

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

**DISSERTAÇÃO**

**METABÓLITOS ESPECIAIS ISOLADOS DE FOLHAS E GALHOS DE  
*Ouratea ferruginea* Engl. (Ochnaceae)**

**QUELI CRISTINA FIDELIS**

*Sob a orientação do  
Professor*

**Dr. Mario Geraldo de Carvalho**

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2011



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

**METABÓLITOS ESPECIAIS ISOLADOS DE FOLHAS E GALHOS DE  
*Ouratea ferruginea* Engl. (Ochnaceae)**

**QUELI CRISTINA FIDELIS**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestrado em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química de Produtos Naturais.

Seropédica, RJ  
Março de 2011

*À Profa. Dra. Dalva Trevisan Ferreira*  
*Por me apresentar a Química de Produtos Naturais*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho pela orientação, ensinamentos, paciência, pelo sentimento de humanidade e respeito que sempre demonstrou para comigo e os demais alunos.

À Profa. Dra Rosane Nora Castro pela colaboração nas análises de CLAE e pela paciência e boa vontade de se colocar a disposição para ajudar no que fosse preciso.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste – LEMANOR da Universidade Federal do Ceará, pelas análises de CL-EM-IES e CG-EM.

A MSc. Luiza pela colaboração nos ensaios de fenôis totais e ao Leonardo pelas análises de Dicroísmo circular.

Aos técnicos do ICE-UFRRJ, Francis, Eli, Carlão, Fábio, Maurício e Vitor.

A minha grande amiga Tereza, pela amizade, por me receber em sua casa no início do mestrado, pelos materiais didáticos emprestados e pelos momentos alegres e descontraídos no Laboratório.

As amigas que me cederam materiais de estudo para seleção de mestrado, Roberta, Aline e Carla.

A todos os amigos do lab. LQPN, pela amizade e por compartilhar experiências que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do alojamento da Pós-Grad. da UFRRJ, pela amizade e pelos momentos de alegria e tristeza, os quais sempre guardarei boas lembranças.

Ao meu namorado Eduardo Aragão (Ceará) pela cooperação nos experimentos, pelos livros emprestados, pelo apoio e paciência em todos os momentos.

Aos meus pais, Maria Ap. Fidelis e Dalmo Fidelis, ao meu irmão e minha cunhada Francisco Paulo Fidelis e Amarilda Lopes Figueiredo Fidelis, além dos meus sobrinhos adoráveis, pelo apoio e motivação.

E acima de tudo a Deus, por criar caminhos que não existiam, colocando na minha vida pessoas de boa vontade.

## SUMÁRIO

ÍNDICE GERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABELAS .....	VIII
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	IX
ÍNDICE DE QUADROS.....	X
ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS.....	XI
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV

## ÍNDICE GERAL

	<b>Pág.</b>
I. INTRODUÇÃO .....	1
II. OBJETIVOS .....	2
III. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
III.1. Família Ochnaceae e características do gênero <i>Ouratea</i> .....	3
III.2. Metabólitos especiais identificados em espécies de Ochnaceae .....	3
III.3. Atividades biológicas apresentadas por espécies do gênero <i>Ouratea</i> .....	11
IV. PARTE EXPERIMENTAL .....	12
IV.1. Material e métodos.....	12
IV.2. Material vegetal.....	14
IV.3. Preparação de derivados.....	14
IV.3.1. Metilação com diazometano .....	14
IV.3.2. Acetilação com anidrido acético e piridina.....	14
IV.4. Preparo dos extratos de folhas e caule .....	14
IV.5. Isolamento e purificação de metabólitos especiais de extratos do caule.....	15
IV.5.1. Fracionamento do extrato do caule obtido com diclorometano (OFCD).....	15
IV.5.2. Fracionamento do extrato metanólico do caule (OFCM).....	17
IV.5.2.1. Fracionamento cromatográfico de OFCM-PH.....	18
IV.5.2.2. Fracionamento cromatográfico de OFCM-PD.....	18
IV.5.2.3. Fracionamento cromatográfico de OFCM-PA.....	19
IV.5.3. Metilação da substância 11 .....	19
IV.5.4. Acetilação da substância 15 e 16 .....	19
IV.5.5. Preparação do derivado acetilado de OFCM-PA e OFCM-PF .....	19
IV.6. Isolamento e Purificação de Metabólitos Especiais dos Extratos de Folhas.....	21
IV.6.1. Fracionamento do extrato hexânico das folhas (OFFH) .....	21
IV. 6.1.1. Fracionamento cromatográfico de fração OFFH polar .....	21

IV.6.1.2. Fracionamento cromatográfico de fração OFFH apolar .....	21
IV. 6.2. Fracionamento do extrato metanólico de folhas (OFFM).....	21
IV. 6.2.1. Fracionamento cromatográfico de OFFM-PH .....	22
IV. 6.2.2. Fracionamento cromatográfico de OFFM-PD .....	22
IV.6.2.3. Fracionamento cromatográfico de OFFM-PA .....	24
IV.6.3. Acetilação da substância 24 .....	25
IV.6.4. Acetilação OFFM-PA e OFCM-PF .....	25
IV.7. Determinação de fenóis totais e taninos de OFCM-PA, OFCM-PF, OFFM-PA e OFFM-PF .....	27
IV.7.1. Determinação de fenóis totais .....	27
IV.7.2. Preparo do reagente de Folin-Denis.....	27
IV.7.3. Preparo da curva analítica do ácido gálico.....	27
IV.7.4. Determinação de taninos por precipitação com caseína.....	28
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
V.1 Determinação estrutural dos constituintes especiais isolados de caule e folhas.....	32
V.1.1. Identificação das substâncias 1 e 2.....	32
V.1.2. Identificação das substâncias 3, 4 e 5.....	35
V.1.3. Determinação estrutural da substância 6 .....	39
V.1.4. Determinação estrutural da substância 7 .....	44
V.1.5. Determinação estrutural da substância 8 .....	51
V.1.6. Determinação estrutural das substâncias 9 e 10 .....	54
V.1.7. Determinação estrutural da substância 11 .....	60
V.1.8. Determinação estrutural do derivado 11a.....	67
V.1.9. Identificação das substâncias 12 e 13.....	69
V.1.10. Determinação estrutural da substância 14.....	76
V.1.11. Identificação das substâncias 15 e 16 através dos derivados 15a e 16a .....	82
V.1.12. Identificação das substâncias 17, 18 e 19.....	85
V.1.13 Identificação da substância 20 em mistura com 1 e 2 .....	89

V.1.14. Análise das frações biflavonoídicas das folhas por CLAE.....	92
V.1.14.1. Perfil cromatográfico e espectros na região do UV dos padrões submetidos à CLAE-DAD em escala analítica.....	96
V.1.14.2. Perfil cromatográfico e espectros na região do UV das frações biflavonoídicas submetidos à CLAE-DAD em escala analítica.....	99
V.1.14.3. Identificação da amentoflavona (21) utilizando CLAE-DAD analítico.....	101
V.1.14.4. Identificação do ácido siríngico (22) utilizando CLAE-DAD analítico.....	102
V. 1.14.5. Perfil cromatográfico da fração OFFM-PD-26-27a submetidas a CLAE -UV em escala semipreparativa.....	102
V.1.15. Identificação da 7-metilamentoflavona (23) .....	104
V.1.16. Identificação da substância 24.....	108
V.1.17. Identificação do derivado acetilado da epicatequina (24a) .....	114
V.2. Proposta biossintética para as isoflavonas e biflavonóides .....	116
V.3. Determinação do teor de fenóis totais e taninos nas frações polares do caule e folhas.....	120
V.3.1. Determinação do teor de fenóis totais .....	120
V.3.2. Determinação do teor de taninos .....	121
V.4. Análise das frações OFCM-PA, OFCM-PF, OFFM-PA e OFFM-PF por RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C.	123
VI. CONCLUSÕES .....	133
VII. REFERÊNCIAS .....	134



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Estruturas da a) ochnaflavona e b) luxenchalcona.....	7
<b>Figura 2.</b> Estruturas de flavonóides encontrados em espécies de <i>Ouratea</i> .....	8
<b>Figura 3.</b> Estruturas das substâncias isoladas de OFCD .....	17
<b>Figura 4.</b> Estruturas das substâncias isoladas de OFCM-PH .....	18
<b>Figura 5.</b> Estruturas das substâncias isoladas de OFCM-PD .....	19
<b>Figura 6.</b> Estruturas das substâncias obtidas de OFFH .....	21
<b>Figura 7.</b> Estruturas da substâncias isoladas de OFFM-PD .....	24
<b>Figura 8.</b> Estrutura da substância isolada de OFFM-PA e seu derivado acetilado.....	25
<b>Figura 9.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>1</b> .....	33
<b>Figura 10.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância <b>1</b> .....	33
<b>Figura 11.</b> a) Cromatograma (CG) da fração contendo <b>1</b> e <b>2</b> ; b, c, d e e) espectros de massas dos componentes de cada pico e comparação com padrão da biblioteca.....	34
<b>Figura 12.</b> Espectro no infravermelho da mistura de triterpenos <b>1</b> e <b>2</b> (KBr).....	35
<b>Figura 13.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da mistura de <b>3</b> , <b>4</b> e <b>5</b> .....	36
<b>Figura 14.</b> Cromatograma (CG) da mistura de esteróides.....	36
<b>Figura 15.</b> Espectros de massas da substância <b>5</b> e comparação com padrão da biblioteca .....	37
<b>Figura 16.</b> Espectros de massas da substância <b>4</b> e comparação com padrão da biblioteca .....	37
<b>Figura 17.</b> Espectros de massas da substância <b>3</b> e comparação com a biblioteca do aparelho .....	38
<b>Figura 18.</b> Espectro no infravermelho das substâncias <b>3</b> , <b>4</b> e <b>5</b> (KBr).....	38
<b>Figura 19.</b> Espectro no IV da substância <b>6</b> (KBr) .....	41
<b>Figura 20.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>6</b> .....	41
<b>Figura 21.</b> Espectro de RMN-HSQC (400/100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>6</b> .....	42
<b>Figura 22.</b> Espectro de RMN-HMBC (400/100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>6</b> .....	43
<b>Figura 23.</b> Espectro no IV da substância <b>7</b> (KBr) .....	46
<b>Figura 24.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>7</b> .....	47

<b>Figura 25.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>7</b> .....	47
<b>Figura 26.</b> Espectro de RMN-HSQC (400/100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>7</b> .....	48
<b>Figura 27.</b> Espectro de RMN-HMBC (400/100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>7</b> .....	49
<b>Figura 28.</b> Espectros RMN-NOEDIFF (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>7</b> .....	50
<b>Figura 29.</b> Espectro no IV da substância <b>8</b> (KBr) .....	52
<b>Figura 30.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>8</b> .....	52
<b>Figura 31.</b> Espectro de RMN-HSQC (400/100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>8</b> .....	53
<b>Figura 32.</b> a) Cromatograma (CG) da substância <b>8</b> ; b, c) espectro de massas da substância <b>8</b> em comparação com a biblioteca do aparelho .....	54
<b>Figura 33.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância <b>9</b> .....	55
<b>Figura 34.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H da mistura das substâncias <b>9</b> e <b>10</b> .....	55
<b>Figura 35.</b> a) Cromatograma (CG) da substância <b>9</b> ; b) Espectro de massas da substância <b>9</b> em comparação com a biblioteca do aparelho .....	56
<b>Figura 36.</b> a) Cromatograma (CG) da mistura de <b>9</b> e <b>10</b> . b e c) espectros de massas das substâncias <b>9</b> e <b>10</b> , respectivamente.....	57
<b>Figura 37.</b> Espectro no IV da substância <b>11</b> (KBr) .....	62
<b>Figura 38.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>11</b> .....	63
<b>Figura 39.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>11</b> .....	63
<b>Figura 40.</b> Espectro expandido de RMN-HSQC (400/100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>11</b> .....	64
<b>Figura 41.</b> Espectro de RMN-HMBC (400/100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>11</b> .....	65
<b>Figura 42.</b> a) Cromatograma (CG) da substância <b>11</b> ; b) espectro de massas da substância <b>11</b> .....	66
<b>Figura 43.</b> Proposta do mecanismo nucleofílico da reação do diazometano para a formação da substância <b>11a</b> .....	67
<b>Figura 44.</b> a) Cromatograma (CG) da substância <b>11a</b> ; b) espectro de massas da substância <b>11a</b> .....	67
<b>Figura 45.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das substâncias <b>12</b> e <b>13</b> .....	71
<b>Figura 46.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das substâncias <b>12</b> e <b>13</b> .....	71
<b>Figura 47.</b> Espectro de RMN-HSQC (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da mistura das substâncias <b>12</b> e <b>13</b> .....	72

<b>Figura 48.</b> a) Cromatograma (CG) da fração contendo <b>12 e 13</b> ; b e c) espectros de massas dos componentes <b>12 e 13</b> , respectivamente .....	73
<b>Figura 49.</b> Espectro no IV da substância <b>14</b> (KBr) .....	78
<b>Figura 50.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>14</b> .....	79
<b>Figura 51.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>14</b> .....	79
<b>Figura 52.</b> Espectro de RMN-HSQC (400/100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>14</b> .....	80
<b>Figura 53.</b> Espectro de RMN-HMBC (400/100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>14</b> .....	81
<b>Figura 54.</b> Espectro no IV da substância <b>15 e 16</b> (KBr) .....	83
<b>Figura 55.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>15a e 16a</b> .....	83
<b>Figura 56.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>15a e 16a</b> .....	84
<b>Figura 57.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>15a e 16a</b> .....	84
<b>Figura 58.</b> Cromatograma (CG) da mistura de <b>17, 18 e 19</b> .....	85
<b>Figura 59.</b> Espectro de massas da substância <b>17</b> em comparação com o espectro fornecido pela biblioteca do aparelho .....	86
<b>Figura 60.</b> Espectro de massas da substância <b>18</b> em comparação com o espectro fornecido pela biblioteca do aparelho .....	87
<b>Figura 61.</b> Espectro de massas da substância <b>19</b> .....	88
<b>Figura 62.</b> Espectro de massas do ftalato (contaminante do solvente).....	89
<b>Figura 63.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das substâncias <b>20, 1 e 2</b> .....	90
<b>Figura 64.</b> Cromatograma (CG) da mistura de <b>20(1), 2(2) e 1(3)</b> .....	90
<b>Figura 65.</b> Espectro de massas da substância <b>20</b> em comparação com o espectro de fornecido pela biblioteca do aparelho .....	91
<b>Figura 66.</b> Espectro de massas da substância <b>2</b> em comparação com o espectro de fornecido pela biblioteca do aparelho .....	91
<b>Figura 67.</b> Espectro de massas da substância <b>1</b> em comparação com o espectro de fornecido pela biblioteca do aparelho .....	92
<b>Figura 68.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) da fração biflavonoídica.....	93
<b>Figura 69.</b> Cromatograma (CL-EM) da fração biflavonoídica.....	95
<b>Figura 70.</b> Espectro de massas de <b>21</b> : a) modo positivo e b) modo negativo .....	95

<b>Figura 71.</b> Espectro de massas de <b>23</b> : a) modo positivo e b) modo negativo .....	96
<b>Figura 72.</b> Cromatogramas e espectros no UV dos padrões Coluna; C-18 (250 mm x 4,6 mm x 5mm), Shimadzu, fase movel [68% (metanol/acetonitrila 90:10) e 32% (H <sub>2</sub> O/ácido acético 99:01)]. <b>a)</b> agatisflavona, Tr: 5,697 <b>b)</b> 7''-metil-agathisflavona, Tr: 10,369 <b>c)</b> amentoflavona, Tr: 8,595 <b>d)</b> podocarpusflavona, Tr: 19,972 <b>e)</b> luxenchalcona, Tr: 30,393 <b>f)</b> ácido siríngico, Tr: 3,289 min .....	98
<b>Figura 73.</b> Perfil cromatográfico obtidos por CLAE-DAD; a) OFFM-PD-26-27a, b) OFFM-PD-27b-29. Coluna C-18 (250 mm x 4,6 mm x 5mm, Shimadzu.), fase móvel: 68% de (metanol/acetonitrila 90:10) e 32% de (H <sub>2</sub> O/ácido acético 99:01).....	99
<b>Figura 74.</b> Espectro de UV obtido por CLAE das substâncias não identificadas; a) fração OFFM-PD-26-27a, pico 3, Tr = 10,774, Biflavonóide; b) fração OFFM-PD-26-27a, pico 4, Tr = 22,334, metilamentoflavona; c) fração OFFM-PD-27b-29, pico 2, Tr = 11,655, biflavonóide; d) fração OFFM-PD-27b-29, pico 3, Tr = 24,574, metilamentoflavona .....	100
<b>Figura 75.</b> Comparação dos espectros no UV das substâncias com Tr=8,096 e 8,595 min com o padrão de amentoflavona obtidos por CLAE-DAD analítico .....	101
<b>Figura 76.</b> Comparação dos espectros no UV da substância com Tr=3,24 min da fração OFFM-PD-26-27a com o padrão de ácido siríngico obtidos por CLAE-DAD analítico .....	102
<b>Figura 77.</b> Perfil cromatográfico da fração OFFM-PD-26-27a obtido por CLAE-UV semipreparativa com a representação das partes coletadas correspondentes as subfrações A, B, C, D e E. (NI = não identificado) .....	103
<b>Figura 78. a)</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H <b>b)</b> expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO-D <sub>6</sub> ) da substância <b>23</b> .....	106
<b>Figura 79.</b> Espectro de RMN-NOEDIFF (500 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) da substância <b>23</b> .....	107
<b>Figura 80.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) da substância <b>24</b> .....	110
<b>Figura 81.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância <b>24</b> .....	110
<b>Figura 82.</b> Espectro de RMN 2D, <sup>1</sup> Hx <sup>1</sup> H COSY (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) da substância <b>24</b> .....	111
<b>Figura 83.</b> Espectro de DC da substância <b>24</b> .....	112
<b>Figura 84.</b> Espectro de DC da 2S,3S-(+)-epicatequina-padrão .....	112
<b>Figura 85.</b> Espectro de DC do padrão catequina-padrão.....	113
<b>Figura 86.</b> Espectro de DC de OFFM-PA-15-19 e 2S,3S-(+)-epicatequina-padrão.....	113
<b>Figura 87. a)</b> Cromatograma (CG) de substância <b>24a</b> ; <b>b)</b> espectro de massas do produto <b>24a</b> .....	114
<b>Figura 88.</b> Curva analítica da relação entre as médias das concentrações da solução do ácido gálico e as absorvâncias (760 nm), nos ensaios de Folin-Denis (VIANNA, 2010).....	120

<b>Figura 89.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) da fração OFFM-PF .....	124
<b>Figura 90.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (100 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) da fração OFFM-PF .....	124
<b>Figura 91.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) da fração OFCM-PF.....	125
<b>Figura 92.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (125 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) da fração OFCM-PF.....	125
<b>Figura 93.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) da fração OFFM-PA .....	126
<b>Figura 94.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (125 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) da fração OFFM-PA .....	126
<b>Figura 95.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) da fração OFCM-PA .....	127
<b>Figura 96.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (125 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) da fração OFCM-PA.....	127
<b>Figura 97.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz,CDCl <sub>3</sub> ) da fração OFFM-PF-A .....	128
<b>Figura 98.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz,CDCl <sub>3</sub> ) da fração OFFM-PF-A .....	129
<b>Figura 99.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz,CDCl <sub>3</sub> ) da fração OFCM-PF-A .....	129
<b>Figura 100.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz,CDCl <sub>3</sub> ) da fração OFCM-PF-A.....	130
<b>Figura 101.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz,CDCl <sub>3</sub> ) da fração OFFM-PA-A.....	130
<b>Figura 102.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz,CDCl <sub>3</sub> ) da fração OFFM-PA-A.....	131
<b>Figura 103.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz,CDCl <sub>3</sub> ) da fração OFCM-PA-A .....	131
<b>Figura 104.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz,CDCl <sub>3</sub> ) da fração OFCM-PA-A .....	132

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Flavonóides isolados de espécies de <i>Ouratea</i> . .....	4
<b>Tabela 2.</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H 1, comparados com dados da literatura para friedelina (VELANDIA, 2002) .....	32
<b>Tabela 3.</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de 6, e comparação com valores de δ <sub>H</sub> da literatura (BENEDEK <i>et al</i> , 2006) .....	40
<b>Tabela 4.</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H e HSQC de 7, comparados com dados da literatura para (5,4'-diidroxí-7,3'-dimetoxi-isoflavona) (MCCORMICK <i>et al</i> , 1986) .....	45
<b>Tabela 5.</b> Dados de RMN de 8 comparados com dados da literatura para aldeído siríngico (PETTIT, 2009) .....	51
<b>Tabela 6.</b> Dados de RMN-HSQC/HMBC de 11 comparados com dados da literatura para aldeído ferúlico (KIM & RALPH, 2003).....	61

<b>Tabela 7.</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C e HSQC de 13 comparados com dados da literatura para panchovillina (5,7-diidroxi-3',4',5'-trimetoxi-isoflavona; NISHIYAMA <i>et al</i> , 1993) .....	70
<b>Tabela 8.</b> Dados de RMN-HSQC/HMBC de 14 comparados com dados da literatura para (5,7,4'-triidroxi-3',5'-dimetoxi-isoflavona) (TAHARA <i>et al</i> , 1991).....	77
<b>Tabela 9.</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H da fração biflavonóidica em comparação com os dados da amentoflavona da literatura I (SUZART, 2006) e II (VELANDIA, 1997).....	94
<b>Tabela 10.</b> Tempo de retenção (Tr) e comprimento de onda ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) dos padrões de biflavonóides e o ácido siríngico analisados por CLAE-DAD .....	96
<b>Tabela 11.</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H de 23 (500 MHz) em comparação com valores da literatura (MARKHAM <i>et al</i> , 1990).....	105
<b>Tabela 12.</b> Dados de RMN <sup>1</sup> H e COSY <sup>1</sup> H x <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) da substância 24 em comparação com a literatura (HARBORNE & MABRY, 1982; HARBORNE, 1994) .....	109
<b>Tabela 13.</b> Resultados obtidos para teor de fenóis totais para as amostras de frações, através do reagente de Folin-Denis .....	121
<b>Tabela 14.</b> Resultados obtidos para teor de fenóis na solução não tanante para as amostras de frações precipitadas em 800 mg de caseína, através do reagente de Folin-Denis .....	122
<b>Tabela 15.</b> Resultados obtidos para teor de taninos com base na equação [T]= [FT] – [SNT] .....	122

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Marcha de fracionamento dos extratos do caule de <i>Ouratea ferruginea</i> .....	20
<b>Esquema 2.</b> Marcha de fracionamento dos extratos de folhas de <i>Ouratea ferruginea</i> .....	26
<b>Esquema 3.</b> Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro de massa do componente com Tr 9,96 min. ....	58
<b>Esquema 4.</b> Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro do componente com Tr 11,00 min. ....	59
<b>Esquema 5.</b> Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro do componente com Tr=12,20 min.....	66
<b>Esquema 6.</b> Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro do componente com Tr=4,20 min.....	68
<b>Esquema 7.</b> Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro do componente com Tr 27,15 min. ....	74
<b>Esquema 8.</b> Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro do componente com Tr 29,62 min. ....	75

<b>Esquema 9.</b> Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro de massas do componente com Tr 9,21 min. ....	86
<b>Esquema 10.</b> Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro de massas do componente com Tr 11,4 min. ....	87
<b>Esquema 11.</b> Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro de massas do componente com Tr 14,2 min. ....	88
<b>Esquema 12.</b> Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro do componente com Tr 25,1 min. ....	115
<b>Esquema 13.</b> Proposta da via biossintética de flavonóides (Dewick, 1997). ....	117
<b>Esquema 14.</b> Proposta da via biossintética de isoflavonóides (Dewick, 1997). ....	117
<b>Esquema 15.</b> Proposta da via biossintética de isoflavonas isoladas de <i>Ouratea ferruginea</i> (Dewick, 1997). ....	118
<b>Esquema 16.</b> Proposta para reação de metilação de flavonóides (Dewick, 1997). ....	118
<b>Esquema 17.</b> Proposta da via biossintética das biflavona: amentoflavona e 7-metilamentoflavona (Dewick, 1997).....	119

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 5.</b> Estruturas dos constituintes isolados de <b>OFC</b> . ....	30
<b>Quadro 6.</b> Estruturas dos constituintes isolados de <b>OFF</b> .....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1D	unidimensional
2D	bidimensional
$\delta_H$	deslocamento químico de hidrogênio (ppm)
$\delta_C$	deslocamento químico de carbono (ppm)
$\nu$	estiramento
$\delta$	dobramento
$\lambda$	comprimento de onda
AcOEt	acetato de etila
CCDA	cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
$CDCl_3$	clorofórmio deuterado
CG-EM	cromatografia em fase gasosa acoplada a espectroscopia de massas
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CL-EM-IES	cromatografia líquida acoplada a espectroscopia de massas com fonte de ionização de elétron-spray.
COSY	<b>C</b> orrelation <b>S</b> pectroscopy
<i>d</i>	dubleto
<i>dd</i>	duplo dubleto
$D_3CCOCD_3$	acetona deuterada
DMSO- $d_6$	dimetilsulfóxido deuterado
EM	espectrometria de massas
HMBC	<b>H</b> eteronuclear <b>M</b> ultiple- <b>B</b> ond <b>C</b> orrelation
HSQC	<b>H</b> eteronuclear <b>S</b> ingle- <b>Q</b> uantum <b>C</b> oherence
Hz	Hertz
IV	infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento em Hertz
<i>m</i>	multiplete
$M^{+\bullet}$	íon molecular
MeOH	metanol
Me	metila
MHz	Mega Hertz
<i>m/z</i>	relação massa/carga
NOESY	<b>N</b> uclear <b>O</b> verhauser and <b>E</b> xchange <b>S</b> pectroscopy
OFCD	<i>Ouratea ferruginea</i> caule diclorometano
OFM	<i>Ouratea ferruginea</i> caule metanol
OFM-PA	<i>Ouratea ferruginea</i> caule metanol – partição acetato de etila
OFM-PA-A	<i>Ouratea ferruginea</i> caule metanol – partição acetato de etila acetilada
OFM-PD	<i>Ouratea ferruginea</i> caule metanol – partição diclorometano
OFM-PF	<i>Ouratea ferruginea</i> caule metanol – partição final
OFM-PF-A	<i>Ouratea ferruginea</i> caule metanol – partição final acetilada
OFM-PH	<i>Ouratea ferruginea</i> caule metanol – partição hexano
OFFH	<i>Ouratea ferruginea</i> folha hexano
OFFM	<i>Ouratea ferruginea</i> folha metanol
OFFM-PA	<i>Ouratea ferruginea</i> folha metanol – partição acetato de etila
OFFM-PA-A	<i>Ouratea ferruginea</i> folha metanol – partição acetato de etila acetilada
OFFM-PD	<i>Ouratea ferruginea</i> folha metanol – partição diclorometano



OFFM-PH	<i>Ouratea ferruginea</i> folha metanol – partição hexano
OFFM-PF	<i>Ouratea ferruginea</i> folha metanol – partição final
OFFM-PF-A	<i>Ouratea ferruginea</i> folha metanol – partição final acetilada
OMe	metoxila
p.f.	ponto de fusão
RMN <sup>1</sup> H	ressonância magnética nuclear de proton
RMN <sup>13</sup> C	ressonância magnética nuclear de carbono-13
R <sub>f</sub>	fator de retenção
<i>s</i>	singleto
<i>sl</i>	singleto largo
<i>t</i>	tripleto
Tr	tempo de retenção
TMS	tetrametilsilano

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

FIDELIS, Queli Cristina. **Metabólitos especiais isolados de folhas e galhos de *Ouratea ferruginea* Engl. (Ochnaceae)**. 2011. 159p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica, Química de Produtos Naturais). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. RJ, 2011.

## RESUMO

Este trabalho descreve o estudo fitoquímico de caule e folhas da espécie vegetal *Ouratea ferruginea* Engl, Ochnaceae. O material para estudo foi coletado no campus da Embrapa em Belém do Pará e identificado pela Dra Silvane Tavares Rodrigues. As substâncias descritas nesta investigação fitoquímica foram isoladas através de partição com solventes e técnicas cromatográficas de extratos obtidos através de maceração a frio com hexano, acetato de etila e metanol. As estruturas foram determinadas através da análise de dados fornecidos por espectrometria na região do infravermelho, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (técnicas 1D e 2D), de massas incluindo CG-EM e CLAE-EM das substâncias naturais e de alguns derivados. Do extrato em diclorometano do caule foram isolados friedelina, friedelinol, sitosterol, estigmasterol, campesterol, 3- $\beta$ -*O-D*-glicopiranosil-estigmasterol, 2,6-dimetoxi benzoquinona, 2,6-dimetoxi hidroquinona, as isoflavonas 5,4'-diidroxí-7,3',5'-trimetoxi-isoflavona, 5,4'-diidroxí-7,3'-dimetoxi-isoflavona, 5-hidroxí-7,3',4',5'-tetrametoxi-isoflavona, 7,5-diidroxí-3',4',5'-trimetoxi-isoflavona, 7,5,4'-triidroxí-3',5'-dimetoxi-isoflavona, além dos aldeídos siríngico e ferúlico. Da partição em diclorometano do extrato metanólico do caule foram isolados ácido vanílico, 4((1*E*)-3-hidroxí-1-propenil)-2-metoxifenol e 3,5-dimetoxi-4-hidroxí-diidrocinamaldeído. Das folhas foi isolada a lupeona na partição em hexano do extrato metanólico; e na partição em diclorometano foram identificados os biflavonóides amentoflavona e 7-metil-amentoflavona, conhecida como sequioiaflavona, e o ácido siríngico. Na partição em acetato de etila foi isolado a epicatequina cuja configuração absoluta foi definida com análise do espectro de dicroísmo circular. A sequioflavona está sendo registrada pela primeira vez em Ochnaceae. Das frações polares foram determinados o teor de fenóis totais e taninos por métodos de Folin-Denis e precipitação com caseína, adaptados, além de análise com espectros de RMN.

Palavras-chave: terpenóides, isoflavonas, biflavonóides, fenólicos totais, *Ouratea ferruginea* Engl, Ochnaceae.

FIDELIS, Queli Cristina. **Special metabolites isolated from the leaves and stem of *Ouratea ferruginea* Engl (Ochnaceae)** 2011. 159p. Dissertation (Master in Science, Organic Chemistry, Natural products Chemistry). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. RJ, 2011.

## ABSTRACT

This work describes the phytochemical study of the stems and leaves of *Ouratea ferruginea* Engl., Ochnaceae. The material for study was collected in the campus of Embrapa in Belém, Pará state, and identified by Dra Silvana Taveres Rodrigues. The compounds described in this phytochemistry investigation were isolated by the solvents partition and chromatographic techniques of the extracts obtained by maceration at room temperature with hexane, ethyl acetate and methanol. The structures were determined through analysis of data provided by IR, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (1D and 2D techniques), mass spectrometry including GC-MS and HPLC-MS of natural compounds and some derivatives. From the stem dichloromethane extract friedelin, friedelinol, sitosterol, stigmasterol, campesterol, 3-β-O-D-glucopyranosyl-stigmasterol, 2,6-dimethoxy-benzoquinone, 2,6-dimethoxy-hydroquinone, the isoflavones: 5,4'-dihydroxy-7,3',5'-trimethoxy-isoflavone, 5-hydroxy-7,3',4',5'-tetramethoxy-isoflavone, 5,4'-dihydroxy-7,3'-dimethoxy-isoflavone, 7,5-dihydroxy-3',4',5'-trimethoxy-isoflavone, 7,5,4'-trihydroxy-3',5'-dimethoxy-isoflavone, and ferulic and syringic aldehyde were isolated. From the dichloromethane partition of the methanol extract of the stem vanillic acid, 4-((1E)-3-hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol and 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-dihydrocinamaldehyde were isolated. From hexane fraction of methanol extract from the leaves lupeone was isolated, and from the dichloromethane methanol partition were identified the biflavonoids amentoflavone and 7-methyl-amentoflavone, known as sequoiaflavone, along with syringic acid. From the ethyl acetate of the methanol extracts partition the epicatechin which absolute configuration was defined by circular dichroism spectral analysis was isolated. The sequoiaflavone is been identified in Ochnaceae for the first time. From the polar fraction the total phenol were determined by adapted Folin-Denis and precipitation with casein methods and by NMR spectral analysis.

Keywords: isoflavones, biflavonoids, total phenol, *Ouratea ferruginea* Engl, Ochnaceae.

## I. INTRODUÇÃO

Atualmente, quase a totalidade dos países, principalmente aqueles considerados desenvolvidos, realizam atividades de pesquisas com base no estudo de constituintes químicos produzidos pelo metabolismo secundário de organismos vivos. A principal razão dessas atividades é a procura de produtos para resolver problema de saúde humana. Para o profissional de Química de Produtos Naturais seus objetivos vão além da procura de medicamentos. O químico de produtos naturais estuda a composição química de organismos vivos na procura de desvendar as estruturas dos metabólitos especiais para o entendimento de suas propriedades no sistema inserido e tirar conclusões em relação a sistemática química-botânica, ecologia química, química de alimentos, etc, além de criar modelos estruturais para síntese orgânica com diferentes objetivos. O conhecimento da composição química de organismos vegetais ou animais contribui também para a manipulação racional de rotas biogênicas e a produção controlada de metabólitos secundários selecionados com base em critérios práticos, científicos e tecnológicos.

Uma das razões mais relevantes para o desenvolvimento de trabalhos na área de Química de Produtos Naturais é a necessidade de se obter fontes naturais de novos medicamentos, para utilizá-los diretamente ou como biofornecedores de matéria prima para preparação semissintética de substâncias, com atividade biológica. Isso tem pressionado as indústrias farmacêuticas a investir nesta área, mas, entretanto percebe-se a dificuldade de criação de novos medicamentos derivados de plantas. Certamente o poder econômico dominado pelos investimentos em medicamentos sintéticos tem sido o motivo da inibição da criação desta classe de medicamentos, mais acessíveis pela população. A possibilidade deste caminho é indiscutível, pois a medicina alopática já utiliza universalmente apenas 119 drogas, com estruturas definidas, que são extraídas de cerca de 90 espécies de plantas superiores. Também é impossível ignorar que cerca de 80% da população de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, são quase completamente dependentes da medicina caseira, utilizando plantas para suas necessidades primárias de saúde (BRAZ-FILHO, 1994). Isso revela a necessidade do conhecimento farmacognóstico deste material utilizado pela população. A química de produtos naturais deve continuar contribuindo nos processos de investigação das plantas usadas nesses costumes populares, que, aliado à Química Farmacêutica, permitirá no futuro a inserção de novos fitofármacos no mercado farmacêutico.

Produtos naturais também são empregados em outras áreas de conhecimento como agroquímica pelo fornecimento de fungicidas e inseticidas naturais como as rotenonas; alimentícias, para a obtenção de substâncias naturais usadas para sabor e cor dos alimentos como o mentol, ácido benzóico, etc.; e em cosméticos, pela necessidade de perfumes naturais como a cânfora, cumarina e linalol (BRAZ-FILHO, 1994).

Dentre as diversas classes de metabólitos especiais, tem-se observado um interesse crescente no estudo da atividade biológica de plantas que contém flavonoides. Neste sentido tem-se desenvolvido trabalhos sobre ação dos flavonoides na biologia das plantas, bioquímica ecológica, quimiotaxonomia, tecnologia de alimentos e farmacologia. (BOHLIN *et al*, 2010; BRAZ-FILHO, 2010). Levando em consideração estes fatores, tornam-se relevantes os conhecimentos sobre as fontes naturais de flavonoides. Para melhor contribuir com os estudos da atividade biológica de constituintes desta classe de metabolitos, é importante a identificação correta nos extratos de plantas, até mesmo quando eles se apresentam como traços (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

Flavonoides são encontrados em diversas famílias, no entanto, algumas famílias ou gêneros são capazes de biossintetizar biflavonoides com grande diversidade estrutural. Em levantamento na literatura verificou-se que a família Ochnaceae apresenta essa característica. Dessa forma escolheu-se a espécie *Ouratea ferruginea* que em pesquisa bibliográfica realizado até o momento (*Chemical abstract, Biological chemistry*, resumos de eventos, etc.) não revelou trabalhos sobre o seu estudo fitoquímico ou farmacológico. A investigação fitoquímica dessa planta permite ampliar o conhecimento sobre a composição química do gênero *Ouratea* e família Ochnaceae. Diante destes fatos, iniciou-se o estudo da composição química dos extratos de folhas e galhos de *O. ferruginea* Engl..

## II. OBJETIVOS

**II.1.** Isolar, purificar e identificar metabólitos especiais presentes nos extratos orgânicos de caule e folhas de *Ouratea ferruginea* Engl. pela utilização de técnicas cromatográficas e métodos espectrométricos (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , IV, EM).

**II.2.** Contribuir para o conhecimento da química da família Ochnaceae.

**II.3.** Preparar derivados dos constituintes químicos isolados em quantidade adequada.

**II.4.** Determinar o teor de fenóis totais e taninos presentes nos extratos polares de folhas e galhos da espécie *Ouratea ferruginea* Engl. (Ochnaceae).

### III. REVISÃO DA LITERATURA

#### III.1. Família Ochnaceae e características do gênero *Ouratea*

A família Ochnaceae pertence à ordem Theales (CRONQUIST *et al.*, 1988; DAHLGREN *et al.*, 1980) ou Ochnales (TAKHTAJAN *et al.*, 1997) e têm sido incluída na subclasse Dilleniidae (AMARAL *et al.*, 1998). Encontram-se nesta família cerca de 35 gêneros e 600 espécies de ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (WATSON & DALLWITZ, 2000). No Brasil, ocorrem aproximadamente nove gêneros com 105 espécies (JOLY *et al.*, 1988). São plantas essencialmente arbóreas ou arbustivas (CURTIS *et al.*, 1960). O gênero *Ouratea* Alb., é endêmico da região neotropical, e é o maior da família com aproximadamente 120 espécies (SALVADOR *et al.*, 2005).

#### III.2. Metabólitos especiais identificados em espécies de Ochnaceae

As espécies de Ochnaceae já estudadas são biprodutoras principalmente de flavonóides (MOREIRA *et al.*, 1994) e biflavonóides (MBING *et al.*, 2003a, 2003b), sendo os gêneros *Ouratea*, *Luxemburgia*, *Ochna* e *Lophira* os melhores representantes da família, quanto à composição química. Em *Luxemburgia* foram detectados os biflavonóides derivados de chalconas, como luxenchalcona (C-3'→O-C-4'', **Figura 1b, p.7**) e ochnaflavona (também C-3'→O-C-4'', **Figura 1a, p.7**) (CARVALHO *et al.*, 2004) estruturas próximas às encontradas em *Lophira* (TIH *et al.*, 1990; GHOGOMU TIH *et al.*, 1990) e *Ochna* (PEGNYEMB *et al.*, 2001). Por outro lado, *Ouratea* tem tendência em metabolizar com mais frequência os dímeros de flavonas. As ligações entre as unidades flavonoídicas podem ser C-C ou C-O-C envolvendo os anéis A, B ou C dos monômeros. Uma característica do gênero *Ouratea* é a ligação entre seus monômeros, sendo as mais abundantes C-3→C-8'' e C-6→C-8'', acrescentando uma variação no padrão de metilação, **Figura 2 (p. 8)**. Isso permite perceber a diferença entre esses gêneros, sendo que *Luxemburgia* é próximo ao gênero *Ochna* e metaboliza com frequência os dímeros de chalconas. A frequência e a diversidade estrutural dos biflavonóides em espécies desses gêneros permitem utilizá-los como marcadores quimiotaxonômicos (SUZART *et al.*, 2007). Nos extratos hexânicos das raízes de *Ouratea hexasperma* foram isoladas as isoflavonas dímeras, hexaspermona A (**4**), hexaspermona B (**5**)

e hexaspermona C (6), (MOREIRA *et al.*, 1994). Os extratos dos galhos de *Ouratea semisserrata* forneceram isoflavonas cloradas a 3',6,8-tricloro-4',5-diidroxi-7-metoxiflavona (13) e a 3',5',6,8-tetracloro-4',5-diidroxi-7-metoxiflavona (14) (VELANDIA *et al.*, 2002). Algumas espécies como a *Ouratea flava* são capazes de biossintetizar biflavonóides com unidades dímeras pouco comuns com a calodenina B (28), flavumona A (29), flavumona B (30) e lophirona A (31) além de isoflavona (33) (GARTLAN *et al.*, 1980). Os extratos metanólicos de folhas de *Ouratea staudtii* Van Tiegh forneceram o biflavonóide ochnaflavona (Figura 1a, p.7), já isolada em espécies do gênero *Ochna*, e a lophirona A (32), encontrada no gênero *Lophira*. A amentoflavona (11), bilobetina (41), podocarpusflavona A (18) e agatisflavona (35) também foram isoladas desta espécie de *Ouratea*. Isto mostra a proximidade de espécies deste gênero com *Lophira* e *Ochna*, uma vez que este é o primeiro relato do isolamento de ochnaflavona em espécies de *Ouratea* (ZINTCHEM *et al.*, 2007). Os biflavonóides amentoflavona, agatisflavona, e derivados, são os mais frequentemente encontrados em espécies de *Ouratea*, portanto são considerados marcadores quimiotaxonômicos do gênero *Ouratea*. Outras classes de metabolitos especiais como Cianidina (3) proantocianidina (1) e catequina (2) (*Ouratea sp*) também já foram encontradas em espécies desse gênero como *Ouratea affinis* e *Ouratea calantha* (MARCOL *et al.*, 1988; GONÇALEZ *et al.*, 2001). Outros metabólitos especiais como nor-isoprenóides, lignanas, diterpenos (VELANDIA *et al.*, 1998a), triterpenos, ácidos graxos e triglicerídeo (SUZART *et al.*, 2007) também são encontrados na composição química de espécies de *Ouratea*. A Tabela 1 (p. 4) contém uma relação dos flavonóides encontrados em espécies de *Ouratea* e as estruturas estão representadas na Figura 2. (p.8) Estas observações permitem perceber que os flavonóides constituem a principal classe de metabólitos de *Ouratea*. Dando continuidade ao estudo de espécies de *Ouratea* realizamos o estudo fitoquímico da espécie *Ouratea ferruginea* (Capítulo IV) cuja química ainda é totalmente desconhecida.

**Tabela 1.** Flavonóides isolados de espécies de *Ouratea*.

Flavonóides	Espécies	Ref.
cianidina (3)	<i>O. affinis</i>	GARTLAN <i>et al.</i> , 1980
amentoflavona (11)	<i>O. aquatica</i>	LIMA <i>et al.</i> 2006
cianidina (3)	<i>O. calantha</i>	GARTLAN <i>et al.</i> , 1980
5,7,4'-trimetoxiisoflavona (7)	<i>O. castaneifolia</i>	NASCIMENTO <i>et al.</i> 2009
5,4'-diidroxi-7,3',5'-trimetoxiflavona (42)	<i>O. castaneifolia</i>	NASCIMENTO <i>et al.</i> 2009

**Tabela 1. Continuação**

<b>Flavonóides</b>	<b>Espécies</b>	<b>Ref.</b>
amentoflavona (11)	<i>O. castaneifolia</i>	NASCIMENTO <i>et al.</i> 2009
7,7''-O-dimetil-amentoflavona (43)	<i>O. castaneifolia</i>	NASCIMENTO <i>et al.</i> 2009
heveaflavona (44)	<i>O. castaneifolia</i>	NASCIMENTO <i>et al.</i> 2009
tetrametilamentoflavona (45)	<i>O. castaneifolia</i>	NASCIMENTO <i>et al.</i> 2009
amentoflavona (11)	<i>O. cuspidata</i>	SUZART <i>et al.</i> ,2007
putraflavona (24)	<i>O. cuspidata</i>	SUZART <i>et al.</i> ,2007
5,7,4'-triidroxi-3',5'-dimetoxi-flavona (25)	<i>O. cuspidata</i>	SUZART <i>et al.</i> ,2007
3,4',5,7-tetraidroxi-3'-metoxi-flavonol (39)	<i>O. cuspidata</i>	SUZART <i>et al.</i> ,2007
5,4',7-triidroxi-3'-metoxi-3-β-O-galactopiranosil-flavona (40)	<i>O. cuspidata</i>	SUZART <i>et al.</i> ,2007
calodenina B (28)	<i>O. flava</i>	MBING <i>et al.</i> , 2003a
flavumona A (29)	<i>O. flava</i>	MBING <i>et al.</i> , 2003a
flavumona B (30)	<i>O. flava</i>	MBING <i>et al.</i> , 2003a
calodenina C (31)	<i>O. flava</i>	MBING <i>et al.</i> , 2003a
lophirona A (32)	<i>O. flava</i>	MBING <i>et al.</i> , 2003b
4',5-OMe-6,7-metilenodioxi-isoflavona (33)	<i>O. flava</i>	MBING <i>et al.</i> , 2003a
lophirona G (50)	<i>O. flava</i>	MBING <i>et al.</i> , 2003b
hexaspermona A (4)	<i>O. hexasperma</i>	MOREIRA <i>et al.</i> , 1994
hexaspermona B (5)	<i>O. hexasperma</i>	MOREIRA <i>et al.</i> , 1994
hexaspermona C (6)	<i>O. hexasperma</i>	MOREIRA <i>et al.</i> , 1994
5,7,4'-O-metil-isoflavona (7)	<i>O. hexasperma</i>	MOREIRA <i>et al.</i> , 1994
7''-O-metilagatisflavona (10)	<i>O. hexasperma</i>	MOREIRA <i>et al.</i> , 1999
7,7''-O-dimetillanaraflavona (34)	<i>O. hexasperma</i>	DANIEL <i>et al.</i> ,2005
7'''-O-metilgastiflavona (10)	<i>O. hexasperma</i>	DANIEL <i>et al.</i> ,2005
agastiflavona (35)	<i>O. hexasperma</i>	DANIEL <i>et al.</i> ,2005
epicatequina (51)	<i>O. hexasperma</i>	DANIEL <i>et al.</i> ,2005
6-C-glicopiranosil-luteolina (36)	<i>O. hexasperma</i>	DANIEL <i>et al.</i> ,2005
3-O-glicopiranosil-quercetina (37)	<i>O. hexasperma</i>	DANIEL <i>et al.</i> ,2005

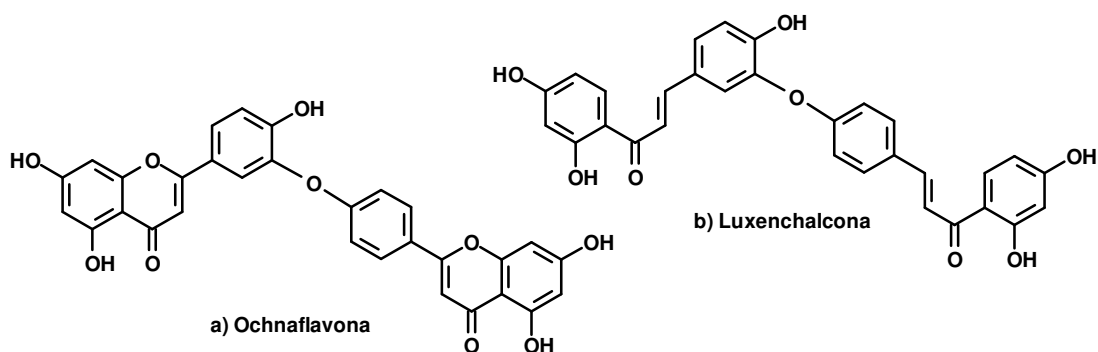


**Tabela 1. Continuação**

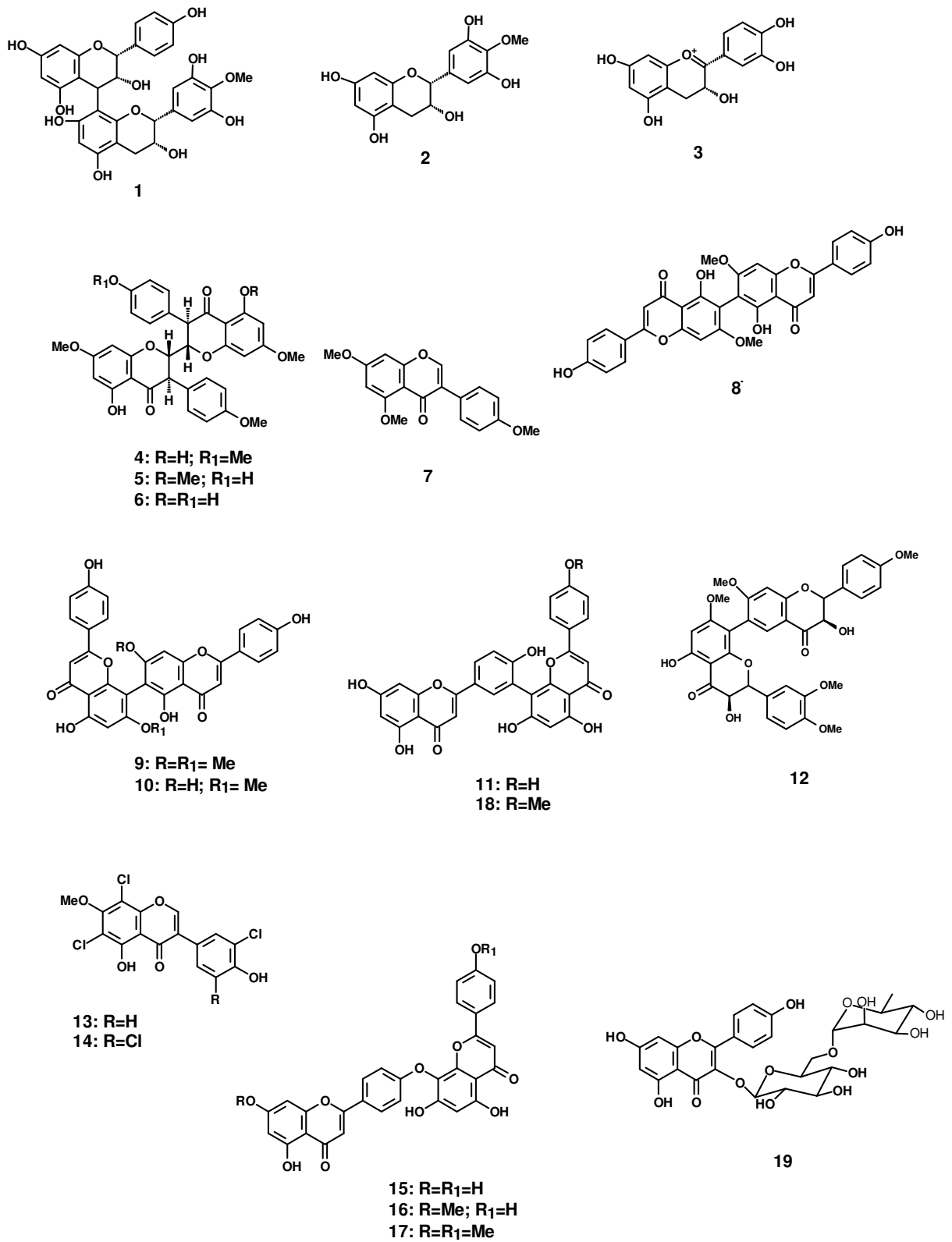
<b>Flavonóides</b>	<b>Espécies</b>	<b>Ref.</b>
8-C-β-D-glicopiranosil 2''-O-β-D-glicopiranosil-luteolina ( <b>38</b> )	<i>O. hexasperma</i>	DANIEL <i>et al.</i> ,2005
rutina ( <b>19</b> )	<i>O. hexasperma</i>	SUZART <i>et al.</i> ,2007
vitexina ( <b>26</b> )	<i>O. hexasperma</i>	SUZART <i>et al.</i> ,2007
orientina ( <b>27</b> )	<i>O. hexasperma</i>	SUZART <i>et al.</i> ,2007
swertisina ( <b>20</b> )	<i>O. hexasperma</i>	SUZART <i>et al.</i> ,2007
swertiajaponina ( <b>21</b> )	<i>O. hexasperma</i>	SUZART <i>et al.</i> ,2007
3,4',5-triidroxi-6-γ,γ dimetil-alil-7-O-β-D-glicosil-flavanona ( <b>22</b> )	<i>O. hexasperma</i>	SUZART <i>et al.</i> ,2007
3,4',5-triidroxi-6-γ,γ dimetil-alil-7-O-β-D-glicopiranosil-flavona ( <b>23</b> )	<i>O. hexasperma</i>	SUZART <i>et al.</i> ,2007
7''-O-metil-agathisflavona ( <b>10</b> )	<i>O. microdonta</i>	CARVALHO <i>et al.</i> , 2008
amentoflavona ( <b>11</b> )	<i>O. microdonta</i>	CARVALHO <i>et al.</i> , 2008
agatisflavona ( <b>35</b> )	<i>O. microdonta</i>	CARVALHO <i>et al.</i> , 2008
amentoflavona ( <b>11</b> )	<i>O. multiflora</i>	MONACHE <i>et al.</i> , 1967
3-OH-4',5,7-OMe-flavona-(6→8'')- 3''-OH-3'''',4''',5'',7''-OMe-flavona ( <b>12</b> )	<i>O. multiflora</i>	MONACHE <i>et al.</i> , 1967
ouratina A ( <b>46</b> )	<i>O. nigroviolacea</i>	MBING <i>et al.</i> , 2006
ouratina B ( <b>47</b> )	<i>O. nigroviolacea</i>	MBING <i>et al.</i> , 2006
agatisflavona ( <b>35</b> )	<i>O. nigroviolacea</i>	MBING <i>et al.</i> , 2006
7,7''-O-dimetilagatisflavona ( <b>9</b> )	<i>O. parviflora</i>	FELICIO <i>et al.</i> 2004
amentoflavona ( <b>11</b> )	<i>O. parviflora</i>	FELICIO <i>et al.</i> 2004
3',6,8-Cl-4',5-OH-7-O-Me-isoflavona ( <b>13</b> )	<i>O. semisserrata</i>	VELANDIA <i>et al.</i> , 2002
3',5',6,8-Cl-4',5-OH-7-O-Me-isoflavona ( <b>14</b> )	<i>O. semisserrata</i>	VELANDIA <i>et al.</i> , 2002
5,7-OH-flavona-(4'→O→8'')- 4''',5'',7''-OH-flavona ( <b>15</b> )	<i>O. semisserrata</i>	VELANDIA <i>et al.</i> , 2002
5-OH-7-O-Me-flavona-(4'→O→8'')- 4''',5'',7''-OH-flavona ( <b>16</b> )	<i>O. semisserrata</i>	VELANDIA <i>et al.</i> , 2002
5-OH-7-O-Me-flavona-(4'→O→8'')-5'',7''-OH-4'''-O-Me-flavona ( <b>17</b> )	<i>O. semisserrata</i>	VELANDIA <i>et al.</i> , 2002

**Tabela 1. Continuação**

Flavonóides	Espécies	Ref.
amentoflavona (11)	<i>O. semisserrata</i>	VELANDIA <i>et al.</i> , 2002
podocarpusflavona A (18)	<i>O. semisserrata</i>	VELANDIA <i>et al.</i> , 2002
rutina (19)	<i>O. semisserrata</i>	VELANDIA <i>et al.</i> , 2002
proantocianidina (1)	<i>Ouratea sp</i>	MARCOL <i>et al.</i> , 1988
catequina (2)	<i>Ouratea sp</i>	MARCOL <i>et al.</i> , 1988
6,6''- bigenkanina (8)	<i>O. spectabilis</i>	FELICIO <i>et al.</i> , 1995
7,7''-O-dimetilagastiflavona (9)	<i>O. spectabilis</i>	FELICIO <i>et al.</i> , 1995
bilobetina (41)	<i>O. staudtii</i>	ZINTCHEM <i>et al.</i> , 2007
lophirona A (32)	<i>O. staudtii</i>	ZINTCHEM <i>et al.</i> , 2007
amentoflavona (11)	<i>O. staudtii</i>	ZINTCHEM <i>et al.</i> , 2007
ochnaflavona (Fig.1a)	<i>O. staudtii</i>	ZINTCHEM <i>et al.</i> , 2007
podocarpusflavona A (18)	<i>O. staudtii</i>	ZINTCHEM <i>et al.</i> , 2007
agatisflavona (35)	<i>O. staudtii</i>	ZINTCHEM <i>et al.</i> , 2007
sulcatona A (48)	<i>O. sulcata</i>	PEGNYEMB <i>et al.</i> , 2005
3-hidroxi-2,3-diidroapigenil-(4' → O → 3')- diidrocampferol (49)	<i>O. sulcata</i>	PEGNYEMB <i>et al.</i> , 2005
amentoflavona (11)	<i>O. sulcata</i>	PEGNYEMB <i>et al.</i> , 2005
agatisflavona (35)	<i>O. sulcata</i>	PEGNYEMB <i>et al.</i> , 2005
lophirona A (32)	<i>O. sulcata</i>	PEGNYEMB <i>et al.</i> , 2005



**Figura 1.** Estruturas da a) ochnaflavona e b) luxenchalcona.



**Figura 2.** Estruturas de flavonóides encontrados em espécies de *Ouratea*

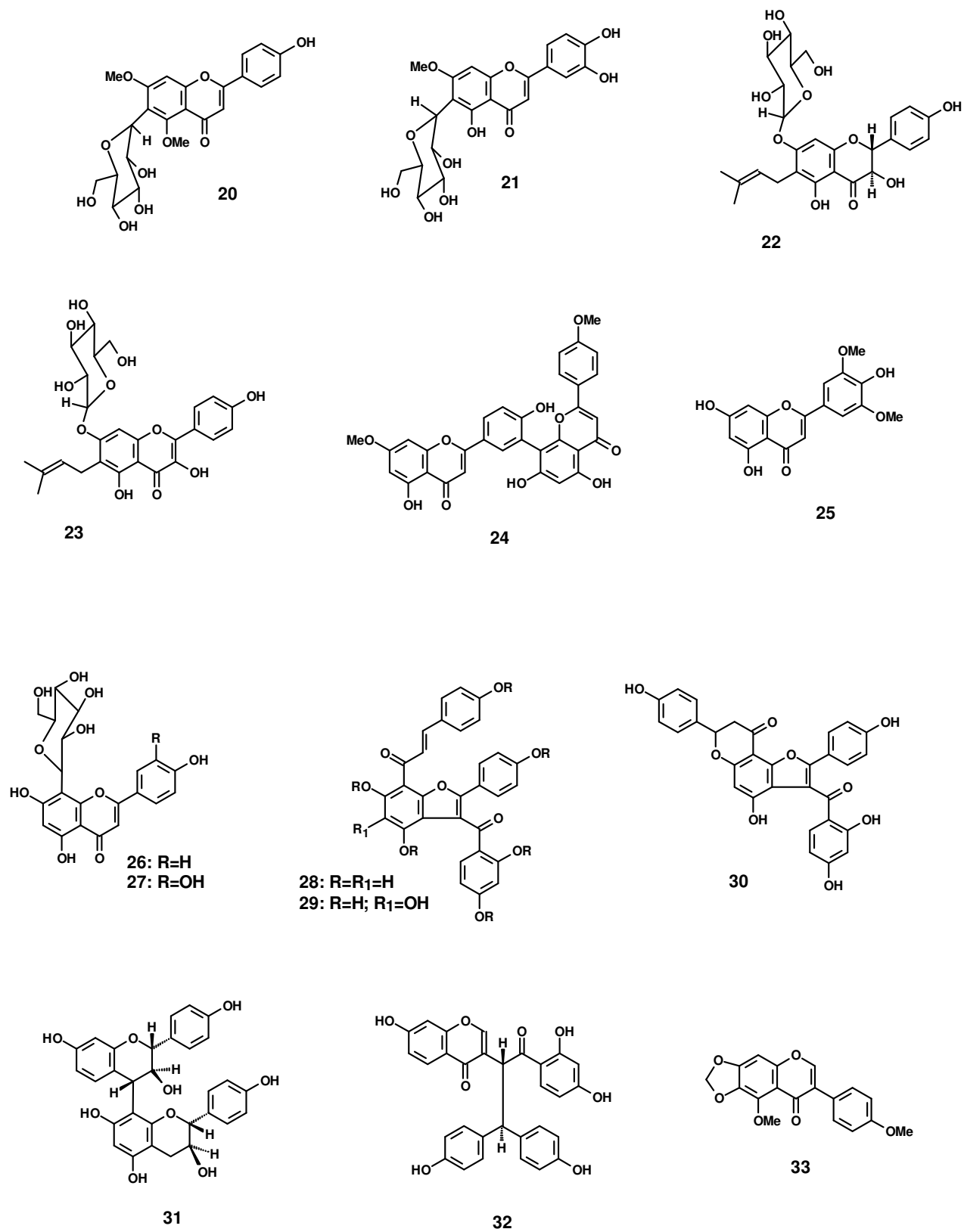


Figura 2. Continuação.

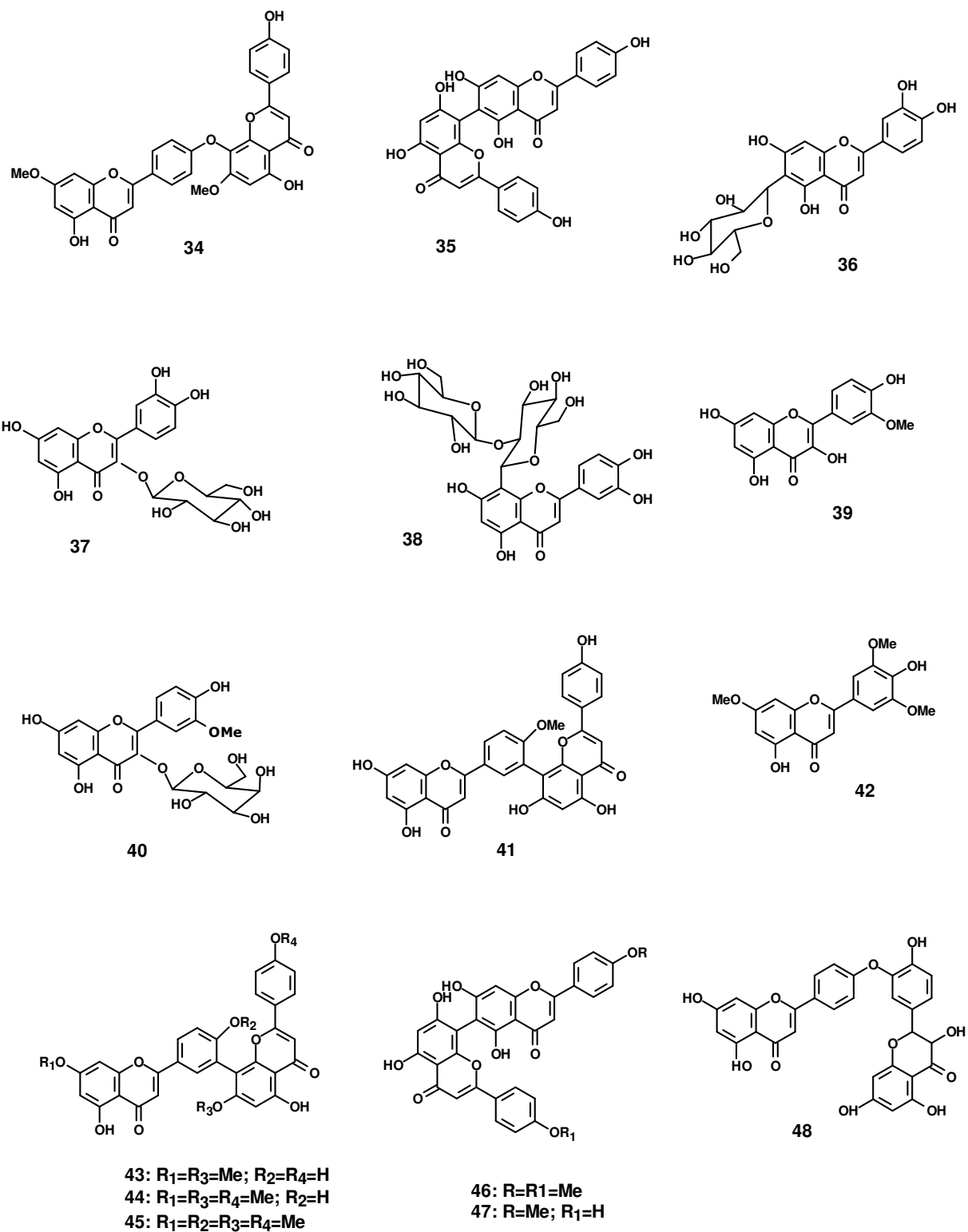
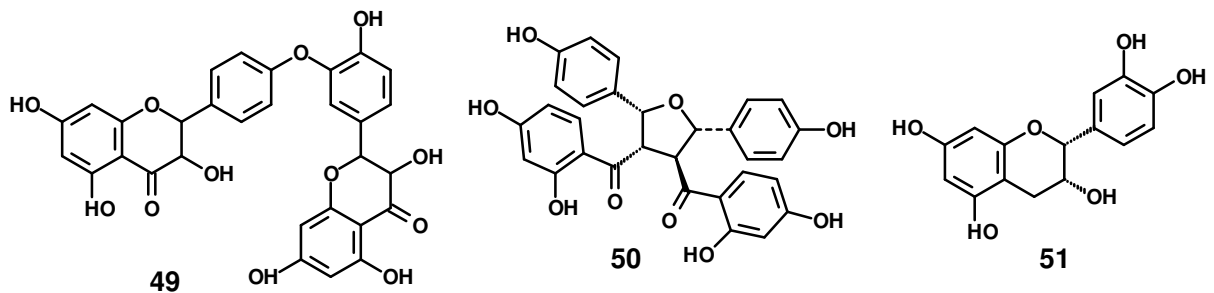


Figura 2. Continuação.



**Figura 2.** Continuação.

### III.3. Atividades biológicas apresentadas por espécies do gênero *Ouratea*

O extrato aquoso de *Ouratea sp.*, contendo proantocianidinas, mostrou atividade antitumoral contra o carcinossarcoma de Walker 256 e sarcoma 180 em ratos (SAMPAIO *et al.*, 1975; OLIVEIRA *et al.*, 1972). As biflavonas 6→6''- bigenkwanina (**8**) e a 7,7''-dimetoxiagatisflavona (**9**), isoladas da *O. spectabilis*, apresentaram atividade inibitória sobre a enzima aldose redutase de cristalino bovino, a qual está relacionado com a patogênese da maioria das complicações da diabetes como cataratas, retinopatia e neuropatia (FELICIO, *et al.*, 1995). Os biflavonóides isolados de *O. spectabilis*, *O. multiflora* e *O. parviflora* mostraram inibição da produção de aflatoxina por *Aspergillus flavus* (GONÇALEZ, *et al.*, 2001). Os biflavonóides, 7''-O-metilagatisflavona (**10**) de *O. hexasperma*, a amentoflavona (**11**) de *O. semiserrata* e o derivado acetilado da amentoflavona foram avaliados quanto as atividades inibitórias de DNA topoisomerase humana tipo I e II- $\alpha$ , crescimento de células de carcinoma de Ehrlich e crescimento de células de leucemia humana K562; os biflavonóides e o derivado apresentaram potente atividade sobre a inibição do crescimento de células de carcinoma de Ehrlich e a atividade inibitória da DNA topoisomerase humana tipo I na concentração de 200  $\mu$ M, enquanto que a apenas a 7''-O-metilagatisflavona (**10**) apresentou atividade sobre a inibição da DNA topoisomerase humana tipo II- $\alpha$ , na mesma concentração. O biflavonóide (**10**) também apresentou inibição de 42% do crescimento de células de leucemia humana K562 (GRYNBERG *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2002). O extrato hidroetanólico e a fração acetato de etila de *O semiserrata* apresentaram efeito vasodilatador endotélio-dependente e atividade antiipertensiva *in vitro*, inibindo a conversão da enzima angiotensina I (BRAGA *et al.*, 2000). A avaliação da atividade vasodilatadora de extrato hidroalcolico de caules de *O. semiserrata* em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina, produziu vasodilatação significativa ( $63 \pm 3 \%$ ,  $n = 6$ ) na concentração de 100 mg/mL. Este

estudo demonstrou a potente atividade vasodilatadora *in vitro* para o extrato hidroalcoólico de caules de *O. semiserrata* a qual, juntamente com a atividade inibitória da ECA *in vitro*, anteriormente relatada por Braga, apontam a espécie como fonte de substâncias bioativas, potencialmente úteis para o tratamento da hipertensão primária (VALADARES *et al.*, 2003). O óleo extraído do extrato hexânico dos frutos de *Ouratea parviflora* apresentou atividade antibacteriana e antifúngica (MARCOL *et al.*, 1988). Os extratos metanólicos de folhas de algumas espécies de *Ouratea* apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* (*O. sulcata*), e *Candida albicans* (*O. elongata* e *O. flava*) (GANGOUÉ-PIÉBOJI *et al.*, 2006). Os biflavonóides sulcatona A (**48**) e 3-hidroxi-2,3-diidroapigenil-(4'→O→3')-diidrocampferol (**49**) obtidos de *O. sulcata* também exibiram significante atividades antimicrobiana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio anguillarum* e *Escherichia coli* (PEGNYEMB *et al.*, 2005).

## IV. PARTE EXPERIMENTAL

### IV.1. Material e métodos

Utilizou-se evaporador rotatório Fisaton 801 para retirar solventes das soluções de extratos brutos.

Os reagentes usados foram: cloreto de alumínio hexahidratado, tungstato de sódio diidratado ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), ácido fosfomolibdico ( $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]_x \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) da Vetec; o carbonato de sódio anidro da Grupo Química; os padrões (+)-catequina e (+)-epicatequina da Sigma Chemical Co e o ácido gálico da Merck.

Os espectros de RMN 1D foram processados no programa ACDLABS, os espectros de dicroísmo circular em programa Origin 5.0 e 6.0 e o gráfico em Microsoft Office Excel 2003.

As cromatografias em coluna foram realizadas com gel sílica (230-400 e 70-230 mesh, Vetec), e com Sephadex LH-20 (Sigma, USA).

Cromatografia em camada preparativa foi realizada em gel sílica 60 PF<sub>254</sub> da Merck ou Vetec sobre suporte de vidro e espessura de 1 mm. As substâncias foram detectadas por irradiação com lâmpada ultravioleta (254 e 366 nm).

As análises por cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas em “cromatofolhas” com gel sílica 60 F<sub>254</sub> em suporte de alumínio da Merck, Whatman e Sorbent. As substâncias foram visualizadas através de irradiação com lâmpada ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm e 365 nm, ou exposição a cristais de iodo resublimado

e/ou pulverizadas com solução de vanilina sulfúrica e solução de  $\text{AlCl}_3\text{-EtOH}$  (1%) (DOMINGUEZ, 1973; MATOS, 1988).

Os solventes utilizados para extração, técnicas cromatográficas e reações foram todos grau P.A. da indústria química Vetec. Alguns solventes comerciais foram destilados antes de serem utilizados como por exemplo o metanol, hexano, diclorometano, acetato de etila e clorofórmio. Para as análises em CLAE e UV foram usados solventes grau espectroscópico do Grupo Química e Vetec, e água Milli-Q.

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

Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram registrados em um espectrofotômetro VERTEX-70 com transformada de Fourier, em pastilhas de KBr ou em filmes sobre cela de NaCl.

Para a determinação do total de fenólicos foi utilizado o espectrofotômetro UV-Vis da marca Shimadzu, modelo UV-mini 1240, e as leituras realizadas a 760 nm, em cubeta de quartzo de caminho ótico de 1 cm.

Os cromatogramas e espectros de massas foram registrados a espectrômetro de massas computadorizado com analisador quadrupolo e ionização por impacto de elétrons, 70 eV, acoplado em cromatógrafo com fase gasosa, CG/EM-QP2010 Plus da Shimadzu.

As análises em LC-EM-IES foram realizadas na Universidade Federal do Ceará, no Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste – LEMANOR, em aparelho Shimadzu LC-EM-TOF (225-07100-34) equipado com fonte de ionização de elétron-spray.

Nas análises realizadas em CLAE utilizou o aparelho Shimadzu LC DAD com detector de fotodiodo, com coluna Shimadzu C18 (250 mm x 4,6 mm x 5  $\mu\text{m}$ ) e CLAE Shimadzu LC-20AT, detector UV, com coluna C18 (250 mm x 10 mm x 5  $\mu\text{m}$ ) para técnica semipreparativa.

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos em aparelho DC-Jasco 815; as leituras realizadas de 500 a 200 nm, a 22°C, em cubeta de quartzo com 1cm de caminho ótico.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ), incluindo experimentos em 2D, foram obtidos em aparelhos Brücker, modelos Advance II, de (400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) e (500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ ). Os solventes usados foram clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), metanol deuterado ( $\text{D}_3\text{COD}$ ) acetona deuterada ( $\text{D}_3\text{CCOCD}_3$ ) ou dimetilsulfóxido deuterado ( $\text{DMSO-d}_6$ ). Como padrão



interno foi usado tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram obtidos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) foram expressos em Hertz (Hz).

## **IV.2. Material vegetal**

O material para estudo, folhas e caule da espécie *Ouratea ferruginea* Engl., foi coletada na Embrapa de Belém, no estado do Pará, com a colaboração da Profa. Dra. Giselle M. S. P. Guilhon e identificado pela MSc. Silvane Tavares Rodrigues. A exsicata está depositada no herbário IAN da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, com o registro de nº 183954.

## **IV.3. Preparação de derivados**

Foram preparados derivados de frações e substâncias isoladas para facilitar o isolamento ou obtenção de espectros de RMN em clorofórmio deuterado e análise em CG-EM.

### **IV.3.1. Metilação com diazometano**

A solução de diazometano foi preparada de acordo com a metodologia experimental descrita na literatura (VOGEL, 1989; CARVALHO *et al.*, 2006). Adicionou-se a solução etérea do diazometano em excesso às substâncias dissolvidas em metanol. O solvente foi evaporado, fornecendo as substâncias metiladas.

### **IV.3.2. Acetilação com anidrido acético e piridina**

A reação de acetilação das substâncias foi feita adicionando-se piridina (3 mL /100 mg) e anidrido acético (4 mL/100 mg) nas amostras. A mistura reacional permaneceu sob agitação por 24 horas a temperatura de 60 °C. Após esse intervalo, adicionou-se água gelada à solução. O material acetilado foi extraído com clorofórmio (3x) e a solução clorofórmica lavada com HCl (10%) para eliminar a piridina, e em seguida, lavou-se várias vezes com água destilada. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e evaporada em rota evaporador, obtendo-se as substâncias acetiladas (MOREIRA *et al.*, 1999).

## **IV.4. Preparo dos extratos de folhas e caule**

Caule e folhas da planta, após serem secos e moídos, foram submetidos à extração através de maceração a frio. O caule (3645,97 g) foi inicialmente extraído com diclorometano e as folhas (968,57 g) com hexano e depois, em ambos, com metanol. Os solventes das extrações foram retirados através de destilação em evaporador rotatório sob pressão reduzida,

para a obtenção dos extratos. Das folhas foram obtidos os extratos denominados **OFFH** (*Ouratea ferruginea* folhas hexano: 18,95 g) e **OFFM** (*Ouratea ferruginea* folhas metanol: 152,26 g). Do caule resultaram os extratos **OFCD** (*Ouratea ferruginea* caule diclorometano: 15,33 g) e **OFCM** (*Ouratea ferruginea* caule metanol: 197,98 g). O **Esquema 1** (p. 20) mostra os procedimentos realizados no fracionamento dos extratos de caule e o **Esquema 2** (p. 26) os procedimentos de fracionamento dos extratos de folhas.

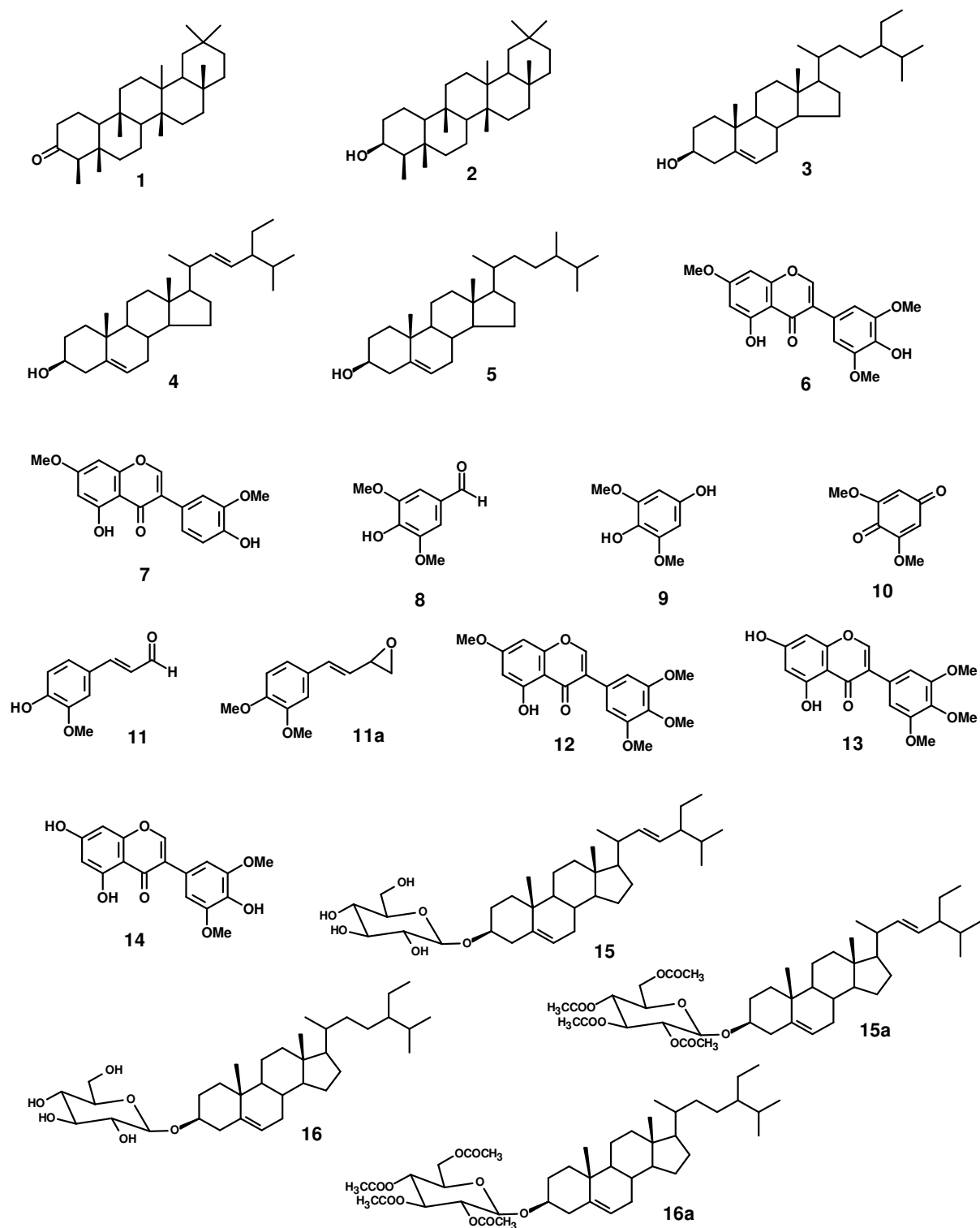
#### **IV.5. Isolamento e purificação de metabólitos especiais de extratos do caule**

##### **IV.5.1. Fracionamento do extrato do caule obtido com diclorometano (OFCD)**

Uma parte do extrato **OFCD** (5,33 g) foi reservada para a realização de ensaios biológicos. O restante (10,0 g) foi submetido à cromatografia líquida clássica. O extrato foi incorporado em gel de sílica (70-230 mesh) formando uma pastilha a qual foi introduzida dentro de um funil de separação de 1L. A coluna foi empacotada com o mesmo tipo de gel de sílica da pastilha. Utilizou-se hexano como eluente inicial, aumentando-se gradativamente a polaridade dos solventes, passando por diclorometano, acetato de etila, e metanol. Este fracionamento gerou 97 frações de 400 mL, as quais foram concentradas em evaporador rotatório. A comparação das frações foi feita por CCDA, usando vanilina sulfúrica e solução etanólica de cloreto de alumínio [ $\text{AlCl}_3\text{-EtOH}$  (1%)] como soluções reveladoras. As frações foram reunidas de acordo com a semelhança de seus perfis em CCDA.

A fração OFCD-6 resultou em um precipitado branco, identificado como o triterpeno **friedelina (1)**; 82,0 mg; p.f. 248-258°C) por análise de RMN  $^1\text{H}$ . Nas frações seguintes (OFCD-7-8; 126,0 mg) identificou-se a mistura de dois triterpenos: **friedelina (1)** e **friedelinol (2)** por análise em CG-EM e comparação com a biblioteca do aparelho. A fração OFCD-13-15 (297,0 mg; p.f. 140-145°C) forneceu cristais de coloração branca, os quais foram identificados, por análise de espectro de RMN  $^1\text{H}$  e CG-EM, como sendo mistura de **sitosterol (3)**, **estigmasterol (4)** e **campesterol (5)**. A fração OFCD-21-25 (228,0 mg) foi submetida CCDP, eluída com hexano/AcOEt – (9:1), que resultou em 4 partes. A parte 1(origem) foi submetida a uma segunda preparativa, eluída com hexano/AcOEt – (1:1), da qual se obteve uma substância em forma de pó levemente esbranquiçado, cuja análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e 2D (HSQC e HMBC) permitiu identificá-la como a **5,4'-diidroxí-7,5',3'-trimetoxi-isoflavona (6)**; 3,3 mg, p.f. 150-155°C). A sexta parte obtida da CCDP (eluente n-hexano/AcOEt – 1:1) da fração OFCD-27-28 (10,0 mg), forneceu a substância identificada como **5,4'-diidroxí-7,3'-dimetoxi-isoflavona (7)**; 6,0 mg, p.f. 180°C).

A fração OFCD-27-28-1p3 resultou de uma preparativa da reunião do sobrenadante da fração OFCD-27-28 com as partes restantes da preparativa descrita acima. A análise dos espectros de RMN<sup>1</sup>H 1D e HSQC 2D, permitiu identificar o **aldeído siríngico (8)**; 2,0 mg, p.f. 110<sup>0</sup>C). A fração OFCD-27-28-2p8 foi analisada com CG-EM e RMN<sup>1</sup>H e foi identificada como **2,6-dimetoxibenzoquinona (9)** enquanto a OFCD-27-28-p4 forneceu a mistura de **2,6-dimetoxibenzoquinona (9) e 2,6-dimetoxiidroquinona (10)** após análise com CG-EM. A fração OFC-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-33-34 foi submetida a sucessivas precipitações e recristalizações; foram obtidos desse procedimento um precipitado branco e sua água mãe; a análise do precipitado por espectro RMN <sup>1</sup>H conduziu a identificação do **aldeído ferúlico (11)**; 1,9 mg); a água mãe (4,9 mg, p.f. 175<sup>0</sup>C), foi analisada por CG-EM, RMN <sup>1</sup>H e HSQC e revelou a presença de duas isoflavonas em mistura, a **5-hidroxi-7,3',4',5'-tetrametoxi-isoflavona (12)** e a **7,5-diidroxi-5',4',3'-trimetoxi-isoflavona (13)**. A fração OFCD-50-51 forneceu um precipitado após adição de clorofórmio, que foi identificado como **5,7,4'-trihidroxi-3',5'-dimetoxi-isoflavona (14)**; 5,0 mg, p.f. 228-240<sup>0</sup>C) após análise dos espectros RMN 1D e 2D (HMBC e HSQC). A fração OFCD-68-69 (38,0 mg) foi insolúvel em clorofórmio e acetona, e pouco solúvel em metanol e DMSO, o que dificultou a aquisição de espectros de RMN. O espectro de infravermelho deste precipitado permitiu verificar a presença de hidroxilas. Esta informação possibilitou a preparação de um derivado acetilado (Ver **IV.4.3.2**), que após ser submetido a experimentos de RMN <sup>1</sup>H, COSY e CG-EM, identificou-se dois derivados acetilados em mistura, por conseguinte as saponinas **15** e **16**. As estruturas das substâncias isoladas de OFCD são apresentadas na **Figura 3 (p. 17)**.



**Figura 3.** Estruturas das substâncias isoladas de **OFCD**

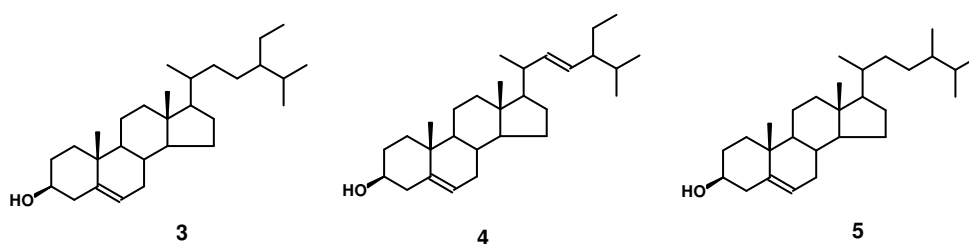
#### IV.5.2. Fracionamento do extrato metanólico do caule (OFCM)

O extrato **OFCM** (56,56 g) foi dissolvido em MeOH:H<sub>2</sub>O (8:2) e extraído primeiramente com hexano, em seguida diclorometano e acetato de etila. As soluções obtidas nestes solventes e a solução hidrometanólica restante foram concentradas em evaporador

rotatório resultando nas frações **OFCM-PH** (0,45 g), **OFCM-PD** (2,75 g), **OFCM-PA** (2,43 g) e **OFCM-PF** (50,23 g), correspondentes aos solventes extratores hexano, diclorometano, acetato de etila, e o resíduo hidrometanólico, respectivamente.

#### IV.5.2.1. Fracionamento cromatográfico de OFCM-PH

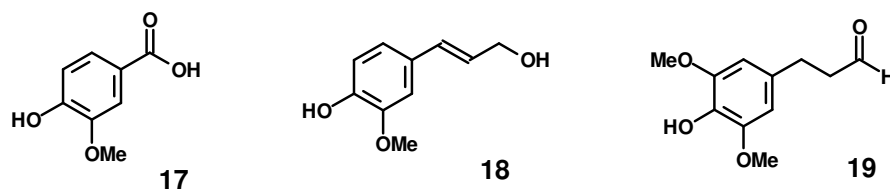
A fração **OFCM-PH** (0,45 g), foi submetida a cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica. Utilizaram-se os solventes hexano, diclorometano, clorofórmio e metanol, individualmente e em mistura, na eluição da coluna, por polaridade crescente. Foram coletadas 22 frações de 50 mL cada. A fração **OFCM-PH-6** (33,0 mg) foi aplicada em placa cromatográfica preparativa que forneceu 5 partes diferentes. A parte 3 (20,0 mg) foi analisada por RMN<sup>1</sup>H de CG-EM e conduziu à identificação de uma mistura de **sitosterol (3)**, **estigmasterol (4)** e **campesterol (5)**, **Figura 4 (p. 18)**. As frações menos polares apresentaram-se como mistura de hidrocarbonetos e as demais frações não forneceram resultados adequados para conclusões de constituintes.



**Figura 4.** Estruturas das substâncias isoladas de **OFCM-PH**

#### IV.5.2.2. Fracionamento cromatográfico de OFCM-PD

Utilizou-se 2,52g a fração OFCM-PD para fracionamento e 230,0 mg foi separado para ensaio biológico. A coluna de gel sílica foi eluída em polaridade crescente com hexano, diclorometano, clorofórmio e metanol. O fracionamento resultou em 22 frações de 250 mL. A fração OFCM-PD-14 (3 mg) foi injetada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectro de massas e mostrou picos de uma mistura de três constituintes majoritários [Tr= 9,27 (2,94%; m/z=168.0); 11,48 (42,87%; m/z=180.0); 14,20 (28,98%; m/z= 210.0)] que foram identificados como **ácido vanílico (17)**, **4-((1E)-3-hidroxi-1-propenil)-2-metoxifenol (18)** e **3,5-dimetoxi-4-hidroxi-diidrocinaldeído (19)**, **Figura 5 (p. 19)**. Junto a estas substâncias identificou-se um ftalato considerado contaminante do solvente [Tr: 19,02 (25,21%; m/z= 279.0)].



**Figura 5.** Estruturas das substâncias isoladas de OFCM-PD

#### IV.5.2.3. Fracionamento cromatográfico de OFCM-PA

Uma parte do material da fração OFCM-PA (64 mg) foi solubilizada em metanol e aplicada em gel Sephadex LH-20. Foram recolhidas 11 frações de 5 mL. A fração OFCM-PA-6-8 (18,9 mg) foi reaplicada em gel Sephadex LH-20, obtendo-se 13 frações de 5mL. Como as frações apresentaram em CCDA composição complexa, semelhante à fração de origem OFCM-PA, observou-se que a técnica de separação não foi eficiente. Ver **Cap. V.3. (p. 121)** e **V.4. (p. 124)**.

#### IV.5.3. Metilação da substância 11

Uma parte do precipitado de **11** (1,9 mg), obtido da fração OFCD-33-34, foi solubilizado em pequena quantidade de clorofórmio. Foram adicionados, ao material totalmente solubilizado, 4 mL de solução de diazometano. A mistura ficou em banho de ultrassom até verificar a ausência de desprendimento de gás N<sub>2</sub> da solução. Após o término da reação o material permaneceu em capela para secagem do solvente. O material obtido foi submetido a análise em CG-EM, que revelou um constituinte majoritário com tempo de retenção de 4,20 min e massa igual a m/z = 207 (M+1). Obteve-se o produto (*E*)-1-(3,4-dimetoxifenil)-3,4-epoxi-1-buteno (**11a**) pela metilação do fenol e adição a carbonila.

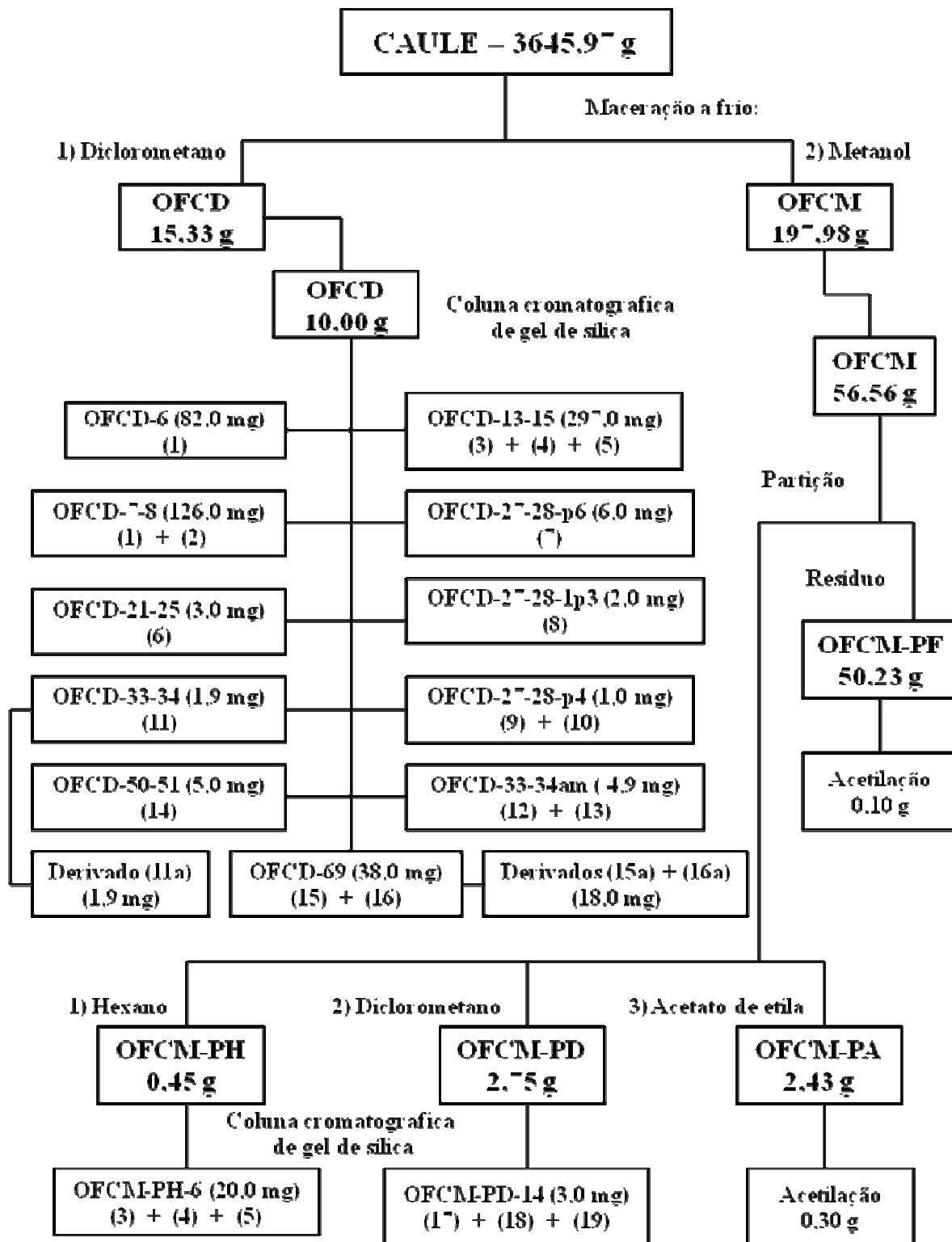
#### IV.5.4. Acetilação da substância 15 e 16

Uma parte do precipitado da mistura de **15** e **16** (18 mg), obtido da fração OFCD-68-69, foi acetilado com piridina e anidrido acético, conforme descrito em **IV.3.2 (p. 14)**. Dessa reação obteve-se 35,0 mg de material acetilado. Através de experimento de RMN <sup>1</sup>H e CG-EM foram identificados os derivados acetilados (**15a** e **16a**), das substâncias naturais conhecidas por 3-β-O-β-D-glicopiranosilestigmasterol (**15**) e 3-β-O-β-D-glicopiranosilsterol (**16**).

#### IV.5.5. Preparação do derivado acetilado de OFCM-PA e OFCM-PF

300 mg da fração OFCM-PA e 100 mg da fração OFCM-PF foram tratados com

piridina e anidrido acético obtendo-se 505,8 mg de OFCM-PA e 134,3 mg de OFCM-PF acetilados. Estas frações acetiladas foram analisadas por experimentos de RMN para a determinação da composição química e pode-se verificar a presença de substâncias fenólicas.



Esquema 1. Marcha de fracionamento dos extratos do caule de *Ouratea ferruginea*

## IV.6. Isolamento e Purificação de Metabolitos Especiais dos Extratos de Folhas

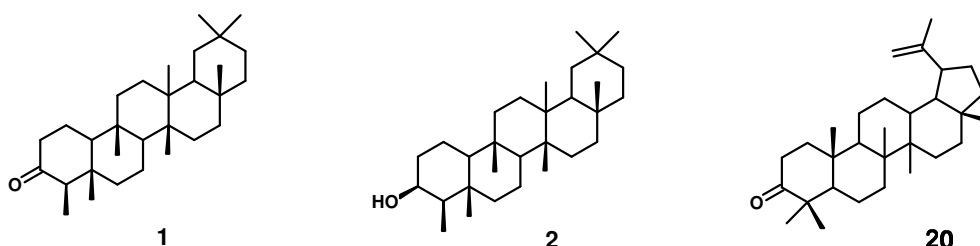
O **esquema 2** mostra um resumo dos procedimentos de fracionamento dos extratos de folhas da planta.

### IV.6.1. Fracionamento do extrato hexânico das folhas (OFFH)

Parte do extrato hexânico de folhas (8g, **OFFH**) foi solubilizado em 75 mL de hexano e lavado, em funil de separação, com solução MeOH/H<sub>2</sub>O (8:2). As duas frações obtidas foram nomeadas de polar e apolar, solúveis em metanol e hexano, respectivamente. Ambas foram concentradas em evaporador rotatório e resultaram em 0,30 g de fração polar e 7,5 g de fração apolar.

#### IV. 6.1.1. Fracionamento cromatográfico de fração OFFH polar

O material polar (0,30 g) foi aplicado em coluna cromatográfica de gel sílica e foram obtidas 13 frações de 50 mL. A subfração 4 foi analisada em CG e identificaram-se 3 substâncias. A comparação dos espectros de massas com a biblioteca do aparelho permitiu identificá-las como os triterpenos **friedelina (1)**, **friedelinol (2)** e **lupenona (20)** (1,0 mg).



**Figura 6.** Estruturas das substâncias obtidas de OFFH

#### IV.6.1.2. Fracionamento cromatográfico de fração OFFH apolar

5,00 g da fração **OFFH apolar** foram submetidos ao fracionamento cromatográfico em gel sílica usando os solventes: hexano, diclorometano e metanol. Foram coletadas 41 subfrações de 250 mL. A subfração 15-16 gerou um precipitado que foi identificado por CG-EM como mistura de **friedelina (1)** e **friedelinol (2)** [55,0 mg, p.f. 248-258°C]. As estruturas encontram-se acima.

### IV. 6.2. Fracionamento do extrato metanólico de folhas (OFFM)

Parte do extrato metanólico das folhas **OFFM** (85,67 g) foram solubilizados em 600 mL de solução MeOH/H<sub>2</sub>O (8:2), mas uma parte deste material (5,23 g) foi insolúvel. A solução obtida foi lavada, em funil de separação, com hexano, diclorometano, e acetato de



etila exaustivamente. Procedeu-se de forma semelhante à partição realizada com o extrato metanólico do caule. Obtiveram-se as frações correspondentes as frações: hexano [OFFM-PH] (1,49 g), diclorometano [OFFM-PD] (2,31 g), acetato de etila [OFFM-PA] (6,97 g) e o resíduo [OFFM-PF] (66,59 g).

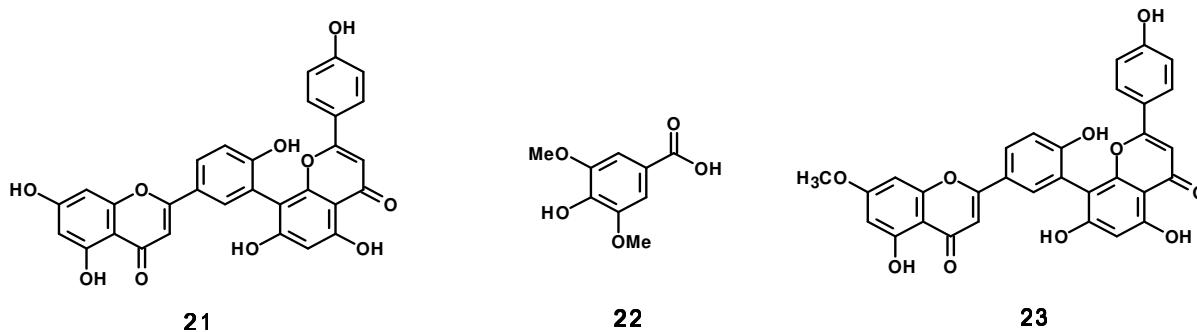
#### IV. 6.2.1. Fracionamento cromatográfico de OFFM-PH

A fração OFFM-PH (1,49 g) foi submetida a cromatografia em coluna usando gel de sílica como adsorvente e hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol como eluentes. Obteveram-se 35 frações. A fração OFFM-PH-8 (8,5 mg) apresentou-se como um sólido branco identificado como sendo dois triterpenos, **friedelina (1)** e **lupeona (20)**, **Figura 6 (p. 22)**. A fração OFFM-PH-16 (1,4 mg) gerou um precipitado branco identificado como mistura dos 3 esteróides, **sitosterol (3)**, **estigmasterol (4)** e **campesterol (5)** **Figura 4 (p. 18)**, em ambas se utilizou de CG-EM e RMN <sup>1</sup>H para determinar a estrutura.

#### IV. 6.2.2. Fracionamento cromatográfico de OFFM-PD

A fração OFFM-PD foi solubilizada em clorofórmio e revelou a presença de um precipitado de coloração amarela insolúvel em clorofórmio, nomeado OFFM-PD-ppt. O mesmo foi recolhido e analisado em CCDA e experimentos de RMN. A análise dos espectros de RMN <sup>1</sup>H permitiu identificar uma mistura de biflavonas. O material solúvel em clorofórmio foi submetido a cromatografia em coluna de gel de sílica usando solventes orgânicos com polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol) e foram recolhidas 51 frações de 50 mL. As frações 26, 27a (precipitado), 27b (sobrenadante), 28 e 29 apresentaram precipitados de coloração amarela. Estas frações foram comparadas com OFFM-PD-ppt em CCDA e apresentaram semelhanças de R<sub>f</sub> entre alguns dos componentes da mistura. As com maiores semelhanças de R<sub>f</sub> foram reunidas, resultando em duas frações codificadas de OFFM-PD-26-27a e OFFM-PD-27-29b. A análise por CL-EM-IES revelou a presença de duas substâncias majoritárias na fração 27b-29b. A análise dos espectros de massas de cada constituinte com sistema de íons positivos e negativos permitiu identificar para a substância com tempo de retenção de 61,5 minutos, o valor de  $m/z = 537,8072$  e para a substância com tempo de retenção de 68,8 minutos, o valor de  $m/z = 551,1015$ . Com o objetivo de se obter informações adicionais sobre os constituintes dessa mistura, fez-se uma análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos e comparou-se com os tempos de retenção e as curvas de UV de padrões de biflavonóides isolados anteriormente dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* (BOSSO, 2004; DANIEL, 2004).

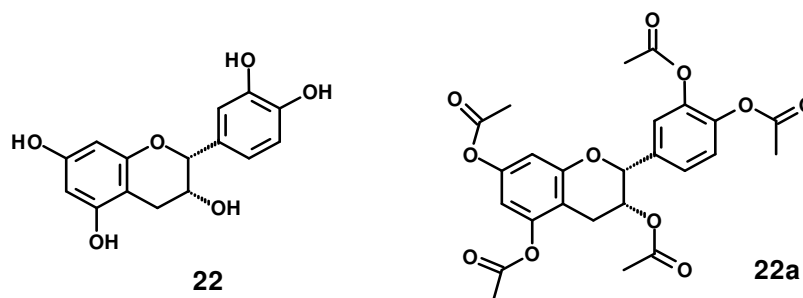
Os padrões usados foram: agatisflavona, 7''-metilagatisflavona, amentoflavona, podocarpusflavona e luxenchalcona, além do ácido sirínico comercial. Os padrões e as frações 26-27a, 27b-29 e foram solubilizados em metanol grau espectroscópico e analisados por CLAE-DAD (Shimadzu) em sistema isocrático com injetor Rheodyne. Utilizou-se coluna analítica de fase reversa C-18 (250 mm x 4,6 mm x 5µm, Shimadzu), como fase móvel 68% de A (metanol:acetonitrila, 90:10) e 32% de B (água:ácido acético 1%), velocidade de fluxo de 1mL.min<sup>-1</sup>, detecção foi feita a 254 nm e o volume de injeção foi de 10 µL. As frações 27b-29 apresentou três picos no cromatograma (**Figura 73b, p. 99**), ambos apresentaram máximos de absorção no UV na região característica de biflavonóide. Somente o biflavonóide **amentoflavona (21)** foi identificado por CLAE-DAD através da comparação do seu tempo de retenção e da sua curva de UV com a do padrão autêntico. A fração 26-27a apresentou quatro picos no cromatograma, sendo a substância com Tr= 3,29 min identificada como o ácido sirínico (**22**) e a substância com Tr= 8,096 min como a amentoflavona (**21**) através de comparação do tempo de retenção e da curva de UV com padrão autêntico. Os outros dois picos foram incompatíveis com os padrões analisados, mas apresentaram os espectros na região do UV característicos de biflavonóides. Estas frações foram então submetidas ao fracionamento em CLAE escala semipreparativa, em um cromatógrafo líquido Shimadzu-Modelo LC-20AT equipado com detector de ultravioleta. Utilizou-se uma coluna semipreparativa C-18 (250 mm x 10 mm x 5 µm, Supelco), como fase móvel 75% de A (metanol:acetonitrila, 90:10) e 25% de B (H<sub>2</sub>O); velocidade do fluxo de 5mL.min<sup>-1</sup>, detecção a 254 nm e injeção de 100 µL. Foram injetados aproximadamente 15 mg de material solubilizado em metanol grau espectroscópico e as substâncias com tempos de retenção semelhantes foram coletadas no mesmo recipiente. Após a análise foram obtidas cinco frações nomeadas de **A** (2 mg), **B** (2 mg), **C** (7 mg), **D** (1 mg) e **E** (3 mg). Na subfração **A** estava presente o ácido sirínico; a subfração **B** apresentou mistura de constituintes não identificados; em **C** obteve-se a amentoflavona em mistura com um biflavonóide não identificado; **D** apresentou a mistura de amentoflavona e de seu derivado monometoxilado e em **E** obteve-se apenas a amentoflavona monometoxilada. A fração OFFM-PD-26-29-E, incompatível com os nossos padrões de biflavonóide, foi submetida a experimentos de RMN (<sup>1</sup>H, HSQC, HMBC e NOESY) que permitiu identificá-la como sendo 7-metilamentoflavona (**23**). As estruturas das substâncias identificadas em **OFFM-PD** são apresentadas na **Figura 7 (p. 24)**.



**Figura 7.** Estruturas da substâncias isoladas de OFFM-PD

#### IV.6.2.3. Fracionamento cromatográfico de OFFM-PA

A fração OFFM-PA (2,50 g) foi aplicada em coluna cromatográfica de gel de sílica, com sistema eluentes de clorofórmio e metanol. Recolheram-se 24 frações de 150 mL. A fração OFFM-PA-10-11 (630 mg) apresentou uma coloração castanho-avermelhada em CCDA com revelador de solução de vanilina sulfúrica. As mesmas foram novamente submetidas à cromatografia em coluna nas mesmas condições anteriores. A fração OFFM-PA-10-11 gerou 12 subfrações. A subfração 6-9 (169,0 mg) foi filtrada em gel de sephadex LH-20. Foram recolhidas 26 frações. Na fração OFFM-PA-10-11-SG-6-9-SPH-15-19, analisada por experimento de RMN ( $^1\text{H}$  e COSY), identificou-se o tanino conhecido como epicatequina (**24**) [13 mg, óleo]. Para melhor identificação desta substância, resolveu-se analisá-la em espectrofotômetro de dicroísmo circular, em comparação com os padrões (+)-catequina e (+)-epicatequina. Foram preparadas soluções em metanol grau espectroscópico nas concentrações de  $1,45 \times 10^{-3}$ ,  $1,72 \times 10^{-3}$  e  $7,86 \times 10^{-3}$  mol/L para (+)-catequina, (+)-epicatequina e a substância **24**, respectivamente. As leituras foram realizadas a partir da adição de 50  $\mu\text{L}$  de solução em cubeta com 3 mL de metanol grau espectroscópico. Os espectros, com a curva dicróica satisfatória, de cada composto analisado foram obtidos após a adição de 150, 200 e 50  $\mu\text{L}$  das soluções de (+)-catequina, (+)-epicatequina e a substância **24**, respectivamente. Para a obtenção de um espectro de massas, uma pequena quantidade da substância **24** foi acetilada com anidrido acético e piridina (IV.6.3, p. 25).



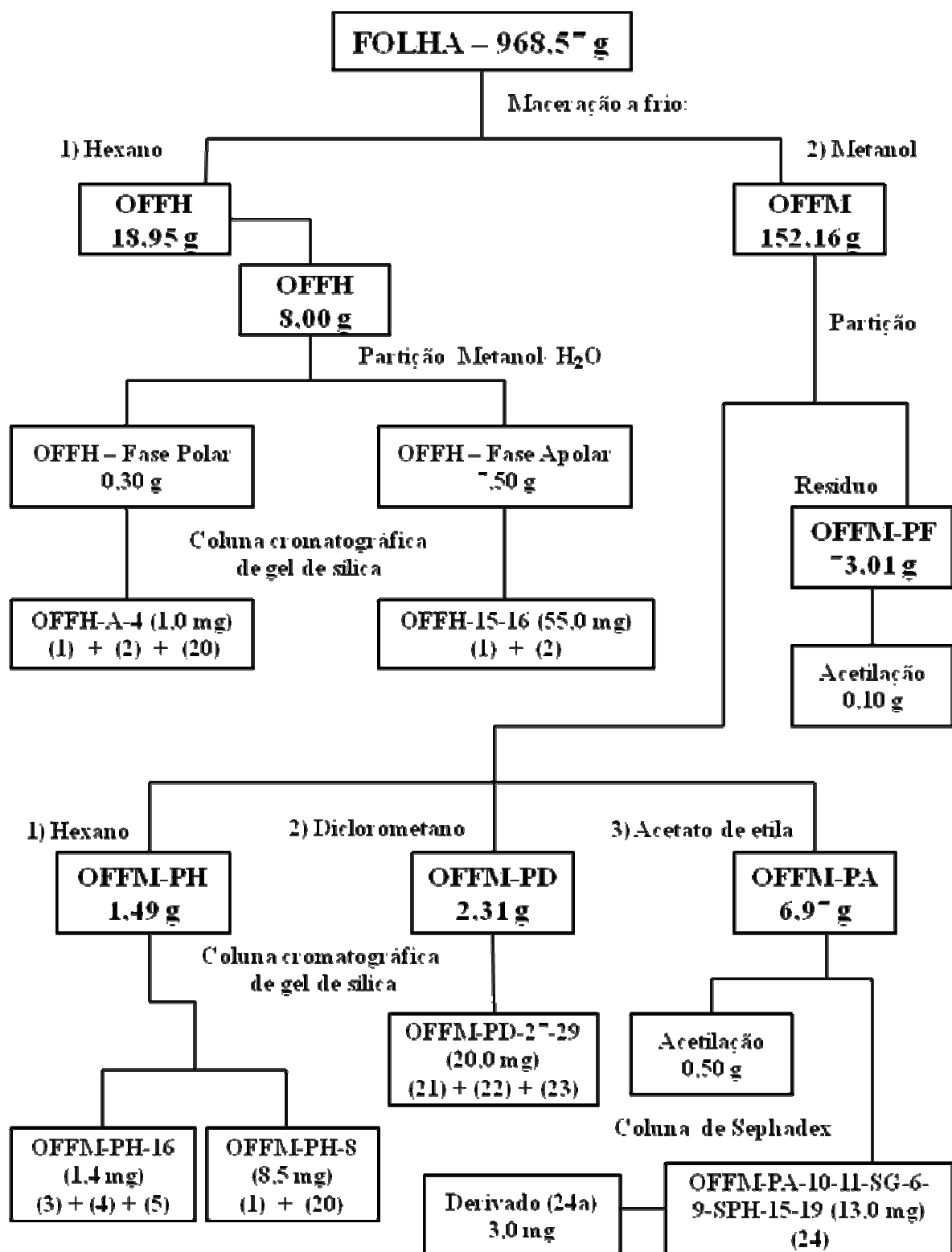
**Figura 8.** Estrutura da substância isolada de OFFM-PA e seu derivado acetilado

#### IV.6.3. Acetilação da substância 24

Foram acetilados 2,0 mg da substância **24** conforme descrito em **IV.3.2 (p. 14)**, o material acetilado gerou massa de 3mg e solubilidade em solventes apolares como diclorometano e clorofórmio. Esse material foi filtrado em coluna de gel de sílica para remoção de impurezas e analisado por CG-EM. O espectro de massas revelou uma massa e um padrão de fragmentação compatível com a substância acetilada esperada, pentaacetil-epicatequina (**24a**).

#### IV.6.4. Acetilação OFFM-PA e OFCM-PF

Foram acetilados 500 mg da fração em acetato de etila do extrato metanólico das folhas (OFFM-PA) e 100 mg da fração residual obtida pela partição do extrato metanólico das folhas (OFFM-PF) com piridina e anidrido acético conforme descrito em **IV.3.2 (p. 14)**. O material acetilado da fração OFFM-PA (600 mg) e da fração OFFM-PF (100,5 mg) foram analisados por experimentos de RMN para a determinação da composição química.



Esquema 2. Marcha de fracionamento dos extratos de folhas de *Ouratea ferruginea*

## **IV.7. Determinação de fenóis totais e taninos de OFCM-PA, OFCM-PF, OFFM-PA e OFFM-PF**

### **IV.7.1. Determinação de fenóis totais**

A determinação do teor de fenóis totais presentes nas frações OFCM-PA, OFCM-PF, OFFM-PA e OFFM-PF foram feitas por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin-Denis, com adaptações quanto ao tempo de reação e concentração da amostra (FOLIN e DENIS, 1912; SANT'ANA *et al.*, 2010, SOUSA *et al.*, 2007). O comprimento de onda ótimo de leitura (760 nm) foi estabelecido mediante varredura na faixa de 400 a 800 nm, em 2h após a adição do reagente de oxi-redução ao extrato. Foram preparadas soluções na concentração de 0,15 mg/mL, em metanol grau espectroscópico, de cada frações e todas as análises foram feitas em triplicatas. A uma alíquota de 0,5 mL (utilizando micropipetas de 1000 µL) dessa solução foram adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Denis, e após 5 minutos foram adicionados 2,0 mL de uma solução aquosa de carbonato de sódio a 14%, recém-preparada. A mistura reacional ficou em repouso por 2 h, e observou-se a mudança da coloração da solução de esverdeada para azul. Em seguida, fez-se a leitura a 760 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e metanol/água Milli-Q (9:1) como branco. O teor de fenóis totais das frações foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva analítica construída com soluções padrão de ácido gálico em metanol e expressos como g de equivalentes de ácido gálico por 100 g de fração (gEAG/100 g).

### **IV.7.2. Preparo do reagente de Folin-Denis**

Em um balão de fundo redondo de 250 mL acoplado a um condensador de refluxo, foram inseridos 20 g de tungstato de sódio diidratado ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 4 g de ácido fosfomolibdico ( $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]_x \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), 10 mL de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) e 152 mL de água Milli-Q. Após duas horas de refluxo, a solução foi resfriada a temperatura ambiente, passada para balão volumétrico de 200 mL e seu volume completado com água Milli-Q. A solução apresentou coloração esverdeada, foi armazenada em frasco âmbar, sob refrigeração até o momento do uso (LIANDA, 2009).

### **IV.7.3. Preparo da curva analítica do ácido gálico**

Foi preparada uma curva analítica a partir da solução metanólica do padrão de ácido gálico (1 mg/mL  $\equiv$  0,0059 mM). Alíquotas de 2, 6, 8, 10, 20, 30 µL desta solução mãe foram

misturadas com 2,5 mL do reagente de Folin-Denis, e após 5 minutos adicionou-se 2,0 mL de solução aquosa recém-preparada de carbonato de sódio a 14%. As leituras foram feitas a 760 nm, utilizando-se água Milli-Q como branco. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

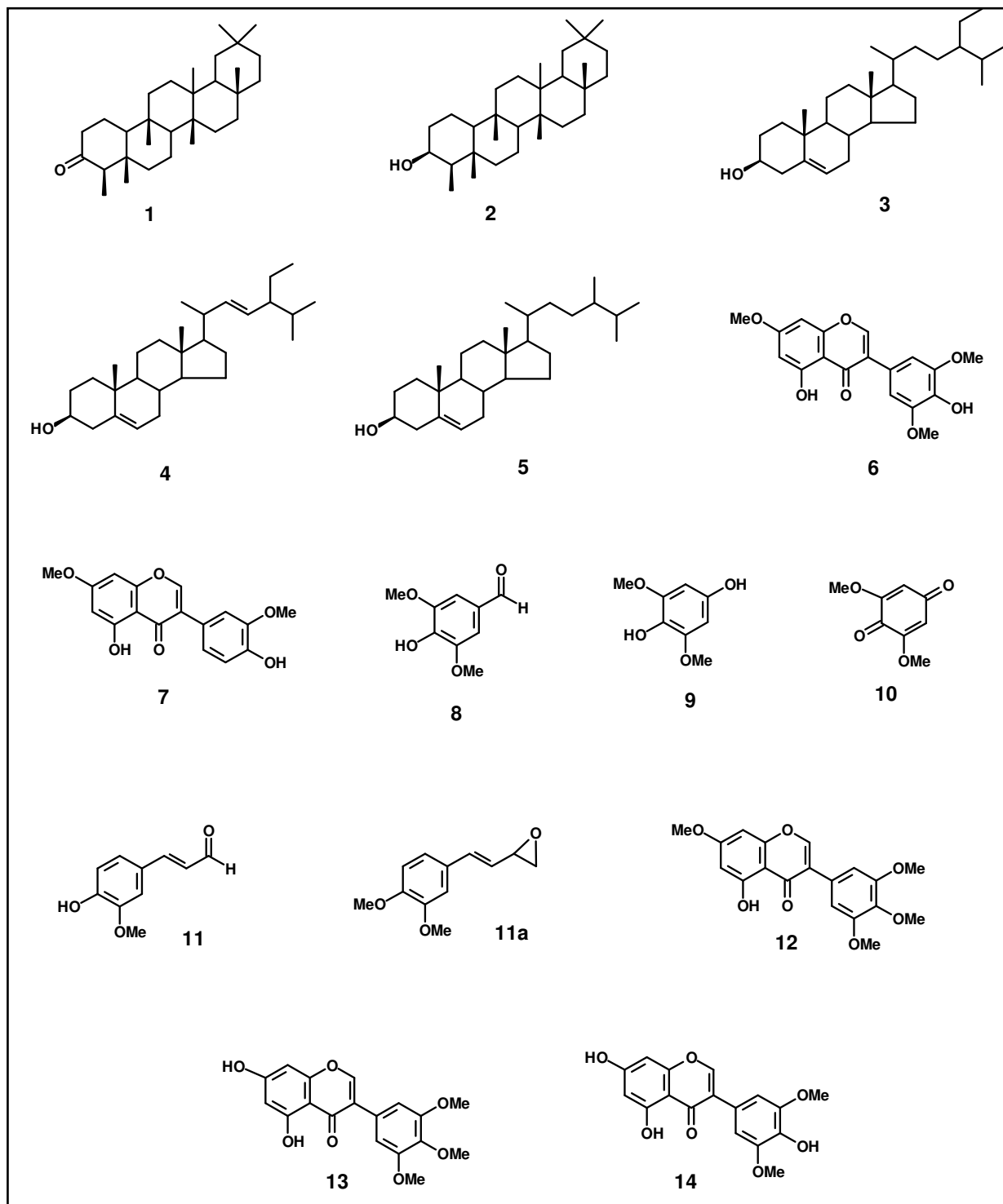
#### **IV.7.4. Determinação de taninos por precipitação com caseína**

Para determinação de taninos usou-se uma metodologia de precipitação com caseína (SEIGLER *et al*, 1986; READEL *et al*, 2001; MONTEIRO *et al*, 2007, VERZA *et al*, 2007) com modificações. A precipitação dos taninos por caseína, consistiu em adicionar 5 mL das soluções estoque de cada fração em tubos de ensaios contendo caseína nas concentrações de 400, 600 e 800 mg. Os tubos de ensaios ficaram em banho de ultrassom por 90 min (WANG *et al*, 2009), e após sonicação foram centrifugadas e retiradas alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante (solução não-tanante) para determinação dos fenóis residuais por método de Folin-Denis como descrito em (IV.7.1, p. 27). Todas as análises foram feitas em triplicata. A quantidade de taninos presente nas frações corresponde à diferença entre o valor encontrado para a solução não-tanante e o obtido na determinação de fenóis totais. O teor de fenóis simples e taninos foram expressos como g de equivalentes de ácido gálico por 100 g de fração (gEAG/100 g), assim como os fenóis totais.

## V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento cromatográfico dos extratos de caule e folhas de *O. ferruginea* conduziu à identificação de 24 substâncias, cujas estruturas estão representadas a seguir (pág. 29 à 31).

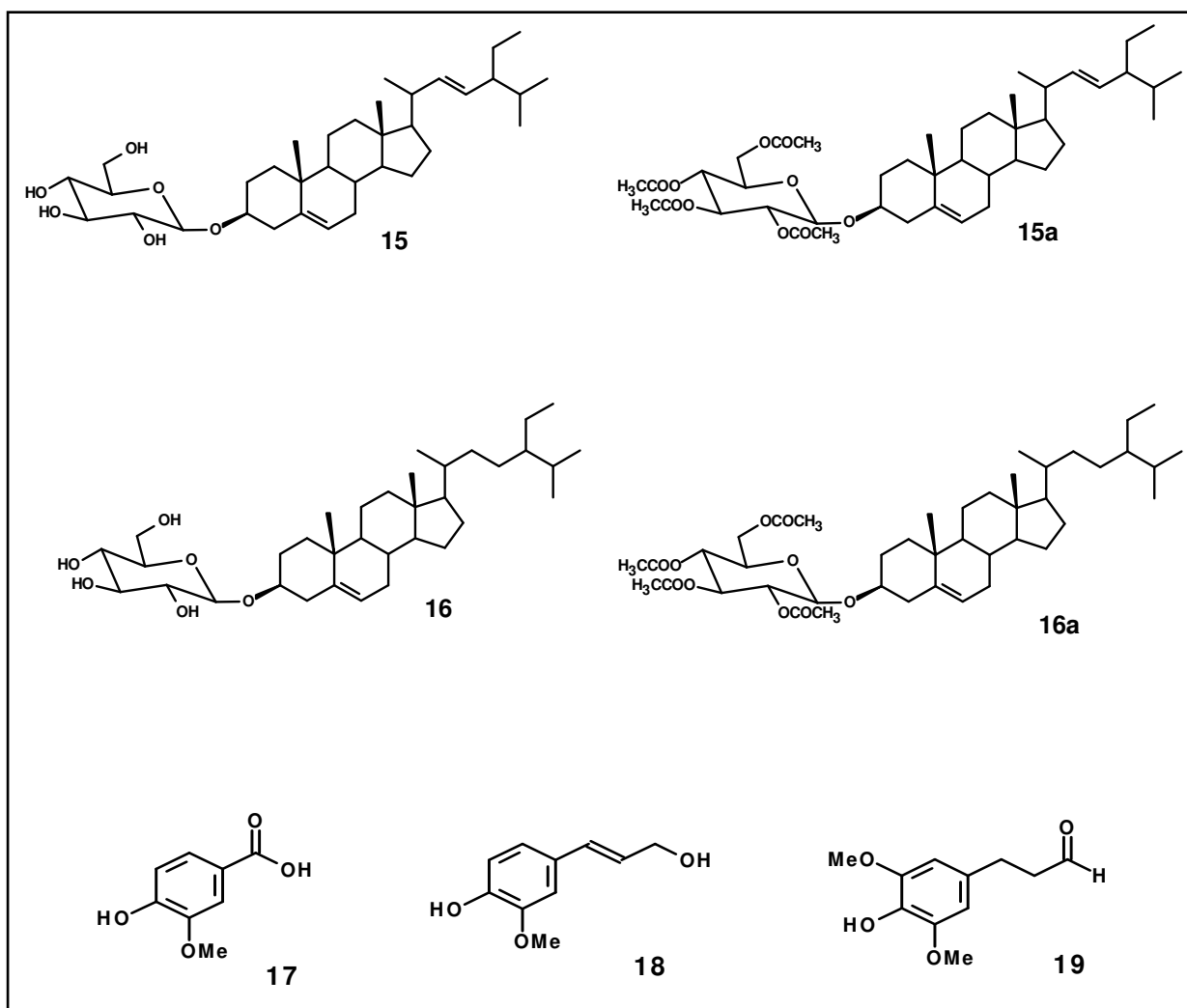
### CAULE



Quadro 5. Estruturas dos constituintes isolados OFC

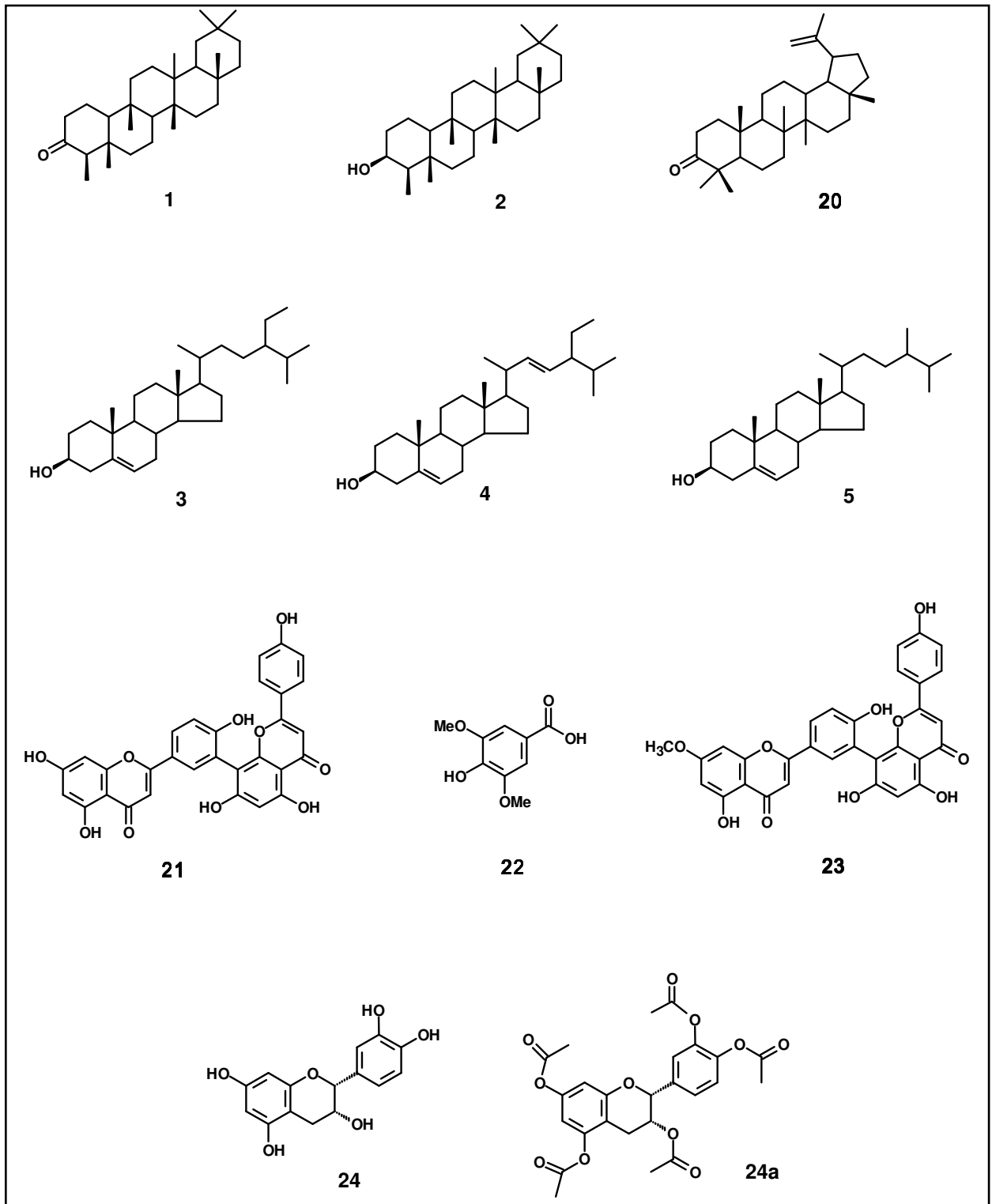


Continuação



**Quadro 1.** Estruturas dos constituintes isolados de OFC

## FOLHAS

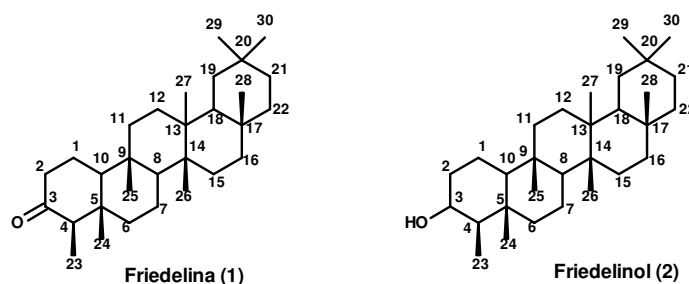


**Quadro 2.** Estruturas dos constituintes isolados de OFF

## V.1 Determinação estrutural dos constituintes especiais isolados de caule e folhas

### V.1.1. Identificação das substâncias 1 e 2

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 9 e 10, p. 33**) corresponde a substância **1** e mostra sinais característicos de metilas de triterpeno,  $\delta_{\text{H}}$  0,74(*s*), 0,89(*s*), 0,91(*s*), 0,97(*s*), 1,02(*d*), 1,07(*s*), 1,20(*s*), 1,27(*s*) e em  $\delta_{\text{H}}$  2,0(*m*); 2,26(*m*) e 2,38(*m*) correspondentes aos hidrogênios vizinhos à função carbonila. A análise desses dados, aliados a considerações biossintéticas e comparação com valores da literatura (KOJIMA *et al*, 1990; CARVALHO *et al*, 1995; VELANDIA, 2002), além de comparação com padrão em placa de cromatografia em camada fina analítica permitiram propor a estrutura da friedelina. Uma parte menos purificada deste material, a fração OFCD-7-8, foi analisada com cromatografia a gás acoplada com espectrômetro de massas e forneceu um cromatograma com dois picos (Tr = 24.4 e 25.0; **Figura 11a (p. 34)** cujos espectros de massas (*m/z* 428 e 426,  $\text{M}^+$ , respectivamente; **Figura 11b-11e (p. 34)** foram comparados com a espectroteca e permitiu identificar os dois triterpenos pentacíclicos, friedelinol (**2**) e friedelina (**1**), respectivamente. O espectro de IV (**Figura 12, p. 35**) da mistura mostrou absorção de determinados grupos funcionais como:  $\nu_{\text{OH}} = 3442 \text{ cm}^{-1}$ ; 2925 e 2856  $\text{cm}^{-1}$  para estiramentos  $\nu_{\text{C-H}}$ ; 1463 e 1388  $\text{cm}^{-1}$  para estiramentos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  respectivamente;  $\nu_{\text{C=O}} = 1714$  e  $\nu_{\text{C-O}} = 1072 \text{ cm}^{-1}$ . Os valores de absorção na região de infravermelho estão de acordo com a estrutura proposta pelos experimentos de RMN e CG-EM.



**Tabela 2.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  1, comparados com dados da literatura para friedelina (VELANDIA, 2002)

H	Substância 1 ( $\text{CDCl}_3$ ) $\delta_{\text{H}}$	Friedelina ( $\text{CDCl}_3$ ) $\delta_{\text{H}}$
H-1	2,00( <i>m</i> )	—
H-2	2,38( <i>m</i> )	2,15–2,50( <i>m</i> )
H-4	2,26( <i>m</i> )	2,15–2,50( <i>m</i> )
3H-23	0,89( <i>s</i> )	0,87( <i>s</i> )
3H-24, 3H-25, 3H-26	0,74( <i>s</i> ); 0,91( <i>s</i> ); 0,97( <i>s</i> )	0,72( <i>s</i> ); 0,86( <i>s</i> ); 0,94( <i>s</i> );
3H-27, 3H-28, 3H-29	1,02( <i>d</i> ); 1,07( <i>s</i> ); 1,02( <i>s</i> )	0,99( <i>s</i> ); 1,04( <i>s</i> ); 1,04( <i>s</i> )
3H-30	1,19( <i>s</i> )	1,17( <i>s</i> )

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: OFC-F6 (PROTON)
Date	07 Oct 2009 10:49:50		
File Name	C:\Users\QUELI CRISTINA\Documents\O. ferruginea\queli_001001r		
Frequency (MHz)	400.13	Nucleus	<sup>1</sup> H
Original Points Count	32768	Points Count	32768
Solvent	CHLOROFORM-D	Number of Transients	16
Temperature (degree C)	27.000	Pulse Sequence	zg30
		Sweep Width (Hz)	8223.68

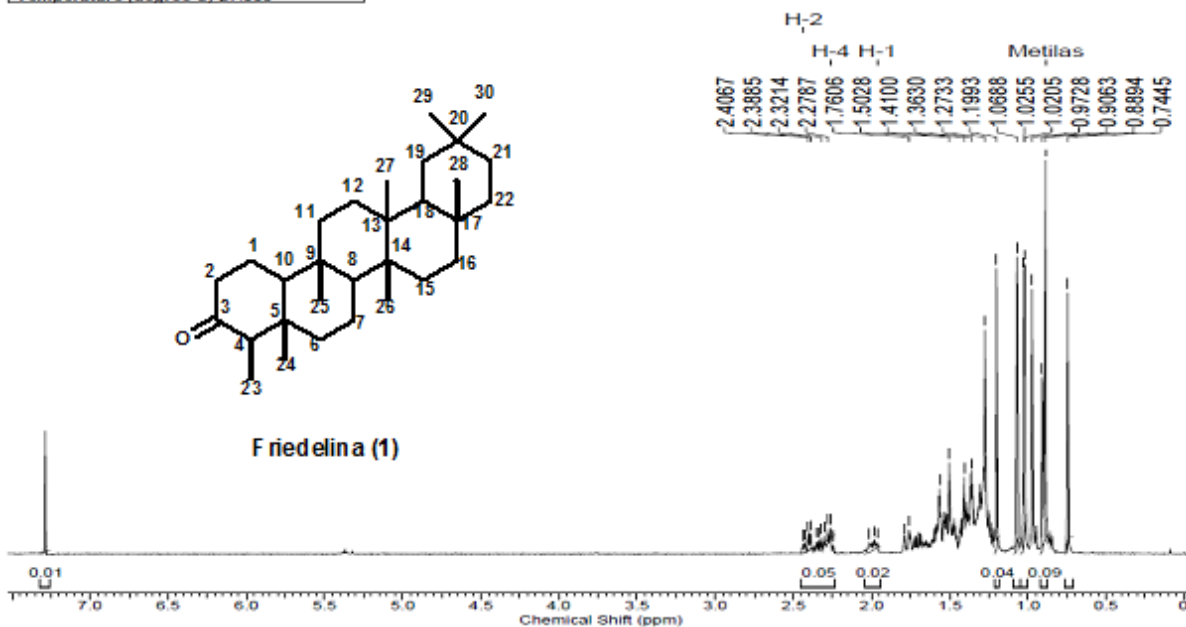


Figura 9. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância 1

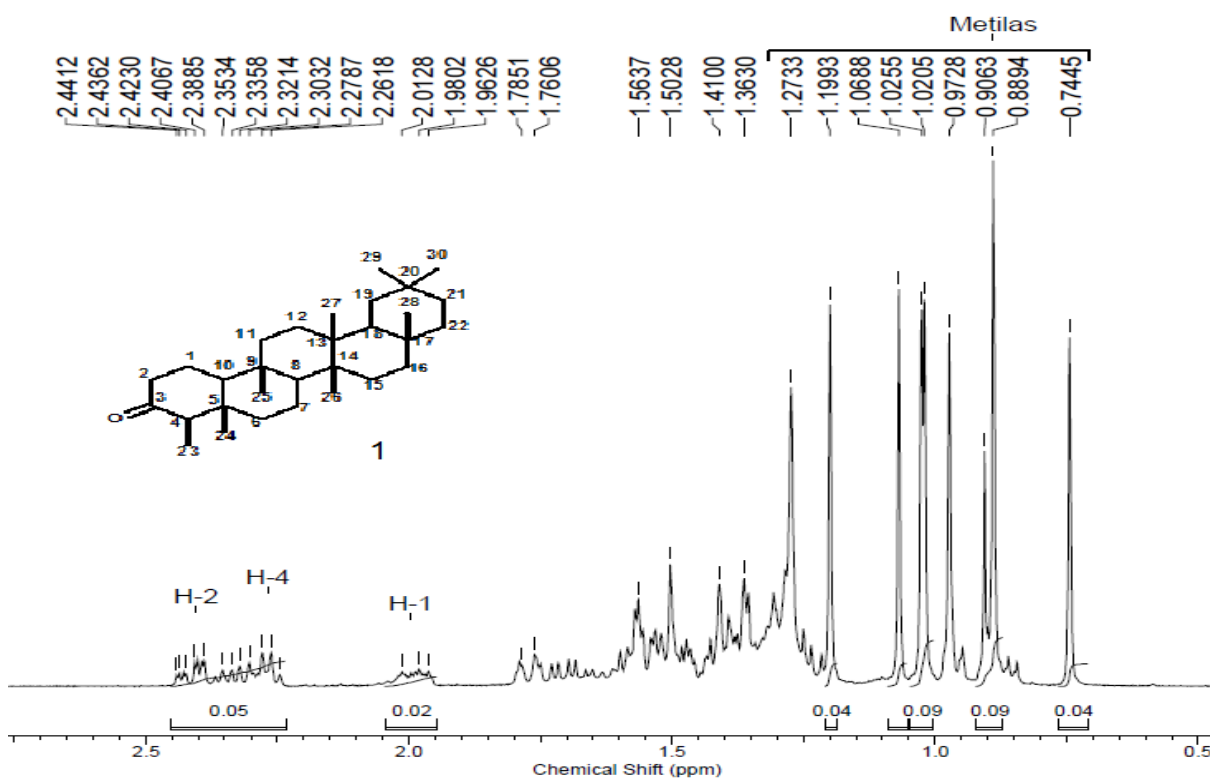
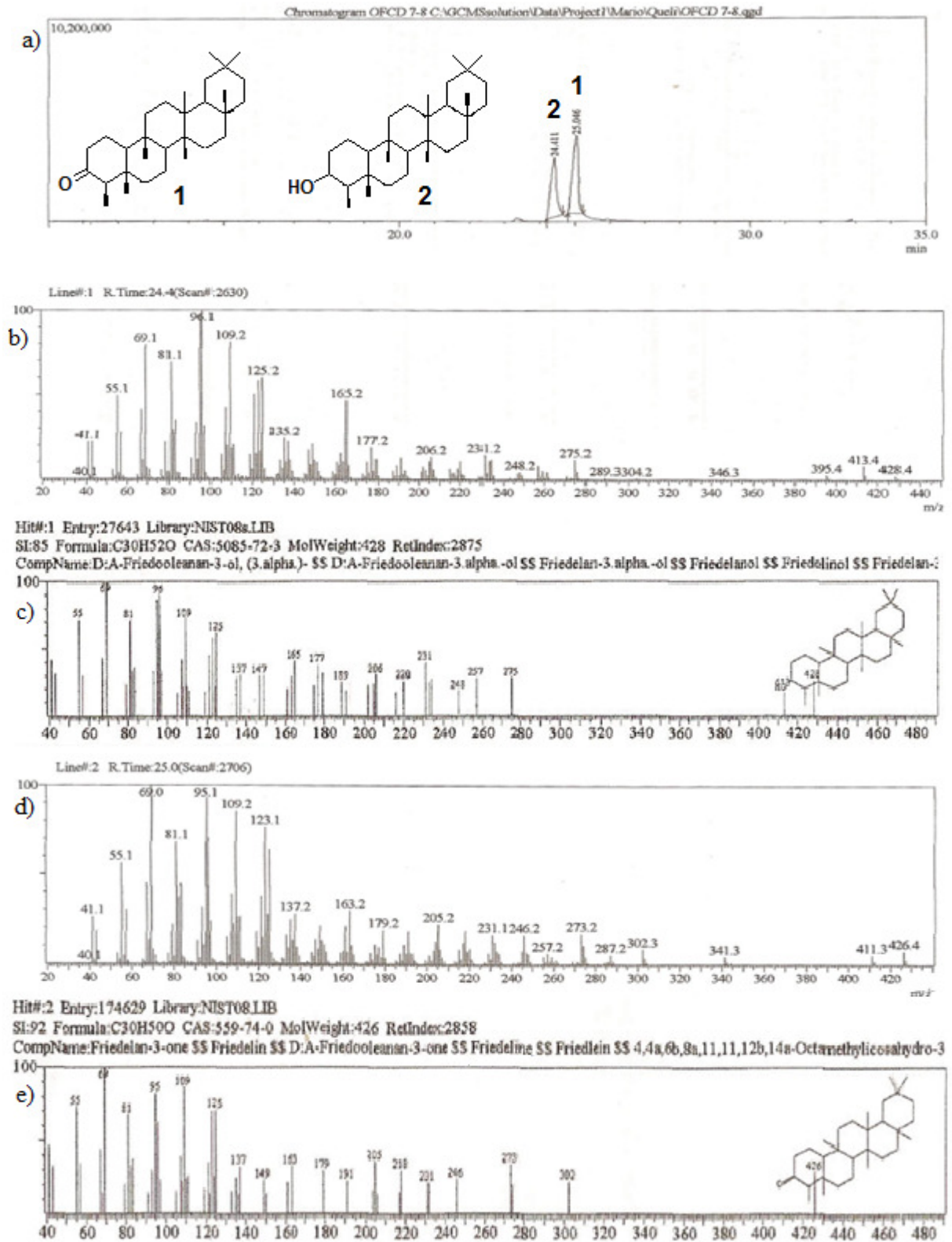


Figura 10. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H da substância 1



**Figura 11.** a) Cromatograma (CG) da fração contendo 1 e 2; b, c, d e e) espectros de massas dos componentes de cada pico e comparação com padrão da biblioteca

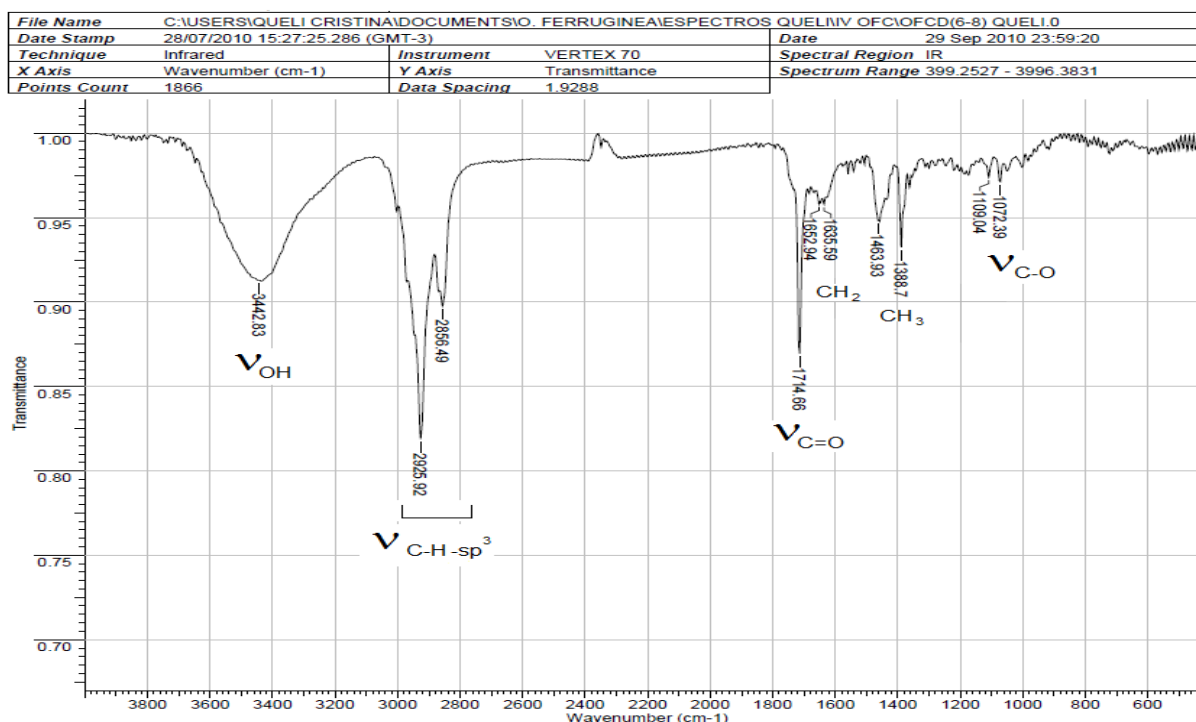
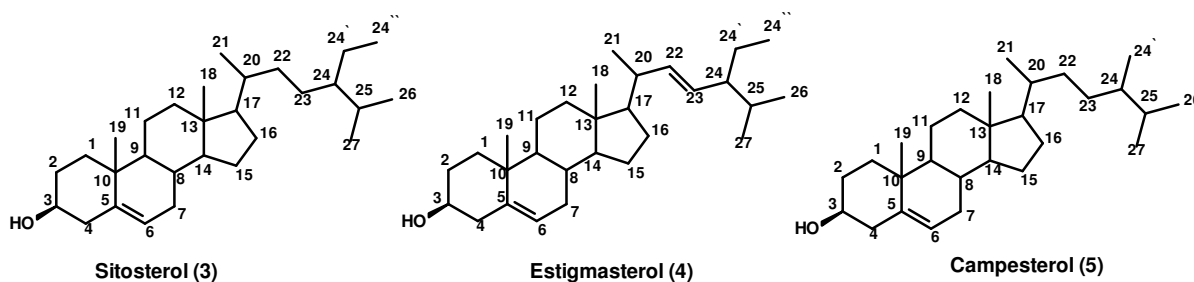


Figura 12. Espectro no infravermelho da mistura de triterpenos 1 e 2 (KBr)

### V.1.2. Identificação das substâncias 3, 4 e 5

Os esteróides 3, 4 e 5 foram obtidos em mistura e identificados através da análise dos espectros de IV, RMN <sup>1</sup>H e comparação com dados descritos na literatura (CARVALHO *et al.*, 2001) e principalmente pela análise com CG-EM. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 13, p. 36) apresenta sinais entre  $\delta_H$  0,70 e 1,05 de grupos metílicos com multiplicidades característica de esteróides (RUBINSTEIN *et al.*, 1976), um multipletto em  $\delta_H$  3,55 para o hidrogênio carbinólico (H-3), o simpleto largo um em  $\delta_H$  5,37 correspondente a hidrogênio olefínico (H-6), com esqueleto do tipo estigmast-5-enos. Os sinais em  $\delta_H$  5,17 e 5,06 (*dd*,  $J_1=12,0$  Hz,  $J_2=8$  Hz) correspondem aos hidrogênios H-22 e H-23 do estigmasterol, respectivamente. Os dados obtidos por análise em RMN revelam sinais atribuídos aos componentes 3 e 4. A análise deste material com CG-EM (Figura 14, p. 36) revelou a presença de três componentes com Tr = 13,3, 13,9 e 15,2 min. Os espectros de massa dos componentes de cada pico foram comparados com os da espectroteca (Figura 15-17, p. 37 e 38) e além de confirmar a proposta de esteróides revelou um terceiro componente, sendo identificados como sitosterol (3), estigmasterol (4) e campesterol (5). O espectro de IV (Figura 18, p. 38) apresenta  $\nu_{\text{máx}}$  em 3431 cm<sup>-1</sup> absorção característica de estiramento O-H; absorção de esqueleto carbônico em 2960 e 2937 cm<sup>-1</sup> para  $\nu_{\text{C-H}}$ ; 1458 cm<sup>-1</sup> para CH<sub>2</sub> e 1380,

$\text{cm}^{-1}$  para  $\text{CH}_3$ ;  $\nu_{\text{C}=\text{C}} = 1652$  e  $1055 \text{ cm}^{-1}$  para estiramento C-O. As absorções observadas na região do infravermelho são comuns as três substâncias da mistura.



Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: OFC 13-15 (PROTON)	
Date	12 Nov 2009 14:48:48		Temperature (degree C) 27.000	
File Name	C:\Users\QUELI CRISTINA\Documents\O. ferruginea\queli_006001r			
Frequency (MHz)	400.13	Nucleus	1H	Number of Transients
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence
Solvent	CHLOROFORM-D			Sweep Width (Hz)
				8223.68

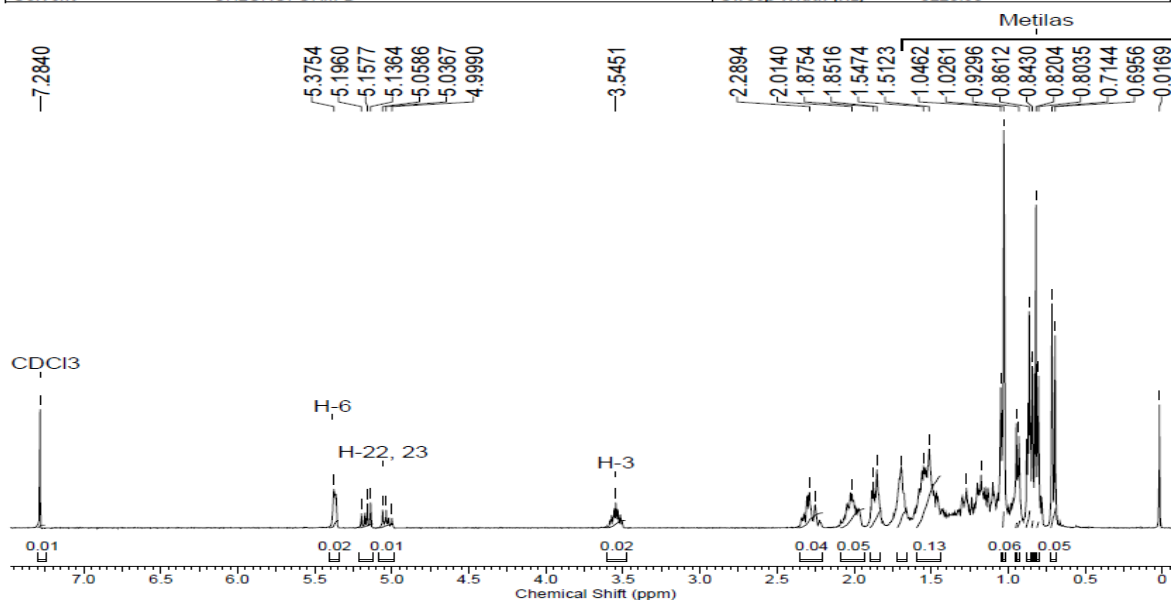


Figura 13. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de 3, 4 e 5

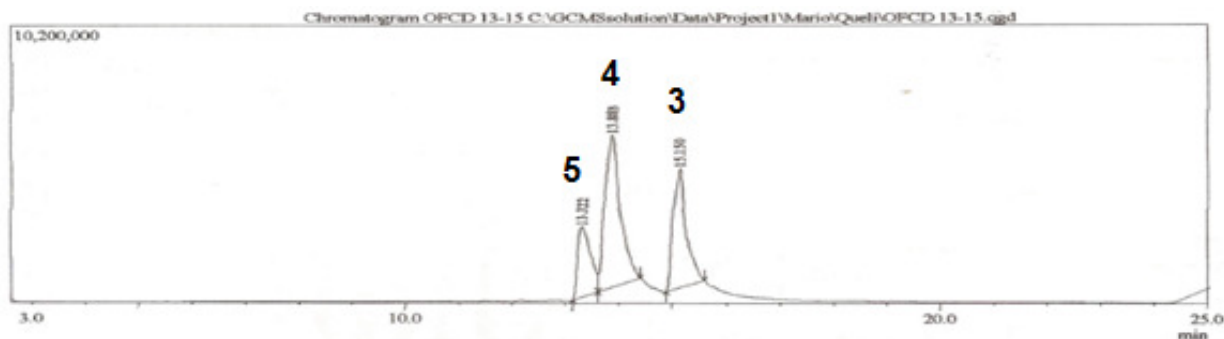


Figura 14. Cromatograma (CG) da mistura de esteróides

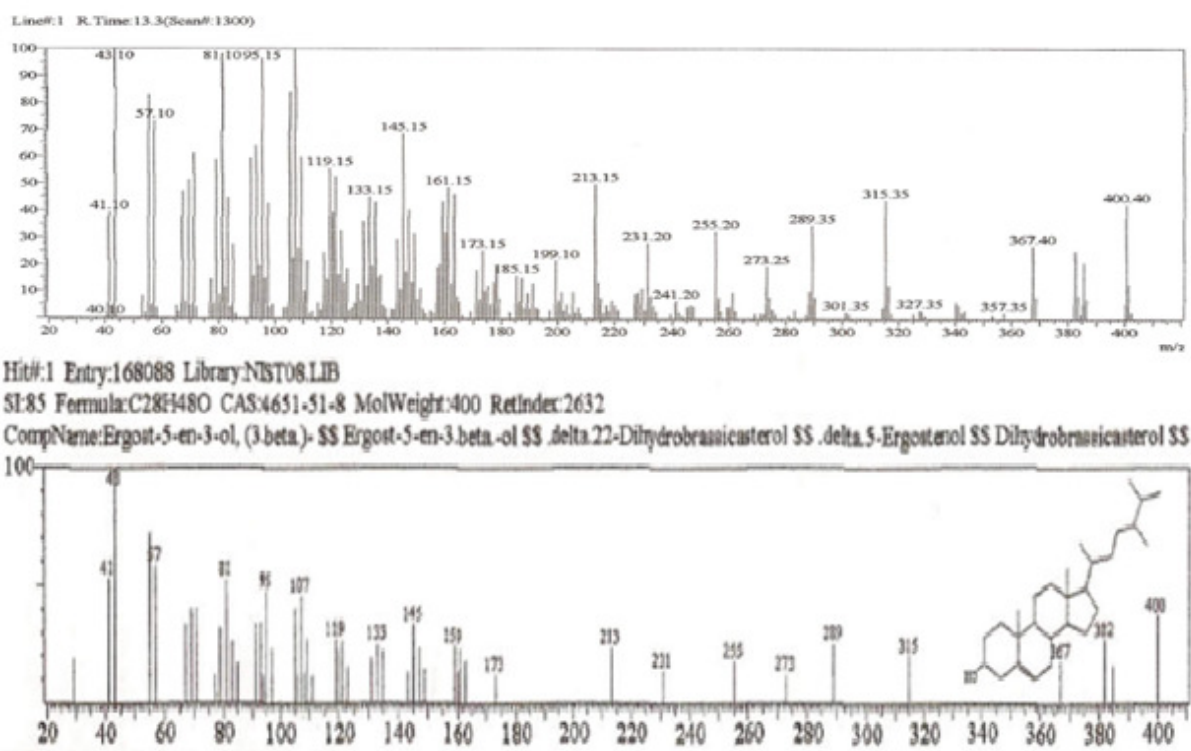


Figura 15. Espectros de massas da substância 5 e comparação com padrão da biblioteca

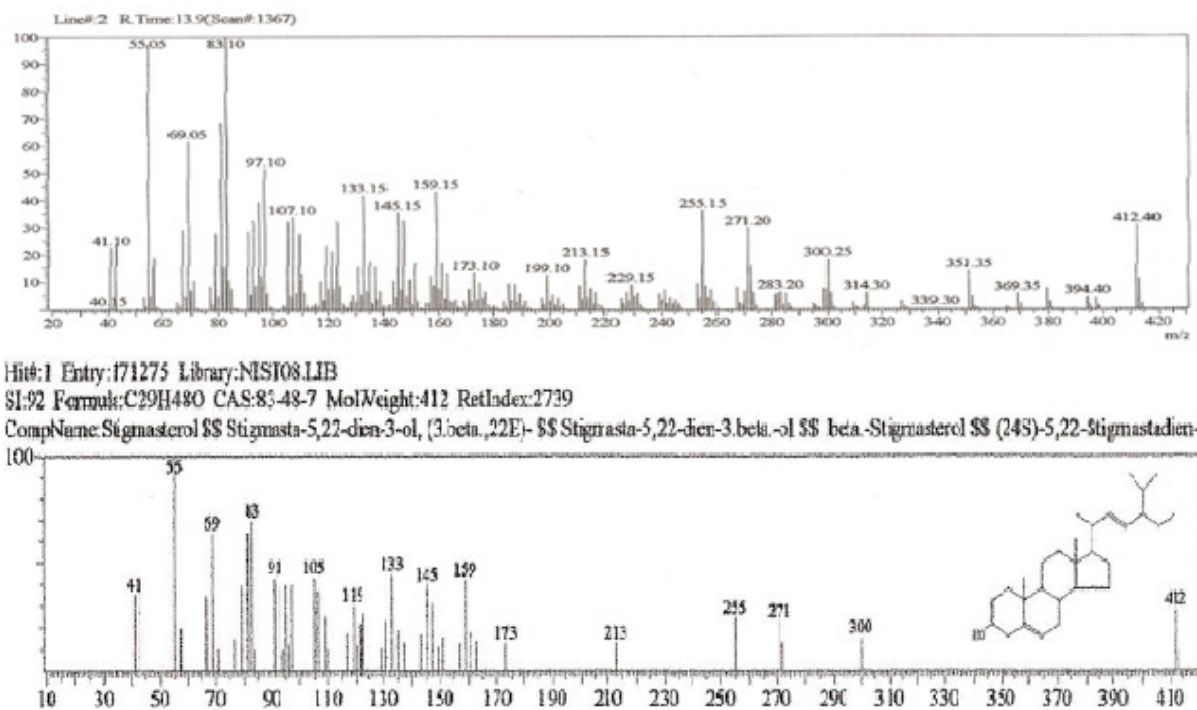
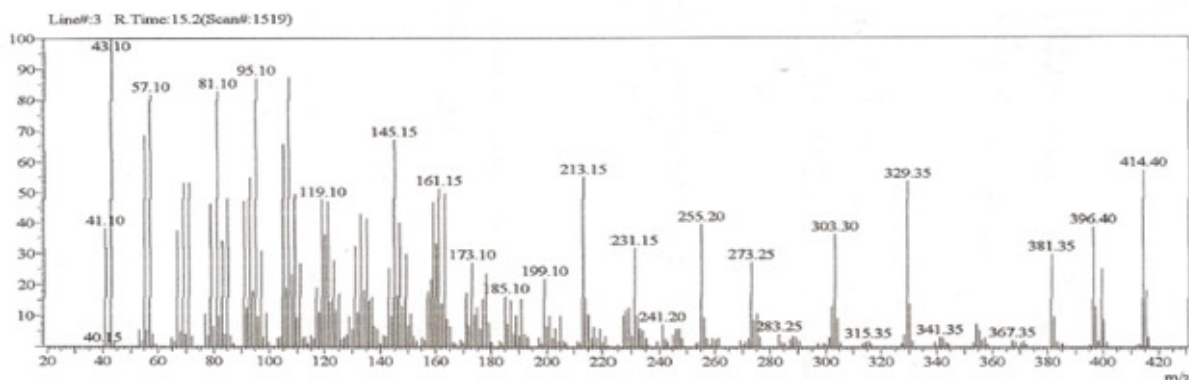


Figura 16. Espectros de massas da substância 4 e comparação com padrão da biblioteca





Hit#1 Entry: 171855 Library: NIST08.LIB  
 Sil: 84 Formula: C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O CAS: 83-47-6 MolWeight: 414 RetIndex: 2731  
 CompName: gamma-Sitosterol \$\$ Stigmat-5-en-3-ol, (3.beta.,24S)- \$\$ Stigmat-5-en-3.beta.-ol, (24S)- \$\$ Chionasterol \$\$ Fucosterol, .beta.-dihydro- \$\$ 2-

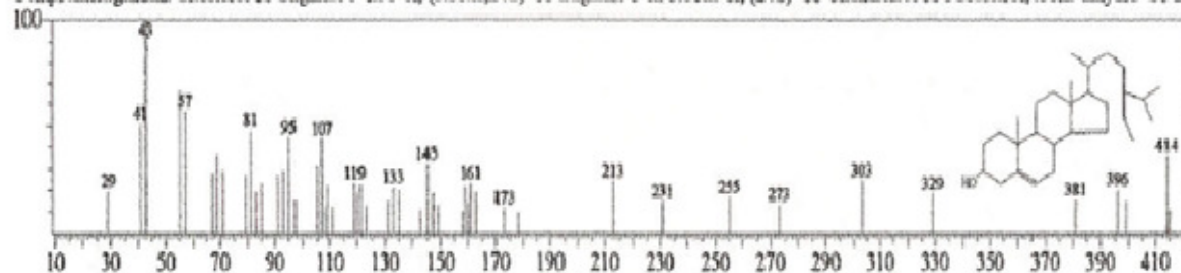


Figura 17. Espectros de massas da substância 3 e comparação com a biblioteca do aparelho

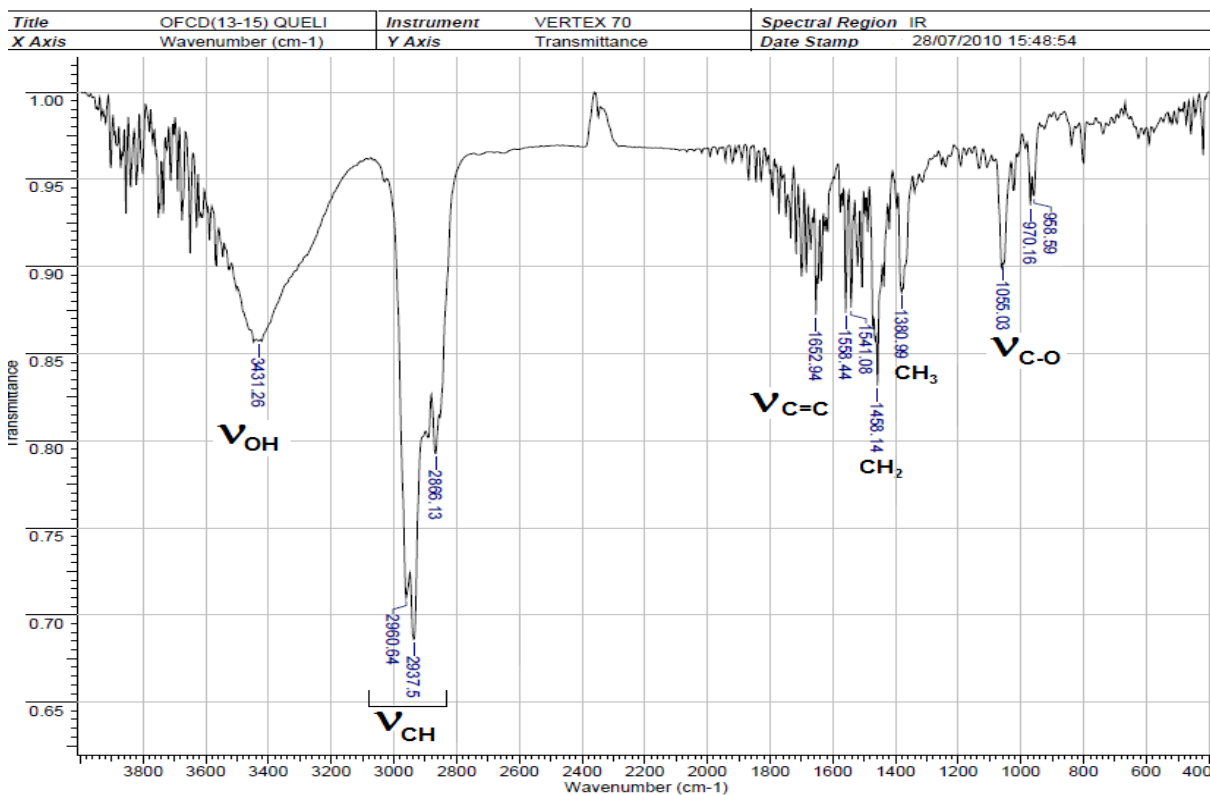
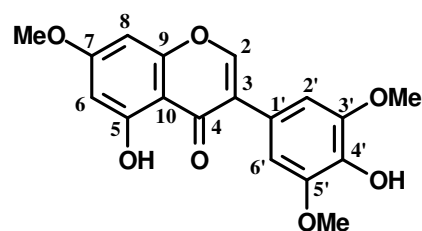


Figura 18. Espectro no infravermelho das substâncias 3, 4 e 5 (KBr)

### V.1.3. Determinação estrutural da substância 6

A determinação estrutural desta substância foi realizada por análise de experimentos de RMN 1D e 2D, e IV. As absorções observadas no espectro de IV (**Figura 19, p. 41**) foram de estiramento O-H em  $3429\text{ cm}^{-1}$ ; presença dos estiramentos C=O e C-O foram confirmadas em  $1654$  e  $1114\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. A absorção da carbonila caracteriza a presença de conjugação, por aparece com a frequência reduzida. Os estiramentos correspondentes ao esqueleto carbônico foram encontrados em  $2922$  e  $2850$  (C-H  $\text{sp}^3$ ),  $1618$  e  $1519$  (C=C),  $1346$  ( $\text{CH}_3$ ) e dobramento  $833$  e  $819\text{ cm}^{-1}$  (C-H  $\text{sp}^2$ ). O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 20, p. 41**) apresenta sinais típicos de flavonóide: os dubletos em  $\delta_{\text{H}} 6,43$  ( $J = 2,1\text{ Hz}$ ) e  $6,41$  ( $J = 2,1\text{ Hz}$ ) podem ser atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente, do anel A do flavonóide. O sinal em  $\delta_{\text{H}} 12,86$  (s) foi atribuído a HO-5 formando ligação de hidrogênio com a carbonila do C-4. O simpleto em  $\delta_{\text{H}} 6,77$  foi atribuído aos hidrogênios H-2' e 6' do anel B. Em  $\delta_{\text{H}} 7,90$  (s) aparece um sinal característico de H-2 de isoflavona, esta informação foi confirmada pela análise do espectro 2D HSQC (**Figura 21, p. 42**) que apresentou sinal de interação entre o H-2 ( $7,90$ ) e um carbono em ( $\delta_{\text{CH}} 152,6$ ). O espectro de HSQC mostrou o acoplamento  $^1J_{\text{CH}}$  de H/C-OMe-7 ( $\delta_{\text{C}} 55,7$ ), (H/C-OMe-3',5' ( $\delta_{\text{C}} 56,4$ ), H-8/C-8 ( $\delta_{\text{C}} 92,3$ ), H-6/C-6 ( $\delta_{\text{C}} 98,1$ ), H-2',6'/C-2',6' ( $\delta_{\text{C}} 105,8$ ) e H-2/C-2 ( $\delta_{\text{C}} 152,6$ ). Três grupos metoxílicos foram identificados com os simpletos em  $\delta_{\text{H}} 3,90$  (3H) ligado ao C-7 e  $\delta_{\text{H}} 3,95$  (6H) ligados aos carbonos equivalentes C-3' e C-5'. Estas atribuições foram definidas com a análise do espectro HMBC, que permitiu observar os acoplamentos  $^2J_{\text{CH}}$  e  $^3J_{\text{CH}}$  (**Figura 22, p. 43**). Os acoplamentos com  $^2J_{\text{CH}}$  observados no espectro de HMBC foram: HO-5/C-5 ( $\delta_{\text{C}} 162,9$ ), H-2',6'/C-1' ( $\delta_{\text{C}} 124,0$ ), H-2'/C3' ( $\delta_{\text{C}} 146,9$ ), H-6'/C-5' ( $\delta_{\text{C}} 146,9$ ), e os acoplamentos  $^3J_{\text{CH}}$  foram: H-2/C-9 ( $\delta_{\text{C}} 158,0$ ), H-2',6'/C-3 ( $\delta_{\text{C}} 135,3$ ), H-2/C-4 ( $\delta_{\text{C}} 180,9$ ), HO-5/C-6 ( $\delta_{\text{C}} 98,1$ ), H-8/C-6 ( $\delta_{\text{C}} 98,1$ ), OMe-7/C-7 ( $\delta_{\text{C}} 165,4$ ), H-2/C-9 ( $\delta_{\text{C}} 158,0$ ), H-6,8 e HO-5/C-10 ( $\delta_{\text{C}} 105,8$ ), H-2/C-1' ( $\delta_{\text{C}} 124,0$ ), OMe-3/C-3' ( $\delta_{\text{C}} 146,9$ ), OMe-5'/C-5' ( $\delta_{\text{C}} 146,9$ ). Esses dados estão de acordo com a estrutura da 5,4'-diidroxí-7,5',3'-trimetoxi-isoflavona (**6**). A comparação com os valores da literatura (BENEDEK *et al*, 2006) confirmaram esta proposta. Essa isoflavona já está registrada na literatura, foi isolada de *Godoya antioquiensis* (BENEDEK *et al*, 2006). Este é o primeiro registro desta substância em espécie de *Ouratea*.



5,4'-diidroxi-7,5',3'-trimetoxi-isoflavona (6)

**Tabela 3.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **6**, e comparação com valores de  $\delta_{\text{H}}$  da literatura (BENEDEK *et al*, 2006)

C	Substância <b>6</b> ( $\text{CDCl}_3$ )			5,4'-diidroxi-7,5',3'- trimetoxi-isoflavona ( $\text{DMSO-d}_6$ )	
	$^{13}\text{C}$ $\delta_{\text{C}}$	$^1\text{H}$ $\delta_{\text{H}}$ (mult. <i>J</i> )	$^a\text{HSQC}(^1\text{J}_{\text{HC}})$ ; $^b\text{HMBC}(^n\text{J}_{\text{HC}})$ H/C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult. <i>J</i> )
<b>2</b>	152,6	7,90 ( <i>s</i> )	H-2/C-2 ; C-1'; C-9; C-4	152,0	8,47 ( <i>s</i> )
<b>3</b>	135,3	-	-	124,0	-
<b>4</b>	180,9	-	-	181,0	-
<b>5</b>	162,9	-	-	162,0	-
<b>6</b>	98,1	6,43 ( <i>d</i> ; 2,1Hz)	H-6/C-6; C-10	98,0	6,41 ( <i>d</i> ; 2,0Hz)
<b>7</b>	165,4	-	-	166,0	-
<b>8</b>	92,3	6,43 ( <i>d</i> ; 2,1Hz)	H8/C-8; C-6; C-10	92,0	6,66 ( <i>d</i> ; 2,0Hz)
<b>9</b>	158,0	-	-	158,0	-
<b>10</b>	105,8	-	-	105,0	-
<b>1'</b>	124,0	-	-	121,0	-
<b>2'</b>	105,8	6,78 ( <i>s</i> )	H-2'/C-2'; C-3'; C-3; C-1'	107,0	6,85 ( <i>s</i> )
<b>3'</b>	146,9	-	-	148,0	-
<b>4'</b>	146,9	-	-	136,0	-
<b>5'</b>	146,9	-	-	148,0	-
<b>6'</b>	105,8	6,78 ( <i>s</i> )	H-6'/C-6'; C-1'; C-3; C-5'	107,0	6,85 ( <i>s</i> )
<b>3'-OMe</b>	56,4	3,95 ( <i>s</i> )	H/C-MeO		3,77 ( <i>s</i> )
<b>5'-OMe</b>	56,4	3,95 ( <i>s</i> )	H/C-MeO		3,77 ( <i>s</i> )
<b>7-OMe</b>	55,7	3,90 ( <i>s</i> )	H-MeO/C-MeO; C-7		3,85 ( <i>s</i> )
<b>5-OH</b>	-	12,86 ( <i>s</i> )	HO-5/C-5; C-6; C-10		12,96 ( <i>s</i> )
<b>4'-OH</b>	-	5,62 ( <i>s</i> )	-		-

<sup>a,b</sup>. Valores definidos com base em sinais de HSQC e HMBC.

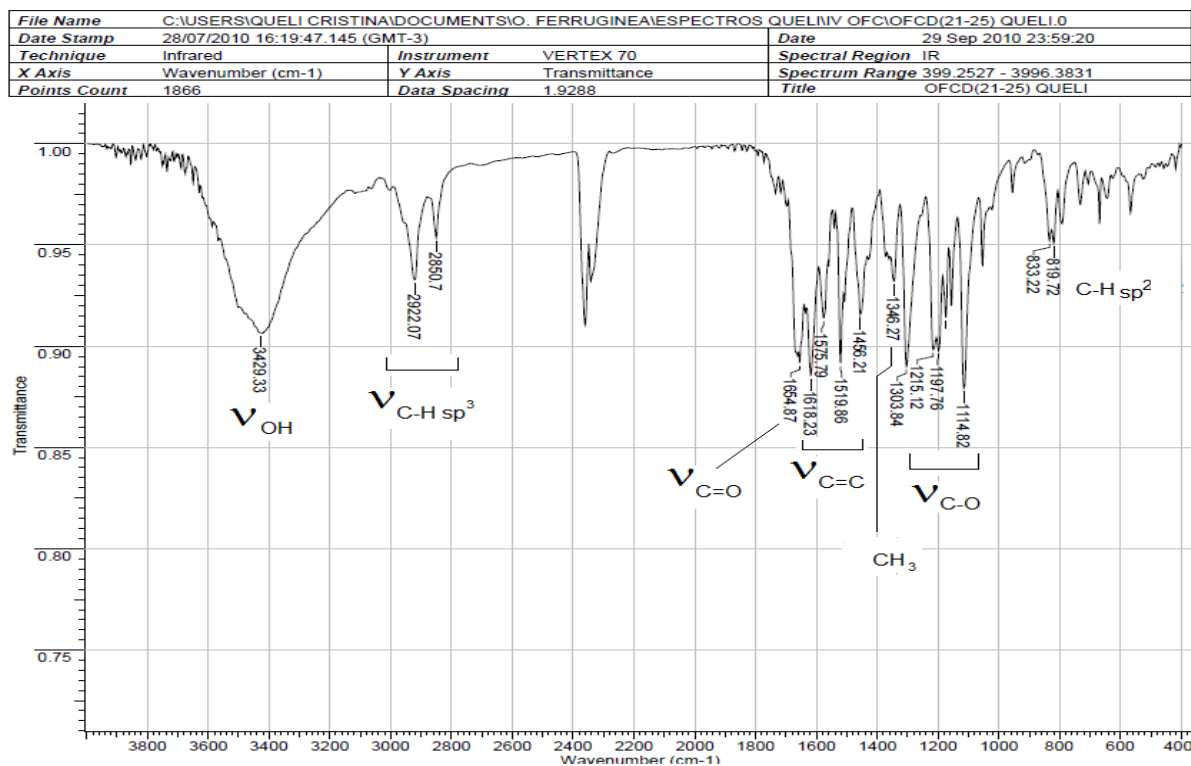


Figura 19. Espectro no IV da substância 6 (KBr)

<b>Acquisition Time (sec)</b>	3.9846	<b>Comment</b>	AMOSTRA: OFC-21-25 EXPERIMENTO: 1H
<b>Date</b>	27 Nov 2009 21:00:38	<b>Temperature (degree C)</b>	27.000
<b>File Name</b>	C:\Users\QUELI CRISTINA\Documents\o. ferruginea\queli_015001r		
<b>Frequency (MHz)</b>	400.13	<b>Nucleus</b>	1H
<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	65536
<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D	<b>Pulse Sequence</b>	zg
		<b>Sweep Width (Hz)</b>	8223.68

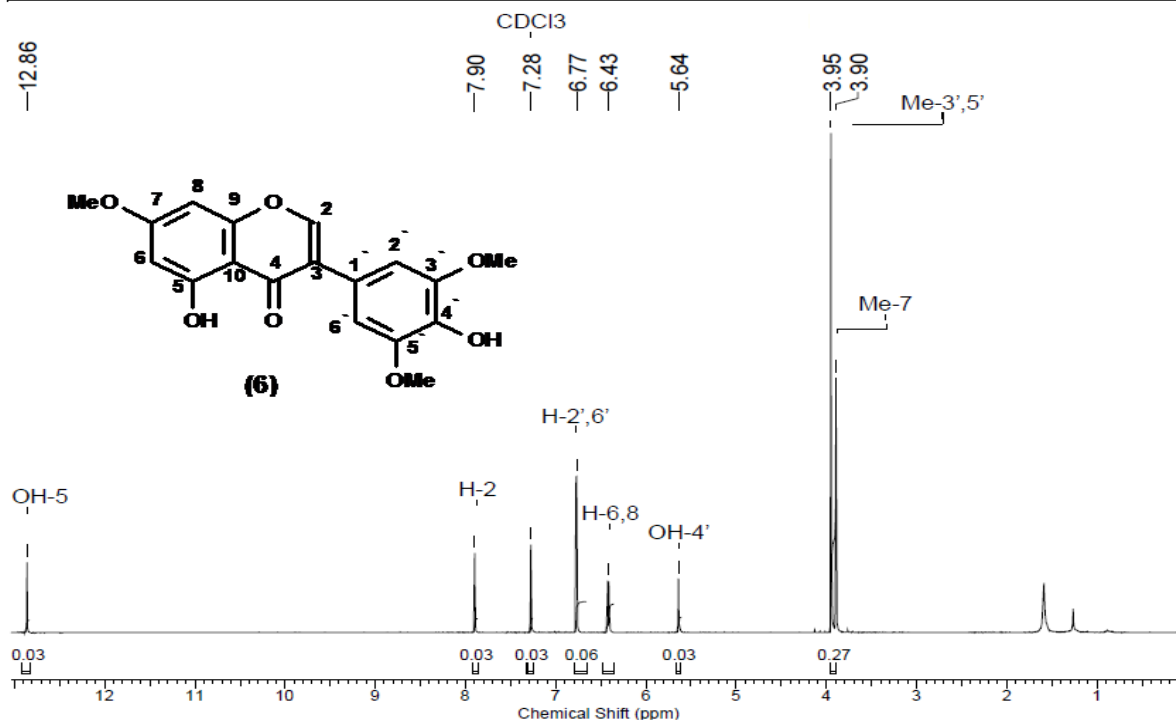
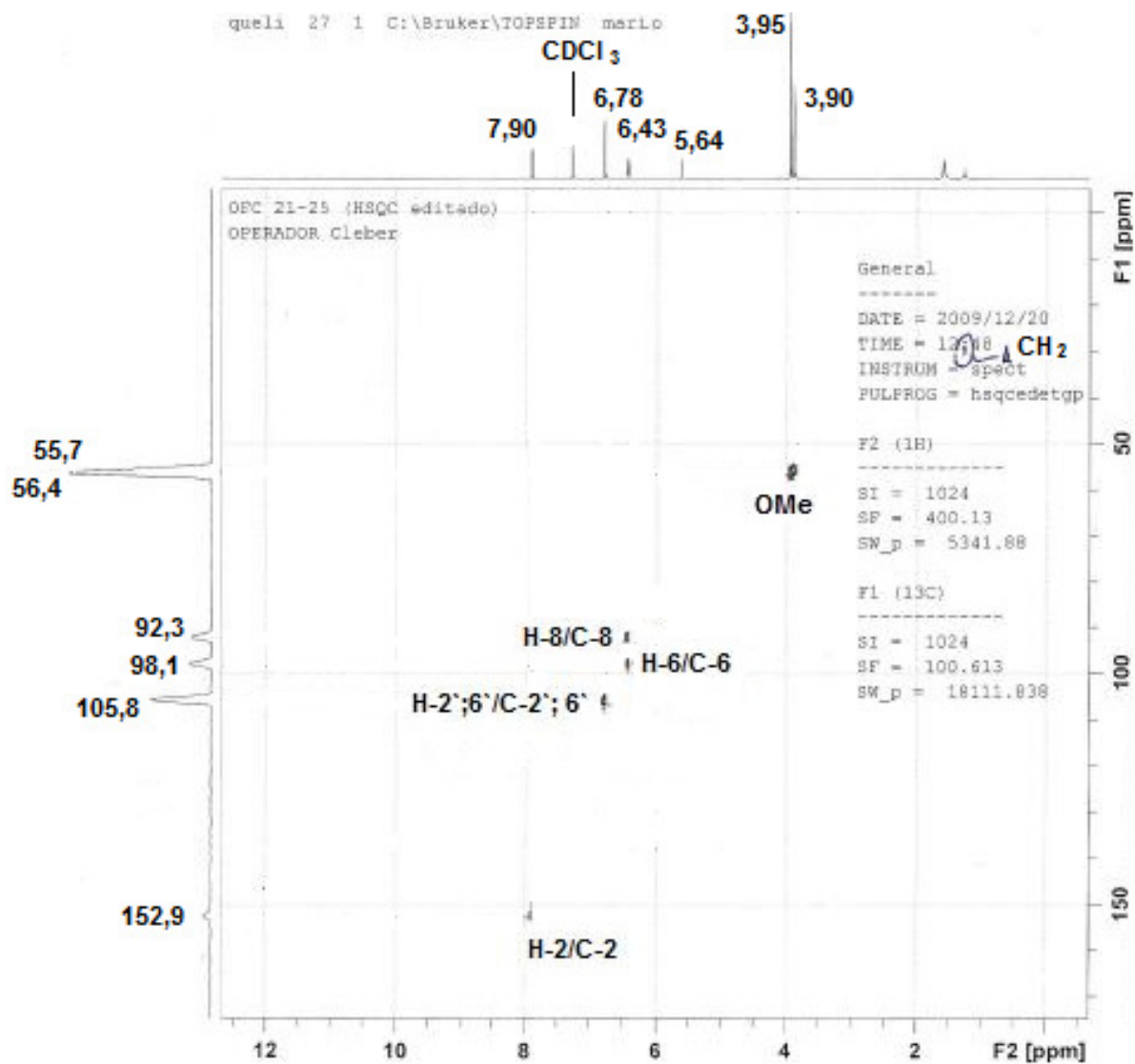
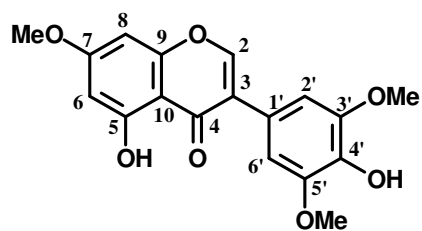


Figura 20. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância 6



**Figura 21.** Espectro de RMN-HSQC (400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância **6**



**5,4'-dihidroxi-7,5',3'-trimetoxi-isoflavona (6)**

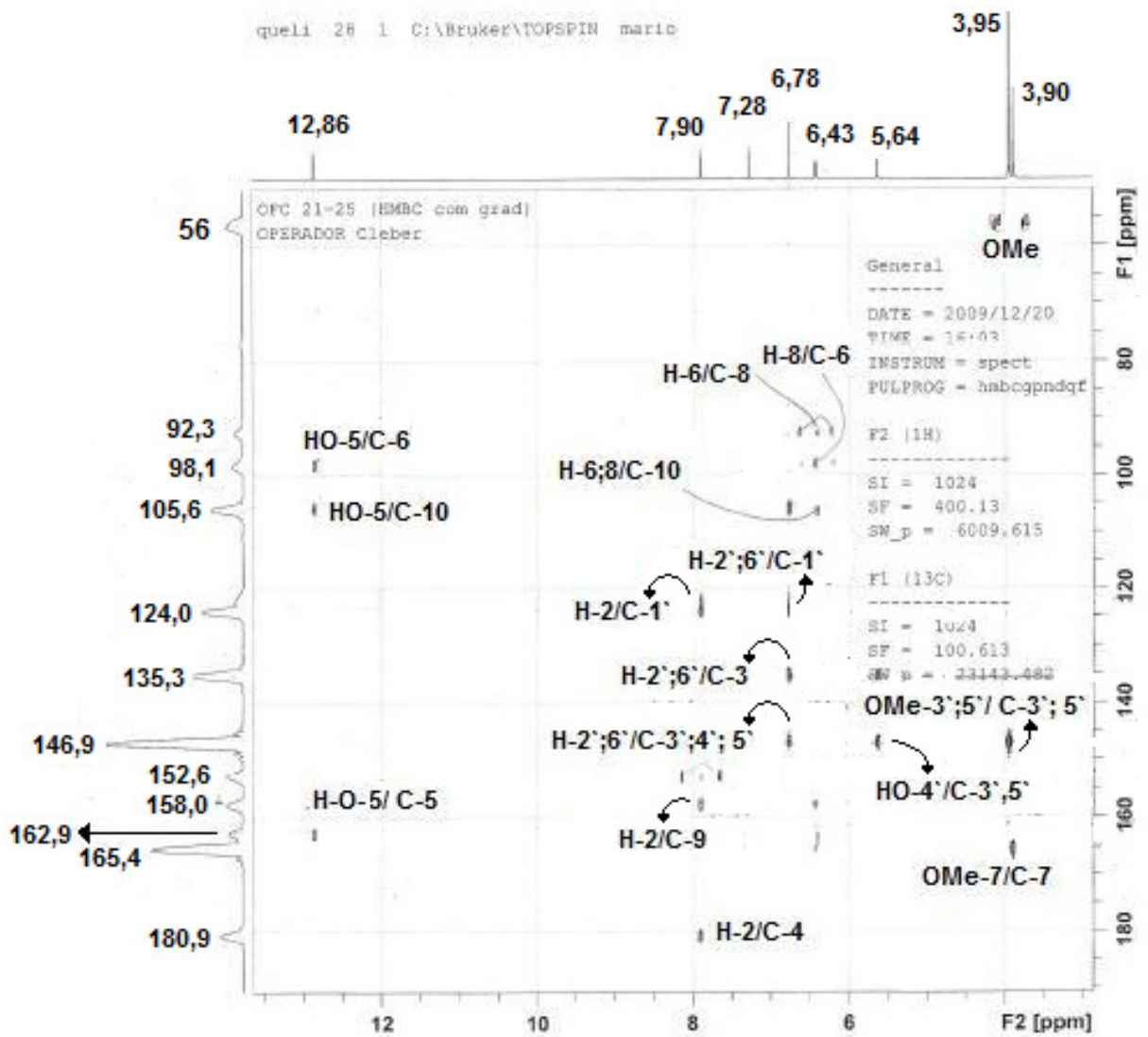
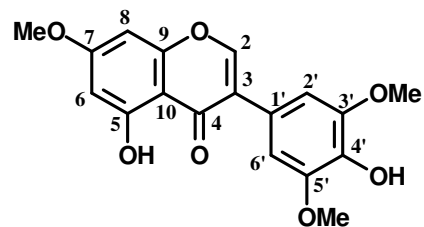


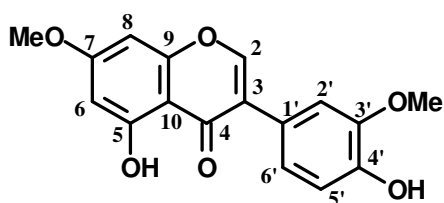
Figura 22. Espectro de RMN-HMBC (400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância 6



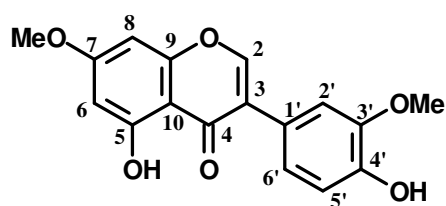
5,4'-dihidroxi-7,5',3'-trimetoxi-isoflavona (6)

#### V.1.4. Determinação estrutural da substância 7

Os experimentos de RMN e IV foram usados na determinação estrutural da substância 7. Por análise do espectro no IV (**Figura 23, p. 46**) foi observado absorções em:  $3435\text{ cm}^{-1}$  para estiramento O-H;  $1658\text{ cm}^{-1}$  para estiramento de C=O com frequência reduzida; na região de 1028 a  $1278\text{ cm}^{-1}$  foram encontrados sinais compatíveis com estiramentos de C-O; além das absorções de esqueleto carbônico da substância 7 de 2923 a 2552 para estiramentos de C-H  $\text{sp}^3$ ; em 1371 para  $\text{CH}_3$ , e em 823 e 790 dobramento de C-H  $\text{sp}^2$ . O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 7 (**Figura 24 e 25, p. 47**) apresenta sinal de hidroxila quelada com carbonila em  $\delta_{\text{H}} 12,88\text{ (s)}$ , sinais  $\delta_{\text{H}} 6,43\text{ (sl)}$  e  $6,41\text{ (sl)}$  correspondentes a H-6 e H-8 do anel A de um flavonóide. Os hidrogênios do anel B estão referenciados pelos sinais em  $\delta_{\text{H}} 7,15\text{ (sl, H-2')}$ ,  $6,99\text{ (sl, H-5' e H-6')}$ , além dos sinais de duas metoxilas em  $\delta_{\text{H}} 3,89\text{ (s)}$  e  $3,96\text{ (s)}$  que, de acordo com correlações observadas no espectro de HMBC (**Figura 27, p. 49**), estão ligadas nos carbonos C-7 e C-3', respectivamente. Foi proposta a estrutura de uma isoflavona com base no sinal do H-2 em  $\delta_{\text{H}} 7,89\text{ (s)}$  semelhante a substância 6. Os espectros de NOEDIFF (**Figura 28, p. 50**) confirmaram a posição das metoxilas em 7 e 3' através das seguintes observações: a) a irradiação na frequência de 3,96 ppm (OMe-3') gerou NOE em  $\delta_{\text{H}} 7,15$ , característico de H-2'; b) a irradiação na frequência de 3,89 ppm (OMe-7) gerou NOE em  $\delta_{\text{H}} 6,40$  e  $6,43$  dos H-8 e H-6, respectivamente. O espectro de HSQC (**Figura 26, p. 48**) mostrou sinais de acoplamento  $^1J_{\text{HC}}$  dos hidrogênios e carbonos e permitiram identificar os  $\delta_{\text{HC}}$  dos respectivos carbonos em: 91,8 (H-8/C-8), 98 (H-6/C-6), 111,4 (H-2'/C-2'), 114,3 (H-5'/C-5'), 121,6 (H-6'/C-6'), e 152,9 (H-2/C-2); ver **Tabela 4 (p. 45)**. O espectro de HMBC mostrou os  $^2J_{\text{HC}}$ , H-2' acoplado com C-1', e  $^3J_{\text{HC}}$  H-2' com C-6', H-2/C-1', H-5'/C-1', H-6'/C-2', H-8/C-6, H-6/C-8 (**Tabela 4, p. 45**). Esta substância foi identificada como a 5,4'-diidroxil-7,3'-dimetoxiisoflavona, já registrada na literatura e conhecida como 7,3'-dimetil-orobol (7). Foi isolada pela primeira vez dos extratos em diclorometano das folhas de *Wyethia angustifolia* (MCCORMICK *et al*, 1986). A comparação dados da literatura confirmou a proposta.



5,4'-diidroxil-7,3'-dimetoxiisoflavona (7)



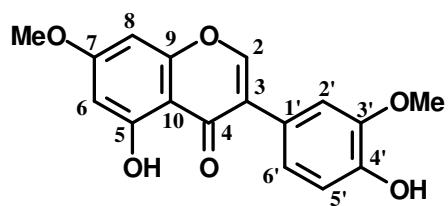
**5,4'-diidroxi-7,3'-dimetoxi-isoflavona (7)**

**Tabela 4.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e HSQC de **7**, comparados com dados da literatura para (5,4'-diidroxi-7,3'-dimetoxi-isoflavona) (MCCORMICK *et al*, 1986)

C	Substância <b>7</b> ( $\text{CDCl}_3$ )			7,3'-dimetil-orobol ( $\text{CDCl}_3$ )	
	$^1\text{H}$	$^1\text{H}$	$^a\text{HSQC}(^1\text{J}_{\text{HC}});$ $^b\text{HMBC}(^n\text{J}_{\text{HC}})$	$^1\text{H}$	$^1\text{H}$
	$^a,^b\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult. <i>J</i> )	H/C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult. <i>J</i> )
<b>2</b>	152,9	7,89 ( <i>s</i> )	H-2/C-2; C-1'	154,00	7,87 ( <i>s</i> )
<b>3</b>	-	-	-	124,01	-
<b>4</b>	-	-	-	181,47	-
<b>5</b>	-	-	-	163,30	-
<b>6</b>	98,0	6,41 ( <i>d</i> ; 2,2Hz)	H-6/C-6; C-8	98,57	6,37 ( <i>d</i> ; 2,3Hz)
<b>7</b>	-	-	-	166,40	-
<b>8</b>	91,8	6,43 ( <i>d</i> ; 2,2Hz)	H-8/C-8; C-6	92,69	6,41 ( <i>d</i> ; 2,3Hz)
<b>9</b>	-	-	-	158,61	-
<b>10</b>	105,8	-	-	106,52	-
<b>1'</b>	121,6	-	-	122,95	-
<b>2'</b>	111,4	7,15 ( <i>d</i> ; 1,7Hz)	H-2'/C-2'; C-6'; C-1'	113,61	7,14 ( <i>d</i> ; 1,5Hz)
<b>3'</b>	-	-	-	147,62	-
<b>4'</b>	-	-	-	147,91	-
<b>5'</b>	114,3	6,99 ( <i>d</i> ; 8,2Hz)	H-5'/C-5'; C-1'	115,53	6,99 ( <i>d</i> ; 8,0Hz)
<b>6'</b>	121,6	6,95 ( <i>dd</i> ; 8,2 e 1,7Hz)	H-6'/C-6'; C-2'	122,49	6,95 ( <i>dd</i> ; 8,0 e 1,5Hz)
<b>3'-OMe</b>	-	3,96( <i>s</i> )	-	56,16	3,94( <i>s</i> )
<b>7-OMe</b>	-	3,89( <i>s</i> )	-	55,30	3,89( <i>s</i> )
<b>5-OH</b>	-	12,87( <i>s</i> )	-	-	12,85( <i>s</i> )
<b>4'-OH</b>	-	-	-	-	5,51( <i>s</i> )

<sup>a,b</sup>. Valores definidos com base em sinais de HSQC e HMBC





5,4'-diidroxi-7,3'-dimetoxi-isoflavona (7)

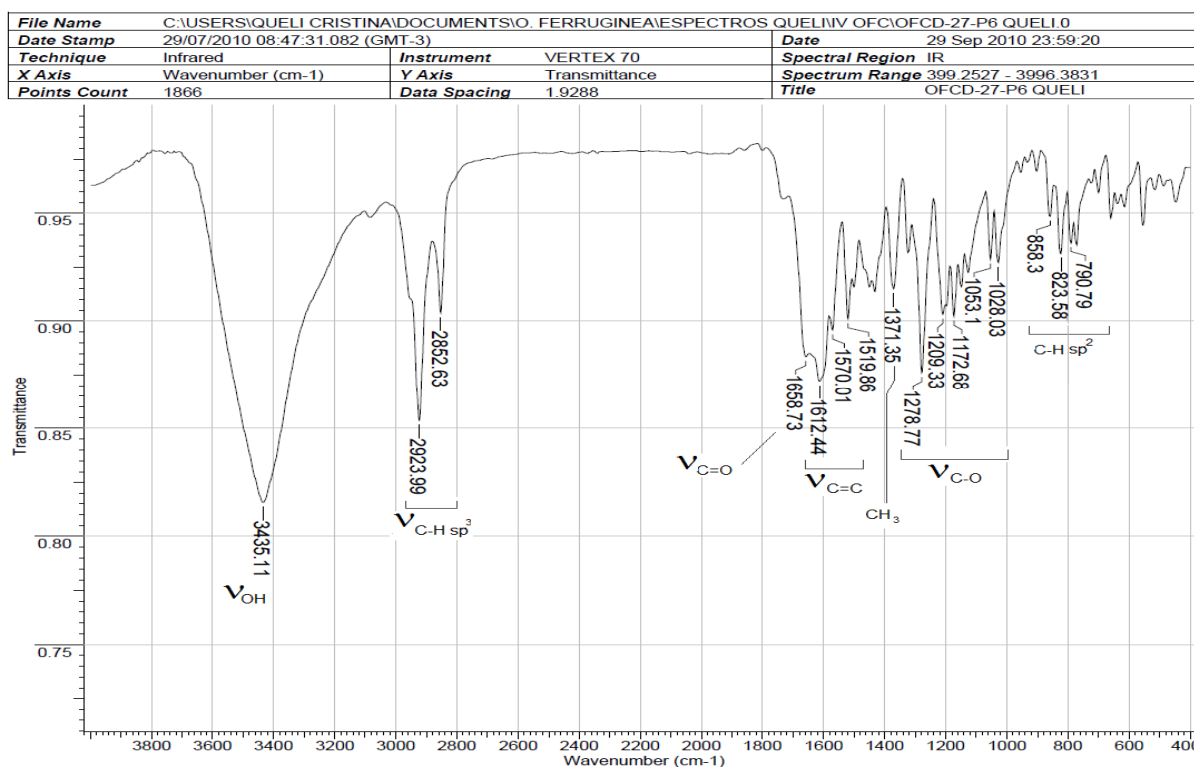


Figura 23. Espectro no IV da substância 7 (KBr)

Acquisition Time (sec)	3.9846	Date	27 Nov 2009 19:34:48
File Name	C:\Users\QUELI\CRISTINA\Documents\O_ferruginea\queli_014001r	Nucleus	<sup>1</sup> H
Frequency (MHz)	400.13	Points Count	65536
Original Points Count	32768	Sweep Width (Hz)	8223.68
Solvent	CHLOROFORM-D		
Temperature (degree C)	27.000		

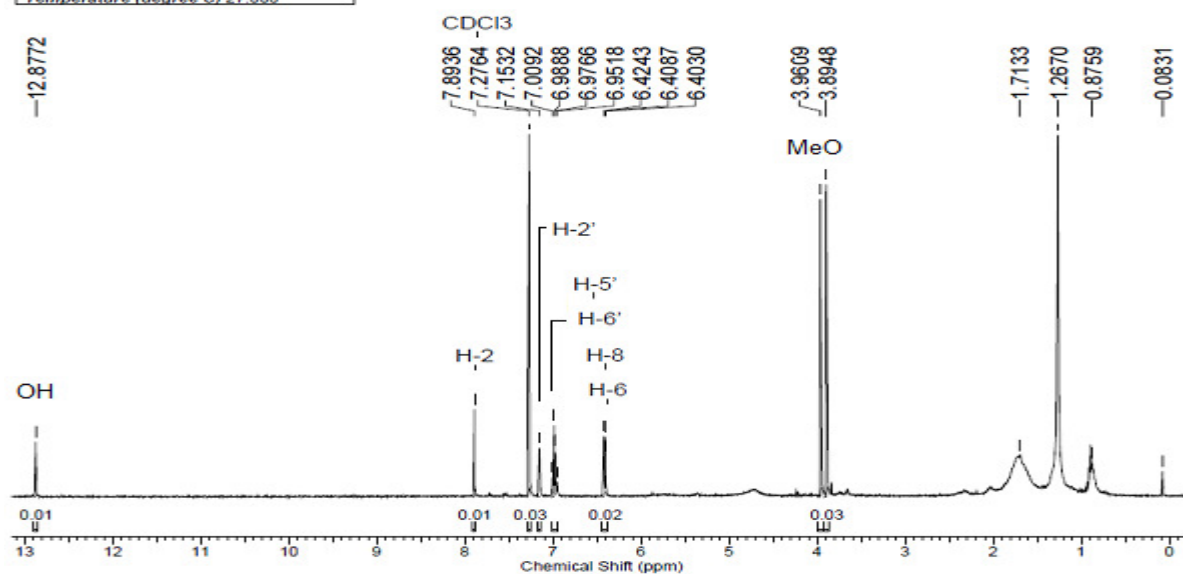


Figura 24. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância 7

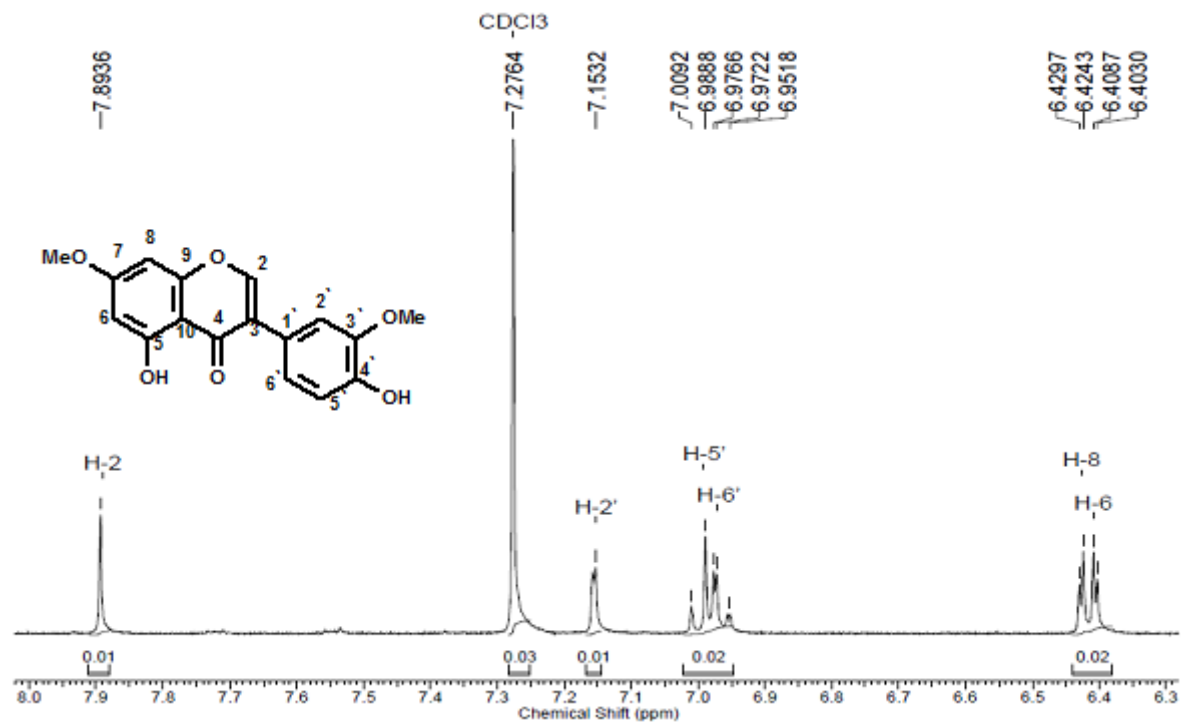


Figura 25. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância 7

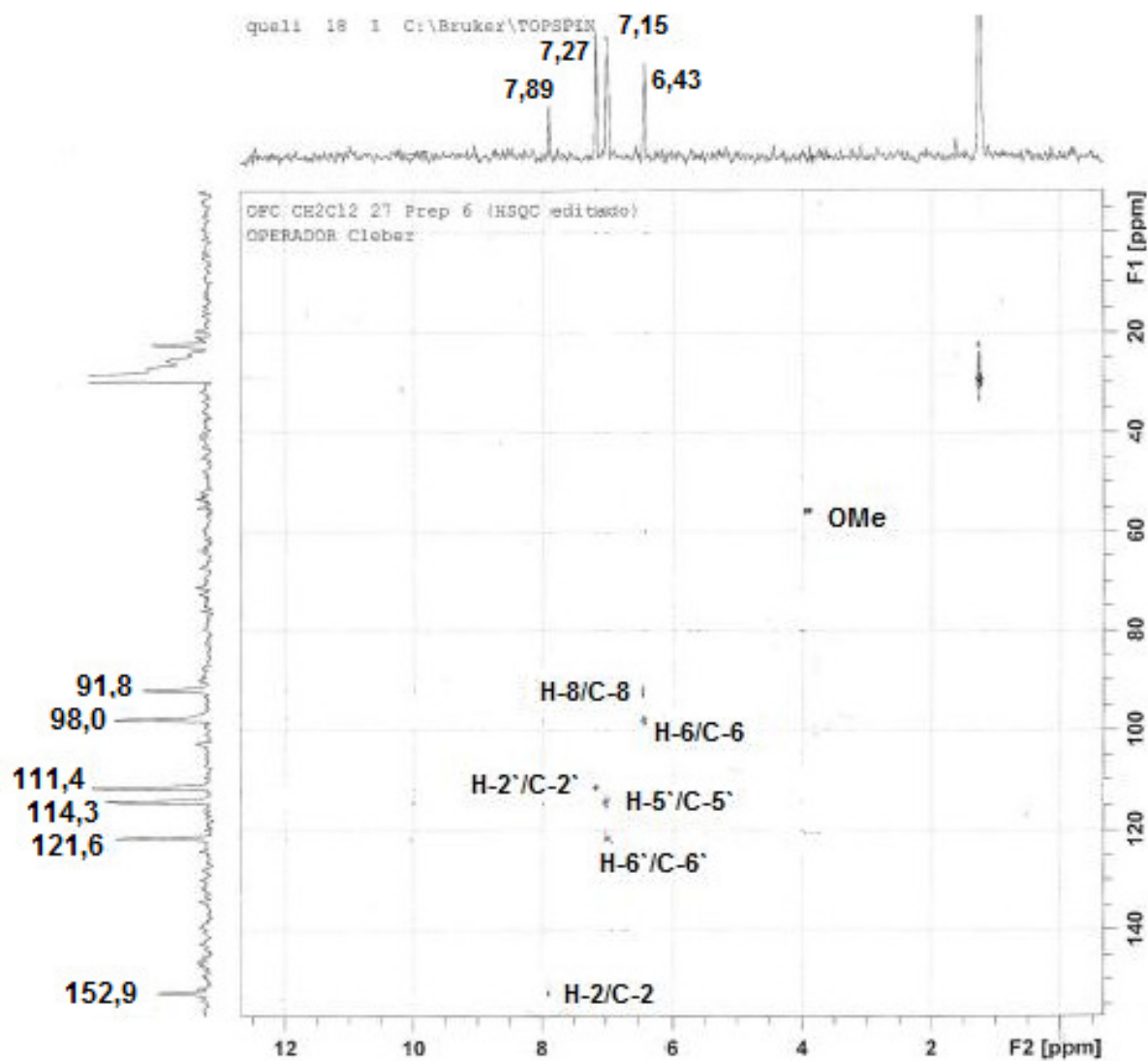
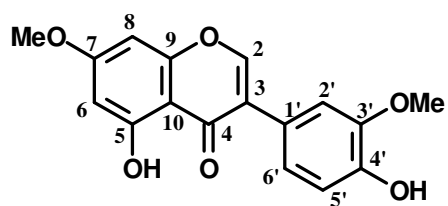


Figura 26. Espectro de RMN-HSQC (400/100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância 7



5,4'-diidroxi-7,3'-dimetoxi-isoflavona (7)

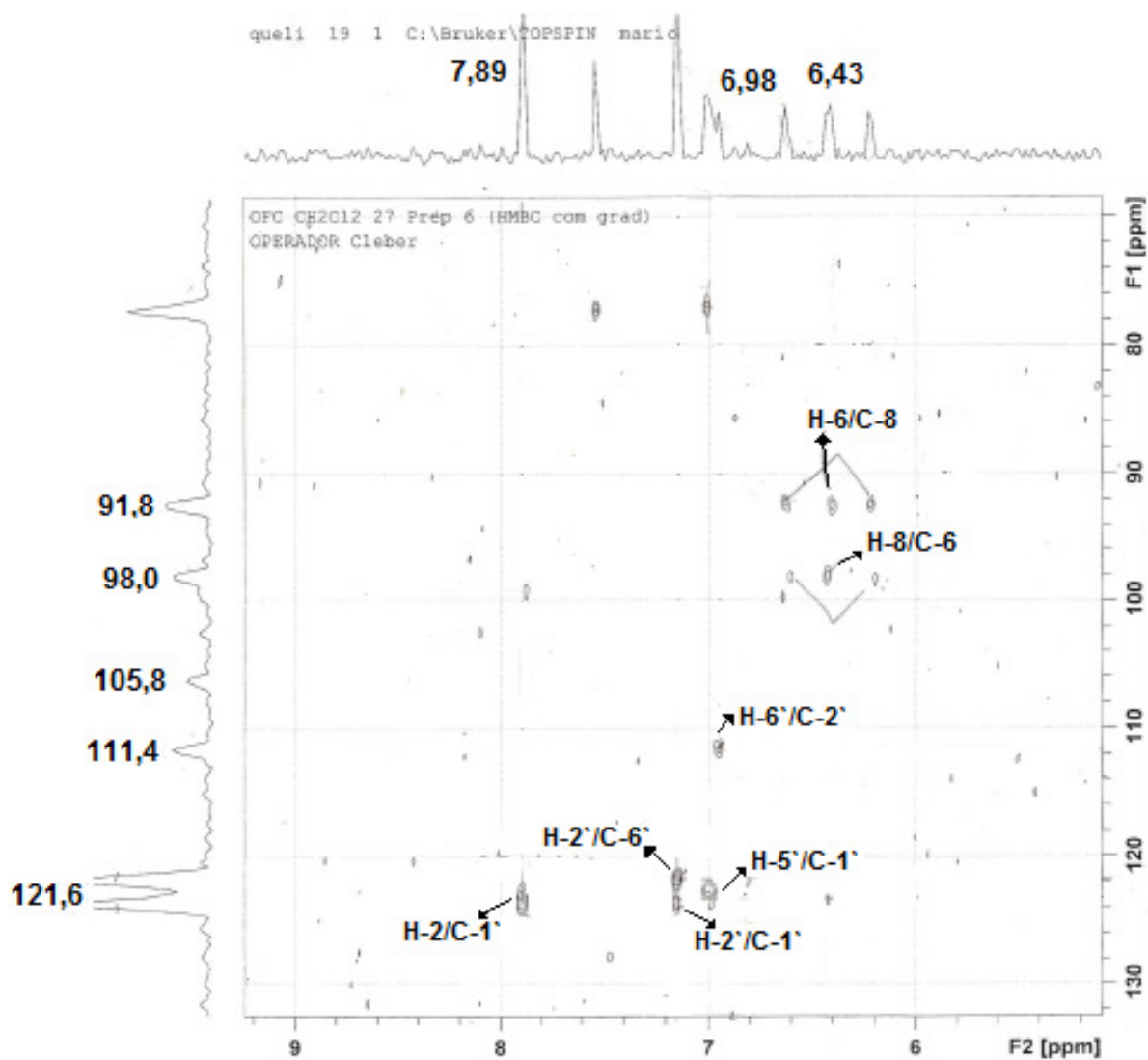
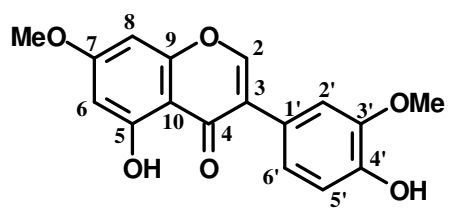
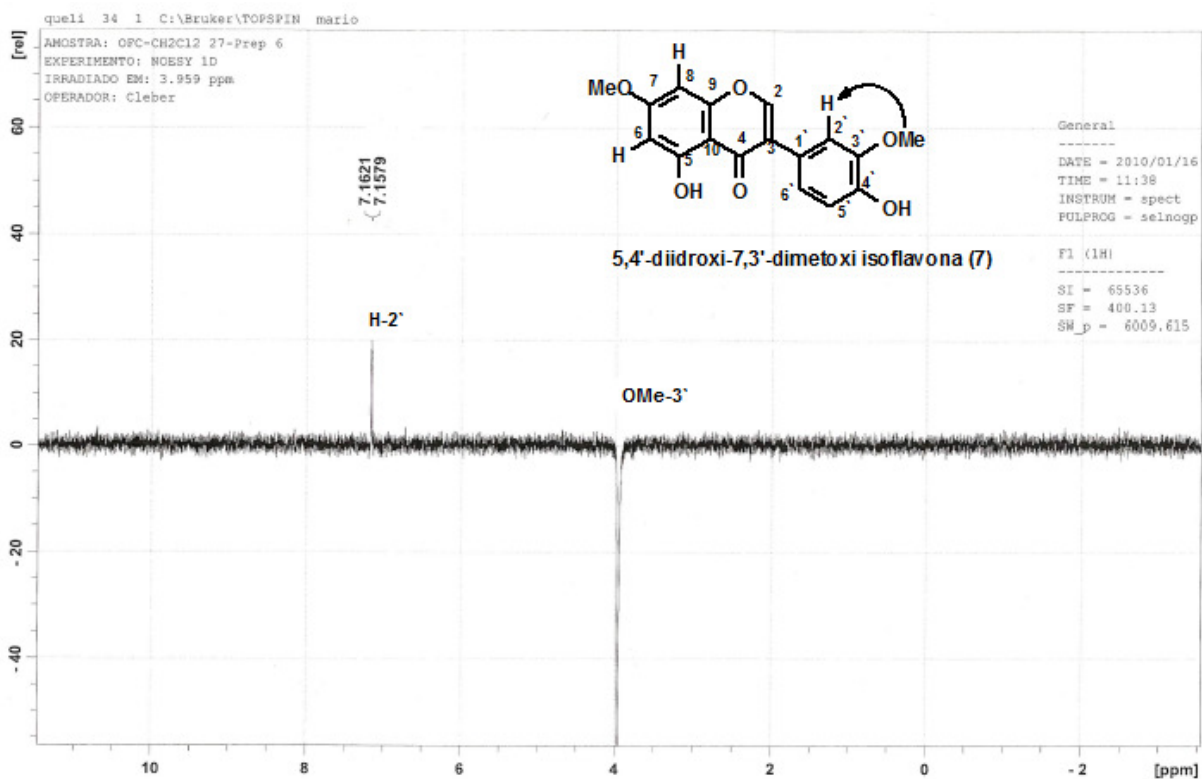
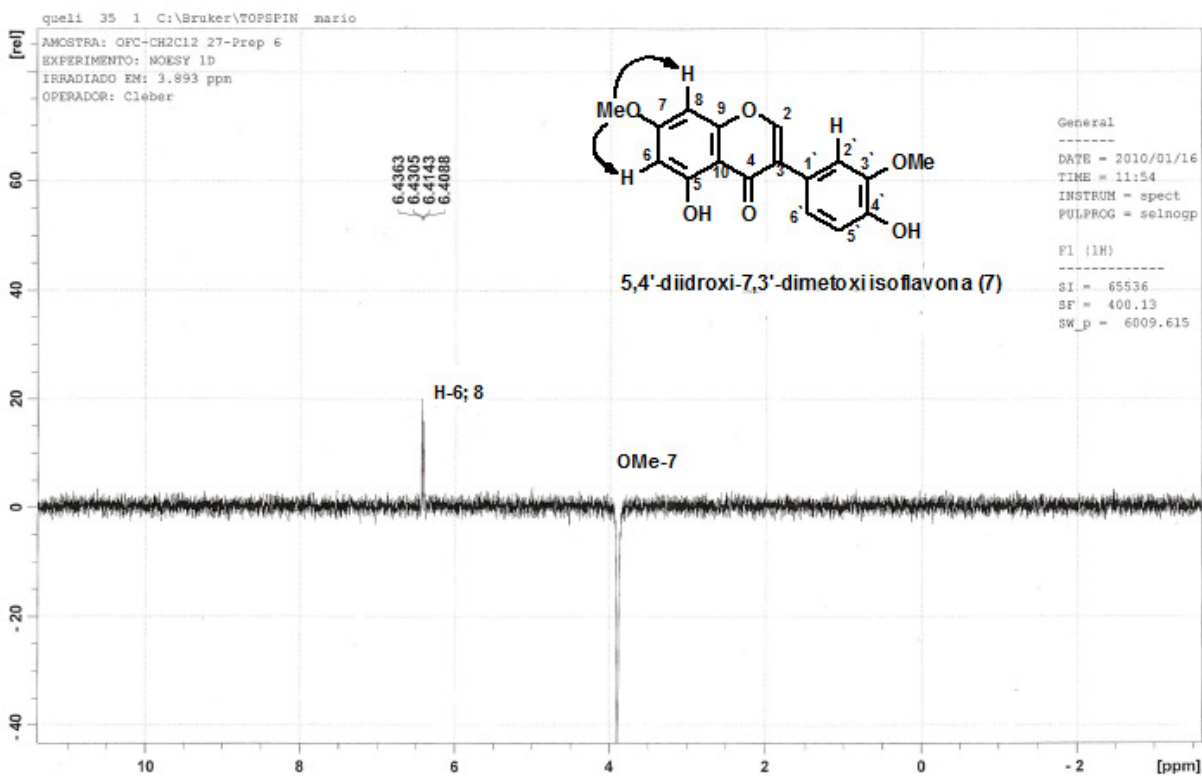


Figura 27. Espectro de RMN-HMBC (400/100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância 7



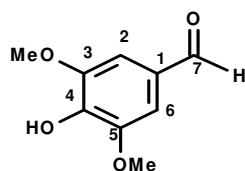
5,4'-diidroxi-7,3'-dimetoxi-isoflavona (7)



**Figura 28.** Espectros RMN-NOEDIFF (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância 7

### V.1.5. Determinação estrutural da substância 8

Análise do espectro de IV (**Figura 29, p. 52**) desta substância mostrou absorções em  $3396\text{ cm}^{-1}$  para estiramento de O-H,  $1672$  para estiramento de C=O, duas bandas de absorção característica de C=C uma em  $1603$  e outra em  $1514\text{ cm}^{-1}$ , além de estiramento de C-H  $\text{sp}^3$  em de  $2964$  a  $2856$  e o dobramento C-H  $\text{sp}^2$  em  $831$  e  $727\text{ cm}^{-1}$ . O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 30, p. 52**) apresentou um sinal em  $\delta_{\text{H}} 9,84(\text{s})$  característico de hidrogênio de aldeído. Em  $\delta_{\text{H}} 7,28$  há um sinal característico de OH fenólico. Em  $7,17(\text{s})$  aparece o sinal de dois hidrogênios de sistemas aromáticos e um outro simpleto muito intenso em  $\delta_{\text{H}} 3,99$  correspondente as duas metoxilas. A comparação com os dados de referência confirmaram ser o aldeído sirínico (**8**) (PETTIT, 2009). Devido a pouca quantidade de amostra, não foi possível registrar o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e, por isso, fez-se o espectro 2D de RMN  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  (HSQC) (**Figura 31, p.53**) que permitiu a identificação dos valores de deslocamento químico dos carbonos metínicos ( $\delta_{\text{CH}} 106,4$ ) e metílicos ( $\delta_{\text{CH}} 56,3$ ), além de confirmar a função aldeído com o sinal de acoplamento do hidrogênio com  $\delta_{\text{H}} 9,84$  e o  $\delta_{\text{C}}$  em  $190,6$  ppm. O espectro de massas (**Figura 32, p. 54**) obtido com inserção via CG foi compatível com a estrutura proposta.



aldeído sirínico (**8**)

**Tabela 5.** Dados de RMN de **8** comparados com dados da literatura para aldeído sirínico (PETTIT, 2009)

C	Substância <b>8</b> ( $\text{CDCl}_3$ )			aldeído sirínico ( $\text{CDCl}_3$ )	
	$^{13}\text{C}$ $^a\delta_{\text{C}}$	$^1\text{H}$ $\delta_{\text{H}}$ (mult. $J$ )	$^a\text{HSQC}(^1J_{\text{HC}})$ H/C	$^{13}\text{C}$ $\delta_{\text{C}}$	$^1\text{H}$ $\delta_{\text{H}}$ (mult. $J$ )
<b>1</b>				128,3	
<b>2</b>	106,4	7,17(s)	H-2/C-2	106,6	7,15(s)
<b>3</b>				147,3	
<b>4</b>				140,8	
<b>5</b>				147,3	
<b>6</b>	106,4	7,17(s)	H-6/C-6	106,6	7,15(s)
<b>7</b>	190,6	9,84(s)	H-7/C-7	190,7	9,82(s)
<b>OMe</b>	56,3	3,99(s)	H-Me/C-Me	56,4	3,97(s)
<b>OH</b>		7,28(s)			6,12(s)

<sup>a</sup>.Valores definidos com base em sinais de HSQC.

<b>File Name</b>	C:\USERS\QUELI CRISTINA\DOCUMENTS\O. FERRUGINEA\ESPECTROS QUELI\IV OFC\OFCD(27-1P3) QUELI.0		<b>Date</b>	29 Sep 2010 23:59:20
<b>Date Stamp</b>	28/07/2010 15:58:41.159 (GMT-3)		<b>Spectral Region</b>	IR
<b>Technique</b>	Infrared	<b>Instrument</b>	VERTEX 70	
<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)	<b>Y Axis</b>	Transmittance	<b>Spectrum Range</b> 399.2527 - 3996.3831
<b>Points Count</b>	1866	<b>Data Spacing</b>	1.9288	<b>Title</b> OFCD(27-1P3) QUELI

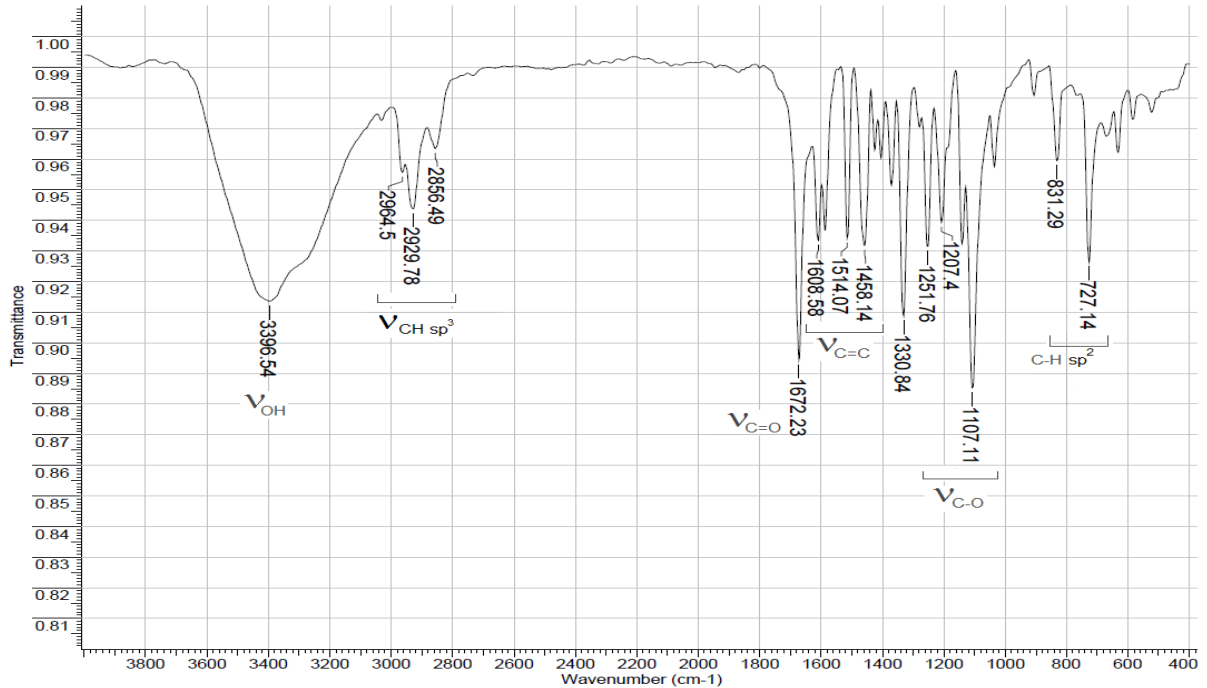


Figura 29. Espectro no IV da substância **8** (KBr)

<b>Acquisition Time (sec)</b>	3.9846	<b>Comment</b>	AMOSTRA: OFC-CH2Cl2 27-1P-3 (PROTON)	
<b>Date</b>	20 Dec 2009 14:01:28			
<b>File Name</b>	C:\Users\QUELI CRISTINA\Documents\o_ferruginea\queli_024001r			
<b>Frequency (MHz)</b>	400.13	<b>Nucleus</b>	<sup>1</sup> H	<b>Number of Transients</b> 32
<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	65536	<b>Pulse Sequence</b> zg
<b>Solvent</b>	CHLOROFORM-D			<b>Sweep Width (Hz)</b> 8223.68
<b>Temperature (degree C)</b>	27.000			

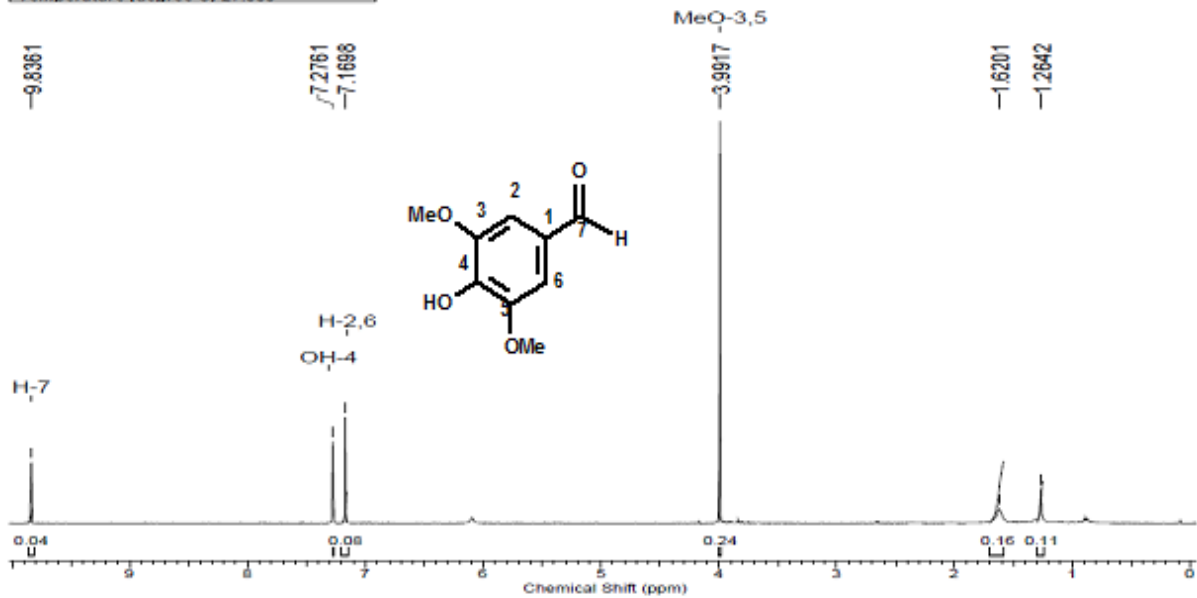
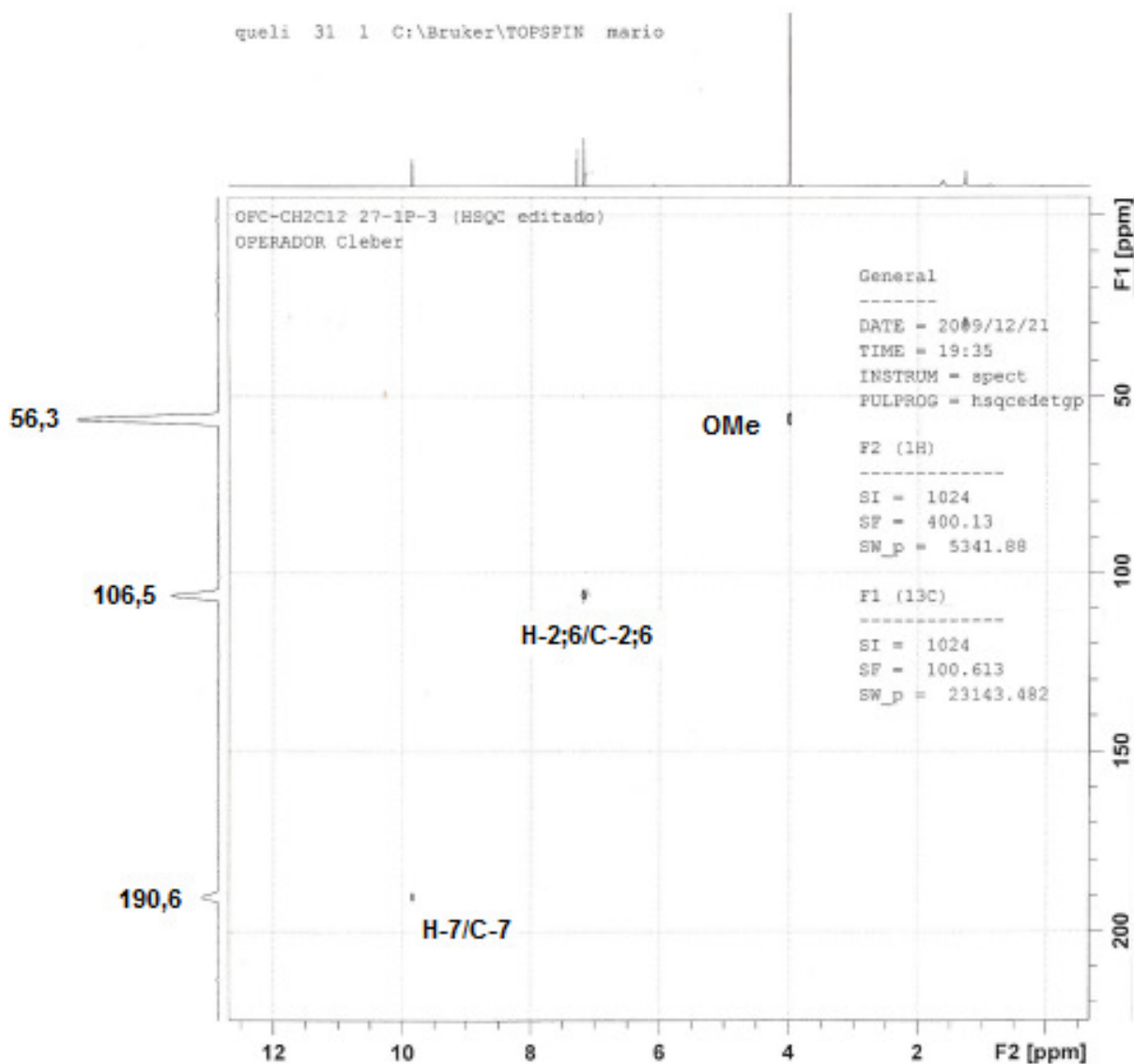
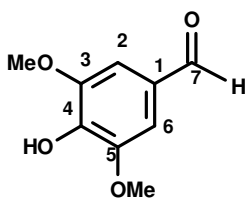


Figura 30. Espectro de RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância **8**

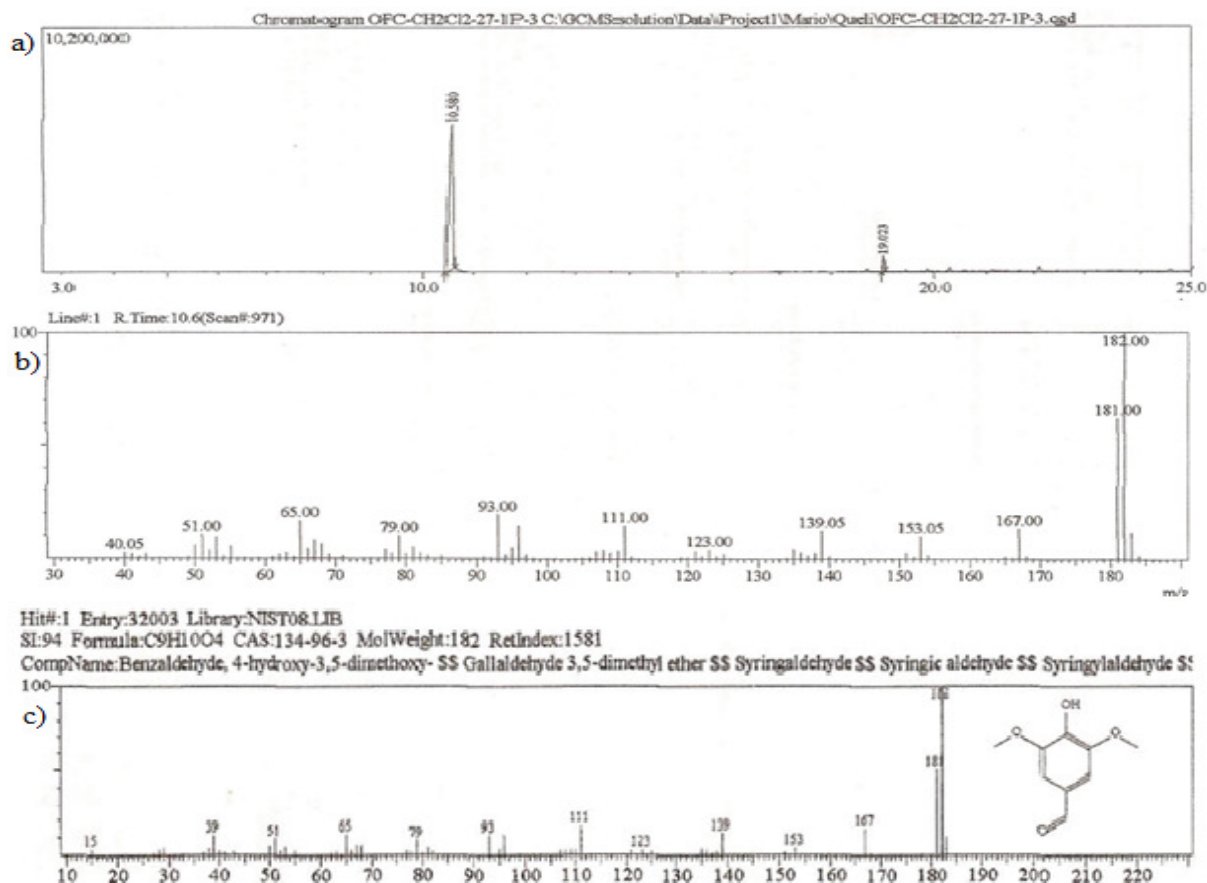


**Figura 31.** Espectro de RMN-HSQC (400/100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **8**



aldeído siringico (**8**)

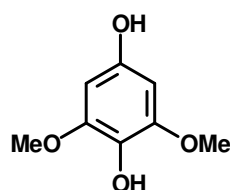
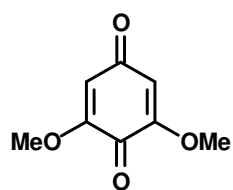




**Figura 32.** a) Cromatograma (CG) da substância **8**; b, c) espectro de massas da substância **8** em comparação com a biblioteca do aparelho

### V.1.6. Determinação estrutural das substâncias **9** e **10**

O espectro de RMN<sup>1</sup>H (**Figura 33**, p. **55**) da substância **9** apresentou os sinais  $\delta_H$  5,44 (s) dos hidrogênios H-2 e 6, e  $\delta_H$  3,78 (s) para os hidrogênios de metoxilas. A análise por CG-EM (**Figura 35**, p. **56**) revelou a 2,6-dimetoxi-benzoquinona (**9**) presente na fração OFCD-27-2p8. Esta substância foi novamente encontrada na fração OFCD-27-p5 (**Figura 36**, p. **57**), mas em mistura com 2,6-dimetoxi-hidroquinona (**10**). O cromatograma da mistura mostra quatro picos, sendo que as substâncias **9** e **10** aparecem como majoritárias. Nos **esquemas 3** e **4** (pág. **58** e **59**) estão representadas as propostas de fragmentação para as substâncias **9** e **10**, respectivamente. O espectro de RMN<sup>1</sup>H da mistura (**Figura 34**, p. **55**) mostrou dois sinais: um em  $\delta_H$  5,87, atribuídos aos hidrogênios H-2 e 6, e outro em 3,88 ppm, atribuídos aos hidrogênios de metoxila. Esses valores estão de acordo com os dados da 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona isolada de *Hydrangea macrophylla* Seringe var. *otaksa* Makino, que apresentou  $\delta_H$  5,85 para H-2;6 e 3,82 para os hidrogênios de metoxilas em CDCl<sub>3</sub> (HARASAWA & TAGASHIRA, 1994).



2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona (9) 2,6-dimetoxi-1,4-hidroxibenzoquinona (10)

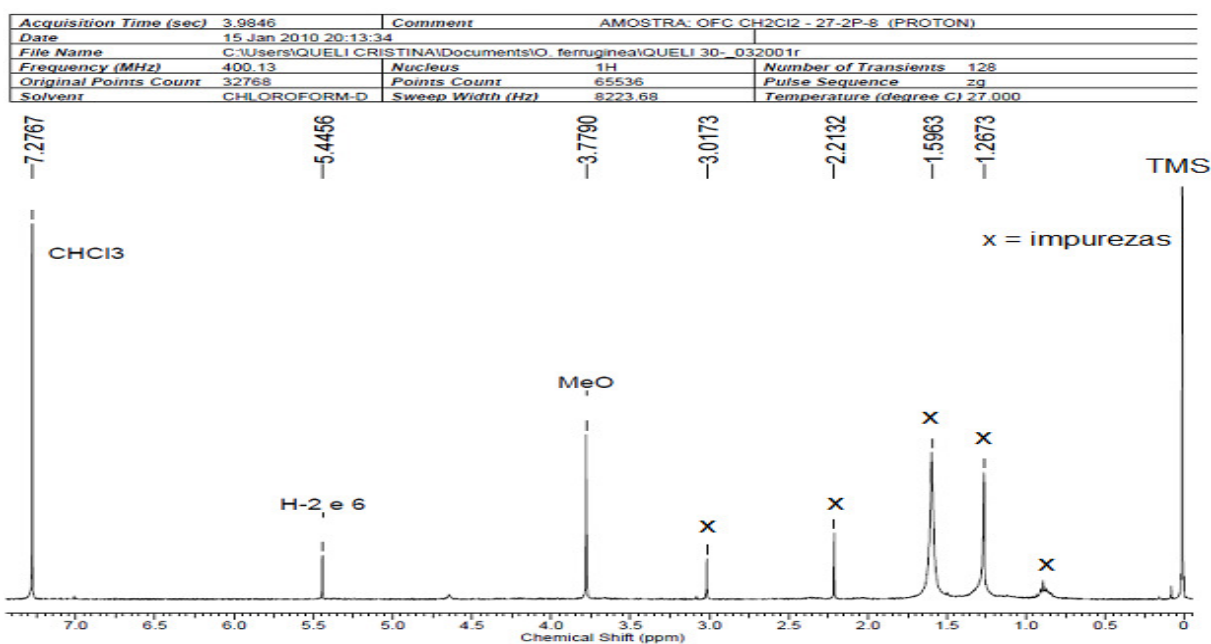


Figura 33. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância 9

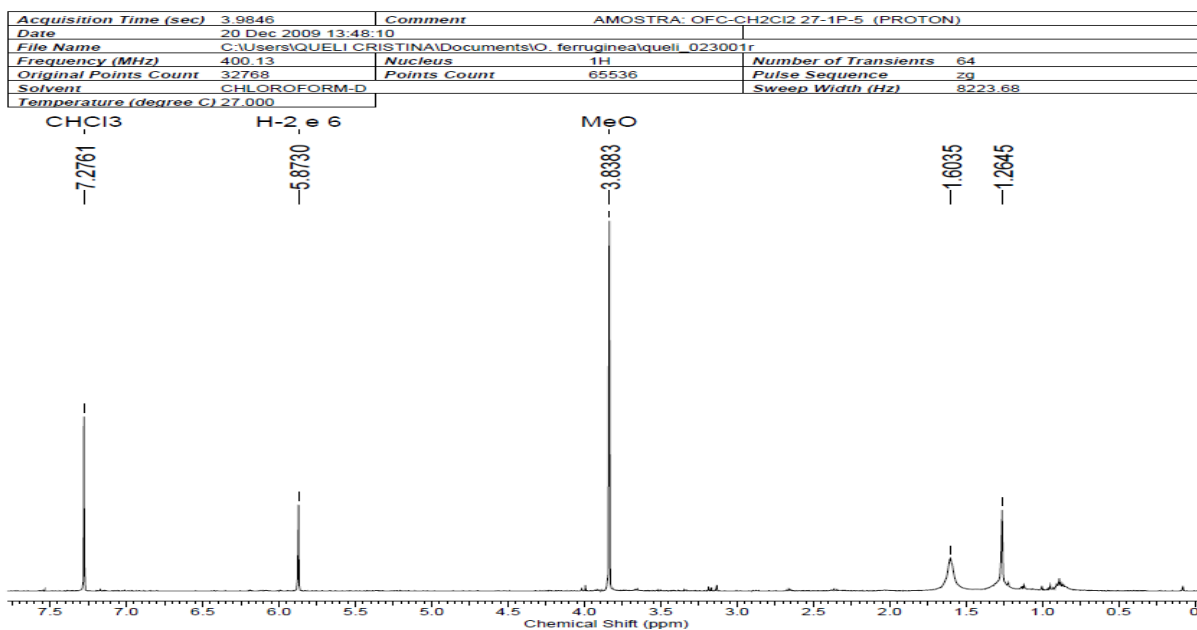
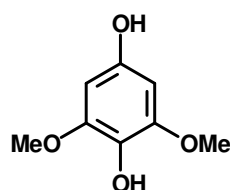
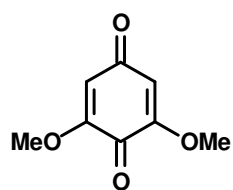
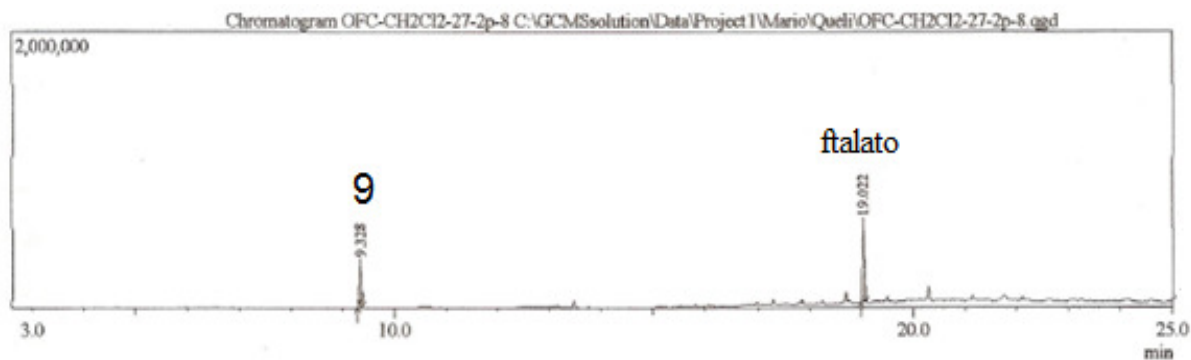


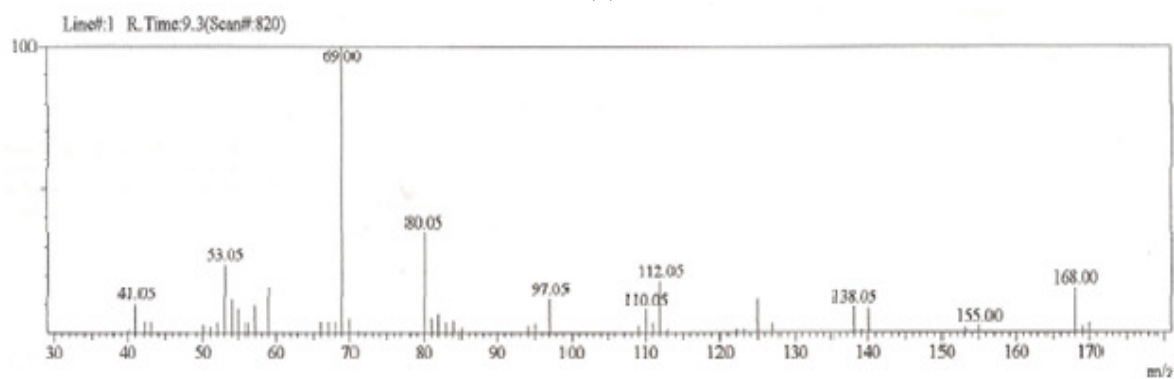
Figura 34. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura das substâncias 9 e 10



2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona (9) 2,6-dimetoxi-1,4-hidroxibenzoquinona (10)



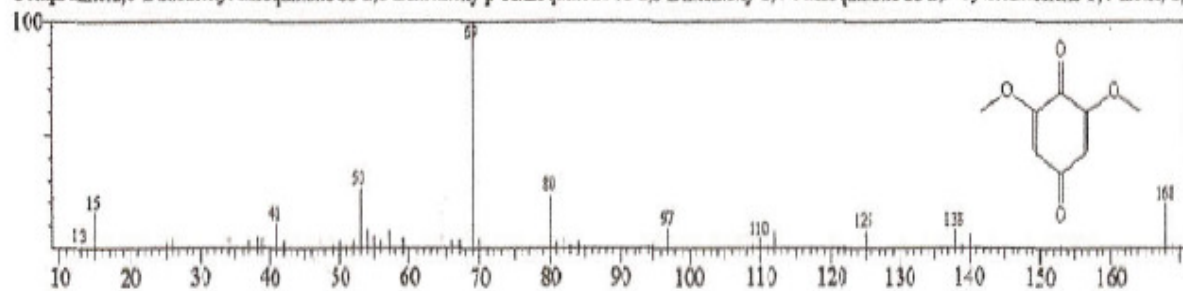
(a)



Hit#:1 Entry:11797 Library:NIST08s.LIB

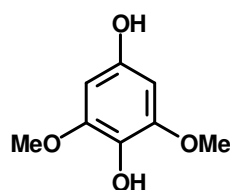
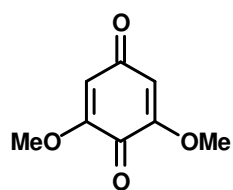
SI:90 Formula:C8H8O4 CAS:530-55-2 MolWeight:168 RefIndex:1357

CompName:2,6-Dimethoxybenzoquinone \$\$ 2,6-Dimethoxy-p-benzoquinone \$\$ 2,6-Dimethoxy-1,4-benzoquinone \$\$ 2,5-Cyclohexadiene-1,4-dione, 2,

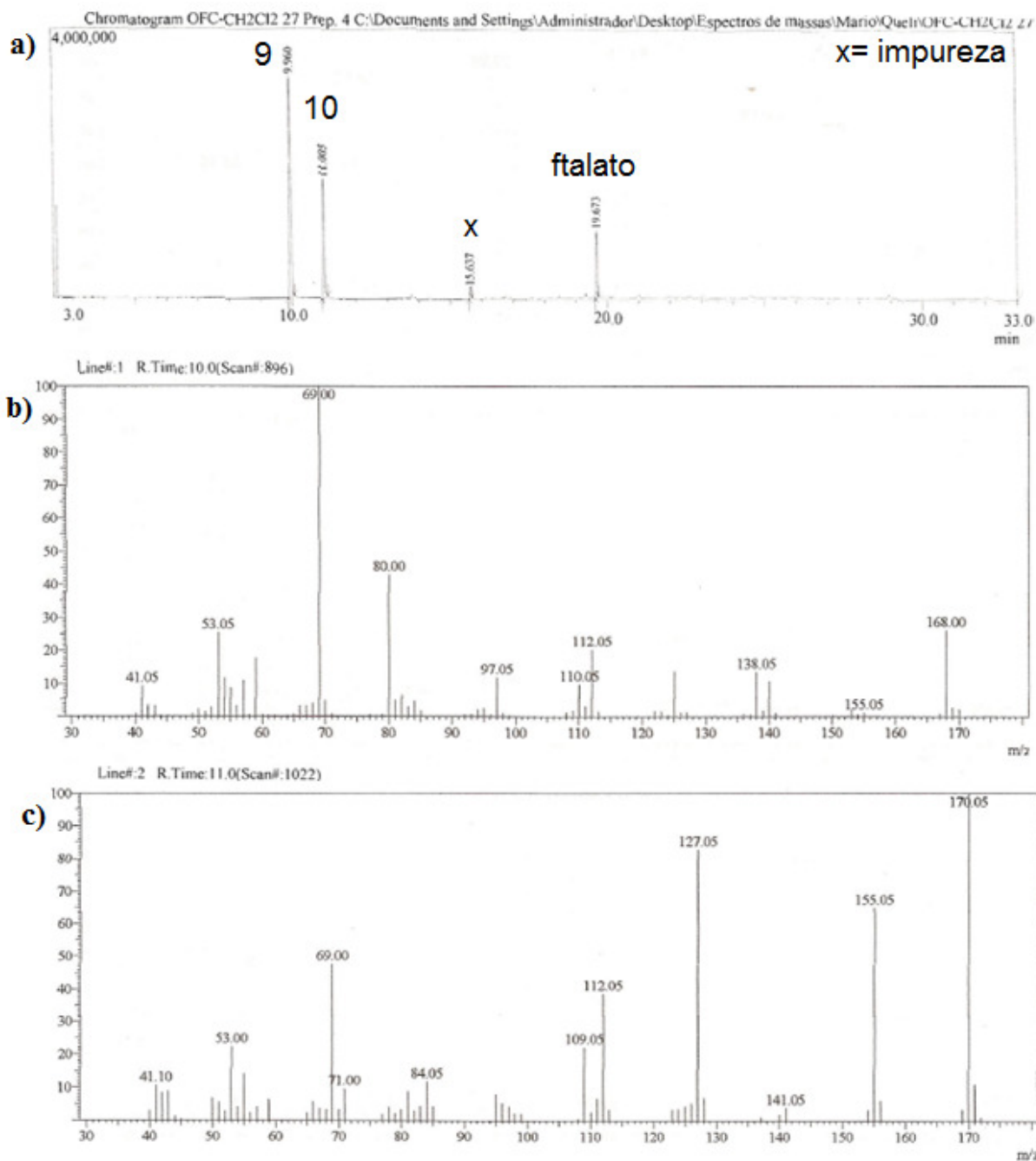


(b)

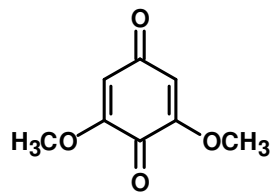
**Figura 35. a)** Cromatograma (CG) da substância **9**; **b)** Espectro de massas da substância **9** em comparação com a biblioteca do aparelho



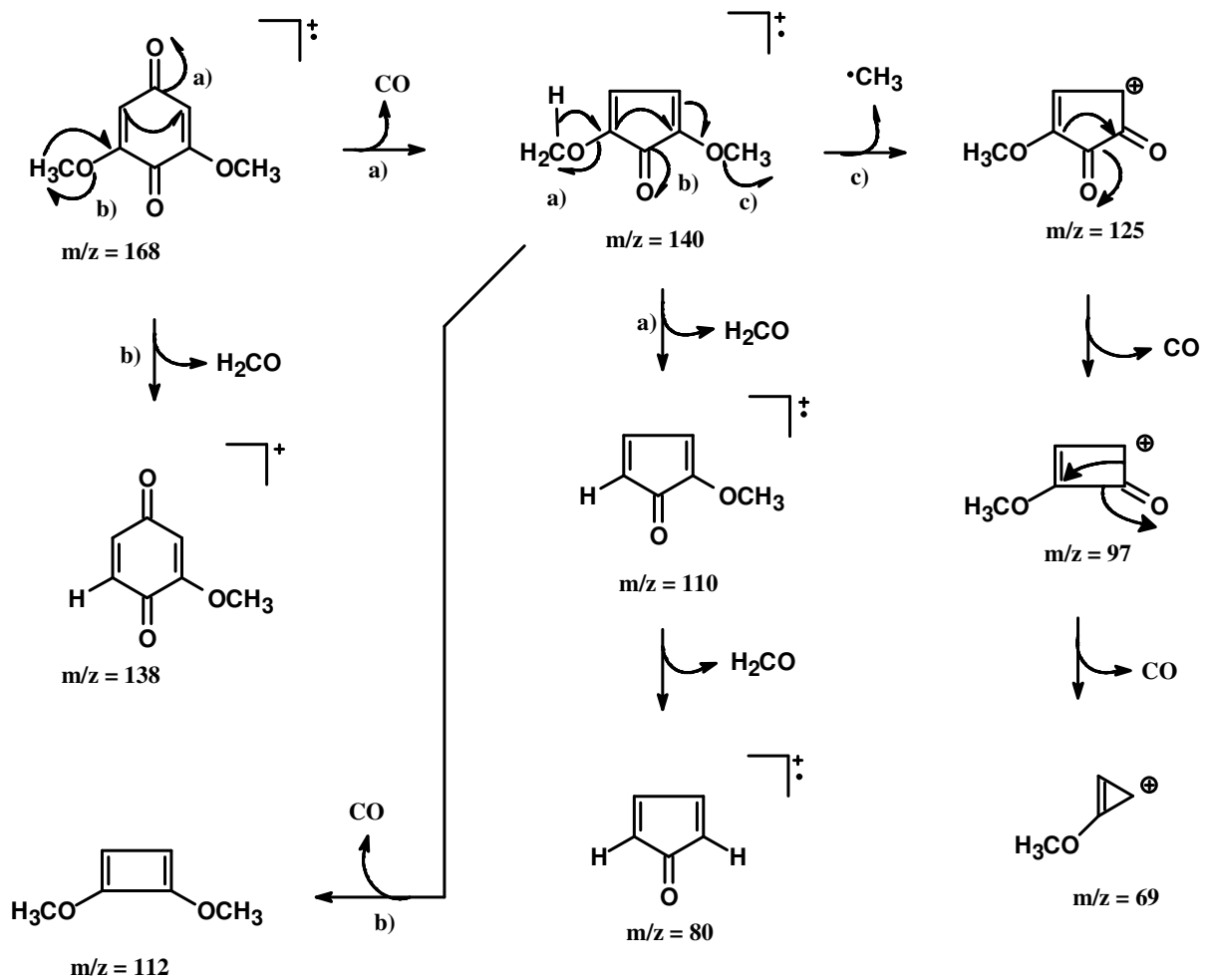
2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona (9) 2,6-dimetoxi-1,4-hidroxi-benzoquinona (10)



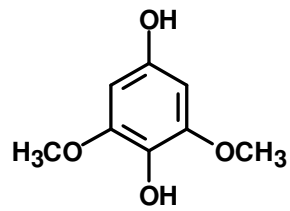
**Figura 36.** a) Cromatograma (CG) da mistura de **9** e **10**. **b** e **c**) espectros de massas das substâncias **9** e **10**, respectivamente



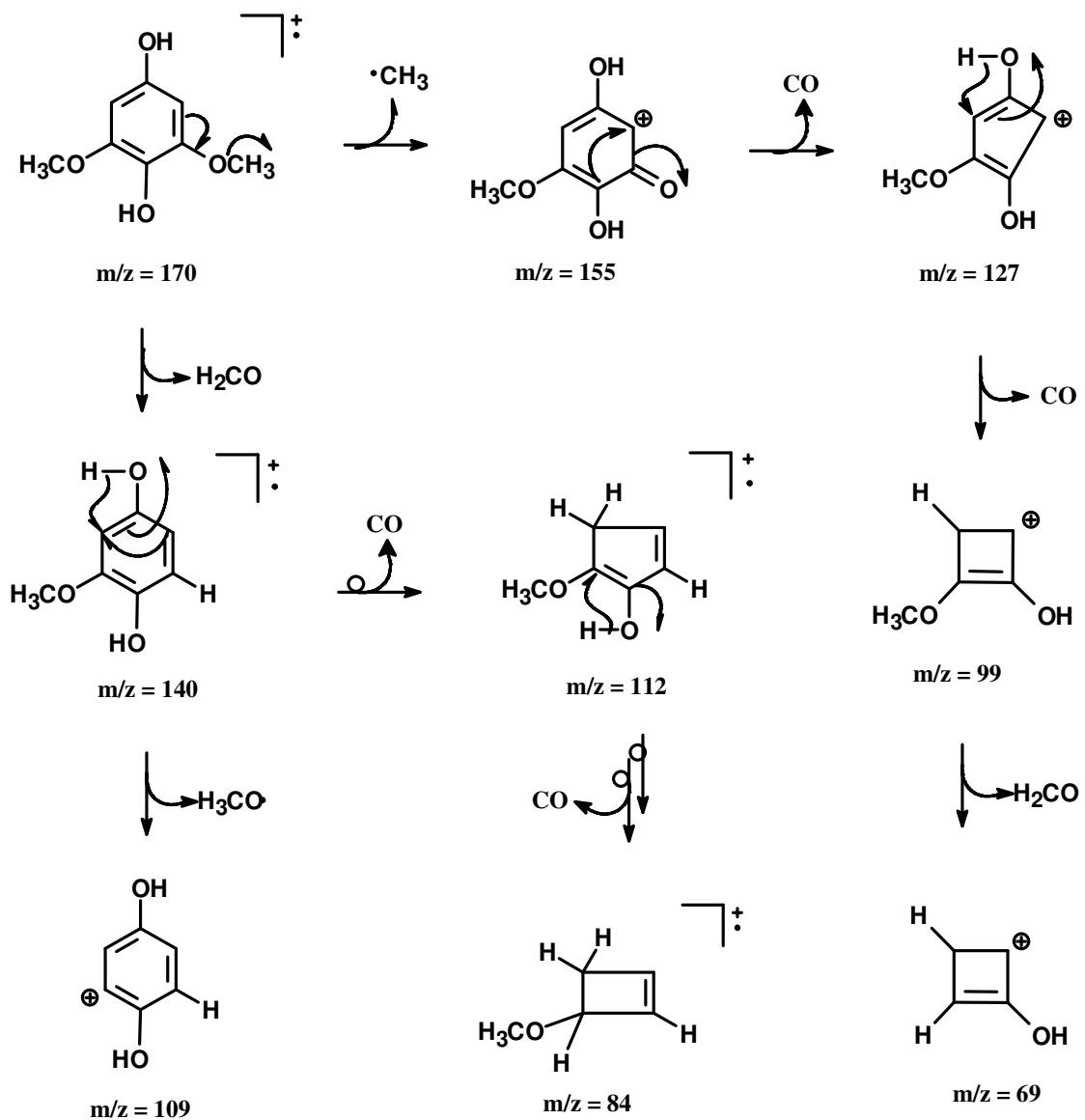
2,6-dimetoxi-benzoquinona (9)



**Esquema 3.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro de massas do componente com Tr 9,96 min



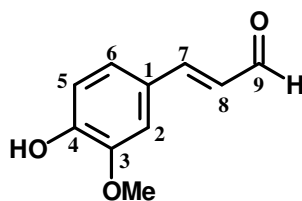
2,6-dimetoxi-hidroquinona (10)



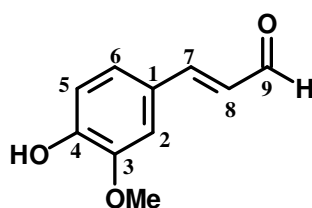
**Esquema 4.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro de massas do componente com Tr 11,00 min

### V.1.7. Determinação estrutural da substância 11

A identificação estrutural desta substância foi feita com base na análise dos espectros de IV, RMN e EM. O espectro IV (**Figura 37, p. 62**) apresenta absorções em  $3433\text{ cm}^{-1}$  de estiramento de O-H;  $1654\text{ cm}^{-1}$  para estiramento de C=O; na região de  $1033$  a  $1209\text{ cm}^{-1}$  estiramentos de C-O; duas bandas de absorção características de estiramento C=C uma em  $1616$  e outra em  $1454\text{ cm}^{-1}$ ; os estiramentos de C-H foram observados em  $2925$  e  $2856$  para  $\text{sp}^3$  e dobramento em  $835$  e  $792\text{ cm}^{-1}$  para  $\text{sp}^2$  fora do plano. As bandas de absorção de deformação axial de C-H  $\text{sp}^2$  não foram observadas, por estarem encobertas pela banda de O-H. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 38 e 39, p. 63**) apresenta um duplete em  $\delta_{\text{H}} 9,66$  ( $J=7,8$  Hz) de hidrogênio de aldeído acoplado com o hidrogênio representado pelo duplo duplete em  $\delta_{\text{H}} 6,60$  ( $J_1=15,8$  Hz,  $J_2=7,8$  Hz) de uma dupla *trans* que acopla com um hidrogênio representado por um duplete em  $7,44$  ppm ( $J=15,8$  Hz). Esses sinais foram atribuídos aos hidrogênios da enona do aldeído ferúlico. Os sinais  $\delta_{\text{H}} 6,98$  ( $d$ ,  $J=8,3$  Hz),  $7,09$  ( $d$ ,  $J=2,0$  Hz),  $7,14$  ( $dd$ ,  $J=2,0$ ;  $8,3$  Hz) correspondem aos hidrogênios H-5, H-2, H-6, respectivamente do anel aromático trissubstituído. O espectro de HSQC (**Figura 40, p.64**) apresentou os acoplamentos de H-8/C-8 ( $\delta_{\text{C}} 126,5$ ), H-5/C-5 ( $\delta_{\text{C}} 115,1$ ), H-2/C-2 ( $\delta_{\text{C}} 109,2$ ), H-6/C-6 ( $\delta_{\text{C}} 123,9$ ) e H-7/C-7 ( $\delta_{\text{C}} 153,0$ ), enquanto que o espectro de HMBC (**Figura 41, p. 65**) revelou os acoplamentos a longa distância de H-7/C-2, H-6/C-2, H-5/C-2, H-7/C-6; 8, H-2/C-6, H-5/C-8, H-9/C-8, H-6/C-4, H-6/C-7, H-2/C-4 ( $\delta_{\text{C}} 146,7$ ), H-7/C-9 ( $\delta_{\text{C}} 193,1$ ), H-OMe/C-3 ( $\delta_{\text{C}} 147,7$ ). Além desses dados, a presença do singleto em  $3,96$  (OCH<sub>3</sub>) e ( $\delta_{\text{C}} 55,9$ ) permitiu a proposta da estrutura do aldeído ferúlico cujos dados foram semelhantes aos da literatura (KIM & RALPH, 2003). Considerando que em Ochnaceae é freqüente a formação de dímeros, sempre é relevante a obtenção do espectro de massas das moléculas isoladas. A **Figura 42 (p. 66)** mostra o espectro de massas de **11** cuja a interpretação está representada no **Esquema 5.(p. 66)** Sabendo-se que o tratamento de aldeídos com diazometano conduz a formação de epóxido, além da metilação dos grupos fenólicos (CARVALHO *et al*, 2011), fez-se esta reação com **11** e obteve-se o produto **11a** cuja discussão encontra-se a seguir.



aldeído ferúlico (**11**)



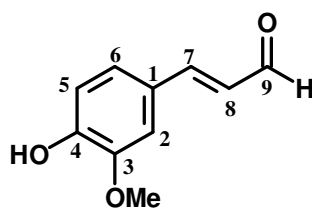
aldeído ferúlico (11)

**Tabela 6.** Dados de RMN-HSQC/HMBC de **11** comparados com dados da literatura para aldeído ferúlico (KIM & RALPH, 2003)

C	Substância 11 (CDCl <sub>3</sub> )			Aldeído ferúlico (Acetona-d <sub>6</sub> )	
	<sup>13</sup> C <sup>a,b</sup> δ <sub>C</sub>	<sup>1</sup> H δ <sub>H</sub> (mult. <i>J</i> )	<sup>a</sup> HSQC( <sup>1</sup> J <sub>HC</sub> ); <sup>b</sup> HMBC( <sup>n</sup> J <sub>HC</sub> ) H/C	δ <sub>C</sub>	<sup>1</sup> H δ <sub>H</sub> (mult. <i>J</i> )
<b>1</b>	-	-	-	127,5	-
<b>2</b>	109,2	7,09 ( <i>d</i> ; 2,0Hz)	H-2/C-2; C-6; C-4	111,7	7,38 ( <i>d</i> ; 2,0Hz)
<b>3</b>	147,7	-	-	150,8	-
<b>4</b>	146,7	-	-	148,8	-
<b>5</b>	115,1	6,98 ( <i>d</i> ; 8,3Hz)	H-5/C-5; C-2; C-8	116,2	6,92 ( <i>d</i> ; 8,2Hz)
<b>6</b>	123,9	7,14 ( <i>dd</i> ; 2,0; 8,3Hz)	H-6/C-6; C-2; C-4; C-7	124,7	7,21 ( <i>dd</i> ; 8,2; 2,0Hz)
<b>7</b>	153,0	7,44 ( <i>d</i> ; 15,8Hz)	H-7/C-7; C-2; C-6; C-8; C-9	153,9	7,57 ( <i>d</i> ; 15,8Hz)
<b>8</b>	126,5	6,60 ( <i>dd</i> ; 15,8; 7,8Hz)	H-8/C-8	127,0	6,67 ( <i>dd</i> ; 15,8; 7,8Hz)
<b>9</b>	193,1	9,66 ( <i>d</i> , 7,8Hz)	H-9/C-8	193,8	9,64 ( <i>d</i> ; 7,8Hz)
<b>OMe</b>	55,9	3,96( <i>s</i> )	H-Me/C-Me; C-3	56,4	3,93 ( <i>s</i> )
<b>OH</b>		7,88 ( <i>s</i> )	-	-	8,23 ( <i>s</i> )

<sup>a,b</sup>. Valores definidos com base em sinais de HSQC e HMBC





aldeído ferúlico (11)

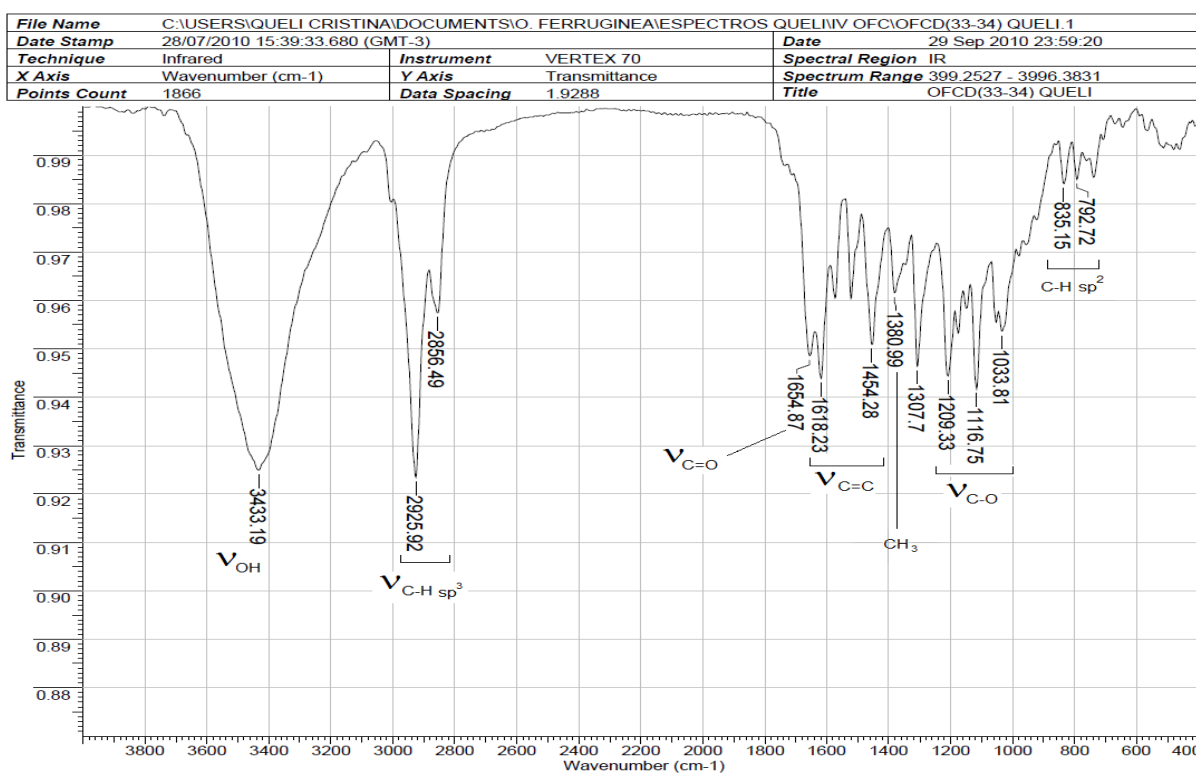


Figura 37. Espectro no IV da substância 11 (KBr)

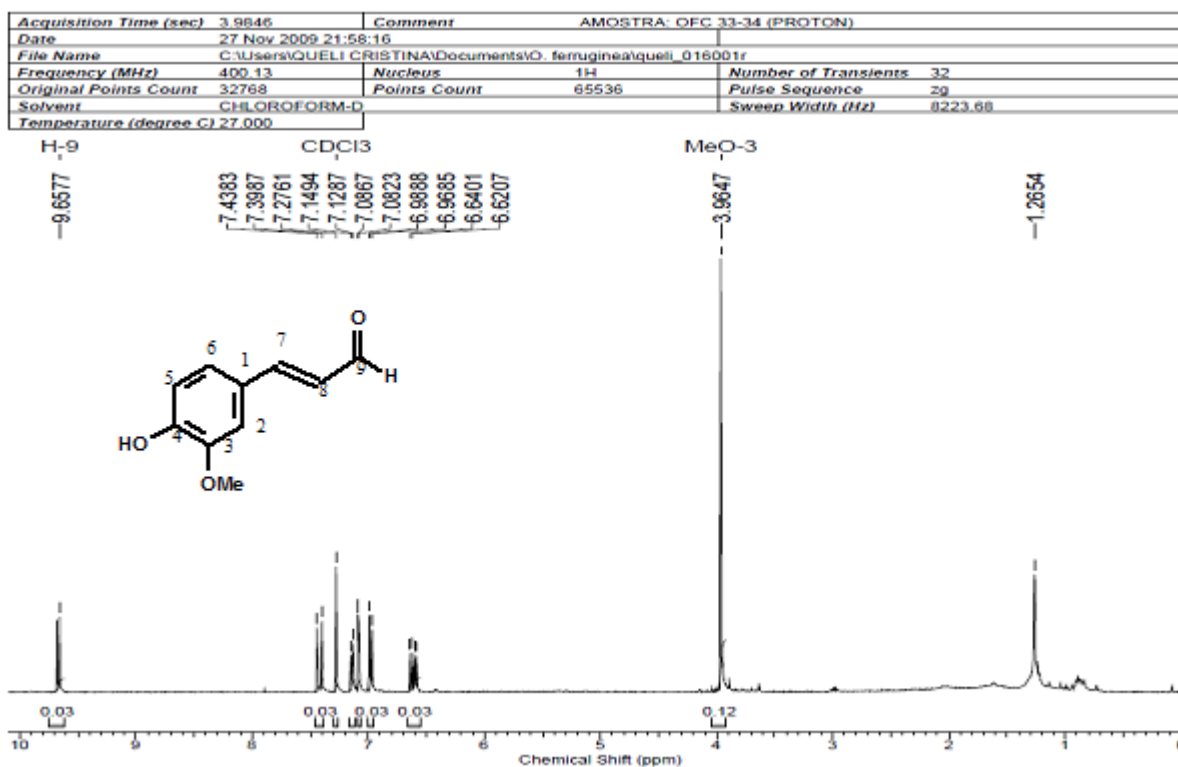


Figura 38. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância **11**

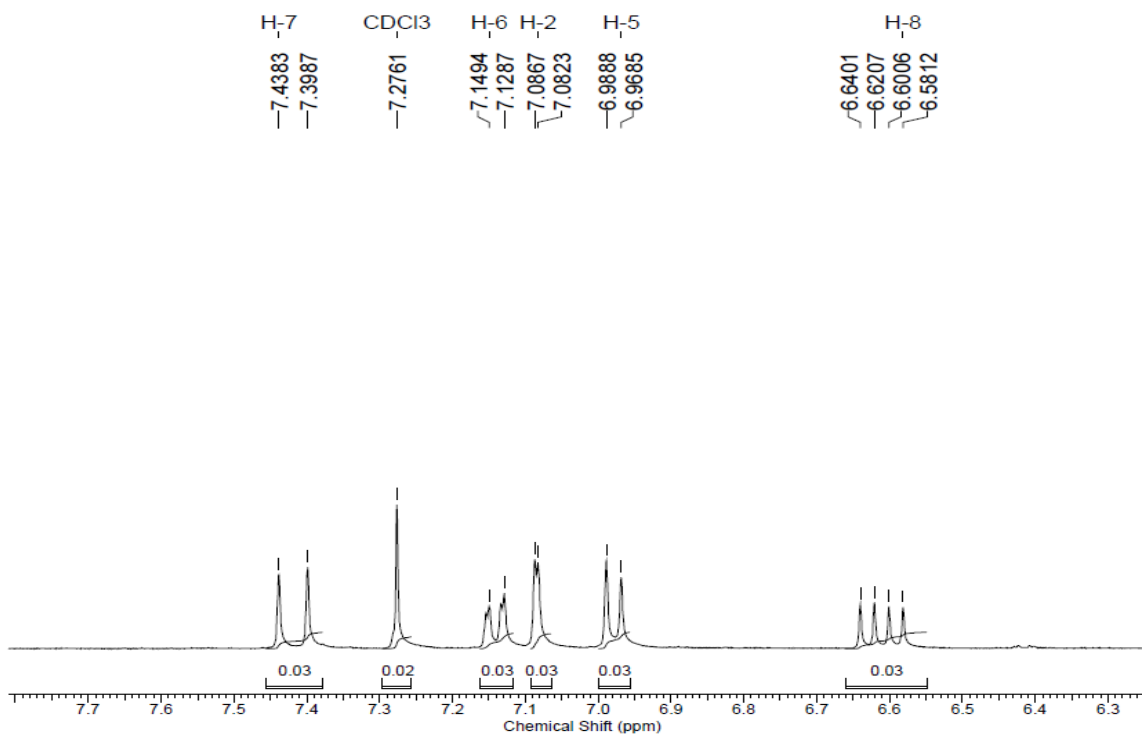
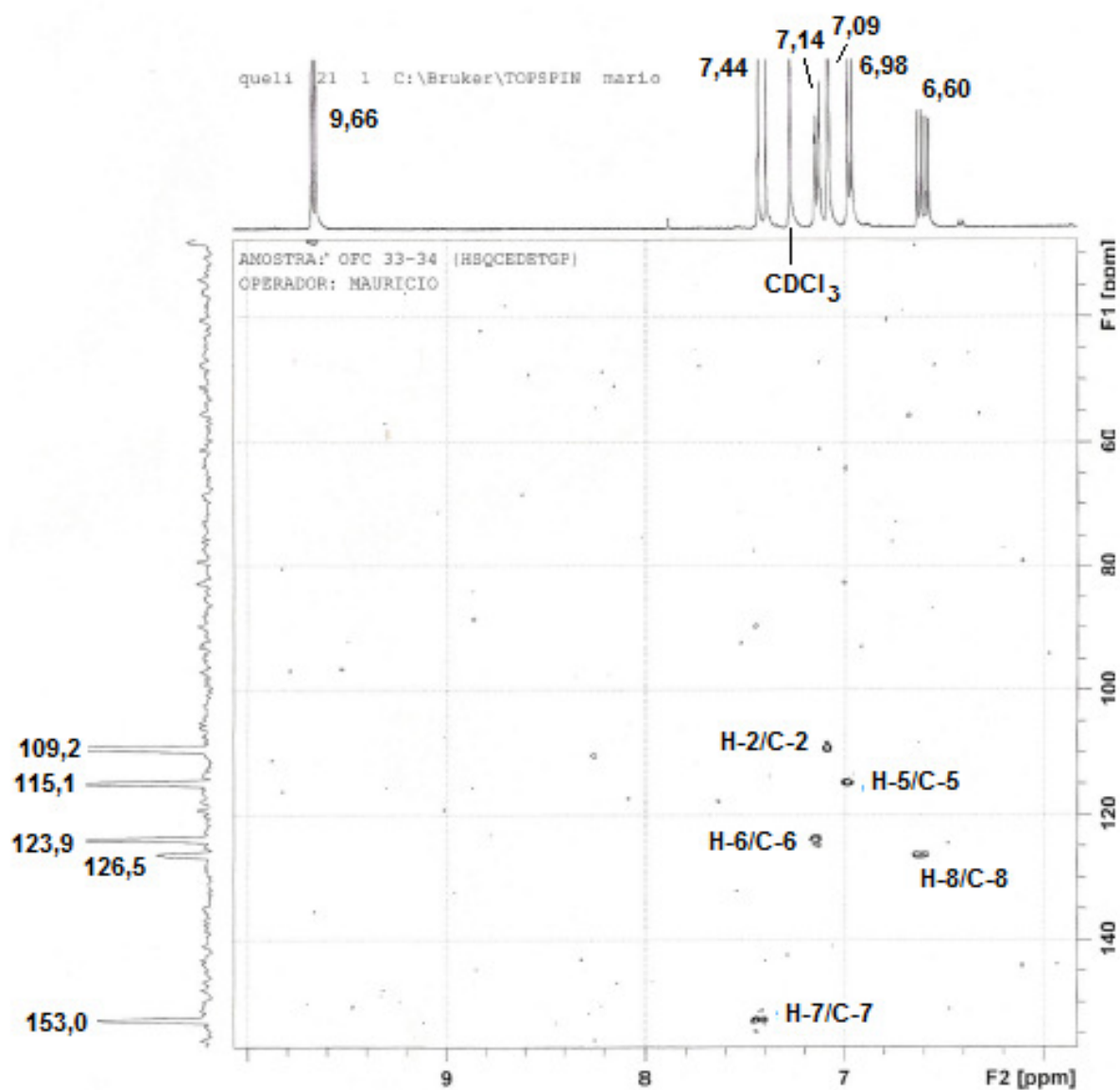
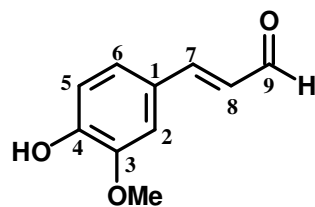


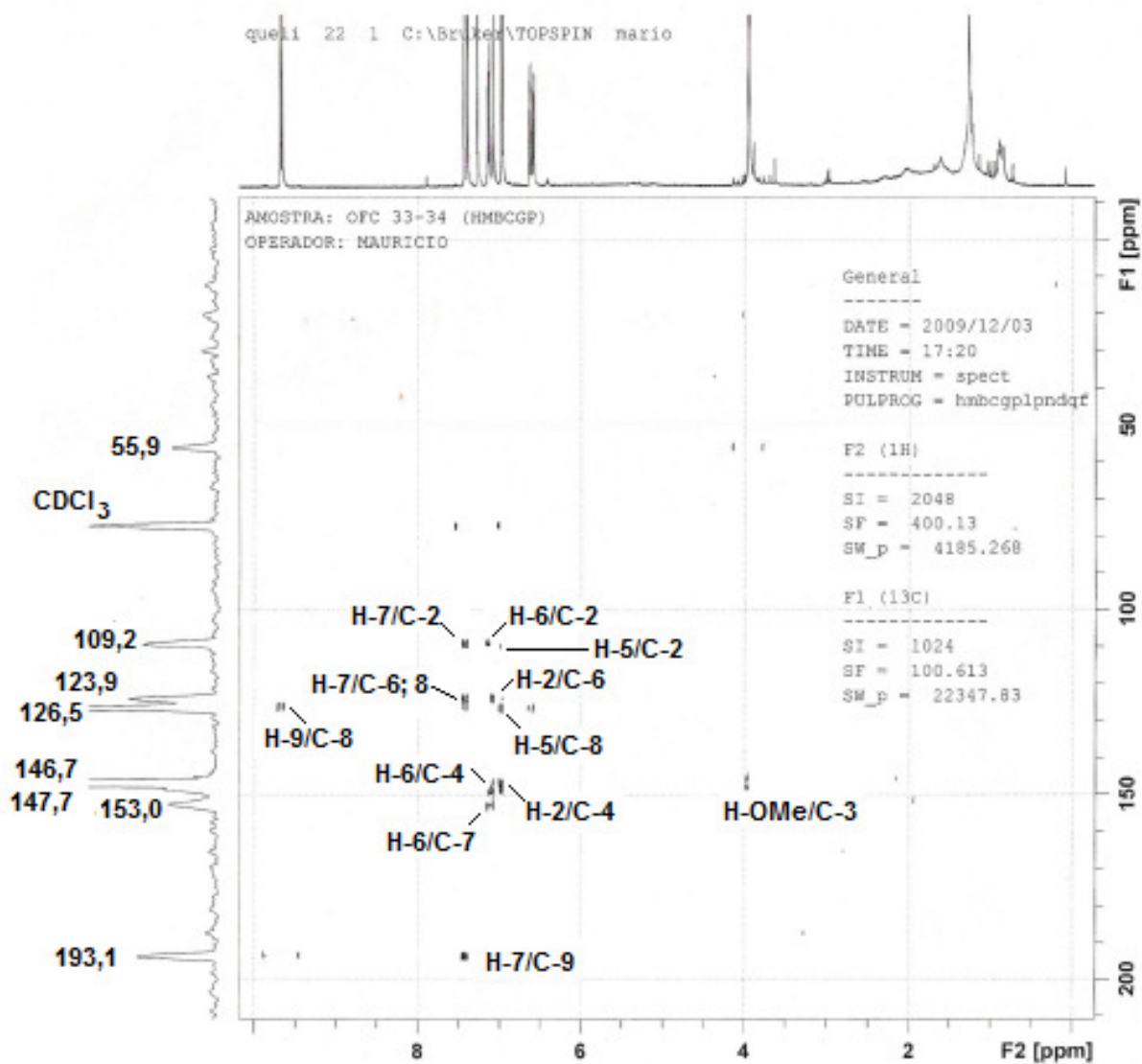
Figura 39. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância **11**



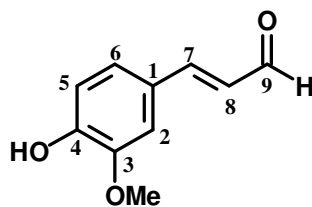
**Figura 40.** Espectro expandido de RMN-HSQC (400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância **11**



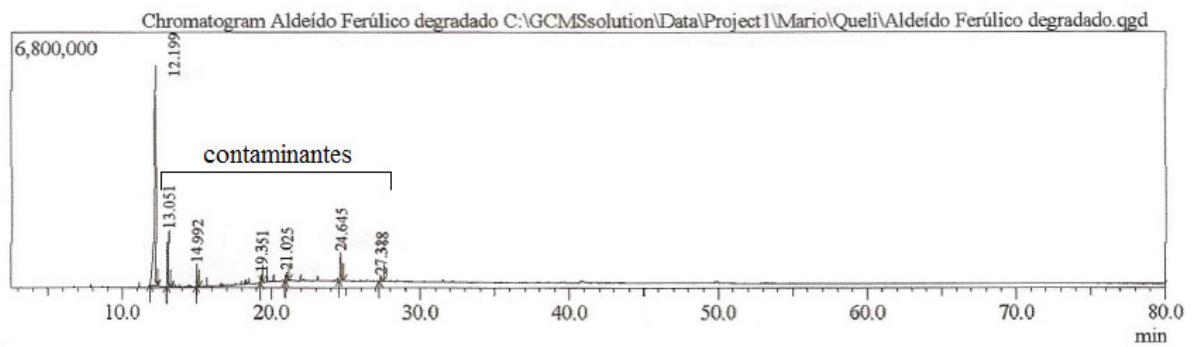
**aldeído ferúlico (11)**



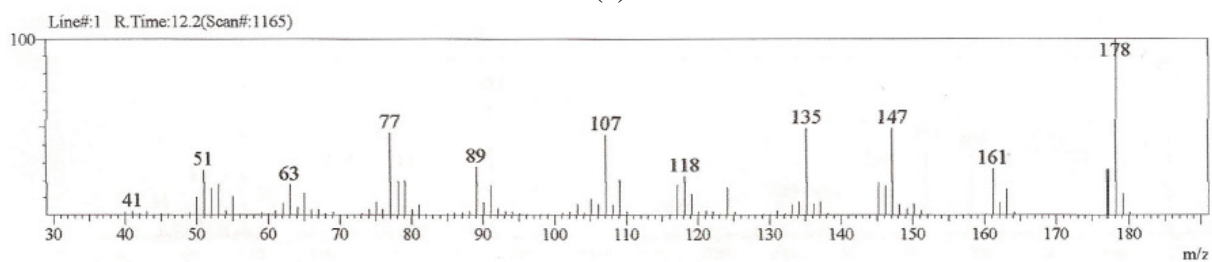
**Figura 41.** Espectro de RMN-HMBC (400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância **11**



**aldeído ferúlico (11)**

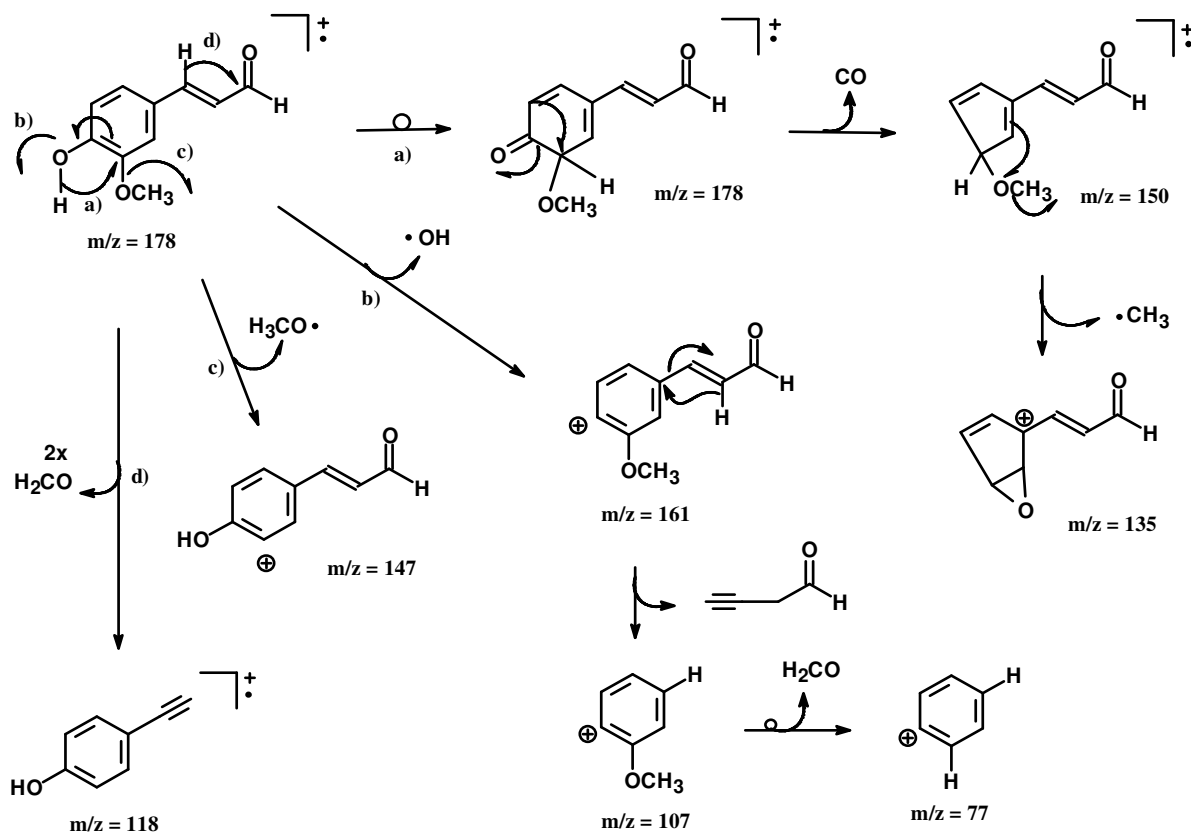


(a)



(b)

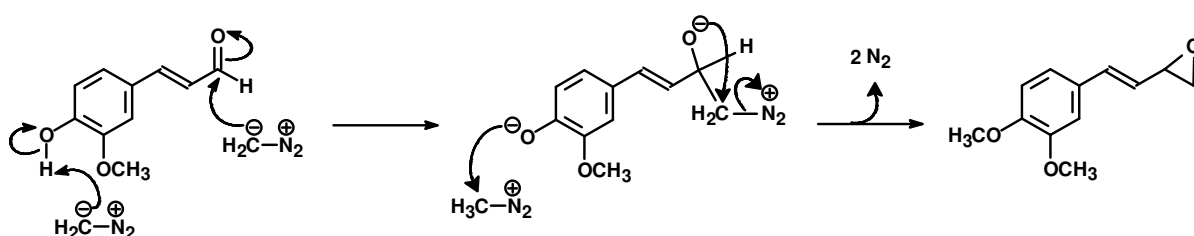
**Figura 42.** a) Cromatograma (CG) da substância **11**; b) espectro de massas da substância **11**



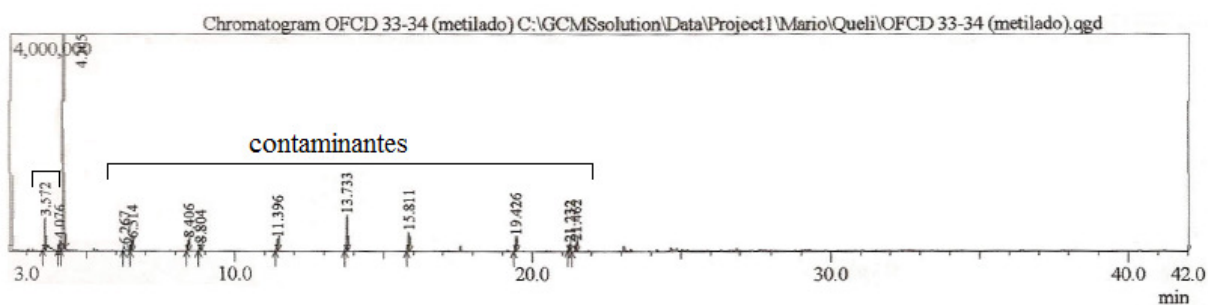
**Esquema 5.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro do componente com Tr = 12,20 min

### V.1.8. Determinação estrutural do derivado 11a

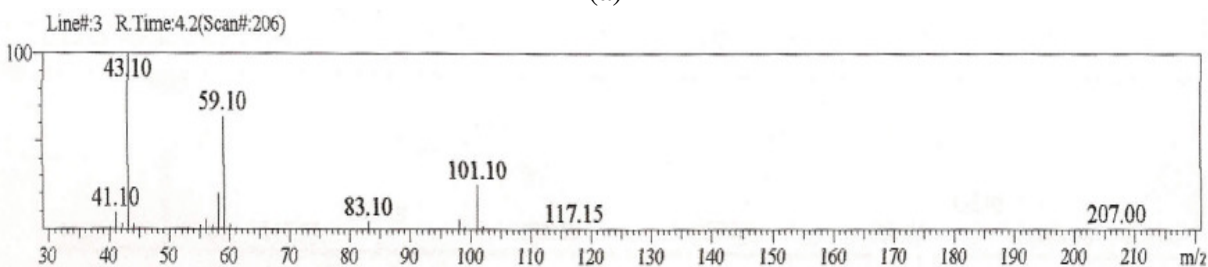
A substância **11** foi submetida a uma derivatização com de diazometano e, além da metilação do fenol houve o ataque nucleofílico do metileno na carbonila como era esperado (CARVALHO *et al*, 2011) . A identificação do produto da reação foi realizada por análise em CG-EM (Figura 44, p. 67), que mostrou um componente majoritário com tempo de retenção de 4,20 min e massas igual a  $m/z = 207$  (M+1). A proposta de fragmentação sugerida (Esquema 6, p. 68) justifica os fragmentos observados no espectro de massa para a presença de uma metila ligada no oxigênio do C-4 e a formação do epóxido pelo ataque nucleofílico do  $\text{CH}_2$  a carbonila (Figura 43, p. 67).



**Figura 43.** Proposta do mecanismo nucleofílico da reação do diazometano para a formação da substância **11a**

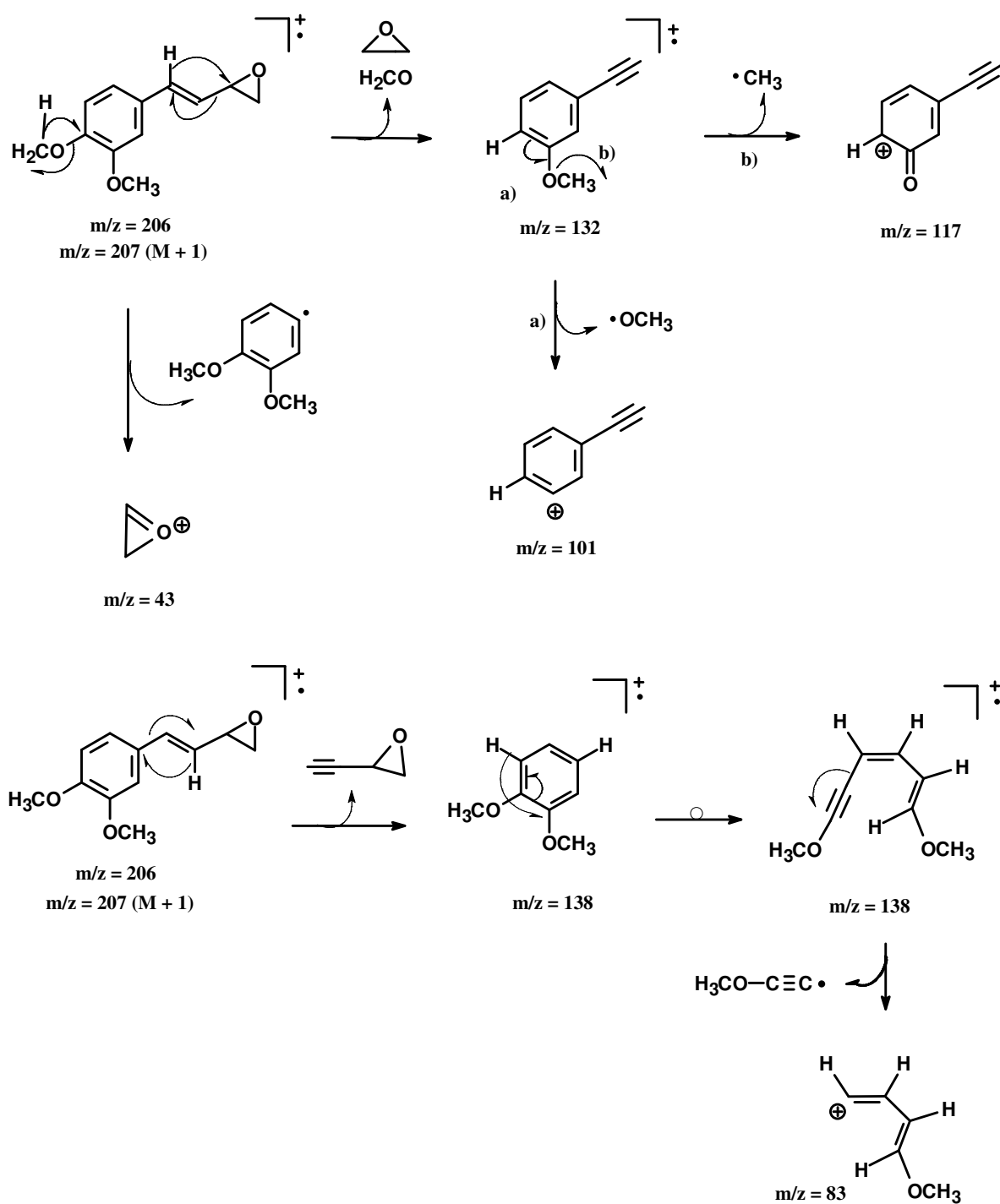


(a)



(b)

**Figura 44.** a) Cromatograma (CG) da substância **11a**; b) espectro de massas da substância **11a**

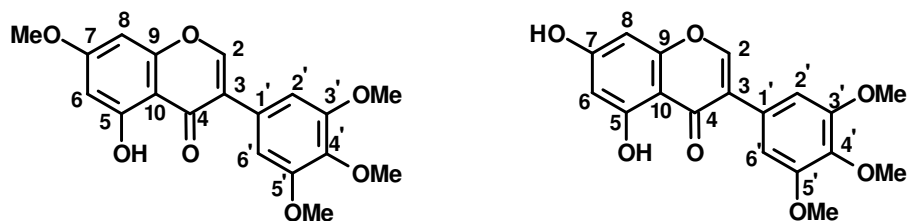


**Esquema 6.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro do componente com Tr=4,20 min (substância **11a**)

### V.1.9. Identificação das substâncias 12 e 13

Na busca de obter maiores quantidades de aldeído ferúlico, analisou-se por CG-EM o sobrenadante, resultante da purificação da fração OFCD-33-34 por precipitação. Nesta análise verificou-se que havia na fração mistura de duas substâncias com tempo de retenção e massa (Tr = 27,149;  $m/z$  = 358; **12** e Tr = 29,619;  $m/z$  = 344; **13**) (**Figura 48, p. 73**) incompatíveis para o aldeído ferúlico. Este material foi submetido a experimentos de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HSQC, e mostraram sinais compatíveis com os de isoflavona. No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 45, p. 71**) foi observado em simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,91 característico de H-2 de anel heterocíclico de isoflavona. Em  $\delta_{\text{H}}$  6,78 encontra-se um simpleto com valor de integração da área proporcional a dois hidrogênios atribuídos a H-2 e 6 do anel B. Foi observada a presença de dois dupletos, um em  $\delta_{\text{H}}$  6,42 e outro em 6,44 ambos com  $J=2,2$  Hz, os quais foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A. Dois simpletos intensos observados em  $\delta_{\text{H}}$  3,96 (6H) e 3,90 (3H), são característicos de metoxilas e foram atribuídos às metoxilas equivalentes ligadas ao C-3' e 5' e a uma metoxila ligada ao C-4', respectivamente. O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  12,87 confirma a presença de hidroxila quelada na estrutura. No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Figura 46, p. 71**) foi observados sinais em  $\delta_{\text{C}}$  56 e 55 ppm, sendo o sinal de maior  $\delta_{\text{C}}$  correspondente aos carbonos das metoxilas ligadas em C-3' e 5', e o sinal de menor  $\delta_{\text{C}}$  atribuído ao carbono da metoxila ligada a C-4'. Os sinais correspondentes aos carbonos do anel B foram observados em  $\delta_{\text{C}}$  106,1 (C-2',6'); 124,1 (C-1'); 135,4 (C-4') e 147,1 (C-3',5'). Em  $\delta_{\text{C}}$  92,5 (C-6); 98,3 (C-8); 121,7 (C-3); 152,9 (C-2); 157,9 (C-9); 162,8 (C-5) e 165,6 (C-7) foram observados os sinais dos carbonos presente no anel A. O espectro de HSQC (**Figura 47, p. 72**) mostrou os acoplamentos  $^1J_{\text{HC}}$  H-2/C-2 em  $\delta_{\text{C}}$  152,9 ppm; H-6,8/C-8 em  $\delta_{\text{C}}$  98,3 e H-6,8/C-6 em  $\delta_{\text{C}}$  92,5 ppm; H-2',6'/C-2',6' em  $\delta_{\text{C}}$  106,1 ppm e em  $\delta_{\text{C}}$  56 ppm detectou o sinal de ambas as metoxilas. Nos espectros de massas de ambas as substâncias da mistura (CG-EM) verificou-se a presença de um fragmento com valor  $m/z$  = 167 que justificou o padrão de substituição no anel B; as propostas de fragmentação de cada substância encontram-se nos **Esquema 7 (p. 74)** e **8 (p. 75)**. Todos estes dados analisados em conjunto permitiram propor as estruturas de 5-hidroxi-7,3',4',5'-tetrametoxi-isoflavona (**12**) e 7,5-diidroxi-3',4',5'-trimetoxi-isoflavona (**13**) em mistura. A 7,5-diidroxi-3',4',5'-trimetoxi-isoflavona também é conhecida por panchovillina e já foi isolada da espécie *Olneya tesota* Gray, Fabaceae (DOMINGUEZ *et al.*, 1989). Até o momento, nenhum registro referente a substância **12** foi encontrado em pesquisa realizada no *Chemical Abstract*.





5-hidroxi-7,3',4',5'-tetrametoxi-isoflavona (12) 7,5-diidroxi-3',4',5'-trimetoxi-isoflavona (13)

**Tabela 7.** Dados de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HSQC de 13 comparados com dados da literatura para panchovillina (5,7-diidroxi-3',4',5'-trimetoxi-isoflavona; NISHIYAMA *et al*, 1993)

C	Substância 13 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)			Panchovilina ( $\text{CDCl}_3$ , 90 MHz)
	$^{13}\text{C}$ $\delta_{\text{C}}$	$^1\text{H}$ $\delta_{\text{H}}$ (mult. <i>J</i> )	HSQC ( $^1J_{\text{HC}}$ ) H/C	$^1\text{H}$ $\delta_{\text{H}}$ (mult. <i>J</i> )
2	152,9	7,91( <i>s</i> )	H-2/C-2	8,38( <i>s</i> )
3	121,7	-		-
4	-	-		-
5	162,,8	-		-
6	98,3	6,42( <i>d</i> ; 2,21 Hz)	H-6,8/C-6	6,20( <i>d</i> ; 2,0 Hz)
7	165,6	-		-
8	92,5	6,44( <i>d</i> ; 2,21 Hz)	H-6,8/C-8	6,36( <i>d</i> ; 2,0 Hz)
9	157,9	-		-
10	-	-		-
1'	124,1	-		-
2'	106,1	6,78( <i>s</i> )	H-2',6'/C-2',6'	6,83( <i>s</i> )
3'	147,1	-		-
4'	135,4	-		-
5'	147,1	-		-
6'	106,1	6,78( <i>s</i> )	H-2',6'/C-2',6'	6,83( <i>s</i> )
3',5'-MeO	56,5	3,96( <i>s</i> )		3,76( <i>s</i> )
4'-MeO	55,8	3,90( <i>s</i> )		3,66( <i>s</i> )
5-OH	-	12,87( <i>s</i> )		12,84( <i>s</i> )

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: OFCD-33-34 (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: CDCL3	
Date	08 Dec 2010 15:39:28	File Name	E:\9\pdata\1\ 009001r	
Frequency (MHz)	500.13	Nucleus	1H	Number of Transients
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	10330.58	
Temperature (degree C)	21.160			

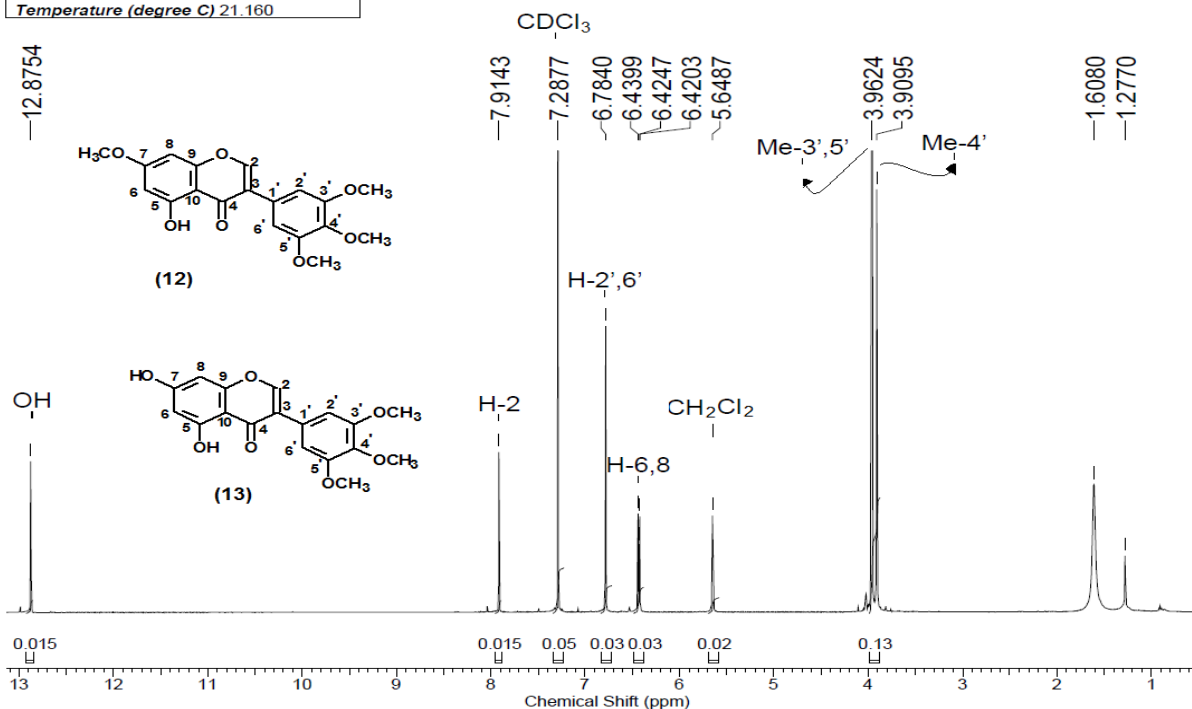


Figura 45. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das substâncias **12** e **13**

Acquisition Time (sec)	1.3631	Comment	AMOSTRA: OFCD-33-34(C13 CPD) 400MHZ SOLVENTE: CDCL3	
Date	07 Dec 2010 16:53:14	File Name	E:\121\pdata\1\ 121001r	
Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	13C	Number of Transients
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	24038.46	
Temperature (degree C)	27.000			

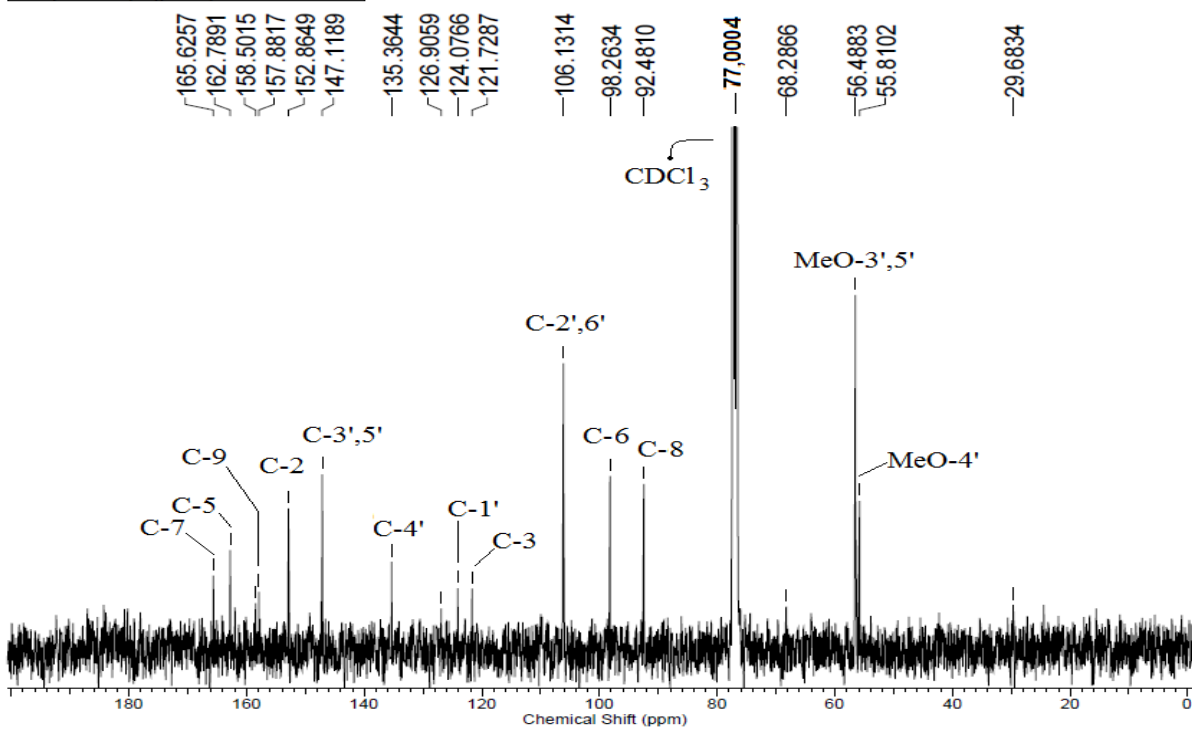
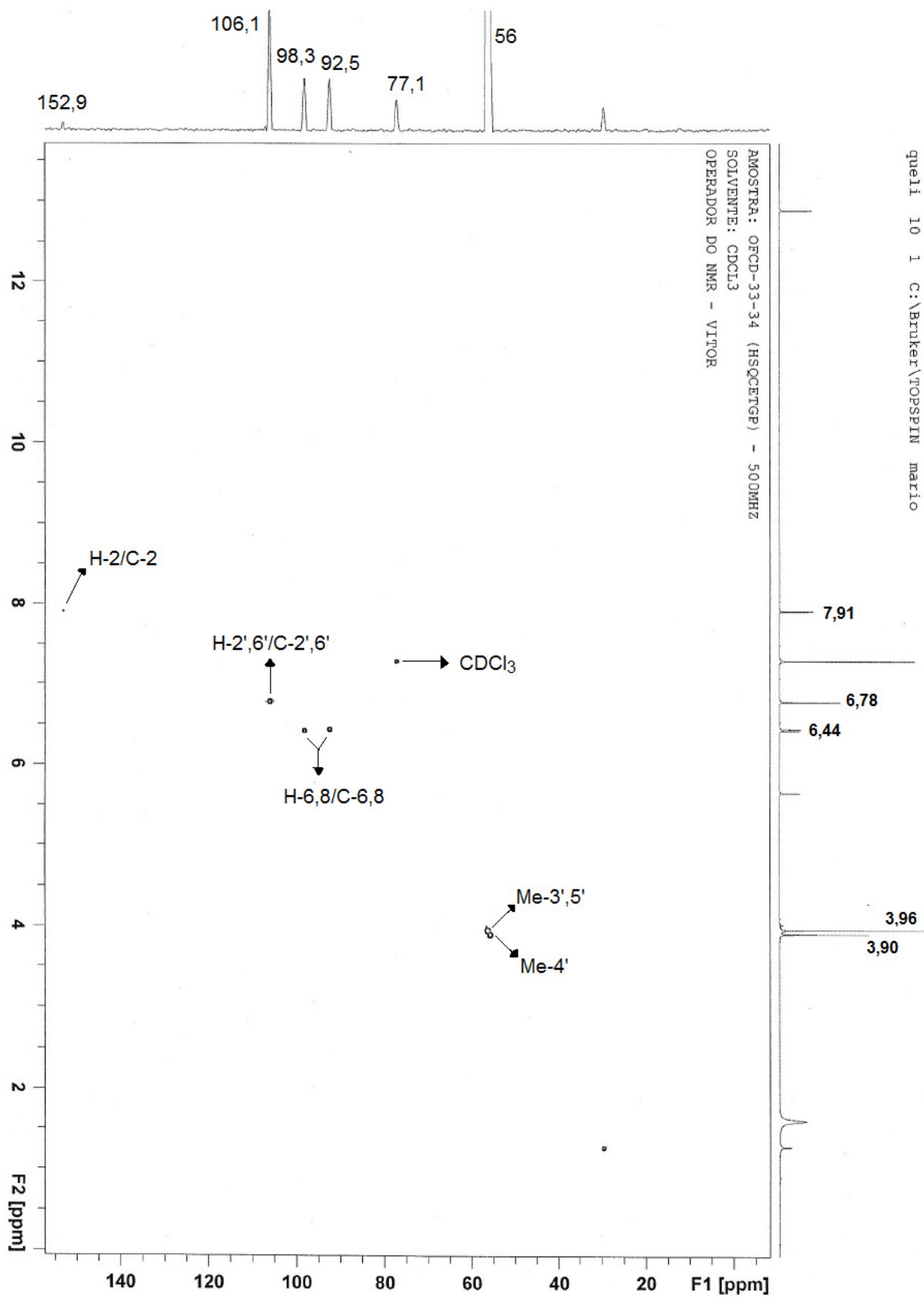
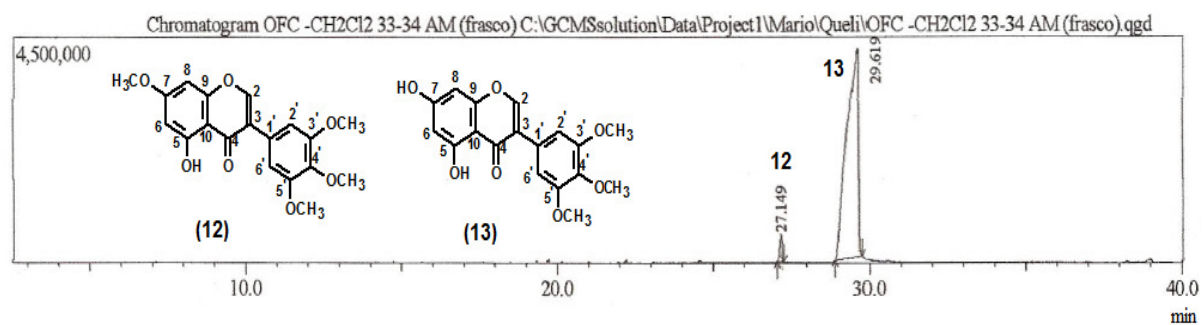


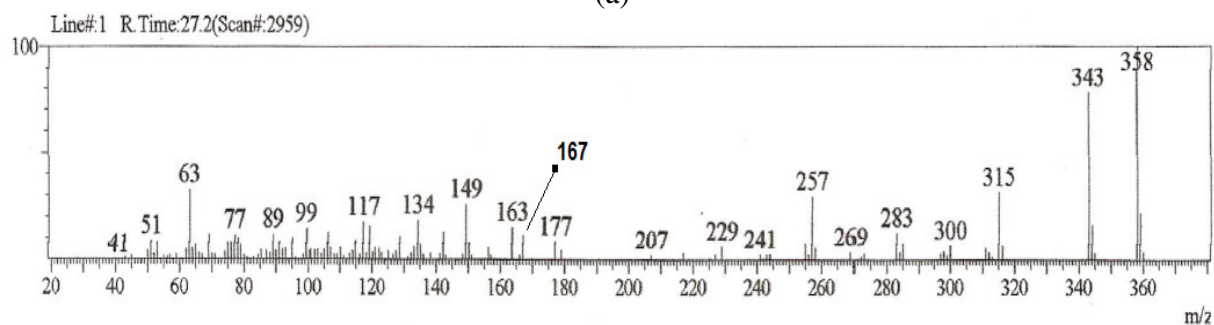
Figura 46. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das substâncias **12** e **13**



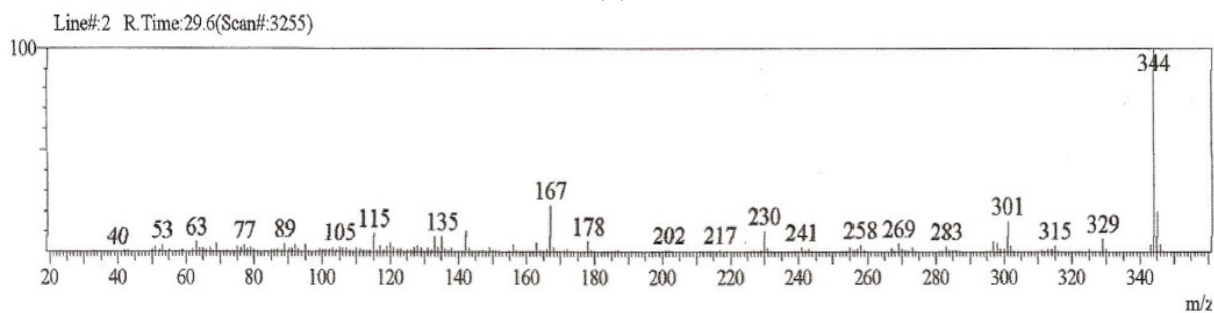
**Figura 47.** Espectro de RMN-HSQC (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da mistura das substâncias **12** e **13**



(a)

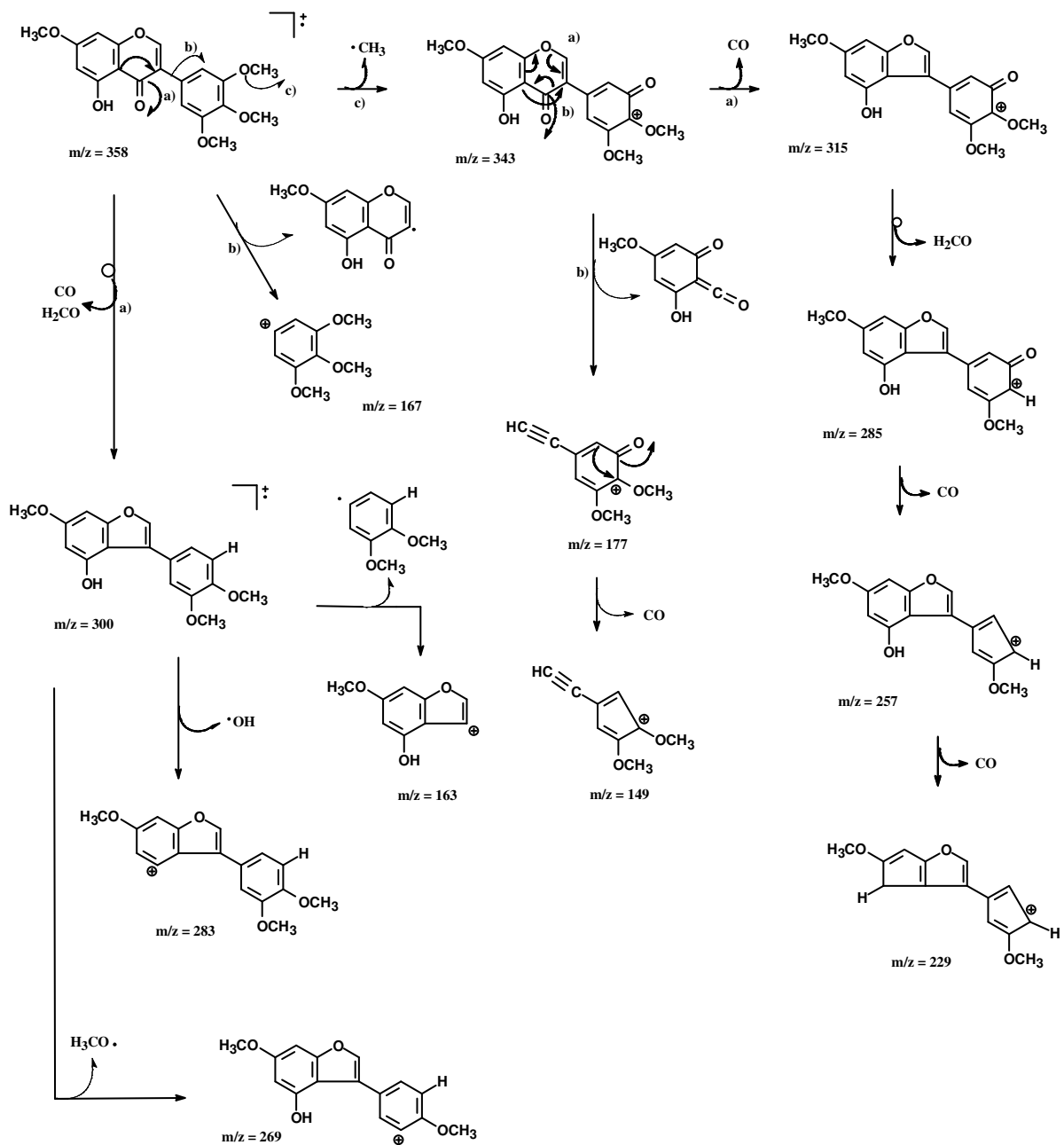


(b)

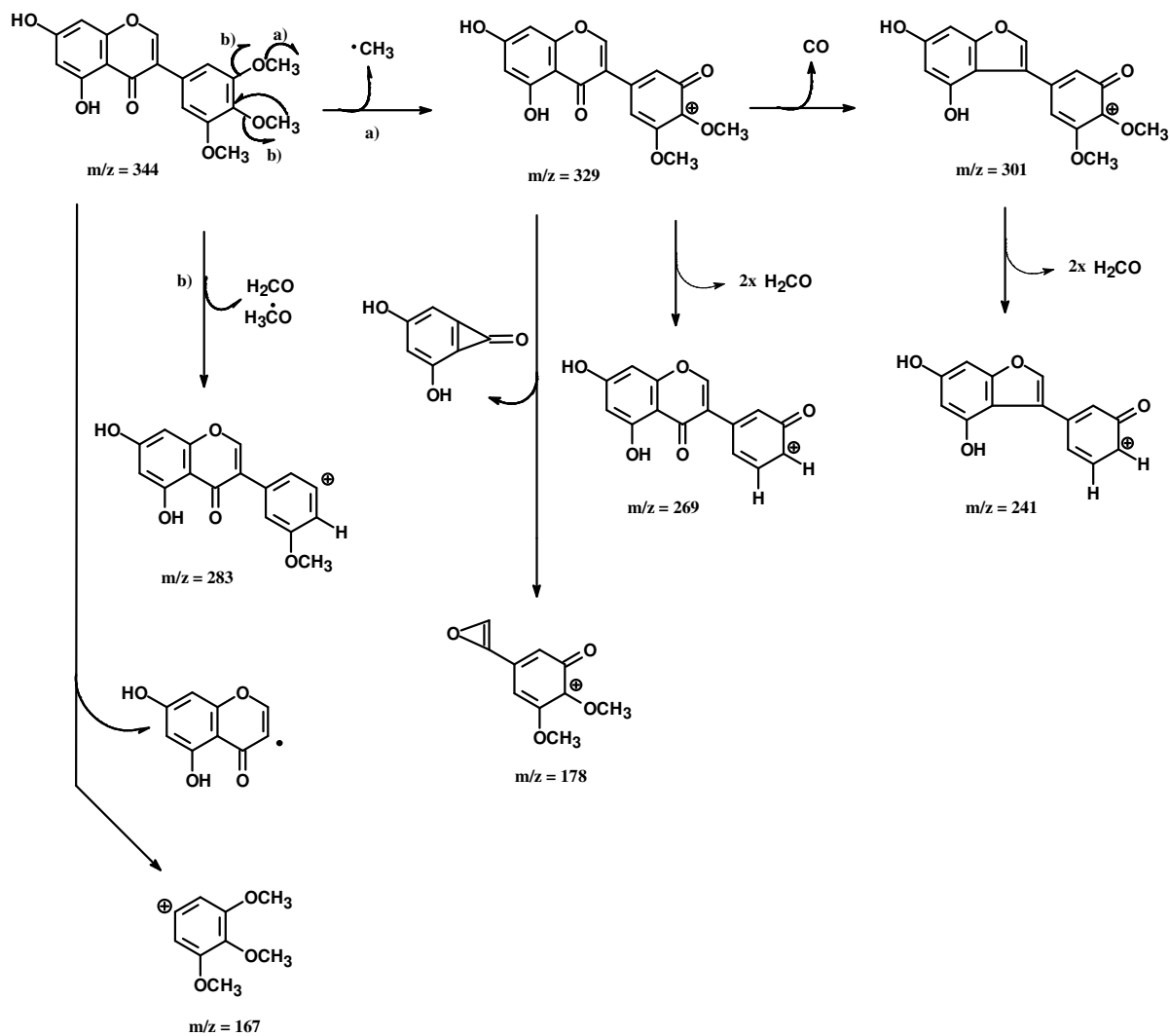


(c)

**Figura 48.** a) Cromatograma (CG) da fração contendo **12 e 13**; b e c) espectros de massas dos componentes **12 e 13**, respectivamente



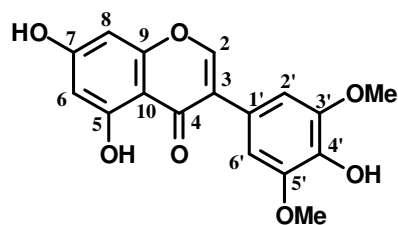
**Esquema 7.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro do componente com Tr 27,15 min (substância **12**)



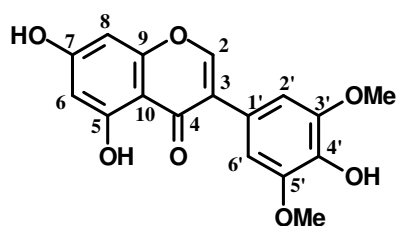
**Esquema 8.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro do componente com Tr 29,62 min (substância **13**)

### V.1.10. Determinação estrutural da substância 14

A análise dos espectros de IV (Figura 49, p. 78), RMN  $^1\text{H}$  (Figura 50 e 51, p. 79), HMQC (Figura 52, p. 80) e HMBC (Figura 53, p. 81) permitiu propor a estrutura de uma isoflavona para 14. O espectro no IV mostrou absorções características de grupos funcionais presentes em isoflavonas como: em  $3465\text{ cm}^{-1}$  estiramento de O-H; estiramentos para o esqueleto aromático em  $3013$  e  $3028\text{ cm}^{-1}$  (C-H  $\text{sp}^2$ , no plano), em  $1614$  e  $1460\text{ cm}^{-1}$  (C=C), e dobramento em  $835$  e  $754\text{ cm}^{-1}$  (C-H  $\text{sp}^2$ , fora do plano); além dos estiramentos de C=O, de frequência reduzida, em  $1649\text{ cm}^{-1}$  e C-O em  $1118$  e  $1209\text{ cm}^{-1}$ . No espectro de RMN  $^1\text{H}$ , em  $\delta_{\text{H}} 3,96$  (s, 6H) encontra-se o sinal característico de duas metoxilas equivalentes compatíveis para as metoxilas ligadas aos carbonos 3' e 5'. Os simpletos largos em  $\delta_{\text{H}} 6,40$  e  $6,34$  são característicos dos H-6 e H-8 do anel A em flavonóide. O sinal atribuído aos hidrogênios H-2' e 6' é observado em  $\delta_{\text{H}} 6,77$  (s). O sinal em  $\delta_{\text{H}} 7,90$  corresponde ao H-2 característico de isoflavona. O sinal em  $\delta_{\text{H}} 12,92$  é característico de hidrogênio de hidroxila fenólica quelada com a carbonila. O espectro de HSQC (Figura 52, p. 80) permitiu detectar o deslocamento dos carbonos das metoxilas em  $\delta_{\text{CH}} 56,2$  ppm, dos carbonos C-6,8 e C-2',6' em  $\delta_{\text{CH}} 98,0$  e  $105,5$  ppm, respectivamente. A pequena quantidade da amostra e o pequeno número de scans acumulados no experimento HMBC (Figura 53, p. 81) não permitiram detectar todos os sinais de carbono. Entretanto foi possível observar sinais de acoplamento dos H-2',6' com C-1' ( $123,5$ ) e o sinal de acoplamento ( $^3J_{\text{HC}}$ ) dos hidrogênios da OMe com o C-3'/5'. A análise desses dados e comparação com valores da literatura conduziram à determinação da estrutura de 14 como 5,7,4'-trihidroxi-3',5'-dimetoxi-isoflavona, conhecida como piscigenina isolada de casca das raízes de *Piscidia erythrina* (TAHARA *et al*, 1991).



7,5,4'-trihidroxi-3',5'-dimetoxi-isoflavona (14)



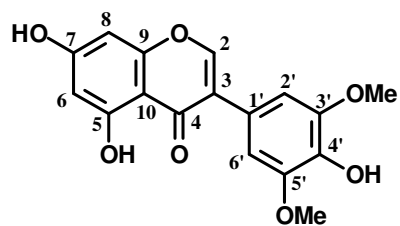
7,5,4'-trihidroxi-3',5'-dimetoxi-isoflavona (14)

**Tabela 8.** Dados de RMN-HSQC/HMBC de **14** comparados com dados da literatura para (5,7,4'-trihidroxi-3',5'-dimetoxi-isoflavona) (TAHARA *et al.*, 1991)

C	Substância 14 (CDCl <sub>3</sub> )			Piscigenina (Acetona-d <sub>6</sub> )
	<sup>a,b</sup> δ <sub>C</sub>	<sup>1</sup> H δ <sub>H</sub> (mult.; J)	<sup>a</sup> HSQC ( <sup>1</sup> J <sub>HC</sub> ); <sup>b</sup> HMBC ( <sup>n</sup> J <sub>HC</sub> ) H/C	<sup>1</sup> H δ <sub>H</sub> (mult. J)
2		7,93( <i>s</i> )	-	8,25( <i>s</i> )
3		-	-	-
4		-	-	-
5		-	-	-
6	98,0	6,34( <i>d</i> ; 2,0 Hz)	H6/C-6-	6,30( <i>t-like</i> , 2,0Hz)
7		-	-	-
8		6,40( <i>d</i> , 2,0Hz)	-	6,43( <i>t-like</i> , 2,0Hz)
9		-	-	-
10		-	-	-
1'	123,5	-	H-2',6'/C-1'	-
2'	105,5	6,77( <i>s</i> )	H-2'/C-2'	6,94( <i>s</i> )
3'	146,7	-	H-OMe/C-3'	-
4'		-	-	-
5'	146,7	-	H-OMe/C-5'	-
6'	105,5	6,77( <i>s</i> )	H-6'/C-6'	6,94( <i>s</i> )
3'-OMe	56,2	3,99( <i>s</i> )	H/C-MeO	3,87( <i>s</i> )
5'-OMe	56,2	3,99( <i>s</i> )	H/C-MeO	3,87( <i>s</i> )
7-OH		-	-	-
5-OH		12,90( <i>s</i> )	-	13,07( <i>s</i> )
4'-OH		5,69( <i>s</i> )	-	-

<sup>a,b</sup>. Valores definidos com base em sinais de HSQC e HMBC





7,5,4'-trihidroxi-3',5'-dimetoxi-isoflavona (14)

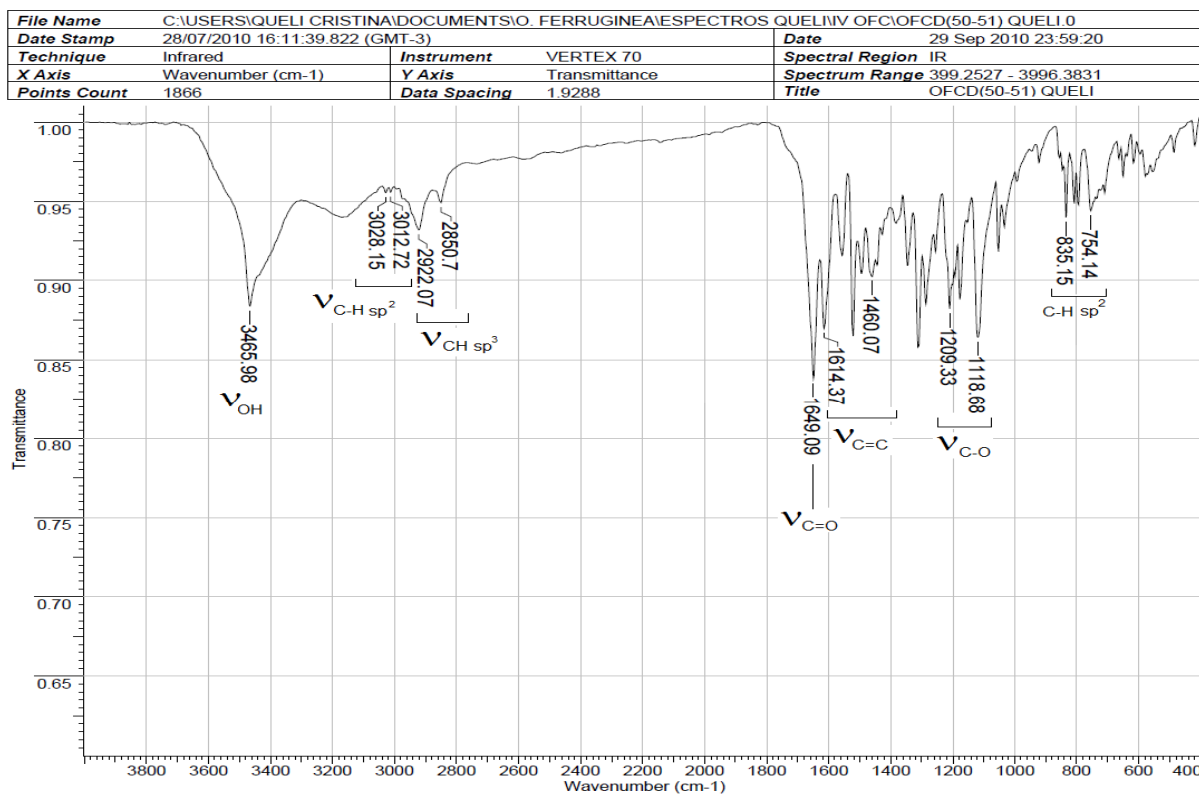
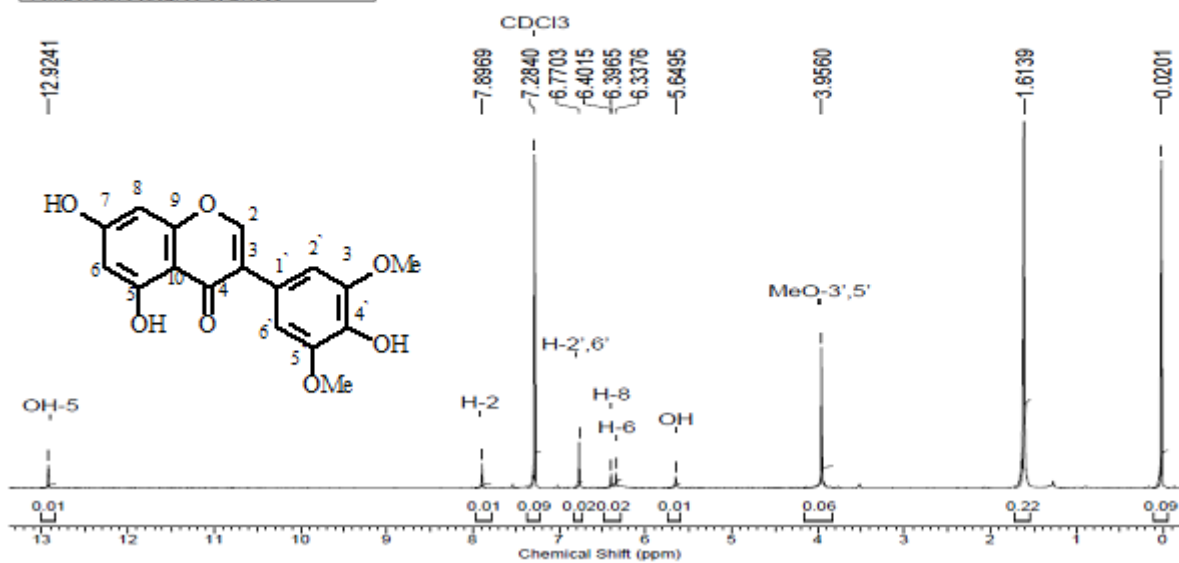
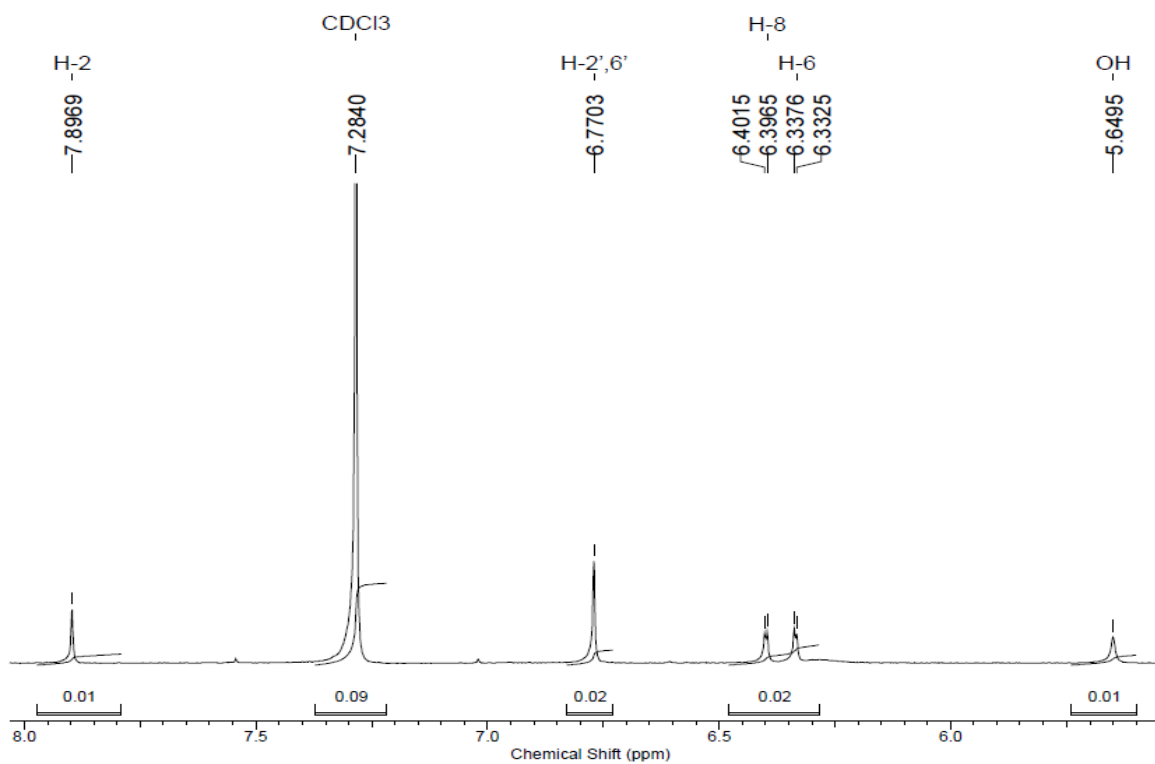


Figura 49. Espectro no IV da substância 14 (KBr)

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: OFC - 50 (PROTON)
Date	12 Nov 2009 15:04:18		
File Name	C:\Users\QUELI CRISTINA\Documents\O. ferruginea\queli_007001r		
Frequency (MHz)	400.13	Nucleus	<sup>1</sup> H
Original Points Count	32768	Points Count	32768
Solvent	CHLOROFORM-D	Number of Transients	64
Temperature (degree C)	27.000	Pulse Sequence	zg30
		Sweep Width (Hz)	8223.68



**Figura 50.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância 14



**Figura 51.** Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância 14

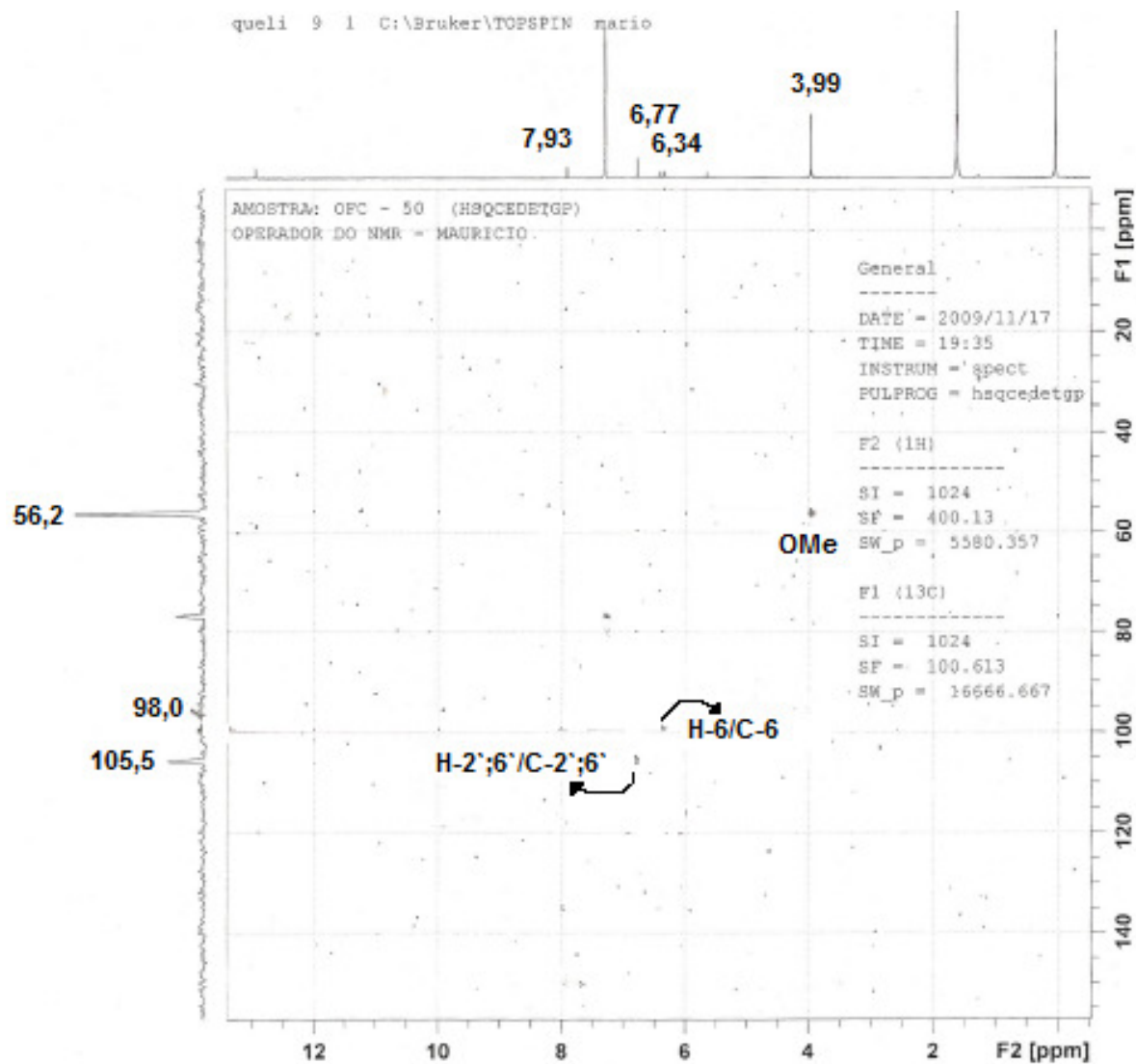
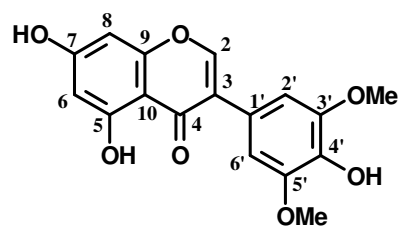
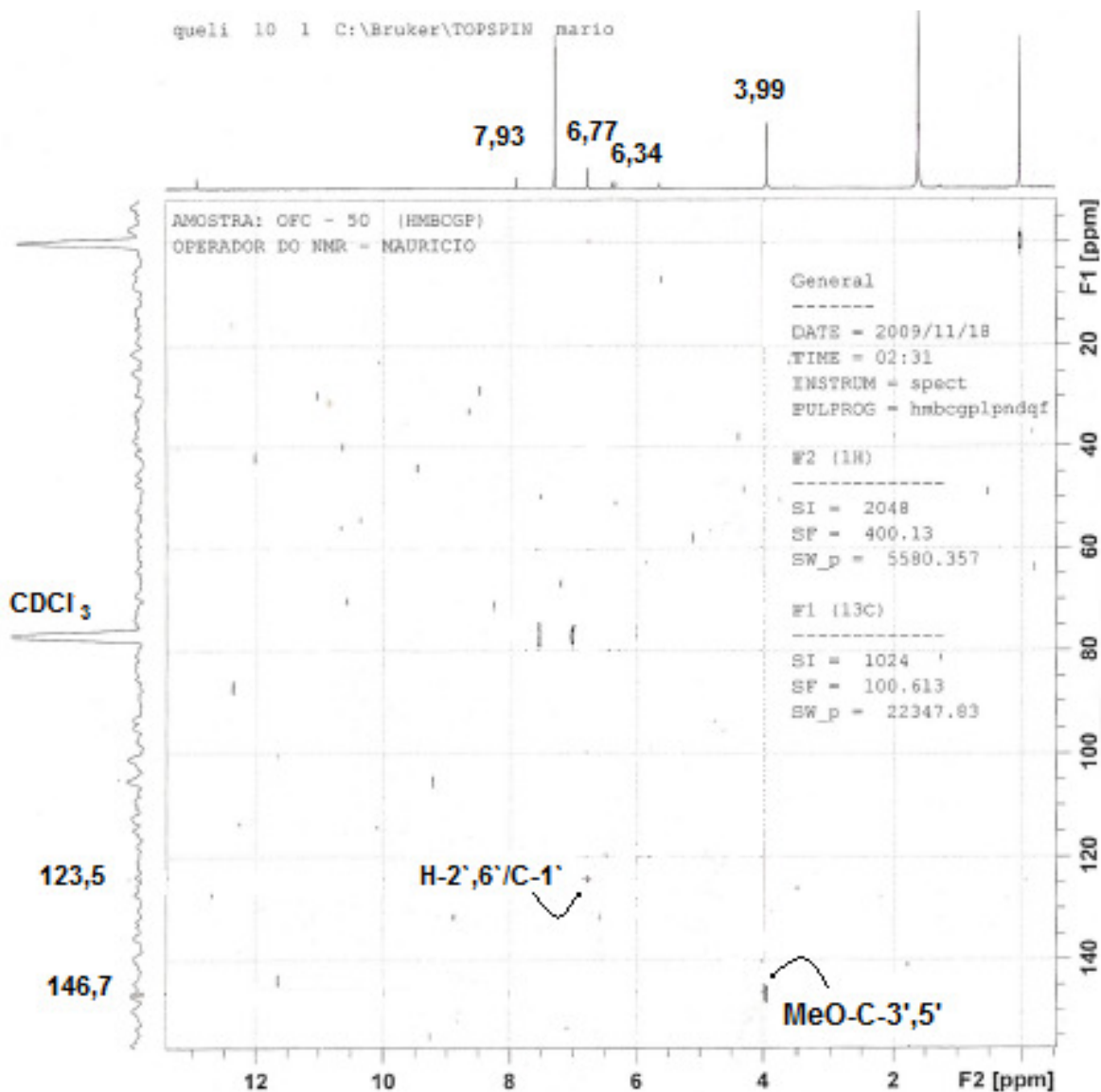


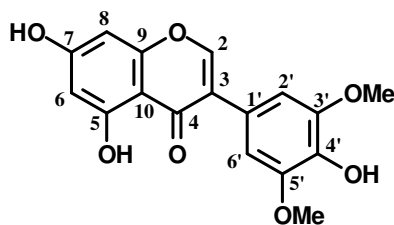
Figura 52. Espectro de RMN-HSQC (400/100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **14**



7,5,4'-trihidroxi-3',5'-dimetoxi-isoflavona (**14**)



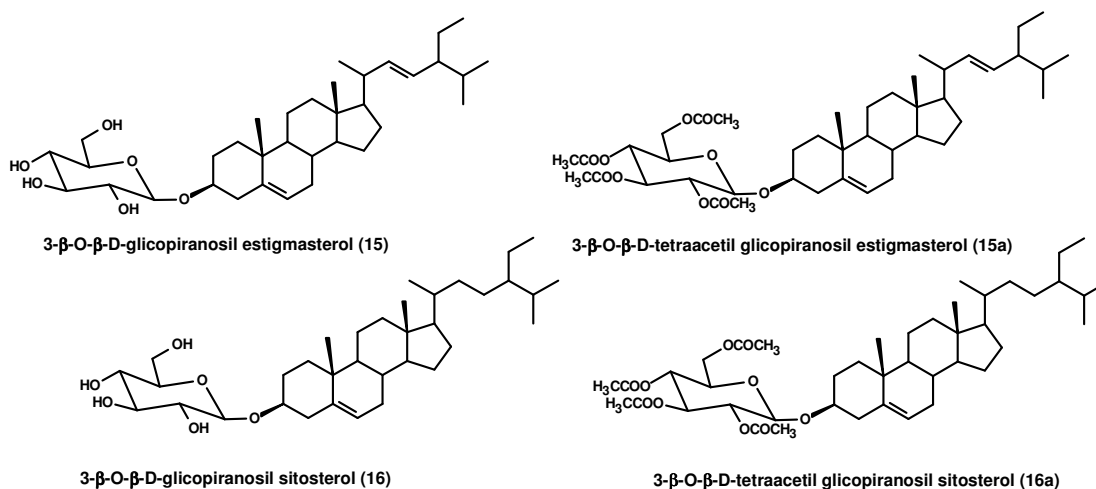
**Figura 53.** Espectro de RMN-HMBC (400/100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância **14**



**7,5,4'-trihidroxi-3',5'-dimetoxi-isoflavona (14)**

### V.1.11. Identificação das substâncias 15 e 16 através dos derivados 15a e 16a

A mistura contendo as substâncias **15** e **16** apresentou-se como um sólido branco insolúvel nos solventes freqüentemente usados para registrar os espectros de RMN. O espectro no IV apresentou absorção em  $3440\text{ cm}^{-1}$  devido a estiramento de O-H, absorções em  $2980$ ,  $1460$  e  $1376\text{ cm}^{-1}$  estiramentos e dobramento de  $\nu_{\text{C-H}}$ ,  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , respectivamente; e  $\nu_{\text{C-O}}$  em  $1073$  e  $1019\text{ cm}^{-1}$  (**Figura 54, p.83**). Os dados do espectro de IV e as propriedades dessa fração permitiram pensar na possibilidade de preparar um derivado acetilado para facilitar a obtenção de espectro em RMN e EM. Após o preparo do derivado acetilado da fração obteve-se o espectro de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Em RMN  $^1\text{H}$  observou a presença de sinais de  $\delta_{\text{H}}$  0,68 a 0,99 provenientes dos grupos metilas, sinais dos hidrogênios de açúcar  $\delta_{\text{H}}$  5,22 (*m*, H-3');  $\delta_{\text{H}}$  5,09 (*m*, H-4');  $\delta_{\text{H}}$  4,97 (*m*, H-2');  $\delta_{\text{H}}$  4,61 (*m*, H-1', 8,0 Hz);  $\delta_{\text{H}}$  3,69 (*m*, H-5');  $\delta_{\text{H}}$  4,29 (*dd*, H-6'a, 4,5 Hz e 12,3 Hz);  $\delta_{\text{H}}$  4,13 (*d*, H-6'b, 12,3 Hz). O H-6 apresenta deslocamento em  $\delta_{\text{H}}$  5,37 e aos grupos metilas das acetoxilas absorvem na região de  $\delta_{\text{H}}$  2,09 a 2,01 ppm (**Figura 55, p. 83 e 56, p. 84**). No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Figura 57, p. 84**) verificou-se a presença de quatro sinais de  $\delta_{\text{C}}$  170 a 169 de carbonilas; sinais em  $\delta_{\text{C}}$  138 para C-22 e 129 para C-23; em  $\delta_{\text{C}}$  99 sinal de C-1' carbono anomérico  $\beta$ , além de inúmeros sinais de  $\delta_{\text{C}}$  14-80 ppm característicos de esqueleto de esteróide que permitem propor a presença de duas substância em misturas **15a** e **16a**. Estes valores estão de acordo com a literatura (KOJIMA *et al.*, 1990; RUBINSTEIN *et al.*, 1976) que confirmam as estruturas de dois derivados acetilados de saponinas: o 3- $\beta$ -O- $\beta$ -D-tetraacetil glicopiranosil sitosterol e o 3- $\beta$ -O- $\beta$ -D-tetraacetil glicopiranosil estigmasterol. Através dessa derivatização, foi possível identificar as substâncias naturais 3- $\beta$ -O- $\beta$ -D-glicopiranosil estigmasterol (**15**) e 3- $\beta$ -O- $\beta$ -D-glicopiranosil sitosterol (**16**).



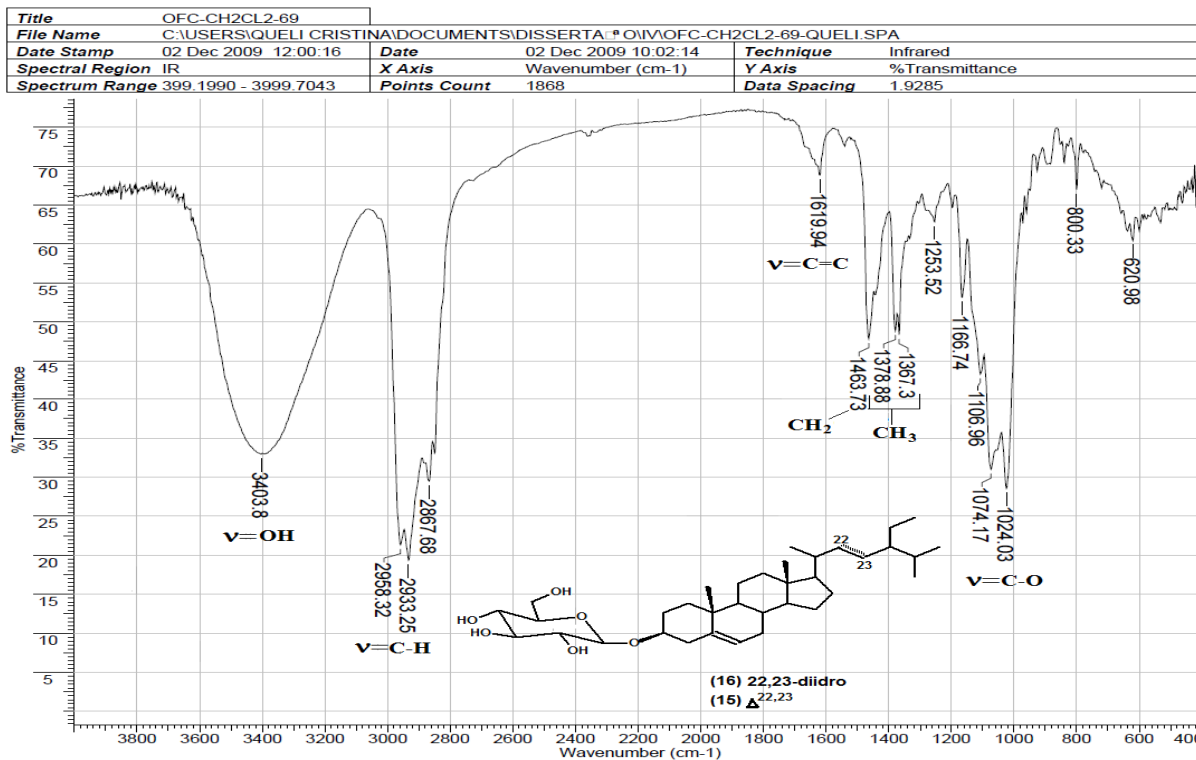


Figura 54. Espectro no IV da substância 15 e 16 (KBr)

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: OFCD-69 (PROTON) - 400MHZ SOLVENTE: CDCL3		
Date	18 Nov 2010 19:02:38				
File Name	C:\Users\QUELI CRISTINA\Documents\O. ferruginea\QUELI 30- 107001r				
Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	1H	Number of Transients	16
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	8223.68	Temperature (degree C)	27.000

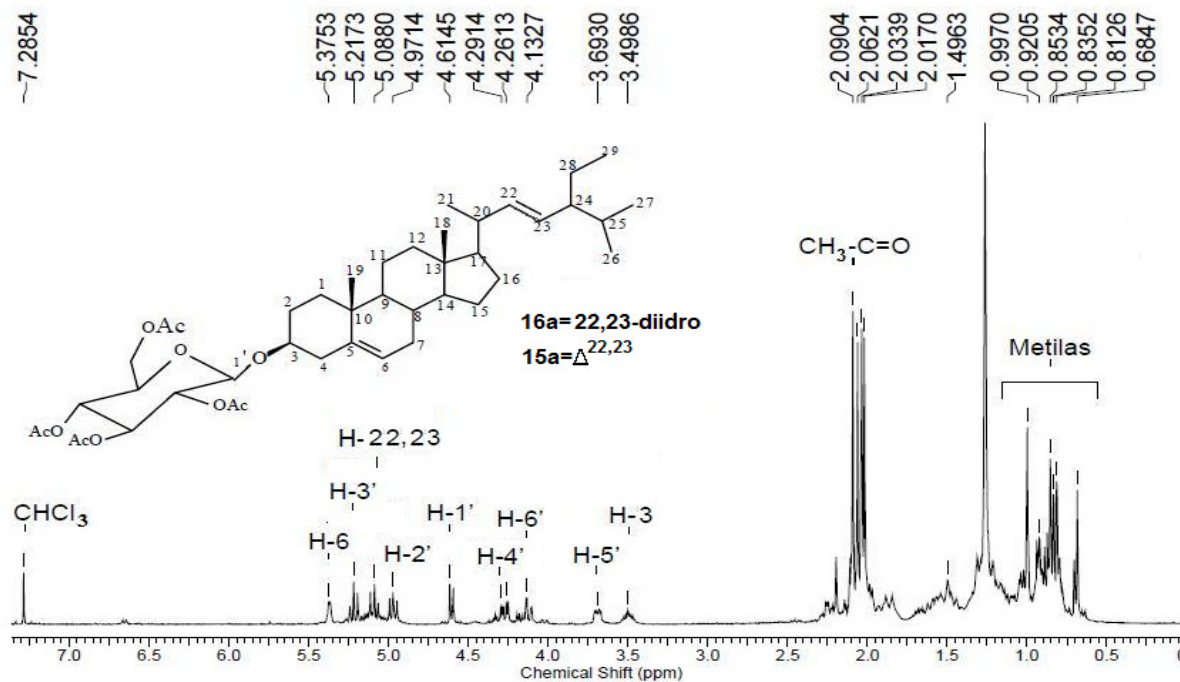


Figura 55. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância 15a e 16a

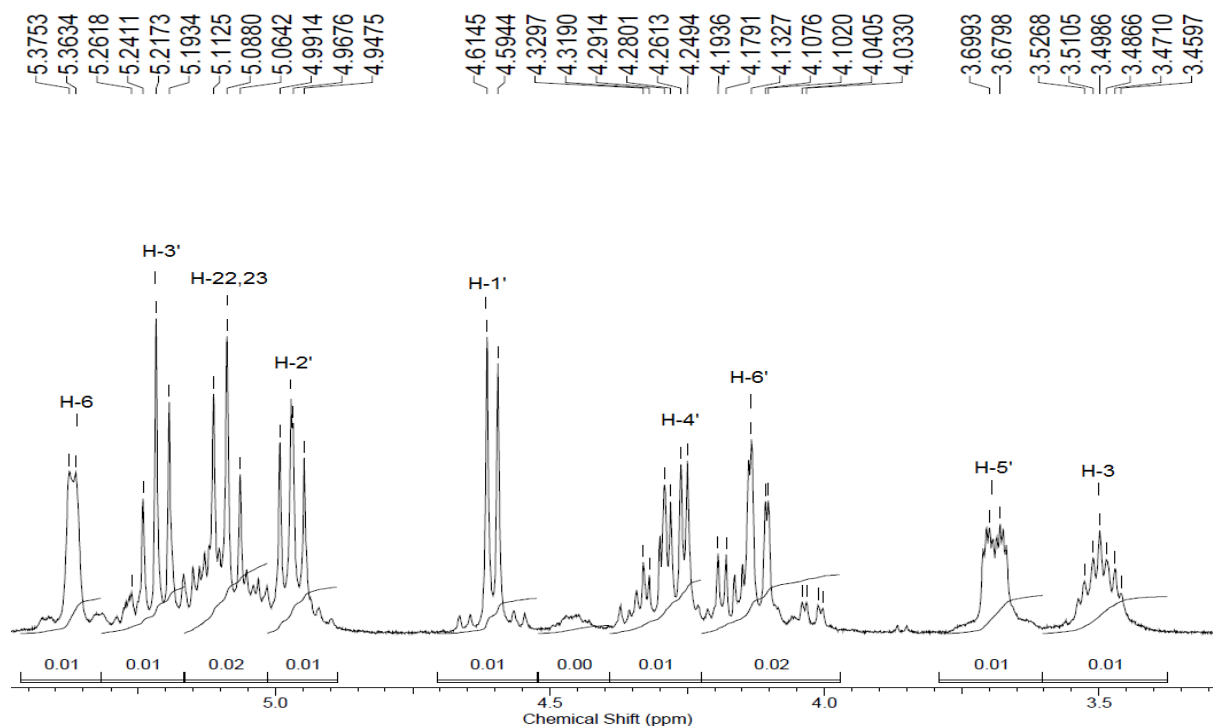


Figura 56. Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância 15a e 16a

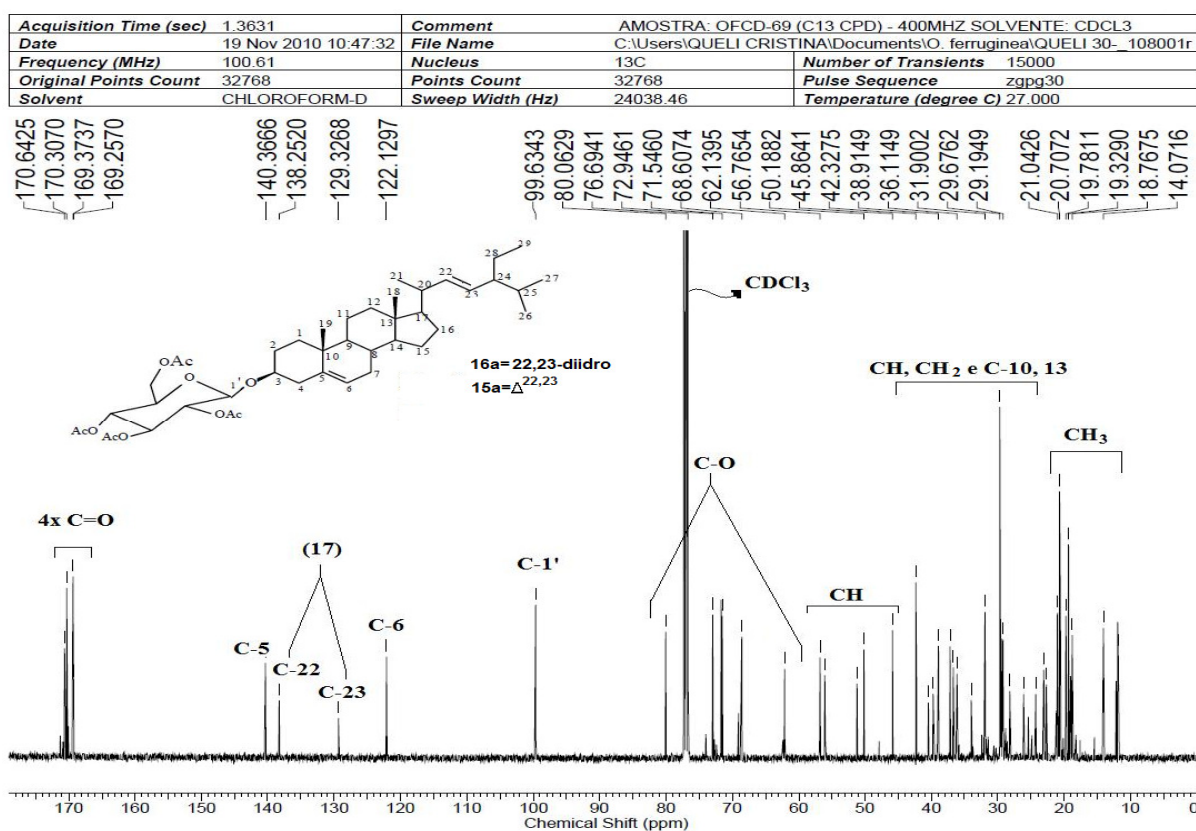
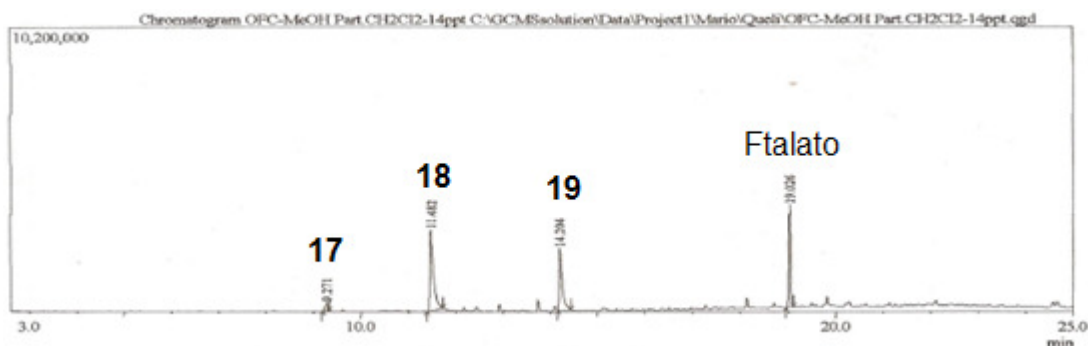
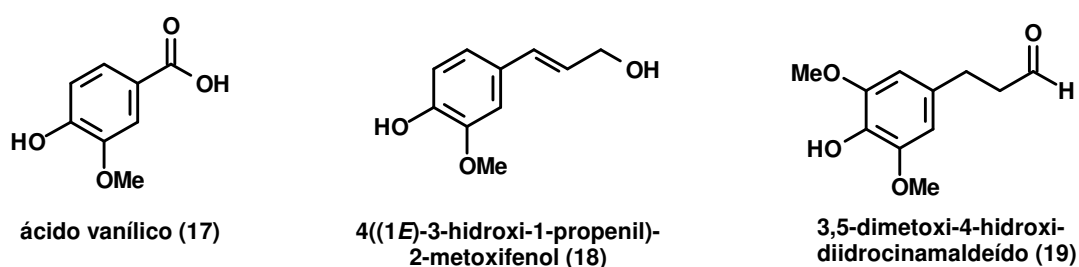


Figura 57. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância 15a e 16a

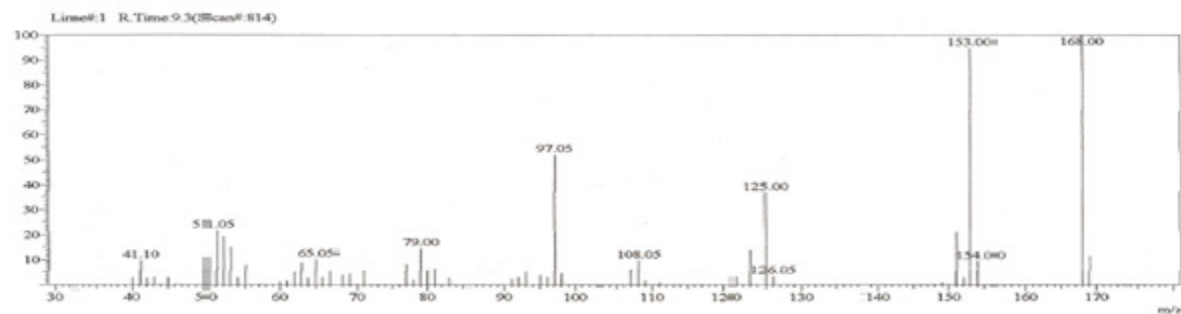
### V.1.12. Identificação das substâncias 17, 18 e 19

A análise de uma das frações obtida da partição do extrato metanólico do caule através de CG-EM permitiu verificar a presença de 4 componentes com Tr 9,27; 11,40; 14,20 e 19,0 min (**Figura 58, p. 85**). A análise dos espectros de massas e comparação com padrões da biblioteca permitiu propor as estruturas de **17** como o ácido vanílico (**Esquema 9, Figura 59, p. 86**), **18** como o 4((1*E*)-3-hidroxi-1-propenil)-2-metoxifenol (**Esquema 10, Figura 60, p. 87**), e **19** como o 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-diidrocinamaldeído ou diidro-sinapaldeído (**Esquema 11, Figura 61, p. 88**) e o ftalato de butila, respectivamente (**Figura 62, p. 89**). A proposta da biblioteca para **19** não pode ser aceita, uma vez que os picos 182 e 149 e o pico 151 (dimetoxi fenil) não existe no espectro de **19**. Por isso, e considerando a frequência que o sistema dimetoxi-hidroxi-benzeno, como do ácido sirínico, foi identificado nesta espécie; além das justificativas plausíveis de fragmentação sugerida no **esquema 11**, a proposta do 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-diidrocinamaldeído foi a mais razoável.

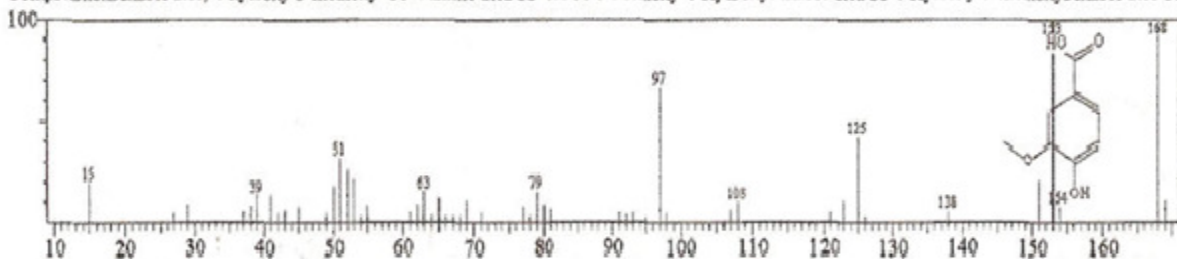


**Figura 58.** Cromatograma (CG) da mistura de **17**, **18** e **19**

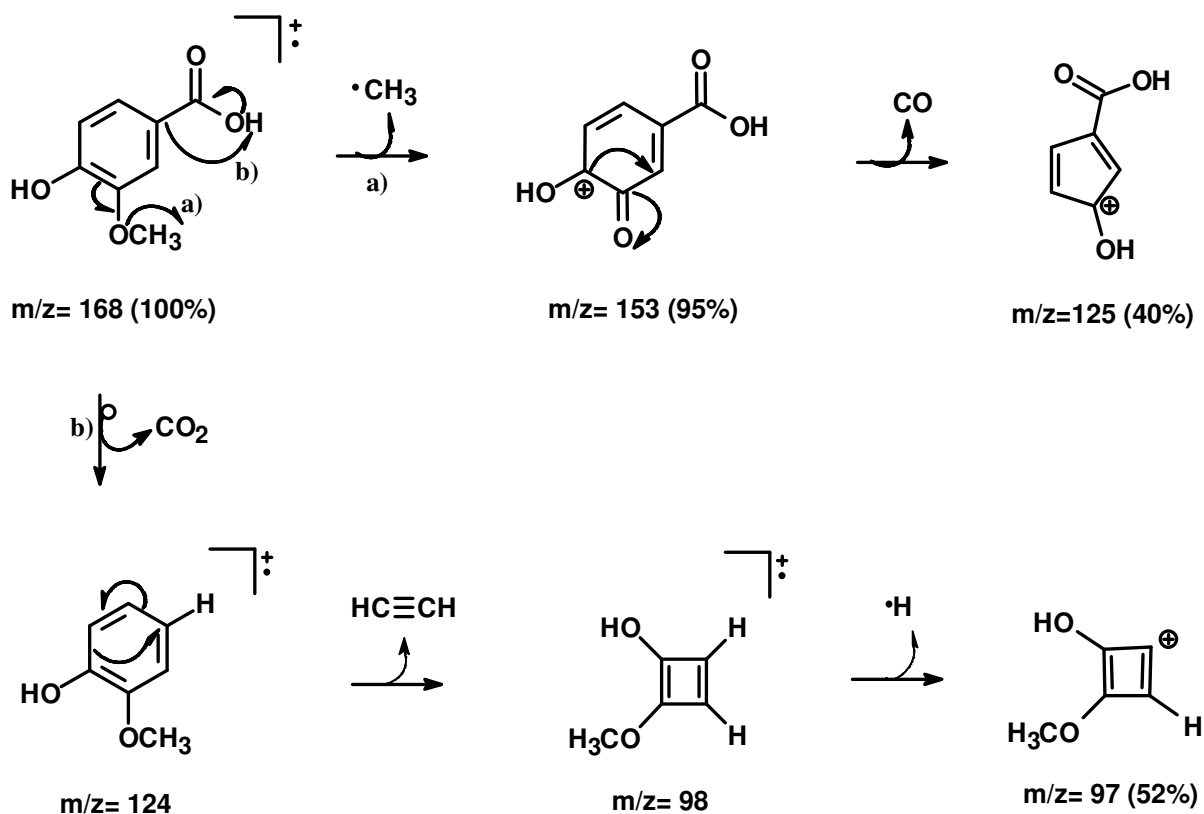




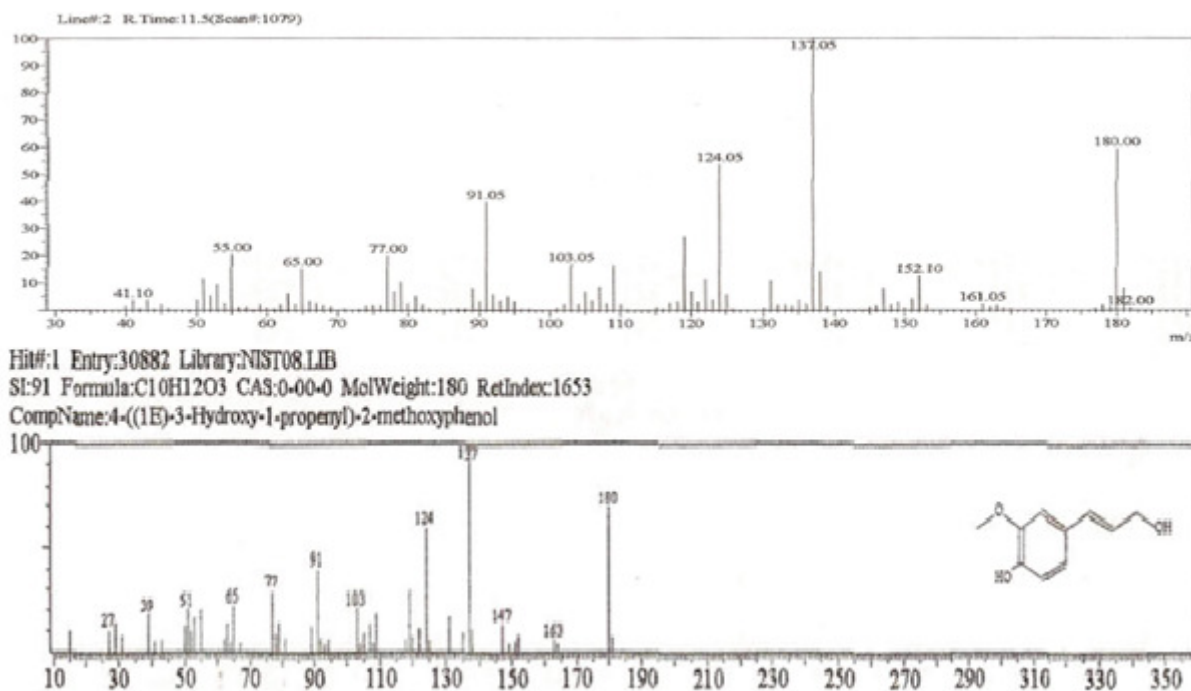
Hit#1 Entry:11819 Library:NIST08a.LIB  
 SI:93 Formula:C8H8O4 CAS:121-34-6 MolWeight:168 RetIndex:1560  
 CompName:Benzoic acid, 4-hydroxy-3-methoxy- \$\$ Vanillic acid \$\$ VA \$\$ 3-Methoxy-4-Hydroxybenzoic acid \$\$ 4-Hydroxy-3-methoxybenzoic acid \$\$



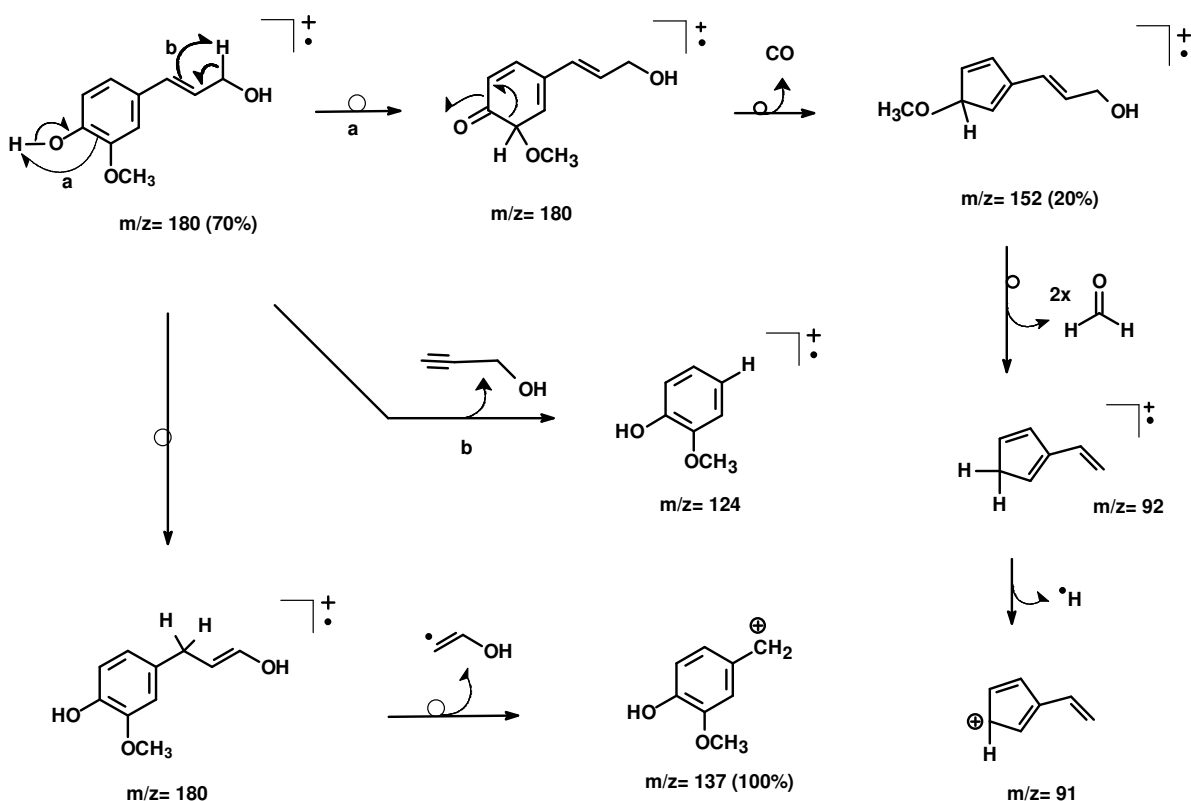
**Figura 59.** Espectro de massas da substância **17** em comparação com o espectro fornecido pela biblioteca do aparelho



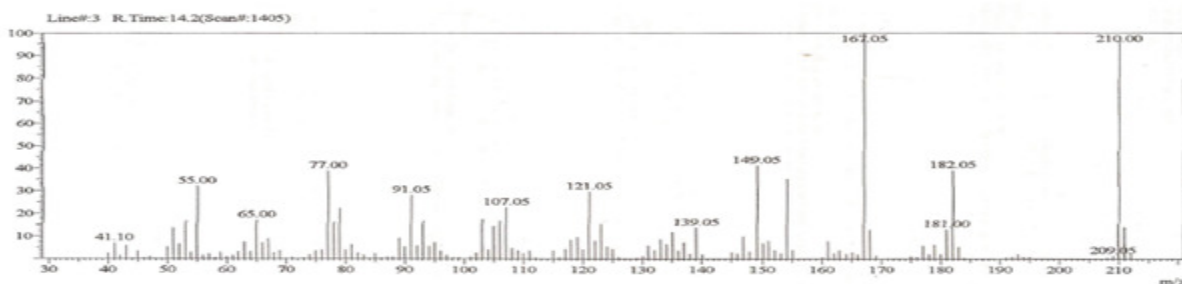
**Esquema 9.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro de massas do componente com Tr 9,21 min



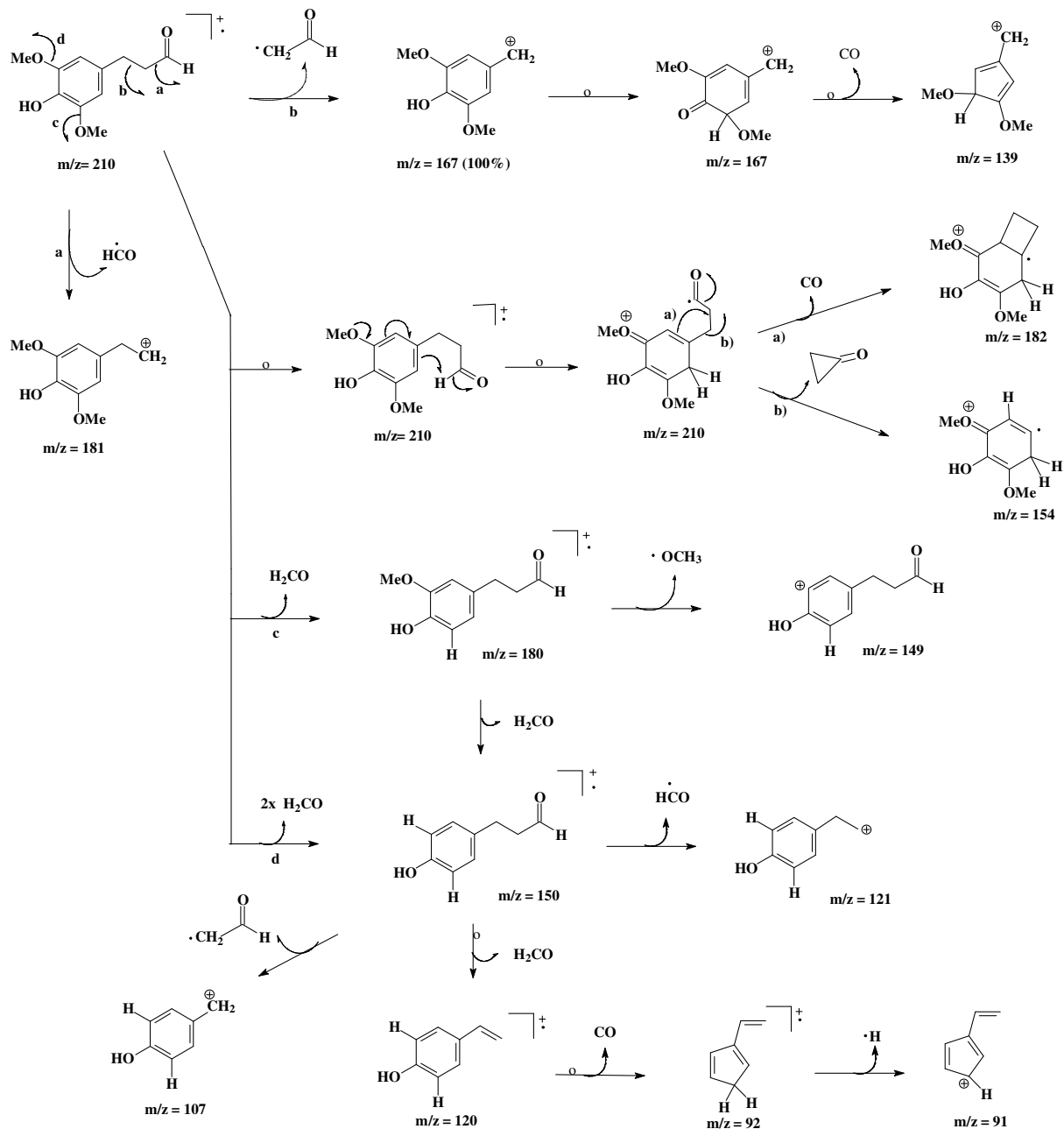
**Figura 60.** Espectro de massas da substância **18** em comparação com o espectro fornecido pela biblioteca do aparelho



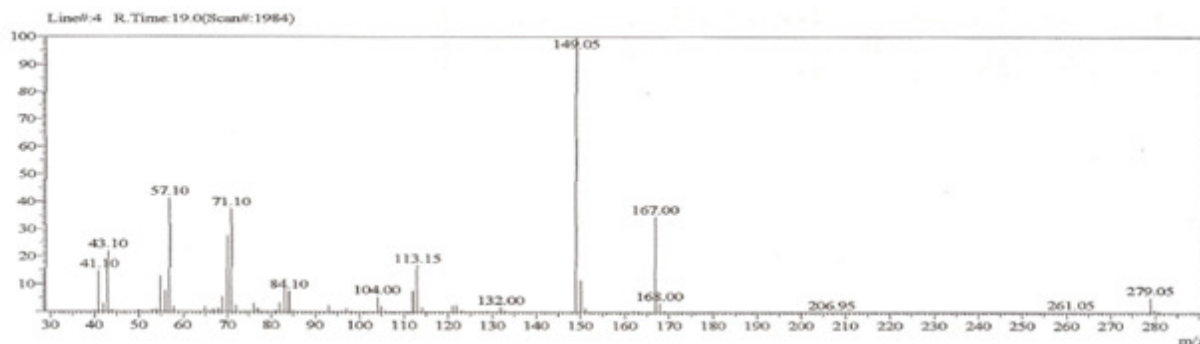
**Esquema 10.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro de massas do componente com Tr 11,4 min



**Figura 61.** Espectro de massas da substância 19



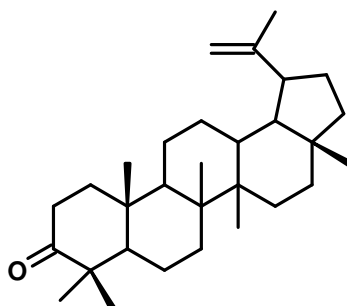
**Esquema 11.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro de massas do componente com Tr 14,2 min



**Figura 62.** Espectro de massas do ftalato (contaminante do solvente)

### V.1.13 Identificação da substância 20 em mistura com 1 e 2

A quarta fração, obtida de OFFH-fase polar, foi analisada com CG-EM e forneceu uma mistura de três componentes (**Figura 64, p. 90**) que foram identificados como **friedelina (1)**, **friedelinol (2)** e a **lupenona (20)**. Os espectros de massas dos componentes responsáveis pelos picos em  $Tr_{(min)}$ : 23,0 (34,37%;  $m/z = 424,0$ ; **20**); 27,2 (19,32%;  $m/z = 428,0$ ; **2**) e 27,9 (46,31%;  $m/z = 426,0$ ; **1**) apresentaram além dos valores do  $m/z$  do pico molecular de cada um, uma série de picos compatíveis com as estruturas propostas conforme os espectros da biblioteca (**Figuras 65-67, p. 91-92**). O espectro de RMN  $^1H$  (**Figura 63, p.90**) mostrou sinais compatíveis a triterpenos. Em  $\delta_H$  2,15; 2,26 e 2,36 ppm encontram-se os sinais de hidrogênios adjacentes a carbonila (H-2), o sinal em  $\delta_H$  3,75 é característico de hidrogênio carbinólico (H-3) da substância **2**, os dois singletos largos em  $\delta_H$  4,70 e 4,58 ppm são referentes os hidrogênios vinílicos da substância **20** e em  $\delta_H$  0,73 a 1,69 ppm pode verificar a presença de sinais de metilas.



lupenona (**20**)

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: OFF-HEX-Part-MeOH/H2O-4 (PROTON)	
Date	08 Mar 2010 10:41:44			
File Name	C:\Users\QUELI CRISTINA\Documents\O. ferruginea\QUELI 30- 038001r			
Frequency (MHz)	400.13	Nucleus	1H	Number of Transients
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	8223.68	Temperature (degree C)
				27.000

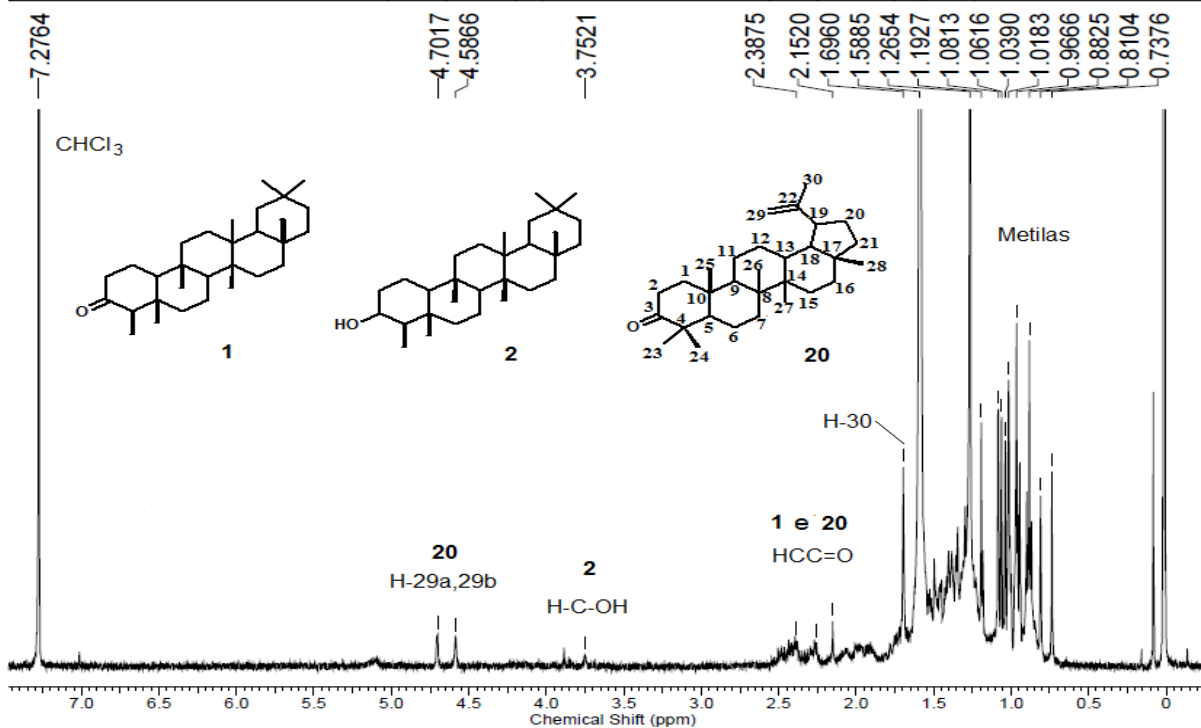


Figura 63. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das substâncias **20**, **1** e **2**

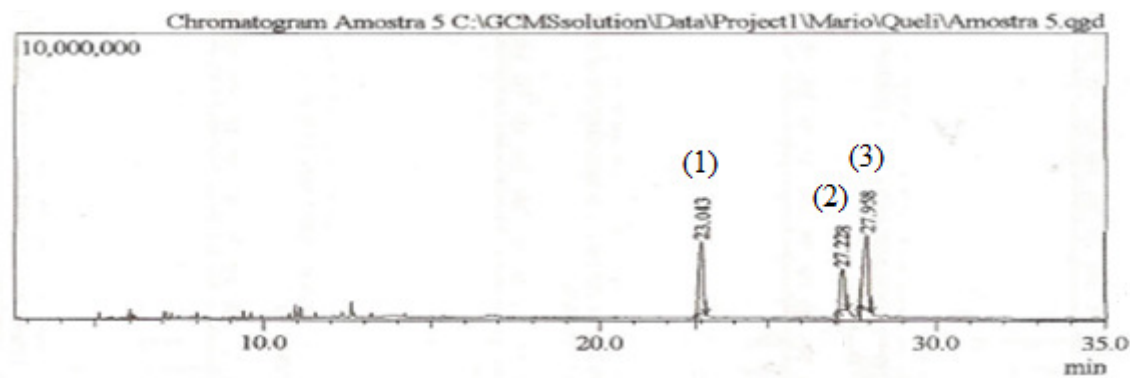
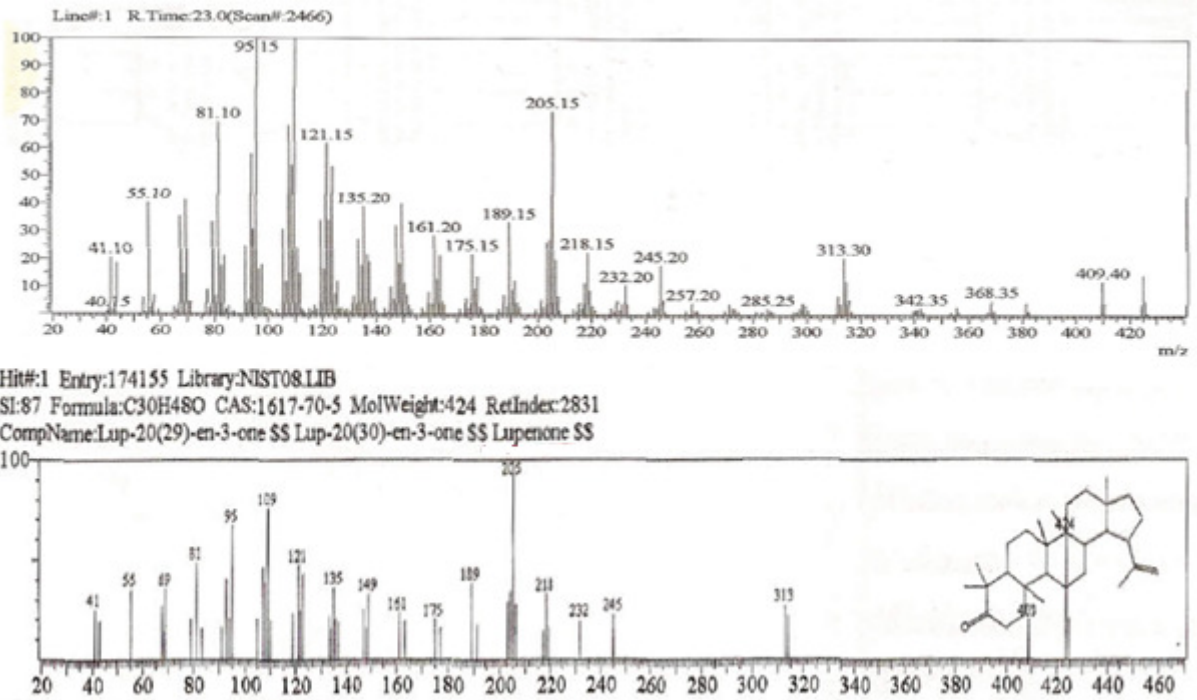
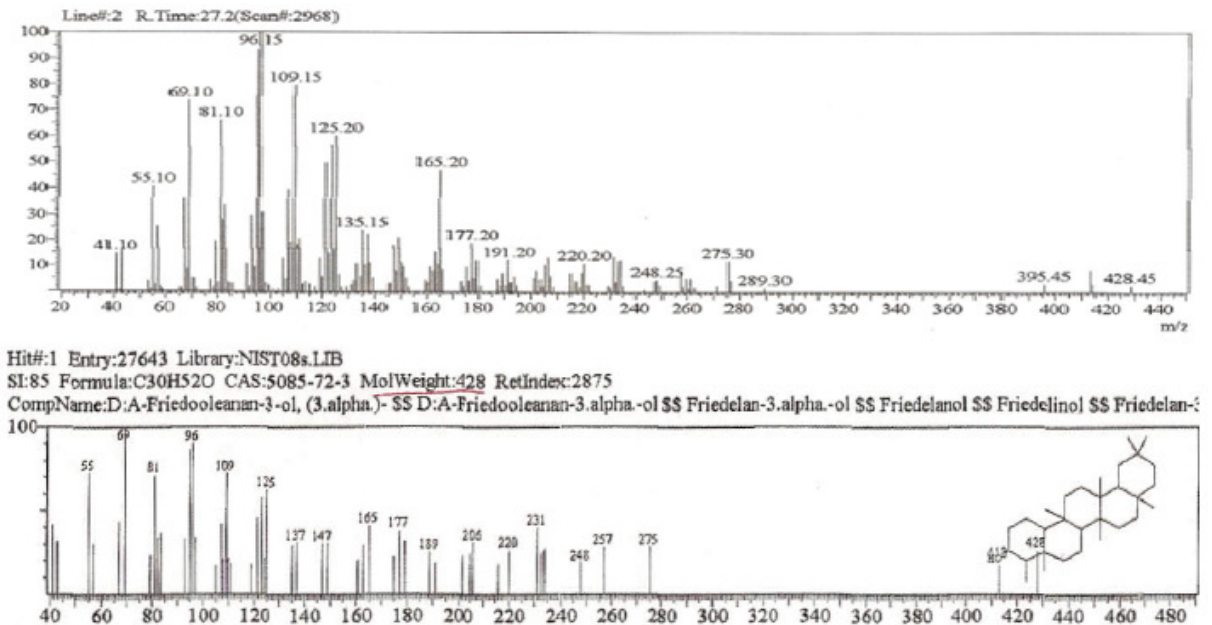


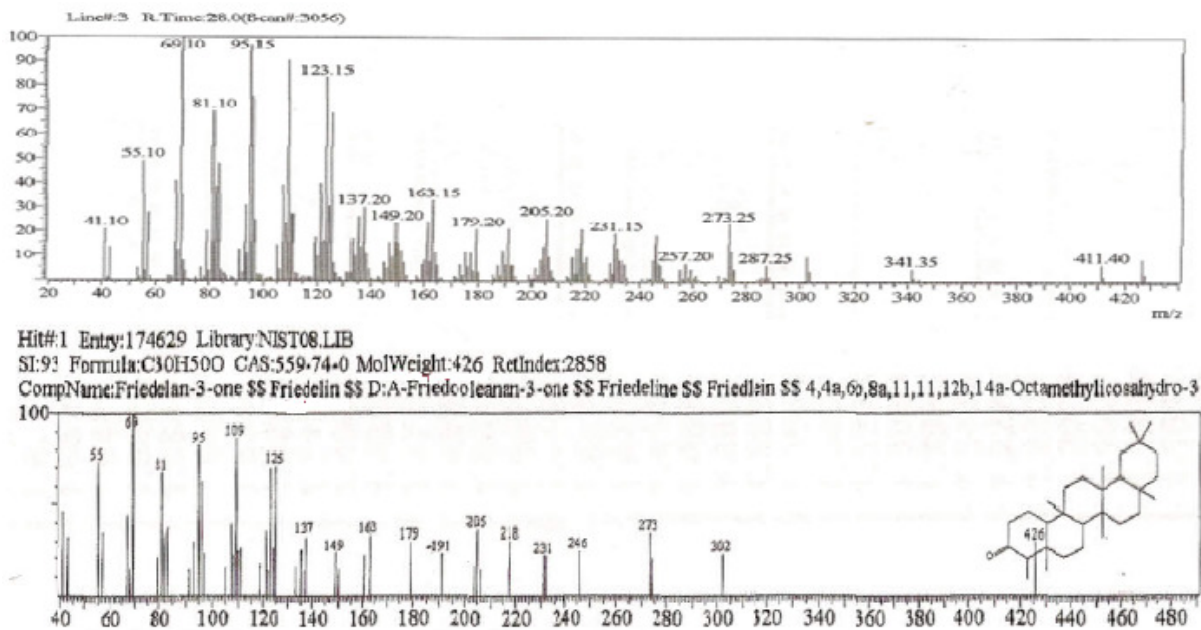
Figura 64. Cromatograma (CG) da mistura de **20**(1), **2**(2) e **1**(3)



**Figura 65.** Espectro de massas da substância **20** em comparação com o espectro de fornecido pela biblioteca do aparelho



**Figura 66.** Espectro de massas da substância **2** em comparação com o espectro de fornecido pela biblioteca do aparelho



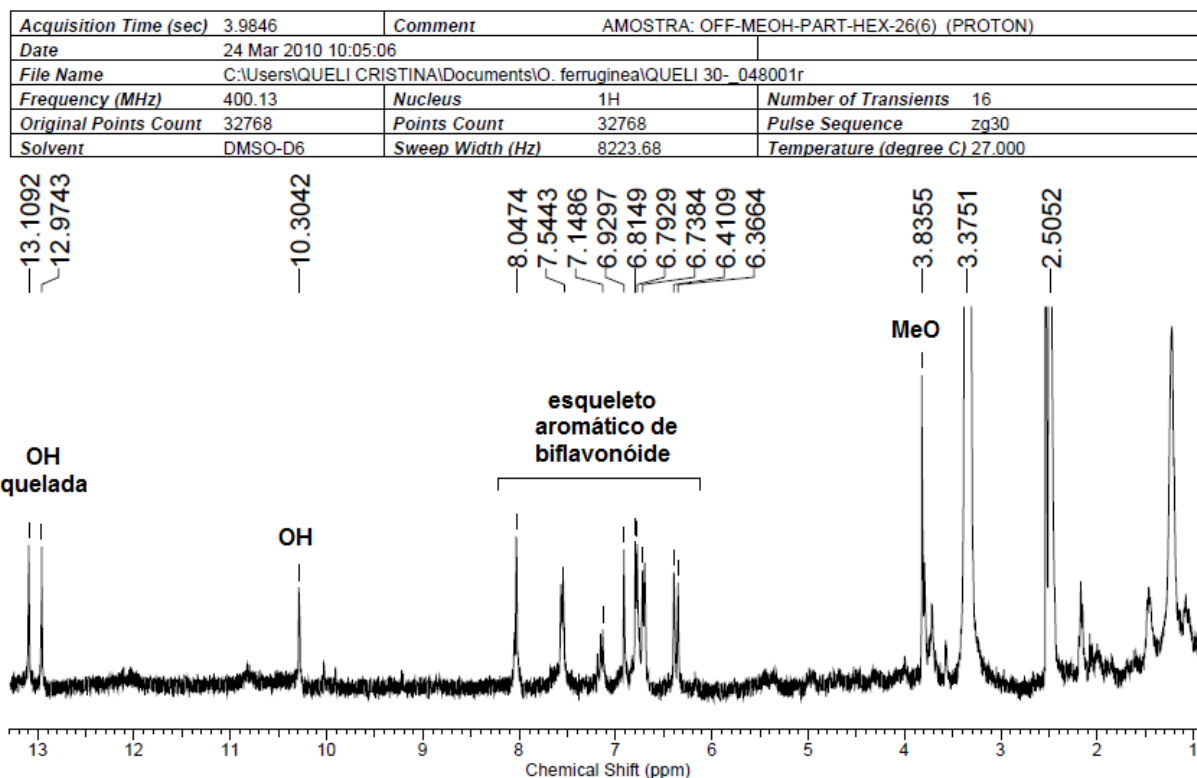
**Figura 67.** Espectro de massas da substância **1** em comparação com o espectro de fornecido pela biblioteca do aparelho

#### V.1.14. Análise das frações biflavonoídicas das folhas por CLAE

As frações que indicaram a presença de biflavonóides em CCDA, pela comparação com os padrões de amentoflavona e agatisflavona, foram primeiramente analisadas por RMN <sup>1</sup>H e CL-EM, e mostraram mistura de substâncias. A análise do espectro de RMN <sup>1</sup>H (**Figura 68, p. 93**) permitiu verificar sinais de hidroxilas queladas em  $\delta_H$  13,10 e 12,97 ppm, de metoxila em  $\delta_H$  3,83 ppm e de prótons em sistema aromático. Os valores de deslocamento químico e multiplicidade dos sinais dos prótons são característicos de biflavonóides. Como exemplo os sinais em  $\delta_H$  6,36; 6,41; 6,73; 6,79; 6,81; 6,92; 7,15; 7,54 e 8,05 e um sinal em  $\delta_H$  10,30 ppm que pode ser de hidroxila fenólica. As intensidades relativas dos sinais são compatíveis com mistura de biflavonóides, o que inclusive estava de acordo com análise com CCDA. Para detectar o número de componentes na mistura fez-se análise por CL-EM-ESI (**Figuras 69, 70 e 71, p.95-96**). O EM forneceu os valores dos íons quase moleculares de cada componente. A análise dos espectros de massas com sistema de íons positivos e negativos, permitiu identificar o valor de  $m/z = 537,8072$  ( $M^+-H$ ) e  $m/z = 551,1015$  ( $M^+-H$ ) para as substâncias com os tempos de retenção em 61,5 (**21**) e 68,8 (**23**) min, respectivamente. O número de sistemas AB e ABC de prótons detectados no espectro de RMN <sup>1</sup>H, aliado aos simplesos compatíveis com sistema cromônico constituinte de flavonóides, juntamente com os

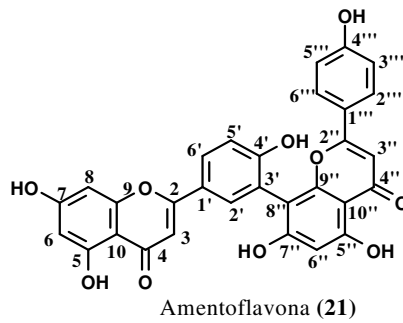


valores do íon molecular ( $M^+$ ) foram compatíveis com a presença da amentoflavona e de um de seus derivados metilados. A **Tabela 9 (p. 94)** mostra os valores de deslocamentos químicos dos prótons comparados com os da amentoflavona (SUZART, 2006). Considerando que pela análise de CLAE-UV foram detectados outros componentes minoritários, resolveu-se fazer análise adicional de algumas dessas frações e identificá-las por comparação com padrões de biflavonóides isolados anteriormente de outras espécies Ochnaceae. Essa escolha fundamentou-se no fato da CLAE ser uma técnica que permite uma melhor resposta em termos de resolução, quantificação e detecção, bem como em um tempo menor de análise. Nesse trabalho utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de fotodiodo (CLAE-DAD), utilizando um sistema isocrático com mecanismo de separação por fase reversa (coluna analítica octadesil- $C_{18}$ ). A escolha dos parâmetros cromatográficos (comprimento de onda no UV, dimensões e fase da coluna, escolha da fase móvel, velocidade de fluxo, etc) foram feitas com base na consulta de trabalhos anteriores (BOSSO, 2004; DANIEL, 2004) e testes prévios com os padrões.



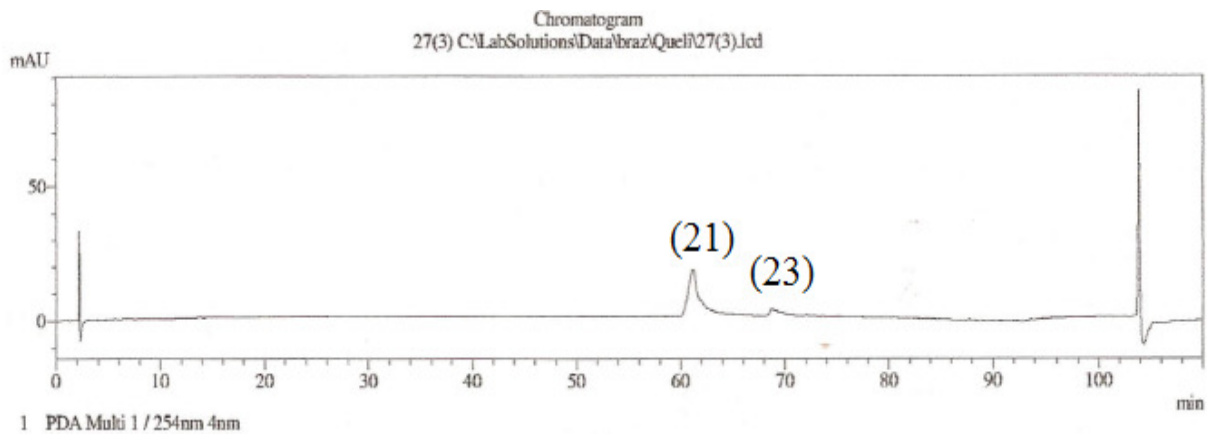
**Figura 68.** Espectro de RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) da fração biflavonoídica



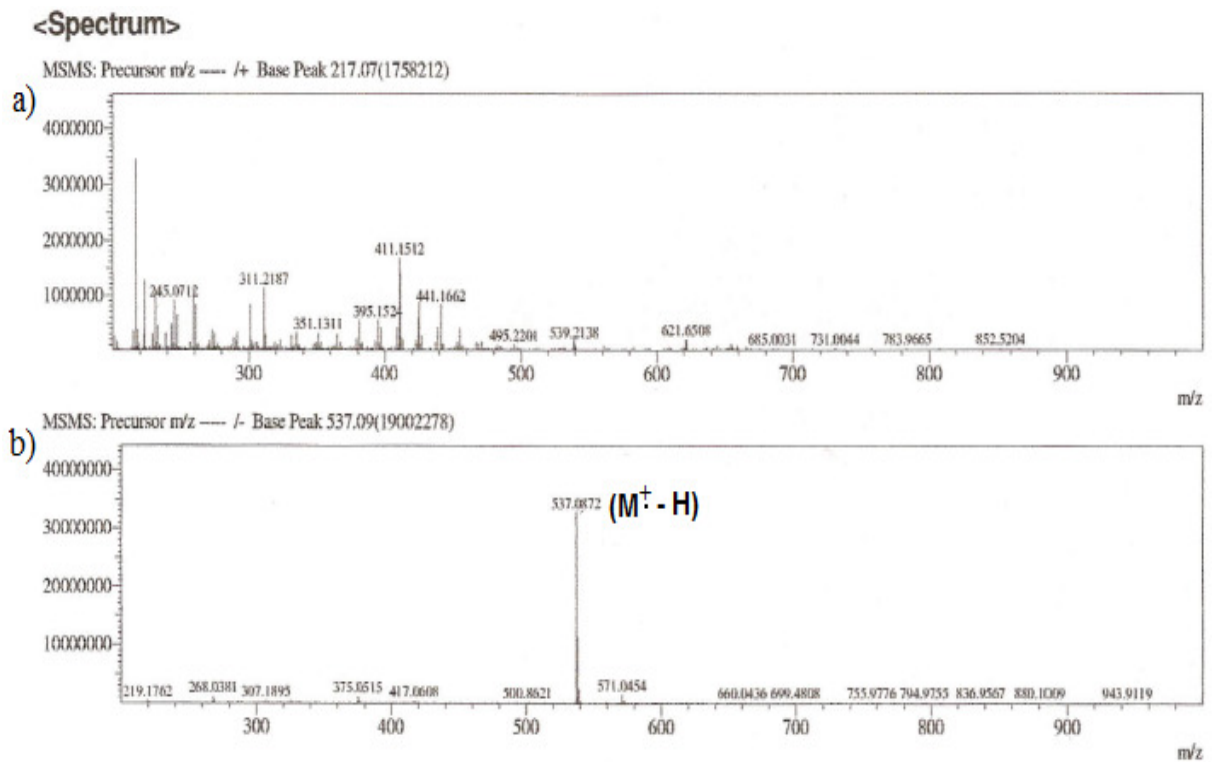


**Tabela 9.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  da fração biflavonóidica em comparação com os dados da amentoflavona da literatura I (SUZART, 2006) e II (VELANDIA, 1997).

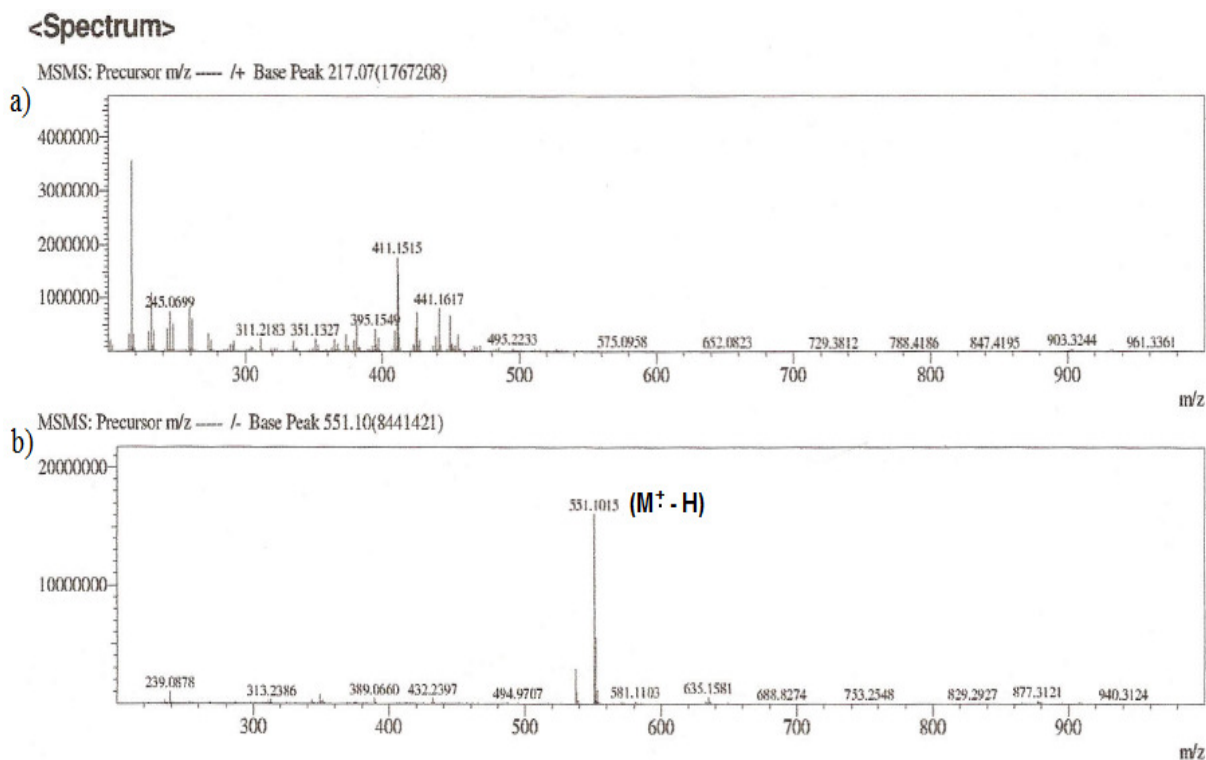
	Fração biflav. (DMSO- $d_6$ )	Amentoflavona I (DMSO- $d_6$ )	Amentoflavona II (Acetona- $d_6$ )
<b>C</b>	$\delta_{\text{H}}$ (mult. $J$ =Hz)		$\delta_{\text{H}}$ (mult. $J$ =Hz)
<b>2</b>			-
<b>3</b>	6,71(s)	6,79(s)	6,65(s)
<b>4</b>			-
<b>5</b>			-
<b>6</b>	6,41 ( <i>d</i> , 2,0 Hz)	6,18( <i>d</i> , 2,0 Hz)	6,22 ( <i>d</i> , 2,0 Hz)
<b>7</b>			-
<b>8</b>	6,41 ( <i>d</i> , 2,0 Hz)	6,46( <i>d</i> , 2,0 Hz)	6,51 ( <i>d</i> , 2,0 Hz)
<b>9</b>			-
<b>10</b>			-
<b>1'</b>			-
<b>2'</b>	8,07 (s)	8,1-7,9 ( <i>m</i> )	8,12 ( <i>d</i> , 2,2 Hz)
<b>3'</b>			-
<b>4'</b>			-
<b>5'</b>	7,15 (s)	7,14( <i>d</i> , 9,3 Hz)	7,23 ( <i>d</i> , 8,8 Hz)
<b>6'</b>	8,05 (s)	8,1-7,9 ( <i>m</i> )	8,02 ( <i>dd</i> , 8,8 e 2,2Hz)
<b>2''</b>			-
<b>3''</b>	6,73 (s)	6,84(s)	6,72(s)
<b>4''</b>			-
<b>5''</b>			-
<b>6''</b>	6,36 (s)	6,39(s)	6,43(s)
<b>7''</b>	-		-
<b>8''</b>	-		-
<b>9''</b>	-		-
<b>10''</b>	-		-
<b>1'''</b>	-		-
<b>2'''/6'''</b>	7,54 ( <i>d</i> , 8,3Hz)	7,57( <i>d</i> , 8,7 Hz)	7,64 ( <i>d</i> , 8,8 Hz)
<b>3'''/5'''</b>	6,81 ( <i>d</i> , 8,8Hz)	6,71( <i>d</i> , 8,7 Hz)	6,82 ( <i>d</i> , 8,8 Hz)
<b>OH-5'</b>	13,11 (s)	13,10(s)	13,16(s)
<b>OH-5</b>	12,97 (s)	12,97(s)	12,99(s)



**Figura 69.** Cromatograma (CL-EM) da fração biflavonoídica



**Figura 70.** Espectro de massas de **21**: a) modo positivo e b) modo negativo



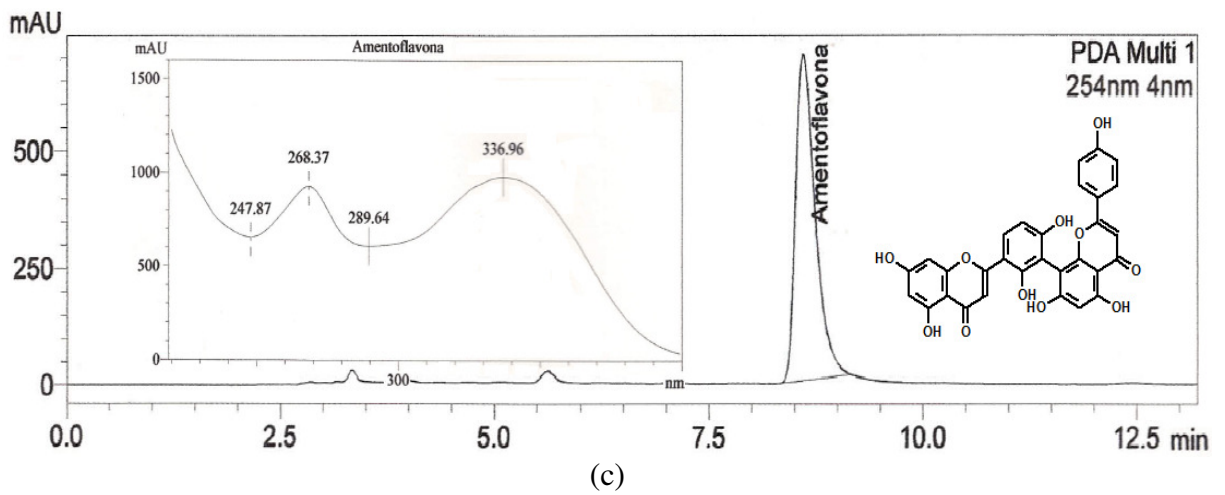
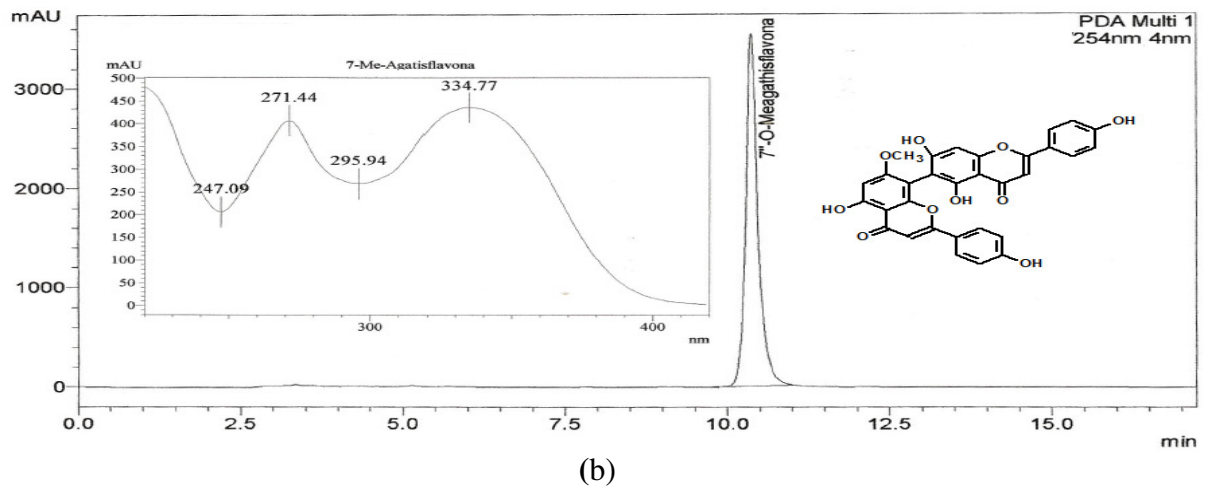
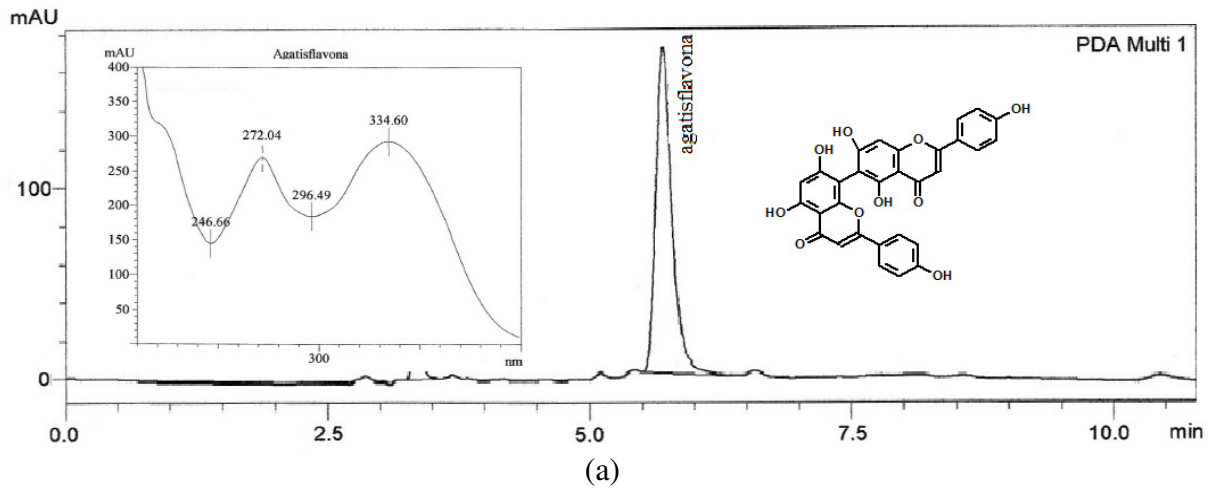
**Figura 71.** Espectro de massas de **23**: a) modo positivo e b) modo negativo

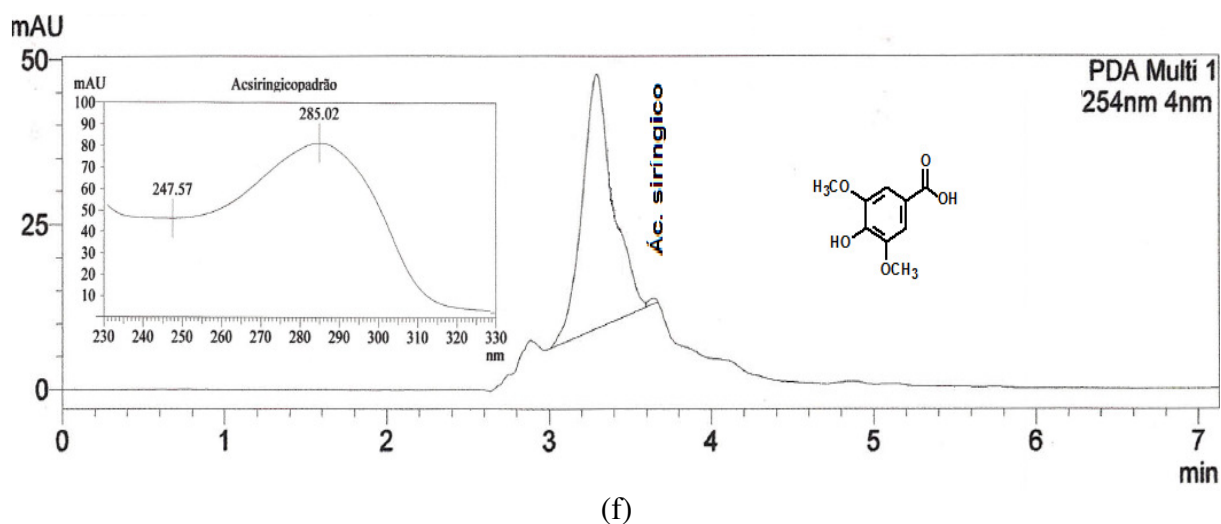
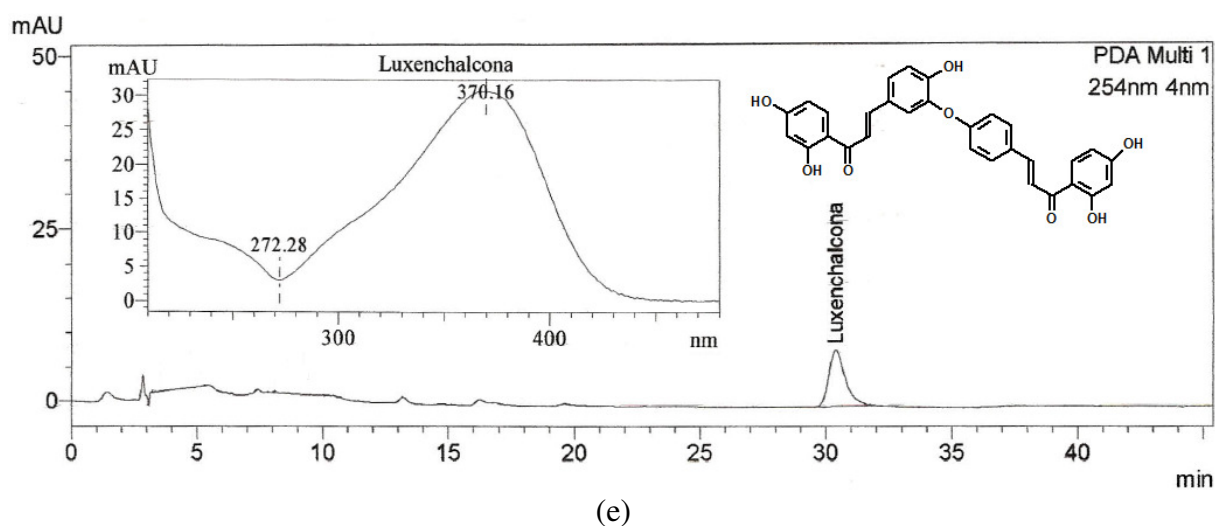
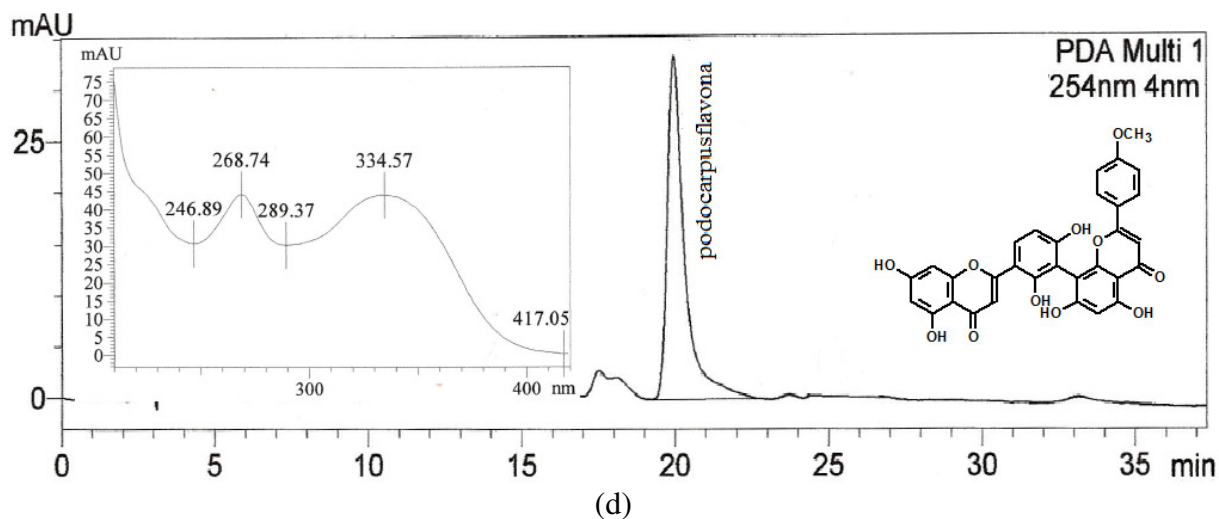
#### V.1.14.1. Perfil cromatográfico e espectros na região do UV dos padrões submetidos à CLAE-DAD em escala analítica

Todos os padrões foram submetidos à cromatografia (CLAE-DAD) separadamente, para determinação dos tempos de retenção e obtenção dos espectros de UV. Na **Tabela 10** (p. **96**), abaixo estão apresentados os tempos de retenção e os máximos de absorção no UV dos padrões de biflavonóides e do ácido sirínico. Os cromatogramas e os seus respectivos espectros no UV obtidos por CLAE-DAD são mostrados na **Figura 72** (p. **97-98**).

**Tabela 10.** Tempo de retenção (Tr) e comprimento de onda ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) dos padrões de biflavonóides e o ácido sirínico analisados por CLAE-DAD

<b>Padrões</b>	<b>Tr. (min)</b>	<b><math>\lambda_{\text{máx.}}</math>(nm)</b>
<b>Agatisflavona</b>	5,697	223, 272, 334
<b>7''-metilagatisflavona</b>	10,369	220, 271, 334
<b>Amentoflavona</b>	8,595	268, 336
<b>Podocarpusflavona</b>	19,972	225, 268, 334
<b>Luxenchalcona</b>	30,393	240, 370
<b>Ácido sirínico</b>	3,289	285

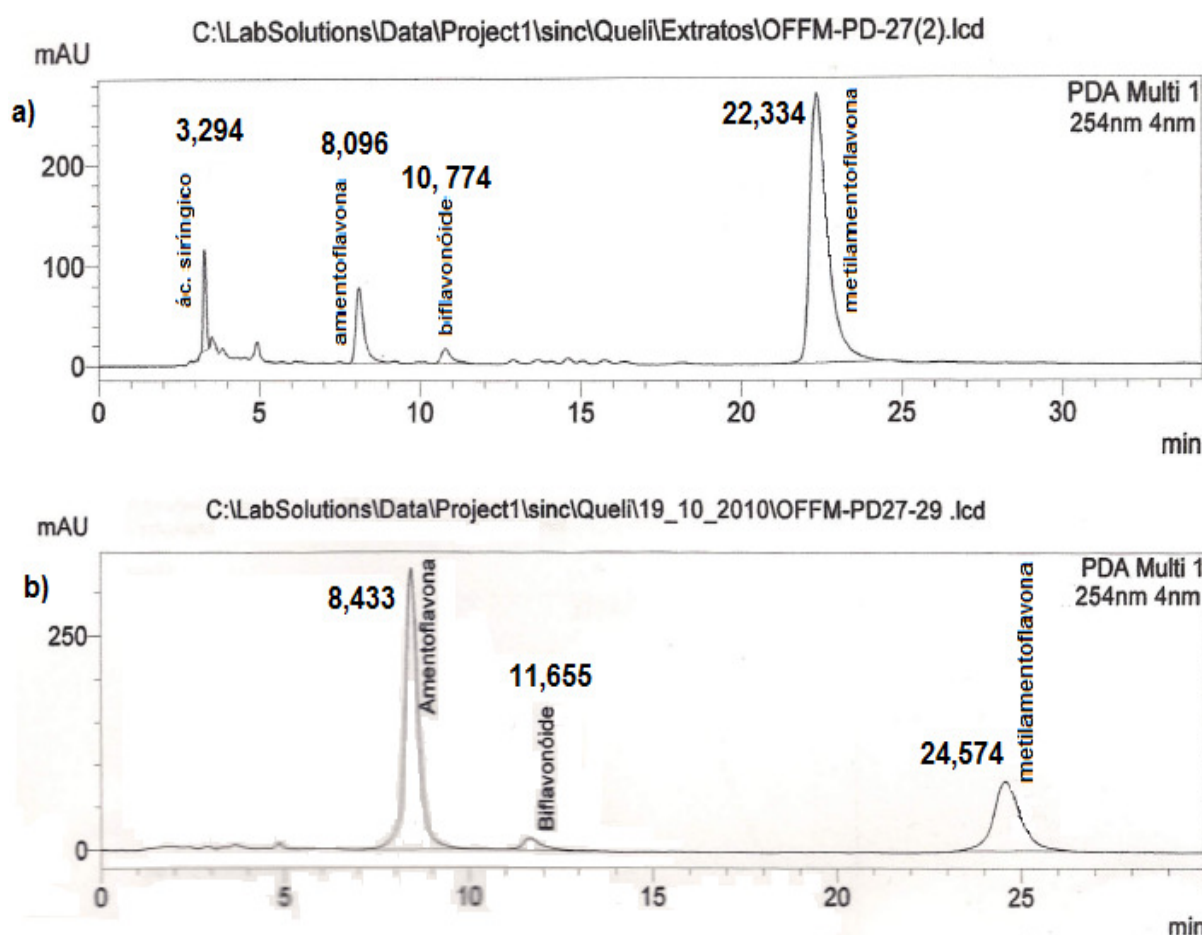




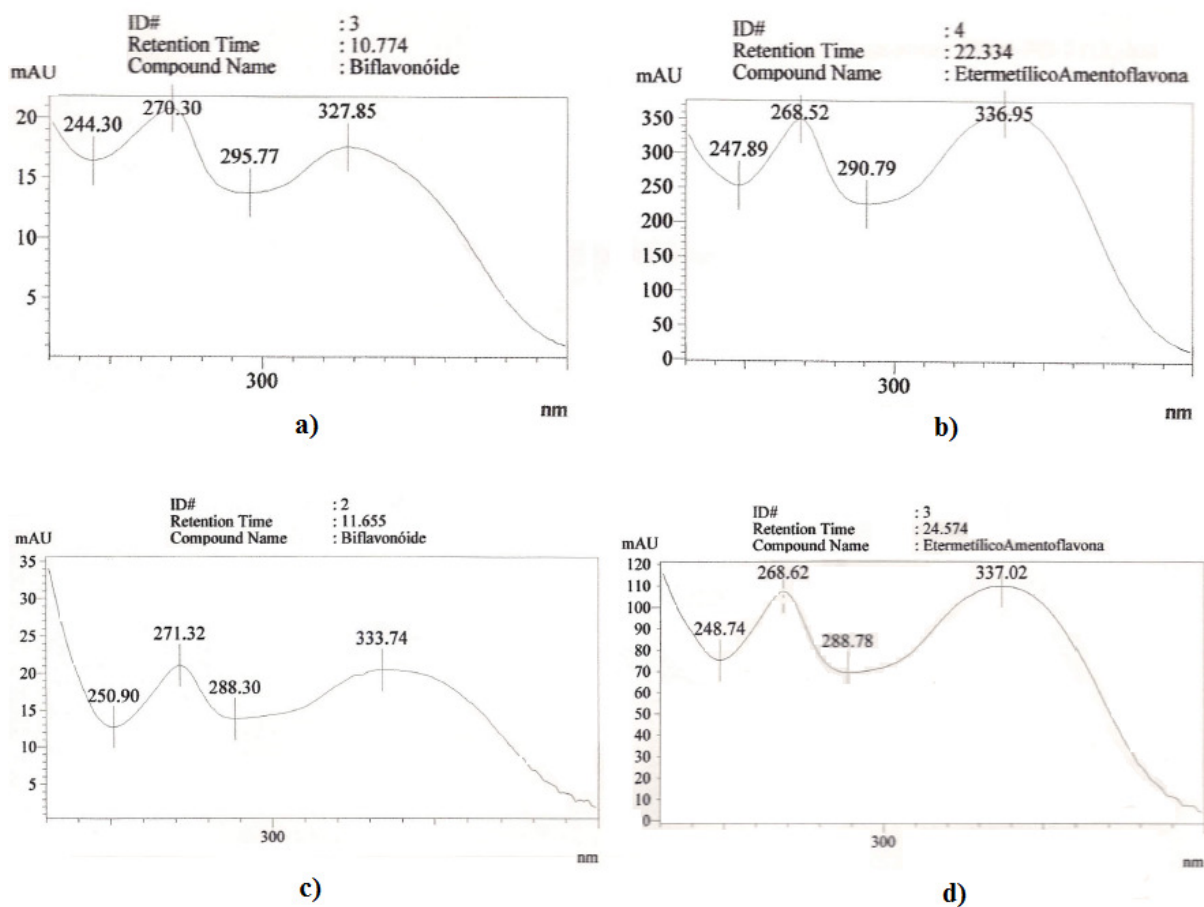
**Figura 72.** Cromatogramas e espectros no UV dos padrões Coluna; C-18 (250 mm x 4,6 mm x 5mm), Shimadzu, fase movel [68% (metanol/acetoneitrila 90:10) e 32% (H<sub>2</sub>O/ácido acético 99:01)]. a) agatisflavona, Tr: 5,697 b) 7''-metilagatisflavona, Tr: 10,369 c) amentoflavona, Tr: 8,595 d) podocarpusflavona, Tr: 19,972 e) luxenhalcona, Tr: 30,393 f) ácido siríngico, Tr: 3,289 min

### V.1.14.2. Perfil cromatográfico e espectros na região do UV das frações biflavonoídicas submetidos à CLAE-DAD em escala analítica

As frações analisadas apresentaram dois perfis principais: a fração OFFM-PD-26-27a mostrou-se como mistura contendo biflavonóides e ácido siríngico, e a fração OFFM-PD-27b-29 apresentou apenas biflavonóides como substâncias majoritárias. Na **Figura 73 (p. 99)** encontram-se os perfis cromatográficos dessas duas frações com os tempos de retenção de cada substância assinalada na mistura. Os compostos com tempo de retenção 10,77 e 11,65 minutos apresentam espectros na região do ultravioleta característico para biflavonóides, enquanto os compostos 22,33 e 24,57 minutos apresentam espectros semelhantes à um dos isômeros monometoxilados da amentoflavona **Figura 74 (p. 100)**.



**Figura 73.** Perfil cromatográfico obtidos por CLAE-DAD; a) OFFM-PD-26-27a, b) OFFM-PD-27b-29. Coluna C-18 (250 mm x 4,6 mm x 5mm, Shimadzu,), fase móvel: 68% de (metanol/acetoneitrila 90:10) e 32% de (H<sub>2</sub>O/ácido acético 99:01)

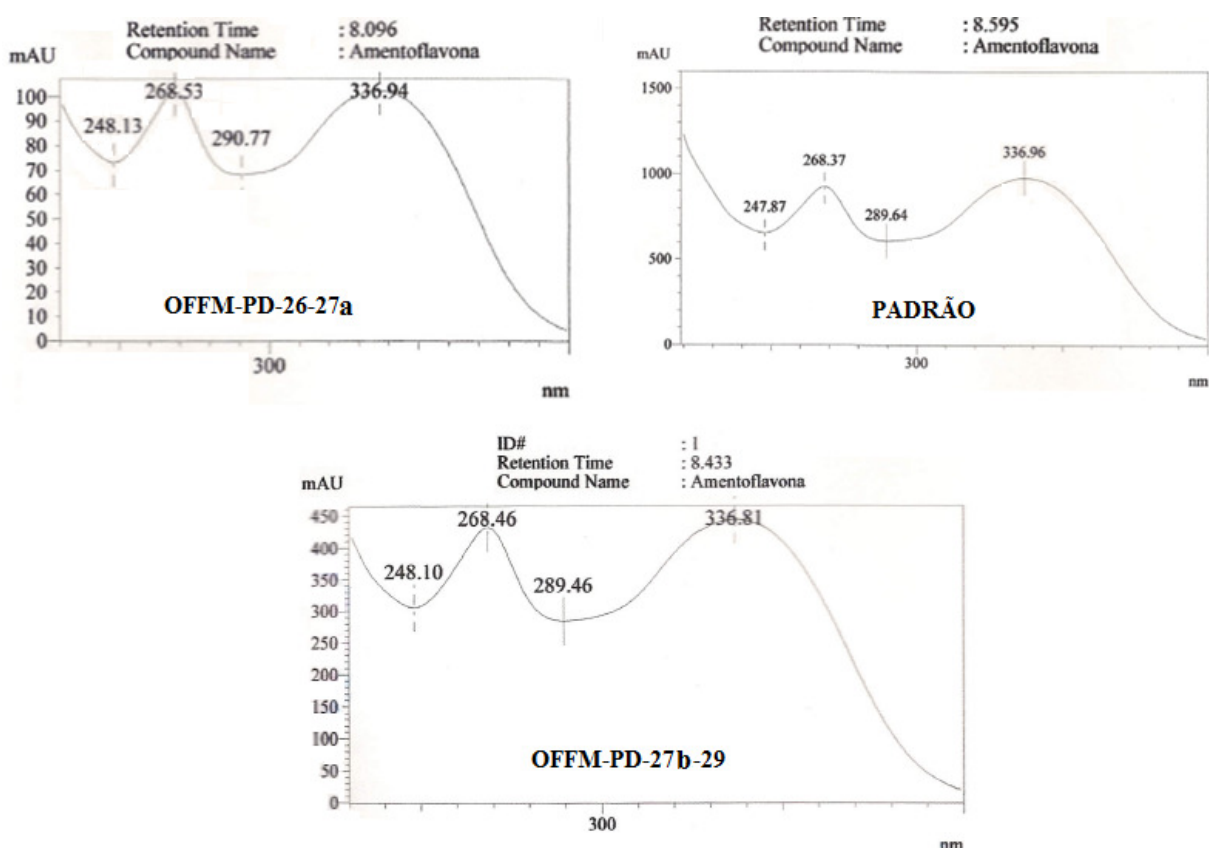


**Figura 74.** Espectro no UV obtido por CLAE das substâncias não identificadas; a) fração OFFM-PD-26-27a, pico 3, Tr = 10,774, Biflavonóide; b) fração OFFM-PD-26-27a, pico 4, Tr = 22,334, metilamentoflavona; c) fração OFFM-PD-27b-29, pico 2, Tr = 11,655, biflavonóide; d) fração OFFM-PD-27b-29, pico 3, Tr = 24,574, metilamentoflavona

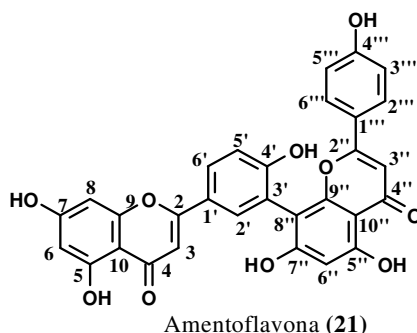


### V.1.14.3. Identificação da amentoflavona (21) utilizando CLAE-DAD analítico

A **Figura 75** (p. 101) apresenta os espectros na luz ultravioleta das substâncias com tempo de retenção de 8,096 minutos, presente na fração OFFM-PD-26-27a, e com tempo de retenção de 8,433 minutos, presente na fração OFFM-PD-27b-29, comparados ao espectro de ultravioleta do padrão de amentoflavona. A comparação dos espectros de UV obtidos por CLAE-DAD nas frações com o padrão mostraram máximos de absorção característicos da amentoflavona.



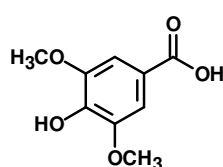
**Figura 75.** Comparação dos espectros no UV das substâncias com Tr=8,096 e 8,595 min com o padrão de amentoflavona obtidos por CLAE-DAD analítico



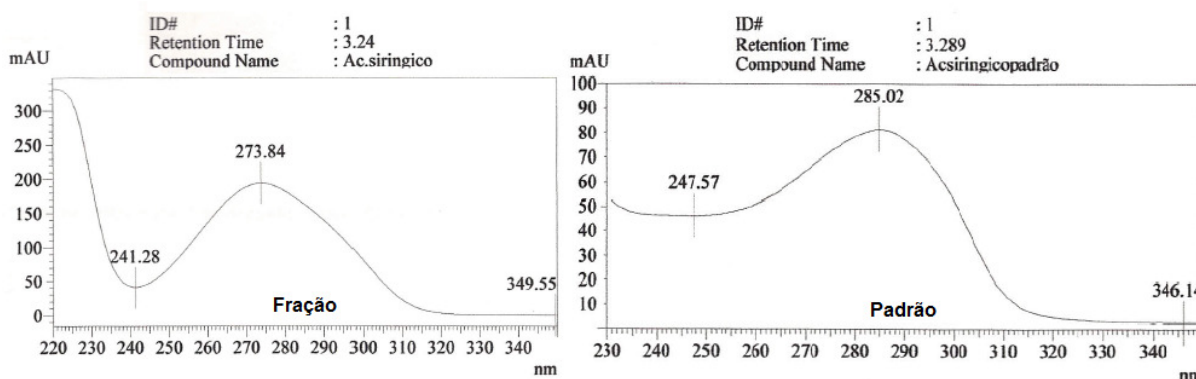


#### V.1.14.4. Identificação do ácido siríngico (22) utilizando CLAE-DAD analítico

A **Figura 76** (p. 102) apresenta o espectro na luz ultravioleta da substância com tempo de retenção de 3,24 minutos, presente na fração OFFM-PD-26-27a, comparado ao espectro de ultravioleta do padrão de ácido siríngico. A análise do espectro indica um máximo de absorção característico de derivados de ácidos benzóicos. O ácido siríngico foi o primeiro a ser comparado por apresentar o mesmo padrão de substituição do anel aromático presente em outros constituintes isoladas desta planta. O tempo de retenção e absorção registrada no espectro UV mostrou ser compatível com o padrão do ácido siríngico.



Ácido siríngico (22)

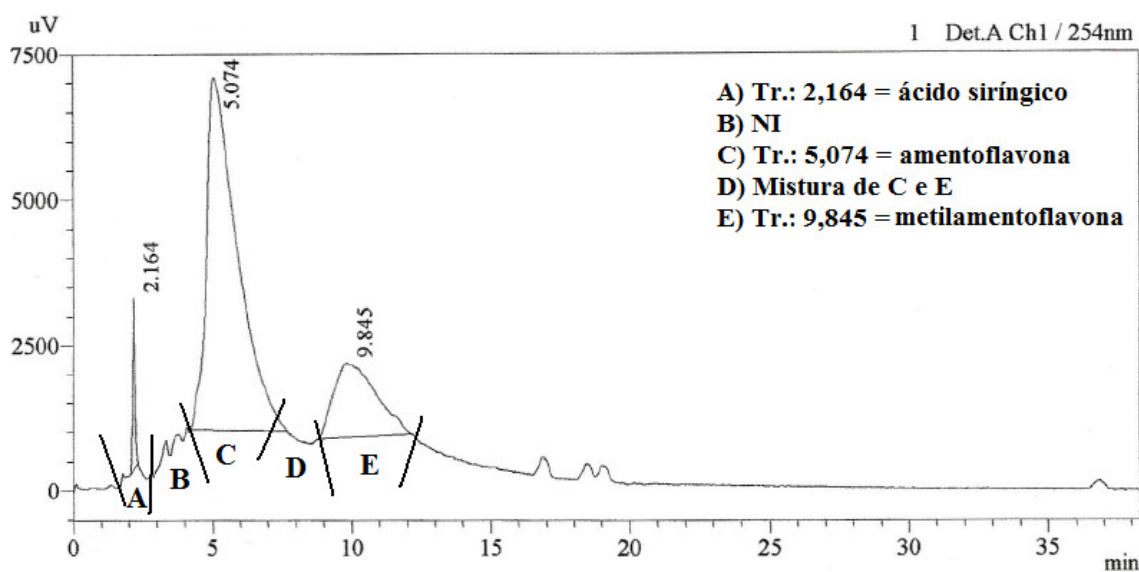


**Figura 76.** Comparação dos espectros no UV da substância com Tr=3,24 min da fração OFFM-PD-26-27a com o padrão de ácido siríngico obtidos por CLAE-DAD analítico

#### V. 1.14.5. Perfil cromatográfico da fração OFFM-PD-26-27a submetidas a CLAE -UV em escala semipreparativa

A análise do perfil cromatográfico por CLAE-DAD analítico da fração OFFM-PD-26-27a (**Figura 73a**, p. 99) permitiu identificar o ácido siríngico (Tr=3,24min) e a amentoflavona (Tr= 8,096min), mas as substâncias com tempos de retenção 10,774 e 22,334 min não puderam ser identificadas, por não serem compatíveis com nenhum dos padrões analisados, embora seus espectros na região do UV foram característicos de biflavonóides. Esta fração, por apresentar maior quantidade da substância com Tr=22,334 min, foi submetida à CLAE-UV em escala semipreparativa porque a cromatografia convencional não foi suficientemente

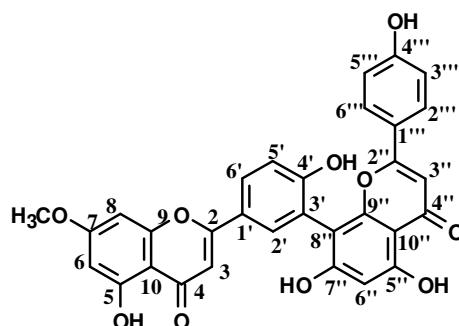
eficaz para separar substâncias com estruturas muito semelhantes. Algumas condições foram adaptadas por serem mais adequadas a técnica semipreparativa. A adição de ácido acético ou ácido fórmico à fase aquosa, que são frequentemente utilizados como modificadores de fase, deve-se ao fato destes ácidos suprimirem a ionização dos grupos acídicos quando presentes na amostra, diminuindo assim os tempos de retenção e influenciando na simetria dos picos (KARCH *et al.* 1976; BOSSO, 2003). No entanto, no fracionamento por CLAE semipreparativa o ácido acético não foi usado adicionando-o à fase aquosa, simplesmente para facilitar o isolamento da substância de interesse da fase móvel. A **Figura 77 (p. 103)** apresenta o perfil cromatográfico da fração. A separação cromatográfica resultou em cinco subfrações denominadas: **A** (Tr=2,164 min; 2 mg), **B** (2 mg), **C** (Tr= 5,074 min; 7 mg), **D** (1 mg) e **E** (Tr=9,845min.; 3 mg).



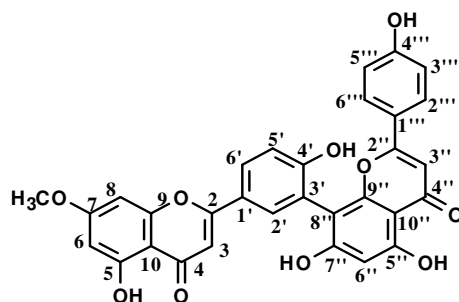
**Figura 77.** Perfil cromatográfico da fração OFFM-PD-26-27a obtido por CLAE-UV semipreparativa com a representação das partes coletadas correspondentes às subfrações A, B, C, D e E. (NI = não identificado)

### V.1.15. Identificação da 7-metilamentoflavona (23)

A subfração **E** obtida através da técnica de CLAE-semipreparativo foi submetida a experimentos de RMN  $^1\text{H}$  e NOEDIFF para confirmar o esqueleto de biflavonóide e a posição da metila. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 78, p. 106**) apresentou um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  13,22(s) de duas hidroxilas queladas. Na região de hidrogênios em anel aromáticos foi observado os sinais: em  $\delta_{\text{H}}$  8,44 (*d*,  $J= 2,5$  Hz, H-2'); 7,82 (*dd*,  $J= 2,5$  e 8,5 Hz, H-6') e 6,89 (*d*,  $J= 8,8$  Hz, H-5') compatíveis com um sistema ABC de um anel B de um flavonóide com substituintes nas posições 3',4';  $\delta_{\text{H}}$  em 7,79 (*d*,  $J= 9,1$  Hz, H-2''' e 6'''); 6,66 (*d*,  $J= 9,1$  Hz, H-3''' e 5''') característico de um anel *para* substituído,  $\delta_{\text{H}}$  6,37 (*d*,  $J= 2,2$  Hz, H-8), 6,23 (*d*,  $J= 2,2$  Hz, H-6) indicando um sistema de hidrogênios em anel aromático com acoplamento *meta*; e  $\delta_{\text{H}}$  6,67 (*s*, H-3''); 6,53 (*s*, H-3), 6,08 (*s*, H-6''). O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,79 é compatível com uma metoxila ligada ao anel aromático. Os valores obtidos no espectro RMN  $^1\text{H}$  confirma a proposta sugerida anteriormente para o derivado monometoxilado da amentoflavona, que também está de acordo com a massa igual a 552 para a substância **23** obtida através da análise em CL-EM-ESI, que forneceu o valor do íon quase molecular  $m/z=551,1015$  ( $\text{M}^+-\text{H}$ ). Para determinar a posição da metila, foi utilizado o experimento NOEDIFF (**Figura 79, p. 107**). O espectro obtido com irradiação na frequência da metoxila ( $\delta_{\text{H}}$  3,79) apresentou sinais de NOE em  $\delta_{\text{H}}$  6,28 e 6,49 correspondentes, respectivamente, aos H-6 e H-8. Estas informações e comparação dos dados de RMN com valores da literatura (MARKHAM *et al*, 1990) chegou-se à estrutura da 7-metilamentoflavona. Esta substância também é conhecida pelo nome de sequoiaflavona já isolada nas famílias Selaginellaceae e Taxaceae, mas esse é a primeira vez que ela é isolada em Ochnaceae.



7-metilamentoflavona (23)

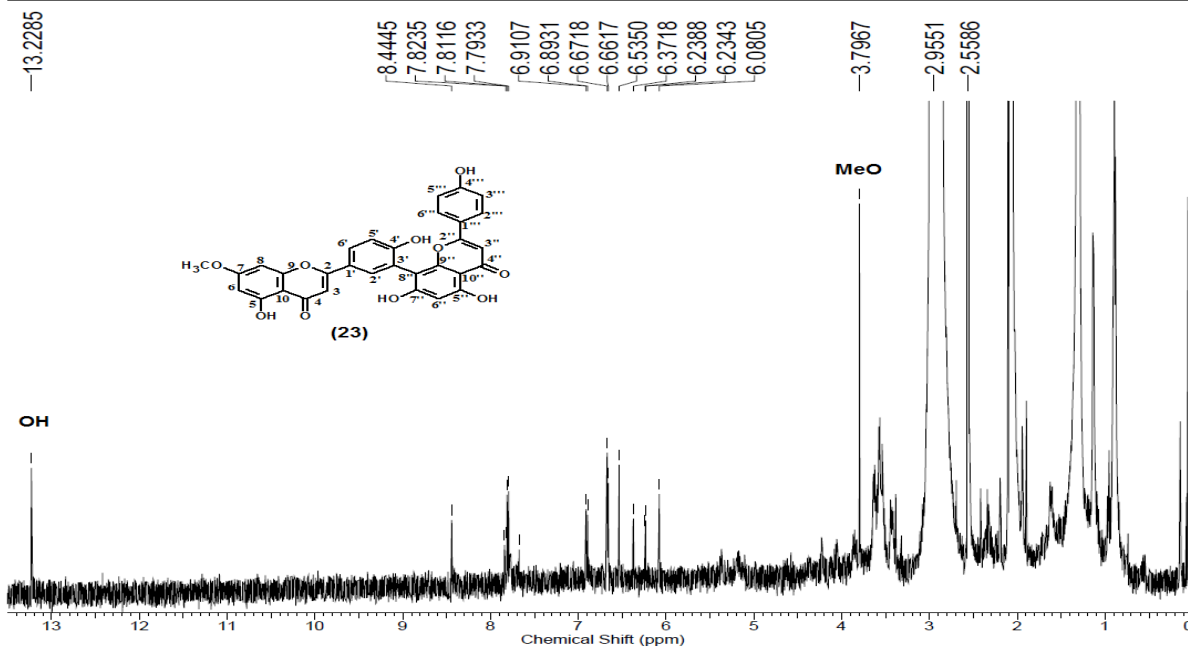


7-metilamentoflavona (23)

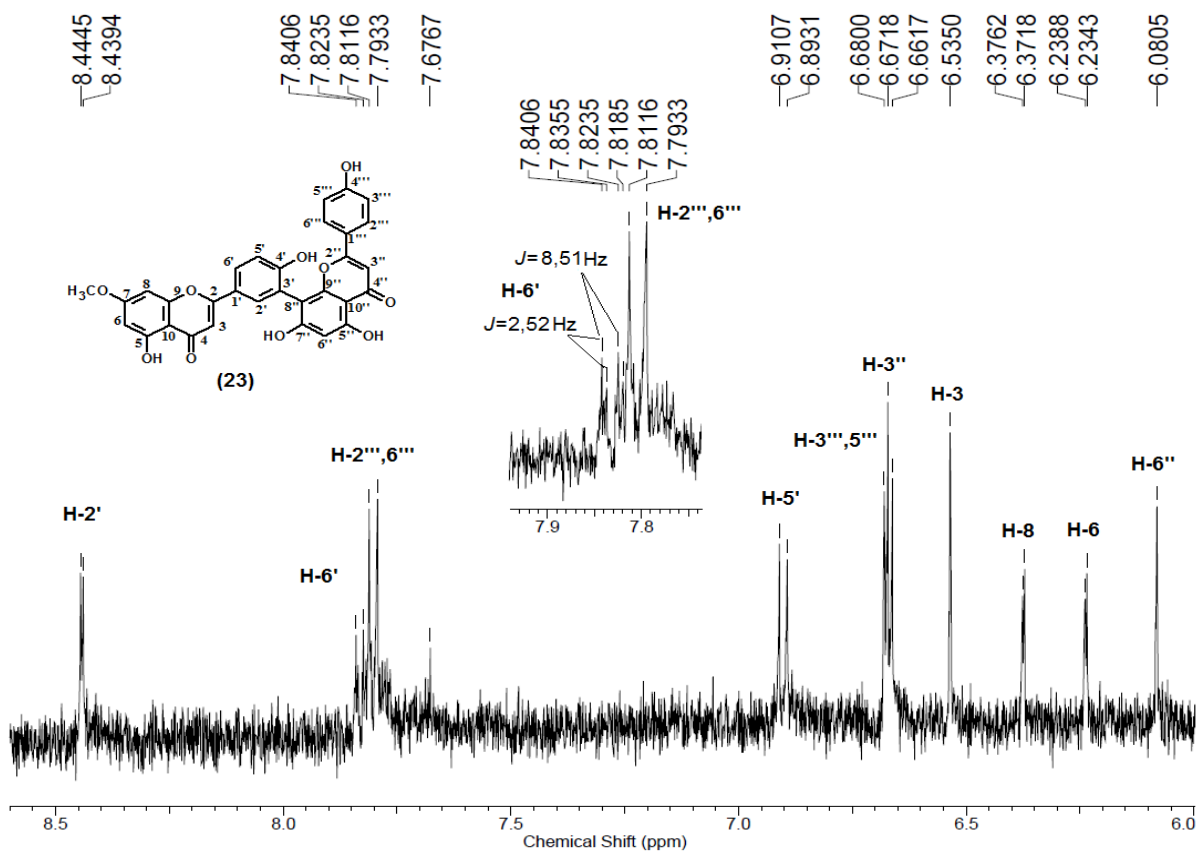
**Tabela 11.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  de **23** (500 MHz) em comparação com valores da literatura (MARKHAM *et al*, 1990)

	Substância 23 (Acetona- $d_6$ )	Substância 23 (DMSO- $d_6$ )	Sequoiaflavona (DMSO- $d_6$ )
<b>C</b>	$\delta_{\text{H}}$ (mult. $J$ =Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (mult. $J$ =Hz)	$\delta_{\text{H}}$ (mult. $J$ =Hz)
<b>2</b>	-	-	-
<b>3</b>	6,53( <i>s</i> )	6,78( <i>sl</i> )	6,78( <i>s</i> )
<b>4</b>	-	-	-
<b>5</b>	-	-	-
<b>6</b>	6,23( <i>d</i> , 2,2 Hz)	6,44( <i>sl</i> )	6,35( <i>d</i> , 2,1 Hz)
<b>7</b>	-	-	-
<b>8</b>	6,37( <i>d</i> , 2,2 Hz)	6,67( <i>sl</i> )	6,73( <i>d</i> , 2,1 Hz)
<b>9</b>	-	-	-
<b>10</b>	-	-	-
<b>1'</b>	-	-	-
<b>2'</b>	8,44( <i>d</i> , 2,5 Hz)	8,37( <i>sl</i> )	8,11( <i>d</i> , 2,0 Hz)
<b>3'</b>	-	-	-
<b>4'</b>	-	-	-
<b>5'</b>	6,89( <i>d</i> , 8,8 Hz)	6,82( <i>m</i> )	7,09( <i>d</i> , 8,6 Hz)
<b>6'</b>	7,82( <i>d</i> , 8,5 e 2,5 Hz)	7,90( <i>m</i> ; 8,6;- Hz)	8,01( <i>dd</i> , 8,6 e 2,0 Hz)
<b>2''</b>	-	-	-
<b>3''</b>	6,67( <i>s</i> )	6,81( <i>s</i> )	6,90( <i>s</i> )
<b>4''</b>	-	-	-
<b>5''</b>	-	-	-
<b>6''</b>	6,08( <i>s</i> )	6,31( <i>s</i> )	6,31( <i>s</i> )
<b>7''</b>	-	-	-
<b>8''</b>	-	-	-
<b>9''</b>	-	-	-
<b>10''</b>	-	-	-
<b>1'''</b>	-	-	-
<b>2'''/6'''</b>	7,79( <i>d</i> , 9,1 Hz)	7,69( <i>d</i> , 8,6 Hz)	7,59( <i>d</i> , 8,8 Hz)
<b>3'''/5'''</b>	6,66( <i>d</i> , 9,1 Hz)	6,49( <i>m</i> , 9,0 Hz)	6,68( <i>d</i> , 8,8 Hz)
<b>5-OH</b>	13,22( <i>s</i> )	13,24( <i>s</i> )	13,11( <i>s</i> )
<b>5'''-OH</b>	-	13,12( <i>s</i> )	12,99( <i>s</i> )
<b>7''-OH</b>	-	-	10,28( <i>s</i> )
<b>7-OMe</b>	3,79( <i>s</i> )	-	3,81( <i>s</i> )

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: OFF - MeOH (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: ACETONA-D	
Date	09 Nov 2010 20:28:32	Nucleus	1H	File Name
Frequency (MHz)	500.13	Points Count	32768	Number of Transients
Original Points Count	32768	Sweep Width (Hz)	10330.58	Pulse Sequence
Solvent	Acetone			Temperature (degree C)

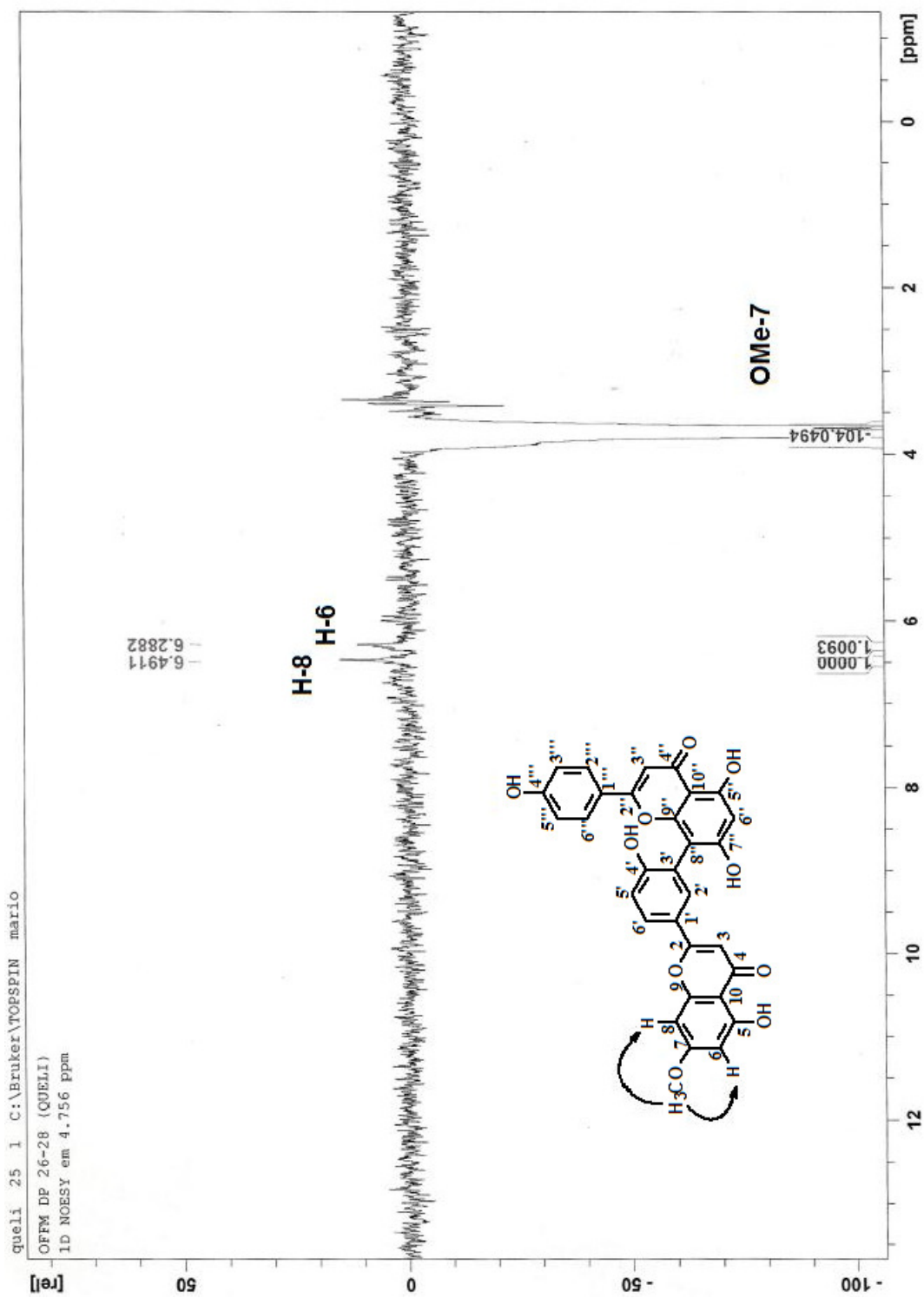


(a)



(b)

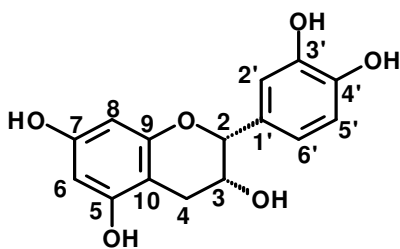
**Figura 78.** a) Espectro de RMN  $^1\text{H}$  b) expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, Acetona- $\text{d}_6$ ) da substância **23**



**Figura 79.** Espectro de RMN-NOEDIFF (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) da substância **23**

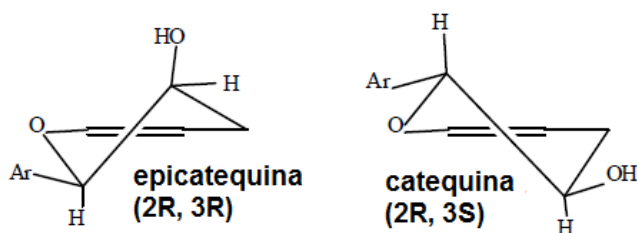
#### V.1.16. Identificação da substância 24

A substância **24** foi obtida como um material amorfo, de coloração castanha e solúvel em solventes polares. A análise desse material por experimento de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 80 e 81, p. 110**) permitiu verificar: os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  2,46 (d,  $J = 3,2$  Hz; H-4b) e  $\delta_{\text{H}}$  2,69 (dd,  $J = 4,2$  e  $16,3$  Hz, H-4a) característicos de hidrogênios diastereotópicos de  $\text{CH}_2$ ; sinais em  $\delta_{\text{H}}$  4,00 (sl, H-3) e 4,68 (dl,  $3,7$  Hz, H-2) de hidrogênios carbinólicos;  $\delta_{\text{H}}$  5,72 (d,  $2,2$  Hz, H-6) e 5,89 (d,  $2,5$  Hz, H-8) de hidrogênios de sistema aromáticos do anel A de flavonóide 5,7-dissubstituído; sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,65 (sl), 6,66 (sl) e 6,89 (sl) atribuídos ao H-2', H-5' e H-6', respectivamente, ligados ao anel B de flavonóide 3',4'-dissubstituído; sinais em  $\delta_{\text{H}}$  8,93 e 9,14 ppm de hidroxila fenólica. As atribuições dos dados do espectro de RMN  $^1\text{H}$  e comparação com dados da literatura (HARBORNE & MABRY, 1982; HARBORNE, 1994) permitiram identificar a substância como sendo a epicatequina devido a ausência de  $J$  típico de correlação ax/ax com  $J = 8$  Hz. Na epicatequina temos os grupos Ar/OH em *cis* de forma que os valores de  $J$  são pequenos, como os da substância **24**. Como informação adicional obteve-se o espectro 2D de correlação homonuclear ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY) da substância **24** (**Figura 82, p. 111**). Este experimento revelou acoplamentos dos hidrogênios: H-6'/H-2'; H-6'/H-2; H-8/H-6; H-2/H-3; H-4a/H-3; H-4b/H-3 e H-4a/H-4b. Para complementar a determinação estrutura desta substância realizou-se a análise por dicroísmo circular e comparação com os padrões de (+) catequina e (+) epicatequina (**Figuras 83 e 84, p. 112; 85 e 86, p. 113**). A configuração relativa de **24** é semelhante a epicatequina com  $J_{\text{H-2/H-3}} \sim 3,4$  Hz, acoplamento ax/eq; diferente da catequina que tem  $J_{\text{H-2/H-3}} \sim 7,4$  Hz, acoplamento ax/ax. O padrão de epicatequina apresenta efeito Cotton em:  $\lambda_{280}$ : (+);  $\lambda_{239}$ : (-);  $\lambda_{218-210}$ : (+); e **24** apresenta em:  $\lambda_{275}$ : (-);  $\lambda_{242}$ : (+);  $\lambda_{233-213}$ : (-). Portanto, sendo este padrão 2*S*,3*S*; a substância **24** deve ser o enantiômero 2*R*,3*R* da epicatequina. Para confirmar a estrutura de **24** foi preparada o derivado acetilado através da reação com anidrido acético e piridina, e obteve-se o produto **24a**, discutido a seguir (**V.1.17**). O conjunto desses dados justificam a proposta da (2*R*,3*R*)-5,7,3',4'-pentaidroxi-flavana para **24**



epicatequina 24

**Tabela 12.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e COSY  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) da substância **24** em comparação com a literatura (HARBORNE & MABRY, 1982; HARBORNE, 1994)



C	Substância 24 (DMSO- $d_6$ )		Epicatequina (DMSO- $d_6$ )	Catequina (DMSO- $d_6$ )
	$^1\text{H}$ $\delta_{\text{H}}$ (mult. $J$ =Hz)	COSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$	$^1\text{H}$ $\delta_{\text{H}}$ (mult. $J$ =Hz)	$^1\text{H}$ $\delta_{\text{H}}$ (mult. $J$ =Hz)
2	4,68 ( <i>d</i> ; 3,76 Hz)	H-3, H-6'	ax; 4,74 ( <i>d</i> ; -)	ax; 4,49 ( <i>d</i> ; 7,4)
3	4,00 ( <i>sl</i> )	H-2 e H-4a	eq; 4,01 ( <i>ddd</i> ; -)	ax, 3,83 ( <i>ddd</i> ; -; $J_{\text{a,a}}=7,4$ ; -)
4a	2,69 ( <i>dd</i> ; 4,2; 16,3 Hz)	H-4b e H-3	2,79 ( <i>dd</i> ; 4,2; 16,3)	2,67 ( <i>dd</i> ; 5,4; 16,0)
4b	2,46 ( <i>d</i> ; 3,2 Hz)	H-4a e H-3	2,48 ( <i>dd</i> ; 3,3; 16,3)	2,36 ( <i>dd</i> ; 8,0; 16,0)
5	-	-	-	-
6	5,72 ( <i>d</i> ; 2,2 Hz)	H-8	5,72 ( <i>d</i> ; 1,7)	5,70 ( <i>d</i> ; 2,1)
7	-	-	-	-
8	5,89 ( <i>d</i> ; 2,5 Hz)	-	5,89 ( <i>d</i> ; 1,7)	5,90 ( <i>d</i> ; 2,1)
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
1'	-	-	-	-
2'	6,65 ( <i>sl</i> )	H-6'	6,90 ( <i>s</i> ;)	6,73 ( <i>d</i> ; 1,7)
3'	-	-	-	-
4'	-	-	-	-
5'	6,66 ( <i>sl</i> )	-	6,66 ( <i>d</i> ; 8,7)	6,70 ( <i>d</i> ; 8,1)
6'	6,89 ( <i>sl</i> )	-	6,66 ( <i>dd</i> ; -; 8,7)	6,60 ( <i>dd</i> ; -; -)



Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: OFFM-PA-SG-10-11 F:6-9 SPH 15-19 (PROTON)	
Date	05 Oct 2010 19:00:46			
File Name	C:\Users\QUELI CRISTINA\Documents\O. ferruginea\QUELI 30_ 080001r			
Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	1H	Number of Transients
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence
Solvent	DMSO-D6	Sweep Width (Hz)	8223.68	Temperature (degree C)
				27.000

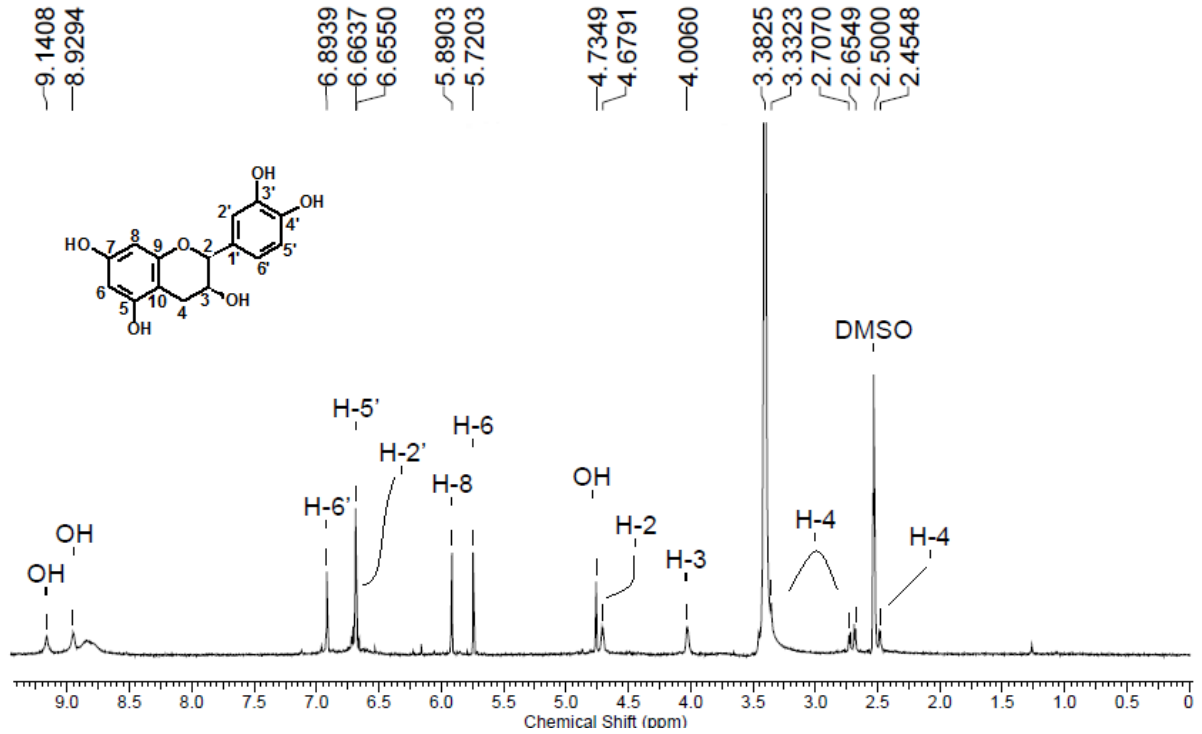


Figura 80. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) da substância **24**

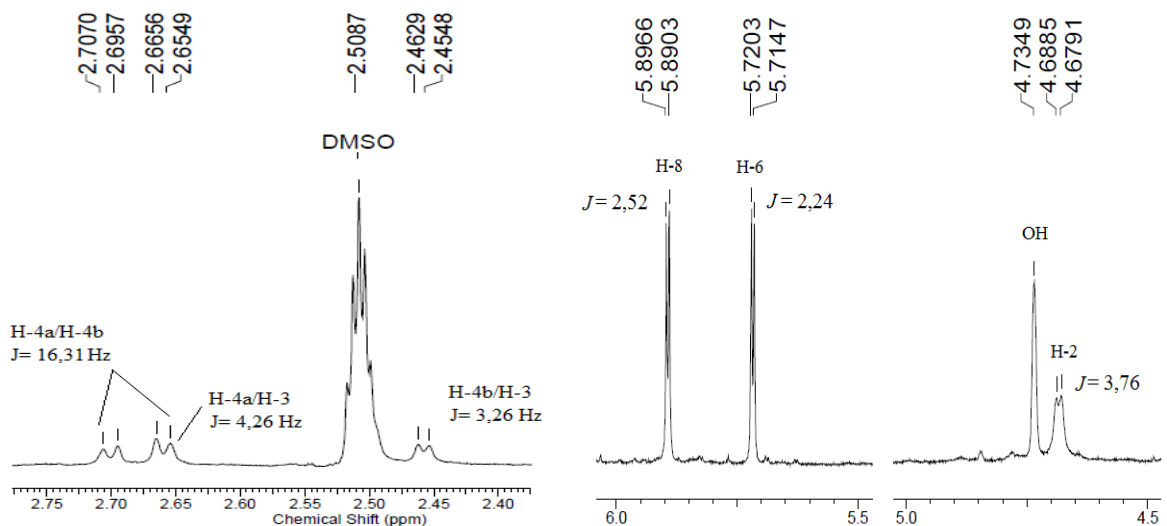


Figura 81. Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **24**

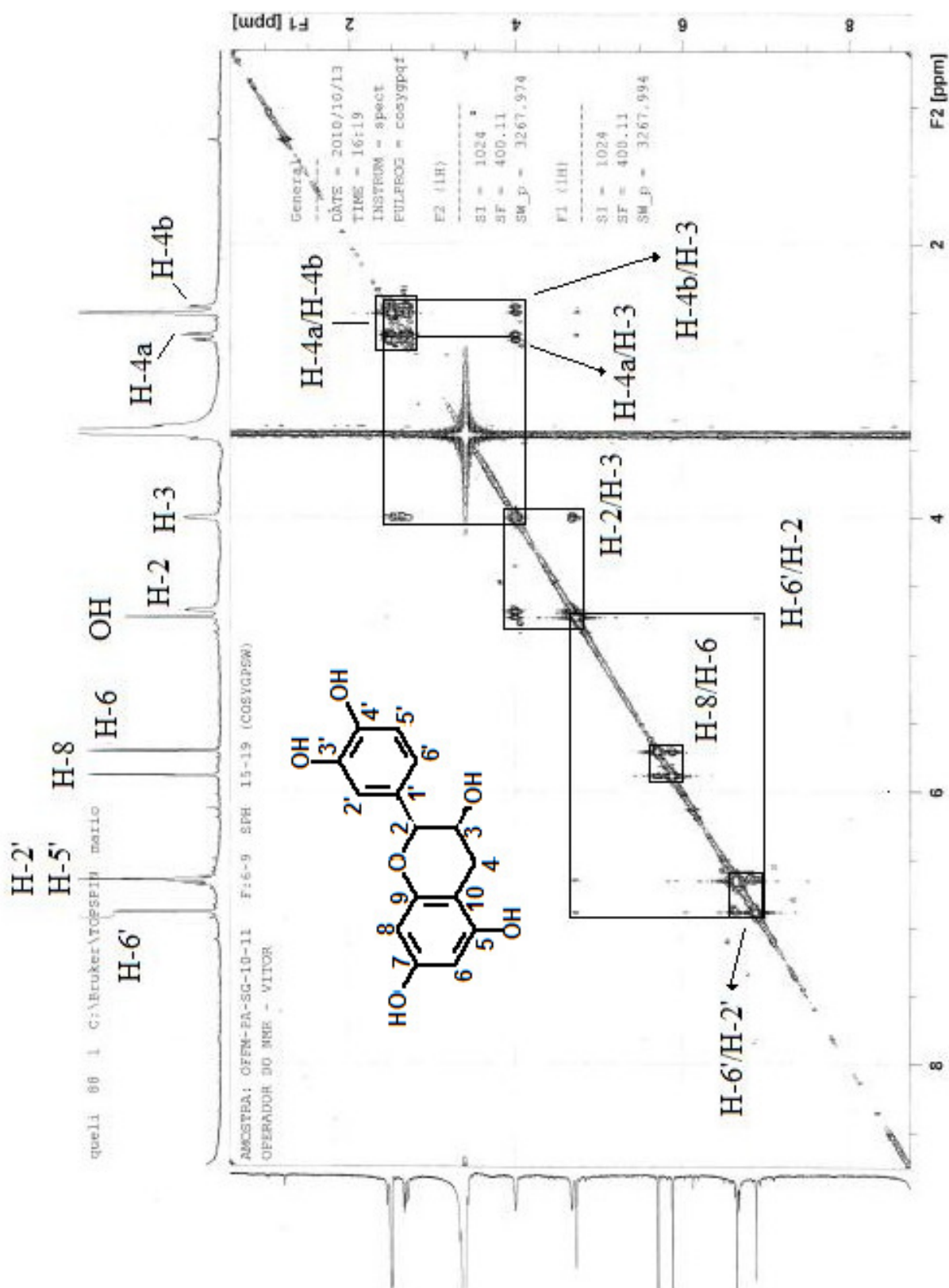
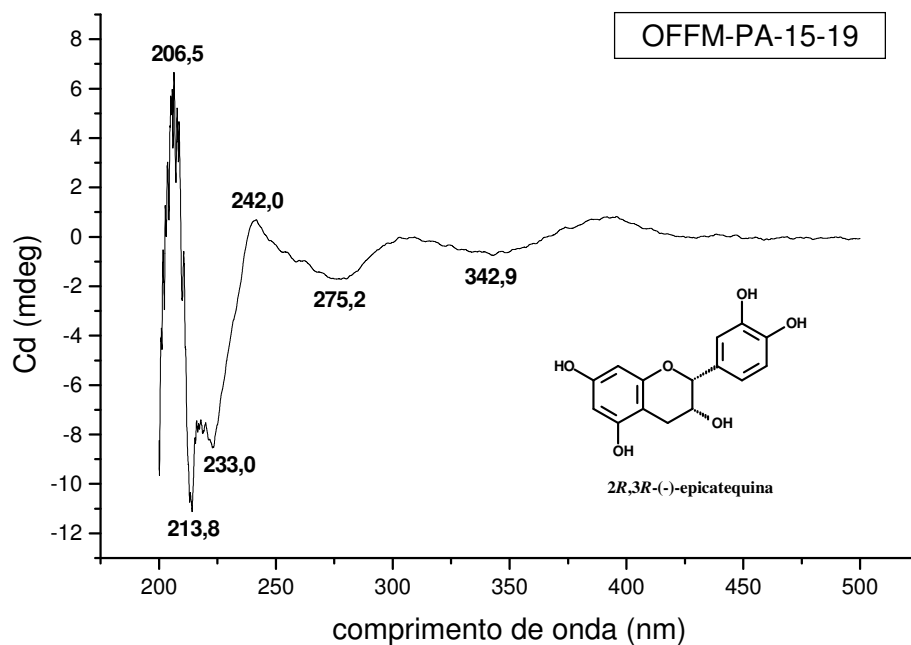
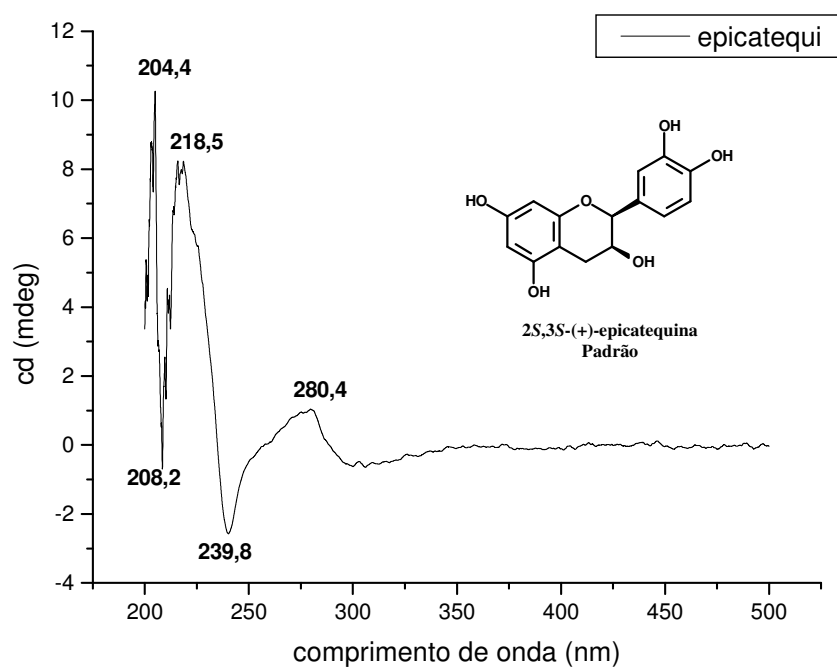


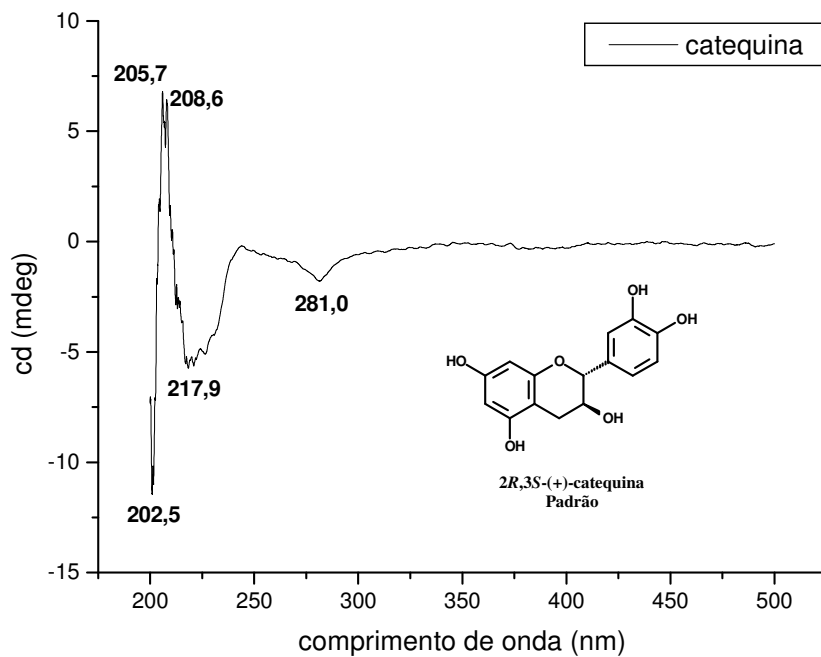
Figura 82. Espectro de RMN 2D,  $^1\text{H}\times^1\text{H}$  COSY (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) da substância 24



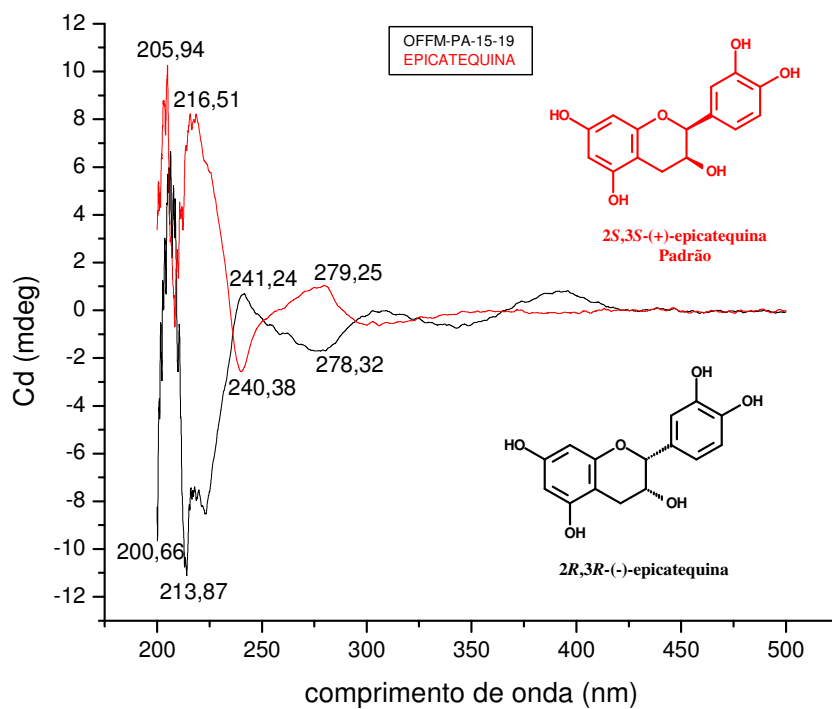
**Figura 83.** Espectro de DC da substância 24



**Figura 84.** Espectro de DC da 2S,3S-(+)-epicatequina-padrão



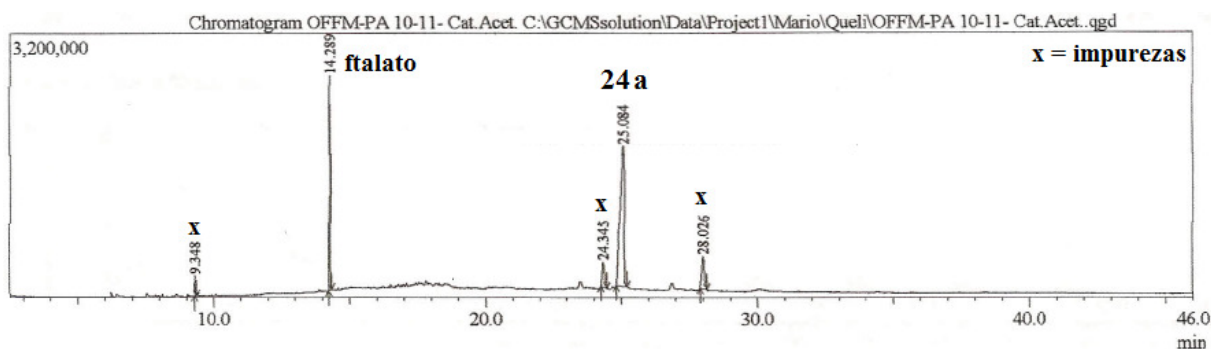
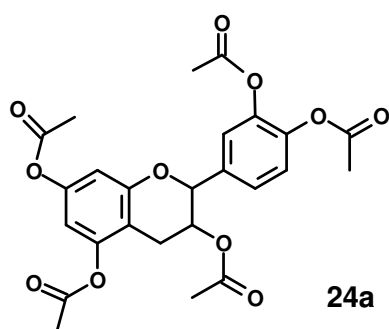
**Figura 85.** Espectro de DC do padrão catequina-padrão



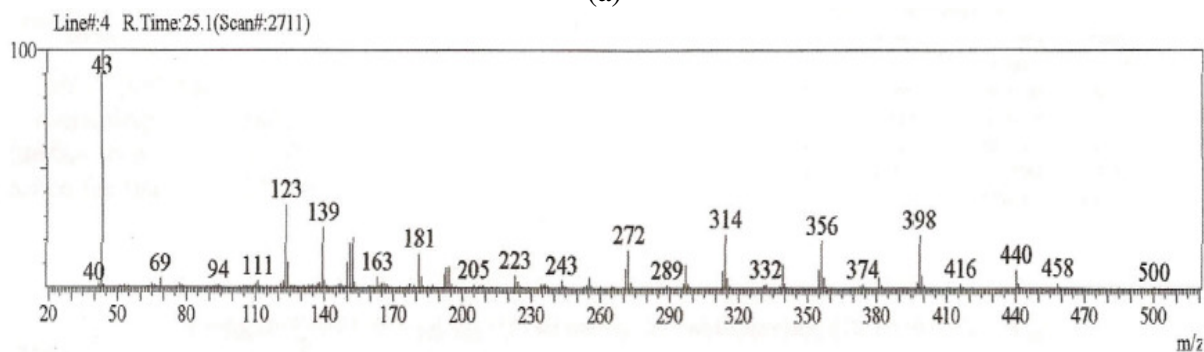
**Figura 86.** Espectro de DC de OFFM-PA-15-19 e 2S,3S-(+)-epicatequina-padrão

### V.1.17. Identificação do derivado acetilado da epicatequina (24a)

A substância **24** foi derivatizada por reação de acetilação com piridina e anidrido acético. A análise em CG-EM (**Figura 87, p. 114**) mostrou como produto majoritário, apesar de algumas impurezas, o derivado pentacetilado da substância **24**. O espectro de massas apresentou padrão de fragmentação compatível para o produto devido a fragmentações envolvendo unidades acetoxílicas. O **Esquema 12 (p. 115)** mostra as propostas de fragmentações que justificam os primeiros picos detectados no espectro de massas do produto contendo cinco unidades de acetila.

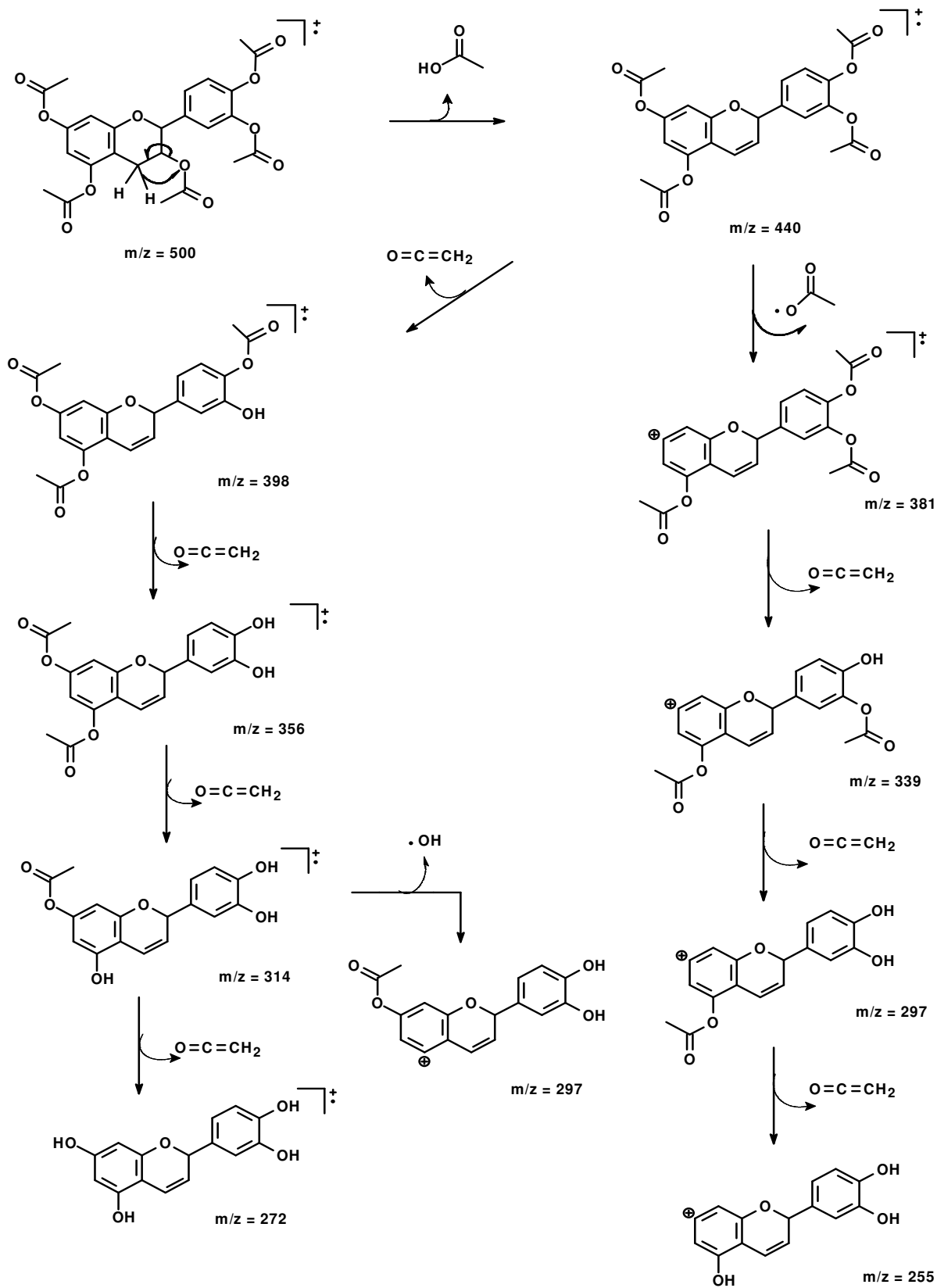


(a)



(b)

**Figura 87.** a) Cromatograma (CG) de substância **24a**; b) espectro de massas do produto **24a**

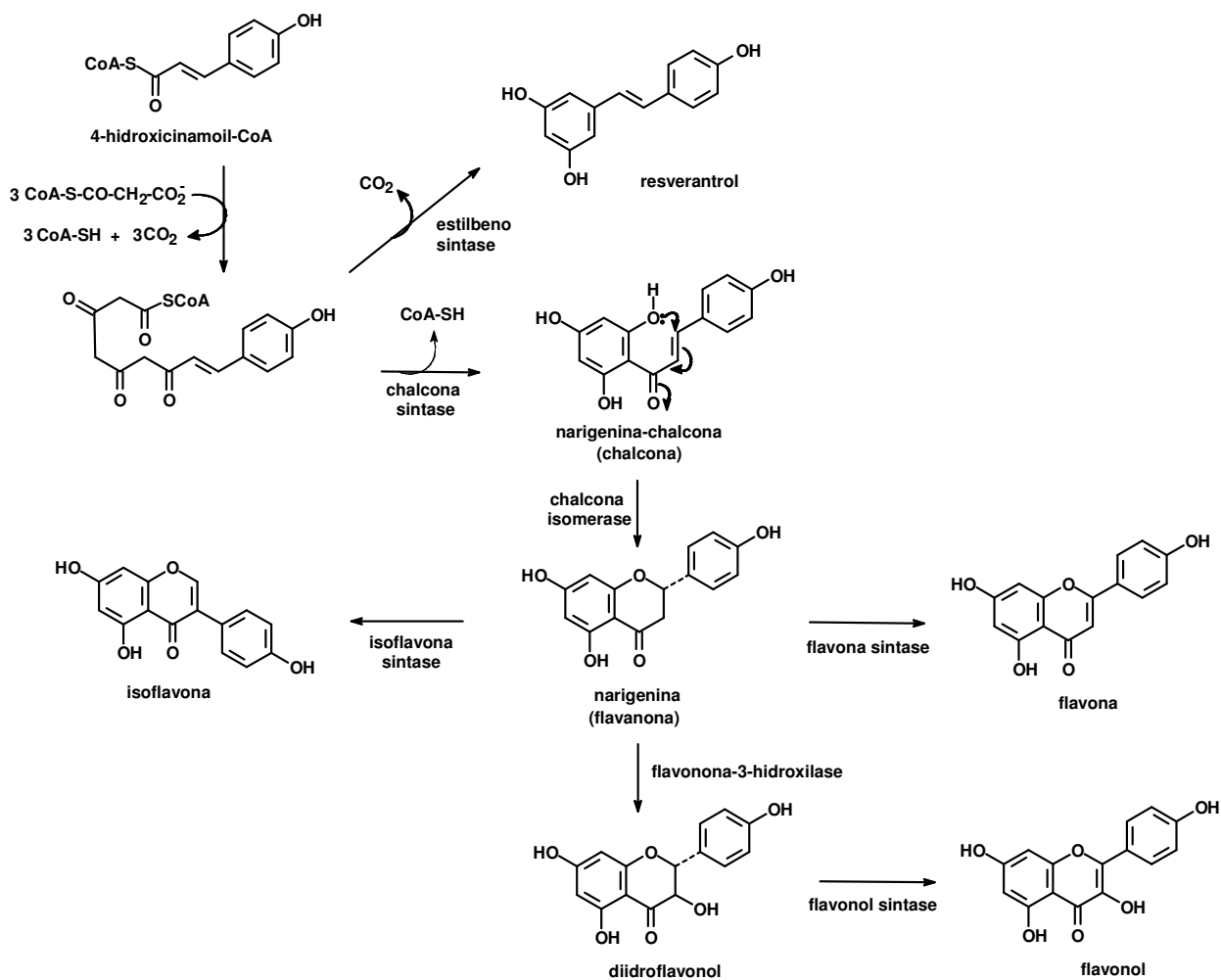


**Esquema 12.** Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro do componente com Tr 25,1 min (substância **24**)

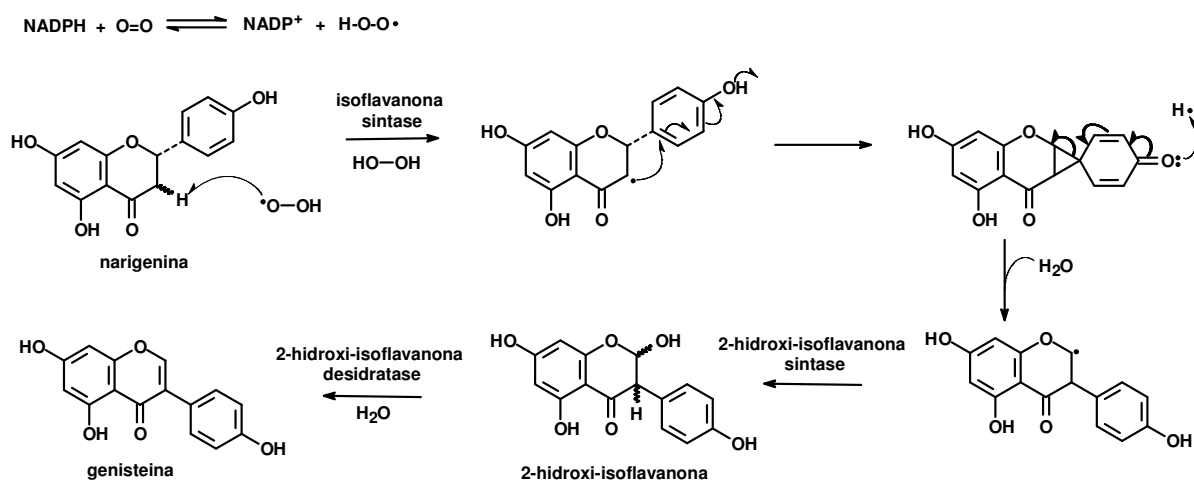
## V.2. Proposta biossintética para as isoflavonas e biflavonóides

Os flavonóides derivam-se da via do chiquimato e da via acetato. Sua biossíntese procede via condensação de uma unidade de *p*-cumaroil-CoA e de três unidades de malonil-CoA, produzindo estilbeno (resveratrol) ou chalconas (narigenina). A formação de estilbeno ou chalcona depende da natureza da enzima que catalisa a reação, estilbeno sintase ou chalcona sintase, respectivamente. Outra enzima, chalcona isomerase, promove a ciclização da chalcona, originando o anel C, heterocíclico, formando um flavonoide. A partir desse flavonoide, podem ocorrer outras modificações produzindo, dessa forma, outros representantes da variedade estrutural desta classe de metabólitos (**Esquema 13, p. 117**). Esses constituintes estruturais podem, inclusive, sofrer hidroxilações, metilações, isoprenilações ou glicosilações. As isoflavonas constituem uma subclasse que apresenta o anel aromático B migrado para o carbono adjacente à carbonila do heterociclo (C-3). Esse rearranjo é induzido por enzimas da família citocromo P-450, na presença dos cofatores NADPH e O<sub>2</sub>. O mecanismo é via radicalar, tendo como substrato flavanonas como liquiritigenina ou narigenina, para formar respectivamente as isoflavonas daidzeina e genisteina (**Esquema 14, p. 117**), além da formação de hidroxí-isoflavanonas intermediárias (DEWICK *et al.*, 1997). As isoflavonas isoladas na espécie *O. ferruginea* apresentam padrão de oxigenação nas posições 3' e 5', seguida de metilações que podem ocorrer nas posições 7, 3', 4' e 5' (**Esquema 15, p. 118**). Essas modificações são promovidas por enzimas do grupo das oxigenase, subgrupo das hidroxilases na presença de NADPH e O<sub>2</sub>, e as enzimas do subgrupo das metil-transferases, na presença de SAM, S-adenosilmetionina (**Esquema 16, p. 118**).

Os biflavonóides constituem um grupo de flavonóides, diferenciando-se de outros oligômeros como as proantocianidinas, devido à origem biogenética das unidades constituintes. A maioria dos representantes dessa classe de produtos naturais é formada pelos dímeros flavona-flavona, flavona-flavanona, flavanona-flavanona além de ocorrerem, mais raramente, os dímeros de chalconas e de isoflavonas. Quando as duas unidades são iguais, constituem os bisflavonóides e quando as duas unidades são diferentes, os biflavonóides (SUZART *et al.*, 2007). O entendimento da biossíntese das diferentes classes de metabólitos facilita a determinação estrutural (**Esquema 17, p. 119**). No caso de flavonóides, o padrão de oxidação e a forma de ligação entre as unidades contribuem na dedução dos sistemas de núcleos constituintes com base em dados espectrométricos. Isso facilita, inclusive, propor inicialmente a fórmula molecular incorporando os substituintes no esqueleto básico proposto.

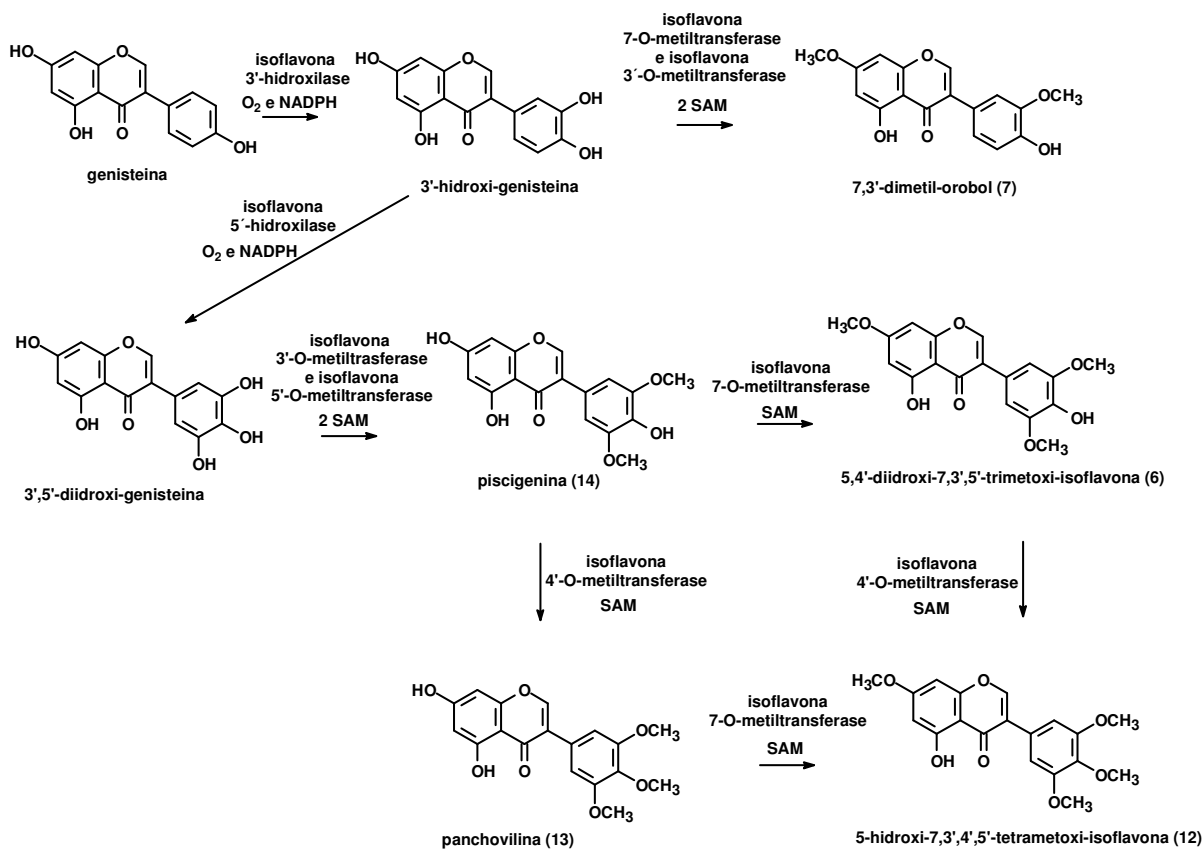


**Esquema 13.** Proposta da via biossintética de flavonóides (Dewick, 1997)

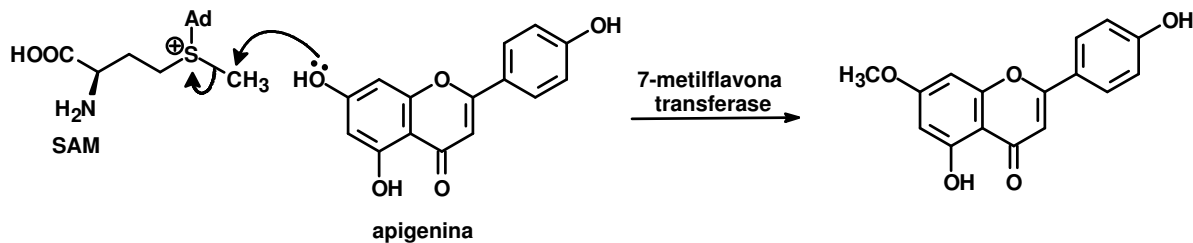


**Esquema 14.** Proposta da via biossintética de isoflavonóides (Dewick, 1997)

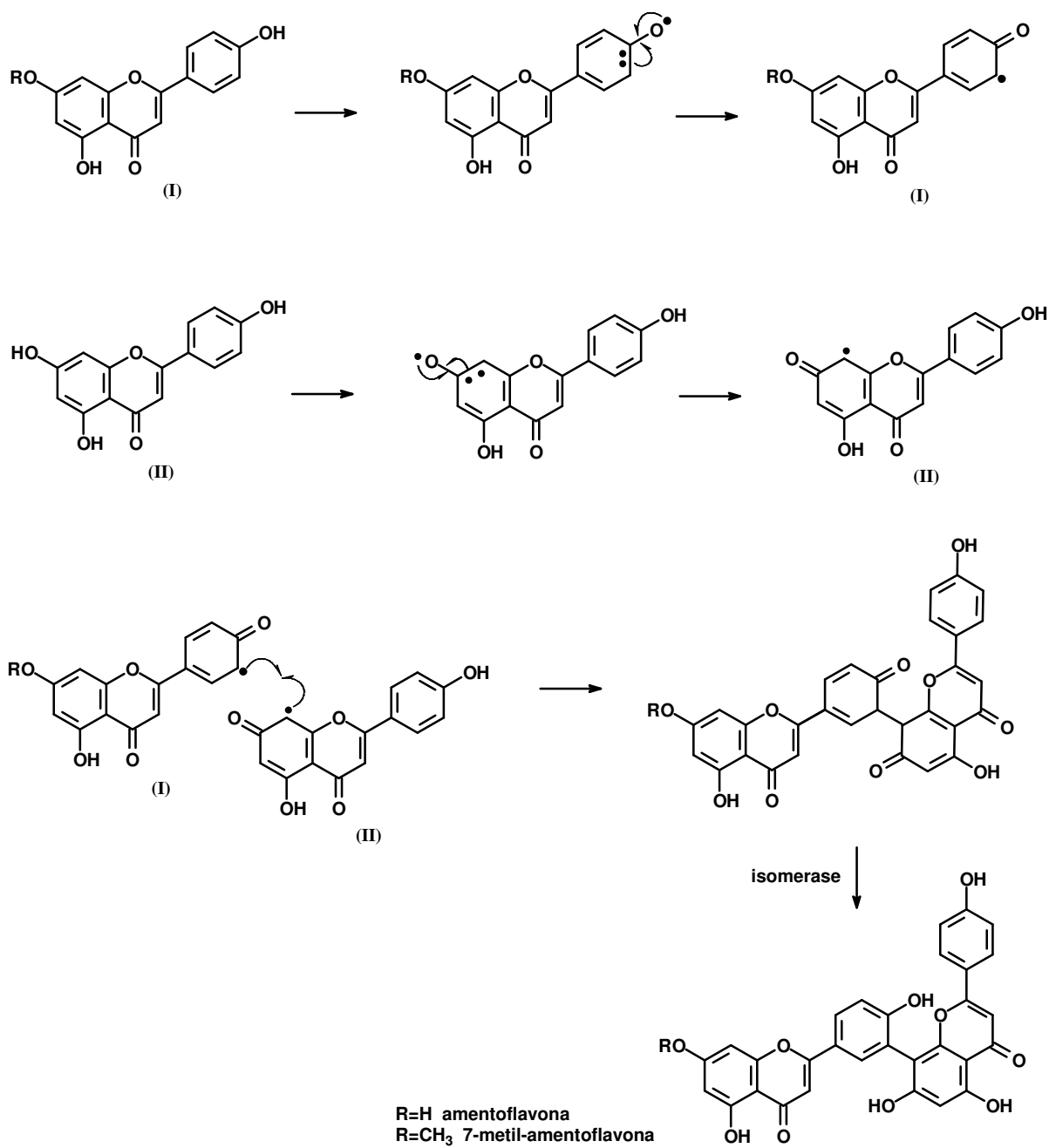




**Esquema 15.** Proposta da via biossintética de isoflavonas isoladas de *Ouratea ferruginea* (Dewick, 1997)



**Esquema 16.** Proposta para reação de metilação de flavonóides (Dewick, 1997)



**Esquema 17.** Proposta da via biossintética das biflavonas: amentoflavona e 7-metilamentoflavona (Dewick, 1997)

### V.3. Determinação do teor de fenóis totais e taninos nas frações polares do caule e folhas

#### V.3.1. Determinação do teor de fenóis totais

Para a determinação do teor de fenóis totais nas frações PA (fração da partição em AcOEt do extrato metanólico do caule e folhas) e PF (fração residual do extrato metanólico do caule e folhas) da espécie *O. ferruginea*, foi escolhida a metodologia de Folin-Denis que se mostrou a mais acessível e eficiente dentre as consultadas na literatura (FOLIN e DENIS, 1912; SANT'ANA *et al.*, 2010, SOUSA *et al.*, 2007, MONTEIRO, 2005a, VERZA, 2007). A metodologia original segundo Sant'Ana (2010) foi adaptada para extratos vegetais seguindo o preparo das soluções estoque de acordo com Souza e colaboradores (2007). Essa análise permitiu determinar a concentração de fenóis totais pela interpolação das absorbâncias obtidas das soluções reagentes de cada extrato contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (0,4456 a 6,6424 µg/mL) e expressos como g de EAG (equivalentes de ácido gálico) por 100 g de extrato. A equação da curva de calibração do ácido gálico foi  $C = 795,1298A - 133,0411$  onde C é a concentração do ácido gálico, A é a absorbância a 760 nm e o coeficiente de correlação  $R = 0,99904$ . Todas as análises foram realizadas em triplicata. As frações OFCM-PA e OFCM-PF foram as que apresentaram a maior concentração de fenóis totais, como pode ser observado na **Tabela 13 (p. 121)**.

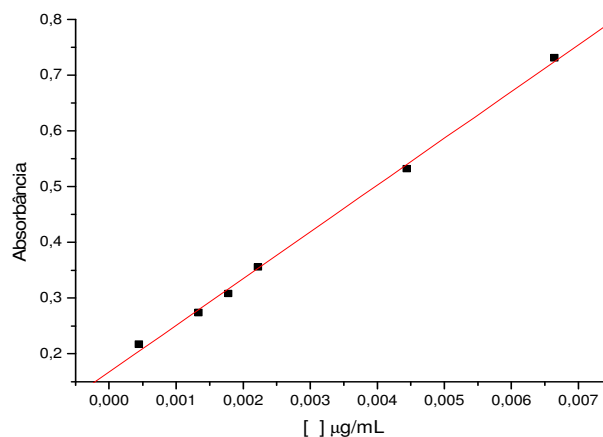
Regressão linear

$$Y = A + B * X$$

Parâmetro	Valor	Erro
A	0,16732	0,00646
B	83,84375	1,83949

R	SD	N	P
0,99904	0,00947	6	<0.0001



**Figura 88.** Curva analítica da relação entre as médias das concentrações da solução do ácido gálico e as absorbâncias (760 nm), nos ensaios de Folin-Denis (VIANNA, 2010)

### Frações polares testadas:

**OFFM-PF:** *O. ferruginea*, extrato de Folha em Metanol Partição Final (resíduo).

**OFCM-PF:** *O. ferruginea*, extrato de Caule em Metanol Partição Final (resíduo).

**OFFM-PA:** *O. ferruginea*, extrato de Folha em Metanol Partição em Acetato de etila.

**OFCM-PA:** *O. ferruginea*, extrato de Caule em Metanol Partição em Acetato de etila.

**Tabela 13.** Resultados obtidos para teor de fenóis totais para as amostras de frações, através do reagente de Folin-Denis

Amostras das frações polares	Médias das repetições			Reproduções <i>Y</i> <sub>méd.</sub>	Desvio Padrão	Teor de fenóis totais	
	<i>y</i> <sub>1</sub>	<i>y</i> <sub>2</sub>	<i>y</i> <sub>3</sub>			g/100g	mg/1g
<b>OFFM-PA</b>	0,590	0,616	0,600	<b>0,602</b>	± 0,013	34,56	345,63
<b>OFFM-PF</b>	0,567	0,512	0,540	<b>0,540</b>	± 0,028	29,63	296,33
<b>OFCM-PA</b>	0,980	0,980	1,013	<b>0,991</b>	± 0,019	65,49	654,93
<b>OFCM-PF</b>	0,726	0,721	0,724	<b>0,724</b>	± 0,003	44,26	442,63

### V.3.2. Determinação do teor de taninos

Para determinar o teor de taninos realizou-se uma busca na literatura e pode-se verificar que os métodos espectrofotométricos mais aceitos envolvem a complexação previa dos taninos com substratos protéicos (pó-de-pele, caseína, albumina) ou poliméricos (PVPP) (MONTEIRO *et al*, 2005a e 2005b; READEL *et al*, 2001; SEIGLER *et al*, 1986; SHEN *et al*, 2008; SILVA *et al*, 2009; VERZA *et al*, 2007; WANG *et al*, 2009; XIE *et al*, 2009). A escolha da caseína grau técnico como agente de precipitação foi feita com base no trabalho de Verza e colaboradores (2007), no qual a caseína grau técnico apresentou maior precisão frente a caseína purificada. Modificações na metodologia original (SEIGLER *et al*, 1986) foram feitas de modo a adequá-las às nossas condições experimentais. Toda modificação foi firmada em outros métodos, de determinação de taninos da literatura, no intuito de não gerar resultados errôneos. A determinação da quantidade de taninos (T) presente nas frações foi realizada com base na diferença entre o valor da concentração da solução não tanante (SNT) e o valor obtido na determinação de fenóis totais (FT);  $[T] = [FT] - [SNT]$ . Os ensaios de precipitação de taninos foram realizados com caseínas nas concentrações de 400, 600 e 800 mg, para encontrar a melhor concentração de caseína capaz de complexar totalmente os taninos presentes em uma alíquota de 5 mL da solução estoque. Pode-se observar que para as

frações OFFM-PF, OFFM-PA e OFCM-PF as três concentrações de caseína apresentaram os mesmos resultados quanto a precipitação de taninos. O mesmo não foi observado para a fração OFCM-PA que apresentou valores diferentes nas leituras de absorvância para as três concentrações de caseína. Logo, realizaram-se novos ensaios com esta fração nas concentrações de 1000, 1200, 1400 e 1600 mg de caseína, e não foram observadas variações nos valores de absorvância, mostrando-se compatível com os valores obtidos para a concentração de 800 mg de caseína. Com base nisto, foi possível verificar que a concentração de 800 mg de caseína foi suficiente para a precipitação total dos fenóis nas frações testadas. Os valores expressos como g de EAG (equivalentes de ácido gálico) por 100g de extrato, obtidos da determinação de fenóis da solução não tanante pelo método de Folin-Denis estão apresentados na **Tabela 14 (p. 122)**. As frações OFCM-PA e OFCM-PF do caule foram as que apresentaram maior teor de taninos, seguidas pela fração OFFM-PF que mostrou ter três vezes mais taninos que a fração OFFM-PA. Foram usados os valores de absorvância da média das melhores repetições para obter a média das reprodutibilidades. Os valores que se encontram nas **Tabelas 13 (p. 121) e 14 (p. 122)** são as médias gerais das repetibilidade e reprodutibilidade obtidas nos ensaios realizados. Na **Tabela 15 (p. 122)** estão apresentados os teores de fenóis totais (FT), fenóis simples presentes na solução não tanante (SNT) e taninos expressos como g de EAG (equivalentes de ácido gálico) por 100g de extrato.

**Tabela 14.** Resultados obtidos para teor de fenóis na solução não tanante para as amostras de frações precipitadas em 800 mg de caseína, através do reagente de Folin-Denis

Amostras	Médias das repetições			Reproduções	Desvio Padrão	Teor de fenóis simples	
	y <sub>1</sub>	y <sub>2</sub>	y <sub>3</sub>			y <sub>méd.</sub>	g/100g
<b>OFFM-PA-8</b>	0,563	0,579	0,571	<b>0,571</b>	± 0,008	32,10	320,98
<b>OFFM-PF-8</b>	0,431	0,436	0,412	<b>0,426</b>	± 0,013	20,57	205,68
<b>OFCM-PA-8</b>	0,831	0,836	0,833	<b>0,833</b>	± 0,003	52,93	529,30
<b>OFCM-PF-8</b>	0,520	0,536	0,528	<b>0,528</b>	± 0,008	28,68	286,79

**Tabela 15.** Resultados obtidos para teor de taninos com base na equação  $[T] = [FT] - [SNT]$

Amostra	[FT]	[SNT]	[T] mg/1g	[T] g/100g
<b>OFFM-PA</b>	345,63	320,98	24,65	2,47
<b>OFFM-PF</b>	296,33	205,68	90,65	9,07
<b>OFCM-PA</b>	654,93	529,30	125,63	12,56
<b>OFCM-PF</b>	442,63	286,79	155,84	15,58

#### V.4. Análise das frações OFCM-PA, OFCM-PF, OFFM-PA e OFFM-PF por RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$

A análise de **OFCM-PA, OFCM-PF, OFFM-PA e OFFM-PF** (frações de maior polaridade) foi realizada por experimentos de RMN, devido a dificuldade de aplicar a essas frações as técnicas cromatográficas mais comuns como as que usam sílica como adsorvente. Apesar do isolamento de um resíduo de tanino condensado, catequina, na fração OFFM-PA, foi decidido analisar as demais frações por técnicas mais rápidas e com menor perda de material, que as usadas no fracionamento de OFFM-PA. Para o estudo destas frações buscou-se identificar quais as classes de metabólitos presentes nas frações e fazer uma correlação com a determinação do teor de fenóis totais realizada com essas frações. Verificaram-se sinais típicos de carboidratos nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  de todas as frações. Os espectros de OFFM-PF e OFCM-PF mostram-se semelhantes entre si pelos sinais de RMN  $^1\text{H}$  na região de  $\delta_{\text{H}}$  3 a 5,5 ppm. Alguns sinais na região de hidrogênio de sistema aromático, em  $\delta_{\text{H}}$  6,65 a 7,5 ppm, indicam a presença de compostos fenólicos como taninos. Destaca-se entre elas a OFCM-PA que mostra em seus espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (**Figuras 95 e 96, p. 127**) sinais mais definidos na região de aromáticos e limpos na região de  $\delta_{\text{H}}$  3 a 4 ppm nos o experimento de  $^1\text{H}$ . Em espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  foi possível identificar a presença de sinal de C=O em  $\delta_{\text{C}}$  167 e 165 ppm, além de sinais na região de carbono de sistema aromático que apresenta deslocamento químico compatível com os carbonos da unidade de galoil ( $\delta_{\text{C}}$  115, 117 e 118 para C-2'e 6';  $\delta_{\text{C}}$  122 para C-1';  $\delta_{\text{C}}$  131 para C-4';  $\delta_{\text{C}}$  144 e 145 para C-3' e 5'). As análises espectrais da fração OFCM-PA justificam o elevado teor de fenóis totais encontrado para a mesma (**ver V.3**). Nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , de todas as frações, foram observados sinais que indicam a presença de carboidratos e taninos; os valores apresentados estão de acordo com literatura (OKUDA, YOSHIDA & HATANO, 1989). Os taninos hidrolisáveis, como os galotaninos, são os mais compatíveis com os sinais verificados nos experimentos de RMN, mas os sinais em 29(CH<sub>2</sub>) e 50-60 (CH) permite aceitar a presença de taninos condensados na mistura tendo o resíduo isolado como a epicatequina.

Fração OFFM-PF

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: OFFM-PF (PROTON)	
Date	13 Oct 2010 19:32:04			
File Name	C:\Users\QUELI CRISTINA\Documents\O. ferruginea\QUELI 30-093001r			
Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	1H	Number of Transients
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence
Solvent	DMSO-D6	Sweep Width (Hz)	8223.68	Temperature (degree C)
				27.000

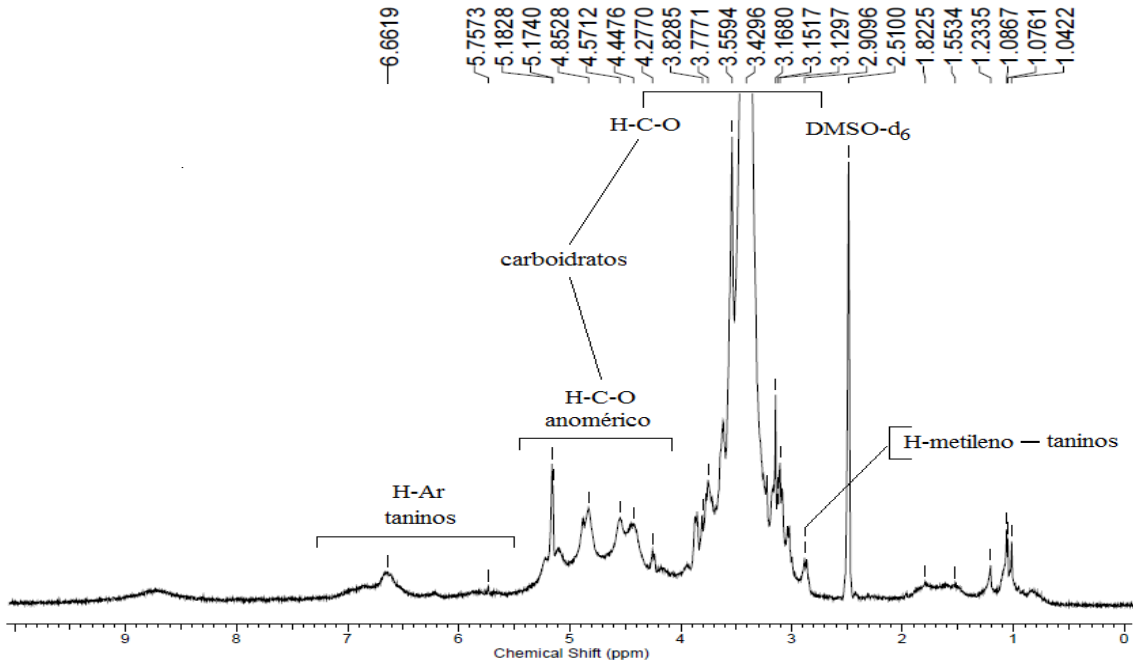


Figura 89. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) da fração OFFM-PF

Acquisition Time (sec)	1.3631	Comment	AMOSTRA: OFFM-PF (C13 CPD) 400MHZ	
Date	04 Nov 2010 13:50:54			
File Name	C:\Users\QUELI CRISTINA\Documents\O. ferruginea\QUELI 30-104001r			
Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	13C	Number of Transients
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence
Solvent	DMSO-D6	Sweep Width (Hz)	24038.46	Temperature (degree C)
				27.000

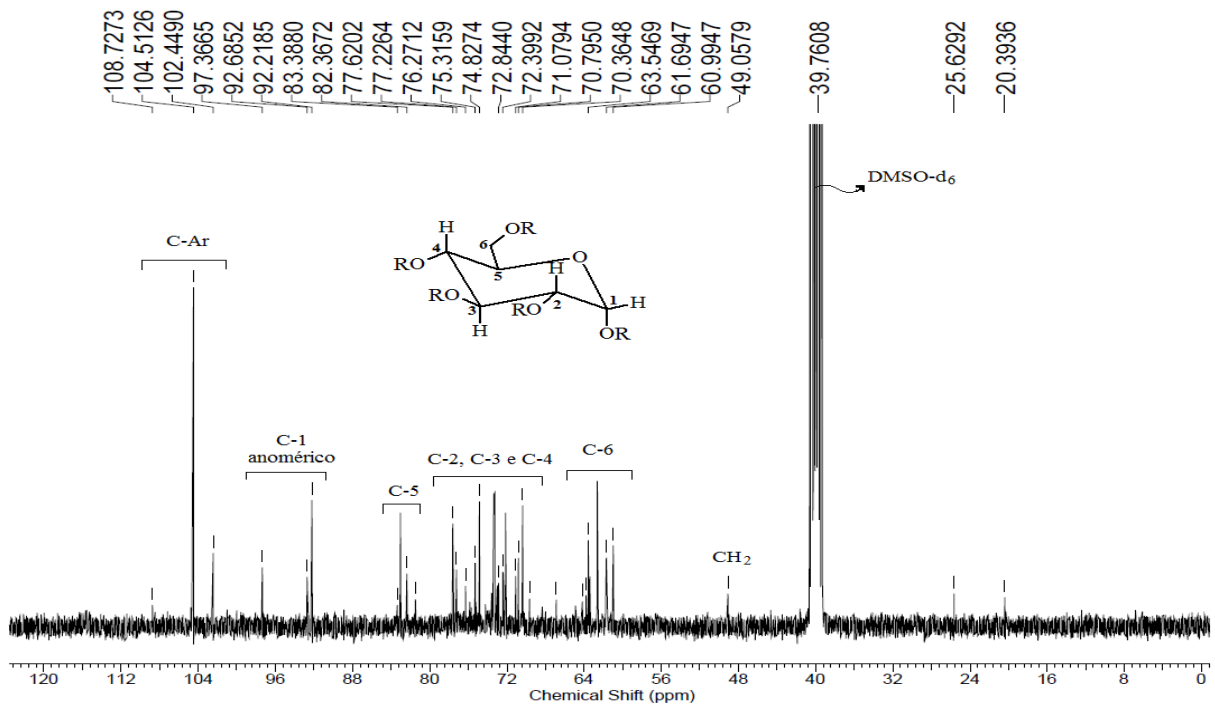


Figura 90. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) da fração OFFM-PF

Fração OFCM-PF

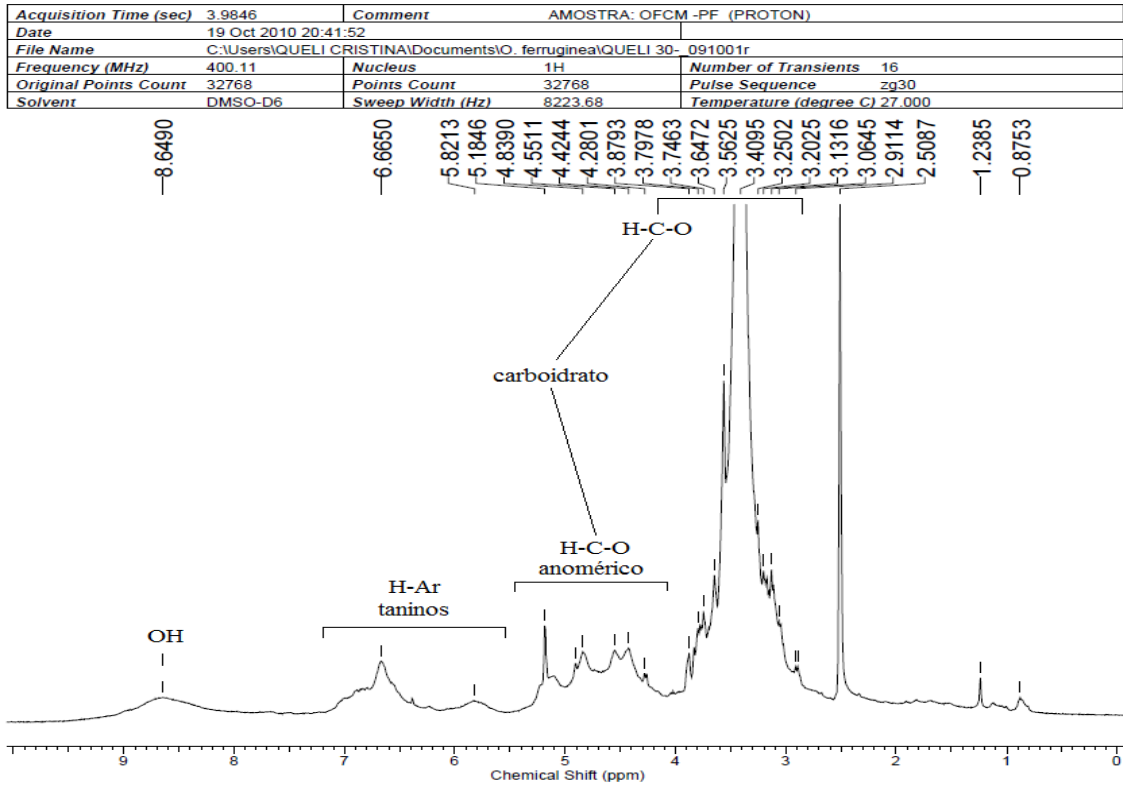


Figura 91. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) da fração OFCM-PF

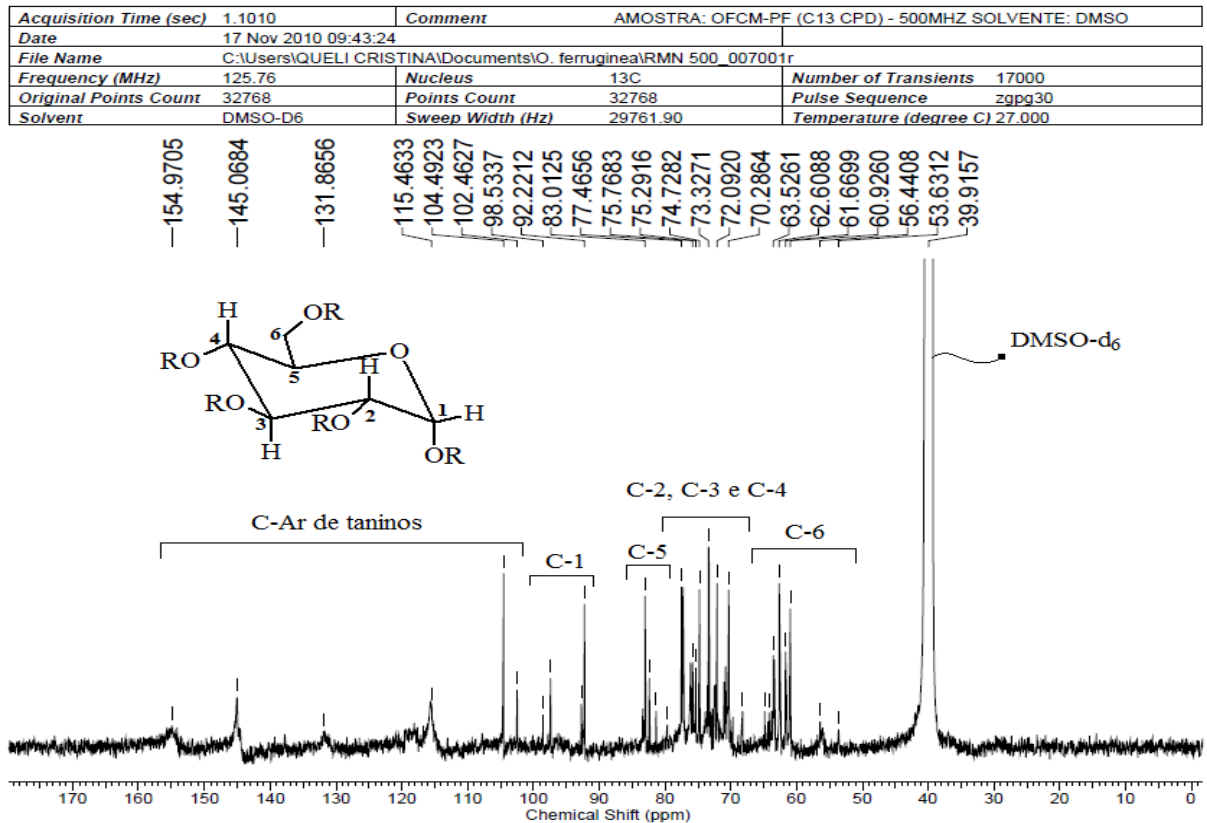


Figura 92. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) da fração OFCM-PF



Fração OFFM-PA

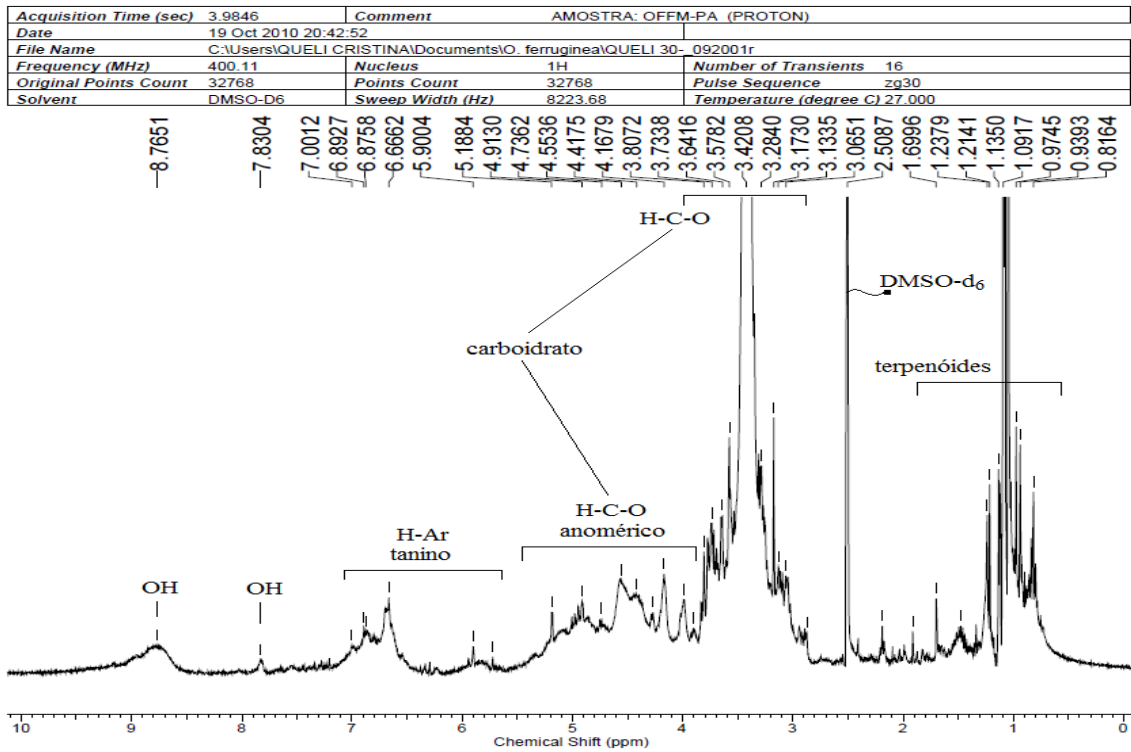


Figura 93. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) da fração OFFM-PA

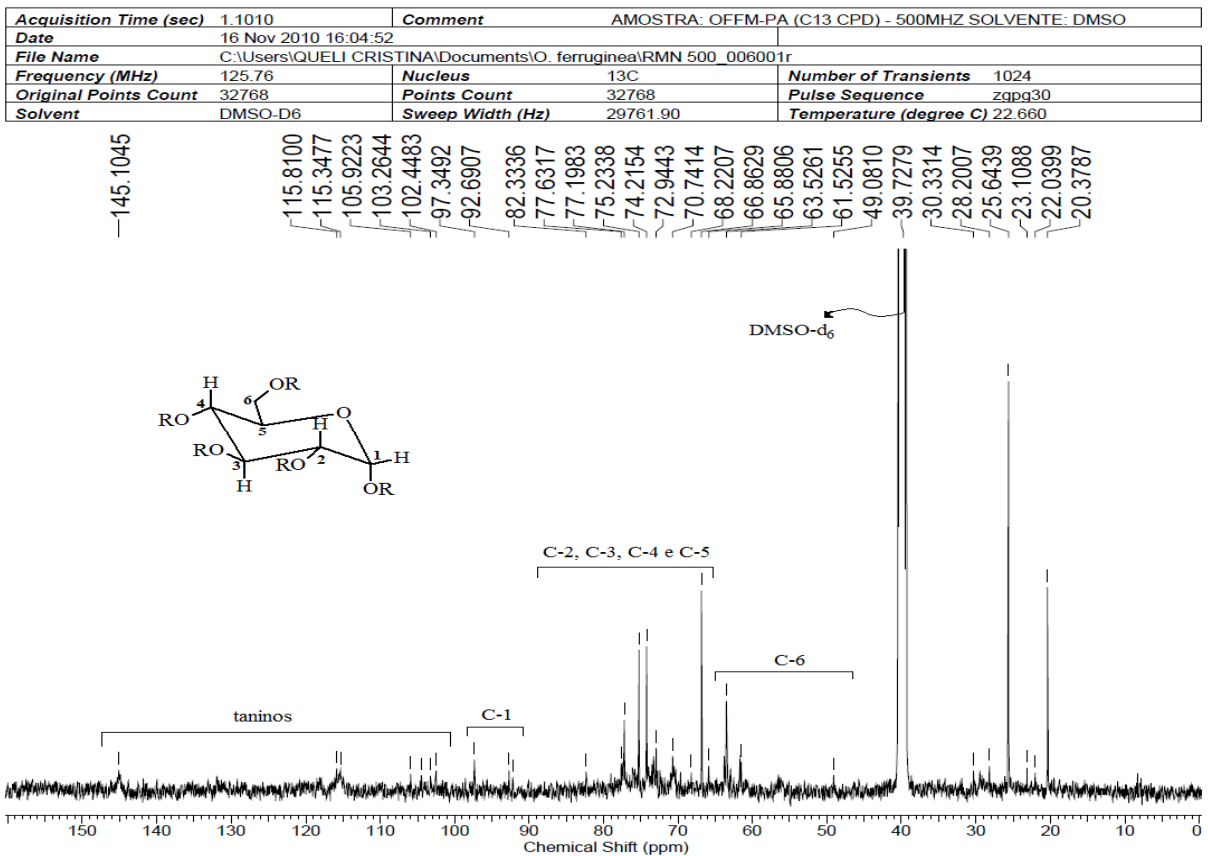


Figura 94. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) da fração OFFM-PA

## Fração OFCM-PA

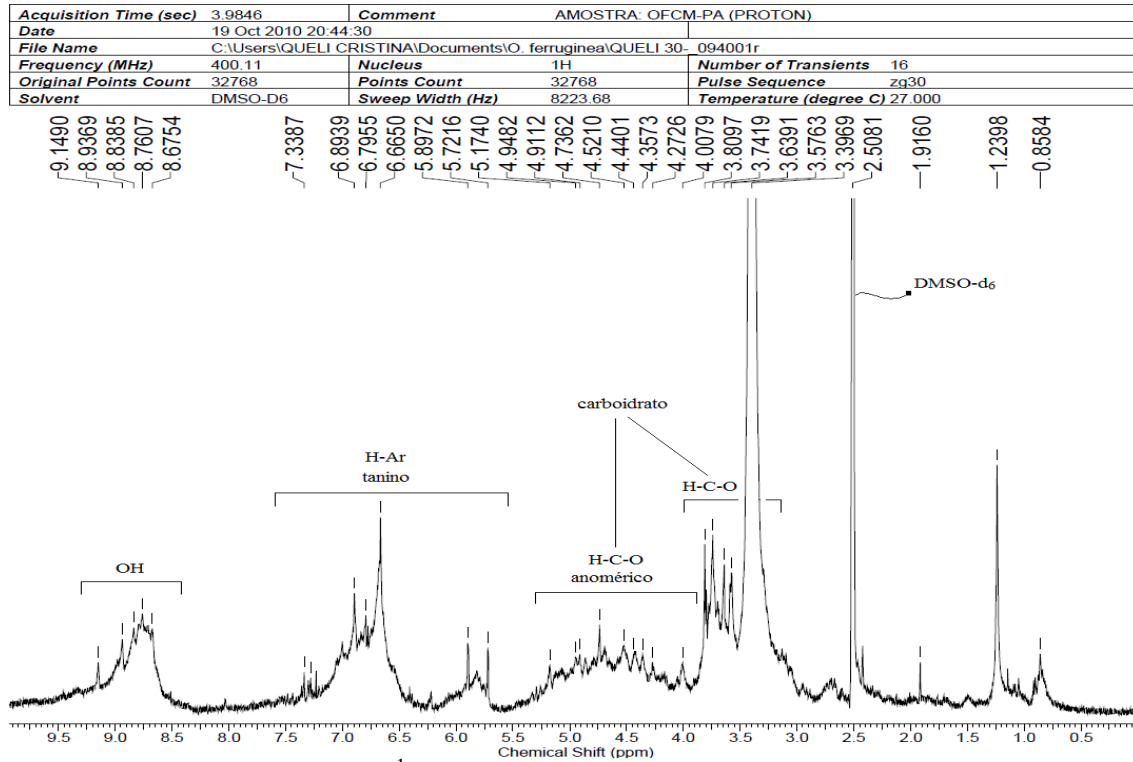


Figura 95. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) da fração OFCM-PA

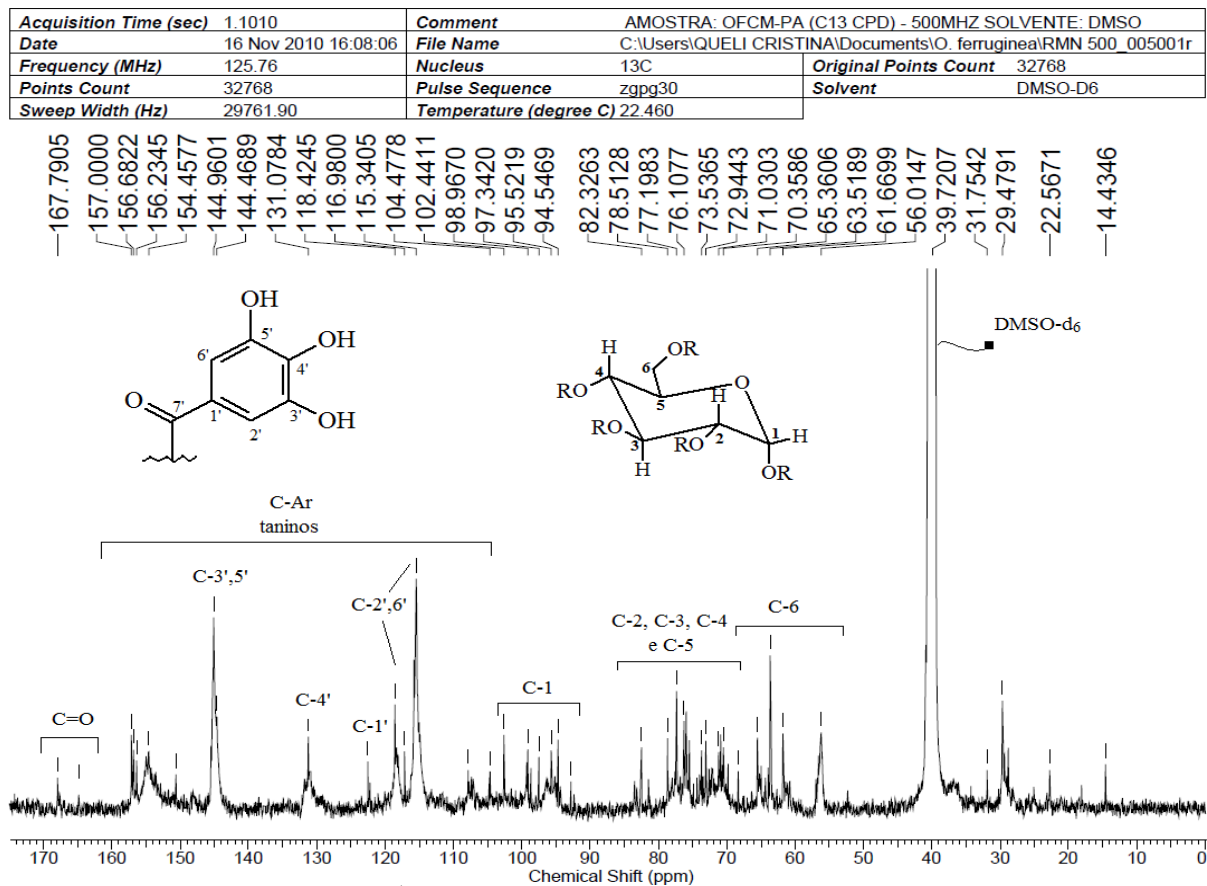
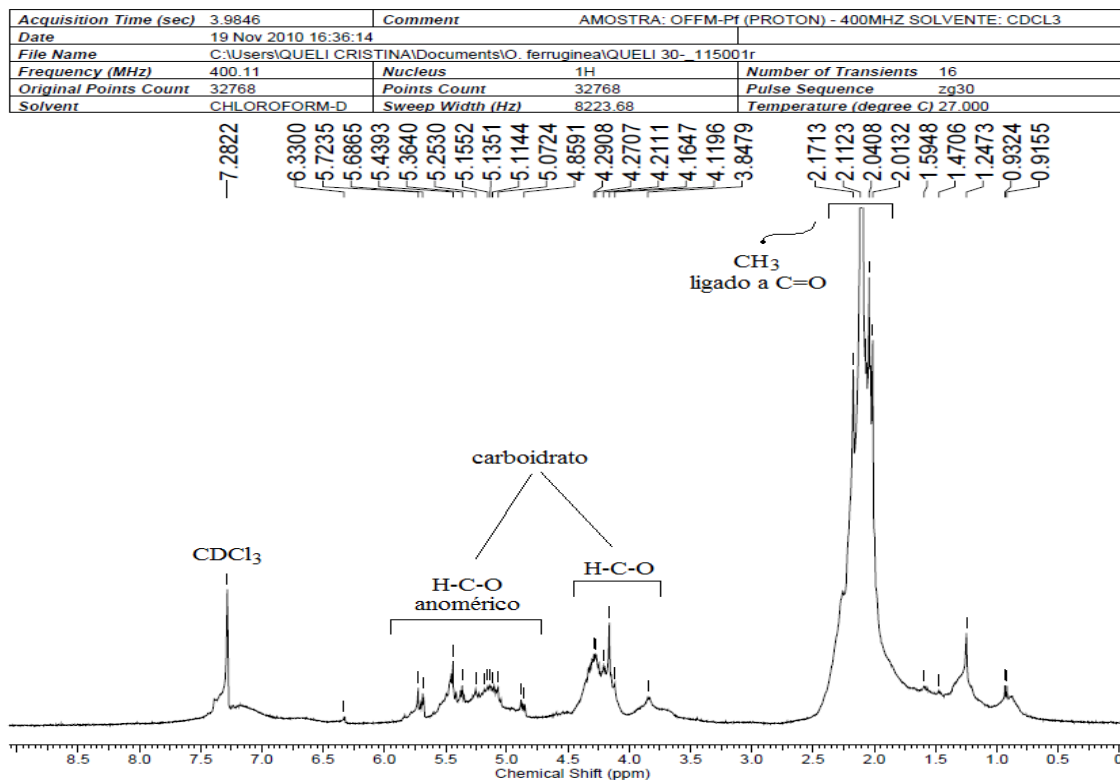


Figura 96. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) da fração OFCM-PA

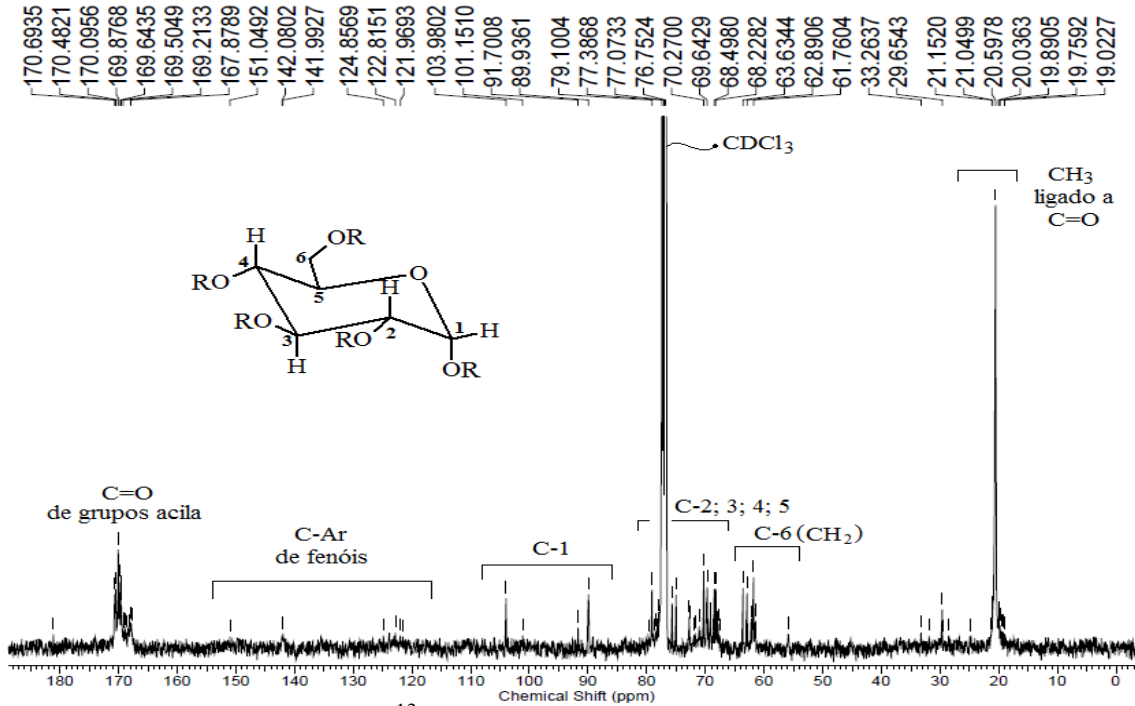
Para obter informações adicionais, as frações polares foram acetiladas e analisadas por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . A acetilação foi confirmada pela presença dos sinais de  $\delta_{\text{H}}$  2,0 a 2,2 ppm para metilas ligadas a C=O no espectro de RMN  $^1\text{H}$ ; e sinais na região de  $\delta_{\text{C}}$  167 a 172 e 19 a 22 ppm correspondendo aos respectivos carbonos de C=O e CH<sub>3</sub> do grupo acila, no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ . Os sinais esperados na região de aromático não apareceram totalmente, isso impossibilitou a obtenção de informações que pudessem complementar a análise feita anteriormente com as frações polares. Nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de todas as frações foram observados sinais característicos de carboidratos confirmando as informações observadas nos espectros das frações não acetiladas. Este material acetilado deve ser analisado com CLAE-EM para através dos valores dos picos de  $m/z$  propor estruturas dos glicosídeos.

#### OFFM-PF-A



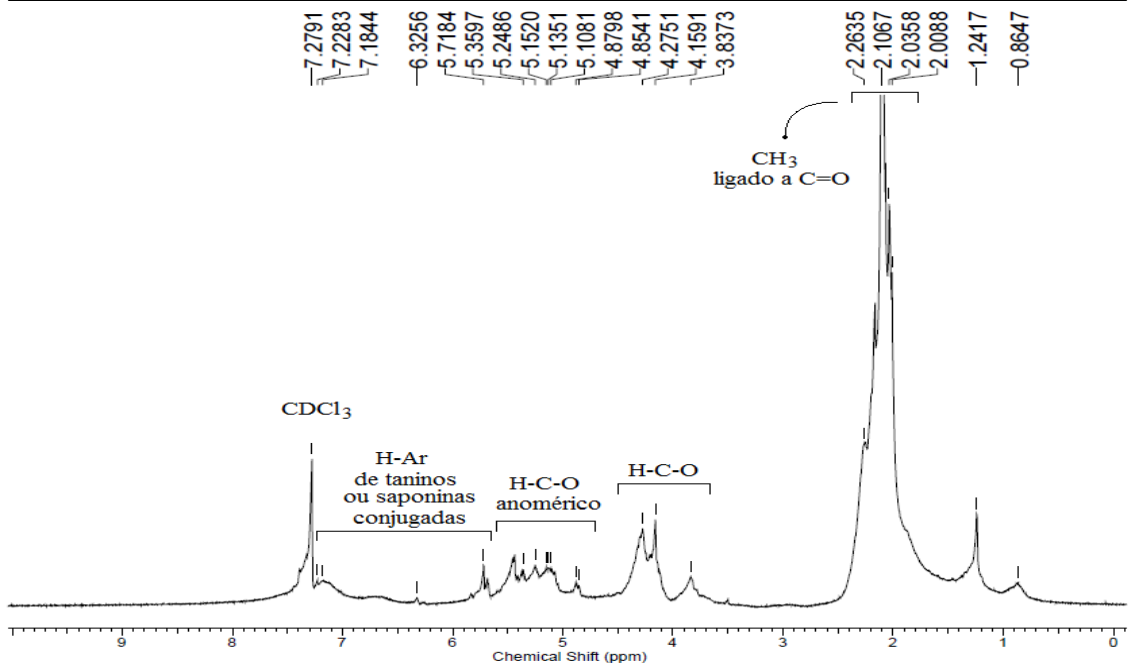
**Figura 97.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração OFFM-PF-A

Acquisition Time (sec)	1.3631	Comment	AMOSTRA: OFFM-Pf (C13 CPD) - 400MHZ SOLVENTE: CDCL3	
Date	19 Nov 2010 17:47:16	File Name	E:\116\data\1\ 116001r	
Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	13C	Number of Transients
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	24038.46	
Temperature (degree C)	27.000			



**Figura 98.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração OFFM-PF-A OFCM-PF-A

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: OFCD-PF (PROTON) - 400MHZ SOLVENTE: CDCL3	
Date	19 Nov 2010 12:31:12	File Name	C:\Users\QUELI CRISTINA\Documents\O. ferruginea\QUELI 30- 109001r	
Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	1H	Number of Transients
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	8223.68	Temperature (degree C)
				27.000



**Figura 99.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração OFCM-PF-A

Acquisition Time (sec)	1.1010	Comment	AMOSTRA: OFCM-PF-A (13C_CPD) - 500MHZ SOLVENTE: CDCL3	
Date	20 Jan 2011 11:59:02	File Name	E:\27\pdata\1\ 027001r	
Frequency (MHz)	125.76	Nucleus	13C	Number of Transients
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	29761.90	
Temperature (degree C)	20.560			

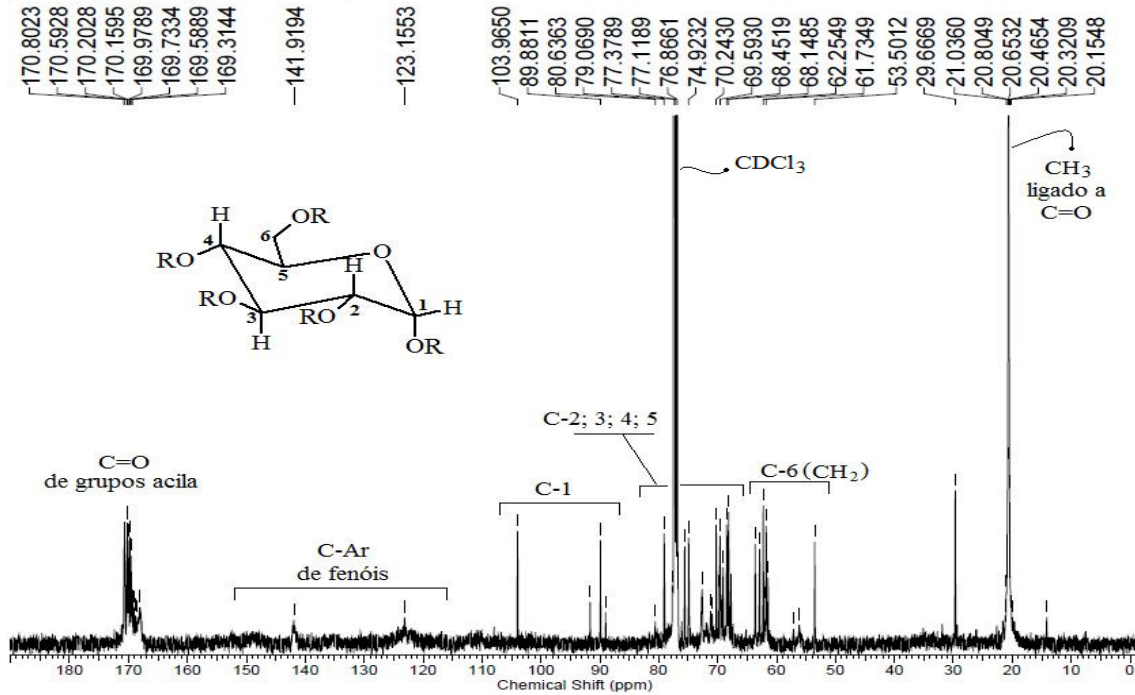


Figura 100. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração OFCM-PF-A

OFFM-PA-A

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: OFFM-PA-A (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: CDCL3	
Date	10 Dec 2010 15:46:24	File Name	C:\Users\QUELI CRISTINA\Documents\O. ferruginea\RMN 500_015001r	
Frequency (MHz)	500.13	Nucleus	$^1\text{H}$	Number of Transients
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	10330.58	Temperature (degree C)
				21.160

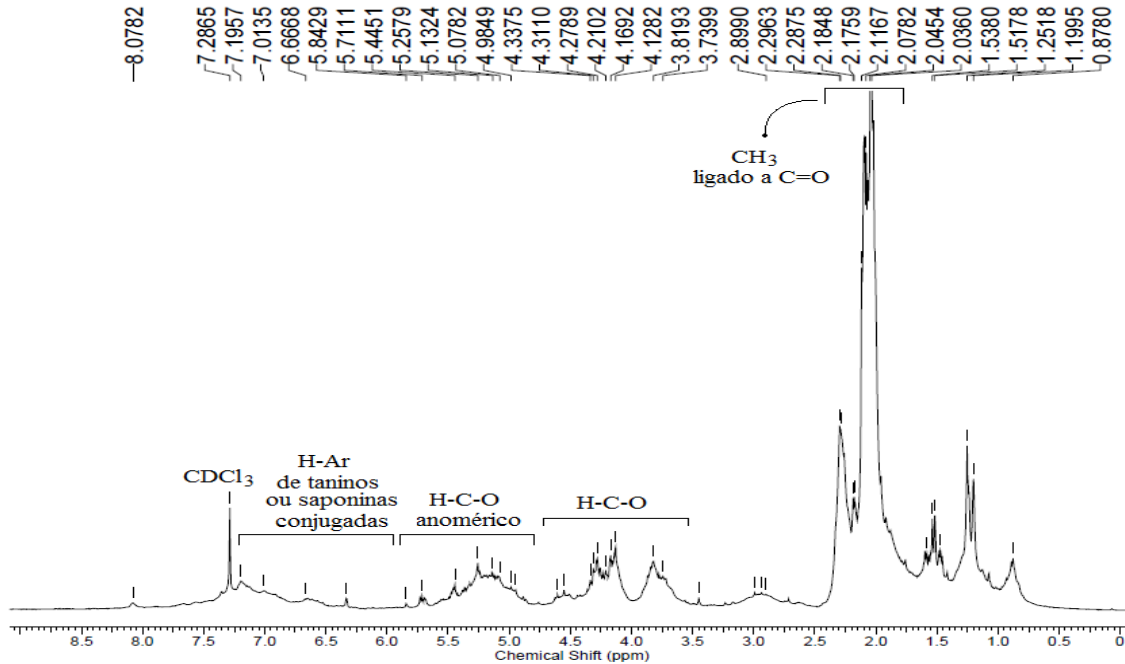
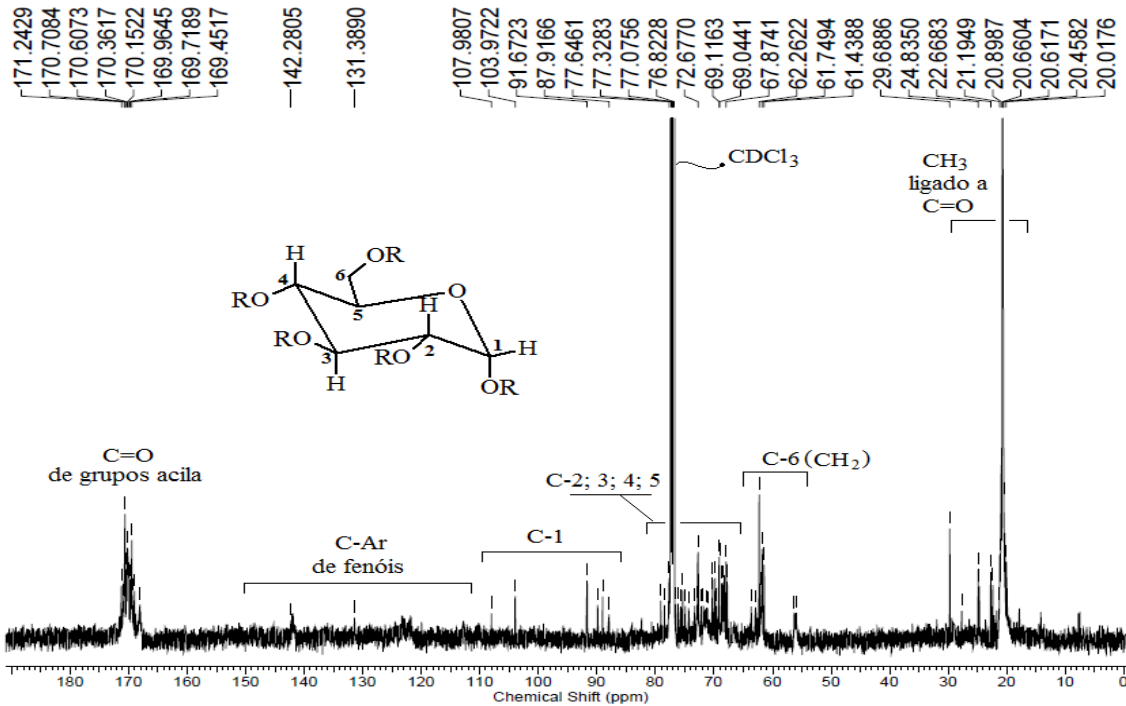


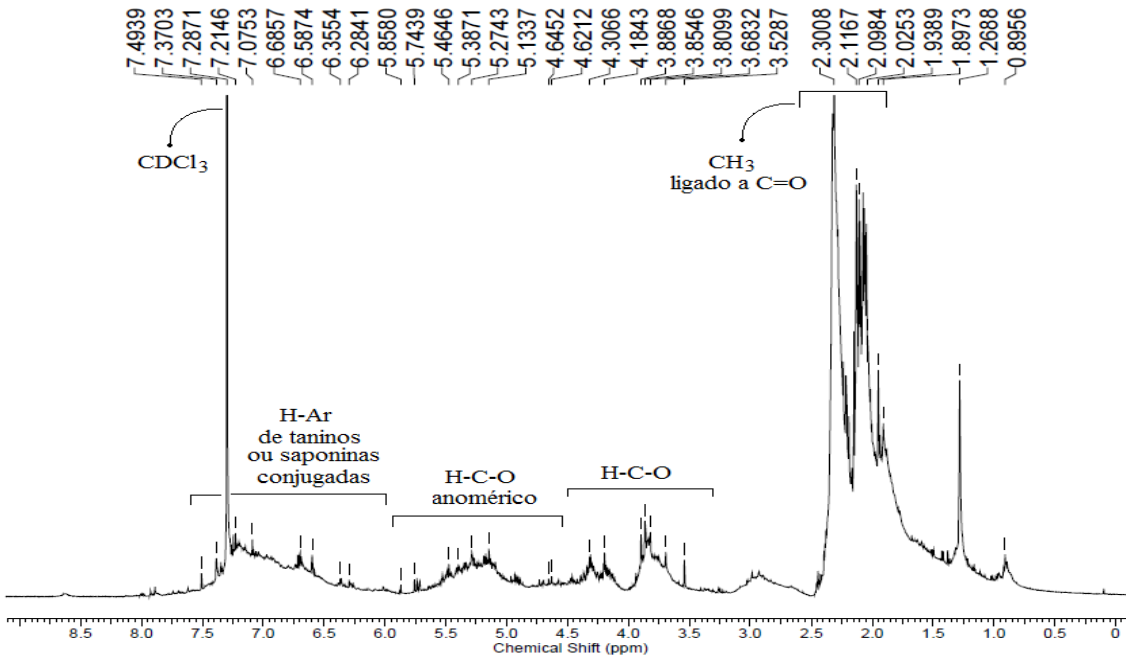
Figura 101. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração OFFM-PA-A

Acquisition Time (sec)	1.1010	Comment	AMOSTRA: OFFM-PA-A (13C_CPD) - 500MHZ SOLVENTE: CDCL3	
Date	20 Jan 2011 14:40:54	File Name	E:\28\pdata\1\ 028001r	
Frequency (MHz)	125.76	Nucleus	13C	Number of Transients
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	29761.90	
Temperature (degree C)	21.660			



**Figura 102.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração OFFM-PA-A OFCM-PA-A

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: OFCM-PA-A (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: CDCL3	
Date	10 Dec 2010 11:51:52	File Name	C:\Users\QUELI CRISTINA\Documents\O. ferruginea\RMN 500_013001r	
Frequency (MHz)	500.13	Nucleus	1H	Number of Transients
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	10330.58	Temperature (degree C)
				20.760



**Figura 103.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração OFCM-PA-A



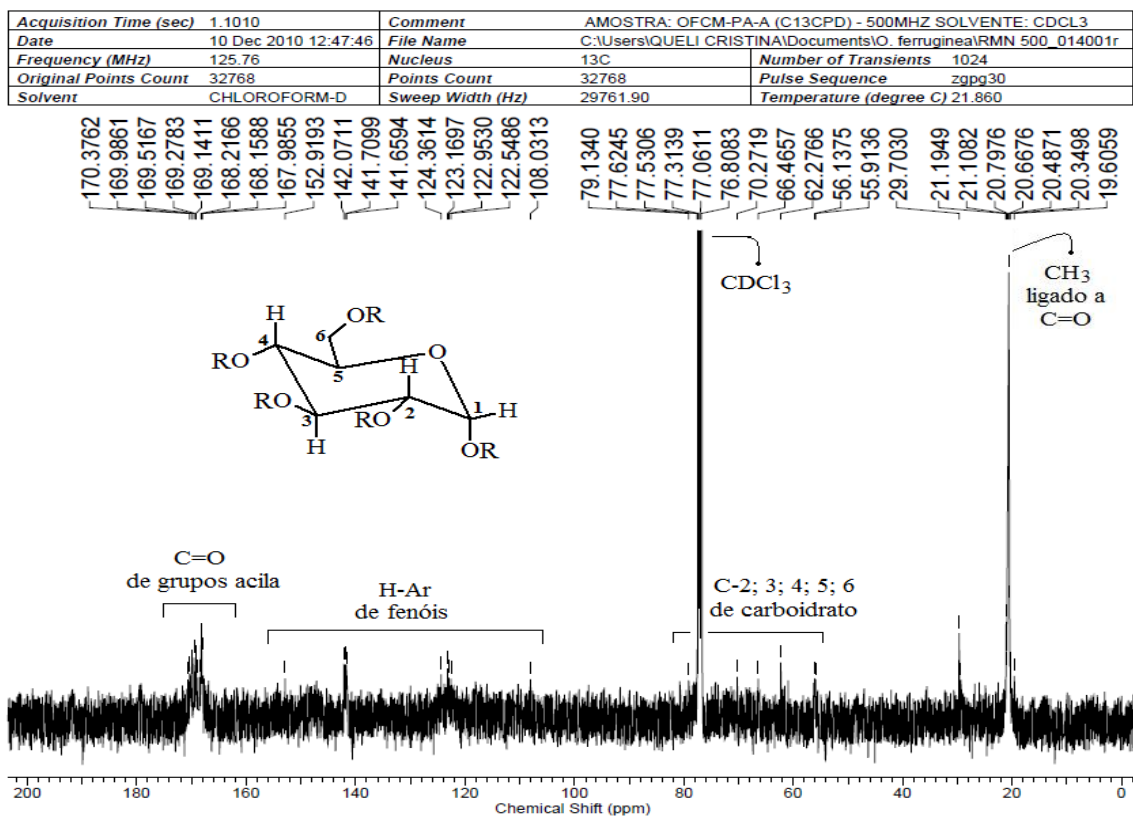


Figura 104. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração OFCM-PA-A

## VI. CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo químico da espécie *Ouratea ferruginea*. Nesse trabalho foram identificadas 24 substâncias presentes nos extratos de caule e folhas dessa espécie.

As substâncias 7,3'-dimetil-orobol (**7**), panchovillina (**13**) e sequoiaflavona (**23**) estão sendo registradas pela primeira vez em Ochnaceae. Não foi encontrado registro na literatura da substância 5-hidroxi-7,3',4',5'-tetrametoxi-isoflavona (**12**), espera-se obter mais material da planta para isolamento e aquisição de dados espectrométricos.

Os flavonóides 5,4'-diidroxí-7,3',5'-trimetoxi-isoflavona (**6**) e piscigenina (**14**), não haviam sido identificados em *Ouratea* anteriormente.

A presença de biflavonoides, como a amentoflavona, em extratos de folhas desta espécie confirma a classificação botânica, uma vez que são marcadores quimiossistematicos do gênero. Desta forma, foi verificado que neste gênero encontram-se, com maior frequência, biflavonoides nos extratos de folhas.

O caule revelou ser um bioprodutor de isoflavonas, sendo esta uma característica relevante dessa espécie, uma vez que isoflavonas foram encontradas apenas nas espécies *Ouratea flava*, *hexasperma* e *semiserrata*.

A configuração absoluta da epicatequina isolada (**24**) foi definida como 2*R*,3*R*. Apesar de ter sido isolado anteriormente de *Ouratea hexasperma*, não se sabe se foi este estereoisômero.

As análises quantitativas de fenóis totais e taninos, realizadas com as frações polares de caule e folhas de *Ouratea ferruginea*, são o primeiro estudo de determinação do teor dessas substâncias no gênero *Ouratea*.

A fração OFCM-PA, obtida com acetato de etila do extrato metanólico do caule, apresentou maior teor de fenóis e, de acordo com a análise em RMN, é a que tem melhor perfil para taninos hidrolisáveis. Na análise de determinação do teor de taninos as frações do caule foram as que apresentaram maior teor.

Os resultados adquiridos neste trabalho permitiram ampliar o conhecimento sobre a composição química do gênero *Ouratea* e família Ochnaceae.



## VII. REFERÊNCIAS

- AMARAL, M. DO C. E.; BITTRICH, V.; Ontogenia inicial do androceu de espécies de Ochnaceae subfam. Sauvagesioideae através da análise em microscopia eletrônica de varredura. *Revta. Brasil. Bot.* v. 21, n. 3, **1998**.
- BENEDEK, B.; WENIGER, B.; PAREJO, I.; BASTIDA, J.; ARANGO, G. J.; LOBSTEIN, A.; CODINA, C. Antioxidant activity of isoflavones and biflavones isolated from *Godoya antioquiensis*. *Arzneimittelforschung*, v. 56, n. 9, p. 661-4, **2006**.
- BOHLIN, L.; GÖRANSSON, U.; ALMARK, C.; WEDÉN, C. BACKLUND, A. Natural products in modern life science. *Phytochem Rev*, v. 9, p. 279-301, **2010**.
- BOSSO, A. A. Identificação de biflavonoides de *Luxemburgia nobilis* e *Ouratea semiserrata* (Ochnaceae) por cromatografia Líquida de Alta Eficiência HPLC. Dissertação de Mestrado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, **2003**.
- BRAGA, F. C.; WAGNER, H.; LOMBARDI, J. A.; OLIVEIRA, A. B. Screening of the Brazilian flora for antihypertensive plant species for *in vitro* angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. *Phytomedicine*, Jena, v.245, p.245-50, **2000**.
- BRAZ-FILHO, R. Importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. *Quím. Nova*, v. 17, n. 5, p. 405-445, **1994**.
- BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Quím. Nova*, v. 33, n. 1, p. 229-239, **2010**.
- CARVALHO, M. G. de, HAUPTLI, M. B., ALMEIDA, M. E., MELEIRO, L. A. C. Triterpenos Isolados de *Eschweilera rabeliana* Mers (Lecitidaceae). *Rev. Univ. Rural, Ser. Ci. Exatas e da Terra*, v.17, p. 33-36, **1995**.
- CARVALHO, M. G. de, GRYNBERG, N. F., ECHEVARRIA, A., OLIVEIRA, M. C. C., In: *Recent Progress in Medicinal Plants*. Govil, JN (Ed), Centre Res. Books (Org) New Dehli, v. 8, **2001**.
- CARVALHO M. G. de; VELANDIA, J. R.; de OLIVEIRA J. C. C.; ECHEVARRIA, A.; BRAZ-FILHO, R.; GRYNBERG, N. F. In *Phytochemical and Pharmacology II of the Series "Recent Progress in Medicinal Plants"*. Majumdar, D.K.; Govil, J.N.; Singh, V.K. eds., SCI Tech Publishing LLC: Texas, USA, v. 8, p 77-92, **2002**.
- CARVALHO, M. G. de; ALVES, C. C.; DA SILVA, K. G. S.; EBERLIN, M. N.; WERLE, A. A. Luxenchalcone, a new bichalcone and other constituents from *Luxemburgia octandra*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.15, n. 1, p. 146-149, **2004**.
- CARVALHO, M. G. de; JR, J. G. R.; CAVATTI, L. C.; SUZART, L. R.; CORNELIUS, M. T. F.; SILVA, V. C. da; CARDOZO, M. A. R. Determinação estrutural de flavonóides usando análise espectrométrica de RMN <sup>1</sup>H 1D e reação com diazometano. *Rev. Univ. Rural, Ser. Ci. Exatas e da Terra*, v. 25, n.1-2; p. 46, **2006**.

CARVALHO, M. G. de; ALBUQUERQUE, L. R. M. de; MENDES A, L. de S.; GUILHON, G M. S. P.; RODRIGUES, S. T. Biflavonoids and terpenoids isolated from the leaves of *Ouratea microdonta* Engl. (Ochnaceae). *Rev. Latinoamer. Quím.* v. 36, n. 3, p. 71-75, **2008**.

CARVALHO, M. G. de; GOMES, M. S. da R.; OLIVEIRA, M. C. C. de; SILVA, C. S. do; CARVALHO, A. G. de, Chemical constituents from *Piptadenia rígida Benth* (Fabaceae) Leguminosae mimosoideae, (“angico”). *Rev. Bras. de Farmacogn.* in press, **2011**.

CRONQUIST, A. (ed) *The evolution and classification of flowering plants*. 2<sup>a</sup>. Ed. The New York Botanical Garden, Bronx, New York. **1988**.

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

DAHLGREN, R. M. T.; *Bot. J. Line Soc.* v. 80, n. 2, p. 91, **1980**.

DANIEL, J. F. de S.; CARVALHO, M. G. de; CARDOSO, R. da S.; AGRA, M. de F.; EBERLIN, M. N. Others flavonoids from *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, v.16, p. 634-638, **2005**.

DANIEL, J. F. de S.; Metabólitos especiais isolados de *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae), *Dipladenia martiana* (Apocynaceae) e de *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae). Tese doutorado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, **2006**.

DEWICK, P. M. (ed) *Medicinal Natural Products – a biosynthetic approach*. Ed Jonh Wiley & Sons LTD: England, p.135, **1997**.

DOMINGUEZ; A X.; *Metodos de investigacion fitoquímica*. México, Ed Limusa, p. 139, 149, 211, **1973**.

DOMINGUEZ, A. X.; ROMBOLD, C.; ESPINOZA, G. B.; ABREGO, I. R.; VARGAS, G. H. Two isoflavonoids from *Olneya tesota Gray* "palo fierro". *Rev. Latinoamer. Quím*, v. 20, n. 2, p. 104 **1989**. Resumo do Chemical Abstracts, v. 112:52224 n, p. 52224, **1990**.

FELÍCIO J. D.; GONÇALEZ,E.; BRAGGIO, M. M.; CONSTANTINO, L.; ALBASINI, A; LINS, A P.; Inibition of lens aldose reductase by biflavones from *Ouratea spectabilis*. *Planta Medica* v. 61, p. 217-220, **1995**.

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

FOLIN, O.; DENIS, W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.*, v.XII, n. 2, 239-243, **1912**.

GANGOUE-PIEBOJI, J.; PEGNYEMB, D. E.; NIYITEGEKA, D.; NSANGOU, A.; EZE, N.; MINYEM, C.; MBING, J. N.; NGASSAM, P.; TIH, R. G.; SODENGAM, B. L.; BODO, B. The in-vitro antimicrobial activities of some medicinal plants from Cameroon. *Ann.Trop. Med.Parasit.*, v. 100, n. 3, p. 237-243, **2006**.

GARTLAN, S.; MCKEY, D. B.; WATERMAN, P. G.; MBI, C. N.; STRUHSACKER, T. T. A Comparative study of the phytochemistry of two African rain forests. *Biochem. Syst. Ecol.*, v. 8, 401-422, **1980**.

GHOOGOMU TIH, R.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Structure of the chalcone dimers lophirone F, G and H from *Lophira lanceolata* stem bark. *Phytochemistry*, v. 29, n. 7, p. 2289-93. **1990**.

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

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

HARASAWA, A.; TAGASHIRA, A. Isolation of 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone from *Hydrangea* (*Hydrangea macrophylla* Seringe var. *otaksa* Makino) and its deodorant activity against methyl mercaptan. *Biosci. Biotech. Biochem.* v. 58, n. 11, p. 2073-2074, **1994**.

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

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

JOLY, A B.; *Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal*. 12<sup>a</sup>. Ed., São Paulo, Cia Editora Nacional, 777p., **1988**.

KARCH, K.; SEBASTIAN, I.; HALÁSZ, I.; ENGELHARDT, H. Optimization of reverse-phase separation. *Journal Chromatog.*,v.122, p. 171-184, **1976**.

KIM, H.; RALPH, J. NMR analysis of lignins in CAD-deficient plants. Part 1. Incorporation of hydroxycinnamaldehydes and hydroxybenzaldehydes into lignins. *Org. Biomol. Chem.*, v. 1, p. 268–281, **2003**.

KOJIMA, H; SATO, N.; HATANO, A., OGIURA, H.; Constituents of the Labiatae plants. 5. sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry*, v. 29 n. 7 p. 2351-2355 **1990**.

LIANDA, R. L. P. Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante. Tese de doutorado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, **2009**.

LIMA, J. D. de; FONSECA, M. do S. R.; NASCIMENTO, L. A. S. do; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, L. S.; MÜLLER, A. H.; ARRUDA, M. S. P.; ARRUDA, A. C.; RODRIGUES, S. T.; CARVALHO, M. G. de; Estudo químico de duas espécies de *Ouratea* da Amazônia. 29<sup>o</sup> RASBQ, PN-121, **2006**.

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

MARKHAM, K. R.; FRANKE, A.; MOLLOY, B. P. I.; WEBBY, R. F. Flavonoids profiles of New Zealand *Libocedrus* and related genera. *Phytochemistry*, v. 29, n. 2, p. 501-507, **1990**.

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

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

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

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

MCCORMICK, S.; ROBSON, K.; BOHM, B. Flavonoids of *Wyethia angustifolia* and *W. helenioides*. *Phytochemistry*, v. 25, n. 7, p. 1723-1726, **1986**.

MONACHE F. D.; ALBUQUERQUE, I. L. de; FERRARI, F.; BETOLLO, G. B. M.; A new catechin and a dimeric proantocianidin from *Ouratea* species. *Tetrahedron Letters*, , v. 8, n. 43, p. 4211-4214. **1967**. Chemical Abstracts, v. 68:104905n, p 10120, **1967**.

MONTEIRO, J. M.; NETO, E. M. F. L.; AMORIM, E. L. C. de; STRATTMANN, R. R.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. de; Teor de taninos de três espécies medicinais arbóreas simpátricas da Caatinga. *Revista Árvore*, v. 29, n. 6, p. 999-1005, **2005a**.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P. de; ARAÚJO, E. de L.; AMORIM, E. L. C. de, Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Quím. Nova*, v. 28, n. 5, p. 892-896, **2005b**.

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

MOREIRA, I. C.; CARVALHO, M. G. de; BASTOS A B. F.; BRAZ-FILHO, R.; A flavone dimer from *Ouratea hexasperma*. *Phytochemistry*, v. 51, p.833-838, **1999**.

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

NISHIYAMA, K.; ESAKI, S.; DEGUCHI, I.; SUGIYAMA, N.; KAMIYA, S. Syntheses of isoflavones e isoflavones glycosides, and their inhibitory activity against bovine liver  $\beta$ -galactosidase. *Biosci. Biotech. Biochem.* v. 57, n. 1, p. 107-114, **1993**.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. New methods of analyzing tannins. *J. Nat. Prod.*, v. 52, n. 1, p. 1-31, **1989**.

- OLIVEIRA, M. M. de; SAMPAIO, M. P.; SIMON, F.; GILBERT, B.; MORS, W. B.; Antitumor activity of condensed flavanols. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, v. 44, n. 1, p. 41-43, **1972**.
- OLIVEIRA, M. C. C. de; CARVALHO, M. G. de; Flavonóides das flores de *Stiffitia chrysantha* Mikan. *Quím. Nova*, Scielo, v. 22, n. 2, p. 182-184, **1999**.
- PEGNYEMB, D. E.; MBING, J. N.; ATCHADÉ, A. de T.; TIH, R. G.; SONDEGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Antimicrobial biflavonoids from the aerial parts of *Ouratea sulcata*. *Phytochemistry*, v. 66, p. 1922–1926, **2005**.
- PEGNYEMB, D. E.; GHOGOMU TIH, R.; SONDEGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Biflavonoids from *Ochna afzelii*. *Phytochemistry*, v. 57, p. 579-582, **2001**.
- RUBINSTEIN, I.; GOAD, L. J.; CLAGUE, A. D. H.; MULHEIRN, L. J. The 220 MHz NMR spectra of Phytosterols. *Phytochemistry*, v. 15, p. 195-200, **1976**.
- SALVADOR, G. S., CERVI, A. C., SANTOS, E. P. dos, Flórua do Morro dos Perdidos, Serra de Araçatuba, Estado do Paraná, Brasil: Ochnaceae. *Estud. Biol.*, v. 27, n. 61, p. 13, **2005**.
- SAMPAIO M. P.; OLIVEIRA, M. M. de; Triagem de substâncias e extratos de origem vegetal no carcinossarcoma de Walker 256. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, v. 47, n. 1 p. 149-153 **1975**.
- SANT'ANA, L. D. Determinação do conteúdo de substâncias fenólicas e avaliação da capacidade antioxidante de méis de *Apis mellifera* comercializados no estado do Rio de Janeiro. Dissertação de mestrado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, **2010**.
- SEIGLER, D. S.; SEILHEIMER, S.; KEESY, J.; HUANG, H. F., Tannins from four common *Acacia* species of Texas and Northeastern Mexico. *Economic Botany*, v. 40, n. 2, p. 220-232, **1986**.
- SHEN, J.; XU, J.; HU, J.; CHENG, Y.; QU, H., Determination of tannins in *Radix salvia miltiorrhiza* with phosphomolybdenum tungstic acid-casein reaction. *Fenxi Huaxue*, v. 36, n. 4, p. 553-555, **2008**. Chemical Abstracts, v. 149:39028 n, p. 61237, **2008**.
- SILVA, I. V.; FERREIRA, M. S.; WARDERLEY, A. G.; FERNANDES, M. J.; SOARES, L. A. L.; SOUZA, T. P de. Influence of extractive parameters on the preparation of a solution from *Psidium guajava* L. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 28, n. 1, p. 116-120, **2009**. Chemical Abstracts, v. 152:270737 n, p. 864226, **2009**.
- SOUSA, C. M. de M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S. da; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. de M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim. Nova*, v. 30, n. 2, p. 351-355, **2007**.
- SUZART, L.R.; DANIEL, J.F. de S.; CARVALHO, M.G. de; KAPLAN, M.A.C. Biodiversidade flavonoídica e aspectos farmacológicos de espécies dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* (Ochnaceae). *Quím. Nova*, v. 30, n. 4, p. 984-987, **2007**.

TAHARA, S.; MORIYAMA, M.; INGHAM, J. L.; MIZUTANI, J. 5,7,3',4',5'-penta-oxygenated and 2',6'-diprenylated isoflavones from *Piscidia erythrina*, *Phytochemistry*, v. 30, n. 8, p. 2769-2775, **1991**.

TAKHTAJAN, A. Diversity and classification of flowering plants. Columbia Univ. Press, New York. **1997**.

TIH, A. E.; GHOGOMU TIH, R.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Bongosin: A new chalcone-dimer from *Lophira alata*. *J. Nat. Prod.*, v. 53, n. 4, p. 964-967, **1990**.

VALADARES, Y. M.; OLIVEIRA, A. B.; CÔRTEZ, S. F.; LOMBARDI, J. A.; BRAGA, F. C. Atividade vasodilatadora *in vitro* de espécies de *Ouratea* (Ochnaceae) e de frações de *Ouratea Semiserrata* (Mart.) Engl. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 39, n. 1, p. 83-91, **2003**.

VELANDIA, J. R.; CARVALHO M. G. de; BRAZ-FILHO, R.; ent-16 $\alpha$ , 17-Dihydroxykauran-19-oic acid isolated from *Ouratea semiserrata* and the stereochemistry defiances of the chiral carbons C-4 and C-16. *Quím. Nova*, v. 21, n. 4, p.397-404, **1998a**.

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

VELANDIA J. R.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R.; WERLE A A. Biflavonoids and a glucopyranoside derivative from *Ouratea semiserrata*. *Phytochem. Anal.*, v. 13, n. 5, p. 283-292, **2002**.

VELANDIA, J. R. Constituintes químicos de *Ouratea semiserrata* e transformações químicas da neolignana aureina. Tese doutorado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, **1997**.

VERZA, S. G.; KREINECKER, M. T.; REIS, V.; HENRIQUES, A. T.; ORTEGA, G. G. Avaliação das variáveis analíticas do método de Folin-Ciocalteu para determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* L. *Quim. Nova*, v. 30, n. 4, p. 815-820, **2007**.

VIANNA, C. A. F. J. Substâncias fenólicas e avaliação da atividade antioxidante em méis de *Apis mellifera*. Dissertação de mestrado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, **2010**.

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

WANG, J.; XIAO, T.; ZHAO, Y.; ZHANG, J.; XIAO, X., Comparative study of determination of tannins in rhubarb by spectrophotometry and absorbed mass analysis. *Zhongguo Xinyao Zazhi*, v.18, n. 14, p. 1369-1371, **2009**. Chemical Abstracts, v. 153:21396 n, p. 1093199, **2009**.

WATSON, L., DALLWITZ, M.J., 1992 onwards. The Families of Flowering Plants. Version: 14th December 2000. <http://biodiversity.uno.edu.delta>.

XIE, K.; TANG, L.; ZHANG, W.; PIAO, X.; LOU, C.; CUI, J., Determination of tannin content in traditional Mongolian drug agei before and after processing with phosphomolybdenum tungstic acid/casein method. *Zhongyaocai*, v. 32, n. 10, p. 1517-1519, **2009**. Chemical Abstracts, v. 152:600115 n, p. 184492, **2010**.

ZINTCHEM, A. A.; ATCHADÉ, A. T.; GHOGOMU, R.; MBAFOR, J. T.; BLOND, A.; PEGNYEMB, D. E.; BODO, B. Flavonoids from *Ouratea staudtii* Van Tiegh. (ex Keay) (Ochnaceae), *Biochem Syst Ecol*, v, 35, p. 255-256, **2007**.