

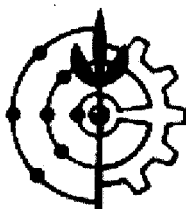
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

TESE

METABÓLITOS ESPECIAIS ISOLADOS DE *Luxemburgia octandra*
(Ochnaceae), *Laseguea erecta* (Apocynaceae), DO LÁTEX DE
Parahancornia amapa (Apocynaceae) e de *Solanum crinitum* (Solanaceae)

Cassia Cristina Fernandes Alves

2003



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

METABÓLITOS ESPECIAIS ISOLADOS DE *Luxemburgia octandra*
(Ochnaceae), *Laseguea erecta* (Apocynaceae), DO LÁTEX DE
Parahancornia amapa* (Apocynaceae) e de *Solanum crinitum
(Solanaceae)

CASSIA CRISTINA FERNANDES ALVES

Sob a Orientação do Professor: **Dr. Mário Geraldo de Carvalho**

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

Seropédica, Rio de Janeiro
Outubro de 2003

Alves, Cassia Cristina Fernandes

METABÓLITOS ESPECIAIS ISOLADOS DE *Luxemburgia octandra* (Ochnaceae), *Laseguea erecta* (Apocynaceae), DO LÁTEX DE *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) e de *Solanum crinitum* (Solanaceae)

Seropédica, Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Exatas, 2003
Tese de Doutorado.

Orientador:

Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho (ICE-UFRRJ)

Instituição:

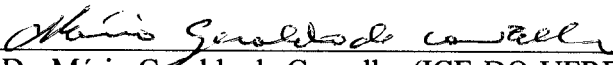
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (ICE-DQ)

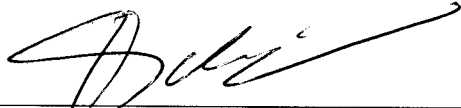
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

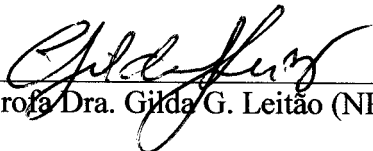
CASSIA CRISTINA FERNANDES ALVES

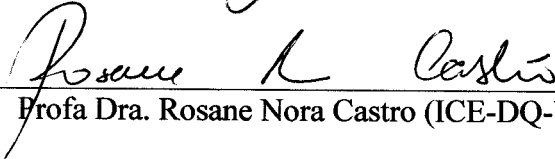
Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências, área de Concentração em Química Orgânica, como requisito parcial para a obtenção do grau de doutora em Química Orgânica.

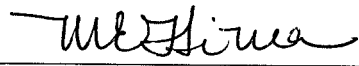
TESE APROVADA EM 24/10/2003

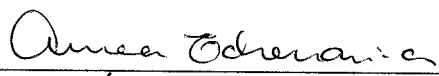

Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho (ICE-DQ-UFRRJ)
(Orientador e Presidente)

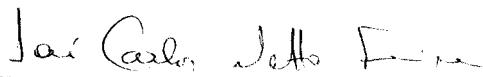

Prof. Dr. Jan Schripsema (LCQUI – CCT-UENF)


Profª Dra. Gilda G. Leitão (NPPN-UFRRJ)


Profª Dra. Rosane Nora Castro (ICE-DQ-UFRRJ)


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


Profª Dra. Áurea Echevarria (ICE-DQ-UFRRJ) (Suplente)


Prof. Dr. José Carlos Netto Ferreira (ICE-DQ-UFRRJ) (Suplente)

Dedico esta tese ao amor da minha vida, José Milton Alves, a pessoa que sempre esteve ao meu lado, o amigo de toda hora. É a pessoa com a qual vou contar para sempre.

Aos meus pais, Anahidor Fernandes Sobrinho e Cárita Custódio Fernandes, pessoas muito especiais na minha vida. Em especial, à minha querida mãe, um exemplo para mim, uma pessoa que foi fundamental para meus estudos.

À minha avó, Regina Caetano Nogueira, que me ajudou muito a percorrer o caminho até aqui.

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Dr. Mário Geraldo de Carvalho, pela orientação, amizade e ensinamentos indispensáveis em minha formação.
- Ao Professor Dr. Raimundo Braz-Filho pela amizade e pelo exemplo de integridade e sabedoria.
- À UFRRJ, pela oportunidade e acolhimento.
- À Professora Dra. Rosana Nora Castro (ICE-UFRRJ), que esteve sempre disponível para me auxiliar.
- À Professora Dra. Áurea Echevarria (ICE-UFRRJ), pela realização dos testes biológicos junto com a aluna de Doutorado Andressa Esteves.
- À Professora Dra. Sandra L. da Cunha e Silva (UESB), pela realização dos testes biológicos e pela amizade.
- Ao Professor Dr. Marcos N. Eberlin (IQ-Universidade Estadual de Campinas), pelos espectros de EMAR.
- A todos os técnicos do ICE-UFRRJ, Frances, Eli, Carlão, Maurício, Áurea Tatagiba, Conceição, Fábio, Rui e Aldir.
- À aluna de Iniciação Científica que me acompanhou durante a realização de parte deste trabalho Kedma.
- Aos colegas de laboratório, cujo companheirismo me auxiliou bastante, Bia, Tania, Patrícia, Ildomar, Lucinha, Kedma, Juliana, Marli, Adriana, Kelly, Virgínia, Luciano, Mário, Rute, Luiz. Em especial às minhas amigas Bia, Lucinha, Patrícia, Tânia, Juliana e Marli.
- Aos colegas da pós-graduação, todos, sem exceção, em especial à minha amiga Viviane Martins Rebello dos Santos, companheira nos estudos das disciplinas.
- A todos que, de algum modo, me ajudaram na realização deste trabalho.
- Aos meus pais, Anahidor Fernandes Sobrinho e Cárta Custódio Fernandes e minha avó Regina Caetano Nogueira que tudo fizeram para que eu sáisse de Quirinópolis, Goiás, e estudasse sempre, em escola pública, com dignidade.
- Aos meus parentes de Goiânia que me apoiaram muito nos estudos e me receberam em suas casas.
- À minha irmã Claudia Cristina Fernandes que sempre me apoiou.
- A todos os meus familiares, por acreditarem em mim.
- Aos meus sobrinhos e à minha afilhada que amo muito.

- A Universidade Estadual do Norte Fluminense pela obtenção dos espectros de RMN e dos espectros de massas, em especial ao Prof. Jan Schripsema pela obtenção dos espectros.
- Desde já, à banca examinadora, pelas sugestões e correções sugeridas a este trabalho.
- A CAPES, CNPq e FAPERJ pelos auxílios e bolsas concedidas.
- E por fim agradeço especialmente ao meu esposo José Milton Alves pelas sugestões, apoio e acompanhamento durante a realização de todo trabalho.

“Melhor do que a criatura,
fez o criador a criação.
A criatura é limitada.
O tempo, o espaço,
Normas e costumes.
Erros e acertos.
A criação é ilimitada.
Excede o tempo e o meio.
Projeta-se no Cosmos”

Cora Coralina, escritora goiana.

SUMÁRIO

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

Índice.....	Pág
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	19
3. Experimental Geral.....	20
3.1-Equipamentos e reagentes.....	20
3.2- Derivatizações.....	20
3.2.1- Metilação.....	20
3.2.2- Acetilação com anidrido acético e piridina.....	21
4. Referências.....	22
CAPÍTULO I.....	29
ESTUDO QUÍMICO DE <i>Luxemburgia octandra</i>	29
I.1- Constituintes químicos isolados de <i>Luxemburgia octandra</i>	30
I.2- Isolamento e purificação dos constituintes.....	31
I.3- Resultados e discussão	35
I.3.1- Determinação estrutural dos constituintes isolados de <i>L. octandra</i>	35
I.3.1.1- Esteróides.....	35
I.3.1.2- Identificação dos terpenóides 3 e 4.....	36
I.3.1.3- Flavonóides.....	43
I.4- Referências- Capítulo I.....	111
CAPÍTULO II.....	113
ESTUDO QUÍMICO DO LÁTEX DE <i>Parahancornia amapa</i>	113
II.1- Constituintes químicos isolados do látex de <i>P. amapa</i>	114
II.2- Isolamento e purificação dos constituintes.....	115
II.3- Resultados e discussão	117
II.3.1. Determinação estrutural dos constituintes.....	117
II.3.1.1- Feniletanóides.....	117
II.3.1.2- Ésteres de triterpenos	130
II.4- Referências- Capítulo II.....	134
CAPÍTULO III.....	135
ESTUDO QUÍMICO DE <i>Laseguea erecta</i>	135
III.1- Constituintes químicos isolados de <i>Laseguea erecta</i>	136
III.2- Isolamento e purificação dos constituintes.....	137
III.3- Resultados e discussão.....	139
III.3.1- Determinação estrutural dos constituintes.....	139

III.3.1.1- Cumarina (escopoletina).....	139
III.3.1.2- Lignana.....	146
III.3.1.3- Digitoxigenina.....	150
III.4- Referências-Capítulo III.....	162
CAPÍTULO IV.....	163
ESTUDO QUÍMICO DE <i>Solanum crinitum</i>	163
IV.1- Constituintes químicos isolados de <i>S. crinitum</i>	164
IV.2- Isolamento e purificação dos constituintes.....	165
IV.3- Resultados e discussão.....	166
IV.3.1- Determinação estrutural dos constituintes.....	166
IV.3.1.1- Glicoalcalóide.....	166
IV.3.1.2-Flavonóide tilirosídeo.....	176
IV.4- Referências-Capítulo IV.....	183
CAPÍTULO V.....	184
ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	184
V.1- Avaliação da toxicidade geral com <i>Artemia salina</i> Leach.....	185
V.2- Avaliação preliminar da atividade antihelmíntica de extratos de <i>Luxemburgia octandra</i> em camundongos naturalmente infectados por <i>Vampirolepis nana</i> e <i>Aspiculuris tetraptera</i>	186
V.3- Atividade alelopática dos glicoalcalóides totais e de solasonina de <i>Solanum crinitum</i>	190
V.4- Atividade citotóxica contra Carcinoma de Ehrlich e Leucemia humana K 562.....	193
V.5- Referências- Capítulo V.....	194
VI- CONCLUSÕES.....	197

Índice de Tabelas, Esquemas e Figuras.....	Pág
Tabela 1. Constituintes químicos isolados das espécies de Ochnaceae.....	4
Tabela 2. Alguns constituintes químicos isolados das espécies de Apocynaceae.....	12
Tabela 3. Espécies do gênero <i>Solanum</i> das quais foram isoladas solasonina.....	17
Tabela 4. Espécies e famílias das quais foi isolado o tilirosídeo (NAPRALERT 2002).	18
Esquema I.1- Marcha para o isolamento das substâncias dos galhos de <i>Luxemburgia octandra</i>	32
Esquema I.2- Marcha para o isolamento das substâncias das folhas de <i>Luxemburgia octandra</i>	33
Esquema I.3- Marcha para o isolamento das substâncias das flores de <i>Luxemburgia octandra</i>	34
Figura I.1- Espectro de IV das substâncias 1 e 2 (sitosterol e estigmasterol).....	35
Figura I.2- Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) das substâncias 1 e 2 (sitosterol e estigmasterol).....	36
Figura I.3- Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da substância 3 (lupeol).....	37
Figura I.4- Espectro de RMN de ¹ H ampliado entre 0,8 e 4,8 ppm (200 MHz, CDCl ₃) da substância 3 (lupeol).....	37
Figura I.5- Espectro de IV da substância 4 (Ácido betulínico).....	39
Figura I.6- Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da substância 4 (Ácido betulínico).....	39
Figura I.7- Espectro de RMN ¹ H ampliado entre 0,7 e 4,8 ppm (200 MHz, CDCl ₃) de 4.....	40
Figura I.8- Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, metanol-d ₄) da substância 4. (Ácido betulínico).....	40
Figura I.9- Espectro de RMN de ¹³ C DEPT (50 MHz, metanol-d ₄) da substância 4.....	41
Tabela I.1- Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de 4 comparados com a literatura (BILIA <i>et al.</i> , 1996).....	42
Figura I.10- Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da substância 5.....	43
Figura I.11- Espectro de IV da substância 6.....	44
Figura I.12- Espectro de RMN ¹ H (200 MHz) da substância 6 em CDCl ₃	45
Figura I.13- Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz) da substância 6 em CDCl ₃	46

Figura I.14- Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT, $\theta = 135$) da substância 6 em CDCl_3	46
Figura I.15- Espectro de massas da substância 6	47
Esquema I.1- Fragmentação de massas da substância 6	47
Tabela I.2- Dados de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) da substância 6 (CDCl_3) comparados com a literatura (SOBRINHO <i>et al.</i> , 2001).....	48
Figura I.16- Espectro de IV das substâncias 7 e 8 em pastilha de KBr.....	49
Figura I.17- Espectros de RMN ^1H (200 MHz) da mistura de 7 e 8 em D_3CCOCD_3	50
Figura I.18- Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz) da mistura de 7 e 8 em D_3CCOCD_3	51
Figura I.19- Espectro de RMN de ^{13}C DEPT ($\theta = 135$, 50 MHz) da mistura de 7 e 8 em D_3CCOCD_3	51
Tabela I.3-Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 7 e 8 comparados com a literatura (ACHENBACH <i>et al.</i> , 1988) da isoliquiritigenina (A) e LINUMA <i>et al.</i> , 1989 e OLIVEIRA, 2000) de B	52
Figura I.20- Espectro de IV da bichalcona 9	54
Figura I.21- Espectros de RMN de ^1H (200 MHz) da mistura de 9 em D_3CCOCD_3	55
Figura I.22- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) da bichalcona 9 em D_3CCOCD_3	56
Figura I.23- Espectro de RMN de ^{13}C DEPT ($\theta = 135$, 50 MHz) da bichalcona 9 (Luxenchalcona) em D_3CCOCD_3	56
Tabela I.4- Dados de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) da luxenchalcona 9 (D_3CCOCD_3).....	57
Figura I.24- Espectro de massas de alta resolução da bichalcona 9 obtido com Ionização Elétron Spray (IES) e detecção de íon negativo.....	58
Esquema I.5- Proposta de fragmentação para justificar os picos (m/z) de íons negativos de 9	58
Figura I.25- Espectro de IV da bichalcona metilada 10	60
Figura I.26- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de 10 em CDCl_3	61
Figura I.27- Expansão do espectro de RMN de ^1H entre 6,4-7,1 ppm (400 MHz) de 10 em CDCl_3	62
Figura I.28- Expansão do espectro de RMN de ^1H entre 7,3-8,0 ppm (400 MHz) de 10 em CDCl_3	63
Figura I.29- Espectro de RMN ^{13}C da bichalcona metilada 10 (100 MHz, CDCl_3).....	64

Figura I.30- Expansão do espectro de RMN ¹³ C entre 143 e 192 ppm da bichalcona metilada 10 (100 MHz, CDCl ₃).....	65
Figura I.31- Espectro de RMN HMQC (400 MHz, CDCl ₃) da bichalcona metilada 10	66
Figura I.32- Espectro de RMN HMBC (400 MHz, CDCl ₃) da bichalcona metilada 10	67
Figura I.33- Espectro de NOESY (400 MHz, CDCl ₃) da bichalcona metilada 10	68
Figura I.34- Espectro resultante de dupla irradiação e subtração de espectros (NOE) do derivado metilado 10 em CDCl ₃	69
Figura I.35- Espectro de massas (IE) da bichalcona metilada 10	70
Esquema I.6- Fragmentação de massas da bichalcona metilada 10	70
Tabela I.5- Dados de RMN 1D e 2D de ¹ H (400 MHz) e de ¹³ C (100 MHz) da trimetil-luxenalcona 10	71
Figura I.36- Espectro de RMN ¹ H ampliado entre δ _H 6,5 e 7,8 ppm da substância 11 em CDCl ₃	73
Figura I.37- Espectro de RMN ¹ H (HOMOCOSY, 200 MHz) da substância 11 em CDCl ₃	74
Figura I.38- Espectro de RMN ¹ H (200 MHz) e experimento de NOEDIFF (dupla irradiação e subtração de espectros) da bichalcona permetilada 11 em CDCl ₃	75
Figura I.39- Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz) da bichalcona permetilada 11 em CDCl ₃	76
Tabela I.6- Dados de RMN de ¹ H (200 MHz) e ¹³ C (50 MHz) de 11 (CDCl ₃).....	77
Figura I.40- Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) da substância 12 em CDCl ₃	80
Figura I.41- Espectros de RMN ¹ H (400 MHz) ampliados da substância 12 em CDCl ₃	81
Figura I.42- Espectros de RMN ¹ H (400 MHz) ampliados da substância 12 em CDCl ₃	82
Figura I.43- Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz) da substância 12 em CDCl ₃	83
Figura I.44- Espectro de RMN ¹³ C (BBD, 50 MHz) ampliados da substância 12 em CDCl ₃	84
Figura I.45- Espectro de RMN ¹³ C DEPT (θ=135) da substância 12 em CDCl ₃ a 200 MHz.....	84
Tabela I.7- Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (50 MHz) da bichalcona acetilada 12 comparados com a bichalcona 9	85

Figura I.46- Espectro de IV da substância 13	87
Figura I.47- Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) da substância 13 em D ₃ COCD ₃	88
Figura I.48- Espectro de RMN ¹ H da substância 13 expandido na região de δ _H 2,7 a 3,3 ppm.....	89
Figura I.49- Espectro de RMN ¹ H da substância 13 expandido na região de δ _H 5,4 a 8,0 ppm.....	90
Figura I.50- Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz) da substância 13 em D ₃ COCD ₃	91
Figura I.51- Espectro de RMN ¹³ C APT da substância 13 em D ₃ COCD ₃	92
Figura I.52- Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio-carbono (¹ H, ¹³ C-COSY- ¹ J _{CH} , HMQC) da substância 13 expandido na região entre δ _C 90 a 130 em D ₃ COCD ₃	93
Figura I.53- Espectro bidimensional NOESY expandido na região entre δ 5,3 a 8,3 ppm da substância 13 em D ₃ COCD ₃	94
Figura I.54- Espectro bidimensional NOESY expandido na região entre δ 2,7 a 3,3 ppm da substância 13 em D ₃ COCD ₃	95
Tabela I.8- Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) do biflavonóide 13 (D ₃ COCD ₃) comparados com a 2'',3''-diidroochnaflavona (DMSO-d ₆) (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2002).....	96
Figura I.55- Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) do derivado 14 em CDCl ₃	98
Figura I.56- Espectros de RMN ¹ H (400 MHz) expandidos (a, b, c, d, e) da substância 14 em CDCl ₃	99
Figura I.57- Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz) da substância 14 em CDCl ₃	100
Figura I.58- Espectro de RMN ¹³ C expandido entre δ _C 92 a 145 ppm da substância 14 em CDCl ₃	101
Figura I.59- Espectro de RMN ¹³ C expandido entre δ _C 154 a 200 ppm da substância 14 em CDCl ₃	101
Tabela I.9- Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) do biflavonóide 14 (CDCl ₃) comparados com a trimetil-2'',3''-diidroochnaflavona (CDCl ₃) (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2002).....	102
Figura I.60- Modelos de substâncias usados para comparar com a mistura de substâncias da fração 15	104
Tabela I.10- Dados de RMN ¹ H e ¹³ C dos modelos: Mod-1 (AGRAWAL <i>et al.</i> , 1989 e AGRAWAL <i>et al.</i> , 1981), Mod-2 (DMSO-d ₆) (CHENG <i>et al.</i> , 2000), Mod-3 (DMSO-	

d ₆) (CHENG <i>et al.</i> , 2000), Mod-4 (PALME <i>et al.</i> , 1994).....	105
Tabela I.11- Dados de RMN ¹ H (400 MHz) (DMSO-d ₆) e ¹³ C (50 MHz) (metanol-d ₄) da mistura dos flavonóides 15a e 15b comparados com os modelos Mod-4 e Mod-2, respectivamente.....	106
Figura I.61-Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) da mistura das substâncias 15a e 15b	107
Figura I.62-Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, metanol-d ₄) da mistura das substâncias 15a e 15b	108
Figura I.63-Espectro de RMN ¹³ C ampliado entre 96-185 ppm (50 MHz, metanol-d ₄) da mistura das substâncias 15a e 15b	108
Figura I.64- Espectro de RMN ¹³ C DEPT (θ=135, 50 MHz) da mistura das substâncias 15a e 15b em metanol-d ₄	109
Figura I.65-Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) da substância 15a	110
Figura I.66-Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, metanol-d ₄) da substância 15a	110
Esquema II.1- Marcha para o isolamento das substâncias do látex de <i>Parahancornia amapa</i>	115
Figura II.1- Espectro de IV da substância 16 (cornosídeo).....	118
Figura II.2- Espectro de RMN ¹ H (200 MHz) da substância 16 em metanol-d ₄	118
Figura II.3- Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz) da substância 16 em metanol-d ₄	119
Figura II.4- Espectro de RMN ¹³ C DEPT (50 MHz) da substância 16 em metanol-d ₄	120
Figura II.5- Espectro de massas da substância 16	120
Esquema II.2- Fragmentação de massas da substâncias 16	121
Tabela II.1- Dados de RMN ¹ H (200 MHz) e ¹³ C (50 MHz) do cornosídeo 16 (metanol-d ₄) comparados com a literatura (KHAN <i>et al.</i> , 1992).....	121
Figura II.6- Espectro de RMN ¹ H (200 MHz) do derivado acetilado 17 em CDCl ₃	122
Figura II.7- Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz) do derivado acetilado 17 em CDCl ₃	123
Figura II.8- Espectro de RMN ¹³ C DEPT (50 MHz) do derivado 17 em CDCl ₃	123
Tabela II.2- Dados de RMN ¹ H (200 MHz) e ¹³ C (50 MHz) do derivado acetilado 17 em (CDCl ₃) comparados com dados do original 16	124

Figura II.9- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) da mistura das substâncias 16 , 18 e 19 em metanol- d_4	125
Esquema II.3- Prováveis precursores da substância 19	126
Figura II.10- Espectro de RMN de ^{13}C DEPT (50 MHz) da mistura das substâncias 16 , 18 e 19 em metanol- d_4	126
Tabela II.3- Dados de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) das substâncias 18 e 19 (metanol- d_4) comparados com dados da literatura (KHAN <i>et al.</i> , 1992 e IDA <i>et al.</i> , 1994).....	127
Figura II.11- CG da amostra PALAAM 23 (mistura das substâncias 16 , 18 e 19).....	127
Figura II.12- Espectro de massas da substância 18	128
Esquema II.4-Fragmentação de massas da substância 18	128
Figura II.13- Espectro de massas da substância 19a	129
Esquema II.5-Fragmentação de massas da substância 19a	129
Figura II.14- Espectro de massas da substância 16	130
Figura II.15- Espectros de RMN ^1H (200 MHz) da mistura das substâncias 20 , 21 e 22 (b-c) em CDCl_3	131
Figura II.16- Espectros de RMN ^{13}C (50 MHz) da mistura das substâncias 20 , 21 e 22 (b-d) em CDCl_3	132
Tabela II.4- Dados de RMN ^{13}C (50 MHz) das substâncias 20a , 21a , 22a comparados com dados da literatura do lupeol, β -amirina, α -amirina (SOBRINHO <i>et al.</i> , 1991 e BARRETO <i>et al.</i> , 1998).....	133
Esquema III.1- Marcha para o isolamento das substâncias do caule de <i>Laseguea erecta</i>	137
Figura III.1- Espectro de IV da substância 23 (escopoletina).....	140
Figura III.2- Espectro de RMN ^1H (200 MHz) da substância 23 em metanol- d_4	140
Figura III.3- Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz) da substância 23 em CDCl_3	141
Figura III.4- Espectro de RMN ^1H (HOMOCOSY, 200 MHz) da substância 23 em metanol- d_4	142
Tabela III.1-Dados de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) da substância 23 (metanol- d_4) comparados com a literatura (SANKAR <i>et al.</i> , 1982).....	142
Figura III.5- Espectro de massas da substância 23	143
Esquema III.2- Fragmentação de massas da substância 23	143
Figura III.6- Espectro de RMN ^1H (400 MHz) da substância 24 em D_3CCOCD_3	144

Figura III.7- Espectro resultante da dupla irradiação e subtração de espectros (NOE) do derivado metilado 24 em D ₃ CCOCD ₃	145
Figura III.8- Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) da substância 25 em D ₃ CCOCD ₃	146
Figura III.9- Espectros de RMN ¹ H (400 MHz) ampliados da substância 25 em D ₃ CCOCD ₃	147
Figura III.10- Espectro de NOESY da substância 25 em D ₃ CCOCD ₃	148
Figura III.11- Espectro de massas da substância 25	148
Esquema III.3- Fragmentação de massas da substância 25	149
Tabela III.2- Dados de RMN ¹ H (400 MHz) da substância 25 (D ₃ CCOCD ₃) comparados com a literatura (CUENCA <i>et al.</i> , 1991).....	149
Figura III.12- Espectro de IV da substância 26	151
Figura III.13- Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) da substância 26 em CDCl ₃	151
Figura III.14- Espectros de RMN ¹ H (400 MHz) ampliados da substância 26 em CDCl ₃	152
Figura III.15- Espectro de RMN ¹ H ¹ H COSY (400 MHz, CDCl ₃) da substância 26	153
Figura III.16- Espectro de RMN ¹ H ¹ H COSY (400 MHz, CDCl ₃) ampliado de δ _H 1,0 a 2,0 ppm da substância 26	154
Figura III.17- Espectro bidimensional NOESY da substância 26 em CDCl ₃	155
Figura III.18- Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz) da substância 26 em CDCl ₃	156
Figura III.19- Espectros de RMN ¹³ C (100 MHz) ampliados da substância 26 em CDCl ₃	157
Figura III.20- Espectros de RMN HMQC (400 MHz, CDCl ₃) da substância 26	158
Figura III.21- Espectros de RMN HMBC (400 MHz, CDCl ₃) da substância 26	159
Figura III.22- Espectro de massas da substância 26	160
Esquema III.4- Fragmentação de massas da substância 26	160
Tabela III.3- Dados de RMN ¹ H (400 MHz) da substância 26 (CDCl ₃) comparados com a literatura (ABE <i>et al.</i> , 1992).....	161
Figura IV.1- Espectro de IV da substância 27 (solasonina).....	167
Figura IV.2- Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) da substância 27 em piridina-d ₅	168
Figura IV.3- Espectros de RMN ¹ H (400 MHz) ampliados da substância 27 em piridina-d ₅	169
Figura IV.4- Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) ampliado da substância 27 em piridina-d ₅	170

Figura IV.5- Espectro de RMN ¹ H COSY (400 MHz, piridina-d ₅) da substância 27....	171
Figura IV.6- Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz) da substância 27 em piridina-d ₅	172
Figura IV.7- Espectros de RMN ¹³ C (100 MHz) ampliados da substância 27 em piridina- d ₅	173
Tabela IV.1- Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e RMN ¹³ C (100 MHz) da substância 27 (piridina-d ₅) comparados com a literatura (SHASHI <i>et al.</i> , 1980).....	174
Figura IV.8- Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, piridina-d ₅) da substância 28 em metanol- d ₄	175
Figura IV.9- Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) da substância 29 em DMSO-d ₆	177
Figura IV.10- Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) ampliado δ_H 3,6 a 5,5 ppm da substância 29 em DMSO-d ₆	178
Figura IV.11- Espectro de RMN ¹ H (400 MHz) ampliado δ_H 6,0 a 8,2 ppm da substância 29 em DMSO-d ₆	178
Figura IV.12- Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz) da substância 29 em DMSO-d ₆	179
Figura IV.13- Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz) ampliados da substância 29 em DMSO- d ₆	180
Figura IV.14- Valores de ¹³ C mostrando o efeito do substituinte glicose nos carbonos C- 2, C-3, C-4, C-1' e 2 CH-2', 6' do flavonóide tilirosídeo em relação ao canferol.....	181
Tabela IV.2- Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e RMN ¹³ C (100 MHz) da substância 29 (DMSO-d ₆) comparados com o tilirosídeo (metanol-d ₄) (KAOUADJI, 1990).....	182
Tabela V.1- Influência dos extratos LOFE, LOFM e LOFA e de quimioterápicos, na eliminação de <i>Vampirolepis nana</i> e <i>Aspicularis tetraptera</i> , em camundongos naturalmente infectados	190
Figura V.1- Dados médios sobre a porcentagem de plântulas (%) de alface obtidos após aplicação de diferentes concentrações do extrato dos glicoalcalóides totais de <i>S.</i> <i>crinitum</i> . Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤ 0,05).....	191
Figura V.2- Dados médios sobre a porcentagem de plântulas (%) de alface obtidos após aplicação de diferentes concentrações de solasonina. Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤ 0,05).....	192

Tabela V.2- Dados médios (4 repetições) do comprimento (cm) da raiz primária e da parte aérea de plântulas de alface submetida à aplicação de diferentes dosagens do extrato dos glicocalcóides totais e de solasonina.....192

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	deslocamento químico (ppm)
M^+	pico do íon molecular
Ac	acetila
Ac_2O	anidrido acético
AcOEt	acetato de etila
AcOH	ácido acético
aq	aquoso
APT	Attached proton Test
Ax	axial
CC	cromatografia em coluna (pressão atmosférica)
CCD	cromatografia em camada delgada
CG-EM	cromatografia de gás acoplada a espectrometria de massas
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
COLOC	Correlation spectroscopy via Long-range Couplings
COSY	correlated spectroscopy
d	dubleto
dd	duplo dubleto
dl	dubleto largo
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
$DMSO_{d6}$	dimetilsulfóxido deuterado
EM	espectrometria de massas
EMAR	espectrometria de massas de alta resolução
eq	equatorial
EtOH	etanol
Ext.	extrato
HBBD	Hydrogen Band Broad Decoupled
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
J	constante de acoplamento em Hertz
m	multipleteo

<i>m/z</i>	relação massa/carga
MeOH	metanol
MHz	megahertz
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Correlation Spectroscopy
Pf	Ponto de fusão
PND	Proton Noise Decoupling
q	quarteto
Rf	Fator de Retentividade
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
s	singleto
sl	singleto largo
t	triplete

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

RESUMO

ALVES, Cassia Cristina Fernandes. **Metabólitos Especiais Isolados de *Luxemburgia octandra* (Ochnaceae), *Laseguea erecta* (Apocynaceae), Do Látex de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) e de *Solanum crinitum* (Solanaceae)**. Seropédica, UFRRJ, 2003. 197 p. (Tese, doutorado em Química Orgânica).

A análise das frações obtidas do processamento cromatográfico dos extratos das espécies *Luxemburgia octandra* (Ochnaceae), látex de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae), *Laseguea erecta* (Apocynaceae) e *Solanum crinitum* (Solanaceae) conduziu ao isolamento de constituintes de diferentes classes de metabólitos especiais. De *Luxemburgia octandra* foram isolados os esteróides, sitosterol e estigmasterol, dois triterpenos, lupeol e ácido betulínico, uma chalcona sem substituintes, a isoliquiritigenina (2,4,4'-trihidroxichalcona) e a 2,4,3',4'-tetraidroxichalcona, uma mistura de C-glicosilflavonóides, 8-C-glicopiranosilluteolina (5,7,3',4'-tetraidroxi-8-C-glicopiranosil-flavona) e a 8-C-glicopiranosil-7-metil-luteolina, e dois bisflavonóides, 2'',3''-diidroochnaflavona [5,7,4'-trihidroxi-3'-O-4''-5'',7''-diidroxi-4'-O-3'''-2'',4'''-diidroxi-3'-O-(β-D-glicopiranosil-etileno) cicloexadienona] e 2,4,3'-trihidroxichalcona-(4'-O-3''')-2'',4'''-diidroxi-3'-O-(β-D-glicopiranosil-etileno) cicloexadienona]. Do látex de *P. amapa* foram isolados três feniletanóides, cornosídeo [4-hidroxi-4-(2-O-β-D-glicopiranosil-etileno) cicloexadienona], 2-*p*-hidroxifeniletanol e 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-etanol e uma mistura de ésteres acil-lupeol, acil-α-amirina e acil-β-amirina. Do caule de *Laseguea erecta* foram isolados a cumarina (escopoletina), o lignóide pinosinol e a saponina digitoxigenina (α-L-tevetosídeo). Dos frutos de *S. crinitum* foi isolado o alcalóide esteroide solasonina e dos tricomas dos frutos isolou-se o flavonóide tilirosídeo [3-O-(β-D-glicopiranosil-6'-cumaril)-canferol].

A estruturas foram identificadas através da análise de espectros IV, massas e RMN¹H e ¹³C, incluindo técnicas especiais 1D e 2D de interação homonuclear (¹Hx¹H-COSY) e heteronuclear (¹Hx¹³C-COSY) das substâncias naturais e derivados metilados e acetilados.

Além da identificação de uma nova bichalcona natural que foi denominada luxenchalcona, foram preparados novos derivados desta substância, o trimetiléter, o permetiléter e o peracetil éster, além do tetracetil-cornosídeo e da solasonina-peracetilada.

Realizaram-se os testes biológicos: toxicidade com *Artemia salina*, atividade anti-helmíntica com extratos de *Luxemburgia octandra*. Atividade citotóxica contra carcinoma de Ehrlich e leucemia humana K562 foram feitos com a solasonina, os glicoalcalóides totais e o tilirosídeo de *Solanum crinitum* e da luxenchalcona e seus derivados. Os glicoalcalóides totais e a solasonina foram avaliados quanto à atividade alelopática.

Palavras chave: Flavonóides, terpenos, feniletanóides.

ABSTRACT

ALVES, Cassia Cristina Fernandes. **Species Metabolites isolated from *Luxemburgia octandra* (Ochnaceae), *Laseguea erecta* (Apocynaceae), Latex of *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) and from *Solanum crinitum* (Solanaceae).** Seropédica, UFRRJ, 2003. 197 p. (Tese, PhD in Organic Chemistry).

The analysis of the fractions from the chromatographic fractionation of the extracts from *Luxemburgia octandra* (Ochnaceae), latex from *Parahancornia amapa* (Apocynaceae), *Laseguea erecta* (Apocynaceae) and from *Solanum crinitum* (Solanaceae) led to the isolation of some chemical constituents which belong to different classes of special metabolites. From the branches of *L. octandra* were isolated sitosterol, stigmasterol, lupeol, betulinic acid, chalcone, isoliquiritigenin (2,4,4'-trihydroxychalcone), 3,4,3',4'-tetrahydroxychalcone, a mixture of two C-glucopiranosylflavone, 8-C-glucopiranosilluteolin and 8-C-glucopiranosyl-7-methyl-luteolin, and two biflavonoids, 2",3"-dihydroochnaflavone [5,7,4'-trihydroxychalcone-(4'-O-3"-)-2",4"-dihydroxychalcone. From the latex of *P. amapa* were isolated three phenylethanoids, cornoside [4-hydroxy-4-(2-O-β-D-glycopiranosyl-ethylene) cyclohexadienone], 2-*p*-hydroxyphenylethanol and 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-ethanol and a mixture of acyl esters of lupeol, α-amyrin and β-amyrin. From the wood of *L. erecta* were isolated scopoletin, the lignoid pinosresinol and the saponin digitoxigenin. The steroidal alkaloid solasonin and the flavonoid tiliroside [3-O-(β-D-glucopiranosyl-6'-coumaroil)-kanferol] were isolated, respectively, from the fruits and from the trichomes of *S. crinitum*.

The structures were determined by IR, MS and ¹H and ¹³C NMR spectra analysis. Besides the identification of the new bichalcone, named luxenchalcone, new derivatives, luxenchalcone-trimethylether, luxenchalcone-permethylether, luxenchalcone-peracetylester, tetraacetyl-cornoside and peracetylsolasonine were also prepared.

The general toxicity was evaluated against *Artemia salina*. The anti-helminthic activity of extracts from *L. octandra* was also studied. Furthermore, the cytotoxic activity against Ehrlich carcinoma and K 562 human leukemia of solasonine, total glycoalkaloids, tiliroside, luxenchalcone and its derivatives was carried out. Finally, the total glycoalkaloids and solasonine were also tested for allelopathic activity and were found to be quite active.

Key words: Flavonoids, terpenoids, phenylethanoids

1. Introdução

O estudo fitoquímico está cada vez mais relacionado com outras áreas do conhecimento de modo interdisciplinar. Neste sentido os estudos relacionados com produtos naturais tem sido mais diversificados e, conseqüentemente, tem-se enfatizado o relacionamento com estudos enzimáticos e, inclusive, o entendimento dos mecanismos de ação dos mesmos através de modelagem molecular. Muitos bioquímicos que estudam as enzimas (suas estruturas, funções, modos de ação, etc...) estão avançando nesta área de conhecimento e procurando correlacionar seus estudos com a química de produtos naturais. Este direcionamento dos conhecimentos científicos tem revelado que o desenvolvimento da ecologia química, química, quimiotaxonomia, taxonomia e busca de substâncias com atividade biológica dependem do trabalho interdisciplinar de profissionais de várias áreas, inclusive do trabalho dos fitoquímicos. Neste sentido qualquer novas informações sobre a química de uma espécie vegetal, mesmo com estruturas conhecidas, deve ser considerado relevante como conhecimento científico.

Uma das funções da ecologia química é procura entender as funções dos produtos naturais nas plantas e suas interações com o meio ambiente. Há vários fatores bioquímicos, tais como: odor e cor das flores, valor nutritivo do néctar e do pólen que são responsáveis pela interação inseto-planta. Em relação à cor das flores, o grupo mais importante de pigmentos florais é os flavonóides, que contribuem com as cores ciânicas, amarelo e branca (HABORNE, 1985).

A quimiotaxonomia utiliza a composição química para estabelecer correlações com a classificação morfológica. Como exemplo pode-se citar o caso de alguns gêneros da família Ochnaceae (*Ouratea*, *Luxemburgia*, *Ochna*,...) que são considerados muito complexos morfológicamente, devido ao fato de que várias de suas características se interceptam com as de outros gêneros. Existem trabalhos sobre gêneros da família Ochnaceae que citam a frequência de flavonóides e sugerem o possível uso destes metabólitos como marcadores sistemático da família.

A busca da longevidade e melhoria da vida humana tem motivado a procura de substâncias naturais bioativas. Entre os mais importantes grupos de metabólitos secundários vegetal bioativos citam-se, tradicionalmente, os alcalóides, os terpenóides e os flavonóides. Os flavonóides possuem várias atividades biológicas e funções nas plantas, entre elas pode-se destacar: antioxidantes, reguladores de crescimento, polinizadores, coloração, sabor cítrico, etc.

Os fatos citados acima revelam a importância do desenvolvimento de trabalhos sobre o estudo químico de plantas de diferentes famílias. Neste trabalho damos ênfase ao estudo de espécies de Ochnaceae, Apocynaceae e Solanaceae.

A família Ochnaceae possui cerca de 28 gêneros e 400 espécies tropicais e subtropicais. No Brasil, ocorrem aproximadamente 9 gêneros com 105 espécies (BARROSO, 1986). O estudo químico de espécies desta família como as dos gêneros *Lophira*, *Ochna* e *Ouratea*, tem revelado a presença de flavonóides e biflavonóides com maior frequência. O estudo químico de espécies de Ochnaceae tem conduzido ao isolamento e identificação de flavonóides com estruturas mais complexas, entre outras classes de metabólitos especiais (Tabela 1, página 4). A obtenção destes flavonóides permite fazer avaliações com a perspectiva de identificar compostos com maior potencial farmacológico. Isto está de acordo com CODY *et al.* 1985 que relatam que "avaliações clínicas de flavonóides tem mostrado que os biflavonóides, in vivo, possuem maior ação do que os flavonóides simples". Neste sentido, temos detectado atividade antitumoral de biflavonóides isolados de espécies desta família, como as

estruturas **33** e **38** entre outras (GRYNBERG *et al.*, 1994; GRYNBERG *et al.*, 1998 e GRYNBERG *et al.*, 2002). Estas avaliações permitiram sugerir que estes flavonóides podem ser úteis na terapia do câncer (CARVALHO *et al.*, 2002).

Outras informações relevantes em relação aos trabalhos com espécies de Ochnaceae é a identificação de novos flavonóides na literatura e na família e a riqueza do material didático obtido com os espectros de RMN e massas das estruturas isoladas.

Considerando as informações citadas acima estamos desenvolvendo estudos para a identificação de metabólitos especiais bioproduzidos por espécies do gênero *Luxemburgia* (Ochnaceae). Isto certamente vai ampliar o conhecimento da química da família Ochnaceae revelando metabólitos que poderão ser usados como marcadores sistemáticos e, inclusive, identificar substâncias que serão usadas para avaliar atividades biológicas.

Trabalhos recentes, desenvolvidos pelo grupo de produtos naturais da UFRRJ tem relatado o isolamento e determinação estrutural de flavonóides e biflavonóides em espécies de *Ouratea* (MOREIRA *et al.*, 1994; BASTOS *et al.*, 1999; VELANDIA *et al.*, 1998; CARVALHO *et al.*, 1998) e desenvolvido estudo químico de espécies de *Luxemburgia*. No estudo do gênero *Luxemburgia* foram isolados esteróides, ácidos graxos, triglicerídeos, saponina e chalcona do extrato hexânico do caule. Do extrato metanólico foram isolados: flavonóides e triterpenos. Das folhas da espécie *Luxemburgia nobilis* foram isolados biflavonóides e entre eles uma flavona-flavanona nova (CARVALHO *et al.*, 2000 e OLIVEIRA *et al.*, 2002). Os resultados obtidos com o estudo químico de *Luxemburgia octandra* faz parte deste trabalho com os mesmos objetivos revelados acima (CARVALHO *et al.*, 2003).

A família Apocynaceae se caracteriza como representante das espécies bioprodutoras de alcalóides, terpenóides e iridóides, ocorrendo com menor frequência os flavonóides (FRANÇA *et al.*, 2000 e SIDDIQUI & BEGUM, 1999) (Tabela 2).

Entre as espécies de Apocynaceae estudadas pelo nosso grupo temos *Himatanthus articulata* da qual foram isolados iridóides e triterpenos (BARRETO *et al.*, 1998), *Dipladenia martiana* que forneceu triterpenos pentacíclicos e flavonóides glicosilados (CARVALHO *et al.*, 2001). E recentemente estão sendo estudados o látex de *Parahancornia Amapa*, *Laseguea erecta* e *Plumeria lancifolia*.

Parahancornia Amapa é endêmica da região Amazônica e é comum no Estado do Amapá, onde é conhecida como amapazeiro. As cascas do caule e o látex desta espécie têm sido utilizados na medicina popular local como tônico e anti-sifílico. Há apenas dois trabalhos publicados sobre o estudo químico desta espécie (CARVALHO *et al.*, 2001 e SOBRINHO *et al.*, 1991). Estes trabalhos descrevem o isolamento e identificação de triterpenos e ésteres acil lupeóis das raízes, cascas e madeira da planta. A continuação do estudo químico desta planta tem como objetivo identificar os constituintes dos extratos mais polares e de partes da planta cujos estudos ainda não foram realizados.

A química do gênero *Laseguea* ainda é desconhecida e por isso estamos desenvolvendo o estudo fitoquímico de um exemplar de *L. erecta* coletado na mata atlântica em Ouro Preto-MG.

Os resultados do estudo químico destas espécies permitirão avaliar atividades biológicas de constituintes dos mesmos e correlacionar os gêneros *Parahancornia*, *Laseguea*, *Himatanthus* e *Plumeria* com as classes dos constituintes químicos isolados. Provavelmente a diferença química dos mesmos servirá para detectar marcadores sistemáticos entre eles.

A família Solanaceae é rica em metabólitos secundários ativos. Em particular o gênero *Solanum* produz uma grande variedade de saponinas esteroidais e glicoalcalóides

de importância na resistência natural destas plantas contra muitas pragas (El SAUED *et al.*, 1998). Este gênero é o maior e mais complexo gênero da família Solanaceae, com cerca de 1500 espécies e 5000 epítetos. Está distribuído, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais do mundo e tem o centro da diversidade e distribuição na América do Sul (AGRA, 1999).

O gênero *Solanum* é conhecido por produzir efeito alelopático devido aos glicoalcalóides espirosolanos, tais como, solamargina e solasonina que suprimem o crescimento de sementes de outras plantas (FUKUHARA & KUBO, 1997).

Os glicoalcalóides de Solanaceae são indiscutivelmente um dos grupos de drogas mais pesquisados de produto secundário de plantas em termos de sua habilidade para influenciar outros organismos. Isto é primariamente consequência da presença de duas plantas de importância global, batata e tomate, e das que causam envenenamento em humanos. Por comparação, muito pouco é conhecido sobre a atividade biológica dos glicoalcalóides de plantas selvagens.

Muitas plantas do gênero *Solanum* apresentam atividade moluscicida, e esta atividade pode estar associada à presença de glicoalcalóides esteroidais (SILVA, 2002).

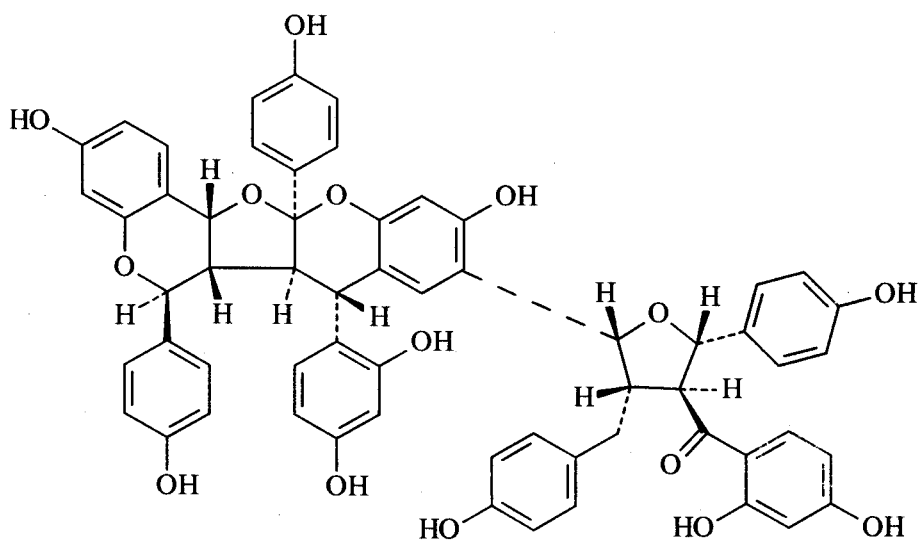
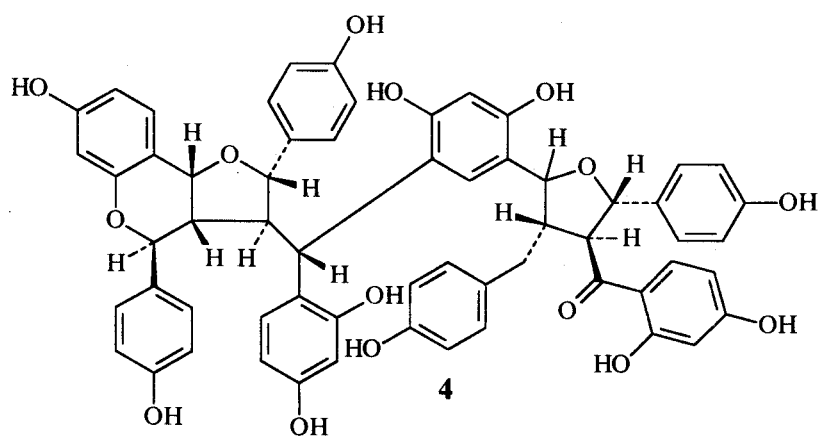
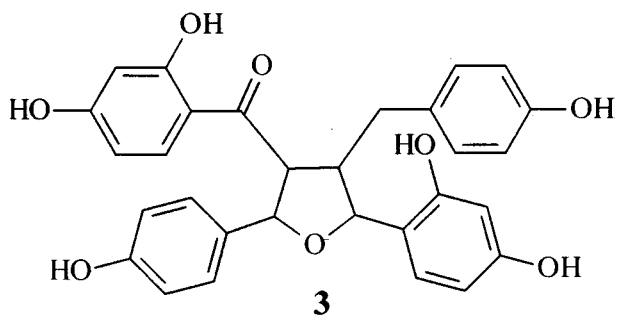
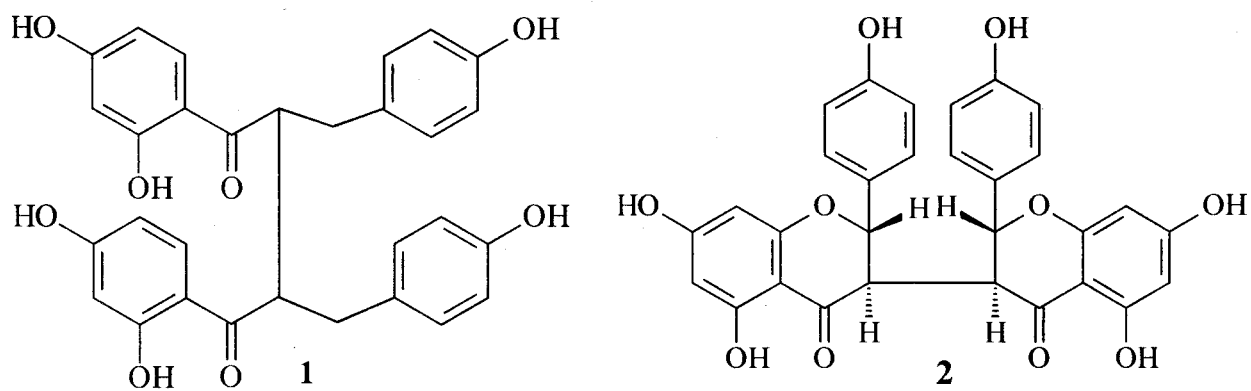
a) Ocorrência de substâncias em Ochnaceae

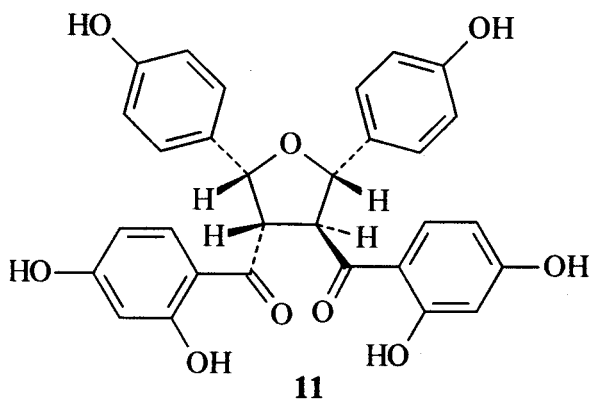
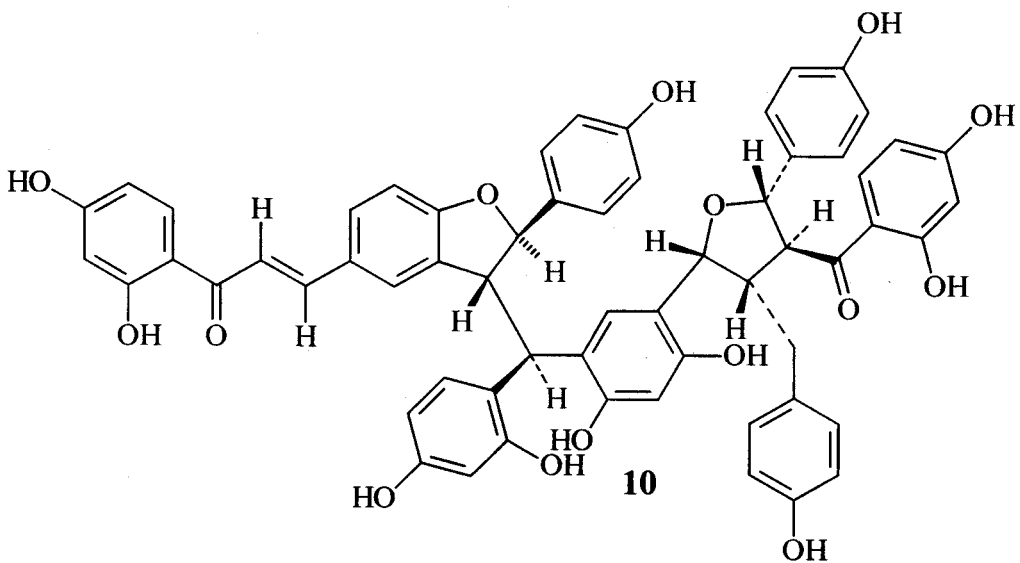
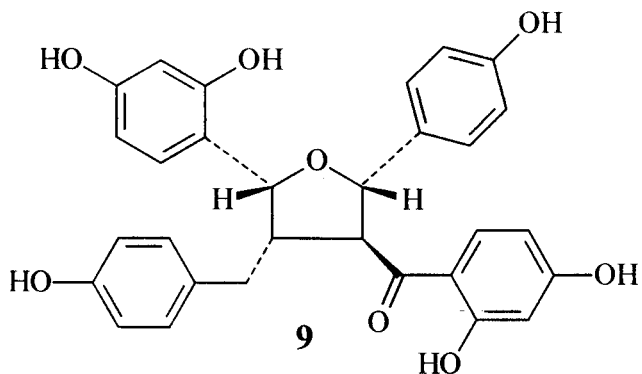
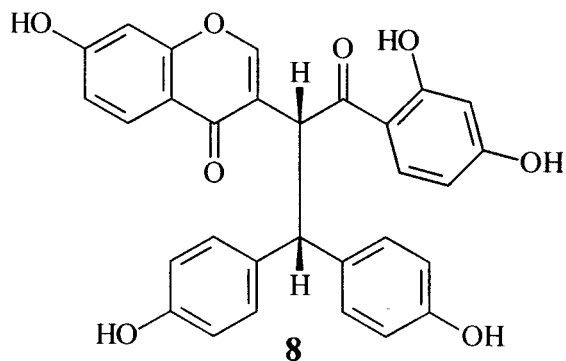
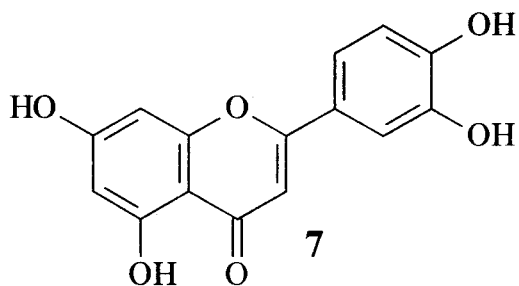
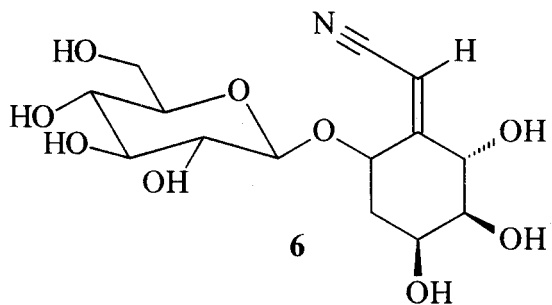
A família Ochnaceae é caracterizada por bioproduzir entre outras classes e compostos flavonóides, biflavonóides, tetraflavonóides e chalconas. A tabela 1 mostra as substâncias isoladas das espécies de ochnaceae já estudadas. Apenas duas espécies do gênero *Luxemburgia* foram estudadas até o momento e foram isolados destas espécies biflavonóides e bichalcona. Isto revela, até o momento, uma diferença química deste gênero e *Ouratea*.

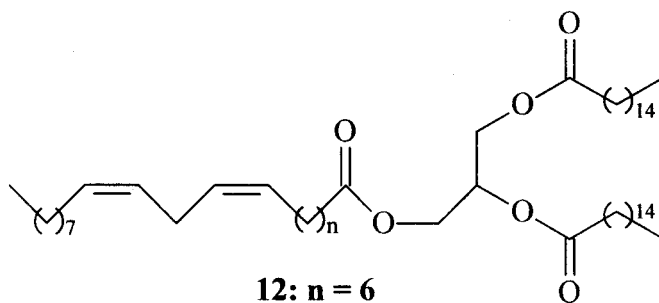
Tabela 1: Constituintes químicos isolados das espécies de Ochnaceae.

Espécies	Classe das substâncias	Referência
<i>Brackenridgea zanguebarica</i>	diidrochalcona 1	Drewes & Hudson, 1983
<i>Brackenridgea zanguebarica</i>	biflavanona 2	Drewes <i>et al.</i> , 1984
<i>Lophira alata</i>	dímero de chalcona 3	Tih <i>et al.</i> , 1988
<i>Lophira alata</i>	tetraflavonóide 4	Tih <i>et al.</i> , 1992
<i>Lophira alata</i>	lophirona 5	Tih <i>et al.</i> , 1992
<i>Lophira alata</i>	cianoglicosídeos 6	Murakami <i>et al.</i> , 1993
<i>Lophira alata</i>	luteolina 7	Tih <i>et al.</i> , 2003
<i>Lophira lanceolata</i>	biflavonóide 8	Ghogomu <i>et al.</i> , 1987
<i>Lophira lanceolata</i>	isombamichalcona 9 , tetraflavonóide 10	Tih Ghogomu <i>et al.</i> , 1989
<i>Lophira lanceolata</i>	dímero de chalcona 11	Tih Ghogomu <i>et al.</i> , 1990
<i>Luxemburgia nobilis</i>	novos triglicerídeos 12, 13	Carvalho <i>et al.</i> , 2000
<i>Luxemburgia nobilis</i>	biflavonóide 14	Oliveira <i>et al.</i> , 2002
<i>Ochna afzelii</i>	dímeros de chalcona 15, 16	Pegnyemb <i>et al.</i> , 2001
<i>Ochna beddomei</i>	biflavanona 17	Jayaprakasam <i>et al.</i> , 2000
<i>Ochna calodendron</i>	biflavonóides 18	Messanga <i>et al.</i> , 1994
<i>Ochna calodendron</i>	triflavonóides 19, 20	Messanga <i>et al.</i> , 2002
<i>Ochna integerrima</i>	biflavonóides 14, 21	Likhitwitayawuid <i>et al.</i> , 2001
<i>Ochna obtusata</i>	biflavonóides 22, 23	Rao <i>et al.</i> , 1997
<i>Ochna pulchra</i>	vismionas 24, 25, 26	Sibanda <i>et al.</i> , 1993
<i>Ochna pumila</i>	biflavona 27	Kamil <i>et al.</i> , 1987
<i>Ochna squarrosa</i>	Isoflavona 28	Rao & Gunasekar, 1989
<i>Ouratea flava</i>	dímero de chalcona 29	Mbing <i>et al.</i> , 2003
<i>Ouratea flava</i>	flavumona A 30	Mbing <i>et al.</i> , 2003
<i>Ouratea floribunda</i>	friedelina, friedelanol e lupeol, depsídeo atranorina 31	Carvalho <i>et al.</i> , 2000

Ouratea hexasperma	dímero de isoflavanona 32	Moreira <i>et al.</i> , 1994
Ouratea hexasperma	dímero de flavona 33	Moreira <i>et al.</i> , 1999
Ouratea multiflora	biflavonóide 34	Felício <i>et al.</i> , 2001
Ouratea reticulata	aquilegiolida 35	Manga <i>et al.</i> , 2001
Ouratea semiserrata	novos tricloroisoflavona 36, 37	Velandia <i>et al.</i> , 1998
Ouratea semiserrata	biflavonóides 38, 39, 40, 41 e 42	Velandia <i>et al.</i> , 2002
Ouratea spectabilis	biflavonóide 43	Felício <i>et al.</i> , 1995

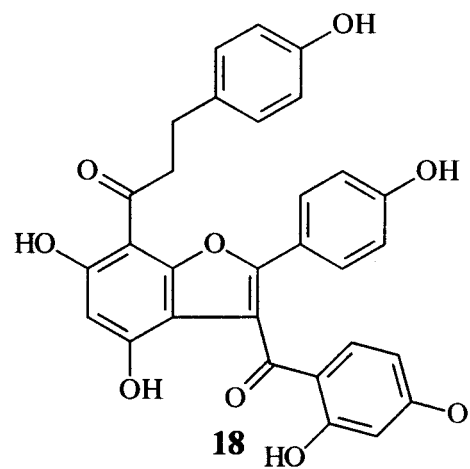
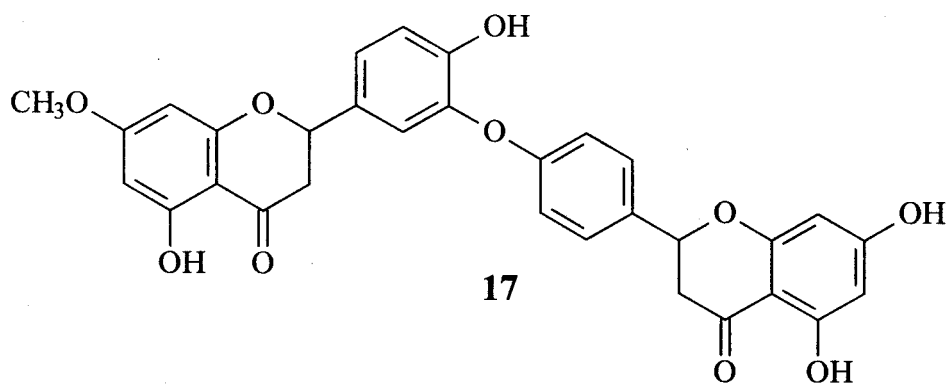
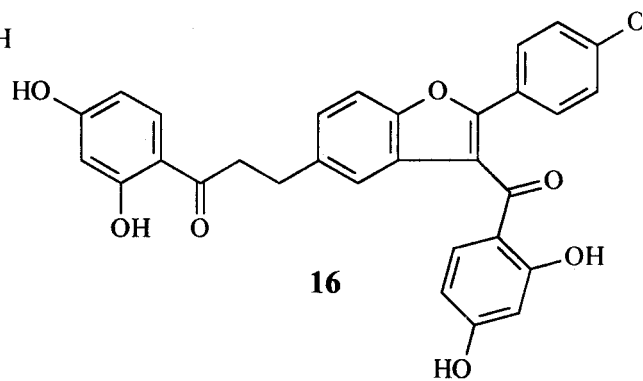
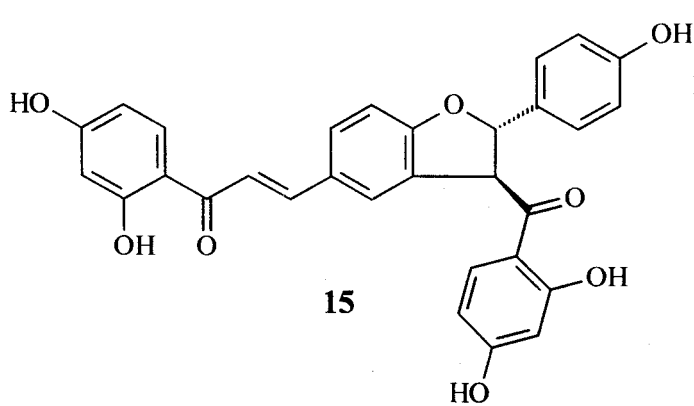
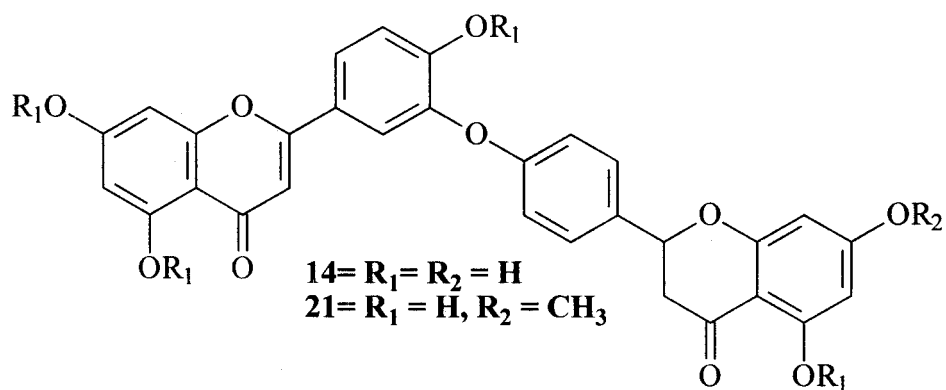


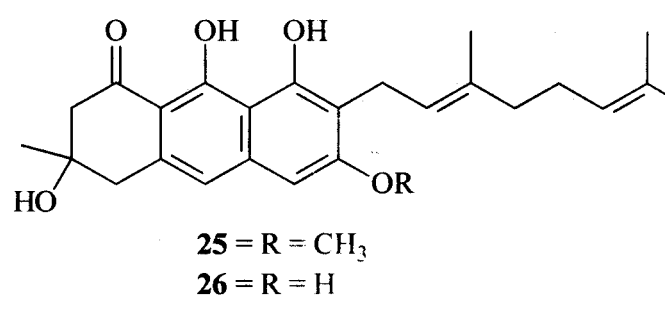
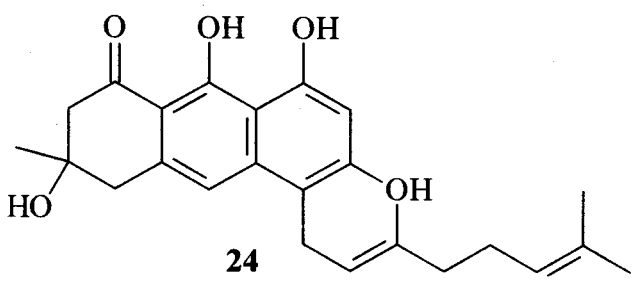
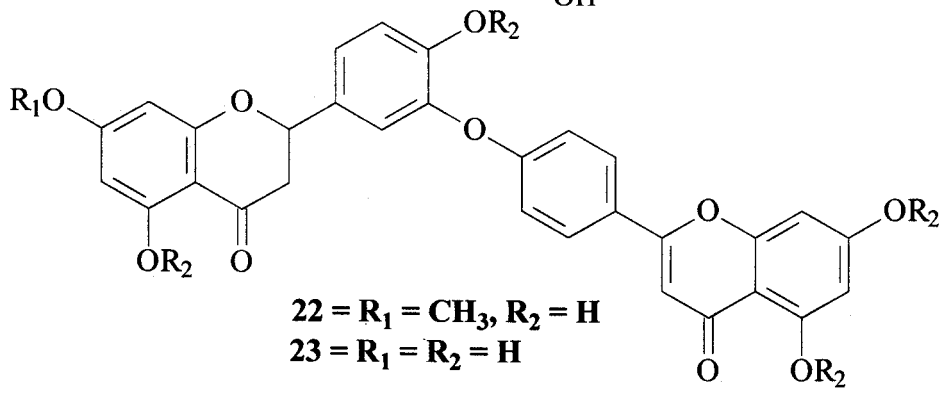
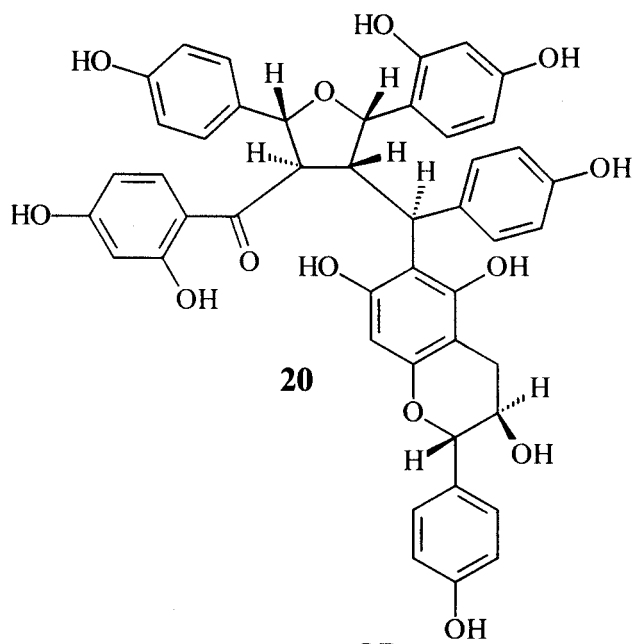
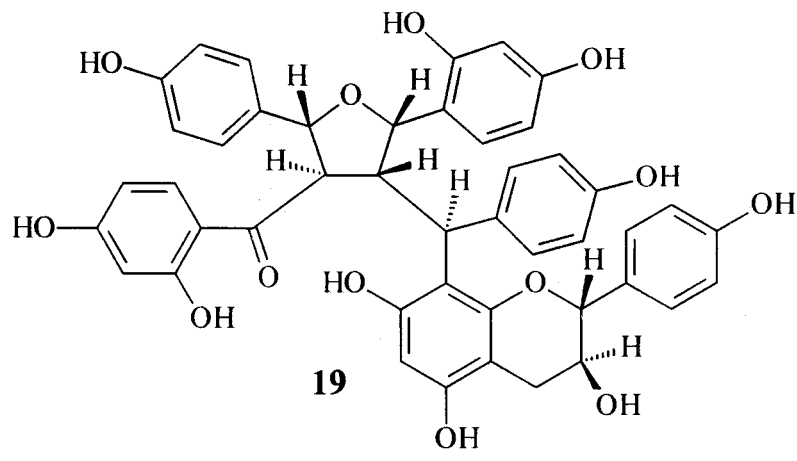


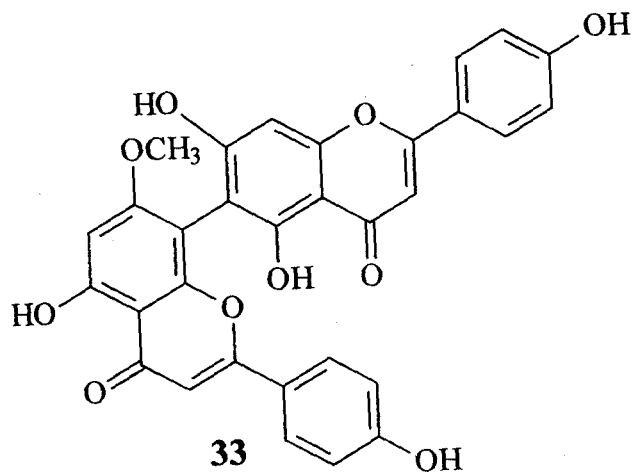
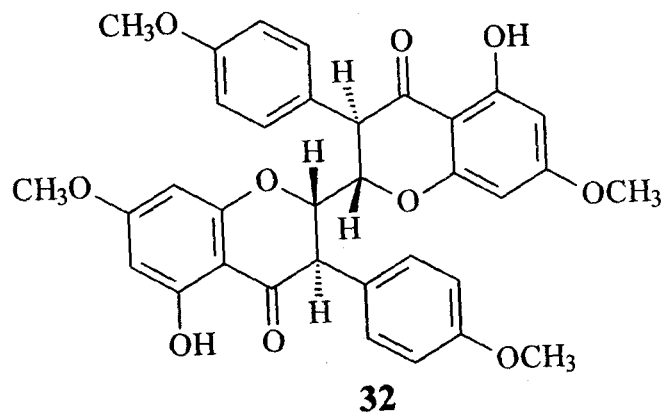
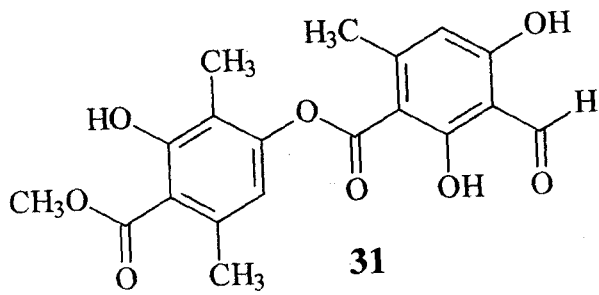
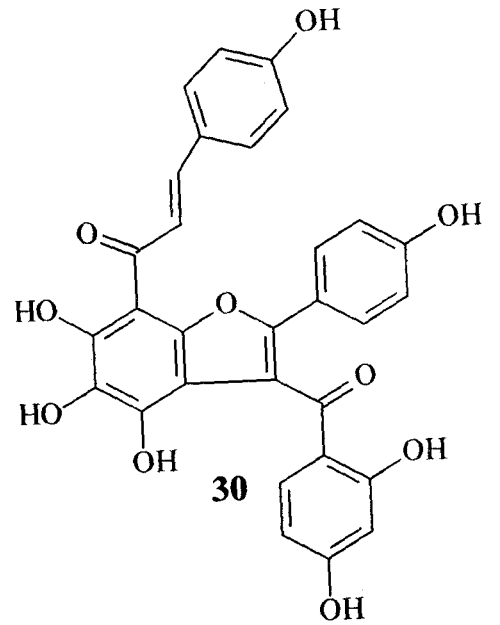
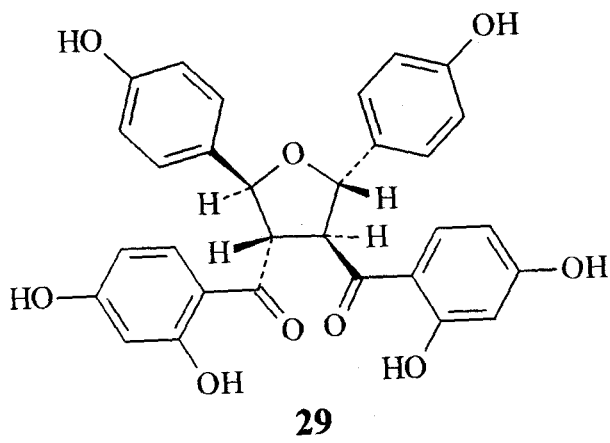
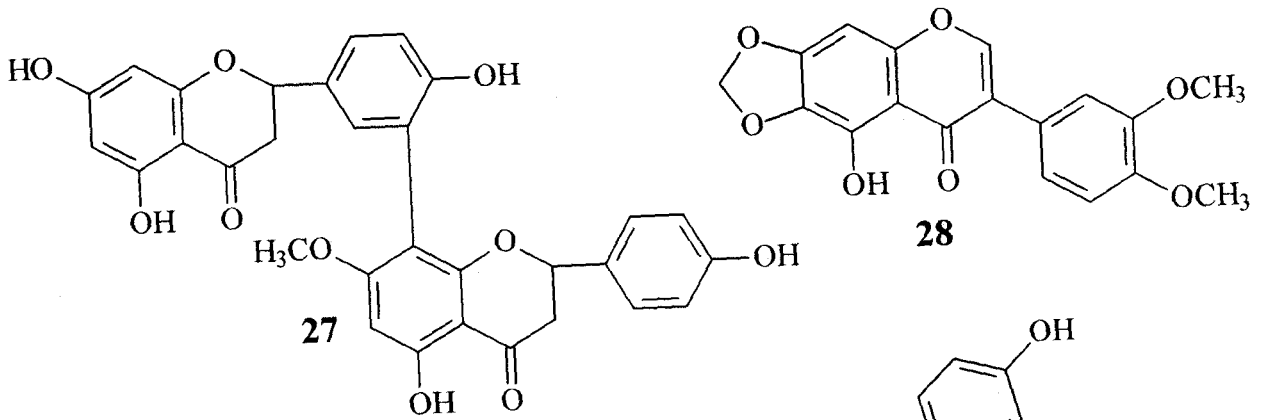


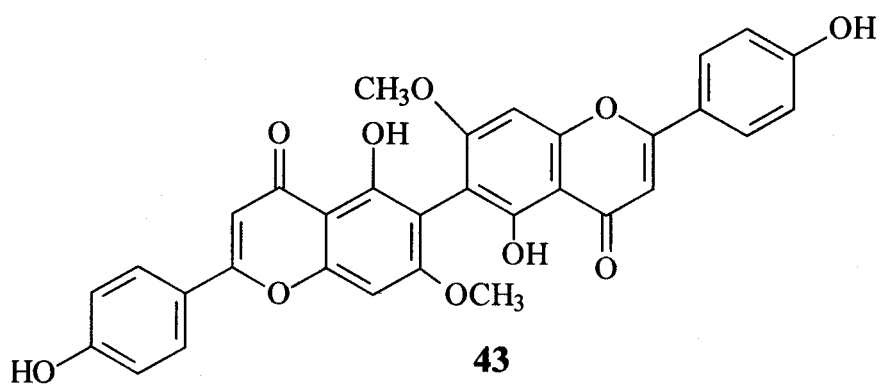
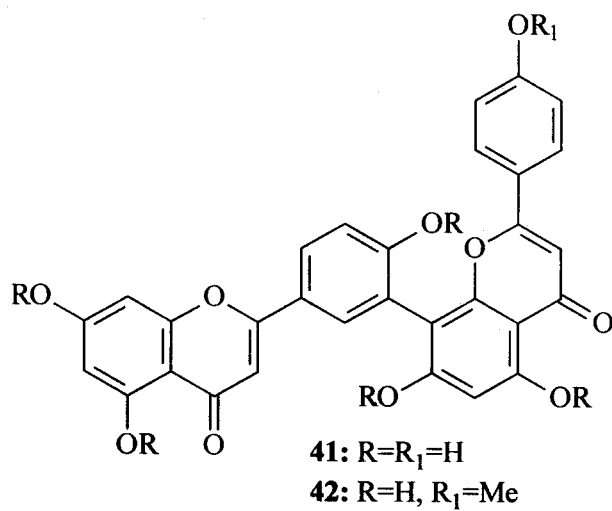
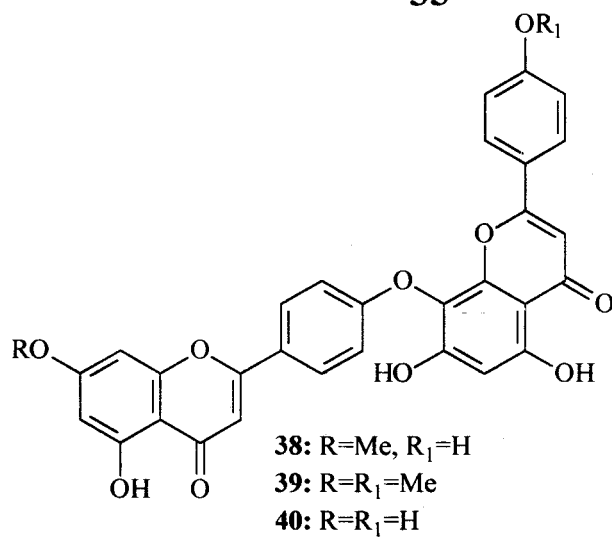
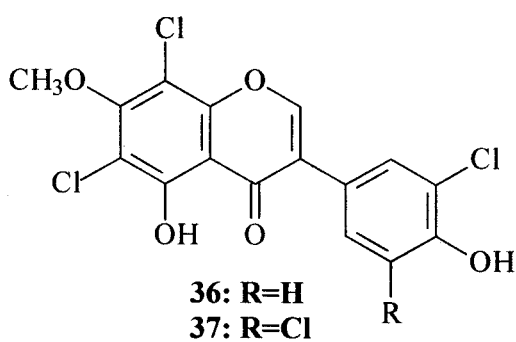
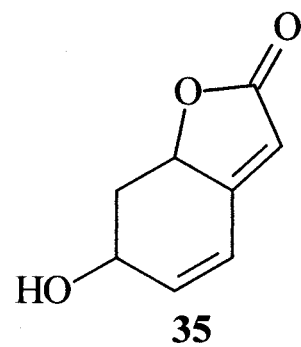
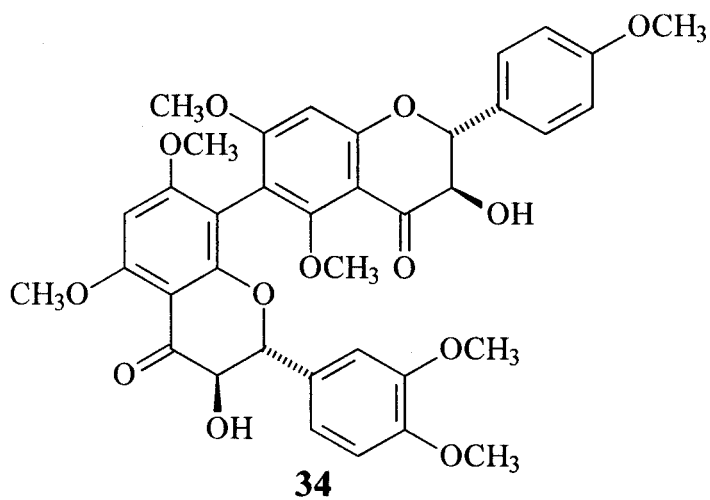
12: n = 6

13: n = 4







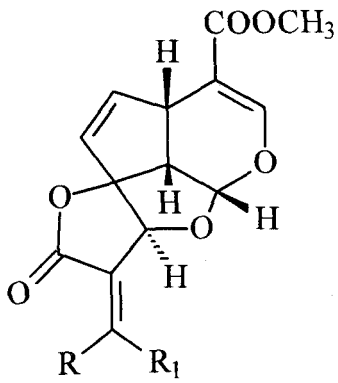


b) Ocorrência de substâncias em Apocynaceae

A família Apocynaceae se caracteriza por produzir alcalóides, terpenos e iridóides. As espécies *Parahancornia amapa*, *Himatanthus articulata* e *Diplademia martiana* já foram estudadas pelo grupo de produtos naturais da UFRRJ e não existe estudo fitoquímico da espécie *Laseguea erecta* (Tabela 2). Os gêneros *Parahancornia* e *Laseguea* são considerados próximos dos gêneros *Plumeria* e *Himatanthus* mas, entretanto, tem-se detectado diferença na química de metabólitos especiais entre eles.

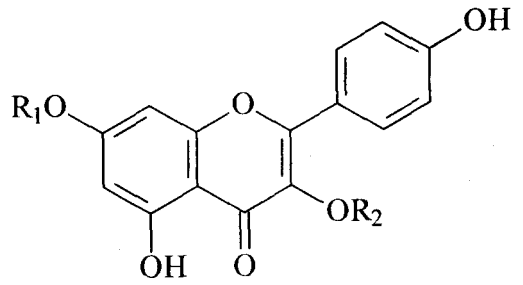
Tabela 2: Alguns constituintes químicos isolados das espécies de Apocynaceae.

Espécie	Classe das substâncias	Referências
<i>Allamanda cathartica</i> <i>Himatanthus fallax</i>	iridóides 44, 45	Abdel-Kader <i>et al.</i> , 1997
<i>Diplademia martiana</i>	lupeol, sitostenona, ácido pomólico, ácido ursólico e flavonóides 46, 47	Carvalho <i>et al.</i> , 2001
<i>Himatanthus articulata</i>	triterpenos, esteróides e iridóide 48	Barreto <i>et al.</i> , 1998
<i>Himatanthus phagedaenica</i>	iridóide 49	Vanderlei <i>et al.</i> , 1991
<i>Himatanthus phagedaenicus</i>	iridóide 50	Veloso <i>et al.</i> , 1999
<i>Himatanthus sucuuba</i>	iridóide 51, triterpenos 52, 53, 54	Silva <i>et al.</i> , 1998
<i>Nerium oleander</i>	triterpeno 55	Siddiqui <i>et al.</i> , 1988
<i>Nerium oleander</i>	triterpeno 56	Begum <i>et al.</i> , 1997
<i>Nerium oleander</i>	triterpeno 57	Siddiqui <i>et al.</i> , 1989
<i>Parahancornia amapa</i>	triterpenos pentacíclicos e ésteres 3 β -O-acil lupeóis 58, 59 e 60	Carvalho <i>et al.</i> , 2001
<i>Parahancornia amapa</i>	ésteres 3 β -O-acil lupeóis e triterpenos pentacíclicos 61, 62, 63, 64	Sobrinho <i>et al.</i> , 1991
<i>Plumeria acutifolia</i>	iridóide 65	Abe <i>et al.</i> , 1988
<i>Plumeria lancifolia</i>	alcalóide indólico 66	França <i>et al.</i> , 2000
<i>Plumeria obtusa</i>	triterpenos 67, 68	Siddiqui <i>et al.</i> , 1990
<i>Plumeria obtusa</i>	iridóide 69	Siddiqui <i>et al.</i> , 1994
<i>Plumeria obtusifolia</i>	iridóide glicosilado 70	Adam <i>et al.</i> , 1979
<i>Plumeria rubra</i>	triterpeno 71	Akhtar & Malik, 1993
<i>Plumeria rubra</i>	iridóide 72	Kardono <i>et al.</i> , 1990
<i>Thevetia neriifolia</i>	triterpeno 73, cardenolido 74	Begum <i>et al.</i> , 1993
<i>Thevetia peruviana</i>	iridóide 75	Abe <i>et al.</i> , 1995



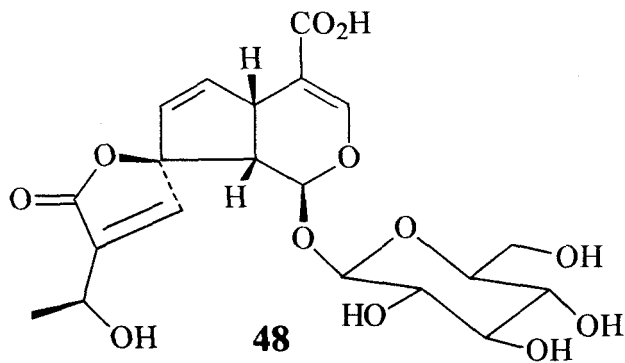
44: R= H, R₁=CH₃

45: R=CH₃, R₁= H

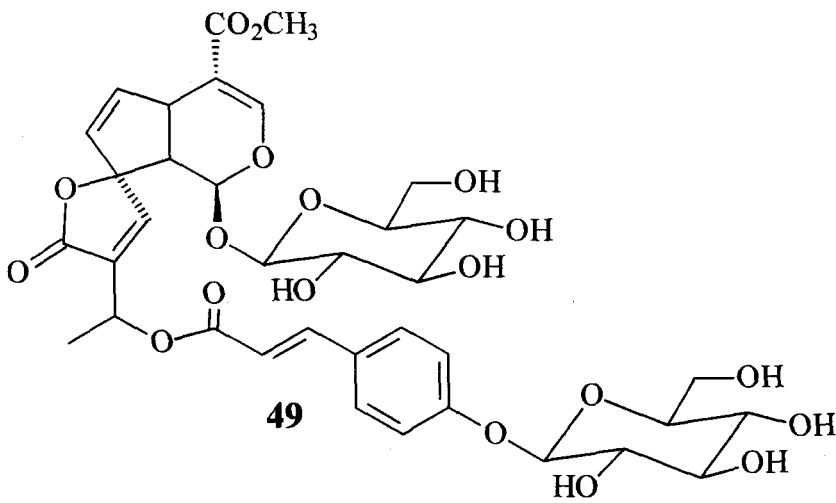


46: R₁=R₂=H

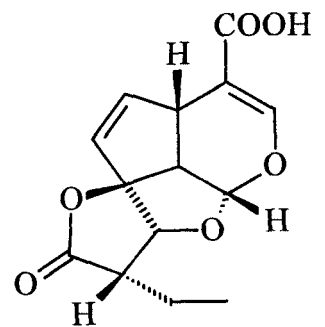
47: R₁=H, R₂= glicopiranosil



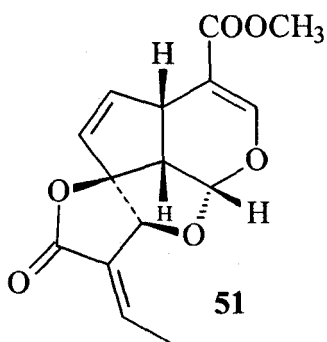
48



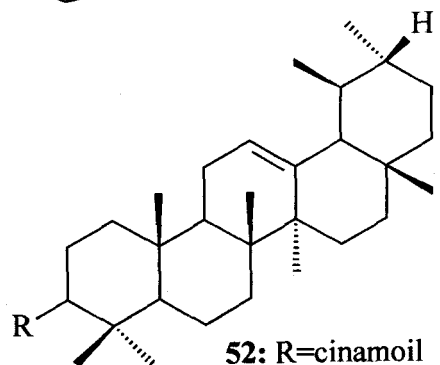
49



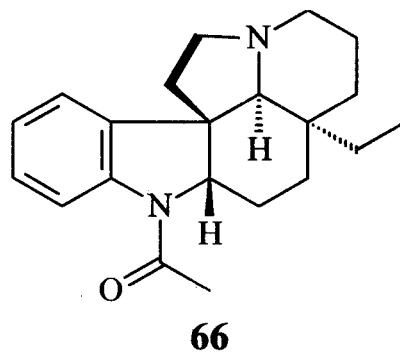
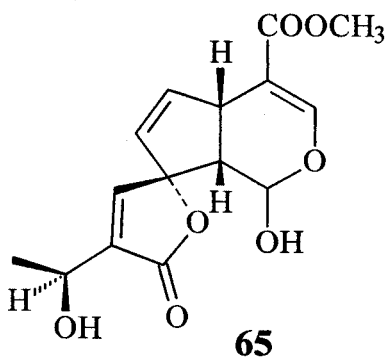
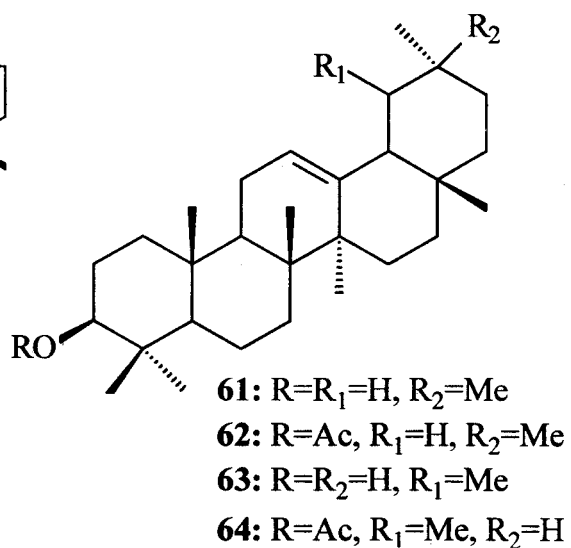
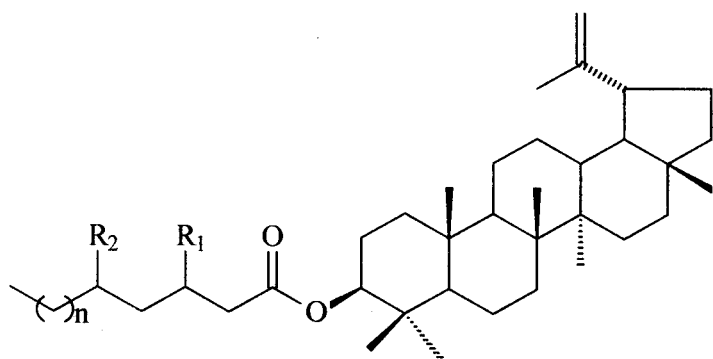
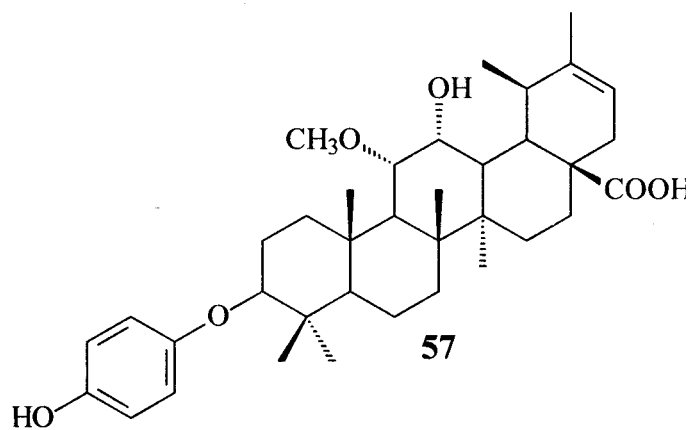
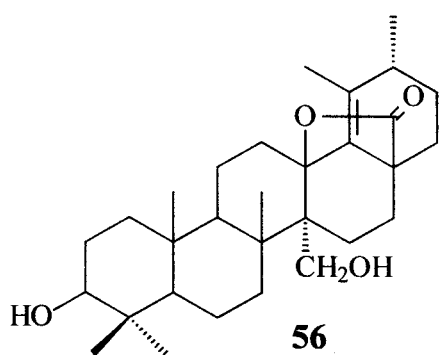
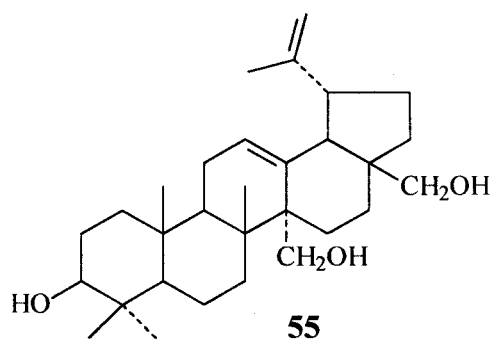
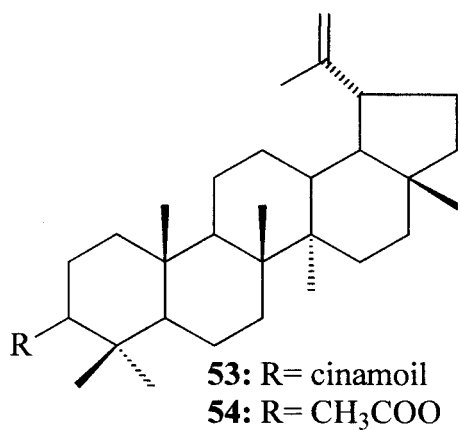
50

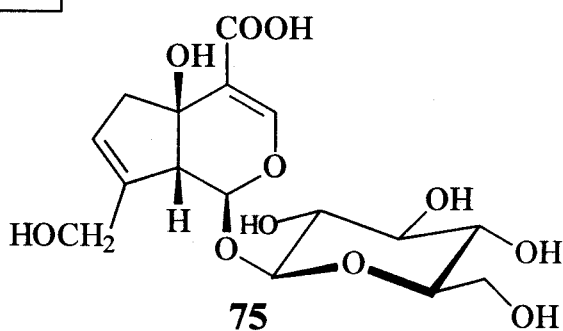
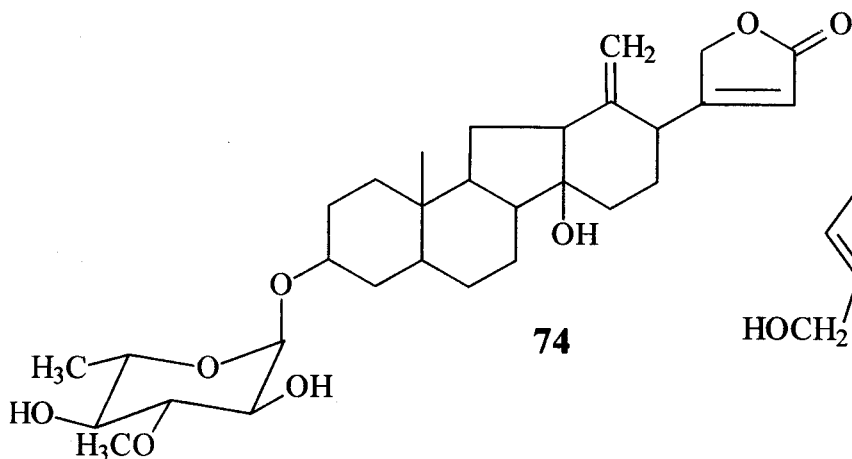
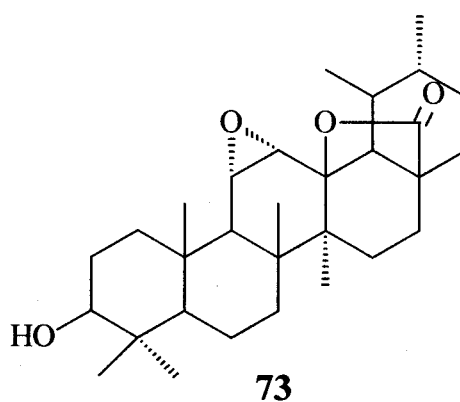
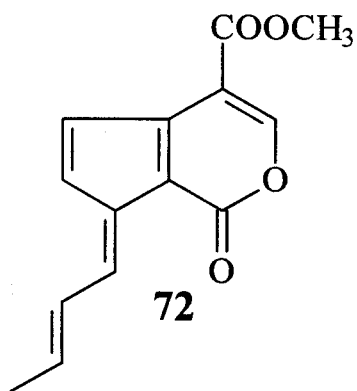
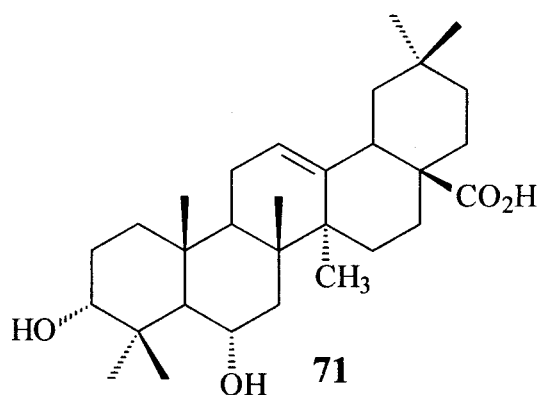
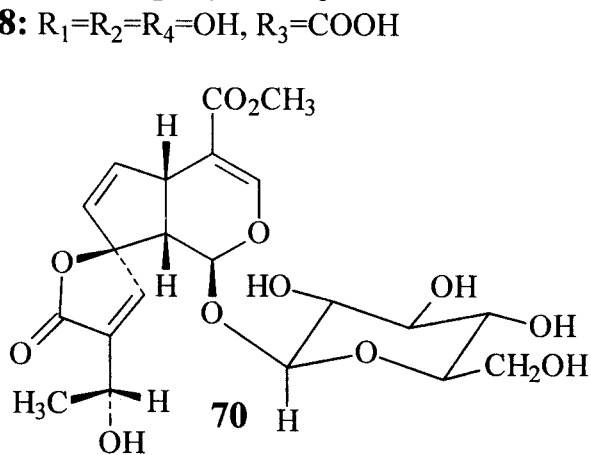
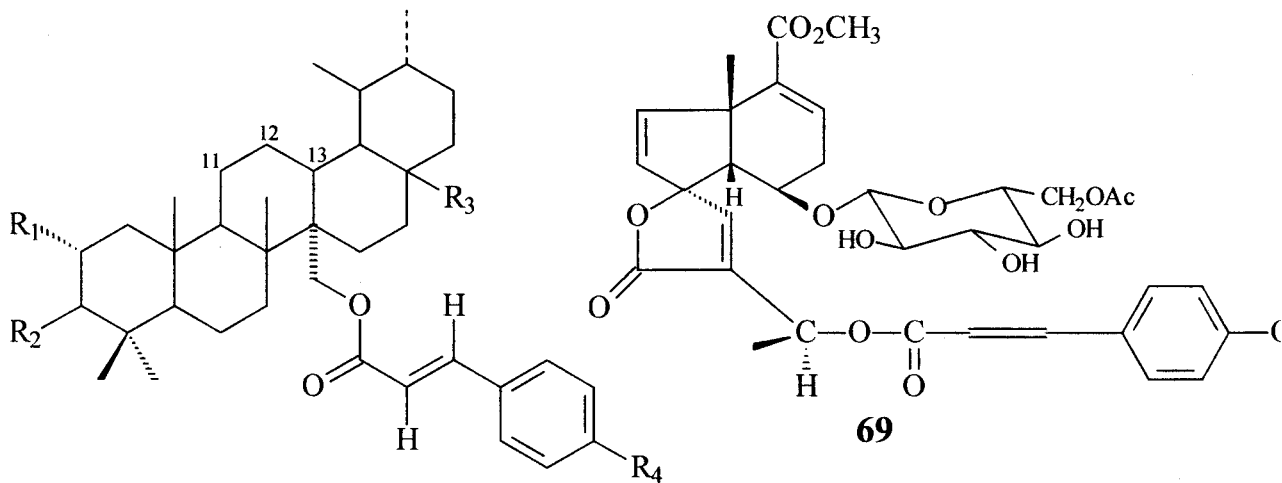


51



52: R=cinamoil





c) Substâncias comuns em espécies de *Solanum* (Solanaceae)

Numerosas espécies de *Solanum* produzem alcalóides esteroidais e seus glicosídeos e são encontrados em maior concentração nos frutos verdes. Estes alcalóides são usados como matéria-prima para a síntese de drogas esteroidais. *Solanum aviculare* L. tem sido usada comercialmente como fonte de solasonina (ROWAN *et al.*, 1983).

Devido à similaridade estrutural com anabolizantes, hormônios esteroidais e corticosteroides, os alcalóides esteroidais tem sido alvos de investigações farmacológicas. O interesse recente tem sido devido à demanda mundial na busca de material de partida para a síntese de esteróides, devido à escassez de diosgenina, o mais importante material de partida para a indústria de esteróides. Muitos alcalóides esteroidais podem ser convertidos em valiosos hormônios esteroidais bioativos por simples conversões químicas e microbiológicas. Muitos corticosteróides usados contra doenças de pele podem ser obtidos por conversão química de alcalóides esteroidais estruturalmente parecidos (ATTA-UR-RAHMAN & CHOUDHARY, 1998). O conhecimento de que o alcalóide esteroidal solasodina, análogo nitrogenado da diosgenina, pode ser convertido de forma análoga no acetato de 16-desidropregnenolona (SATO *et al.*, 1959) despertou, há algum tempo, o interesse em encontrar plantas com alto teor deste alcalóide, interesse que ainda se mantém vigente.

A solasodina (aglicona da solasonina) que possui um esqueleto esteroidal semelhante e com a mesma estereoquímica que os hormônios naturais, é o principal composto deste grupo empregado como matéria prima para a síntese de hormônios esteroidais. Os anéis E e F podem degradar de forma análoga aos da diosgenina pela reação de Marker, porém os rendimentos são um pouco menores (SATO *et al.*, 1957 e SATO *et al.*, 1959).

Solasonina 27 (página 169), um glicoalcalóide muito comum no gênero *Solanum*, foi identificada em extratos de todas as espécies de *Archaeosolanum*, subgênero do gênero *Solanum* (LEWIS & LIJEGREN, 1970). Outra classe de substâncias muito comum em Solanaceae é a classe dos flavonóides.

Espécies do gênero *Solanum* são produtoras de flavonas, flavonóis e seus *O*-heterosídeos (SILVA *et al.*, 2003). Destaca-se a excepcional capacidade de espécies deste gênero produzirem 3-*O*-glicosilflavonóis e um número significativo de canferol, quercetina e miricetina metilados como agliconas, muitos dos quais apresentam hidroxilação/glicosilação em 8.

Uma análise dos resultados obtidos nos diversos trabalhos já publicados, evidencia uma correlação entre grau de complexidade dos flavonóides e o tipo de tricoma existente na planta (SILVA *et al.*, 2003). As espécies com tricomas simples só apresentaram os tipos de flavonóides com estruturas mais simples, como por exemplo, *S. sarrachoides* e *S. angustifolium*. Nas espécies de tricomas estrelados e estrelados-glandulares (*S. paludosum*, *S. crinitum* e *S. jabrense*), característico do subgênero *Leptostemonum* considerados mais complexos, também foram encontrados flavonóides com estruturas mais complexas (SILVA *et al.*, 2003).

Tabela 3: Espécies do gênero *Solanum* das quais foram isoladas solasonina.

Espécies	Referências
<i>Solanum acculeatissimum</i>	KADKADE & ROLZ, 1977
<i>Solanum aculeastrum</i>	DREWES & STADEN, 1995
<i>Solanum aviculare</i>	ROWAN <i>et al.</i> , 1983
<i>Solanum coccineum</i>	LOREY <i>et al.</i> , 1996
<i>Solanum incanum</i>	FUKUHARA & KUBO, 1991
<i>Solanum indicum</i>	YAHARA <i>et al.</i> , 1996
<i>Solanum khasianum</i>	WEISSENBERG, 2001
<i>Solanum Khasianum</i>	MAHATO <i>et al.</i> , 1980
<i>Solanum laciniatum</i>	LIIJEGREN, 1971
<i>Solanum pinnatum</i>	URZÚA & CASSELS, 1972
<i>Solanum platanifolium</i>	PURI & BHATNAGAR, 1975
<i>Solanum robustum</i>	RIPPERGER, 1995
<i>Solanum sodomaeum</i>	CHAM <i>et al.</i> , 1987
<i>Solanum suaveolens</i>	RIPPERGER & PORZEL, 1997
<i>Solanum sycophanta</i>	USUBILLAGA <i>et al.</i> , 1997
<i>Solanum sycophanta</i>	USUBILLAGA <i>et al.</i> , 1997
<i>Solanum umbelliferum</i>	KIM <i>et al.</i> , 1996
<i>Solanum wrightii Benth</i>	FAYEZ & SALEH, 1967

Entre as informações mais relevantes relacionadas com o estudo de *Solanum crinitum* foi detectar a presença do flavonóide tilirosídeo (3-*O*-glicopiranosil-6''-*O*-cumaroil-canferol) que está sendo registrado pela primeira vez em Solanaceae.

Outra informação foi à detecção do efeito antiproliferativo de constituintes de *Solanum crinitum* sobre células do carcinoma de Ehrlich e da leucemia humana K562, principalmente da fração rica em glicoalcalóides contendo solasonina (SOUZA *et al.*, 2002).

Considerando a importância destes constituintes **27** (solasonina) e **29** (tilirosídeo) (página 169), destacamos as espécies de *Solanum* das quais foram detectadas **27** (Tabela 3) e a tabela 4 revela espécies de outras famílias nas quais foi encontrado o tilirosídeo **29**. Este tipo de informação pode indicar espécies a serem avaliadas quanto à ação citotóxica em células tumorais.

Tabela 4: Espécies e famílias das quais foi isolado o tilirosídeo (NAPRALERT, 2002).

Espécies	Família
<i>Alchemilla speciosa</i>	Rosaceae
<i>Althaea armeniaca</i>	Malvaceae
<i>Althaea broussonetiifolia</i>	Malvaceae
<i>Althaea cannabina</i>	Malvaceae
<i>Althaea narbonensis</i>	Malvaceae
<i>Althaea officinalis</i>	Malvaceae
<i>Anaphalis contorta</i>	Asteraceae
<i>Apeiba tibourbou</i>	Tiliaceae
<i>Aristolochia kaempferi</i>	Aristolochiaceae
<i>Castanea sativa</i>	Fagaceae
<i>Colona auriculata</i>	Tiliaceae
<i>Daphne genkwa</i>	Thymelaeaceae
<i>Edgeworthia chrysantha</i>	Thymelaeaceae
<i>Eremocarpus setigerus</i>	Euphorbiaceae
<i>Eryngium campestre</i>	Apiaceae
<i>Galphimia glauca</i>	Malpighiaceae
<i>Guiera senegalensis</i>	Combretaceae
<i>Helianthemum glomeratum</i>	Cistaceae
<i>Helichrysum orientale</i>	Asteraceae
<i>Helichrysum pamphylicum</i>	Asteraceae
<i>Hippophae rhamnoides</i>	Elaeagnaceae
<i>Larix leptolepis</i>	Pinaceae
<i>Leonurus japonicus</i>	Lamiaceae
<i>Leonurus sibiricus</i>	Lamiaceae
<i>Lindera megaphylla</i>	Lauraceae
<i>Magnolia fargesii</i>	Magnoliaceae
<i>Magnolia salicifolia</i>	Magnoliaceae
<i>Melastoma candidum</i>	Melastomataceae
<i>Melastoma villosum</i>	Melastomataceae
<i>Muntingia calabura</i>	Elaeocarpaceae
<i>Siparuna apiosyce</i>	Monimiaceae

2. Objetivos

- a) Isolar e identificar os principais metabólitos especiais de *Luxemburgia octandra*, *Laseguea erecta*, do látex de *Parahancornia amapa* e dos frutos *Solanum crinitum*.
- b) Avaliar as atividades biológicas de extratos e/ou substâncias naturais isoladas das diferentes partes das plantas ou de seus derivados.
- c) Preparar derivados dos constituintes isolados e fazer a completa atribuição de dados espectrométricos das substâncias naturais isoladas e derivados.

3. Parte Experimental Geral

3.1. Equipamentos e reagentes

Os pontos de fusão foram determinados em placa de aquecimento MEL-TEMP II, Laboratory Devices USA, utilizando capilar, sem correção dos valores. Os espectros de infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin-Elmer 1600/1605 FT-IR em KBr e/ou filmes de NaCl. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear, ^1H e ^{13}C (incluindo experimentos em 2D) foram registrados em espectrômetros Bruker AC-200 (^1H : 200 e ^{13}C : 50 MHz) e JEOL JNM-GX-400 (^1H : 400 e ^{13}C : 100 MHz). Como padrão interno foi usado tetrametilsilano ou resíduo do solvente CHCl_3 (δ_{H} 7.24) e o pico central do tripleto em δ_{C} 77.00 do CDCl_3 . As rotações ópticas foram medidas em um polarímetro digital JASCO, modelo DIP 370. O espectro de massa de alta resolução foi obtido por ionização elétron spray (HRESIMS) em um espectrômetro VG 7070E-HF (UNICAMP). Os espectros de massa de baixa resolução foram registrados em cromatógrafo a gás HP-5880A acoplado a espectrômetro de massas computadorizado HP-5897A de analisador de íons quadrupolo e ionização por impacto de elétrons, 70 eV; CG/EM Varian Saturn 2000; CG/EM HP-5989A.

As cromatografias em coluna foram realizadas tendo como suporte Sephadex LH-20 (Sigma, USA) ou sílica gel (230-400 e 70-230 mesh, Vetec). A cromatografia em camada preparativa (CCP) foi feita em placas de sílica gel 60 PF₂₅₄, Merck e Vetec, sobre suporte de vidro e espessura de 1mm. As substâncias foram detectadas por irradiação na região do ultravioleta. Foram usadas placas em folha de alumínio de sílica gel 60 PF₂₅₄ Merck para cromatografia em camada fina (CCF) e como reveladores foram utilizados, além da detecção por irradiação ultravioleta (254 e 366 nm), reagentes de Dragendorff, Mayer e Liebermann-Burchard; soluções de $\text{AlCl}_3\text{-EtOH}$ (1%) e sulfato cérico (1%)- H_2SO_4 (10%) (DOMÍNGUEZ, 1973 e MATOS, 1988). Alguns solventes comerciais foram destilados antes de serem utilizados.

3.2. Derivatizações

A preparação de derivados das substâncias isoladas das espécies *Luxemburgia octandra*, *Laseguea erecta*, *Parahancornia amapa* e *Solanum crinitum* serviu para realização de testes biológicos dos mesmos e em alguns casos facilitou a análise dos dados espectrais devido o aumento da solubilidade em clorofórmio.

3.2.1. Metilação

a) Diazometano

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

b) Sulfato de dimetila

Para a permetilação com sulfato de dimetila, a substância foi dissolvida em acetona e adicionado 1 eq. de K_2CO_3 e 1 eq. de sulfato de dimetila para cada hidroxila livre. A mistura resultante foi agitada durante 2h a temperatura ambiente com monitoramento usando placa cromatográfica em camada fina. Após a reação, o solvente foi removido em rotavapor sob pressão reduzida e o resíduo obtido suspenso em água (cerca de 50 mL), adicionado 5 mL de solução de hidróxido de amônio concentrado e

extraído com 3 vezes 15 mL de CH_2Cl_2 . As frações orgânicas reunidas foram secas com sulfato de sódio anidro e o solvente removido em rotavapor (CAMARA et al., 2001).

3.2.2. Acetilação com anidrido acético e piridina

As substâncias foram dissolvidas em anidrido acético e piridina (1:1) e deixou-se a mistura em repouso por 48 horas à temperatura ambiente e depois foi adicionada água gelada formando um precipitado. O precipitado foi extraído com clorofórmio (3x) e a solução clorofórmica foi lavada 3 vezes com HCl (10%) e depois lavada várias vezes com água destilada e seca com sulfato de sódio anidro. Após evaporação do solvente em rotavapor obtiveram-se as substâncias acetiladas (SHRINER, 1979).

4. Referências

- ABDEL-KADER, M. S.; WISSE, J.; EVANS, R.; WERFF, H. van der, KINGSTON, D. G. I. Bioactive iridoids and a new lignan from *Allamanda cathartica* and *Himatanthus fallax* from the Suriname Rainforest. *J. Nat. Prod.*, **60**, 1294-1297, 1997.
- ABE, F.; CHEN, R. F.; YAMAUCHI, T. Minor iridoids from the Roots of *Plumeria acutifolia*. *Chem. Pharm. Bull.*, **36** (8), 2784-2789, 1988.
- ABE, F.; YAMAUCHI, T.; YAHARA, S.; NOHARA, T. Minor iridoids from *Thevetia peruviana*. *Phytochemistry*, **38** (3), 793-794, 1995.
- ADAM, G.; KHOI, N. H.; BERGNER, C.; LIEN, N. T. Plant growth inhibiting properties of Plumieride from *Plumeria obtusifolia*. *Phytochemistry*, **18**, 1399-1400, 1979.
- AGRA, M. F. A. New species of Solanum subgenus Leptostemonum (Solanaceae) from Chapada da Diamantina, Bahia, Brazil. *Novon*, **9**, 292-295, 1999.
- AKHTAR, N. & MALIK, A. Oleanene type triterpenes from *Plumeria rubra*. *Phytochemistry*, **32** (6), 1523-1525, 1993.
- ATTA-UR-RAHMAN & CHONDHARY, I.; In "The Alkaloids", Academic Press, volume 50, 61-108, ed. G. A. Cordell, San Diego, 1998.
- BARRETO, A. S.; CARVALHO, M. G. de; NERY, I. A.; GONZAGA, L.; KAPLAN, M. A. C. Chemical constituents from *Himatanthus articulata*. *J. Braz. Chem. Soc.*, **9** (5), 430-434, 1998.
- BARROSO, G. M.; Sistemática de Angiosperma do Brasil, *UFV-MG*, 130, 1986.
- BEGUM, S.; ADIL, Q.; SIDDIQUI, B. S.; SIDDIQUI, S. Constituents of the leaves of *Thevetia nerifolia*. *J. Nat. Prod.*, **56** (4), 613-617, 1993.
- BEGUM, S.; SULTANA, R.; SIDDIQUI, B. S. Triterpenoids from the leaves of *Nerium oleander*. *Phytochemistry*, **44** (2), 329-332, 1997.
- CAMARA, C. A.; ROSA, M. A.; PINTO, A. C.; VARGAS, M. D. Secondary amines and unexpected aza-anthraquinones from 2-methoxylapachol. *Tetrahedron*, **57** (47), 9569-9574, 2001.
- CARVALHO, M. G de; VELLOSO, C. R. X.; BRAZ-FILHO, R.; COSTA, W. F. da. Acyl-lupeol Esters from *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, **12** (4), 556-559, 2001.
- CARVALHO, M. G. de, CARVALHO, G. J. A. de; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents from *Ouratea floribunda*: Complete ¹H and ¹³C NMR assignments of Atranorin and its new acetyl derivative. *J. Braz. Chem. Soc.*, **11** (2), 143-147, 2000.

CARVALHO, M. G. de; ALVES, C. C. F.; SILVA, K. G. S. Luxenchalcone, a new bichalcone from *Luxemburgia octandra*. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2003 (in press).

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

CARVALHO, M. G. de; GRYNBERG, N. F.; LIMA, A. E. E. de; OLIVEIRA, M. C. C. de. Chemical Structure, Cytotoxic and Antitumours Activities of Biflavonoids from Brazilian Ouratea (Ochnaceae). In: GOVIL, J. N.; CENTRE, Res. Book. (Org.). Recent Progress in Medicinal Plants. New Dehli, v. 08, p. 77-92, 2002.

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

CHAM, B. E.; GILLIVER, M.; WILSON, L. Antitumour effects of glycoalkaloids Isolated from *Solanum sodomaeum*. *Planta Médica*, 34-36, 1987.

CODY, V.; MIDDLETON, E. Jr.; HARBORNE, J. B.; ALAN, R. L. Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships. In: Clinical and Biological Research (Cody, V. ed), INC., New York, p. 488, 1985.

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

DREWES, F. E. & STADEN, J. V. Aspects of the extraction and purification of solasodine from *Solanum aculeastrum* tissues. *Phytochemical Analysis*, **6**, 203-206, 1995.

DREWES, S. E. & HUDSON, N. A. Brackenin, a dimeric dihydrochalcone from *Brackenridgea zanguebarica*. *Phytochemistry*, **22** (12), 2823-2825, 1983.

DREWES, S. E.; HUDSON, N. A.; BATES, R. B.; LINZ, G. S. Novel dimeric chalcone-based pigments from *Brackenridgea zanguebarica*. *Tetrahedron Lett.*, **25** (1), 105-108, 1984.

EL SAYED, K. A., HAMANN, M. T., ABD EL-RAHMAN, H. A., ZAGHLOUL, A. M. New pyrrole alkaloids from *Solanum sodomaeum*. *J. Nat. Prod.*, **61**, 848-850, 1998.

FAYEZ, M. B. E. & SALEH, A. A. Constituents of local plants-X. The steroidal alkaloids of *Solanum wrightii* Benth. *Phytochemistry*, **6** (3), 433-436, 1967.

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

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

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

FUKUHARA, K. & KUBO, I. Isolation of steroidal glycoalkaloids from *Solanum incanum* by two countercurrent chromatographic methods. *Phytochemistry*, **30** (2), 685-687, 1991.

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

GRYNBERG, N. F.; BRIOSO, P. S. T.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A.; CARVALHO, M. G. DE; BRAZ-FILHO, R. Proceedings of the XVII International Cancer Congress, 317, 1998.

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

GRYNBERG, N. F.; MORTORELLI, R. A.; CARVALHO, M. G. DE; BRAZ-FILHO, R.; MOREIRA, I. C.; SANTOS, A. C. S.; ECHEVARRIA, A. Proceedings of the XVI International Cancer Congress, 63, 1994.

HABORNE, J. B. Introducción a la Bioquímica Ecológica, *Editorial Alambra, S. A.*, 46, 1985.

JAYAPRAKASAM, B.; DAMU, A. G.; RAO, K. V.; GUNASEKAR, D.; BLOND, A.; BODO, B. 7-O-Methyltetrahydroochnaflavone, a new biflavanone from *Ochna beddomei*. *J. Nat. Prod.*, **63** (4), 507-508, 2000.

KADKADE, P. G. & ROLZ, C. Steroidal alkaloids of *Solanum acculeatissimum*. *Phytochemistry*, **16** (7), 1128, 1977.

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

KARDONO, L. B. S.; TSAURI, S.; PADMAWINATA, K.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Cytotoxic constituents of the bark of *Plumeria rubra* collected in Indonesia. *J. Nat. Prod.*, **53** (6), 1447-1455, 1990.

KIM, Y. C.; CHE, Q. M.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive steroidal alkaloids from *Solanum umbelliferum*. *J. Nat. Prod.*, **59**, 283-285, 1996.

LEWIS, D. C. & LIJEGREN, D. R. Glycoalkaloids from *archaesolanum* species. *Phytochemistry*, **9** (10), 2193-2195, 1970.

LIJEGREN, D. R. Glucosylation of solasodine by extracts from *Solanum laciniatum*. *Phytochemistry*, **10** (12), 3061-3064, 1971.

- LIKHITWITAYAWUID, K.; RUNGSERICHAI, R.; RUANGRUNGSI, N.; PHADUNGCHAROEN, T. Flavonoids from *Ochna integerrima*. *Phytochemistry*, **56**, 353-357, 2001.
- LOREY, S.; PORZEL, A.; RIPPERGER, H. Steroid alkaloid glycosides from *Solanum coccineum*. *Phytochemistry*, **41** (6), 1633-1635, 1996.
- MAHATO, S. B.; SAHU, N. P.; GANGULY, A. N.; KASAI, R. TANAKA, O. Steroidal alkaloids from *Solanum khasianum*: application of ^{13}C NMR spectroscopy to their structural elucidation. *Phytochemistry*, **19**, 2017-2020, 1980.
- MANGA, S. S. E.; MESSANGA, B. B.; SONDEGAM, B. L. 7,8-Dihydrobenzofuranones from *Ouratea reticulata*. *Fitoterapia*, **72**, 706-708, 2001.
- MATOS, F. J. A. Introdução a fitoquímica experimental, 121, Ed. Edições UFC, Fortaleza, 1988.
- 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.*, **31**, 215-217, 2003.
- 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, 2003.
- MESSANGA, B. B.; KIMBU, S. F.; SONDEGAM, B. L.; BODO, B. Triflavonoids of *Ochna calodendron*. *Phytochemistry*, **59**, 435-438, 2002.
- MESSANGA, B.; GHOGOMU TIH, R.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Biflavonoids from *Ochna calodendron*. *Phytochemistry*, **35** (3), 791-794, 1994.
- MOREIRA, I. C.; CARVALHO, M. G. de; BASTOS, A. B. F. O.; BRAZ-FILHO, R. A. flavone dimer from *Ouratea hexasperma*. *Phytochemistry*, **51**, 833-838, 1999.
- MOREIRA, I. C.; SOBRINHO, D. C.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R. Isoflavanone dimers hexaspermone A, B and C from *Ouratea hexasperma*. *Phytochemistry*, **35** (6), 1567-1572, 1994.
- MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H.; TANAKA, S.; HIROTA, M.; IRIE, R.; TAKEDA, N.; TATEMATSU, A.; KOSHIMIZU, K. Bitter cyanoglucosides from *Lophira alata*. *Phytochemistry*, **32** (6), 1461-1466, 1993.
- OLIVEIRA, M. C. C.; CARVALHO, M. G. DE; SILVA, C. J.; WERLE, A. A. New biflavonoid and Other constituents from *Luxemburgia nobilis* (EICHL). *J. Braz. Chem. Soc.*, **13** (1), 119-123, 2002.
- PEGNYEMB, D. E.; TIH GHOGOMU, R.; SONDEGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Biflavonoids from *Ochna afzelii*. *Phytochemistry*, **57**, 579-582, 2001.

- PURI, R. K. & BHATNAGAR, J. K. Glycoalkaloids of *Solanum platanifolium*. *Phytochemistry*, **14** (9), 2096, 1975.
- RAO, C. V.; GUNASEKAR, D. Squarrosin, a new isoflavone from *Ochna squarrosa* (Linn.). *Indian Journal of Chemistry*, **28 B**, 780-781, 1989.
- RAO, K. V.; SREERAMULU, K.; RAO VENKATA, C.; GUNASCKAR, D. Two new biflavonoids from *Ochna obtusata*. *J. Nat. Prod.*, **60**, 632-634, 1997.
- RAPPAPORTT, I.; GIACOPELLO, D.; SELDES, A. M.; BLANCO, M. C.; DEULOFEU, V. Phenolic glycosides from *Solanum glaucophyllum*: A new quercetin triglycoside containing D-apiose. *Phytochemistry*, **16** (7), 1115-1116, 1977.
- RIPPERGER, H. & PORZEL, A. Steroidal alkaloid glycosides from *Solanum suaveolens*. *Phytochemistry*, **46** (7), 1279-1282, 1997.
- RIPPERGER, H. Steroid alkaloid glycosides from *Solanum robustum*. *Phytochemistry*, **39** (6), 1475-1477, 1995.
- ROWAN, D. D.; MACDONALD, P. E.; SKIPP, R. A. Antifungal stress metabolites from *Solanum aviculare*. *Phytochemistry*, **22** (9), 2102-2104, 1983.
- SATO, Y.; IKEKAWA, N.; MOSETTIG, E. Improvement in the preparation of 3 β -Acetoxy-5 α -pregn-16-en-20-one and 3 β -Acetoxypregna-5,16-dien-20-one from the steroidal alkaloids, tomatidine and solasodine. *J. Org. Chem.*, **24**, 893-894, 1959.
- SATO, Y.; LATHAM, H. G.; MOSETTIG, E. Some reactions of solasodine. *J. Org. Chem.*, **22**, 1496-1500, 1957.
- SIBANDA, S.; NYANYIRA, C.; NICOLETTI, M. GALEFFI, C. Vismiones L and M from *Ochna pulchra*. *Phytochemistry*, **34** (6), 1650-1652, 1993.
- SIDDIQUI, B. S. & BEGUM, F. S. Two triterpenoids from the leaves of *Plumeria obtusa*. *Phytochemistry*, **52**, 1111-1115, 1999.
- SIDDIQUI, B. S.; NAEED, A.; BEGUM, S. SIDDIQUI, S. Minor iridoids from the leaves of *Plumeria obtusa*. *Phytochemistry*, **37** (3), 769-771, 1994.
- SIDDIQUI, S.; BEGUM, S.; HAFEEZ, F.; SIDDIQUI, B. S. Two triterpenes from the leaves of *Nerium oleander*. *Phytochemistry*, **28** (4), 1187-1191, 1989.
- SIDDIQUI, S.; HAFEEZ, F.; BEGUM, S.; SIDDIQUI, B. S. Oleanderol, a new pentacyclic triterpene from the leaves of *Nerium oleander*. *J. Nat. Prod.*, **51** (2), 229-233, 1988.
- SIDDIQUI, S.; SIDDIQUI, B. S.; NAEED, A.; BEGUM, S. Three pentacyclic triterpenoids from the leaves of *Plumeria obtusa*. *J. Nat. Prod.*, **53** (5), 1332-1336, 1990.

SILVA, J. R. A.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; PINHEIRO, M. L. B.; CORDEIRO, M. C.; TAMBORINI, E.; YOUNG, C. M.; BOLZANI, V. S. Ésteres triterpênicos de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson. *Química Nova*, **21** (6), 702-704, 1998.

SILVA, T. M. S. da. Estudo químico de Espécies de *Solanum*. Tese de Doutorado-Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2002.

SILVA, T. M. S. da; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R.; AGRA, M. F. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae) *Química Nova*, **26** (4): 517-522, 2003.

SOBRINHO, D. C.; HAUPTLI, M. B; APPOLINÁRIO, E. V.; KOLLENZ, C. L. M.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R. Triterpenoids Isolated from *Parahancornia amapa*. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2** (1), 15-20, 1991.

SOUZA, A. E.; SILVA, T. M. S. da; ALVES, C. C. F.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. Cytotoxic activities against Ehrlich Carcinoma and Human K562 Leukaemia of alkaloids and flavonoid from two *Solanum* species. *J. Braz. Chem. Soc.*, **13** (6), 838-842, 2002.

TIH GHOGOMU, R.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Structures of Isombamichalcone and Lophirochalcone, bi- and tetra-flavonoids from *Lophira lanceolata*. *Tetrahedron Lett.*, **30** (14), 1807-1810, 1989.

TIH GHOGOMU, R.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Structure of the chalcone dimers Lophirone F, G and H from *Lophira lanceolata* stem bark. *Phytochemistry*, **29** (7), 2289-2293, 1990.

TIH GHOGOMU, R.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Structure of Lophirones B and C, Biflavonoids from the bark of *Lophira lanceolata*. *Phytochemistry*, **28** (5), 1557-1559, 1989.

TIH, A. E.; GHOGOMU TIH, R.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. A new chalcone dimer from *Lophira alata*. *Tetrahedron Lett.*, **29** (45), 5797-5800, 1988.

TIH, A. E.; GHOGOMU, R. T.; SONDEGAM, B. L.; CAUX, C.; BODO, B. Constituents of *Lophira alata* leaves. *Biochem. Syst. Ecol.*, **31**, 549-551, 2003.

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

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

URZÚA, A. & CASSELS, B. K. Solasodine glycosides and diosgenin from *Solanum pinnatum*. *Phytochemistry*, **11** (12), 3548-3549, 1972.

USUBILLAGA, A.; AZIZ, I.; TETTAMANZI, M. C.; WAIBEL, R.; ACHENBACH, H. Steroidal alkaloids from *Solanum sycophanta*. *Phytochemistry*, **44** (3), 537-543, 1997.

VANDERLEI, M. F.; SILVA, M. S.; GOTTLIEB, H. E.; BRAZ-FILHO, R. Iridoids and Triterpenes from *Himatanthus phagedaenica*: The complete Assignment of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of two Iridoid glycosides. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2** (2), 51-55, 1991.

VELANDIA, J. R.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R. Ácido Ent-16 α ,17-diidroxicauran-19-óico isolado de *Ouratea semiserrata* e os desafios estereoquímicos dos carbonos quirais C-4 e C-16. *Química Nova*, **21** (4), 397-404, 1998.

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

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

VELOSO, M. P.; NAGEM, T. J.; OLIVEIRA, T. T. de. β -Dihidroplumericinic acid from *Himatanthus phagedaenicus*. *Biochem. Syst. Ecol.*, **27**, 669-671, 1999.

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

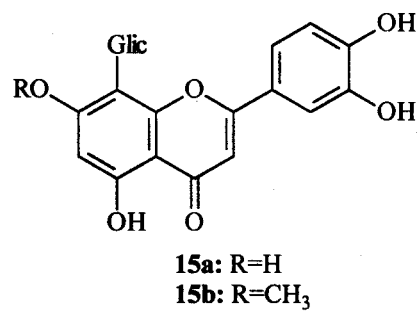
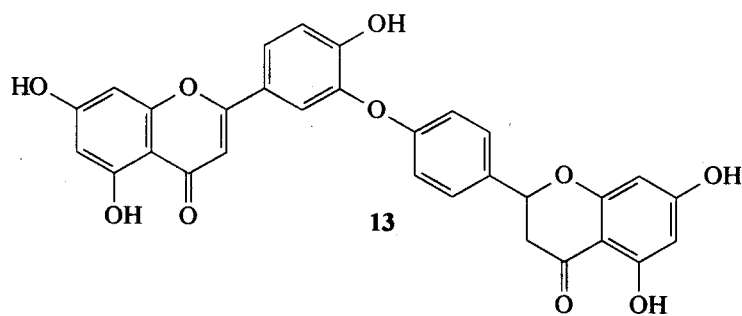
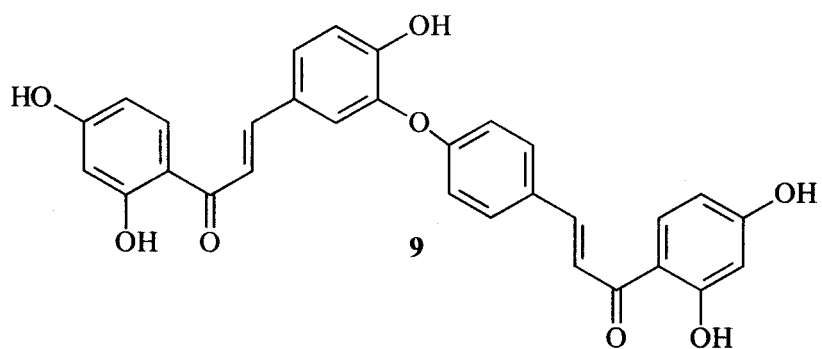
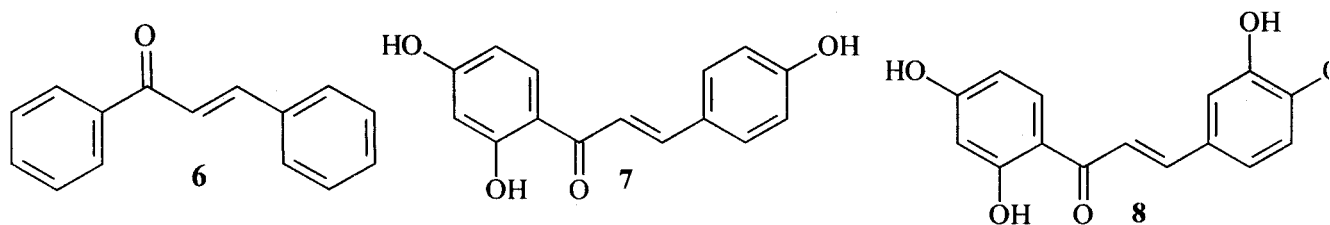
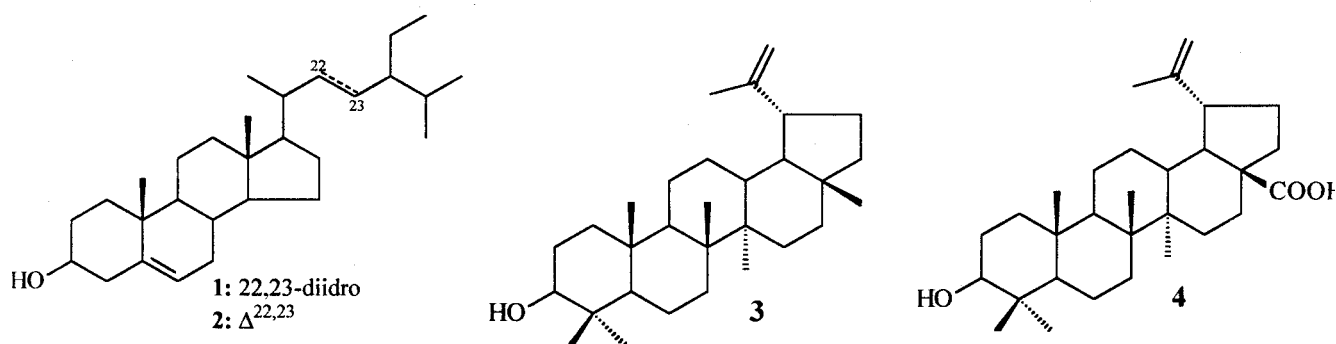
WEISSENBERG, M. Isolation of solasodine and other steroidal alkaloids and sapogenins by direct hydrolysis-extraction of *Solanum* plants or glycosides therefrom. *Phytochemistry*, **58**, 501-508, 2001.

YAHARA, S.; NAKAMURA, T.; SOMEYA, Y.; MATSUMOTO, T.; YAMASHITA, T.; NOHARA, T. Steroidal glycosides, indiosides A-E, from *Solanum indicum*. *Phytochemistry*, **43** (6), 1319-1323, 1996.

CAPÍTULO I
ESTUDO QUÍMICO DE *Luxemburgia octandra*



I-1. Constituintes químicos aislados de *Luxemburgia octandra*



I-2. Isolamento e purificação dos constituintes

Os galhos e folhas de *Luxemburgia octandra* foram coletados no Morro de São Sebastião, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil e autenticado pelo técnico Jorge L. Silva. Uma excicata desta espécie (Nº 26197) está depositada no herbário OUPR-UFOP, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto-MG, Brasil.

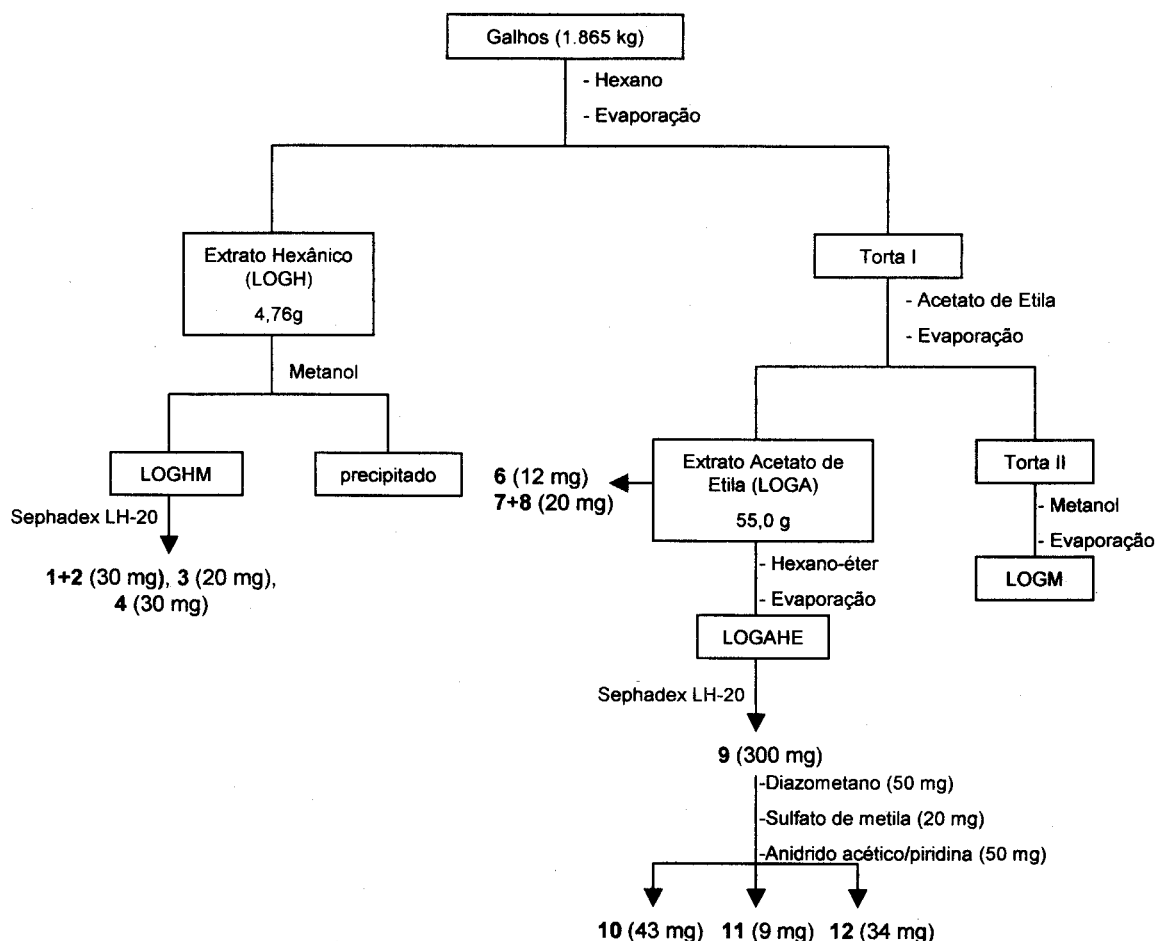
a) Galho

O material seco e pulverizado (1.865 Kg) foi submetido à maceração com hexano (*Luxemburgia octandra* Galho Hexano, LOGH), acetato de etila (*Luxemburgia octandra* Galho Acetato, LOGA) e metanol (*Luxemburgia octandra* Galho Metanol, LOGM) e concentrado sob vácuo (Esquema I.1).

Para precipitar o material alifático foi adicionado metanol ao extrato hexânico (4,76 g). A parte solúvel em metanol foi chamada LOGHM (2,1 g) que foi fracionada em sephadex LH-20 obtendo-se 43 frações. As frações coletadas de LOGHM foram analisadas por CCDA. A fração 14 forneceu uma mistura dos esteróides sitosterol e estigmasterol (1+2, 30 mg), a fração 20 forneceu o triterpeno lupeol (3, 20 mg, PF: 202 °C). A fração 18/19 é constituída do ácido betulínico (4, 30 mg, PF: 295 °C) e o seu derivado metilado (5, 31 mg) foi obtido pelo tratamento de uma solução metanólica do ácido betulínico natural (30 mg) com uma solução etérea de diazometano.

O extrato obtido com acetato de etila (LOGA; 5,0 g) foi fracionado em Sephadex LH-20, gerando 35 frações. A fração LOGA-17 foi analisada através de RMN¹H, RMN¹³C e massas e identificou-se a substância 6 (12 mg). E as frações LOGA-19 a LOGA-24 foram reunidas, após análise em CCDA, e analisadas com espectros de IV, RMN¹H, RMN¹³C (PND e DEPT) identificando-se a mistura das chalconas 7 + 8 (20 mg, material pastoso).

O extrato acetato de etila dos galhos de *Luxemburgia octandra* (*Luxemburgia octandra* Galho Acetato, LOGA; 50,0g) foi submetido a uma partição com solventes obtendo-se a fração hexano-éter (*Luxemburgia octandra* Galho Acetato Hexano Éter, LOGAHE). Esta fração foi submetida a uma filtração em sephadex LH-20, usando metanol como fase móvel, recolhendo-se 39 frações. A fração 22 apresentou-se como um cristal amarelo (300 mg, PF:172 °C) e foi analisada através de infravermelho, RMN¹H e ¹³C (PND e DEPT) e técnica de RMN 2D e, após comparação com 7 + 8 em CCDA, propôs-se a estrutura da bichalcona 9 (página 53). Os derivados 10 (página 59) e 11 (página 72) foram obtidos através do tratamento de 9 (50 mg, 20 mg) com diazometano e sulfato de metila, respectivamente, e 12 através do tratamento de 9 (50 mg) com anidrido acético/piridina. Os produtos foram identificados através da análise dos espectros de IV, RMN¹H, ¹³C (1D, 2D e NOE) e EM. Estes dados foram usados para confirmar a proposta estrutural de 9. A bichalcona 9 e seus derivados são novos na literatura. Os dados da luxenchalcona e de seu derivado trimetiléter foram publicados na literatura (CARVALHO *et al.*, 2003). O completo assinalamento de RMN¹H e ¹³C dos derivados permetiléter e do peracetil éster da luxenchalcona foi feito e submetido à publicação (ALVES *et al.*, 2003).



Esquema I.1- Marcha para o isolamento das substâncias dos Galhos de *Luxemburgia octandra*.

b) Folhas

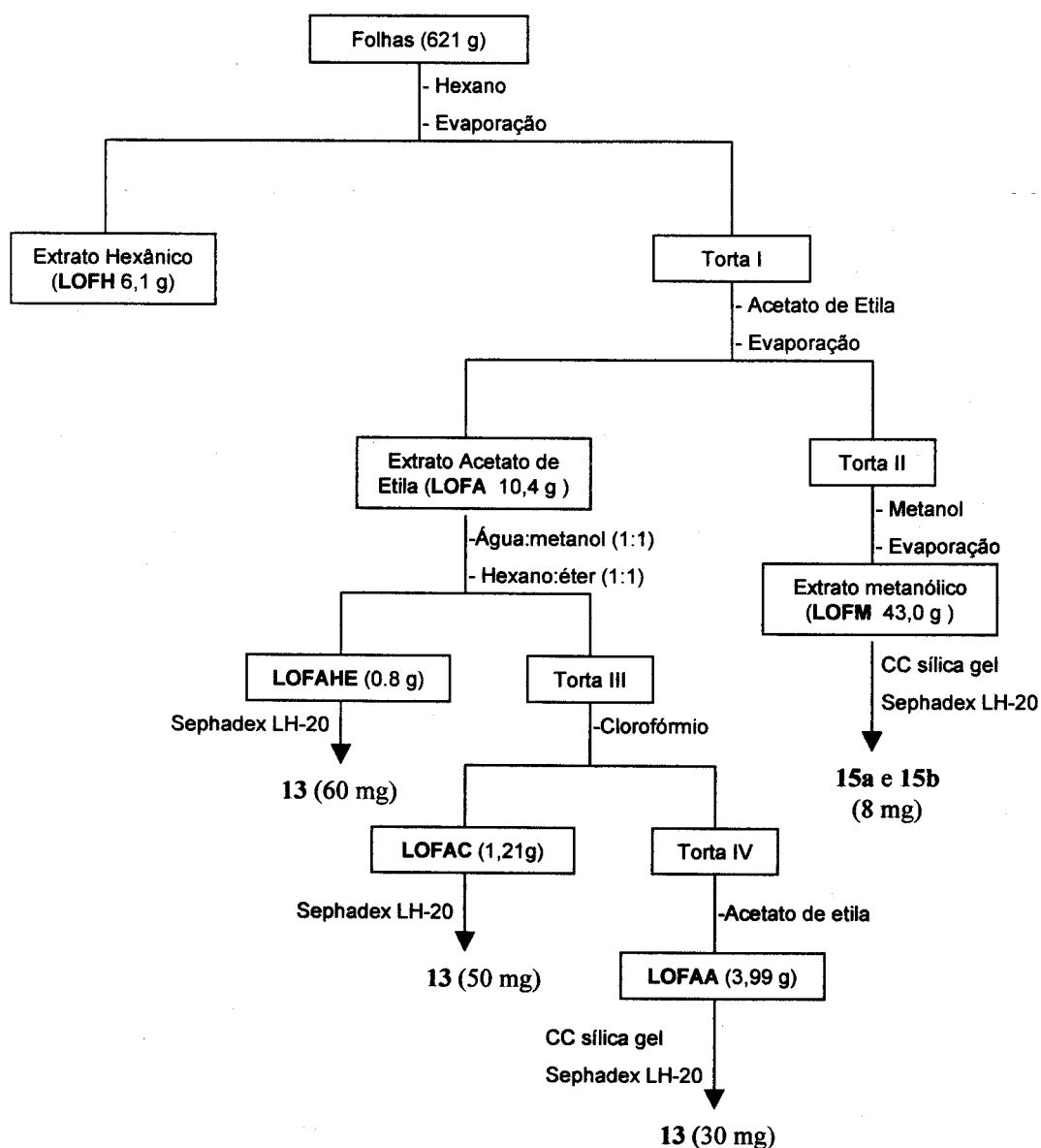
As folhas trituradas e secas (621g) foram submetidas à extração com hexano, acetato de etila e metanol, fornecendo os extratos **LOFH** (6,1 g), **LOFA** (10,4 g) e **LOFM** (43,0 g). O resíduo obtido com acetato de etila foi dissolvido em H₂O/CH₃OH (1:1) e extraído com hexano/éter (1:1) **LOFAHE**, clorofórmio (**LOFAC**) e acetato de etila (**LOFAA**). Os solventes foram removidos sob vácuo e a fração hexano/éter das folhas (**LOFAHE** 0,8 g) foi submetida à cromatografia em coluna usando sephadex LH-20. As frações obtidas deste extrato foram analisadas por CCDA e visualizadas por UV (254 e 366 nm) e AlCl₃-EtOH. Das frações 15-17 de (**LOFAHE**) foi isolado o biflavonóide 4',5,7-triidroxi-flavona-(3'→O→4'')-5'',7''-diidroxiflavanona **13** (60 mg, PF: 220 °C). O derivado **14** foi obtido através do tratamento de **13** com diazometano. O produto foi identificado através da análise dos espectros de RMN¹H e ¹³C.

A parte solúvel em metanol da fração (**LOFAC** 1,21 g) foi submetida à cromatografia em coluna usando Sephadex LH-20 e metanol como eluente, obtendo-se 19 frações, as duas últimas frações foram reunidas e filtradas novamente em Sephadex LH-20, obtendo-se 5 frações. Da fração LOFAC 18-5 foi isolado o biflavonóide 4',5,7-triidroxi-flavona-(3'→O→4'')-5'',7''-diidroxiflavanona **13** (50 mg).

A fração (**LOFAA** 3,99 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel. Iniciou-se a eluição com acetato de etila aumentando-se a polaridade com mistura

de metanol até metanol (100%), obtendo-se 22 frações de 20 mL. As frações 1 e 2 desta coluna foram reunidas e submetida à cromatografia em coluna usando Sephadex LH-20 e metanol como eluente, obtendo-se 21 frações, da fração LOFAA 1-5 foi isolado o biflavonóide **13** (30 mg).

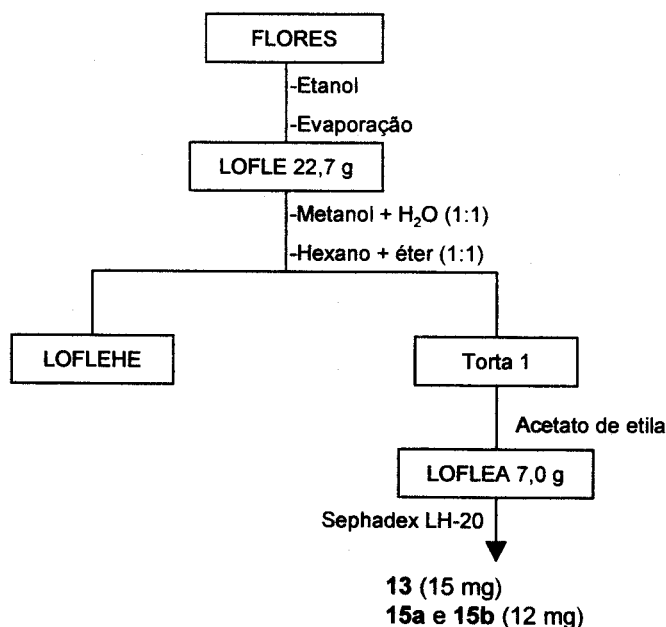
O extrato **LOFM** foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel, iniciou-se a eluição com acetato de etila aumentando-se a polaridade com mistura de metanol até metanol (100%), obtendo-se 30 frações de 20 mL. A fração 3 desta coluna foi submetida à cromatografia em coluna usando sephadex LH-20 e metanol como eluente, obtendo-se 23 frações, as frações LOFM 3-6 a LOFM 3-12 foram reunidas e analisadas através de RMN¹H e ¹³C (PND e DEPT) e foi identificada uma mistura de flavonóides C-glicosilados **15a** e **15b** (8 mg).



Esquema I.2- Marcha para o isolamento das substâncias das folhas de *Luxemburgia octandra*.

c) Flores

As flores secas (270 g) foram submetidas a extração com etanol fornecendo o extrato **LOFLE** (*Luxemburgia octandra* Flores Etanol, **LOFLE** 22,7 g). O resíduo obtido com etanol foi dissolvido em H₂O/CH₃OH (1:1) e extraído com hexano/éter (1:1) **LOFLEHE** e acetato de etila (**LOFLEA**). Os solventes foram removidos sob vácuo e a fração acetato de etila das flores (**LOFLEA** 7,0 g) foi submetida à cromatografia em coluna usando sílica gel obtendo-se 7 frações. Reuniu-se as frações 3 e 4 e filtrou a mistura 3/4 em Sephadex LH-20 obtendo-se 20 frações; das frações **LOFLEA** 3/4-13 a 3/4-19 foi isolada 15 mg do biflavonóide 4',5,7-triidroxi-flavona-(3'→O→4'')-5'',7''-diidroxi-flavanona **13**. E a fração 5 desta coluna também foi submetida a filtração em Sephadex LH-20 usando-se metanol como eluente e obteve-se 28 frações, das frações **LOFLEA** 5/13 a **LOFLEA** 5/20 foi isolada 12 mg de uma mistura de dois flavonóides C-glicosilados **15a** e **15b**. As frações obtidas deste extrato foram analisadas por CCDA e visualizadas por UV (254 e 366 nm) e AlCl₃-EtOH.



Esquema I.3- Marcha para o isolamento das substâncias das flores de *Luxemburgia octandra*.

I-3. Resultados e discussão

I-3.1. Determinação estrutural dos constituintes isolados de *L. octandra*

I-3.1.1. Esteróides

Os esteróides 1 (sitosterol) e 2 (estigmasterol) foram obtidos em forma de mistura, comumente encontrada na natureza vegetal. O espectro de IV (Figura I.1) revela bandas de absorção para grupo hidroxila (3429 cm^{-1} , estiramento O-H), grupamentos CH_2 e CH_3 (2938 cm^{-1} e 2866 cm^{-1}), $\text{C}=\text{C}$ (1643 cm^{-1}) e $\text{C}-\text{O}$ (1056 cm^{-1}). O espectro de RMN de ^1H (Figura I.2) apresenta característica de esteróide com sinais entre δ_{H} 0,6 e 2,0 de grupos metílicos, um multipletto em δ_{H} 3,5 para o hidrogênio carbinólico H-3, singletto largo em δ_{H} 5,3 correspondente ao H-6 olefínico. No caso do stigmasterol, os hidrogênios olefínicos H-22 e H-23, são representados pelo multipletto em δ_{H} 5,1. Estes valores estão de acordo com os dados da literatura (KOJIMA *et al.*, 1990).

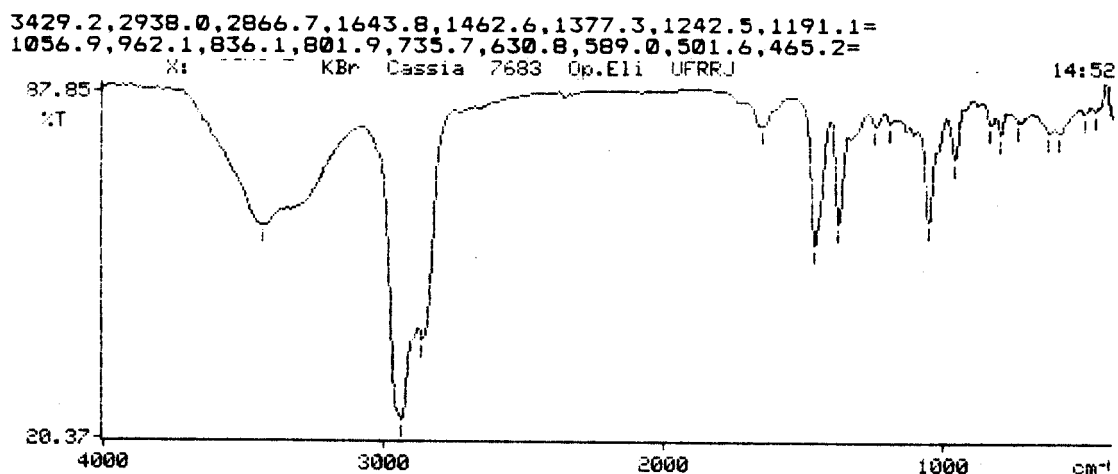


Figura I.1- Espectro de IV das substâncias 1 e 2 (sitosterol e stigmasterol).

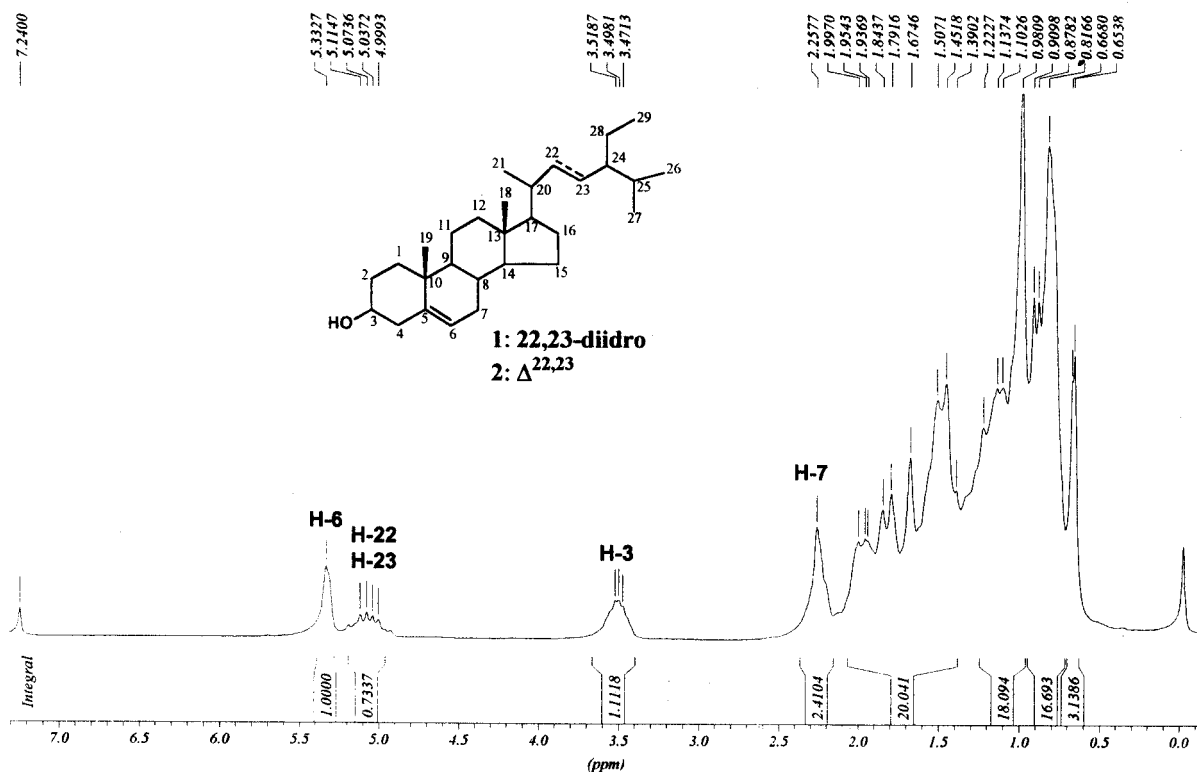


Figura I.2- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) das substâncias 1 e 2 (sitosterol e estigmasterol).

I-3.1.2. Identificação dos terpenóides 3 e 4

a) Lupeol

O espectro de RMN de ^1H do lupeol 3 (Figura I.4) possui sete sinais simples correspondentes às metilas terciárias (δ_{H} 1,23, 0,95, 0,94, 0,91, 0,80 e 0,73) sendo um sinal em δ_{H} 1,67 (s) correspondente à frequência de metila ligada a carbono sp^2 . Os dois singletos largos em δ_{H} 4,58 e 4,72 são referentes a hidrogênios vinílicos e o sinal em δ_{H} 3,15 representa o hidrogênio do carbono carbinólico metínico.

Esta proposta foi confirmada através da comparação do Pf: 202 °C com o ponto de fusão do lupeol 212-215 °C (AHMAD *et al.*, 1994) e comparação em cromatografia em camada fina com amostra autêntica.

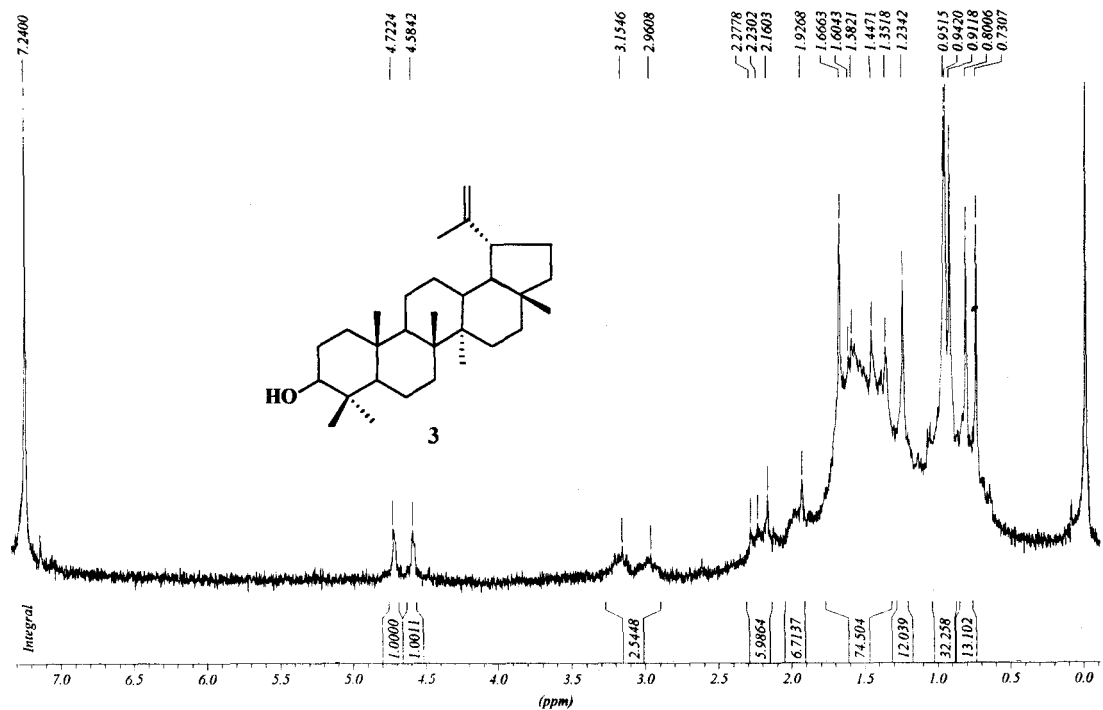


Figura I.3. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **3** (Lupeol).

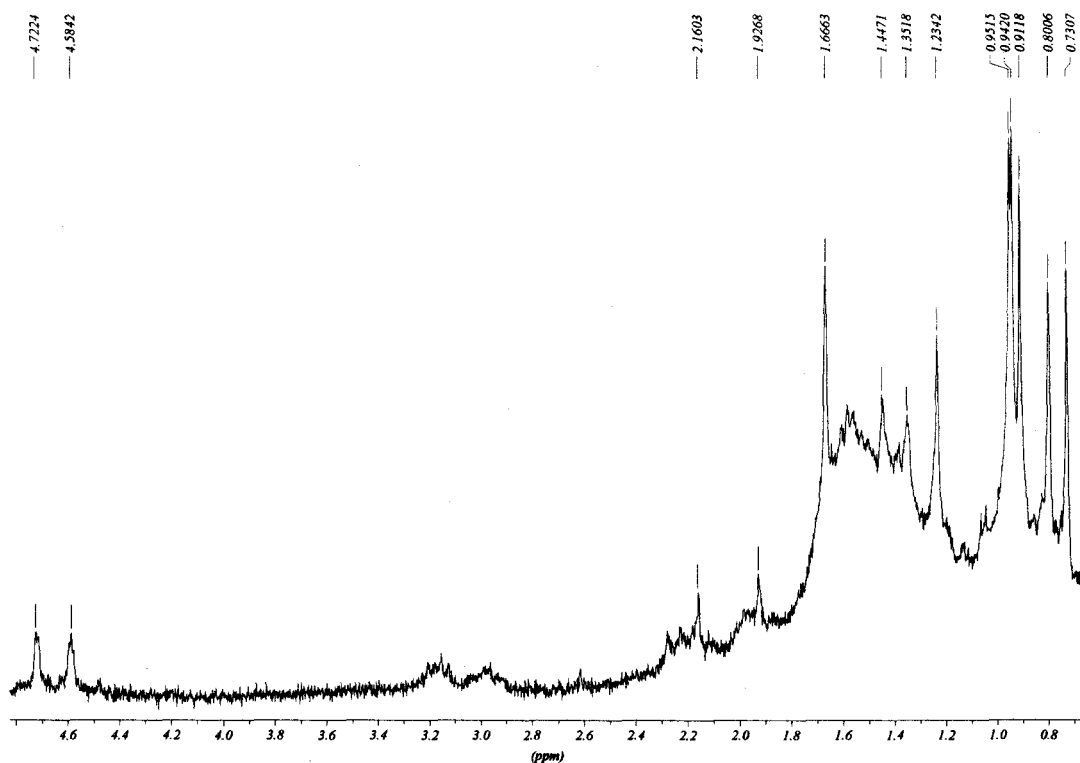


Figura I.4. Espectro de RMN de ^1H ampliado entre δ 0,8 e δ 4,8 ppm (200 MHz, CDCl_3) da substância **3** (Lupeol).

b) Ácido betulínico

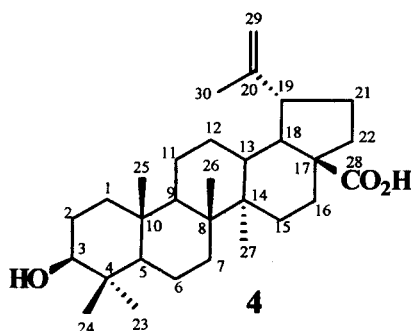
A análise do espectro registrado na região do IV da substância **4** (Figura I.5) revela bandas de absorção para grupo hidroxila (3466 cm^{-1} , estiramento O-H), grupamentos CH_2 e CH_3 (2941 cm^{-1} e 2869 cm^{-1}), $\text{C}=\text{O}$ (1690 cm^{-1}) e $\text{C}-\text{O}$ (1036 cm^{-1}).

Os sinais presentes no espectro de RMN de ^1H (Figura I.6 e I.7) podem ser atribuídos a sinais correspondentes a metilas, sendo que uma delas em δ_{H} : 1,67 corresponde a metila ligada a carbono sp^2 . Também foram observados dois singletos largos em δ_{H} : 4,59 e 4,72 correspondentes a hidrogênios olefínicos e um multipletto entre δ_{H} : 3,1-3,2 atribuído ao hidrogênio carbinólico H-3, sugerindo assim um esqueleto do tipo lup-20(29)-eno.

Nos espectros de RMN de ^{13}C -PND e ^{13}C -DEPT (Figura I.8 e Figura I.9) foram observados a presença de dois carbonos sp^2 sendo um deles quaternário em δ_{C} : 151,35 e outro metilênico em δ_{C} : 110,01, um carbinólico δ_{C} : 79,26 e um carboxílico δ_{C} : 179,73. Os demais sinais são de carbonos sp^3 quaternários, metínicos, metilênicos e metílicos. Estes dados foram comparados com os descritos na literatura (BILIA *et al.*, 1996) e estão de acordo para a estrutura do ácido betulínico (Tabela I.1).

A comparação do ponto de fusão da substância isolada (PF: $280\text{ }^\circ\text{C}$) com o da literatura ($282\text{-}285\text{ }^\circ\text{C}$) (AHMAD *et al.*, 1994) ajudou a confirmar a presença do ácido betulínico nesta amostra.

Os sinais adicionais de baixa intensidade no espectro de RMN ^{13}C (* x) entre δ 120 e δ 145 ppm e entre δ 15 e δ 60 ppm permite sugerir a presença dos ácidos triterpênicos ursólico (*) e oleanólico (x) presentes nesta amostra. Os sinais no espectro de hidrogênio podem ser justificados pela presença destes componentes como impureza na fração analisada.



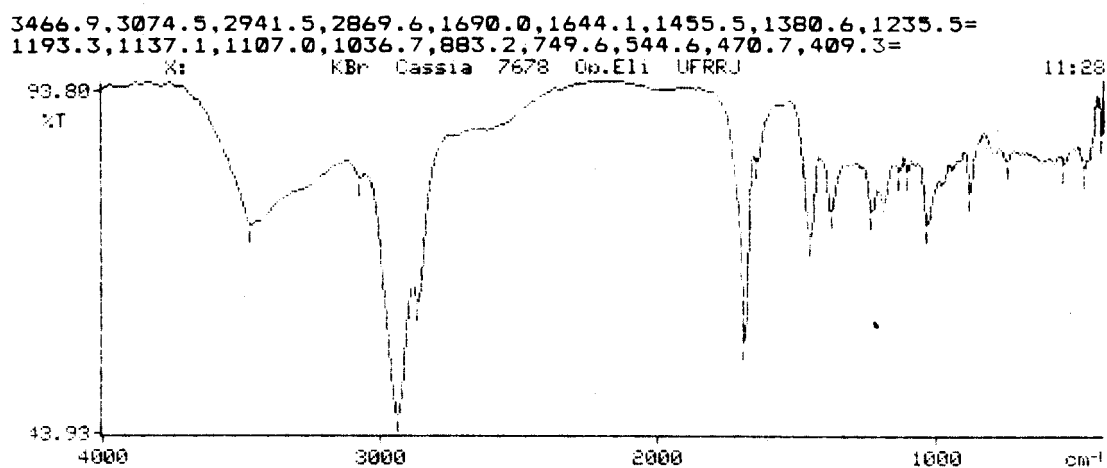


Figura I.5- Espectro de IV da substância 4 (Ácido betulínico).

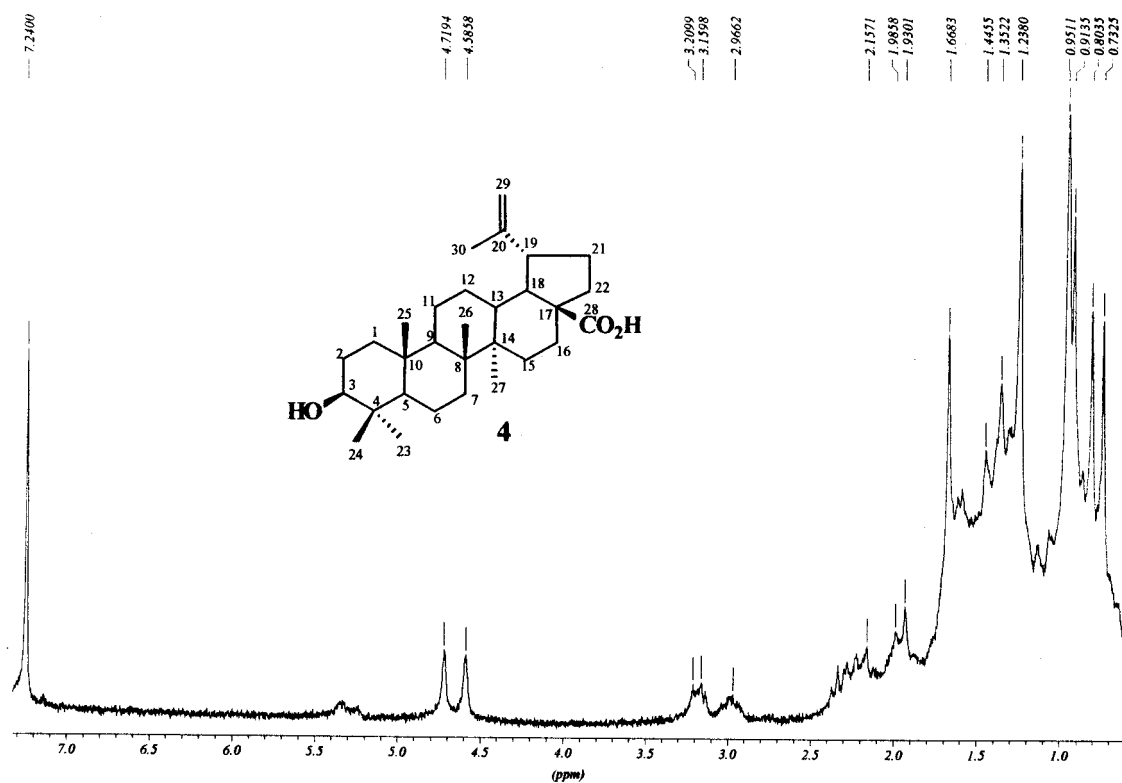


Figura I.6. Espectro de RMN¹H (200 MHz, CDCl₃) da substância 4 (ácido betulínico).

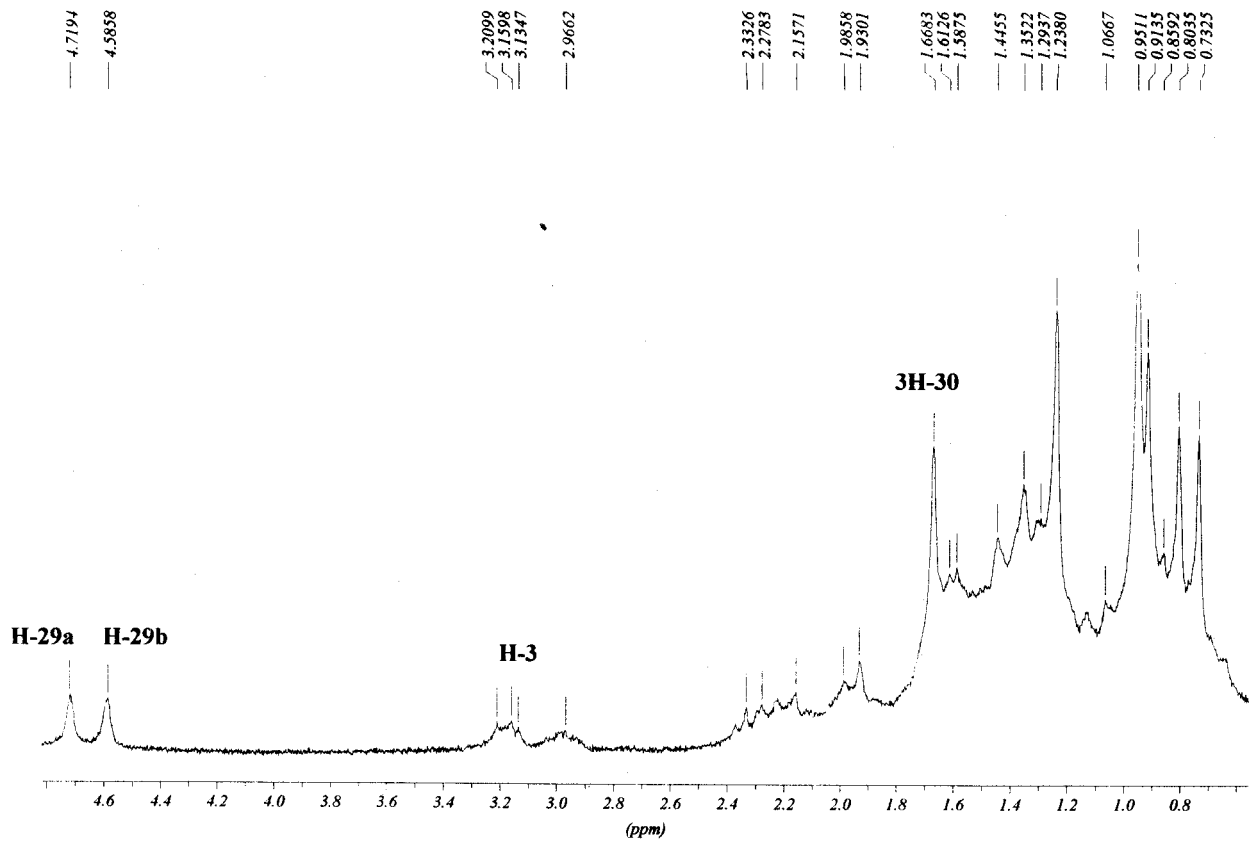
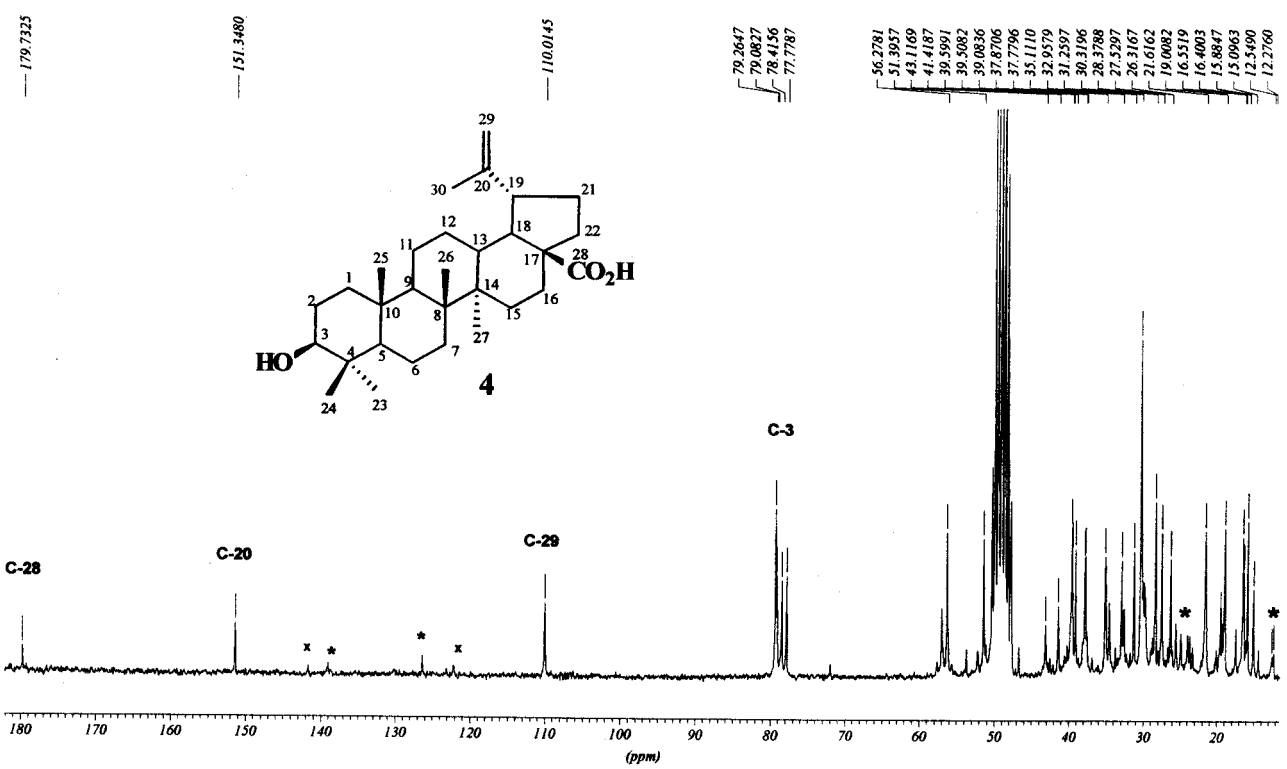


Figura I.7. Espectro de RMN¹H ampliado entre δ 0,7 e δ 4,8 ppm (200 MHz, CDCl₃) de 4.



(* *) sugerem a presença dos ácidos triterpênicos.

Figura I.8. Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, metanol-d₄) da substância 4 (ácido betulínico).

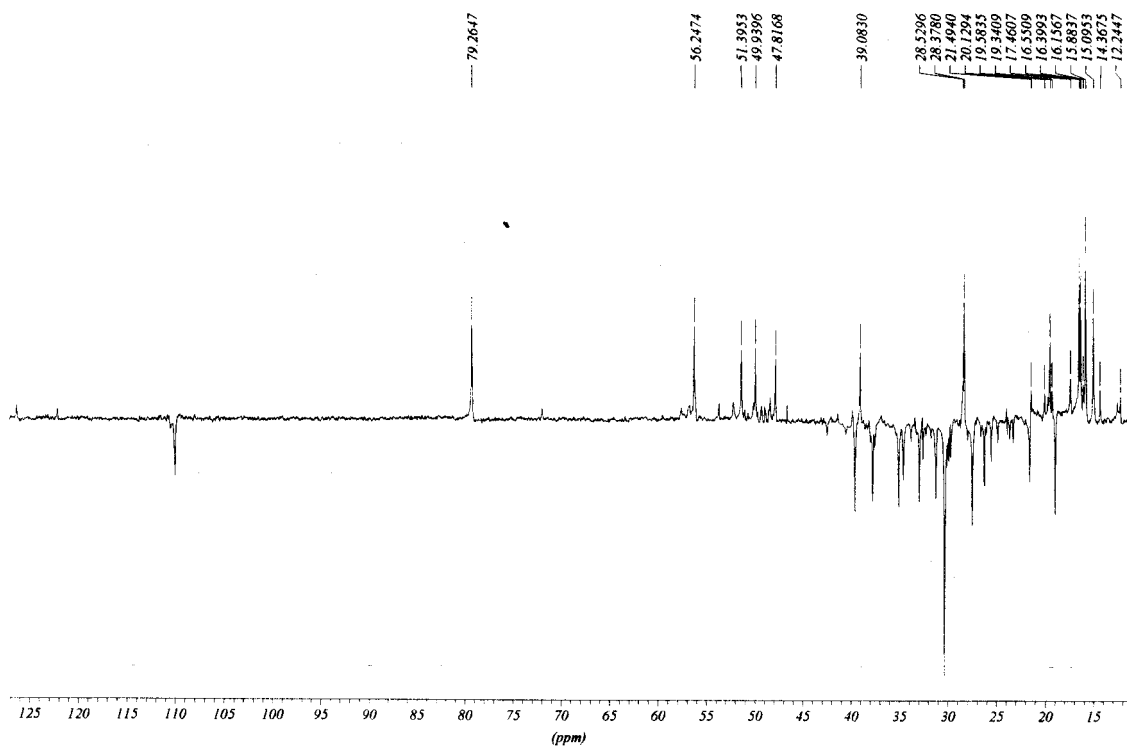


Figura I.9. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT (50 MHz, metanol- d_4) da substância **4**.

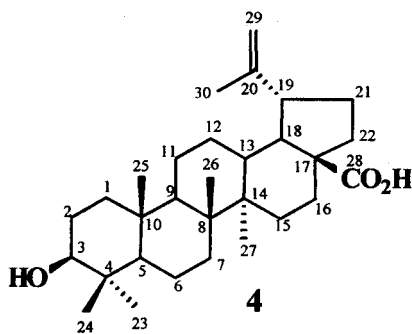


Tabela I.1. Dados de RMN ^1H (CDCl_3) e ^{13}C (metanol) de **4** comparados com a literatura (CDCl_3) (BILIA *et al.*, 1996).

C	Substância 4		Ácido betulínico (literatura)
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
1		39,51	38,70
2		27,53	27,30
3	3,16 (sl)	79,26	78,90
4		39,75	38,90
5		56,28	55,40
6		19,00	18,30
7		35,11	34,30
8		41,42	40,70
9		50,27	50,40
10		37,78	37,20
11		21,61	20,90
12		25,59	25,60
13		39,08	38,50
14		43,12	42,50
15		31,26	30,60
16		30,32	29,30
17		47,73	48,00
18		47,82	48,00
19	2,97 (m)	49,94	48,80
20		151,35	150,40
21		30,11	30,00
22		34,63	34,00
23	0,91 (s)	27,53	28,00
24	0,73 (s)	15,10	15,20
25	0,80 (s)	15,88	15,90
26	0,95 (s)	16,40	16,00
27	0,95 (s)	14,37	14,70
28		179,73	181,00
29	4,59 (sl) e 4,72 (sl)	110,01	109,60
30	1,67 (s)	19,58	19,40

c) Ácido betulínico metilado

O derivado metilado **5** do ácido betulínico foi identificado através da análise do espectro de RMN de ^1H , o deslocamento químico da metoxila aparece em δ 3,6 ppm.

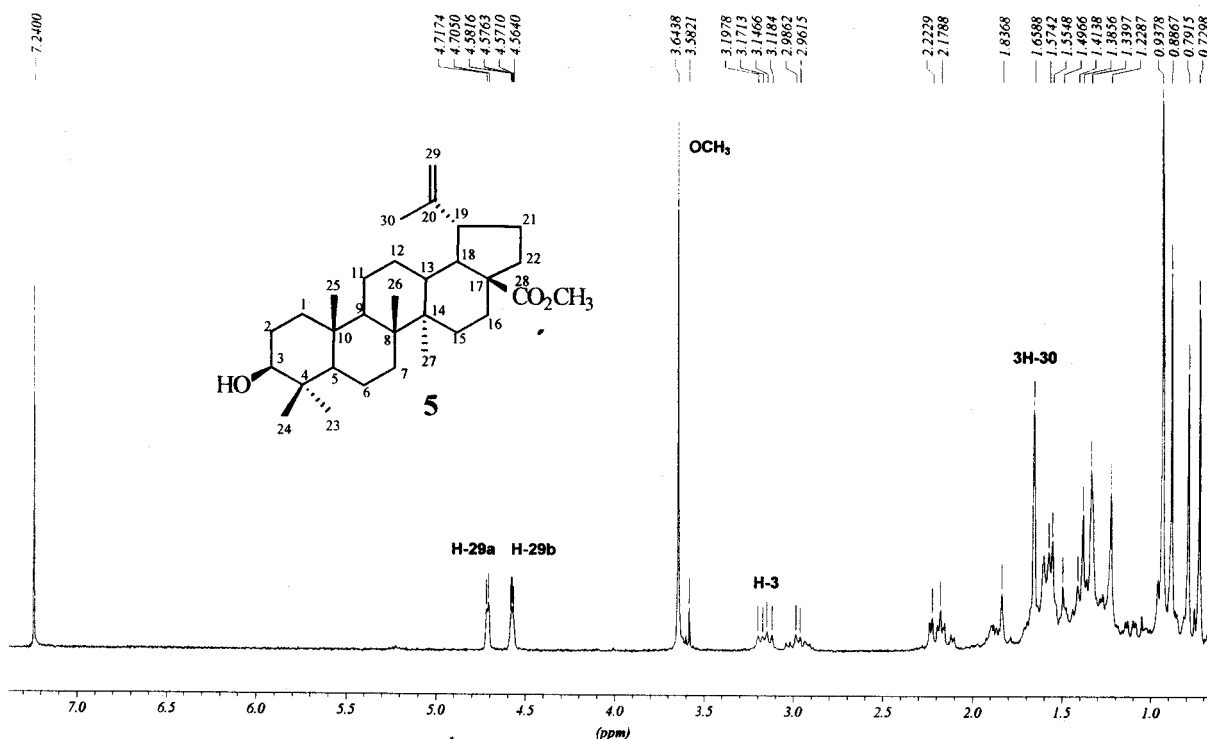


Figura I.10: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **5**.

I-3.1.3. Flavonóides

a) Identificação de **6**

O espectro de IV (Figura I.11) revela bandas de absorção para carbonila conjugada (1626 cm^{-1} (F), estiramento $\text{C}=\text{O}$), ligação dupla conjugada com carbonila (1626 cm^{-1} , $\text{C}=\text{C}$), estiramento $\text{C}=\text{C}$ de anel aromático 1592 , 1555 , 1454 cm^{-1} e estiramento $\text{C}-\text{O}$ (1265 cm^{-1}).

O RMN ^1H da substância **6** mostra sinais de hidrogênios aromáticos conjugados com carbonila H-2' e H-6' em δ_{H} 8,24 (7,5 Hz), hidrogênios α e β em 7,8 e os demais hidrogênios aromáticos entre δ_{H} 7,56 e 7,86 ppm (Figura I.12).

O espectro de RMN de ^{13}C BBD e DEPT (Figura I.13 e Figura I.14) mostra a presença de 12 carbonos metínicos e três carbonos quaternários. Através destas informações e comparação com dados da literatura (SOBRINHO *et al.* 2001) foi possível atribuir a estrutura da substância **6**. O espectro de massas (Figura I.15) contribuiu para confirmar esta proposta.

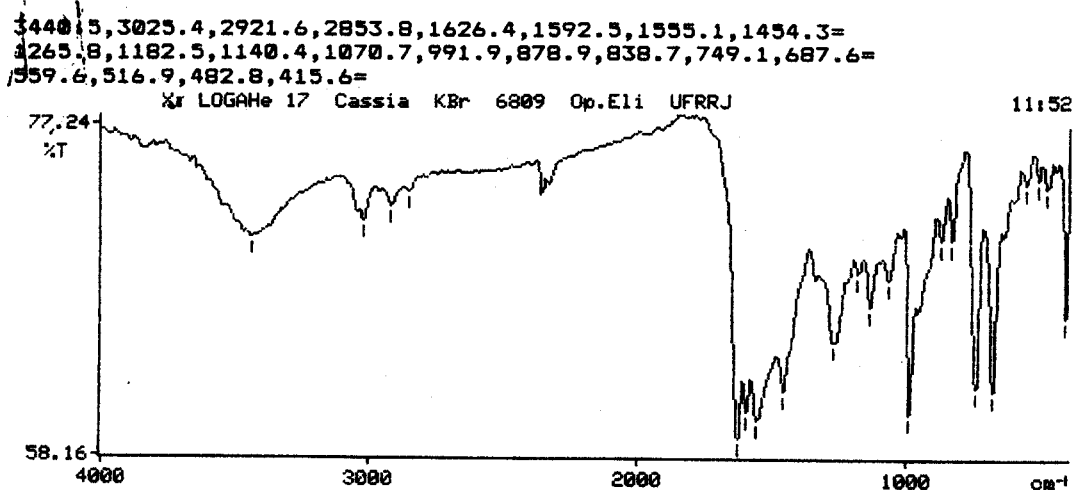
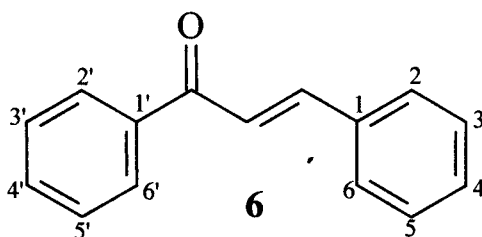


Figura I.11: Espectro de IV da substância 6.



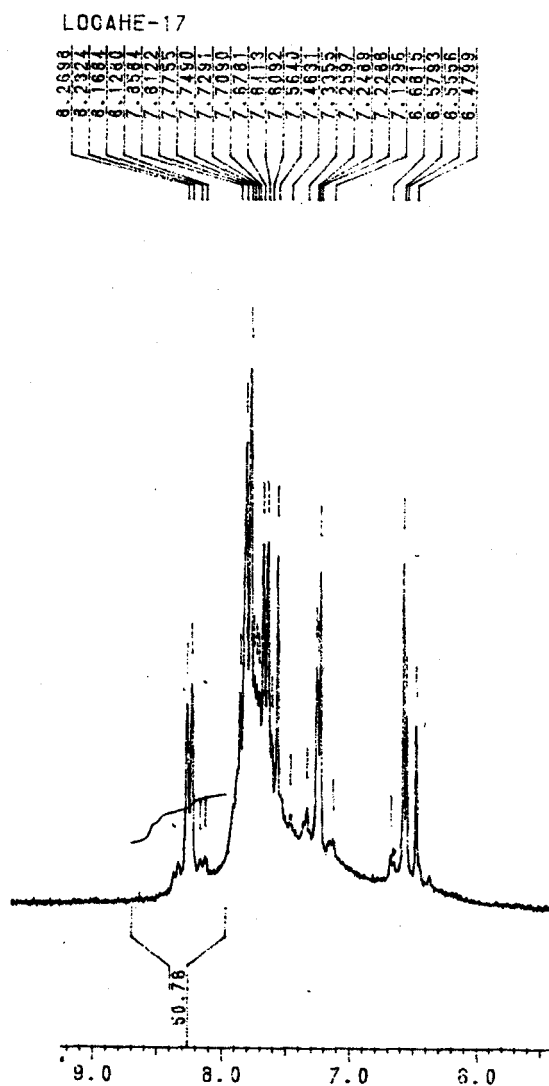
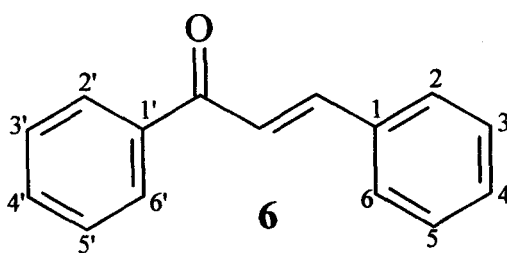


Figura I.12: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da substância 6 em CDCl_3 .



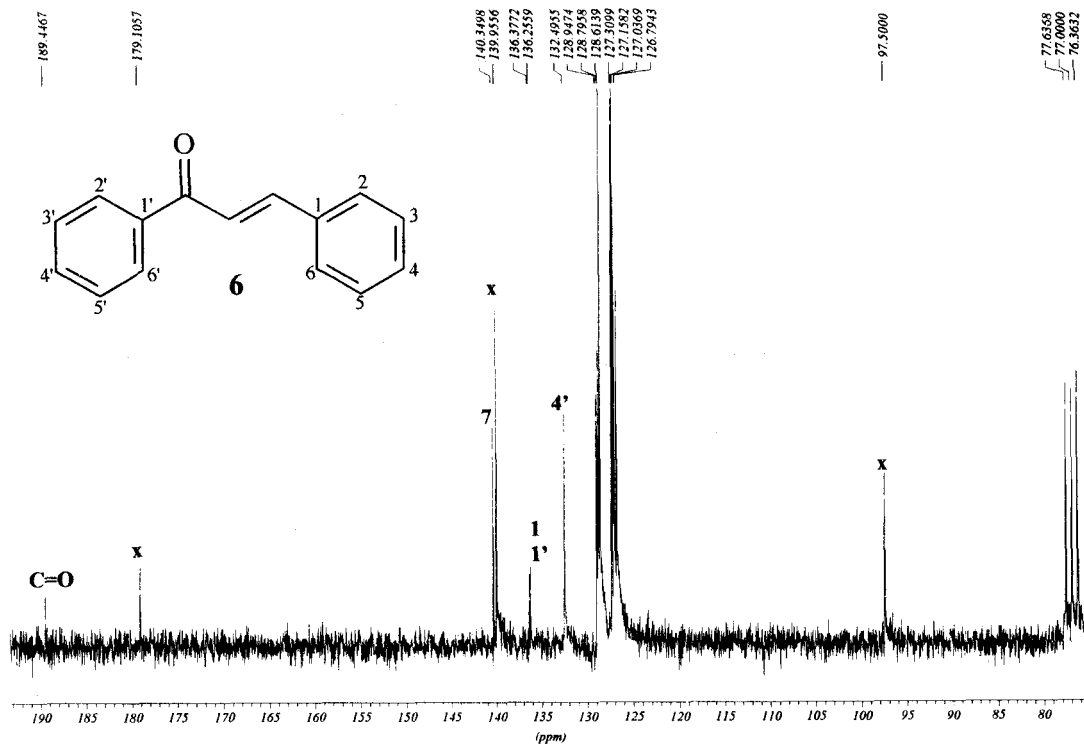


Figura I.13: Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz) da substância 6 em CDCl₃.

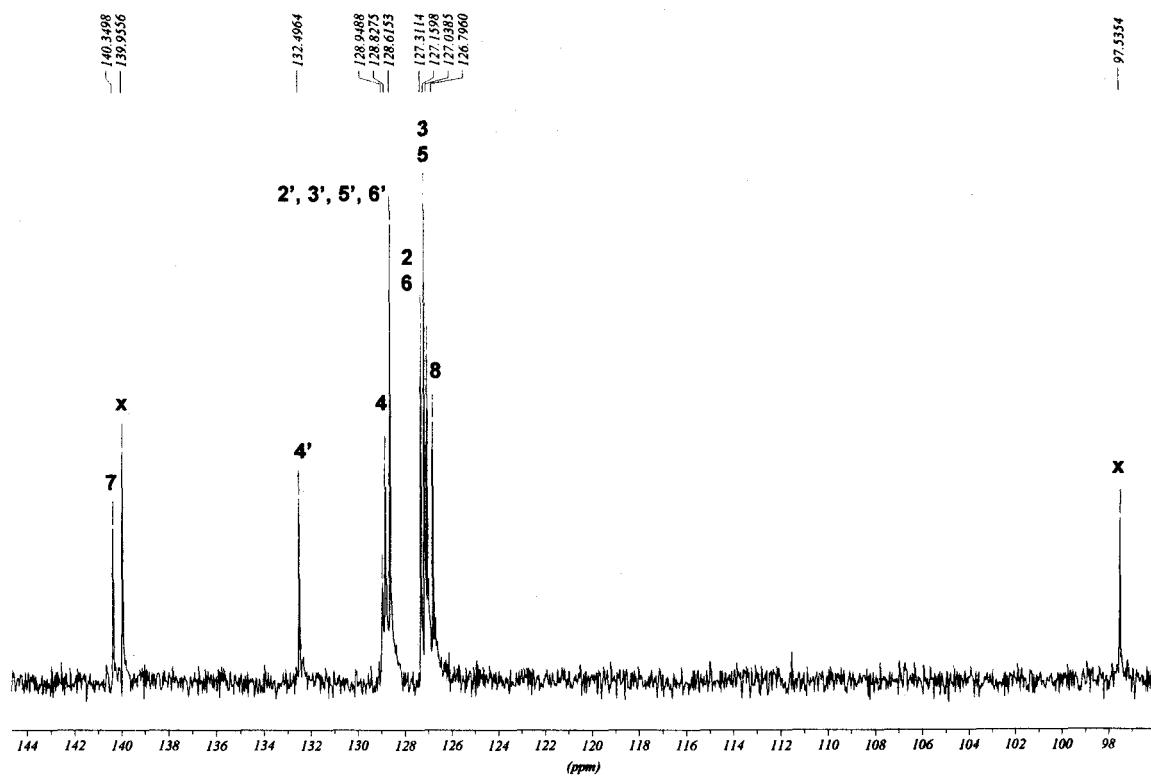


Figura I.14: Espectro de RMN de ¹³C (DEPT, θ 135) da substância 6 em CDCl₃.

Chromatogram Plot

File: c:\saturnw\data\cassia\logahe 17.sms
Sample: LOGAHE 17
Scan Range: 1 - 3481 Time Range: 0.00 - 28.99 min.

Operator: Frances
Date: 10/15/02 2:47 PM

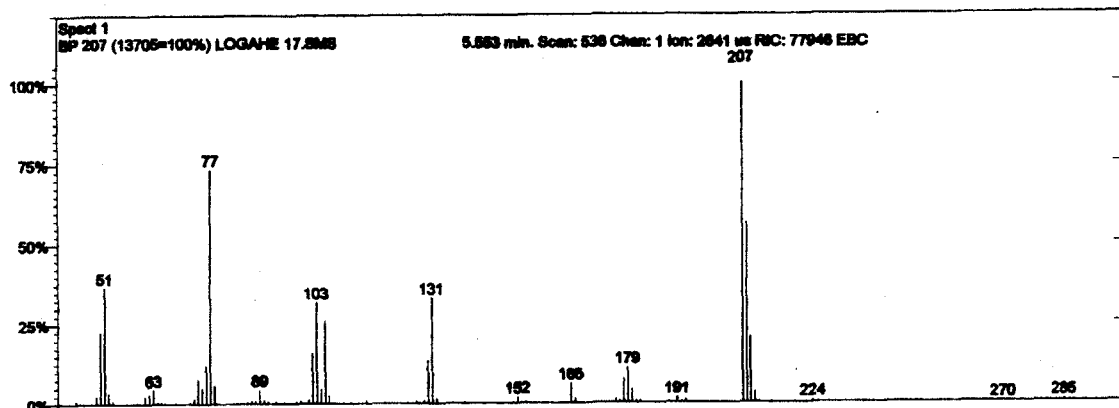
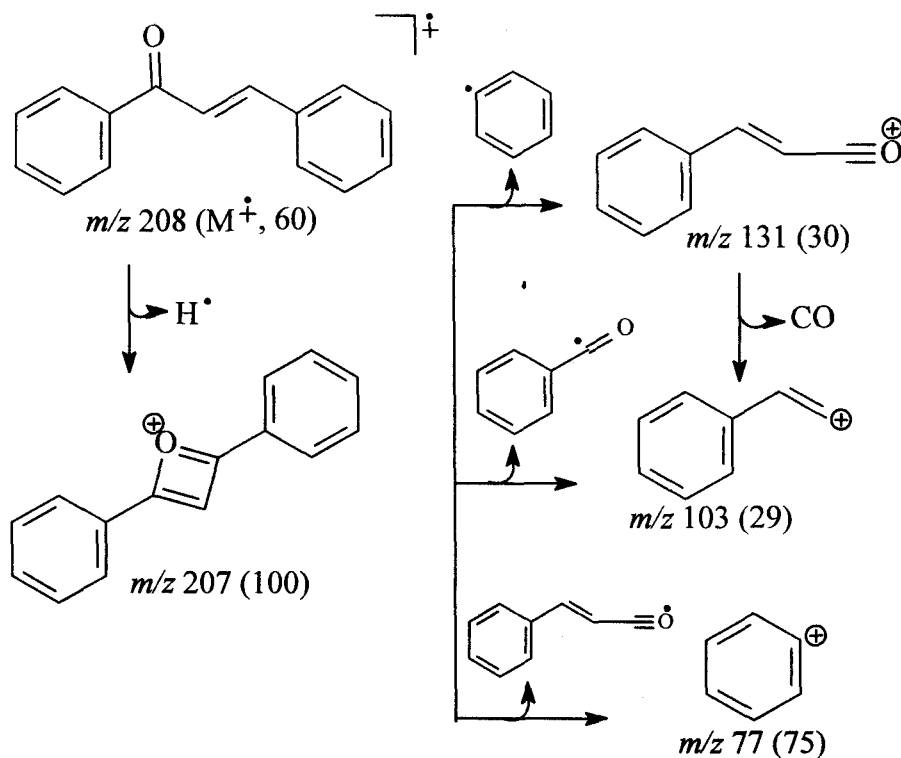


Figura I.15: Espectro de massas da substância 6.



Esquema I.1: Fragmentação de massas da substância 6.

Tabela I.2: Dados de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) da substância **6** (CDCl_3) comparados com a literatura (SOBRINHO *et al.*, 2001).

C/H	Substância 6	Literatura
	$\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$
C-1'	136,3	138,1
C-2'	128,6	128,4
C-3'	128,6	128,4
C-4'	132,5	132,7
C-5'	128,6	128,4
C-6'	128,6	128,4
C-1	136,4	134,8
C-2, 6	127,3	128,9
C-3, 6	127,1	128,5
C-4	128,8	130,5
C- α	126,8	122,0
C- β	140,3	144,7
C=O	189,4	190,4
H-7	7,8	7,80
H-8	7,5	7,48
H-2', 6'	8,24 (7,5 Hz)	8,02

b) Identificação de 7+8

O espectro de IV (Figura I.16) revela bandas de absorção para grupo hidroxila (3415 cm^{-1} , estiramento O-H), carbonila conjugada (1630 cm^{-1} (F), estiramento C=O), ligação dupla conjugada com carbonila (1630 cm^{-1} , C=C), estiramento C=C de anel aromático $1506, 1445\text{ cm}^{-1}$ e estiramento C-O de fenol (1225 cm^{-1}).

O espectro de RMN ^1H (Figura I.17) da mistura de **7** e **8** apresentou singletos atribuídos a duas hidroxilas queladas δ_{H} : 13,58) cinco sinais em δ_{H} : 6,34 (**8**) e 6,36 (**7**) (d, $J=2,3\text{ Hz}$, H-3), 6,43 (**8**), 6,46 (**7**) (dd, $J=8,3$ e $2,3\text{ Hz}$, H-5), 8,1 (**7** e **8**) (d, $J=8,7\text{ Hz}$, H-6) pertencentes a dois sistemas ABC aromático conjugado com carbonila, dois dubletos ($J=8,7\text{ Hz}$) em δ_{H} : 6,99 (H-3', 5') e 7,83 (H-2', 6') que corresponde a um sistema AA'BB' de **7** e outro sistema ABC aromático representado por três sinais em 7,14 (d, $J=8,3\text{ Hz}$, H-5'), 7,62 (dd, $J=8,3$ e $2,3\text{ Hz}$, H-6') e 7,73 (d, $J=2,3\text{ Hz}$, H-2') de **8**. Dois singletos adicionais em δ_{H} : 7,83 e 7,85 foram atribuídos aos hidrogênios 8 e 9 de **7** e **8** (Tabela I.3) (página 52).

A análise dos espectros de RMN de ^{13}C BBD (Figura I.18) e DEPT ($\theta=135$) (Figura I.19.) permitiu identificar sinais compatíveis para CH-9 (144,66) e CH-8 (118,83) e para C=O (193,24) de chalconas. Os sinais de CH do sistema AA', BB' (131,53 e 117,77) e outros sinais que estão de acordo com o sistema ABC detectado no espectro de RMN ^1H (Figura I.17). Os quatro sinais adicionais na região de carbono

quaternário aromático oxigenado estão de acordo com a proposta das chalconas **7** e **8** na fração analisada. Os dados de deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C detectados nos espectros foram comparados com valores da literatura (ACHENBACH *et al.*, 1988 e LINUMA *et al.*, 1989) e permitiu identificar a mistura das chalconas isoliquiritigenina (2, 4, 4'-triidroxichalcona) **7** e 2,4,3',4'-tetraidroxichalcona **8** (Tabela I.3).

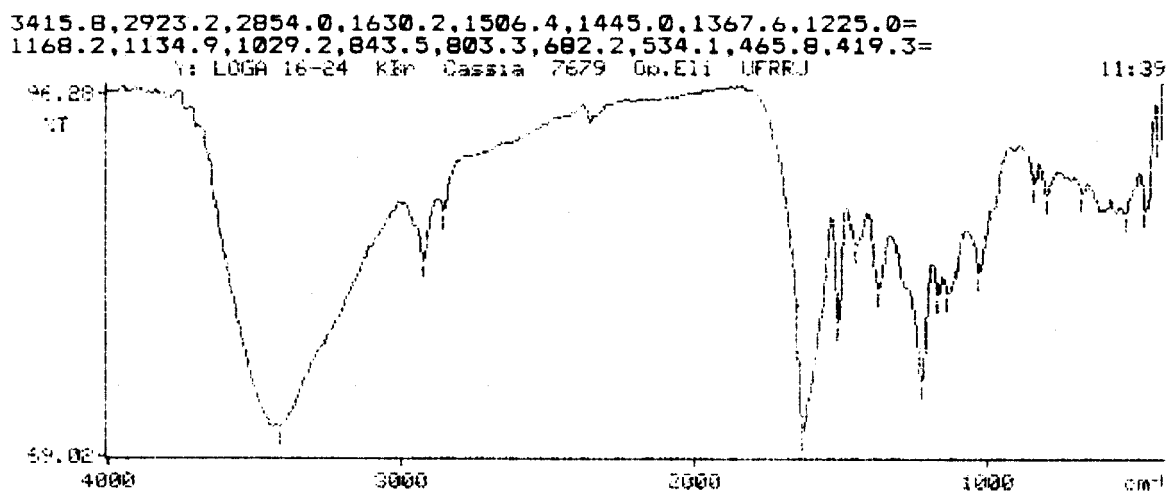
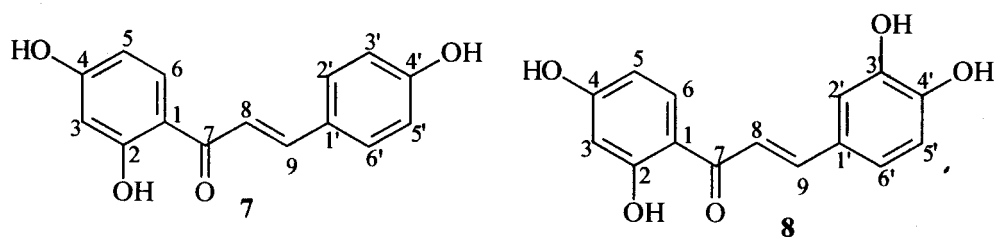


Figura I.16: Espectro de IV das substâncias **7** e **8** em pastilha de KBr.



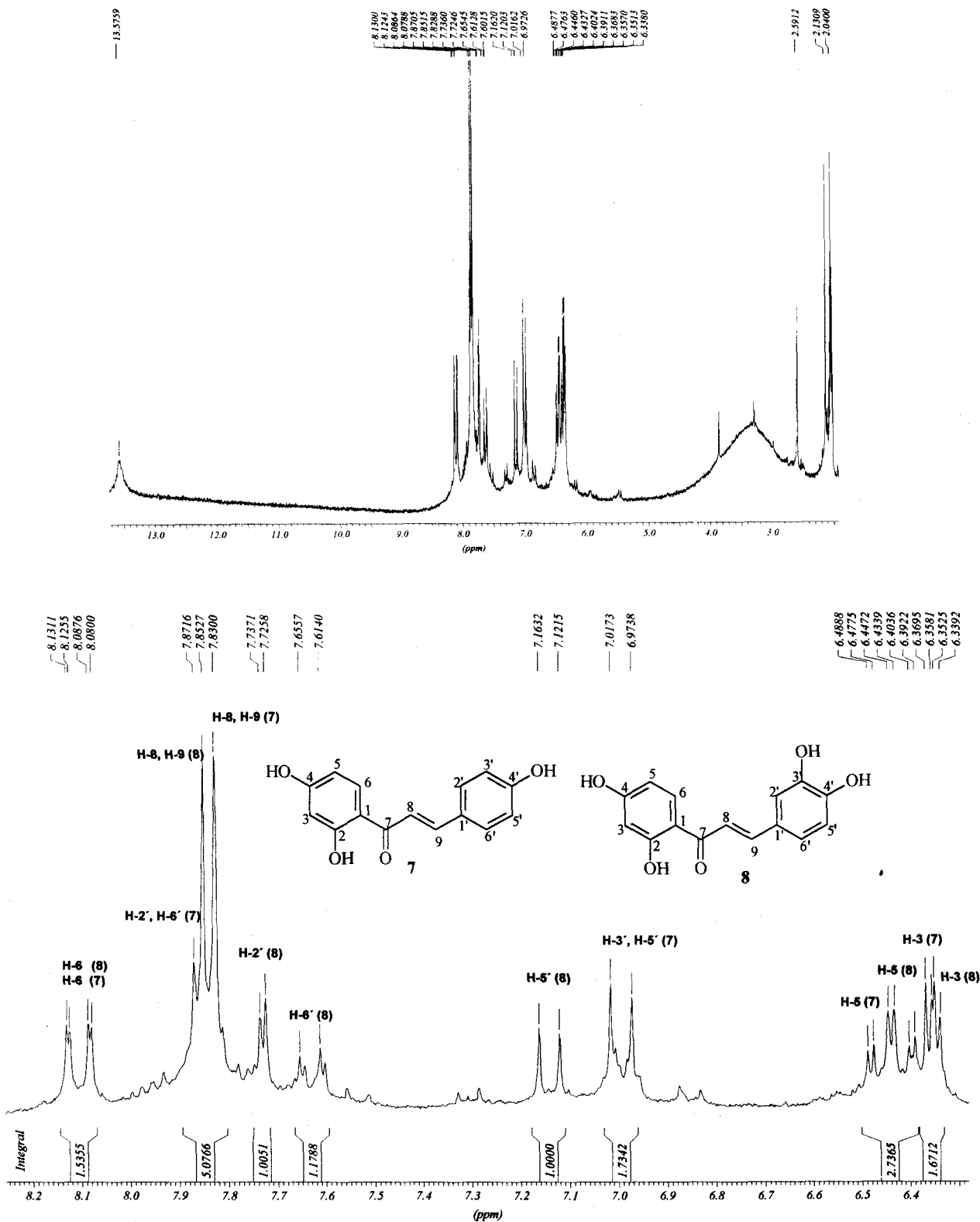


Figura I.17: Espectros de RMN de ^1H (200 MHz) da mistura de **7** e **8** em D_3CCOCD_3 .

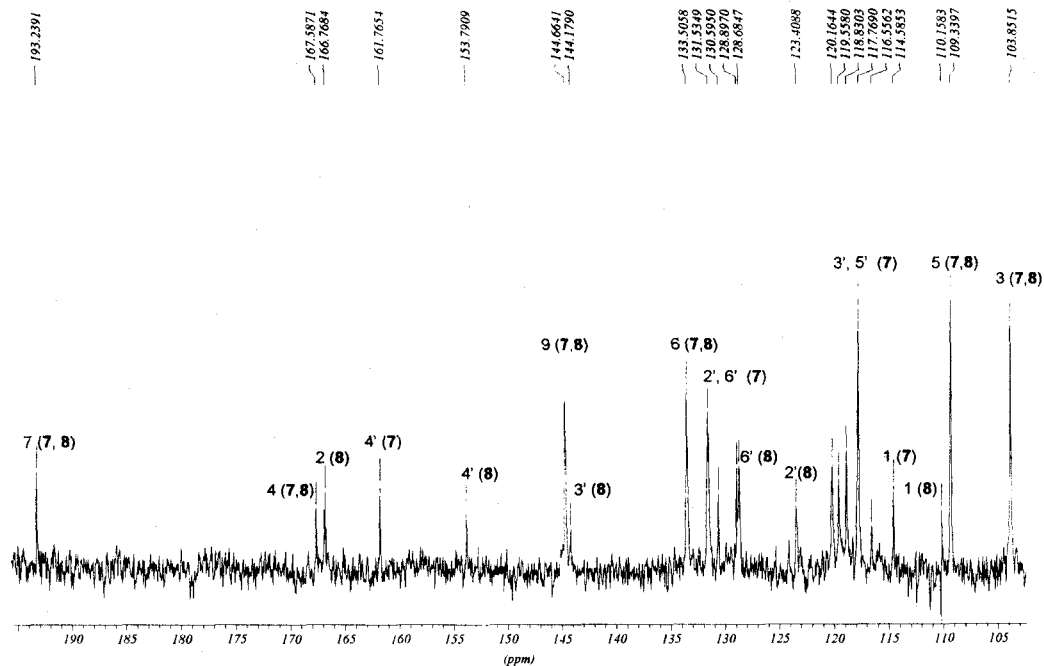


Figura I.18: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) da mistura de 7 e 8 em D_3CCOCD_3 .

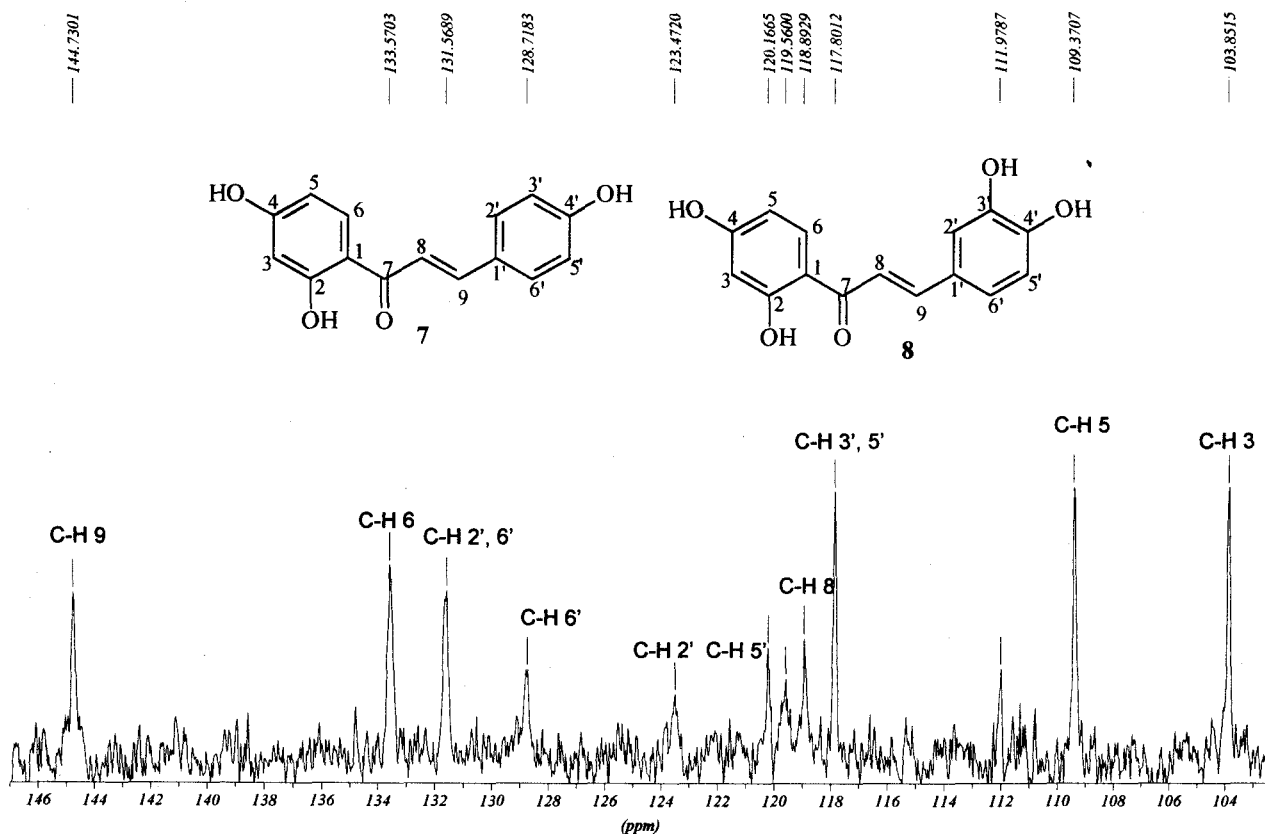
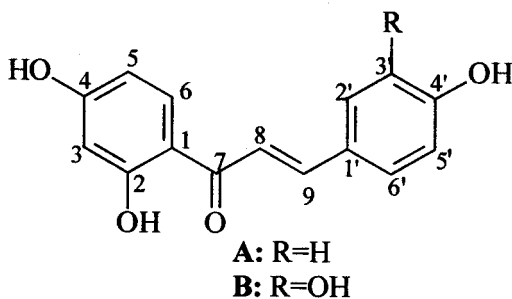
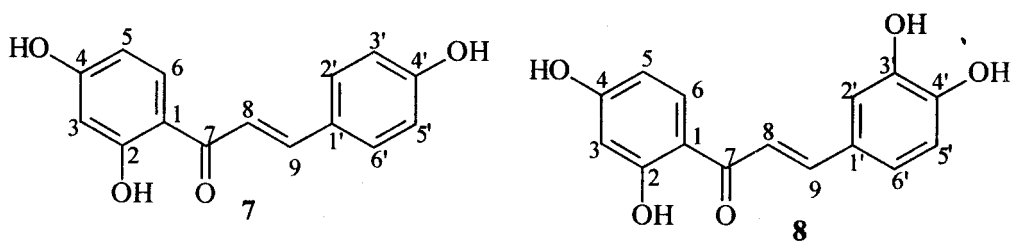


Figura I.19: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT ($\theta=135$) (50 MHz) da mistura de 7 e 8 em D_3CCOCD_3

Tabela I.3: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **7** e **8** comparados com a literatura (ACHENBACH *et al.*, 1988) da isoliquiritigenina (**A**) e (LINUMA *et al.*, 1989 e OLIVEIRA, 2000) de **B**.

C	7		8		A	B
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	-
1	114,58	-	110,16	-	114,13	-
2	166,86	-	166,77	-	166,33	-
3	103,85	6,36 (d, J= 2,3)	103,85	6,34 (d, J= 2,3 Hz)	103,70	-
4	167,59	-	167,59	-	167,44	-
5	109,34	6,46(dd, J=8,3 e 2,3)	109,34	6,43(dd, J=8,3 e 2,3)	108,80	-
6	133,51	8,1 (d, J= 8,3 Hz)	133,51	8,1 (d, J= 8,3 Hz)	131,70	-
7	193,24	-	193,24	-	191,56	-
8	118,83	7,83 (s)	119,56	7,85 (s)	117,80	118,50
9	144,66	7,83 (s)	144,66	7,85 (s)	144,75	145,30
1'	130,59	-	128,90	-	125,93	128,30
2'	131,53	7,82 (d, J= 8,7 Hz)	123,41	7,73 (d, J=2,3 Hz)	130,04	116,50
3'	117,77	6,99 (d, J= 8,7 Hz)	144,18	-	116,25	146,40
4'	161,76	-	153,79	-	160,34	149,20
5'	117,77	6,99 (d, J= 8,7 Hz)	120,16	7,14 (d, J= 8,3 Hz)	116,25	123,40
6'	131,53	7,82 (d, J= 8,7 Hz)	128,68	7,62 (dd, J= 8,3 e 2,3)	130,04	123,40



c) Identificação da bichalcona 9 (Luxenchalcona)

O novo biflavonóide **9** foi caracterizado através da análise de IV, RMN ^1H e ^{13}C (PND e DEPT), EM, da substância natural e dos derivados: 4, 4',4''' trimetil éter **10**, permetilado **11** e do derivado acetilado **12**.

O espectro de IV (Figura I.20) de **9**, que foi nomeada como luxenchalcona, mostra bandas de absorção em 3417 cm^{-1} correspondente as hidroxilas (estiramento O-H), carbonila conjugada (1630 (F) cm^{-1} , estiramento C=O), ligação dupla conjugada com carbonila (1630 cm^{-1} , C=C), estiramento C=C de anel aromático $1510, 1432\text{ cm}^{-1}$ e estiramento C-O (1225 cm^{-1}).

O espectro de RMN de ^1H (Figura I.21) mostra singletos atribuídos a duas hidroxilas queladas (δ_{H} : 13,58) cinco sinais em δ_{H} : 6,34 (H-3''', $J=2,3\text{ Hz}$) e 6,36 (H-3', $J=2,3\text{ Hz}$), 6,41, 6,46 (dd, $J=8,7$ e $2,7\text{ Hz}$, H-5' e H-5'''), 8,1 (d, $J=8,7\text{ Hz}$, H-6' e H-6''') pertencentes a dois sistemas ABC aromático conjugado com carbonila, dois dubletos ($J=8,7\text{ Hz}$) em δ_{H} : 7,0 (H-3'', 5'') e 7,84 (H-2'', 6'') que corresponde a um sistema AA'BB' e outro sistema ABC aromático representado por três sinais em 7,13 (d, $J=8,3\text{ Hz}$, H-5), 7,63 (dd, $J=8,3$ e $2,3\text{ Hz}$, H-6) e 7,73 (d, $J=2,3\text{ Hz}$, H-2). Dois singletos adicionais em δ_{H} : 7,83 e 7,85 foram atribuídos aos hidrogênios α , α' , β , β' (Tabela I.4). Estes dados são compatíveis com a mistura das chalconas **7+8** identificada anteriormente. Entretanto, a comparação em CCDA revela diferença de Rf entre estas frações.

Os espectro de RMN de ^{13}C BBD e DEPT (Figura I.22 e I.23) possui sinais que permite a proposta de mistura de chalconas ou do dímero **9**. Estas informações foram usadas para estabelecer a estrutura da 4,2',4',2''',4'''-pentaidroxi-3-O-4''-bichalcona (**9**, Tabela I.4) (página 57).

O espectro de massas de alta resolução com ionização elétron spray EMAR-IES apresentou o sinal em $m/z\ 510.0584$ [M^+ , 15 % (calculado 510.131467) para $\text{C}_{30}\text{H}_{22}\text{O}_8$] do íon molecular para **9** justificando a diferença de RF da amostra anterior (mistura das duas chalconas). O esquema I.5 (página 58) mostra os íons propostos para os picos majoritários presentes no espectro de massas de **9** (Figura I.24).

O tratamento de **9** com diazometano serviu para confirmar a proposta do dímero, considerando que na mistura de **7+8** teria 5 sinais de OCH_3 e no caso de **9** apareceram apenas três sinais de metoxila (Figura I.26). As discussões detalhadas dos dados espectrométricos de RMN dos derivados desta bichalcona (I-3.1.3 d, e, f) (páginas 59, 72, 78) foram usados para confirmar a estrutura de **9**.

Esta substância está sendo divulgada pela primeira vez na literatura (CARVALHO *et al.*, 2003) e foi nomeada como luxenchalcona.

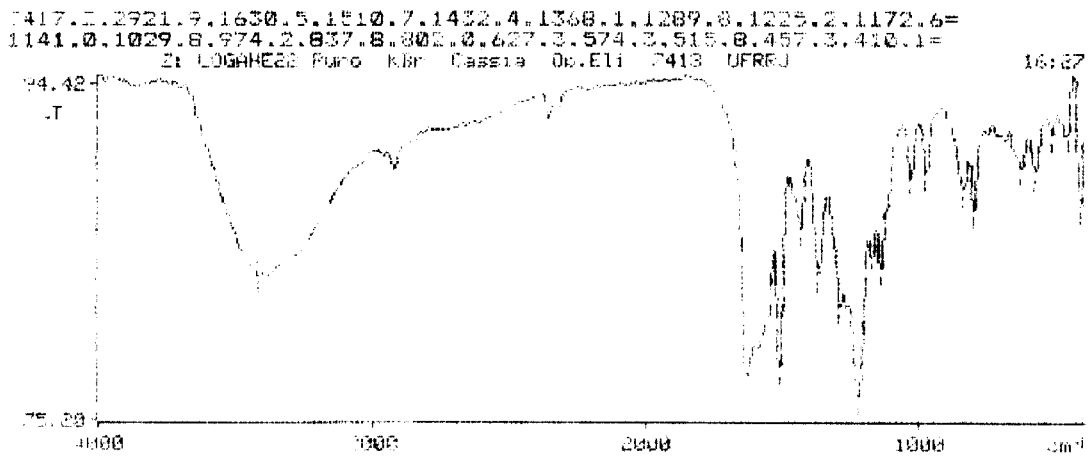
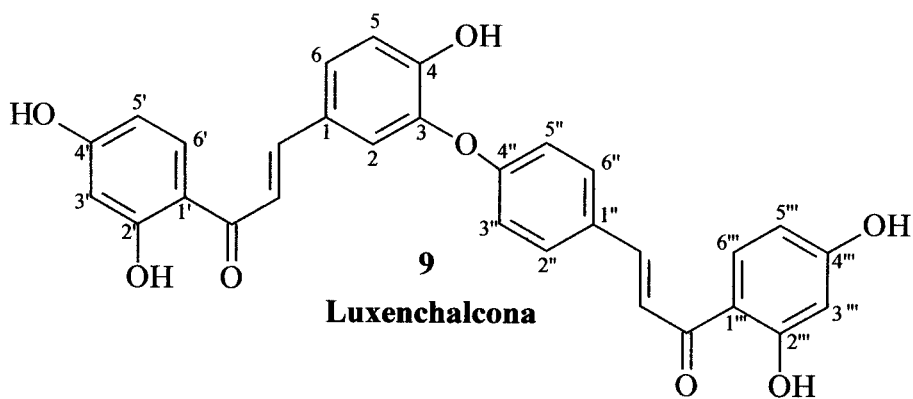


Figura I.20: Espectro de IV da bichalcona **9**.



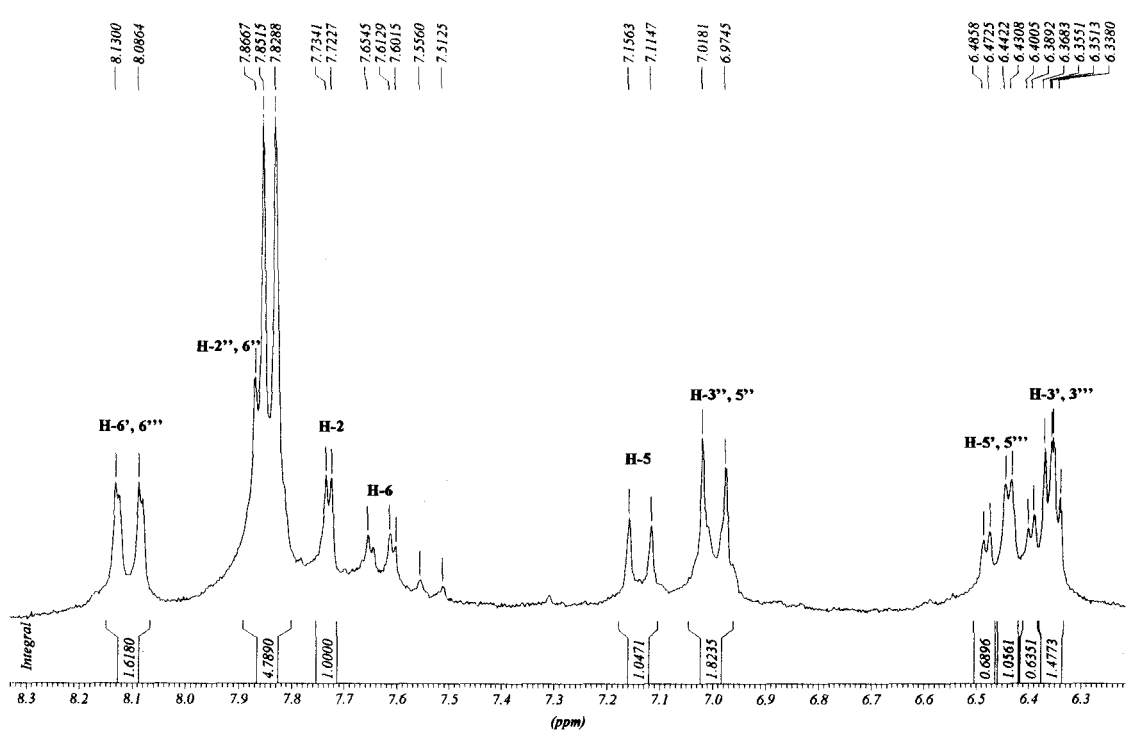
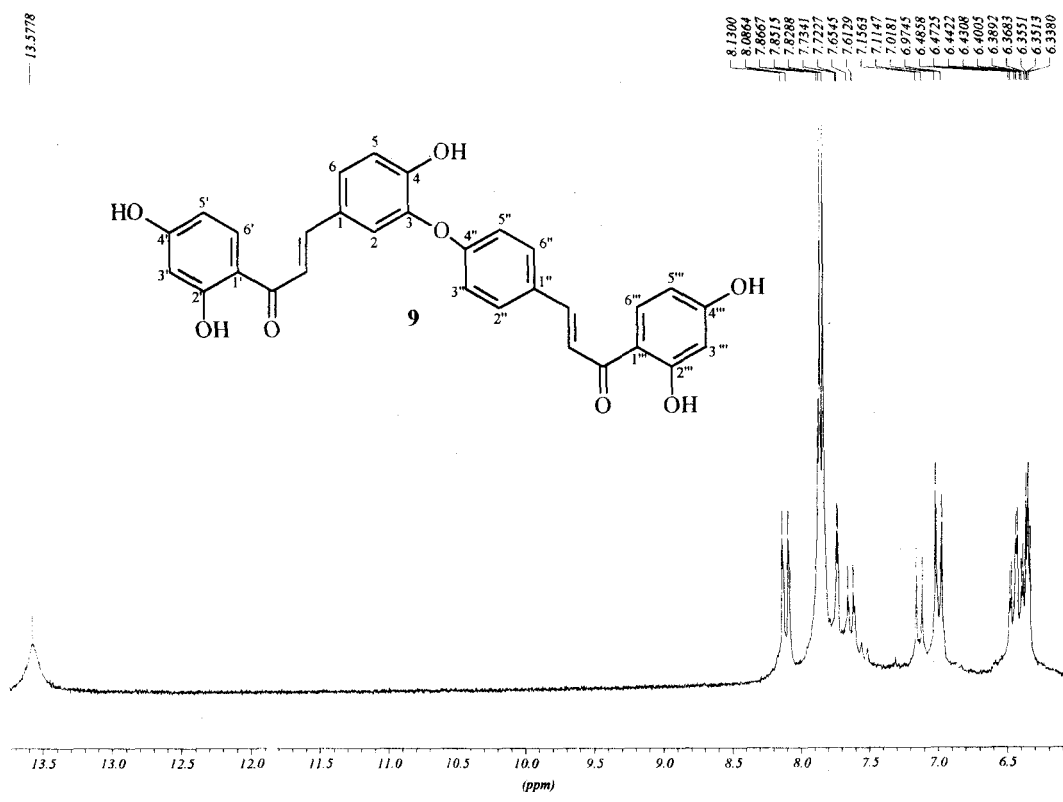


Figura I.21: Espectros de RMN de ^1H (200 MHz) de **9** em D_3CCOCD_3 .

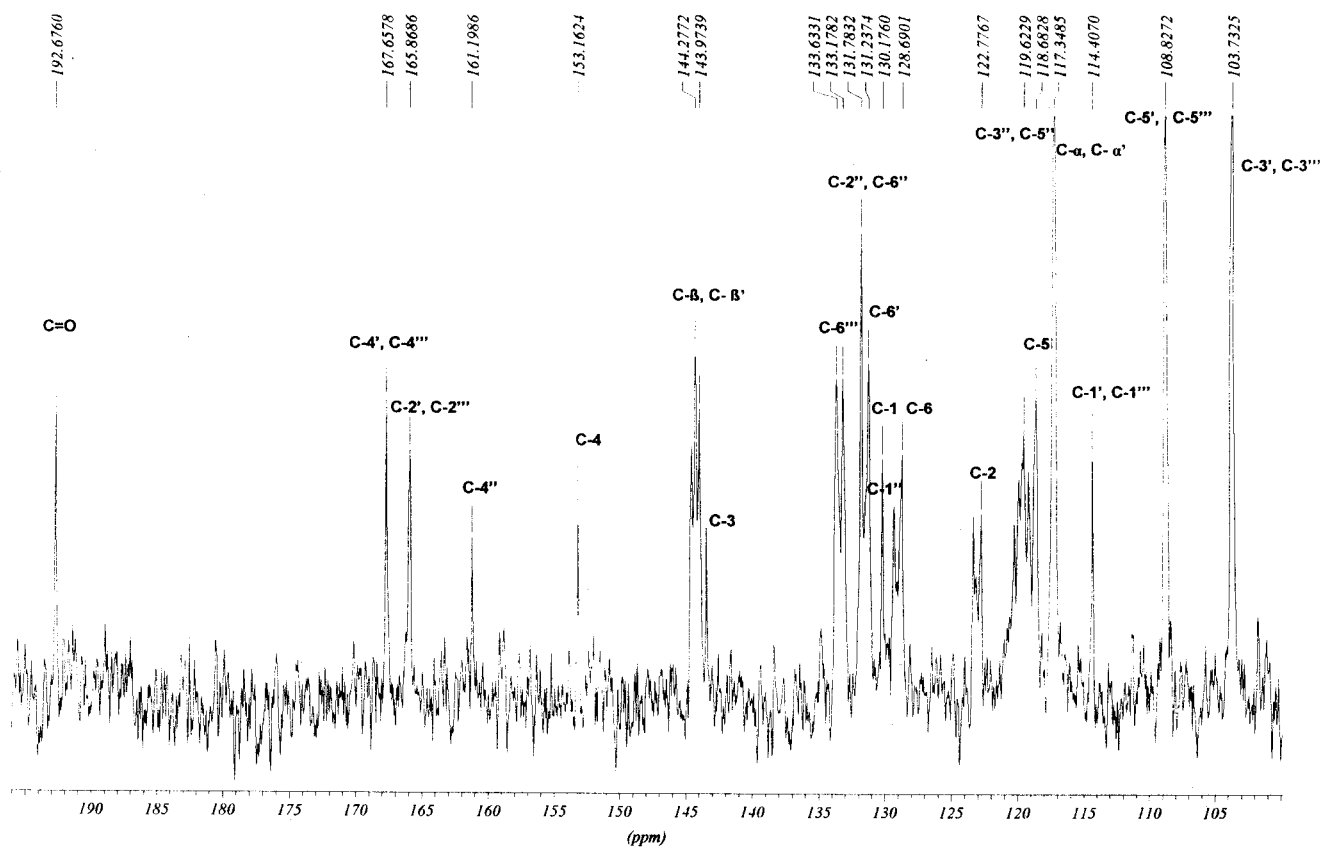


Figura I.22: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) da bichalcona 9 em D_3CCOCD_3 .

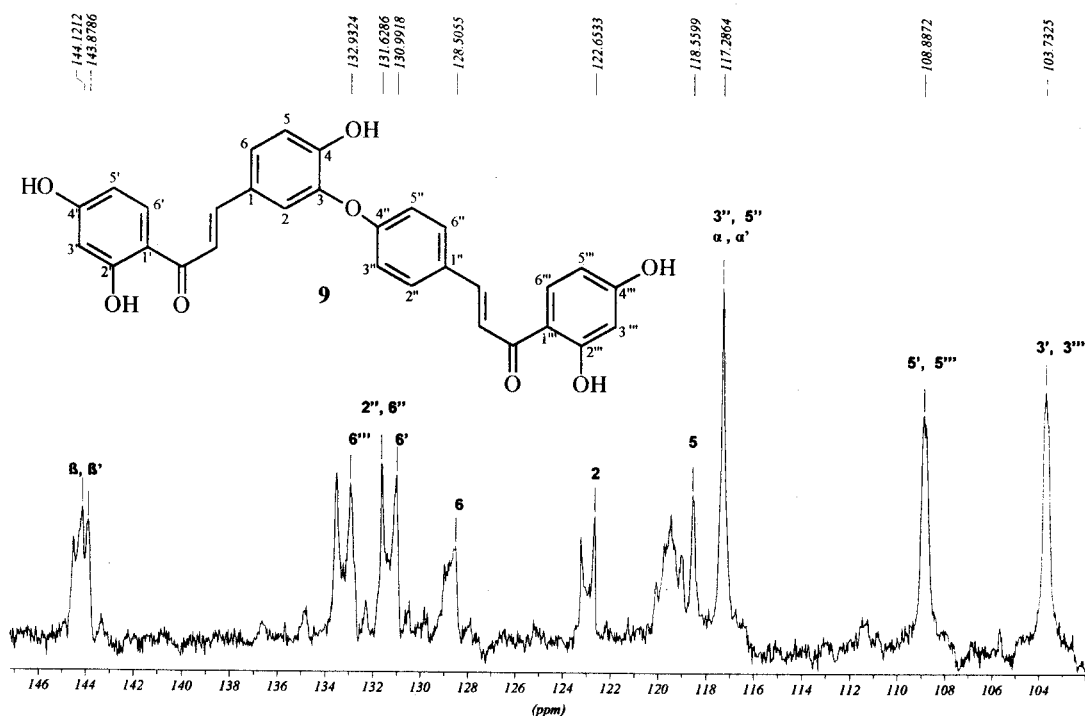


Figura I.23: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT ($\theta=135$, 50 MHz) da bichalcona 9 (Luxenchalcon) em D_3CCOCD_3 .

Tabela I.4: Dados de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) da luxenhalcona **9** (D_3CCOCD_3).

C	δ_{H}	δ_{C}
1	-	130,18
2	7,73 (d, 2,3 Hz)	122,78
3	-	143,43
4	-	153,16
5	7,13 (d, 8,3 Hz)	118,68
6	7,63 (dd, 8,3 e 2,3 Hz)	128,69
1'	-	114,41
2'	-	165,87
3'	6,36 (d, 2,7 Hz)	103,73
4'	-	167,66
5'	6,46 (dd, 8,7 e 2,7 Hz)	108,83
6'	8,10 (d, 8,7 Hz)	131,24
1''	-	129,30
2''	7,84 (d, 8,7 Hz)	131,78
3''	7,0 (d, 8,7 Hz)	117,35
4''	-	161,20
5''	7,0 (d, 8,7 Hz)	117,35
6''	7,84 (d, 8,7 Hz)	131,78
1'''	-	114,41
2'''	-	165,87
3'''	6,34 (d, 2,7 Hz)	103,73
4'''	-	167,66
5'''	6,46 (dd, 8,7 e 2,7 Hz)	108,83
6'''	8,10 (d, 8,7 Hz)	133,63
H- α	7,85 (m)	117,35
H- α'	7,85 (m)	117,35
H- β	7,83 (m)	144,28
H- β'	7,83 (m)	144,28
HO-2',HO-2'''	13,58 (sl)	-
C=O	-	192,68

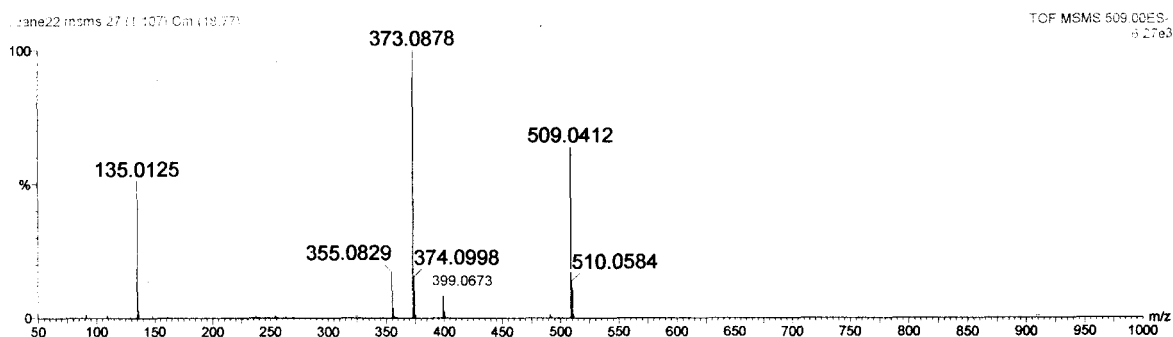
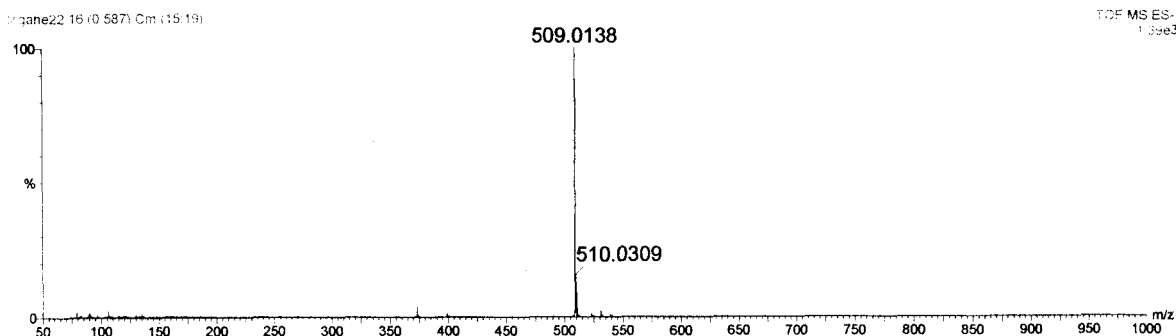
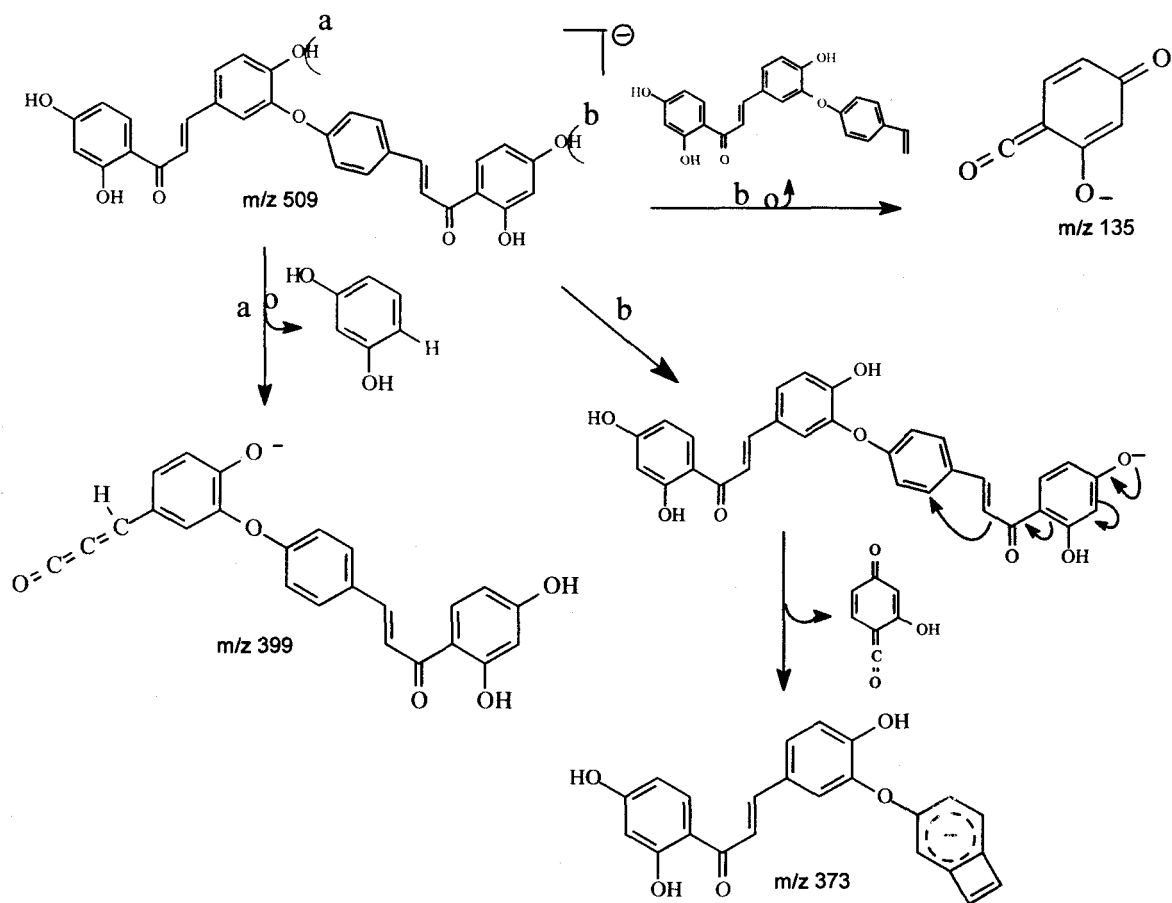


Figura I.24: Espectro de massas de alta resolução da bichalcona 9, obtido com Ionização Elétron Spray (IES) e detecção de íon negativo.



Esquema I.5: Proposta de fragmentação para justificar os picos (m/z) de íons negativos de 9.

d) confirmação da estrutura de 9 através da análise dos dados do éter trimetílico da luxenchalcona (10).

O derivado metilado (10) da bichalcona foi caracterizado através da análise de IV, RMN ^1H e ^{13}C (uni e bidimensional), NOEDIFF, NOESY e EM.

O espectro de IV (Figura I.25) mostra bandas de absorção em 3410 cm^{-1} correspondente as hidroxilas (estiramento O-H), grupamento CH_3 (2923 cm^{-1} e 2851 cm^{-1}), carbonila conjugada (1638 cm^{-1} , estiramento C=O), estiramento C=C de anel aromático $1562, 1508, 1461\text{ cm}^{-1}$ e C-O (1227 cm^{-1}).

Os espectros de RMN de ^1H da substância 10 (Figura I.26, Figura I.27 e Figura I.28) mostram dois singletos atribuídos a duas hidroxilas queladas (δ_{H} : 13,45 e 13,49) cinco sinais em δ_{H} : 6,47 (H-3''', $J = 2,2\text{ Hz}$) e 6,47 (H-3', $J = 2,2\text{ Hz}$), 6,46, 6,48 (dd, $J = 8,7$ e $2,2\text{ Hz}$, H-5''' e H-5'), 7,81 (d, $J = 9,0\text{ Hz}$, H-6'), 7,77 (d, $J = 9,0\text{ Hz}$, H-6''') pertencentes a dois sistemas ABC. Dois dubletos ($J = 8,4\text{ Hz}$) em δ_{H} : 6,97 (H-3'', 5'') e 7,62 (H-2'', 6'') que corresponde a um sistema AA'BB' e outro sistema ABC representado por três sinais em 7,06 (d, $J = 8,4\text{ Hz}$, H-5), 7,49 (dd, $J = 8,4$ e $2,2\text{ Hz}$, H-6) e 7,43 (d, $J = 2,2\text{ Hz}$, H-2). Os quatro dubletos (15,4 Hz) em 7,42, 7,49, 7,81 e 7,86 que foram atribuídos aos hidrogênios α' , β , β' respectivamente. São singletos correspondente a três metoxilas em δ_{H} : 3,85 (MeO-4'''), 3,86 (MeO-4') e 3,88 (MeO-4).

A feição dos sinais e o ambiente químico dos hidrogênios nas estruturas foram correlacionados com os valores dos deslocamentos químicos para fazer as atribuições dos δ_{H} para cada hidrogênio (Tabela I.5).

Os espectros de RMN ^{13}C deste derivado mostram diferenças nos deslocamentos químicos de alguns carbonos que são consistentes com as alterações eletrônicas provocadas pela conversão dos grupos hidroxilas em grupos metoxilas (CARVALHO *et al.*, 1993). Os grupos metoxílicos provocam uma desblindagem dos carbonos *ipso* C-4 ($\delta_{\text{C}} = 153,8$ 10; $\delta_{\text{C}} = 152,8$, 9). Este efeito não pode ser observado para os carbonos C-4' e C-4''' ($\delta_{\text{C}} = 166,6$, 10; $\delta_{\text{C}} = 167,3$, 9) (Figura I.30) certamente porque os espectros foram registrados em diferentes solventes. Os grupos metoxilas não atenuam a proteção exercida pelo efeito mesomérico de átomo de oxigênio sobre posições *para* e aumenta a blindagem dos carbonos *orto* devido ao efeito γ de proteção da metila (RAMADAN *et al.*, 2000). Os carbonos C-3' e C-3''', C-5' e C-5''' e o C-5 deste derivado 10 sofrem proteção das metoxilas $\text{CH}_3\text{O}-4'$, $\text{CH}_3\text{O}-4'''$ e $\text{CH}_3\text{O}-4$ quando comparados com a substância natural 9 (Tabela I.4).

A análise do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio-carbono ($^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -COSY- $^1\text{J}_{\text{CH}}$, HMQC, Figura I.31) permitiu a atribuição dos deslocamentos químicos dos carbonos metínicos (Tabela I.5).

A análise do espectro bidimensional heteronuclear de hidrogênio-carbono de 10 ($^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3 , HMBC) (Figura I.32) permitiu definir as atribuições dos deslocamentos químicos dos carbonos quaternários (Tabela I.5).

Os experimentos 1D (NOEDIFF, Figura I.34) e 2D (NOESY, Figura I.33) do derivado metilado 10 permitiram confirmar a conexão C-3-O-C-4'' entre os dois monômeros das chalconas isoliquiritigenina e 3-hidroxi-isoliquiritigenina.

Através destes experimentos confirmou-se as posições das metoxilas pois quando estas foram irradiadas gerou NOE nos hidrogênios H-3', H-3''', H-5', H-5''' e no H-5. A conexão C-3-O-C-4'' foi confirmada ao irradiar a MeO-4 e verificar NOE no dubleto em δ_{H} 7,06 (H-5, 8,4 Hz) e não apresentou NOE no δ_{H} 7,43 (H-2, 2,2 Hz) e, também, não verificou-se NOE no dubleto em δ_{H} 6,97 dos hidrogênios (H-3'', H-5''; 8,4 Hz). O sinal assinalado no espectro 2D (NOESY) confirma esta observação.

O espectro de massas deste produto (Figura I.35) apresenta picos de valores de m/z compatíveis com a estrutura proposta (Esquema I.6).

Estas análises permitiram confirmar as propostas anteriores para **9** e **10** e definir a estrutura da bichalcona natural **9** como 4,2',4'-triidroxichalcona-(3-O-4'')-2''', 4'''-diidroxichalcona denominada luxenchalcona e do seu derivado **10** como 2',2'''-diidroxí-4,4',4'''-trimetoxi-3-O-4'''-bichalcona. Estas substâncias estão sendo registradas pela primeira vez na literatura no *J. Braz. Chem. Soc.* (2003, no prelo).

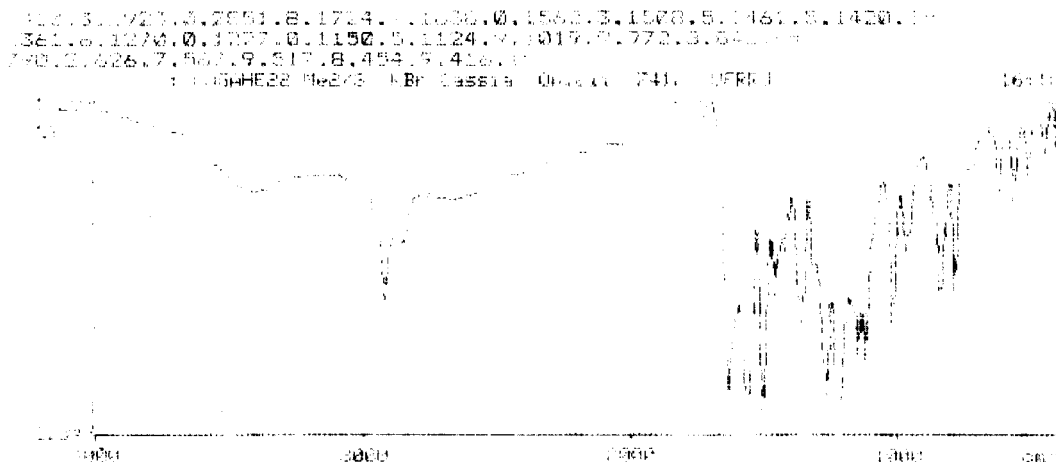
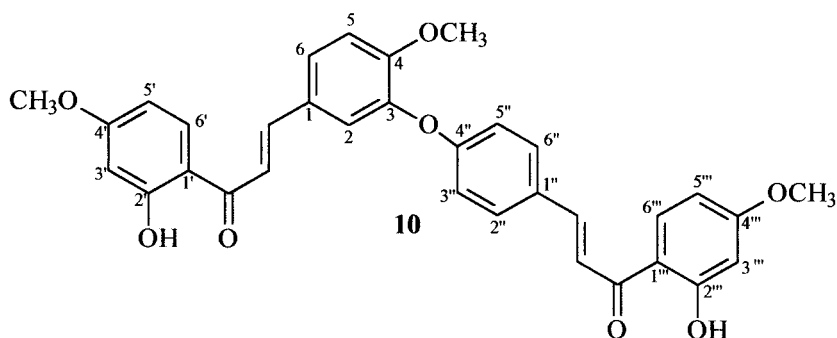


Figura I.25: Espectro de IV da bichalcona metilada **10**.



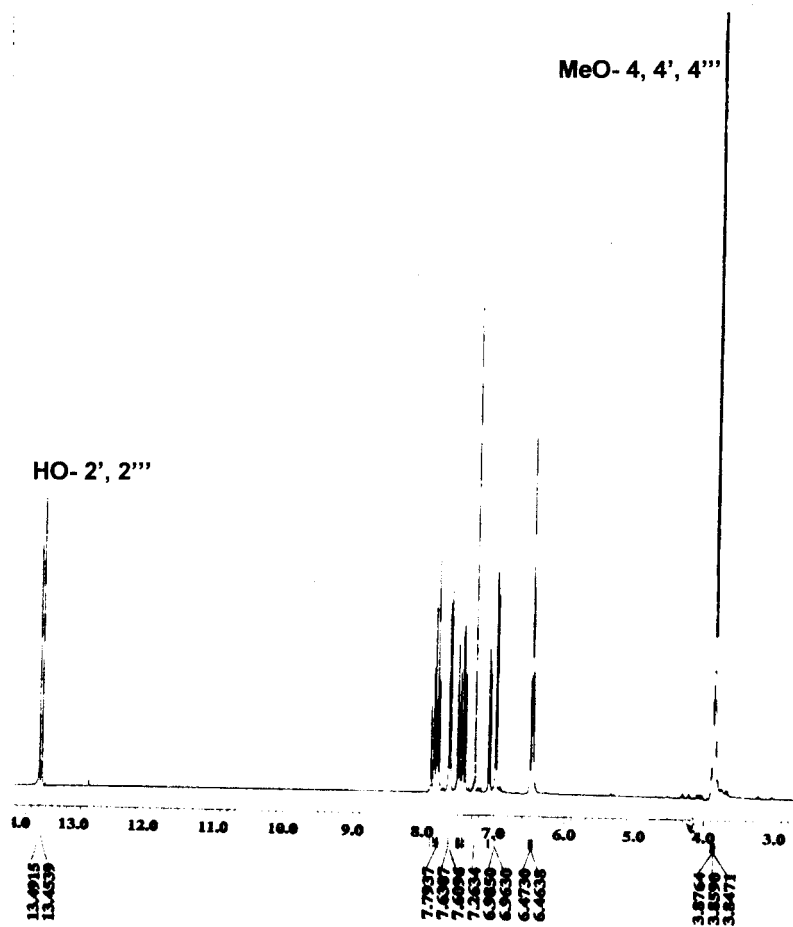
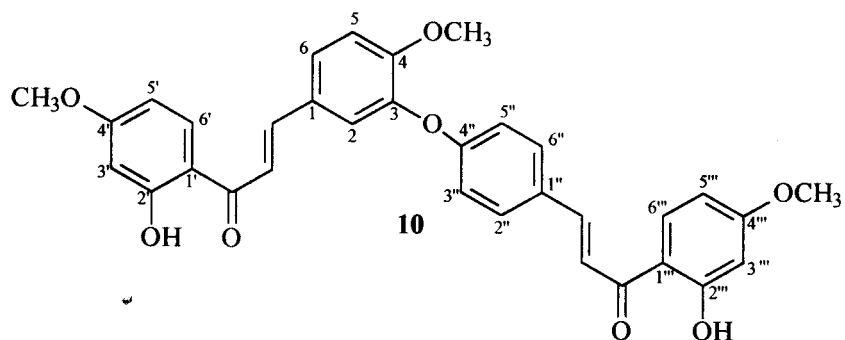


Figura I.26: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de **10** em CDCl_3 .



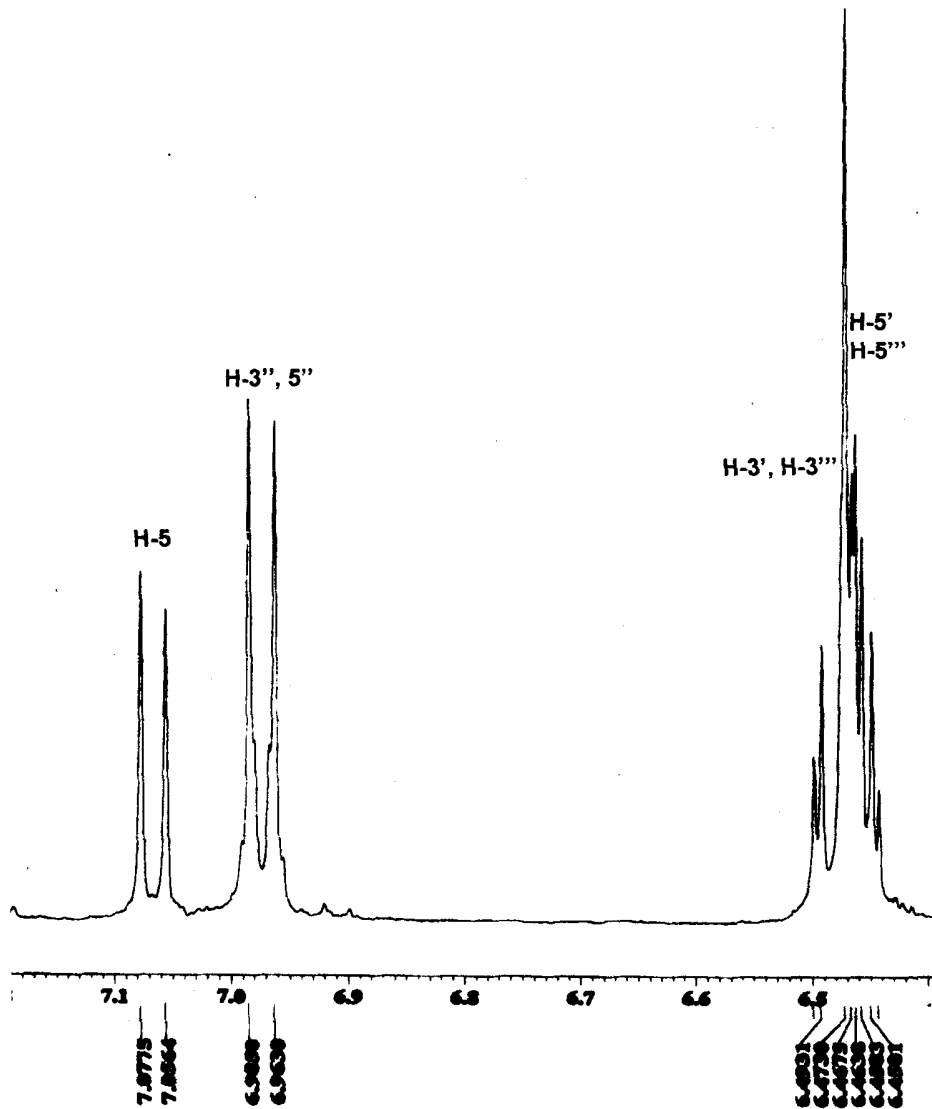
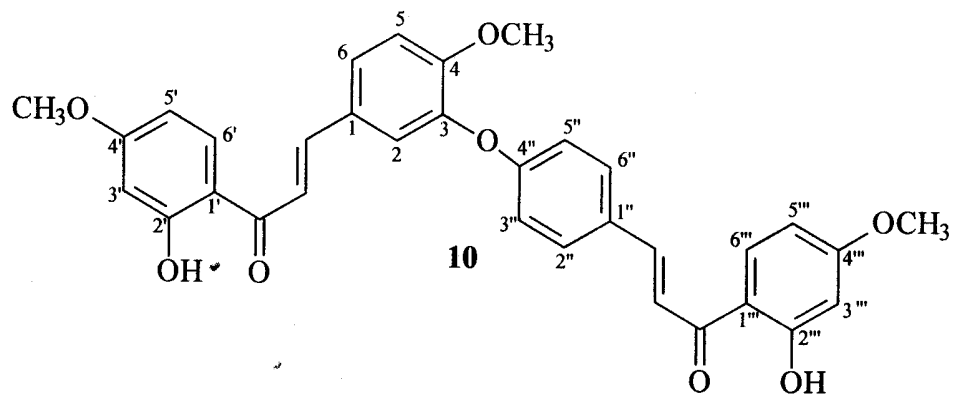


Figura I.27: Expansão do espectro de RMN de ^1H entre δ 6,4-7,1 ppm (400 MHz) de 10 em CDCl_3 .



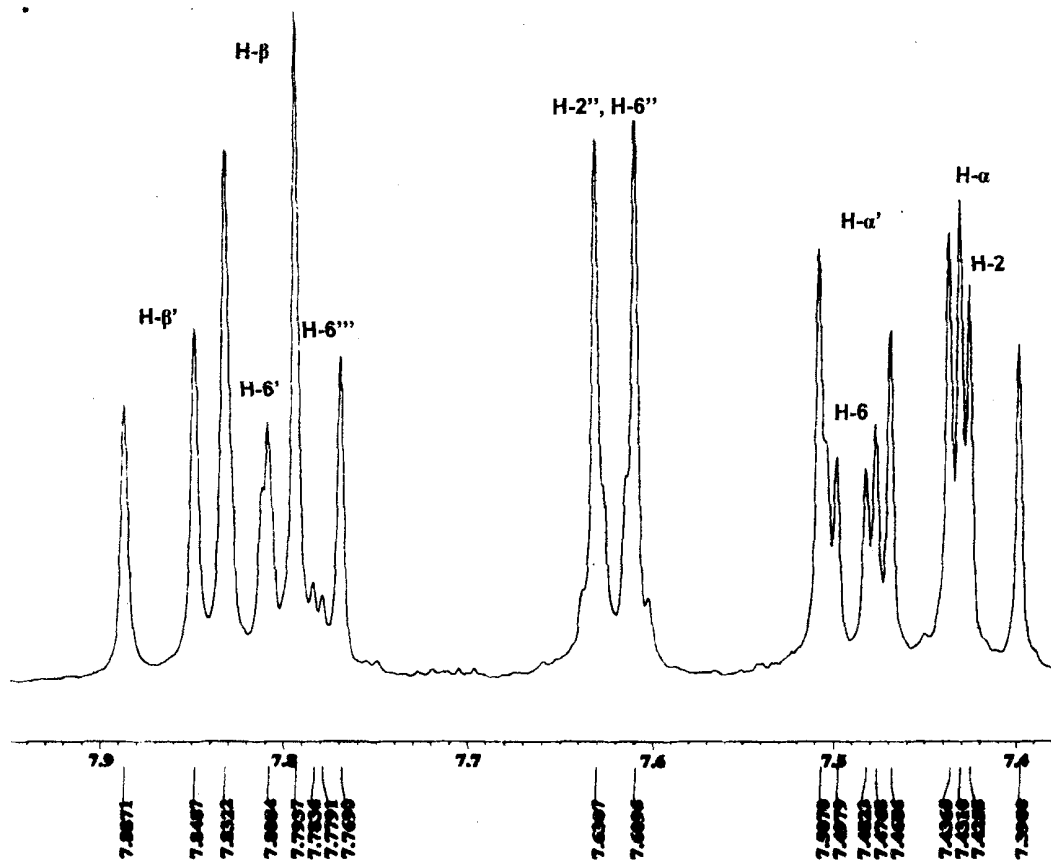
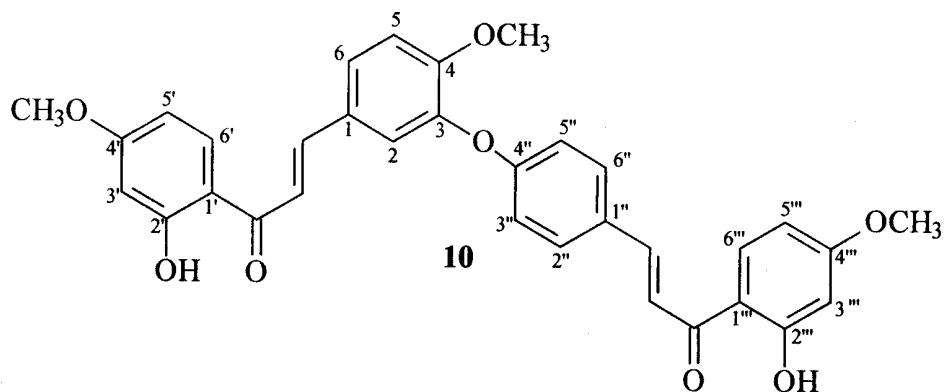


Figura I.28: Expansão do espectro de RMN de ^1H entre δ 7,3-8,0 ppm (400 MHz) de **10** em CDCl_3 .



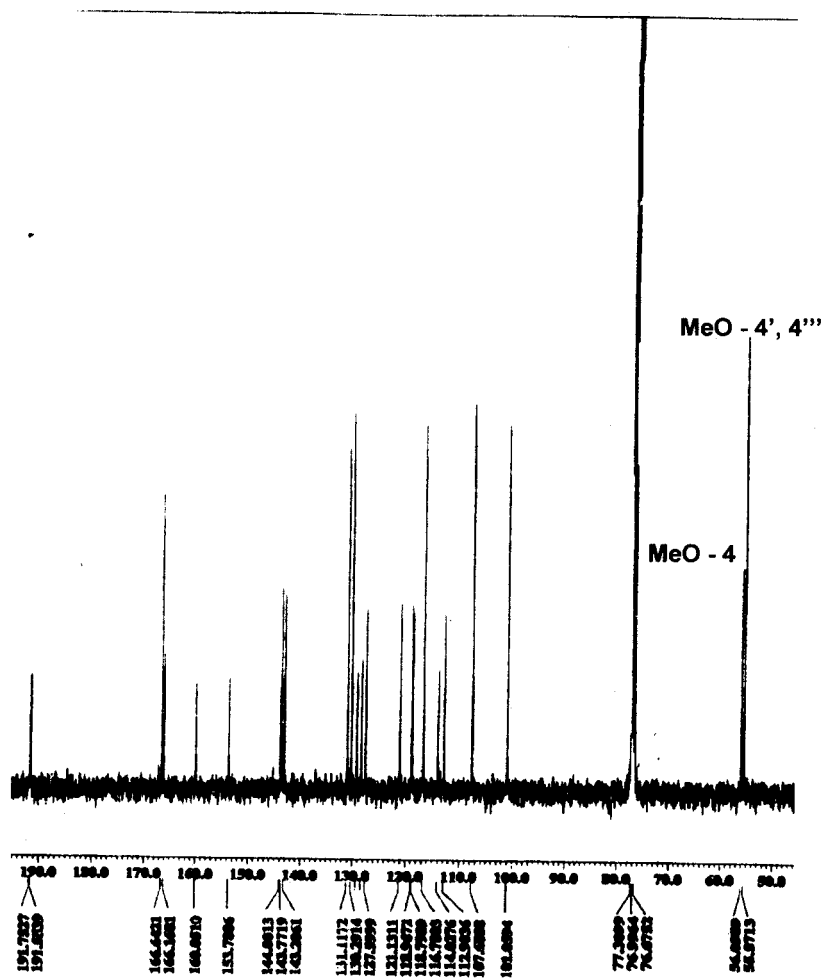
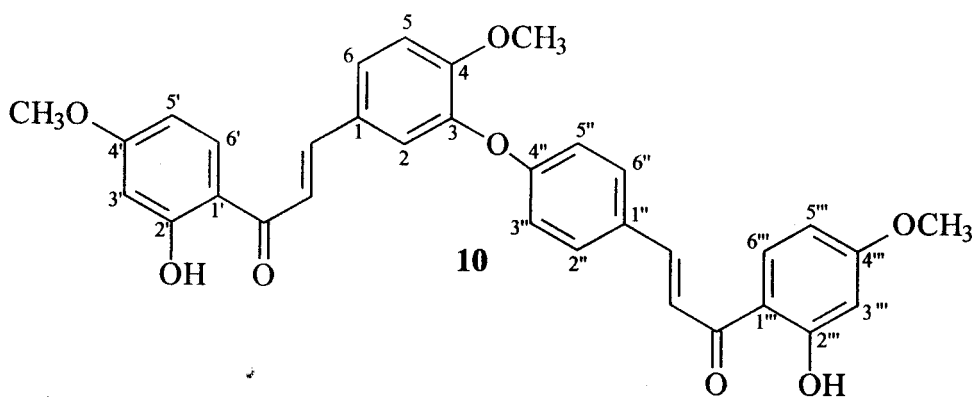


Figura I.29: Espectro de RMN ^{13}C da bichalcona metilada **10** (100 MHz, CDCl_3).



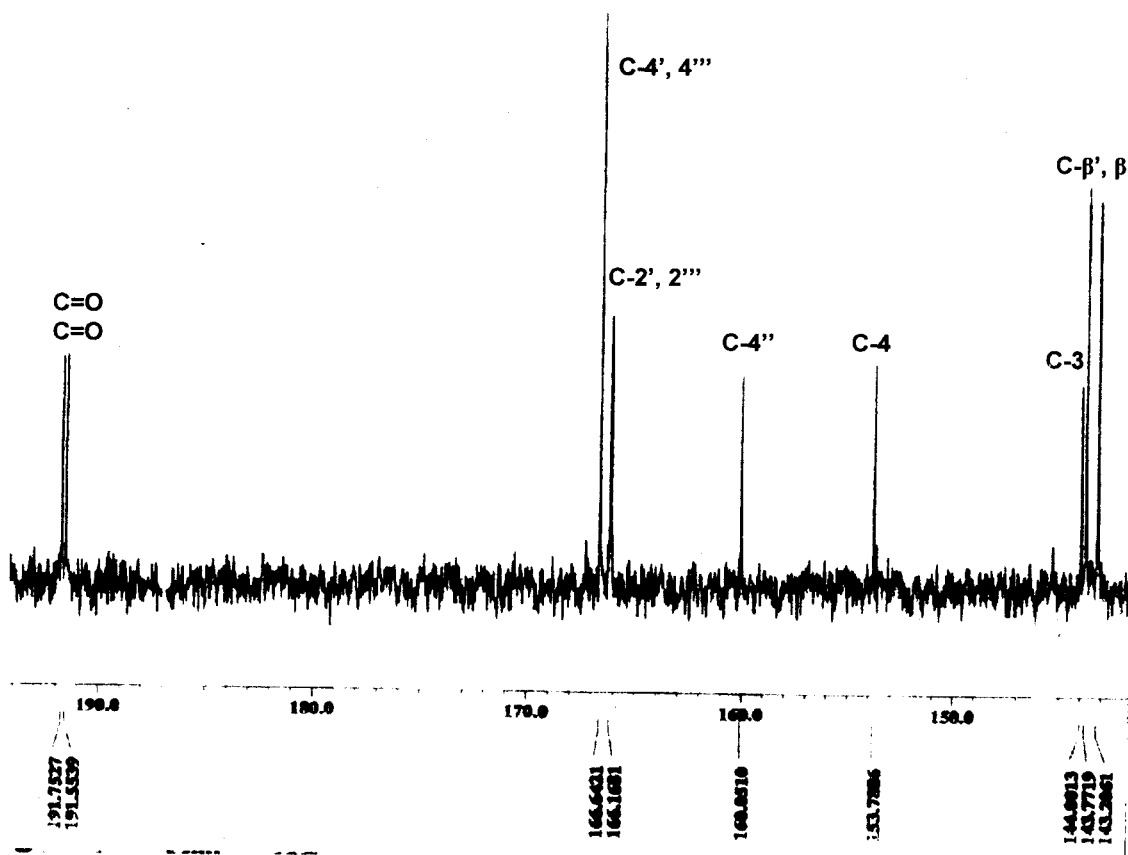
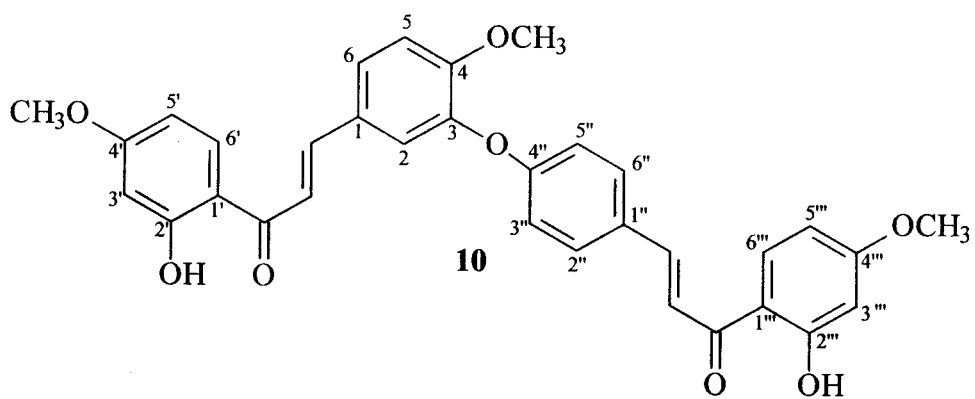


Figura I.30: Expansão do espectro de RMN ^{13}C entre δ 143 e 192 ppm da bichalcona metilada **10** (100 MHz, CDCl_3).



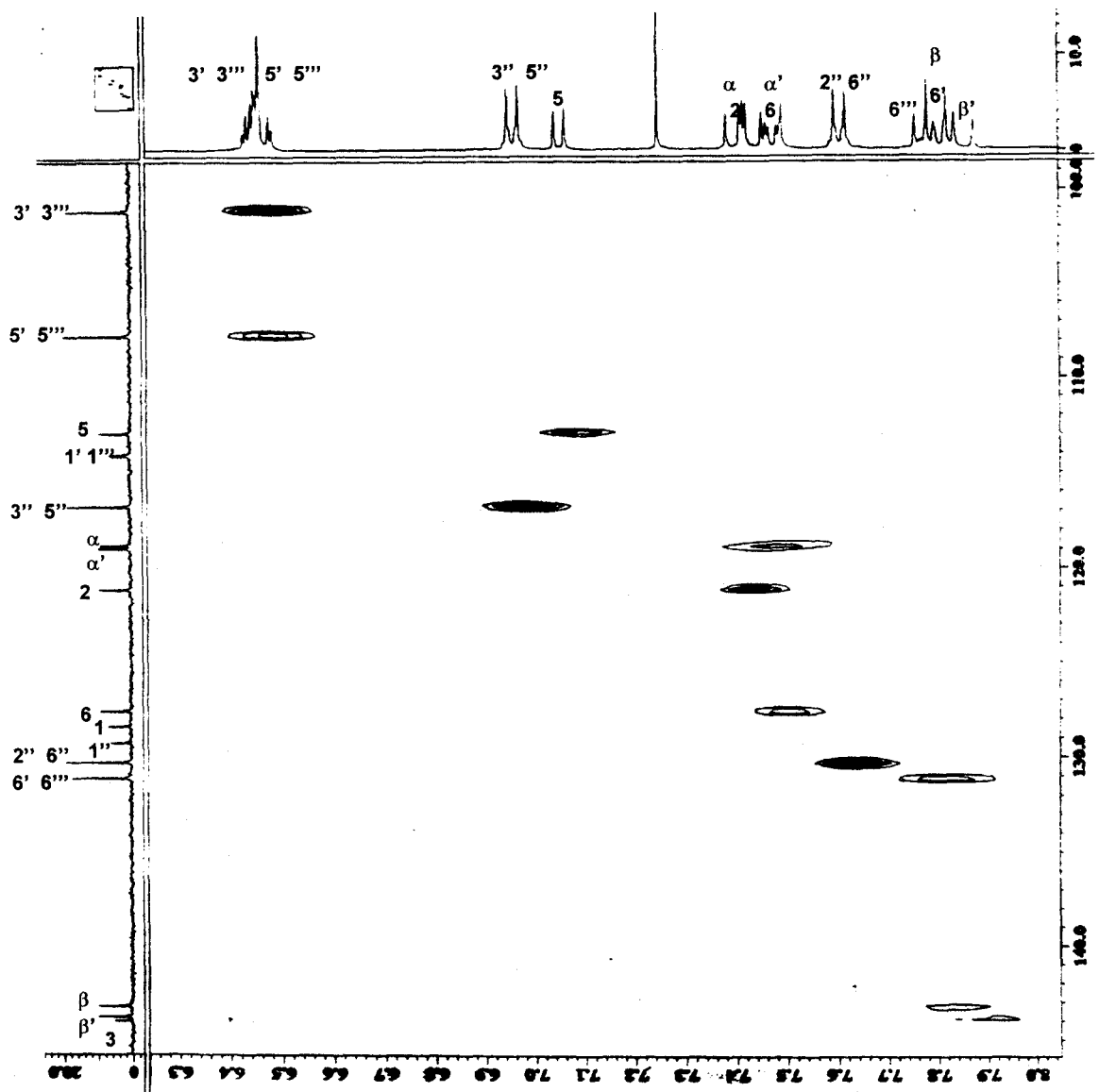
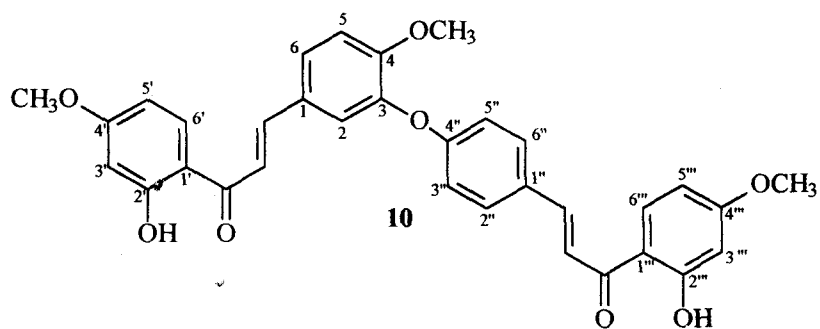


Figura I.31 : Espectro de RMN HMQC (400 MHz, CDCl_3) da bichalcona metilada 10.



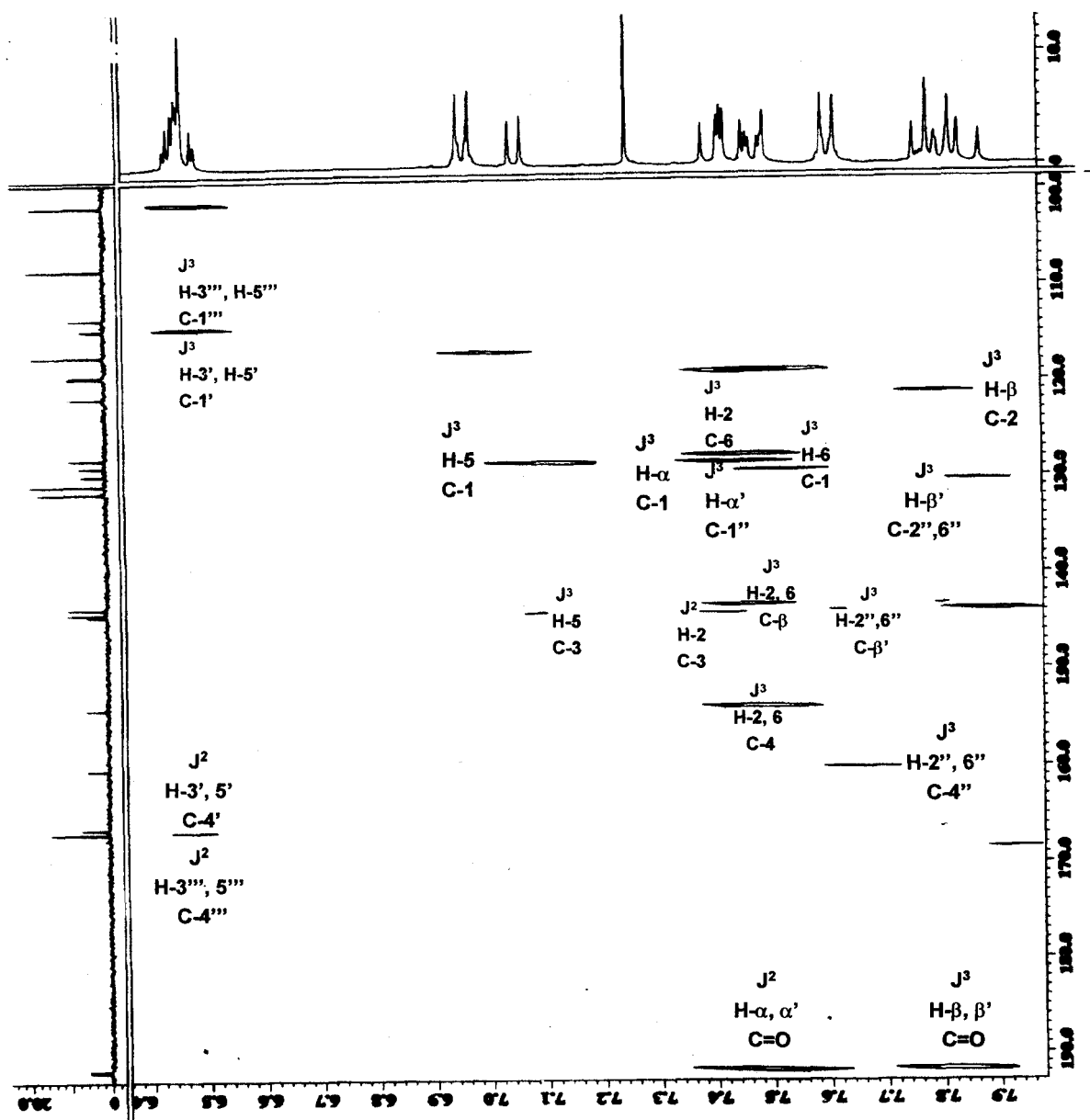
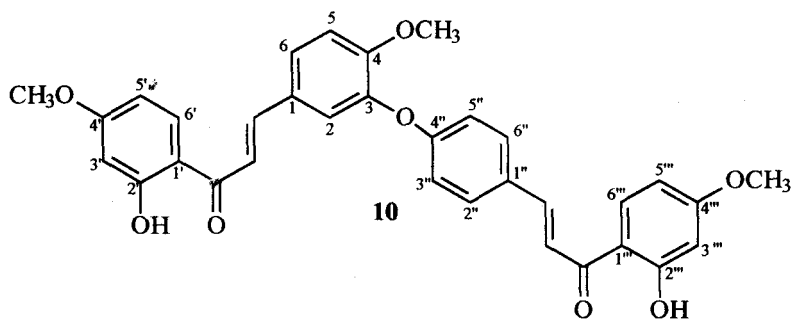


Figura I.32: Espectro de RMN HMBC (400 MHz, CDCl₃) da bichalcona metilada 10.



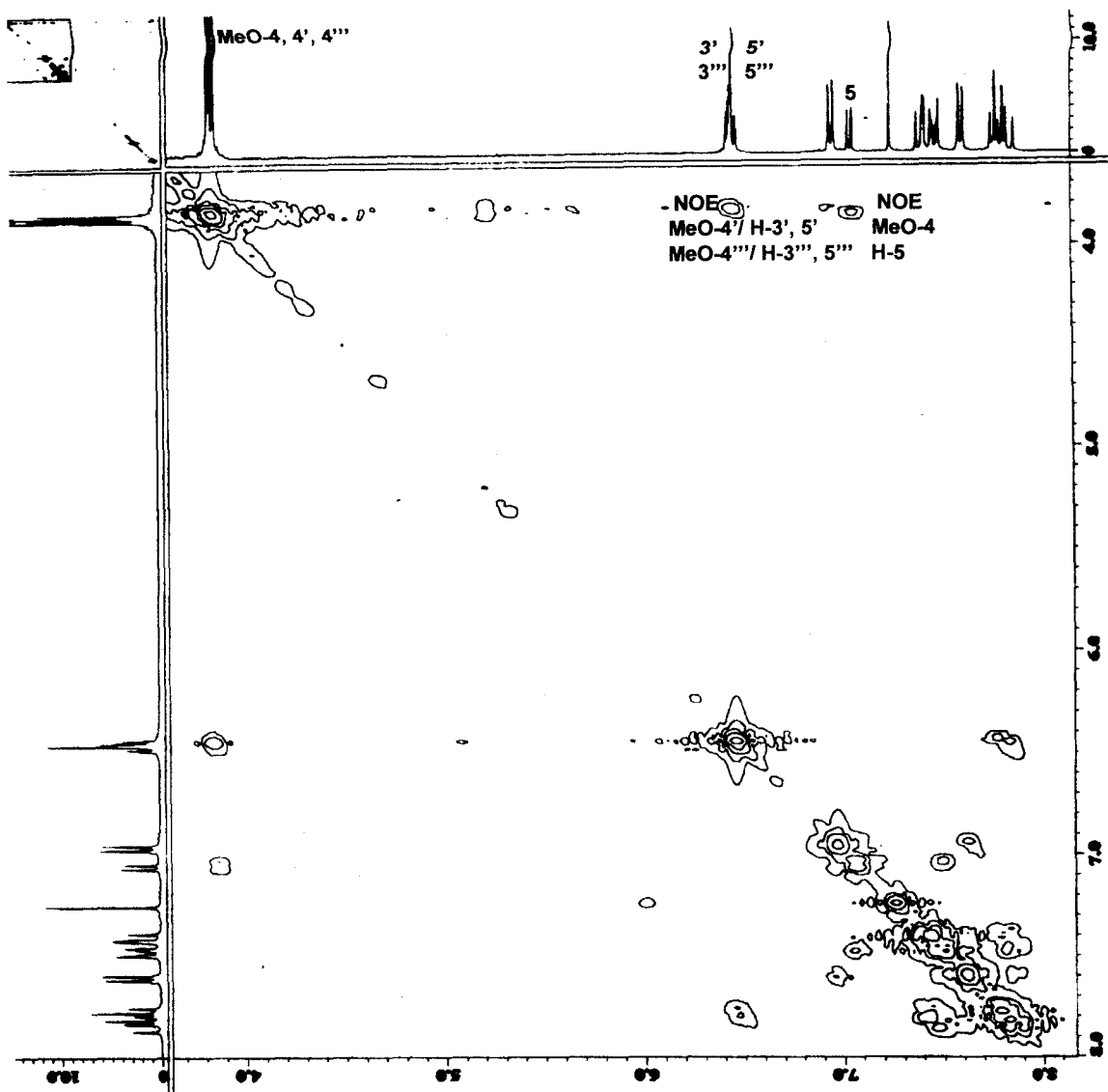
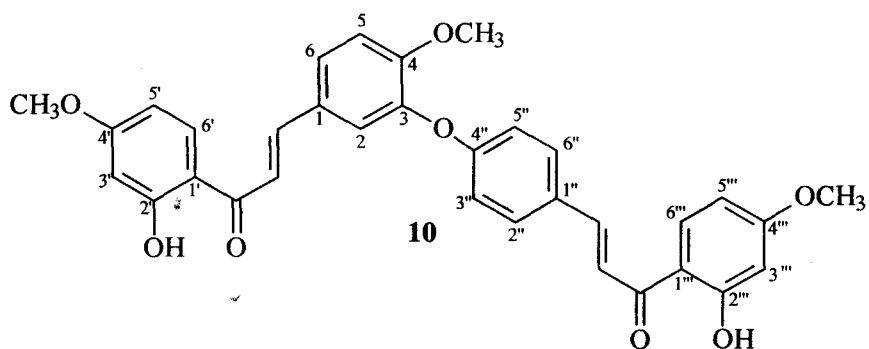


Figura I.33: Espectro de NOESY (400 MHz, CDCl_3) da bicalcona metilada 10.



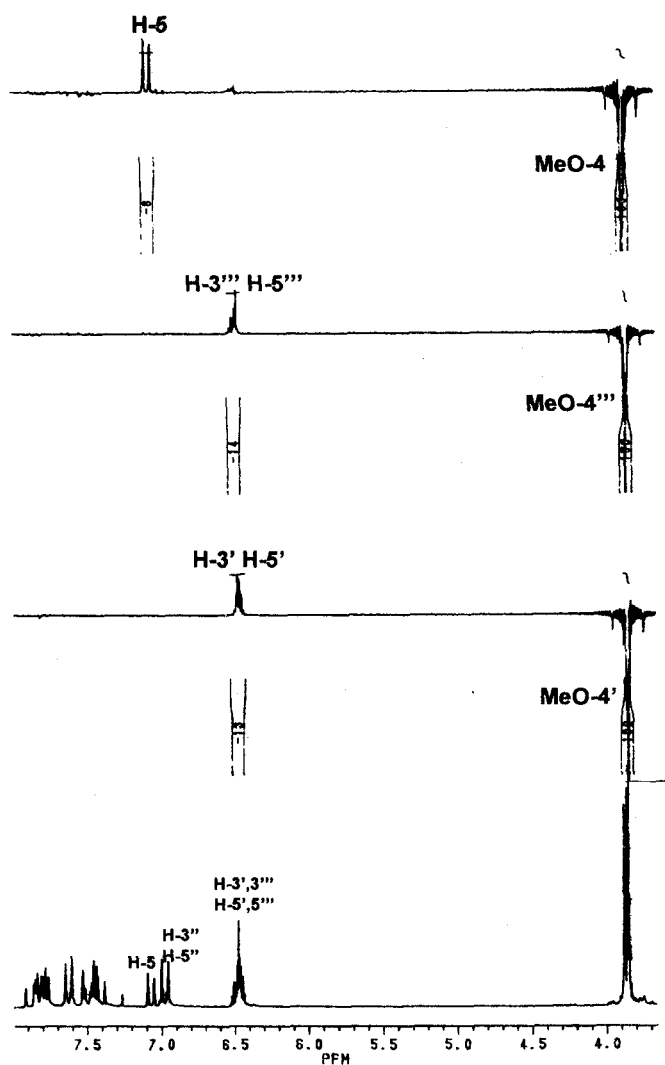
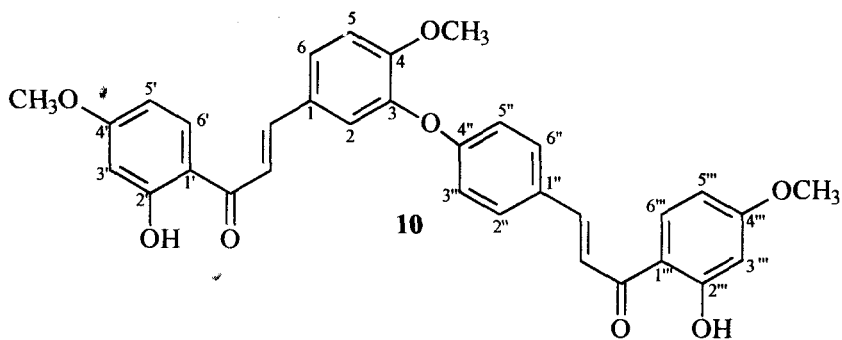


Figura I.34: Espectro resultante da irradiação dupla e subtração de espectros (NOE) do derivado metilado **10** em CDCl_3 .



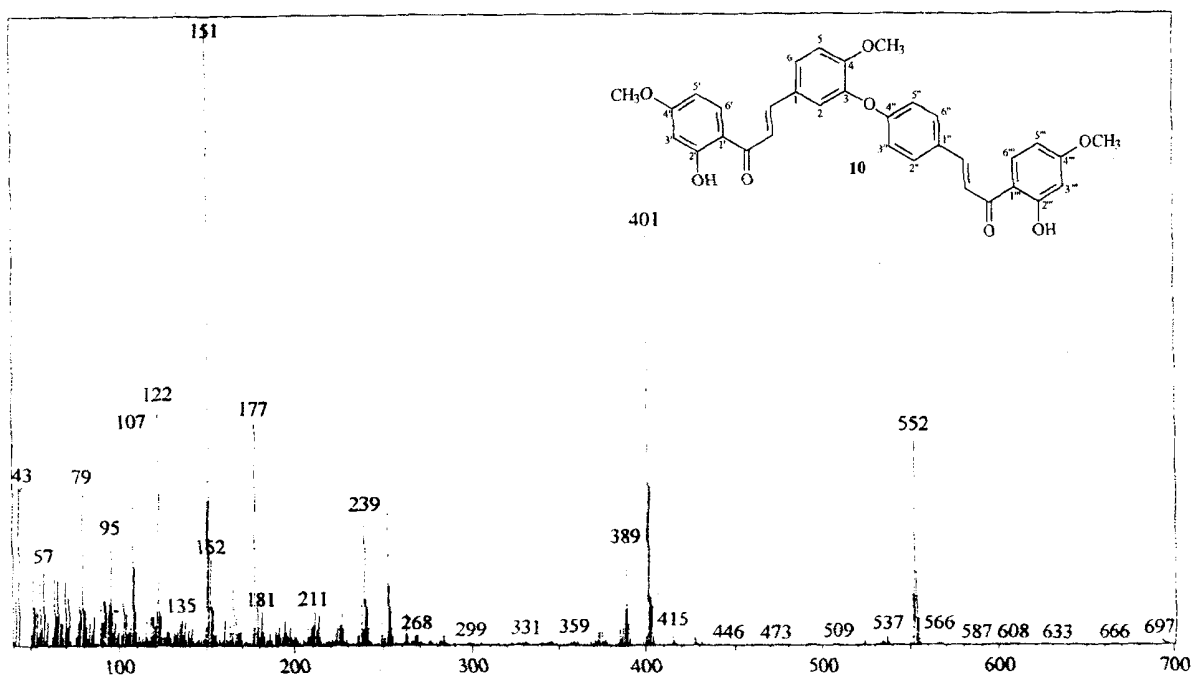
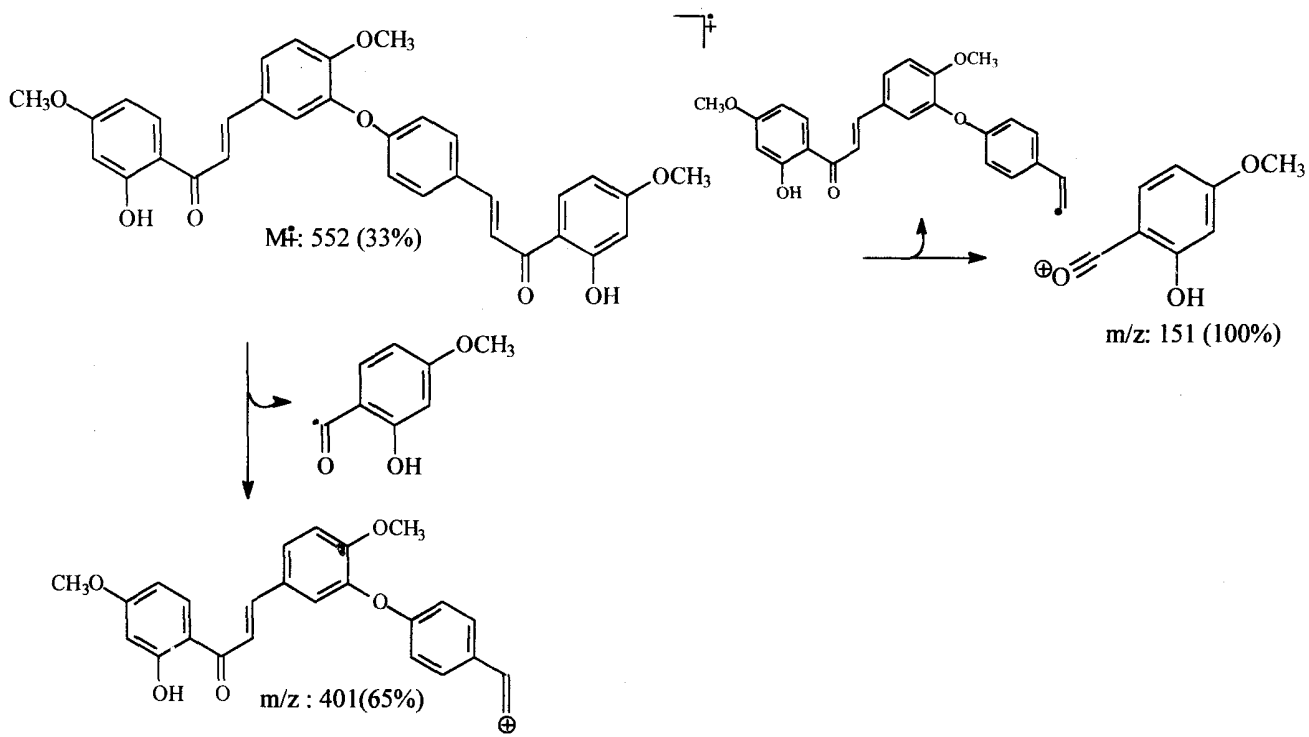


Figura I.35: Espectro de massas (IE) da bichalcona metilada 10.



Esquema I.6: Fragmentação de massas da bichalcona metilada 10.

Tabela I.5: Dados de RMN 1D e 2D de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) da trimetil-luxenhalcona **10**.

C	$^1\text{H}-^{13}\text{C}-\text{COSY}-^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H}-^{13}\text{C}-\text{COSY}-^n\text{J}_{\text{CH}}$	
	δ_{C}	δ_{H} (Hz)	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1	128,4	-	H-6	H-5; H- α
2	121,1	7,43 (d, 2,2)		H- β
3	144,0	-	H-2	H-5
4	153,8	-		H-2; H-6
5	112,9	7,06 (d, 8,4)		
6	127,6	7,49 (dd, 8,4; 2,2)		H-2
1'	114,1	-		H-3'; H-5'
2'	166,2	-		
3'	101,1	6,47 (d, 2,2)		
4'	166,6	-	H-3'; H-5'	
5'	107,7	6,48 (dd, 9,0; 2,2)		
6'	131,1	7,81 (d, 9,0)		
1''	129,3	-		H- α'
2''	130,3	7,62 (d, 8,4)		H- β'
3''	116,8	6,97 (d, 8,4)		
4''	160,1	-		H-2''; H-6''
5''	116,8	6,97 (d, 8,4)		
6''	130,3	7,62 (d, 8,4)		H- β'
1'''	114,0	-		H-3'''; H-5'''
2'''	166,2	-		
3'''	101,1	6,47 (d, 2,2)		
4'''	166,6	-	H-3'''; H-5'''	
5'''	107,7	6,46 (dd, 9,0; 2,2)		
6'''	131,1	7,77 (d, 9,0)		
α	118,8	7,42 (d, 15,4)		
α'	119,0	7,49 (d, 15,4)		
β	143,2	7,81 (d, 15,4)		H-2; H-6
β'	143,8	7,86 (d, 15,4)		H-2''; H-6''
HO	-	13,49; 13,45 (sl)		
C=O	191,5; 191,7	-	H- α ; H- α'	H- β ; H- β'
MeO-4'; 4'''	55,57 x 2	3,86; 3,85 (sl)		
MeO-4	56,10	3,88 (sl)		

e) Atribuição dos dados de RMN¹H e ¹³C do éter-penta-O-metil-luxenchalcona (11).

O deslocamento químico dos hidrogênios do derivado permetilado **11** foram atribuídos através da interpretação dos sinais detectados através de irradiação e subtração de espectros (NOEDIFF). Irradiações na frequência dos grupos metoxilas 4, 2', 4', 2''' e 4''' foi possível detectar os sinais dos hidrogênios vizinhos às mesmas (experimentos *a*, *b*, *c*, *d*, e *e*, Figura I.38) (Tabela I.6). Os deslocamentos químicos dos demais hidrogênios foram atribuídos por comparação com a luxenchalcona natural **9** (CARVALHO *et al.*, 2003) e análise dos espectros 2D (COSY, Figura I.37) que revela o acoplamento entre os hidrogênios. A atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios H-2, H-5 e H-6 de **11** foram feitos através das seguintes observações: a) o sinal resultante de NOE em δ_H 7,0 (d; 8,0 Hz; H-5) devido a irradiação em δ_H 3,87 MeO-4 (s, 3H). b) o sinal de acoplamento entre o hidrogênio deste sinal e do hidrogênio com δ_H 7,60 (H-6 dd; 8,3; 2,0). c) sinal de interação de acoplamento de δ_H 7,60 e δ_H 7,30 (d; 2,0 Hz), H-2 e H-6.

Os deslocamentos químicos δ 6,45 e δ 6,40 foram atribuídos aos hidrogênios H-3' e H-3''' porque ambos apareceram nos espectros resultantes da irradiação na frequência de dois grupos metoxilas (experimentos *a* e *e*). Os experimentos *b* e *d* revelam NOE nos sinais δ 6,51 e δ 6,55 (dd) permitindo atribuir os deslocamentos químicos das metoxilas H₃CO-4' e H₃CO-4''' e os δ_H dos hidrogênios H-5' e H-5'''. O espectro 2D-COSY (Figura I.37) revelou sinal de acoplamento destes hidrogênios e os sinais em δ_H 6,47 e 6,44 de H-3' e H-3'''. Os deslocamentos químicos do H-6' e 6''' foram atribuídos como δ_H 7,72 e δ_H 7,71 (d; 8,6 Hz) devido ao sinal de acoplamento com o sinal em δ_H 6,55 e δ_H 6,51 (H-5' e 5''') que estão vizinhos aos grupos metoxilas (experimentos *b* e *d*). Os hidrogênios do sistema AA'BB' foram atribuídos através de comparação com os dados da luxenchalcona e do espectro de 2D-COSY que mostra o acoplamento entre eles. Além disso, no espectro de RMN¹H do derivado **11** não aparecem os deslocamentos químicos dos hidrogênios das hidroxilas queladas HO-2' e HO-2''' em δ_H 13,58 (sl) que aparece na luxenchalcona **9** (CARVALHO, *et al.* 2003). Isto revela que estes grupos hidroxilas foram transformados em éteres metílicos que sob irradiação gerou NOE em δ_H 6,47 e δ_H 6,44 dos hidrogênios 3' e 3''' (Experimentos *a* e *e*).

O espectro de RMN¹³C do **11** (Figura I.39) mostra diferenças acentuadas nos deslocamentos químicos de alguns carbonos que são consistentes com as alterações eletrônicas provocadas pela conversão dos grupos hidroxilas em grupos metoxila (CARVALHO *et al.*, 1993).

Os grupos metoxilas provocam uma desblindagem dos carbonos *ipso* C-4, C-2', C-4', C-2''', C-4''' e não atenuam a proteção exercida pelo efeito mesomérico de átomo de oxigênio sobre posições *para* e aumenta a blindagem dos carbonos *orto* devido ao efeito γ de proteção da metila. Os carbonos C-3' e C-3''' que estão entre duas metoxilas CH₃O-2' e CH₃O-4', CH₃O-2''' e CH₃O-4''', respectivamente, sofreram um efeito de blindagem quando comparados ao derivado peracetilado **12** ($\Delta\delta = 18,4$ ppm) (RAMADAN *et al.* 2000).

A tabela I.6 (página 77) mostra os deslocamentos químicos dos hidrogênios de **11** e os valores dos δ_C detectados no espectro de RMN¹³C (Figura I.39).

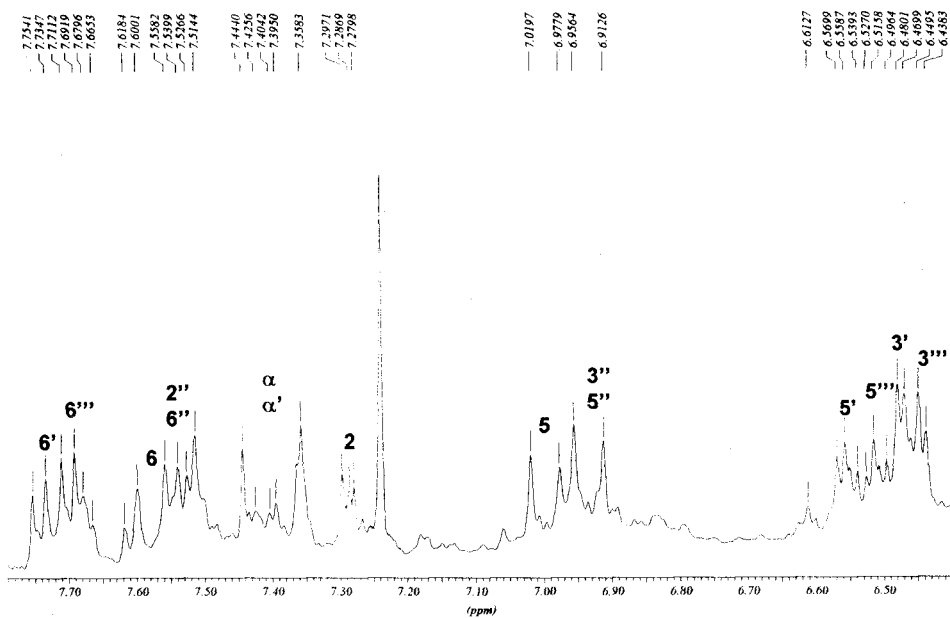
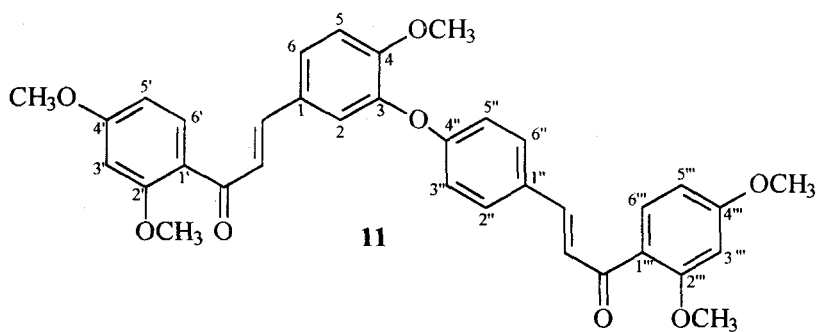


Figura I.36: Espectro de RMN¹H ampliado entre δ 6,5 e δ 7,8 ppm da substância **11** em CDCl₃.



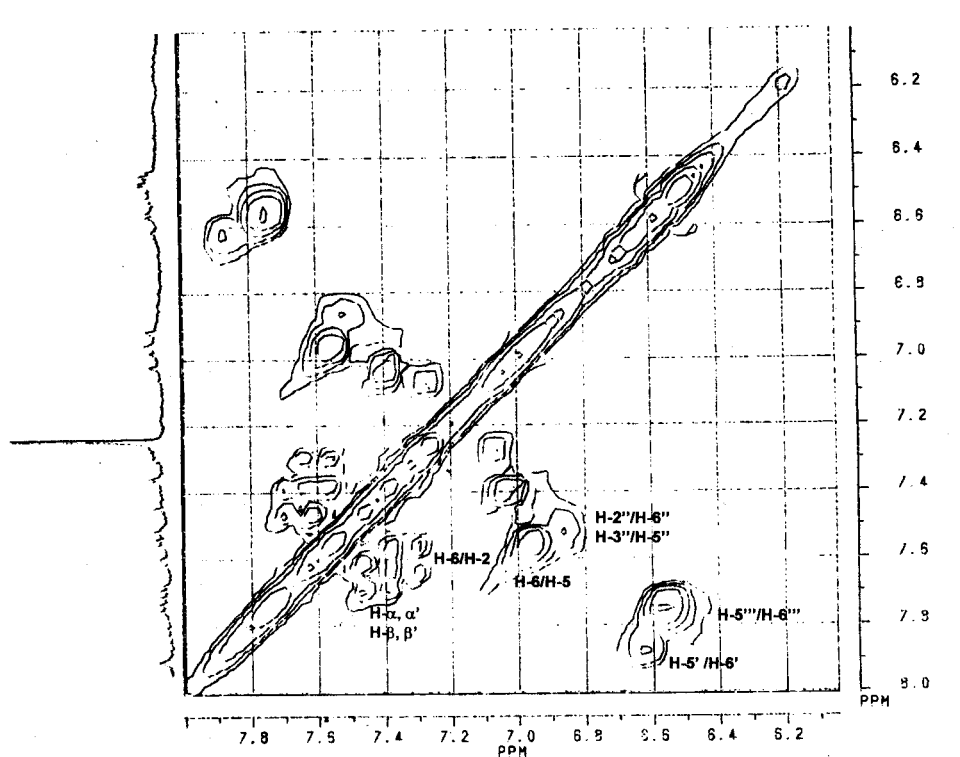
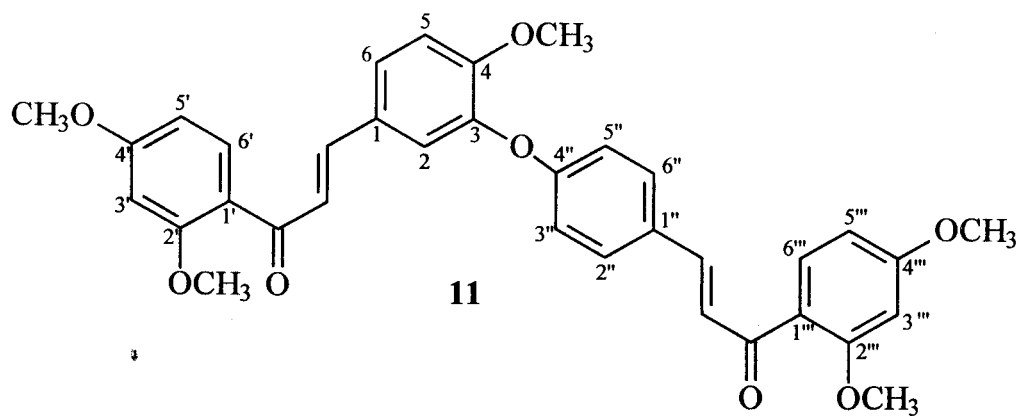


Figura I.37: Espectro de RMN¹H (HOMOCOSY, 200MHz) da substância 11 em CDCl₃.



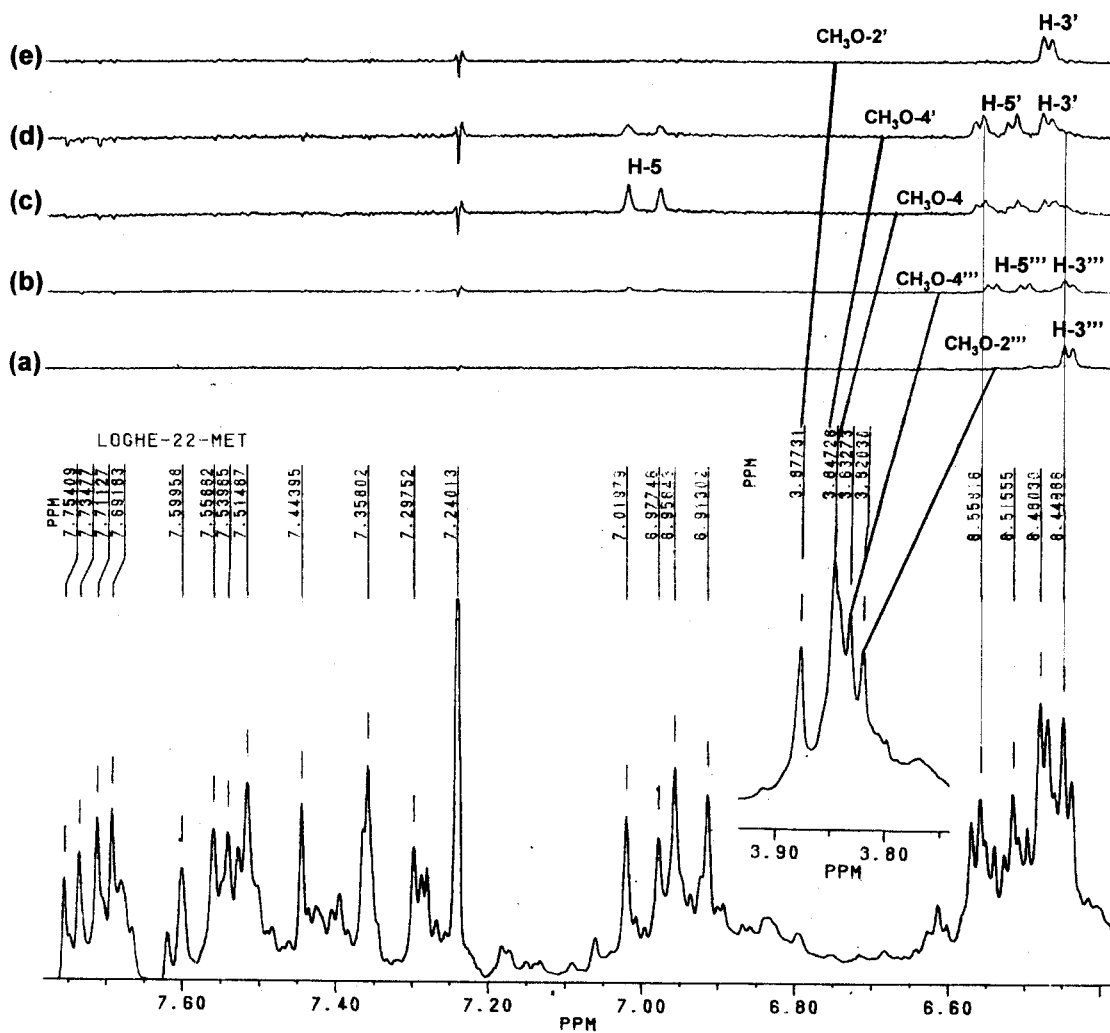
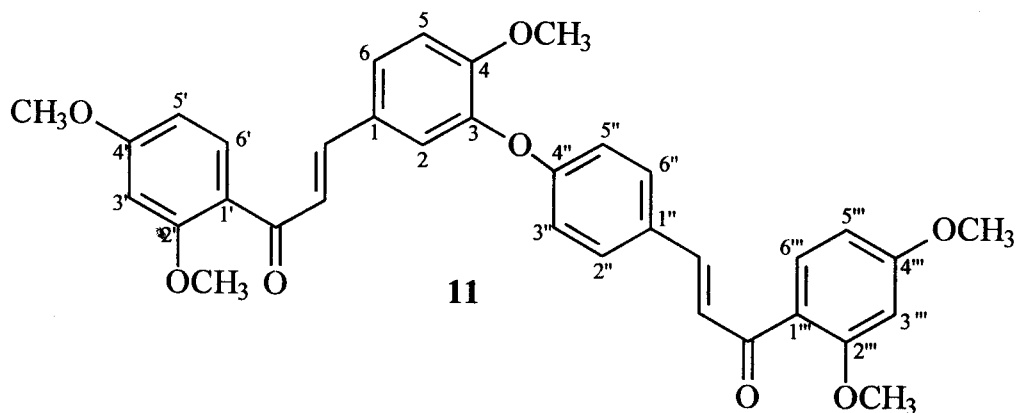


Figura I.38: Espectro de RMN¹H (200 MHz) e experimento de NOEDIFF (dupla irradiação e subtração de espectros) da bichalcona permetilada **11** em CDCl₃.



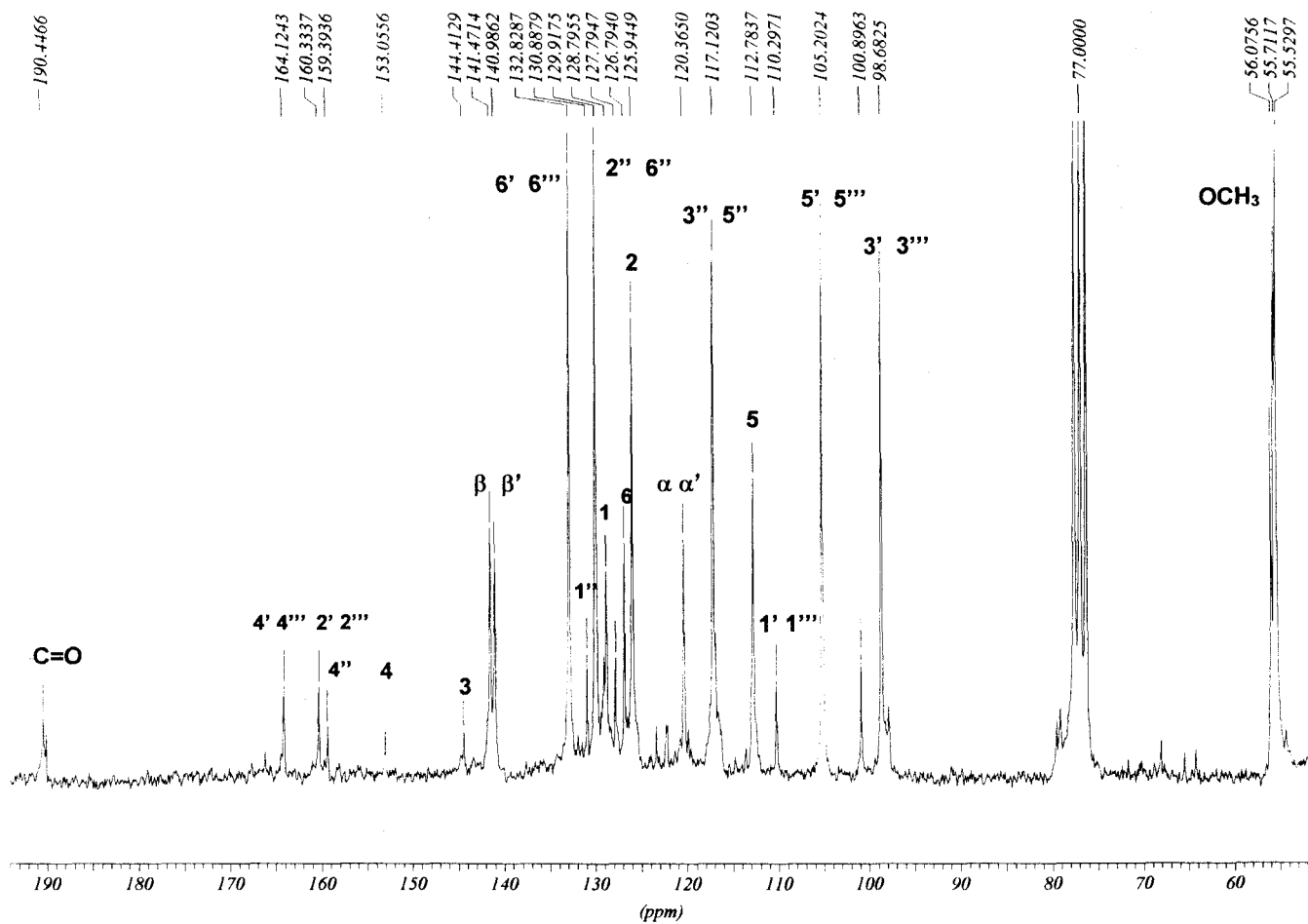


Figura I.39: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) da bichalcona permetilada 11 em CDCl_3 .

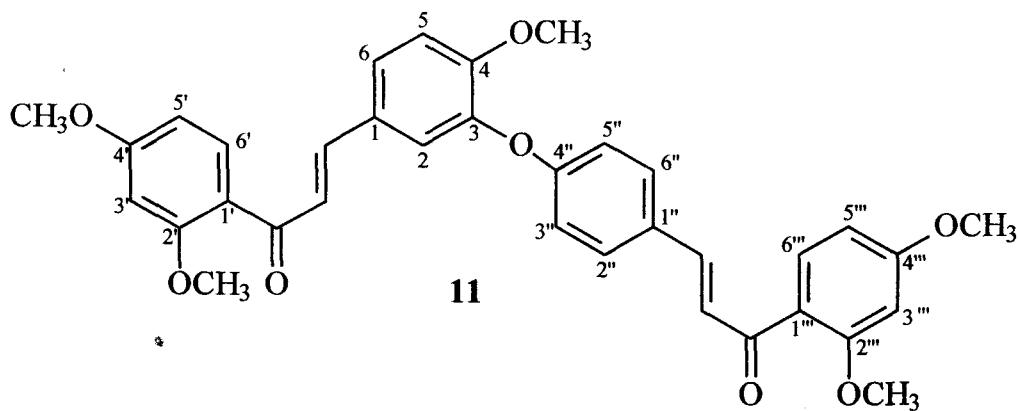
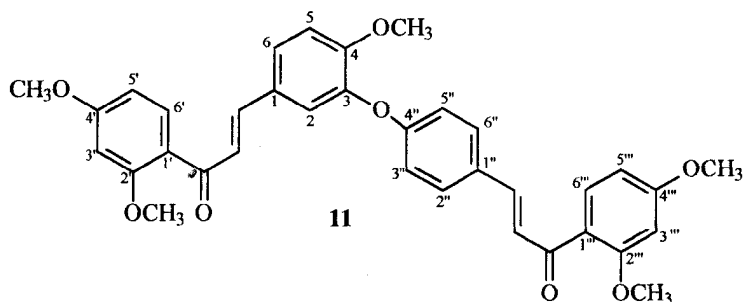


Tabela I.6: Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) de **11** (CDCl_3).

C	δ_{H} (Hz)	δ_{C}
1	-	128,8
2	7,29 (d; 2,0)	125,9
3	-	144,4
4	-	153,0
5	7,00 (d; 8,3)	112,8
6	7,58 (dd; 8,3 e 2,0)	126,8
1'	-	110,3
2'	-	160,3
3'	6,47 (d; 2,2)	98,7
4'	-	164,1
5'	6,55 (dd; 8,6 e 2,2)	105,2
6'	7,72 (d; 8,6)	132,8
1''	-	130,9
2''	7,54 (d; 8,8)	129,9
3''	6,93 (d; 8,8)	117,1
4''	-	159,4
5''	6,93 (d; 8,8)	117,1
6''	7,54 (d; 8,8)	129,9
1'''	-	110,3
2'''	-	160,3
3'''	6,44 (d; 2,2)	98,7
4'''	-	164,1
5'''	6,51 (dd; 8,6; 2,2)	105,2
6'''	7,71 (d; 8,6)	132,8
α	7,40 (d; 17,1)	120,4
α'	7,40 (d; 17,1)	120,4
β	7,60	141,0
β'	7,60	141,5
C=O *	-	190,4
MeO	3,82; 3,83; 3,85; 3,88	55,5; 55,7; 56,1



f) Atribuição dos dados de RMN¹H e ¹³C do derivado acetilado da luxenchalcona

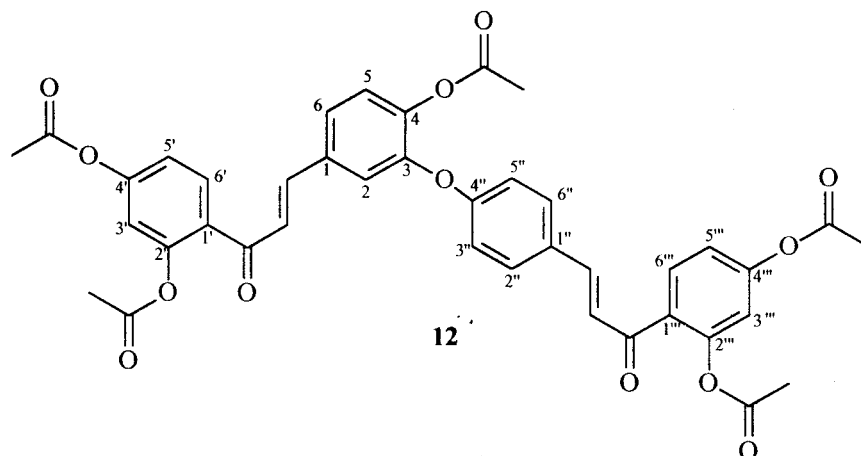
Os deslocamentos químicos dos hidrogênios do derivado peracetilado **12** foram atribuídos através da análise dos espectros de RMN¹H (Figuras I.40, I.41 e I.42). O espectro de RMN¹H (Figura I.41) mostra cinco sinais de metila dos grupos acetoxilas em δ_H 2,17; 2,22; 2,25; 2,31; 2,33 ppm, não aparecendo nenhum valor em torno de δ 13,00 ppm de hidroxilas em ponte.

Os deslocamentos químicos dos carbonos do derivado **12** foram atribuídos através da análise dos espectros de RMN¹³C (Figuras I.43 e I.44) e comparação com valores deduzidos a partir de cálculos empíricos de δ_C para anel aromático substituído.

Os espectros de RMN¹³C do derivado **12** (Figuras I.43, I.44) mostram diferenças acentuadas nos deslocamentos químicos de alguns carbonos que são consistentes com as alterações eletrônicas provocadas pela conversão dos grupos hidroxilas em grupos acetoxila (CARVALHO *et al.*, 1993). Com os grupos acetoxilas ocorre blindagem dos carbonos *ipso* C-4, C-2', C-4', C-2''' e C-4''' (devido aos efeitos γ exercidos pelo átomo de oxigênio carbonílico e pelo grupo metila da função acetoxila) e diminuição da capacidade de blindagem resultante do efeito mesomérico de átomo de oxigênio sobre posições *orto* e *para* C-5, C-3' e C-3''', C-5' e C-5''' (Tabela I.7), [*meta* praticamente inalterada ou pequena blindagem]. O efeito do grupo acetoxila retirador de elétrons (indutivo e mesomérico), atenua a deslocalização dos elétrons não compartilhados do heteroátomo, causando aumento do δ_C em *orto* e *para* (CARVALHO *et al.*, 1993).

O espectro de RMN ¹³C do derivado acetilado **12** mostra sinais em δ_C : 168,5 e 168,9 das carbonilas do acetato e δ_C : 20,4; 20,9; 21,1 das metilas do acetato.

O deslocamento químico dos carbonos de **12** foram atribuídos com base em cálculos empíricos e comparação com modelo da literatura (BARRERO *et al.*, 1997). Os valores básicos de δ_C dos respectivos carbonos foram usados para os cálculos empíricos.



Cálculos dos deslocamentos químicos dos carbonos de 12 (SILVERSTEIN *et al.* 1991).

x	<i>ipso</i>	<i>orto</i>	<i>meta</i>	<i>para</i>
-OC ₆ H ₅	+29	-9,4	+1,6	-5,3
-OCOCH ₃	+22,4	-7,1	-0,4	-3,2
-COC ₆ H ₅	+9,1	+1,5	-0,2	+3,8

$$\delta_{C-1}: 128,5 + 1,6 + (-3,2) = 126,9$$

$$\delta_{C-2}: 128,5 + (-0,4) + (-9,4) = 118,7$$

$$\delta_{C-3}: 128,5 + 29 + (-7,1) = 150,4$$

$$\delta_{C-4}: 128,5 + 22,4 + (-9,4) = 141,5$$

$$\delta_{C-5}: 128,5 + 1,6 + (-7,1) = 123,0$$

$$\delta_{C-6}: 128,5 + (-0,4) + (-5,3) = 122,8$$

$$\delta_{C-1'}, 1''': 128,5 + 9,1 + (-7,1) + (-3,2) = 127,3$$

$$\delta_{C-2'}, 2''': 128,5 + 22,4 + (-0,4) + 1,5 = 152,0$$

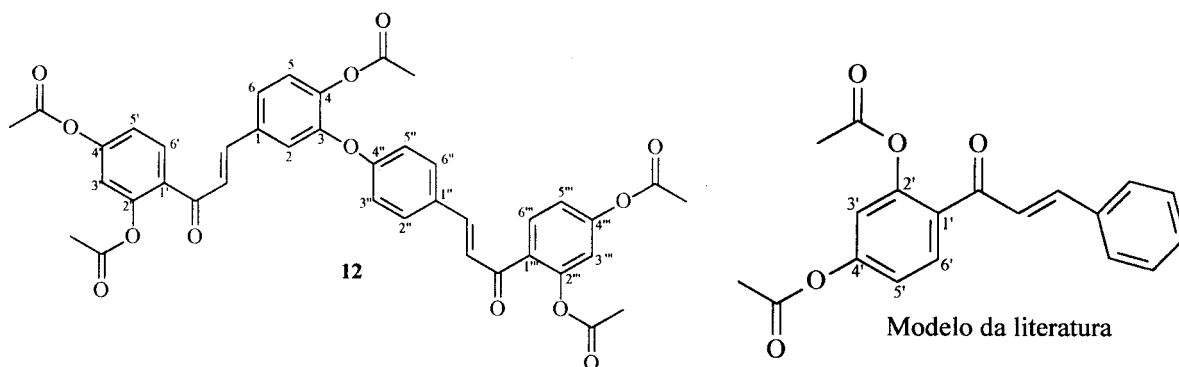
$$\delta_{C-3'}, 3''': 128,5 + 2 \times (-7,1) + (-0,2) = 114,1$$

$$\delta_{C-4'}, 4''': 128,5 + 22,4 + (-0,4) + 3,8 = 154,3$$

$$\delta_{C-5'}, 5''': 128,5 + (-7,1) + (-3,2) + (-0,2) = 118,0$$

$$\delta_{C-6'}, 6''': 128,5 + 2 \times (-0,4) + 1,5 = 129,2$$

Comparação de δ_C com modelo da literatura (BARRERO *et al.*, 1997).



	12	Modelo da literatura (CDCl ₃)
C	δ_C	δ_C
1'	129,5	129,7
2'	153,4	149,6
3'	117,1	117,1
4'	158,8	153,4
5'	119,2	125,0
6'	130,3	130,8

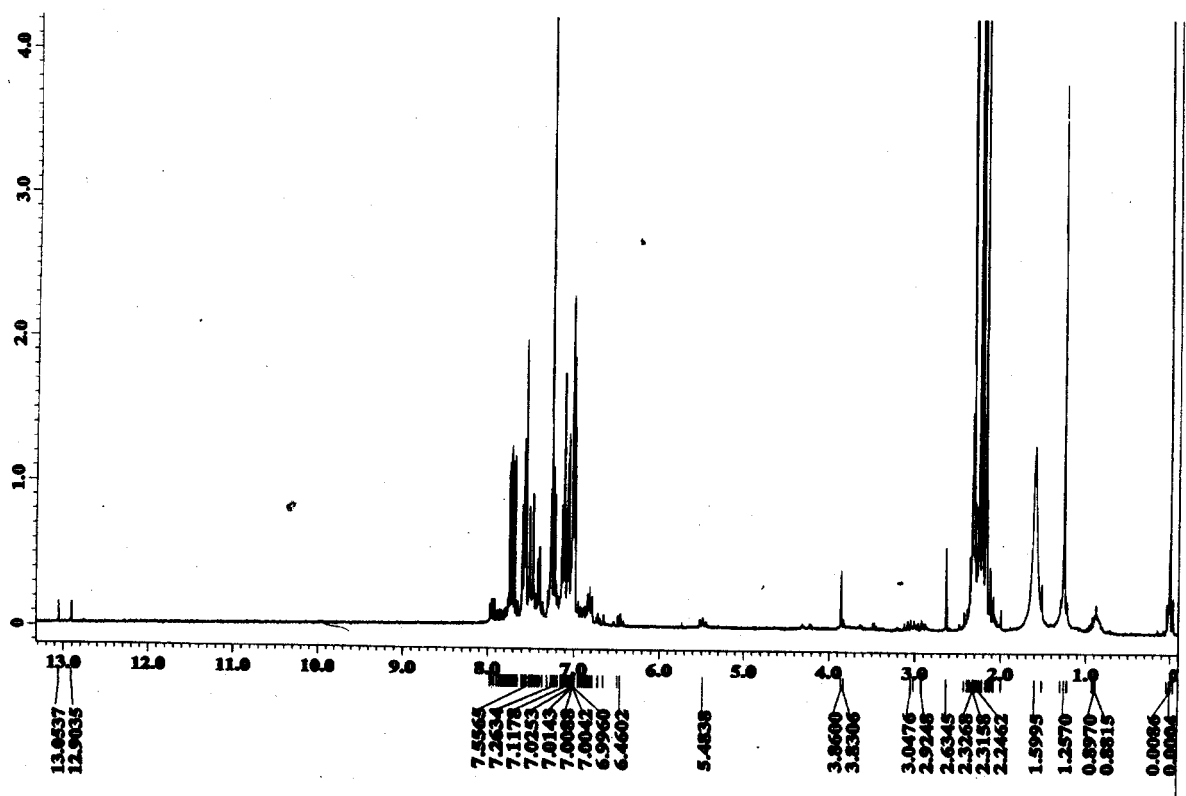


Figura I. 40: Espectro de $^1\text{RMN } ^1\text{H}$ (400 MHz) da substância 12 em CDCl_3 .

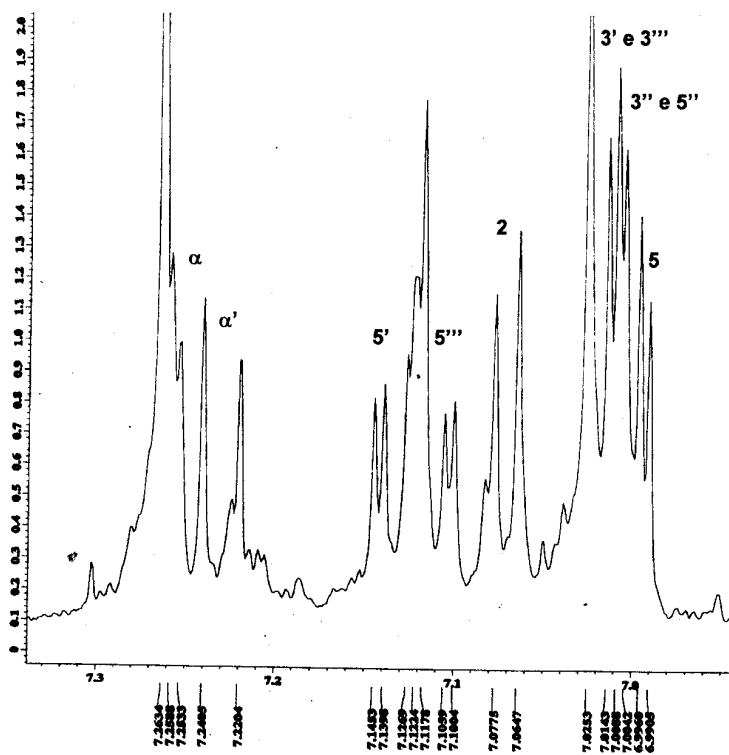
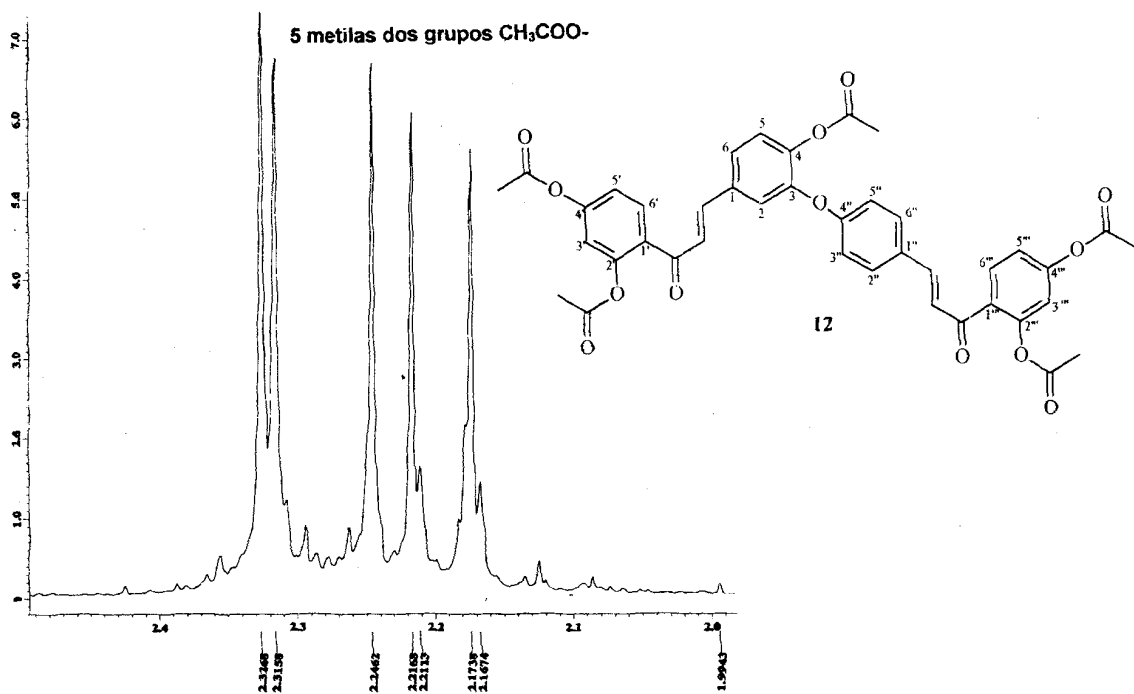


Figura I.41: Espectros de RMN ^1H (400 MHz) ampliados da substância 12 em CDCl_3 .

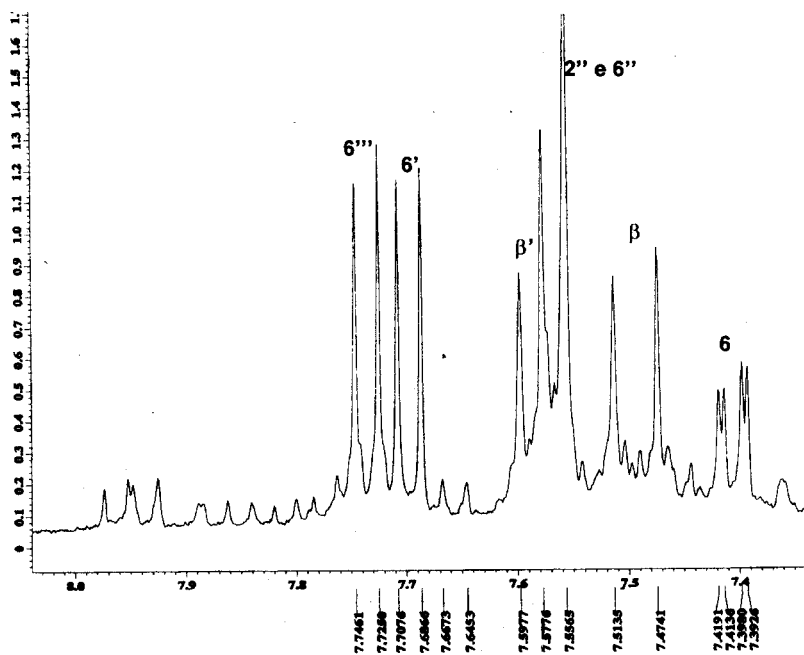
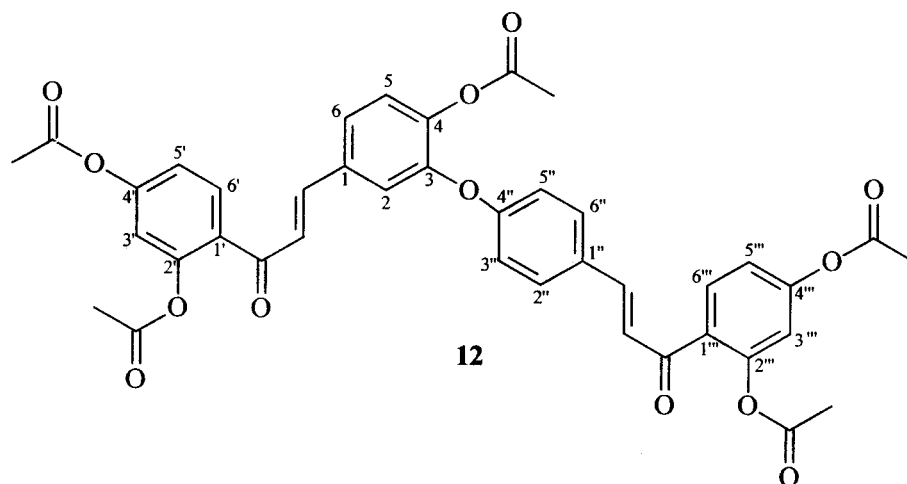


Figura I.42: Espectros de RMN ^1H (400 MHz) ampliados da substância 12 em CDCl_3 .



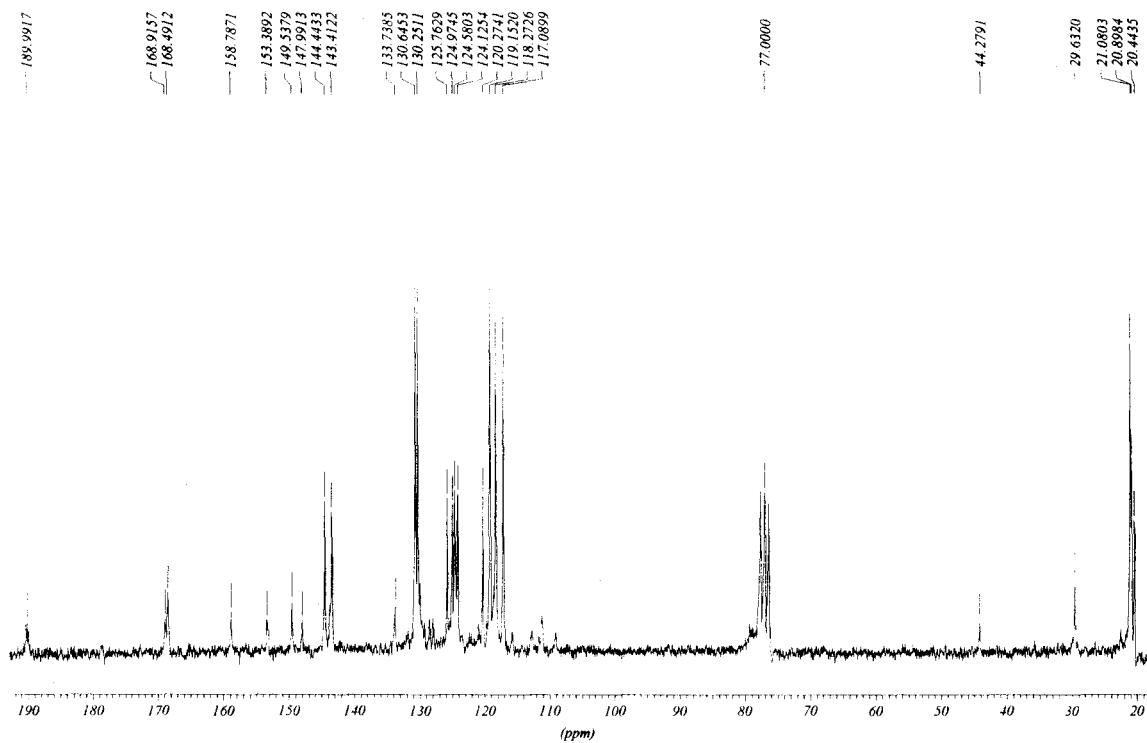
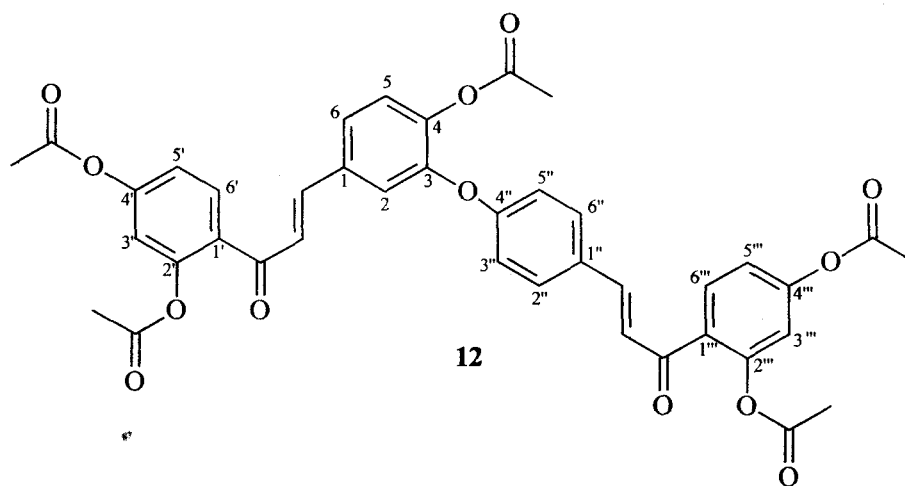


Figura I.43: Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz) da substância 12 em CDCl_3 .



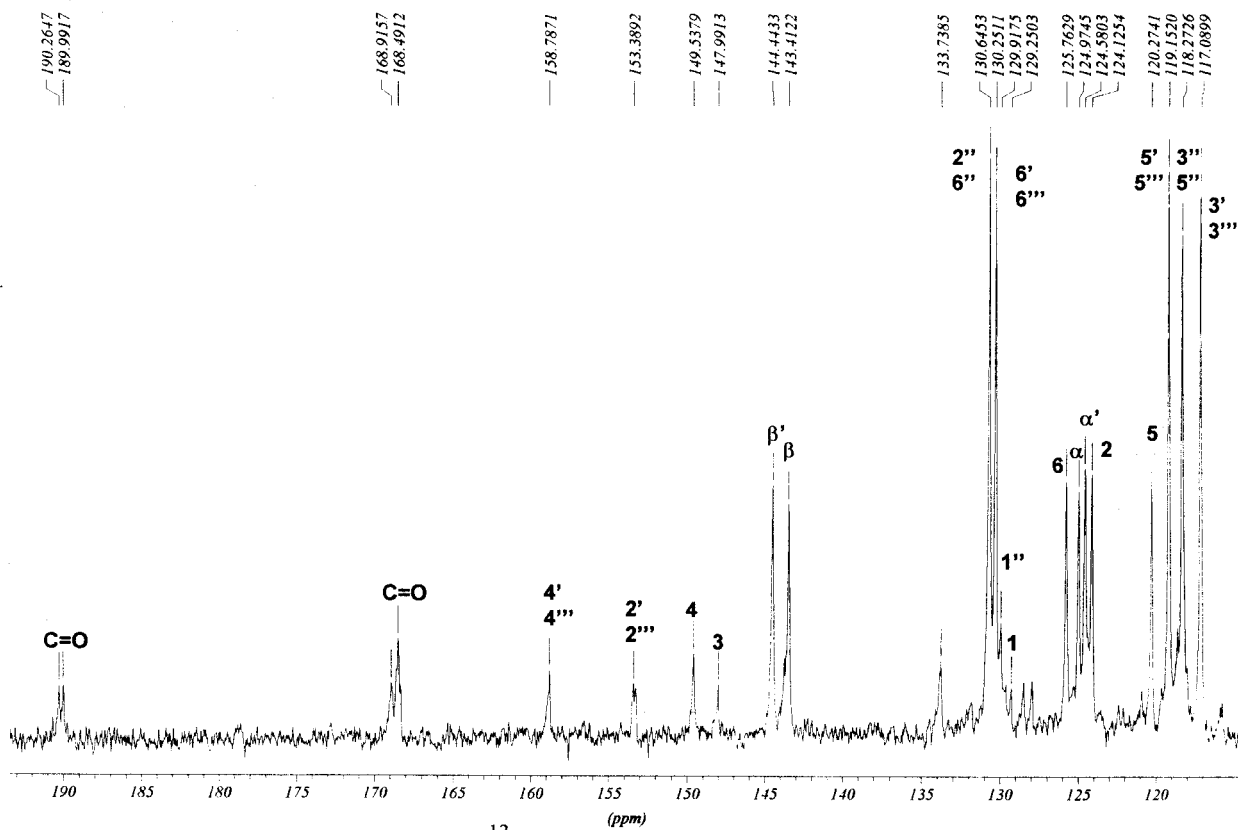


Figura I.44: Espectro de RMN ^{13}C (BBD, 50 MHz) ampliados da substância 12 em CDCl_3 .

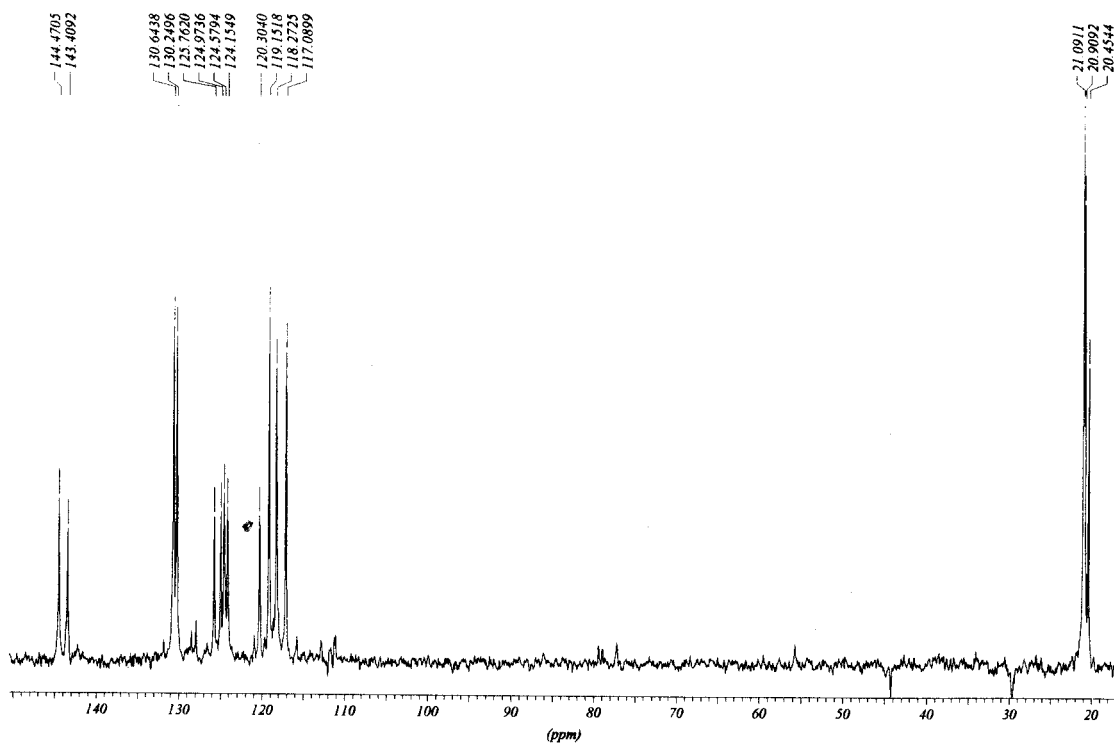


Figura I.45: Espectro de RMN ^{13}C DEPT ($\theta=135$) de 12 em CDCl_3 a 200 MHz.

Tabela I.7: Dados de RMN $^1\text{H}^*$ (400 MHz) e ^{13}C (50 MHz) da bichalcona acetilada 12 comparados com a bichalcona 9.

C	Bichalcona Acetilada 12		Bichalcona
	δ_{H} (Hz)	δ_{C}	δ_{C}
1	-	129,2	130,18
2	7,07	124,1	122,78
3	-	148,0	143,43
4	-	149,5	153,16
5	6,99-7,02 (m)	120,3	118,68
6	7,40 (dd, 8,4; 2,2)	125,8	128,69
1'	-	129,5	114,41
2'	-	153,4	165,87
3'	6,99-7,02 (m)	117,1	103,73
4'	-	158,8	167,66
5'	7,14 (dd, 8,4; 2,2)	119,2	108,83
6'	7,69 (d, 8,4)	130,3	131,24
1''	-	129,9	129,30
2''	7,57 (d, 8,4)	130,6	131,78
3''	6,99-7,02 (m)	118,3	117,35
4''	-	149,5	161,20
5''	6,99-7,02 (m)	118,3	117,35
6''	7,57 (d, 8,4)	130,6	131,78
1'''	-	129,5	114,41
2'''	-	153,4	165,87
3'''	6,99-7,02 (m)	117,1	103,73
4'''	-	158,8	167,66
5'''	7,11 (dd, 8,4; 2,2)	119,2	108,83
6'''	7,73 (d, 8,4)	130,3	133,63
H- α	7,23 (d, 15,8)	124,9	117,35
H- α'	7,23 (d, 15,8)	124,6	117,35
H- β	* 7,49 (d, 15,8)	143,4	144,28
H- β'	7,58 (d, 15,8)	144,4	144,28
C=O	-	190,0	192,68
C=O	-	168,5; 168,9	-
CH ₃	2,17; 2,22; 2,25; 2,31; 2,33	20,4; 20,9; 21,1	-

* Devido à impureza na amostra alguns sinais não ficaram bem definidos.

g) Identificação do biflavonóide 13

O biflavonóide 13, isolado das folhas de *Luxemburgia octandra*, foi caracterizado através da análise de IV, RMN ^1H e ^{13}C (uni e bidimensional) da substância natural e do derivado metilado.

O espectro de IV (Figura I.46) mostra banda de absorção em 3357 cm^{-1} correspondente ao estiramento de hidroxila quelada e em 1646 cm^{-1} correspondente ao estiramento de carbonila quelada e conjugada. As absorções em 1609, 1503 e 1440 cm^{-1} são bandas atribuídas a $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ de aromático.

O espectro de RMN ^1H (Figura I.47) mostra dois sinais de hidroxila em campo baixo a δ_{H} : 12,13 e 12,93, indicando a presença de duas hidroxilas queladas. A presença de dez sinais de hidrogênios aromáticos, incluindo dois sinais de dubletos com acoplamento meta em δ_{H} : 6,25 (H-6) com 6,53 (H-8) e 5,96 (H-6'') com 5,99 (H-8''), descartam a possibilidade das duas unidades estarem ligadas através de um desses carbonos. Além dos sinais citados acima há o sinal em 6,68 (s, 1H) que pode ser atribuído ao H-3 de uma flavona confirmando que os carbonos C-6 e C-8 não estão envolvidos na ligação entre as unidades.

A presença de três duplo dubletos em δ_{H} : 5,55 (12,4 e 2,9 Hz), 3,19 (17,2 e 12,4 Hz) e 2,80 (17,2 e 2,9 Hz), permite sugerir que a substância 13 possui uma unidade de flavanona.

O anel B da unidade da flavona foi identificado pelos três sinais de hidrogênios em δ_{H} : 7,23 (d; 8,4 Hz; H-5'), 7,79 (d; 2,2 Hz; H-2''), 7,86 (dd; 8,4 e 2,2 Hz; H-6'). Além disso, o espectro de RMN ^1H também mostra dubletos em δ_{H} : 7,55 (d; 8,8 Hz; 2H-2''', 6''') e 7,03 (d; 8,8 Hz; 2H-3''', 5''') indicando um sistema AA'BB' para a unidade da flavanona.

O espectro de RMN ^{13}C BBD e APT (Figura I.50 e Figura I.51) da substância 13 mostra 28 sinais incluindo dois sinais em δ_{C} : 129,10 e 117,39 que correspondem a dois carbonos cada, oito carbonos sp^2 (CH), dois carbonos sp^3 em δ_{CH} : 79,56 e δ_{CH_2} : 43,46, catorze carbonos sp^2 quaternários (4 C e 10 C-O) e dois grupos carbonílicos em δ_{C} : 183,04 e 196,93 (Tabela I.8). Estes δ_{C} são compatíveis com os deslocamentos químicos de carbonila de uma flavona e uma flavanona confirmando as deduções anteriores.

A análise do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio-carbono (^1H , ^{13}C -COSY- $^1\text{J}_{\text{CH}}$, HMQC, Figura I.52) permitiu a atribuição dos deslocamentos químicos dos carbonos metínicos de 13.

A junção 3'-O-4''' entre as unidades foi proposta com base nas posições livres deduzidas pela análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e foi confirmada pela obtenção do derivado metilado 14.

A análise dos espectros de NOESY (Figura I.53 e Figura I.54) mostra interações espaciais entre os hidrogênios δ_{H} 7,55 (d, H-2''') e H-6''') do sistema AA'BB' com os hidrogênios em δ_{H} 5,5 (dd, H-2''), δ_{H} 2,8 (dd, H-3'' eq) e δ_{H} 3,19 (dd, H-3'' ax) da flavanona indicando que o sistema AA'BB' pertence à unidade da flavanona. E interação dos hidrogênios δ_{H} 7,79 (d, H-2') e δ_{H} 7,86 (dd, H-6') do sistema AB com o hidrogênio δ_{H} 6,68 (s, H-3) permite incluir o anel B trissubstituído na flavona.

A tabela I.8 (página 96) contém as atribuições dos deslocamentos químicos de 13 comparados com a 2'',3''-diidrochnaflavona isolada de *Luxemburgia nobilis* (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

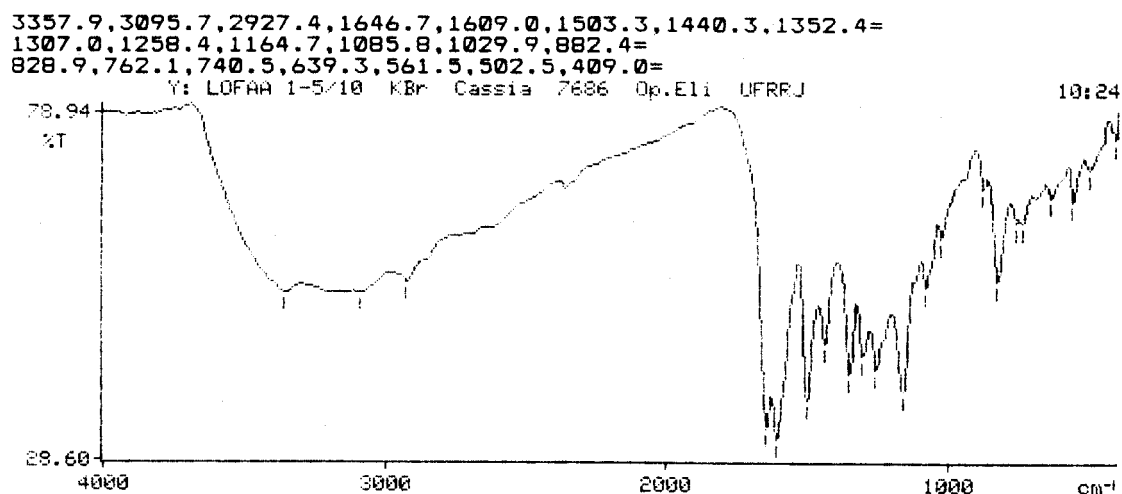
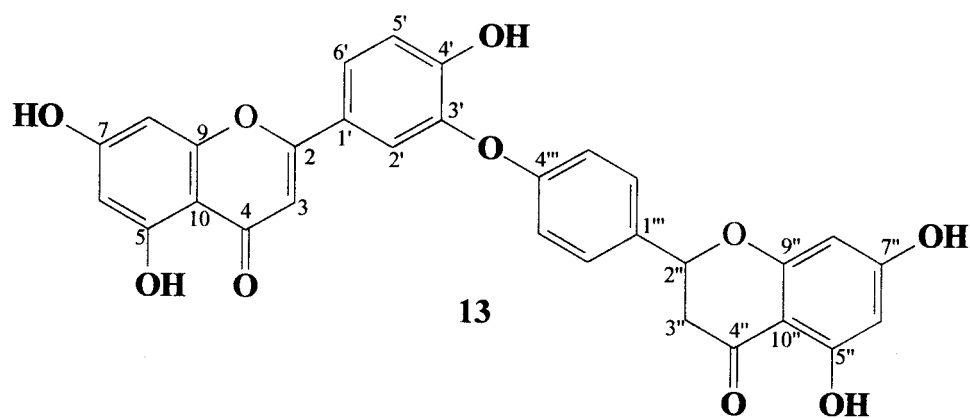


Figura I.46: Espectro de IV da substância 13.



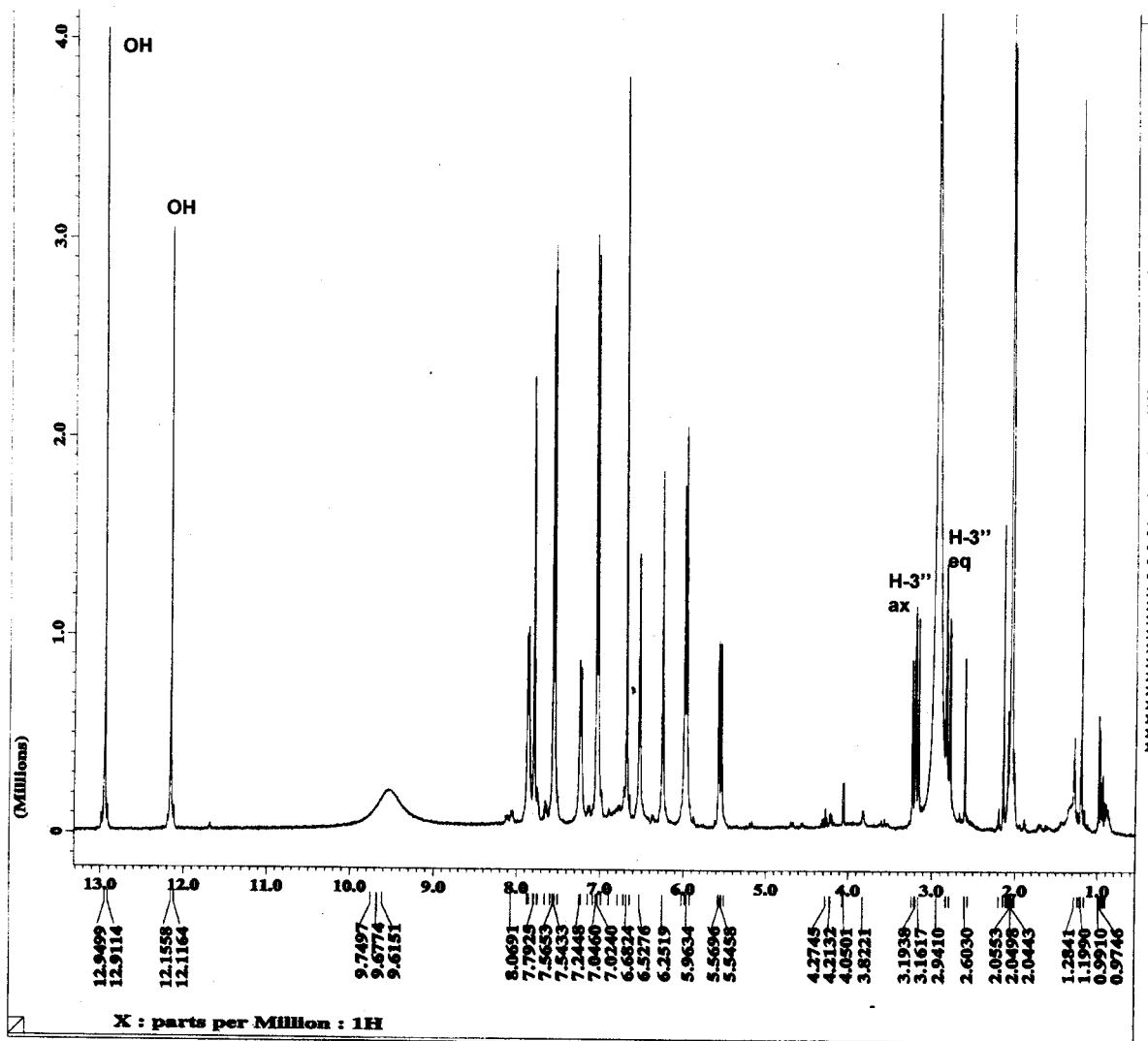


Figura I.47: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) da substância 13 em D_3CCOCD_3 .

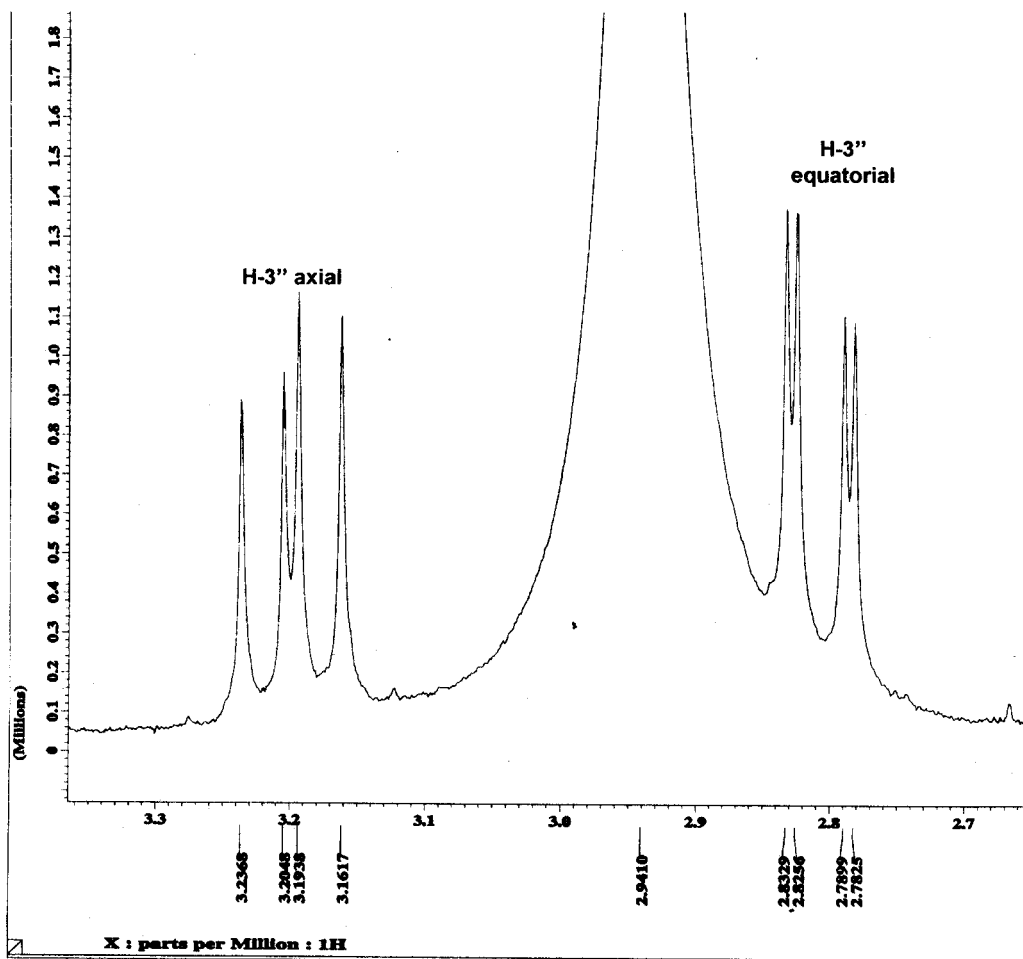
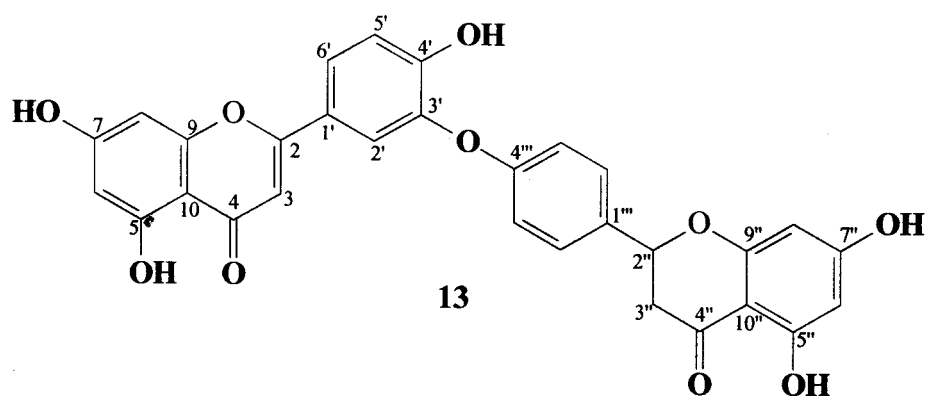


Figura I.48: Espectro de RMN ^1H da substância 13 expandido na região de δ 2,7 a 3,3 ppm.



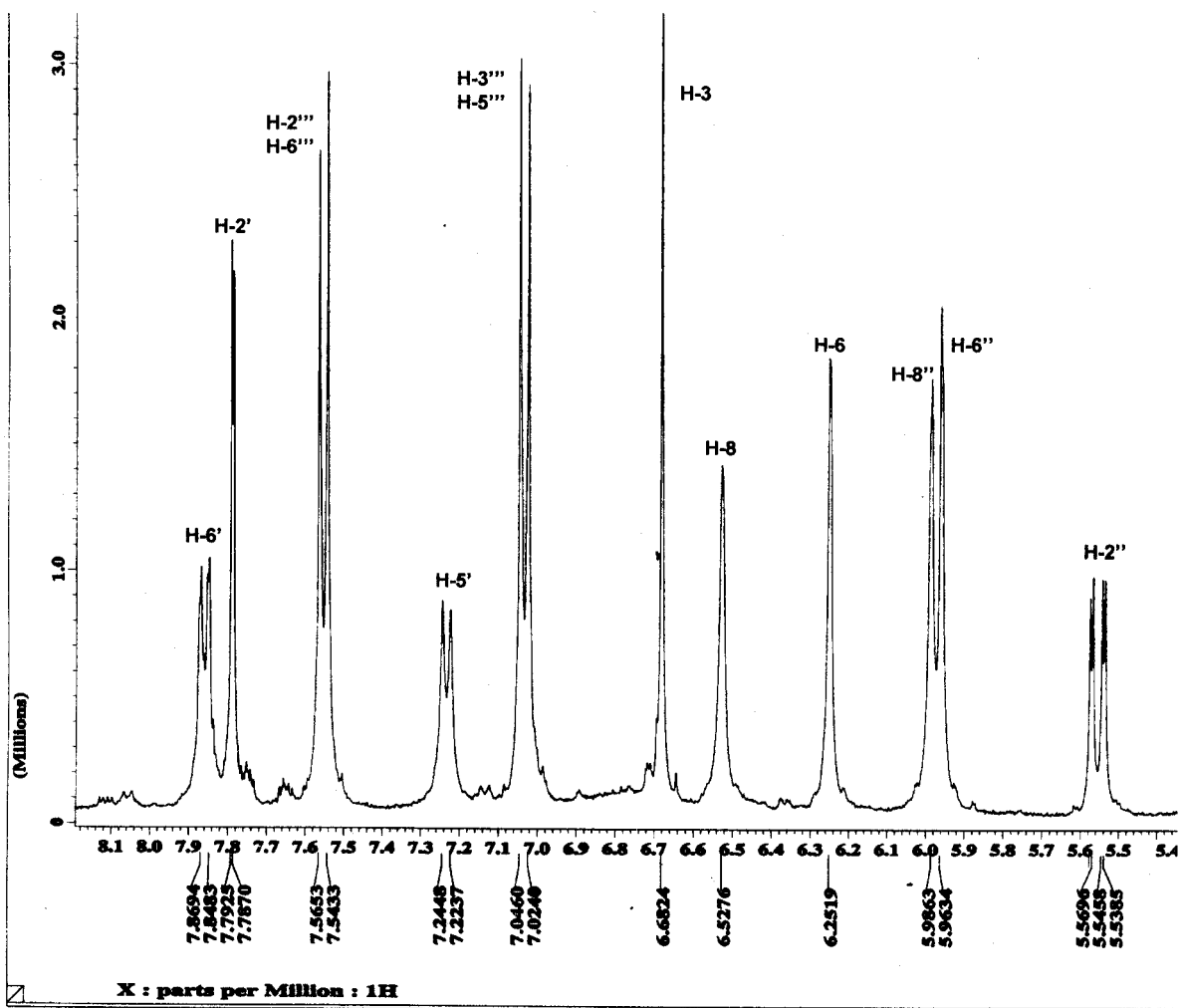
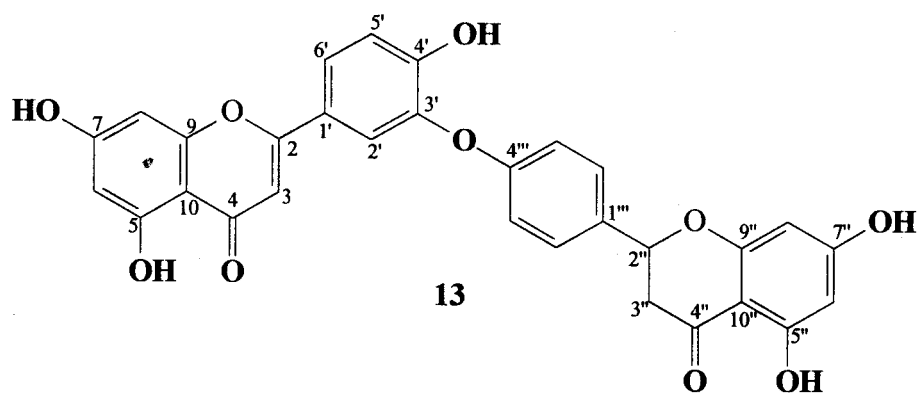


Figura I.49: Espectro de RMN 1H da substância 13 expandido na região de δ 5,4 a 8,0 ppm.



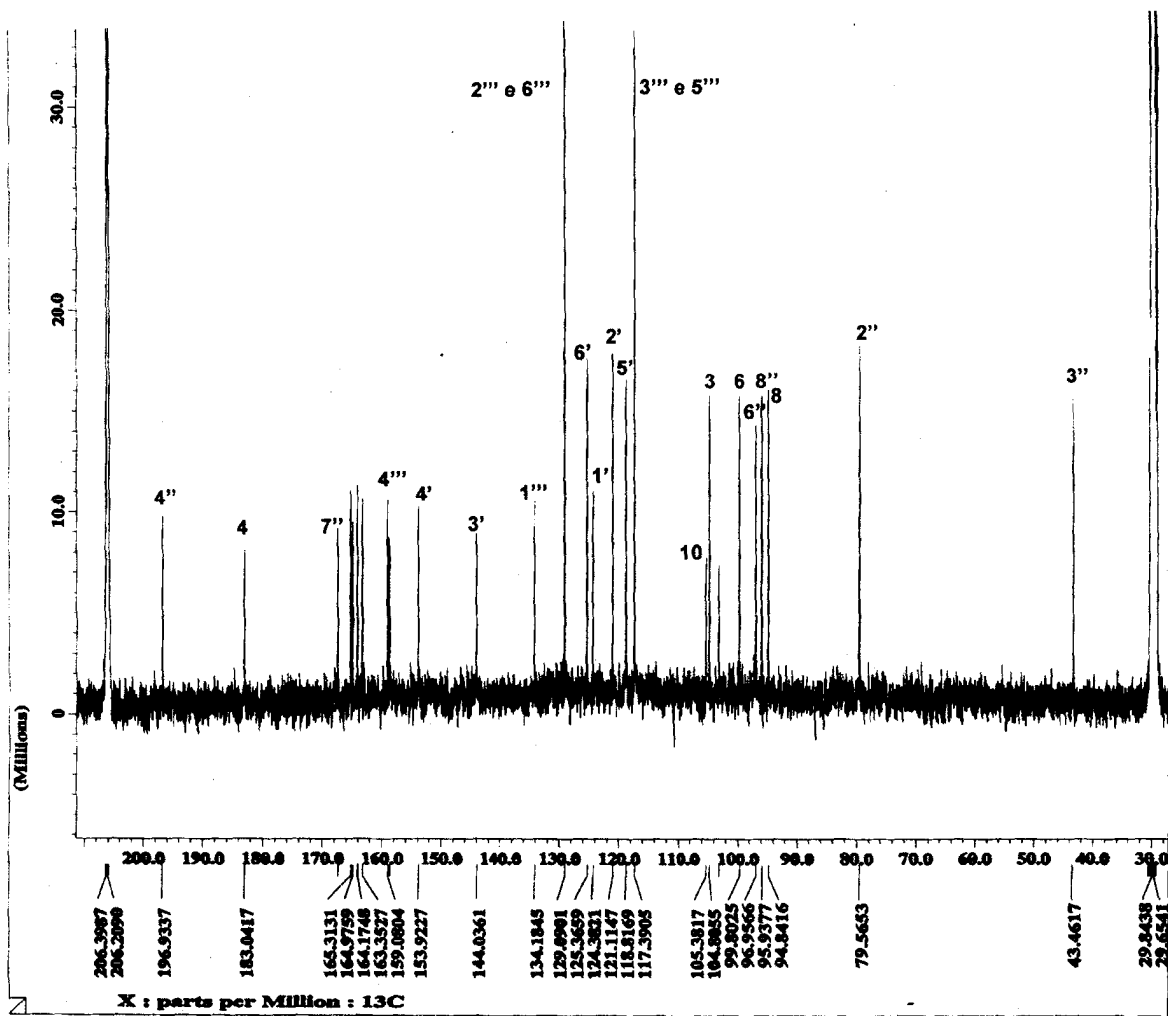
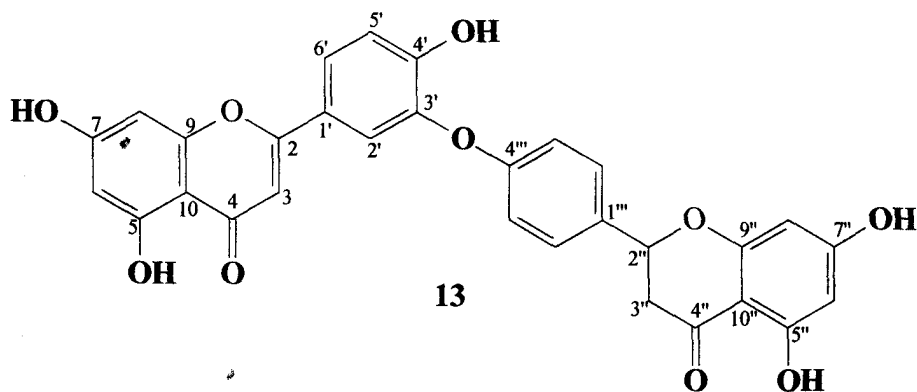


Figura I.50: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) da substância 13 em D_3CCOCD_3 .



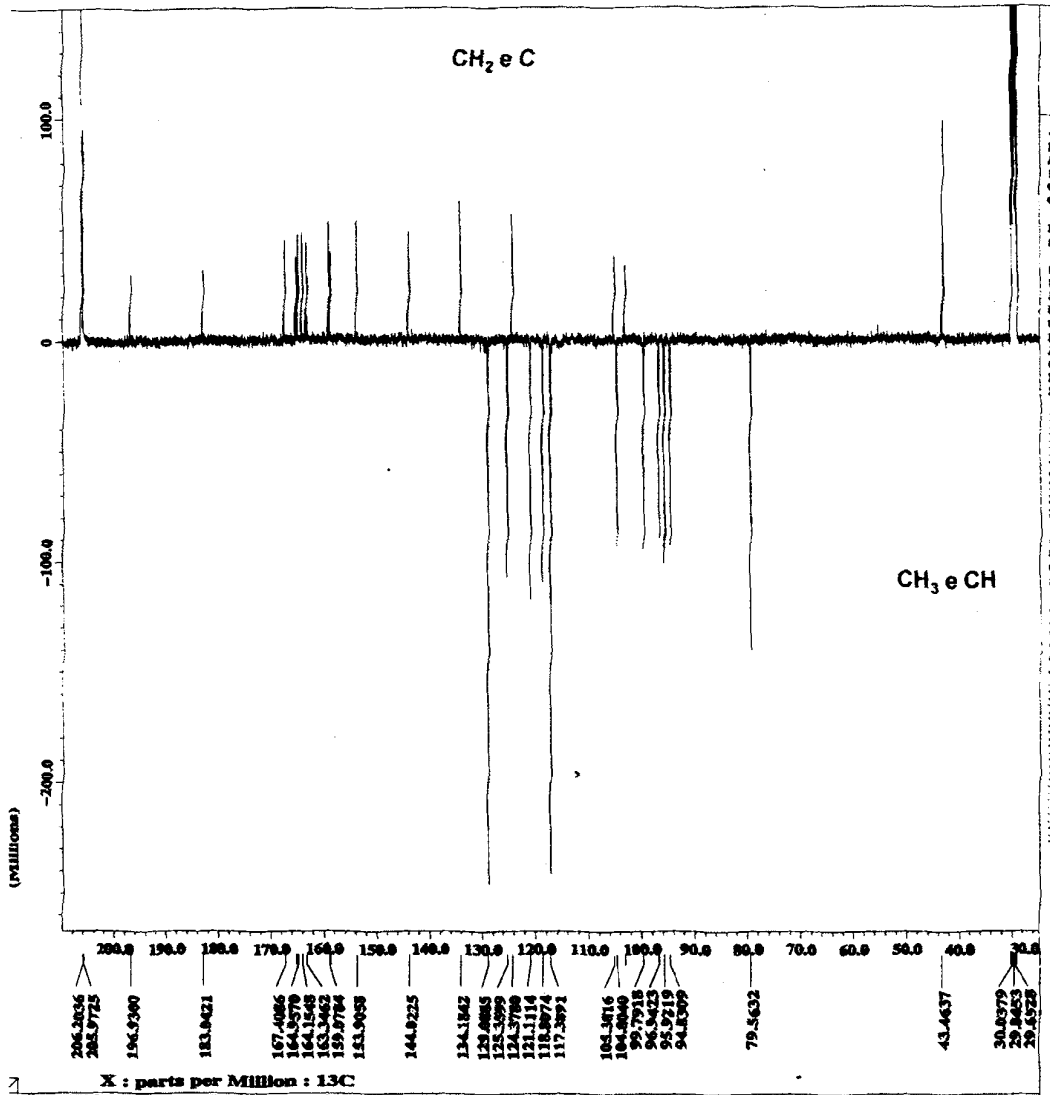
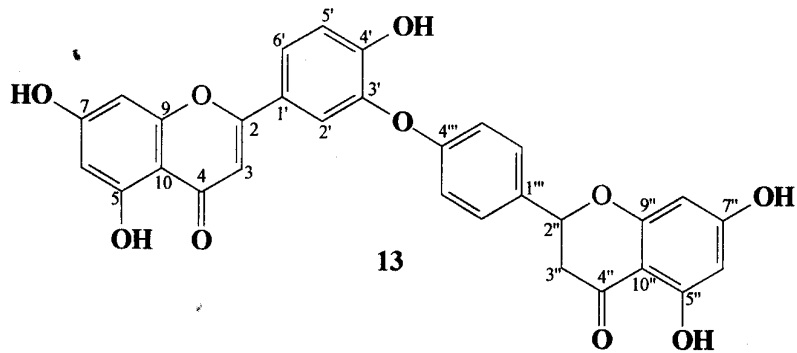


Figura I.51: Espectro de RMN ¹³C APT da substância 13 em D₃CCOCD₃.



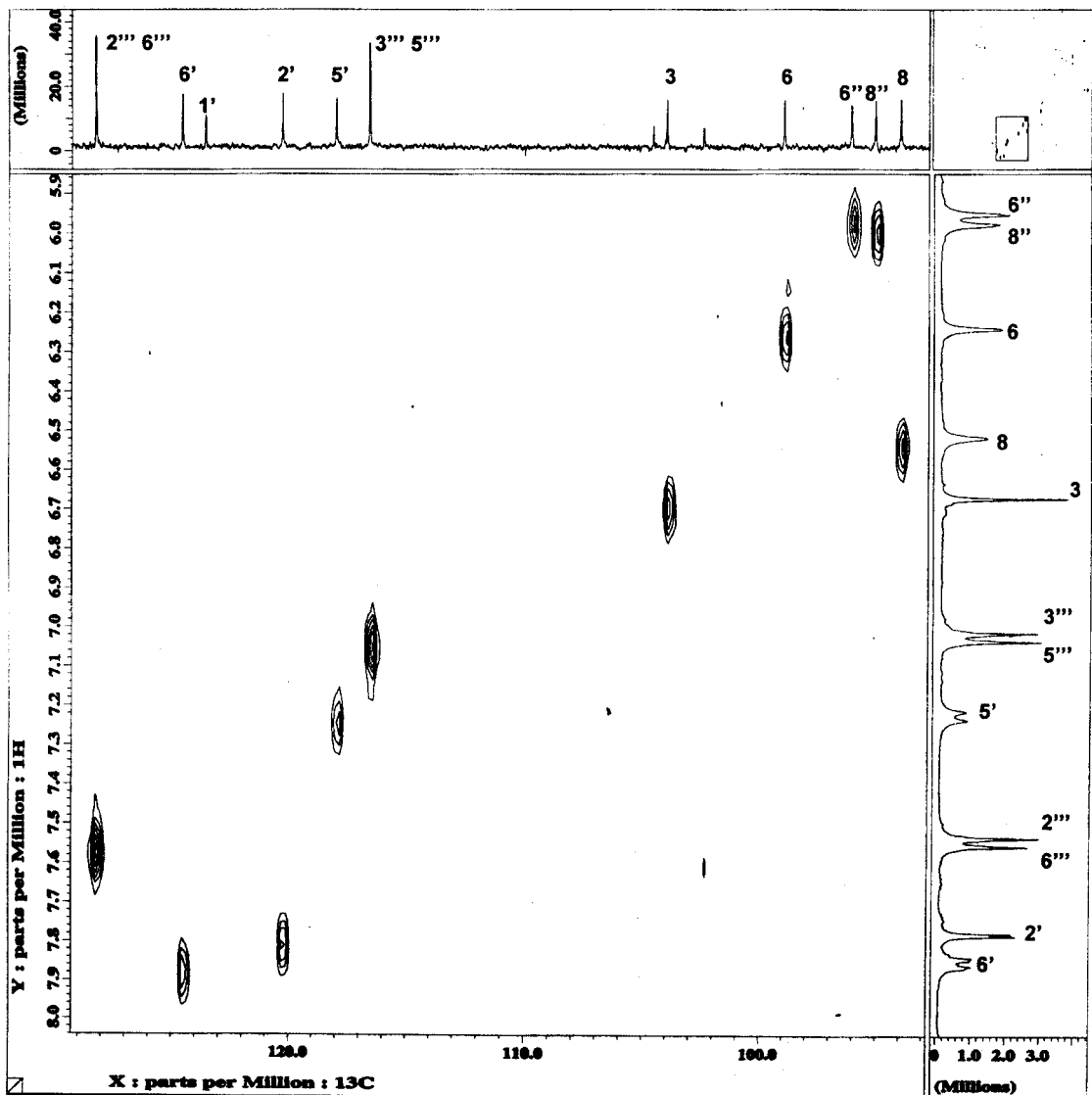
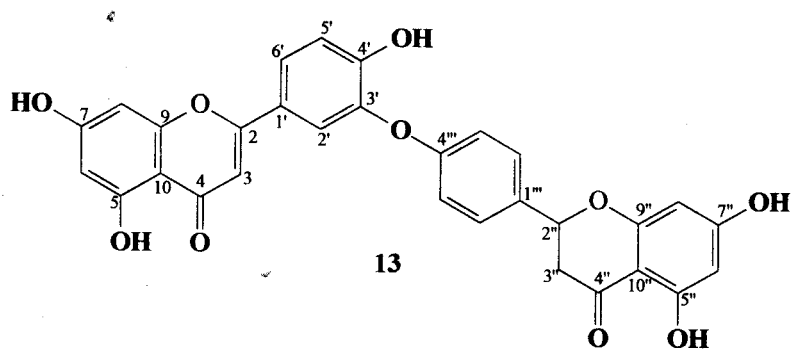


Figura I.52: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio-carbono (^1H , ^{13}C -COSY- $^1\text{J}_{\text{CH}}$, HMQC) da substância 13 expandido na região entre δ 90 a 130 em D_3CCOCD_3 .



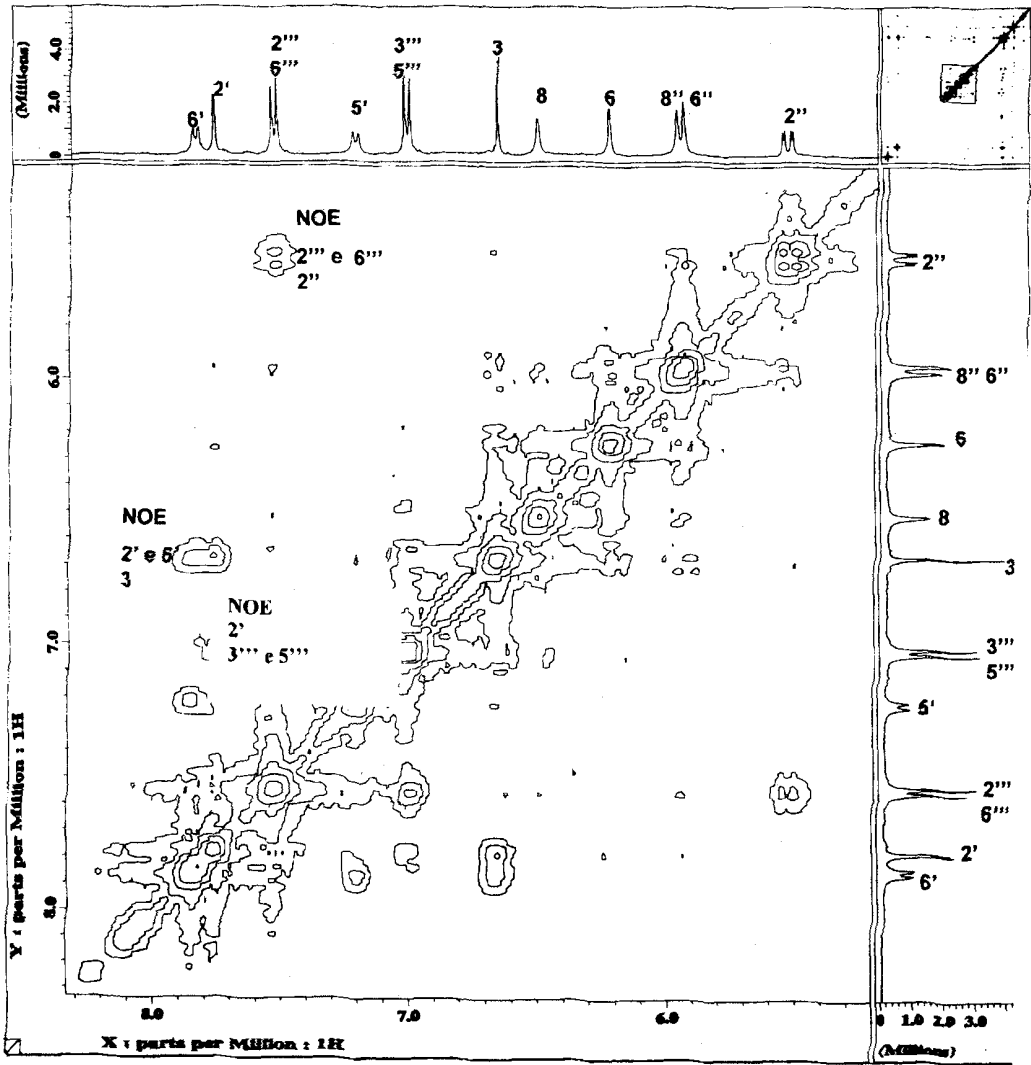
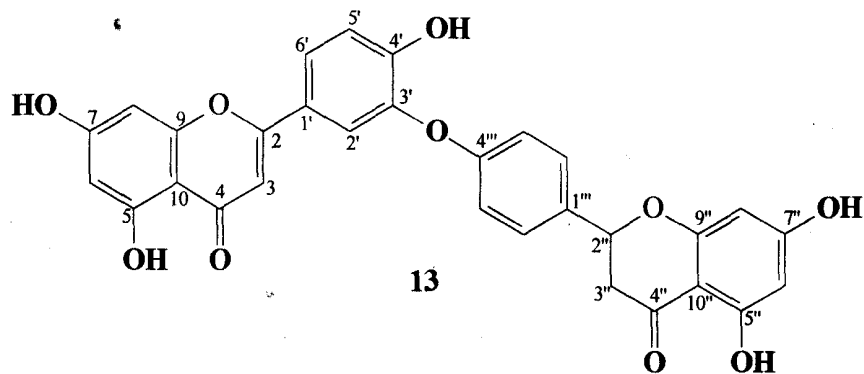


Figura I.53: Espectro bidimensional NOESY expandido na região entre δ 5,3 a 8,3 ppm da substância 13 em D_3CCOCD_3 .



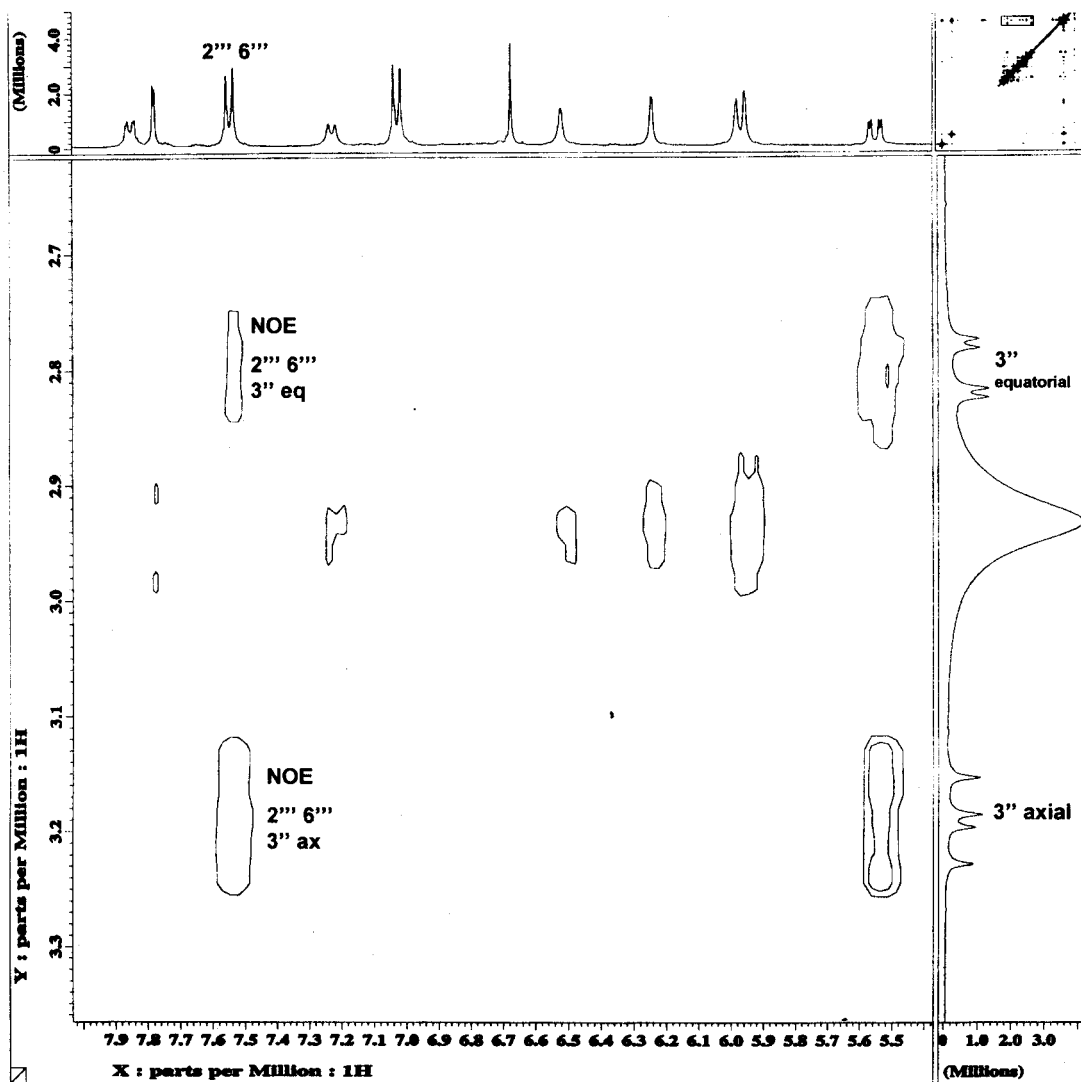


Figura I.54: Espectro bidimensional NOESY expandido na região entre δ 2,7 a 3,3 ppm da substância 13 em D_3CCOCD_3 .

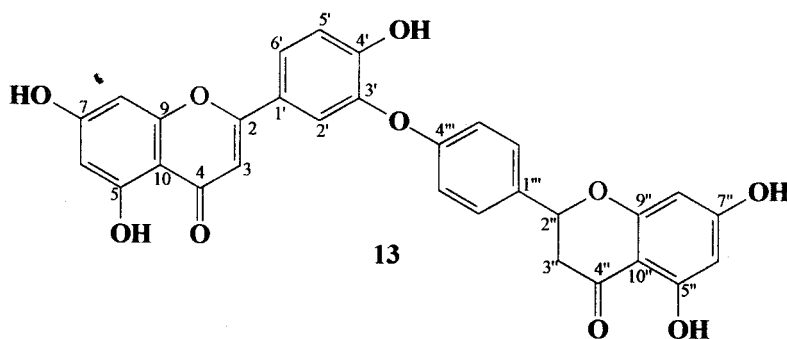


Tabela I.8: Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) do biflavonóide 13 (D_3CCOCD_3) comparados com a 2'',3''-diidroochnaflavona (DMSO-d_6) (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

C	Biflavonóide 13		2'',3''-diidroochnaflavona	
	δ_{C}	δ_{H} (Hz)	δ_{C}	δ_{H}
2	164,98	-	163,94	-
3	104,80	6,68 (s)	103,91	6,62 (s)
4	183,04	-	182,22	-
5	163,35	-	161,80	-
6	99,80	6,25 (s)	99,51	6,11 (d; 2,0)
7	165,31	-	164,80	-
8	94,84	6,53 (s)	94,64	6,37 (d; 2,0)
9	158,77	-	157,82	-
10	105,38	-	104,29	-
1'	124,38	-	122,72	-
2'	121,11	7,79 (d; 2,2)	121,22	7,62 (d; 2,0)
3'	144,02	-	142,88	-
4'	153,91	-	153,84	-
5'	118,82	7,23 (d, 8,4)	118,41	7,06 (d; 7,8)
6'	125,37	7,86 (dd; 8,4 e 2,2)	125,35	7,71 (dd; 7,8 e 2,0)
2''	79,56	5,55 (dd; 12,4 e 2,9)	78,57	5,39 (dd; 12,7 e 6,0)
3''	43,46	2,80 (dd; 17,2 e 2,9) 3,19 (dd; 17,2 e 12,4)	42,38	3,11 (dd; 12,7 e 16,6) 2,66 (dl; 16,6)
4''	196,93	-	196,48	-
5''	164,17	-	163,45	-
6''	96,96	5,96 (s)	96,58	5,81 (d; 2,0)
7''	167,43	-	167,14	-
8''	95,94	5,99 (s)	95,62	5,82 (d; 2,0)
9''	163,35	-	163,28	-
10''	105,38	-	102,30	-
1'''	134,18	-	132,77	-
2'''	129,10	7,55 (d; 8,8)	128,80	7,36 (d; 7,8)
3'''	117,39	7,03 (d; 8,8)	116,30	6,83 (d; 7,8)
4'''	159,08	-	158,45	-
5'''	117,39	7,03 (d; 8,8)	116,30	6,83 (d; 7,8)
6'''	129,10	7,55 (d; 8,8)	128,80	7,36 (d; 7,8)
HO-5,5''	-	12,13 e 12,93	-	11,99 e 12,71

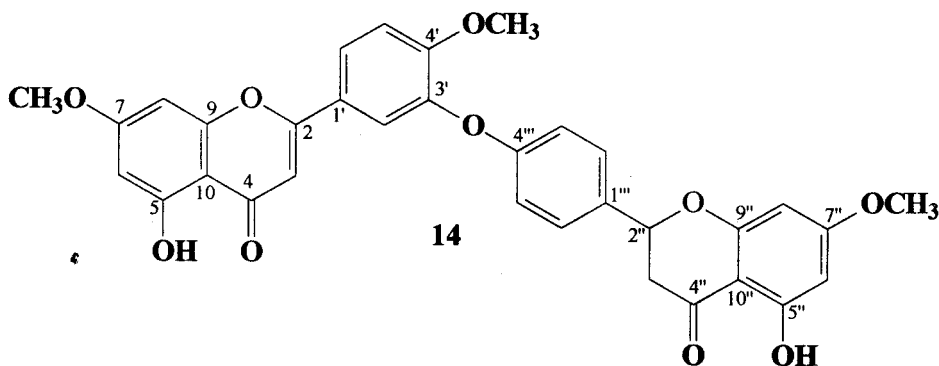
h) Identificação da 2'',3''-diidroochnaflavona metilada (14).

O espectro de RMN¹H (Figura I.55) do derivado metilado **14** mostra dois sinais de hidroxila em campo baixo a δ_H : 12,01 e 12,71, indicando a presença de duas hidroxilas queladas e três sinais em δ_H : 3,81; 3,87; 3,93 correspondentes as metoxilas 4', 7 e 7''.

As figuras I.56 *a-e* representam expansões do espectro de RMN¹H (Figura I.55) com as atribuições dos deslocamentos químicos dos respectivos hidrogênios de 4',7,7''-trimetil-diidroochnaflavona. A formação deste produto com tratamento com diazometano confirma a proposta do dímero. Se fosse mistura de dois flavonóides o espectro de RMN do produto metilado apresentaria cinco metoxilas. Outra informação deduzida com este produto é a confirmação da ligação 3'-O-4''' entre as duas unidades. Se houvesse OCH₃ em 3' o δ_C do CH-2' seria menor do que δ 119,4 ppm, devido ao efeito γ deste grupo. A semelhança dos δ_H e δ_C de **14** e os valores da literatura (Tabela I.9, página 102) confirma a proposta estrutural.

O espectro de RMN ¹³C PND (Figura I.57, Figura I.58 e Figura I.59) da substância **14** mostra 28 sinais, incluindo dois sinais em δ_C : 127,85 e 117,10, que correspondem a dois carbonos cada, oito carbonos sp² (CH), cinco carbonos sp³ em δ_{CH} : 78,80, δ_{CH_2} : 43,28 e três metoxilas em δ : 55,70, 55,81 e 56,27 catorze carbonos sp² quaternários (4 C e 10 C-O) e dois grupos carbonílicos em δ_C : 182,29 e 195,71.

Além desses dados, podemos comprovar a formação do produto **14** através dos valores dos carbonos C-5', C-6, C-6'', C-8, C-8'' que estão com deslocamento químico menores quando comparados com o biflavonóide original **13**, devido à proteção gama das metoxilas 4', 7, 7'' (Tabela I.9, página 102).



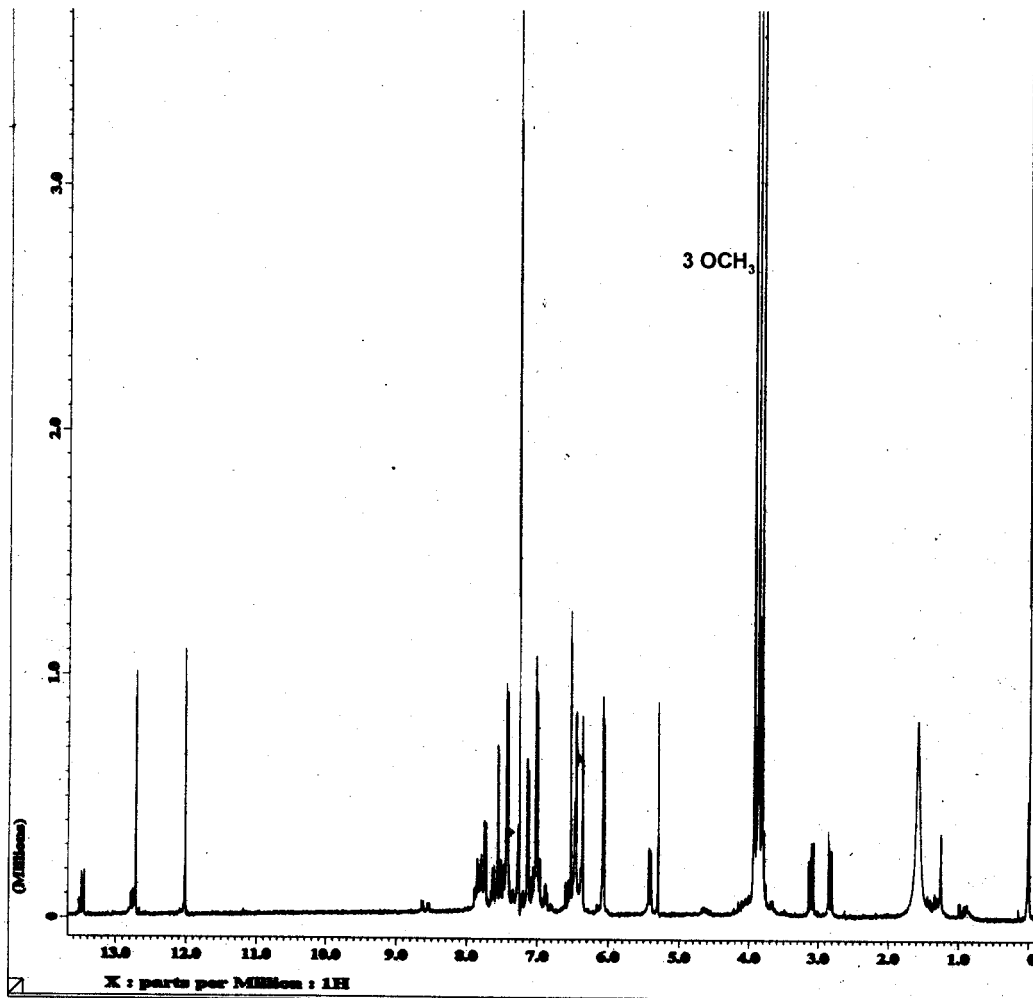
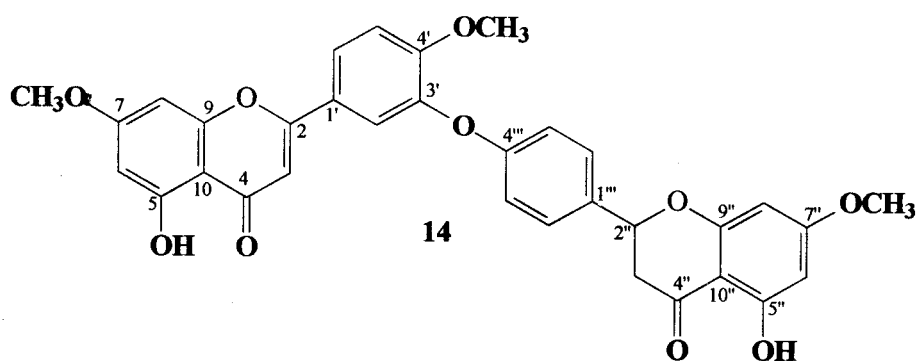


Figura I.55: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) do derivado 14 em CDCl_3 .



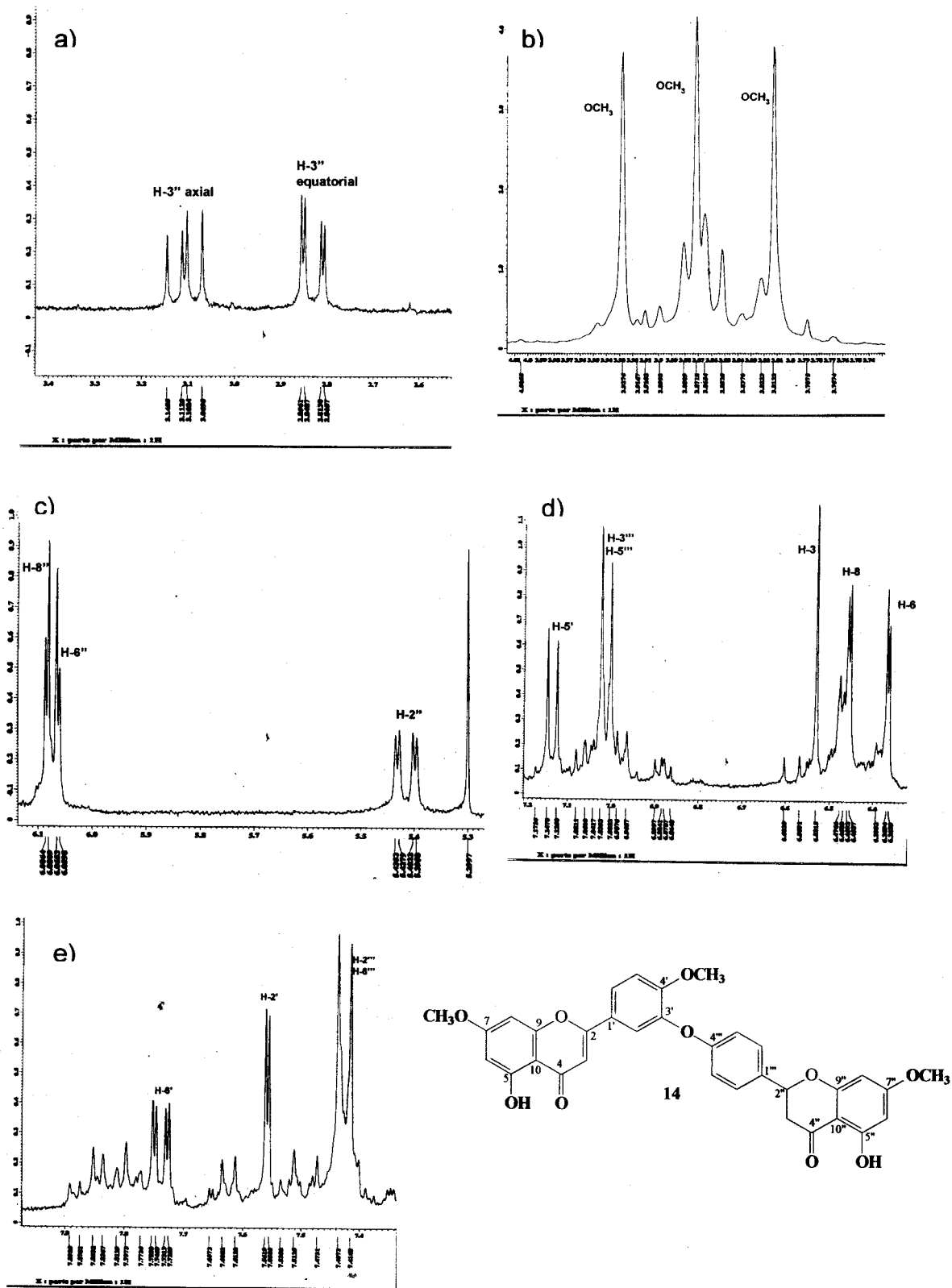


Figura I.56: Espectros de RMN ^1H (400 MHz) expandidos (a, b, c, d, e) da substância 14 em CDCl_3 .

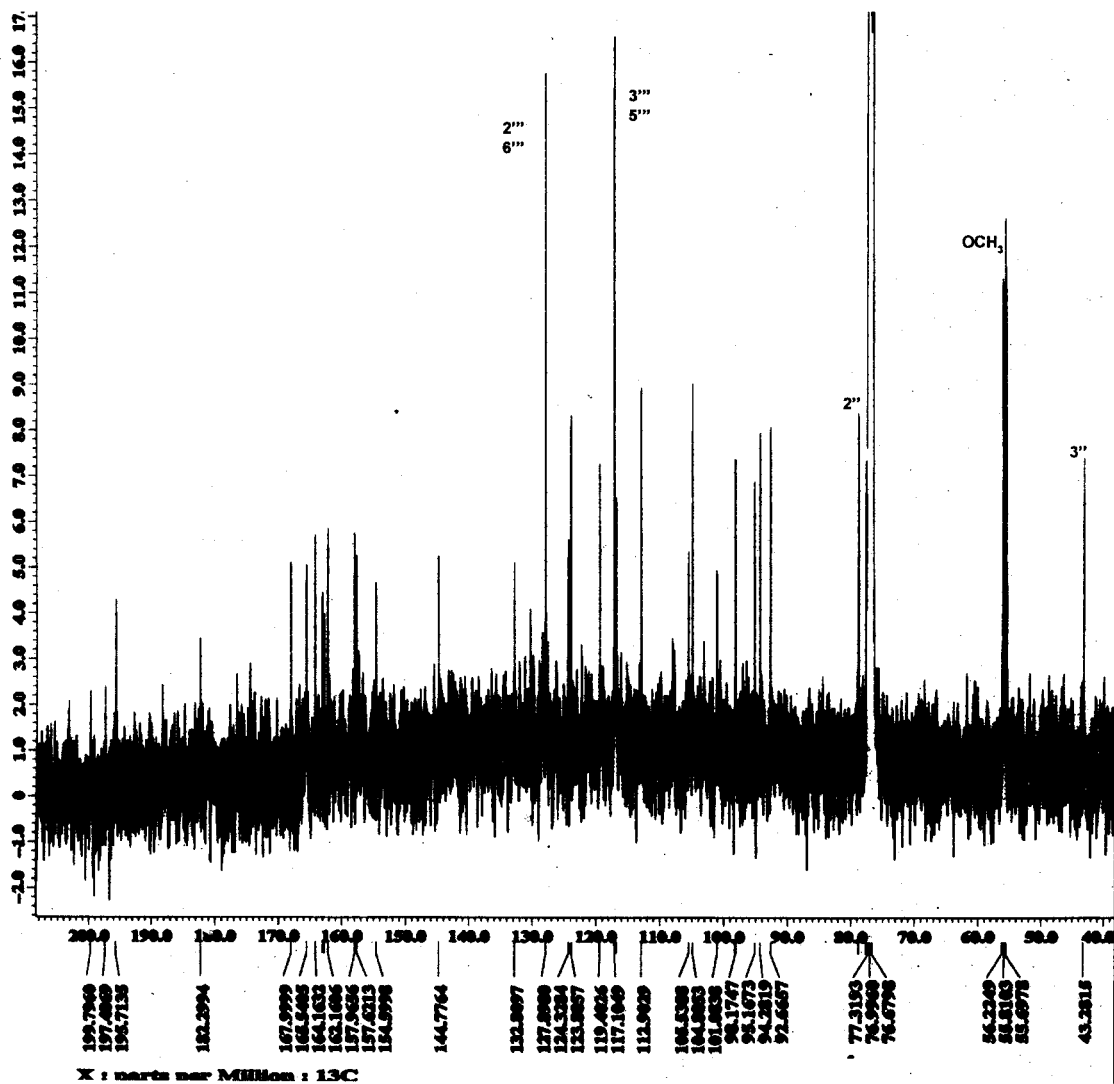
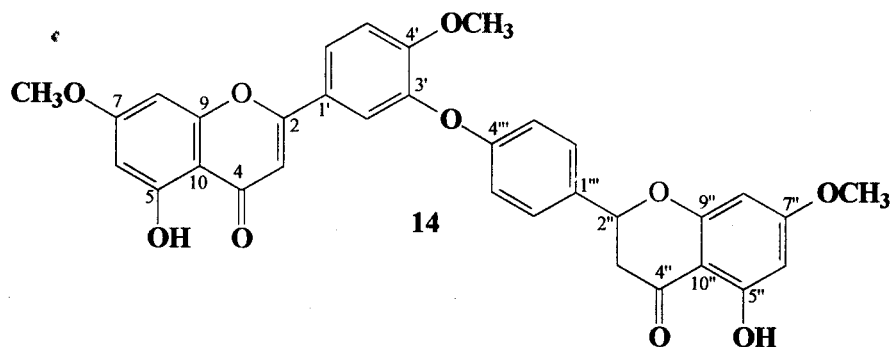


Figura I.57: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) da substância 14 em CDCl_3 .



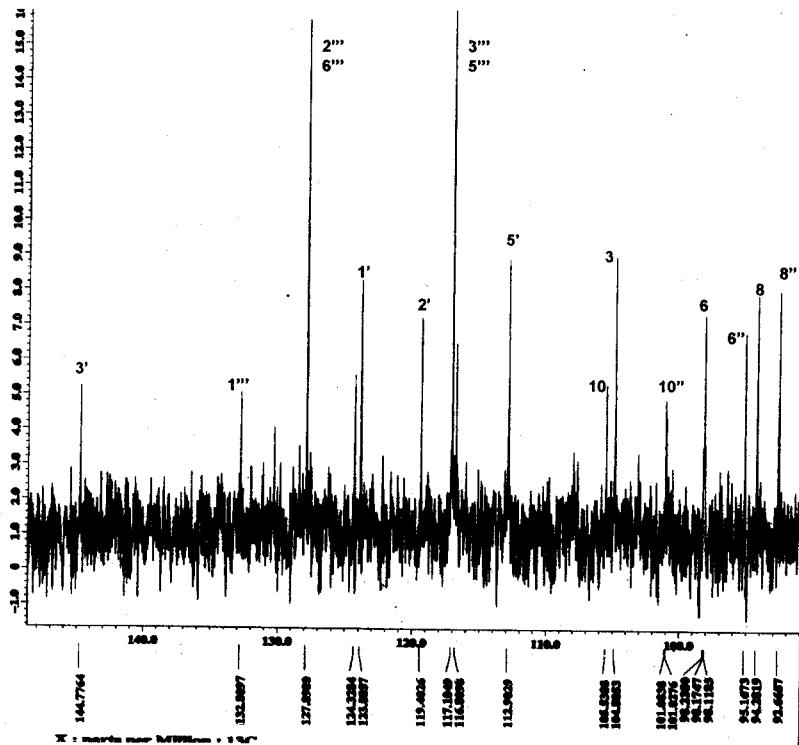


Figura I.58: Espectro de RMN ^{13}C expandido entre δ 92 a 145 ppm da substância 14 em CDCl_3 .

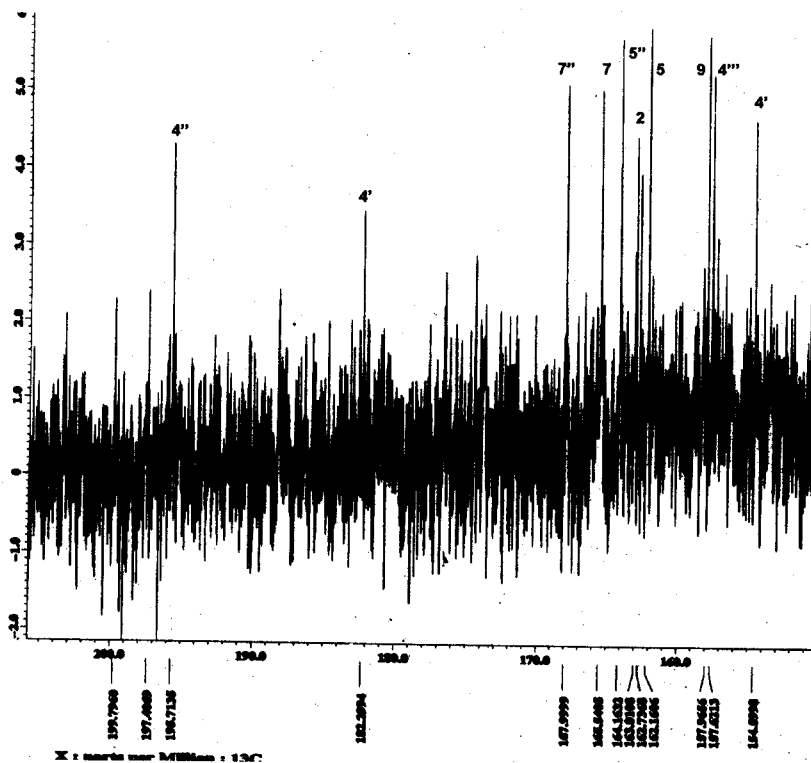


Figura I.59: Espectro de RMN ^{13}C expandido entre δ 154 a 200 ppm da substância 14 em CDCl_3 .

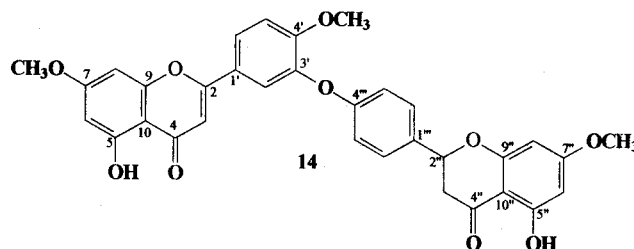


Tabela I.9: Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) do biflavonóide **14** (CDCl_3) comparados com a trimetil-2'',3''-diidrochnaflavona (CDCl_3) (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

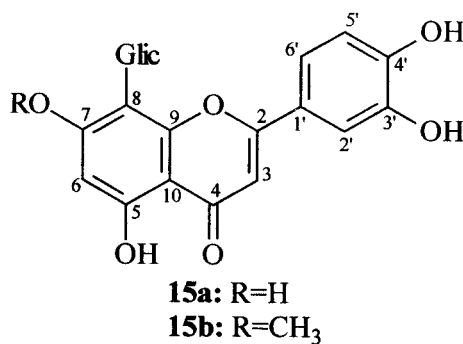
C	Derivado 14		Trimetil-2'',3''- diidrochnaflavona	
	δ_{C}	δ_{H} (Hz)	δ_{C}	δ_{H}
2	163,01	-	162,54	-
3	104,88	6,53 (s)	106,75	6,51 (s)
4	182,30	-	182,64	-
5	162,16	-	158,97	-
6	98,17	6,37 (d; 2,2)	98,36	6,50 (s)
7	165,54	-	164,71	-
8	94,28	6,46 (d; 2,2)	94,15	6,17 (s)
9	157,96	-	158,00	-
10	105,54	-	106,00	-
1'	123,89	-	123,00	-
2'	119,40	7,55 (d; 2,2)	120,75	7,64 (s)
3'	144,78	-	143,00	-
4'	154,60	-	153,69	-
5'	112,9	7,13 (d; 8,8)	113,85	7,21 (d; 8,0)
6'	124,33	7,74 (dd; 8,8 e 2,2)	125,12	7,80 (d; 8,0)
2''	78,80	5,41 (dd; 13,2 e 2,9)	75,17	5,42 (dl; 12,0)
3''	43,28	2,83 (dd; 17,2 e 2,9) 3,11 (dd; 17,2 e 13,2)	43,01	2,70 (dl; 16,0) 3,04 (dd; 12,0 e 16,0)
4''	195,71	-	196,84	-
5''	164,16	-	163,85	-
6''	95,17	6,06 (d; 2,2)	95,03	5,92 (s)
7''	168,00	-	168,39	-
8''	92,67	6,08 (d; 2,2)	92,83	5,89 (s)
9''	162,74	-	166,19	-
10''	101,03	-	101,00	-
1'''	132,81	-	131,51	-
2'''	127,89	7,43 (d; 8,8)	128,56	7,38 (d; 8,0)
3'''	117,10	7,01 (d; 8,8)	116,32	6,83 (d; 8,0)
4'''	157,62	-	155,69	-
5'''	117,10	7,01 (d; 8,8)	116,32	6,83 (d; 8,0)
6'''	127,89	7,43 (d; 8,8)	128,56	7,38 (d; 8,0)
MeO-7	55,70	3,93	55,38	3,78 (s)
MeO-4'	56,22	3,81	56,11	3,70 (s)
MeO-7''	55,81	3,87	55,76	3,77 (s)
HO-5, 5''	-	12,01 e 12,71	-	11,88 e 12,66

g) Identificação da mistura de flavonóides C-glicosilados **15a** e **15b**.

Os espectros de RMN¹H (Figura I.61) da fração contendo **15** apresentou quatro sinais simples de δ_H dos hidrogênios do anel A e do H-3 de flavonóides. O espectro (Figura I.61) mostra os sinais em δ 6,22 e 6,62 com menor intensidade do que os sinais δ 6,52 e 6,68. Isto revela a presença de dois componentes com diferentes grupos substituintes. O sinal em δ 3,88 (s) no espectro de RMN¹H representa um grupo metoxila e o dubleto em δ 4,71 (9,9 Hz) pode ser atribuído ao hidrogênio do carbono 1'' de um C-glicosídeo. Os sinais entre δ 63,2 e δ 82,9 no espectro de RMN¹³C permitem sugerir a presença de uma unidade de açúcar na molécula. A intensidade destes sinais comparada com os demais δ_{CH} da amostra permite propor um mistura de substâncias contendo o mesmo carboidrato.

A comparação destes valores com os deslocamentos químicos de modelos da literatura (**Mod-1**, **Mod-2**, **Mod-3**, **Mod-4**, Tabela I.10, página 105) permitiu verificar que **15a** e **15b** estão compatíveis com os modelos **Mod-4** e **Mod-2**, respectivamente (Tabela I.11 página 106). Os demais sinais são compatíveis com os valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios do sistema ABC do anel B de flavonóides dioxigenados. A mesma comparação foi feita com os valores de δ_C (BBD e DEPT, Figuras I.62, I.63 e I.64) da mistura com os valores dos padrões da literatura (CHENG *et al.*, 2000, PALME *et al.*, 1994 e AGRAWAL *et al.*, 1989). Os δ_C e δ_{CH} em 106,2, 99,6 e 96,0 são próximos dos δ_C e δ_{CH} dos padrões (**Mod-4** e **Mod-2**), respectivamente. A unidade de C-glicose foi proposta através de comparação dos δ_{CH} de **15** com valores descrito na literatura Tabela I.11 (PALME *et al.*, 1994). Desta comparação pode-se propor para **15a** e **15b** as estruturas da 5,7,3',4'-tetraidroxi-8-C-glicopiranosil-flavona e 5,3',4'-triidroxi-7-metoxi-8-C-glicopiranosil-flavona, respectivamente.

O espectro de RMN¹H (Figura I.65) e de ¹³C (Figura I.66) é de uma fração seguinte a que contém a mistura de **15**. Os sinais em δ_H 6,22 (H-6), 6,61 (H-3), δ_{CH} 99,7 (C-6) e δ_C 103,6 (C-3 e C-8) são mais intensos nos espectros de RMN¹H e ¹³C respectivamente, sendo portanto, **15a** o componente em maior quantidade nesta fração.



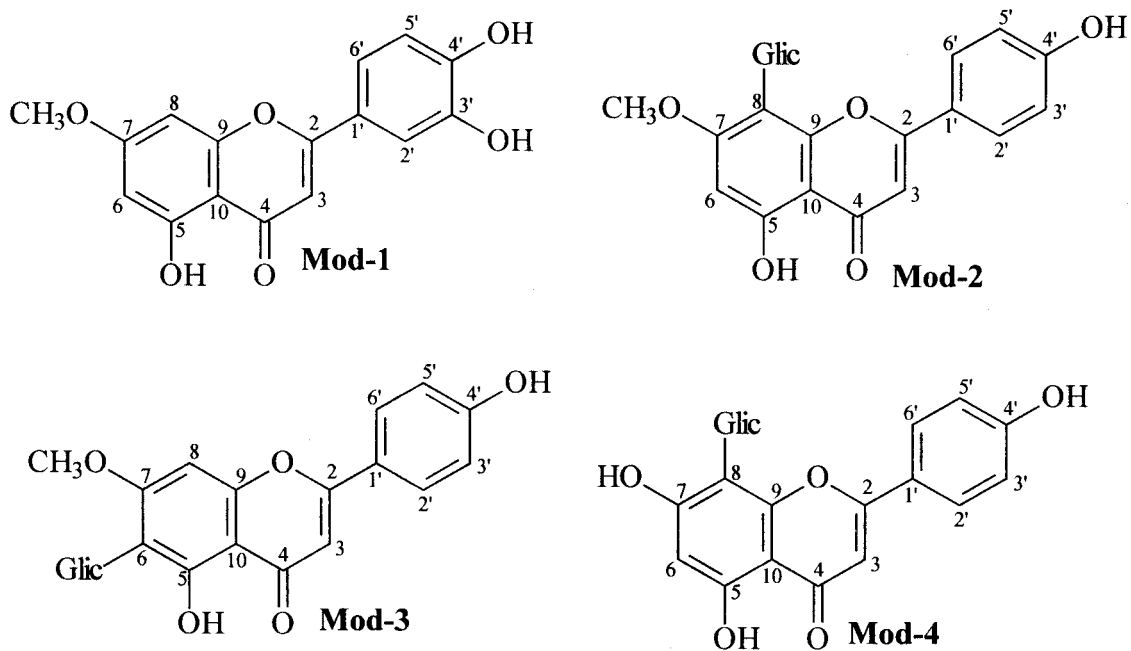
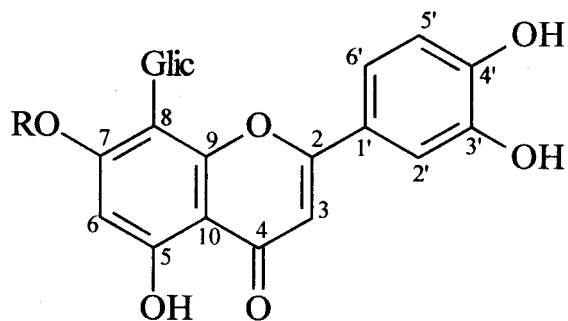


Figura I.60: Modelos de substâncias usados para comparar com a mistura de substâncias da fração 15.



15a: R=H

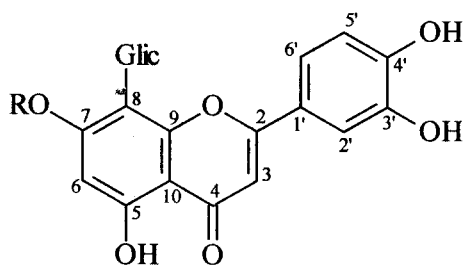
15b: R=CH₃

Tabela I.10: Dados de RMN¹H e ¹³C dos modelos: Mod-1 (AGRAWAL *et al.*, 1989 e AGRAWAL *et al.*, 1981), Mod-2 (DMSO-d₆) (CHENG *et al.*, 2000), Mod-3 (DMSO-d₆) (CHENG *et al.*, 2000), Mod-4 (PALME *et al.* 1994).

C	Mod-1		Mod-2		Mod-3		Mod-4	
	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C
2	-	164,5	-	163,5	-	163,7	-	165,3
3	<u>6,69</u>	<u>103,3</u>	<u>6,46 (s)</u>	<u>102,7</u>	<u>6,83 (s)</u>	<u>103,0</u>	<u>6,60 (s)</u>	<u>102,6</u>
4	-	182,2	-	182,3	-	181,8	-	182,8
5	-	161,0	-	161,2	-	159,5	-	160,8
6	<u>6,22</u>	<u>99,2</u>	<u>6,77 (s)</u>	<u>95,1</u>	-	<u>109,6</u>	<u>6,23 (s)</u>	<u>99,0</u>
7	-	164,7	-	164,3	-	164,9	-	162,1
8	<u>6,47</u>	<u>93,0</u>	-	<u>104,9</u>	<u>6,86 (s)</u>	<u>90,1</u>	-	<u>104,3</u>
9	-	162,2	-	155,3	-	156,7	-	160,9
10	-	104,4	-	104,3	-	104,1	-	104,3
1'	-	123,5	-	121,7	-	121,0	-	121,9
2'	7,43	113,8						
3'	-	146,2						
4'	-	150,1	-					
5'	6,92	116,4						
6'	7,44	122,1						
1''	-		4,82 (d, 10,0 Hz)					73,6
2''	-							71,0
3''	-							78,7
4''	-							71,5
5''	-							81,9
6''	-							61,2
OCH ₃	56,0		3,84 (s)	56,0		56,2	-	-

Tabela I.11: Dados de RMN ^1H (400 MHz) (DMSO-d_6) e ^{13}C (50 MHz) (metanol- d_4) da mistura dos flavonóides **15a** e **15b** comparados com os modelos **Mod-4** e **Mod-2**, respectivamente.

C	15a		Mod 4	15b		Mod 2
	δ_{H} Hz	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
2	-	166,5	165,3	-	166,9	163,5
3	6,62 (s)	<u>103,5</u>	<u>102,6</u>	6,52 (s)	<u>103,5</u>	<u>102,7</u>
4	-	184,0	182,8	-	184,2	182,3
5	-	162,6	160,8	-	163,4	161,2
6	6,22 (s)	<u>99,6</u>	<u>99,0</u>	6,68 (s)	<u>96,0</u>	<u>95,1</u>
7	-	165,5	162,1	-	165,2	164,3
8	-	<u>106,2</u>	<u>104,3</u>	-	<u>106,2</u>	<u>104,9</u>
9	-	157,2	160,9	-	157,2	155,3
10	-	106,0	104,3	-	106,0	104,3
1'	-	123,7		-	123,7	
2'	7,48 (d, 2,0)	114,9		7,48 (d, 2,0)	114,9	
3'	-	147,0		-	147,0	
4'	-	151,0		-	151,2	
5'	6,84 (d, 8,4)	116,7		6,84 (d, 8,4)	116,7	
6'	7,54 (dd, 2,0 e 8,4)	121,0		7,54 (dd, 2,0 e 8,4)	121,0	
1''	4,71 (d, 9,9)	75,1	73,6	4,71 (d, 9,9)	75,1	
2''		72,2	71,0		72,2	
3''		80,3	78,7		80,3	
4''		72,8	71,5		72,8	
5''		82,9	81,9		82,9	
6''		63,2	61,2		63,2	
OCH ₃	-	-	-	3,88 (s)	56,9	56,0



15a: R=H
15b: R=CH₃

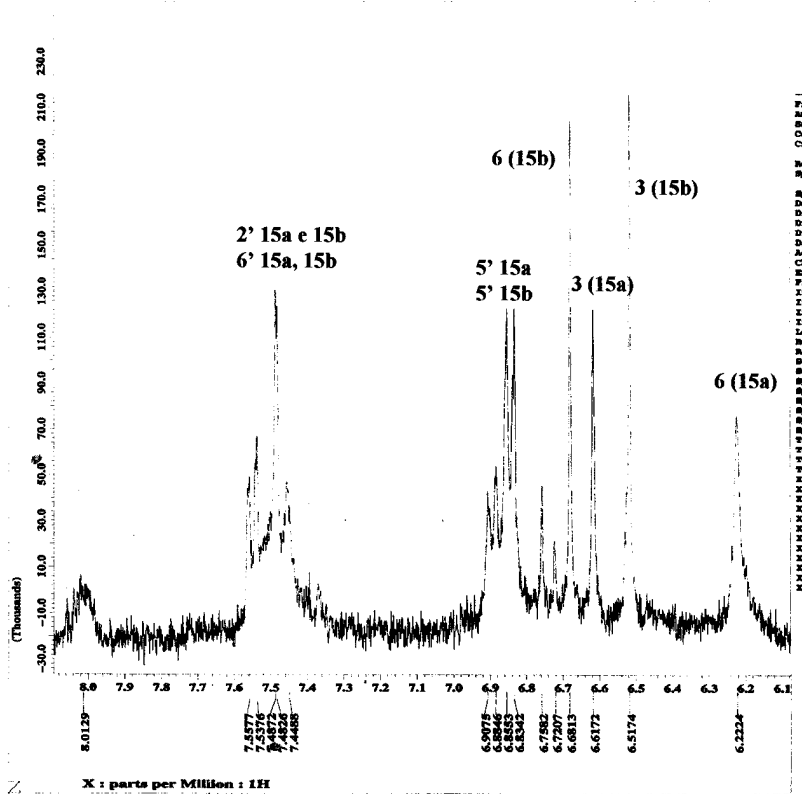
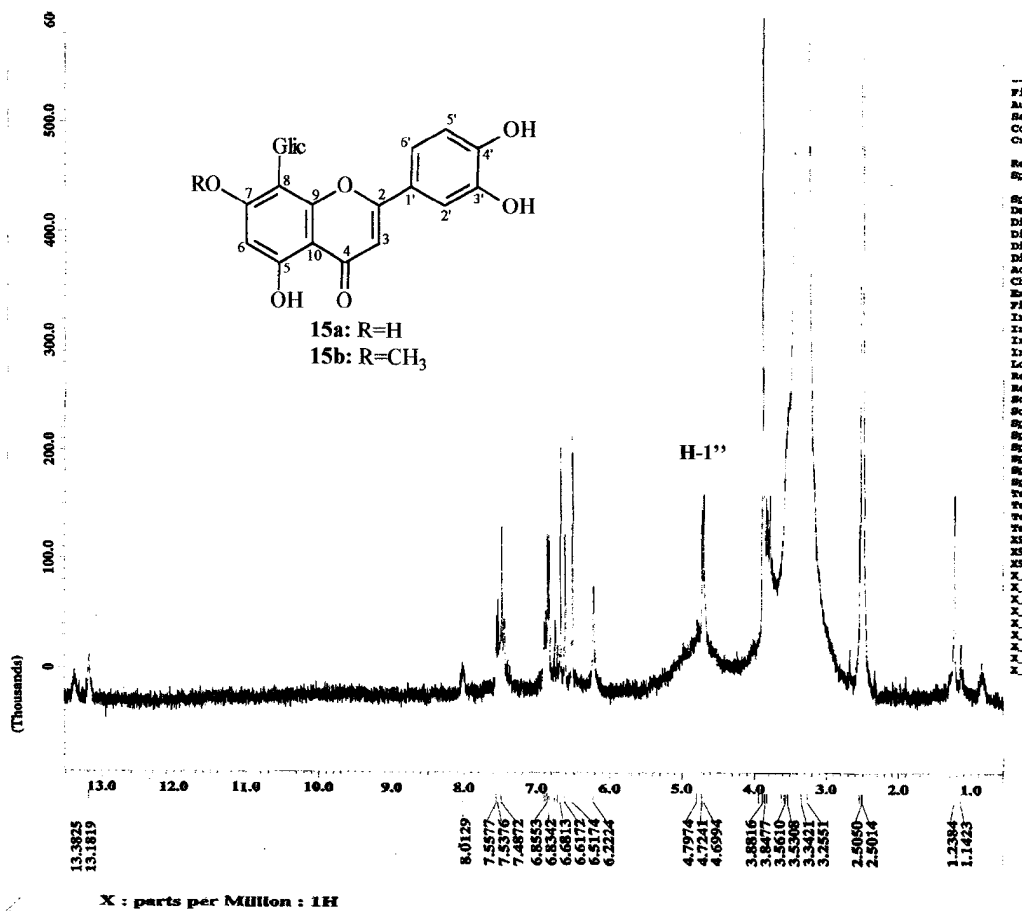


Figura I.61: Espectro de RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆) da mistura das substâncias 15a e 15b.

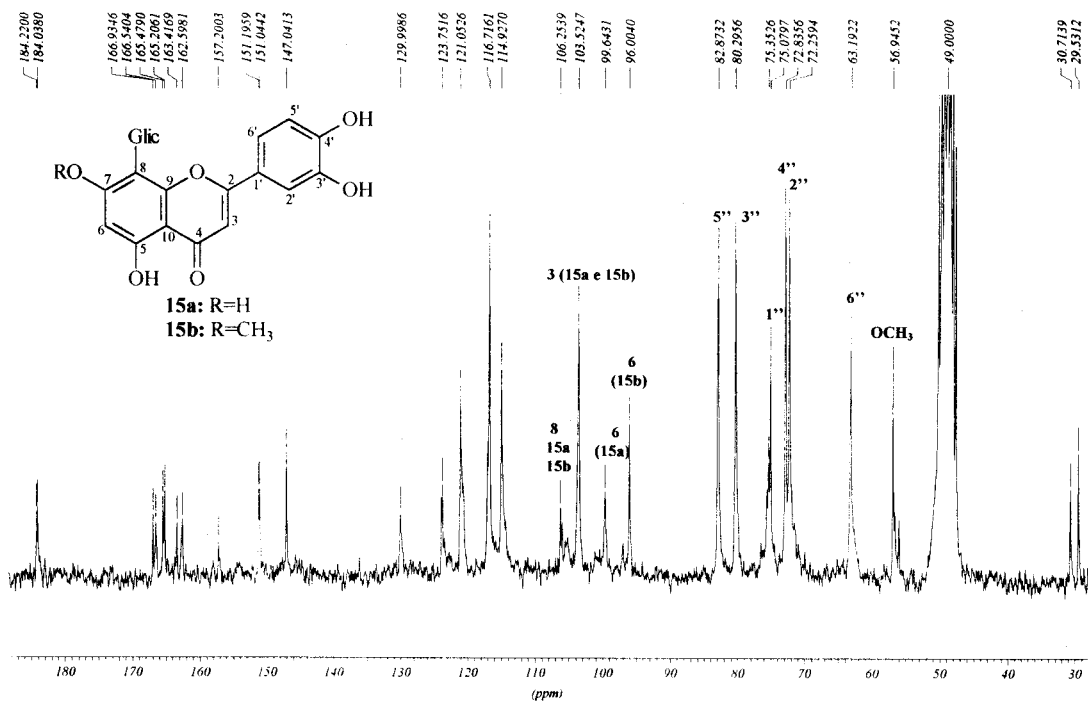


Figura I.62: Espectro de RMN¹³C (50 MHz, metanol-d₄) da mistura das substâncias 15a e 15b.

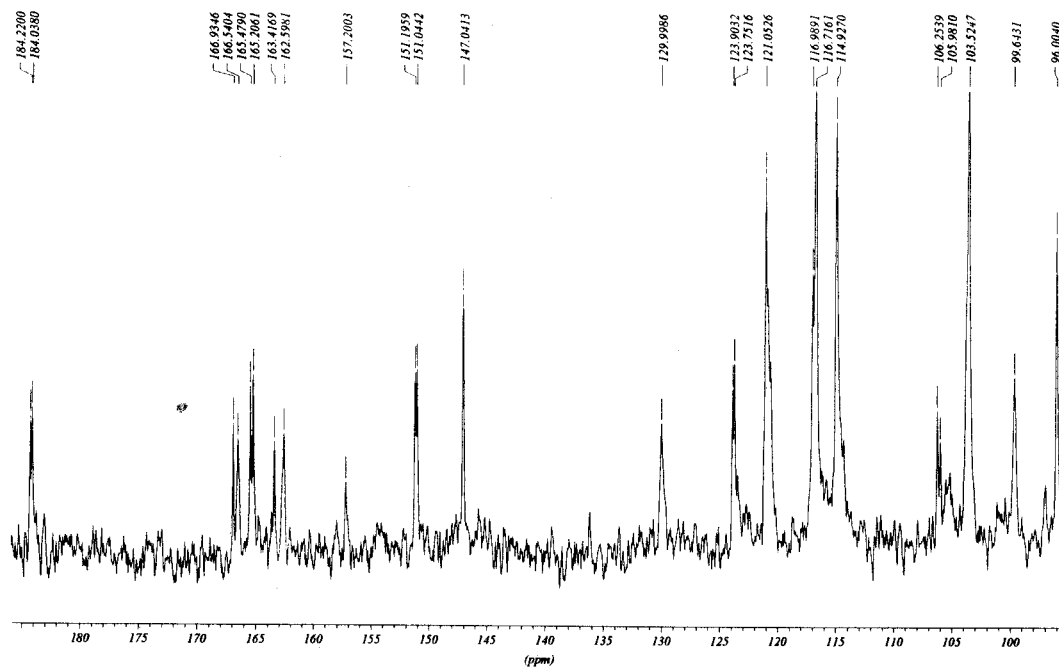


Figura I.63: Espectro de RMN¹³C ampliado entre 96-185 ppm (50 MHz, metanol-d₄) da mistura das substâncias 15a e 15b.

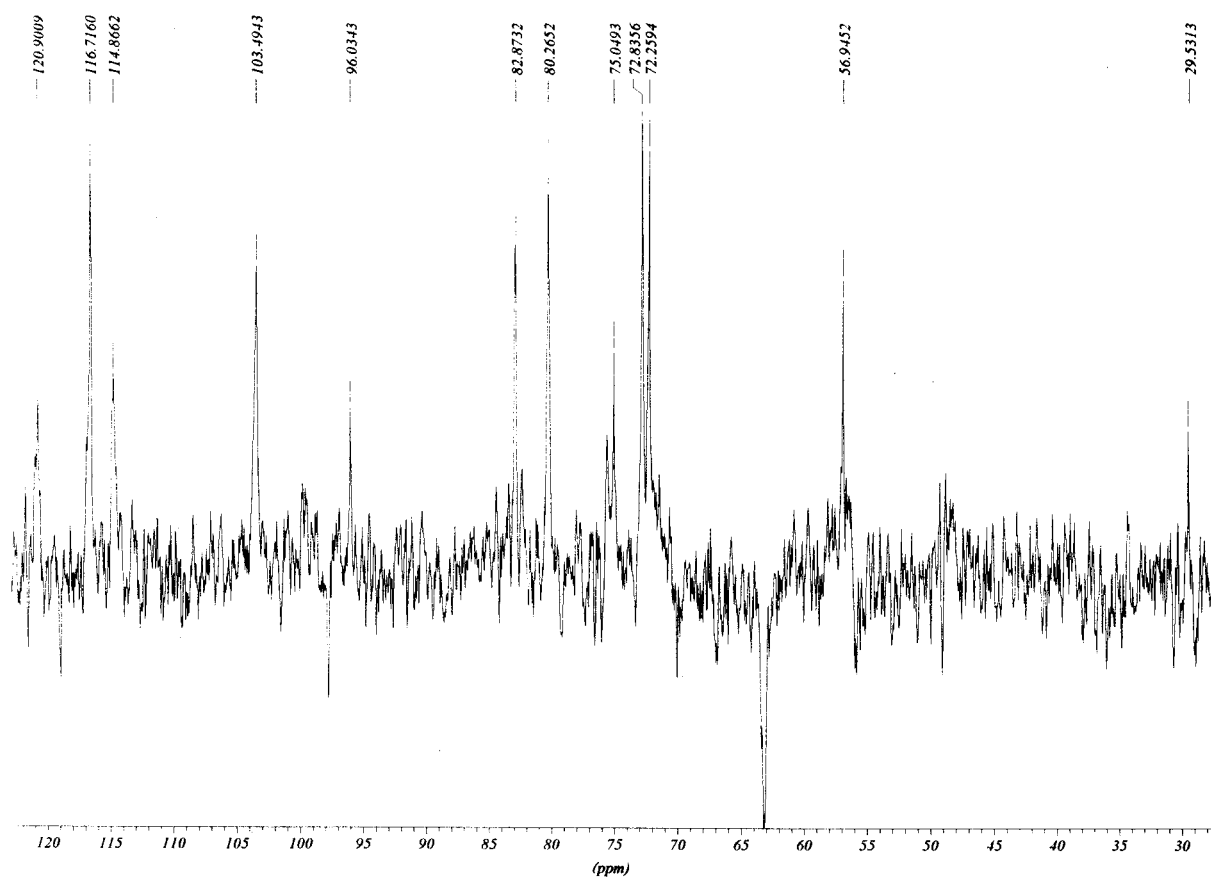
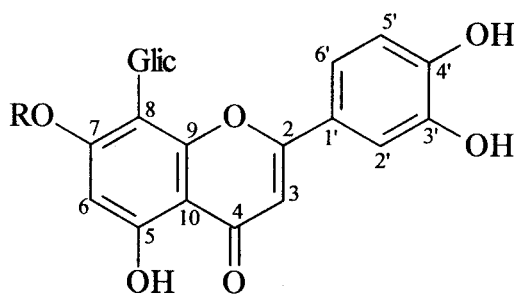
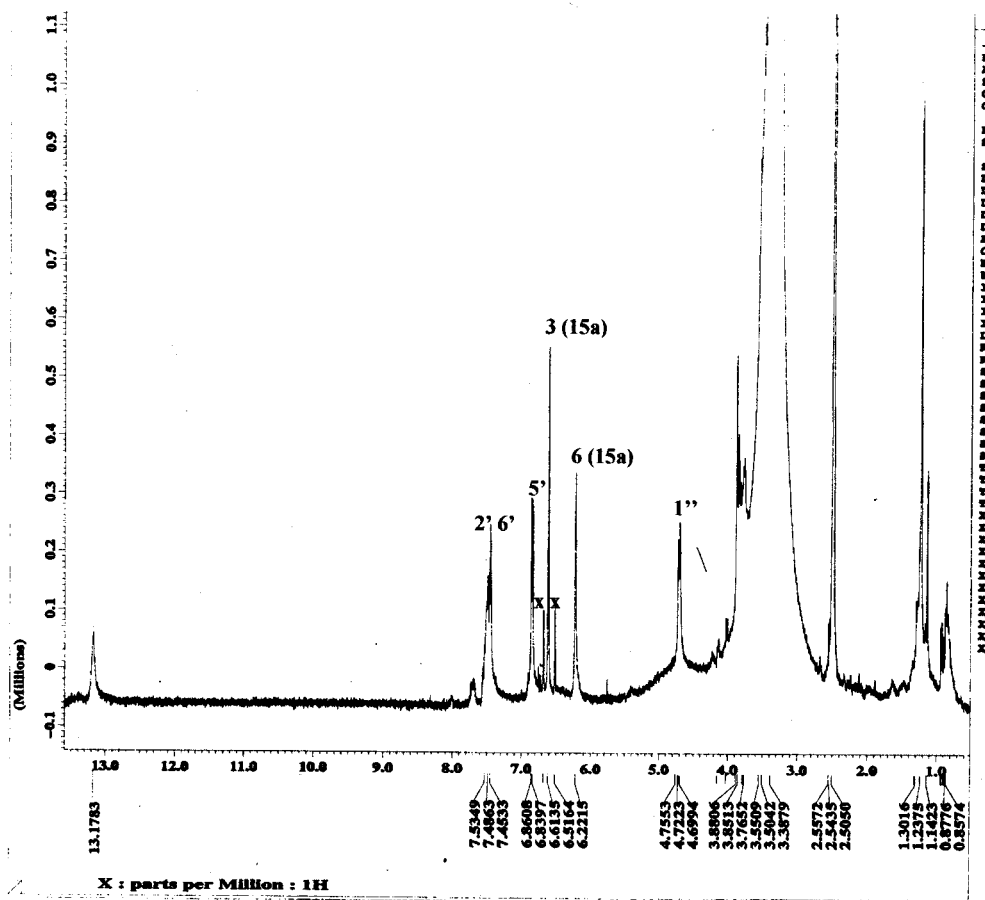


Figura I.64: Espectro de RMN¹³C DEPT ($\theta=135$, 50 MHz) da mistura das substâncias **15a** e **15b** em metanol-d₄.



15a: R=H

15b: R=CH₃



x impureza (15b)

Figura I.65: Espectro de RMN¹H (400 MHz, DMSO-d₆) da substância 15a.

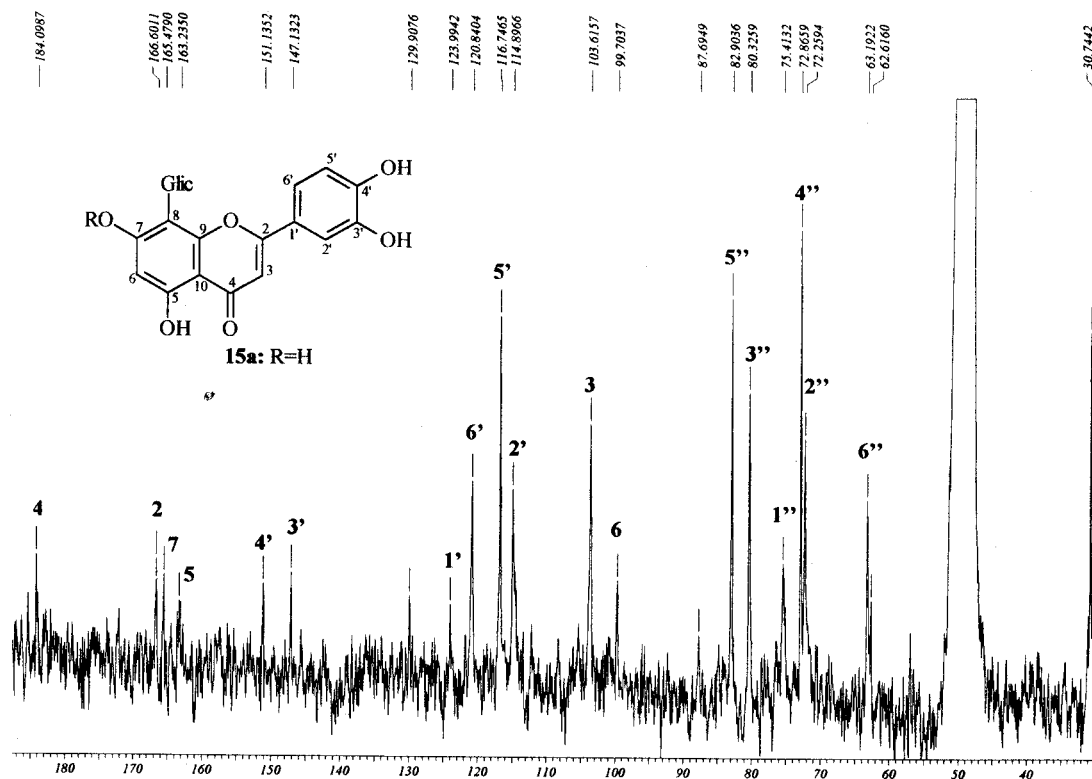


Figura I.66: Espectro de RMN¹³C (50 MHz, metanol-d₄) da substância 15a.

I-4. Referências – Capítulo I

- ACHENBACH, H.; STÖCKER, M.; CONSTENLA, M. A. Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca*. *Phytochemistry*, **27** (6), 1835-1841, 1988.
- AGRAWAL, P. K. Methods in signal assignement. In: "Carbon-13 NMR of Flavonoids", Studies in Organic Chemistry-39, 298, Ed. Elsevier, Amsterdam, 1989.
- AGRAWAL, P. K.; RASTOGI, R. P. ^{13}C NMR Spectroscopy of flavonoids. *Heterocycles*, **16** (12), 2181-2236, 1981.
- AHMAD, V. U.; RAHMAN, A. Pentacyclic triterpenoids. In: "Handbook of Natural Products data", volume 2, 1038 e 1102, Ed. Elsevier, Amsterdam, 1994.
- ALVES, C. C.F.; SANTOS, V. M. R. dos; CARVALHO, M. G. de; SCHRIPSEMA, J. O completo assinalamento de RMN ^1H e ^{13}C de novos derivados da luxenchalcona isolada de *Luxemburgia octandra*. *Rev. Univ. Rural, Sér. Ciênc. Exatas e da Terra*, 2003 (submetido).
- BARRERO, A. F.; HERRADOR, M. M.; ARTEAGA, P.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, I.; GARCÍA-MORENO, M. Resorcinol derivatives and flavonoids of *Ononis natrix* Subspecies *ramosissima*. *J. Nat. Prod.*, **60** (2), 65-68, 1997.
- BILIA, R. A.; MENDEZ, J.; MORELLI, I. Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania carii*. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, **71**, 191-197, 1996.
- CARVALHO, M. G. DE; ALVES, C. C. F.; SILVA, K. G. S. Luxenchalcone, a new bichalcone from *Luxemburgia octandra*. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2003 (in press).
- CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R. Novas técnicas de RMN e os deslocamentos químicos dos átomos de ^1H e ^{13}C da isoflavana Duartina. *Química Nova*, **16** (2), 89-94, 1993.
- CHENG, G.; BAI, Y.; ZHAO, Y.; TAO, J.; LIU, Y.; TU, G.; MA, L.; LIAO, N.; XU, X. Flavonoids from *Ziziphus jujuba* Mill var. *spinosa*. *Tetrahedron*, **56**, 8915-8920, 2000.
- IINUMA, M.; MIZUNO, M. Natural occurrence and synthesis of 2'-oxygenated flavones, flavonols, flavanones and chalcones. *Phytochemistry*, **28** (3), 681-694, 1989.
- KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Constituents of the Labiatae plants.5. Sterol glucosides from *prunella vulgaris*. *Phytochemistry*, **29** (7), 2351-2355, 1990.
- OLIVEIRA, M. C. C. D. de; CARVALHO, M. G. de; SILVA, C. J. da; WERLE, A. A. New biflavonoid and other constituents from *Luxemburgia nobilis* (EICHL). *J. Braz. Chem. Soc.*, **13** (1), 119-123, 2002.

OLIVEIRA, M. C. C. de. Estudo Químico de *Luxemburgia nobilis* EICHL, Tese de doutorado-Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2000.

PALME, E.; BILIA, A. R.; DE FEO, V.; MORELLI, I. Flavonoid glycosides from *Cotoneaster thymaefolia*. *Phytochemistry*, **35** (5), 1381-1382, 1994.

RAMADAN, M. A.; KAMEL, M. S.; OHTANI, K.; KASAI, R.; YAMASAKI, K. Minor phenolics from *Crinum bulbispermum* bulbs. *Phytochemistry*, **54**, 891-896, 2000.

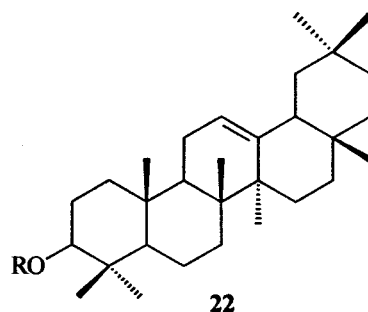
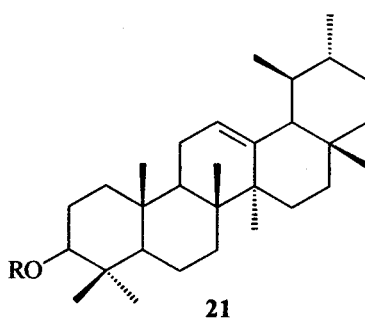
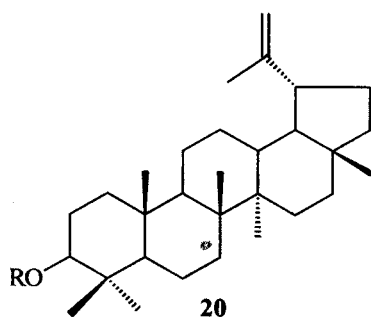
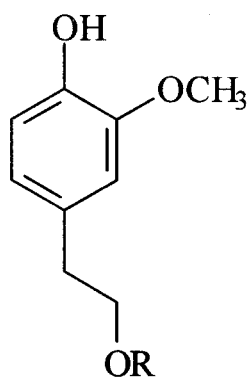
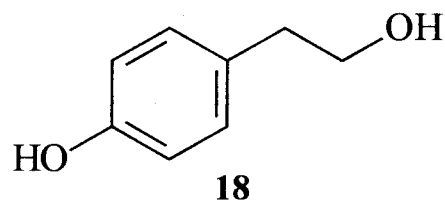
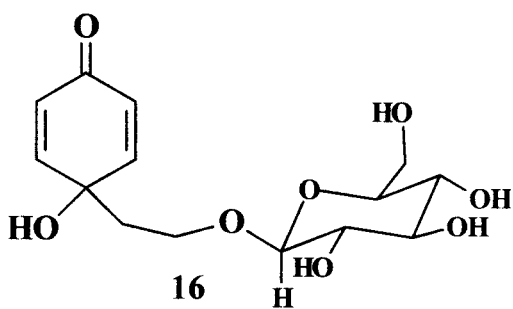
SILVERSTEIN, M. R.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. Spectrometric identification of organic compounds, 240, Ed. John Wiley & Sons, INC., 1991.

SOBRINHO, D. C.; NETTO-FERREIRA, J. C.; BRAZ-FILHO, R. Efeito da substituição por átomos de flúor no equilíbrio conformacional de chalcona. *Química Nova*, **24** (5), 604-611, 2001.

CAPÍTULO II
ESTUDO QUÍMICO DO LÁTEX DE *Parahancornia amapa*



II.1. Constituintes químicos isolados do látex de *Parahancornia amapa*



20-22a: R=H

20-22b: R= $\left(\text{---} \right)_n$

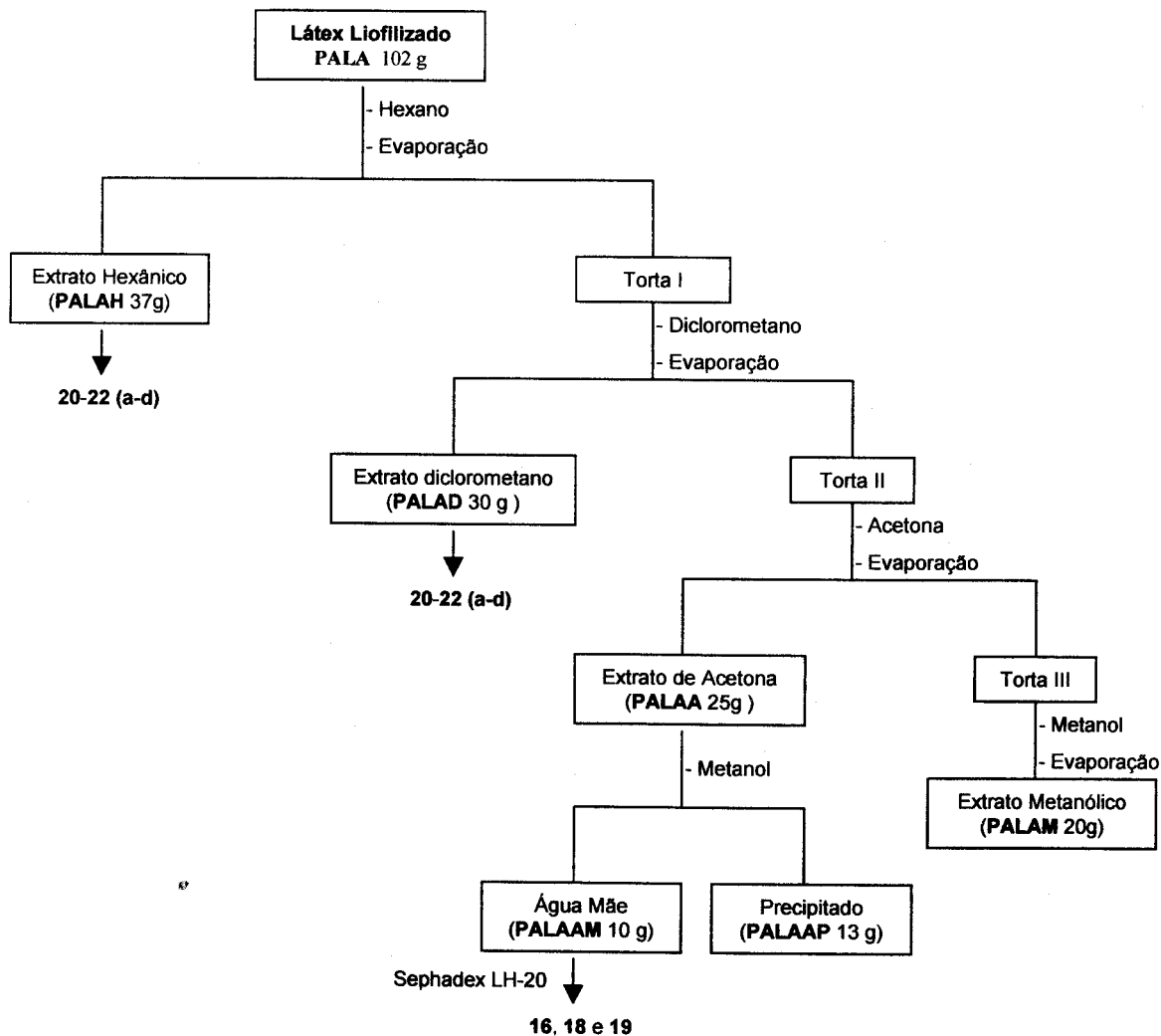
20-22c: R= $\left(\text{---} \right)_{n_1}$

20-22d: R= $\left(\text{---} \right)_{n_2}$

II-2. Isolamento e purificação dos constituintes

O látex de *Parahancornia amapa* foi coletado de um espécime identificado pelo botânico Benedito Vitor Rabello no estado do Amapá, Brasil. Uma exsiccata desta espécie (nº 07231) está depositada no Herbário Amapaense (HAMAB) da Divisão de Botânica do Museu Ângelo Moreira da Costa Lima, Instituto de Estudos e Pesquisas do Amapá (IEPA), Macapá-AP, Brasil.

O látex liofilizado de *Parahancornia amapa* foi submetido à extração com hexano, diclorometano, acetona e metanol.



Esquema II.1- Marcha para o isolamento das substâncias do látex de *Parahancornia amapa*.

a) PALAA (*Parahancornia amapa* Látex Acetona)

A fração obtida com acetona, **PALAA**, foi solubilizada com metanol e a parte solúvel (**PALAAM**) foi submetida a uma filtração com sephadex LH-20 usando metanol como fase móvel, obtendo-se 30 frações. A fração 22 desta coluna forneceu um material pastoso (100 mg) cuja análise dos dados de IV, RMN ^1H e ^{13}C (PND e DEPT), técnica de RMN 2D, espectro de massas e comparação com dados da literatura (KHAN *et al.*, 1992) permitiu identificar o feniletanóide **16**. Esta substância foi isolada dos frutos de *Forsythia suspensa* (Oleaceae) e de *Martynia louisiana* (Martyniaceae) e é conhecida como cornosídeo (JIMÉNEZ, 1994). O novo derivado (**17**, 30 mg) foi obtido através do tratamento de **16** (50mg) com anidrido acético/piridina. O produto foi identificado através da análise dos dados espectrométricos. Outros componentes **18** e **19** foram identificados como impureza em frações contendo **16**.

b) PALAH (*Parahancornia amapa* Látex Hexano)

Esta fração foi analisada através de técnicas espectrométricas de RMN ^1H e ^{13}C e foi constatada uma mistura de ésteres de lupeol, β -amirina e α -amirina **20-22 (b-d)**. Estes constituintes já foram identificados nesta espécie em estudos anteriores (CARVALHO *et al.*, 2001 e SOBRINHO *et al.*, 1991).

c) PALAD (*Parahancornia amapa* Látex Dicloro)

Esta fração foi analisada através de técnicas espectrométricas de RMN ^1H e ^{13}C e foi constatada uma mistura de ésteres de lupeol, β -amirina e α -amirina **20-22 (b-d)**.

II-3. Resultados e discussão

II-3.1. Determinação estrutural dos constituintes

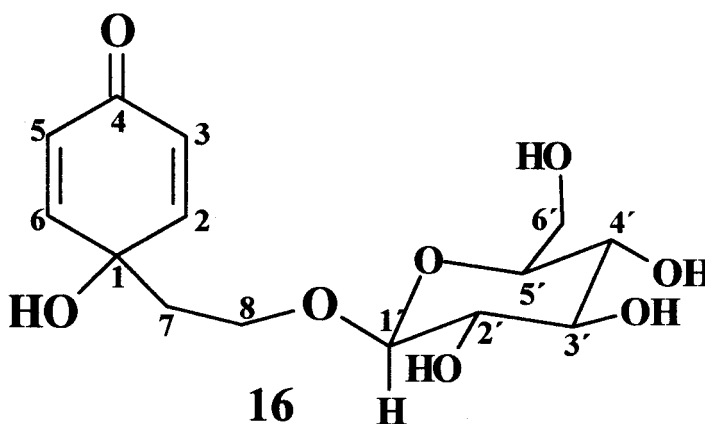
II-3.1.1. Feniletanóides

a) Identificação do cornosídeo

O espectro de IV da substância **16** (Figura II.1) revela bandas de absorção para grupo hidroxila (3378 cm^{-1} , estiramento O-H), banda fraca de ν_{CH} de grupamentos CH_2 e CH_3 (2923 cm^{-1}), carbonila conjugada (1666 cm^{-1}), C=C conjugada (1622 cm^{-1}) e $\nu_{\text{C-O}}$ de álcool e éter (1075 cm^{-1}).

O espectro de RMN ^1H da substância **16** apresenta dois dubletos ($J= 8,4\text{ Hz}$) em δ_{H} : 6,13 (H-3, 5) e 7,03 (H-2, 6) que corresponde a um sistema AA'BB', hidrogênios metilênicos em δ_{H} : 2,07 (H-7); 3,7 e 4,0 (H-8a e 8b) e sinais em δ_{H} : 3,1-4,0 (m) que pode ser atribuídos a hidrogênios de unidade de carboidrato.

A análise dos espectros de RMN ^{13}C (BB e DEPT, Figura II.3 e II.4) permitiu identificar 14 sinais de carbono entre os quais nove metínicos, dois quaternários e três metilênicos. A presença da dienona contendo um C-O quaternário e dois CH_2 sendo um oxigenado conduziu a procura de sistemas semelhantes na literatura e verificou-se serem compatíveis com derivados estruturais de feniletanóides. Os dados de RMN ^{13}C comparados com os valores de feniletanóides descritos na literatura (KHAN *et al.*, 1992) foram semelhantes ao 1-hidroxi-4-ceto-2,5-dien-cicloexil-1-etilano-*O*-glipiranosídeo **16** isolado de *Parahancornia amapa* (Tabela II.1). Esta proposta foi confirmada através da análise do espectro de massas (Figura II.5, Esquema II.2). Os sinais adicionais (x) presentes nos espectros de RMN ^{13}C (Figura II.3 e Figura II.4) sugerem a presença de outros componentes na amostra analisada. Esta substância está sendo registrada pela primeira vez em Apocynaceae.



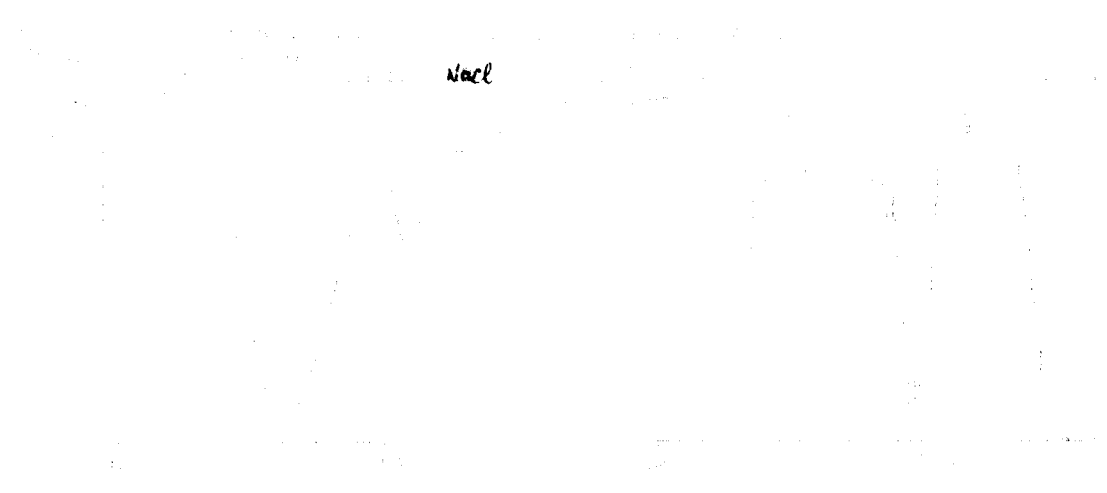


Figura II.1- Espectro de IV da substância 16 (cornosídeo).

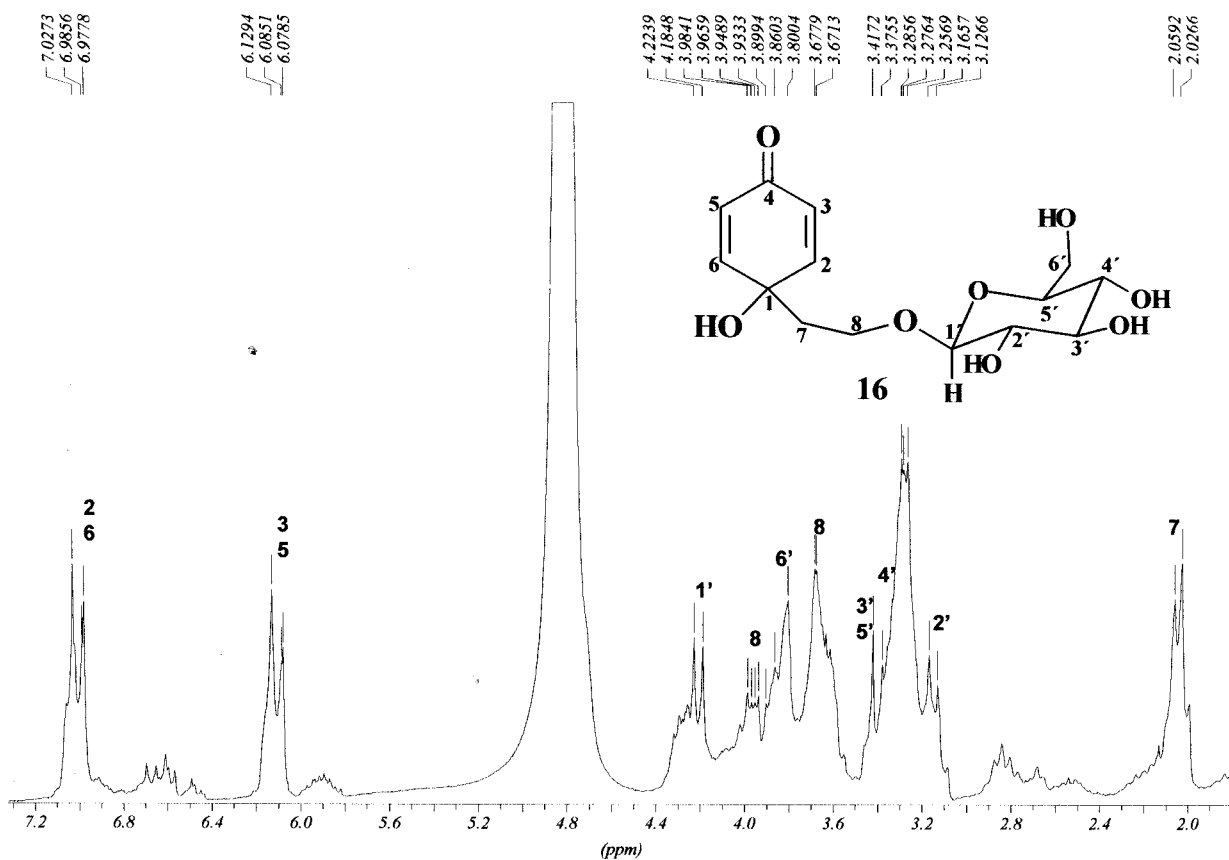
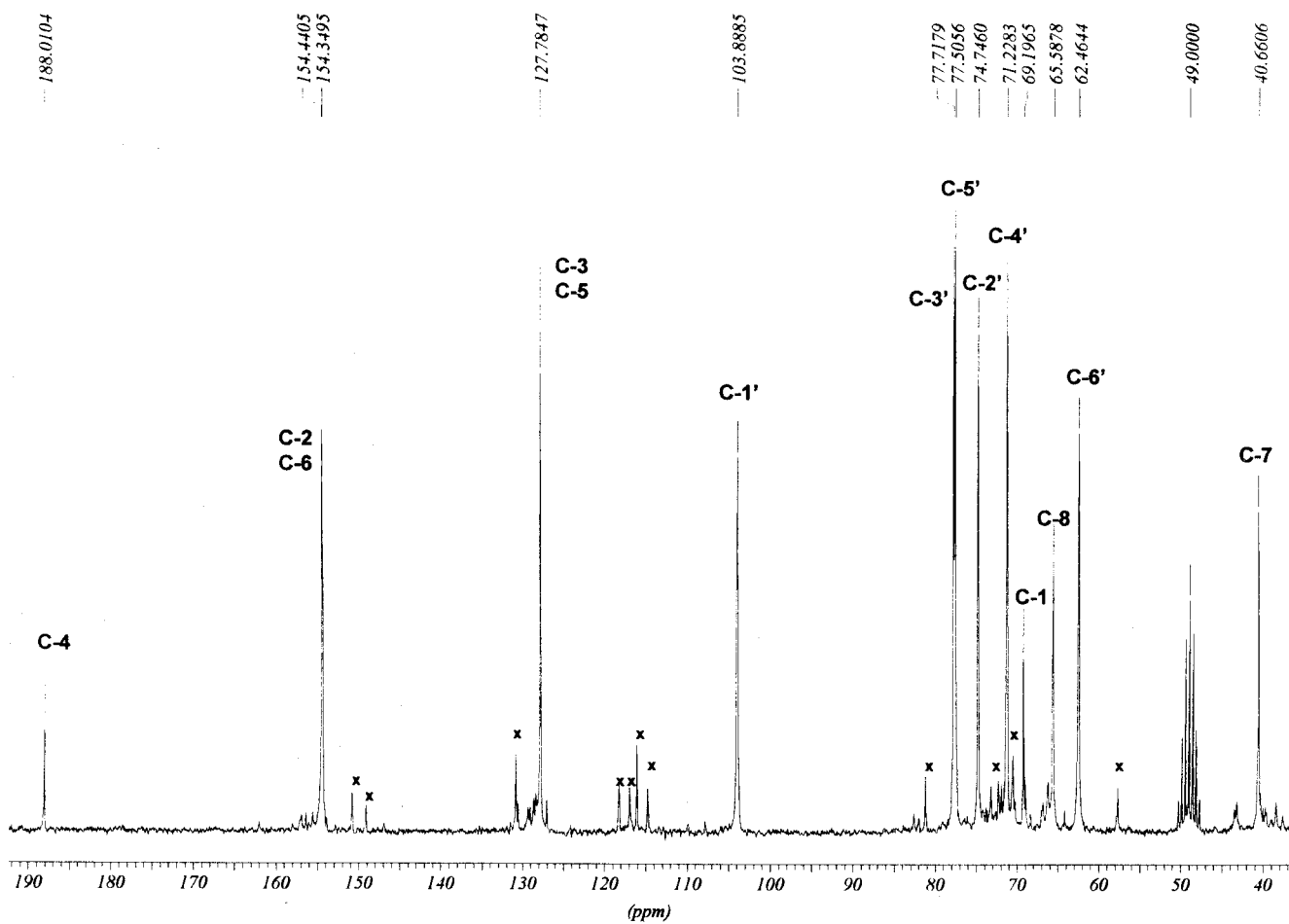
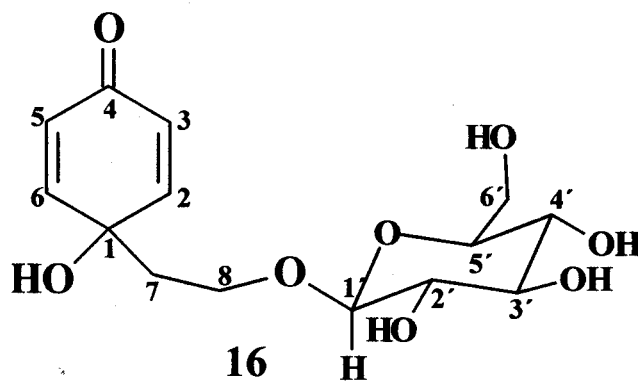


Figura II.2: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) da substância 16 em metanol- d_4 .



(^x impureza, 18 e 19)

Figura II.3: Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz) da substância 16 em metanol-d₄.



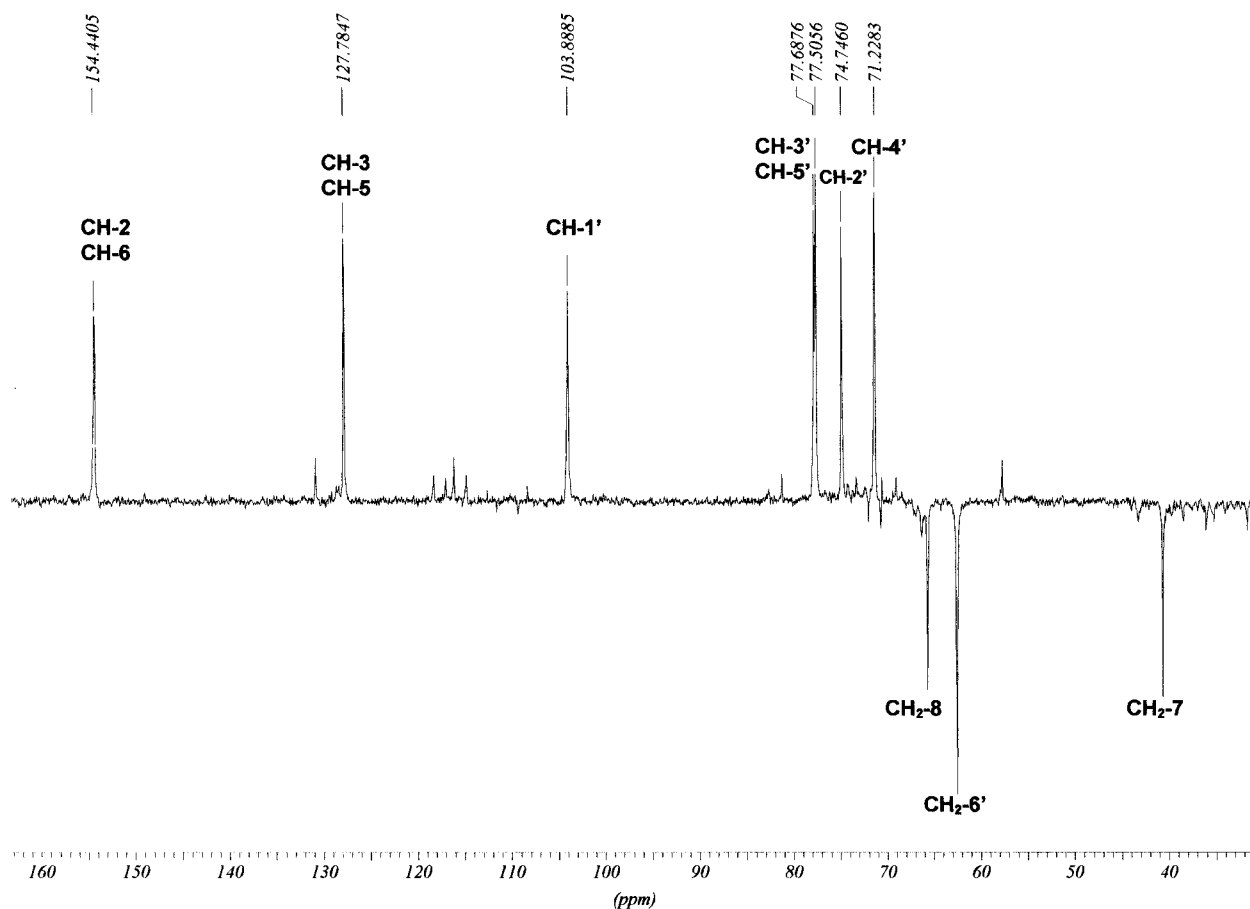


Figura II.4: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT (50 MHz) da substância 16 em metanol- d_4 .

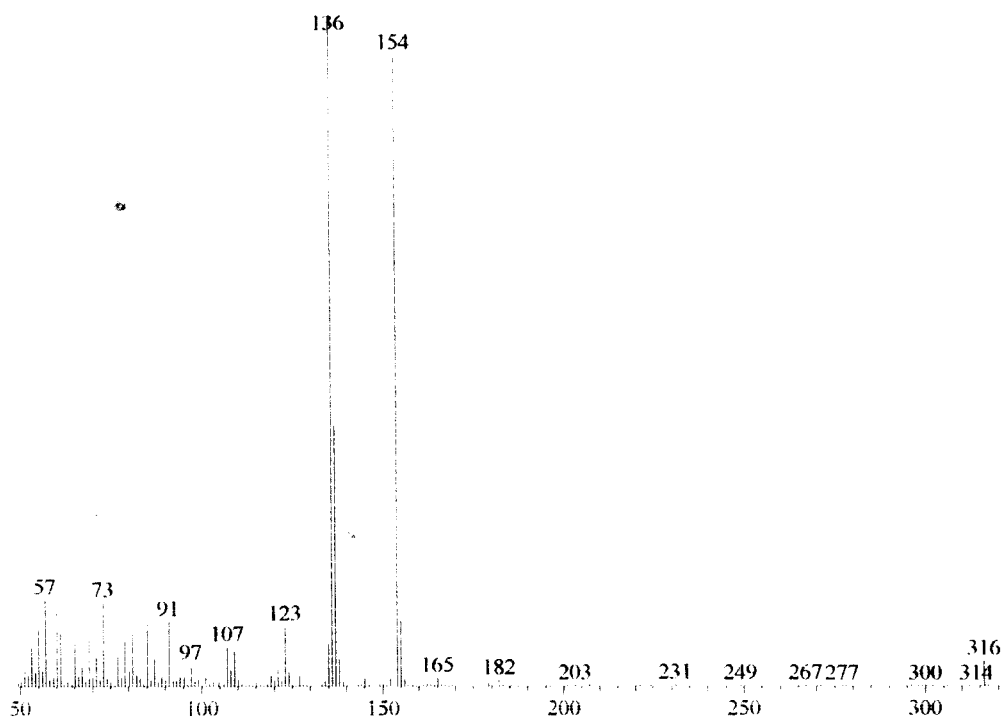
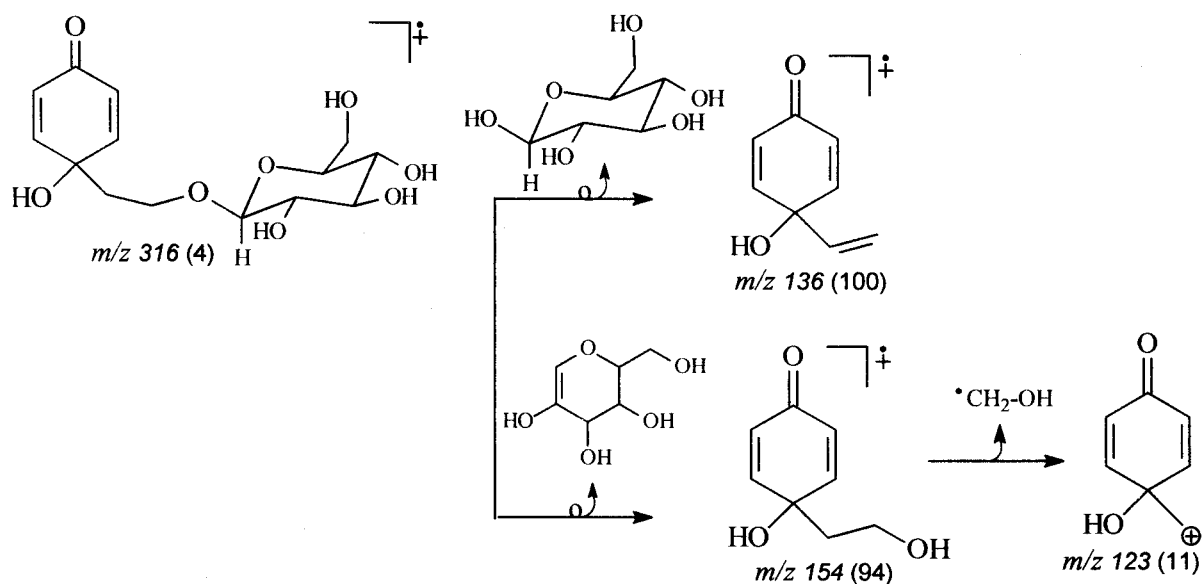


Figura II.5: Espectro de massas da substância 16.



Esquema II.2 : Fragmentação de massas da substância 16.

Tabela II.1: Dados de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) do cornosídeo 16 (metanol- d_4) comparados com a literatura (KHAN *et al.*, 1992).

C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C} Literatura
1	69,2	-	69,2
2	154,4	7,03 (d; 8,4 Hz)	154,3
3	127,7	6,13 (d; 8,4 Hz)	128,0
4	188,0	-	187,8
5	127,7	6,13 (d; 8,4 Hz)	127,9
6	154,4	7,03 (d; 8,4 Hz)	154,3
7	40,7	2,07 (m)	41,0
8	65,6	4,0 (m); 3,7 (m)	65,9
1'	103,9	4,4 (d; 8,0 Hz)	104,9
2'	74,7	3,2 (d; 7,8)	75,5
3'	77,7	3,4 (m)	77,9
4'	71,3	3,35 (m)	71,8
5'	77,5	3,4 (m)	75,0
6'	62,5	3,8 (m)	64,6

b) Identificação do derivado acetilado do cornosídeo (17)

O tratamento de 16 com anidrido acético e piridina forneceu o tetra-*O*-acetil-derivado 17 que está sendo registrado pela primeira vez na literatura.

O espectro de RMN ^1H (Figura II.6) do derivado acetilado 17 mostra que os hidrogênios 2', 3' e 4' sofreram um deslocamento para campo baixo devido ao efeito retirador de elétrons dos grupos acetatos e mostra sinais em 2,0 a 2,1 ppm devido aos hidrogênios das metilas dos grupos acetoxílicos.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura II.7) mostra a presença de carbonos em torno de 20 ppm que são atribuídos as metilas e carbonos em 169,3 de carbonilas do grupo acetoxila de 17. Os demais sinais assinalados no espectro Figura II.7 e II.8 confirma a presença do produto 17 (Tabela II.2).

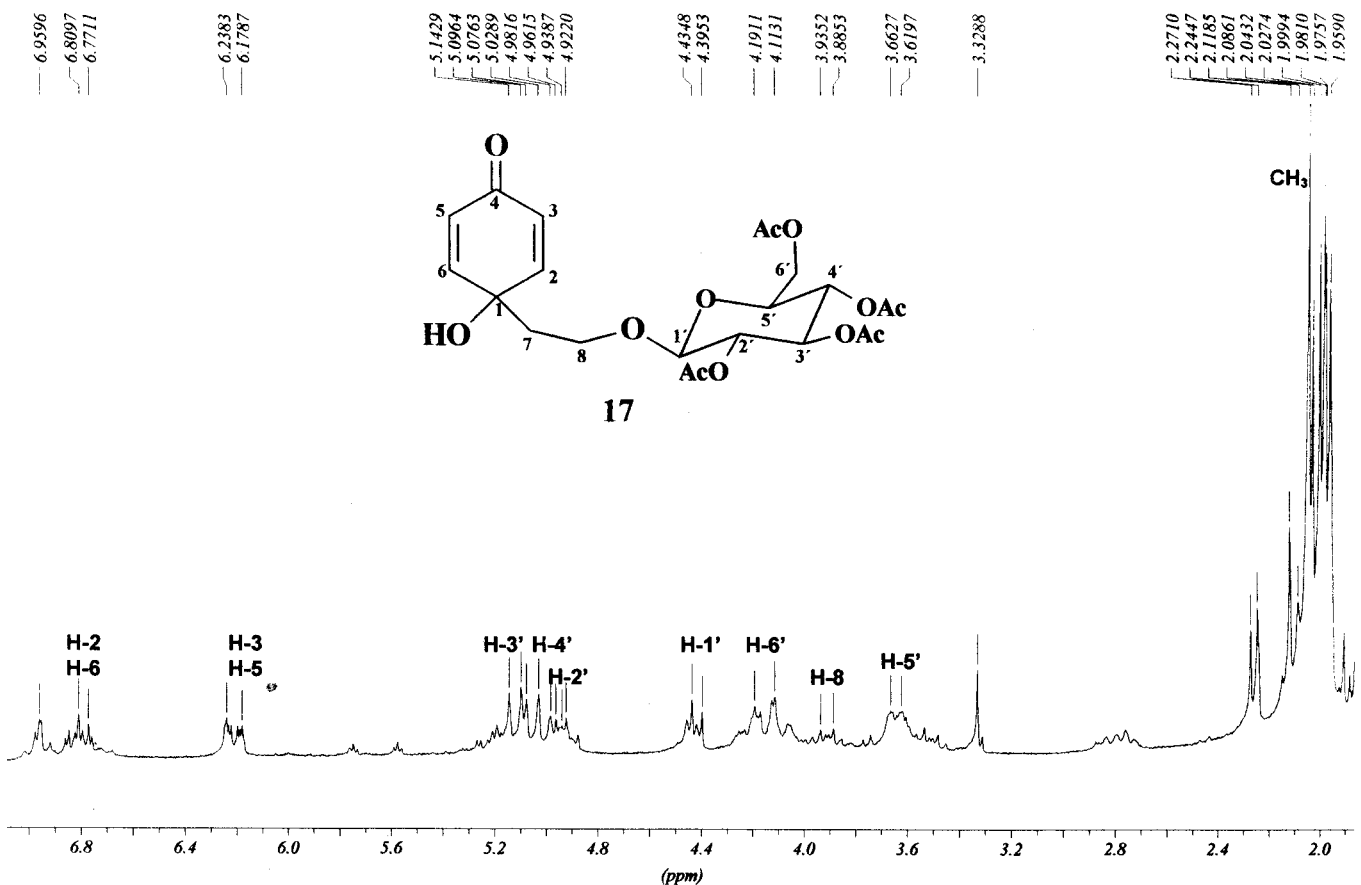


Figura II.6: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) do derivado acetilado 17 em CDCl_3 .

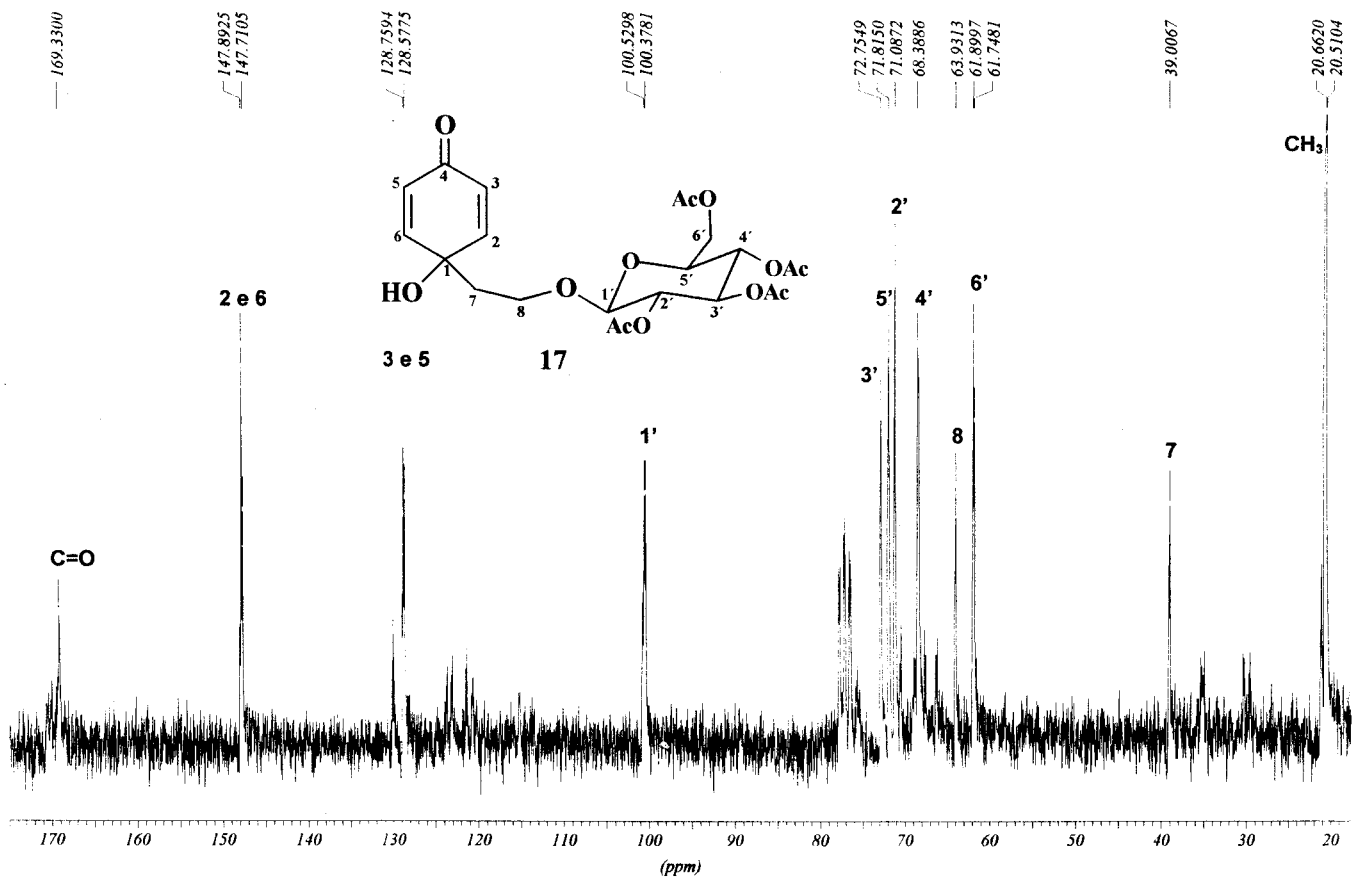


Figura II.7: Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz) do derivado 17 em CDCl₃.

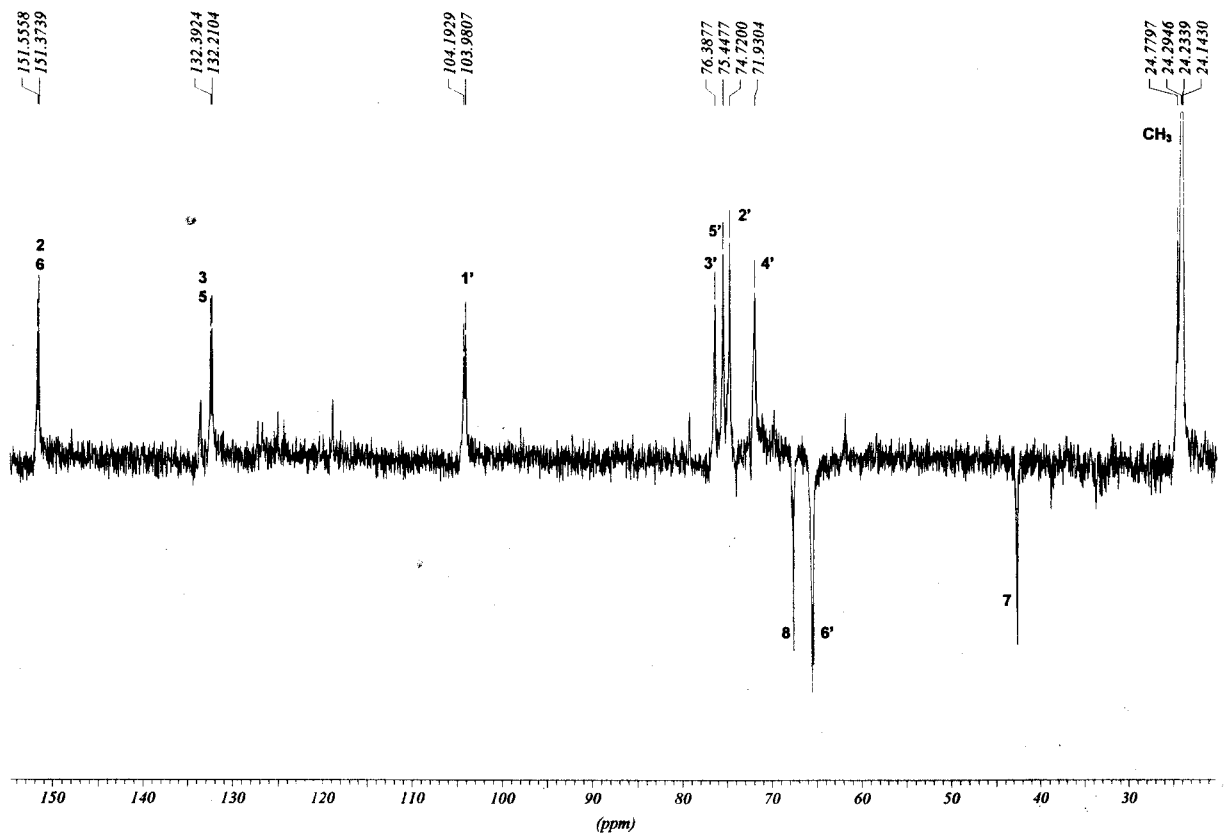
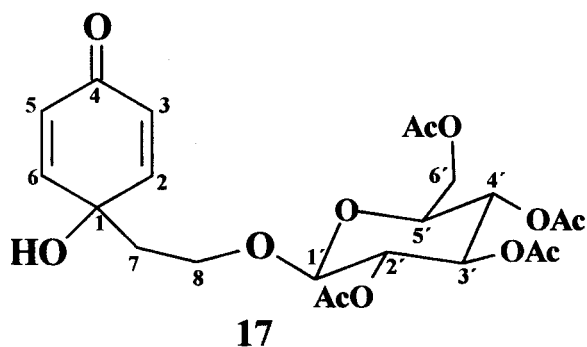


Figura II.8: Espectro de RMN de ¹³C DEPT (50 MHz) do derivado 17 em CDCl₃.

Tabela II.2: Dados de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) do derivado acetilado 17 (CDCl_3) comparados com dados do original 16.

C	Derivado acetilado 17		16
	δ_{C}	δ_{H} (Hz)	δ_{C}
1	61,9	-	69,2
2	147,8	6,8 (d, 8,0)	154,4
3	128,6	6,2 (d, 8,0)	127,7
4	188,0	-	188,0
5	128,6	6,2 (d, 8,0)	127,7
6	147,8	6,8 (d, 8,0)	154,4
7	39,0	2,2	40,7
8	63,9	3,9	65,6
1'	100,3	4,4 (d, 8,0)	103,9
2'	71,1	4,9 (d, 8,0)	74,7
3'	72,7	5,1	77,7
4'	68,4	5,0	71,3
5'	71,8	3,7	77,5
6'	61,7	4,1-4,2	62,5
CH_3	20,5-20,7	2,0 – 2,1	-
$\text{C}=\text{O}$	169,3	-	-



c) Identificação da mistura das substâncias 16, 18, 19.

A presença de sinais adicionais no espectro de RMN (Figura II.9) permitiu deduzir a presença de outros componentes na amostra analisada. Estes valores foram analisados e são compatíveis com a proposta de outros feniletanóides **18** e **19** na amostra, sendo que de acordo com as intensidades dos δ_{CH} da unidade de carboidrato um destes componentes poderá, também, estar na forma de glicosídeo

A perda de OH de **16** e formação do fenol gera a substância **18** que foi identificada na amostra analisada através de CG-EM (Figura II.2, esquema II.3). Nesta amostra pode estar presente também **19a**, que pode gerar **19** com aromatização do fenol. Esta amostra foi injetada no CG (Figura II.11) e os espectros de massas de cada pico foram obtidos (Figura II.12, Figura II.13, Figura II.14). Esta análise permitiu identificar os componentes **18** (m/z 138, M^+) entre outros picos (Figura II.2, esquema II.3), certamente ele ocorre na forma glicosilada e durante o aquecimento ocorre a eliminação deste grupo. Os valores de δ_C e δ_{CH} adicionais no espectro de RMN¹³C justifica esta proposta (Tabela II.3). O componente **19** pode se formar na solução clorofórmica a partir de **19a** (Esquema II.3) que foi detectado no CG-EM (Esquema II.4). A presença de **16** na amostra foi confirmada com a obtenção do espectro (Figura II.14).

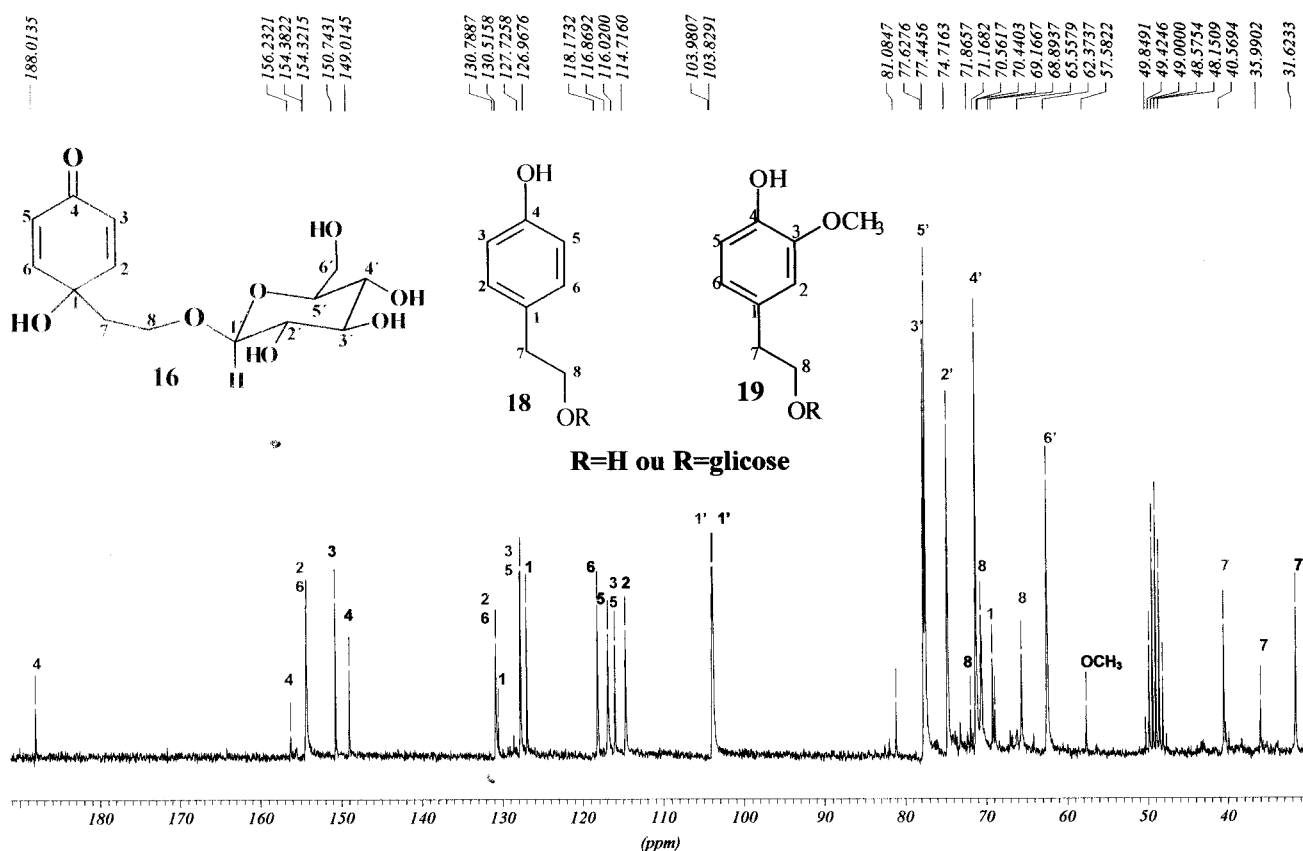
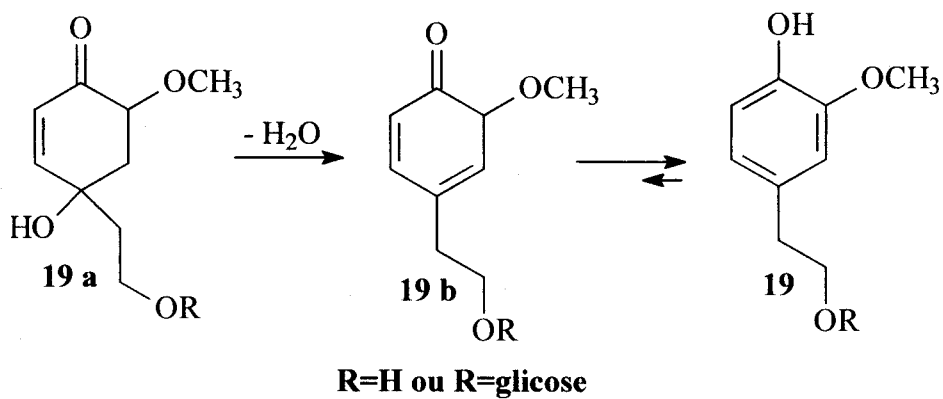


Figura II.9: Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz) da mistura das substâncias **16**, **18** e **19** em metanol-d₄.



Esquema II.3: Prováveis precursores da substância 19.

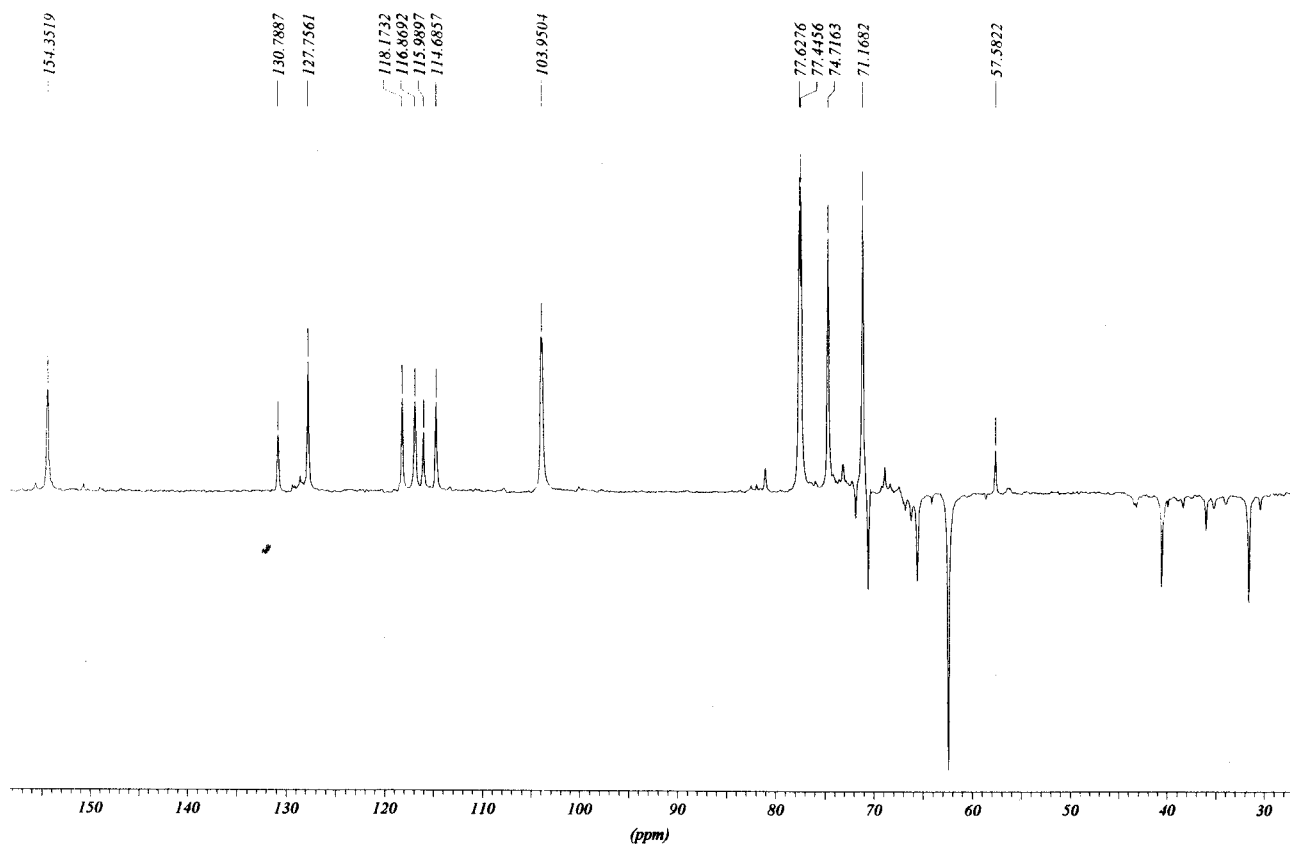


Figura II.10: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT (50 MHz) da mistura das substâncias 16, 18 e 19 em metanol- d_4 .

Tabela II.3: Dados de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) das substâncias **18** e **19** (metanol- d_4) comparados com dados da literatura (KHAN *et al.*, 1992 e IDA *et al.*, 1994).

	18	Literatura	19
	δ_C	δ_C	δ_C
1	130,5	130,5	127,0
2	130,8	130,9	114,7
3	116,0	116,2	150,7
4	156,2	156,8	149,0
5	116,0	116,9	116,9
6	130,8	130,6	118,2
7	36,0	36,5	31,6
8	70,4	72,4	71,2
1'	-	-	103,8
2'	-	-	74,7
3'	-	-	77,6
4'	-	-	71,2
5'	-	-	77,4
6'	-	-	62,4
OCH ₃	-	-	57,6

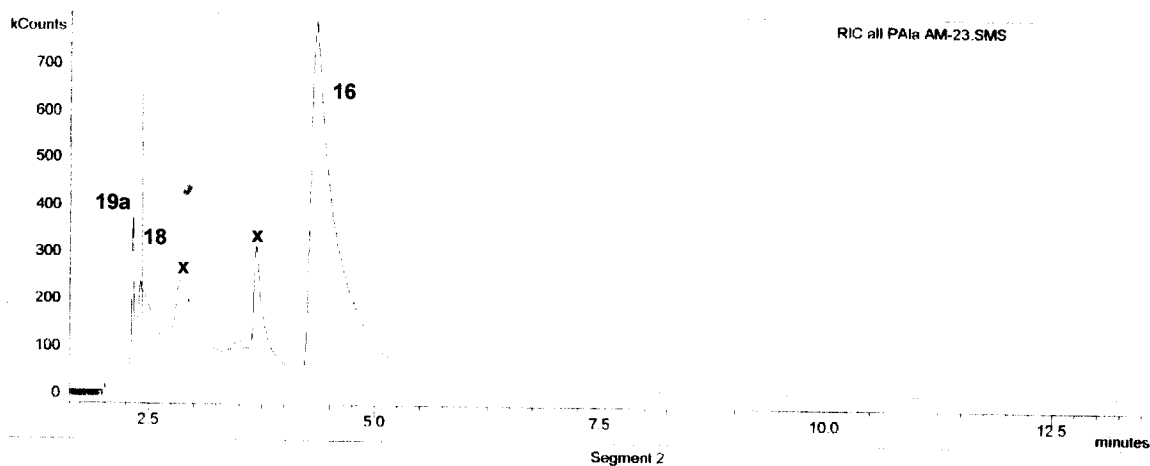


Figura II.11: CG da amostra PAŁAAM 23 (mistura das substâncias **16**, **18** e **19a**)

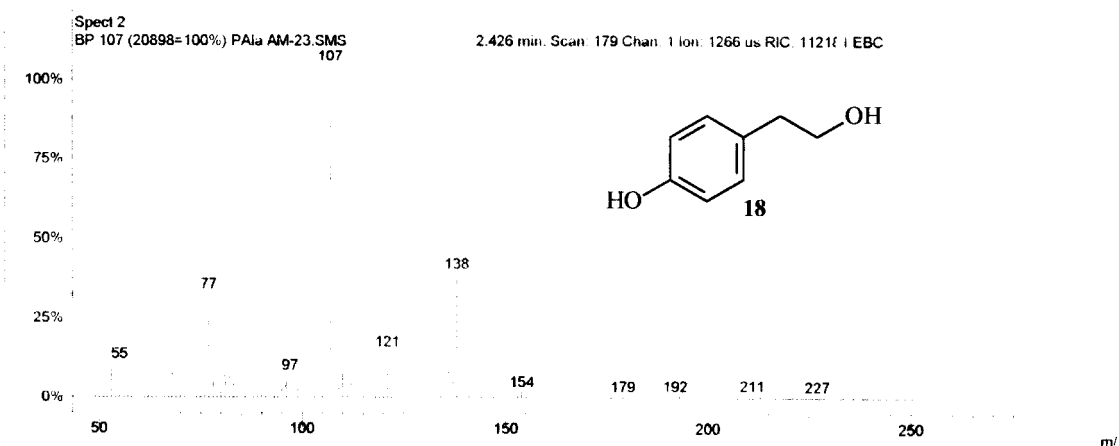
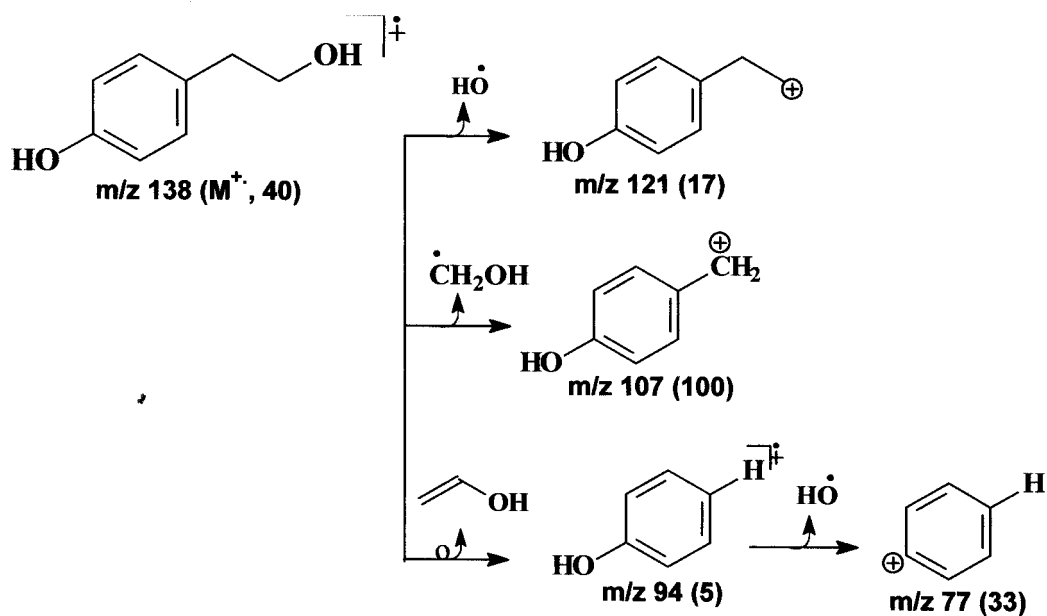


Figura II.12: Espectro de massas da substância 18.



Esquema II.4: Fragmentação de massas da substância 18.

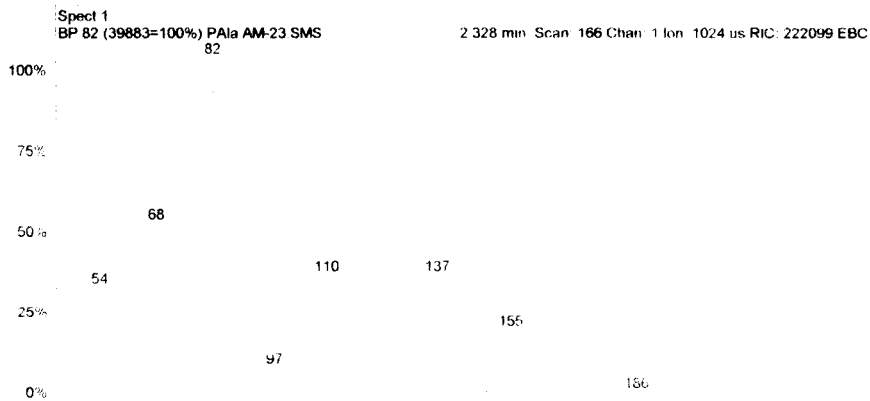
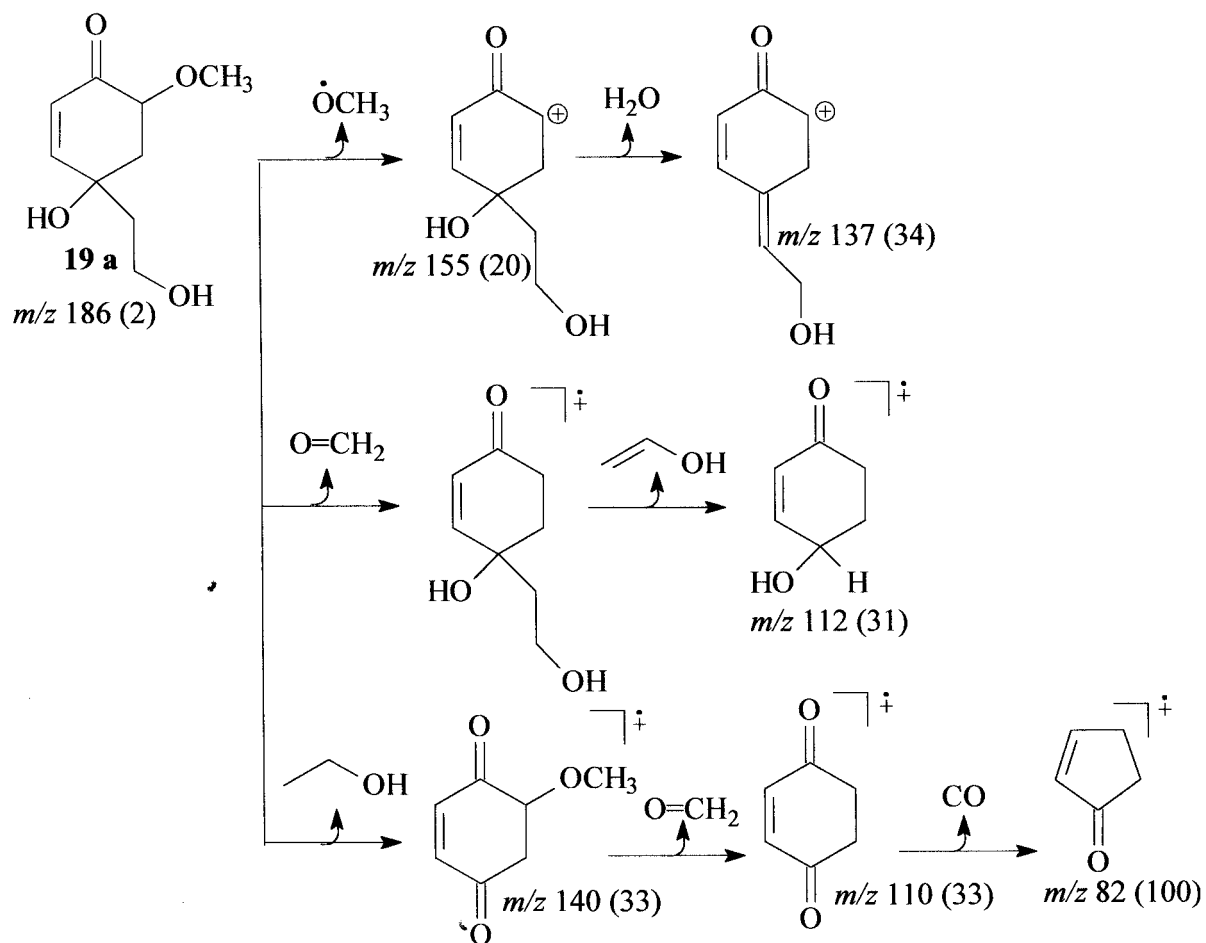


Figura II.13: Espectro de massas da substância 19a.



Esquema II.5: Fragmentação de massas da substância 19a.

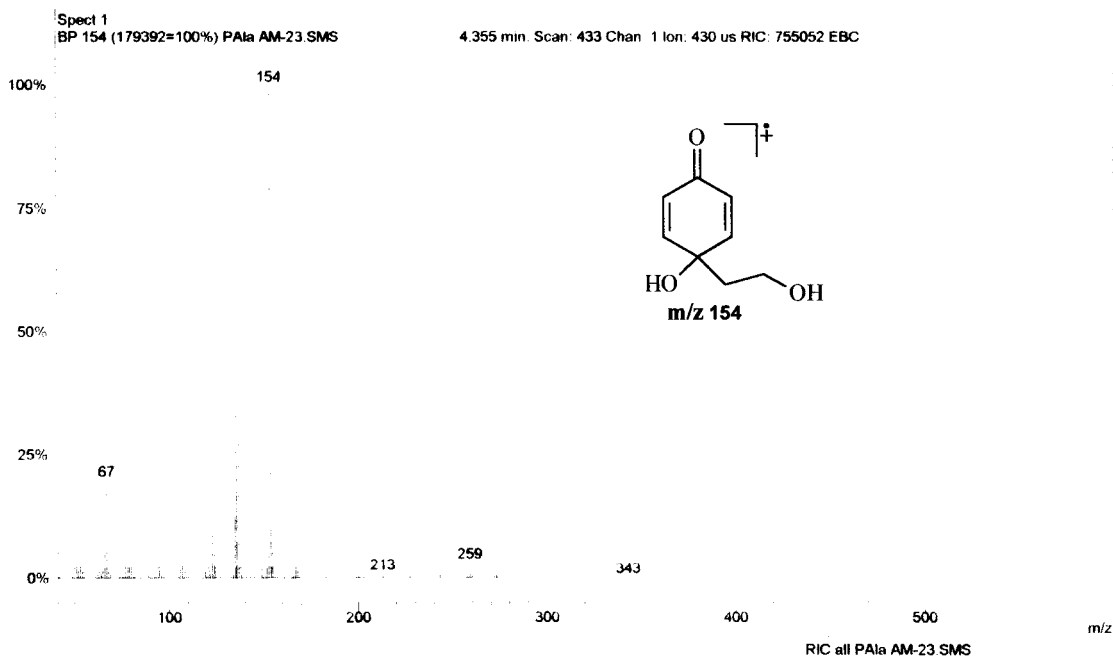


Figura II.14: Espectro de massas da substância 16.

II-3.1.2. Ésteres de Triterpenos

A comparação dos espectros de RMN ^{13}C (Figura II.16) com dados da literatura (SOBRINHO *et al.*, 1991; BARRETO *et al.*, 1998 e VELLOSO, 1998) permitiu identificar os sinais representantes de átomos de carbono metílicos, metilênicos, metínicos e quaternários. Os deslocamentos químicos dos carbonos em δ_{C} 144,9 e 124,1, 139,4 e 124,9 e 150,3 (C) e 109,3 (CH_2) foram atribuídos a átomos de ligação dupla e são compatíveis com triterpenos pentacíclicos das séries oleanano, ursano e lupano. Os sinais intensos no espectro de RMN ^{13}C (δ_{C} : 150,3 e δ_{CH_2} : 109,3) juntamente com outros sinais do lupeol garante a presença majoritária da mistura de ésteres acil lupeol (**20 b-d**). Os sinais assinalados no espectro de hidrogênio (Figura II.15) estão de acordo com as estruturas **20**, **21** e **22 (b, c)** na fração analisada. Estruturas semelhantes foram isoladas anteriormente de *Parahancornia amapa* (SOBRINHO *et al.*, 1991; CARVALHO *et al.*, 2001 e VELLOSO, 1998). A ausência de δ_{H} em 3,5 sugere a presença de ésteres dos triterpenos **20**, **21** e **22**. A tabela II.4 mostra os δ_{C} dos triterpenos comparados com valores da literatura. Esta amostra deverá ser submetida à hidrólise para definir a unidade acila.

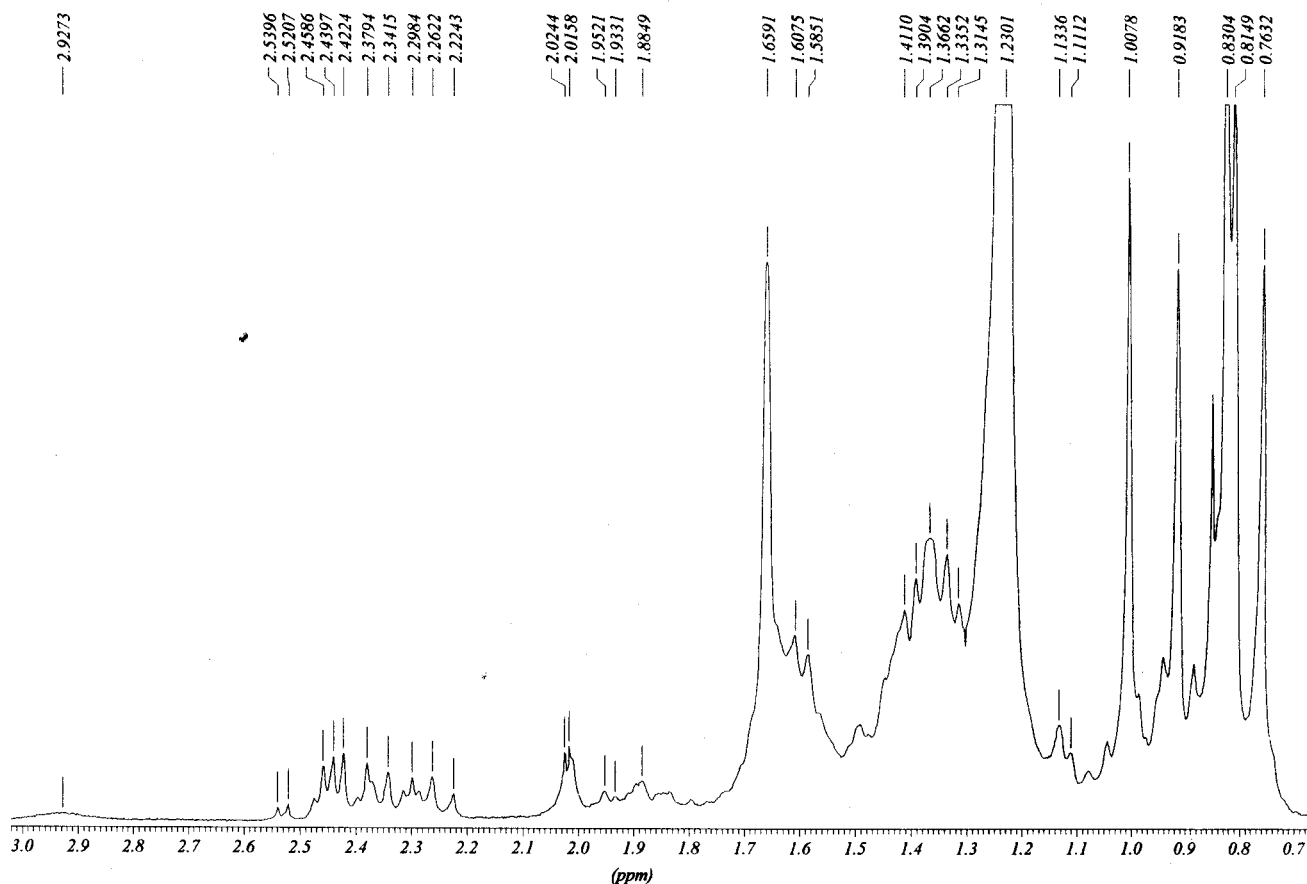
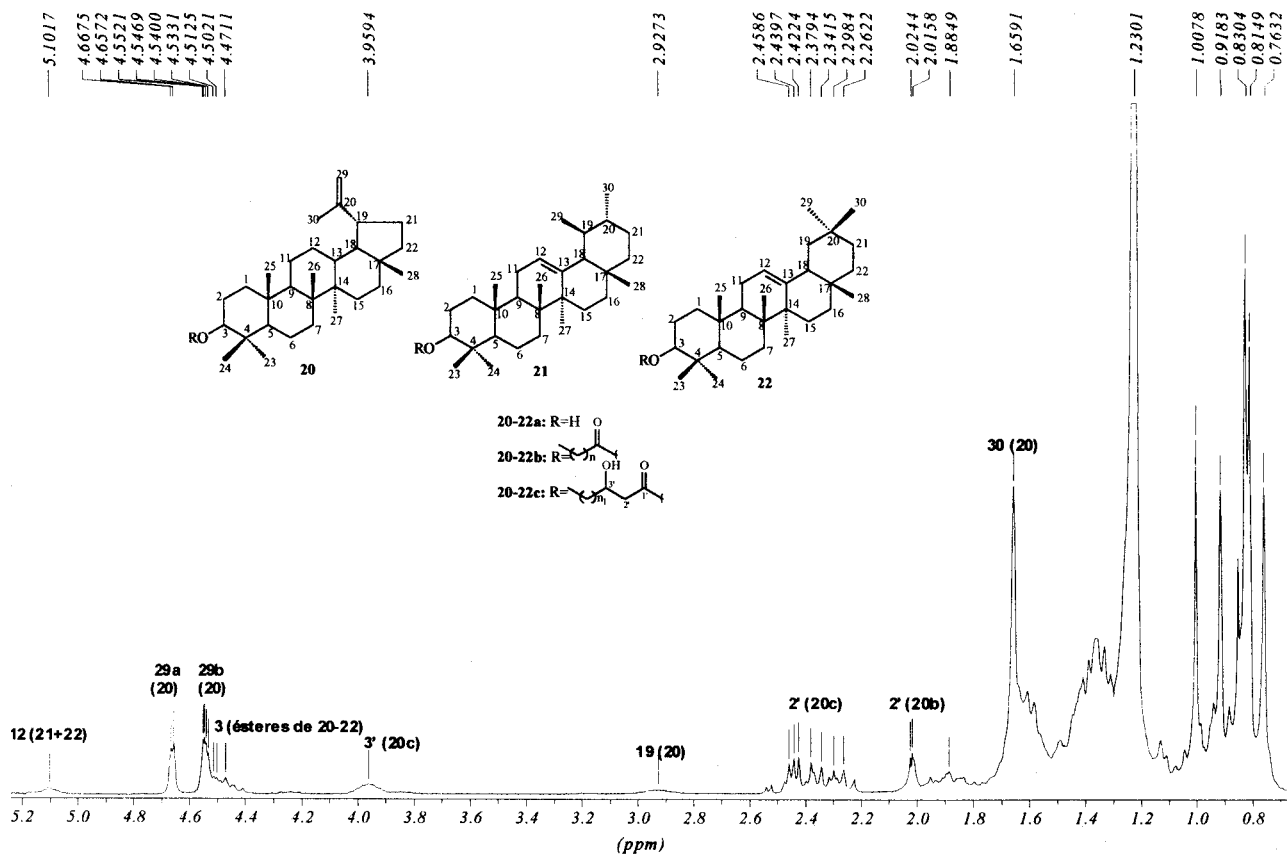


Figura II.15: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) da mistura das substâncias 20, 21 e 22 (b-c).em CDCl_3 .

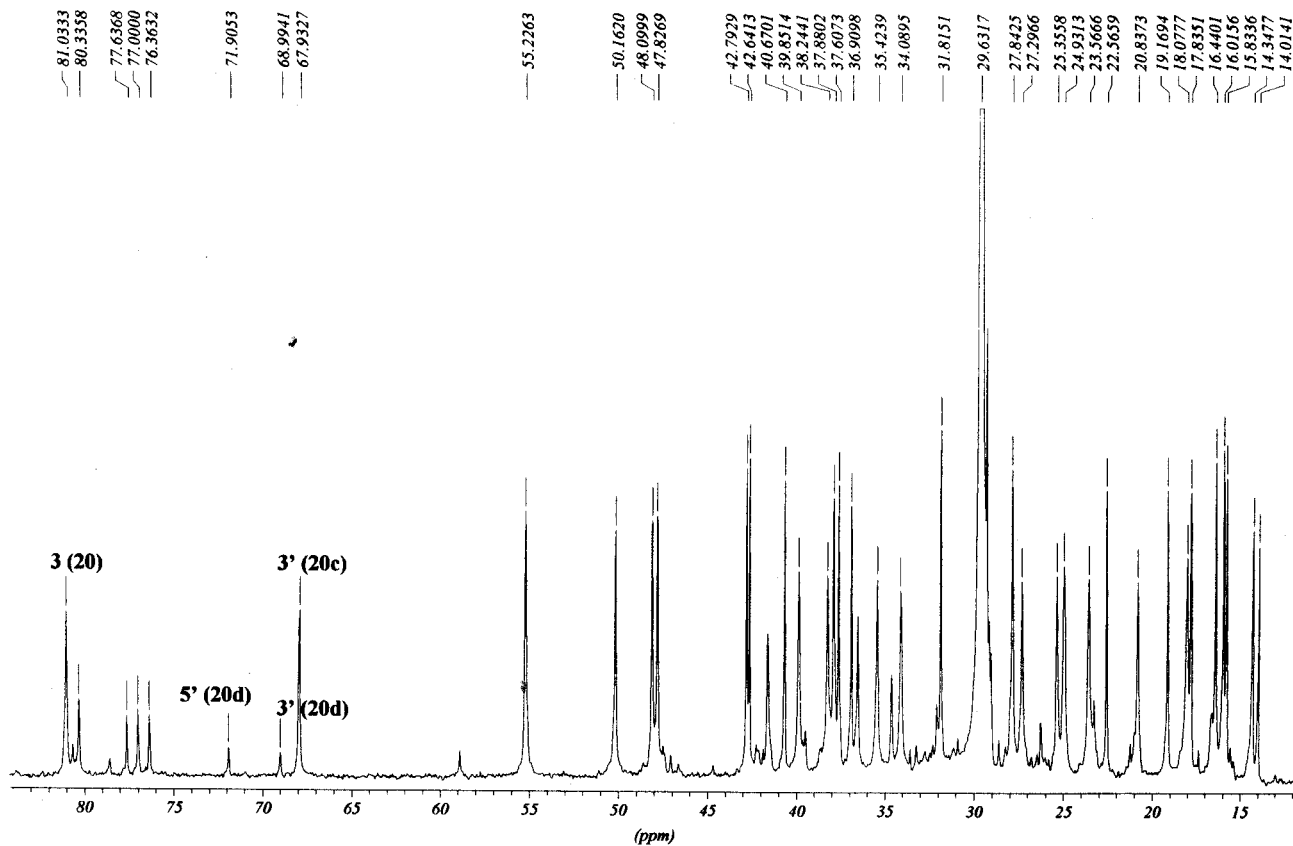
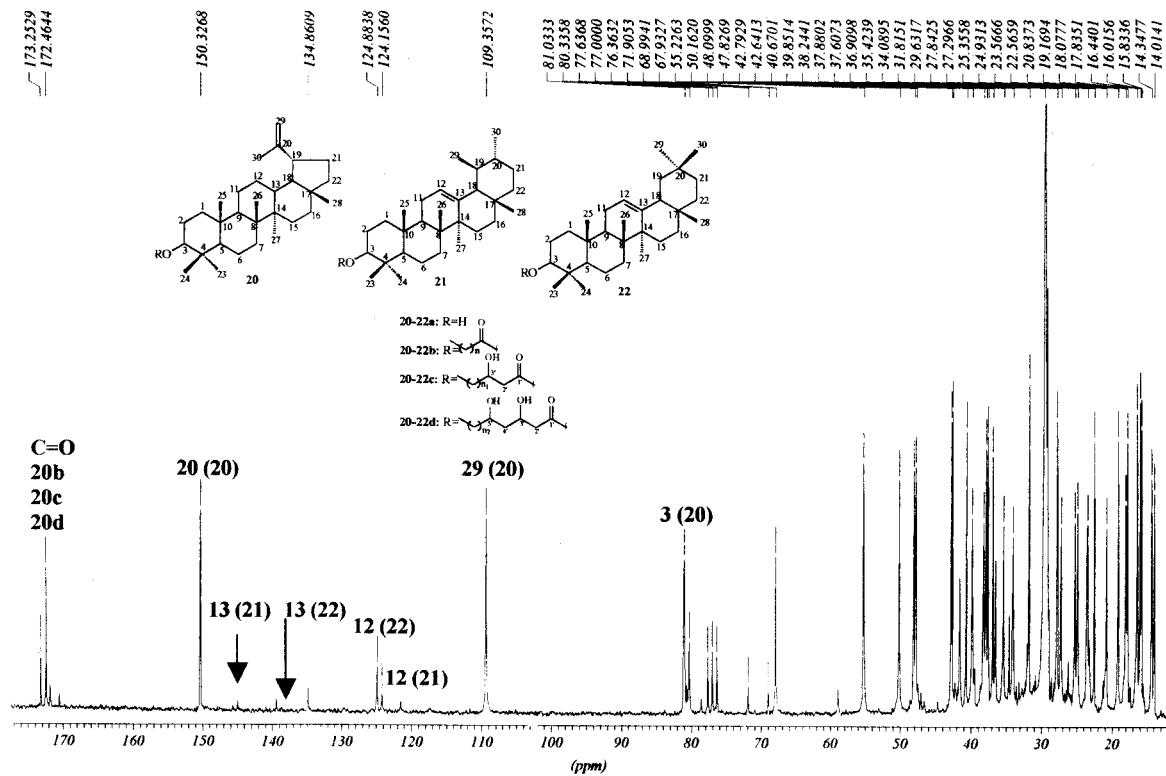


Figura II.16: Espectros de RMN ^{13}C (50 MHz) da mistura das substância 20, 21 e 22 (b-d), em CDCl_3 .

Tabela II.4: Dados de RMN ^{13}C (50 MHz) das substâncias **20a**, **21a** e **22a** comparados com os dados da literatura do lupeol, β -amirina e α -amirina (SOBRINHO *et al.*, 1991 e BARRETO *et al.*, 1998).

C	20a	Lupeol	21a	β -amirina	22a	α -amirina
1	38,2	38,7	38,7	38,7	37,8	38,7
2	27,3	27,4	27,3	27,3	27,3	27,2
3	78,6	78,9	78,6	79,0	78,6	78,3
4	39,4	38,8	38,2	38,8	38,7	38,7
5	55,2	55,3	55,2	55,3	55,2	55,2
6	18,1	18,3	18,1	18,5	18,1	18,3
7	34,1	34,2	32,7	32,8	32,7	32,9
8	40,7	40,8	39,5	38,8	39,8	40,0
9	50,2	50,4	47,8	47,7	47,8	47,7
10	36,9	37,1	37,6	37,6	36,9	36,9
11	20,8	20,9	23,6	23,6	23,3	23,3
12	24,9	25,1	121,5	121,8	124,2	124,3
13	37,9	38,0	144,9	145,1	139,4	139,3
14	42,8	42,8	41,6	41,8	41,6	42,0
15	27,3	27,4	26,2	26,2	28,7	28,7
16	35,4	35,5	26,8	27,0	26,5	26,6
17	42,8	43,0	32,1	32,5	33,5	33,7
18	48,1	48,2	47,5	47,4	58,9	58,9
19	47,8	47,9	46,6	46,9	39,5	39,6
20	150,3	150,9	31,8	31,1	39,5	39,6
21	29,8	29,8	34,6	34,8	31,1	31,2
22	39,8	40,0	37,6	37,2	41,6	41,5
23	27,8	28,0	28,2	28,2	28,2	28,1
24	15,8	15,4	15,8	15,5	15,8	15,6
25	16,0	16,1	15,6	15,6	15,6	15,6
26	15,8	15,9	16,4	16,9	16,4	16,8
27	14,3	14,5	26,2	26,0	23,3	23,3
28	17,8	18,0	28,6	28,4	28,2	28,1
29	109,3	109,3	33,2	33,3	17,4	17,4
30	19,2	19,3	23,6	23,7	21,3	21,3

II-4. Referências – Capítulo II

BARRETO, A. de S.; CARVALHO, M. G. de; NERY, I. de A.; GONZAGA, L.; KAPLAN, M. A. C. Chemical Constituents from *Himatanthus articulata*. *J. Braz. Chem. Soc.*, **9** (5), 430-434, 1998.

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

IDA, Y.; SATOH, Y.; OHTSUKA, M.; NAGASAO, M.; SHOJI, J. Phenolic constituents of phellodendron amurense bark. *Phytochemistry*, **35** (1), 209-215, 1994.

JIMÉNEZ, C.; RIGUERA, R. Phenylethanoid glycosides in plants: structure and biological activity. *Natural Product Reports*, 591-606, 1994.

KHAN, A. I.; ERDELMEIER, C. A. J.; Sticher, O. New phenolic glucosides from leaves of *Eurya tigang*. *Jornal of Natural Products*, **55** (9), 1270-1274, 1992.

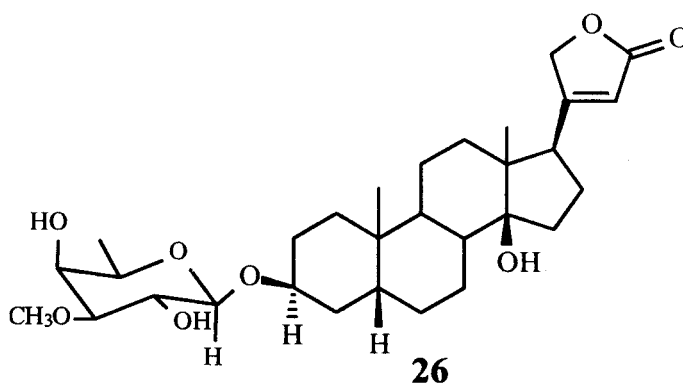
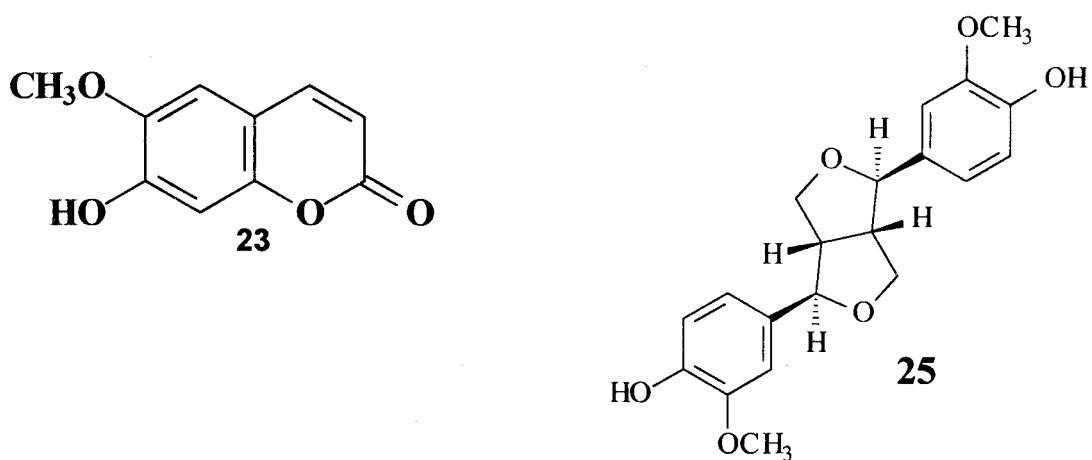
SOBRINHO, D. C.; HAUPTLI, M. B.; APPOLINÁRIO, E. V.; KOLLENZ, C. L. M.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R. Triterpenoids Isolated from *Parahancornia amapa*. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2** (1), 15-20, 1991.

VELLOSO, C. R. X. Triterpenos Isolados de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) e Diterpenos Isolados de *Pinus caribaea* var. *Bahamensis* Barr et Golf, Tese de Mestrado-Laboratório de Fitoquímica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1998.

CAPÍTULO III
ESTUDO QUÍMICO DE *Laseguea erecta*



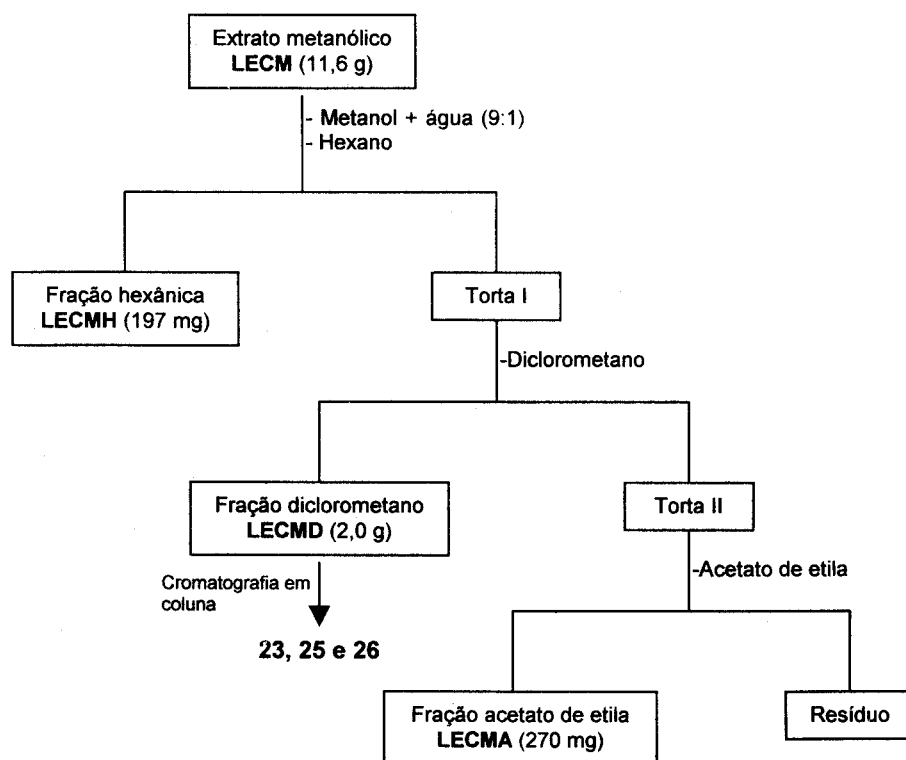
III.1- Constituintes químicos aislados de *Laseguea erecta*



III-2. Isolamento e purificação dos constituintes

O material vegetal da espécie *Laseguea erecta* foi coletado no Morro de São Sebastião, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil e autenticado pelo técnico Jorge L. Silva. Uma exsicata desta espécie (nº 6732) está depositada no Herbário OUPR-UFOP, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto -MG, Brasil.

O caule de *Laseguea erecta* foi triturado e submetido à extração com hexano, clorofórmio e metanol. O extrato metanólico foi submetido à partição com solventes e as frações foram processadas por técnicas cromatográficas para isolamento das substâncias naturais (Esquema III.1).



Esquema III.1- Marcha para o isolamento das substâncias do caule de *Laseguea erecta*.

a) LECMA (*Laseguea erecta* Caule Metanol Acetato)

A fração LECMA (270 mg) foi acetilada com anidrido acético/piridina (1:1), fornecendo 336 mg da fração LECMAAc, esta fração foi submetida a cromatografia em coluna rápida obtendo 6 frações. A fração LECMAAc-1 foi analisada através de técnicas espectrométricas de RMN¹H, IV e foi identificado o acetato de lupeol. Esta proposta foi confirmada através de comparação com padrão usando CCDA.

b) LECMD (*Laseguea erecta* Caule Metanol Diclorometano)

O extrato LECMD (2,0 g) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel obtendo-se 24 frações que foram analisadas com CCDA e IV e as frações menos complexas foram analisadas com RMN ¹H, ¹³C (1D e 2D) e NOESY. Através destas análises conclui-se que nas frações LECMD 1-3, LECMD 1-6 e na fração LECMD 5-3 estão presentes os constituintes **23**, **25** e **26**, respectivamente. Foi obtido o derivado metilado **24** através do tratamento de **23** com diazometano.

III-3. Resultados e discussão

III-3.1. Determinação estrutural dos constituintes

III-3.1.1. Cumarina (escopoletina)

O espectro de IV da substância **23** (Figura III.1) revela bandas de absorção para grupo hidroxila (3442 cm^{-1} , estiramento O-H), grupamento CH_3 (2923 cm^{-1}), carbonila conjugada (1642 cm^{-1}), C=C aromático (1517 cm^{-1} , 1421 cm^{-1}) e C-O (1033 cm^{-1}).

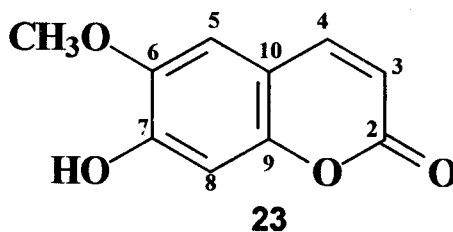
O espectro de RMN ^1H (Figura III.2) da substância **23** apresenta dois dubletos ($J= 9,4\text{ Hz}$) em δ_{H} : 6,2 (H-3) e 7,8 (H-4) e dois singletos em δ_{H} : 6,7 (H-8) e 7,1 (H-5) que correspondem a hidrogênios aromáticos e sinal em δ_{H} : 3,9 de 3H de grupo metoxila. O sinal em 8,5 (sl) foi atribuído ao OH fenólico.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura III.3) da substância **23** mostra deslocamento químico de dois carbonos de olefina em δ_{C} : 113,3 (C-3) e 143,8 (C-4), carbonila em δ_{C} : 161,0 e dois carbonos oxigenados em δ_{C} : 144,0 e 150,0.

O espectro $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY (Figura III.4) mostra o acoplamento do hidrogênio H-4 com o H-3 do sistema AB da substância **23**.

O espectro de massas (Figura III.5) apresenta picos cujos valores de m/z são compatíveis com a estrutura proposta para **23** (Esquema III.2).

Estes dados foram atribuídos a estrutura **23** e comparados com os dados da literatura (SANKAR *et al.*, 1982) atribuídos para a 7-hidroxi-6-metoxi-2H-1-benzopiran-2-ona. Esta substância foi isolada de *Guarea rhopalocarpa* e é conhecida como escopoletina (CAMACHO *et al.*, 2001).



3442.5, 2923.5, 2853.8, 1721.4, 1642.8, 1517.2, 1421.8, 1384.5=
1324.8, 1278.0, 1033.2, 918.9, 533.0, 469.1, 424.5=

Y: LECMD 1-3 KBr Cassia 7681 Op.E11 UFRRJ

14:31

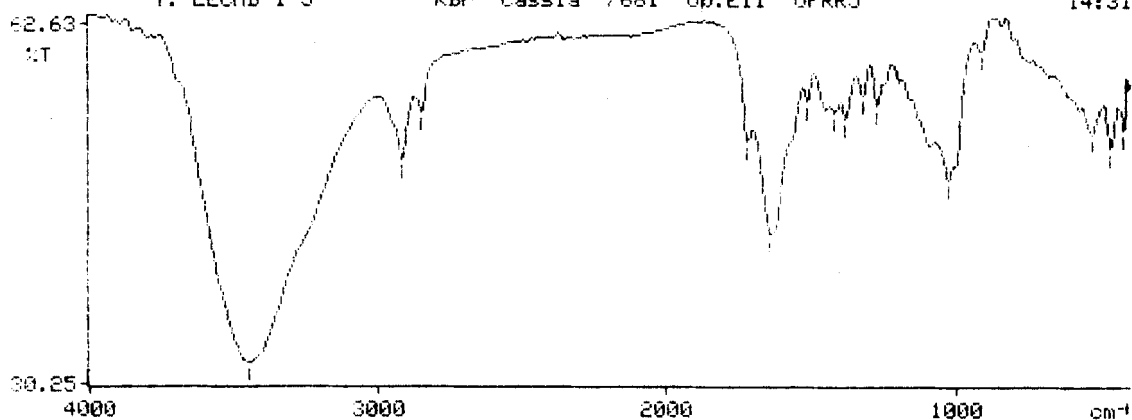


Figura III.1- Espectro de IV da substância 23 (escopoletina).

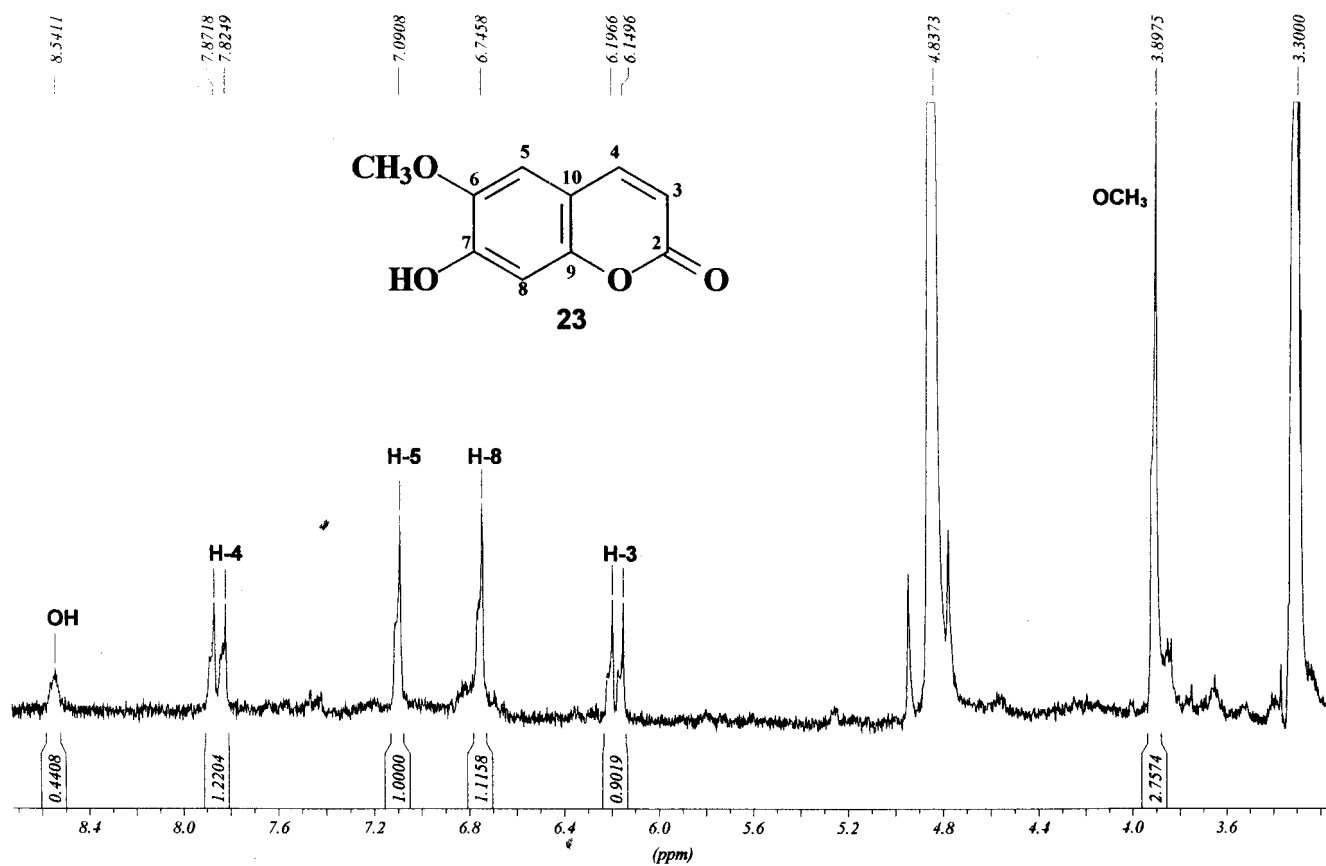


Figura III.2: Espectro de RMN ¹H (200 MHz) da substância 23 em metanol.

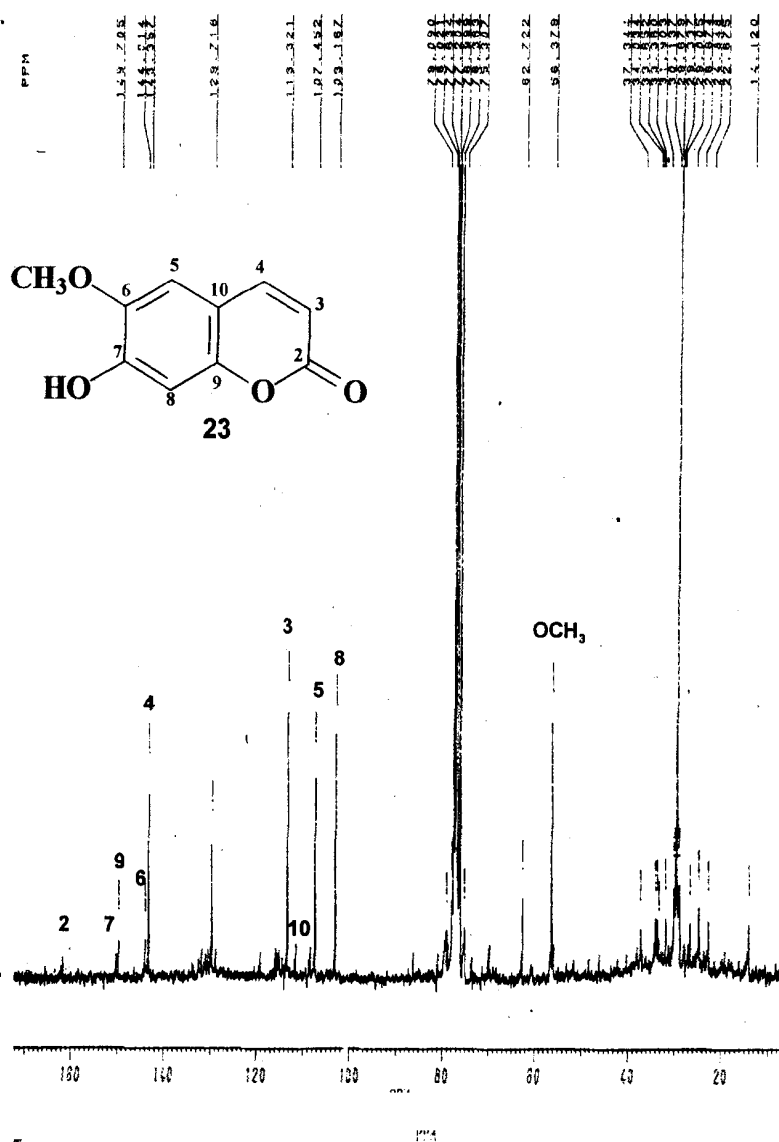


Figura III.3: Espectro de RMN ¹³C (50 MHz) da substância 23 em CDCl₃.

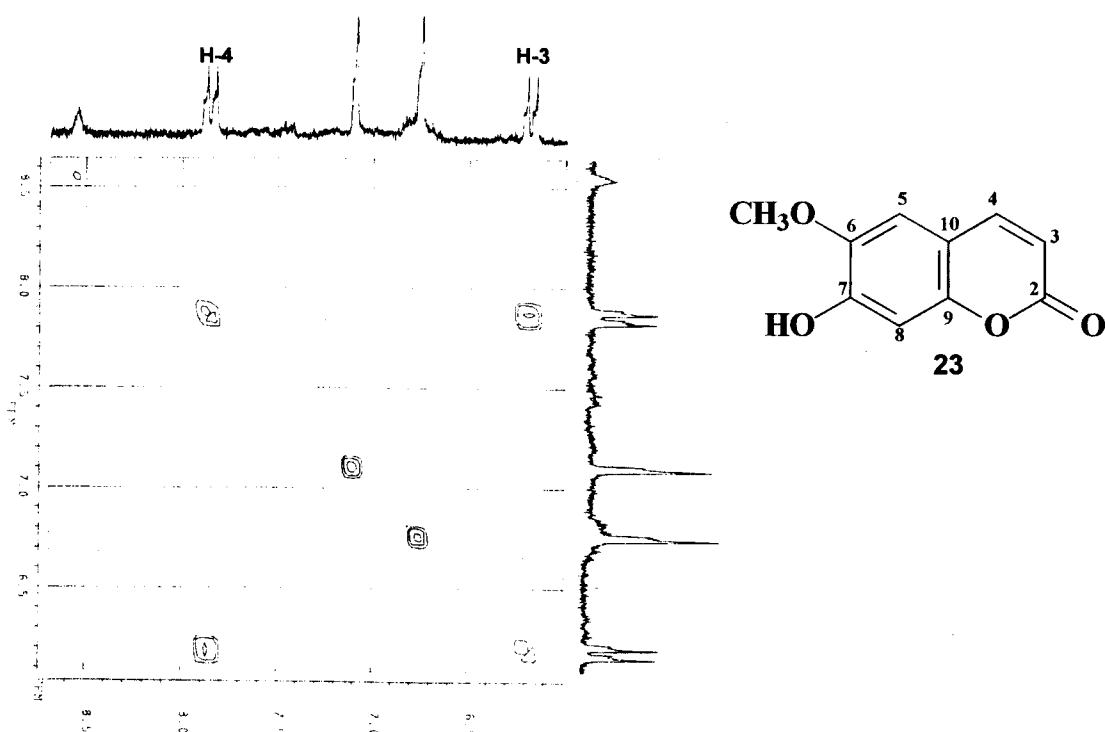


Figura III.4: Espectro de RMN ^1H (HOMOCOSY, 200 MHz) da substância **23** em metanol- d_4 .

Tabela III.1: Dados de RMN ^1H (200 MHz) (metanol- d_4) e ^{13}C (50 MHz) (CDCl_3) da substância **23** comparados com a literatura (SANKAR *et al.*, 1982).

C	Escopoletina 23		Literatura
	δ_{C}	δ_{H} (Hz)	δ_{C}
2	161,0	-	160,4
3	113,3	6,2 (d; 9,4)	111,5
4	143,8	7,8 (d; 9,4)	144,2
5	107,4	7,1 (s)	109,4
6	144,0	-	145,0
7	150,0	-	150,9
8	103,2	6,7 (s)	102,6
9	149,7	-	149,3
10	111,0	-	110,4
OCH_3	56,4	3,9 (s)	55,9

Scan # : (649 - 653) B.G. Scan # : (643 - 646)
 Mass Peak # : 192 Ret. Time : (8.400 - 8.433)
 Base Peak : 192.00 (152395)

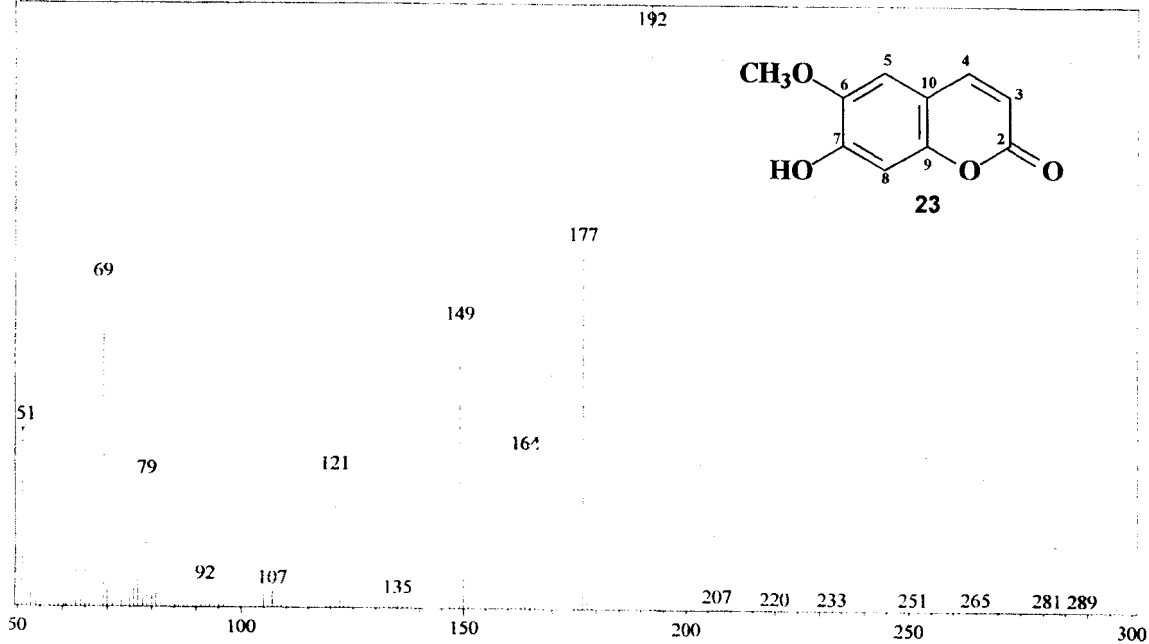
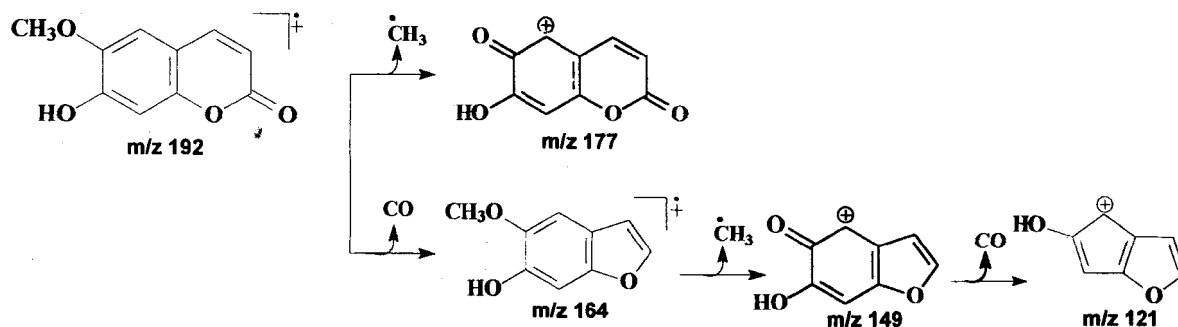


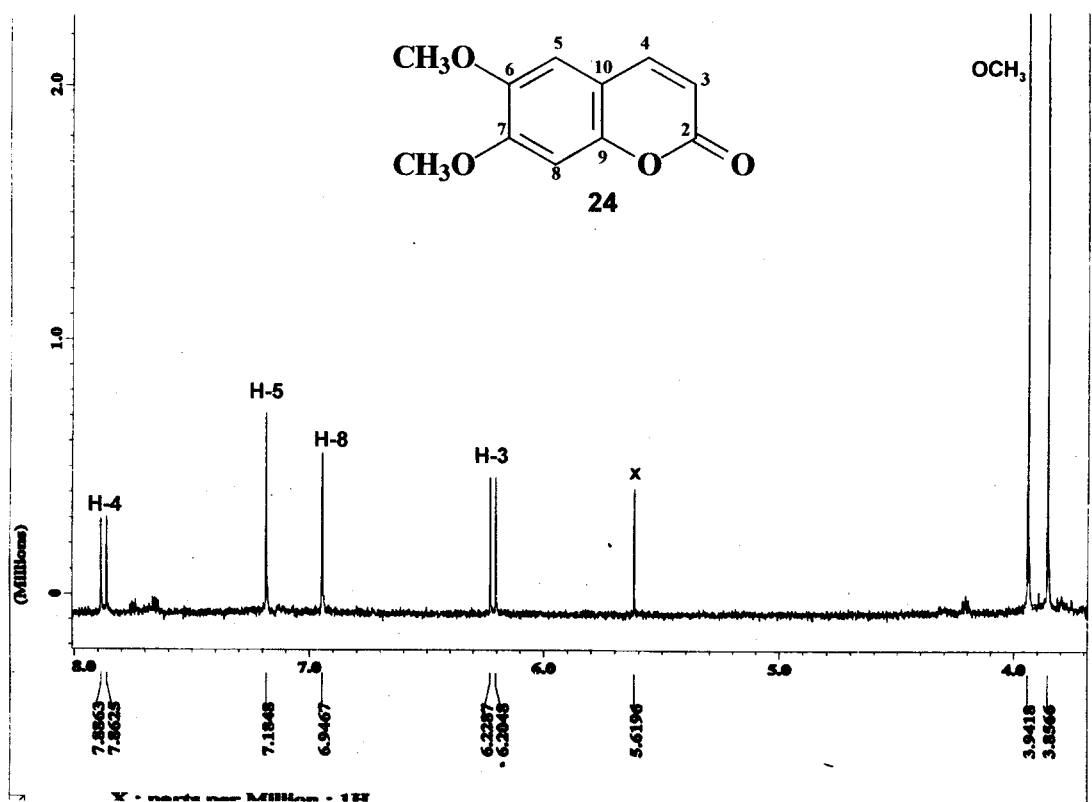
Figura III.5: Espectro de massas da substância 23.



Esquema III.2: Fragmentação de massas da substância 23.

O derivado metilado da escopoletina (**24**) foi identificado através da análise do espectro de RMN ^1H . Aparecem dois valores em δ_{H} 3,86 e δ_{H} 3,94 de duas metoxilas, confirmando a metilação da hidroxila δ_{H} 8,54 de **23**.

O espectro de NOEDIFF (Figura III.7.a-d) serviu para garantir os deslocamentos químicos dos grupos metoxílicos e dos δ_{H} do H-6 e H-8.



$\text{X CH}_2\text{Cl}_2$

Figura III.6: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) da substância **24** em D_3CCOCD_3 .

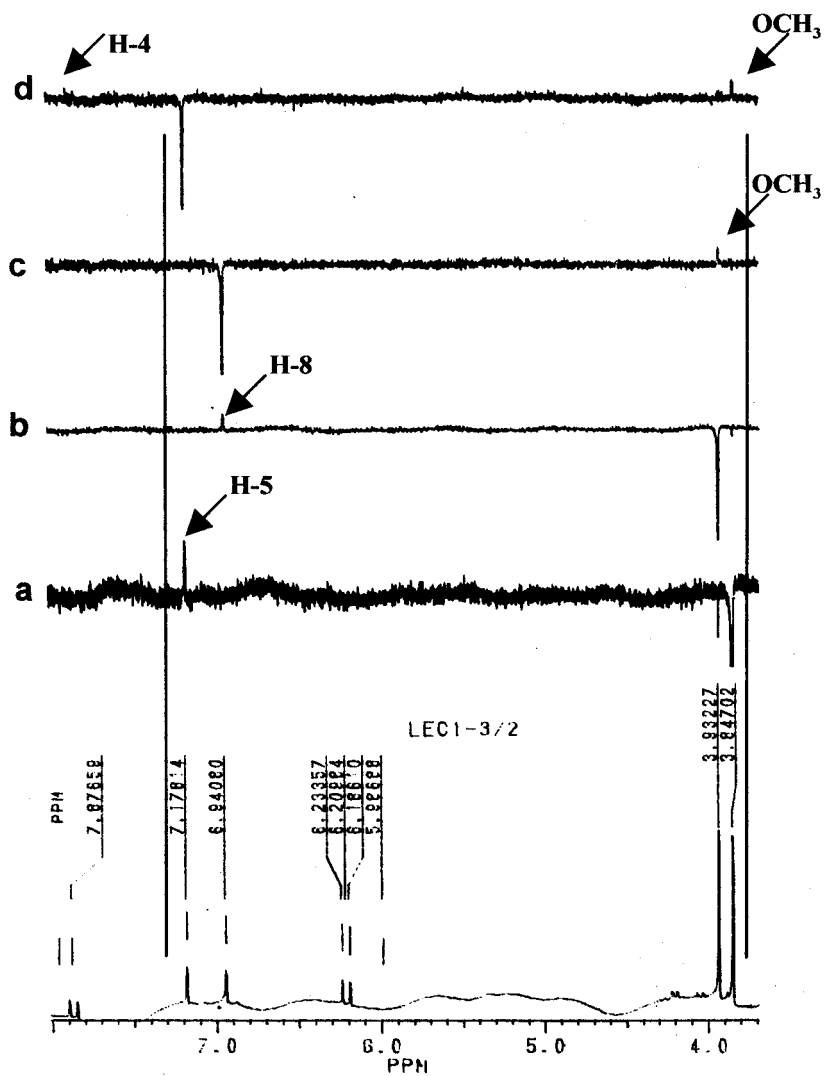
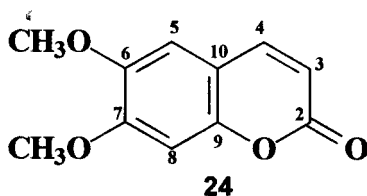


Figura III.7: Espectro resultante da dupla irradiação e subtração de espectros (NOE) do derivado metilado **24** em D_3CCOCD_3 .



III-3.1.2. Lignana

O espectro de RMN ^1H da substância **25** (Figura III.9) apresentou hidrogênios de dois sistema aromático ABC em δ_{H} : 6,98 (H-2' e H-2''); 2,0 Hz), 6,78 (H-5' e H-5''); 8,0 Hz), e 6,82 (H-6' e H-6''); 2,0 e 8,0 Hz), compatíveis com sistemas aromáticos trissubstituídos, hidrogênios em δ_{H} : 3,08 (H-1 e H-5), 4,66 (H-2 e H-6), 4,19 e 3,80 (H-4 e H-8) e de uma metoxila em δ_{H} : 3,84 (Tabela III.2).

O espectro de NOESY (Figura III.10) mostra interações entre os hidrogênios H-4 e H-8 eq com os hidrogênios H-2 e H-6 e dos hidrogênios H-2' e H-2'' com a metoxila. Estas interações confirma a estereoquímica relativa e a posição da metoxila em **25**. A comparação de dados espectrométricos de **25** com valores da literatura atribuídos para o pinoresinol (CUENCA *et al.*, 1991) confirma a identidade entre as mesmas. O espectro de massas apresenta picos cujos íons fragmentados propostos (Esquema III.3) confirmam a estrutura de **25**.

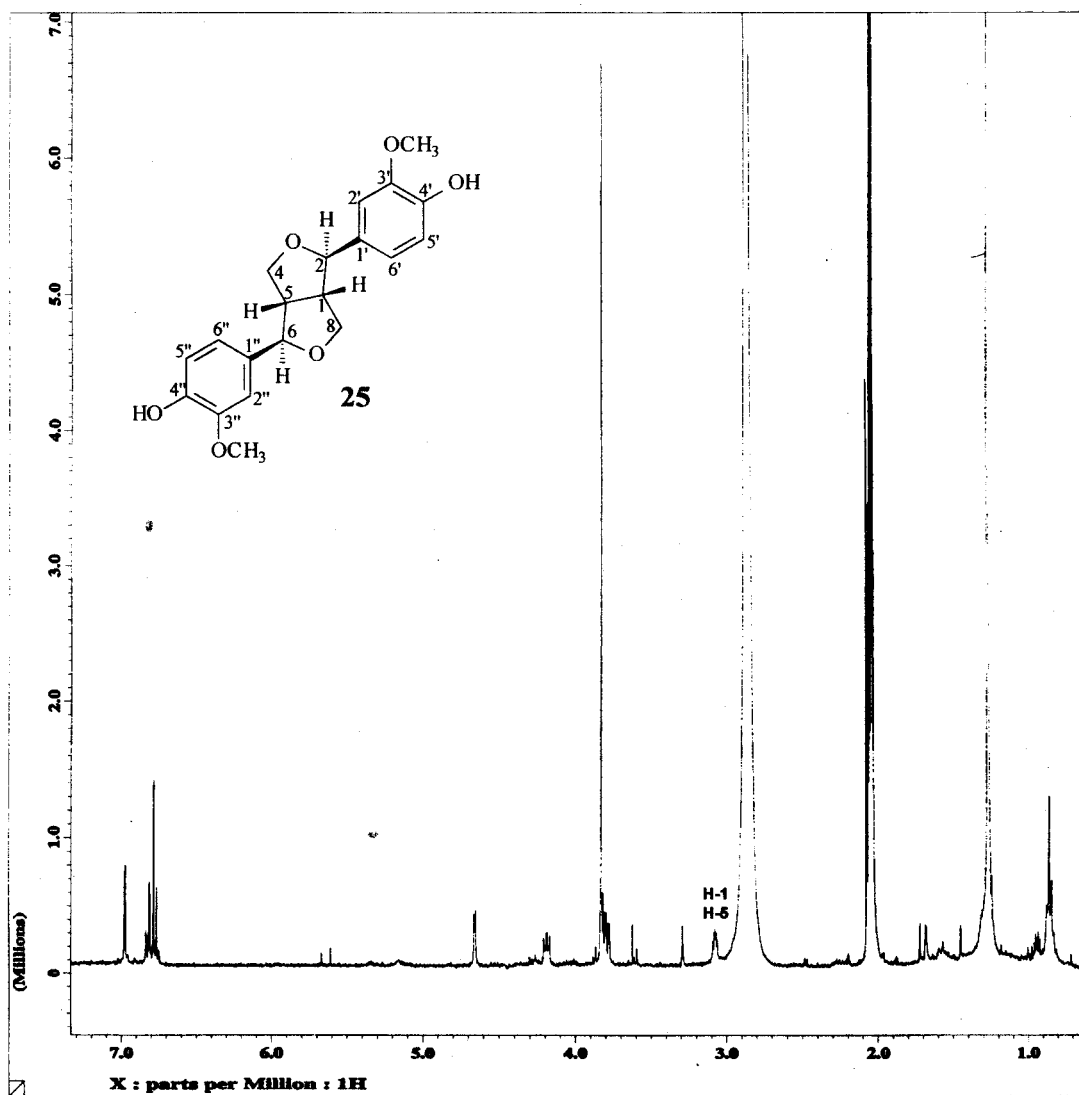


Figura III.8: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) da substância **25** em D_3CCOCD_3 .

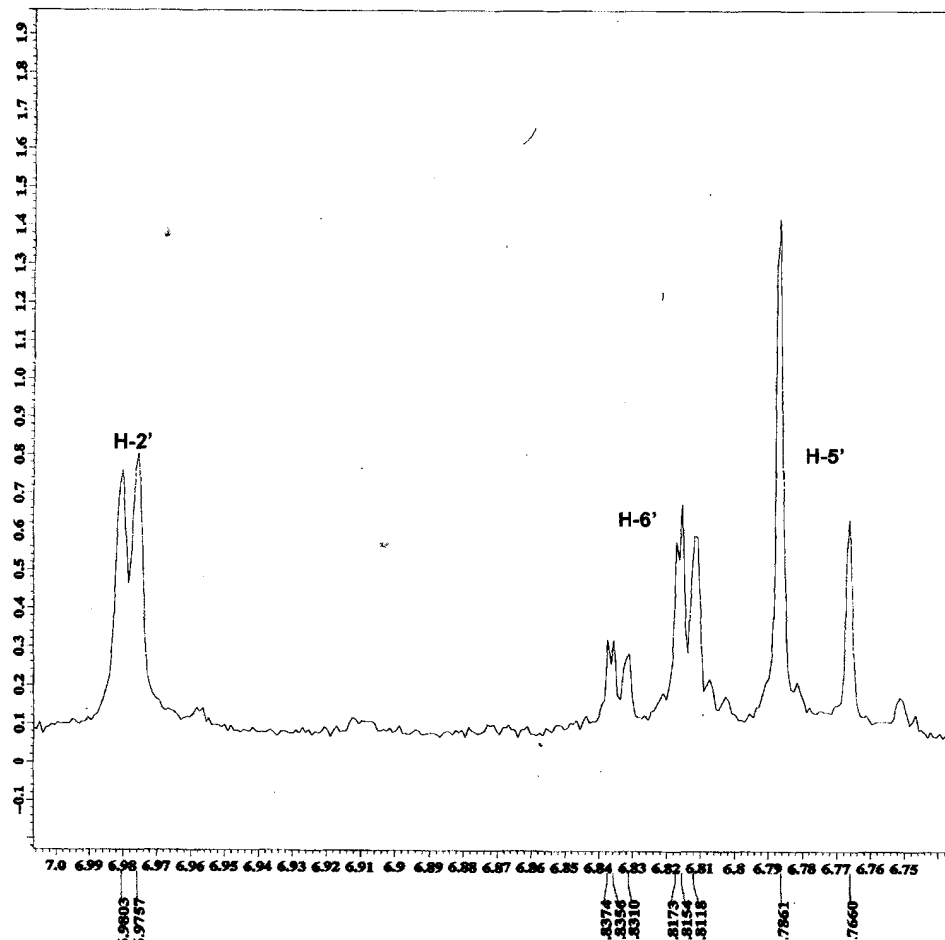
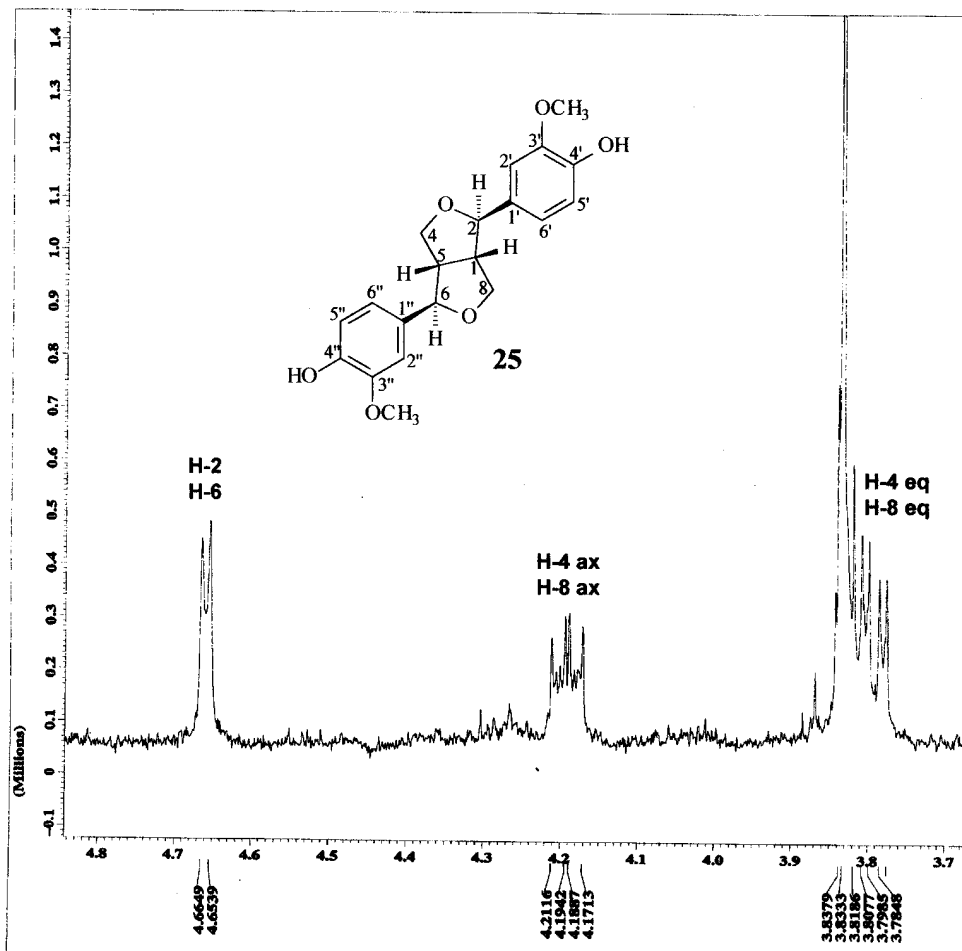


Figura III.9: Espectros de RMN 1H (400 MHz) ampliados da substância 25 em D₃CCOCD₃.

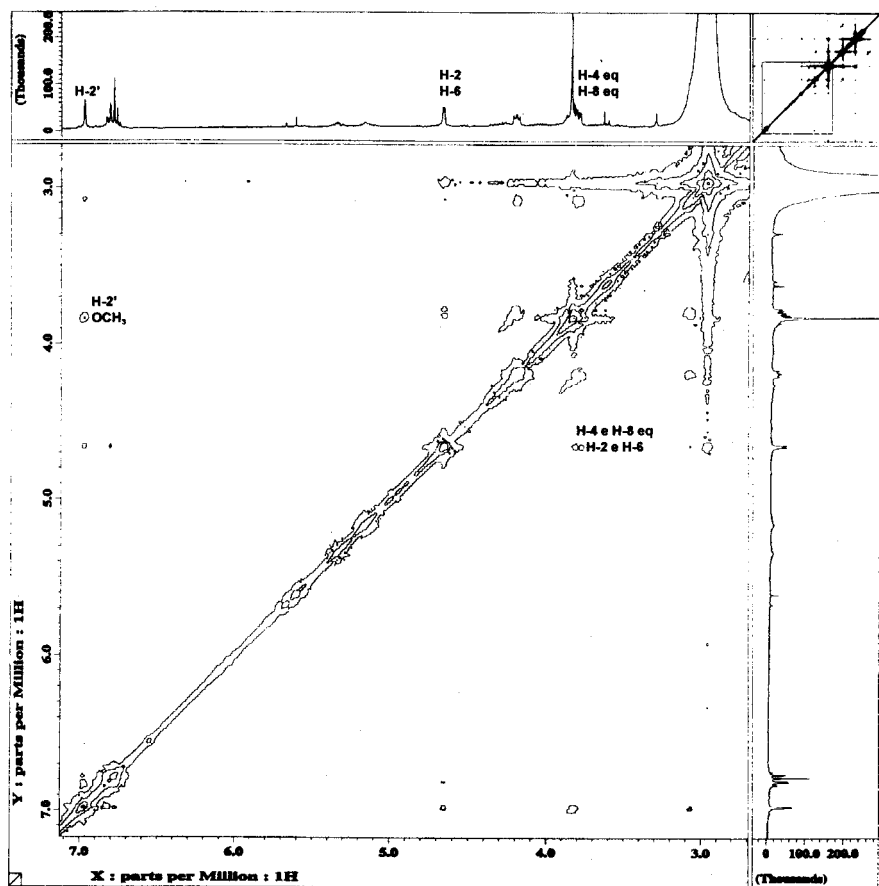


Figura III.10: Espectro de NOESY da substância 25 em D_3CCOCD_3 .

Scan # : (662 - 781)
 Mass Peak # : 461 Ret. Time : (8.506 - 9.496)
 Base Peak : 150.95 (157083)

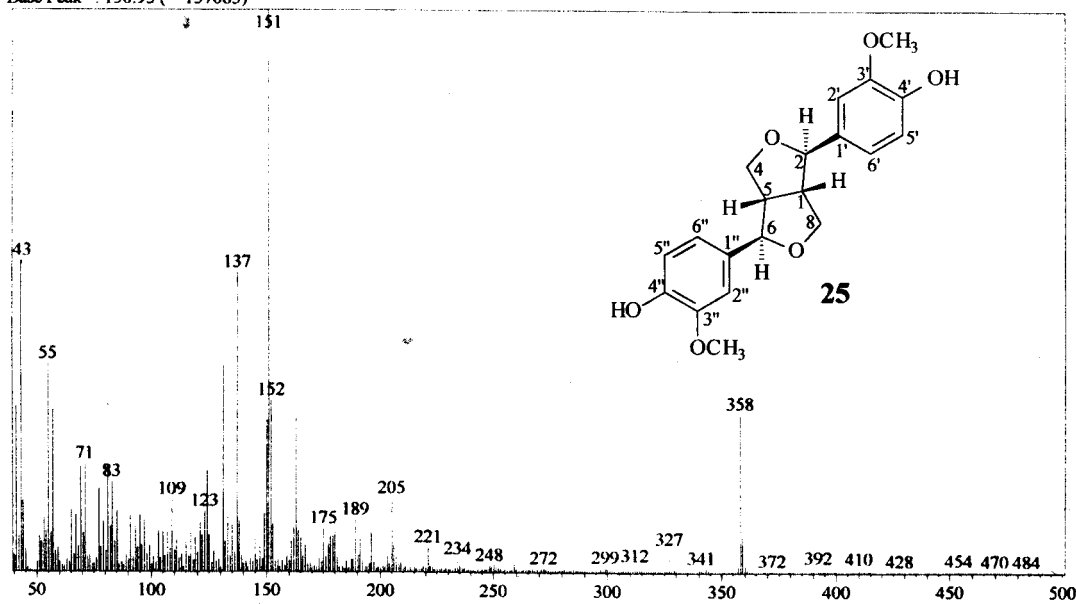
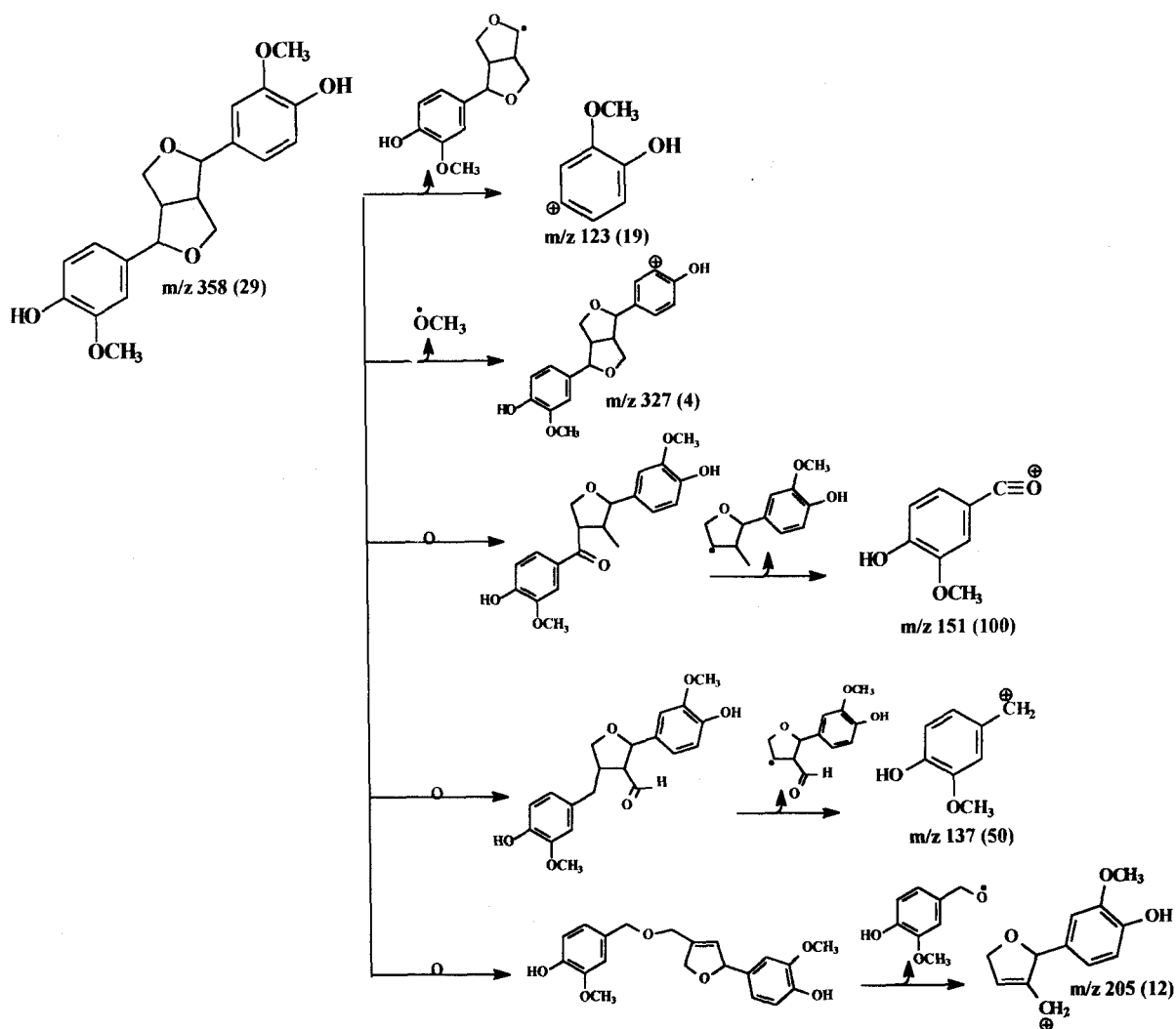


Figura III.11: Espectro de massas da substância 25.



Esquema III.3 : Fragmentação de massas da substância 25.

Tabela III.2: Dados de RMN¹H (400 MHz) da substância 25 (acetona) comparados com a literatura (CUENCA *et al.*, 1991).

C	Substância 25		Literatura
	δ_{H} (Hz)	NOE	δ_{H} (Hz)
1, 5	3,08 (m)		3,1 (m)
2, 6	4,66 (d, 4,4)	H-4 eq e H-8 eq	4,73 (d, 4,0)
4, 8	ax- 4,19 (dd, 9,0 e 7,0) eq- 3,80 (dd, 9,0 e 3,7)		4,25 (dd, 9,0 e 6,5) 3,87 (dd, 9,0 e 4,0)
1', 1''	-		-
2', 2''	6,98 (d, 2,0)		6,89 (d, 2,0)
3', 3''	-		-
4', 4''	-		-
5', 5''	6,78 (d, 8,0)		6,88 (d, 8,0)
6', 6''	6,82 (ddd, 8,0; 2,0 e 0,7)		6,82 (dd, 8,0 e 2,0)
OH			5,59 (s)
OCH ₃	3,84 (s)	H-2' e H-2''	3,91 (s)

III-3.1.3. Digitoxigenina

O espectro de IV da substância **26** (Figura III.12) revela bandas de absorção para grupo hidroxila (3468 cm^{-1} , estiramento O-H), grupamentos CH_2 e CH_3 (2934 cm^{-1} , 2861 cm^{-1}), carbonila de lactona conjugada (1745 cm^{-1}), $\text{C}=\text{C}$ conjugada (1625 cm^{-1}) e C-O ($1263\text{-}1072\text{ cm}^{-1}$).

O espectro de RMN ^1H desta substância (Figura III.13) apresenta sinais de hidrogênio olefínico em δ_{H} : 5,88 (H-22) e hidrogênios alílicos em δ_{H} : 4,80 (H-21a) e 4,98 (H-21b), uma metoxila em δ_{H} : 3,53, e sinais que pode ser atribuídos a hidrogênios de um carboidrato em δ_{H} : 3,22 (H-3'), 3,57 (H-5'), 3,65 (H-2'), 3,85 (H-4'), 4,25 (H-1'). Os demais sinais múltiplos entre δ 1,25 e δ 2,2 ppm pode ser atribuído a hidrogênios de esteróide, o que é confirmado pelos dois singletos em δ 0,87 e δ 0,94. O dubleto em δ 1,35 pode ser atribuído ao grupo metila de um carboidrato. Esta dedução se justifica pelo acoplamento observado entre os hidrogênios deste sinal e o hidrogênio carbinólico representado pelo sinal em δ_{H} 3,57 (q) (Figura III.15, Tabela III.3, página 161).

Além das interpretações descritas acima foi identificada a lactona com base nos sinais em δ_{H} 5,88 (s) ligado a CH δ_{C} 117,7 e δ_{H} 4,80 e 4,98 de um grupo metilênico cujo δ_{C} CH_2 é 73,4 (Figura III.19). A contagem do número de CH, CH_2 , CH_3 e C conduziu a identificação da aglicona com uma unidade de carboidrato.

A identificação dos grupos descritos acima conduziu a comparação dos sinais de δ_{H} e δ_{C} de **26** com os da digitoxigenina registrada na literatura (ABE *et al.*, 1992). A análise detalhada dos espectros de RMN 1D e 2D permitiu fazer a completa atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos desta substância (Tabela III.3), e contribuiu para complementar as atribuições de δ_{H} da literatura (ABE *et al.*, 1992).

A análise dos deslocamentos químicos dos carbonos hidrogenados permitiu atribuir os δ_{C} através da interpretação do espectro HMQC (Figura III.20) e os deslocamentos dos carbonos quaternários foram confirmados através dos sinais do espectro HMBC (Figura III.21).

Os picos em m/z 339 e 357 (Figura III.22) confirmam a proposta da digitoxigenina para **26**.

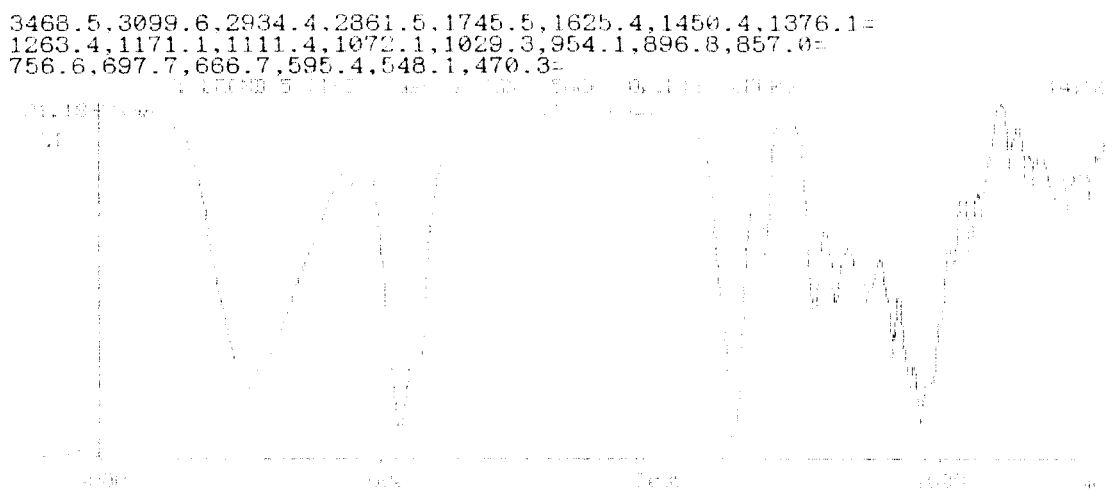


Figura III.12: Espectro de IV da substância 26.

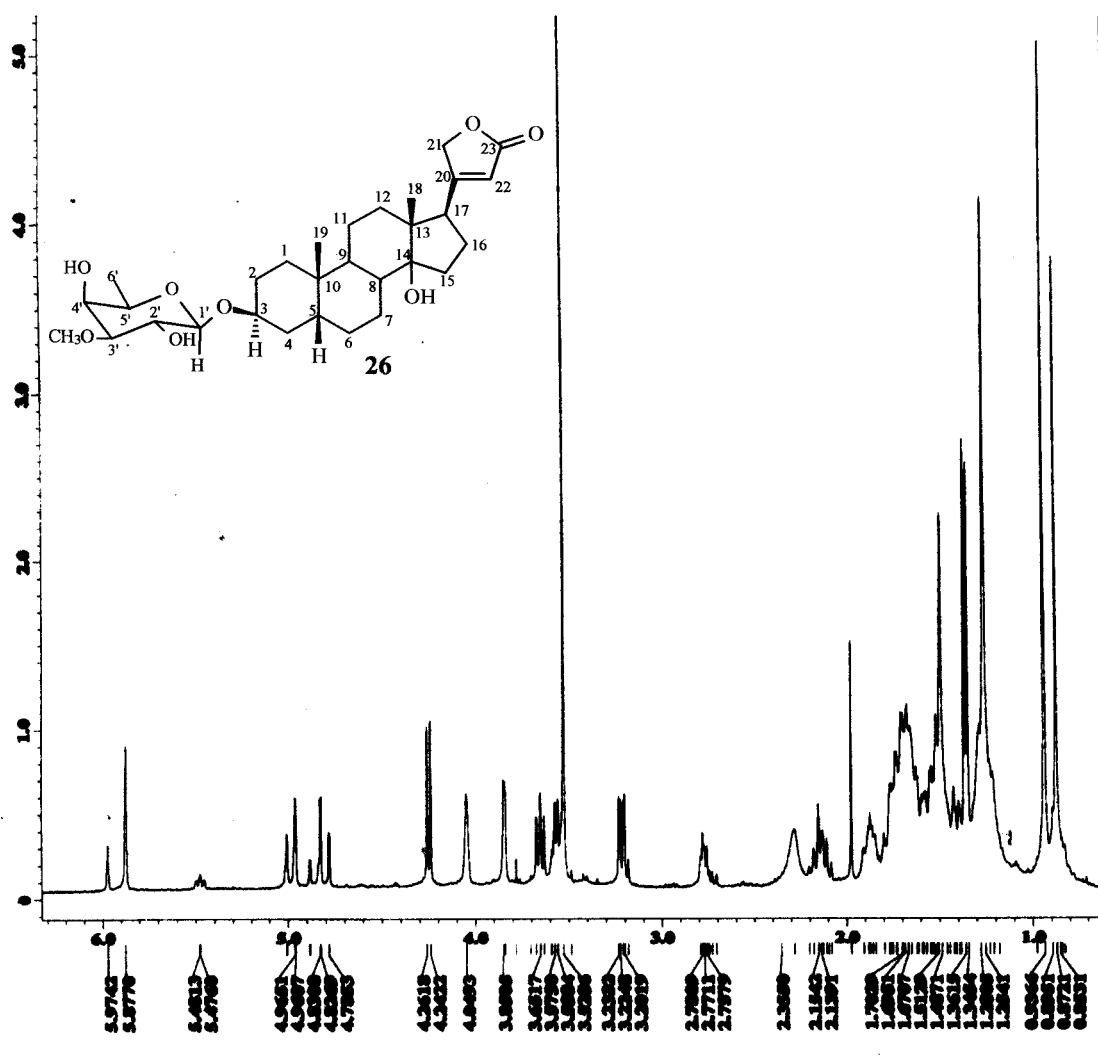


Figura III.13: Espectro de RMN ¹H (400 MHz) da substância 26 em CDCl₃.

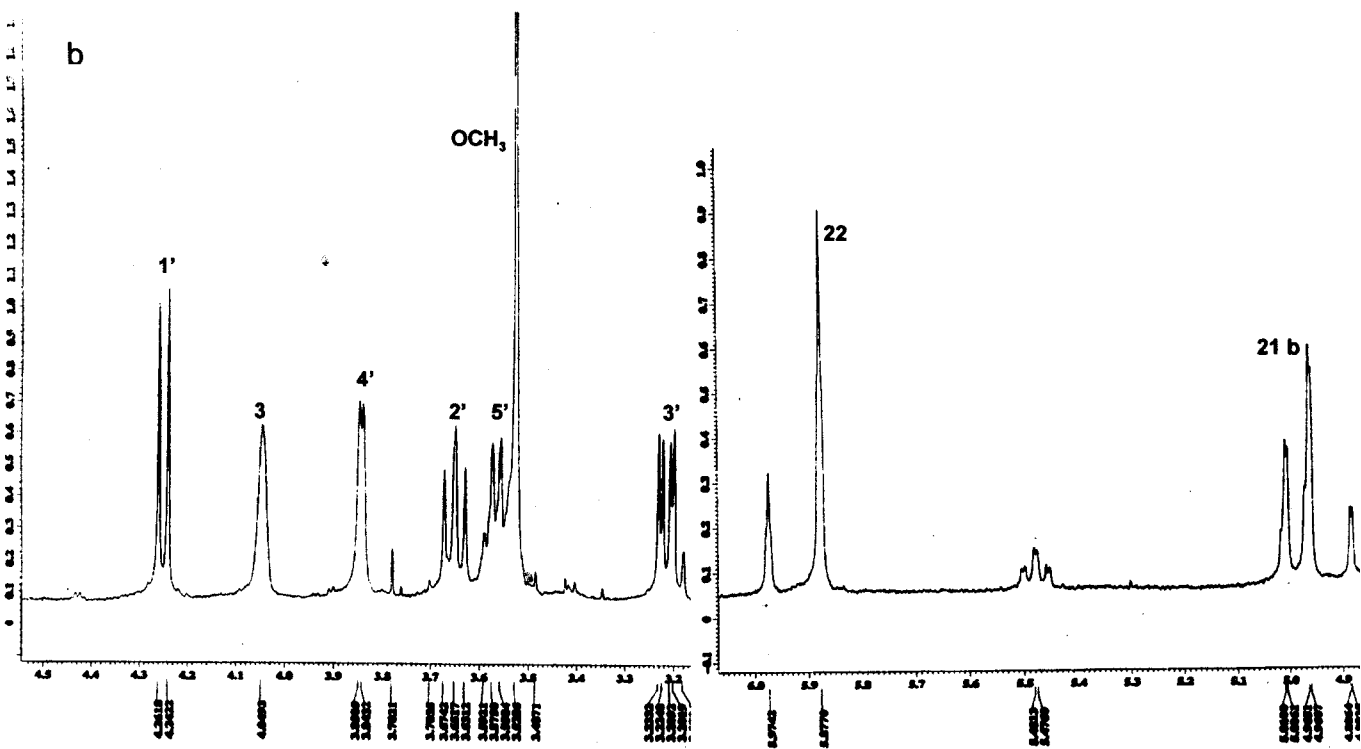
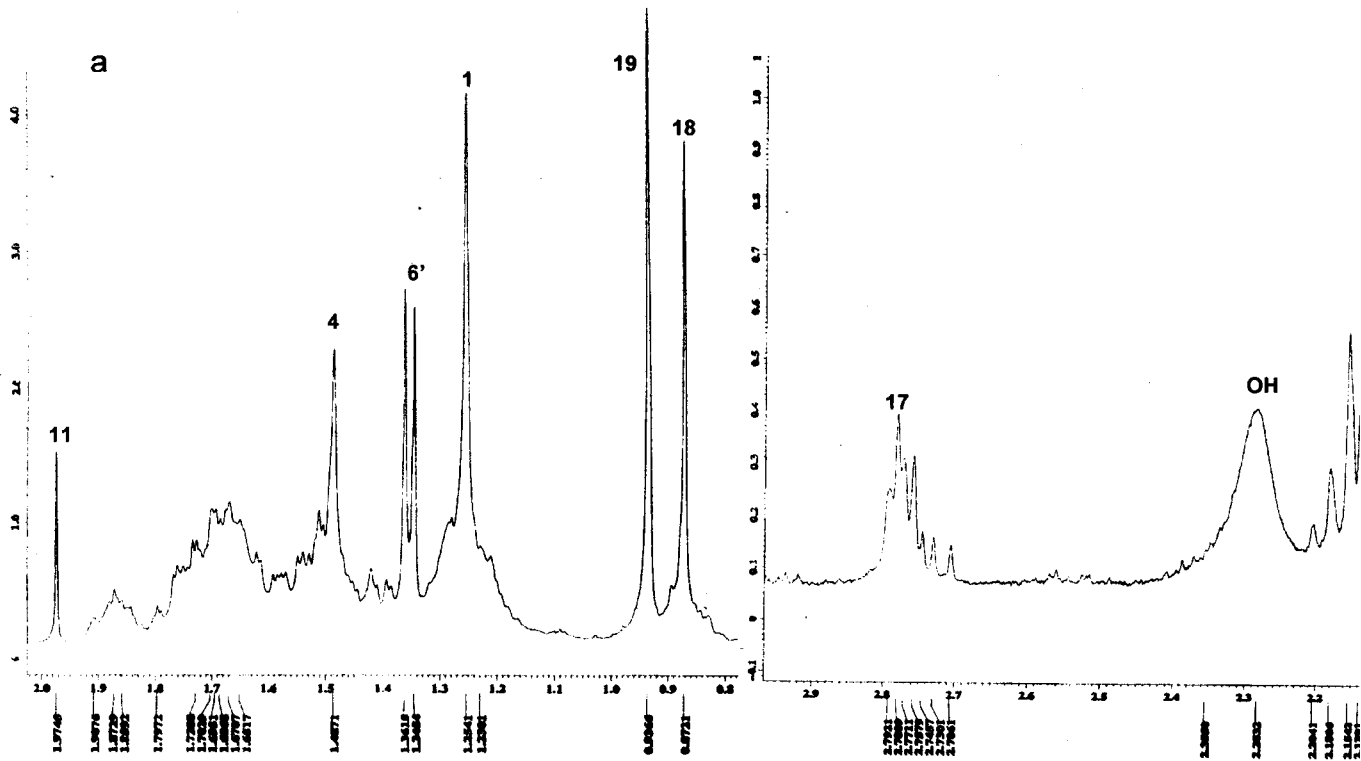


Figura III.14: Espectros de RMN ^1H (400 MHz) ampliados da substância 26 em CDCl_3 .

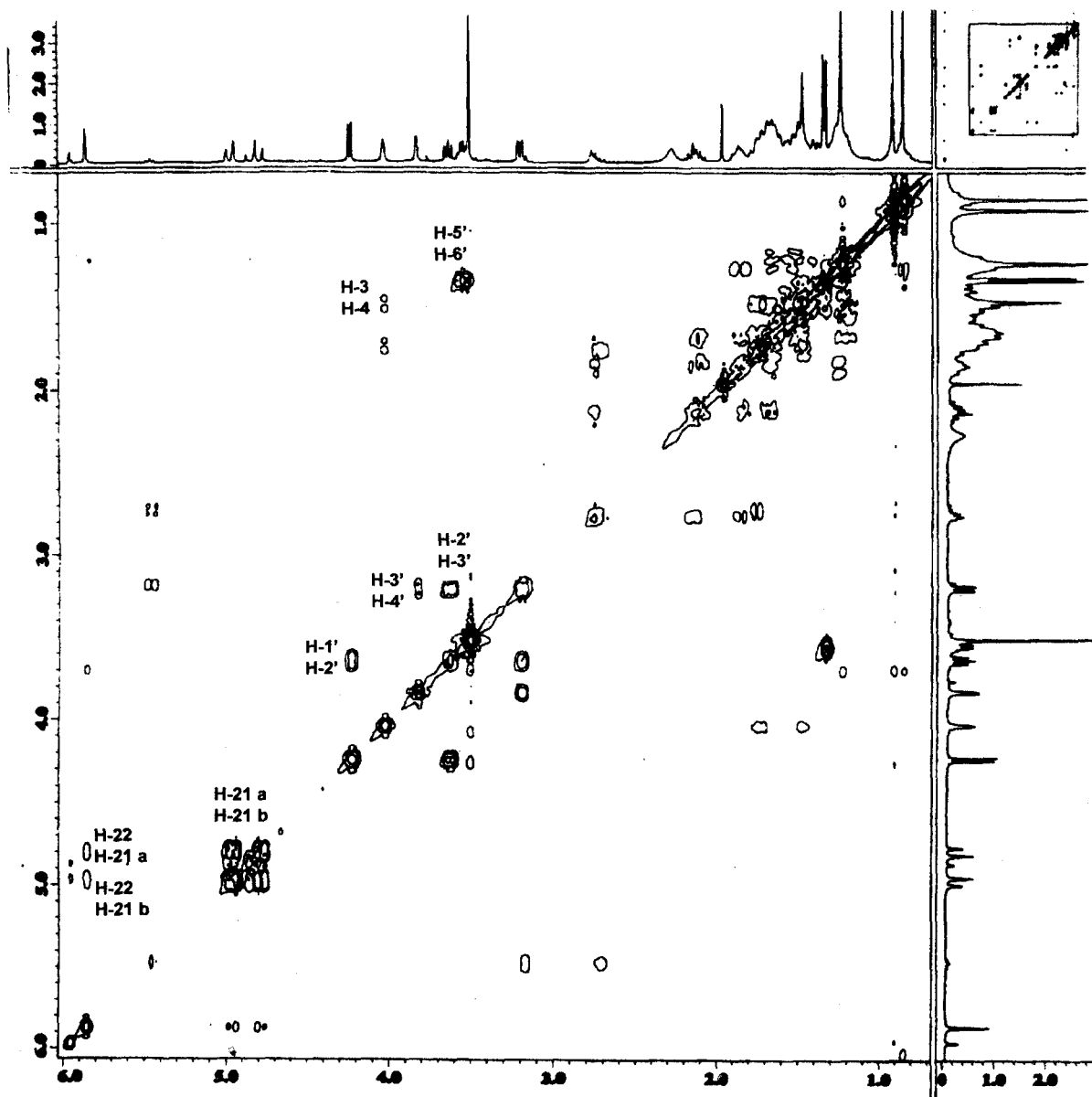
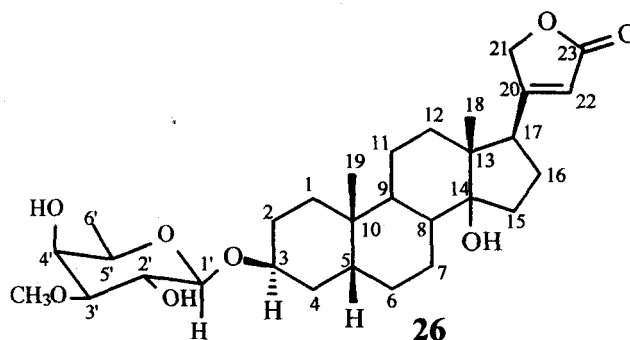


Figura III.15: Espectro de RMN $^1\text{H}^1\text{H}$ COSY (400 MHz, CDCl_3) da substância 26.



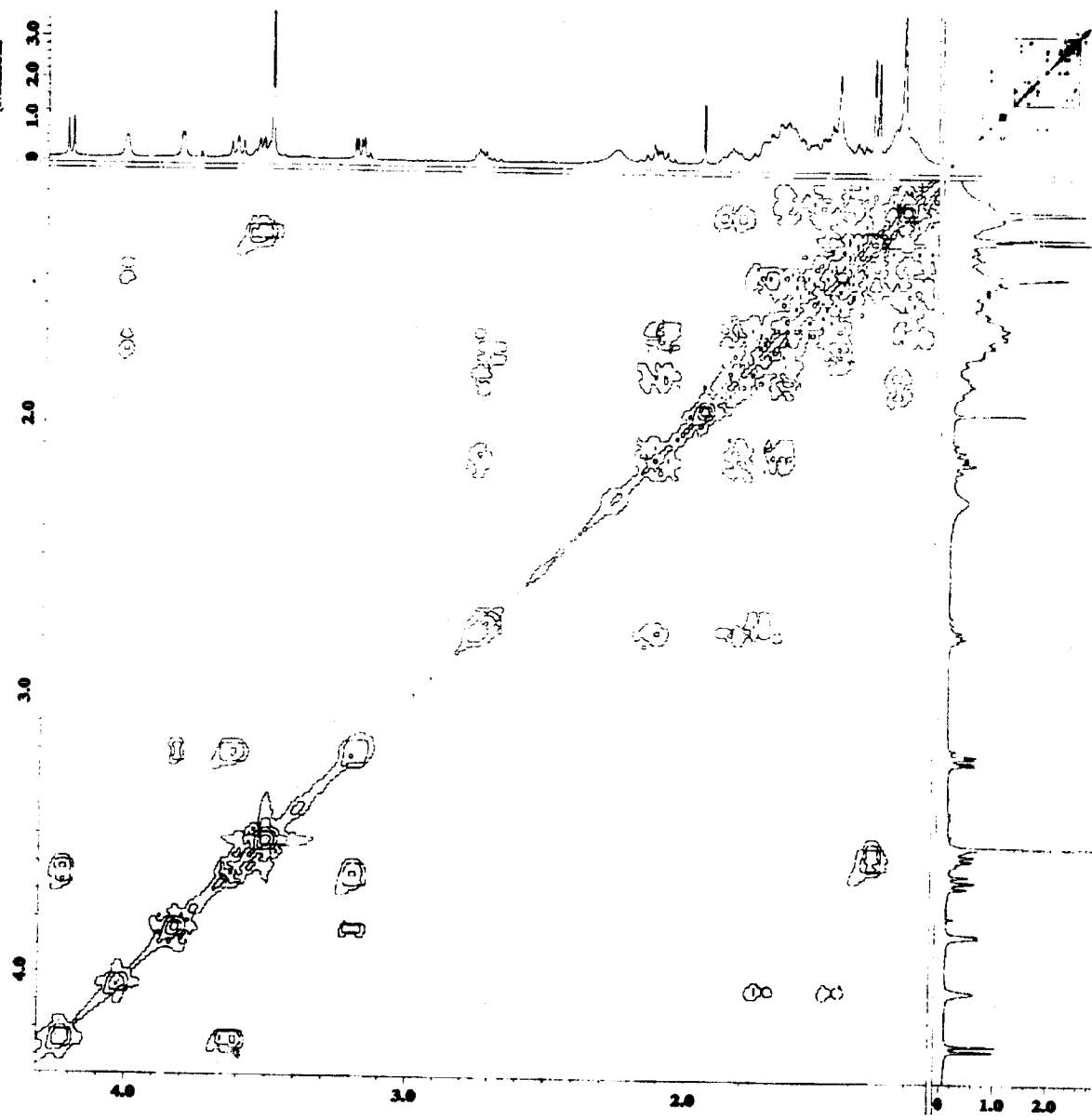
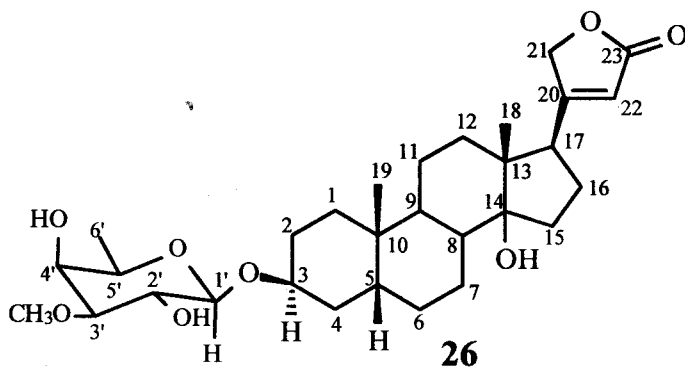


Figura III.16: Espectro de RMN ^1H ^1H COSY (400 MHz, CDCl_3) ampliado de δ 0,0 a 4,0 ppm da substância 26.



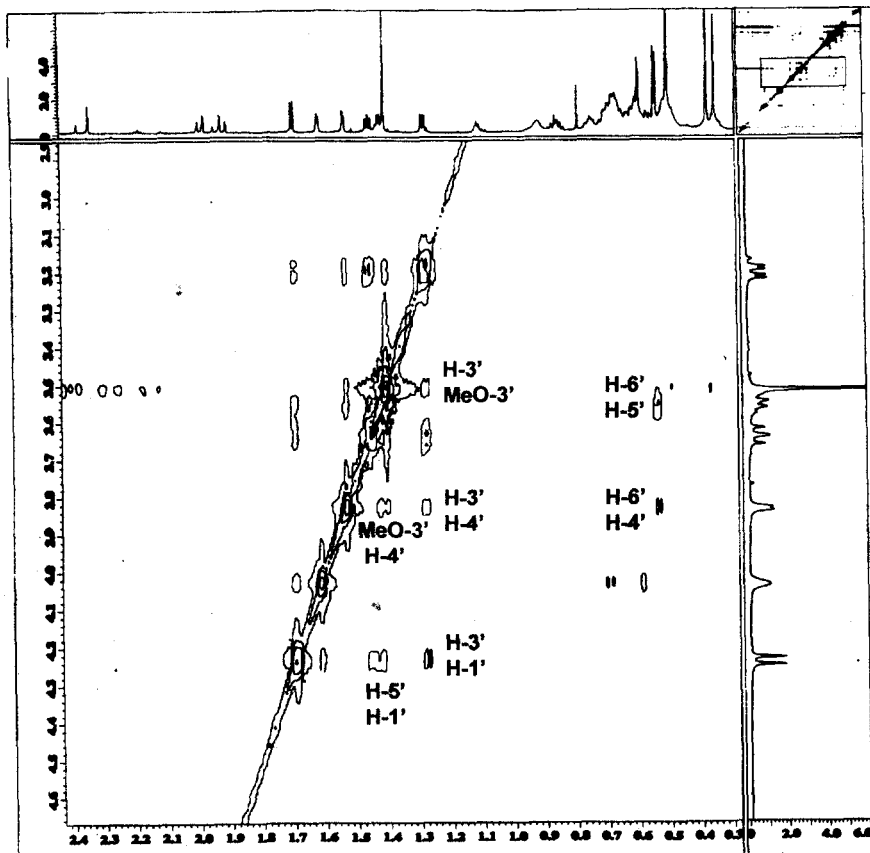
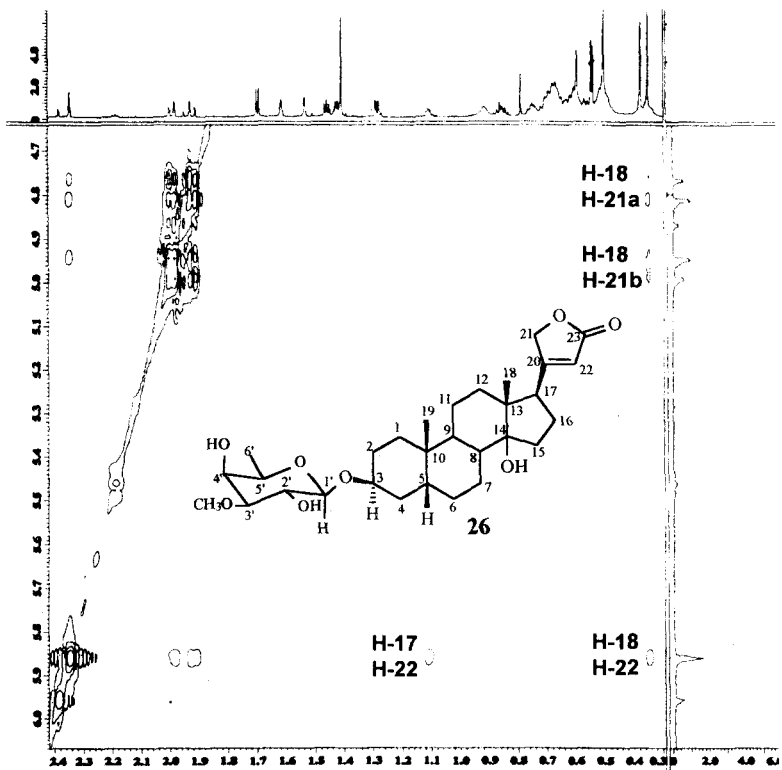


Figura III.17: Espectro bidimensional NOESY da substância 26 em $CDCl_3$

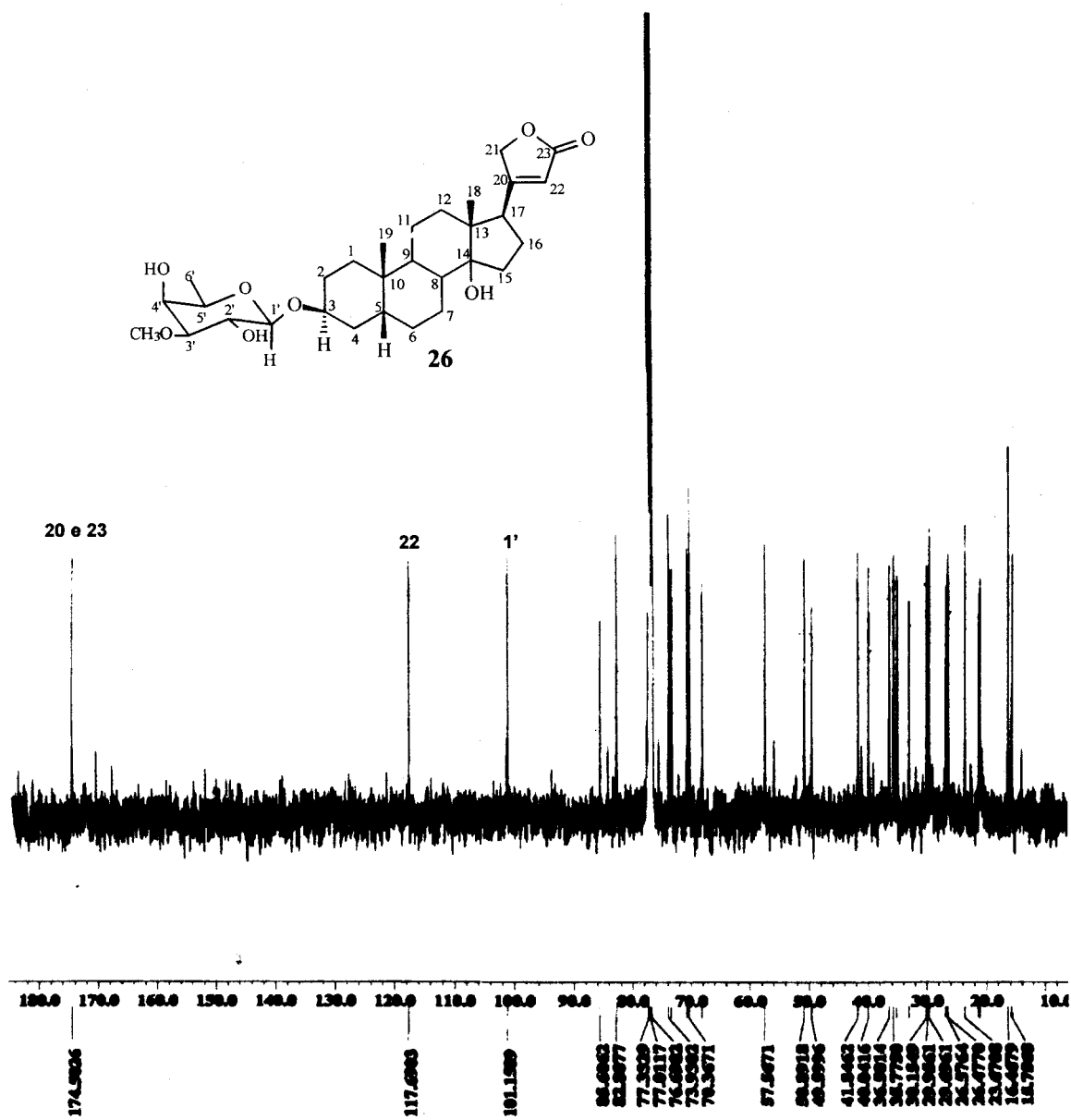


Figura III.18: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) da substância 26 em CDCl_3 .

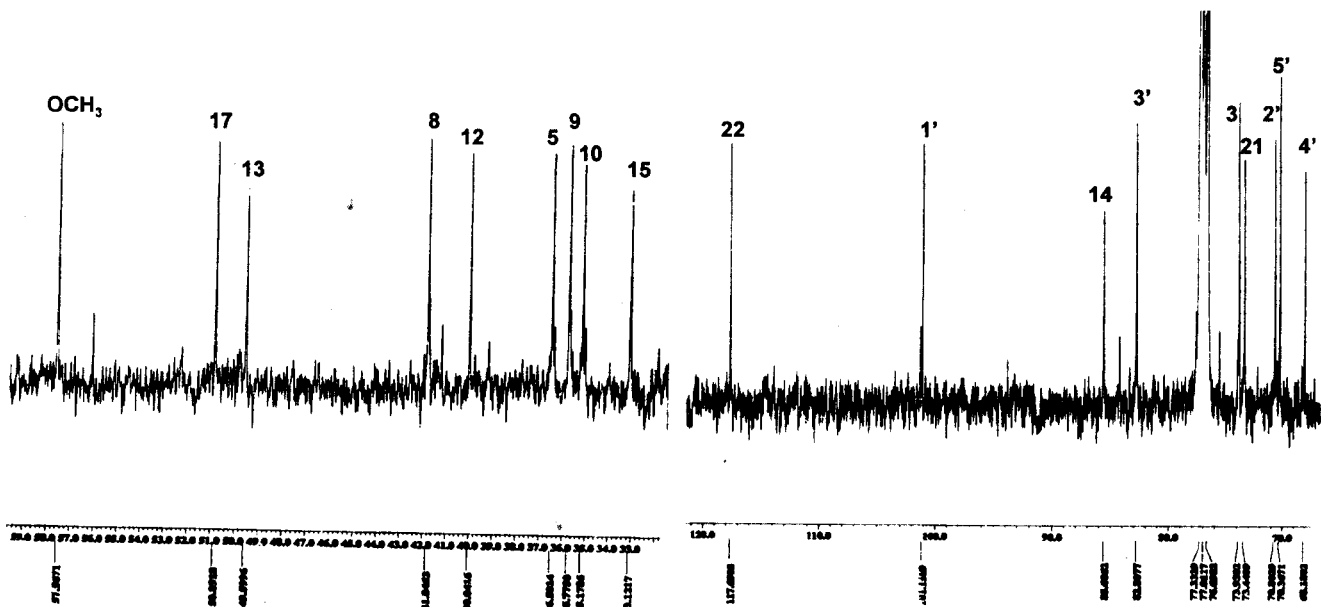
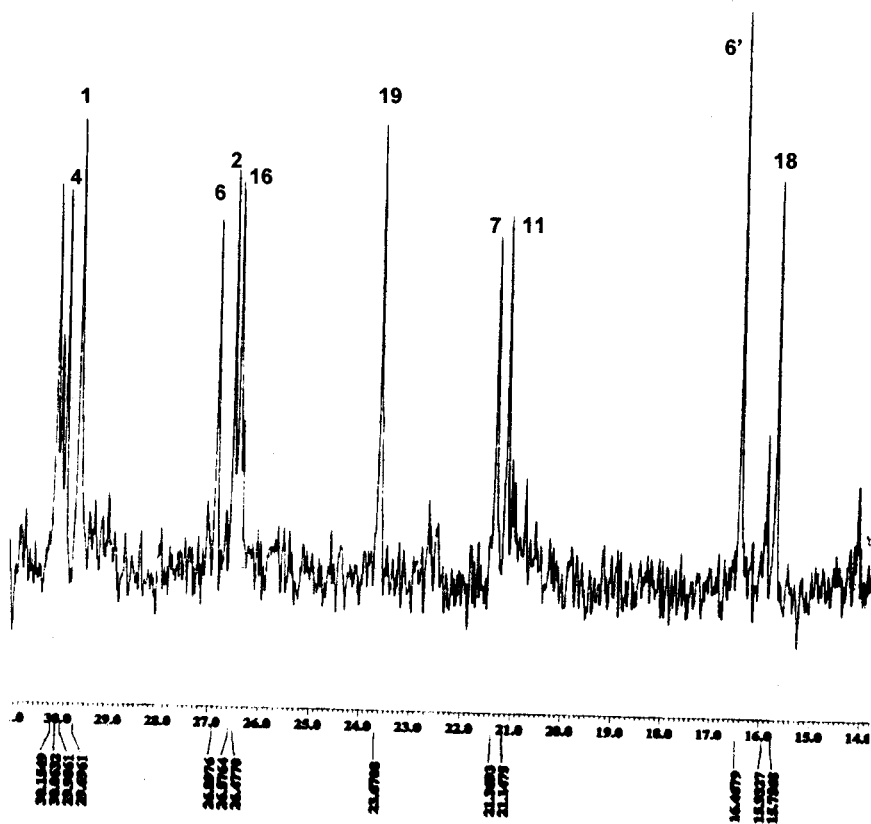
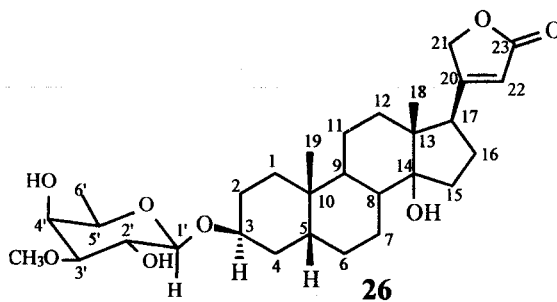


Figura III.19: Espectros de RMN de ^{13}C (100 MHz) ampliados da substância 26 em CDCl_3 .



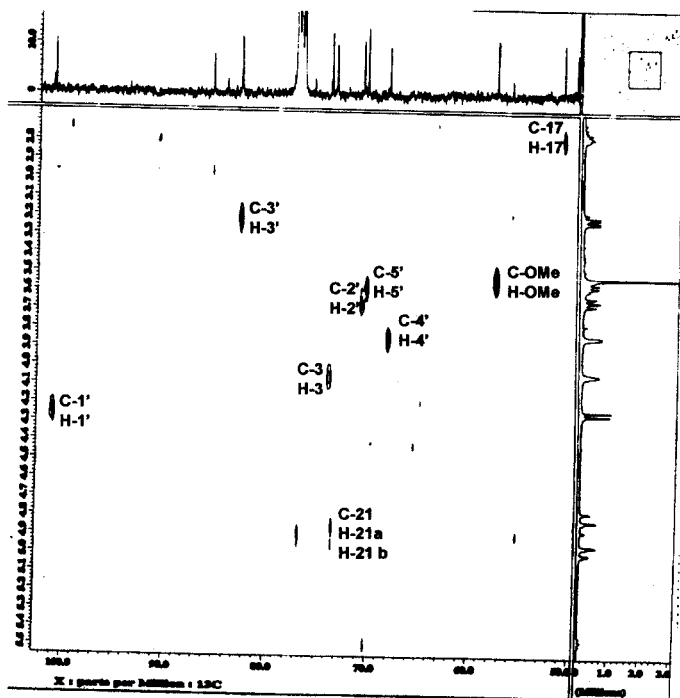
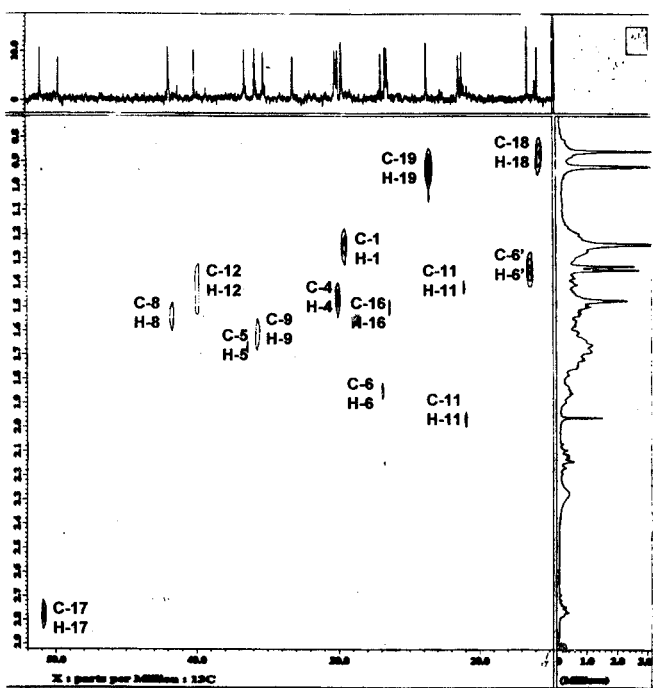
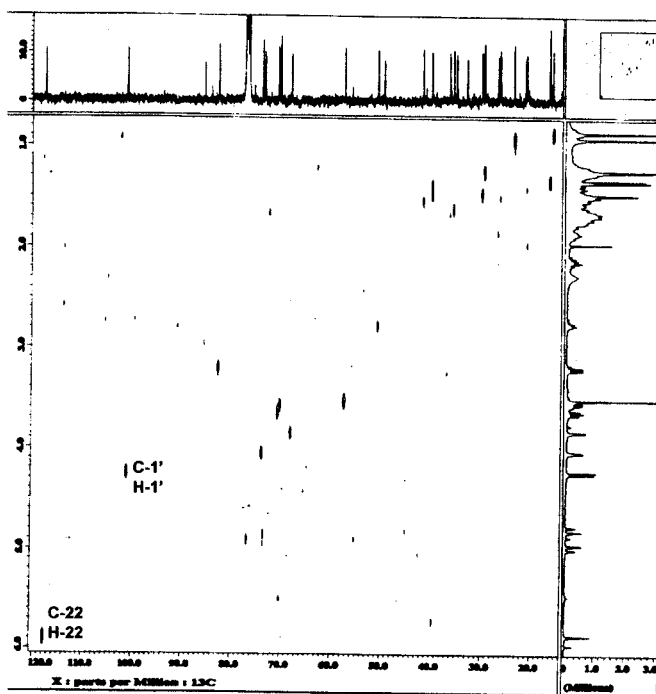
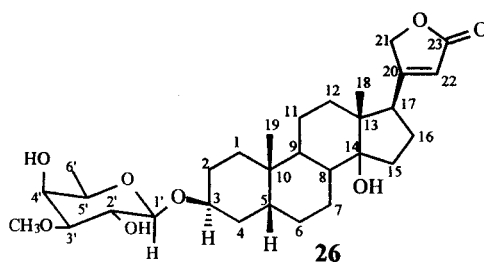


Figura III.20: Espectros de RMN HMQC (400 MHz, CDCl_3) da substância 26.



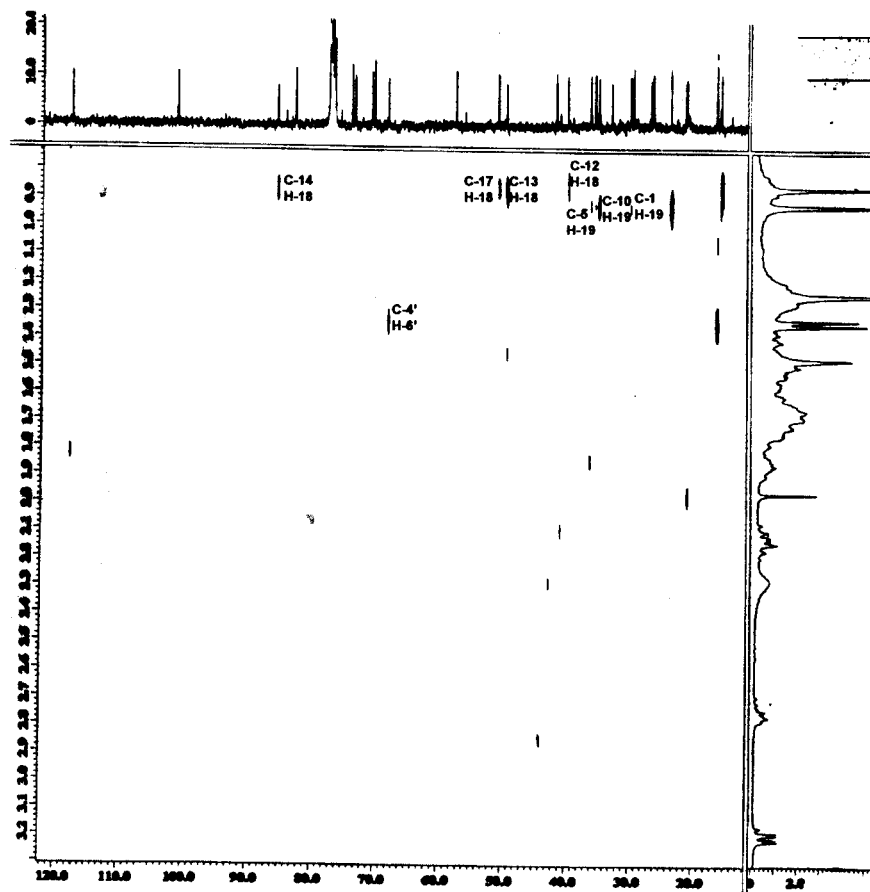
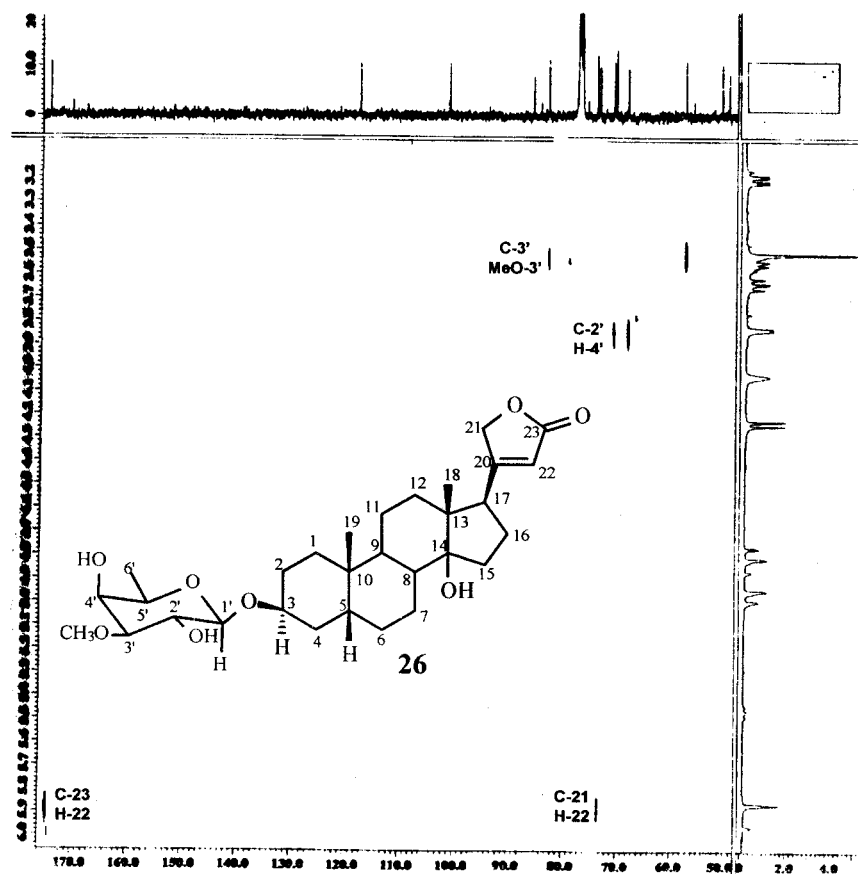


Figura III.21: Espectro de RMN HMBC (400 MHz, CDCl_3) da substância 26.

Scan # : (2052 - 2345) B.G. Scan # : (2803 - 3160)
 Mass Peak # : 533 Ret. Time : (20.092 - 22.533)
 Base Peak : 74.10 (65797)

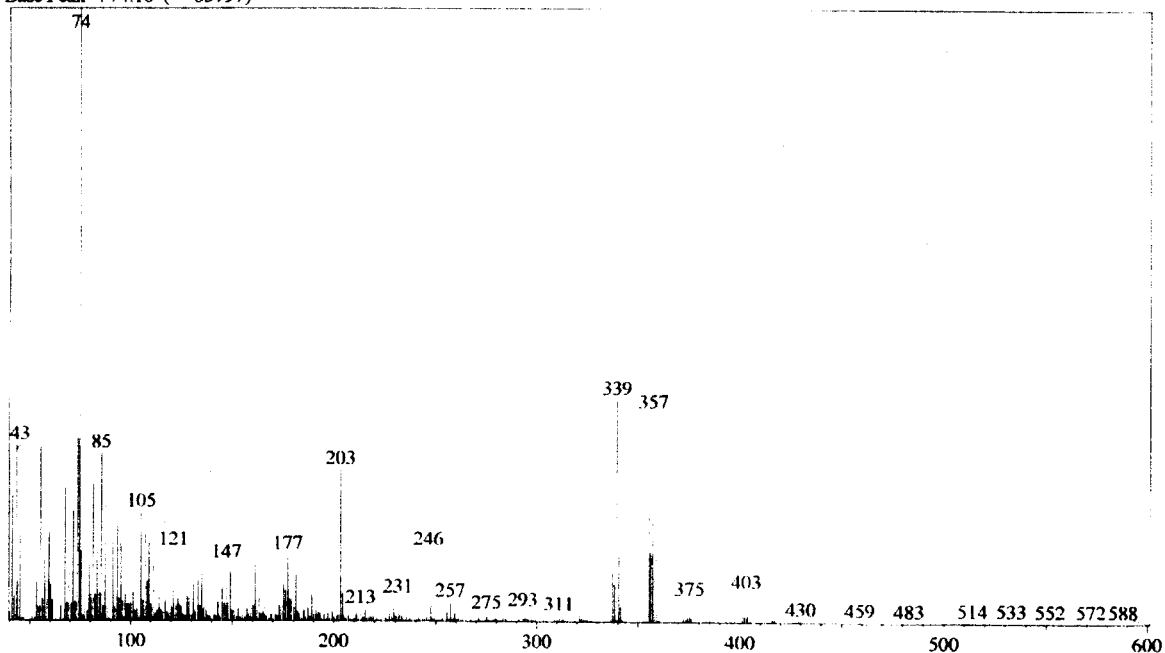
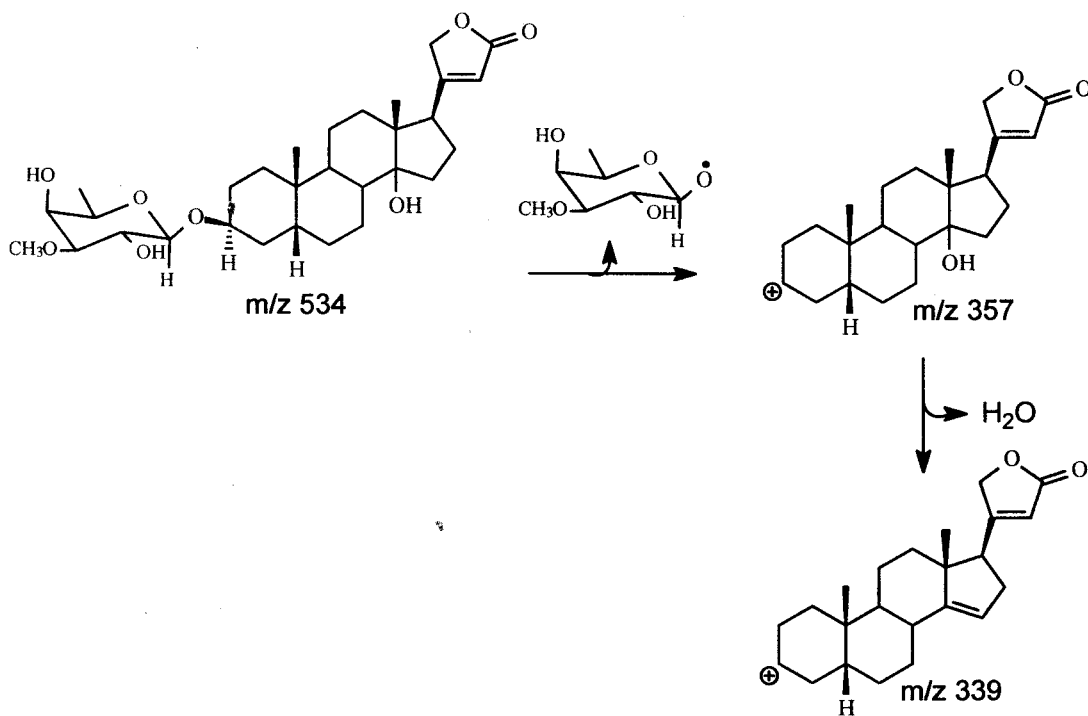


Figura III.22: Espectro de massas da substância 26.



Esquema III.4: Fragmentação de massas da substância 26.

Tabela III.3: Dados de RMN ^1H (400 MHz) da substância **26** (CDCl_3) comparados com a literatura (ABE *et al.*, 1992).

C	$^1\text{H}-^{13}\text{C}-\text{COSY}-^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H}-^{13}\text{C}-\text{COSY}-$		Literatura	
	δ_{C}	δ_{H} (Hz)	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H} (Hz)
1	29,7	1,25 (sl)		H-19	30,3	
2	26,6	1,26			26,9	
3	73,9	4,05 (sl)			73,7	4,17 (sl)
4	30,0	1,49 (sl)			31,0	
5	36,5	1,66		H-19	36,8	
6	26,9	1,87			27,1	
7	21,4	1,64; 1,20			21,5	
8	41,8	1,54			41,9	
9	35,8	1,58		H-19	35,8	
10	35,2	-	H-19		35,5	-
11	21,1	1,97; 1,43			21,9	
12	40,0	1,39		H-18	39,8	
13	49,6	-	H-18		50,1	-
14	85,6	-		H-18	84,6	-
15	33,1	2,08; 1,68			33,2	
16	26,5	1,70; 1,54			27,1	
17	50,9	2,77 (dd; 4,5; 9,2)		H-18	51,5	2,80 (dd; 5,0; 9,0)
18	15,8	0,87 (s)			16,2	1,02 (s)
19	23,7	0,94 (s)			23,8	0,83 (s)
20	174,5	-			175,9	-
21	73,4	4,80 (dd; 1,6; 18,2) 4,98 (dd; 1,8; 18,2)		H-22	73,6	5,02 (dd; 1,0; 18,0) 5,30 (dd; 1,0; 18,0)
22	117,7	5,88 (s)			117,6	6,12 (sl)
23	174,5	-	H-22		174,4	-
1'	101,2	4,25 (d; 7,8)			98,8	5,23 (d; 4,0)
2'	70,8	3,65 (t; 9,0)		H-4'	73,4	4,05 (dd; 4,0; 9,0)
3'	82,8	3,22 (dd; 3,4; 9,2)		MeO-3'	85,4	3,99 (t; 9,0)
4'	68,2	3,85 (dl; 3,0)		H-6'	76,6	3,65 (t; 9,0)
5'	70,4	3,57 (d; 6,4)			68,9	4,30 (dq; 9,0; 6,0)
6'	16,5	1,35 (d; 6,4)			18,5	1,60 (d; 6,0)
MeO-3'	57,6	3,53 (s)			60,5	3,83 (s)

III-4. Referências – Capítulo III

ABE, F.; YAMAUCHI, T.; NOHARA, T. C-Nor-D-homo-cardenolide glycosides from *Thevetia neriifolia*. *Phytochemistry*, **31** (1), 251-254, **1992**.

CAMACHO, M. R.; PHILLIPSON, J. D.; CROFT, S. L.; KIRBY, G. C.; WARHURST, D. C.; SOLIS, P. N. Terpenoids from *Guarea rhopalocarpa*. *Phytochemistry*, **56**, 203-210, **2001**.

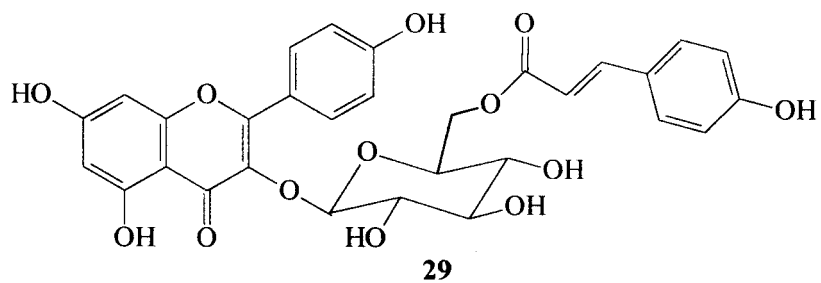
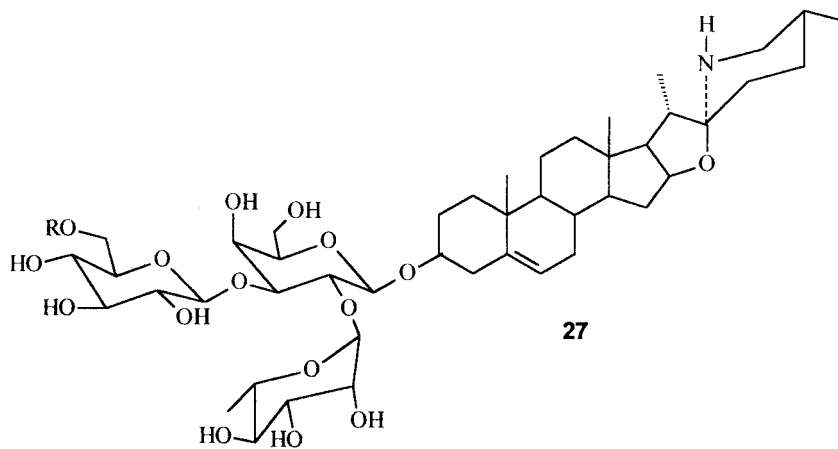
CUENCA, M. D. R.; CATALAN, C. A. N. Monoterpenes and lignans from *Mikania saltensis*. *Jornal of Natural Products*, **54** (4), 1162-1164, **1991**.

SANKAR, S. S.; GILBERT, R. D.; FORNES, R. E. ¹³CNMR studies of some hydroxycoumarins and related compounds. *Organic Magnetic Resonance*, **19** (4), 222-224, **1982**.

CAPÍTULO IV
ESTUDO QUÍMICO DE *Solanum crinitum*



IV.1- Constituintes químicos aislados de *Solanum crinitum*



IV.2- Isolamento e purificação dos constituintes

Os frutos verdes de *Solanum crinitum* Lam foram coletados em Seropédica (Rio de Janeiro, Brasil) e uma excisata desta espécie (Sarmento s. n., JPB-28000), foi depositada no Herbarium Lauro Pires Xavier da Universidade Federal da Paraíba (Paraíba, Brasil).

a) Isolamento dos alcalóides dos frutos verdes:

Os frutos verdes e triturados de *Solanum crinitum* (2,6 Kg) foram tratados com etanol contendo 2% de ácido acético. Na solução (900 mL) foi adicionada a mesma quantidade de uma solução aquosa de AcOH 10%. Filtrou-se, a vácuo, com uma camada de celite sobre o papel de filtro. Ao filtrado foi adicionado NH₄OH (pH 9-10) e submetido a resfriamento em geladeira (pernoite), uma fração rica em glicoalcalóides totais foi precipitada (96,36 g), a qual foi coletada por filtração.

O extrato dos glicoalcalóides totais foi cromatografado em coluna com Sephadex LH-20 usando metanol como eluente e foram recolhidas 25 frações. As frações de 1 a 5 foram reunidas e cristalizadas em acetona fornecendo um sólido amorfo (PF: 301°C, 250 mg) que apresentou teste positivo para alcalóide com reagente de Dragendorff. Este material foi analisado através de RMN¹H, ¹³C (1D e 2D) e comparação com dados da literatura (SHASHI *et al*, 1980). Desta análise foi identificada a solasonina **27**.

b) Isolamento do flavonóide tilirosídeo dos tricomas dos frutos:

Os tricomas dos frutos verdes foram raspados e submetidos à extração com clorofórmio, obtendo-se o extrato clorofórmico dos tricomas dos frutos verdes de *Solanum crinitum*. Este extrato foi cromatografado em Sephadex LH-20, usando metanol como eluente obtendo-se 20 frações. Nas frações 17-20 foi identificado a presença de um flavonóide contendo carboidrato e sinais de ácido cumárico. Considerando que foi isolado o tilirosídeo dos tricomas do caule desta espécie, fez-se comparação dos dados desta substância com valores do tilirosídeo (KAOUADJI, 1990). Esta análise permitiu identificar o 3-(6-coumaroil-β-D-glicopiranosil),4',5,7-triidroxiflavona **29**.

IV-3. Resultados e discussão

IV-3.1. Determinação estrutural dos constituintes

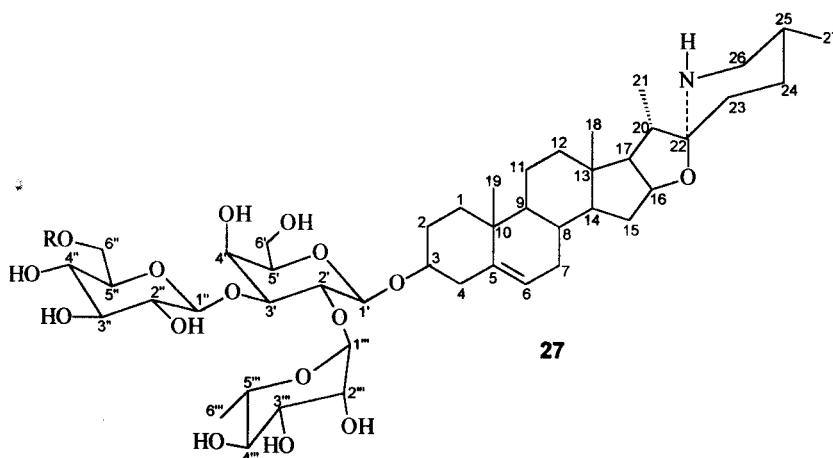
IV-3.1.1. Glicoalcalóide

a) Solasonina

O espectro de IV da substância **27** (Figura IV.1) revela bandas de absorção para grupo hidroxila (3409 cm^{-1} , estiramento O-H), grupamento CH_2 e CH_3 (2939 cm^{-1}) e C-O (1069 cm^{-1}).

Os espectros de RMN^1H (Figuras IV-2, IV-3 e IV-4) mostra dois dubletos para duas metilas ($\delta\ 0,81$ e $\delta\ 1,1$ ppm) e dois sinais simples em $\delta\ 0,87$ e $\delta\ 1,06$ ppm, representando 4 metilas. O sinal em $\delta\ 5,3$ ppm sugere a dupla ligação. A interpretação do espectro 2D (1H-1H-COSY) foi usada na atribuição dos δ_{H} de **27**.

A análise do espectro de RMN^{13}C (Figuras IV-6 e IV-7) permitiu confirmar a presença da dupla ligação e o carbono em $\delta\ 98,2$ ppm sugere a presença de um carbono carbinólico na substância. Devido os aspectos dos espectros de RMN^1H e ^{13}C e a característica das espécies do gênero *Solanum* de bioproduzir glicoalcalóides esteroidais, que estão em maior concentração nos frutos verdes, foi comparado os dados desta substância com a literatura (SHASHI *et al.*, 1980) confirmando que **27** é o glicoalcalóide solasonina (2'-raminosil-3'-glicopiranosil-3-O- β -D-arabinopiranosil-solasodina).



3409.7, 2939.1, 1644.1, 1454.4, 1377.9, 1304.2, 1252.4, 1135.5=
1069.6, 890.4, 816.7, 779.6, 630.9, 593.0, 533.2, 465.0=

X: SCF 1 KBr Cassia 7687 Op.Eli UFRRJ

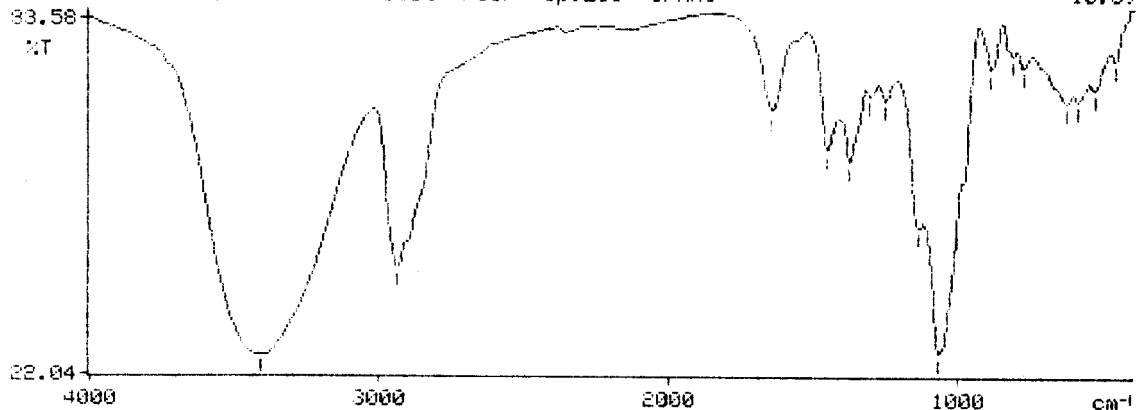
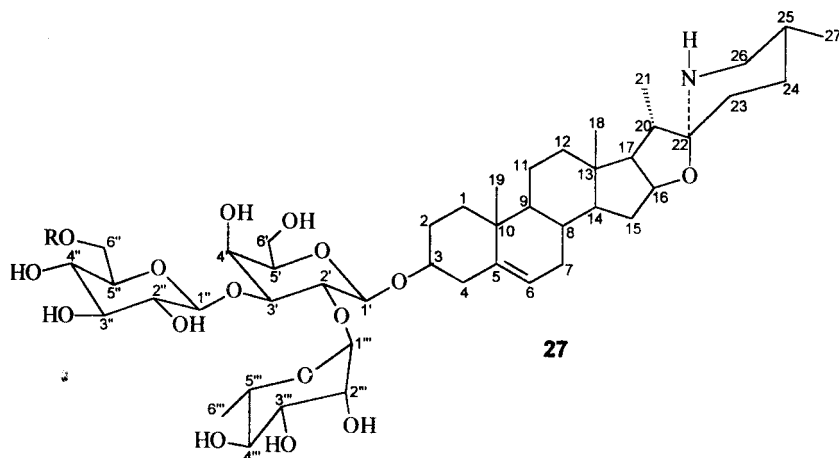


Figura IV.1- Espectro de IV da substância 27 (solasonina).



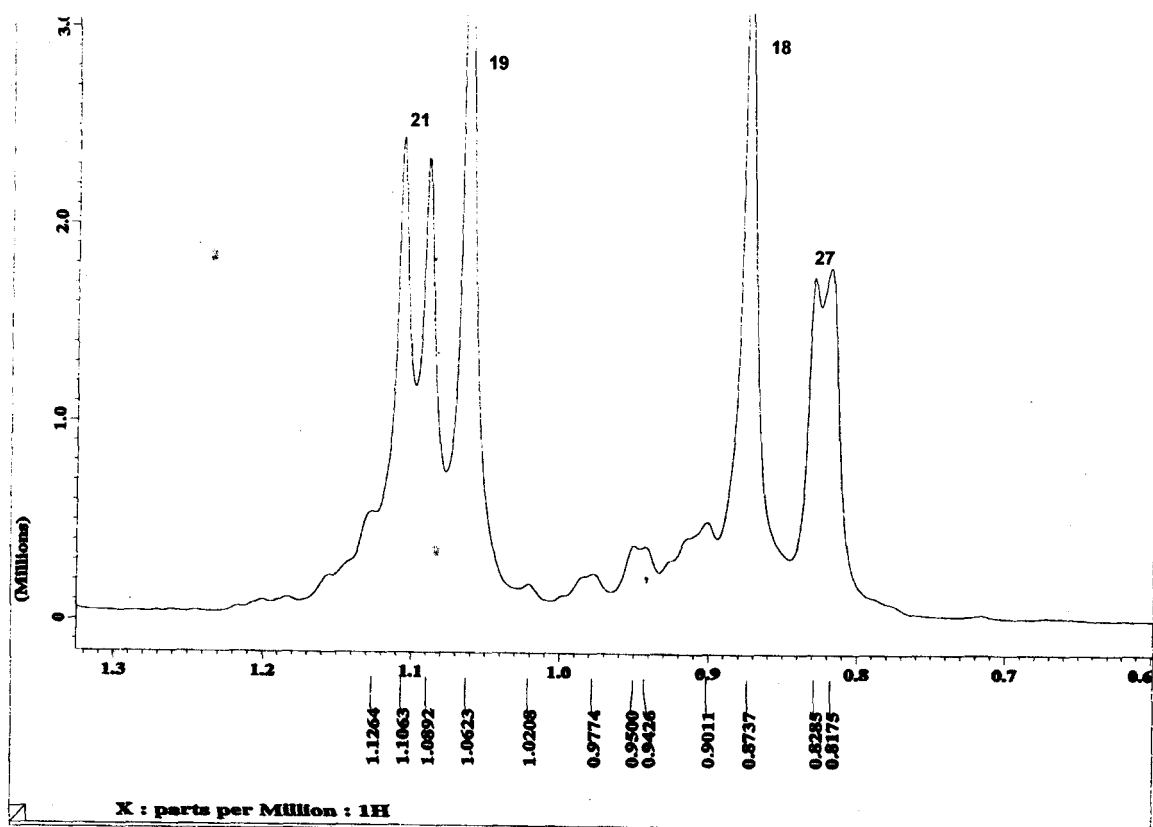
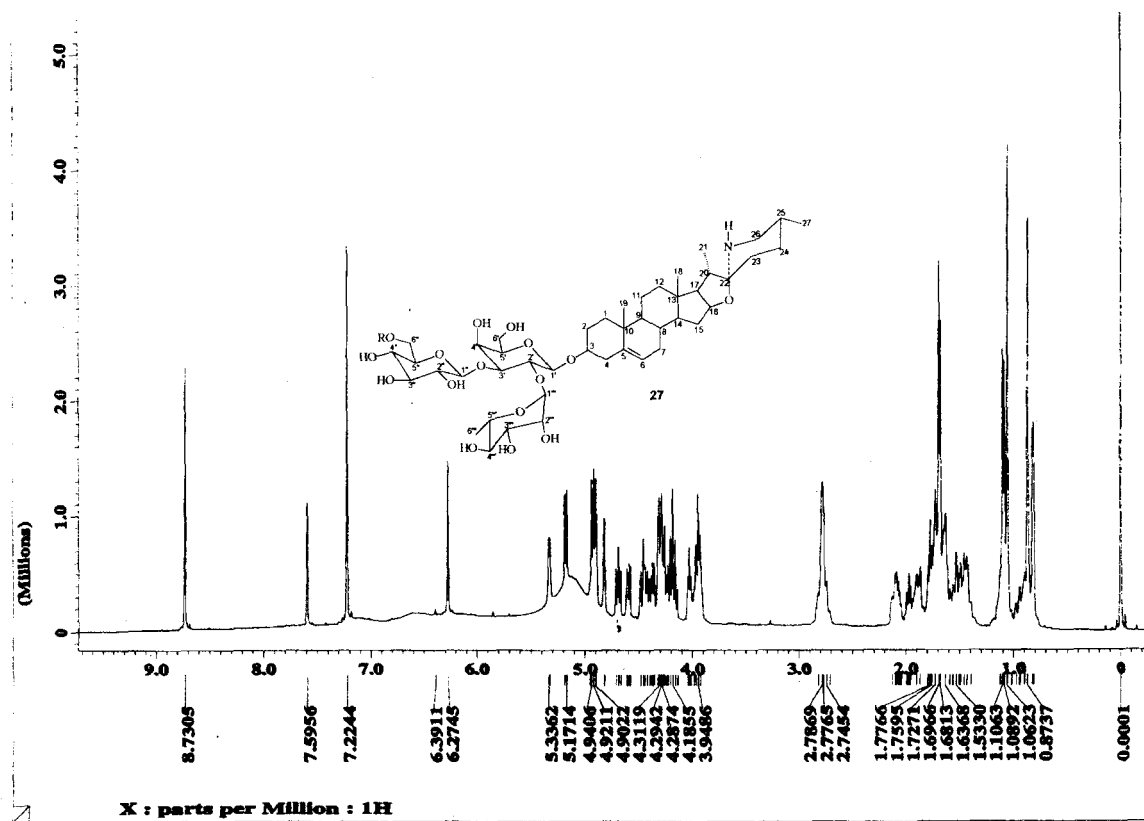


Figura IV.2: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) da substância 27 em piridina- d_5 .

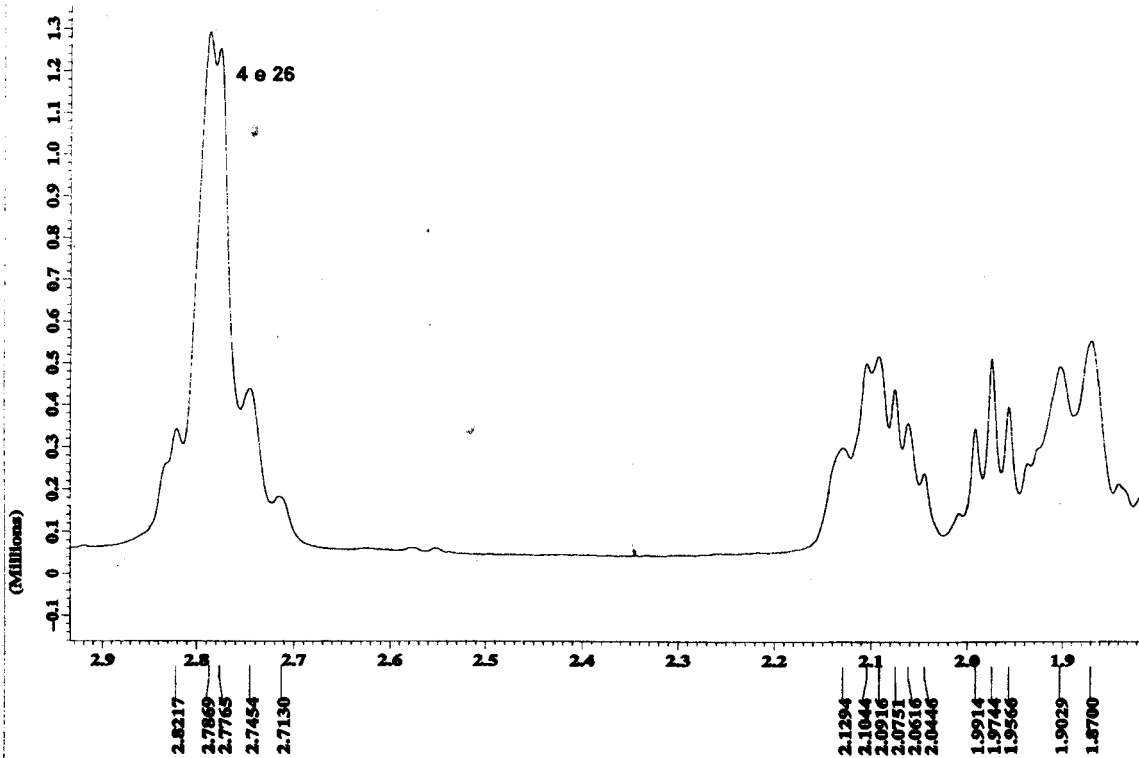
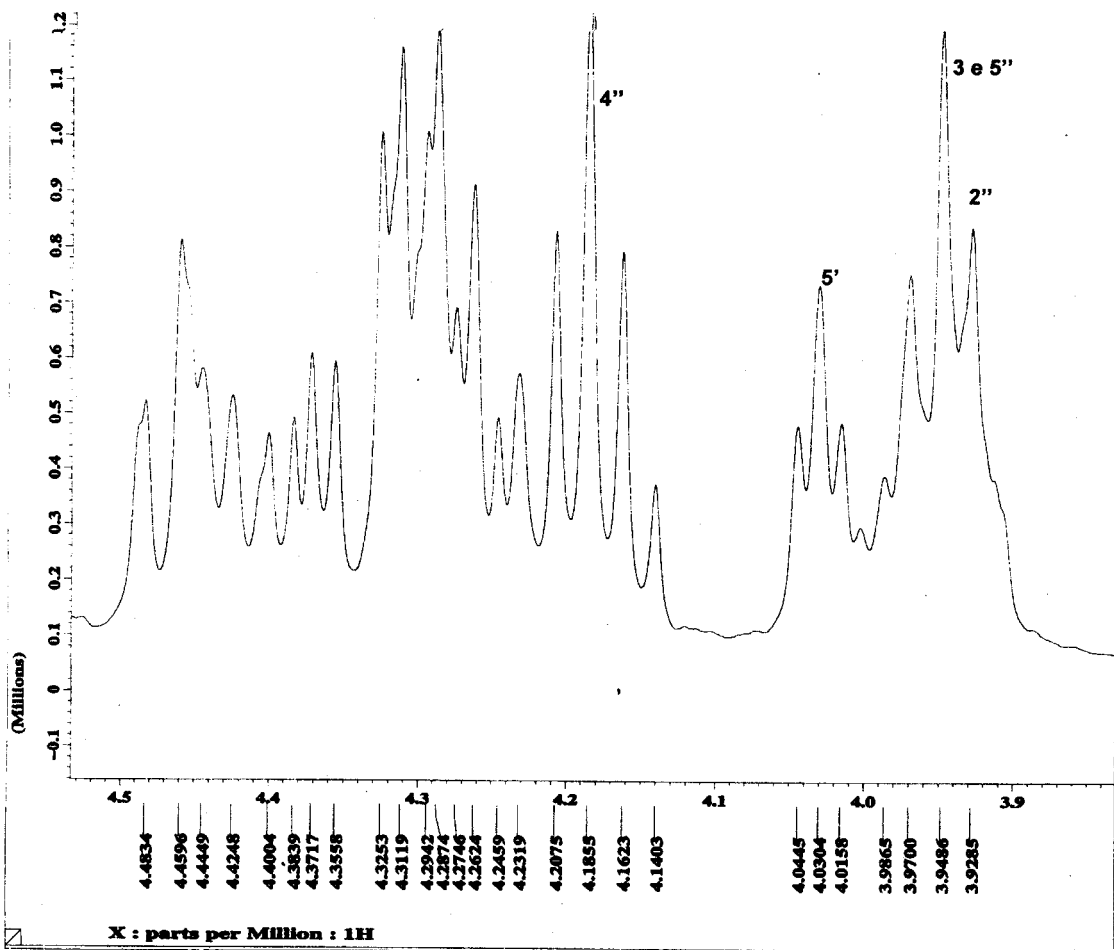


Figura IV.3: Espectros de RMN ^1H (400 MHz) ampliados da substância 27 em piridina- d_5 .

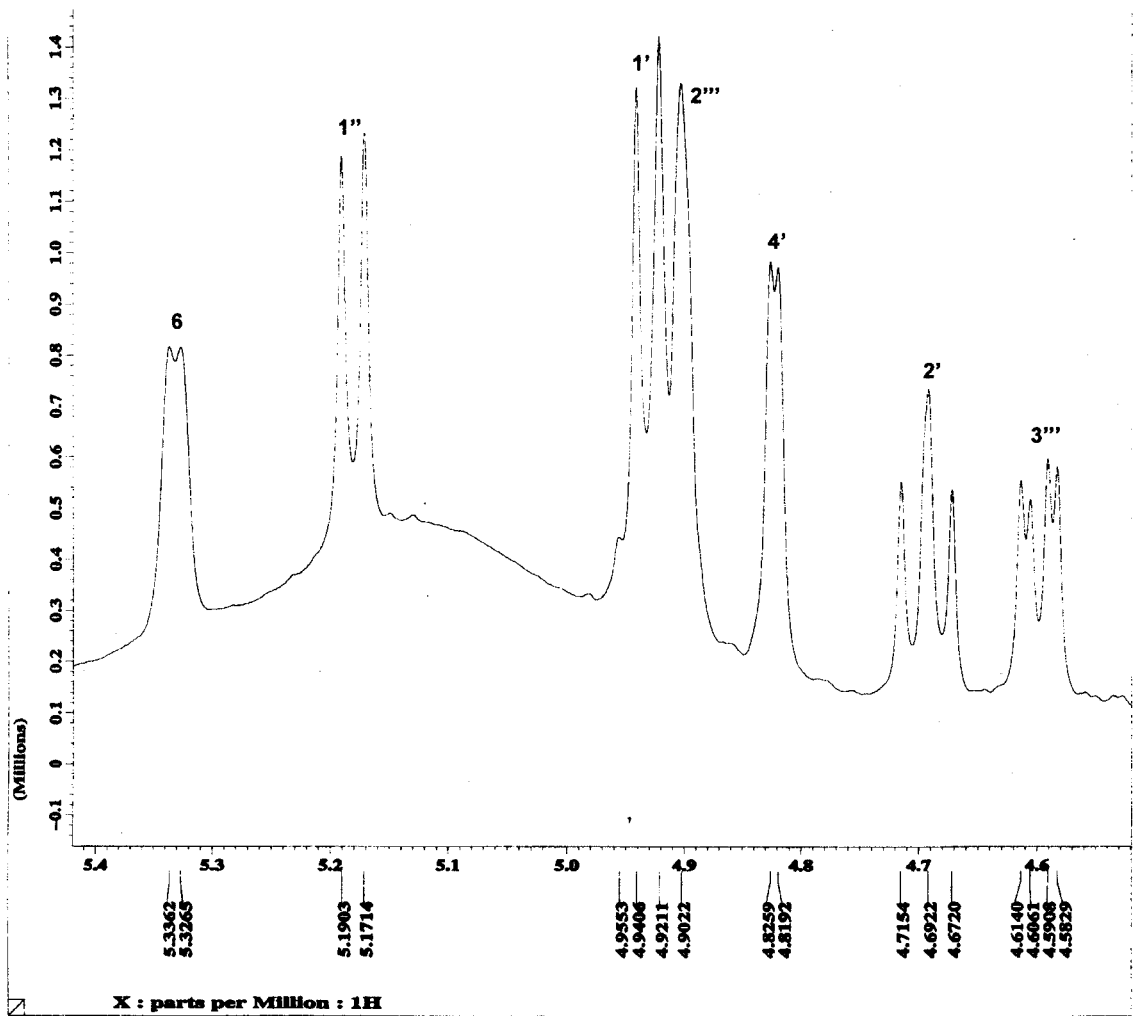
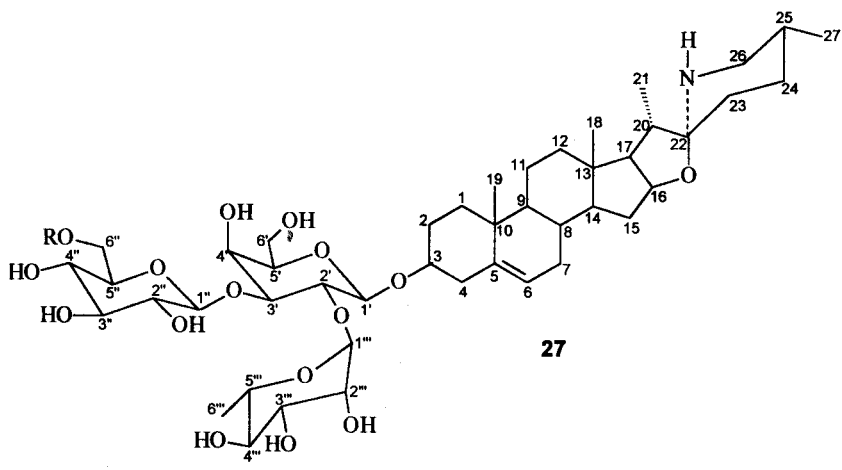


Figura IV.4: Espectro de RMN ^1H (400 MHz) ampliado da substância 27 em piridina- d_5 .



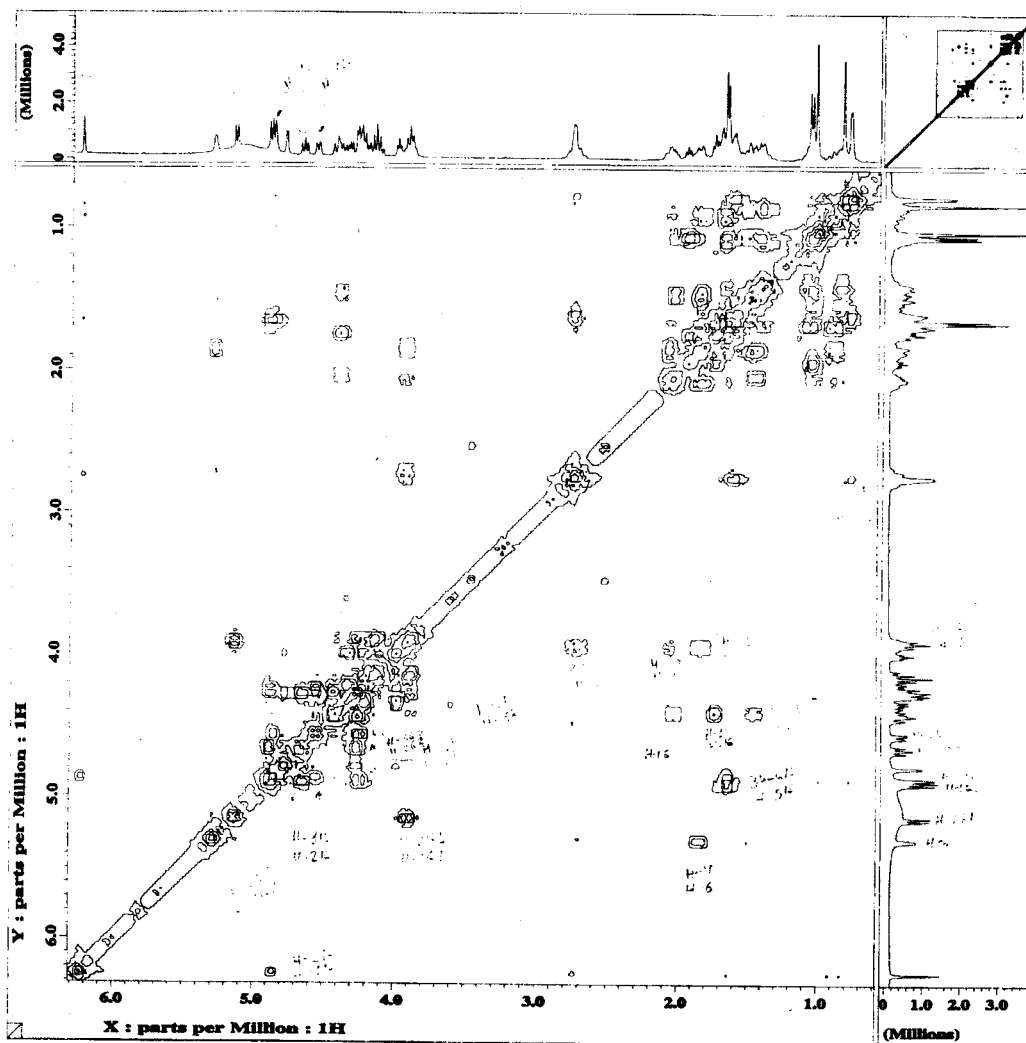
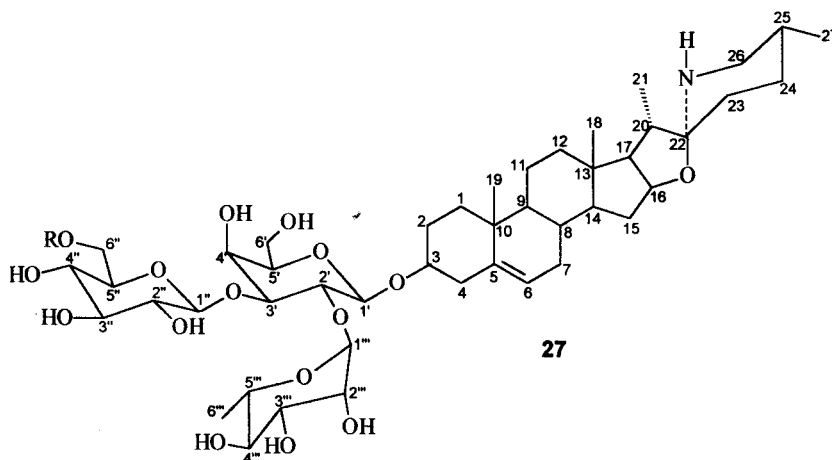


Figura IV.5: Espectro de RMN H COSY (400 MHz, piridina-d₅) da substância 27.



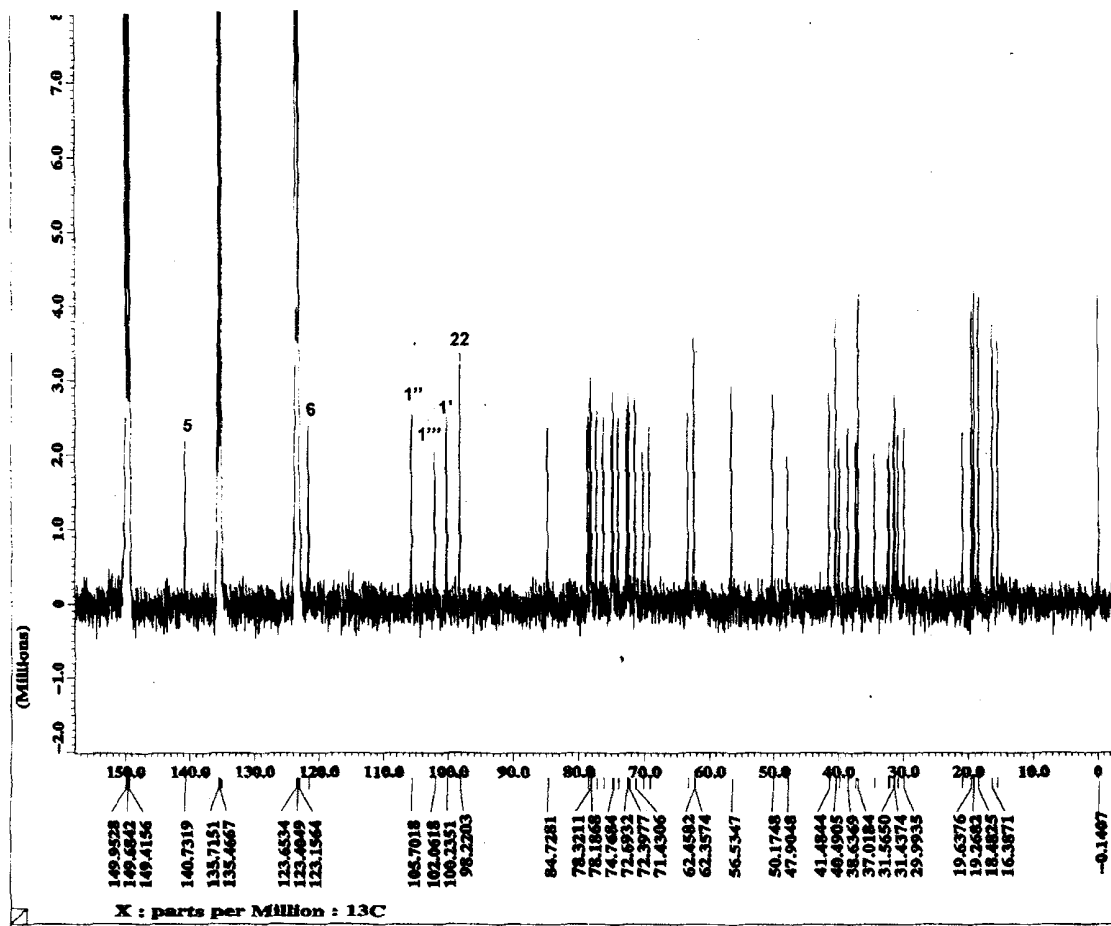
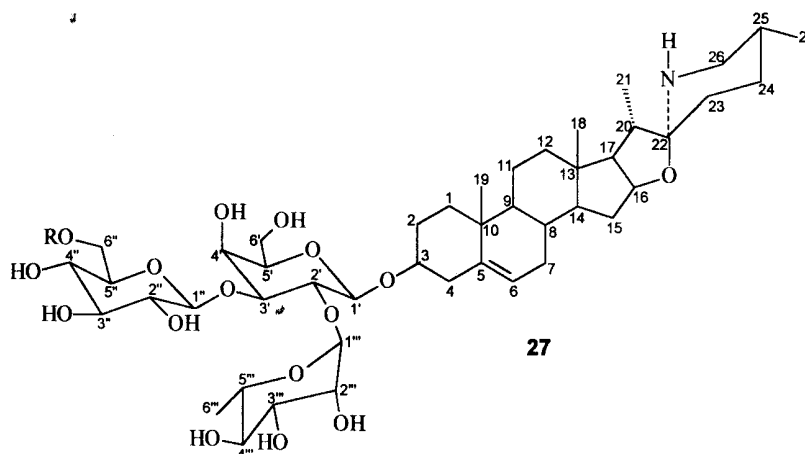


Figura IV.6: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) da substância 27 em piridina- d_5 .



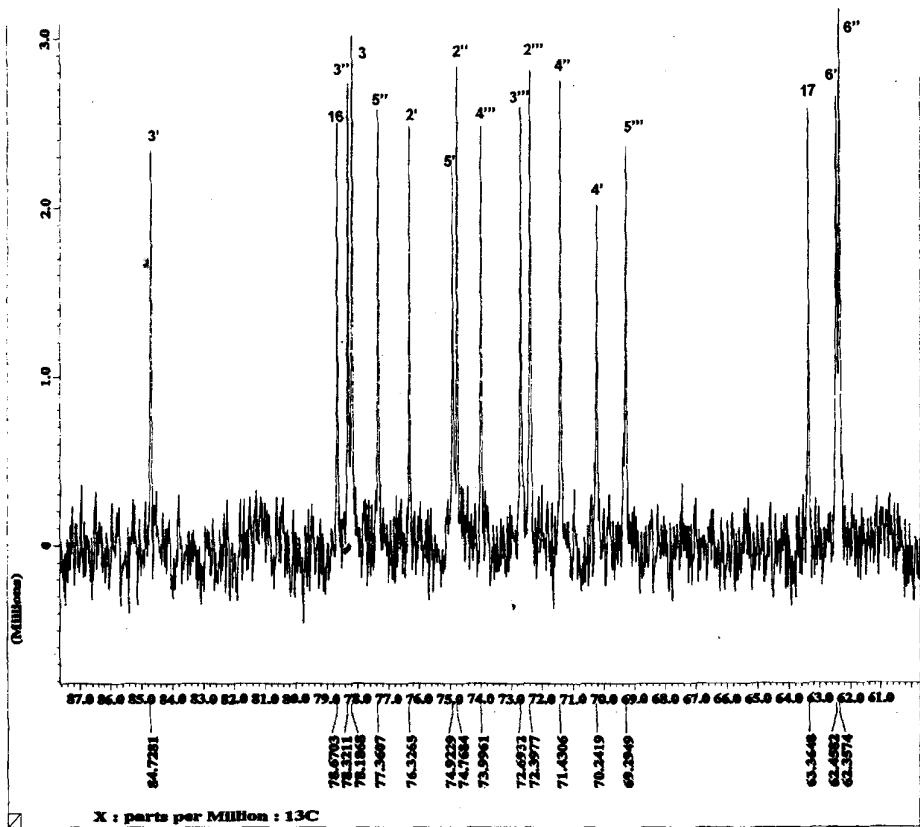
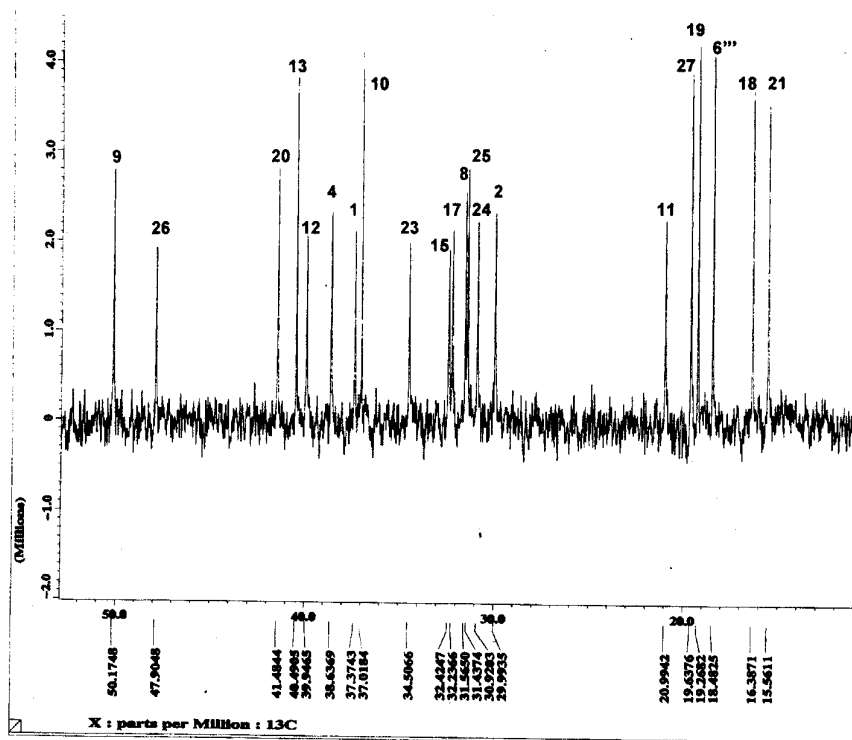


Figura IV.7: Espectros de RMN de ^{13}C (100 MHz) ampliados da substância 27 em piridina- d_5 .

Tabela IV.1: Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) da substância 27 (piridina- d_5) comparados com a literatura (SHASHI *et al.*, 1980).

C	Substância 27		Solasonina
	δ_C	δ_H (Hz)	δ_C
1	37,4	1,70; 0,94	37,4
2	30,0	2,10; 1,88	30,1
3	78,2	3,94	78,3
4	38,6	2,78	38,8
5	140,7	-	140,7
6	121,6	5,33 (dl; 3,9)	121,6
7	32,2	1,86; 1,44	32,5
8	31,6	1,58	32,5
9	50,2	0,86	50,3
10	37,0	-	37,1
11	21,0	1,46	21,1
12	39,9	1,64; 1,10	40,1
13	40,5	-	40,6
14	56,5	1,08	56,7
15	32,4	2,07; 1,84	31,7
16	78,7	4,38	78,7
17	63,4	1,76	63,5
18	16,4	0,87 (s)	16,5
19	19,3	1,06 (s)	19,3
20	41,5	1,96	41,5
21	15,6	1,09 (d; 6,8)	15,6
22	98,2	-	98,2
23	34,5	1,72	34,6
24	30,9	1,60	31,1
25	31,4	1,60	31,7
26	47,9	2,78	47,9
27	19,6	0,82 (dl; 4,4)	19,7
1'	100,2	4,94 (d; 7,8)	100,3
2'	76,3	4,69 (dd; 7,8; 9,3)	76,3
3'	84,7	4,30 (dd; 2,7; 9,3)	84,8
4'	70,2	4,82 (dl; 2,7)	70,2
5'	74,9	4,03 (t; 5,8)	74,9
6'	62,4		62,4
1''	105,7	5,18 (d; 7,6)	105,7
2''	74,8	3,93	74,8
3''	78,3	4,21 (t; 8,8)	78,7
4''	71,4	4,16 (t; 8,8)	71,4
5''	77,4	3,94	78,3
6''	62,3		61,8
1'''	102,0	6,27 (s)	102,0
2'''	72,4	4,90 (sl)	72,4
3'''	72,7	4,60 (dd; 3,2; 9,3)	72,7
4'''	74,0	4,27	74,0
5'''	69,3	4,95	69,3
6'''	18,5	1,69 (d; 6,1)	18,5

b) Solasonina acetilada

O tratamento de **27** com Ac_2O /piridina forneceu uma mistura de produtos, certamente além do produto peracetilado **28** houve formação de derivados parcialmente acetilados. A figura IV-8 revela a formação destes produtos. Após a purificação do produto peracetilado será possível fazer a completa atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos deste novo derivado da solasonina.

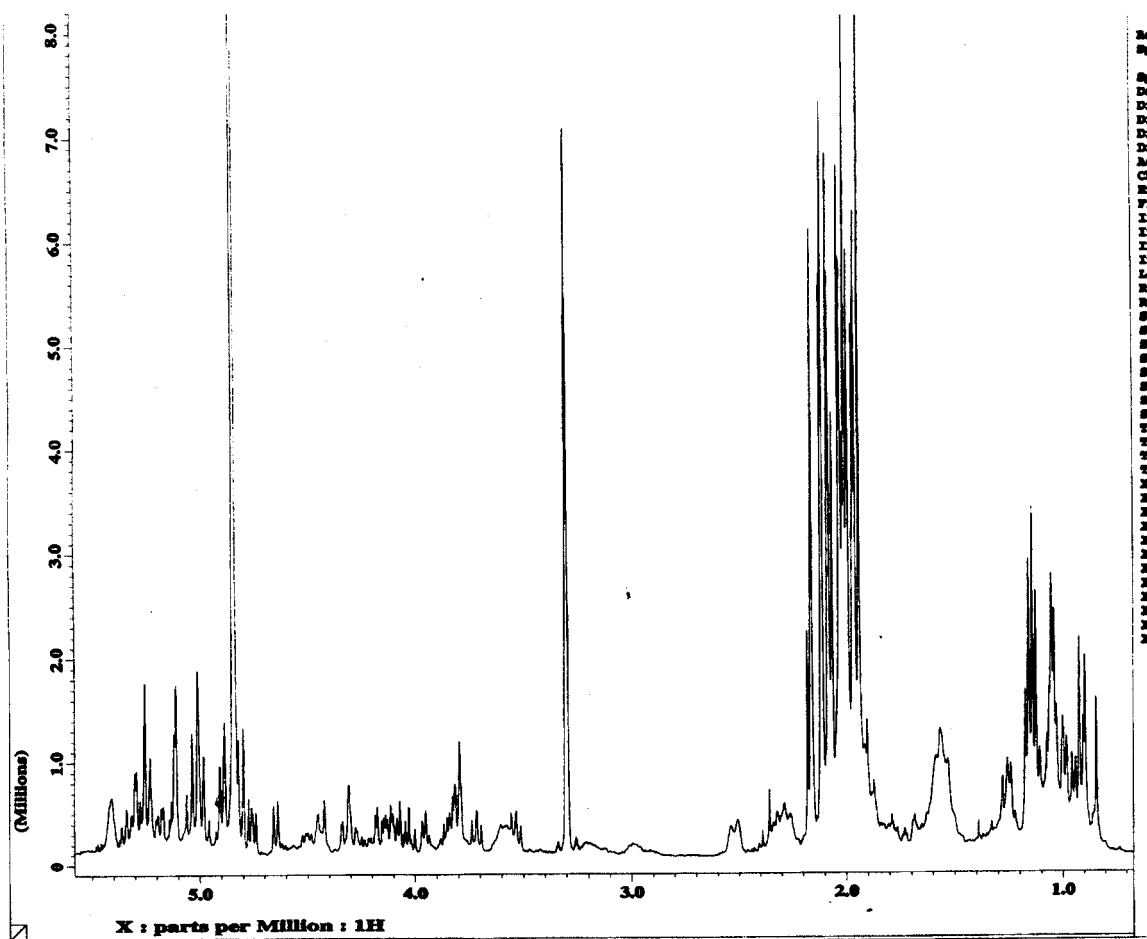
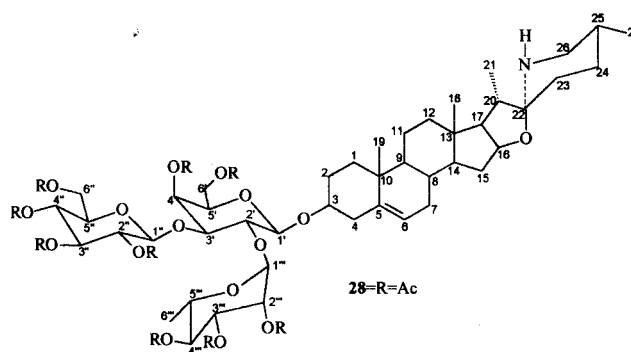


Figura IV.8: Espectro de RMN^1H (400 MHz) da substância **28** em metanol- d_4 .

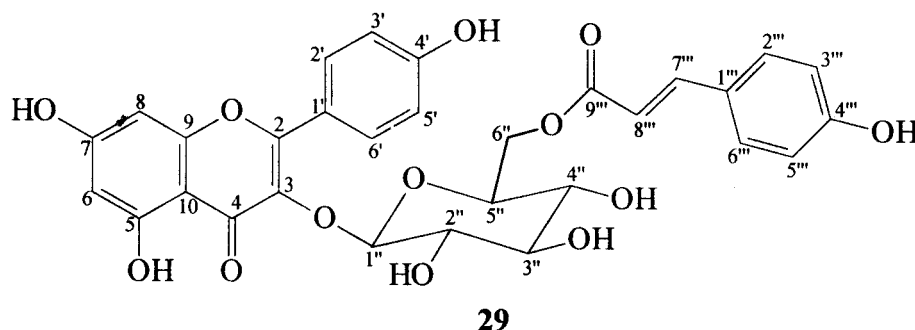


IV-3.1.2. Flavonóide tilirosídeo

Os espectros de RMN¹H da substância **29** (Figuras IV-9, IV-10 e IV-11) apresentam sinais típicos do flavonol canferol. O anel A de **29** apresenta sinais em δ 6,14 (sl), δ 6,36 (d, 1,5 Hz) e o singlete em δ 12,57 são referentes aos hidrogênios H-6, H-8 e OH-5, respectivamente. O anel B do flavonóide com sistema AA'BB' apresentou dos dubletos em δ 6,85 (2H-3', 5'; J=8,8 Hz) e δ 8,00 (2H-2', 6'; J=8,8 Hz). Este flavonóide mostra sinais de absorções no espectro de RMN¹H correspondentes a uma unidade de açúcar representada pelos sinais de hidrogênio ligado em carbono carbinólico, podendo destacar o sinal em δ_H 5,44 (d, J=7,4 Hz, H-1'') do carbono anomérico. A unidade de carboidrato pode ser localizada no C-3 com base na análise dos valores dos deslocamentos químicos dos carbonos de **29** (Figuras IV-12 e IV-13) e comparação com a literatura (AGRAWAL, 1989). As desproteções verificadas nos carbonos C-2 ($\delta\Delta$ 9,5), C-4 ($\delta\Delta$ 1,4), 2H-2',6' ($\delta\Delta$ 1,3), e proteção em C-3 ($\delta\Delta$ 2,6) e C-1' ($\delta\Delta$ 0,9) quando comparados com o canferol (AGRAWAL, 1989), (Figura IV-13 e IV-14) justifica a localização deste grupo no C-3. A unidade de açúcar foi proposta como sendo a β -D-glicose pelo valor de J = 7,4 Hz apresentado pelo hidrogênio anomérico H-1'' e comparação dos deslocamentos químicos dos CH com valores da literatura (KAOUADJI, 1990) (Tabela IV.2, página 182).

Os espectros de RMN¹H e de ¹³C deste flavonóide possuem sinais adicionais que estão de acordo com uma unidade coumaroila. Esta unidade adicional foi identificada pelo sistema AA'BB' observado no RMN¹H em δ 6,79 (2H-3''', 5'''; d, 8,4 Hz) e δ 7,37 (2H-2''', 6'''; d, 8,4 Hz) e pelos dubletos em δ 6,12 (J=16,1 Hz; H-8''') e δ 7,35 (J=16,1 Hz; H-7''') no espectro de RMN¹H (Figura IV-9).

Esta é a primeira vez que este flavonóide foi encontrado em Solanaceae.



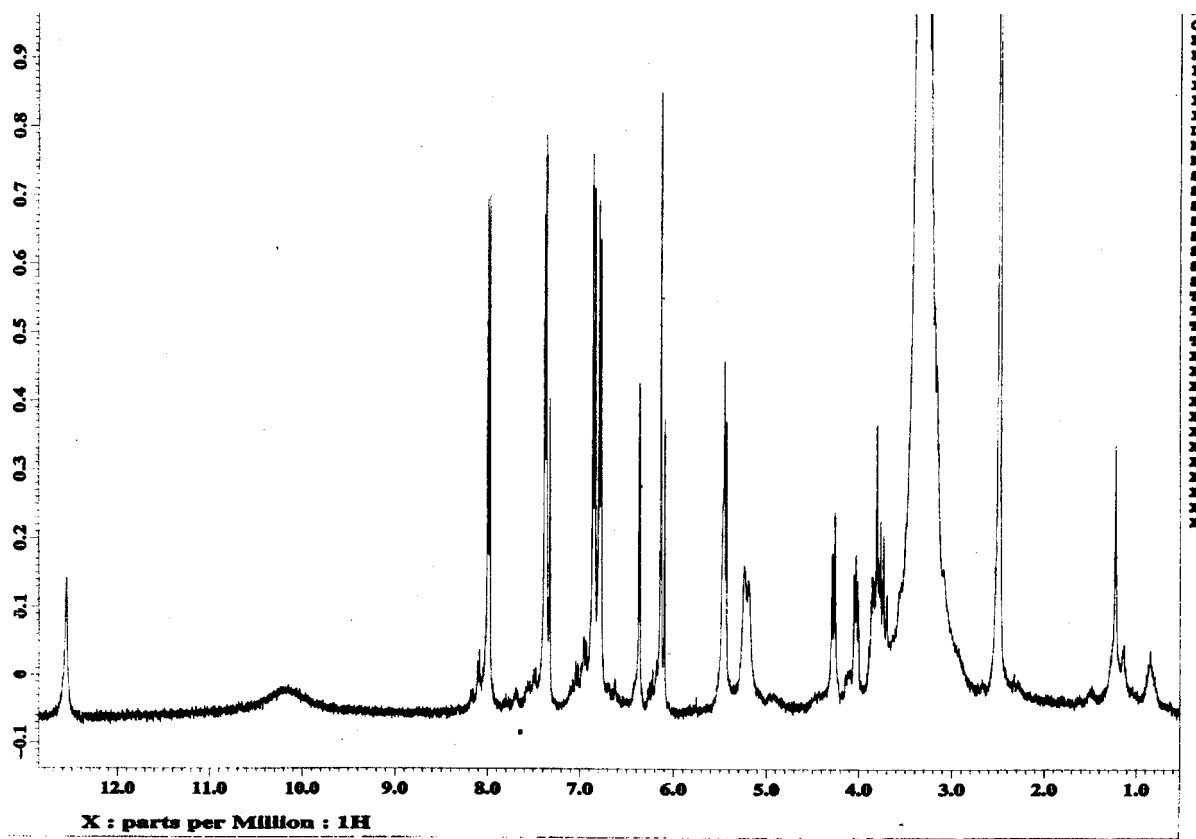
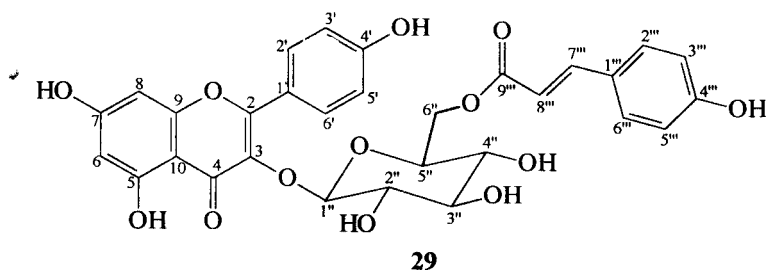


Figura IV.9: Espectro de RMN¹H (400 MHz) da substância 29 em DMSO-d₆.



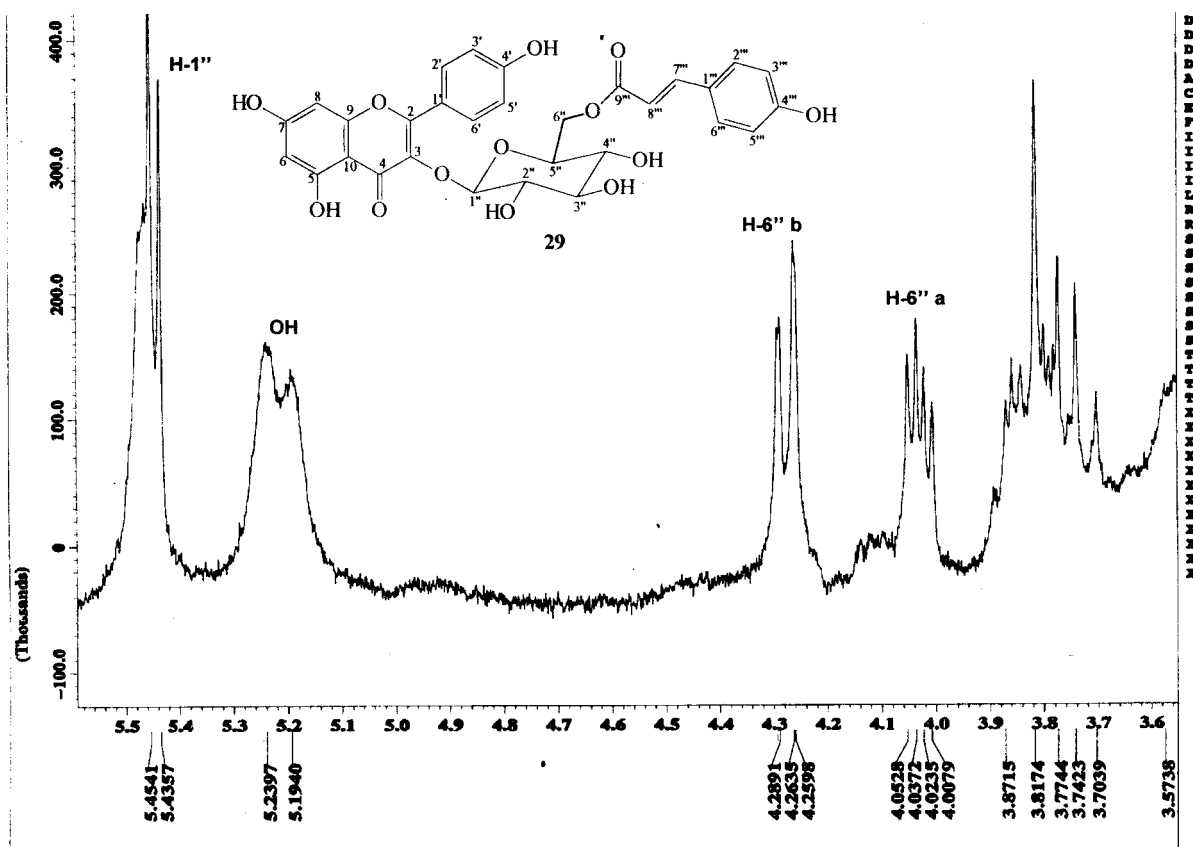


Figura IV.10: Espectro de RMN^1H (400 MHz) ampliado na região entre 3,6 a 5,5 ppm da substância 29 em DMSO-d_6 .

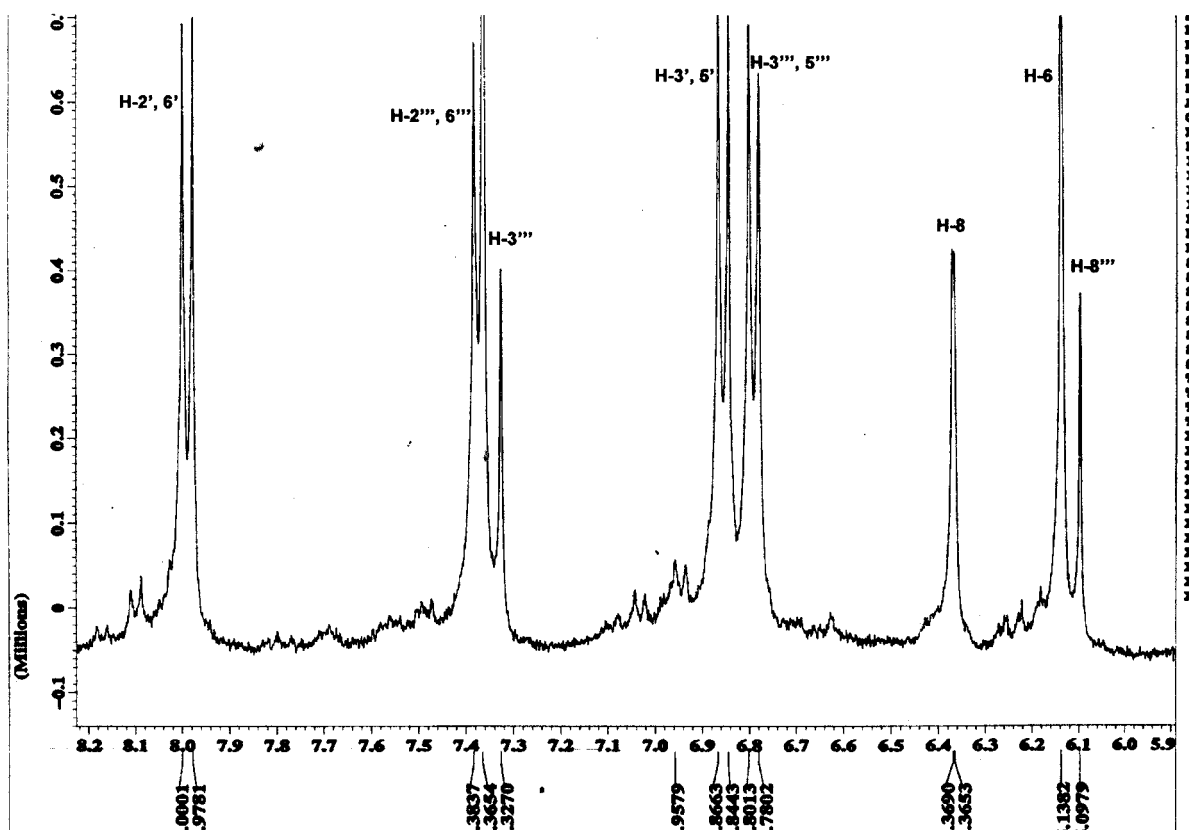


Figura IV.11: Espectro de RMN^1H (400 MHz) ampliado de δ 6,0 a 8,2 ppm da substância 29 em DMSO-d_6 .

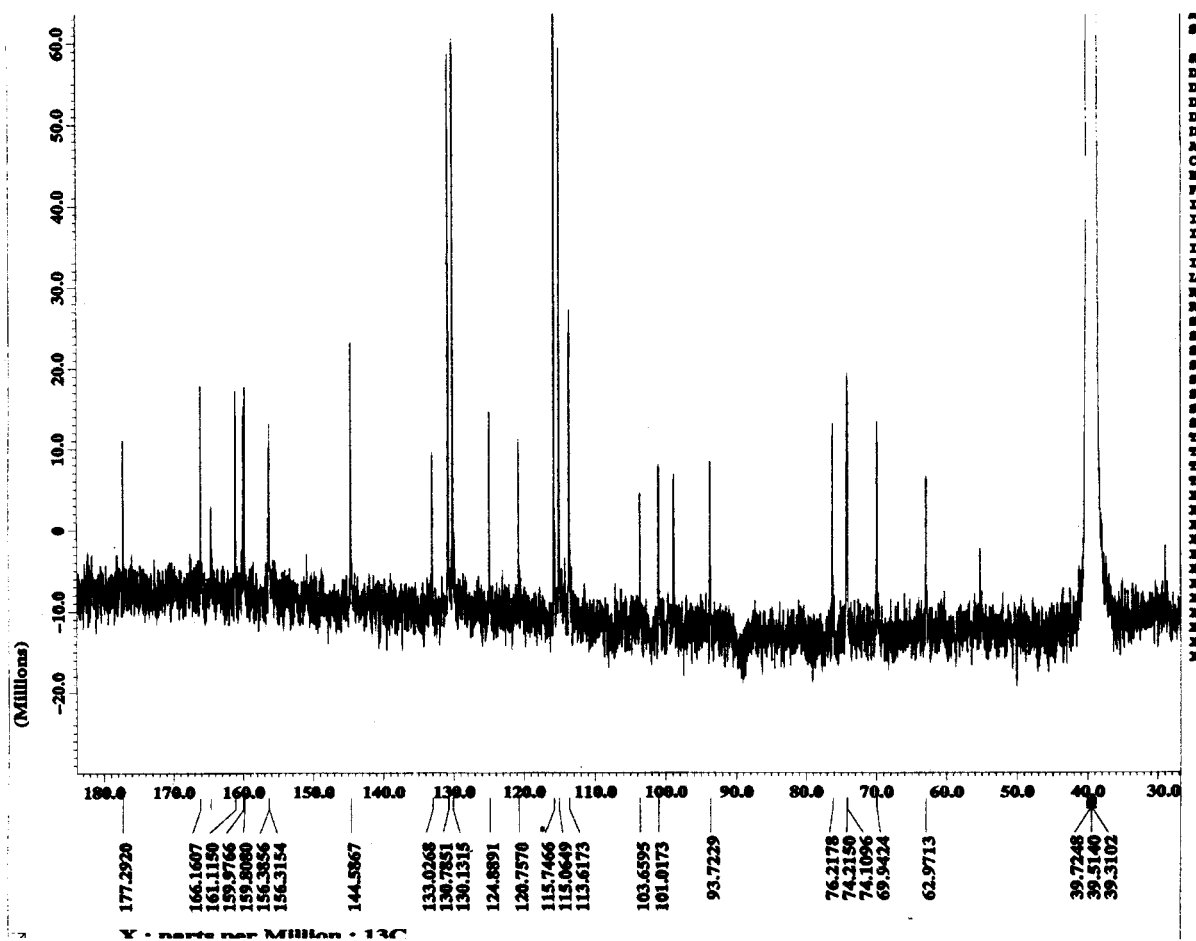
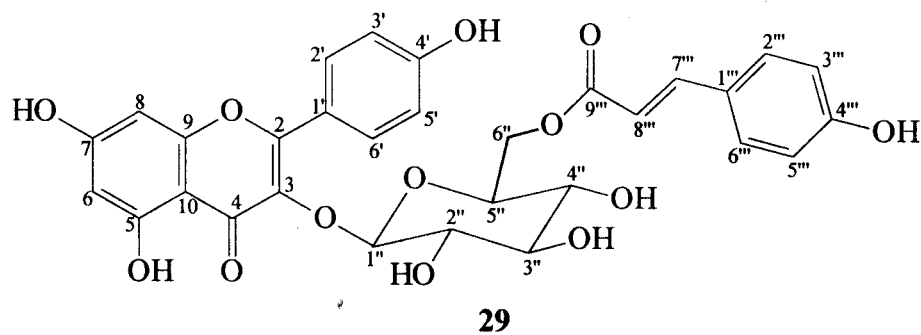


Figura IV.12: Espectro de RMN¹³C (100 MHz) da substância 29 em DMSO-d₆.



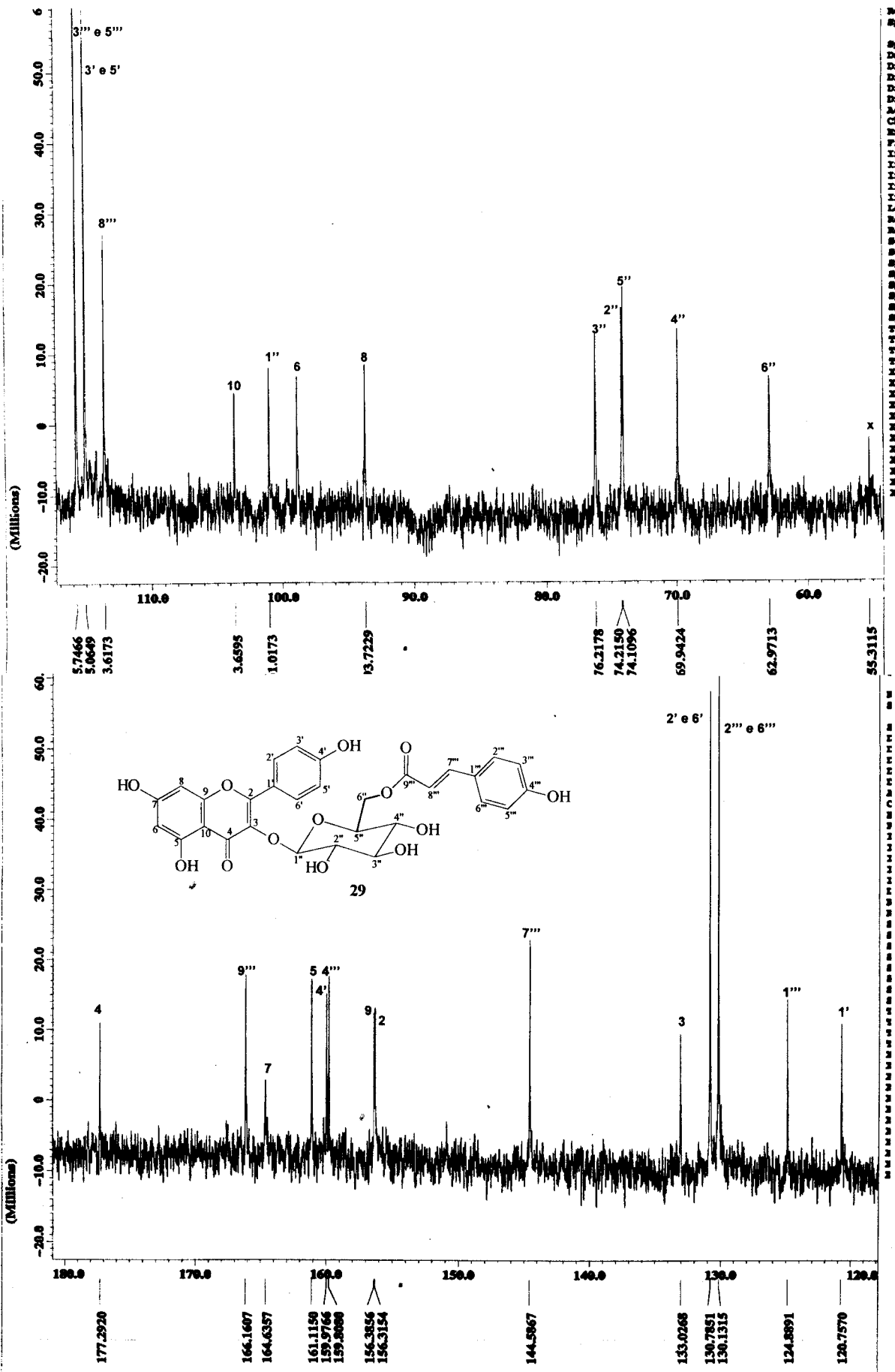
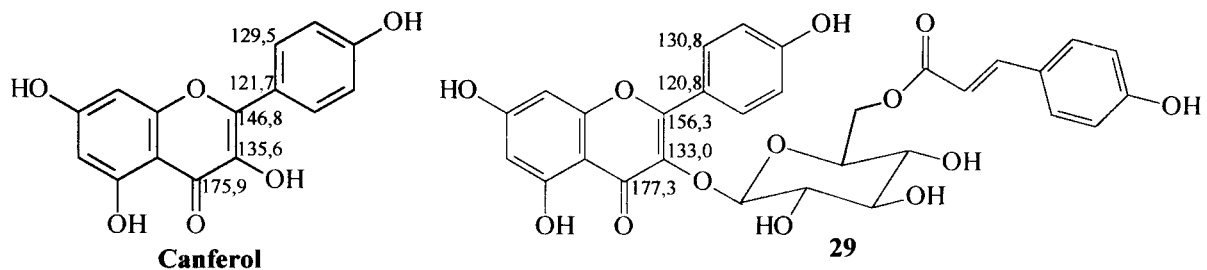


Figura IV.13: Espectros de RMN ^{13}C (100 MHz) ampliados da substância 29 em DMSO- d_6 .



$\Delta(3\text{-OH} \rightarrow 3\text{-Gli})$	
C-2	+ 9,5
C-3	- 2,6
C-4	+ 1,4
C-1'	- 0,9
2 CH-2',6'	+ 1,3

Figura IV.14: Valores de ^{13}C mostrando o efeito do substituinte glicose nos carbonos C-2, C-3, C-4, C-1' e 2 CH-2', 6' do flavonóide tilirosídeo em relação ao canferol.

Tabela IV.2: Dados de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (100 MHz) da substância **29** (DMSO- d_6) comparados com o tilirosídeo (metanol- d_4) (KAOUADJI, 1990).

C	Substância 29		Tilirosídeo	
	δ_{C}	δ_{H} (Hz)	δ_{C}	δ_{H} (Hz)
2	156,3	-	159,2	-
3	133,0	-	135,2	-
4	177,3	-	179,2	-
5	161,1	-	162,7	-
6	99,0	6,14 (sl)	99,9	6,05 (d; 2,0)
7	164,6	-	165,7	-
8	93,7	6,36 (d; 1,5)	94,9	6,19 (d; 2,0)
9	156,4	-	158,2	-
10	103,7	-	105,0	-
1'	120,8	-	122,6	-
2', 6'	130,8	8,0 (d; 8,8)	132,2	7,91 (d; 8,6)
3', 5'	115,0	6,85 (d; 8,8)	116,7	6,76 (d; 8,6)
4'	160,0	-	161,4	-
1''	101,0	5,44 (d; 7,4)	104,1	5,19 (d; 7,6)
2''	74,2	3,75 (m)	75,7	3,45 (m)
3''	76,2	3,75 (m)	78,0	3,45 (m)
4''	69,9	3,75 (m)	71,7	3,45 (m)
5''	74,1	3,85 (m)	75,7	3,50 (m)
6''	63,0	4,27 (dd; 11,7 e 1,5) 4,02 (dd; 11,7 e 6,2)	64,4	4,29 (dd; 11,9 e 1,9) 4,15 (dd; 11,9 e 6,8)
1'''	124,9	-	127,0	-
2''', 6'''	130,1	7,37 (d; 8,4)	131,1	7,21 (d; 8,5)
3''', 5'''	115,7	6,79 (d; 8,4)	116,0	6,71 (d; 8,5)
4'''	159,8	-	161,0	-
7'''	144,6	7,35 (d; 16,1)	146,5	7,34 (d; 15,9)
8'''	113,6	6,12 (d; 16,1)	114,7	6,02 (d; 15,9)
9'''	166,2	-	168,8	-
HO-5	-	12,57 (s)	-	-
HO-7,4',4'''	-	5,2	-	-

IV-4. Referências - Capítulo IV

AGRAWAL, P. K., Methods in Signal Assignment. In: "Carbon-13 NMR of Flavonoids", Studies in Organic Chemistry-39, 41-94, Ed. Elsevier, Amsterdam, 1989.

KAOUADJI, M. Acylated and non-acylated kaempferol monoglycosides from *Platanus acerifolia* Buds. *Phytochemistry*, **29** (7), 2295-2297, **1990**.

SHASHI, B. M.; SAHU, N. P.; GANGULY, A. N.; KASAI, R.; TANAKA, O. Steroidal Alkaloids from *Solanum khasianum*: Application of ^{13}C NMR Spectroscopy to their Structural Elucidation. *Phytochemistry*, **19**, 2017-2020, **1980**.

CAPÍTULO V
ATIVIDADES BIOLÓGICAS

V-1. AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE GERAL COM *ARTEMIA SALINA* LEACH (SIQUEIRA, *et al.*, 1998).

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

As ovas de *Artemia salina* são oferecidas comercialmente a baixo custo e podem ser usadas, se mantidas secas e refrigeradas, por vários meses. As larvas quando colocadas em água de mar artificial eclodem no período de 48 horas e são atraídas por luz artificial. As substâncias puras ou extratos vegetais são adicionados em várias concentrações, por replicata, em tubos de vidro tendo água do mar artificial e 10 a 15 larvas de *Artemia salina*. As larvas mortas e vivas são contadas após 24 horas e os valores de DL₅₀ (Dose Letal-50%) são calculados utilizando métodos estatísticos (MEYER *et al.*, 1982).

Foram realizados os testes de toxicidade geral com extratos de *Luxemburgia octandra* porque, fez-se este mesmo teste com extratos de outra espécie do gênero *Luxemburgia*, estudada pelo grupo de produtos naturais da UFRRJ, *Luxemburgia nobilis* (OLIVEIRA, 2000). A pesar dos extratos de *L. nobilis* não terem apresentado atividade frente a *Artemia salina*, fez-se o teste com os extratos de *L. octandra* para verificar se os resultados seriam os mesmos.

Foram avaliados os seguintes extratos de *Luxemburgia octandra*:

Galhos

LOGH = 0,15 mg/mL

LOGA = 0,39 mg/mL

LOGM = 0,067 mg/mL

Folhas

LOFH = 0,52 mg/mL

LOFA = 0,04 mg/mL

Os extratos ou as substâncias com valores de DL₅₀ menores que 1000 ppm tem sido considerados como ativos (OLIVEIRA, 2000). Sendo assim, todos os extratos de *Luxemburgia octandra* testados foram muito ativos, sendo LOFA o mais ativo.

V-2. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DE EXTRATOS DE *LUXEMBURGIA OCTANDRA* EM CAMUNDONGOS NATURALMENTE INFECTADOS POR *VAMPIROLEPIS NANA* E *ASPICULURIS TETRAPTERA*.

Os testes de atividade anti-helmíntica foram realizados pela Dra. Sandra L. da Cunha e Silva em colaboração com o Dr. Hélcio R. Borba. Departamento de Biologia Animal, UFRRJ, Seropédica, RJ.

Diversos relatos são encontrados na literatura a respeito do uso popular de plantas com atividade anti-helmíntica (PECKOLT 1942; GAMBLE & GAMBLE 1987; BORTHAKUR 1992; BOTSARIS 1995; ALONSO 1998; GARCÍA *et al.*, 1999). Representantes de diversas famílias como Cucurbitaceae, Liliaceae, Annonaceae, Compositae, Leguminosae, são, na medicina folclórica, consideradas anti-helmínticas, mas freqüentemente recomendadas para o tratamento de outras moléstias. As drogas antinematóides mais antigas usadas no homem e algumas vezes em animais, eram de origem natural, a exemplo da curcubitina obtida da semente de abóbora, da oleorresina de aspídio, o qual foi o anti-helmíntico mais conhecido e mais comumente usado contra todas as espécies de tênias humanas, até o aparecimento das drogas orgânicas sintéticas; a camala, obtida das glândulas e pêlos que revestem frutos de *Mallotus philippinensis*, a arecolina, alcalóide obtido das sementes de *Areca catechu*, ainda empregada para a produção de diversas substâncias anticestóides (ROBERSON, 1992). No entanto, é extremamente perigosa a idéia de que, por se tratar de uma fonte natural, e não se manifestar a curto prazo nenhum sinal e/ou sintoma após o seu uso, possam ser utilizadas de forma segura, especialmente quando o uso crônico for previsto. A utilização de plantas medicinais requer algo além do conhecimento tradicional, sendo necessário evidências científicas que apoiem o seu uso (GILBERT *et al.*, 1997).

Assim é que, e em virtude de poucas espécies de plantas terem sido submetidas a uma avaliação científica para determinar suas propriedades anti-helmínticas, padronização biológica e um estudo químico e farmacológico que possibilite não apenas sua identificação, mas também proporcione um melhor rendimento no processo de obtenção dos princípios ativos, faz-se necessário à realização de estudos que visem referendar ou não a utilização dessas espécies, levando em consideração não apenas as informações obtidas no levantamento etnofarmacológico, como época e horário de coleta, modo de preparo e posologia, mas também as interferências dos fatores hereditários, ontogênicos e ambientais na produção dos metabólitos secundários.

***Vampirolepis nana* (SIELBOLD, 1852) SPASSKII, 1954 (Eucestoda: Hymenolepididae)**

A espécie *Vampirolepis nana* foi descrita pela primeira vez em ratos e camundongos por Dujardin em 1845, sendo posteriormente descoberta por Bilharz em uma criança egípcia, em 1851, e nomeada *Taenia nana* por Sielbold (BELDINA 1965). Esse cestóide, conhecido como "tênia anã", previamente chamada de *Hymenolepis nana*, pertence à família Hymenolepididae (ROBERTS & JANOVY 1996; CINERMAN & CINERMAN 1999). De importância veterinária secundária, as espécies pertencentes a essa família, infectam aves, o homem e roedores. Contudo, a espécie *V. nana* tem relativa importância em ensaios biológicos, em virtude do seu potencial zoonótico e de não necessitar de um hospedeiro intermediário para completar o seu

ciclo biológico (CROWLEY 1961; VERDERAME & MACKIEWICZ 1986; URQUHART *et al.*, 1996; GRUBER *et al.*, 2001).

***Aspiculuris tetraptera* (NITZSCH, 1821) SCHULZ, 1924 (Nematoda: Heteroxyematidae)**

A espécie *Aspiculuris tetraptera* pertence à família Heteroxyematidae (Nematoda: Oxyurida), segundo classificação proposta por PETER & QUENTIN (PETER & QUENTIN, 1976).

A presença de nematóides da espécie *Aspiculuris tetraptera* é considerada comum em roedores de laboratório (ZENNER, 1998), sendo também, relatada a sua presença em camundongos sinantrópicos, encontrados em área urbana e rural (RASTI *et al.*, 2000), podendo ocasionalmente infectar ratos (ZENNER, 1998; HENDRIX, 1998).

Oxiuríasis em camundongos de laboratório são usualmente causadas pelas espécies *Aspiculuris tetraptera* e *Syphacia obvelata* (HOAG, 1961; HENDRIX 1998).

MATERIAL E MÉTODOS

a) Animais

- Procedência

Para o delineamento experimental, foram utilizados camundongos albinos adultos SW, oriundos da colônia mantida na Área de Biologia, do Instituto de Biologia da UFRRJ, apresentando infecção natural por *V. nana* e *A. tetraptera*.

- Manutenção

Os camundongos, após a desmama, com a idade de 21 dias, foram transferidos para gaiolas coletivas de polipropileno (42,5 x 27,5 x 17,0 cm), em condições de higiene insatisfatória, visando a um aumento da infecção natural por *V. nana* e *A. tetraptera*, com no máximo 20 animais por gaiola, onde os mesmos tinham acesso a água e ração à vontade, até atingirem um peso corporal entre 20 a 25 g.

- Determinação da infecção natural por *Vampirolepis nana* e *Aspiculuris tetraptera*

A constatação da infecção natural por *V. nana* e *A. tetraptera* foi avaliada através de exame coproparasitológico, utilizando a técnica de centrífugo sedimentação (DE CARLI 1994), confirmando a infecção através da identificação morfológica dos ovos característicos das espécies *V. nana* e *A. tetraptera*. Para a confirmação definitiva, foram sacrificados 10% do total de camundongos mantidos na colônia, de ambos os sexos, obtidos ao acaso de uma população de indivíduos adultos. Os animais foram sacrificados por inalação de vapores de éter etílico, em seguida foi feita uma incisão mediano-ventral nos camundongos, para retirar o intestino delgado e o cólon, os quais foram colocados em placa de Petri, contendo solução fisiológica (NaCl 0,85%). O exame para constatar a presença do cestóide e do nematóide foi realizado com o emprego de um microscópio estereoscópico Carl Zeiss, em fundo escuro. A preservação e a montagem dos helmintos foi realizada segundo Amato (AMATO *et al.*, 1991).

b) Teste de avaliação anti-helmíntica

Na avaliação dos testes anti-helmínticos foram formados grupos de 15 camundongos, machos e fêmeas, mantidos em gaiolas individuais de polipropileno (30 x 20 x 13 cm), tendo ao fundo estrado de tela rígida (malha de 7 x 7 mm) sobre folhas de papel absorvente, com o objetivo de facilitar a coleta de fezes. O mesmo procedimento foi adotado para o grupo controle, sem administração de drogas e os dois grupos que serviram de padrão de referência quimioterápica.

c) Aplicação dos extratos e quimioterápicos

Os extratos e quimioterápicos foram aplicados nos camundongos por via oral (intragástrica), com o emprego de uma sonda fina e flexível de polietileno, adaptada a uma agulha hipodérmica de calibre 25/7, conectada a uma seringa descartável de 5 mL. A administração dos extratos ocorreu durante três dias consecutivos, no período da manhã e duas horas antes retirava-se a ração de todos os animais submetidos ao experimento, sendo aplicado um volume de 0,04 mL/g de peso vivo. Foi fornecida água aos camundongos durante os três dias de administração dos extratos.

d) Execução dos testes

As fezes frescas, coletadas 24 horas após cada aplicação, por um período de cinco dias consecutivos, foram previamente amolecidas por imersão em água destilada por, no mínimo, 30 minutos e, em seguida, transferidas para tamis de malha de 125 micrômetros e lavadas em água corrente. O resíduo resultante foi colocado em placa de Petri contendo água destilada e examinado em microscópio estereoscópico Carl Zeiss, com o objetivo de proceder a identificação e coleta de segmentos de *V. nana* e contagem dos *A. tetraoptera*. No quinto dia após o início do experimento, os camundongos foram sacrificados por inalação de vapores de éter etílico e necropsiados, sendo o intestino delgado e o cólon transferidos para placa de Petri contendo solução fisiológica (NaCl 0,85%) e seccionados longitudinalmente com o emprego de uma tesoura oftálmica. O exame do conteúdo desses órgãos foi avaliado com o auxílio de um microscópio estereoscópico em fundo escuro, com o objetivo de coletar os proglotes de *V. nana* remanescentes, bem como para a contagem dos *A. tetraoptera*, presentes no intestino. A eliminação de proglotes foi avaliada através da determinação do peso úmido dos mesmos, em balança analítica.

Dos camundongos utilizados nos lotes experimentais, somente foram considerados aqueles que apresentavam biparasitismo, observado através do exame de fezes e da necropsia.

A mesma metodologia foi adotada no lote controle de camundongos objetivando avaliar a eliminação espontânea dos helmintos estudados, assim como para o mebendazol e o nitroscanato, indicados para o controle de cestóides e nematóides (GEORGI 1982 e REY 2002), os quais serviram de padrão de referência quimioterápica.

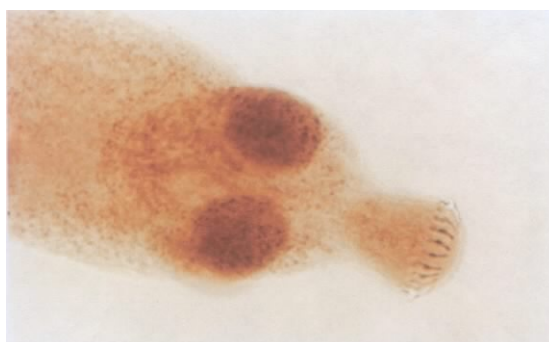
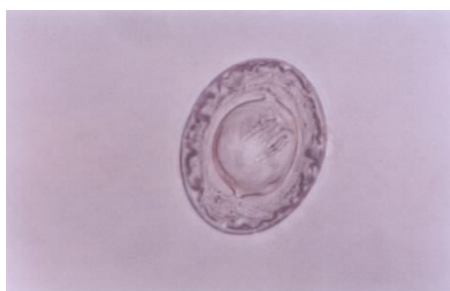
Foram utilizadas as doses de 8 mg/kg/dia para LOFE, LOFM e 20 mg/kg/dia LOFA. Foram utilizadas as doses de 20 e 100 mg/kg/dia, para o mebendazol e o nitroscanato, respectivamente os quais serviram de padrão de referência quimioterápica.

e) Cálculo da atividade anti-helmíntica

Foi utilizado o teste crítico (STEWART 1995), onde o efeito anticestóide, expresso em termos de percentuais médios de eliminação de proglotes, foi avaliado através do peso úmido de segmentos eliminados nas fezes após o tratamento, em relação à massa total de segmentos; e o efeito antinematóide expresso em termos de percentuais médios de nematóides eliminados, considerando-se o número de nematóides eliminados nas fezes em relação ao número total de nematóides.

f) Fotomicrografia de *Vampirolepis nana* e *Aspiculuris tetraptera*

Vampirolepis nana



Aspiculuris tetraptera



g) Resultados

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do teste de Newman-Keuls, ao nível de 5% de probabilidade. Os extratos não apresentaram atividade que diferenciasse estatisticamente dos padrões nas concentrações testadas, mas apresentaram atividade suficiente para justificar novos testes em outras concentrações.

Tabela V.1: Influência dos extratos LOFE, LOFM e LOFA e de quimioterápicos, na eliminação de *Vampirolepis nana* e *Aspicularis tetraptera*, em camundongos naturalmente infectados.

Tratamento	Número de animais infectados	Forma de preparação	Dose (mg/kg/dia)	Porcentagem de eliminação de <i>V. nana</i>	Porcentagem de eliminação de <i>A. tetraptera</i>
LOFE	10	Maceração	8	47,27 b	-
LOFM	11	Maceração	8	31,07 b	-
LOFA	12	Maceração	20	40,82 b	0,23 b
Controle	10	-	-	15,64 b	0,20 b
Mebendazol	10	Suspensão	20	35,64 b	100,00 a
Nitroscanato	12	Suspensão	100	100,00 a	68,94 a

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls ao nível de 5% de probabilidade.

V-3. ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS GLICOALCALÓIDES TOTAIS E DE SOLASONINA DE *SOLANUM CRINITUM*.

Este experimento foi realizado pelo Engenheiro Agrônomo (MS) José Milton Alves, Departamento de Fitotecnia, Instituto de Agronomia, UFRRJ, Seropédica, RJ.

O gênero *Solanum* é conhecido por produzir efeito alelopático devido aos glicoalcalóides espirosolanos tais como solamargina e solasonina que suprimem o crescimento de sementes de outras plantas (FUKUHARA *et al.*, 2001).

A Sociedade Internacional de Alelopatia tem definido esta atividade como um processo envolvendo metabólitos especiais (aleloquímicos) produzidos por plantas, microorganismos, vírus e fungos que influenciam o crescimento e desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos (excluindo animais), incluindo efeitos positivos e negativos (TORRES *et al.*, 1996). Os aleloquímicos de plantas são liberados no ambiente por exudação das raízes, tronco e folhas ou na decomposição do material vegetal. Atualmente tem-se aumentado o interesse na exploração da alelopatia como uma alternativa estratégica principalmente para o controle de ervas daninhas, mas também, de insetos e doenças. Ervas daninhas podem ser controladas pelo crescimento de plantas capazes de exudar aleloquímicos ou pela incorporação de resíduos de plantas com alto teor de aleloquímicos no solo.

Os frutos verdes e triturados de *Solanum crinitum* (2,6 Kg) foram tratados com etanol contendo 2% de ácido acético. Foi feita a marcha para alcalóide com o extrato obtendo-se os alcalóides totais 92g. Com o extrato dos alcalóides totais foi feito o ensaio sobre a germinação de sementes com alface (*Lactuca sativa*).

O extrato dos glicoalcalóides totais foi cromatografado em coluna com sephadex LH-20 usando metanol como eluente e foram recolhidas 25 frações. As frações de 1 a 5 foram reunidas, e cristalizadas em acetona fornecendo um sólido amorfo (PF: 301°C, 250 mg) que apresentou teste positivo para alcalóide com reagente de Draggendorff. Este material foi analisado através de RMN¹H, ¹³C (1D e 2D) e comparação com dados da literatura (SHASHI *et al.*, 1980) e identificado como solasonina (27).

Neste bioensaio a fração dos glicoalcalóides totais e a solasonina não influenciou estatisticamente o processo de germinação, porém inibiram o desenvolvimento normal das plântulas de alface (*L. sativa* L.). A fração dos glicoalcalóides totais provocou uma redução significativa na porcentagem de plântulas normais a partir da menor concentração testada (100 ppm). E a partir de 200 ppm o efeito foi tão pronunciado que não se obteve plântula normal (Figura V.1). A solasonina apresentou um efeito mais pronunciado, pois inibiu o desenvolvimento de praticamente 100% das plântulas normais na menor concentração utilizada (100 ppm) (Figura V.2). Estes efeitos (inibitórios) foram revelados através da visível redução do comprimento da raiz principal proporcionalmente ao aumento da concentração testada, Tabela V.1 (página 192).

A fração dos glicoalcalóides totais e o glicoalcalóide solasonina apresentaram elevada atividade alelopática.

Verificou-se um efeito alelopático bem maior da solasonina do que da fração dos glicoalcalóides totais. Considerando-se que a solasonina é o componente majoritário da fração dos glicoalcalóides totais, conclui-se que o efeito alelopático verificado nos dois experimentos é devido à presença desta substância. Estes resultados foram submetidos à publicação (ALVES, *et al.*, 2003).

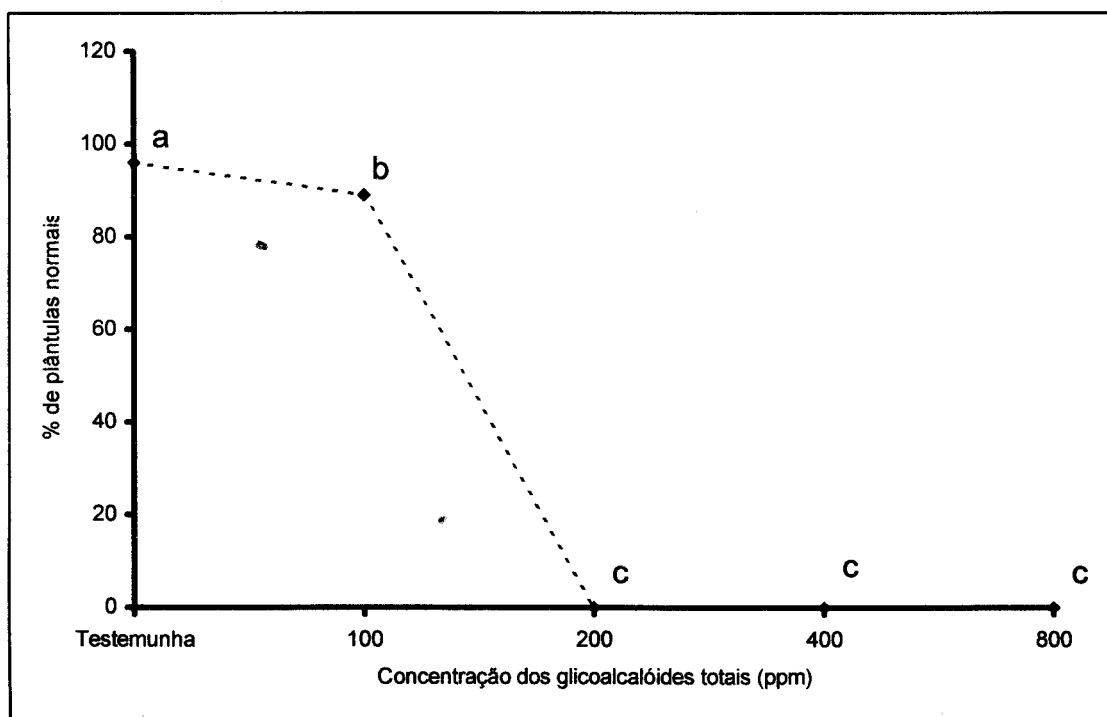


Figura V.1. Dados médios sobre a porcentagem de plântulas (%) de alface obtidos após aplicação de diferentes concentrações do extrato dos glicoalcalóides totais de *S. crinitum*. Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

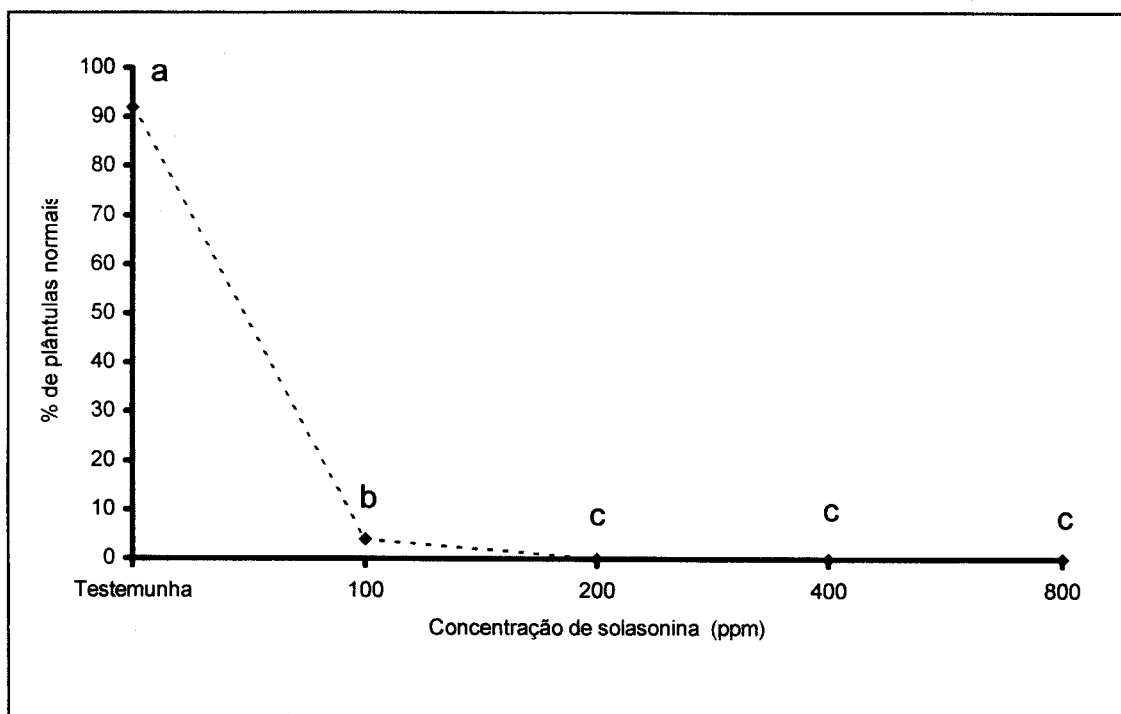


Figura V. 2. Dados médios sobre a porcentagem de plântulas (%) de alface obtidos após aplicação de diferentes concentrações de solasonina. Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela V.1. Dados médios (4 repetições) do comprimento (cm) da raiz primária e da parte aérea de plântulas de alface submetidas à aplicação de diferentes dosagens do extrato dos glicoalcalóides totais e de solasonina.

Concentração (ppm)	Alcalóides totais		Solasonina	
	C. raiz (cm)	C. parte Aérea (cm)	C. raiz (cm)	C. parte Aérea (cm)
Testemunha	4,94 a	1,49 ab	5,90 a	2,67 a
100	3,61 b	1,71 a	2,35 b	1,98 b
200	0,63 c	1,26 bc	1,32 c	2,14 bc
400	0,46 c	0,97 cd	0,83 d	1,82 c
800	0,35 c	1,07 d	0,63 d	1,51 d
CV (%)	22,17	17,25	16,76	11,75

Médias seguidas de mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

V-4. Atividade Citotóxica Contra Carcinoma de Ehrlich e Leucemia humana K562.

Estes testes foram realizados pela doutoranda Andressa Esteves-Souza sob a orientação da Dra. Áurea Echevarria. Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFRRJ, Seropédica, RJ.

Os flavonóides apresentam diversas atividades biológicas: antiviral, antimicrobial, antiinflamatório e anti-hepatotóxico. Estudos sugerem que os flavonóides também possuem uma importante função na prevenção do câncer e possuem atividade anticâncer (SOUZA *et al.*, 2002).

Os alcalóides esteroidais e seus glicosídeos ocorrem em numerosas espécies do gênero *Solanum* e possuem uma variedade de atividades biológicas, incluindo antifúngica, moluscicida, teratogênico e embriotóxico. Preparações contendo solasonina glicosilada são empregadas no tratamento de alguns tipos de câncer (SOUZA *et al.*, 2002).

Diversas espécies do gênero *Solanum* apresentam glicoalcalóides e flavonóides com grande variedade de atividades biológicas. Por isso foi feita uma avaliação da atividade de um flavonóide e glicoalcalóides isolados de *Solanum crinitum* sobre Carcinoma de Ehrlich e Leucemia humana K562.

O flavonóide tilirosídeo **29**, uma fração rica em glicoalcalóides (GT) e o glicoalcalóide solasonina **27** foram obtidos de *Solanum crinitum* e tiveram sua atividade citotóxica avaliada frente a células do carcinoma de Ehrlich e da leucemia humana K562. O efeito antiproliferativo destas substâncias mostrou comportamento dose-dependente após avaliação através do método do MTT, para ambos os casos. Os resultados indicaram atividade citotóxica para **29**, GT e **27**, com $IC_{50} = 69,50 \mu M$, $19,5 \mu g mL^{-1}$ e $74,20 \mu M$ respectivamente, quando ensaiadas frente ao carcinoma de Ehrlich, e $IC_{50} = 118,40 \mu M$, $13,65 \mu g mL^{-1}$ e $60,35 \mu M$ para **29**, (GT) e o glicoalcalóide solasonina **27** frente a leucemia K 562 (SOUZA *et al.*, 2002).

A família Ochnaceae é rica em flavonóides e biflavonóides com diversas atividades biológicas. Sendo assim, foi testada uma bichalcona natural, isolada de *Luxemburgia octandra*, e seus derivados contra Carcinoma de Ehrlich e Leucemia humana K562.

A bichalcona **9** (Luxenchalcona) e os seus derivados metilado **10** e acetilado **12** tiveram sua atividade citotóxica avaliada frente a células do carcinoma de Ehrlich e da leucemia humana K562. A bichalcona e seu derivado **10** não apresentaram atividade citotóxica, mas o seu derivado acetilado **12** apresentou efeito antiproliferativo com comportamento dose-dependente após avaliação através do método do MTT, para ambos os casos. Os resultados indicaram atividade citotóxica para **12**, com $IC_{50} = 74,04 \pm 0,46 \mu M$, quando ensaiadas frente ao carcinoma de Ehrlich, e $IC_{50} = 63 \mu M$ frente a leucemia K 562 (Resultados não publicados).

V-5. Referências- Capítulo V

ALONSO, J. R. Tratado de Fitomedicina-Bases clínicas y farmacológicas, Isis Ediciones, Buenos Aires, 1039, 1998.

ALVES, C. C. F.; ALVES, J. M.; SILVA, T. M. S. da; CARVALHO, M. G. de; JACOB-NETO, J. Inibição alelopática de plântulas de alface por glicoalcalóides totais e solasonina de *Solanum Crinitum* Lam. *Floresta e Ambiente*, 2003 (Submetido).

AMATO, J. F. R.; BOEGER, W. A. AMATO, S. B. Protocolos para laboratório-Coleta e processamento de parasitos. Imprensa Universitária UFRRJ, Rio de Janeiro, 81, 1991.
BELDINA, D. L. Textbook of parasitology, 1374, Appleton-Century-Crofts, New York, 1965.

BORTHAKUR, S. L. Native for child and woman diseases from Assam in northeastern India. *Fitoterapia* LXIII, 6, 483-488, 1992.

BOTSARIS A. S. Fitoterapia chinesa e plantas brasileiras, Editora Ícone, São Paulo, Brasil, 550, 1995.

CINERMAN, B.; CINERMAN, S. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais, 375, Editora Atheneu, São Paulo, 1999.

CROWLEY, B. S. An *in vivo* screening method for anthelmintic activity using *Hymenolepis nana* var. *fraterna* in mice. *Parasitology*, 51, 339-345, 1961.

DE CARLI, G. A. Diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas, Métodos e técnicas, Medsi Editora Médica e Científica, Rio de Janeiro, 315, 1994.

FUKUHARA, K.; KUBO, I. Isolation of steroidal glycoalkaloids from *Solanum incanum* by two countercurrent chromatographic methods. *Phytochemistry*, 30 (2), 685, 2001.

GAMBLE, B.; GAMBLE, A. Chinese herbal medicine, Ed. Eastland Prees, Washington, 723, 1987.

GARCÍA, A. A.; VANACLOCHA, B. V.; SALAZAR, J. I. G.; COBO, R. M.; MARTÍNEZ, C. A.; GARCÍA, J. E. Vandemecum de prescripción: Plantas medicinais. Masson S. A., Barcelona, 1148, 1999.

GEORGI, J. R. Parasitologia veterinária. Interamericana, Rio de Janeiro, 353, 1982.

GILBERT, B.; FERREIRA, J. L. P.; ALMEIDA, B. S.; CARVALHO, E. S.; CASCON, V.; ROCHA, L. M. The official use of medicinal plants in public health. *Ciênc. Cult.* 49 (5/6), 339-344, 1997.

GRUBER, H. E.; JOHNSON, T. L.; KINSELLA, J. M.; GREINER, E. C.; GORDON, B. E. Tapeworm identification in the fat sand rat (*Psammomys obesus obesus*). *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.*, 40 (6), 22-24, 2001.

- HENDRIX, C. M. Diagnostic veterinary parasitology, 321, Mosby, St. Louis, 1998.
- HOAG, W. G. Oxyuriasis in laboratory mouse colonies. *Am. J. Vet. Res.*, **4**, 150-153, 1961.
- MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. J.; SMITH, D. L. "Bench-Top" Bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. Studies in Natural Products Chemistry. In: Atta-ur-Rahman(Ed.), 387, Ed. Elsevier, Amsterdam, 1991.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, **45**, 31-34, 1982.
- OLIVEIRA, M. C. C. de. Estudo Químico de *Luxemburgia nobilis* EICHL, Tese de doutorado-Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 227, 2000.
- PECKOLT, G. O valor dos anti-helmínticos brasileiros. *Rev Flora Med.*, **7**, 333-389, 1942.
- PETTER, A. J.; QUENTIN, J. Keys to general of oxyuroidea. In CIH keys to the nematode parasites of vertebrates, 1-29, Agricultural Bureaux, England, 1976.
- RASTI, S.; MOVVEDI, I.; DEGHANIR, R.; DRODGAR, A. The survey of gastrointestinal helminths of mice in Kashan. *J. Fac. Vet. Med.*, **55** (4), 57-59, 2000.
- REY, L. Parasitologia. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 379, 2002.
- ROBERSON, E. L. Quimioterapia das doenças parasitárias. In NH Booth, LE McDonald, Farmacologia e terapêutica em veterinária, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 707-749, 1992.
- ROBERTS, L. S.; JANOVY, J. Foundations of Parasitology, 659, WMC Brown Publishers, Iowa, 1996.
- SHASHI, B. M.; NIRANJAN, P. S.; AMAR, N. G.; RYOJI, K.; OSAMU, T. Steroidal Alkaloids from *Solanum khasianum*: Application of ¹³C NMR Spectroscopy to their Structural Elucidation. *Phytochemistry*, **19**, 2017-2020, 1980.
- SHASHI, B. M.; NIRANJAN, P. S.; AMAR, N. G.; RYOJI, K.; OSAMU, T. Steroidal Alkaloids from *Solanum khasianum*: Application of ¹³C NMR Spectroscopy to their Structural Elucidation. *Phytochemistry*, **19**, 2017-2020, 1980.
- SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G. GARCEZ, W. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii*- Annonaceae, Biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*, **21** (5), 557-559, 1998.
- SOUZA, A. E.; SILVA, T. M. S.; ALVES, C. C. F.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. Cytotoxic Activities Against Ehrlich Carcinoma and

Human K562 Leukaemia of Alkaloids and Flavonoid from Two Solanum Species. *J. Braz. Chem. Soc.*, **13** (6), 838-842, 2002.

STEWART, J. S. Anthelmintic studies: I. A controlled critical entero-nematicidal test. *Parasitology*, **45**, 231-241, 1995.

TORRES, A.; OLIVA, R. M.; CASTELLANO, D.; CROSS, P. (Editors), Introduction Proceedings of the First World Congress on Allelopathy- *A Science for the Future*, 16-20 September, Cádiz, Spain, 1996.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J. DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JUNNINGS, F. W. *Parasitologia Veterinária*, 237, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996.

VERDERAME, M.; MACKIEWICZ, J. Anthelmintics. In *CRC Handbook of Chemotherapeutic agents*, Vol. II, 156-163, CRC Press, Flórida, 1986.

ZENNER, L. Effective eradication of pinworms (*Syphacia muris*, *Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera*) from a rodent breeding colony by oral anthelmintic therapy. *Lab. Anim.*, **32**, 337-342, 1998.

VI. CONCLUSÕES

- a) Foram obtidas novas informações sobre a química das quatro espécies estudadas.
- b) O estudo químico de *Luxemburgia octandra* conduziu ao isolamento de flavonóides cujas estruturas são freqüentes em espécies de Ochnaceae.
- c) A luxenchalcona isolada de *L. octandra* é uma nova bichalcona registrada na literatura, assim como seus derivados.
- d) As frações polares do látex de *Parahancornia amapa* não possuem iridóides e sim feniletanóides glicosilados.
- e) A presença do glicoalcalóide solasonina nos frutos verdes de *S. crinitum* está de acordo com a característica de espécies do gênero *Solanum* de bioproduzir glicoalcalóides esteroidais nesta parte da planta. É a primeira vez que é isolado flavonóide de tricomas de frutos de *Solanum*.
- f) O estudo biológico dos extratos de *Luxemburgia octandra*, *Solanum crinitum*, substâncias naturais e derivados mostraram resultados promissores merecendo novas avaliações.
- g) Foram obtidos dados de RMN de derivados que não estão registrados na literatura.