil-3,6,7-tri-O-metilcanferol (ii)	<i>Vellozia nanuzae</i>
8-C-metil-3,6,7-tri-O-metilquercetagetina (iii)	<i>V. lilacina</i> e <i>V. aff. epidendroides</i>
8-C-metil-3,6,3'-tri-O-metilquercetagetina (iv)	<i>V. nanuzae</i>
8-C-metil-3,6,7,3'-treta-O-metilquercetagetina (v)	<i>V. aff. epidendroides</i>
8-C-metil-3,6,7,4'-treta-O-metilquercetagetina (vi)	<i>V. nanuzae</i> e <i>V. phalocarpa</i>

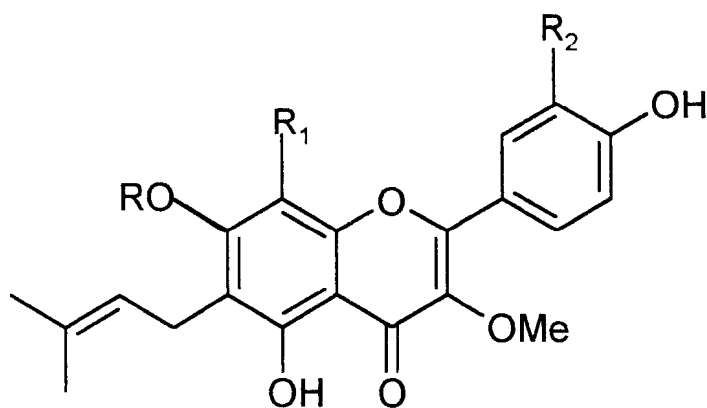


	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(i)	Me	H	H	OH	H
(ii)	OMe	Me	Me	H	H
(iii)	OMe	Me	Me	OH	H
(iv)	OMe	H	Me	OMe	H
(v)	OMe	Me	Me	OMe	H
(vi)	OMe	Me	Me	OH	Me

TABELA II

**Flavonóis prenilados identificados na família Velloziaceae,
no período entre 1992-1994**

6-C-prenil-3,8-di-O-metilherbacetina (vii)	<i>V. aff. scoparia</i>
6-C-prenil-3-O-metilquercetina (xiii)	<i>V. coronata</i>
6-C-prenil-3,7-di-O-metilquercetina (ix)	<i>V. coronata</i>



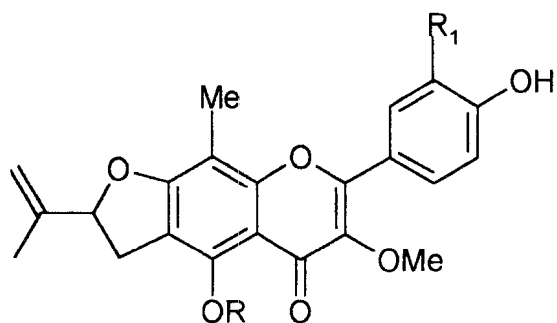
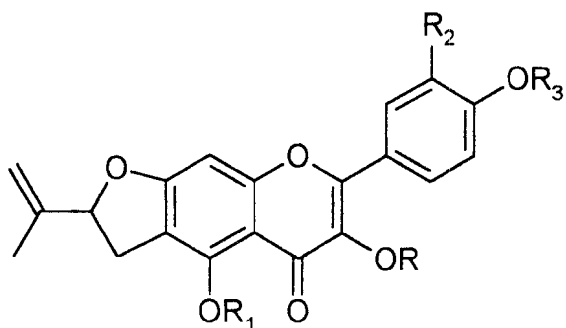
	R	R ₁	R ₂
(vii)	OH	OMe	H
(viii)	H	H	OH
(ix)	Me	H	OH

TABELA III

**Furoflavonóis identificados na família Velloziaceae,
no período entre 1992-1994**

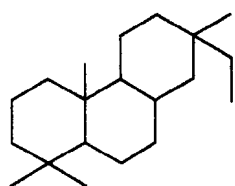
2''-Isopropenildihidrofuro[4'',5'':6,7]canferol (x)	<i>V. stipitata e V. streptophylla</i>
3-O-metil-2''-Isopropenildihidrofuro[4'',5'':6,7]canferol (xi)	<i>V. stipitata e V. streptophylla</i>
3,4'-di-O-metil-2''-Isopropenildihidrofuro[4'',5'':6,7]canferol (xii)	<i>V. stipitata e V. streptophylla</i>
3,5-di-O-metil-2''-Isopropenildihidrofuro[4'',5'':6,7]canferol (xiii)	<i>V. stipitata</i>
Velloquercetina (xiv)	<i>V. stipitata e V. streptophylla</i>
4'-O-metilvelloquercetina (xv)	<i>V. stipitata e V. streptophylla</i>
3,3'-di-O-metilvelloquercetina (xvi)	<i>V. stipitata e V. streptophylla</i>
3,3',4'-tri-O-metilvelloquercetina (xvii)	<i>V. stipitata e V. streptophylla</i>
3-O-metilvelloquercetina (xviii)	<i>V. stipitata</i>
3,5,3'-tri-O-metilvelloquercetina (xix)	<i>V. stipitata</i>
8-C-metil-3,5-di-O-metilvellocanferol (xx)	<i>V. stipitata</i>
8-C-metil-3-O-metilvelloquercetina (xxi)	<i>V. stipitata</i>
8-C-metil-3,5,3'-tri-O-metilvelloquercetina (xxii)	<i>V. stipitata</i>

Continuação...

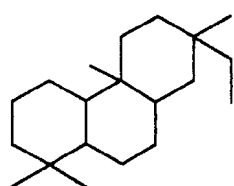


	R	R ₁	R ₂	R ₃
(x)	H	H	H	H
(xi)	Me	H	H	H
(xii)	Me	H	Me	Me
(xiii)	Me	Me	H	H
(xiv)	H	H	OH	H
(xv)	H	H	H	Me
(xvi)	Me	H	OMe	H
(xvii)	Me	H	OMe	Me
(xviii)	Me	H	OH	H
(xix)	Me	Me	OMe	H

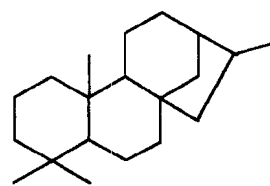
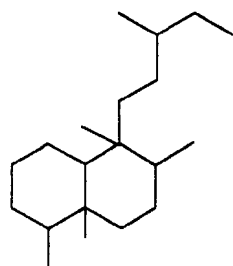
	R	R ₁
(xx)	Me	H
(xxi)	H	OH
(xxii)	Me	OMe

ESQUEMA 1**Esqueletos diterpênicos isolados de Velloziaceae**

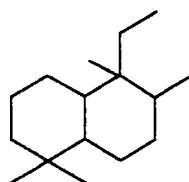
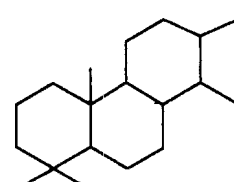
isopimarano



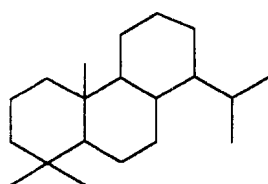
rosano

*ent*-caurano

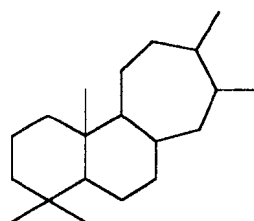
clerodano

tetra-*nor* friedo-labdano

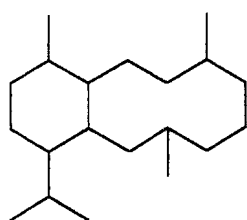
cleistantano



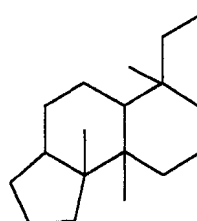
totarano



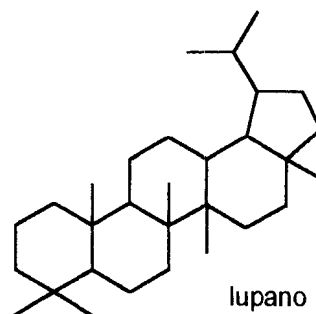
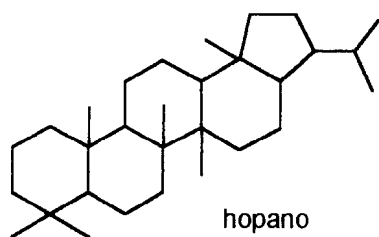
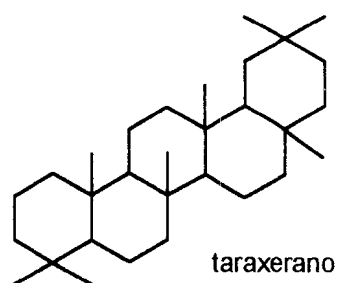
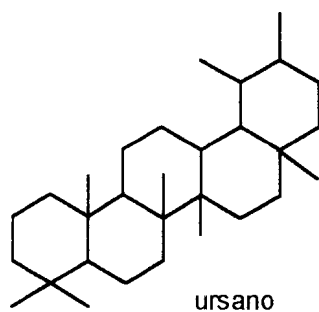
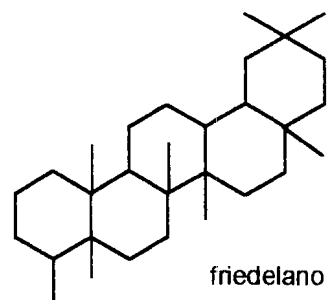
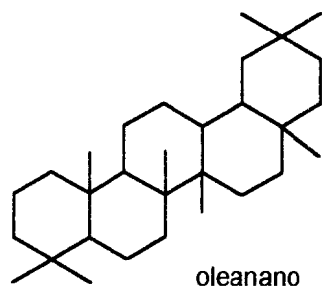
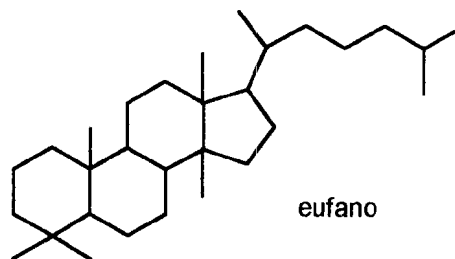
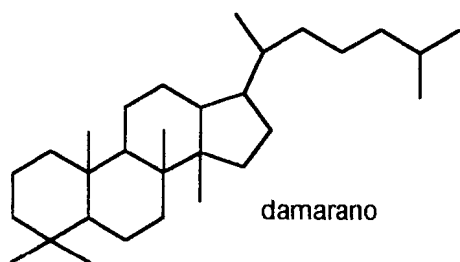
estrobano



eunicelano



barbacenano

ESQUEMA 2**Esqueletos triterpênicos isolados de Velloziaceae**

CONSIDERAÇÕES BIOSSINTÉTICAS

As considerações biossintéticas incluídas neste estudo foram feitas, resumidamente, a partir dos seguintes livros textos: *Natural Product Chemistry*⁸⁰, *Introduction to Plant Biochemistry*⁸¹ e *Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism*⁸².

1.3.1 Flavonóides monoisoprenilados 3, 3a, 4 e 4a

A biossíntese de flavonóides é a única em que os dois anéis aromáticos originam-se de diferentes rotas biossintéticas. O resíduo fenilpropano (anel B e C_{2,3} e 4) deriva do ácido *p*-cumárico, formado através da via chiquimato, enquanto o anel A é oriundo da via acetato [Esquema 3] (pag. 19).

Experimentos isotópicos mostram que diidroflavonóis (Flavanonas) são provavelmente precursores dos flavonóis. O Esquema 4 (pag. 20) indica as reações básicas para a formação dos flavonóides monoisoprenilados 3, 3a, 4 e 4a partindo de uma flavanona.

1.3.2 Terpenóides

Em 1887 Wallach propôs a "regra do isopreno" para a formação de terpenóides. Esta regra, na essência, iniciou-se devido à observação de ligações do tipo C-isopreno nas estruturas de muitas substâncias de ocorrência na natureza. Esta hipótese foi afastada e a regra foi estendida por Ruzicka que desenvolveu a *regra biogenética do isopreno* e propôs que todos os terpenóides são sintetizados de um precursor comum chamado 'isopreno ativo'. Isto tornou-se uma realidade bioquímica quando Lynen identificou esta substância como sendo o Δ^3 -isopentenil pirofosfato (IPP). O precursor do IPP é o ácido (3*R*)-mevalônico no qual foi

demonstrado por Folkers em 1956. O precursor básico da biossíntese de terpenóides (acetil-CoA) e a rota biossintética para a formação do DMAPP está demonstrado no Esquema 5 (pag. 21).

1.3.2.1 Ácido 3 β -hidroxilabd-8(20)-en-15-óico (5)

O IPP é primeiramente isomerizado pela enzima sulfidril IPP isomerase a dimetilalil pirofosfato (DMAPP) [Esquema 5] (pag. 21). O DMAPP age em seguida como iniciador para o alongamento de sua cadeia condensando-se com uma molécula de IPP para formar o geranyl pirofosfato (GPP), sofrendo influência da enzima preniltransferase. O GPP se condensa agora com uma molécula de IPP para formar o farnesil pirofosfato (FPP) que tem a possibilidade de sofrer extensão de sua cadeia para a formação do diterpeno 5 [Esquema 6] (pag. 22).

1.3.2.2 Triterpenos pentacíclicos (2a, 2b, 2c e 2d)

No estudo da biossíntese de triterpenos um novo conceito vem surgindo. Este conceito se baseia no fato de que o precursor triterpênico (30 C) é sintetizado pela junção cauda-a-cauda de dois resíduos de farnesil (15 C).

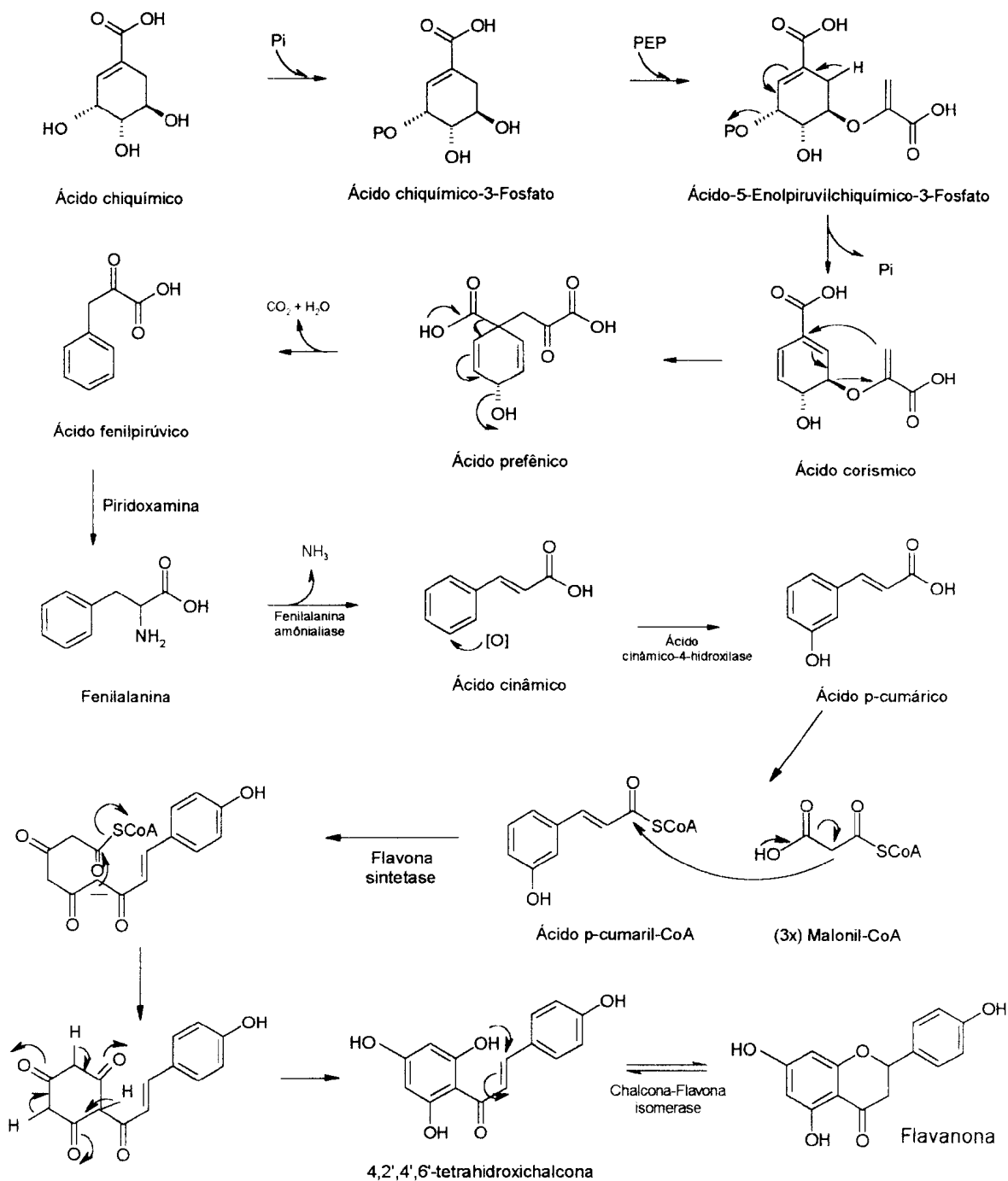
O primeiro composto estável formado na rota biossintética dos triterpenóides é o presqualeno pirofosfato. Esta reação é catalisada pela enzima presqualeno sintetase, que também catalisa a próxima reação: a redução do presqualeno pirofosfato pelo NADPH a esqualeno. A estereoquímica da conversão de duas moléculas de FPP a esqualeno foi elucidada por Popják e Cornforth e pode ser sumarizada nos seguintes passos: (i) uma das moléculas participantes de FPP perde um hidrogênio do C-1, (ii) o hidrogênio perdido do C-1 da molécula 1 é pro-S, (iii) o hidrogênio pro-S da molécula 1 eliminado é recolocado pelo anel nicotinamida do NADPH, (iv) o hidrogênio recolocado no C-1 é agora pro-R [Esquema 71 (pag. 23)].

Na formação do esterol o esqualeno é primeiramente convertido pela esqualeno epoxidase, requerendo O_2 e NADPH, a 2,3-oxidoesqualeno e em seguida ciclizado pela enzima 2,3-oxidoesqualeno ciclase. Esta ciclização é iniciada pela protonação do oxigênio do epóxido.

O íon transiente carregado positivamente, produzido pela ciclização, sofre então rearranjos do tipo Wagner-Meerwein. Uma ligação Wagner-Meerwein pode ser considerada como o movimento de um átomo ou grupo carregado negativamente (Ex. H^- ou CH_3^-) de um carbono para um carbono adjacente (Ex. uma ligação 1,2) carregado positivamente. Estes rearranjos, bem como a formação da Lupenona (2a), da β -amirona (2b), α -amirona (2c) e lupeol (2d) estão melhor representados no Esquema 8 (pag. 24).

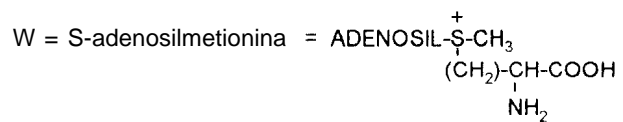
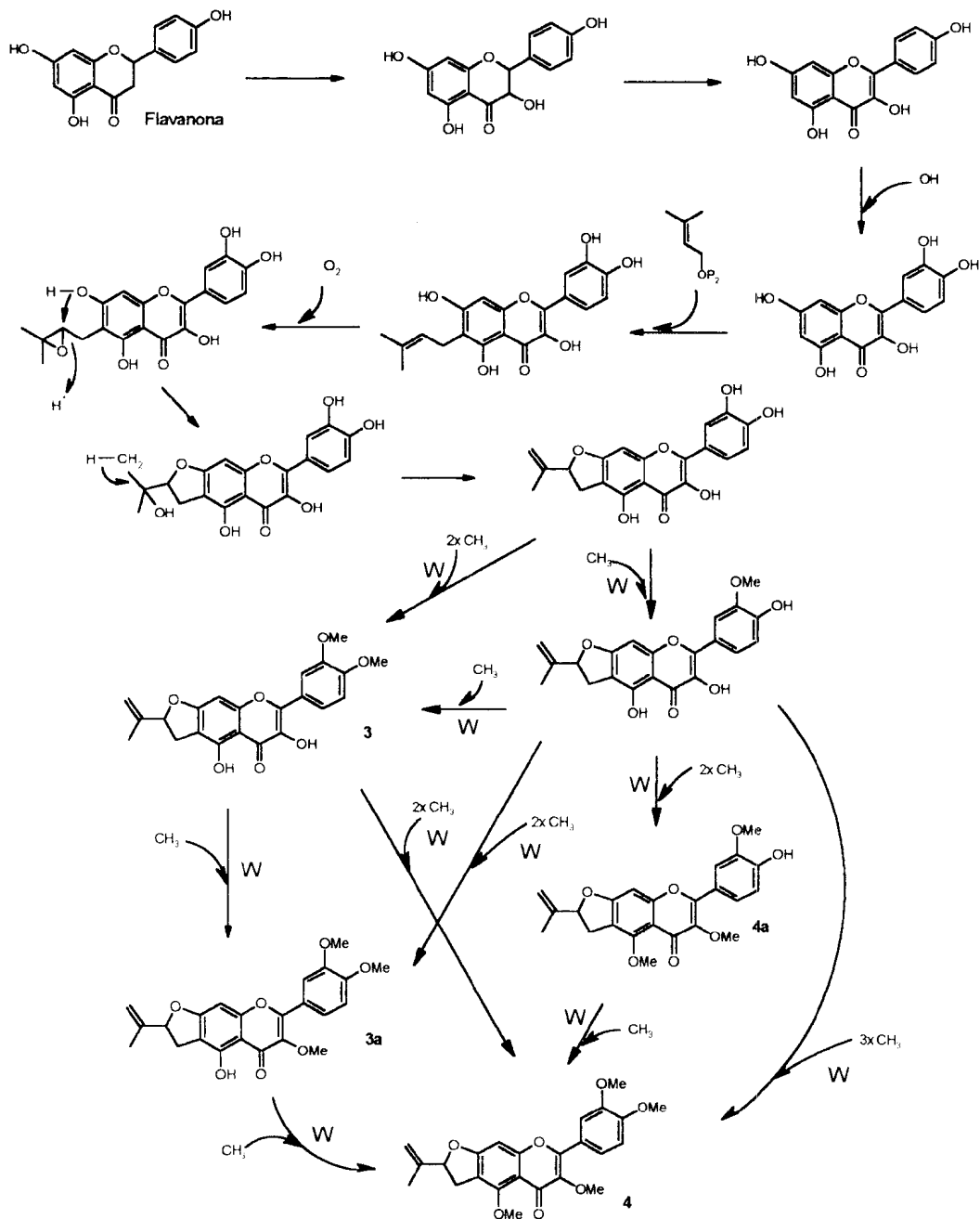
ESQUEMA 3

Proposta biossintética da formação de uma flavanona a partir do ácido chiquímico



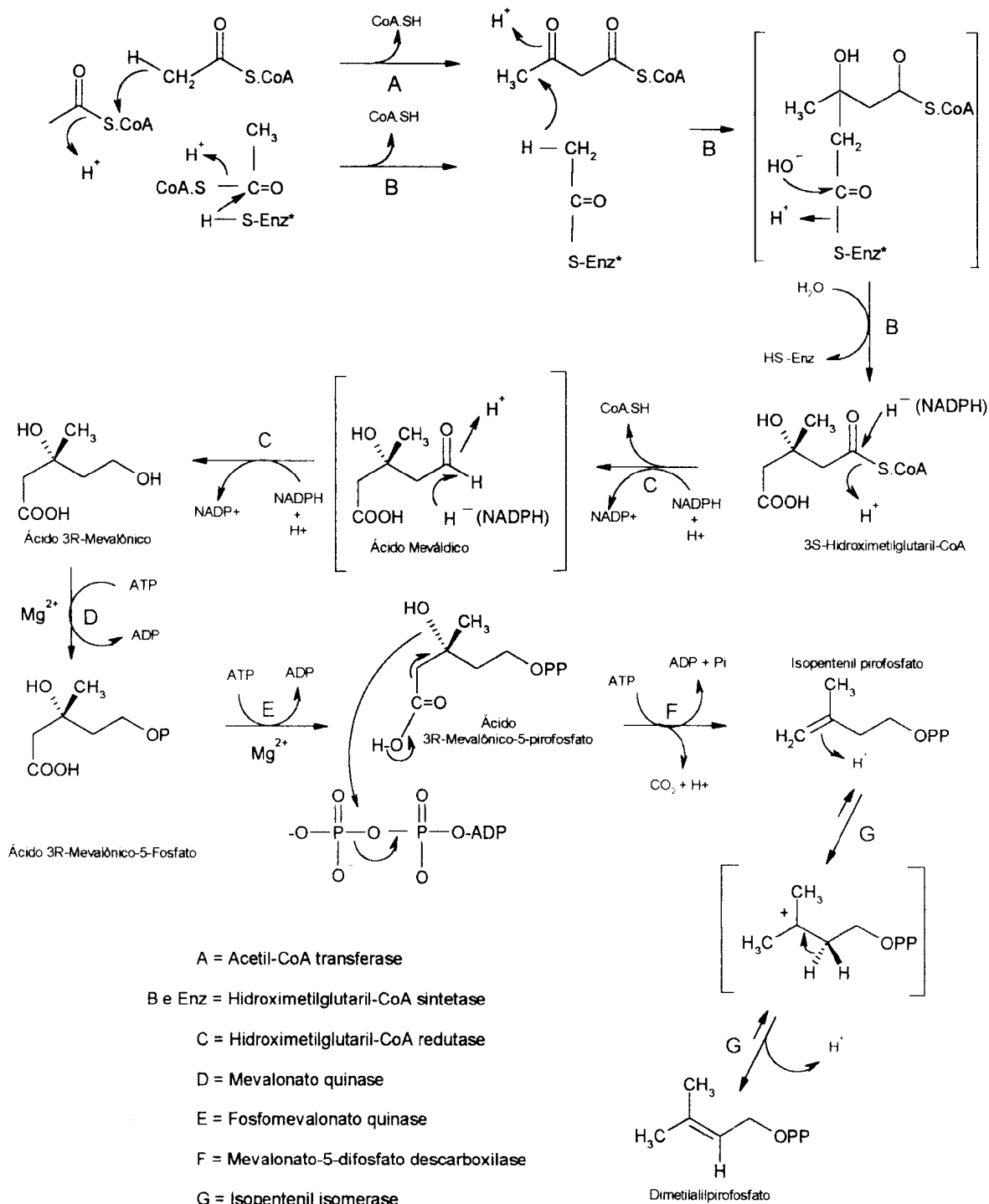
ESQUEMA 4

Proposta biossintética para 3, 3a, 4 e 4a partindo de uma flavanona



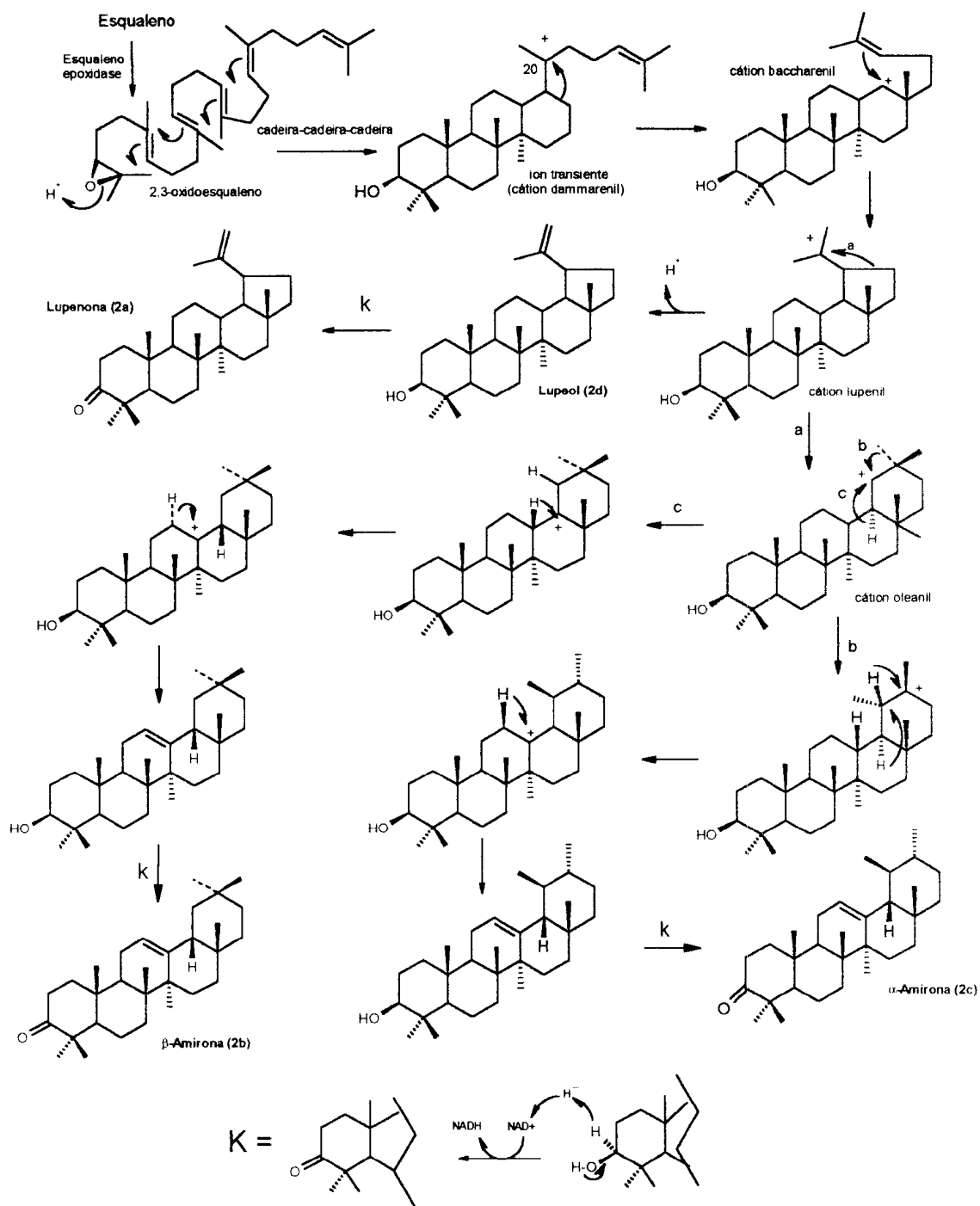
ESQUEMA 5

Formação do dimetilalil pirofosfato a partir do ácido mevalônico



ESQUEMA 8

Proposta biossintética para os triterpenos pentacíclicos 2a, 2b, 2c e 2d



OBJETIVOS

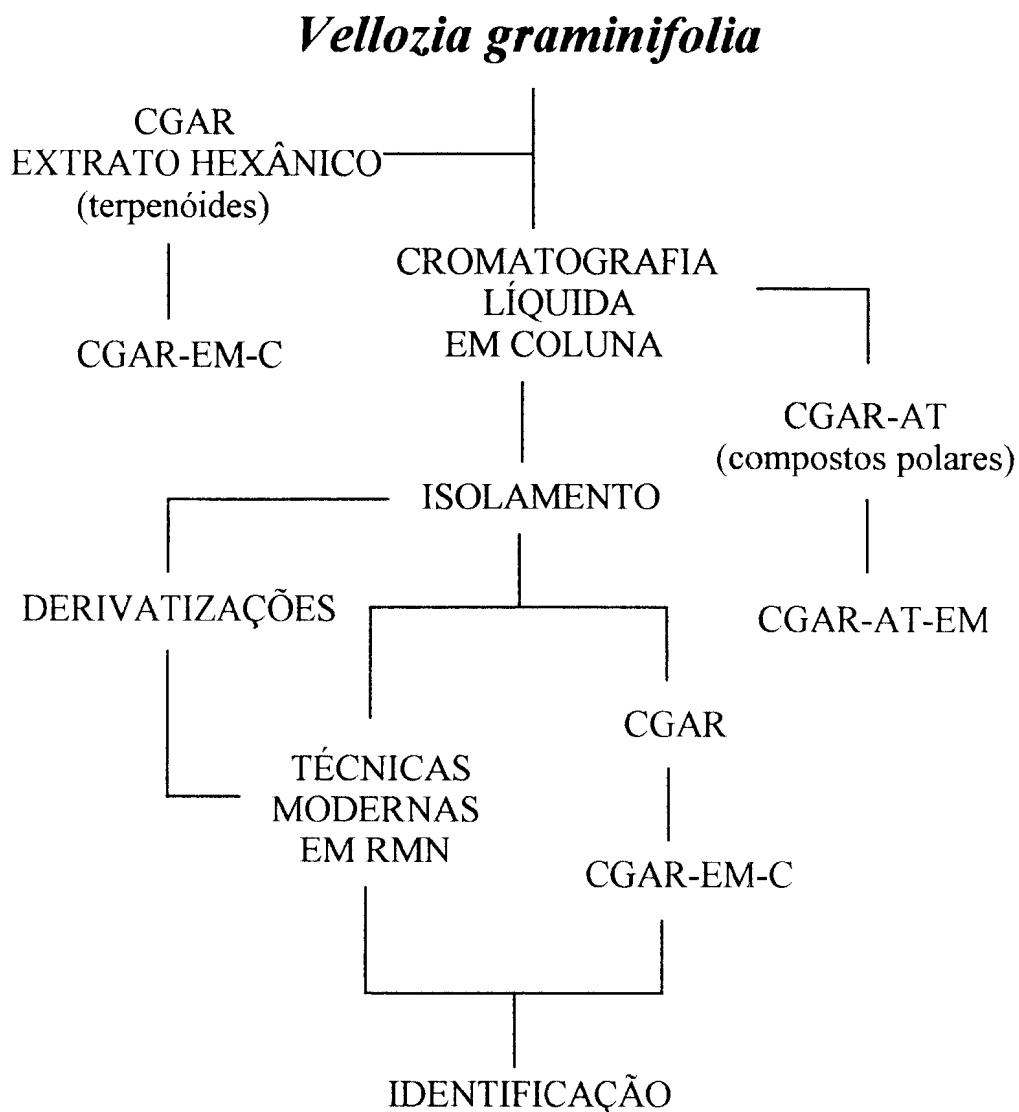
O objetivo deste trabalho é realizar o isolamento e a identificação dos componentes químicos, produzidos pelo metabolismo secundário de *Vellozia graminifolia*, através da cromatografia líquida em coluna de gel de sílica e das técnicas espectroscópicas clássicas (IV, EM, RMN ^1H e ^{13}C) e modernas (HMQC, HMBC e NOESY), respectivamente. Estes estudos serão acompanhados pelas técnicas em CGAR-EM para análise dos compostos apolares, principalmente os pertencentes a classe dos terpenóides, e de CGAR a altas temperaturas acoplada a espectrometria de massas, para compostos de maior polaridade (Flavonóides).

METODOLOGIA

A metodologia para o estudo fitoquímico de *Vellozia graminifolia* está mostrada no **Esquema 9** (pag. 27).

ESQUEMA 9

Metodologia aplicada no estudo fitoquímico de *Vellozia graminifolia*



RESULTADOS

E

DISCUSSÃO

4.1 Determinação estrutural dos constituintes químicos

4.1.1 Hidrocarbonetos Lineares (1a, 1b e 1c)

Material sólido, de aparência amorfa e apresentando ponto de fusão entre 57-58 °C, foi obtido do extrato hexânico eluído com hexano 100%. O espectro na região de IV [Fig. 1] (pag. 30) de 1a, 1b e 1c, em mistura, apresentou absorções intensas para grupos CH₃ e CH₂ (ν 2960, 2910 e 2820 cm⁻¹) característicos de hidrocarbonetos lineares com número de grupos metilênicos igual ou superior a quatro devido a absorção em 720 cm⁻¹. A intensa absorção do sinal em δ_H 1.23 no espectro de RMN ¹H [Fig. 2] (pag. 31) revelou-se de acordo com as deduções descritas anteriormente.

A análise por CGAR [Fig. 3] (pag. 32) mostrou a existência de seis compostos, onde o mesmo espaçamento entre os picos 1a/1b e 1b/1c caracteriza a presença de uma série homóloga contendo três hidrocarbonetos lineares. Através da análise dos respectivos espectros de massas de baixa resolução, obtidos por CGAR-EM-C [Fig. 4] (pag. 33), foi possível deduzir o peso molecular de 1a {m/z 380 [M]⁺, C₂₇H₅₆}, 1b {394 [M]⁺, C₂₈H₅₈} e 1c {408 [M]⁺ (ausente), C₂₉H₆₀} e definir as estruturas dos hidrocarbonetos (1a, 1b e 1c) componentes da mistura.

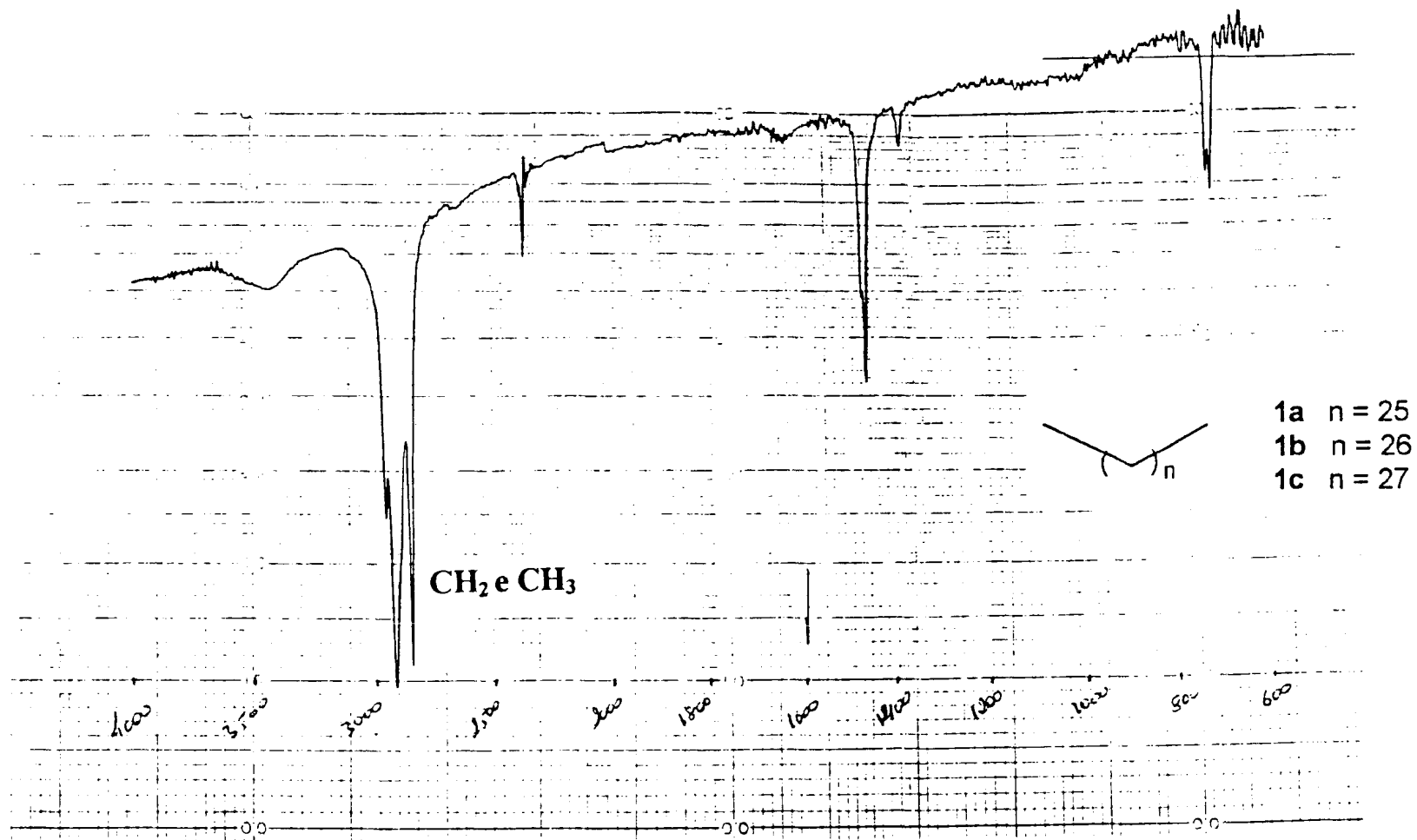


FIGURA 1. Espectro na região do IV de 1a, 1b e 1c, em mistura. Pastilha de KBr

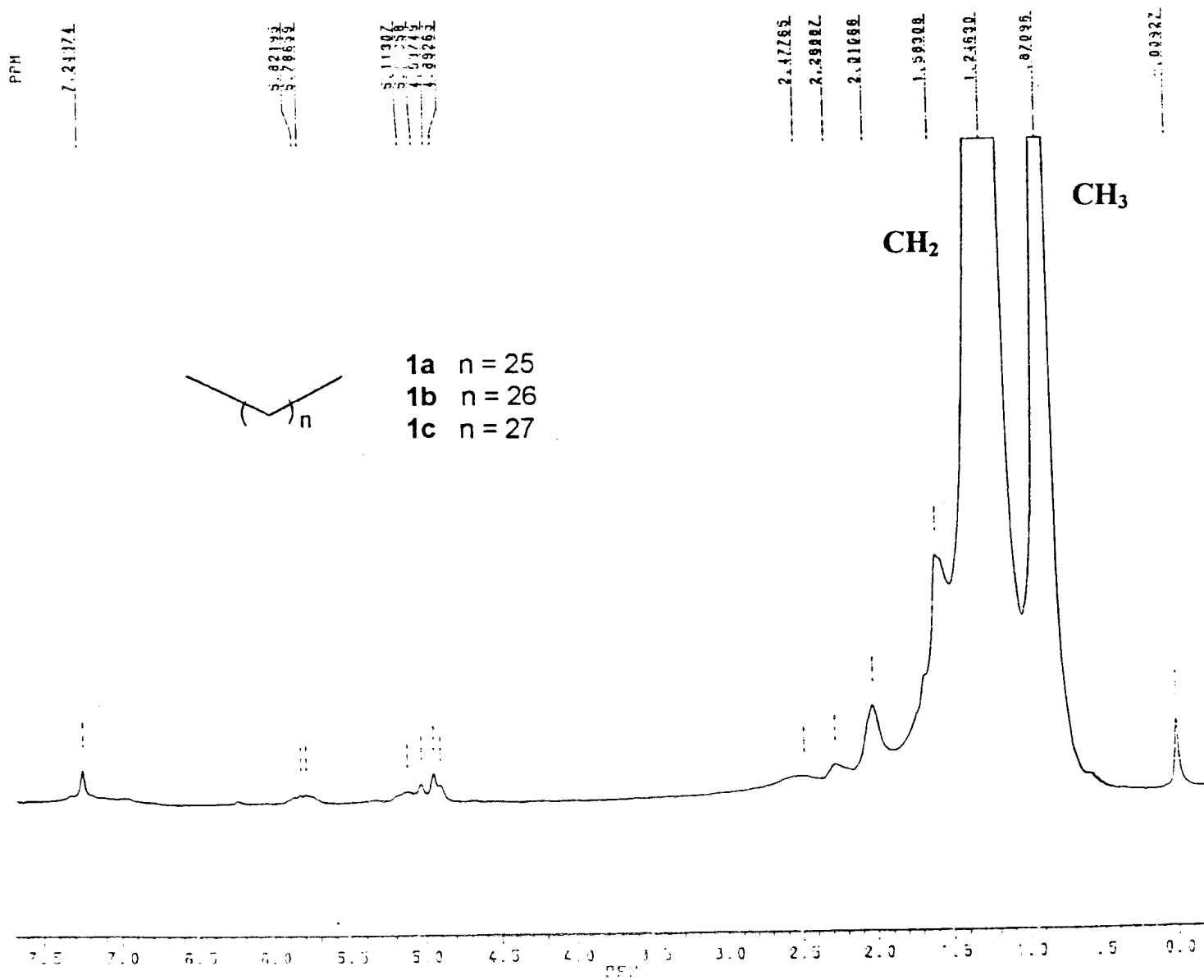


FIGURA 2. Espectro de RMN ¹H de 1a, 1b e 1c, em mistura (200 MHz, CDCl₃).
 TMS como referência interna

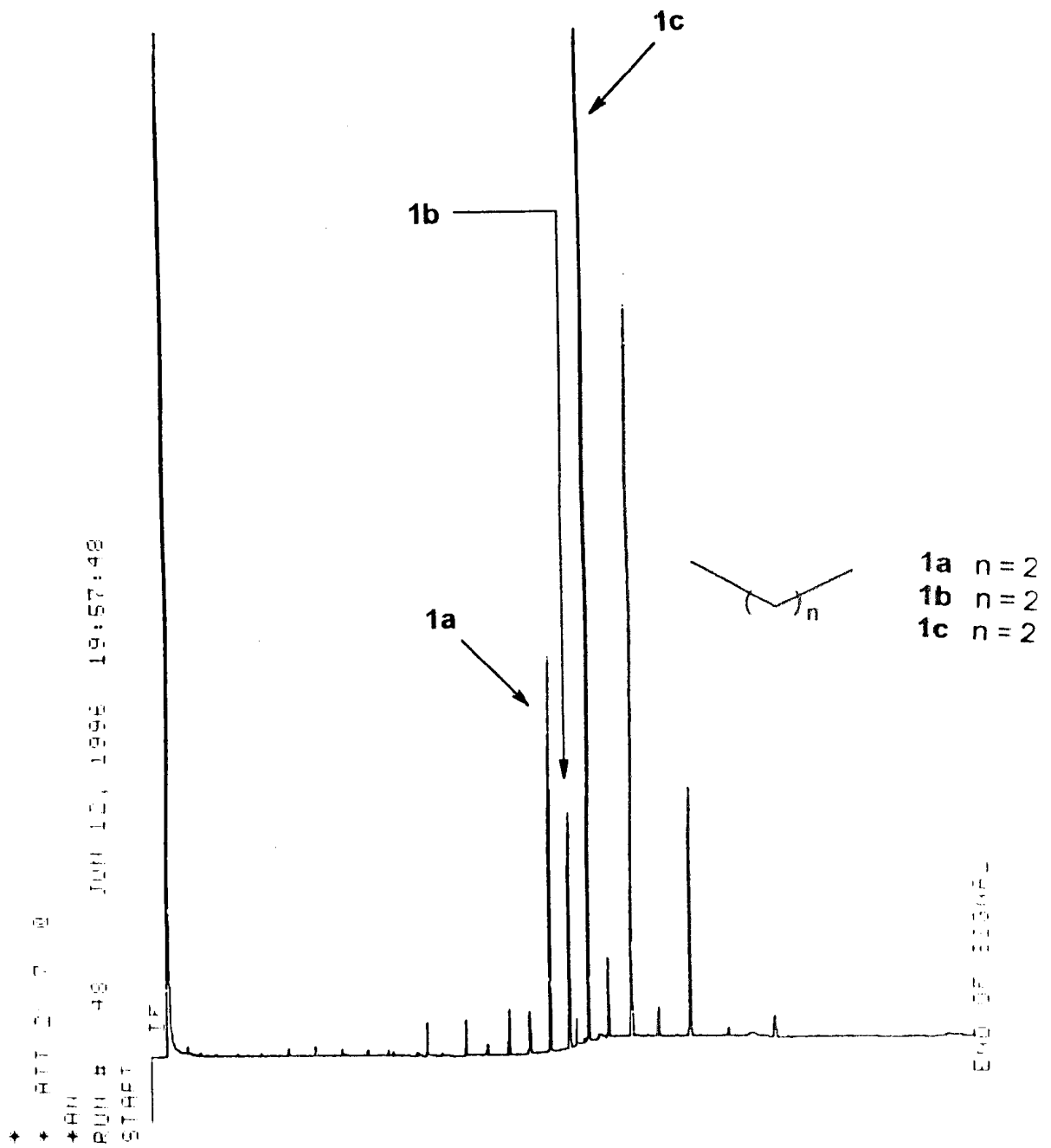


FIGURA 3. Cromatograma de 1a, 1b e 1c, em mistura.

Análise obtida por CGAR

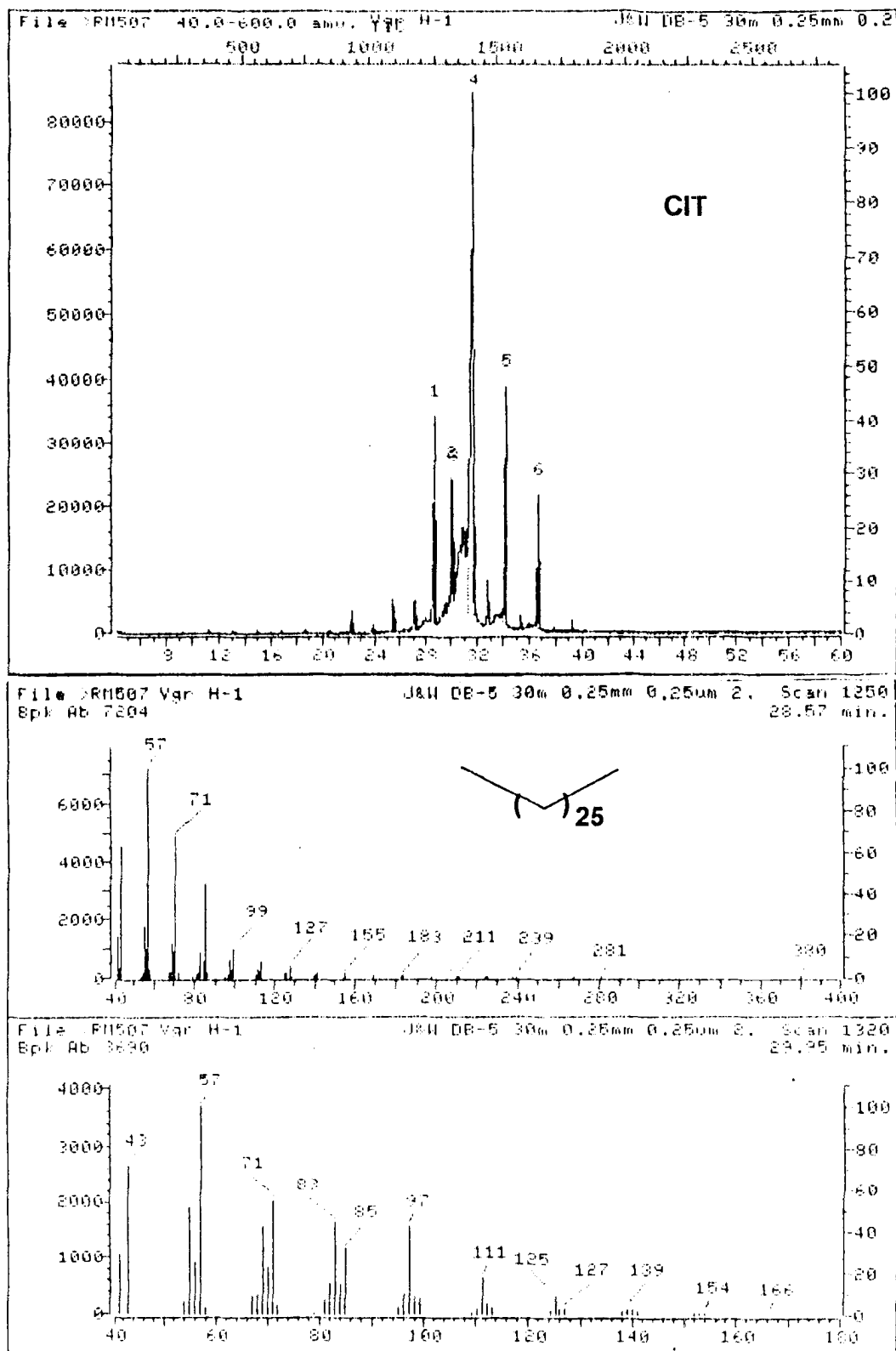
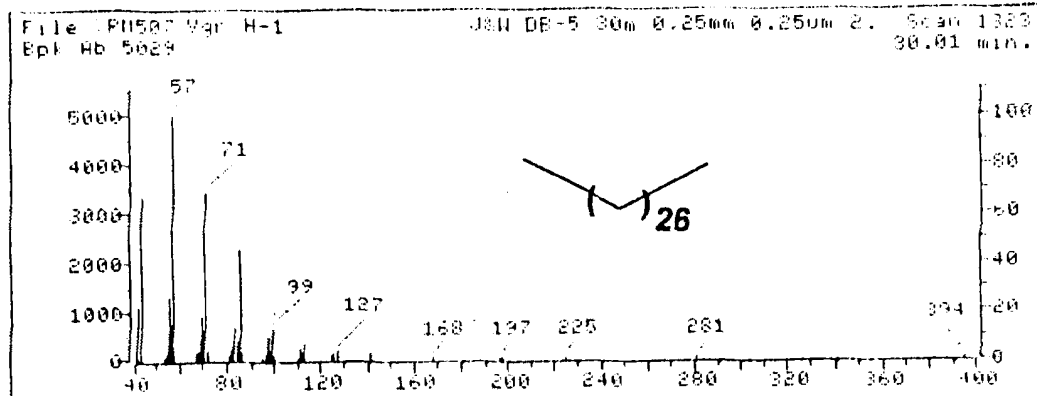
Espectro
A

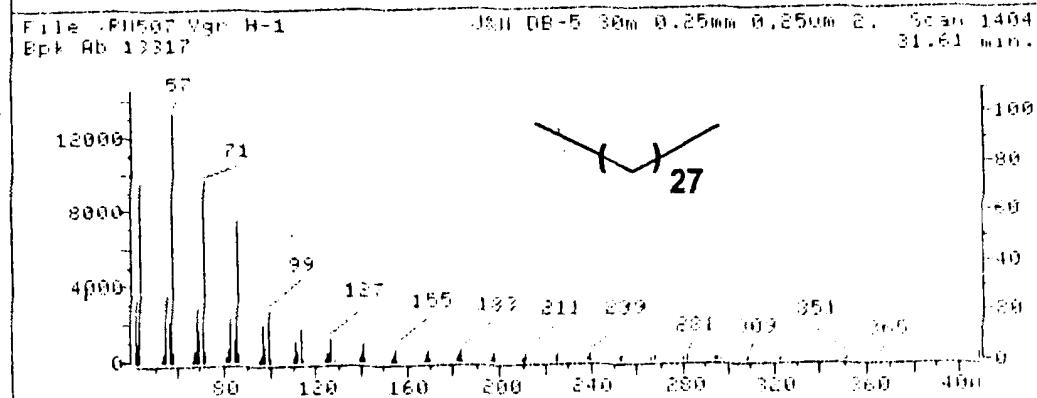
FIGURA 4. Cromatograma de ions totais (CIT) e espectros de massas de 1a (espectro A), 1b (espectro B) e 1c (espectro C).

Análise obtida por CGAR-EM-C

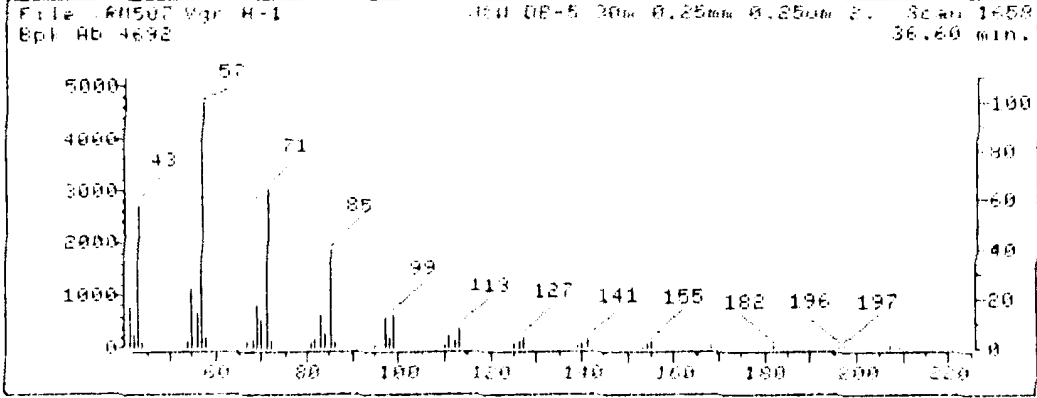
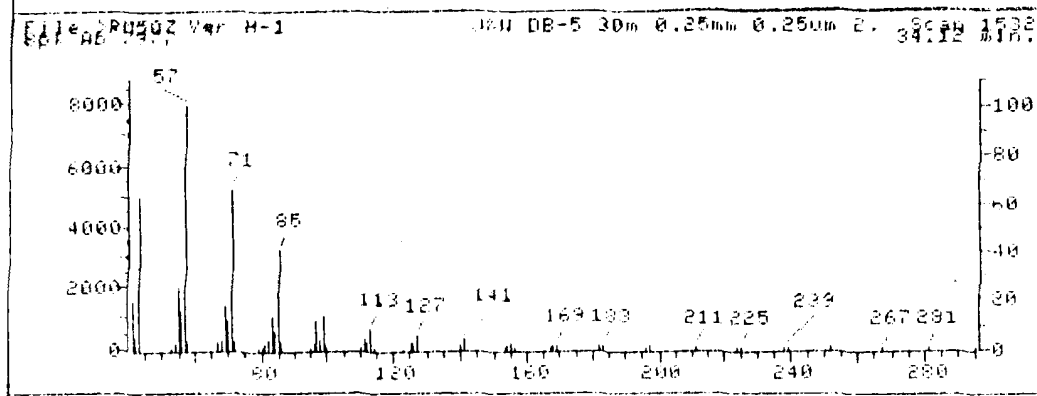
Continuação...



Espectro B



Espectro C



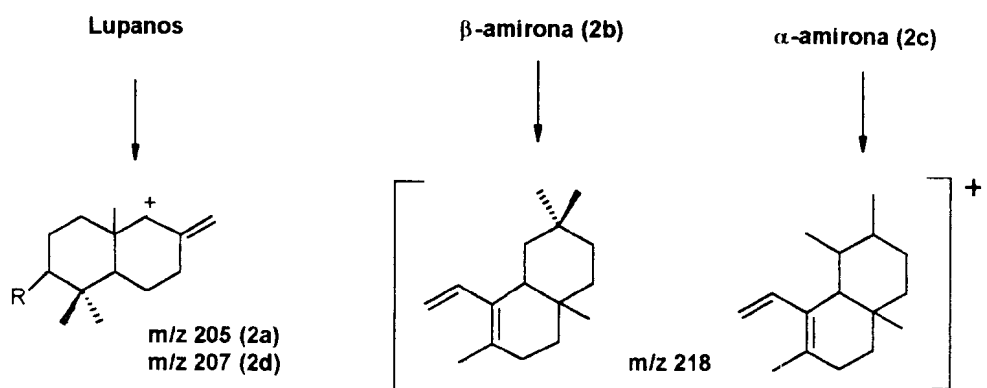
4.1.2 Lupenona (2a), β -amirona (2b), α -amirona (2c) e lupeol (2d)

O espectro na região do IV [Fig. 5] (pag. 37) de 2a + 2b + 2c + 2d mostrou absorções características de grupamentos CH_3 , CH_2 e CH (ν 2950-2750 cm^{-1}) e $\text{C}=\text{O}$ (ν 1730 cm^{-1}). Os espectros de RMN ^1H {1D [Fig. 6] (pag. 38) e 2D $^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY [Fig. 7] (pag. 39)} permitiram reconhecer os sinais correspondentes aos hidrogênios olefínicos de 2a [δ_{H} : 4.56 (*sl*) e 4.68 (*sl*); 2H-29] e de 2b [δ_{H} 5.25 (*m*); H-12] em mistura.

Os compostos 2a + 2b, na mistura, apresentaram dados espectrais de RMN ^{13}C PND [Fig. 8] (pag. 40) e DEPT { $\theta = 135^\circ$ [Fig. 9] (pag.42) e 90° [Fig 10] (pag. 43)} concordantes com os valores descritos na literatura⁶⁷ [Tabela IV] (pag 48). Estas deduções foram acompanhadas pelo experimento 2D $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$ {n = 1, HMQC} [Fig. 11] (pag. 44) da mistura, onde o respectivo espectro, mostrou acoplamentos heteronucleares ($^1\text{J}_{\text{CH}}$) entre o carbono C-29 (δ_{C} 109,55) e os hidrogênios vinílicos terminais em δ_{H} : 4.56 (*sl*) e 4.68 (*sl*) de 2a e entre C-12 (δ_{C} 121.63) e o hidrogênio olefínico em δ_{H} 5.25 (*m*) de 2b. Numa análise mais detalhada do espectro HMQC foi possível constatar, também na região de hidrogênio e carbono olefínicos, a presença de α -amirona (2c) e lupeol (2d) pelos acoplamentos heteronucleares ($^1\text{J}_{\text{CH}}$) entre C-12 (δ_{C} 125.31) e o hidrogênio olefínico em δ_{H} 5.12

(*m*) de 2c e entre o carbono C-29 (δ_C 106.15) e os hidrogênios vinílicos terminais em δ_H : 4.72 (*sl*) e 4.63 (*sl*) de 2d. A presença de 2e e 2d, em concentrações minoritárias na mistura, são esperadas devido suas proximidades biossintéticas com lupenona (2a) e β -amirona (2b) [ver item 1.3.2] (pag. 16).

A análise por CGAR [Fig. 12] (pag. 45) mostrou a presença de dois picos (2a e 2b + 2e) em concentrações majoritárias, sendo que, pelos espectros de massas de baixa resolução, obtido por CGAR-EM-C [Fig. 13] (pag. 46), foi possível detectar a fragmentação e o ion molecular característico para seis esqueletos triterpênicos. Através da análise destes espectros de massas pode-se observar o ion molecular de 2a { m/z 424 (40%) $[M]^{+}$, $C_{30}H_{48}O$ }, 2b {424 (10) $[M]^{+}$, $C_{30}H_{48}O$ }, 2c {424 (11) $[M]^{+}$, $C_{30}H_{48}O$ } e 2d {426 (12) $[M]^{+}$, $C_{30}H_{50}O$ }. A literatura^{68,69} cita que compostos pertencentes a classe dos lupanos apresentam, em seus espectros de massas, intenso fragmento iônico origin/trio dos anéis A e B [m/z 205 (2a) e 207 (2d)] enquanto os oleananos (2b) e ursanos (2c), devido a insaturação em C-12, originam ions de m/z 218, como mostra o esquema abaixo:



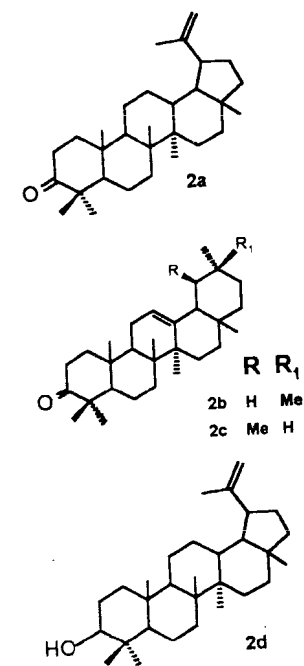
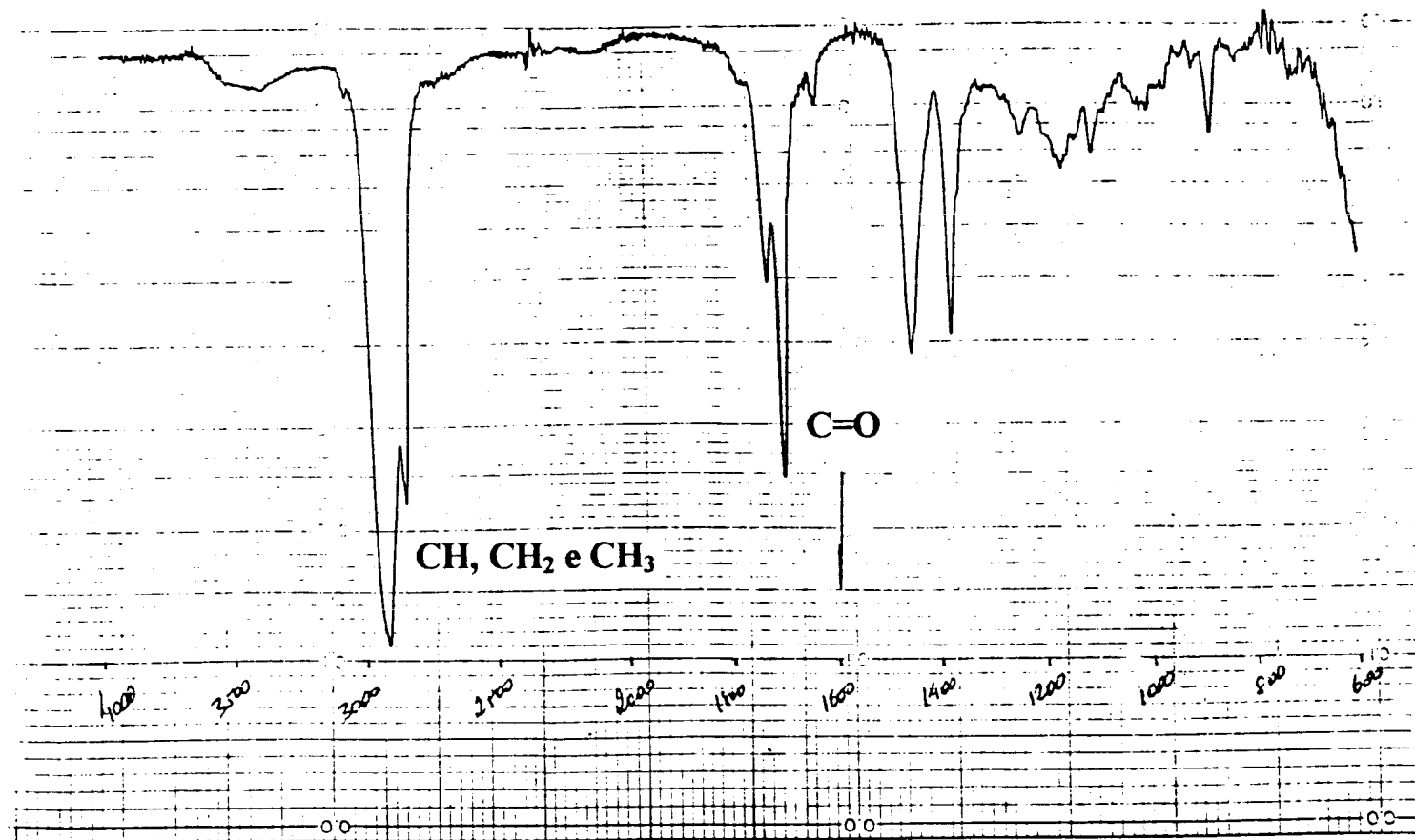


FIGURA 5. Espectro na região do IV de 2a, 2b, 2c e 2d, em mistura. Pastilha de KBr

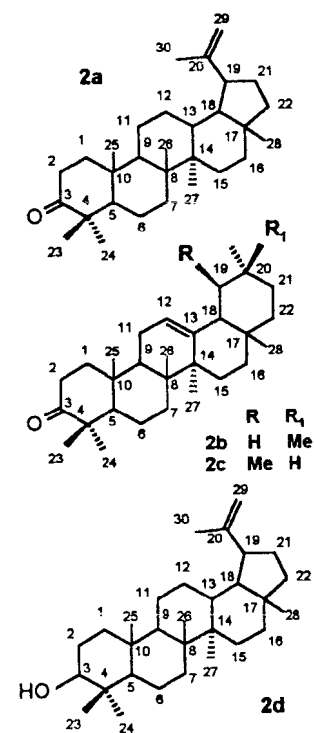
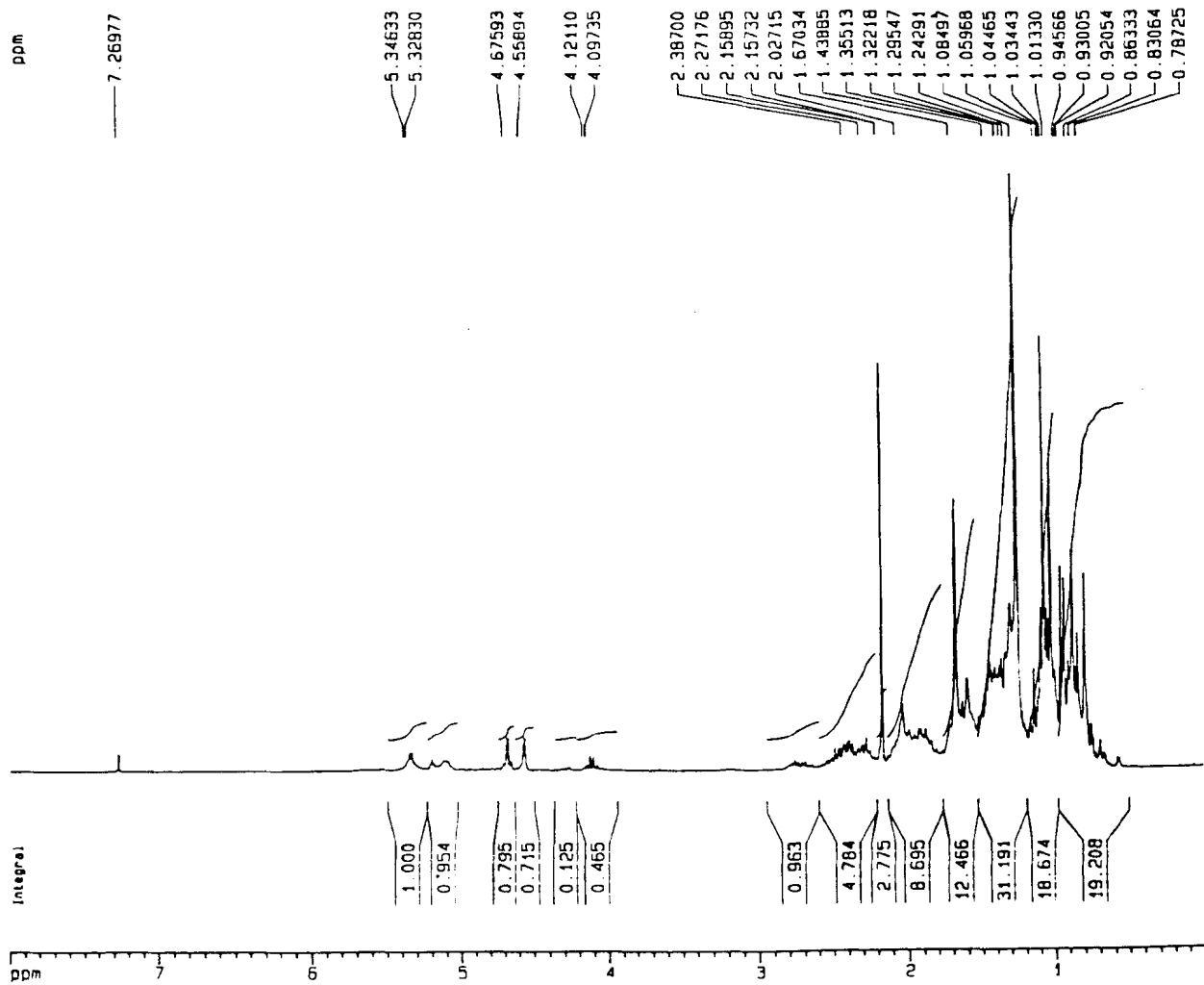


FIGURA 6. Espectro de RMN 1H de 2a, 2b, 2c e 2d, em mistura (300 MHz, $CDCl_3$).
TMS como referência interna

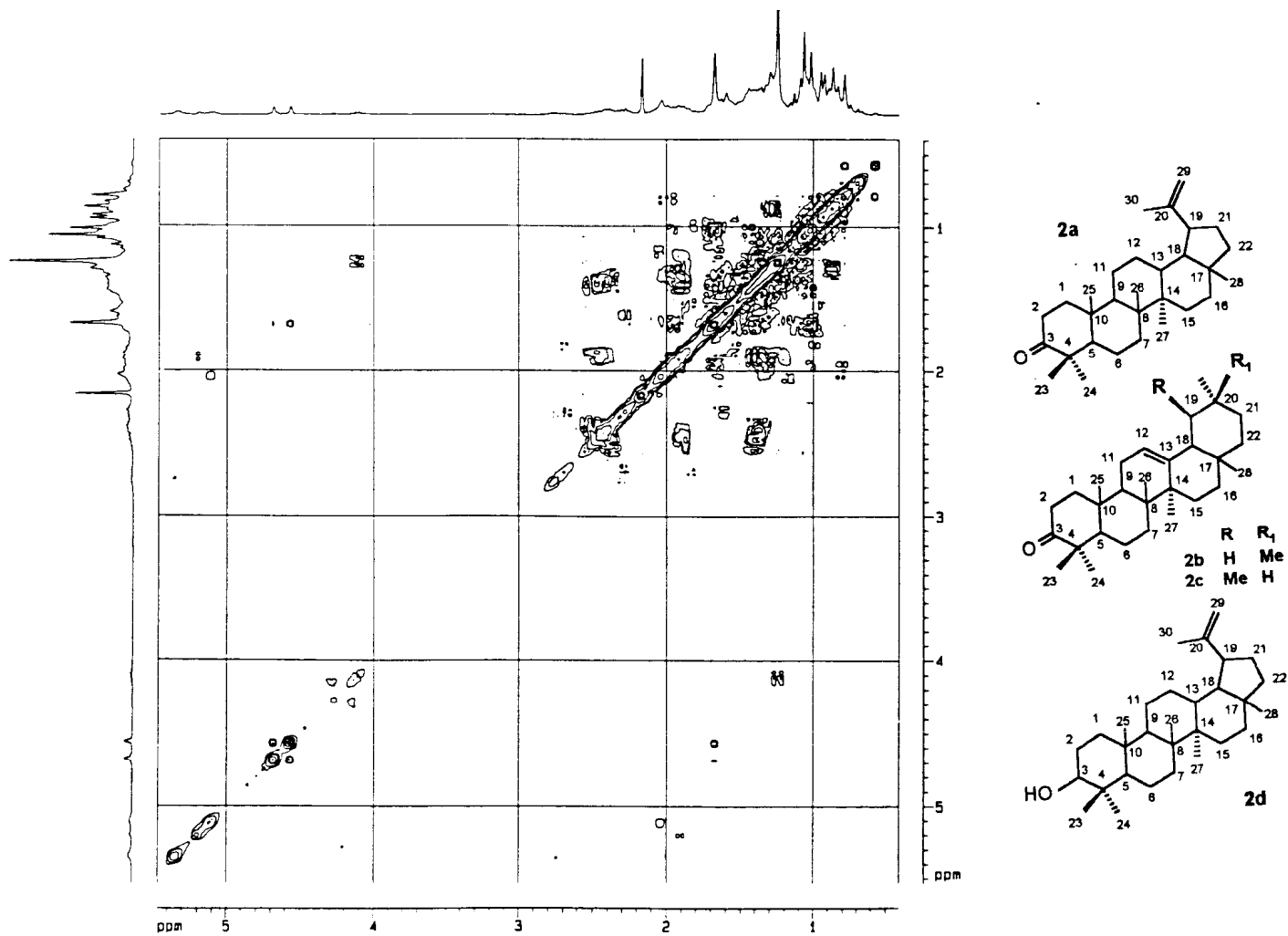


FIGURA 7. Espectro bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio [$^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY] de 2a, 2b, 2c e 2d, em mistura (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

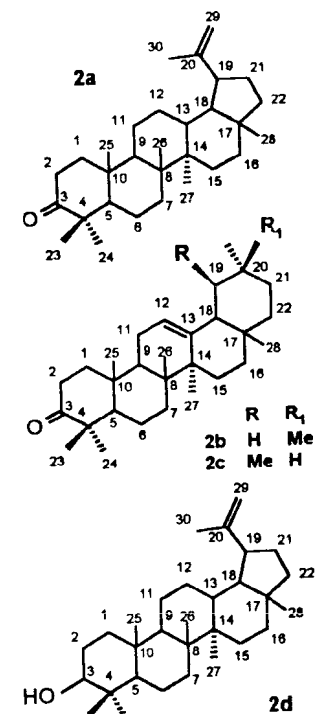
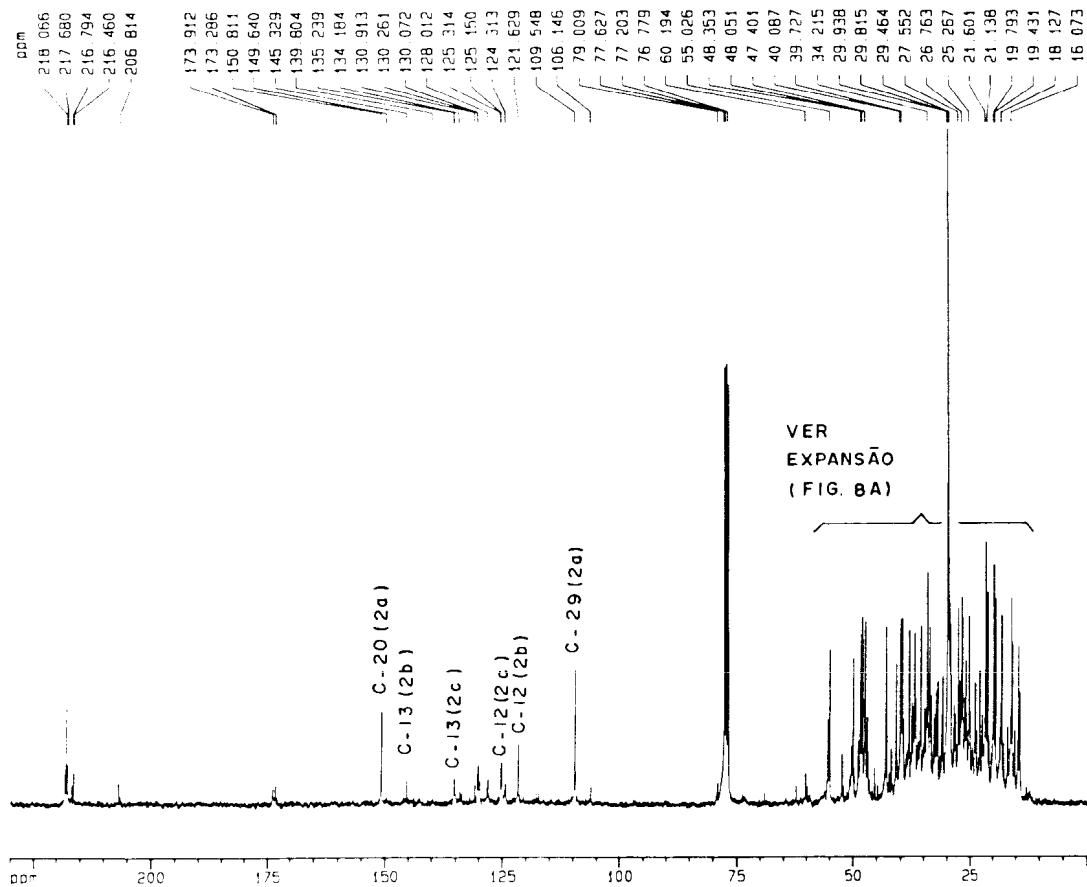


FIGURA 8. Espectro de RMN ^{13}C [PND] de 2a, 2b, 2c e 2d, em mistura (75 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

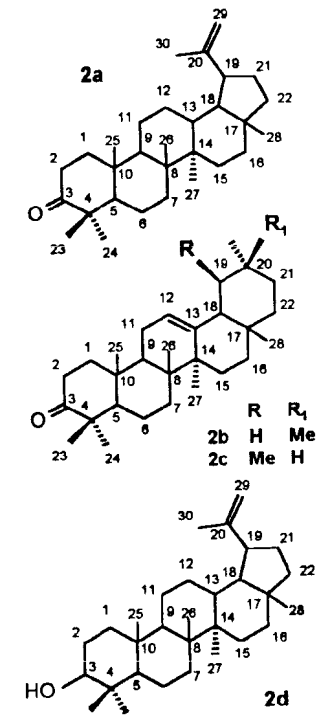
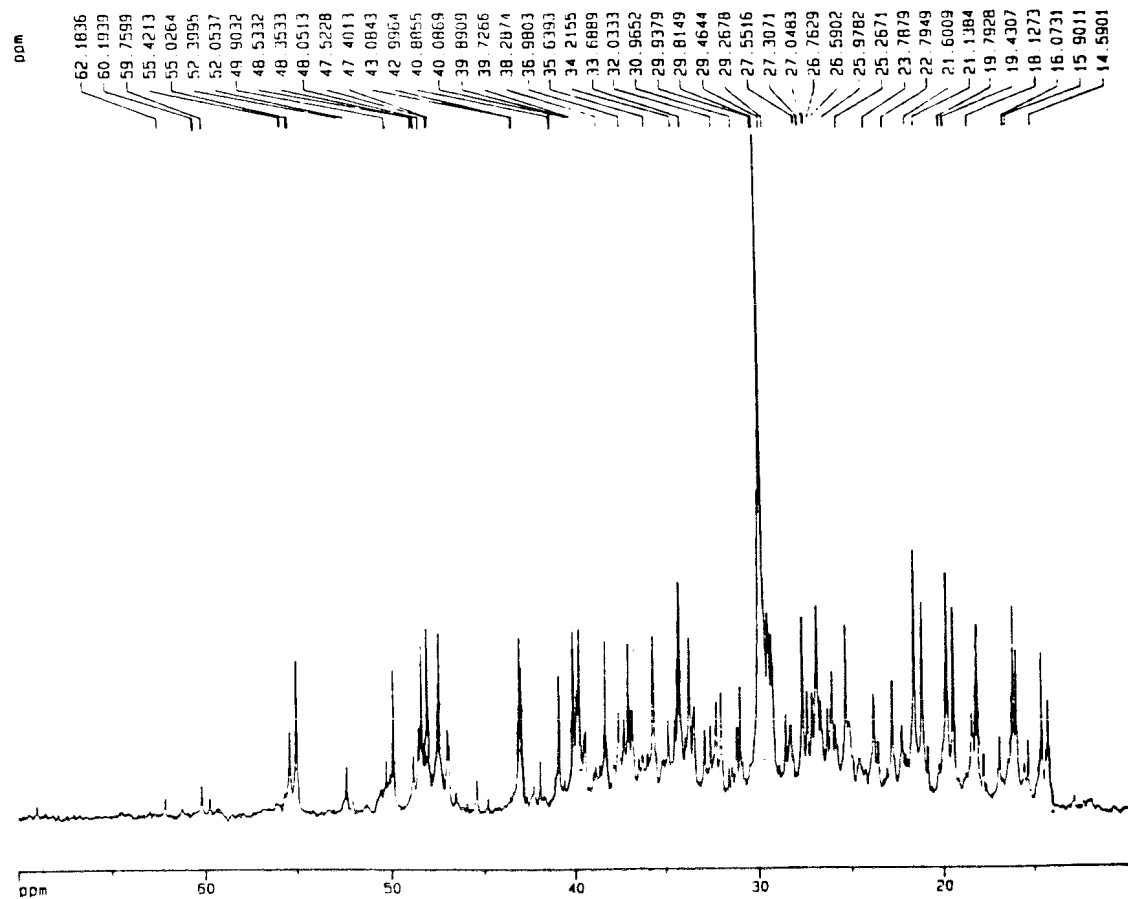


FIGURA 8A. Expansão da região entre 0-60 ppm do espectro de RMN ^{13}C [PND] de 2a, 2b, 2c e 2d, em mistura (75 MHz, $CDCl_3$). TMS como referência interna

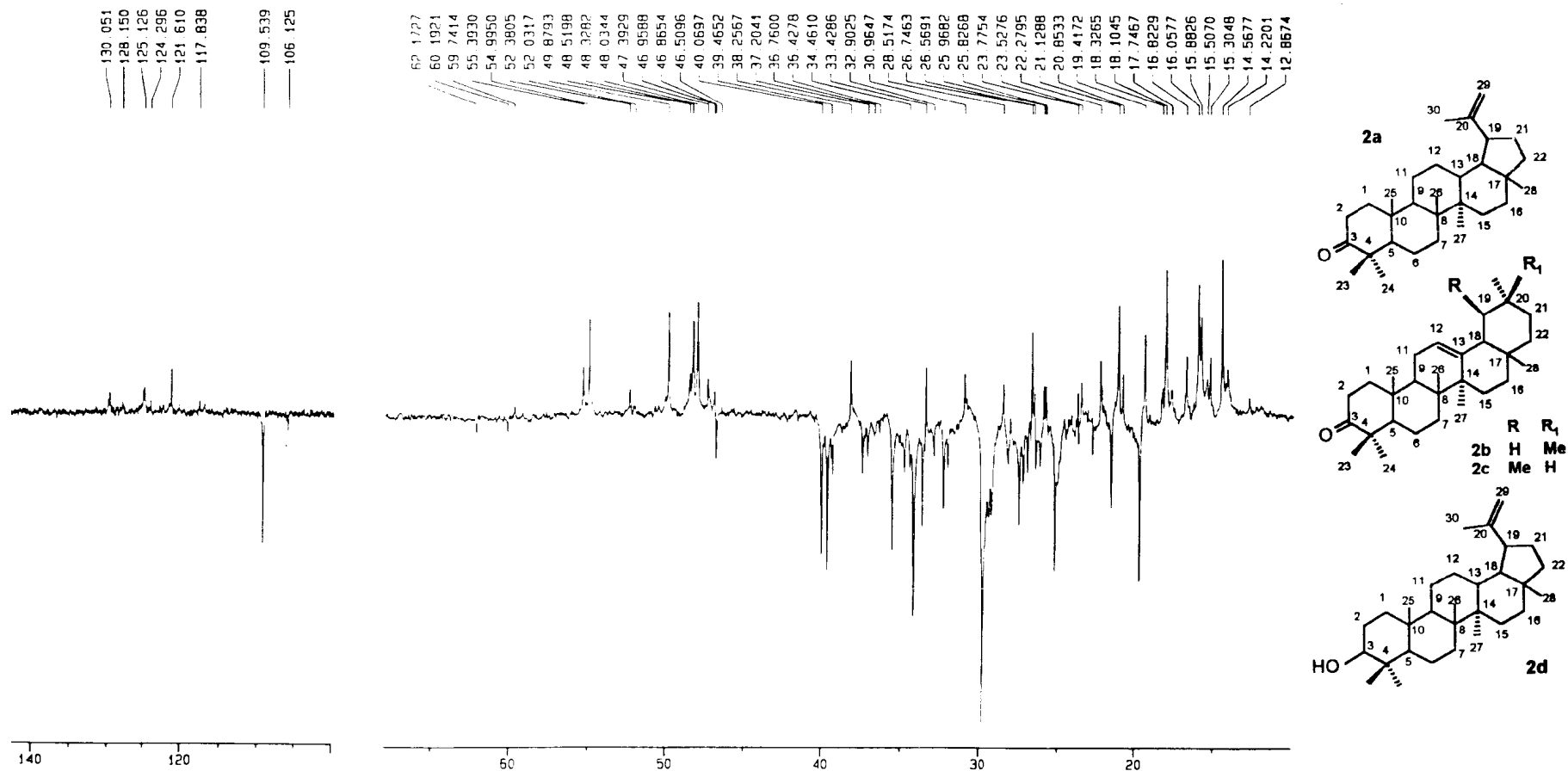


FIGURA 9. Espectro de RMN ^{13}C [DEPT $\theta = 135^\circ$] de 2a, 2b, 2c e 2d, em mistura (75 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

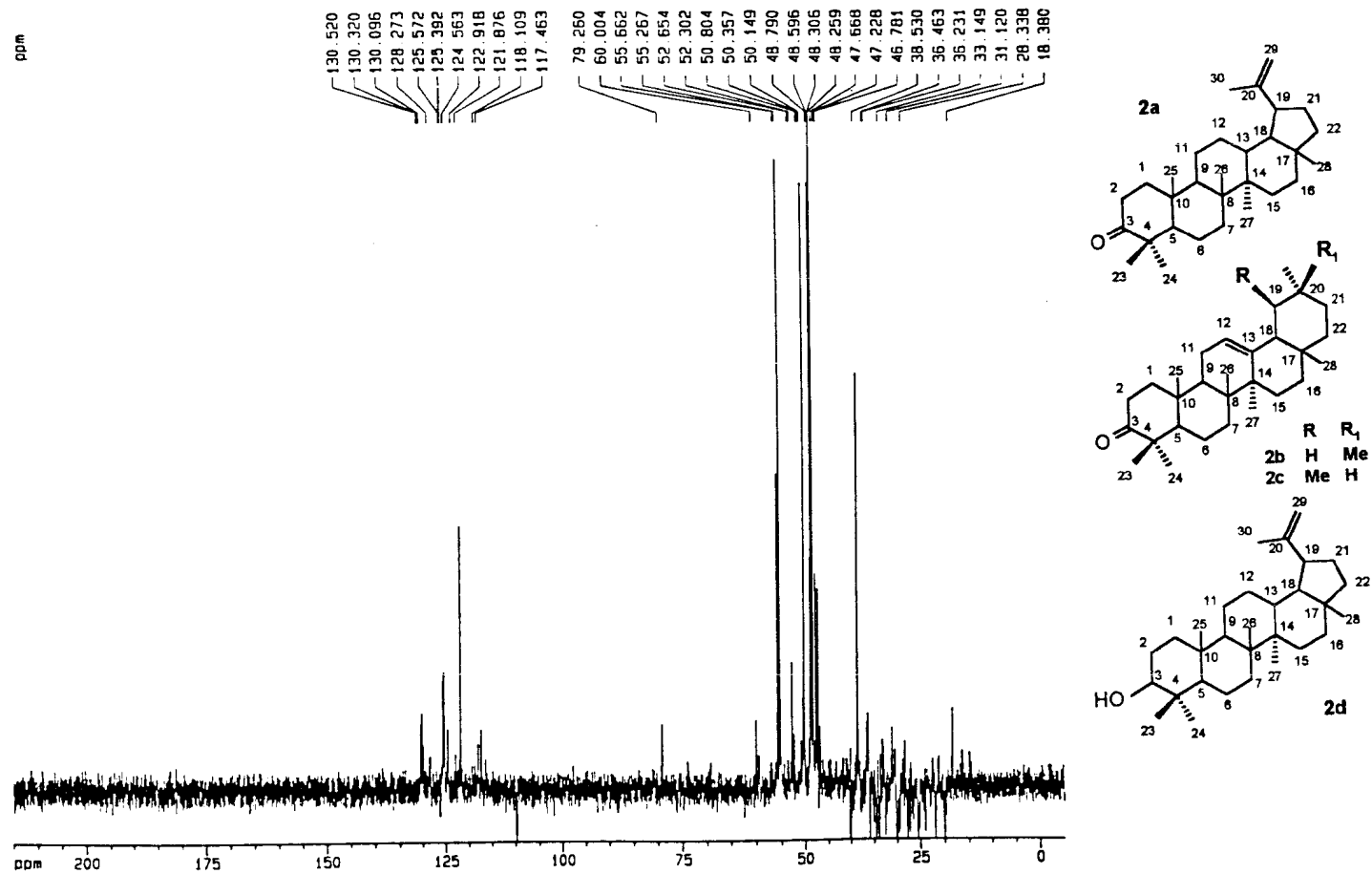


FIGURA 10. Espectro de RMN ^{13}C [DEPT $\theta = 90^\circ$] de 2a, 2b, 2c e 2d, em mistura (75 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

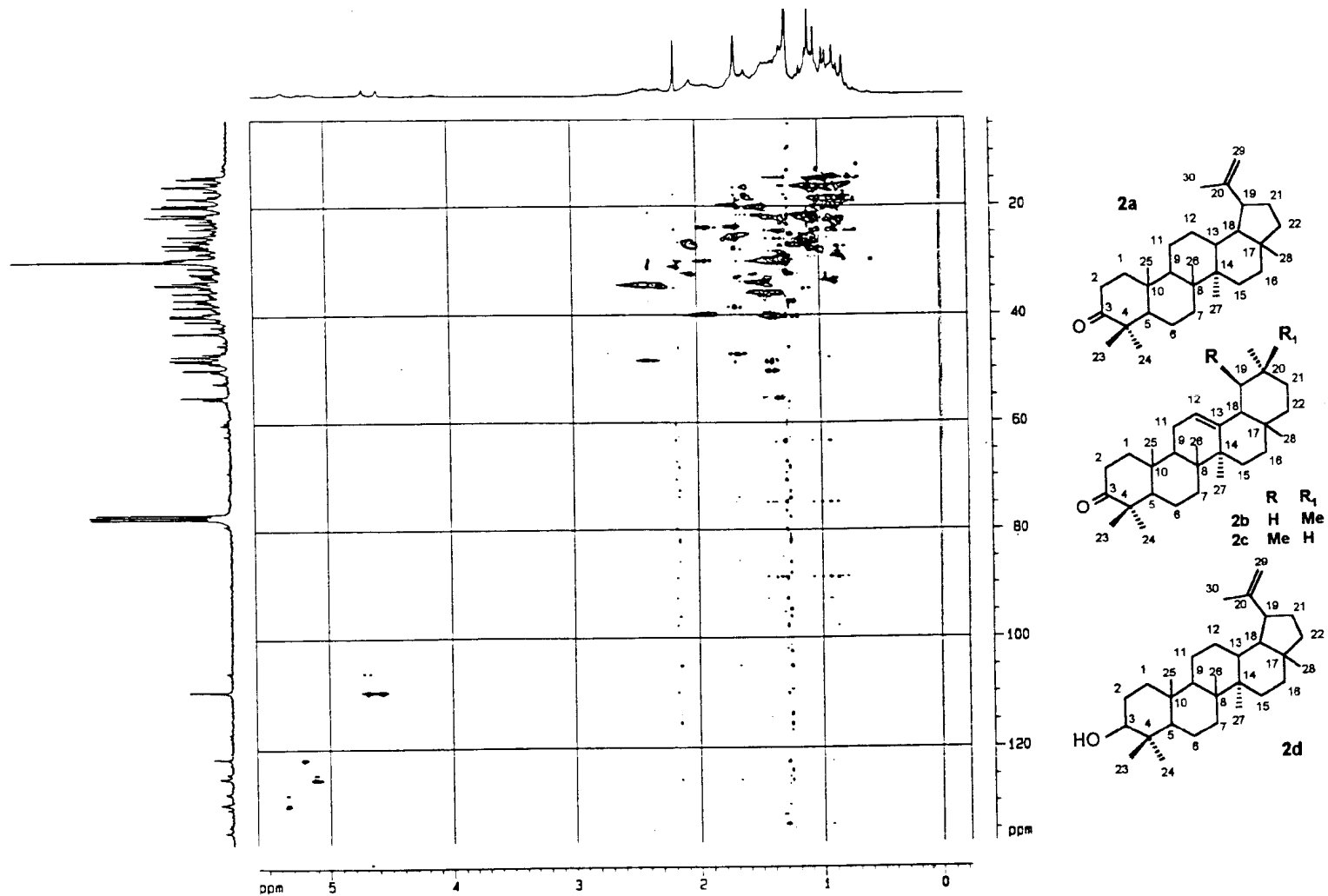


FIGURA 11. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 através de uma ligação [$^1\text{Hx}^{13}\text{C-COSY-}^1\text{J}_{\text{CH}} = ^1\text{Hx}^{13}\text{C-HMQC}$] de 2a, 2b, 2c e 2d, em mistura (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

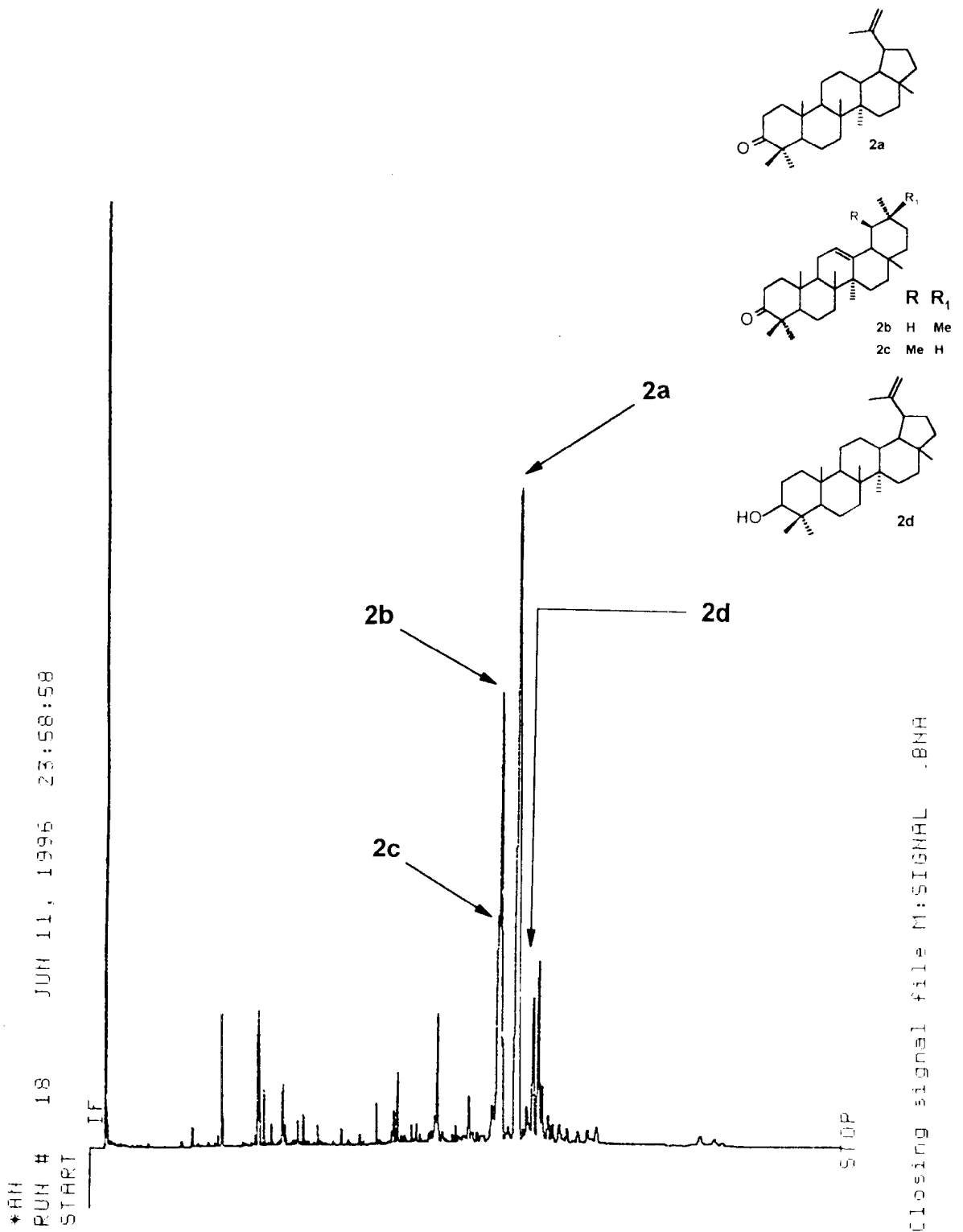


FIGURA 12. Cromatograma de 2a, 2b, 2c e 2d, em mistura.
Análise obtida por CGAR

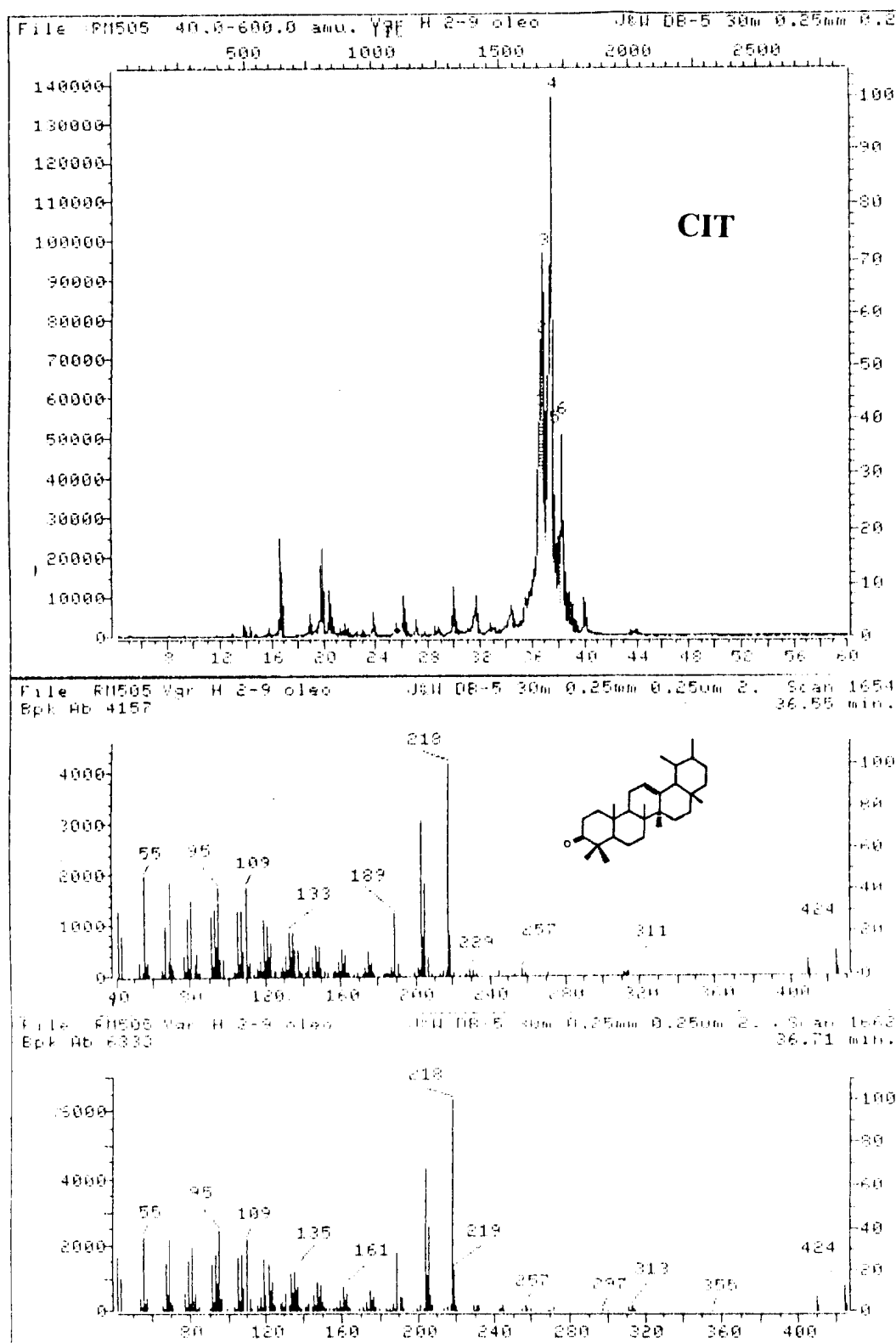


FIGURA 13. Cromatograma de ions totais (CIT) e espectro de massas de 2a, 2b, 2c e 2d. Análise obtida por CGAR-EM-C

Continuação...

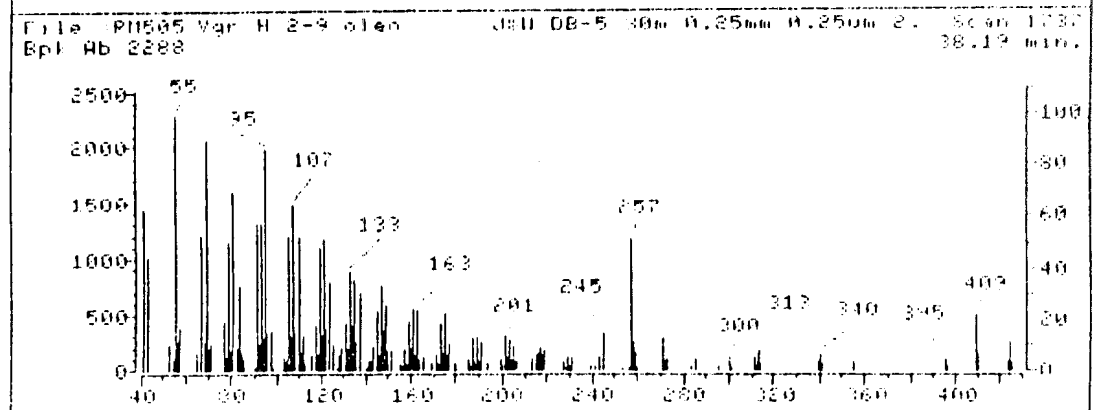
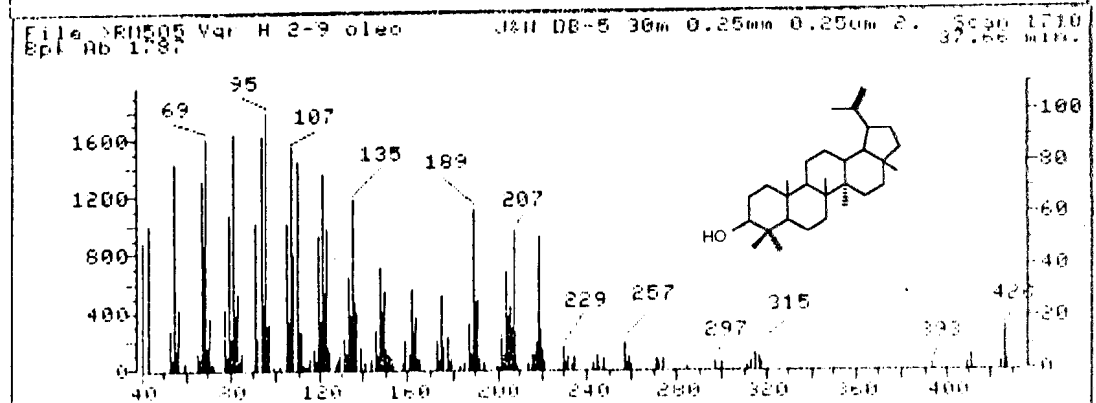
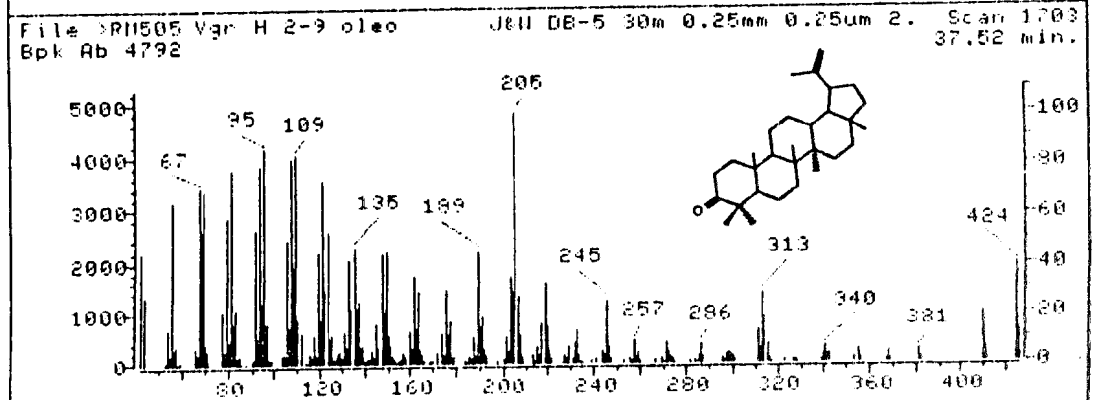
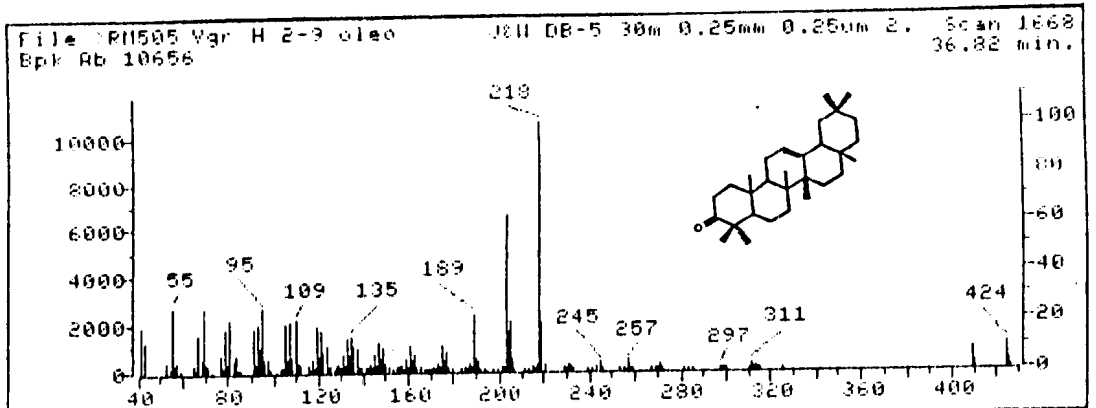


TABELA IV

Comparação dos dados de RMN ^{13}C (75 MHz)* de 2a e 2b com lupenona e β -amirona descritos na literatura^{68,69}

C	2a	Lupenona	2b	β -amirona
1	39.46	39.6	38.86	39.1
2	34.46	34.1	34.46	34.1
3	218.06	218.3	217.68	217.6
4	48.30	47.3	48.60	47.4
5	54.99	54.9	55.39	55.3
6	19.41	19.7	19.41	19.6
7	33.42	33.6	33.42	32.2
8	39.89	40.8	39.72	39.3
9	49.87	49.7	49.90	49.2
10	36.98	36.9	38.10	38.8
11	21.12	21.6	22.27	23.0
12	26.76	26.7	121.62	122.1
13	38.25	38.1	145.32	143.8
14	42.99	42.9	41.54	41.8
15	27.30	27.4	26.35	26.2
16	34.45	35.4	26.95	27.0
17	43.08	43.0	32.03	32.5
18	48.32	48.8	47.39	47.4
19	48.03	47.9	46.95	46.9
20	150.81	150.6	30.96	31.1
21	30.96	29.9	34.50	34.8
22	40.07	40.0	37.20	37.2
23	33.68	33.4	28.51	28.2
24	21.12	21.6	14.22	15.5
25	15.90	16.1	15.30	15.6
26	16.07	16.1	15.60	16.9
27	14.56	14.6	25.96	26.0
28	18.32	18.0	26.56	28.4
29	109.55	109.2	33.42	33.3
30	19.79	19.3	23.52	23.7

* Multiplicidade dos sinais dos carbonos foram deduzidas pela análise comparativa dos espectros RMN ^{13}C [PND e DEPT ($\theta = 90^\circ$ e 135°)].

4.1.3 3,5-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7:2,1-12-(1-metiletetil)fuoro] flavona
(3) e 5-hidroxi-3,3',4'-trimetoxi-6,7:2,1-[2-(1-metiletetil)fuoro]
flavona (3a) em mistura

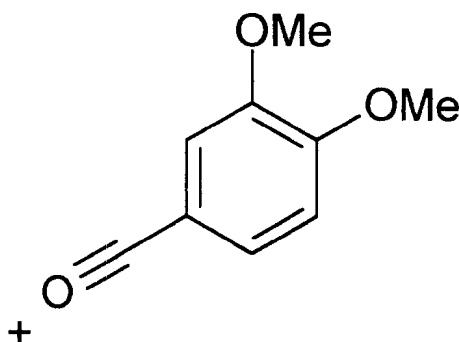
O espectro na região do IV [Fig. 14] (pag. 55) da mistura (3 + 3a) apresentou bandas de absorção para grupo hidroxila (3400 cm^{-1}), grupo carbonila conjugado (1667 cm^{-1}) e anel aromático (1608 e 1508 cm^{-1}). A análise do cromatograma, obtido por CGAR-AT [Fig. 15] (pag. 56), mostrou claramente a presença de dois compostos. No espectro de RMN ^{13}C -Pendant [Fig. 16] (pag. 57), uma sequência de pulso envolvendo os princípios do APT + DEPT no qual se observa os sinais de carbono primário/terciário acima e os carbonos secundários/quaternários abaixo da linha de base (ou vice-versa)⁷⁰, deduz-se o deslocamento químico e a multiplicidade para cada carbono de 3 e 3a [Tabela V] (pag. 76). Os espectros de massas de baixa resolução [Fig. 17] (fig. 59) $\{m/z\}$ 396 [M]^+ , $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_7$ (3), e 410 [M]^+ , $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_7$ (3a)} e o espectro de RMN ^1H [Fig. 18] (pag. 60) levaram a expansão das respectivas fórmulas moleculares para $[\text{C}]_{11} [\text{C}=\text{O}] [\text{H}-\text{C}-\text{O}] [\text{CH}]_4 [\text{CH}_2]_2 [\text{CH}_3] [\text{OCH}_3]_2 [\text{OH}]_2$ (3) e $[\text{C}]_{11} [\text{C}=\text{O}] [\text{H}-\text{C}-\text{O}] [\text{CH}]_4 [\text{CH}_2]_2 [\text{CH}_3] [\text{OCH}_3]_3 [\text{OH}]$ (3a). A presença de hidroxilas quelatogênicas em C-3 (3) e C-5 (3 e 3a) foram atribuídas aos sinais singletos em δ_{H} 11.90 e 12.85, sendo que, o último apresentou maior intensidade revelada pela curva de integração.

As fórmulas moleculares $C_{22}H_{20}O_7$ (3) e $C_{23}H_{22}O_7$ (3a) requerem grau de insaturação treze, compatível com o esqueleto flavônico ($C_{15}H_{10}O_2$ grau de insaturação onze) sustentando um anel adicional juntamente com uma dupla ligação. De fato, a presença de um grupamento isoprenóide envolvido em um anel furânico foi evidenciado pelos deslocamentos químicos de 2H-1" [3/3a: δ_H 5.10 (*sl*)/5.30 (*sl*) e 4.95 (*sl*)/4.95 (*sl*)], H-3" [3/3a: δ_H 5.35 (*m*)/5.35 (*m*)], 2H-4" (3/3a: δ_H 3.39 (*dd*, $J= 9.7$ e 15.8 Hz)/3.38 (*dd*, $J= 9.6$ e 15.7 Hz) e 3.03 (*dd*, $J= 7.4$ e 15.8 Hz)/3.02 (*dd*, $J= 7.9$ e 15.7 Hz)] e 3H-5" (3/3a: δ_H 1.78 (*s*)/1.78 (*s*)) e pelos átomos de carbonos C-1" até C-5" [3/3a: δ_C 112.94/112.92 (CH₂-1"), 143.33/143.33 (C-2"), 88.36/88.36 (CH-3"), 30.67/30.67 (CH₂-4") e 17.13/17.13 (CH₃-5")]. A localização do grupamento isoprenóide, no anel A, envolvendo o átomo de carbono C-6 foi definida pelo acoplamento heteronuclear via 3 ligações ($^3J_{CH}$) entre este carbono [δ_C 108.20 (3) e 108.39 (3a)] e o hidrogênio do grupo hidroxila [δ_H 12.89 (3 e 3a)] em C-5 observado no espectro HMBC [Fig. 22] (pag. 64).

Os espectros de RMN 1H {1D [Fig. 18] (pag. 60) e 2D $^1H \times ^1H$ -COSY [Fig. 27] (pag. 69)} revelaram a presença do sistema ABX do anel aromático 1,3,4-trissubstituído (Anel B 3',4'-dimetoxilado) pertencentes aos flavonóides 3 e 3a, pela análise dos deslocamentos químicos de H-2' [3/3a: δ_H 7.78 (*d*, $J= 2.0$ Hz)/7.69 (*d*, $J= 2.0$ Hz)], H-5' [3/3a: δ_H 7.01 (*d*, $J= 8.6$ Hz)/7.00 (*d*, $J= 8.6$ Hz)] e H-6' [3/3a: δ_H 7.83 (*dd*, $J= 2.0$ e 8.6 Hz)/7.73 (*dd*, $J= 2.0$ e 8.6 Hz)], o que foi confirmado pelos

sinais dos C-1' até C-6' observados no espectro de RMN ^{13}C -Pendant [Fig. 16] (pag. 57) {3/3a: δ_{C} 122.59/1123.14 (C-1'), 110.62/111.33 (CH-2'), 148.80/148.91 (C-3'), 151.45/151.45 (C-4'), 111.05/110.00 (CH-5') e 121.43/122.26 (CH-6')}. Através da expansão, no espectro de RMN ^1H , foi possível analisar com mais detalhe as diferenças no deslocamento químico entre as metoxilas [Fig. 19] (pag. 61), hidrogênios metínico e metilênicos [Fig. 20] (pag. 62) e aromáticos [Fig. 21] (pag. 63) de 3 e 3a em mistura.

O pico de m/z 165 observado nos espectros de massas [Fig. 17] (pag. 59) de 3 e 3a, atribuído ao fragmento iônico abaixo, também colaborou para estas deduções. As demais fragmentações estão contidas no Esquema 10 (pag. 79).



A diferença de 14 daltons observada no espectro de massas entre 3 e 3a, qual foi confirmada por CGAR-AT-FM [Fig. 17] (pag. 59), foi atribuída a presença do

grupo hidroxila em C-3 [δ_{H} 11.94 (s)] de 3 e metoxila em C-3 [δ_{H} 3.86 (s) e δ_{C} 60.36 (MeO-3)] de 3a.

Assim, os flavonóides monoisoprenilados 3 e 3a isolados, em mistura, de *Vellozia graminifolia* foram caracterizados como 3,5-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7:2, 1-[2-(1-metiletênil)furo] flavona (3) e 5-hidroxi-3,3',4'-trimetoxi-6,7:2,1-[2-(1-metiletênil)furo] flavona (3a). O composto 3 ainda não foi registrado como um produto natural, entretanto seu derivado metoxilado em C-3 (3a) foi anteriormente isolado de outras espécies de *Vellozia*²². Com base na intensidade dos sinais correspondentes a H-8 [δ_{H} 6.48 (3) e 6.43 (3a)] no espectro de RMN ^1H [Fig. 18] (pag. 60) foi estimada a porcentagem de 3 (30%) e 3a (70%) na mistura.

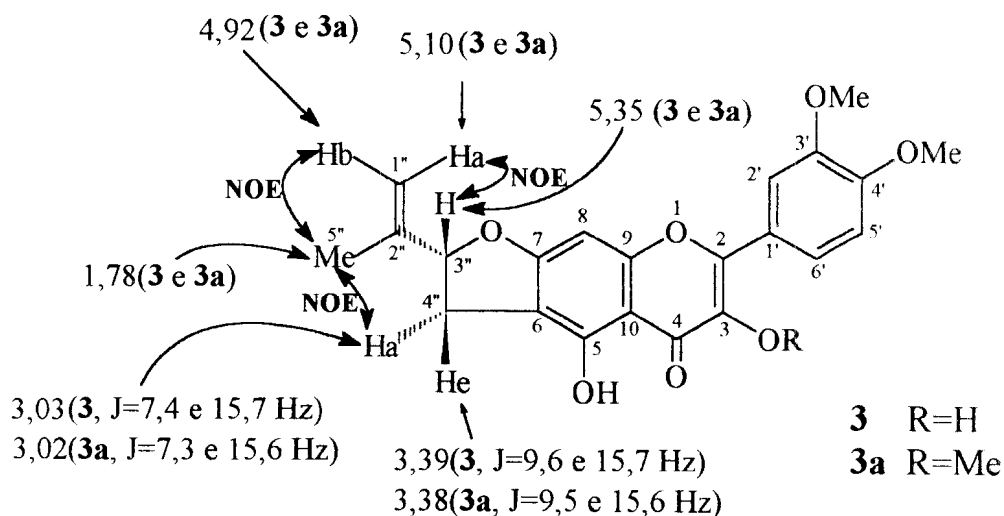
O correto assinalamento dos átomos de hidrogênio e carbono nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C -Pendant:, respectivamente, foram acompanhados pelos experimentos homonuclear 2D $^1\text{H}_x^1\text{H}$ -COSY e 2D $^1\text{H}_x^1\text{H}$ -NOESY [Tabela VI] (pag. 78) e heteronuclear 2D $^1\text{H}_x^{13}\text{C}$ -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$ {n = 1, HMQC [Fig. 28] (pag. 70); n = 2 e 3 HMBC [Fig. 22] (pag. 63)} da mistura (3 + 3a) [Tabela V] (pag. 76). O espectro HMBC mostrou que o hidrogênio HO-5 [3/3a: δ_{H} 12.89 (s)/12.89 (s)] está correlacionado com os átomos de carbonos quaternários C-5 [3/3a: δ_{C} 156.65/156.65; $^2\text{J}_{\text{CH}}$], C-6 [3/3a: δ_{C} 108.20/108.39, $^3\text{J}_{\text{CH}}$] e C-10 [3/3a: δ_{C} 104.26/106.44; $^3\text{J}_{\text{CH}}$]. Estes resultados indicam que o C-10 de 3a absorve 2.18 ppm em campo mais baixo [$\Delta\delta_{\text{C}}$ = 106.44 (3a) - 104.26 (3)]. O espectro HMBC também

revelou que os hidrogênios do carbono C-4" [3/3a: δ_{H} 3.39 (*dd*, $J = 9.6, 15.7$ Hz) e 3.03 (*dd*, $J = 7.4, 15.7$ Hz)/3.38 (*dd*, $J = 9.5, 15.6$ Hz) e 3.02 (*dd*, $J = 7.3, 15.6$ Hz)] estão correlacionado com C-6 [3/3a: δ_{C} 108.20/108.39; $^2J_{\text{CH}}$], excluindo definitivamente qualquer ambigüidade para o assinalamento dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono C-6 e C-10 de 3 e 3a em mistura. A comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos quaternários C-2, C-3 e C-4 de 3 e 3a também mostraram variações no deslocamento químico para campo mais baixo em 10.34 [$\Delta\delta = 155.73$ (3a) - 145.39 (3)], 3.22 [$\Delta\delta_{\text{C}} = 139.04$ (3a) - 135.82 (3)] e 3.96 ppm [$\Delta\delta_{\text{C}} = 179.00$ (3a) - 175.31 (3)], respectivamente [Tabela V] (pag. 76). Estes dados e as correspondentes variações podem ser usados para caracterizar 3-hidroxi flavonas (flavonóis) e derivados 3-metoxilados (3-metoxiflavonas).

O espectro HMBC da mistura (3 + 3a) foi expandido nas regiões onde aparecem sinais de metoxila { δ_{H} : 1.5-4.5/ δ_{C} : 80-160} [Fig. 23] (pag. 65), metínico { δ_{H} : 4.5-8.0/ δ_{C} : 80-180} [Fig. 24] (pag. 66), metilênicos { δ_{H} : 2.9-3.5/ δ_{C} : 80-180} [Fig. 25] (pag. 67) e núcleos aromáticos { δ_{H} : 4.5-8.0/ δ_{C} : 80-200} [Fig. 26] (pag. 68) para facilitar a interpretação da correlação entre os átomos de carbonos e hidrogênios a longa distância ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$).

O espectro homonuclear 2D $^1\text{Hx}^1\text{H}$ -NOESY [Fig. 29] (pag. 72), juntamente com expansões em certas regiões, possibilitou analisar com mais detalhe a relação espacial entre os hidrogênios metínico (3") e metilênicos (C-4") de 3 e 3a.

A análise do espectro 2D $^1\text{Hx}^1\text{H}$ -NOESY revelou picos transversais correspondentes as interações dipolar-dipolar entre H-3" {3/3a: δ_{H} 5.35 (*m*)/5.35 (*m*)} e H-1"a {(3/3a: δ_{H} 5.10 (*sl*)/5.10 (*sl*)} [Fig. 30] (fig. 73); 3H-5" {(3/3a: δ_{H} 1.78 (*s*)/1.78 (*s*)} e pseudoaxial H-4"ax {3/3a: δ_{H} 3.03 (*dd*, $J = 7.4$ e $J = 15.7$ Hz)/3.02 (*dd*, $J = 7.3$ e 15.6 Hz) [Fig. 31] (pag. 74); acoplamento *vicinal* (*trans*-H-3"/H-4"ax) = $J_{\text{v}} = 7.4$ (3) e 7.3 Hz (3a) [Fig. 32] (fig. 75) e *geminal* (H-4"ax/H-4"eq) = $J_{\text{g}} = 15.8$ (3) e 15.7 Hz (3a)} [Fig. 30] (pag. 73). Conseqüentemente, a interação dipolar-dipolar entre H-1"b [3/3a: δ_{H} 4.92 (*sl*)/4.92 (*sl*)] e pseudoequatorial H-4"eq [3/3a: δ_{H} 3.39 (*dd*, $J_{\text{v}} = 9.6$ e $J_{\text{g}} = 15.7$ Hz)/3.38 (*dd*, $J_{\text{v}} = 9.5$ e $J_{\text{g}} = 15.6$ Hz)] (Fig. 32) também foi observado. Outros acoplamentos dipolares contidos no espectro homonuclear 2D $^1\text{Hx}^1\text{H}$ -NOESY [Fig. 29] (pag. 72) estão sumarizados na Tabela VI (pag. 78).



A estrutura acima demonstra as interações dipolar-dipolar observadas no espectro 2D NOESY de 3 e 3a.

3453.8, 3400.0, 3292.3, 2923.1, 2953.8, 2846.2, 1667.2, 1607.7, 1507.7, 1469.2, 1323.1, 1261.5, 1161.5, 1138.5, 1092.3, 1023.1, 800.0, 407.7=

N: Vgr H 10 Alex Op: Carlos KBr No: 349 UFRRJ

13:02

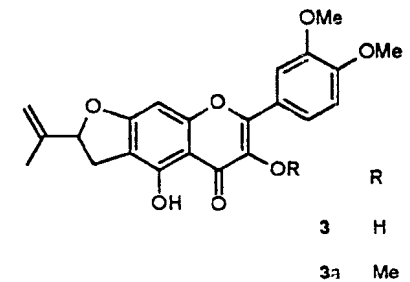
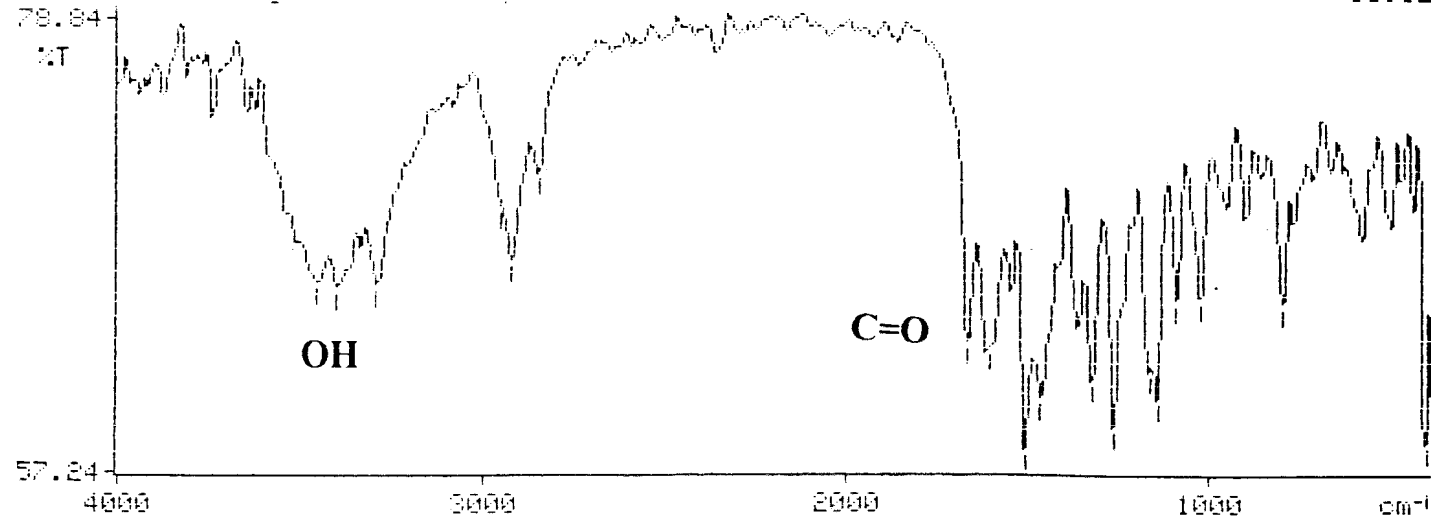


FIGURA 14. Espectro na região do IV de 3 e 3a, em mistura. Pastilha de KBr

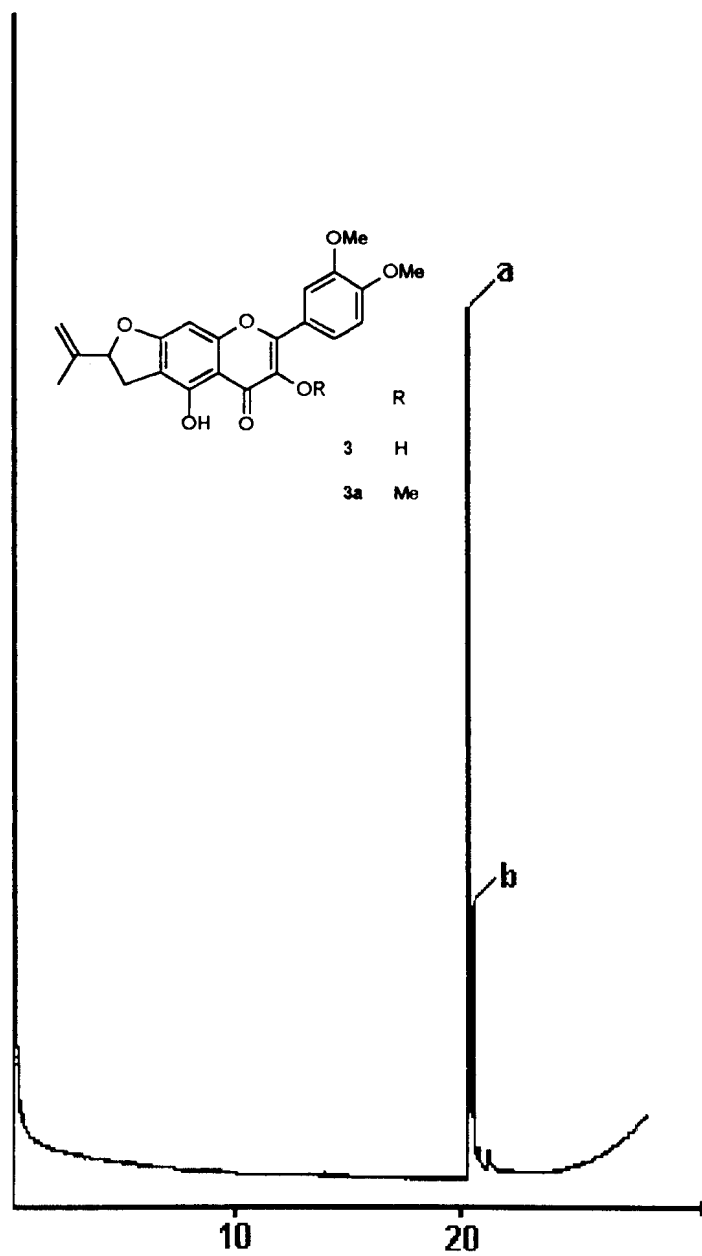


FIGURA 15. Cromatograma de 3 (pico b) e 3a (pico a), em mistura.

Análise obtida por CGAR-AT

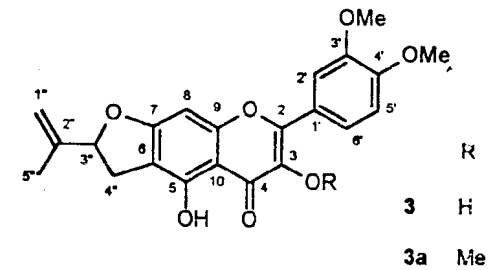
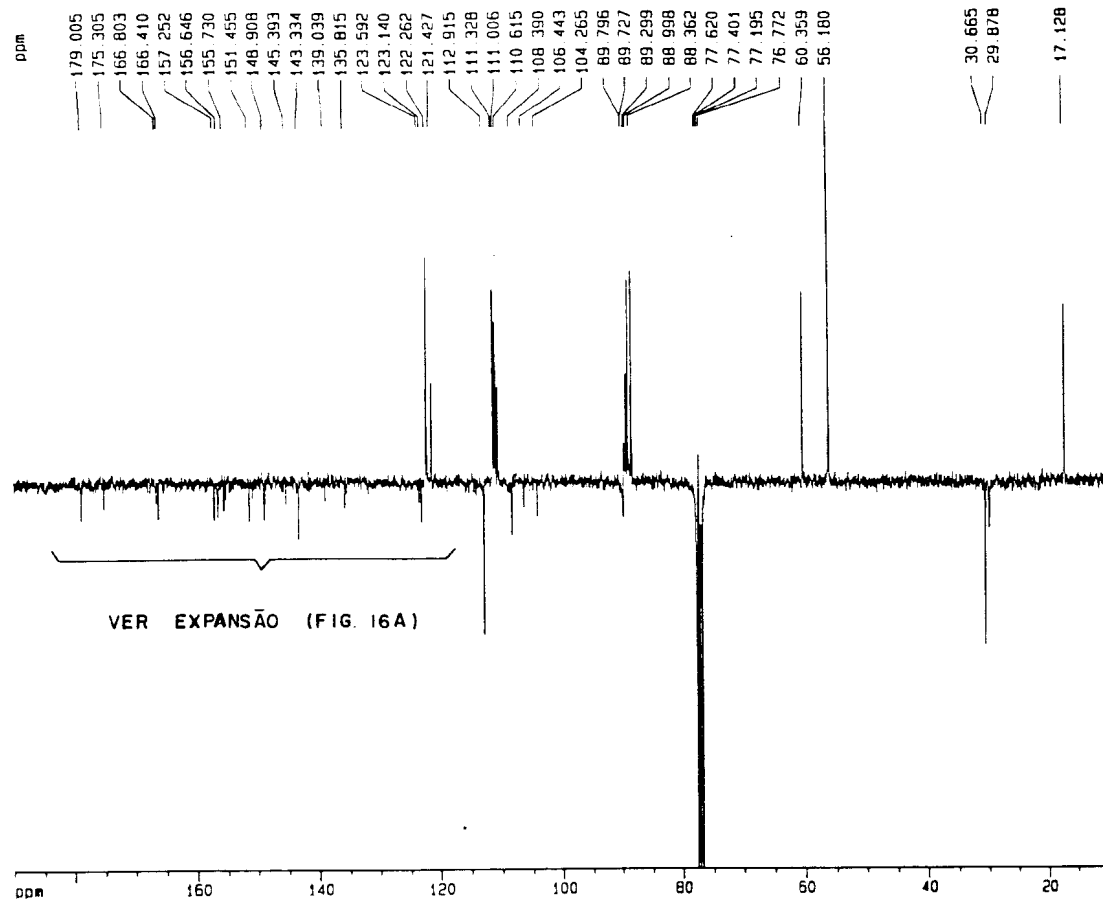


FIGURA 16. Espectro de RMN ^{13}C -Pendant de 3 e 3a, em mistura (75 MHz, CDCl_3).
TMS como referência interna

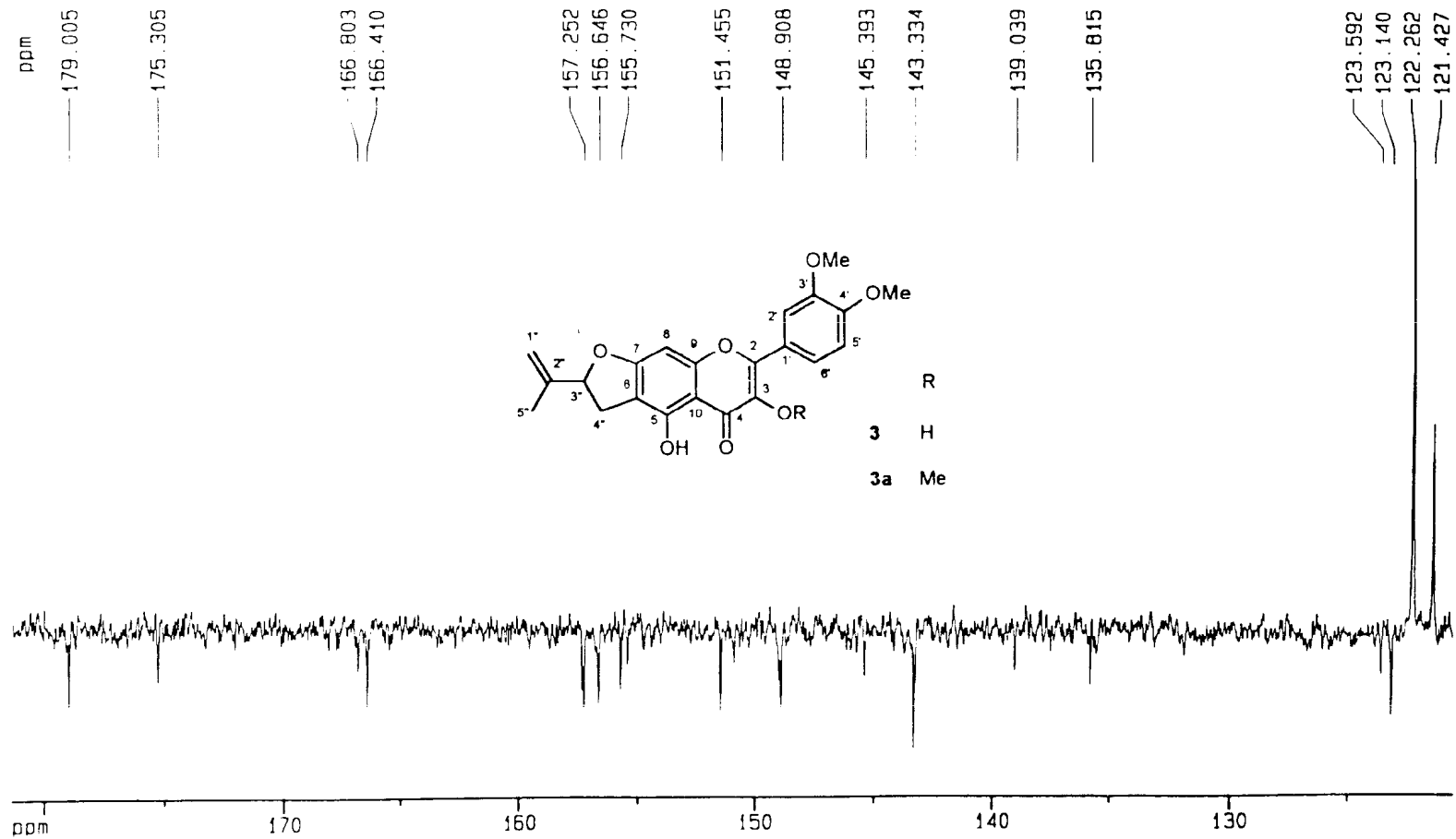


FIGURA 16A. Expansão da região entre 120-180 ppm do espectro de RMN ^{13}C -Pendant de 3 e 3a, em mistura (75 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

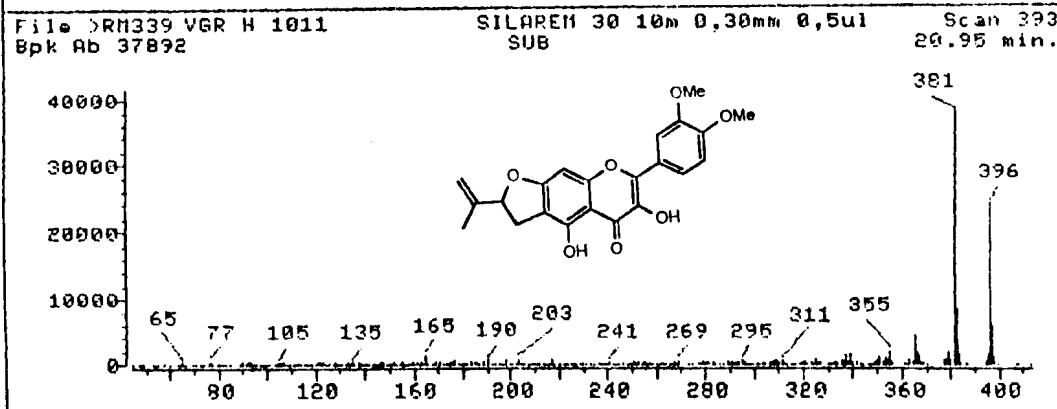
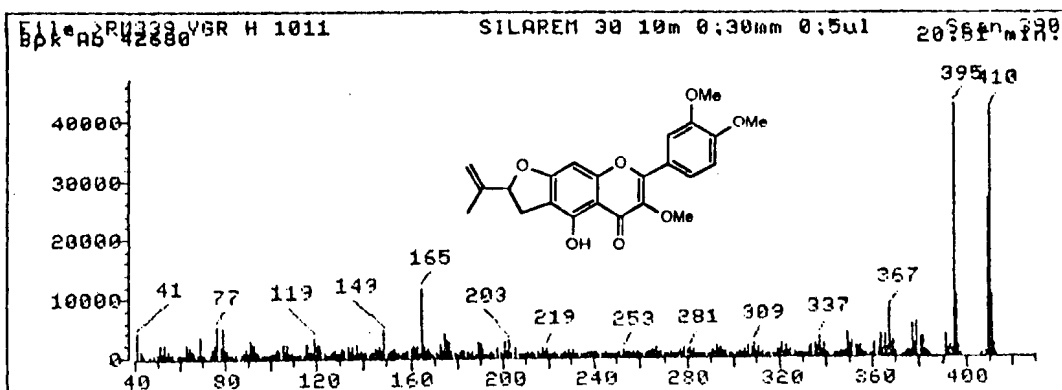
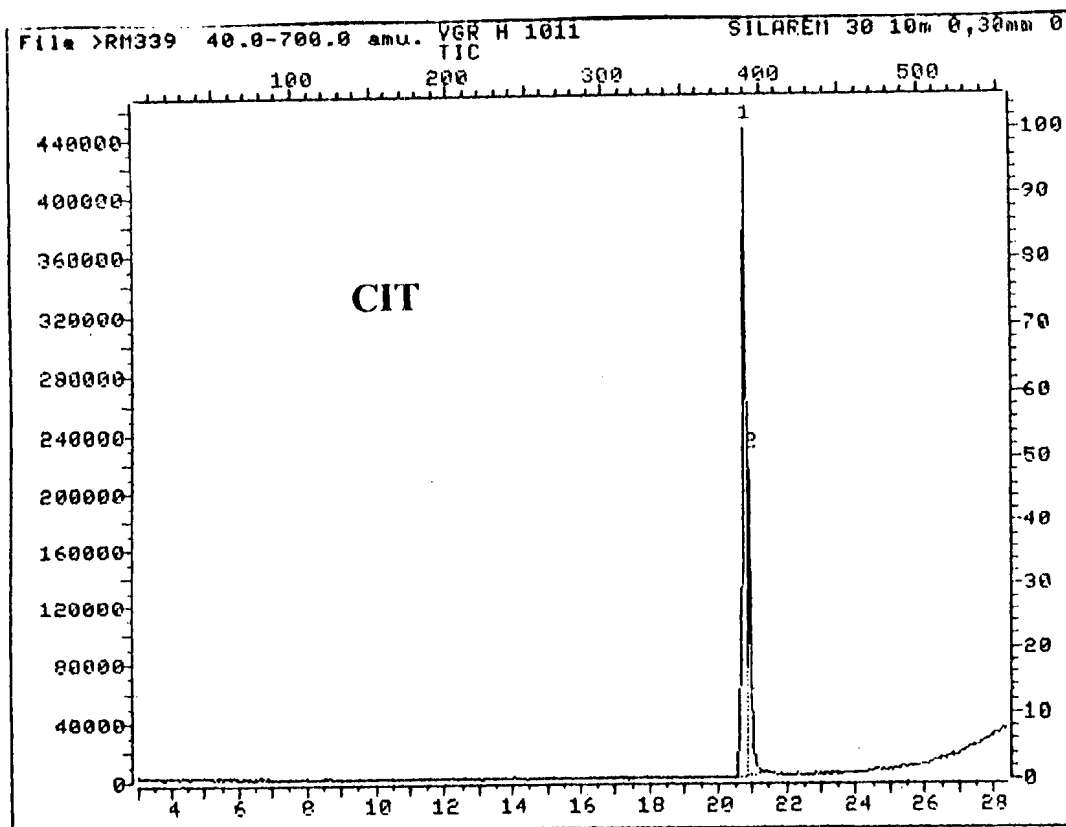


FIGURA 17. Cromatograma de ions totais (CIT) e espectro de massas de 3 e 3a, em mistura. Análise obtida por CGAR-AT-EM

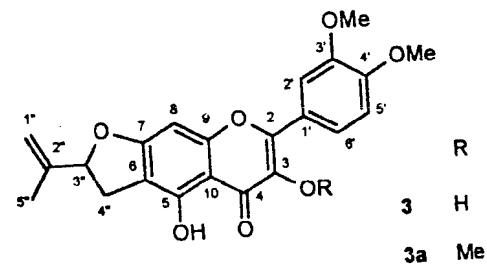
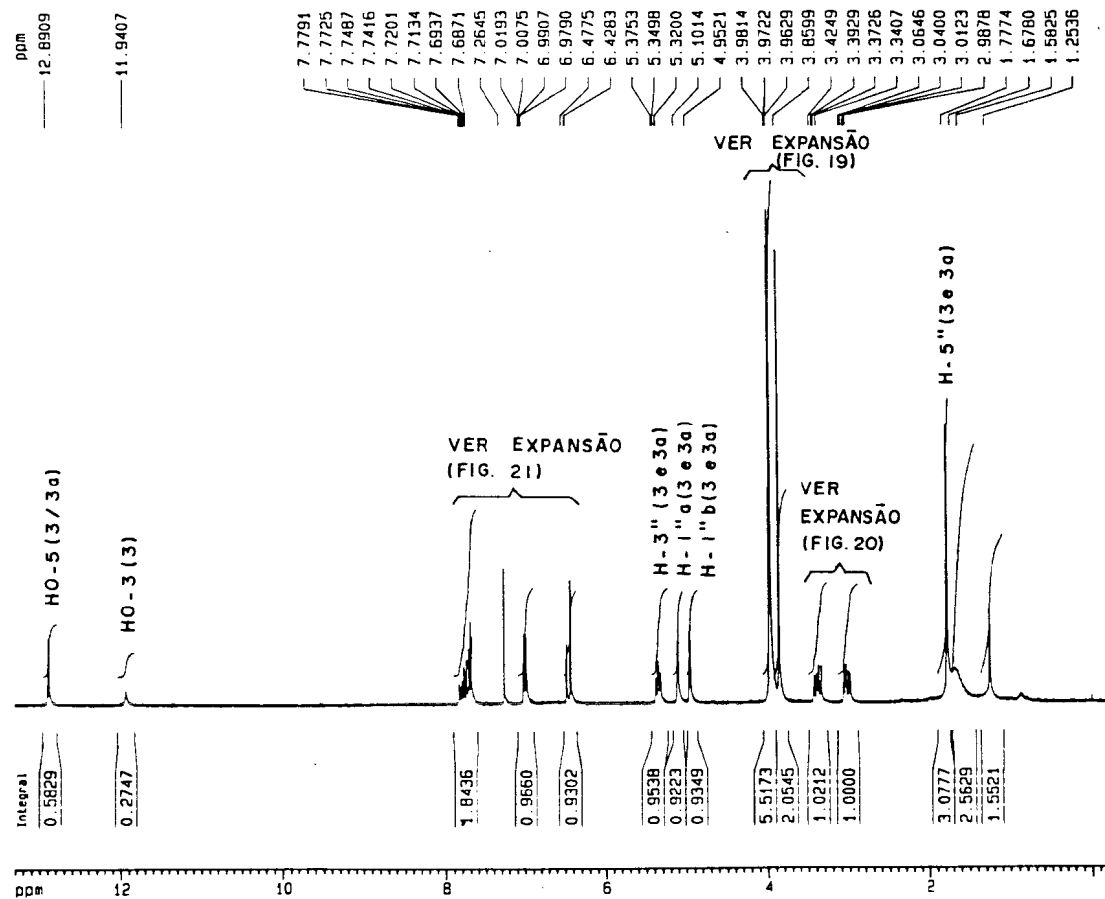


FIGURA 18. Espectro de RMN ^1H de 3 e 3a, em mistura (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

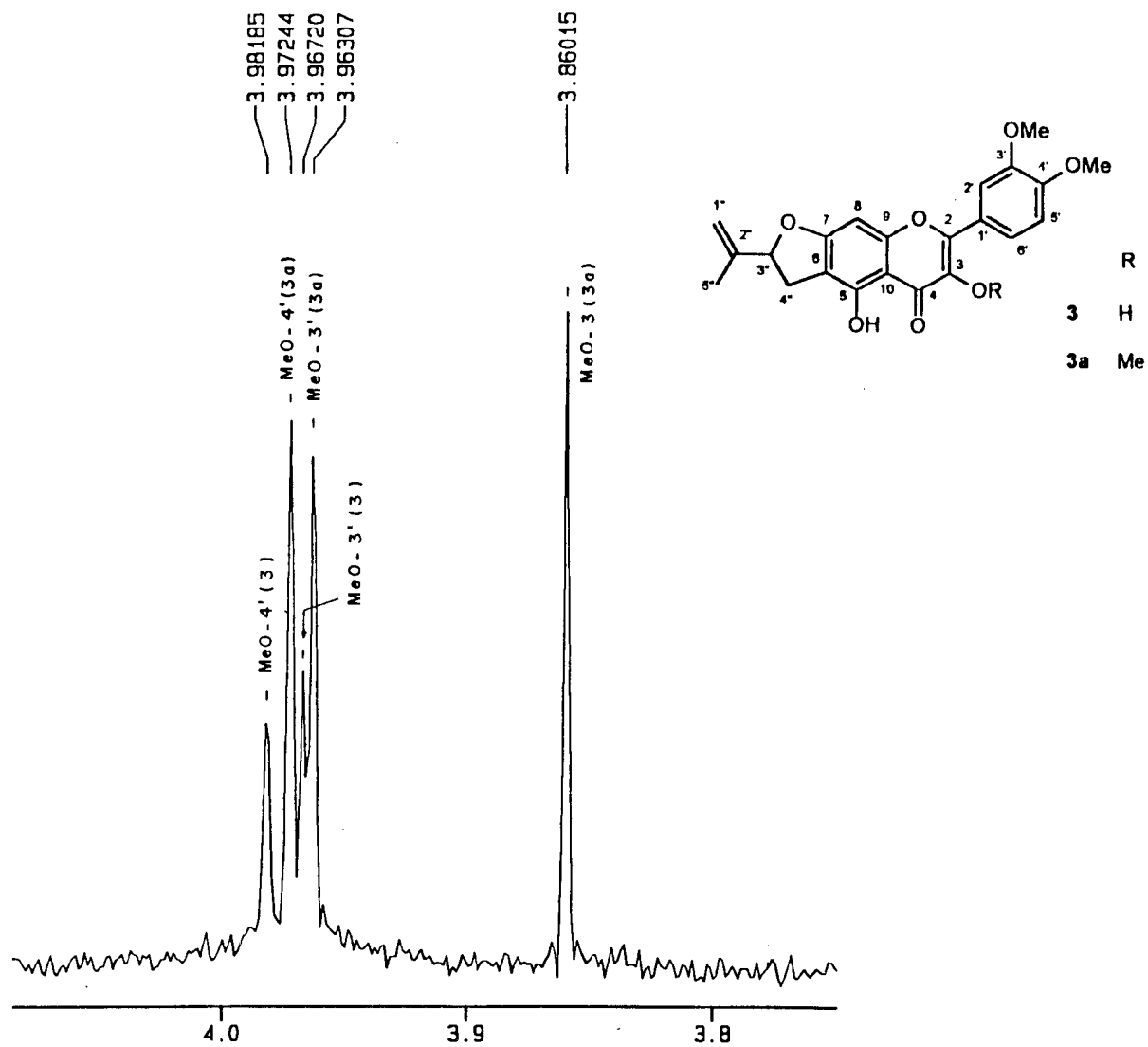


FIGURA 19. Expansão da região entre 3.8-4.0 ppm do espectro de RMN ^1H de 3 e 3a, em mistura (300 MHz, CDCl_3).

TMS como referência interna

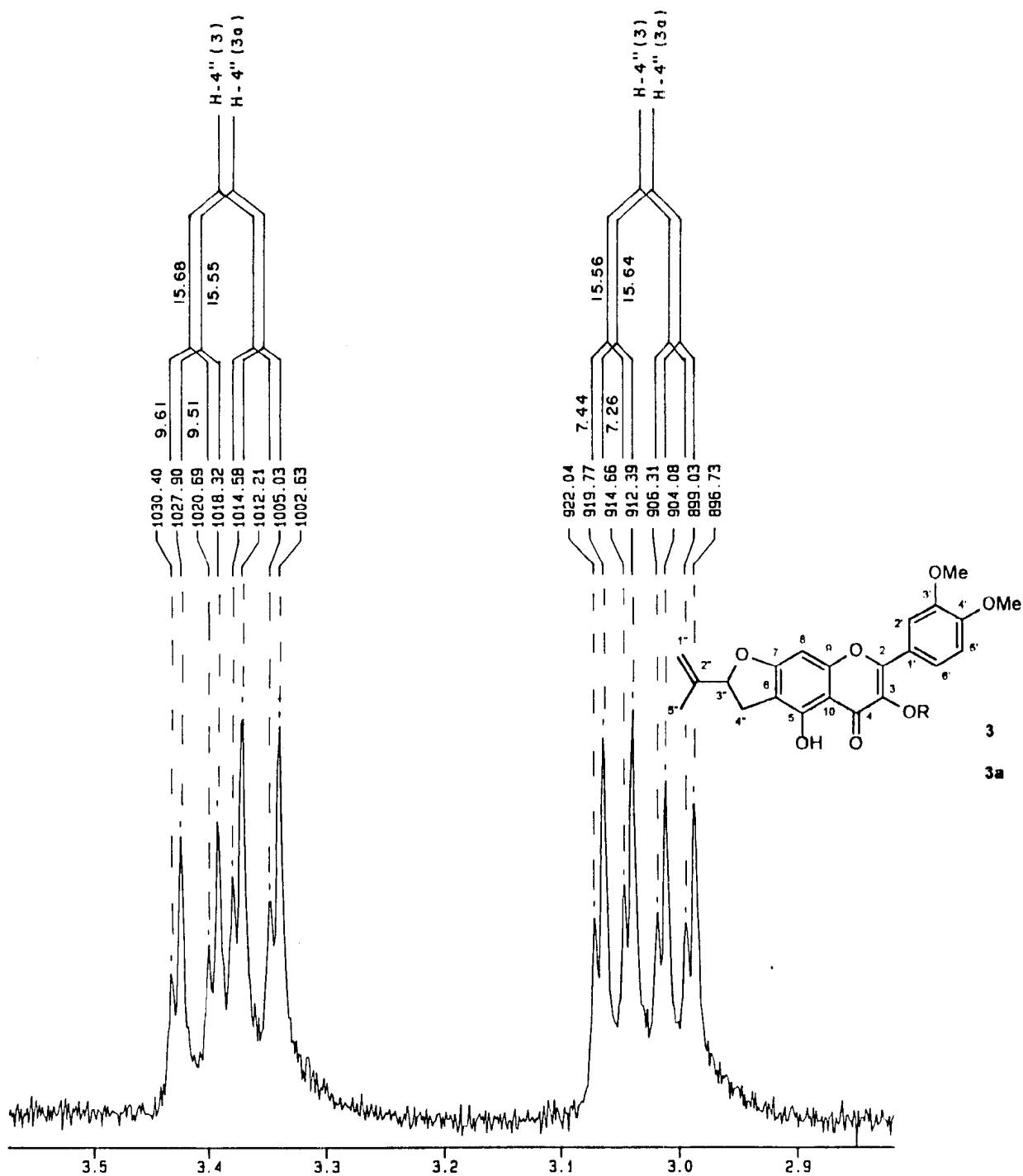


FIGURA 20. Expansão da região entre 2.9-3.5 ppm do espectro de RMN ^1H de 3 e 3a, em mistura (300 MHz, CDCl_3).

TMS como referência interna

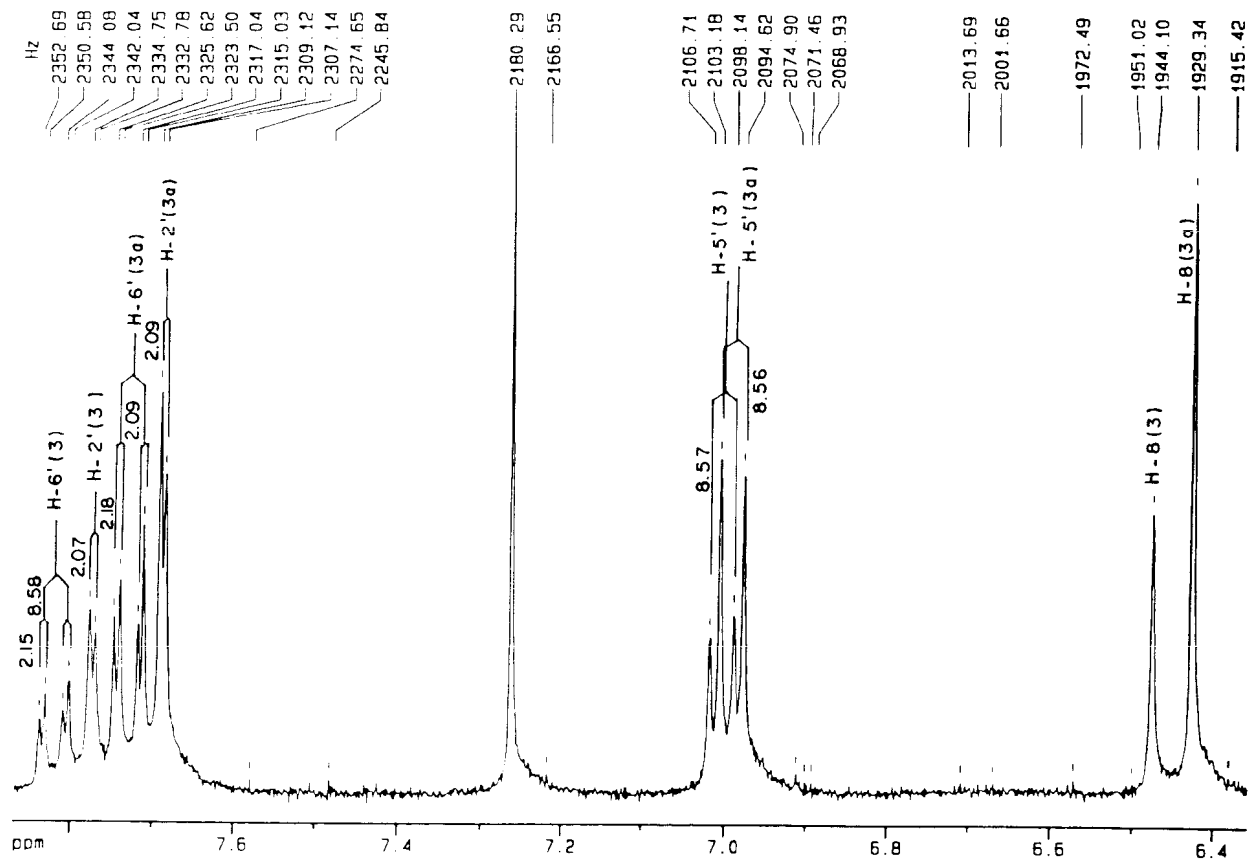


FIGURA 21. Expansão da região entre 6.4-8.0 ppm do espectro de RMN ^1H de 3 e 3a, em mistura (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

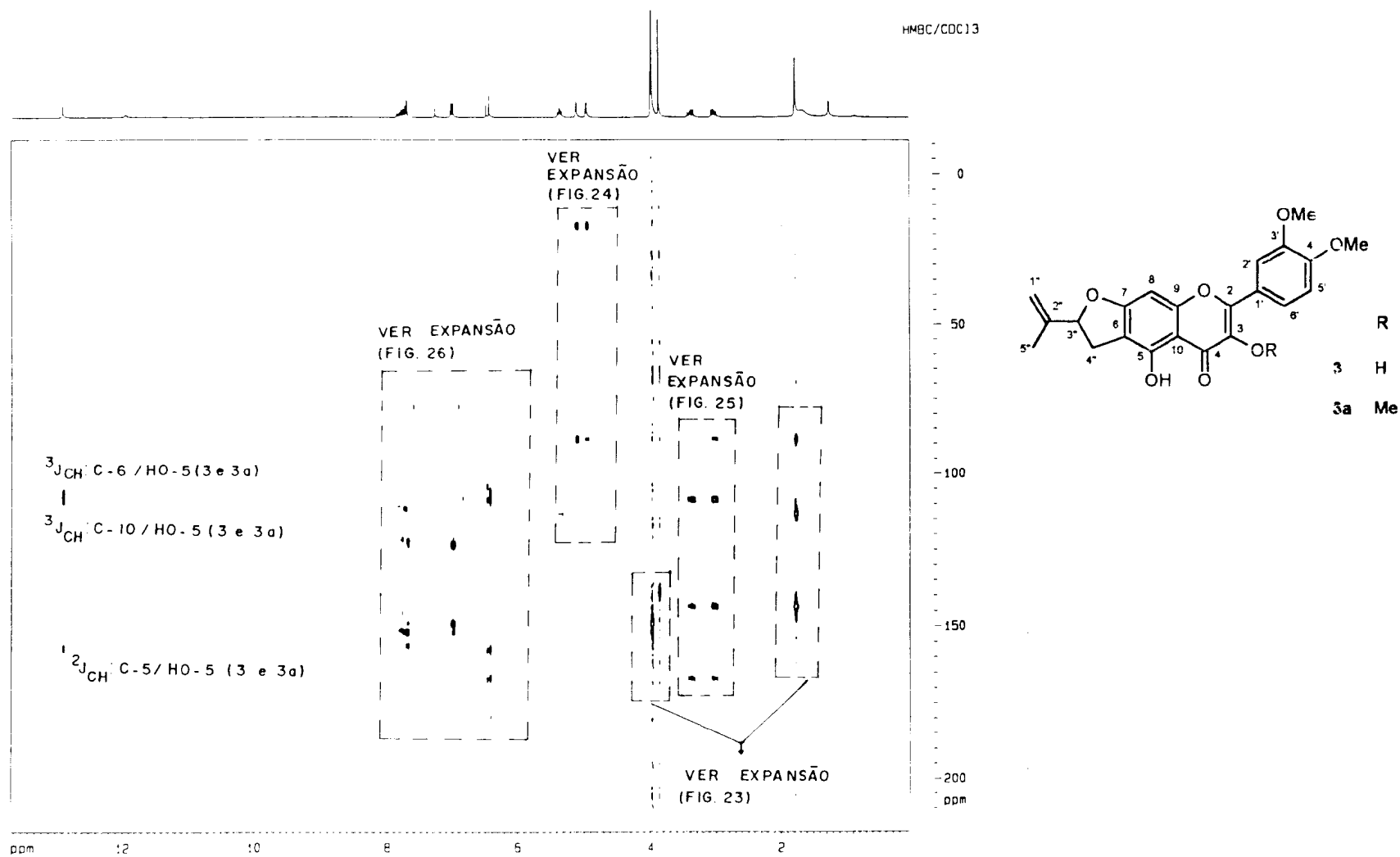


FIGURA 22. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 a longa distância [$^1\text{Hx}^{13}\text{C-COSY-}^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3)= $^1\text{Hx}^{13}\text{C-HMBC}$] de 3 e 3a, em mistura (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

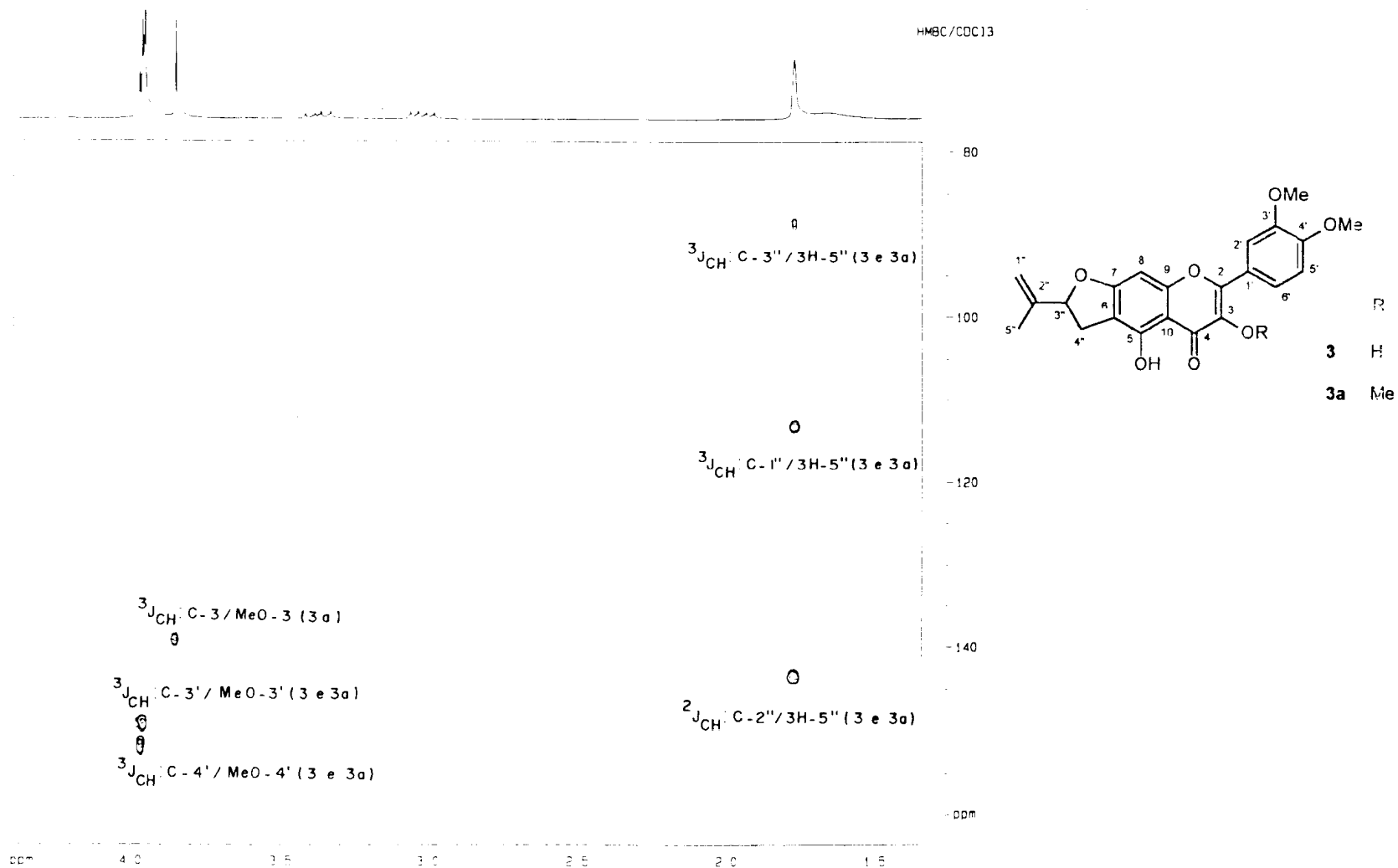


FIGURA 23. Expansão das regiões entre 1.5-4.5 e 80-160 ppm do espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 a longa distância [$^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ -COSY- $^nJ_{CH}$ ($n=2$ e 3)= $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ -HMBC)] de **3** e **3a**, em mistura (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

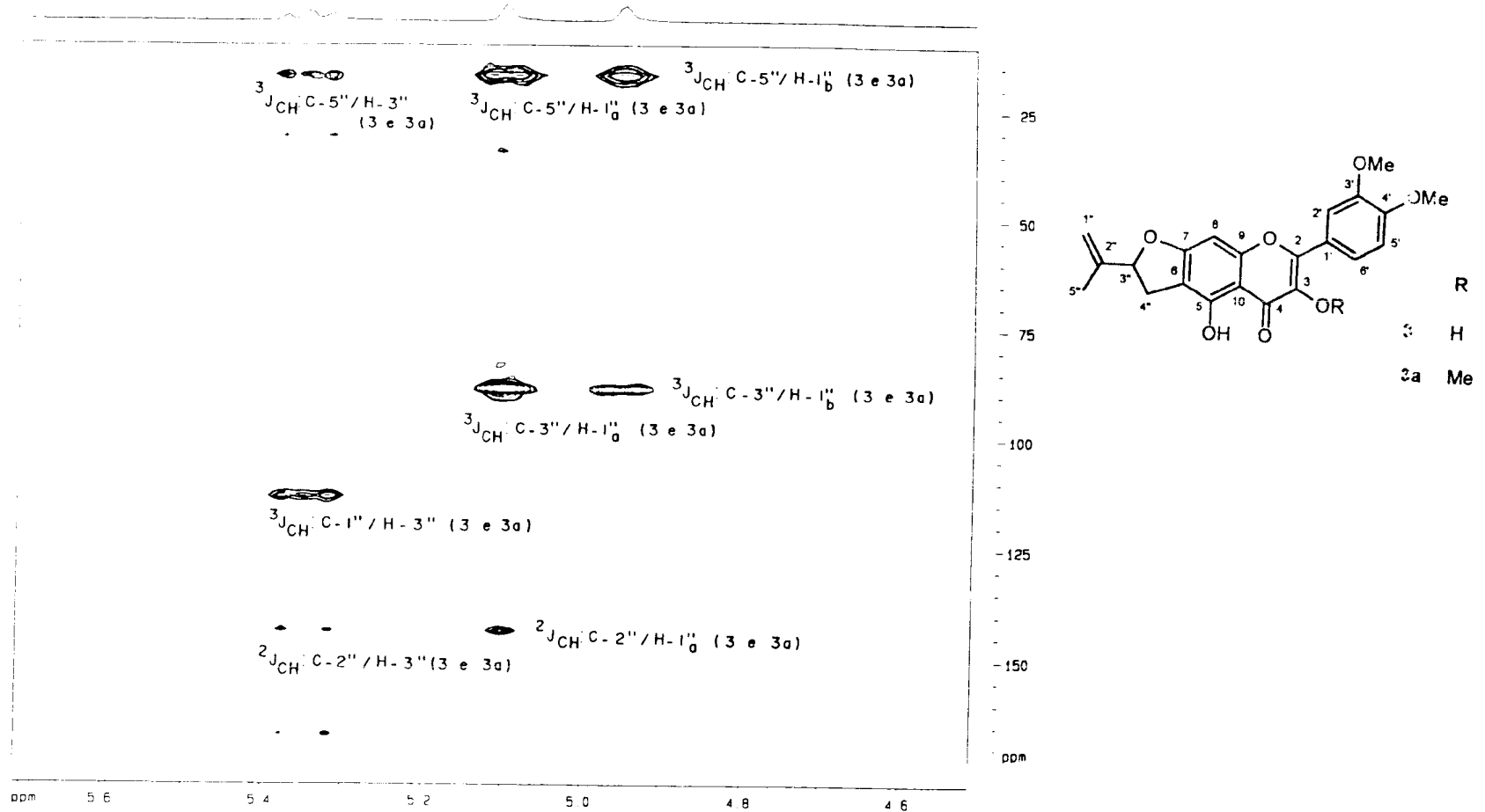


FIGURA 24. Expansão das regiões entre 4.5-8.0 e 80-180 ppm do espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 a longa distância [$^1Hx^{13}C-COSY-^nJ_{CH}$ ($n=2$ e 3)= $^1Hx^{13}C-HMBC$] de 3 e 3a, em mistura (300 MHz, $CDCl_3$). TMS como referência interna

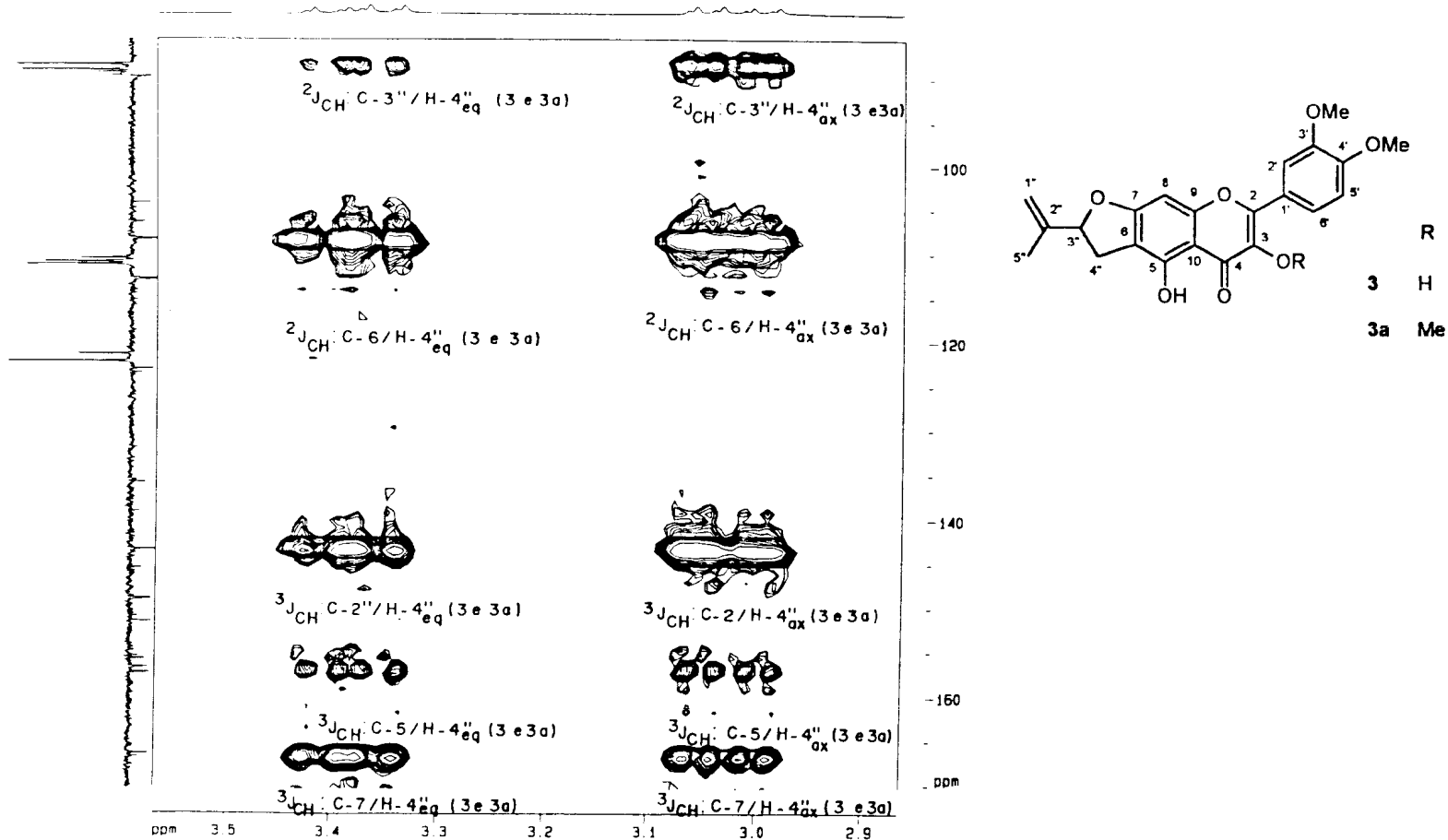


FIGURA 25. Expansão das regiões entre 2.9-3.5 e 80-180 ppm do espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 a longa distância [$^1\text{H}_x^{13}\text{C}\text{-COSY-}^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3)= $^1\text{H}_x^{13}\text{C}\text{-HMBC}$] de **3** e **3a**, em mistura (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

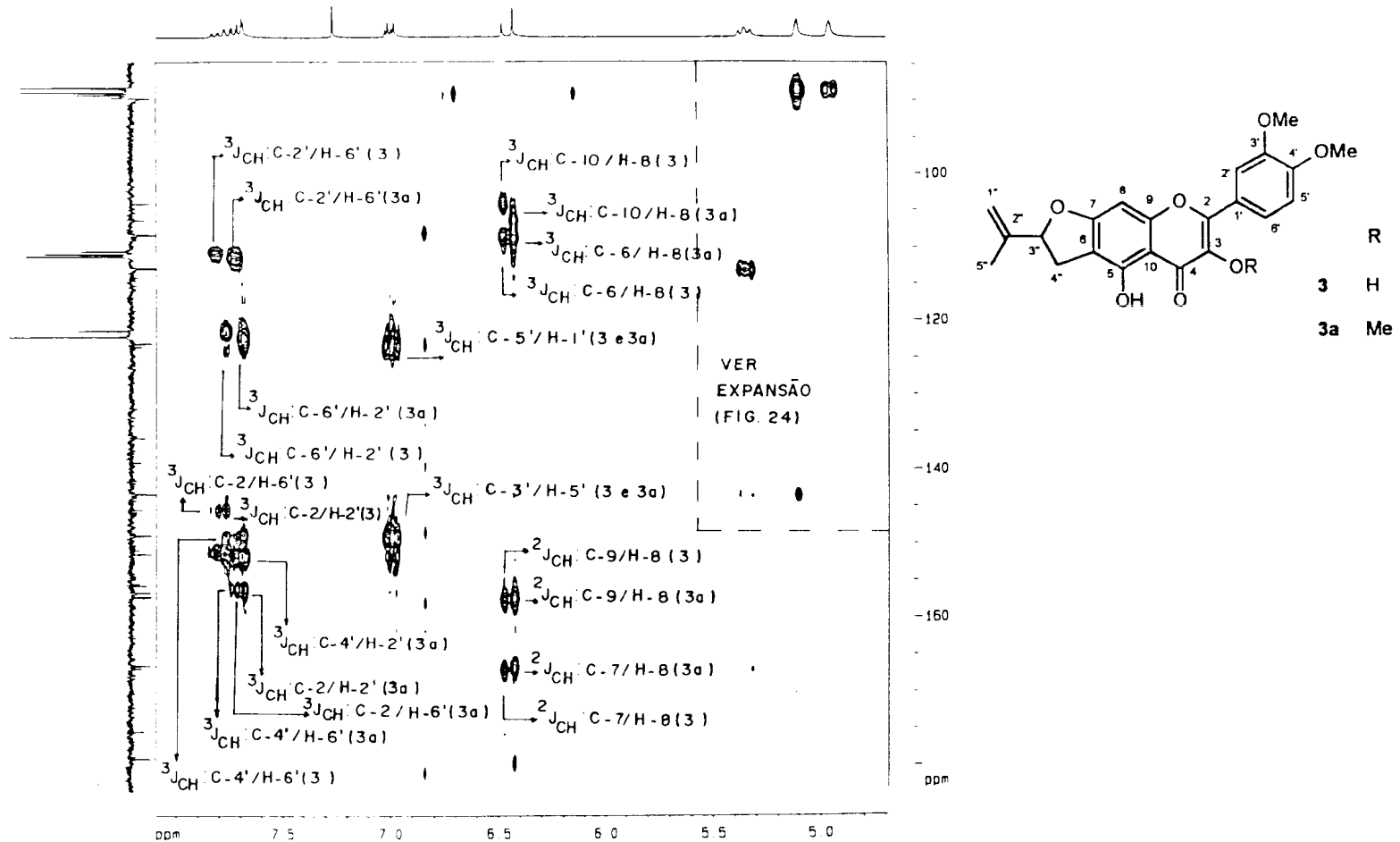


FIGURA 26. Expansão da região entre 4.5-8.0 e 80-200 ppm do espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 a longa distância [$^1\text{H}\times^{13}\text{C}\text{-COSY-}^n\text{J}_{\text{CH}}\text{(n=2 e 3)=}^1\text{H}\times^{13}\text{C}\text{-HMBC}$] de **3** e **3a**, em mistura (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

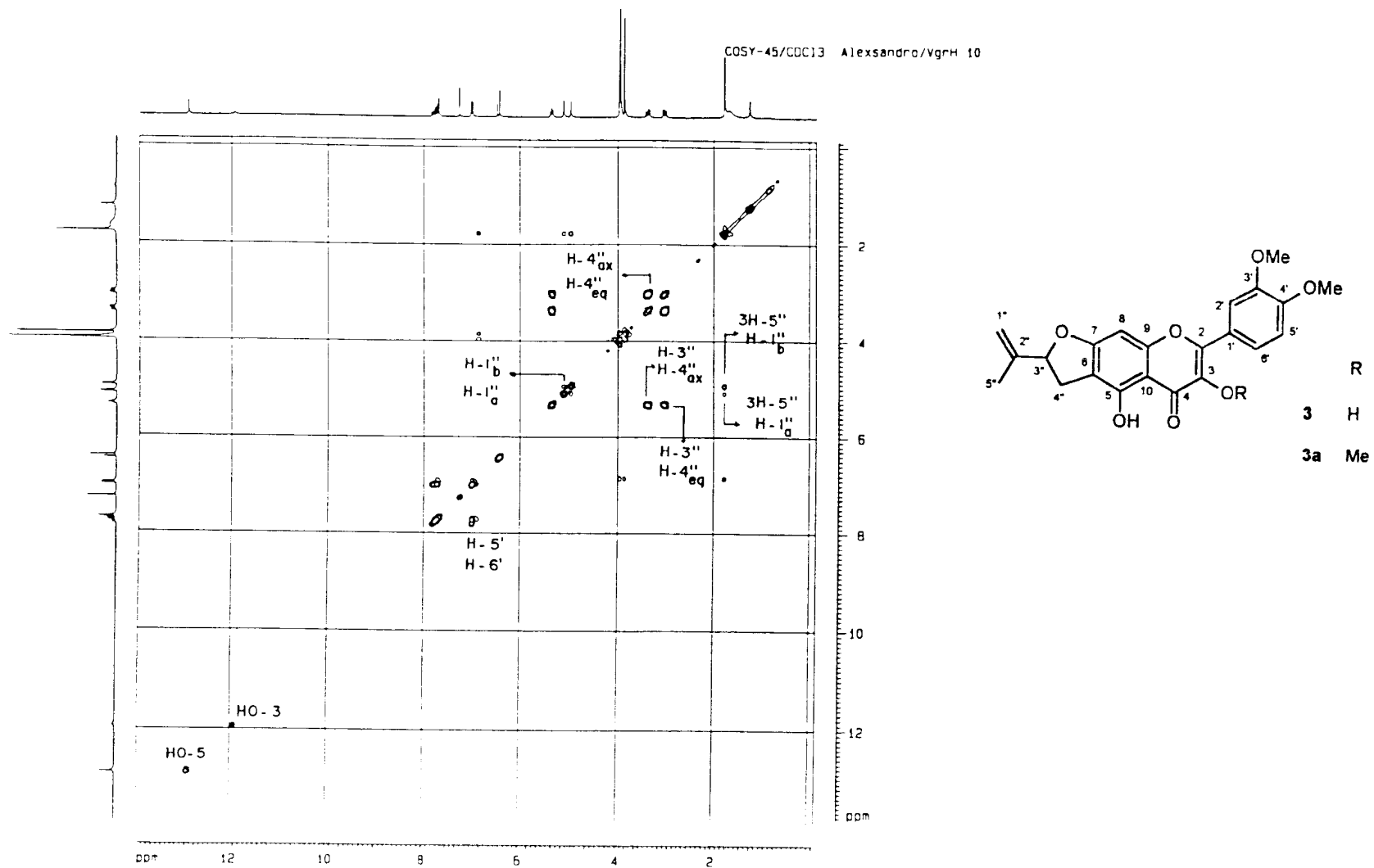


FIGURA 27. Espectro bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio [$^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY] de **3** e **3a**, em mistura (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

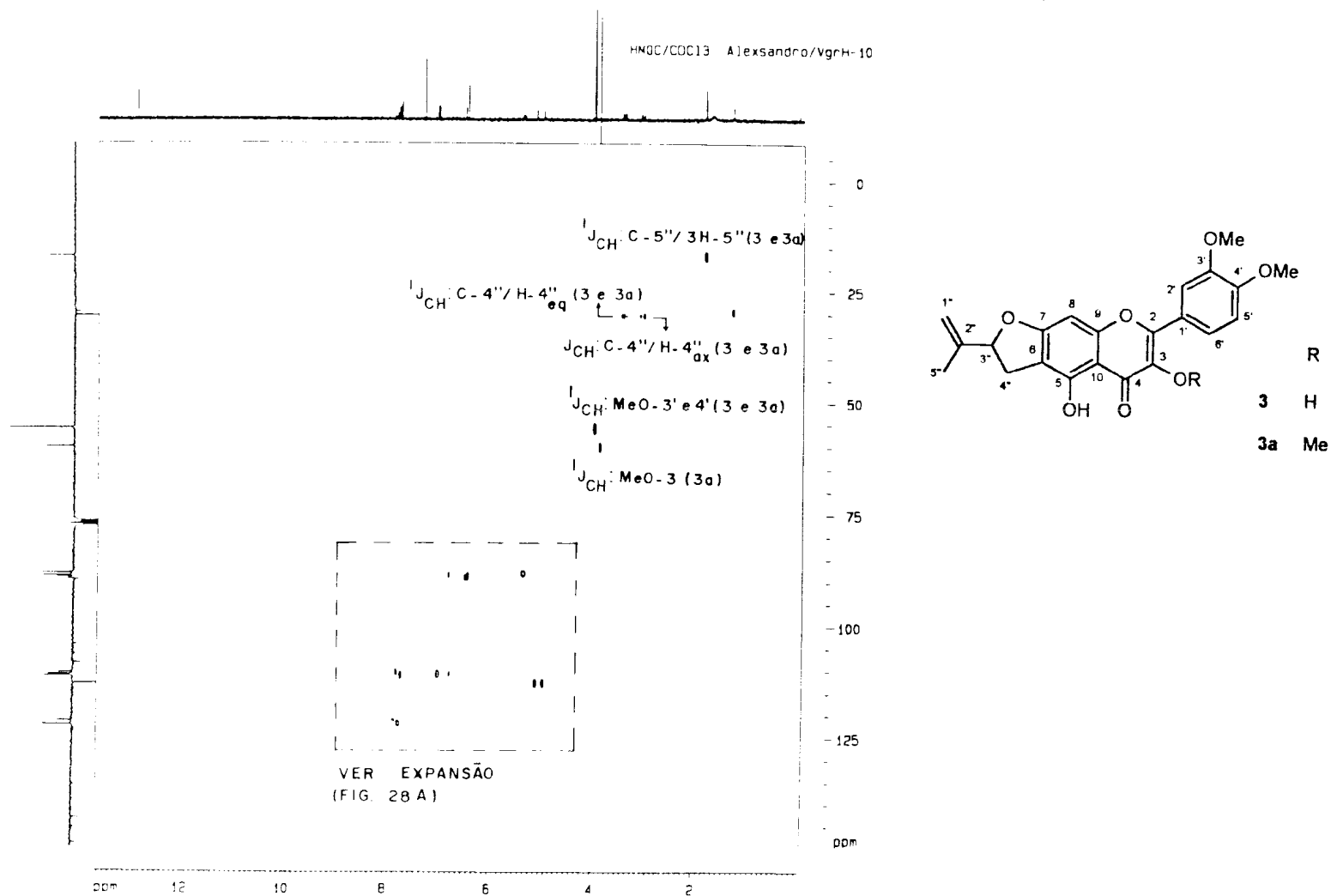


FIGURA 28. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 através de uma ligação [$^1Hx^{13}C-COSY-^1J_{CH} = ^1Hx^{13}C-HMQC$] de **3** e **3a**, em mistura (300 MHz, $CDCl_3$). TMS como referência interna

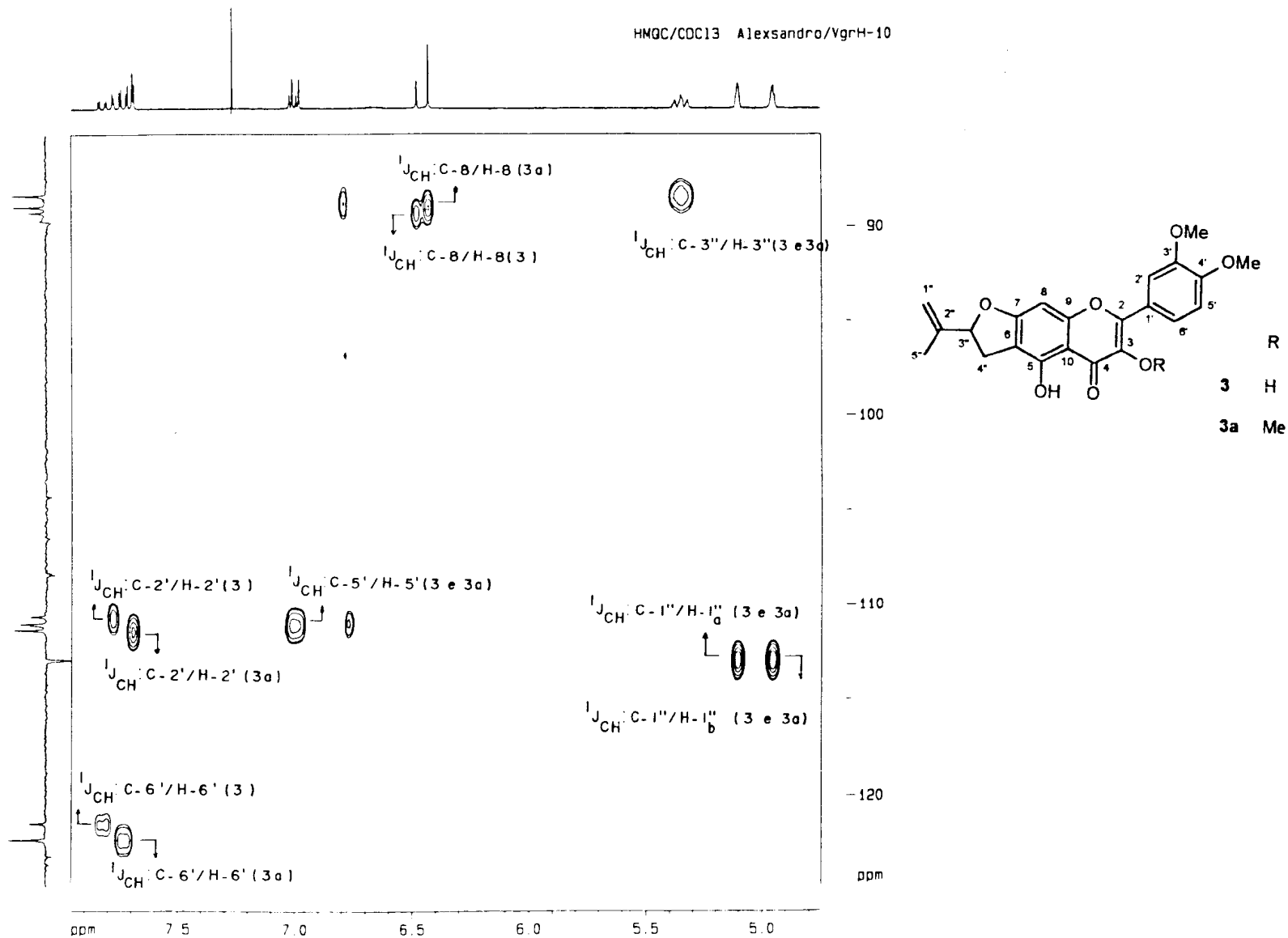


FIGURA 28A. Expansão da região entre 4.5-8.0 e 80-130 ppm no espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 através de uma ligação [$^1\text{H}\times^{13}\text{C}\text{-COSY-}^1\text{J}_{\text{CH}} = ^1\text{H}\times^{13}\text{C}\text{-HMQC}$] de 3 e 3a, em mistura (300 MHz, em CDCl_3). TMS como referência interna

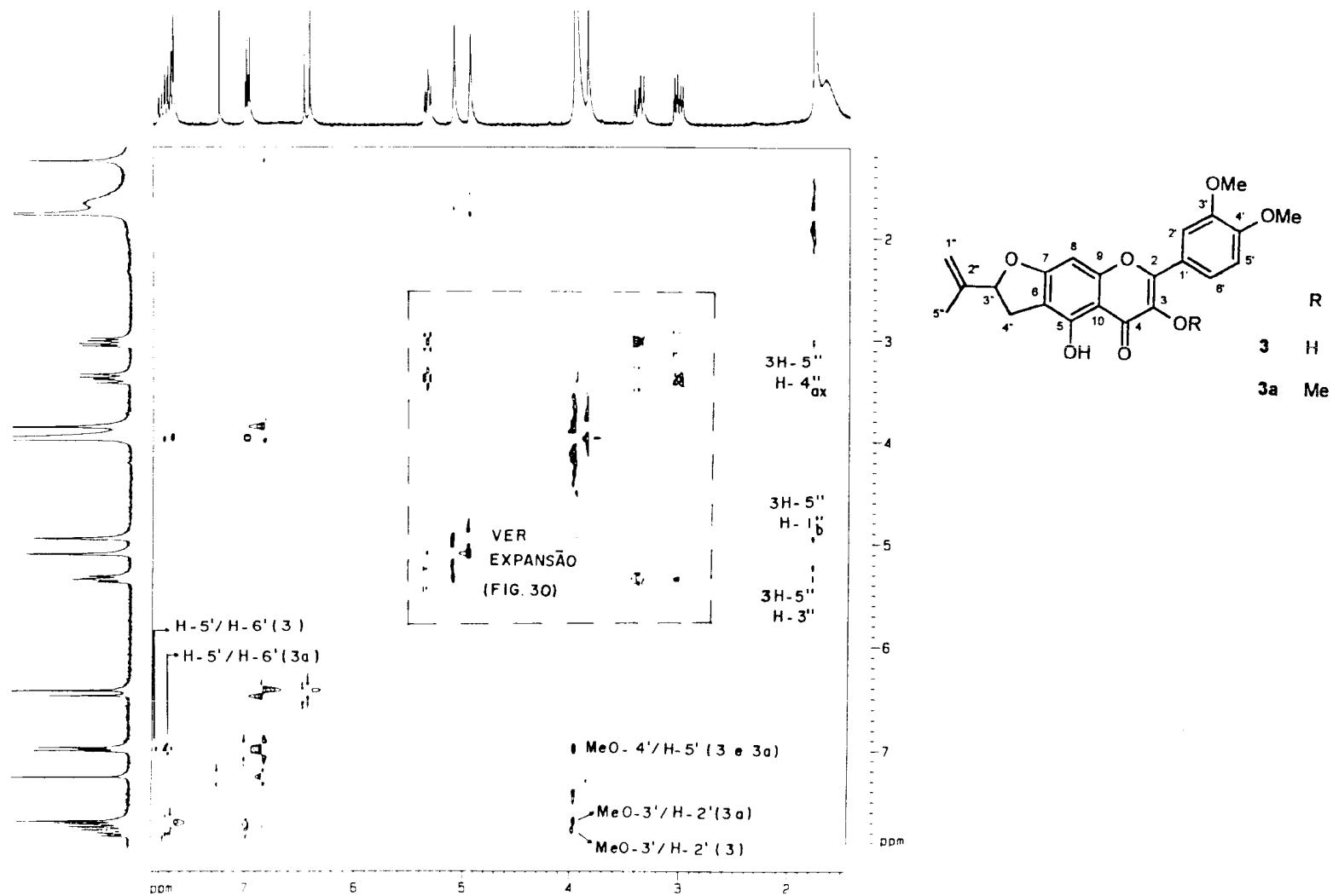


FIGURA 29. Espectro bidimensional de correlação homonuclear dipolar [¹Hx¹H-NOESY] de 3 e 3a, em mistura (300 MHz, CDCl₃). TMS como referência interna

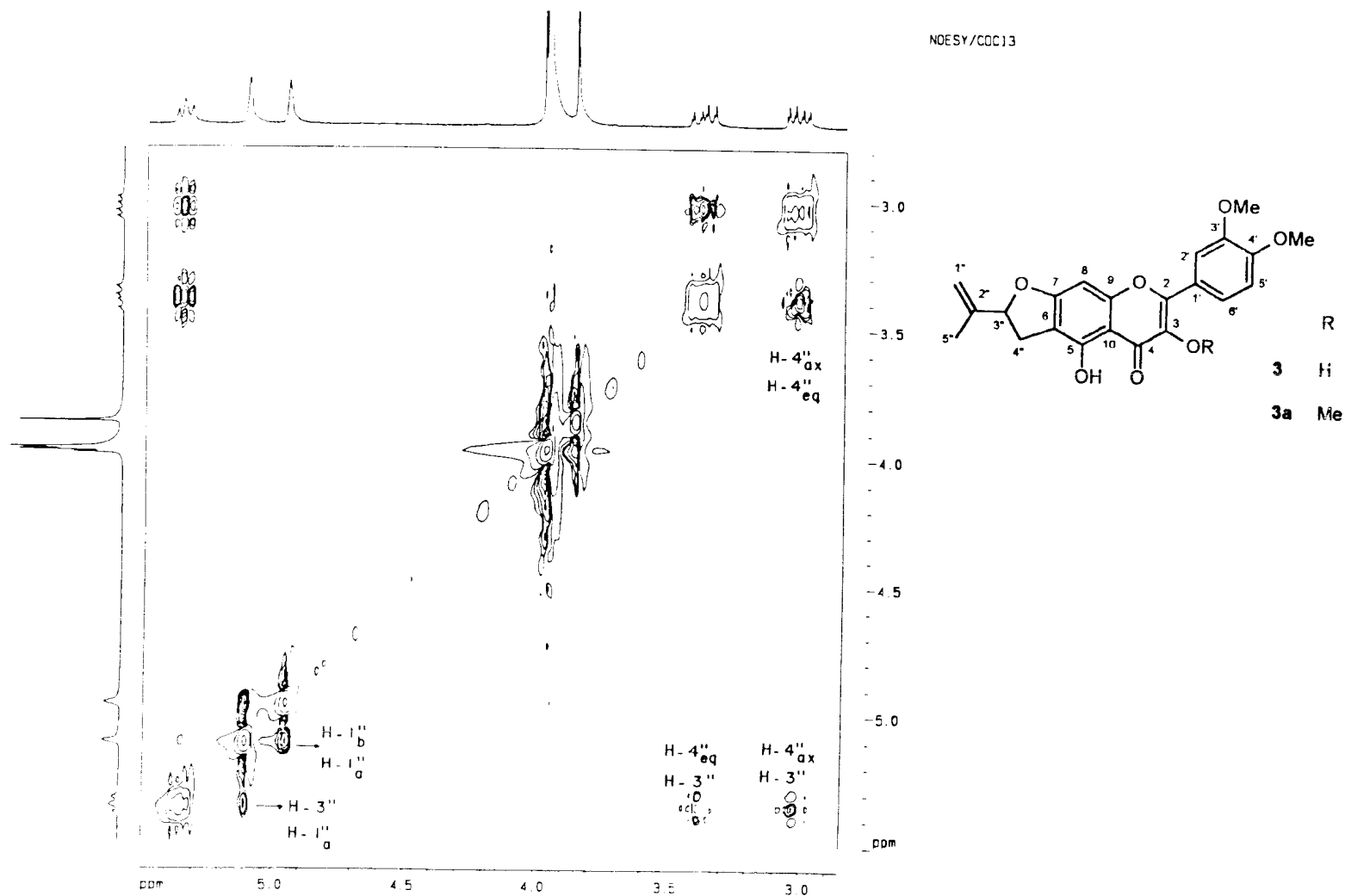


FIGURA 30. Expansão das regiões entre 2.8-5.5 e 3.0-5.5 no espectro bidimensional de correlação homonuclear dipolar [$^1\text{H}\times^1\text{H}$ -NOESY] de 3 e 3a, em mistura (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

NOESY/CDC13

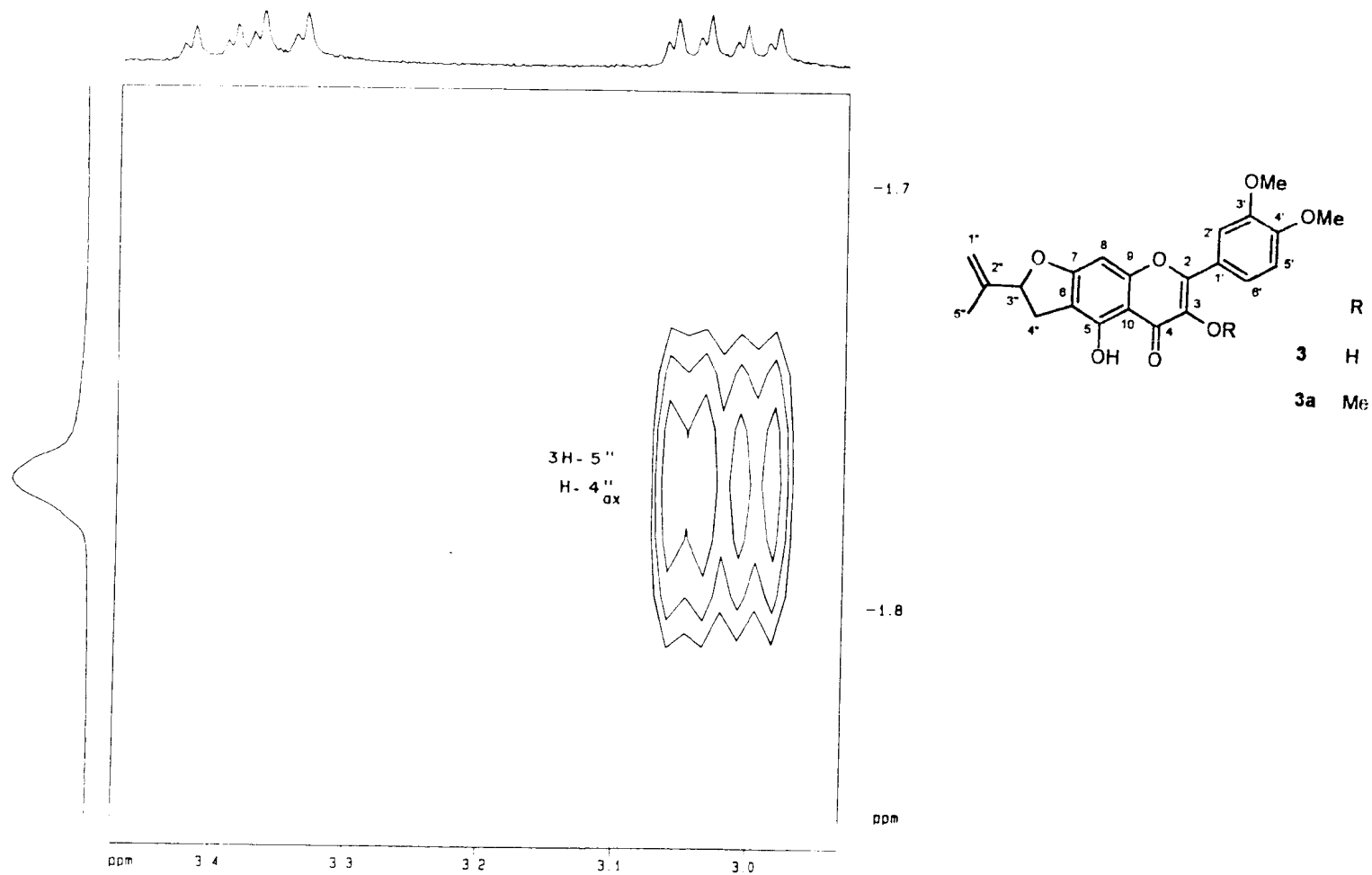


FIGURA 31. Expansão das regiões entre 1.7-1.9 e 2.9-3.5 no espectro bidimensional de correlação homonuclear dipolar [$^1\text{H}\times^1\text{H}$ -NOESY] de 3 e 3a, em mistura (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

TABELA V

Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) para os flavonóides **3** e **3a**, em mistura (CDCl_3), incluindo os resultados dos experimentos heteronucleares 2D HMQC ($^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ -COSY- $^1\text{J}_{\text{CH}}$) e HMBC ($^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3)*

		3		
		HMQC	HMBC	
C	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
2	145.39	-		H-2',H-6'
3	135.82	-		
4	175.31	-		
5	156.65	-	HO-5	
6	108.20	-	2H-4''	HO-5,H-8
7	166.80	-	H-8	2H-4''
9	157.35	-		
10	104.26	-		HO-5,H-8
1'	122.59	-		H-5'
3'	148.80	-	H-2'	H-5'
4'	151.45	-		H-2',H-6'
2''	143.33	-	3H-5''	2H-4''
CH				
8	89.30	6.48 (<i>s</i>)		
2'	110.62	7.78 (<i>d</i> , $J = 2.0$)		H-6'
5'	111.05	7.01(<i>d</i> , $J = 8.6$)		
6'	121.43	7.83 (<i>dd</i> , $J = 2.0$ e 8.6)		H-2'
3''	88.36	5.35 (<i>m</i>)	H-4'' ^b	3H-5'',2H-1''
CH₂				
1''	112.94	5.10 (<i>sl</i>) / 4.95 (<i>sl</i>)		3H-5''
4''	30.67	3.39 (<i>dd</i> , $J = 9.7$ e 15.8) 3.03 (<i>dd</i> , $J = 7.4$ e 5.8)		
CH₃				
5''	17.13	1.78 (<i>s</i>)		2H-1''
HO-3		11.94 (<i>s</i>)		

Continuação...

HO-5		12.89 (s)		MeO-3
MeO-3'	56.18	3.98 (s)		MeO-3'
MeO-4'	56.18	3.97 (s)		MeO-4'
3a				
2	155.73	-		H-2',H-6'
3	139.04	-		OMe-3
4	179.00	-		
5	156.65	-	HO-5	
6	108.39	-	2H-4''	HO-5,H-8
7	166.41	-	H-8	2H-4''
9	157.25	-	H-8	
10	106.44	-		HO-5,H-8
1'	123.14	-		H-5'
3'	148.91	-	H-2'	H-5'
4'	151.45	-		H-2',H-6'
2''	143.33	-	3H-5''	2H-4''
CH				
8	89.00	6.43 (s)		
2'	111.33	7.69 (d, J = 2.0)		H-6'
5'	110.00	7.00 (d, J = 8.6)		
6'	122.26	7.73 (dd, J = 2.0 e 8.6)		H-2'
3''	88.36	5.35 (m)	H-4''b	3H-5'',2H-1''
CH₂				
1''	112.92	5.10 (sl) / 4.95(sl)		3H-5''
4''	30.67	3.38 (dd, J = 9.6 e 15.7)		
		3.03 (dd, J = 7.9 e 15.7)		
CH₃				
5''	17.13	1.78 (s)		2H-1''
HO-5		12.89 (s)		
MeO-3	60.36	3.86 (s)		MeO-3
MeO-3'	56.18	3.96 (s)		MeO-3'
MeO-4'	56.18	3.97 (s)		MeO-4'

* Deslocamento químico (δ) e constante de acoplamento (J em Hz. entre parênteses) obtido do espectro RMN ^1H uni-dimensional. Multiplicidade dos sinais dos carbonos foram deduzidas pela análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C (PND e Pendant). RMN bi-dimensional ^1H - ^1H -COSY também foi usado para estes assinalamentos.

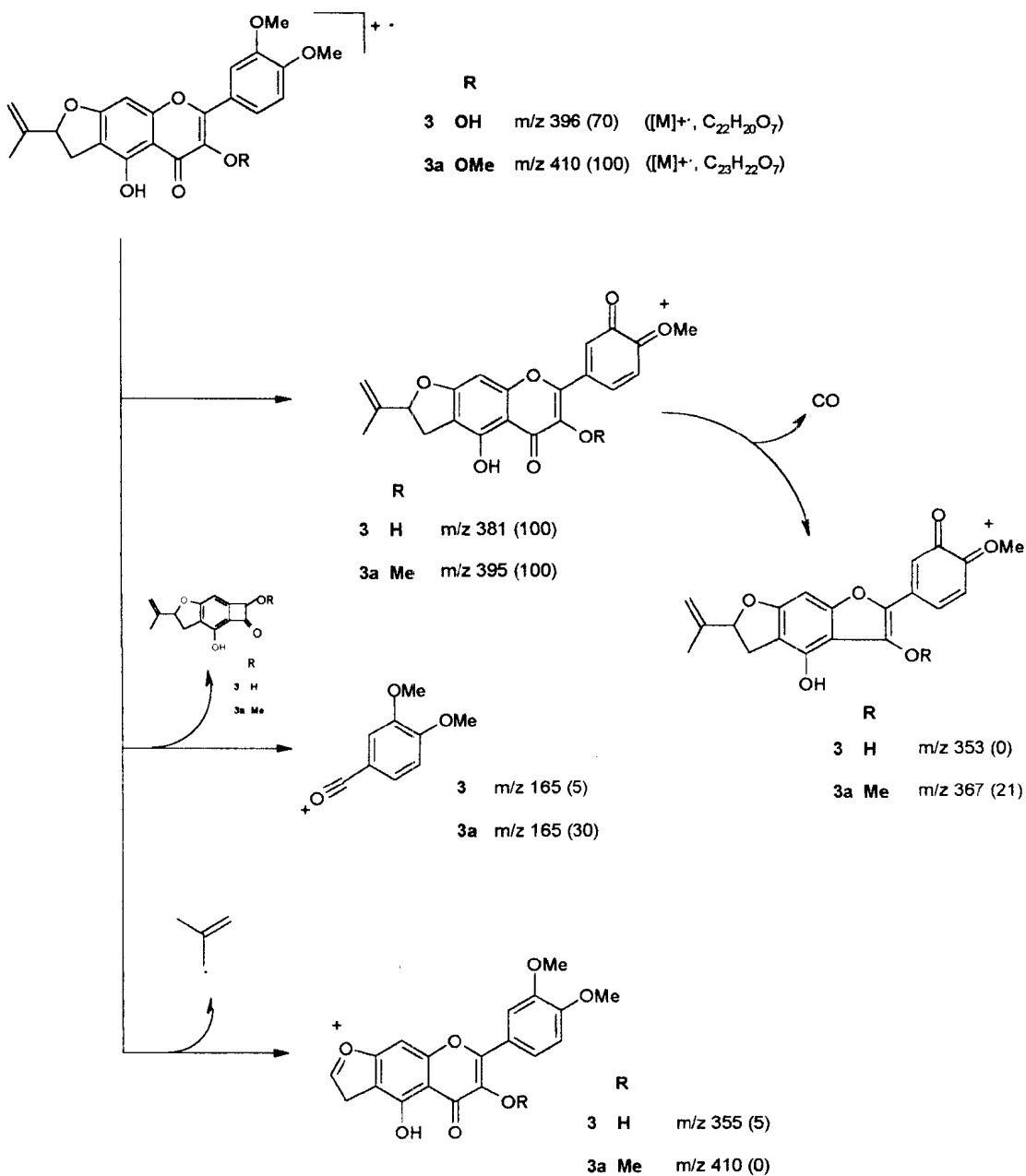
TABELA VI

Dados de $^1\text{Hx}^1\text{H-COSY}$ [acoplamento escalar] e $^1\text{Hx}^1\text{H-NOESY}$ [acoplamento dipolar] para os flavonóides 3 e 3a (300 MHz, CDCl_3, δ).

		3				3a	
H	δ_{H}	H	δ_{H}	H	δ_{H}	H	δ_{H}
$^1\text{Hx}^1\text{H-COSY}$							
6'	7.82	5'	7.01	6'	7.73	5'	7.00
3''	5.34	4''a	3.39	3''	5.34	4''a	3.38
		4''b	3.03			4''b	3.02
1''a	5.10	1''b	4.92	1''	5.10	1''b	4.92
		5''	1.78			5''	1.78
1''b	4.92	5''	1.78	1''b	4.92	5''	1.78
4''a	3.39	4''b	3.03	4''a	3.38	4''b	3.02
$^1\text{Hx}^1\text{H-NOESY}$							
2'	7.78	MeO-3'	3.96	2'	7.69	MeO-3'	3.96
5'	7.01	MeO-4'	3.98	5''	7.00	MeO-4'	3.97
		6'	7.82			6'	7.73
3''	5.34	1''a	5.10	3''	5.34	1''a	5.10
		4''eq	3.39			4''eq	3.38
		4''ax	3.03			4''ax	3.02
		5''	1.79			5''	1.78
1''b	4.92	1''a	5.10	1''b	4.92	1''a	5.10
		5''	1.78			5''	1.78
4''ax	3.03	4''eq	3.39	4''ax	3.02	4''eq	3.39
		5''	1.78			5''	1.78

ESQUEMA 10

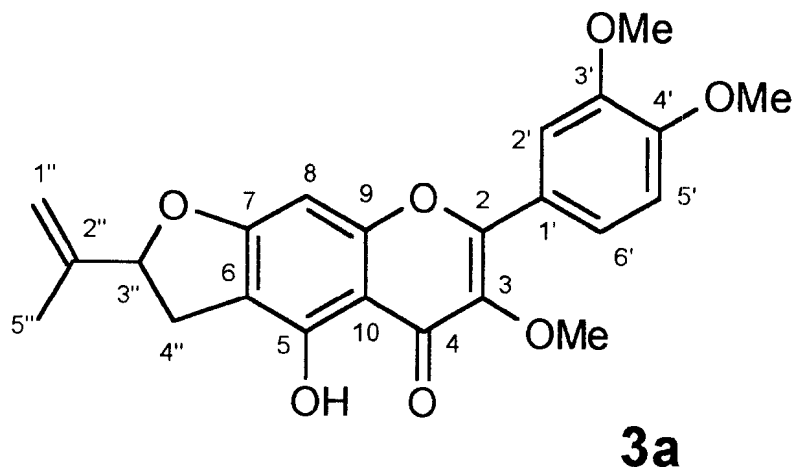
Prováveis caminhos de fragmentação para justificar os principais picos registrados nos espectros de massas de 3 e 3a



4.1.3.1 5-hidroxi-3,3',4'-trimetoxi-6,7:2,1-[2-(1-metiletenil)furo]

flavona (3a)

O flavonóide 3a foi preparado a partir da mistura (3 + 3a), por metilação seletiva da hidroxila em C-3 de 3, utilizando solução etérea de diazometano. O composto 3a apresentou ponto de fusão entre 134-135° C e absorções na região do IV [Fig. 33] (pag. 82) para carbonila conjugada (ν 1667 cm^{-1}) e anel aromático (ν 1608 e 1508 cm^{-1}). Este resultado contribuiu para a confirmação das estruturas dos produtos de partida (3 + 3a), descritos no item 4.1.3 (pag. 49).



O espectro de RMN ^{13}C -Pendant⁷⁰ [Fig. 34] (pag. 83) apresentou 22 carbonos com suas respectivas multiplicidade [Tabela VIII (pag. 90)]. O espectro de RMN ^1H

[Fig. 35] (pag. 85) de 3a apresentou sinais para três metoxilas [δ_{H} : 3.85 (3H, *s*) e 3.94 (6H, *s*)], uma hidroxila quelatogênica [δ_{H} : 12.90 (^1H , *s*)] e quatro prótons aromáticos [δ_{H} : 7.70 (*dd*, $J = 8.53$ e 2.12 Hz), 7.68 (*d*, $J = 2.06$), 6.97 (*d*, $J = 8.5$ Hz) e 6.43 (*s*)]. Estes dados juntamente com o espectro de RMN ^1H [2D $^1\text{Hx}^1\text{H}$ -COSY] [Fig. 36] (pag. 88) confirmam a fórmula molecular ($\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_7$) com sua respectiva expansão $[\text{C}]_{11} [\text{C}=\text{O}] [\text{H}-\text{C}-\text{O}]_2 [\text{CH}]_4 [\text{CH}_2]_2 [\text{CH}_3] [\text{OCH}_3]_3 [\text{OH}]$ para a flavona 3a.

O espectro heteronuclear 2D $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$ [$n=1$, HMQC] [Fig. 37] (pag. 89) também foi analisado para o correto assinalamento dos deslocamentos químicos de cada um dos hidrogênios [Tabela VII] (pag. 90).

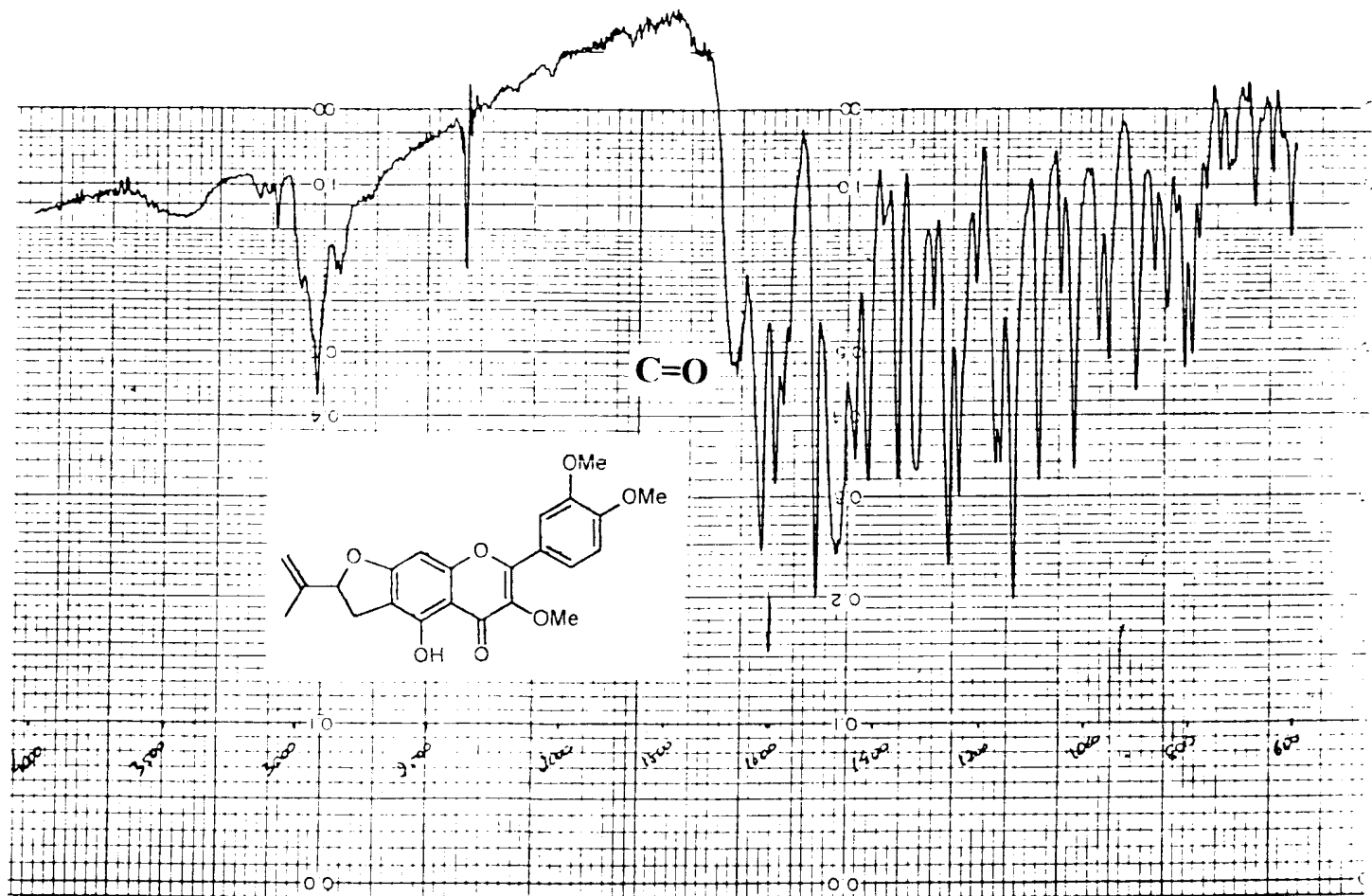


FIGURA 33. Espectro na região do IV de 3a. Pastilha de KBr

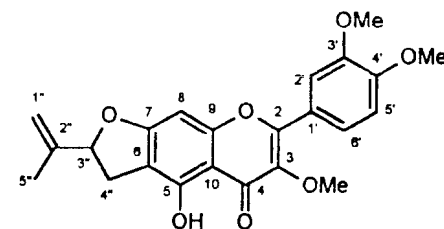
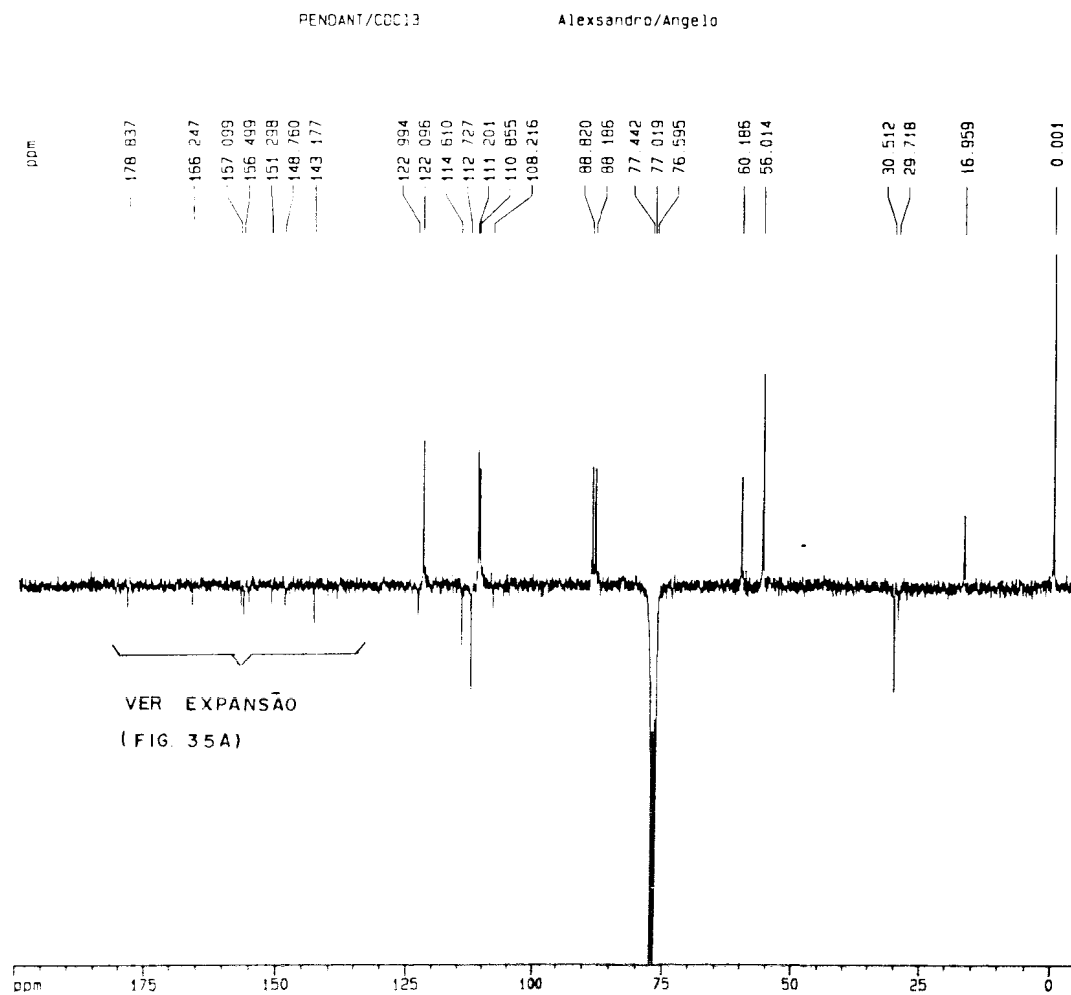


FIGURA 34. Espectro de RMN ^{13}C -Pendant de 3a (75 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

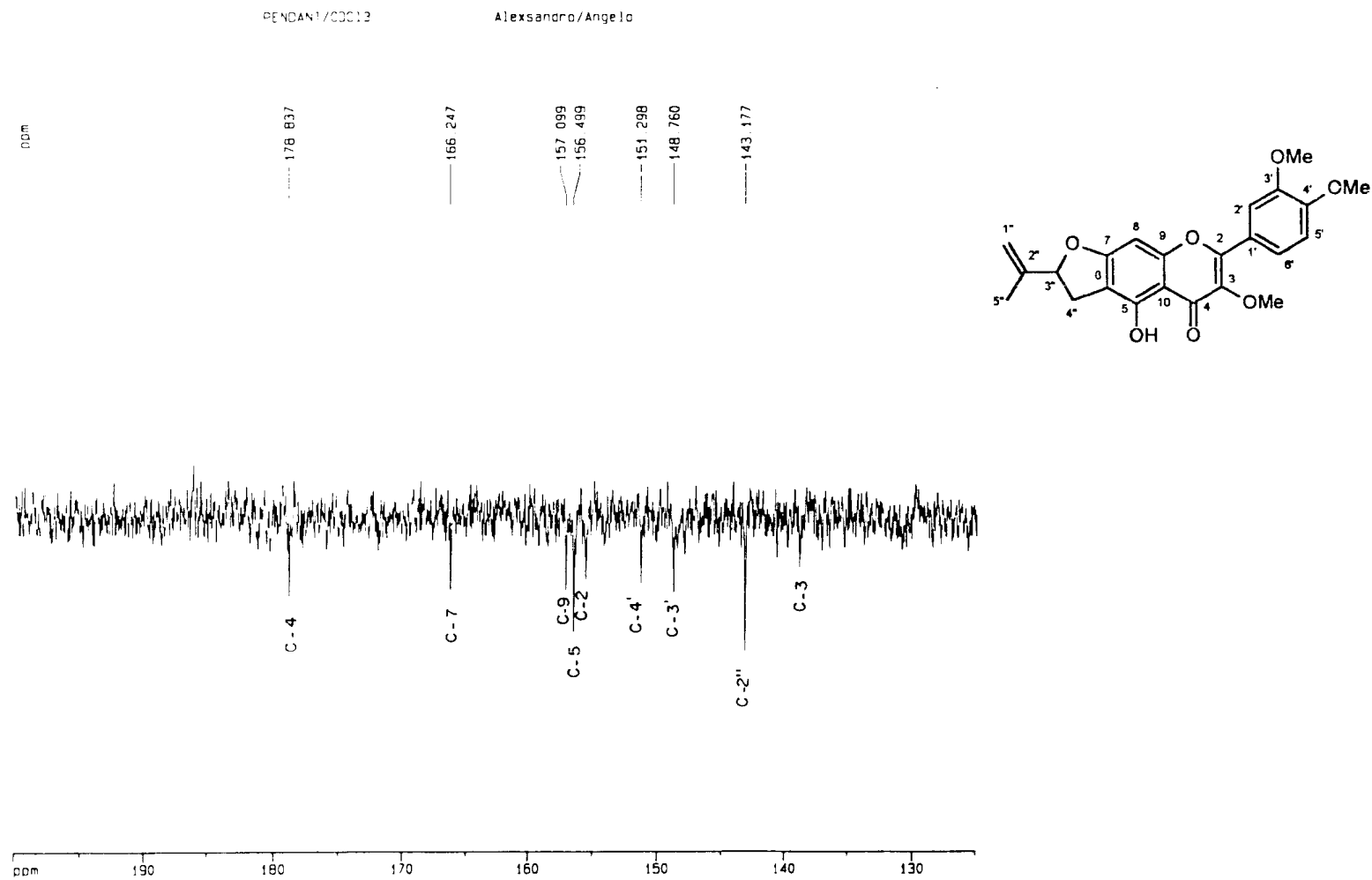


FIGURA 34A. Expansão da região entre 130-190 ppm do espectro de RMN ¹³C-Pendant de 3a (70 MHz, CDCl₃). TMS como referência interna

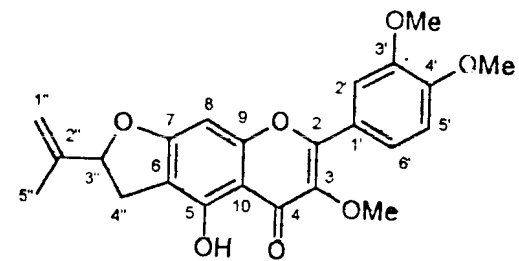
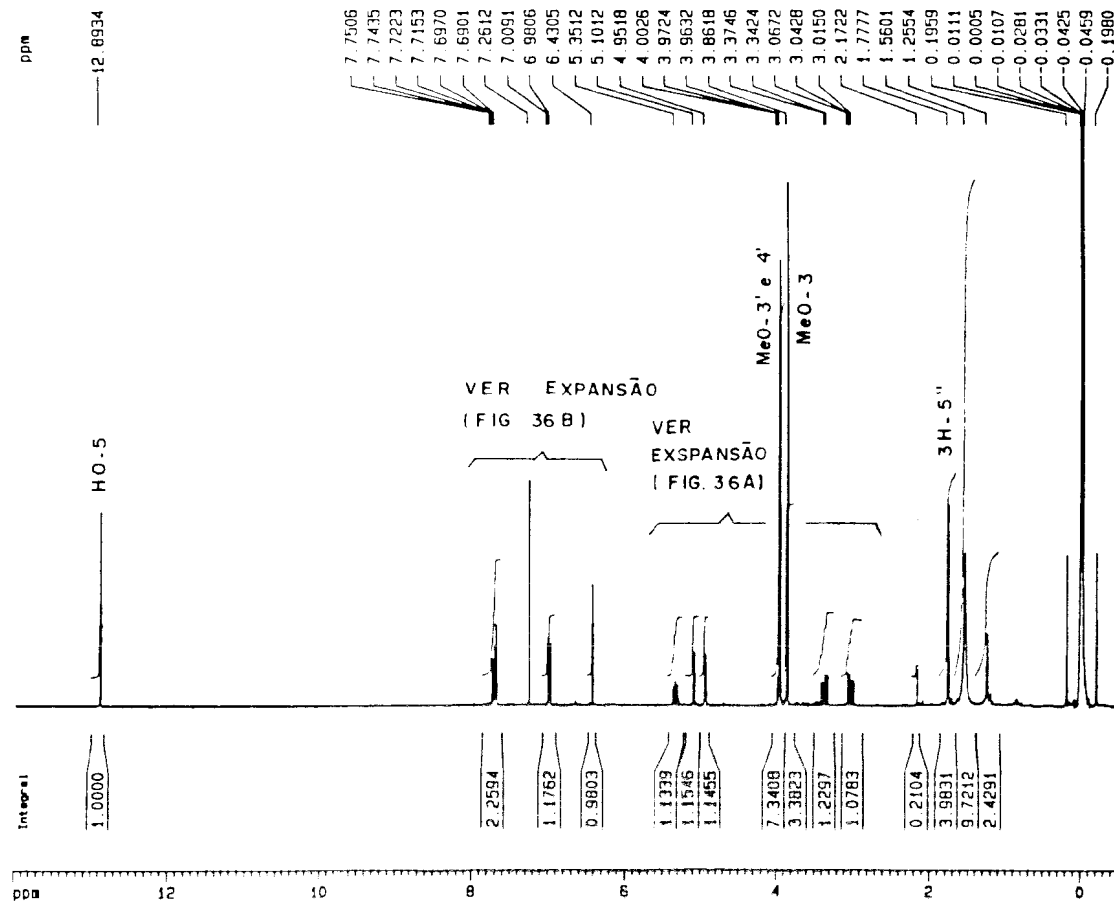


FIGURA 35. Espectro de RMN ^1H de 3a (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

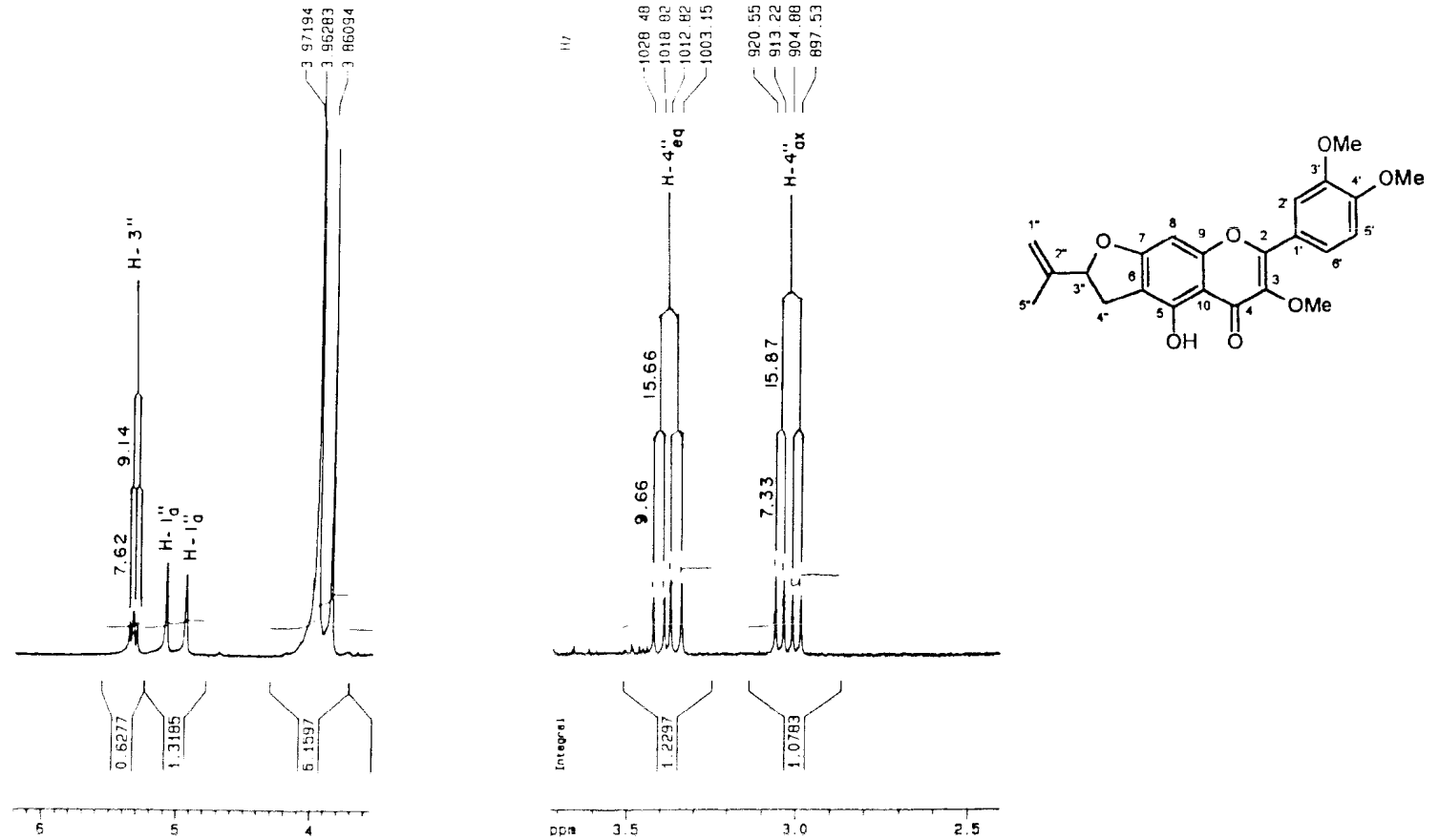


FIGURA 35A. Expansão da região entre 2.5-6.0 ppm do espectro de RMN ¹H de 3a (300 MHz, CDCl₃). TMS como referência interna

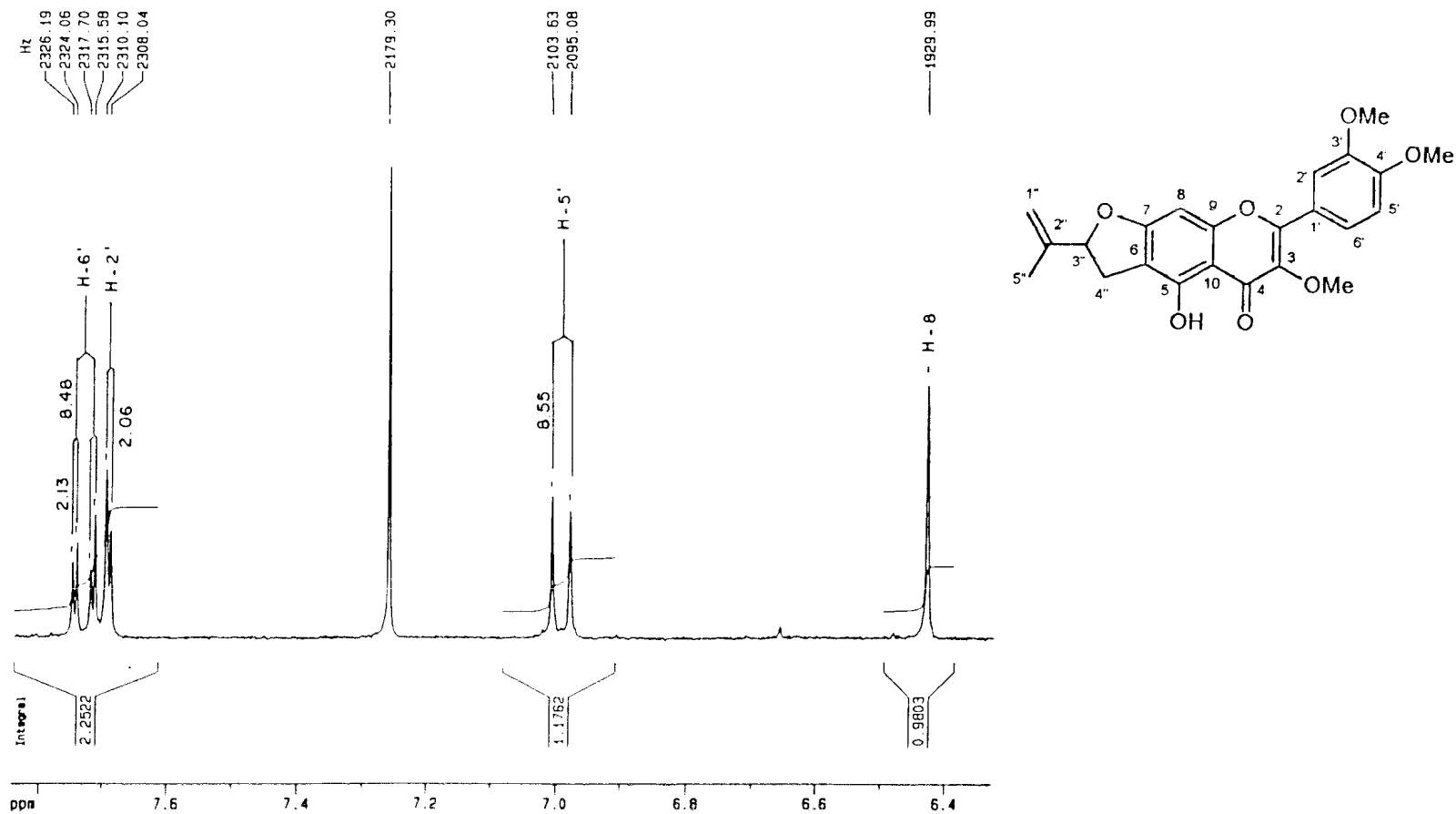


FIGURA 35B. Expansão da região entre 6.4-7.8 ppm do espectro de RMN ^1H de **3a** (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

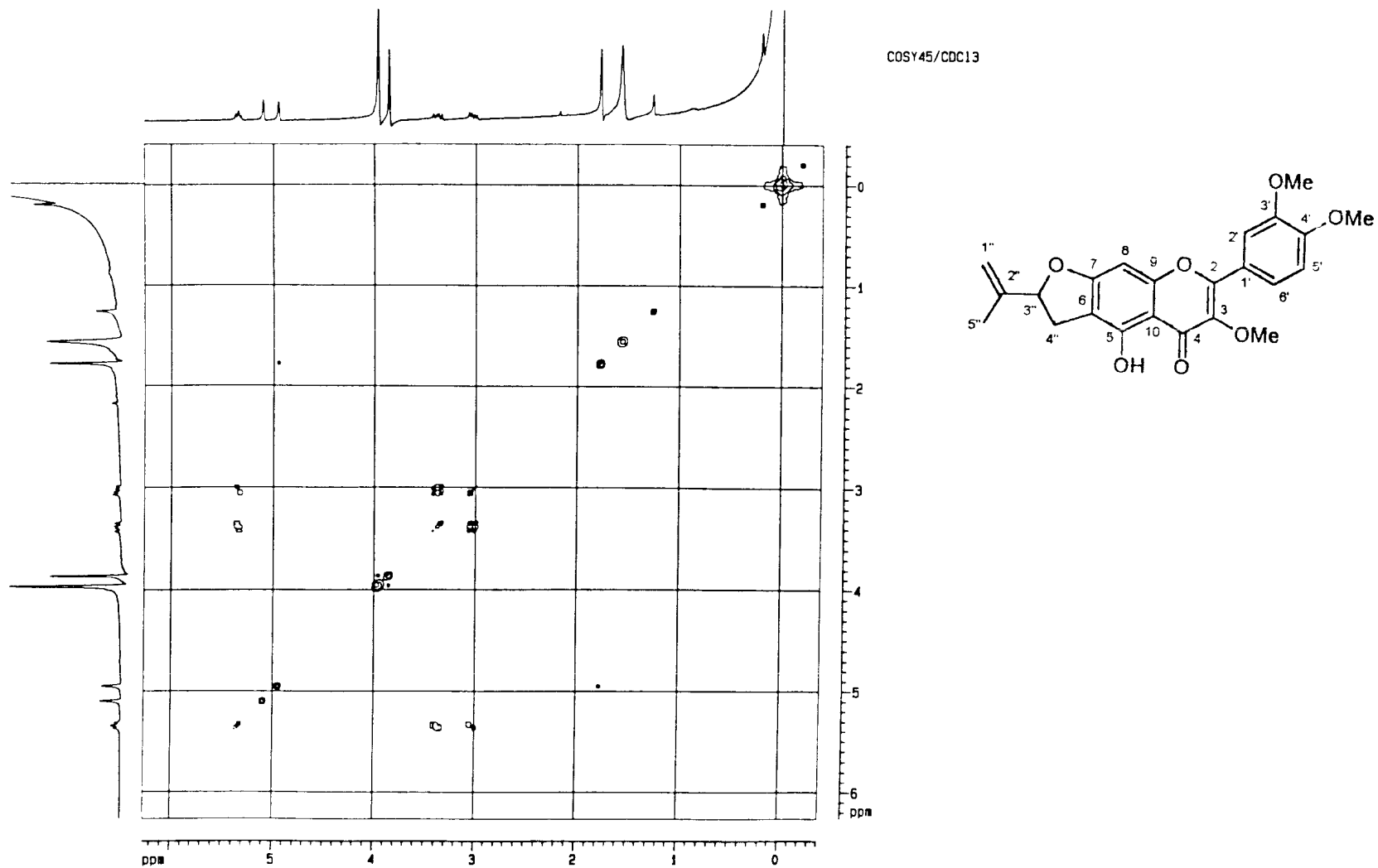


FIGURA 36. Espectro bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio [$^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY] de 3a (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

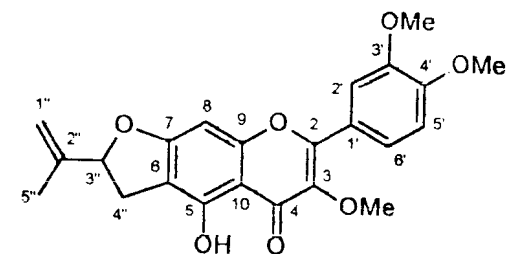
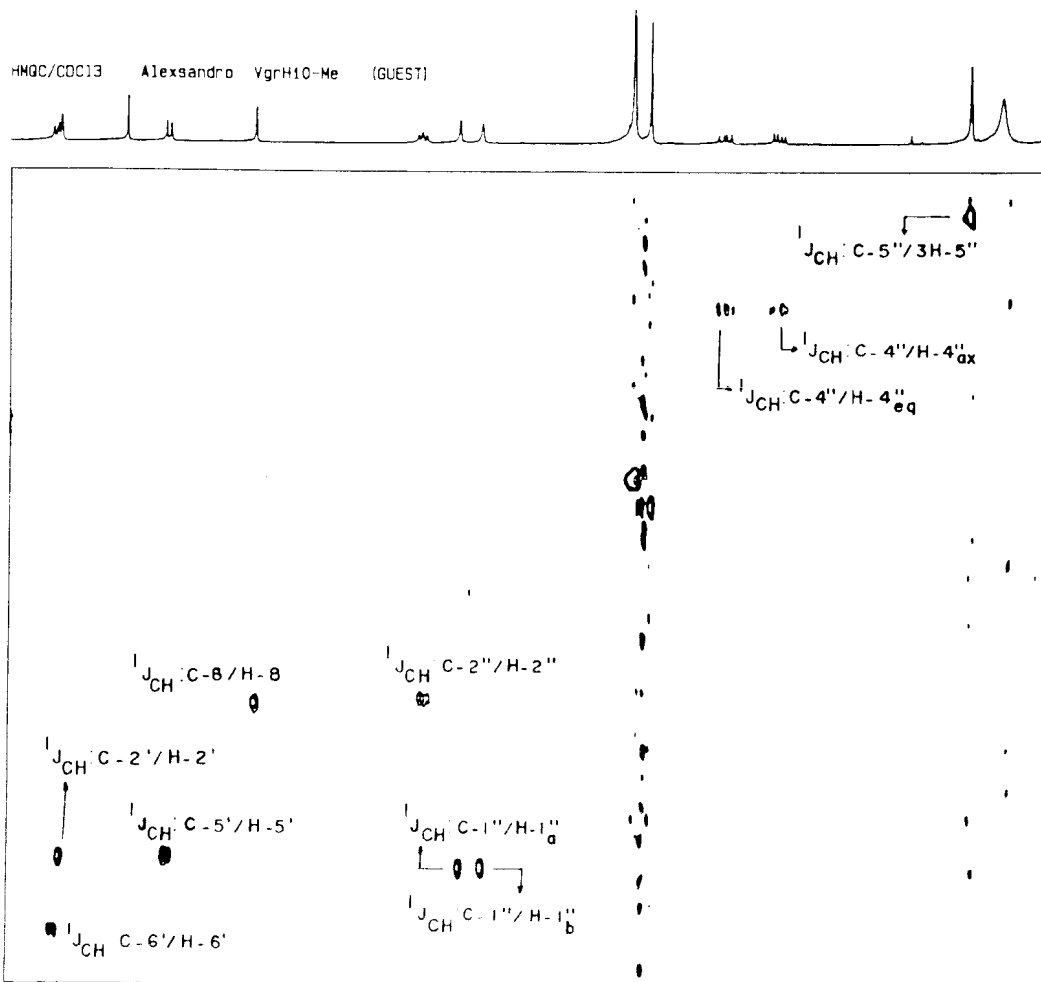


FIGURA 37. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 através de uma ligação [$^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -COSY- $^1\text{J}_{\text{CH}} = ^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -HMQC) de 3a (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

TABELA VII

Atribuição dos deslocamentos químicos (δ_H e δ_C) de RMN 1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) para o flavonóide 3a ($CDCl_3$), incluindo dados de 1H - 1H -COSY (acoplamento escalar) e do experimento heteronuclear 2D HMQC (1H - ^{13}C -COSY- $^1J_{CH}$)*

C	HMQC		1H - 1H -COSY
	δ_C	δ_H	
2	155.50	-	
3	138.92	-	
4	178.84	-	
5	156.50	-	
6	106.21	-	
7	166.25	-	
9	157.10	-	
10	108.21	-	
1'	122.99	-	
3'	148.76	-	
4'	151.30	-	
2''	143.18	-	
CH			
8	88.82	6.43 (<i>s</i>)	
2'	111.20	7.68 (<i>d</i> , 2.06)	H-6'
5'	110.85	6.97 (<i>d</i> , 8.5)	H-6'
6'	122.07	7.70 (<i>dd</i> , 8.5 e 2.12)	H-2',H-5'
3''	88.19	5.32 (<i>dd</i> , 9.8 e 7.6)	H-4''a,H-4''e
CH₂			
1''	112.73	5.08 (<i>sl</i>)	H-1''b
		4.93 (<i>sl</i>)	H-1''a,3H-5''
4''	30.51	3.32 (<i>dd</i> , 15.8 e 9.8)	H-4''a,H-3''
		3.01 (<i>dd</i> , 9.8 e 7.6)	H-4''e,H-3''
CH₃			
5''	16.96	1.76 (<i>s</i>)	H-4''b
OMe-3	60.19	3.85 (<i>s</i>)	
OMe-3'	56.01	3.94 (<i>s</i>)	
OMe-4'	56.01	3.94 (<i>s</i>)	

* Deslocamento químico (δ) e constante de acoplamento (J em Hz, entre parênteses) foram obtidos do espectro RMN 1H uni-dimensional. Multiplicidade dos sinais dos carbonos foram deduzidas pela análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C (PND e Pendant).

4.1.4 3,5,3',4'-tetrametoxi-6,7:2,1-[2-(1-metiletenil)furo] flavona (4)
 4'-hidroxi-3,5,3'-trimetoxi-6,7:2,1-[2-(1-metiletenil)furo]
 flavona (4a) em mistura

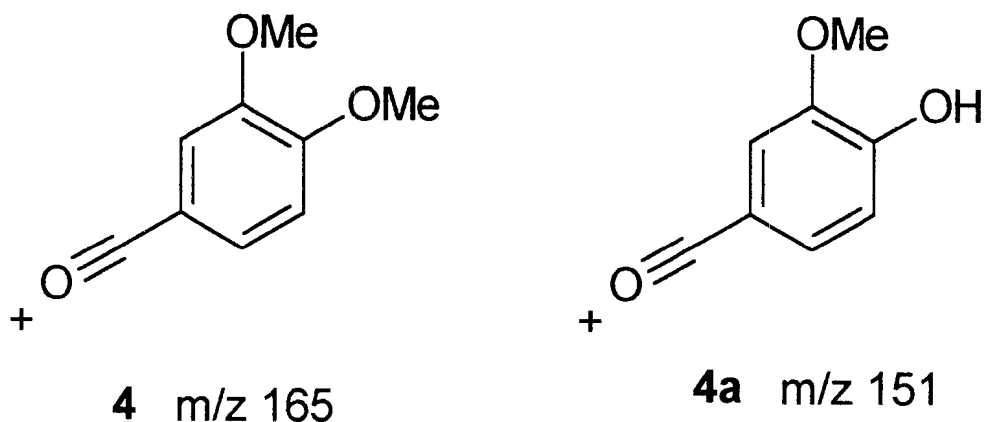
O espectro na região do IV [Fig. 38] (pág. 94) da mistura (4 + 4a) apresentou bandas de absorção para grupo hidroxila (ν 3300 cm^{-1}) e para carbonila (ν 1630 cm^{-1}). A análise do cromatograma, obtido por CGAR-AT [Fig. 39] (pág. 95), mostrou a presença de dois compostos em concentração majoritária (Picos c e d).

No espectro de RMN ^{13}C PND [Fig. 40] (pág. 96) e DEPT $\{\theta = 90$ [Fig. 41] (pág. 98) e 135° [Fig. 42] (pág. 100)} podemos deduzir o deslocamento químico e a multiplicidade para cada carbono de 4 e 4a [Tabela VIII] (pág. 106). Esta análise em comparação com os espectros de massas de baixa resolução $\{m/z$ 424 $[\text{M}]^+$, $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{O}_7$ (4) e m/z 410 $[\text{M}]^+$, $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_7$ (4a)}, obtidos por CGAR-AT-EM [Fig. 43] (pág. 101), e o espectro de RMN ^1H [Fig. 44] (pág. 105) levaram a expansão das respectivas fórmulas moleculares para: $[\text{C}]_{11} [\text{C}=\text{O}] [\text{H}-\text{C}-\text{O}] [\text{CH}]_4 [\text{CH}_2]_2 [\text{CH}_3] [\text{OCH}_3]_4$ (4) e $[\text{C}]_{11} [\text{C}=\text{O}] [\text{H}-\text{C}-\text{O}] [\text{CH}]_4 [\text{CH}_2]_2 [\text{CH}_3] [\text{OCH}_3]_3 [\text{OH}]$ (4a). Não foi notada a presença de hidroxilas quelatogênicas em C-3 e/ou C-5 no espectro de RMN ^1H [Fig. 44] (pág. 105).

As fórmulas moleculares $C_{24}H_{24}O_7$ (4) e $C_{23}H_{22}O_7$ (4a) são compatíveis com o esqueleto flavônico ($C_{15}H_{10}O_2$ grau de insaturação onze) sustentando um grupamento isoprenóide envolvido em um anel furânico. Este grupamento foi evidenciado pelos deslocamentos químicos de 2H-1" [4/4a: δ_H 5.08 (s) e 4.93 (s)/5.08 (s) e 4.93 (s)], H-3" [4/4a: δ_H 5.28 (m)/5.23 (m)], 2H-4" (4/4a: δ_H 3.47 (dd, J= 9.5 e 15.6 Hz) e 3.13 (dd, J= 7.3 e 15.6 Hz)/3.47 (dd, J= 9.5 e 15.6 Hz) e 3.13 (dd, J= 7.3 e 15.6 Hz)] e 3H-5" (4/4a: δ_H 1.75 (s)/1.75 (s)] e pelos átomos de carbonos C-1" até C-5" [4/4a: δ_C 112.27/112.27 (CH₂-1"), 142.32/142.32 (C-2"), 87.07/87.07 (CH-3"), 33.39/33.39 (CH₂-4") e 16.42/16.42 (CH₃-5")]. A presença do anel aromático 1,3,4-trissubstituído [Anel B 3',4'-dimetoxilado (4) e 3'-metoxi,4'-hidroxilado (4a)] pertencente aos flavonóides 4 e 4a foi deduzido pela análise dos deslocamentos químicos de H-2' (δ_H 7.68 (m)/7.68 (m)), H-5' [4/4a: δ_H 7.68 (m)/7.68 (m)] e H-6' [4/4a: δ_H 7.68 (m)/7.68 (m)], o qual foi confirmado pelos sinais dos C-1" até C-6 observados no espectro de RMN ¹³C [4/4a: δ_C 122.62/122.31 (C-1'), 110.90/110.72 (CH-2'), 147.99/147.99 (C-3'), 150.49/148.72 (C-4'), 110.12/114.43 (CH-5') e 121.25/120.85 (CH-6')] [Tabela VIII] (pág. 106). Estes assinalamentos foram acompanhados por comparações com o flavonóide monoisoprenilado 3a [Tabela IX] (pag. 104), identificado no item 4.1.3.1 (pág. 80).

Os picos de m/z 165 e 151 observados nos espectros de massas de 4 e 4a [Fig. 43] (pág. 99), respectivamente, foram atribuídos aos fragmentos iônicos

descrito abaixo, confirmando o padrão de substituição do anel B de 4 e 4a. As demais fragmentações de 4 e 4a estão contidas nos Esquemas 11 (pág. 110) e 12 (pág. 111), respectivamente.



A diferença de 14 daltons observada no espectro de massas entre 4 e 4a, o qual foi confirmada por CGAR-AT-EM, foi atribuída a presença do carbono fenólico em C-4' (δ_C 150.49) de 4a e pela presença da metoxila em C-4' [δ_H 3.96 (s) e δ_C 55.70 (MeO-4')] de 4.

Assim, os flavonóides monoisoprenilados 4 e 4a isolados, em mistura, de *Vellozia graminifolia* foram caracterizados como 3,5,3',4'-tetrametoxi-6,7:2,1-[2-(1-metiletetil)fuoro] flavona (4) 4'-hidroxi-3,5,3'-trimetoxi-6,7:2,1-[2-(1-metil etenil) fuoro] flavona (4a), isolados anteriormente de outras espécies de *Vellozia*²².

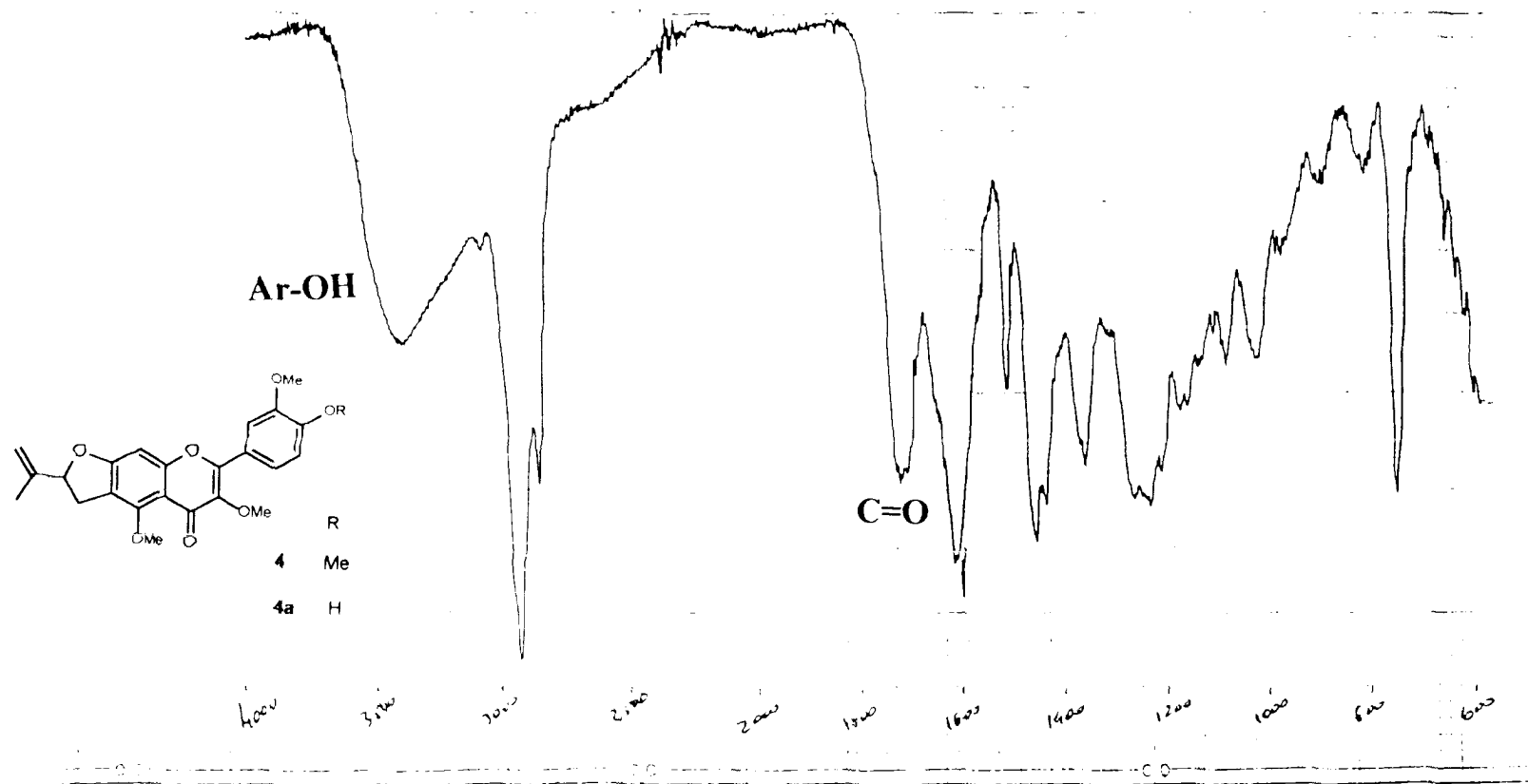


FIGURA 38. Espectro na região do IV de 4 e 4a, em mistura. Pastilha de KBr

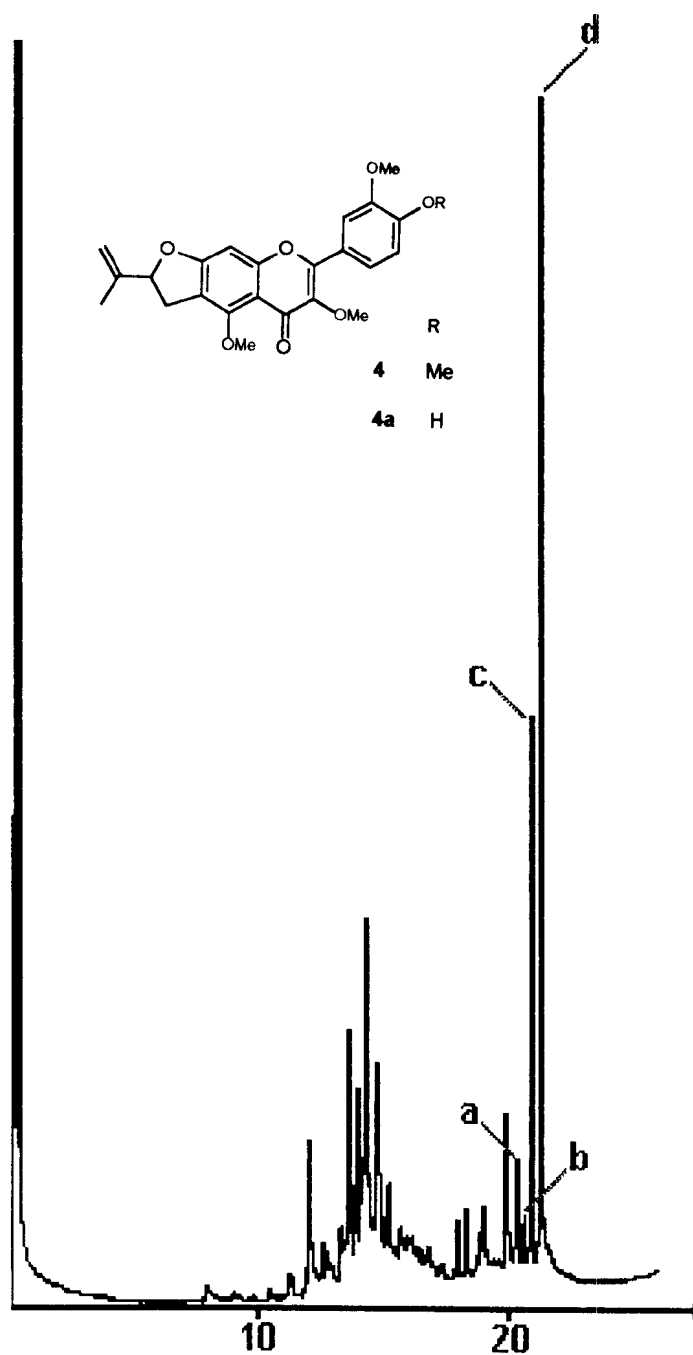


FIGURA 39. Cromatograma de 4 (pico c) e 4a (pico d), em mistura.

Análise obtida por CGAR-AT

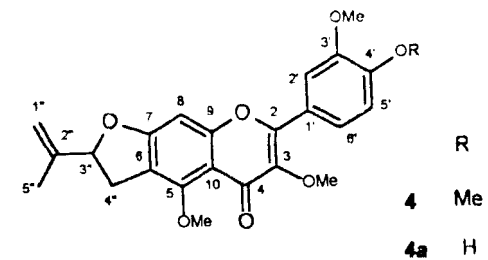
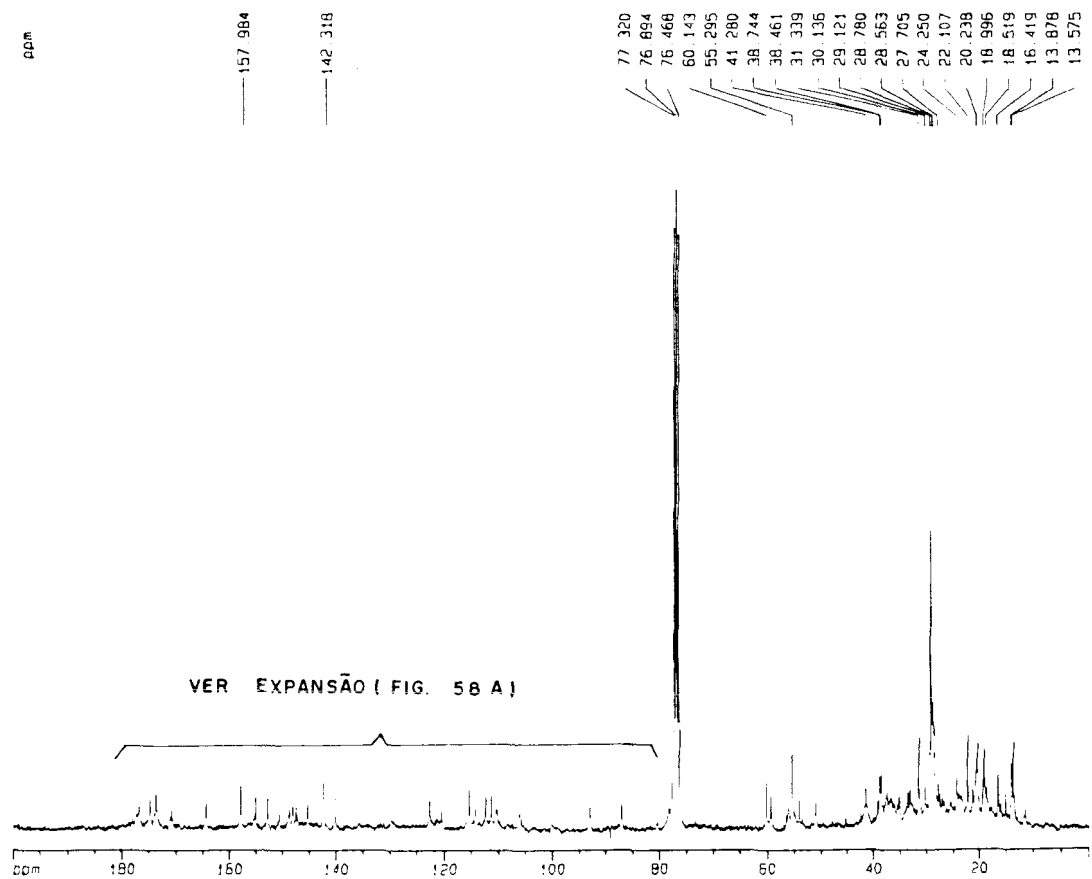


FIGURA 40. Espectro de RMN ^{13}C [PND] de 4 e 4a, em mistura (75 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

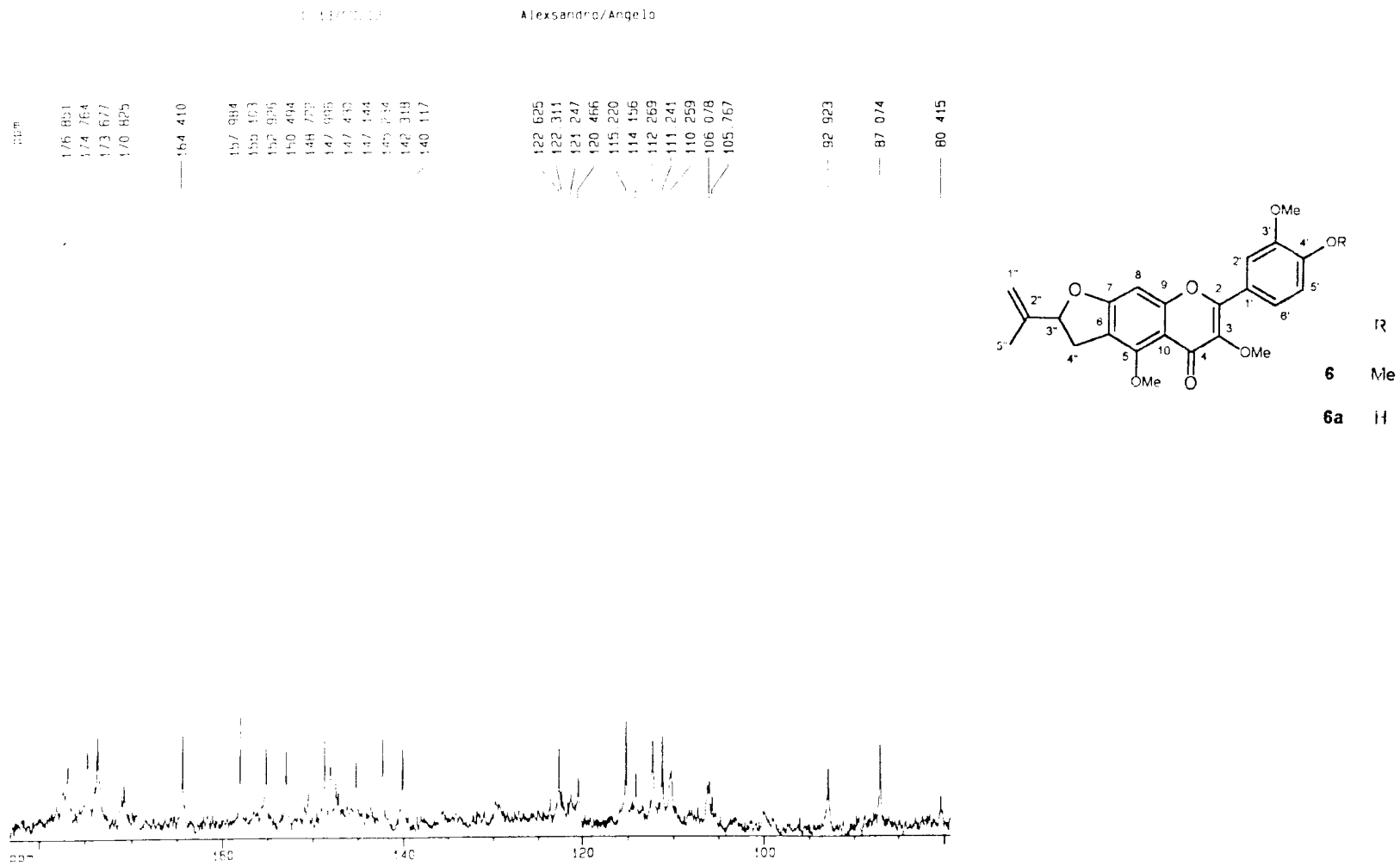


FIGURA 40A. Expansão da região entre 80-200 ppm do espectro de RMN ^{13}C [PND] de **4** e **4a**, em mistura (75 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

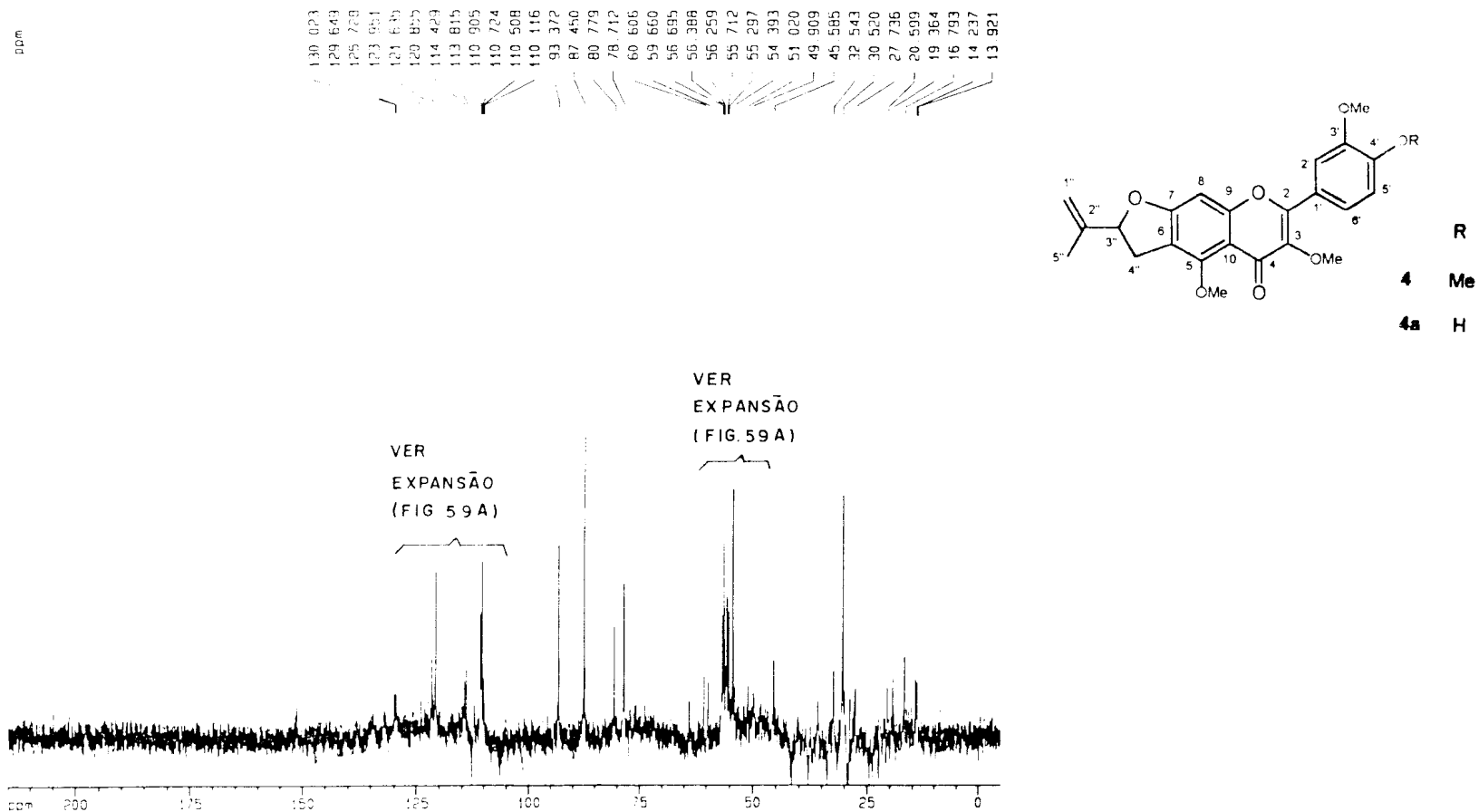


FIGURA 41. Espectro de RMN ^{13}C [DEPT $\theta = 90^\circ$] de 4 e 4a, em mistura (75 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

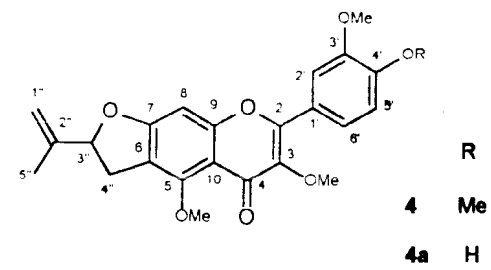
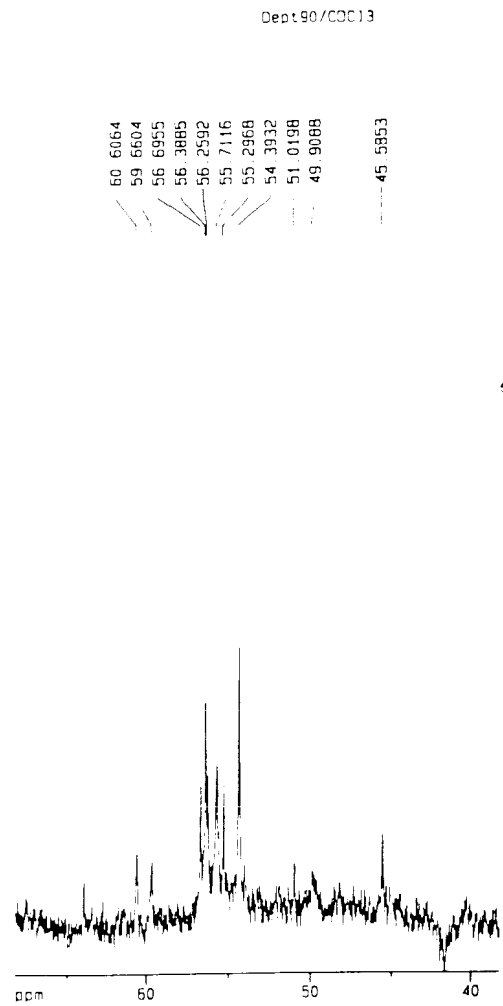


FIGURA 41A. Expansões das regiões entre 40-70 e 100-140 ppm do espectro de RMN ^{13}C [DEPT $\theta = 90^\circ$] de 4 e 4a, em mistura (75 MHz, CDCl_3).
TMS como referência interna

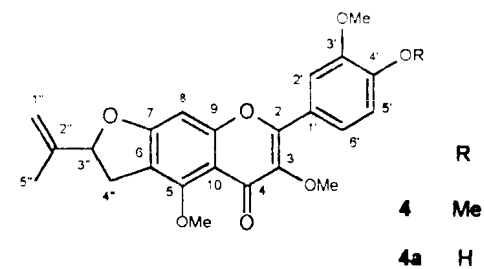
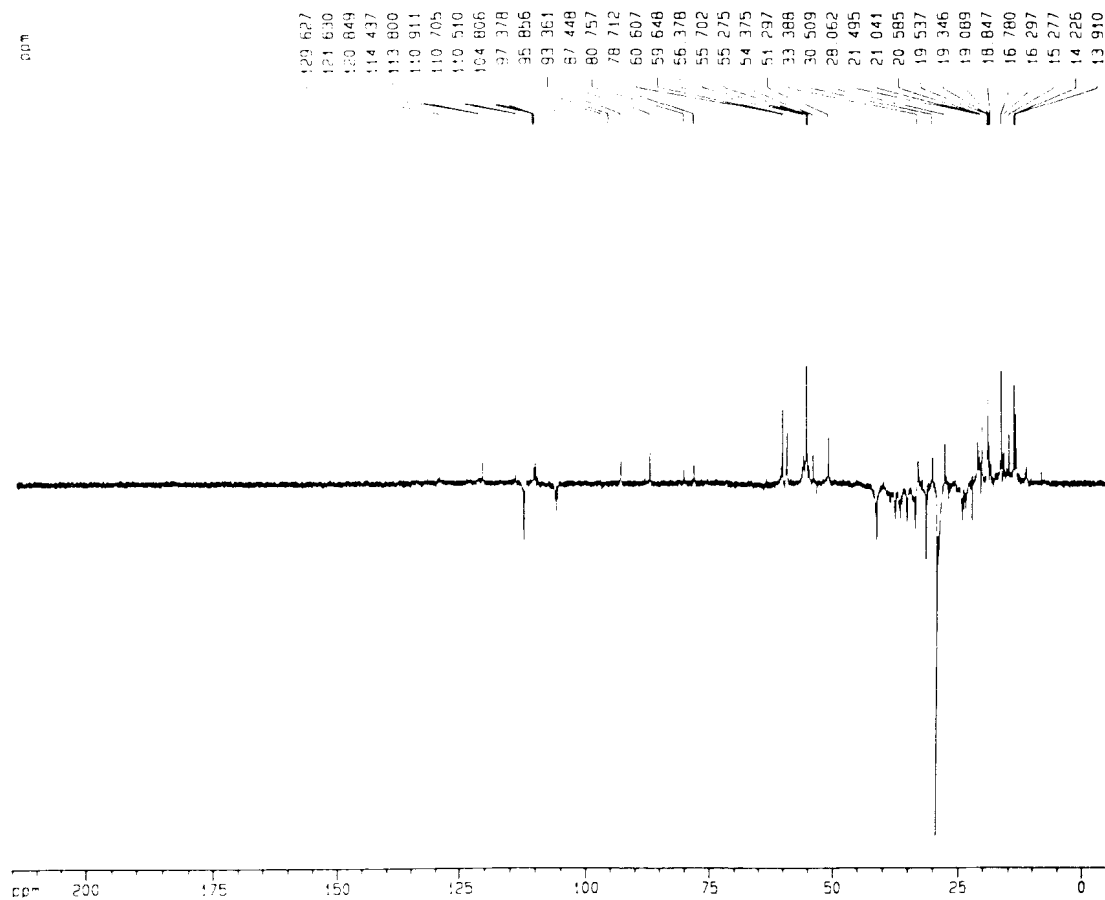


FIGURA 42. Espectro de RMN ^{13}C [DEPT $\theta = 135^\circ$] de 4 e 4a, em mistura (75 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

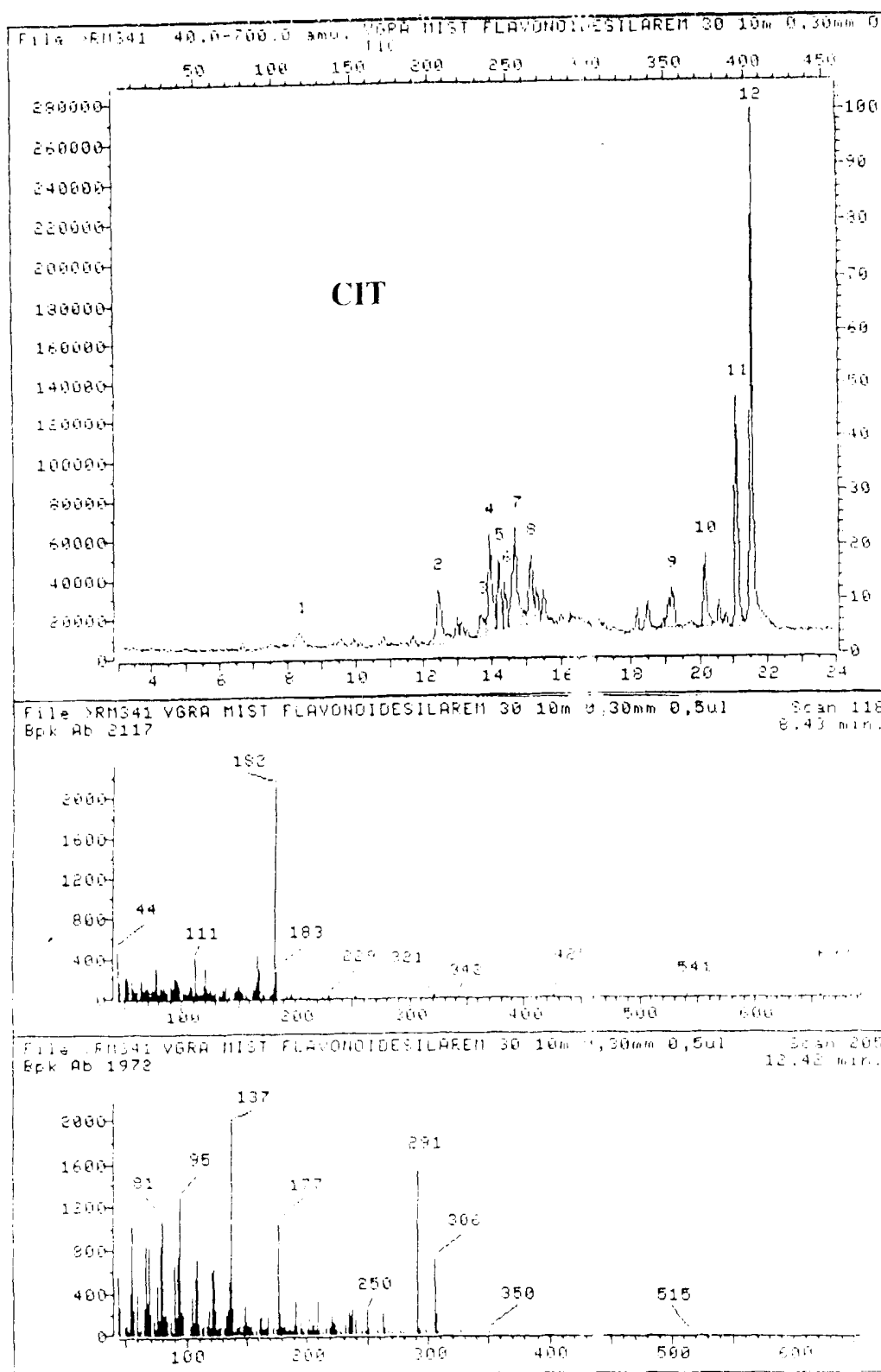
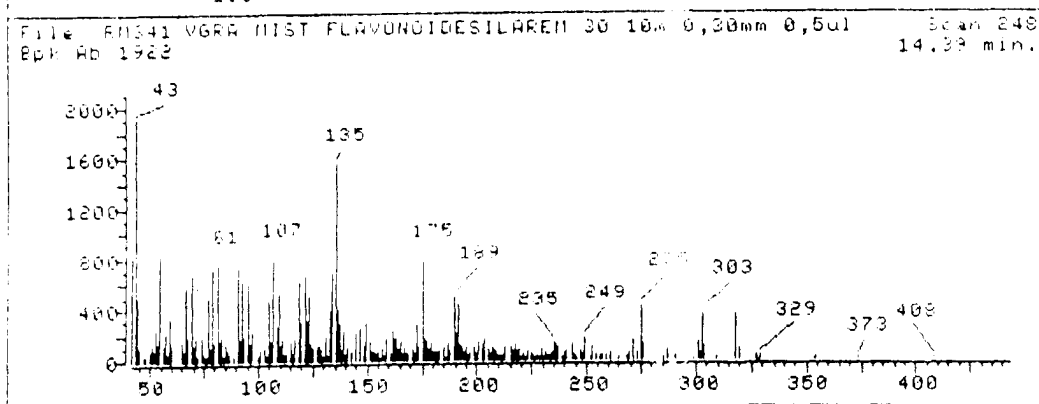
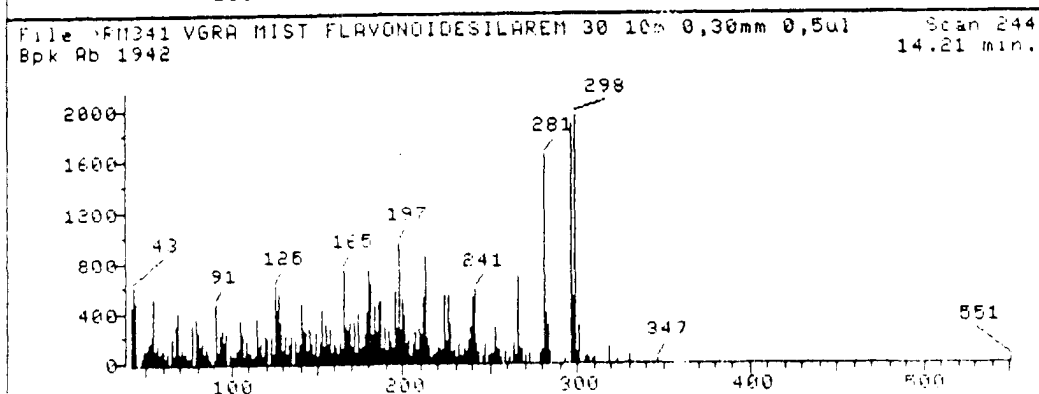
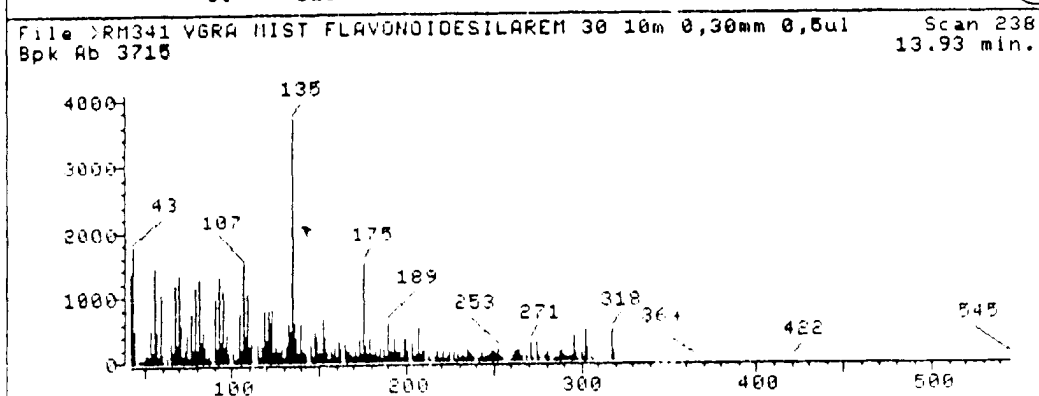
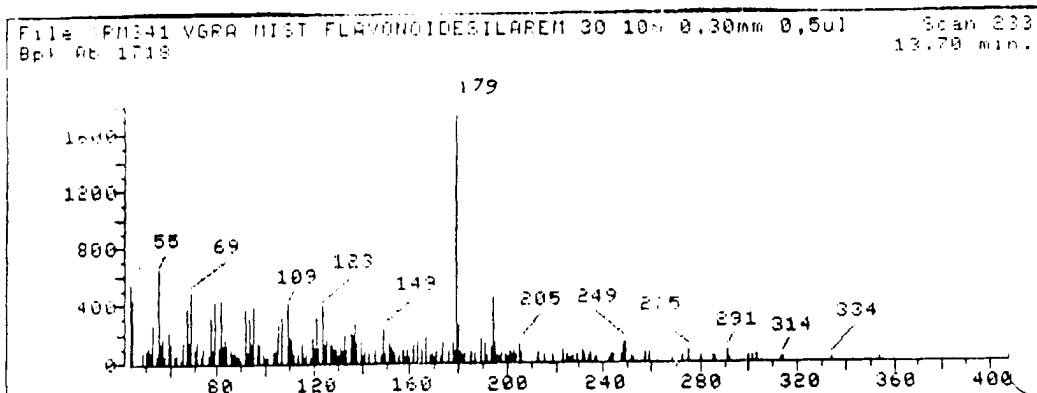
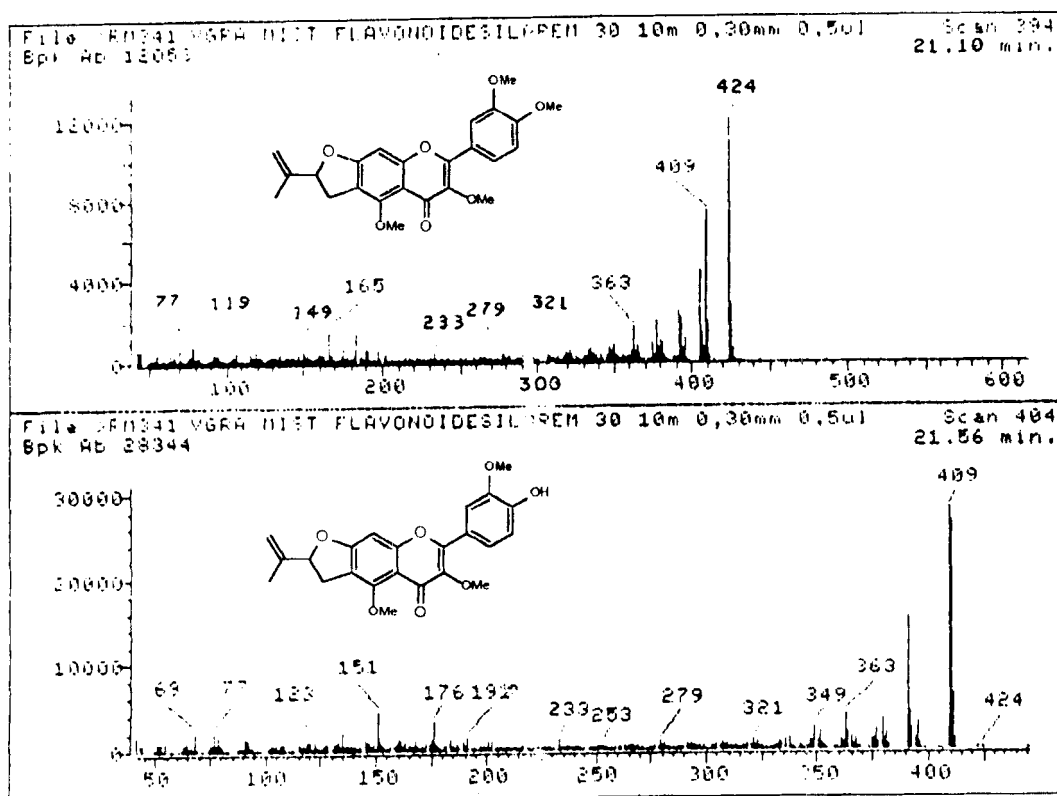


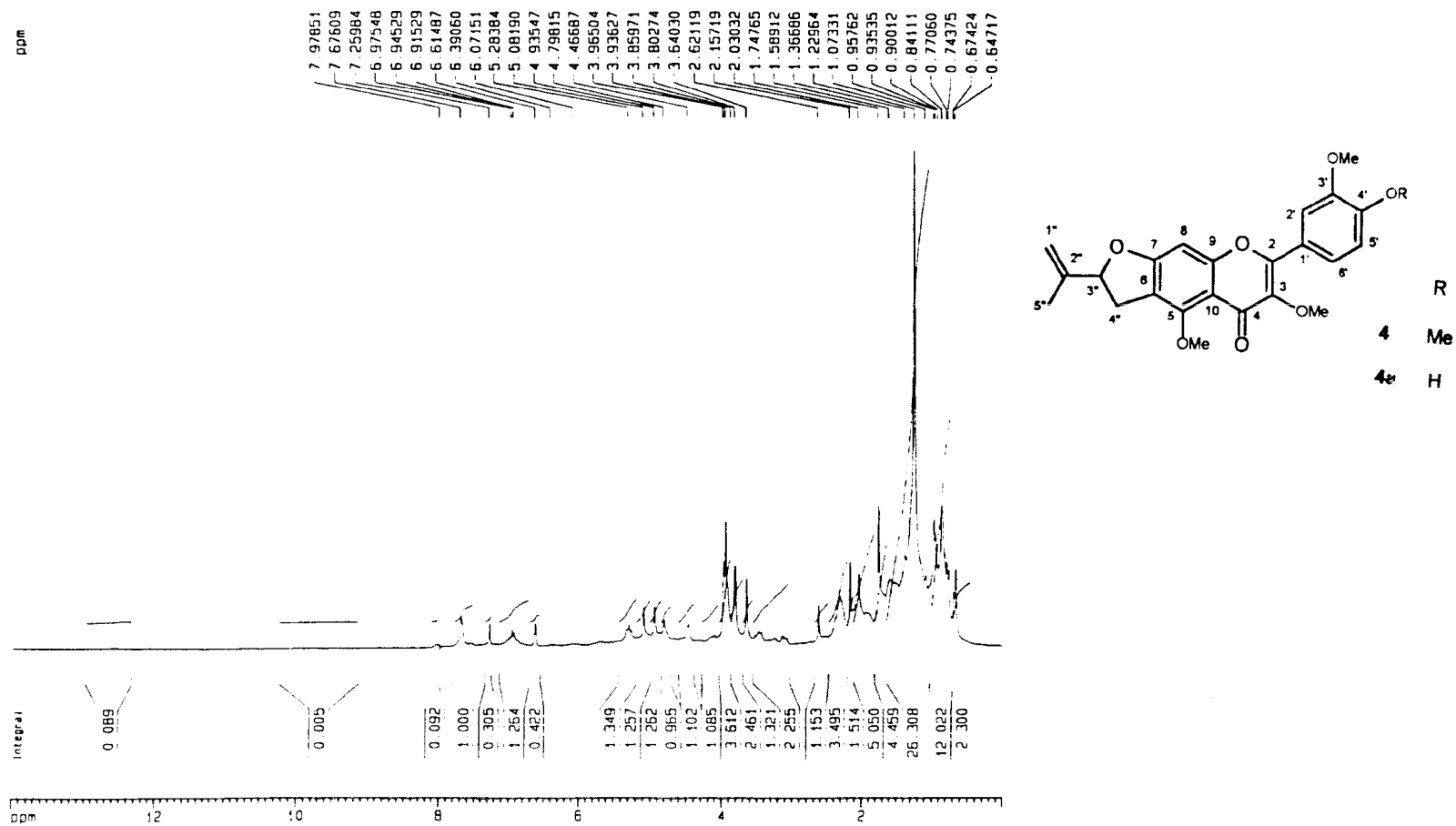
FIGURA 43. Cromatograma de ions totais (CIT) e espectros de massas de 4 e 4a, em mistura. Análise obtida por CGAR-AT-EM

Continuação...



Continuação...





**FIGURA 44. Espectro de RMN ^1H de 4 e 4a, em mistura (300 MHz, CDCl_3).
TMS como referência interna**

TABELA VIII

Atribuição dos deslocamentos químicos (δ_H e δ_C) de RMN 1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) para os flavonóides 4 e 4a, em mistura ($CDCl_3$)*

C	4		4a	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
2	155.10	-	155.10	-
3	140.12	-	140.12	-
4	174.76	-	173.69	-
5	152.93	-	152.93	-
6	106.89	-	106.89	-
7	164.41	-	164.41	-
9	157.98	-	157.98	-
10	105.77	-	105.77	-
1'	122.62	-	122.31	-
3'	147.99	-	147.99	-
4'	150.49	-	148.72	-
2''	142.32	-	142.32	-
CH				
8	92.92	6.61 (s)	92.92	6.61 (s)
2'	110.90	7.68 (m)	110.72	7.68 (m)
5'	110.12	7.00-6.80 (m)	114.43	7.00-6.80 (m)
6'	121.25	7.68 (m)	120.85	7.68 (m)
3''	87.07	5.28 (m)	87.07	5.23 (m)

Continuação...

CH₂				
1''	112.27	5.08 (s)	112.27	5.08 (s)
		4.93 (s)		4.93 (s)
4''	33.39	3.47 (dd, J = 9.5 e 15.6)	33.39	3.47 (dd, J = 9.5 e 15.6)
		3.13 (dd, J = 7.3 e 15.6)		3.13 (dd, J = 7.3 e 15.6)
CH₃				
5''	16.42	1.75 (s)	16.42	1.75 (s)
MeO-3	60.14	3.80 (s)	60.14	3.80 (s)
MeO-5	59.26	3.93 (s)	59.26	3.93 (s)
MeO-3'	55.70	3.93 (s)	55.70	3.64 (s)
MeO-4'	55.70	3.96 (s)	-	-

* Deslocamento químico (δ) e constante de acoplamento (J em Hz, entre parênteses) obtidos do espectro RMN ¹H uni-dimensional. Multiplicidade dos sinais dos carbonos foram deduzidas pela análise comparativa dos espectros RMN ¹³C [PND e DEPT ($\theta = 90^\circ$ e 135°)]

TABELA IX

Comparação dos dados de RMN ^{13}C (75 MHz) de 4 e 4a
com o flavonóide 3a descrito no item 4.1.3.1

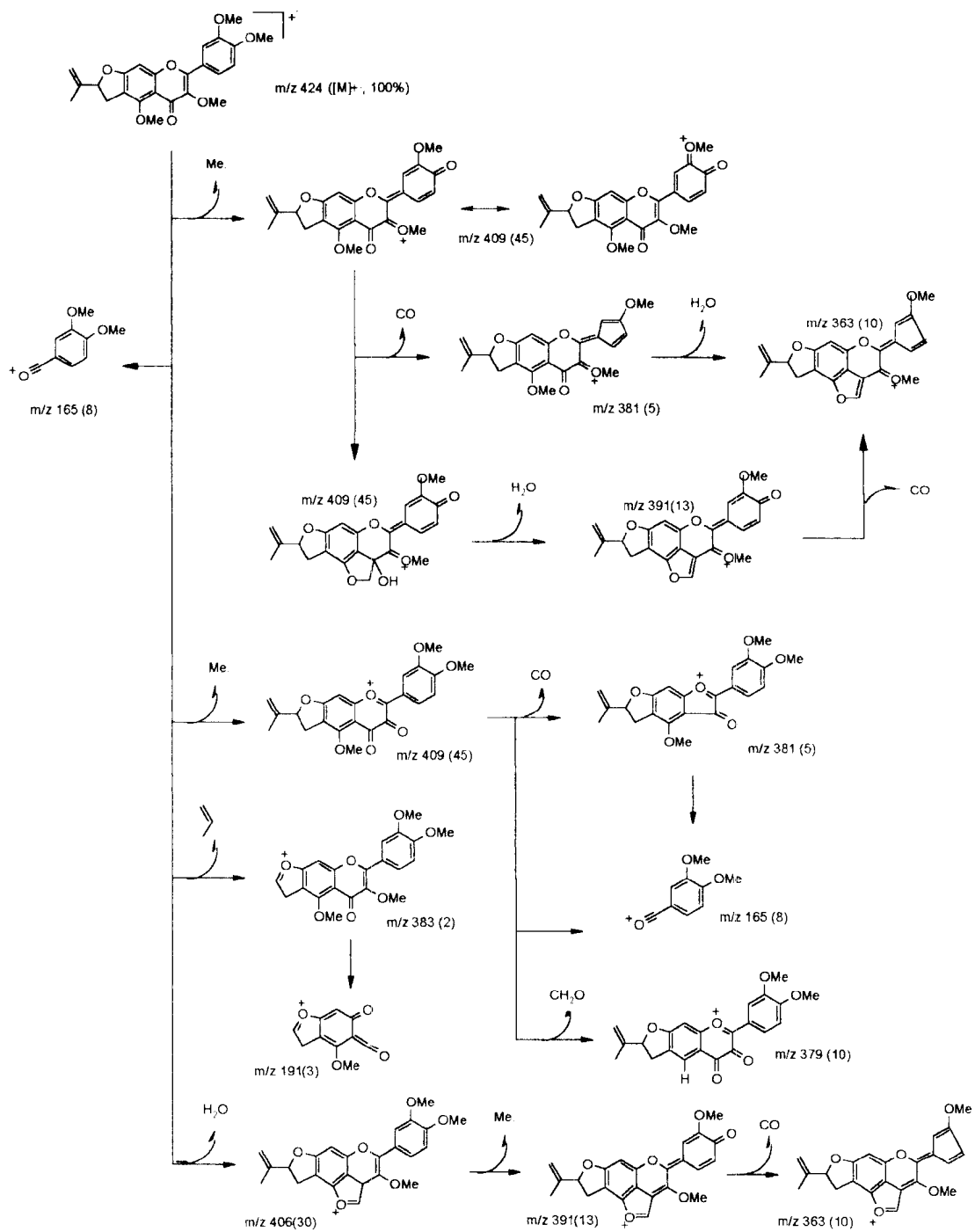
	4	4a	3a
C	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
2	155.10	155.10	155.73
3	140.12	140.12	139.04
4	174.76	173.69	179.00
5	152.93	152.93	156.65
6	106.89	106.89	108.39
7	164.41	164.41	166.41
9	157.98	157.98	157.25
10	105.77	105.77	106.44
1'	122.62	122.31	123.14
3'	147.99	147.99	148.91
4'	150.49	148.72	151.45
2''	142.32	142.32	143.33
CH			
8	92.92	92.92	89.00
2'	110.90	110.72	111.33
5'	110.12	114.43	110.00
6'	121.25	120.85	122.26
3''	87.07	87.07	88.36

Continuação...

CH₂			
1''	112.27	112.27	112.92
4''	33.39	33.39	30.67
CH₃			
5''	16.42	16.42	17.13
MeO-3	60.14	60.14	60.36
MeO-5	59.26	59.26	-
MeO-3'	55.70	55.70	56.18
MeO-4'	55.70	-	56.18

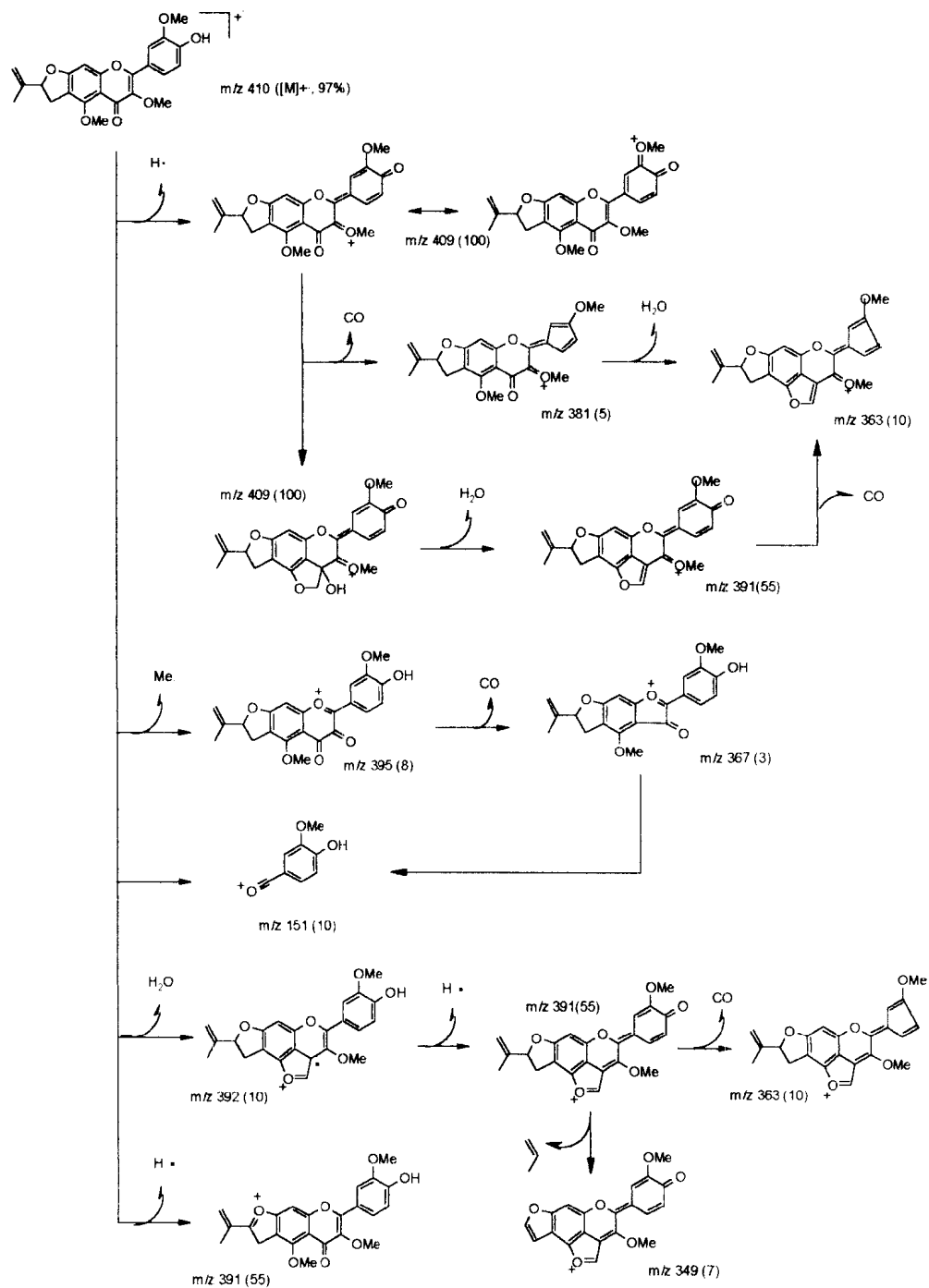
ESQUEMA 11

Prováveis caminhos de fragmentação para justificar os principais picos registrados nos espectros de massas de 4



ESQUEMA 12

Prováveis caminhos de fragmentação para justificar os principais picos registrados nos espectros de massas de 4a



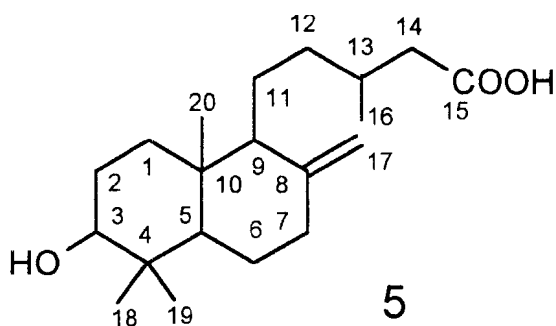
4.1.5 Ácido 3 β -hidroxilabd-8(17)-en-15-óico (5)

O material sólido, obtido do fracionamento do extrato hexânico, foi purificado por sucessivas recristalizações em acetona até ponto de fusão constante de 144 °C.

No espectro na região do IV [Fig. 45] (pág. 114) destacaram-se absorções para ligação dupla 1,1-dissubstituída [ν 1640, 850 cm^{-1} (C=CH₂), ligação dupla exocíclica] e para o grupo carbonila [1700 cm^{-1} (C=O)]. A presença de grupo carbonila e a observação de uma absorção larga entre o 3300 a 2600 cm^{-1} (OH) sugeriram a presença de função ácido carboxílico. Os espectros de RMN ¹H [Fig. 46] (pág. 115) e ¹³C {PND e DEPT ($\theta = 90^\circ$ e 135°)} [Fig. 471 (pág. 116) permitiram reconhecer sinais para uma unidade carbinólica { $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$: 3.23 (*dd*, J= 10.8 e 4.1)/78.89 [C-3]} e para quatro metilas { $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$: 0.95 (*d*, J= 6.0 Hz)/19.54 [C-16], 0.97 (*s*)/28.25 [C-18], 0.75 (*s*)/15.37 [C-19] e 0.66 (*s*)/14.44 [C-20]}.

O espectro de massas de baixa resolução { m/z 322 [M]⁺} [Fig. 48] (pág. 117) juntamente com a análise comparativa dos espectros de RMN ¹³C [PND e DEPT ($\theta = 90^\circ$ e 135°)] e RMN ¹H {1D e 2D ¹Hx¹H-COSY [Fig. 49] (pág. 118)} levaram a dedução da fórmula molecular C₂₀H₃₄O₃ com a seguinte expansão: [C]₂ [CH₂]₇ [CH₃]₄ [CH]₄ [C=CH₂] [COOH] [OH]. Esta fórmula molecular permitiu supor tratar-se de um diterpeno (C₂₀H₃₄) com grau de insuficiência quatro,

compatível com esqueleto bicíclico (duas insuficiências) da classe labdano ($C_{20}H_{34}$), contendo uma ligação dupla e uma função ácido carboxílico. A presença destes grupos funcionais foi evidenciada pelos deslocamentos químicos do grupamento exometilênico em C-17 [δ_H/δ_C : 4.80 (*sl*) e 4.30 (*sl*)/106.64 (CH_2) e 148.02 (C)] e pela absorção do carbono C-15 (δ_C 173.79) referente ao ácido carboxílico.



A proposição da estrutura 5 foi reforçada pela interpretação de seu espectro de massas onde os fragmentos mais importantes são mostrados no Esquema 13 (pág. 120). O assinalamento dos deslocamentos químicos dos carbonos do diterpeno 5 no espectro de RMN ^{13}C foi acompanhado por comparações com substâncias-modelo descritas na literatura⁷¹ [Tabela X] (pág. 119), sendo então posteriormente confirmados por RMN, incluindo experimentos 2D, de seu derivado 5a.

Assim, o diterpeno 5 isolado de *Vellozia graminifolia* foi caracterizado como ácido 3 β -hidroxilabd-8(17)-en-15-óico. Este diterpeno, pertencente à classe dos labdanos, é registrado aqui pela primeira vez na família Velloziaceae.

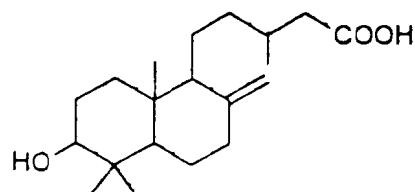
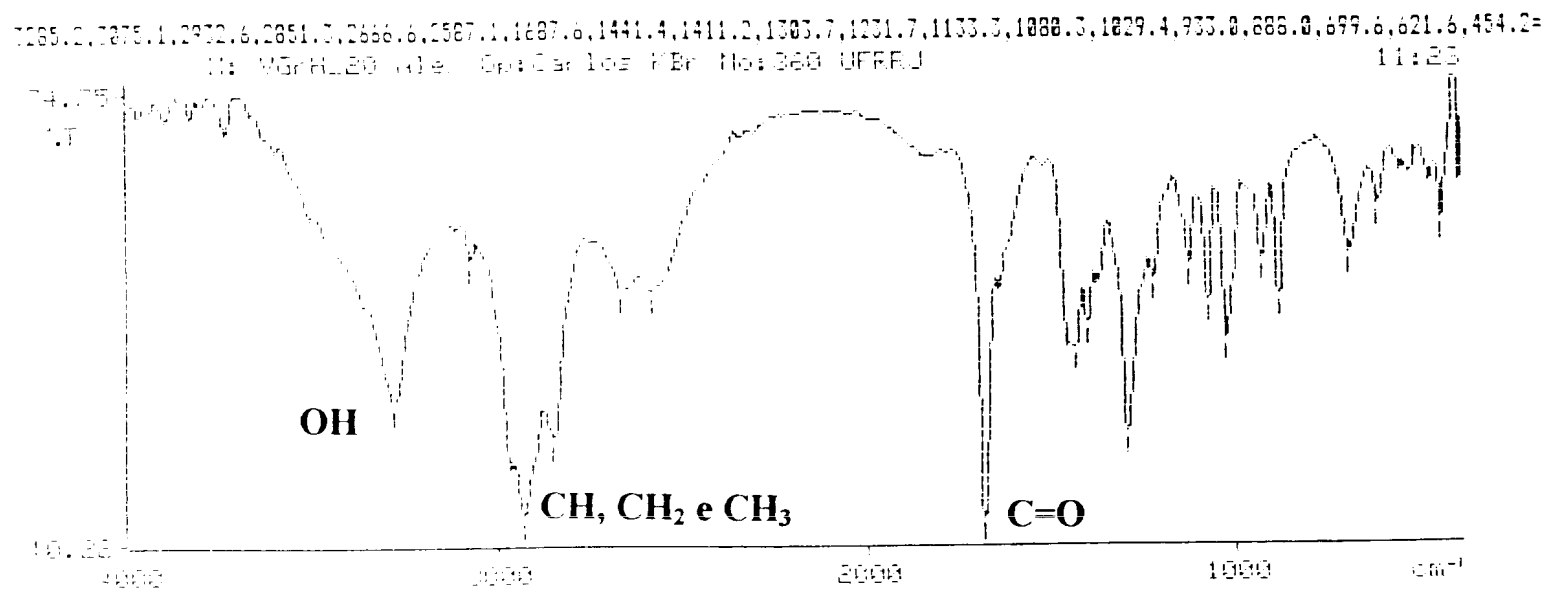


FIGURA 45. Espectro na região do IV de 5. Pastilha de KBr

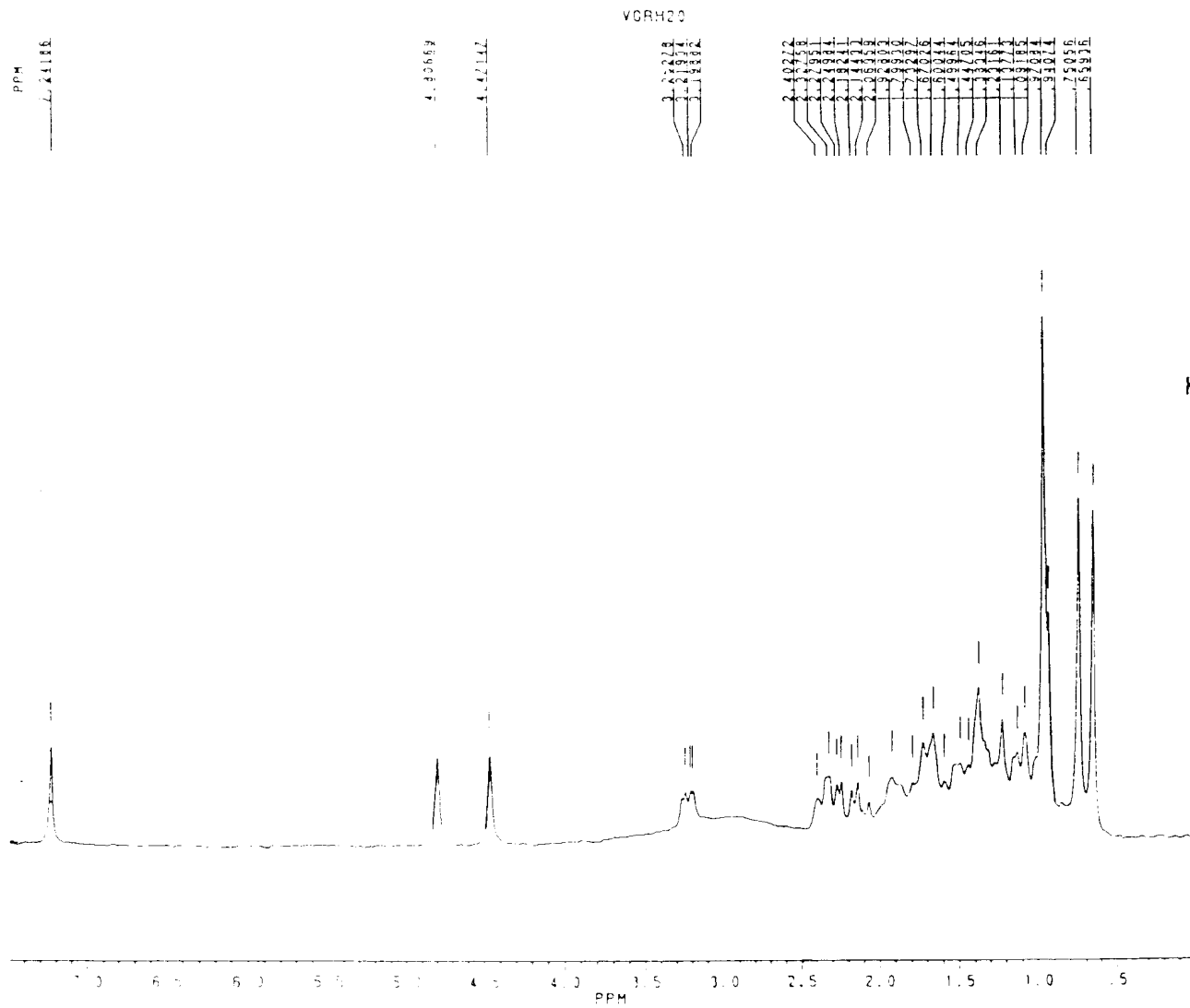


FIGURA 46. Espectro de RMN ^1H de 5 (200 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

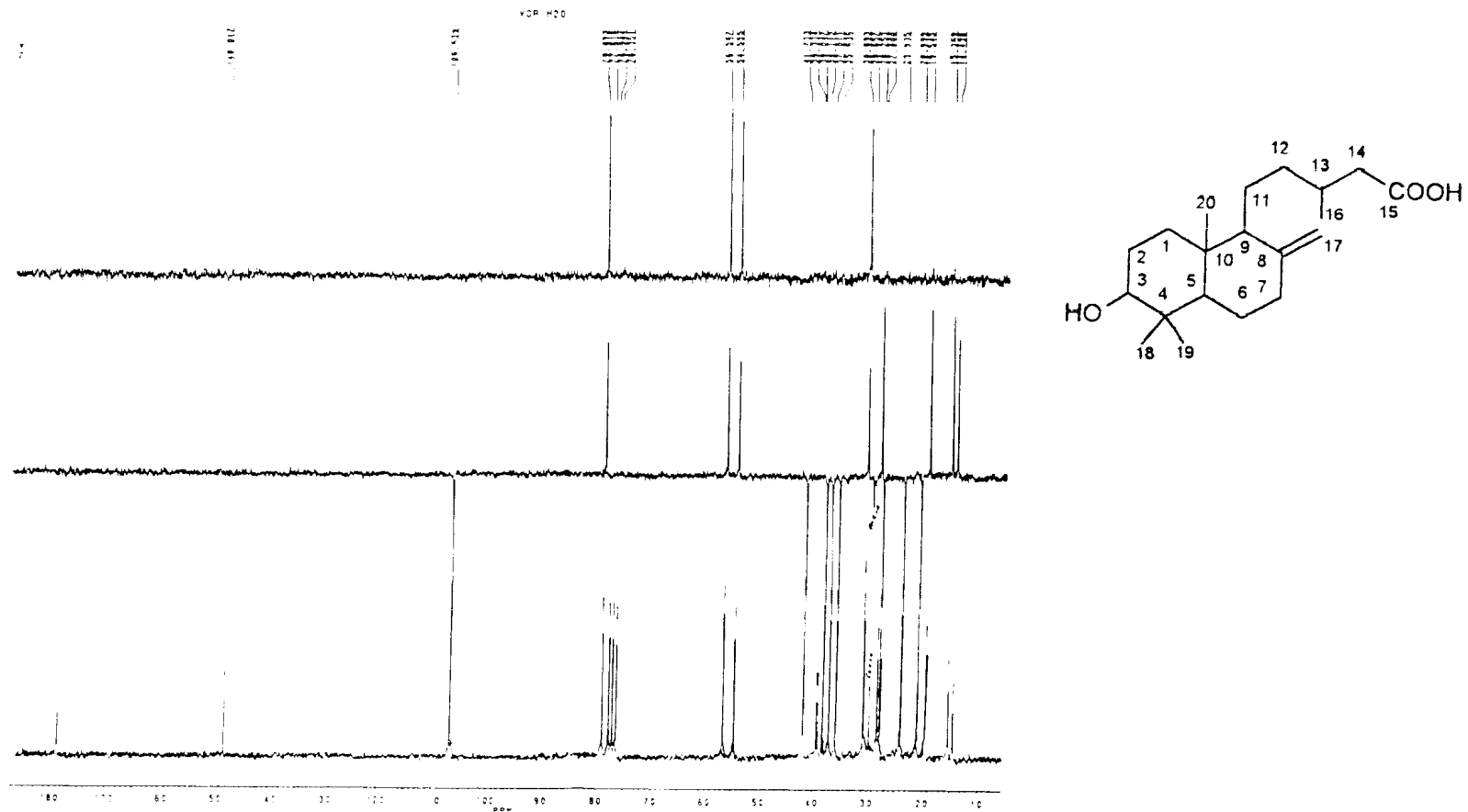
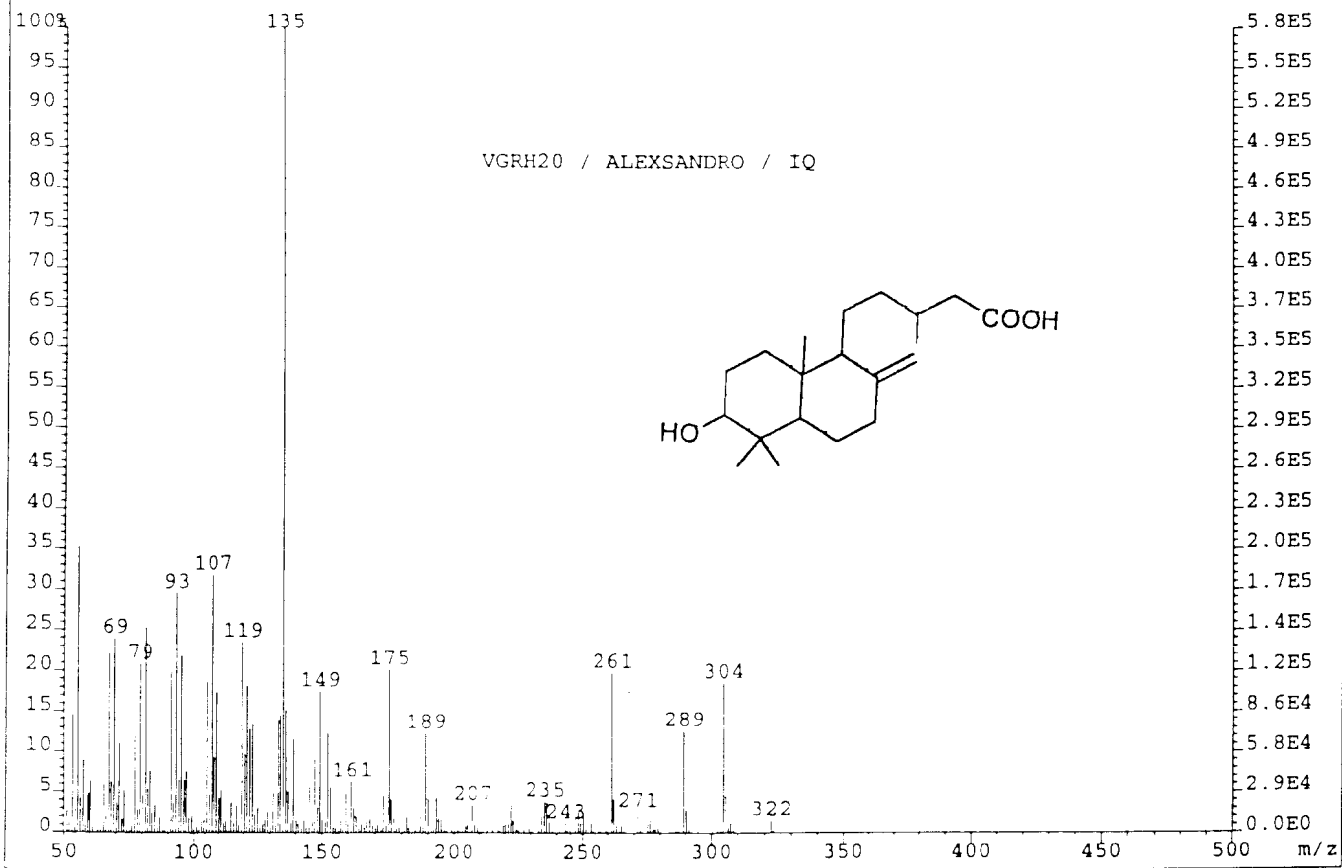


FIGURA 47. Espectro de RMN ^{13}C [PND e DEPT ($\theta = 90^\circ$ e $\theta = 135^\circ$)] de 5
(50,3 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

File:CRIS10 Ident:76-33 Win 100PPM Acq:14-AUG-1996 13:09:40 Cal:PFK14-8_1
AutoSpecQ EI+ Magnet BpM:135 BpI:575488 TIC:5956494 Flags:HALL





NUCLEO DE PESQUISAS DE PRODUTOS NATURAIS
CENTRAL ANALITICA
LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS

FIGURA 48. Espectro de massas de 5 obtido por impacto de elétrons (70 eV)

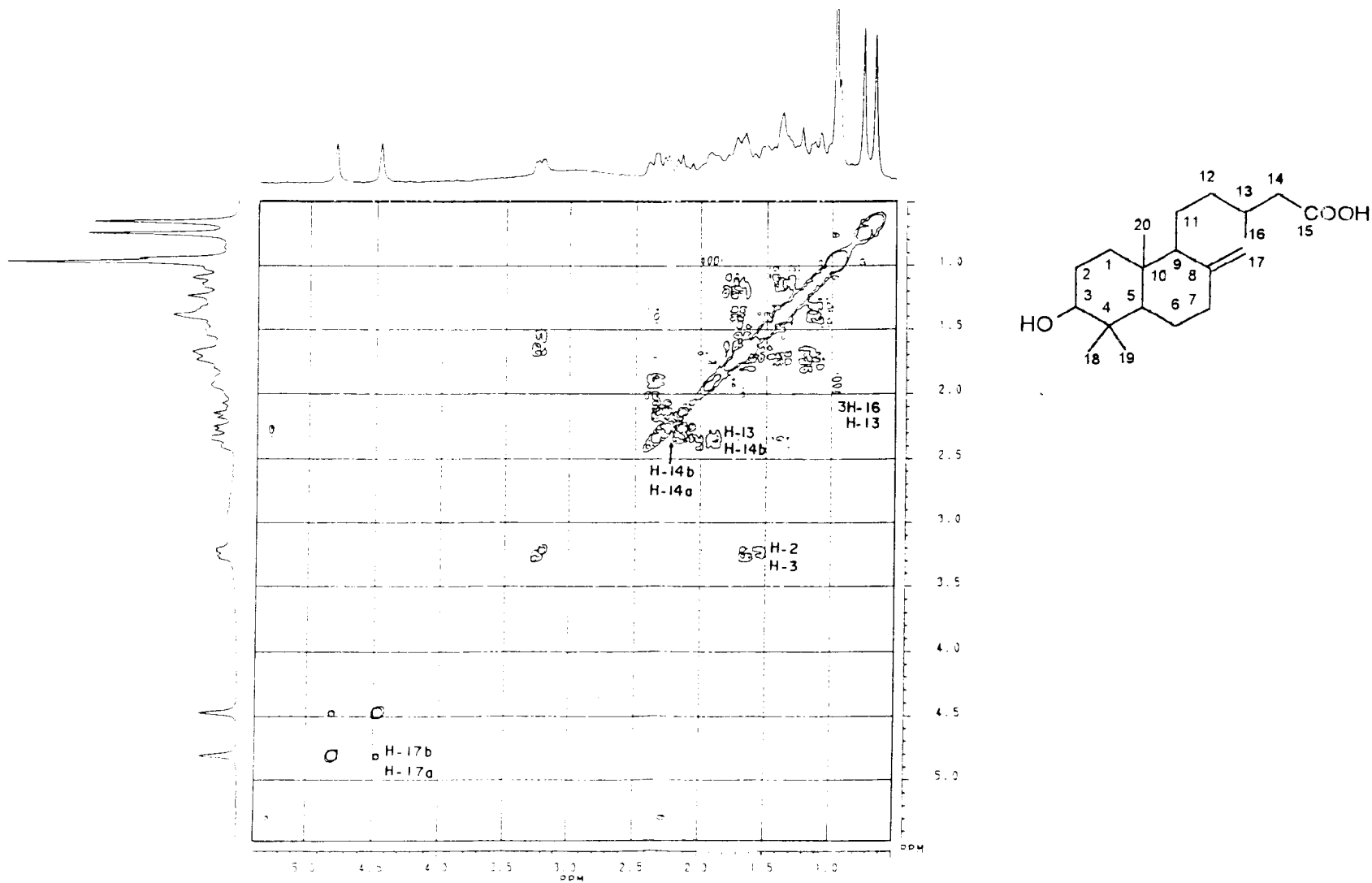


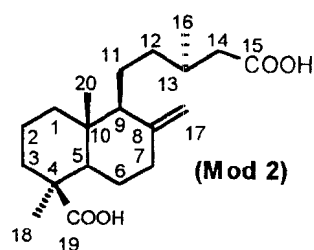
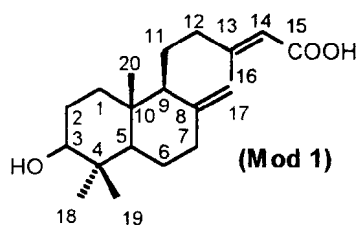
FIGURA 49. Espectro bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio [$^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY] de 5 (200 MHz, CDCl_3) TMS como referência interna

TABELA X

Atribuição dos deslocamentos químicos (δ_H e δ_C) de RMN 1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) para o diterpeno 5 ($CDCl_3$), incluindo comparações em RMN ^{13}C com estruturas-modelo descritas na literatura (Mod 1)⁷¹ (Mod 2)⁷²

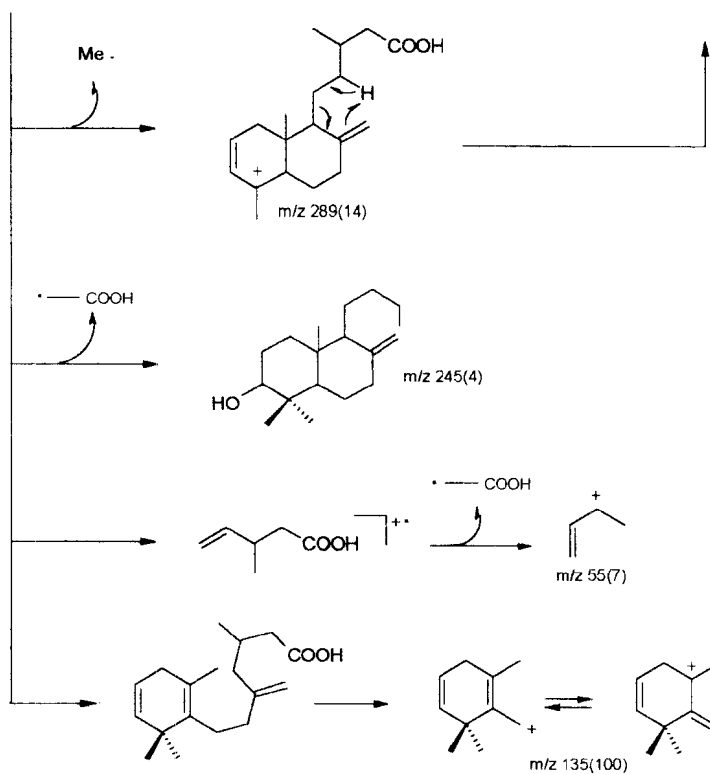
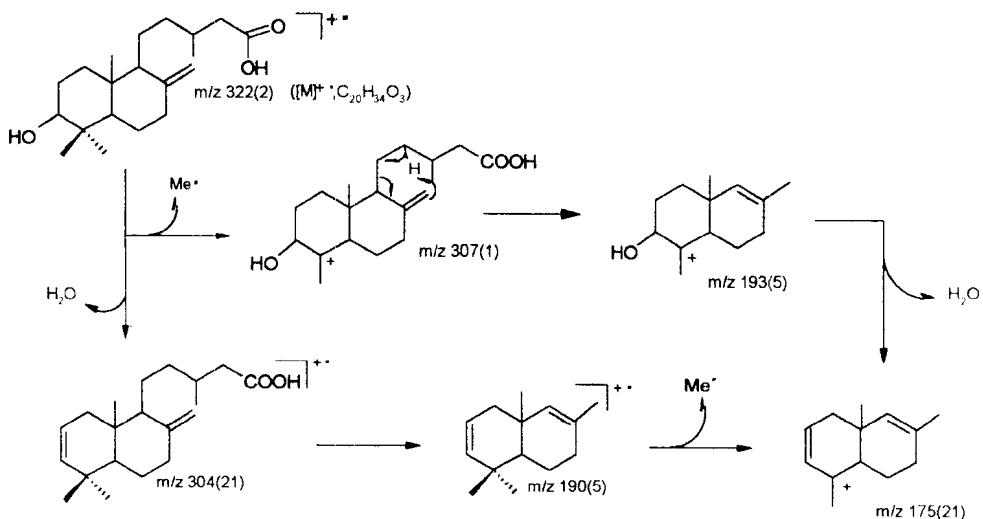
C	δ_C			δ_H
	5	Mod 1	Mod 2	5
4	39.05	39.2		-
8	148.02	147.7	149.4	-
10	39.33	39.5		-
15	178.67	171.4	176.9	-
CH				
3	78.89	78.9		3.23 (<i>dd</i> , J = 10.8 e 4.1)
5	51.55	54.7		
9	56.57	56.0	58.8	
13	30.69	163.7	32.2	
CH₂				
1	35.64	37.1		
2	27.80	27.8		1.70 ^a e 1.55 ^a
6	23.93	24.0		
7	38.11	38.2		
11	21.00	21.7	22.0	
12	37.01	40.0	37.0	
14	41.73	114.9	42.5	2.30 ^a e 1.90 ^a
17	106.64	106.9	107.5	4.80 (<i>sl</i>) e 4.47 (<i>sl</i>)
CH₃				
16	19.54	19.2	80.4	0.95 (<i>d</i> , J = 6.0)
18	28.25	28.3		0.97 (<i>s</i>)
19	15.37	15.4		0.75 (<i>s</i>)
20	14.44	14.6	15.2	0.66 (<i>s</i>)

^a Valores aproximados deduzidos pelo espectro $^1Hx^1H$ -COSY



ESQUEMA 13

Prováveis caminhos de fragmentação para justificar os principais picos resgistrados no espectro de massas de 5



4.1.5.1 Obtenção de 3 β -hidroxilabd-8(17)-en-15-oato de metila (5a)

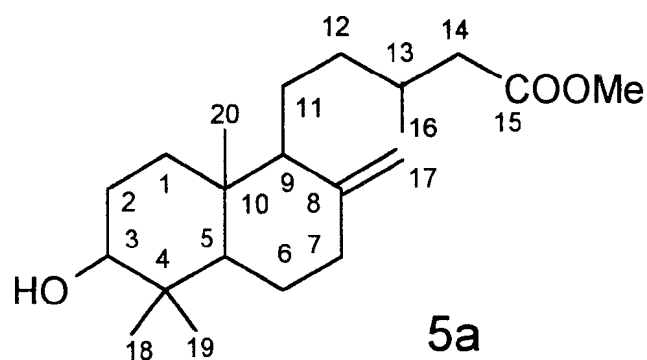
O tratamento de 5 com solução etérea de diazometano forneceu, como único produto, o seu éster metílico correspondente (5a).

Os espectros de RMN ^1H [Fig. 50] (pag. 123) e ^{13}C [PND] [Fig. 51] (pág. 125) mostraram, respectivamente, sinais de metila de éster [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$: 3.66 (3H, s)/51.40] ausente no espectro do diterpeno 5, comprovando deste modo, a presença da função ácido carboxílico no composto natural.

No espectro de RMN ^{13}C PND e DEPT ($\theta = 135^\circ$ [Fig. 52] (pág. 126) e 90° [Fig. 53]) (pág. 127) podemos deduzir o deslocamento e a multiplicidade de cada carbono [Tabela XI] (pág. 136) de 5a. A localização do grupamento ácido carboxílico em 5, envolvendo o átomo de carbono C-15, foi confirmado pelos acoplamentos heteronucleares a longa distância entre este carbono [δ_{C} : 173.79] e os hidrogênios do grupo metila [δ_{H} : 3.65 (s); $^3\text{J}_{\text{CH}}$] em MeO-15 e o grupo metilênico [δ_{H} : 2.28 (*dd*; J= 6.2 e 14.6) e 2.12 (*dd*; J= 8.0 e 14.6); $^2\text{J}_{\text{CH}}$] em C-14, observados no espectro HMBC [Fig. 56] (pág. 132) de 5a.

O completo assinalamento dos átomos de hidrogênio e de carbono de 5a nos seus espectros de RMN ^1H e ^{13}C , respectivamente, foram acompanhados pelos experimentos homonuclear 2D $^1\text{Hx}^1\text{H}$ -COSY [Fig. 54] (pág. 128) e heteronuclear 2D $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$ {n = 1, HMQC [Fig. 55] (pág. 130); n = 2 e 3, HMBC [Fig.

56] (pág. 132)}. O espectro HMBC mostrou correlações a longa distância ($^3J_{CH}$) entre os hidrogênios das metilas em C-18 [δ_H : 0.99 (s)], C-19 [δ_H : 0.77 (s)] e C-20 [δ_H : 0.68 (s)] com o carbono terciário C-5 (δ_C : 54.99), 2H-11 (δ_H : 1.42) com os carbonos C-8 (δ_C : 148.13) e C-10 (δ_C : 39.41), 2H-14 [δ_H : 2.28 (dd, J= 6.2 e 14.6 Hz) e 2.12 (dd, J= 8.0 e 14.6 Hz)] e 3H-16 [δ_H : 0.94 (d, J= 6.6 Hz)] com C-12 (δ_C : 36.07). As demais mterações estão sumarizadas na Tabela XI (pág. 136). O espectro HMBC de 5a foi expandido em determinadas regiões [ver Fig. 561 (pág. 132) para facilitar a interpretação da correlação entre os átomos de hidrogênio e carbono a longa distância ($^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$).



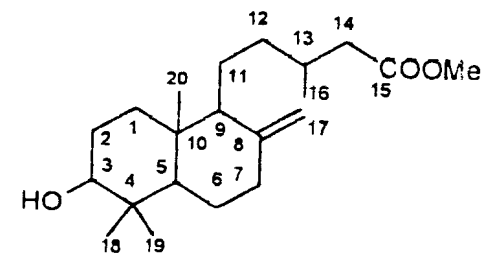
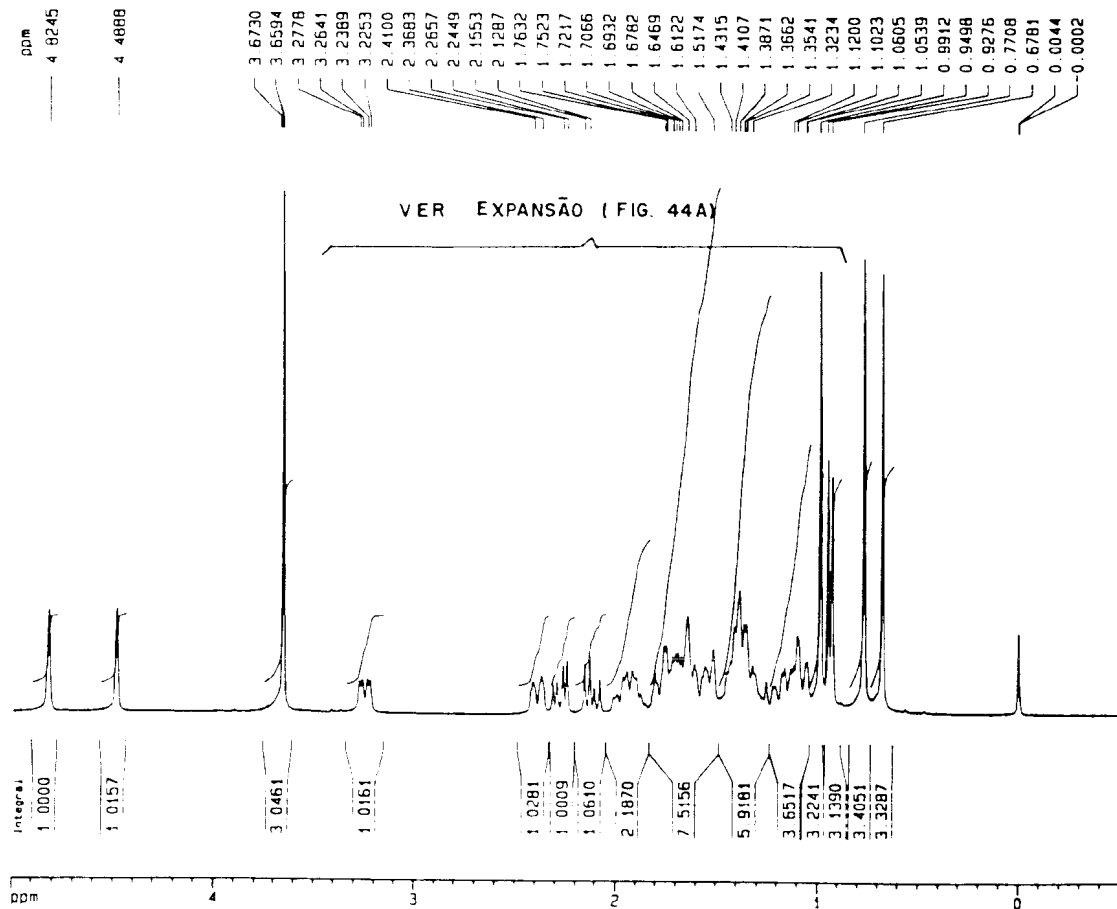


FIGURA 50. Espectro de RMN ^1H de 5a (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

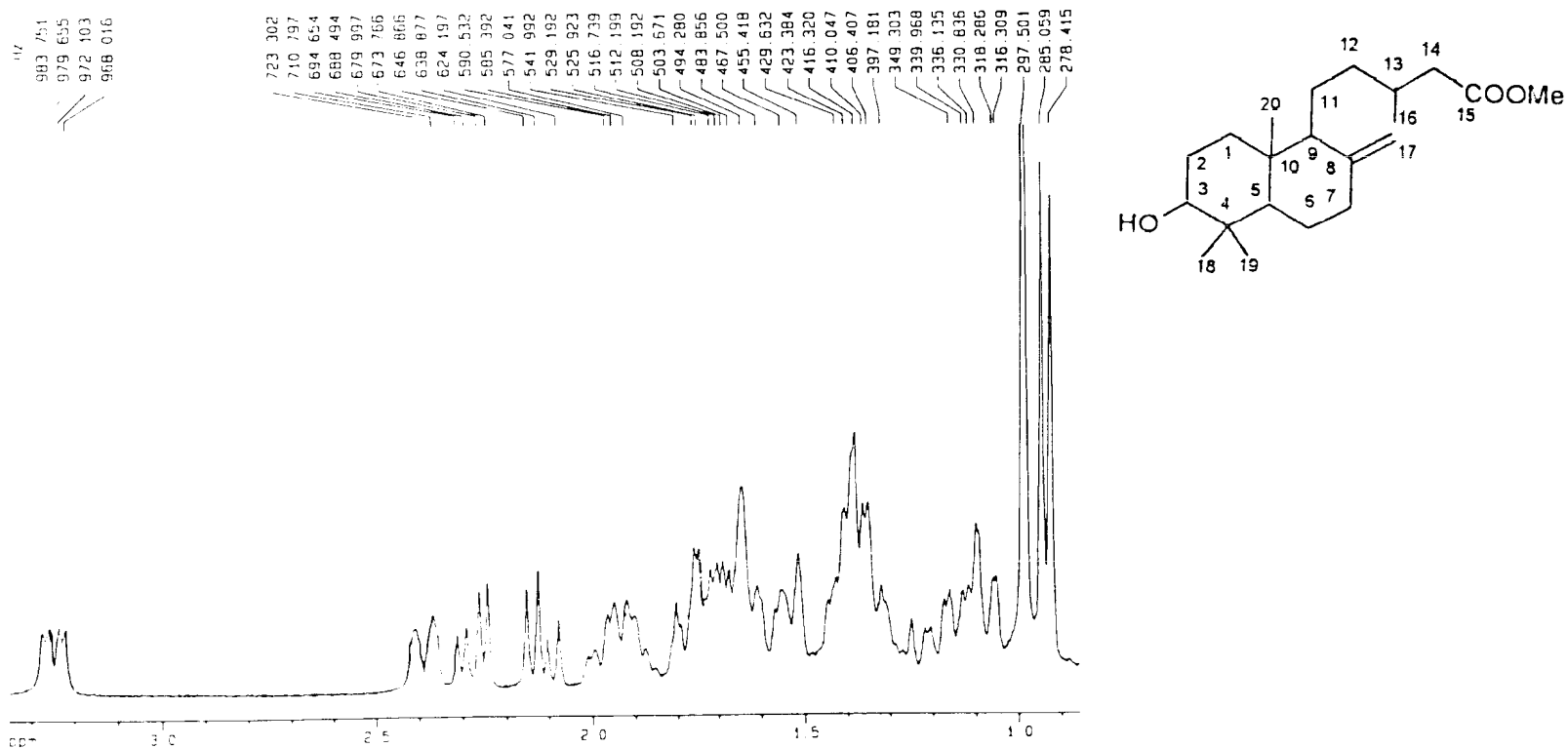


FIGURA 50A. Expansão da região entre 0,9-3,7 no espectro de RMN ^1H de **5a** (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

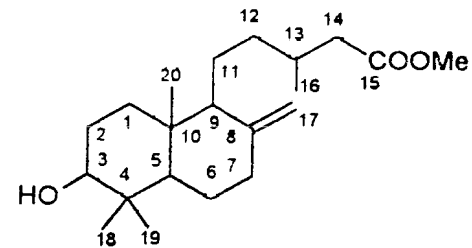
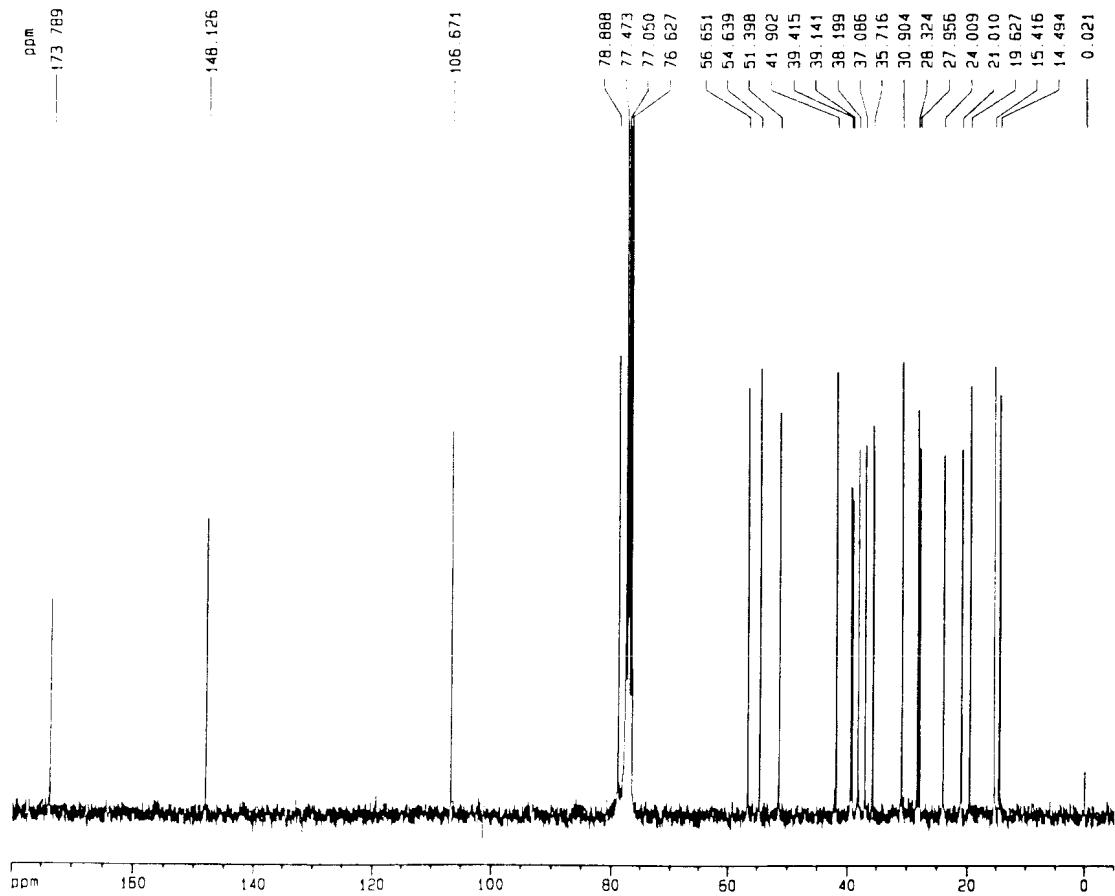


FIGURA 51. Espectro de RMN ^{13}C [PND] de 5a (75 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

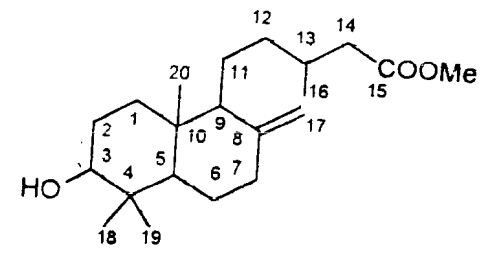
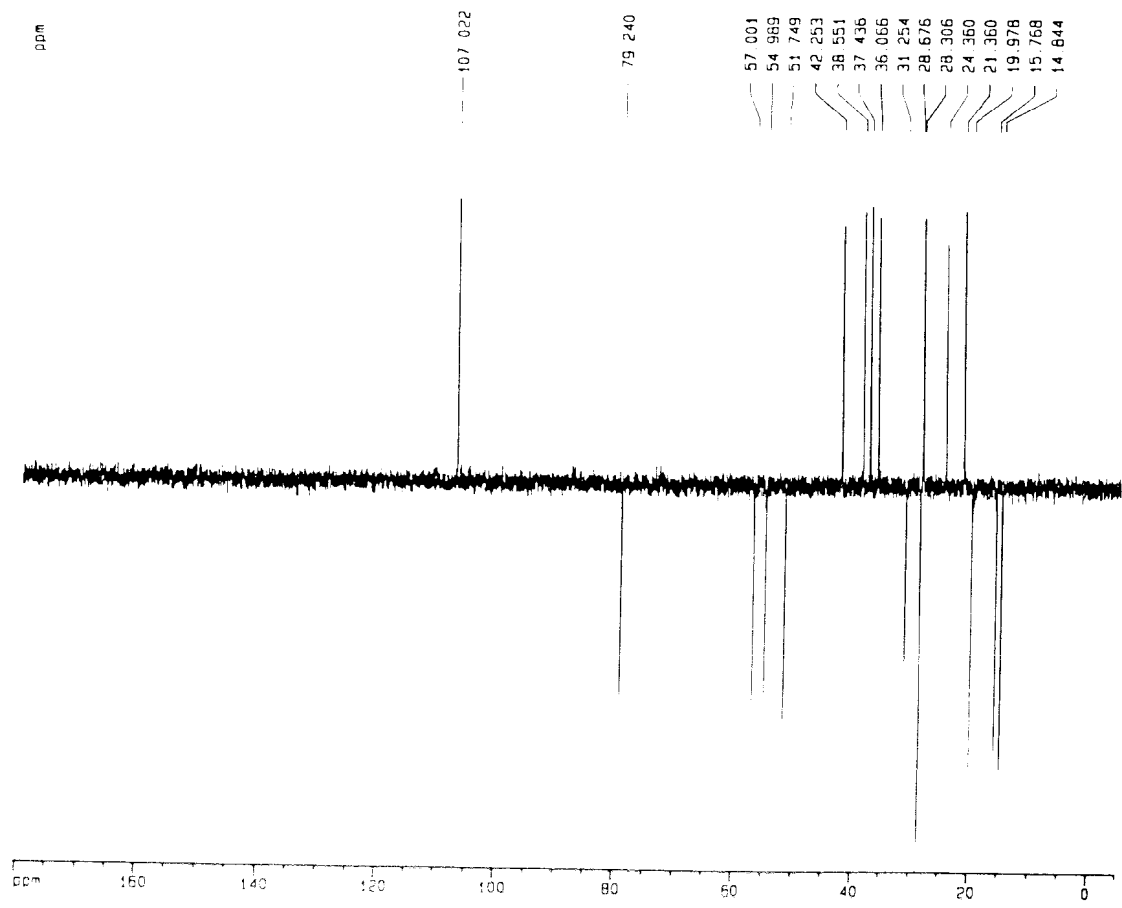


FIGURA 52. Espectro de RMN ^{13}C [DEPT $\theta = 135^\circ$] de 5a (75 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

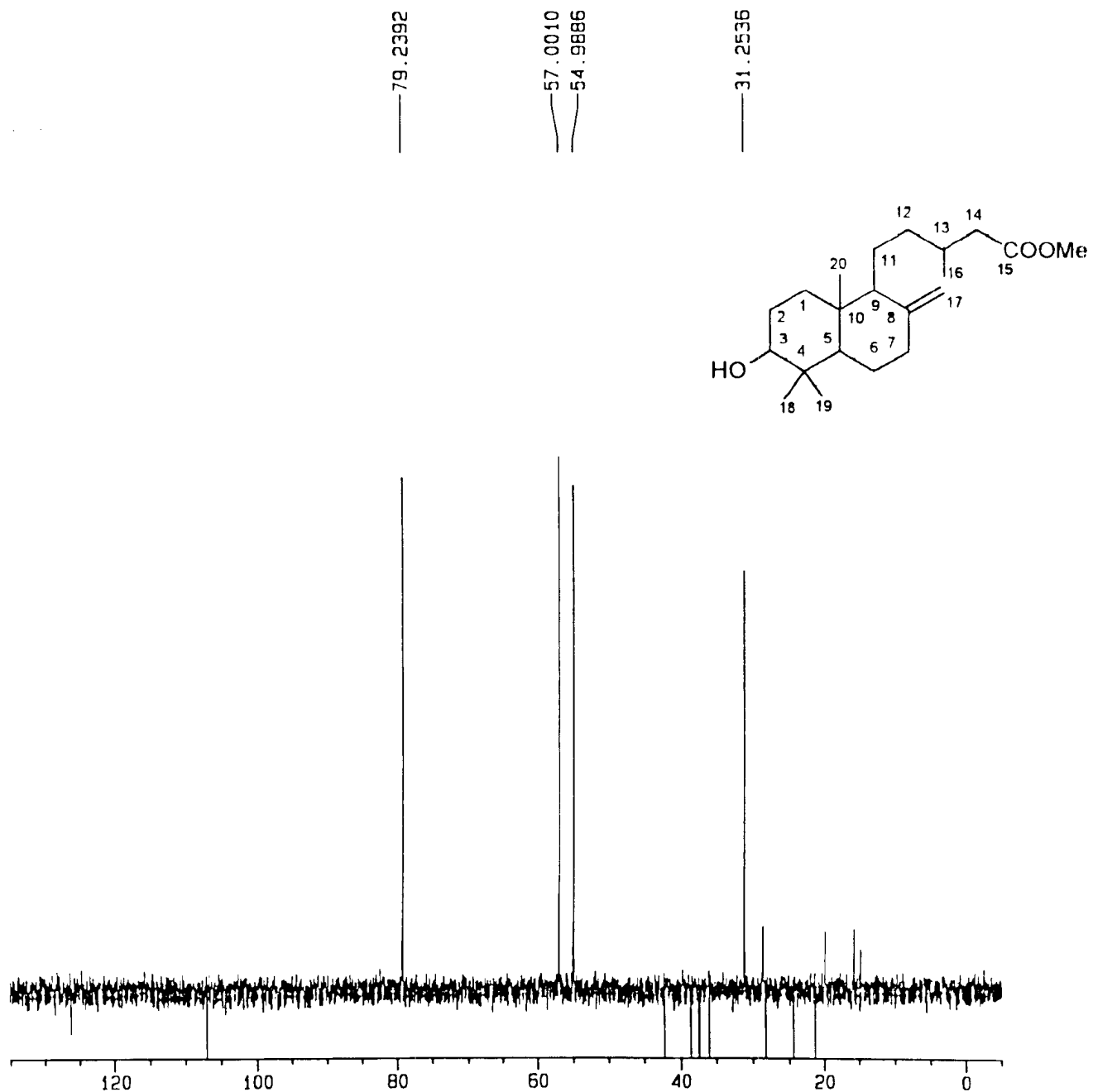


FIGURA 53. Espectro de RMN ^{13}C [DEPT $\theta = 90^\circ$] de 5a (75 MHz, CDCl_3).

TMS como referência interna

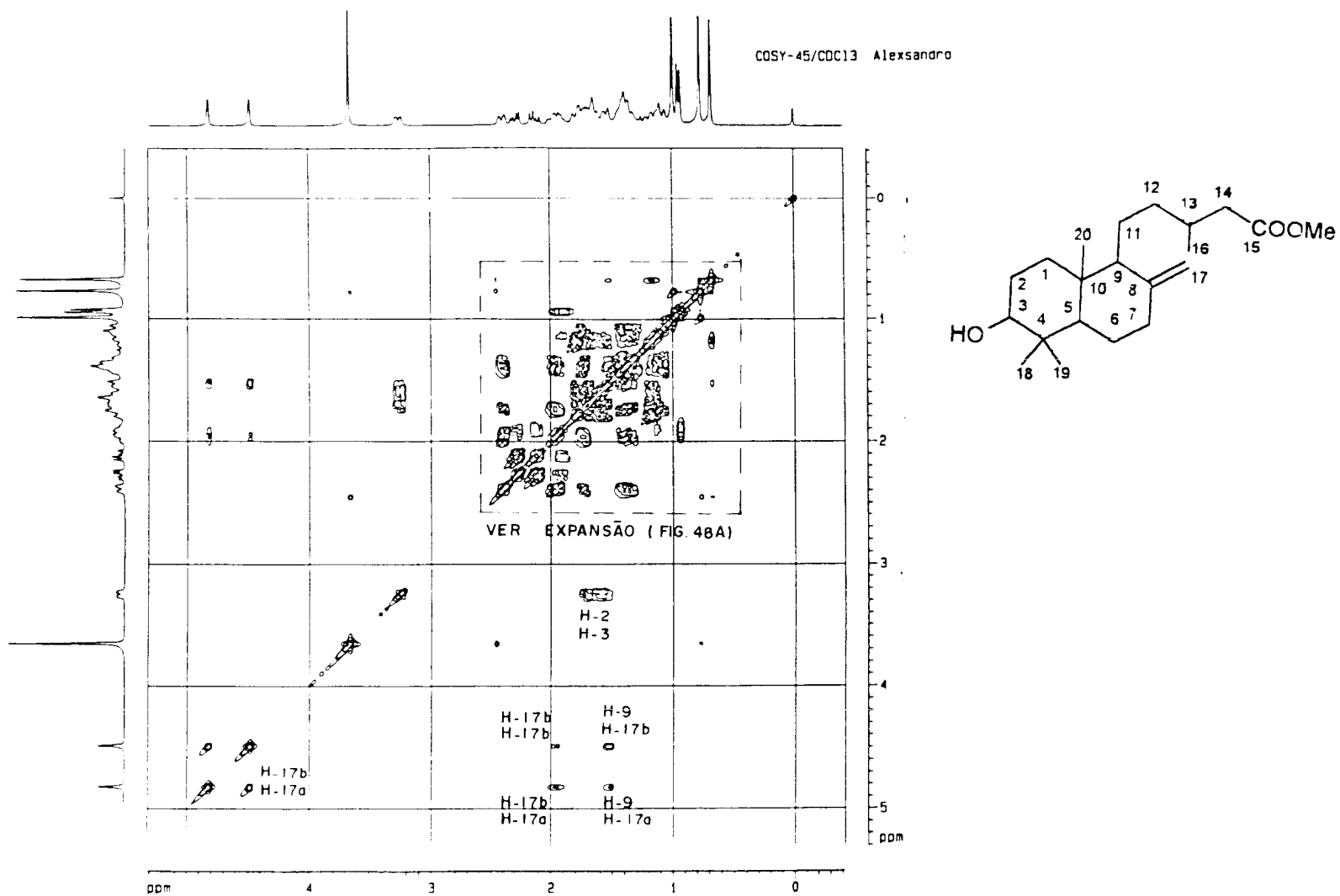


FIGURA 54. Espectro bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio [$^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY] de 5a (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

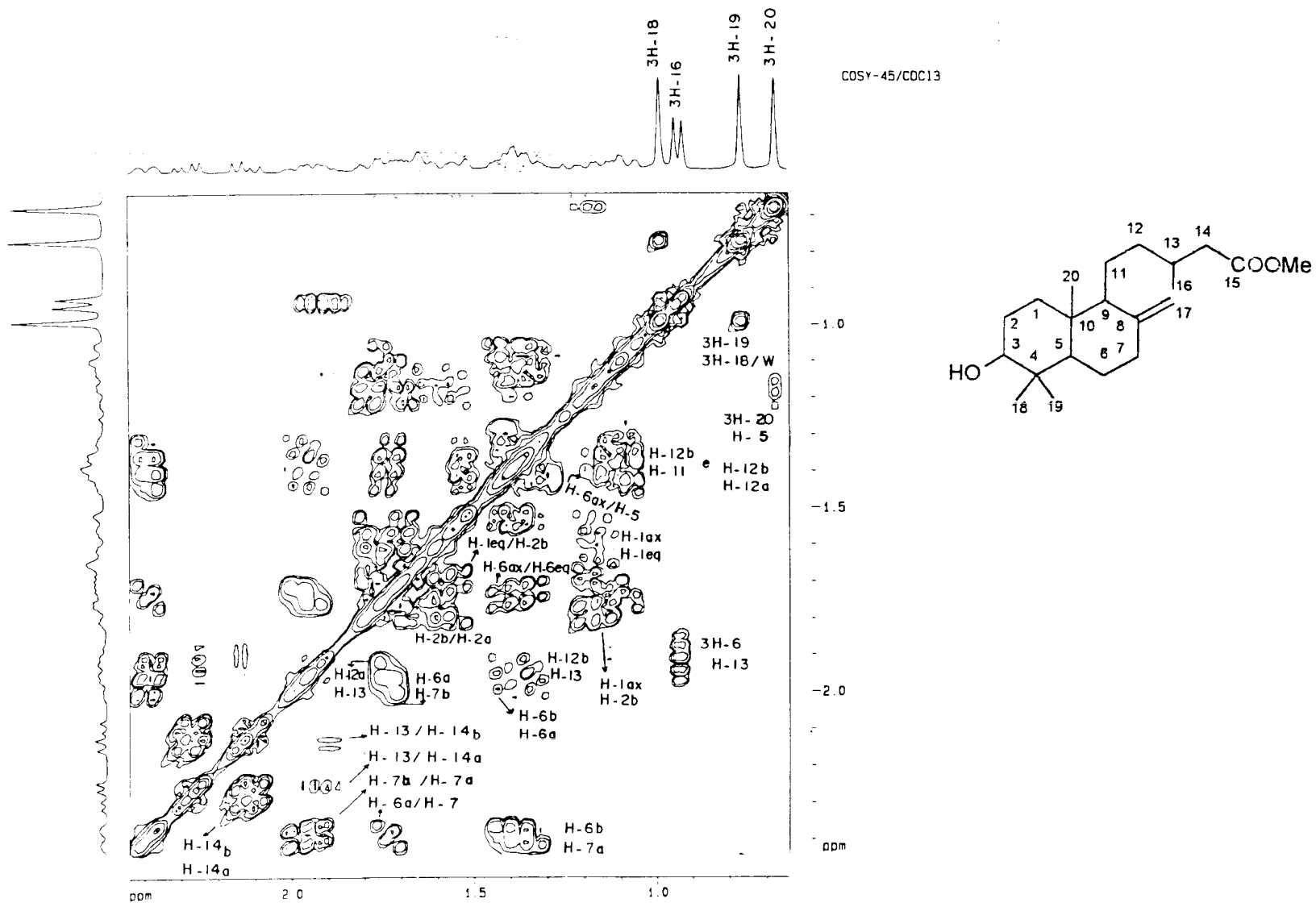


FIGURA 54A. Expansão das regiões entre 0-2.5 e 0-2.5 ppm no espectro bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio [$^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY] de 5a (300 MHz, CDCl_3).

TMS como referência interna

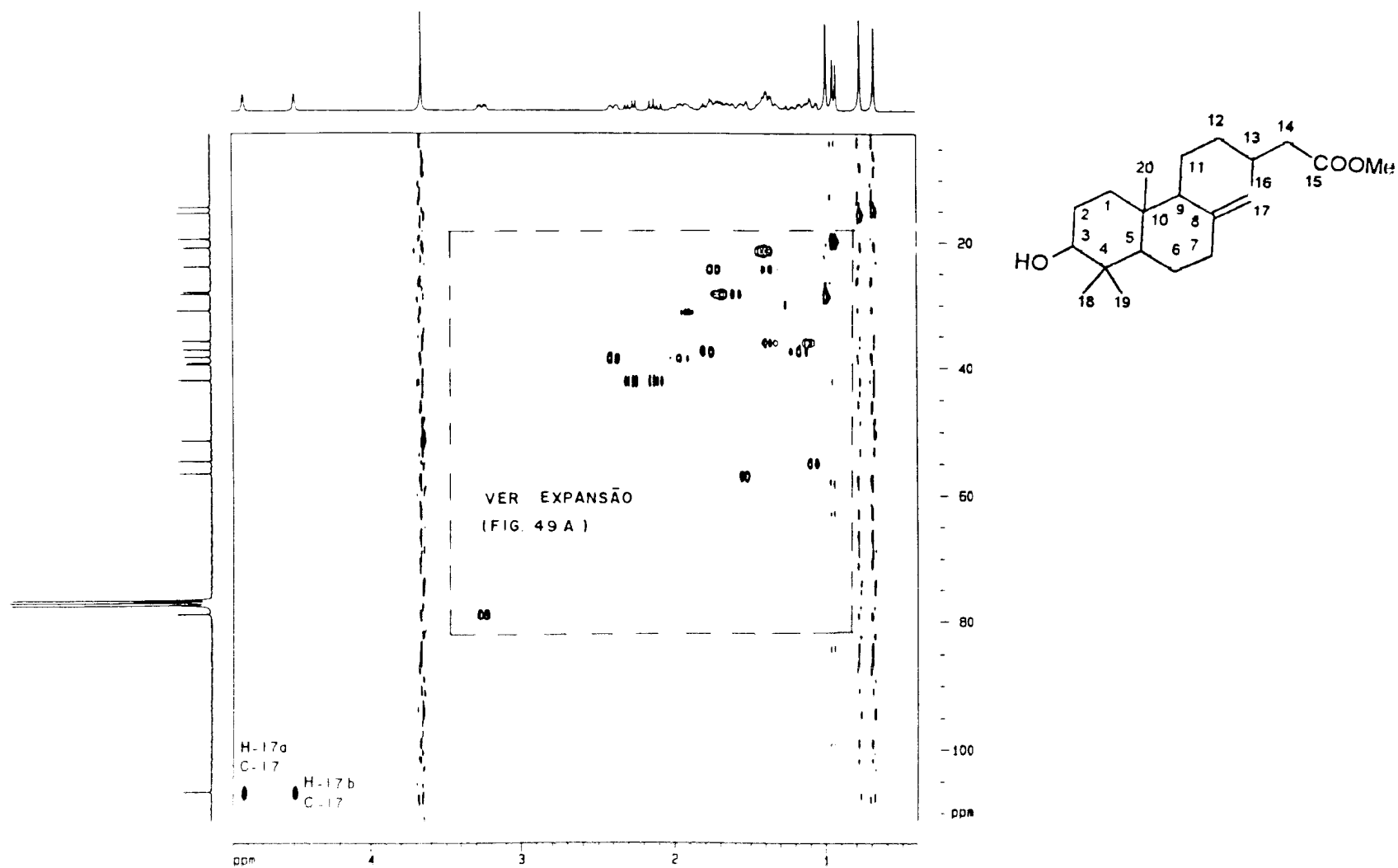


FIGURA 55. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 a uma ligação $[^1\text{H}\times^{13}\text{C-COSY-}^1\text{J}_{\text{CH}}=^1\text{H}\times^{13}\text{C-HMQC}]$ de 5a (300 MHz, CDCl_3), TMS como referência interna

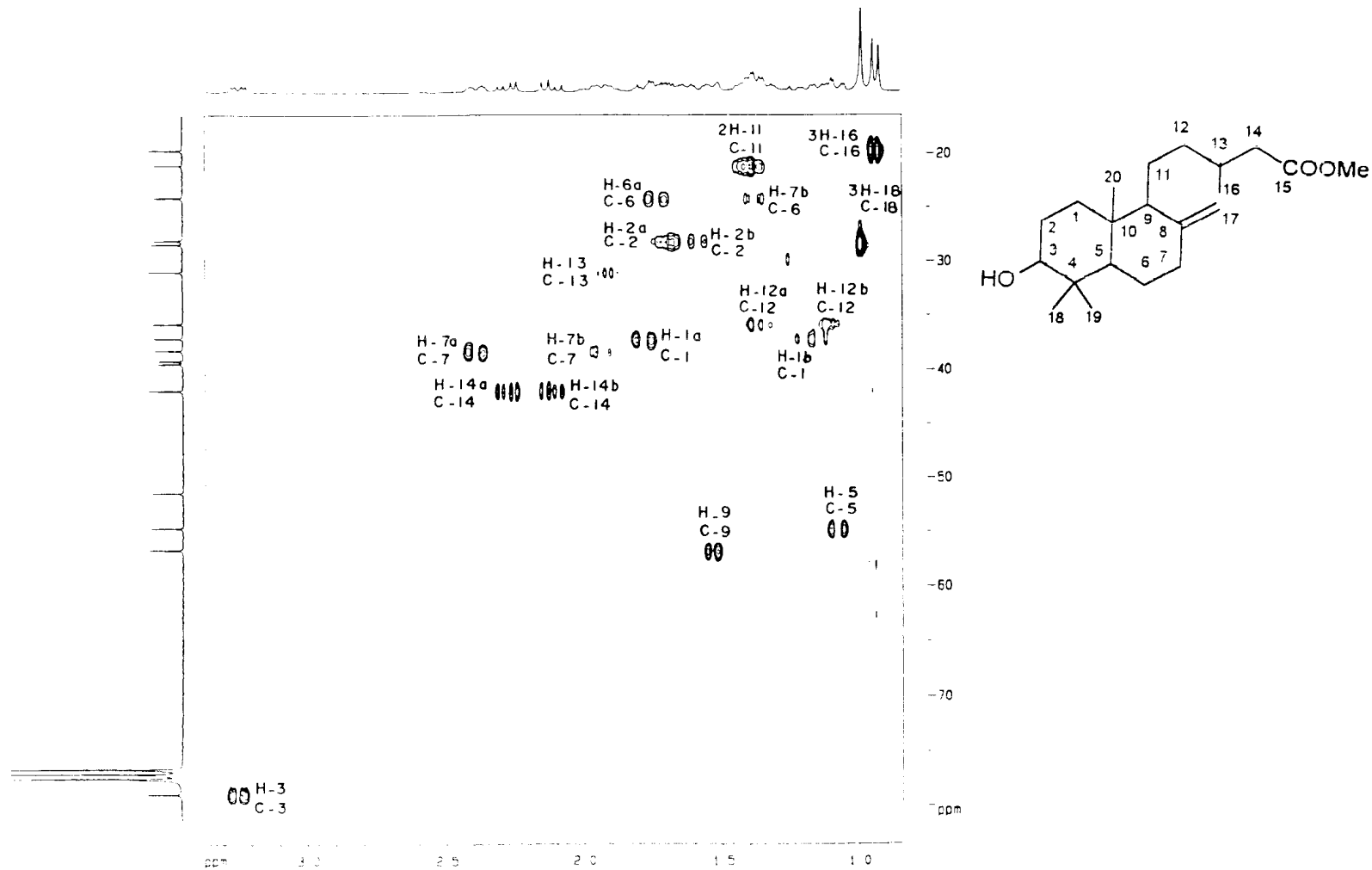


FIGURA 55A. Expansão das regiões entre 0.5-3.5 e 10-80 ppm no espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 a uma ligação [$^1\text{H}\times^{13}\text{C}\text{-COSY-}^1\text{J}_{\text{CH}} = ^1\text{H}\times^{13}\text{C}\text{-HMQC}$] de 5a (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

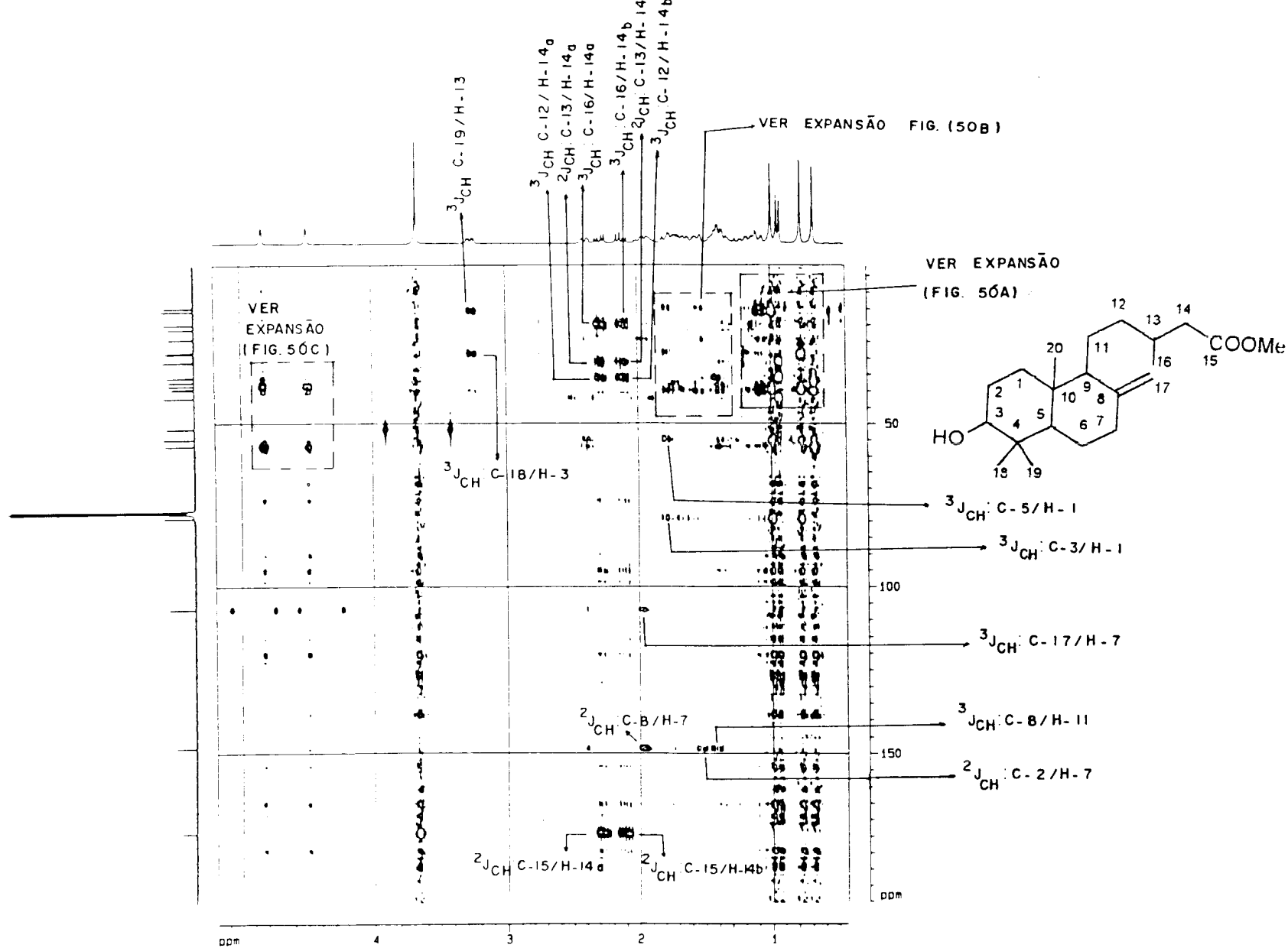


FIGURA 56. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 a longa distância [$^1\text{H}\times^{13}\text{C}\text{-COSY-}^n\text{J}_{\text{CH}} (n=2 \text{ e } 3)=^1\text{H}\times^{13}\text{C}\text{-HMBC}$] de 5a (300 MHz, CDCl_3).

TMS como referência interna

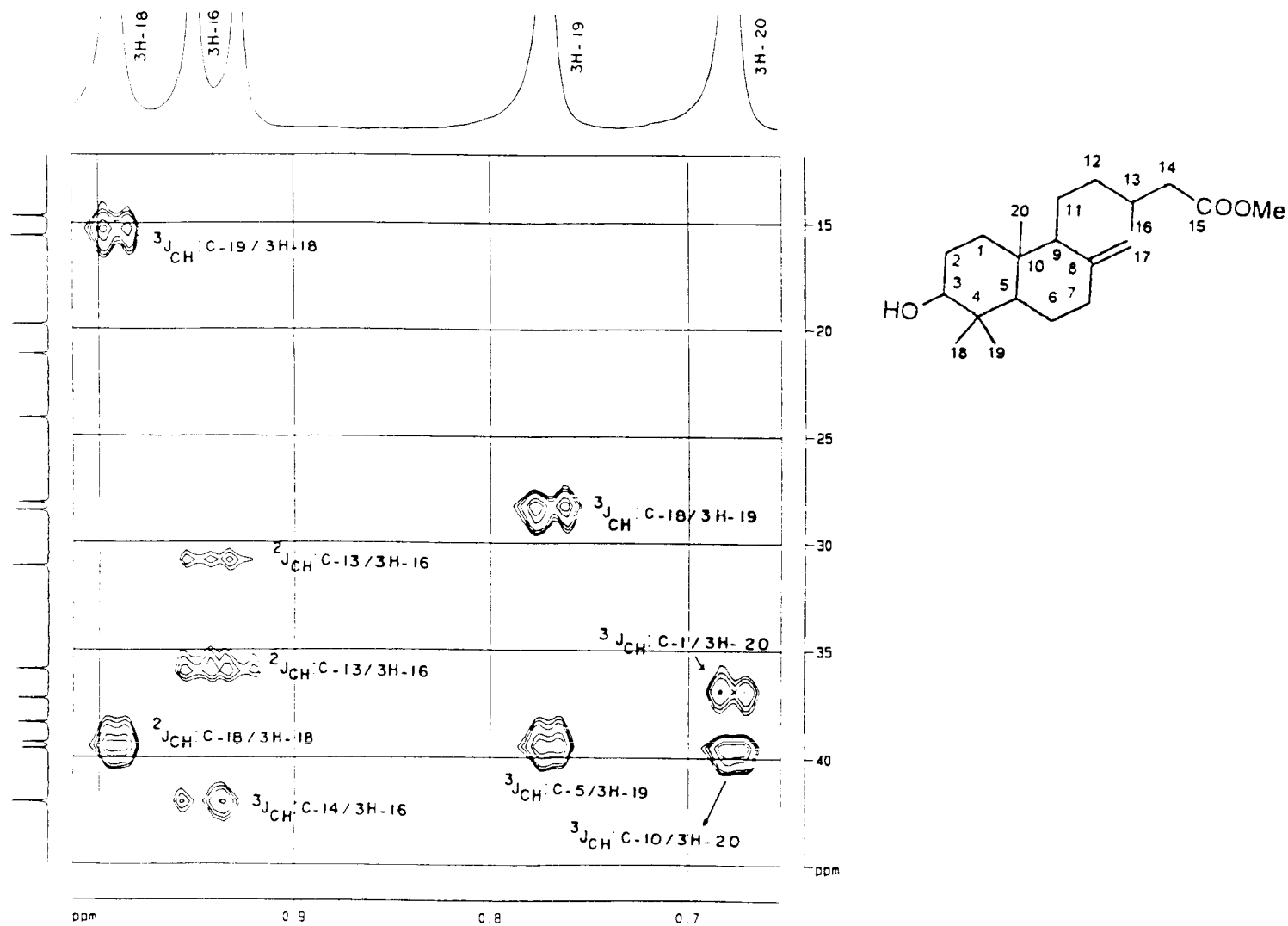


FIGURA 56A. Expansão das regiões entre 0.6-1.0 e 10-45 ppm no espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 a longa distância [$^1\text{H}\times^{13}\text{C}\text{-COSY-}^n\text{J}_{\text{CH}}\text{(n=2 e 3)=}^1\text{H}\times^{13}\text{C}\text{-HMBC}$] de 5a (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

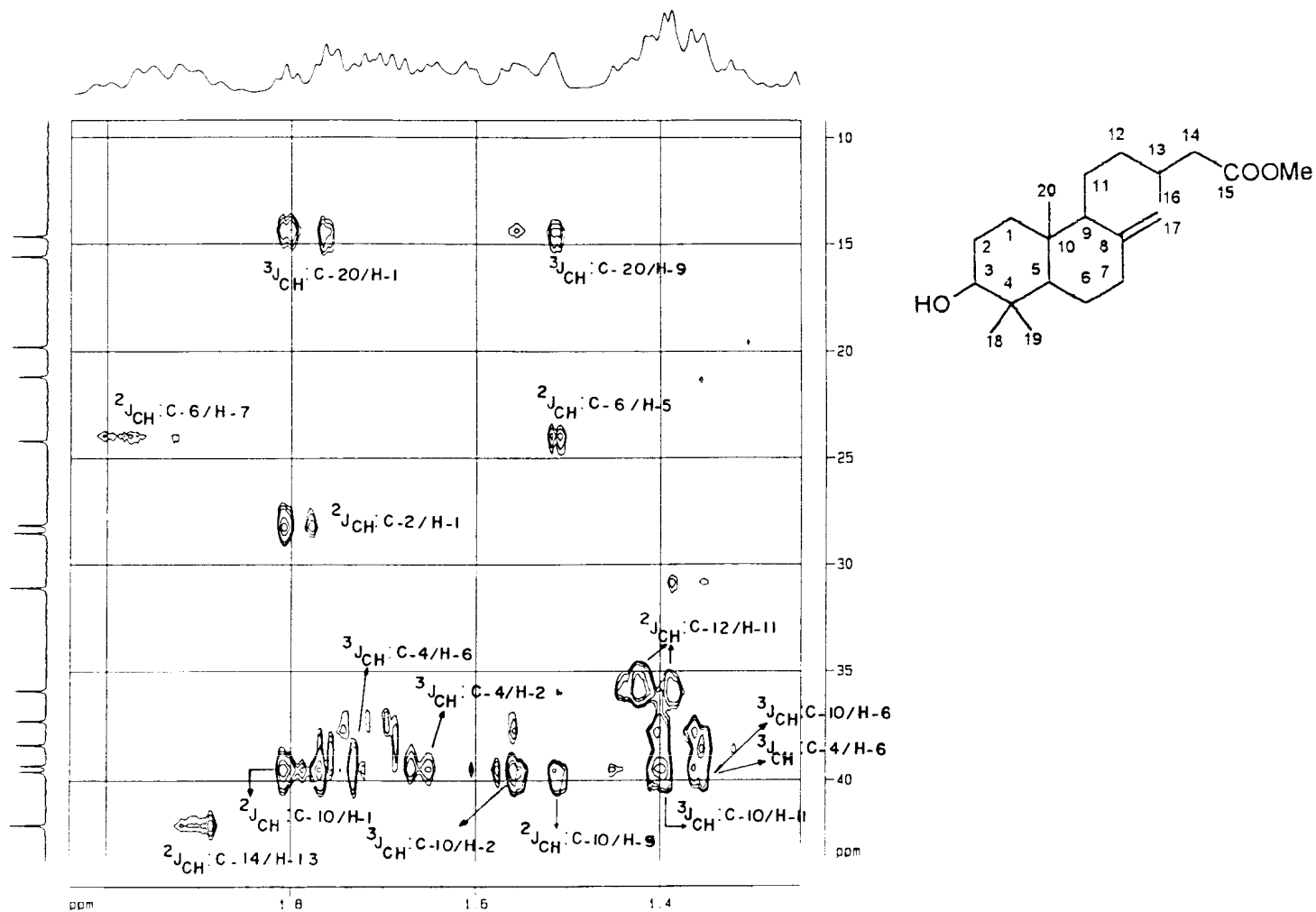


FIGURA 56B. Expansão das regiões entre 1.2-2.0 e 10-45 no espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 a longa distância

$[^1\text{H}\times^{13}\text{C}\text{-COSY-}^n\text{J}_{\text{CH}} (n = 2 \text{ e } 3) = ^1\text{H}\times^{13}\text{C}\text{-HMBC}]$ de 5a (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

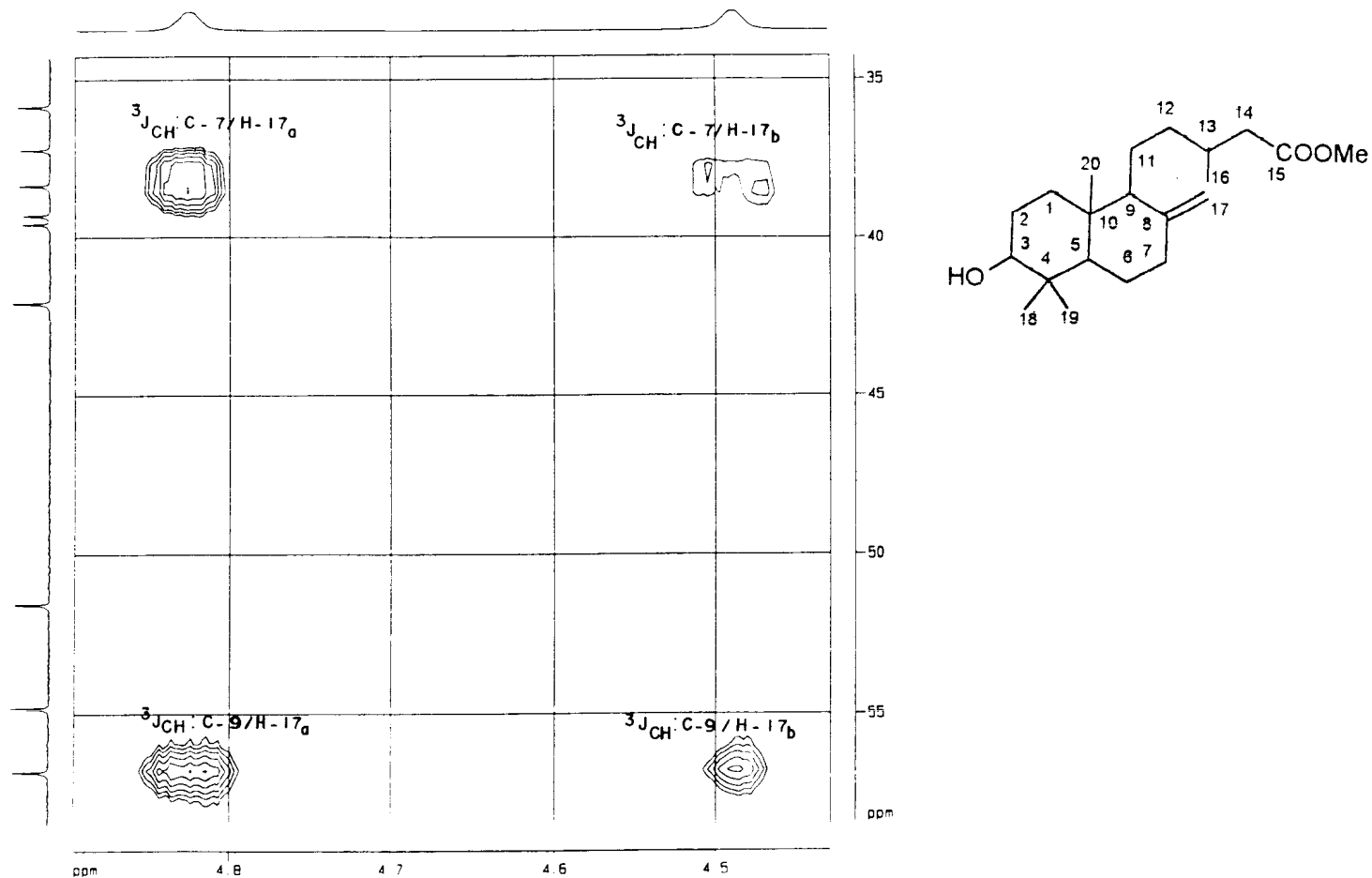


FIGURA 56C. Expansão das regiões entre 4.4-4.9 e 35-60 ppm no espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 a longa distância [$^1\text{H}\times^{13}\text{C}\text{-COSY-}^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e 3) = $^1\text{H}\times^{13}\text{C}\text{-HMBC}$] de 5a (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

TABELA XI

Dados espectrais (δ_H e δ_C) de RMN 1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) para o diterpeno 5a ($CDCl_3$), incluindo os resultados dos experimentos heteronucleares 2D HMQC ($^1Hx^{13}C$ -COSY- $^1J_{CH}$) e HMBC ($^1Hx^{13}C$ -COSY- $^nJ_{CH}$, n=2 e 3)*

C	HMQC		HMBC	
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
3	-	-		
4	39.14	-	H-3,3H-18, 3H-19	
8	148.13	-	H-7,H-9	H-11
10	39.41	-	3H-20,H-5,H-1	H-11
15	173.79	-	2H-14	MeO-15
CH				
3	79.24	3.25 (<i>dd</i> , J = 4.1 e 11.7)	H-2	3H-18,3H-19,H-1
5	54.99	1.08 (<i>dd</i> , J = 12.5 e 2.0)		H-1,3H-18, 3H-19,3H-20
9	57.00	1.54	H-11	2H-17,3H-20
13	31.25	1.92	2H-14,3H-16	
CH₂				
1	37.44	1.79 1.17 (<i>dt</i> , J = 13.2 e 3.8)		3H-20
2	28.31	1.68 / 1.57	H-1	

Continuação...

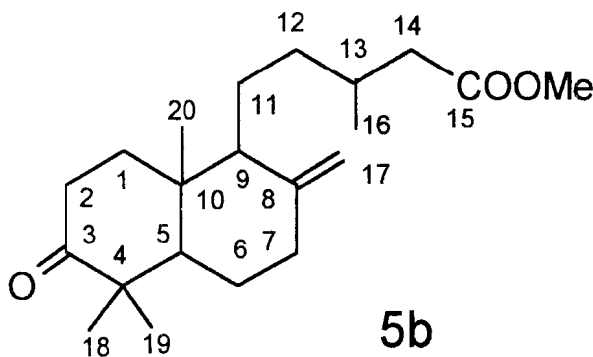
6	24.36	1.74 / 1.36	H-7a,H-5,	
7	38.55	2.39 (<i>dl</i> , J = 12.5)		2H-17
		1.96 (<i>dt</i> , J = 12.5 e 5.1)		
11	21.36	1.42		
12	36.07	1.36 / 1.12	H-11	2H-14,3H-16
14	42.25	2.28 (<i>dd</i> , J = 6.2 e 14.6)	H-13	
		2.12 (<i>dd</i> , J = 8.0 e 14.6)		3H-16
17	107.02	4.82 (<i>sl</i>) / 4.49 (<i>sl</i>)		H-7
CH₃				
16	19.88	0.94 (<i>d</i> , J = 6.6)		2H-14
18	28.68	0.99 (<i>s</i>)		H-3,3H-19
19	15.77	0.77 (<i>s</i>)		H-3,3H-18
20	14.84	0.68 (<i>s</i>)		H-1,H-9
MeO-15	51.75	3.65 (<i>s</i>)		

* Deslocamento químico (δ) e constante de acoplamento (J em Hz, entre parênteses) obtidos do espectro RMN ^1H uni-dimensional. Multiplicidade dos sinais dos carbonos foram deduzidas pela análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C [PND e DEPT ($\theta = 90^\circ$ e 135°)]. RMN bi-dimensional ^1H - ^1H -COSY também foi usado para estes assinalamentos.

4.1.5.2 Obtenção de 3-oxolabd-8(17)-en-15-oato de metila (5b)

A oxidação da hidroxila em C-3 de 5a com reagente de Jones ofereceu como produto final da reação, após purificação em coluna de gel de sílica e na forma de um óleo incolor, o 3-oxolabd-8(17)-en-15-oato de metila (5b).

Os espectros de RMN ^1H {1D [Fig. 57] (pág. 139) e 2D $^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY [Fig. 58] (pag. 141) mostraram ausência de sinais na faixa de absorção de hidrogênio carbinólico. Este dado juntamente com o espectro de massas de baixa resolução [Fig. 59] (pág. 143), que apresentou íon molecular m/z 334 $[\text{M}]^{++}$ compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_3$, serviram como confirmação adicional da estrutura molecular do diterpeno 5b. As fragmentações correspondentes aos principais picos que aparecem no espectro de massas estão propostas resumidamente no Esquema 14 (pág. 144).



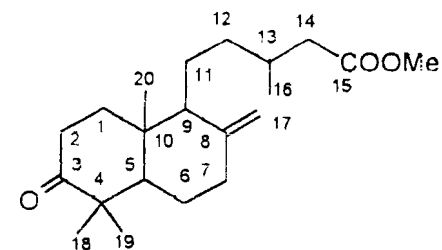
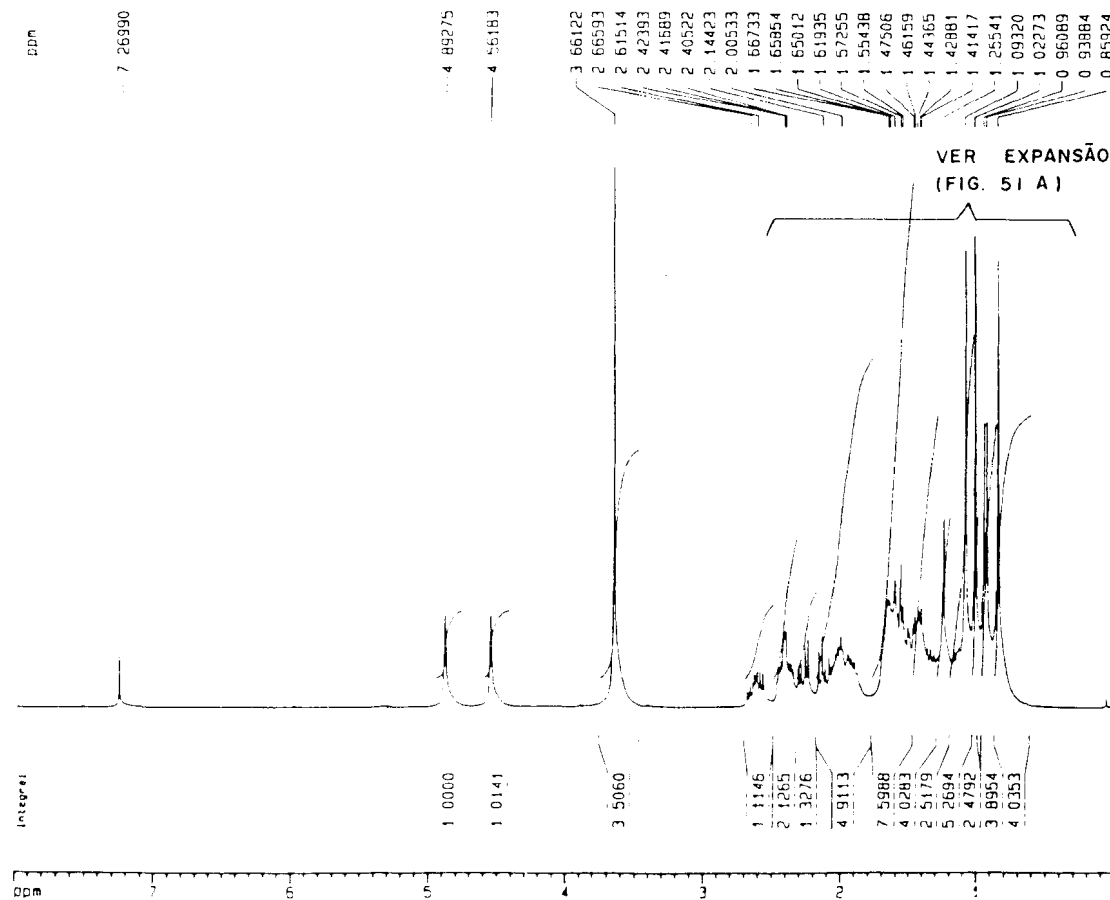


FIGURA 57. Espectro de RMN ^1H de 5b (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

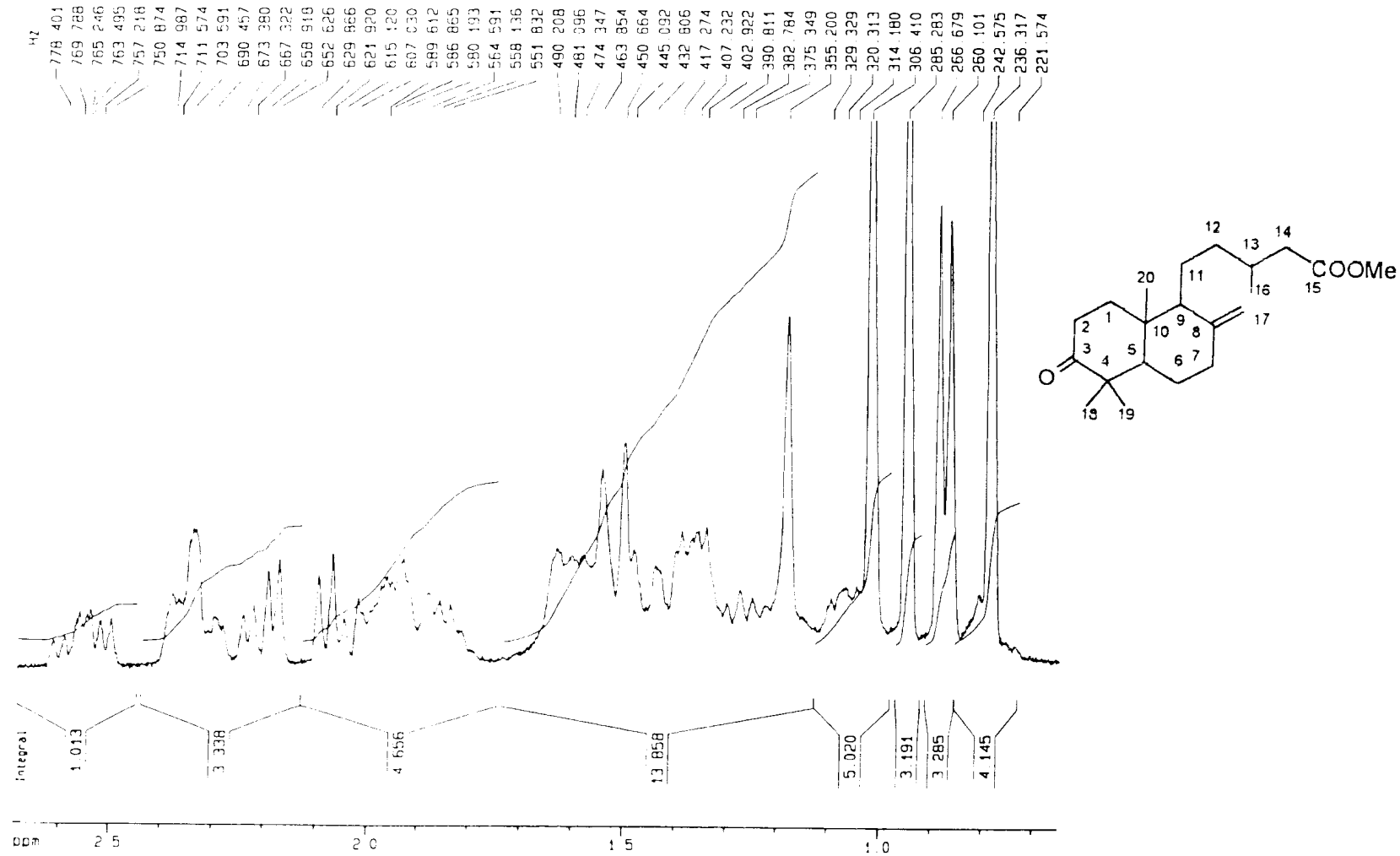


FIGURA 57A. Expansão da região entre 0-2.1 no espectro de RMN ¹H de 5b (300 MHz, CDCl₃). TMS como referência interna

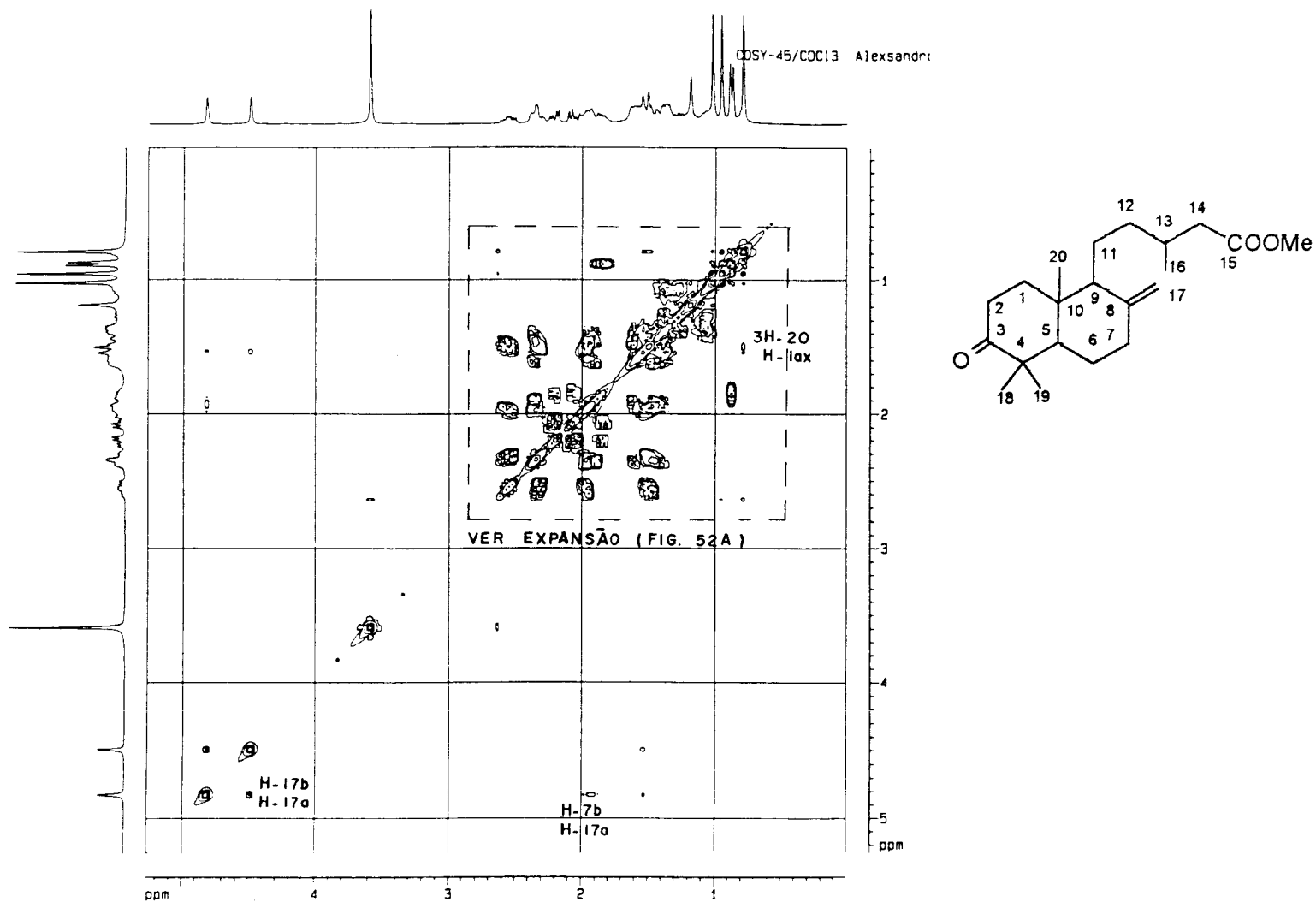


FIGURA 58. Espectro bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio [$^1\text{H}_x^1\text{H}$ -COSY] de 5b (300 MHz, CDCl_3). TMS como referência interna

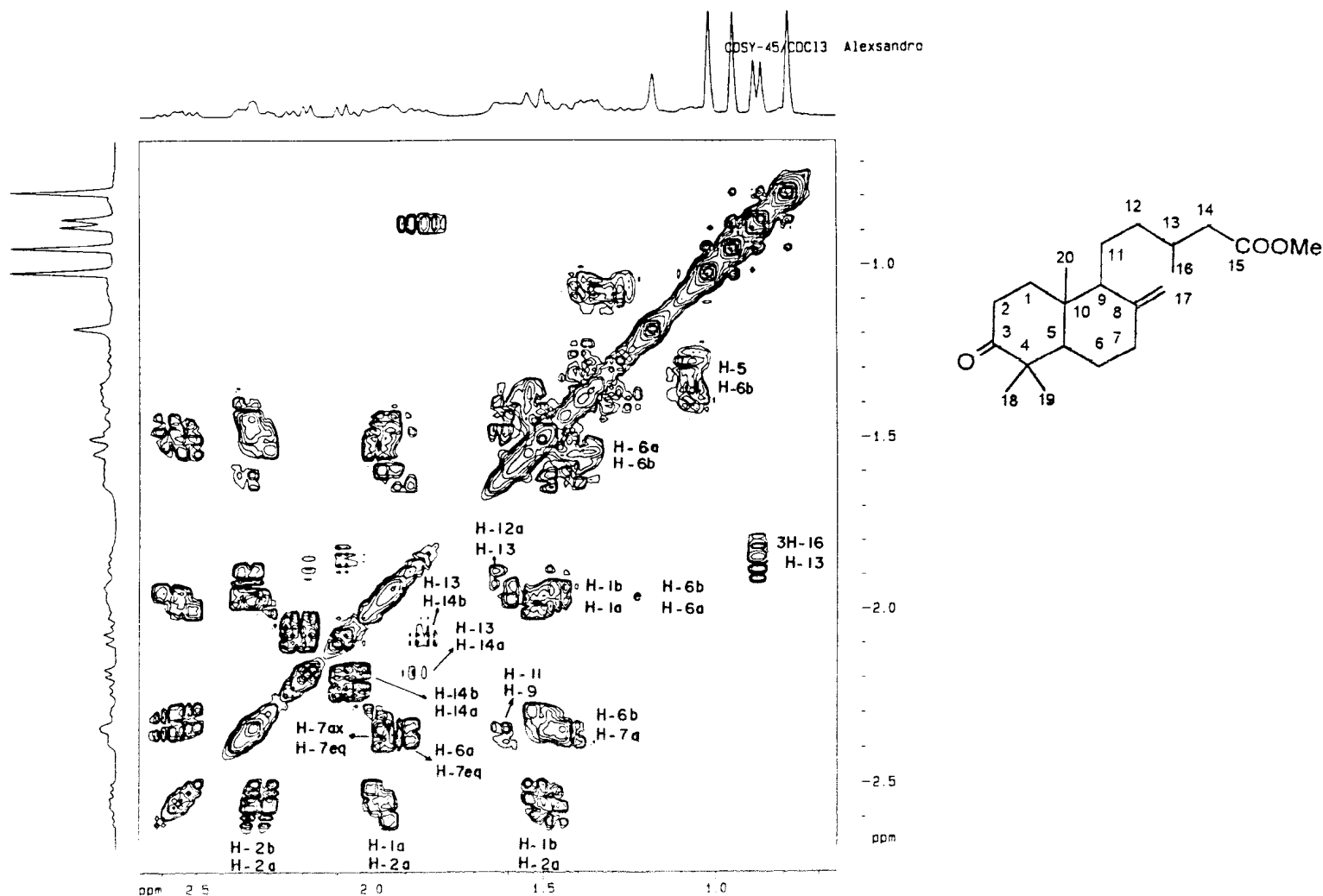
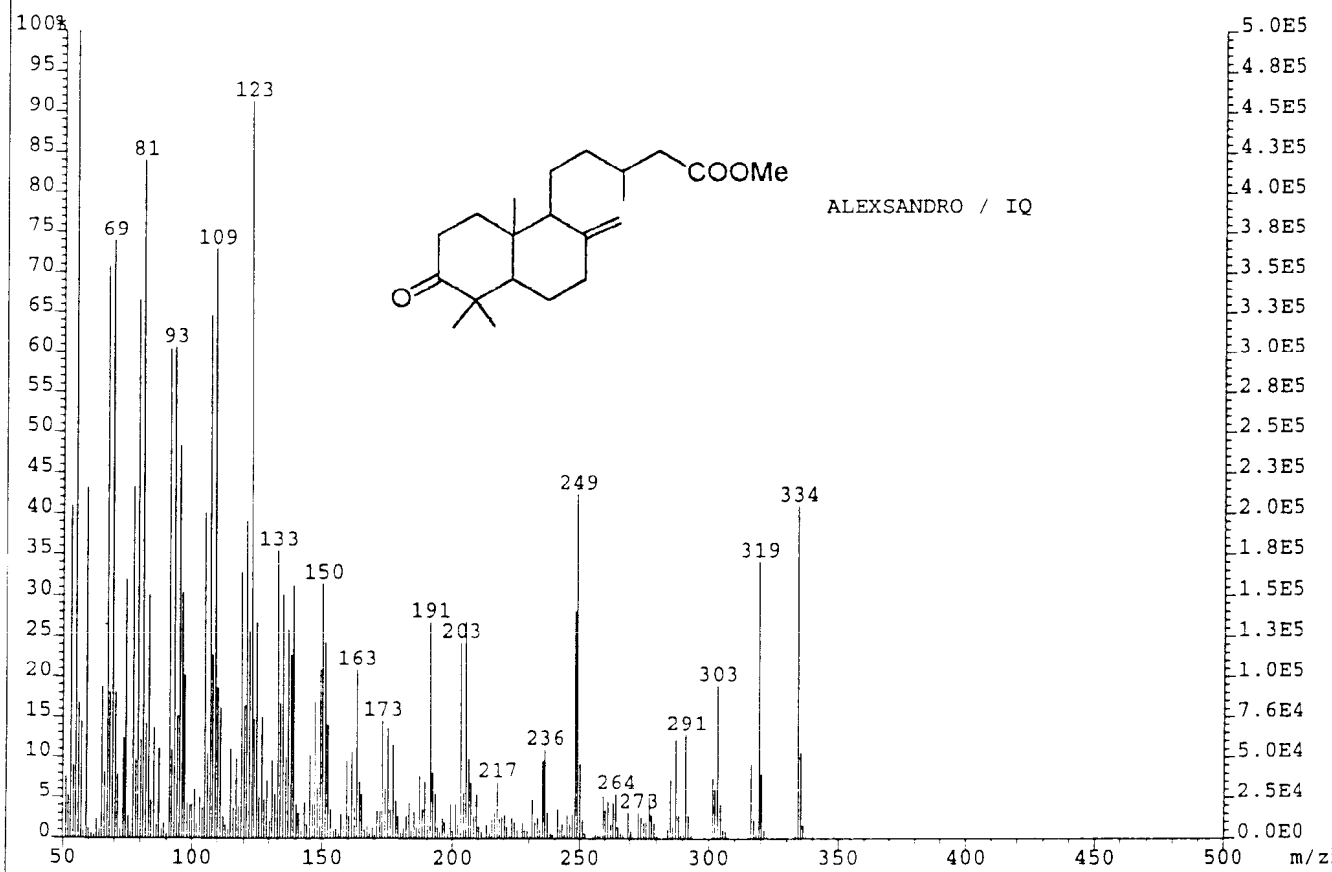


FIGURA 58A. Expansão das regiões entre 0-2.6 e 0-0.6 ppm no espectro Espectro bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio [$^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY] de 5b (300 MHz, CDCl_3).

TMS como referência interna

File:CRIS5-28-8 Ident:763-748 Win 100PPM Acq:28-AUG-1996 10:54:07 Cal:PKR28-8_1
AutoSpecQ EI+ Magnet BpM:55 BpI:503526 TIC:13779534 Flags:HALL

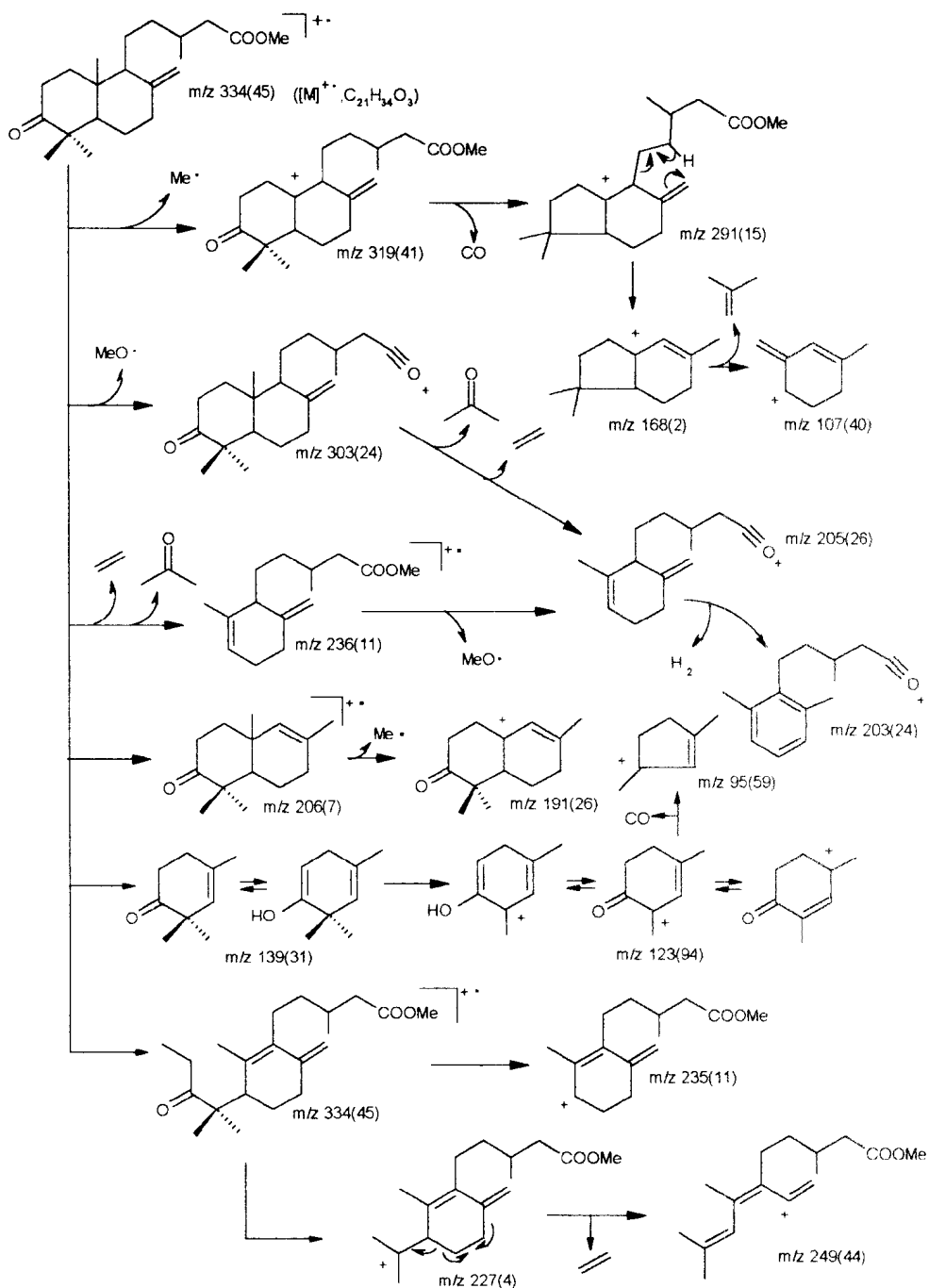


NUCLEO DE PESQUISAS DE PRODUTOS NATURAIS
CENTRAL ANALITICA
LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS

FIGURA 59. Espectro de Massas de 5b obtido por impacto de elétrons (70 eV)

ESQUEMA 14

Prováveis caminhos de fragmentação para justificar os principais picos registrados no espectro de massas de 5b



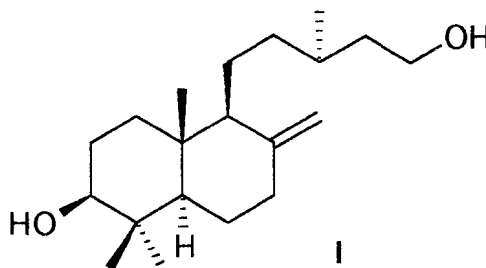
4.1.6 Análise da estereoquímica do diterpeno 5

A estereoquímica relativa do diterpeno labdânico (5) foi determinada por RMN através do experimento homonuclear 2D $^1\text{Hx}^1\text{H}$ -NOESY dos derivados metilado 5a [Fig. 60] (pag. 147) e oxidado 5b [Fig. 61] (pag. 149).

Os picos transversais indicaram interações dipolares entre H-17a [δ_{H} 4.82 (*sl*)] e H-7eq [δ_{H} 2.39 (*dl*, $J = 12.5$ Hz)], H-17b [δ_{H} 4.49(*sl*)] e 2H-11 (δ_{H} 1.42), H-9 (δ_{H} 1.54) e H-5 (δ_{H} 1.08), 3H-19 (δ_{H} 0.77) com H-2ax (δ_{H} 1.57) e 3H-20 (δ_{H} 0.68) Outros acoplamentos dipolares deduzidos do espectro homonuclear 2D $^1\text{Hx}^1\text{H}$ -NOESY de 5a estão sumarizados na Tabela XII (pag. 151). A configuração relativa do diterpeno ácido 3 β -hidroxilabd-8(17)-en-15-óico (5) e as demais interações dipolares observadas no espectro $^1\text{Hx}^1\text{H}$ -NOESY de 5a estão mostradas no Esquema 15 (pag. 152).

O diterpeno 3 β -hidroxilabd-8(17)-en-15-óico foi isolado, até o momento, de *Araucaria imbricata*⁷³, uma espécie de conífera encontrada na América do Sul e Austrália. Chandra *et al* propõe, neste artigo, a estereoquímica relativa *trans* entre os anéis do diterpeno natural 3 β -hidroxilabd-8(17)-en-15-ol {[α]_D + 29° (*c* 0.6, CHCl₃)} e revela que a sua dispersão óptica rotatória é similar à exibida pelo ácido 3 β -hidroxilabd-8(17)-en-15-óico {éster metílico: [α]_D + 52° (*c* 0.5, CHCl₃)}.

Recentemente, foi publicado⁷⁴ a síntese total enantiosseletiva em 14 etapas, do diol **I** $\{[\alpha]_D + 27.7^\circ (c\ 0.63, \text{CHCl}_3)\}$ definindo, através da comparação entre as rotações óticas, a configuração absoluta (13*S*) do diterpeno natural.



A rotação ótica do diterpeno 3β-hidroxiabd-8(17)-en-15-óico (**5**), isolado de *Vellozia graminifolia* apresentou $[\alpha]_D - 28.3^\circ (c\ 1.00, \text{CHCl}_3)$.

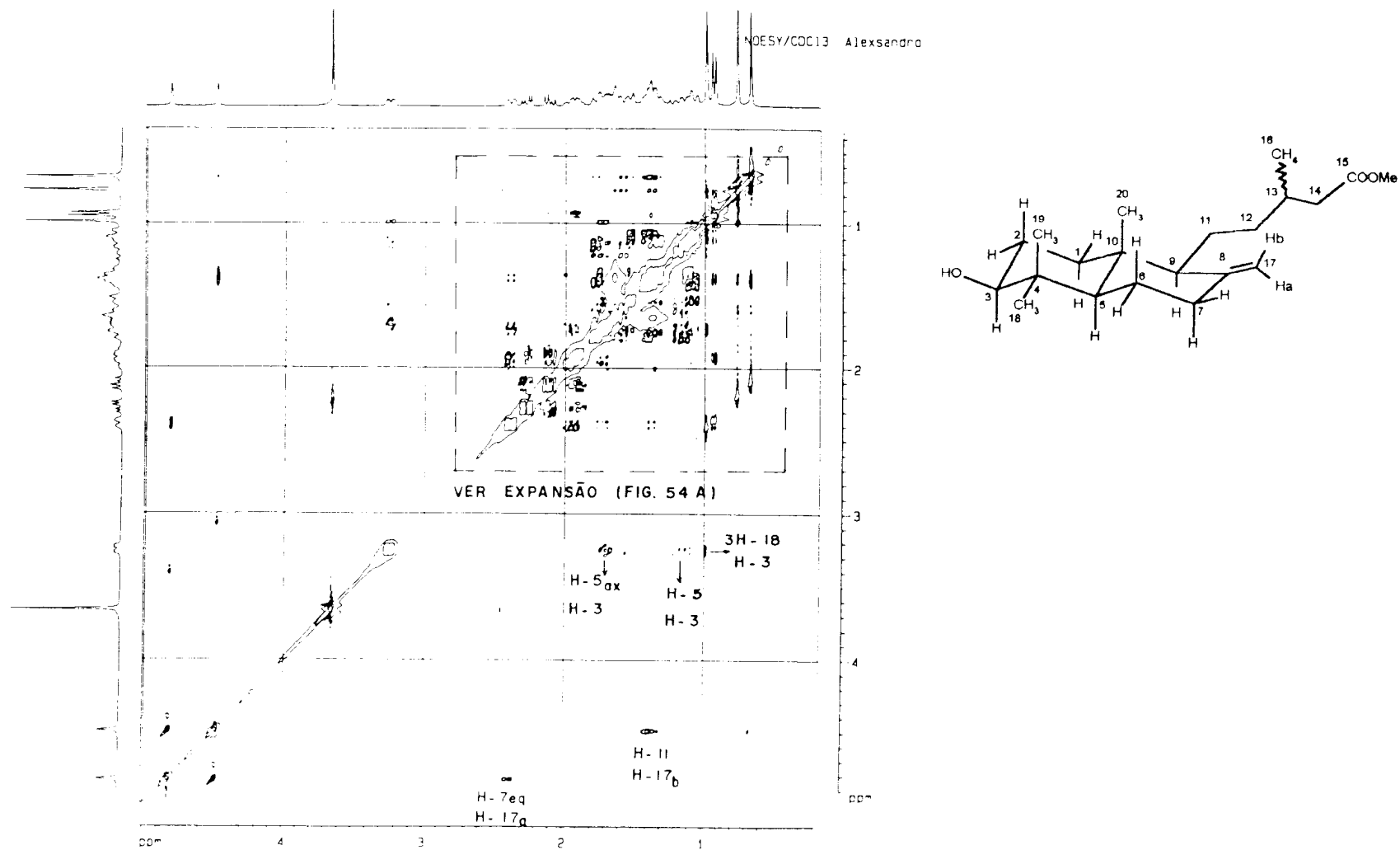


FIGURA 60. Espectro bidimensional de correlação homonuclear dipolar [¹Hx¹H-NOESY] de 5a (300 MHz, CDCl₃). TMS como referência interna

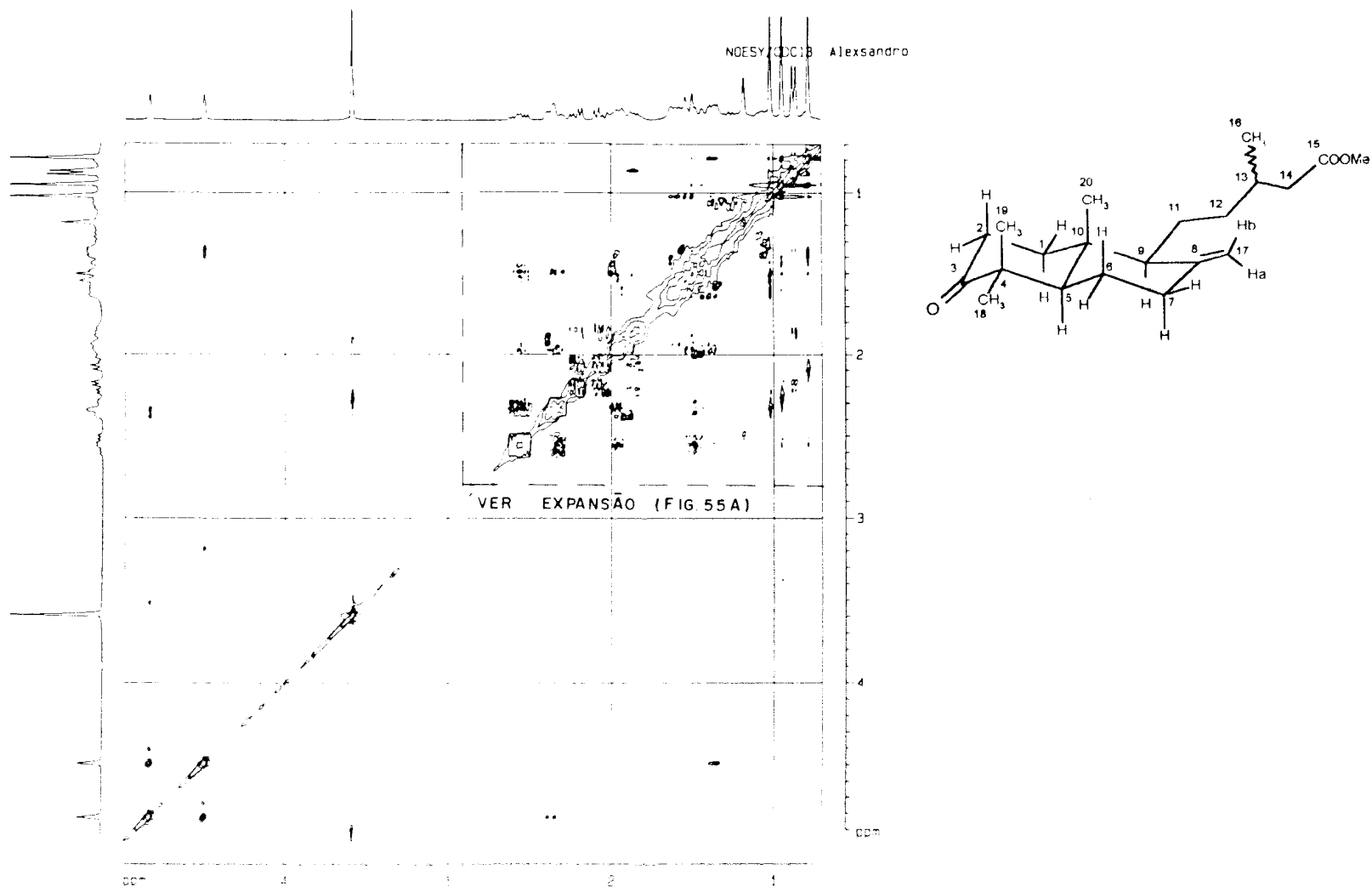


FIGURA 61. Espectro bidimensional de correlação homonuclear dipolar [¹Hx¹H-NOESY] de 5b (300 MHz, CDCl₃). TMS como referência interna

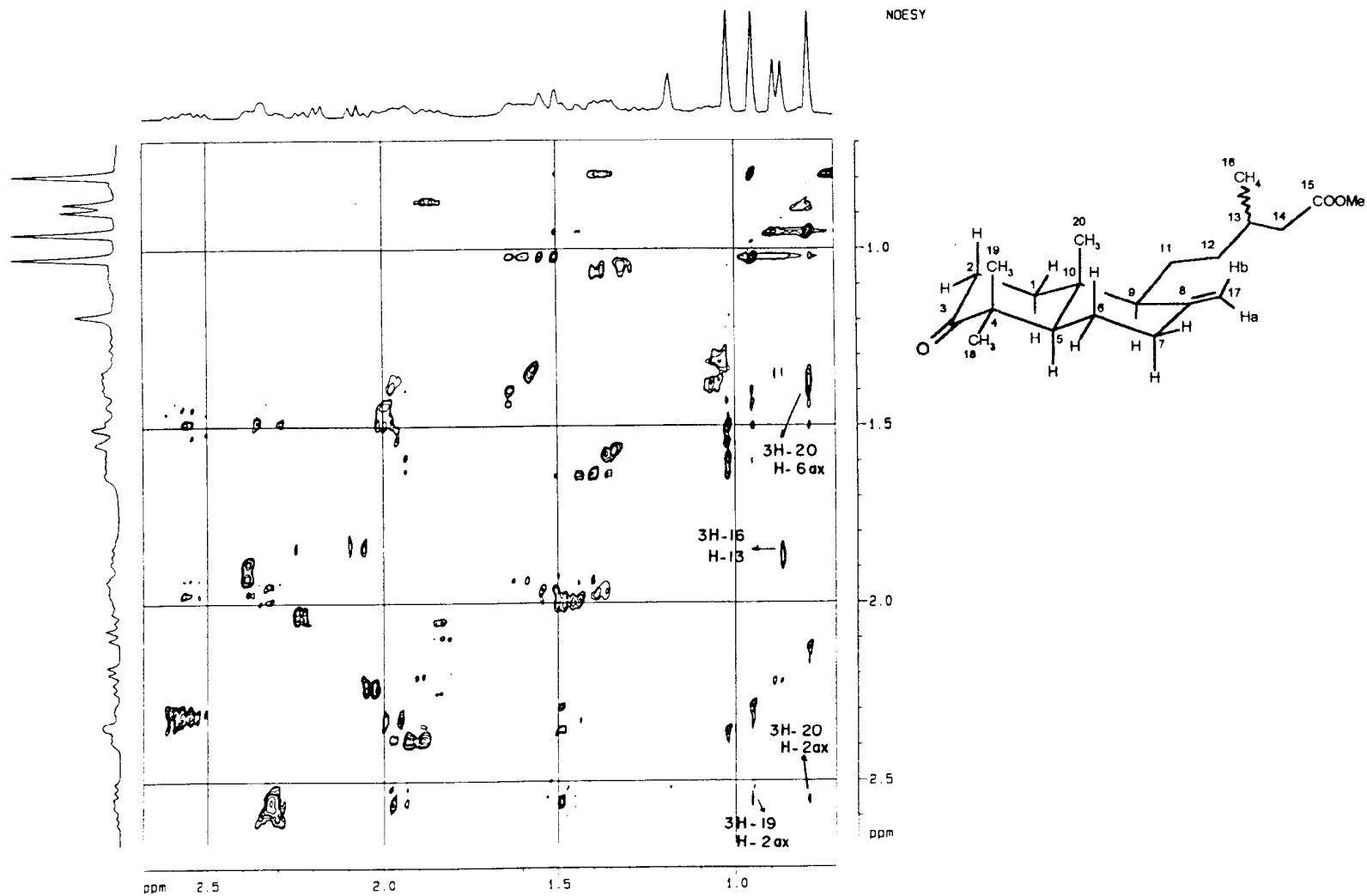
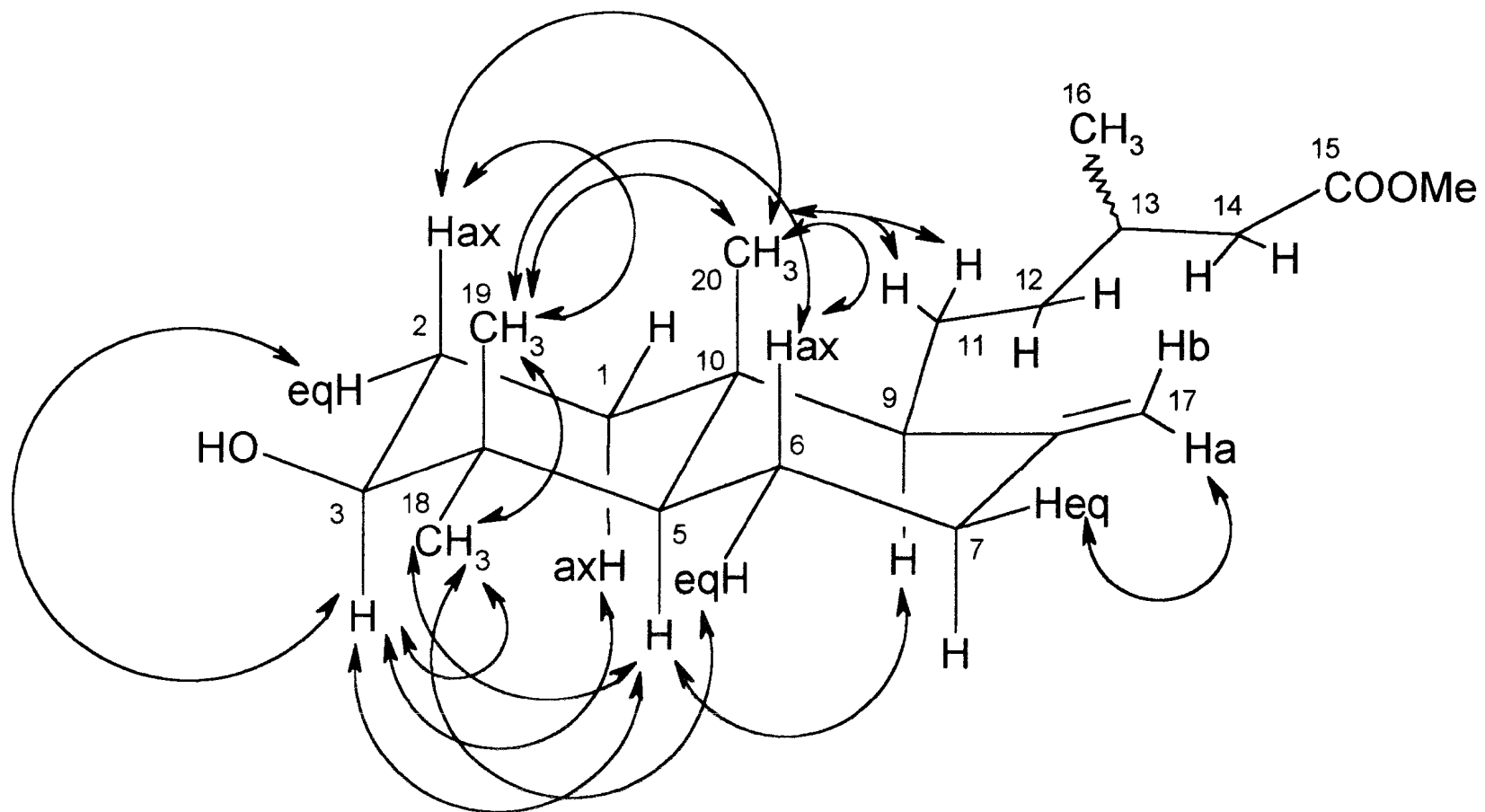


FIGURA 61A. Expansão das regiões entre 0-2.6 e 0-2.6 ppm no espectro bidimensional de correlação homonuclear dipolar [$^1\text{H}\times^1\text{H}$ -NOESY] de 5b (300 MHz, CDCl_3).
TMS como referência interna

TABELA XII

Dados de $^1\text{H}\times^1\text{H}$ -NOESY [acoplamento dipolar] para o diterpeno 5a
(300 MHz, CDCl_3 , δ).

H	δ_{H}	H	δ_{H}
17a	4.82	7eq	2.39
17b	4.49	11	1.42
3	3.25	2eq	1.68
		1ax	1.17
		5	1.08
		18	0.99
9	1.54	5	1.08
18	0.99	6 eq	1.74
		5	1.08
		19	0.77
19	0.77	2ax	1.57
		6ax	1.36
		18	0.99
		20	0.68
20	0.68	2ax	1.57
		6ax	1.36
		11	1.42
		19	0.77



ESQUEMA 15

Configuração relativa e interações dipolares observadas no espectro homonuclear 2D $^1\text{Hx}^1\text{H}$ -NOESY de 5a

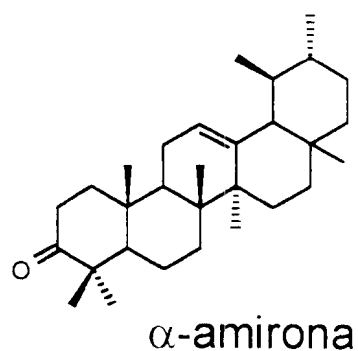
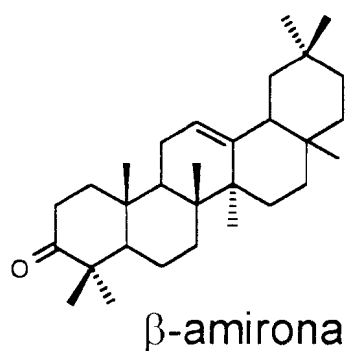
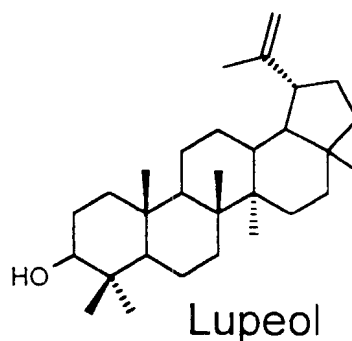
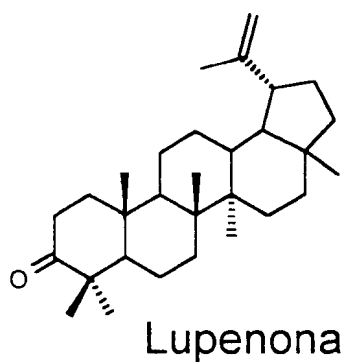
4.2 Análise de triterpenos no extrato hexânico de *Vellozia graminifolia* por CGAR-EM

A CGAR-EM tem sido usada, nas últimas três décadas, como uma importante ferramenta na elucidação estrutural de triterpenóides⁷⁵. O trabalho de Djerassi *et al*⁷⁶, publicado em 1963 sobre o padrão de fragmentação de triterpenos pentacíclicos (oleananos e ursanos), marca o início de uma série de outros trabalhos utilizando a mesma técnica para identificação desta classe de compostos. Recentemente, Shiojima *et al*⁷⁷ publicou o estudo da fragmentação de mais de cem, entre saturados e insaturados, triterpenos pentacíclicos pertencentes a diversos esqueletos.

Assim, o extrato hexânico de *Vellozia graminifolia* foi fracionado (ver item 5.3) (pag. 167) antes de ser analisado por CGAR-EM. Este procedimento foi adotado porque o extrato bruto já havia sido analisado anteriormente⁷⁸ e porque o extrato apresentou considerável presença de substâncias graxas, o que congestionava o cromatograma.

A análise por CGAR [Fig. 62] (pag. 155) desta fração mostrou uma série de compostos. Os espectros de massas, obtidos por CGAR-EM [Fig. 63] (pag. 156), continuam sugerindo considerável presença de hidrocarbonetos lineares ($[M]^+$ - 29, $[M]^+$ - 43, $[M]^+$ - 57, $[M]^+$ - 71 ...). A presença de triterpenos pentacíclicos nesta fração foi escassa. Os três primeiros cromatogramas apresentados na Figura 63

(Pág. 161) sugerem, pelos íons moleculares e fragmentações características, a presença de compostos pertencentes a esta classe. O estudo descrito no item 4.2 (Pág. 35), deste trabalho, confirmam esta análise através da identificação dos seguintes triterpenos pentacíclicos:



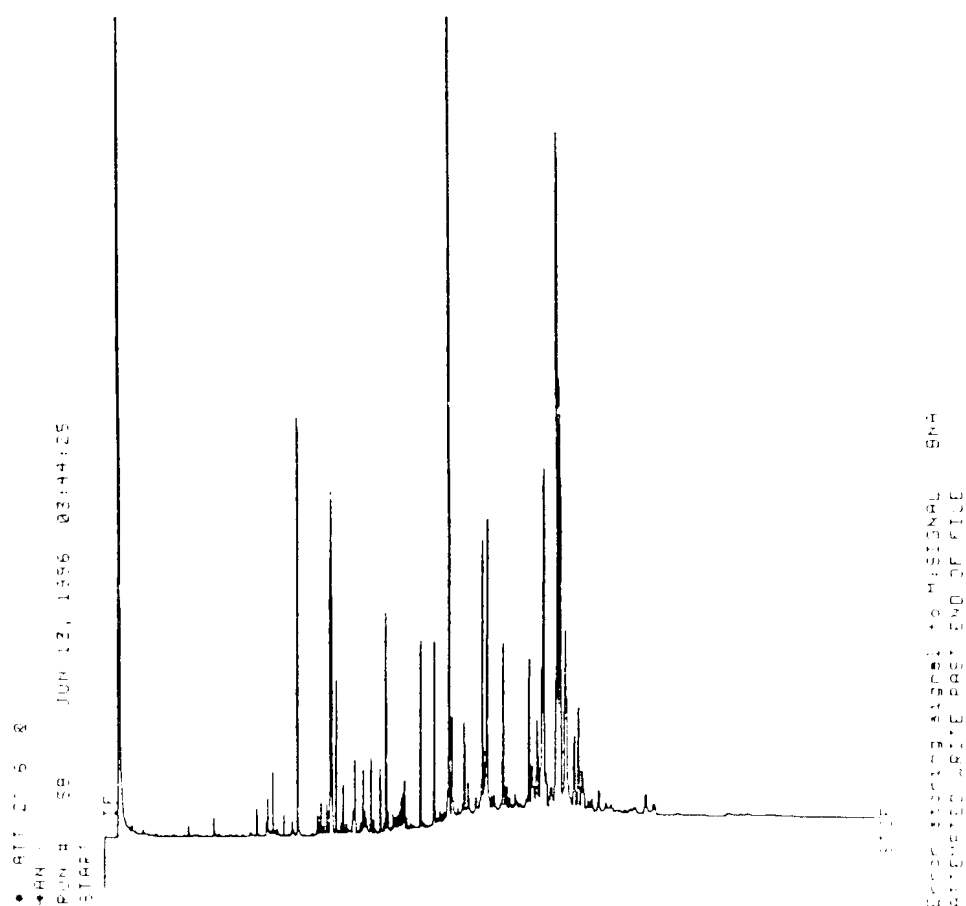


FIGURA 62. Cromatograma do extrato hexânico de *Vellozia graminifolia*.

Análise obtida por CGAR

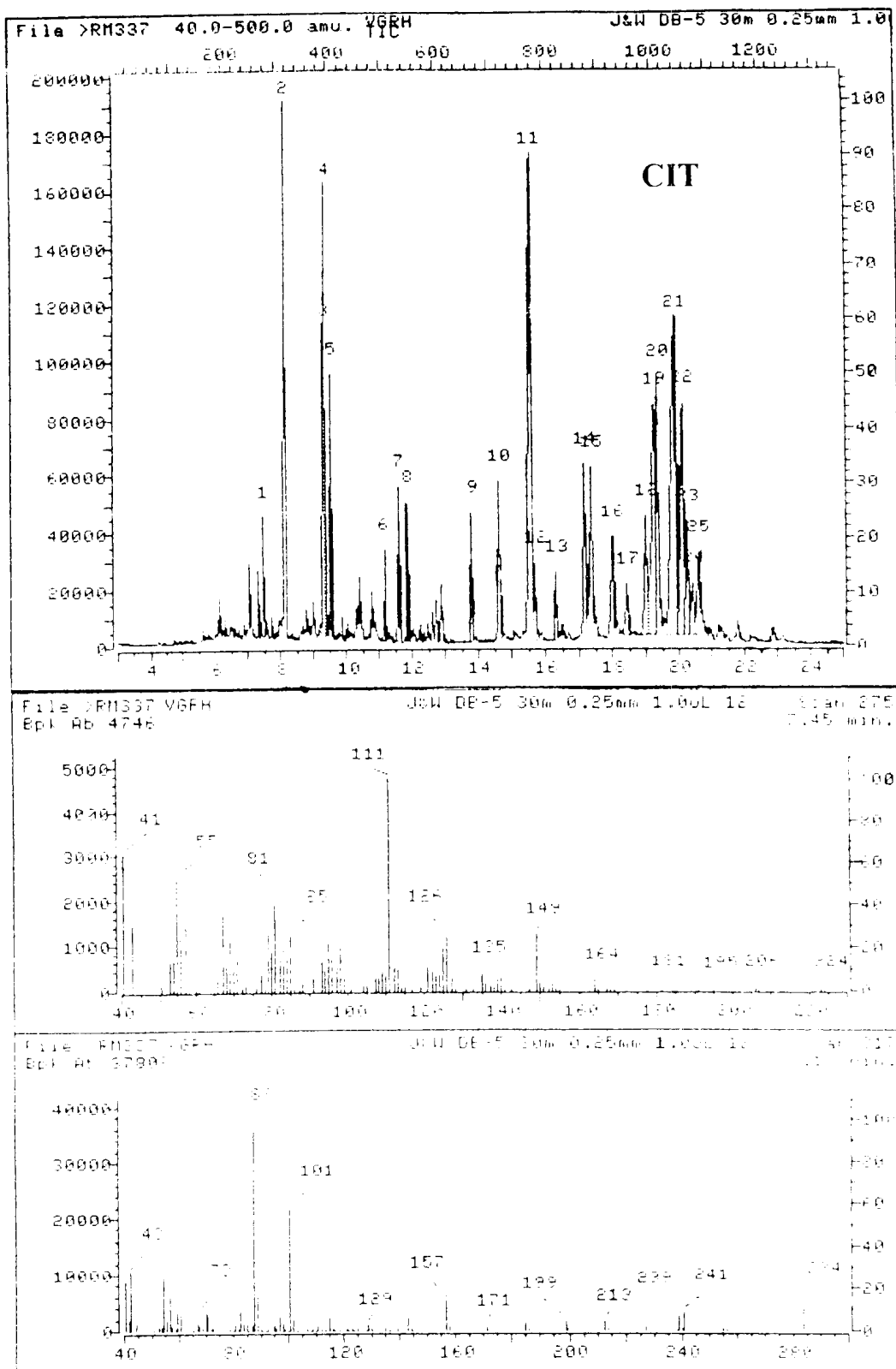
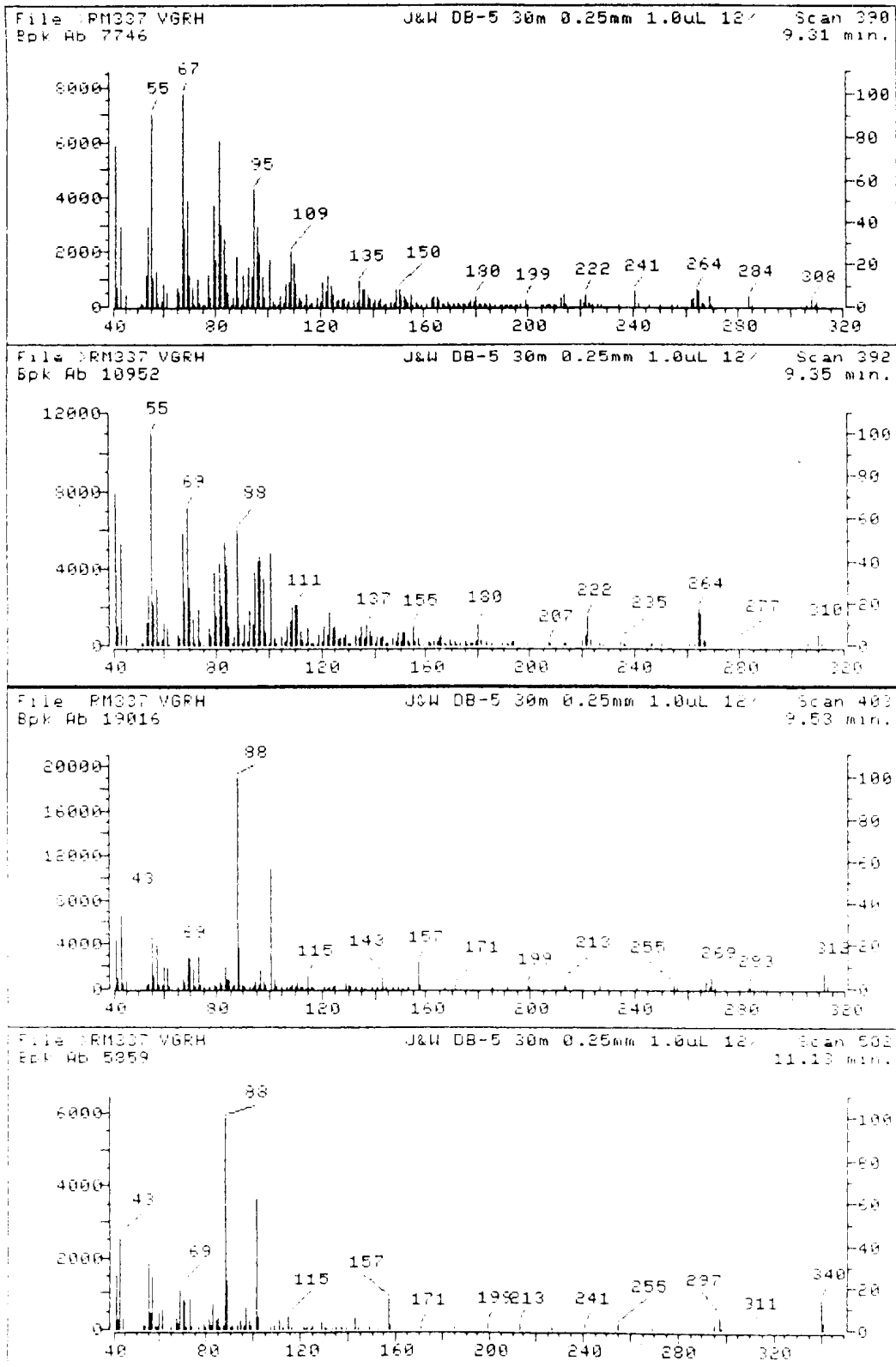
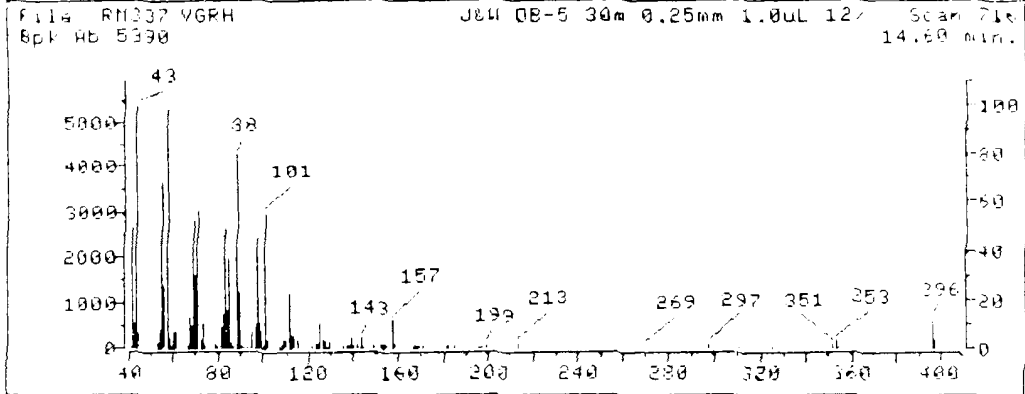
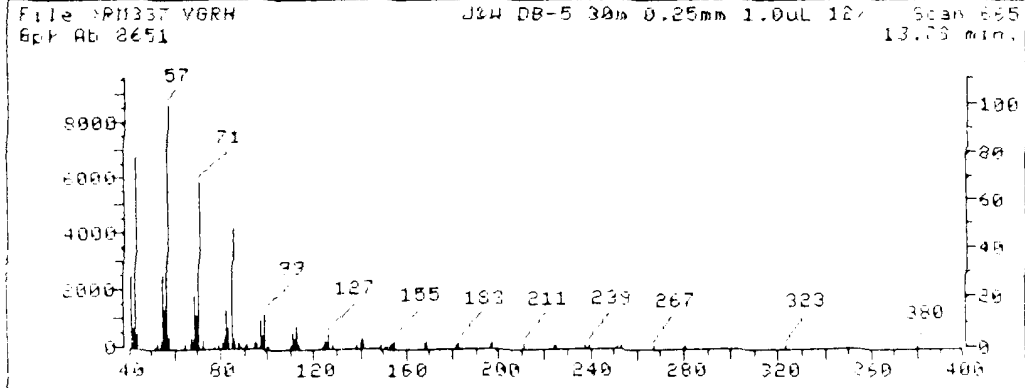
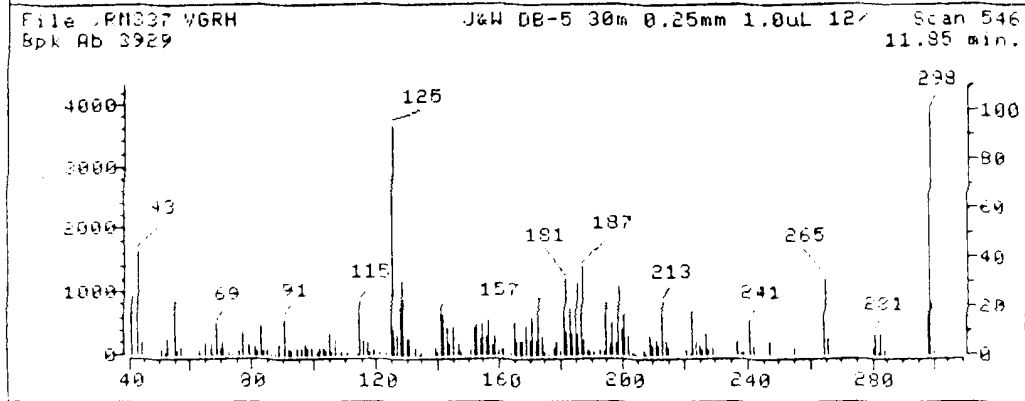
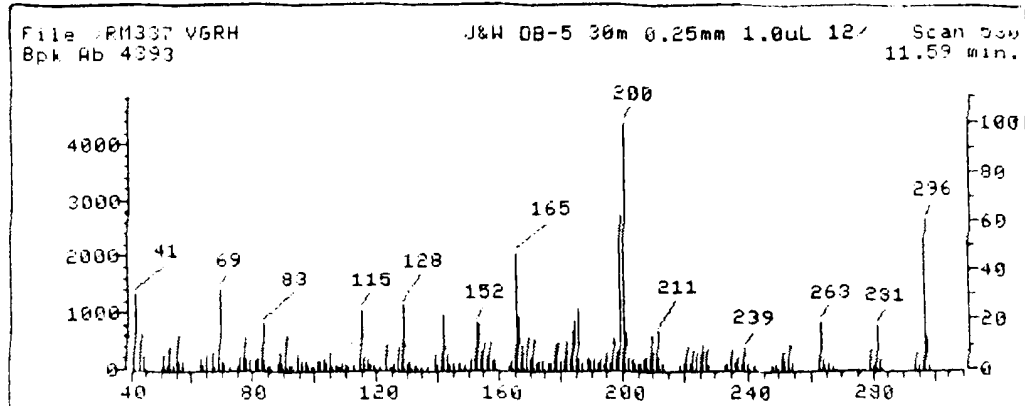


FIGURA 63. Cromatograma de íons totais (CIT) e espectros de massas do extrato hexânico de *Vellozia graminifolia*
Análise obtida por CGAR-EM-C

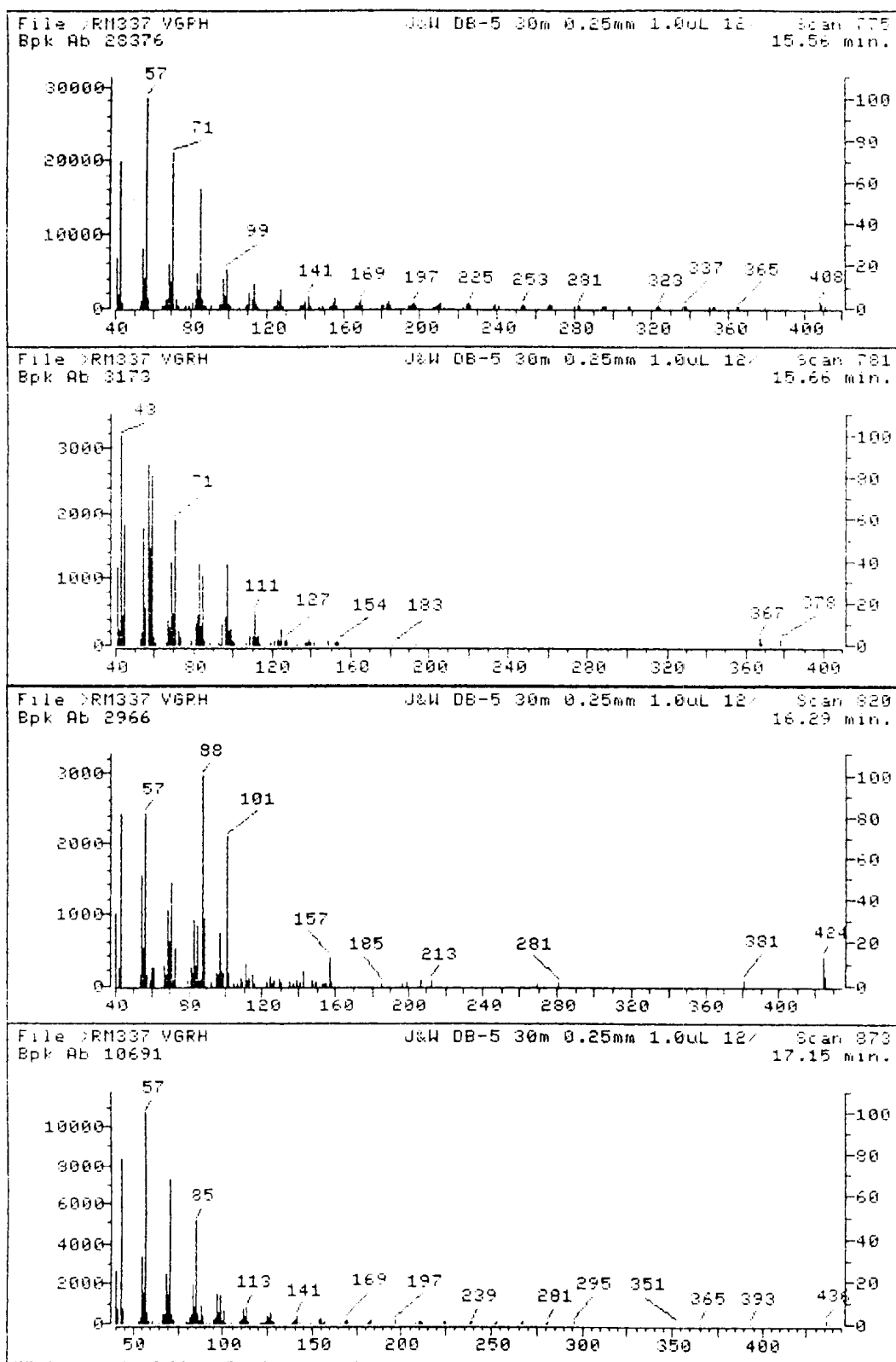
Continuação...



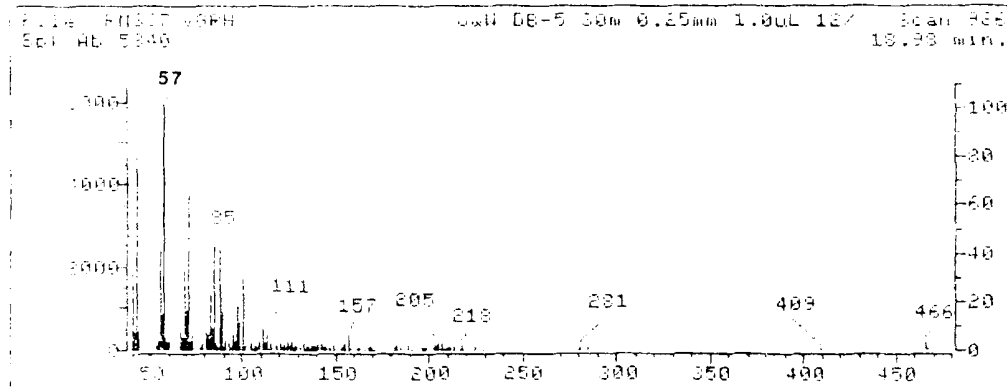
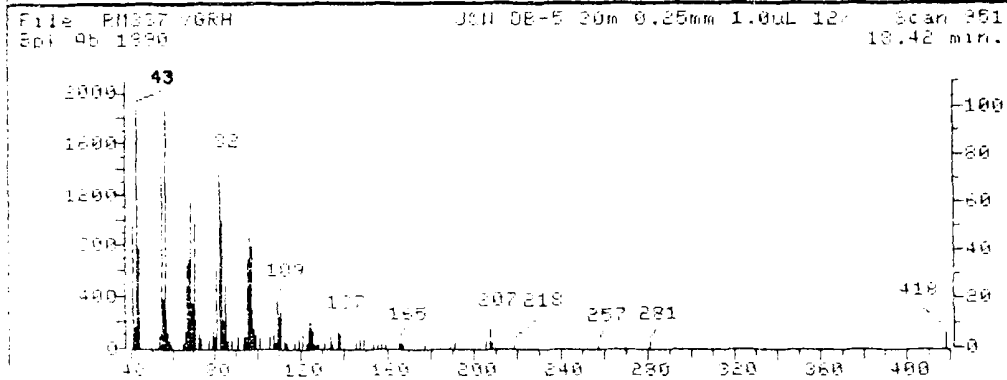
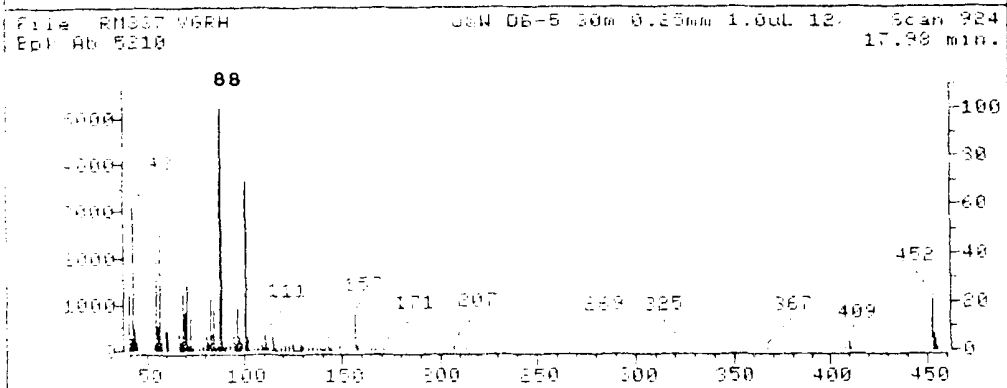
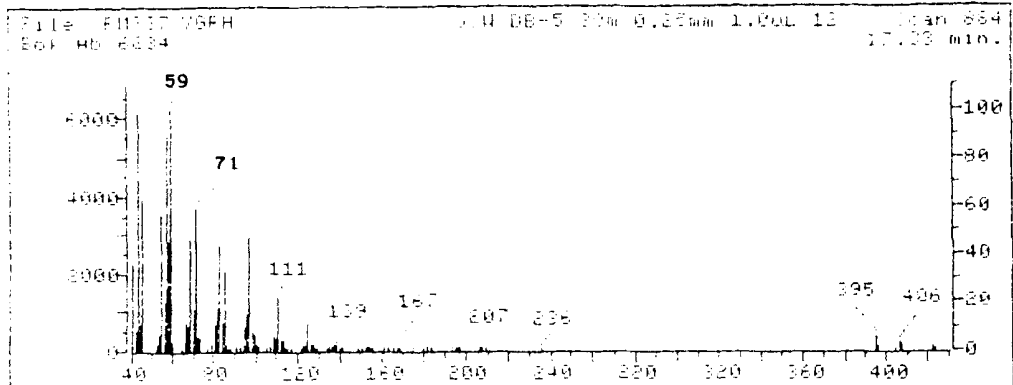
Continuação...



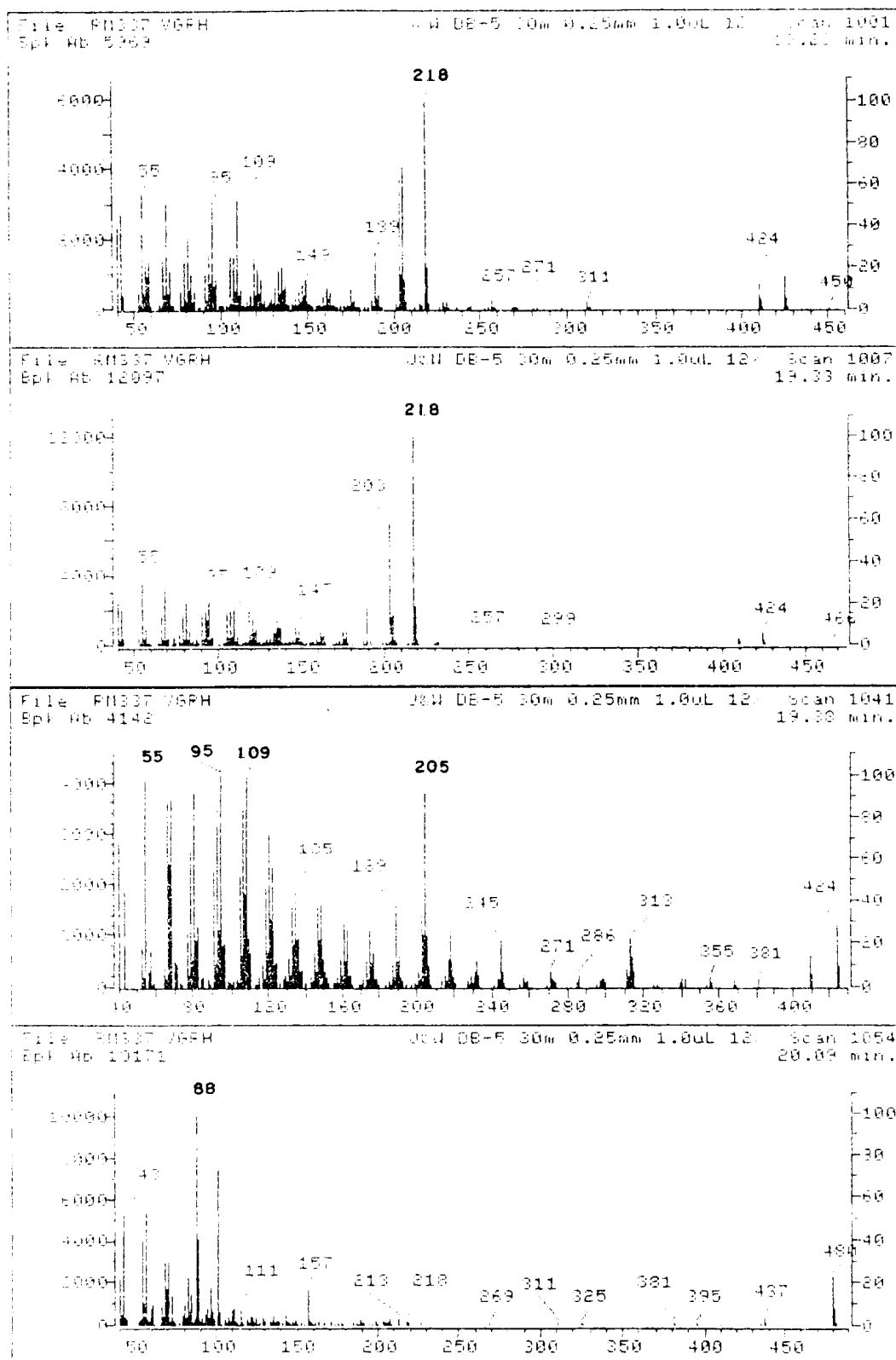
Continuação...



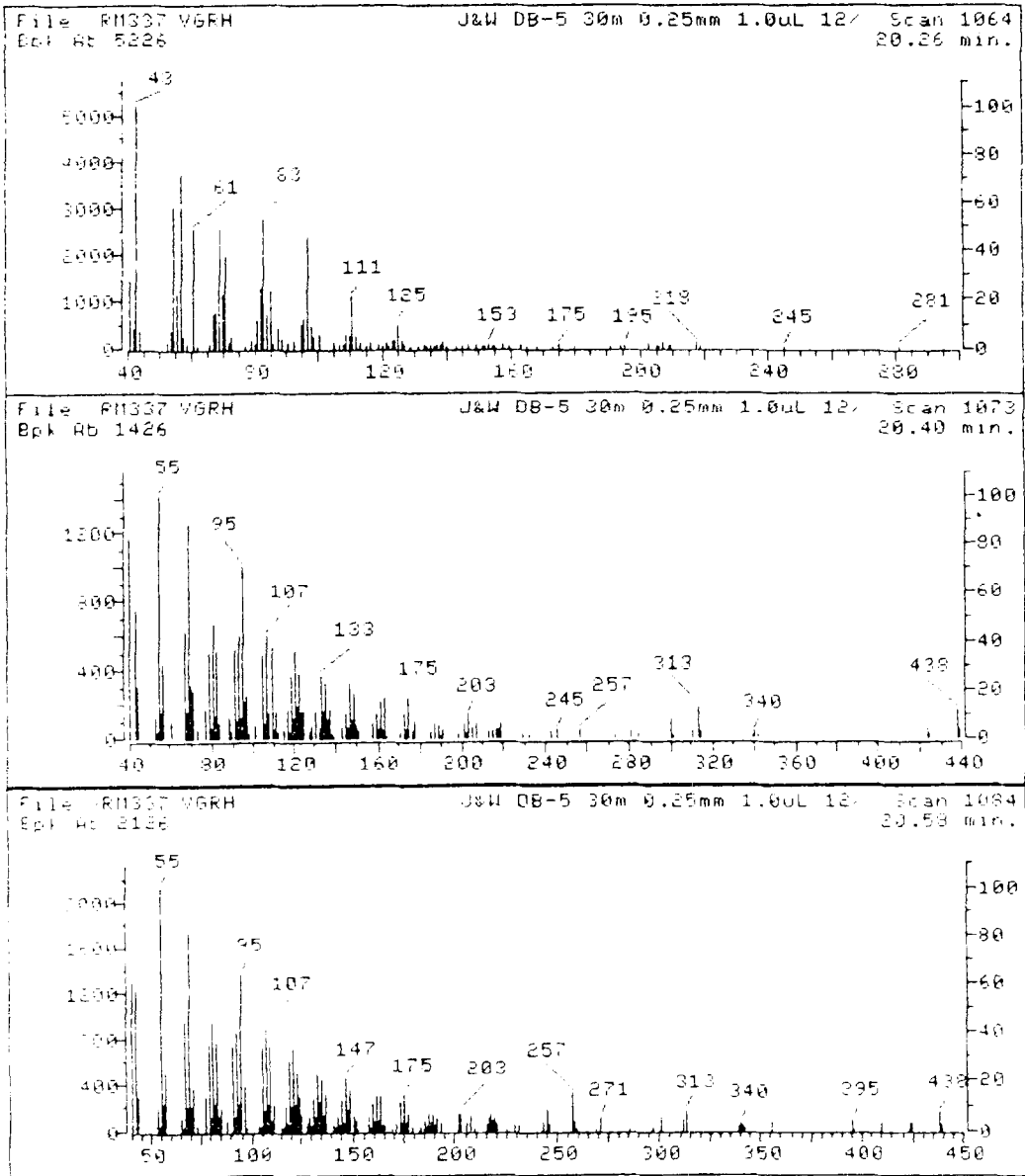
Continuação...



Continuação...



Continuação...



4.3 Análise de flavonóides em *Vellozia graminifolia* por C G A R - A T - E M

Os flavonóides monoisoprenilados identificados, em mistura, no item 4.1.3 (pág. 49) foram separados por CGAR-AT revelando, em seu respectivo cromatograma [Fig. 15] (pág. 56), picos em 20.143 (3a; pico a) e 20.274 minutos (3; pico b). A análise por CGAR-AT-EM [Fig. 17] (pág. 59) mostrou picos intensos correspondentes aos íons moleculares $\{m/z\}$ 396 $[M]^+$ (3) e 410 $[M]^+$ (3a).

Os flavonóides identificados no item 4.1.4 (pág. 91) também foram analisados por CGAR-AT [Fig. 39] (pág. 95) apresentando picos em 20.575 (4, pico c) e 21.002 (4a, pico d) minutos, correspondendo aproximadamente a 33% da área total dos picos registrados no cromatograma. Os espectros de massas obtidos por CGAR-AT-EM [Fig. 43] (pág. 101) confirmam os íons moleculares m/z 424 $[M]^+$ e 410 $[M]^+$ para 4 e 4a, respectivamente.

Estas análises obtidas por CGAR-AT-EM mostraram que os espectros de massas pertencentes a classe dos flavonóides monoisoprenilados apresentam intensos íons moleculares e fragmentações concordantes com os descritos na literatura [M-15 (M-Me'), M-43 (M-OMe) e M-55 (M-CH₂=CCH₃)]⁷².

Numa análise mais detalhada dos espectros de massas, dos demais compostos eluídos com 4 e 4a, notamos a possível existência de novas estruturas pertencentes

a classe de flavonóides monoisoprenilados. A presença de íons moleculares e fragmentações muito próximas aos mesmos reforçam esta hipótese. Os picos a e b registrados no cromatograma de 4 (pico c) e 4a (pico d) [Fig. 39] (pág. 95), apresentaram íons moleculares idênticos aos flavonóides 3a {m/z 410 [M]⁺} e 3 {m/z 396 [M]⁺}, respectivamente (Estes dados foram obtidos manualmente no computador). A identificação destes compostos foram feitos através da eluição de 3 e 3a juntamente com 4 e 4a. O aumento da área de a e b [Fig. 64] (pág. 165), em relação aos outros picos, estabeleceu a identificação de 5-hidroxi-3,3',4'-trimetoxi-6,7:2,1-[2-(1-metiletenil) furo] flavona (3a) 3,5-dihidroxi-3',4'-dimetoxi-6,7:2,1-[2-(1-metiletenil)furo] flavona (3), em mistura com os flavonóides 4 e 4a.

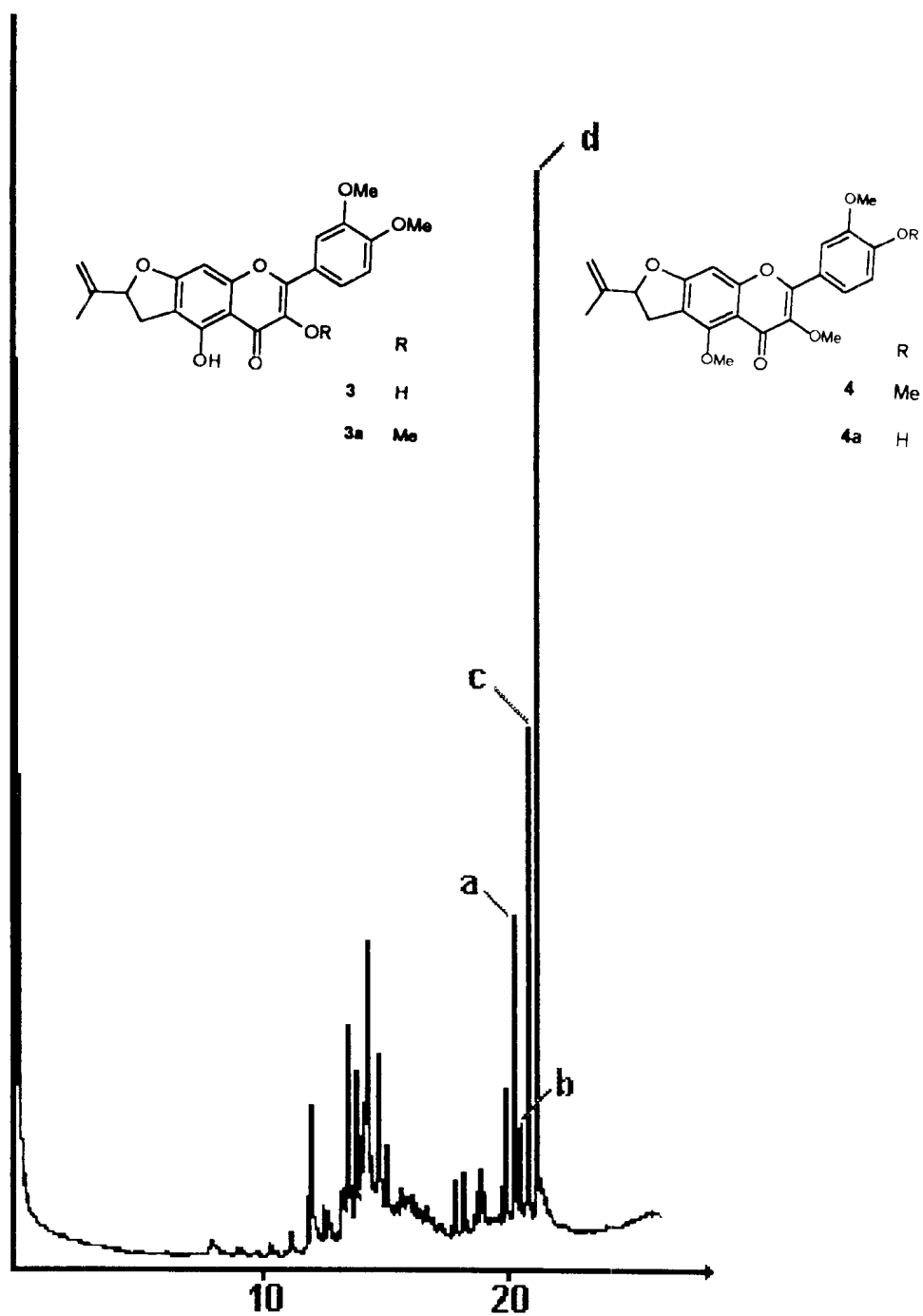


FIGURA 64. Cromatograma obtido através da coeluição entre 3 e 3a e os picos a e b, contidos na mistura de 4 (pico c) + 4a (pico d).

Análise obtida por CGAR-AT

EXPERIMENTAL

5.1 Coleta e identificação da planta *Vellozia graminifolia*

O espécimen de *Vellozia graminifolia*, coletada na Chapada da Diamantina em Minas Gerais, foi classificada pela Professora Nanuza Luiza de Menezes, Instituto de Botânica da Universidade de São Paulo (USP).

5.2 Obtenção dos extratos

A espécie coletada (raízes, caule, galhos e bainhas foliar) permaneceu a temperatura ambiente por vinte dias para secagem. Após este período, as partes

foram moídas e em seguida maceradas, em recipientes fechados, por 15 dias com solventes orgânicos na ordem crescente de polaridade. Os solventes foram destilados, separadamente, a pressão reduzida e temperatura controlada utilizando evaporador rotatório [Esquema 161 (pág. 170)].

5.3 Preparação do extrato hexânico para CGAR-EM

Uma alíquota do extrato hexânico bruto (654 mg) foi filtrada em uma coluna capilar contendo sílica gel (1,8 g), utilizando hexano 100% (50 mL) e posteriormente uma mistura de hexano/acetato de etila 50% (50 mL) como eluentes, obtendo duas frações distintas. A primeira foi descartada, analisando-se somente a segunda fração (247 mg).

5.4 Isolamento e purificação dos constituintes químicos

As frações cromatográficas foram lavadas com acetona ou hexano/acetato de etila, com leve aquecimento para permitir somente a dissolução de substâncias impregnadas na amostra. Após o resfriamento o sobrenadante foi cuidadosamente removido com auxílio de pipeta Pasteur. Este procedimento foi repetido diversas vezes até a obtenção de cristais.

5.4.1 Fracionamento do extrato hexânico

12,86 g do extrato hexânico foram fracionados por cromatografia líquida em coluna contendo 112 g de sílica gel e eluído com solventes na ordem crescente de polaridade (Hexano-Acetato de etila-Metanol). Foram coletadas 29 frações de aproximadamente 120 mL, que sob pressão reduzida e temperatura controlada foram concentradas e reunidas com base na análise obtida por C.C.D. [Tabela XIII] (pág.171).

5.4.2 Fracionamento do extrato acetato de etila

Uma alíquota (12.1 g) do extrato acetato de etila foi adsorvida em sílica (30.67 g) e colocada no topo de uma coluna de gel de sílica (143 g) empacotada com hexano, no qual foi eluída com solventes na ordem crescente de polaridade. Com esse procedimento obteve-se 18 frações, de aproximadamente 120 mL cada, as quais foram concentradas sob pressão reduzida e a temperatura controlada. [Tabela XIV] (pág. 172).

Após estes procedimentos as frações 4-14 apresentaram tempo de retenção muito semelhantes em C.C.D. com eluente tolueno-ácido acético (4:1). Estas frações eram constituídas de um rastro de 5 a 6 manchas bastante coloridas. Como passo seguinte reuniu-se todas estas frações (6.76 g) e por cromatografia em coluna líquida recheada com Sephadex LH 20, tentou-se purificar estes constituintes. O uso de metanol 100% não separou qualquer componente. Entretanto, no topo da coluna

permaneceu retida uma espécie de graxa. A análise por C.C.D., utilizando o mesmo sistema tolueno-ácido acético (4:1), das frações obtidas (25 frações de 12 mL cada) notou-se que as frações 4 até 18 continuavam apresentando os mesmos índices de retenção, mas com 5 pontos definidos e coloridos. Assim sendo, uniu-se estas frações perfazendo um total de 4.8 g de peso.

5.4.3 Fracionamento do extrato metanólico

O extrato metanólico de aparência bastante resinosa (17.6 g) foi submetido a partição com os solventes tetracloreto de carbono (CCl_4) e butanol (BuOH) fornecendo os respectivos sub-extratos. Estes procedimentos estão descritos no Esquema 17 (pág. 173).

Os sub-extratos CCl_4 (4.74 g) e BuOH (8.98 g) foram submetidos a cromatografia em coluna de gel de sílica, separadamente, sendo então eluídas com mistura de acetato de etila e metanol na ordem crescente de polaridade. Os sub-extratos CCl_4 e BuOH forneceram 19 e 16 frações, respectivamente, que foram coletadas com aproximadamente 120 mL cada. Estas frações foram então concentradas em evaporador rotativo com temperatura controlada e analisadas por cromatografia em camada delgada analítica em diversos sistemas de eluentes. Com estes procedimentos não foi possível isolar nenhuma substância em ambos os sub-extratos.

ESQUEMA 16

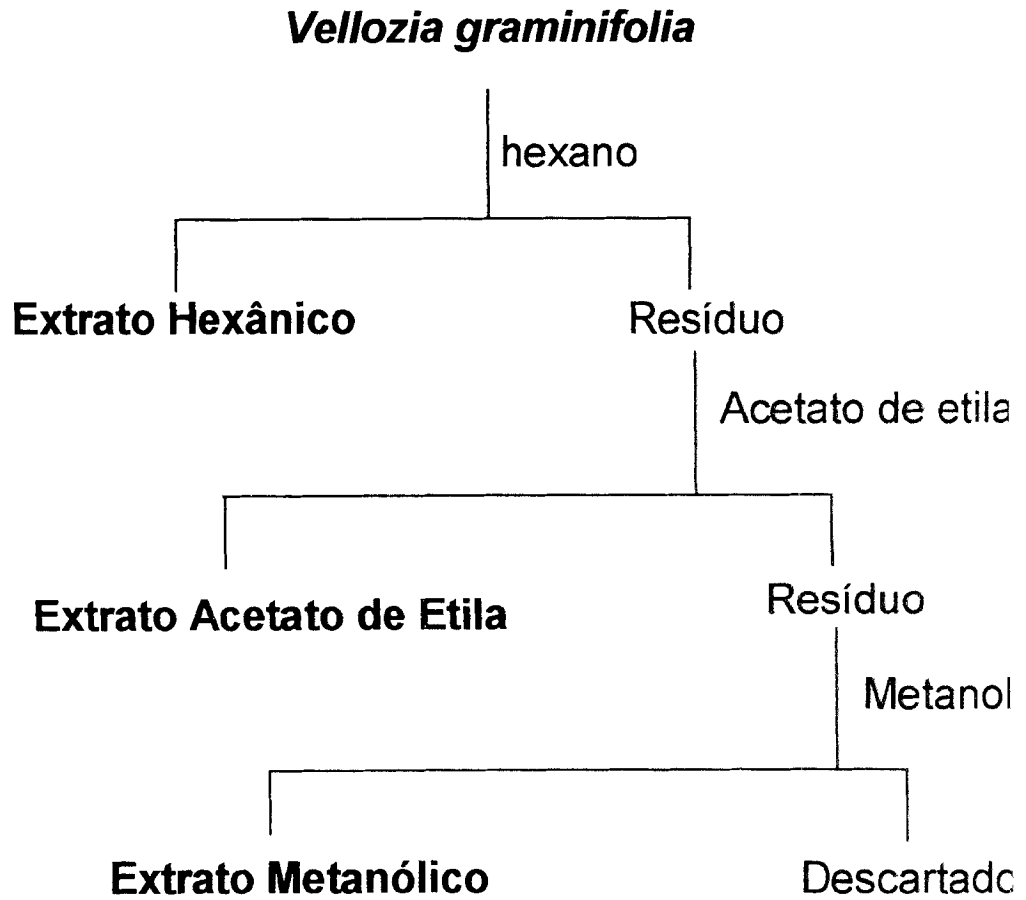
Obtenção dos extratos de *Vellozia graminifolia*

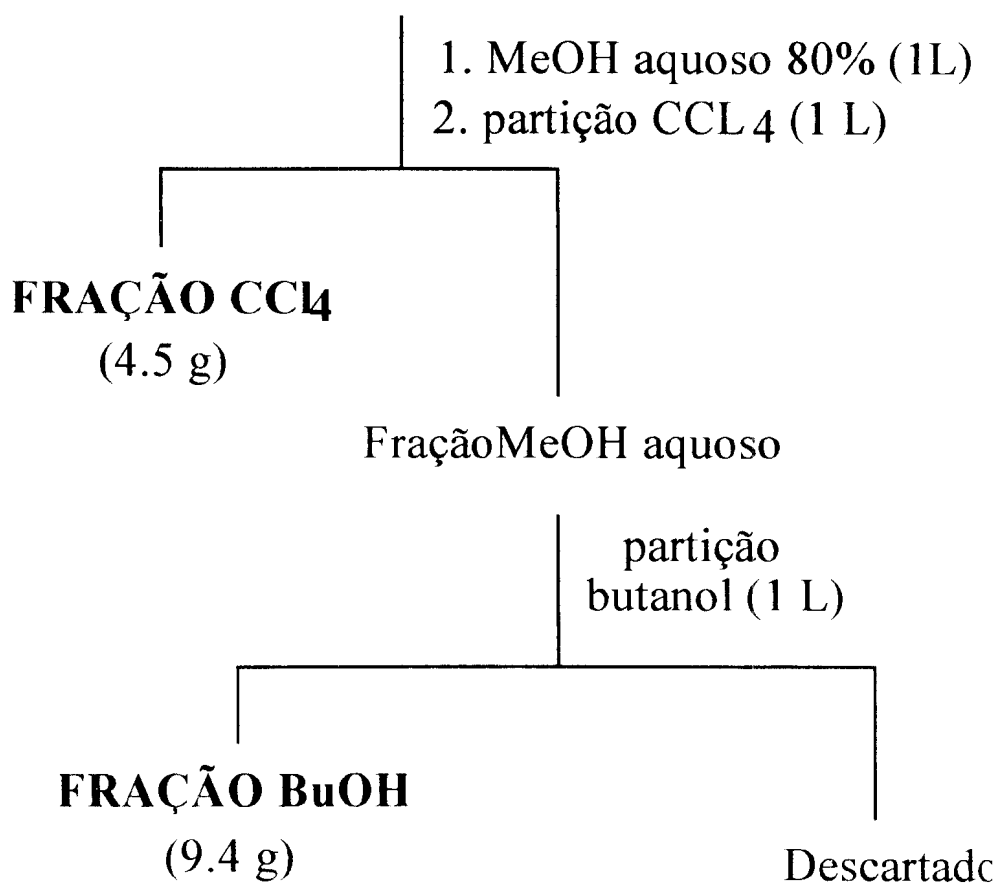
TABELA XIII

Fracionamento do extrato hexânico

ELUENTE (%)		FRAÇÕES	COMPOSTOS
Hexâno	Acetato de Etila	REUNIDAS	ISOLADOS
100	0	1	1
98	2		
	a	2 a 9	2a, 2b, 2c
82	18		
80	20	10	3 e 3a
78	22		
	a	11 a 19	
48	42		
46	44	20	5
44	46		
	a	21 a 29	
0	100		

TABELA XIV**Fracionamento do extrato acetato de etila**

ELUENTE (%)		
Hexano	Acetato de Etila	FRAÇÕES
100	0	1
95	5	2
90	10	3
80	20	4
70	30	5
60	40	6
50	50	7
40	60	8
30	70	9
20	80	10
10	90	11
0	100	12
Ac. de Etila	MeOH	
95	5	13
90	10	14
80	20	15
60	40	16
30	70	17
0	100	18

ESQUEMA 17**Partição do extrato metanólico por solventes orgânicos****EXTRATO METANÓLICO**

5.5 Derivatizações

5.5.1 Metilação usando diazometano

5.5.1.1 Preparo do diazometano

Uma solução de 1 g de Diazald (N-nitroso-toluol-4-sulfometilamida) em 20 mL de éter etílico foi mantida sob refrigeração em banho de gelo, em seguida adicionou-se 3 mL de uma solução a 4% de KOH em etanol 96%. O éter etílico foi destilado em kit apropriado (Aldrich), em banho-maria a 50° C e o destilado de cor amarela (solução etérea de diazometano) foi coletado em banho de gelo.

5.5.1.2 Metilação dos flavonóides 3 e 3a, em mistura,

Solução etérea de diazometano (ver ítem 5.5.1) foi adicionada a temperatura ambiente sobre os cristais de 3 e 3a (11.9 mg), em mistura, até persistir a coloração amarelada do diazometano e cessar o desprendimento de nitrogênio. O solvente foi evaporado com nitrogênio e recristalizado em acetona. Obteve-se assim, o composto 4 (12.0 mg) como único produto, em forma de cristais amarelos. P.f. 134° C.

5.5.1.3 Metilação do diterpeno 5 com diazometano

Solução etérea de diazometano foi adicionada, a temperatura ambiente, sobre cristais de 5 (11.9 mg) até persistir a coloração amarelada do diazometano e cessar o desprendimento de nitrogênio. O solvente foi evaporado com nitrogênio obtendo-se o éster 5a (22.0 mg) como único produto, na forma de um óleo incolor.

5.5.2 Oxidação com reagente de Jones

5.5.2.1 Preparo do reagente de Jones

Num frasco de 5 mL, imerso em banho de gelo, adicionou-se 0.30 g de trióxido de cromo e 0.25 mL de ácido sulfúrico concentrado, diluindo-se a mistura com 1 mL de água destilada.

5.5.2.2 Oxidação do diterpeno 5a com reagente de Jones

A uma solução de 5 (9.6 mg) em acetona (5 mL), adicionou-se o reagente de Jones, lentamente, até persistir a coloração alaranjada do reagente. O excesso de reagente foi destruído pela adição de isopropanol e o solvente evaporado sob pressão reduzida a temperatura controlada. Após o material reacional foi suspenso em

cloreto de metileno e particionado com água. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro e o solvente evaporado sob pressão reduzida e purificado por cromatografia em coluna flash usando acetato de etila/metanol (3:1) como eluente. Foi obtido como produto final um óleo incolor (6.4 mg).

5.6 Materiais e equipamentos utilizados

5.6.1 Solventes e adsorventes

Os solventes utilizados nos processos cromatográficos, extrações e cristalizações foram todos destilados em destiladores com coluna Vigreux de 1.5 m de comprimento.

Os fracionamentos e separações cromatográficas foram efetuados em colunas de vidro contendo gel de sílica 60 como adsorvente, fabricação Merck de granulação 70-230 mesh (0.063-0.2 mm). Para cromatografia em camada delgada analítica (CCD) foram utilizadas cromatoplacas em folhas de alumínio contendo sílica gel de fabricação Merck (PF 254) com espessura de 0.5 mm.

As revelações foram efetuadas em cuba saturada com vapores de iodo e sob lâmpada de ultra-violeta Mineralight (comprimento de onda de 254 e 365 nm).

Os critérios de pureza adotados foram: obtenção da faixa de ponto de fusão de + 1° C, obtenção de uma única mancha na cromatografia em camada delgada analítica, com diferentes sistemas de eluentes e os reveladores acima citados e a obtenção de um único sinal, além do solvente, em cromatografia gasosa de alta resolução.

As misturas de solventes foram feitas em volume por volume (v/v).

5.6.2 Equipamentos

Os pontos de fusão foram determinados em bloco de Koffler e não foram corrigidos.

Os espectro de absorção na região de infravermelho foram registrados por espectrômetro Perkin-Elmer (modelo 1420), utilizando filme em pastilha de NaCl ou pastilhas comprimidas de KBr. Os valores para as absorções foram medidas em unidades de números de onda (cm^{-1}) sendo os espectros calibrados com filme de poliestireno de 0.5 mm de espessura através da absorção em 1601 cm^{-1} como referência interna.

Os espectros de RMN ^1H e foram registrados a 200 MHz em aparelho Bruker AC-200 (UFRRJ) e a 300 MHz em aparelho Bruker AC-300 (UFRJ).

Os deslocamentos químicos foram medidos em valores adimensionais δ (ppm) e as constantes de acoplamento (J) medidas em Hertz (Hz). Foram utilizados CDCl_3 como solvente e tetrametilsilano como referência interna. Os espectros bidimensionais $^1\text{Hx}^1\text{H}$ -COSY, HMQC, HMBC e os experimentos de NOESY foram obtidos no aparelho Bruker AC-300.

Os espectros de RMN ^{13}C [PND] foram obtidos a 50.3 MHz em aparelho Bruker AC-200 e a 75 MHz em aparelho Bruker AC-300. Foram utilizados CDCl_3 como solvente e tetrametilsilano como referência interna. Os deslocamentos químicos medidos em unidades adimensionais δ (ppm). Os espectros DEPT ($\theta = 90^\circ$ e 135°) foram obtidos a 50.3 e 75 MHz, sendo que os espectros ^{13}C -Pendant foram obtidos 75 MHz

As análises por CGAR e CGAR-EM foram realizadas em cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 5790A e cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 5880 acoplado a Espectrômetro de Massas computadorizado (HP 5987A) de analisador quadrupolo (ionização por impacto de elétrons, 70 eV), respectivamente. Integrador HP 3396-II.

As condições de análise para as frações apolares foram as mesmas para os dois aparelhos: H_2 ; vazão: 2 mL; injetor: 280°C (com divisão de fluxo); detector de ionização de chama: 300°C ; coluna capilar (25m x 0.3 mm) com fase estacionária: SE 54 (5% fenil em metil silicone), $df = 0.25\text{ nm}$; Programação: 100 a 290°C , taxa: $8^\circ\text{C}/\text{min.}$.

As análises por CGAR-AT foram realizadas em cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 5890-II com detector de ionização de chama (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) e injetor "on-column" (Carlo Erba, Itália). Integrador HP 3396-II. As condições de análise foram: H₂: vazão: 50 cm/sec; coluna capilar (10 m x 0.3 mm) com fase estacionária: Silarem 30 [(30% fenil-30% difenilenosilileter-40% metilpolisiloxana), BGB Suíça], di = 0.1 µm As amostras foram injetadas usando o modo "cold on-column" (volume de injeção: 0.2 µL), com injetor a temperatura ambiente e detector a 400 °C. Programação: 40-370 °C, taxa: 12 °C/min..

As análises por CGAR-EM-AT foram realizadas em espectrômetro de massas computadorizado (HP 5987A) de analisador quadrupolo (ionização por impacto de elétrons, 70 eV), A programação da coluna e o modo de injeção foram as mesmas usadas na análise cromatográfica.

Os espectros de massas (diterpenos) foram obtidos em espectrômetros VG Auto Spec Q por EI a 70 eV utilizando-se o PFK como referência.

A medida de rotação ótica foram realizadas em polarímetro Perkin-Elmer 234-B (caminho ótico de 0,1 dm), à temperatura ambiente.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

1. Baker, J.T., Borris, R.P., Carté, B., Cordell, G.A., Soejarto, D.D., Cragg, G.M., Gupta, M.P., Iwu, M.M., Madulid, D.R. and Tyler, V.E. (1995) *J. Nat. Prod.* **58**, 1325.
2. Cordell, G.A. (1995) *Phytochemistry* **40**, 1585.
3. Korolkovas, A. (1988) *Essentials of Medicinal Chemistry* 2nd ed, wiley Interscience, pp 53-140.

4. Friebolin, H. (1993) *Basic One- and Two-dimensional NMR Spectroscopy* 2nd ed, editora VCH, 368.
5. Duddeck, H. and Dietrich, W. (1989) *Structure Elucidation by Modern NMR*, 345.
6. Greenaway, W., English, S., May, J. and Whatley, F.R. (1991) *Phytochemistry* **30**, 3005.
7. Patitucci, M.L., Pinto, A.C. and Cardoso, J.N. (1995) *Phytochemical Analysis* **6**, 38.
8. Phillipson, J. D. (1995) *Phytochemistry* **38**, 1319.
9. Giulietti, A.M., Menezes, N.L., Pirani, J.R., Meguro, M. and Wanderley, M.G.L. (1987) *Bol. Botânica Univ. S. Paulo* **9**, 1.
10. Menezes, N.L. (1980) em *Petaloid Monocotyledons: Horticultural and Botanical Research*, *Linn. Soc. Symp. Ser.* **8**, pp 117-139.
11. Menezes, N.L. (1971) *Cienc. Cult.* **23**, 389.
12. Menezes, N.L. (1971) *Cienc. Cult.* **23**, 421.
13. Smith, L.B. and Ayensu, E.S. (1976) *Smithson. Contrib. Bot* **30**, 1.
14. Smith, L.B. and Ayensu, E.S. (1974) *Kew Bull.* **29**, 181.
15. Williams, C.A., Harborne, J.B. and Menezes, N.L. (1991) *Biochem. Syst. Ecol.* **19**, 483.

16. Salatino, M.L.F., Salatino, A., Menezes, N.L. and Mello-Silva, R. (1989)
Phytochemistry **28**, 1105.
17. Menezes, N.L. (1980) *Revta Brasil. Bot.* **3**, 37.
18. Williams, C.A., Harborne, J.B. and Tomas-Barberan, F.A (1987)
Phytochemistry **26**, 2553.
19. Williams, C.A., Harborne, J.B., Greenham, J. and Eagles, J. (1994)
Phytochemistry **36**, 931.
20. Harborne, J.B., Williams, C.A., Greenham, J. and Eagles, J. (1994)
Phytochemistry **35**, 1475.
21. Harborne, J.B., Greenham, J., Williams, C.A., Eagles, J. and Markham, K.R.
(1993) *Phytochemistry* **34**, 219.
22. Williams, C.A., Harborne, J.B., Greenham, J., Eagles, J. and Markham, K.R.
(1993) *Phytochemistry* **32**, 731.
23. Williams, C.A., Greenham, J., Harborne, J.B., Eagles, J. and Markham, K.R.
(1992) *Phytochemistry* **31**, 555.
24. Harborne, J.B., Greenham, J., Williams, C., Eagles, J. and Markham, K.R..
(1992) *Phytochemistry* **31**, 305.
25. Harborne, J.B. and Williams, C.A. (1995) *Nat. Prod. Rep.* **4**, 639.
26. Pinto, A.C., Garcez, W.S., Queiroz, P.P.S. and Fiorani, N.G. (1994)
Phytochemistry **37**, 1115.

27. Pinto, A.C., Brito, L.C., Zukerman-Schpfechter, J. and Epifanio, R.A. (1993)
Phytochemistry **33**, 1269.
28. Pinto, A.C., Figueiredo, M.R. and Epifanio, R.A. (1992)
Phytochemistry **31**, 1681.
29. Pinto, A.C., Epifanio, R.A., Pizzolatti, M.G., Rezende, C.M. and Silva, B.R.
(1992) *Phytochemistry* **31**, 1679.
30. Pinto, A.C., Valente, L.M.M. and Pizzolatti, M.G. (1991)
Phytochemistry **30**, 3136.
31. Pinto, A.C. and Maçaira, A.M.P. (1988) *Phytochemistry* **27**, 3973.
32. Pinto, A.C., Frechiani, M.C. and Pereira, A.L. (1988)
Phytochemistry **27**, 3917.
33. Pinto, A.C., Valente, L.M.M. and Silva, R.S (1988) *Phytochemistry* **27**, 3913.
34. Pinto, A.C.; Zocher, D.H.T.; Queiroz, P.P.S. and Kelecom, A. (1987)
Phytochemistry **26**, 2409.
35. Pinto, A.C., Patitucci, M.L., Zocher, D.H.T. and Kelecom, A. (1985)
Phytochemistry **24**, 2345.
36. Pinto, A.C., Gonzaga, L. and Fiorani, N.G.M. (1984) *Phytochemistry* **23**, 918.
37. Pinto, A.C., Peixoto, E.M. and Fiorani, N.G.M. (1984)
Phytochemistry **23**, 1293.
38. Pinto, A.C.; Pinchin, R. and Prado, S.K. (1983) *Phytochemistry* **22**, 2017.

39. Pinto, A.C. and Borges, C. (1983) *Phytochemistry* **22**, 2011.
40. Pinto, A.C., Scofield, T.C.V. and Braz Filho, R. (1983)
Tetrahedron. Lett. **24**, 5043.
41. Pinto, A.C. (1980) *An. Acad. Bras. Cienc.* **52**, 473.
42. Pinto, A.C., Prado, S.K. and Pinchin, R. (1981) *Phytochemistry* **20**, 520.
43. Pinchin, R, Mayer, L.M.U. and Pinto, A.C. (1978) *Phytochemistry* **17**, 1671.
44. Pinto, A.C., Pinchin, R., Zocher, D.H.T. and Lopes, C.C. (1979)
Tetrahedron Lett. **5**, 405.
45. Pinto, A.C., Silva, A.J.R., Mayer, M.U. and Braz-Filho, R. (1979)
Phytochemistry **18**, 2036.
46. Pinto, A.C., Resende, C.M., Antunes, O.A.C. and Correia, C.R.D. (1996)
Phytochemistry **42**, 767.
47. Pinto, A.C., Figueiredo, M.R., Brito, L.C. and Pereira, A.L. (1986)
Química Nova **9**, 222.
48. Pinto, A.C., Antunes, O.A.C., Resende, C.M., and Correia, C.R.D. (1995)
Phytochemistry **38**, 1269.
49. Pinto, A.C., Antunes, O.A.C., Pizzolatti, M.G. and Rumjanek, V.M. (1996)
Phytochemistry **42**, 771.
50. Pinto, A.C., Ribeiro, N.M., Brito, L., Tinant, B. and Declercq, J.P. (1988)
Bull. Soc. Chim. Belg. **97**, 1067.

51. Pinto, A.C., Queiroz, P.P.S. and Garcez, W.S. (1991)
J. Braz. Chem. Soc. **2**, 25.
52. Pinto, A.C., Furtado, L.R. and Gonzaga, L. (1990) *Química Nova* **13**, 64.
53. Pinto, A.C., Prado, S.K., Braz-Filho, R., Hull, W.E., Neszmelyi, A. and Lukacs, G. (1982) *Tetrahedron Lett.* **23**, 5267.
54. Pinto, A.C., Valente, L.M.M., Silva, R.S., Garcez, W.S. e Queiroz, P.P.S. (1981) *An. Acad. brasil. Ciênc.* **53**, 73.
55. Pinto, A.C., Patitucci, M.L., Queiroz, P.P.S. and Kelecom, A. (1993)
Tetrahedron **38**, 3351.
56. Pinto, A.C., Epifanio, R.A. and Pizzolatti, M.G (1992)
Phytochemistry **31**, 4241.
57. Pinto, A.C., Peixoto, E.M. and Fiorani, N.G.M. (1984)
Phytochemistry **23**, 1293.
58. Barreiro, E.J., Barreira, M.D. e Pinto, A.C. (1980)
An. Acad. brasil. Ciênc. **52**, 489.
59. Pinto, A.C., Silva, R.S. and Valente, L.M.M (1988) *Phytochemistry* **27**, 3909.
60. Pinto, A.C., Baker, P.M., Gilbert, B., Pinchin, R., Reis, F.A.M., Waineraich, M.S. and Zocher, D.H.T. (1980) *Phytochemistry* **19**, 2486.
61. Barnes, R.A., Pereira, A.L., Scofield, T.C.V. and Pinto, A.C (1984) *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 3674.

62. Baker, P.M., Barreiro, E.J.L. and Gilbert, B. (1976) *Phytochemistry* **15**, 785.
63. Pinto, A.C., Ribeiro, N.M. e Epifanio, R.A. (1987) *Química Orgânica Sintética* J.V. ed, 90.
64. Patitucci, M.L., Silva, R.S., Valente, L.M.M., Epifanio, R.A. e Pinto, A.C. (1990) *Química Nova* **13**, 273.
65. Garcez, W. S., Pereira, A.L., Queiroz, P.P.S., Silva, R.S., Valente, L.M.M., Peixoto, E.M. e Pinto, A.C. (1981) *Química Nova*, 116.
66. Patitucci, M.L., Veiga-Jr, V.F., Pinto, A.C., Zoghbi, M.G.B. e Silva, J.R. (1995) *Química Nova* **18**, 262.
67. Mahato, S.B. and Kundu, A.P. (1994) *Phytochemistry* **37**, 1517.
68. Budzikiewicz, H., Wilson, J.M. and Djerassi, C. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3688.
69. Ogunkoya, L. (1981) *Phytochemistry* **20**, 121.
70. Homer, J. and Perry, M.C. (1994) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 373.
71. Braun, S. and Breitenbach, H. (1977) *Tetrahedron* **33**, 145.
72. Calderon, J. S., Quijano, L., Gomez-Garibay, F., Moran, M. and Rios, T. (1987) *Phytochemistry* **41**, 255.
73. Chandra, G., Clark, J.; McLean, J.; Pauson, P.L. and Watson, J. (1964) *J. Chem. Soc.*, 3648.
74. Pemp, A. and Seifert, K. (1997) *Tetrahedron Lett.* **38**, 2081.

75. Mahato, S. B. and Sen, S. (1997) *Phytochemistry* **44**, 1185.
76. Budzikiewicz, H., Wilson, J. M. and Djerassi, C. (1963)
J. Am. Chem. Soc. **85**, 3688.
77. Shiojima, K., Arai, Y., Masuda, K., Takase, Y., Ageta, T. and
Ageta, H (1992) *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 1683.
78. Novis, A. O. B., Patitucci, M. L., Valente, L. M. M., Pinto, A. C. e
Menezes, N. L. (1995) Livro de Resumos-PN 101 da 18^a Reunião
Anual da Sociedade Brasileira de Química.
79. Takayama, M., Fukai, T., Hano Y. and Nomura, T. (1992)
Heterocycles **33**, 405.
80. Torsel, K.B.G (1983) *Natural Product Chemistry*, John Wiley & Sons.
81. Goodwin, T.W. and Mercer, E.I. (1983) *Introduction to Plant Biochemistry*
2d, Pergamon Press.
82. Geissman, T.A. and Crout, D.H.G. (1969) *Organic Chemistry of Secondary
Plant Metabolism*, editora Freeman, Cooper & Company.