

UFRRJ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS/DEPARTAMENTO DE
QUÍMICA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
ORGÂNICA.

TESE

CONSIDERAÇÕES SOBRE OS GÊNEROS *OURATEA* E
LUXEMBURGIA, ESTUDO QUÍMICO DE DUAS ESPÉCIES DE
OCHNACEAE: *Ouratea hexasperma* St. Hil E *Ouratea cuspidata* St.
Hil E ATIVIDADES BIOLÓGICAS.

LUCIANO RAMOS SUZART

Orientador: Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Auxiliadora Coelho Kaplan

2007



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

**CONSIDERAÇÕES SOBRE OS GÊNEROS *OURATEA* E
LUXEMBURGIA, ESTUDO QUÍMICO DE DUAS ESPÉCIES DE
OCHNACEAE: *Ouratea hexasperma* St. Hil E *Ouratea cuspidata* St. Hil E
ATIVIDADES BIOLÓGICAS.**

LUCIANO RAMOS SUZART

Sob a Orientação do Professor
Dr. Mário Geraldo de Carvalho
Co-Orientação da professora
Dra. Maria Auxiliadora Coelho Kaplan

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

Seropédica, RJ
fevereiro de 2007

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

LUCIANO RAMOS SUZART

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

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

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

Dra. Maria Auxiliadora Coelho Kaplan (NPPN-UFRJ)
(Co-Orientadora)

Dra. Maria Raquel Figueiredo (Far-Manguinhos/FIOCRUZ)

Dra. Lavínia de Carvalho Brito (DBB/LARAMG-UERJ)

Dr. Antonio Jorge R. da Silva (NPPN-UFRJ)

Dr. Marco Edílson Freire de Lima (DEQUIM-UFRuralRJ)

Dr. Victor Marcus Rumjanek (DEQUIM-UFRRJ)

*À Elise Regina Rodrigues Carvalho
Pelo amor, compreensão e pelo incentivo necessário para enfrentar este desafio.*

*À Colomba Ribeiro da Costa (In Memoriam).
Por em vida ter incentivado e contribuído para meu desenvolvimento.*

*Se o homem não sabe a que porto se dirige, nenhum vento lhe será favorável.
(Sêneca, filósofo latino, 4 a.C. – 65 d. C.)*

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho pela amizade, orientação, ensinamentos, meu sincero respeito e a sua família pela forma calorosa com que sempre fui recebido.
- À Prof^a Dra Maria Auxiliadora Coelho Kaplan, pelo constante apóio, incentivo, ensinamentos e principalmente pela amizade, mais uma vez minha sincera gratidão;
- À Prof^a Dra Rosane Nora Castro por estar sempre de prontidão, toda vez que necessitei de seu auxílio;
- Aos professores do do PPGQO pela formação e evolução profissional;
- Dra Tânia Sarmiento e á Dra Maria de Fátima Agra que me cederam a espécie *Ouratea hexasperma* para o estudo.
- Ao Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira do CENAUREM, Curso de Pós-graduação em Química Orgânica da UFC pela obtenção dos espectros a 500 MHz;
- A FIOCRUZ (CIVA), Erika e Pedro pela obtenção de espectros a 500 MHz;
- A Faculdade de Farmácia USP-Ribeirão Preto pelos espectros de massas de alta resolução ;
- Ao Prof. Dr. Ronald Bastos Freire (IB-UFRRJ), juntamente com a aluna de mestrado Renata da Silva Ribeiro pela realização dos teste antiparasitários;
- Aos técnicos do ICE-UFRRJ, Francis, Eli, Carlão, Fábio, Maurício, Rui, Aldir, Conceição, Áurea Tatagiba (In Memoriam);
- Aos amigos do LQPN-UFRuralRJ: Virginia, Mário Sérgio, Marli, Juliana, Ildomar, Luiz Roberto (Pilha), Maritza, pela amizade e pelos momentos de alegrias, tristeza e desespero que passamos, mas que certamente fortaleceram nossos elos E ao mais recente amigo Eduardo (Ceará) a quem desejo muito sucesso;.
- À amiga Virginia Claudia, cuja agitação e inconformidade, em alguns momentos me serviram como estímulo;.
- À Maritza Cardozo pela alegria de uma convivência feliz e harmoniosa.;
- À Lorena, aluna de iniciação científica, pela amizade e auxílio durante a realização deste trabalho;
- Aos demais alunos de iniciação científica Ana Paula, Aline, Alessandra, Jose Geraldo, pela amizade e agradável convivência;
- A todos os colegas do PPGQO pelo bom convívio;
- Especial aos amigos Cláudio, Ari; Andréa Rosane, Bauer,
- Á Regina, grande amiga e parceira durante toda esta trajetória;
- Desde já a banca examinadora pelas sugestões e correções sugeridas a esse trabalho;
- À UFRRJ pela oportunidade e tão agradável acolhimento;
- Ao Cnpq pela concessão da bolsa de estudos e a CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro aos projetos do nosso grupo de pesquisa;
- Á turma das sextas-feiras no Bar do Arnaldo com discussões complementares a formação Prof^a. Áurea, Prof. Braz, Prof. Waldomiro, Ildomar, Regina, Heloisa, Juliana, Ari, Kenia,;
- Aos meus familiares pelo apoio e confiança depositada;
- À minha mãe, manifestação de Deus em minha vida;
- A todos que de alguma forma me ajudaram na realização desse trabalho;
- E a cima de tudo a DEUS.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABELAS	VII
ÍNDICE DE ESQUEMAS	VIII
ÍNDICE DE FLUXOGRAMAS	IX
ÍNDICE DE QUADROS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
INTRODUÇÃO	1
CONSIDERAÇÕES SOBRE OS GENEROS <i>Ouratea</i> E <i>Luxemburgia</i> (OCHNACEAE)	4
PARTE EXPERIMENTAL	12
ESTUDO QUÍMICO DE ESPÉCIES DE OURATEA	12
EQUIPAMENTOS E REAGENTES	12
REAÇÕES DE DERIVAÇÃO	13
Reação de metilação com diazometano	13
Reação de acetilação.	13
<u><i>Ouratea hexasperma St. Hil</i></u>	14
MATERIAL VEGETAL.	14
ELABORAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS	14
<u><i>Ouratea cuspidata St. Hil.</i></u>	19
MATERIAL VEGETAL	19
ELABORAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS	20
RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
Identificação dos constituintes isolados de inflorescência de <i>Ouratea hexasperma (St. Hil)</i>.	26
Campesterol (1), Estigmasterol (2) e Sitosterol (3)	26
3-β-O-β-D-glicopiranosil sitosterol (4)	30
3-β-O-β-D-tetracetil glicopiranosil sitosterol (4a)	31
3-β-O-ácil-olean-12-en-28-óico (5)	32
Rutina (6)	36
Orientina e Vitexina (7+8)	42
Swertisina (9)	53
Swertiajaponina (10)	57
Identificação dos constituintes isolados do caule de <i>Ouratea hexasperma (St. Hil)</i>.	57
Ácido 2,4-diidroxifenil acético (11)	63
3,4',5-triidroxi-6-δ,δ-dimetilalil -7-O-β-D-glicopiranosil-flavanona (12)	66
3,4',5-triidroxi-6-δ,δ-dimetilalil -7-O -β-D-glicopiranosil-flavona (13)	79
3,4'-dimetoxi-5-hidroxi-6-δ,δ-dimetilalil-7-O-β-D glicopiranosil-flavona (13a)	88
3,5,4',2''3'',4'',6''heptaacetil-6-δ,δ-dimetilalil7-O-β-D-glicopiranosilflavona(13b)	90
Identificação dos constituintes isolados das folhas de <i>Ouratea cuspidata</i>.	

St Hil	95
Lupeol (14), α -Amirina,(15) β -Amirina.(16)	95
Amentoflavona (17)	96
Tetrametilamentoflavona (17a)	100
Peracetilamentoflavona (17b)	109
Putraflavona (18)	113
5,7,4' triidroxi-3',5' dimetoxi-flavona (19)	127
Identificação dos constituintes isolados de caule de <i>Ouratea cuspidata</i>	132
(St Hil)	
1-Metil β D-glucopiranosil (20)	132
4', 3, 5, 7-tetraidroxi-3'-metoxi flavonol (21)	134
5, 4',7-triidroxi-3'-metoxi-3- β -O-galactopiranosil flavona (22)	136
ASPECTOS GERAIS DA BIOSÍNTESE DE CONSTITUINTES DE <i>O. hexasperma</i> E	
<i>O. cuspidata</i>.	140
Atividade Biológica.	
Preparação das Amostras	147
Ensaio de bioproteção contra a geração de radicais livres	147
Teste de ação antiparasitária	149
Curva de crescimento	149
Teste de exclusão do Azul de Trypan	150
Medidas de atividade mitocondrial	153
Atividade Antiinflamatória	155
Avaliação da capacidade de fagocitose dos macrófagos	155
CONCLUSÃO	158
REFERÊNCIAS	159

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Dímeros de flavonóides	5
Figura 2	Estrutura de flavonóides isolados de espécies de <i>Ouratea</i> e <i>Luxemburgia</i>	9
Figura 3	Espectro de RMN ¹ H das substâncias 1+2+3 em CDCl ₃ (200 MHz).	27
Figura 4:	Espectro de RMN de ¹³ C das substâncias 1+2+3 CDCl ₃ (200 MHz).	27
Figura 5	Cromatograma da mistura dos esteróides 1+2+3 . Indicando os picos de 1 e 2 .	28
Figura 6	Espectro de massas de (1) comparado com biblioteca do aparelho	28
Figura 7	Espectro de massas de (2) comparado com biblioteca do aparelho.	29
Figura 8	Espectro de massas de (3) comparado com biblioteca do aparelho.	29
Figura 9	Espectro de I V da substância 4 .	30
Figura 10	Espectro de RMN de ¹ H da substância 4 em piridina d ₅ . (200 MHz)	30
Figura 11	Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, em CDCl ₃) da substância 4a	31
Figura 12	Espectro de RMN ¹ H da substância 5 em CDCl ₃ .(200MHz).	34
Figura 13	Espectro de RMN ¹³ C da substância 5 em CDCl ₃ . (50MHz).	34
Figura 14	Expansão do espectro de RMN ¹³ C da substância da 5 entre 15 a 56 ppm em CDCl ₃ . (50MHz)	35
Figura 15	Espectro de I V da substância 6	38
Figura 16	Espectro de RMN ¹ H (200 MHz) da substância 6 em DMSO-d ₆	38
Figura 17	Expansão do espectro de RMN ¹ H (200 MHz DMSO-d ₆) da substância 6 entre 1–8 ppm.	39
Figura 18	Espectro de ¹³ C (BBD 50 MHz) da substância 6 em DMSO-d ₆ .	40
Figura 19	Espectro de RMN de ¹³ C (BBD e DEPT 50 MHz) da substância 6 em DMSO-d ₆ .	41
Figura 20	Espectro de I V da mistura de substâncias 7+8 .	45
Figura 20	Espectro de RMN ¹ H (400MHz) da mistura das substâncias 7+8 em DMSO-d ₆ .	45
Figura 21	Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz) da mistura 7+8 em DMSO-d ₆ entre 6,2 – 8,2 ppm.	46
Figura 22	Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz) na região de açúcares entre 3–5 ppm da substância 7+8 .	47
Figura 23	Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz) da mistura das substâncias 7+8 . em DMSO-d ₆ .	47
Figura 24	Expansão do espectro de RMN ¹³ C (100 MHz) da mistura das substâncias 7+8 entre 145–183 ppm em DMSO-d ₆ .	48
Figura 25	Expansão do espectro de RMN ¹³ C (100 MHz) da mistura das substâncias 7+8 entre 97–130 ppm em DMSO-d ₆ .	48
Figura 26	Expansão do espectro de RMN ¹³ C (100 MHz) da mistura das substâncias 7+8 em DMSO-d ₆ .	49
Figura 27	Espectro RMN ¹³ C DEPT 100 MHz substância 7+8 .em DMSO-d ₆	50

Figura 28	Mapa de contorno HMQC (400/100 MHz DMSO-d ₆) na região de C-sp ² (95-132 ppm) da mistura das substâncias 7+8 .	51
Figura 29	Mapa de contorno de HMQC (400/100 MHz DMSO-d ₆) das substâncias 7+8 na região de C-sp ³ (30 – 85 ppm).	52
Figura 30	Espectro de RMN ¹ H (500 MHz) da substância 9 em DMSO-d ₆	55
Figura 31	Espectro de RMN-NOEDIFF (200 MHz DMSO-d ₆) da substância 9 .	56
Figura 32	Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, DMSO-d ₆) da substância 10	59
Figura 33	Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, DMSO-d ₆) da substância 10 .	60
Figura 34	Espectro de RMN-NOEDIFF (200 MHz) da substância 10 .	61
Figura 35	Espectro de I V da substância 11 .	63
Figura 36	Espectro de RMN ¹ H (200 MHz CD ₃ OD) da substância 11	64
Figura 37	Espectro de RMN ¹³ C(BBD 50MHz DMSO-d ₆) da substância 11 .	64
Figura 38	Cromatograma da substância 11	65
Figura 39	Espectro de massas da substância 11. [Coluna CPSIL8CB (30m x 0,25 x 0,25mm), Temperatura: 180C/1min-10C/min-290/20min. Ionização: EI (70eV)].	65
Figura 40	Espectro de RMN ¹ H (200 MHz) DMSO-d ₆ . (Região 8,0-12 ppm é apresentada no centro da figura).	71
Figura 41	Espectro de RMN ¹³ C(BBD, 50 MHz) DEPT θ= 135, DMSO-d ₆ da substância 12	72
Figura 42	Mapa de contorno HETCOR (200/50 MHz DMSO-d ₆) da substância 12	73
Figura 43	Mapa de contorno COLOC (200/50 MHz) DMSO-d ₆ da substância 12	74
Figura 44	Mapa de contorno ¹ Hx ¹ H COSY da substância 12.	75
Figura 45	Espectro de NOEDIFF (200 MHz) DMSO-d ₆ substância 12 , com impureza de 13 .	76
Figura 46-a	Espectro de massas de alta resolução da substância 12 obtido com Ionização elétron spray (IES) e detecção de íons negativos.	77
Figura 46-b	: Espectro de massas de alta resolução MS/MS do pico m/z 553 (46-a) da substância 12 obtido com Ionização electrospray (IES) e detecção de íons negativos.	77
Figura 46-c	Espectro de massas de alta resolução MS/MS do pico 517 (46-a) da substância 12 . obtido com Ionização electrospray (IES) e detecção de íons negativos.	78
Figura 46-d	Espectro de massas de alta resolução MS/MS do pico 515 (46-a) da substância 12 . obtido com Ionização electrospray (IES) e detecção de íons negativos	78
Figura 47	Espectro de RMN ¹ H (200 MHz) DMSO-d ₆ da substância 13 Substancia 12 .*	82
Figura 48	Espectro de RMN ¹³ C (BBD), DEPT θ 135 (50 MHz DMSO-d ₆) da substância 13 .	83
Figura 49:	Mapa de contorno HETCOR (50 MHz DMSO-d ₆) da substância 13 .	84
Figura 50	Mapa de contorno ¹ Hx ¹ H COSY (200 MHz DMSO-d ₆) de 13	85

Figura 51-a	Espectro de massas de alta resolução da substância 13 , obtido com Ionização elétron Spray (IES) e detecção de íons negativos.	86
Figura 51-b	Espectro de massas de alta resolução MS/MS do pico 515 (51-a) da substância 13 , obtido com Ionização elétron Spray (IES) e detecção de íons negativos	86
Figura 51-c	Espectro de massas de alta resolução MS/MS do pico 399 (51-a) da substância 13 , obtido com Ionização elétron Spray (IES) e detecção de íons negativos	87
Figura 52	Espectro de RMN-NOEDIFF (200 MHz DMSO-d ₆) da substância 13a	89
Figura 53	Espectro de RMN ¹ H (200 MHz DMSO-d ₆) da substância 13b	90
Figura 54	Espectro de RMN ¹ H (200 MHz DMSO-d ₆) expansão da região entre 2,7-1,0 ppm da substância 13b .	91
Figura 55	Modelos para atribuição dos dados de RMN ¹³ C do derivado acetilado (13b).	92
Figura 56	Espectro de RMN ¹³ C (BBD 50 MHz CDCl ₃) do derivado 13b .	93
Figura 57	Espectro de RMN ¹ H (200MHz, CDCl ₃) das substância 14 , 15 , e 16 .	95
Figura 58	Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substância 17	98
Figura 59	Espectro de RMN ¹³ C (200 Mhz, CD ₃ COCD ₃) da substância 17	99
Figura 60	Espectro de RMN ¹ H (500 MHz CDCl ₃) substância 17a .	102
Figura 61	Expansão do espectro de RMN ¹ H (500MHz CDCl ₃) substância 17a entre 6,5 a 8,5ppm.	102
Figura 62	Mapa de contorno RMN 2D HMQC (500 MHz CDCl ₃) ampliado em 6,3 – 8,0 ppm da substância 17a	103
Figura 63	Mapa de contorno RMN 2D de HMBC (500 MHz CDCl ₃) ampliado em 6,5–7,5 ppm da substância 17a .	104
Figura 64	Mapa de contorno RMN 2D de HMBC (500 MHz CDCl ₃) ampliado em 6,5 – 7,3 ppm da substância 17a	105
Figura 65	Mapa de conotorno de HxH COSY (500 MHz, CDCl ₃) da substância 17a	106
Figura 66	Mapa de contorno de RMN-2D HMBC (500 MHz, CDCl ₃) ampliado em 3,7 – 4,0 ppm. Da substância 17a	107
Figura 67	Mapa de cotrono RMN 2D NOESY (500 MHz, CDCl ₃) ampliado em 3,7 – 4,0 ppm da substância 17a	108
Figura 68	Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) do derivado 17b	111
Figura 69	Espectro de RMN ¹³ C (BBD, 50 MHz CDCl ₃) do derivado 17b	111
Figura 70	Expansão do espectro de RMN ¹³ C (BBD, 50 MHz CDCl ₃) do derivado 17b . Entre a região 105-180 ppm.	112
Figura 71	Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 18	115
Figura 72	Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO –d ₆) da substância 18 ampliado entre 6,2 – 8,2 ppm.	116
Figura 73:	Mapa de contornode ¹ Hx ¹ H COSY (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 18 .	117
Figura 74	Espectro de RMN ¹³ C(BBD 500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 18	118
Figura 75	Expansão Figura 74 entre 92–135 ppm.	118

Figura 76	Expansão do espectro de RMN ¹³ C (BBD, 500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 18 , entre 155 – 185 ppm	119
Figura 77	Mapa de contorno HMQC (500/125 MHz, DMSO-d ₆) da substância 18 .	120
Figura 78	Mapa de contorno HMBC (500/125 MHz, DMSO –d ₆) da substância 18	121
Figura 79	Mapa de contorno HMBC (500/125 MHz, DMSO –d ₆) da substancia 18 entre 101–125 ppm.	122
Figura 80	Mapa de contorno HMBC (500/125 MHz, DMSO- d ₆) da substância 18 , entre 157–169 ppm.	123
Figura 81	Mapa de contorno HMBC (500/125 MHz, DMSO –d ₆) da substância 18 , entre 96 – 108 ppm.	124
Figura 82	Mapa de contorno HMBC (500/125 MHz, DMSO –d ₆) da substância 18 , entre 159 – 169 ppm	125
Figura 83	Espectro de RMN-NOEDIFF da substância 18	126
Figura 84	Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da substância 19	129
Figura 85	Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) da substância 19	129
Figura 86	Espectro de RMN-NOEDIFF da substância 19	130
Figura 87	Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, DMSO-d ₆) da substância 20	133
Figura 88	Espectro de RMN ¹³ C (BBD 50 MHz, DMSO-d ₆) da substância 20	133
Figura 89	Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, DMSO-d ₆) da substancia 21	134
Figura 90	Espectro de RMN ¹ H NOEDIFF (200 MHz DMSO-d ₆)da substância 21	135
Figura 91	Espectro de RMN ¹ H NOEDIFF (200 MHz DMSO-d ₆)da substância 21	135
Figura 92	Espectro de RMN ¹ H (500 MHz DMSO-d ₆) da mistura contendo a substância 22	137
Figura 93	Expansão do espectro de RMN ¹ H(500 MHz, DMSO-d ₆) da mistura contendo a substância 22 entre as regiões 4,5-8,0 ppm	137
Figura 94	Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz DMSO-d ₆) da fração contendo a substância 22 . * Sinais de outros glicosídeos presentes na fração	138
Figura 95	Expansão da figura 94 na região entre 115-180 ppm	138
Figura 96	Espectro de RMN ¹³ C (DEPT 135, 125 MHz DMSO-d ₆) expandido entre as regiões 55-85 ppm da fração contendo a substância 22 . * Sinais de outros glicosídeos presentes na fração	139
Figura 97	Curva padrão de malonildialdeído (MDA) gerada através da indução de radicais livres , medidos espectrofotometricamente a 532nm frente a um padrão de malonildialdeído adquirido comercialmente (Fisher, USA, AC14861-1000). Os resultados representam a média de quatro repetições adicionadas do erro padrão (p≤0,01)	148
Figura 98	Figura 98: Ensaio de redução de radicais livres com extratos de <i>Ouratea cuspidata</i> . Concentrações diferentes do extrato metanólico (barras negras), do extrato hexânico (barras cinzas) e do extrato acetato de etila (barras listradas) foram adicionadas a sistema biológico gerador de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os tubos foram lidos a 540 nm e a concentração de TBARS determinada contra uma curva padrão malonildialdeído (barra branca) em nMoles por mL. Os resultados são a média de quatro repetições acrescidas do erro padrão (p≤0,5). O círculo evidencia a maior eficiência bioprotetora da fração metanólica em relação às demais	148

- Figura 99** Curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (L566+OCMeOH) em meio axênico bifásico (NNN) adicionado de 16 mg/mL de extrato metanólico de *Ouratea cuspidata* (OCMeOH), em relação ao sistema controle (L566) constituído de promastigotas não expostas ao extrato. Os resultados expressam a média de quatro observações turbidimétricas, adicionadas do erro padrão ($p \leq 0,01$). 150
- Figura 100** Viabilidade de promastigotas de *Leishmania braziliensis* (L566) e de macrófagos peritoneais (M ϕ) de hamsters (*Cricetus cricetus*) frente a diferentes concentrações do extrato metanólico de *Ouratea cuspidata*. Os pontos assinalados representam a média de quatro observações adicionadas do erro padrão. As diferenças foram analisadas através de ANOVA, sendo considerados significativas quando $p \leq 0,05$. 152
- Figura 101** Alterações morfológicas de promastigotas de *Leishmania braziliensis* (L566) e de macrófagos peritoneais (M ϕ) de hamsters (*Cricetus cricetus*) frente a diferentes concentrações do extrato metanólico de *Ouratea cuspidata*. Os pontos assinalados representam a média de quatro observações adicionadas do erro padrão. As diferenças foram analisadas através de ANOVA, sendo considerados significativas quando $p \leq 0,05$ 152
- Figura 102** Medidas de Absorbância da atividade enzimática mitocondrial em macrófagos peritoneais (M ϕ) de hamsters (*Cricetus cricetus*), através da dosagem de formazana, gerada pelo desdobramento fisiológico do brometo de metiltetrazólico (MTT), após exposição por 24 horas a diferentes concentrações do extrato metanólico de *Ouratea cuspidata* (OCMeOH). N= 5 ($p \leq 0,05$) 154
- Figura 103** Medidas de Absorbância da atividade enzimática mitocondrial em promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (L566) através da dosagem de formazanas, geradas pelo desdobramento fisiológico do brometo de metiltetrazólico (MTT), após exposição por 24 horas a diferentes concentrações do extrato metanólico de *Ouratea cuspidata* (OCMeOH). N= 5 ($p \leq 0,05$) 154
- Figura 104** Percentual de endocitose de partículas inertes (Zymozan) em macrófagos peritoneais de hamsters (*Cricetus cricetus*) tratados com diferentes doses do extrato metanólico de *Ouratea cuspidata* (OCMeOH) durante duas horas a 37°C, 5% CO₂, em comparação ao controle constituído por células não tratadas. Os resultados estão expressos como sendo a média de quatro repetições por concentração analisada adicionados do erro padrão ($p \leq 0,01$). 156
- Figura 105** Percentual de bioproteção contra a geração de radicais livres por diferentes concentrações da fração metanólica de *Ouratea cuspidata* (OCMeOH). Os resultados representam a média de quatro repetições de ensaios realizados “*in vitro*” onde as diferentes concentrações do extrato vegetal foram adicionadas sobre sistema gerador de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). 156

Figura 106 Curva de regressão linear evidenciando a hormese bioprotetora obtida pela adição da fração metanólica de *Ouratea cuspidata* (OCMeOH) sobre sistema biológico sujeito à indução de radicais livres reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os resultados estão representados como a média de quatro repetições acrescidos do erro padrão ($p \leq 0,01$). 157

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Ocorrência de flavonóides em espécies dos gêneros <i>Ouratea</i> e <i>Luxemburgia</i> (Ochnaceae.)	7
Tabela 2	Dados de RMN ¹³ C da substância 5 comparada com a literatura	32
Tabela 3	Atribuição dos dados de RMN ¹ H e de ¹³ C da substância 6 e comparação com deslocamentos químicos de carbono 13 registrados na literatura	37
Tabela 4	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C incluindo acoplamento heteronuclear (HMQC) da substância 7 e comparação com δ _H e δ _C da orientina	43
Tabela 5	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C incluindo acoplamento heteronuclear (HMQC) da substância 8 e comparação com δ _H e δ _C da vitexina	44
Tabela 6	Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e RMN ¹³ C (125 MHz) da substância 9 em DMSO-d ₆ comparado com a literatura em D ₃ COD (KUMARASAMY, <i>et. al.</i> , 2004). ^a DMSO-d ₆ ; ^b D ₃ COD	54
Tabela 7	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (200 MHz, 50 MHz) (DMSO-d ₆) da substância 10 e comparação com valores de deslocamento químico de carbono-13 da literatura (KUMARASAMY, <i>et. al.</i> , 2004).	58
Tabela 8	Dados de RMN ¹ H (200 MHz) e ¹³ C (BBD, 50 MHz), em CD ₃ OD	61
Tabela 9	Dados de RMN ¹ H * (δ, J Hz, DMSO-d ₆) (200 MHz) ¹³ C (50 MHz) da substância 12	68
Tabela 10	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (200 e 50 MHz, DMSO-d ₆) da substância 12 com parados com dados de RMN ¹ H e ¹³ C (500 e 125 MHz, DMSO-d ₆) do modelo da literatura	69
Tabela 11	Dados de RMN ¹ H e ¹ H- ¹ H-COSY (200 MHz) ¹³ C , 2D HETCOR, em DMSO-d ₆ da substância 13	80
Tabela 12	Tabela de dados de RMN ¹³ C e ¹ H de 13b comparados com dados de RMN ¹³ C de modelos da literatura (SILVA 2002; BASTOS <i>et al.</i> , 2002)	92
Tabela 13	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (200 MHz , 50 MHz, D ₃ CCOCD ₃) da substância 17	97
Tabela 14	Dados de RMN ¹ H (500 MHz), ¹³ C (125 MHz) 1D e 2D da substância 17a (CDCl ₃).	101
Tabela 15	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (200 e 50 MHz CDCl ₃) do derivado 17b comparado com valores de RMN ¹ H e ¹³ C (400 e 100 MHz CDCl ₃) da literatura (VELANDIA <i>et al.</i> , 2002)	110
Tabela 16	Dados de RMN ¹ H e ¹ H- ¹ H-COSY (500MHz) ¹³ C (125MHz) e 2D da substância 18 em DMSO-d ₆	114
Tabela 17	Dados espectrométricos de RMN ¹ H-NOEDIFF da substância 18	115
Tabela 18	-Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (200 MHz e 50 MHz, em CDCl ₃) da substância 19 e comparação com RMN ¹ H e ¹³ C (400 MHz e 100 MHz, em DMSO-d ₆) da literatura (KWABARA <i>et al.</i> , 2003).	128
Tabela 19	Dados espectrométrico de experimento RMN ¹ H NOEDIFF da substância 19	128
Tabela 20	Dados de RMN ¹³ C(BBD, 50 MHz DMSO-d ₆) da substância 20 comparada com valores da literatura	132
Tabela 21	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (500 e 125 MHz DMSO-d ₆) do constituinte majoritário da fração da fração 22 (5,4',7-triidroxi-3'-metoxi-3-β-O-D-galactopiranosil flavona com valores da literatura (CARVALHO <i>et al.</i> , 2001 e DANIEL, 2004).	136

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1	Proposta de fragmentação e constituição dos íons compatíveis com os valores dos picos detectados nos espectros de massas de 12 .	70
Esquema 2	Proposta de fragmentação e constituição dos íons compatíveis com os valores dos picos detectados nos espectros de massa de 13 .	81
Esquema 3	Rota biossintética geral para flavonóides. (Adaptado de DEY et al., 1997; DEWICK, 1997).	141
Esquema 4	Proposta biossintética de dimerização na formação da amentoflavona e putraflavona	142
Esquema 5	Proposta biossintética da formação das substâncias 12 e 13 (adaptado de DEWICK, 1997).	143
Esquema 6	Proposta biogenética para os esteróides isolados de <i>O. cuspidata</i> e <i>O. hexasperma</i> (Adaptado de MANN,1994; DEWICK, 1997)	145
Esquema 7	Rota biossintética de formação dos triterpenos isolados das espécies <i>O. cuspidata</i> e <i>O. hexasperma</i> . (Adaptado de DEWIK, 1997)	146

ÍNDICE DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1	Preparação e fracionamento do extrato metanólico da inflorescência de <i>O. hexasperma</i> St. Hil	16
Fluxograma 2	Fracionamento cromatográfico da fração OHIMAc	17
Fluxograma 3	Preparação e fracionamento do extrato metanólico do caule de <i>O. hexasperma</i> st. Hil.	19
Fluxograma 4	Preparação e fracionamento cromatográfico dos extratos das folhas de <i>Ouratea cuspidata</i>	21
Fluxograma 5	Preparação e fracionamento cromatográfico do extrato metanólico do caule de <i>Ouratea cuspidata</i>	23

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1	Constituintes químicos isolados de inflorescência de <i>Ouratea hexasperma</i>	25
Quadro 2	Constituintes químicos isolados de caules de <i>Ouratea hexasperma</i>	62
Quadro 3	Constituintes químicos isolados de folhas de <i>Ouratea cuspidata</i>	94
Quadro 4	Constituintes químicos isolados de caules de <i>Ouratea cuspidata</i> ;	131

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	deslocamento químico (ppm)
ν	estiramento
M^+	íon molecular
AcOEt	acetato de etila
CC	cromatografia em coluna (pressão atmosférica)
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CCDA	cromatografia em camada delgada analítica
CG-EM	cromatografia em fase gasosa acoplado ao espectro de massas
$CDCl_3$	clorofórmio deuterado
COLOC	CO rrelation spectroscopy via log-range couplings
COSY	CO rrelated Spectroscop Y
<i>d</i>	dubleto
<i>dd</i>	duplo dubleto
DEPT	D istortionless E nhancement by P olarization T ransfer
DMSO- d_6	dimetilsulfóxido deuterado
EM	espectroscopia de massas
eV.	electron volt
HBBD(BBD)	H ydrogen B and B road D ecoupled
HETCOR	H eteronuclear correlated spectroscopy
HMBC	H eteronuclear M ultiple- B ond C orrelation
HMQC	H eteronuclear M ultiple- Q uantum C oherence
Hz	hertz
IV	infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento em Hertz
<i>m</i>	multiplete
<i>m/z</i>	relação carga/massa
MeOH	metanol
Me	metila
NOE	N uclear O verhauser E ffect
NOESY	N uclear O verhauser and E xchange S pectroscopy
OMe	metoxila
P.F.	ponto de fusão
RMN 1H	ressonância magnética nuclear de hidrogenio
RMN ^{13}C	ressonância magnética nuclear de carbono-13
<i>s</i>	singleto
<i>sl</i>	singleto largo
<i>t</i>	tripleto

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

RESUMO

Além das considerações sobre a diversidade flavonoídica dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia*, desenvolveram-se o estudo químico de duas espécies de *Ouratea* (Ochnaceae): *O. cuspidata*, coletada na restinga do município de Barra de Maricá-RJ e *O. hexasperma*, coletada na região de tabuleiro, município de João Pessoa-PB, Brasil. As substâncias descritas nesta investigação fitoquímica foram isoladas através de partição com solventes e técnicas cromatográficas de extratos obtidos através de maceração a frio com hexano, acetato de etila e metanol. As estruturas foram determinadas através da análise de dados fornecidos por espectrometria na região do infravermelho, de massas, RMN ^1H e ^{13}C (técnicas 1D e 2D) das substâncias naturais e de alguns derivados. Do extrato metanólico das inflorescências de *O. hexasperma* foram isolados campesterol, sitosterol, estigmasterol, ácido 3- β -*O*-acil-olean-12-en-28-óico, 3- β -*O*-*D*-glicopiranosil-sitosterol, os flavonóides, orientina, vitexina, rutina, swertisina e swertiajaponina; do extrato metanólico dos caules dessa espécie isolaram-se o ácido 1,5-diidroxi-fenilacético, 3,4',5-triidroxi-6-prenil-7-*O*- β -*D*-glicosil-flavanona e 3,4',5-triidroxi-6-prenil-7-*O*- β -*D*-glicopiranosil-flavona. Das folhas de *O. cuspidata* foram isolados lupeol, α -amirina, β -amirina, amentoflavona, putraflavona e 5,7,4'-triidroxi-3',5'-dimetoxi-flavona. Esse estudo com os caules dessa espécie forneceu 4',3,5,7-tetraidroxi-3'-metoxi-flavonol, 4',3,5,7-tetraidroxi-3'-metoxi-3- β -*O*-*D*-galctopiranosil-flavona e metil- β -*D*-glicopiranosídeo. Os glicosil-prenil-flavonóides são novos na literatura. Os extratos de *O. cuspidata* foram submetidos à avaliação de atividade antiparasitária frente a *Leishmania brasiliensis*.

ABSTRACT

Besides the considerations concerning the flavonoidic biodiversity of *Ouratea* and *Luxemburgia* genera, the chemical study of two *Ouratea* (Ochnaceae) species was achieved. *O. cuspidata*, collected in the beach ridge of Barra de Maricá township, RJ and *O. hexasperma*, collected in tabuleiro region, João Pessoa township, PB, Brazil. The described substances in this phytochemical investigation were isolated using solvent partition and chromatographic technique of the extract obtained by cold maceration with hexane, ethyl acetate and methanol. The structures were determined by IR, MS and ^1H and ^{13}C NMR (1D and 2D techniques) analysis of natural substances and of some derivatives. From the inflorescence methanol extract of *O. hexasperma* were isolated campesterol, sitosterol, stigmasterol, 3- β -O-acyl-olean-12-en-28-oic acid, sitosterol-3-O- β D-glycopyranoside, the flavonoids, orientin, vitexin, rutin, swertisin and swertijaponin; from the methanolic extract of stem of this specie the 1,5-dihydroxyphenylacetic acid, flavanone-3,4',5-trihydroxi-6-prenyl-7-O- β D-glycopyranoside, and flavone-3,4',5-trihydroxi-6-prenyl-7-O- β D-glycopyranoside were isolated. From the *O. cuspidata* leaves were isolated lupeol, α -amyrin, β -amyrin, amentoflavone, putraflavone and 5,7,4'-trihydroxy-3',5'-dimethoxy-flavone. The same study of the stem of this specie yielded 4',3,5,7,-tetrahydroxy-3'-methoxy-flavonol, 4',3,5,7,-tetrahydroxy-3'-methoxy-3- β -OD-galactopiranosyl-flavone and methyl- β D-glycopyranoside. The glycopyranosyl-prenyl-flavonoids are new in the literature. The extracts of *O. cuspidata* were evaluated as antiparasitic against *Leishmania brasiliensis*.

INTRODUÇÃO

O Brasil é certamente um dos países que possui maior diversidade de plantas terrestres, comportando entre 15 a 20% de todas as espécies conhecidas. Nesse sistema as *Angiospermae* destacam-se constituindo cerca de 16 a 20% do total mundial. Esses valores representam uma fração substancial da diversidade do globo mas, junto com uma condição privilegiada, impõe ao Brasil uma grande responsabilidade na exploração, utilização e preservação dessa biodiversidade.(SHEPHERD, 2002).

As principais causas da perda da diversidade genética têm sido associadas à destruição, fragmentação dos ecossistemas e aos estresses ambientais como a poluição e as mudanças climáticas globais. A preocupante taxa de extinção de espécies vegetais leva à necessidade de se considerar urgente o estabelecimento de políticas e ações de conservação. Entre as diversas ações de proteção dos ecossistemas, está a avaliação do conhecimento etnobotânico acumulado há milênios pelas comunidades a eles associadas além dos estudos químico e farmacológico das espécies para, através de dados científicos, dar orientações no uso popular de plantas.(NODARI, *et al.*, 2000).

Nesses estudos estão incluídas as formas de preservar as espécies, levando em consideração o ambiente no qual as mesmas se desenvolvem. O entendimento que microconstituintes respondendo pela utilidade das diferentes partes das plantas dependem do ecossistema onde elas se desenvolvem, é um dos fatores mais relevantes sobre a utilização de espécies vegetais.

A química de produtos naturais está inserida no contexto da biodiversidade, pois além do conhecimento dos constituintes químicos relacionados às espécies em estudo, gera também informações para o entendimento de outras áreas de conhecimento como ecologia química, quimiotaxonomia, etnofarmacologia, genética, farmacologia, bioquímica, etc. Os profissionais da área de química de produtos naturais sempre deram maior atenção ao estudo das substâncias micromoleculares, mas ultimamente têm produzido trabalhos com estruturas mais complexas, não se limitando às substâncias elaboradas via processos do metabolismo especial. O avanço tecnológico tem permitido o aperfeiçoamento da ligação entre os trabalhos de química de produtos naturais, bioquímica e farmacologia. A evidência disso pode ser confirmada pelos surgimento de novos títulos de divulgações científicas como: “Phytomedicine”, “Biochemical Systematics and Ecology”, “Journal Nat. Cancer Inst.”, “Journal Med. Biol. Res.”, etc além da exigência no mercado de trabalho de profissionais com formação mais diversificada.

Em todo este contexto o parâmetro mais considerado sobre o conhecimento científico de plantas está relacionado aos estudos que contribuem para indústria farmacêutica, procurando soluções para os problemas relacionados com a saúde humana.

Diferentes classes químicas de produtos naturais originaram diversos fármacos, de distintas categorias terapêuticas. Curare, alcalóide tetraidroquinolínico, originários da flora da América do Sul, inspirou os bloqueadores ganglionares representados, entre outros, pelo hexametoneo, succinilcolina e pancurônio. Os alcalóides indólicos diméricos vincristina e vimblastina são fármacos eficazes no tratamento de leucemia infantil e são isolados da *Vinca rosea* pela empresa farmacêutica Eli Lilly. O diterpeno paclitaxel extraído de *Taxus brevifolia* Nutt, é importante antitumoral útil no tratamento do câncer de ovários e mama. É importante ressaltar que sua atividade biológica foi detectada na década de sessenta e o produto entrou no mercado quase 25 anos após seu isolamento. Os glicosídeos de *Digitalis*, que apesar de apresentarem reduzido índice terapêutico, são empregados até hoje como cardiotônicos em virtude de não ter sido identificado um substituto adequado com as mesmas propriedades e mais seguro. Eles podem ser considerados como um dos mais antigos produtos naturais de

origem vegetal com aplicação terapêutica. (BARREIROS *et al*, 2001, SCHENKEL, *et al*, 2000).

Uma outra forma de fazer uso das virtudes terapêuticas das plantas, sem necessariamente isolar suas substâncias, é através dos fitoterápicos. Medicamentos originados exclusivamente de material botânico integral ou seus extratos usados com o propósito de tratamento médico. Esse tipo de medicamento tem se mostrado atraente principalmente pela indústria farmacêutica de países desenvolvidos as quais se caracterizam pela alta tecnologia e rápido crescimento, buscando novas oportunidades de diversificação. A maior restrição que se tinha para o emprego desses medicamentos era a dificuldade de sua reprodutibilidade e em quantificar seus constituintes e realizar o seu controle de qualidade. Isso deixava em dúvida sua eficácia clínica e sua segurança.

O aprimoramento da tecnologia farmacêutica, permitindo melhor controle de qualidade baseado na moderna tecnologia de isolamento, identificação, determinação estrutural e quantificação de substâncias químicas vem tornando possível a produção de fitoterápicos seguros, eficazes e com efeito totalmente reprodutível. Por outro lado os avanços na pesquisa de fitoterápicos em nível farmacológico e molecular permitiram constatar que esses produtos apresentam um mecanismo de ação total ou parcialmente esclarecidos, com avaliação toxicológica segura e estudos de farmacologia pré-clínicos e clínicos realizados segundo as normas que regem os processos de validação de fármacos puros. Exemplos podem ser citados: *Hypericum perforatum* (erva de São João) largamente prescrito na Europa para tratamento de distúrbios psíquicos, sua atividade antidepressiva sobre o SNC é devida a presença de naftodiantronas como a hipericina, pseudohipericina e isohipericina; e as xantinas; outro exemplo, *Serenoa repens* cujo extrato lipoesterólico é usado no tratamento da hiperplasia benigna da próstata. Sua ação baseia-se na inibição da enzima 5 α -redutase. Esse extrato age melhorando tanto as complicações urológicas como as inflamatórias, ou seja, age em diferentes alvos bioquímicos responsáveis pela etiologia da doença o que seria difícil com o uso de um único fármaco sintético para o tratamento desta patologia. Outros exemplos: o *Tanacetum partenium* empregado para o tratamento da enxaqueca; *Allium sativum*, usado no tratamento de problemas cardiovasculares e redução do colesterol; *Echinacea púrpurea*, empregada como antiinflamatório e imunoestimulante, são alguns dos fitoterápicos que foram analisados por vários estudos clínicos (YUNES *et. al.*, 2001, CALIXTO 2001).

A indústria brasileira de fitoterápico é constituída por empresas de pequeno ou médio porte, fundamentadas apenas no uso popular das plantas sem nenhuma comprovação pré-clínica, nem clínica, não podendo portanto ser competitiva em nível nacional e muito menos internacional. Caso os investimentos das empresas em pesquisa, controle de qualidade etc., não venham a ocorrer, a defasagem em relação as empresas de fitoterápicos de outros países irá se ampliar. Como essas empresas estão se internacionalizando, eventualmente associadas ou incorporadas as multinacionais do setor farmacêutico é razoável supor que o futuro da produção brasileira de fitoterápicos dependerá diretamente das estratégias das grandes empresas. O incentivo ao desenvolvimento da indústria de fitoterápico nacional seria uma política estratégica para a conservação e aproveitamento racional da nossa biodiversidade (FERREIRA *et. al.*, 1998).

O grupo de pesquisa em química de produtos naturais da UFRRJ tem registrado, dentre outros trabalhos, estudos de espécies do gênero *Ouratea* e *Luxemburgia* (Ochnaceae) dando valiosas contribuições para o conhecimento da química dessa família, propiciando subsídios para avaliações quimiotaxonômicas, além de apresentar substâncias com importantes atividades biológicas contribuindo para busca de novos fármacos (SUZART, *et al.* 2007). A quantidade de resultados obtidos até o momento com estudo de espécies desses gêneros orientou a fazer uma coletânea de informações relacionadas a esses gêneros e fazer considerações sobre eles constituindo o capítulo II deste trabalho

Outro objetivo deste trabalho é dar continuidade ao estudo químico de espécies de Ochnaceae desenvolvendo estudo de *Ouratea hexasperma* e *Ouratea cuspidata*. Apesar de haver estudos anteriores dessas espécies, principalmente de *O. hexasperma* coletada na Amazônia (Moreira, 1994, 1999) e coletada na Mata Atlântica, Nordeste do Brasil (Daniel, 2005), o estudo versou apenas as folhas dessa planta. Dando continuidade ao estudo desse material foi desenvolvida a pesquisa com os galhos e inflorescências da planta. Em relação a *O cuspidata* fez-se apenas uma comunicação divulgando a presença de carboidratos (SILVA, et al., 1997). Além do isolamento e identificação dos constituintes das diferentes partes dessas espécies, procurou-se dentro do possível, preparar derivados dos constituintes verificando a probabilidade de registrar substâncias novas na literatura; fazer a completa atribuição de dados espectrométricos das substâncias naturais isoladas e derivados e fazer avaliação de atividades biológicas de alguns constituintes ou extratos.

CONSIDERAÇÕES QUIMIOSISTEMATICAS E FARMACOLOGICAS SOBRE OS GENEROS *Ouratea* E *Luxemburgia* (OCHNACEAE)

O levantamento na literatura sobre os constituintes químicos desses gêneros (Tabela 1) permitiu tirar deduções e fazer considerações sobre a biodiversidade da classe de substâncias mais frequentes e constatar seus aspectos farmacológicos.

A família Ochnaceae pertence à ordem Theales (DAHLGREN, 1980) e compreende cerca de 28 gêneros e 400 espécies de ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. No Brasil, ocorrem aproximadamente 9 gêneros com 105 espécies (JOLY, 1988). São plantas essencialmente arbóreas ou arbustivas. As espécies de *Ouratea* espalhadas pelo país recebem designações específicas como Angelim (*Ouratea vaccinoides*), Caju Bravo (*Ouratea floribunda* e *Ouratea salicifolia*) e Coração de Bugre (*Ouratea parviflora*). *Ouratea floribunda* e *Ouratea castanaefolia* são empregadas em ornamentação urbana. No Nordeste as espécies desse gênero são conhecidas como batiputá (BARROSO, 1986).

As espécies de Ochnaceae, são capazes de biossintetizar flavonóides e biflavonóides, sendo essa família mais bem representada pelos gêneros *Ouratea*, *Luxemburgia*, *Ochna* e *Lophira*. (TIH *et al.*, 1989; TIH, *et al.*, 1992; MESSANGA, *et al.*, 2002; LIKHITWITAYAWUID, 2001). A frequência e a diversidade estrutural dos biflavonóides em espécies desses gêneros permitem utilizá-los como marcadores taxonômicos.

Os biflavonóides constituem uma classe de flavonóides diméricos, diferenciando-se de outros oligômeros como as proantocianidinas, devido a origem biogenética das unidades constituintes. A maioria dos representantes dessa classe de produtos naturais é formada pelos dímeros flavona-flavona, flavona-flavanona, flavanona-flavanona além de ocorrer, mais raramente, os dímeros de chalconas e de isoflavonas. Quando as duas unidades são iguais constituem os bisflavonóides e quando as duas unidades são diferentes são os biflavonóides. As ligações entre as unidades flavonoídicas podem ser C-C ou C-O-C envolvendo os anéis A, B ou C dos monômeros (**Figura 1 Pág, 5**). Raramente ocorre alteração no padrão de oxigenação dos precursores, sendo garantida a oxigenação em 5, 7 e 4' e raramente uma oxidação adicional em 3'. Podem ocorrer oxidações nas posições 6, 8 ou 3' e quando isso acontece é, certamente, proveniente da outra unidade ligada nessa posição via C-O-C (**XXXIV, Figura 2, pág, 9**). A primeira biflavona, foi isolada em 1929 e é conhecida como gingentina. Desde então mais de mil biflavonóides foram isolados de plantas e muitas atividades biológicas, têm sido relacionadas a essa classe de substâncias (LIN *et al.*, 1999). Utiliza-se a numeração dos biflavonóides atribuindo números ordinários para os anéis A e C e primados (') para o anel B de um dos monômeros. Para a segunda unidade empregam-se números ordinários duplamente primados (") para os núcleos A e C e números ordinários triplamente primados (''') para o núcleo B. De acordo com os átomos de carbonos envolvidos na ligação entre as unidades, os dímeros são classificados em grupos de biflavonóides (**Figura-1**), (SIMÕES *et al.*, 2001, CHARI, *et al.*, 1977, DORA, *et al.*, 1991) além dos dímeros de chalconas: C-3→O-C-4''' (luxenchalconas) (DE CARVALHO *et al.*, 2004) e C-3'→C3'' (brackeninas) (DREWES, *et al.*, 1984) e dos dímeros de isoflavonas C-2→C-2'' (hexaspermonas) (MOREIRA *et al.*, 1994), sem destacar os dímeros com duas ligações entre as unidades. Certos grupos hidroxila podem apresentar-se metilados originando os respectivos éteres metílicos que, às vezes, recebem nomes especiais (MOREIRA, *et al.*, 1999; FELICIO *et al.*, 1995; VELANDIA *et al.*, 2002; DANIEL *et al.*, 2005).

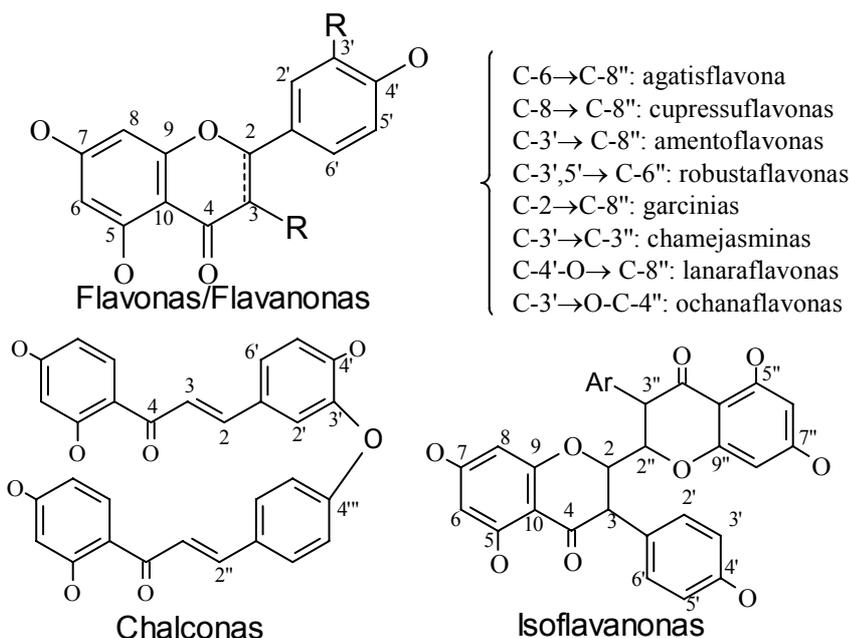


Figura-1. Dímeros de flavonóides.

Nos casos dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia*, além de alguns monômeros, tem-se detectado com freqüência a presença de bi- ou bisflavonóides. Destacando-se as hexaspermonas (IV-VI), amentoflavonas (XI, XVIII, XXIV), agatisflavonas (XII), robustaflavona (XXIV) e lanaraflavonas (XV-XVII, XXXIV) em *Ouratea*, **Figura 2**. Em *Luxemburgia* foram detectados os biflavonóides derivados de chalconas, luxenchalcona (XXV, C-3'→O-C-4"') e ochnaflavona (XX, também C-3'→O-C-4"'), **Figura 2**, que pode ter como precursor a luxenchalcona. Isso permite perceber a diferença entre esses gêneros sendo que *Luxemburgia* próximo ao gênero *Ochna*, que metabolizam com freqüência os dímeros de chalconas (PEGNYEMB, *et. al.*, 2001). Por outro lado *Ouratea* tem tendência em metabolizar com mais freqüência os dímeros de flavonas. A ocorrência de biflavonóides nos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* permite destacar a importância da química dos mesmos como potencial farmacológico e considerar substâncias dessa classe como marcadores quimiotaxonômicos.

Flavonóides identificados nos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia*

Além dos flavonóides e biflavonóides, esses gêneros são bioprodutores de outras classes de metabólitos especiais como triterpenos, diterpenos, depsídeos, ésteres graxos, e triglicérides (VELANDIA *et al.*, 2002; FELICIO *et al.*, 2004; DE CARVALHO *et al.*, 2000 e 2002; VELANDIA, *et al.*, 1998). Entre essas classes de substâncias os biflavonóides recebem destaque na literatura, devido a freqüência e abundância com que são encontrados nesses gêneros e cuja diversidade estrutural é devida, principalmente, aos diferentes padrões de ligações entre seus monômeros.

Do gênero *Ouratea* foram isolados biflavonóides dos grupos amentoflavona (XI), agatisflavona (XXXV), bigenkanina (VIII), podocarpusflavona (XVIII), lanaraflavona (XV) e seus derivados além de outros derivados de lofironas (XXXII), calodeninas (XXVIII, XXXI) e flavumonas (XXIX, XXX). A junção de isoflavanonas (C-2→C-2") deu origem às hexaspermonas A, B e C (IV; V; VI), respectivamente. A ligação tipo C-O-C é característica das ochnaflavonas (C-3'→O-C-4"'), das lanaraflavonas (C-4'-O→C-8") e do grupo das ochnaflavonas (XX) que ocorrem em espécies de *Luxemburgia* (DE CARVALHO *et al.*,

2004; OLIVEIRA *et al.*, 2002) e *Ochna* (LIKHITWITAYAWUID, 2001). Desse gênero foram isoladas as chalconas, **XXII**, **XXIII** e a bichalcona **XXV** (C-3→O-C-4"), **Figura 2**.

Uma característica do gênero *Ouratea* é a ligação entre seus monômeros, sendo as mais abundantes C-3→C-8" e C-6→C-8", acrescentando uma variação no padrão de metilação. No caso dos derivados da agatisflavona (C-6→C-8") a metilação é mais freqüente na posição 7 (**X**). Com ligações (C-O-C), foram isolados os dímeros (C-4'-O→C-8") e (C-3'→O-C-4"), incluindo a ligação entre os monômeros das bichalconas, que são característicos do gênero *Luxemburgia* (DE CARVALHO *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2002), enquanto que de *Ouratea* isolaram-se os derivados de lanaraflavona (C-4'-O-C-8") com diferentes padrões de metilação (**XVI**, **XVII**, **XXXIV**). A forma de ligação e os tipos de monômeros podem ser usados como diferenciadores entre esses gêneros. A diferença principal entre ambos é que em *Ouratea* a biflavona mais abundante é a 7"- metilagatisflavona (**X**) e de *Luxemburgia* a diidroochnaflavona (**XX**), **Figura 2**.

As flavonas e flavonóis (3-oxiflavonas) glicosilados são descritos como bioprodutos de espécies de *Ouratea* e *Luxemburgia*. São geralmente derivados da luteolina (5,7,3',4'-tetraidroxiflavona, **XXXVI**) e de quercetina (3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavona, **XXXVII**), podendo ser, inclusive, metilados. A rutina (3-O-rutinosil quercetina, **XIX**) foi isolada de *Luxemburgia nobilis* (OLIVEIRA *et al.*, 2002) e de *Ouratea semiserrata* (VELANDIA *et al.*, 2002). Das flores de *Luxemburgia octandra* foram isolados dois flavonóides 8-C-glicosilas (**XXVI**, **XXVII**), **Figura 2**. A glicose aparece como o único carboidrato encontrado até o momento, entre os flavonóides C-glicosilas isolados de espécies desses gêneros. Chama atenção a presença de isoflavonóides clorados, monoméricos, isolados somente de *O. semisserata* (**XIII**, **XIV**), além de chalconas presentes em duas espécies do gênero *Luxemburgia* (**XXII**, **XXIII**).

Aspectos farmacológicos e importância econômica de algumas espécies estudadas.

A avaliação dos trabalhos na literatura permitiu verificar a existência de vários estudos farmacológicos tanto com frações de extratos brutos como com biflavonóides naturais e seus derivados isolados de espécies do gênero *Ouratea* e *Luxemburgia*.

Os biflavonóides 7"-O-metilagatisflavona (*O. hexasperma*), e a amentoflavona (*O. semiserrata*) e o derivado acetilado da amentoflavona apresentaram atividade inibitória da DNA topoisomerase humana tipo I. Potente atividade sobre a inibição do crescimento de células de carcinoma de Ehrlich, porém, apenas a agatisflavona apresentou atividade sobre a inibição da DNA topoisomerase humana tipo II- α e inibição de 42% do crescimento de células de leucemia humana K562. (GRYNBERG *et al.*, 2002; DE CARVALHO *et al.*, 2002) As biflavonas 6→6"- begenkwanina e a 7,7"-dimetoxiagatisflavona isoladas da *O. spectabilis* apresentaram atividade inibitória sobre a enzima aldose redutase de cristalino bovino. O aumento da atividade dessa enzima está relacionado com a patogênese da maioria das complicações da diabetes como cataratas, retinopatia, neuropatia (FELICIO, *et al.*, 1995). O extrato hidroetanólico e a fração acetato de etila de *O. semiserrata* apresentaram efeito vasodilatador endotélio-dependente e atividade antihipertensiva in vitro, inibindo a conversão da enzima angiotensina I(ACE) (CORTES *et al.*, 2002). O extrato aquoso de *Ouratea sp.*, contendo proantocianidinas, mostrou atividade antitumoral contra o carcinossarcoma de Walker 256 e sarcoma 180 em ratos (SAMPAIO *et al.*, 1975; OLIVEIRA *et al.*, 1972). O óleo extraído do extrato hexânico dos frutos de *Ouratea parviflora* apresentou atividade antibacteriana e antifúngica (MARCOL *et al.*, 1988). Os biflavonóides isolados de *O. spectabilis*, *O. multiflora* e *O. parviflora* mostraram inibição da produção de aflatoxina por *Aspergillus flavus* (GONÇALEZ, *et al.*, 2001).

Neste estudo foi verificado que as substâncias mais significativas do gênero *Ouratea* são os biflavonóides com ligação interflavonoídica do tipo C-C, sendo o representante mais abundante o derivado 7''-O-metilagatisflavona. Por outro lado o gênero *Luxemburgia* é caracterizado pela ligação do tipo C-O-C, cujo componente mais abundante a 2''-diidrochnaflavona, além das chalconas presentes apenas em espécies desse gênero, tanto na forma monomérica como nas bichalconas.

A distribuição do grupo de produtos naturais formados por acoplamento de duas unidades flavonoídicas nos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* e o levantamento de suas propriedades biodinâmicas permitiram: caracterizá-los como marcadores quimiotaxonômicos para os referidos táxons, propor uma nomenclatura com notação para esse grupo de substâncias e evidenciar suas potencialidades farmacológicas.

Apesar dessas espécies não serem tão conhecidas na medicina popular, a frequência das biflavonas é indicativo de ótimas perspectivas para se tornarem constituintes de medicamentos.

Tabela 1. Ocorrência de flavonóides em espécies dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* (Ochnaceae.)

Flavonóide	Espécie.	Ref.
proantocianidina I	<i>Ouratea sp.</i>	MARCOL <i>et al.</i> , 1988.
catequina II	<i>Ouratea sp.</i>	MARCOL <i>et al.</i> , 1988.
cianidina III	<i>O. affinis</i>	Gonçalez <i>et al.</i> , 2001
cianidina III	<i>O. calantha</i>	Gonçalez <i>et al.</i> , 2001
5-OH-4',7-OMe-2/3- <u>trans</u> -isoflavonona (2→2'')-5''-OH 4''' 7''- OMe -2''/3''- <u>trans</u> -isoflavanona. (hexaspermona A, IV)	<i>O. hexasperma</i>	MOREIRA <i>et al.</i> , 1994
5-OH -4',7- OMe-2/3- <u>trans</u> -isoflavanona (2→2'')-4''' OH 5'',7'' -OMe -2''/3''- <u>trans</u> -isoflavanona. (hexaspermona B, V)	<i>O. hexasperma</i>	MOREIRA <i>et al.</i> , 1994
5-OH -4',7- OMe -2/3- <u>trans</u> -isoflavanona-(2→2'')-4''' ,5''' - OH-7'' -OMe -2''/3''- <u>trans</u> -isoflavanona. (hexaspermona C, VI)	<i>O. hexasperma</i>	MOREIRA <i>et al.</i> , 1994
5,7,4'-OMe-isoflavona (VII)	<i>O. hexasperma</i>	MOREIRA <i>et al.</i> , 1994
6,6''- bigenkanina (VIII)	<i>O. spectabilis</i>	FELICIO <i>et al.</i> , 1995
4',5- OH-7-metoxiflavona (6→8)-5'',4'''- OH- 7''-OMe- flavona (7,7''-O-dimetilagastiflavona, IX)	<i>O. spectabilis</i>	FELICIO <i>et al.</i> , 1995
4',5,7- OH-flavona (6→8'') 5'',4''' -OH -7''-OMe-flavona (7''-O-metilagatisflavona, X)	<i>O. hexasperma</i>	MOREIRA <i>et al.</i> , 1999
4',5,7-OH-flavona-(3'→8'')-4''' ,5'',7''-OH-flavona. (amentoflavona, XI)	<i>O. multifora</i>	MONACHE <i>et al.</i> , 1967
3-OH -4',5,7-OMe-flavona-(6→8'')- 3'' -OH -3''',4''',5'',7'' - OMe-flavona (XII)	<i>O. multifora</i>	MONACHE <i>et al.</i> , 1967
3',6,8-cloro-4',5-OH-7-OMe-isoflavona (XIII)	<i>O. semisserata</i>	VELANDIA, <i>et al.</i> 2002
3',5',6,8-cloro-4',5-OH-7-OMe-isoflavona (XIV)	<i>O. semisserata</i>	VELANDIA, <i>et al.</i> 2002
5,7-OH-flavona-(4'→O→8'')- 4''',5'',7''-OH-flavona (XV)	<i>O. semisserata</i>	VELANDIA, <i>et al.</i> 2002

Tabela 1 Continuação**Flavonoíde**

	Espécie.	Ref.
5-OH-7-OMe-flavona-(4'→O→8'')-4''',5'',7''- OH-flavona (XVI)	<i>O. semisserata</i>	VELANDIA, et al 2002
5-OH-7-OMe-flavona-(4'→O→8'')-5'',7''-OH-4'''-OMe-flavona (XVII)	<i>O. semisserata</i>	VELANDIA, et al 2002
4',5,7-OH-flavona-(3'→8'')-4''',5'',7''- OH-flavona. (amentoflavona XI)	<i>O. semisserata</i>	VELANDIA, et al 2002
4',5,7- OH-flavona-(3'→8'')-5'',7''-OH- 4'''-OMe-flavona (podocarpusflavona XVIII)	<i>O. semisserata</i>	VELANDIA, et al 2002
3-O-α-L- raminosil (1→6)-β-D-glicopiranosil-quercetina (rutina, XIX)	<i>O. semisserata</i>	VELANDIA, et al 2002
3-O-α-L- raminosil (1→6)-β-D-glicopiranosil-quercetina (rutina, XIX)	<i>Luxemburgia nobilis</i>	*CARVALHO et al 2002
4',5,7-OH- flavona-(3'→O→4''')-5'',7''- OH-flavanona (XX)	<i>Luxemburgia nobilis</i>	*CARVALHO et al 2002
Epicatequina, (XXI)	<i>Luxemburgia nobilis</i>	*CARVALHO et al 2002
2,4,3'4'-OH-chalcona (3-hidroxiisoliquiritigenina, XXII)	<i>Luxemburgia nobilis</i>	*CARVALHO et al 2002
2,4,4'- OH- chalcona (isoliquiritigenina, XXIII)	<i>Luxemburgia nobilis</i>	*CARVALHO et al 2002
4',5,7-OH- flavona-(3'→8'')-4''',5'',7''- OH-flavona. (amentoflavona, XI)	<i>Luxemburgia nobilis</i>	*CARVALHO et al 2002
4',5,7-OH-flavona-(3'→6)-4''',5'',7''-OH-flavona (robustaflavona, XXIV)	<i>Luxemburgia nobilis</i>	*CARVALHO et al 2002
4,2',4'-OH- chalcona-(3→O→4'')-2''',4'''-OH-chalcona (luxenchalcona, XXV)	<i>Luxemburgia octandra.</i>	*CARVALHO et al, 2004
2,4,3'4'- OH- chalcona (3-hidroxiisoliquiritigenina, XXII)	<i>Luxemburgia octandra.</i>	*CARVALHO et al, 2004
2,4,4'-OH- chalcona (isoliquiritigenina, XXIII)	<i>Luxemburgia octandra.</i>	*CARVALHO et al, 2004
4',5,7-OH- flavona-(3'→O→4''')-5'',7''- OH-flavanona (XX)	<i>Luxemburgia octandra.</i>	*CARVALHO et al, 2004
5,7,3',4'-OH- 8 -C- glicopiranosil-flavona (XXVI)	<i>Luxemburgia octandra.</i>	ALVES.C.C 2003
5,3,4-OH- 7-OMe-8-C- glicopiranosil-flavona (XXVII)	<i>Luxemburgia octandra..</i>	ALVES. C. C 2003
calodenina B (XXVIII)	<i>O. flava</i>	GARTLAN et al, 1980
flavumona A (XXIX)	<i>O. flava</i>	GARTLAN et al, 1980
flavumona B (XXX)	<i>O. flava</i>	GARTLAN et al, 1980
calodenina C (XXXI)	<i>O. flava</i>	GARTLAN et al, 1980
lophirona A (XXXII)	<i>O. flava</i>	GARTLAN et al, 1980
4',5-OMe - 6,7- metilenodioxo-isoflavona (XXXIII)	<i>O. flava</i>	GARTLAN et al, 1980
5-OH -7- OMe - flavona-(4'→O→8'')-5'',4''''- OH - , 7''''- OMe flavona (7,7''-O-dimetillanaraflavona, XXXIV)	<i>O. hexasperma</i>	DANIEL et al.,2005

Tabela 1 Continuação

Flavonóide

4',5,7- OH- flavona- (6→8'')-5'',4'''- OH- 7''- OMe-flavona.

(7''-O-metilagastiflavona, **X**)

4',5,7-OH - flavona(6→8'')- 4''' ,5,7'''-OH- flavona.

(agastiflavona **XXXV**)

epicatequina (**XXI**)

6-C-glicopiranosil-luteolina (**XXXVI**)

3-O-glicopiranosil-quercetina (**XXXVII**)

8-C-β-D-glicopiranosil 2''-O-β-D- glicopiranosil-luteolina (**XXXVIII**)

* DE CARVALHO.

Espécie.

O. hexasperma

O. hexasperma

O. hexasperma

O. hexasperma

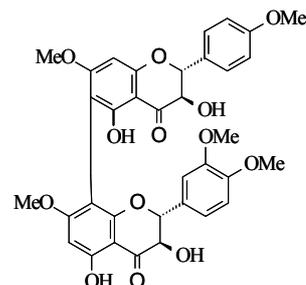
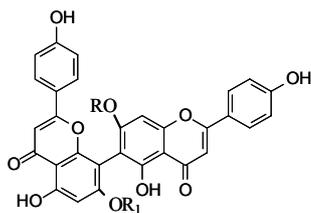
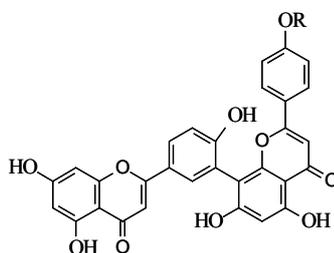
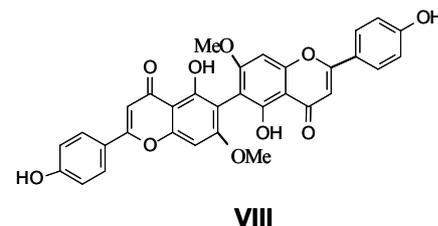
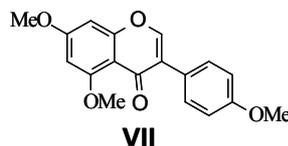
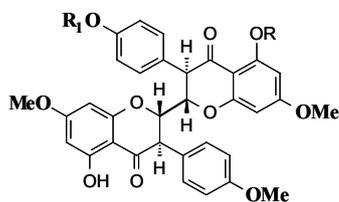
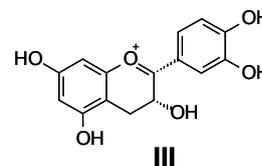
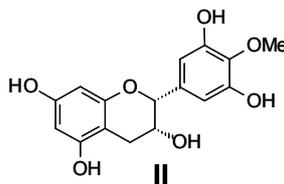
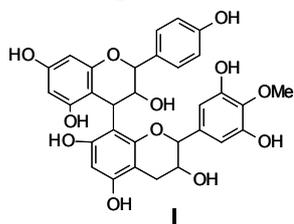
O. hexasperma

O. hexasperma

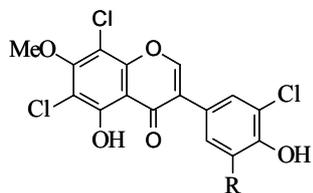
Ref.

DANIEL *et. al.*,2005

Figura 2 Estrutura de flavonóides isolados de espécies de *Ouratea* e *Luxemburgia*.

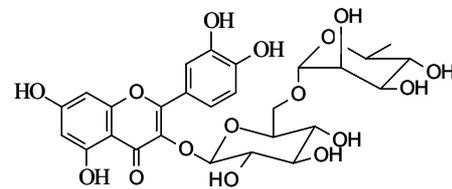


Continuação figura 2.

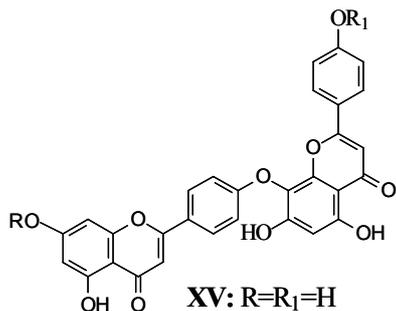


XIII: R=H

XIV: R=Cl



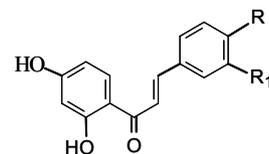
XIX



XV: R=R₁=H

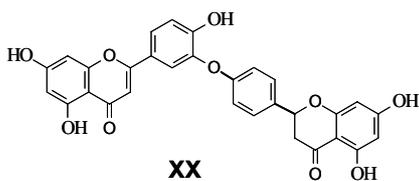
XVI: R=Me, R₁=H

XVII: R=R₁=Me

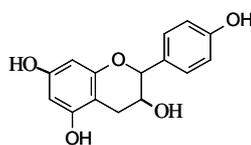


XXII: R=R₁=OH

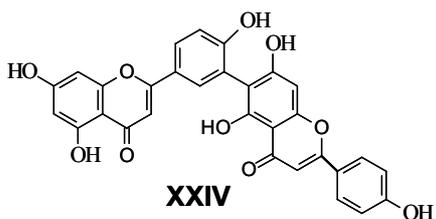
XXIII: R=OH, R₁=H



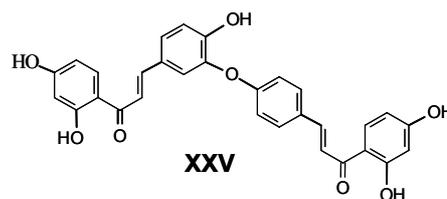
XX



XXI

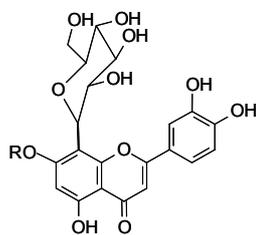


XXIV

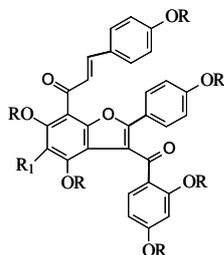


XXV

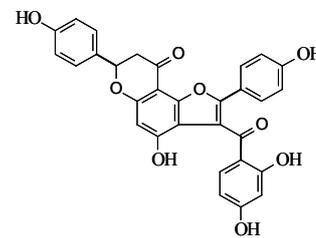
Continuação da **figura 2**.



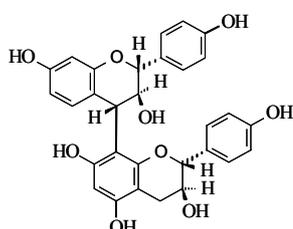
XXVI: R=H
XXVII: R=CH₃



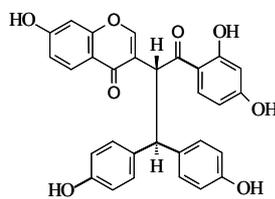
XXVIII: R=R1=H
XXIX: R=H, R1=OH



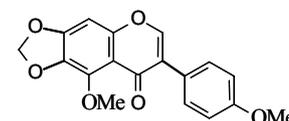
XXX



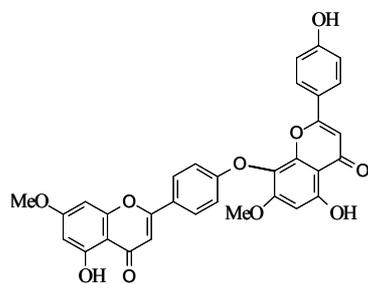
XXXI



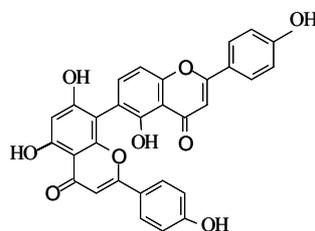
XXXII



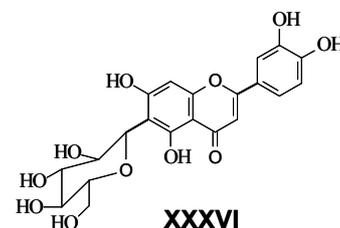
XXXIII



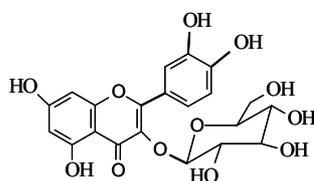
XXXIV



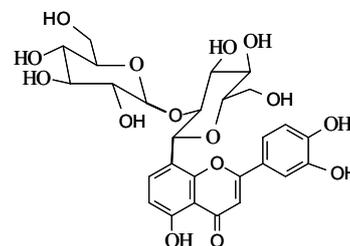
XXXV



XXXVI



XXXVII



XXXVIII

PARTE EXPERIMENTAL

ESTUDO QUÍMICO DE ESPÉCIES DE OURATEA

EQUIPAMENTOS E REAGENTES.

- Os pontos de fusão foram determinados em placa de aquecimento Reicherd, acoplada a um microscópio ou em aparelho MEL-TEMP II, Laboratory Devices USA, utilizando capilar e sem correção dos valores obtidos.

- Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram registrados em um espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo 1600 com transformada de Fourier, em pastilhas de KBr ou em filmes sobre cela de NaCl.

- Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C) foram registrados em espectrômetros Bruker AC (200 (200MHz), Varian Unit-400 (400MHz), Varian unit-500 (500MHz). Os solventes utilizados foram clorofórmio deuterado (CDCl_3), metanol deuterado (D_3COD), acetona deuterada (D_3CCOCD_3), dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6), utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS) ou residuo do solvente utilizado. Os deslocamentos químicos (δ) são indicados em ppm e as constantes de acoplamentos (J) em Hertz (Hz).

- Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos por ionização electrospray (EM-IES) em um espectrômetro ultrOTOFG-ESI-TOF Mass Spectrometer da Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA. Condições do experimento: Bomba de Infusão, fluxo $300\mu\text{l/h}$. Fase móvel para solubilização: água. O modo de detecção: Negativo.

Os espectros de massas de baixa resolução foram registrados em espectrômetro de massas computadorizado HP-5897A de analisador de ionização por impacto de elétrons, 70 eV acoplado a um cromatógrafo com fase gasosa HP-5880A.

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

- Cromatografia em camada preparativa foram realizadas em gel sílica 60 PF₂₅₄ da Merck e da Vetec sobre suporte de vidro e espessura de 1mm. As substâncias foram detectadas por irradiação com lâmpada ultravioleta (254 e 366nm).

- As cromatografias em camada delgada analítica foram realizadas em cromatofolhas de gel de Sílica 60 F₂₅₄ e como reveladores foram usados, além da detecção por irradiação ultravioleta (254 e 366), reagentes Liebermann-Burchard, Iodo, solução de $\text{AlCl}_3\text{-EtOH}$ (1%), sulfato cérico (1%)- H_2SO_4 (10%), reagente de Godin (DOMINGUEZ, 1973 e MATOS, 1988).

- Os solventes utilizados para extração, técnicas cromatográficas e reações foram todos grau P. A. da industria química Vetec. Alguns solventes comerciais foram destilados antes de serem utilizados (metanol, hexano, diclorometano, acetato de etila e clorofórmio).

REAÇÕES DE DERIVAÇÃO.

A preparação de derivados acetilados e metoxilados das substâncias isoladas foram feitas para facilitar a análise dos dados espectrométricos, e inclusive em análises com algumas técnicas especiais de RMN, devido aumento da solubilidade destes compostos em clorofórmio.

Reação de metilação com diazometano.

A solução de diazometano foi preparada de acordo com a metodologia experimental descrita na literatura (VOGEL, 1989). Adicionou-se a solução etérea do diazometano em excesso as substâncias dissolvidas em clorofórmio ou metanol. Os derivados metilados foram obtidos após evaporação do solvente.

Reação de acetilação.

A reação de acetilação das substâncias foi feita adicionando-se piridina/anidrido acético (1:1, v.v.) nas amostras. Após repouso de 48 horas a temperatura ambiente foi adicionada água gelada (25,0 ml) e em seguida extraído com clorofórmio (3x). A solução clorofórmica foi lavada com HCl (10%) para eliminar a piridina e em seguida lavou-se várias vezes com água destilada. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e evaporada em rotavapor, obtendo-se as substâncias acetiladas (SHRINER, 1979).

Ouratea hexasperma (St. Hil).

MATERIAL VEGETAL.

O material vegetal, inflorescência e galhos foram coletados na região do tabuleiro, município de João Pessoa–PB, em dezembro de 2003 e identificado pela Doutora Maria de Fátma Agra. Uma exsicata desta espécie (N° 3497) está depositada no herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB–21438), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

ELABORAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS.

a) Inflorescências.

As inflorescências secas e moídas (330,0 g) foram submetidas a extração por maceração dinâmica com metanol. O extrato foi filtrado e a remoção do solvente foi feita através de destilação sob pressão reduzida, fornecendo o extrato OHIM (**O**uratea **h**exasperma **I**nflorescência **M**etanol) (50,0 g).

O extrato obtido OHIM (50,0 g) foi solubilizado em metanol-água (8:2) e submetido a partição líquido/líquido com os solventes hexano e acetato de etila fornecendo respectivamente, as frações OHIMH (12,1 g) e OHIMAc (8,2 g). (**Fluxograma 1 Pág-16**).

A fração OHIMH (12,1 g) foi cromatografada em coluna de gel sílica com gradiente de polaridade crescente de mistura binária dos solventes: hexano, acetato de etila e metanol gerando 40 frações de 125 ml. As frações 30-35 forneceram um precipitado que foi recromatografado sob as mesmas condições gerando 20 novas frações.

A fração 4 desta coluna forneceu um pó branco identificado como o triterpeno **5 (3 β -O-acil-olean-12-en-28-oico)** [(116,0 mg); P.F. 110°C; RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ : 5,24 (*sl*, H-12); 4,47 (*t*, J=7,6Hz, H-3); 2,77 (*dl*, J=10, H-18); 2,26 (*t*, J=7,2Hz, H-21); 0,71-1,90 (8 x CH₃) (**Figura 12, pág.34**). RMN ¹³C (CDCl₃, 50MHz) δ : 15,32 (C-25); 16,68 (C-26); 22,66 (C-24); 23,54 (C-30); 25,14 (C-27); 25,87 (C-23); 33,03 (C-29); 122,48 (C-12); 143,55 (C-13), 173,72 (C-1'); 184,58 (C-28); 80,51 (C-3)] (**Figura 13 pág, 34**).

As frações 11-12 foram identificadas como a mistura dos esteróides **Campesterol (1), Estigmasterol (2), Sitosterol (3)**[(95 mg), P.F.:120°C, RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz) δ : 5,33 (*sl*, H-6); 5,18 (*m*, H-22, 23); 3,54 (*m*, H-6); 0,64-0,97 (Me_(s)) (**Figura 3 Pág 27**). RMN ¹³C (CDCl₃, 50MHz) δ (ppm) 140,68 (C-5), 138,28 (C-22); 129,18(C-23); 121,63 (C-6), 71,69 (C-3) (**Figuras 4, pág 27**). EM (IE, 70eV): 400 (60%); 413 (25%); 414 (33%)] (**Figuras 6, 7, 8, págs 28, 29**)

A fração OHIMAc (8,2 g) foi cromatografada em coluna de gel sílica. Iniciou-se a eluição com clorofórmio e foi desenvolvida aumentando-se a polaridade do eluente pela adição gradativa de metanol até metanol (100%), foram recolhidas 15 frações de 125 ml. (**Fluxograma 2, pág-17**)

A fração 1 forneceu um precipitado branco amorfo que após purificação com metanol, filtração e secagem foi identificado como a saponina **3-O- β -D-glicopiranosil sitosterol (4)**[(160,0 mg), P.F. 300°C IV: (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3394 ($\nu_{\text{O-H}}$); 2957, 2921, 2851 ($\nu_{\text{C-H}}$); 1460, 1379 ($\delta_{\text{C-H}}$), 1075, 1025 ($\nu_{\text{C-O}}$)] (**Figura 9 pág 30**); RMN ¹H (Piridina-d₅ 200 MHz) δ : 5,33 (*sl*, H-6); 5,1(*d*, J=8,0Hz, H-1'), 0,82-1,04 (6 x CH₃) (**Figura 10 pág 30**)] O derivado **4a** foi obtido através do tratamento de **4** (50,0 mg) com anidrido acético e piridina. A fração 3

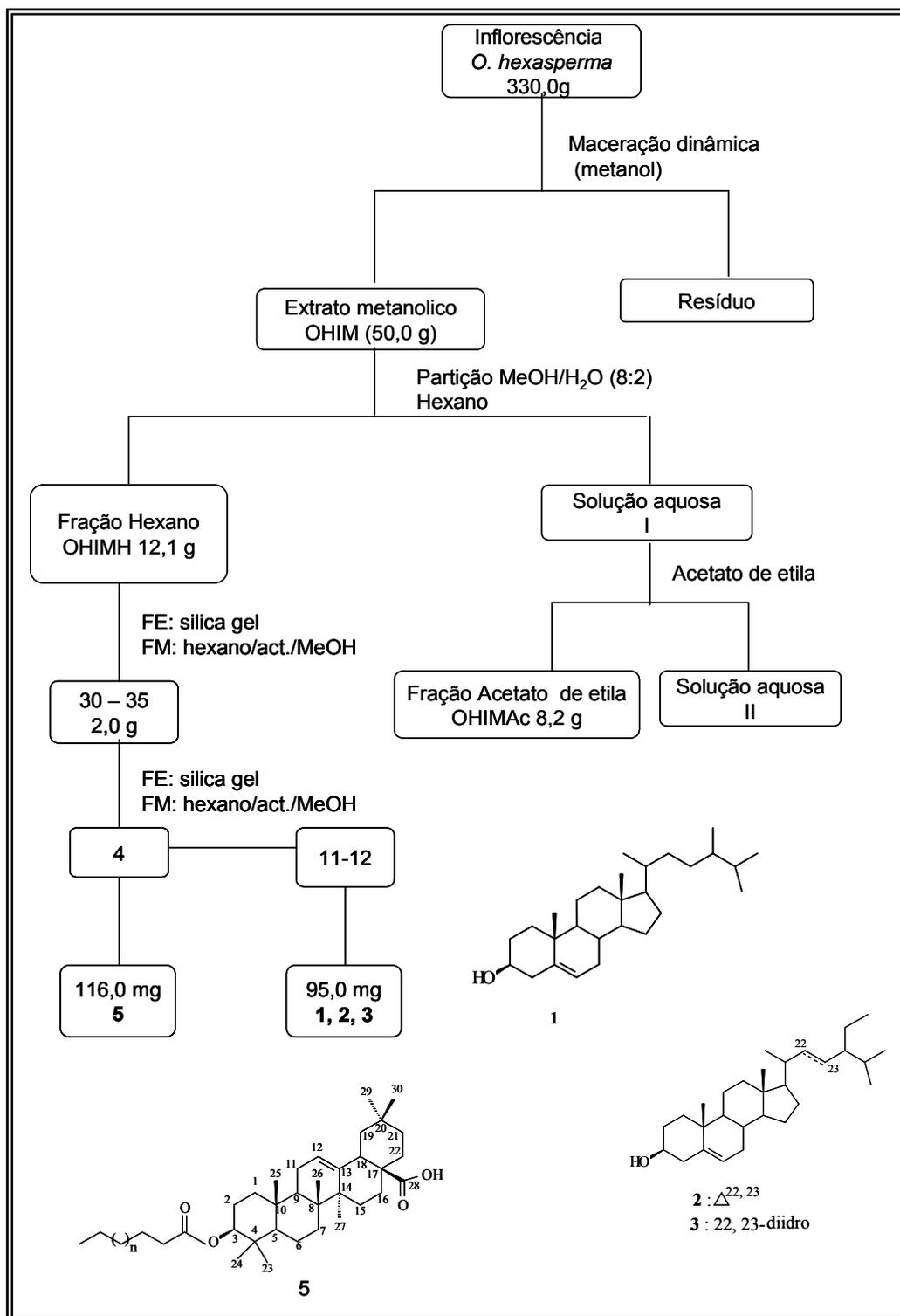
apresentou um precipitado solúvel em metanol que foi submetido a uma coluna de Sephadex LH-20 eluída com metanol, recolhendo-se 20 frações de 15 ml.

As frações 3-5 forneceram um sólido amarelo identificado como mistura dos flavonóides orientina (**7**) e vitexina (**8**). [(15,0 mg), P.F. 260°C; **IV**: (KBr) ν_{\max} cm^{-1} 3384, 3246 ($\nu_{\text{O-H}}$); 1655 ($\nu_{\text{C=O}}$); 1614, 1508, 1428, ($\nu_{\text{C=C}}$); 1094, 1041 ($\nu_{\text{C-O}}$). Flavonóide **7** (Orientina) **RMN** ^1H (DMSO- d_6 400 MHz,) δ : 6,64 (s, H-3), 6,27 (s, H-6), 7,48 (s, H-2'); 6,85 (d, J=8,0Hz, H-5'); 7,52 (d, J=8,0Hz, H-6'); 4,68 (d, J=10,0Hz, H-1''); 3,82(m, H-2''); 3,35 (m, H-3''); 3,25 (m, H-4''); 3,35 (m, H-5''); 3,78 (m, H-6''); 13,17(s, HO-5); **RMN** ^{13}C (DMSO- d_6 100 MHz,)] (**Figura 23, Pág-47, Tabela 4, pág-43**) Flavonóide **8** (Vitexina) **RMN** ^1H (DMSO- d_6 400 MHz,) δ : 6,78 (s, H-3), 6,27 (s, H-6), 8,02 (d, J=8,0Hz, H-2',6'); 6,89 (d, J=8,0Hz, H-3', 5'); 4,68 (d, J=10,0Hz, H-1''); 3,82(m, H-2''); 3,25 (m, H-3''); 3,35 (m, H-4''); 3,25 (m, H-5''); 3,78 (m, H-6''); 13,17(s, HO-5); **RMN** ^{13}C (DMSO- d_6 100 MHz,)] (**Figura 23 pág-47, Tabela 5, Pág-44**).

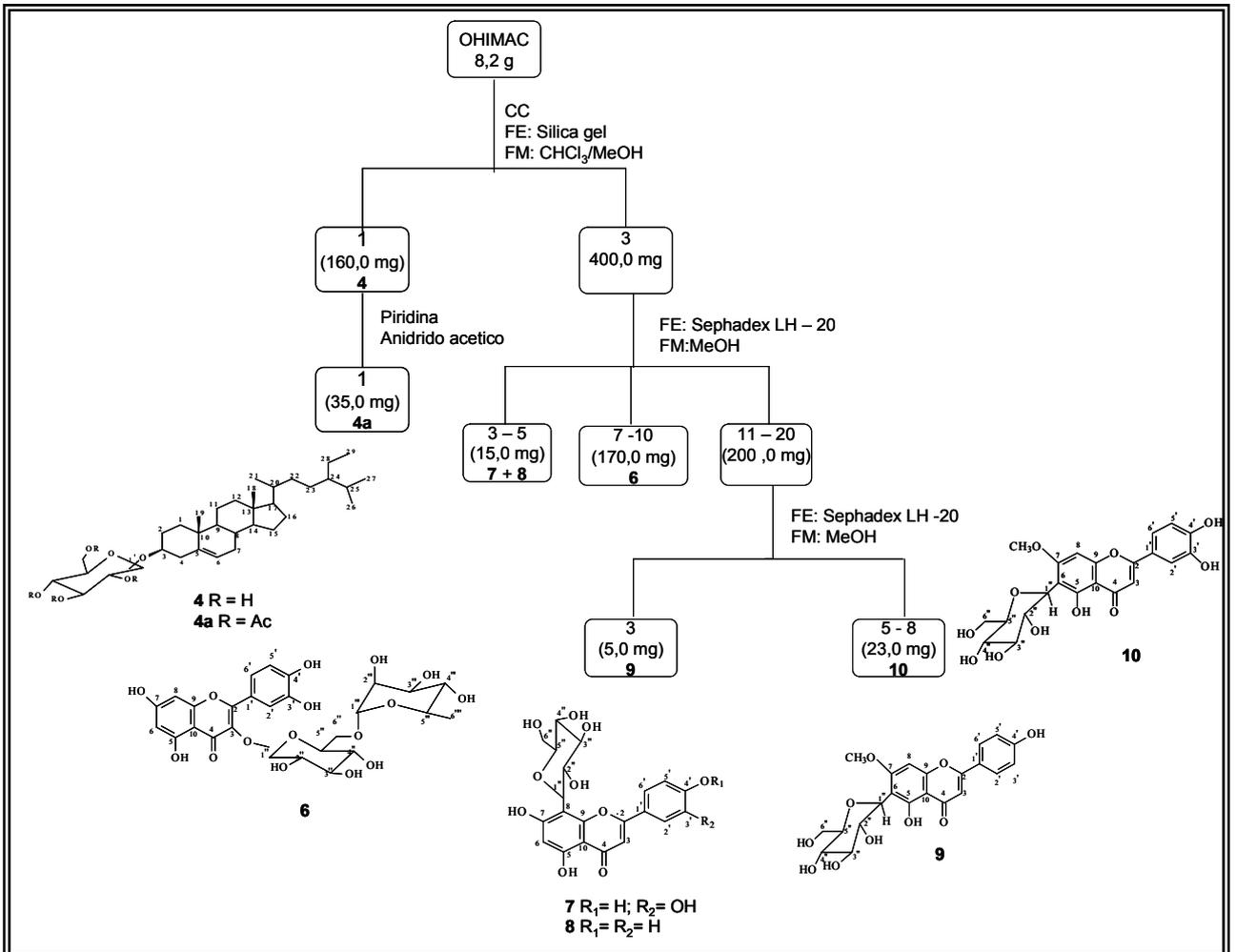
As frações 7-10 foram reunidas e identificadas como o flavonóide Rutina (**6**) [(170,0 mg) P.F. 190°C; **IV**: (KBr) ν_{\max} cm^{-1} 3423 ($\nu_{\text{O-H}}$); 1654 ($\nu_{\text{C=O}}$); 1504, 1458 ($\nu_{\text{C=C}}$); 1063, 1012 ($\nu_{\text{C-O}}$); **RMN** ^1H (DMSO- d_6 200 MHz,) δ : 6,19 (d, J=1,9 Hz, H-6); 6,35 (d, J=1,9 Hz, H-8); 7,51 (s, H-2'); 6,82 (d, J=8,0 Hz, 5'); 7,55 (D, J=8,0 Hz, 6'); 5,32 (d, J= 8,0 Hz, H-1''); 3,25 (sl, H-2''); 3,28 sl, H-3''); 3,66 (sl, H-4''); 3,22 (sl, H-5''); 3,72 (sl, H-6''), 4,36 (sl, H-1'''); 3,05 (sl, H-2'''); 3,37 (sl, H-3'''); 3,00 (sl, H-4'''); 3,09 (sl, H-5'''); 0,97 (sl, H-6'''); 12,57 (s, HO-5)] (**Figura 17, pág**). **RMN** ^{13}C (DMSO- d_6 50 MHz,)] (**Figura 18 pág-40, Tabela 3 Pág-37**).

As frações 11-20 foram reunidas e purificadas em nova coluna de Sephadex LH-20 eluída sob as mesmas condições. A fração 3 um pó amarelo foi identificada como flavonóide Swertisina (**9**), (5,0 mg). **RMN** ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 6,81 (s, H-3); 6,51 (s, H-8); 8,02(d, J=8,5 Hz, H-2', 6'); 6,89 (d, J= 8,5 Hz, H-3', 5'); 4,72 (d, J= 10,0 Hz, H-1''); 3,25-3,60 (H-açúcar); 3,86 (s, MeO) (**Figura 30 pág-55**).

As frações 5-8 foram reunidas e delas obtido o flavonóide Swertijaponina (**10**) [(23,0 mg). **RMN** ^1H (DMSO- d_6 500 MHz,) δ (ppm) 6,79 (s, H-3); 6,59 (s, H-8); 7,55(s, H-2'); 6,92 (d, J= 8,6 Hz, H-5'); 7,56 (m, H-6') 4,76 (d, J= 10,0 Hz, H-1''); 3,25-3,50 (H-açúcar); 3,88 (s, MeO) (**Figura 32 pág-59**). **RMN** ^{13}C (DMSO- d_6 50 MHz,)] (**Figura 33 pág-60, Tabela 7 Pág-58**).



Fluxograma 1: Preparação e fracionamento do extrato metanólico da inflorescência de *O. hexasperma* St. Hil.



b) Caule.

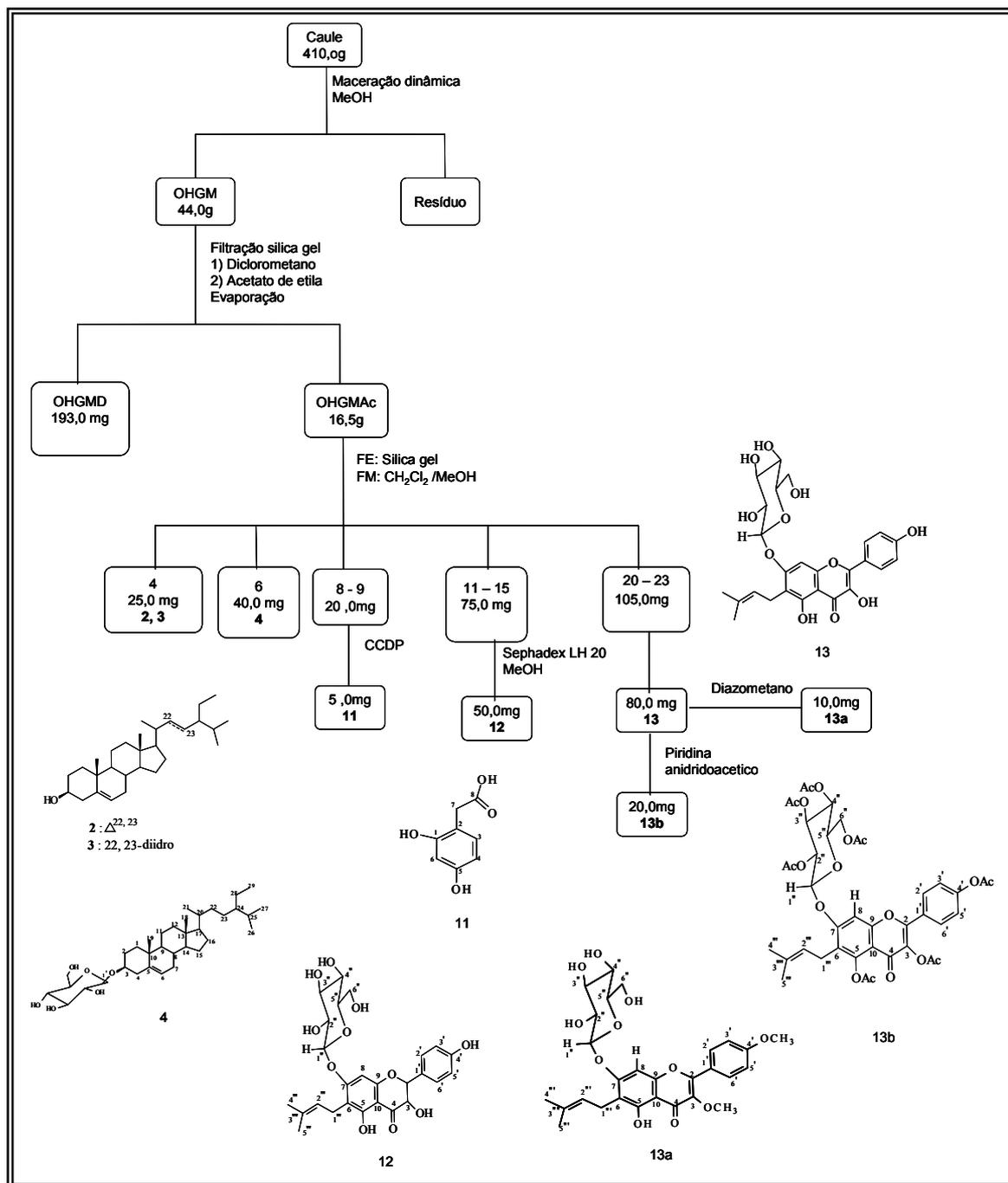
O caule seco e moído (410,0 g) foi submetido ao processo de maceração dinâmica com metanol a temperatura ambiente. O extrato líquido foi filtrado e então concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida fornecendo o extrato seco OHGM (*Ouratea hexasperma* Galhos Metanol) (44,0 g). O extrato (OHGM) foi submetido a filtração seletiva em gel sílica com os solventes diclorometano e acetato de etila que após a remoção do solvente em evaporador rotativo forneceu as respectivas frações: OHGMD (193,0 mg) e OHGMaC (16,5 g).

A fração OHGMaC foi cromatografada em coluna de gel sílica eluída com mistura dos solventes diclorometano / metanol com gradiente de polaridade crescente até metanol 100%, gerando 30 subfrações. Essas foram analisadas por CCDA e reunidas conforme seu perfil cromatográfico. A fração 4 apresentou um precipitado branco, identificado como os esteróides estigmasterol (**2**) e sitosterol (**3**) (25,0 mg); a fração 6 apresentou um pó amorfo de difícil solubilidade nos solventes orgânicos e posteriormente identificado como a saponina 3- β -O- β -D-glicopiranosil sitosterol (**4**) (40,0 mg) As frações 8-9 (20,0 mg) foram reunidas e submetidas à cromatografia em camada delgada preparativa, fornecendo uma resina avermelhada identificada como a substância ácido 1,5-diioxifenilacético (**11**) [(5,0 mg) **IV.**: (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3437 ($\nu_{\text{O-H}}$); 1695 ($\nu_{\text{C=O}}$); 1390, 1293 ($\nu_{\text{C-O}}$) **RMN** ¹H (D₃CO), 200 MHz). δ 6,85(d, J=8,0 Hz, H-3); 6,20 (dd, J= 8,0 e 2,4 Hz, H-4); 6,28 (d, J= 2,4 Hz, H-6); 3,4 (s, 2H-7). **RMN** ¹³C (D₃CO), 50 MHz) δ 156,7 (C-1); 115,4 (C-2); 130,2 (C-3); 104,9 (C-4); 158,9 (C-5); 104,1 (C-6); 43,7 (C-7); 176,9 (C-8)].

As frações 11–15 foram reunidas e purificadas em coluna de Sephadex LH–20 eluída com metanol e forneceu um pó amarelo identificado como o glicopiranosil diidroflavonol prenilado (**12**). [(50,0 mg) **P.F.**:173°C **RMN** ¹H (DMSO-d₆ 200 MHz). δ 5,11 (d, J= 11,0 HZ, H-2); 4,55 (m, H-3); 6,22 (s, H-8); 7,30 (d, J= 8,0 HZ, H-2', 6'); 6,79 (d, J= 8,0 Hz H-3', 5'); 4,92 (d, J= 8,0 Hz, H-1''); 3,29 (m, H- 2'', 3''); 3,18 (m, H-4''); 3,35 (m H-5''); 3,50 (m, 2H-6''); 3,31 e 3,14 (m, 2H-1'''); 5,17 (dd, H-2'''); 1,61 (s Me-4''');1,75 (s, Me-5''');12,04 (OH-5) **RMN** ¹³C (DMSO-d₆ 50 MHz). (**Figura 41, Tabela 9 Pág-72,68**).

As frações 20–23 foram também reunidas e purificadas nas mesmas condições e forneceu um pó amarelo e identificado como o glicopiranosil flavonol prenilado (**13**). [(80,0 mg) **P.F.**: 180° C **RMN** ¹H (DMSO-d₆) 200 MHz). δ (ppm) 6,89 (s, H-8); 8,08 (d, J= 8,8 Hz H-2', 6'); 6,95 (d, J= 8,8 Hz H-3', 5'); 4,90 (d, J= 8,0 Hz H-1''); 3,29 (m, H-2''); 3,33(m, 3''); 3,36 (m, H-4''); 3,44 (m, H-5''); 3,51 (m, 2H-6''); 3,31 e 3,27 (m, 2H-1'''); 5,08 (dd, H-2'''); 1,64 (s, Me-4'''); 1,77 (s, Me-5'''). **RMN** ¹³C (DMSO-d₆) 50 MHz). (**Figura 47,pág-82 e Tabela 11 Págs-80**).

Foram preparados dois derivados de 13. O tratamento de **13** (20,0 mg) com diazometano forneceu o derivado 7-glicosil-6-prenil-3,4'-dimetoxi-5-hidroxi-flavona (**13a**) (12,0 mg). O tratamento de **13** (35,0 mg) com piridina e anidrido acético forneceu o derivado 3,5,4',2'',3'',4'',6''-heptacetil-7- β -glicopiranosil flavona (**13b**) (20,0 mg).



Fluxograma 3 Preparação e fracionamento do extrato metanólico do caule de *O. hexasperma* St. Hil.

Ouratea cuspidata (St. Hil).

MATERIAL VEGETAL.

O material vegetal, folhas e caules de *Ouratea cuspidata* foram coletados na restinga do município de Barra de Maricá, Rio de Janeiro, RJ, em setembro de 2002 e identificado pela Dra. Luci de Senna Valle Uma excicata (N^o 206313) desta espécie esta depositada no herbário do Museu Nacional do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

a) Folhas

As folhas após terem sido secas a sombra em temperatura ambiente e moídas em moinho de facas (580,0 g) foram submetidas a extração por maceração dinâmica em seqüência com hexano, acetato de etila e metanol. Os extratos foram filtrados e os solventes removidos até completa secura em evaporador rotativo sob pressão reduzida e ar quente fornecendo respectivamente os extratos **OCFH** (29,69 g) (*Ouratea cuspidata* Folha Hexano); **OCFAc** (36,2 g) (*O. cuspidata* Folha Acetato); **OCFM** (117,0g)(*O. cuspidata* Folha Metanol).

O extrato **OCFH** (14,0 g) foi submetido à filtração seletiva em sílica com diclorometano. A fração diclorometano (OCFHD 3,03 g) foi cromatografada em coluna de gel de sílica e eluída com mistura de solventes hexano, acetato de etila, metanol em gradiente de polaridades crescentes gerando 35 frações de 125 ml. As frações 8–14 foram reunidas pois apresentaram um precipitado branco identificado como a mistura dos esteróides estigmasterol (**2**) e sitosterol (**3**) (35,0 mg). (**Fluxograma 4, Pág-21**)

A fração 17–22 apresentou precipitado branco (20,0 mg) identificado como mistura dos triterpenos lupeol (**14**), α -amirina (**15**), β -amirina (**16**) [P.F. 180°C **RMN** ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) δ : 5,15 (M, H-12 (**16**); 5,10 (m, H-12 (**15**); 4,65 (d, J=2,2 Hz, H-29a (**14**)); 4,54 (d, J=1,28 Hz H-29b (**14**)); 3,24 (dd, J= 10,0; 7,2 Hz, H β -3); 0,76-1,10 (Me $_{(s)}$)] (**Figura 57 pag-95**)

O extrato OCFAc (36,2 g) foi solubilizado em metanol-água (8:2) e submetido a partição líquido/líquido com clorofórmio fornecendo respectivamente, as frações OCFAcH (2,49 g) e OCFAcC (11,43 g). Da fração **OCAcC** houve a formação de um precipitado solúvel em metanol, que foi submetido a uma coluna de Sephadex LH–20 eluída com metanol gerando 10 fração de 50 ml.

As frações 5–7 foram reunidas e forneceram um prepitado amarelo, solúvel em metanol identificado como a biflavona **Amentoflavona** (**17**). (95,0 mg.) **RMN** ^1H (D_3CCOCD_3 , 200 MHz) δ : 6,65 (s, H-3); 6,22 (d, J= 2,0 Hz, H-6); 6,51 (d, J= 2,0 Hz, H-8); 8,12 (d, J= 2,2 Hz, H-2'); 7,23 (d, J= 8,8 Hz, H-5''); 8,02 (dd, J= 8,8; 2,2 Hz, H-6'); 6,72 (s, H-3'''); 6,43 (s, H-6'''); 7,64 (d, J= 8,8 Hz, H-2''', 6'''); 6,82 (d, J=8,8 Hz, H-3''', 5'''), 13,6 (s, OH), 12,99 (s, OH);(**Figura 58, pág-98**) **RMN** ^{13}C (D_3CCOCD_3 , 50 MHz,)] (**Figura 58 Tabela 13 Pág-97**).

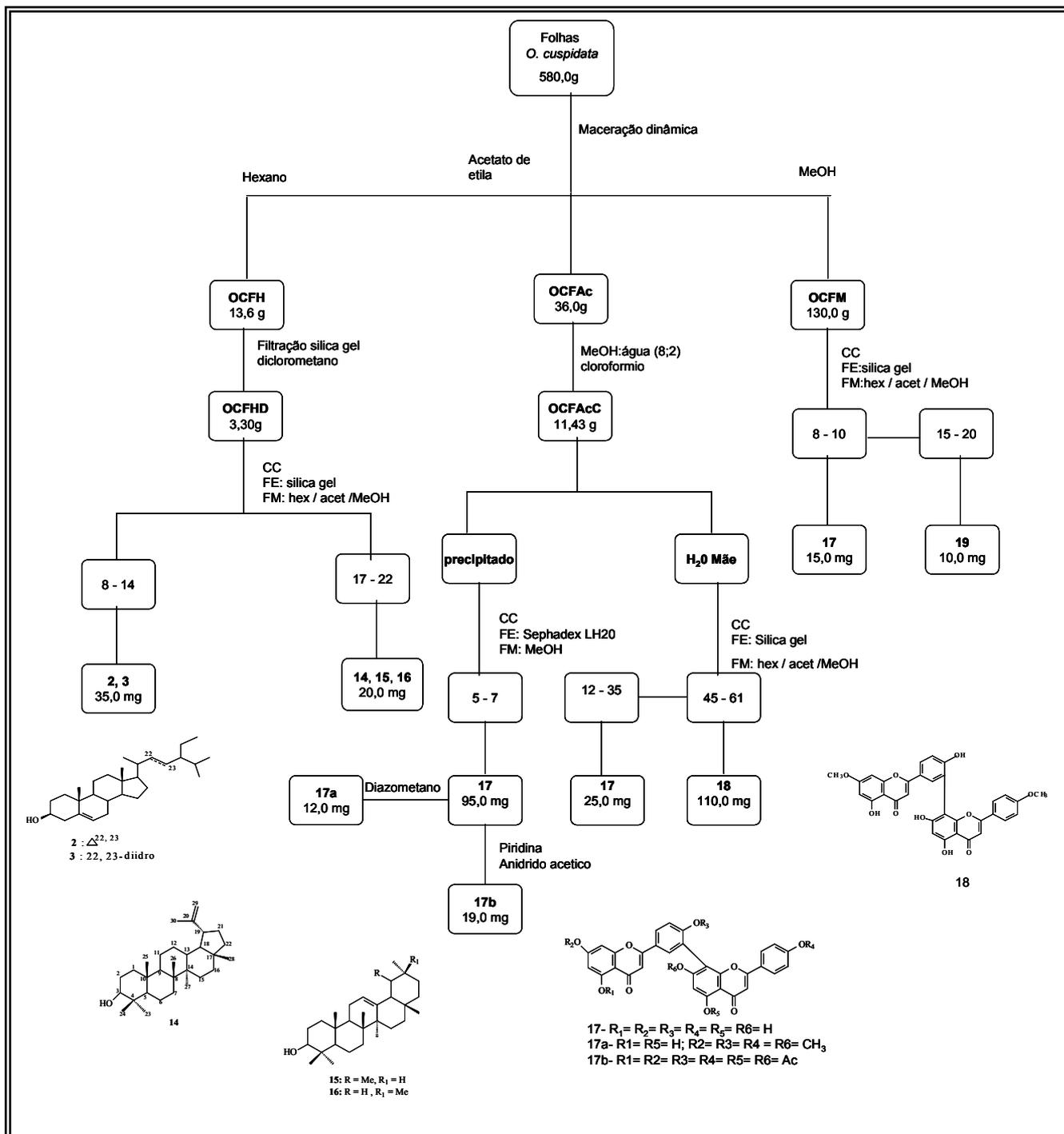
A água-mãe da fração **OCAcC** foi submetida a uma coluna de gel sílica eluída com a mistura dos solventes hexano/acetato de etila, metanol com gradiente de polaridade crescente até metanol 100% gerando 80 frações 125 ml. As frações 12–35 foram reunidas, purificadas e identificadas como a biflavona **17** (25,0 mg). A substancia **17** foi tratada com diazometano produzindo o derivado metilado tetrametilamentoflavona (**17a**) (12,0 mg), e também tratada com piridina e anidrido acetido obtendo-se o derivado acetilado peracetilamentoflavona (**17b**).(19,0 mg)(**Paginas 100 e 109.**)

As frações 45–61 forneceu um precipitado amarelo solúvel em metanol que foi identificado como biflavona **putraflavona18**. (110,0 mg) P.F. 256°C; **RMN** ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ : 6,90 (s, H-3); 6,36 (d, J= 1,9 HZ, H-6); 6,76 (sl, H-8); 8,09 (m, H-2', 6'); 7,15 (d, J= 9,1 Hz, H-5''); 6,91 (s, H-3'''); 6,40 (s, H-6'''); 7,68 (d, J= 8,7 Hz, 2''', 6'''); 6,93 (d, J= 8,7 Hz, H- 3''', 5'''); 12,91 (s, HO-5); 13,07 (s, HO-5''); 3,83 (s, MeO-7); 3,75 (s, MeO-4'''); (**Figura 71 pág.115**); **RMN** ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz,)] (**Figura 72, pág-116 Tabela 16 Pág-114**).

O extrato metanolico OCFM (30,0 g) foi fracionado numa coluna cromatográfica contendo gel sílica. Iniciou-se a eluição com acetato de etila aumentando a polaridade do

eluente pela adição gradativa de metanol até metanol 100%. Obtiveram-se 60 frações. As frações 8–10 forneceram novamente o biflavonoide amentoflavona (**17**) (15,0 mg).

As frações 15–20 forneceu pó amarelo identificado como flavonoide 5,7,4'-triidroxi-3',5'-dimetoxi-flavona (**19**). (10,0 mg) [RMN ¹H CDCl₃, 200 MHz) δ: 6,97 (s, H-3); 6,19 (d, J= 2,1 Hz, H-6), 6,55 (d, J= 2,1 Hz, H-8); 7,31 (s, H-2', 6'); 3,87 (s MeO-3', 5'), (**Figura 84 e 85** pág-129, **Tabela 18** pág-128.) RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz,)]



Fluxograma 4: Preparação e fracionamento cromatográfico dos extratos das folhas de *Ouratea cuspidata*

b) Caule

O caule após ter sido seco a sombra em temperatura ambiente e moído em moinho de facas, (650,0 g) foi submetido à extração por maceração dinâmica com metanol. O extrato metanólico foi filtrado e o solvente removido até completa secura em evaporador rotativo sob pressão reduzida fornecendo o extrato OCGM (**O**uratea **C**uspidata **G**alho **M**etanol).

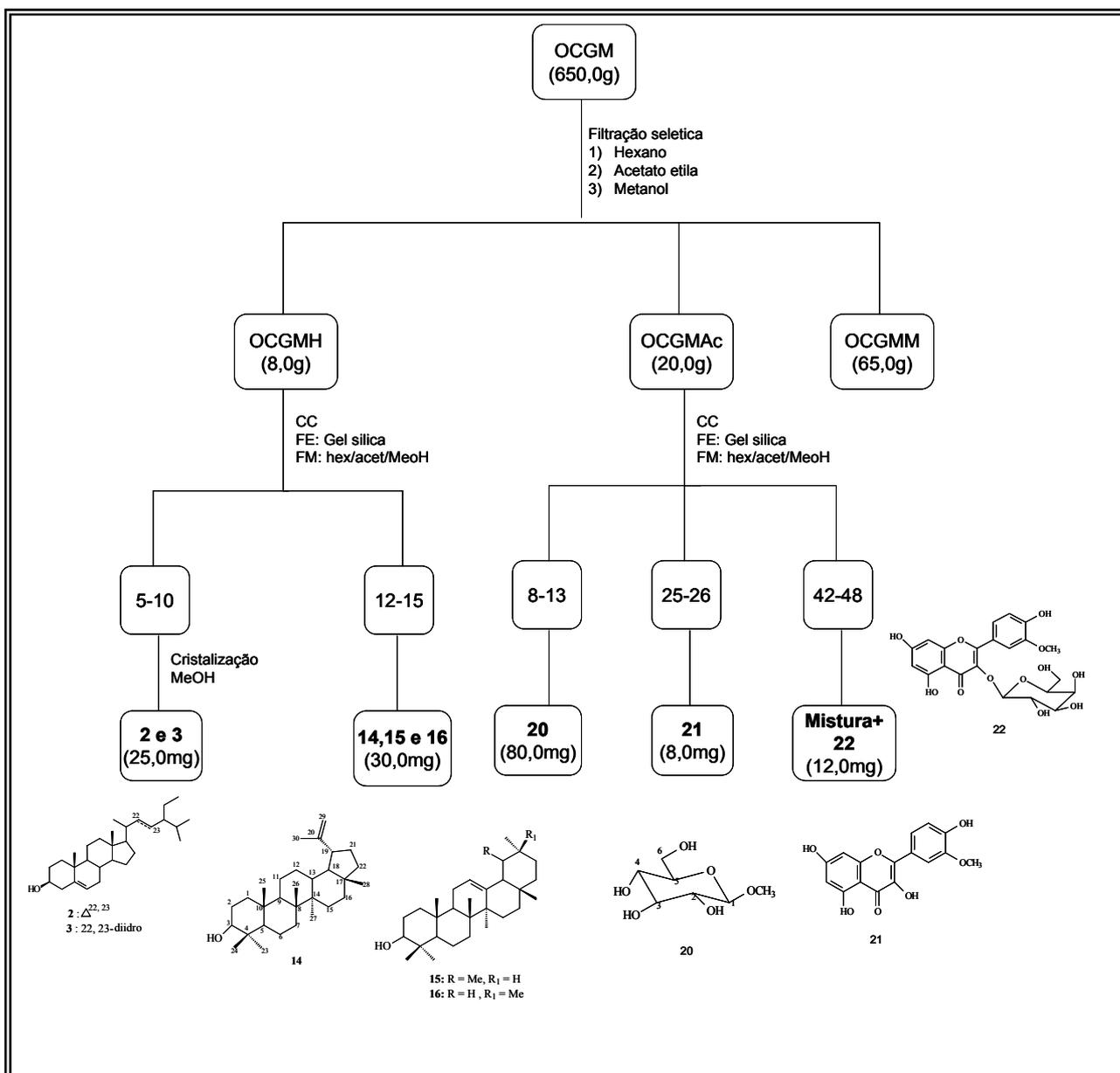
O extrato metanólico dos galhos OCGM (130,0 g) foi submetido ao processo de filtração seletiva em gel de sílica com os solventes hexano, acetato de etila e metanol gerando as respectivas frações OCGMH (8,0 g), OCGMAc (38,0g) e OCGMM (65,0).

A fração OCGMH (8,0g) foi cromatografada em coluna de gel de sílica e eluída com mistura dos solventes hexano, acetato de etila, metanol em gradiente de polaridades crescentes até metanol 100%, gerando 25 frações de 125 mL. Essas frações foram reunidas conforme seu perfil em CCDA. As frações 5-10 apresentaram um precipitado branco que foi identificado como a mistura dos esteróides estgmasterol (**2**) e sitosterol (**3**) (25,0 mg). A fração 12-15 apresentou precipitado branco identificado como a mistura dos triterpenos Lupeol (**14**), α -amirina (**15**), β -amirina (**16**). (30,0mg). (**Fluxograma 5** pág-23)

A fração OCGMAc (20,0 g) foi submetida ao mesmo tratamento cromatográfico e nas mesmas condições que a fração OCGMH. Gerando 50 frações de 125 mL. As frações 8-13 foram reunidas e forneceu uma substância pastosa (80,0 mg) identificada como o carboidrato 1-Metil- β -D-glicopiranosil (**20**) [RMN ^{13}C DMSO- d_6 , 50 MHz) δ : 105,3 (C-1); 77,9 (C-3); 77,8 (C-5); 71,5 (C_4); 62,6 (C-6); 57,3 (OCH₃)].

A reunião das frações 25-26 seguida de sua purificação em coluninha de gel de sílica eluída com Hexano:acetato de etila (4:6) forneceu pó amarelo (8,0 mg) identificado como o flavonóide 4',3,5,7-tetraidroxi-3'-metoxi-flavonol (**21**). RMN ^1H DMSO- d_6 , 200 MHz) δ : 12,5 (HO-5); 7,93 (s, H-2'); 7,49 (d, J=8,0 Hz, H-6'); 6,92 (d, J= 8,0 Hz, H-5'); 6,38 (sl, H-8); 6,15 (sl, H-6); 3,82 (s, MeO-3').

As frações 42-48 (3,30 g) foram reunidas e recromatografadas em gel de sílica e eluída com mistura de solventes hexano, acetato de etila, metanol em gradiente de polaridade crescente até metanol 100% gerando 20 frações de 50 mL a fração 15 apresentou uma mistura de flavonóides e carboidratos contendo como substância majoritária o flavonóide 4',5,7-triidroxi-3'-metoxi-3- β -*O*-galactopiranosil (**22**); RMN ^1H DMSO- d_6 , 200 MHz) δ : 6,2 (sl, H-6); 6,4 (sl, H-8); 7,9 (d, J=2,0 Hz, H-2'); 6,9 (d, J= 8,0 Hz, H-5'); 7,5 (dd, J= 8,0 e 2,0 Hz H-6'); 5,56 (d, J= 7,0 Hz, H-1'); 3,9-3,1(m, H-2'',3'',4'' .5'',6''); 3,83 (s, MeO-3'); 12,5 (HO-5). RMN ^{13}C DMSO- d_6 , 50 MHz) (**Figura 92** pag).



Fluxograma 5: Preparação e fracionamento cromatográfico do extrato metanólico do caule de *Ouratea cuspidata*

RESULTADOS E DISCUSSÕES.

Antes do início da década de 70, a determinação da estrutura de um produto natural, necessitava-se de um longo período de tempo e uma grande quantidade de substâncias. Isto, porque essas análises baseavam-se fundamentalmente em métodos de degradação, e derivação porque os métodos físicos eram menos informativos como UV, IV, RMN com baixa resolução. Hoje são mais usadas as técnicas espectroscópicas são mais informativas. Além da espectrometria no infravermelho (IV) e espectrometria de massas, a ressonância magnética nuclear tem sido aprimorada a cada dia gerando mais informações e tornando as análises mais interessantes.

Esse constante desenvolvimento da RMN com ímãs supercondutores, com a introdução das técnicas de pulso e da transformada de Fourier, não somente aumentaram a sensibilidade dos equipamentos, mas também abriram caminho para o desenvolvimento de várias técnicas especiais canalizando melhores informações estruturais.

Hoje, as técnicas mono e bidimensionais são superiores ao número de duzentas, porém só algumas dezenas são usadas com mais frequência..

Para um químico de produtos naturais, os fundamentos físicos e matemáticos, sobre os quais são baseadas essas técnicas, não são essenciais. O mais importante é o uso adequado delas.

Mesmo com toda essa evolução dos métodos físicos, é muito importante para a elucidação estrutural o conhecimento do metabolismo condutor à formação dos representantes das diferentes classes das substâncias naturais. O conhecimento dos precursores e, as vezes, das etapas necessárias para elaborações desses constituintes naturais é a base fundamental de raciocínio para a determinação estrutural das substâncias isoladas.

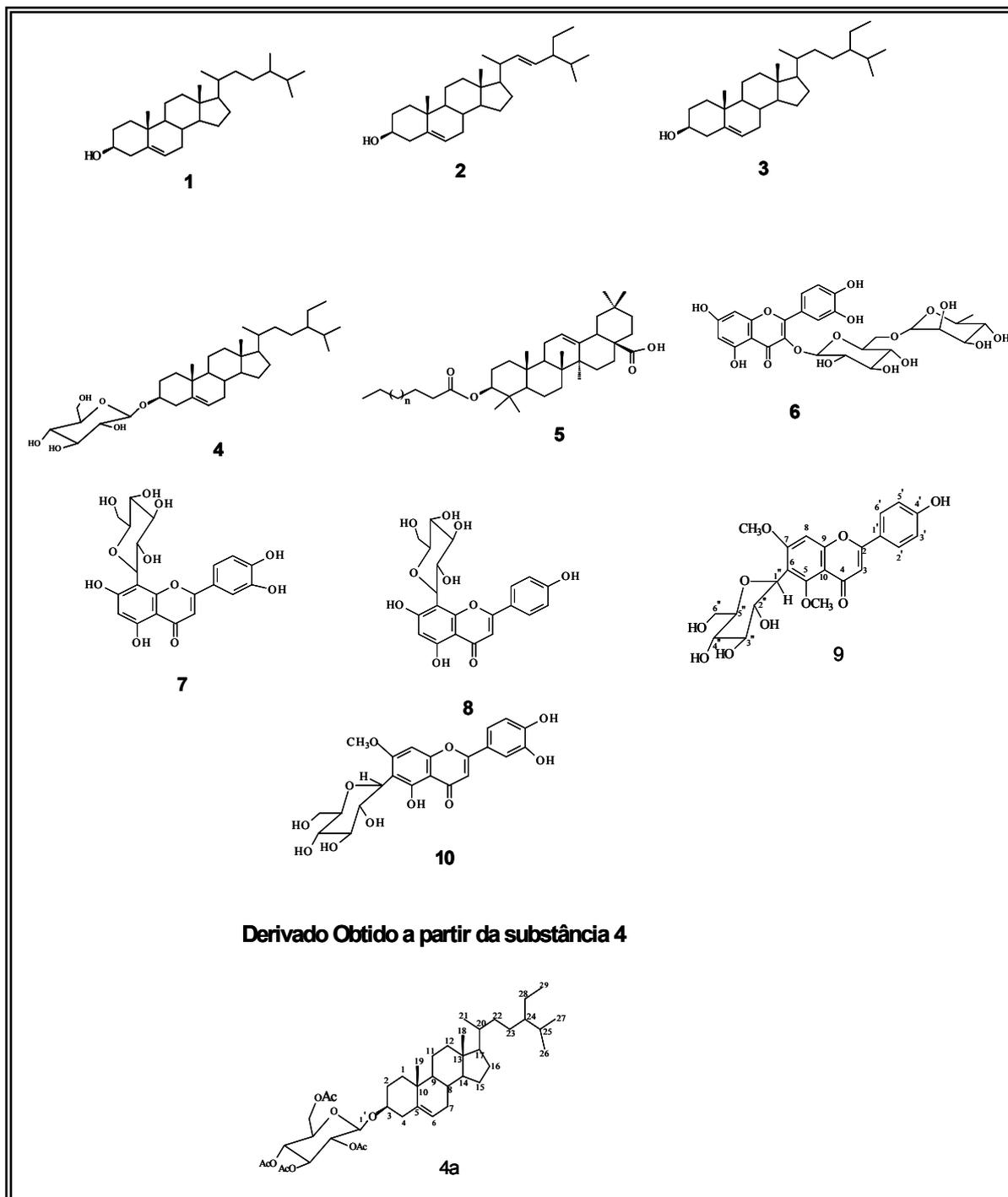
O estudo químico de *O. hexasperma* e *O. cuspidata* levou ao isolamento, purificação e determinação estrutural de trinta e duas substâncias naturais e de cinco derivados obtidos dos produtos naturais. Essas informações estão sistematizadas em quatro quadros:

Quadro 1 Constituintes químicos isolados de inflorescências de *Ouratea hexasperma*;

Quadro 2 Constituintes químicos isolados de caules de *Ouratea hexasperma*;

Quadro 3 Constituintes químicos isolados de folhas de *Ouratea cuspidata*;

Quadro 4 Constituintes químicos isolados de caules de *Ouratea cuspidata*;



Quadro 1 - Constituintes químicos isolados de inflorescência de *Ouratea hexasperma*.

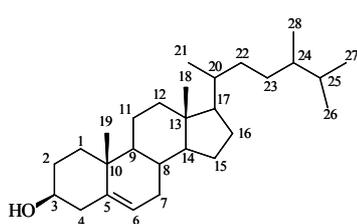
Identificação dos constituintes isolados de inflorescência de *Ouratea hexasperma* (St. Hil).

Mistura de esteróides, Campesterol (1), Estigmasterol (2) e Sitosterol (3)

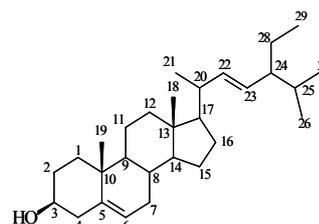
Os esteróides **1**, **2** e **3** foram obtidos em mistura e identificados através da análise dos espectros de IV, RMN ^1H e ^{13}C e comparação com dados descritos na literatura (CARVALHO *et al.*, 2001, VEGA *et al.* 2001) e principalmente pela análise com CG-EM

O espectro de RMN ^1H (**Figura 3**, pág-27) mostra sinais entre δ_{H} 0,64–0,97 correspondentes aos grupos metílicos. O multiplete em δ_{H} 3,54 corresponde aos hidrogênios carbinólicos H-3, o singlete largo em δ_{H} 5,33 representa o hidrogênio olefínico H-6 e o multiplete em δ_{H} 5,18 corresponde aos H-22 e H-23 característico da ligação dupla do estigmasterol. O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 4**, pág-27) revela a presença de sinais de carbonos olefínicos δ_{CH} 121,63 atribuído a C-6 do campesterol (**1**), estigmasterol (**2**) e sitosterol (**3**) δ_{CH} 138,28 e 129,18 (C-22 e 23 de **2**), um sinal de carbono quaternário olefínico com δ_{C} 140,68 (C-5, **1**, **2** e **3**) e um carbono carbinólico δ_{CH} 71,69 (C-3) comum aos três esteróides. Essas análises permitiram propor a presença de **2** e **3** nessa fração pois são os esteróides mais freqüentes em vegetais.

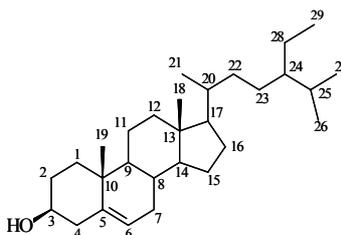
Considerando que os espectros de RMN ^1H e ^{13}C dessa mistura não garantem a presença de apenas **2** e **3**, uma vez que a multiplicidade dos sinais na região de metila não permite distinguir as possíveis ramificações da cadeia aberta dos esteróides. Por isso decidiu-se fazer análise adicional dessa amostra com CG-EM. Essa análise permitiu detectar além de **2** e **3** um terceiro componente (**1**) (TR: 17,82; 18,26 e 19,47) para **1**, **2** e **3**, respectivamente (**Figura 5**). Os espectros de massas correspondentes a cada componente apresenta os respectivos valores de m/z de fragmentos inclusive o do pico do íon molecular (M^+) de **1**: (400u, 50%); **2**: 413u M^+ +1, 25%); **3**: 414u, 30%) (**Figuras 6, 7, 8**). A comparação desses espectros com a biblioteca (REPLIB NIST Library) permitiu caracterizar cada componente.



1 - Campesterol



2 - Estigmasterol



3 - Sitosterol

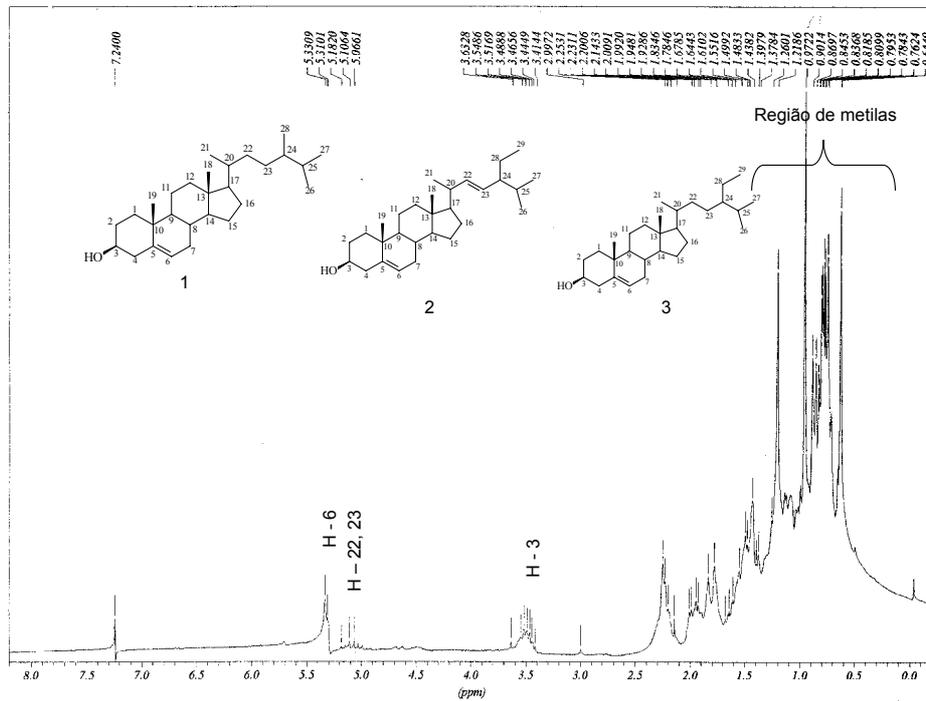


Figura 3 Espectro de RMN ^1H das substâncias 1 + 2 + 3 em CDCl_3 (200 MHz).

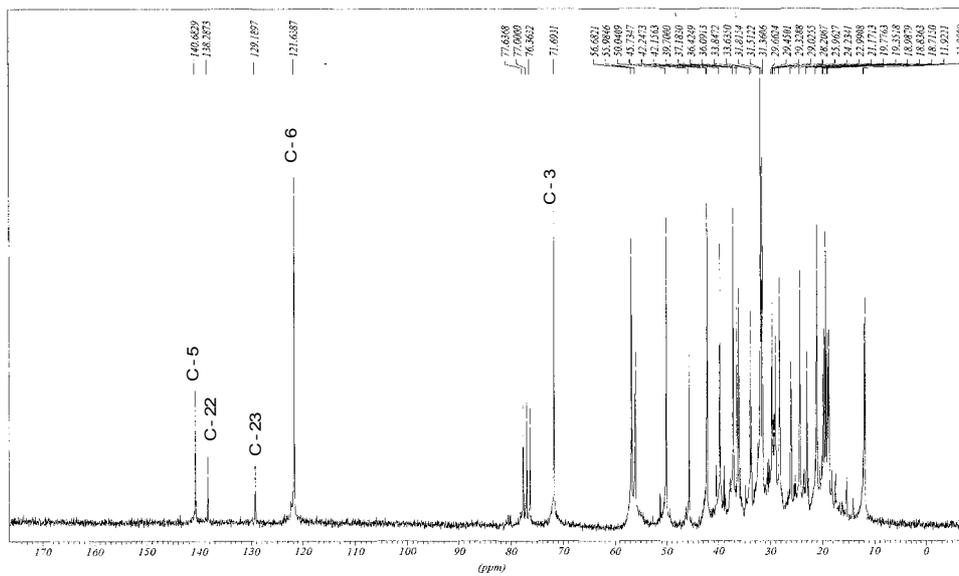


Figura 4: Espectro de RMN de ^{13}C das substâncias 1 + 2+3 CDCl_3 (200 MHz).

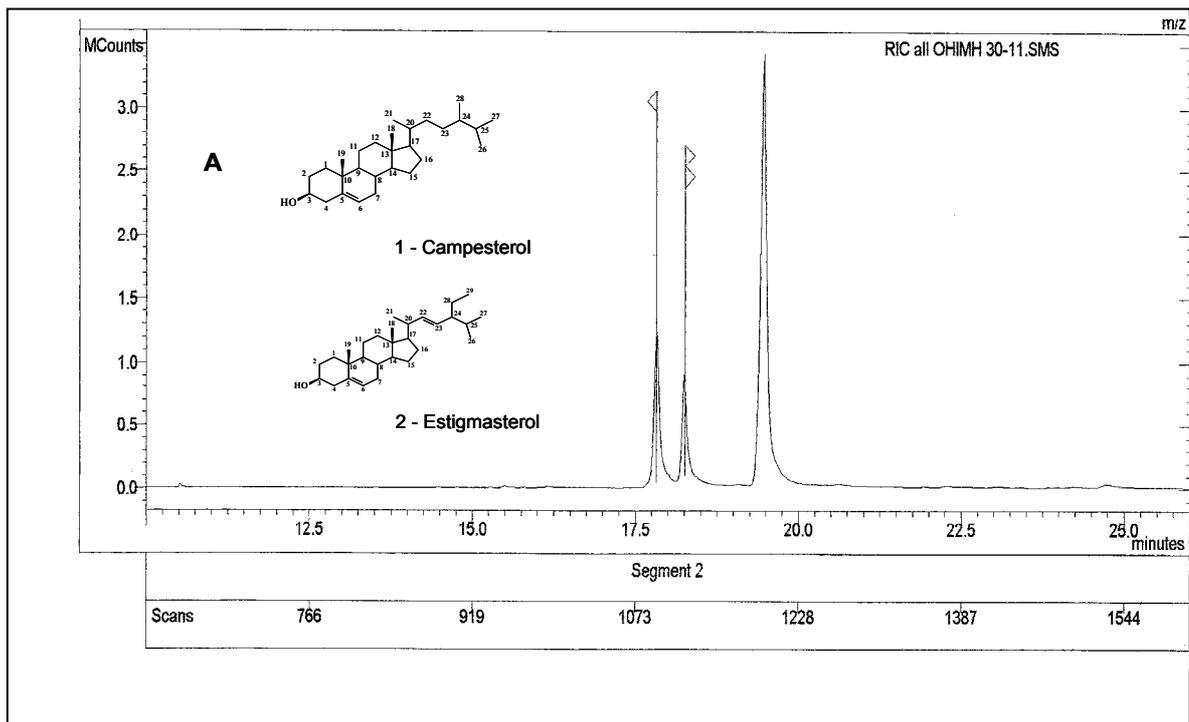


Figura 5: Cromatograma da mistura dos esteróides 1 + 2 + 3. Indicando os picos de 1 e 2.

Print Date: 23 Oct 2006 15:14:52

Scan 1093 from c:\cg-ms (rotina)\data\mario\luciano\OHIMH 30-11.SMS

Entry 11728 from REPLIB NIST Library

Purity = 625 Fit = 779 RFit = 645 Average = 683 Ion Range: 40 - 420

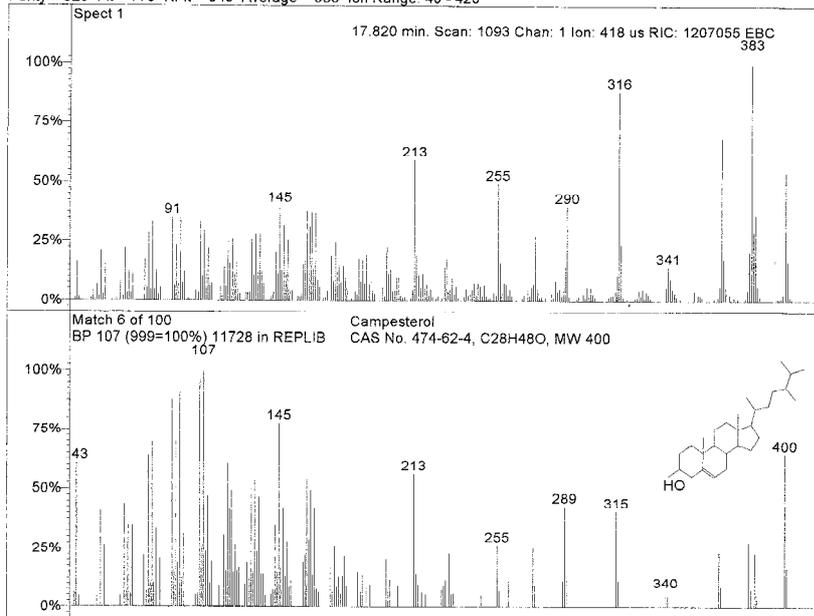


Figura 6: Espectro de massas de (1) comparado com biblioteca do aparelho.

Print Date: 23 Oct 2006 15:16:16

Scan 1120 from c:\cg-ms (rotina)\data\mario\luciano\OHIMH 30-11.SMS

Entry 3773 from REPLIB NIST Library

Purity = 635 Fit = 865 RFit = 663 Average = 721 Ion Range: 40 - 450

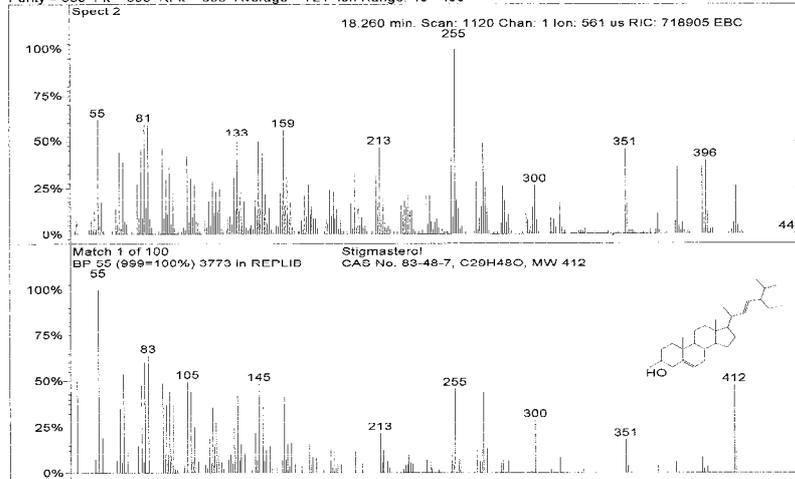


Figura 7: Espectro de massas de (2) comparado com biblioteca do aparelho.

Print Date: 23 Oct 2006 15:18:28

Scan 1196 from c:\cg-ms (rotina)\data\mario\luciano\OHIMH 30-11.SMS

Entry 5248 from MAINLIB NIST Library

Purity = 452 Fit = 763 RFit = 479 Average = 565 Ion Range: 27 - 650

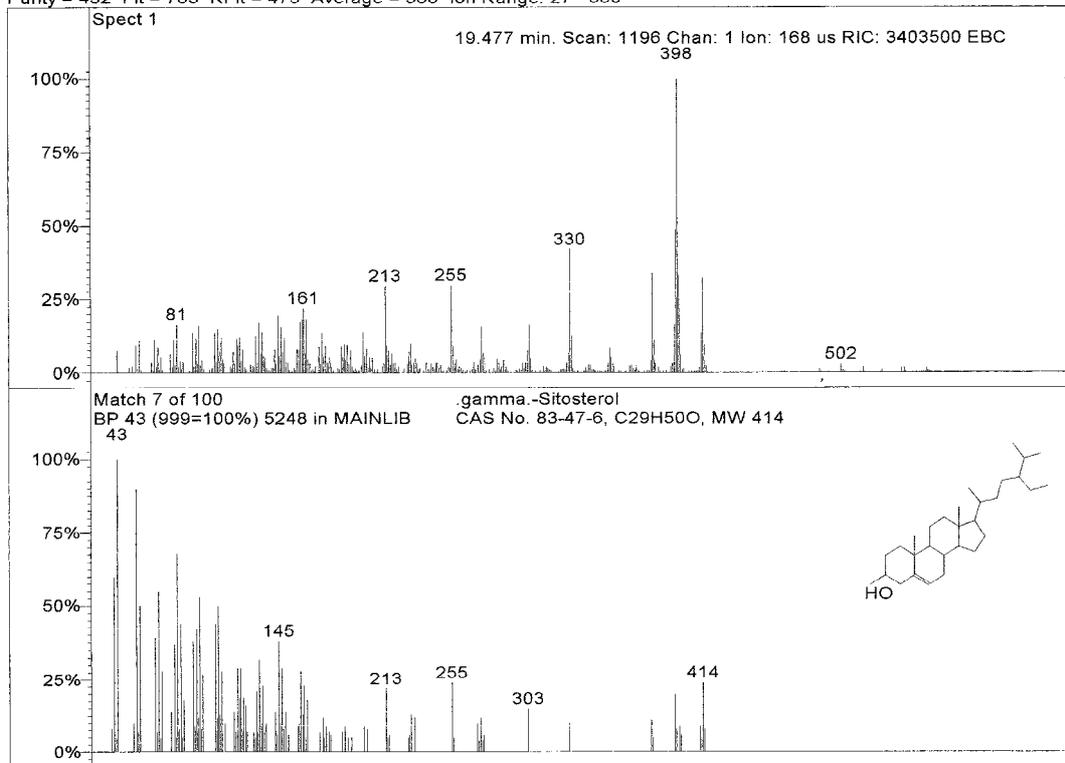


Figura 8: Espectro de massas de (3) comparado com biblioteca do aparelho.

Substância 4. (3-β-O-β-D-glicopiranosil sitosterol)

A substância **4** apresentou-se como um sólido branco insolúvel nos solventes freqüentemente usados para registrar os espectros de RMN. O espectro no IV apresentou absorções em 3.394 cm^{-1} devido a estiramento de O-H e as absorções em 2.957, 2.921, 2.870, 1.467, 1.379 cm^{-1} que são $\nu_{\text{C-H}}$ de grupos, CH_2 e CH_3 ; 1.649 $\nu_{\text{C=C}}$, e 1075 e 1025 de $\nu_{\text{C-O}}$ (**Figura 9, pág-30**). Os dados do espectro de IV, as propriedades dessa substância e as feições dos sinais no espectro de RMN ^1H permitiram pensar no sitosterol glicosilado. Nesta análise considerou-se o sinal do H-1' sobreposto pelo sinal da H_2O do solvente $\delta_{\text{H}}5,1$ (d, 8,8 Hz) (**Figura 10 pag 30**) deduzido pelo espectro do padrão (CARDOZO, 2006) correspondendo a um hidrogênio anomérico. Os sinais correspondentes a grupos metílicos entre $\delta_{\text{H}}0,82\text{--}1,04$ e um sinal de hidrogênio olefínico em $\delta_{\text{H}}5,33$ (sl, H-6) além de outros sinais do açúcar entre 3,8–4,7. Estas informações e a análise por CCDA da amostra com padrão isolado de *Laseguea erecta* levaram a identificação de **4** como sendo o esteróide glicosilado 3-β-O-βD-glicopiranosil sitosterol.

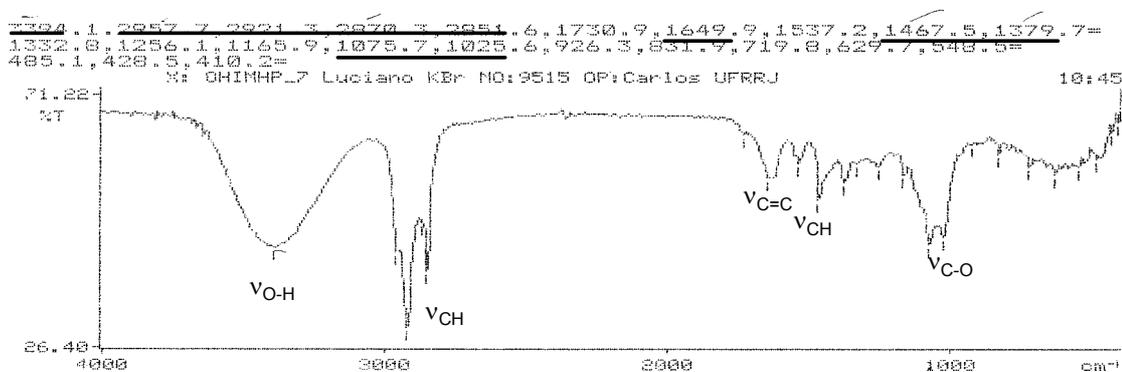


Figura 9: Espectro de I. V. da substância 4.

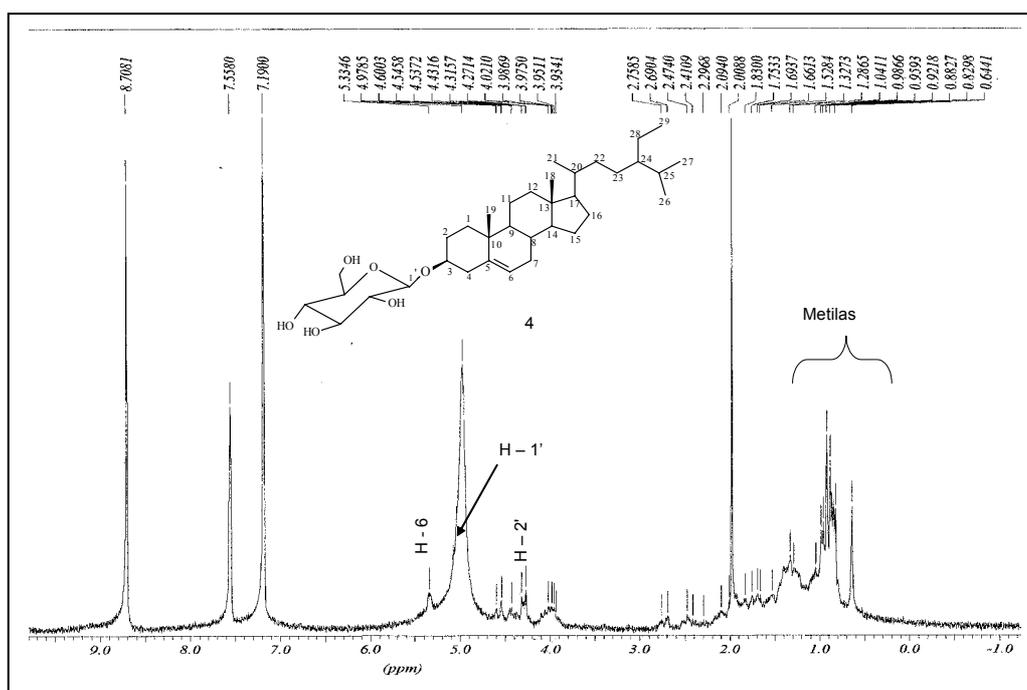


Figura 10: Espectro de RMN de ^1H da substância 4 em piridina d_5 . (200 MHz)

Derivado 4a. (3-β-O-β-D-tetraacetil glicopiranosil sitosterol)

A substância **4** (3-β-O-β-D-glicopiranosil sitosterol 50,0 mg) foi submetida à reação de acetilação com anidrido acético e piridina, obtendo-se o derivado **4a**. O ponto de fusão do derivado **4a** (P.F: 170°C) e os deslocamentos químicos de RMN ¹H deste derivado mostra sinais dos hidrogênios do açúcar (δ_H 4,25 dd J=4,0 e 12,0 Hz; δ_H 4,09 dl, 12,0 Hz, H-6'); δ_H 4,62 (J= 8Hz, H-1') e os δ_H 3,66 (m, H-5'); δ_H 4,96 (tl, H-2'); δ_H 5,03 (tl, H-4') e δ_H 5,22 (tl, H-3'). O H-6 apresenta deslocamento em δ_H 5,38 e aos grupos metilas das acetoxilas absorvem na região de 2,25 a 2,01 ppm. (Figura 11, pág-31). Estes dados estão de acordo com a literatura (KOJIMA *et al.*, 1990). Permitindo identificá-lo como 3-β-O-β-D-tetraacetil glicopiranosil sitosterol e confirmando a substância natural **4** como o 3-β-O-β-D-glicopiranosil sitosterol.

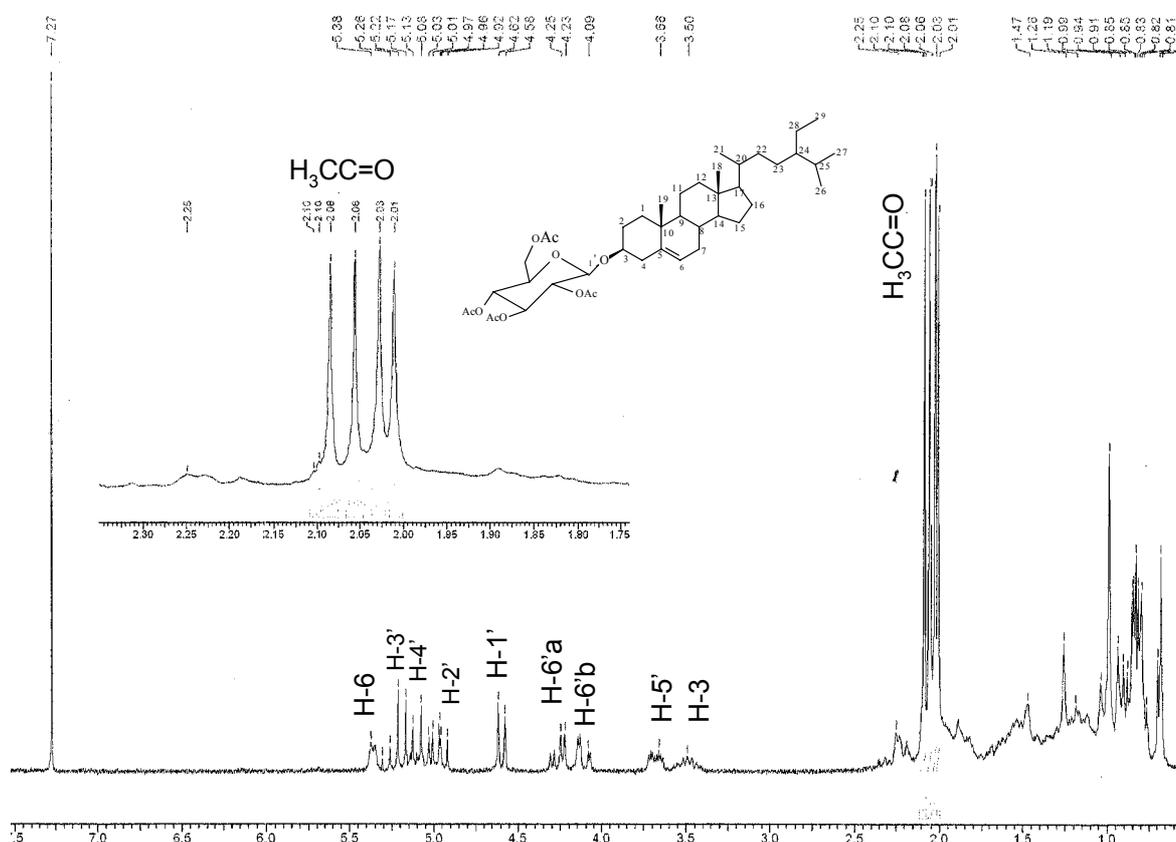


Figura 11 : Espectro de RMN ¹H (200 MHz, em CDCl₃) da substância **4a**

Substância 5. (3 β -O-acil-olean-12-en-28-óico.)

O espectro de RMN ^1H mostrou sinais em δ_{H} 0.71, 0.82, 0.84, 0.87, 0.90 e 1.90 correspondente a sete grupos metila podendo então se tratar de uma estrutura triterpênica: um tripleto em δ_{H} 0.87 ($\text{H}_3\text{C-CH}_2$), δ_{H} 2.26 de grupo metilênico alfa a carbonila (t, $J= 7,2\text{Hz}$, H-2'), sinais em δ_{H} 2,77 (dl, $J= 10,0\text{ Hz}$, H-18), δ_{H} 4,47 (t, $J= 7,6\text{Hz}$, H-3) e δ_{H} 5,24 (sl, H-12) (**Figura 12**). Estes dados permitiram propor estrutura de triterpeno e a feição do sinal do H-18 está de acordo com o da série oleanano com carbonila em C-28. O valor do δ_{H} do H-3 e o tripleto representante do H-2' justificam a inclusão de uma unidade acila na posição 3 constituindo um éster do ácido triterpênico. O espectro de RMN ^{13}C (BBD) (**Figuras 13, 14, págs-35,35**) apresentou além dos sinais de grupos metílicos [δ_{C} 15.32 (C-25), 16.68 (C-26), 17,14 (C-24), 22,66 (C-30), 25.14 (C-27), 25.87 (C-23), 33.03 (C-29)], os sinais de carbonos olefinicos em 122.48, e 143.55, duas carbonilas δ_{C} 173.72 (éster) e 184.58 (ácido). O sinal em δ_{C} 80,51 é compatível com o valor do deslocamento químico do C-3, sustentando o grupo O-acila.

A análise destes dados espectrais e a comparação com dados registrados na literatura (DE CARVALHO, et al 2001) (**Tabela 2 pag-32.**), permitiram identificar o triterpeno como sendo o ácido 3 β -O-acil-olean-12-en-28 oico.

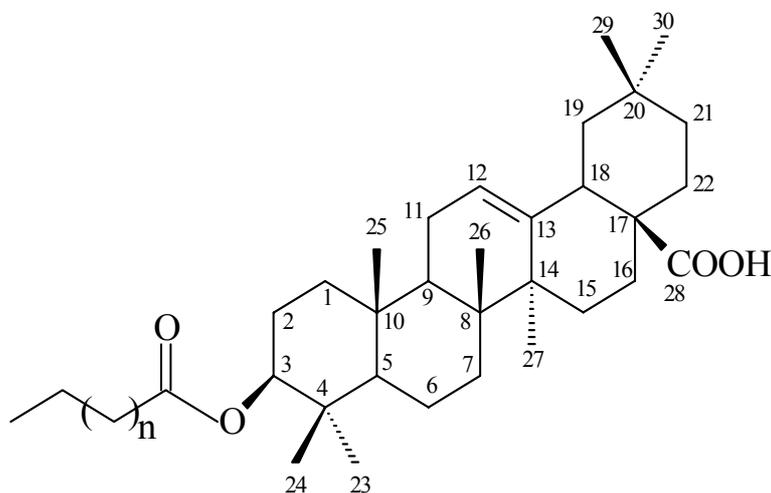
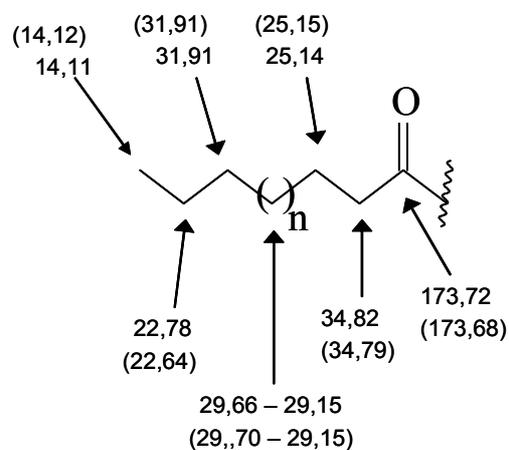


Tabela 2: Dados de RMN ^{13}C da substância $3\beta\text{-O-acil-olean-12-en-28-óico}$ (**5**) comparada com (DE CARVALHO *et al.* 2001;)

C	Substância 5		Literatura
	δH	δc	δc
1		38,00	38,2
2		23,54	26,7
3	4,54(t, J=8,8Hz)	80,51	80,9
4		37,67	37,9
5		55,22	55,2
6		18,11	18,2
7		32,45	32,8
8		39,21	39,3
9		47,49	47,6
10		36,94	37,1
11		22,78	23,7
12	5,24(sl)	122,48	121,6
13		143,55	145,2
14		41,46	42,0
15		27,63	26,2
16		25,87	26,7
17		31,91	32,5
18	2,77(dl, J=10 Hz)	46,49	47,2
19		45,79	46,7
20		30,63	31,0
21		33,76	34,6
22		34,82	33,0
23		27,99	28,3
24		17,14	16,7
25		15,32	15,3
26		16,68	16,8
27		25,14	25,9
28		184,58	184,0
29		33,03	33,0
30		22,66	23,2



() : Valores da Literatura (SOBRINHO, et al., 1991)

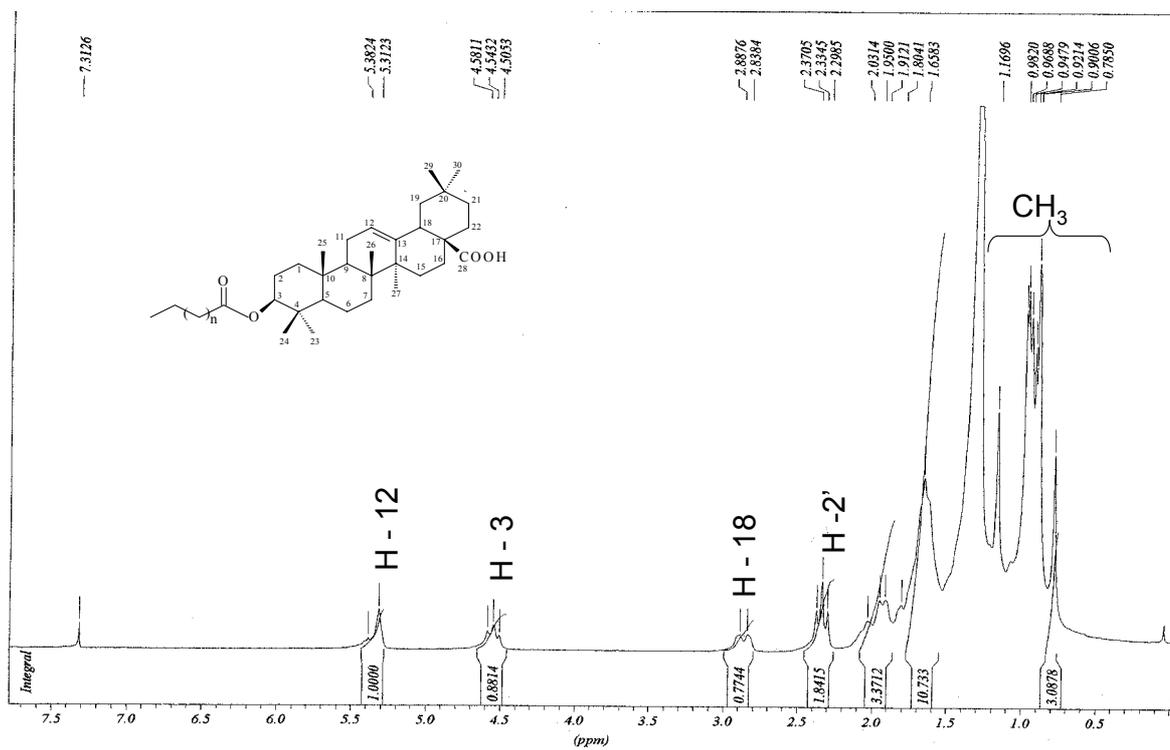


Figura 12: Espectro de RMN ^1H da substância 5 em CDCl_3 (200MHz).

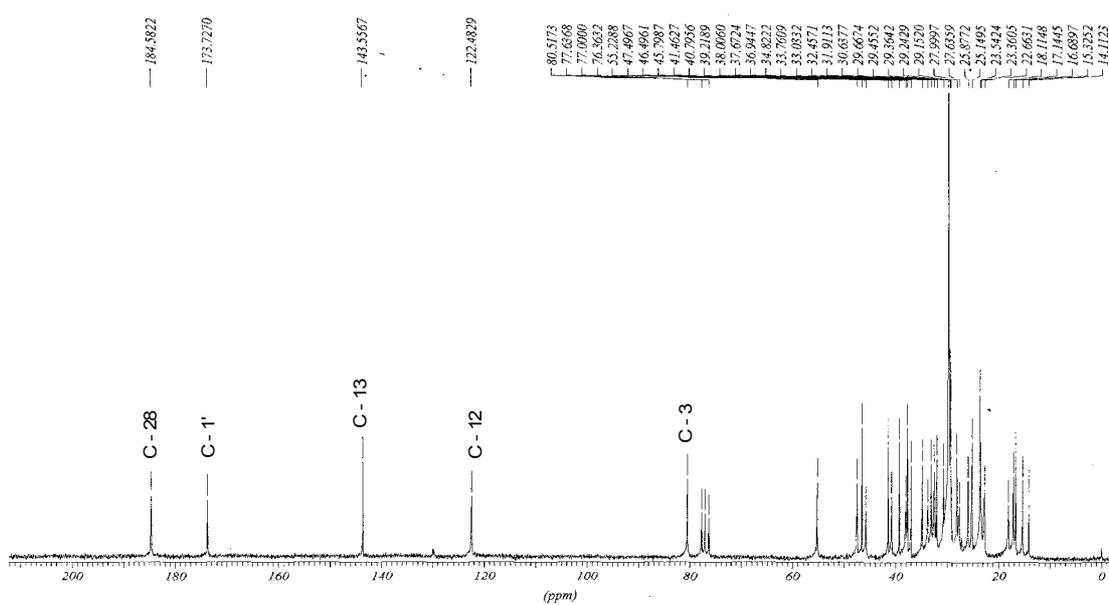


Figura 13: Espectro de RMN ^{13}C da substância 5 em CDCl_3 . (50MHz).

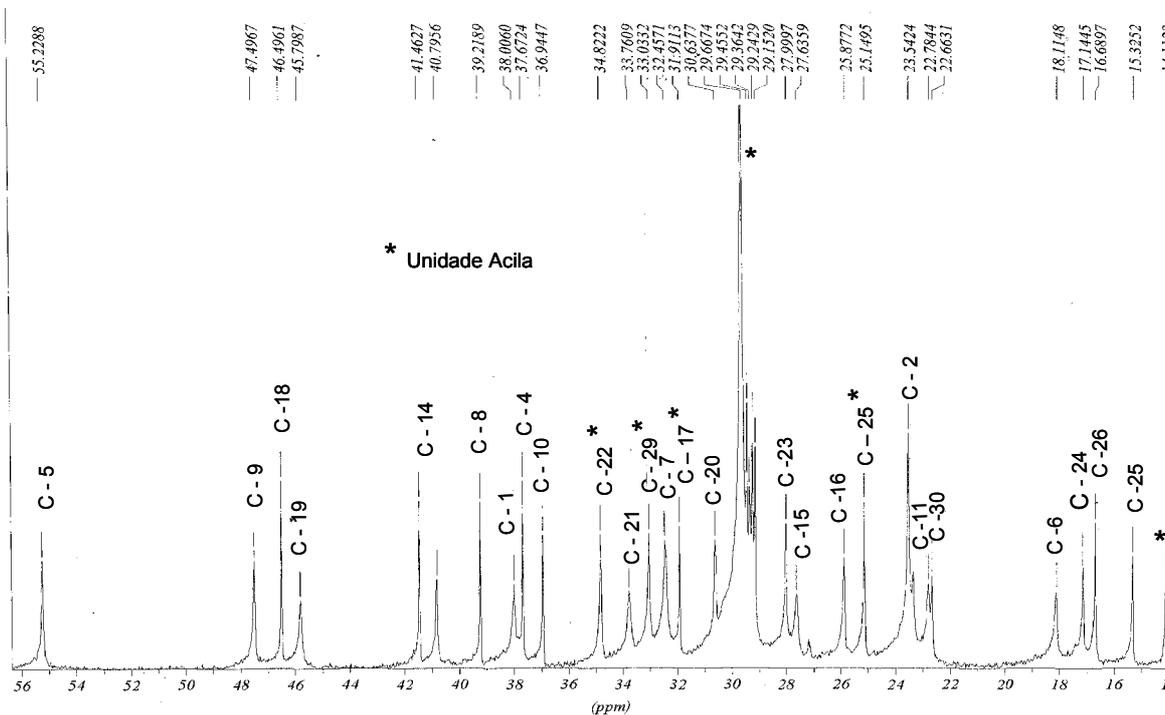


Figura 14: Expansão do espectro de RMN ^{13}C da substância da **5** entre 15 a 56 ppm em CDCl_3 , (50MHz)

Substância 6 (Rutina)

O espectro de IV do substância 6 apresentou sinais de absorção no IV em $3.423, \text{cm}^{-1}$ (ν_{OH}), 1.654 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$), $1.504, 1.458 \text{ cm}^{-1}$ $\nu_{\text{C=C}}$ (anel aromático), $1063-1012 \text{ cm}^{-1}$ de $\nu_{\text{C-O}}$. (Figura 15 Pág-38). As análises em CCDA e revelação com AlCl_3 indicou a substância como um flavonóide.

O espectro de RMN ^1H (Figura 16, pág-38 Tabela 3 pág-37) dessa substância apresentou sinais de hidrogênio em anel aromático cujas feições são compatíveis com anel trissubstituído [δ_{H} 7,51 (s, H-2'), 7,55 (dl, $J= 8,0 \text{ Hz}$, H-6'), 6,82 (d, $J= 8,0 \text{ Hz}$, H-5')] Os sinais em δ_{H} 6,16 (d, $J=1,9 \text{ Hz}$), 6,35(d, $J= 1,9 \text{ Hz}$) representam os hidrogênios 6 e 8 do anel A do flavonóide. O singlete em δ_{H} 12,6 foi atribuído a uma grupo hidroxila quelada (HO-5). A ausência de um sinal representante do H-3 permitiu propor a presença de um substituinte nesse carbono. As duas unidades de carboidratos foram identificadas por dois sinais de hidrogênios anoméricos em δ_{H} 5,32 (d, $J= 8,0 \text{ Hz}$ H-1'') e 4,36 (s, H-1''') ligados aos carbonos δ_{C} 101,2, 100,78, respectivamente. O sinal δ_{H} 0,96 (d, $J= 6,0 \text{ Hz}$, H-6''') ligado ao carbono δ_{C} 17,78 serviu para propor a rhamnose como um dos carboidratos. A comparação dos demais sinais de deslocamentos químicos de carbono presentes nos espectros de RMN ^{13}C (BBD e DEPT, Figuras 18, 19 pags-40,41 , Tabela 3 pag-37) com os valores atribuídos para a glicose e rhamnose permitiram identificar estas duas unidades de açúcar.

Os dados discutidos acima e a comparação com valores descritos na literatura (AGRAWAL, 1989, VELANDIA et al., 2002) possibilitaram definir a substância 6 como sendo 3 (β -O- β -D-glicopiranosil-6-1-O- β -L-rhamnopiranosil-quercetina conhecida como rutina. Esta substância foi isolada anteriormente de *O. semiserrata* (VELANDIA, 2002) e *Luxemburgia nobilis* (OLIVEIRA et al., 2002).

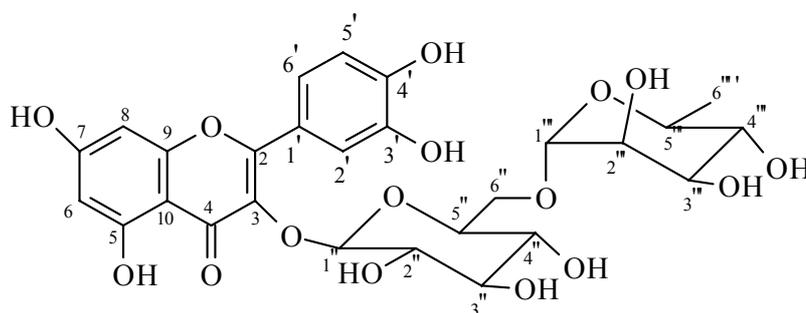
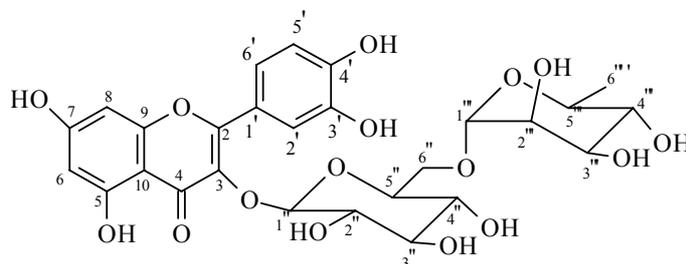


Tabela 3: Atribuição dos dados de RMN ^1H e de ^{13}C da substância Rutina (6) e comparação com deslocamentos químicos de carbono 13 registrados na literatura (AGRAWAL, 1989).



Substância 6			Literatura
δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
2	-	156,61	156,60
3	-	133,29	133,60
4	-	177,36	177,40
5	12,57 (s, OH)	161,25	161,20
6	6,19 (d, J=1,9 Hz)	98,78	98,80
7	-	164,41	163,90
8	6,35 (d, J= 1,9Hz)	93,66	93,60
9	-	156,49	156,40
10	-	103,88	104,20
1'	-	121,16	121,60
2'	7,51(s)	115,25	115,30
3'	-	144,79	144,60
4'	-	148,49	148,30
5'	6,82 (d, J= 8,0 Hz)	116,25	116,50
6'	7,55 (d, J= 8,0 Hz)	121,62	121,60
1''	5,32 (d, J=8,0 Hz)	101,24	101,50
2''	3,25 (sl)	74,10	74,20
3''	3,28 (sl)	75,90	76,10
4''	3,66 (sl)	70,55	70,80
5''	3,22 (sl)	76,43	76,80
6''	3,72 (sl)	67,03	67,10
1'''	4,36 (s)	100,78	100,70
2'''	3,05 (sl)	70,40	70,40
3'''	3,37 (sl)	70,00	70,40
4'''	3,00 (sl)	71,85	72,20
5'''	3,09 (sl)	68,27	68,20
6'''	0,97 (d, J= 6,0 Hz)	17,78	17,50

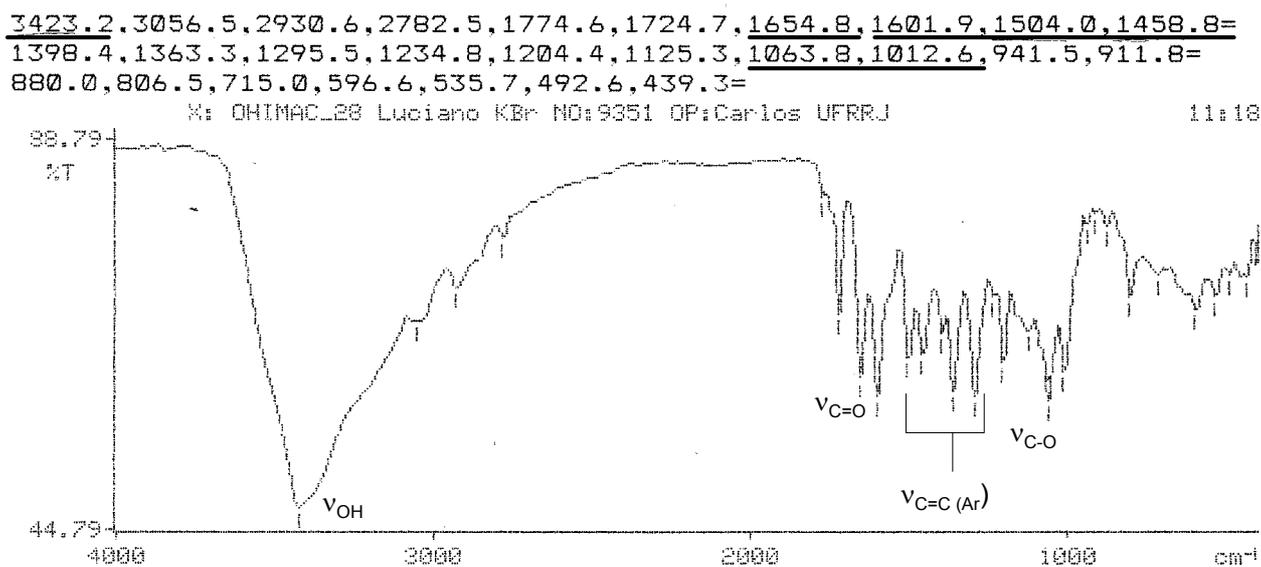


Figura 15: Espectro de I. V. da substância Rutina (6).

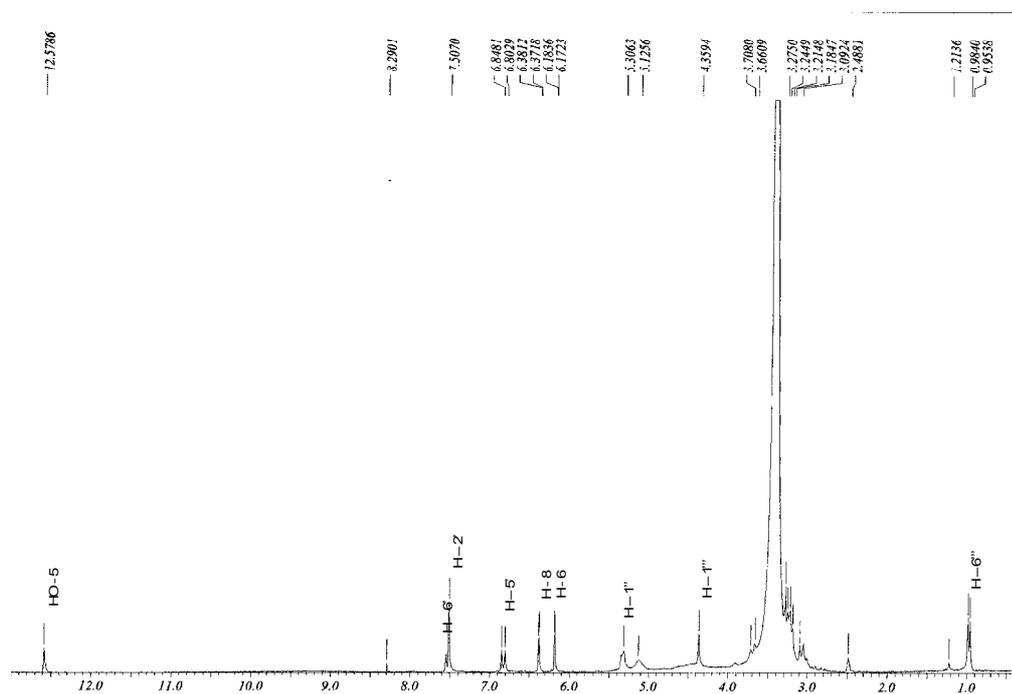


Figura 16: Espectro de RMN ^1H (200MHz) da substância Rutina (6) em DMSO-d_6 (Ver expansão).

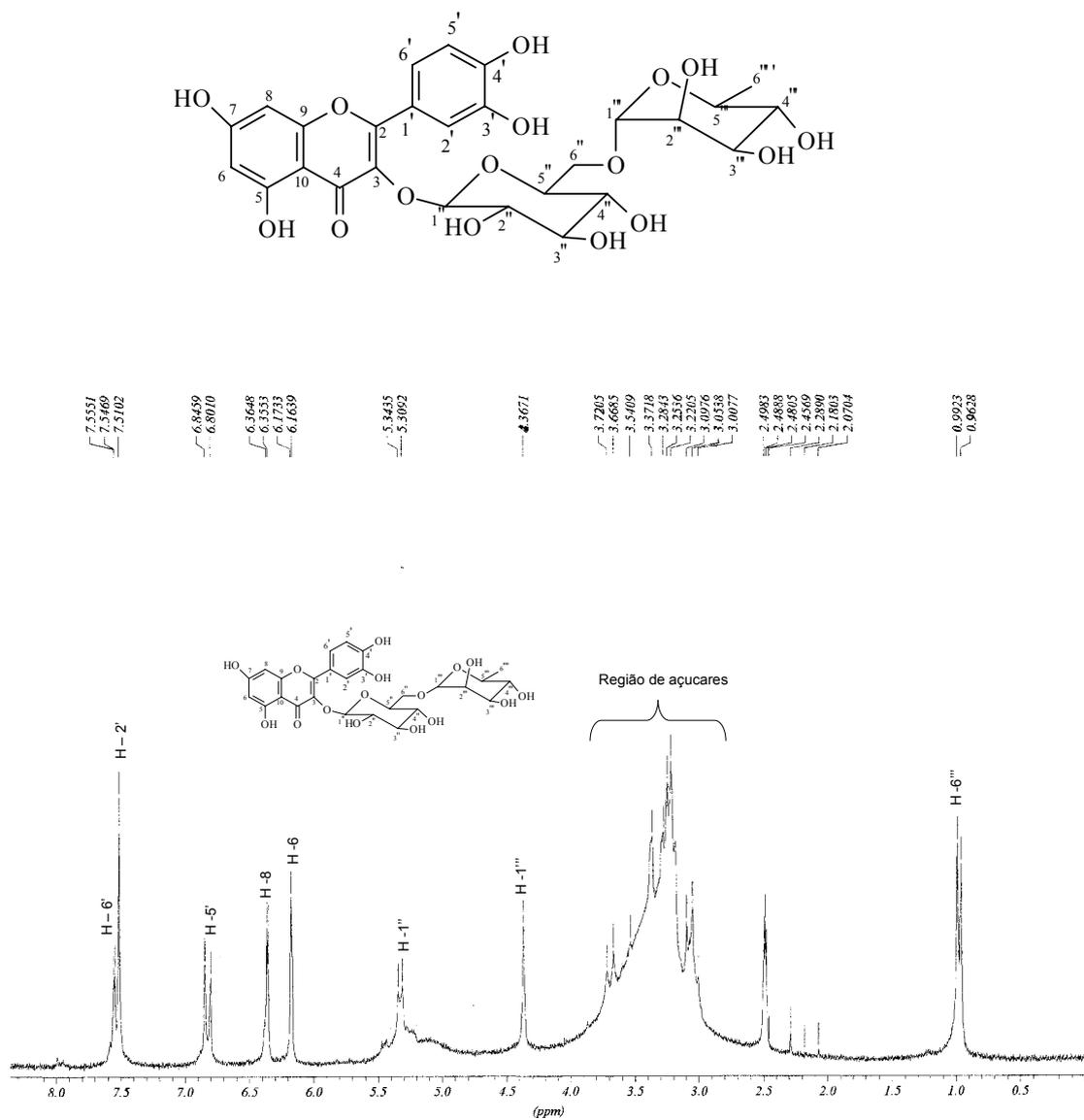


Figura 17: Expansão do espectro de RMN ^1H (200MHz DMSO d_6) da substância Rutina (6) entre 1–8 ppm.

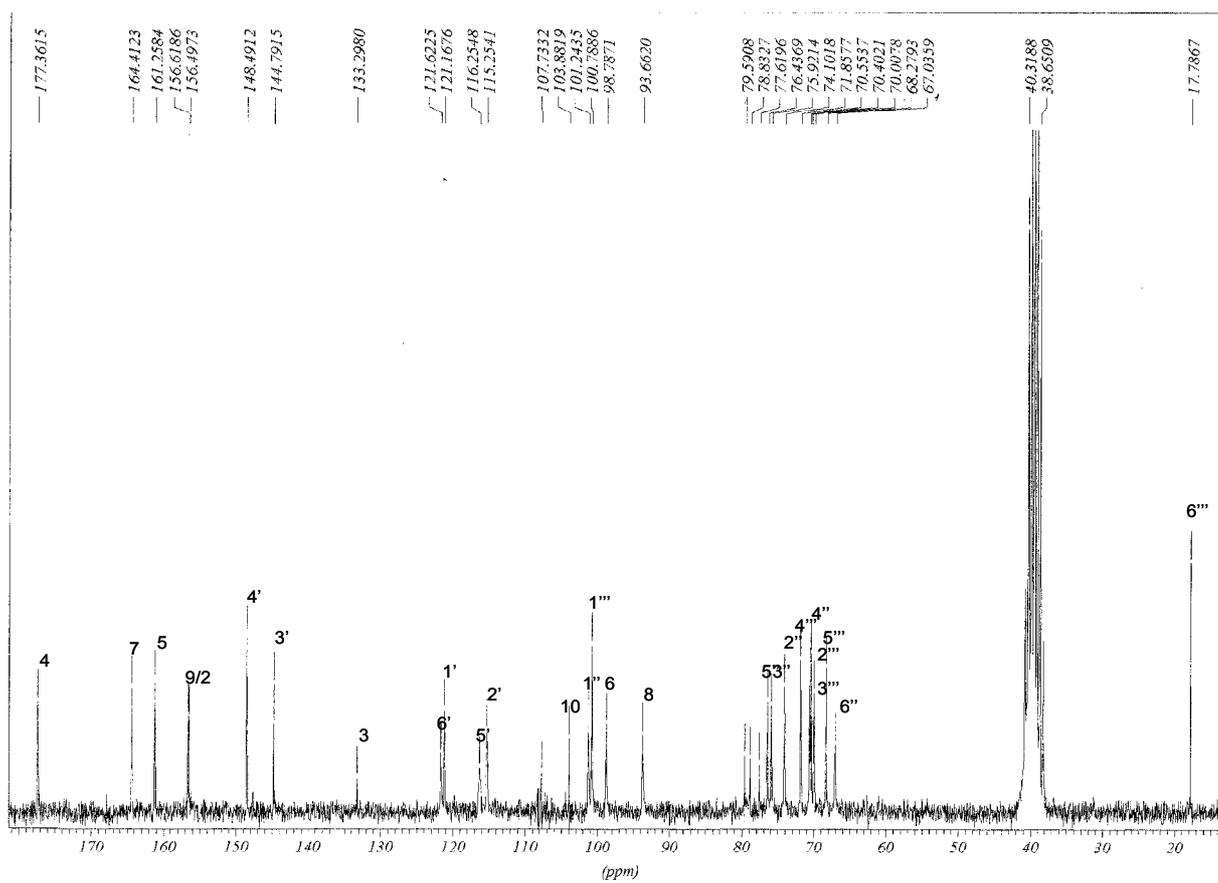
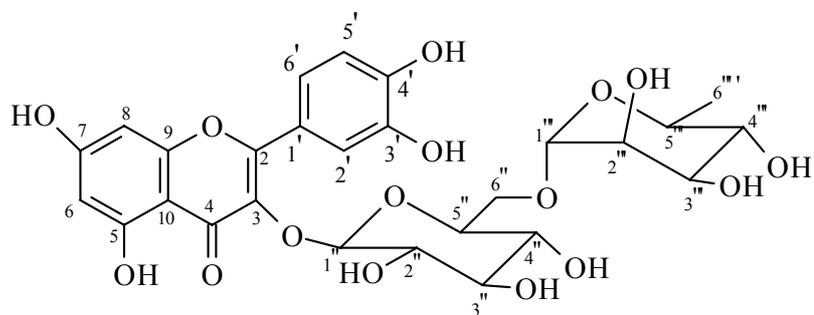


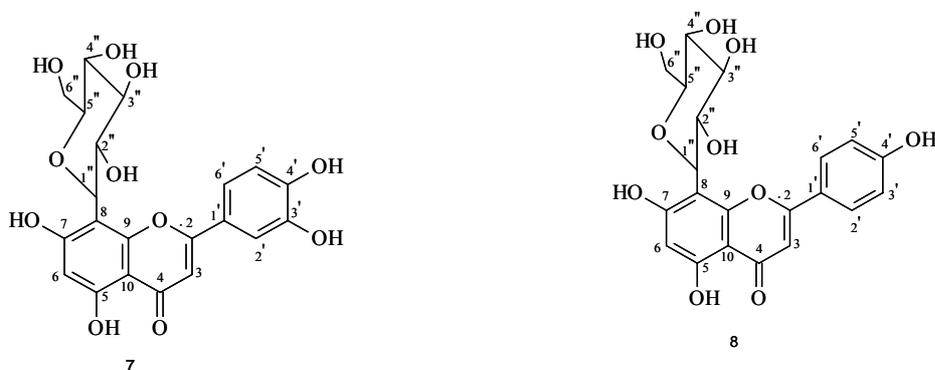
Figura 18: Espectro de ^{13}C (BBD 50MHz) da substância Rutina (6) em DMSO-d_6 .

Substância 7 + 8.(Orientina e Vitexina)

Além da indicação de flavonóide pela análise com CCDA revelada com AlCl_3 , o espectro obtido na região de I V dessa fração revelou presença de sinais de absorção intensa em 3.384 cm^{-1} , 3.246 cm^{-1} (atribuído ao estiramento de grupos hidroxílicos); absorção em 1.655 cm^{-1} , (referente estiramento de carbonila conjugada); 1.614 cm^{-1} , 1.508 cm^{-1} , 1.428 cm^{-1} $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ (de anel aromático) e $1094\text{-}1041$ estiramento $\nu_{\text{C}-\text{O}}$ que são compatíveis com essa classe de metabolitos naturais. A análise detalhada dos espectros de RMN permitiram identificar dois flavonóides **7** e **8**.

O espectro de RMN ^1H dessa fração apresentou singletos em δ_{H} 6,64 (H-3, **7**), δ_{H} 6,78 (H-3, **8**) e δ_{H} 6,27 (H-6, **7** e **8**). A diferença na intensidade dos sinais permitiu supor a mistura de duas substâncias. Os sinais δ_{H} 7,48 (sl), 6,85 (d, $J=8,0\text{Hz}$) e 7,52 (d, $J=8,0\text{Hz}$) foram atribuídos a três átomos de hidrogênio em anel aromático (H-2', 5', 6') de um sistema ABC no anel B da substância (**7**). A presença do sistema AA'BB' foi evidenciado pelos sinais em δ_{H} 8,02 (d, $J=8,0\text{ Hz}$, H-2', 6') e 6,89 (d, $J=8,0\text{Hz}$, H-3', 5') que foram atribuídos a substância (**8**). Ainda analisando o espectro RMN ^1H é verificado um sinal em δ_{H} 4,68 (d, $J=10\text{ Hz}$) referente a um hidrogênio anomérico cujo valor é compatível para C-glicosídeos. Os demais sinais na região de carboidrato e a análise dos espectros de RMN ^{13}C (BBD e DEPT) e comparação com dados da literatura (AGRAWAL, 1989) permitiram identificar a unidade β -D-glicopiranosila em cada uma das substância (**7**) e (**8**). A ausência de um carbono em torno de 94 ppm para HC-8 e o sinal de carbono quaternário em 104,42 ppm permitiu localizar o carboidrato em **8**. Esses valores e os demais valores de δ_{C} , δ_{H} , δ_{CH_2} são semelhantes aos da literatura (**Tabela 4, Pág-43**) para os flavonóides C-glicosilados **7** e **8**.

Além dessas observações a análise do mapa de contorno HMQC (**Figuras 28 e 29 pags-51,52**) permitiu a correta atribuição dos deslocamentos químicos de H e C de cada componente da mistura. Conduzindo a identificação da substância (**7**) como sendo a orientina e a substância (**8**) como a vitexina. A orientina foi anteriormente isolada de *Luxemburgia octandra* (ALVES, 2003) e a vitexina de *Piptadenia gonoacantha* (CARDOZO, 2006).



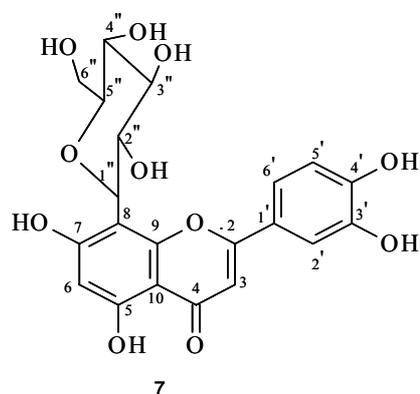
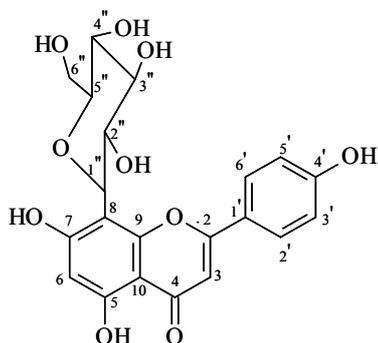


Tabela 4: Dados de RMN ^1H e ^{13}C incluindo acoplamento heteronuclear(HMQC) da substância orientina (7) e comparação com δ_{H} e δ_{C} da orientina.(ZHOU *et. al.* 2005).

C	Substância 7		Orientina	
	HMQC		HMQC	
2	163,95	-	164,16	-
3	102,32	6,64 (s)	102,41	6,65(s)
4	181,88	-	182,03	-
5	160,25	13,17(s, OH)	160,47	13,17(s, OH)
6	98,01	6,27 (s)	98,31	6,25(s)
7	162,43	-	162,80	-
8	104,42	-	104,65	-
9	155,87	-	156,01	-
10	103,91	-	103,99	-
1'	121,88	-	121,97	-
2'	113,93	7,48(s)	114,07	7,44(d,j=2,1Hz)
3'	145,67	-	145,95	-
4'	149,47	-	149,90	-
5'	115,52	6,85(d, J= 8,0 Hz)	115,78	6,90(d, J= 8,2Hz)
6'	119,23	7,52(d, J= 8,0 Hz)	119,45	7,50(dd, J=2,1 e 8,0Hz)
1''	73,25	4,68(d, J= 10,0Hz)	73,50	4,72(d, J= 9,0Hz)
2''	70,71	3,82(m)	70,90	3,82(t, J= 9,6Hz)
3''	78,63	3,35(m)	78,88	3,24(m)
4''	70,41	3,25(m)	70,83	3,37(t, J= 9,4Hz)
5''	81,87	3,35(m)	82,04	3,21(m)
6''	61,50	3,78(m)	61,76	3,75(dd, J= 1,4/11,6Hz)



8

Tabela 5: Dados de RMN ^1H e ^{13}C incluindo acoplamento heteronuclear(HMQC) da substância vitexina (**8**) e comparação com δ_{H} e δ_{C} da vitexina.(ZHOU *et. al.* 2005).

C	Substância 8		vitexina	
	δ_{C}	HMJC	δ_{C}	HMJC
2	163,82	-	164,98	-
3	102,32	6,78 (s)	102,51	6,94(s)
4	181,96	-	182,73	-
5	160,00	13,17(s, OH)	160,28	13,17(s, OH)
6	98,01	6,27 (s)	98,45	6,44(s)
7	162,43	-	162,31	-
8	104,42	-	104,56	-
9	155,87	-	155,64	-
10	103,91	-	104,07	-
1'	121,48	-	122,07	-
2'	128,83	8,02(d, J= 8,0Hz)	128,99	8,26(d, J= 8,7Hz)
3'	115,68	6,89(d, J=8,0Hz)	115,01	7,05(d, J= 8,7Hz)
4'	161,00	-	161,32	-
5'	115,68	6,89(d, J= 8,0 Hz)	115,01	7,05(d, J= 8,7Hz)
6'	128,83	8,02 (d, J= 8,0 Hz)	128,99	8,26(d, J= 8,7Hz)
1''	73,25	4,68(d, J= 10,0Hz)	73,93	4,94(d, J= 9,8Hz)
2''	70,42	3,82(m)	71,03	3,82(t, J= 9,6Hz)
3''	78,52	3,25(m)	79,01	3,24(m)
4''	70,71	3,35(m)	70,20	3,37(t, J= 9,4Hz)
5''	81,72	3,25(m)	81,29	3,21(m)
6''	61,16	3,78(m)	61,36	3,75(dd, J= 1,4/11,6Hz)

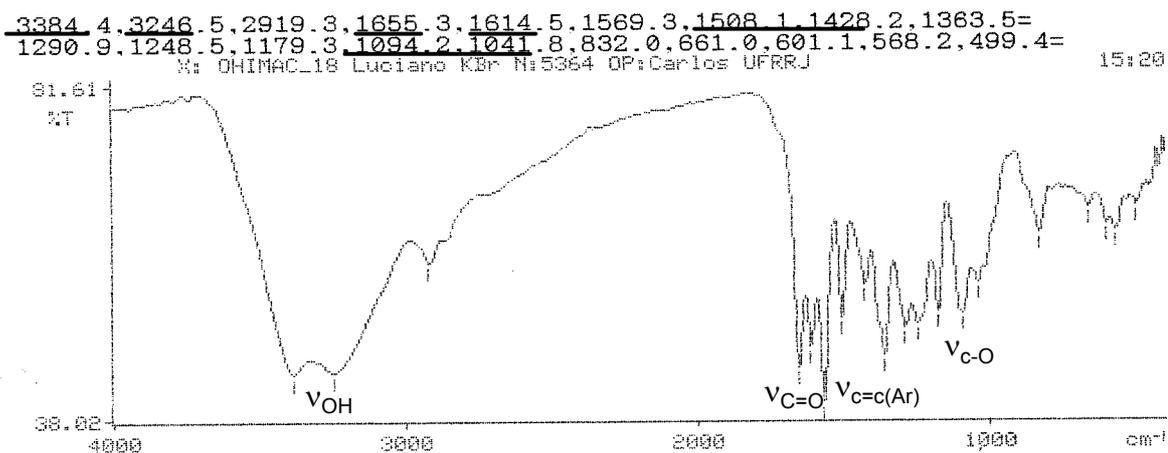


Figura 20: Espectro de I V da mistura de substâncias 7 + 8.

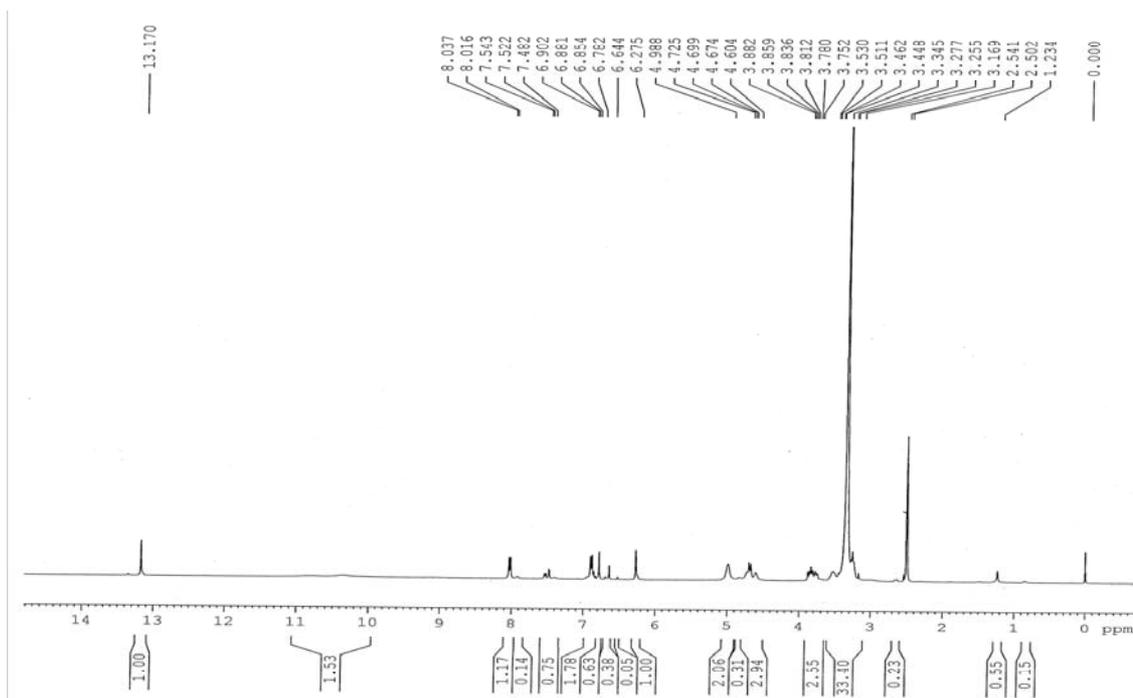


Figura 20: espectro de RMN ^1H (400MHz) da mistura das substâncias 7 + 8 em DMSO- d_6 .

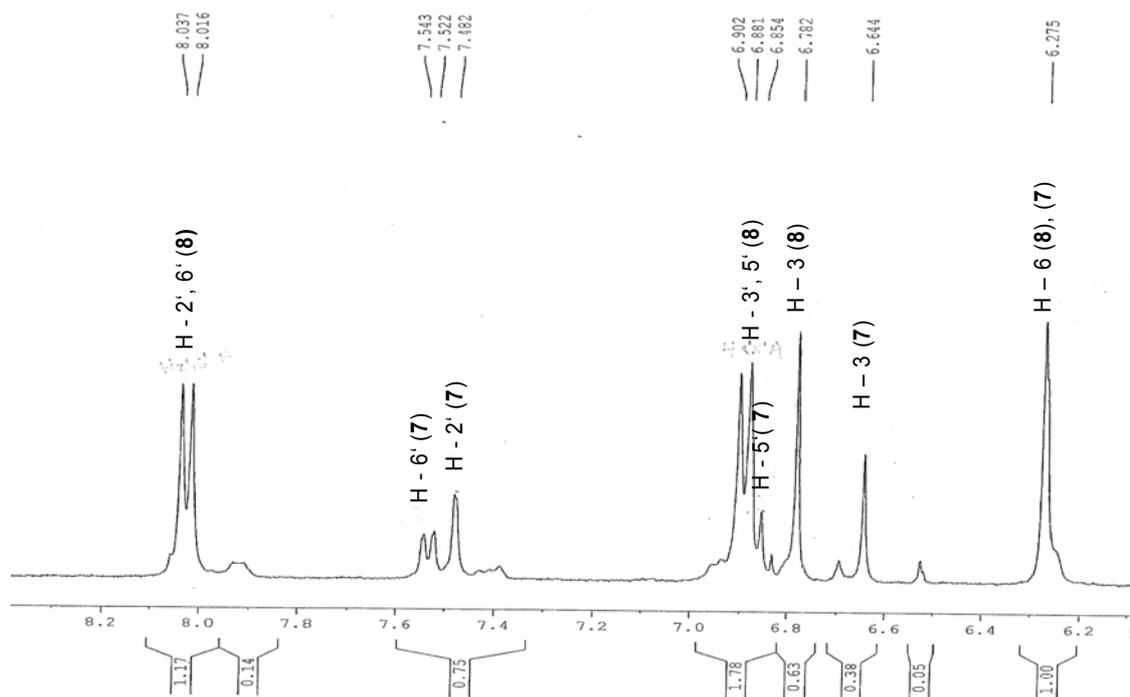
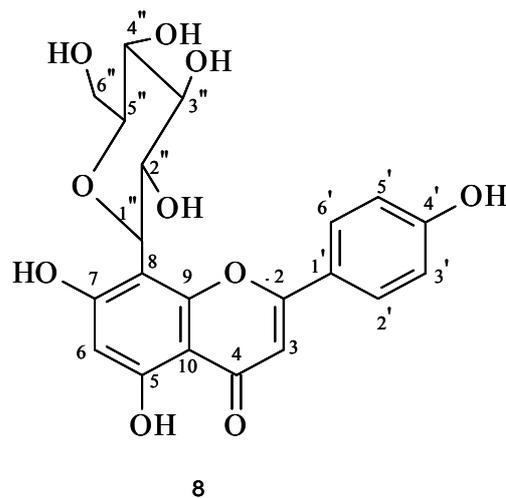
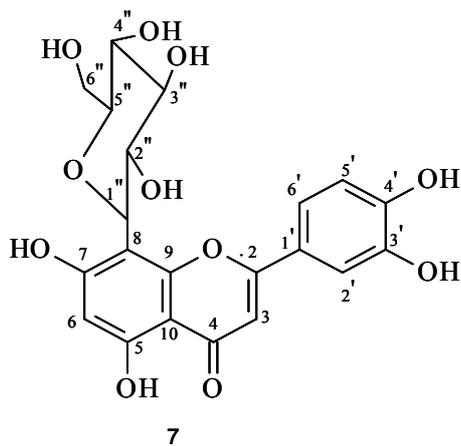


Figura 21: Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz) da mistura **7** + **8** em DMSO-d_6 entre 6,2 – 8,2 ppm.

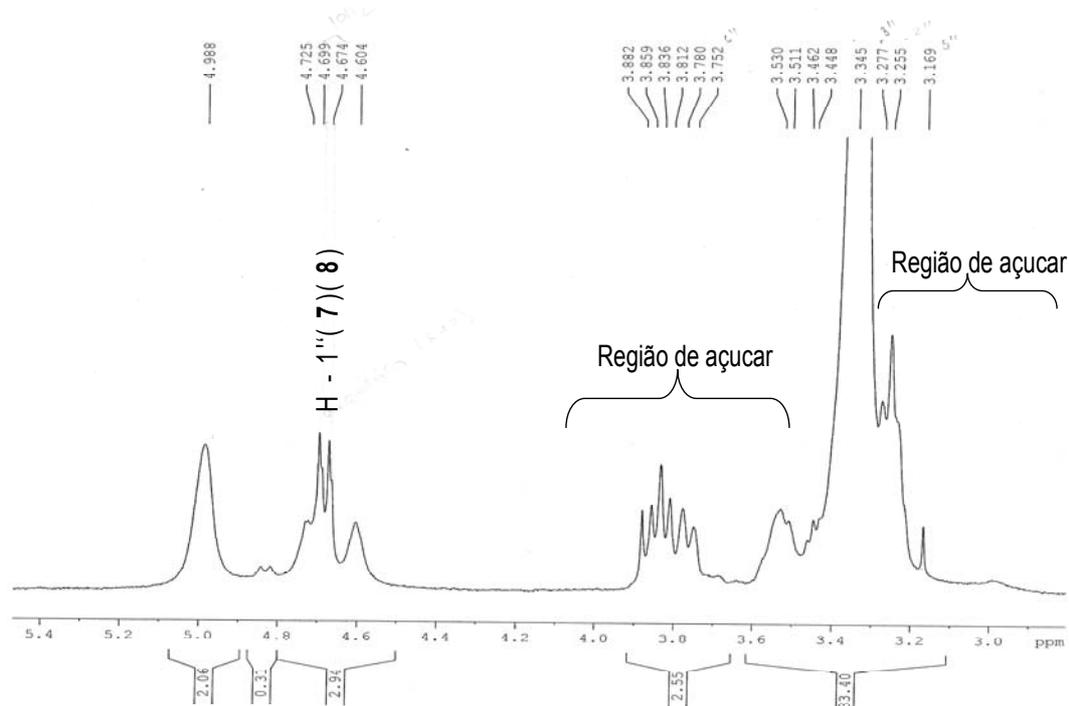


Figura 22: Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz) na região de açúcares entre 3–5 ppm da mistura das substâncias 7 + 8.

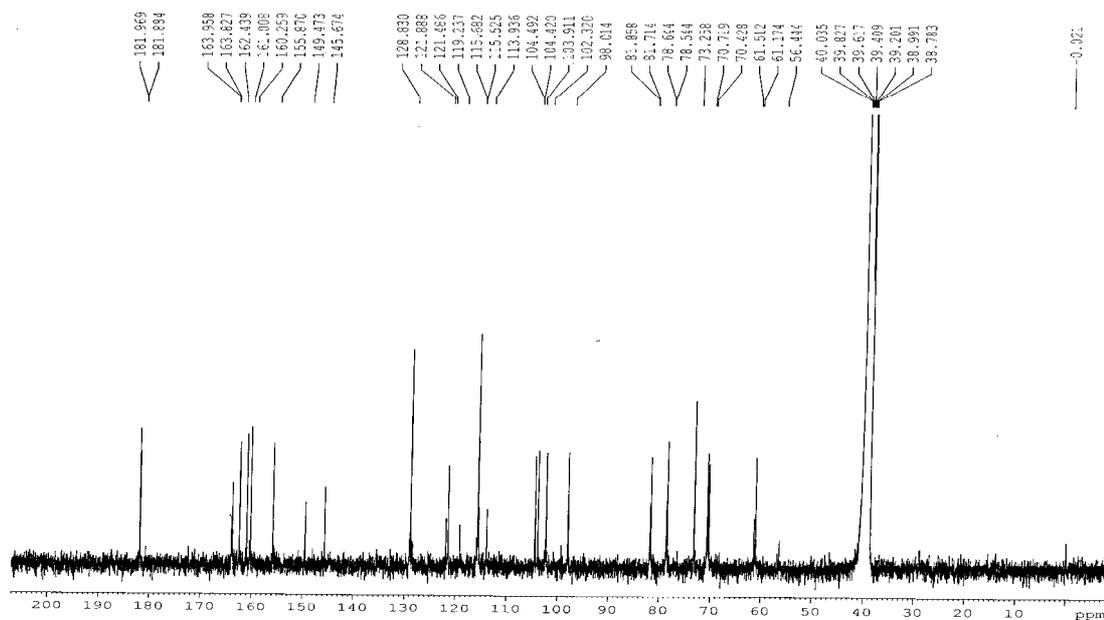


Figura 23: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) da mistura das substâncias 7 + 8, em DMSO-d_6 .

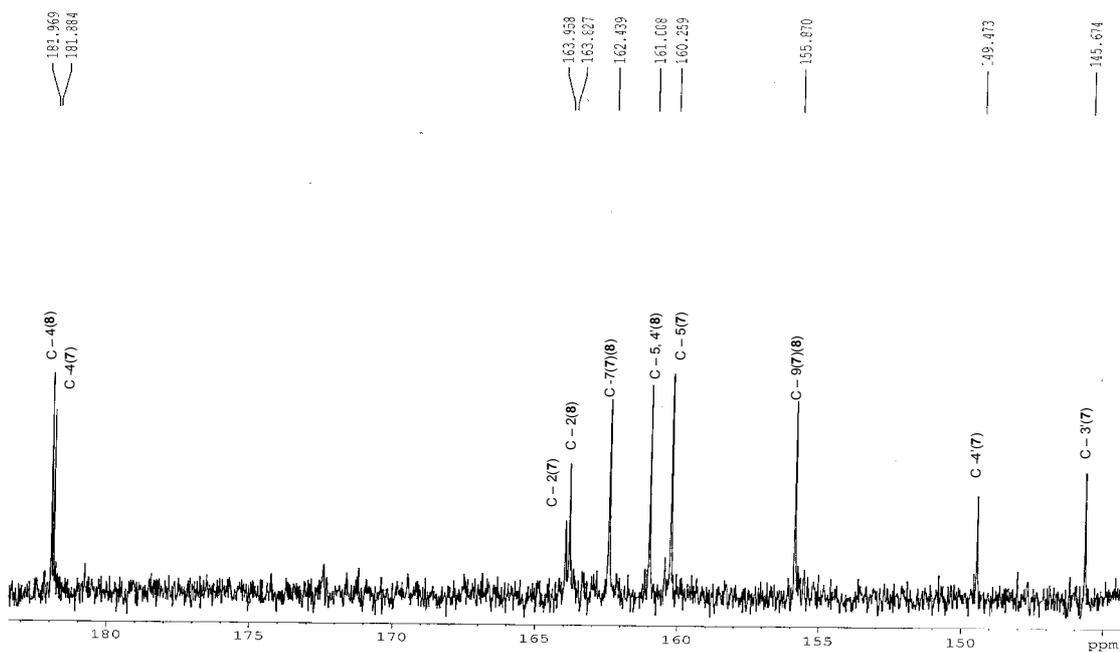


Figura 24: Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) da mistura das substâncias **7 + 8** entre 145–183 ppm em DMSO-d_6 .

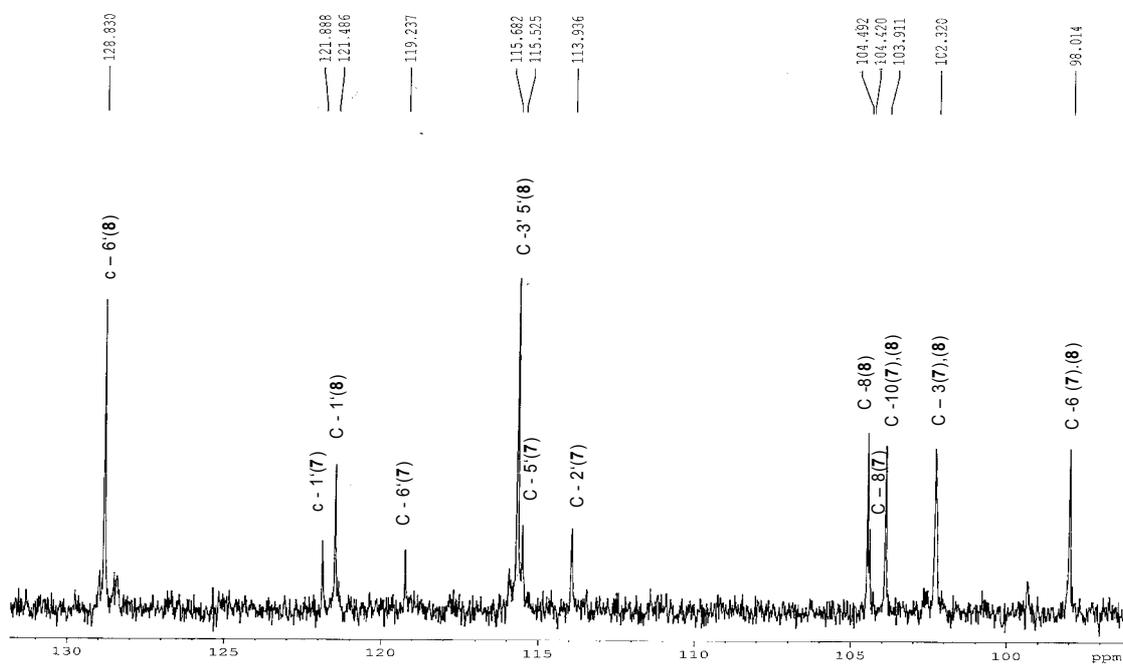


Figura 25: Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) da mistura das substâncias **7 + 8** entre 97–130 ppm em DMSO-d_6 .

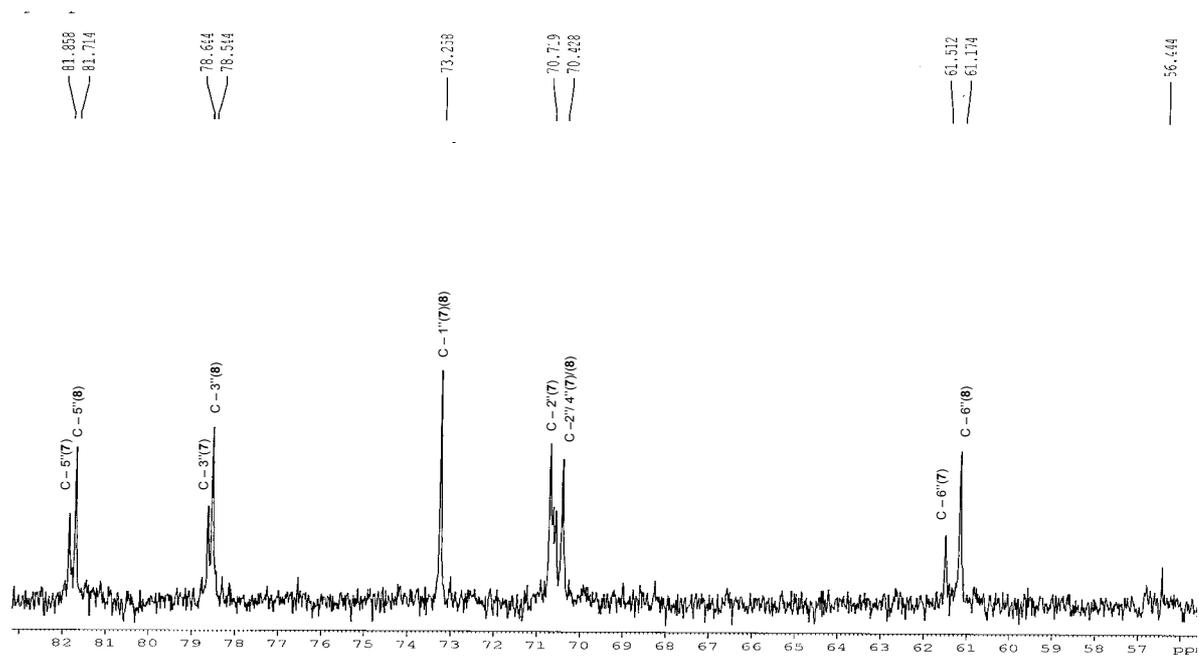


Figura 26: Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) da mistura das substâncias **7 + 8** em DMSO-d_6 .

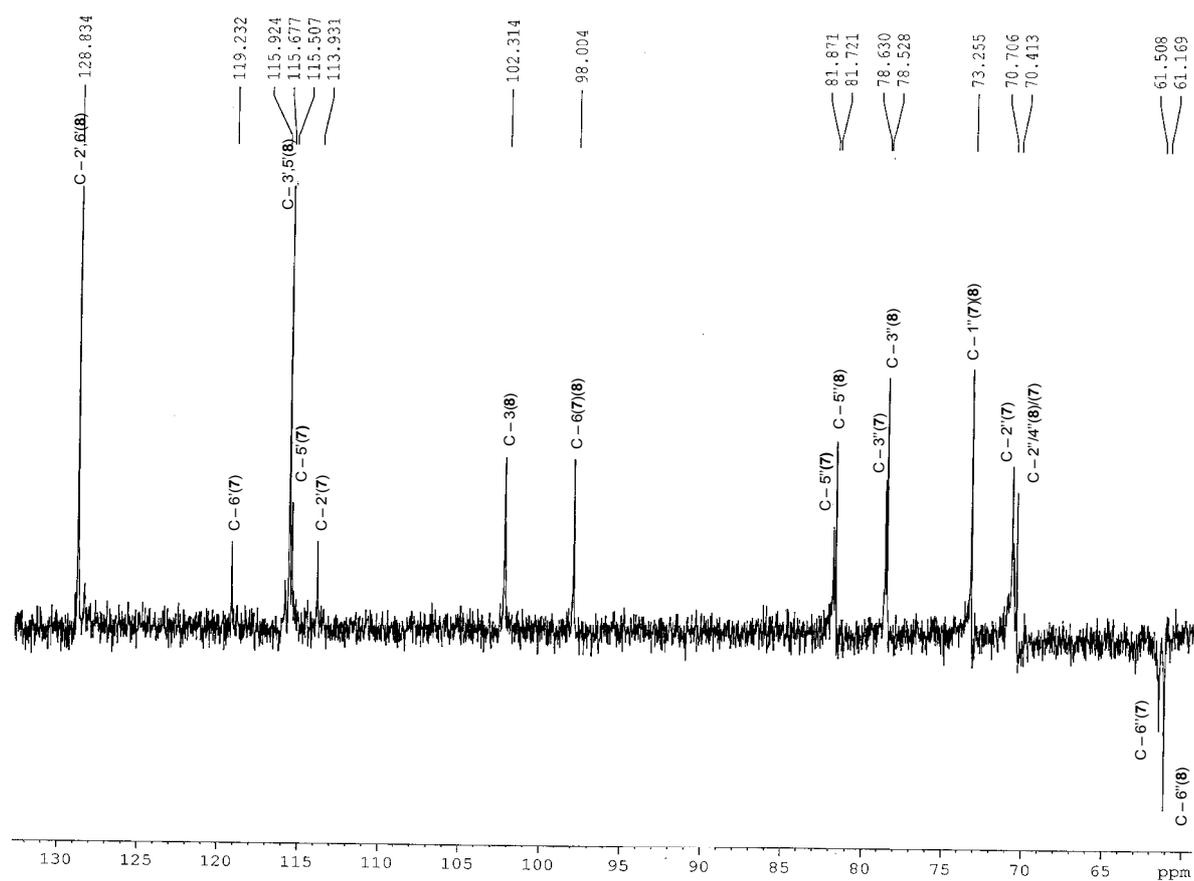
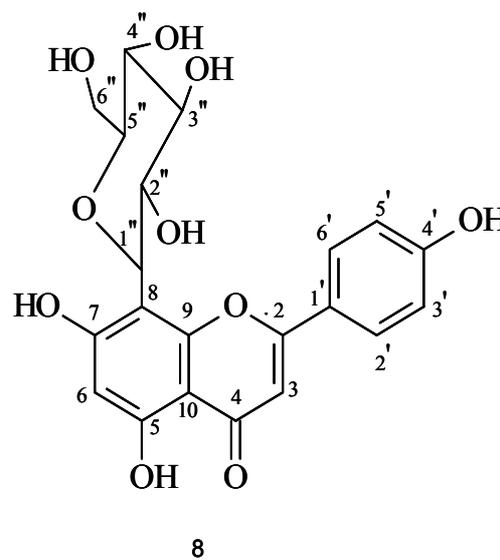
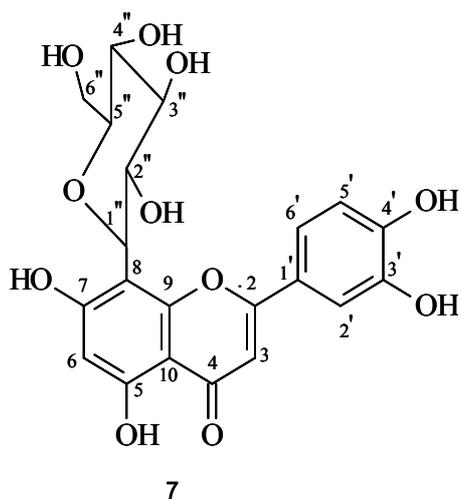


Figura 27: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT (100 MHz) da mistura substância **7** + **8**. em DMSO-d₆

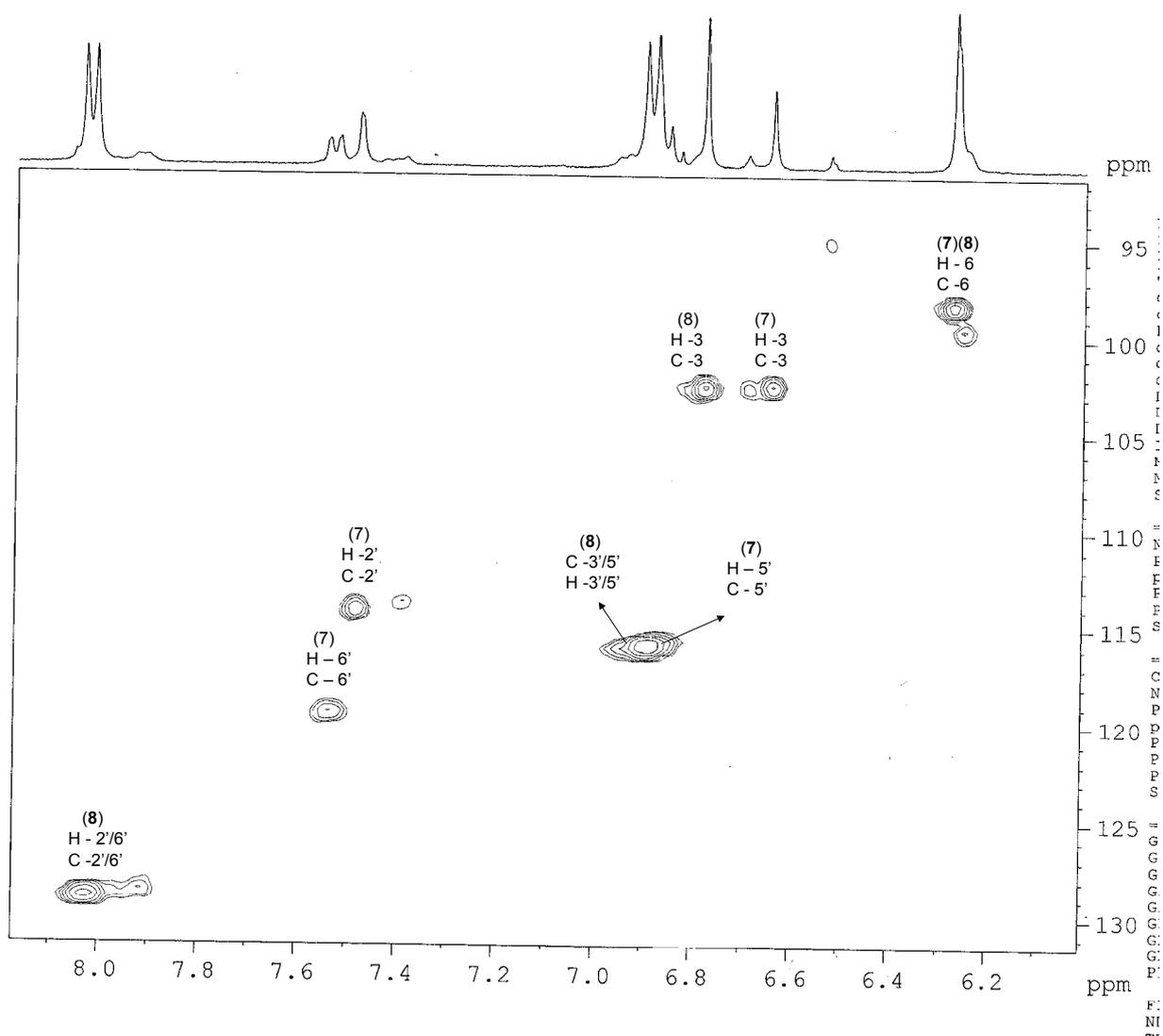


Figura 28: Mapa de contorno HMBC (400/100 MHz DMSO-d₆) na região de C-sp² (95-132 ppm) da mistura das substâncias **7** + **8**.

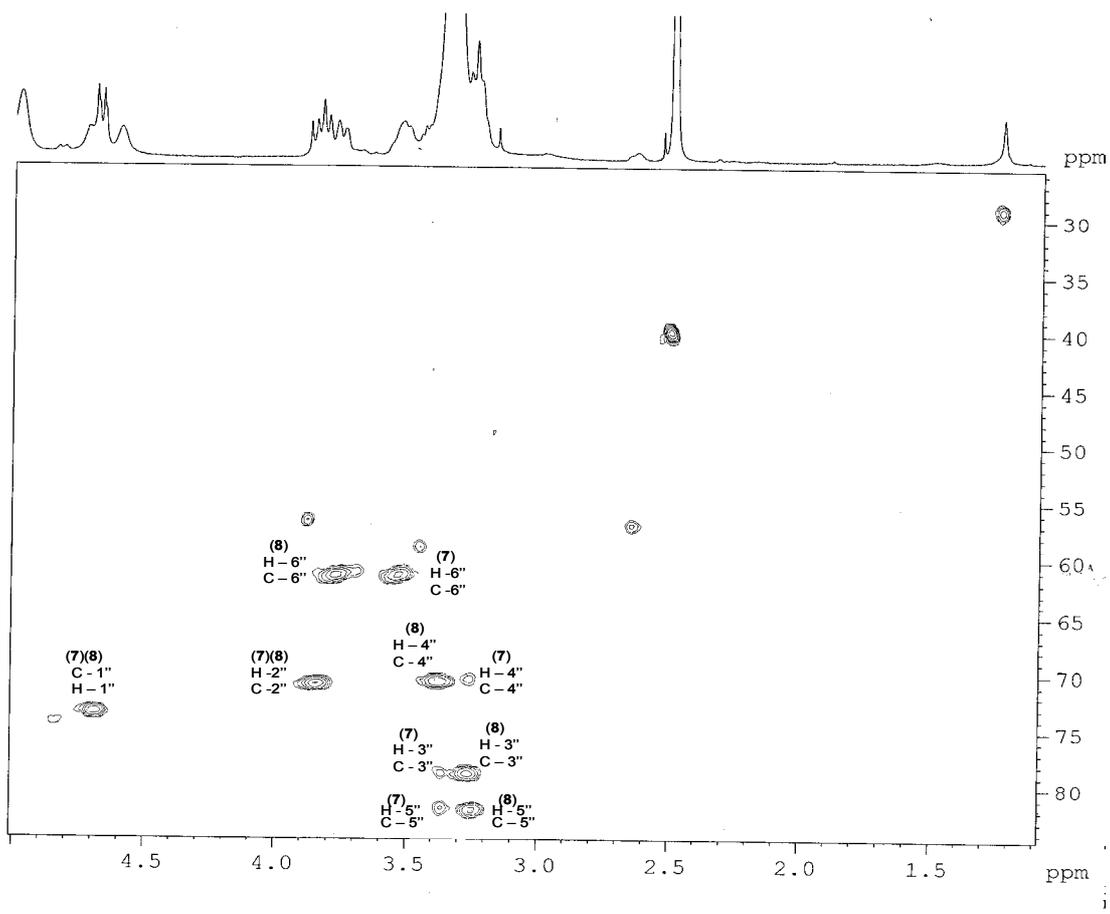
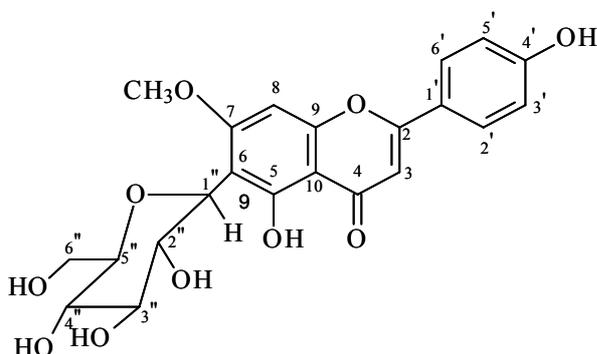


Figura 29: Mapa de contorno de HMQC (400/100 MHz DMSO-d₆) mistura das substâncias **7** + **8** na região de C-sp³ (30 – 85 ppm).

Substância 9 (swertisina)

A análise em CCDA e comparação dos espectros dessa fração com as de **7** e **8** permitiu identificá-la como outro flavonóide C-glicosilado. O espectro de RMN ^1H (**Figura 30, pág-55**) apresentou além dos singletos em δ_{H} 6,81, δ_{H} 6,51, referentes aos hidrogênios H-3 e H-8 respectivamente; os sinais característicos de um sistema AA'BB' [δ_{H} 8,02 (d, $J= 8,5$ Hz, H-2',6'') e δ_{H} 6,89 (d, $J= 8,5$ Hz, H-3',5')]. A presença de dupletos em δ_{H} 4,72 ($J= 10$ Hz) referente a um hidrogênio anomérico H-1'' permitiu surgir uma flavona C-glicosilada. O singletos em δ_{H} 3,86 é representante de um grupo metoxila na molécula. Não se percebeu sinal de hidrogênio quelado conforme em **7** e **8**. Os experimentos de RMN ^1H -NOEDIFF (**Figura 31, pág-56**) permitiu definir as posições do grupo metoxila e do açúcar. Foram feitas irradiações em δ_{H} 3,86 (OMe) e observou-se nOe em δ_{H} 6,51 (H-8), indicando que o grupo metoxila esta no C-7. Irradiação em δ_{H} 6,51 (H-8) gerou nOe na metoxila, confirmando a observação anterior. Irradiando o dupletos do hidrogênio anomérico em δ_{H} 4,72 gerou fraco nOe na metoxila (δ_{H} 3,86) e não gerou nOe nos hidrogênios 3',5', confirmando que o grupo glicosila deve estar no C-6 ao lado das metoxilas. O dupletos na frequência dos H-2',6'', resultante de nOe devido a irradiação no singletos em δ_{H} 6,81 (H-3), confirmou a atribuição dessa frequência para esse hidrogênio.

Estas análises permitiram definir a estrutura de **9** como 5,4'-diidroxí-7-metoxi-6-C-glipiranosil-flavona. A comparação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios com a substância **7** e com valores descritos na literatura (KUMARASAMY *et al.*, 2004) para swertisina isolada de *Alliaria petiolada* (**Tabaela 6, pág-54**) confirma essa estrutura. Essa substância foi isolada pela primeira vez da espécie *Swertia japonica* (KOMATSU *et al.*, 1966).



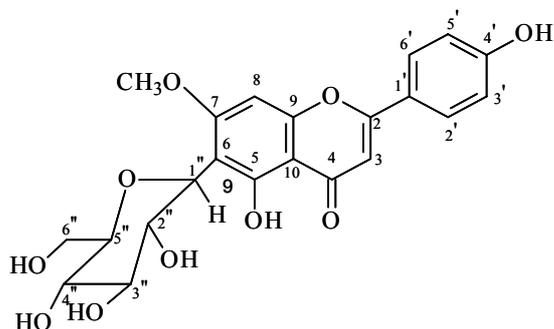


Tabela 6: Dados de RMN ^1H (500MHz) e RMN ^{13}C (125 MHz) da substância **9** em DMSO- d_6 comparado com a literatura D₃COD (KUMARASAMY, et. al, 2004). ^a DMSO- d_6 ; ^bD₃COD

	Substância 9 ^a	Subst. 8 ^a	Literatura ^b
C	δ_{H}	δ_{H}	$\delta_{\text{H}}(\text{D}_3\text{COD})$
2	-	-	
3	6,81(s)	6,78 (s)	6,54
4	-		
5	-		
6	-	<u>6,27 (s)</u>	
7	-	-	
8	<u>6,51</u>	-	6,60
9	-	-	
10	-	-	
1'	-	-	
2',6'	8,02 (d, J= 8,5 Hz)	8,02(d, J= 8,0Hz)	7,78
3',5'	6,89 (d, J= 8,5 Hz)	6,89(d, J=8,0Hz)	6,87
4'	-	-	
1''	4,72 (d, J= 10,0Hz)	4,68(d, J= 10,0Hz)	
2''	3,25(m)	3,82(m)	
3''	3,25(m)	3,25(m)	
4''		3,35(m)	
5''		3,25(m)	
6''		3,78(m)	
OMe	3,86(s)	-	
OH-5	?	13,17(s, OH)	

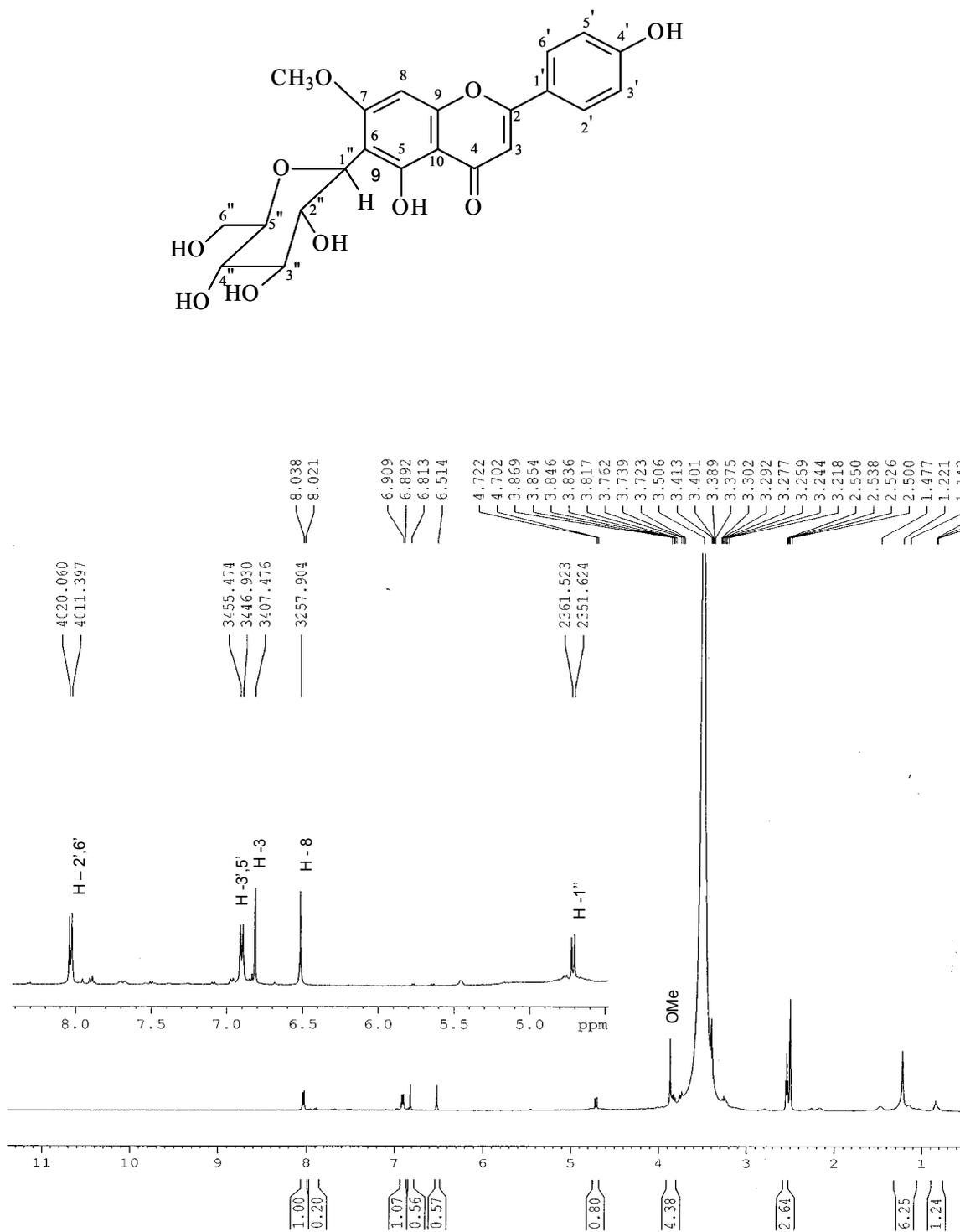


Figura 30: Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da substância 9 em DMSO-d_6

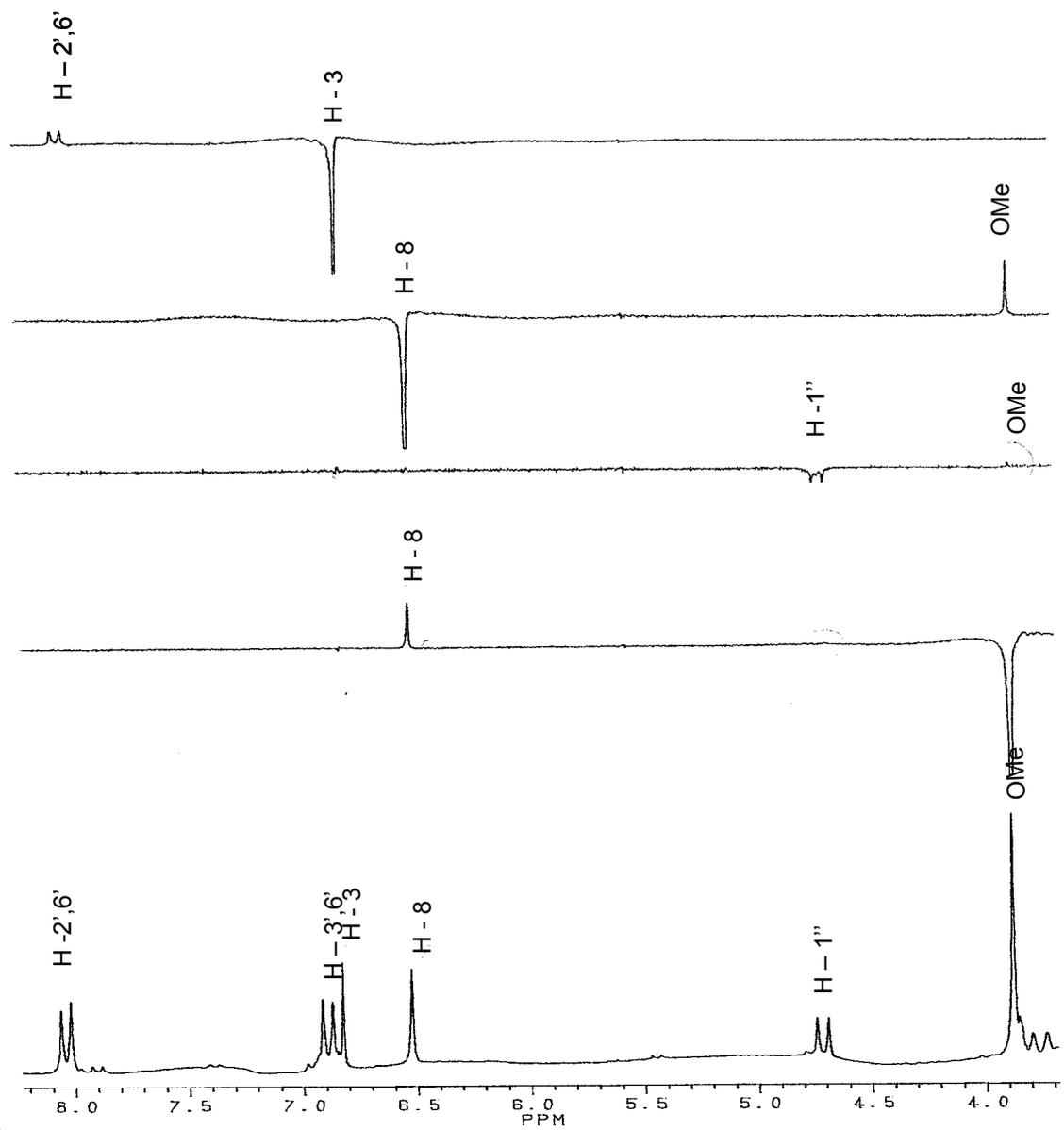
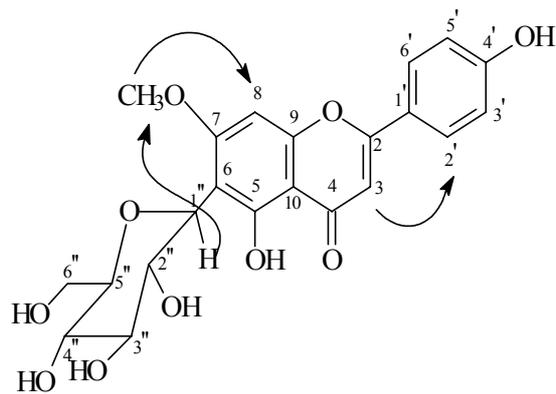
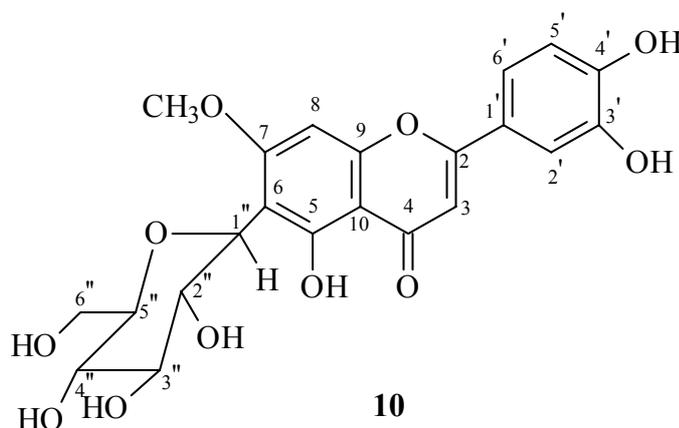


Figura 31: Espectro de RMN-NOEDIFF (200 MHz DMSO-d₆) da substância **9**.

Substancia 10. (swertiajaponina).

As mesmas análise feitas com a fração contendo a substância **9** foram feitas com essa fração Isso conduziu a proposta de um flavonóide. A diferença entre os espectros dessa substância e os de **9** está nas feições dos sinais de um anel aromático. O espectro de RMN ^1H (**Figura 32, pág-59**) apresentou singletes em δ_{H} 6,79 (H-3); δ_{H} 6,59 (H-8) e os sinais característicos de sistema ABC para o anel C de uma flavona: δ_{H} 6,92 (d, $J=8,6$ Hz, H-5'); δ_{H} 7,55 (sl, H-2'); δ_{H} 7,56 (m, H-6'). As mesmas observações feitas para a substância **7** e **8** discutidas anteriormente foram feitas para a substância **10**, chegando-se a conclusão que esta substância é um flavonóide C-glicosilado mas, entretanto, com grupo metoxila adicional. Esses grupos estão representados pelos sinais em δ_{H} 3,88 (s, OMe); δ_{H} 4,76 (d, $J=10\text{Hz}$, H-1'') e multiplete entre 3,0 e 3,7 ppm. Os sinais no espectro de RMN ^{13}C são compatíveis com o grupo glicosila em 6 [$\delta_{\text{CH-8}}$ 94,9; $\delta_{\text{C-6}}$ 108,56] e o valor (56.7) para a metoxila. Os demais valores de deslocamento químico estão de acordo com o anel B diidroxilado e o anel A sustentando a unidade de açúcar, um grupo hidroxila em 5 e a metoxila em 7 (**Tabela 7, pág-58**). Essas deduções foram confirmadas pela análise dos espectros obtidos com experimento de NOEDIFF (**Figura 34, pág-61**). Foram feitas irradiações em δ_{H} 3,88 (OMe) e observou-se sinal de nOe em δ_{H} 6,59 (H-8); indicando que o grupo metoxila está no C-7; irradiação em δ_{H} 6,59 (H-8) gerou nOe na metoxila (δ_{H} 3,88); irradiando no δ_{H} 6,79 (H-3) observou-se nOe em δ_{H} 7,55 (H-2') confirmando não haver substituinte na posição 3 nem na posição 2'. A comparação desses dados com valores da literatura (KUMARASAMY *et. al.*, 2004) confirmam a proposta da 6-C-glicosil-7-metoxi-5,3',4'-triidroxiflavona para **10**. Essa substância foi isolada de *Swertia japonica* e de *Alliaria petiolatados*. É conhecida como swertiajaponina (KOMATSU *et al.*, 1966, KUMARASAMY, *et. al.*, 2004). A **Tabela 7 pág-58**) mostra a completa atribuição dos dados de RMN ^1H e ^{13}C e comparação com os valores divulgados por KUMARASAMY *et. al.* (2004).



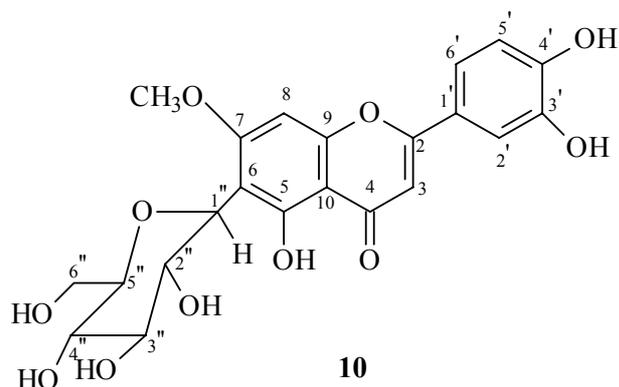


Tabela 7: Dados de RMN ^1H e ^{13}C (200 MHz, 50MHz) (DMSO- d_6) da substância swertiajaponina (**10**) e comparação com valores de deslocamento químico de carbono-13 da literatura (KUMARASAMY, *et. al.*, 2004).

C	Substância 10		Literatura
	δ_c	δ_H	δ_c
2	164,54	-	164,8
3	102,28	6,79 (s)	102,5
4	182,25	-	182,7
5	161,29	-	160,8
6	108,56	-	108,4
7	163,30	-	163,4
8	94,94	6,59 (s)	90,0
9	155,60	-	157,6
10	104,41	-	104,0
1'	121,69	-	122,1
2'	113,95	7,55 (s)	112,9
3'	145,90	-	145,2
4'	150,01	-	149,0
5'	115,61	6,92 (d, J= 8,6 Hz)	115,6
6'	119,51	7,56 (m)	119,1
1''	73,12	4,76 (d, J= 10 Hz)	74,0
2''	70,65	3,50(m)	71,4
3''	78,73	3,50(m)	78,9
4''	70,65	3,50(m)	70,6
5''	82,09	3,50(m)	81,4
6''	61,60	3,50(m)	61,7
OMe	56,58	3,88 (s)	56,0

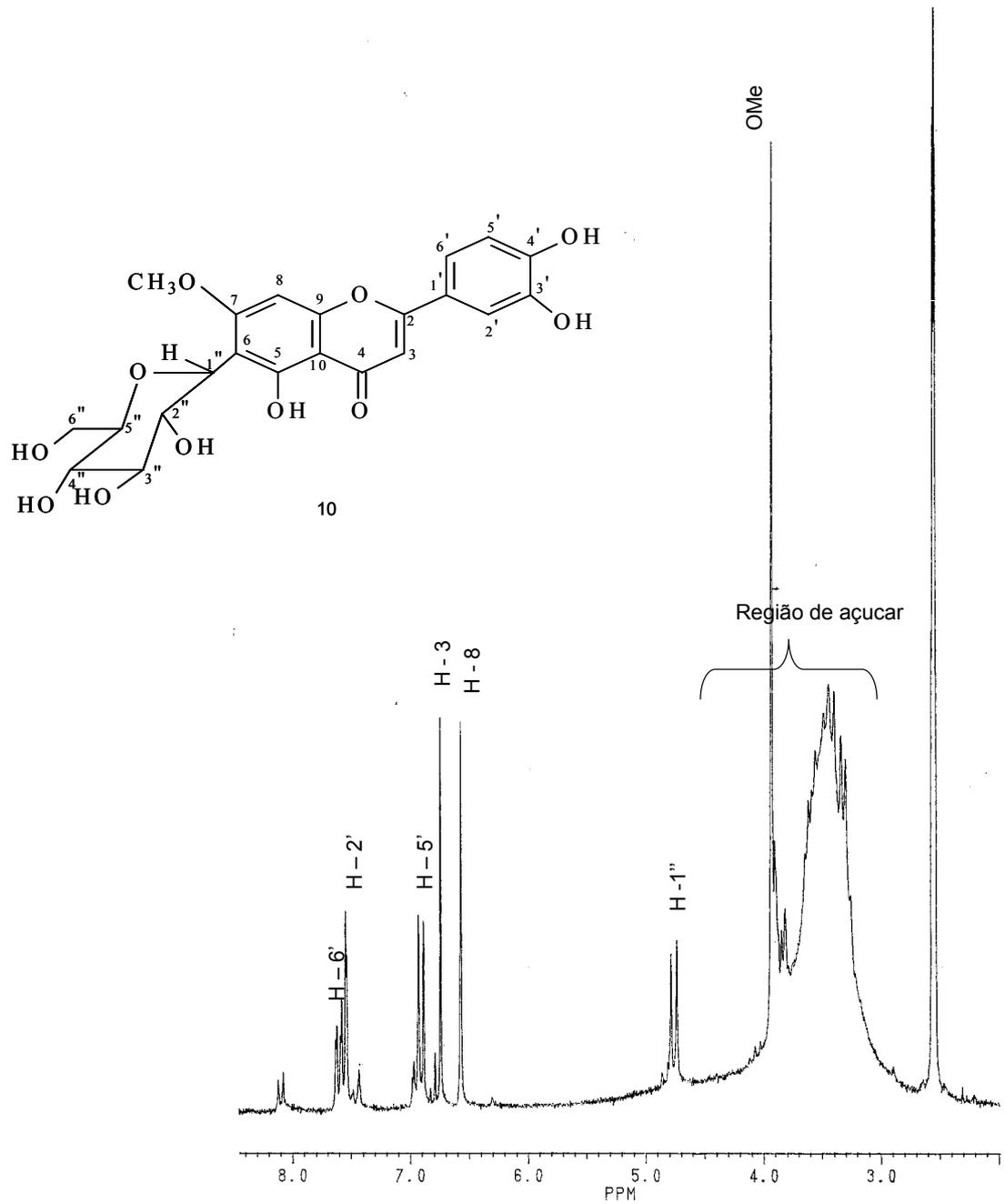


Figura 32: Espectro de RMN ^1H (200MHz, DMSO-d_6) substância swertiajaponina (10).

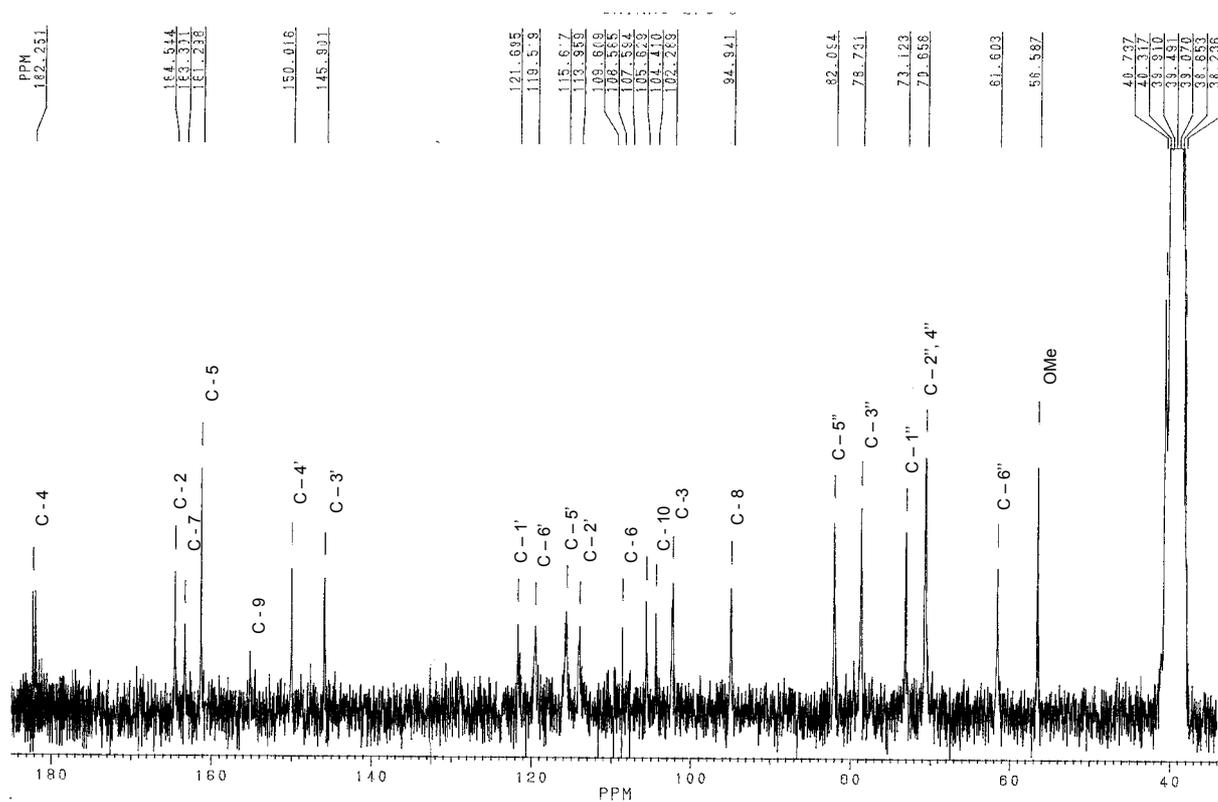
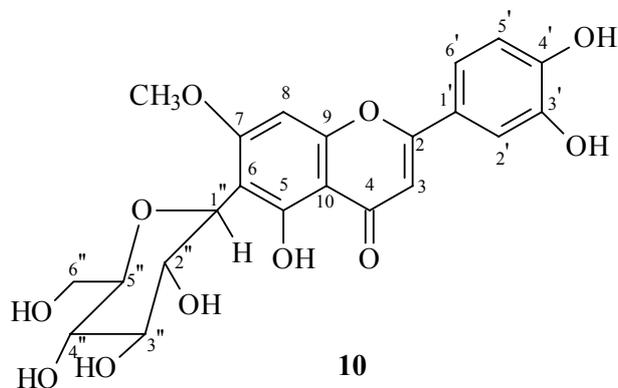


Figura 33: Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) substância swertiajaponina (10).

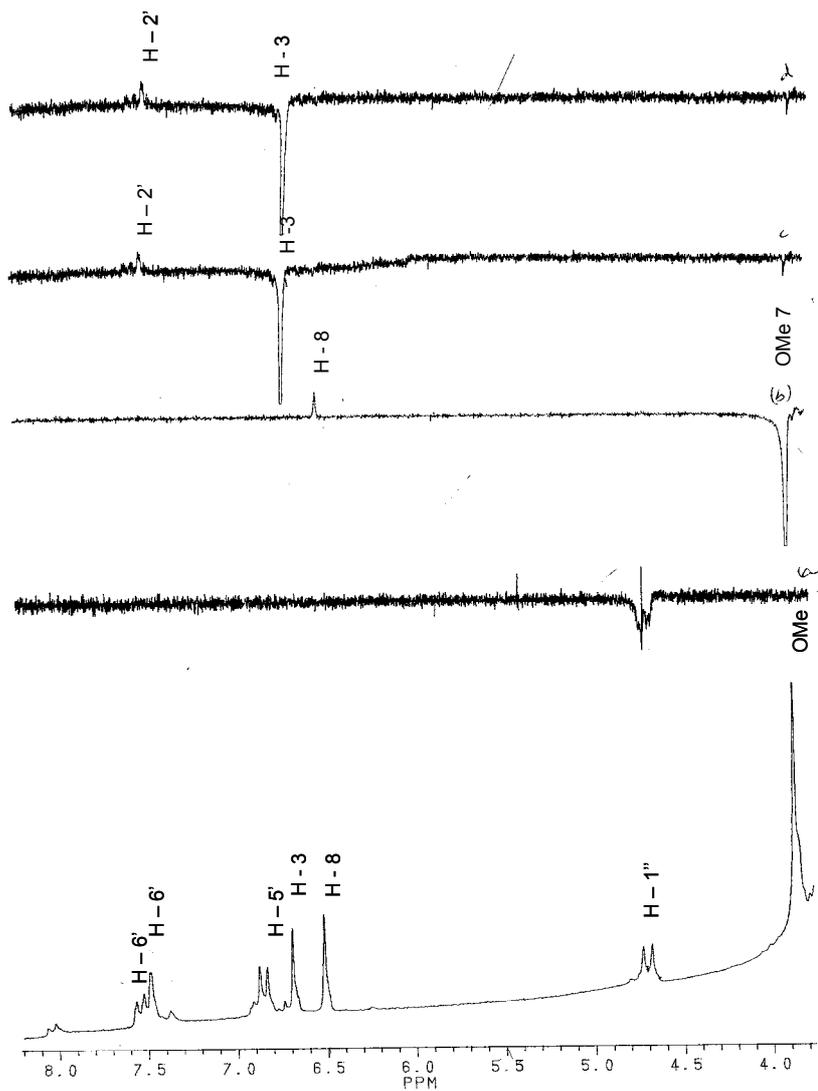
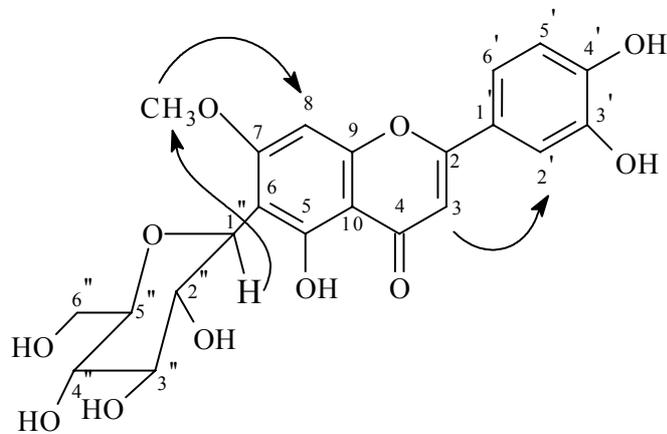
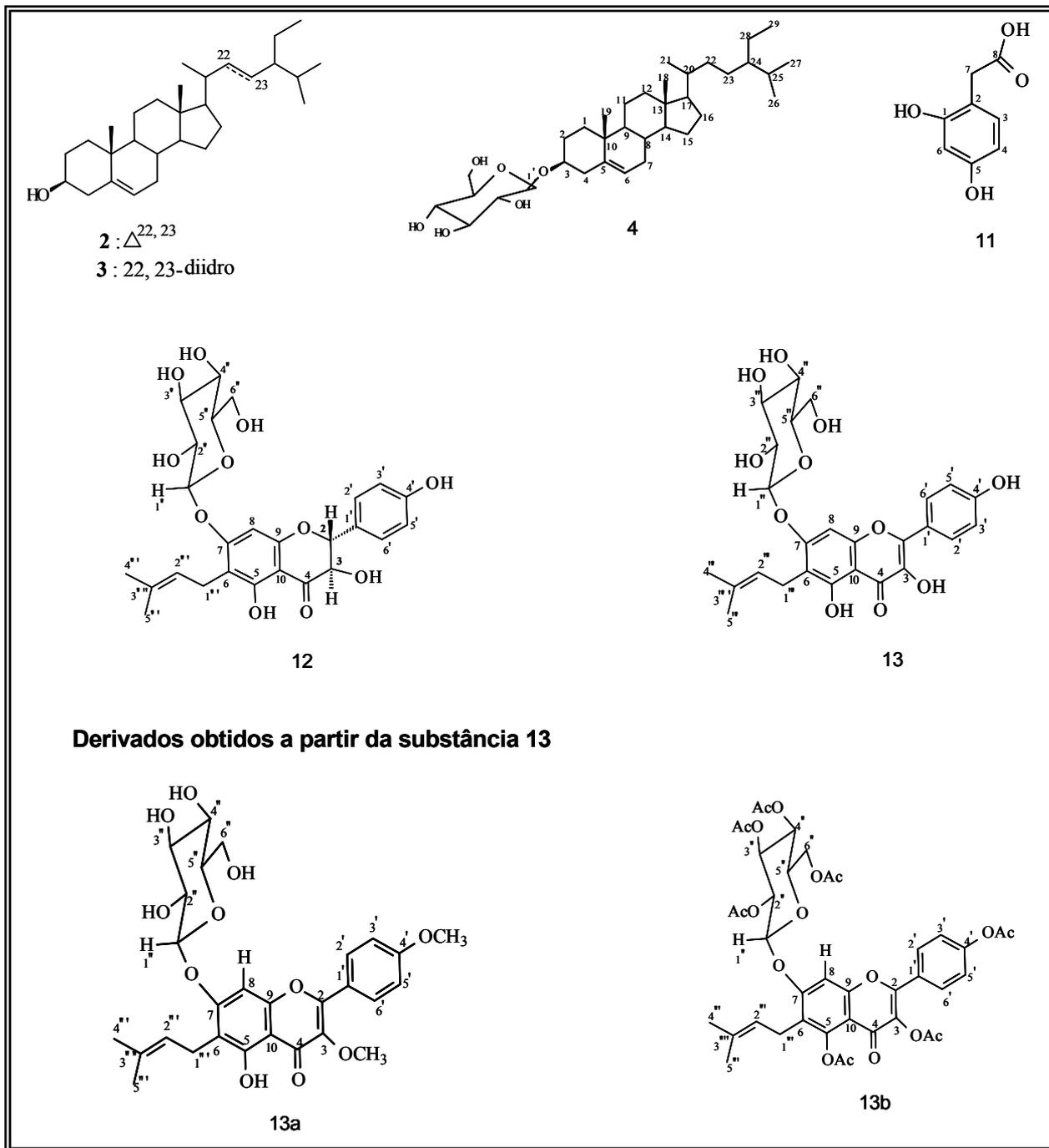


Figura 34 : Espectro de RMN-NOEDIFF (200 MHz) da swertiajaponina 10.



Quadro 2 - Constituintes químicos isolados de caule de *Ouratea hexasperma* St Hil

Identificação dos constituintes isolados do caule de *Ouratea hexasperma* (St. Hil).

Substância 11 (ácido 2,4-diidroxifenil acético).

O espectro no IV (**Figura 37 Pág-64**) mostra bandas de absorção características de ácidos: 3.437 cm^{-1} (estiramento OH); 1.695 cm^{-1} (estiramento de C=O) 1.293 cm^{-1} (estiramento C-O).

O espectro de RMN ^1H (**Figura 36 Pág-64**) mostra sinais de hidrogênios em anel aromático em δ_{H} 6,85(d, J=8,0 Hz, H-6); 6,28 (d, J= 2,4 Hz H-3) 6,20 (dd, J= 8,0 e 2,4 Hz, H-5); além de um singlete em 3,4 (CH₂-7). Os dados detectados no espectro de carbono desacoplado de RMN ^{13}C (**Figura.37, Pág-64.**) estão de acordo com a proposta deduzida com a análise acima (**Tabela 8, pág-61**). A inserção dessa amostra no cromatógrafo a gás acoplado com espectrômetro de massas forneceu o pico com TR 2,88 min. O espectro de massas apresentou picos cujos valores registrados são compatíveis com a estrutura do ácido 1,5 diidroxifenilacetico. (**Figura 38, 39 Pag-65**)

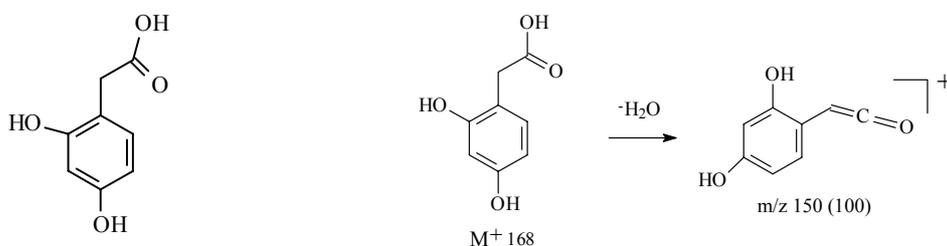


Tabela 8: Dados de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (BBD, 50 MHz), em CD₃OD.

C	δ_{C}	δ_{H}
1	115,4	-
2	156,7	-
3	104,1	6,28 (d, J= 2,4
4	158,9	-
5	104,9	6,20(dd, J= 8,0 e 2,4 Hz)
6	130,2	6,85(d, J= 8,0 Hz))
7	43,7	3,4(s, 2H)
8	176,9	-

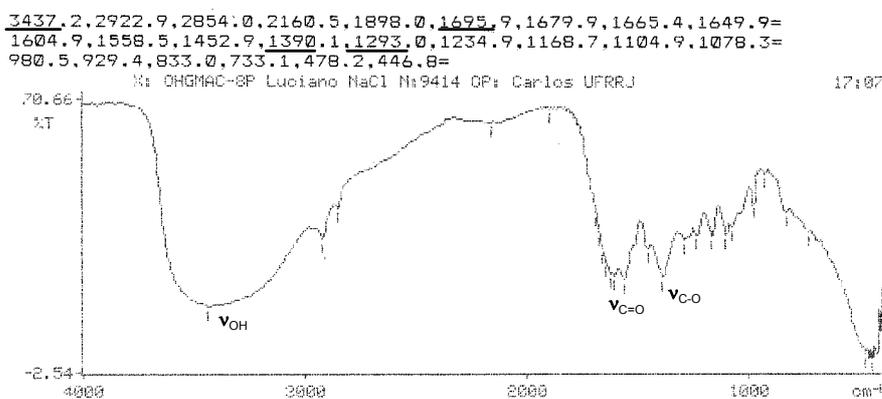


Figura 35: Espectro de IV da substância ácido 1,5-diidroxifenil acético (11).

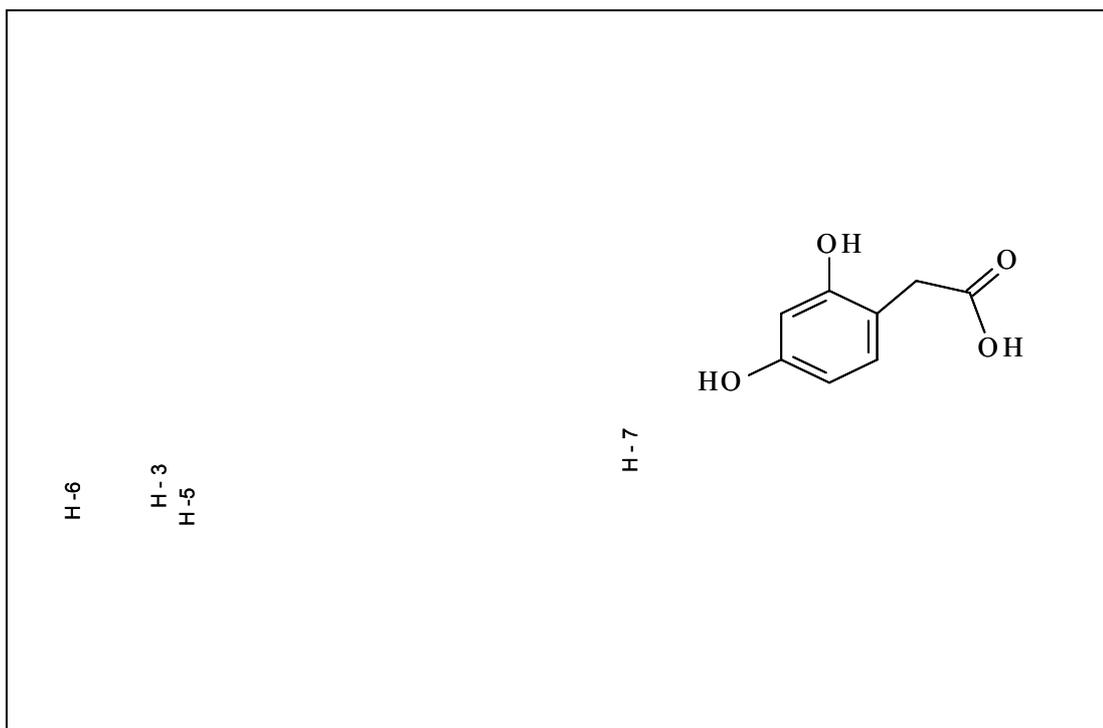


Figura 36: Espectro de RMN ^1H (200 MHz CD_3OD) da substância ácido 2,4-diidroxifenil acético (**11**).

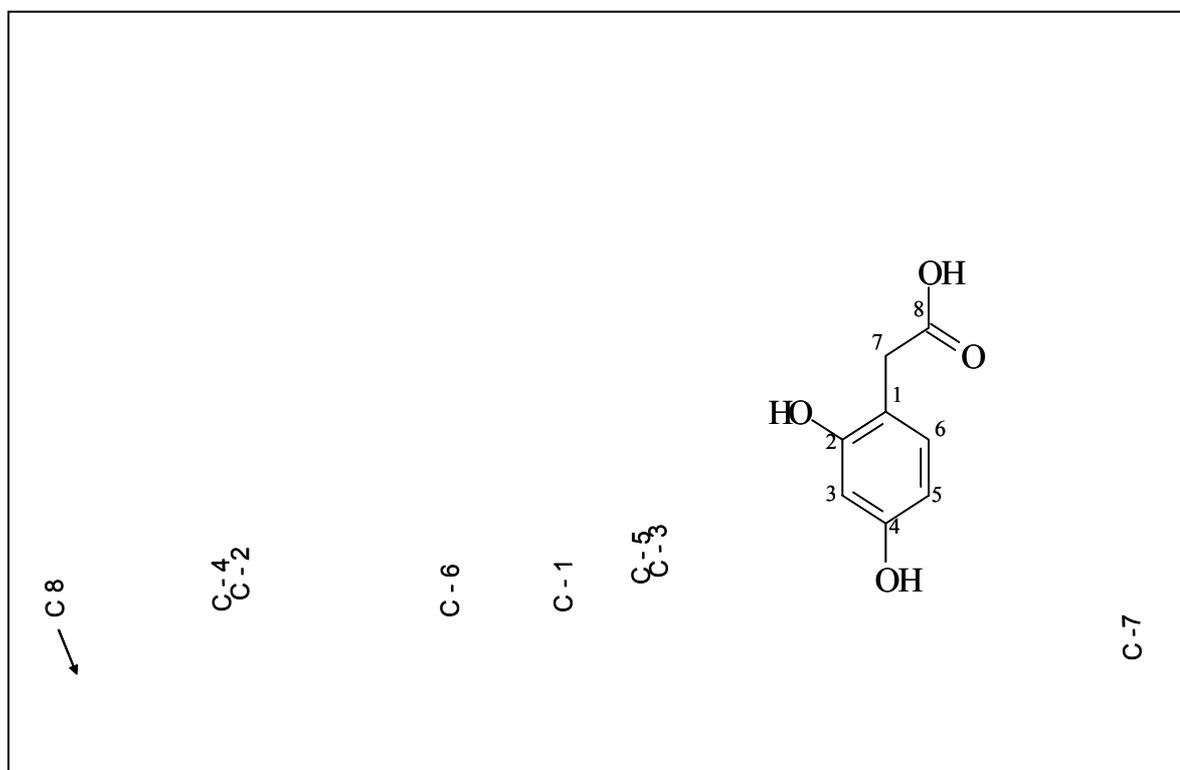


Figura 37: Espectro de RMN ^{13}C (BBD 50MHz DMSO-d_6 .) substância **11**.

Print Date: 02 Aug 2006 14:42:37

Sample Report for OHGMAC - 8 ...SMS

Data File: c:\... ohgmac - 8 Instrument ID: Saturn GC/MS
Acquisition Date: 8/2/06 2:11 PM Operator: Frances
Method: C:\Cg-ms (ROTINA)\Metodos\Marco.mth

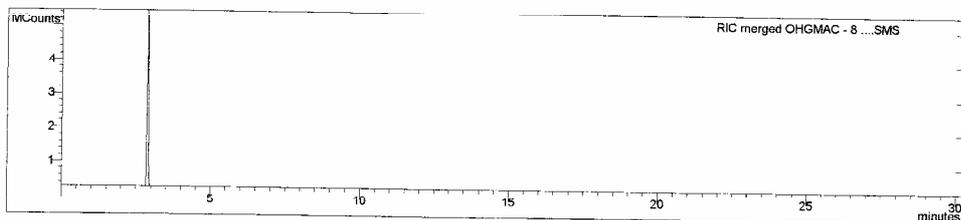


Figura 38: Cromatograma da substância 11

Print Date: 02 Aug 2006 14:48:12

Scan 240 from c:\cg-ms (rotina)\data\mario\luciano\OHGMAC - 8 ...SMS

Entry 55408 from MAINLIB NIST Library

Purity = 531 Fit = 659 RFit = 558 Average = 582 Ion Range: 12 - 600

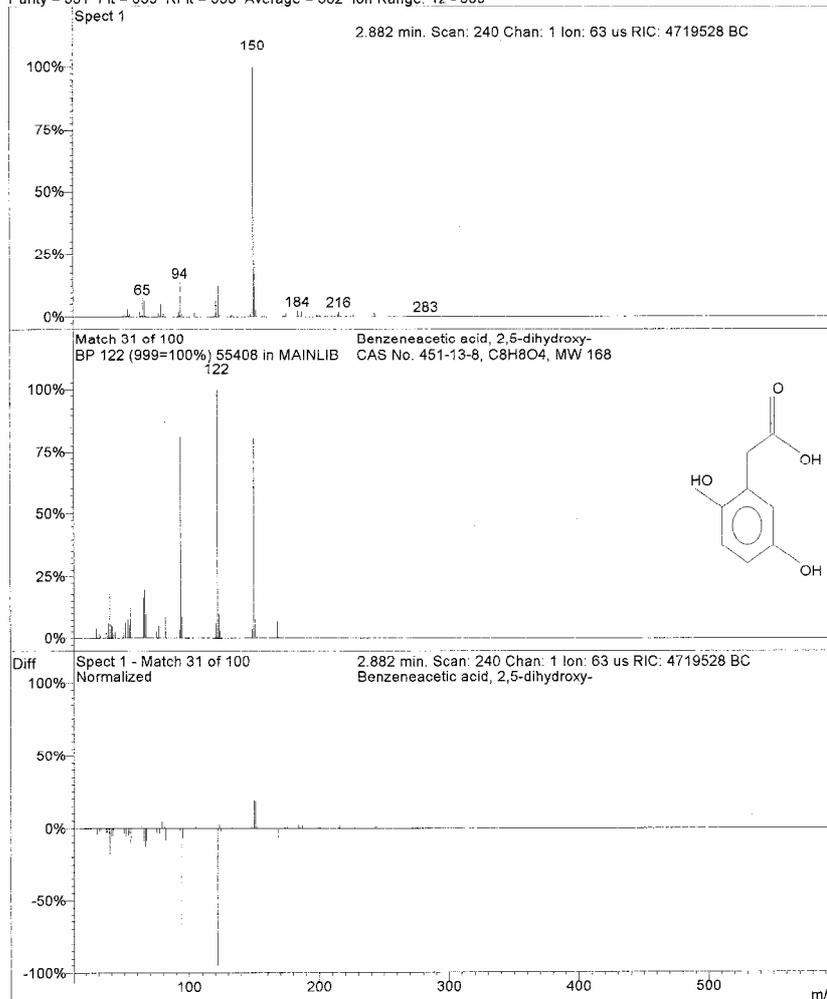


Figura 39 Espectro de massas da substância 11. [Coluna CPSIL8CB (30m x 0,25 x 0,25mm), Temperatura: 180C/1min-10C/min-290/20min. Ionização: EI (70eV)].

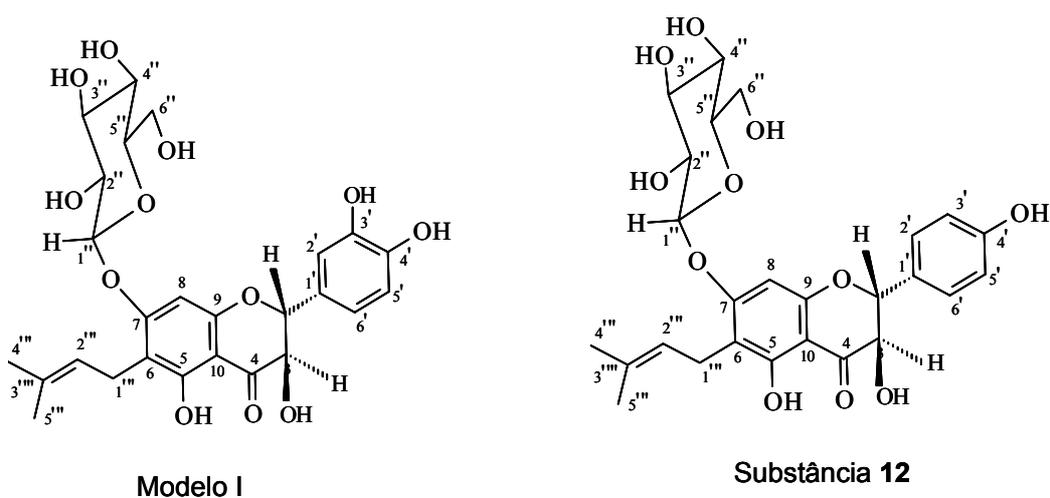
Substância 12 (3,4',5-triidroxi-6- γ,γ dimetil-alil-7-O- β -D-glicosil-flavanona)

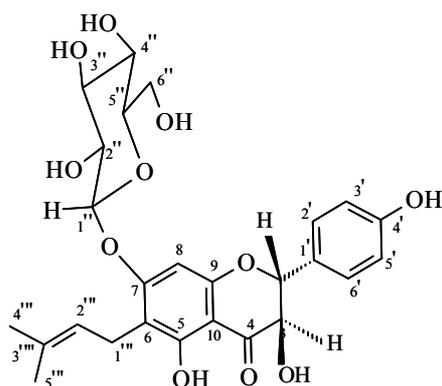
O espectro de RMN ^1H de **12** (Figura 40 Pág.71) apresenta sinais de hidrogênios de anel aromático *para* substituído δ_{H} 7,30 (d, 8,0 Hz, 2H); 6,79 (d, 8,0 Hz, 2H) que podem ser atribuídos a hidrogênios do anel B do flavonoíde. O sinal em δ_{H} 6,22 (s, 1H) representa um hidrogênio do anel A. Além dos sinais múltiplos em 5,2-4,9 e 4,7-4,5 e 3,5-3,0 aparecem dois sinais simples em 1,61 e 1,75 compatíveis com grupos metilas de unidade prenila. Estes dados permitiram propor a presença de uma unidade de açúcar e um grupo prenila na molécula. Esta dedução foi confirmada pela análise dos espectros de RMN ^{13}C (BBD e DEPT (Figura 41 pág-72) que apresentou dois sinais de CH_3 (25,7 e 17,18) dois sinais de CH_2 (21,03 e 60,74) além de 11 sinais de CH. Esses dados são compatíveis com os carbonos metínicos sp^2 do flavonoíde [94,15, (C-8); 129,7, (C-2', 6'); 115,11, (C-3', 5'); com os da prenila [122,55, (C-2''); 21,03 (C-1''); 25,7 e 17,68 (C-4''' e 5''')]. Os demais sinais de carbonos hidrogenados 7 CH e 1 CH_2 pode ser representantes de uma glicose [100,5 (C-1''); 77,19 (C-5''); 76,7 (C-3''); 73,4 (C-2''); 69,1 (C-4'') e 60,7 (CH_2 -6'')] e de dois carbonos sp^3 do flavonoíde [83,2 (C-2) e 71,85 (C-3)]. A análise do espectro de correlação heteronuclear a uma ligação $^1\text{J}_{\text{CH}}$ (Figura 42 pág-73) permitiu confirmar as freqüências de absorção dos hidrogênios ligados aos respectivos carbonos das unidades da molécula (Tabela 9 pag-68). O duplete em 5,84 pode ser atribuído ao OH ligado a carbono 3 do flavononol uma vez que não apareceu sinal de acoplamento com $^1\text{J}_{\text{CH}}$. Os sinais de carbonos quaternários (Figura.41 Pág-72) com δ_{C} 199,7 (C=O); 163,2; 160,6; 159,6; 157,96; 130,67; 127,6; 109,87; 101,83 possui valores compatíveis com carbonos quaternários das unidades propostas (Tabela 9 pág-68) O valor CH 94,15 é compatível com o valor do CH-8 do anel A de flavonoides e o δ_{C} 109,87 pode ser atribuído ao C-6 sustentando o grupo prenila. Se esse grupo estivesse ligado no C-8 deveria aparecer um δ_{CH} em torno de 98 ppm. Esta dedução foi também confirmada pelos sinais de interação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ no mapa de contorno (COLOC, $^{2,3}\text{J}_{\text{CH}}$). Este espectro apresenta sinais entre C-9 (160,6) com o sinal do H-8 (6,22) e entre C-6 (109,87) e H-1''' (3,31, m) e entre o carbono 2''' com os hidrogenios das metilas (H-4''' e H-5'''). Os sinais de $^3\text{J}_{\text{CH}}$ com os carbonos metílicos 4''' e 5''' permitiram confirmar a freqüência de absorção dos H-2''' e dos carbonos metínicos 2' e 6' com os sinais 5,11 permitiram confirmar essa freqüência para o H-2. Dentro do multiplete entre 5,2-4,9 aparece um sinal que pode ser interpretado como duplete (11 Hz) esse pode ser usado para informar a freqüência para H-2 trans ao H-3. Outra justificativa para essa atribuição é o $^1\text{J}_{\text{CH}}$ com os respectivos carbonos (Tabela 9 pág-68, Figura 42 Pág-73). A comparação dos espectros de **12** com os de **13** serviu para confirmar as atribuições para HC-2, HC-3, e HO-3 os sinais desses núcleos não aparecem em **13**.

A análise de uma fração contendo as substâncias **12+13** (sendo **12** em maior quantidade) usando experimento 1D para detectar NOE (NOEDIFF, Figura 45 pág-76) permitiu tirar algumas conclusões que podem ser utilizadas como confirmação adicional para a proposta estrutural de **12**, a irradiação na freqüência δ_{H} 4,92 do hidrogênio ligado ao carbono (1'', δ_{CH} : 100,15) gerou NOE no H-8 (6,22); (Figura 45-e) irradiação na freqüência de H-2''' e H-2 (\cong 5,1) gerou fraco NOE nas metilas e não gerou NOE no H-3 (Figura 45-c) os demais experimentos não foram conclusivos. Estas análises e comparação com dos dados de modelo da literatura (Tabela 10 pag-69) permitiram propor para **12** a estrutura da 3,4',5-triidroxi-6-prenil-7-O- β -D-glicosil-flavanona. Após essa proposta registraram-se espectros de massas desse material com sistema de ionização eletrônica usando H_2O como dispersante (Figuras 46-a, 46-b, 46-c e 46-d págs-77 e 78). O espectro de massas obtido na primeira ionização (Fig 46-a pag-77) apresentou como principais picos m/z 607, 553, 515, 399, 355 e 255. No esquema 1 pág-70 são propostas partículas responsáveis pelos respectivos íons negativos detectados. Os espectros obtidos da 2ª Ionização dos íons detectados em 46-a

(Figura 46-b, 46-c e 46-d pág-77,78) forneceu picos que permitiu deduzir que os íons com m/z 517 e 515 são responsáveis pelos picos em m/z 355 e 327 (Figura 46-c e 46-d pág-78). O pico 553 é de 517 com duas moléculas de H_2O (Fig 45-b pág-77) o 517 produz o 515 e o pico em m/z 255 é formado pelo fragmento 219 com uma molécula de H_2O (Fig 46-c pág-78) uma vez que este não aparece nos demais espectros. Esses fragmentos confirmam a estrutura proposta. Além dessa substância ser nova na literatura esse é o primeiro registro de flavonoídes prenilados em *Ouratea*.

O modelo I utilizado corresponde a uma substância que difere de **12** apenas na hidroxila adicional em 3'. Essa substância foi isolada da espécie *Ochna integerrima* (Ochnaceae) sendo o único exemplo de flavonoíde prenilado nessa família (LIKHITWITAYAWUID, *et al.*, 2001).



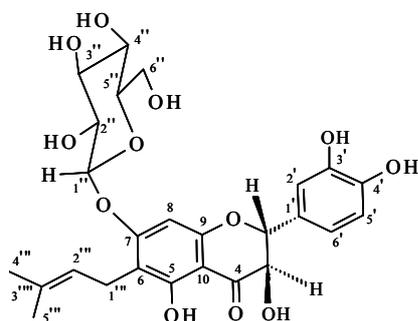


12

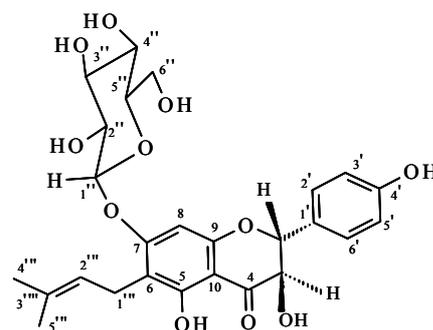
Tabela 9: Dados de RMN* (δ , J Hz, DMSO- d_6) ^1H (200 MHz) ^{13}C (50 MHz) da substância 12.

$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HETCOR			$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ COLOC		$^1\text{H} \times ^1\text{H}$ Cosy	NOE ^b
C	δ_c	$^1J_{\text{CH}}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$		
2	83,2	5,11(d,J= 11,0Hz)			H-3	
3	71,85	4,55(m)			H-2, HO-3	H-2
4	199,70	-		H-2		
5	159,59					
OH	-	12,04 (s)			H-3	
6	109,87	-	H-1''''	H-8, H-2''''		
7	163,24	-	H-8			
8	94,15	6,22 (s)				
9	160,63	-	H-8			
10	101,83	-		H-8		
1'	127,61	-		H-3', 5'		
2'	129,71	7,30(d,J= 8,0Hz)		H-2	H-6'	
3'	115,11	6,79(d,J= 8,0Hz)			H-5'	
4'	157,96	-	H-3', 5'	H-2', 6'		
5'	115,11	6,79(d,J= 8,0Hz)			H-3'	
6'	129,71	7,30(d,J= 8,0Hz)		H-2	H-2'	
1''	100,15	4,92(d,J= 8,0Hz)			H-2''	H-8, H-2''
2''	73,43	3,29 (m)			H-1''	
3''	76,70	3,29 (m)				
4''	69,60	3,18 (m)				
5''	77,19	3,35 (m)				
6''	60,74	3,50 (m)				
1'''	21,03	3,31 e 3,14 (m)			1''''(a)(b) / 2''''	
2'''	122,55	5,17(dd,)		H-4'''' , 5''''	1''''(a) (b)	
3'''	130,67	-	H-5'''' H-4''''			
4'''	25,70	1,61 (s)		H-5'''' , H-2''''		
5'''	17,68	1,75 (s)		H-4'''' , H-2''''		
HO-3	-	5,34(d)				

*Espectro 2D de correlação homonuclear ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY), heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY) e espectros de RMN ^{13}C (BBD e DEPT) e NOEDIFF^b foram usados nas atribuições desses valores.



Modelo I

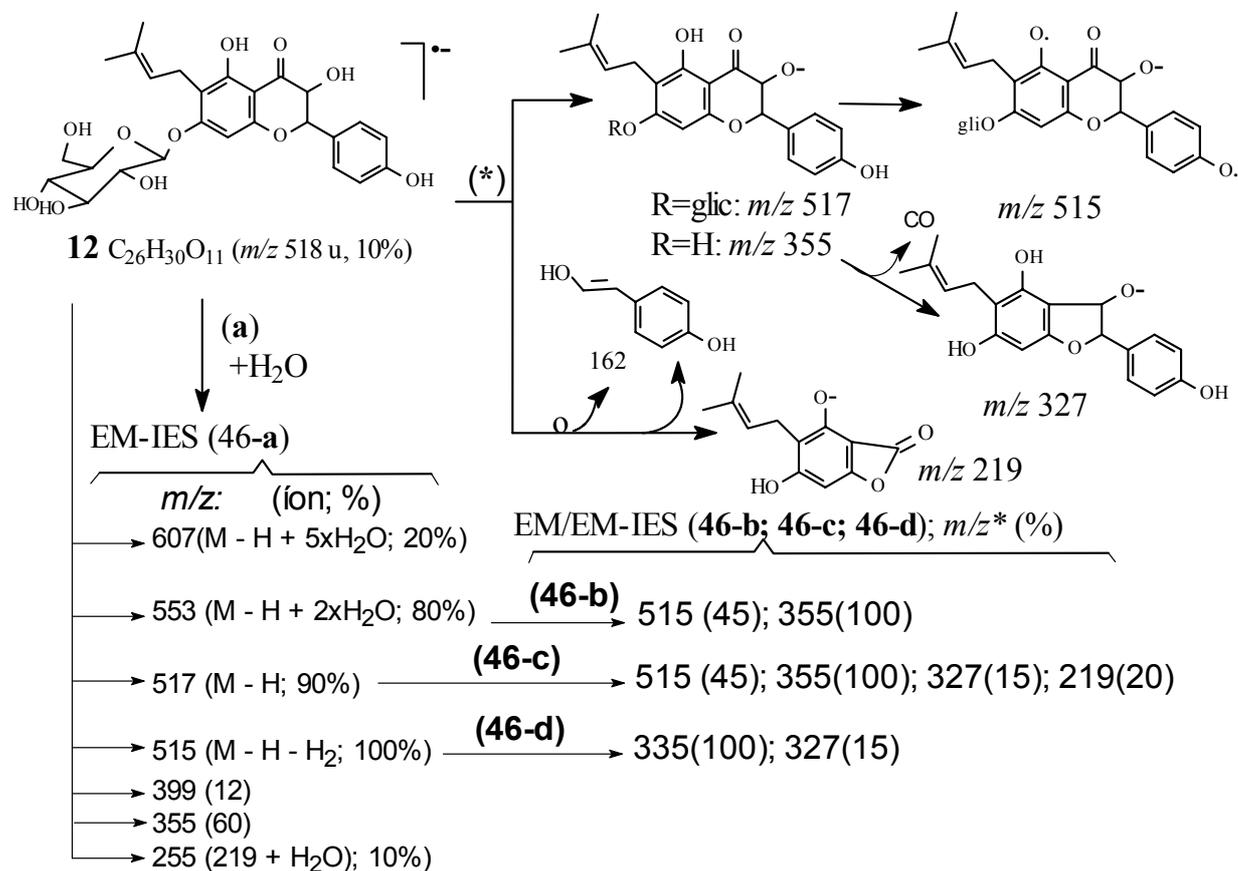


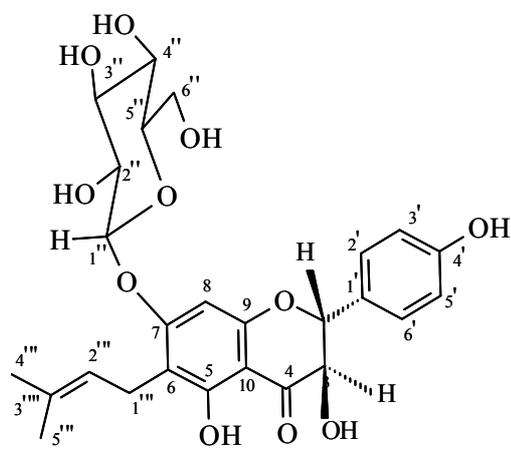
Substância 12

Tabela 10: Dados de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, DMSO- d_6) da substância 3,4',5-triidroxi-6-prenil-7-O- β -D-glicosil-flavanona (12) com parados com dados de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, DMSO- d_6) do modelo da literatura.

Substancia 12			Modelo I (LIKHWITAYAWUID,2001)	
C	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H
2	83,2	5,11(d,J= 11,0Hz)	83,3	5,01 (d,11,0 Hz)
3	71,85	4,55(m)	71,8	4,55 (d, 11,0 Hz)
4	199,70	-	199,0	-
5	159,59		159,5	-
OH	-	12,04 (s)		-
6	109,87	-	109,7	-
7	163,24	-	163,1	-
8	94,15	6,22 (s)	94,0	6,22 (s)
9	160,63	-	160,5	
10	101,83	-	101,7	
1'	127,61	-	128,0	
2'	129,71	7,30(d,J= 8,0Hz)	115,4	6,88 (sl)
3'	115,11	6,79(d,J= 8,0Hz)	145,0	
4'	157,96	-	145,9	
5'	115,11	6,79(d,J= 8,0Hz)	115,2	6,74 (sl)
6'	129,71	7,30(d,J= 8,0Hz)	119,5	6,74 (sl)
1''	100,15	4,92(d,J= 8,0Hz)	100,1	4,91 (d, 7,6 Hz)
2''	73,43	3,29 (m)	73,3	3,27 (m)
3''	76,70	3,29 (m)	76,6	3,27 (m)
4''	69,60	3,18 (m)	69,6	3,14 (m)
5''	77,19	3,35 (m)	77,1	3,40 (m)
6''	60,74	3,50 (m)	60,6	3,43 (m) 36,5 (dd 11,3; 1,8 Hz)
1'''	21,03	3,31 e 3,14 (m)	20,9	3,38 (m)
2'''	122,55	5,17(dd,)	122,5	5,17 (dd, 7,0; 7,0 Hz)
3'''	130,67	-	130,5	-
4'''	25,70	1,61 (s)	25,6	1,61 (s)
5'''	17,68	1,75 (s)	17,8	1,71 (s)

Esquema 1. Proposta de fragmentação e constituição dos íons compatíveis com os valores dos picos detectados nos espectros de massas de **12** (figuras: **46-a**; **46-b**; **46-c** e **46-d**).





12

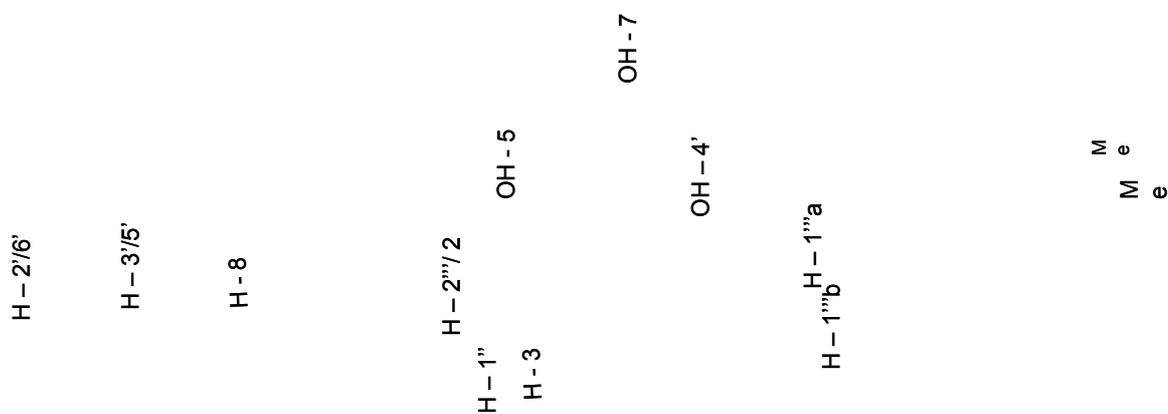
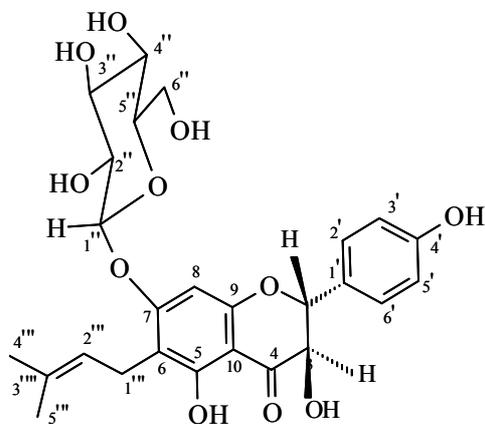


Figura 40: Espectro de RMN ¹H (200 MHz) DMSO-d₆. (Região 8,0-12 ppm é apresentada no centro da Figura).



12

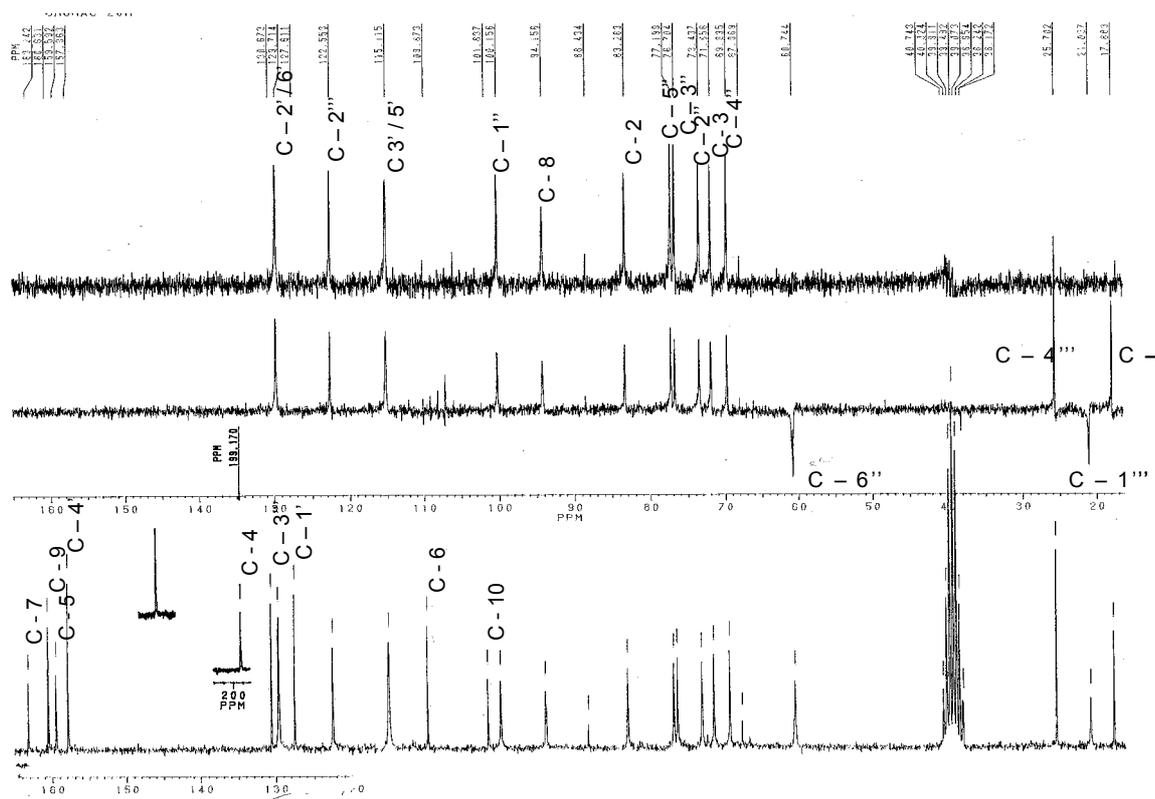
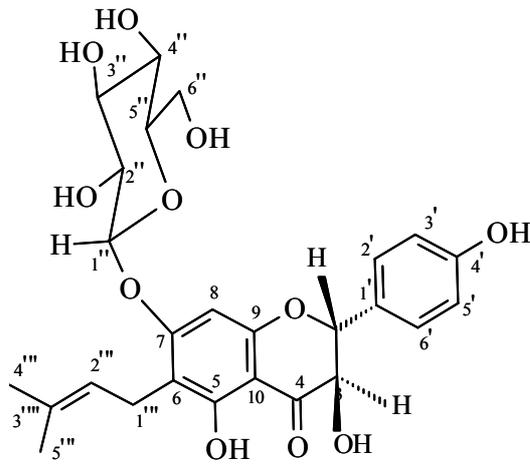


Figura 41: Espectro de RMN ^{13}C (BBD, 50MHz) DEPT $\theta = 135$, DMSO- d_6 da substância 3,4',5-triidroxi-6-prenil-7-O- β -D-glicosil-flavanona (12)



12

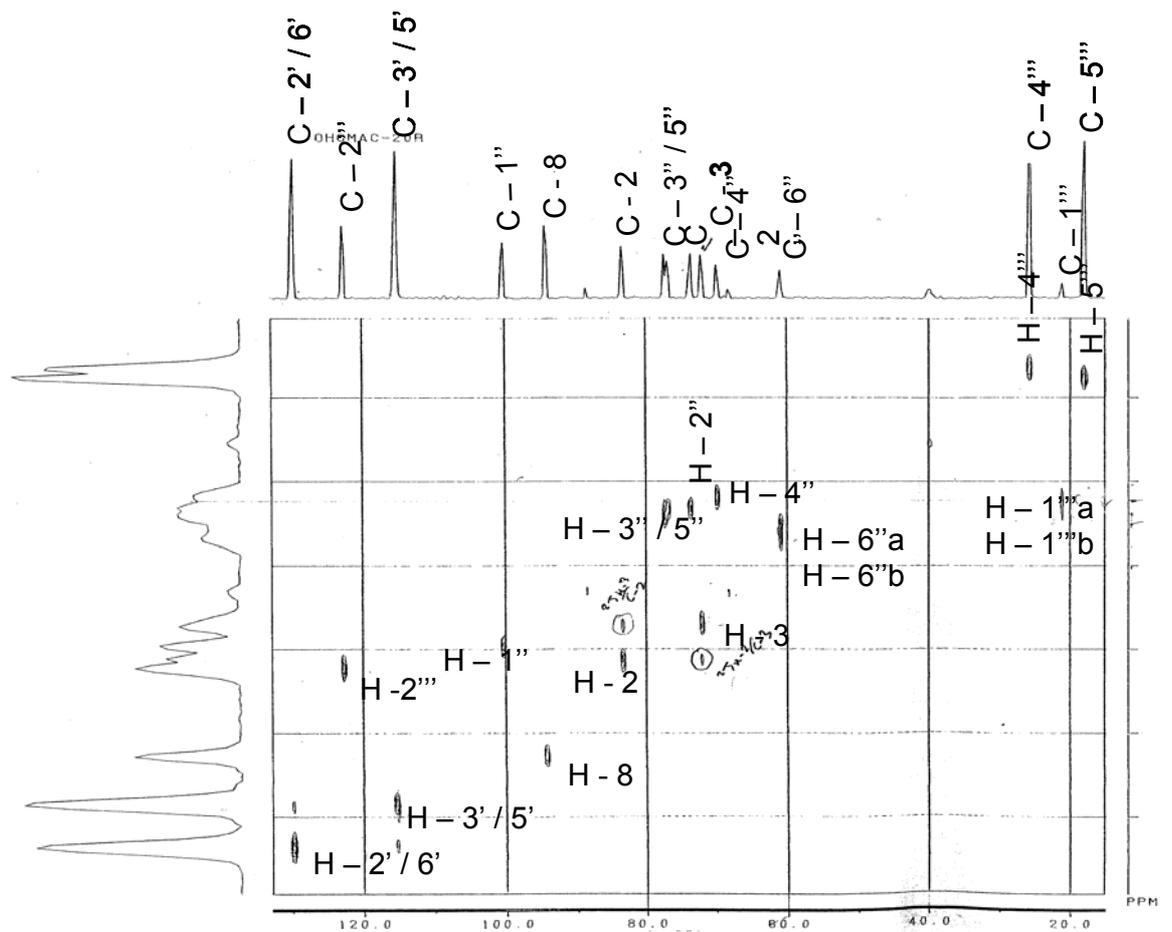
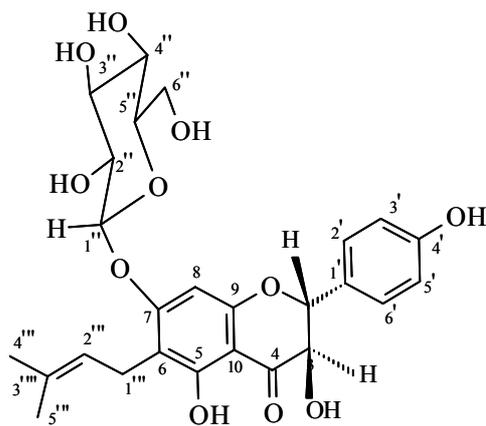


Figura 42: Mapa de contorno HETCOR (200/50 MHz) DMSO- d_6 da substância 3,4',5-triidroxi-6-prenil-7-O- β -D-glicosil-flavanona (**12**).



12

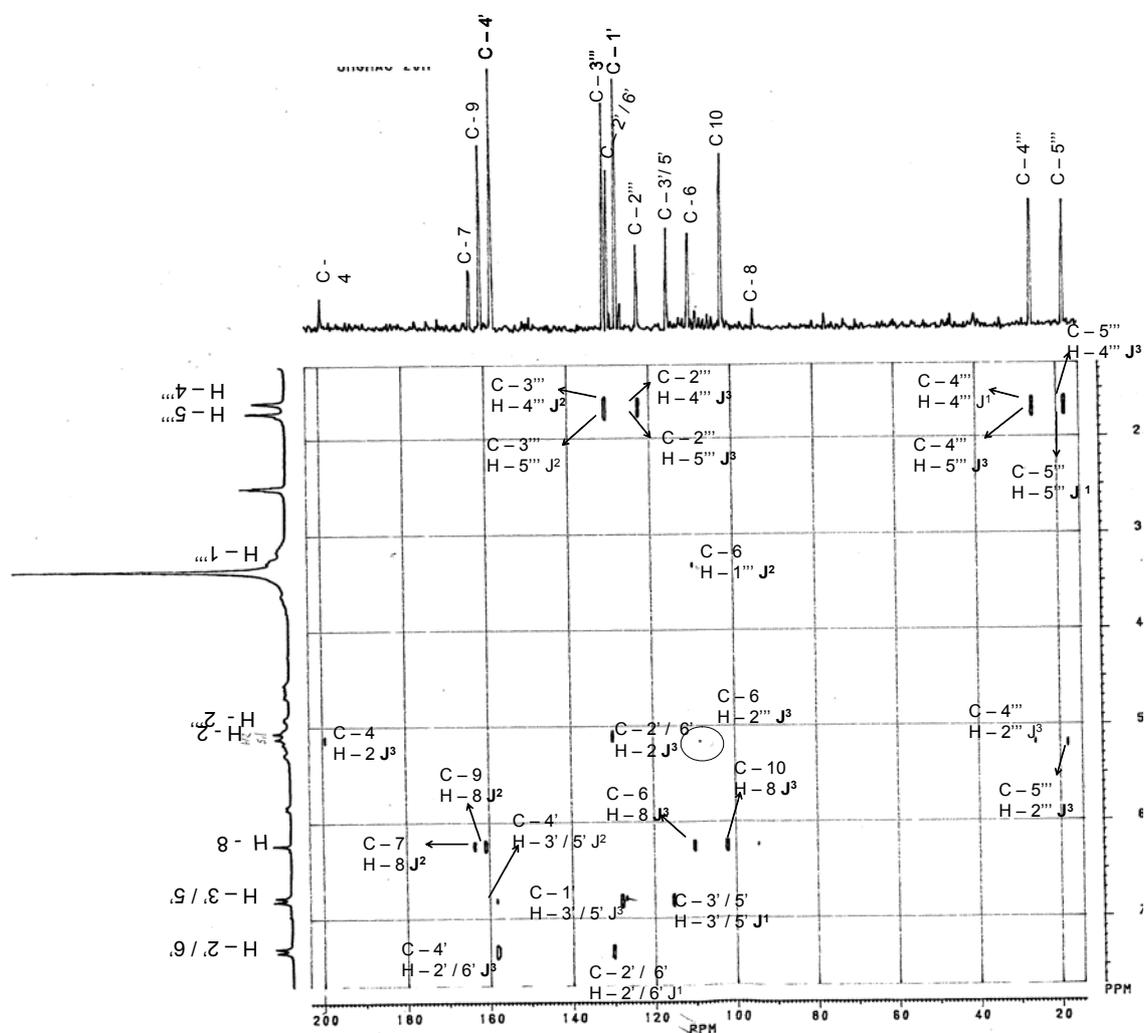
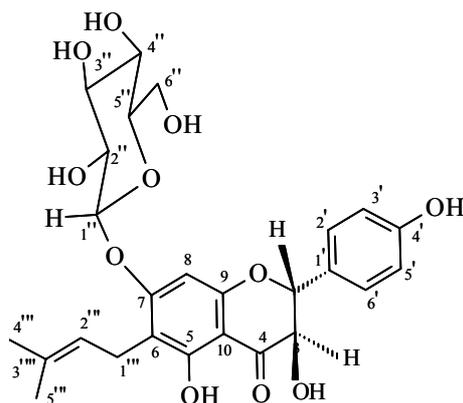


Figura 43: Mapa de conotorno COLOC (200/50 MHz) DMSO-d₆ da substância 3,4',5-triidroxi-6-prenil-7-O-β-D-glicosil-flavanona (12).



12

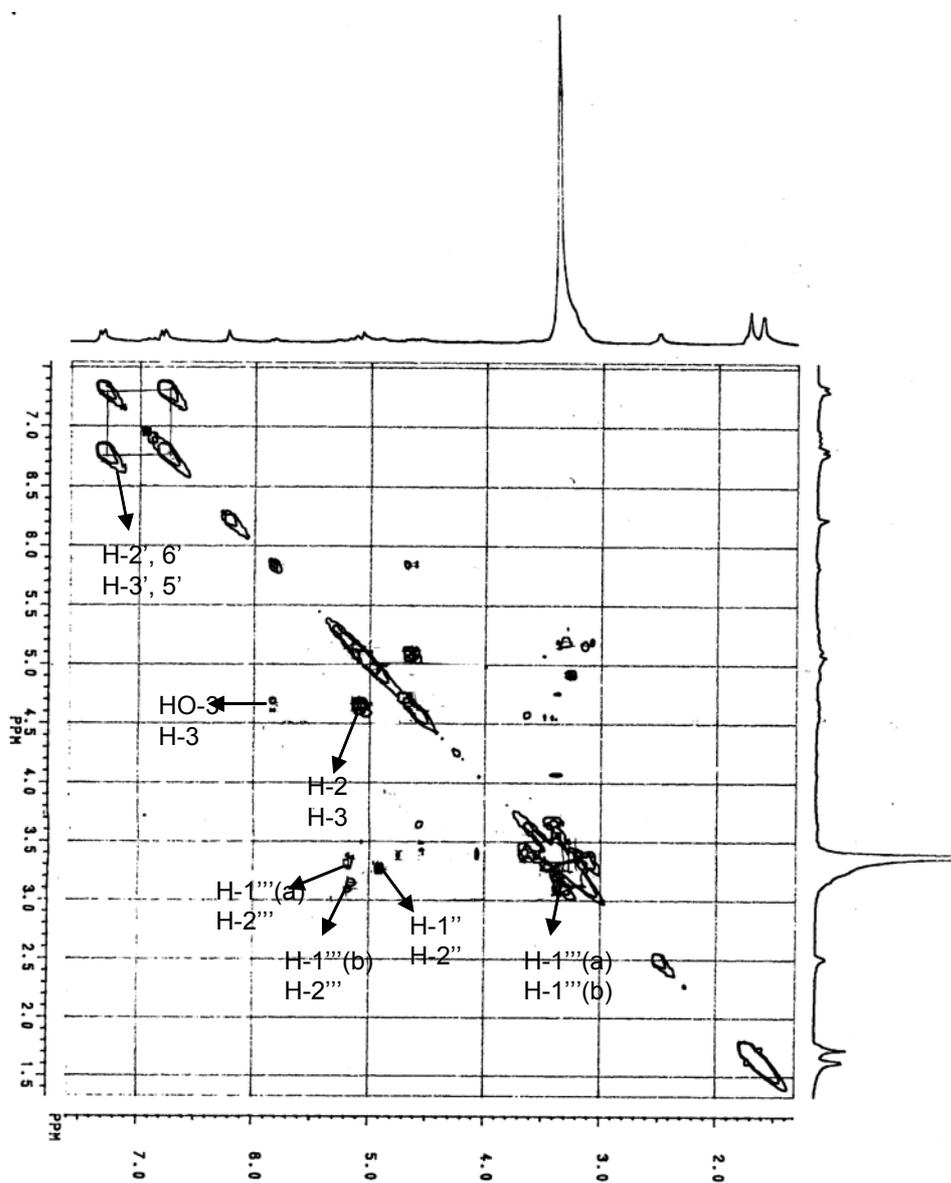


Figura 44 ; Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY da substância 12.

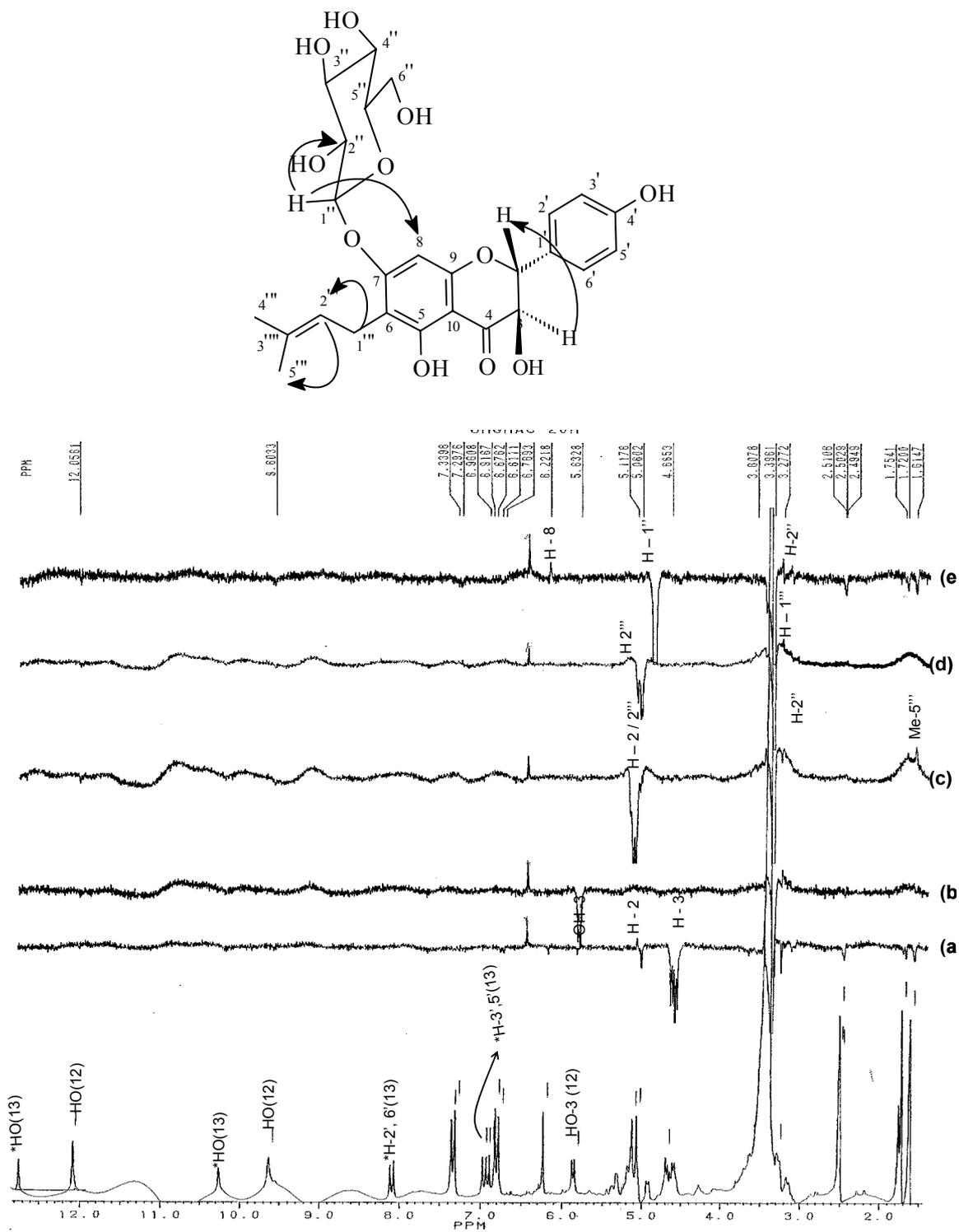


Figura 45: Espectro de experimento de NOEDIFF (200 MHz) DMSO- d_6 da substância 3,4',5-triidroxi-6-prenil-7-O- β -D-glicosil-flavanona (12), com impureza de 13.

a



Figura 46-a: Espectro de massas de alta resolução da substância **12** obtido com Ionização elétron spray (IES) e detecção de íons negativos.

b

Figura 46-b: Espectro de massas de alta resolução MS/MS do pico m/z 553 (**46-a**) da substância **12** obtido com Ionização elétron spray (IES) e detecção de íons negativos.

c

Figura 46-c: Espectro de massas de alta resolução MS/MS do pico 517 (46-a) da substância **12**. obtido com Ionização elétron spray (IES) e detecção de íons negativos.

d

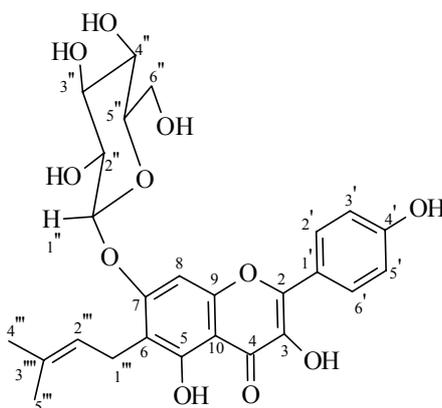
Figura 46-d: : Espectro de massas de alta resolução MS/MS do pico 515 (46-a) da substância **12**. obtido com Ionização elétron spray (IES) e detecção de íons negativos.

Substância 13 (3,4',5-triidroxi-6- γ,γ dimetil-alil-7-O - β -D-glicopiranosil-flavona)

As mesmas frações que forneceram **12** continham esta substância com as mesmas propriedades cromatográficas.

A comparação dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C de **13** com os de **12** permitiu perceber que a única diferença entre as estruturas é na dupla ligação ($\Delta^{2,3}$) tendo como esqueleto básico uma flavona. Os espectros de RMN ^1H de **13** (**Figuras 47, Pág-82**) apresenta os dubletos δ_{H} 8,08 (H-2', 6') e 6,95 (H-3', 5') do sistema aromático *para* substituído (anel B) da flavona. O sinal do H-8 aparece em 6,89 (s, 1H). Os demais sinais são compatíveis com as unidades de açúcar e prenila. O mapa de contorno (**Figura 50** **pág-85**) do espectro $^1\text{H}\times^1\text{H}$ COSY confirma o sistema AA'BB' do anel B da flavona e permite perceber sinais de acoplamento do 1'' com H-2'' e do H-1''' com H-2''' (5,08) (**Tabela 11** **pág-80**) A análise dos espectros de RMN ^{13}C (**BBD e DEPT, Figura 48** **pág-83**) e do HETCOR de **13** permitiu deduzir alguns valores de δ_{H} e de δ_{C} e a comparação com modelo da literatura (Mod-1) (LIKHITWITAYAWUID, *et al.*, 2001) e com **12** permitiu compor a **tabela 11** **pág-80** com as atribuições dos deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios de **13**. As mesmas análises com EM-IES (**Figura 51-a-c, págs 86,86 esquema 2** **Pag-81**) foi feita com essa substância e os dados estão relacionados no esquema 2 **Pág 81**. Esses dados confirmam valor da massa de **13** e revela que os sinais dos picos em m/z 353, 219 são formados a partir do 515 e o 399 é um de 219 com glicose mais uma molécula de H_2O . Na segunda ionização o carboidrato sofre fragmentação formando outros picos de menor m/z .

A preparação de derivados de 13 forneceu dois produtos **13a** (**pág-88**) e **13b** (**Pág-90**) que serviram para confirmar a proposta estrutural dessa substância como 3,5,4'-triidroxi-7-O- β -D-glicopiranosil-6-prenil-flavona



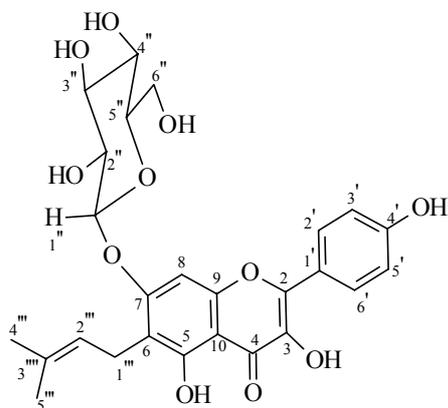
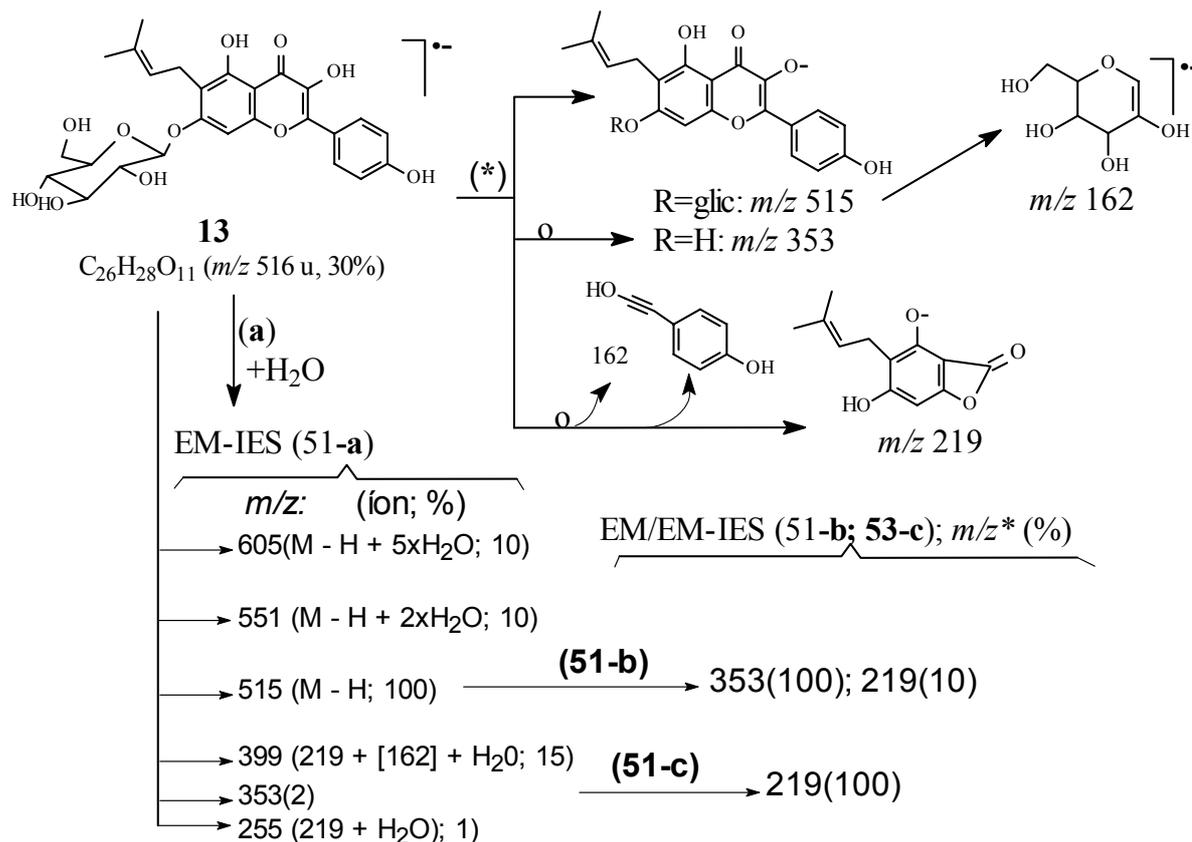
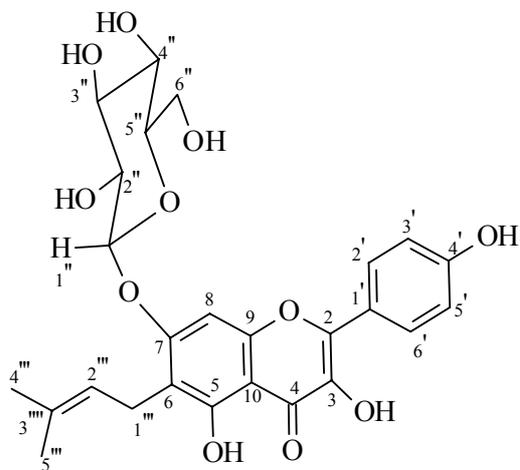


Tabela 11: Dados de RMN ^1H e ^1H - ^1H -COSY (200 MHz) ^{13}C , 2D HETCOR, em DMSO- d_6 da substância **13**.

HETCOR			H x H COSY
C	δ_c	δ_H	
2	153,99		H-3
3	136,07		H-2
4	176,15	-	
5	159,59	-	
OH	-	12,04 (s)	H-3
6	111,76	-	
7	147,38	-	
8	93,19	6,89 (s)	
9	160,60	-	
10	104,41	-	
1'	121,64	-	
2'	129,91	8,08(d,J= 8,8Hz)	H-3'/5'
3'	115,54	6,95(d,J= 8,8Hz)	H-2'/6'
4'	156,41	-	
5'	115,54	6,95(d,J= 8,8Hz)	H-2'/6'
6'	129,91	8,08(d,J= 8,8Hz)	H-3'/5'
1''	100,38	4,90(d,J= 8,0Hz)	
2''	73,39	3,29 (m)	
3''	76,76	3,33 (m)	
4''	69,68	3,36 (m)	
5''	77,24	3,44 (m)	
6''	60,68	3,51 (m)	
1'''	21,27	3,31 e 3,27 (m)	1'''/ 2'''
2'''	122,20	5,08(dd,)	1'''(a) (b)
3'''	130,70	-	
4'''	25,58	1,64 (s)	
5'''	17,82	1,77 (s)	

Esquema 2. Proposta de fragmentação e constituição dos íons compatíveis com os valores dos picos detectados nos espectros de massas de **13** (figuras: **51-a**; **51-b** e **51-c**).





H - 2' / 6'

H - 3' / 6'
H - 8

H - 2'''

H - 1''' a/b

* * *

Me
Me

Figura 47: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) DMSO- d_6 da substância 13.
* Substancia 12.

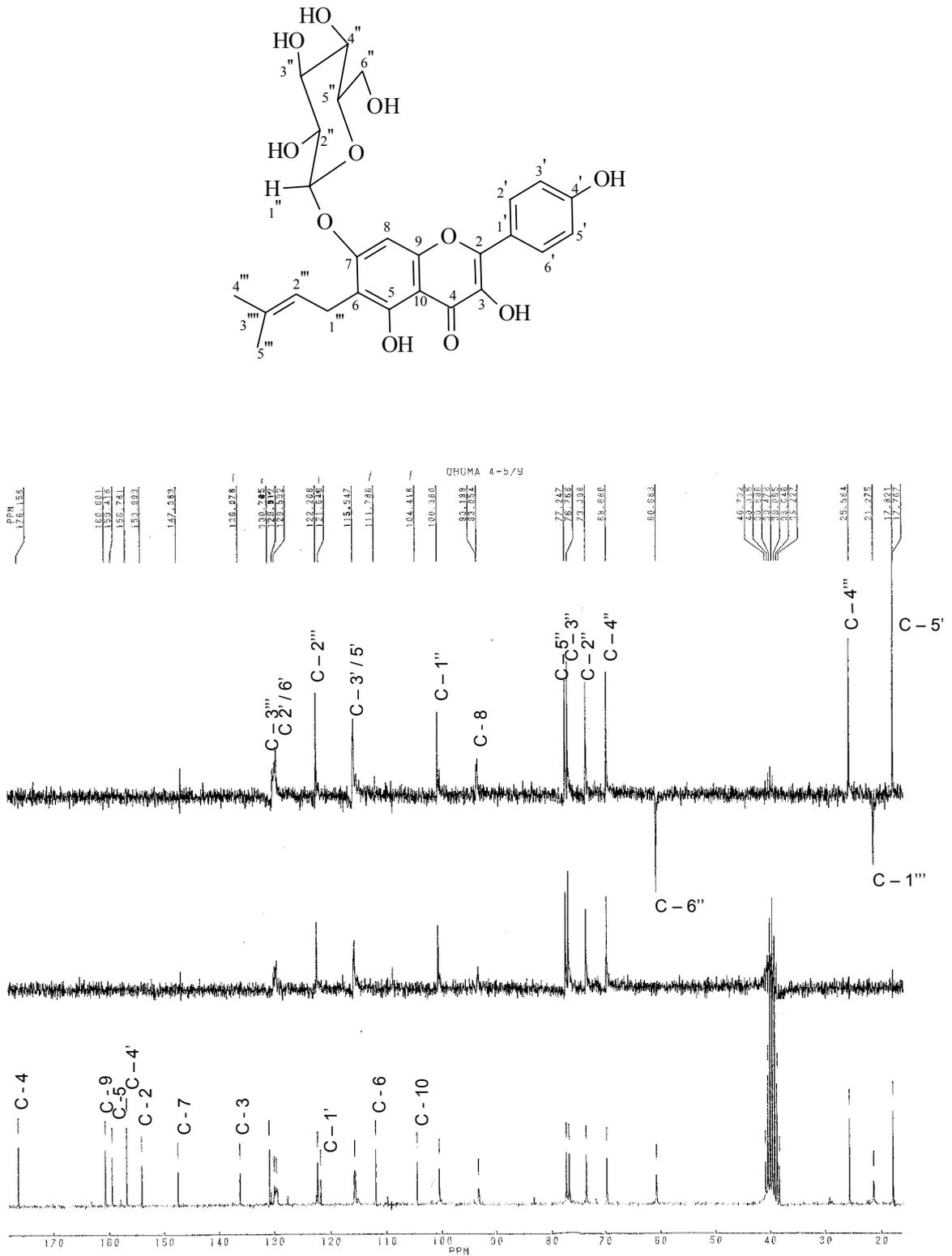


Figura 48 Espectro de RMN ^{13}C (BBD), DEPT θ 135 (50 MHz DMSO-d₆) da substância 13.

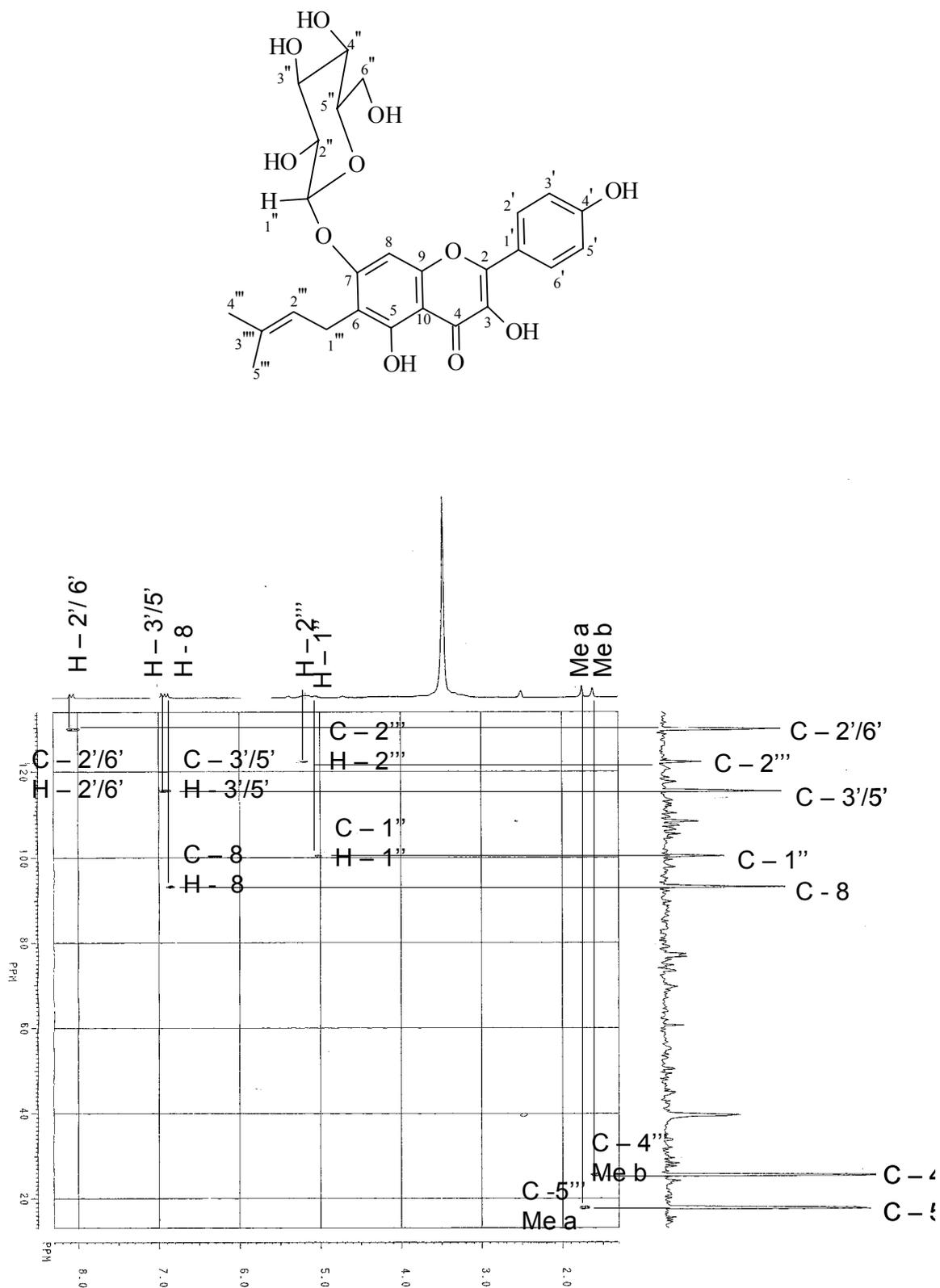


Figura 49: Mapa de contorno HETCOR (50 MHz DMSO-d₆) da substância 13.

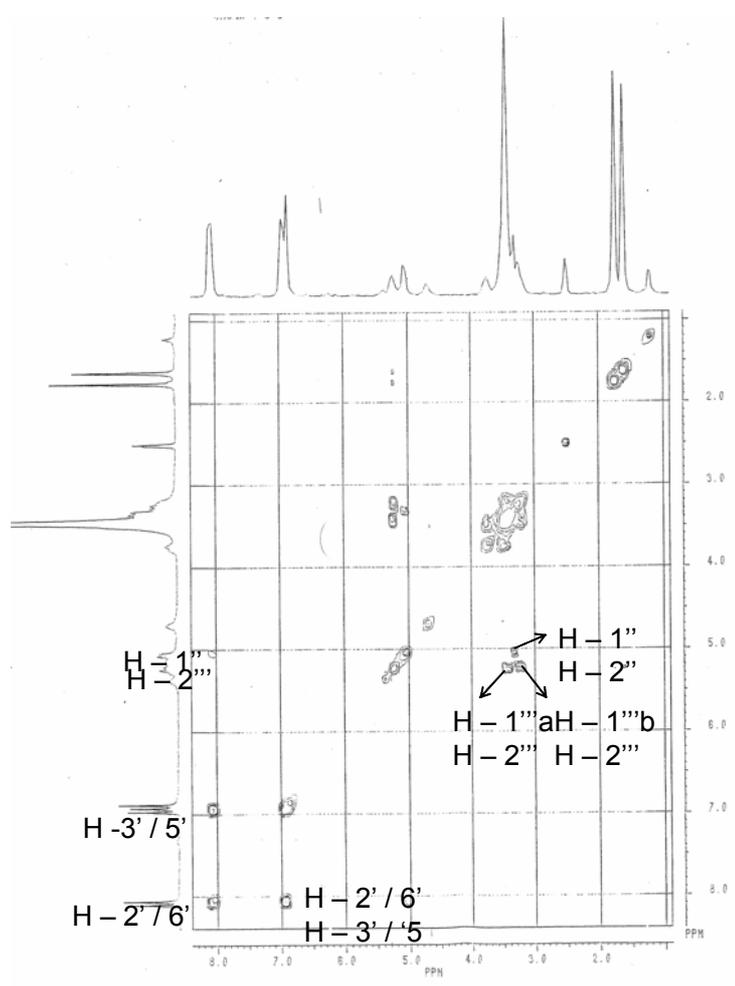
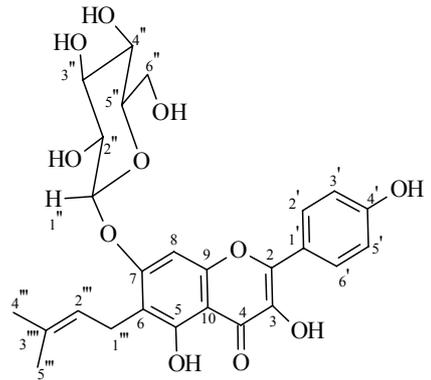


Figura 50; Mapa de contorno $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (200 MHz DMSO- d_6) da substância 13.

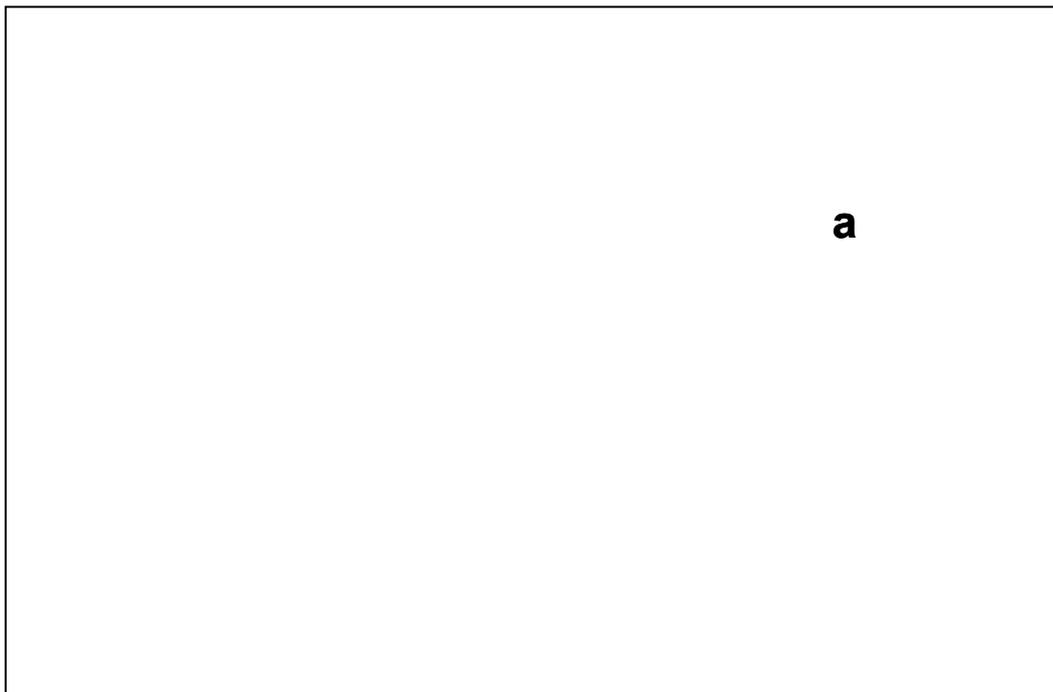


Figura 51-a :Espectro de massas de alta resolução da substância **13**, obtido com *Ionização elétron Spray* (IES) e detecção de íons negativos.

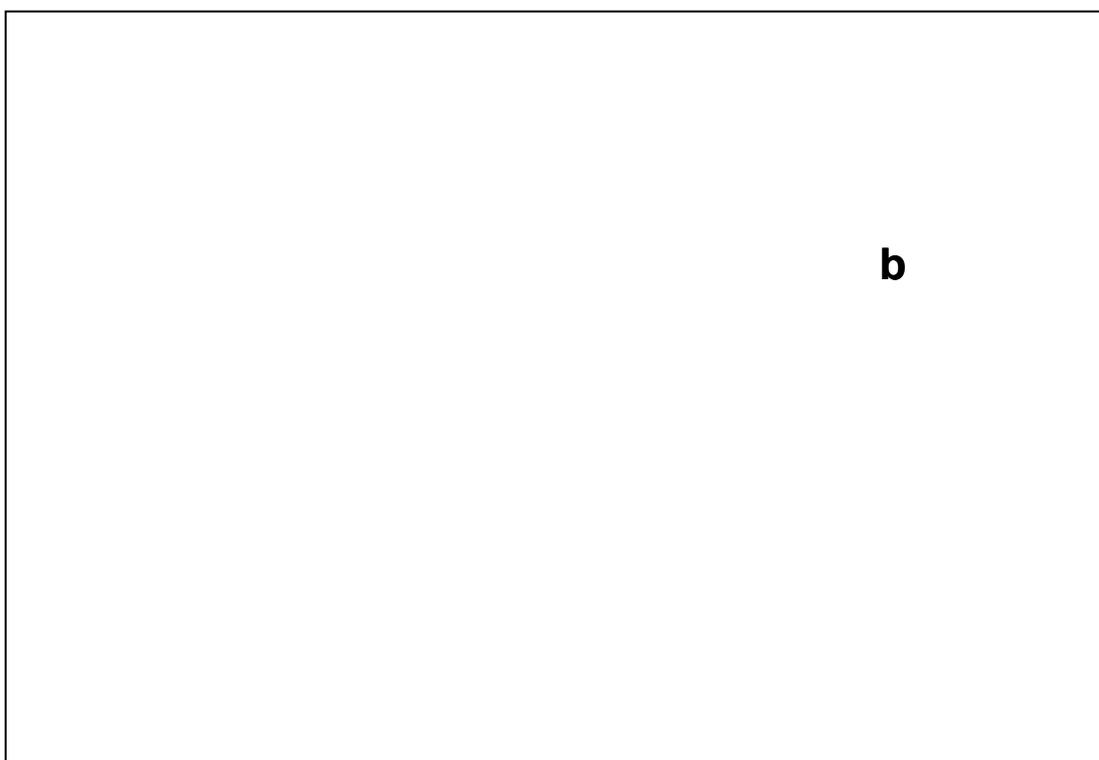


Figura 51-b :Espectro de massas de alta resolução MS/MS do pico 515 (**51-a**) da substância **13**, obtido com *Ionização elétron Spray* (IES) e detecção de íons negativos.

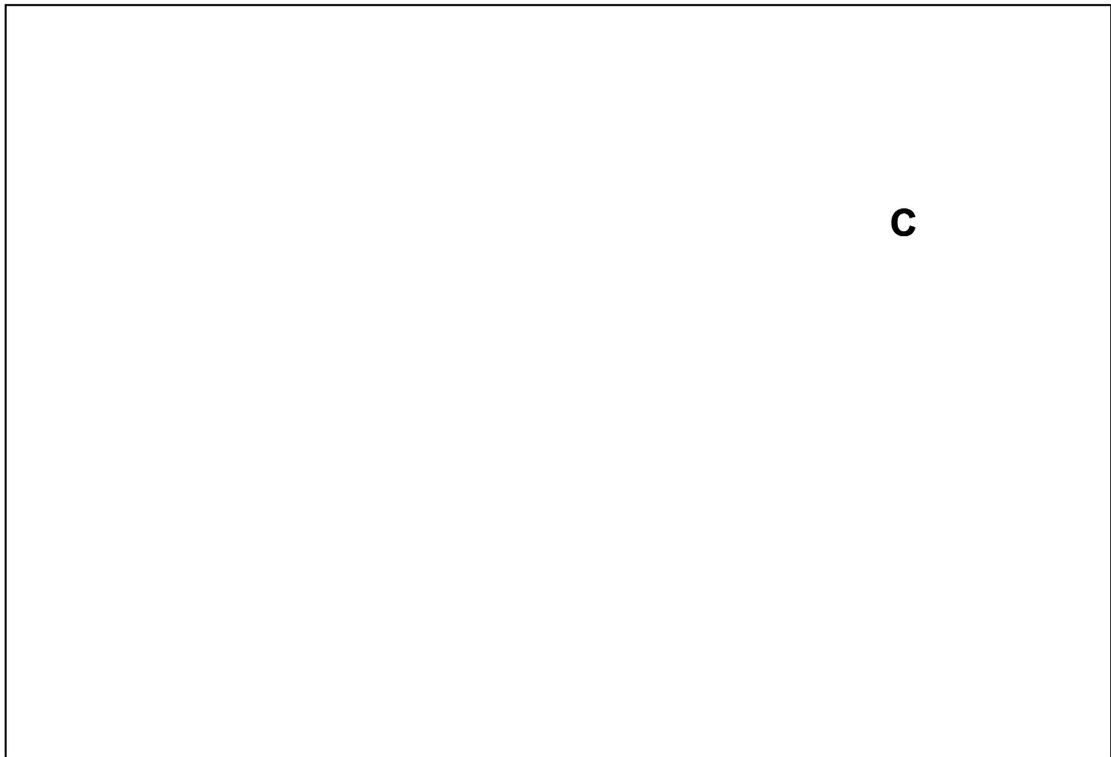
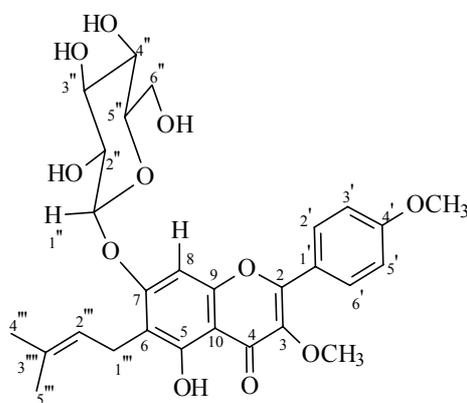


Figura 51-c :Espectro de massas de alta resolução MS/MS do pico 399 (**51-a**) da substância **13**, obtido com *Ionização elétron Spray* (IES) e detecção de íons negativos.

Derivado 13a (3,4'-dimetoxi-5-hidroxi-6-prenil-7-O-glicosil-flavona)

A substância **13** foi submetida à reação de metilação com diazometano gerando a substância **13a**. No seu espectro de RMN ^1H são observados os mesmos sinais de **13** além dos sinais em δ_{H} 3,87 e 3,85 referentes aos grupos metila adicionados pela reação. Através deste derivado foi possível confirmar a localização dos grupos OH livres da flavona e do prenila em **13**. Esta confirmação foi feita através de experimento com NOEDIFF com irradiação nos grupos metoxila (**Figura 52-c e 52-d** pag-89) que revelou NOE nos hidrogênios H-3', 5' (3,87 MeO-4') e no H-2', 6' (3,85, MeO-3). Isso confirma que os demais substituintes no flavonol estão localizados no anel A. Outra informação relevante foi o NOE observado no H-1'' com irradiação na frequência do H-8 que confirma a localização do açúcar (**Figura 52 pag 89**).



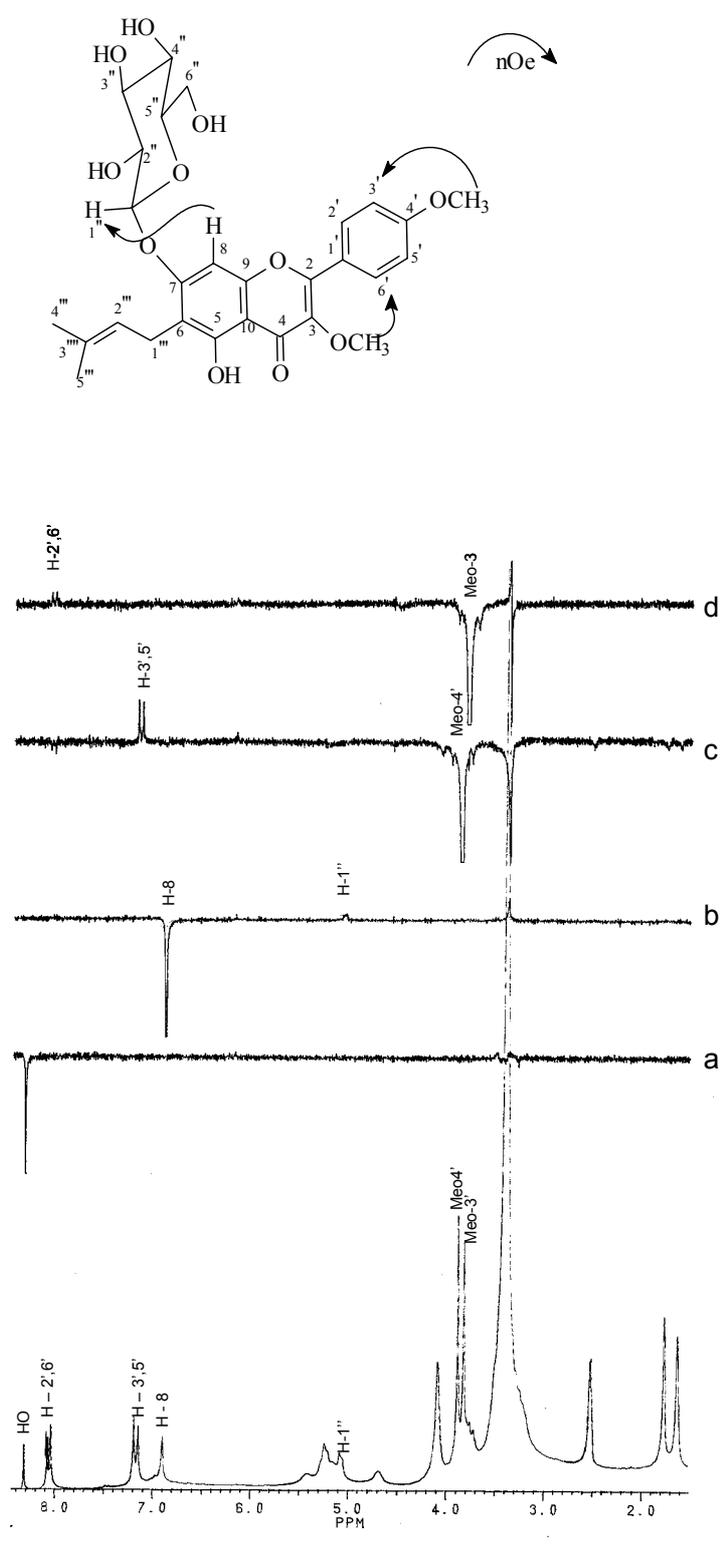


Figura 52: espectro de RMN-NOEDIFF (200 MHz DMSO-d₆) da substancia **13a**

Derivado 13b (3, 5, 4',2'',3'',4'',6''-heptaacetil-6-prenil-7-O-glicopiranosil-flavona)

A substância **13** foi submetida a reação de acetilação com piridina e anidrido acético produzindo o derivado acetilado **13b**. O espectro de RMN ^1H (200MHz) apresentou além dos demais sinais sete sinais dos grupos acetoxilas (**Figura 53** **pág-90**) revelando a reação nos grupos hidroxilas aromáticos e do açúcar.

Considerando que este derivado é novo utilizaram-se de modelos de estruturas semelhantes (Mod-2, Mod-3 e Mod-4) (SILVA, 2002; BASTOS *et al.*, 2002)(**Figura 55** **pag-92**) para comparar os dados de RMN ^{13}C e fazer as atribuições dos deslocamentos químicos registrados no espectro (**Figura 56** **pág-93**) conforme mostrado na **tabela.12** **Pág-92**

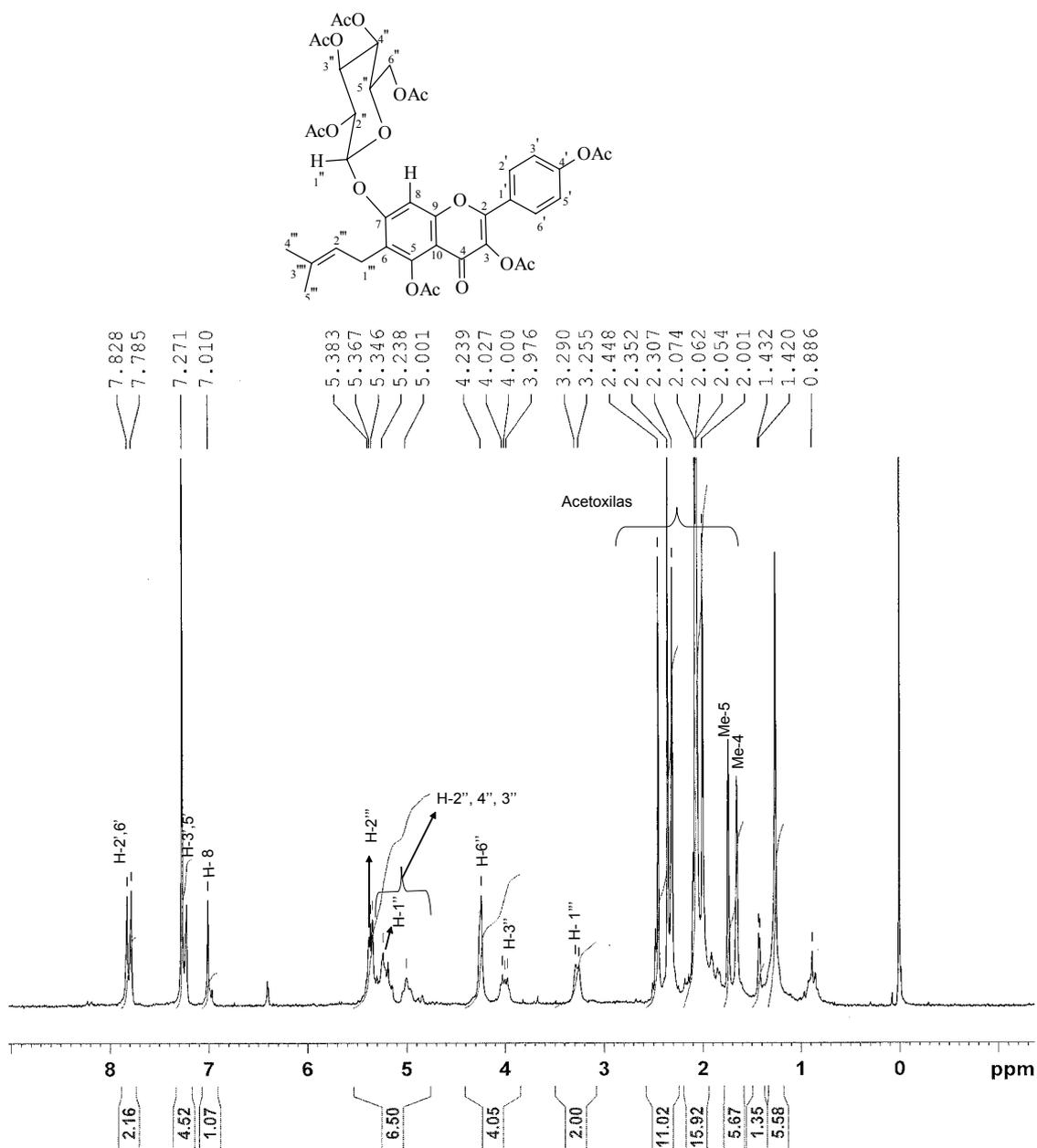


Figura 53: Espectro de RMN ^1H (200 MHz DMSO- d_6) da substância **13b**

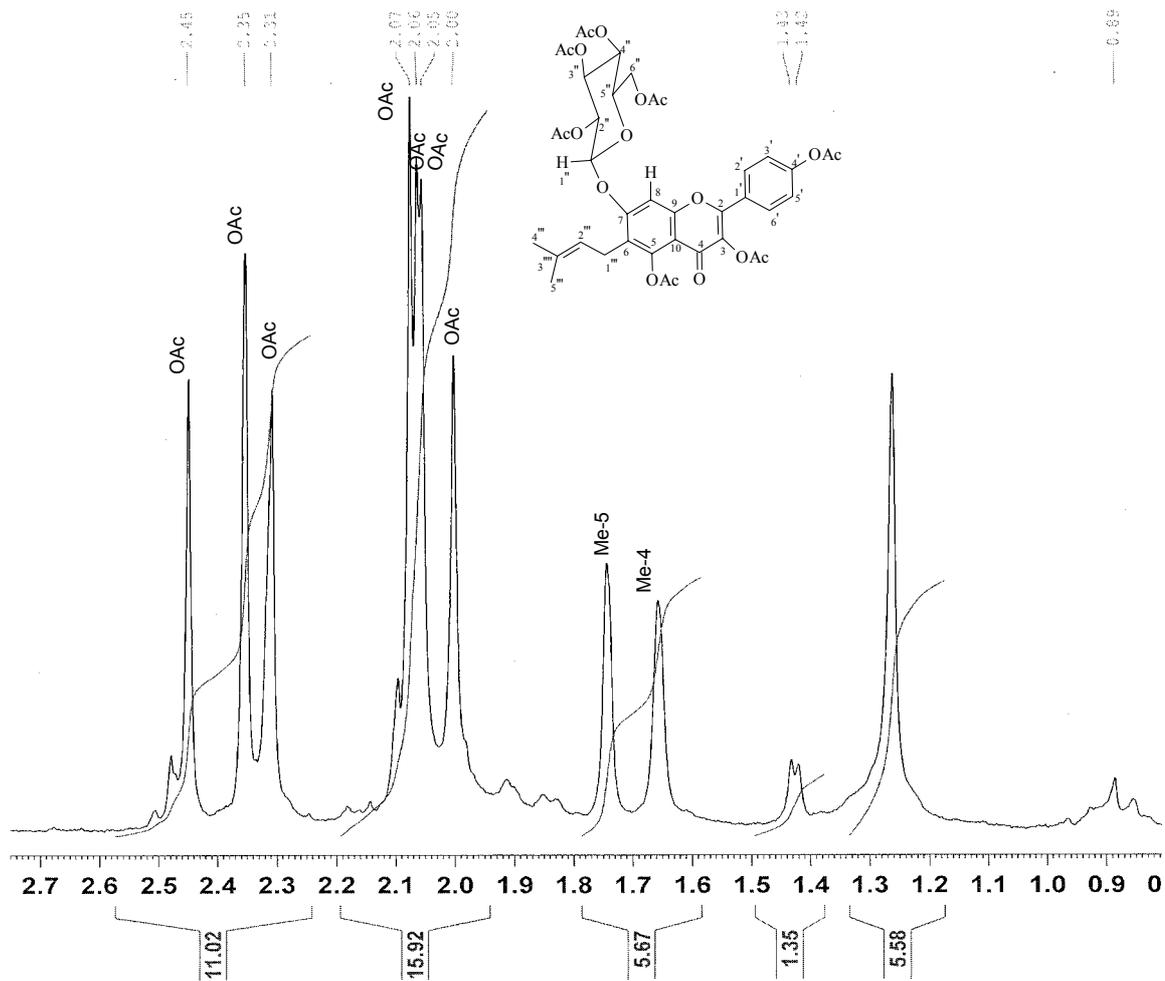


Figura 54 Espectro de RMN ^1H (200 MHz DMSO-d_6) expansão da região entre 2,7-1,0 ppm da substância **13b**.

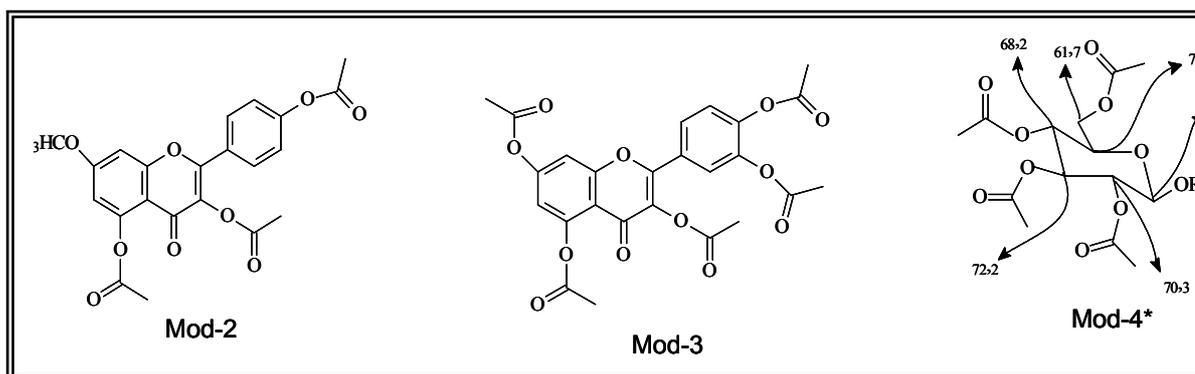


Figura 55: Modelos para atribuição dos dados de RMN ^{13}C do derivado acetilado (13b).

Tabela 12 Tabela de dados de RMN ^{13}C e ^1H de 13b comparados com dados de RMN ^{13}C de modelos da literatura (SILVA 2002; BASTOS *et al.*, 2002)

C	Modelo 2	Modelo 3	Derivado 13b	
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}
2	154,0	144,0	148,0	-
3	133,7	134,0	133,7	-
4	170,1	170,0	170,1	-
5	152,0	150,0	154,3	-
6	108,0	114,0	120,5	-
7	163,8	154,0	155,8	-
8	98,8	109,0	98,4	7,01 (s)
9	158,2	157,0	158,8	-
10	111,1	114,9	112,5	-
1'	127,0	127,4	127,2	-
2',6'	129,5	-	129,5	7,82 (d, J=8,0 Hz)
3',5'	121,9	-	122,0	7,26 (d, j= 8,0 Hz)
4'	150,7	-	152,7	-
*1''	95,8		100,8	5,23 (sl)
*2''	70,3		70,9	5,0 (m)
*3''	72,2		72,5	5,0 (m)
*4''	68,2		68,0	5,0 (m)
*5''	72,3		72,5	4,0 (m)
*6''	61,7		62,0	4,23 (s)
1'''			29,7	3,29 (d J= 8,0 Hz)
2'''			123,1	5,36 (m)
3'''			128,8	-
4'''			25,6	1,64 (s)
5'''			17,9	1,77 (s)
OCOCH ₃			167,9-169,4	
OCOCH ₃				20,6-21,2

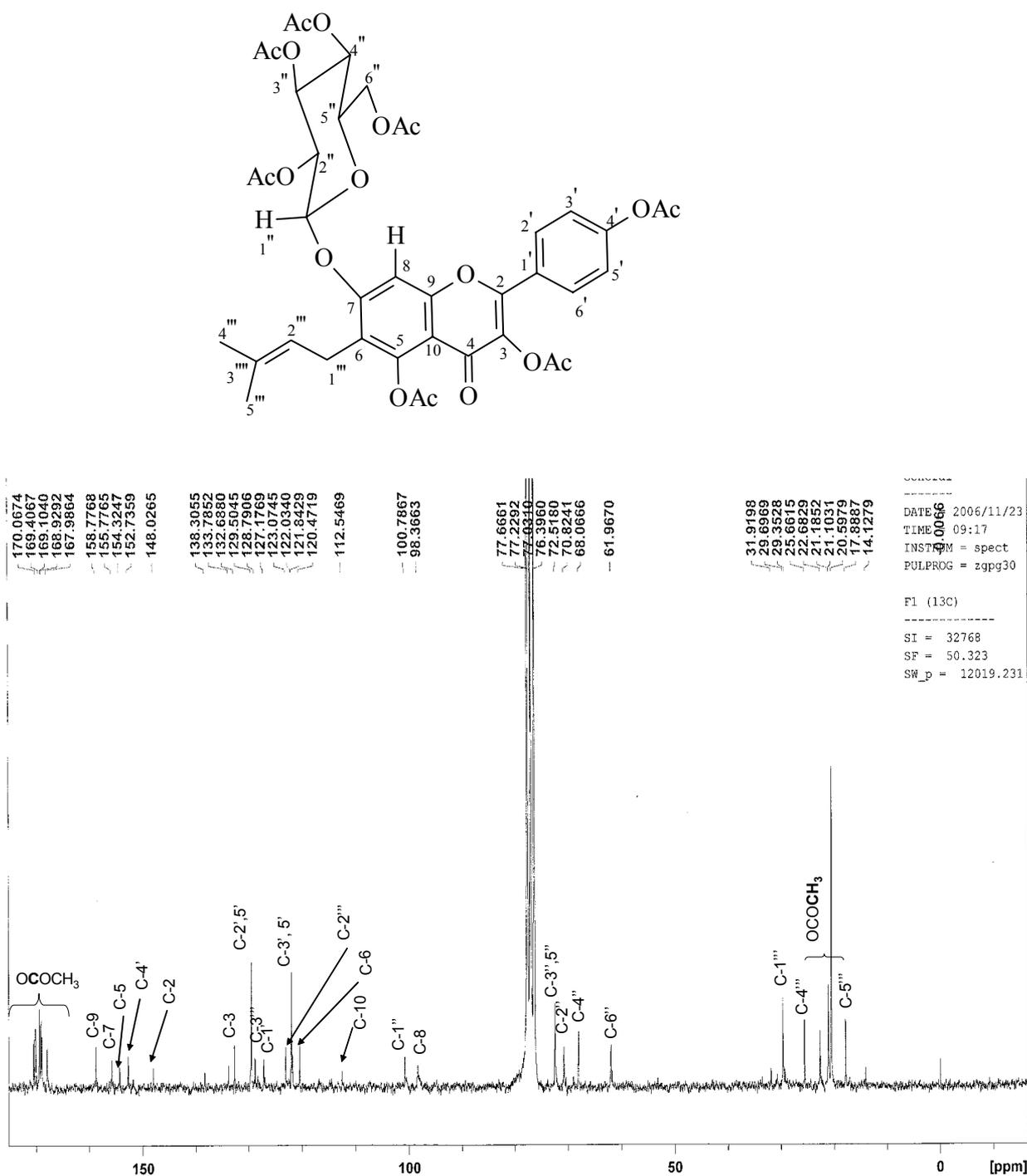
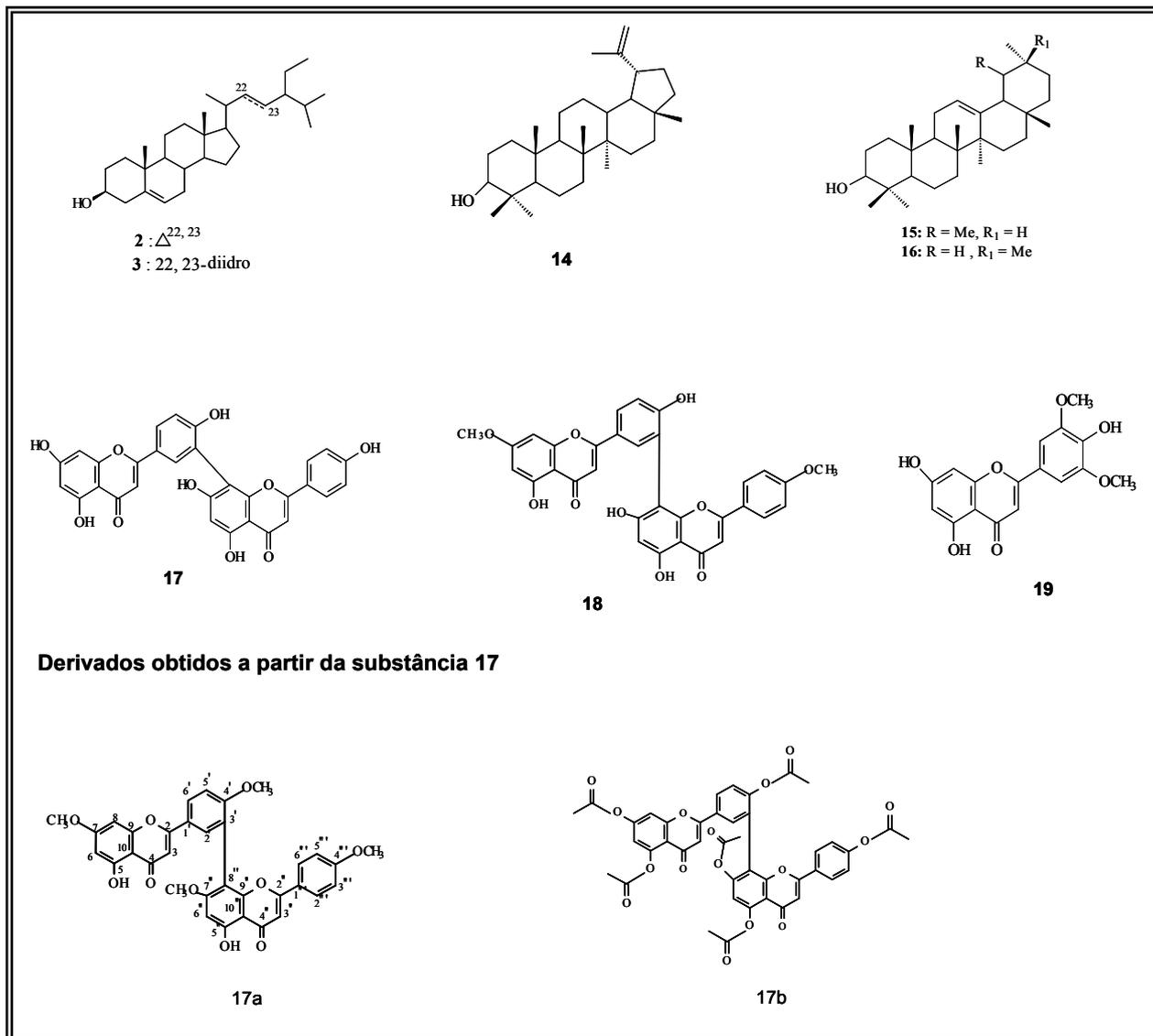


Figura 56 : Espectro de RMN ¹³C (BBD 50 MHz CDCl₃) do derivado 13b.



Quadro-3 - Constituintes químicos isolados das folhas de *Ouratea cuspidata* St. Hil

Identificação dos constituintes isolados das folhas de *Ouratea cuspidata*. St Hil

Substâncias 14, 15 e 16 Lupeol, α -amirina, β -amirina.

As estruturas dos três componentes da mistura foram definidas pela interpretação do espectro de RMN ^1H (Figura 57, pág 95), reconhecendo-se a presença dos sinais correspondentes aos grupos metila ligados a carbono sp^3 em δ_{H} 0,76 – 1,10 e sp^2 δ_{H} 1,65. Sinais de hidrogênio carbinólicos metínicos em δ_{H} 3,24 (dd $J= 10,0$ Hz e $J= 7,2$ Hz, H β -3) e de hidrogênios olefinicos em δ_{H} 5,15 (m H-12 de **16**), 5,10 (m, H-12 de **15**), 4,65 (d, $J= 2,2$ Hz H-29a de **14**) e 4,54 (d, $J= 1,28$ Hz H-29b de **14**). A análise dos dados espectrais e a comparação com amostra padrão da mistura em CCDA e com espectros dessa mistura isolados de outras espécies vegetais como *Luxemburgia nobilis* (OLIVEIRA 2000); e *Parahancornia amapá* (VELLOSO, 1998) permitiu identificar os três isômeros triterpênicos da mistura como sendo Lupeol (**14**), α -amira (**15**) e β -amirina (**16**).

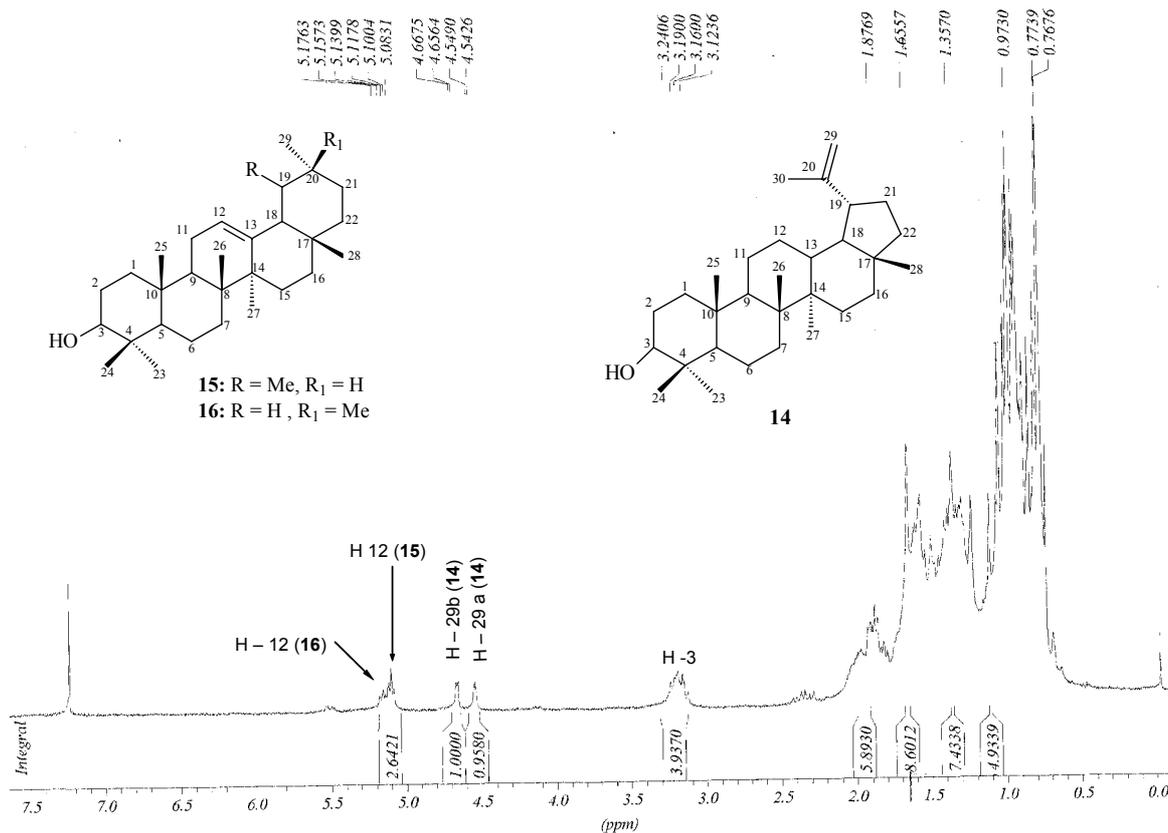


Figura 57; Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) das substância 14, 15, e 16 Lupeol, α -amirina, β -amirina.

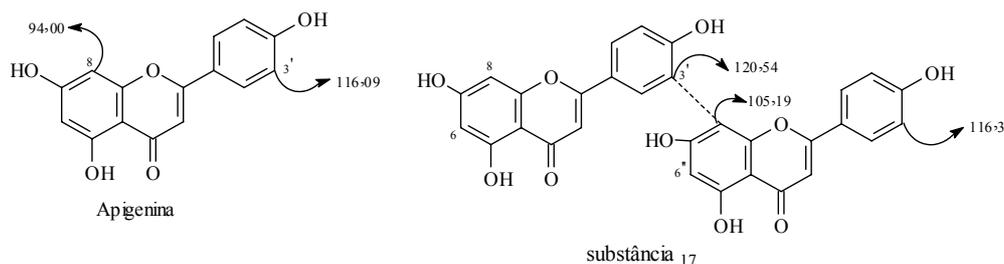
Substância 17 (Amentoflavona)

A fração contendo essa substância apresentou-se como um sólido amorfo amarelado cuja revelação em CCDA com AlCl_3 foi compatível com flavonóide. O espectro de RMN ^1H (Figura 58 pág-98), apresentou dois sinais simples referentes a grupos hidroxila quelados (δ_{H} 13,16 e 12,99) sinais indicativos de biflavonóides (VELANDIA, 2002). Essas observações permitiram fazer a análise dos espectros direcionando as conclusões para o dímero Na região de hidrogênios em anel aromáticos foi observado os sinais: em δ_{H} 8,12 (d, $J= 2,2$ Hz, H-2''); 8,02 (dd, $J= 2,2$ e 8,4 Hz H - 6') e 7,23 (d, $J= 8,4$ Hz, H-5') compatíveis com um sistema ABC de um anel B com 3', 4' quaternário de um flavonóide; δ_{H} em 7,64 (d, $J= 8,8$ Hz H-2''') e 6'''); 6,82 (d, $J= 8,8$ Hz, H-3''') e 5''') característico de um anel *para* substituído, δ_{H} 6,51 (d, $J= 2,0$ Hz H-8), 6,22 (d, $J= 2,0$ Hz H-6) indicando um sistema de hidrogenios em anel aromático com acoplamento *meta*; e δ_{H} 6,72 (s, H-3''); 6,65 (s, H-3), 6,43 (s, H-6'') surgindo indicar que a substância 17 possui duas unidades de flavonas cuja ligação entre as unidades envolve um carbono do anel A. O valor dos deslocamentos químicos do H-2' (8,12) e a ausência de um sinal compatível para H-8 permitiu pensar em uma estrutura do grupo das amentoflavonas (SUZART *et al.*, 2007; VELANDIA *et al.*, 2002)

O espectro de RMN ^{13}C (BBD) (figura 59 Pág-99) mostrou 30 sinais de carbonos dentre os quais foi possível observar os carbonos metínicos do sistema de acoplamento *meta* no anel A de flavonoide δ_{C} 94,49 (C-8), δ_{C} 99,43 (C-6); carbonos metínicos do sistema AA'BB' δ_{C} 116,38 (C-3''' e C-5'''), δ_{C} 129,09 (C-2''' e C-6'''). O sinal de CH em 101,40 (C-6'') esta de acordo com dados de amentoflavonas. Além dos sinais para as duas carbonilas conjugadas δ_{C} 183,16 e 182,77.

A ligação interflavonoídica pôde ser confirmada através do deslocamento químico do C-3' que, quando comparado com o da apigenina { $\Delta_{\delta_{\text{C}}}$ C: 120,54 (17) – 116,09 (apg.) = 4,45} apresentou deslocamento para campo mais baixo por estar mais desprotegido. Logo envolvido na ligação com a outra unidade de flavonóide. Esta dedução confirma a observação acima com referencia ao $\delta_{\text{H}}-2'$. OH-6'' apresenta-se como um sinal simples não ocorrendo o acoplamento *meta* com o H-8'' como foi observado para outra unidade. Comparando o deslocamento químico do C-8'' com o da apigenina constata-se que C-8'' também esta mais desprotegido { $\Delta_{\delta_{\text{C}}}$ C: 105,19 (17) – 95 (apg.) = 11,19}. Estas observações surgem a ligação entre os dímeros estar ocorrendo entre C-3' de uma apigenina com o C-8'' da outra unidade. As observações acima juntamente com a comparação dos valores de deslocamentos químicos de carbono com valores descritos na literatura (VELANDIA *et. al.* 2002) e comparação com amostra padrão em CCDA confirma que a substância 17 é o biflavonóide amentoflavona.

Considerando que apenas a comparação de dados de RMN pode acarretar em erro sempre que possível deve-se preparar derivados para confirmar a proposta. Por isso preparou-se dois derivados 17a.e 17b.



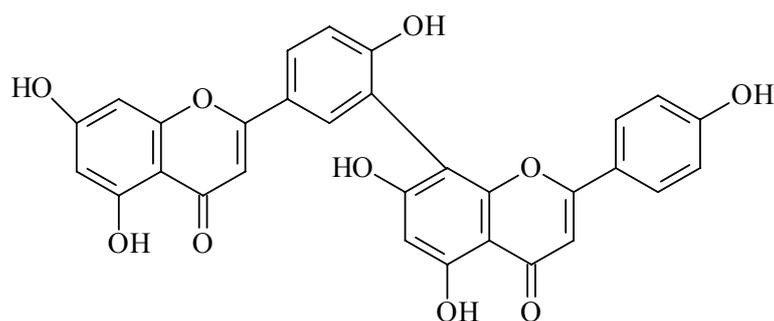


Tabela 13: Dados de RMN ^1H e ^{13}C (200 MHz , 50 MHz D_3CCOCD_3) da substância amentoflavona (17).

C	δ_c	δ_H	VELANDIA et al, 2002
2	164,78	-	165,12
3	103,38	6,65 (s)	103,78
4	182,77	-	183,47
5	162,33	-	162,83
6	99,43	6,22 (d, J= 2,0 Hz)	99,75
7	161,51	-	163,37
8	94,49	6,51 (d, J= 2,0 Hz)	94,81
9	155,81	-	156,15
10	105,04	-	105,38
1'	122,97	-	123,31
2'	132,64	8,12 (d, J= 2,2 Hz)	132,61
3'	120,54	-	120,90
4'	158,54	-	158,51
5'	117,17	7,23 (d, J= 8,8 Hz)	117,53
6'	128,54	8,02 (dd, J= 8,8 3 2,2Hz)	128,83
2''	164,57	-	165,12
3''	103,92	6,72 (s)	104,32
4''	183,16	-	183,08
5''	162,15	-	162,66
6''	101,40	6,43 (s)	99,80
7''	163,02	-	164,91
8''	105,19	-	104,44
9''	159,99	-	160,30
10''	105,19	-	105,56
1'''	123,03	-	123,41
2'''/6'''	129,09	7,64 (d, J= 8,8 Hz)	129,14
3'''/5'''	116,28	6,82 (d, J= 8,8 Hz)	116,73
4'''	162,48	-	161,83
OH		13,16	
OH		12,99	

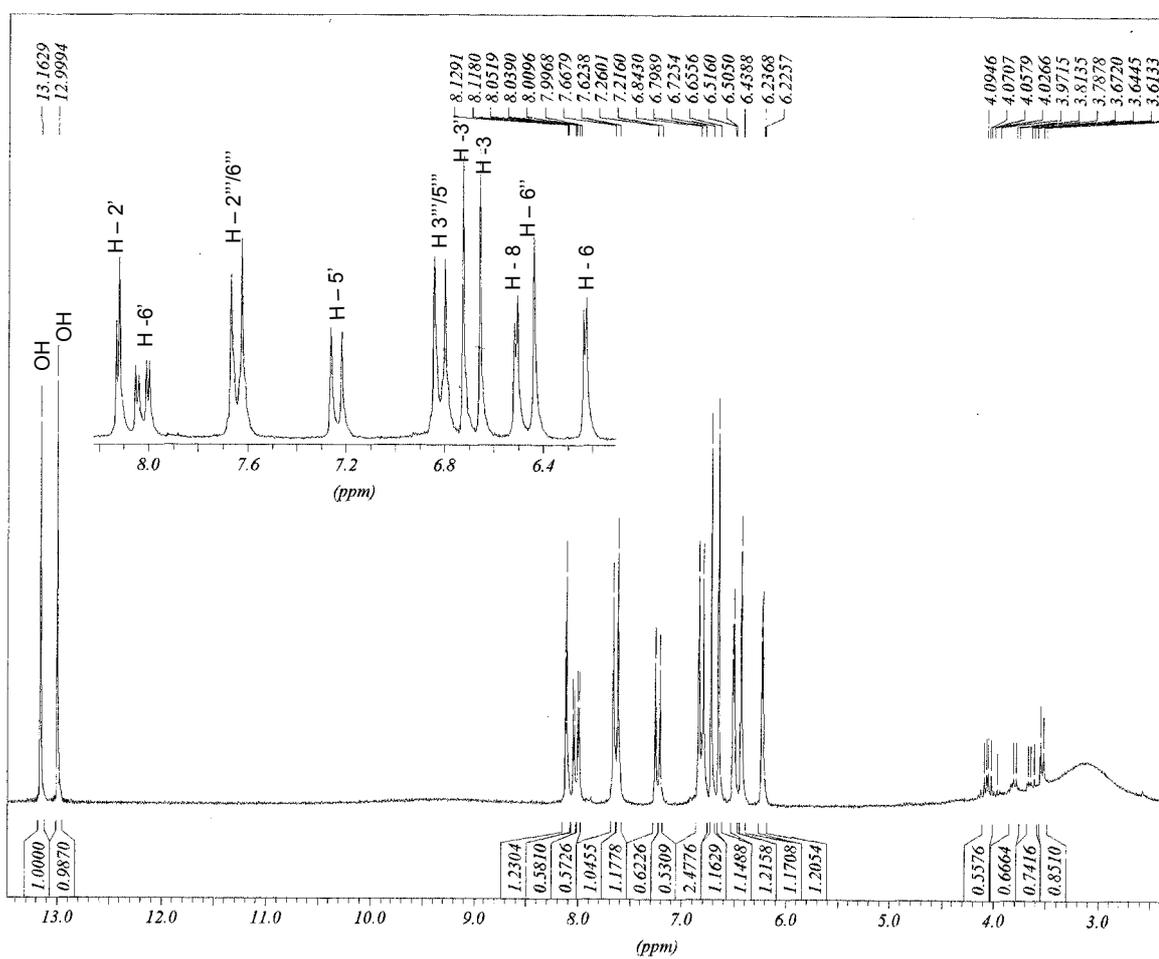
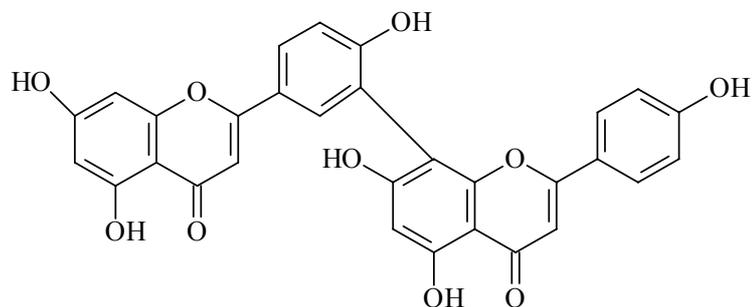


Figura 58 Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CD_3COCD_3) da substância amentoflavona (17).

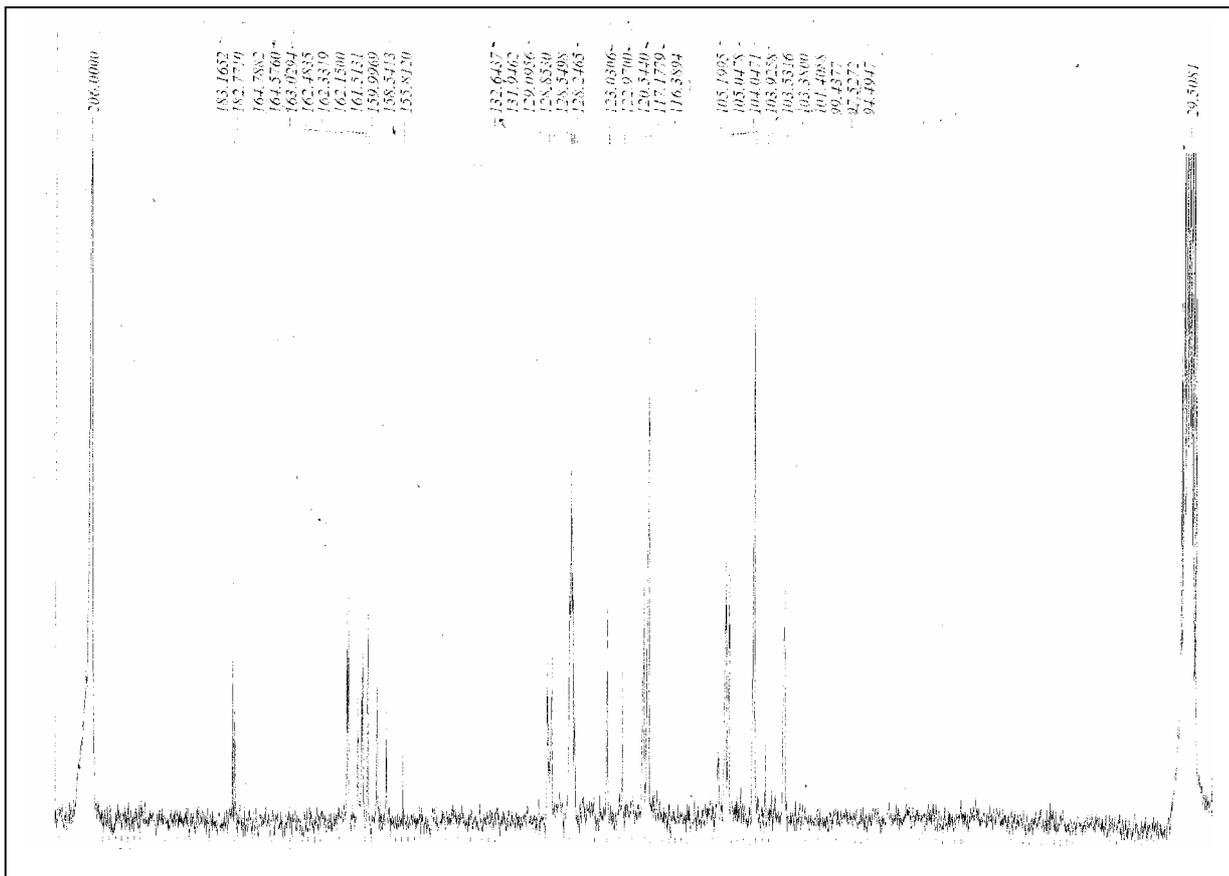


Figura 59: Espectro de RMN ^{13}C (200 Mhz, CD_3COCD_3) da substância amentoflavona (17).

Derivado 17a (Tetrametilamentoflavona)

O produto **17a** foi obtido da reação de metilação com diazometano da substância amentoflavona (**17**). Esta reação incorpora diazometano nas hidroxilas livres e fazendo-se a análise dos espectros confirma-se o padrão de substituição e a conexão entre as unidades.

O espectro de RMN ^1H (**Figura 60 Pag-102**) do derivado metilado **17a**, mostra dois sinais em campo baixo δ_{H} 13,11 e 12, 79 indicando a presença de dois grupos hidroxilas quelados, além de 4 sinais simples δ_{H} 3,87, 3,85, 3,81, 3,80 correspondentes as metilações das hidroxilas livres 7, 4', 7'' e 4''' . O mapa de contorno HMQC (**Figura 62, Pág-103**) da substância **17a** mostra correlação para 12 carbonos sp^2 (CH) (**Tabela 14 Pag-101**). Os carbonos quaternários tiveram seus deslocamentos determinados através da análise do mapa de contorno HMBC (**Figura 65, 64 Pag-105, 106**) mostrando seus acoplamentos. O mapa de contorno (**Figura 65 Pag-106**) $^1\text{Hx}^1\text{H}$ -COSY apresenta os acoplamentos do sistema AA'BB' (H-2''' e 6''' com H-3''' e 5''') e acoplamento do sistema ABC H-6' com H-5'.

As posições das metoxilas foram definidas por meio do mapa de contorno NOESY (**Figura 67 pag-108**) onde é observado nOe entre a MeO-7'' (δ_{H} 3,87) com H-6'' (δ_{H} 6,44) ; entre Meo-7 (δ_{H} 3,85) com H-6 e H-8 entre Meo-4' (δ_{H} 3,81) com H-5' e entre Meo-4''' δ_{H} 3,80 com H-3''' e 5''' . Esses dados permitiram definir os deslocamentos químicos dos hidrogênios de cada metoxila e com a análise do espectro HMBC definiu-se os δ_{C} dos carbonos C-7; 7''; 4' e 4''' . Outra confirmação obtida deste experimento é a conexão C-3'→C-8'' devido ao nOe no H-5' e MeO 4' . Se esta metoxila estivesse em 3' daria nOe no H-2' . Além do nOe no H-6'' gerado pela MeO-7''; o acoplamento a três ligações entre o H-5' (δ_{H} 7,17) e o C-3' (δ_{C} 122,0) e entre H-6'' e C-8'' (HMBC, **Figura 64 Pag-105**) confirma a ligação das unidades de flavona através dos C-3' e 8'' . A **tabela 14** **pág-101** mostra a completa atribuição dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de **17a**. Os valores dos deslocamentos químicos dos carbono C-5', C-6, C-6'', C-8, C-8'' C-3''' e 5''' que estão em posição *orto* às metoxilas possuem deslocamentos químicos menores do que os respectivos carbono de **17**. Nesses casos ocorre a proteção gama das metoxilas 4', 7, 7'', 4''' sobre esses núcleos. Esse derivado está registrado na literatura, (VELANDIA, *et al* 2002).

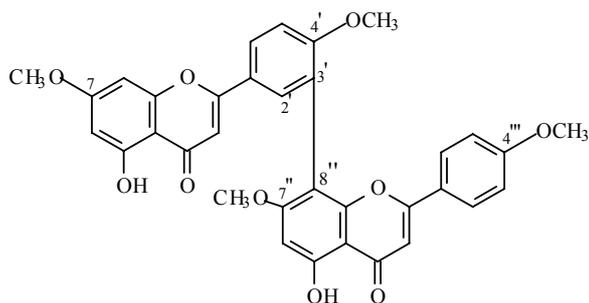


Tabela 14; Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) 1D e 2D da substância **17a** (CDCl_3).

C	δ_{c_a}	δ_{H}	HMBC _b		H xH cosy	NOESY
			$^2J_{\text{ch}}$	$^3J_{\text{ch}}$		
2	163,9	-	H - 3			
3	103,7	6,61 (s)				
4	183,0	-	H - 3			
5	?	-				
6	98,1	6,37 (d, J= 1,85Hz)				Meo-7
7	165,9	-		Meo-7		
MeO-7	?	3,85 (s)				H-6 / H-8
8	93,1	6,44 (d, J=1,85Hz)				Meo-7
9	?					
10	105,1			H-3		
1'	123,6			H-3		
2'	131,2	7,88 (s)				
3'	122,5	-		H-5'		
4'	161,0	-		MeO-4'		
MeO-4'	?	3,81 (s)				H-5'
5'	111,2	7,17 (d, J= 8,8Hz)			H-6'	MeO-4'
6'	129,0	7,98 (dd, J= 1,8/6,6Hz)			H-5'	
2''	164,1	-	H-3''	H-2'''/6'''		
3''	104,9	6,64 (s)				
4''	182,5		H-3''			
5''	?					
6''	95,6	6,54 (s)				MeO-7''
7''	163,0			MeO-7''		
MeO-7''	?	3,87 (s)				H-6''
8''	104,9			H-6''		
9''	?					
10''	105,9			H-3'' / H-6''		
1'''	123,3			H-3''		
2'''/6'''	129,0	7,48 (d, J= 8,8Hz)			H-3'''/5'''	
3'''/5'''	114,8	6,84 (d, J= 8,8Hz)			H-2'''/6'''	MeO-4'''
4'''	162,8		H-3'''/5'''	MeO-4'''		
MeO-4'''	?	3,80 (s)				H-3'''/5'''

Aguardando espectro da região que fornece esses valores.

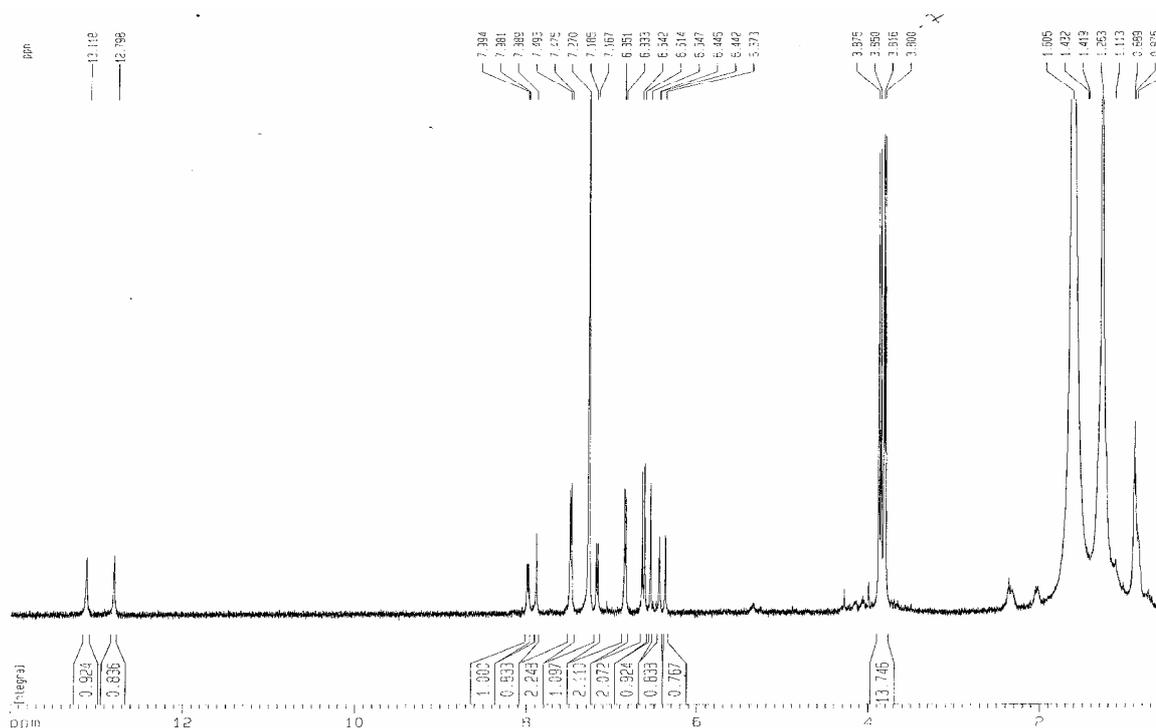


Figura 60: Espectro de RMN ^1H (500 MHz CDCl_3) substância (17a).

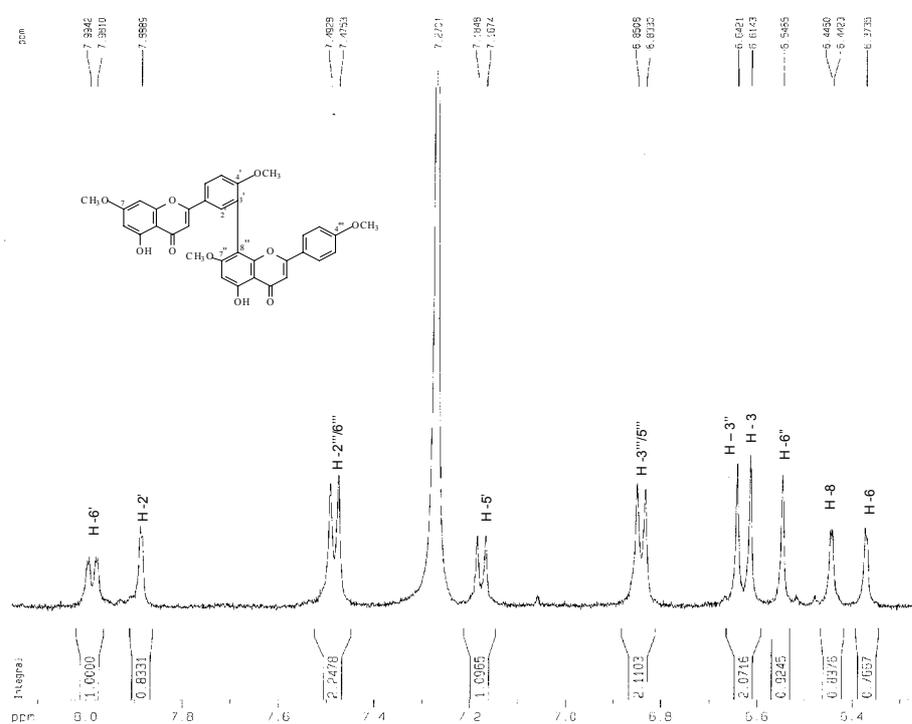


Figura 61: Expansão do espectro de RMN ^1H (500MHz CDCl_3) substância tetrametilamentoflavona (17a) entre 6,5 a 8,5ppm.

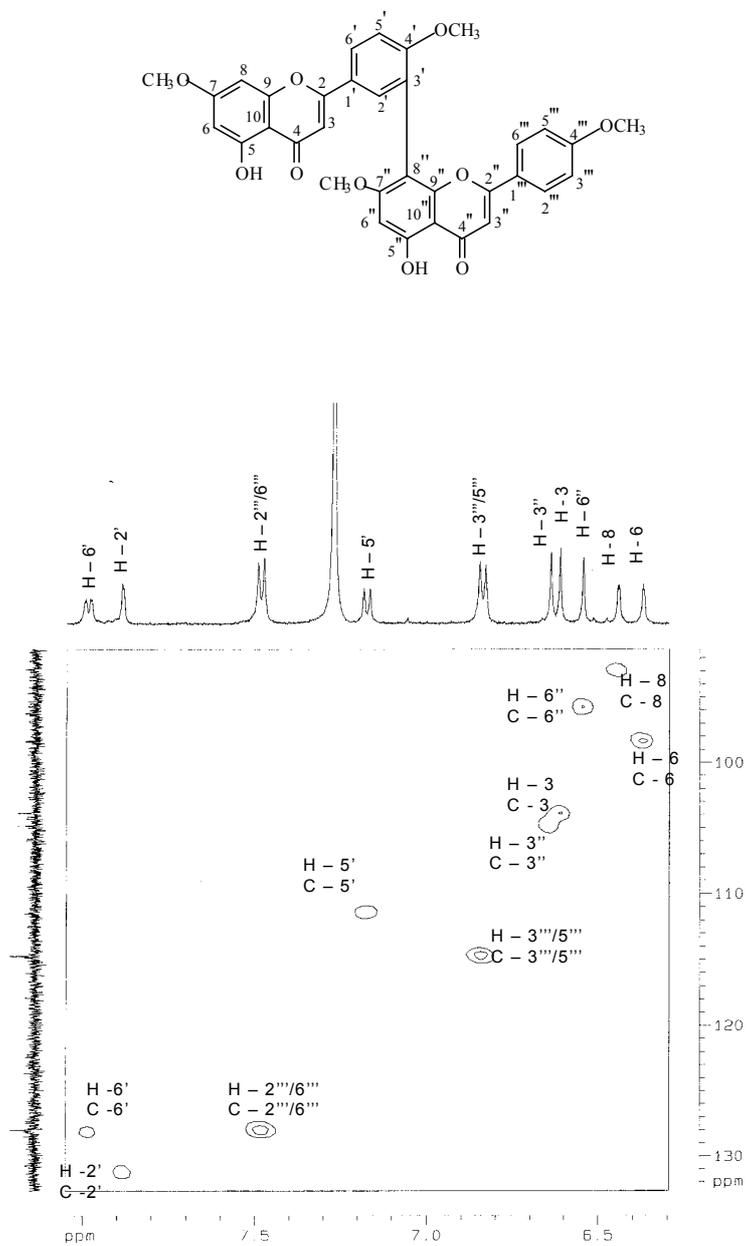


Figura 62: Mapa de contorno RMN 2D HMQC (500 MHz CDCl₃) ampliado em 6,3 – 8,0 ppm da substância 17a

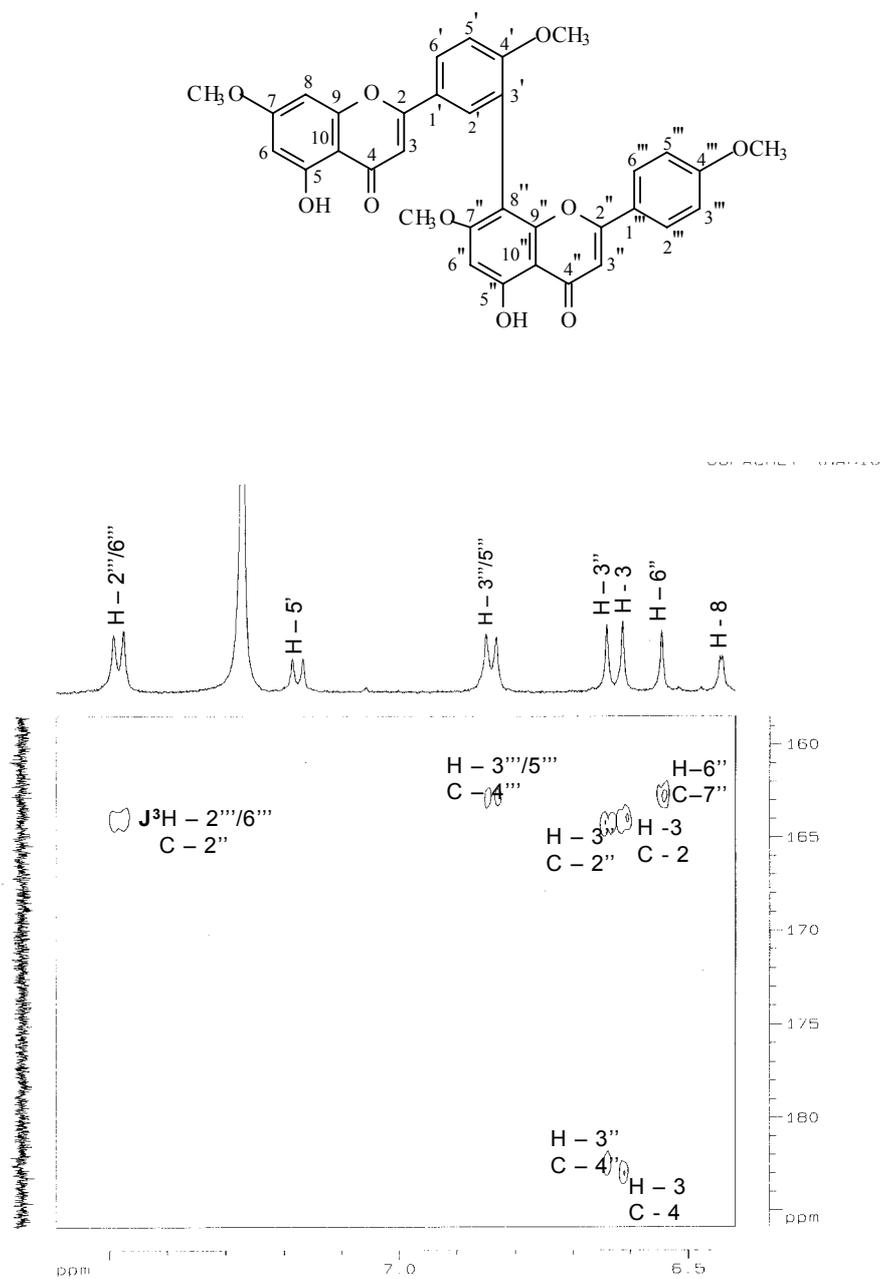


Figura 63: Mapa de contorno RMN 2D de HMBC (500MHz CDCl₃) ampliado em 6,5–7,5 ppm da substância tetrametilamentoflavona **17a**.

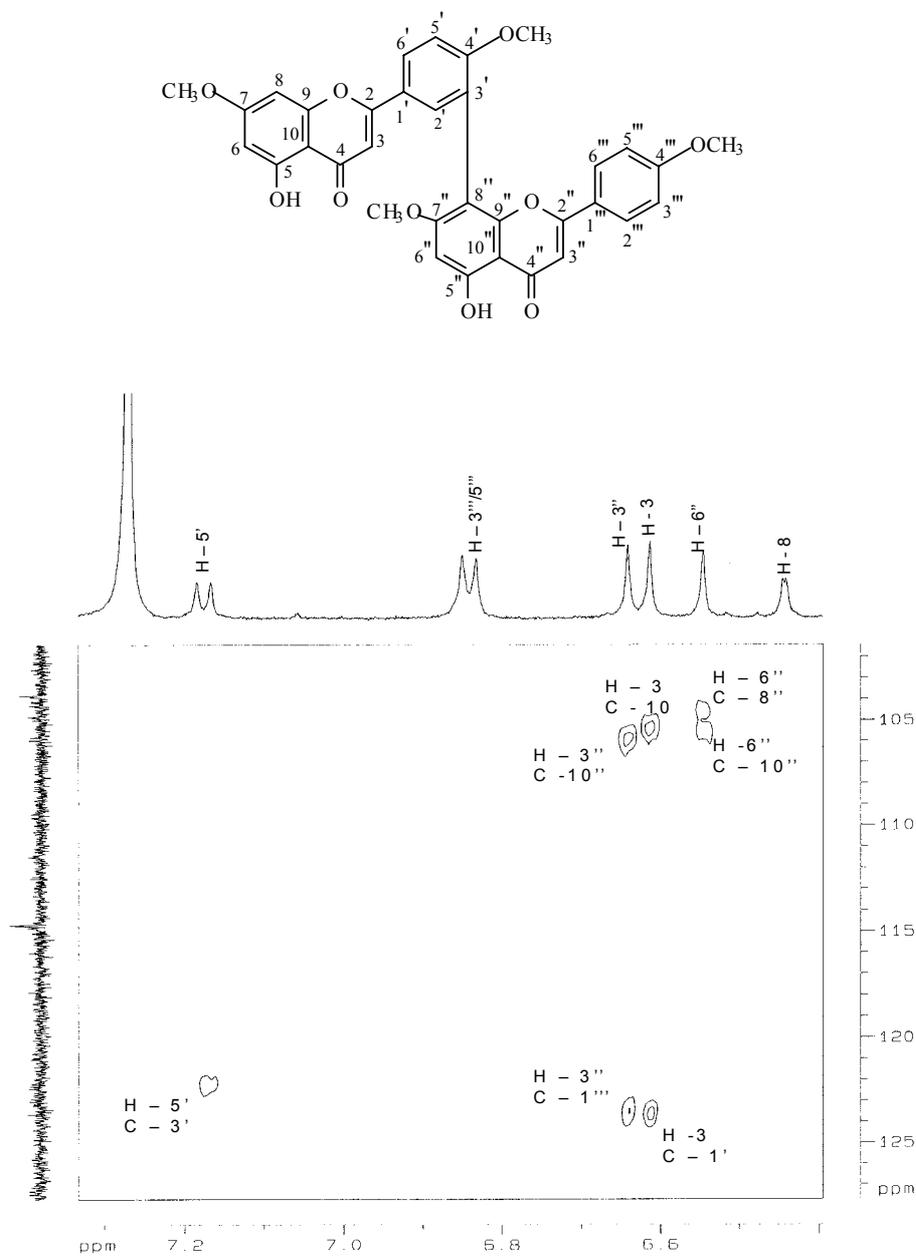


Figura 64: Mapa de contorno RMN 2D de HMBC (500MHz CDCl₃) ampliado em 6,5 – 7,3 ppm da substância tetrametilamentoflavona (**17a**).

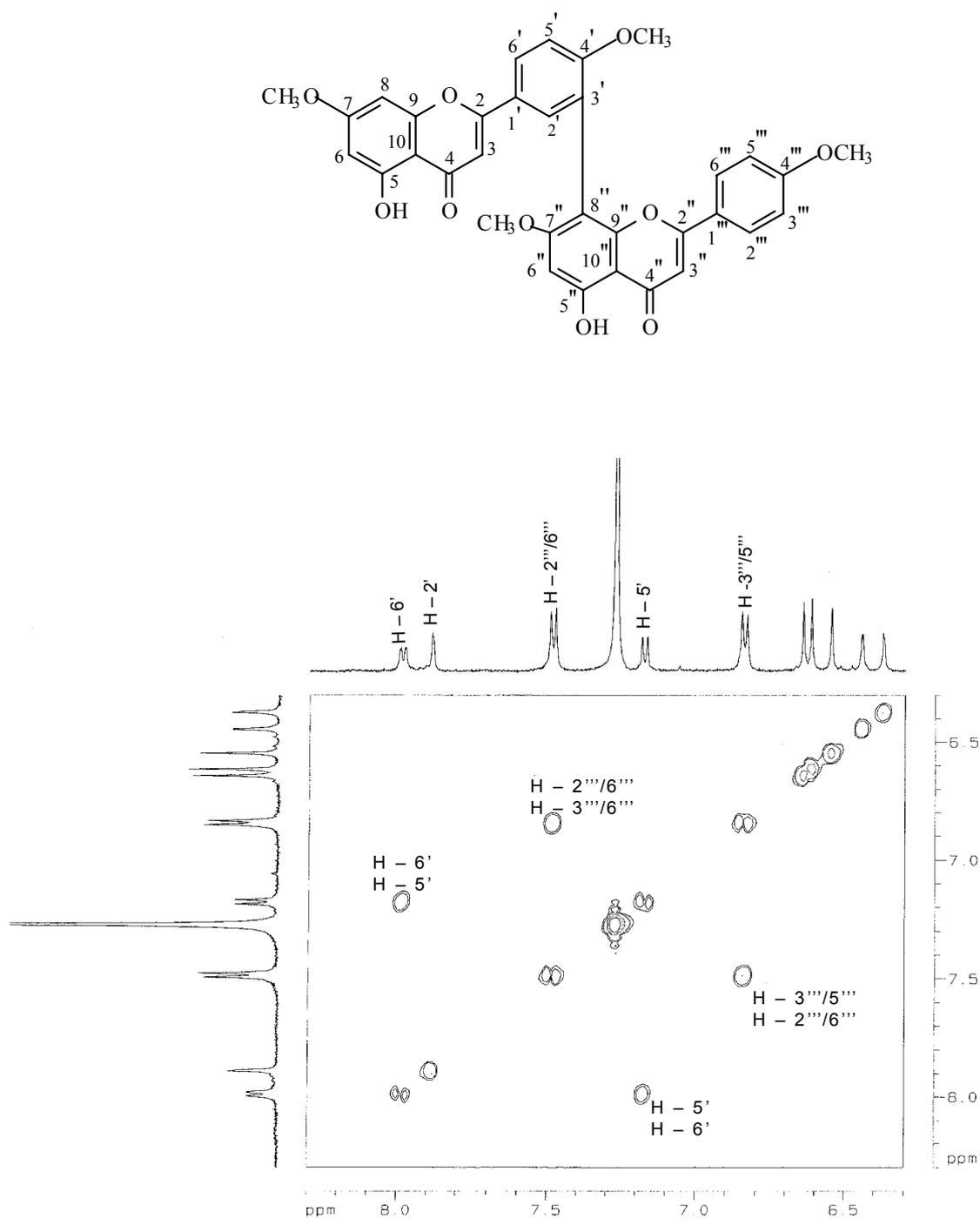


Figura 65: Mapa de conotorno de HxH COSY (500 MHz, CDCl₃) da substância 17a.

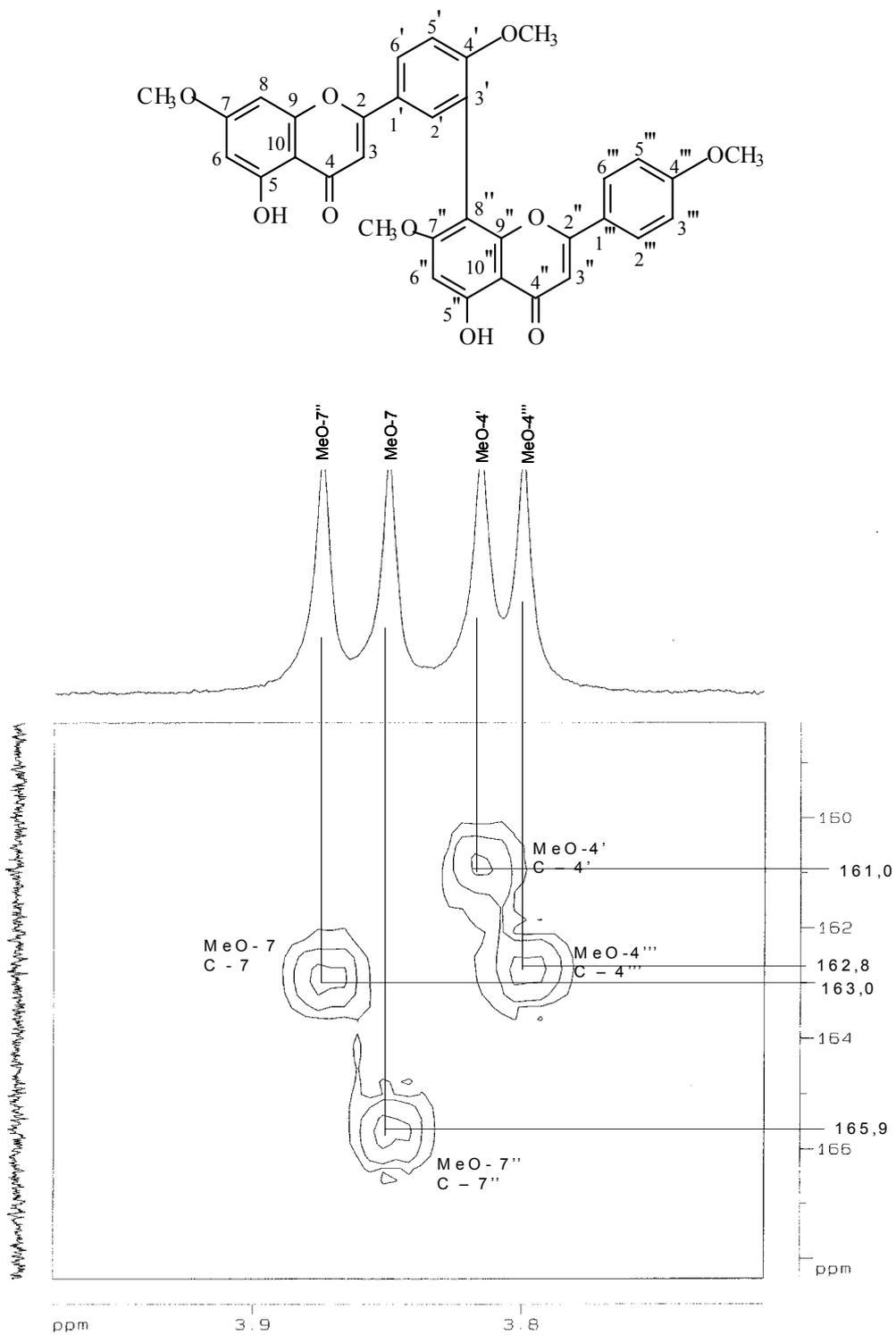


Figura 66 Mapa de contorno de RMN-2D HMBC (500 MHz, CDCl₃) ampliado em 3,7 – 4,0 ppm. Da substância **17a**.

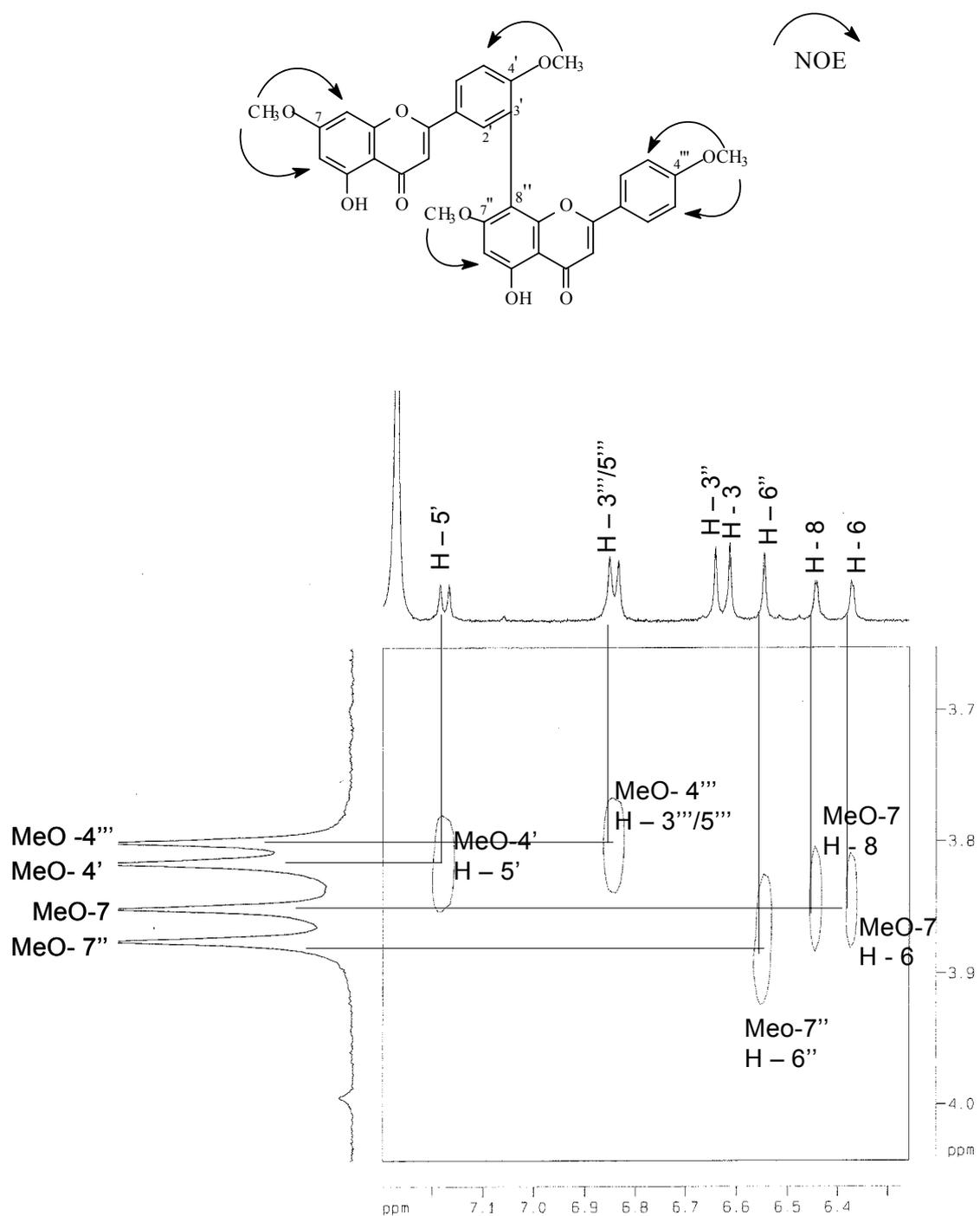
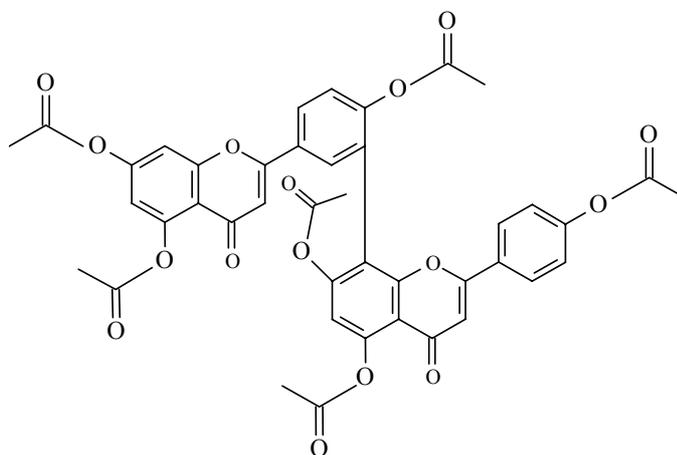


Figura 67: Mapa de cotrono RMN 2D NOESY (500 MHz, CDCl₃) ampliado em 3,7 – 4,0 ppm da substância **17a**

Derivado 17b. (Amentoflavona Peracetilada).

O derivado **17b** foi obtido através da reação de acetilação da substância **17** com piridina e anidrido acético. A análise do espectro de RMN ^1H do derivado **17b** (**Figura 68 Pág-111**) quando comparado com o da substância **17** foram observados desaparecimento dos singletes δ_{H} 13,16 e 12,99 e surgimento de sinais adicionais nas frequências 2,45; 2,40; 2,28; 2,23; 2,05; 2,01 ppm referentes aos grupos acetoxilas incorporados à molécula. O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 69** **pág-111**) mostra deslocamento químico referentes as carbonilas do grupo acetato na região entre 169,4-167,9 e 21,08-20,59 para as metilas desse grupo. São também observado diferenças acentuadas em alguns deslocamentos químicos de carbono que são compatíveis com as alterações eletrônicas provocadas pela conversão dos grupos hidroxila em grupos acetoxila (**Figura 70** **pág-112.**) (CARVALHO, *et al.*, 1993).

Os dados espectrais fornecidos pelos espectros de RMN ^1H e ^{13}C do derivado **17b** confirmam a estrutura e as atribuições do δ_{H} e δ_{C} , de **17**. Considerando-se obviamente as modificações previstas com base nos efeitos eletrônicos e estéricos incorporados pela derivação. Os deslocamentos químicos de carbonos do derivado **17b** foram atribuídos com base nos valores descritos na literatura (VELANDIA *et al.*, 1997, 2002).



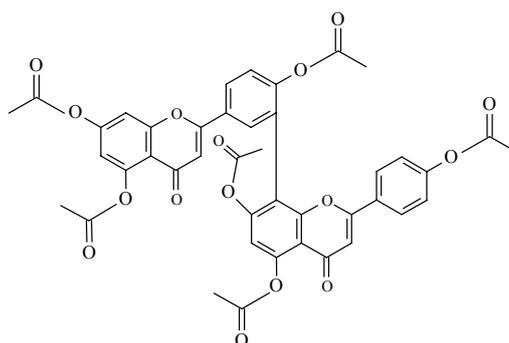


Tabela 15 Dados de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz CDCl_3) do derivado 17b comparado com valores de RMN ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz CDCl_3) da literatura (VELANDIA et al, 2002)

Derivado 17b			(VELANDIA et al, 2002)
C	δC	δH	δC
2	161,0		161,0
3	108,81	6,64(s)	108,86
4	176,22	-	176,16
5	150,14	-	150,20
6	113,93	6,75	113,96
7	154,11	-	154,13
8	109,08	7,46	109,09
9	157,54	-	157,57
10	114,78	-	114,91
1'	127,88	-	128,78
2'	129,88	8,04 (m)	129,92
3'	125,0	-	125,05
4'	151,90	-	151,41
5'	123,91	6,98 (d)	123,94
6'	127,30	8,04 (m)	127,89
2''	161,66	-	161,66
3''	108,20	6,66 (s)	108,24
4''	176,22	-	176,34
5''	150,14	-	149,97
6''	115,24	6,989 (sl)	114,91
7''	151,90	-	151,93
8''	117,02	-	117,06
9''	155,11	-	155,11
10''	115,24		115,29
1'''	127,88		128,19
2''',6'''	127,30	7,48 (d)	127,32
3''',5'''	122,42	7,06 (d)	122,45
4'''	153,32	-	153,36
OCOCH_3	169-167,9	-	169-167,9
OCOCH_3	21,08-20,59	2,01-2,45	

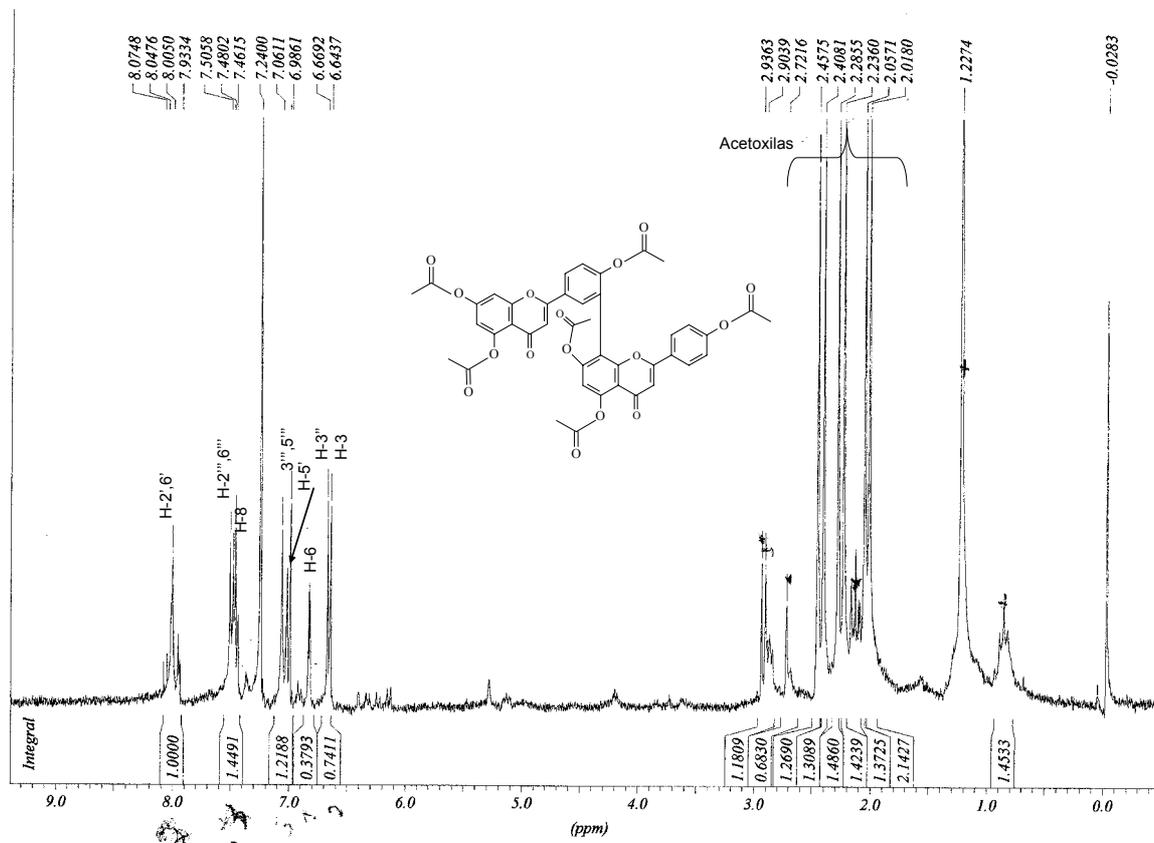


Figura 68 Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do derivado 17b.

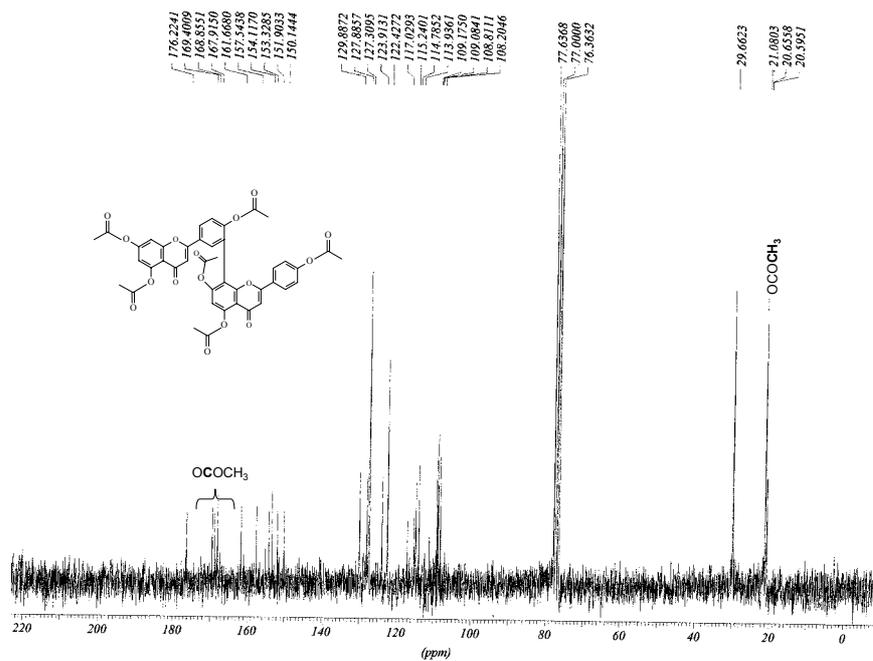


Figura 69 Espectro de RMN ^{13}C (BBD, 50 MHz CDCl_3) do derivado 17b.

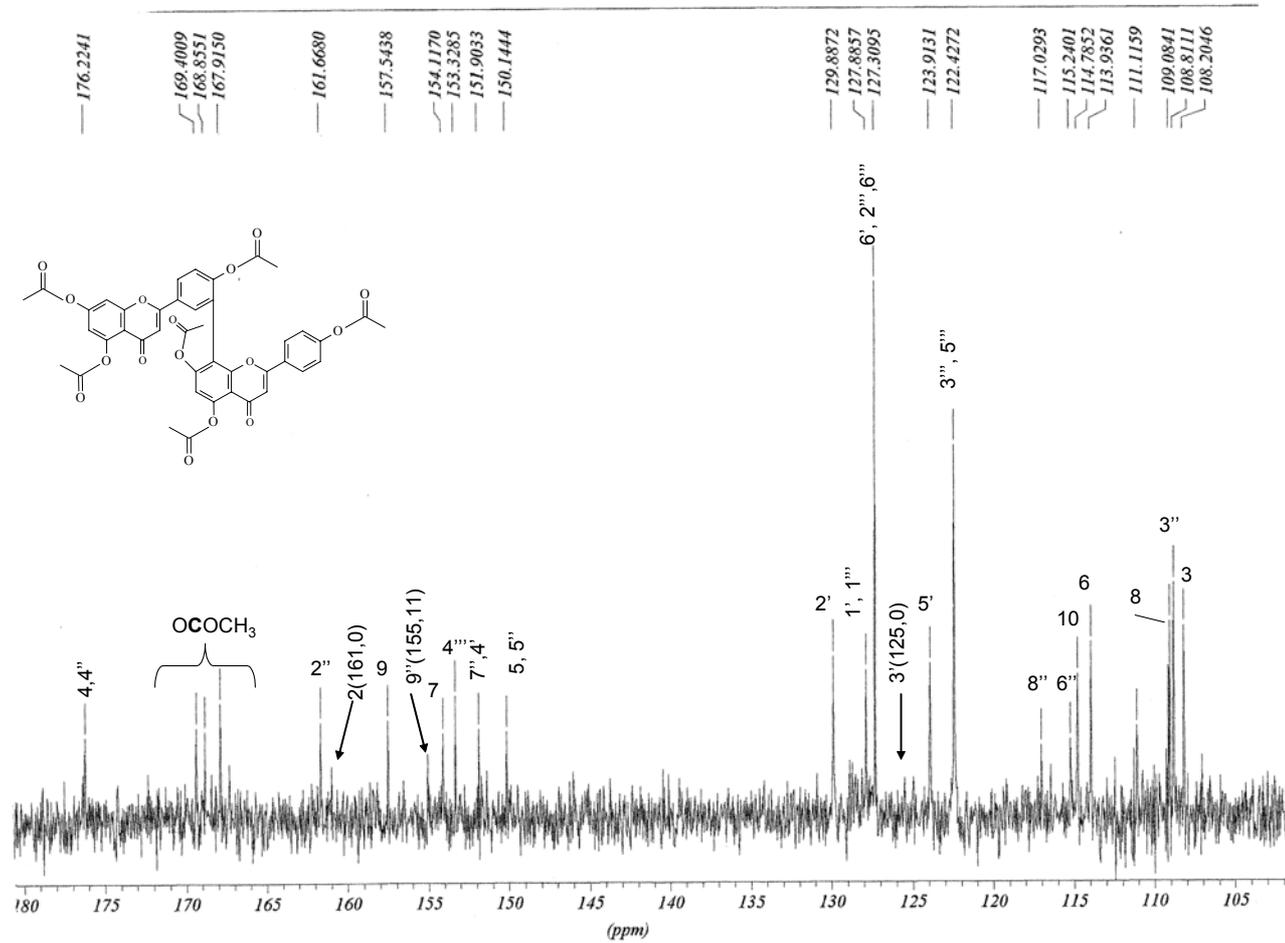


Figura 70 Expansão do espectro de RMN ^{13}C (BBD, 50 MHz CDCl_3) do derivado **17b**. Entre a região 105-180 ppm.

Substância 18 (Putraflavona)

O espectro de RMN ^1H (**Figura 71 Pág-115**) da substância **18** mostra dois sinais singletos em $\delta_{\text{H}}13,07$ e $\delta_{\text{H}} 12,97$ correspondentes a hidroxilas queladas. Na região de hidrogênios em anéis aromáticos foram observados três sinais em $\delta_{\text{H}} 8,06$ (m, H-2' e 6'), e 7,17 (d, J= 9,1 Hz, H-5') de um anel B trissubstituído. Os sinais em $\delta_{\text{H}} 7,68$ (d, J= 8,7 Hz, H-2''' e 6'''); 6,93 (d, J= 8,7 Hz H-3''' e 5''') para um sistema AA'BB' e os sinais em $\delta_{\text{H}} 6,76$ (d, J= 1,9 Hz H-8); 6,36 (d, J= 1,9 Hz H-6) de dois hidrogênios *meta* do anel A de um flavonóide. Os sinais em $\delta_{\text{H}} 6,91$, 6,90 e 6,40 representam os hidrogênios 3'', 3, 6'' das unidades de flavona. (**Figura 72 Pág-116**)

O mapa de contorno 2D de $^1\text{Hx}^1\text{H}$ COSY (**Figura 73 Pág-117,**) mostra os acoplamentos entre hidrogênios H-5' com H-6'; H-2' com H-6'; e do H-2''', 6''' com H-3''', 5''', e do H-6 com H-8. Estas análises confere à substância **18** o mesmo esqueleto que o da biflavona **17**. Diferindo apenas pela presença no espectro de RMN ^1H (**Figura 71 pág-115**) de dois sinais simples $\delta_{\text{H}} 3,82$, $\delta_{\text{H}} 3,75$ referentes a grupos metoxila.

O espectro de RMN ^{13}C (BBD **Figura 74 Pág-118**) mostra duas carbonilas conjugadas $\delta_{\text{C}} 182,0$, $\delta_{\text{C}} 181,0$; sinais de $\delta_{\text{CH}} 114,49$ (C-3''' e 5'''); 127,99 (C-2''' e 6'''); 92,67 (C-8); 98,08 (C-6); δ_{CH_3} em 56,05 e 55, 51 para as metoxila.

Os mapas de contorno 2D de HMQC (**Figura 77 Pág-120**) mostra acoplamento para 12 carbonos metínicos com os respectivos hidrogênios (**Tabela 16 Pág-114**). A atribuição dos deslocamentos químicos dos carbonos quaternários foram feitos através da análise dos mapas de contorno 2D HMBC ($^2\text{J}_{\text{CH}}$, $^3\text{J}_{\text{CH}}$) (**Figuras 78-82 Págs-,121-125**).

A posição de cada hidroxila quelada foi determinada através do mapa de contorno 2D HMBC ($^2\text{J}_{\text{CH}}$) (**Figura 81 Pag-124**) no qual é observado acoplamento a duas ligações entre $\delta_{\text{C}} 161,12$ (C-5) com $\delta_{\text{H}} 12,9$ (OH-5); $\delta_{\text{C}} 160,56$ (C-5'') com $\delta_{\text{H}} 13,07$ (OH-5''). Os sinais de acoplamento a longa distância ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) entre os carbonos 6 (δ_{CH} : 98,08) e 10 (104,7) e o (HO-5 e entre HO-5'' e os carbonos 6'' (98,91) e C-10'' (104,22) e ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) entre $\delta_{\text{H}} 8,06$ (H-2') com o C-8'' (104,22) confirmam a proposta da amentoflavona. (**Tabela 16 pág-114**) para a substância **18**.

Para definir a posição das metoxilas fez-se análise com experimentos de RMN-NOEDIFF com irradiação nas metoxilas. Irradiação em 3,75 gerou nOe em 6,36 (H-6) e 6,76 (H-8) e irradiação em 3,85 gerou nOe em 6,93 (H-3''',5''') (**Tabela 17 pág-115**). Esses dados permitiram localizar as metoxilas ($\delta_{\text{H}}3,75$) em 7 e a metoxila $\delta_{\text{H}} 3,85$ em 4'''. A **tabela 16 pág-114** mostra as atribuições dos demais sinais detectados nos espectros 2D. A estrutura de **18** ficou assim definida como 7, 4''' dimetilamentoflavona sendo conhecida com putraflavona. Esta substância foi isolada de *Putranjiva roxburghii* Wall (GARG *et al.*, 1971) e é a primeira vez que esta sendo registrada no gênero *Ouratea* os dados de RMN ^{13}C está sendo descrito pela primeira vez.

Substâncias semelhantes foram isoladas dos extratos das folhas de *Ouratea semiserrata* através do trabalho de VELANDIA (1997) que usou as técnicas usuais de cromatografia de adsorção e o trabalho de BOSSO (2004) que além de usar fracionamento cromatográfico em gel sílica, utilizou a técnica HPLC-DAD, UV e RMN ^1H (incluindo NOEDIFF) para identificar outros flavonóides não isolados anteriormente com as técnicas usuais. Estes biflavonóides são: Amentoflavona, 4'-metil-amentoflavona (Podocarpusflavona-A); 7-metil-amentoflavona (Podocarpusflavona) e 7,4'-dimetil-amentoflavona (Podocarpusflavona-B), (BOSSO, 2004).

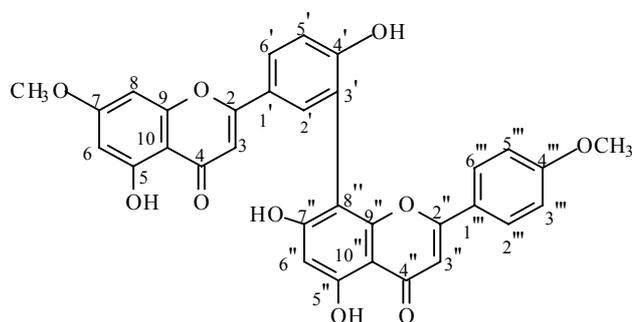


Tabela 16: Dados de RMN ^1H e ^1H - ^1H -COSY (500MHz) ^{13}C (125MHz) e 2D da substância putraflavona (**18**) em DMSO- d_6

C	HMQC		HMBC		HxH COSY
	δ_c	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	
2	164,13	-	H-3	H-2', H-6'	
3	103,10	6,90 (s)			
4	182,12	-	H-3		
5	161,12	-	H-6, OH-5		
OH-5		12,91			
6	98,08	6,36 (d,J= 1,9Hz)		OH-5	H-8
7	165,12	-		Meo-7	
Meo-7	56,05	3,83			
8	92,67	6,76 (s l)			H-6
9	157,32	-	H-8		
10	104,70	-		OH-5, H-6, H-3 H-8	
1'	120,80	-		H-3	
2'	131,42	8,06 (m)			
3'	120,24	-			
4'	157,32	-			
5'	116,42	7,15 (d,J= 9,1 Hz)			H-6'
6'	127,99	8,06 (m)			H-5'
2''	163,16	-	H-3''	H-2'''/6'''	
3''	103,55	6,91 (s)			
4''	181,94		H-3''		
5''	160,56		H-6'', OH-5''		
OH-5''		13,07			
6''	98,91	6,40 (s)		OH-5''	
7''					
8''	104,22			H-6'', H-2'	
9''	154,57				
10''	104,22			OH-5'', H-6'', H-3''	
1'''	122,99			H-3''	
2'''/6'''	127,99	7,68 (d,J= 8,7 Hz)			H-3'''/5'''
3'''/5'''	114,49	6,93 (d,J= 8,7 Hz)			H-2'''/6'''
4'''	162,20		H-3'''/5'''	H-2'''/6''', MeO-4'''	
MeO-4'''	55,51	3,75 (s)			

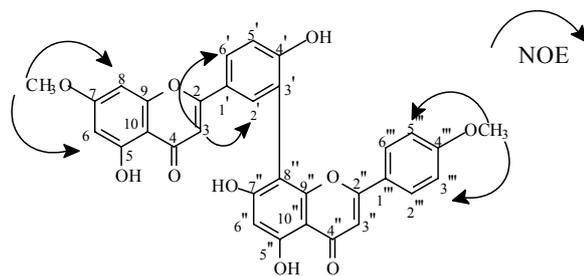


Tabela 17: Dados espectrométricos de RMN¹H-NOEDIFF da substância **18**

H Irradiado		NOE	
δ_H	H	δ_H (mult. Hz)	H
3,83	Meo-7	6,76 (s l), 6,36 (d,J= 1,9Hz)	8 e 6
3,75	Meo-4'''	6,93 (d,J= 8,7 Hz)	3''' e 5'''
6,90	3	8,06 (s l) e 8,04 9 (s l)	2' e 6'
6,91	3''	7,68 (d,J= 8,7 Hz)	2''' e 6'''

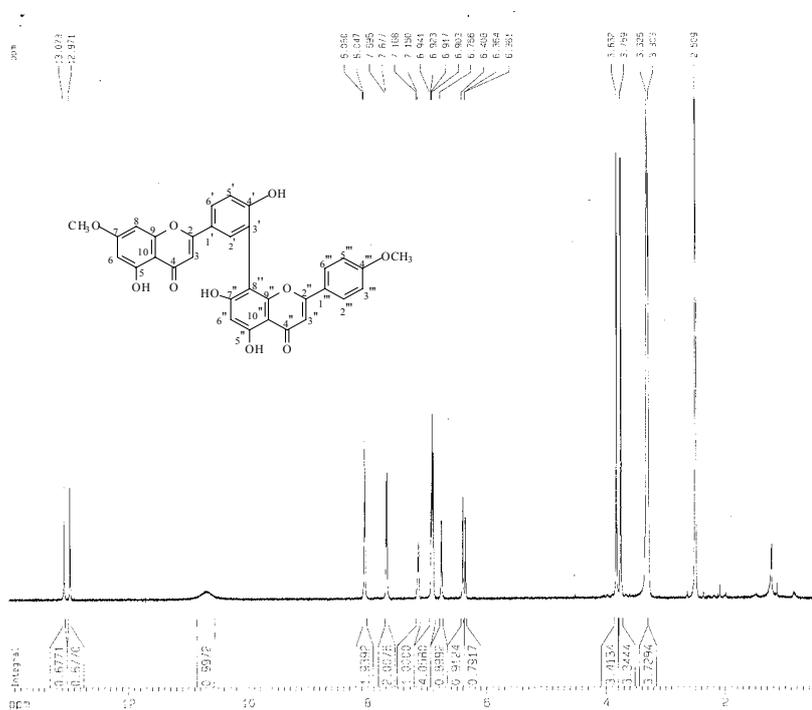


Figura 71: Espectro de RMN ¹H (500MHz, DMSO-d₆) da substância putraflavona (18).

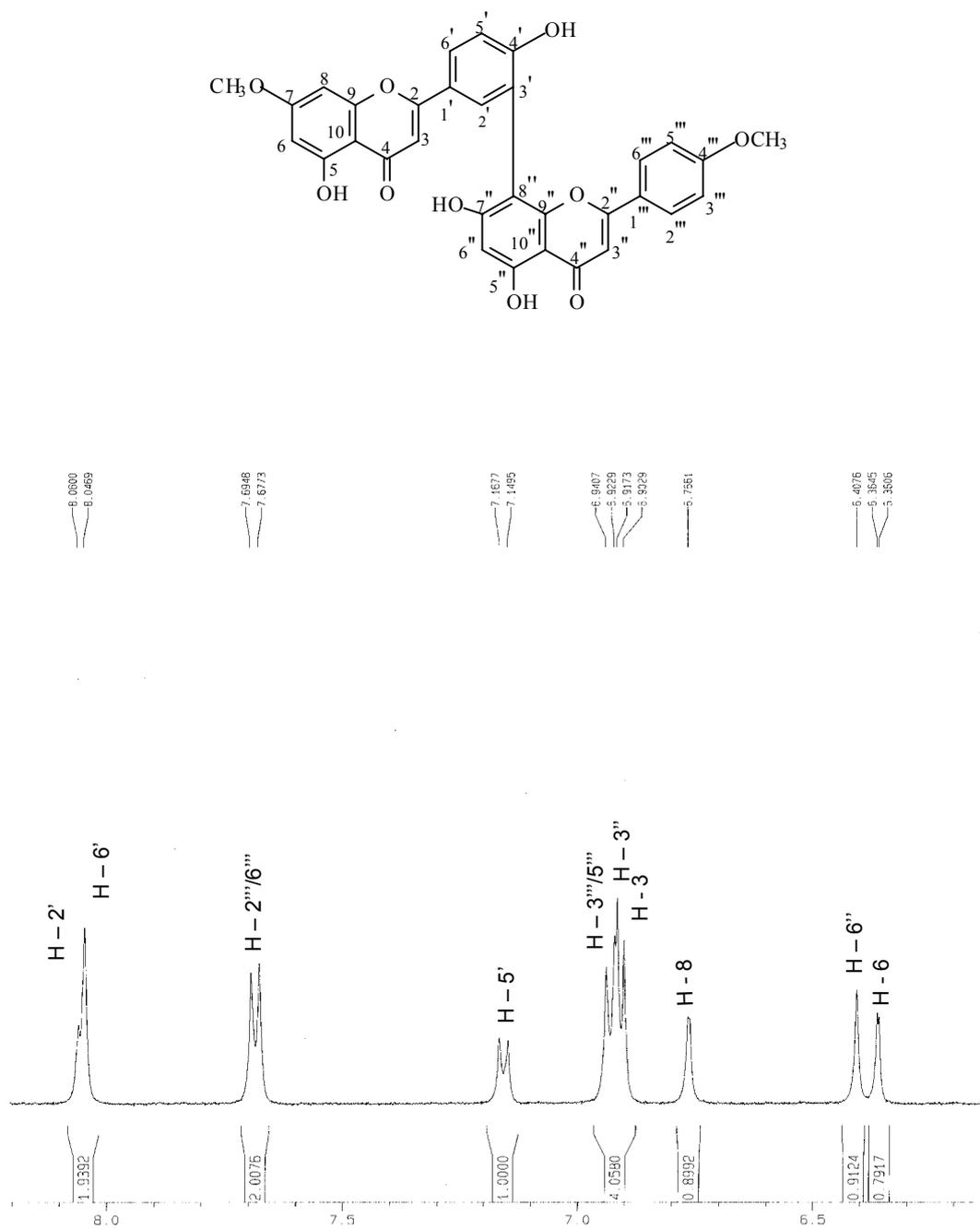


Figura 72: Espectro de RMN ^1H (500MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da substância Putraflavona (18) ampliado entre 6,2 – 8,2 ppm.

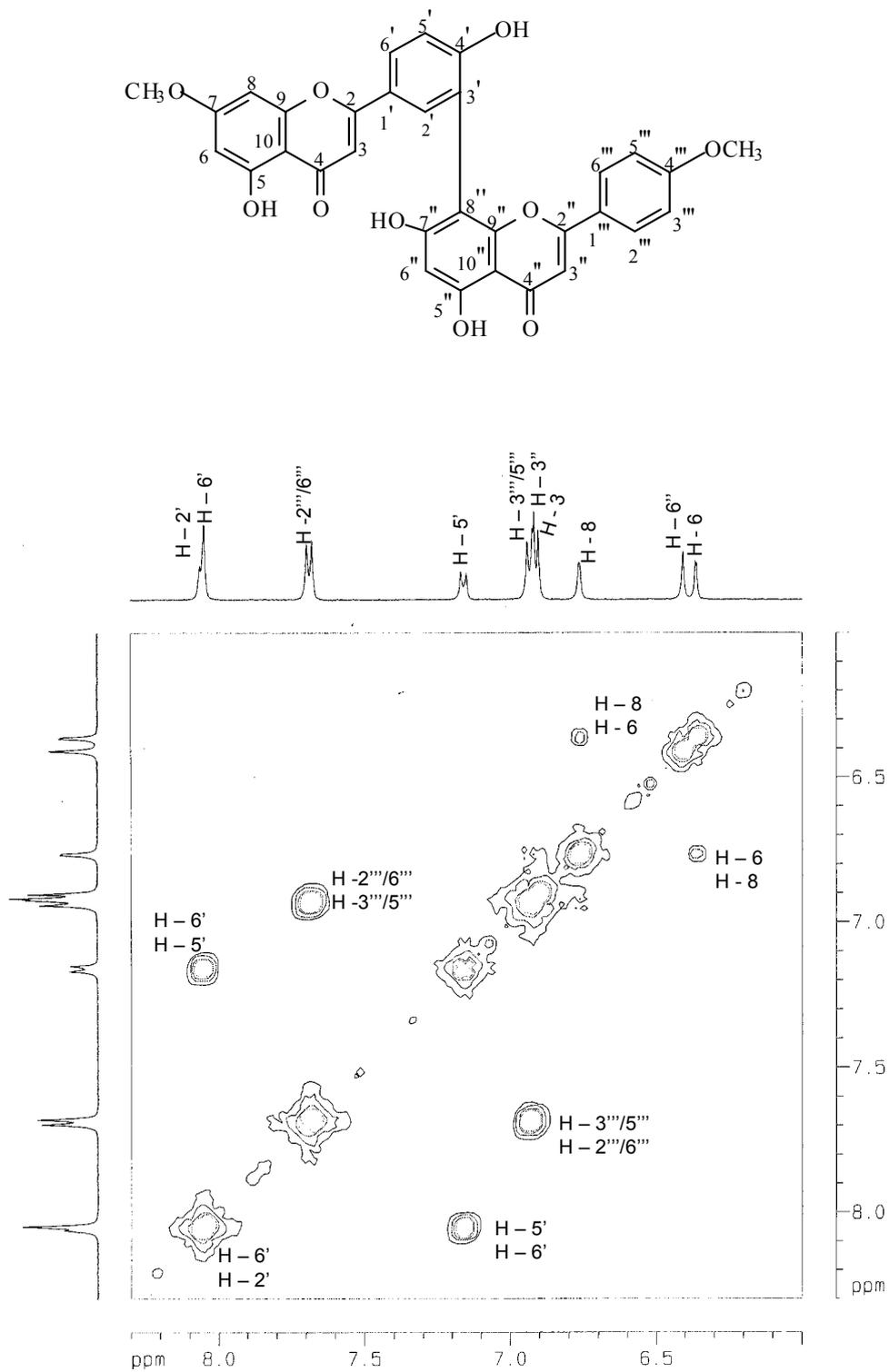


Figura 73: Mapa de contornode $^1\text{Hx}^1\text{H}$ COSY (500 MHz, DMSO- d_6) da substância putraflavona (18).

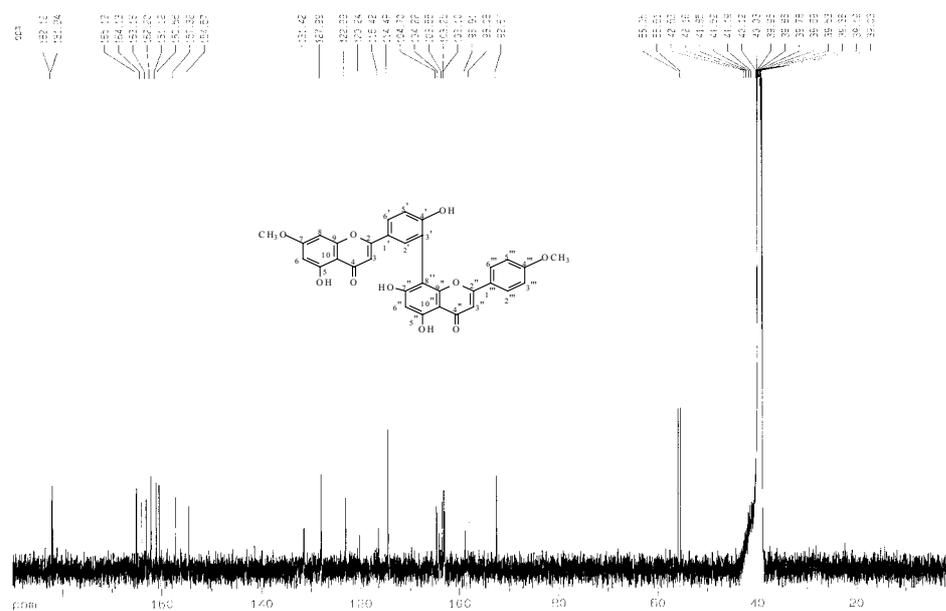


Figura 74: Espectro de RMN ^{13}C (BBD 500MHz, DMSO- d_6) da substância **18**.

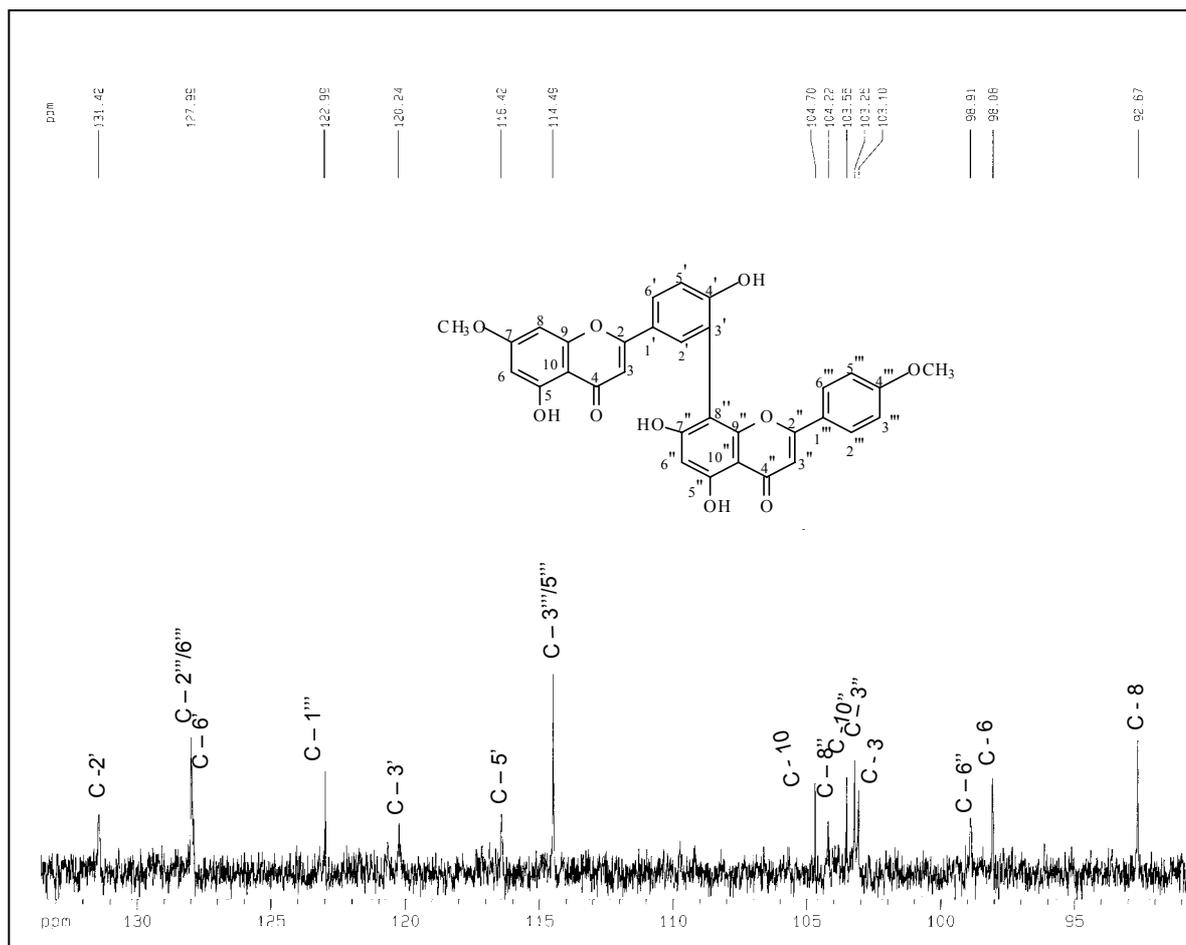


Figura 75 :Expansão do Espectro de RMN ^{13}C (BBD 500MHz, DMSO- d_6) da substância putraflavona (**18**) entre 92–135 ppm.

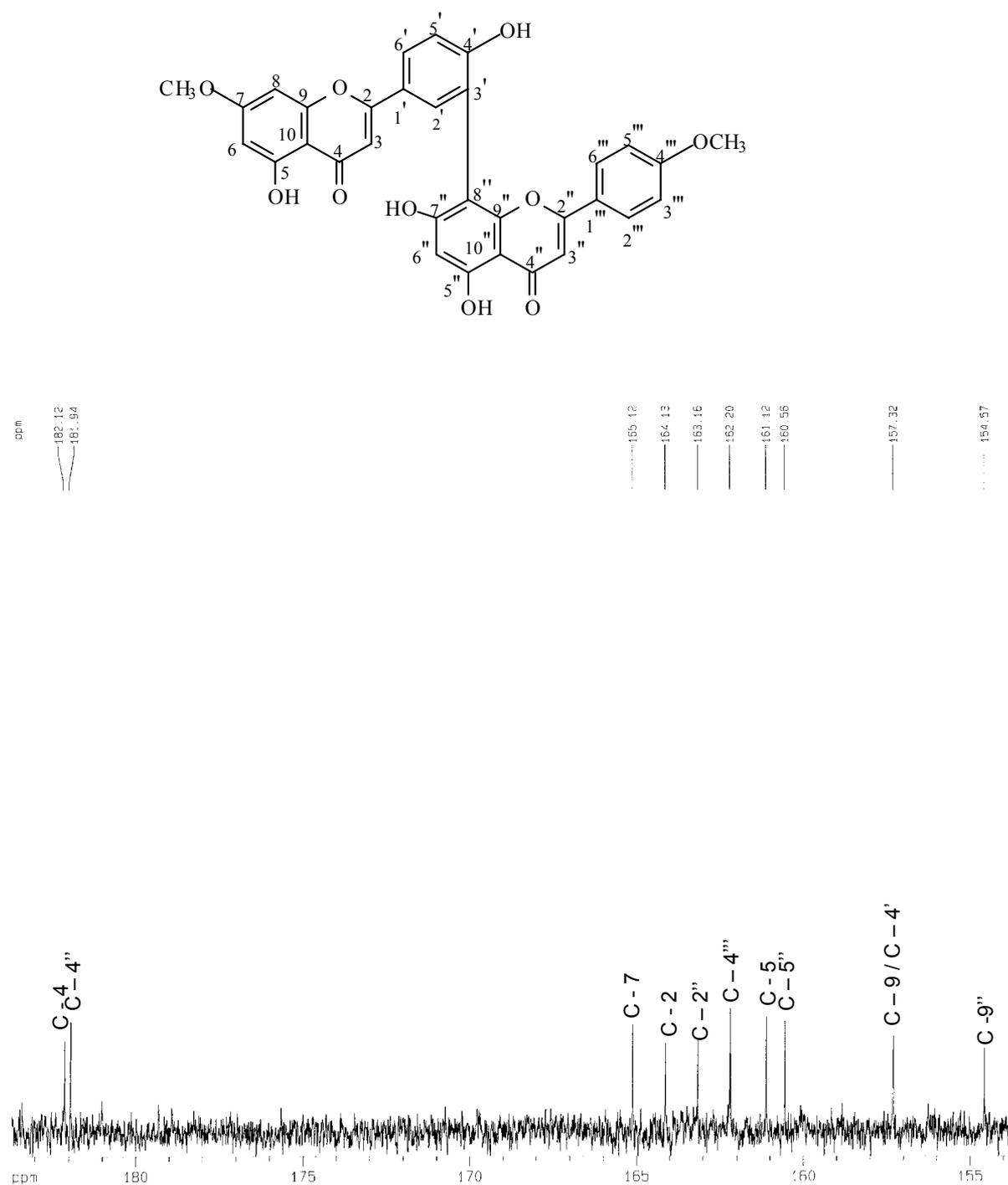


Figura 76: Expansão do espectro de RMN ^{13}C (BBD, 500MHz, DMSO-d₆) da substância putraflavona (**18**), entre 155 – 185 ppm

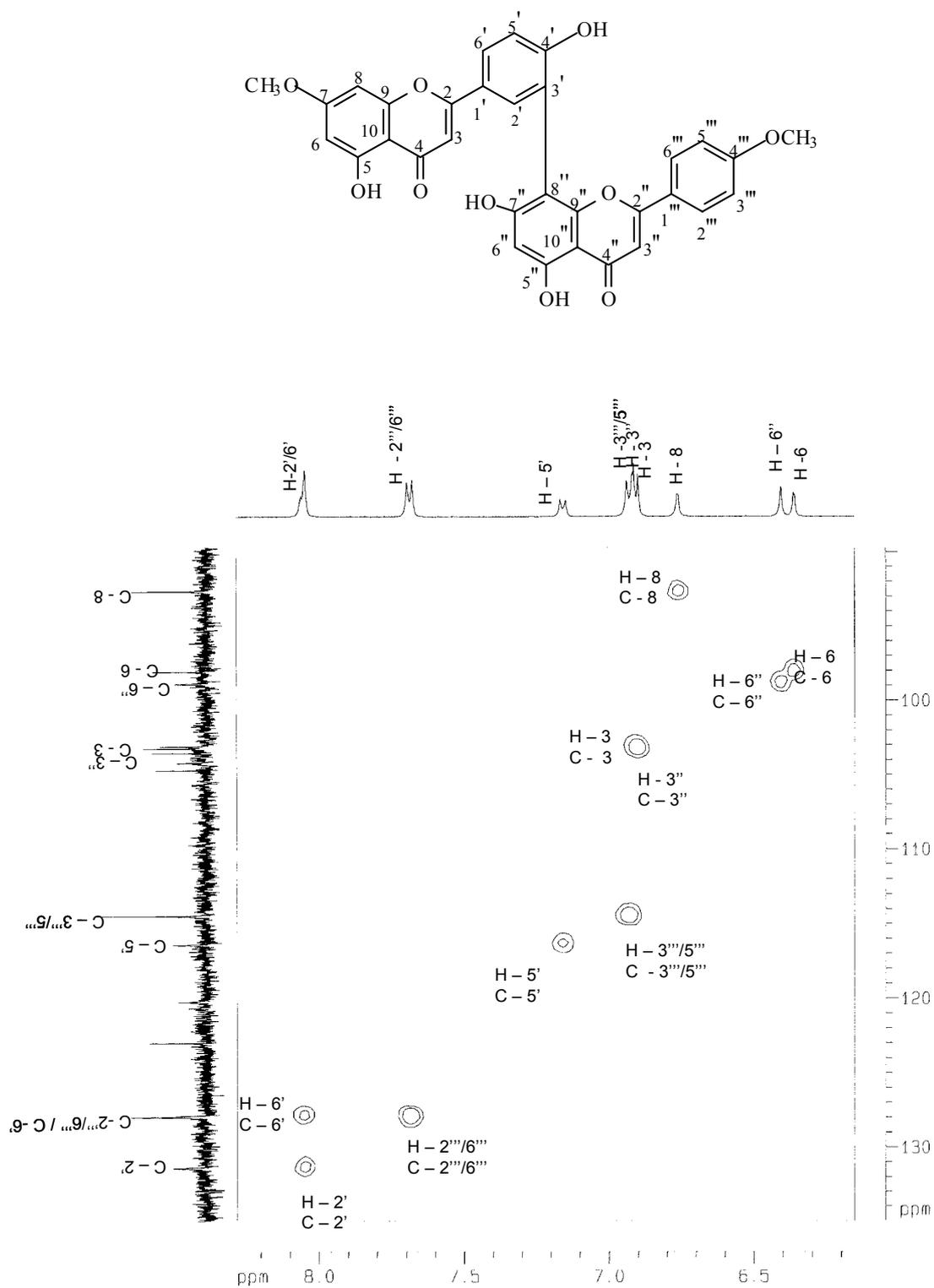


Figura 77: Mapa de contorno HMQC (500/125 MHz, DMSO-d₆) da substância putraflavona (18).

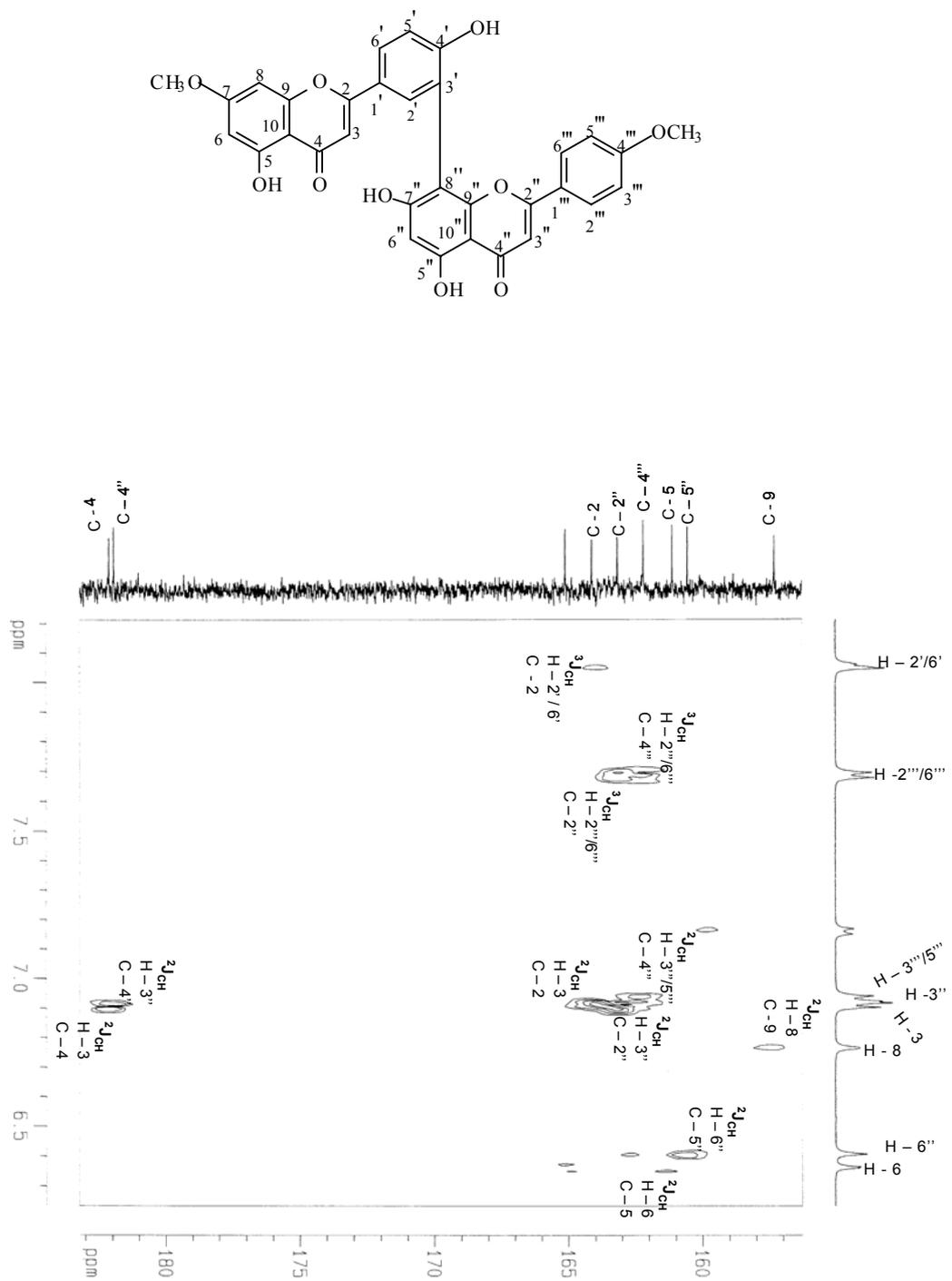


Figura 78 ; Mapa de contorno HMBC (500/125MHz, DMSO -d₆) da substância putraflavona (**18**).

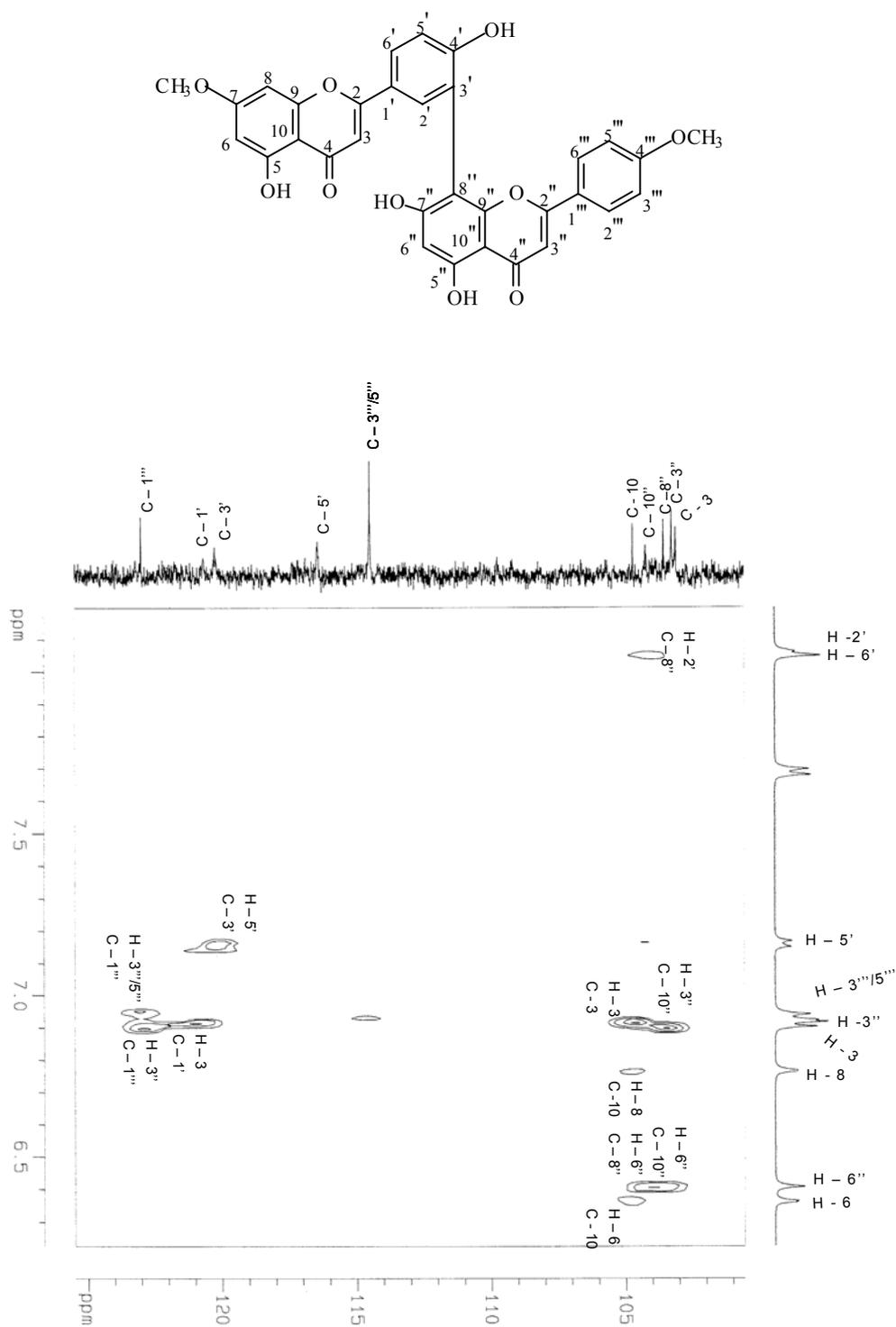


Figura 79: Mapa de contorno HMBC (500/125 MHz, DMSO -d₆) da substancia putraflavona (18) entre 101–125 ppm.

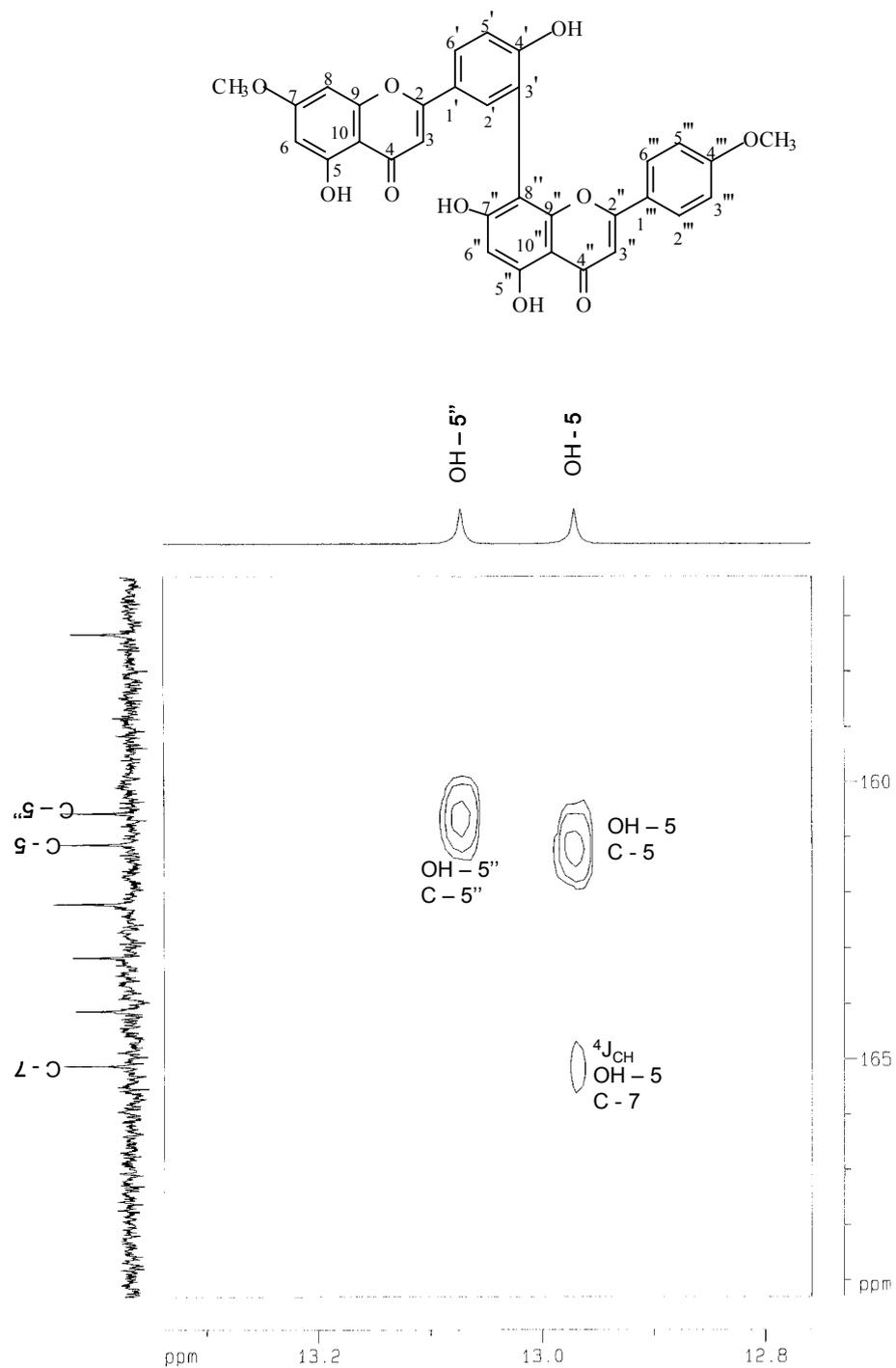


Figura 80: Mapa de contorno HMBC (500/125 MHz, DMSO- d_6) da substância putraflavona (18), entre 157–169 ppm.

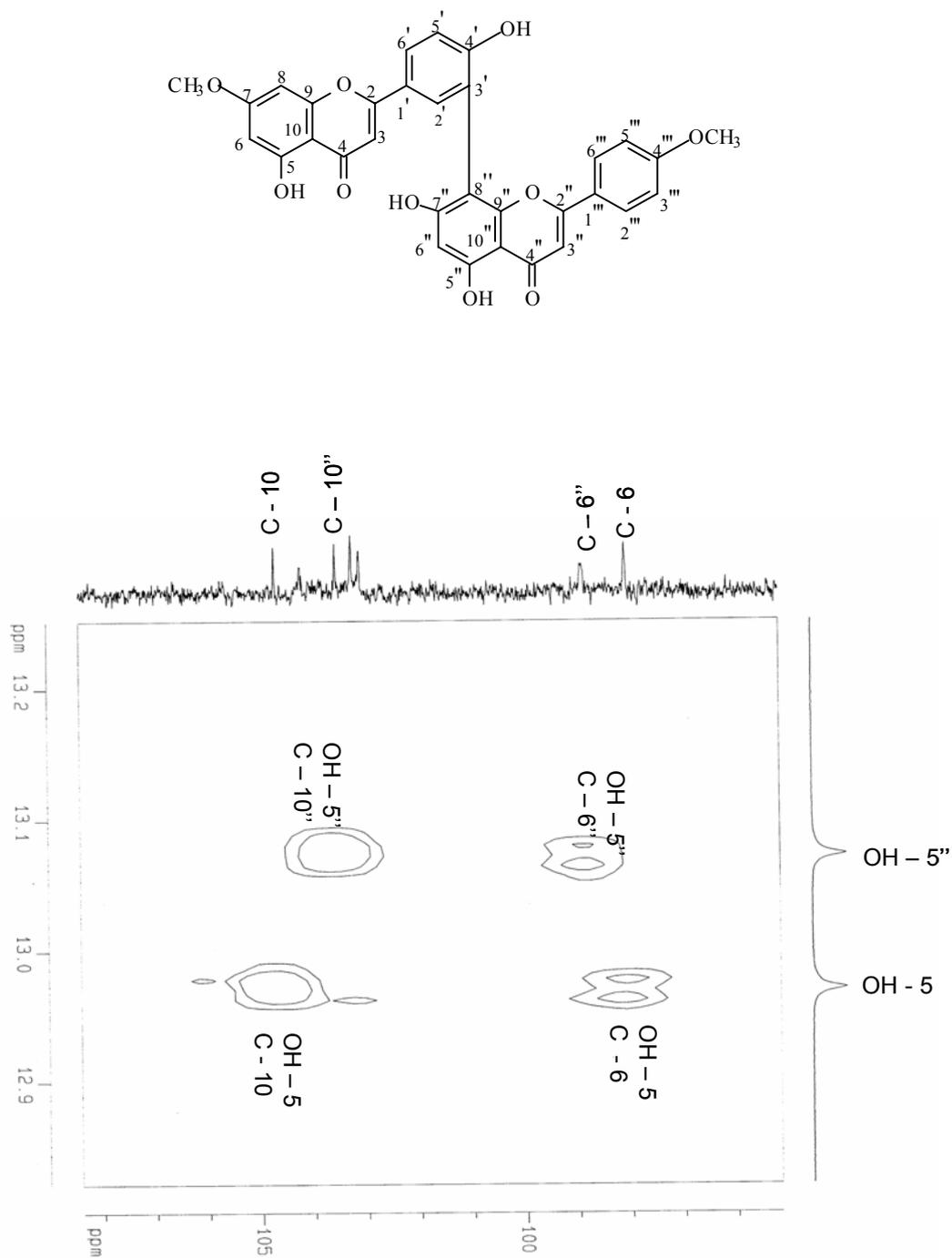


Figura 81: Mapa de contorno HMBC (500/125 MHz, DMSO -d₆) da substância putraflavona (18), entre 96 – 108 ppm.

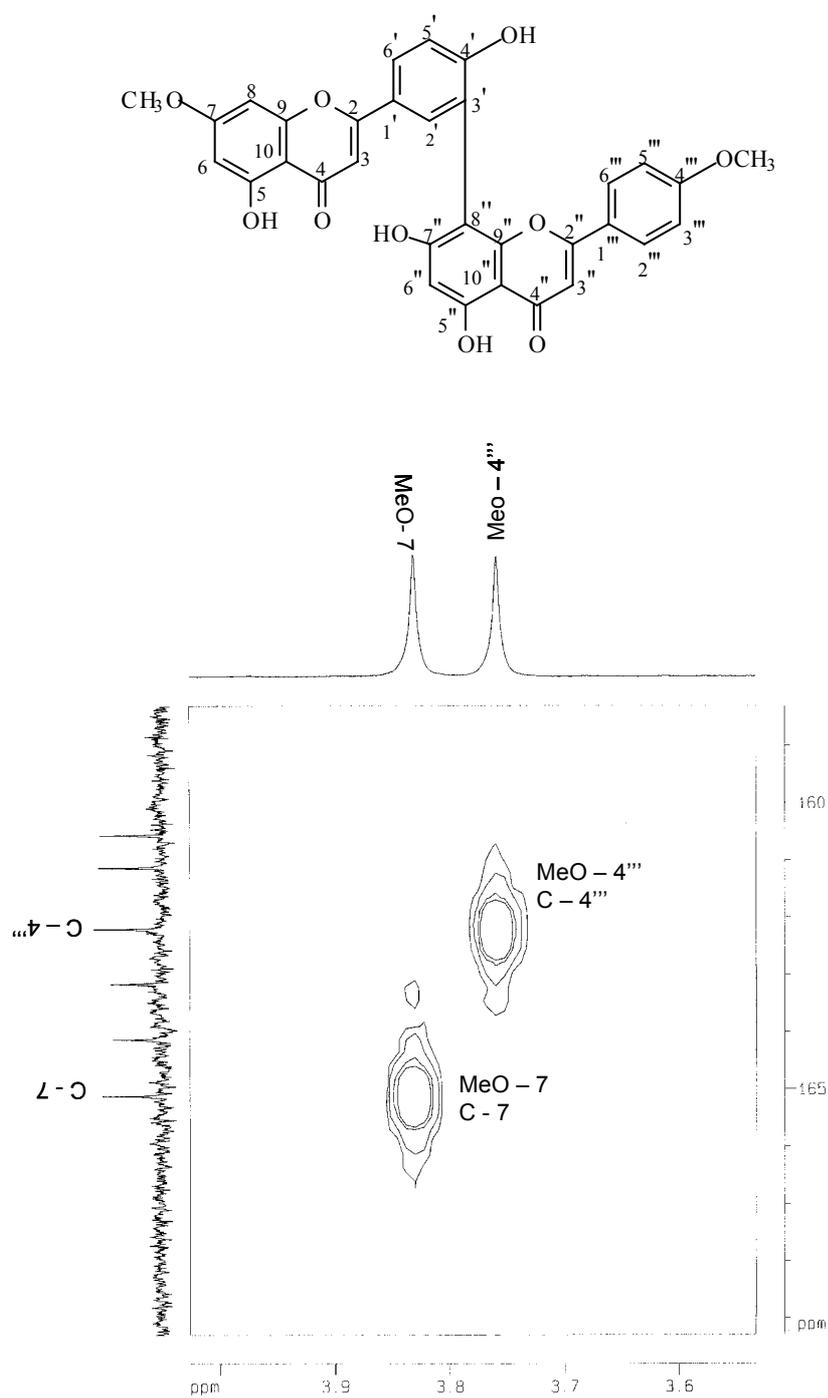


Figura 82 Mapa de contorno HMBC (500/125 MHz, DMSO -d₆) da substância putraflavona (**18**), entre 159 – 169 ppm.

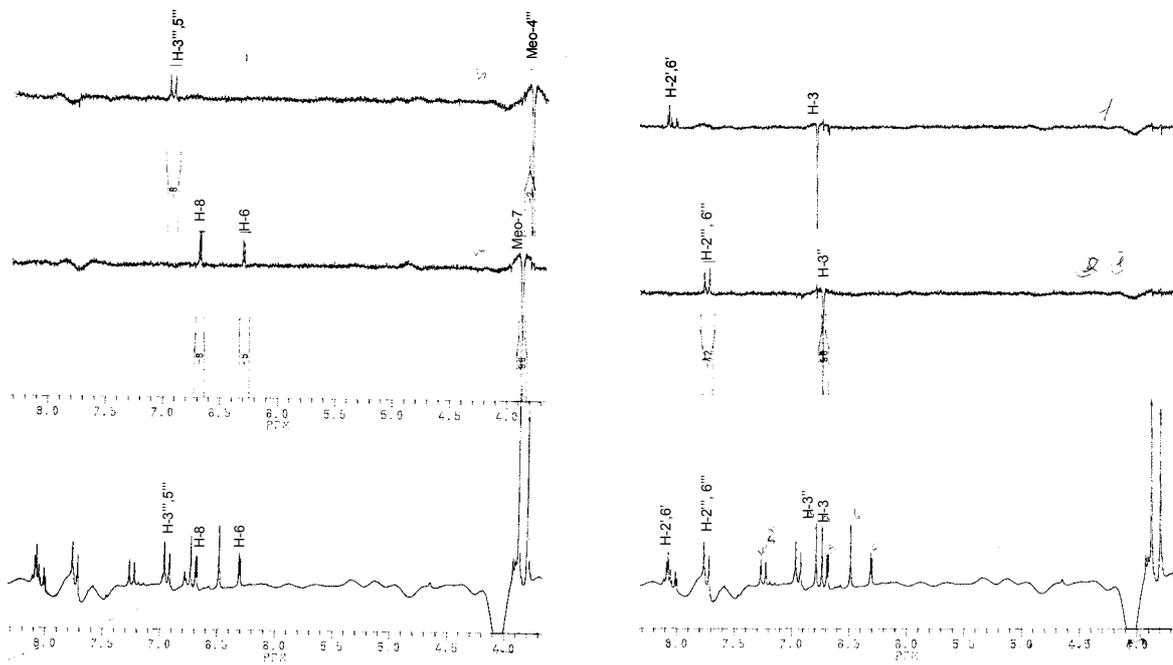
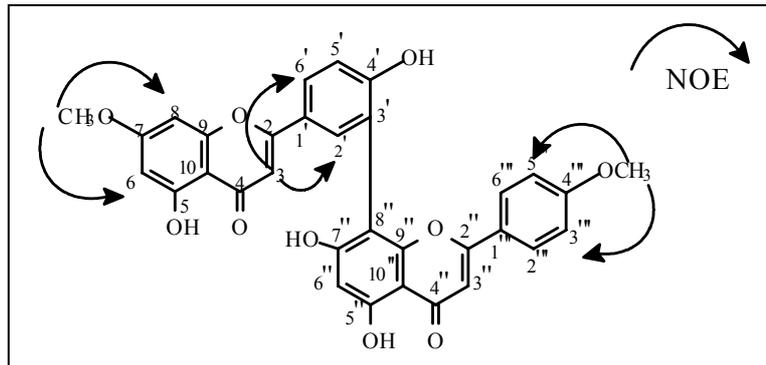
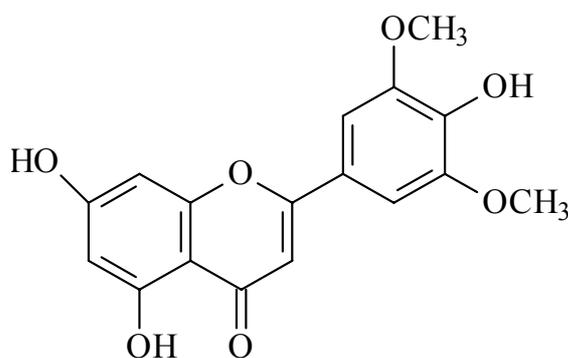


Figura 83 Espectro de RMN-NOEDIFF (200 Mhz) da substância putraflavona (**18**).

Substância 19. (5,7,4' triidroxi-3',5' dimetoxi-flavona)

O espectro de RMN ^1H (Figura 84 pág-129) apresenta um sinal simples em δ_{H} 12,95 evidenciando grupo hidroxila formando ligação de hidrogênio. Sinais em δ_{H} 7,31 (s 2H, H-2' e 6'); 6,97 (s, H-3); 6,55(d, J= 2,1 Hz, H-8); 6,19 (d, J= 2,1 Hz, H-6) e 3,87 (s, 6H. 2x MeO). A análise desses dados permitiu sugerir uma flavona com anel A contendo hidrogênio com acoplamento *meta* e o anel B trissubstituído contendo dois hidrogênios equivalentes representados por um singleto. O espectro de RMN ^{13}C (Figura 85 pág-129) mostra entre os sinais os representantes de carbonila conjugada δ_{C} 181,94 (C-4) e δ_{CH} 98,97 (C-6); 94,34 (C-8) e as duas metoxilas 56,50. A Tabela 18 pág-128 mostra as atribuições dos deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono de 19.

Experimento de RMN ^1H NOEDIFF (Figura 86, pág-130 Tabela 19 pág-128) permitiu determinar a posição dos substituintes do anel B. Irradiação na frequência das metoxilas obteve-se nOe nos H-2',6' (δ_{H} 7,31); irradiando na frequência do H-3(6,97) obteve-se nOe no H-2',6'; irradiando na frequência dos hidrogenios H-2' e 6' (7,31) obteve-se nOe no H-3 (6,97) e nas metoxilas (3,87). Esses dados confirmam a localização das metoxilas em 3' e 5' ficando um grupo OH em 4'. As análises acima e comparação com valores descritos na literatura (KUWABARA, *et al.*, 2003) concluímos que a substância 19 é o flavonoide 5,7,4'-triidroxi-3',5'-dimetoxi-flavona, anteriormente isolada de *Agelaea pentagyna* (Connaraceae).



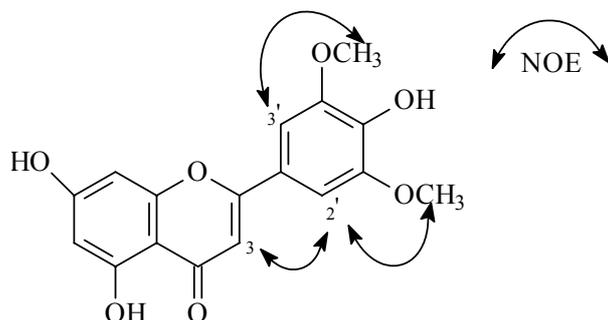
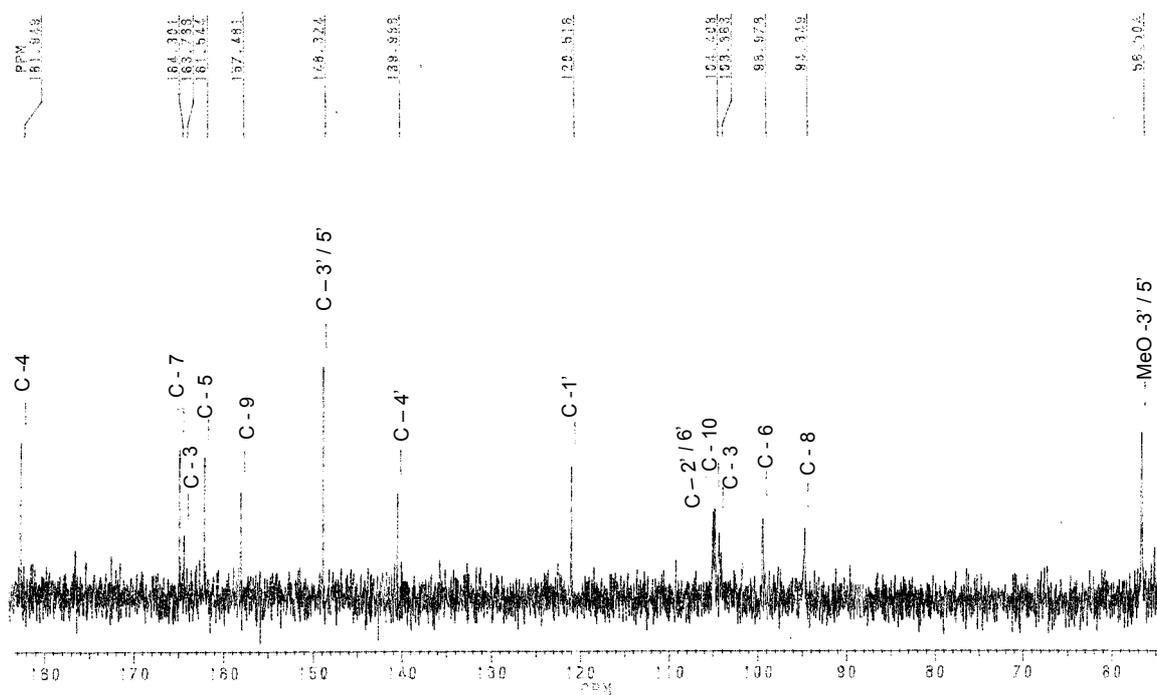
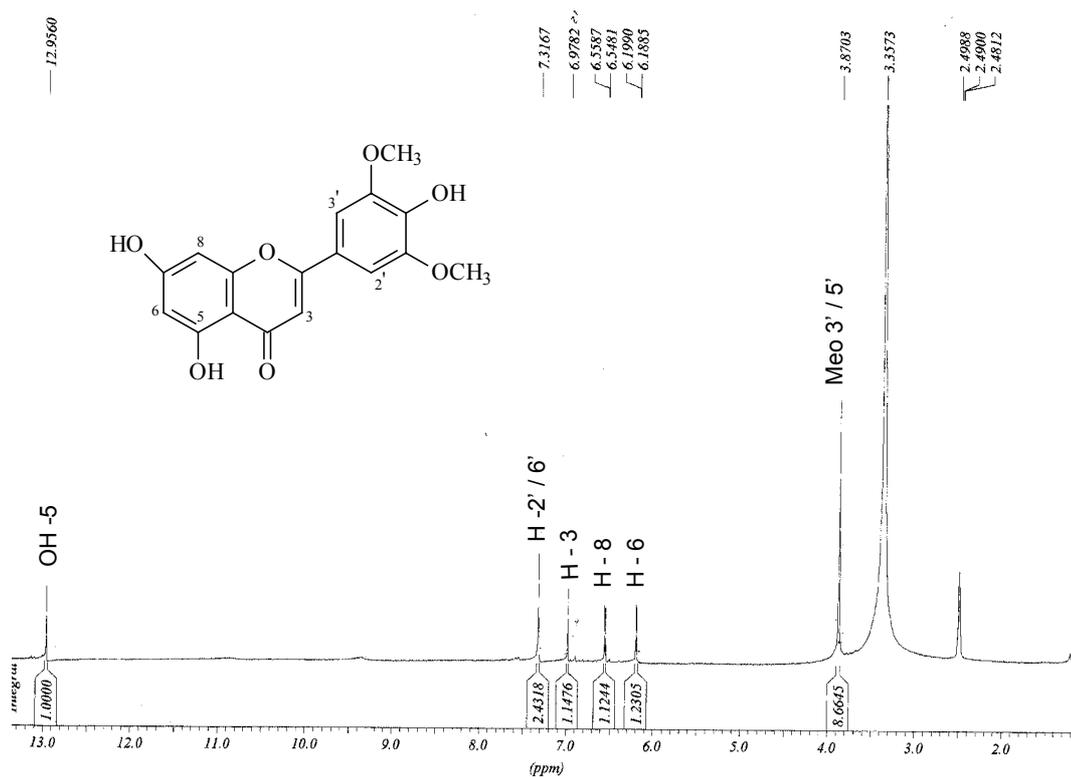


Tabela 18 -Dados de RMN ^1H e ^{13}C (200MHz e 50 MHz, em CDCl_3) da substância **19** e comparação com RMN ^1H e ^{13}C (400MHz e 100 MHz, em DMSO-d_6) da literatura (KWABARA et al., 2003).

C	Substância 19		KWABARA et al., 2003	
	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H
2	163,78	-	163,6	-
3	103,86	6,97 (s)	103,5	6,97 (s)
4	181,94	-	181,7	-
5	161,54	-	157,3	-
OH-5		12,95		
6	98,97	6,19 (d, J= 2,1Hz)	98,8	6,21(d, J=2,0 Hz)
7	164,30	-		-
8	94,34	6,55 (d, J= 2,1 Hz)	94,1	6,56(d, J=2,0 Hz)
9	157,48	-	161,3	-
10	104,40	-	103,6	-
1'	120,51	-	120,3	-
2'	105,0	7,31 (s)	104,3	7,32 (s)
3'	148,32	-	148,1	-
MeO-3'	56,50	3,87 (s)	56,3	3,89 (s)
4'	139,98	-	139,8	-
5'	148,32	-	148,1	-
Meo-5'	56,50	3,87 (s)	56,3	3,89 (s)
6'	105,0	7,31 (s)	104,3	7,32 (s)

Tabela 19: Dados espectrométrico de experimento RMN ^1H NOEDIFF da substância **19**.

H irradiado		NOE	
δ_H	H	δ_H (Mult Hz)	H
3,87 (s)	MeO-3', 5'	7,31 (s)	2' e 6'
6,97 (s)	3	7,31 (s)	2' e 6'
7,31 (s)	2' e 6'	6,97 (s) e 3,87 (s)	3 e Meo 3', 5'



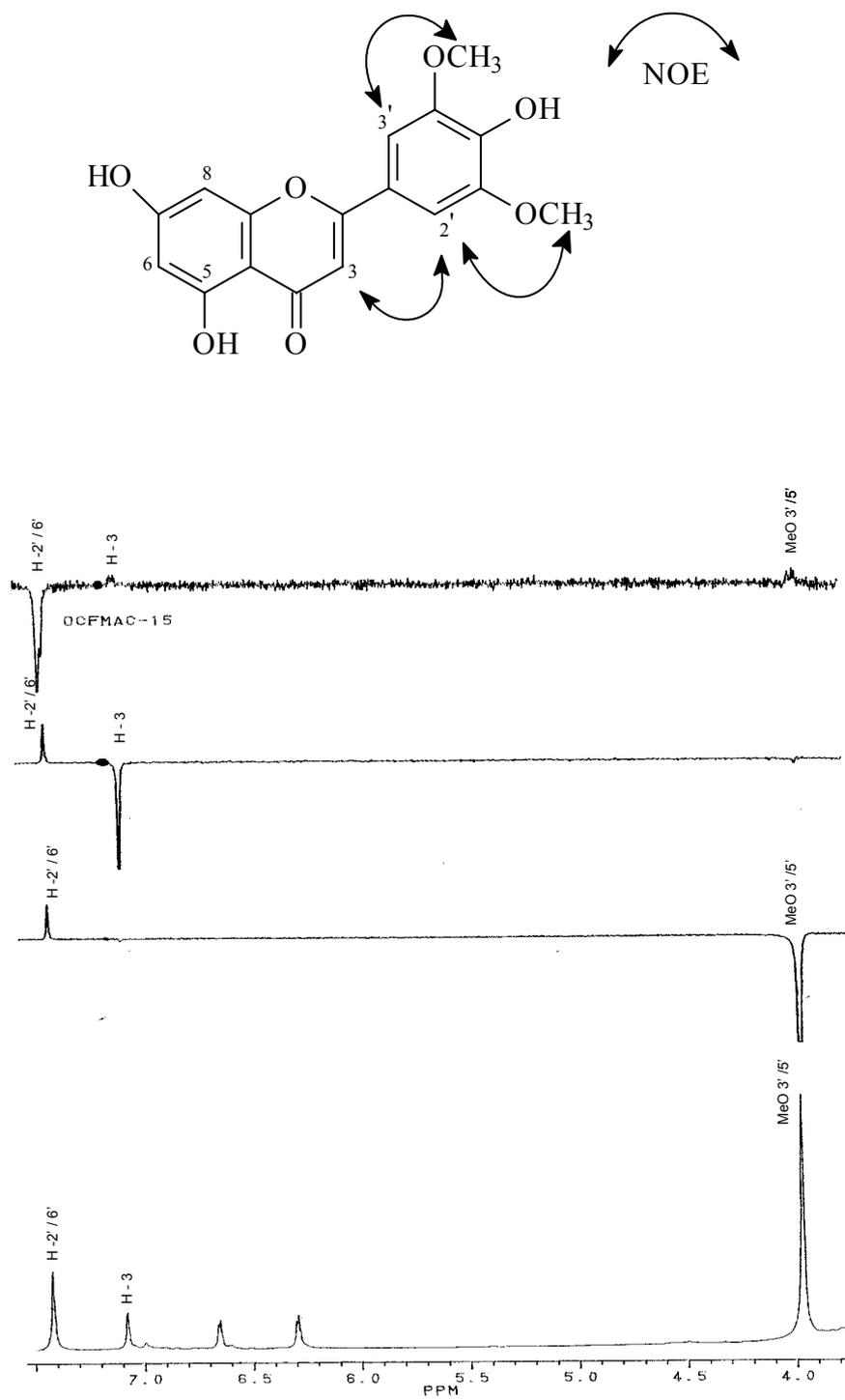
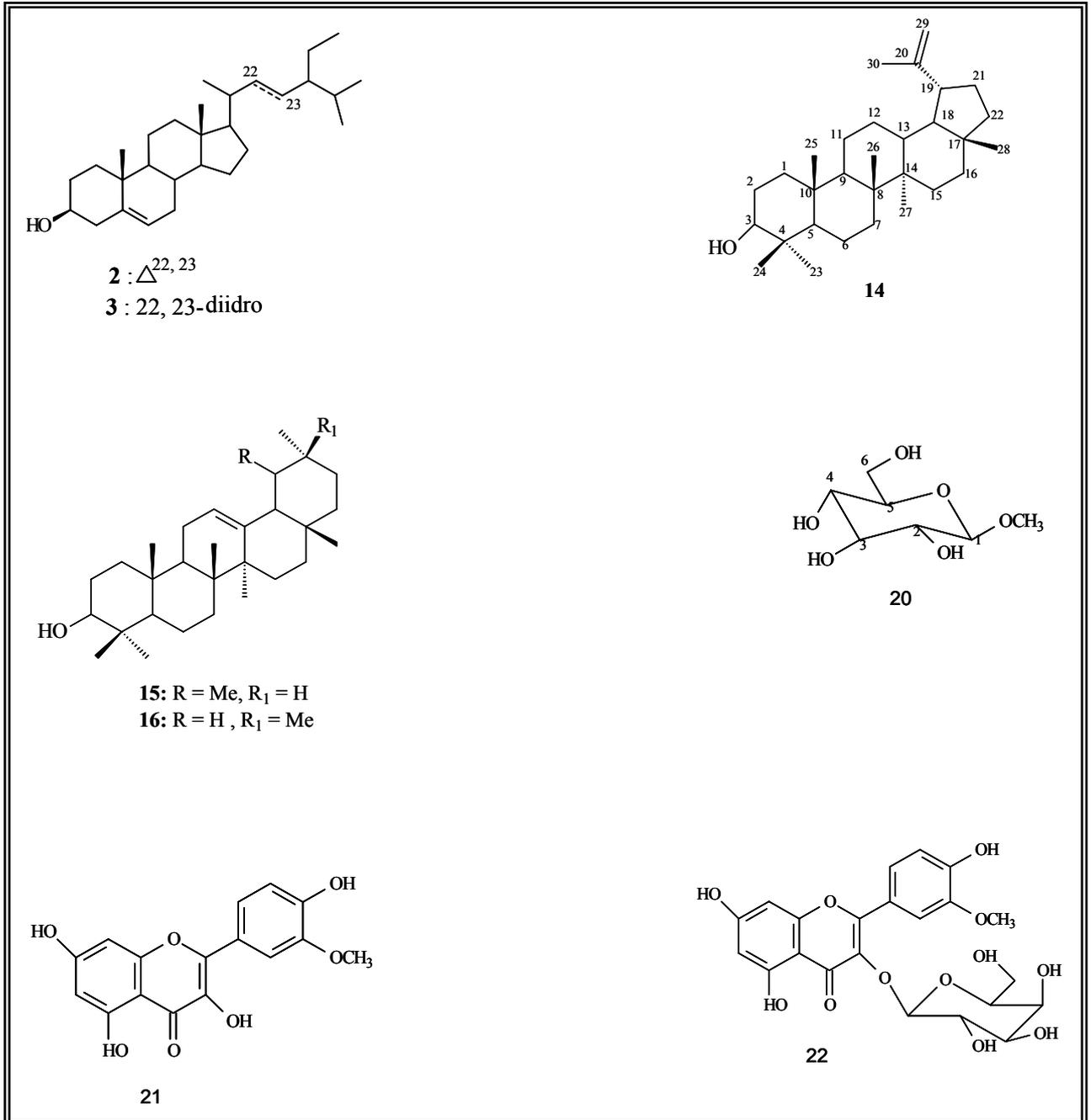


Figura 86: Espectro de RMN-NOEDIFF da substância 19.



Quadro 4 - Constituintes químicos isolados de caules de *Ouratea cuspidata* St Hil

Identificação dos constituintes isolados de caule de *Ouratea cuspidata* (St Hil)

Substância 20 (1-Metil β D-glucopiranosil).

A substância apresentou-se com um material pastoso. O espectro de RMN ^1H (Figura 87 pág 133) apresentou sinais entre 4,2-3,18 ppm compatíveis com deslocamentos químicos de carboidratos. O espectro de RMN ^{13}C (Figura 88 Pag 133) apresentou sinais cujos valores foram comparados com os da literatura (BREITMAIER *et al*, 1989) e levou a concluir que a substância 20 é o carboidrato 1-Metil β D-glucopiranosil.

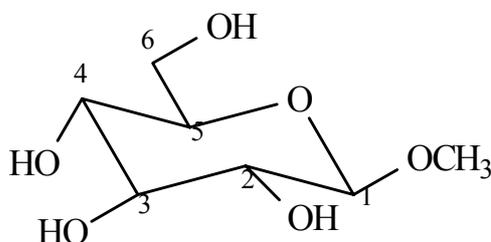


Tabela 20: Dados de RMN ^{13}C (BBD, 50 MHz DMSO- d_6) da substância 20 comparada com valores da literatura

	Substancia 20	Breitmaier <i>et al.</i> , 1989
C	δ_C	δ_C
1	105,33	103,40
2	74,99	73,40
3	77,86	75,20
4	70,0	71,55
5	77,98	75,20
6	62,67	61,40
OCH ₃	57,33	57,50

Substância 21 (4', 3, 5, 7-tetraidroxi-3'-metoxi flavonol)

A análise feita em CCDA revelada com AlCl_3 indicou tratar-se de um flavonóide. O espectro de RMN ^1H desta fração mostrou dois singletos δ_{H} 6,38; e 6,15 compatíveis com H-8 e H-6 do anel A de um flavonóide; um singlete 3,82 é frequência característica de metoxila. Além de outros sinais δ_{H} 7,93 (s); 7,49 (d, $J= 8,28$ Hz), 6,92 (d, $J= 8,30$ Hz) de um anel aromático trissubstituído. A ausência de um singlete atribuível ao H-3 permitiu propor a estrutura de um flavonol. O experimento de RMN ^1H NOEDIFF permitiu determinar a posição dos substituintes do anel B. Irradiação na frequência 7,93 (s, H-2') obteve-se NOE na frequência da metoxila, e irradiação na frequência da metoxila gerou NOE no H-2' isso mostra que a metoxila esta ligada no C-3'. (**Figura 90 Pág-135**). Irradiação na frequência 5,56 não é observado NOE levando a concluir que este sinal é de impureza na amostra. (**Figura 91 Pág-135**). Estas análises permitiram propor para **21** a estrutura do. 4', 3, 5, 7-tetraidroxi-3'-metoxi flavonol. A comparação da substância **21** com **22** em CDDA eluída com $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (8;2) apresentou R_f s diferentes sendo **21** menos polar.

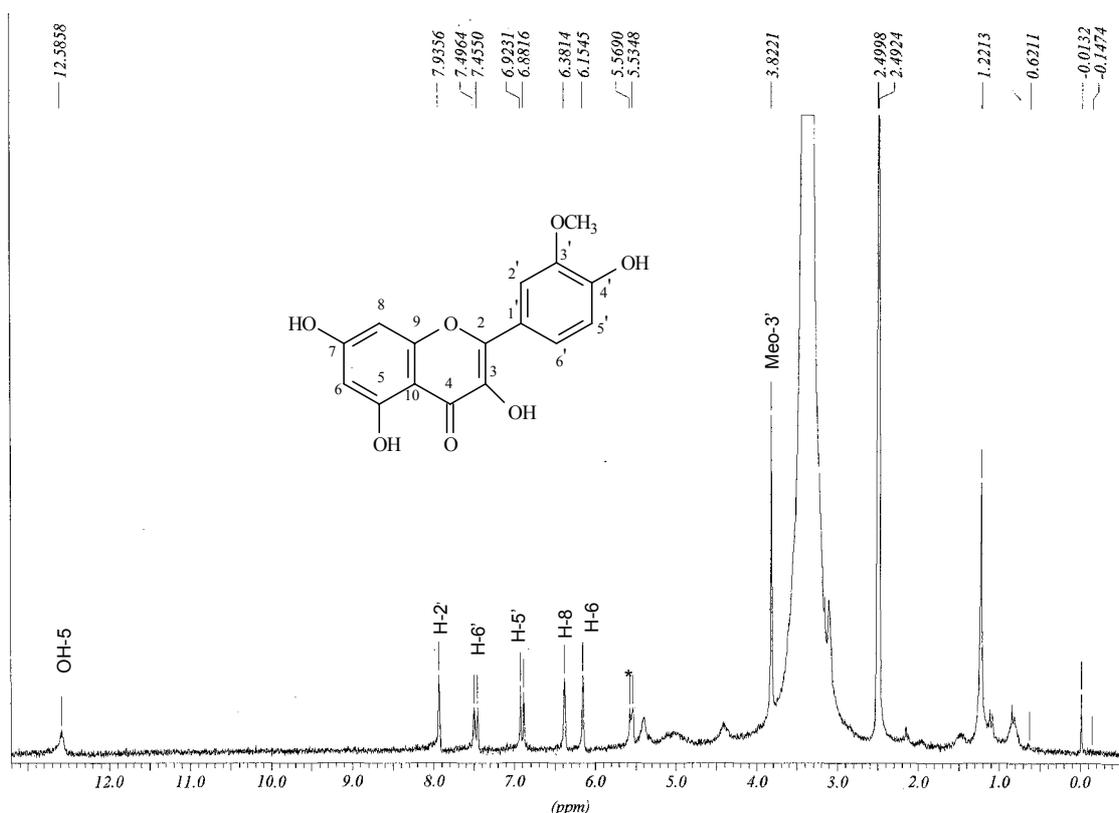


Figura 89: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, DMSO-d_6) da substancia **21**.

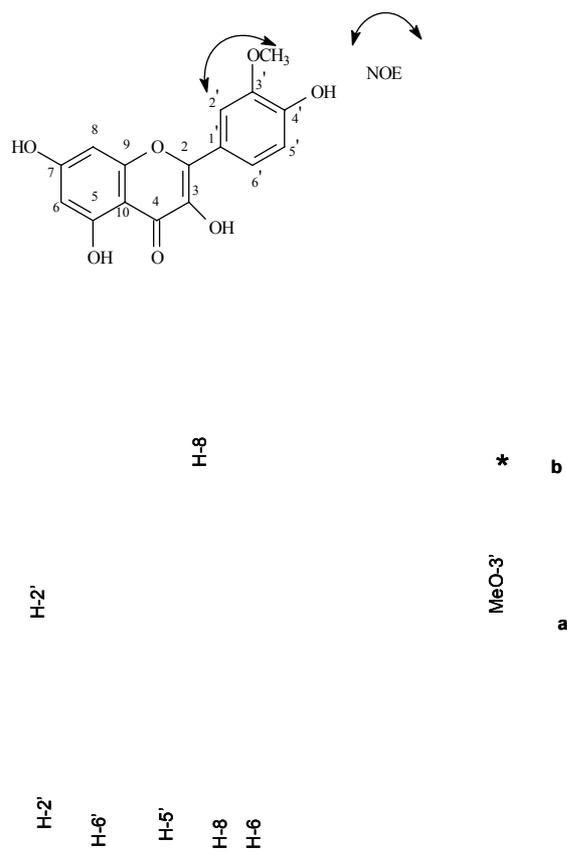


Figura 90: Espectro de RMN ^1H NOEDIFF (200 MHz DMSO- d_6) da substância 21.

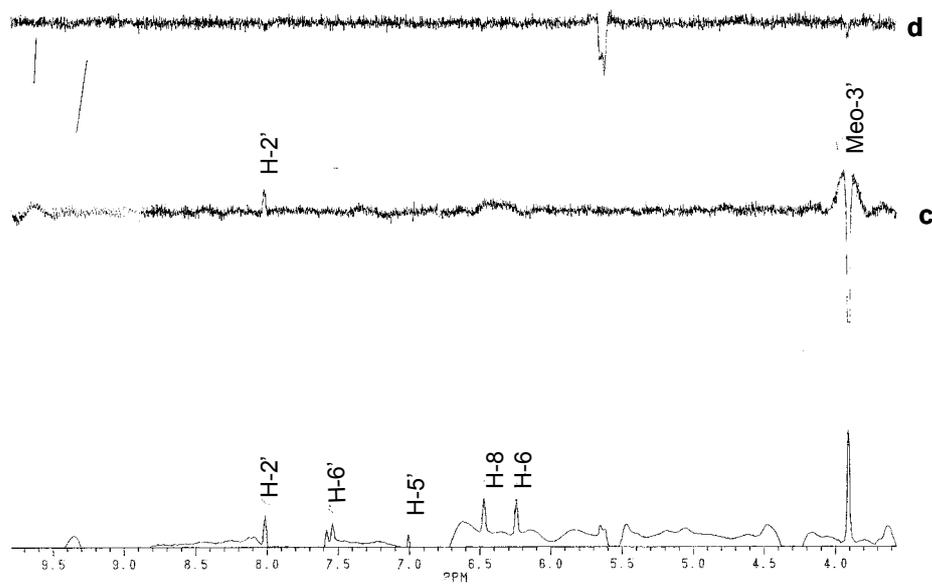


Figura 91: Espectro de RMN ^1H NOEDIFF (200 MHz DMSO- d_6) da substância 21.

Fração 22 (5, 4',7-triidroxi-3'-metoxi-3-β-O-galactopiranosil flavona

A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (BBD e DEPT) (Figuras 92-96, pág-137-139) da fração 22 contendo mistura de flavonóides glicosilados permitiu detectar como principal componente a 5, 4',7-triidroxi-3'-metoxi-3-β-O-galactopiranosil flavona. Esta proposta foi feita através de comparação dos deslocamentos químicos de carbonos registrados nos espectros pelos sinais mais intensos com valores da literatura (CARVALHO *et al.*, 2001 e Daniel, 2004) conforme registrado na tabela 21 'pág-136. Os demais sinais podem ser de outro (s) glicosídeos contendo a glicose e ou a rhamnose como carboidrato.

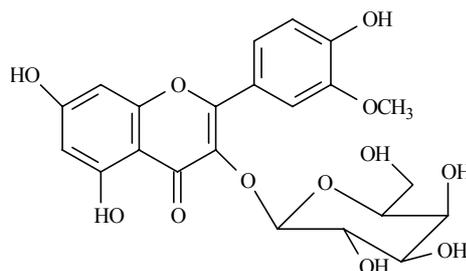


Tabela 21: Dados de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz DMSO- d_6) do constituinte majoritário da fração da fração 22 (5,4',7-triidroxi-3'-metoxi-3-β-O-D-galactopiranosil flavona com valores da literatura (CARVALHO *et al.*, 2001 e Daniel, 2004).

5, 4', 7-triidroxi-3'-metoxi-3-β-O-D-galactopiranosil			Refer. Literat.
C	δ_C	δ_H	δ_C
2	156,2	-	156,2
3	133,1	-	135,4
4	177,3	-	177,7
5	161,2	-	161,3
6	98,8	6,2 (sl)	98,8
7	165,3	-	164,2
8	93,7	6,4 (sl)	93,7
9	156,5	-	156,4
10	103,7	-	104,2
1'	121,1	-	121,9
2'	112,9	7,9 (d, J= 2,0 Hz)	113,9
3'	146,0	-	145,1
4'	149,5	-	147,1
5'	115,9	6,9 (d, J= 8,0 Hz)	115,3
6'	122,0	7,5 (dd, J= 8,0 e 2,0 Hz)	102,0
1''	100,9	5,56 (d, J= 7,0 Hz)	73,3
2''	74,1	3,9-3,1 (m)	75,2
3''	76,2	“	71,3,
4''	69,4	“	77,3
5''	77,2	“	61,9
6''	60,4	“	
OCH ₃	55,5	3,83 (s, 3H)	
OH		12,5 (sl)	

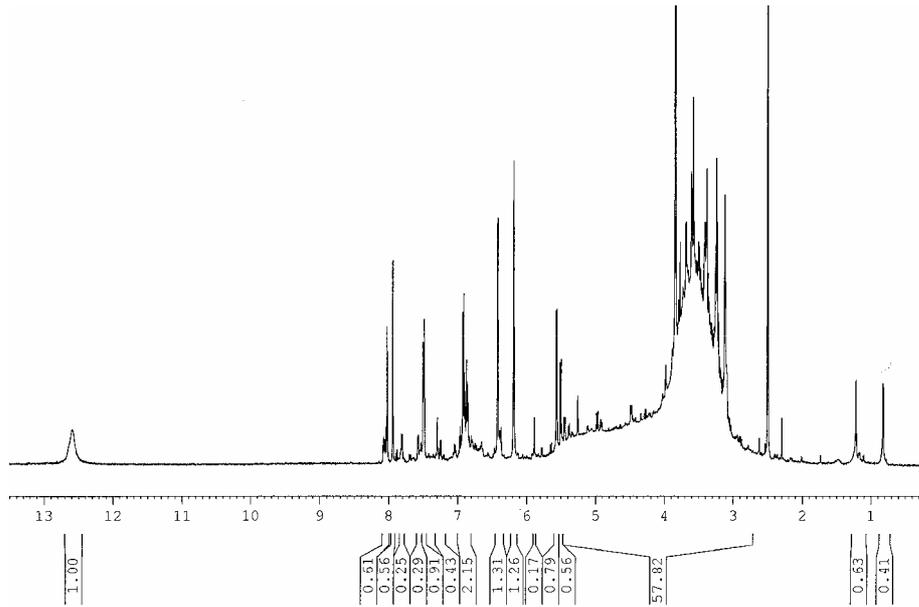


Figura 92 Espectro de RMN ^1H (500 MHz DMSO- d_6) da mistura contendo a substância **22**.

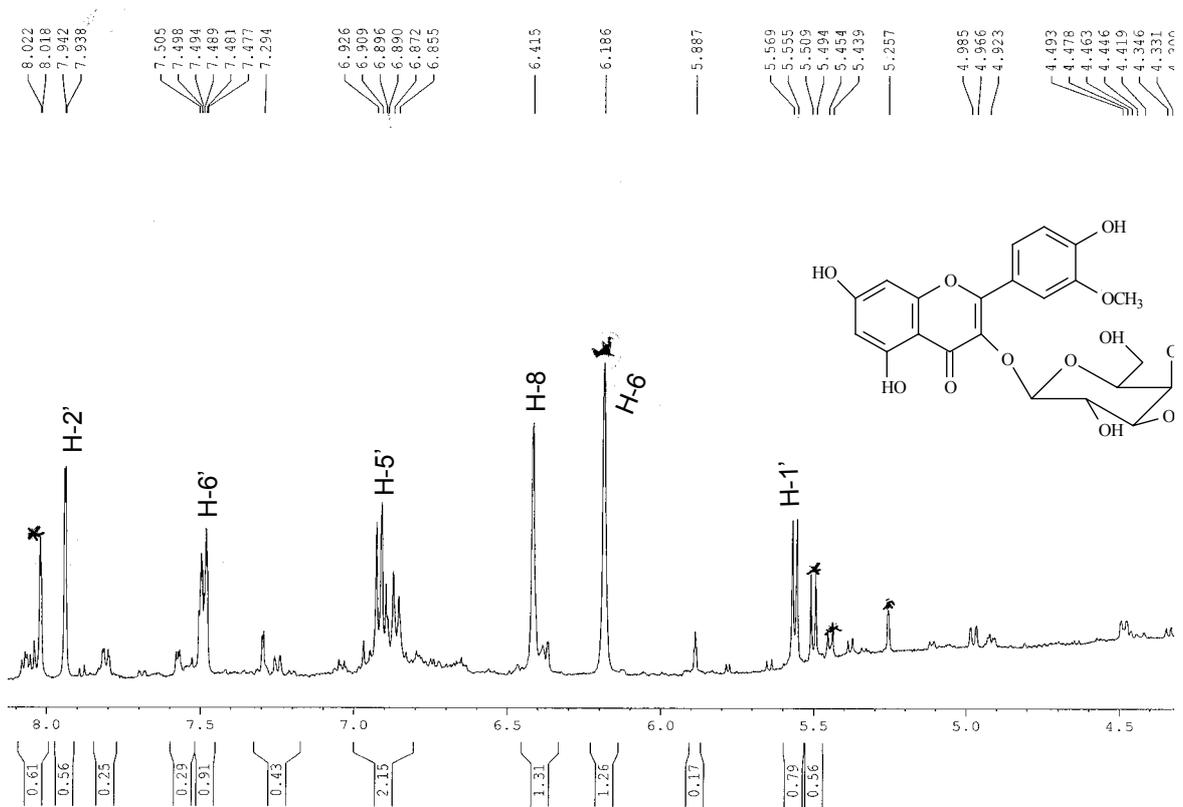


Figura 93: Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da mistura contendo a substância **22** entre as regiões 4,5-8,0 ppm.

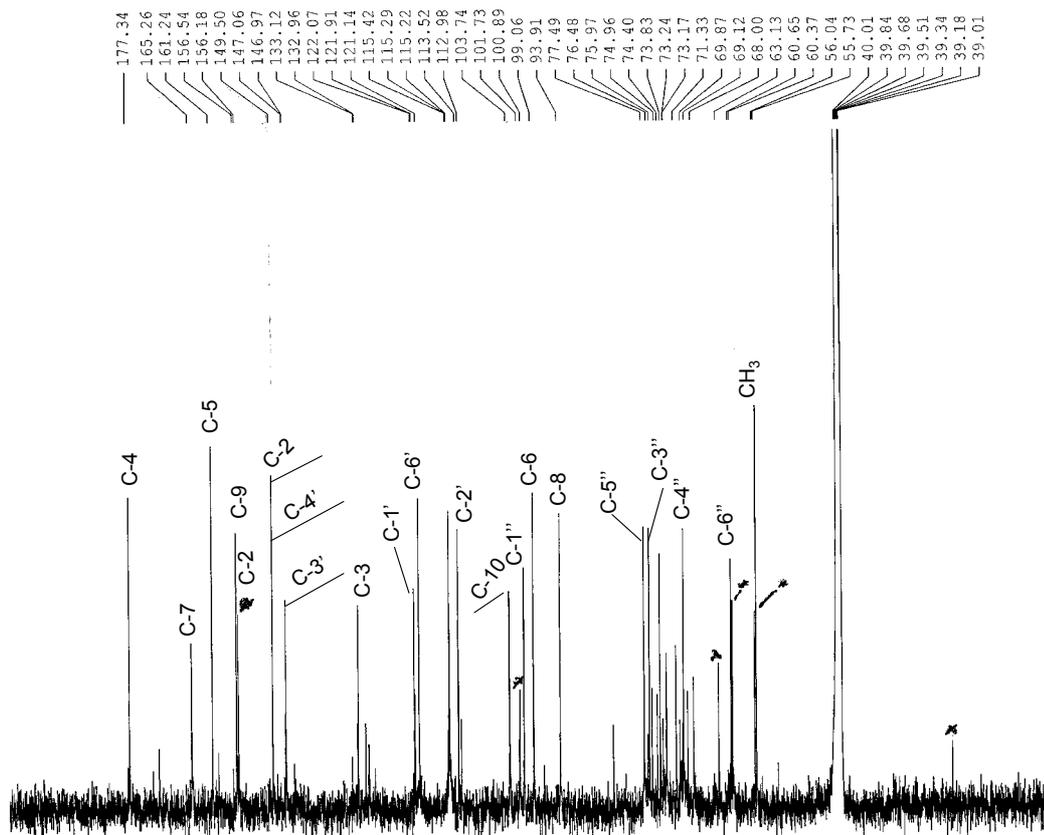


Figura 94 Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz DMSO- d_6) da fração contendo a substância **22**. * Sinais de outros glicosídeos presentes na fração.

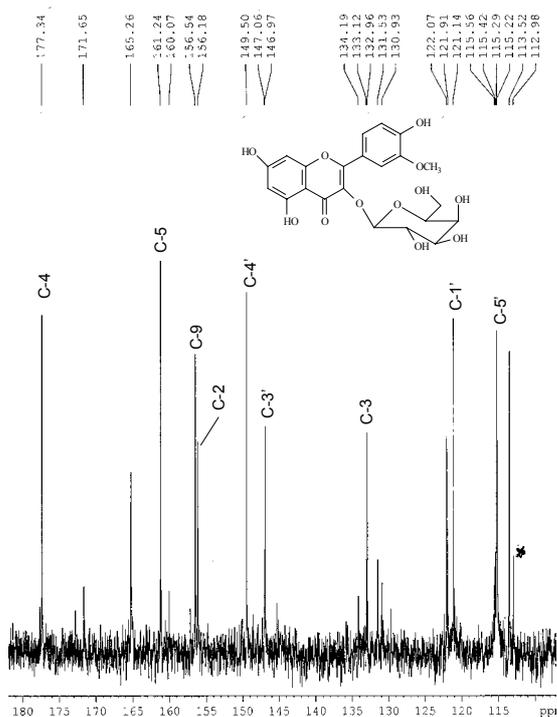


Figura 95: Expansão da figura 94 na região entre 115-180 ppm..

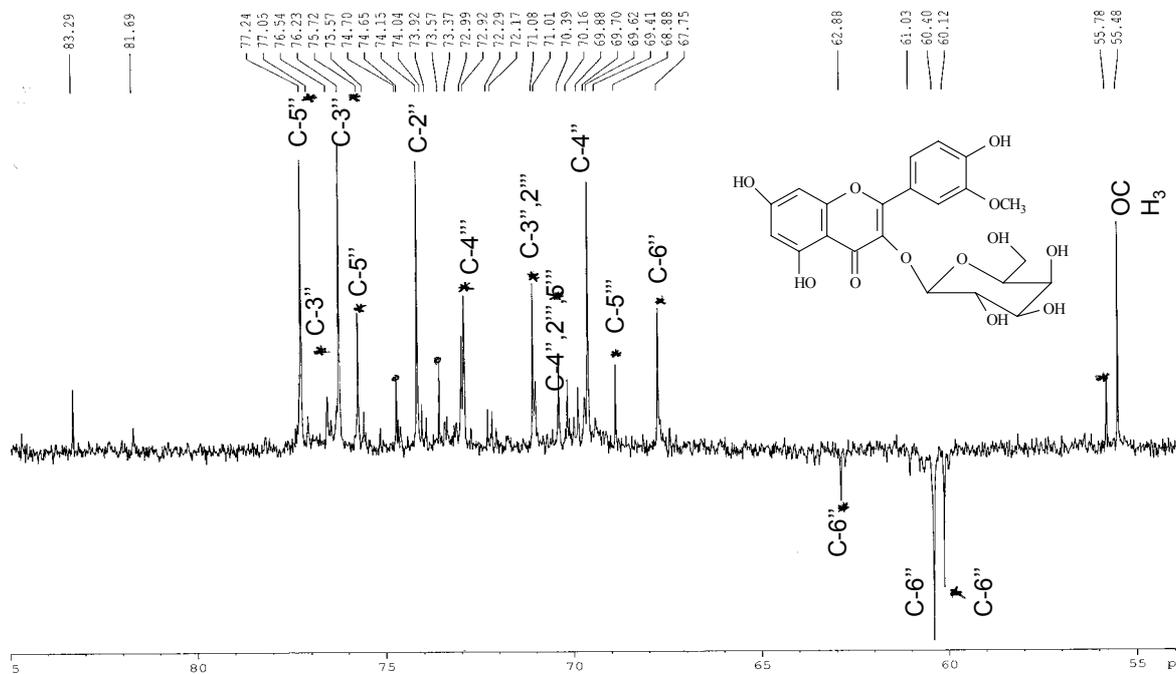


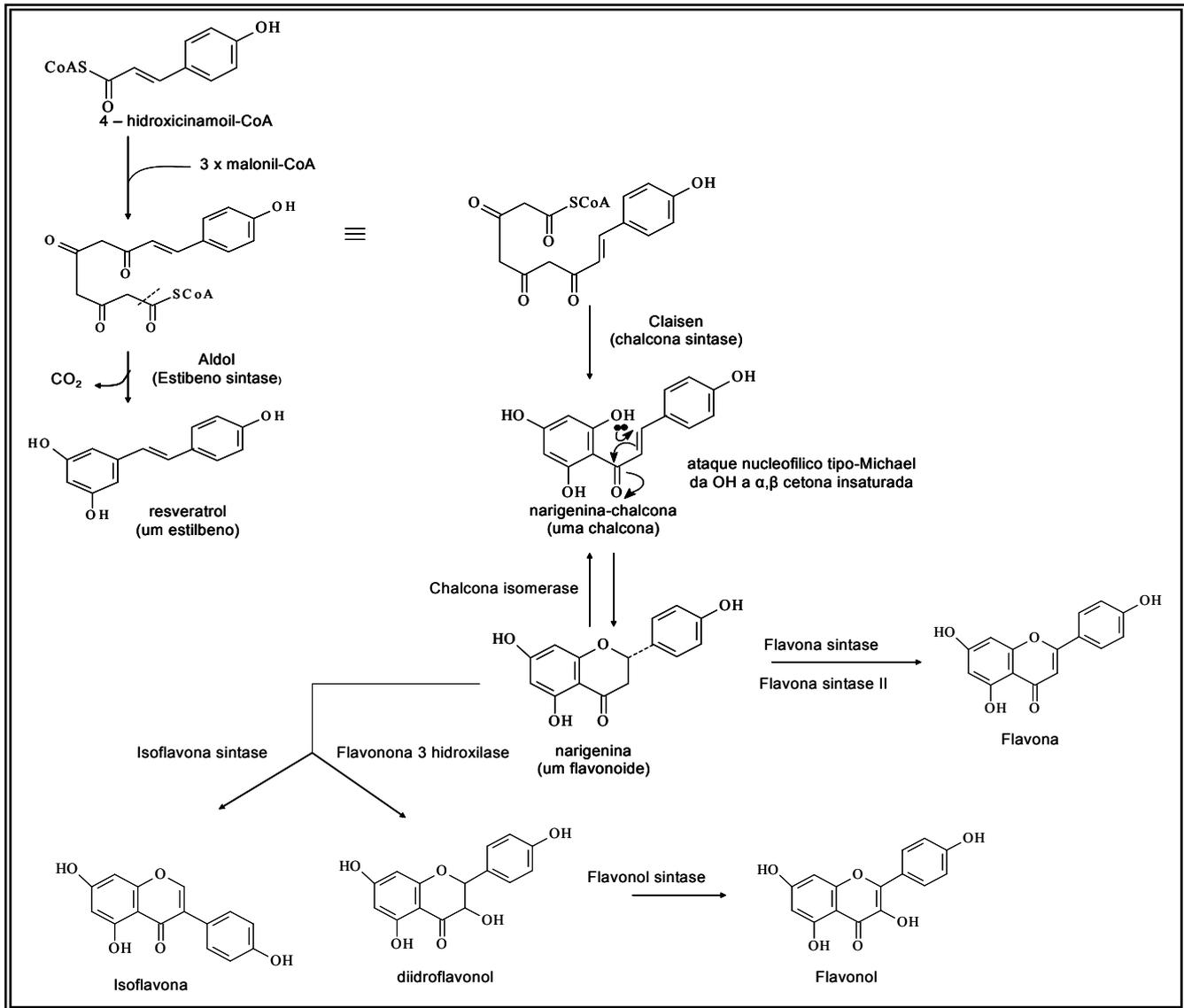
Figura 96: Espectro de RMN ^{13}C (DEPT 135, 125 MHz DMSO- d_6) expandido entre as regiões 55-85 ppm da fração contendo a substância **22**. * Sinais de outros glicosídeos presentes na fração.

ASPECTOS GERAIS DA BIOSÍNTESE DE CONSTITUINTES DE *O. hexasperma* E *O. cuspidata*.

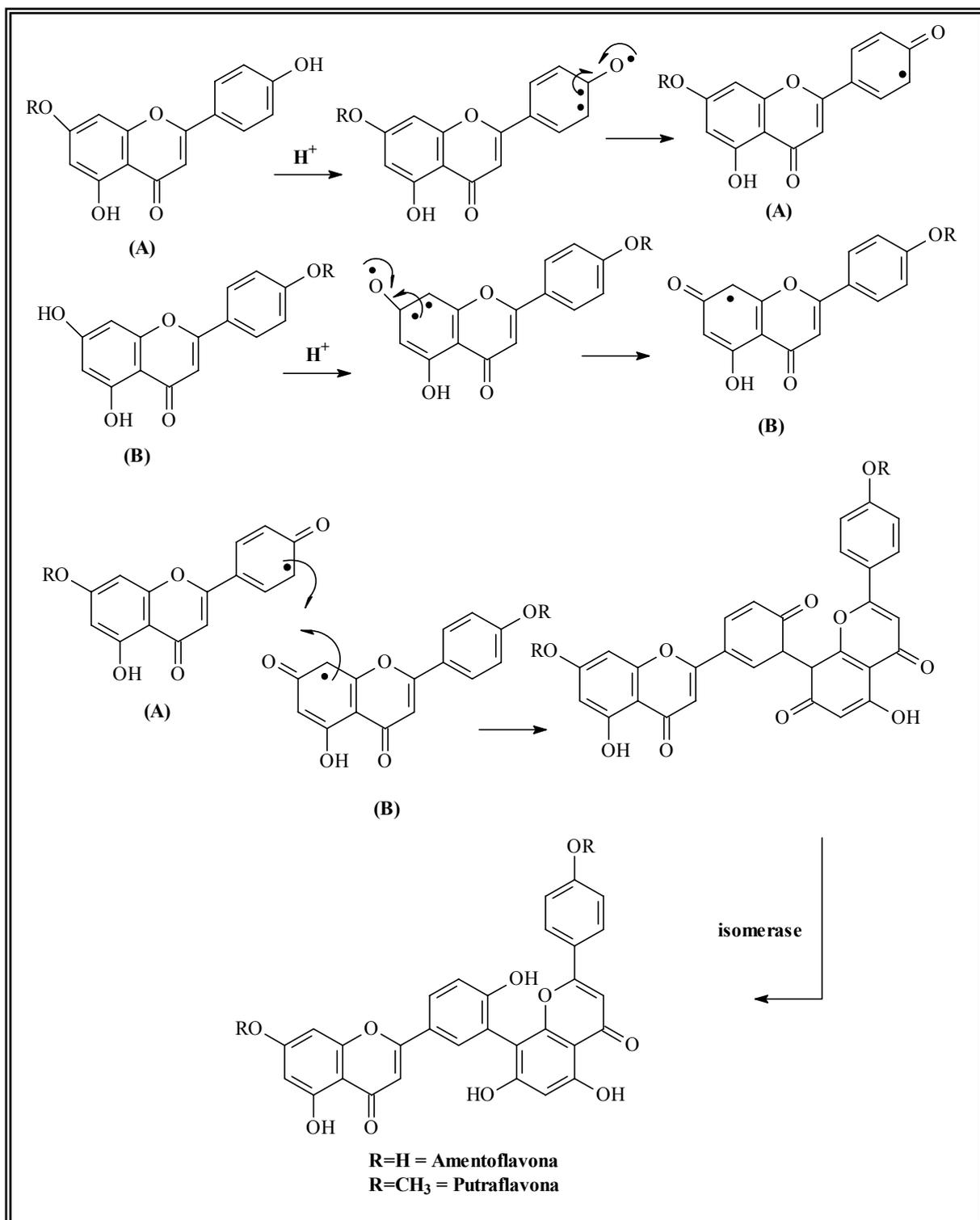
FLAVONÓIDES.

Os flavonóides compreendem uma larga família de metabolitos especias que têm parte de sua estrutura derivada do chiquimato e parte da via dos policetídeos. Sua biossíntese procede via condensação de uma unidade 4-hidroxicinamoil-CoA com três unidades da malonil-CoA, produzindo estilbeno (resveratrol) ou chalconas (narigenina-chalcona) a depender da natureza da enzima que catalisa a reação estilbeno sintase ou chalcona sintase respectivamente. Os padrões de oxigenação nos anéis aromáticos ilustram as partes oriundas do chiquimato e da via do acetato. Os flavonóides isolados neste trabalho indicam que sua síntese foi mediada via a chalcona sintase.

Chalconas agem como precursoras para uma vasta extensão de derivados de flavonóides encontrados por todo reino vegetal. Maior parte contém anel heterocíclico com seis membros formado por ataque nucleofílico, tipo adição de Michael, produzindo flavonona (ex narigenina). Essa isomerização pode ocorrer sendo que quimicamente, condições ácidas favorecem a flavonona e condições básicas a chalconas, mas na natureza a reação é catalizada por enzimas estereoespecíficas. A partir do esqueleto básico de flavononas podem ser formados uma variedade de flavonóides (Ex.: flavonas, flavonol, falvononol, antocianidinas etc). Modificações no padrão de hidroxilação nos dois anéis aromáticos podem acontecer. Geralmente ocorrem nas flavonas ou diidroflavonol. Podem ocorrer também metilação e dimetilalilação aumentando assim a variedade estrutural destes compostos. Ocorrem também flavonóides glicosilados que são solúveis em água (**Esquemas 3, 5 pág-141 e 143**). Eles são geralmente encontrados conjugados com açúcares como as pentoses: D-apiose, L- arabinose, L- ramnose e D-xilose; as hexoses: D-glicose, D-galactose, D-alose, e os ácidos D-galacturônico e D-glicurônico. Podem também, estar associados a dissacarídeos e a trissacarídeos. São responsáveis pelas cores das flores, frutos, algumas folhas e asas de insetos. Os biflavonoides constituem uma classe de flavonóides dímeros. A maioria dos representantes dessa classe de produtos naturais é formada pelos dímeros flavona-flavona, flavona-flavanona, flavanona-flavanona além de ocorrer, mais raramente, os dímeros de chalconas e de isoflavonas, (**Esquema 4, pág-142**).



Esquema 3 Rota biosintética geral para flavonóides. (Adaptado de DEY et al., 1997; DEWICK, 1997)..

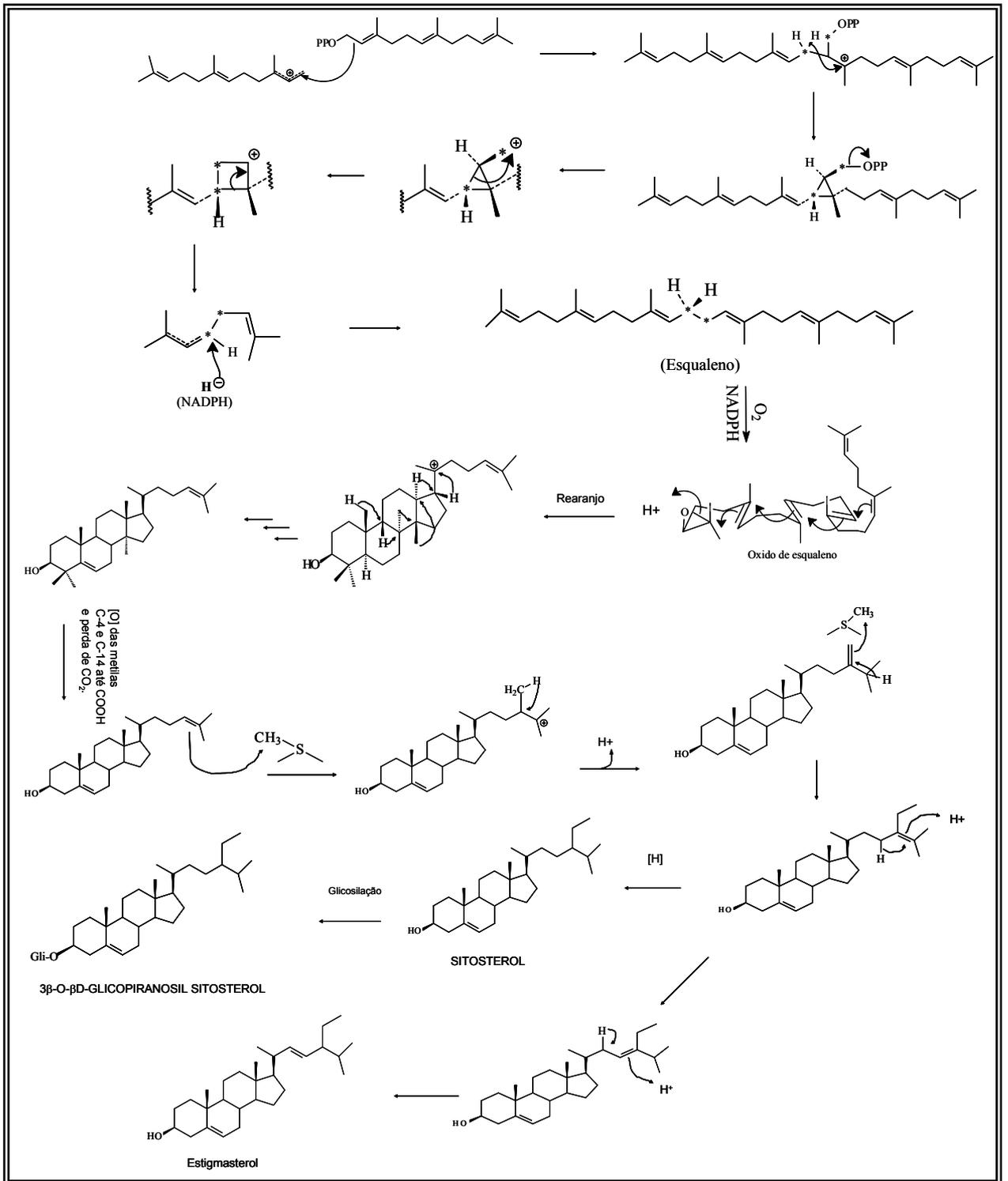


Esquema 4 : Proposta biossintética de dimerização na formação da amentoflavona e putraflavona.

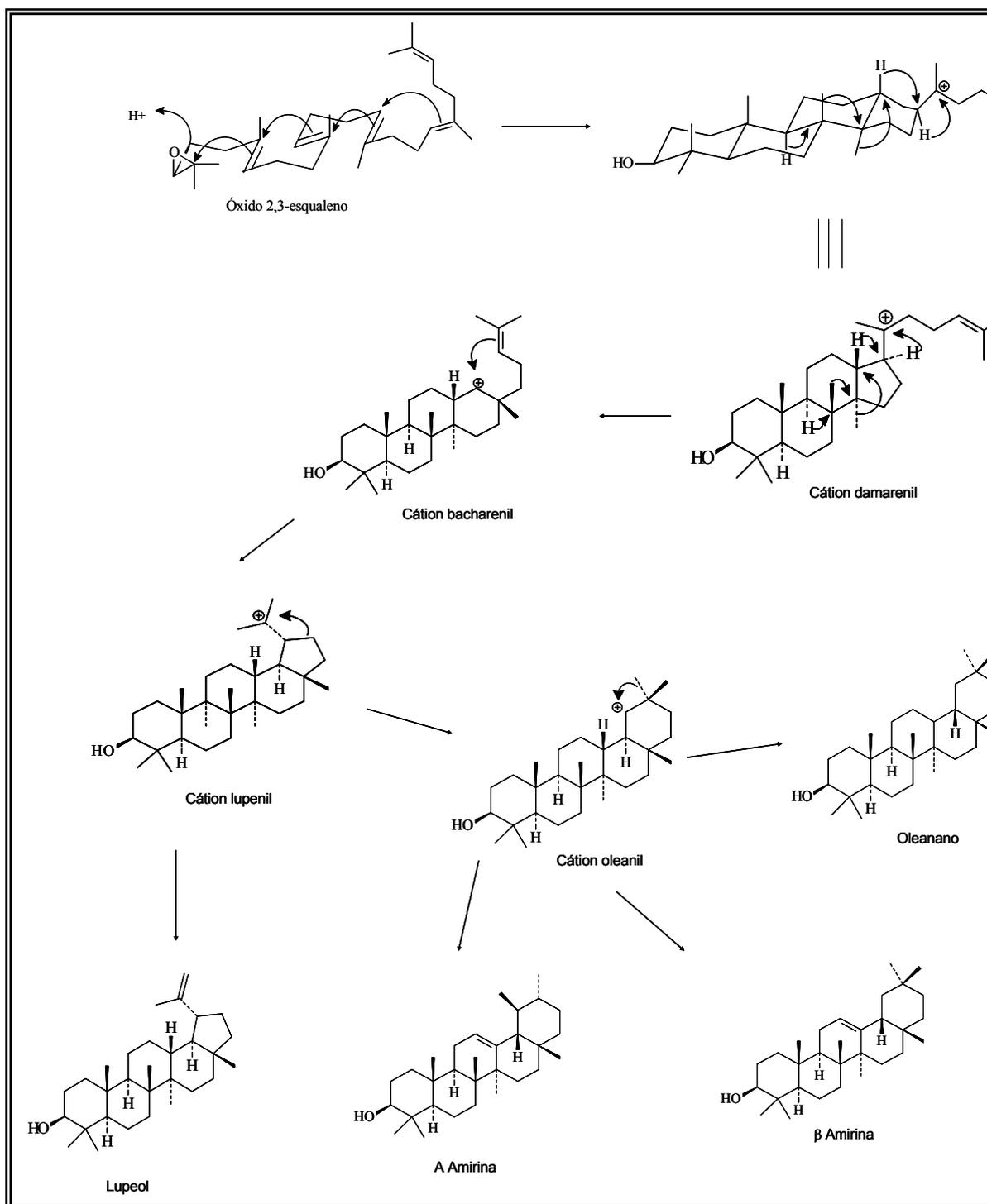
ESTEROIDES E TRITERPENOS

Tanto os esteroides como triterpenos e saponinas são formados pela via do ácido acético/ácido mevalônico. Nesta via, três unidades de AcetilCoA sofrem condensações para formar o pirofosfato de isopentenila (IPP) que sofre isomerização para pirofosfato de dimetilalila (DMAPP). Estes são os precursores básicos dos terpenóides e esteróides que sofrerão polimerização dando origem a moléculas de cadeias carbônicas crescentes de cinco átomos de carbono. A reação do IPP com seu isômero DMAPP formam o trans -pirofosfato de geranila (GPP), a partir do qual podem ser formados os demais terpenos. Novas ligações cabeça-cauda entre GPP e IPP resultarão em pirofosfato de farnesila (FPP) e pirofosfato de geranilgeranila com 15 e 20 átomos de carbono respectivamente. O farnesilpirofosfato é o intermediário para a biossíntese dos sesquiterpenos (C15), (C20), triterpenos (C30), e esteróides C18-29). Duas moléculas de FPP se unem cauda-cauda para formar o hidrocarboneto esqualeno, principal precursor dos esteroides, triterpenos. Após sua formação o esqualeno sofre oxidação gerando o esqualeno epóxi (óxido de esqualeno), que sofre ciclização catalisada por flavoproteína e pelos cofatores NADPH e O₂. Na etapa seguinte uma enzima ciclase modifica a conformação do óxido de esqualeno para cadeira-cadeira-cadeira-barco, e através de vários rearranjos 1,2-metil é formado o carbocation damarenil. O carbocation damarenil é muito instável e sofre novamente migrações do tipo 1,2-alkil para formar o cátion bacharenil. Acredita-se que a passagem do cátion terciário (damarenil) para o secundário (Bacharenil) seja resultado de transformações enzimáticas. Novas migrações formam o sistema pentacíclico do cátion lupenila terciário precursor dos esqueletos do tipo ursano e oleanano (**Esquema 6 pág-145**).

Já para formar os esteróides o oxido de esqualeno com conformação cadeira-barco-cadeira-barco, cicliza após vários rearranjos do tipo 1,2 formando o cicloartenol. O cicloartenol após clivagem oxidativa de três metilas forma os esteroides (**Esquema 5 pág-143**). (DEWICK, 2002).



Esquema 6 Proposta biogenética para os esteroides isolados de *O. cuspidata* e *O. hexasperma* (Adaptado de MANN,1994; DEWICK, 1997).



Esquema 7; Rota biossintetica de formação dos triterpenos isolados nas espécies *O. cuspidata* e *O. hexasperma*. (Adaptado de DEWIK, 1997).

Atividade Biológica.

Os ensaios de atividade biológica foram realizados no Laboratório de Imunofarmacologia e Imunologia Parasitária do Departamento de Biologia Animal – IB da UFRRJ sob orientação do Professor Dr. Ronald Bastos Freire e consistiram de testes de bioproteção contra radicais livres, atividade antiparasitária frente a *Leishmania brasiliensis*, efeitos antiinflamatórios e a associação entre a bioproteção química

Preparação das Amostras.

Para a realização de todos os ensaios biológicos os extratos hexano, acetato de etila e metanol de *Ouratea cuspidata* St. Hil foram previamente solubilizados em PBS (solução salina tamponada com fosfato) e esterelizados por filtração através de membranas com 0,22 μ de diâmetro (Nalgene, USA). O material solubilizado e esterelizado foi identificado e acondicionado à temperatura de -20°C para seu uso nas diferentes etapas dos ensaios biológicos.

Ensaio de bioproteção contra a geração de radicais livres

Diferentes concentrações dos extratos metanólico, hexânico e acetato de etila de *Ouratea cuspidata* foram adicionadas a sistema biológico gerador de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), constituída de 0,2 mL de uma suspensão contendo 16 mg/mL de membranas de eritrócitos de carneiro, 2 mM de deoxirribose, 100 mM de FeCl₃. Cada frasco foi incubado a 45°C durante 60 minutos e adicionado de 0,65 mL de solução de ácido Tiobarbitúrico (TBA) previamente dissolvido em acetonitrila numa concentração de 10,3mM. Após incubação a 95-100 °C 10 min, os tubos foram lidos a 540 nm e a concentração de, TBARS determinada contra uma curva padrão malonildialdeído em nMoles por mL.

A curva padrão obtida para o sistema controle, na ausência dos extratos, apresentou grande reprodutibilidade, com R² superior a 0,9 e tendência exponencial, com correlação direta entre a concentração de malonildialdeído (MDA) e a absorbância observada a 532 nm (**Figura 97**). Nos ensaios de bioproteção, pela franca diminuição de produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico (**Figura 98**), ficou evidente que o extrato OCMeOH, de maior polaridade, apresentou atividade protetora, com eliminação de TBARS. Na concentração de 0,2 mg/mL houve a diminuição de 98% das substâncias oxigênio-reativas. Nas concentrações de 25 e de 60 mg/mL, entretanto, esta atividade bioprotetora mostrou-se progressivamente diminuída, com a detecção respectiva de 71% e 24,4%. Os demais extratos avaliados não apresentaram ação inibitória da geração de radicais livres nessas concentrações. De outro modo, ficou evidente que todos os extratos apresentaram potencial tóxico, uma vez que induziram a formação de concentrações elevadas de radicais livres, quando adicionados na concentração de 100mg/mL. A produção de TBARS foi entre duas a quatro vezes maior que a concentração de radicais livres produzidos pelo sistema controle.

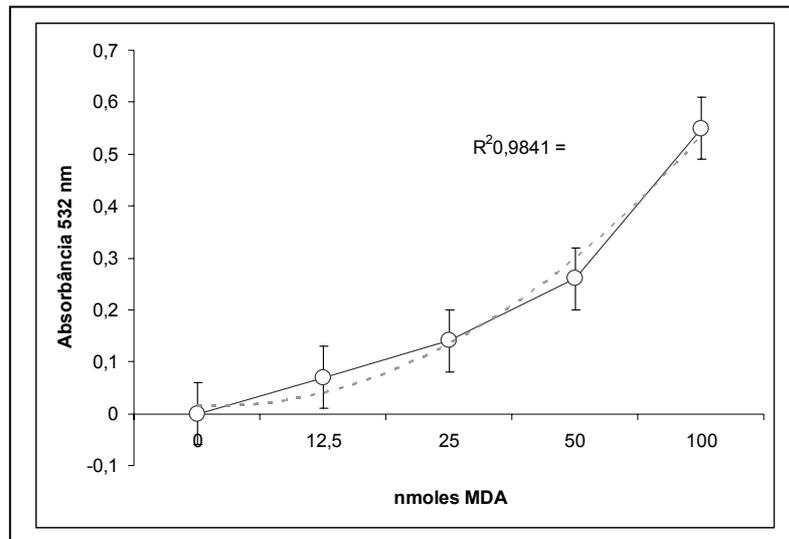


Figura 97; Curva padrão de malonildialdeído (MDA) gerada através da indução de radicais livres, medidos espectrofotometricamente a 532nm frente a um padrão de malonildialdeído adquirido comercialmente (Fisher, USA, AC14861-1000). Os resultados representam a média de quatro repetições adicionadas do erro padrão ($p \leq 0,01$).

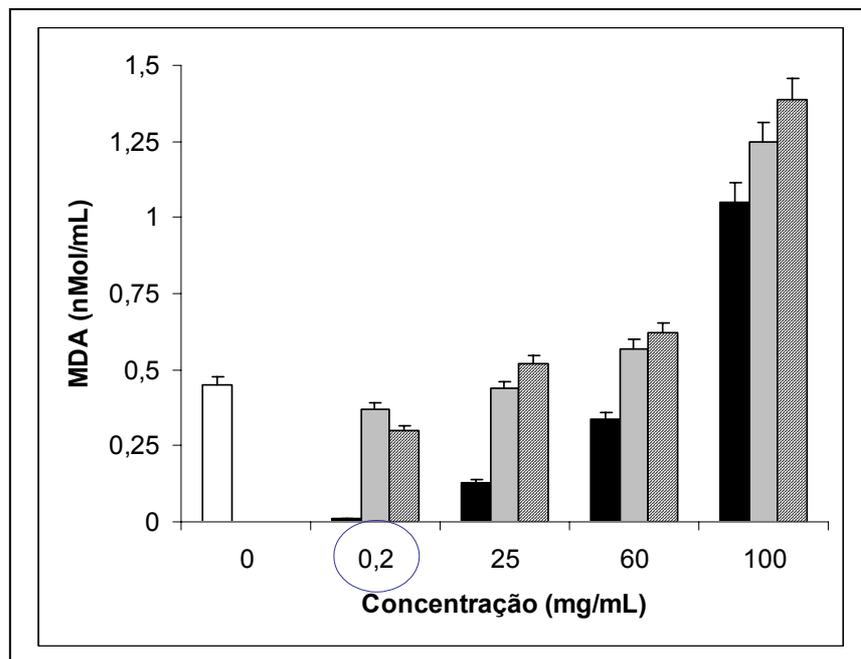


Figura 98: Ensaio de redução de radicais livres com extratos de *Ouratea cuspidata*. Concentrações diferentes do extrato metanólico (barras negras), do extrato hexânico (barras cinzas) e do extrato acetato de etila (barras listradas) foram adicionadas a sistema biológico gerador de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os tubos foram lidos a 540 nm e a concentração de TBARS determinada contra uma curva padrão malonildialdeído (barra branca) em nmoles por mL. Os resultados são a média de quatro repetições acrescidas do erro padrão ($p \leq 0,5$). O círculo evidencia a maior eficiência bioprotetora da fração metanólica em relação às demais.

Teste de ação antiparasitária

Devido ao fato de que o extrato metanólico apresentou melhor atividade bioprotetora em concentrações atóxicas para o sistema hospedeiro. Os demais extratos não foram ensaiados por apresentarem toxicidade residual. Assim, realizaram-se ensaios para determinação dos efeitos do extrato metanólico sobre o crescimento, desenvolvimento e metabolismo de formas promastigotas de *Leishmania brasiliensis*. Para tanto, inóculos contendo 10^4 formas promastigotas do parasito (cepa L566-FIOCRUZ) foram cultivados, a 27°C, em tubos de ensaio contendo 4,0 mL de meio de infusão de cérebro e coração (BHI) adicionado de 10% de soro fetal bovino, e de diferentes concentrações dos extratos (2, 4, 8, 32, 64, mg/mL). Em intervalos de 12 horas, foram colhidas alíquotas de 0,1 mL de cada tubo para realização de ensaios de contagem dos parasitas em câmara de Neubauer ao microscópio ótico comum, originando dados quantitativos e morfológicos do parasito sob as diferentes concentrações de exposição aos extratos. Concomitantemente foram realizados testes de exclusão do Azul de Trypan (Viabilidade) e ensaios de biotransformação do azul de tetrazólio (atividade enzimática-mitocondrial). Todos os ensaios foram realizados com quatro repetições e comparativamente analisados, em relação a cultivos parasitários na ausência de drogas, ou aditivos extras. Os resultados foram estatisticamente avaliados usando ANOVA. Os dados que apresentaram diferenças em relação ao controle foram expressos como a média das repetições adicionada do desvio padrão ou do erro padrão para cada ponto, sendo considerados significativos os dados com $p \leq 0,5$.

Uma vez que as formas promastigotas de *Leishmania* não penetram ativamente nas células do hospedeiro, sua capacidade infectante é considerada bem sucedida quando o parasito é fagocitado. Por conta disso, foram utilizados, também, ensaios de viabilidade e funcionalidade de fagócitos de hospedeiro vertebrado com a finalidade de se observar a alteração anti-fagocitária de constituintes do extrato vegetal capazes de interferir prematuramente no ciclo biológico parasitário, evitando sua assimilação em macrófagos de um sistema hospedeiro (roedor) e conseqüente implantação da doença (leishmaniose tegumentar americana). Desta forma, os resultados obtidos nessa segunda fase experimental permitiram, também, a avaliação do potencial antiinflamatório dos extratos.

Curva de crescimento parasitário.

Foi empregada a metodologia clássica da avaliação numérica de formas parasitárias desenvolvidas em meio acelular, conforme descrito na literatura (JENSEN, 1983). Para cada cultivo iniciado, foi elaborado uma curva de crescimento, onde as absorbâncias das suspensões celulares, tratadas com as diferentes concentrações de extratos vegetais, foram colorimetricamente medidas no comprimento de onda de 540 nm. Os valores turbidimétricos obtidos foram associados à quantificação hemocitométrica (câmara de Neubauer) das alíquotas dos tratamentos nos diferentes intervalos de tempo, gerando curvas de crescimento quantitativo das formas promastigotas em meio axênico frente aos extratos. Os resultados evidenciaram um efeito estimulador da proliferação de promastigotas de *L. brasiliensis* quando tratadas com o extrato metanólico (**Figura 97 pág-148**).

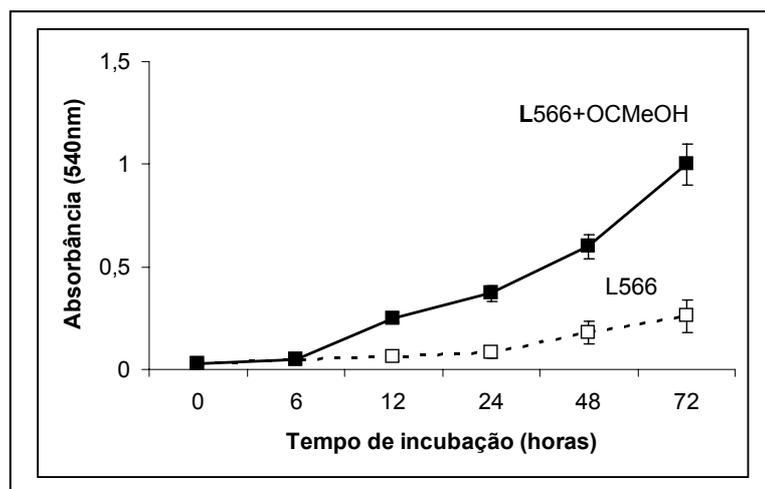


Figura 99: Curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (L566+OCMeOH) em meio axênico bifásico (NNN) adicionado de 16 mg/mL de extrato metanólico de *Ouratea cuspidata* (OCMeOH), em relação ao sistema controle (L566) constituído de promastigotas não expostas ao extrato. Os resultados expressam a média de quatro observações turbidimétricas, adicionadas do erro padrão ($p \leq 0,01$).

Teste de exclusão do Azul de Trypan (Viabilidade):

Para realização dos ensaios de viabilidade, empregou-se a metodologia descrita por (SAVOIA *et al.*, 2002), que foi aplicada tanto em promastigotas quanto em fagócitos do hospedeiro submetidos aos diferentes tratamentos com extrato vegetal. Os resultados serviram para comparar o efeito antiparasitário com a toxicidade relativa das substâncias biologicamente ativas contidas no extrato da planta.

a) Em promastigotas de *L. braziliensis*:

No ensaio com promastigotas L566, alíquotas referentes aos diferentes tratamentos foram adicionadas de 10% de uma solução de azul Trypan-CI23850 (J.T. Baker Chemical Co., USA) e mantidas em repouso por dez minutos à temperatura ambiente. Em seguida as células foram centrifugadas sob baixa rotação (100 rpm/10 minutos/27°C) em centrífuga clínica convencional Ecelsa 2, mod 205 (FANEM, Brasil). O sobrenadante contendo o corante não absorvido foi descartado e, ao sedimento, adicionou-se solução salina tamponada com fosfato (PBS -8,0 g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na₂HPO₄, 0,24g KH₂PO₄, H₂O q.s.p 1000mL, pH 7,2-7,4) em volume equivalente ao da alíquota inicial. As células coradas (mortas) foram quantificadas hemocitometricamente (câmara de Neubauer) sob aumento de 400_x em microscópio ótico comum BX-41 (Olympus, Japão), em relação às células viáveis, que não foram permeáveis ao corante, para a estimativa do percentual de viabilidade. Assim, os valores numéricos foram aplicados à fórmula:

$$V\% = \frac{NCV - NCM}{TCC} \times 100$$

Onde, V% = Percentual de Viabilidade; NCV = Numero de células vivas;
NCM = Numero de células mortas; TCC = Total de células contadas

b) Em macrófagos do hospedeiro vertebrado

No ensaio com macrófagos do hospedeiro vertebrado foram utilizados lavados peritoneais de acordo com a metodologia descrita na literatura (HERSCOWITZ *et al.*, 1981), adaptada para nossas condições experimentais, de acordo com (HERZOG-SOARES *et al.*, 2004). Os macrófagos foram obtidos de Hamsters (*Crycetua crycetus*) adultos jovens, gerando suspensões contendo 10^6 células/mL em meio RPMI-1640 (Difco-Inglaterra), isento de soros, antibióticos ou aditivos. As suspensões foram divididas em alíquotas de 1mL sobre as quais foram adicionadas diferentes concentrações do extrato vegetal. As células submetidas aos diferentes tratamentos foram mantidas, durante 24 horas a 37°C, 5% CO₂. Ao final do período de incubação, as diferentes suspensões celulares foram adicionadas de Azul de Trypan e submetidas às avaliações microscópicas para a caracterização da viabilidade e de alterações morfológicas relacionadas ao processo de morte celular programada (morte natural), ou apoptose. A avaliação da apoptose foi realizada de acordo com as metodologias descritas por (SHWARTZ, et al 1995).

Nesse ensaio foi observado que as formas promastigotas permaneceram viáveis em todas as concentrações do extrato (*Ouratea cuspidata* metanolico) OCM_{OH}, entretanto alterações morfológicas foram observadas partir da exposição à concentração equivalente a 2 mg/10⁶ L566/mL. A exposição às concentrações de 8, 16 e 32 mg de OCM_{OH}/10⁶ L566/mL, respectivamente causou a deformação de 62%, 78% e 98% das células que perderam suas características de forma, tornando-se totalmente redondas, mas ainda com flagelos, sugerindo tratem-se de células defectivas e não de formas amastigotas.

A viabilidade das células hospedeiras, macrófagos (M ϕ) foi mais afetada quando comparadas com as promastigotas (L566). Entretanto, nas concentrações do extrato OCM_{OH} de 2 e 4 mg/10⁶ M ϕ /mL 99% das células se apresentavam viáveis, enquanto que alterações morfológicas extensas já aconteciam nas formas parasitárias submetidas a tratamento idêntico. A viabilidade dos macrófagos (M ϕ), diminuiu gradativamente a partir da exposição à concentração de OCM_{OH} equivalente a 8, 16, 32 mg/10⁶ M ϕ /mL, onde observou-se viabilidade de 87%, 78% e 70%, respectivamente. Em relação a alterações morfológicas, os macrófagos (M ϕ) foram menos afetados que as L566. As alterações foram visualizadas somente em M ϕ tratados com as doses iguais ou superiores a 4 mg de OCM_{OH}/10⁶ M ϕ /mL. Nesta concentração 7% das células apresentaram alguma alteração morfológica. Nas concentrações de 16 e 32 mg de OCM_{OH}/10⁶ M ϕ /mL as alterações morfológicas foram compatíveis com as ocorrentes em processos apoptóticos, com fragmentação nuclear, aparecimento de bolhas citoplasmáticas e fragmentação celular. Nas concentrações de 16 e 32 mg de OCM_{OH}/10⁶ M ϕ /mL foram observadas alterações em 40% e 62%, dos M ϕ tratados, respectivamente.

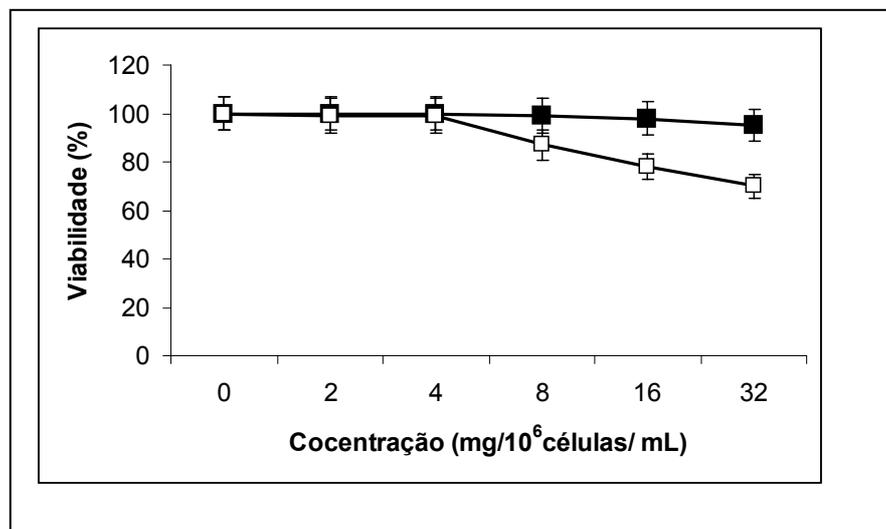


Figura 100: Viabilidade de promastigotas de *Leishmania braziliensis* (L566) e de macrófagos peritoneais (Mφ) de hamsters (*Cricetus cricetus*) frente a diferentes concentrações do extrato metanólico de *Ouratea cuspidata*. Os pontos assinalados representam a média de quatro observações adicionadas do erro padrão. As diferenças (asterisco) foram analisadas através de ANOVA, sendo considerados significativas quando $p \leq 0,05$.

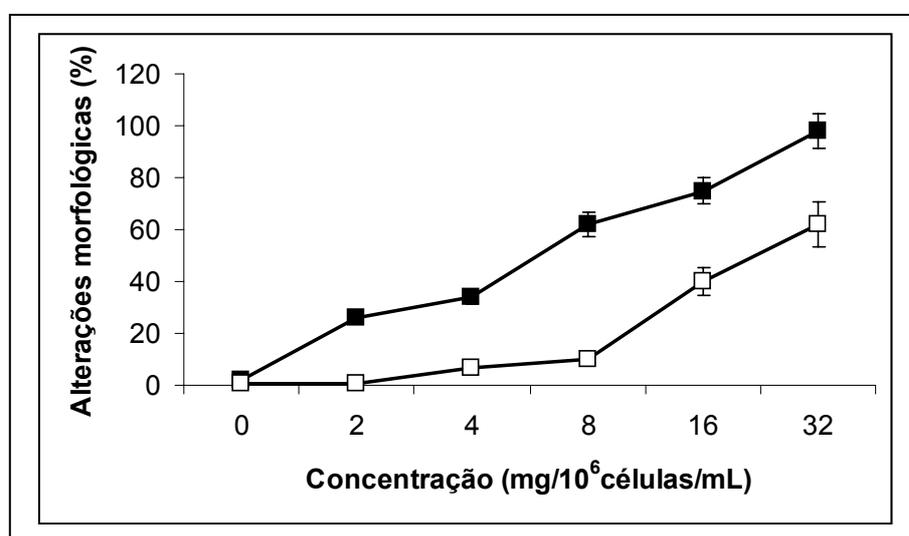


Figura 101: Alterações morfológicas de promastigotas de *Leishmania braziliensis* (L566) e de macrófagos peritoneais (Mφ) de hamsters (*Cricetus cricetus*) frente a diferentes concentrações do extrato metanólico de *Ouratea cuspidata*. Os pontos assinalados representam a média de quatro observações adicionadas do erro padrão. As diferenças (asterisco) foram analisadas através de ANOVA, sendo considerados significativas quando $p \leq 0,05$.

Medidas de atividade mitocondrial (metabolismo enzimático intermediário).

O efeito dos tratamentos sobre a atividade enzimática-mitocondrial foi medida através da metodologia descrita na literatura (BERG *et al.*, 1994, DUTTA *et al.*, 2005), onde a taxa de atividade das desidrogenases mitocondriais, foi aferida através do desdobramento do azul de Tetrazólio (MTT), assimilado pelas células viáveis, com a geração de formazanas intracelulares. Os produtos corados passam ao sobrenadante dos cultivos quando as suspensões celulares livres do excesso de MTT não assimilado (lavadas com PBS) são rompidas pela adição de dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 5%. Ocorre a geração proporcional de cor nos sobrenadantes que foi medido espectrofotometricamente (492nm) gerando dados proporcionais onde a coloração citoplasmática das células tratadas foi proporcional a atividade enzimática intracelular, permitindo, assim, estimar a potencialidade metabólica celular nos diferentes tratamentos realizados.

Nas avaliações realizadas com as promastigotas L566, células foram previamente cultivadas em meio BHI em microplacas de fundo chato com 96 orifícios, contendo 10^6 formas promastigotas por mL e tratadas com as diferentes concentrações de extrato vegetal durante 24 horas. Posteriormente, as células foram centrifugadas o meio de cultura foi aspirado e as células foram ressuspensas com 100 μ L de uma solução de MTT em solução salina tamponada com fosfato (PBS), na concentração de 2 mg/mL e encubadas durante quatro horas a 37 °C na ausência de luz. Os cristais de formazana oriundos da redução enzimática do corante pelas células viáveis, foram dissolvidos em DMSO. A atividade mitocondrial foi estimada através de leitura espectrofotométrica a 492nm.

A intensidade da cor azulada desenvolvida nas células controle, foi considerada como representando 100 % de viabilidade em todas as medidas realizadas. Todas as comparações posteriores foram baseadas nesse critério de referência. Comparativamente foram realizados testes de controle negativo, onde a absorbância do MTT e do veículo, nas diluições de 1:1 foram avaliadas, na ausência de células.

Os resultados indicaram haver alteração das funções mitocondriais nos M ϕ tratados, que apresentaram diminuição da capacidade de desdobrar o metiltetrazólio em cristais de formazana pelos macrófagos (M ϕ) tratados, quando comparados com o controle (M ϕ não tratados) (**Figura 102 pág-154**). Nesse caso, a atividade mitocondrial foi gradativamente afetada, sendo diretamente relacionada ao aumento das concentrações de OCM_{OH}.

Foi observada uma diminuição da atividade enzimática intracelular em 13,51%, 33,7% e 51,35%, nos tratamentos com 8, 16 e 32 mg de OCM_{OH}/10⁶ M ϕ /mL .

Embora as L566 também tenham sido afetadas pelo tratamento, tal efeito não apresentou correlação direta entre a dose de OCM_{OH} e a diminuição da atividade enzimática (**Figura 103 pág-154**). Embora tenha havido uma diminuição de 26% da atividade mitocondrial parasitária em L566 tratadas com 4mg /10⁶ L566/mL, em relação ao tratamento com 2 mg/10⁶ L566/mL, a atividade mitocondrial das promastigotas foi sempre superior a atividade detectada nas L566 não tratadas (controle), sugerindo terem sido a uma aceleração metabólica induzida pelo tratamento com OCM_{OH}. Nas concentrações 8, 16, 32 mg de OCM_{OH}/10⁶ L566/mL houve um aumento de 220%, 389% e 480%, respectivamente, na atividade enzimática parasitária. O aumento na atividade metabólica mitocondrial evidenciado nas formas L566 apresentou correlação direta com o aumento das taxas de proliferação celular observado nas avaliações do crescimento de promastigotas frente às mesmas concentrações de OCM_{OH} (**Figura 99 pág-150**), sugerindo que constituintes do extrato possam afetar mitose parasitária.

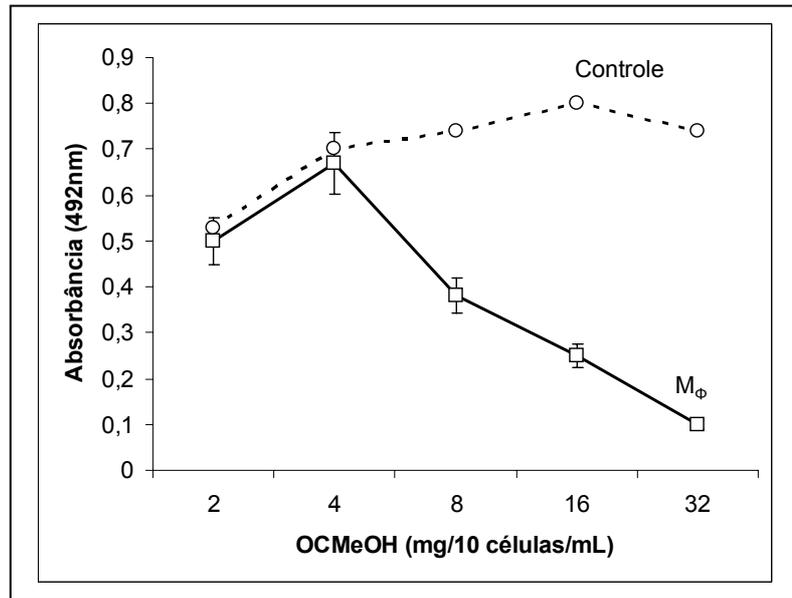


Figura 102 : Medidas de Absorbância da atividade enzimática mitocondrial em macrófagos peritoneais (M ϕ) de hamsters (*Cricetus cricetus*), através da dosagem de formazana, gerada pelo desdobramento fisiológico do brometo de metiltetrazólio (MTT), após exposição por 24 horas a diferentes concentrações do extrato metanólico de *Ouratea cuspidata* (OCMeOH). N= 5 ($p \leq 0,05$).

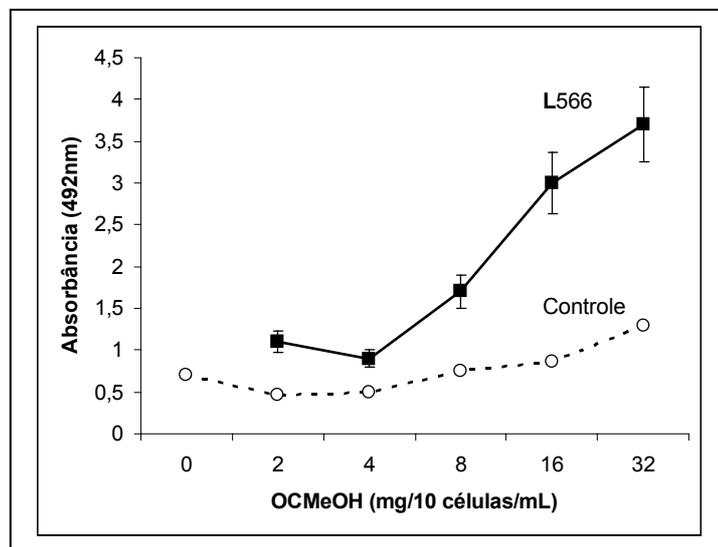


Figura 103: Medidas de Absorbância da atividade enzimática mitocondrial em promastigotas de *Leishmania(Viannia) braziliensis* (L566) através da dosagem de formazanas, geradas pelo desdobramento fisiológico do brometo de metiltetrazólio (MTT), após exposição por 24 horas a diferentes concentrações do extrato metanólico de *Ouratea cuspidata* (OCMeOH). N= 5 ($p \leq 0,05$).

Atividade Antiinflamatória

A atividade antiinflamatória foi estimada em macrófagos peritoneais de mamíferos hospedeiros e consistiu nas avaliações da viabilidade, morfologia e atividade enzimática, associadas a ensaios de avaliação da atividade fagocitária para partículas inertes. Todas as metodologias empregadas nesses ensaios foram inicialmente baseadas naquelas descritas por (HERSCOWITZ *et al* 1981).

Avaliação da capacidade de fagocitose dos macrófagos

A capacidade de fagocitose dos macrófagos peritoneais dos hamsters foi avaliada pelo método previamente descrito por (TORRES-SANTOS *et al.*, 1999). Os macrófagos foram cultivados em quatro repetições na presença de 5 concentrações de extratos vegetais (2mg/mL, 4mg/mL, 8mg/mL, 16mg/mL e 32mg/mL) por 2 horas. As células foram centrifugadas a 600rpm/10⁰C por 15 minutos (três vezes), para a retirada do sobrenadante e novamente acrescidas de meio RPMI-1640 adicionado de uma suspensão de Zymozan equivalente a uma concentração de 5-10mg/mL de partículas inertes para cada 10⁶ macrófagos peritoneais. Após 1 hora de incubação a 37⁰C (5% CO₂) as células foram novamente centrifugadas por três vezes consecutivas, para a retirada das partículas de Zymosan que não foram fagocitadas. As células foram fixadas e coradas pelo Panótico (hematoxilina-Eosina), e avaliadas quanto à capacidade fagocítica, de acordo com a seguinte fórmula:

$$IF = \frac{\text{Número de M}\phi \text{ que fagocitaram 3 ou mais partículas}}{\text{Número total de M}\phi \text{ contados}} \times 100$$

Onde IF corresponde ao índice fagocítico (%) e M ϕ corresponde aos macrófagos.

Os resultados foram comparados aos controles constituídos de M ϕ não tratados e expressos em percentuais de atividade fagocítica.

A capacidade fagocítica, assim determinada, diminuiu drasticamente à partir da exposição à concentração de OCM_{OH} equivalente a 16 mg/10⁶ M ϕ /mL, onde observou-se uma capacidade de ingestão equivalente a 8% da capacidade fagocítica observada nos controles (M ϕ não tratados). A exposição à concentração de 32 mg de OCM_{OH}/10⁶ M ϕ /mL causou uma inibição de 98% da capacidade fagocítica em relação ao controle. A perda da função fagocitária foi irreversível, uma vez que os macrófagos tratados com as doses limitantes do extrato vegetal, quando lavados por centrifugações sequenciais e adicionados em meio de cultivo livre de aditivos, na presença de soro fetal bovino inativado, não recuperaram suas funções metabólicas.

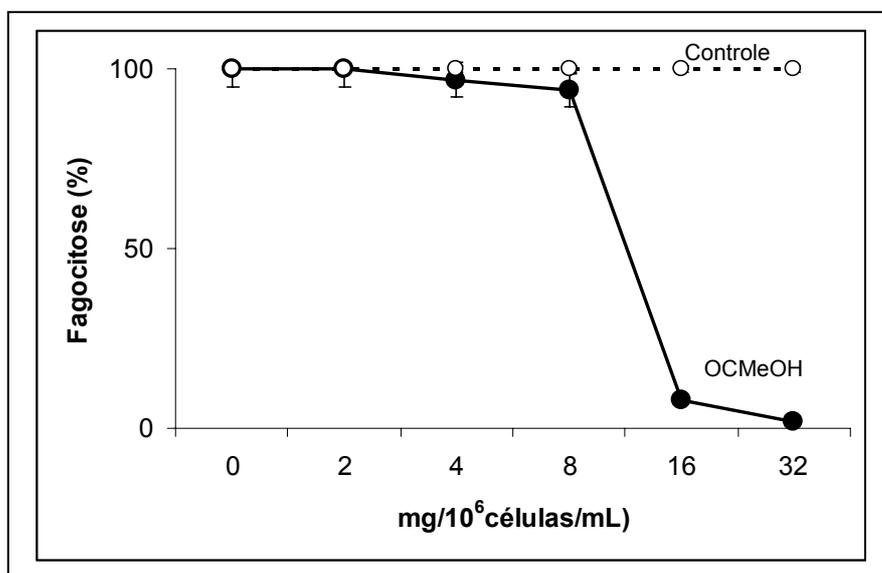


Figura 104: Percentual de endocitose de partículas inertes (Zymozan) em macrófagos peritoneais de hamsters (*Cricetus cricetus*) tratados com diferentes doses do extrato metanólico de *Ouratea cuspidata* (OCMeOH) durante duas horas a 37°C, 5% CO₂, em comparação ao controle constituído por células não tratadas. Os resultados estão expressos como sendo a média de quatro repetições por concentração analisada adicionados do erro padrão ($p \leq 0,01$).

A avaliação das alterações morfofisiológicas presentemente detectadas sugeriu que OCMeOH exerce efeitos distintos para ambos, células hospedeiras e promastigotas. Tal possibilidade foi corroborada através de ensaios de bioproteção *in vitro*, nos quais comprovou-se que as doses atóxicas para as células hospedeiras corresponderam àquelas que melhor eliminaram substâncias oxigênio-reativas ocorrentes pela indução artificial de TBARS em membranas eritrocitárias, através de mecanismos não enzimáticos (**Figuras 97 pág-148 e 105 pág-156**).

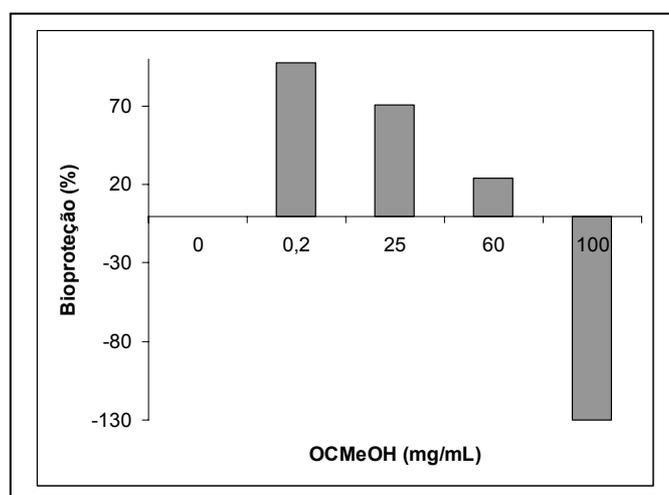


Figura 105: Percentual de bioproteção contra a geração de radicais livres por diferentes concentrações da fração metanólica de *Ouratea cuspidata* (OCMeOH). Os resultados

representam a média de quatro repetições de ensaios realizados “*in vitro*” onde as diferentes concentrações do extrato vegetal foram adicionadas sobre sistema gerador de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Neste experimento, foi confirmada a ação bioprotetora em doses decrescentes de OCM_{OH}, onde a concentração de 0,2 mg/mL foi capaz de proteger 98% das membranas quanto à formação de peróxidos de lipídeos e formação de TBARS. A concentração de 100 mg/mL (500 vezes maior) induziu a formação de TBARS adicionais no sistema, que apresentou concentração de radicais livres 1,3 vezes maior que o sistema de experimental utilizado. As concentrações de 25 mg/mL (125 vezes maior) e de 60 mg/mL (300 vezes maior), apresentaram percentual de bioproteção de 71% e 24%, respectivamente. Sugerindo ter ocorrido o efeito farmacológico, comum em plantas com atividade medicinal, denominado de hormese, onde as doses mais baixas de um extrato exercem efeito biológico mais pronunciado que aquelas mais elevadas (**Figura 106**).

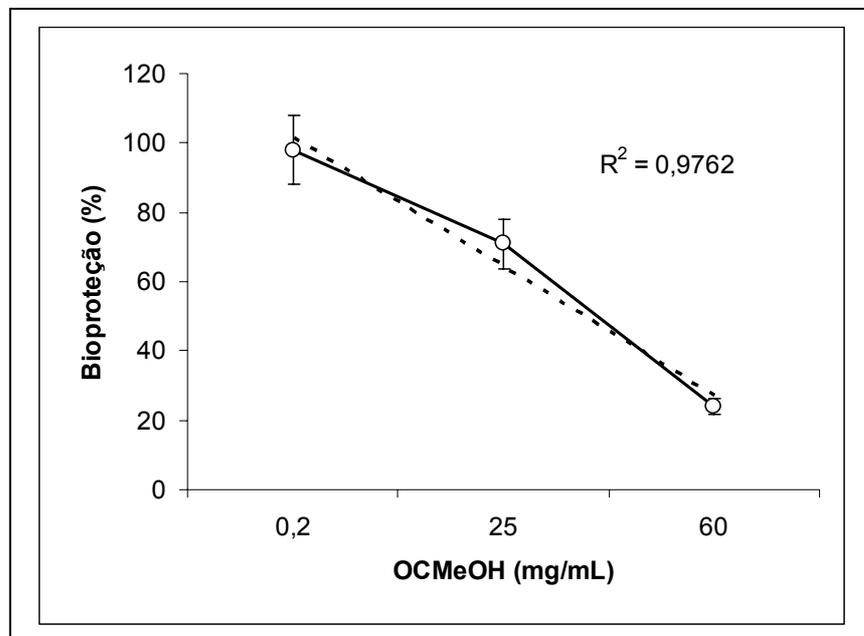


Figura 106; Curva de regressão linear evidenciando a hormese bioprotetora obtida pela adição da fração metanólica de *Ouratea cuspidata* (OCMeOH) sobre sistema biológico sujeito à indução de radicais livres reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os resultados estão representados como a média de quatro repetições acrescidos do erro padrão ($p \leq 0,01$).

No presente ensaio pôde-se notar uma intensa atividade biológica sobre a proliferação parasitária e concomitante efeito antiinflamatório decorrente da paralisação metabólica nas células hospedeiras. Nesse contexto, a atividade antiparasitária exercida pelos constituintes presentes no extrato OCM_{OH} estariam relacionados à inibição da fagocitose dos parasitas que, por não penetrarem ativamente nas células do hospedeiro, estariam mais expostos aos efeitos locais da droga

Conclusão.

O estudo sobre a diversidade flavonoídica dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* permitiu verificar que as substâncias mais significativas do gênero *Ouratea* são os biflavonóides com ligação interflavonoídica do tipo C-C, sendo o representante mais abundante o derivado da agatisflavona. Por outro lado o gênero *Luxemburgia* é caracterizado pela ligação do tipo C-O-C, cujo componente mais abundante a 2''-diidroochanaflavona, além das chalconas presentes apenas em espécies desse gênero, tanto na forma monomérica como nas bichalconas A distribuição do grupo de produtos naturais formados por acoplamento de duas unidades flavonoídicas nos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* e o levantamento de suas propriedades biodinâmicas permitiram: caracterizá-los como marcadores quimiotaxonômicos para os referidos táxons, propor uma nomenclatura com notação para esse grupo de substâncias e evidenciar suas potencialidades farmacológicas. Apesar dessas espécies não serem tão conhecidas na medicina popular, a frequência das biflavonas é indicativo de ótimas perspectivas para se tornarem constituintes de medicamentos.

Este é o primeiro estudo químico de inflorescência de *Ouratea hexasperma* e revelou a presença de glicosídeos não isolados anteriormente de *Ouratea* e, inclusive, permitiu verificar que, certamente, nessa parte da planta não são metabolizados biflavonas.

Quanto ao estudo químico de caule de *O. hexasperma* permitiu identificar duas substâncias novas a serem registradas na literatura e verificar que espécies desse gênero podem metabolizar flavonóides prenilados.

O estudo químico de folhas e caule de *Ouratea cuspidata* levou ao isolamento de substâncias pertencentes as classes de metabólitos identificados em outras espécies de *Ouratea*. A presença de biflavonóides do grupo da amentoflavona foi confirmada nessa parte da planta. Tanto o biflavonóide putraflavona como a monoflavonoide tricina são registradas pela primeira vez no gênero *Ouratea*.

A avaliação da atividade biológica dos extratos das folhas de *Ouratea cuspidata* revelou que em baixas concentrações o extrato metanólico apresenta maior atividade antiparasitária frente a *Leishmania braziliensis*, maior ação bioprotetora contra radicais livres e antiinflamatória. Esses resultados demonstram que folhas dessa espécie podem ser empregadas como fonte de fármaco na terapêutica contra Leishmaniose.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P. K.; BANSAL, M. C.; PORTER, L. J.; FOO, L. Y. *Carbon-13 NMR of flavonoids – studies in organic chemistry* 39; AGRAWAL, P. K. ed; elsevier Science Publishers B. V.: Amsterdam v 39 201p. **1989**.
- ALVES C. C. F.; Estudo químico de *Luxemburgia octandra* (Ochnaceae), *Laseguea erecta* (Apocynaceae), do látex de *Parahancornia amapá* (Apocinaceae) e de *Solanum crinitum* (Solanaceae) Tese, Doutorado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, **2003**.
- BARREIRO, E. J.; Fraga; C. A. M; *Química medicinal As bases moleculares da ação dos fármacos*, Porto Alegre, Artmed Editora, p 53-81, **2001**
- BAROSO; G. M.; *Sistemática de Angiospermas do Brasil*, UFV-MG 130p, **1986**.
- BASTOS, A. B. F. D.O; CARVALHO, M. G.; VELANDIA J.R.; BRAZ-FILHO,R; Constituintes químicos isolados de *Simira glazeava* e a atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio do alcalóide ofiorina e seus derivados, *Química Nova*, v. 25 n.2, p. 241-245, **2002**.
- BERG, K., ZHAI, L., KHARAZMI, A.; OWEN, T. C. The use of a water-soluble formazan-complex to quantitate the cell number and mitochondrial function of *Leishmania major* promastigotes. *Parasitology Research*, v. 80: p. 235-239, **1994**
- BOSSO, A. A. Identificação de biflavonoides de *Luxemburgia nobilis* e *Ouratea semiserrata* (Ochnaceae) por cromatografia Líquida de Alta Eficiência HPLC. Dissertação de Mestrado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, **2003**.
- BREITMAIER, E.; VOELTER, W.; *Carbon-13 NMR Spectroscopy high-resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry*, New York third, completely revised edition, **1989**
- CALIXTO; J. B.; Medicamentos fitoterápicos In: YUNES; R. A.; CALIXTO J. B;(Org) *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*, Chapecó: Agros p. 297-315, **2001**
- CARDOZO, M. A. R; Metabólitos especiais isolados dos galhos e folhas de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. (Leguminosae) e das flores de *Laseguea erecta* Mull. Arg. (Apocynaceae). Dissertação Mestrado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, **2006**.

- CARVALHO, M. G. DE.; ALVES, C. C. F.; SILVA, K. G. S.; EBERLIN, M. N.; WERLE, A. A.; Luxenchalcone, a new bichalcone and other Constituents from *Luxemburgia octandra* *J. Braz. Chem. Soc.* V.15, n. 1 p. 146-149, **2004**.
- CARVALHO M. G. DE; VELANDIA, J. R.; de OLIVEIRA J. C. C.; ECHEVARRIA, A.; BRAZ-FILHO, R.; GRYNBERG, N. F. Chemical Structure, Cytotoxic and Antitumour Activities of Biflavonoids from Brazilian *Ouratea* (Ochnaceae). In *Phytochemical and Pharmacology II of the Series "Recent Progress in Medicinal Plants"*, Majumdar, D.K.; Govil, J.N.; Singh, V.K. eds., SCI Tech Publishing LLC: Texas, USA, 8, p 77-92, **2002**
- CARVALHO, M. G. DE., DE CARVALHO G. J. A. de, BRAZ-FILHO; R; chemical constituents from *Ouratea floribunda*: Complete ^1H and ^{13}C NMR assignments of Atranorin and new acetyl derivate *J. Braz. Chem. Soc.* V. 11, n.2 p. 143-147, **2000**.
- CARVALHO, M. G. DE.; OLIVEIRA, M. C. C.; WERLE, A. A.; Chemical constituents from *Luxemburgia nobilis* (EICHL), *J. Braz. Chem. Soc.* V. 11, n. 3 p. 232-236, **2000**.
- CARVALHO M. G. DE; BRAZ-FILHO, R Novas técnicas de RMN e os deslocamentos químicos dos átomos de ^1H e ^{13}C da isoflavona Duartina. *Química Nova*, v. 16, n. 2. p. 89-94, **1993**
- CHARI; V. M.; CHEN, F.; CHEN; L.; ILYAS, M.; LIN, Y. C.; LIN, Y. M.; NESAMELY; A; WAGNER; H.; ^{13}C -NMR Spectroscopy of biflavanoids *Phytochemistry* v.16 p.1273-1278, **1977**.
- CORTES, S. F.; VALADARES, M. Y.; OLIVEIRA, A B. DE; LEMOS. S. V.; BARBOSA, M. P. T.; BRAGA, F. C.; Mechanism of endothelium-dependent vasodilation induced by a proanthocyanidin-rich fraction from *Ouratea semisserata*, *Planta Medica* v.68 n.5, p. 412-415; **2002**
- DAHLGREN, R. M. T.; *Bot. J. Line Soc.* 80(2), 91. **1980**
- DANIEL, J. F. De S.; DE CARVALHO, M. G.; CARDOSO, R. dA S.; AGRA, M. de F.; EBERLIN, M. N.; Others flavonoids from *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* V.16, p. 634, **2005**
- DANIEL, J. F. DE S.; Metabólitos especiais isolados de *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae), *Dipladenia martiana* (Apocynaceae) e de *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae), Tese doutorado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, **2006**.
- DE CARVALHO G. J., CARVALHO, M. G DE., BRAZ-FILHO, R.; Terpenos, triterpenos e esteroides de flores de *Wedelia paludosa*, *Química Nova*, V. 24 n. 1 p. 24-26, **2001**.
- DEWICK, P. M.; Medicinal natural products. A biosynthetic approach, ed John Wiley & Sons LTD: England 466p **1997**,
- DEWICK, P. M.; Medicinal natural products. A biosynthetic approach, 2 ed John Wiley & Sons LTD: England 507p **2002**,
- DOMINGUEZ; A X.; Metodos de investigacion fitoquímica, México, Ed Limusa, p. 139, 149, 211, **1973**.

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

DREWES S. E.; Hudson, N. A.; Bates, R. B.; Linz, G. S.; Novel dimeric c halcone –based pigments from *Brackenridgea zanguebarica*. *Tetrahedron Letters* v. 25 n. 1 105-108, **1984**

DUTTA, A., ANDYOPADHYAY, S., MANDAL, C. CHATTERJEE, M., Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitology International*, v. 54: p. 119-122. **2005**.

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

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

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

FERREIRA;S. H.; BARATA; L.E.S.; SALLES;S. L. M ; QUEIRÓZ; S.R. R.; NETO; N. E. H.; CORAZZA; R.; FARIAS; R. C.; Medicamentos a partir de plantas medicinais do Brasil Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, 131p **1998**

GARG, H. S.; MITRA, C. R.; Putraflavona, A new biflavonoid from *Putranjiva roxburghii*, *Phytochemistry*, v. 10, p. 2787-2791, **1971**.

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

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

GARTLAN, S.; MCKEY D. B.; WATERMAN, P. G.; MBI, C. N.; STRUHSAKER, T. T.; A comparative study of the phytochemistry of two African rain florests. *Biochem. Syst. Ecol.* , V. 8, p. 401-422. **1980**.

HERSCOWITZ , H. B, HOLDEN H. T. BELLANTI, JA. ;GHAFFAR, *A Manual of macrophage methodology, collention, characterization and function*, ed Marcel Dekker, INC, New York, 531p. **1981**

HERZORG-SOARES, J. D. A. & FREIRE, R. B.. Effect of Citrinin and in Association with Aflatoxin B₁ on the Infectivity and Proliferation of *Toxoplasma gondii* in vitro. *The Brazilian Journal of Infection Diseases*, **8**:101-108. **2004**

JENSEN, J. B.; In vitro cultivation of protozoan parasites, ed CRC Press, Florida, 297 p, 1983

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

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

KOMATSU, M; TOMIMORI, T.; Studies on the constituents of *Swertia japonica*: isolation and structure of new flavonoids, swertisin and swertijaponin. *Tetrahedron Letters* n. 15 p. 1611-1617, **1966**.

KUMARASAMY Y.; BYRES, M.; COX, P. J.; DELAZAR, A.; JASPARS, M.; NAHAR, L.; SHOEB, M.; SARKER, S. D.; Isolation, structure elucidation, and biological activity of flavone 6-cglycosides, *Chemistry of Natural compounds*, v. 40, n. 2, **2004**

KUWABARA, H.; MOURI, K.; OTSUKA, H.; KASAI, R.; YAMASAKI, K.; Tricin form a Malagasy Connaraceous plant with potent antihistaminic Activity, *J. Nat. Prod*, v. 66, p. 1273-1275, **2003**.

LIKHITWITAYAWUID, K.; RUNGSERICHAI, R.; RUANGRUNGSI, N.; PHADUNGCHAROEN, T.; Flavonoids from *Ochna integerrima*, *Phytochemistry*, V. 56, p. 353-357, **2001**.

LIN, Y. M.; FLAVIN M. T.; SCHURE, R.; CHEN, F. C.; SIDWEL, R.; BARNARD, D. L.; HUFFMAN, J.H.; KERN, E. R.; Antiviral activities of biflavonoids; *Planta Medica*,v. 65, n. 2 p. 120-125 **1999**.

MANN J., *Chemical Aspects of biosynthesis*, 1 ed, Oxford University press, 92p, **1994**.

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

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

MESSANGA, B. B.; KIMBU, S. F.; SONDEMGAM, B. L.; BODO, B.; Triflavonoids of *Ochna calodendron*, *Phytochemistry*, V. 59, p. 435. **2002**.

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

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

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

MONACHE, F. D; Determinação estrutural de produtos naturais através da técnica de ressonância magnética nuclear In: YUNES; R. A.; CALIXTO J. B.; (ORG) *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna* Chapeco: Argos p. 101-146, **2001**

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

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P.; Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos, In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GUSMAN, G.; MELLO J. C. P. de; MENTZ L. A.; PETROVICK, P. R.; *Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento*, UFSC/UFRGS, p. 11-24, **2001**.

OLIVEIRA; M. M. de; SAMPAIO, M. P.; SIMON, F.; GILBERT, B.; MORS, W. B.; Antitumor activity of Condensed flavanols, *An. Acad. Bras. Ciênc.*, v. 44, n. 1 P. 41-43, **1972**.

OLIVEIRA, M. C. C.; DE CARVALHO, M. G. SILVA, C. J.; WERLE, A. A.; New biflavonoids and Other constituents from *Luxemburgia nobilis* (EICHL) *J. Braz. Chem. Soc.*, v.13, n. 1 p. 119123 **2002**.

PEGNYEMB, D. E.; TIH, R. G.; SONDEGAM, B. L.; BLOND A.; BODO, B.; Biflavonoids from *Ochna afzelii*, *Phytochemistry*, v. 57, p. 579-582 **2001**.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GUSMAN, G.; MELLO J. C. P. de; MENTZ L. A.; PETROVICK, P. R.; *Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento*, UFSC/UFRGS 821p, **2001**.

SAMPAIO M. P.; OLIVEIRA, M. M. de; Triagem de substâncias e extratos de origem vegetal no carcinossarcoma de Walker 256, *An. Acad. Bras. Ciênc.*, V. 47, n. 1 p. 149-153 **1975**.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN; G.; PETROVICK; P. R.; *Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos*; In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GUSMAN, G.; MELLO J. C. P. de; MENTZ L. A.; PETROVICK, P. R.; *Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento*, UFSC/UFRGS, p. 291-320, **2001**.

SHRINER, R. L.; *The systematic identification of organic compounds* 6 th Singapore, ed John Wiley & sons, p. 160, **1979**

SHEPHERD, G. J.; *Conhecimento de Diversidade de Plantas terrestres do Brasil*; In: T. M. Lewinsohn; P. I. Prado (org) *Biodiversidade brasileira síntese do estado atual do conhecimento*, São Paulo, Ed. Contexto, p. 155-159, **2002**

SHWARTZ, et al 1995

SILVA, T. M. S.; Estudo químico de espécie de *Solanum* (Solanaceae). Tese Doutorado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, **2002**.

SOBRINHO, D. C., HAUPTLI, M. B.; APPOLINARIO, E. V.; KOLLENZ, C. L. M.; CARVALHO M. G.; BRAZ-FILHO, R.; Triterpenoids isolated from *Parahancornia amapá*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 2, n.1, p. 15-20, **1991**.

SUZART, L. R.; DANIEL; J. F. de S.; DE CARVALHO; M. G.; KAPLAN; M. A. C.; Biodiversidade flavonoídica e aspectos farmacológicos de espécies dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* (Ochnaceae), *Química Nova*, **QN 336/06**, aceito, **2007**.

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

TIH R. G.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B.; Structure of Lophirones B and C, biflavonoids from the bark of *Lophira lanceolata*, *Phytochemistry*, v. 28, n. 5 p. 1557-1559 **1989**.

VELANDIA, J. R.; DE CARVALHO M. G.; BRAZ-FILHO, R.; *Quím. Nova* 21, 397, **1998**.

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

VELLOSO, C. R. X.; Triterpenos isolados de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) e Diterpenos isolados de *Pinus caribaea* var. bahamensis Barr et Golf, Dissertação de Mestrado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, **1998**.

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

YUNES; R. A.; PEDROSA; R. C.; CECHINEL FILHO; V. C.; Farmacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da industria de fitoterápicos e fitofarmacos no Brasil, *Química Nova*, V. 24 n. 1 p. 147-152, **2001**.

ZHOU, X., PENG, J.; FAN, GUORONG; WU, Y; Isolation and purification of flavonoid glycosides from *Trollius ledebouri* using high-speed counter-current chromatography by stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase, *Journal of Chromatography A*, 1092 p. 216-221, **2005**.