

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

**VIVIANE CÂNDIDA DA SILVA**

TESE DE DOUTORADO

**Estudo químico e biológico de espécies de  
Rubiaceae**

Tese apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Nasser Lopes

Araraquara  
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

S586e Silva, Viviane Cândida da  
Estudo químico e biológico de espécies de Rubiaceae / Viviane Cândida da Silva. – Araraquara : [s.n], 2007  
330 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química  
Orientador: Márcia Nasser Lopes

1. Química Orgânica. 2. Fitoquímica. 3. Atividade biológica. 4. Alibertia.  
I. Título.

## VIVIANE CÂNDIDA DA SILVA

Tese apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Química.

Araraquara, 09 de março de 2007.

### BANCA EXAMINADORA



Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Márcia Nasser Lopes (Orientadora)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara.



Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lourdes Campaner dos Santos  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara.



Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ângela Regina Araujo  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. João Luis Callegari Lopes  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto.



Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Dionéia Camilo Rodrigues de Oliveira  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto.

## Súmula curricular

### **Dados pessoais**

Viviane Cândida da Silva

Endereço eletrônico: vcandida@iq.unesp.br, vivicandida@yahoo.com.br

### **Formação Acadêmica**

#### Fevereiro 2003 – Março 2007

Doutorado em Química.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara/SP

Título da Tese: Estudo químico e biológico de espécies de Rubiaceae

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Nasser Lopes

Bolsista: CNPq

#### Fevereiro 2001 – Fevereiro 2003

Mestrado em Química.

Universidade de Brasília, UnB, Brasília/DF

Título da Dissertação: Estudos iniciais para a utilização dos constituintes do líquido da castanha de caju (LCC) como filtros solares

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Márcia Murta

Co-orientador: Prof. Dr. Gouvan Cavalcante de Magalhães

Bolsista: CAPES

#### Março 1999 – Março 2000

Graduação em Química - Licenciatura. Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia/GO

Título de trabalho desenvolvido: O que produzem e como produzem os pequenos agricultores dos municípios do entorno de Goiânia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Agustina Rosa Echeverria

Bolsista: FUNAPE/UFG

#### Março 1996 – Março 1999

Graduação em Química - Bacharelado. Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia/GO

Título de trabalho desenvolvido: Síntese de maleimidias enantiomericamente puras

Orientador: Prof. Dr. Silvio do Desterro Cunha

Bolsista: PIBIC/CNPq

### **Experiência Acadêmica**

✓ Estágio Docência na Disciplina Química Orgânica Prática para o Curso de Química Bacharelado (4 horas/semana) – 2º semestre de 2001.

✓ Estágio Docência na Disciplina Química Orgânica Experimental II para o Curso de Química Bacharelado (8 horas/semana) – 1º semestre de 2004.

✓ Bolsista Didático na Disciplina Química Orgânica Experimental II para o Curso de Química Bacharelado (8 horas/semana) – 1º semestre de 2006.

✓ Bolsista Didático na Disciplina Química Orgânica I para o Curso de Farmácia-Bioquímica – Integral (8 horas/semana – Teoria e Prática) – 2º semestre de 2006.

## **Publicações**

✓ CUNHA, Silvio do Desterro; **SILVA, Viviane Cândida da**; NAPOLITANO, Hamilton B; VENCATO, Ivo; LARIUCCI, Carlito. Reaction of acyclic enamines with methoxymethylene Meldrum's acid. Synthetic and structural implications. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 14, n. 1, p. 107-112, 2003.

✓ **SILVA, Viviane Cândida da**; LOPES, Márcia Nasser; BOLZANI, Vanderlan da Silva. Chemical study of leaves of *Chrysophyllum marginatum* (Hook. & Arn.) Radlk (Sapotaceae). Química Nova, v. 29, p. 493-495, 2005.

✓ **SILVA, Viviane Cândida da**; SILVA, Geraldo H.; BOLZANI, Vanderlan da Silva; LOPES, Márcia Nasser. Isolation of lignan glycosides from *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. (Rubiaceae) by preparative high-performance liquid chromatography. Eclética Química, v. 31, n. 4, p. 55-58, 2006.

✓ **SILVA, Viviane Cândida da**; BOLZANI, Vanderlan da Silva; YOUNG, Maria Cláudia Marx; LOPES, Márcia Nasser. A New Antifungal Phenolic Glycoside Derivative, and Further Iridoids and Lignans, from *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. (Rubiaceae) - Artigo submetido 2006

## **Patentes**

✓ ROMEIRO, Luiz Antônio Soares; **SILVA, Viviane Cândida da**; MURTA, Maria Márcia; MAGALHÃES, Gouvan Cavalcante de; LOGRADO, Lúcio Paulo Lima; SANTOS, Maria Lucília dos; RESCK, Inês Sabione; ARAÚJO, Emeli Moura de; GARCIA, Sheila; ORTIZ, Gisela M. D. Uso de Novos Compostos Capazes de Absorver Radiação Ultravioleta, Composições Contendo os Mesmos e Processos para sua Preparação - PI 0406040-7A. 2003.

✓ ROMEIRO, Luiz Antônio Soares; **SILVA, Viviane Cândida da**; MURTA, Maria Márcia; MAGALHÃES, Gouvan Cavalcante de; ARAÚJO, Emeli Moura de; GARCIA, Sheila; LOGRADO, Lúcio Paulo Lima; ORTIZ, Gisela M. D.; RESCK, Inês Sabione; SANTOS, Maria Lucília dos. Compounds Capable of Absorbing Ultraviolet Radiation, Compositions Containing them and Processes for their Preparation - WO2006042391. 2006

## **Trabalhos apresentados em congressos**

✓ **SILVA, Viviane Cândida da**; BOLZANI, Vanderlan da Silva; YOUNG, Maria Cláudia Marx; LOPES, Márcia Nasser. Estudo químico dos galhos de *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. (Rubiaceae) continuação. In: 29ª RASBQ, 2006, Águas de Lindóia-SP.

✓ **SILVA, Viviane Cândida da**; SILVA, Geraldo H.; BOLZANI, Vanderlan da Silva; LOPES, Márcia Nasser. Isolamento por HPLC de lignanas glicosiladas da espécie *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum: primeiro relato em Rubiaceae. In: II Simpósio de Cromatografia, 2006, São Pedro - SP.

✓ MONTEIRO, Maisa C. M.; **SILVA, Viviane Cândida da**; PESSOA, Cláudia do Ó; BOLZANI, Vanderlan da Silva; LOPES, Márcia Nasser. Evaluation of the antitumor activity of xanthenes from *Kielmeyera rubriflora* (Clusiaceae). In: 3rd Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, 2006, São Pedro - SP.

✓ **SILVA, Viviane Cândida da**; LOPES, Márcia Nasser; BOLZANI, Vanderlan da Silva; YOUNG, Maria Cláudia Marx. Estudo fitoquímico dos galhos de *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. (RUBIACEAE). In: 28ª RASBQ, 2005, Poços de Caldas – MG.

✓ **SILVA, Viviane Cândida da**; LOPES, Márcia Nasser; YOUNG, Maria Cláudia Marx; BOLZANI, Vanderlan da Silva; FARIA, Andréia de Oliveira. Estudo químico e biológico de espécies de Rubiaceae. In: V Simpósio e V Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp, 2005, Águas de Lindóia – SP.

✓ **SILVA, Viviane Cândida da**; LOPES, Márcia Nasser; YOUNG, Maria Cláudia Marx; BOLZANI, Vanderlan da Silva. Estudo químico das folhas de *Chrysophyllum marginatum* (Hook. & Arn.) Radlk (Sapotaceae). In: 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e XXVI Congresso Latinoamericano de Química, 2004, Salvador - BA.

✓ **SILVA, Viviane Cândida da**; MURTA, Maria Márcia; ROMEIRO, Luiz Antônio Soares; ARAÚJO, Emeli Moura de; GARCIA, Sheila; SANTOS, Maria Lucília dos ; LOGRADO, Lúcio Paulo Lima; ORTIZ, Gisela M. D.; RODRIGUES, A. P. C.; CASTRO, C. F. S. Determinação do Fator de Proteção Solar e Fototoxicidade de Derivados da Castanha de Caju. In: 3º Congresso de Ciências Farmacêuticas do Rio de Janeiro, 2003.

✓ **SILVA, Viviane Cândida da**; MURTA, Maria Márcia; MAGALHÃES, Gouvan Cavalcante de . Síntese de Protetores Solares a Partir de Constituintes Químicos do LCC. In: 25ª RASBQ, 2002, Poços de Caldas – MG.

✓ **SILVA, Viviane Cândida da**; CUNHA, Silvio do Desterro. Síntese de Maleimidas Enantiomericamente Puras. In: VII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA NA UFG, 1999, Goiânia - GO.

✓ **SILVA, Viviane Cândida da**; CUNHA, Silvio do Desterro . Síntese De Maleimidas Enantiomericamente Puras In: VIII ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 1999, Campo Grande - MS.

✓ **SILVA, Viviane Cândida da**; CUNHA, Silvio do Desterro; KASCHERES, Albert J . Reações de Enaminonas com o Ácido de Meldrum. Implicações Sintéticas e Mecanísticas. In: 21ª RASBQ, 1998, Poços de Caldas – MG.

### **Participação em congressos**

- ✓ 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2006.
- ✓ II Simpósio de Cromatografia e Técnicas afins. 2006.
- ✓ 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2005.
- ✓ I Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas. 2005.
- ✓ V Simpósio e V Reunião do Programa Biota/Fapesp. 2005.
- ✓ 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e XXVI Congresso Latinoamericano de Química. 2004.
- ✓ IV Workshop da Pós-Graduação em Ciências Biológicas. 2004.
- ✓ 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2002.
- ✓ XI Semana do Instituto de Química - UFG. 2001.

- ✓ 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2000.
- ✓ XL Congresso Brasileiro de Química. 2000.
- ✓ 22ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 1999.
- ✓ XXXIX Congresso Brasileiro de Química. 1999.
- ✓ VII Seminário de Iniciação Científica na UFG. 1999.
- ✓ Programa de Seminários do Instituto de Química da UFG. 1999.
- ✓ VIII Encontro de Iniciação Científica. 1999.
- ✓ II Semana de Engenharia de Alimentos. 1999.
- ✓ XXXVIII Congresso Brasileiro de Química. 1998.
- ✓ 21ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 1998.
- ✓ Programa de Seminários do Instituto de Química da UFG. 1998.
- ✓ XXXVII Congresso Brasileiro de Química. 1997.
- ✓ Programa de Seminários do Instituto de Química da UFG. 1997.
- ✓ II Seminário Piqui "O Papel do Professor nas Diferentes Concepções de Ensino Aprendizagem". 1997.
- ✓ Formação de Professores na LDB - Sessão Pública da Comissão de Educação e Cultura da Câmara Municipal de Goiânia. 1997.

*À Deus, ofereço.*

*Ao meu esposo Clenilson,  
aos meus pais Corival e Jandira e  
às minhas irmãs Janaina e  
Marlise, dedico esta tese.*



## AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Márcia Nasser Lopes, por ter me aceito como sua aluna, sem mesmo conhecer-me. Agradeço pela confiança em mim depositada durante a realização deste trabalho e ainda, pelos ensinamentos, que com sua seriedade, tranquilidade e conhecimento, transmitiu-me nos momentos de dúvidas e indecisões.

Aos professores, membros da banca, que gentilmente aceitaram o convite de ler este manuscrito.

Aos professores Dra. Márcia Nasser, Dra. Ângela R. Araújo, Dra. Lourdes C. dos Santos, Dr. Ian Castro-Gamboa, Dr. Wagner Vilegas e aos técnicos Mario Cilense, Marco Antônio, Alberto Alécio, Márcia Lara, Luciana Polese e Elaine, pela convivência e pelo aprendizado durante meus seis meses de Estágio Docência e um ano de bolsista didática. À doutoranda Tamara R. Calvo, pela convivência e trocas no preparo de nossas aulas, e pelos desabafos sobre a “arte de ensinar e de aprender”.

Aos demais professores do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara, pela química ensinada em suas aulas.

À Dra. Maria Cláudia M. Young e suas colaboradoras Ludmila Raggi e Cynthia Murakami do Instituto Botânico de São Paulo, à Dra. Maria José S. M. Gianini e suas alunas Liliana Scorzoni e Tatiane Benaducci da Faculdade de Farmácia da UNESP/Ar e à Dra. Cláudia do Ó Pessoa da Universidade Federal do Ceará, pela realização dos ensaios biológicos.

Aos professores Dr. Wagner Vilegas e Dra. Lourdes C. dos Santos por intermediar a análise da saponina por RMN e MS Tandem na Itália. À Dra. Virginia Carbone do Centro di Spettrometria di Massa Proteomica e Biomolecolare, Istituto di Scienze dell' Alimentazione, Avellino, pela realização dos espectros de massas em Tandem e aos professores Dra. Sonia Piacente e Cosimo Pizza do Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Salerno, Salerno, pela realização dos espectros de RMN.

Ao professor Dr. Norberto Pepporine Lopes e ao especialista em Laboratório Jose Carlos Tomaz, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP Ribeirão Preto, pela realização dos espectros de massas de alta resolução.

Ao Dr. Nivaldo Boralle, pela realização dos espectros, pelo aprendizado, pelas longas conversas e pela paciência em estar sempre disposto a fazer um novo espectro que auxiliasse na determinação estrutural da substância isolada.

Às funcionárias da Seção de pós-graduação, Vilma A. Pestana, Sandra R. Pavanelli, Célia Maria C. V. Coelho e Patrícia F. Ribeiro, sempre prontas atender e solucionar nossas dúvidas.

À Hélia, pela convivência e longas conversas no laboratório. Ao Dr. Alberto C. Alécio, pela convivência, pelos socorros e intermediações nas compras de material.

À química Andréia de O. Faria, ex-aluna de iniciação científica, por estar sempre disposta a aprender o que eu tinha a ensinar-lhe e desta forma, contribuir para este trabalho.

Ao doutorando Ioanis H. Leptokarydis e à Dra. Lidilhone Hamerski, por terem me ensinado os primeiros passos da Fitoquímica.

Em especial, agradeço ao agrônomo-químico professor Dr. Geraldo Humberto Silva e a mestre Maísa Cristina M. Monteiro, pela convivência, ensinamentos, “dicas” e incentivos e, por parte do Dr. Geraldo cobranças para publicar. Muito obrigada pela amizade e carinho de vocês!

À doutoranda Vânia A. F. Formenton, pelas longas conversas sobre os fatos da vida que acontecem fora do laboratório e ao doutorando Jonas M. da Silva, pelas longas conversas sobre os fatos da vida que acontecem dentro do laboratório. Obrigada pela amizade de vocês.

Aos colegas e amigos conquistados no Departamento de Química Orgânica, que ainda estão ou já passaram por lá, alunos de iniciação científica, mestrado, doutorado, pós-doutorado e alguns já profissionais atuando pelo país a fora: Adriana Lopes, Luís Octávio Regasini, Luciana de Ávila, Lidiane Gaspareto, Marcela, Débora Cristina Baldoqui, Andréa Nastri, João Marcos Batista, Hosana Maria Debonisi, Waldemar B. Filho, Juliana Gama, Otávio Flausino, Marcelo Telascrea, Karin Bandeira, Mariana Cafeu, Camila Martins, Camila Higa, Maria Amélia Serrano, Patrícia Pauletti, Aristeu Tininis, Tito da Silva, Inara Pascoli, Marcos Baptista, Gisele Baraldi, Cláudio Viegas, Marcos Pivatto, Amanda Danuello, Lisinéia, Fernanda, Fernando Cotinguiba, Douglas Picchi, Sara de Marqui, Guilherme Julião, Murilo Assonuma, Carenina Vidotte, Andréia Morandim, Renata Sordi, Helder Lopes, Carlos Carbonezi, André Gonzaga, Gustavo Henrique, Juliana Rodrigues, Juliana Severi, Ana Lúcia Nasser, Kamilla Lorenzi, Daniel Rinaldo, Marcelo A. da Silva, Márcio Andreo, Roberta Coelho, Miriam Sannomiya, Roberto Olea, agradeço pela convivência no laboratório, nas festinhas de defesas e de final de ano, nas reuniões do grupo, nos congressos e como não lembrar, na organização do V Simpósio Biota/Fapesp...

À FAPESP pelo apoio financeiro e ao CNPq pela bolsa concedida.

*“Gosto de ser gente porque, mesmo sabendo que as condições materiais, econômicas, sociais e políticas, culturais e ideológicas em que nos achamos geram quase sempre barreiras de difícil superação para o cumprimento de nossa tarefa histórica de mudar o mundo, sei também que os obstáculos não se eternizam.”*

*(Pedagogia da Autonomia: saberes necessários à prática educativa - Paulo Freire)*

*“... e cantar*

*A beleza de ser um eterno aprendiz...”*

*(Que é, o Que é? - Gonzaguinha)*

## RESUMO

Rubiaceae encontra-se amplamente distribuída nos principais ecossistemas brasileiros (Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica). É bem conhecida devido à importância econômica e terapêutica de suas espécies, especialmente *Coffea arabica* e *Cinchona ledgeriana*. Relatos sobre os constituintes químicos de Rubiaceae mostram uma grande diversidade de metabólitos secundários, tais como iridóides, alcalóides, antraquinonas, flavonóides, derivados fenólicos, triterpenos e diterpenos. Poucos estudos químicos do gênero *Alibertia* têm sido relatados, apesar da evidência de que Rubiaceae representa uma fonte rica de micromoléculas. Este trabalho descreve o estudo químico dos extratos dos caules de três espécies de *Alibertia* (*A. edulis*, *A. macrophylla* e *A. sessilis*). Os extratos foram submetidos a várias técnicas cromatográficas e quando necessário CLAE preparativa foi empregada para purificar algumas frações. Estes fracionamentos resultaram no isolamento e elucidação/identificação estrutural de onze triterpenos, oito iridóides e sete derivados fenólicos, assim como um diterpeno, uma saponina e duas lignanas. A elucidação/identificação estrutural foi realizada através de análise espectroscópica, tais como RMN de  $^1\text{H}$  (gCOSY, gHMQC, gHMBC, TOCSY), RMN de  $^{13}\text{C}$  e espectrometria de massas. Os dados obtidos também foram comparados aos valores da literatura. As substâncias éster metílico 6 $\beta$ -hidroxi-7-*epi*-gardosideo (**6**), 2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -triidroxi-*ent*-caurano (**9**), ácido 21-hidroxi-3,4-*seco*-cicloart-4(29), 24(31)-dien-3-óico (**20**), pomolato de 3 $\beta$ -O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-glicopiranosideo 28-O- $\beta$ -D-glicopiranosideo (**25**) e 3,4,5-trimetoxifenil-1-O- $\beta$ -D-(5-O-siringoila)-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)-glicopiranosideo (**32**) são inéditas. As lignanas (+)-lioniresinol 3a-O- $\beta$ -D-glicopiranosideo (**33**) e (-)-lioniresinol 3a-O- $\beta$ -D-glicopiranosideo (**34**) estão sendo descritas pela primeira vez em Rubiaceae. A substância nova 3,4,5-trimetoxifenil-1-O- $\beta$ -D-(5-O-siringoila)-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)-glicopiranosideo (**32**) apresentou atividade antifúngica contra os fitopatógenos *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides* na concentração de 100  $\mu\text{g}$ . Todos os extratos polares de *A. edulis* mostraram atividade antifúngica moderada (CIM 7,81 – 62,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) frente aos fungos patogênicos humanos *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*. As substâncias diterpeno (**9**), saponina (**25**), ácido salicílico (**26**) e D-manitol (**35**) também mostraram forte atividade antifúngica quando bioensaiadas com *Candida*. Todos os extratos apresentaram inatividade no bioensaio antitumoral.

Palavras-chave: Rubiaceae, *Alibertia*, fitoquímica

## ABSTRACT

Rubiaceae is widely distributed in Brazilian main ecosystems (Amazon, Cerrado and Atlantic Forest). This family is well known due to economic and therapeutic importance of these species, specially *Coffea arabica* and *Cinchona ledgeriana*. Reported chemical constituents of Rubiaceae revealed a great diversity of secondary metabolites such as iridoids, alkaloids, anthraquinones, flavonoids, phenolics derivatives, triterpenes and diterpenes. Relatively few chemical studies on *Alibertia* genus have been reported, despite evidence that Rubiaceae represents a rich source of micromolecules. This work describes the chemical study on stems extracts from three *Alibertia* species (*A. edulis*, *A. macrophylla* and *A. sessilis*). The extracts were submitted to various chromatographic techniques, and preparative HPLC was employed to purify some fractions. The structural elucidation/identification was performed through the use of spectroscopic analyses, such as  $^1\text{H}$  NMR (*g*COSY, *g*HMQC, *g*HMBC, TOCSY),  $^{13}\text{C}$  NMR and MS. The data obtained were compared to literature values. The results obtained showed the isolation and structural elucidation/identification of eleven triterpenes, eight iridoids and seven phenolic derivatives, as well as a diterpene, a saponin and two lignans. This is the first report of the substances 6 $\beta$ -hydroxy-7-*epi*-gardoside methyl ester (**6**), 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,16 $\alpha$  -tri hydroxy-*ent*-kaurene (**9**), 21-hydroxy-3,4-*seco*-cycloart-4(29),24(31)-dien-3-oic acid (**20**), 3 $\beta$ -O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-glucopyranoside 28-O- $\beta$ -D-glucopyranoside pomolate (**25**) and 3,4,5-trimethoxyphenyl-1-O- $\beta$ -D-(5-O-syringoyl)-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-glucopyranoside (**32**). The lignans (+)-lyoniresinol 3a-O- $\beta$ -glucopyranoside (**33**) and (-)-lyoniresinol 3a-O- $\beta$ -glucopyranoside (**34**) are being described for the first time in Rubiaceae. The new substance 3,4,5-trimethoxyphenyl-1-O- $\beta$ -D-(5-O-syringoyl)-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-glucopyranoside presented antifungal activity against phytopathogenes *Cladosporium sphaerospermum* and *C. cladosporioides* at 100  $\mu\text{g}$ . All polar extracts from *A. edulis* showed moderate antifungal activity (MIC 7.81 – 62.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) towards human pathogenic fungi *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *Cryptococcus neoformans*. The substances diterpene (**9**), saponin (**25**), salicylic acid (**26**) e D-manitol (**35**) showed strong antifungal activity when bioassayed with *Candida*. All extratcs showed inactivity in antitumoral bioassay.

Keywords: Rubiaceae, *Alibertia*, phytochemistry

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Diversidade e endemismos de espécies de plantas superiores*	35
<b>Tabela 2.</b> Quantidade de material obtido da extração e dos extratos provenientes da partição	52
<b>Tabela 3.</b> Frações obtidas da coluna cromatográfica, em fase reversa, do extrato em acetato de etila dos caules de <i>Alibertia macrophylla</i>	60
<b>Tabela 4.</b> Dados obtidos da sistematização para determinação dos epímeros de iridóides	82
<b>Tabela 5.</b> Correlações observadas no experimento NOESY 2D	83
<b>Tabela 6.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ , de $^{13}\text{C}$ e gHMBC para as substâncias <b>1</b> , <b>2</b> e <b>3</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz para $^1\text{H}$ e 125 MHz para $^{13}\text{C}$ )*	85
<b>Tabela 7.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e gHMBC para as substâncias <b>4</b> , <b>5</b> e <b>6</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz para $^1\text{H}$ e 125 MHz para $^{13}\text{C}$ )*	90
<b>Tabela 8.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ , de $^{13}\text{C}$ e gHMBC da substância <b>7</b> e <b>8</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ <b>7</b> e $\text{DMSO}-d_6$ <b>8</b> , 500 MHz para $^1\text{H}$ e 125 MHz para $^{13}\text{C}$ )*	93
<b>Tabela 9.</b> Comparação dos dados de RMN de $^1\text{H}$ , de $^{13}\text{C}$ e gHMBC para a substância <b>9</b> e diterpenos da literatura	98
<b>Tabela 10.</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ em ppm) para as substâncias <b>10</b> , <b>11</b> , <b>12</b> , <b>13</b> , <b>14</b> , <b>15</b> , <b>16</b> , <b>17</b> , <b>18</b> e <b>19</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)	107
<b>Tabela 11.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ , de $^{13}\text{C}$ e gHMBC para a substância <b>20</b> . ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz para $^1\text{H}$ e 125 MHz para $^{13}\text{C}$ )#	110
<b>Tabela 12.</b> Dados de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ em ppm) para as substâncias <b>21</b> , <b>22</b> , <b>23</b> e <b>24</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)	114
<b>Tabela 13.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para a aglicona da substância <b>25</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz para $^1\text{H}$ e 125 MHz para $^{13}\text{C}$ )*	119
<b>Tabela 14.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para os açúcares da substância <b>25</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz para $^1\text{H}$ e 125 MHz para $^{13}\text{C}$ )*	120
<b>Tabela 15.</b> Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto principal.	121
<b>Tabela 16.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ , de $^{13}\text{C}$ , e gHMBC para as substâncias <b>26</b> , <b>27</b> , <b>28</b> e <b>29</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz para $^1\text{H}$ e 125 MHz para $^{13}\text{C}$ )	124
<b>Tabela 17.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ , de $^{13}\text{C}$ e gHMBC para a substância <b>30</b> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz para $^1\text{H}$ e 125 MHz para $^{13}\text{C}$ )*	126
<b>Tabela 18.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e gHMBC para as substâncias <b>31</b> e <b>32</b> (500 MHz para $^1\text{H}$ e 125 MHz para $^{13}\text{C}$ )*	130

<b>Tabela 19.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ , de $^{13}\text{C}$ e gHMBC para as substâncias <b>33</b> e <b>34</b> . ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz para $^1\text{H}$ e 125 MHz para $^{13}\text{C}$ )**	134
<b>Tabela 20.</b> Resultados da bioautografia em camada delgada do teste antifúngico para os extratos provenientes da partição	156
<b>Tabela 21.</b> Resultados da bioautografia em camada delgada do teste antifúngico para as substâncias isoladas do extrato em acetato de etila de <i>A. sessilis</i>	156
<b>Tabela 22.</b> Resultados da bioautografia em camada delgada do teste antifúngico para as frações dos extratos hexânicos de <i>A. edulis</i> e <i>A. macrophylla</i>	157
<b>Tabela 23.</b> Valores da concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) obtidas para os extratos e frações das folhas e caules de <i>A. sessilis</i> , <i>A. edulis</i> e <i>A. macrophylla</i> para os diversos fungos patógenos	158
<b>Tabela 24.</b> Valores da concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) obtidas para as substâncias isoladas dos extratos que apresentaram atividade forte de <i>A. sessilis</i> e <i>A. edulis</i>	159
<b>Tabela 25.</b> Resultados da bioautografia em camada delgada do teste de citotoxicidade para os extratos provenientes da partição de <i>A. edulis</i> e <i>A. sessilis</i>	160
<b>Tabela 26.</b> Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$	160

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diversidade química e distribuição dos principais constituintes micromoleculares entre as subfamílias de Rubiaceae. 39
- Figura 2.** Constituintes químicos isolados do gênero *Alibertia*. (\* atividade fungitóxica) 40
- Figura 3.** Ilustrações das três espécies de *Alibertia* estudadas. 42
- Figura 4.** Modelo, com acetato marcado [1-<sup>13</sup>C], do aminobacteriohopanotriol isolado de *Rhodopseudomonas palustris*. Átomos de carbono esperados estarem enriquecidos com carbono 13, segundo a via do mevalonato estão indicados por (°); átomos de carbonos enriquecidos com carbono 13 observados experimentalmente são indicados por (\*). 44
- Figura 5.** Vias de formação do IPP (6) e DMAPP (7). Os átomos de carbono que se originam de acetil-CoA (1), piruvato (8) e gliceraldeído 3-fosfato (9) são indicados em azul, vermelho e verde, respectivamente. (a) Na via do mevalonato, 3 moléculas de acetil-CoA (1) são condensadas a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (3) via acetoacetil-CoA (2). Subseqüente redução para mevalonato (4), fosforilação e descarboxilação ATP-dependente produz IPP (6), que pode ser convertido para e a partir de DMAPP (7) por uma isomerase. (b) Na via desoxixilulose fosfato, D-gliceraldeído 3-fosfato (9) e piruvato (8) são convertidos a 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato (10) em uma reação descarboxilativa. Subseqüente rearranjo e redução levam a 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (11), que é convertido em 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato (14) via 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol (12) e 4-difosfatocitidil-2C-metil-D-eritritol 2-fosfato (13). Reações adicionais levam a IPP (6) e DMAPP (7). 46
- Figura 6.** Rearranjo do esqueleto de 1-desoxixilulose conduzindo a formação do IPP. (os átomos de carbono são numerados de acordo com a IUPAC). 47
- Figura 7.** Compartimentalização da biossíntese dos isoprenóides nas plantas superiores. Flechas ao nível do IPP (C<sub>5</sub>) e farnesil difosfato (C<sub>15</sub>) indicam possíveis trocas entre os compartimentos. 47
- Figura 8.** Partição líquido-líquido dos extratos brutos das folhas e dos caules de *A. edulis*, *A. macrophylla* e *A. sessilis* (esquema geral). 51
- Figura 9.** Obtenção dos extratos hexânico e etanólico dos caules de *A. edulis*. 52
- Figura 10.** Partição líquido-líquido do extrato etanólico dos caules de *A. edulis*. 53
- Figura 11.** Fracionamento do extrato hexânico dos caules de *Alibertia edulis*. 55
- Figura 12.** Fracionamento do extrato hexânico, obtido da segunda coleta, dos caules de *Alibertia edulis*. 56
- Figura 13.** Fracionamento do extrato *n*-BuOH (SH) dos caules de *A. edulis*. 57
- Figura 14.** Fracionamento do extrato hexânico dos caules de *A. macrophylla*. 59



- Figura 15.** Fracionamento do extrato em acetato de etila dos caules de *A. macrophylla* 62
- Figura 16.** Fracionamento do extrato hexânico dos caules de *A. sessilis*. 63
- Figura 17.** Fracionamento do extrato em AcOEt dos caules de *A. sessilis*. 65
- Figura 18.** Fracionamento do extrato *n*-butanólico dos caules de *A. sessilis*. 66
- Figura 19.** Cromatogramas obtidos para os extratos provenientes da partição do extrato bruto etanólico dos caules de *A. edulis*. Condição: Coluna C<sub>18</sub>, 5 – 100% MeOH em 30 min, F = 1,0 mL min<sup>-1</sup>, λ = 235, 254 e 320 nm (colocado apenas o cromatograma no comprimento de onda que apresentou informações mais significativas com relação a quantidade de picos observados). 71
- Figura 20.** Espectros de RMN de <sup>1</sup>H e cromatogramas analíticos (Condição: Coluna C<sub>18</sub>, 5 – 100% MeOH em 30 min, F = 1,0 mL min<sup>-1</sup>, λ = 235 nm) para as frações *n*-Butanólica (SH) e AcOEt sobrenadante (SAC) provenientes da partição para taninos dos extratos oriundos do extrato bruto etanólico de *A. edulis*. 72
- Figura 21.** Cromatograma analítico obtido para a fração *n*-BuOH (SH). Condições: Coluna C<sub>18</sub>, modelo Luna (2) (Phenomenex®) de 250 x 4,6 mm, partículas com tamanho de 5 μm, F = 1,0 mL min<sup>-1</sup>, λ = 235 nm e sistema de solventes MeOH/H<sub>2</sub>O 18:82 (v/v). 73
- Figura 22.** Cromatograma preparativo obtido para a fração *n*-BuOH (SH). Condições: Coluna C<sub>18</sub>, modelo Luna (2) (Phenomenex®) de 250 x 21,20 mm, partículas com tamanho de 10 μm, F = 10,0 mL min<sup>-1</sup>, λ = 235 nm e sistema de solventes MeOH/H<sub>2</sub>O 18:82 (v/v). 73
- Figura 23.** Cromatograma analítico obtido para as frações 1A e 2A *n*-BuOH (SH). Condições: Coluna C<sub>18</sub>, modelo Luna (2) (Phenomenex®) de 250 x 4,6 mm, partículas com tamanho de 5 μm, F = 1,0 mL min<sup>-1</sup>, λ = 235 nm e sistema de solventes MeOH/H<sub>2</sub>O (20:80 v/v para fração 1A) e (26:74 v/v para fração 2A) 74
- Figura 24.** Cromatograma analítico obtido para as frações 3 do extrato em acetato de etila de *A. macrophylla*. Condições: Coluna C<sub>18</sub>, modelo Luna (2) (Phenomenex®) de 250 x 4,6 mm, partículas com tamanho de 5 μm, F = 1,0 mL min<sup>-1</sup>, λ = 254 nm e sistema de solventes MeOH/H<sub>2</sub>O 17:83 (v/v). 74
- Figura 25.** Substâncias isoladas dos caules de *Alibertia edulis*. 75
- Figura 26.** Substâncias isoladas dos caules de *Alibertia macrophylla*. 76
- Figura 27.** Substâncias isoladas dos caules de *Alibertia sessilis*. 77
- Figura 28.** Exemplos de compostos iridoídicos. 78

<b>Figura 29.</b> Biossíntese de formação do núcleo iridoídico característico das substâncias isoladas nas espécies de <i>Alibertia</i> .	79
<b>Figura 30.</b> Esqueleto básico dos iridóides.	80
<b>Figura 31.</b> Exemplos de iridóides e seco-iridóides com atividades biológicas.	80
<b>Figura 32.</b> Núcleos iridoídicos identificados.	82
<b>Figura 33.</b> Cromatogramas obtidos para a mistura de iridóides <b>1</b> + <b>2</b> + <b>3</b> e para as substâncias puras <b>2</b> e <b>3</b> . Condições: Coluna C <sub>18</sub> , modelo Luna (2) (Phenomenex®) de 250 x 4,6 mm, partículas com tamanho de 5 µm, F = 1,0 mL min <sup>-1</sup> , λ = 235 nm e sistema de solventes MeOH/H <sub>2</sub> O 17:83 (v/v)	84
<b>Figura 34.</b> Estereoisômeros formados pela ciclização do GGPP.	94
<b>Figura 35.</b> Esquema da ciclização do GGPP via copalil PP, para formação de <i>ent</i> -caureno.	95
<b>Figura 36.</b> Interações observadas nos experimentos de NOESY 1D (.....) e TOCSY 1D (___).	96
<b>Figura 37.</b> Exemplos dos diferentes esqueletos de triterpenos.	99
<b>Figura 38.</b> Rota biossintética para a formação de alguns triterpenos mais comuns.	100
<b>Figura 39.</b> Biossíntese do cicloartenol.	111
<b>Figura 40.</b> Seqüência de reação para a formação dos esteróis a partir do cicloartenol.	112
<b>Figura 41.</b> Cromatograma da mistura sitosterol, estigmasterol e campesterol.	113
<b>Figura 42.</b> Cromatograma obtido para as misturas <b>24</b> e <b>25</b> de ésteres de sitosterol	115
<b>Figura 43.</b> Cromatograma analítico obtido para a subfração estudada. Condições: Coluna C <sub>18</sub> , modelo Luna (2) (Phenomenex®) de 250 x 4,6 mm, partículas de 5 µm, F = 1,0 mL min <sup>-1</sup> , λ = 238 nm e sistema de solventes MeOH/H <sub>2</sub> O 30:70 (v/v).	131
<b>Figura 44.</b> Cromatograma preparativo obtido para a subfração estudada. Condições: Coluna C <sub>18</sub> , modelo Luna (2) (Phenomenex®) de 250 x 21,20 mm, partículas de 10 µm, F = 10,0 mL min <sup>-1</sup> , λ = 238 nm e sistema de solventes MeOH/H <sub>2</sub> O 30:70 (v/v).	131
<b>Figura 45.</b> Conversão de <i>D</i> -manose a <i>D</i> -manitol.	136
<b>Figura 46.</b> Cromatogramas obtidos dos extratos hexânicos de <i>A. edulis</i> .	137
<b>Figura 47.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do extrato hexânico das folhas de <i>A. edulis</i> (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz).	137

<b>Figura 48.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato hexânico dos caules de <i>A. edulis</i> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).	138
<b>Figura 49.</b> Cromatogramas dos extratos em AcOEt de <i>A. edulis</i> e espectro de ultravioleta das classes de substâncias observadas nos extratos.	139
<b>Figura 50.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato em AcOEt das folhas de <i>A. edulis</i> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz).	139
<b>Figura 51.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato em AcOEt dos caules de <i>A. edulis</i> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz).	140
<b>Figura 52.</b> Cromatogramas dos extratos hidroalcóolicos de <i>A. edulis</i> .	141
<b>Figura 53.</b> Espectro de ultravioleta para a substância <b>32</b> , experimental e da literatura para taninos.	141
<b>Figura 54.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato hidroalcólico das folhas de <i>A. edulis</i> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz).	142
<b>Figura 55.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato hidroalcólico dos caules de <i>A. edulis</i> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz).	142
<b>Figura 56.</b> Cromatogramas obtidos para os extratos hexânicos de <i>A. macrophylla</i>	143
<b>Figura 57.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato hexânico das folhas de <i>A. macrophylla</i> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).	143
<b>Figura 58.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato hexânico dos caules de <i>A. macrophylla</i> ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).	144
<b>Figura 59.</b> Cromatogramas obtidos para os extratos em AcOEt de <i>A. macrophylla</i> .	145
<b>Figura 60.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato em AcOEt das folhas de <i>A. macrophylla</i> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 200 MHz).	145
<b>Figura 61.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato em AcOEt dos caules de <i>A. macrophylla</i> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz).	146
<b>Figura 62.</b> Cromatogramas obtidos para os extratos hidroalcóolicos de <i>A. macrophylla</i> .	147
<b>Figura 63.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato hidroalcólico das folhas de <i>A. macrophylla</i> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 200 MHz).	147
<b>Figura 64.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato hidroalcólico dos caules de <i>A. macrophylla</i> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz).	148
<b>Figura 65.</b> Cromatogramas obtidos para os extratos hexânicos de <i>A. sessilis</i> .	149
<b>Figura 66.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato hexânico das folhas de <i>A. sessilis</i> ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).	149

<b>Figura 67.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato hexânico dos caules de <i>A. sessilis</i> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).	150
<b>Figura 68.</b> Cromatogramas obtidos para os extratos em AcOEt de <i>A. sessilis</i> .	151
<b>Figura 69.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato em AcOEt das folhas de <i>A. sessilis</i> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 200 MHz).	151
<b>Figura 70.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato em AcOEt dos caules de <i>A. sessilis</i> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 200 MHz).	151
<b>Figura 71.</b> Cromatogramas obtidos para os extratos hidroalcoólicos de <i>A. sessilis</i> .	152
<b>Figura 72.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>A. sessilis</i> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz).	152
<b>Figura 73.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do extrato hidroalcoólico dos caules de <i>A. sessilis</i> ( $\text{DMSO}-d_6$ , 200 MHz).	153
<b>Figura 74.</b> Cromatogramas obtidos para os extratos hexânicos dos caules de <i>A. macrophylla</i> , <i>A. sessilis</i> e <i>A. edulis</i> .	153
<b>Figura 75.</b> Cromatogramas obtidos para os extratos em AcOEt dos caules de <i>A. macrophylla</i> , <i>A. sessilis</i> e <i>A. edulis</i> .	154
<b>Figura 76.</b> Cromatogramas dos extratos hidroalcoólicos dos caules de <i>A. macrophylla</i> , <i>A. sessilis</i> e <i>A. edulis</i> .	155
<b>Figura 77.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ das substâncias <u>1</u> , <u>2</u> e <u>3</u> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)	172
<b>Figura 78.</b> Ampliações do espectro de RMN de $^1\text{H}$ das substâncias <u>1</u> , <u>2</u> e <u>3</u> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	173
<b>Figura 79.</b> Ampliações do espectro de RMN de $^1\text{H}$ das substâncias <u>1</u> , <u>2</u> e <u>3</u> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	174
<b>Figura 80.</b> Espectro de TOCSY da aglicona da substância <u>3</u> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)	175
<b>Figura 81.</b> Espectro de TOCSY da aglicona da substância <u>1</u> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	176
<b>Figura 82.</b> Espectro de TOCSY da aglicona da substância <u>2</u> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	176
<b>Figura 83.</b> Espectro de TOCSY do açúcar das substâncias <u>1</u> e <u>2</u> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	177
<b>Figura 84.</b> Espectro de TOCSY do açúcar da substância <u>3</u> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	177
<b>Figura 85.</b> Espectro de NOESY 2D das substâncias <u>1</u> , <u>2</u> e <u>3</u> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)	178
<b>Figura 86.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ das substâncias <u>1</u> , <u>2</u> e <u>3</u> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz).	179
<b>Figura 87.</b> Ampliações do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ das substâncias <u>1</u> , <u>2</u> e <u>3</u> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz).	180

<b>Figura 88.</b> Mapa de correlação <i>g</i> HMQC das substâncias <b><u>1</u></b> , <b><u>2</u></b> e <b><u>3</u></b> (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).	181
<b>Figura 89.</b> Ampliações do mapa de correlação <i>g</i> HMQC das substâncias <b><u>1</u></b> , <b><u>2</u></b> e <b><u>3</u></b> (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).	182
<b>Figura 90.</b> Ampliações do mapa de correlação <i>g</i> HMQC das substâncias <b><u>1</u></b> , <b><u>2</u></b> e <b><u>3</u></b> (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).	183
<b>Figura 91.</b> Mapa de correlação <i>g</i> HMBC das substâncias <b><u>1</u></b> , <b><u>2</u></b> e <b><u>3</u></b> (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).	184
<b>Figura 92.</b> Ampliações do mapa de correlação <i>g</i> HMBC das substâncias <b><u>1</u></b> , <b><u>2</u></b> e <b><u>3</u></b> (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).	185
<b>Figura 93.</b> Ampliações do mapa de correlação <i>g</i> HMBC das substâncias <b><u>1</u></b> , <b><u>2</u></b> e <b><u>3</u></b> (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).	186
<b>Figura 94.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b><u>4</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	187
<b>Figura 95.</b> Espectro de NOESY da substância <b><u>4</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	188
<b>Figura 96.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b><u>4</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz).	189
<b>Figura 97.</b> Espectro de DEPT 90° da substância <b><u>4</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz).	190
<b>Figura 98.</b> Espectro de DEPT 135° da substância <b><u>4</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz).	190
<b>Figura 99.</b> Mapa de correlação <i>g</i> HMQC da substância <b><u>4</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	191
<b>Figura 100.</b> Ampliações do mapa de correlação <i>g</i> HMQC da substância <b><u>4</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	192
<b>Figura 101.</b> Mapa de correlação <i>g</i> HMBC da substância <b><u>4</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	193
<b>Figura 102.</b> Ampliações do mapa de correlação <i>g</i> HMBC da substância <b><u>4</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	194
<b>Figura 103.</b> Espectro de Massas da substância <b><u>4</u></b> (modo negativo).	194
<b>Figura 104.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b><u>5</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	195
<b>Figura 105.</b> Ampliações do espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b><u>5</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	196
<b>Figura 106.</b> Ampliação do espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b><u>5</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	197
<b>Figura 107.</b> Espectro de NOESY da substância <b><u>5</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	197
<b>Figura 108.</b> Espectro de <i>g</i> COSY da substância <b><u>5</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	198
<b>Figura 109.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b><u>5</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz).	199

<b>Figura 110.</b> Espectro de DEPT 135° da substância <b>5</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz).	200
<b>Figura 111.</b> Espectro de DEPT 90° da substância <b>5</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz).	200
<b>Figura 112.</b> Mapa de correlação gHMQC da substância <b>5</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	201
<b>Figura 113.</b> Ampliações do mapa de correlação gHMQC da substância <b>5</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	202
<b>Figura 114.</b> Mapa de correlação gHMBC da substância <b>5</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	203
<b>Figura 115.</b> Ampliações do mapa de correlação gHMBC da substância <b>5</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	204
<b>Figura 116.</b> Espectro de Massas da substância <b>5</b> (modo negativo).	205
<b>Figura 117.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>6</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	206
<b>Figura 118.</b> Ampliações do espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>6</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	207
<b>Figura 119.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>6</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz).	208
<b>Figura 120.</b> Espectro de DEPT 90° da substância <b>6</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz).	209
<b>Figura 121.</b> Espectro de DEPT 135° da substância <b>6</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz).	209
<b>Figura 122.</b> Mapa de correlação gHMQC da substância <b>6</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	210
<b>Figura 123.</b> Ampliações do mapa de correlação gHMQC da substância <b>6</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	211
<b>Figura 124.</b> Ampliação do mapa de correlação gHMQC da substância <b>6</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	212
<b>Figura 125.</b> Mapa de correlação gHMBC da substância <b>6</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	213
<b>Figura 126.</b> Ampliação do mapa de correlação gHMBC da substância <b>6</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	214
<b>Figura 127.</b> Espectro de Massas da substância <b>6</b> (modo negativo).	214
<b>Figura 128.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>7</b> (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).	215
<b>Figura 129.</b> Espectros de TOCSY da substância <b>7</b> (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).	216
<b>Figura 130.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>7</b> (CD <sub>3</sub> OD, 125 MHz).	217
<b>Figura 131.</b> Espectro de DEPT 135° da substância <b>7</b> (CD <sub>3</sub> OD, 125 MHz).	218
<b>Figura 132.</b> Mapa de correlação gHMQC da substância <b>7</b> (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).	219
<b>Figura 133.</b> Ampliação do mapa de correlação gHMQC da substância <b>7</b> 222(CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).	220

<b>Figura 134.</b> Mapa de correlação <i>g</i> HMBC da substância <b><u>7</u></b> (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).	221
<b>Figura 135.</b> Ampliação do mapa de correlação <i>g</i> HMBC da substância <b><u>7</u></b> (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).	222
<b>Figura 136.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b><u>8</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	223
<b>Figura 137.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b><u>8</u></b> (em mistura) (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	224
<b>Figura 138.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b><u>8</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz).	225
<b>Figura 139.</b> Espectro de DEPT 90° da substância <b><u>8</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz).	226
<b>Figura 140.</b> Espectro de DEPT 135° da substância <b><u>8</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz).	226
<b>Figura 141.</b> Mapa de correlação <i>g</i> HMQC da substância <b><u>8</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	227
<b>Figura 142.</b> Ampliações do mapa de correlação <i>g</i> HMQC da substância <b><u>8</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	228
<b>Figura 143.</b> Mapa de correlação <i>g</i> HMBC da substância <b><u>8</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	229
<b>Figura 144.</b> Ampliação do mapa de correlação <i>g</i> HMBC da substância <b><u>8</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	230
<b>Figura 145.</b> Espectro de Massas da substância <b><u>8</u></b> (modo positivo).	230
<b>Figura 146.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b><u>9</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	231
<b>Figura 147.</b> Espectro de TOCSY da substância <b><u>9</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	232
<b>Figura 148.</b> Espectro de NOESY da substância <b><u>9</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	232
<b>Figura 149.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b><u>9</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz).	233
<b>Figura 150.</b> Ampliação do espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b><u>9</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz).	233
<b>Figura 151.</b> Espectro de DEPT 135° da substância <b><u>9</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz).	234
<b>Figura 152.</b> Espectro de DEPT 90° da substância <b><u>9</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 125 MHz).	234
<b>Figura 153.</b> Mapa de correlação <i>g</i> HMQC da substância <b><u>9</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	235
<b>Figura 154.</b> Ampliações do mapa de correlação <i>g</i> HMQC da substância <b><u>9</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	236
<b>Figura 155.</b> Ampliação do mapa de correlação <i>g</i> HMQC da substância <b><u>9</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	237
<b>Figura 156.</b> Mapa de correlação <i>g</i> HMBC da substância <b><u>9</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	328
<b>Figura 157.</b> Ampliações do mapa de correlação <i>g</i> HMBC da substância <b><u>9</u></b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).	239

<b>Figura 158.</b> Ampliações do mapa de correlação gHMBC da substância <b>9</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)	240
<b>Figura 159.</b> Espectro de massas da substância <b>9</b> (modo positivo).	240
<b>Figura 160.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>10</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).	241
<b>Figura 161.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>10</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).	241
<b>Figura 162.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>11</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).	242
<b>Figura 163.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>11</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).	242
<b>Figura 164.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ das substâncias <b>12</b> e <b>13</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).	243
<b>Figura 165.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ das substâncias <b>12</b> e <b>13</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz).	243
<b>Figura 166.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>14</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).	244
<b>Figura 167.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>14</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).	244
<b>Figura 168.</b> Espectro de massas da substância <b>14</b> (modo negativo).	245
<b>Figura 169.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>15</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).	245
<b>Figura 170.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>15</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).	246
<b>Figura 171.</b> Espectro de DEPT $135^\circ$ da substância <b>15</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).	246
<b>Figura 172.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ das substâncias <b>16</b> , <b>17</b> , <b>18</b> e <b>19</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).	247
<b>Figura 173.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ das substâncias <b>16</b> , <b>17</b> , <b>18</b> e <b>19</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).	248
<b>Figura 174.</b> Ampliações do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ das substâncias <b>16</b> , <b>17</b> , <b>18</b> e <b>19</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).	248
<b>Figura 175.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>20</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).	249
<b>Figura 176.</b> Ampliações do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>20</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).	250
<b>Figura 177.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>20</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz).	251
<b>Figura 178.</b> Espectro DEPT $135^\circ$ da substância <b>20</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz).	252
<b>Figura 179.</b> Ampliação do espectro DEPT $135^\circ$ da substância <b>20</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz).	252
<b>Figura 180.</b> Mapa de correlação gHMQC da substância <b>20</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).	253
<b>Figura 181.</b> Ampliações do mapa de correlação gHMQC da substância <b>20</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).	254



<b>Figura 182.</b> Mapa de correlação <i>g</i> HMBC da substância <b>20</b> (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz)	255
<b>Figura 183.</b> Ampliações do mapa de correlação <i>g</i> HMBC da substância <b>20</b> (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz).	256
<b>Figura 184.</b> Ampliação do mapa de correlação <i>g</i> HMBC da substância <b>20</b> (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz).	257
<b>Figura 185.</b> Espectro de massas da substância <b>20</b> (ESI, modo negativo).	257
<b>Figura 186.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H das substâncias <b>21</b> e <b>22</b> (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz).	258
<b>Figura 187.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C das substâncias <b>21</b> e <b>22</b> (CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz).	258
<b>Figura 188.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>23</b> (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz).	259
<b>Figura 189.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>23</b> (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz).	259
<b>Figura 190.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>24</b> (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz).	260
<b>Figura 191.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>24</b> (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz).	260
<b>Figura 192.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>25</b> (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).	261
<b>Figura 193.</b> Ampliações do espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>25</b> (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).	262
<b>Figura 194.</b> Espectros de massas Tandem da substância <b>25</b> (modo negativo).	263
<b>Figura 195.</b> Espectros de massas Tandem da substância <b>25</b> (modo negativo).	264
<b>Figura 196.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>25</b> (CD <sub>3</sub> OD, 125 MHz).	265
<b>Figura 197.</b> Ampliações do espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>25</b> (CD <sub>3</sub> OD, 125 MHz).	266
<b>Figura 198.</b> Mapa de correlação <i>g</i> HSQC da substância <b>25</b> (CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz).	267
<b>Figura 199.</b> Ampliações do mapa de correlação <i>g</i> HMQC da substância <b>25</b> (CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz).	268
<b>Figura 200.</b> Mapa de correlação <i>g</i> HMBC da substância <b>25</b> (CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz).	269
<b>Figura 201.</b> Espectro de TOCSY 1D da substância <b>25</b> (β-D-glicose') (CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz).	270
<b>Figura 202.</b> Espectro de TOCSY 1D da substância <b>25</b> (β-D-glicose'') (CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz).	271
<b>Figura 203.</b> Espectro de TOCSY 1D da substância <b>25</b> (β-D-glicose''') (CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz) (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 500 MHz).	272
<b>Figura 204.</b> Espectros de TOCSY 1D da substância <b>25</b> (α-L-ramnose''') (CD <sub>3</sub> OD, 600 MHz).	273

<b>Figura 205.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>26</b> (DMSO- $d_6$ , 300 MHz).	274
<b>Figura 206.</b> Espectro de COSY da substância <b>26</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	274
<b>Figura 207.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>26</b> (DMSO- $d_6$ , 50 MHz).	275
<b>Figura 208.</b> Espectro de DEPT 135 $^\circ$ da substância <b>26</b> (DMSO- $d_6$ , 75 MHz).	275
<b>Figura 209.</b> Espectro de massas da substância <b>26</b> ( <i>Electrospray</i> , - 30 volts.).	275
<b>Figura 210.</b> Mapa de correlação gHMQC da substância <b>26</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	276
<b>Figura 211.</b> Mapa de correlação gHMBC da substância <b>26</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	276
<b>Figura 212.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>27</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	277
<b>Figura 213.</b> Espectro de gCOSY da substância <b>27</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	277
<b>Figura 214.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>27</b> (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).	278
<b>Figura 215.</b> Espectro de DEPT 135 $^\circ$ da substância <b>27</b> (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).	278
<b>Figura 216.</b> Mapa de correlação gHMQC da substância <b>27</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	279
<b>Figura 217.</b> Ampliação do mapa de correlação gHMQC da substância <b>27</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	279
<b>Figura 218.</b> Mapa de correlação gHMBC da substância <b>27</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	280
<b>Figura 219.</b> Ampliação do mapa de correlação gHMBC da substância <b>27</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	280
<b>Figura 220.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ das substâncias <b>28</b> e <b>29</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	281
<b>Figura 221.</b> Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ das substâncias <b>28</b> e <b>29</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	281
<b>Figura 222.</b> Mapa de correlação gHMQC das substâncias <b>28</b> e <b>29</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	282
<b>Figura 223.</b> Ampliação do mapa de correlação gHMQC das substâncias <b>28</b> e <b>29</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	282
<b>Figura 224.</b> Mapa de correlação gHMBC das substâncias <b>28</b> e <b>29</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	283
<b>Figura 225.</b> Ampliações do mapa de correlação gHMBC das substâncias <b>28</b> e <b>29</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	284
<b>Figura 226.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>30</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	285
<b>Figura 227.</b> Ampliações do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>30</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	286

<b>Figura 228.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>30</b> (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).	287
<b>Figura 229.</b> Mapa de correlação $g\text{HMQC}$ da substância <b>30</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	288
<b>Figura 230.</b> Ampliações do mapa de correlação $g\text{HMQC}$ da substância <b>30</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	289
<b>Figura 231.</b> Mapa de correlação $g\text{HMBC}$ da substância <b>30</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	290
<b>Figura 232.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>31</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	291
<b>Figura 233.</b> Ampliações do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>31</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	292
<b>Figura 234.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>31</b> (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).	293
<b>Figura 235.</b> Espectro de DEPT $90^\circ$ da substância <b>31</b> (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).	294
<b>Figura 236.</b> Espectro de DEPT $135^\circ$ da substância <b>31</b> (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).	294
<b>Figura 237.</b> Mapa de correlação $g\text{HMQC}$ da substância <b>31</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	295
<b>Figura 238.</b> Ampliações do mapa de correlação $g\text{HMQC}$ da substância <b>31</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	296
<b>Figura 239.</b> Mapa de correlação $g\text{HMBC}$ da substância <b>31</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	297
<b>Figura 240.</b> Ampliações do mapa de correlação $g\text{HMBC}$ da substância <b>31</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	298
<b>Figura 241.</b> Ampliação do mapa de correlação $g\text{HMBC}$ da substância <b>31</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).	299
<b>Figura 242.</b> Espectro de Massas da substância <b>31</b> (modo positivo).	299
<b>Figura 243.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>32</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	300
<b>Figura 244.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>32</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz).	301
<b>Figura 245.</b> Mapa de correlação $g\text{HMQC}$ da substância <b>32</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	302
<b>Figura 246.</b> Ampliações do mapa de correlação $g\text{HMQC}$ da substância <b>32</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	303
<b>Figura 247.</b> Mapa de correlação $g\text{HMBC}$ da substância <b>32</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	304
<b>Figura 248.</b> Ampliações do mapa de correlação $g\text{HMBC}$ da substância <b>32</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	305
<b>Figura 249.</b> Ampliações do mapa de correlação $g\text{HMBC}$ da substância <b>32</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	306
<b>Figura 250.</b> Espectro de Massas da substância <b>32</b> (modo negativo – alta resolução).	307

<b>Figura 251.</b> Espectro de Massas da substância <b>32</b> (modo negativo – baixa resolução).	307
<b>Figura 252.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da mistura das substâncias <b>33</b> e <b>34</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	308
<b>Figura 253.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da mistura das substâncias <b>33</b> e <b>34</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz).	309
<b>Figura 254.</b> Ampliações do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da mistura das substâncias <b>33</b> e <b>34</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz).	310
<b>Figura 255.</b> Espectro de DEPT $135^\circ$ da mistura das substâncias <b>33</b> e <b>34</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz).	311
<b>Figura 256.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>33</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	312
<b>Figura 257.</b> Ampliações do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>33</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	313
<b>Figura 258.</b> Espectro de TOCSY da substância <b>33</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	314
<b>Figura 259.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>33</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz).	315
<b>Figura 260.</b> Mapa de correlação <i>g</i> HMQC da substância <b>33</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	316
<b>Figura 261.</b> Ampliações do mapa de correlação <i>g</i> HMQC da substância <b>33</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	317
<b>Figura 262.</b> Mapa de correlação <i>g</i> HMBC da substância <b>33</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	318
<b>Figura 263.</b> Ampliações do mapa de correlação <i>g</i> HMBC da substância <b>33</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	319
<b>Figura 264.</b> Ampliações do mapa de correlação <i>g</i> HMBC da substância <b>33</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	320
<b>Figura 265.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>34</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	321
<b>Figura 266.</b> Ampliações do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>34</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	322
<b>Figura 267.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>34</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz).	323
<b>Figura 268.</b> Mapa de correlação <i>g</i> HMQC da substância <b>34</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	324
<b>Figura 269.</b> Ampliações do mapa de correlação <i>g</i> HMQC da substância <b>34</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	325
<b>Figura 270.</b> Mapa de correlação <i>g</i> HMBC da substância <b>34</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	326
<b>Figura 271.</b> Ampliações do mapa de correlação <i>g</i> HMBC da substância <b>34</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).	327

<b>Figura 272.</b> Ampliações do mapa de correlação <i>g</i> HMBC da substância <b>34</b> (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).	328
<b>Figura 273.</b> Espectro de Massas da mistura das substâncias <b>33</b> e <b>34</b> (modo negativo).	329
<b>Figura 274.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>35</b> (D <sub>2</sub> O, 200 MHz).	330
<b>Figura 275.</b> Espectro de massas da substância <b>35</b> (modo negativo).	330
<b>Figura 276.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>35</b> (D <sub>2</sub> O, 50 MHz).	330
<b>Figura 277.</b> Espectro de DEPT 135° da substância <b>35</b> (D <sub>2</sub> O, 50 MHz).	330

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$[\alpha]_D$	rotação óptica
$\delta$	deslocamento químico
$\lambda$	comprimento de onda
1D	unidimensional
2D	bidimensional
AcOEt	acetato de etila
C <sub>18</sub>	octadecilssilano
CC	Cromatografia em coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
$d$	dubleto
$dd$	duplo dubleto
$dl$	dubleto largo
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer</i>
DMAPP	dimetilalil difosfato
F	Fluxo
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
GGPP	geranil geranil difosfato
$g$ COSY	<i>gradient Correlated Spectroscopy</i>
$g$ HMBC	<i>gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
$g$ HMQC	<i>gradient Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HAc	ácido acético glacial
HDA	hidroalcolica
Hex	hexano
IPP	isopentenil difosfato
$J$	constante de acoplamento
$m$	múltiplo
$m/z$	razão massa carga
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>

p	página
R <sub>f</sub>	fator de retenção
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono treze
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	singleto
s/	singleto largo
t	triplete
t/	triplete largo
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
t <sub>r</sub>	tempo de retenção
UV	ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>33</b>
1.1. Produtos Naturais e Biodiversidade	33
1.2. Rubiaceae	37
1.3. <i>Alibertia</i>	39
1.4. Biossíntese de Produtos Naturais	43
1.4.1. Terpenos	43
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>48</b>
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>49</b>
<b>3.1. Materiais e Equipamentos</b>	<b>49</b>
<b>3.2. Coletas e identificação do material vegetal</b>	<b>51</b>
<b>3.3. Obtenção dos extratos brutos e de partição das espécies estudadas</b>	<b>51</b>
3.3.1. Teste para verificação de Taninos	53
<b>3.4. Fracionamento dos extratos provenientes da partição e isolamento dos constituintes químicos</b>	<b>54</b>
3.4.1. <i>Alibertia edulis</i>	54
3.4.2. <i>Alibertia macrophylla</i>	57
3.4.3. <i>Alibertia sessilis</i>	63
<b>3.5. Perfis cromatográficos</b>	<b>66</b>
<b>3.6. Bioensaios para verificação da atividade antifúngica</b>	<b>67</b>
3.6.1. Bioautografia direta	67
3.6.2. Método de diluição	67
<b>3.7. Bioensaios para verificação da atividade antitumoral</b>	<b>68</b>
3.7.1. Avaliação de citotoxicidade com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68
3.7.2. Avaliação da citotoxicidade com linhagens tumorais	69
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>71</b>
<b>4.1. Considerações iniciais sobre os extratos e frações estudados</b>	<b>71</b>
4.1.1. <i>Alibertia edulis</i>	71
4.1.2. <i>Alibertia macrophylla</i>	74
4.1.3. <i>Alibertia sessilis</i>	74
<b>4.2. Substâncias isoladas</b>	<b>75</b>
4.2.1. <i>Alibertia edulis</i>	75
4.2.2. <i>Alibertia macrophylla</i>	76
4.2.3. <i>Alibertia sessilis</i>	77
<b>4.3. Identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas</b>	<b>78</b>
<b>4.3.1. Monoterpenos modificados (Iridóides)</b>	<b>78</b>



4.3.1.1. Substâncias <b>1</b> , <b>2</b> e <b>3</b> : geniposídeo, 6 $\alpha$ -hidroxigeniposídeo e 6 $\beta$ -hidroxigeniposídeo	81
4.3.1.2. Substância <b>4</b> : gardenosídeo	86
4.3.1.3. Substância <b>5</b> : éster metílico shanzhisideo	87
4.3.1.4. Substância <b>6</b> : éster metílico $\beta$ -hidroxi-7- <i>epi</i> -gardosideo	88
4.3.1.5. Substâncias <b>7</b> e <b>8</b> : ácido geniposídico e ixosídeo	91
<b>4.3.2. Diterpeno</b>	<b>94</b>
4.3.2.1. Substância <b>9</b> : 2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -tridroxi- <i>ent</i> -caurano	95
<b>4.3.3. Triterpenos</b>	<b>99</b>
4.3.3.1. Substâncias <b>10</b> , <b>11</b> , <b>12</b> e <b>13</b> : 3 $\beta$ -O-acetil $\beta$ -amirina, 3 $\beta$ -O-acetil $\alpha$ -amirina, ácido oleanólico e ácido ursólico	101
4.3.3.2. Substância <b>14</b> : ácido 3 $\beta$ -O-acetil morólico	103
4.3.3.3. Substância <b>15</b> : lupeol	104
4.3.3.4. Substâncias <b>16</b> , <b>17</b> , <b>18</b> e <b>19</b> : lupenona, germanicon, $\alpha$ -amirenona e $\beta$ -amirenona	105
4.3.3.5. Substância <b>20</b> : ácido 21-hidroxi-3,4-seco-cicloart-4(29), 24(31)-dien-3-óico	108
<b>4.3.4. Esteróides</b>	<b>111</b>
4.3.4.1. Substâncias <b>21</b> , <b>22</b> , <b>23</b> e <b>24</b> : Sitosterol, estigmasterol, éster saturado de sitosterol e éster insaturado de sitosterol	112
<b>4.3.5. Saponina</b>	<b>115</b>
4.3.5.1. Substância <b>25</b> : pomolato de 3 $\beta$ -O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-glicopiranosideo 28-O- $\beta$ -D-glicopiranosideo	116
<b>4.3.6. Derivados fenólicos</b>	<b>120</b>
4.3.6.1. Substância <b>26</b> : ácido salicílico	121
4.3.6.2. Substância <b>27</b> : ácido protocatecuico	122
4.3.6.3. Substâncias <b>28</b> e <b>29</b> : ácido vanílico e ácido cafeico	123
4.3.6.4. Substância <b>30</b> : ácido 5-O-cafeoil-quínico (ácido clorogênico)	125
4.3.6.5. Substância <b>31</b> : 3,4,5-trimetoxifenil- $\beta$ -apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6) O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo	126
4.3.6.6. Substância <b>32</b> : 3,4,5-trimetoxifenil-1-O- $\beta$ -D-(5''-O-siringoila)-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)-glicopiranosideo	127
4.3.6.7. Substâncias <b>33</b> e <b>34</b> : (+)-lioniresinol 3a-O- $\beta$ -D-glicopiranosideo e (-)-lioniresinol 3a-O- $\beta$ -D-glicopiranosideo	131
<b>4.3.7. Outras classes de substâncias isoladas</b>	<b>136</b>
4.3.7.1. Substância <b>35</b> : D-Manitol	136
<b>4.4. Avaliação dos perfis cromatográficos das espécies estudadas</b>	<b>136</b>
4.4.1. <i>Alibertia edulis</i>	136
4.4.2. <i>Alibertia macrophylla</i>	142

4.4.3. <i>Alibertia sessilis</i>	148
<b>4.5. Bioensaios para verificação da atividade antifúngica</b>	<b>155</b>
4.5.1. Bioautografia direta	155
4.5.2. Método de diluição	157
<b>4.6. Bioensaios para verificação da atividade antitumoral</b>	<b>159</b>
4.6.1. Avaliação de citotoxicidade com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	159
4.6.2. Avaliação da citotoxicidade com linhagens tumorais	160
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>161</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b>	<b>163</b>
<b>7. ESPECTROS</b>	<b>172</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Produtos Naturais e Biodiversidade

A Natureza é uma fonte inesgotável de compostos com grande diversidade química, encontrados em plantas, animais, organismos marinhos e microorganismos.

A espetacular diversidade molecular que se encontram nas distintas classes de produtos naturais, como flavonóides, lignanas, cumarinas, quinonas, alcalóides, entre outras, conseguida pela combinação de apenas átomos de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, representa fonte de modelos originais de arquitetura molecular enantiopura (BARREIRO, 2001).

Dentre cerca de 250.000 espécies de plantas existentes na Terra (BRASIL, 1998), apenas uma pequena porcentagem foi investigada sob o ponto de vista fitoquímico, e um número ainda menor de plantas foi analisado do ponto de vista farmacológico (HOSTETTMANN *et al.*, 2003). Mesmo uma grande quantidade de compostos já isolados e estrutura química definida, ainda não foi avaliada quanto às suas atividades biológicas, seja em relação às suas funções para a própria espécie vegetal, seja quanto às suas potencialidades de uso para outras finalidades, especialmente de interesse terapêutico (DI STASI, 1995). Além disso, plantas avaliadas quanto à atividade antitumoral, por exemplo, são consideradas não investigadas em relação a qualquer outra atividade farmacológica (antifúngica, antiulcerogênica, antibacteriana, etc.) (HAMBURGER, HOSTETTMANN, 1991). “O reino vegetal representa desta forma, um enorme reservatório de moléculas farmacologicamente ativas a serem descobertas” (HOSTETTMANN *et al.*, 2003), muitas das quais servirão como modelo para a síntese de fármacos.

Estes compostos, também chamados de micromoléculas, são produtos do metabolismo secundário das plantas que garantem vantagens para a sobrevivência e a perpetuação da espécie vegetal.

O metabolismo secundário se caracteriza pela elevada capacidade biossintética, tanto em relação ao número de substâncias produzidas quanto à sua diversidade estrutural numa mesma espécie. Várias funções desses compostos estão esclarecidas, como: defesa contra herbívoros e microorganismos, proteção contra os raios ultravioleta, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes, e também em alelopatia (CSEKE, KAUFMAN, 1998).

*“A riqueza de metabólitos secundários em plantas é, pelo menos parcialmente, explicável no simples fato de que os vegetais estão enraizados no solo e não podem se deslocar, eles não podem responder ao meio ambiente pelas vias possíveis dos animais.”* (SANTOS, 2003)

Assim, os metabólitos podem apresentar propriedades antimicrobianas e inseticidas, uma vez que as plantas produzem estes compostos, chamados fitoalexinas, em resposta a um ataque por patógenos ou por insetos, e também em resposta a fatores físicos e ambientais. Para os químicos de produtos naturais, as fitoalexinas são fontes de novas estruturas, uma vez que não estão presentes na planta sadia, e para os farmacêuticos, fontes de atividade farmacológica em potencial, uma vez que são antimicrobianas por definição (GRAYER, KOKUBUN, 2001).

Na defesa contra herbívoros estão envolvidas substâncias como sílica e ligninas (barreira física); taninos, saponinas e iridóides (desestimulantes alimentares); substâncias voláteis para atraírem parasitas e predadores dos insetos fitófagos (TAKABAYASHI, DICKE, 1996), além de órgãos como tricomas e espinhos (CSEKE, KAUFMAN, 1998).

Os metabólitos secundários também podem auxiliar na reestruturação de sistemas de classificação taxonômica. A observação de que plantas diferentes nascidas em solos idênticos continham produtos diferentes enquanto que, plantas análogas nascidas em solos completamente diferentes formavam produtos análogos, resultou na consideração da composição química como um caráter taxonômico (POSER, 2003).

Atualmente, os produtos do metabolismo secundário considerados mais apropriados aos estudos quimiotaxonômicos são alcalóides, aminoácidos não proteicos, poliacetilenos, iridóides e compostos fenólicos, como os taninos hidrolisáveis. Todos estes compostos são de ocorrência restrita, sendo amplamente utilizados como marcadores quimiotaxonômicos (POSER, 2003).

A grande diversidade de metabólitos em plantas ganha proporções ainda maiores ao considerarmos a rica biodiversidade em espécies do planeta.

Com uma extensão de mais de 8,5 milhões de Km<sup>2</sup>, o espaço geográfico brasileiro apresenta uma grande diversidade de clima, de fisiografia, de solo, de vegetação e de fauna, tendo pelo menos 10 a 20% do número total de espécies (fauna e flora) do planeta. A riqueza da flora e da fauna brasileiras são reflexos da

variedade dos biomas ou zonas biogeográficas (Floresta Amazônica, Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga, Pantanal e Pampa) (BRASIL, 1998).

Entretanto, com toda essa extensão e complexidade, a composição da diversidade biológica brasileira não é conhecida com precisão e talvez nunca venha a ser totalmente. A perda da biodiversidade é consequência direta de fatores como: perda e fragmentação dos habitats; introdução de espécies e doenças exóticas; exploração excessiva de espécies de plantas e animais, chegando ao nível da extinção; uso de híbridos e monoculturas na agroindústria e nos programas de reflorestamento; contaminação do solo, água e atmosfera por poluentes, e mudanças climáticas (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2006).

O país conta com um número superior a 55.000 espécies de plantas descritas, correspondendo a 22% do total mundial, uma proporção consideravelmente alta para um único país, e talvez o patrimônio genético mais rico do mundo neste grupo, com exceção da Colômbia, como pode ser visto na tabela 1:

**Tabela 1.** Diversidade e endemismos de espécies de plantas superiores\*

<b>País</b>	<b>Total da diversidade</b>	<b>Endemismo</b>
Brasil	~ 50.000 – 56.000	~ 16.500 – 18.500
Colômbia	45.000 – 51.000	15.000 – 17.000
México	18.000 – 30.000	10.000 – 15.000
Austrália	15.638	14.458
China	27.100 – 30.000	~ 10.000
Filipinas	8.000 – 12.000	3.800 – 6.000
Índia	> 17.000	7.025 – 7.875
Peru	18.000 – 20.000	5.356
Equador	17.600 – 21.100	4.000 – 5.000
Estados Unidos	18.956	4.036
Venezuela	15.000 – 21.070	5.000 – 8.000
Malásia	15.000	6.500 – 8.000
África do Sul	23.420	16.500

\*Considerando o total de 250.000 espécies no mundo.

Fonte: BRASIL, 1998.

O grupo das angiospermas é o principal grupo de plantas terrestres e o mais importante economicamente. Estima-se que o número total de angiospermas no mundo está próximo de 250.000 espécies, sendo o grupo mais diversificado em

número de espécies (BRASIL, 1998). Dada sua importância econômica e ecológica, as angiospermas são prioritárias para a preservação, utilização sustentável e pesquisa.

Embora as angiospermas do Brasil constituam um grupo diversificado, existe certa dominância de algumas famílias que possuem muito mais espécies que as demais: Asteraceae (1.900 espécies), Fabaceae (1.800 espécies), Euphorbiaceae (1.100 espécies), Rubiaceae (1.010 espécies), Myrtaceae (820 espécies), Caesalpiniaceae (790 espécies) e Mimosaceae (580 espécies) (SHEPHERD, 2003).

Tendo como exemplo a devastação da Mata Atlântica, o ritmo atual de extinção pode fazer com que um grande número de plantas, com possíveis propriedades medicinais, desapareça antes de seu valor ser reconhecido uma vez que, apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira e 15 a 17% das espécies no mundo foram estudadas sob este ponto de vista (GUERRA, NODARI, 2003; SOEJARTO, 1996).

Assim, o Projeto Temático – BIOTA/FAPESP, intitulado “Conservation and sustainable use of the plant biodiversity from Cerrado and Atlantic Forest: chemical diversity and prospecting for potencial drugs”, desenvolvido pelo Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE), visa o estudo de espécies vegetais do Cerrado e Mata Atlântica do Estado de São Paulo, baseado em bioensaios prévios (antitumoral, antifúngico e antioxidante) dos extratos, com vistas ao estabelecimento de modelo para a preservação, estudo e exploração racional da flora remanescente no Estado.

A Flora do Estado de São Paulo é composta pelos biomas Cerrado e Mata Atlântica. O Cerrado, com sua vegetação típica de troncos tortuosos, baixo porte, ramos retorcidos, cascas espessas e folhas grossas, restando 50% do território original, é reconhecido como a savana mais rica do mundo em biodiversidade, com uma flora riquíssima composta por mais de 10.000 espécies de plantas, sendo 4.400 endêmicas desta área. Já a Mata Atlântica, com apenas 7,3% de sua cobertura florestal original e tendo sido identificada como a quinta área mais ameaçada e rica em espécies endêmicas do mundo, possui cerca de 20.000 espécies de plantas vasculares, dos quais 8.000 são endêmicas do bioma (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, 2006).

## 1.2. Rubiaceae

Na triagem de famílias para este Projeto Temático, Rubiaceae está representada por espécies dos gêneros *Alibertia*, *Tocoyena*, *Chiococca*, *Uncaria*, *Chimarris*, *Palicourea* e *Rudgea* (BOLZANI *et al.*, 1991; 1997; YOUNG *et al.*, 1992; 1998; BROCHINI *et al.*, 1994; OLEA *et al.*, 1997; CARBONEZI, 1998; 1999) que apresentaram potencial atividade antifúngica e tiveram algumas espécies estudadas pelo nosso grupo de pesquisa.

O interesse por plantas ou substâncias antifúngicas se deve ao aumento de infecções fúngicas humanas, como resultado das imunodeficiências associadas a AIDS, quimioterapia anticancerígena, transplantes e, também infecções fúngicas em plantas que representam perdas incalculáveis para a agricultura.

A família Rubiaceae Juss., pertencente a ordem Gentianales e compreendendo cerca de 600 gêneros e 10.000 espécies, tem distribuição predominantemente tropical e subtropical e é constituída essencialmente de espécies lenhosas, entretanto, observa-se a ocorrência de alguns representantes herbáceos e arbustivos (ROBBRECHT, 1988\* *apud* BOLZANI *et al.*, 2001; TREVISAN, 1993).

Considerada a quarta maior família de angiospermas do Brasil, com 1.010 espécies (10% das espécies em relação ao total mundial) (SHEPHERD, 2003), está amplamente distribuída nos biomas mais representativos: Amazônia, Mata Atlântica e Cerrado. Neste último, são encontrados 25 gêneros, sendo o maior número de espécies encontrados nos gêneros *Alibertia*, *Psychotria*, *Palicourea* e *Tocoyena* (CASTRO, 1999).

A família se destaca por apresentar espécies de considerável expressão econômica, como o café (*Coffea arabica*) e, também, espécies de interesse farmacológico, como *Cinchona ledgeriana*, de onde é extraído o antimalárico quinina e *Cephaelis ipecuanha*, onde se extrai ipeca, utilizada como expectorante na medicina popular (TREVISAN, 1993). Destacam-se também espécies empregadas na ornamentação e paisagismo, como o gênero *Gardenia* e na alimentação, como *Genipa americana*, conhecida como jenipapo, cujo fruto é utilizado na preparação de doce e licor (LORENZI, 1998).

---

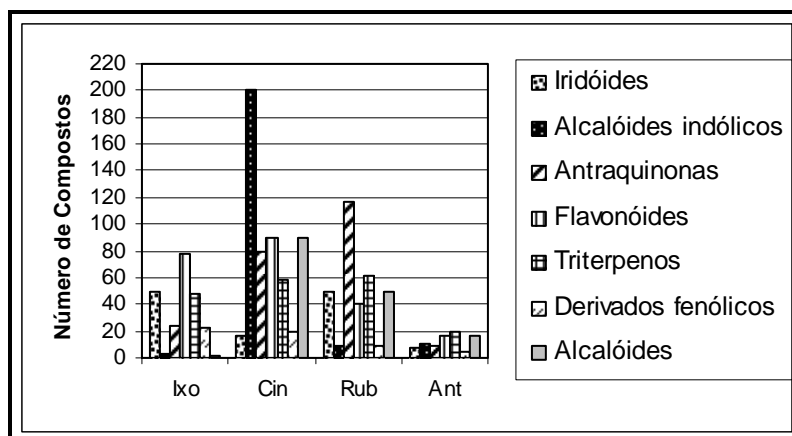
\* ROBBRECHT, E. **Tropical Woody Rubiaceae**, National Botanic Garden of Belgium, Meise, 1988.

Algumas espécies apresentam alto grau de toxicidade, como por exemplo, *Psychotria* e *Palicourea*, muito abundantes em pastagens brasileiras. A espécie *Palicourea marcgravii* A.St.-Hil., popularmente conhecida como erva-de-rato e responsável por vitimar animais, principalmente o rebanho bovino, tem sua toxicidade atribuída à presença do ácido monofluoracético (SCHENKEL *et al.*, 2003).

Levantamento bibliográfico sobre a constituição química de Rubiaceae, mostra uma grande diversificação de classes de metabólitos secundários: alcalóides dos tipos quinolínicos, indoloterpênicos, isoquinolínicos, piridínicos e piperidínicos (HENRIQUES *et al.*, 2003); iridóides (YOUNG *et al.*, 1992; OLEA *et al.*, 1997); triterpenos (OLEA *et al.*, 1997; BROCHINI *et al.*, 1994; BOLZANI *et al.*, 1991; YOUNG *et al.*, 1998; LOPES *et al.*, 1999); flavonóides (OLEA *et al.*, 1997); saponinas (YOUNG *et al.*, 1998); quinonas (VERMES, WAGNER, 1980); lignóides; diterpenos (KOIKE *et al.*, 1980) e esteróides (NAGASAMPAGI *et al.*, 1971).

Há, entretanto, que considerar que os relatos sobre a constituição química da família referem-se a espécies que representam uma centena dentre os mais de seiscentos gêneros incluídos na família. Este fato sugere que a família seja caracterizada por mais de um grupo biogenético. A avaliação do perfil químico obtido para as subfamílias Cinchonoideae, Ixoroideae, Antirheoideae e Rubioideae revelam uma significativa relação da presença/ausência entre iridóides, alcalóides e antraquinonas. Na subfamília Ixoroideae, os iridóides são encontrados como os marcadores quimiotaxômicos, enquanto em Cinchonoideae, predominam os alcalóides indólicos e em Rubioideae, antraquinonas representam a principal classe de metabólitos secundários. Em Antirheoideae, não há ocorrência expressiva ou predominante de nenhum desses marcadores (TREVISAN, 1993; BOLZANI *et al.*, 2001), como é visto na figura 1:





**Figura 1.** Diversidade química e distribuição dos principais constituintes micromoleculares entre as subfamílias de Rubiaceae. (ROBBRECHT, 1988 *apud* BOLZANI *et al.*, 2001)

Embora os iridóides sejam os marcadores quimiotaxônicos de Ixoroideae, eles também ocorrem nas demais subfamílias. Porém, segundo estudos de INOUE e colaboradores (1988), é possível classificar as subfamílias de Rubiaceae em três grupos, de acordo com a ocorrência exclusiva de diferentes iridóides glicosilados:

- i) subfamília Ixoroideae: constituída por espécies que contêm os iridóides gardenosídeo, geniposídeo e ixorosídeo;
- ii) subfamília Rubioideae: constituída por espécies que contêm asperulosídeo e/ou ácido deacetilasperulosídeo;
- iii) subfamílias Cinchonoideae e Antirheoideae: constituídas por espécies que contêm loganina, seco-iridóides e /ou alcalóides indólicos.

### 1.3. *Alibertia*

Os poucos relatos químicos encontrados na literatura sobre o gênero *Alibertia*, pertencente à subfamília Ixoroideae, faz destaque a sua rica constituição terpenoídica. Espécies de *Alibertia* são conhecidas como fontes de triterpenos pentacíclicos, especialmente do tipo oleanano e ursano (LUCIANO *et al.*, 2004; OLEA *et al.*, 1997; BROCHINI *et al.*, 1994; BOLZANI *et al.*, 1991). Adicionalmente, iridóides e flavonol glicosilados foram isolados de *A. sessilis* (OLEA *et al.*, 1997) e flavonas e cumarina de *A. myrciifolia* (LUCIANO *et al.*, 2004).

Estudos anteriores realizados com as espécies *Alibertia sessilis* e *A. macrophylla* levaram ao isolamento de alguns metabólitos secundários com atividade antifúngica: ésteres do ácido cafeico e iridóides não-glicosilados (BOLZANI *et al.*, 1991; YOUNG *et al.*, 1992).

A figura 2 apresenta os constituintes químicos isolados até então, das espécies de *Alibertia* e na figura 3 estão ilustradas as espécies estudadas neste trabalho.

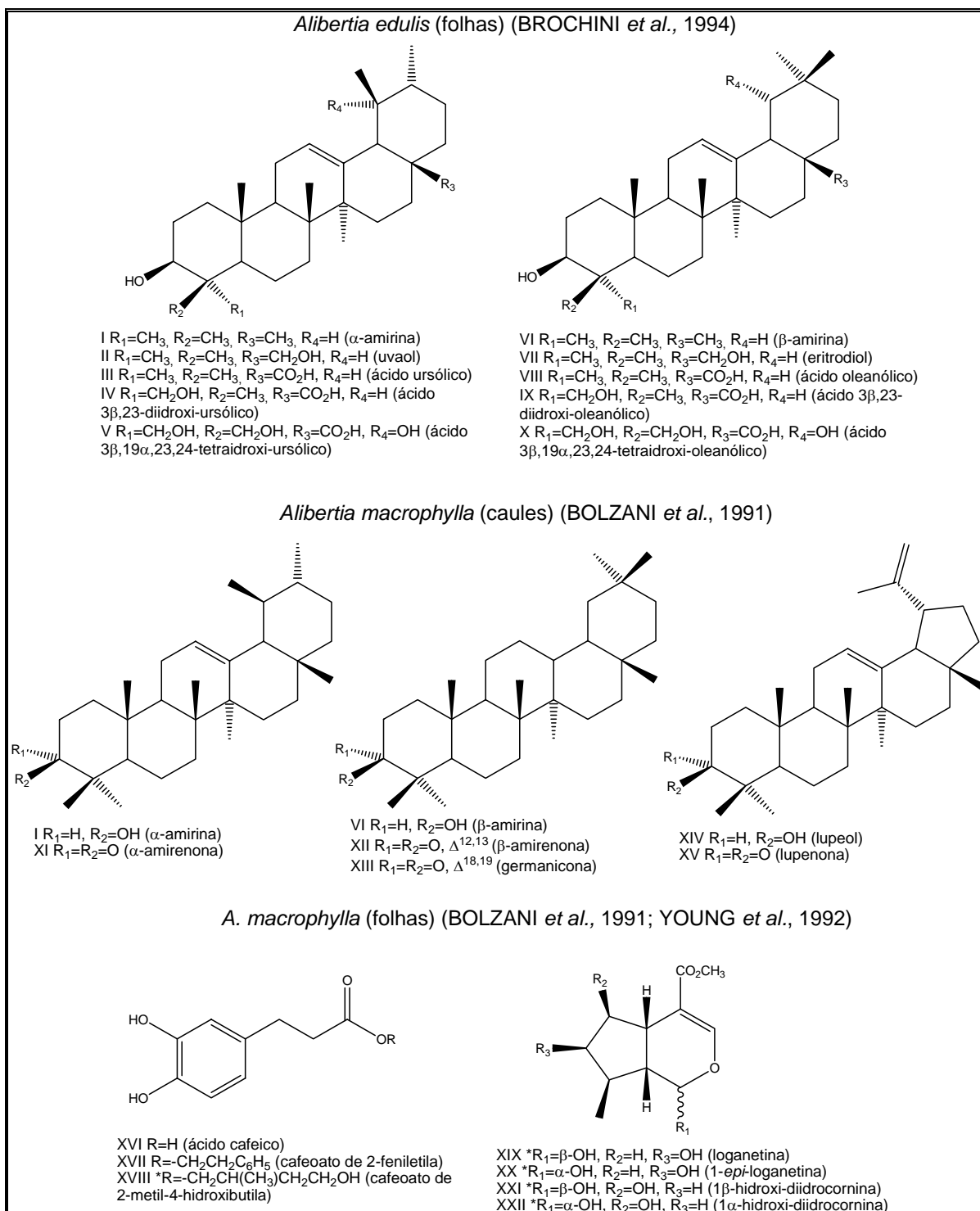
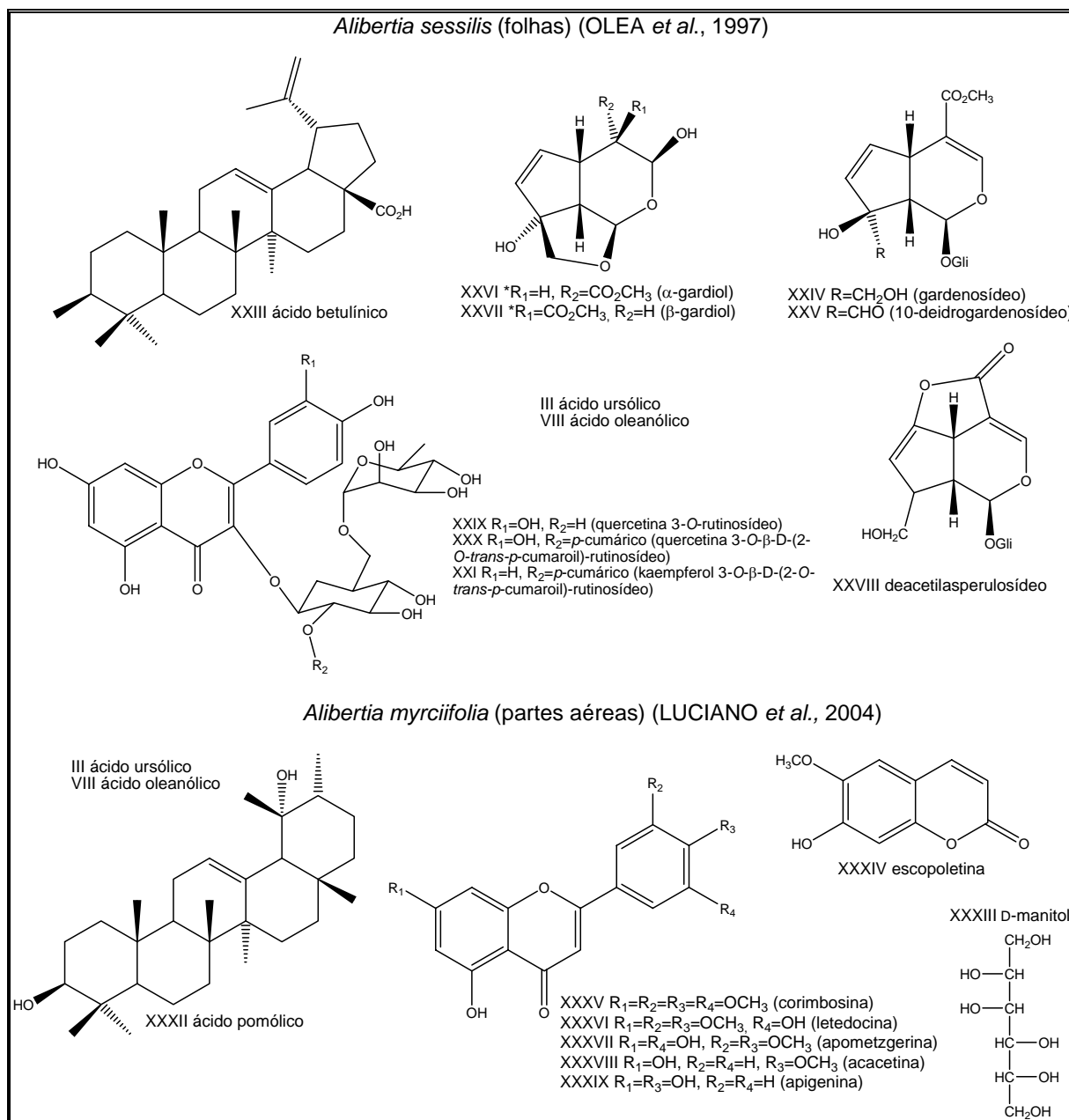


Figura 2. Constituintes químicos isolados do gênero *Alibertia*. (\* atividade fungitóxica)

Continuação da Figura 2.



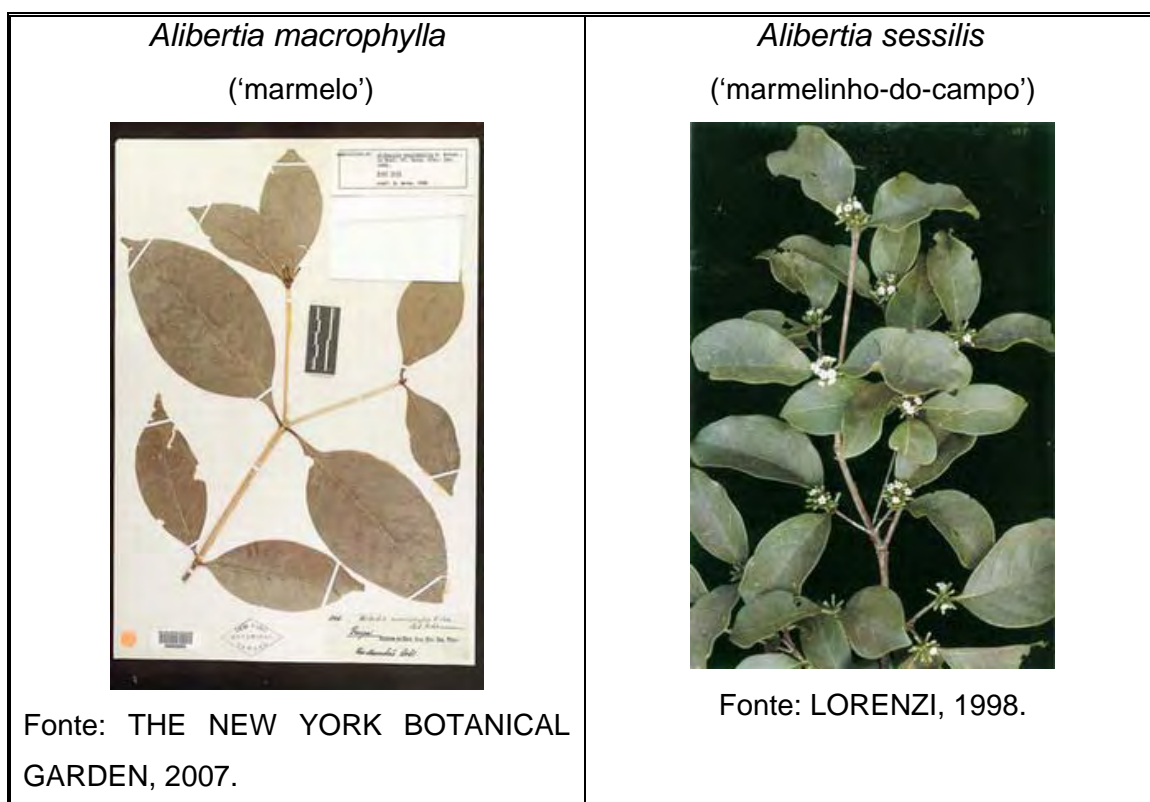
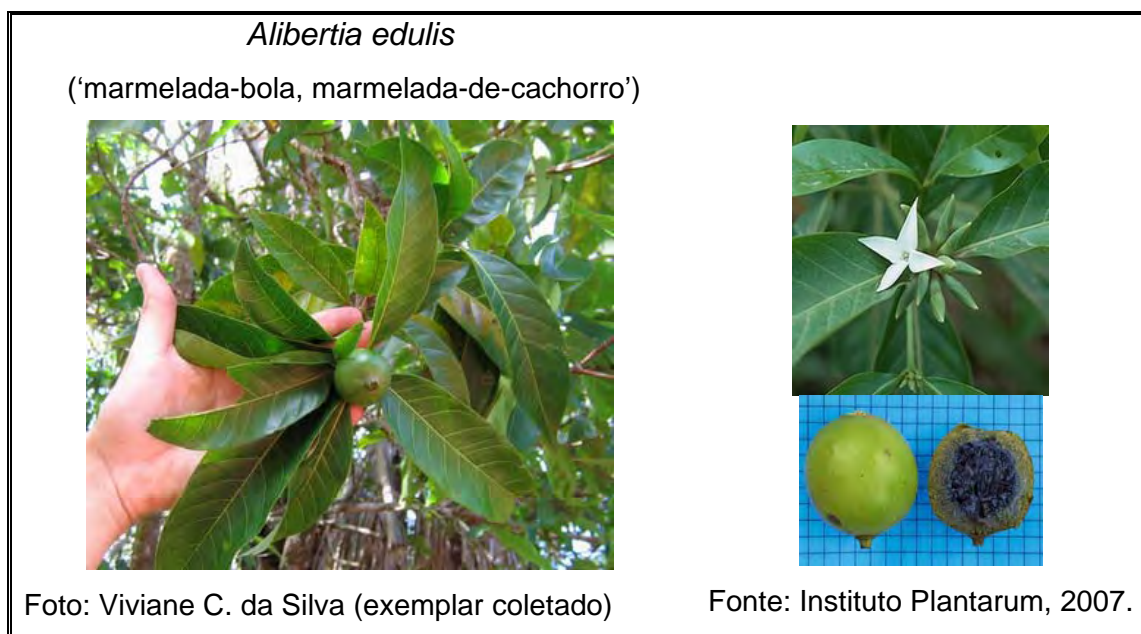


Figura 3. Ilustrações das três espécies de *Alibertia* estudadas.

## 1.4. Biossíntese de Produtos Naturais

A grande importância de vários metabólitos secundários, particularmente na área farmacêutica, torna o estudo e conhecimento da biogênese destes, essencial, uma vez que possibilita ao homem interferir racionalmente sobre o organismo de forma a direcionar sua produção.

Embora algumas generalizações distingam metabólitos primários e secundários, a linha divisória entre eles não é nítida. Por exemplo, ácidos graxos e açúcares são, em sua maioria, melhores descritos como metabólitos primários, mas existem alguns representantes que são extremamente raros e encontrados somente em algumas espécies. Assim, como os metabolismos primário e secundário se sobrepõem, a divisão entre eles é apenas uma conveniência.

A origem dos blocos construtores para os metabólitos secundários é a partir do metabolismo primário, mais precisamente do metabolismo da glicose. Os blocos construtores mais importantes são derivados a partir dos intermediários acetil coenzima A (acetil CoA), ácido chiquímico e ácido mevalônico, utilizados, respectivamente, nas vias do acetato, chiquimato e mevalonato (DEWICK, 1997c).

Os metabólitos formados na via do acetato incluem fenóis, prostaglandinas, antibióticos macrolídeos e vários ácidos graxos e derivados da interface do metabolismo primário/secundário. A via do chiquimato leva a formação de uma variedade de fenóis, derivados do ácido cinâmico, lignanas e alcalóides. Já as vias do mevalonato e desoxixilulose, esta recentemente descoberta, são responsáveis pela biossíntese de um vasto número de terpenóides e esteróides (DEWICK, 1997c).

Como será visto no item 4. Resultados e Discussão, a grande maioria das substâncias isoladas neste trabalho faz parte da classe dos terpenos, justificando um maior detalhamento das vias biossintéticas a eles relacionados.

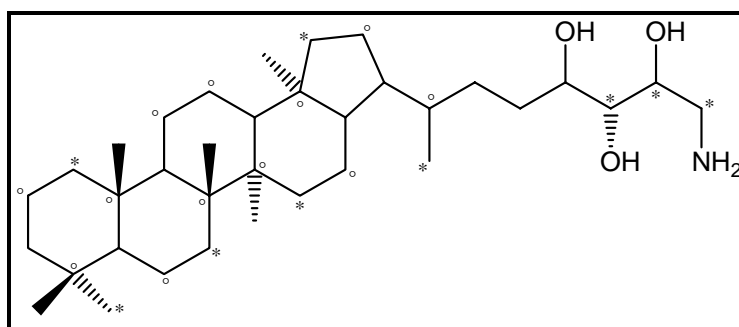
### 1.4.1. Terpenos

Os terpenóides formam um dos maiores grupos de produtos naturais, mais de 25.000 compostos, com grande diversidade estrutural. Possuem uma ampla variedade de funções biológicas e muitos têm potencial aplicação medicinal. Por exemplo, carotenóides ( $\beta$ -caroteno) são pigmentos protetores contra luz, os terpenóides, nas plantas, possuem funções como atratores de insetos e repelentes e, ainda podemos citar o Paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>), um diterpeno usado como agente citostático (EISENREICH *et al*, 1998; 2001).

A junção das unidades de isopreno bioquimicamente ativas, isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetilalil pirofosfato (DMAPP), formados a partir do metabolismo do acetato pela via do ácido mevalônico ou pela junção do *D*-gliceraldeído 3-fosfato e acetaldeído pela via da desoxixilulose, é a base da biossíntese de todos os terpenóides.

Desde a descoberta da via do mevalonato, surgiram muitos estudos sobre a biossíntese destes compostos numa variedade de espécies. Em muitos casos, porém, os dados experimentais da biossíntese de terpenóides específicos em plantas e microorganismos não puderam ser explicados facilmente pela via do mevalonato. Hipóteses complexas envolvendo a compartimentalização e o pouco acesso de metabólitos extrínsecos a compartimentos celulares específicos foram desenvolvidos a fim de harmonizar os dados da via do mevalonato como a fonte de todos os terpenóides em todos os organismos (EISENREICH *et al.*, 1998).

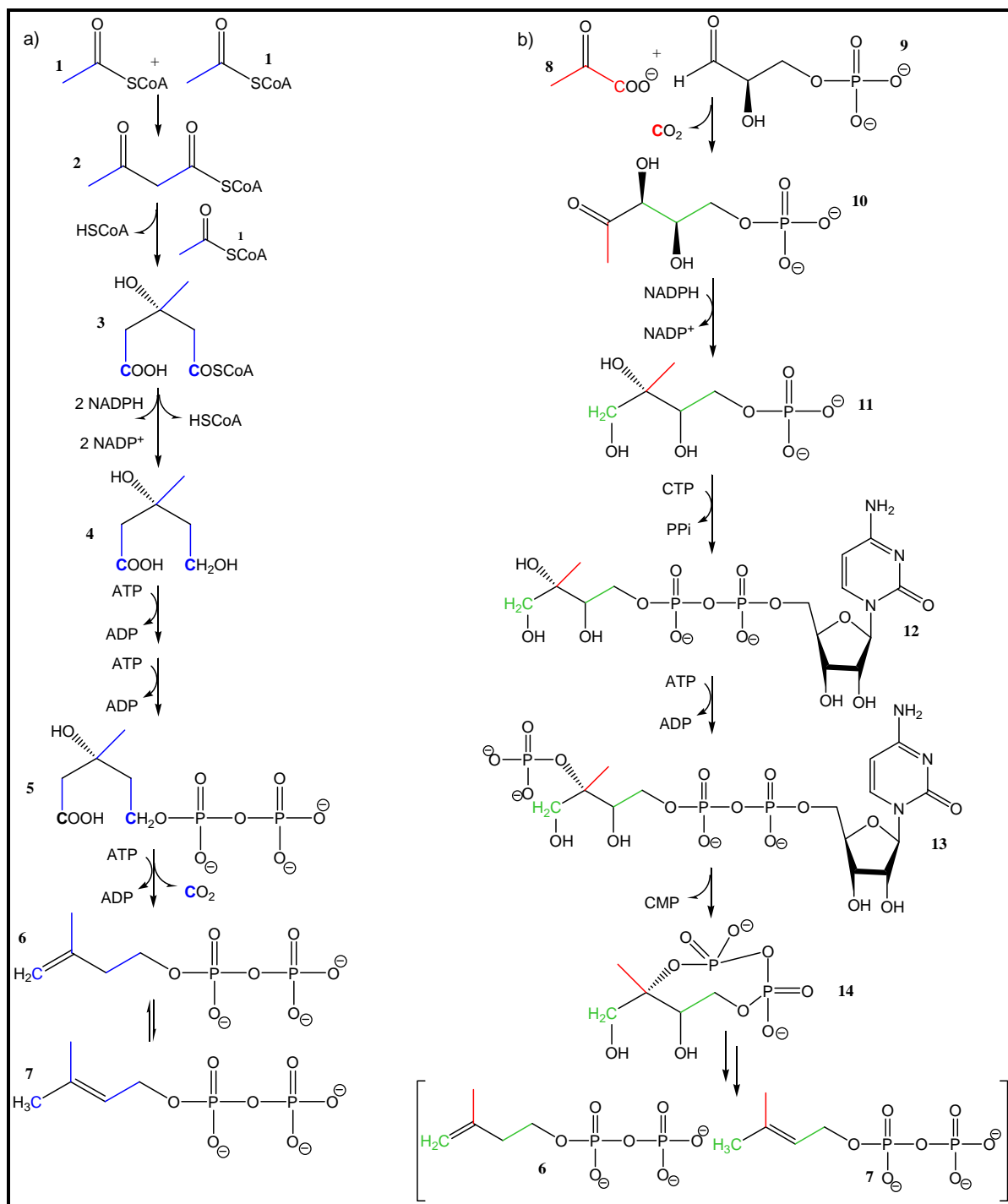
A investigação argumentativa sobre a biossíntese dos isoprenóides iniciou-se no final da década de 80 com experimentos em bactérias. Hopanóides marcados com carbono treze foram isolados a partir daqueles organismos, os quais cresceram em meio contendo acetatos marcados (Figura 4).



**Figura 4.** Modelo, com acetato marcado [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ], do aminobacteriohopanotriol isolado de *Rhodopseudomonas palustris*. Átomos de carbono esperados estarem enriquecidos com carbono 13, segundo a via do mevalonato estão indicados por (°); átomos de carbonos enriquecidos com carbono 13 observados experimentalmente são indicados por (\*). (EISENREICH *et al.*, 1998)

A existência de diferentes *pools* de acetyl CoA foi proposta para explicar a marcação anômala observada na via do mevalonato. Porém, outras possibilidades foram também consideradas e, mais tarde os dados foram reinterpretados em termos de uma nova via biossintética, a via da desoxixilulose (EISENREICH *et al.*, 1998).

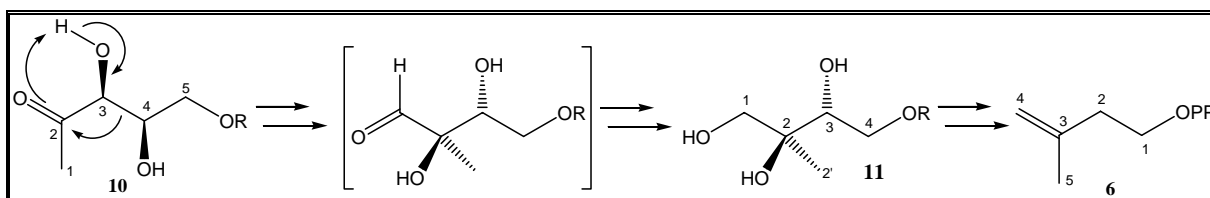
Um mecanismo hipotético foi sugerido a partir da condensação do *D*-gliceraldeído 3-fosfato e acetaldeído ativado, derivado do piruvato, e resultando na formação de 1-desoxi-*D*-xilulose 5-fosfato como o primeiro precursor para a nova via biossintética. Esta hipótese foi confirmada pela eficiente incorporação de 1-desoxi-*D*-xilulose com deutério na cadeia lateral isoprenóide da ubiquinona em *Escherichia coli* (EISENREICH *et al.*, 2001). Os átomos marcados sugerem que C-3, C-2 e C-1 da triose fornecem C-1, C-2 e C-4 do IPP e que C-2 e C-3 do piruvato fornecem C-3 e C-5 do IPP, nesta rota biossintética (Figura 5):



**Figura 5.** Vias de formação do IPP (6) e DMAPP (7). Os átomos de carbono que se originam de acetil-CoA (1), piruvato (8) e gliceraldeído 3-fosfato (9) são indicados em azul, vermelho e verde, respectivamente. (a) Na via do mevalonato, 3 moléculas de acetil-CoA (1) são condensadas a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (3) via acetoacetil-CoA (2). Subseqüente redução para mevalonato (4), fosforilação e descarboxilação ATP-dependente produz IPP (6), que pode ser convertido para e a partir de DMAPP (7) por uma isomerase. (b) Na via do desoxixilulose fosfato, D-gliceraldeído 3-fosfato (9) e piruvato (8) são convertidos a 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato (10) em uma reação descarboxilativa. Subseqüente rearranjo e redução levam a 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (11), que é convertido em 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato (14) via 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol (12) e 4-difosfatocitidil-2C-metil-D-eritritol 2-fosfato (13). Reações adicionais levam a IPP (6) e DMAPP (7). (EISENREICH *et al.*, 2001)

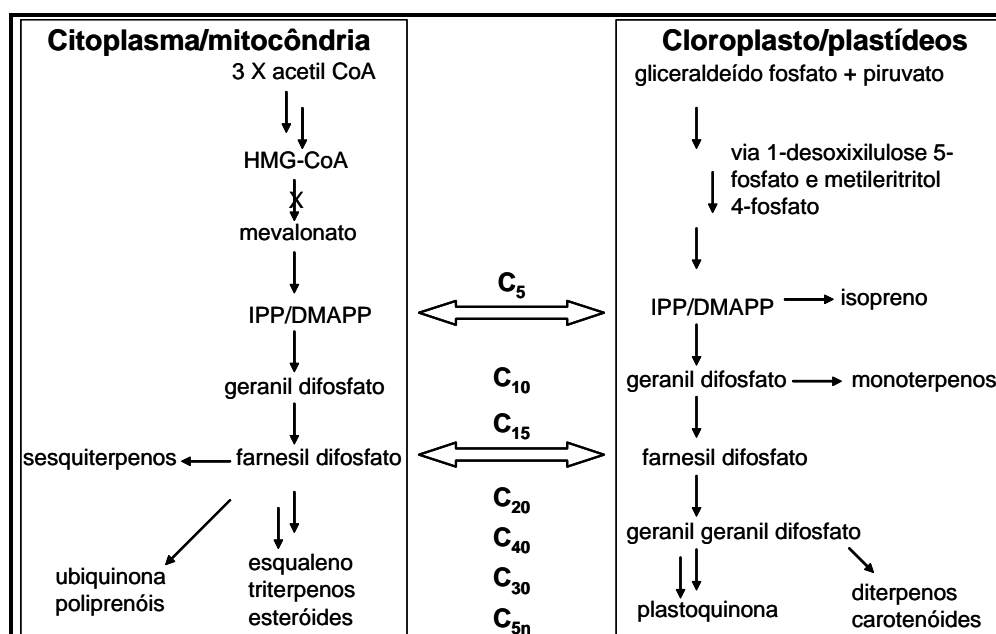


Uma proposta de transformação do 1-desoxi-*D*-xilulose 5-fosfato (10) a IPP(6)/DMAPP(7) sugere um rearranjo sigmatrópico de esqueleto, três passos de redução e no mínimo um passo de fosforilação (Figura 6).



**Figura 6.** Rearranjo do esqueleto de 1-desoxixilulose conduzindo a formação do IPP. (os átomos de carbono são numerados de acordo com a IUPAC) (EISENREICH *et al.*, 1998).

Nas plantas superiores, a rota do mevalonato opera no citoplasma e mitocôndria, formando esteróides, triterpenos, sesquiterpenos e poliprenóis. Os isoprenóides sintetizados nos plastídeos (hemiterpenos, monoterpenos, diterpenos e carotenóides) são formados predominantemente via 1-desoxixilulose 5-fosfato. A compartimentalização das duas vias biossintéticas de IPP não é absoluta, porque metabólitos podem movimentar-se entre os compartimentos (Figura 7). A extensão desta travessia depende tanto da espécie quanto da presença e concentração do precursor exógeno (EISENREICH *et al.*, 2001).



**Figura 7.** Compartimentalização da biossintese dos isoprenóides nas plantas superiores. Flechas ao nível do IPP ( $C_5$ ) e farnesil difosfato ( $C_{15}$ ) indicam possíveis trocas entre os compartimentos (ROHMER, 1999).

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

a) Geral

Conhecer, em maior profundidade, a constituição química de espécies vegetais nativas das regiões do Cerrado e Mata Atlântica remanescentes no Estado de São Paulo.

b) Específicos

b.1) extração, isolamento e identificação e/ou elucidação de metabólitos secundários das espécies *Alibertia edulis*, *Alibertia macrophylla* e *Alibertia sessilis*;

b.2) ensaios biológicos (antifúngico e antitumoral) com os extratos, frações semi-purificadas e substâncias isoladas, uma vez que estas espécies já apresentaram potencial atividade antifúngica.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Materiais e Equipamentos

Os solventes orgânicos utilizados para obtenção de extratos e fracionamentos foram das marcas Mallinckrodt (p.a.), Synth (p.a.) e J. T. Baker (grau HPLC). A água (grau HPLC) foi obtida usando um sistema de purificação Milli-Q Plus (Millipore). As soluções foram concentradas em evaporador rotativo Büchi R-114, sob pressão reduzida.

Nas análises por CCDC foi utilizada sílica gel 60 G (Merck) e para a CCDP sílica gel 60 G PF<sub>254</sub> (Merck). Ambas as placas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica em água destilada, na proporção de 1:2 (p/v) sobre placas de vidro de 5, 10 e 20 x 20 cm, obtendo-se 0,10 e 0,75 mm de espessura de adsorvente, para CCDC e CCDP respectivamente, através de espalhador Quickfitt. As placas eram deixadas em repouso por cerca de 3 a 4 horas à temperatura ambiente e depois ativadas em estufa a 120 °C por 1 a 2 horas.

Como reveladores para CCDC foram utilizados: irradiação na região do ultravioleta em 254 e 366 nm (Chromatovus), vapores de iodo e solução metanólica de anisaldeído/ ácido sulfúrico/ ácido acético seguido de aquecimento em estufa.

Para cromatografia em coluna (CC) foram utilizadas: sílica gel 70 – 200 Mesh (Acros), sílica flash 35 – 70 Mesh (Acros), sílica de fase reversa LiChroprep RP-18 15 – 25 µm (Merck) e Sephadex LH-20.

O *clean-up* das amostras para injeção em CLAE foi realizado em cartucho preenchido com sílica de fase reversa (C<sub>18</sub>), seguido de filtração em membrana de *teflon* (0,20 ou 0,45 µm) e as soluções das amostras foram acondicionadas em *vials* de 2,0 mL. O *clean-up* das amostras para injeção em CG foi realizado em cartucho preenchido com sílica *flash* e carvão ativo, seguido também de filtração em membrana de *teflon* e acondicionamento em *vials*.

Os cromatógrafos líquidos utilizados foram: i) analítico sistema binário, Varian *ProStar* modelo 310 com detector UV-Vis modelo 240; ii) analítico sistema ternário Varian *ProStar* modelo 210, com auto sampler Varian *ProStar* modelo 410 e detector UV-Diodo Array modelo 330; iii) preparativo sistema binário, Varian *PrepStar* Dynamax modelo SD-1, com detector UV-Vis Varian modelo 320; iv) analítico sistema ternário Shimadzu LC-10AD, com auto injetor Shimadzu SIL-10A e detector UV-Diodo Array; v) sistema analítico e preparativo Shimadzu CLASS-VP Ver.5.41, com detector UV-Vis modelo SPD10Avp. Foram utilizadas colunas Phenomenex

Luna C<sub>18</sub> analítica (250 mm x 4,60 mm, 5 µm) e preparativa (250 mm x 21,20 mm, 10 µm).

O cromatógrafo gasoso utilizado foi um modelo Varian CP-3380, com detector de ionização em chama e as análises foram feitas em coluna LM-5 (15,0 m x 0,2 mm x 0,2 µm). Gás de arraste (H<sub>2</sub>): 50 kPa. Gás de chama (H<sub>2</sub>): 35 kPa. Ar sintético: 40 kPa. Gás auxiliar (N<sub>2</sub>): 50 kPa.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram adquiridos nos espectrômetros: Bruker AC 200, operando a 200 MHz para <sup>1</sup>H e 50 MHz para <sup>13</sup>C, Varian INOVA 500, operando a 500 MHz para <sup>1</sup>H e 125 MHz para <sup>13</sup>C e Bruker DRX 600 (equipado com crioprobe). Os espectros de RMN 600MHz foram realizados pela Prof<sup>a</sup> Virginia Carbone do Istituto di Scienze dell Centro di Spettrometria di Massa Proteomica e Biomolecolare, Itália. O padrão interno utilizado como referência foi tetrametilsilano (TMS) e os solventes deuterados CDCl<sub>3</sub>, DMSO-*d*<sub>6</sub> e CD<sub>3</sub>OD são da marca Cambridge Isotope Laboratories.

Rotação óptica ( $[\alpha]_D$ ) foi obtida em um polarímetro Polamat A Carl Zeiss Jena.

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em espectrômetro quadrupolar do tipo *time of flight* (UltrOTOF-Q, Bruker Daltonics) e os de baixa resolução em um espectrômetro Platform, no modo *electrospray*.

Os espectros de massas Tandem foram obtidos em um espectrômetro de massas acoplado a um trapeador de íons, *ion-trap* (IT), LCQ Deca (ESI-IT-MS/MS, Thermo Finnigan<sup>®</sup>) e a foi utilizada a técnica de Análise por injeção em Fluxo (FIA). Os espectros de massas em primeira-ordem (MS) e segunda-ordem (MS/MS) foram obtidos sob as seguintes condições: voltagem do capilar -4 V, voltagem do *spray* -5 kV, temperatura do capilar 280 °C, gás de arraste (N<sub>2</sub>) fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi *m/z* 50-2000, com dois eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LCQ. O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa *m/z* estabelecida. O segundo evento de varredura foi um experimento MS/MS realizado a partir dos dados da varredura feita com os íons das moléculas desprotonadas com energia de colisão entre 25 e 30%. As análises de FIA-ESI-IT-MS/MS foram realizadas junto ao grupo do Prof. Cosimo Pizza e Sonia Piacente da Università degli Studi di Salerno, Itália.

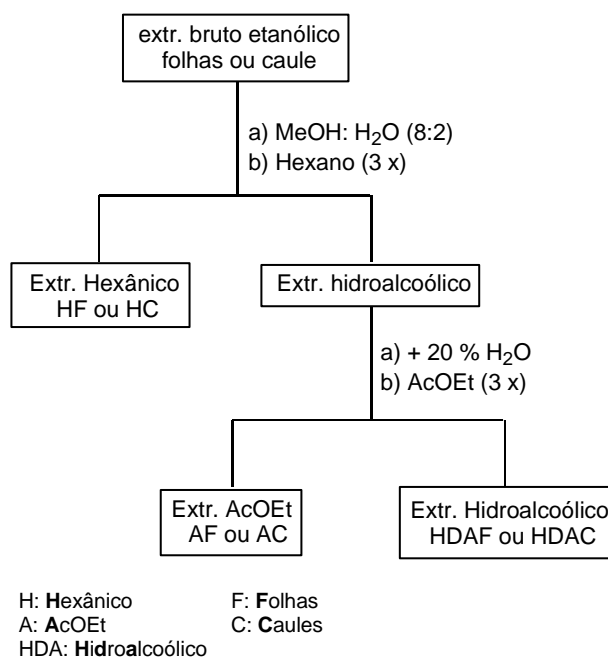
### 3.2. Coletas e identificação do material vegetal

As plantas estudadas foram coletadas na Fazenda Campininha - Estação Ecológica e Experimental de Mogi-Guaçu/SP (*Alibertia sessilis* e *Alibertia macrophylla*) em novembro/2003 e na Fazenda Aleluia (propriedade particular), município de Aporé/GO (*Alibertia edulis*) em janeiro e julho/2004. As espécies foram identificadas pela botânica Inês Cordeiro no Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, local onde se encontram depositadas suas exsicatas: *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. ex DC n° SP 370.913, *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. n° SP 370.914 e *Alibertia macrophylla* K. Schum. n° SP 370.915.

### 3.3. Obtenção dos extratos brutos e de partição das espécies estudadas

Os materiais vegetais coletados, depois de separados em folhas e caules, foram secos em estufa a 40 °C, moídos e exaustivamente extraídos com etanol destilado, por maceração, à temperatura ambiente. A concentração dos extratos foi realizada em evaporador rotativo à pressão reduzida.

Em seguida, o extrato bruto etanólico, tanto das folhas quanto dos caules das espécies, foram solubilizados em MeOH/H<sub>2</sub>O 80:20 (v/v) e submetidos à partição líquido-líquido com hexano, acetato de etila e *n*-butanol, como mostra a figura 8. As massas obtidas desde o material seco aos extratos provenientes da partição estão relatadas na tabela 2.



**Figura 8.** Partição líquido-líquido dos extratos brutos das folhas e dos caules de *A. edulis*, *A. macrophylla* e *A. sessilis* (esquema geral).

**Tabela 2.** Quantidade de material obtido da extração e dos extratos provenientes da partição

	<i>Alibertia sessilis</i>		<i>Alibertia edulis</i>			<i>Alibertia macrophylla</i>	
	Folhas	Caules	Folhas	Caules		Folhas	Caules
				1ª coleta	2ª coleta		
Material seco	57,21 g	50,04 g	763,00 g	157,74 g	600,00 g	61,00 g	550,0 <sup>4</sup> g
Ext. bruto etanólico	13,00 g	4,15 g	160,00 g	12,75 g	-	10,16 g	-
Ext. etanólico para partição	10,00 g	3,75 g	10,00 <sup>1</sup> g	10,00 g	40,20 <sup>2</sup> g	10,00 g	-
Ext. hexânico	0,97 g	0,56 g	0,15 g	0,28 g	0,84 <sup>3</sup> g	1,97 g	2,89 g
Ext. em AcOEt	2,67 g	1,38 g	1,04 g	3,02 g	12,13 g	3,74 g	12,58 g
Ext. hidroalcoólico	6,03 g	1,58 g	2,82 g	6,64 g	6,06 g	4,25 g	5,72 g

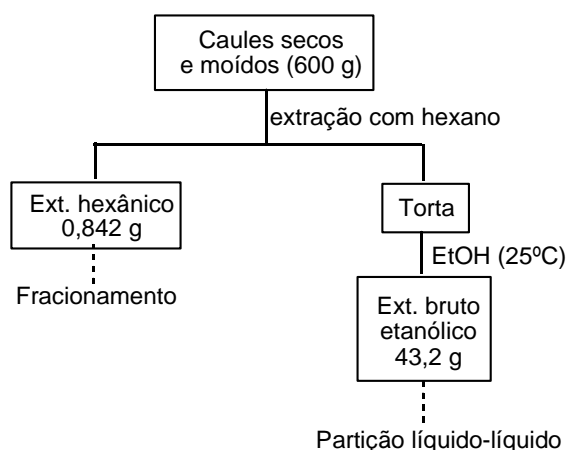
<sup>1</sup>material insolúvel 5,60 g

<sup>2</sup>demais extratos obtidos: emulsão Hex/HDA (1,62 g), Precipitado interfases AcOEt/HDA (12,25 g) e extrato *n*-butanólico (9,36 g) – Figura 10

<sup>3</sup>extrato obtido diretamente do material seco (fracionamento diferenciado da 2ª coleta, descrito a seguir)

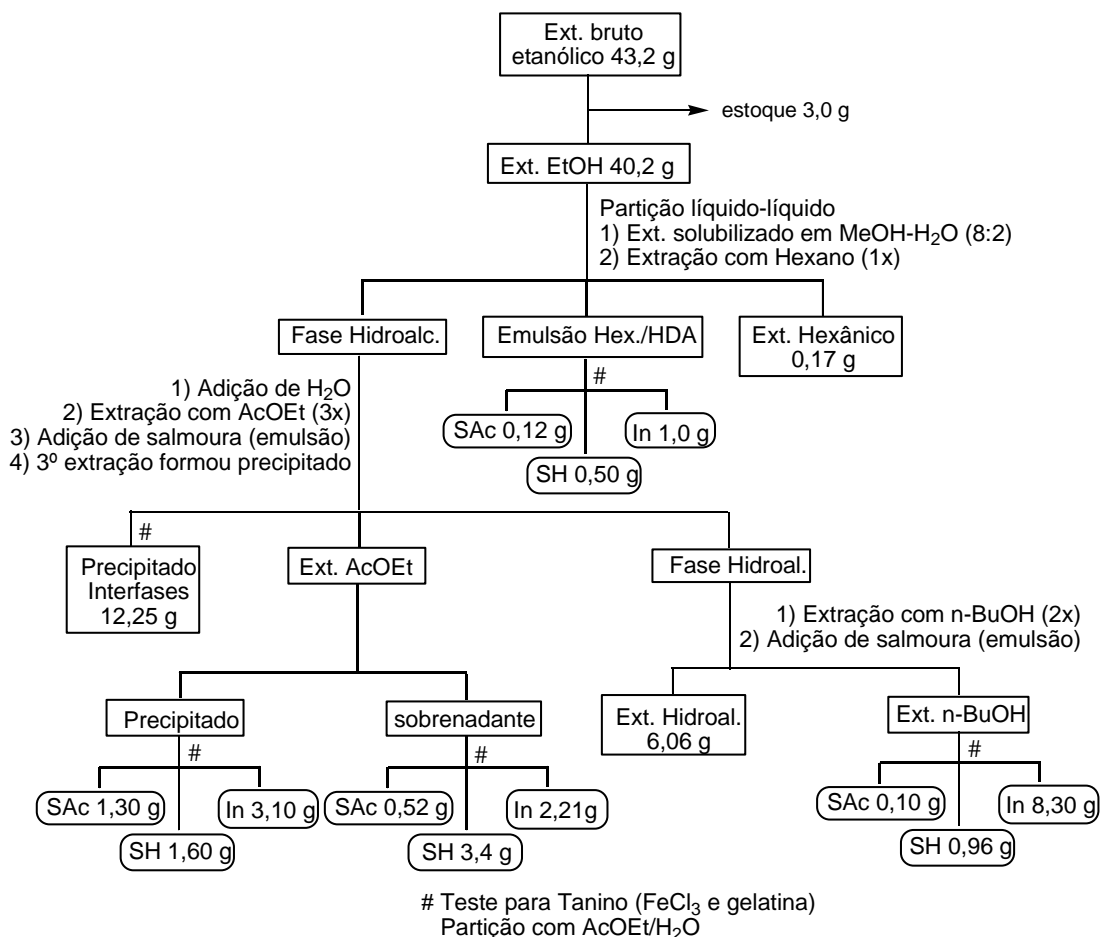
<sup>4</sup>extratos obtidos diretamente da torta (sem partição)

Uma nova coleta da espécie *Alibertia edulis* foi realizada em Julho/2004 a fim de se obter maior quantidade de material vegetal. Foi realizada extração direta com hexano do material seco, o qual forneceu 0,84 g de extrato bruto, e posterior extração exaustiva da torta com etanol, que por sua vez, forneceu 43,2 g de extrato bruto etanólico (Figura 9).

**Figura 9.** Obtenção dos extratos hexânico e etanólico dos caules de *A. edulis*.

O extrato etanólico foi solubilizado em 800,0 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O 80:20 (v/v) e submetido à partição líquido-líquido com hexano, acetato de etila e *n*-butanol, como mostra figura 10. Durante as extrações ocorreu formação de emulsão, em alguns casos a adição de solução saturada de NaCl resolveu o problema, caso contrário a emulsão foi recolhida e separada das demais fases. Na terceira vez que foi

adicionado AcOEt ao extrato hidroalcolico, ocorreu formação de precipitado marrom na interfase e este foi separado da mistura.



**Figura 10.** Partição líquido-líquido do extrato etanólico dos caules de *A. edulis*. (SAc – solúvel em acetato de etila, SH - solúvel em água, In – insolúvel).

Os extratos obtidos da partição do extrato bruto etanólico de *A. edulis* foram testados quanto à presença de taninos.

### 3.3.1. Teste para verificação de taninos

i) Teste com solução de gelatina 1% (SANTOS, MELLO, 2003): os extratos solubilizados em MeOH foram adicionados (5 a 10 gotas) em tubo de ensaio contendo a solução de gelatina 1% e NaCl 10% (2,0 mL). Aqueles em que ocorreu precipitação ou turvação foram considerados positivos;

ii) Teste com solução FeCl<sub>3</sub> 0,05% (SANTOS, MELLO, 2003): os extratos solubilizados em MeOH foram adicionados (5 a 10 gotas) em tubo de ensaio contendo a solução alcoólica de FeCl<sub>3</sub> 0,05% (2,0 mL). A mudança de cor da

solução de amarelo para verde indicou a presença de taninos condensados e para azul de taninos hidrolisáveis;

iii) Procedimento de partição com AcOEt/H<sub>2</sub>O para eliminação de taninos (HAGERMAN, 2002): os extratos obtidos da partição líquido-líquido do extrato etanólico foram solubilizados em AcOEt, porém parte permaneceu insolúvel. O sobrenadante foi separado e o material remanescente foi solubilizado em H<sub>2</sub>O, da mesma forma que o anterior, parte não solubilizou e foi separado da solução. As soluções AcOEt e aquosa foram particionadas. A fase aquosa foi extraída mais duas vezes com AcOEt. As frações orgânicas foram combinadas e secas, assim como a aquosa.

### 3.4. Fracionamento dos extratos provenientes da partição e isolamento dos constituintes químicos

#### 3.4.1. *Alibertia edulis*

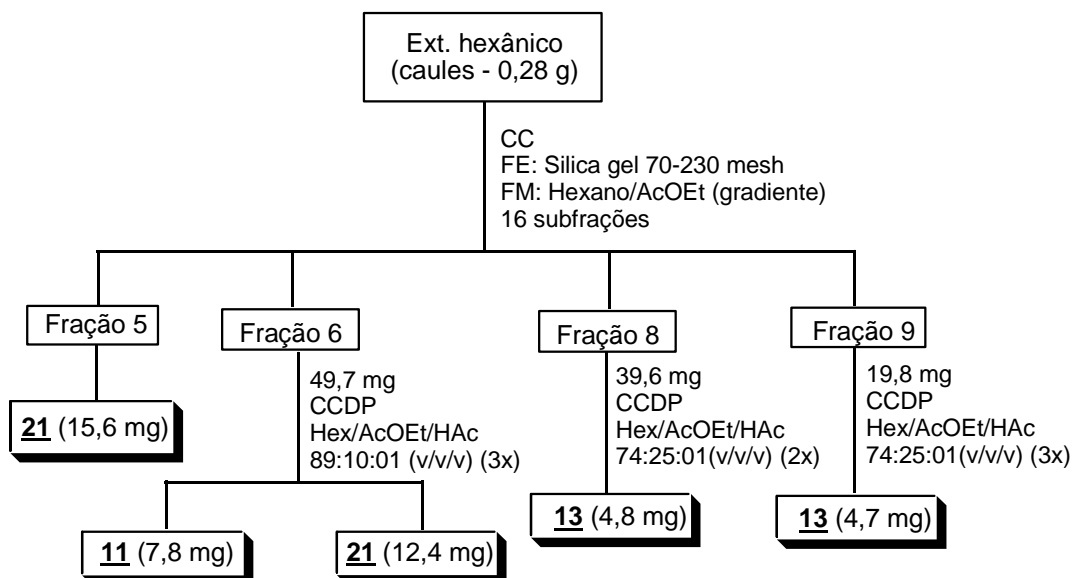
O estudo fitoquímico foi iniciado com os caules, pelo fato de não existirem relatos na literatura sobre esta parte da planta, ao contrário das folhas (BROCHINI *et al.*, 1994).

O extrato hexânico (0,28 g) foi submetido a cromatografia em coluna, utilizando sílica gel como fase estacionária, eluída em hexano/acetato de etila, modo gradiente e fornecendo 16 frações (as frações trabalhadas estão descritas a seguir).

- ✓ A fração 5 forneceu a substância **21** (15,6 mg);
- ✓ A fração 6 (49,7 mg), após CCDP eluída em hexano/AcOEt/HAc 89:10:01 (v/v/v) (3 vezes), forneceu a subfração 6.2 identificada como a substância **11** (7,8 mg) e a subfração 6.4 identificada como a substância **21** (12,4 mg);
- ✓ A fração 8 (39,6 mg), após CCDP eluída em hexano/AcOEt/HAc 74:25:01 (v/v/v) (2 vezes), forneceu a subfração 8.5 identificada como a substância **13** (4,8 mg);
- ✓ A fração 9 (19,8 mg), após CCDP eluída em hexano/AcOEt/HAc 74:25:01 (v/v/v) (3 vezes), forneceu a subfração 9.1 identificada como a substância **13** (4,7 mg).

Todo este fracionamento pode ser visualizado na figura 11:





**Figura 11.** Fracionamento do extrato hexânico dos caules de *Alibertia edulis*.

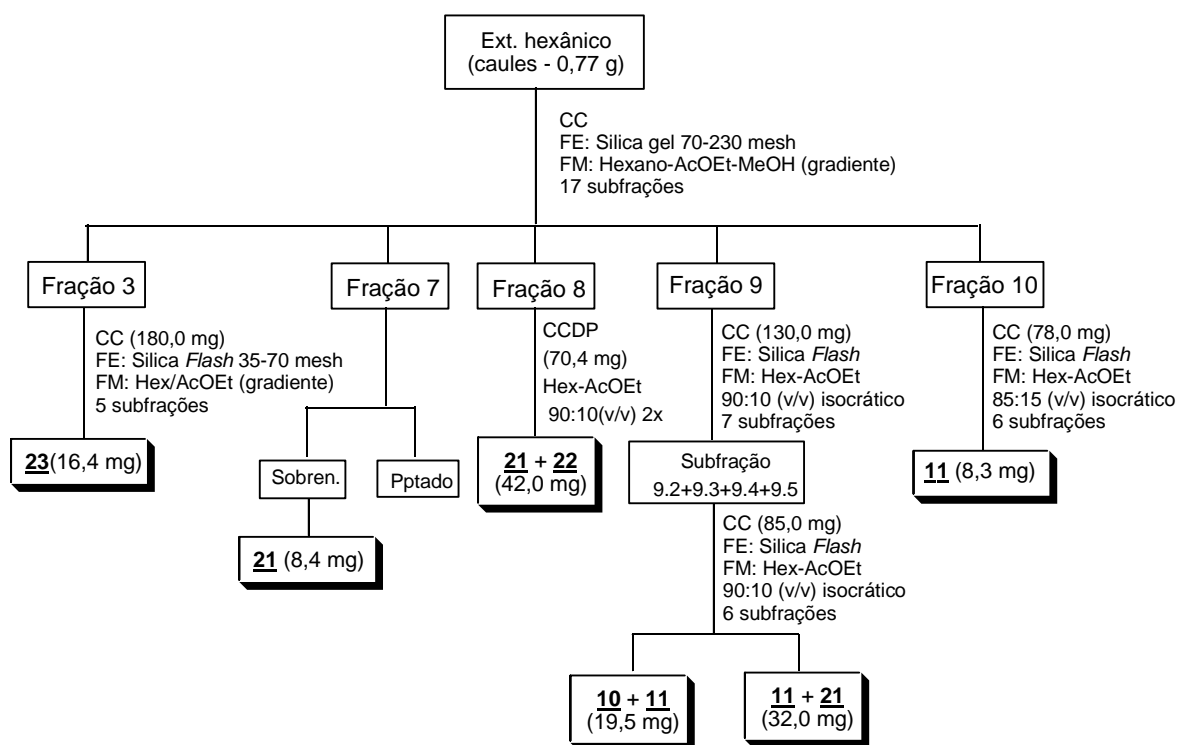
O extrato hexânico (0,77 g), obtido a partir da segunda coleta da espécie, também foi fracionado em coluna cromatográfica, utilizando sílica gel como fase estacionária e eluída em hexano/AcOEt em modo gradiente, fornecendo 17 subfrações (as frações trabalhadas estão descritas a seguir).

- ✓ A fração 3 (180,0 mg) foi refracionada em coluna de fase normal, utilizando sílica *flash* como fase estacionária, eluída em hexano e AcOEt (modo gradiente), fornecendo 5 subfrações. A subfração 3.2 (16,4 mg) foi caracterizada como a substância **23**;
- ✓ Na fração 7 (25,7 mg) ocorreu formação de precipitado com adição de MeOH. O precipitado foi caracterizado como material graxo, por análise de RMN de  $^1\text{H}$ , e o sobrenadante, após seco, foi identificado como a substância **21** (8,4 mg);
- ✓ A fração 8 (70,4 mg), após CCDP eluída em hexano/AcOEt 90:10 (v/v) (2 vezes), forneceu a subfração 8.3 (42,0 mg) identificada como uma mistura das substâncias **21** e **22**;
- ✓ A fração 9 (130,0 mg) foi submetida a coluna cromatográfica, utilizando sílica *flash* como fase estacionária e eluída em modo isocrático com o sistema hexano/AcOEt 90:10 (v/v), fornecendo 7 subfrações. A análise por CCDC mostrou que a separação não fora eficiente, portanto foram reunidas as subfrações 9.2 a 9.5 (85,0 mg) e refracionada em coluna de baixa pressão utilizando a mesma fase estacionária e a mesma fase móvel, porém

foi aumentada a altura da coluna e diminuído o seu diâmetro interno. Foram obtidas 6 subfrações, onde a subfração 9.(2-5).2 (19,5 mg) foi caracterizada como uma mistura das substâncias **10** e **11**, e a subfração 9.(2-5).4 (32,0 mg) como uma mistura de **11** e **21**;

✓ A fração 10 (78,0 mg) foi refractionada também em coluna cromatográfica sob pressão e eluída em modo isocrático com o sistema hexano/AcOEt 85:15 (v/v), fornecendo 6 subfrações. A subfração 10.2 (8,3 mg) foi identificada como a substância **11**;

Todo este fracionamento pode ser visualizado na figura 12:



**Figura 12.** Fracionamento do extrato hexânico, obtido da segunda coleta, dos caules de *Alibertia edulis*.

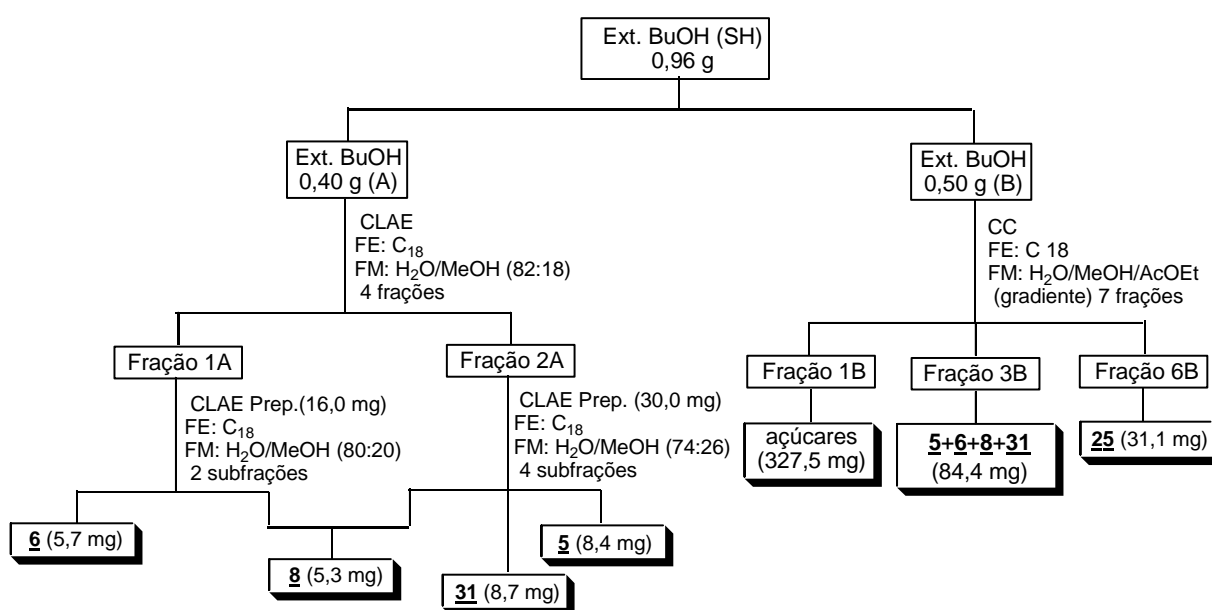
Os extratos obtidos após partição líquido-líquido do extrato etanólico (Figura 10 – p. 53) foram avaliados por CLAE analítico e RMN de  $^1\text{H}$ , conforme item 4.1.1, justificando assim o fracionamento dos extratos descritos a seguir.

O extrato butanólico (SH) foi dividido em duas porções para fracionamento (Figura 13).

A primeira porção do extrato foi submetida à análise por CLAE (gradiente e isocrático) e a condição para o fracionamento e purificação, em escala preparativa, foi estabelecida [Coluna  $\text{C}_{18}$ , modelo Luna (2) (Phenomenex<sup>®</sup>) de 250 x 4,6 mm,

partículas com tamanho de 5  $\mu\text{m}$ ,  $F = 1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $\lambda = 235 \text{ nm}$  e sistema de solventes MeOH/H<sub>2</sub>O 18:82 (v/v)]. As frações obtidas (1A e 2A) foram analisadas, também via CLAE, utilizando-se Coluna C<sub>18</sub>, modelo Luna (2) (Phenomenex®) de 250 x 4,6 mm, partículas com tamanho de 5  $\mu\text{m}$ ,  $F = 1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $\lambda = 235 \text{ nm}$  e sistema de solventes MeOH/H<sub>2</sub>O (20:80 (v/v) para fração 1A) e (26:74 (v/v) para fração 2A) fornecendo as substâncias **8** e **6** a partir da fração 1A e as substâncias **8**, **5** e **31**, a partir da fração 2A

A segunda porção do extrato *n*-BuOH foi fracionada em coluna cromatográfica à vácuo, utilizando-se C<sub>18</sub> como fase estacionária, obtendo-se 7 frações. A fração 1B foi caracterizada como uma mistura de açúcares livres (327,5 mg). A fração 3B foi caracterizada como uma mistura das substâncias **8**, **5**, **6** e **31** (84,4 mg) e a fração 6B foi identificada como a substância **25** (31,1 mg) (Figura 13).



**Figura 13.** Fracionamento do extrato *n*-BuOH (SH) dos caules de *A. edulis*.

### 3.4.2. *Alibertia macrophylla*

Para a espécie *Alibertia macrophylla* foram selecionados os caules para análise fitoquímica, uma vez que apenas o extrato hexânico destes havia sido investigado anteriormente. Desta forma, este trabalho visa reestudar o extrato hexânico e estudar os extratos polares (AcOEt e EtOH) buscando ampliar o conhecimento sobre a constituição química desta espécie.

O extrato hexânico (2,80 g) foi fracionado em coluna cromatográfica, utilizando sílica gel como fase estacionária, eluída em hexano/AcOEt em modo

gradiente, fornecendo, após análise por CCDC, 10 frações (as frações trabalhadas estão descritas a seguir).

- ✓ A fração 1 (60,0 mg) foi caracterizada como material graxo, após análise por RMN de  $^1\text{H}$ ;
- ✓ A fração 2 (350,0 mg) foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica, utilizando sílica *flash* como fase estacionária e eluída com o sistema hexano/AcOEt 98:02 (v/v) em modo isocrático, fornecendo 4 subfrações. A subfração 2.1 (88,1 mg) foi caracterizada como a substância **24**. A subfração 2.3 (133,6 mg) foi caracterizada como uma mistura de quatro substâncias **16**, **17**, **18** e **19**;
- ✓ A fração 3 (150,0 mg) foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica, utilizando sílica *flash* como fase estacionária e eluída com o sistema hexano/AcOEt 85:15 (v/v) em modo isocrático, fornecendo 6 subfrações. A subfração 3.3 (22,0 mg) foi caracterizada como a substância **16**;
- ✓ A fração 4 (140,0 mg), após CCDC eluída em hexano/AcOEt 80:20 (v/v), forneceu a subfração 4.3 (54,8 mg) identificada como a substância **15**;
- ✓ A fração 7 (103,0 mg), após CCDC eluída em hexano/AcOEt 70:30 (v/v), forneceu a subfração 7.4 (10,0 mg) identificada como uma mistura das substâncias **12** e **13**;
- ✓ A fração 8 (60,7 mg), após CCDC eluída em hexano/AcOEt 50:50 (v/v), forneceu a subfração 8.3 (4,9 mg) identificada como a substância **13**.

Todo este fracionamento pode ser visualizado na figura 14:

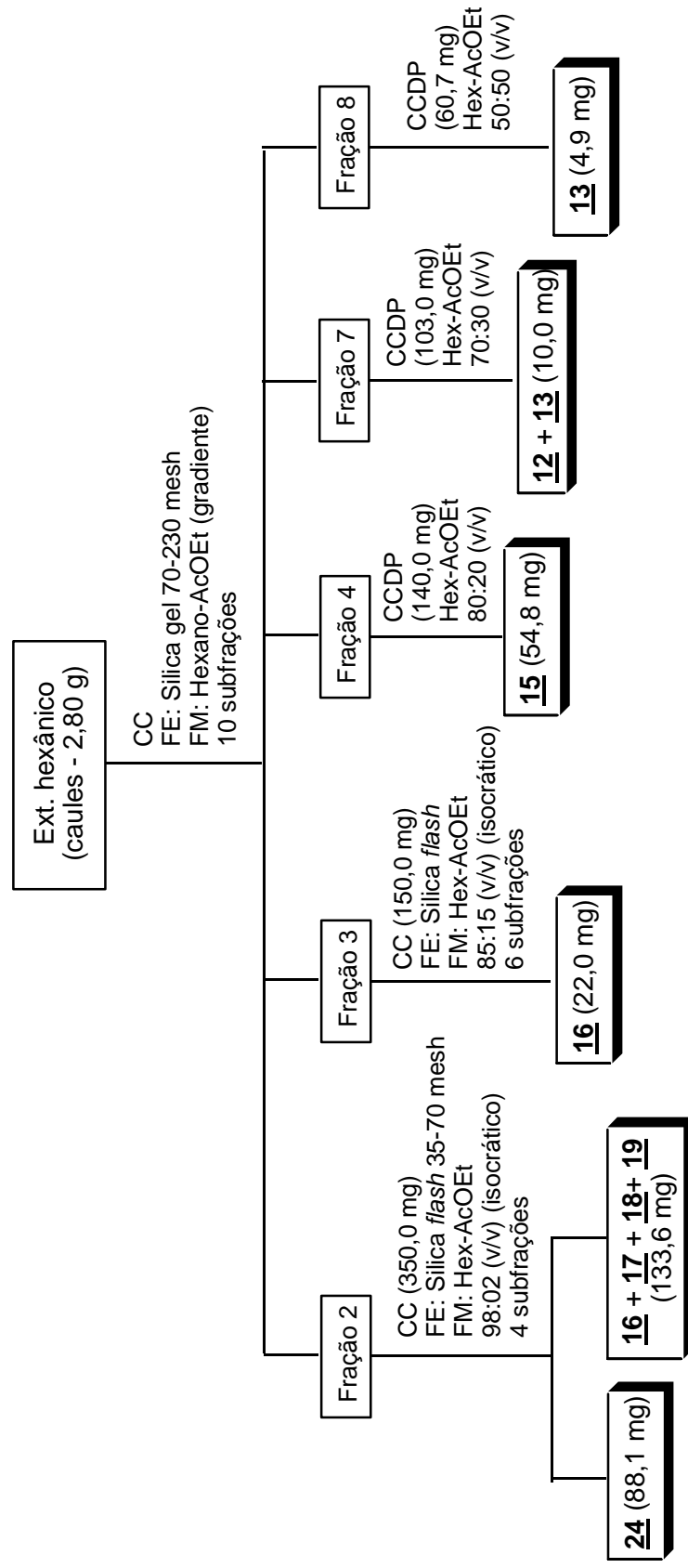


Figura 14. Fracionamento do extrato hexânico dos caules de *A. macrophylla*.

O extrato em acetato de etila (3,0 g) foi fracionado em coluna Sephadex LH-20, eluída em metanol e fornecendo 115 frações. A análise por CCDC mostrou que não ocorreu uma separação eficiente das substâncias, o que nos levou a tentar fracionar o extrato em outra fase estacionária, já que por exclusão molecular não foi promissora.

Assim, 8,0 g do extrato em acetato de etila foram fracionados em coluna à vácuo, utilizando C<sub>18</sub> como fase estacionária e eluída em H<sub>2</sub>O/MeOH/AcOEt (modo gradiente). A análise por CCDC das frações obtidas mostrou uma separação bem mais eficiente que a anterior. Cada sistema eluente forneceu uma ou mais frações (de acordo com a evolução da coluna) conforme tabela 3:

**Tabela 3.** Frações obtidas da coluna cromatográfica, em fase reversa, do extrato em acetato de etila dos caules de *Alibertia macrophylla*

Sistema eluente	Fração	Massa obtida
H <sub>2</sub> O-MeOH 90:10 (v/v)	1	1,810 g
H <sub>2</sub> O-MeOH 80:20 (v/v)	2	1,051 g
H <sub>2</sub> O-MeOH 70:30 (v/v)	3	0,420 g
H <sub>2</sub> O-MeOH 50:50 (v/v)	4	2,196 g
H <sub>2</sub> O-MeOH 30:70 (v/v)	5	0,205 g
MeOH 100 %	6	0,800 g
	6.1	0,114 g
	6.2	0,263 g
	6.3	0,109 g
MeOH-AcOEt 75:25 (v/v)	7	0,160 g
	7.1	0,316 g
MeOH-AcOEt 50:50 (v/v)	8	0,045 g
AcOEt 100 %	9	0,160 g

As frações trabalhadas estão descritas a seguir:

- ✓ A fração 1 (1,81 g) foi caracterizada como uma mistura de açúcares livres, após análise por RMN de <sup>1</sup>H;
- ✓ A fração 3 (0,42 g) foi analisada por CLAE (modo gradiente) e em seguida foi estabelecida condição isocrática para seu fracionamento em escala preparativa [Coluna C<sub>18</sub>, modelo Luna (2) (Phenomenex®) de 250 x 4,6 mm, partículas com tamanho de 5 µm, F = 1,0 mL min<sup>-1</sup>, λ = 254 nm e

sistema de solventes MeOH/H<sub>2</sub>O 17:83 (v/v)]. Deste fracionamento foram identificadas as substâncias **2**, **3**, **4**, **27**, **28** e **29**;

✓ A fração 4 (1,50 g) foi refractionada em coluna cromatográfica, utilizando C<sub>18</sub> como fase estacionária e eluída com H<sub>2</sub>O/MeOH/AcOEt em modo gradiente, e fornecendo 8 subfrações. As subfrações 4.3 (40 mg) e 4.4 (70 mg) foram avaliadas por CLAE e submetidas ao fracionamento em escala preparativa [Coluna C<sub>18</sub>, modelo Luna (2) (Phenomenex®) de 250 x 4,6 mm, partículas com tamanho de 5 µm, F = 1,0 mL min<sup>-1</sup>, λ = 254 nm e sistema de solventes MeOH/H<sub>2</sub>O 17:83 (v/v)]. Destes fracionamentos foram isoladas as substâncias **2**, **3**, **4** e **28**. A subfração 4.5 (70 mg) foi fracionada em coluna cromatográfica de fase reversa (C<sub>18</sub>), utilizando H<sub>2</sub>O/MeOH em sistema gradiente, e fornecendo 8 subfrações. Da subfração 4.5.1 (8,7 mg) foi identificada a substância **28**, e da subfração 4.5.4 foi identificada a substância **5** (16,4 mg). A subfração 4.6 (550 mg) também foi fracionada em coluna cromatográfica utilizando C18 como fase estacionária e eluída com H<sub>2</sub>O/MeOH/AcOEt (modo gradiente), fornecendo 9 subfrações após análise por CCD. Da subfração 4.6.8 (238,6 mg) foi identificada a substância **32**;

✓ A fração 6 (800,0 mg) foi fracionada em coluna de fase normal, utilizando sílica *flash* como fase estacionária, eluída em AcOEt/MeOH (modo gradiente), fornecendo 6 subfrações. A subfração 6.3 (130,0 mg) foi caracterizada como a substância **9**;

✓ A fração 6.2 (0,263 mg) apresentou um precipitado que foi separado e lavado com metanol. O sólido branco obtido foi caracterizado como a substância **13**; o sobrenadante, após CCDP eluída em hexano/AcOEt (80:20), forneceu a subfração 6.2.4 (18,0 mg) identificada como uma mistura das substâncias **12** e **13**;

✓ A fração 7.1 foi fracionada em coluna de fase normal, utilizando sílica *flash* como fase estacionária, eluída em hexano/AcOEt (modo gradiente), fornecendo 10 subfrações. A subfração 7.1.4 (23,6 mg) foi caracterizada como uma mistura das substâncias **21** e **22**.

Todo este fracionamento pode ser visualizado na figura 15:

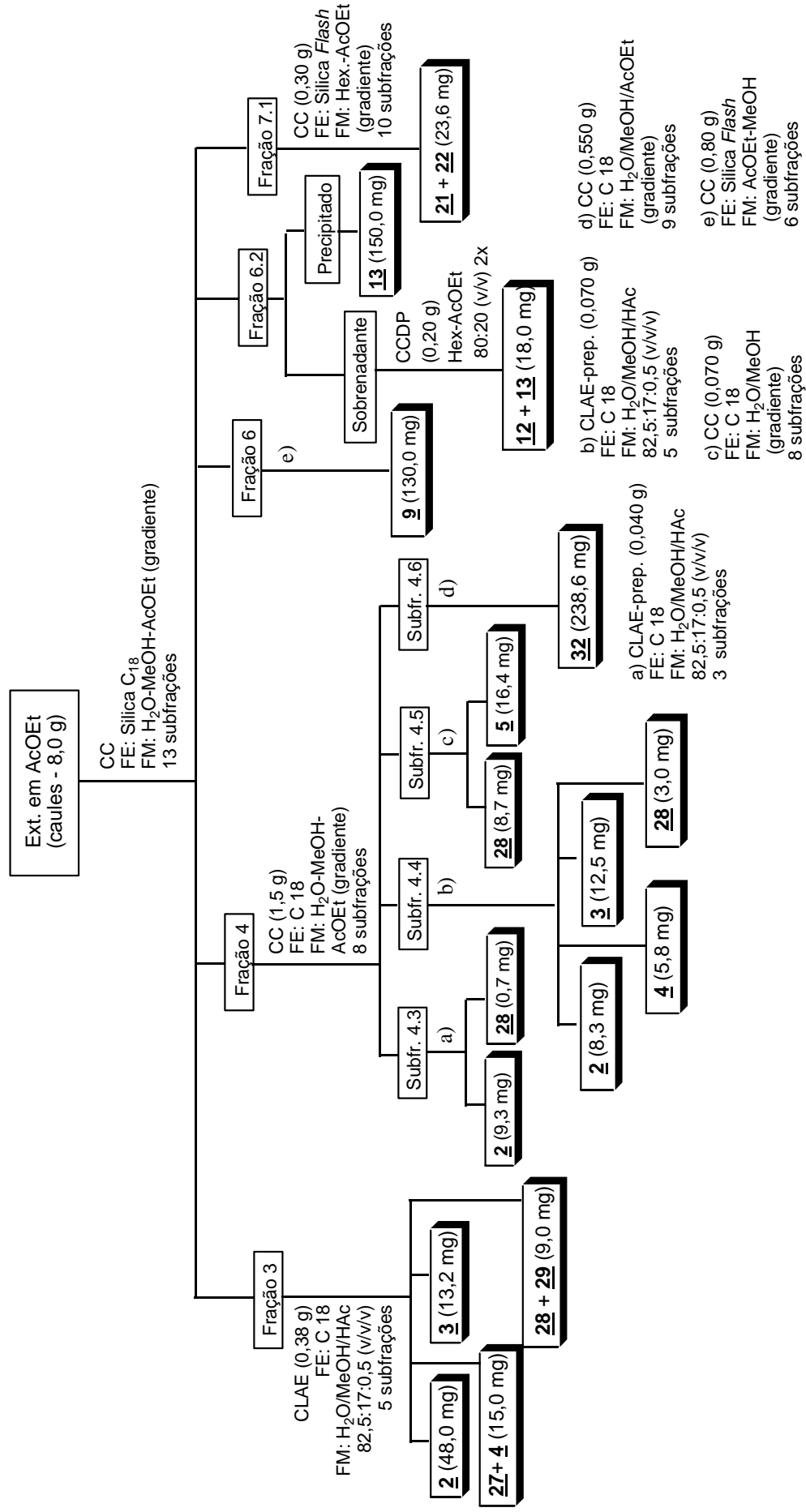


Figura 15. Fracionamento do extrato em acetato de etila dos caules de *A. macrophylla*.



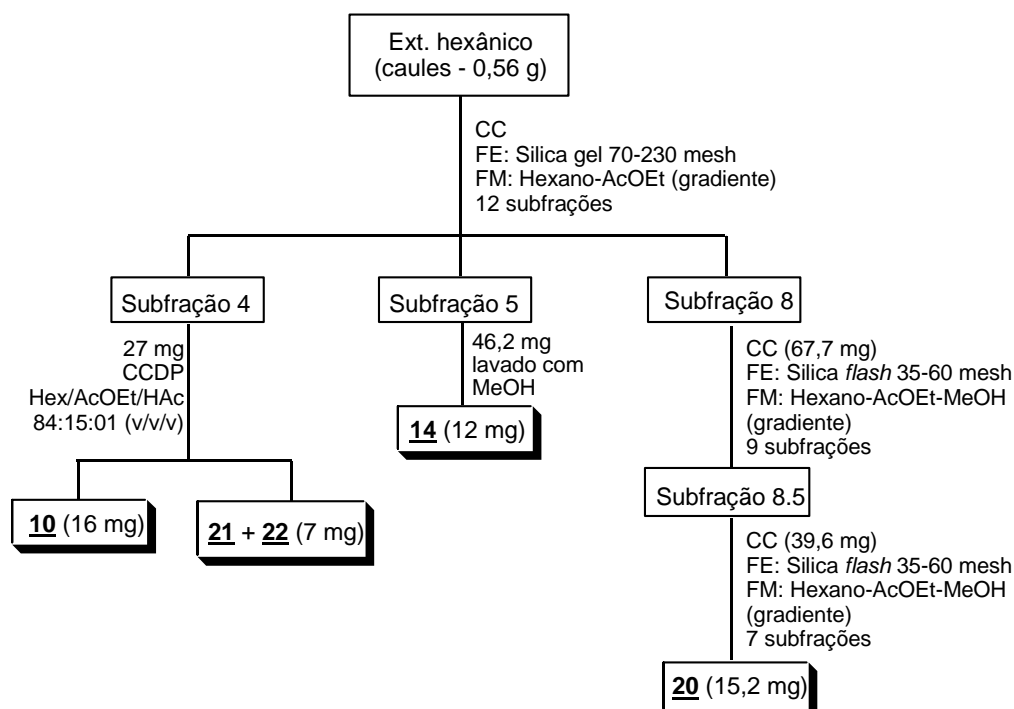
### 3.4.3. *Alibertia sessilis*

Assim como *A. edulis*, há relatos somente do estudo químico das folhas (OLEA *et al.*, 1997), justificando desta forma a investigação dos caules.

O extrato hexânico (0,56 g) foi cromatografado em coluna, utilizando sílica gel como fase estacionária, eluída em hexano/acetato de etila, modo gradiente. Após análise por CCDC, as 23 frações obtidas foram reunidas em 12 subfrações (as frações trabalhadas estão descritas a seguir).

- ✓ A subfração 4 (27 mg), após CCDC eluída em Hexano/AcOEt/HAc 84:15:01 (v/v/v), forneceu a subfração 4.1 identificada como a substância **10** (16 mg) e a subfração 4.3 como a mistura das substâncias **21** e **22** (7 mg);
- ✓ A subfração 5 (46,2 mg), após lavagem com metanol, forneceu a substância **14** (12 mg);
- ✓ A subfração 8 (67,7 mg) foi submetida a uma coluna cromatográfica utilizando sílica *flash* como fase estacionária, eluída em hexano/AcOEt/MeOH em modo gradiente, fornecendo 9 subfrações após análise por CCDC. A subfração 8.5 (39,6 mg), após refração em coluna com sílica *flash* tendo como eluente hexano/AcOEt/MeOH, também gradiente, forneceu 7 subfrações, sendo que a subfração 8.5.5 foi identificada como a substância **20** (15,2 mg).

Todo este fracionamento pode ser visualizado na figura 16:

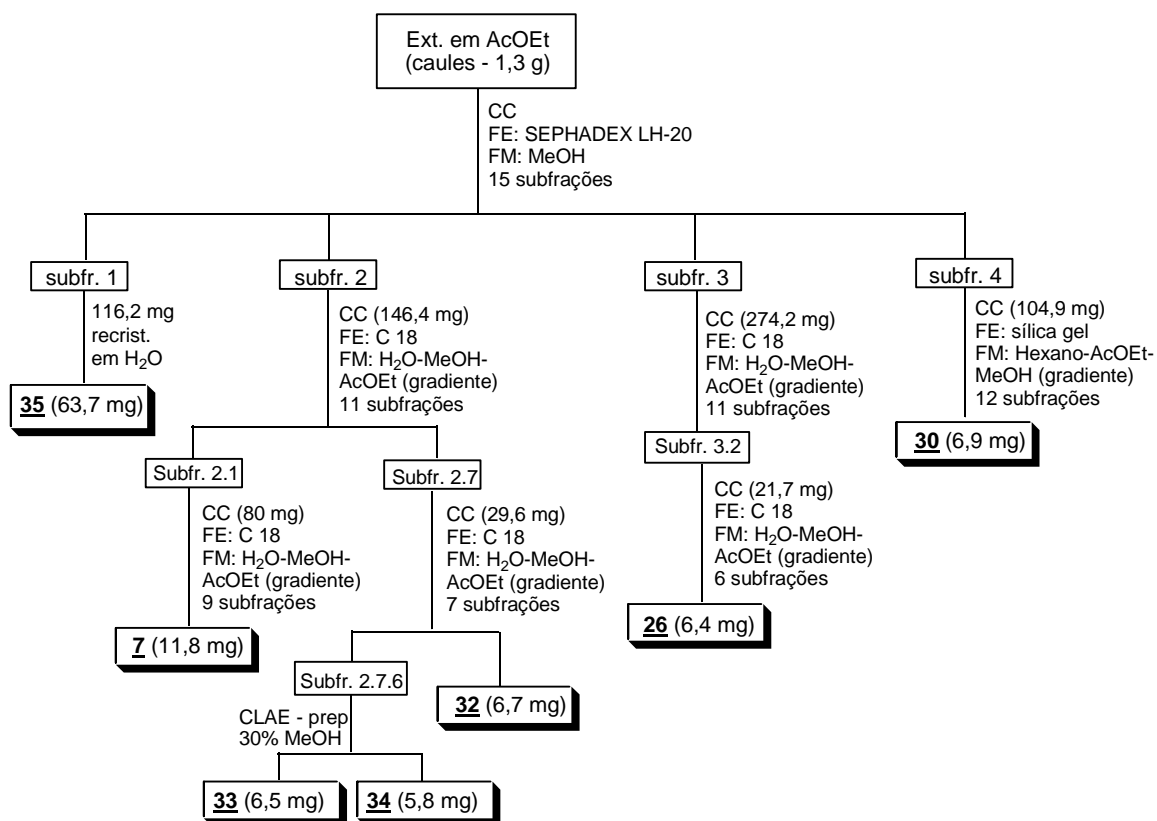


**Figura 16.** Fracionamento do extrato hexânico dos caules de *A. sessilis*.

O extrato em acetato de etila (1,30 g) foi fracionado em coluna Sephadex LH-20, utilizando metanol como eluente, e fornecendo 205 frações, as quais, após análise por CCDC foram reunidas em 15 subfrações (as frações trabalhadas estão descritas a seguir).

- ✓ A subfração 1 (116,2 mg), após lavagem com água, forneceu a substância **35** (63,7 mg);
- ✓ A subfração 2 (146,4 mg) foi submetida a uma coluna cromatográfica utilizando C<sub>18</sub> como fase estacionária, eluída em H<sub>2</sub>O/MeOH/AcOEt em modo gradiente, fornecendo 11 subfrações após análise por CCDC. A subfração 2.1 (80,0 mg) foi novamente fracionada em coluna C<sub>18</sub> e eluída em H<sub>2</sub>O/MeOH/AcOEt (modo gradiente), fornecendo 9 subfrações, onde a subfração 2.1.2 resultou na substância **7** (11,8 mg). A subfração 2.7 (29,6 mg), após refracionamento em coluna com fase estacionária C<sub>18</sub>, tendo como eluentes H<sub>2</sub>O/MeOH/AcOEt (modo gradiente), forneceu 7 subfrações, onde a subfração 2.7.6 resultou na mistura das substâncias **33** e **34** (18,8 mg) e a subfração 2.7.7 foi identificada como a substância **32** (6,7 mg);
- ✓ A subfração 3 (374,2 mg) foi submetida a uma coluna cromatográfica utilizando C<sub>18</sub> como fase estacionária, eluída em H<sub>2</sub>O/MeOH/AcOEt em modo gradiente, fornecendo 11 subfrações após análise por CCDC. A subfração 3.2 (21,7 mg), após refracionamento, também em coluna de fase reversa (C<sub>18</sub>), forneceu 6 subfrações, onde a subfração 3.2.2 foi identificada como a substância **26** (6,4 mg);
- ✓ A subfração 4 (104,9 mg) foi submetida a uma coluna cromatográfica utilizando sílica gel como fase estacionária, eluída em hexano/AcOEt/MeOH, modo gradiente, fornecendo 12 subfrações após análise por CCDC. A subfração 4.11 foi identificada como a substância **30** (6,9 mg).

Todo este fracionamento pode ser visualizado na figura 17:



**Figura 17.** Fracionamento do extrato em AcOEt dos caules de *A. sessilis*.

O extrato hidroalcolólico foi solubilizado em MeOH/H<sub>2</sub>O 60:40 (v/v) e particionado com *n*-butanol. A solubilização do extrato, porém, não foi completa, obtendo-se 0,05 g de material insolúvel.

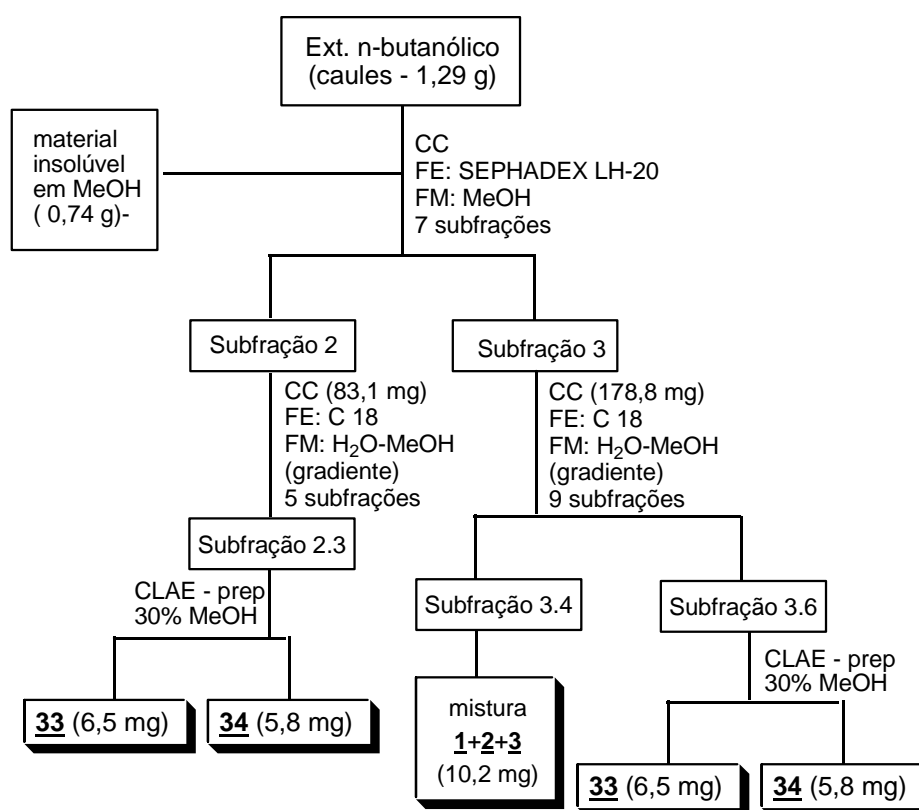
O extrato *n*-butanólico (1,29 g) foi fracionado em coluna Sephadex LH-20, utilizando metanol como eluente, e forneceu 45 frações, as quais, após análise por CCDC foram reunidas em 7 subfrações. No preparo da amostra para aplicação na coluna, novamente, parte de material insolúvel (0,74 g) em metanol foi separado. As frações trabalhadas estão descritas a seguir:

- ✓ A subfração 2 (83,1 mg) foi submetida a uma coluna cromatográfica utilizando C<sub>18</sub> como fase estacionária, eluída em H<sub>2</sub>O/MeOH em modo gradiente, fornecendo 5 subfrações após análise por CCDC. A subfração 2.3 resultou na mistura das substâncias **33** e **34** (9,2 mg);
- ✓ A subfração 3 (178,8 mg) foi submetida a uma coluna cromatográfica utilizando C<sub>18</sub> como fase estacionária, eluída em H<sub>2</sub>O/MeOH em modo gradiente, fornecendo 9 subfrações, após análise por CCDC. A subfração 3.4 foi caracterizada como uma mistura de três substâncias majoritárias **1**, **2**

e **3**. A separação das mesmas não foi possível devido à pequena quantidade de material (10,2 mg). A subfração 3.6 resultou também na mistura das substâncias **33** e **34** (8,6 mg).

✓ As subfrações 2.7.6 (Ext. AcOEt), 2.3 e 3.6 (Ext. *n*-butanólica), consideradas iguais após comparação por RMN de  $^1\text{H}$  e CCDC, foram reunidas e purificadas por CLAE preparativo. Esta subfração foi submetida à análise em CLAE analítico e a condição para sua purificação, em escala preparativa foi estabelecida: Coluna  $\text{C}_{18}$ , modelo Luna (2) (Phenomenex®) de 250 x 21,20 mm, partículas com tamanho de 10  $\mu\text{m}$ ,  $F = 10,0 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $\lambda = 238 \text{ nm}$  e sistema de solventes MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  30:70 (v/v). A separação resultou nas substâncias **33** e **34**.

Todo este fracionamento pode ser visualizado no figura 18:



**Figura 18.** Fracionamento do extrato *n*-butanólico dos caules de *A. sessilis*.

### 3.5. Perfis cromatográficos

Os perfis cromatográficos dos extratos hexânicos dos caules e folhas das três espécies de *Alibertia* foram realizados em um cromatógrafo gasoso Varian modelo CP-3380 com detector de ionização em chama. As análises foram feitas em coluna LM-5 (5% fenil 95% metilpolisiloxano, 15,0 m comprimento, 0,2 mm d.i., 0,2  $\mu\text{m}$

espessura do filme), temperatura do injetor a 250 °C, temperatura do detector a 280 °C, volume de injeção de 2,0 µL, modo split 1:20, 50 – 300 (10 °C/min) mantendo a 300 °C por 10 min, perfazendo um tempo total de análise de 36 min.

Os perfis cromatográficos dos extratos em acetato de etila e hidroalcoólico foram avaliados utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência Varian modelo *ProStar* 210 com detector ultravioleta e arranjo de fotodiodos modelo *ProStar* 330. As análises foram feitas em coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (Phenomenex, 250 x 4,6 mm), com fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 20,0 µL, gradiente exploratório ACN/H<sub>2</sub>O (05:95 a 100:0 (v/v) em 40 min).

### **3.6. Bioensaios para verificação da atividade antifúngica**

#### **3.6.1. Bioautografia direta**

Estes ensaios foram realizados no laboratório do Instituto de Botânica de São Paulo sob a supervisão da Dra. Maria Cláudia Marx Young.

Suspensões contendo esporos dos fungos das espécies *Cladosporium cladosporoides* e *Cladosporium sphaerospermum* foram utilizadas como reveladores em cromatografia em camada delgada para a realização da bioautografia (HOMANS, FUCHS, 1970).

Este ensaio consiste em um procedimento relativamente simples. A amostra de extratos foi aplicada em cromatoplacas e eluída com solventes adequados. Após a evaporação dos solventes e localização das manchas por meio de absorção no ultravioleta, uma solução de glicose e sais contendo esporos do fungo foi nebulizada sobre as placas que foram incubadas à temperatura de 25° C em câmara úmida e escura durante 2 a 3 dias. Após o tempo de incubação, observou-se o crescimento do fungo sobre a placa. Nos locais onde existem substâncias fungitóxicas surge um halo de inibição. Foi utilizado nistatina (1 µg) como padrão positivo.

#### **3.6.2. Método de diluição**

Estes ensaios foram realizados no laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, campus de Araraquara/SP sob a supervisão da Professora Maria José Soares Mendes Giannini.

Os testes da atividade antifúngica foram executados usando o método da microdiluição do caldo como descrito na M27-A2 do Instituto Clínico e do Laboratório de Padrões (CLSI), com modificações. Foi utilizado o meio RPMI 1640 com L-

glutamina e pH 7,0 com concentração de 0,165 M de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS), enriquecido com 2% de glicose. Os fungos patogênicos humanos testados foram: *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 90012), obtidos do Laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas – UNESP.

Os extratos e as frações foram preparados em DMSO e o volume para ser adicionado a placa com meio de RPMI foi calculado para que a concentração do primeiro composto natural fosse 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A suspensão da célula foi preparada em 0,85% de sal com uma densidade ótica equivalente a McFarland 0,5 e diluição de 1:100 em RPMI para a concentração final de  $1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^5$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ . Esta suspensão foi inoculada na placa de microdiluição, preparada previamente com os extratos da planta e as frações diluídas na concentração entre 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 0,48  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As placas foram incubadas, sob agitação, a 37°C por 24 h para as espécies de *Candida* e 48h para *Cryptococcus neoformans*.

O controle positivo utilizado foi a anfotericina B. Pelo método espectrofotométrico, a CIM foi definida como a concentração mais baixa em que a densidade ótica (OD) foi reduzida a 90% do OD do poço controle do crescimento. Para os extratos e as frações de planta, a CIM foi definida como a concentração mais baixa capaz de inibir todo o crescimento visível do fungo. Os resultados foram analisados visualmente e por análise espectrofotométrica. Considerou-se que se os extratos que indicassem CIM menor que 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , apresentaram atividade antimicrobiana forte; 75 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , atividade antimicrobiana moderada; 100 a 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , atividade antimicrobiana fraca; e acima de 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  os extratos foram considerados inativos (HOLETZ *et al*, 2003).

### **3.7. Bioensaios para verificação da atividade antitumoral**

#### **3.7.1. Avaliação de citotoxicidade com *Saccharomyces cerevisiae***

Estes ensaios foram realizados no laboratório do Instituto de Botânica de São Paulo sob a supervisão da Dra. Maria Cláudia Marx Young.

A atividade antitumoral potencial será medida em extratos brutos (2,0 – 3,0 mg), frações cromatográficas (0,5 – 1,0 mg) e substâncias puras (< 0,2 mg), através de bioensaio utilizando as seguintes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, proficientes e deficientes no reparo do DNA:

- Rad<sup>+</sup>: linhagem selvagem
- Rad 52Y: linhagem mutante recombinante (associada ao reparo na dupla hélice e recombinação meiótica)
- Rad 321N: linhagem mutante associada a Topoisomerase II (enzima vital no processo de divisão celular)

Este teste fundamenta-se no fato de que, as células tumorais não fazem reparo do DNA como as células normais. Assim, agentes ou drogas com toxidez seletiva dirigida para células deficientes em um desses mecanismos de reparação, podem agir como agentes antitumorais potenciais. A metodologia baseia-se na resposta diferencial entre as leveduras normais Rad<sup>+</sup> (células sadias que fazem reparo de DNA) e células que não possuem a capacidade de fazer reparo ou reconstituir a dupla hélice do DNA, Rad 321N e Rad 52Y, quando submetidas à ação de uma determinada amostra (extrato, fração ou substância pura). O resultado do bioensaio é dado pela medida diferencial dos halos de inibição da cultura de cada linhagem em relação à linhagem normal, podendo indicar um potencial antitumoral e/ou citotóxico.

O diâmetro do halo de inibição é medido para o mínimo de quatro diluições distintas, sendo os resultados expressos através de uma curva da concentração da amostra ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em função do diâmetro do halo de inibição. O coeficiente da equação é calculado e representa a concentração mínima inibitória para se obter um halo de inibição de 12 mm (IC<sub>12</sub>) (GUNATILAKA *et al.*, 1994). Os padrões positivos utilizados são: camptotecina: rad<sup>+</sup> 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (16,0 mm) e 52Y 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (21,0 mm) e estreptonigrina: 321N 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (20,0 mm).

### **3.7.2. Avaliação da citotoxicidade com linhagens tumorais**

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob a supervisão da Professora Cláudia do Ó Pessoa.

As células foram plaqueadas na concentração de  $0,1 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> para as linhagens MDA/MB-435 e SF-295 e  $0,7 \times 10^5$  cél mL<sup>-1</sup> para a linhagem HCT-8. Os diversos compostos foram acrescidos em concentração única de 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida,

adicionou-se 150  $\mu\text{L}$  da solução de MTT (sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3 horas. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150  $\mu\text{L}$  de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm. As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril. Substâncias puras foram testadas na concentração de 5  $\text{mg mL}^{-1}$ , frações e subfrações na concentração de 10  $\text{mg mL}^{-1}$  enquanto os extratos foram testados na concentração de 25  $\text{mg mL}^{-1}$ . (MOSSMAN,1983; SKEHAN *et al.*, 1990; BERRIDGE *et al.*, 1996).

Os experimentos foram analisados segundo a média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular.

As linhagens tumorais utilizadas, MDA-MB435 (mama - humano), HCT-8 (côlon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano), foram cedidas pelo National Cancer Institute (NCI), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ .

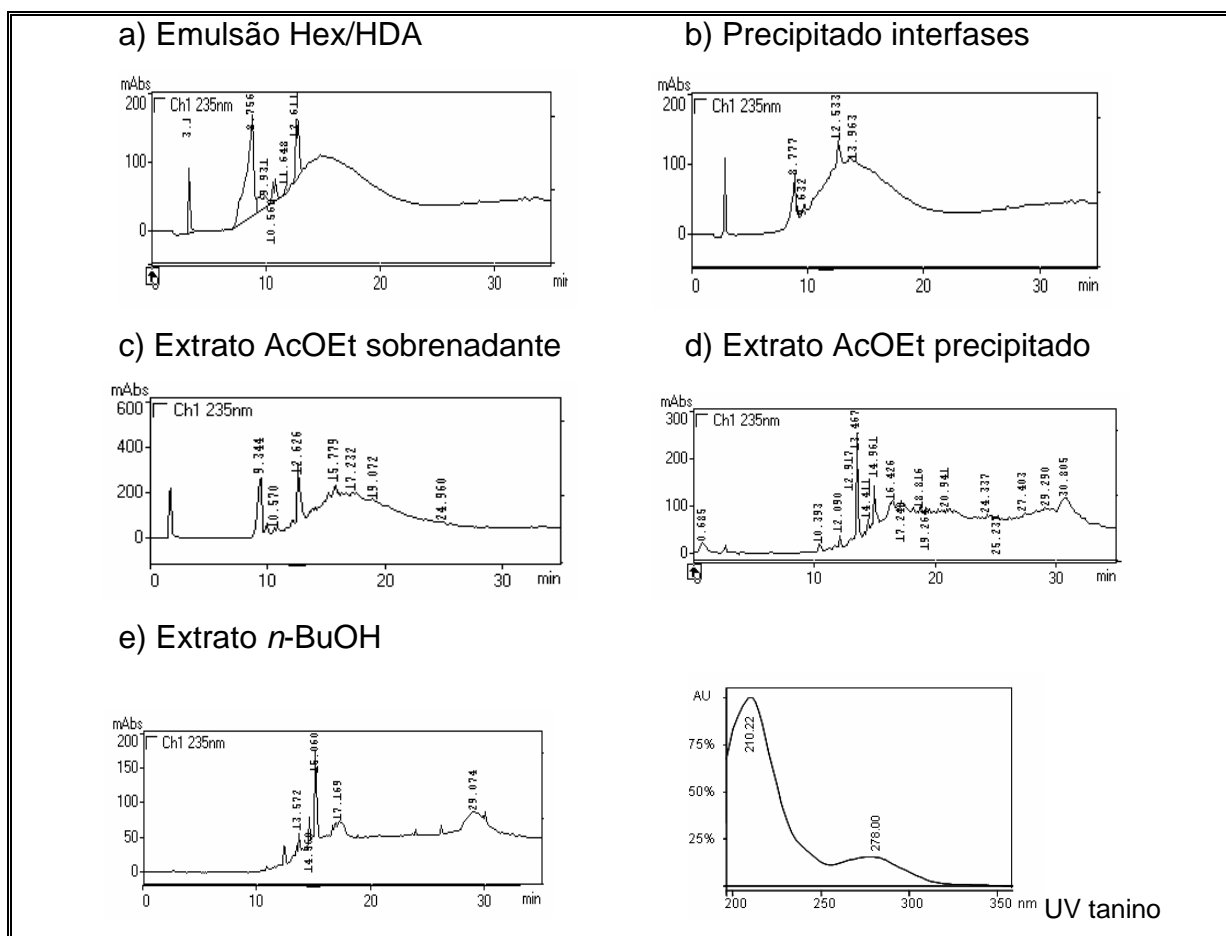


## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Considerações iniciais sobre os extratos e frações estudados

#### 4.1.1. *Alibertia edulis*

Os extratos obtidos da partição líquido-líquido do extrato etanólico (emulsão Hex/HDA, precipitado interfaces, ext. AcOEt, ext. *n*-BuOH e ext. Hidroal. – figura 10, p. 53) foram avaliados por CLAE analítico para verificação da complexidade e composição dos mesmos (Figura 19).



**Figura 19.** Cromatogramas obtidos para os extratos provenientes da partição do extrato bruto etanólico dos caules de *A. edulis*. Condição: Coluna  $C_{18}$ , 5 – 100% MeOH em 30 min,  $F = 1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $\lambda = 235, 254$  e  $320 \text{ nm}$  (colocado apenas o cromatograma no comprimento de onda que apresentou informações mais significativas com relação a quantidade de picos observados).

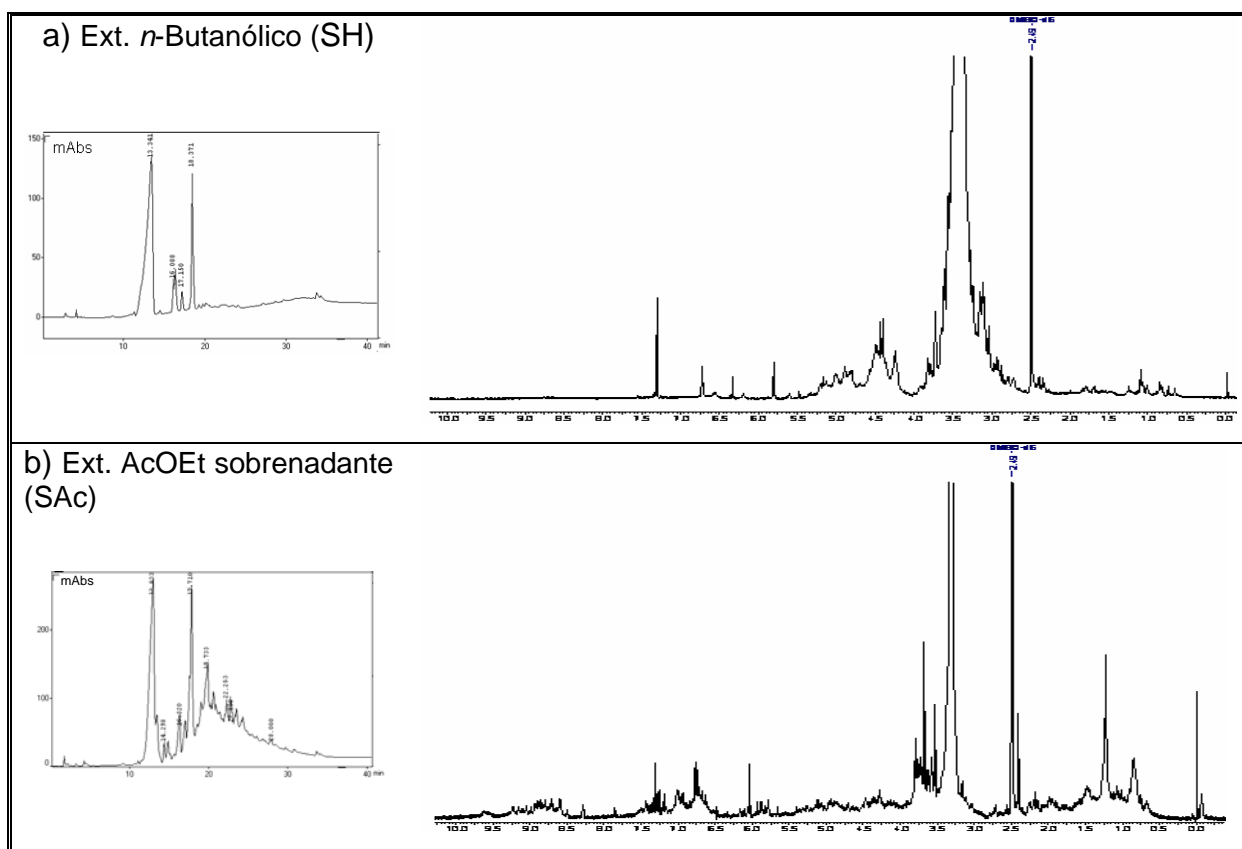
Foi verificada uma baixa resolução dos cromatogramas, que aliada a coloração marrom-avermelhada característica das amostras, levou-nos a suspeitar que contivessem quantidade significativa de taninos, justificando assim os testes realizados. Todos os extratos em questão deram resultado positivo no teste com solução de gelatina e apresentaram coloração verde no teste com solução de  $\text{FeCl}_3$ .

Uma vez confirmada a presença de taninos, os extratos foram particionados com AcOEt/H<sub>2</sub>O, para eliminação dos mesmos (Figura 10, p. 53) e, após esta etapa, foram analisados via RMN de <sup>1</sup>H e CLAE e tomadas as seguintes decisões:

a) como o extrato em AcOEt, precipitado (SH) e sobrenadante (SH), e *n*-BuOH (SH) se mostraram semelhantes, apenas o último foi fracionado, por ter um cromatograma mais limpo e um espectro com sinais bem definidos, como mostra a figura 20a;

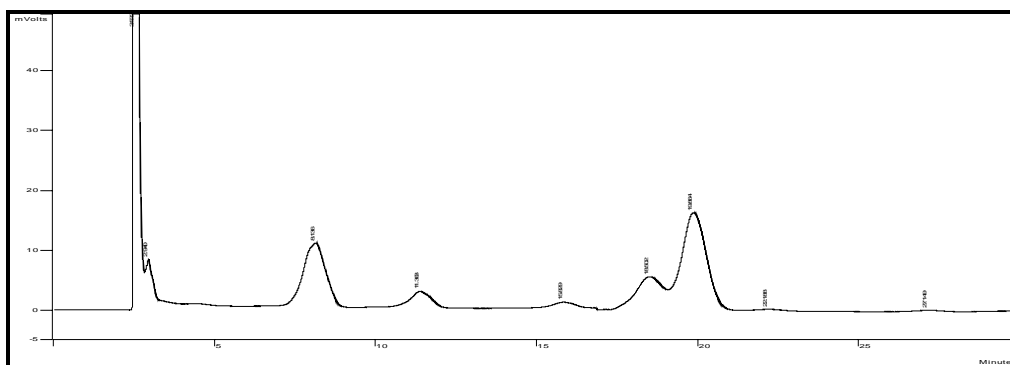
b) os extratos da emulsão Hex/HDA (SH) e (SAc), do precipitado em AcOEt (SAc) e *n*-BuOH (SAc), por apresentarem espectro de RMN de <sup>1</sup>H não significativo ou pouca massa para muitos picos cromatográficos, não foram fracionados;

c) o extrato em AcOEt sobrenadante (SAc) mostrou um espectro de RMN de <sup>1</sup>H muito rico em sinais (Figura 20b), o que levou ao seu fracionamento por coluna cromatográfica utilizando C<sub>18</sub> como fase estacionária. Porém, a separação não foi eficiente.

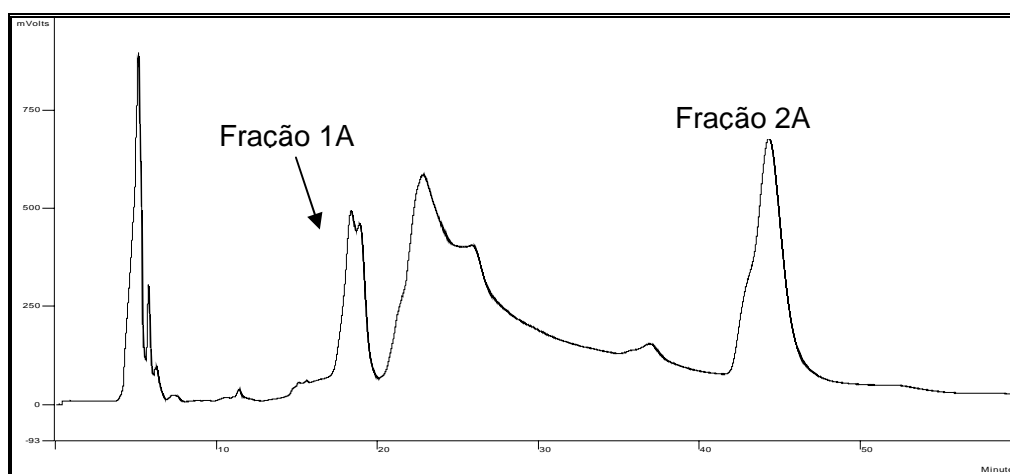


**Figura 20.** Espectros de RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz) e cromatogramas analíticos (Condição: Coluna C<sub>18</sub>, 5 – 100% MeOH em 30 min, F = 1,0 mL min<sup>-1</sup>, λ = 235 nm) para os extratos *n*-Butanólico (SH) e AcOEt sobrenadante (SAc) provenientes da partição para taninos dos extratos oriundos do extrato bruto etanólico de *A. edulis*.

O extrato butanólico (SH) foi dividido em duas porções para fracionamento conforme visto na figura 13 (p. 57). A primeira porção do extrato foi submetida à análise em CLAE (gradiente e isocrático) (Figura 21) onde estabelecemos a condição para o fracionamento e purificação em escala preparativa (Figura 22).

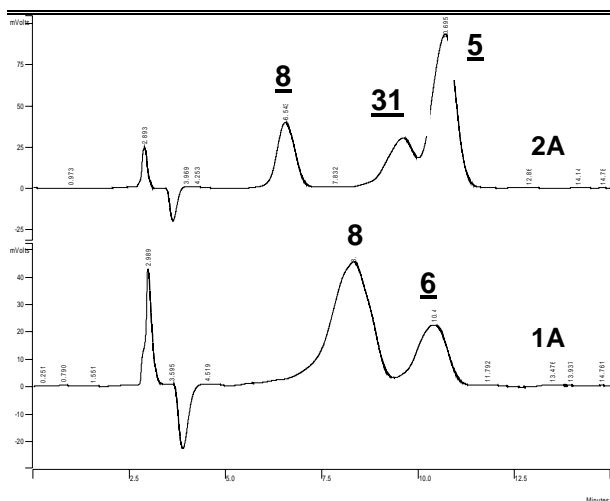


**Figura 21** Cromatograma analítico obtido para a fração *n*-BuOH (SH). Condições: Coluna C<sub>18</sub>, modelo Luna (2) (Phenomenex®) de 250 x 4,6 mm, partículas com tamanho de 5 µm, F = 1,0 mL min<sup>-1</sup>, λ = 235 nm e sistema de solventes MeOH/H<sub>2</sub>O 18:82 (v/v).



**Figura 22.** Cromatograma preparativo obtido para a fração *n*-BuOH (SH). Condições: Coluna C<sub>18</sub>, modelo Luna (2) (Phenomenex®) de 250 x 21,20 mm, partículas com tamanho de 10 µm, F = 10,0 mL min<sup>-1</sup>, λ = 235 nm e sistema de solventes MeOH/H<sub>2</sub>O 18:82 (v/v).

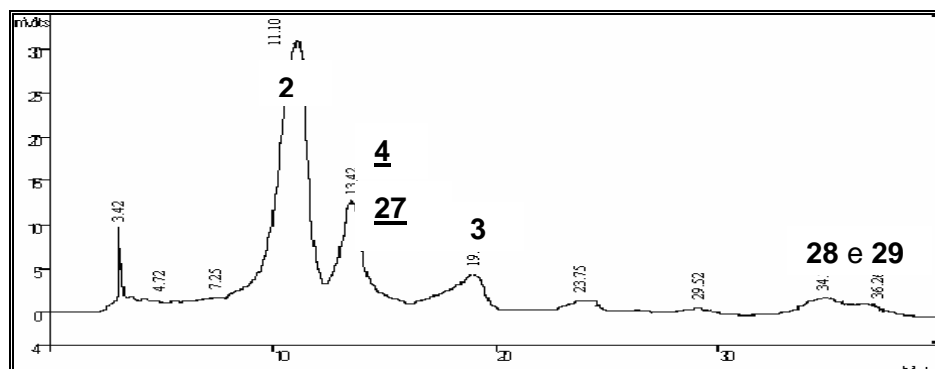
As frações obtidas (1A e 2A) foram analisadas e estabelecidas condições isocráticas para seus fracionamentos (Figura 23), também via CLAE, fornecendo, assim, as substâncias **6**, **8** e **5**, **8**, **31**, respectivamente.



**Figura 23.** Cromatograma analítico obtido para as frações 1A e 2A *n*-BuOH (SH). Condições: Coluna C<sub>18</sub>, modelo Luna (2) (Phenomenex®) de 250 x 4,6 mm, partículas com tamanho de 5 µm, F = 1,0 mL min<sup>-1</sup>, λ = 235 nm e sistema de solventes MeOH/H<sub>2</sub>O (20:80 (v/v) para fração 1A) e (26:74 (v/v) para fração 2A).

#### 4.1.2. *Alibertia macrophylla*

A fração 3 do extrato em AcOEt foi analisada por CLAE (modo gradiente) e em seguida foi estabelecida condição isocrática (Figura 24) para seu fracionamento em escala preparativa, fornecendo as substâncias indicadas no cromatograma.



**Figura 24.** Cromatograma analítico obtido para as frações 3 do extrato em acetato de etila de *A. macrophylla*. Condições: Coluna C<sub>18</sub>, modelo Luna (2) (Phenomenex®) de 250 x 4,6 mm, partículas com tamanho de 5 µm, F = 1,0 mL min<sup>-1</sup>, λ = 254 nm e sistema de solventes MeOH/H<sub>2</sub>O 17:83 (v/v).

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H do extrato hidroalcolólico de *A. macrophylla* (Figura 64, p. 148) apresentou destacadamente sinais referentes à hidrogênios característicos de açúcares ( $\delta$  3,0 – 4,5), e por isso não foi fracionado.

#### 4.1.3. *Alibertia sessilis*

O extrato hidroalcolólico dos caules de *A. sessilis* (0,24 g) não foi fracionado por apresentar sinais de hidrogênios característicos de açúcares no espectro de RMN de <sup>1</sup>H ( $\delta$  3,0 – 4,5), como pode ser visto na figura 73 (p. 153).

## 4.2. Substâncias isoladas

### 4.2.1. *Alibertia edulis*

O fracionamento dos caules de *A. edulis* levou ao isolamento de 11 substâncias: 3 iridóides, 3 triterpenos, 3 esteróides, 1 saponina e 1 derivado fenólico glicosilado (Figura 25).

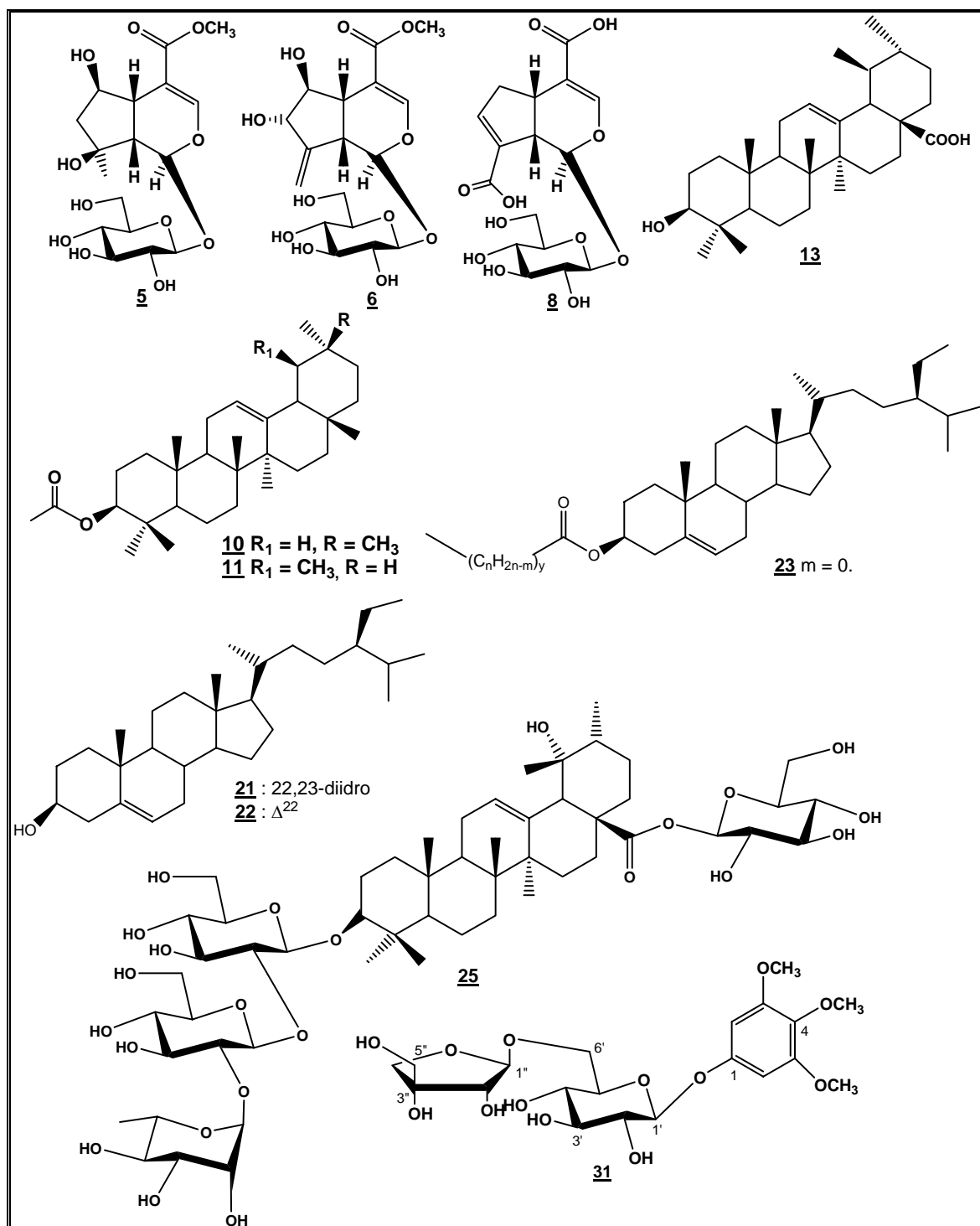


Figura 25. Substâncias isoladas dos caules de *Alibertia edulis*.

#### 4.2.2. *Alibertia macrophylla*

O fracionamento dos caules de *A. macrophylla* levou ao isolamento de 20 substâncias: 4 iridóides, 7 triterpenos, 4 esteróides, 1 diterpeno ainda não descrito na literatura, 3 ácidos fenólicos e 1 derivado fenólico glicosilado (Figura 26).

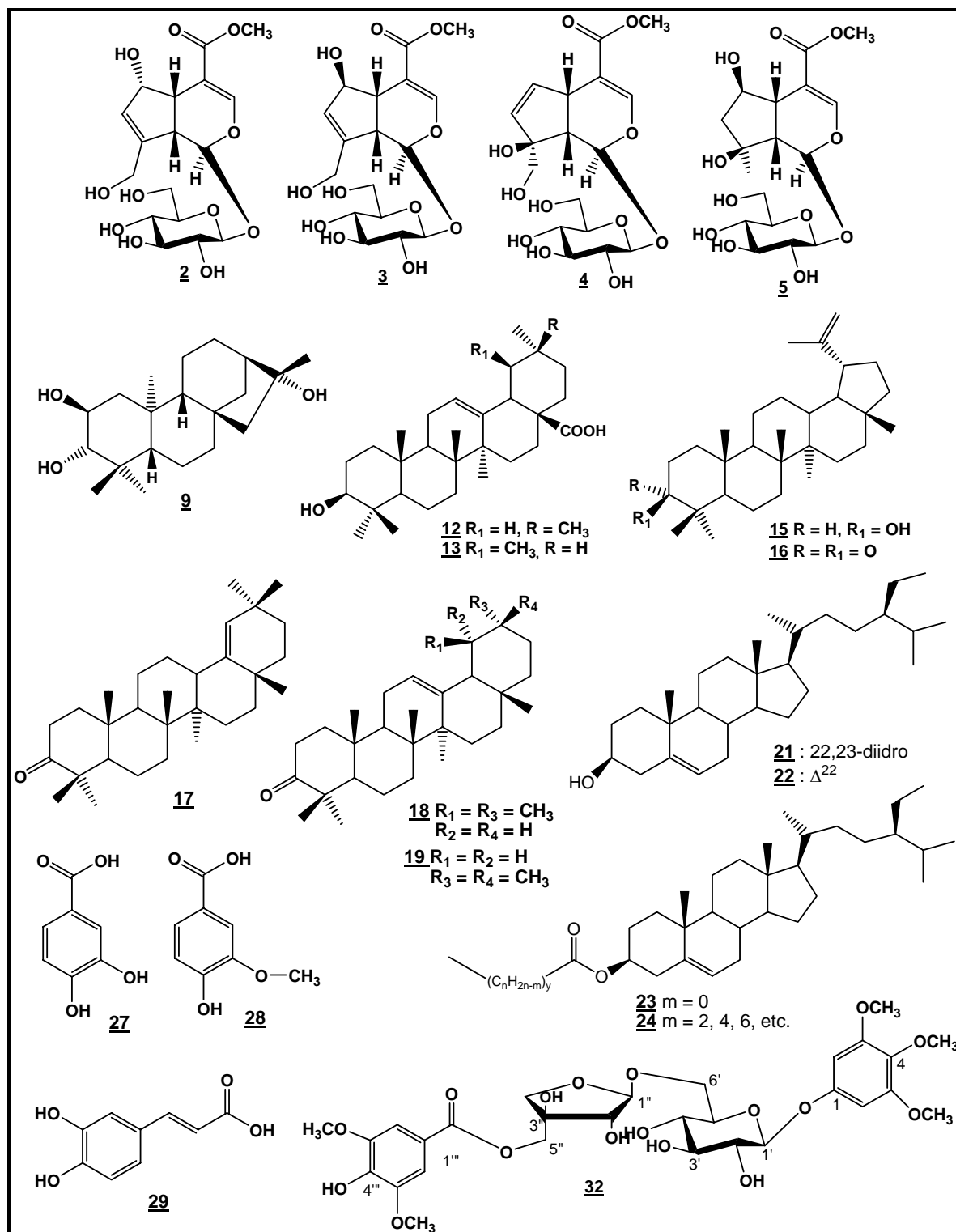


Figura 26. Substâncias isoladas dos caules de *Alibertia macrophylla*.

### 4.2.3. *Alibertia sessilis*

O fracionamento dos caules de *A. sessilis* levou ao isolamento de 15 substâncias: 4 iridóides, 3 triterpenos, sendo 1 derivado cicloartano ainda não descrito na literatura, 2 esteróides, 2 lignanas, 1 açúcar, 2 ácidos fenólicos e 1 derivado fenólico glicosilado não descrito na literatura (Figura 27).

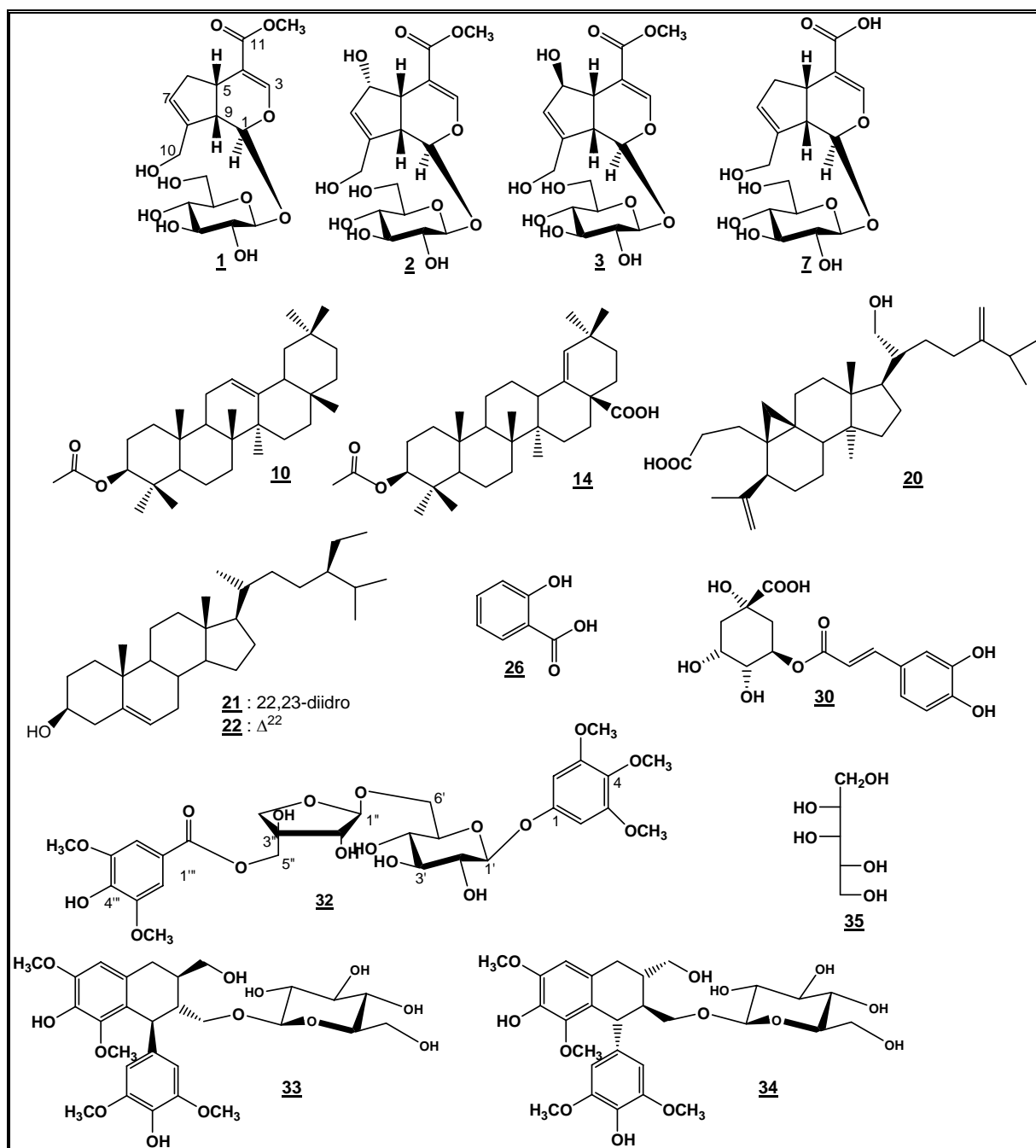


Figura 27. Substâncias isoladas dos caules de *Alibertia sessilis*.

As substâncias isoladas foram agrupadas por classe química de metabólitos secundários para a sua identificação ou elucidação estrutural, porque foram isoladas as mesmas classes de compostos nas três espécies estudadas.

### 4.3. Identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas

A identificação e/ou elucidação estrutural das substâncias isoladas das três espécies de *Alibertia* foi feita baseada na análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , DEPT, TOCSY,  $g\text{COSY}$ ,  $g\text{HMQC}$ ,  $g\text{HMBC}$ , na espectrometria de massas e na comparação com dados da literatura. Para as substâncias que não foram encontrados relatos na literatura, através de pesquisa no Banco de Dados Scifinder, foram realizados experimentos de espectrometria de massas e de rotação óptica ( $[\alpha]_D$ ).

#### 4.3.1. Monoterpenos modificados (Iridóides)

Os iridóides representam um grande grupo de compostos naturais monoterpenoídicos encontrados em uma variedade de espécies animais e em algumas famílias de plantas da classe das Dicotiledôneas (PETER JUNIOR, 1990).

O nome iridóide é derivado da iridomirmecina (I) e outros compostos relacionados isolados a partir da secreção de defesa das formigas do gênero *Iridomyrmex* (PETER JUNIOR 1990). Este nome comumente se refere a um grupo de monoterpens caracterizados pela presença, em seu esqueleto, de um resíduo ciclopentanoídico (BIANCO, 1990).

Os compostos iridóidicos são representados por substâncias neutras e podem ser divididos em quatro grupos (Figura 28): iridóides simples (I), iridóides glicosilados (II), seco-iridóides (III) e bisiridóides (IV) (BIANCO, 1990):

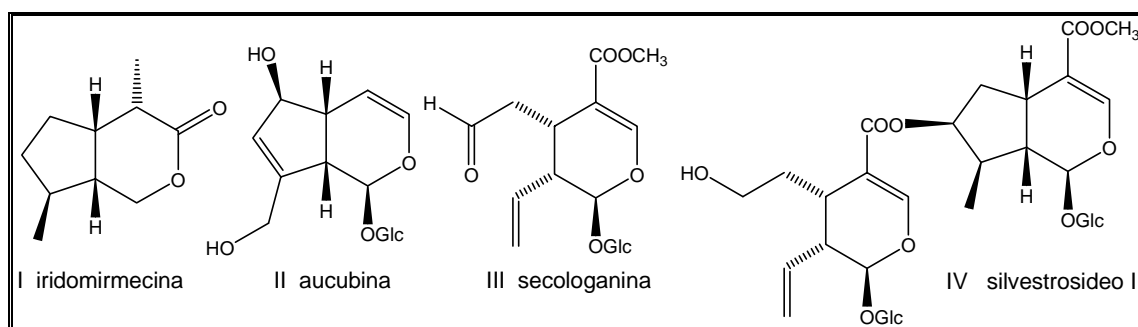
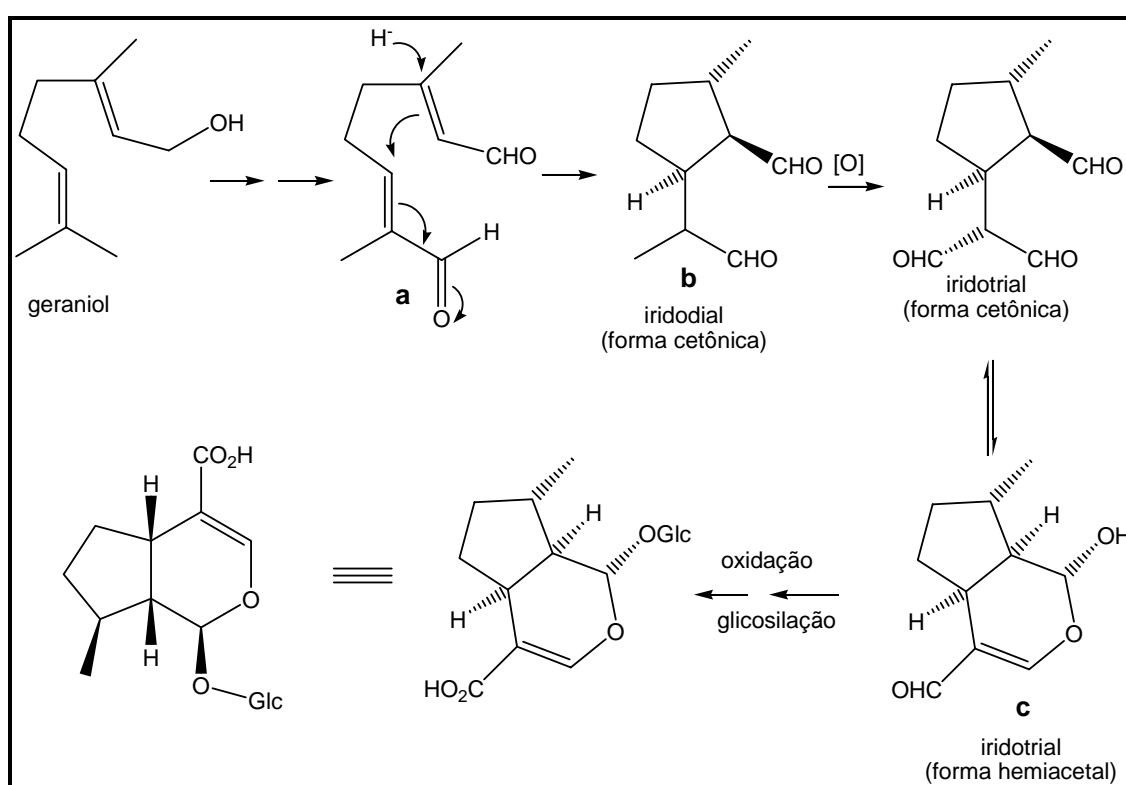


Figura 28. Exemplos de compostos iridóidicos.



A etapa chave na via biossintética destes monoterpenos é a ciclização do intermediário dialdeídico **a**, derivado do geraniol, que leva a formação do anel ciclopentano (intermediário **b**). Esta etapa é seguida, devido à acetalização da função 1,5-dialdeído de **b**, pelo fechamento do anel diidropirano (intermediário **c**), onde o sistema hemiacetálico é estabilizado pela glicosilação, transformando-se num acetal (Figura 29). Esta é, portanto, a evidência de que os iridóides permanecem estáveis somente enquanto a hidroxila hemiacetálica está protegida pela ligação glicosídica (BIANCO, 1990).



**Figura 29.** Biossíntese de formação do núcleo iridoídico característico das substâncias isoladas nas espécies de *Alibertia*.

O anel de seis membros dos iridóides sempre tem uma ligação dupla entre os carbonos 3 e 4, que se origina a partir da enolização da função aldeídica em C-3, e portanto, tem uma estrutura diidropirânica.

Assim, o esqueleto iridoídico é caracterizado por uma unidade ciclopentanoídica ligada, por uma junção *cis*, a um anel diidropirânico no carbono C-1, no qual está ligado um resíduo glicosídico (Figura 30).

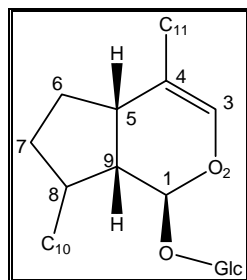


Figura 30. Esqueleto básico dos iridóides.

A partir da biossíntese, é possível destacar as características estereoquímicas introduzidas no núcleo iridoídico pelo metabolismo secundário:

- i) a junção entre os dois ciclos é *cis*, com os hidrogênios em configuração  $\beta$ ;
- ii) o resíduo O-glicosídico em C-1 tem também configuração  $\beta$  e, portanto este centro tem configuração absoluta S;
- iii) substituintes em C-6, C-7 e C-8 leva a obtenção de epímeros.

Os iridóides são os componentes ativos de um grande número de plantas usadas na medicina popular. Algumas atividades descritas para os iridóides, exemplificados na figura 31, são: sedativa (iridóides não glicosídicos de *Valeriana officinalis*), hipotensiva (*seco*-iridóide oleuropeína), antimicrobiana (iridóide não-glicosilado), analgésica (harpagosídeo), laxativa (muitos iridóides glicosilados), antileucêmica (muitos iridóides não-glicosilados), contração uterina (verbenalina), diurética (catalpol e derivados). Alguns iridóides e *seco*-iridóides são responsáveis pelo sabor amargo em frutos e folhas (BIANCO, 1990).

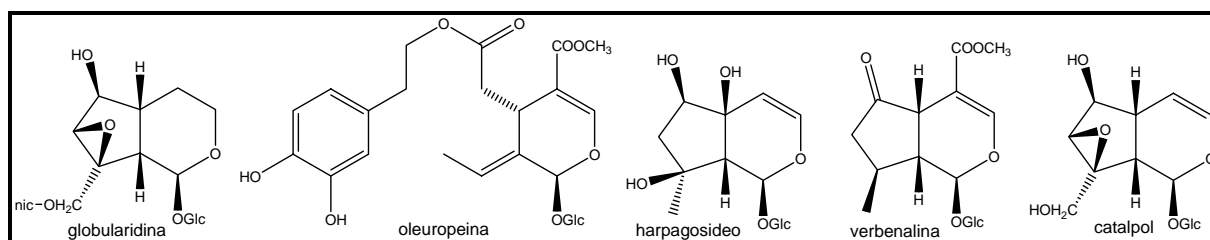


Figura 31. Exemplos de iridóides e *seco*-iridóides com atividades biológicas.

Os iridóides glicosilados são de interesse particular para os botânicos por causa de seu potencial valor em quimiosistemática para a elucidação de relações filogenéticas. Eles são distribuídos em um número restrito de famílias pertencentes a poucas superordens de Angiospermas (BIANCO, 1990), sendo considerados marcadores quimiotaxonômicos em Rubiaceae.

#### 4.3.1.1. **Substâncias 1, 2 e 3: geniposídeo, 6 $\alpha$ -hidroxigeniposídeo e 6 $\beta$ -hidroxigeniposídeo**

As substâncias 1, 2 e 3 foram identificadas em mistura, porque devido a pouca quantidade de material não foi possível a separação. As substâncias são conhecidas e isto facilitou a identificação.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura das substâncias 1, 2 e 3 (Figuras 77-79, p. 172-174) apresentou sinais característicos de hidrogênios de esqueletos iridoídicos:

a) os hidrogênios em  $\delta$  7,38 (*sl*, 1H),  $\delta$  7,55 (*d*, 1 Hz, 1H) e  $\delta$  7,41 (*d*, 1 Hz, 1H) são referentes ao H-3 do núcleo ciclopentanodihidropirano de iridóides carbocíclicos;

b) os hidrogênios em  $\delta$  5,70 (*d*; 1,5 Hz, 1H),  $\delta$  5,92 (*d*; 1,5 Hz, 1H) e  $\delta$  5,71 (*d*; 2 Hz, 1H) são referentes aos hidrogênios olefínicos H-7 da ligação dupla do anel pentacíclico;

c) os hidrogênios em  $\delta$  5,05 (*d*; 8 Hz, 01H),  $\delta$  4,96 (*d*, 8 Hz, 1H) e  $\delta$  5,08 (*d*; 6,5 Hz, 1H) são referentes aos hidrogênios oximetínicos H-1 do núcleo iridoídico.

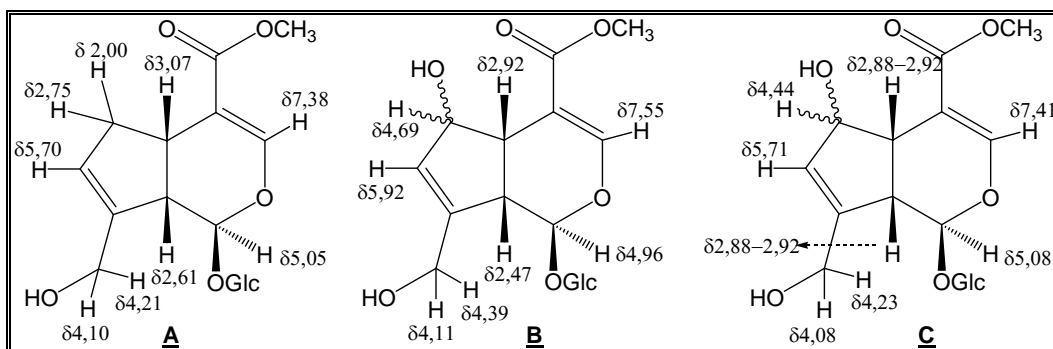
Foram observados ainda, singletos referentes às metoxilas em  $\delta$  3,61; 3,64 e 3,65. Os demais sinais presentes no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  são de hidrogênios alifáticos, oximetilênicos e oximetínicos. Baseado nestes dados foi proposto que a mistura consiste de 3 iridóides majoritários.

Uma análise mais detalhada do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  sugeriu a presença de três unidades glicosídicas pela existência de um hidrogênio anomérico em  $\delta$  4,57 (*d*, 8 Hz) e de dois hidrogênios anoméricos em  $\delta$  4,62 (*d*; 7,5 Hz); estando, desta forma, cada unidade iridoídica ligada a uma unidade de  $\beta$ -glicose, como é comum na literatura (BIANCO, 1990).

A identificação e a atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos dos iridóides não foi possível levando-se em consideração apenas dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Figuras 86 e 87, p. 179 e 180), gHMQC (Figuras 88-90, p. 181-183) e gHMBC (Figuras 91-93, p. 184-186). A correspondência entre qual unidade glicosídica está ligada a qual unidade iridoídica também não foi possível apenas com estes experimentos.

Através do experimento TOCSY 1D (Figuras 80-84, p. 175-177), as unidades iridoídicas e glicosídicas foram identificadas individualmente e a partir daí, somando-

se aos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , gHMQC e gHMBC, os núcleos iridóidicos foram determinados (Figura 32):



**Figura 32.** Núcleos iridóidicos identificados.

Os núcleos B e C consistem de epímeros em C-6. Segundo DAMTOFT (1981), quando os dois epímeros estão presentes, algumas diferenças sistemáticas podem ser usadas para a determinação estrutural e atribuição do centro assimétrico:

- i)  $\delta\text{C-1 (6}\alpha) > \delta\text{C-1 (6}\beta)$ ;
- ii)  $\Delta\delta(\text{C3-C4 (6}\alpha) > \Delta\delta(\text{C3-C4 (6}\beta)$ ;
- iii)  $J_{\text{H1,H9 (6}\alpha) > J_{\text{H1,H9 (6}\beta)$ ;
- iv)  $\delta\text{H-1 (6}\alpha) < \delta\text{H-1 (6}\beta)$ .

Na tabela 4, estão os resultados obtidos para esta sistematização aplicada na mistura em questão:

**Tabela 4.** Dados obtidos da sistematização para determinação dos epímeros de iridóides

	Núcleo B	Núcleo C
$\delta\text{C-1}$	101,6	98,3
$\Delta\delta(\text{C3-C4})$	47,1	43,0
$J_{\text{H1,H9}}$	9 Hz	6,5 Hz
$\delta\text{H-1}$	4,96	5,08
	▼	▼
	6 $\alpha$	6 $\beta$

Os epímeros em C-6 foram identificados como 6 $\alpha$  - núcleo B e 6 $\beta$  - núcleo C.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de pares epiméricos 6-O-substituído mostra claramente que a epimerização no carbono 6 influencia os deslocamentos químicos dos carbonos 3( $\gamma$ ) e 4( $\beta$ ). Quando se muda a configuração de 6 $\beta$ -OH para 6 $\alpha$ -OH, é possível notar variação nos carbonos 3 (ca + 1,5 ppm) e 4 (ca - 3,0 ppm). O cálculo da diferença dos deslocamentos entre C-3 e C-4 permite concluir que esta diferença

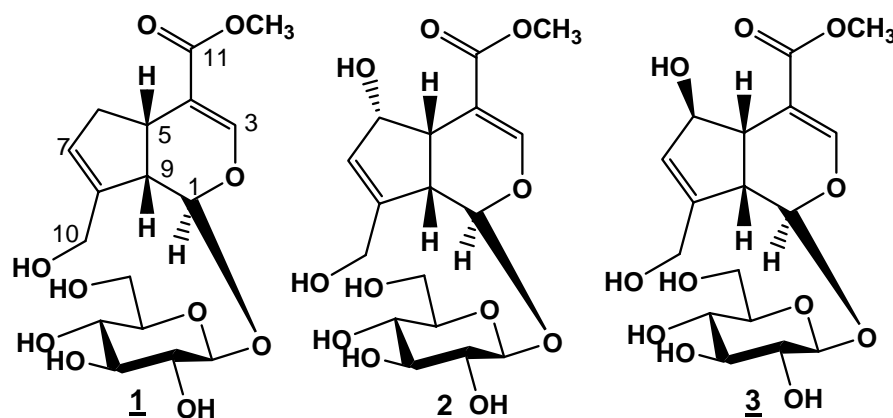
é maior, em todos os casos, para o epímero 6 $\alpha$  do que para o correspondente epímero 6 $\beta$ . Ainda, quando se passa de 6 $\alpha$ -OH para 6 $\beta$ -OH, é observado uma proteção de C-1 (ca 0,6 – 4,9 ppm), desproteção de H-1 e uma variação na constante de acoplamento  $J_{1,9}$  ( $J_{1,9}$  é maior para 6 $\alpha$ -hidroxi, sendo na maioria dos casos  $J \geq 8$  Hz).

Através do experimento NOESY 2D (Figura 85, p. 178) foi possível definir qual unidade glicosídica está ligada a qual núcleo iridoídico, como mostra a tabela 5:

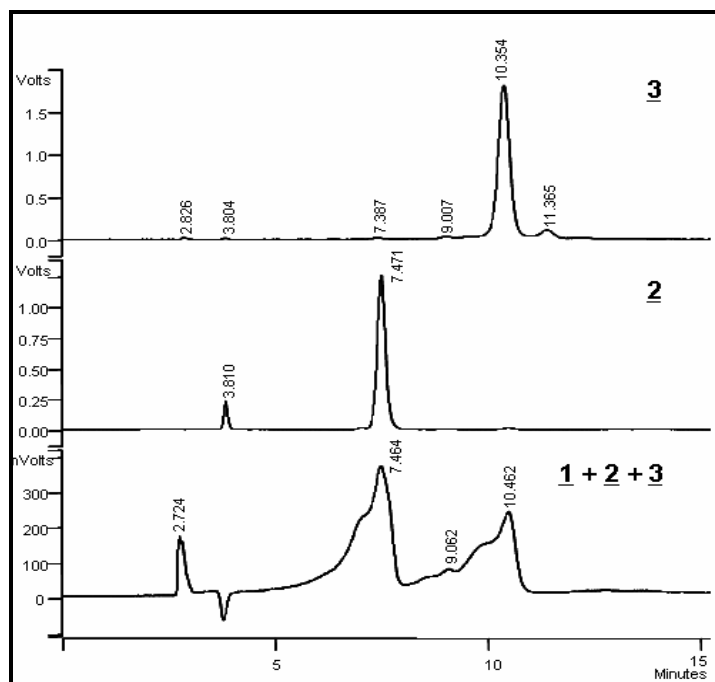
**Tabela 5.** Correlações observadas no experimento NOESY 2D

	$\delta$ H-1	$\delta$ H-1'	Substância
Núcleo A	5,05	4,62	<u>1</u>
Núcleo B	4,96	4,62	<u>2</u>
Núcleo C	5,08	4,57	<u>3</u>

Desta forma, o conjunto dos dados obtidos dos experimentos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , gHMQC, gHMBC, TOCSY 1D e NOESY 2D (tabela 6) e os critérios da literatura para identificar os epímeros em C-6 (DAMTOFT *et al.*,1981), permitiram que as substâncias da mistura fossem identificadas como geniposídeo 1, 6 $\alpha$ -hidroxigeniposídeo 2 e 6 $\beta$ -hidroxigeniposídeo 3.



A mistura de iridoídeos 1, 2 e 3 foi comparada, via CLAE (Figura 33), com as substâncias 2 e 3, isoladas, posteriormente, durante o fracionamento do extrato em AcOEt de *A. macrophylla*.



**Figura 33.** Cromatogramas obtidos para a mistura de iridóides 1 + 2 + 3 ( $t_r = 2,724$  não se refere a 1) e para as substâncias puras 2 e 3. Condições: Coluna  $C_{18}$ , modelo Luna (2) (Phenomenex®) de 250 x 4,6 mm, partículas com tamanho de 5  $\mu\text{m}$ ,  $F = 1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $\lambda = 235 \text{ nm}$  e sistema de solventes MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  17:83 (v/v).

Tabela 6. Dados de RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  e gHMBC para as substâncias **1**, **2** e **3** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ )\*

nº H/C	1			2			3		
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	gHMBC	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	gHMBC	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	HMBC
1	5,05 (d; 8,0)	98,2	36,8/ 100,3	4,96 (d; 8)	101,6	101,5/ 151,4	5,08 (d; 6,5)	98,3	45,8/ 100,3/ 147,5/ 153,8
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	7,38 (s)	152,8	98,2/ 36,8/ 112,0/ 170,0	7,55 (d; 1)	155,3	100,5/ 108,2/ 169,0	7,41 (d; 1)	153,8	98,3/ 110,8/ 169,4
4	-	112,0	-	-	108,2	-	-	110,8	-
5	3,07 (q; 8,0)	36,8	-	2,92 (t; 8)	45,6	-	2,88-2,92 (m)	43,4	-
6	2,00 (dd; 8,0 e 16,5) 2,75 (dd; 8,0 e 16,5)	-	-	4,69 (d; 8)	75,4	45,6	4,44 (m)	82,3	128,4
7	5,70 (d; 1,5)	130,1	-	5,92 (d; 1,5)	129,8	-	5,71 (d; 1,5)	128,4	82,3
8	-	144,8	-	-	151,4	-	-	147,5	-
9	2,61 (t; 8,0)	47,1	144,8	2,47 (t; 8)	39,7	-	2,88-2,92 (m)	45,8	-
10	4,10 (d; 12,5) 4,21 (d; 12,5)	61,4	-	4,11 (d; 14,2) 4,39 (d; 14,2)	61,8	-	4,08 (d; 15,5) 4,23 (d; 15,5)	61,0	128,4/ 147,5
11	-	170,0	-	-	169,0	-	-	169,4	-
-OCH <sub>3</sub>	3,65	52,0	170,0	3,61	51,7	169,0	3,64	51,8	169,4
1'	4,62 (d; 7,5)	100,3	98,2	4,62 (d; 7,5)	100,5	101,6	4,57 (d; 8)	100,3	98,3
2'	3,16 -3,31 (m)	74,8	-	3,16 -3,31 (m)	74,9	-	3,17 - 3,28 (m)	74,8	-
3'	3,16 -3,31 (m)	78,4	-	3,16 -3,31 (m)	78,3	-	3,17 - 3,28 (m)	78,4	-
4'	3,14 (t; 7,5)	71,5	-	3,13 (t; 8 Hz)	71,6	-	3,11 (t; 8)	71,5	-
5'	3,16 -3,31 (m)	77,9	-	3,16 -3,31 (m)	78,0	-	3,17 - 3,28 (m)	77,9	-
6'	3,54 (dd; 4,5 e 11,5) 3,76 (d; 11,5)	62,7	-	3,52 (dd; 4,5 e 11,5) 3,74 (d; 11,5)	62,8	-	3,54 (dd; 3,5 e 11) 3,76 (d; 11)	62,7	-

\* $\delta$  em ppm. Multiplicidade e constante de acoplamento (J em Hz) entre parênteses.

#### 4.3.1.2. Substância 4: gardenosídeo

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da subfração 3.2 do extrato em AcOEt de *A. macrophylla* (Figura 94, p.187) apresentou sinal em  $\delta$  7,31 (*d*; 1,5 Hz, 1H) característico de hidrogênio olefínico H-3 (hidrogênio  $\beta$ -carbonílico) do núcleo dos iridóides carbocíclicos. A presença de um duplo dubleto em  $\delta$  6,00 (2,8 e 5,5 Hz, 1H) e um outro duplo dubleto em  $\delta$  5,70 (1,5 e 5,5 Hz, 1H) característicos de hidrogênios olefínicos, sugerem a presença de uma ligação dupla no anel pentacíclico. Em  $\delta$  5,70 (*d*, 2 Hz, 1H) observa-se o sinal do hidrogênio H-1 e em  $\delta$  3,64 (3H), o singlete referente aos hidrogênios metílicos de um grupo metoxila.

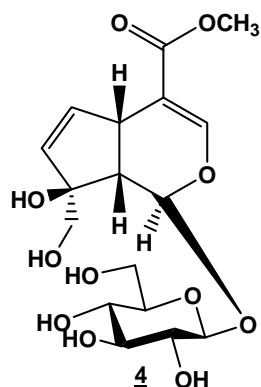
A análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 96, p. 189), DEPT 90° e 135° (Figuras 97 e 98, p. 190) e gHMQC (Figuras 99 e 100, p. 191 e 192) confirmou a presença de uma ligação dupla trissubstituída e uma ligação dupla dissubstituída, através dos deslocamentos químicos dos carbonos em  $\delta$  150,0 (CH) e 109,5 (C) e em  $\delta$  132,3 (CH) e 136,4 (CH), respectivamente. Foi observado ainda, em  $\delta$  166,4, o sinal de um carbono carbonílico característico de éster conjugado e em  $\delta$  84,3 o sinal de um carbono carbinólico quaternário.

A presença de uma unidade glicosídica foi confirmada pelo sinal do hidrogênio anomérico em  $\delta$  4,46 (*d*; 8 Hz, 1H), pelos carbonos carbinólicos em  $\delta$  60,8; 69,8; 72,9; 76,6; 77,2 e pelo carbono anomérico em  $\delta$  97,9. A localização da  $\beta$ -glicose na aglicona, configuração definida pelo valor da constante de acoplamento, foi definida pela correlação existente entre o hidrogênio anomérico em  $\delta$  4,46 e o carbono C-1 ( $\delta$  91,9) do iridóide, através do mapa de correlação gHMBC (Figuras 101 e 102, p. 193 e 194).

A presença dos sinais em  $\delta$  65,5 (CH<sub>2</sub>) e em  $\delta$  84,3 (C) levou a sugerir a existência de duas hidroxilas neste iridóide, uma na posição 10 e outra na posição 8, respectivamente. No espectro NOESY 1D (Figura 95, p. 188) a irradiação do sinal em  $\delta$  2,46 (H-9) mostrou interação apenas com H-5 ( $\delta$  3,5) e portanto, a estereoquímica do carbono 8 foi proposta como S (EL-NAGGAR, BEAL, 1980).

O conjunto dos dados obtidos (Tabela 7) caracteriza a substância **4** como sendo gardenosídeo e está de acordo com a fórmula molecular C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>11</sub>, obtida a partir dos fragmentos fornecidos pela espectrometria de massas (Figura 103, p. 194),  $m/z$  439 [M - H + 2 H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>,  $m/z$  403 [M - H]<sup>-</sup> e  $m/z$  241 [M - 162 - H]<sup>-</sup>.





#### 4.3.1.3. **Substância 5: éster metílico shanzhisideo**

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 5 (Figuras 104-106, p.195-197) sugeriu tratar-se de um iridóide glicosilado pela presença dos hidrogênios em  $\delta$  7,32 (*d*; 1,5 Hz, 1H) e  $\delta$  5,47 (*d*, 2 Hz, 1H), característicos de H-3 e H-1, respectivamente, do núcleo diidropirano e a  $\beta$ -glicose pelo hidrogênio anomérico em  $\delta$  4,45 (*d*, 8 Hz, 1H). Foi observado também hidrogênios de metoxila em  $\delta$  3,65 (*s*, 3H) e de metila em  $\delta$  1,1 (*s*, 3H) e os demais sinais correspondendo a hidrogênios alifáticos, oximetínicos e oximetilênicos. Não foi observado hidrogênio olefínico em torno de  $\delta$  5,6 – 5,8, característico de H-7 do anel pentacíclico, sugerindo que este anel esteja saturado.

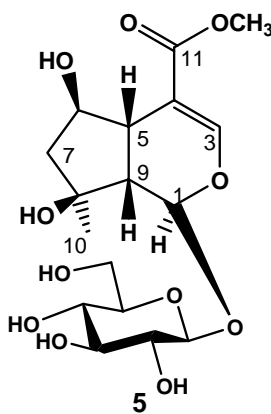
Todos estes dados foram confirmados pela análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 109, p.199) e DEPT  $135^\circ$  e  $90^\circ$  (Figuras 110 e 111, p. 200). Foram observados sinais de carbonos em  $\delta$  92,7 (CH) atribuído a C-1; em  $\delta$  97,4 (CH) a C-1'; em  $\delta$  109,5 (C) e 150,9 (CH) os carbonos olefínicos correspondentes a C-4 e C-3, respectivamente; carbono carbonílico em  $\delta$  167,1 (C-11) e os carbonos metílicos em  $\delta$  51,0 (OCH<sub>3</sub>) e em  $\delta$  24,5 (C-10).

A existência de dois carbonos carbinólicos, sendo um metínico em  $\delta$  74,8 e outro quaternário em  $\delta$  76,8 sugere a presença de duas hidroxilas no anel pentacíclico do iridóide. A interação observada, no mapa de correlação *g*HMBC (Figuras 114 e 115, p. 203 e 204), entre H-10 ( $\delta$  1,1) e o carbono em  $\delta$  76,8 sugere que a posição 8 esteja substituída pela hidroxila e pela metila. A interação de H-10 ( $\delta$  1,1) e o carbono 7 ( $\delta$  48,9 - CH<sub>2</sub>) sugere que a posição 6 (C em  $\delta$  74,8 e H em  $\delta$  3,92) esteja substituída pela segunda hidroxila.

A estereoquímica de C-6, definida como  $\beta$ -OH, foi baseada, segundo DAMTOFT (1981), em: i) C-1 em  $\delta$  92,7; ii)  $\Delta\delta$  (C3-C4) = 41,4; iii)  $J_{1,9}$  = 2,0 Hz; iv) H-1 em  $\delta$  5,47, como visto para a determinação dos epímeros 2 e 3.

No espectro de NOESY 1D (Figura 107, p. 197), a irradiação de H-7 em  $\delta$  1,82 mostra interação com H-6 em  $\delta$  3,92, já definido com  $6\alpha$ -H, e com H-10 em  $\delta$  1,1, permitindo definir então, que a metila C-10 também esteja em posição  $\alpha$ .

Assim, a substância 5 foi caracterizada como éster metílico shanzhisideo (TAKEDA *et al.*, 1977), tendo a fórmula molecular  $C_{17}H_{26}O_{11}$ , confirmada pela espectrometria de massas (Figura 116, p. 205), através dos fragmentos em  $m/z$  441  $[M - H + 2 H_2O]^+$ ,  $m/z$  405  $[M - H]^+$  e  $m/z$  243  $[M - H - 162]^+$  e pelos dados de RMN de  $^1H$ ,  $^{13}C$ , gHMBC (Figuras 112 e 113, p. 201 e 202), gCOSY (Figura 108, p. 198) e gHMBC (Tabela 7).



#### 4.3.1.4. Substância 6: éster metílico $6\beta$ -hidroxi-7-epi-gardosideo

O espectro de RMN de  $^1H$  da substância 6 (Figuras 117 e 118, p. 206 e 207) apresentou sinais característicos de iridóide glicosilado pela presença de hidrogênio em  $\delta$  7,34 (*d*, 1 Hz, 1H) característico do hidrogênio olefínico H-3 do anel diidropirano, de hidrogênio em  $\delta$  5,61 (*d*, 2 Hz, 1H) referente ao H-1 e de sinal em  $\delta$  4,41 (*d*, 8 Hz, 1H) referente ao hidrogênio anomérico de  $\beta$ -glicose. Além disso, foi observado hidrogênios de metoxila em  $\delta$  3,64 (*s*, 3H), hidrogênios olefínicos em  $\delta$  5,21 (*d*; 2,5 Hz, 2H) e dois singletos largos, um em  $\delta$  4,02 e outro em  $\delta$  4,08, característicos de hidrogênios oximetínicos.

A análise dos espectros de RMN de  $^{13}C$  (Figura 119, p. 208) e DEPT  $90^\circ$  e  $135^\circ$  (Figuras 120 e 121, p. 209) confirmou a presença de ligação dupla conjugada a carbonila com os sinais em  $\delta$  152,2 (CH), 107,9 (C) e 166,3 (C), de carbono

oximetílico em  $\delta$  50,9 e de dupla exocíclica em  $\delta$  150,4 (C) e 110,0 (CH<sub>2</sub>), sendo esta entre os carbonos 8 e 10 do núcleo pentacíclico. Foi observado ainda dois carbonos oximetínicos em  $\delta$  73,5 e 73,7, sendo então atribuídos aos carbonos 6 e 7, uma vez que os carbonos 5 e 9 não estão substituídos ( $\delta$  35,5 C-5 e  $\delta$  41,8 C-9).

A estereoquímica de C-6 foi definida como  $\beta$ -OH baseada em: i) C-1 em  $\delta$  98,4; ii)  $\Delta\delta$  (C3-C4) = 44,3; iii)  $J_{1,9} = 2,0$  Hz; iv) H-1 em  $\delta$  5,61, como descrito por DAMTOFT (1981). A constante de acoplamento observada para H-6 (*s*) sugere que a interação com H-7 seja pequena ( $J \leq 1$  Hz), correspondendo a um ângulo diedral de cerca de 90°, e concluindo que a hidroxila em C-7 está em  $\alpha$ ; estereoquímica oposta ao iridóide éster metílico 6 $\beta$ -hidroxi-7-*epi*-gardosideo descrito na literatura por DAMTOFT (1994).

Assim, a substância **6** foi caracterizada como éster metílico 6 $\beta$ -hidroxi-7-*epi*-gardosideo, tendo a fórmula molecular C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>11</sub>, confirmada pela espectrometria de massas (Figura 127, p. 214) através dos fragmentos em  $m/z$  439 [M – H + 2 H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>,  $m/z$  403 [M – H]<sup>-</sup> e  $m/z$  241 [M – H – 162]<sup>-</sup> e pelos dados de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, gHMQC (Figura 122-124, p. 210-212) e gHMBC (Tabela 7), sendo relatado pela primeira vez na literatura.

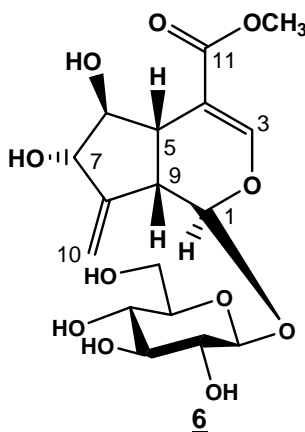


Tabela 7. Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e gHMBC para as substâncias **4**, **5** e **6** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ )\*

nº H/C	<b>5</b>		<b>6</b>		<b>4</b>	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	5,47 (d; 2)	92,7 (CH)	5,61 (d; 2)	95,0 (CH)	5,70 (d; 2)	91,9 (CH)
3	7,32 (d; 1,5)	39,0/ 92,7/ 109,5/ 167,0	7,34 (d; 1)	152,2 (CH)	7,31 (d; 1,5)	150,0 (CH)
4	-	109,5 (C)	-	107,9(C)	-	109,5 (C)
5	2,82 (dd; 2,5 e 10)	39,0 (CH)	2,81 (di; 8)	35,5 (CH)	3,50 (m)	36,6 (CH)
6	3,92 (m)	74,8 (CH)	4,08 (s)	73,7 (CH)	6,00 (dd; 2,8 e 5,5)	132,3 (CH)
7	7 $\beta$ 1,67 (dd; 5,5 e 13) e 7 $\alpha$ 1,82 (dd; 6 e 13)	24,5/ 39,0/ 49,8/ 74,8/ 76,8	4,02 (s)	73,5 (CH)	5,70 (dd; 1,5 e 5,5)	136,5 (CH)
8	-	76,8 (C)	-	150,4 (C)	-	84,3 (C)
9	2,45 (dd; 2 e 10)	49,8 (CH)	3,13 (m)	41,8 (CH)	2,46 (m)	50,5 (CH)
10	1,1 (s)	24,5 (CH <sub>3</sub> )	5,21 (d; 2,5)	110,0 (CH <sub>2</sub> )	3,40 (m)	65,5 (CH <sub>2</sub> )
11	-	167,0 (C)	-	166,3 (C)	3,70 (m)	3,70 (m)
-OCH <sub>3</sub>	3,65 (s)	51,0 (CH <sub>3</sub> )	3,64 (s)	50,9 (CH <sub>3</sub> )	3,64 (s)	50,9 (CH <sub>3</sub> )
1'	4,45 (d; 8)	97,4 (CH)	4,41 (d; 8)	98,4 (CH)	4,46 (d; 8)	97,9 (CH)
2'	2,94	73,0 (CH)	2,94	72,9 (CH)	2,96 (m)	72,9 (CH)
3'	-	76,6 (CH)	3,13 (m)	76,6 (CH)	3,10 - 3,20 (m)	77,2 (CH)
4'	3,04	69,9 (CH)	3,03 (t; 9)	70,0 (CH)	3,08 (m)	69,8 (CH)
5'	-	77,2 (CH)	-	77,2 (CH)	3,10 - 3,20 (m)	76,6 (CH)
6'	3,70 3,4 (m)	61,0 (CH <sub>2</sub> )	3,44 (dd; 6 e 11,5) e 3,68 (dd; 5 e 11,5)	61,0 (CH <sub>2</sub> )	3,42 (m) 3,70 (m)	60,8 (CH <sub>2</sub> )

\* $\delta$  em ppm. Multiplicidade e constante de acoplamento (J em Hz) entre parênteses.

#### 4.3.1.5. Substância **7** e **8**: ácido geniposídico e ixosídeo

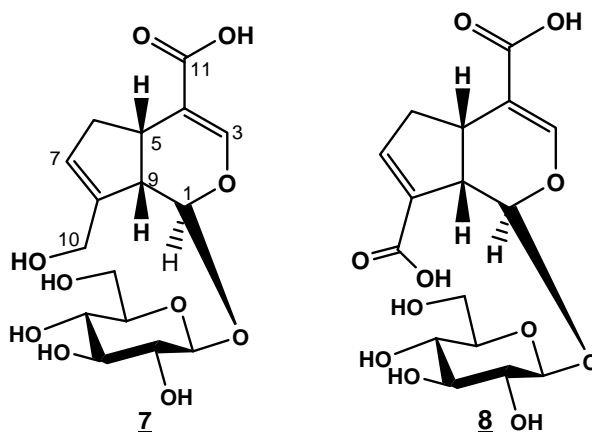
Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **7** e **8** (Figura 128, p. 215 e figuras 136 e 137, p. 223 e 224) apresentaram sinais em  $\delta$  7,23 (*d*, 1 Hz, 1H) e em  $\delta$  7,33 (*s*, 1H), respectivamente, correspondendo ao hidrogênio olefínico H-3 do núcleo ciclopentanodiidropirano de iridóides. Este hidrogênio olefínico apresenta deslocamento químico atípico por estar em posição  $\beta$  a carbonila. Foi observado ainda um singlete largo em  $\delta$  5,68 (**7**) e em  $\delta$  6,76 (**8**) referente ao hidrogênio olefínico do anel pentacíclico. Os demais sinais presentes nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias são referentes à hidrogênios alifáticos, oximetínicos e oximetilênicos.

A análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 130, p. 217 **7** e figura 138, p. 225 **8**) e DEPT  $135^\circ$  e  $90^\circ$  (Figura 131, p. 218 **7** e figuras 139 e 140, p. 226 **8**) confirmou a presença de duas ligações duplas trissubstituídas, pelos carbonos em  $\delta$  150,3 (CH)/ 118,5 (C) e  $\delta$  128,4 (CH)/ 144,9 (C) para **7** e em  $\delta$  151,0 (CH)/ 111,3 (C) e  $\delta$  145,5 (CH)/ 134,6 (C) para **8**. O deslocamento químico do carbono em  $\delta$  145,5 (CH) para a substância **8** sugere que este carbono esteja em posição  $\beta$  num sistema de ligação dupla conjugada a carbonila. Isto se confirma pela presença do sinal em  $\delta$  165,5 característico de uma carboxila e pela interação observada, no mapa de correlação gHMBC (Figuras 143 e 144, p. 229 e 230), com o hidrogênio do sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado em  $\delta$  6,76. Foram observados também, outros sinais de carbonos carbonílicos em  $\delta$  175,7 para **7** e em  $\delta$  167,8 para **8**, concluindo que existe grupo carboxila em C-11. Apesar do deslocamento químico não usual de proteção para o carbono 11 (grupo carboxílico), esta função foi confirmada pela espectrometria de massas (Figura 145, p. 230), onde se observa aduto com sódio em  $m/z$  411 e aduto com potássio em  $m/z$  427, correspondente a fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$ , confirmando assim, duas funções ácidas para a substância **8**.

A presença da unidade glicosídica foi confirmada pela existência dos hidrogênios anoméricos em  $\delta$  4,61 (*d*; 8,5 Hz, 1H) para **7** e em  $\delta$  4,43 (*d*, 8 Hz, 1H) para **8**, e pelos carbonos em  $\delta$  100,2 e 98,8, respectivamente. A localização da  $\beta$ -glicose foi definida pela correlação existente entre H-1' ( $\delta$  4,61) e C-1 ( $\delta$  97,9) para **7** e H-1' ( $\delta$  4,43) e C-1 ( $\delta$  93,3) para **8**, através do mapa de correlação gHMBC.

Assim, o conjunto dos dados adquiridos (Figuras 128-135, p. 215-222 **7** e figuras 136-145, p. 223-230 **8**) (Tabela 8) e a comparação com a literatura (EL

NAGGAR, BEAL, 1980) caracterizam a substância **7** como o ácido geniposídico e a substância **8** como ixosídeo.



O isolamento das substâncias **1** (geniposídeo) e **4** (gardenosídeo) está de acordo com os estudos realizados por INOUE e colaboradores (1988), em que as espécies pertencentes à subfamília Ixoroideae, neste caso as espécies de *Alibertia*, contêm como marcador quimiotaxonômico os iridóides gardenosídeo e geniposídeo.

Tabela 8. Dados de RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  e gHMBC da substância **7** e **8** ( $\text{CD}_3\text{OD}$  **7** e  $\text{DMSO-}d_6$  **8**, 500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ )\*

nº H/C	<b>7</b>			<b>8</b>		
	$^1\text{H}$ **	$^{13}\text{C}$	gHMBC	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	gHMBC
<b>1</b>	5,00 (d; 8)	97,9 (CH)	37,3/100,2	5,80 (d; 1)	93,3 (CH)	32,2/98,8/111,3/134,6/151,0
<b>3</b>	7,23 (d; 1)	150,3 (CH)	37,3/97,9/118,5/ 175,7	7,33 (s)	151,0 (CH)	32,2/93,3/ 111,03/ 167,8
<b>4</b>	-	118,5 (C)		-	111,3 (C)	
<b>5</b>	3,12 (q, 8)	37,3 (CH)	39,9/150,3	3,16 (m)	32,2 (CH)	
<b>6</b>	1,99 (dd, 8 e 16,5) 2,74 (dd, 8 e 16,5)	39,9 (CH <sub>2</sub> )		2,39 (dd; 2,5 e 18) 2,80 (m)	38,2 (CH <sub>2</sub> )	
<b>7</b>	5,68 (s)	128,4 (CH)		6,76 (s)	145,5 (CH)	32,2/ 46,4/ 165,5
<b>8</b>	-	144,9 (C)		-	134,6 (C)	
<b>9</b>	2,59 (t, 8)	47,3 (CH)	39,9/97,9/128,4/ 144,9	3,16 (m)	46,4 (CH)	145,5
<b>10</b>	4,08 (d; 14) 4,20 (d; 14)	61,5 (CH <sub>2</sub> )	128,4/144,9	-	165,5 (C)	
<b>11</b>	-	175,7 (C)		-	167,8 (C)	
<b>1'</b>	4,61 (d; 8,5)	100,2 (CH)	97,9	4,43 (d; 8)	98,8 (CH)	93,3
<b>2'</b>	3,12 (t, 8,5)	74,9 (CH)	100,2	2,96 (t, 8)	73,0 (CH)	98,8/ 76,7
<b>3'</b>	3,29 (t, 8,5)	77,8 (CH)	71,5	3,27 (m)	76,7 (CH)	
<b>4'</b>	3,18 (m)	71,5 (CH)		3,10 (m)	69,8 (CH)	76,7/ 60,8
<b>5'</b>	3,18 (m)	78,3 (CH)	77,8	3,14 (m)	77,0 (CH)	69,8
<b>6'</b>	3,55 (dd; 5 e 12) 3,75 (dd; 1,5 e 12)	62,6 (CH <sub>2</sub> )	78,3	3,47 (dd; 5 e 12) 3,66 (m)	60,8 (CH <sub>2</sub> )	77,0

\* $\delta$  em ppm. Multiplicidade e constante de acoplamento (J em Hz) entre parênteses.

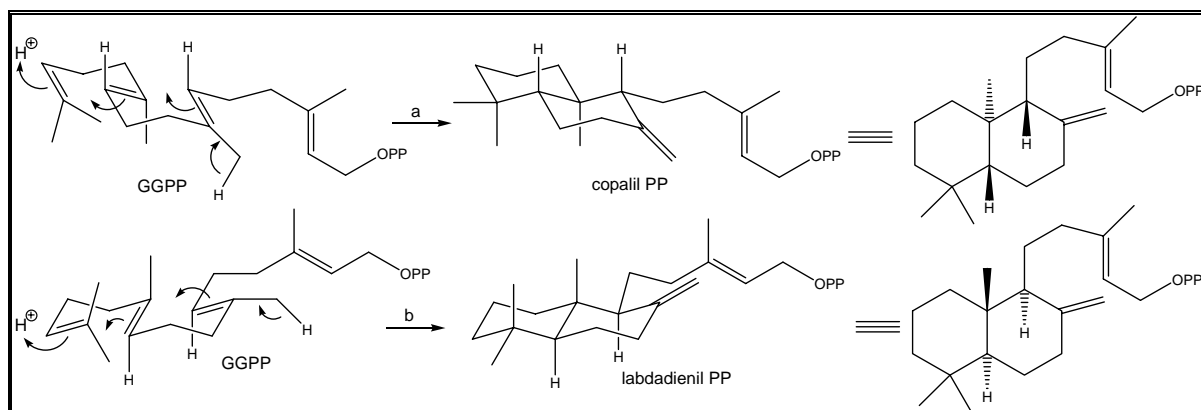
\*\*Algumas multiplicidades foram determinadas com base no espectro de TOCSY 1D.

### 4.3.2. Diterpeno

Os diterpenos se originam do geranyl-geranyl difosfato (GGPP), que é formado pela adição de uma molécula de IPP ao farnesil difosfato. Um dos mais simples e mais importante diterpeno é o fitol, uma forma reduzida do geranylgeraniol, que forma a cadeia lateral lipofílica das clorofilas (DEWICK, 1997b).

Em contraste ao mecanismo de ciclização, onde a perda do difosfato gera o carbocátion inicial, muitos diterpenos naturais originam-se por um mecanismo diferente. A ciclização inicial ocorre pela protonação da ligação dupla da cabeça da cadeia e a perda posterior do difosfato que facilita a ciclização.

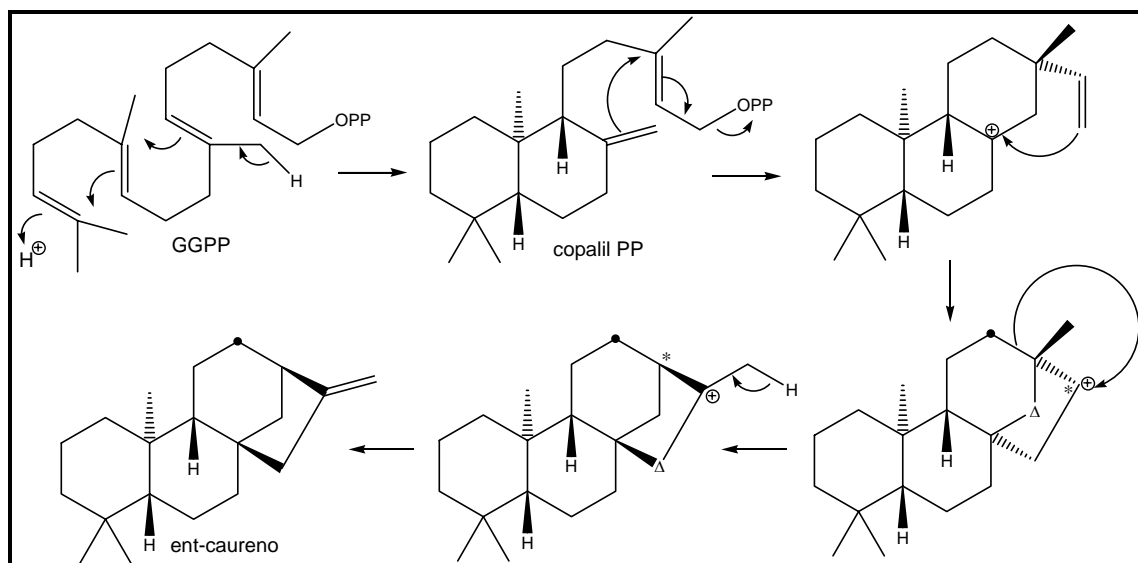
A protonação do GGPP pode iniciar uma seqüência de ciclização concertada, terminando pela com a perda de um próton de uma metila resultando no copalil PP. A estereoquímica deste produto é controlada pelo encaixe do substrato na superfície da enzima, no entanto, um encaixe alternativo pode levar ao labdadienil PP, o produto enantiomérico (Figura 34).



**Figura 34.** Estereoisômeros formados pela ciclização do GGPP (DEWICK, 1997b).

A partir do copalil PP, uma seqüência de ciclizações e rearranjo levam ao *ent*-caureno. O processo envolve a saída do grupo difosfato e a formação de carbocátion no terceiro anel, com subsequente formação do quarto anel. Uma migração de Wagner-Meerwein leva a contração de um anel de 6 membros a um de 5 membros, enquanto expande outro anel de 5 membros a um de 6 membros. A perda do próton da metila vizinha ao carbocátion, origina a dupla exocíclica do *ent*-caureno (Figura 35) (DEWICK, 1997b).





**Figura 35.** Esquema da ciclicação do GGPP, via copalil PP, para formação de *ent*-caureno.

Uma série de etapas envolvendo oxidação, hidroxilação e contração de anel, a partir do *ent*-caureno, levam a produção do esqueleto básico das giberilinas, que possuem o papel de hormônio do crescimento nas plantas.

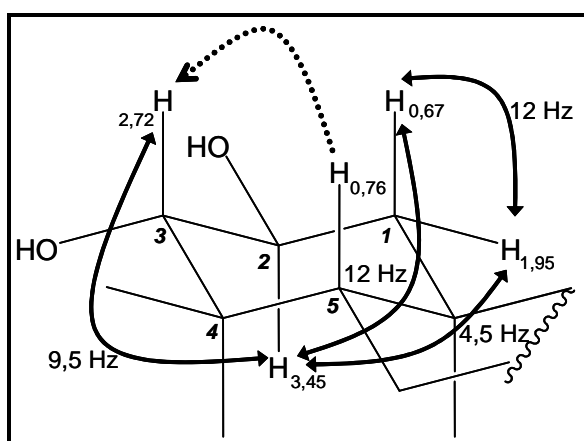
#### 4.3.2.1. **Substância 9: 2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -triidroxí-*ent*-caurano**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **9** (Figura 146, p. 231) mostrou apenas sinais na região diamagnética, sendo observados os singletos em  $\delta$  0,69; 0,90; 1,00 e 1,22 referentes a hidrogênios metílicos. Os demais sinais se referem à hidrogênios metínicos e metilênicos, não sendo observados hidrogênios olefínicos.

Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 149 e 150, p. 233) e DEPT 135 $^\circ$  e 90 $^\circ$  (Figuras 151 e 152, p. 234) foram observados 20 sinais, levando-nos a propor a estrutura de um diterpeno para esta substância. As quatro metilas foram confirmadas pelos carbonos em  $\delta$  16,8; 18,7; 24,3 e 28,9. A presença de 7 carbonos metilênicos, 5 metínicos e 4 quaternários, sendo 3 metínicos e 1 quaternário carbinólicos e comparação com estruturas descritas na literatura (DELGADO *et. al*, 1985; SAKAI, NAKAGAWA, 1983) (Tabela 9), levou-nos a sugerir o esqueleto de um diterpeno do tipo *ent*-caurano, onde as posições 2, 3 e 16 encontram-se hidroxiladas.

Pela biossíntese, H-5 ( $\delta$  0,76) tem configuração  $\beta$  (axial) e ao ser irradiado no experimento de NOESY 1D (Figura 148, p. 232), mostra interação espacial com hidrogênio em  $\delta$  2,72, atribuído a H-3 (Figura 36), estando este portanto, também em  $\beta$  (axial).

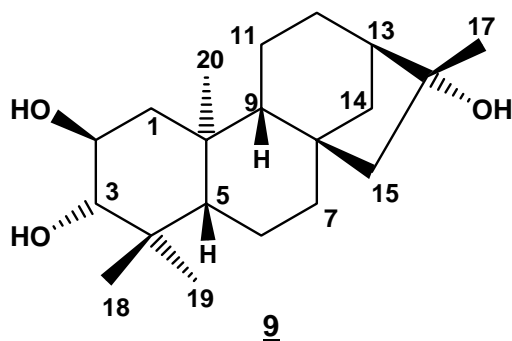
A estereoquímica relativa de C-2 foi determinada baseando-se nos valores das constantes de acoplamento dos hidrogênios H-2 e H-3, conforme espectro de TOCSY (Figura 147, p. 232). A constante de 9 Hz observada para H-3 ( $\delta$  2,72; *d*) e H-2 ( $\delta$  3,45; *ddd*) indica que estes hidrogênios encontram-se em axial e como foi proposto que H-3 estaria em  $\beta$ , temos portanto, o sistema  $2\beta,3\alpha$ -(OH)<sub>2</sub>. A estereoquímica de C-16 foi atribuída por comparação com dados da literatura.



**Figura 36.** Interações observadas nos experimentos de NOESY 1D (.....) e TOCSY 1D (—).

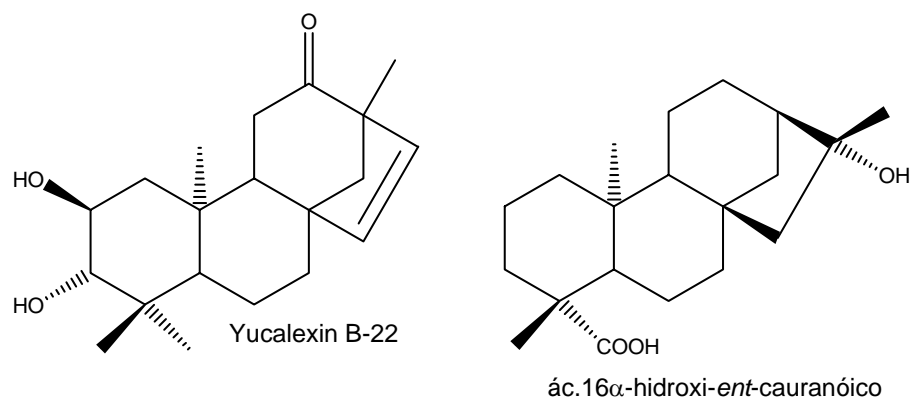
A fórmula molecular proposta, pelos dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , *g*HMQC (Figuras 153-155, p. 235-237), *g*HMBC (Figuras 156-158, p. 238-240) e DEPT (Tabela 9),  $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_3$ , foi confirmada pela espectrometria de massas (Figura 159, p. 240), através da observação do aduto com sódio em *m/z* 345,25, permitindo definir a substância **9** como  $2\beta,3\alpha,16\alpha$ -trihidroxi- *ent*-caurano. A estereoquímica *ent* foi deduzida pela comparação da rotação óptica de **9** com análogos na literatura (CONNOLLY, HILL, 1991).

De acordo com levantamento bibliográfico, não há registro deste diterpeno na literatura.



Dados complementares:

- ✓  $[\alpha]_D^{27} - 1,36$  (*c* 0,122; MeOH);
- ✓ Estado físico: sólido amarelo de baixo ponto de fusão



Análogos da literatura.

**Tabela 9.** Comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  e gHMBC para a substância **9** e diterpenos da literatura

nº H/C	Yucalexin B-22**		Ac.16 $\alpha$ -hidroxi-ent-cauranóico*		Substância 9 <sup>#</sup>	
	$^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	gHMBC
1	ax 0,93 (dd; 12 e 12) eq 1,82 (dd; 12 e 4,5)	44,2	39,4	ax 0,67 (dd; 12 e 12) eq 1,95 (dd; 12 e 4,5)	47,0 (CH <sub>2</sub> )	54,6/67,2 82,3
2	ax 3,65 (ddd; 12; 9,5 e 4,5)	68,5	19,0	ax 3,45 (ddd; 12; 9,5 e 4,5)	67,2 (CH)	
3	ax 3,00 (d; 9,5)	83,6	37,9	ax 2,72 (d; 9,5)	82,3 (CH)	16,8/28,9/38,8/67,2
4		39,2	43,1	-	38,8 (C)	
5	ax 0,97 (dd)	54,6	56,5	ax 0,76 (dl; 12)	54,6 (CH)	17,7/28,9/39,0
6		19,8	22,0	1,49 (m)	17,7 (CH <sub>2</sub> )	44,4
7		36,1	40,6	1,50 (m)	41,6 (CH <sub>2</sub> )	
8		49,2	44,9	-	44,4 (C)	
9		54,8	55,8	0,92 (m)	56,1 (CH)	
10		54,6	42,0	-	39,0 (C)	
11		36,2	18,1		19,8 (CH <sub>2</sub> )	
12		211,8	26,6	1,48 (m)	26,4 (CH <sub>2</sub> )	76,7
13		57,3	48,0	1,72 (m)	47,8 (CH)	26,4/57,5/76,7
14		58,3	37,2	1,52 (m) e 1,70 (m)	37,0 (CH <sub>2</sub> )	76,7
15		139,3	57,7	1,38 – 1,48 (m)	57,5 (CH <sub>2</sub> )	
16		136,4	77,4	-	76,7 (C)	
17		17,2	24,3	1,22 (s)	24,3 (CH <sub>3</sub> )	47,8/57,5/76,7
18		28,6	28,8	0,90 (s)	28,9 (CH <sub>3</sub> )	16,8/38,8/54,6/82,3
19		16,7	178,8	0,69 (s)	16,8 (CH <sub>3</sub> )	28,9/38,8/54,6/82,3
20		15,2	15,5	1,00 (s)	18,7 (CH <sub>3</sub> )	39,0/47,0/56,1

\* DELGADO et. al, 1985 (CDCl<sub>3</sub>). \*\* SAKAI et al., 1988 (CDCl<sub>3</sub>). # DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ .  
 $\delta$  em ppm. Multiplicidade e constante de acoplamento (J em Hz) entre parênteses.

### 4.3.3. Triterpenos

Espécies de *Alibertia* são conhecidas por serem ricas fontes de triterpenos pentacíclicos, especialmente do tipo oleanano e ursano (LUCIANO *et al.*, 2004; OLEA *et al.*, 1997; BROCHINI *et al.*, 1994; BOLZANI *et al.*, 1991). Este estudo veio confirmar os dados anteriores, uma vez que foram isolados 11 triterpenos dos caules de *Alibertia edulis*, *A. macrophylla* e *A. sessilis*. Além de triterpeno do tipo ursano e oleanano, foi isolado também um triterpeno derivado do cicloartano.

Os triterpenóides são um grupo de produtos naturais amplo e estruturalmente diverso, derivados do esqualeno ou precursores acíclicos de 30 carbonos. Com atividades biológicas bem caracterizadas incluem também os esteróides e saponinas. Este grupo exibe mais de 100 esqueletos distintos. A maioria dos triterpenóides são 6-6-6-5 tetracíclicos, 6-6-6-6-5 ou 6-6-6-6-6 pentacíclicos, mas acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos e hexacíclicos também têm sido isolados de fontes naturais (Figura 37) (XU *et al.*, 2004).

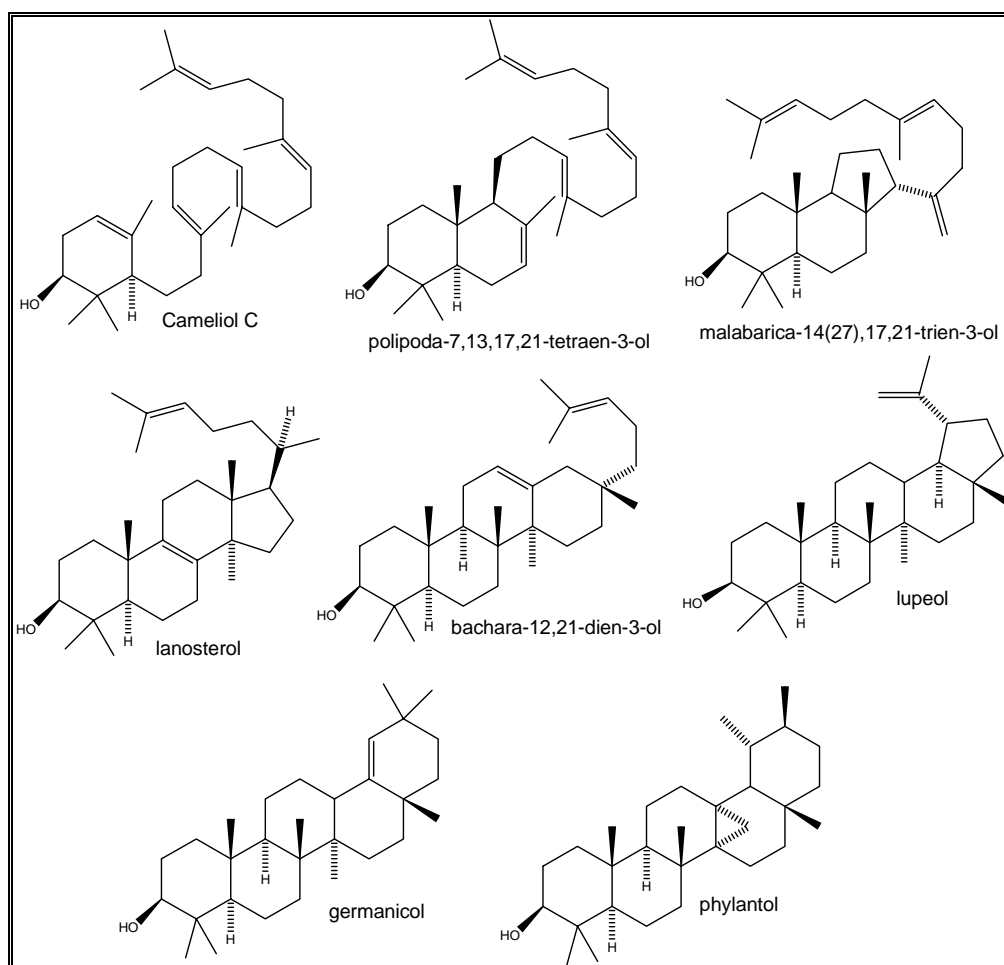


Figura 37. Exemplos dos diferentes esqueletos de triterpenos (XU *et al.*, 2004).

Os triterpenos não são formados pelo processo de adição de IPP para o crescimento da cadeia. Duas moléculas de farnesil PP são unidas cauda-cauda para produzir o hidrocarboneto esqualeno, via pré-esqualeno PP. A ciclização do esqualeno é via intermediário 2,3 óxido de esqualeno, produzido numa reação com  $O_2$  e NADPH. O óxido de esqualeno, na conformação cadeira-cadeira-cadeira-barco leva à formação do cátion damarenil. Através de rearranjo Wagner-Meerwein, um anel de seis membros é criado, em contrapartida, a formação de carbocátion secundário, levando a obtenção do cátion bacarenil. A partir deste, formação de anéis, migração de metilas ou hidretos e a perda de próton, levam a formação dos triterpenos lupeol,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, taraxasterol e germanicol, como mostra a figura 38 (DEWICK, 1997b):

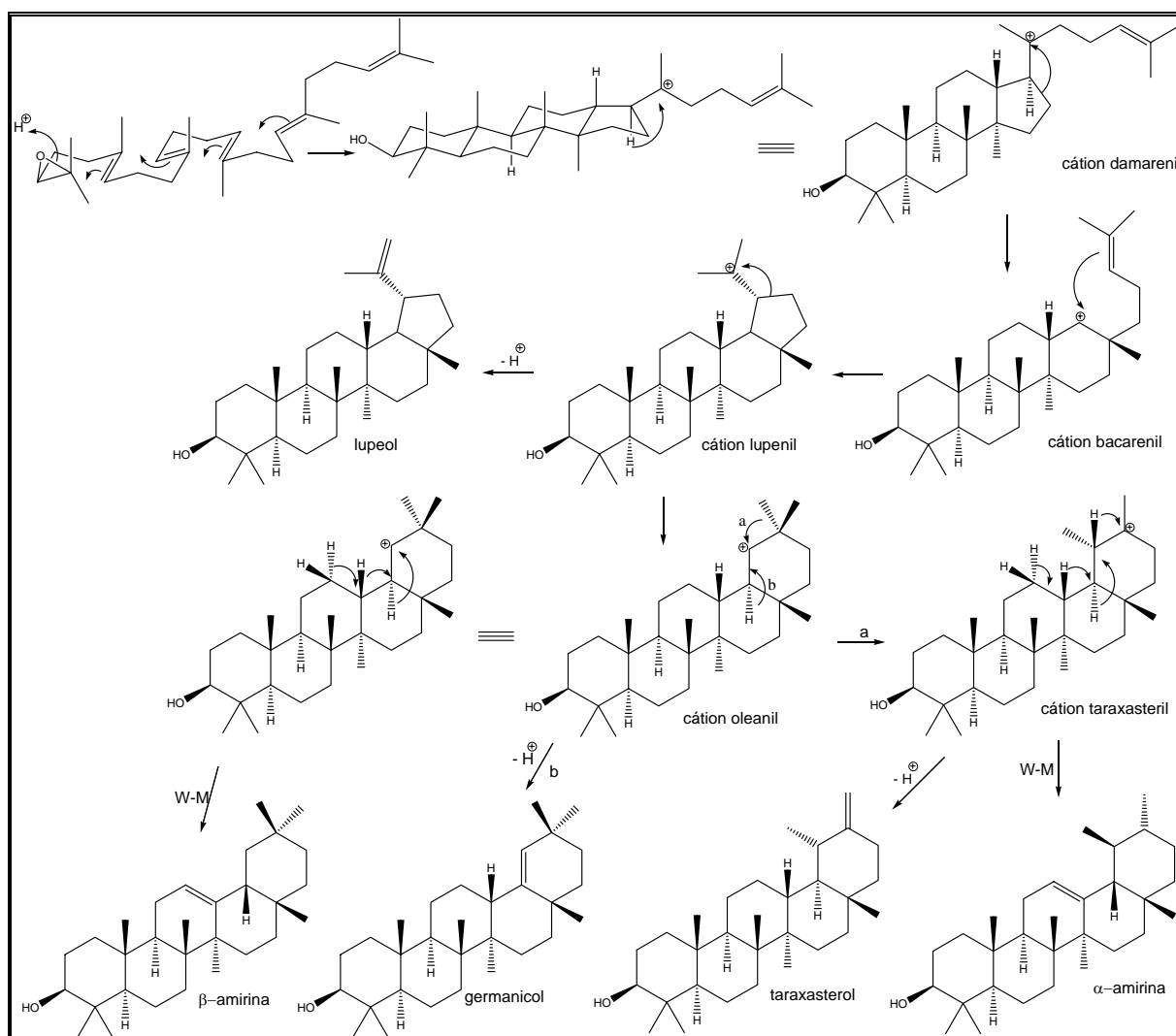


Figura 38. Rota biossintética para a formação de alguns triterpenos mais comuns.

Dentro da ampla variedade de triterpenos, existe uma quantidade significativa deles que pode ser considerado de estrutura simples, que apresenta como característica comum uma única ligação dupla, e apenas um grupo funcional oxigenado no C-3, ou neste carbono e em algum dos grupos metilas. Comumente vários deles ocorrem numa mesma espécie, formando misturas complexas. Em função da semelhança estrutural, esses triterpenos apresentam um comportamento cromatográfico muito semelhante, dificultando o isolamento e a posterior identificação dos constituintes da mistura.

O emprego de técnicas de RMN de  $^{13}\text{C}$ , como a obtenção de um espectro totalmente desacoplado, e das seqüências de DEPT  $90^\circ$  e  $135^\circ$ , permite a identificação dos componentes de misturas de triterpenos simples com a mesma funcionalização, através da comparação dos valores de deslocamento químico de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtidos, com os descritos na literatura, especialmente dos átomos de carbono que sustentam a ligação dupla, por serem característicos em alguns tipos de esqueletos (OLEA *et al.*, 1990).

Os triterpenos estão amplamente distribuídos no reino vegetal. Algumas plantas contêm grande quantidade deles no látex e na resina e a função fisiológica desses compostos, acredita-se ser de defesa química contra patógenos e herbívoros. No âmbito dos seres humanos e animais, há relatos de atividades antitumoral e anticancerígena, como por exemplo, o ácido ursólico que apresentou inibir tumores em peles de ratos e o ácido 23-hidroxi-3-oxo-urs-12-en-28-óico que apresentou atividade antiulcerogênica. Atividade antiinflamatória foi descrita para acetato de taraxasterol e para  $2\alpha,3\beta,23$ -trihidroxi-olean-12-eno, além de atividades antiviral e antibacteriana (MAHATO, SEN, 1997).

#### **4.3.3.1. Substâncias 10, 11, 12 e 13: $3\beta$ -O-acetil $\beta$ -amirina, $3\beta$ -O-acetil $\alpha$ -amirina, ácido oleanólico e ácido ursólico**

O congestionamento de sinais na região diamagnética do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  propõe que as substâncias em análise sejam triterpenos.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias 10 e 11 (Figuras 160 e 162, p. 241 e 242) e da mistura 12 e 13 (Figura 164, p. 243) apresentaram vários sinais entre  $\delta$  0,69 – 1,07 referentes aos hidrogênios metílicos, um sinal em  $\delta$  5,20 referente a hidrogênios olefínicos e dois multipletos em  $\delta$  4,4 (10 e 11) e em  $\delta$  3,2

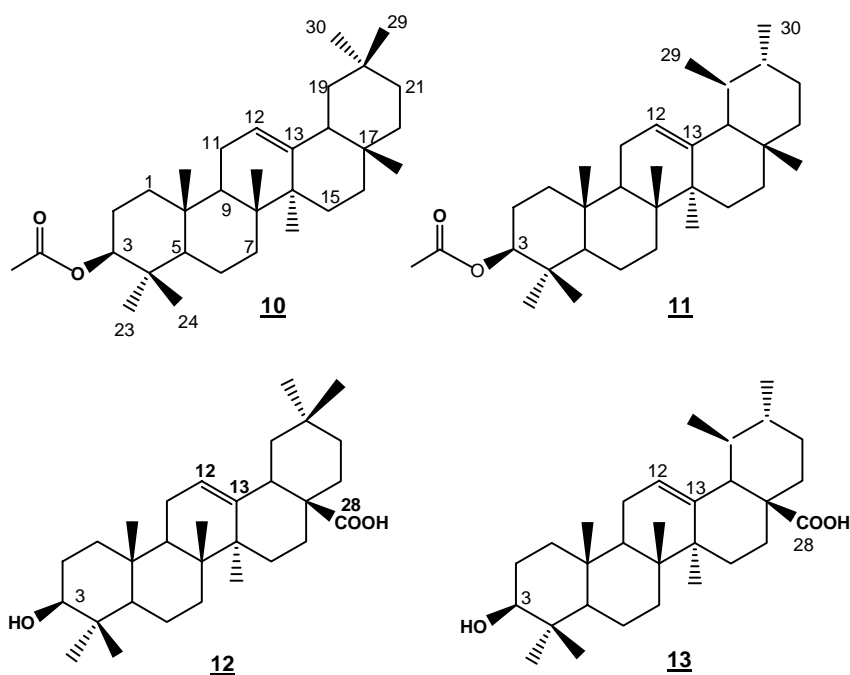
(**12** e **13**) característicos de hidrogênios oximetínicos. Para as substâncias **10** e **11** foi observado ainda, um singlete em  $\delta$  1,98 referente aos hidrogênios da metila de grupo acetato. Os hidrogênios H-3 em **10** e **11** estão desblindados devido ao efeito anisotrópico causado pela carboxila do acetato.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 161, p. 241) de **10** apresentou sinais em  $\delta$  122,5 e 143,5, que caracterizam os carbonos olefínicos C-12 e C-13, respectivamente, de triterpenos com esqueleto do tipo oleanano. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 163, p. 242) de **11** foi observado os carbonos olefínicos em  $\delta$  125,7 e 137,9, que caracterizam os carbonos C-12 e C-13, respectivamente, de triterpeno do tipo ursano. Já na mistura **12** e **13** (Figura 165, p. 243), foram observados os quatro carbonos olefínicos citados acima, além de carbono em  $\delta$  178,2 referente a carboxila, sugerindo que a mistura seja composta pelos ácidos ursólico **13** e oleanólico **12**. Em  $\delta$  79,0 foi observado o sinal do carbono oximetínico para a mistura e em  $\delta$  80,9 para as substâncias separadas, além de carbonila em  $\delta$  171,0 característica do grupo acetato. O sinal de C-3 para as substâncias **10** e **11** está deslocado para a região de desproteção do espectro devido a esterificação da hidroxila na posição 3. A acetilação acentua o efeito no carbono  $\alpha$  e diminui o efeito em  $\beta$ , e o efeito em  $\gamma$  permanece mais ou menos inalterado. Isto pode ser observado no caso dos triterpenos  $\beta$ -amirina e acetato de  $\beta$ -amirina onde C-3, C-2 e C-4 ressonam respectivamente em  $\delta$  78,8; 27,4; 38,7 e 81,1 (+ 2,4); 23,6 (- 3,8); 37,7 (- 1,1) (MAHATO, KUNDU, 1994).

Assim, as substâncias **10** e **11** foram caracterizadas como acetato de  $\beta$ -amirina e acetato de  $\alpha$ -amirina, respectivamente (Tabela 10).

Os triterpenos olean-12-eno e urs-12-eno podem ser distinguidos pelos valores de ressonância dos carbonos olefínicos. C-12 é desprotegido em 2 ppm e C-13 é protegido em 5 ppm em urs-12-eno, em comparação aos carbonos correspondentes nos olean-12-enos. A diferença entre os dois valores pode ser racionalizada pela presença do grupo metila em  $19\beta$ -equatorial que está próximo a ligação dupla ( $\gamma$  e  $\delta$  em relação a C-13 e C-12, respectivamente), nos urs-12-enos. Além disso, o átomo de carbono do anel E, que mostra as maiores diferenças nos deslocamentos químicos entre as duas séries, é C-18, cuja ressonância está blindada ca 11,5 ppm em olean-12-eno devido ao efeito de proteção do grupo metila  $20\beta$ -axial, disposto em  $\gamma$ -gauche com C-18 (MAHATO, KUNDU, 1994).



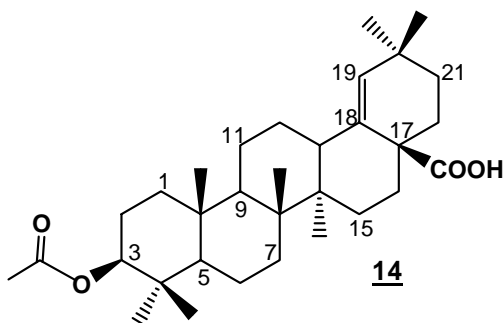


#### 4.3.3.2. Substância **14** : ácido 3 $\beta$ -O-acetil morólico

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **14** (Figura 166, p. 244) apresentou singletos em  $\delta$  0,71; 0,77; 0,78; 0,82; 0,91; 0,92 e 0,93 referentes aos hidrogênios de sete grupos metílicos, um singlete em  $\delta$  1,98 referente aos hidrogênios da metila do grupo acetato, um singlete em  $\delta$  5,15 característico do hidrogênio olefínico da estrutura e um multipletto em  $\delta$  4,40 referente a hidrogênio oximetínico.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 167, p. 244) foram observados sinais em  $\delta$  133,2 e 136,7 que caracterizam os carbonos olefínicos C-18 e C-19 respectivamente, de triterpenos com esqueleto do tipo 18,19-oleanano, estruturas descritas pela primeira vez por MAJUMDER (1979). O sinal do carbono carbinólico foi observado em  $\delta$  80,9 e em  $\delta$  171,1 e 181,9 verificou-se a presença de carbonilas de éster e ácido, respectivamente.

A comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **14** com os descritos na literatura (MAJUMDER *et al*, 1979; MAHATO, KUNDU, 1994) (Tabela 10), aliada a confirmação da fórmula molecular ( $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$ ), obtida pela espectrometria de massas (Figura 168, p. 245)  $m/z$  497,36  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , conduziram a identificação da substância como sendo o acetato do ácido morólico, sendo este o primeiro relato do metabólito na família.

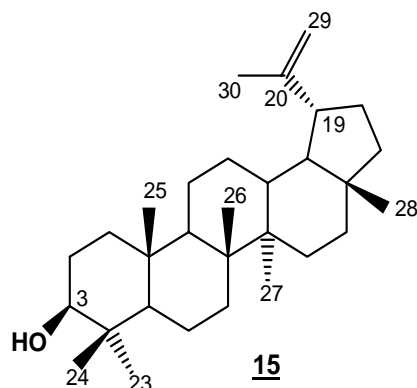


#### 4.3.3.3. **Substância 15: lupeol**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 15 (Figura 169, p. 245) caracterizou-se pela predominância de sinais na região diamagnética, característicos de triterpenos e pela presença de singletos largos na região relativa aos hidrogênios olefínicos. Na primeira região observou-se entre outros, os singletos em  $\delta$  0,74; 0,77; 0,81; 0,92; 0,95 e 1,01 atribuídos aos seis grupos metílicos presentes na estrutura e um singleto em  $\delta$  1,66 correspondente aos hidrogênios metílicos H-30 de derivado lupano. Observou-se também um multipletto em  $\delta$  3,20 característico de hidrogênio oximetínico. Na região dos hidrogênios olefínicos observou-se dois dubletos de constante de acoplamento 2 Hz, um em  $\delta$  4,55 e outro em  $\delta$  4,67 referentes a dois hidrogênios não equivalentes e geminais de um grupo metilênico.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 170, p. 246) e DEPT 135° (Figura 171, p. 246) confirmou a presença da ligação dupla, pelos sinais em  $\delta$  109,3 ( $\text{CH}_2$ ) e 150,9 (C) característicos dos carbonos olefínicos C-29 e C-20, respectivamente, de triterpeno derivado do lupano. As metilas foram confirmadas pela presença dos carbonos em  $\delta$  14,5; 15,3; 15,9; 16,1; 17,9; 19,3 e 27,9. O sinal em  $\delta$  78,9, presente no espectro, é característico do carbono oximetínico.

A comparação dos dados obtidos da substância 15 (Tabela 10) com os descritos na literatura (MAHATO, KUNDU, 1994) permitiu propor a substância como sendo lupeol.



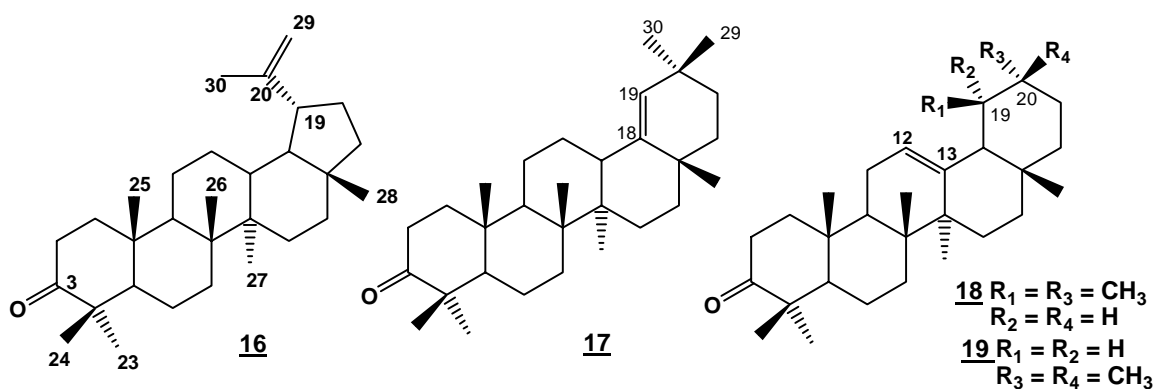
#### 4.3.3.4. Substâncias **16**, **17**, **18** e **19**: *lupenona*, *germaniconona*, $\alpha$ -*amirenona* e $\beta$ -*amirenona*

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura das substâncias **16**, **17**, **18** e **19** (Figura 172, p. 247) caracterizou-se pela predominância de sinais na região diamagnética característicos de triterpenos e pela presença de sinais em  $\delta$  4,57; 4,68; 4,85; 5,14 e 5,20 relativos à hidrogênios olefínicos. Na primeira região observou-se além dos vários singletos atribuídos aos grupos metílicos presentes nas estruturas, um singlete em  $\delta$  1,68 correspondente aos hidrogênios metílicos H-30 do derivado lupano. Na região dos hidrogênios olefínicos os singletos largos em  $\delta$  4,57 e outro em  $\delta$  4,68 são referentes a dois hidrogênios geminais não equivalentes de um grupo metilênico, característico de derivado lupano e os multipletos em  $\delta$  5,14 e 5,20 característicos de hidrogênios olefínicos de duplas trissubstituídas, como nos derivados ursano e oleanano.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 173 e 174, p. 247 e 248) sugeriu que a amostra é composta por uma mistura de quatro triterpenos. Isto pôde ser verificado pela comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos  $sp^2$  com os existentes na literatura e pela presença de 7 sinais de carbonos olefínicos no espectro [não foi observado o sinal para o carbono 19 (C)]. Os carbonos em  $\delta$  109,3 ( $\text{CH}_2$ ) e 150,8 (C) são característicos dos carbonos olefínicos C-29 e C-20, respectivamente, de triterpeno derivado do lupano. O carbono em  $\delta$  121,5 (CH) e 145,3 (C) característico do carbono olefínico C-12 e C-13, respectivamente, e em  $\delta$  129,8 (CH) característico de carbono olefínico C-18, todos de triterpenos derivado do oleanano. Os carbonos em  $\delta$  124,2 (CH) e 139,7 (C) são característicos dos carbonos olefínicos C-12 e C-13, respectivamente, de triterpeno derivado do ursano.

Observou-se também a presença de carbonos carbonílicos em  $\delta$  217,9 e 218,2, sugerindo tratar-se das cetonas dos triterpenos e não de seus álcoois.

A elucidação das estruturas destes triterpenos foi baseada no método descrito por OLEA (1990), além da comparação dos valores dos deslocamentos químicos dos carbonos (Tabela 10) com valores descritos na literatura. Desta forma, foram identificados os triterpenos lupenona **16**, germaniconona **17**,  $\alpha$ -amirenona **18** e  $\beta$ -amirenona **19**.



**Tabela 10.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$  em ppm) para as substâncias **10**, **11**, **12**, **13**, **14**, **15**, **16**, **17**, **18** e **19** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)

nº C	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>
<b>1</b>	38,0	38,2	38,4	38,4	37,8	38,7	39,7	39,9	39,6	39,4
<b>2</b>	23,5	23,5	27,6	27,1	23,6	27,3	34,2	34,1	34,2	34,2
<b>3</b>	80,9	80,9	79,0	79,0	80,9	79,0	218,2	218,2	217,9	217,9
<b>4</b>	37,6	39,0	38,7	38,7	38,5	38,6	47,3	47,3	47,3	47,3
<b>5</b>	55,2	55,2	55,2	55,2	55,4	55,2	54,9	54,9	55,2	55,2
<b>6</b>	18,1	18,1	18,3	18,3	18,2	18,3	19,6	19,6	19,6	19,6
<b>7</b>	32,4	32,8	32,6	32,6	34,5	34,2	33,5	33,8	32,4	32,2
<b>8</b>	39,2	39,4	39,5	39,5	40,6	40,7	39,9	39,9	39,7	39,7
<b>9</b>	47,5	47,9	47,6	47,5	51,1	50,3	49,8	49,8	48,2	46,9
<b>10</b>	36,9	36,8	37,0	37,0	37,1	37,1	37,1	36,6	36,8	36,8
<b>11</b>	23,5	23,5	23,4	22,9	20,9	20,8	21,3	21,6	23,5	23,5
<b>12</b>	122,5	125,7	122,6	125,8	25,9	25,0	25,1	26,1	124,2	121,5
<b>13</b>	143,5	137,9	143,5	137,9	41,2	38,0	38,3	38,5	139,7	145,3
<b>14</b>	41,5	41,9	41,6	41,6	42,5	42,8	43,0	43,0	42,2	41,9
<b>15</b>	25,6	29,0	28,0	27,6	29,3	27,3	27,4	27,4	28,1	26,9
<b>16</b>	27,6	27,9	23,5	23,5	33,3	35,5	35,5	37,3	26,6	26,1
<b>17</b>	32,4	33,7	46,5	46,5	47,9	42,9	43,0	34,2	33,5	32,3
<b>18</b>	46,5	55,2	41,0	52,6	136,7	48,2	48,2	n.o.	59,1	47,4
<b>19</b>	45,8	39,4	45,8	38,8	133,2	47,9	47,9	129,8	39,8	46,7
<b>20</b>	30,6	39,4	30,6	38,8	32,0	150,9	150,8	32,4	39,8	31,2
<b>21</b>	33,7	30,5	33,7	30,6	33,5	29,7	29,8	33,3	31,2	34,7
<b>22</b>	37,6	41,9	32,4	37,0	33,3	39,9	39,9	37,3	41,5	37,3
<b>23</b>	28,0	29,0	28,0	29,0	27,9	27,9	26,6	26,9	26,6	26,1
<b>24</b>	15,3	15,5	15,5	15,5	16,7	15,3	21,0	21,0	21,5	21,3
<b>25</b>	15,3	15,5	15,3	15,3	16,5	16,1	15,8	15,9	15,4	15,4
<b>26</b>	16,6	16,7	16,9	16,9	15,9	15,9	15,9	15,9	16,8	16,8
<b>27</b>	25,8	23,3	25,9	22,6	14,8	14,5	14,5	14,5	23,1	26,1
<b>28</b>	28,0	28,0	178,2	178,2	181,7	17,9	17,4	25,3	28,7	28,4
<b>29</b>	33,0	17,0	33,0	16,9	30,3	109,3	109,3	31,2	17,4	33,3
<b>30</b>	23,3	21,1	23,5	21,1	29,0	19,3	19,3	29,1	21,5	23,6
<b>CH<sub>3</sub>COO-</b>	21,3	21,3			21,3					
<b>CH<sub>3</sub>COO-</b>	171,0	171,0			171,1					

#### 4.3.3.5. **Substância 20: ácido 21-hidroxi-3,4-seco-cicloart-4(29), 24(31)-dien-3-óico**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 20 (Figuras 175 e 176, p. 249 e 250) caracterizou-se pela predominância de sinais na região diamagnética e pela presença de singletos largos na região dos hidrogênios olefínicos, sugerindo tratar-se de um triterpeno. Os singletos em  $\delta$  0,89 (3H) e 0,92 (3H), os dubletos em  $\delta$  0,96 (7 Hz, 6H) e o singlete em  $\delta$  1,61 (3H) são referentes a 5 grupos metílicos presentes na estrutura, sendo que o singlete em  $\delta$  1,61 é característico do hidrogênio metílico alílico H-30. Em  $\delta$  3,55 (*dd*, 4,5 e 11 Hz, 1H) e em  $\delta$  3,68 (*dd*, 2,6 e 11 Hz, 1H) foram observados os hidrogênios oximetilênicos H-21. Na região dos hidrogênios olefínicos, observou-se três singletos largos em  $\delta$  4,63 (1H); 4,67 (2H) e 4,75 (1H) referentes à hidrogênios metilênicos geminais não equivalentes de ligação dupla dissustituída. Além desses, a presença de dois dubletos, um em  $\delta$  0,34 (*d*; 4,5 Hz, 1H) e outro em  $\delta$  0,68 (*d*; 4,5 Hz, 1H) sugerem a existência de um anel ciclopropânico na estrutura da substância.

A análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 177, p. 251) e DEPT 135° (Figuras 178 e 179, p. 252) confirmou a presença de duas ligações duplas dissustituídas pelos carbonos em  $\delta$  106,2 ( $\text{CH}_2$ )/156,5 (C) e em  $\delta$  111,6 ( $\text{CH}_2$ )/149,3 (C); de carbono metilênico carbinólico em  $\delta$  62,4 e também de carbono carboxílico em  $\delta$  178,8.

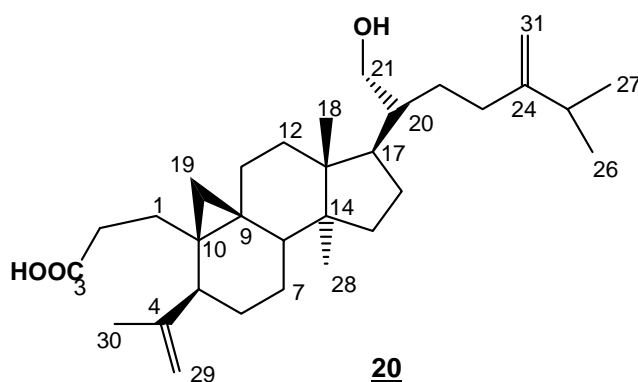
A presença de um anel ciclopropano, de duas ligações duplas dissustituídas, de carbonila, de um número reduzido de metilas e da ausência, principalmente, de carbono oximetínico característico de triterpeno C-3-OH ( $\sim\delta$  78,0) levou-nos a sugerir que a estrutura da substância 20 seja um derivado 3,4-seco-cicloartano.

A dupla que contem os carbonos em  $\delta$  111,6 e 149,3 foi atribuída aos carbonos 29 e 4, respectivamente, devido a correlação observada no mapa gHMBC (Figuras 182-184, p. 255-257) com os hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,61 (H-30). E a dupla com os carbonos em  $\delta$  106,2 e 156,5, foi atribuída aos carbonos 24 e 31, devido a correlação observada com os hidrogênios metílicos em  $\delta$  0,96 (H-26 e H-27).

A hidroxila foi localizada em C-21 devido aos sinais em  $\delta$  46,1 e 42,5 atribuídos a C-17 e C-20, respectivamente, com base na análise dos efeitos nos

carbonos  $\beta$  e  $\gamma$  do grupo -OH. Se C-21 correspondesse a um  $\text{CH}_3$ , C-17 apresentaria deslocamento em  $\delta$  52,2 e C-20 em  $\delta$  36,1 (FURLAN *et al.*, 1993).

A análise dos mapas de correlação *g*HMQC (Figuras 180 e 181, p. 253 e 254) e *g*HMBC (Tabela 11) e a comparação com análogos na literatura (PAULA *et al.*, 1997; CABRERA *et al.*, 1995) levaram-nos a propor que a substância **20** seja o ácido 21-hidroxi-3,4-seco-cicloart-4(29), 24(31)-dien-3-óico. O espectro de massas confirmou a fórmula molecular proposta  $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_3$  através do fragmento  $m/z$  469  $[\text{M} - \text{H}]^-$  (Figura 185, p.257). Levantamento bibliográfico não apresentou relatos desta substância na literatura.



Dados complementares:

- ✓  $[\alpha]_D^{26} + 4,22$  (c 0,102; AcOEt);
- ✓ Estado físico: sólido branco de baixo ponto de fusão.

**Tabela 11.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  e gHMBC para a substância **20**. ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ )<sup>#</sup>

nº H/C	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	DEPT 135º	gHMBC
1	1,89 (m)	27,6	CH <sub>2</sub>	
2	2,27 (m) ou 2,44(m)	31,3*	CH <sub>2</sub>	156,5/ 178,8
3	-	178,8	C	
4	-	149,3	C	
5	2,35 (m)	45,8	CH	
6	1,04 (m)	27,4	CH <sub>2</sub>	
7	1,56 (m)	24,9	CH <sub>2</sub>	
8	1,52 (m)	47,5	CH	
9	-	21,3	C	
10	-	27,1	C	
11	2,04 (m)/ 1,26 (m)	26,9	CH <sub>2</sub>	
12	1,54 (m)	32,1	CH <sub>2</sub>	
13	-	45,0	C	
14	-	49,0	C	
15	1,28 (m)	35,4	CH <sub>2</sub>	
16	1,98 (m)	28,7	CH <sub>2</sub>	
17	1,88 (m)	46,1	CH	
18	0,92 (s)	18,2	CH <sub>3</sub>	32,1/ 45,0/ 49,0
19	0,35 (d; 4,5)	29,8	CH <sub>2</sub>	27,6/ 47,5
	0,68 (d; 4,5)			
20	1,45 (m)	42,5	CH	
21	3,55 (dd; 4,5 e 11)	62,4	CH <sub>2</sub>	
	3,68 (dd; 2,6 e 11)			
22	1,53 (m)	28,2	CH <sub>2</sub>	
23	2,27 (m) ou 2,44(m)	31,3*	CH <sub>2</sub>	156,5/ 178,8
24	-	156,5	C	
25	2,27 (m)	33,7	CH	156,5
26	0,96 (d; 7)	21,8**	CH <sub>3</sub>	21,9/ 33,7/ 156,5
27	0,96 (d; 7)	21,9**	CH <sub>3</sub>	21,8/ 33,7/ 156,5
28	0,89 (s)	19,4	CH <sub>3</sub>	35,4/ 45,0/ 49,0
29	4,67 (s)/ 4,75 (s)	111,6	CH <sub>2</sub>	19,6/ 45,8
30	1,61 (s)	19,7	CH <sub>3</sub>	45,8/ 111,6/ 149,3
31	4,63 (s)/ 4,67 (s)	106,2	CH <sub>2</sub>	31,3/ 33,7

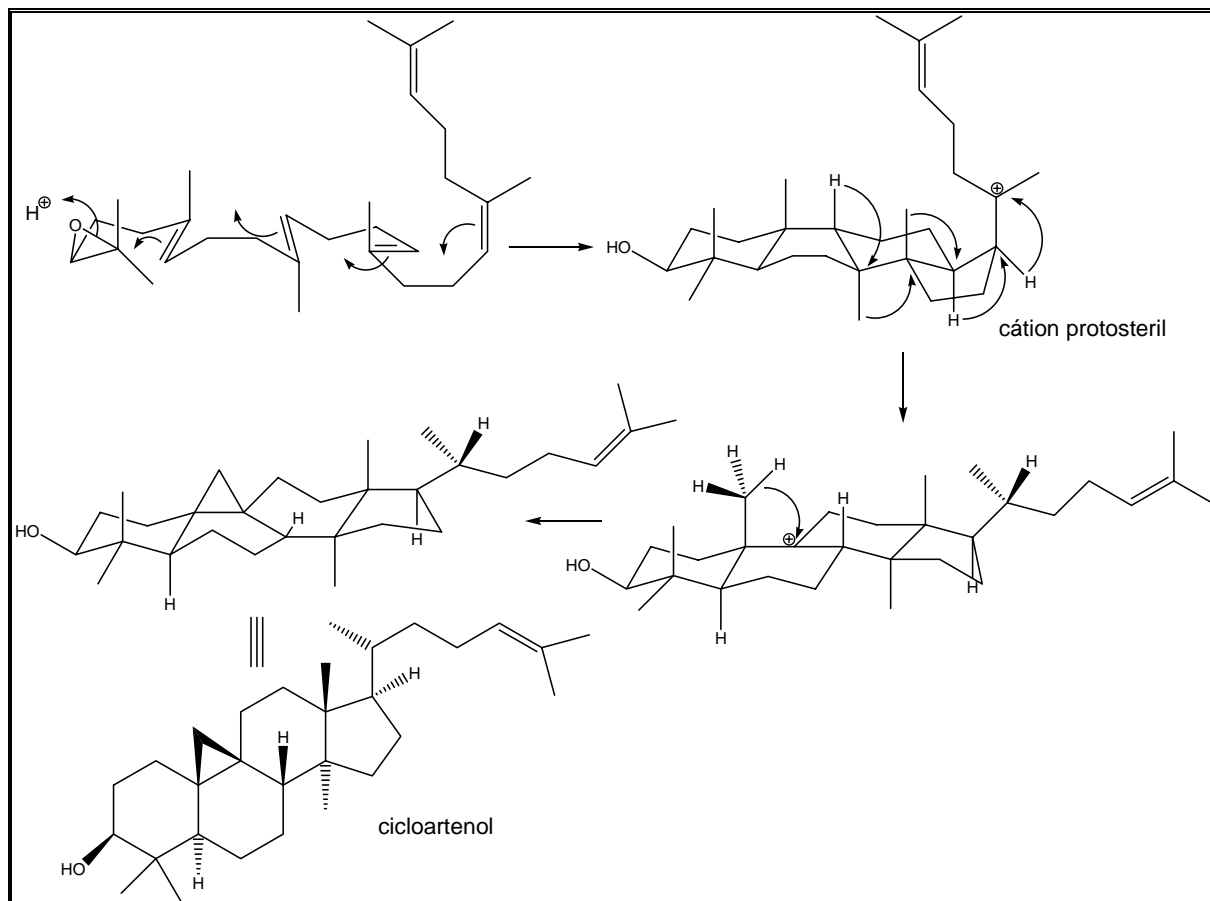
\*/\*\* podem estar trocados.

<sup>#</sup>δ em ppm. Multiplicidade e constante de acoplamento (*J* em Hz) entre parênteses.

Os derivados cicloartanos são formados a partir do cátion protosteril originado da ciclização do óxido de esqualeno, porém neste caso, na conformação cadeira-



barco-cadeira-barco (figura 39) e não mais cadeira-cadeira-cadeira-barco, como na formação dos triterpenos  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina, lupeol e germanicol (figura 38).

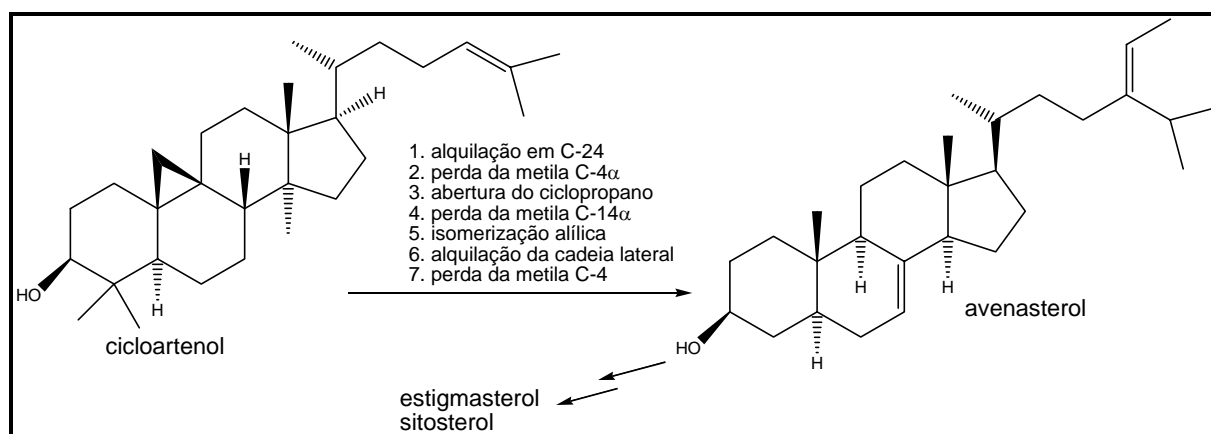


**Figura 39.** Biossíntese do cicloartenol (DEWICK, 1997b).

#### 4.3.4. Esteróides

Os esteróides são triterpenóides modificados contendo o sistema de anéis tetracíclico do lanosterol (fungos) ou cicloartenol (plantas), mas sem os grupos metílicos em C-4 e em C-14 (Figura 40). Estudos recentes descrevem que os fitoesteróis são capazes de reduzir as taxas de colesterol no plasma humano (KRITCHEVSKY, CHEN, 2005).

Os principais esteróis em plantas, fungos e algas são caracterizados por apresentar substituintes extras, com um ou dois carbonos, no carbono 24. Os esteróis de plantas campesterol e sitosterol apresentam, respectivamente, uma metila e uma etila em C-24 na estrutura análoga ao colesterol. Já o estigmasterol contém uma insaturação adicional na cadeia lateral, entre os carbonos C-22 e C-23 (*trans*) (DEWICK, 1997b).



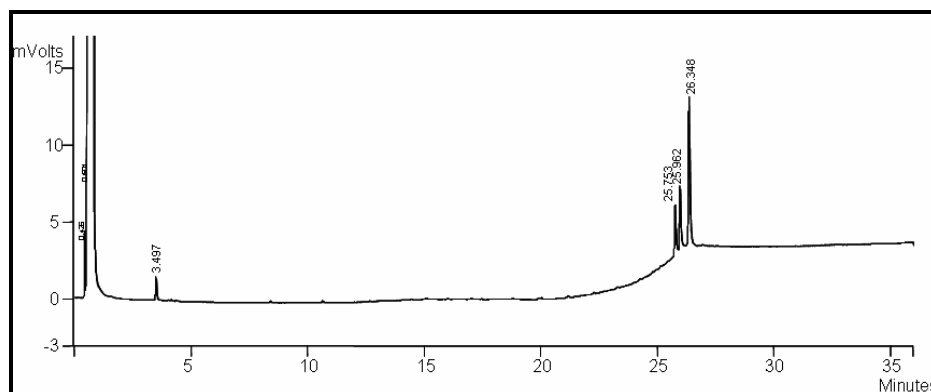
**Figura 40.** Seqüência de reação para a formação dos esteróis a partir do cicloartenol.

#### 4.3.4.1. Substâncias **21**, **22**, **23** e **24**: Sitosterol, estigmasterol, éster saturado de sitosterol e éster insaturado de sitosterol

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura de **21** e **22** (Figura 180, p. 258), da substância **23** (Figura 188, p. 259) e da substância **24** (Figura 190, p. 260) apresentaram vários sinais na região diamagnética do espectro, entre  $\delta$  0,62 – 1,00 correspondentes aos vários hidrogênios de grupos metílicos. Observou-se também sinais em  $\delta$  5,00; 5,20 e 5,35 referentes aos hidrogênios olefínicos.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 187, p. 258) de **21** e **22** apresentou sinais entre  $\delta$  11,8 e 21,0 correspondentes aos carbonos metílicos. Os sinais em  $\delta$  121,7; 140,7 e 129,2; 138,3 referentes aos carbonos olefínicos foram importantes para caracterizar a natureza esteroidal de **21** e **22**. Os demais valores de deslocamento químico foram relacionados aos carbonos metílicos, metilênicos e metínicos (Tabela 12), todos compatíveis com aqueles descritos na literatura (NES *et al.*, 1992; FORGO, KÖVÉR, 2004) para o sitosterol **21** e estigmasterol **22**.

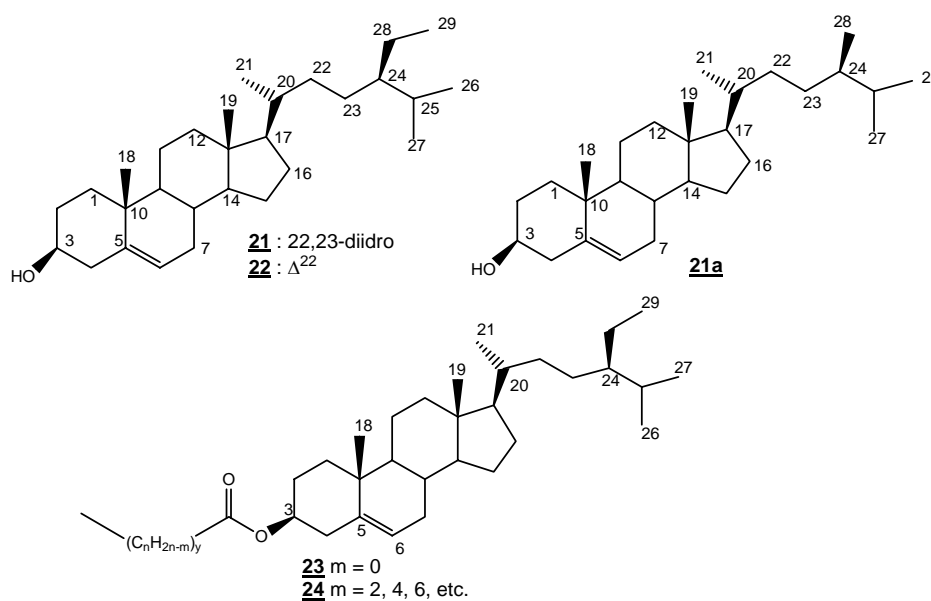
A mistura das substâncias **21** e **22** foi injetada no cromatógrafo gasoso e após análise cromatográfica foi observada a presença de um terceiro pico (Figura 41), o qual atribuímos ao campesterol **21a**, substância que co-ocorre com os outros dois fitoesteróis na maioria das plantas.



**Figura 41.** Cromatograma da mistura sitosterol, estigmasterol e campesterol.

Para as substâncias **23** e **24** (Figura 189, p. 259 e figura 191, p. 260) foram observados os carbonos olefínicos em  $\delta$  122,5 e 139,7; o carbono oximetínico em  $\delta$  73,6 e o carbono carbonílico de éster em  $\delta$  173,9/ 173,2 (Tabela 12). A existência de vários hidrogênios alifáticos em  $\delta$  1,24 e de carbonos metilênicos em  $\delta$  29 sugere a presença de uma cadeia alifática na estrutura. A existência de carbono carbonílico e do deslocamento químico de C-3 em  $\delta$  73,6, sugere que o sitosterol esteja esterificado com um ácido graxo saturado em **23** e insaturado em **24**. Em **24**, a insaturação é caracterizada pelos carbonos olefínicos em  $\delta$  127,9; 129,9 e 130,1.

As estruturas propostas estão baseadas na comparação com dados de carbono 13 da literatura (ZHANG *et al.*, 2005) e no relato de que além de esteróides livres, é comum encontrar nos tecidos das plantas os ésteres de esteróides (BERGMANN *et al.*, 1964).



**Tabela 12.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$  em ppm) para as substâncias **21**, **22**, **23** e **24** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)

nº C	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	Literatura*
1	37,2	37,2	37,0	37,0	36,7
2	31,6	31,6	31,9	31,5	31,8
3	71,7	71,7	73,7	73,6	73,9
4	42,2	42,2	42,3	42,3	42,3
5	140,7	140,7	139,7	139,7	139,6
6	121,7	121,7	122,6	122,6	122,6
7	31,8	31,6	31,9	31,9	31,9
8	31,8	31,8	31,9	31,9	31,9
9	50,1	50,1	50,0	50,0	50,0
10	36,4	36,4	36,6	36,6	36,6
11	21,0	21,1	21,0	21,0	21,0
12	39,7	39,7	39,7	39,7	39,7
13	42,2	42,2	42,3	42,3	42,3
14	56,7	56,0	56,7	56,7	56,7
15	24,2	24,2	24,3	24,3	24,3
16	28,2	28,2	28,2	28,2	28,2
17	56,0	56,0	56,0	56,0	56,0
18	11,8	11,8	11,8	11,8	11,8
19	19,3	19,3	19,3	19,3	19,3
20	36,1	40,5	36,1	36,1	36,1
21	18,7	21,0	18,7	18,7	18,7
22	33,8	138,3	33,9	33,9	33,9
23	26,0	129,2	26,1	26,1	26,0
24	45,8	51,2	45,8	45,8	45,8
25	29,1	31,8	29,1	29,1	29,1
26	19,7	19,7	19,8	19,8	19,8
27	18,9	18,9	19,0	19,0	19,0
28	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0
29	11,9	11,9	11,9	11,9	11,9
<b>CH<sub>3</sub>COO-</b>			173,9	173,2	170,5

\*Acetato do sitosterol (ZHANG *et al.*, 2005)

Análise por cromatografia gasosa das substâncias **23** e **24**, mostrou tratar-se de uma mistura de ésteres de série homóloga. Nos cromatogramas obtidos são

observados picos com um intervalo médio de ca de 1 minuto (Figura 42), sendo este perfil característico de séries homólogas de cadeia carbônica.

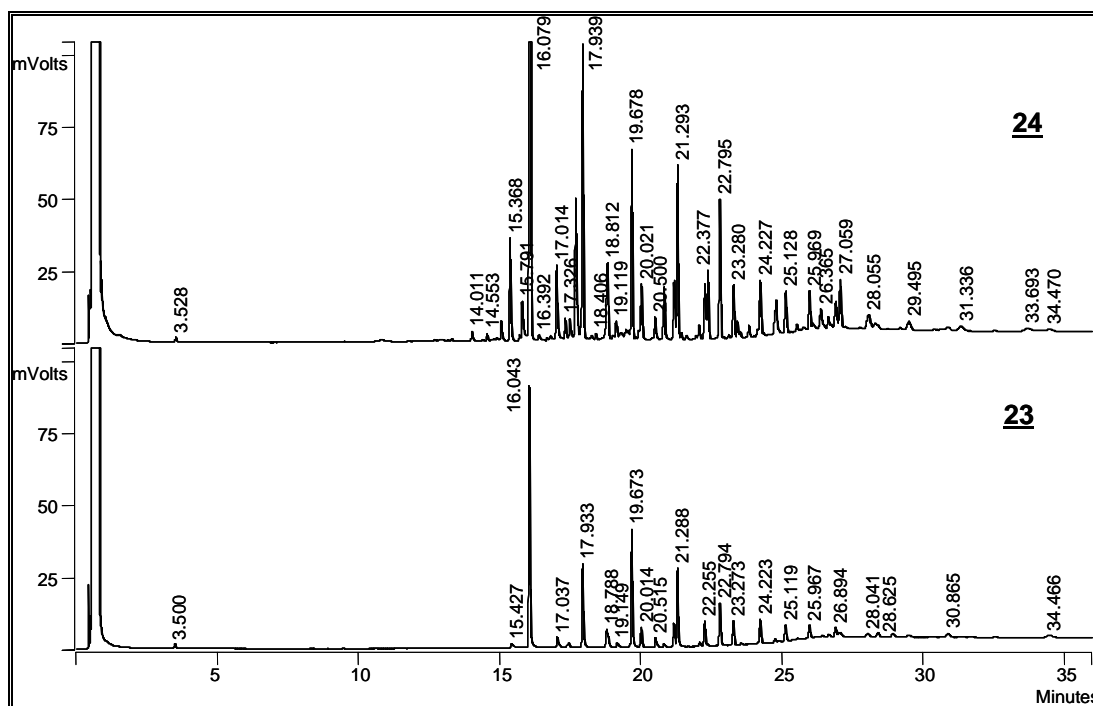


Figura 42. Cromatograma obtido para as misturas **23** e **24** de ésteres de sitosterol.

#### 4.3.5. Saponina

Saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos. Esse tipo de estrutura, que possui uma parte lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (açúcares), determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergente e emulsificante (SCHENKEL *et al.*, 2003).

Podem ser classificadas de acordo com o núcleo fundamental da aglicona ou, ainda, pelo seu caráter ácido, básico ou neutro. Quanto à aglicona, denominam-se saponinas esteroidais e saponinas triterpênicas. O caráter ácido pode ser devido à presença de um grupamento carboxila na aglicona ou na cadeia de açúcares (p.e., ácido glicurônico), ou ambos. O caráter básico decorre da presença de nitrogênio, em geral sob forma de uma amina secundária ou terciária.

Outra classificação refere-se ao número de cadeias de açúcares ligadas na aglicona. Assim, saponinas monodesmosídicas possuem uma cadeia de açúcares, enquanto que saponinas bidesmosídicas têm duas cadeias de açúcares, a maioria

com ligação éter na hidroxila em C-3 e a outra com ligação éster em C-28 no caso das saponinas triterpênicas.

O comportamento anfífilico e a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolípidos de membranas determinam um número variado de propriedades biológicas para essas substâncias, destacando-se a ação sobre membranas celulares, alterando sua permeabilidade ou causando sua destruição. Relacionadas com essa ação sobre membranas, estão às atividades hemolítica, ictiotóxica e moluscicida. A complexação com esteróides, tem incentivados trabalhos que avaliam o uso de saponinas na dieta com o objetivo de reduzir os níveis de colesterol sérico. Apresentam ainda, atividades antiinflamatória, antiviral e antifúngica (SCHENKEL et al., 2003).

**4.3.5.1. Substância 25: pomolato de  $3\beta$ -O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-glicopiranosideo] 28-O- $\beta$ -D-glicopiranosideo**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 192 e 193, p. 261 e 262) da substância 25 apresentou sinais na região característica de hidrogênios metílicos de triterpenos e na região de hidrogênios oximetínicos e oximetilênicos típico de açúcares, levando a propor que a substância em análise seja uma saponina.

Foram observados sinais de hidrogênios referentes a sete metilas,  $\delta$  0,81; 0,90; 0,96 ( $d$ ; 6,7 Hz); 0,99; 1,14; 1,23 e 1,36 e um hidrogênio olefínico em  $\delta$  5,33 ( $s$ ) no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , que em conjunto com dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 196 e 197, p. 265 e 266), onde foi observado sinais de carbonos olefínicos em  $\delta$  129,7 e 139,5, levaram a sugerir que a aglicona tenha o esqueleto urs-12-eno.

Correlação observada, no mapa gHMBC (Figura 200, p. 269), entre as metilas em  $\delta$  1,23 e 0,96 ( $d$ ; 6,7 Hz) com o carbono oximetínico em  $\delta$  73,5 e a multiplicidade observada para H-18 em  $\delta$  2,55 ( $s$ ) no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  são consistentes para a aglicona do ácido pomólico (MAHATO, KUNDU, 1994), em que os sinais correspondentes a C-3 e C-28 são observados em  $\delta$  78,2 e 180,6, respectivamente. Porém, quando estas posições são glicosiladas, C-3 é desprotegido e C-28 é protegido, logo como foram observados sinais desses carbonos em  $\delta$  92,1 e 178,5 para a substância 25, podemos sugerir que trata-se de uma saponina bidesmosídica.

A presença de quatro unidades de açúcar foi estabelecida a partir da observação de quatro carbonos anoméricos, em  $\delta$  105,5; 101,9; 101,8 e 95,6, cujos hidrogênios correspondentes, estabelecidos através de gHSQC (Figuras 198-199, p. 267-268), são  $\delta$  4,44 ( $d$ ; 7,7 Hz); 4,91 ( $d$ ; 7,6 Hz); 5,22 ( $s$ ) e 5,36 ( $d$ ; 8,1 Hz), respectivamente. O sinal em  $\delta$  1,28 ( $d$ ; 6,1 Hz) sugere que uma das unidades de açúcar seja uma ramnose.

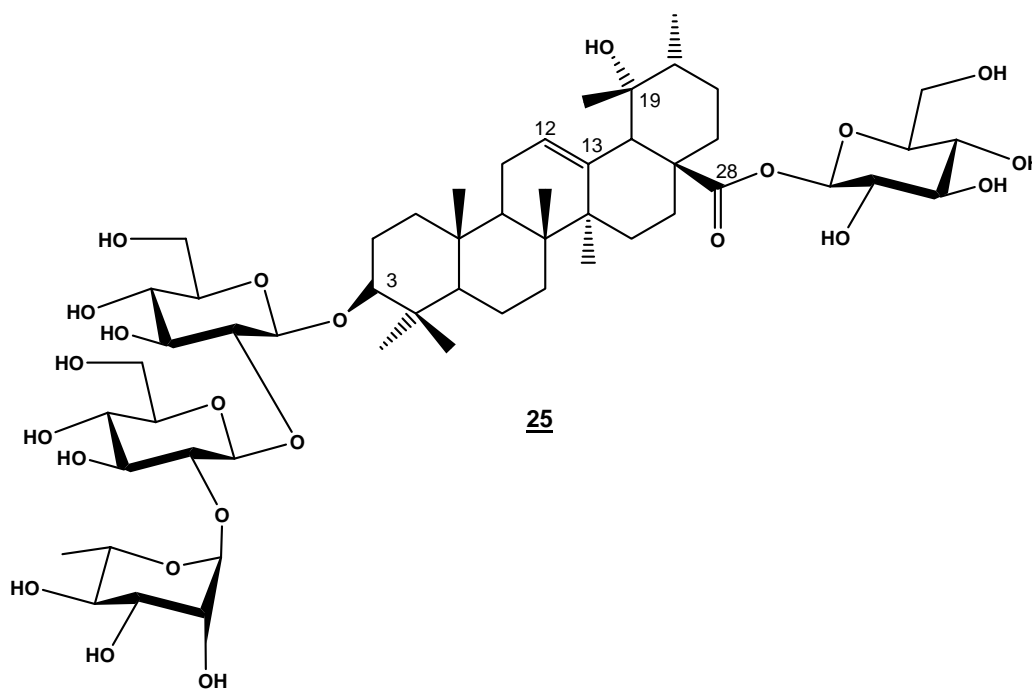
A análise dos espectros de massas em Tandem (Figuras 194 e 195, p. 263 e 264) confirma esta proposição. Fragmentação em segunda ordem (MS2) da molécula desprotonada ( $m/z$  1103) evidenciou a perda de 162 Da, sugerindo a eliminação de uma hexose. MS3 do íon-precursor em  $m/z$  941 mostrou a eliminação de 146 Da, sendo este valor compatível com a ramnose e, fornecendo o íon-produto em  $m/z$  795. MS4 deste íon levou a perda de um fragmento de 162 Da, o que sugere novamente a eliminação de uma outra hexose, com formação do íon-produto  $m/z$  633. E finalmente, MS5 de  $m/z$  633 evidenciou a eliminação de uma quarta unidade de açúcar, sendo a terceira hexose, com a formação do íon-produto em  $m/z$  471, que corresponde a aglicona do ácido pomólico.

A análise dos espectros de TOCSY 1D (Figuras 201-204, p. 270-273), obtidos da irradiação dos hidrogênios anoméricos, aliada às constantes de acoplamento observadas para tais hidrogênios (7,6; 7,7 e 8,1 Hz), comparação com a literatura (BIALY *et al.*, 1999) e fragmentação nos espectros de massas Tandem, permitiu definir que as unidades de açúcar são uma  $\alpha$ -L-ramnose e três  $\beta$ -D-glicose.

Com base no mapa de correlação gHSQC, todos os açúcares tiveram seus hidrogênios e carbonos determinados. Foi possível deduzir também que, as 2 unidades  $\beta$ -D-glicopiranosil com hidrogênios anoméricos em  $\delta$  4,44 e 4,91 estão substituídas no carbono 2 e que a unidade  $\beta$ -D-glicopiranosil com hidrogênio anomérico em  $\delta$  5,36 é terminal. Os deslocamentos químicos de H-1<sup>'''</sup> ( $\delta$  5,36) e C-1<sup>'''</sup> ( $\delta$  95,6) indicam que este açúcar está envolvido numa ligação éster com o grupo carboxílico em C-28, sendo esta ligação confirmada pela correlação no mapa gHMBC, entre H-1<sup>'''</sup> ( $\delta$  5,36) e C-28 ( $\delta$  178,5). Ainda no mapa gHMBC, correlação a longa distância entre H-1' ( $\delta$  4,44) e C-3 ( $\delta$  92,1) indica que esta unidade de  $\beta$ -D-glicose está ligada no carbono 3 da aglicona. As demais correlações observadas entre H-1'' ( $\delta$  4,91) e C-2' ( $\delta$  78,1) e entre H-1<sup>'''</sup> ( $\delta$  5,22) e C-2'' ( $\delta$  79,3) formam a

cadeia triglicosídica  $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-glicopiranosideo.

Assim, baseado nos dados descritos (Tabelas 13 e 14), a substância **25** foi identificada como pomolato de 3 $\beta$ -O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-glicopiranosideo 28-O- $\beta$ -D-glicopiranosideo, não sendo encontrado relatos desta estrutura na literatura.



Dados complementares:

- ✓  $[\alpha]_D^{26} + 2,43$  (c 0,126; MeOH);
- ✓ Estado físico: sólido amorfo marrom.



**Tabela 13.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a aglicona da substância **25** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ )\*

nº C/H	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	1,68/ 1,05	39,7
2	2,00/ 1,77	26,9
3	3,23	92,1
4	-	40,3
5	0,82	56,9
6	1,57/ 1,43	19,3
7	1,57/ 1,36	34,0
8	-	41,1
9	1,71	48,0
10	-	37,7
11	2,00	24,5
12	5,33 (s)	129,6
13	-	139,5
14	-	42,5
15	1,88/ 1,04	29,5
16	2,64/ 1,67	26,4
17	-	49,0
18	2,55 (s)	54,8
19	-	73,5
20	1,38	42,7
21	1,77/ 1,27	26,9
22	1,82/ 1,65	37,7
23	1,14 (s)	28,6
24	0,90 (s)	16,7
25	0,99 (s)	15,8
26	0,81 (s)	17,5
27	1,36 (s)	24,6
28	-	178,5
29	1,23 (s)	27,0
30	0,96 (d; 6,7)	16,4

\* $\delta$  em ppm. Multiplicidade e constante de acoplamento ( $J$  em Hz) entre parênteses.

**Tabela 14.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para os açúcares da substância **25** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ )\*

nº C/H	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	nº C/H	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1'	4,44 ( <i>d</i> ; 7,7)	105,5	1'''	5,22 ( <i>sl</i> )	101,9
2'	3,71 ( <i>dd</i> ; 7,7 e 8,9)	78,1	2'''	3,94 ( <i>d</i> ; 3,2)	72,1
3'	3,59 ( <i>dd</i> ; 8,9 e 8,9)	78,7	3'''	3,76 ( <i>dd</i> ; 3,2 e 9,5)	72,0
4'	3,26 ( <i>dd</i> ; 8,9 e 8,9)	72,0	4'''	3,43 ( <i>tl</i> ; 9,5)	73,7
5'	3,28 ( <i>m</i> )	77,9	5'''	4,16 ( <i>m</i> )	69,4
6'	3,69 ( <i>dd</i> ; 4 e 11) 3,91 ( <i>dd</i> ; < 3 e 11)	62,8	6'''	1,28 ( <i>d</i> ; 6,1)	18,1
1''	4,91 ( <i>d</i> ; 7,6)	101,8	1''''	5,36 ( <i>d</i> ; 8,1)	95,6
2''	3,40 ( <i>dd</i> ; 7,6 e 9,3)	79,4	2''''	3,35 ( <i>dd</i> ; 8,1 e 8,9)	73,5
3''	3,47 ( <i>dd</i> ; 9,3 e 9,3)	79,1	3''''	3,36 ( <i>dd</i> ; 8,9 e 9,1)	78,3
4''	3,07 ( <i>dd</i> ; 9,3 e 9,3)	72,5	4''''	3,39 ( <i>dd</i> ; 9,1 e 9,1)	70,7
5''	3,26 ( <i>m</i> )	77,6	5''''	3,43 ( <i>m</i> )	78,1
6''	3,56 ( <i>dd</i> ; 6,7 e 11,3) 3,87 ( <i>dd</i> ; < 3 e 11,3)	63,5	6''''	3,72 ( <i>dd</i> ; 3,5 e 11,7) 3,84 ( <i>dd</i> ; 2 e 11,7)	62,3

\* $\delta$  em ppm. Multiplicidade e constante de acoplamento ( $J$  em Hz) entre parênteses. As multiplicidades dos hidrogênios foram obtidas com base no espectro de TOCSY 1D

#### 4.3.6. Derivados fenólicos

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal e nos microorganismos, fazendo também parte do metabolismo animal. Dentre os compostos fenólicos pertencentes ao metabolismo secundário dos vegetais são encontradas estruturas tão variadas como à dos ácidos fenólicos, dos derivados de cumarina, dos pigmentos hidrossolúveis das flores, dos frutos e das folhas (CARVALHO *et al.*, 2003).

A via do chiquimato proporciona uma rota alternativa para compostos aromáticos, particularmente os aminoácidos aromáticos *L*-fenilalanina, *L*-tirosina e *L*-triptofano. Os dois primeiros aminoácidos formam a base das unidades fenilpropano C6-C3 encontrados em muitos produtos naturais, como por exemplo, ácidos cinâmicos, cumarinas, lignanas e flavonóides, e o último aminoácido é precursor da estrutura de um grande número de alcalóides. Em adição, podem-se encontrar muitos derivados simples de ácido benzóico, que são produzidos em ramificações da via do chiquimato (DEWICK, 1997d).

Esses compostos podem ser classificados segundo o tipo do esqueleto carbônico principal (Tabela 15 -DEWICK, 1997d).

**Tabela 15.** Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto principal.

Esqueleto principal	Classe de compostos fenólicos
C6	Fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C6-C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	Fenilpropanóides, fenilpropenos, cumarinas e cromonas
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas
C6-C2-C6	Estilbenos, antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonóides e isoflavonóides
(C6-C3) <sub>2</sub>	Lignanais
(C6-C3-C6) <sub>2</sub>	Diflavonóides
(C6) <sub>n</sub>	Melaninas vegetais
(C6-C3) <sub>n</sub>	Ligninas
(C6-C1) <sub>n</sub>	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) <sub>n</sub>	Taninos condensados

No gênero *Alibertia*, já foram relatados até então, o isolamento da cumarina escopoletina em *A. myrciifolia* (LUCIANO *et al.*, 2004) e de ésteres do ácido cafeico das folhas de *A. macrophylla* (BOLZANI *et al.*, 1991).

Neste estudo estamos descrevendo o isolamento de três derivados C6-C1, dois derivados C6-C3, dois derivados (C6-C3)<sub>2</sub> e outros dois derivados fenólicos glucosilados, sendo todos isolados pela primeira vez no gênero, as lignanas isoladas pela primeira vez na família e um dos derivados fenólicos ainda não descrito na literatura.

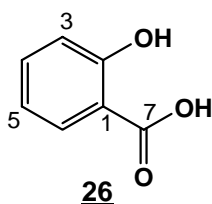
#### 4.3.6.1. **Substância 26: ácido salicílico**

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância 26 (Figura 205, p. 274) apresentou apenas sinais em  $\delta$  6,50 – 6,70 (*m*, 2H), em  $\delta$  7,10 (*td*, 2 e 8 Hz, 1H) e em  $\delta$  7,63 (*dd*, 1,5 e 8 Hz, 1H), que acoplando entre si, como visto no espectro de *g*COSY (Figura 206, p. 274), caracterizam uma substância aromática dissubstituída.

Os espectros de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 207, p. 275) e DEPT 135° (Figura 208, p. 275) apresentaram três sinais de carbonos metínicos em  $\delta$  115,7 (x2), 129,9 e 131,2, e um sinal de carbono quaternário em  $\delta$  163,0, característico de carbono ligado a átomo eletronegativo, neste caso, oxigênio.

No mapa de correlação gHMBC (Figura 211, p. 276), observa-se o acoplamento a longa distância do hidrogênio H-6 em  $\delta$  7,63 com um carbono quaternário em  $\delta$  172,0, provavelmente de carboxila.

O conjunto dos dados obtidos (Tabela 17) sugere a substância **26** como sendo o ácido salicílico. Isto pode ser confirmado pelo espectro de massas (Figura 209, p. 275) que mostra os fragmentos  $[M - H]^-$   $m/z$  137 e  $[M - 44 - H]^-$   $m/z$  93, sugerindo perda de CO<sub>2</sub>.

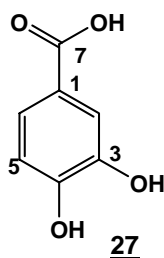


#### 4.3.6.2. Substância **27**: ácido protocatecuico

Na região de hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 212, p. 277) da subfração 3.2, proveniente do extrato em AcOEt de *A. macrophylla* e em que já foi caracterizado o iridóide **4** (p. 87), foram observados sinais em  $\delta$  6,78 (*d*; 8 Hz, 1H); 7,29 (*d*; 8 Hz, 1H) e 7,34 (*s*, 1H) sugerindo um sistema aromático trissubstituído. Os deslocamentos químicos em  $\delta$  7,29 e 7,34 desses hidrogênios sugerem que eles estejam em posição *orto* a um grupo retirador de elétrons e que o hidrogênio em  $\delta$  6,78 esteja *orto* a um grupo doador de elétrons no anel aromático.

Mesmo não sendo observado o desdobramento dos sinais para o acoplamento em *meta* dos hidrogênios, é possível verificar no espectro de gCOSY (Figura 213, p. 277) o acoplamento entre os hidrogênios em  $\delta$  7,29 e 7,34.

As interações observadas nos mapas de correlação gHMQC (Figuras 216 e 217, p. 279) e gHMBC (Figuras 218 e 219, p. 280), juntamente com os dados iniciais (Tabela 16), levaram a propor a estrutura do ácido protocatecuico para o composto fenólico presente na subfração 3.2.



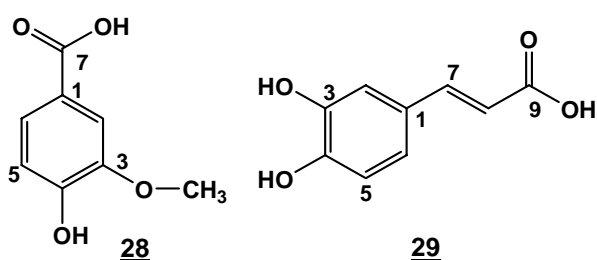
#### 4.3.6.3. Substâncias **28** e **29**: ácido vanílico e ácido cafeico

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da subfração 3.5 do extrato em AcOEt de *A. macrophylla* (Figuras 220 e 221, p. 281) também apresentou sinais característicos de substância aromática. Os sinais em  $\delta$  6,88 (*d*; 8,5 Hz, 1H); 7,53 (*dt*; 8,5 Hz, 1H) e 7,49 (*sl*, 1H) indicaram a presença de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído. Foram observados ainda sinais em  $\delta$  6,16 (*d*; 16 Hz) e 7,42 (*d*; 16 Hz) referentes a uma ligação dupla dissustituída com configuração *trans*. Um segundo anel 1,3,4-trissubstituído foi evidenciado pelos sinais em  $\delta$  6,76 (*d*; 8 Hz, 1H); 6,98 (*dt*; 8 Hz, 1H) e 7,04 (*sl*, 1H).

As interações observadas no mapa de correlação *g*HMBC (Figuras 224 e 225, p. 283 e 284) entre o hidrogênio em  $\delta$  7,42 e os carbonos C-9, em  $\delta$  165,8 e C-1 em  $\delta$  121,0, confirmam o sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado conjugado ao anel. Foi observado, também, o acoplamento dos hidrogênios metílicos em  $\delta$  3,82 com o carbono em  $\delta$  147,0, evidenciando um éter alquil-aril.

Ainda com a análise do mapa de correlação *g*HMBC, foi possível estabelecer que os dois sistemas aromáticos encontram-se independentes um do outro, já que não se observa qualquer correlação entre eles.

O conjunto dos dados obtidos (Tabela 16) sugere a mistura de um derivado C6-C1 e um derivado C6-C3, sendo as substâncias **28** e **29**, então, identificadas como o ácido vanílico e o ácido cafeico, respectivamente.



**Tabela 16.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$ , e gHMBC para as substâncias **26**, **27**, **28** e **29** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ )

nº	<b>26</b>			<b>27</b>			<b>28</b>			<b>29</b>		
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	g- HMBC	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	gHMBC	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	gHMBC	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	gHMBC
1	-	122,0 (C)		-	no	-	-	121,0	-	-	125,4	-
2	-	163,0 (C)		7,34 (s)	116,5 (CH)	121,8/ 144,8/ 149,9/ 167,0	7,49 (s)	112,7	123,0/ 151,4/ 165,0	7,04 (s)	114,4	121,0/ 148,0
3	6,50-6,70 (m, 2H)	115,7 (CH)	115,7/131,2/ 122,0	-	144,8 (C)		-	147,0	-	-	145,6	-
4	7,10 (td; 2 e 8, 1H)	131,2 (CH)	129,9/ 163,0	-	149,9 (C)	-	-	151,4	-	-	148,0	-
5	6,50-6,70 (m, 2H)	115,7 (CH)	115,7/131,2/ 122,0	6,78 (d; 8)	115,0 (CH)	121,8/ 144,8/ 149,9	6,88 (d; 8)	114,8	121,0/ 147,0	6,76 (d; 8)	115,4	125,4/ 145,6
6	7,63 (dd; 2 e 8, 1H)	129,9 (CH)	131,2/163,0/ 172,0	7,29 (d; 8)	121,8 (CH)	116,5/ 149,9/ 167,0	7,53 (d/; 8)	123,4	-	6,98 (d/; 8)	121,0	114,4/ 148,0
7	-	172,0 (C)		-	167,0 (C)	-	-	165,0	-	7,42 (d; 16)	144,5	121,0/114,4/ 114,2/ 165,8
8	-			3,82 (s)			3,82 (s)	55,5	147,0	6,16 (d; 16)	114,2	125,4
9	-			-			-			-	165,8	-

\* $\delta$  em ppm. Multiplicidade e constante de acoplamento (J em Hz) entre parênteses.

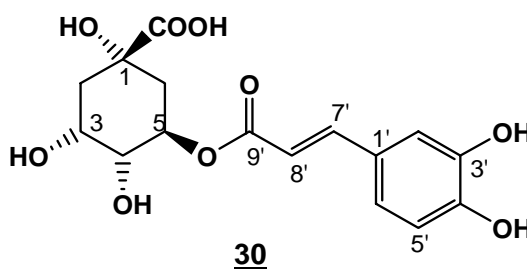
#### 4.3.6.4. **Substância 30: ácido 5-O-cafeoil-quínico (ácido clorogênico)**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **30** (Figuras 226 e 227, p. 285 e 286) apresentou sinais característicos de substância aromática. Os sinais em  $\delta$  7,04 (*d*, 1H, 2 Hz), 6,96 (*dd*, 1H, 2 e 8 Hz) e 6,74 (*d*, 1H, 8 Hz) indicaram a presença de anel aromático 1,3,4-trissubstituído. Foram observados ainda sinais em  $\delta$  7,43 (*d*, 1H, 16 Hz) e 6,22 (*d*, 1H, 16 Hz) que indicaram a presença de ligação dupla *trans*-dissubstituída. A análise do conjunto destes sinais evidenciou a presença da porção do ácido cafeico. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  exibiu ainda os sinais em  $\delta$  5,16 e 3,89 característicos de hidrogênios oximetínicos.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 228, p. 287) confirmou a presença da unidade do ácido cafeico pelos sinais em  $\delta$  166,4; 148,7; 145,7; 144,6; 125,4; 121,3; 115,8 e 114,5. Foram observados sinais de carbonos carbinólicos em  $\delta$  79,1; 73,4; 71,7 e 71,5 e sinais de carbono metilênico em  $\delta$  38,1 e 39,0 além da presença de carbono de carboxila em  $\delta$  176,3, o que levou a propor a estrutura do ácido quínico.

Os acoplamentos observados no mapa de correlação *g*HMBC (Figura 231, p. 290) entre os hidrogênios em  $\delta$  7,43 e 6,22 e o carbono em  $\delta$  166,4 atribuído a carbonila de éster e  $\delta$  121,3 atribuído ao C-6' do sistema aromático, confirmam o sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado conjugado ao anel. Ainda no mapa *g*HMBC, a localização do ácido quínico na estrutura foi determinada pela existência de acoplamento à longa distância entre o hidrogênio em  $\delta$  5,16 (H-5) do ácido quínico e o carbono carboxílico do ácido cafeico em  $\delta$  166,4, indicando a esterificação do ácido cafeico pelo ácido quínico.

O conjunto dos dados adquiridos (Tabela 17) identifica a substância **30**, como o ácido 5-O-cafeoil-quínico ou ácido clorogênico.



**Tabela 17.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  e gHMBC para a substância **30** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}^*$ 

n <sup>o</sup> H/C	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	gHMBC
1'	-	125,4	
2'	7,04 ( <i>d</i> ; 2)	114,5	148,7/ 144,6/ 121,3
3'	-	145,7	
4'	-	148,7	
5'	6,74 ( <i>d</i> ; 8)	115,8	148,7/ 145,7/ 125,4
6'	6,96 ( <i>dd</i> ; 2 e 8)	121,3	148,7/ 144,6/ 114,5
7'	7,43 ( <i>d</i> ; 16)	144,6	166,4/ 125,4/ 121,3/114,5
8'	6,22 ( <i>d</i> ; 16)	114,5	166,4/ 125,4
9'	-	166,4	
1	-	79,1	
2	1,60 ( <i>m</i> ) 1,97 ( <i>dd</i> ; 3 e 14,5)	38,1	
3	3,89 ( <i>m</i> )	71,5	38,1
4	3,50 ( <i>m</i> )	73,4	71,5
5	5,16 ( <i>ddd</i> ; 11,10 e 5)	71,7	39,0/ 73,4/166,4
6	1,74 ( <i>m</i> )/ 1,82 ( <i>t</i> , 11)	39,0	71,7
7	-	176,3	

\* $\delta$  em ppm. Multiplicidade e constante de acoplamento (*J* em Hz) entre parênteses.

Compostos catecólicos não flavonoídicos como o ácido clorogênico (ácido 5-O-cafeoilquínico) e seus derivados são encontrados em diversas plantas. Estão presentes na dieta alimentar em frutas, chás, café e vinho. Há um crescente interesse por suas propriedades biológicas e farmacológicas e são encontrados relatos de atividades antiinflamatórias, antimutagênica e anticarcinogênica para estes compostos, além da atividade antioxidante já conhecida (MORIDANI *et al*, 2001).

#### 4.3.6.5. Substância **31**: 3,4,5-trimetoxifenil-O- $\beta$ -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6) $\beta$ -D-glicopiranosídeo

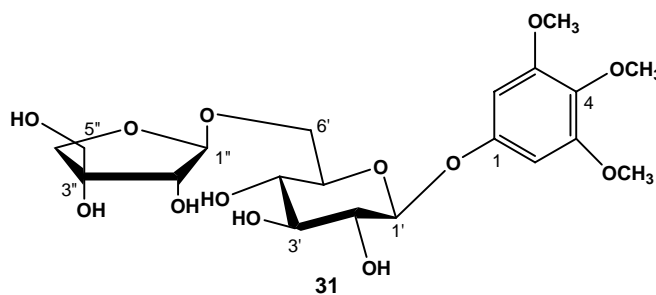
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **31** (Figuras 232 e 233, p. 291 e 292) apresentou sinais de hidrogênios oximetílicos, oximetilênicos e oximetínicos entre  $\delta$  3,0 e 4,0, hidrogênios anoméricos em  $\delta$  4,8, hidrogênios hidroxílicos entre  $\delta$  4,9 e 5,2 e um singleto em  $\delta$  6,35 característico de anel aromático simetricamente substituído.



A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 234, p. 293) confirmou a estrutura de um anel aromático pela presença dos carbonos  $\delta$  94,3; 132,5; 153,0 e 153,8. Duas unidades de açúcares são propostas pela observação dos carbonos entre  $\delta$  62,9 e 78,6 e pelos carbonos anoméricos em  $\delta$  100,8 e 109,0. O conjunto dos dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT  $90^\circ$  e  $135^\circ$  (Figuras 235 e 236, p. 294) e gHMBC (Figuras 237 e 238, p. 295 e 296) (Tabela 18), levou-nos a propor a estrutura de um fenólico glucosilado para a substância **31**.

A ligação dissacarídica e a ligação anel aromático-açúcar foram estabelecidas pelas interações observadas no mapa de correlação gHMBC (Figuras 239-241, p. 297-299) entre H-1' em  $\delta$  4,79 ( $d$ ; 7,5 Hz) e C-1 em  $\delta$  153,8 e entre H-1'' em  $\delta$  4,81 e C-6' em  $\delta$  67,6. As unidades glucosídicas foram definidas como uma hexose e uma pentose pela presença de 11 carbonos carbinólicos e como  $\beta$ -glicosídeos pelas constantes de acoplamento de 3 Hz para H-1'', característico de apiose e 7,5 Hz para H-1' da glicose.

Assim, a substância **31** foi definida como 3,4,5-trimetoxifenil-O-D- $\beta$ -apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)-O-D- $\beta$ -glicopiranosídeo, condiz com estrutura descrita por KANCHANAPOOM e colaboradores (2002) e está de acordo com a fórmula molecular proposta de  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_{13}$  obtida por espectrometria de massas (Figura 242, p. 299), com a observação dos fragmentos  $m/z$  517  $[\text{M} + \text{K}]^+$ ,  $m/z$  501  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  e  $m/z$  185  $[\text{aglicona} + \text{H}]^+$ .



#### 4.3.6.6. Substância **32**: 3,4,5-trimetoxifenil-1-O- $\beta$ -D-(5-O-siringoila)-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)-glicopiranosídeo

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 244, p. 301) da substância **32** mostrou grande semelhança ao da substância **31**. Porém, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foram observados dois singletos característicos de hidrogênios aromáticos em  $\delta$  6,43 e 7,35, e três singletos referentes às metoxilas em  $\delta$  3,69; 3,78 e 3,88. Os demais sinais correspondendo a hidrogênios de açúcar.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  observou-se carbonos oximetílicos em  $\delta$  56,7; 56,9 e 61,2; carbonos carbinólicos característicos de açúcares entre  $\delta$  67,9 e 79,1; carbonos anoméricos em  $\delta$  103,2 e 110,4; carbonos aromáticos em  $\delta$  96,5 e entre  $\delta$  108,5 a 155,0 e ainda sinal de carboxila em  $\delta$  167,0, característica de ácido fenólico.

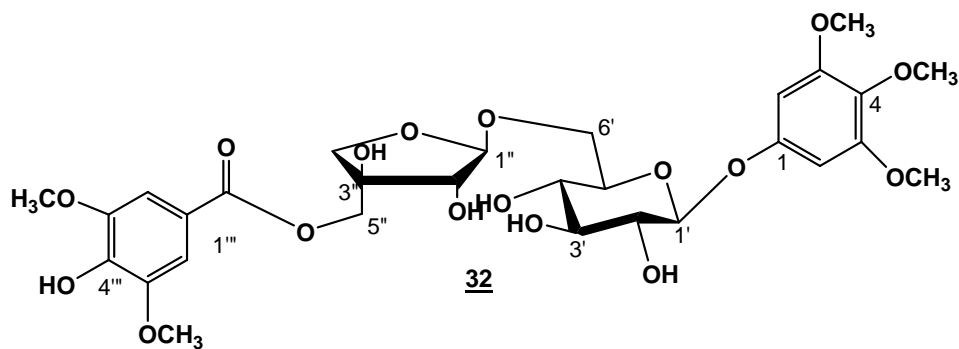
O conjunto dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , dos mapas de correlação gHMQC (Figuras 245 e 246, p. 302 e 303) e gHMBC (Figuras 247-249, p. 304-306) (Tabela 18) e comparação com dados da literatura (JUNG *et al.*, 2004) sugerem duas unidades aromáticas: um ácido fenólico 1,3,4,5-tetrassubstituído (derivado do ácido siríngico) e um grupo benzoílico 1,3,4,5-tetrassubstituído.

A presença de onze carbonos carbinólicos sugere uma hexose e uma pentose. A porção  $\beta$ -apiofuranosídeo foi identificada pelos deslocamentos químicos em  $\delta$  110,4, atribuído ao carbono anomérico dioximetínico  $-\text{O}-\text{CH}-\text{O}-$  (C-1'') e em  $\delta$  5,02 (*d*, 2,3 Hz), atribuído ao hidrogênio anomérico H-1'', observado para anel furanosídico (ISHII *et al.*, 1998). A hexose foi determinada com base nos dados da literatura (YANG *et al.*, 2005), como sendo  $\beta$ -glicopiranosídeo. A ligação dissacarídica foi definida como apiofuranosil (1'' $\rightarrow$ 6') glicopiranosídeo pelo acoplamento a longa distância, observado no mapa de correlação gHMBC, entre os hidrogênios 6' em  $\delta$  3,63 e 4,05 da glicose e o carbono 1'' em  $\delta$  110,4 da apiose e também pelo deslocamento químico do carbono oximetilênico C-6' ( $\delta$  68,2), uma vez que o deslocamento químico deste glicosídeo com a posição C-6' livre apresenta deslocamento em  $\delta$  62 (REZANKA *et al.*, 2000).

A localização dos açúcares foi estabelecida pelos acoplamentos observados no mapa de correlação gHMBC entre os hidrogênios metilênicos H-5'' ( $\delta$  4,32 e 4,40) da apiose com o carbono em  $\delta$  167,0 pertencente ao grupo siringoila e o hidrogênio H-1' ( $\delta$  4,80) da glicose com o carbono em  $\delta$  155,0 do grupo benzoila (Tabela 19).

A fórmula molecular proposta ( $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{O}_{17}$ ) foi confirmada pela espectrometria de massas de alta resolução (Figura 250, p. 307), onde observou-se o fragmento  $m/z$  657,2065 [ $\text{M} - \text{H}$ ] $^-$  e o fragmento  $m/z$  477,1609 [ $\text{Bz} + \text{Gli} + \text{Api} - \text{H}$ ] $^-$  que corresponde à substância **31**. No fragmentograma de baixa resolução (Figura 251, p. 307), foram observados os fragmentos correspondentes as duas unidades aromáticas:  $m/z$  183 [ $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$ ] $^-$ , que corresponde ao derivado benzoílico e  $m/z$  197 [ $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_5$ ] $^-$ , correspondente ao derivado siríngico.

Desta forma, a substância **32** foi caracterizada como 3,4,5-trimetoxifenil-1-O- $\beta$ -(5-O-siringoila)-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)-glicopiranosideo, não sendo encontrados, até o momento, registros na literatura.



Dados complementares:  $[\alpha]_D^{25} -2,36^{\circ}$  (c 0,021, MeOH)

UV  $\lambda_{\max}$  /nm (MeOH) 279

**Tabela 18.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e gHMBC para as substâncias **31** e **32** (500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ )\*

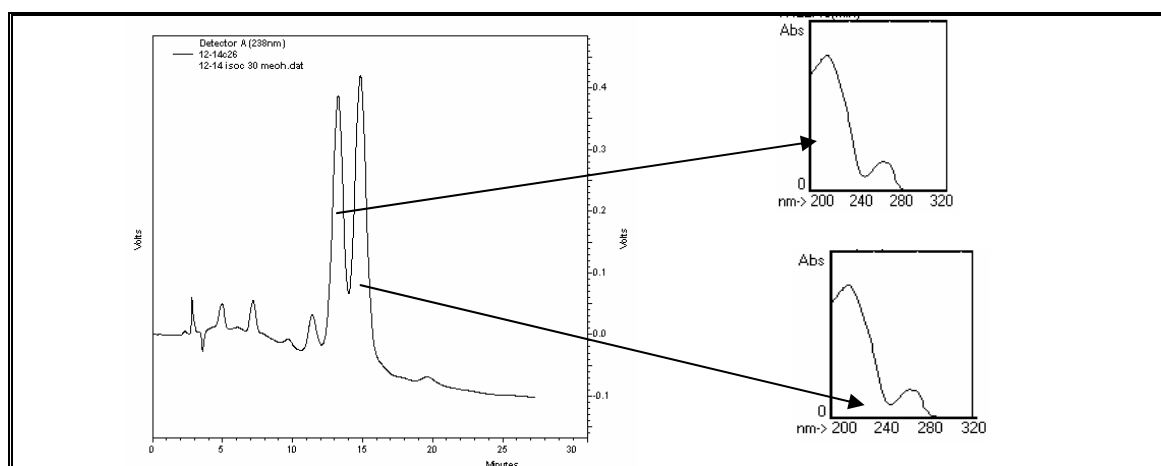
nº H/C	<b>31</b> (DMSO- $d_6$ ) $^{13}\text{C}$		<b>32</b> (CD $_3$ OD) $^{13}\text{C}$	
	$^1\text{H}$	gHMBC	$^1\text{H}$	gHMBC
1	-	153,8 (C)	-	155,9
2,6	6,35 (s, 2H)	94,3 (CH) x2	6,43 (s, 2H)	96,5 (x2)
3,5	-	153,0 (C)	-	154,7
4	-	132,5 (C)	-	134,7
1'	4,79 (d; 7,5)	100,8 (CH)	4,80	103,2
2'	3,20 (dt; 5 e 7,5)	73,0 (CH)	3,42 (m)	74,9
3'	3,27-3,30 (m)	76,4 (CH)	3,42 (m)	77,9
4'	3,06(dt; 5 e 10)	70,0 (CH)	3,35 (m)	71,5
5'	3,52 (tl, 8)	75,4 (CH)	3,58 (m)	76,9
6'	3,40 (dd; 7,5 e 10)/ 3,91 (d, 10)	67,6 (CH $_2$ )	3,63 (m)/4,05 (m)	68,2
1''	4,81 (d; 3)	109,0 (CH)	5,02 (d; 2,3)	110,4
2''	3,71 (dd; 3 e 6)	75,7 (CH)	3,95 (d; 2,3)	78,7
3''	-	78,6 (C)	-	79,0
4''	3,57 (d; 9,5)/ 3,85 (d; 9,5)	73,1 (CH $_2$ )	3,85 (m)/ 4,05 (m)	75,0
5''	3,25-3,36 (m)	62,9 (CH $_2$ )	4,32 e 4,40 (d; 12)	67,9
1'''	-	-	-	120,5
2''',6'''	-	-	7,35 (s, 2H)	108,5 (x2)
3''',5'''	-	-	-	149,1 (x2)
4'''	-	-	-	143,1
C=O	-	-	-	167,9
3,5-OCH $_3$	3,74 (s)	55,7 (x2)	3,78 (s)	56,7 (x2)
4-OCH $_3$	3,60 (s)	60,0	3,69 (s)	61,2
3''',5'''-OCH $_3$	-	-	3,88 (s)	56,9 (x2)
				149,1

\* $\delta$  em ppm. Multiplicidade e constante de acoplamento (J em Hz) entre parênteses.

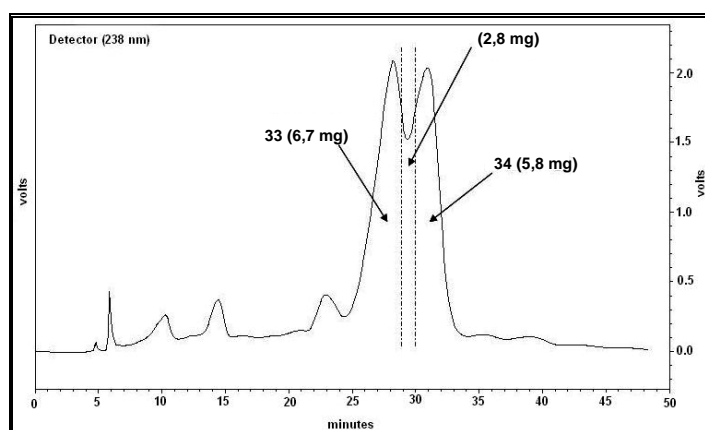
#### 4.3.6.7. Substâncias **33** e **34**: (+)-lioniresinol 3a-O-β-D-glicopiranosídeo e (-)-lioniresinol 3a-O-β-D-glicopiranosídeo

A subfração 2.7.6 do extrato em AcOEt de *A. sessilis*, por apresentar apenas uma mancha ao ser avaliada por CCDC em vários sistemas de solventes, foi submetida a análise por RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 252, p. 308), de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 253 e 254, p. 309 e 310) e DEPT 135° (Figura 255, p. 311). No entanto, o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , mostrou tratar-se de uma mistura binária de substâncias muito semelhantes, uma vez que a maioria dos sinais de carbono aparecem duplicados.

A subfração foi então purificada por CLAE preparativo (Figuras 43 e 44), fornecendo os dois estereoisômeros descritos a seguir.



**Figura 43.** Cromatograma analítico obtido para a subfração estudada. Condições: Coluna  $\text{C}_{18}$ , modelo Luna (2) (Phenomenex®) de 250 x 4,6 mm, partículas de 5  $\mu\text{m}$ ,  $F = 1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $\lambda = 238 \text{ nm}$  e sistema de solventes MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  30:70 (v/v).



**Figura 44.** Cromatograma preparativo obtido para a subfração estudada. Condições: Coluna  $\text{C}_{18}$ , modelo Luna (2) (Phenomenex®) de 250 x 21,20 mm, partículas de 10  $\mu\text{m}$ ,  $F = 10,0 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $\lambda = 238 \text{ nm}$  e sistema de solventes MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  30:70 (v/v).

**(+)-lioniresinol 3a-O-β-D-glicopiranosideo**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **33** (Figuras 256 e 257, p. 312 e 313) apresentou apenas dois singletos na região de hidrogênios aromáticos, um em  $\delta$  6,32 (2H) e outro em 6,48 (1H), sugerindo tratar-se de dois sistemas aromáticos distintos, um tetrassubstituído simetricamente e o segundo pentassubstituído. Foram observados três singletos referentes a quatro metoxilas em  $\delta$  3,25; 3,64 (x2) e 3,76; vários sinais entre  $\delta$  3,0 e 3,9 característicos de hidrogênios oximetínicos e oximetilênicos e ainda multipletos em  $\delta$  1,61; 1,99 e 2,48 - 2,63 referentes a hidrogênios alifáticos. A presença de dubletos em  $\delta$  4,18 (7,5 Hz, 1H) e em  $\delta$  4,32 (6 Hz, 1H) sugere a existência de dois hidrogênios anoméricos.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 259, p. 315) confirma a presença dos anéis aromáticos com os sinais em  $\delta$  107,0, 107,9 e entre  $\delta$  126 – 149; das metoxilas em  $\delta$  56,6; 56,9 (x2) e 60,2 e dos carbonos alifáticos em  $\delta$  33,8; 40,6; 42,7 e 46,7. Entre  $\delta$  62 e 78, estão os carbonos pertencentes a unidade de açúcar e outros carbonos carbinólicos pertencentes à estrutura.

Pelo mapa de correlação gHMQC (Figuras 260 e 261, p. 316-317), verificou-se que o hidrogênio em  $\delta$  4,18 está ligado diretamente ao carbono  $\delta$  104,8 e o hidrogênio em  $\delta$  4,32 ao carbono  $\delta$  42,7, inferindo a presença de apenas uma unidade de açúcar e não duas como proposto anteriormente. A análise do mapa de correlação gHMBC (Figuras 262-264, p. 318-320) mostrou o acoplamento a longa distância entre o hidrogênio anomérico H-1" ( $\delta$  4,18) e o carbono C-3a ( $\delta$  71,5).

A análise das correlações nos mapas gHMQC e gHMBC (Tabela 19), comparação com a literatura (ACHENBACH *et al.*, 1992), além da confirmação da fórmula molecular ( $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_{13}$ ) pela espectrometria de massas (Figura 273, p. 329), em que se observa o fragmento  $m/z$  581,2303  $[\text{M} - \text{H}]^-$  levaram a conclusão de que a substância **33** é a lignana glicosilada (+)-lioniresinol 3a-O-β-D-glicopiranosideo.

**(-)-lioniresinol 3a-O-β-D-glicopiranosideo**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **34** (Figuras 265 e 266, p. 321 e 322) mostrou-se muito semelhante ao da substância **33** diferenciando apenas no sinal do hidrogênio anomérico e de alguns hidrogênios alifáticos, sugerindo tratar-se da mesma estrutura. A comparação com dados da literatura (ACHENBACH *et al.*, 1992)

levou a determinação de **34** como (-)-lioniresinol 3a-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, ou seja, o estereoisômero de **33** (as agliconas de **33** e **34** são enantiômeros).

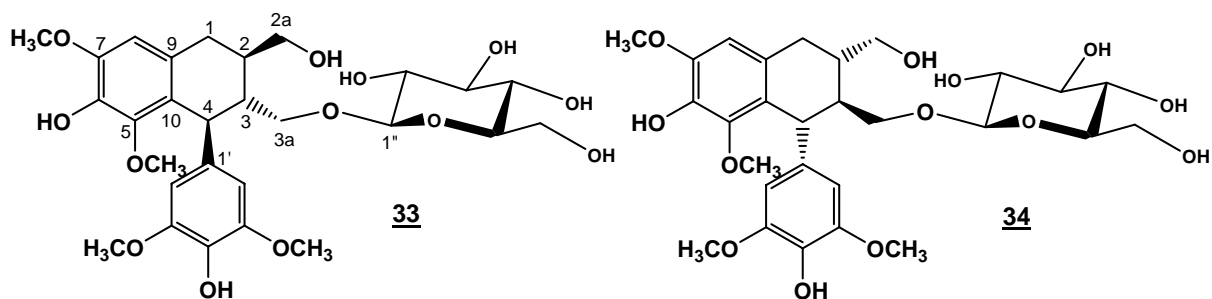


Tabela 19. Dados de RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  e gHMBC para as substâncias **33** e **34**. ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ )\*\*

nº H/C	<b>33</b>			<b>34</b>		
	$^1\text{H}^*$	$^{13}\text{C}$	gHMBC	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	gHMBC
1	2,51 (dd; 11 e 15)	33,8 (CH <sub>2</sub> )	40,6	2,56 (m, 2H)	33,8 (CH <sub>2</sub> )	41,6/46,6/107,8/126,2/130,2
2	2,61 (dd; 5 e 15)		40,6/46,7/126,4/130,2	1,58 (m, 1H)	41,6 (CH)	
2a	3,43 (dd; 6 e 11)	40,6 (CH)		3,50 (m)	66,2 (CH <sub>2</sub> )	33,8/41,6/46,6
	3,55 (dd; 4 e 11)	66,2 (CH <sub>2</sub> )				
3	1,99 (m, 1H)	46,7 (CH)		2,03 (m, 1H)	46,6 (CH)	
3a	3,35 (dd; 4 e 10)	71,5 (CH <sub>2</sub> )	40,6/42,7/46,7	3,51 (m) /3,72 (m)	72,0 (CH <sub>2</sub> )	
	3,78(dd; 5,5 e 10)					
4	4,32 (d; 6, 1H)	42,7 (CH)	40,6/46,7/107,0/126,4/	4,13 (d; 6,5; 1H)	43,2 (CH)	41,6/46,6/72,0/107,1/126,2/
			130,2/139,3/147,6/ 71,5			130,2/139,4/147,5
5	-	147,6 (C)		-	147,5 (C)	
6	-	138,9 (C)		-	138,9 (C)	
7	-	148,6 (C)		-	148,7 (C)	
8	6,48 (s, 1H)	107,9 (CH)	33,8/126,4/138,9/148,6	6,48 (s, 1H)	107,8 (CH)	33,8/126,2/138,9/148,7
9	-	130,2 (C)		-	130,2 (C)	
10	-	126,4 (C)		-	126,2 (C)	
1'	-	139,3 (C)		-	139,4 (C)	
2', 6'	6,32 (s, 2H)	107,0 (CH)	42,7/107,0/135/139,3/149,0	6,31 (s, 2H)	107,1 (CH)	43,2/107,1/135/139,4/149,0
3', 5'	-	149,0 (C)		-	149,0 (C)	
4'	-	135 (C)		-	135,0 (C)	
1''	4,18 (d; 7,5; 1H)	104,8 (CH)	71,5	4,03 (d; 7,5; 1H)	104,2 (CH)	72,0



2"	3,11-3,15 (m)	75,2 (CH)	77,9/78,2	3,03-3,11 (m)	75,1 (CH)	78,2
3"	3,11-3,15 (m)	77,9 (CH)	78,2		77,9 (CH)	
4"	3,18 (t, 8,5 Hz)	71,7 (CH)	77,9/78,2		71,6 (CH)	
5"	3,24-3,27 (m)	78,2 (CH)	71,7/75,2		78,2 (CH)	
6"	3,55 (dd, 5 e 12)	62,8 (CH <sub>2</sub> )		3,58 (m) /3,74 (m)	62,7 (CH <sub>2</sub> )	
	3,73 (dl, 12)					
5-OCH <sub>3</sub>	3,25 (s)	60,2 (CH <sub>3</sub> )	147,6	3,23 (s)	60,1 (CH <sub>3</sub> )	
7-OCH <sub>3</sub>	3,76 (s)	56,6 (CH <sub>3</sub> )	148,6	3,75 (s)	56,6 (CH <sub>3</sub> )	148,7
3',5'-OCH <sub>3</sub>	3,64 (s)	56,9 (CH <sub>3</sub> )	149,0	3,65 (s)	56,9 (CH <sub>3</sub> )	149,0

\*As multiplicidades dos hidrogênios foram obtidas com base no espectro de TOCSY 1D (Figura 258, p. 314).

\*\* $\delta$  em ppm. Multiplicidade e constante de acoplamento (*J* em Hz) entre parênteses.

#### 4.3.7. Outras classes de substâncias isoladas

##### 4.3.7.1. Substância **35**: *D*-Manitol

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **35** (Figura 274, p. 330) apresentou apenas sinais de hidrogênios oximetínicos e oximetilênicos entre  $\delta$  3,55 e 3,90, sugerindo a estrutura de um composto totalmente hidroxilado.

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 276, p. 330) e DEPT 135° (Figura 277, p. 330) confirmou o composto substituído por grupos hidroxilas pela presença de três carbonos carbinólicos em  $\delta$  64,4 ( $\text{CH}_2$ ); 69,8 (CH) e 71,2 (CH). A fórmula molecular proposta com base no pico do íon molecular  $m/z$  181,0692, observado no fragmentograma de espectrometria de massas (Figura 275, p. 330), foi  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ . Assim, com um número reduzido de carbonos observados, sugerimos que a molécula possua uma estrutura totalmente simétrica.

O conjunto dos dados adquiridos permite sugerir a substância **35** como sendo o açúcar *D*-manitol. Biossinteticamente, o *D*-manitol é produto da redução do monossacarídeo *D*-manose (DEWICK, 1997a) (Figura 45).

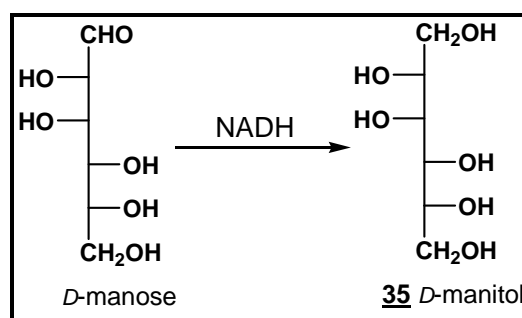


Figura 45. Conversão de *D*-manose a *D*-manitol.

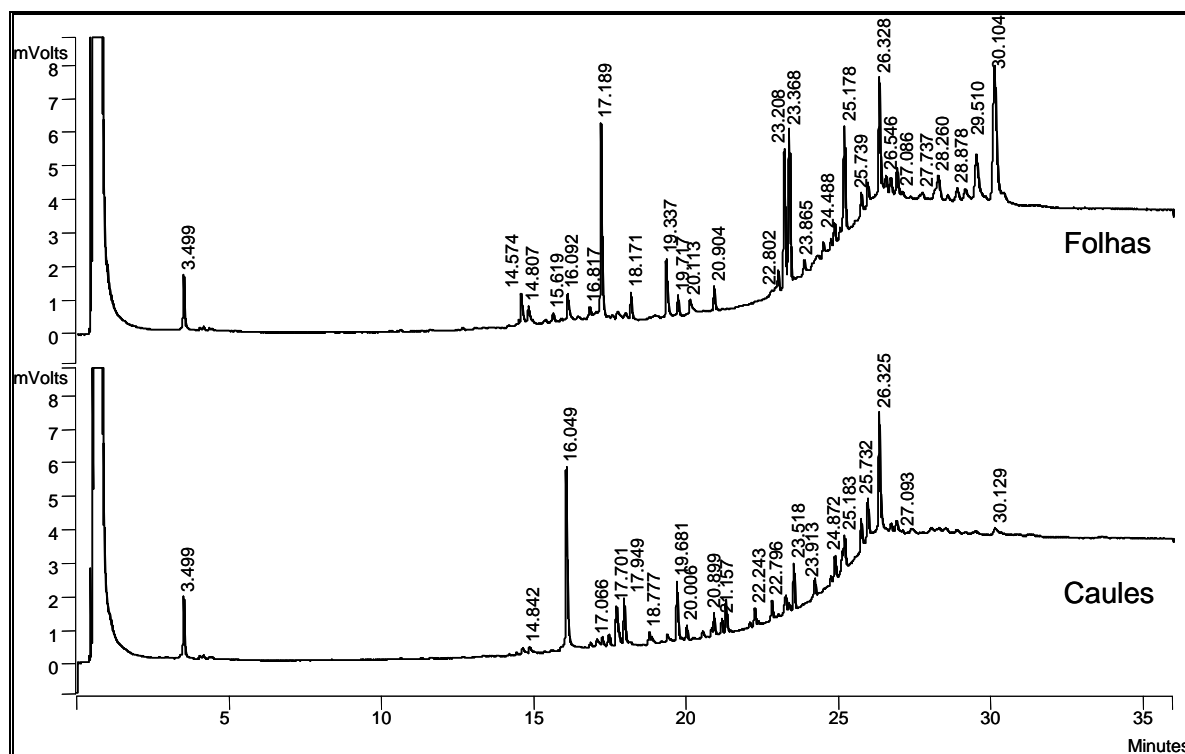
#### 4.4. Avaliação dos perfis cromatográficos das espécies estudadas

Neste trabalho, como foram fracionados apenas os extratos dos caules, optou-se em realizar uma comparação química entre esses extratos e os das folhas de cada espécie, através de RMN de  $^1\text{H}$  e cromatografia, onde foram empregadas as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia gasosa (as condições utilizadas nas cromatografias estão descritas na Parte Experimental, item 3.5 Perfis cromatográficos).

##### 4.4.1. *Alibertia edulis*

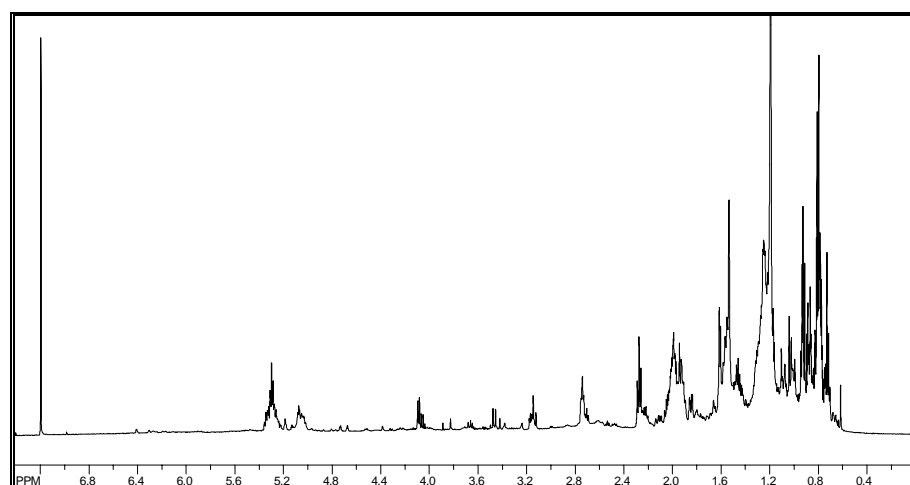
A figura 46 mostra o perfil cromatográfico do extrato hexânico das folhas e dos caules de *A. edulis*. A partir de uma análise dos picos eluídos no cromatograma

é possível verificar que a composição química nas duas partes da planta é bastante semelhante, sendo notada diferença apenas entre as concentrações dos picos onde se verifica que o cromatograma das folhas apresenta picos com maior intensidade na região das substâncias menos voláteis (26 – 30 min).

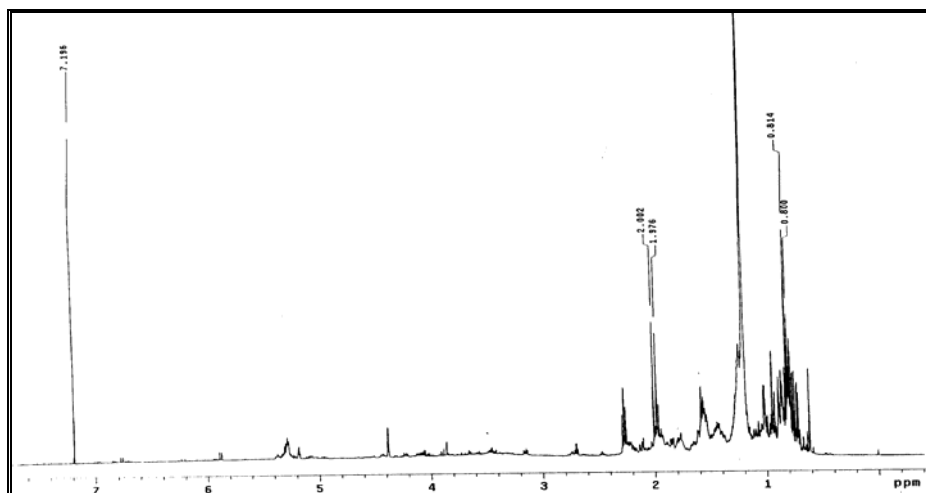


**Figura 46.** Cromatogramas obtidos dos extratos hexânicos de *A. edulis*.

A análise dos cromatogramas (Figura 46) e dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 47 e 48) obtidos nos permite inferir que os extratos hexânicos possuem mesmo perfil cromatográfico e químico.



**Figura 47.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato hexânico das folhas de *A. edulis* ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).



**Figura 48.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato hexânico dos caules de *A. edulis* ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

Os cromatogramas obtidos para os extratos em AcOEt sugerem que também possam perfis cromatográficos similares (Figura 49). Foram observados, para as folhas, espectros de UV característicos das seguintes classes químicas: iridóides (SCHAUFELBERGER, HOSTETTMANN, 1985) ( $t_r = 7,29$  min), sendo esta a substância predominante no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  desse extrato, cujos sinais correspondem ao iridóide **8** (Figura 136, p. 223); flavonóides (MARKHAM, 1982) ( $t_r = 11,96; 12,87; 13,08$  e  $13,98$  min) e derivados do ácido clorogênico (ROHR *et al.*, 2000) ( $t_r = 10,39; 11,08$  e  $15,25$  min), como mostra a figura 50. Nos cromatogramas dos extratos dos caules, observamos também picos com espectros de UV característicos de iridóides [ $t_r = 7,13; 8,37$  min (A);  $7,17$  min (B);  $7,72; 33,5$  min (C)] e derivados do ácido clorogênico [ $t_r = 8,46$  min (B) e  $8,98$  min (C)], além de taninos ou derivados fenólicos [ $t_r = 11,49; 13,97$  (B) e  $11,77$  min (C)] e não sendo observados picos com UV de flavonóides. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  dos caules além dos sinais referentes ao iridóide **8**, foram observados muitos outros sinais, caracterizando um extrato rico em substâncias (Figura 51).

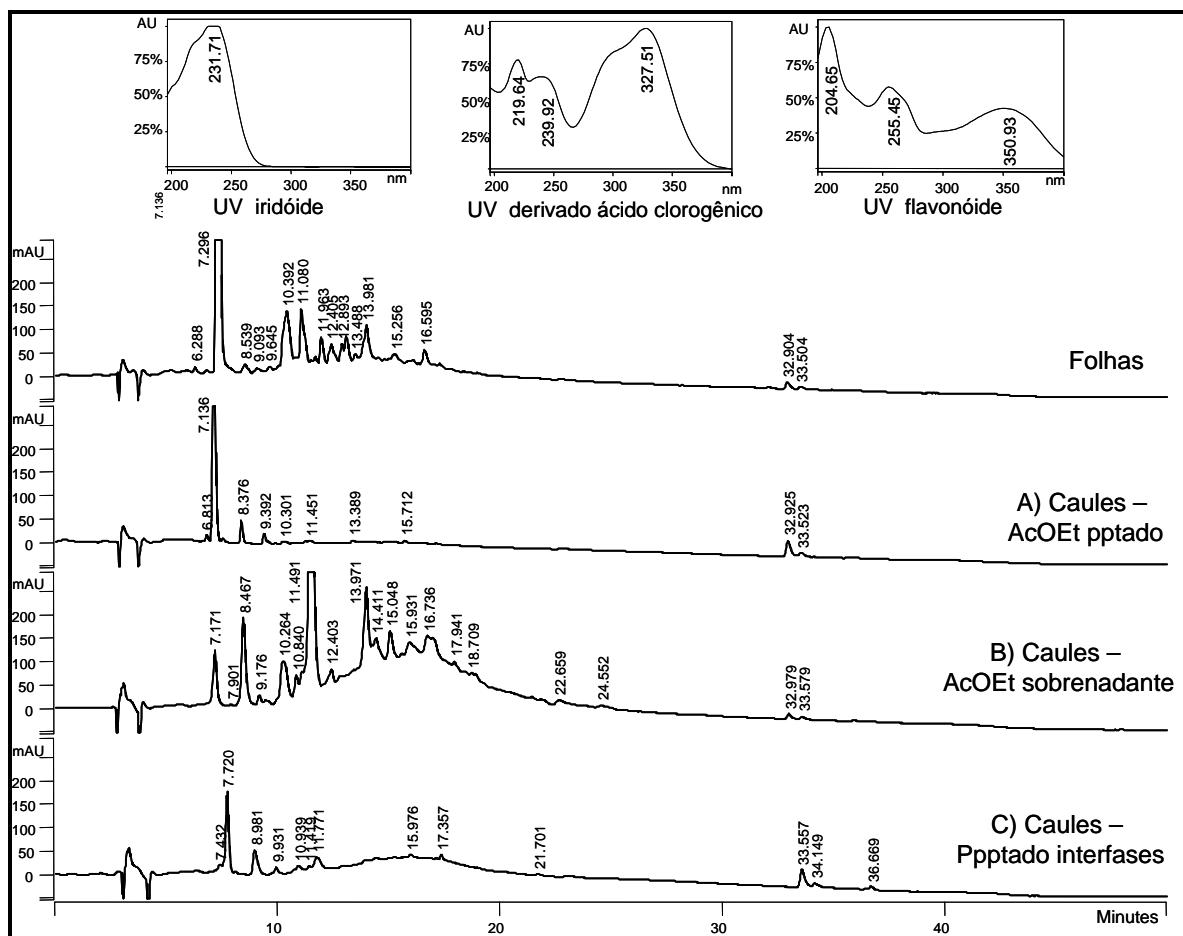


Figura 49. Cromatogramas dos extratos em AcOEt de *A. edulis* e espectro de ultravioleta das classes de substâncias observadas nos extratos.

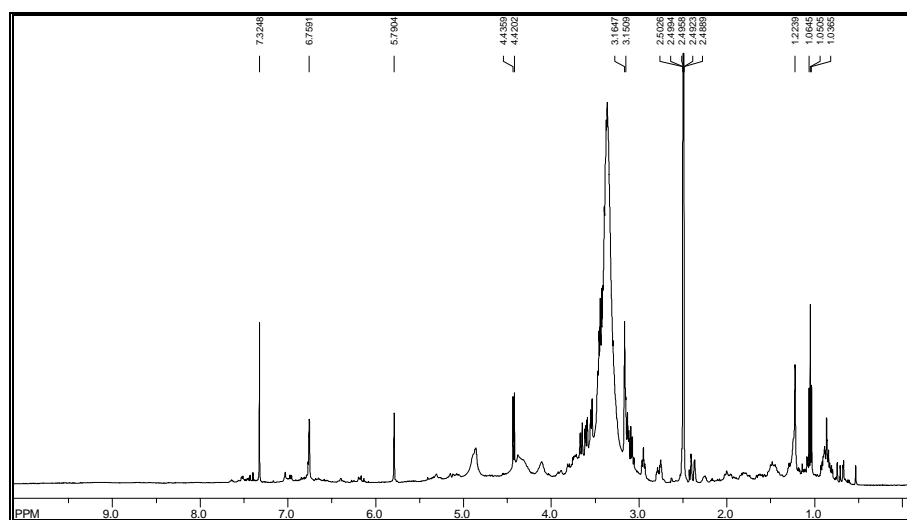
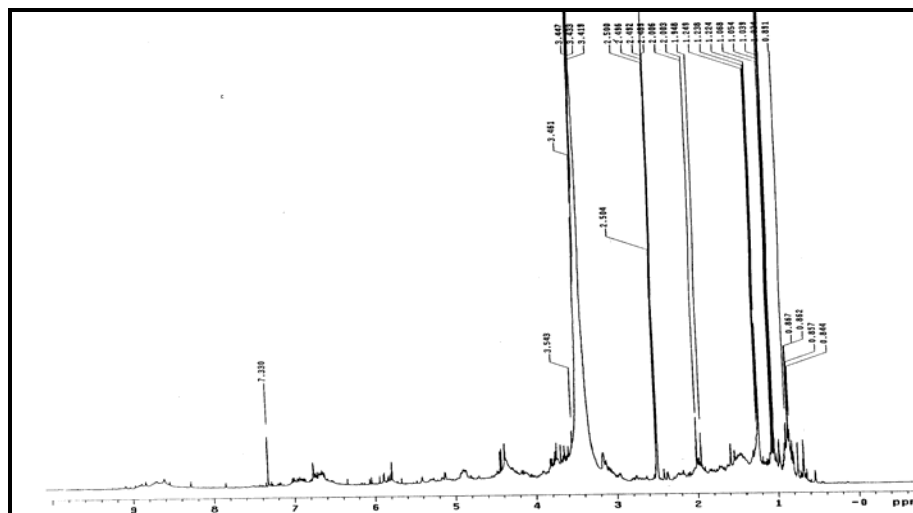


Figura 50. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do extrato em AcOEt das folhas de *A. edulis* (DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz).



**Figura 51.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato em AcOEt dos caules de *A. edulis* ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz).

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram realizados com material obtido da primeira coleta, enquanto que o perfil cromatográfico foi realizado com material da segunda coleta. Apesar disto, podemos notar a ocorrência predominante do iridóide **8** tanto no primeiro extrato quanto no segundo, do qual foi isolado.

Os cromatogramas dos extratos hidroalcoólicos (Figura 52) apresentam poucos picos com espectros de UV de iridóides em  $t_r = 7,22$  min (folhas); 7,15; 33,25 min (A - caules) e 7,16; 36,02 min (B - caules) e de derivados do ácido clorogênico em  $t_r = 8,46$ ; 10,36; 11,00; 11,59; 12,79; 13,85 min (folhas) e 10,28 min (B - caules). Além desses, foi observado pico com espectro de UV característico de flavonóide no cromatograma das folhas em  $t_r = 11,84$  min e de tanino ou derivado fenólico nos caules em  $t_r = 9,56$  e 11,35 min. O espectro de UV observado no  $t_r = 11,35$  min pode ser atribuído tanto a tanino condensado (ROHR *et al.*, 2000) quanto a derivado fenólico, uma vez que a substância **32** apresenta espectro de UV semelhante, como pode ser visto na figura 53.

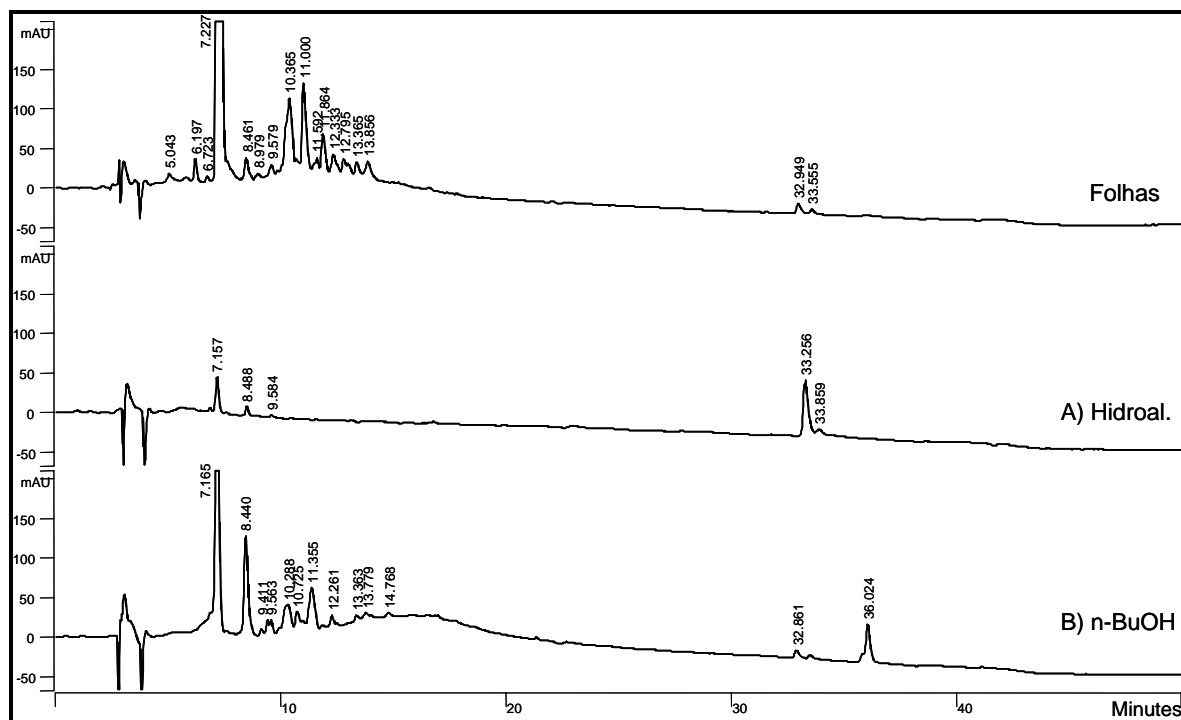


Figura 52. Cromatogramas dos extratos hidroalcoólicos de *A. edulis*.

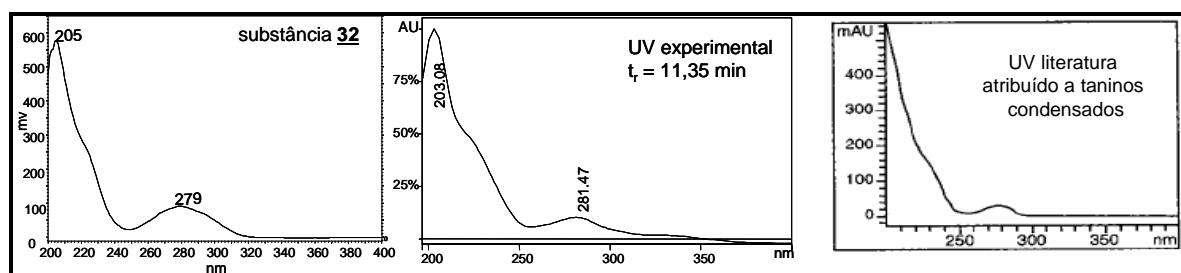
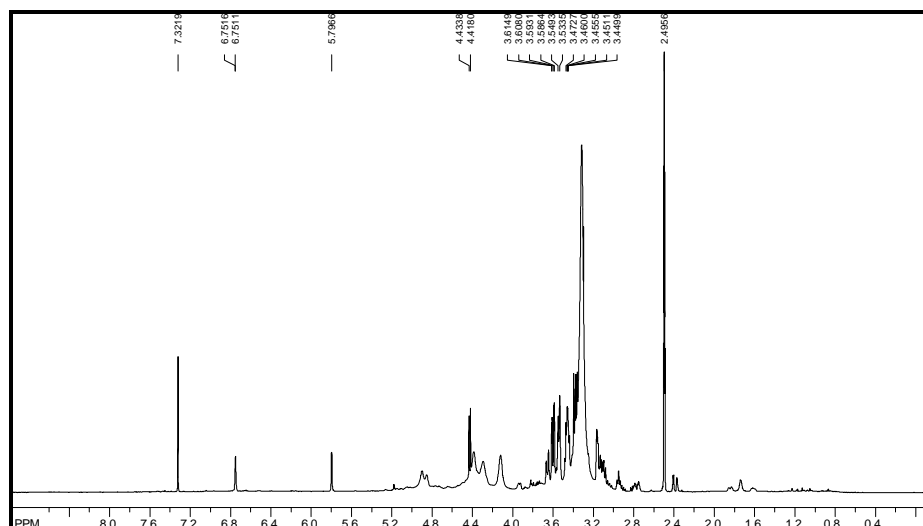
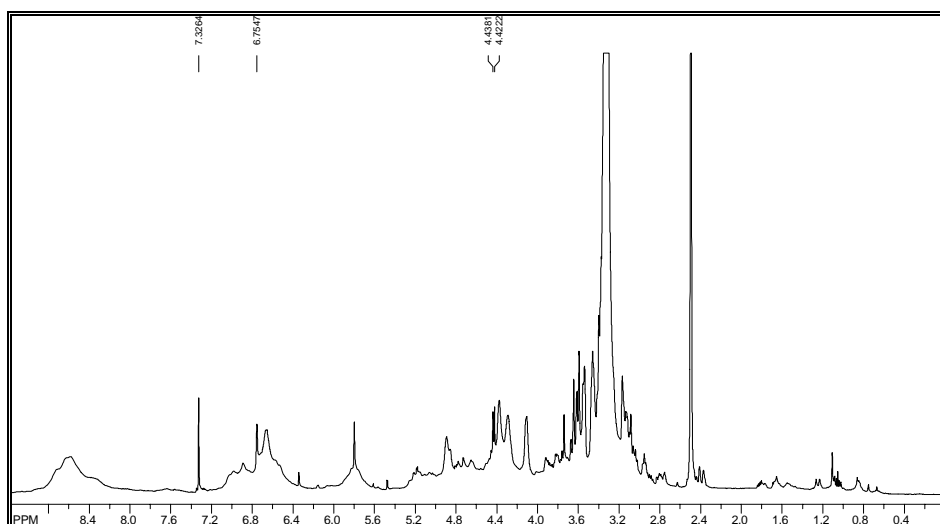


Figura 53. Espectro de ultravioleta para a substância **32**, experimental e da literatura para taninos.

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 54 e 55) foram registrados os mesmos sinais predominantes em ambos os extratos, sinais estes que caracterizam novamente o iridóide **8**.



**Figura 54.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato hidroalcolico das folhas de *A. edulis* (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figura 55.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato hidroalcolico dos caules de *A. edulis* (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

#### 4.4.2. *Alibertia macrophylla*

No extrato hexânico das folhas, apesar de muito diluído, foi possível observar alguns picos, que também estão presentes no extrato dos caules (Figura 56). É possível notar também que as substâncias eluídas no cromatograma dos caules apresentam uma diferença de aproximadamente 1 min no tempo de retenção, essa característica é geralmente encontrada para substâncias em uma série homóloga.



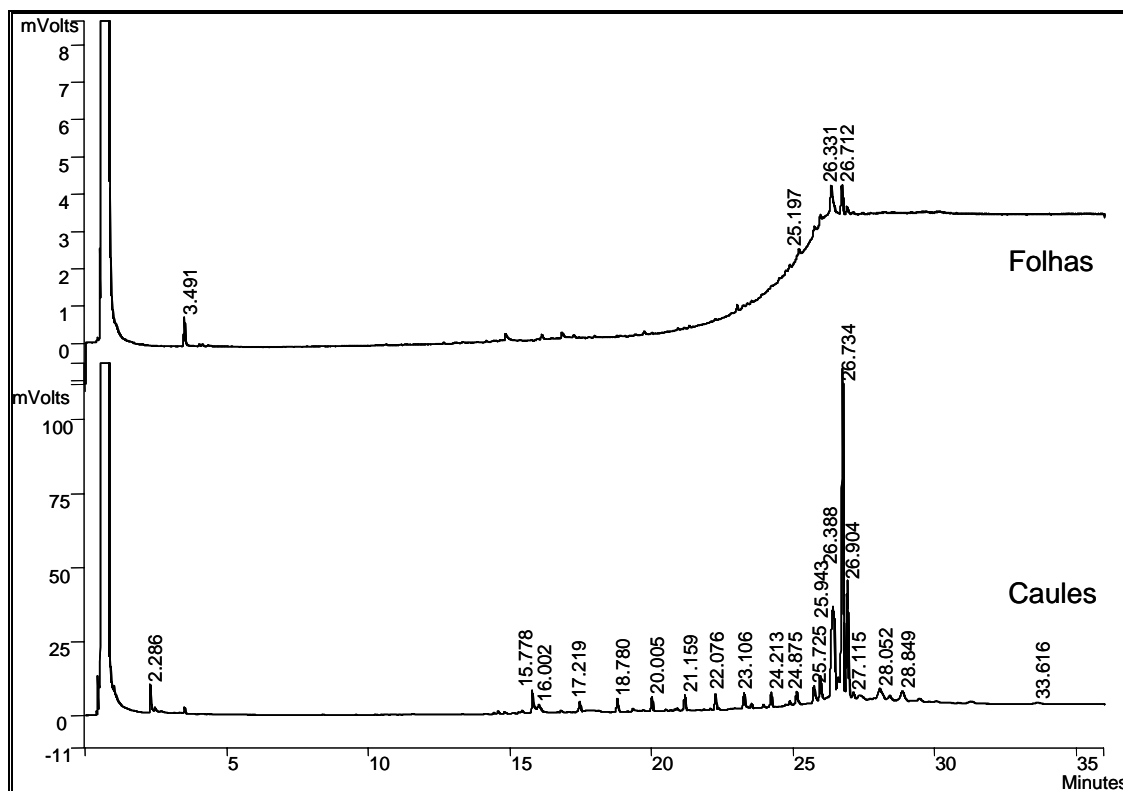


Figura 56. Cromatogramas obtidos para os extratos hexânicos de *A. macrophylla*.

A semelhança entre os extratos também pode ser verificada nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 57 e 58), pelos hidrogênios olefínicos em  $\delta$  5,3 e pelos hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,6 característico de H-30 de derivado lupano.

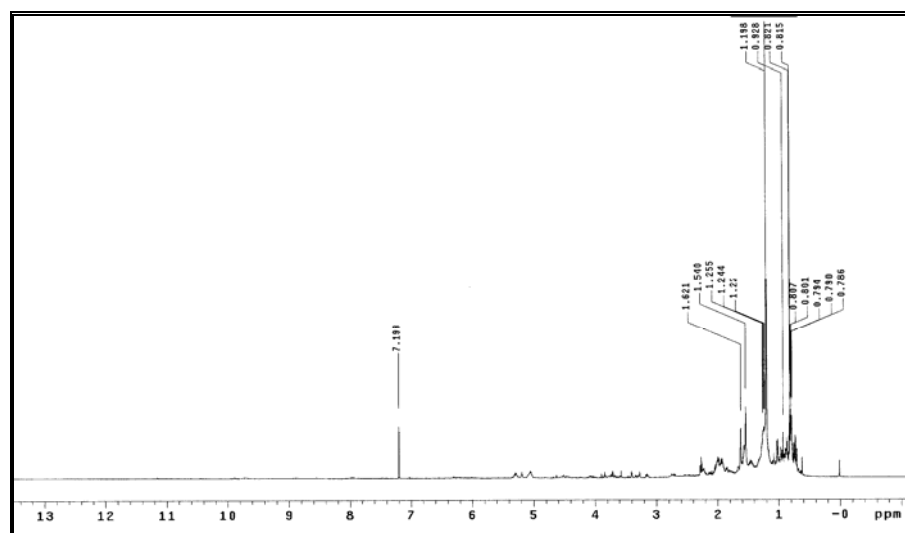
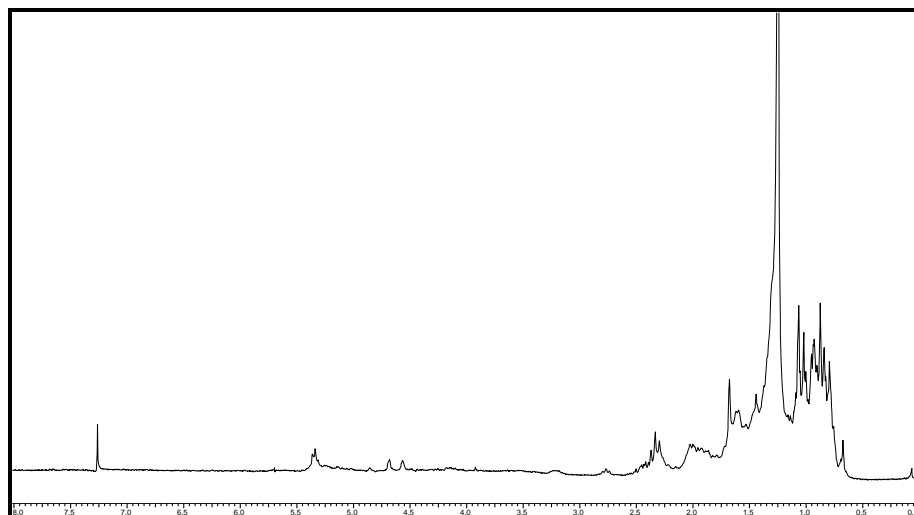
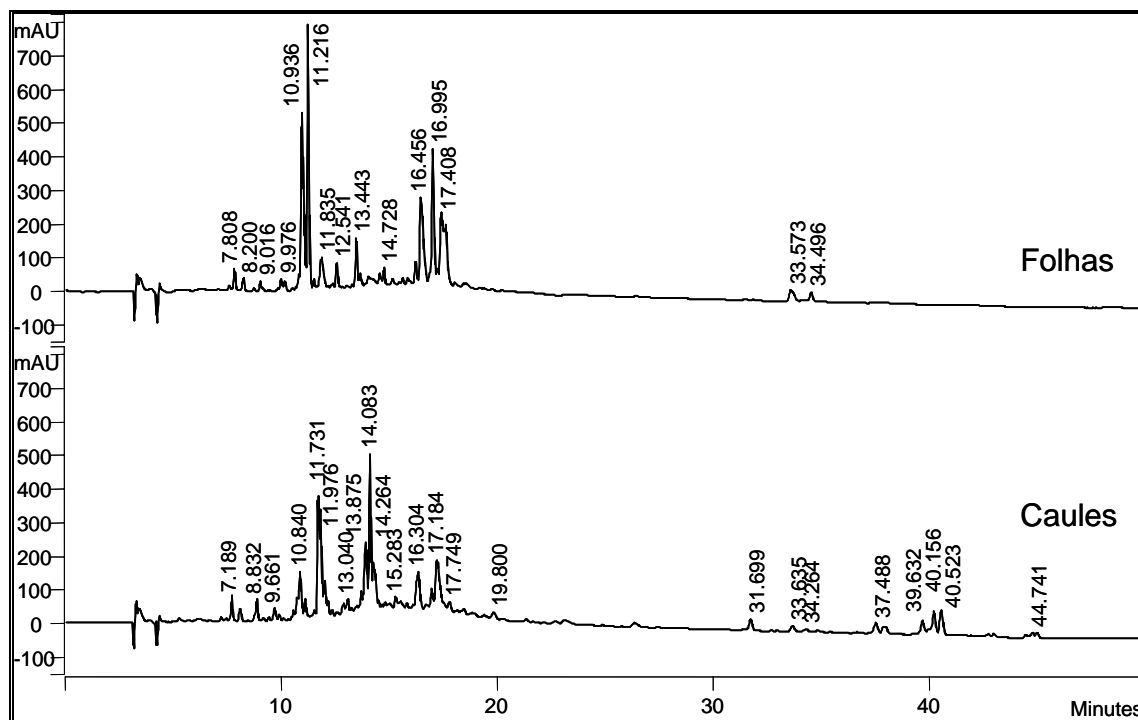


Figura 57. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato hexânico das folhas de *A. macrophylla* ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).



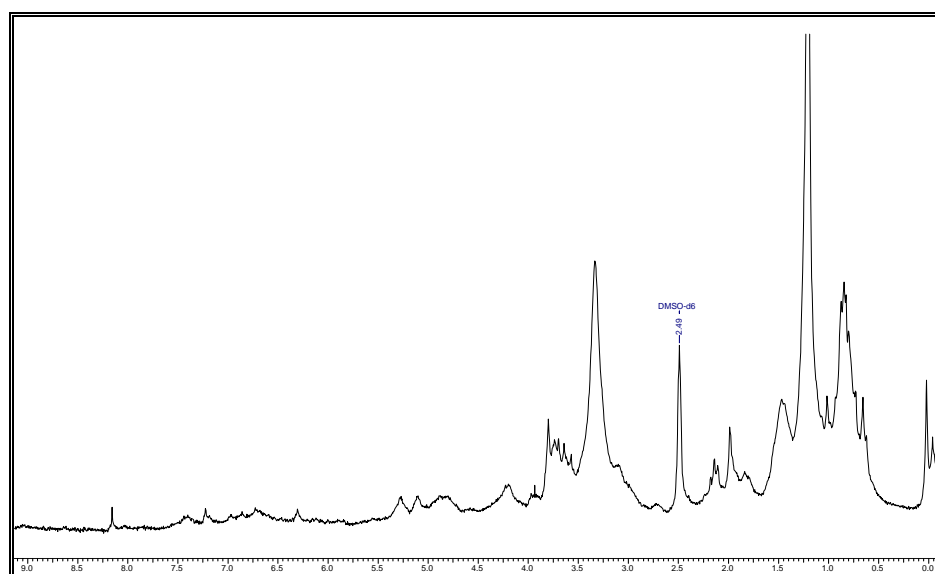
**Figura 58.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato hexânico dos caules de *A. macrophylla* ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

Os perfis cromatográficos dos extratos em AcOEt diferem na região acima de 30 min, apresentando o cromatograma dos caules um número maior de substâncias (Figura 59). Já na região abaixo de 30 min, nota-se uma semelhança nos cromatogramas. O extrato das folhas se caracteriza pela presença de derivados do ácido clorogênico ( $t_r = 9,97; 10,93; 11,83; 12,54; 16,45; 16,99$  e  $17,40$  min) e iridóide em  $t_r = 11,21$  min. O extrato dos caules, além de derivados do ácido clorogênico ( $t_r = 10,84; 16,30$  e  $17,18$  min) e iridóides ( $t_r = 31,69; 37,48; 39,63; 40,15$  e  $40,52$  min), apresenta também taninos ou derivados fenólicos ( $t_r = 11,73$  e  $14,08$  min).

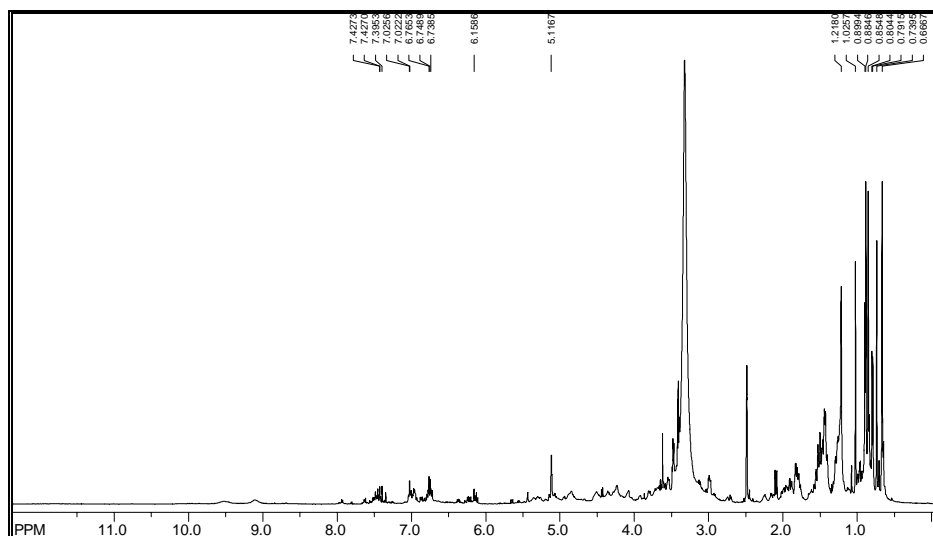


**Figura 59.** Cromatogramas obtidos para os extratos em AcOEt de *A. macrophylla*.

Assim como nos cromatogramas dos extratos em AcOEt, os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 60 e 61) se mostraram semelhantes, com sinais na região diamagnética, característica de triterpenos e sinais na região paramagnética, característica de hidrogênios olefínicos aromáticos e também na região intermediária, característica de hidrogênios de açúcares.



**Figura 60.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato em AcOEt dos caules de *A. macrophylla* (DMSO- $d_6$ , 200 MHz).



**Figura 61.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato em AcOEt das folhas de *A. macrophylla* ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz).

Através da comparação entre os cromatogramas da figura 62 é possível verificar que no extrato hidroalcolólico dos caules há a presença de substâncias de média polaridade eluindo na região de 13 - 25 min, o que não é verificado no mesmo extrato das folhas. Já na região onde há similaridade entre as substâncias eluídas, observa-se que os cromatogramas dos extratos hidroalcolólicos apresentaram dois picos em comum:  $t_r = 7,77$  min (folhas)/  $7,84$  min (caules) e  $t_r = 8,16$  min (folhas)/  $8,28$  min (caules) com espectros de UV característico de iridóide. Além desses, o extrato das folhas apresentou mais dois picos referentes à iridóides em  $t_r = 7,50$  e  $11,12$  min. Os dois extratos também apresentaram picos com UV característico de derivados do ácido clorogênico em  $t_r = 8,89$ ;  $9,89$ ;  $10,83$  e  $11,73$  min (folhas) e em  $t_r = 11,08$ ;  $16,77$  e  $17,66$  min (caules). Assim como no extrato em AcOEt, os caules apresentaram pico com UV característico de tanino ou derivados fenólico em  $t_r = 12,09$  min.

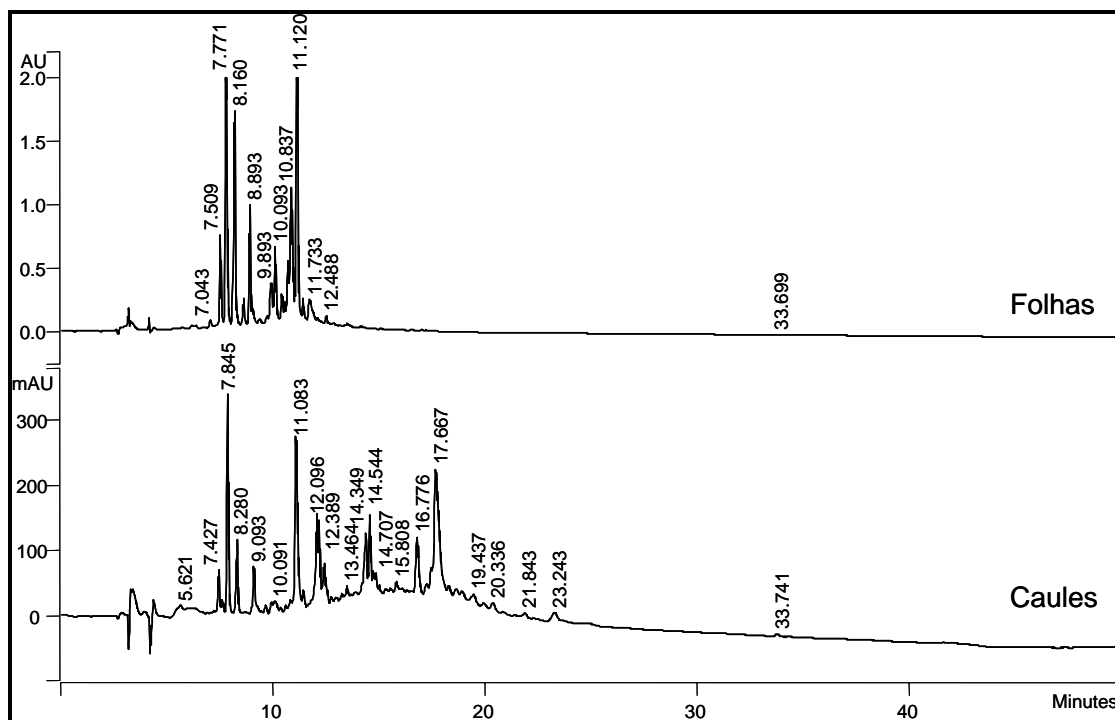


Figura 62. Cromatogramas obtidos para os extratos hidroalcoólicos de *A. macrophylla*.

Apesar dos cromatogramas mostrarem a presença de substâncias como iridóides e derivados fenólicos, tanto nos caules quanto nas folhas, os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  mostram a predominância de açúcares, como pode ser visto nas figuras 63 e 64:

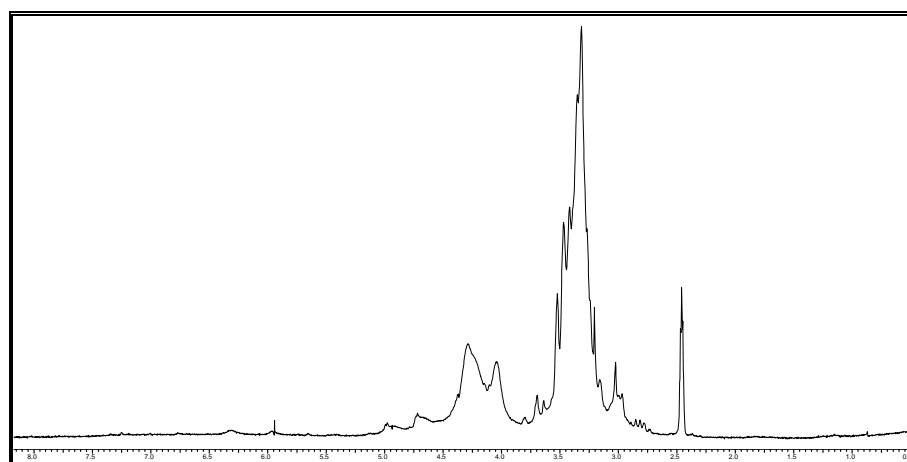
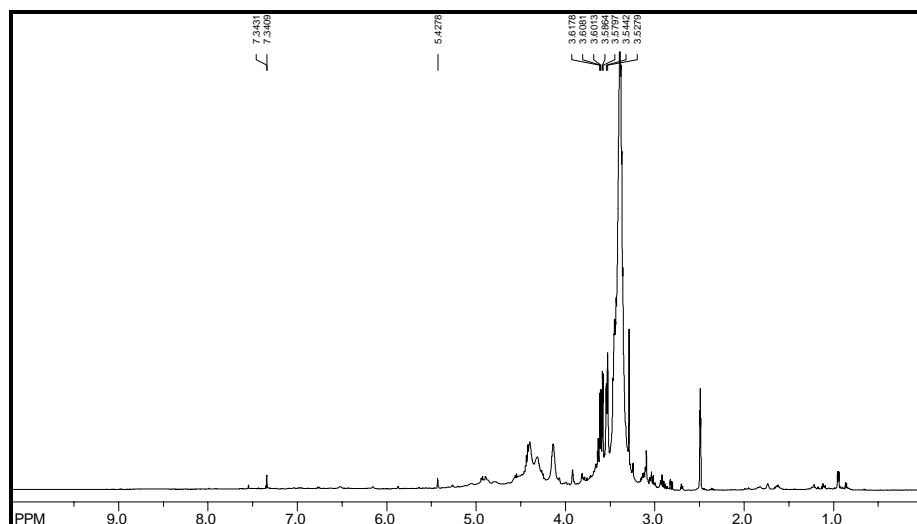


Figura 63. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato hidroalcoólico dos caules de *A. macrophylla* (DMSO- $d_6$ , 200 MHz).



**Figura 64.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato hidroalcoólico das folhas caules de *A. macrophylla* (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

#### 4.4.3. *Alibertia sessilis*

A análise dos cromatogramas obtidos para os extratos hexânicos mostra que nos caules ocorre a presença de ésteres de sitosterol com uma série homóloga da cadeia lateral, eluindo na região de 20-30 min, fato que não é verificado no extrato das folhas (Figura 65). Este, por sua vez, exhibe picos cromatográficos distintos, que nos permite sugerir que as duas partes da planta possuam perfil cromatográfico e químico diferentes. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das folhas a região referente aos hidrogênios metílicos, característicos de triterpenos, apresenta pouco sinais (Figuras 66 e 67).

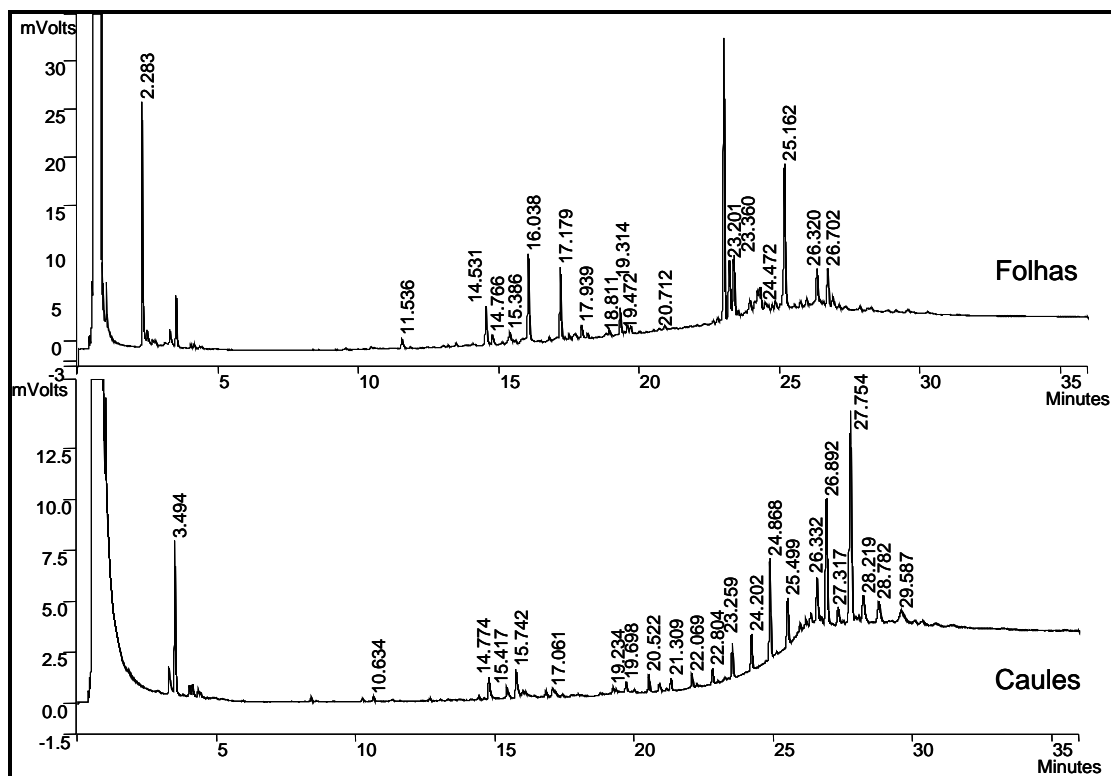


Figura 65. Cromatogramas obtidos para os extratos hexânicos de *A. sessilis*.

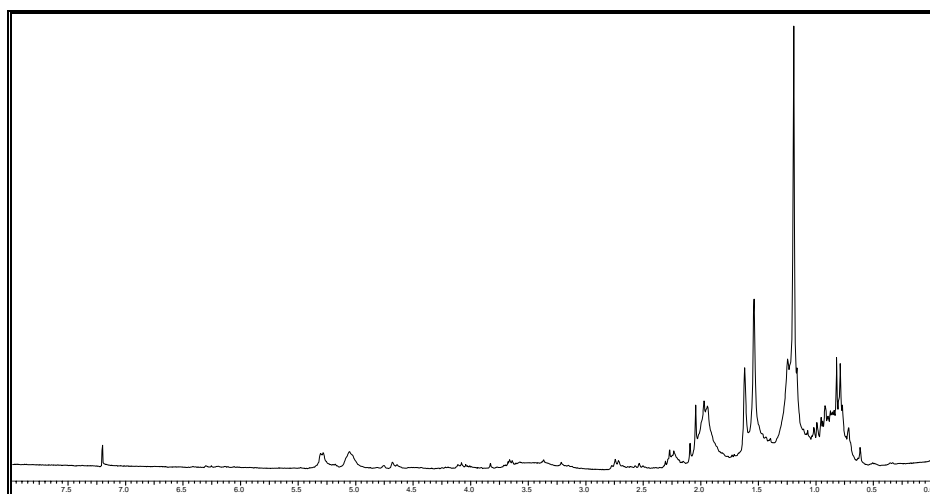
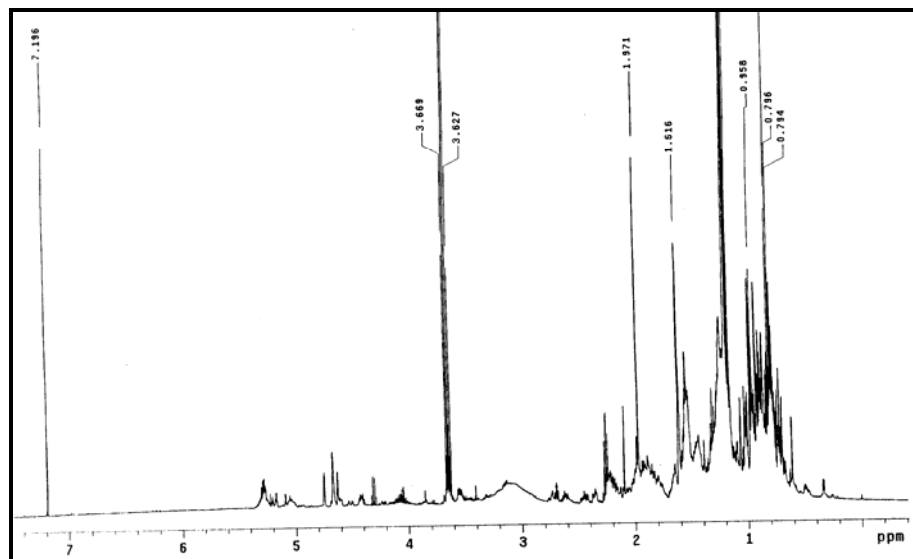


Figura 66. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do extrato hexânico das folhas de *A. sessilis* (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz).



**Figura 67.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato hexânico dos caules de *A. sessilis* ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

Os extratos em AcOEt apresentaram espectro de RMN de  $^1\text{H}$  diferentes (Figuras 69 e 70), assim como seus perfis cromatográficos (Figura 68). No extrato das folhas foram observados picos com espectro de UV característico de flavonóides em  $t_r = 16,07$ ;  $16,70$ ;  $13,85$  e  $14,09$  min e de derivados de ácido clorogênico em  $t_r = 10,30$  e  $12,19$  min. No cromatograma dos caules foram observados picos com espectro de UV referente a derivados do ácido clorogênico em  $t_r = 10,24$  min e taninos ou derivados fenólicos em  $t_r = 11,17$ ;  $11,63$  min e na região de  $12,01$  a  $18,41$  min, não definida no cromatograma. Ainda podemos notar que a principal diferença entre os cromatogramas é a baixa resolução, alargamento dos picos e a eluição sem obtenção de linha de base para o extrato dos caules, essa característica é comum quando há a presença de grande concentração de taninos (MERGHEM *et al.*, 2004).



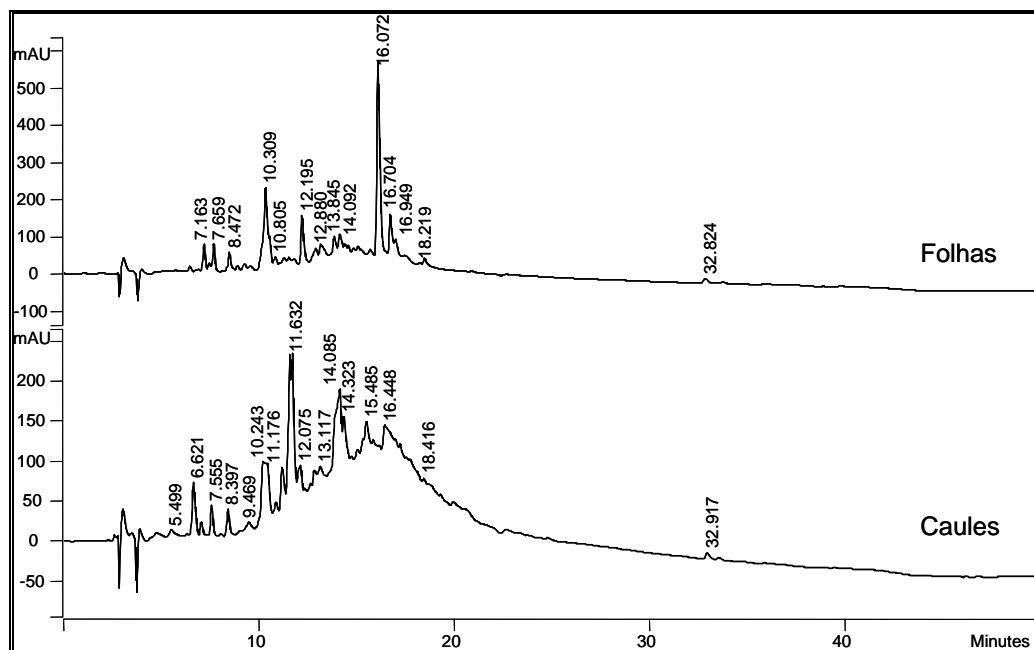


Figura 68. Cromatogramas obtidos para os extratos em AcOEt de *A. sessilis*.

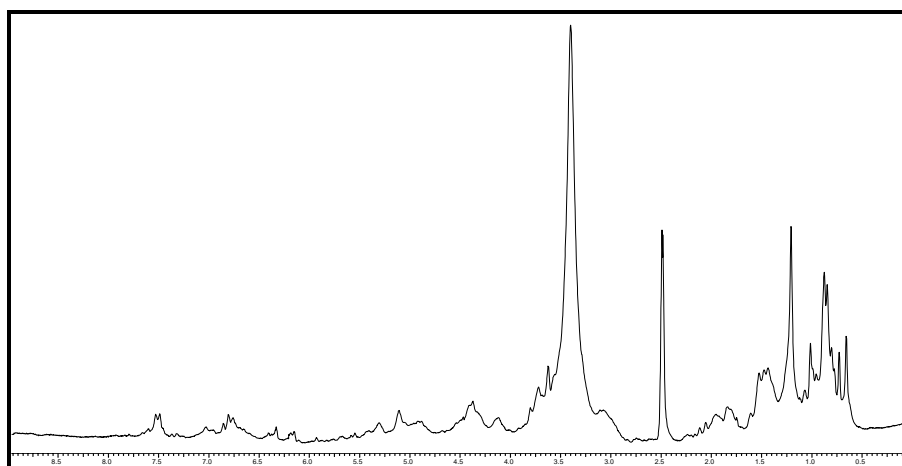


Figura 69. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato em AcOEt das folhas de *A. sessilis* ( $\text{DMSO-d}_6$ , 200 MHz).

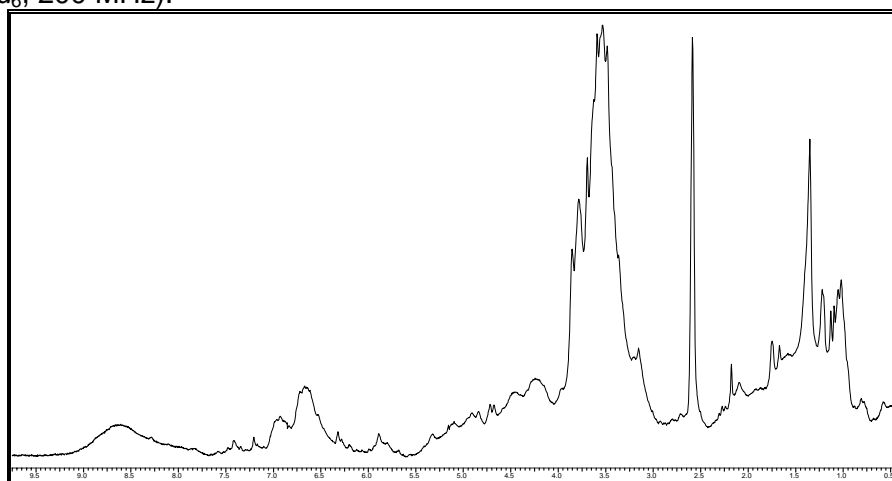


Figura 70. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato em AcOEt dos caules de *A. sessilis* ( $\text{DMSO-d}_6$ , 200 MHz).

Os extratos hidroalcoólicos além de apresentarem espectro de RMN de  $^1\text{H}$  muito semelhantes e pobres em sinais (Figuras 72 e 73), apresentaram perfis cromatográficos similares (Figura 71). O extrato das folhas apresentou picos com espectros de UV característico de iridóides em  $t_r = 7,31$ ;  $7,77$  e  $36,01$  min; de derivado do ácido clorogênico em  $t_r = 8,53$ ;  $10,13$ ;  $10,37$  min e de flavonóide em  $t_r = 10,52$  e  $12,37$  min. E o extrato dos caules se caracterizou pela presença de derivados de ácido clorogênico em  $t_r = 8,45$  e  $10,37$  min e de taninos ou derivados fenólicos em  $t_r = 11,53$  min e ao longo do cromatograma.

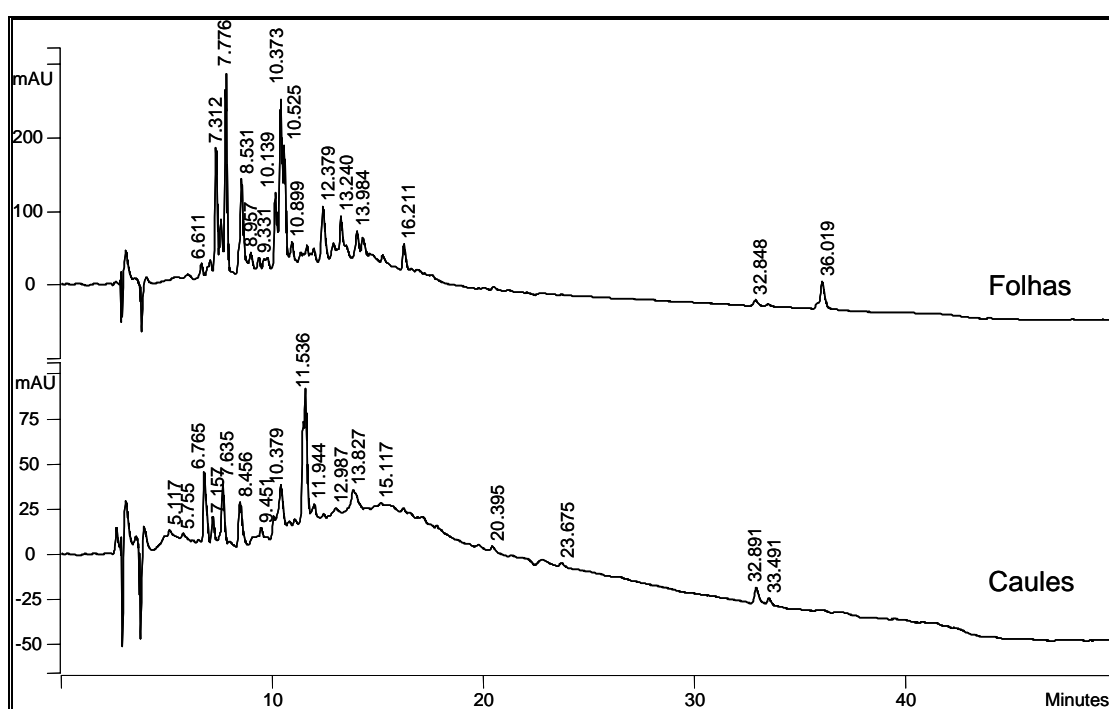


Figura 71. Cromatogramas obtidos para os extratos hidroalcoólicos de *A. sessilis*.

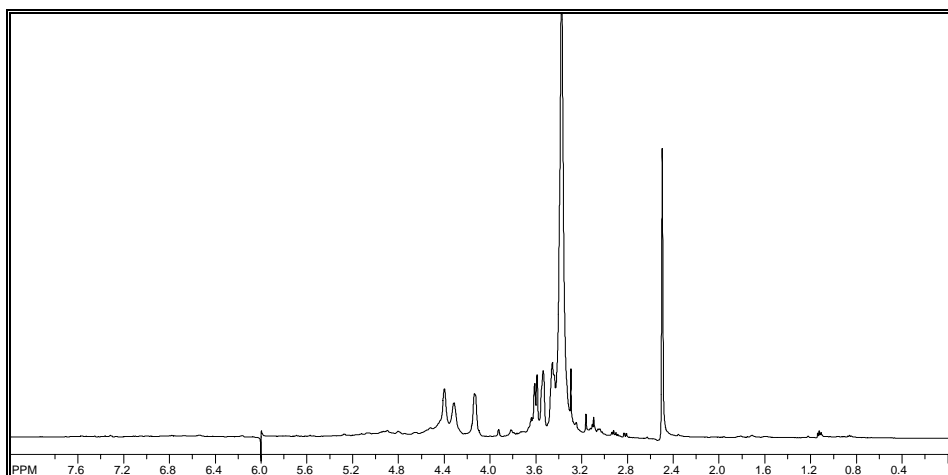
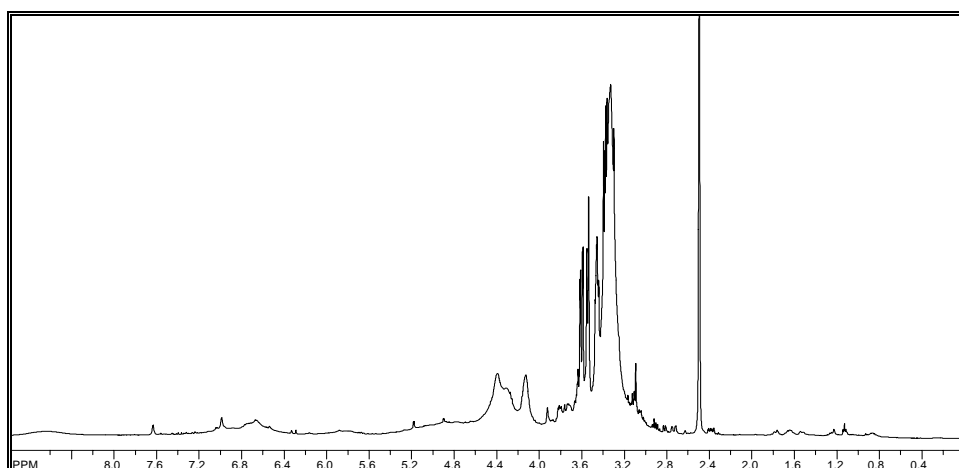
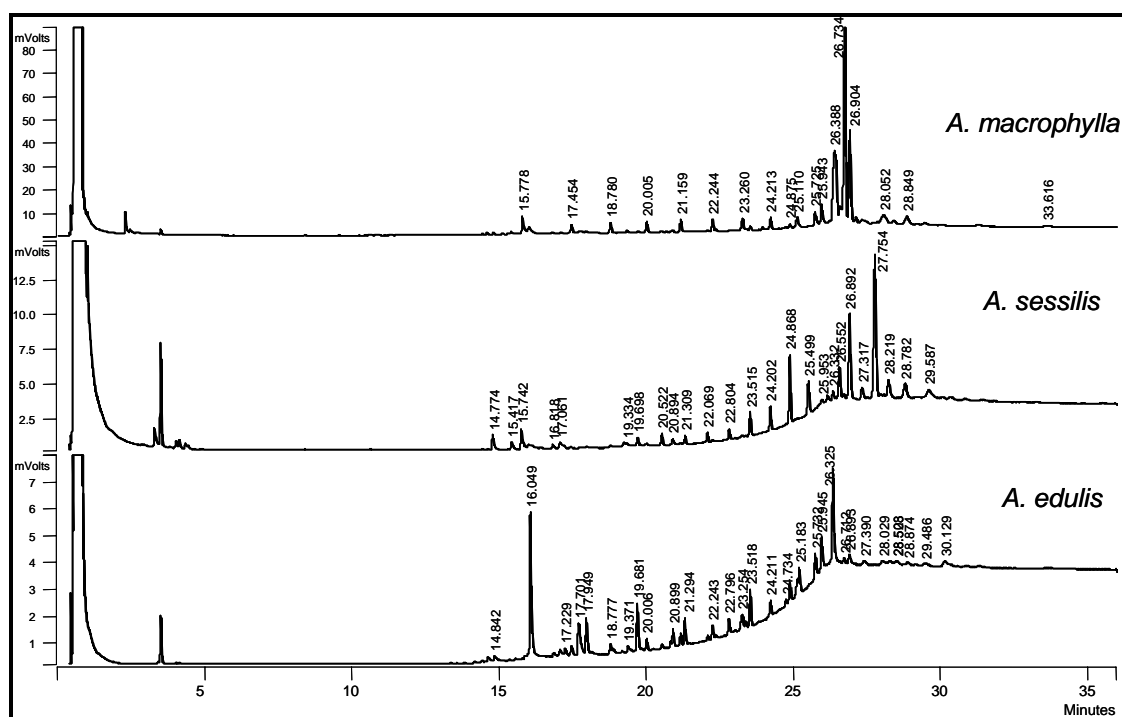


Figura 72. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. sessilis* ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz).



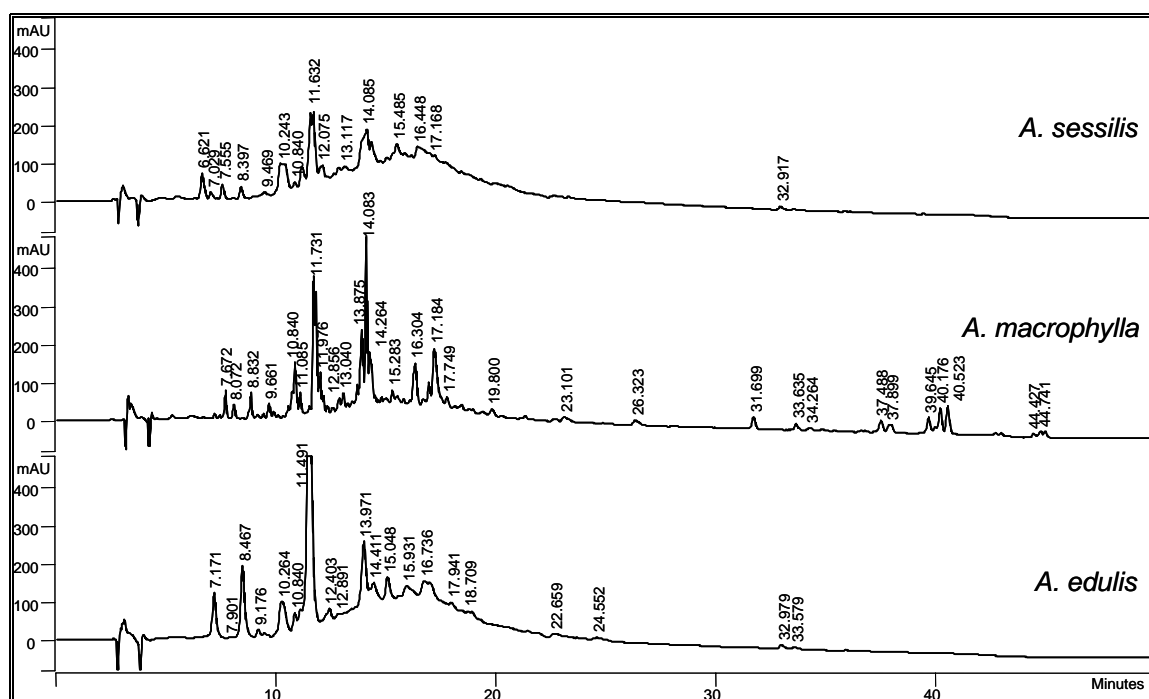
**Figura 73.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato hidroalcolico dos caules de *A. sessilis* (DMSO- $d_6$ , 200 MHz).

Por fim, uma comparação entre os extratos hexânico dos caules das três espécies, mostra semelhança nos perfis cromatográficos (Figura 74). O fracionamento químico levou ao isolamento de triterpenos do tipo oleanano e ursano nas três espécies, lupano em *A. macrophylla* e cicloartano em *A. sessilis*, além de ésteres de sitosterol em *A. edulis* e *A. macrophylla*, cujos picos cromatográficos são facilmente visualizados nos perfis dos extratos destas espécies.



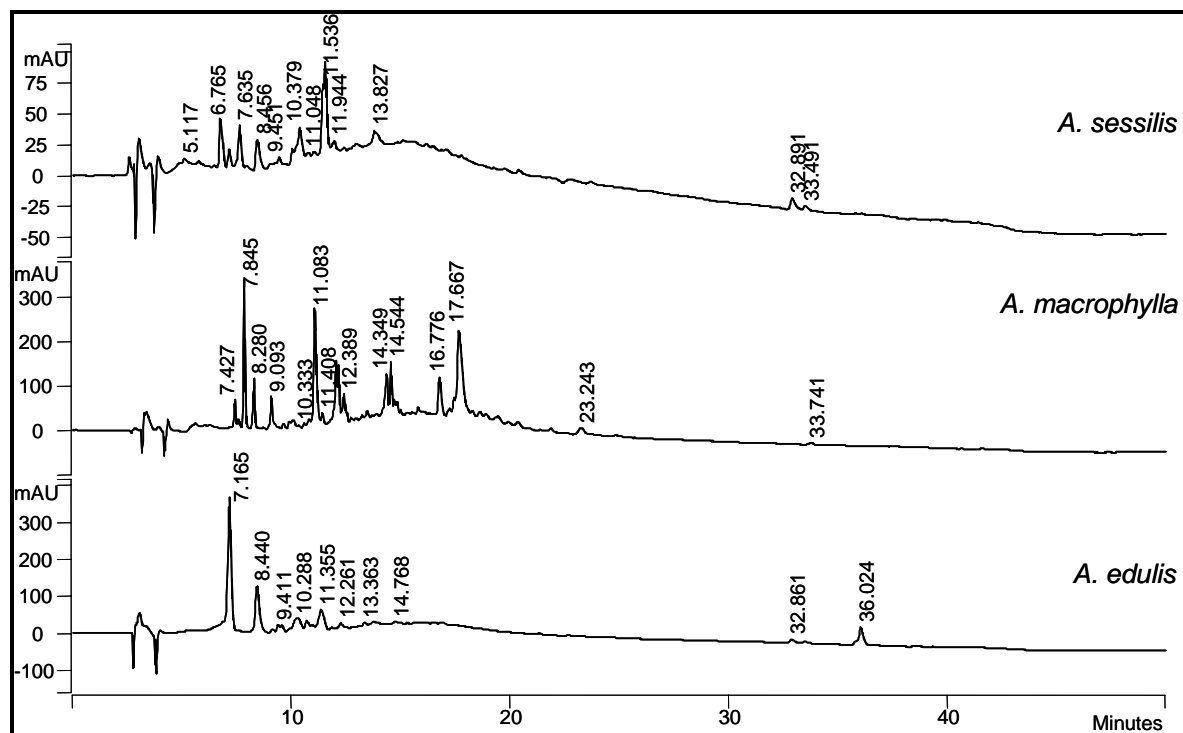
**Figura 74.** Cromatogramas obtidos para os extratos hexânicos dos caules de *A. macrophylla*, *A. sessilis* e *A. edulis*.

Os extratos em AcOEt dos caules das espécies apresentaram perfis cromatográficos e químicos semelhantes (Figura 75). Foram observados picos com espectros de UV característicos de derivados do ácido clorogênico, taninos ou derivados fenólicos nos três extratos e de iridóides em *A. edulis* e *A. macrophylla*. O fracionamento químico levou ao isolamento de iridóides e derivados fenólicos nas três espécies, além de ácido clorogênico e lignanas em *A. sessilis* e saponina em *A. edulis*.



**Figura 75.** Cromatogramas obtidos para os extratos em AcOEt dos caules de *A. macrophylla*, *A. sessilis* e *A. edulis*.

Já os extratos hidroalcolóicos dos caules apresentaram perfis diferentes (Figura 76). Foram observados picos com espectros de UV de taninos nas três plantas, derivados clorogênicos em *A. sessilis* e *A. macrophylla* e iridóides em *A. edulis* e *A. macrophylla*. O fracionamento químico realizado com *A. sessilis* levou ao isolamento de iridóides e lignanas, como no extrato em AcOEt. O fracionamento realizado com o extrato de *A. edulis* levou ao isolamento de iridóides e derivados fenólicos, como observados no perfil cromatográfico. Já o extrato hidroalcolóico de *A. macrophylla* não foi fracionado, porque o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  mostrou predominância de açúcares, não sendo interessante seu estudo.



**Figura 76.** Cromatogramas dos extratos hidroalcoólicos dos caules de *A. macrophylla*, *A. sessilis* e *A. edulis*.

Apesar de terem sido isoladas as mesmas classes de substâncias nas três espécies, podemos observar que a maioria das substâncias são diferentes, sendo poucas as coincidentes. Cabe considerar também que as plantas foram coletadas em dois Estados diferentes (São Paulo e Goiás), porém, sempre em regiões de Cerrado.

#### 4.5. Bioensaios para verificação da atividade antifúngica

##### 4.5.1. Bioautografia Direta

Os resultados obtidos para os extratos na bioautografia com os fungos fitopatogênicos *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides* estão apresentados na tabela 20.

**Tabela 20.** Resultados da bioautografia em camada delgada do teste antifúngico para os extratos provenientes da partição.

Espécie	Fração	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>		<i>Cladosporium cladosporioides</i>	
		Rf	Potencial	Rf	Potencial
<i>Alibertia edulis</i>	HF	rastro	*	-	i
	HC	rastro	**	-	i
	AF	-	i	-	i
	AC	-	i	-	i
	HDAF	-	i	-	i
	HDAC	-	i	-	i
<i>Alibertia sessilis</i>	HF	-	i	-	i
	HC	-	i	-	i
	AF <sup>#</sup>	0,61	**	-	i
	AC <sup>#</sup>	rastro	*	-	i
	HDAF	-	i	-	i
	HDAC	-	i	-	i
<i>Alibertia macrophylla</i>	HC	-	i	0,05	*
	AC	-	i	-	i
	BC	-	i	-	i
	HDAC	-	i	-	i
	HF	-	i	-	i
	AF	-	i	-	i
	HDAF	-	i	-	i

(Atividade fraca = \*/ Média atividade = \*\*/ Atividade forte = \*\*\*)

H: Hexânico, A: Acetato de etila, HDA: HiDroAlcólica, B: *n*-Butanol, F: Folhas, C: Caules.

<sup>#</sup>Sistema de eluição: AcOEt 100%.

Todas as substâncias isoladas do extrato em acetato de etila dos caules de *Alibertia sessilis*, que mostrou-se ativo, foram avaliadas quanto à atividade antifúngica. Apenas a substância **32** mostrou-se ativa na concentração de 100 µg (sistema eluente: AcOEt/MeOH 70:30 (v/v)) (Tabela 21).

**Tabela 21.** Resultados da bioautografia em camada delgada do teste antifúngico para as substâncias isoladas do extrato em acetato de etila de *A. sessilis*.

	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>		<i>Cladosporium cladosporioides</i>	
	Rf	Potencial	Rf	Potencial
<b>35</b>	-	i	-	i
<b>7</b>	-	i	-	i
<b>33</b>	-	i	-	i
<b>34</b>	-	i	-	i
<b>32</b>	0,68	*	0,68	*
<b>26</b>	-	i	-	i
<b>30</b>	-	i	-	i

As frações provenientes do extrato hexânico ativo de *A. edulis* e *A. macrophylla*, que apresentaram Rf próximo ou igual ao Rf das manchas observadas nos referidos extratos, foram avaliadas quanto à atividade antifúngica (Tabela 22). Não foi isolada nenhuma substância destas frações. Análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H das mesmas indica que se trata de material graxo polar (talvez ácidos graxos)

e, que provavelmente, sejam estes os responsáveis pela atividade observada no extrato (GATA-GONÇALVES *et al.*, 2003; WALTERS *et al.*, 2004).

**Tabela 22.** Resultados da bioautografia em camada delgada do teste antifúngico para as frações dos extratos hexânicos de *A. edulis* e *A. macrophylla*.

Espécie	Fração	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>		<i>Cladosporium cladosporioides</i>	
		Rf	Potencial	Rf	Potencial
<i>Alibertia edulis</i>	11	-	i	origem a 0,29	*
	13	-	i	origem a 0,15	*
	15	-	i	origem a 0,30	*
	16	-	i	origem a 0,10/ 0,71	*/ *
<i>Alibertia macrophylla</i>	4	-	i	-	i
	5	0,12	*	0,17	*
	6	-	i	origem a 0,10	*
	7	-	i	origem a 0,12	*
	8	-	i	origem a 0,30	*
	9	-	i	origem a 0,21	*
	10	-	i	origem/ de 0,02 a 0,30	**/ *

As substâncias **12** e **13** isoladas das frações ativas 7 e 8 do extrato hexânico dos caules de *A. macrophylla* foram avaliadas quanto à atividade antifúngica e nenhuma apresentou atividade para os fungos testados.

#### 4.5.2. Método de diluição

Os resultados obtidos dos extratos e frações frente aos fungos patógenos são mostrados na tabela 23 e estão expressos em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (CIM):

**Tabela 23.** Valores da concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) obtidas para os extratos e frações das folhas e caules de *A. sessilis*, *A. edulis* e *A. macrophylla* para os diversos fungos patógenos.

Espécie	Parte da Planta	Extrato/fração	<i>Candida albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Alibertia sessilis</i>	Caules	AcOEt	125	125	250	62,5
		n-BuOH	250	125	250	125
		HDA	250	125	250	62,5
	Folhas	Hexânica	125	250	125	62,5
		AcOEt	250	125	125	31,25
		n-BuOH	250	125	125	62,5
		HDA	insolúvel em DMSO			
<i>Alibertia edulis</i>	Caules	Hexânica	> 250	250	s.a.	s.a.
		Precipitado interfases	125	31,25	62,5	7,81
		AcOEt sobr. (SAc)	250	62,5	125	7,81
	Folhas	AcOEt sobr. (SH)	250	125	250	31,25
		AcOEt sobr. (In)	125	31,25	62,5	7,81
		AcOEt ptado	125	31,25	62,5	15,62
		n-BuOH	insolúvel em DMSO			
<i>Alibertia macrophylla</i>	Caules	HDA	insolúvel em DMSO			
		Hexânica	250	125	125	125
		AcOEt	250	250	250	125
	Folhas	HDA	250	125	125	62,5
		Hexânica	> 250	> 250	> 250	> 250
		AcOEt	> 250	250	> 250	125
		HDA	> 250	62,5	> 250	62,5
Folhas	Hexânica	125	125	125	125	
	AcOEt	250	125	125	125	
	HDA	insolúvel em DMSO				

Todas as substâncias isoladas dos extratos que apresentaram CIM menor que  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (atividade antimicrobiana forte e moderada) foram testadas a fim de verificar se alguma delas seria a responsável pela atividade apresentada no extrato (Tabela 24).



**Tabela 24.** Valores da concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) obtidas para as substâncias isoladas dos extratos que apresentaram atividade forte de *A. sessilis* e *A. edulis*.

Espécie	Substância	<i>Candida</i>	<i>Candida</i>	<i>Candida</i>	<i>Cryptococcus</i>
		<i>albicans</i>	<i>krusei</i>	<i>parapsilosis</i>	<i>neoformans</i>
<i>Alibertia</i>	<b>35</b>	125	62,5	250	> 250
<i>sessilis</i>	<b>26</b>	62,5	31,25	62,5	> 250
	<b>8</b>	250	250	> 250	> 250
<i>Alibertia</i>	<b>5 + 31</b>	250	125	> 250	> 250
<i>edulis</i>	<b>6</b>	125	125	> 250	> 250
	<b>25</b>	125	62,5	> 250.	> 250
<i>Alibertia</i>					
<i>macrophylla</i>	<b>9</b>	125	62,5	250	> 250

As substâncias diterpeno **9**, saponina **25**, ácido salicílico **26** e D-manitol **35**, apresentaram forte atividade antifúngica quando bioensaiadas com *Candida*.

Os baixos valores de CIM para os extratos polares dos caules de *A. edulis* provavelmente se justificam pela presença de taninos, como foi verificado durante o fracionamento e nos testes realizados durante a partição (Figura 10, p. 53).

Segundo SANTOS (2003), testes *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros têm apresentado diversas atividades biológicas. Dentre elas podemos citar: ação bactericida e fungicida (SCALBERT, 1991), antiviral, moluscicida, inibição de enzimas como glicosiltransferases de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus*, inibição da peroxidação de lipídios e seqüestrador de radicais livres e ação antitumoral.

#### 4.6. Bioensaios para verificação da atividade antitumoral

##### 4.6.1. Avaliação de citotoxicidade com *Saccharomyces cerevisiae*

Conforme dados da tabela 25, nenhum dos extratos testados, provenientes da partição, mostrou-se ativo quando submetidos a ensaios utilizando linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*.

**Tabela 25.** Resultados da bioautografia em camada delgada do teste de citotoxicidade para os extratos provenientes da partição de *A. edulis* e *A. sessilis*.

Espécie	Fração	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
		Rad+	Rad 52Y	Rad 321N
<i>Alibertia edulis</i>	HF			
	HC			
	AF			
	AC			
	HDAF			
	HDAC			
<i>Alibertia sessilis</i>	HF			
	HC			
	AF			
	AC			
	HDAF			
	HDAC			

H: Hexânico, A: Acetato de etila, HDA: HiDroAlcólica, B: *n*-Butanol, F: Folhas, C: Caules.

#### 4.6.2. Avaliação da citotoxicidade com linhagens tumorais

A atividade citotóxica das amostras testadas está apresentada na Tabela 26, com seus respectivos percentuais de inibição. Nenhuma das amostras mostrou atividade citotóxica frente às linhagens tumorais testadas e nenhum valor de inibição  $\geq 75\%$  em pelo menos duas linhagens.

**Tabela 26.** Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Valores são média  $\pm$  DPM.

Substâncias	SF-295		HCT-80		MDA-MB/435	
	Média	DPM	Média	DPM	Média	DPM
Doxorrubicina	92,32	2,19	93,34	1,75	97,04	1,06
15	15,96	31,57	4,33	5,28	-3,88	24,33
35	-5,18	0,29	-21,52	10,29	-8,55	4,74
7	-4,28	6,28	-40,14	0,27	-22,53	5,32
33	-2,62	3,73	-23,89	3,91	-0,57	12,63
34	46,20	5,49	20,91	11,04	48,43	10,23
32	22,07	23,34	-5,27	26,81	28,92	1,70

A inatividade observada nos bioensaios antitumorais, apesar de não promissora quanto ao emprego farmacológico, mostra por outro lado, que estas espécies, pelo menos no âmbito dos testes realizados, não apresentam riscos de toxicidade.

## 5. CONCLUSÕES

O estudo químico e biológico dos caules das espécies de *Alibertia edulis*, *A. macrophylla* e *A. sessilis*, pertencentes à família Rubiaceae, através do isolamento de 35 substâncias e da verificação das atividades antifúngicas e citotóxicas, proporcionou-nos, principalmente, o conhecimento da composição química dessas espécies nativas do Cerrado brasileiro.

Dentre as substâncias isoladas, destacam-se 11 triterpenos, 8 com esqueletos do tipo ursano e oleanano, que caracterizam o gênero na literatura, 2 derivados lupanos e 1 derivado cicloartano ácido 21-hidroxi-3,4-seco-cicloart-4(29),24(31)-dien-3-óico (**20**), sendo este ainda não relatado na literatura. O diterpeno  $2\beta,3\alpha,16\alpha$ -triidroxi-*ent*-caurano, isolado de *A. macrophylla*, merece destaque ao ser o primeiro relato no gênero e também na literatura. Está sendo descrito também, pela primeira vez no gênero e na literatura a saponina bidesmosídica pomolato de  $3\beta$ -O- $[\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1→2)-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1→2)-O- $\beta$ -D-glicopiranosideo 28-O- $\beta$ -D-glicopiranosideo (**25**).

Dos 9 derivados fenólicos, ainda não descritos no gênero, as lignanas **33** e **34** estão sendo relatadas pela primeira vez na família e o derivado fenólico glicosilado 3,4,5-trimetoxifenil-1-O- $\beta$ -D-(5-O-siringoila)-apiofuranosil-(1→6)-glicopiranosideo **32**, pela primeira vez na literatura.

A composição química do gênero foi constituída ainda de 8 iridóides glicosilados, sendo o éster metílico  $6\beta$ -hidroxi-7-*epi*-gardosideo (**6**) relatado pela primeira vez na literatura. Estes compostos são marcadores quimiotaxonômicos de Rubiaceae.

TREVISAN (1993) no manuscrito "A química micromolecular e a classificação de Rubiaceae" mostra, pelo perfil químico de centenas de espécies de Rubiaceae, que iridóides são marcadores quimiotaxonômicos na sub-família Ixoroideae, e que o gênero *Alibertia*, pertencente a esta sub-família, se caracteriza pela presença de iridóides, triterpenóides e derivados fenólicos. Desta forma, o isolamento de iridóides, derivados fenólicos e triterpenóides ao longo deste trabalho vem a confirmar a colocação do gênero *Alibertia* em Ixoroideae. Além disso, esta sub-família, segundo INOUE e colaboradores (1988), se caracteriza por ser constituída principalmente dos iridóides gardenosídeo e geniposídeo, e estes foram isolados neste estudo.

Neste trabalho, apesar de fracionados somente os extratos dos caules das três espécies de *Alibertia*, uma comparação do perfil químico entre os extratos dos caules e das folhas mostra que possuem a mesma constituição química: iridóides, derivados fenólicos e triterpenos.

No estudo biológico realizado com os extratos, frações e substâncias puras isoladas de frações ou extratos ativos, foram avaliados os potenciais antifúngico e citotóxico. Apenas o derivado fenólico 3,4,5-trimetoxifenil-1-O- $\beta$ -D-(5-O-siringoila)-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)glicopiranosideo (**32**) apresentou atividade antifúngica frente aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides* na concentração de 100  $\mu$ g. Os extratos polares de *Alibertia edulis* mostraram atividade antifúngica, com CIM entre 7,81 – 62,5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, frente aos fungos patogênicos *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, e *Cryptococcus neoformans*. Neste caso, a atividade observada pode ser justificada pela presença de taninos observada nos extratos e frações. As substâncias diterpeno **9**, saponina **25**, ácido salicílico **26** e D-manitol **35**, também mostraram forte atividade antifúngica quando bioensaiadas com *Candida*.

Quanto ao bioensaio de citotoxicidade, apesar dos resultados não serem promissores quanto ao emprego farmacológico, mostram, por outro lado, que estas espécies, pelo menos no âmbito dos testes realizados, não apresentam riscos de toxicidade.

Este trabalho contribui para a investigação químico-farmacológica da Flora brasileira, ao estudar a composição química e avaliar as atividades antifúngica e citotóxica dos extratos, frações e substâncias isoladas das espécies *Alibertia edulis*, *A. macrophylla* e *A. sessilis*, pertencentes a quarta maior família de plantas do Brasil, dentro das angiospermas.

## 6. REFERÊNCIAS

ACHENBACH, H.; LÖWEL, M.; WAIBEL, R.; GUPTA, M.; SOLIS, P. New lignan glucosides from *Stemmadenia minima*. **Planta Med.**, v. 58, p. 270-272, 1992.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Planejamento racional baseado no mecanismo de ação: fármacos inteligentes. In: \_\_\_\_\_. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 2001. cap. 3, p. 83-124.

BERGMANN, E. D.; IKAN, R.; HAREL, S. Thin-layer chromatography of  $\beta$ -sitosteryl esters. **J. Chromatog.**, v. 15, p. 204-206, 1964.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.

BIALY, Z.; JURZYSTA, M.; OLESZEK, W.; PIACENTE, S.; PIZZA, C. Saponins in alfafa (*Medicago sativa* L.) root and their structural elucidation. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, n. 8, p. 3185-3192, 1999.

BIANCO, A. The chemistry of iridoids. In: ATTA-UR-RAHMAN (Ed.). **Studies in natural products chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 1990. v. 7, p. 439-497.

BOLZANI, V. DA S.; TREVISAN, L. M. V.; IZUMISAWA, C. M.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I.; YOUNG, M. C. M. Iridoids from *Tocoyena formosa*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 2, p. 305-308, 1997.

BOLZANI, V. DA S.; TREVISAN, L. M. V.; YOUNG, M. C. M. Caffeic acid esters and triterpenes of *Alibertia macrophylla*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 6, p. 2089-2091, 1991.

BOLZANI, V. DA S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, A. R.; SILVA, D. H. S.; LOPES, M. N. Secondary metabolites from brazilian Rubiaceae plant species: chemotaxonomical and biological significance. **Recent Res. Devel. Phytochem.**, v. 5, p. 19-31, 2001.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Primeiro relatório nacional para a convenção sobre diversidade biológica**. Brasília: MMA, 1998. 283 p.

BROCHINI, C. B.; MARTINS, D.; ROQUE, N. F.; BOLZANI, V. DA S. An oleanane acid from *Alibertia edulis*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 5, p. 1293-1295, 1994.

CABRERA, G. M.; GALLO, M.; SELDES, A. M. A 3,4-seco-cycloartane derivative from *Tillandsia usneoides*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 3, p. 665-666, 1985.

CARBONEZI, C. A. **Estudo fitoquímico e biológico de *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. e *Chiococca alba* Hitch. (Rubiaceae)**. 1998. 201 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1998.

CARBONEZI, C. A.; MARTINS, D.; YOUNG, M. C. M.; LOPES, M. N.; FURLAN, M.; RODRIGUES FILHO, E.; BOLZANI, V. DA S. Iridoid and seco-iridoid glucosides from *Chiococca alba* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 51, n. 6, p. 781-785, 1999.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003. cap. 20, p. 519-536.

CASTRO, A. A. J. F.; MARTINS, F. R.; TAMASHIRO, J. Y.; SHEPHERD, G. J. How rich is the flora of brazilian cerrados? **Ann. Missouri Bot. Gard.**, v. 86, n. 1, p. 192-224, 1999.

CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. Kauranes. In:\_\_\_\_\_. **Dictionary of terpenoids**. Di- and higher terpenoids. London: Chapman & Hall, 1991. v. 2, p. 921-927.

CSEKE, L. J.; KAUFMAN, P. B. How and why these compounds are synthesized by plants. In: KAUFMAN, P. B.; CSEKE, L. J.; WARBER, S.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. **Natural products from plants**. New York: CRC Press, 1998. cap. 2, p. 37-90.

DAMTOFT, S.; JENSEN, R. S.; NIELSEN, B. J. <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy as a tool in the configurational analysis of iridoid glucosides. **Phytochemistry**, v. 20, n. 12, p. 2717-2732, 1981.

DAMTOFT, S. Iridoid glucosides in *Zaluzianskya capensis*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 2, p. 373-375, 1994.

DELGADO, G.; ALVAREZ, L.; VIVAR, A. R. 15-Hydroxy-acetylerioflorin and other constituents from *Viguiera linearis*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 11, p. 2736-2738, 1985.

DEWICK, P. M. Carbohydrates. In: \_\_\_\_\_. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. New York: John Wiley & Sons, 1997a. cap. 8, p. 427-447.

DEWICK, P. M. The mevalonate pathway: terpenoids and steroids. In: \_\_\_\_\_. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. New York: John Wiley & Sons, 1997b. cap. 5, p. 152-264.

DEWICK, P. M. Secondary metabolism: the building blocks and construction mechanisms. In: \_\_\_\_\_. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. New York: John Wiley & Sons, 1997c. cap. 2, p. 5-31.

DEWICK, P. M. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. In: \_\_\_\_\_. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. New York: John Wiley & Sons, 1997d. cap. 4, p. 109-150.

DI STASI, L. C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: \_\_\_\_\_. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: UNESP, 1995. cap. 9, p. 109-127.

EISENREICH, W.; SCHWARZ, M.; CARTAYRADE, A.; ARIGONI, D.; ZENK, M. H.; BACHER, A. The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoids biosynthesis in plants and microorganisms. **Chem. Biol.**, v. 5, n. 9, p. R221-R233, 1998.

EISENREICH, W.; ROHDICH, F.; BACHER, A. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. **Trends Plant Sci.**, v. 6, n. 2, p. 78-84, 2001.

EL-NAGGAR, L. J.; BEAL, J. L. Iridoids. a review. **J. Nat. Prod.**, v. 43, n. 6, p. 649-706, 1980.

FORGO, P.; KÖVÉR, K. E. Gradient enhanced selective experiments in the <sup>1</sup>H NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. **Steroids**, v. 69, n. 1, p. 43-50, 2004.

FURLAN, M.; ROQUE, N. F.; WOLTER FILHO, W. Cycloartane derivatives from *Guarea trichilioides*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1519-1522, 1993.

GATA-GONÇALVES, L.; NOGUEIRA, J. M. F.; MATOS, O.; SOUSA, R. B. Photoactive extracts from *Thevetia peruviana* with antifungal properties against *Cladosporium cucumerinum*. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v. 70, p. 51-54, 2003.

GRAYER, R. J.; KOKUBUN, T. Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. **Phytochemistry**, v. 56, n. 3, p. 253-263, 2001.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003. cap. 1, p. 13-28.

GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I.; JOHNSON, R. K. Mechanism-based isolation and structures of some anticancer active natural products. **Pure & Appl. Chem.**, v. 66, n. 10/11, p. 2219-2222, 1994.

HAGERMAN, A. E. **Tannin Chemistry**. 2002. Disponível em: <<http://www.users.muohio.edu/hagermae>>. Acesso em: 25 set. 2006.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003. cap. 29, p.765-792.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOMANS, A. L.; FUCHS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **J. Chromatog.**, v. 51, p. 327-329, 1970.



HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. A importância das plantas medicinais. In: \_\_\_\_\_. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003. cap. 1, p. 9-42.

INOUE, H.; TAKEDA, Y.; NISHIMURA, H.; KANOMI, A.; OKUDA, T.; PUFF, C. Chemotaxonomic studies of rubiaceaceous plants containing iridoid glycosides. **Phytochemistry**, v. 27, n. 8, p. 2591-2598, 1988.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Ecossistemas brasileiros**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/home.htm>>. Acesso em: 19 dez. 2006.

INSTITUTO PLANTARUM. **Viajem ao Alto Paranaíba – MG**. Disponível em: <<http://www.plantarum.com.br/altoparnaiba2005.html>>. Acesso em: 28 jan. 2007.

ISHII, T.; YANAGISAWA, M. Synthesis, separation and NMR spectral analysis of methyl apiofuranosides. **Carbohydr. Res.**, v. 313, n. 3/4, p. 189-192, 1998.

JUNG, M. J.; KANG, S. S.; JUNG, Y. J.; CHOI, J. S. Phenolic glycosides from the stem bark of *Albizia julibrissin*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 52, n. 12, p. 1501-1503, 2004.

KANCHANAPOOM, T.; KASAI, R.; YAMASAKI, K. Iridoid and phenolic glycosides from *Morinda coreia*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 551-556, 2002.

KOIKE, K.; CORDELL, G. A.; FARNSWORTH, N. R.; FREER, A. A.; GILMORE, C. J.; SIM, G. A. New cytotoxic diterpenes from *Rondeletia panamensis* (Rubiaceae). **Tetrahedron**, v. 36, n. 9, p. 1167-1172, 1980.

KRITCHEVSKY, D.; CHEN, S. C. Phytosterols - health benefits and potential concerns: a review. **Nutr. Res.**, v. 25, p. 413-428, 2005.

LOPES, M. N.; MAZZA, F. C.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. DA S. Complete Assignments of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of the 3,4-seco-triterpene canaric acid isolated from *Rudgea jasminoides*. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 10, n. 3, p. 237-240, 1999.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1998. v. 2, p. 284.

LUCIANO, J. H. S.; LIMA, M. A. S.; SOUZA, E. B.; SILVEIRA, E. R. Chemical constituents of *Alibertia myrciifolia* Spruce ex K. Schum. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 32, n. 12, p. 1227-1229, 2004.

MAHATO, S. B.; SEN, S. Advances in triterpenoids research, 1990-1994. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, p. 1185-1236, 1997.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MAJUMDER, P. L.; MAITI, R. N.; PANDA, S. K.; MAL, D. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of naturally occurring substances. 64. Structure of moronic acid. **J. Org. Chem.**, v. 44, n. 15, p. 2811-2811, 1979.

MARKHAM, K. R. Ultraviolet-visible absorption spectroscopy. In: \_\_\_\_\_. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982. cap. 3, p. 36-50.

MERGHEM, R.; JAY, M.; BRUN, N.; VOIRIN, B. Qualitative analysis and HPLC isolation and identification of procyanidins from *Vicia faba*. **Phytochem. Anal.**, v. 15, p. 95–99, 2004.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade brasileira**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/sbf/chm/capa/index.html>>. Acesso em: 19 dez. 2006.

MORIDANI, M. Y.; SCOBIE, H.; JAMSHIDZADEH, A.; SALEHI, P.; O'BRIEN, P. J. Caffeic acid, chlorogenic acid and dihydrocaffeic acid metabolism: glutathione conjugate formation. **Drug Metab. Dispos.**, v. 29, n. 11, p. 1432-1439, 2001.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAGASAMPAGI, B. A.; ROWE, J. W.; SIMPSON, R.; GOAD, L. J. Sterols of coffee. **Phytochemistry**, v. 10, n. 5, p. 1101-1107, 1971.

NES, W. D.; NORTON, R. A.; BENSON, M. Carbon-13 NMR studies on sitosterol biosynthesized from [ $^{13}\text{C}$ ] mevalonates. **Phytochemistry**, v. 31, n. 3, p. 805-811, 1992.

THE NEW YORK BOTANICAL GARDEN. **Virtual Herbarium**: catalog of vascular plants. Disponível em: < <http://sweetgum.nybg.org/vh/specimen.php?irn=651800> >. Acesso em: 28 jan. 2007.

OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de  $^{13}\text{C}$ . **Quim. Nova**, v. 13, n. 4, p. 278-281, 1990.

OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F.; BOLZANI, V. DA S. Acylated flavonol glycosides and terpenoids from the leaves of *Alibertia sessilis*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 8, n. 3, p. 257-259, 1997.

PAULA, J. R.; VIEIRA, I. J. C.; SILVA, M. F. G. F. DA; FILHO, E. R.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; PINHEIRO, A. L.; VILELE, E. F. Sesquiterpenes, triterpenoids, limonoids and flavonoids of *Cedrela odorata* graft and speculations on the induced resistance against *Hypsipyla grandella*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 8, p. 1449-1454, 1997.

PETER JUNIOR. Recent developments in the isolation and structure elucidation on naturally occurring iridoid compounds. **Planta Med.**, v. 56, p. 1-13, 1990.

POSER, G. L. V.; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003. cap. 4, p. 75-89.

REZANKA, T.; GUSCHINA, I. Glycosidic compounds of murolic, protoconstipatic and allo-murolic acids from lichens of Central Asia. **Phytochemistry**, v. 54, n. 6, p. 635-645, 2000.

ROHMER, M. A mevalonate-independent route to isopentenyl diphosphate. In: CANE, D. E. **Comprehensive natural products chemistry**. Stuttgart: Elsevier, 1999. v. 2, cap. 3, p. 45-68.

ROHR, G. E.; MEIER, B.; STICHER, O. Evaluation of different detection modes for the analysis of procyanidins in leaves and flowers of *Crataegus spp.* Part I. Diode array and electrochemical detection. **Phytochem. Anal.**, v. 11, n. 2, p. 106-112, 2000.

SAKAI, T.; NAKAGAWA, Y. Diterpenes stress metabolites from cassava roots. **Phytochemistry**, v. 27, n. 12, p. 3769-3779, 1988.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003. cap. 16, p.403-434.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003. cap. 24, p. 615-656.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.

SCHAUFELBERGER, D.; HOSTETTMANN, K. Analytical and preparative reversed-phase liquid chromatography of secoiridoid glycosides. **J. Chromatogr.**, v. 346, p. 369-400, 1985.

SCHENKEL, E. P.; ZANNIN, M.; MENTZ, L. A.; BORDIGNON, S. A. L.; IRGANG, B. Plantas tóxicas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003. cap. 37, p. 959-994.

SHEPHERD, G. J. **Plantas terrestres: avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica do Brasil**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2003. 60 p.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BODESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit-sharing: perspectives from the field. **J. Ethnopharmacol.**, v. 51, n. 1/3, p. 1-15, 1996.

TAKABAYASHI, J.; DICKE, M. Plant-carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants. **Trends Plant Sci.**, v. 1, n. 4, p. 109-113, 1996.

TAKEDA, Y.; NISHIMURA, H.; INOUE, H. Two new iridoid glucosides from *Mussaenda parviflora* and *Mussaenda shikokiana*. **Phytochemistry**, v. 16, n. 9, p. 1401-1404, 1977.

TREVISAN, L. M. V. **A química micromolecular e a classificação de Rubiaceae.** 1993. 52 f. Tese (Livre-Docência) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1993.

VERMES, B.; WAGNER, H. Synthesis and structure proof of morindone 6-O-gentiobioside from *Morinda tinctoria*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 11, p. 2493-2494, 1980.

WALTERS, D.; RAYNOR, L.; MITCHELL, A.; WALKER R.; WALKER, K. Antifungal activities of four fatty acids against plant pathogenic fungi. **Mycopathologia**, v. 157, p. 87-90, 2004.

XU, R.; FAZIO, G. C.; MATSUDA, S. P. T. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 261-291, 2004.

YANG, H.; SUNG, S. H.; KIM, Y. C. Two new hepatoprotective stilbene glycosides from *Acer mono* leaves **J. Nat. Prod.**, v. 68, n. 1, p. 101-103, 2005.

YOUNG, M. C. M.; BRAGA, M. R.; DIETRICH, S. M. C.; GOTTLIEB, H. E.; TREVISAN, L. M. V.; BOLZANI, V. DA S. Fungitoxic non-glycosidic iridoids from *Alibertia macrophylla*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3433-3435, 1992.

YOUNG, M. C. M.; ARAÚJO, A. R.; DA SILVA, C. A.; LOPES, M. N.; TREVISAN, L. M. V.; BOLZANI, V. DA S. Triterpenes and saponins from *Rudgea viburnioides*. **J. Nat. Prod.**, v. 61, n. 7, p. 936-938, 1998.

ZHANG, X.; GEOFFROY, P.; MIESCH, M.; JULIEN-DAVID, D.; RAUL, F.; AOUD'E-WERNER, D.; MARCHIONI, E. Gram-scale chromatographic purification of  $\beta$ -sitosterol: Synthesis and characterization of  $\beta$ -sitosterol oxides. **Steroids**, v. 70, n. 13, p. 886-895, 2005.

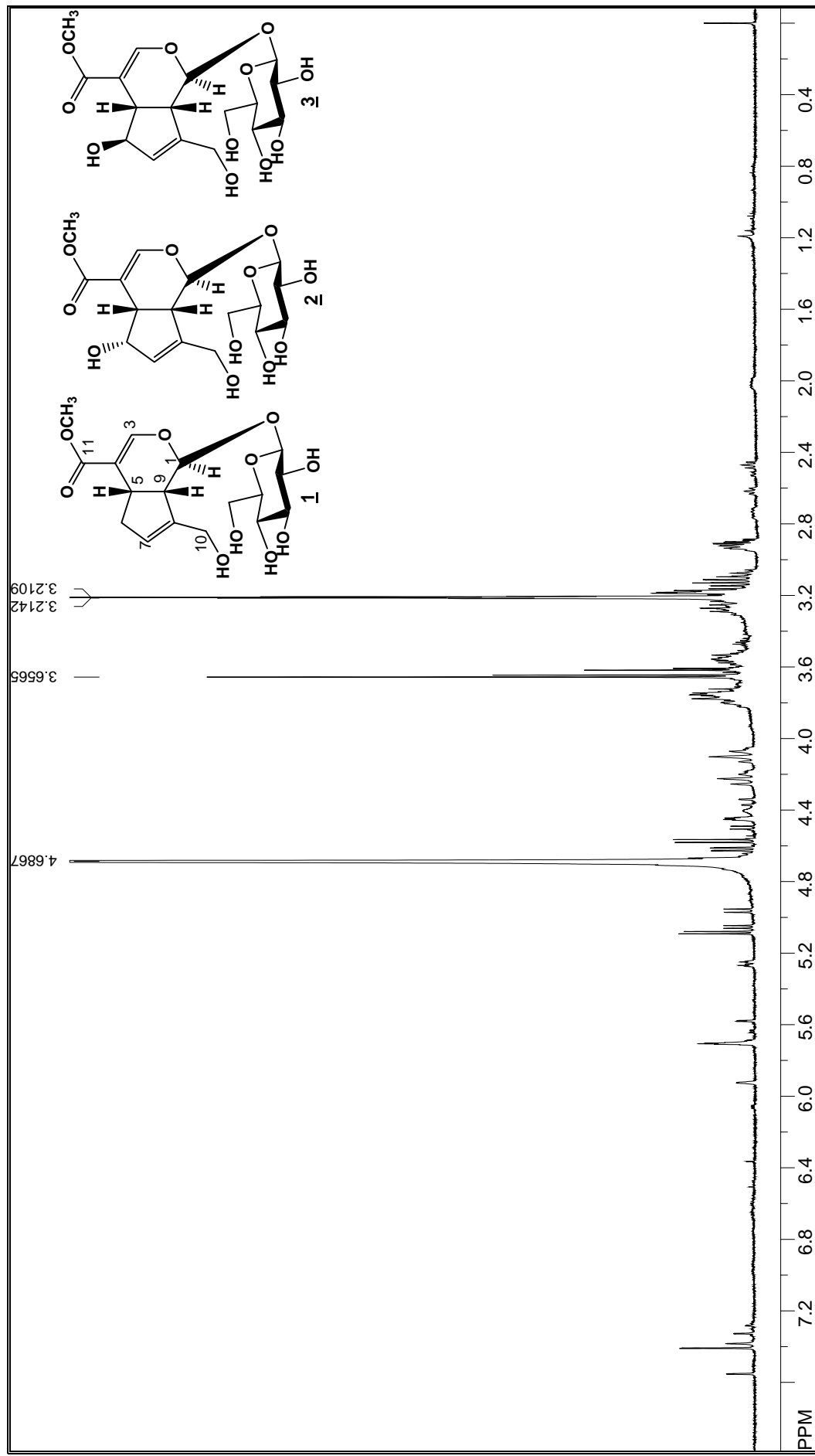


Figura 77. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H das substâncias **1**, **2** e **3** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

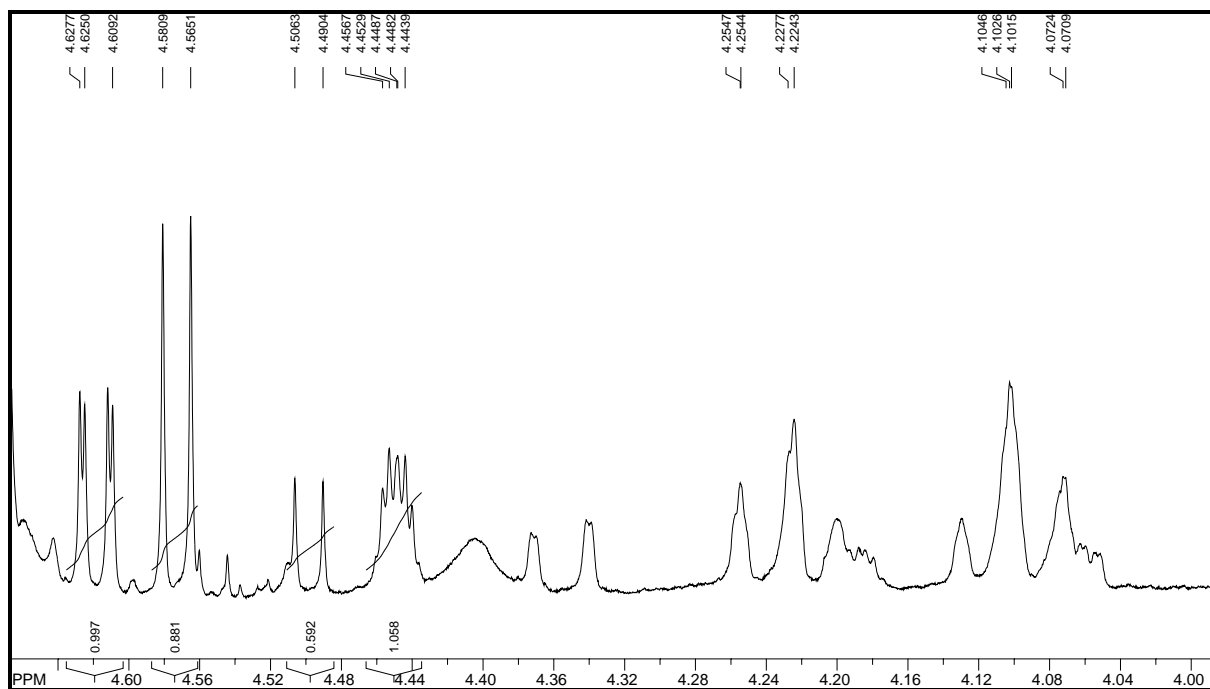
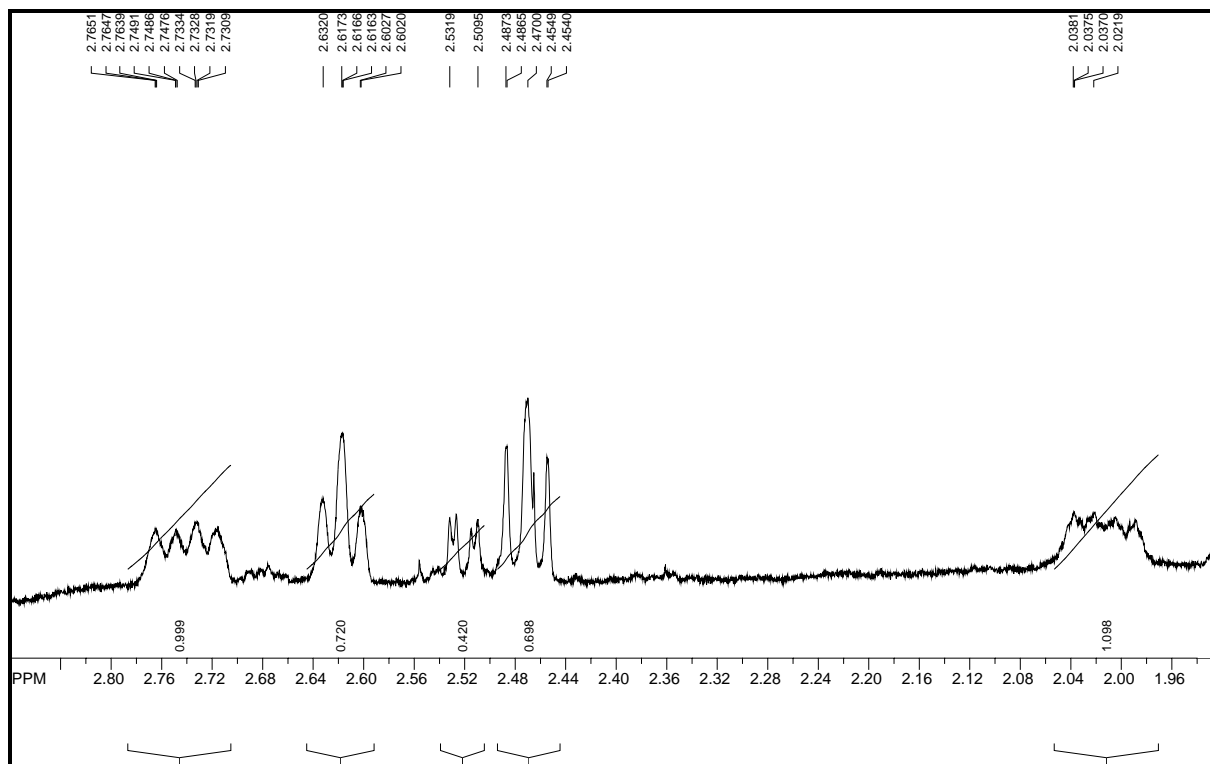


Figura 78. Ampliações do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **1**, **2** e **3** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).

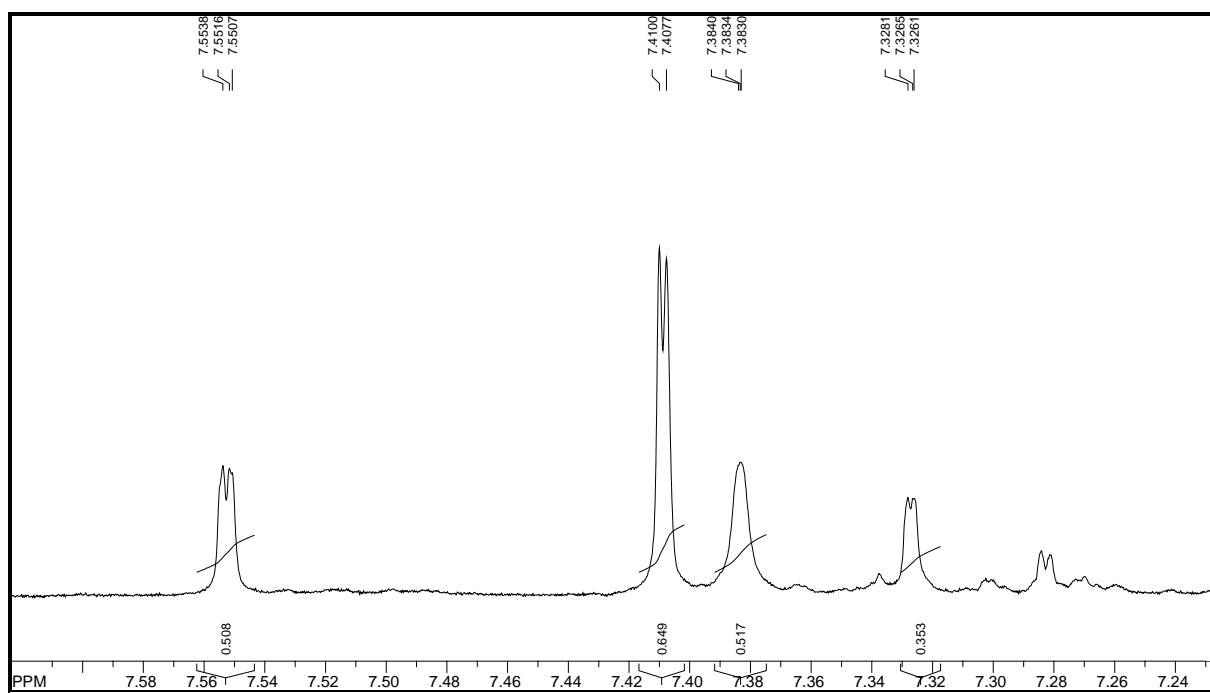
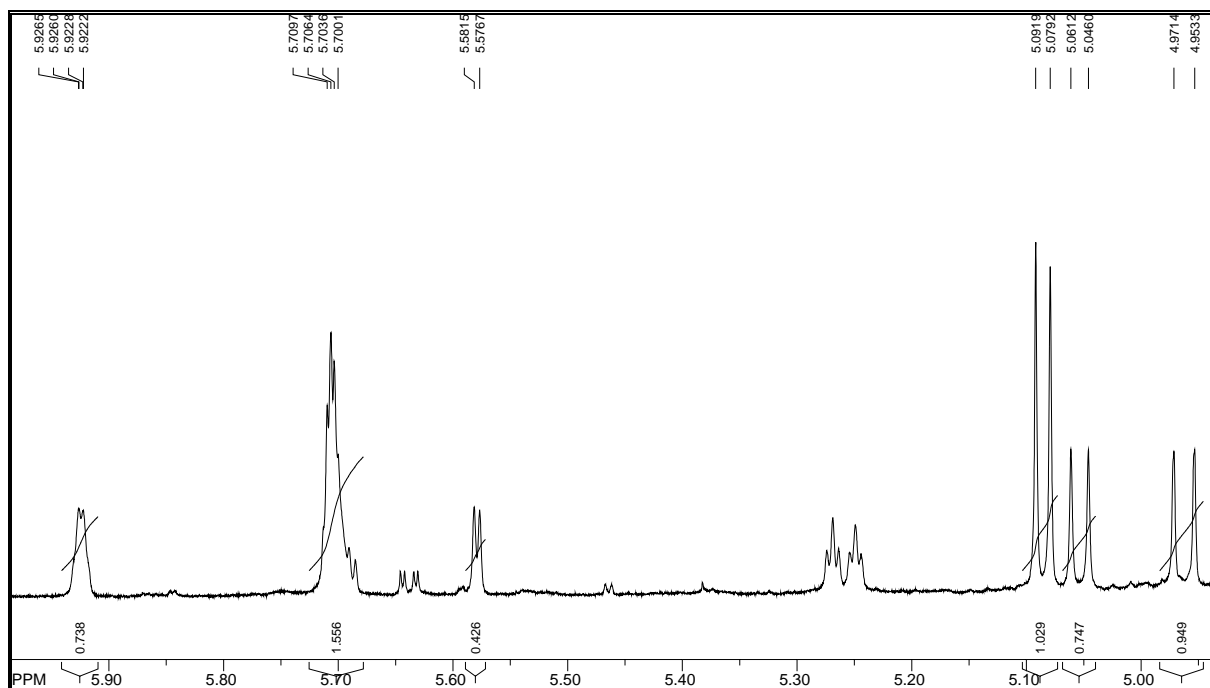


Figura 79. Ampliações do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **1**, **2** e **3** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).



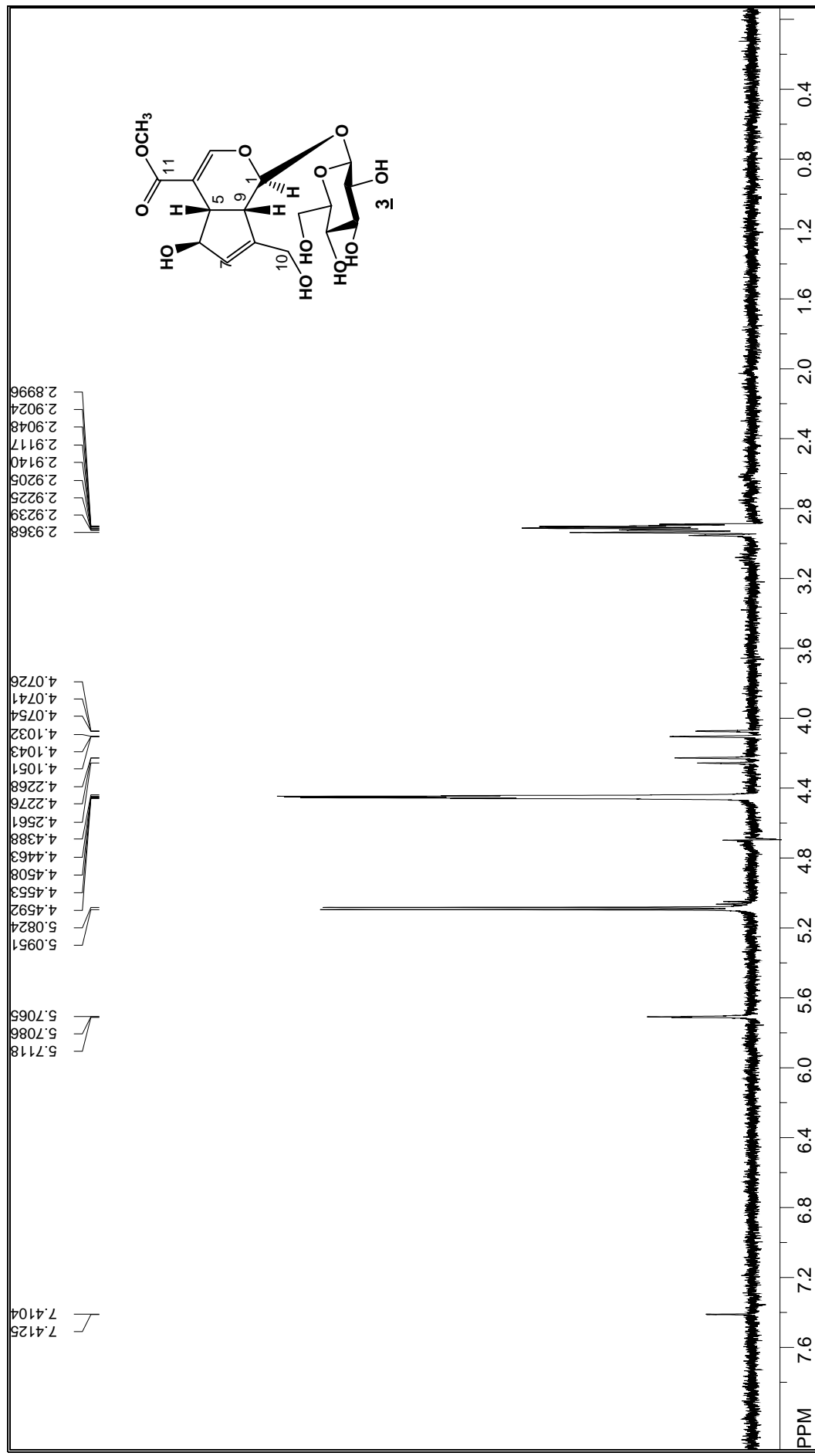


Figura 80. Espectro de TOCSY da aglicona da substância **3** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).

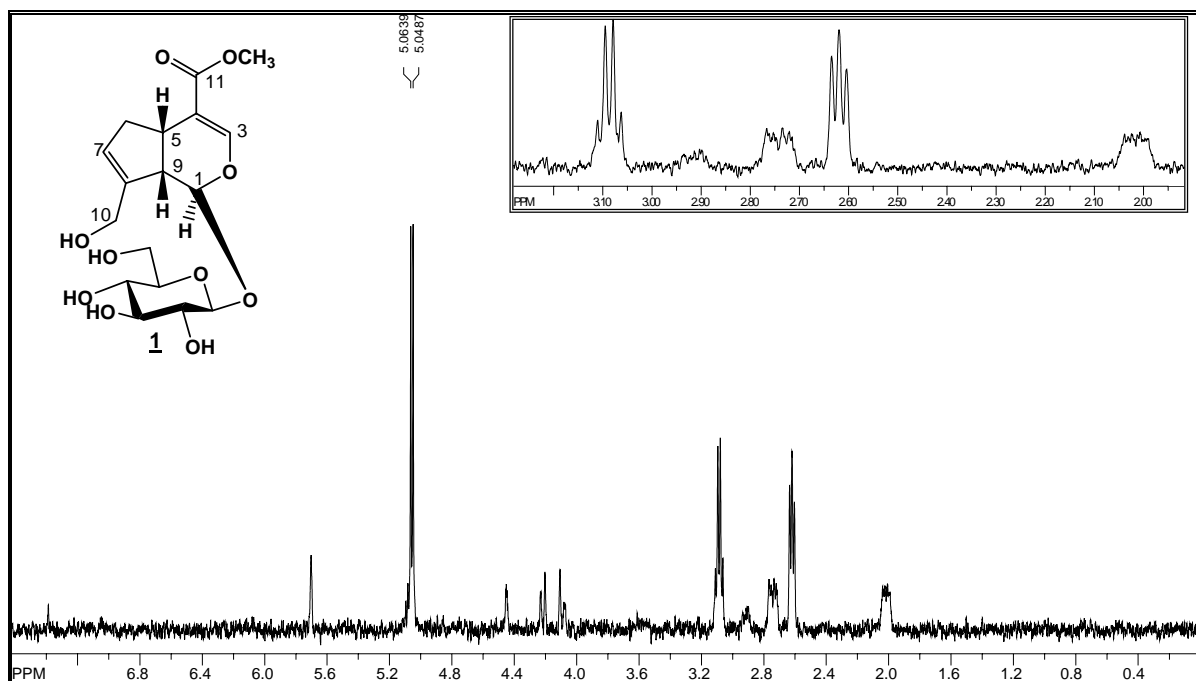


Figura 81. Espectro de TOCSY da aglicona da substância **1** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).

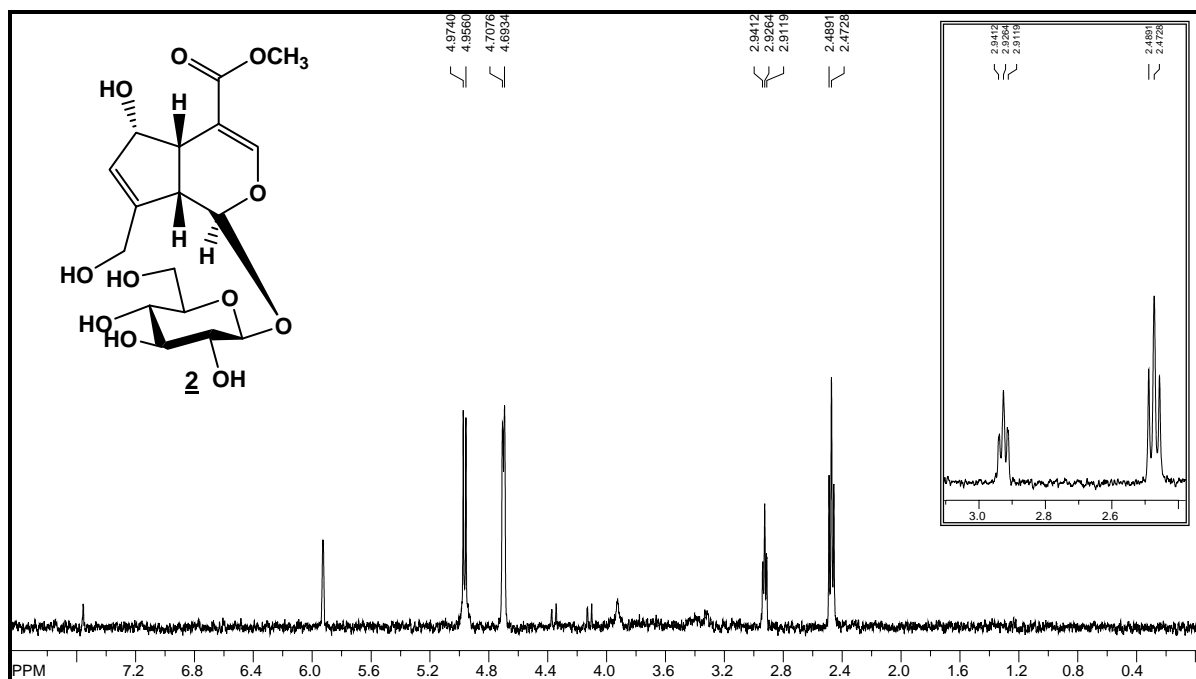


Figura 82. Espectro de TOCSY da aglicona da substância **2** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).

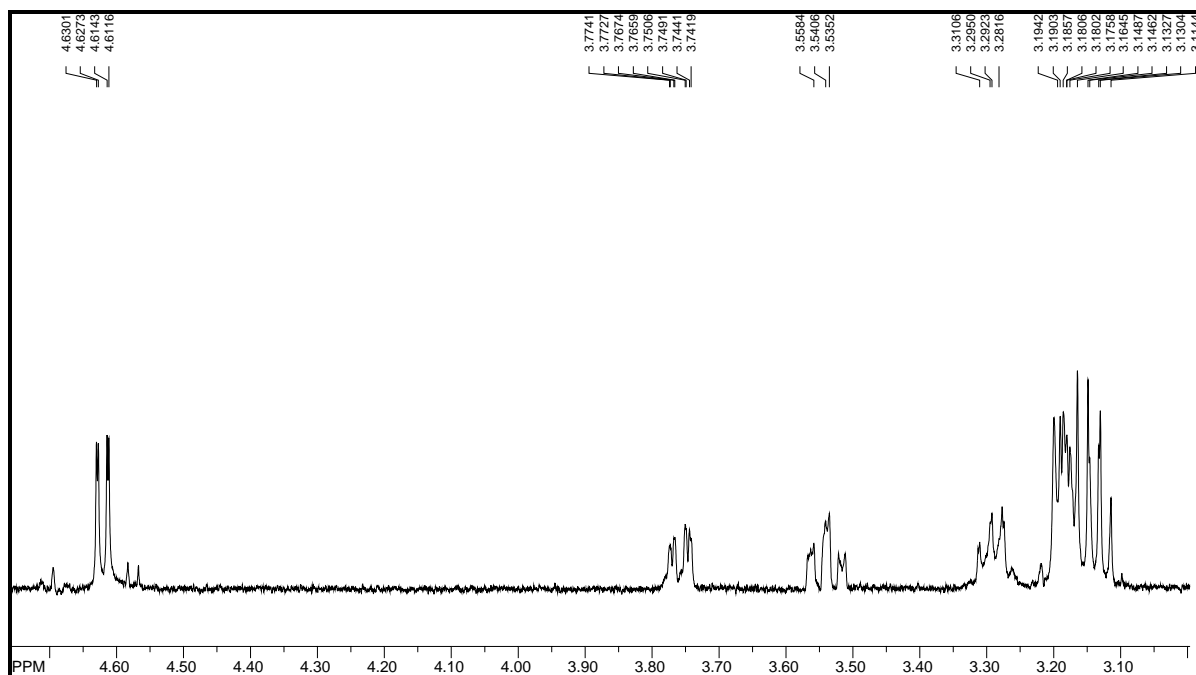


Figura 83. Espectro de TOCSY do açúcar das substâncias **1** e **2** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).

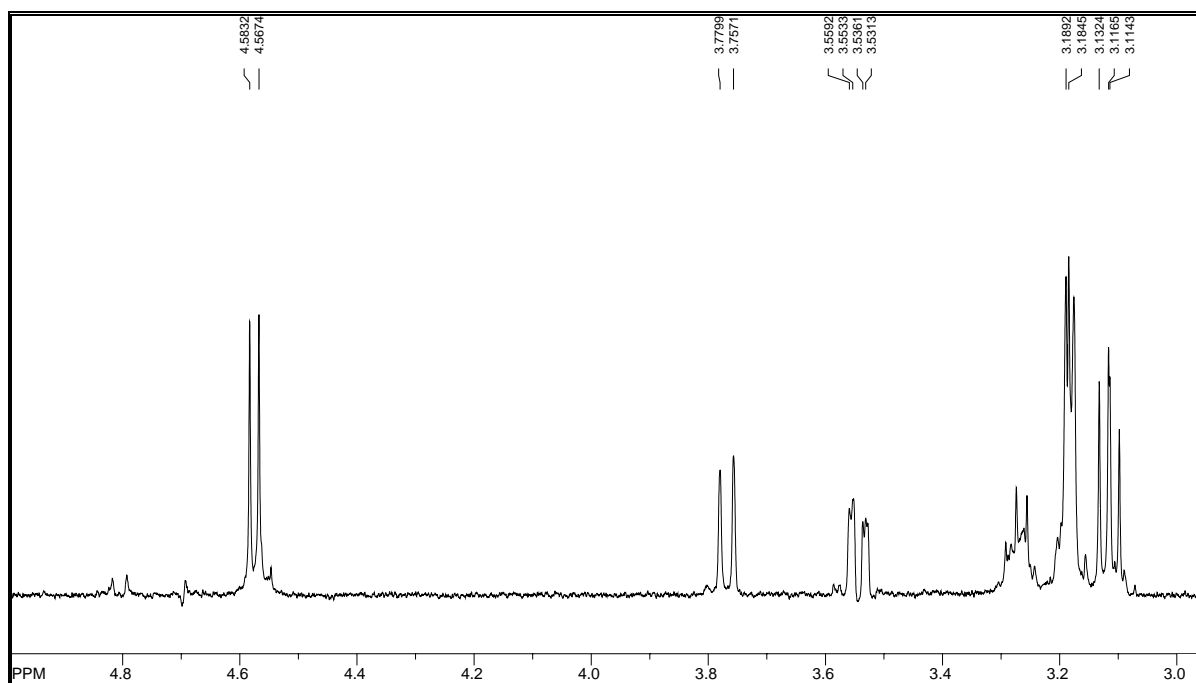


Figura 84. Espectro de TOCSY do açúcar da substância **3** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).

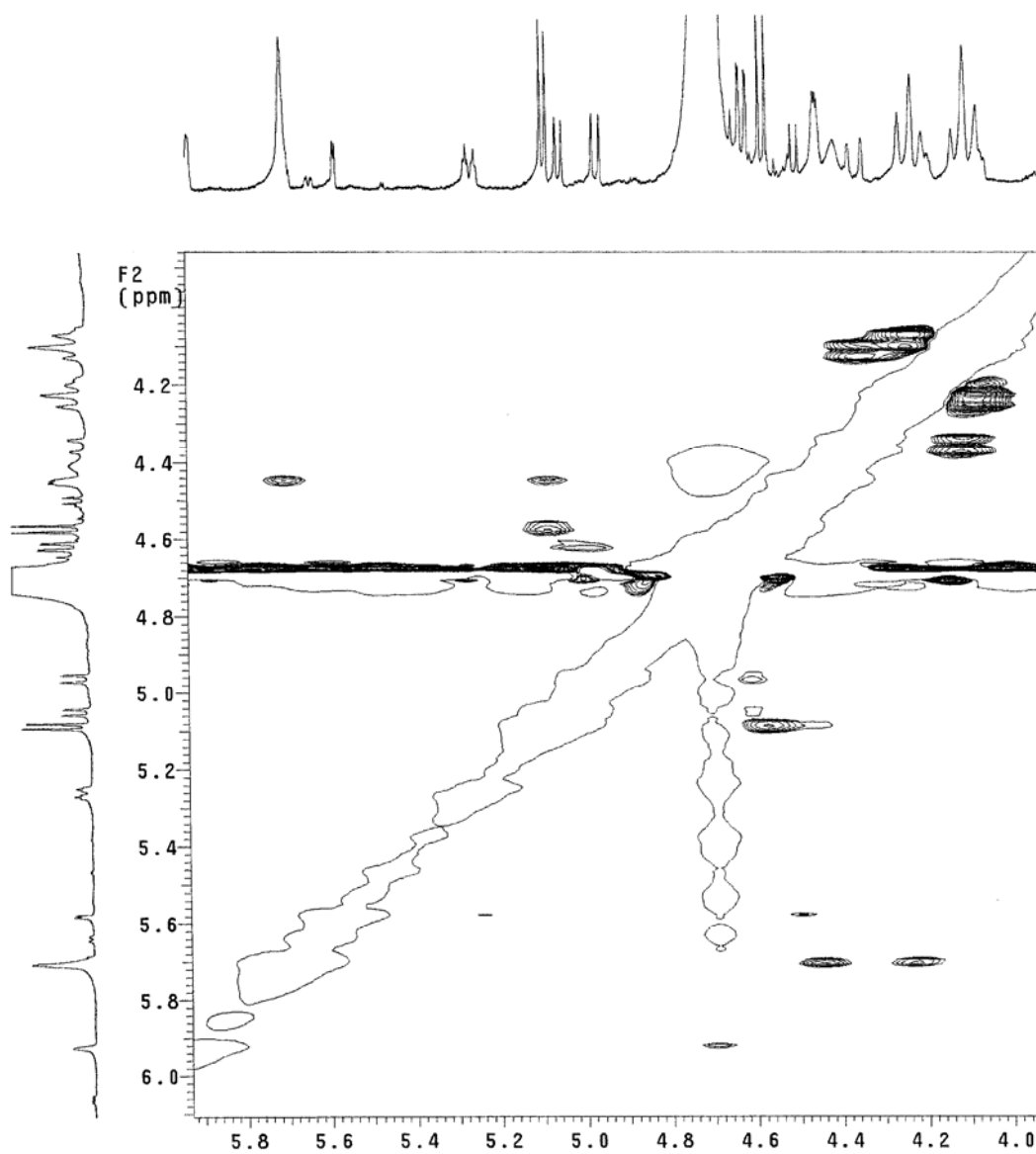


Figura 85. Espectro de NOESY 2D das substâncias 1, 2 e 3 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

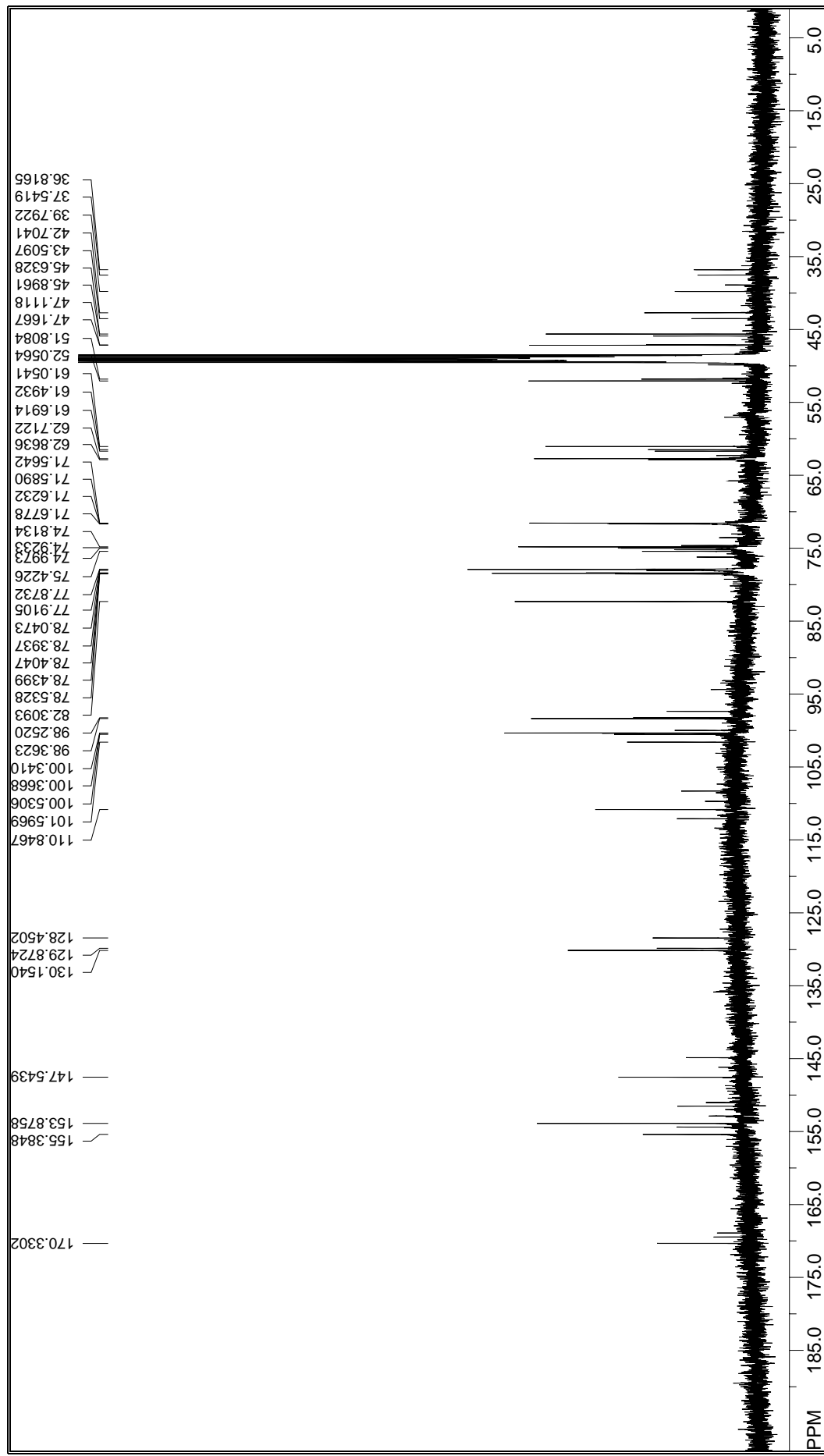


Figura 86. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  das substâncias **1**, **2** e **3** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz).

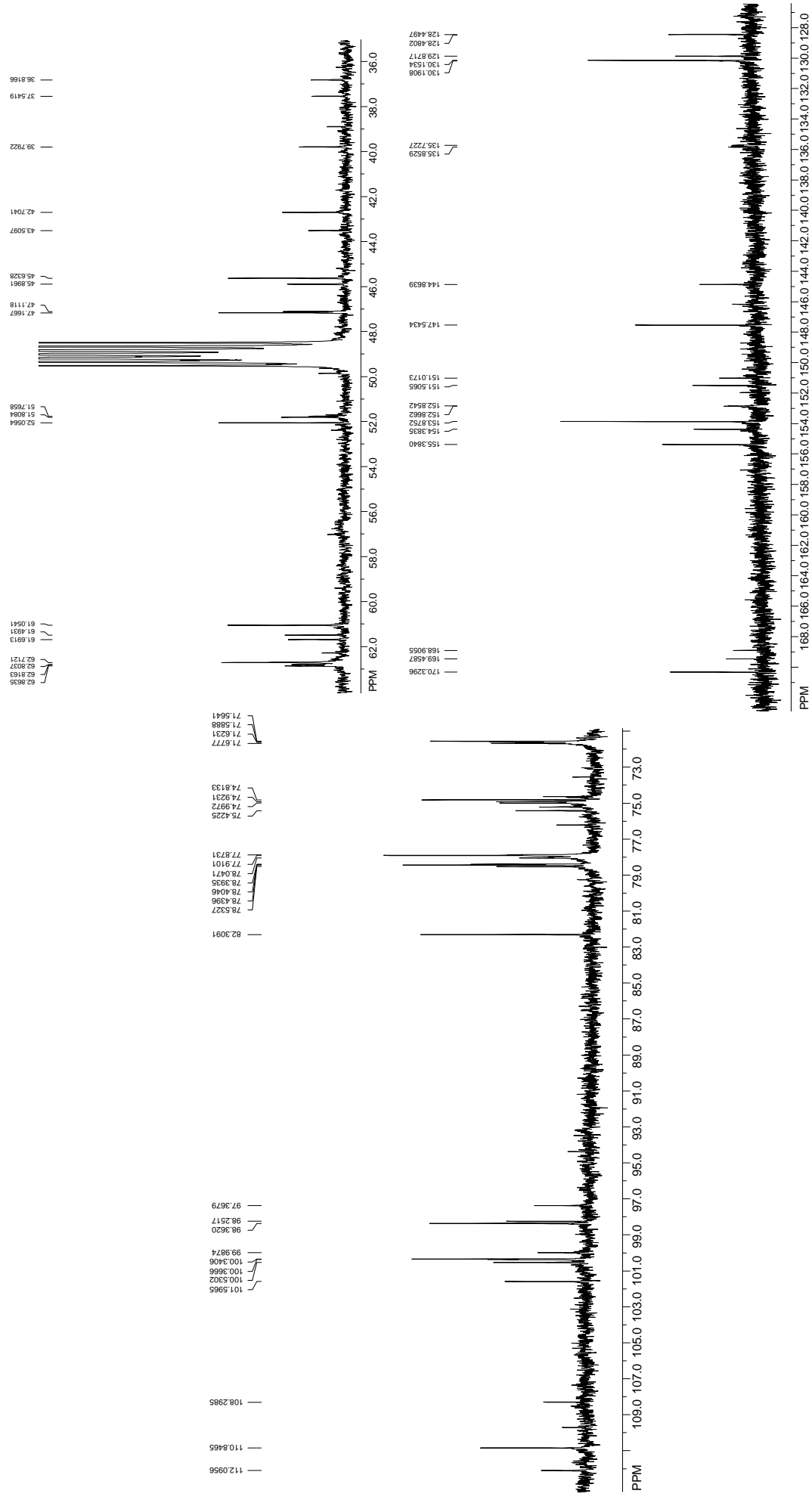
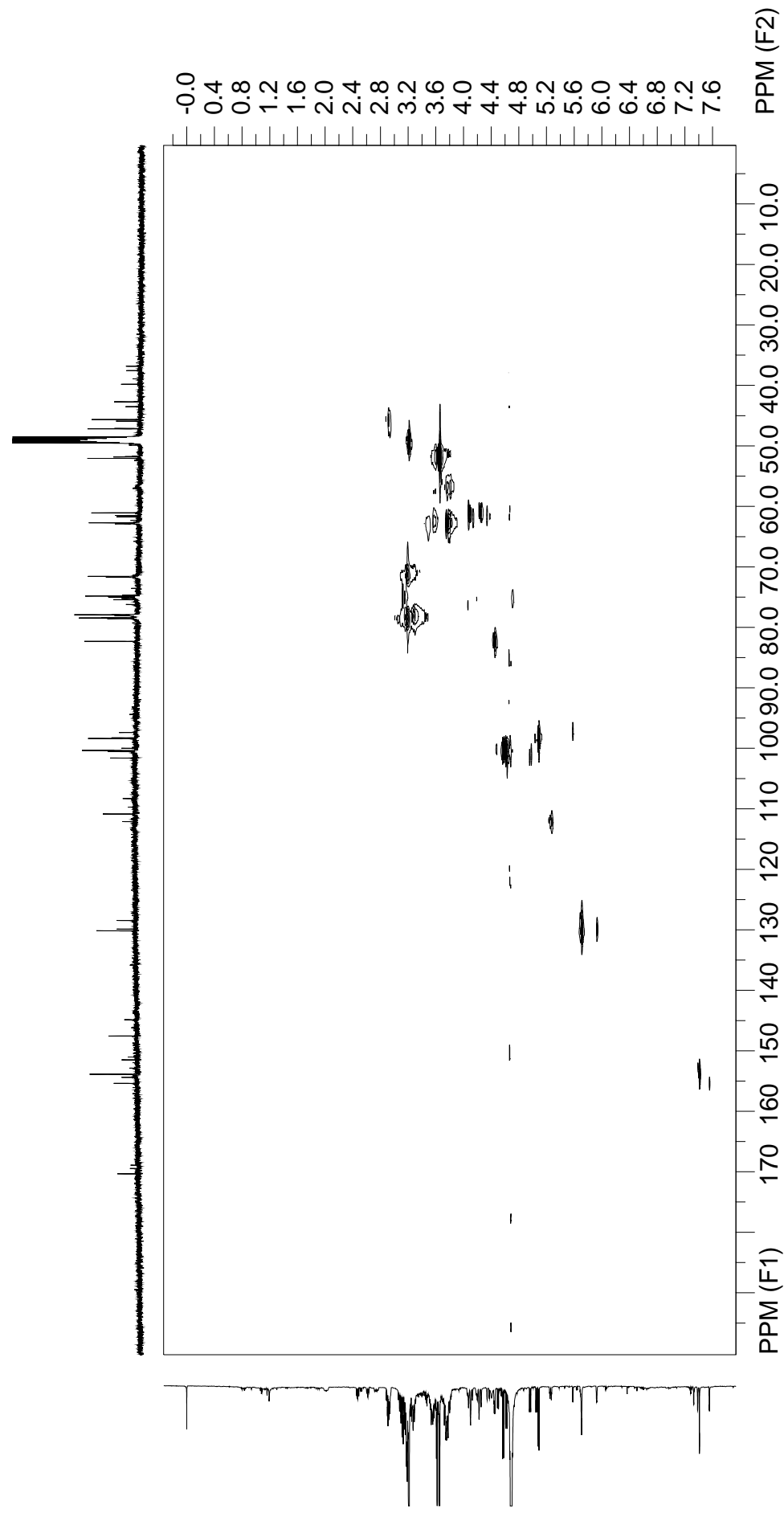
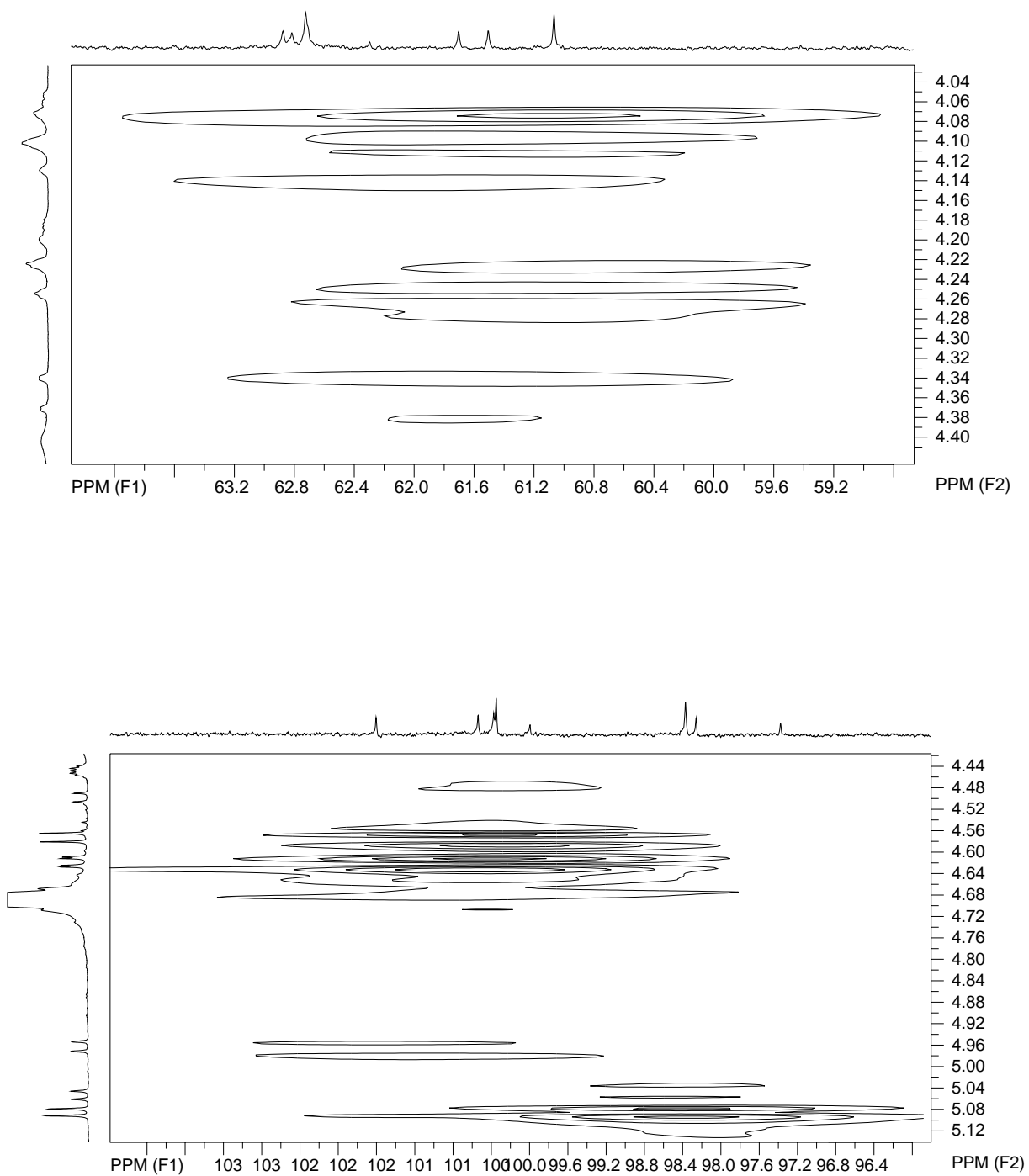


Figura 87. Ampliações do espectro de RMN de <sup>13</sup>C das substâncias **1**, **2** e **3** (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz).

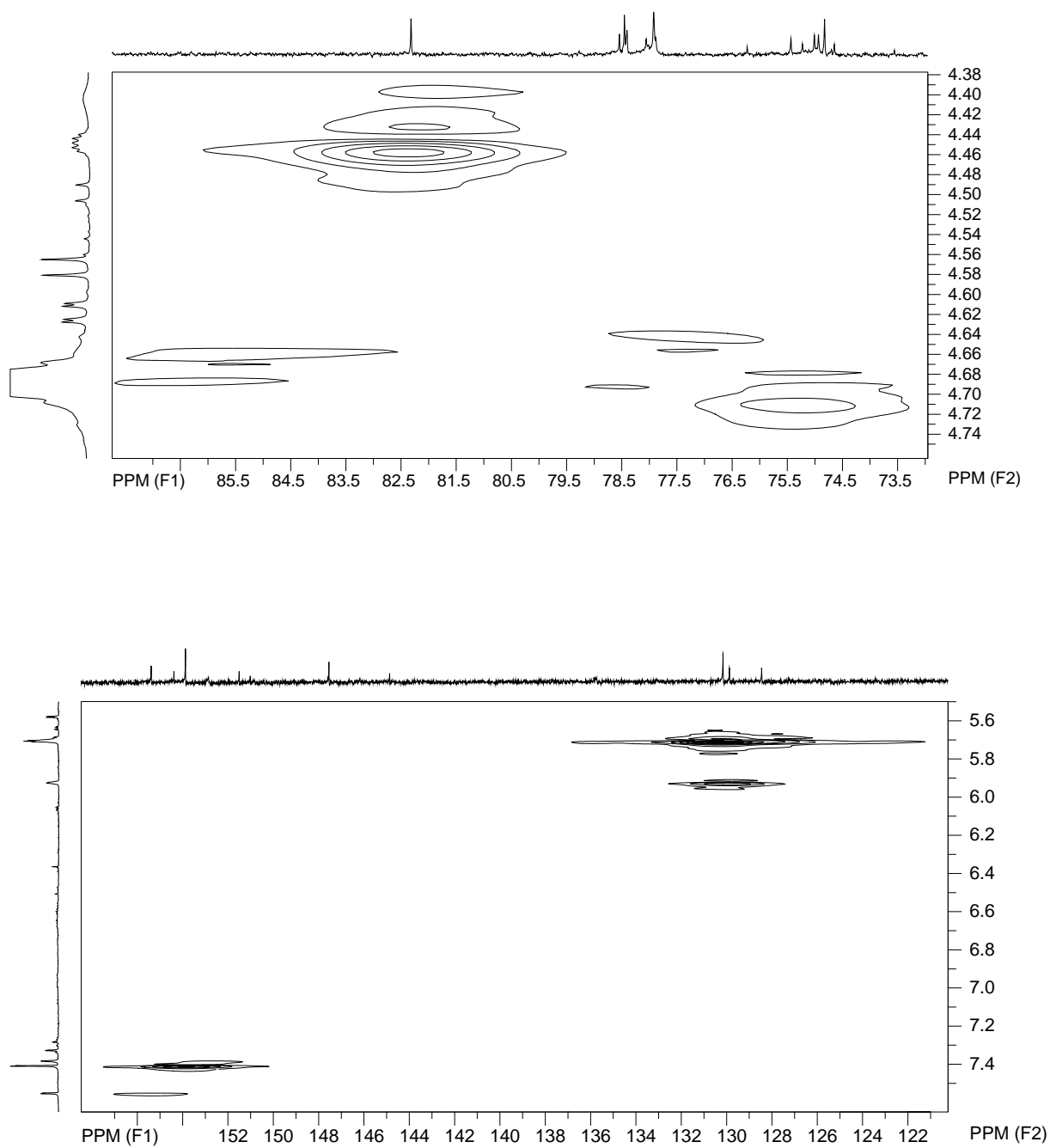


**Figura 88.** Mapa de correlação gHMBC das substâncias **1**, **2** e **3** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).



**Figura 89.** Ampliações do mapa de correlação gHMQC das substâncias **1**, **2** e **3** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).





**Figura 90.** Ampliações do mapa de correlação gHMQC das substâncias **1**, **2** e **3** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).

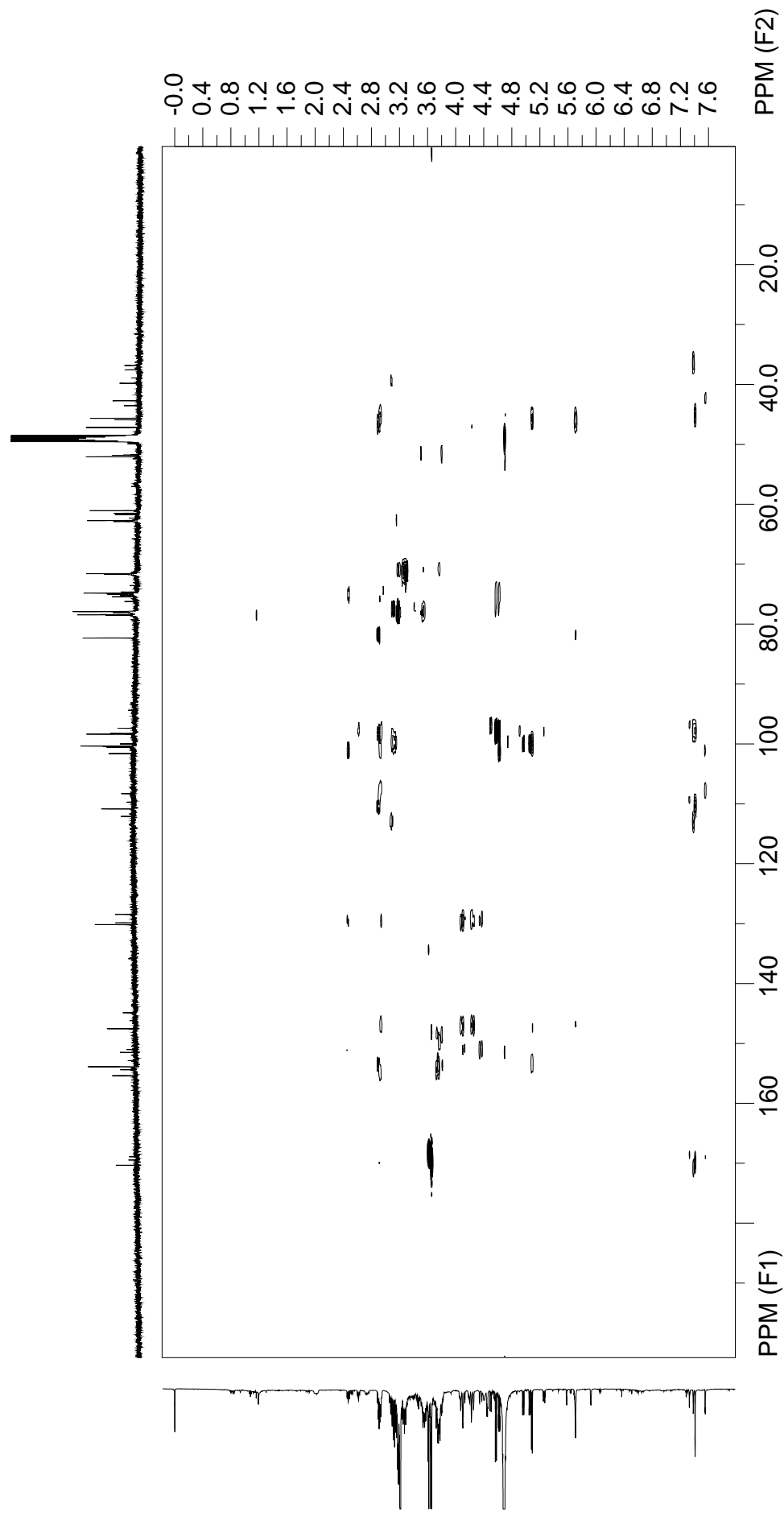
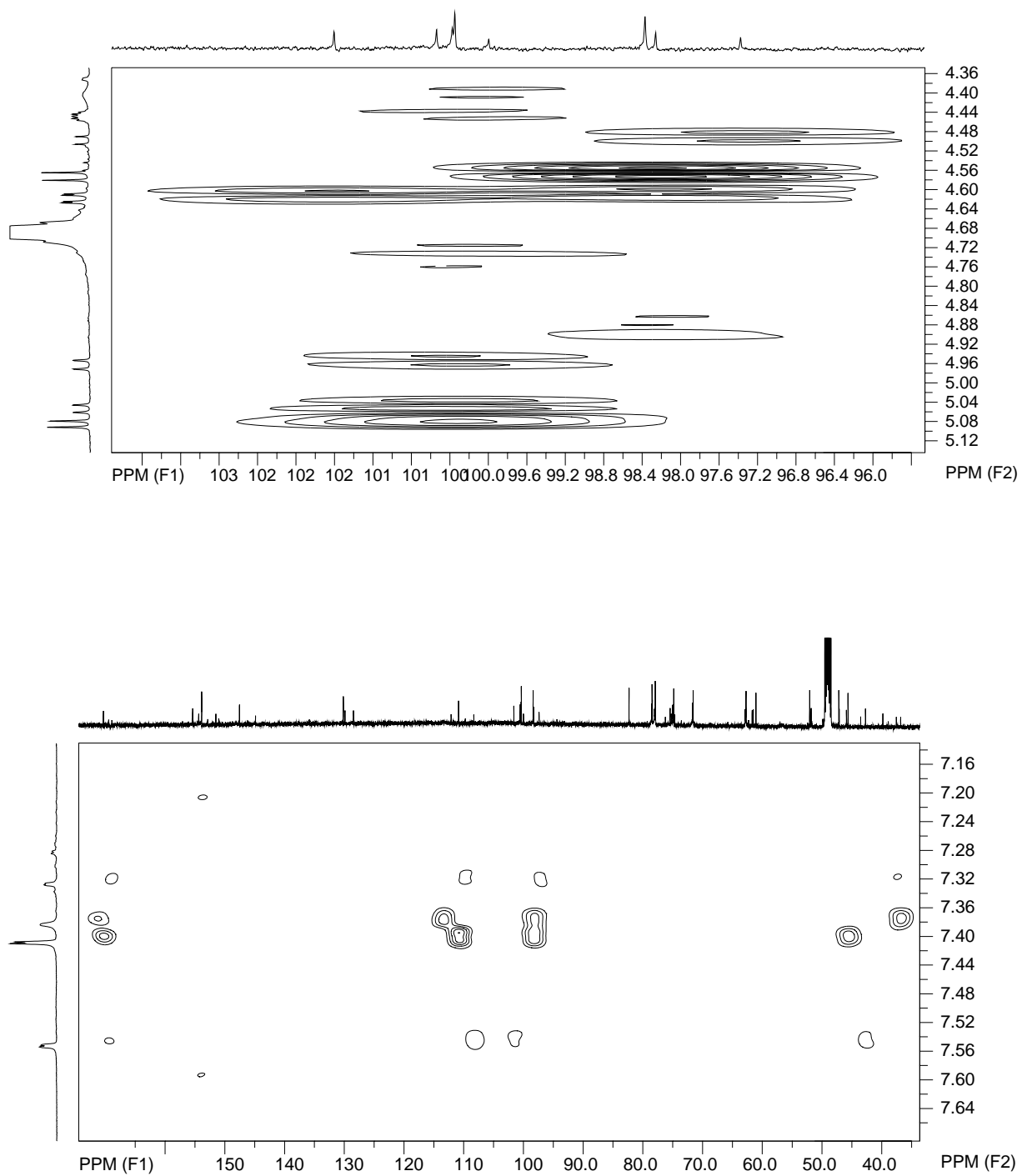
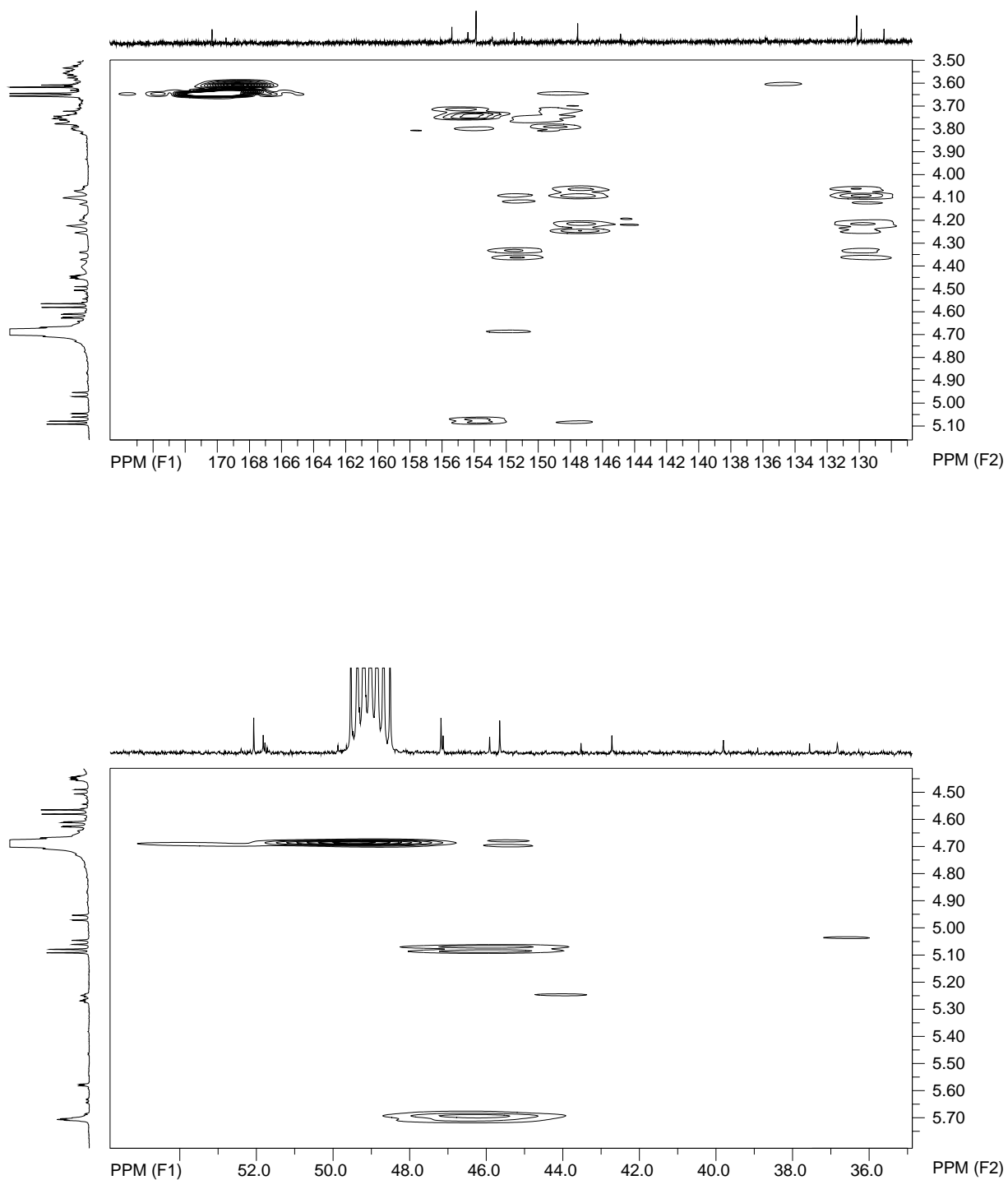


Figura 91. Mapa de correlação gHMBC das substâncias **1**, **2** e **3** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).



**Figura 92.** Ampliações do mapa de correlação gHMBC das substâncias **1**, **2** e **3** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).



**Figura 93.** Ampliações do mapa de correlação gHMBC das substâncias **1**, **2** e **3** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).

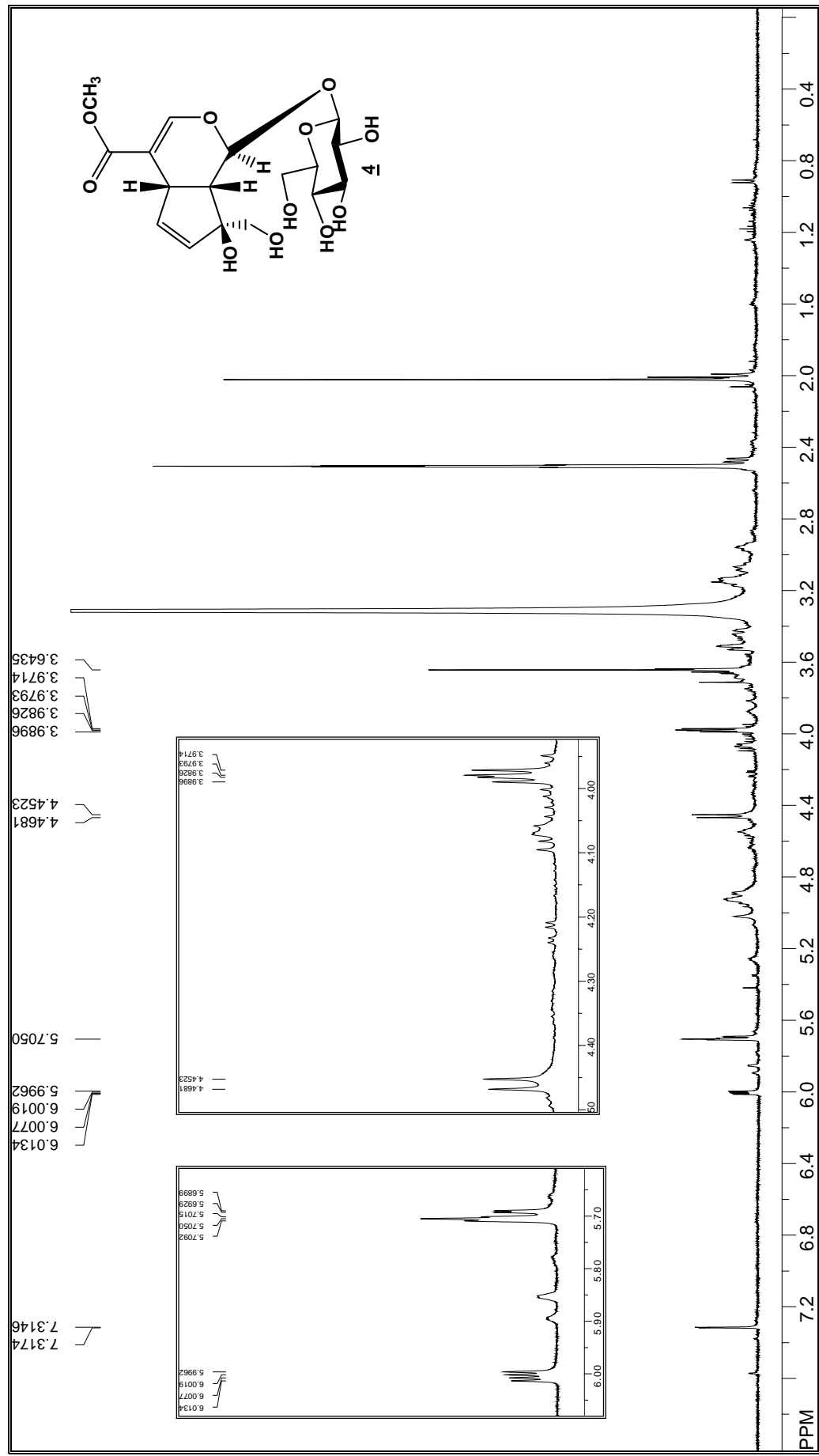


Figura 94. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **4** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).

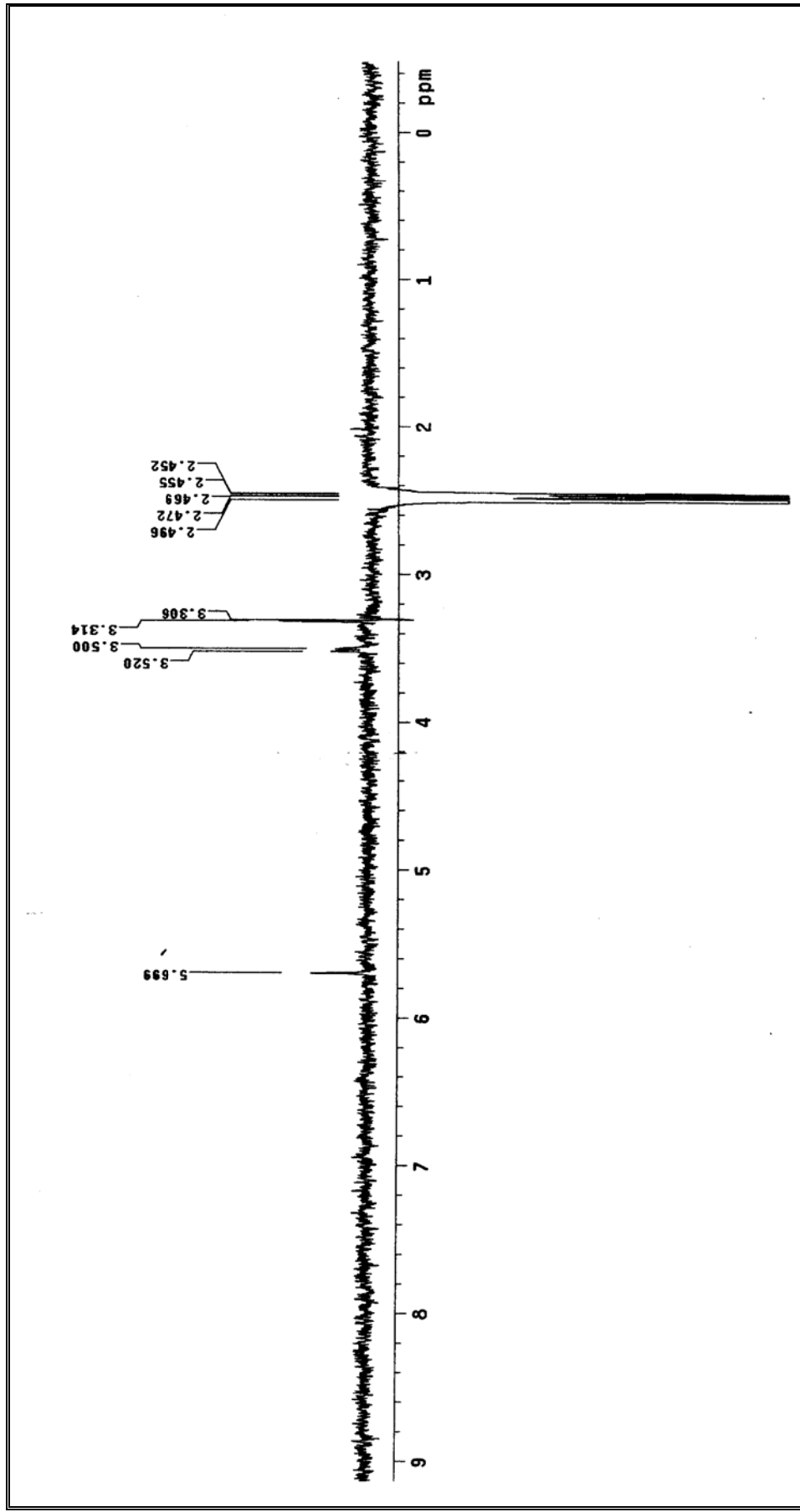
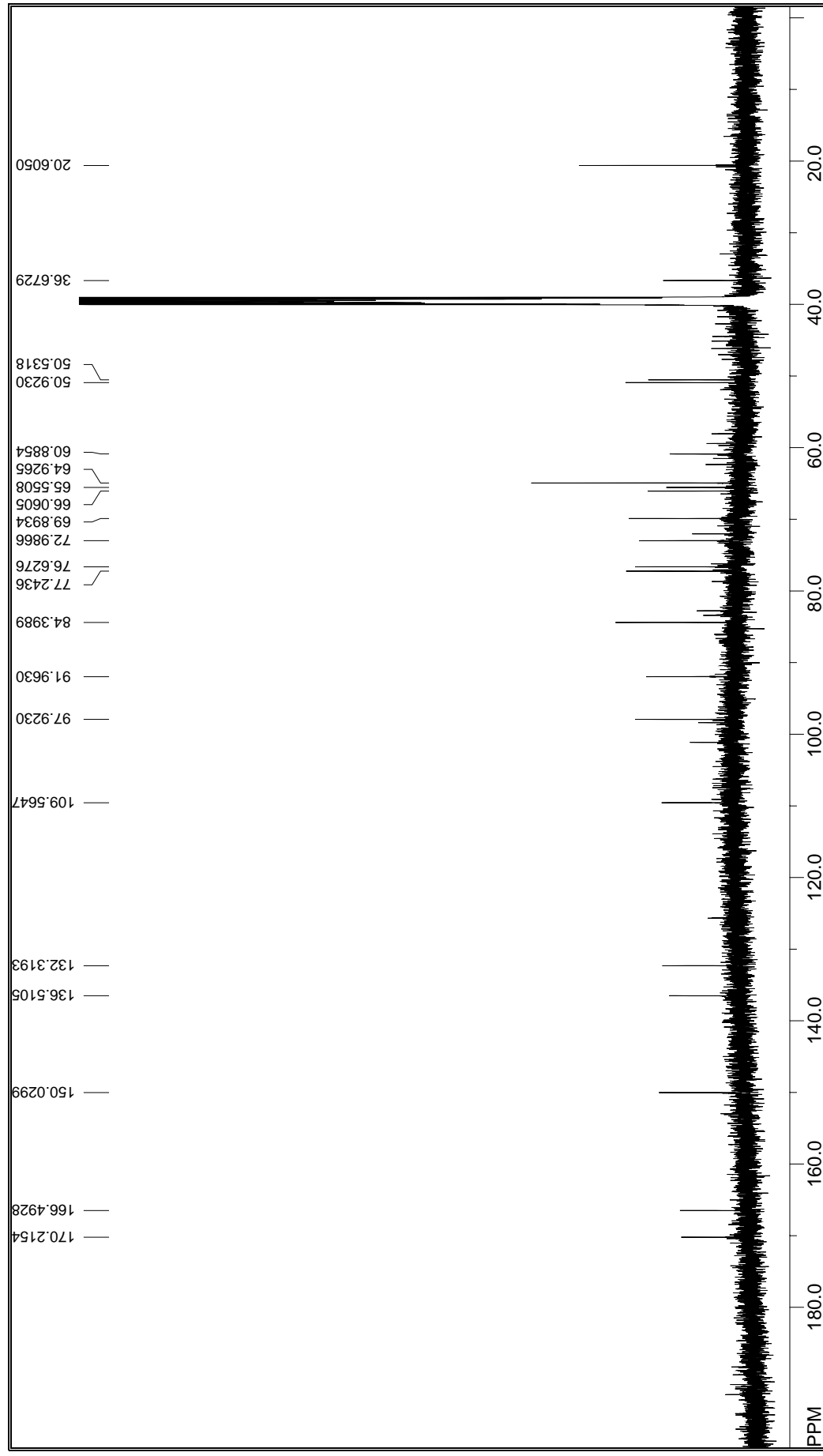


Figura 95. Espectro de NOESY da substância **4** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz).

Figura 96. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **4** (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).

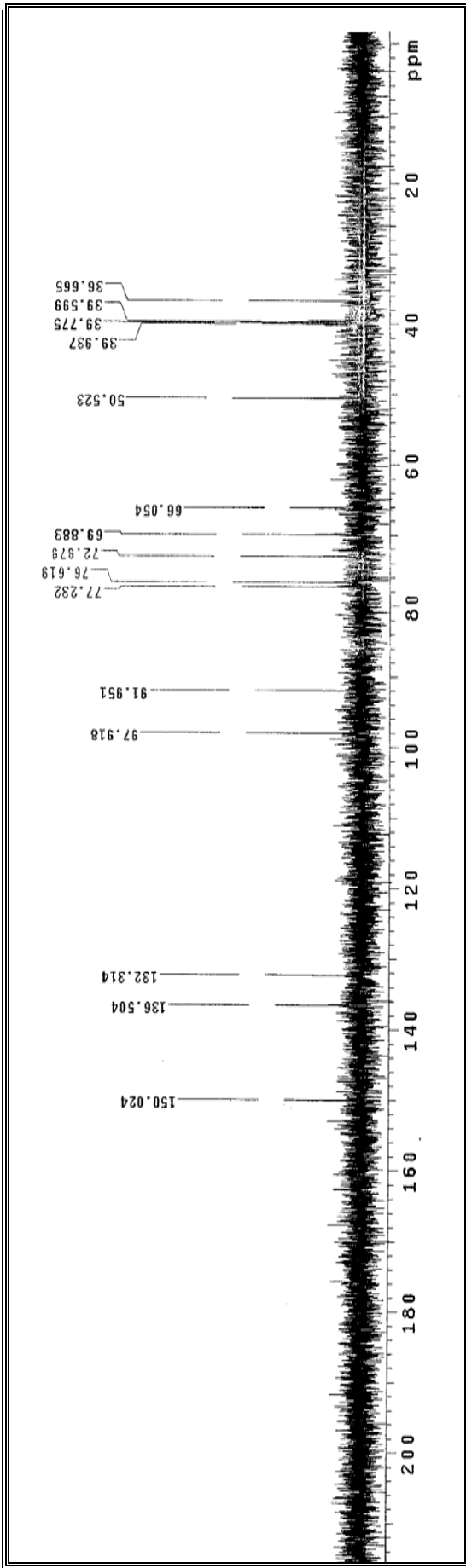


Figura 97. Espectro de DEPT 90° da substância **4** (DMSO-d<sub>6</sub>, 125 MHz).

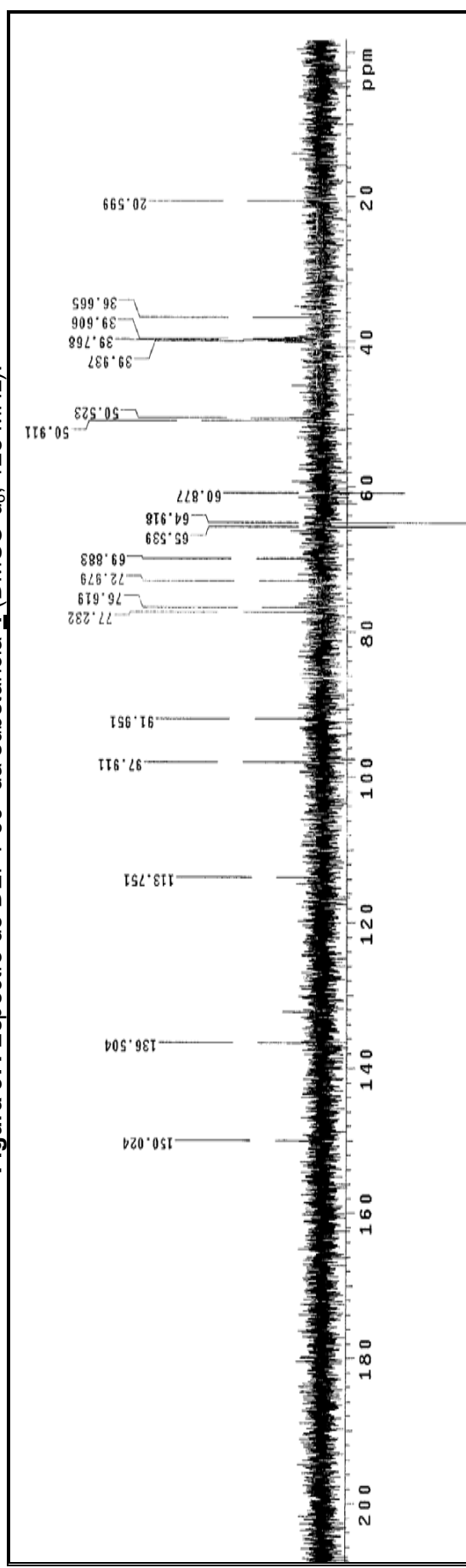
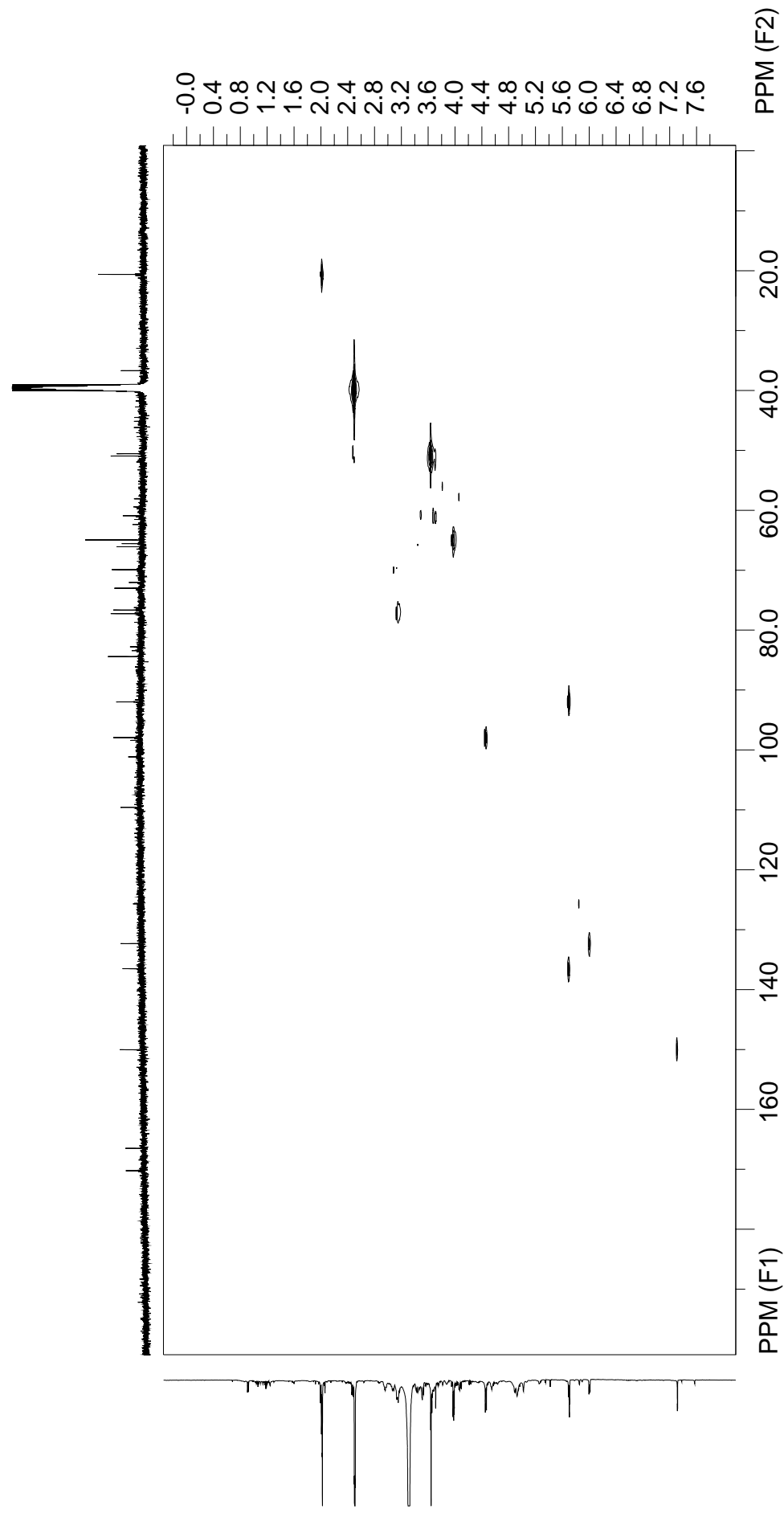
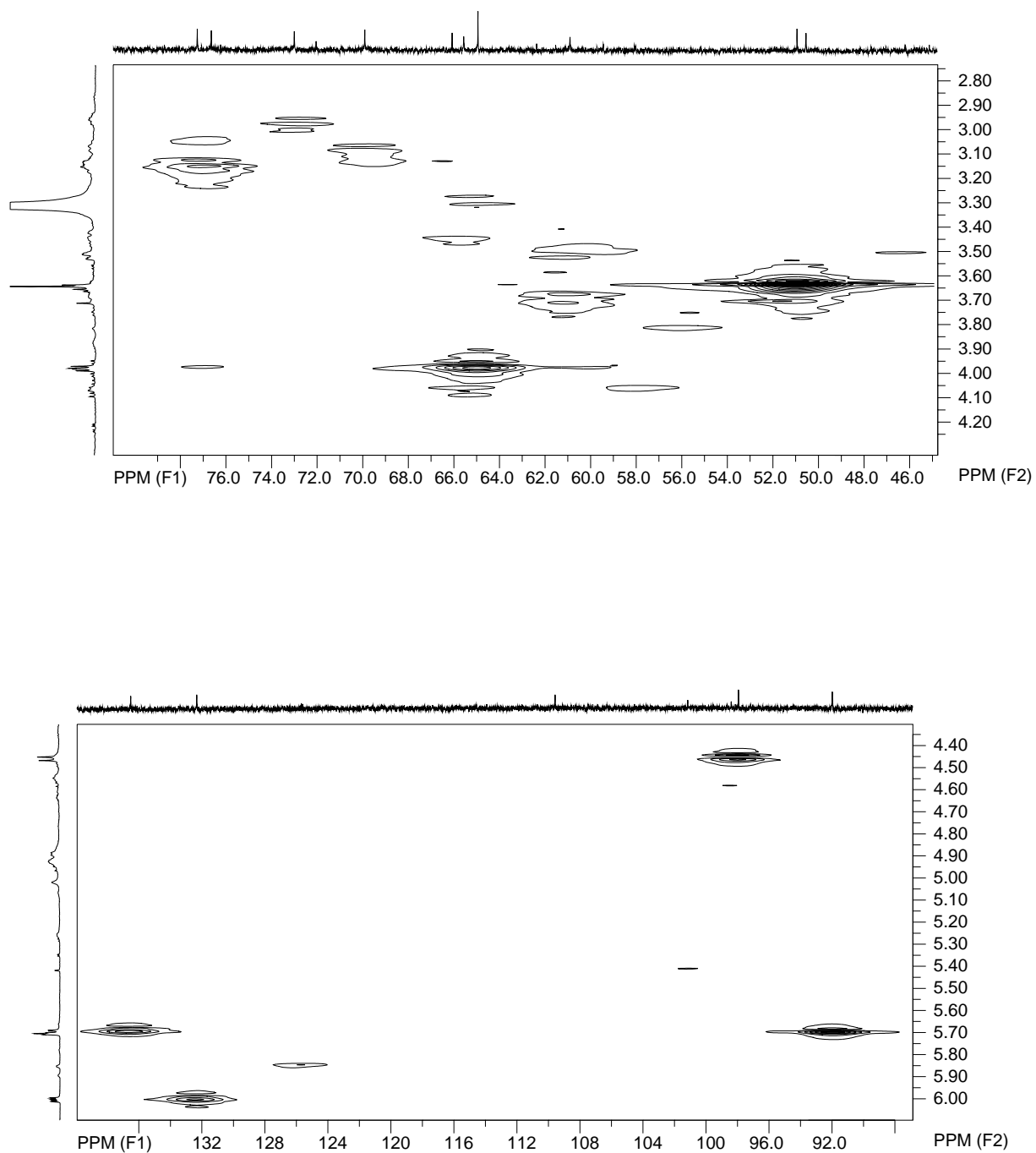


Figura 98. Espectro de DEPT 135° da substância **4** (DMSO-d<sub>6</sub>, 125 MHz).





**Figura 99.** Mapa de correlação gHMQC da substância **4** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).



**Figura 100.** Ampliações do mapa de correlação gHMBC da substância **4** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

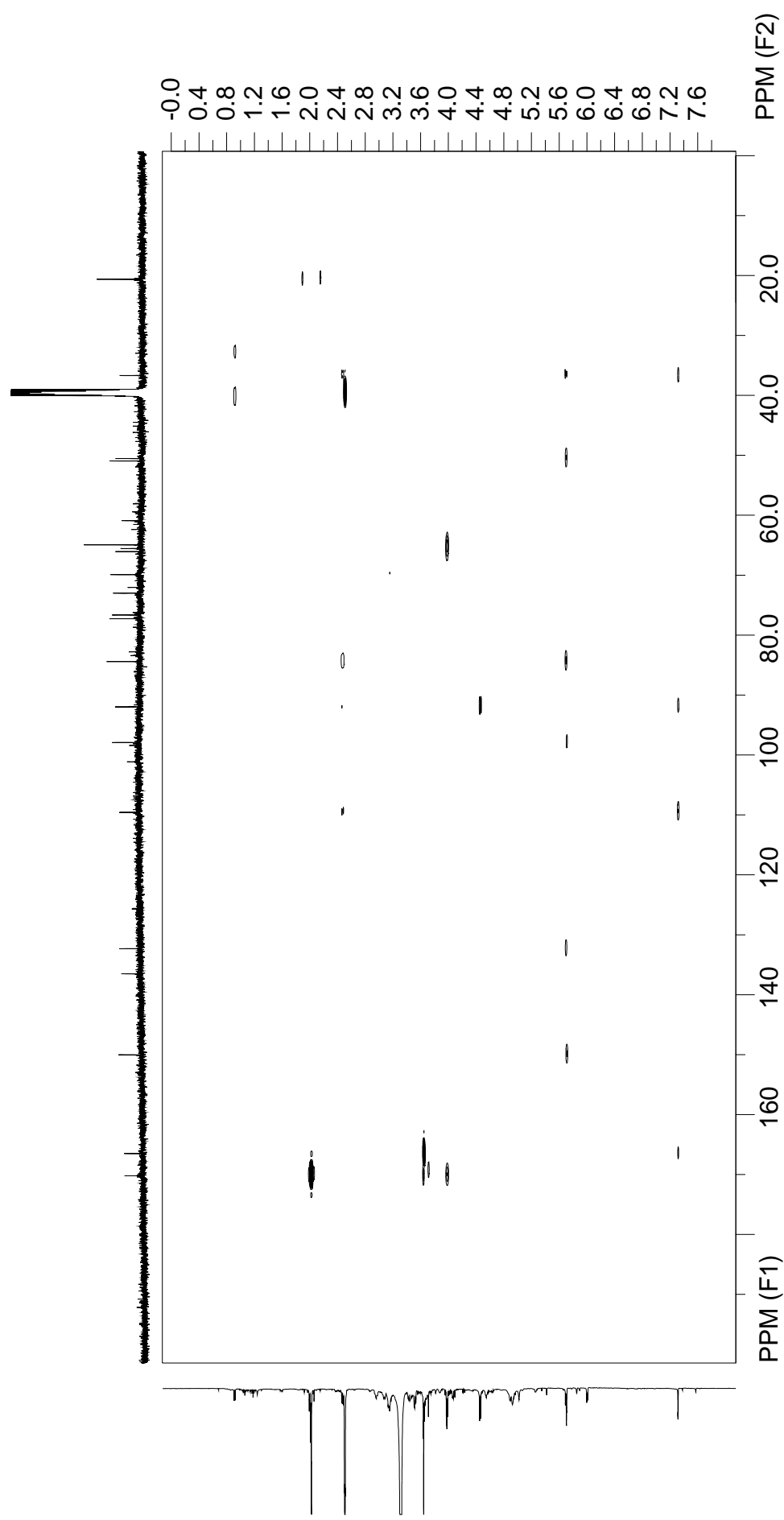
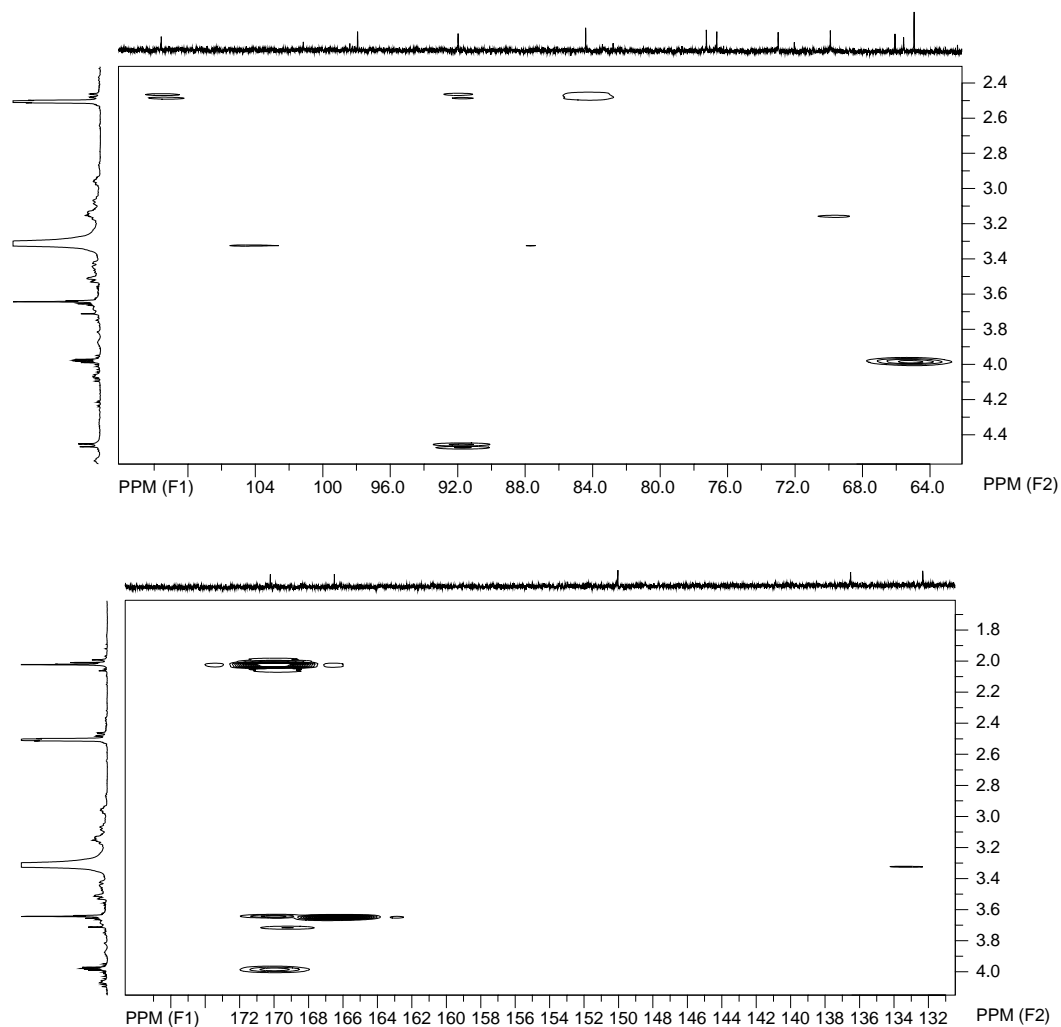
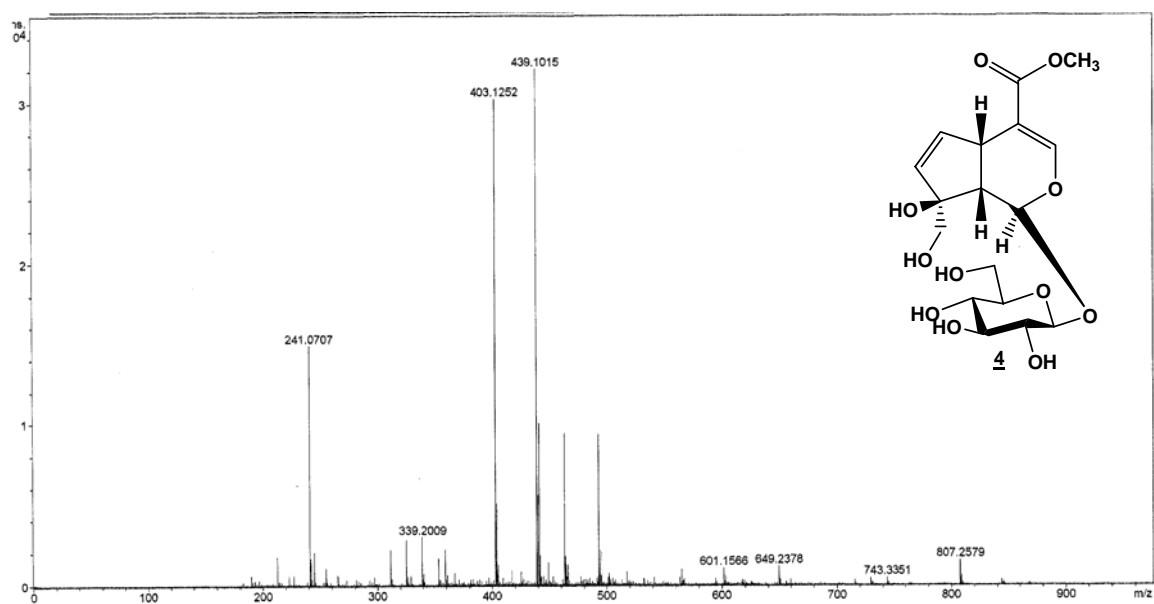


Figura 101. Mapa de correlação gHMBC da substância **4** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).



**Figura 102.** Ampliações do mapa de correlação gHMBC da substância **4** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz).



**Figura 103.** Espectro de Massas da substância **4** (modo negativo).

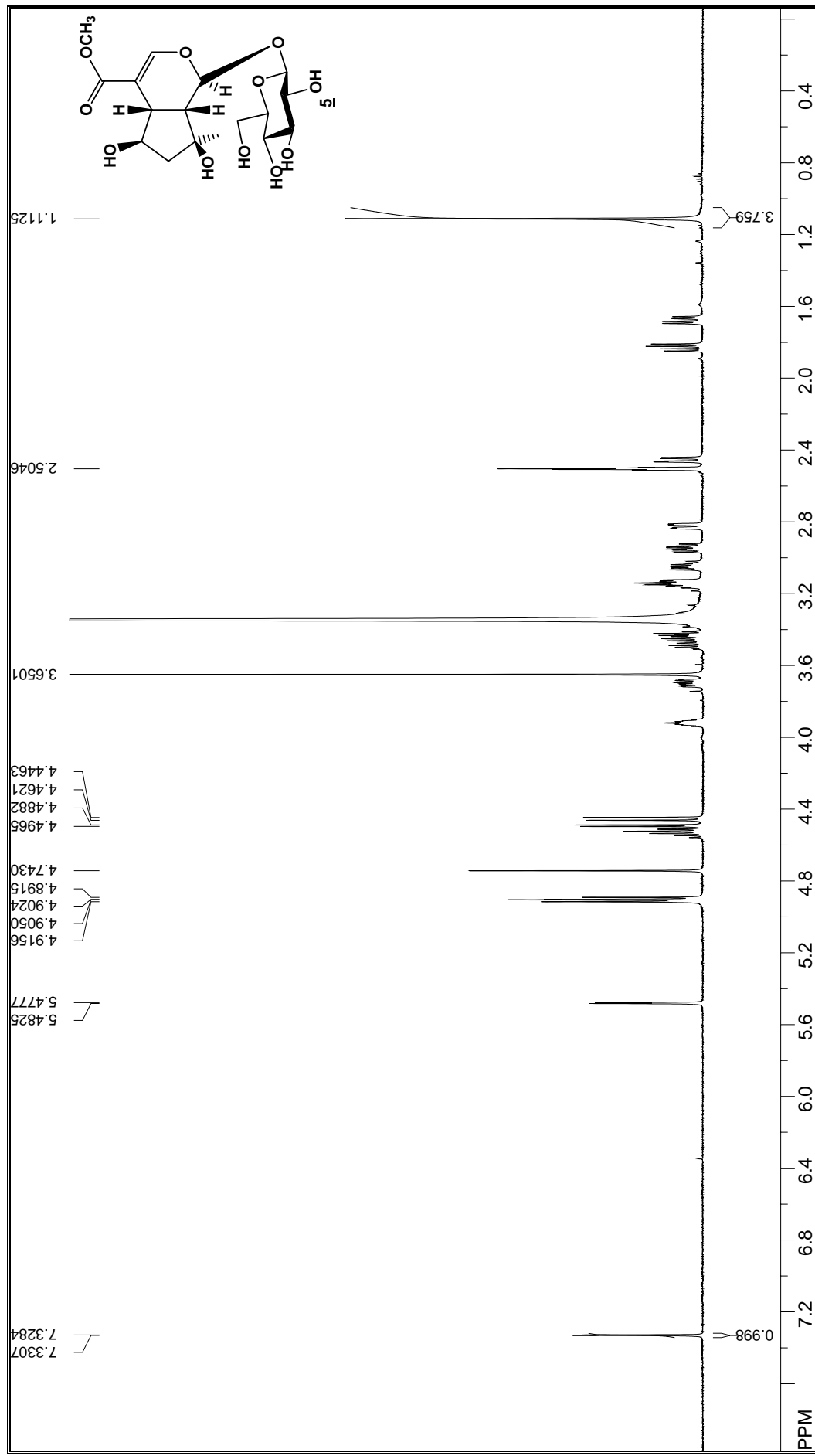


Figura 104. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **5** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz).

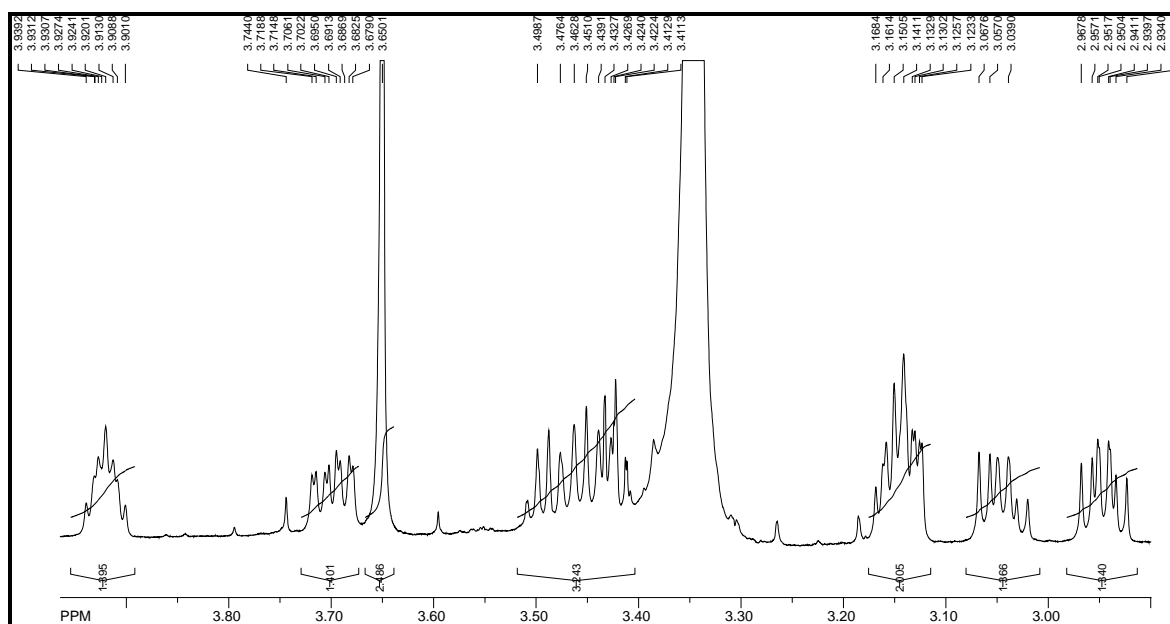
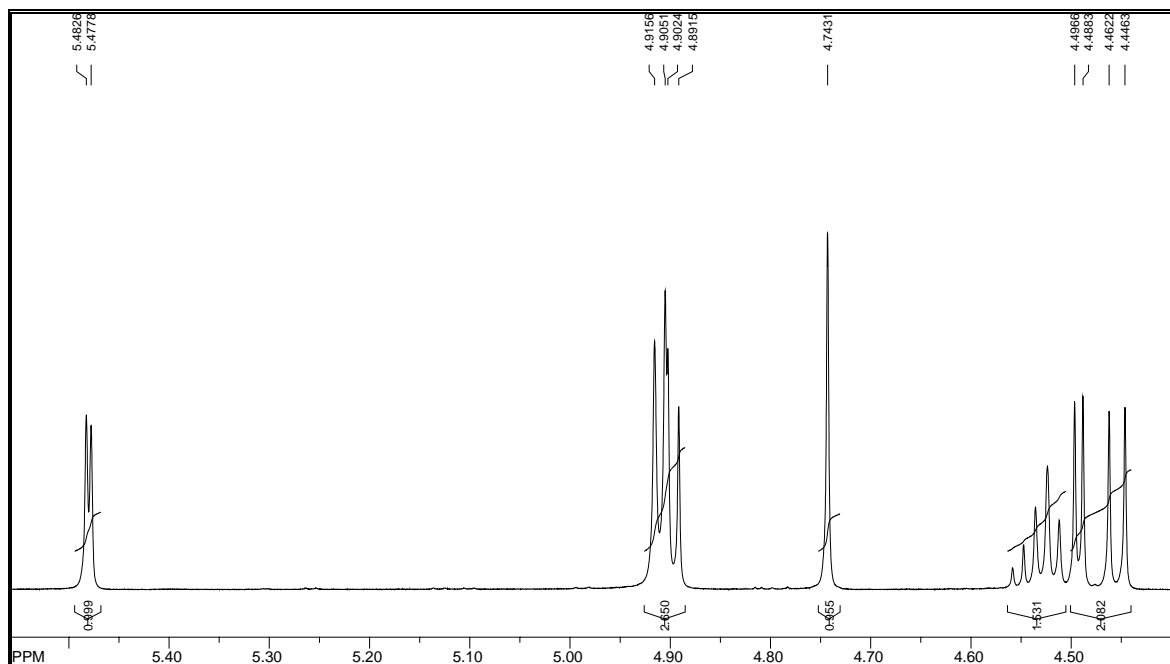


Figura 105. Ampliações do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **5** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz)

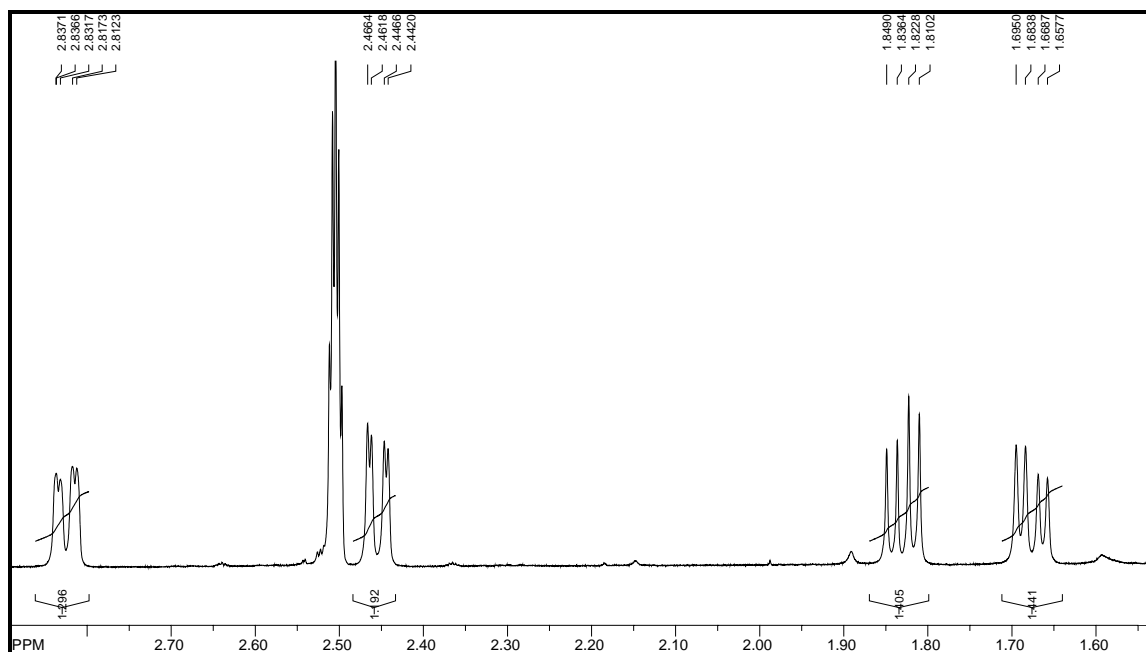


Figura 106. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **5** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)

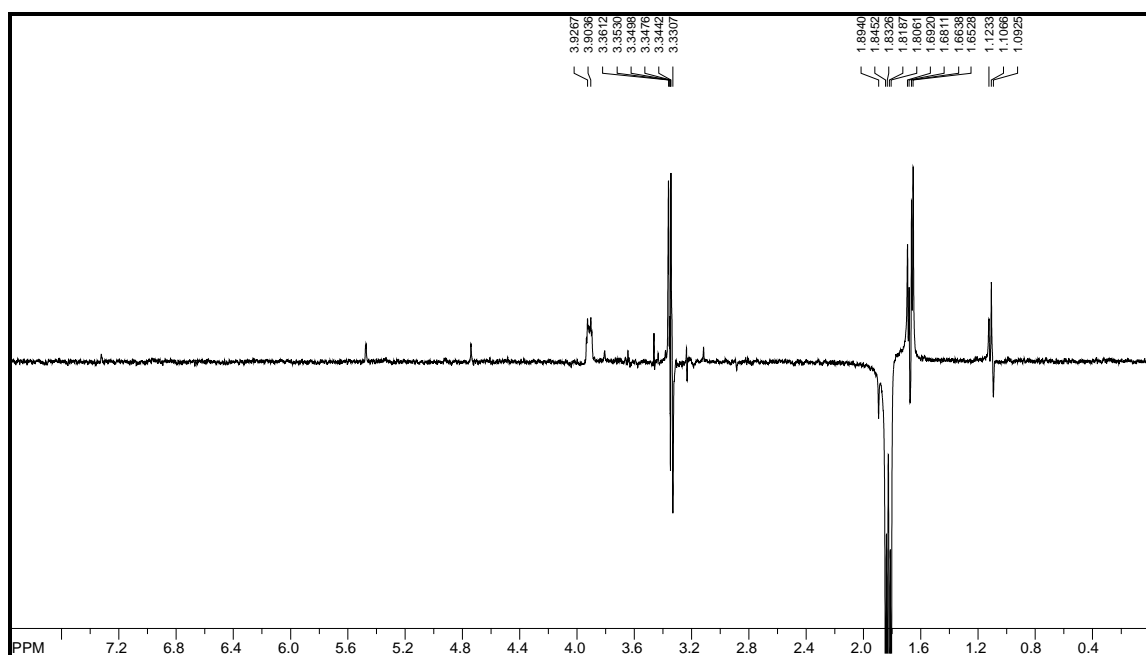


Figura 107. Espectro de NOESY da substância **5** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

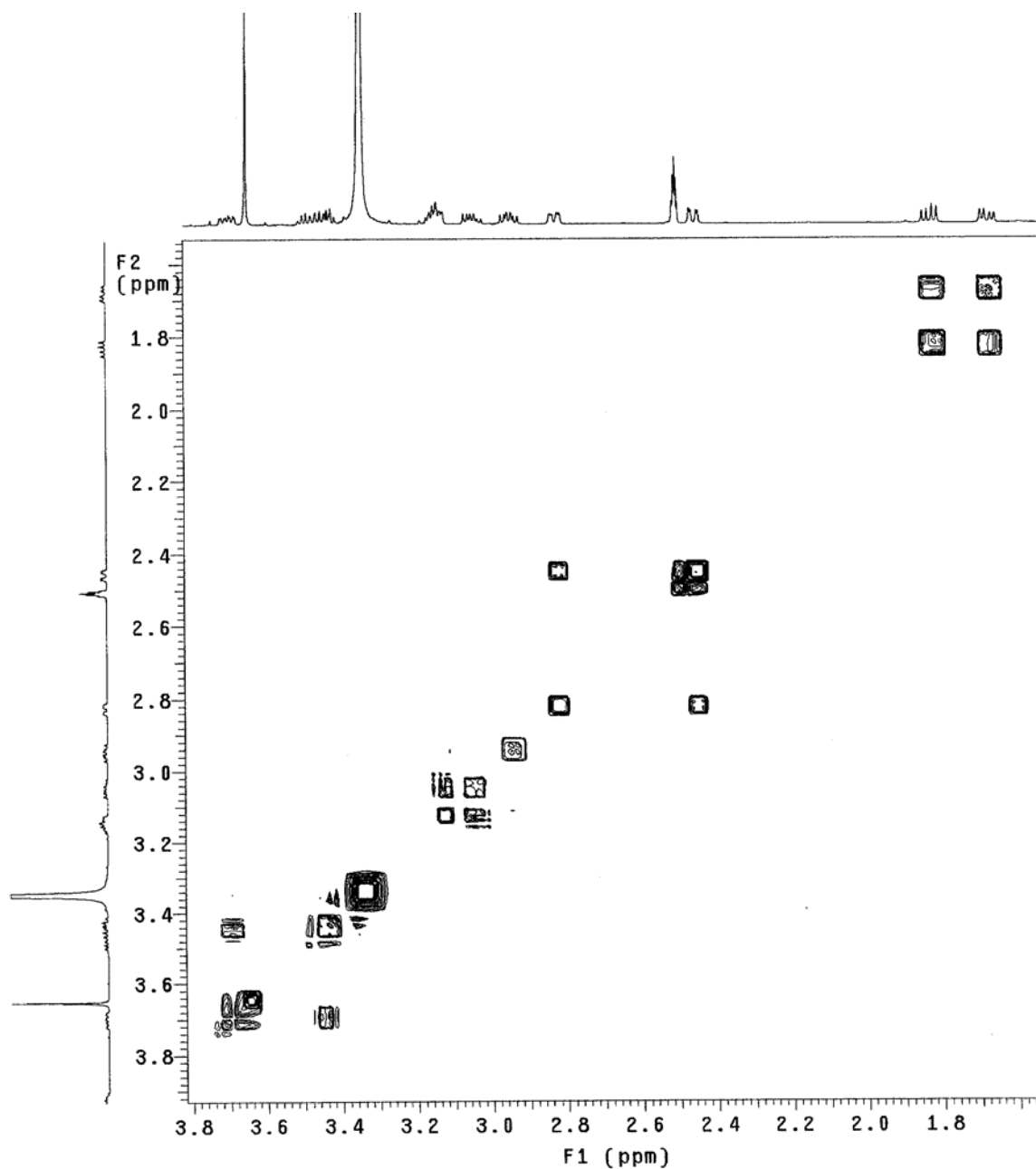


Figura 108. Espectro de gCOSY da substância 5 (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz)



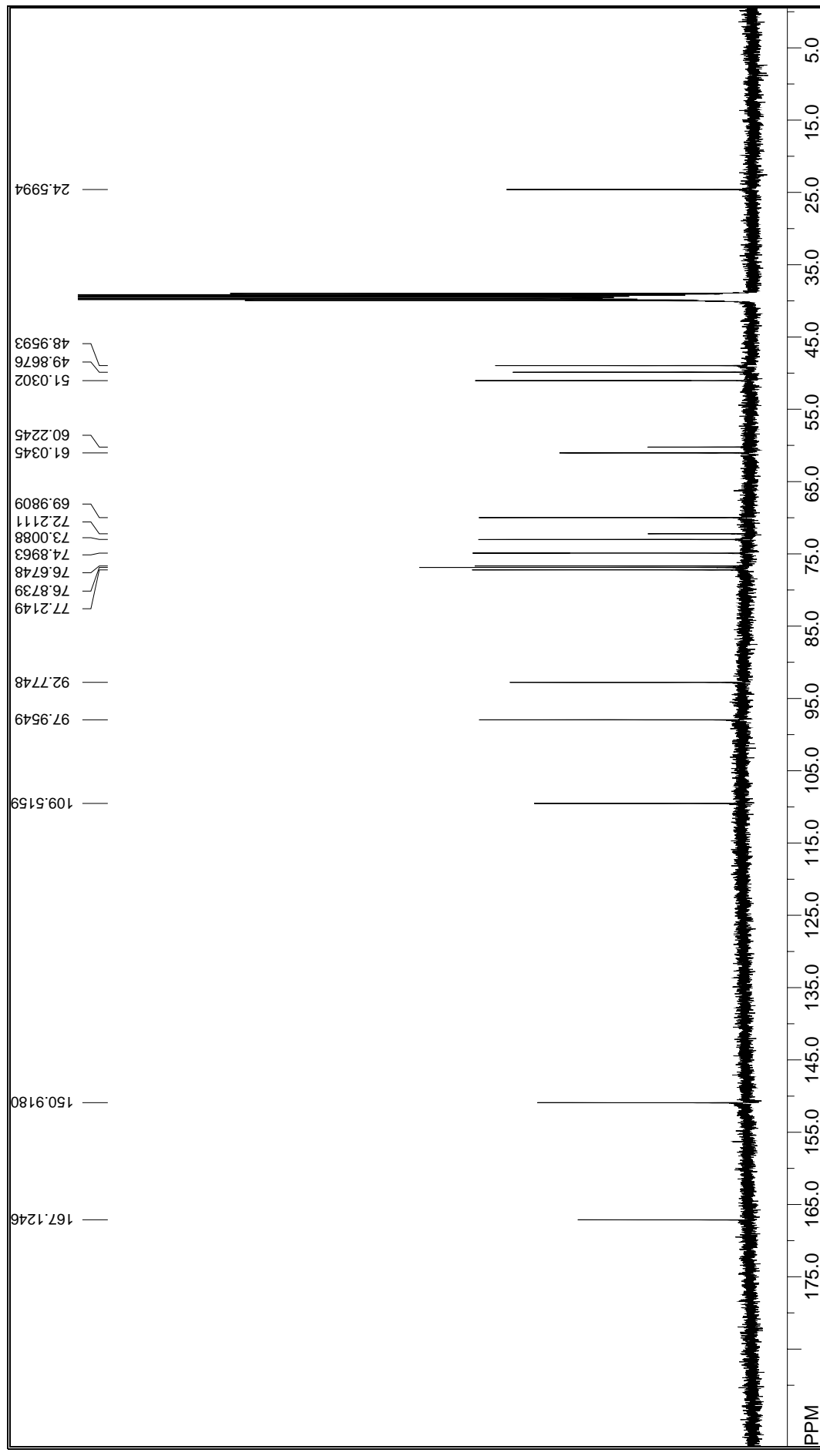


Figura 109. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **5** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 125 MHz).

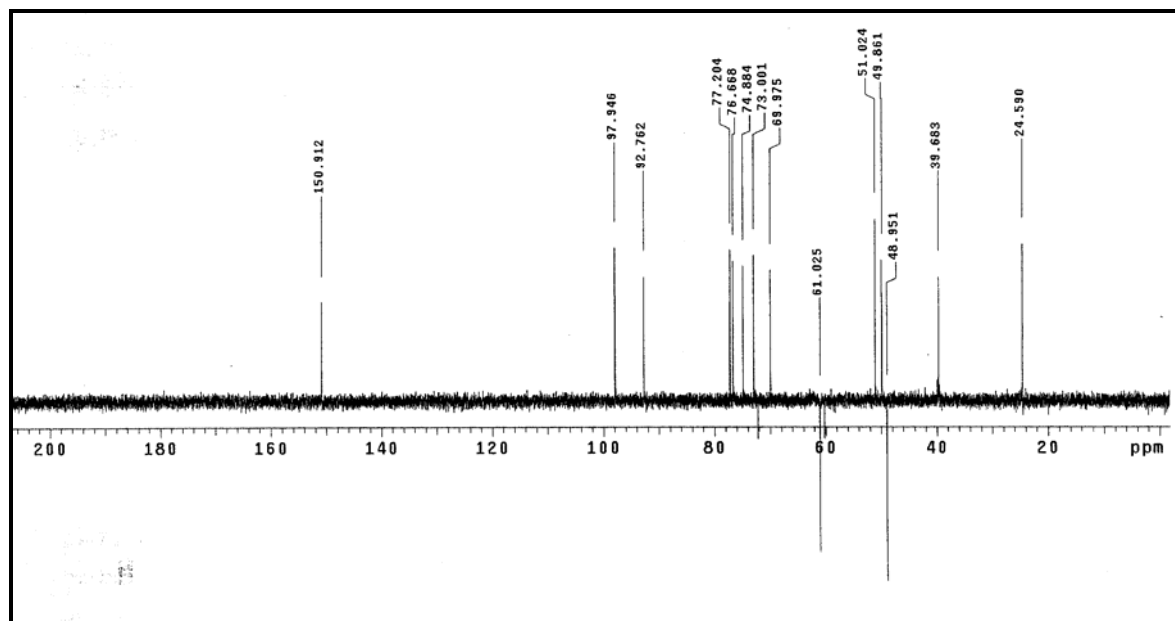


Figura 110. Espectro de DEPT 135° da substância 5 (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).

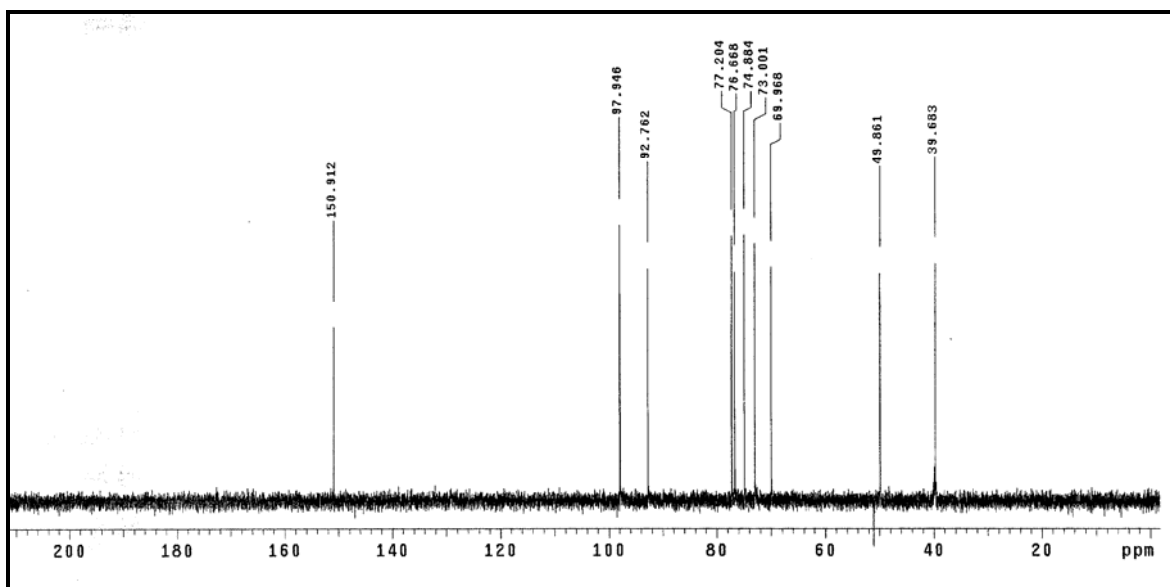


Figura 111. Espectro de DEPT 90° da substância 5 (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).

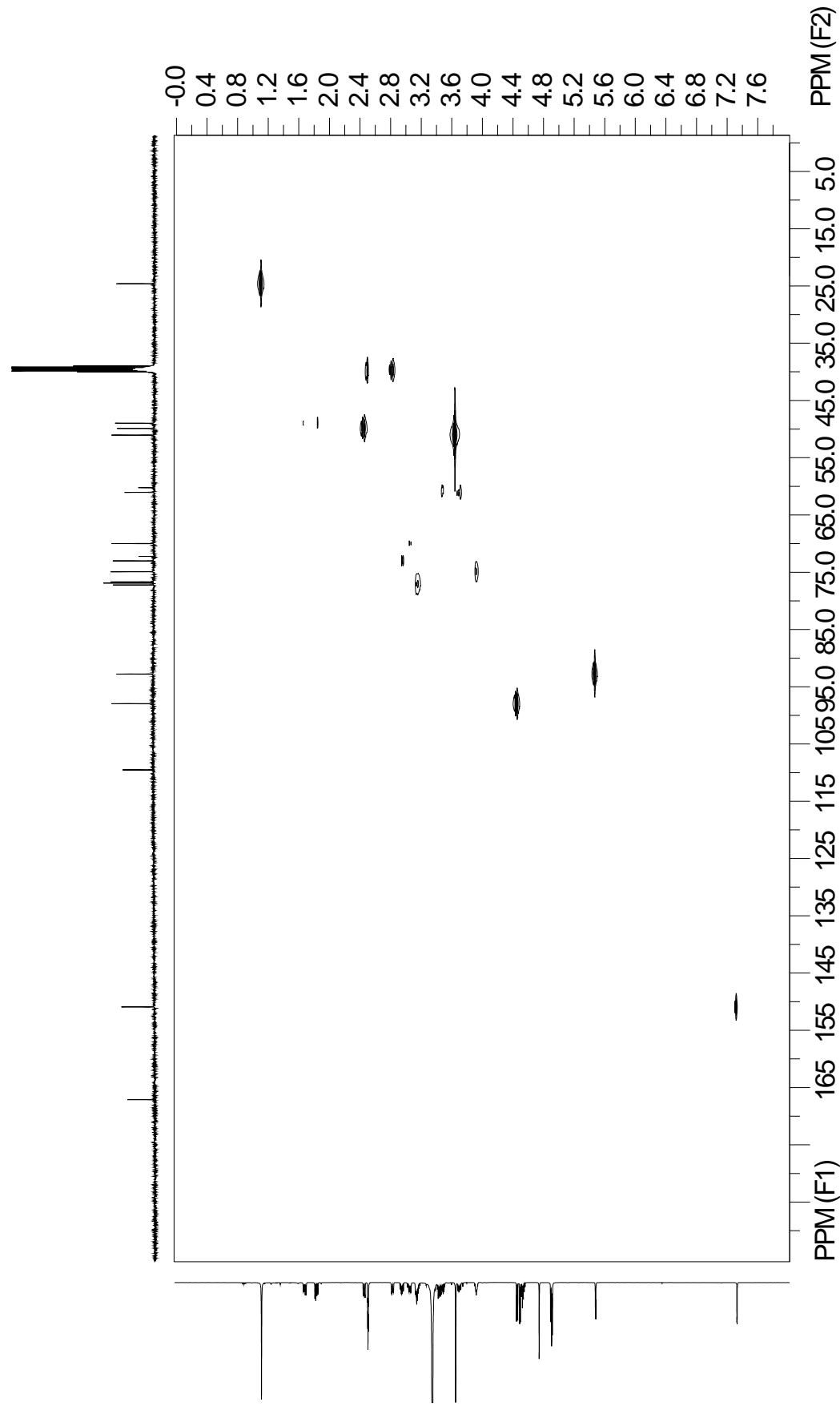
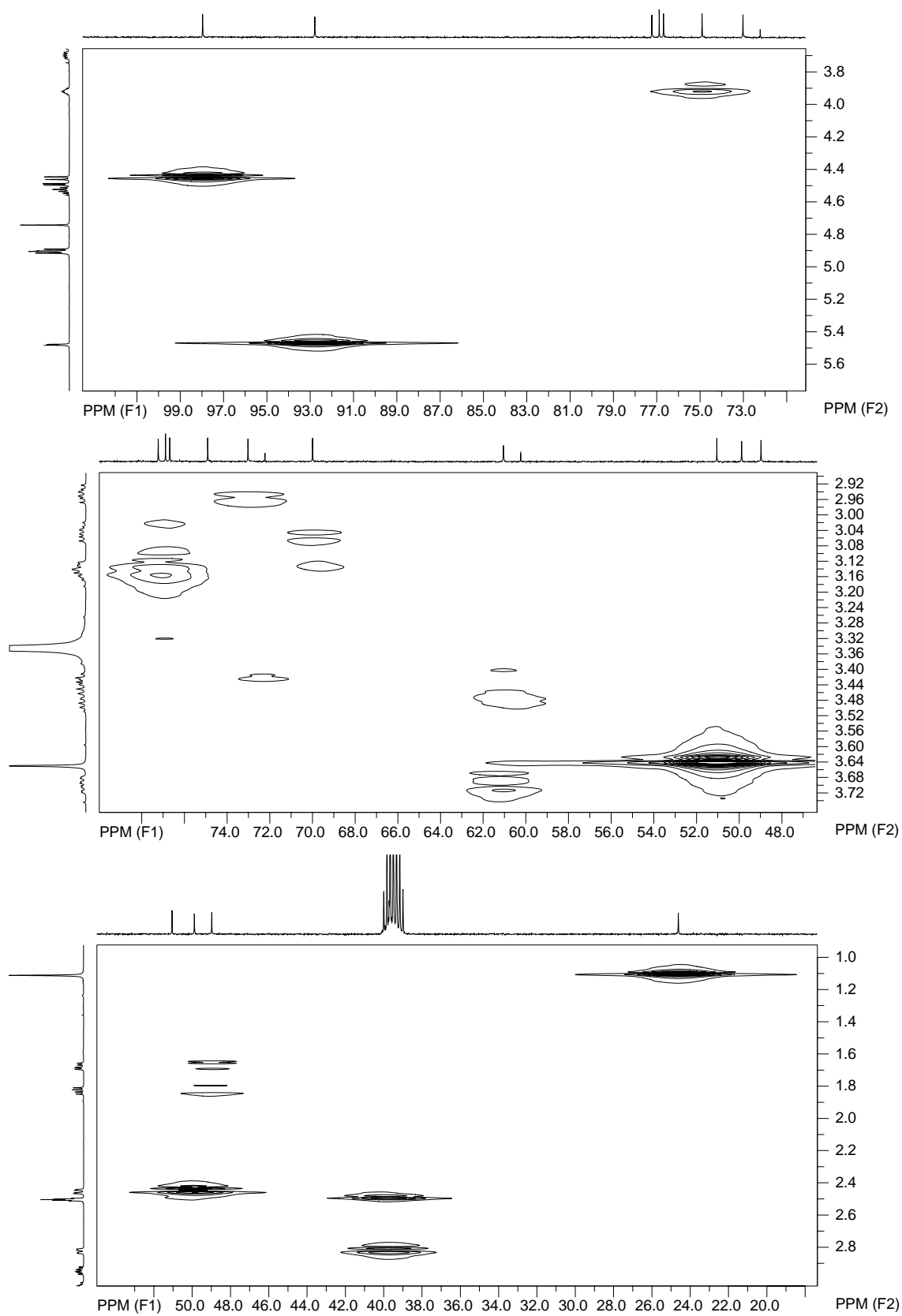


Figura 112. Mapa de correlação gHMQC da substância **5** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz)



**Figura 113.** Ampliações do mapa de correlação gHMBC da substância **5** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)

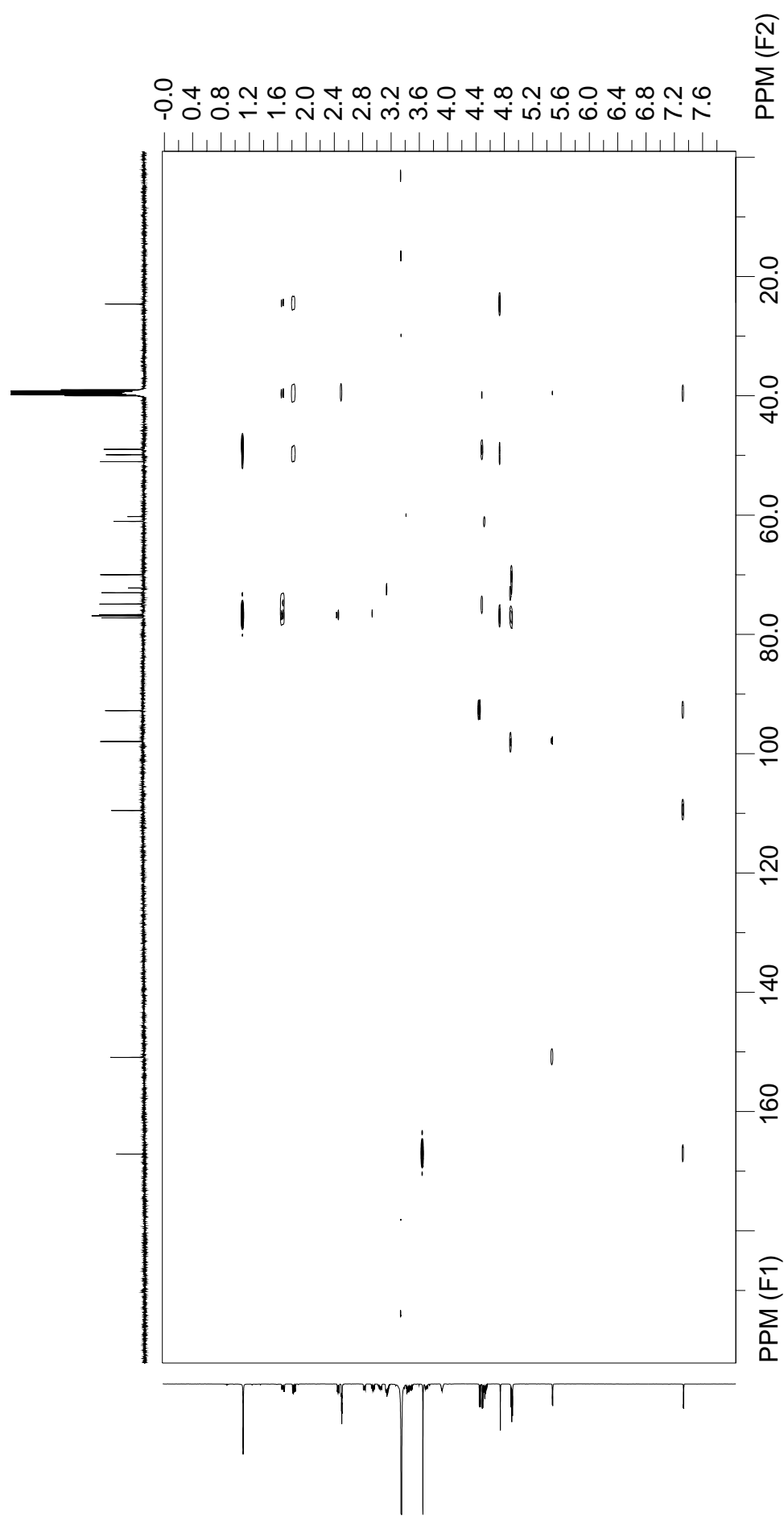
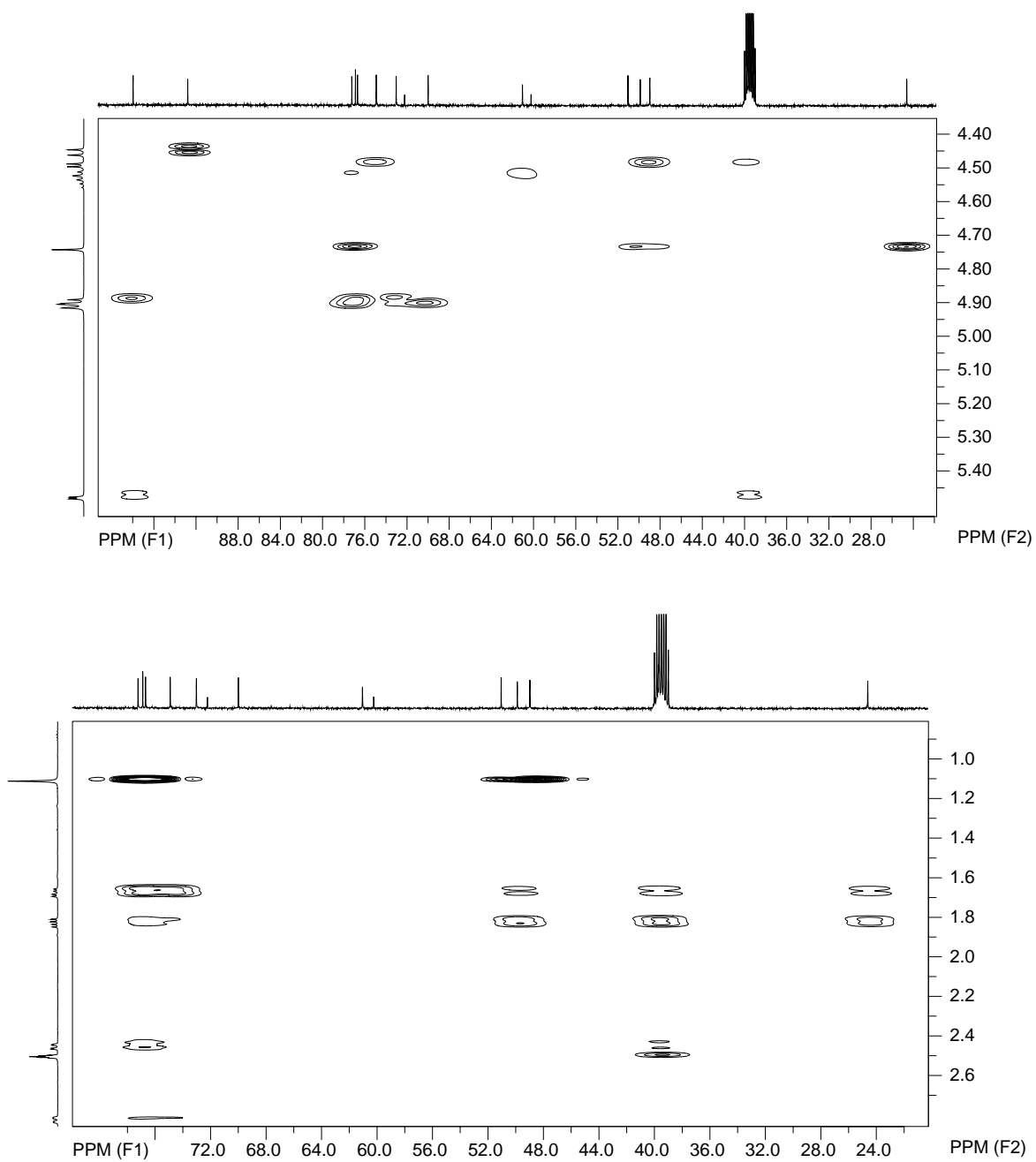


Figura 114. Mapa de correlação gHMBC da substância **5** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).



**Figura 115.** Ampliações do mapa de correlação gHMBC da substância **5** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

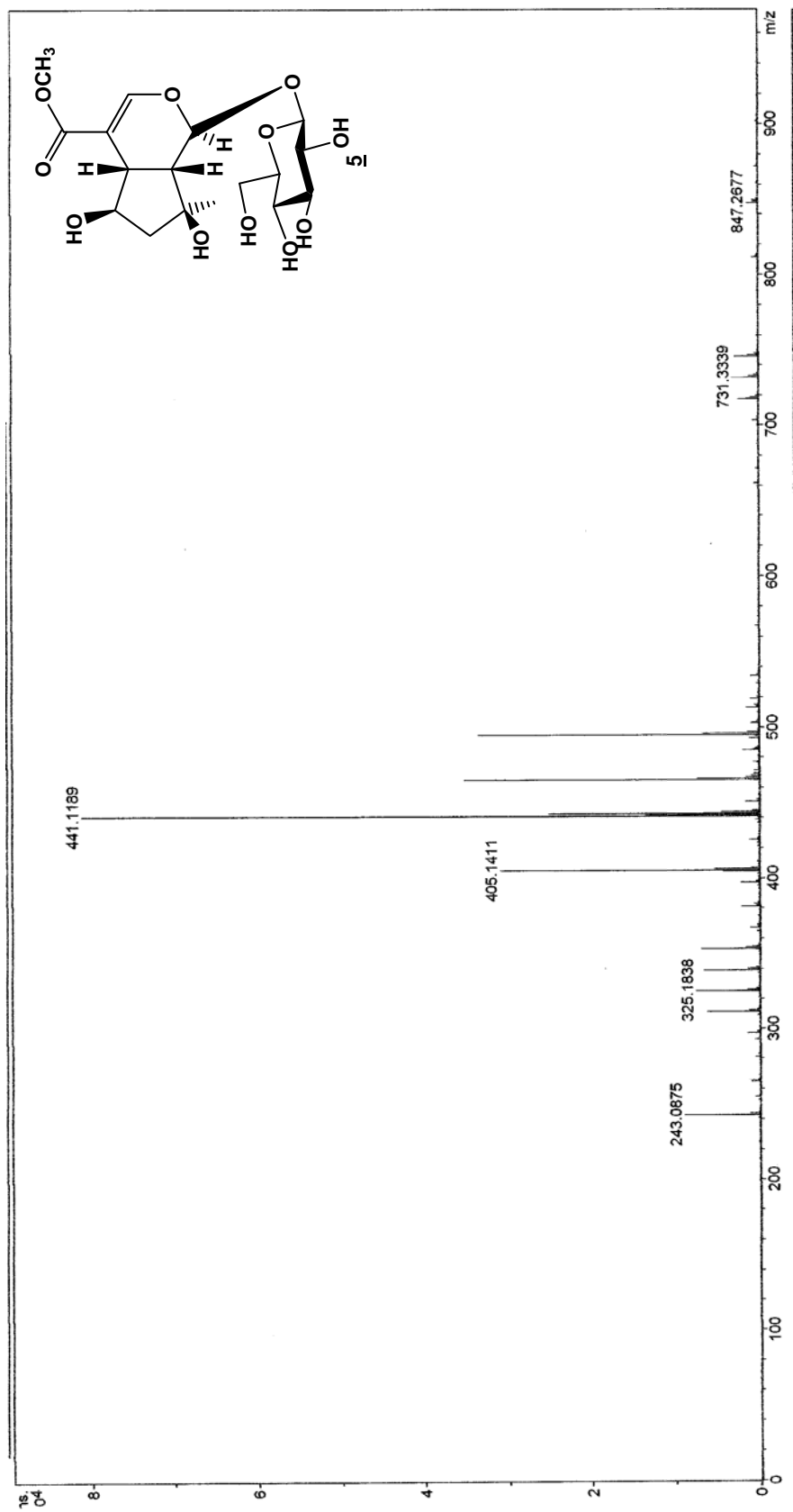


Figura 116. Espectro de Massas da substância **5** (modo negativo).

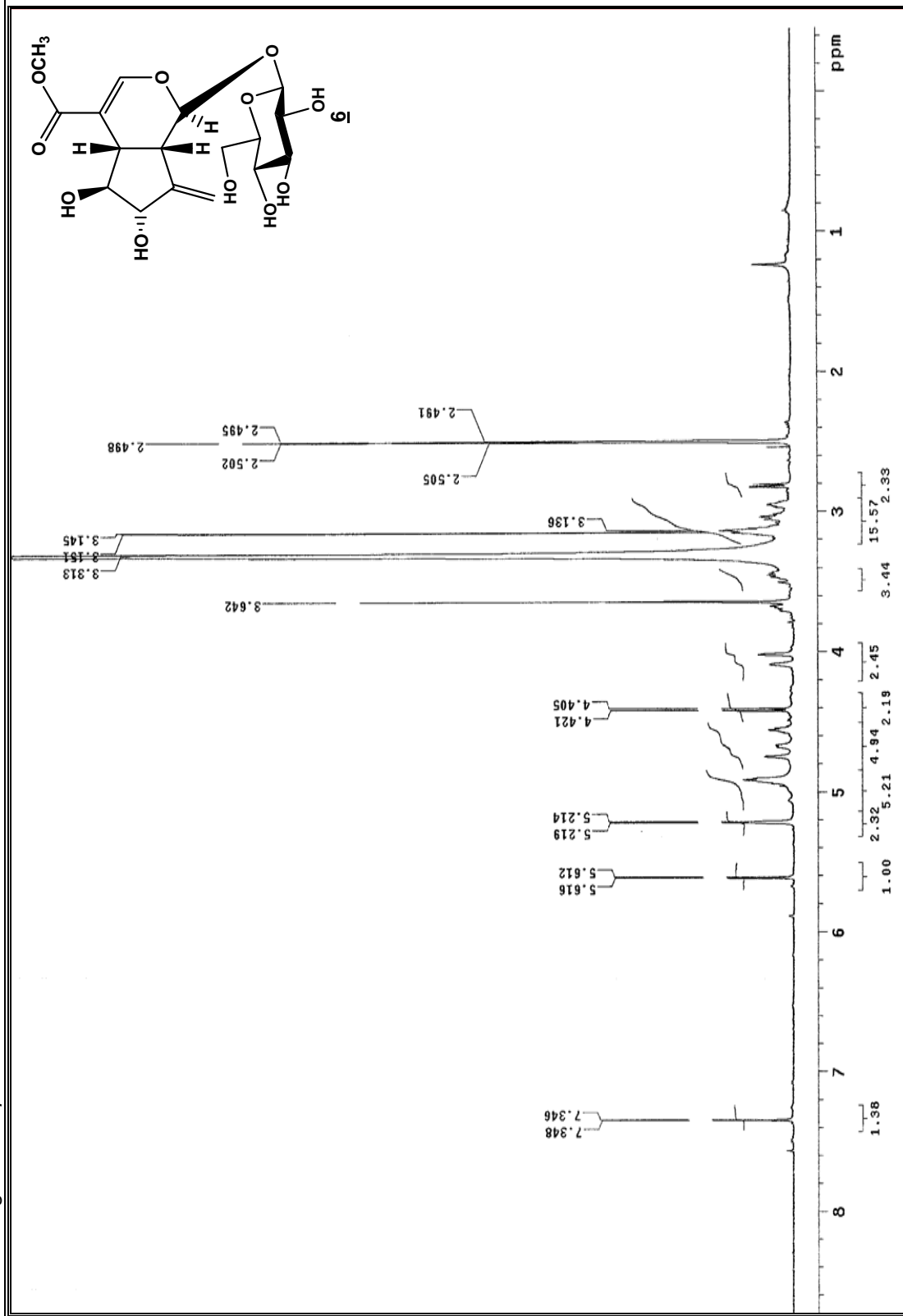


Figura 117. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **6** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz).



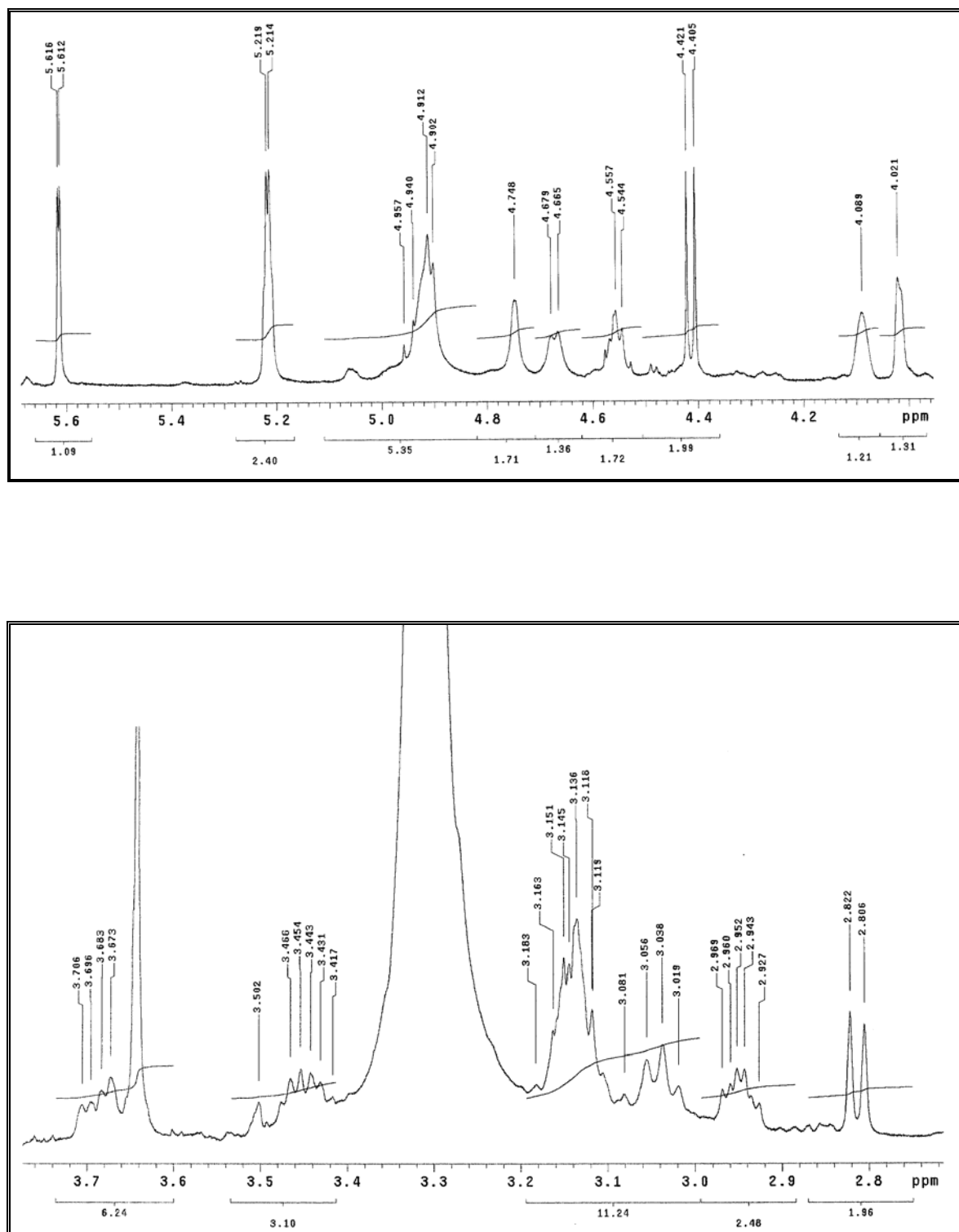


Figura 118. Ampliações do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **6** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz).

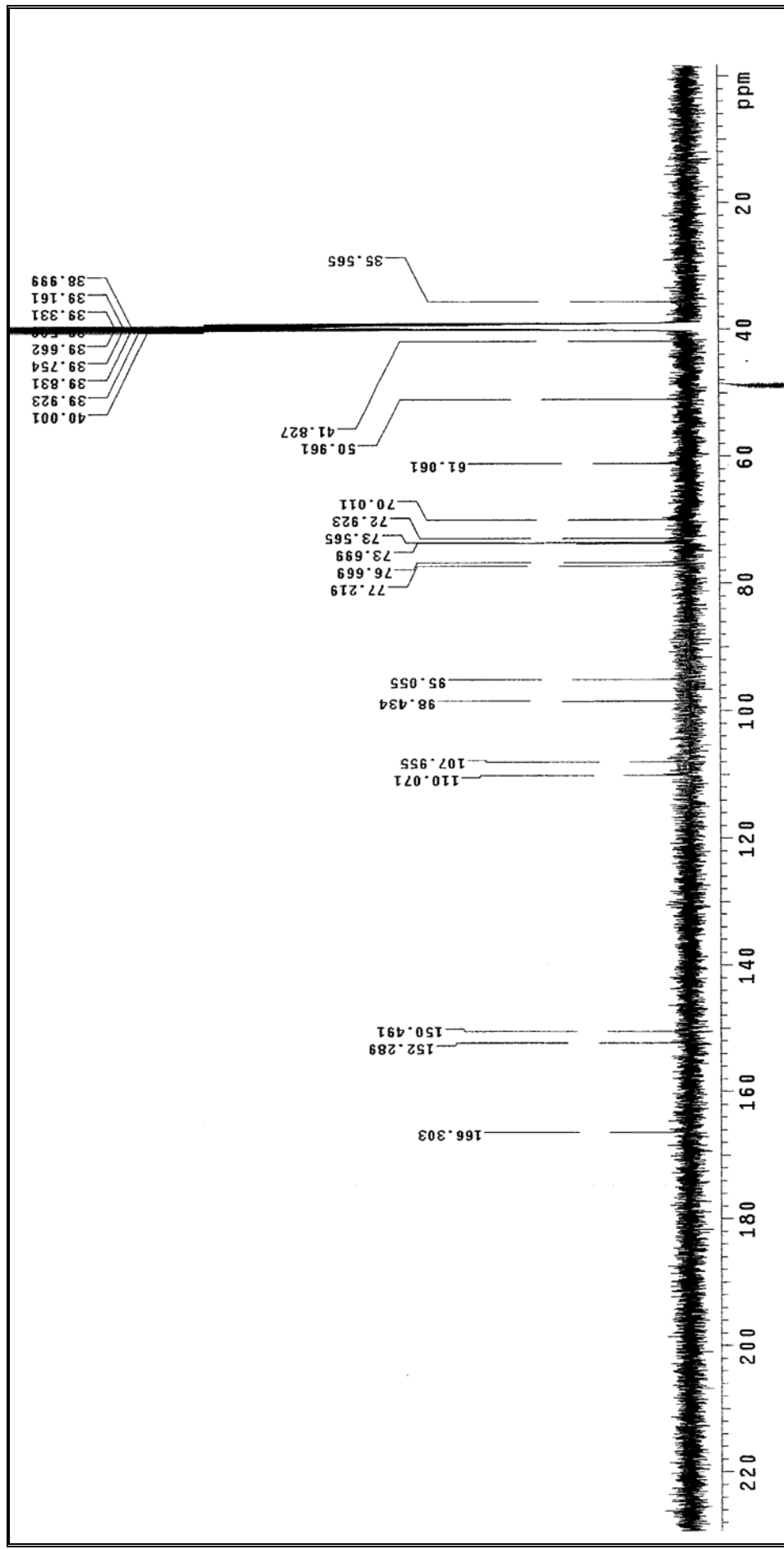


Figura 119. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **6** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 125 MHz).

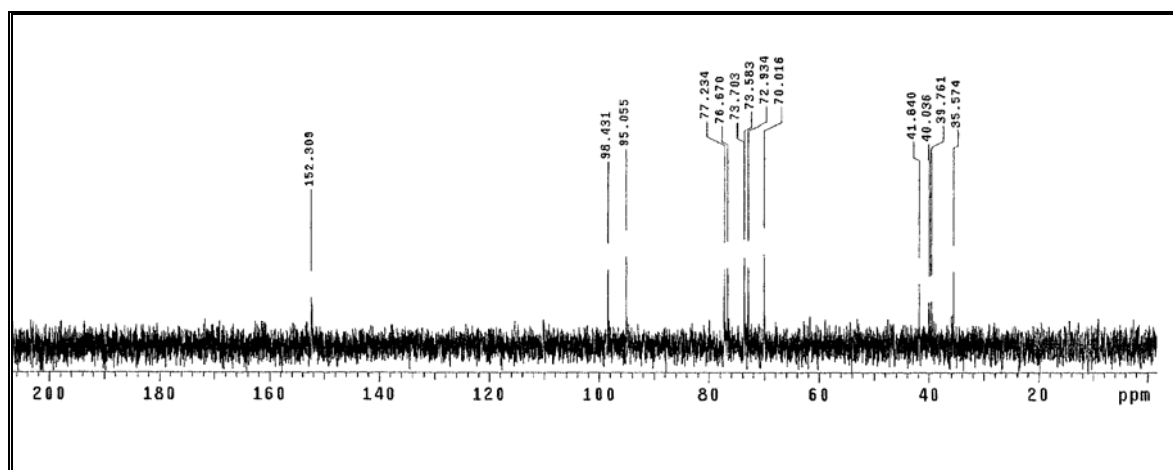


Figura 120. Espectro de DEPT 90° da substância **6** (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).

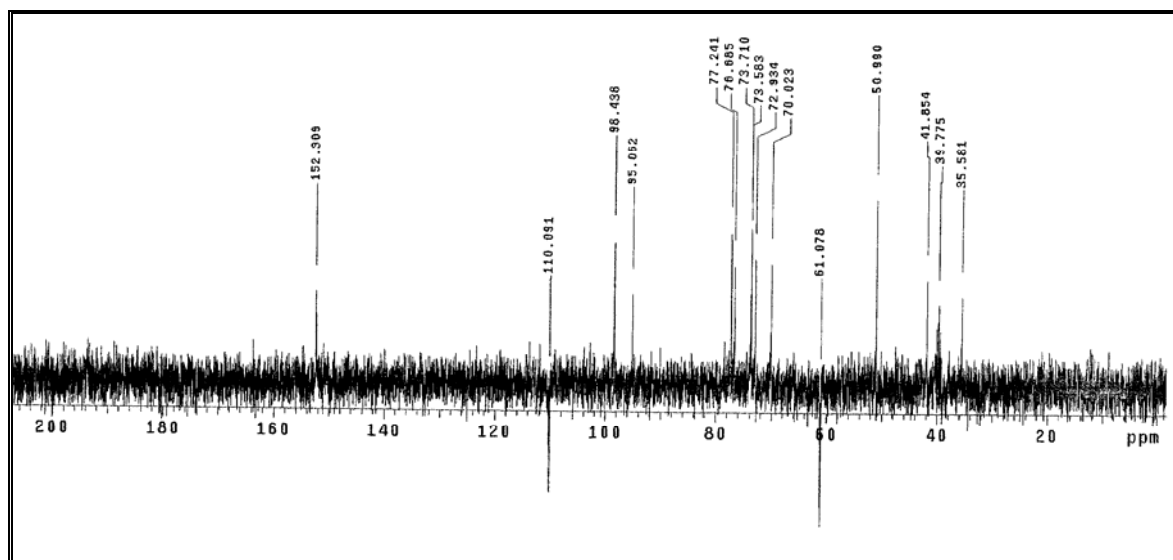


Figura 121. Espectro de DEPT 135° da substância **6** (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).

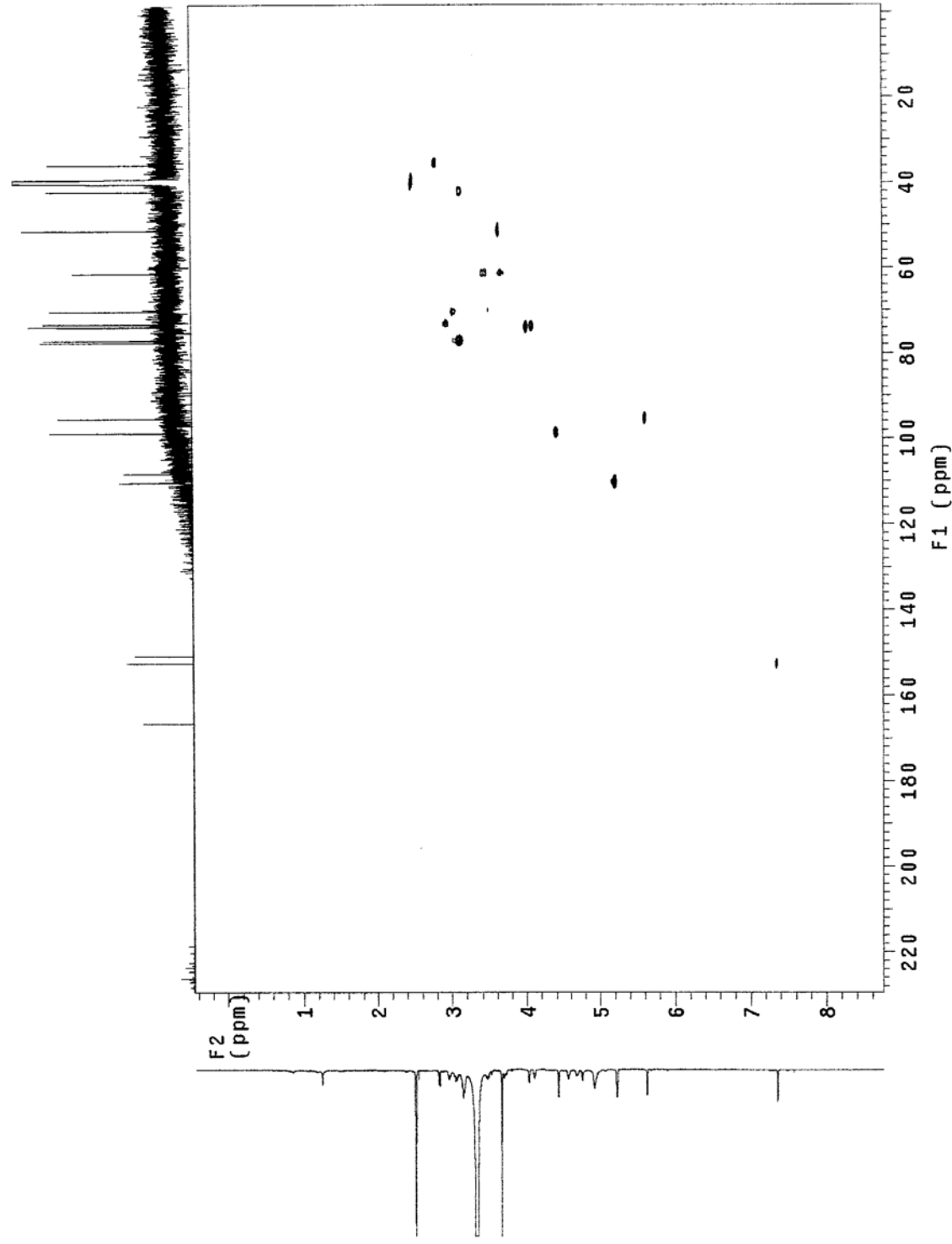
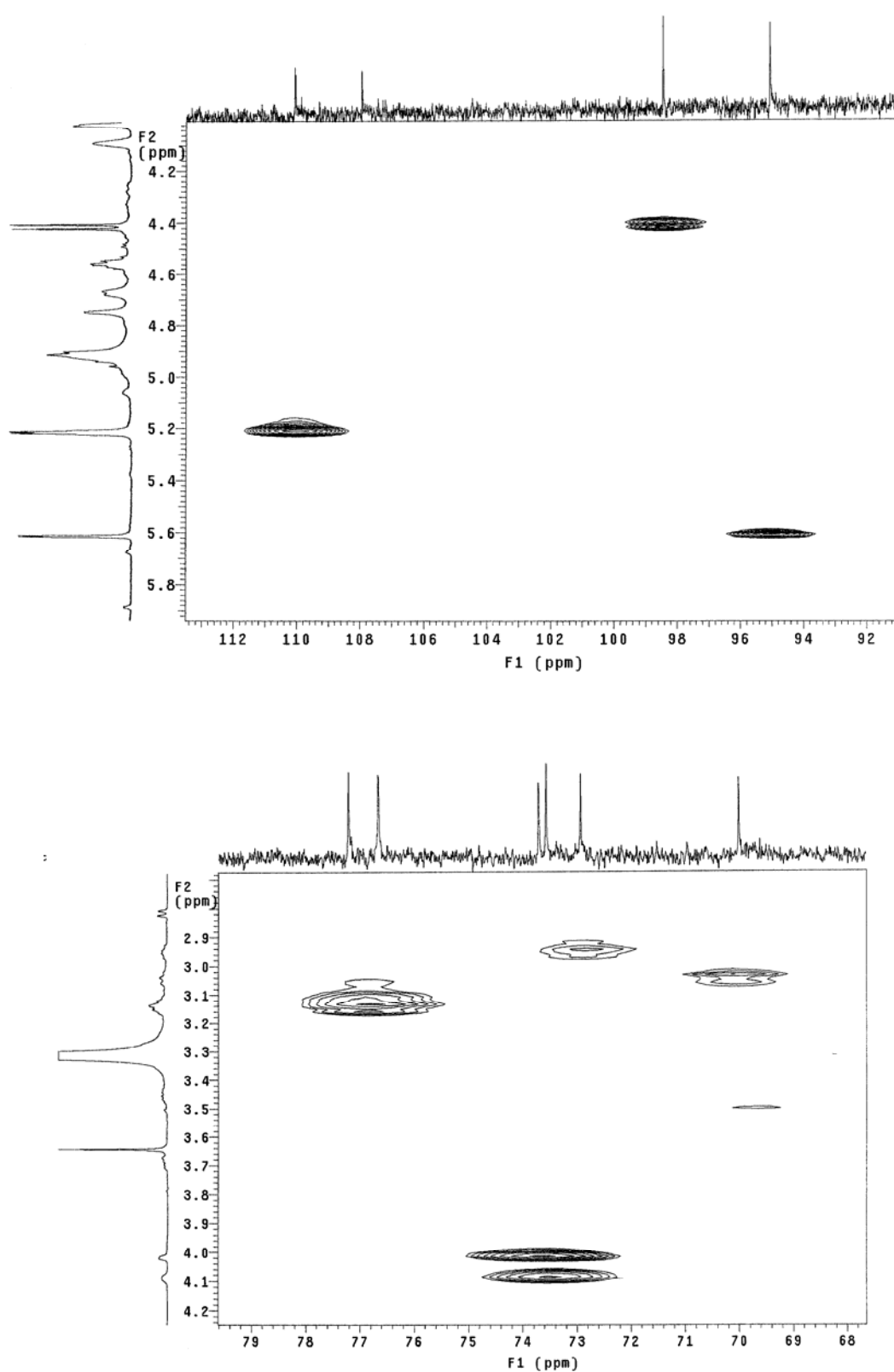


Figura 122. Mapa de correlação gHMOC da substância **9** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).



**Figura 123.** Ampliações do mapa de correlação gHMQC da substância **6** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).

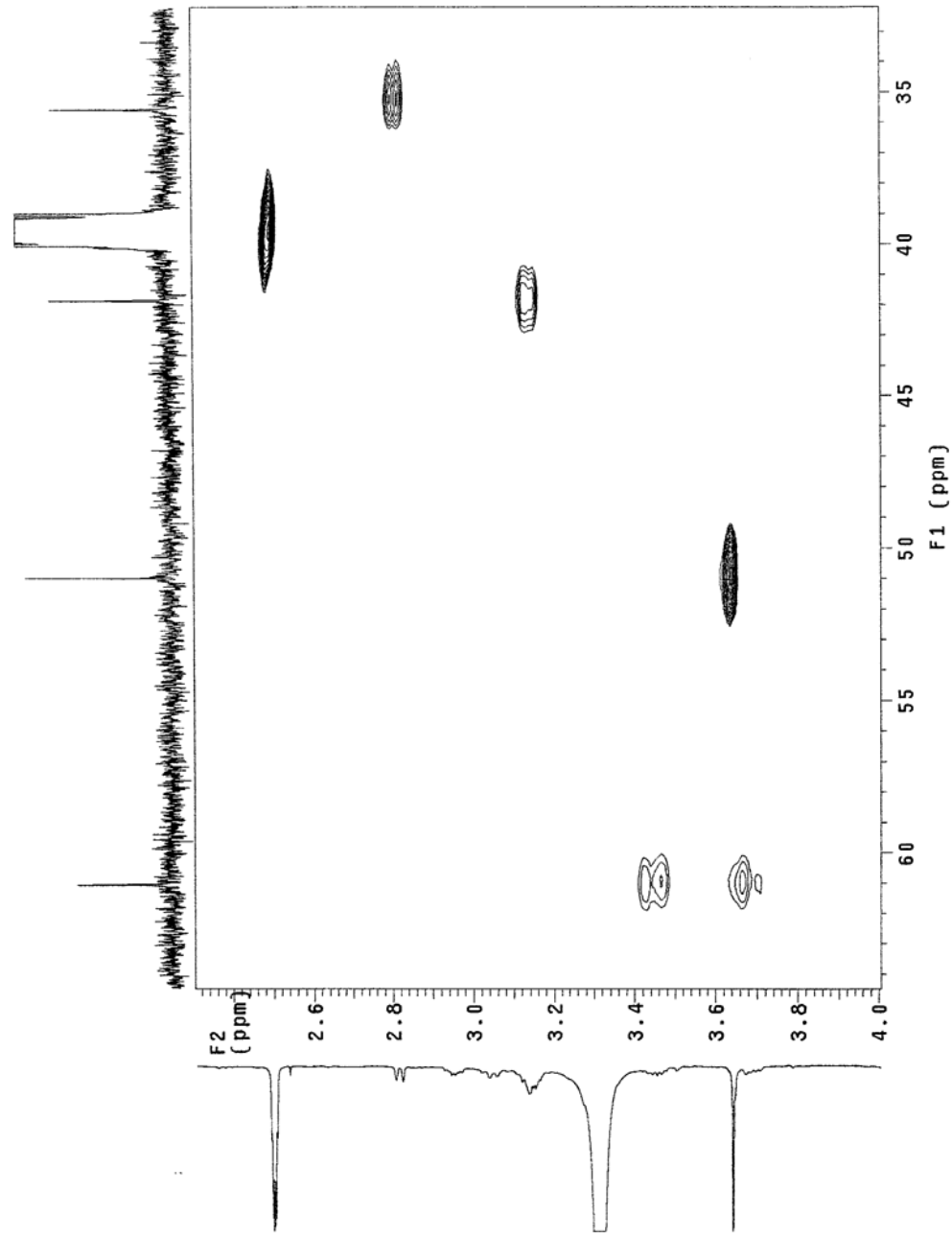


Figura 124. Ampliação do mapa de correlação gHMQC da substância **6** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).

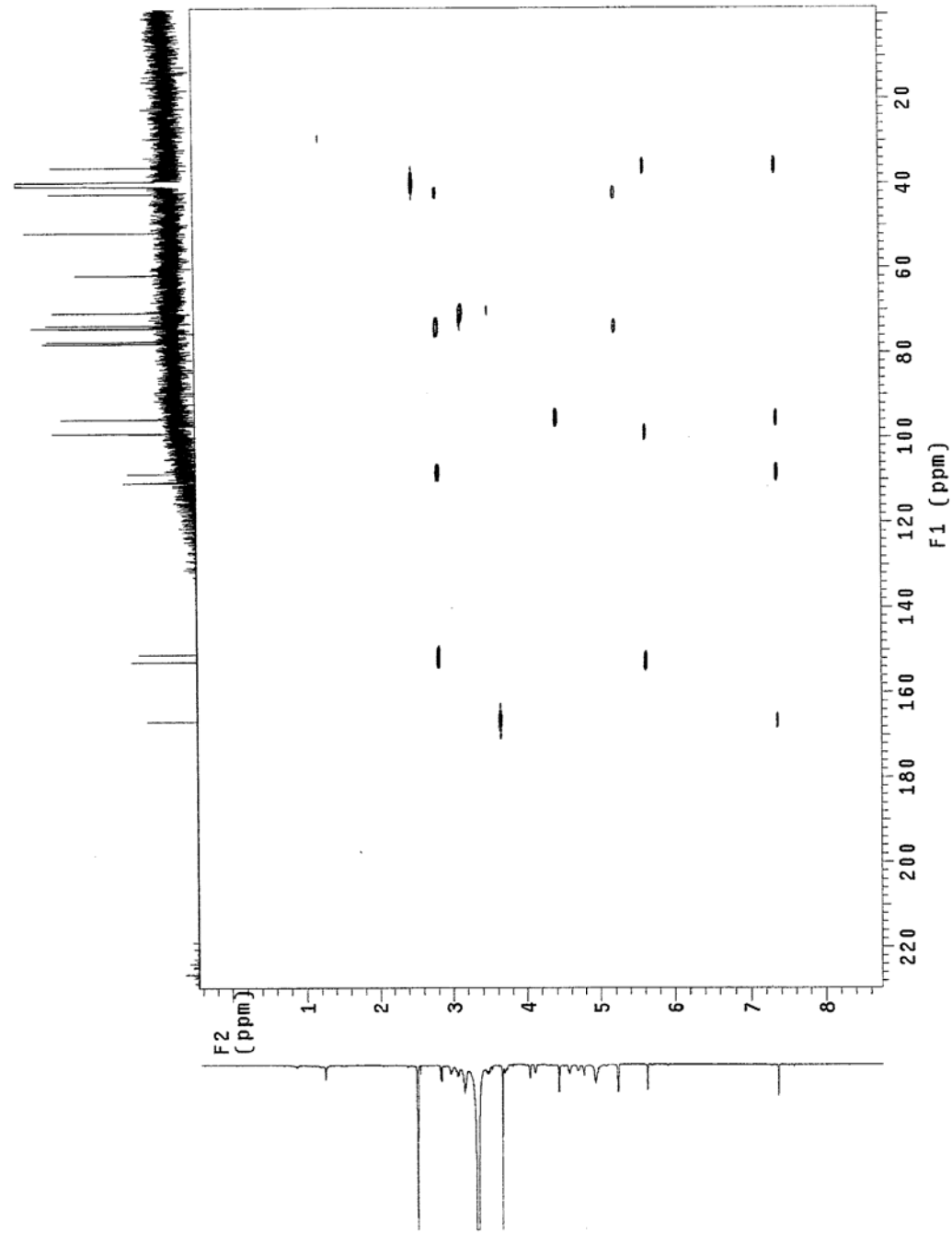
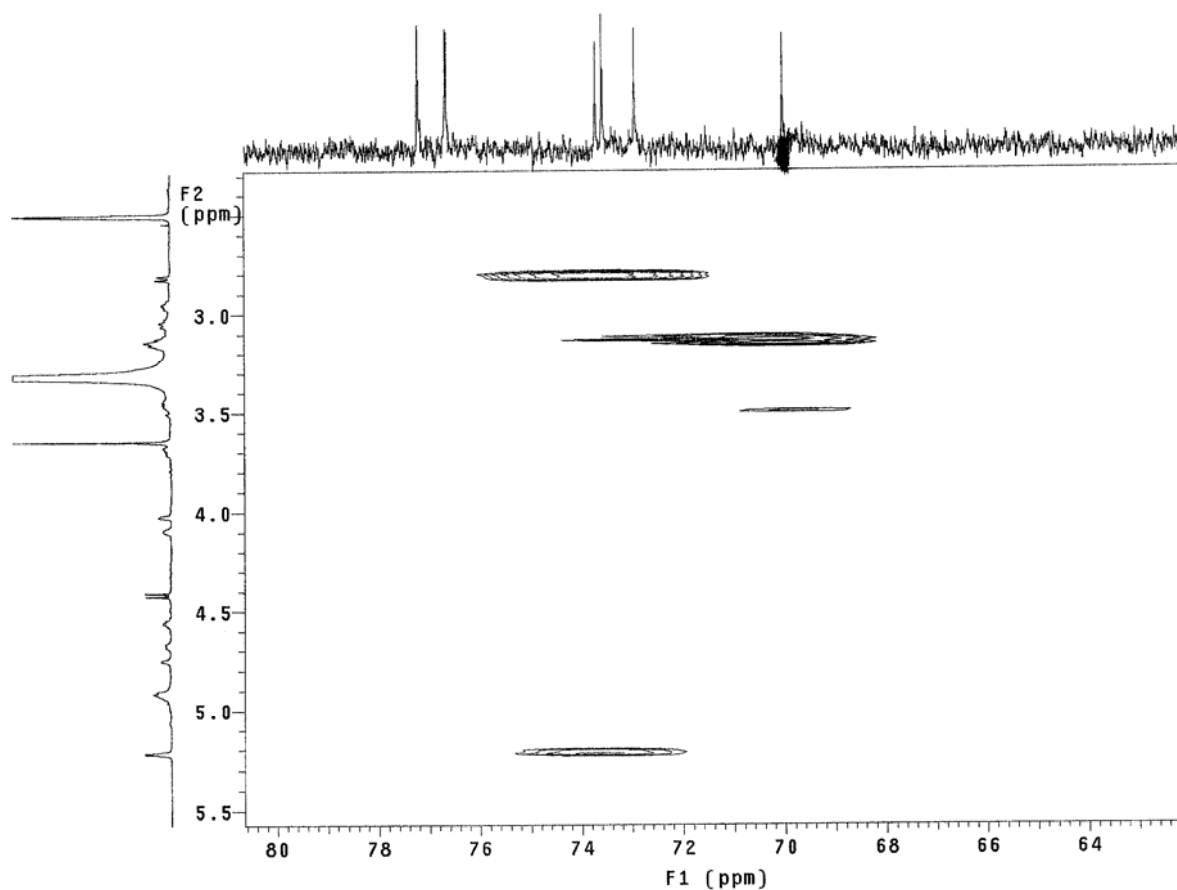
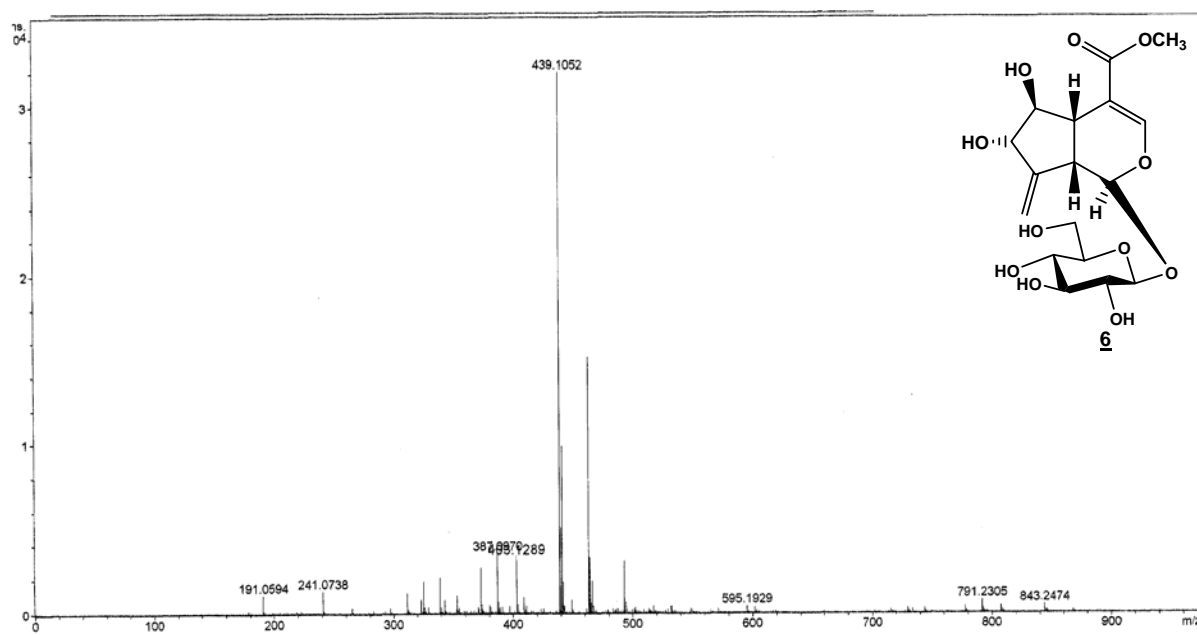


Figura 125. Mapa de correlação gHMBC da substância **6** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).



**Figura 126.** Ampliação do mapa de correlação gHMBC da substância **6** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figura 127.** Espectro de Massas da substância **6** (modo negativo).



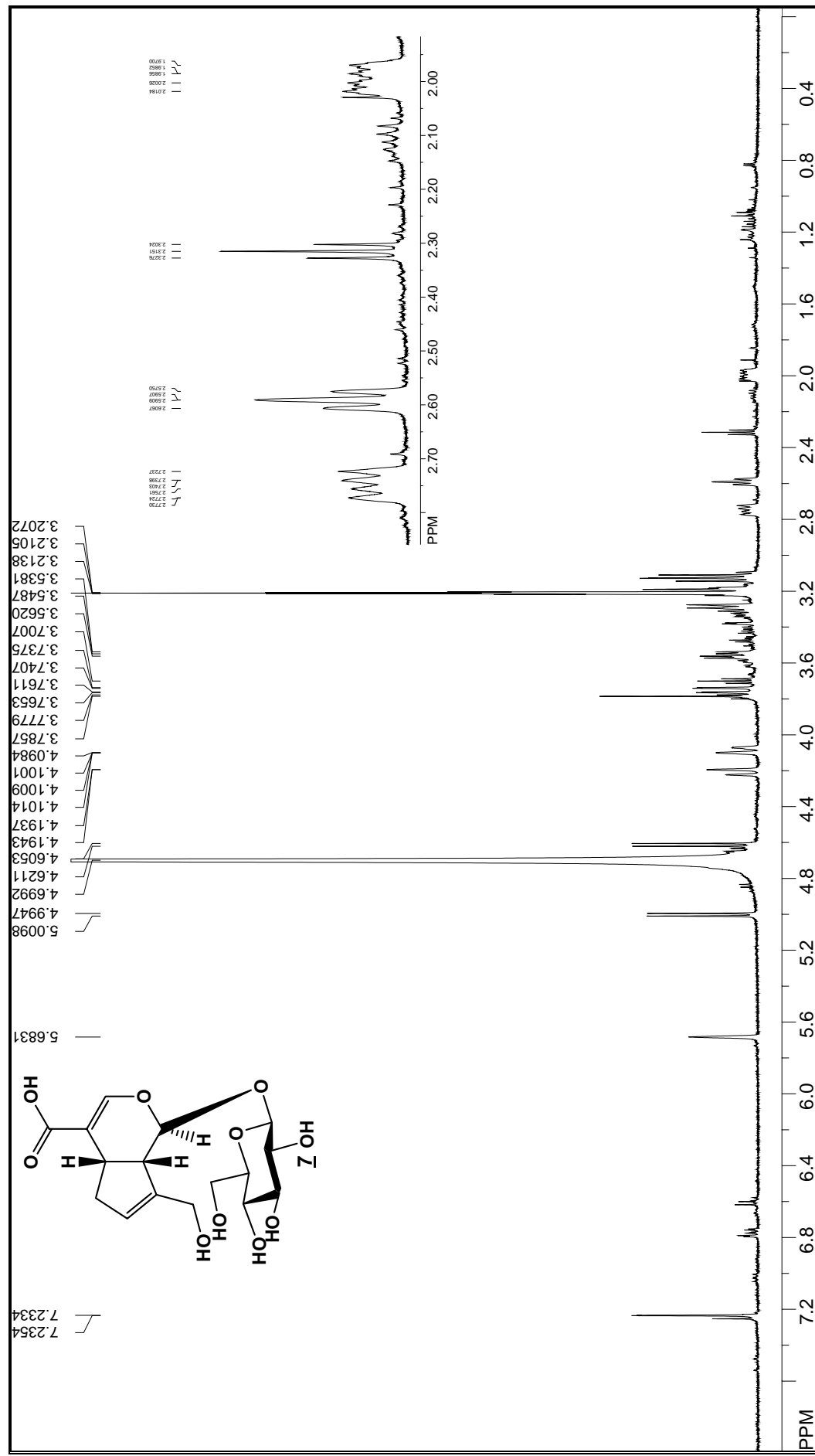


Figura 128. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância Z (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).

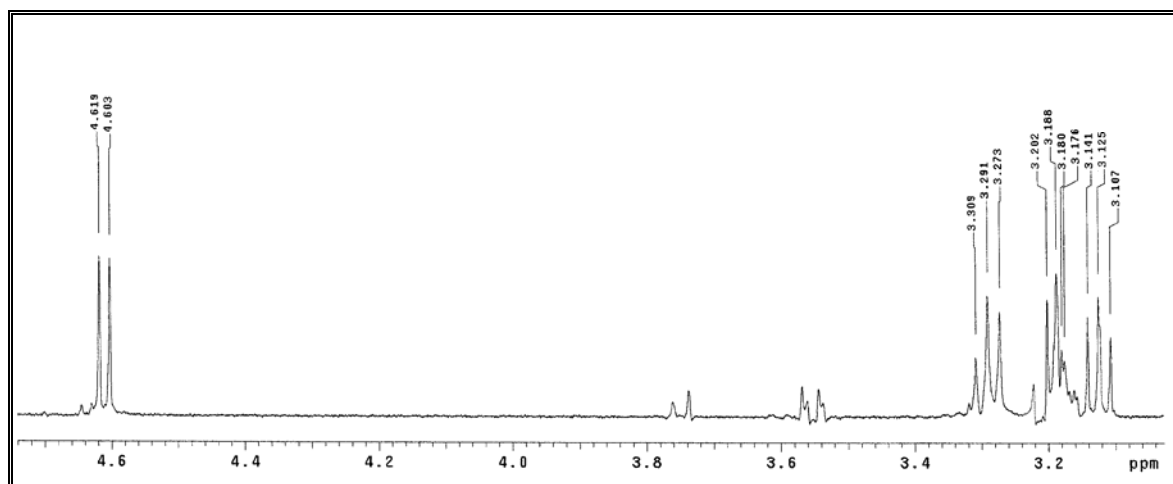
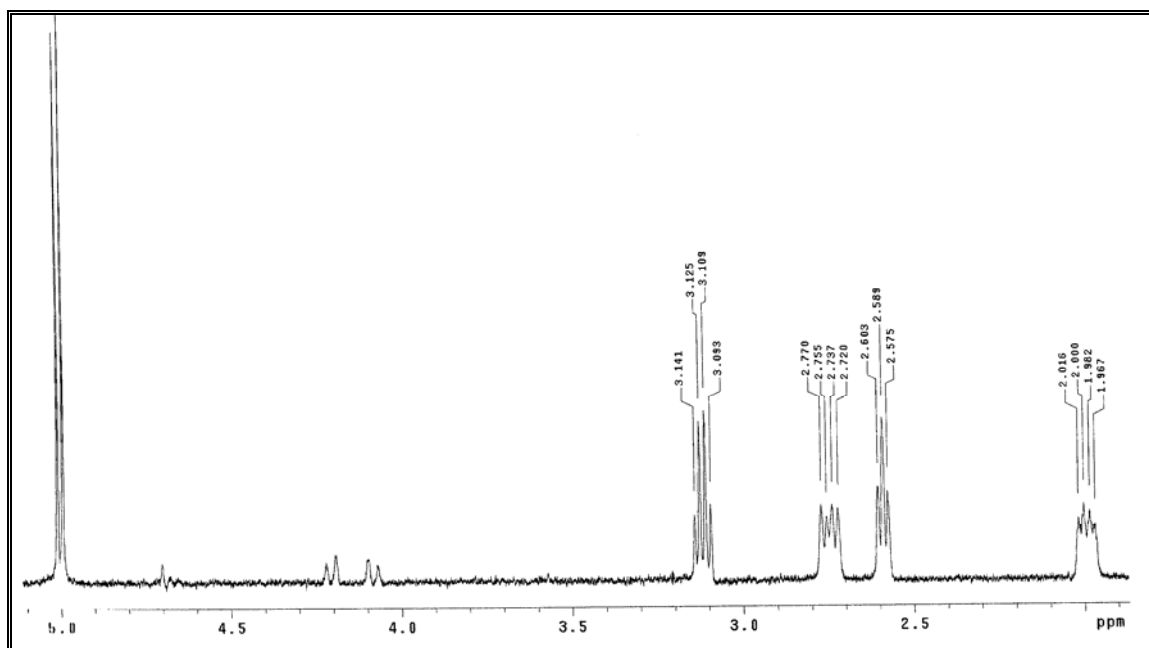
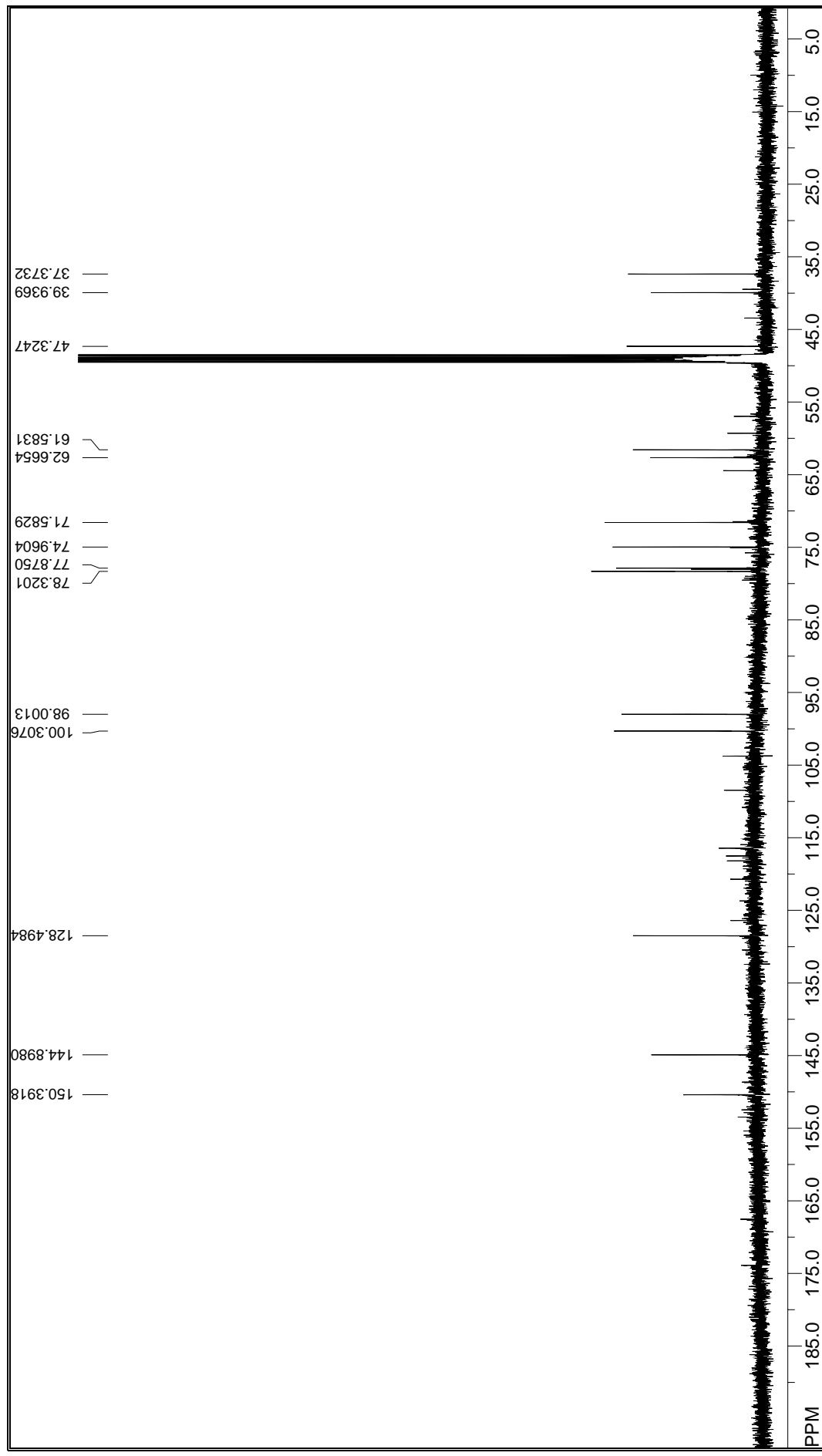


Figura 129. Espectros de TOCSY da substância **7** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).



**Figura 130.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **Z** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz).

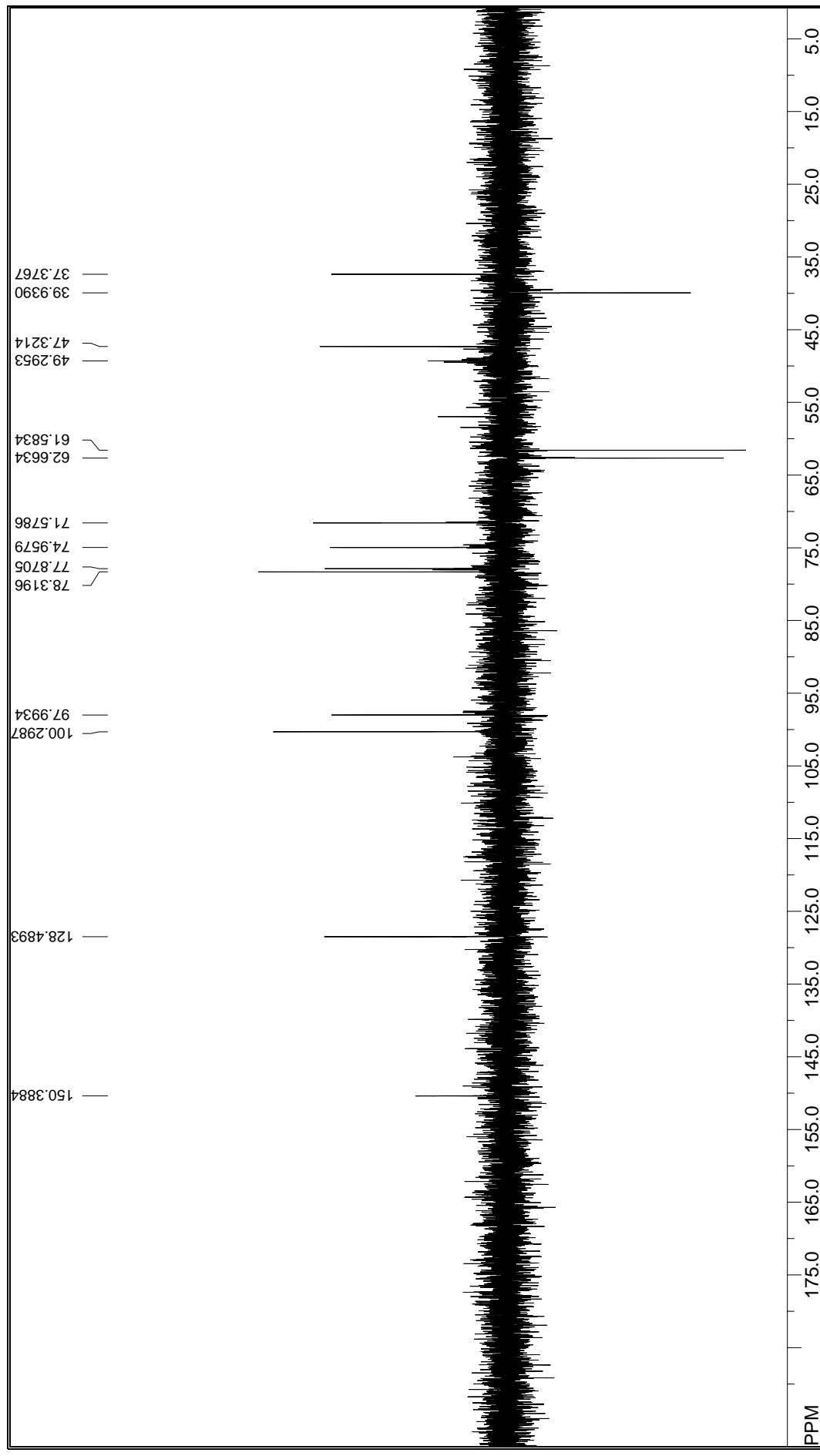
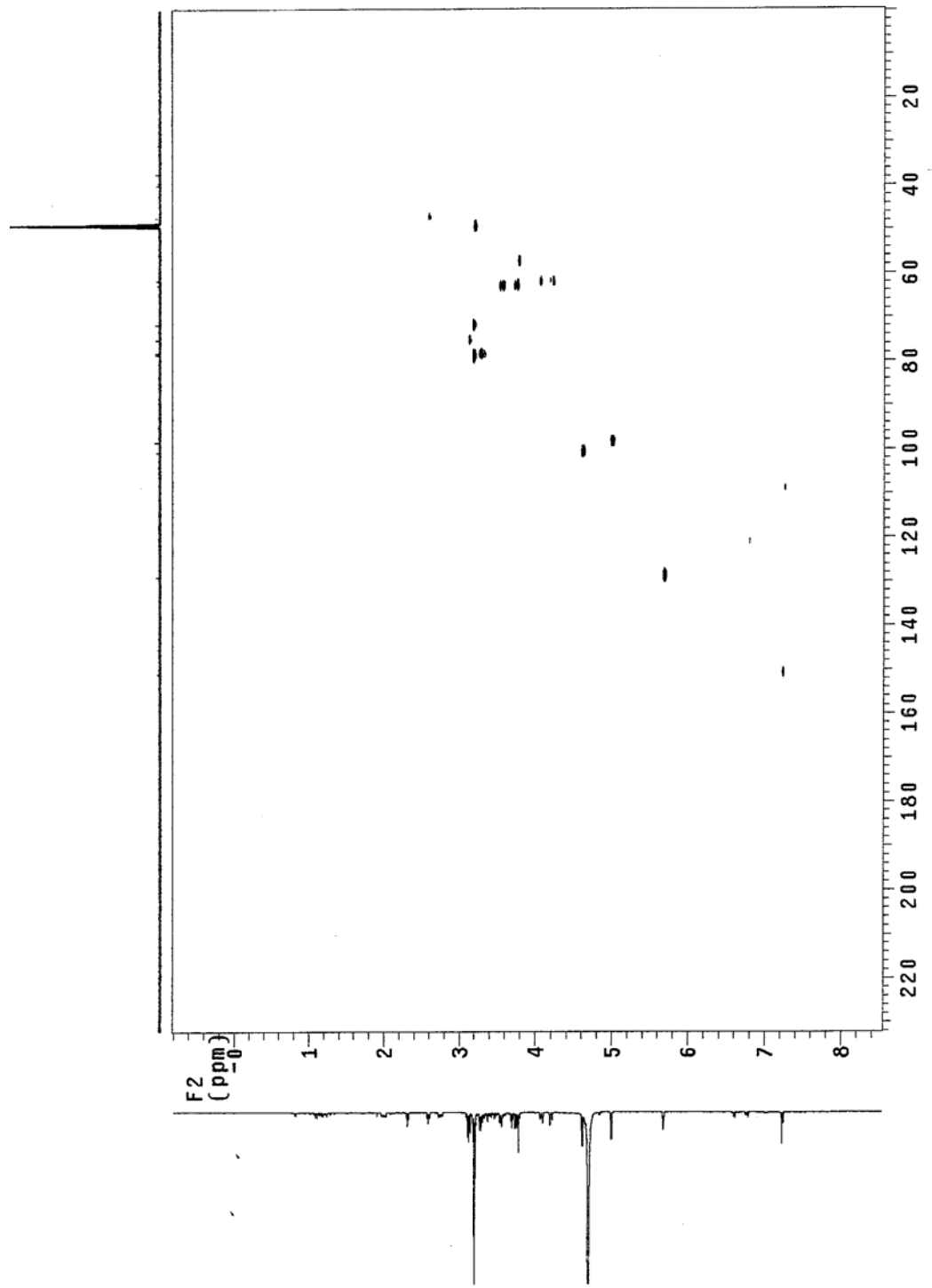


Figura 131. Espectro de DEPT 135° da substância Z (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz).



**Figura 132.** Mapa de correlação gHMBC da substância **1** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).

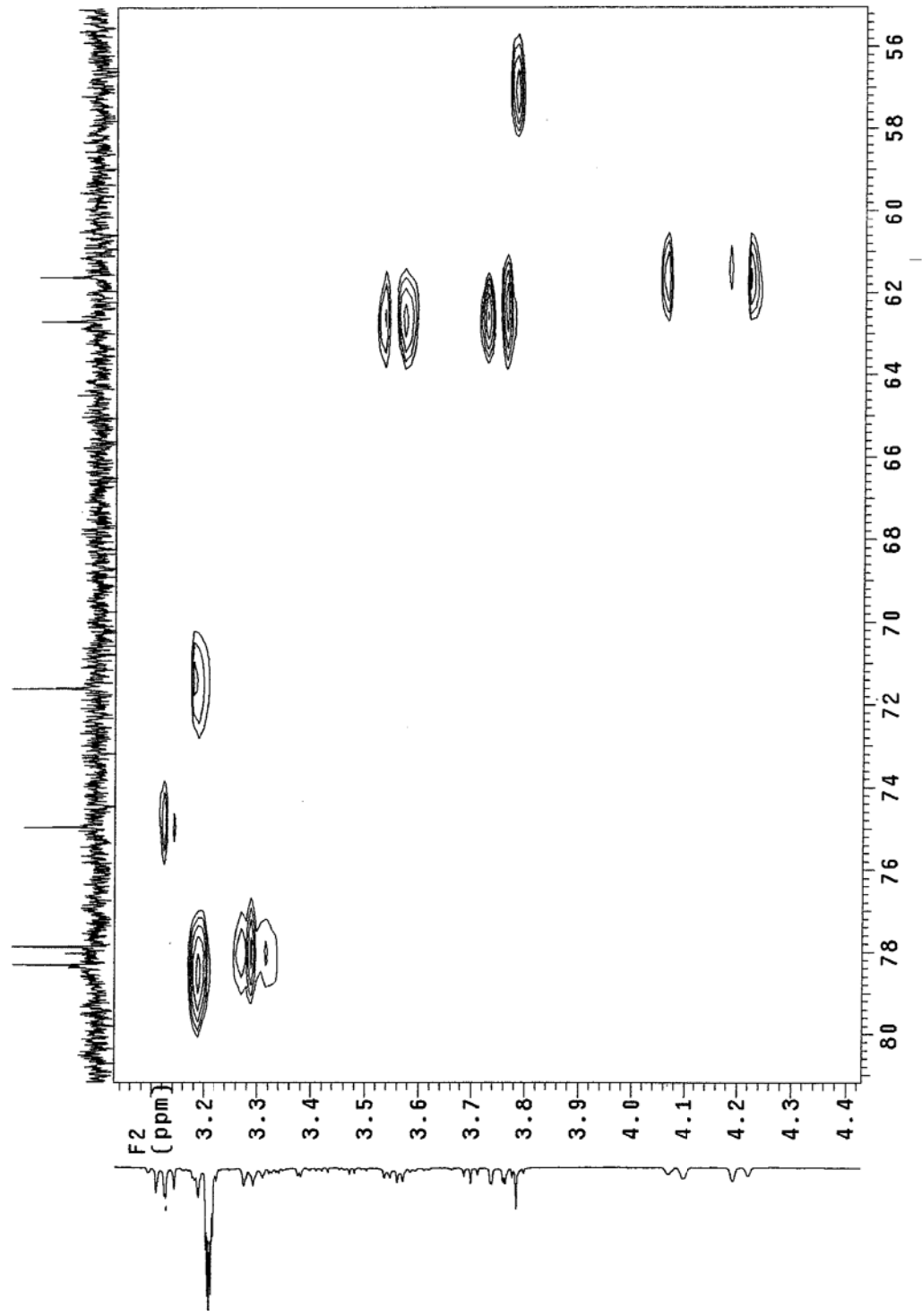


Figura 133. Ampliação do mapa de correlação gHMQC da substância **Z** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).

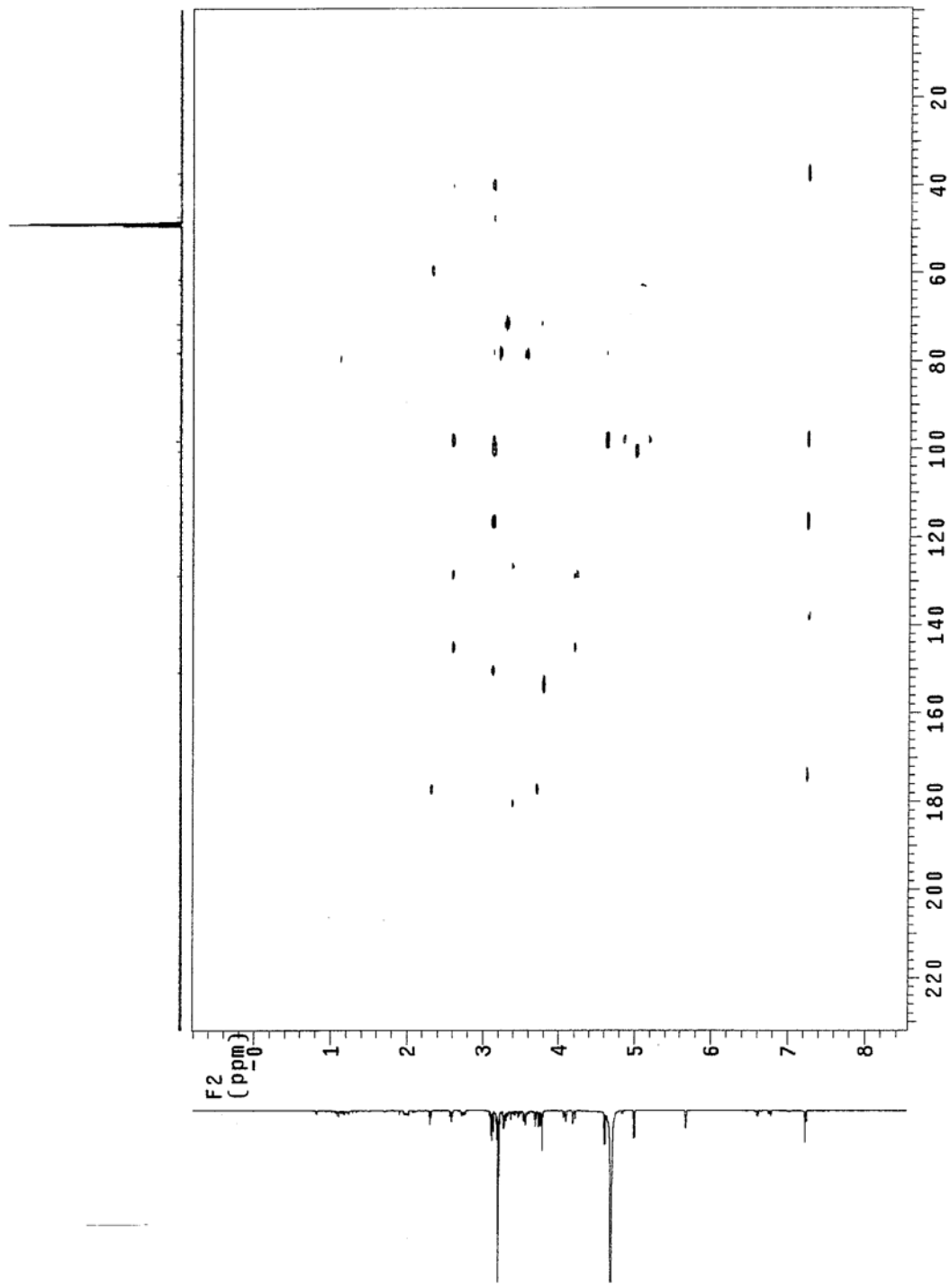


Figura 134. Mapa de correlação gHMBC da substância **Z** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).

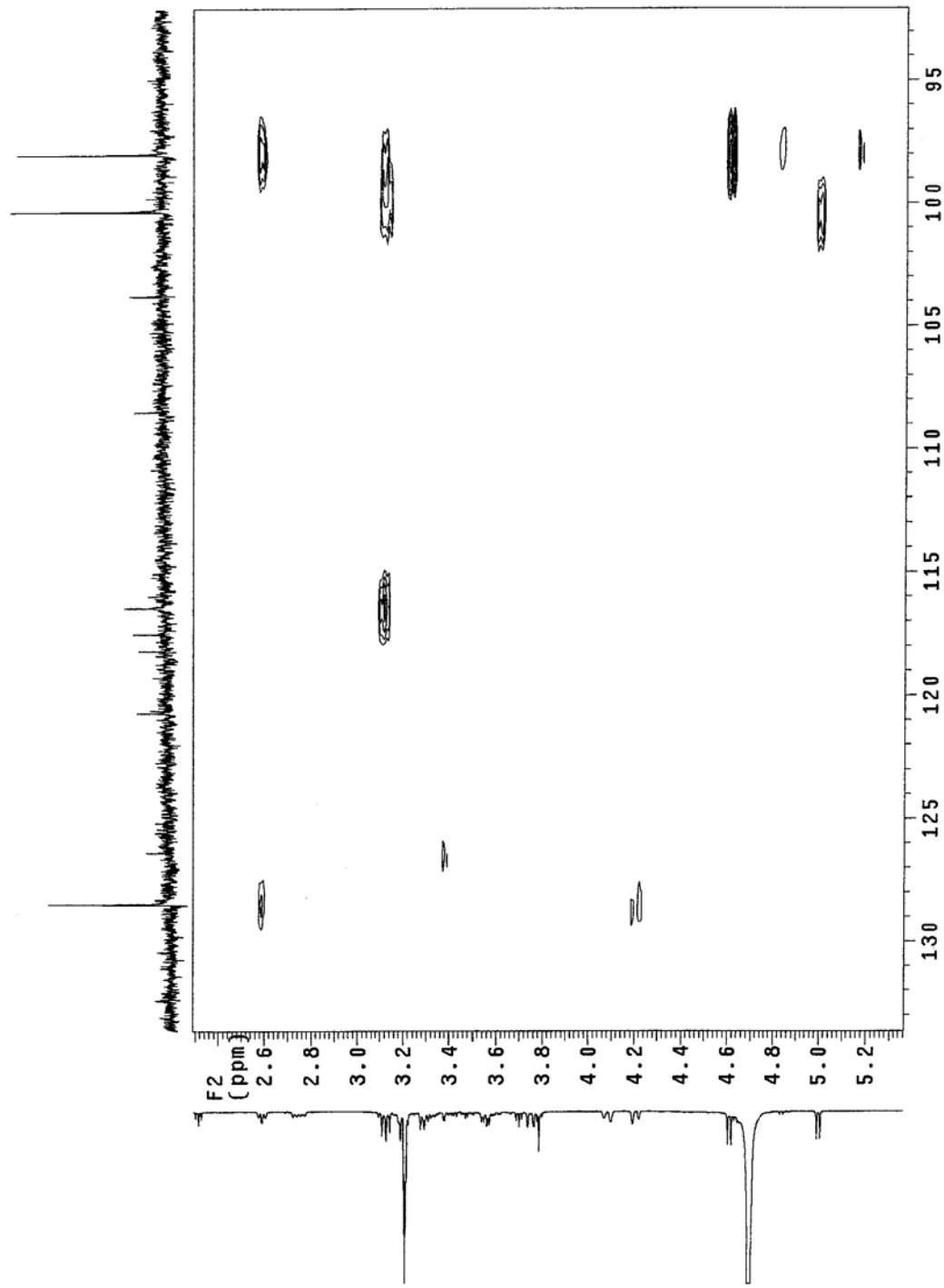


Figura 135. Ampliação do mapa de correlação gHMBC da substância **Z** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).



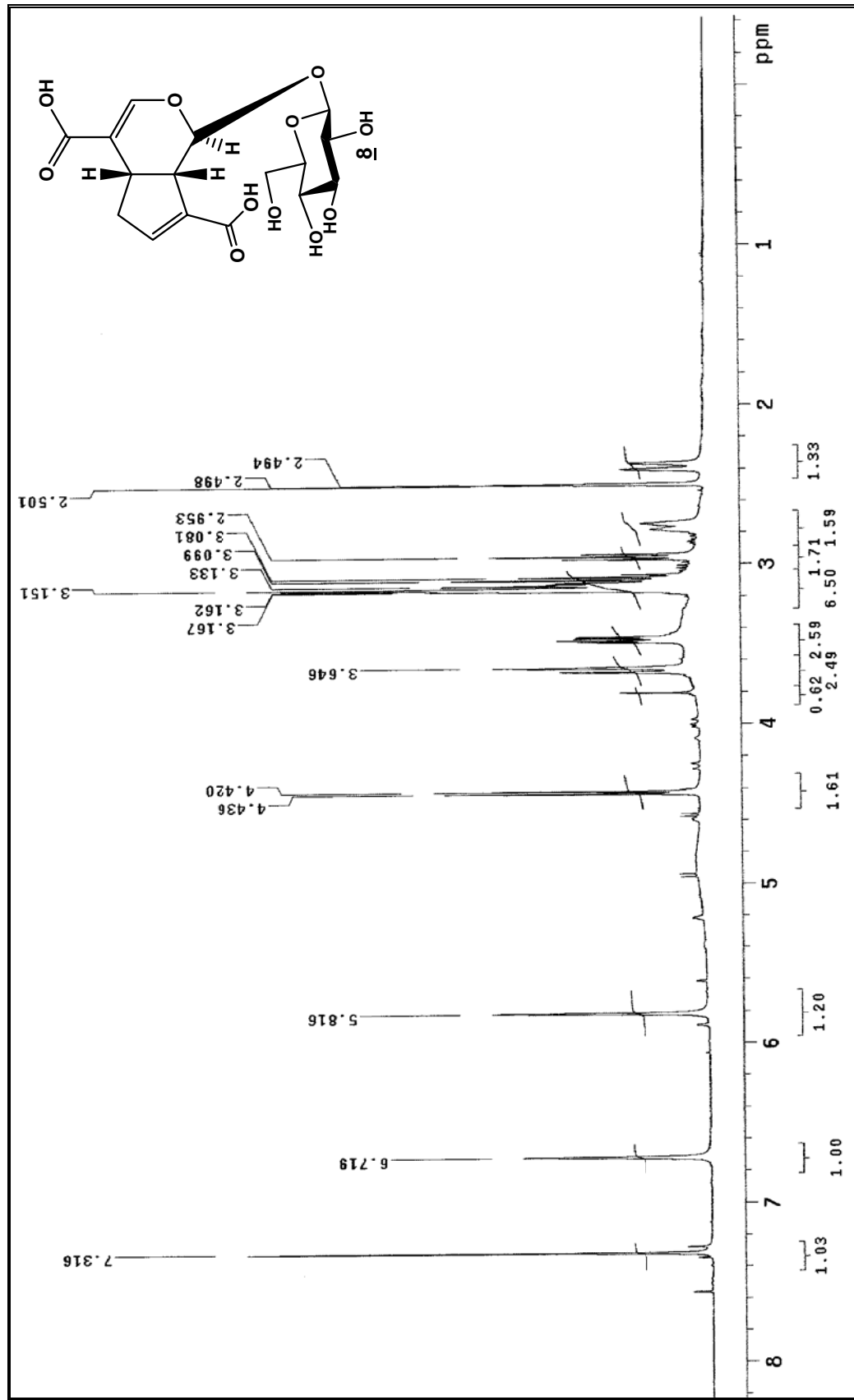


Figura 136. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **8** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz).

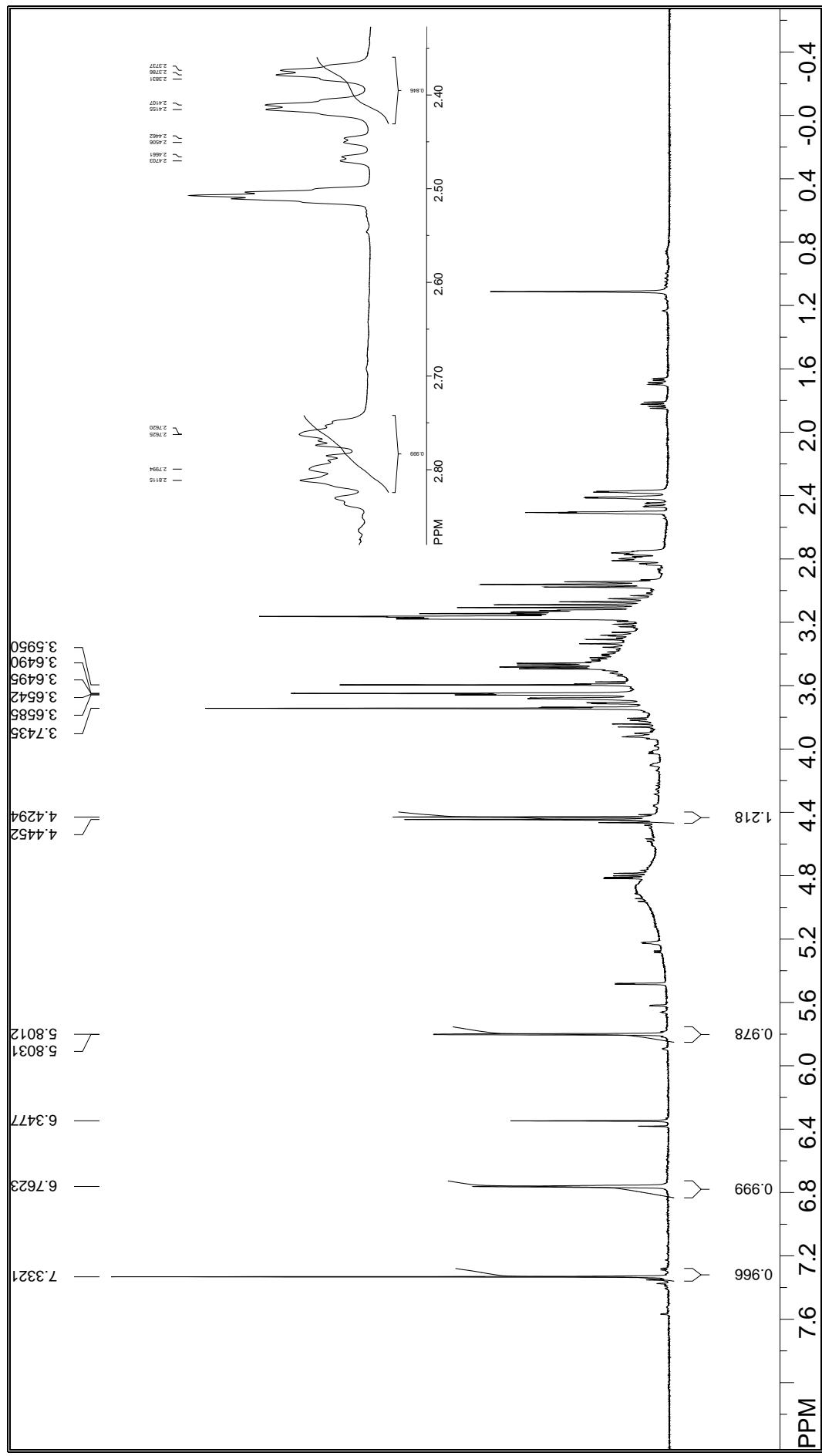


Figura 137. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **8** (em mistura) ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz).

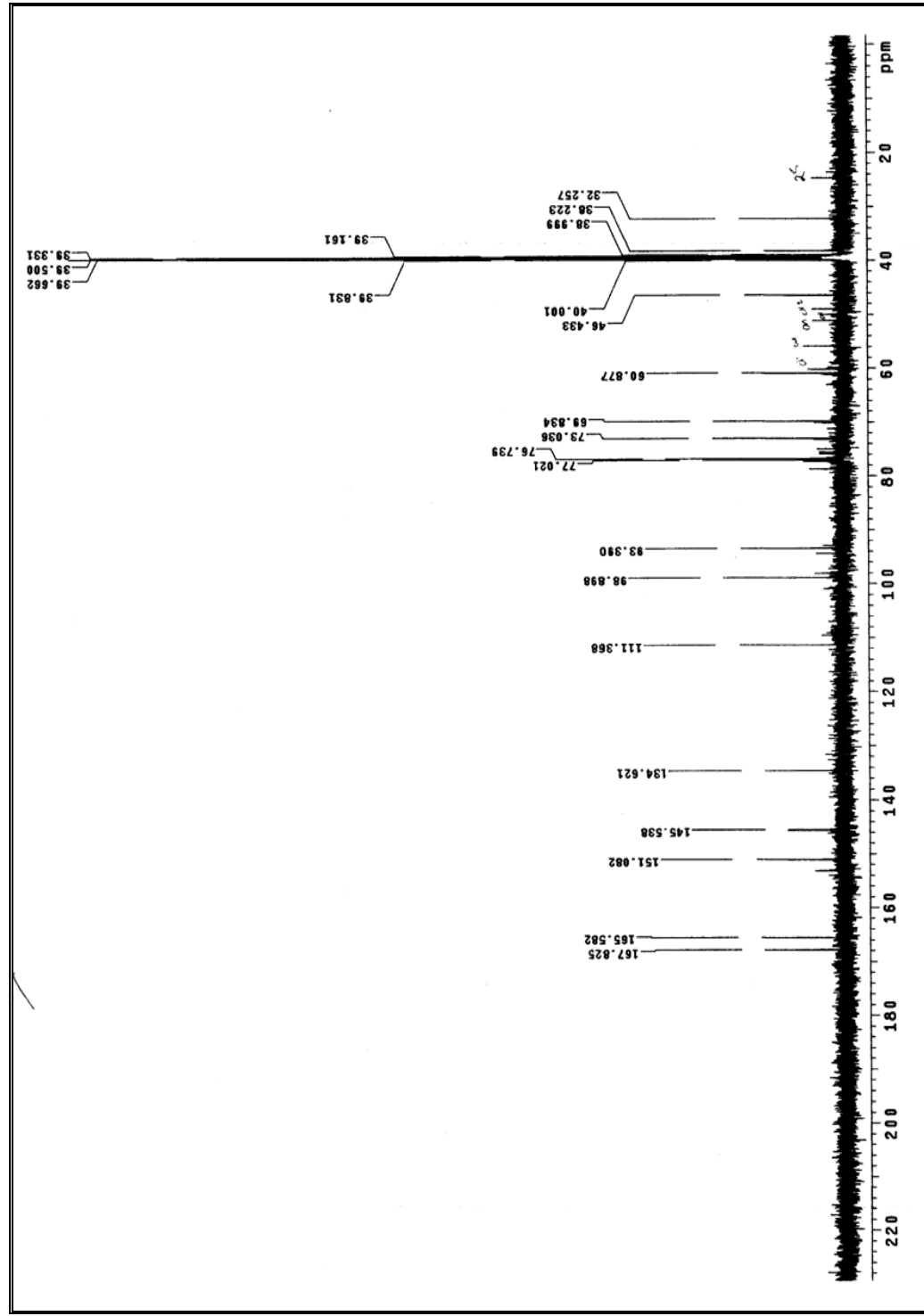


Figura 138. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **8** em mistura (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).

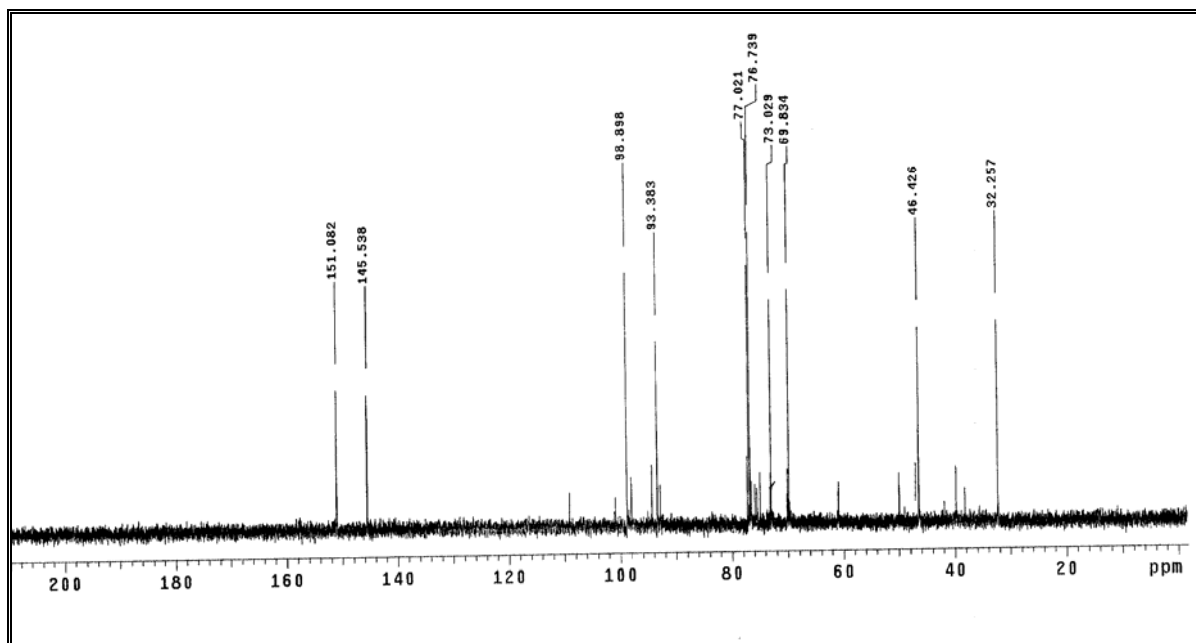


Figura 139. Espectro de DEPT 90° da substância **8** em mistura (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).

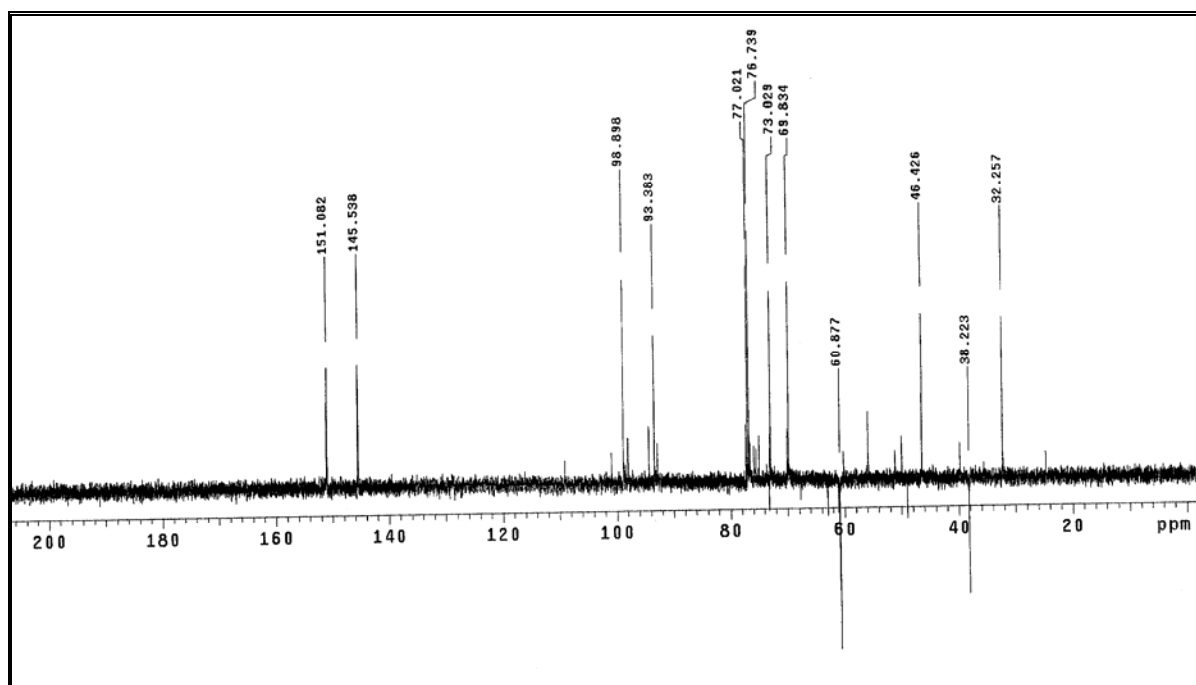


Figura 140. Espectro de DEPT 135° da substância **8** em mistura (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).

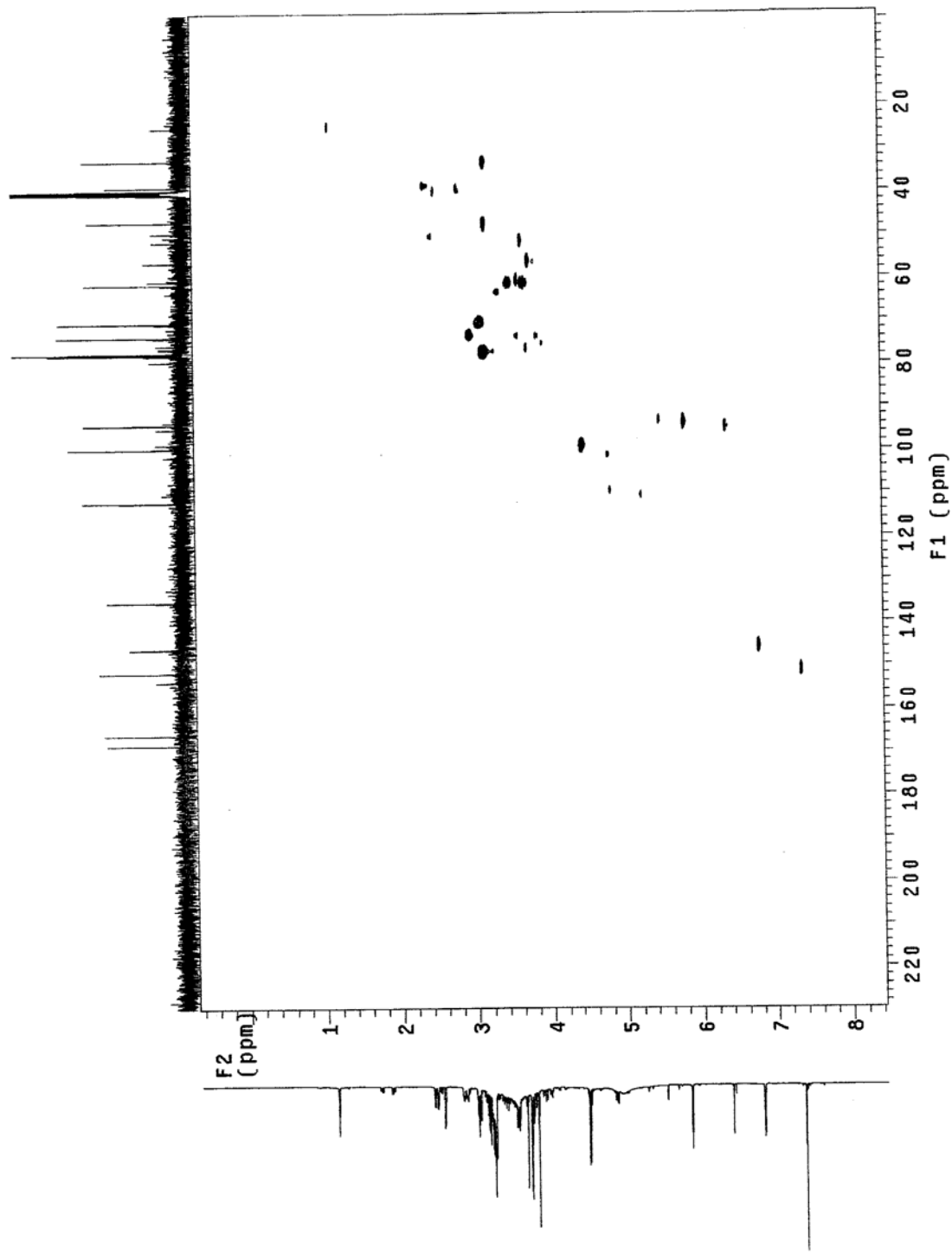


Figura 141. Mapa de correlação gHMBC da substância **8** em mistura (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

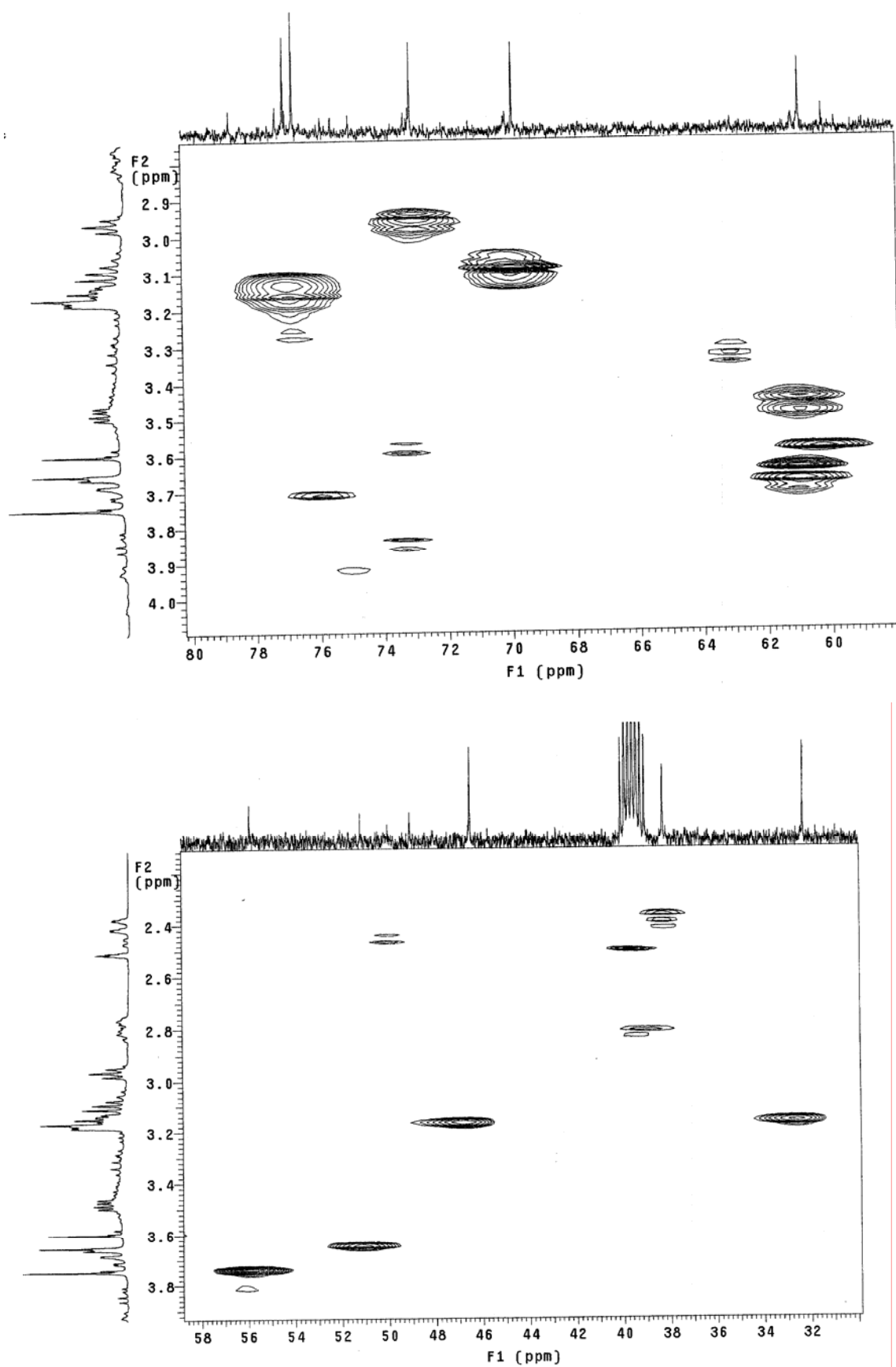


Figura 142. Ampliações do mapa de correlação gHMBC da substância **8** em mistura (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).

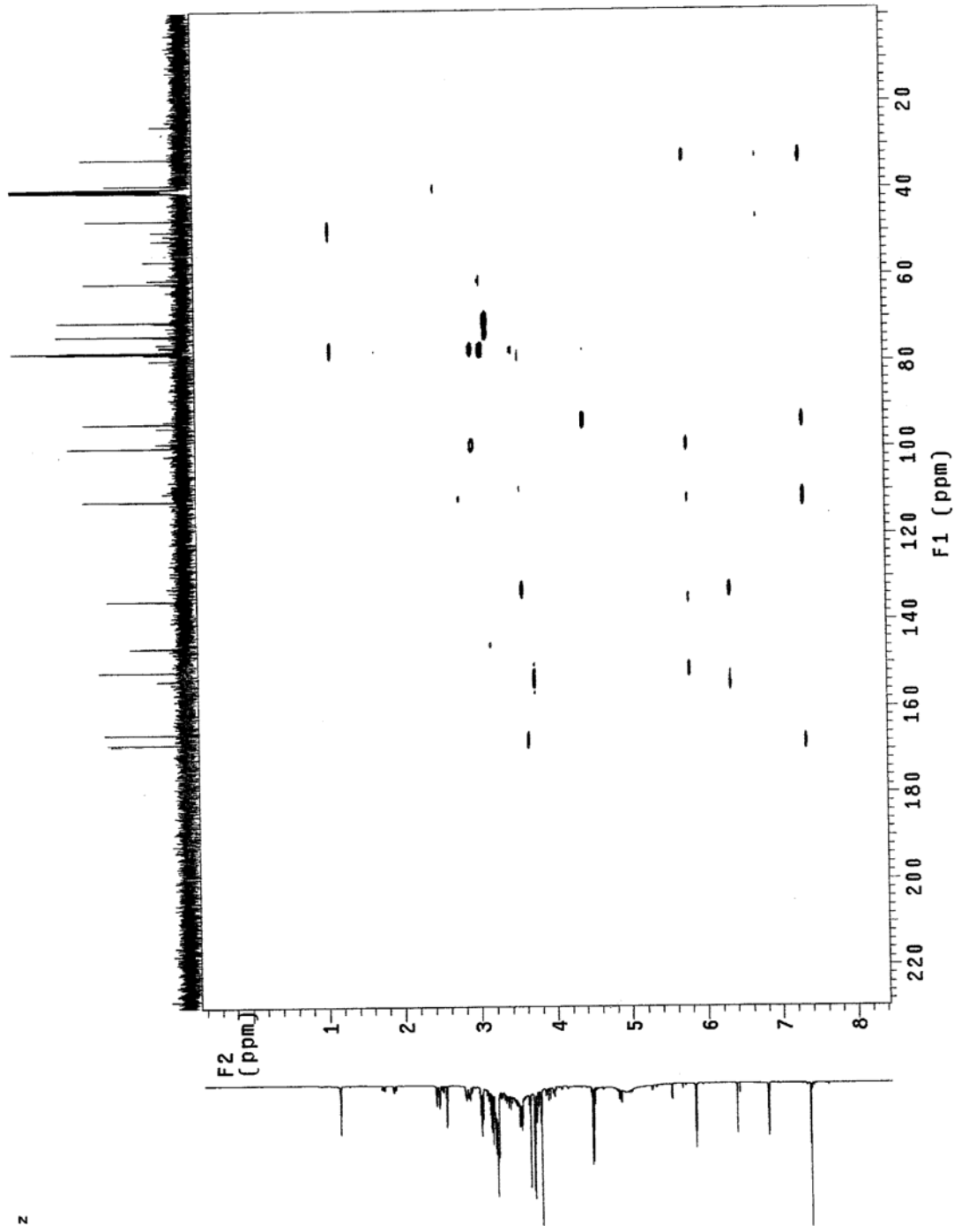
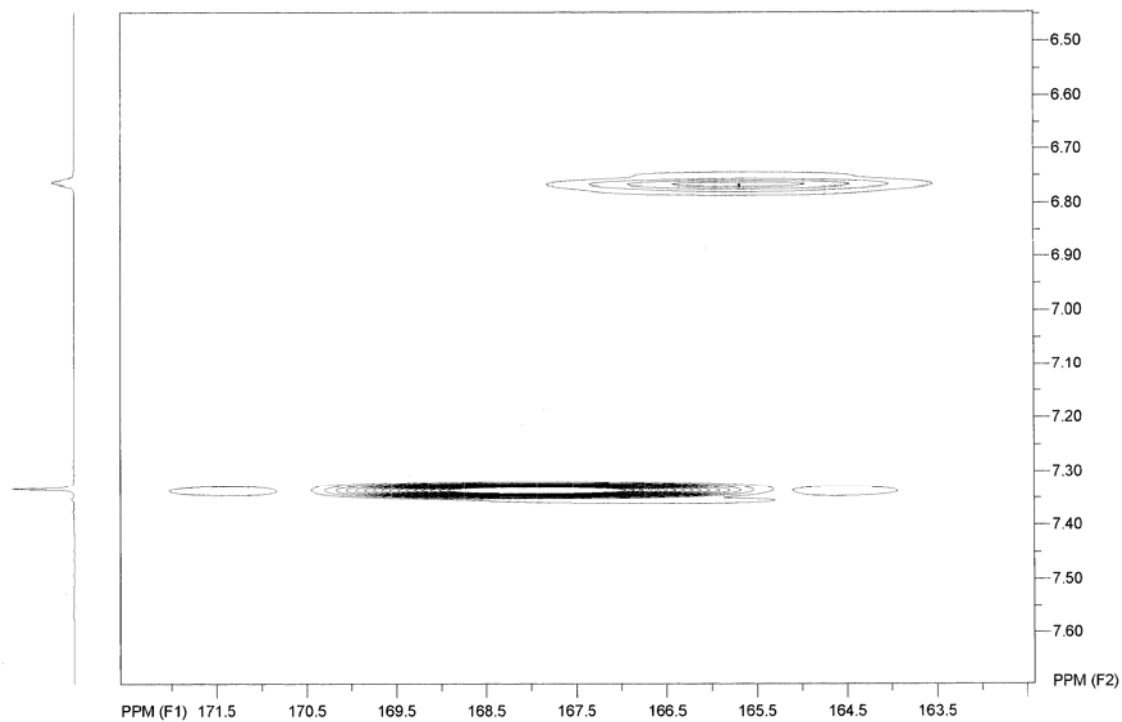
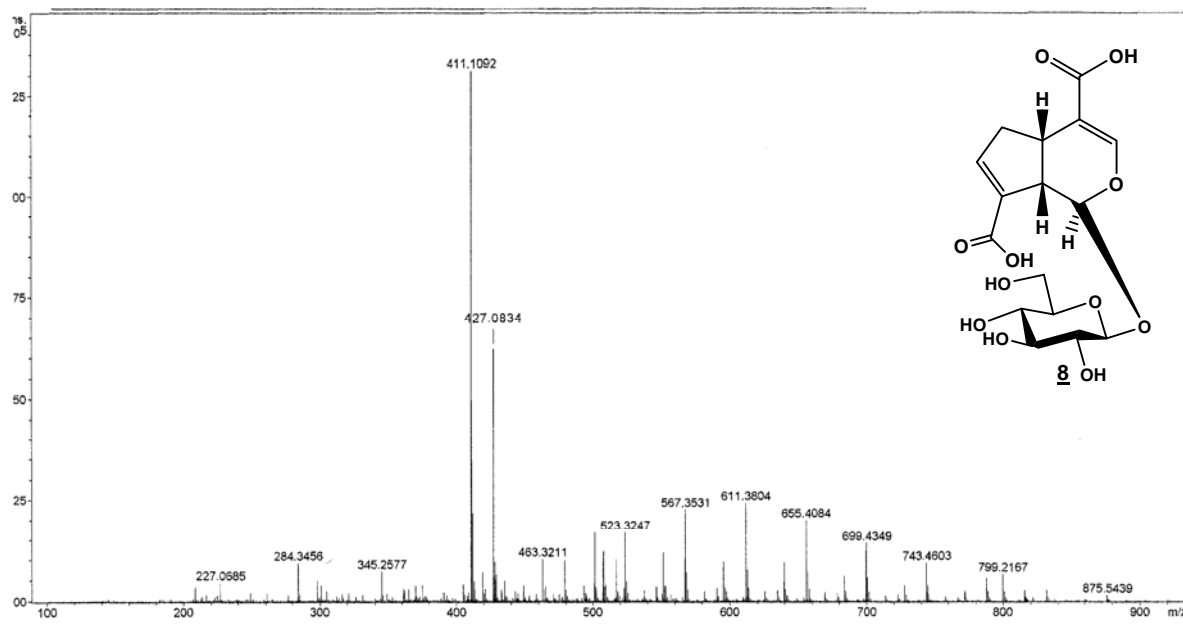


Figura 143. Mapa de correlação gHMBC da substância **8** em mistura (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).



**Figura 144.** Ampliação do mapa de correlação gHMBC da substância **8** em mistura (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).



**Figura 145.** Espectro de Massas da substância **8** (modo positivo).



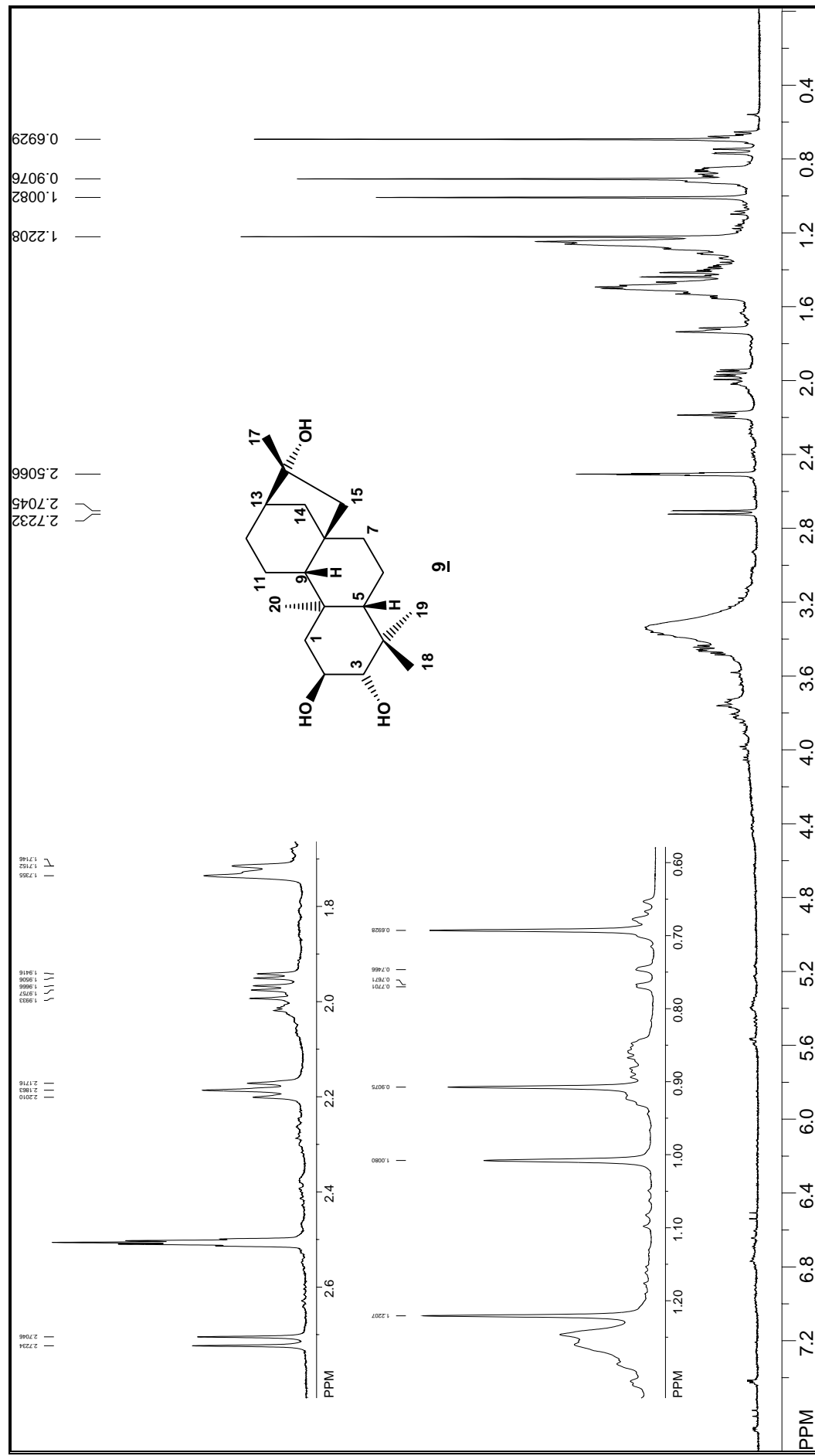


Figura 146. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **9** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

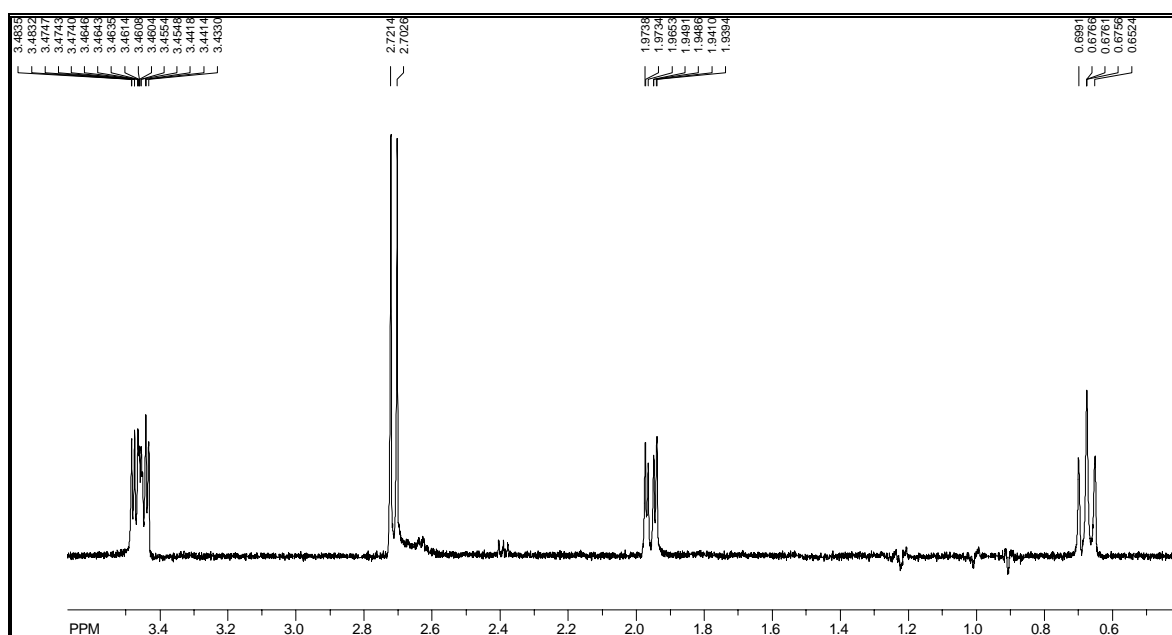


Figura 147. Espectro de TOCSY da substância **9** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

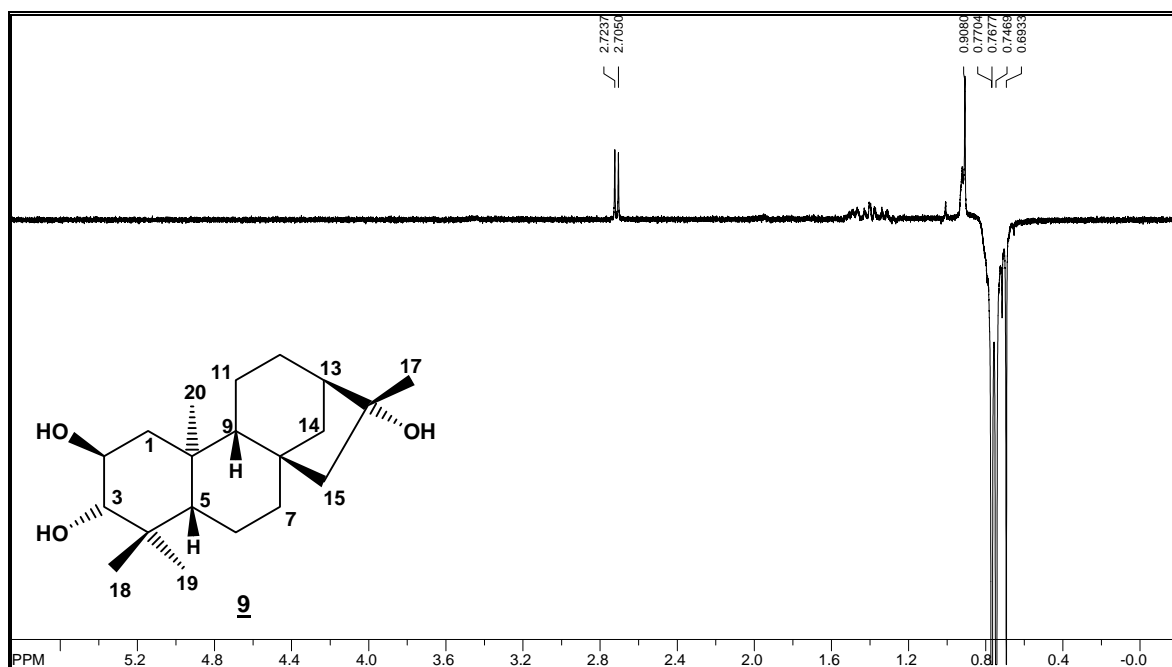


Figura 148. Espectro de NOESY da substância **9** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)

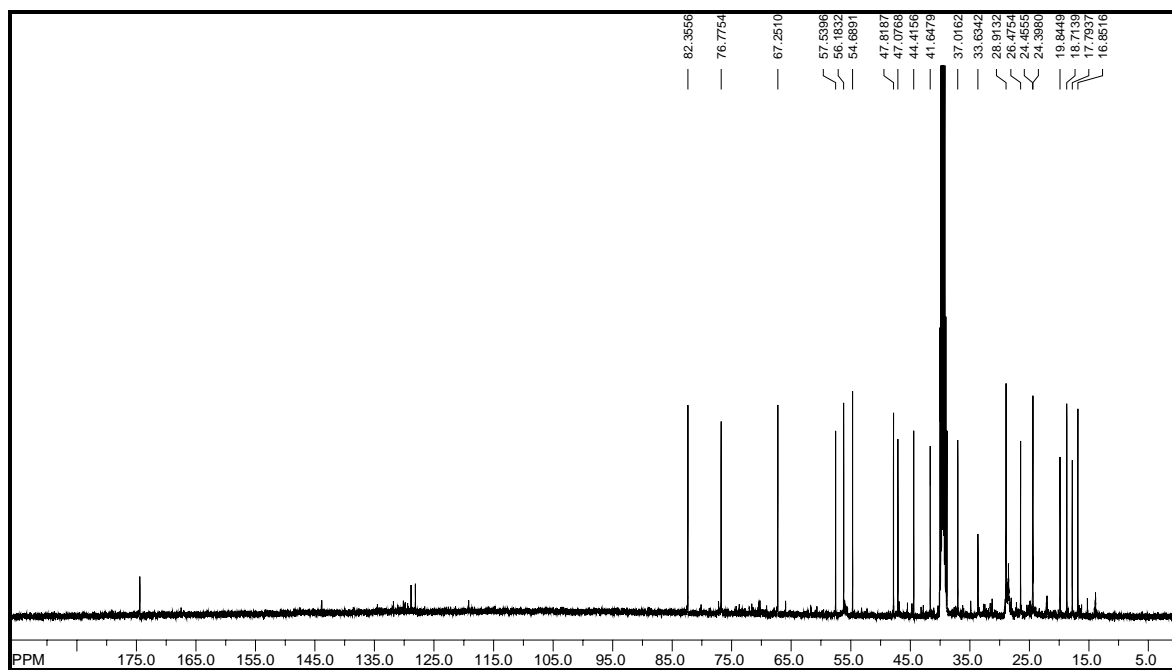


Figura 149. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **9** (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).

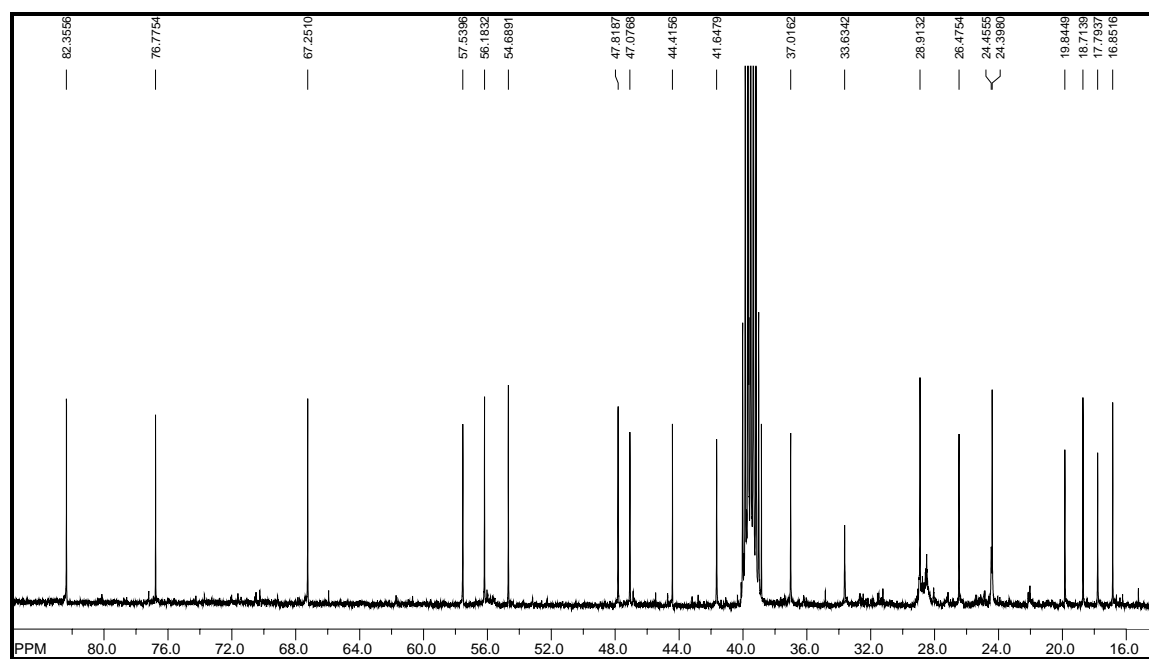


Figura 150. Ampliação do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **9** (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).

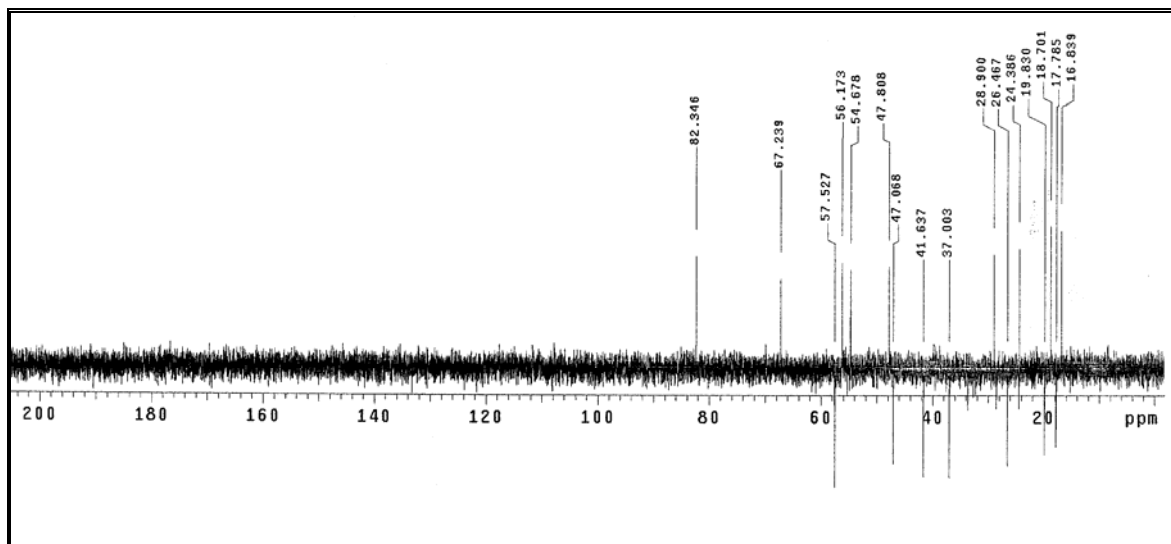


Figura 151. Espectro de DEPT 135° da substância **9** (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).

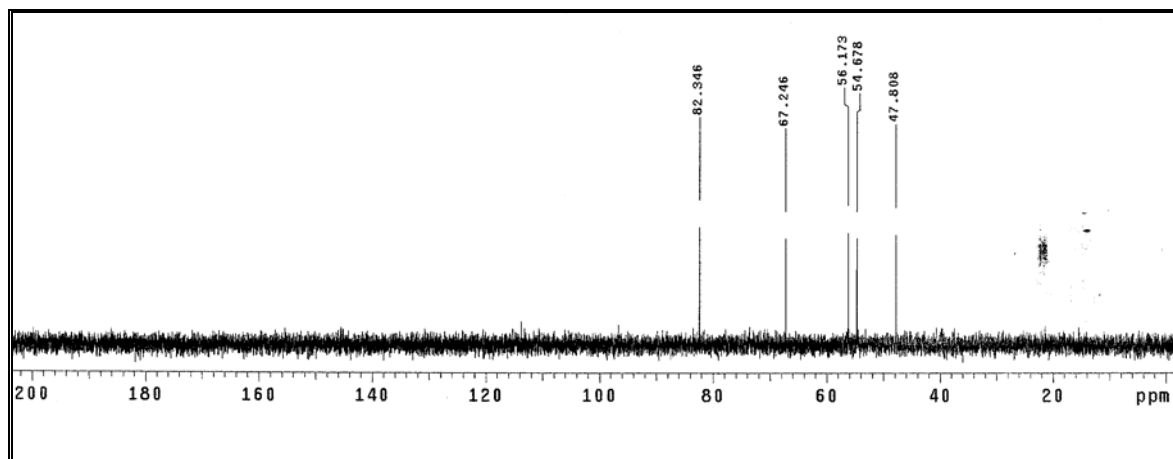
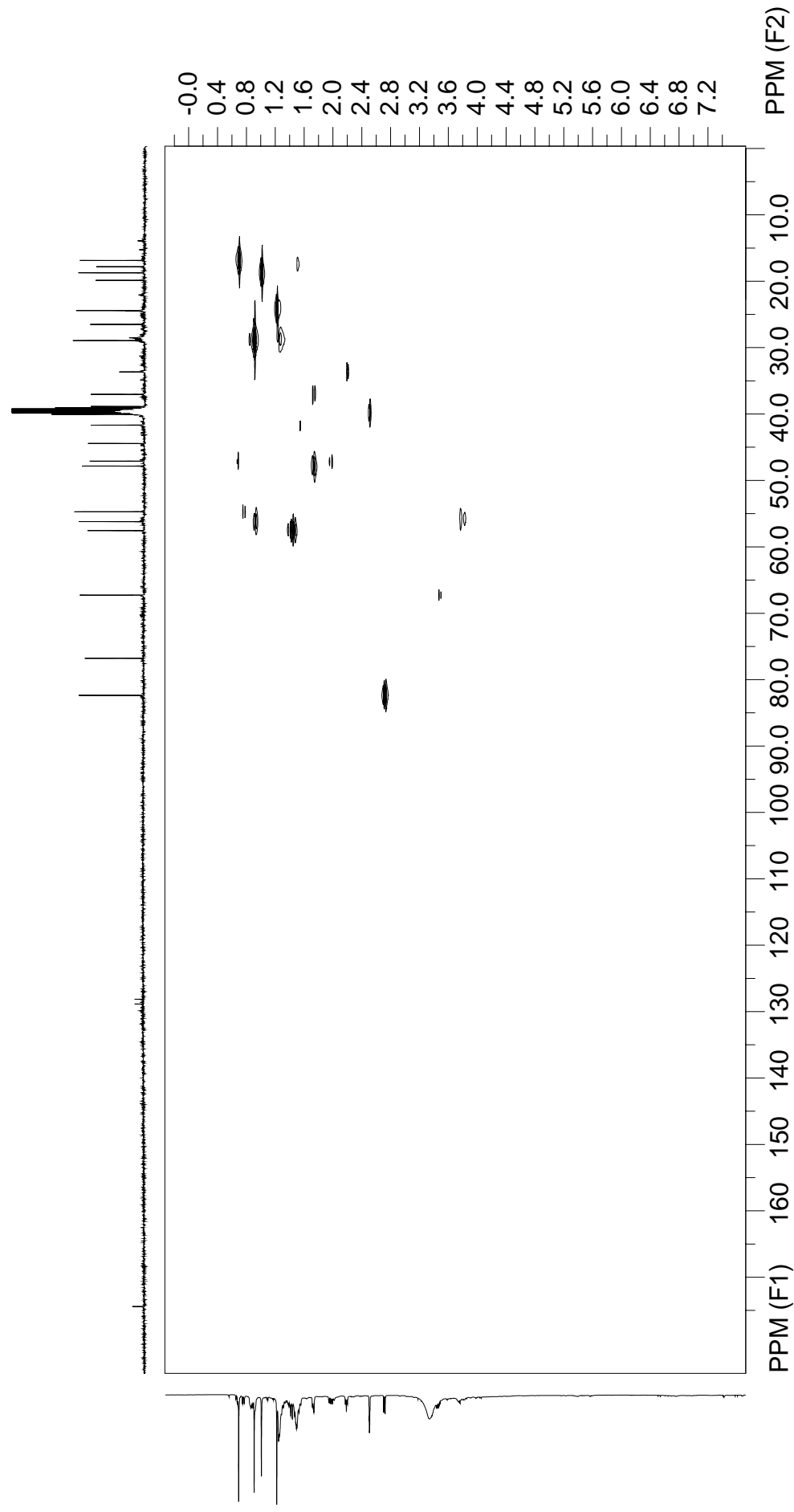
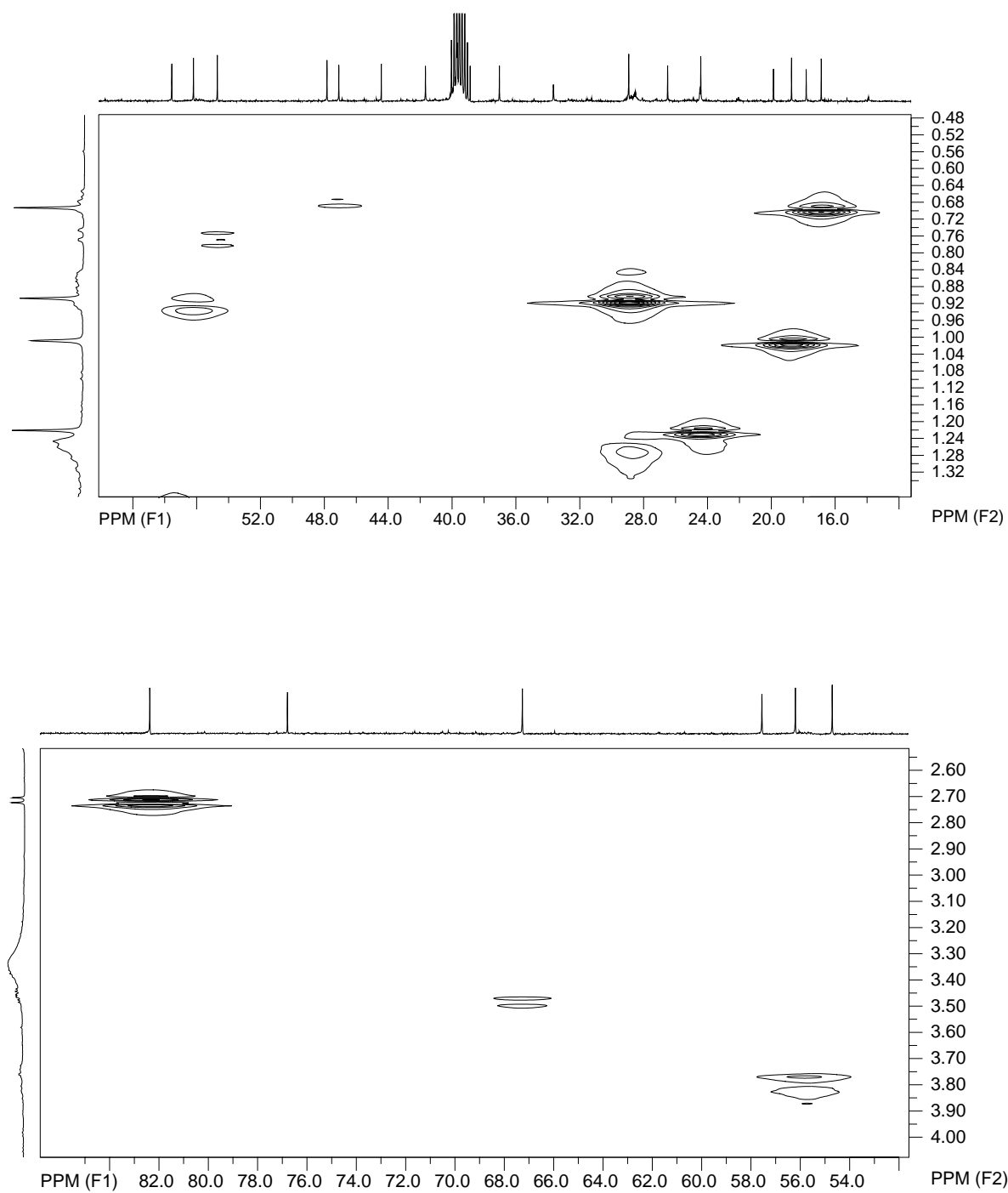


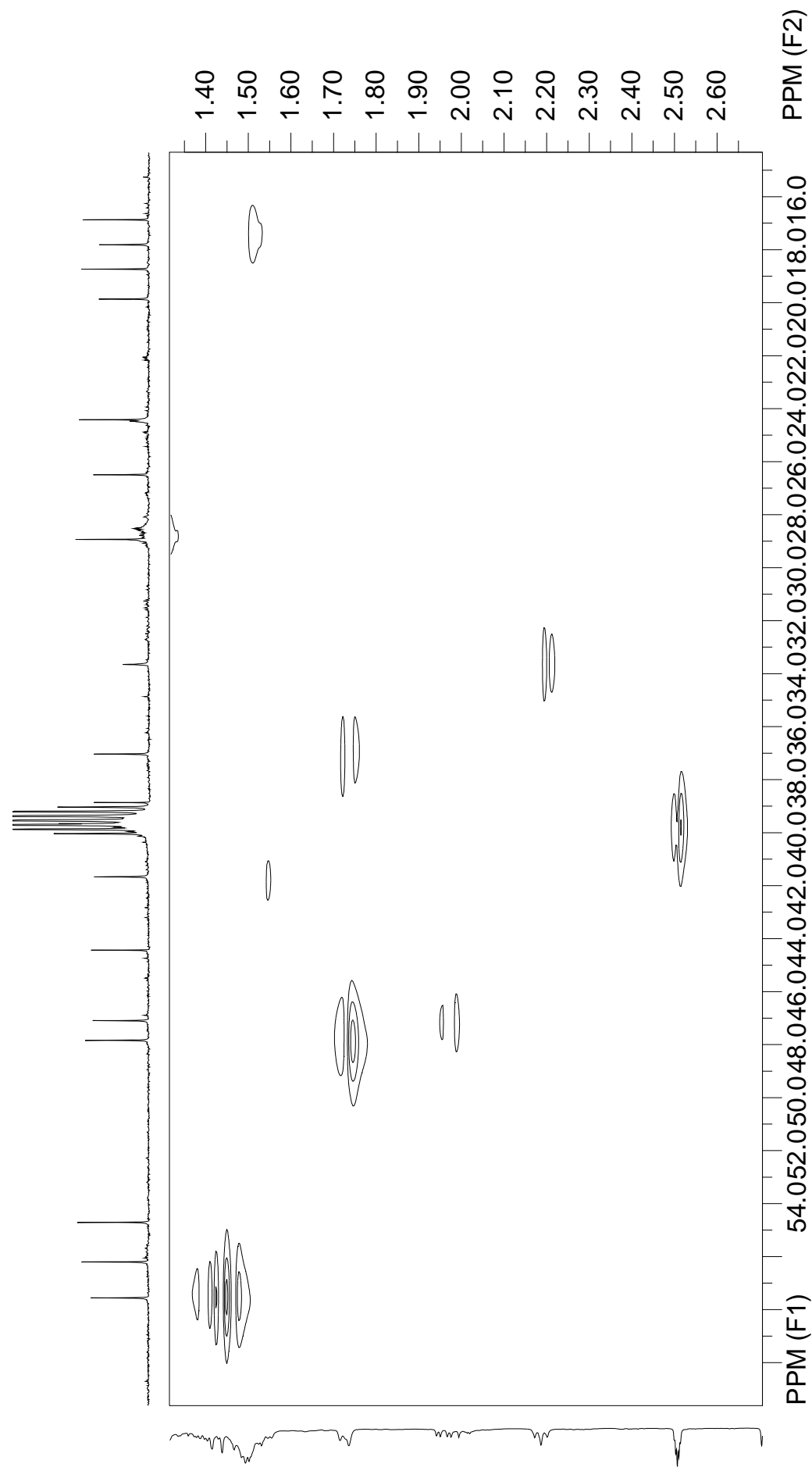
Figura 152. Espectro de DEPT 90° da substância **9** (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).



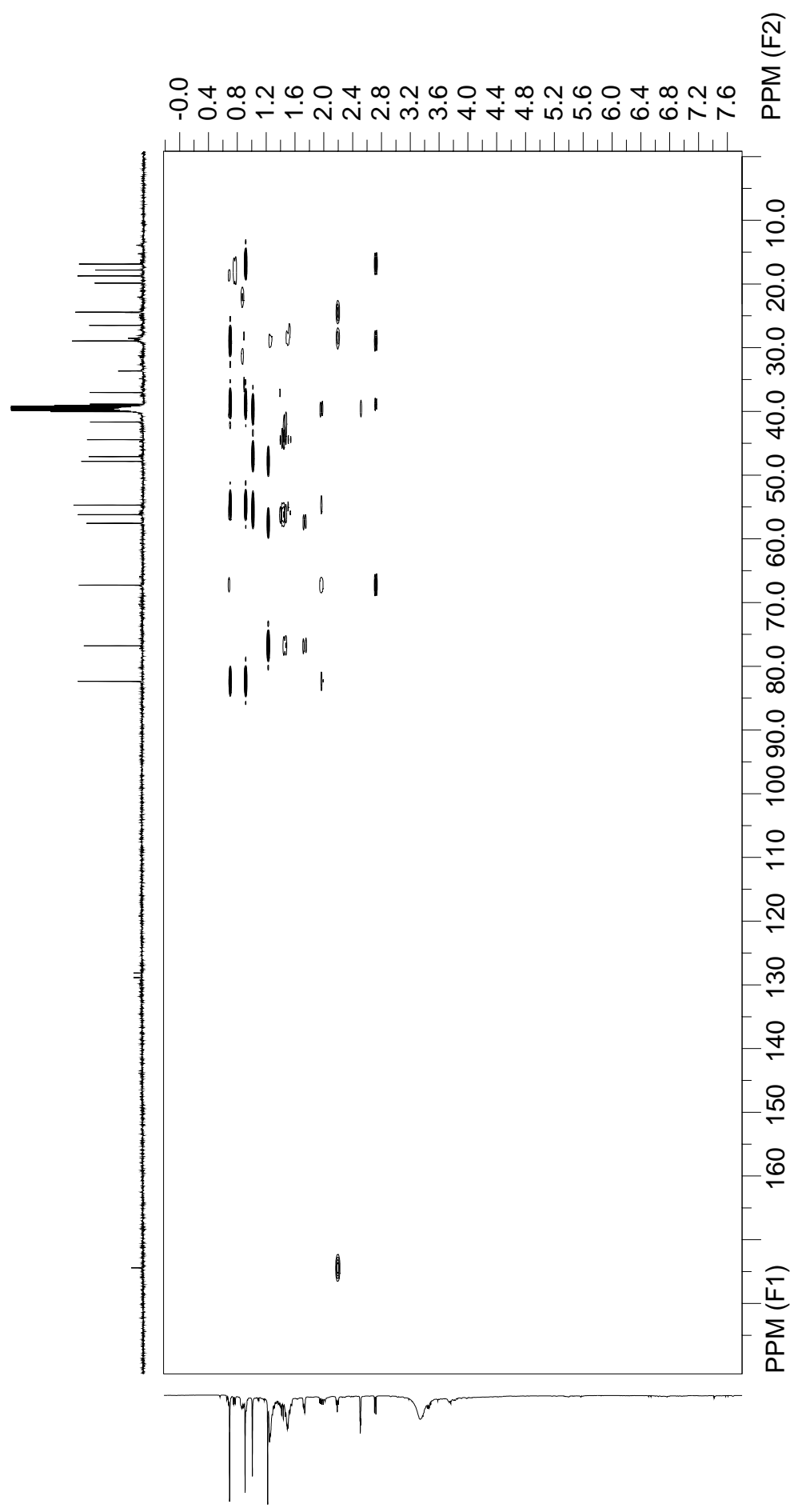
**Figura 153.** Mapa de correlação gHMBC da substância **9** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figura 154.** Ampliações do mapa de correlação gHMQC da substância **9** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

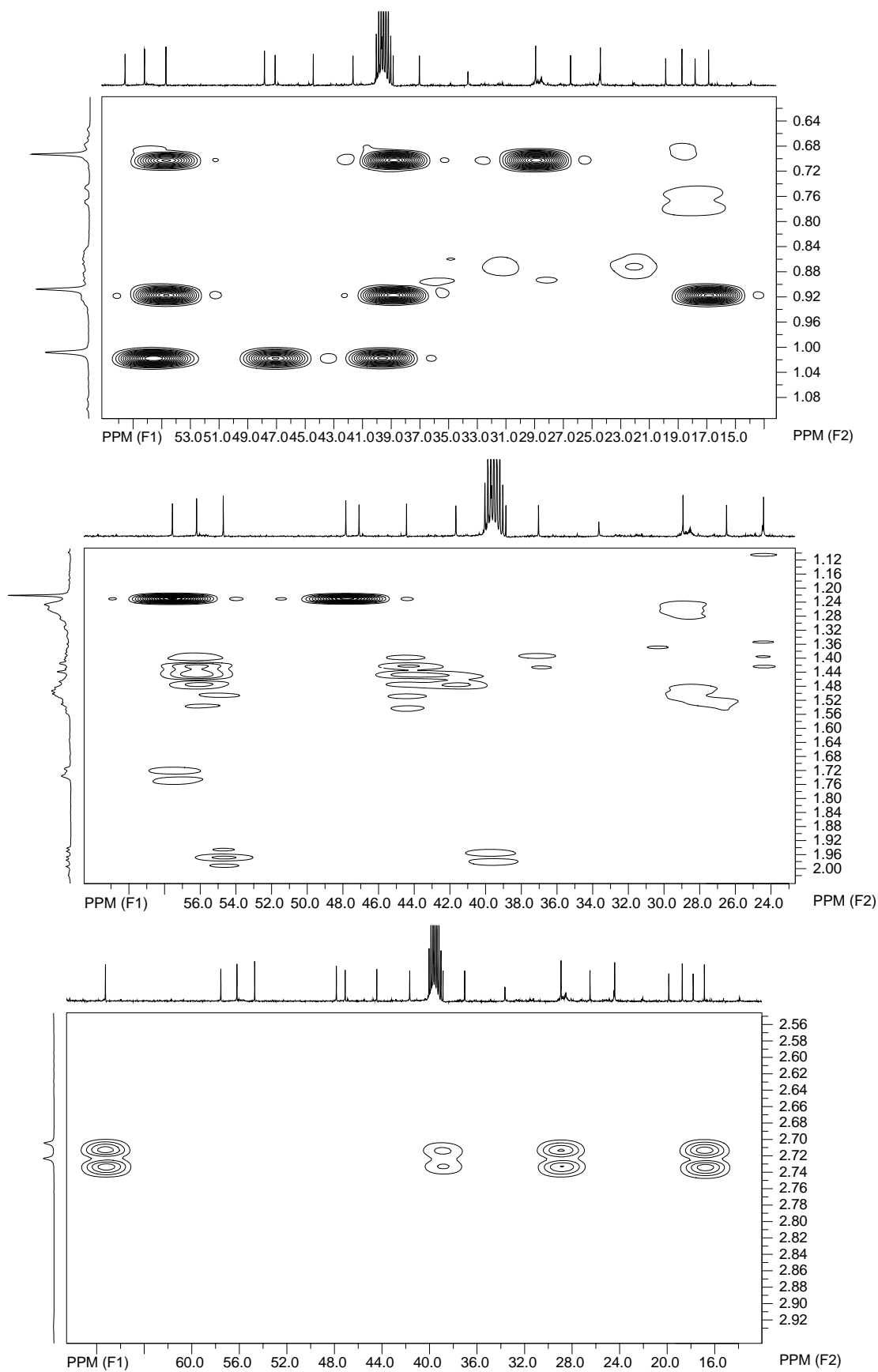


**Figura 155.** Ampliação do mapa de correlação gHMQC da substância **9** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figura 156.** Mapa de correlação gHMBC da substância **9** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).





**Figura 157.** Ampliações do mapa de correlação gHMBC da substância **9** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).

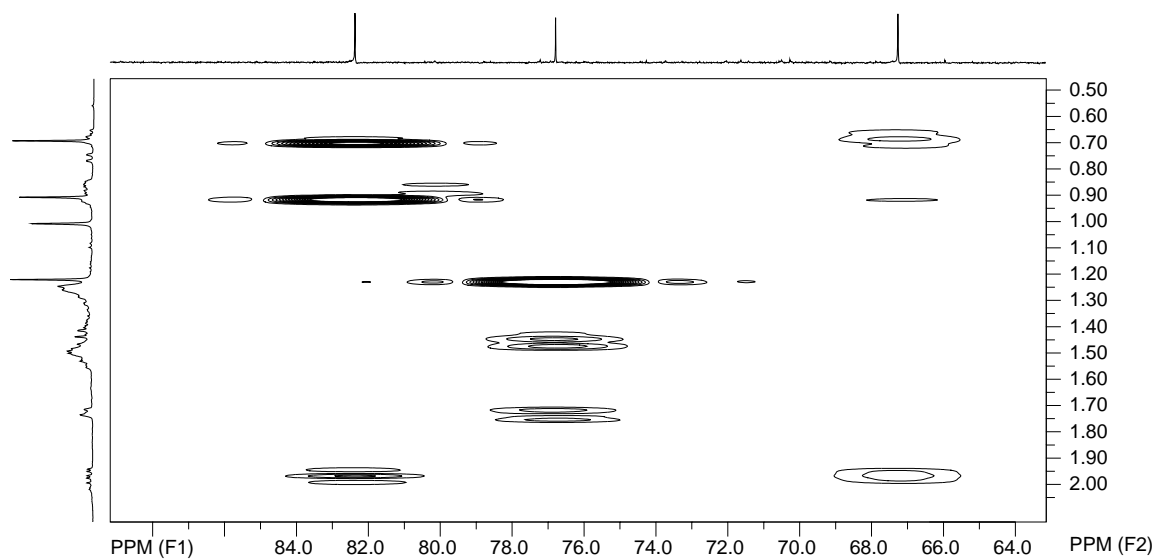


Figura 158. Ampliações do mapa de correlação gHMBC da substância **9** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz)

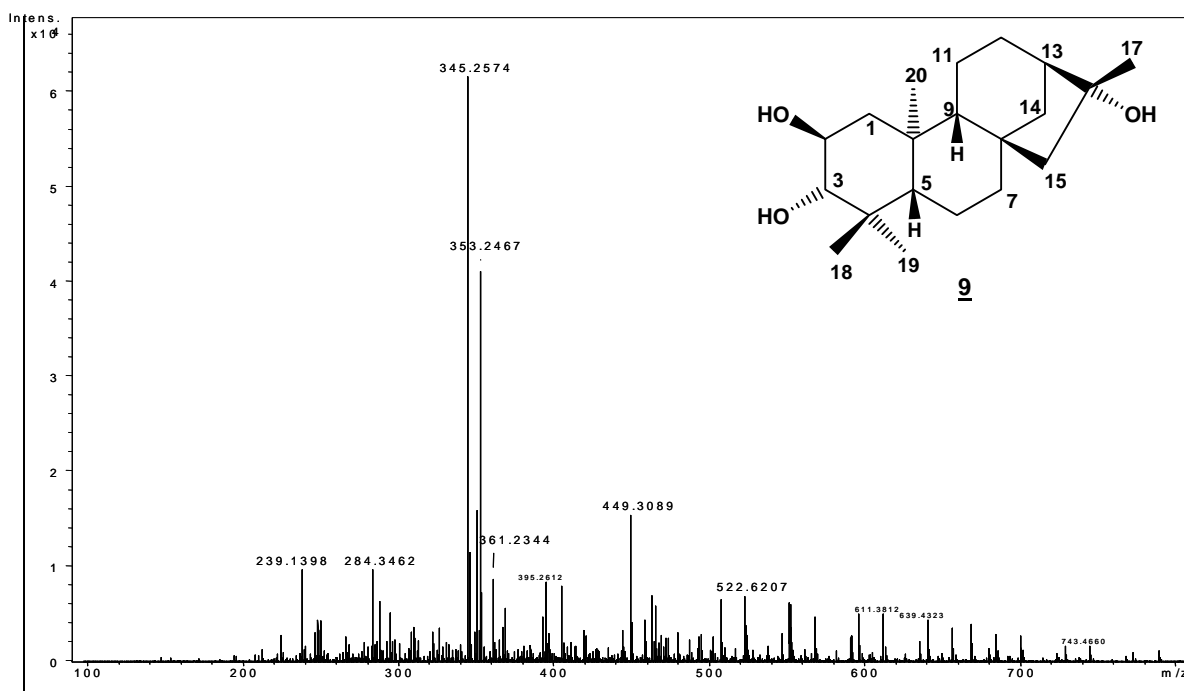


Figura 159. Espectro de massas da substância **9** (modo positivo).

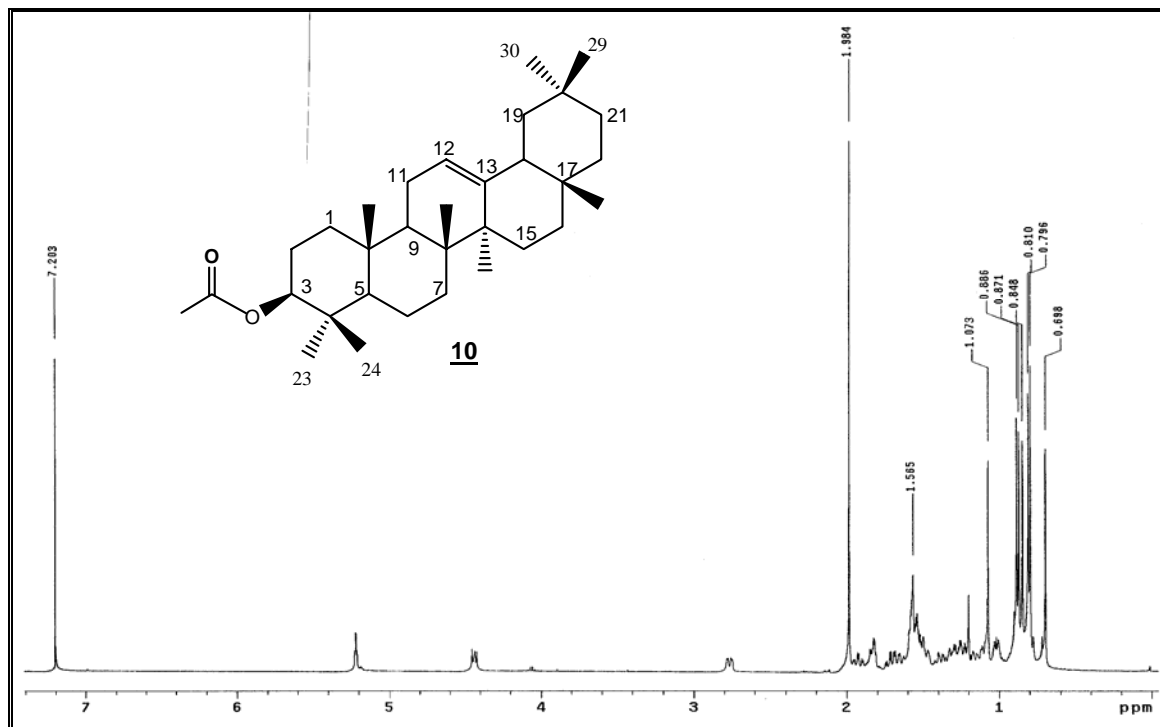


Figura 160. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **10** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).

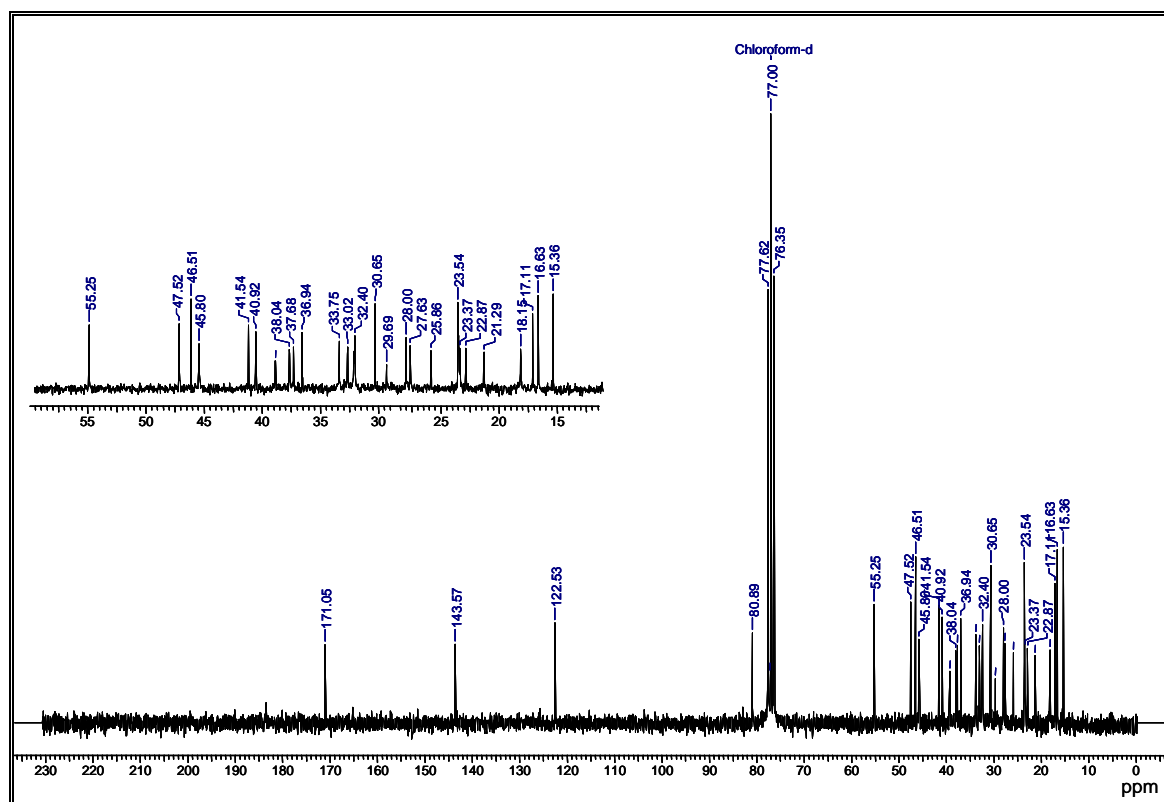


Figura 161. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da substância **10** (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz).

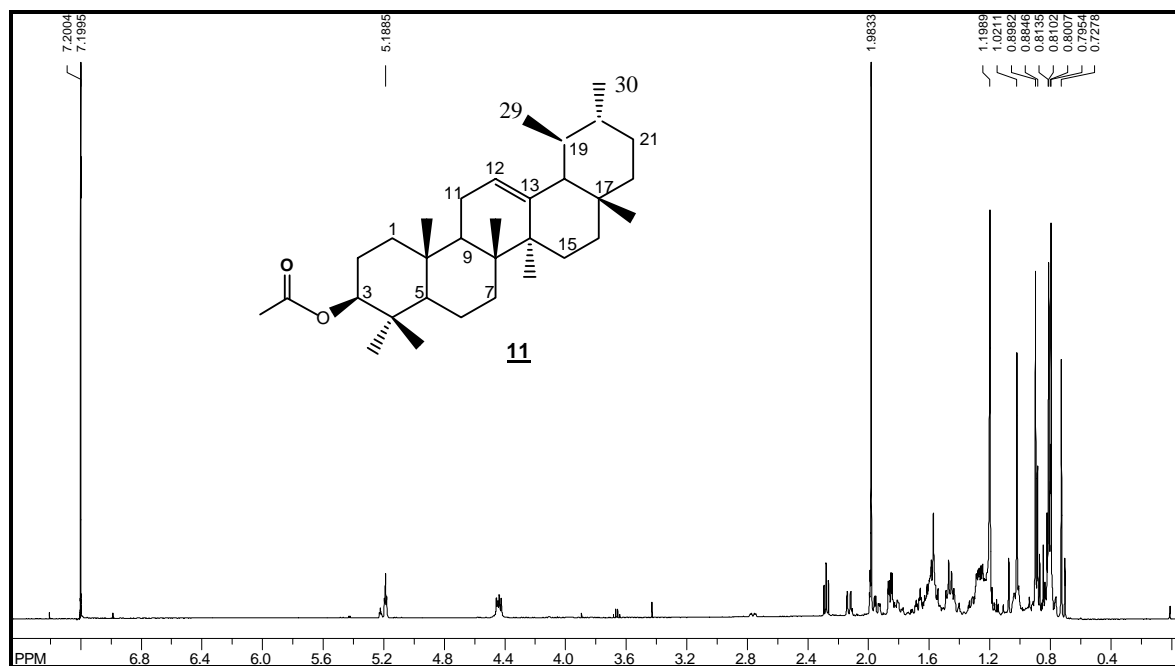


Figura 162. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **11** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).

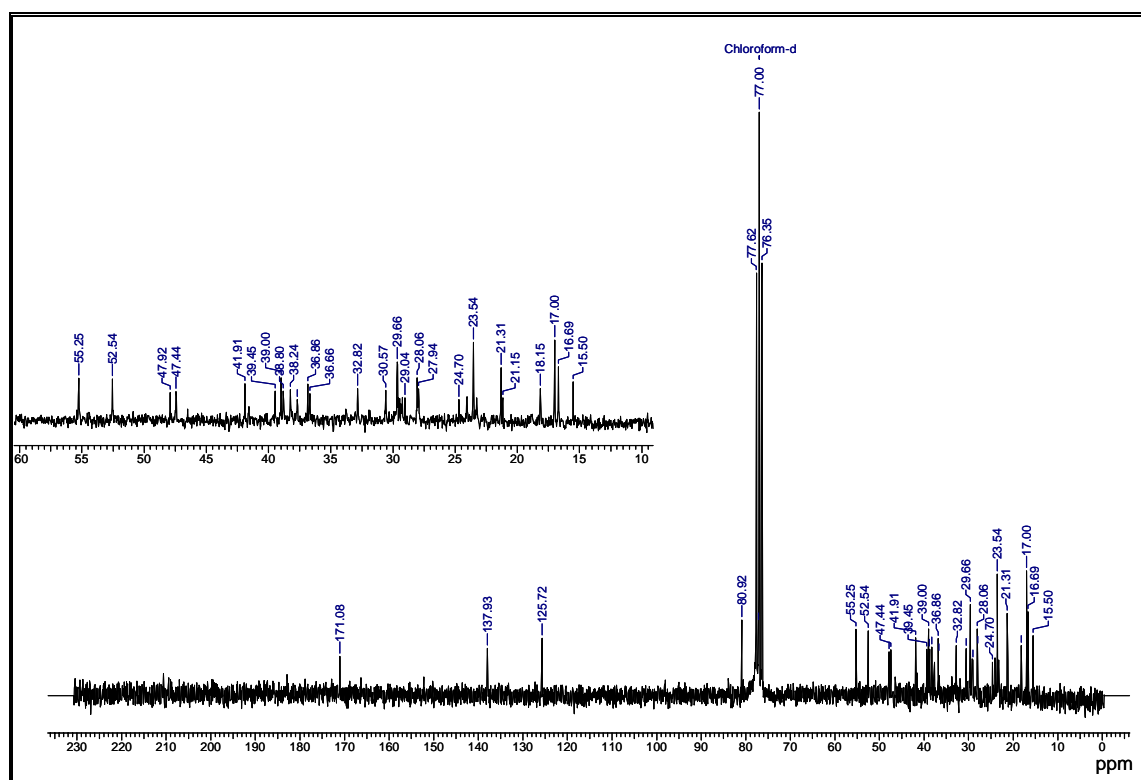


Figura 163. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da substância **11** (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz).

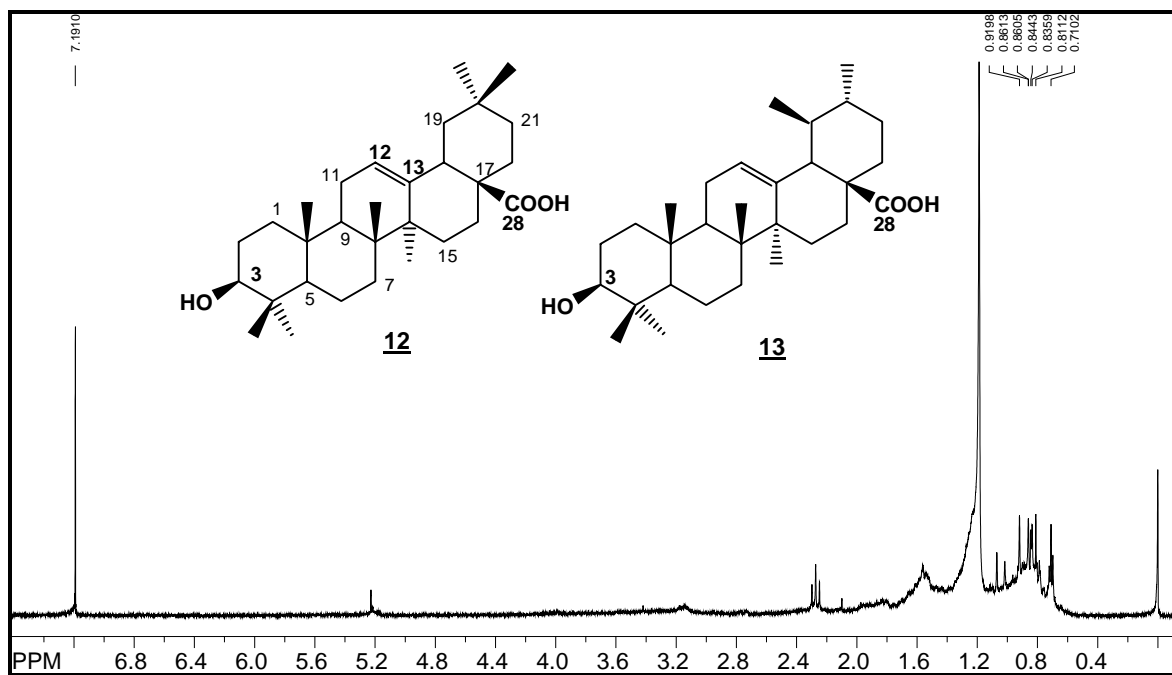


Figura 164. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H das substâncias **12** e **13** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).

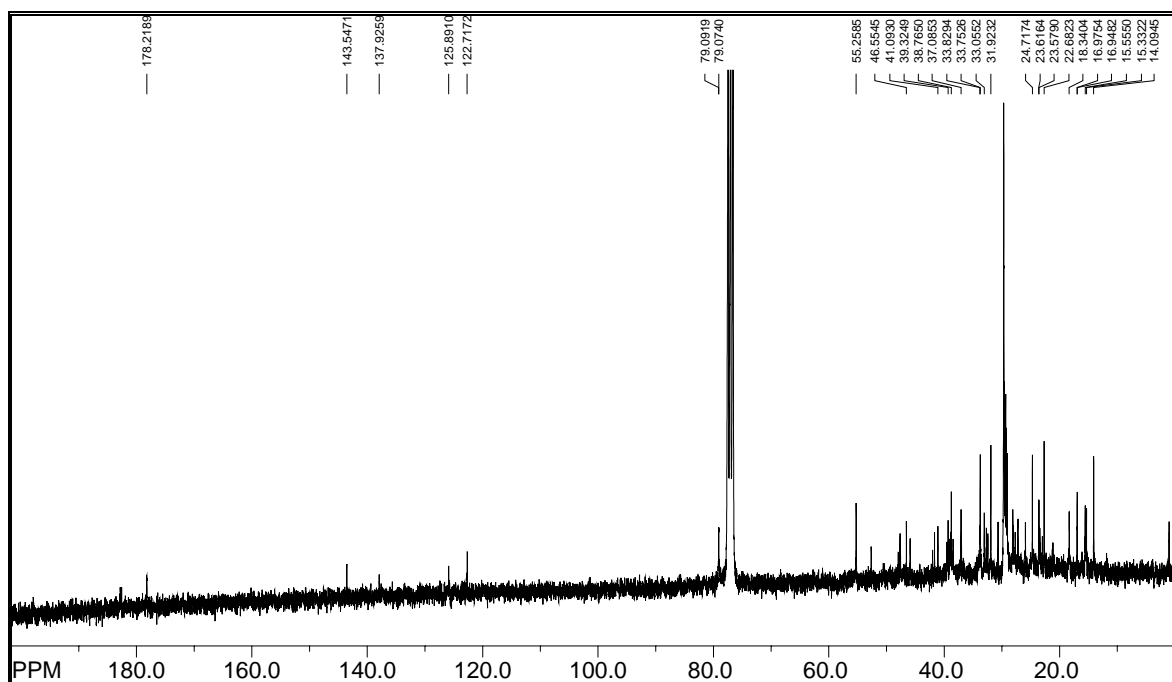


Figura 165. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C das substâncias **12** e **13** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz).

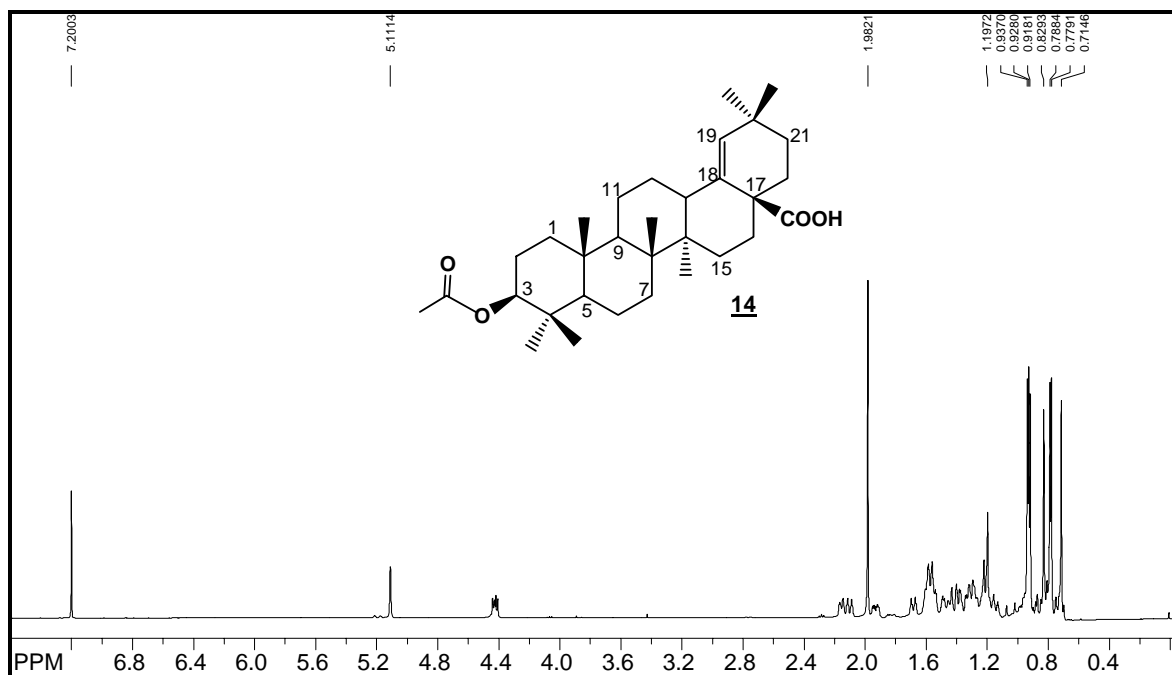


Figura 166. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **14** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

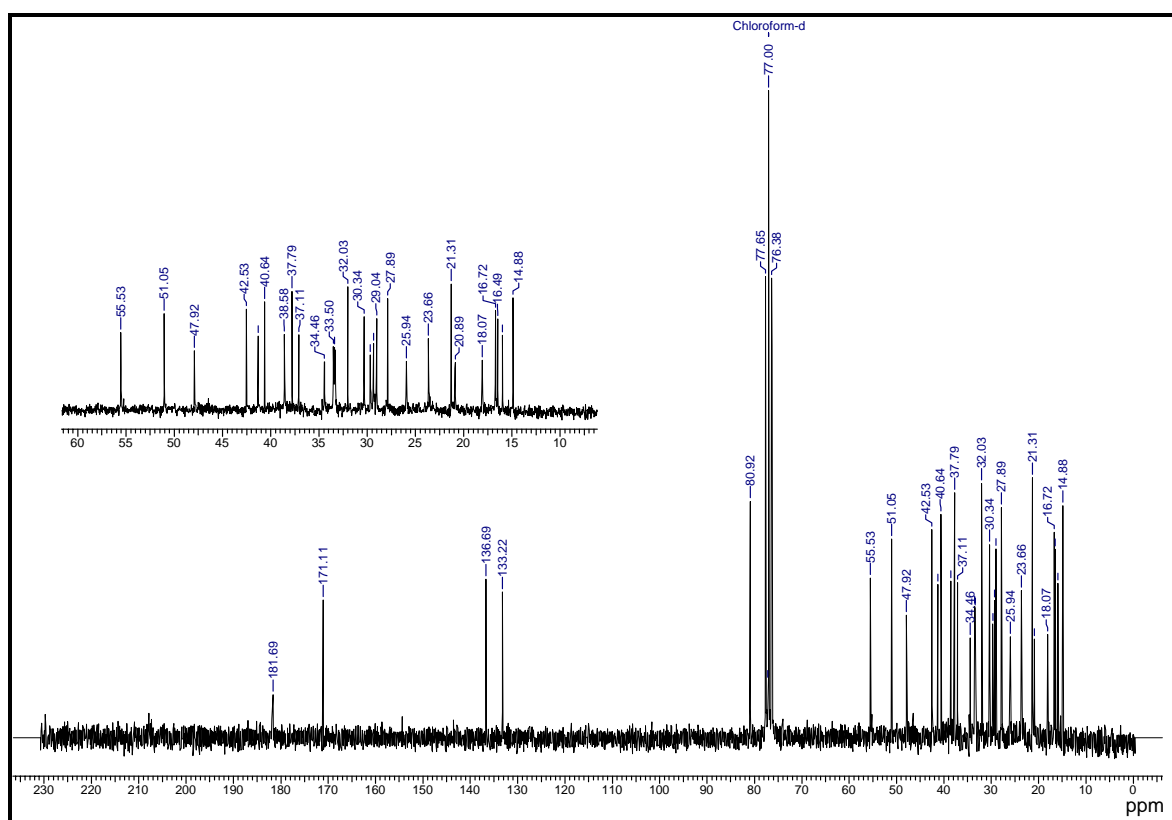


Figura 167. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **14** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).

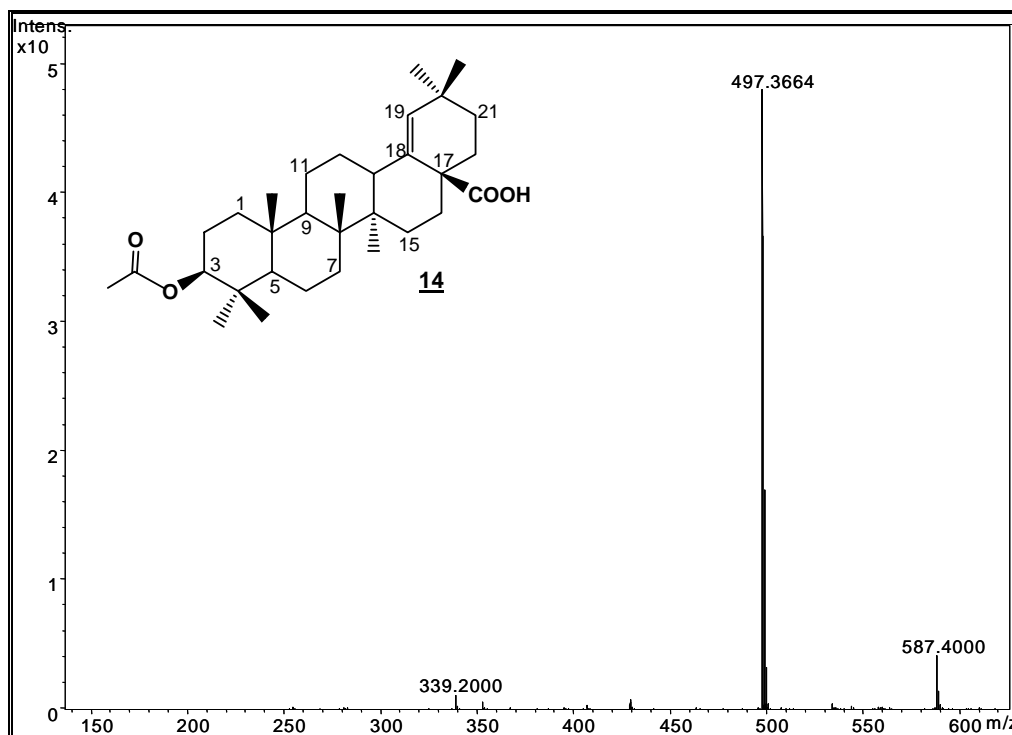


Figura 168. Espectro de massas da substância **14** (modo negativo).

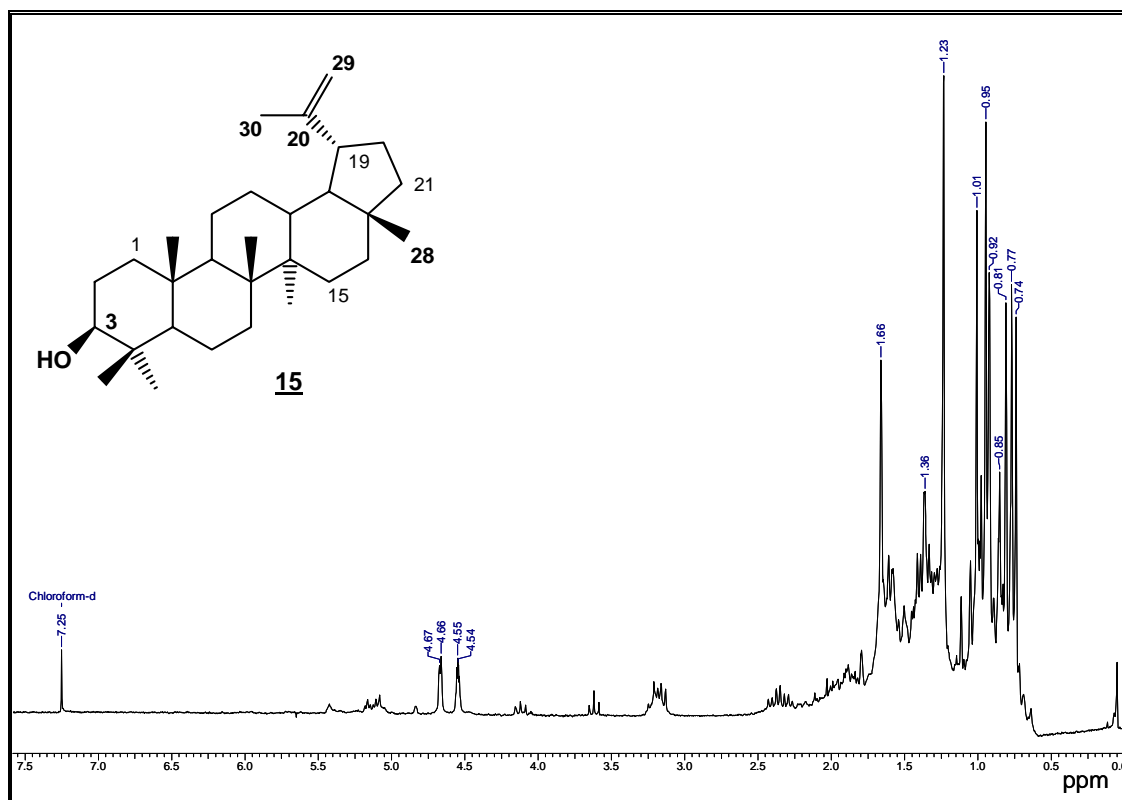


Figura 169. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **15** (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz).

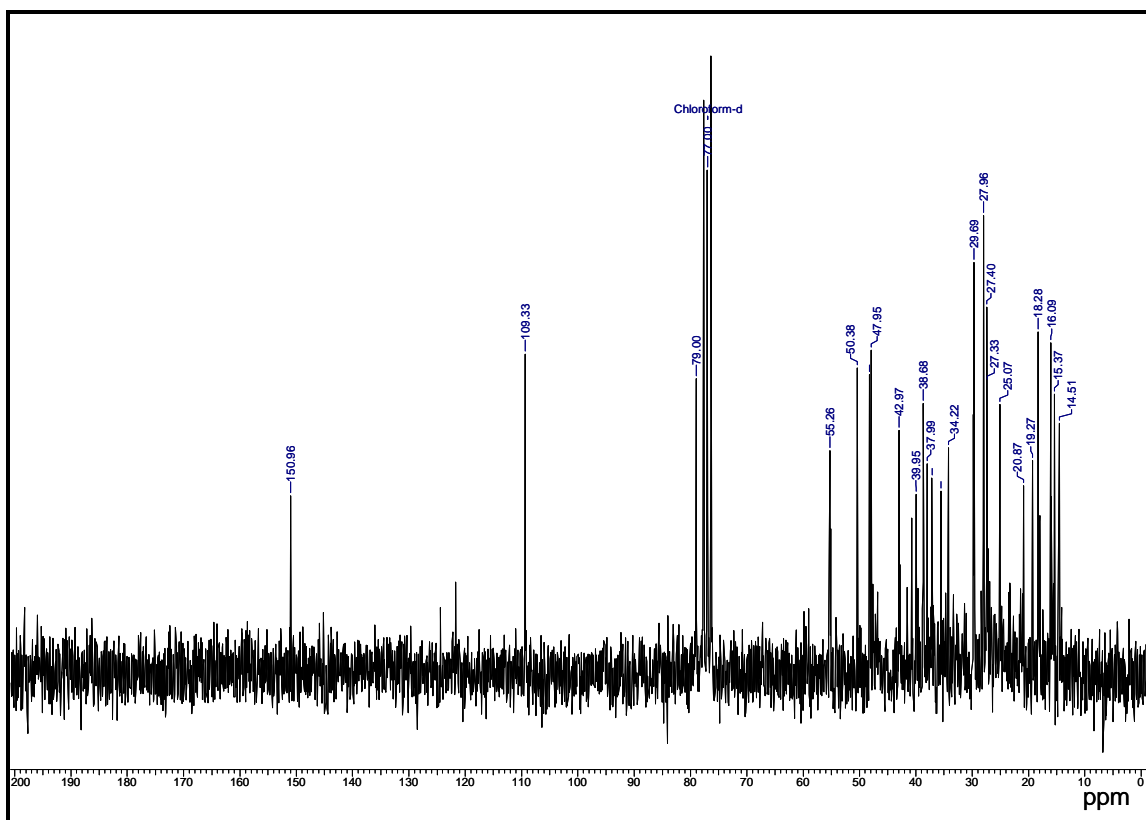


Figura 170. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **15** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).

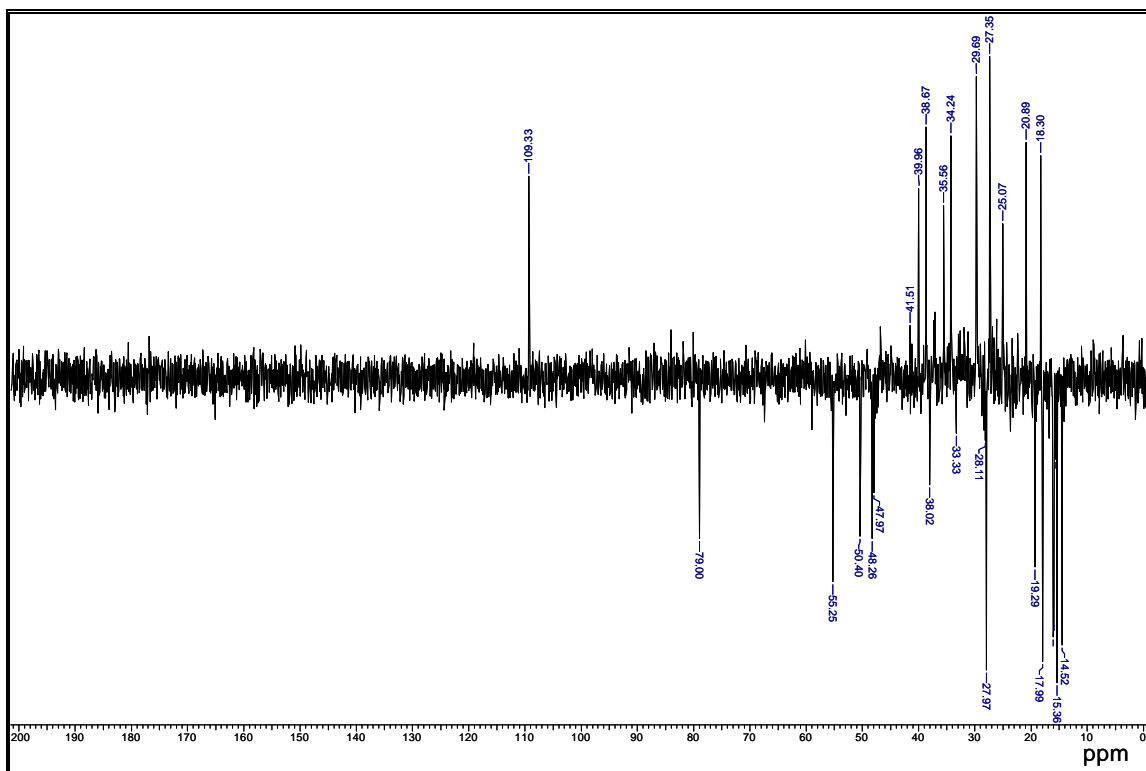


Figura 171. Espectro de DEPT  $135^\circ$  da substância **15** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).



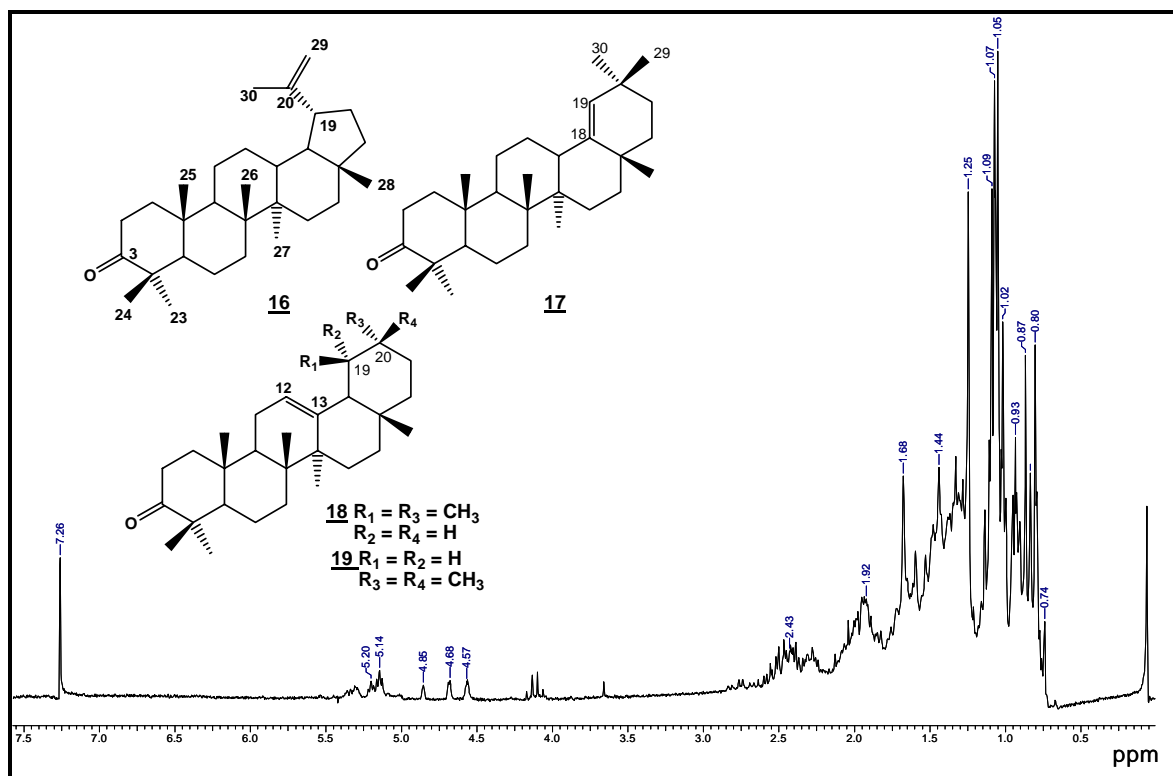


Figura 172. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **16**, **17**, **18** e **19** ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).

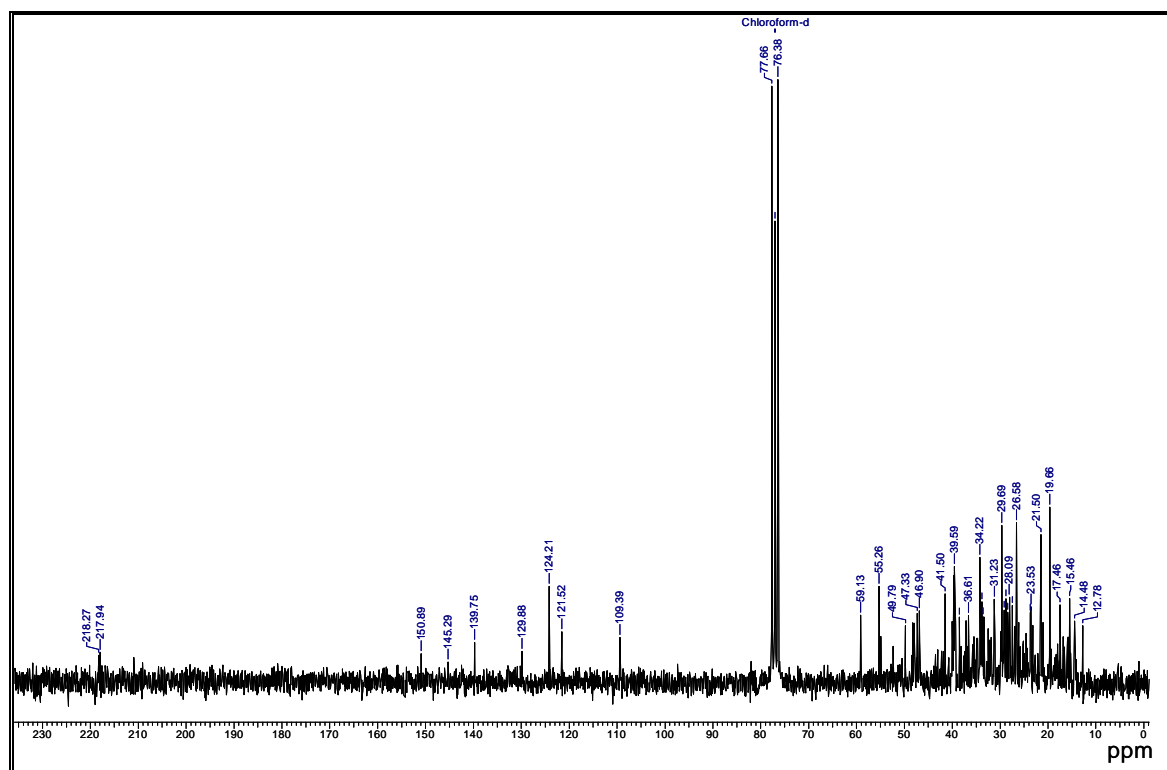
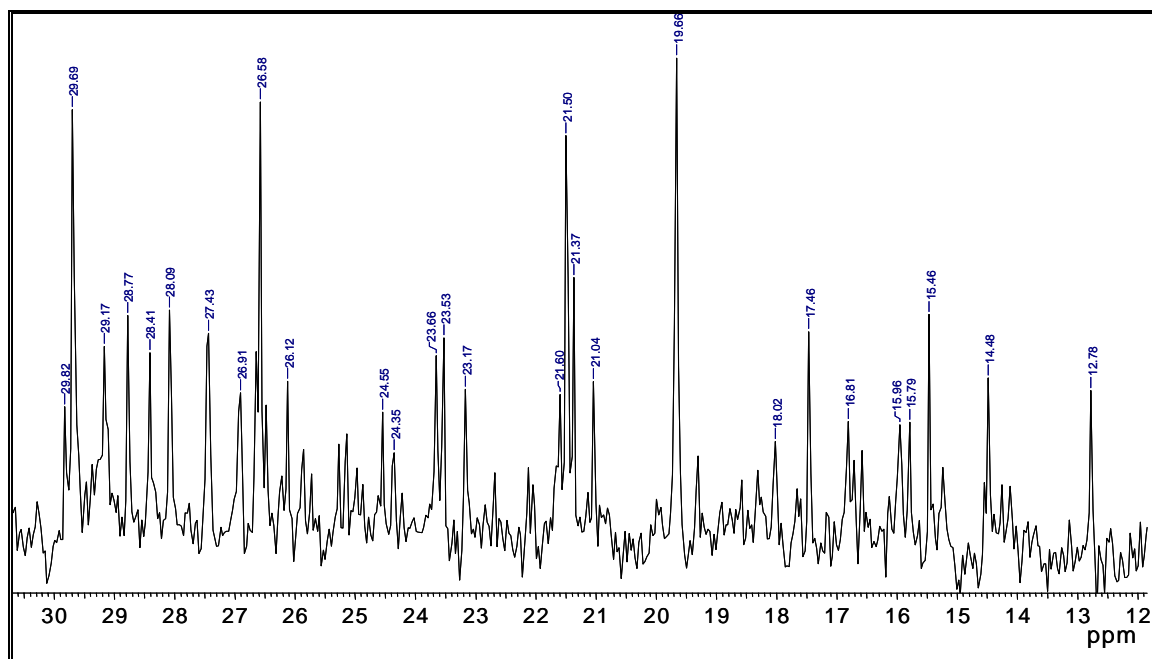
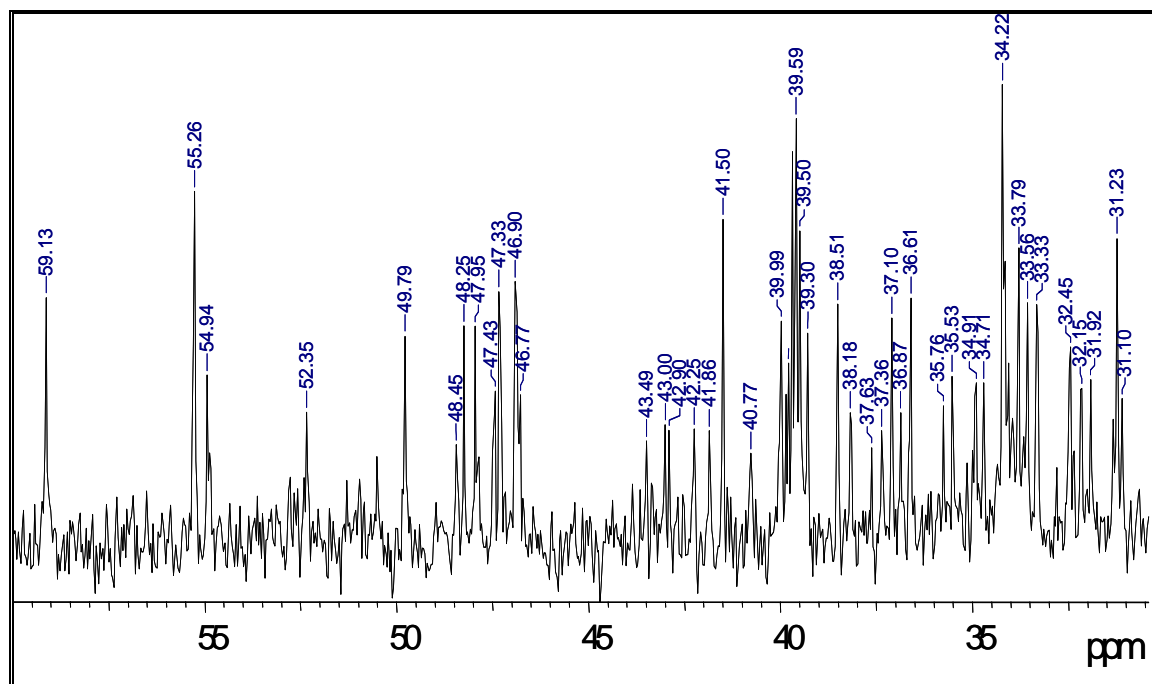


Figura 173. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  das substâncias **16**, **17**, **18** e **19** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).



**Figura 174.** Ampliações do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  das substâncias **16**, **17**, **18** e **19** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).

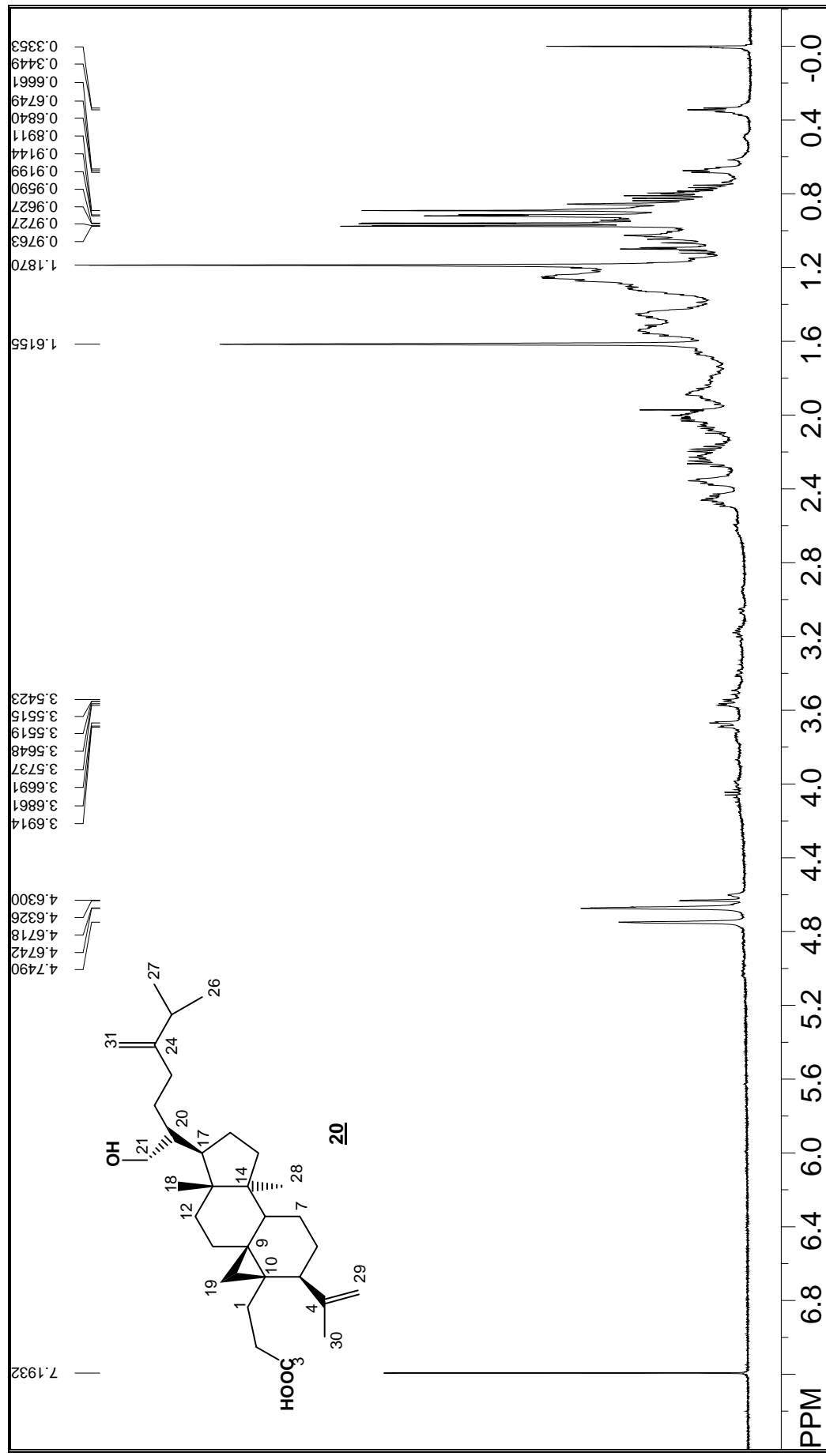


Figura 175. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **20** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

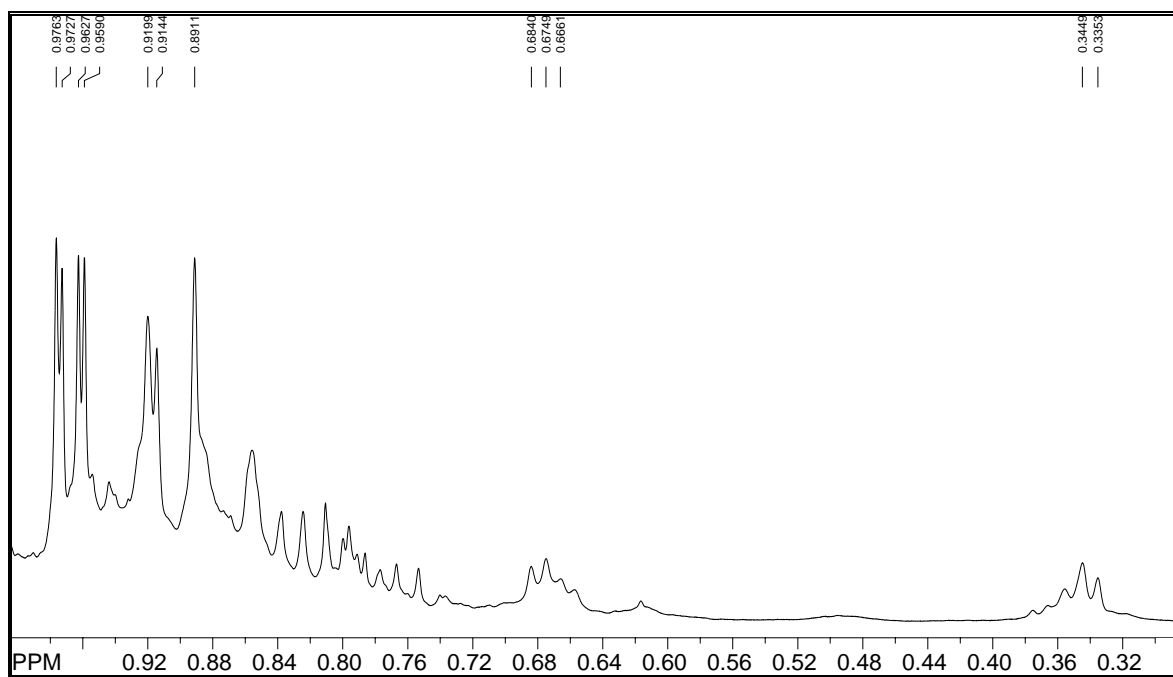
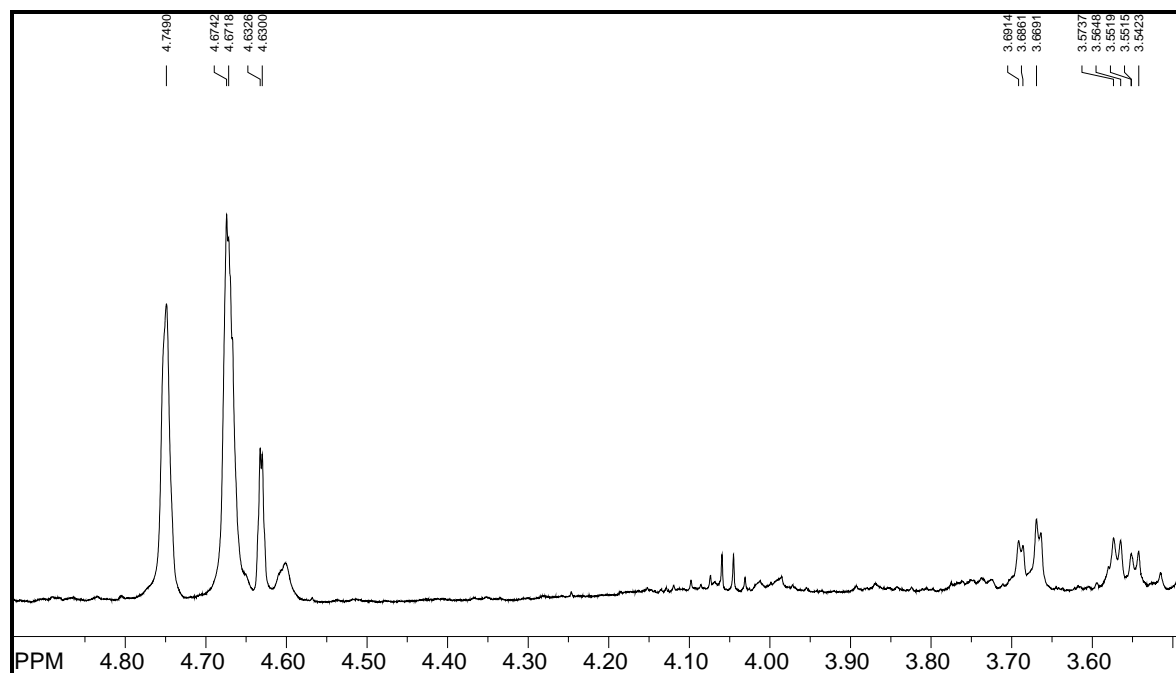


Figura 176. Ampliações do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **20** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).

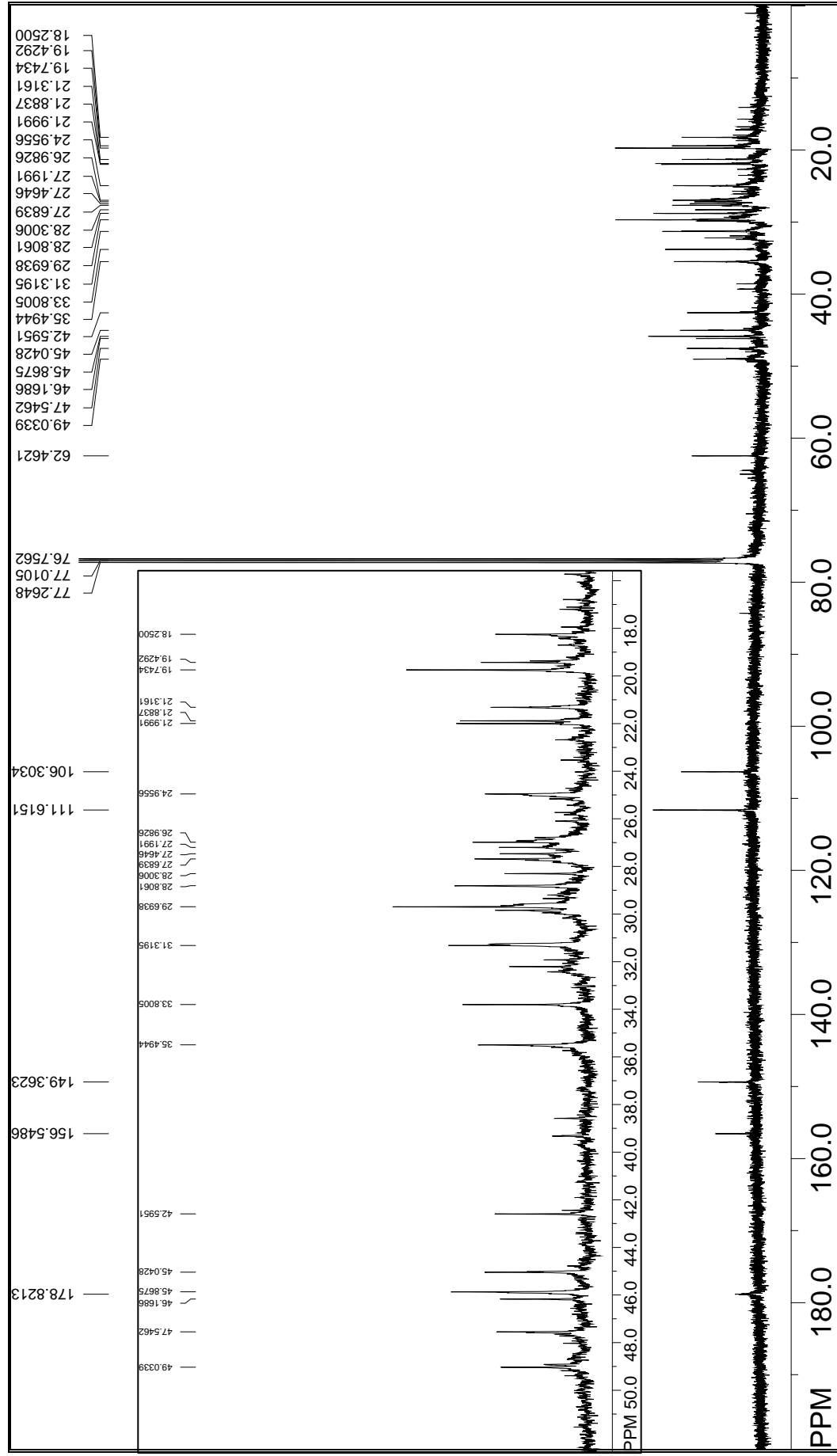


Figura 177. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **20** ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz).

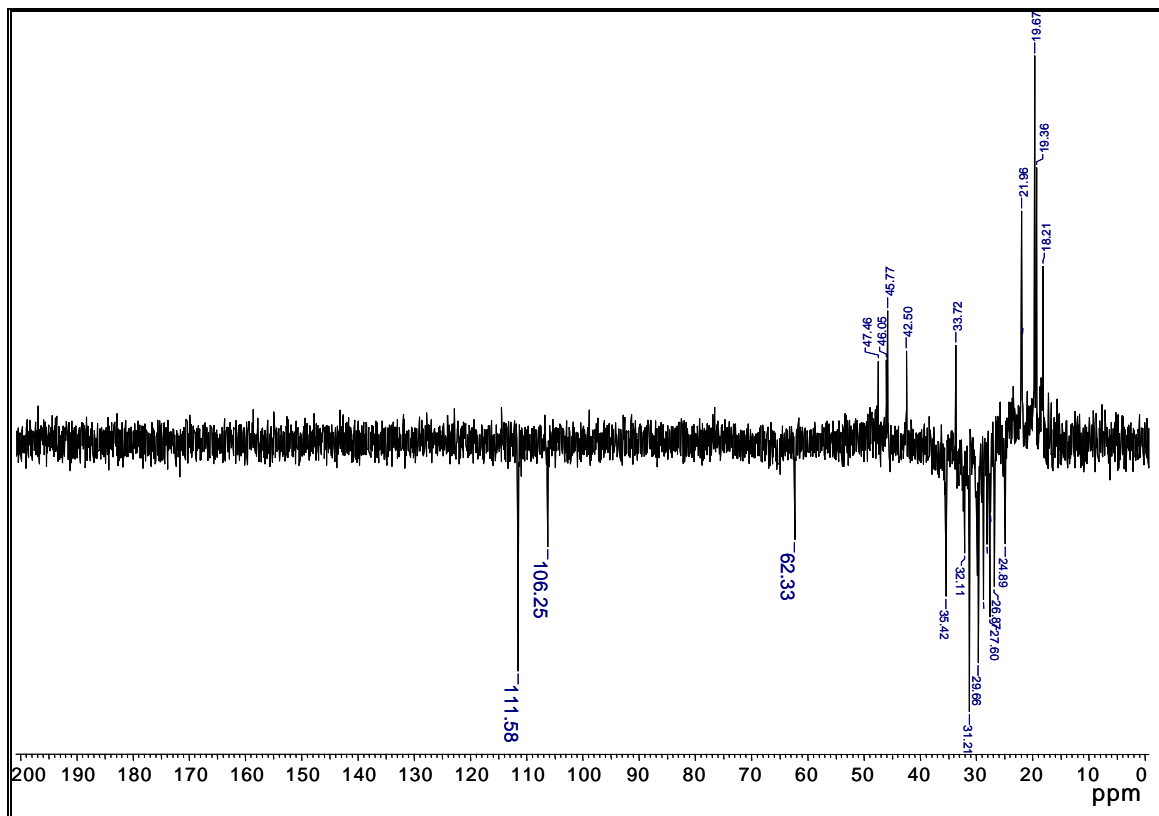


Figura 178. Espectro DEPT 135° da substância **20** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz).

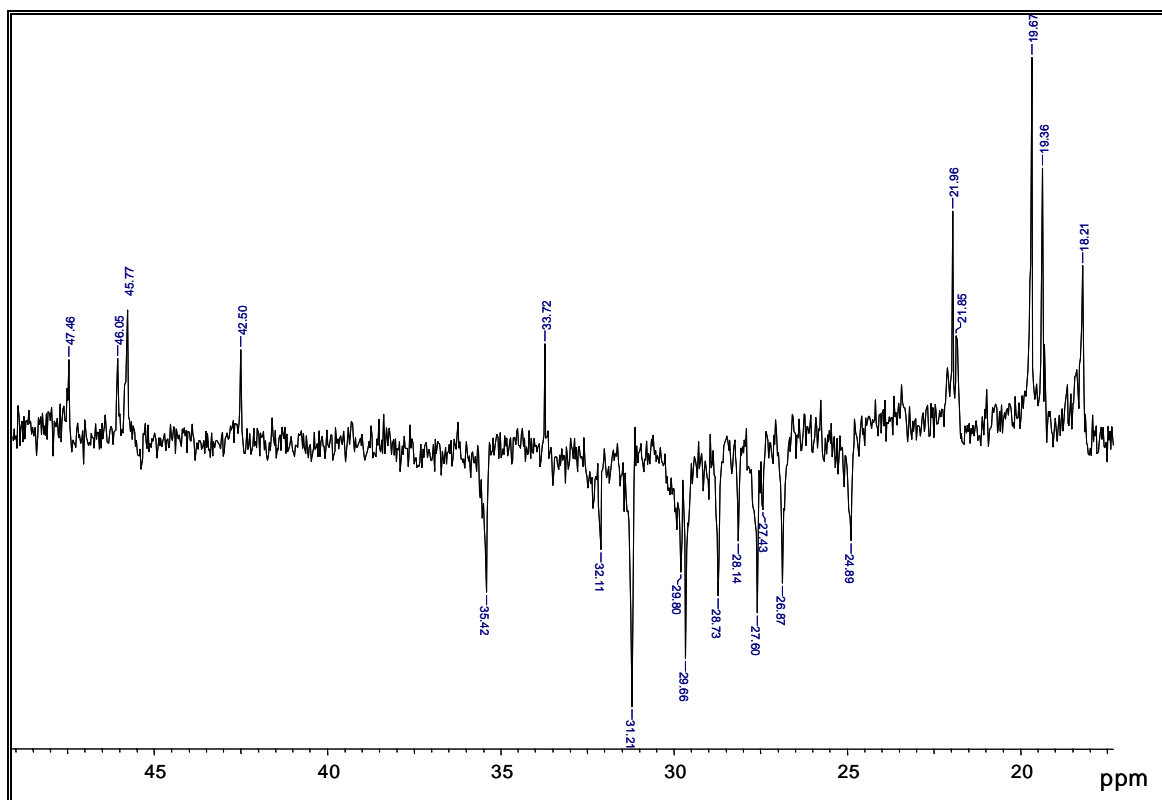


Figura 179. Ampliação do espectro DEPT 135° da substância **20** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz).

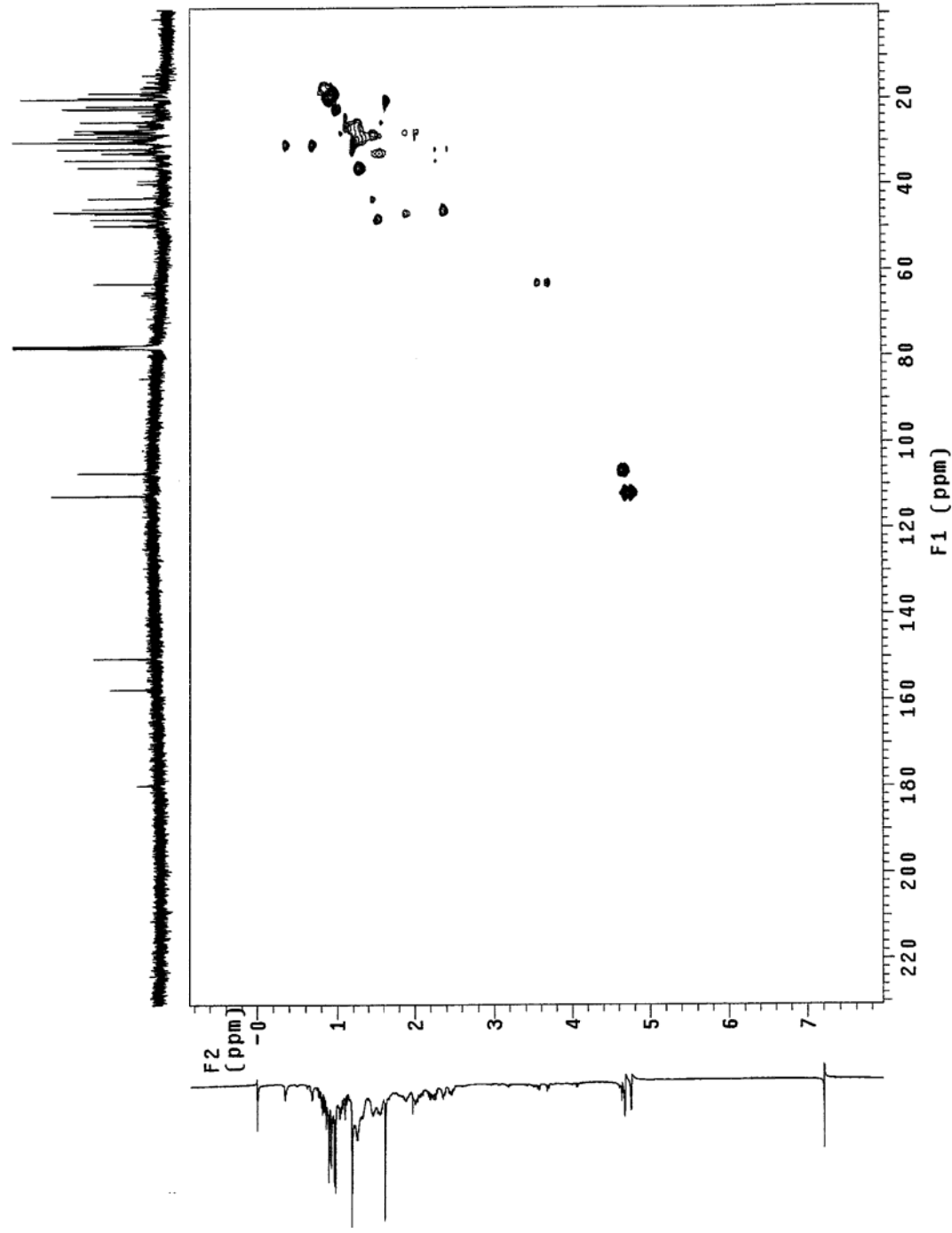


Figura 180. Mapa de correlação gHMBC da substância **20** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).

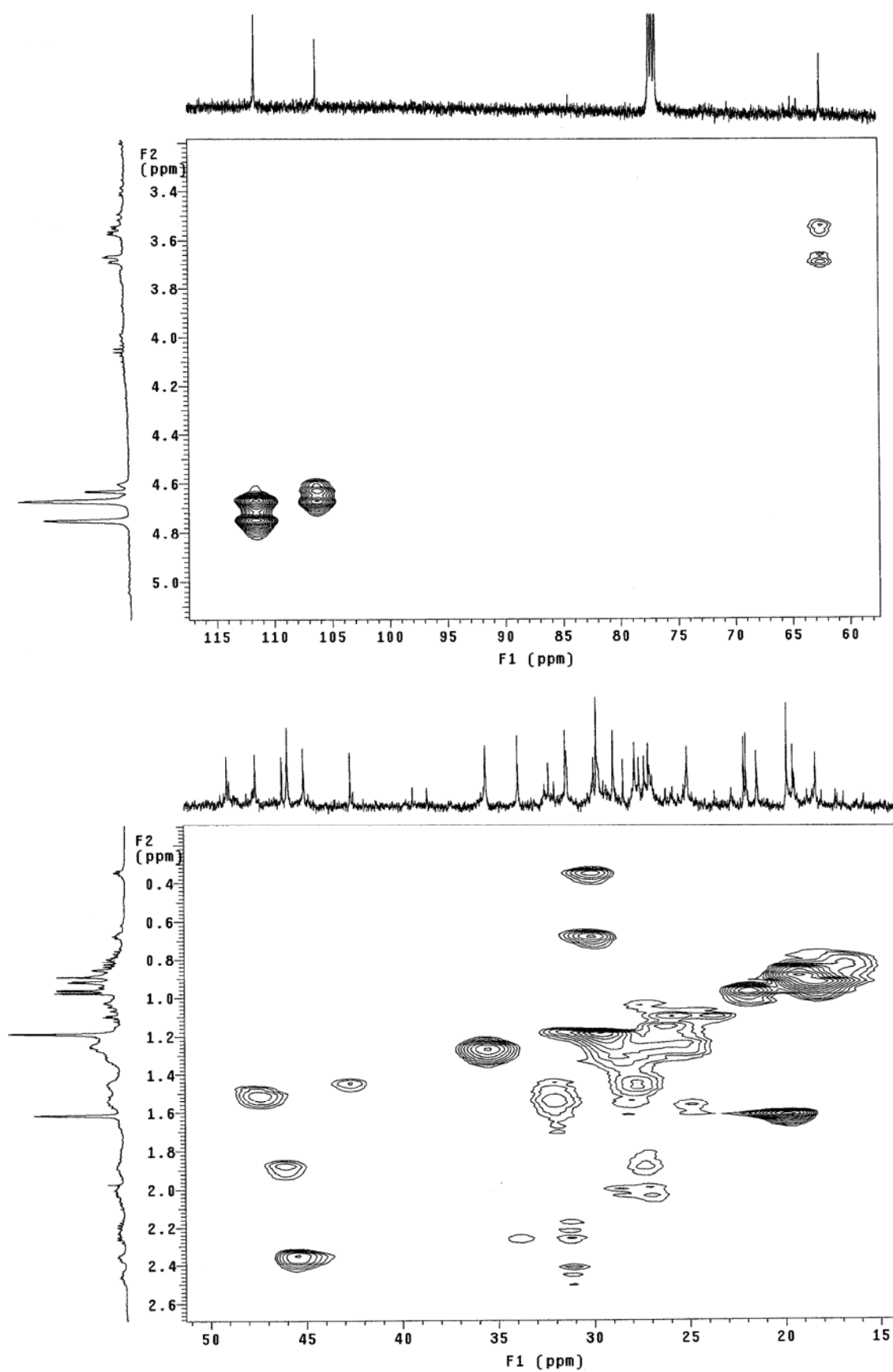


Figura 181. Ampliações do mapa de correlação gHMQC da substância **20** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).



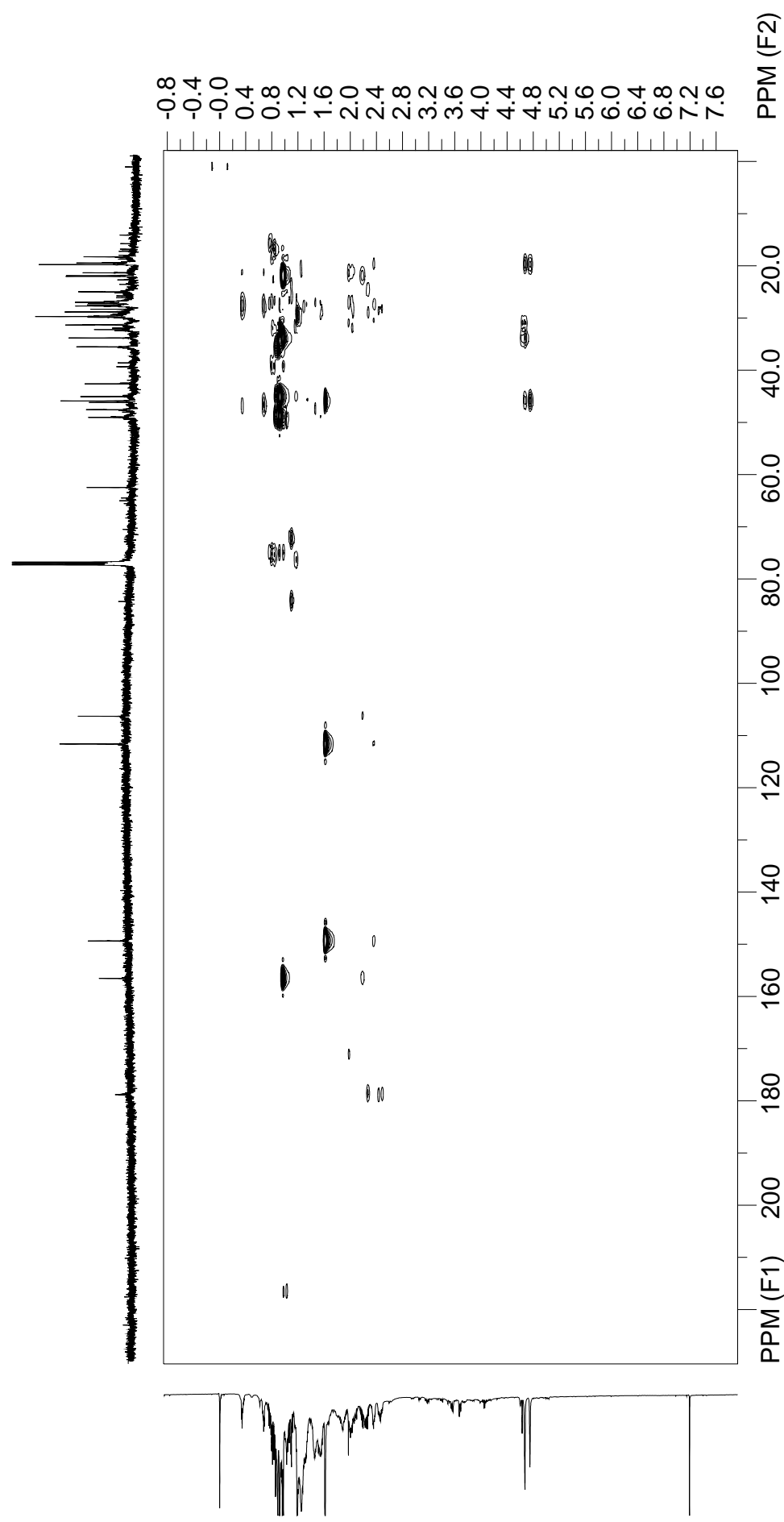
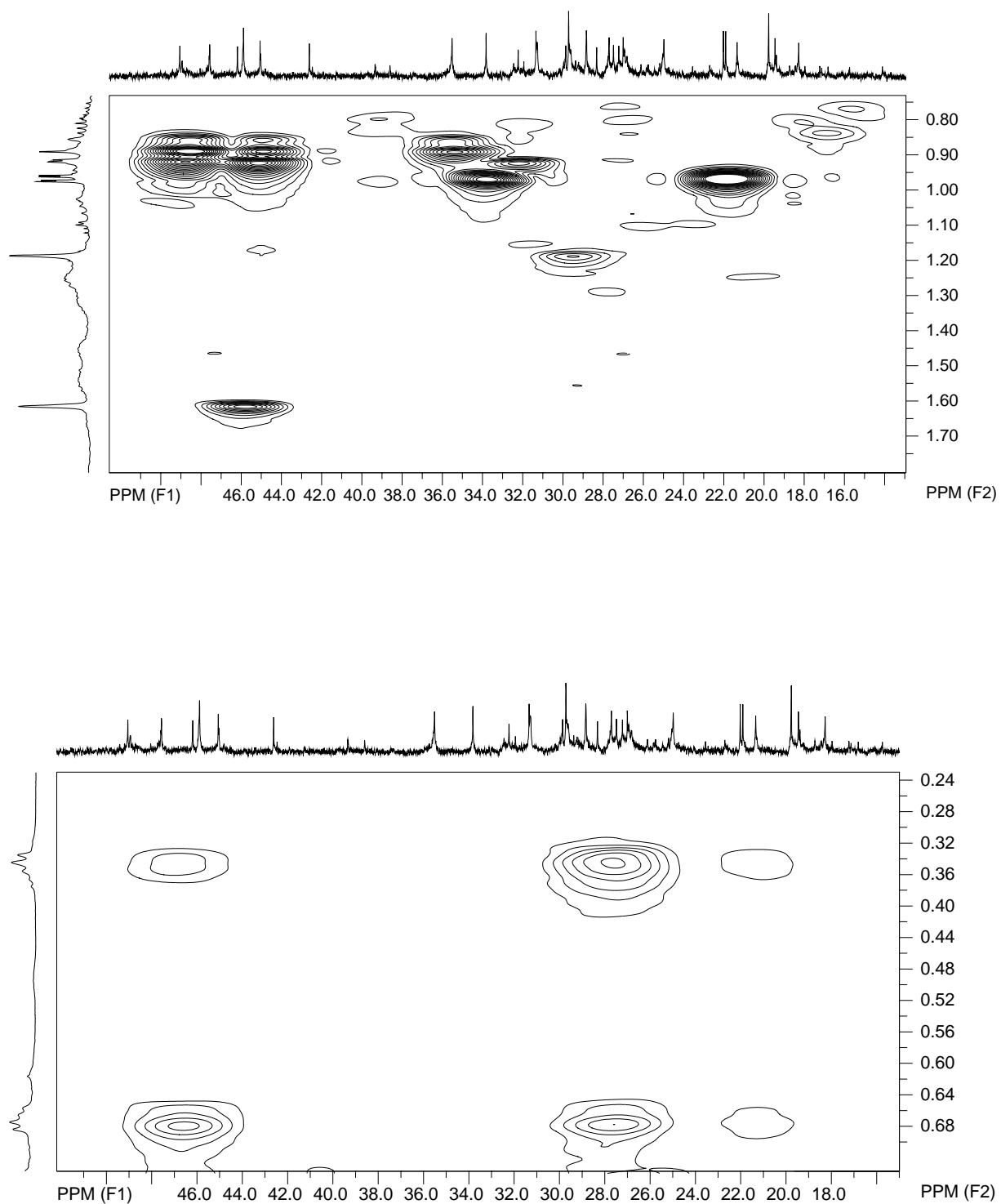


Figura 182. Mapa de correlação gHMBC da substância **20** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)



**Figura 183.** Ampliações do mapa de correlação gHMBC da substância **20** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

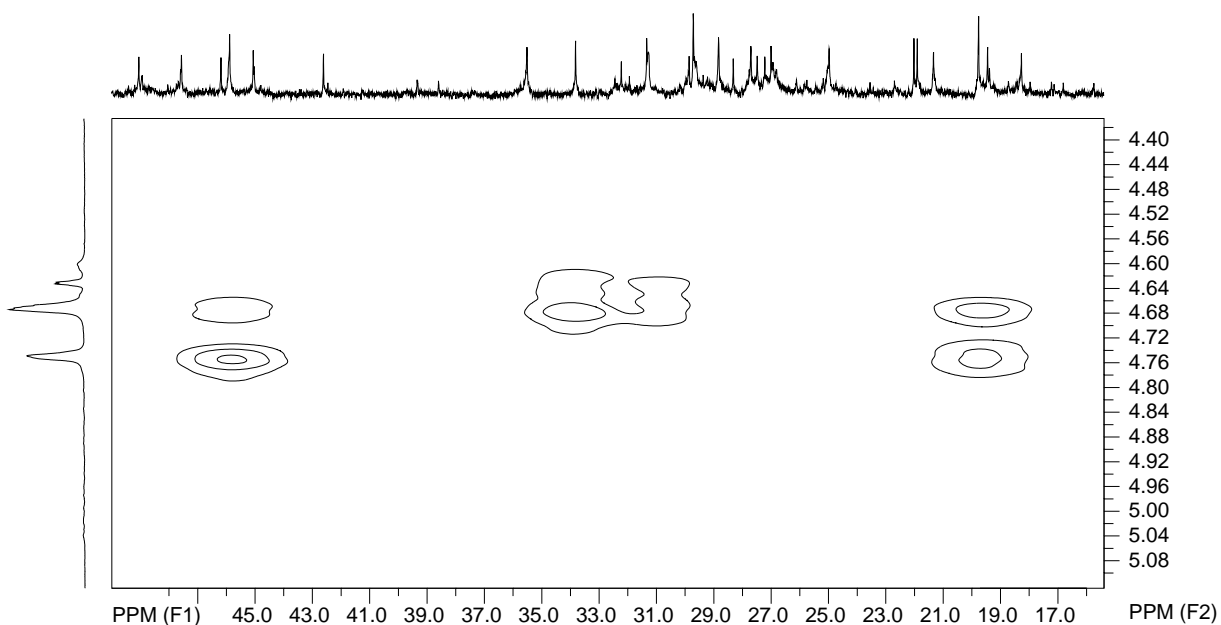


Figura 184. Ampliação do mapa de correlação gHMBC da substância **20** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).

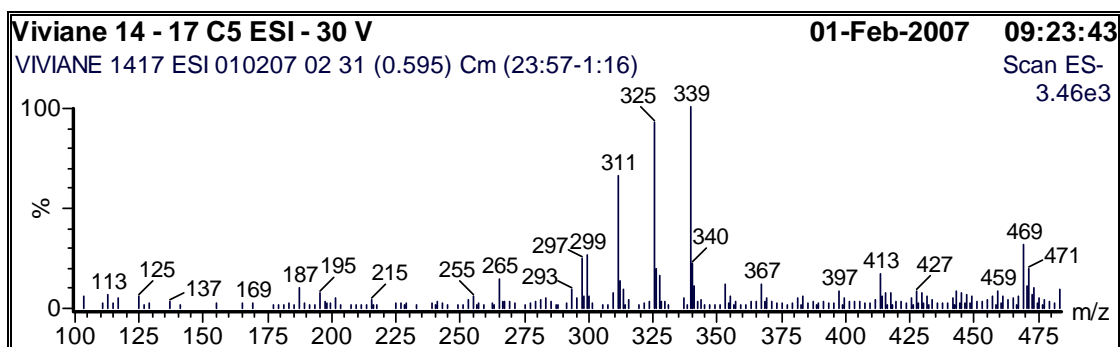
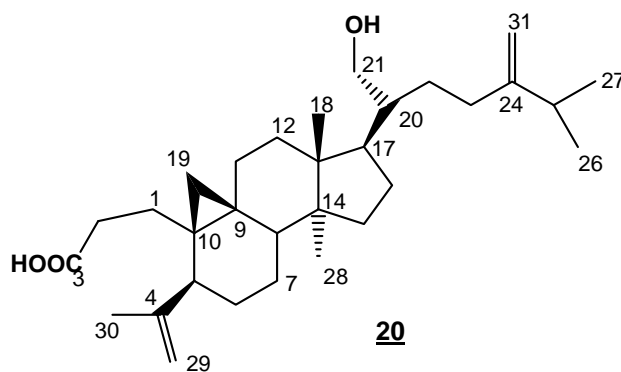


Figura 185. Espectro de massas da substância **20** (ESI, modo negativo).

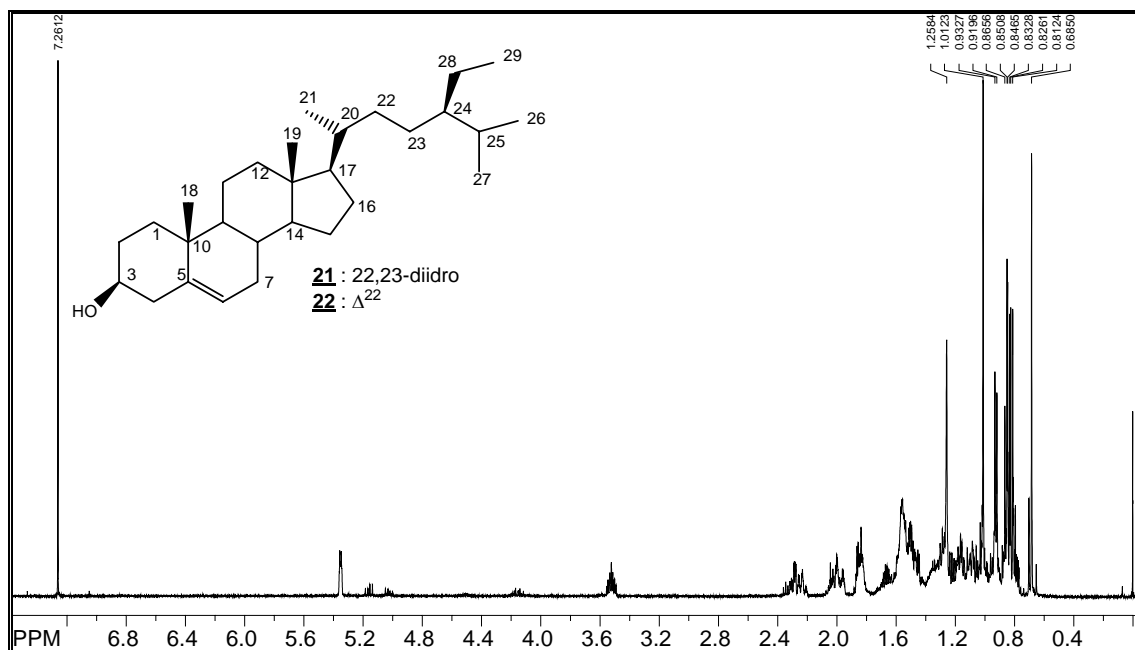


Figura 186. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **21** e **22** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

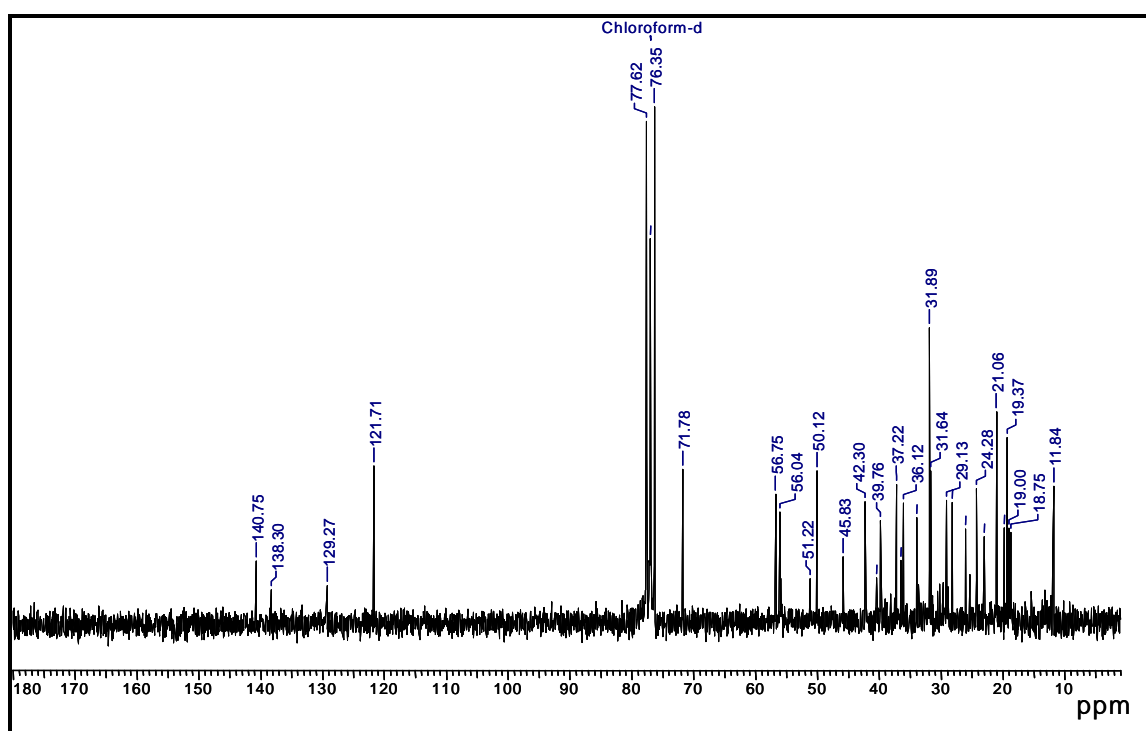


Figura 187. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  das substâncias **21** e **22** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).

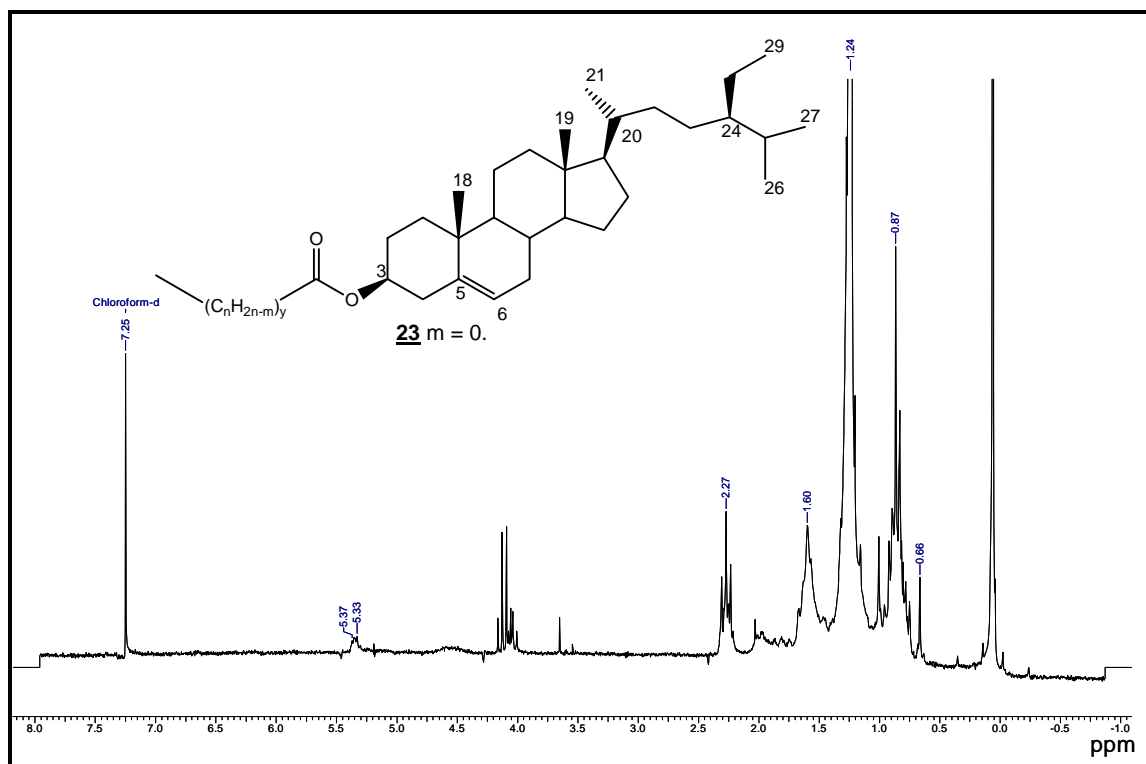


Figura 188. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **23** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).

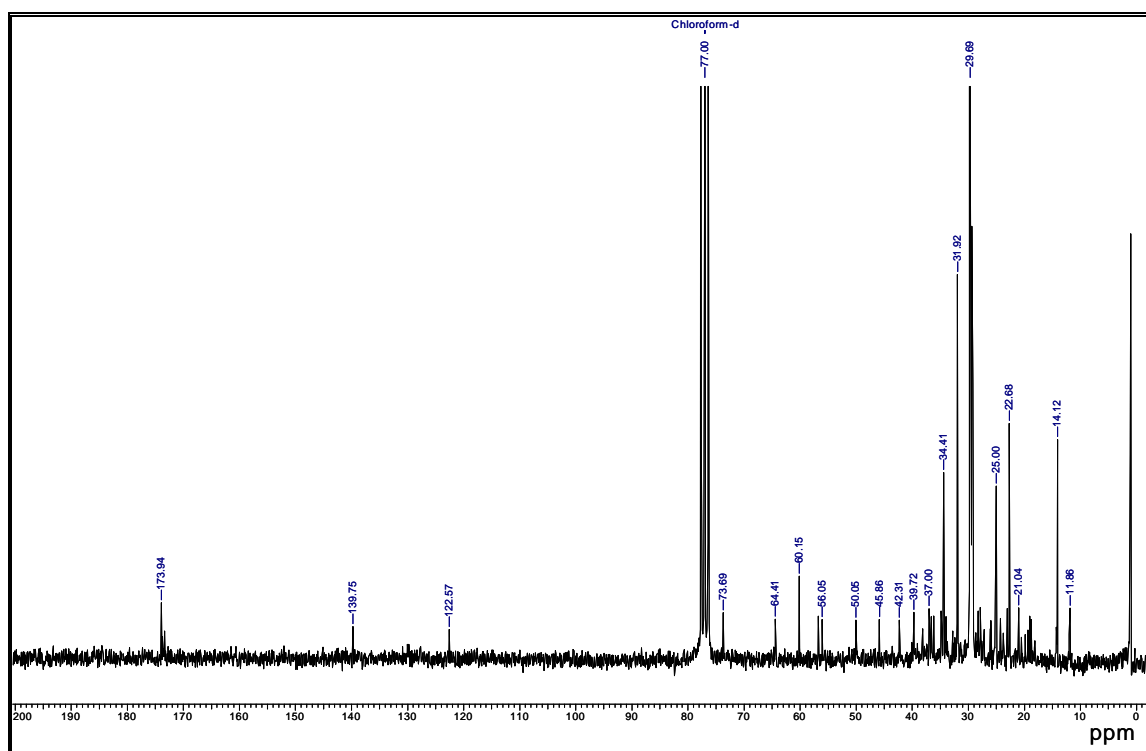


Figura 189. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da substância **23** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz).

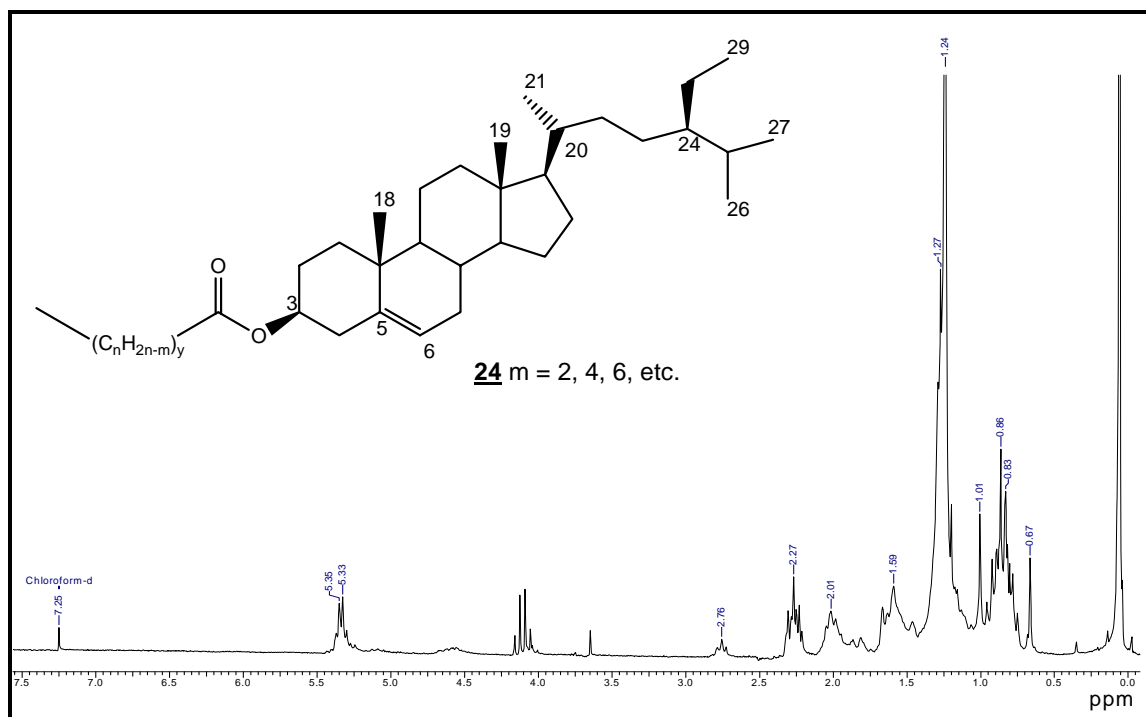


Figura 190. Espectro de RMN de  $^1H$  da substância **24** ( $CDCl_3$ , 500 MHz).

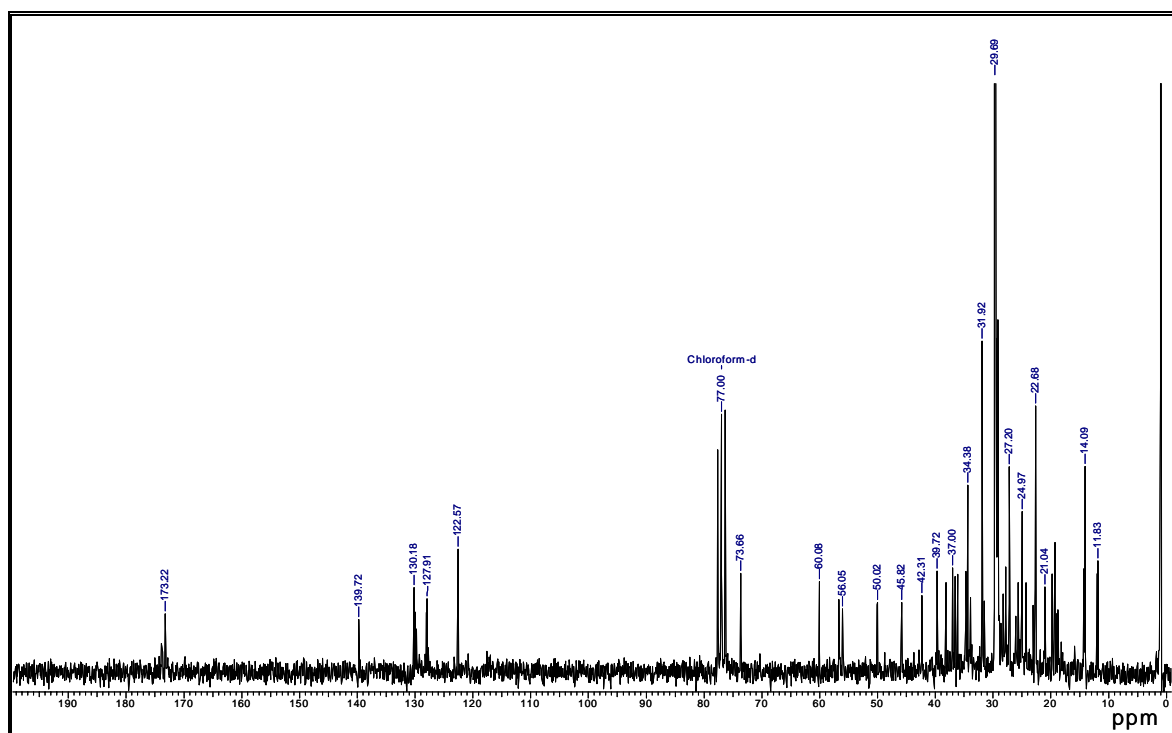


Figura 191. Espectro de RMN de  $^{13}C$  da substância **24** ( $CDCl_3$ , 125 MHz).

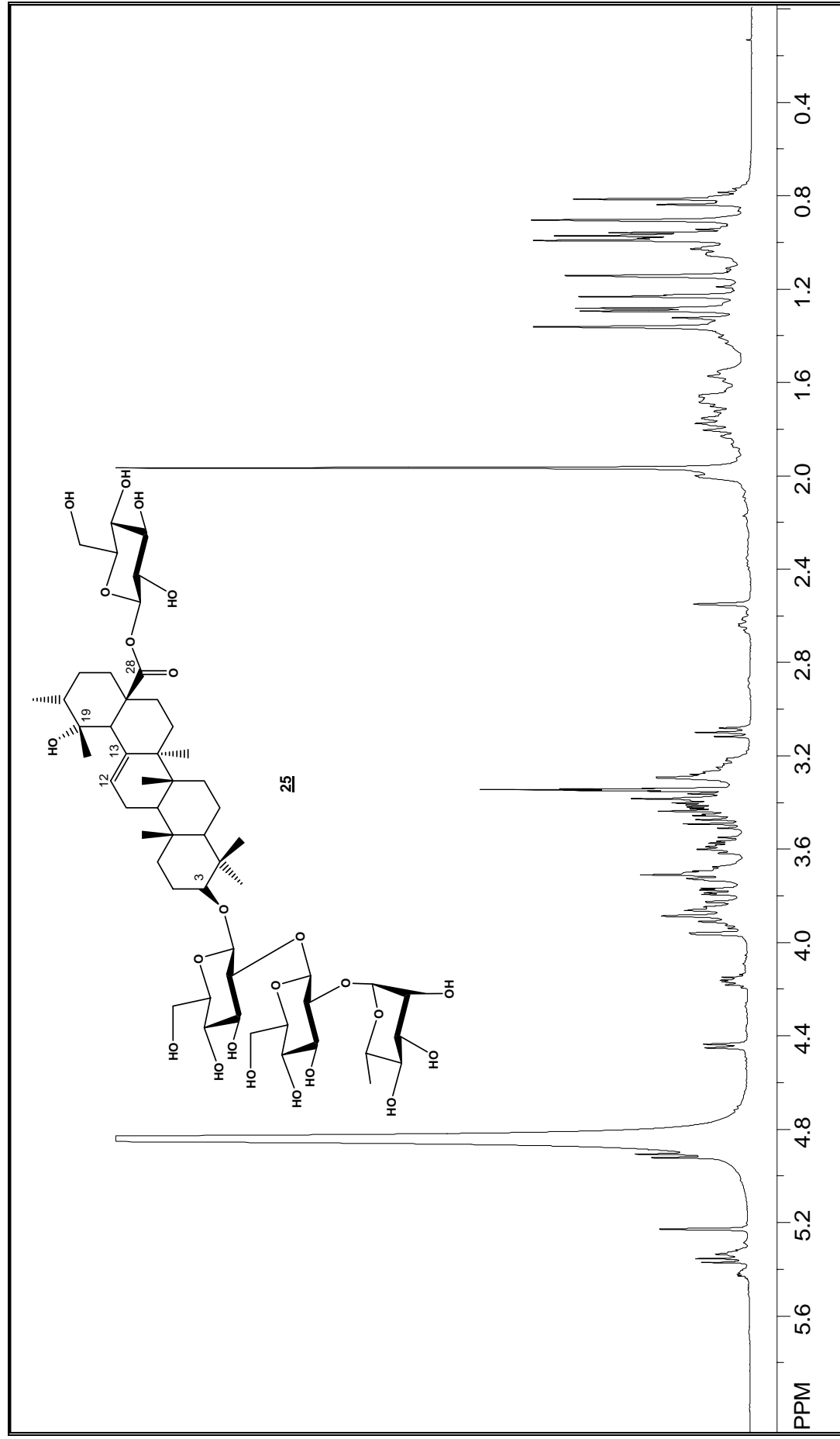


Figura 192. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **25** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).

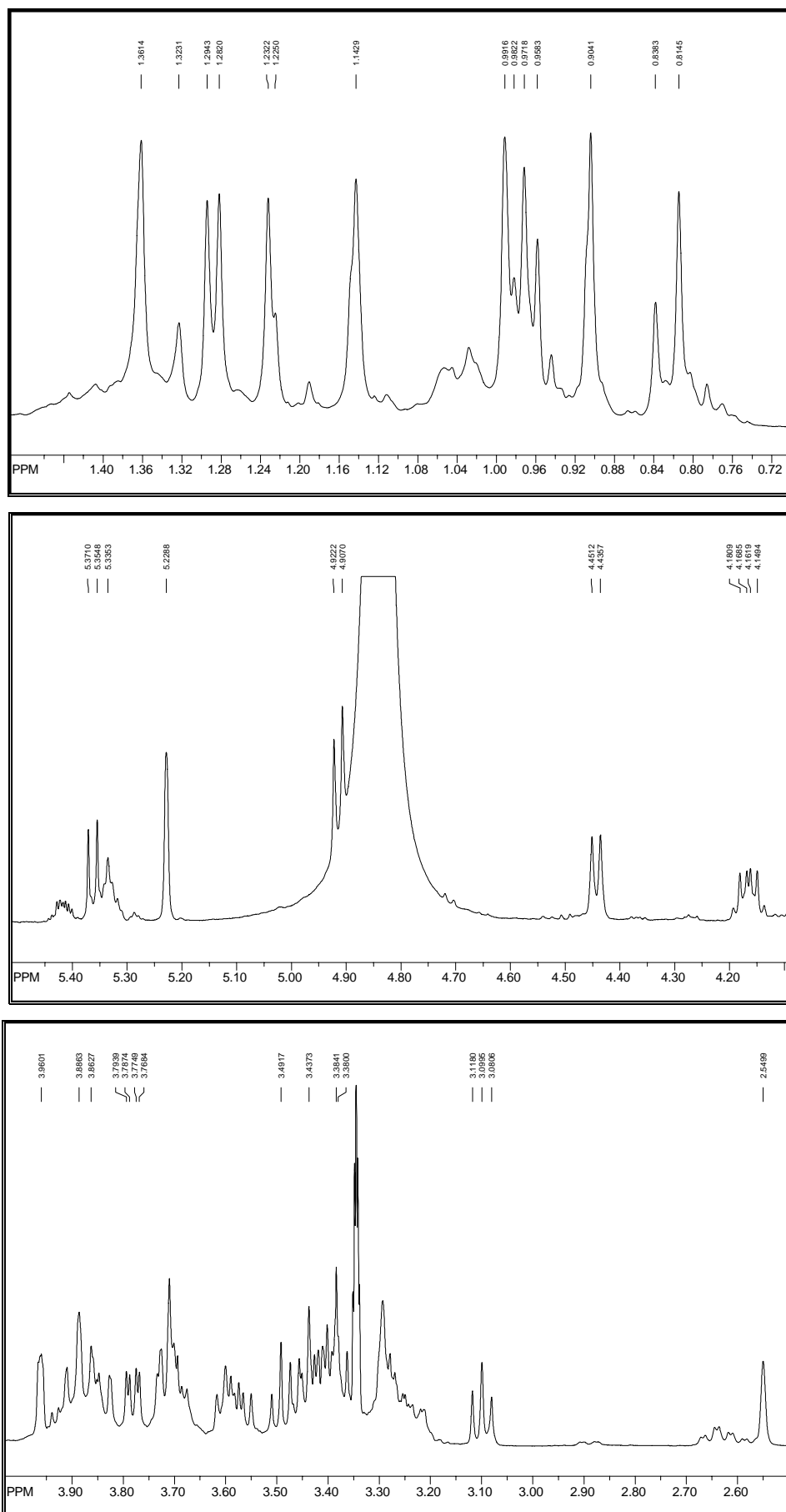


Figura 193. Ampliações do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **25** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).



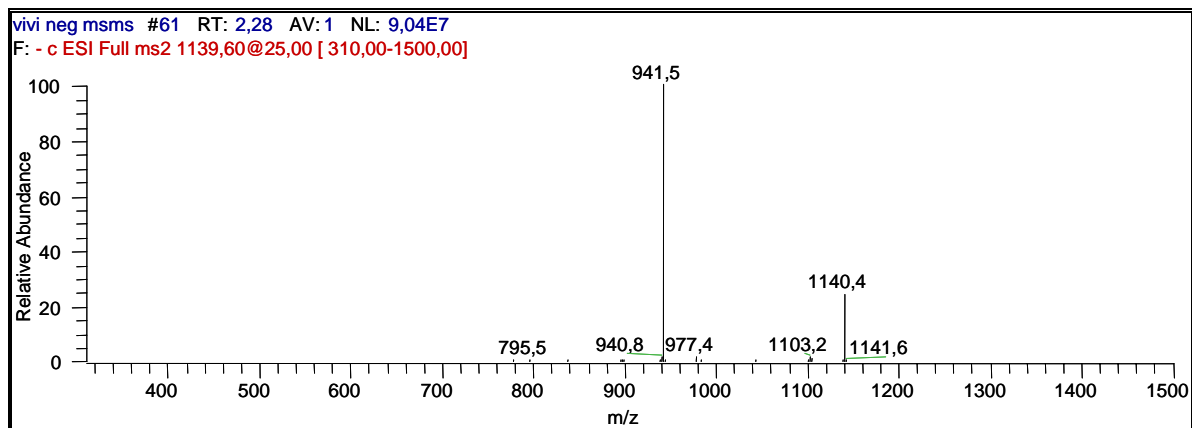
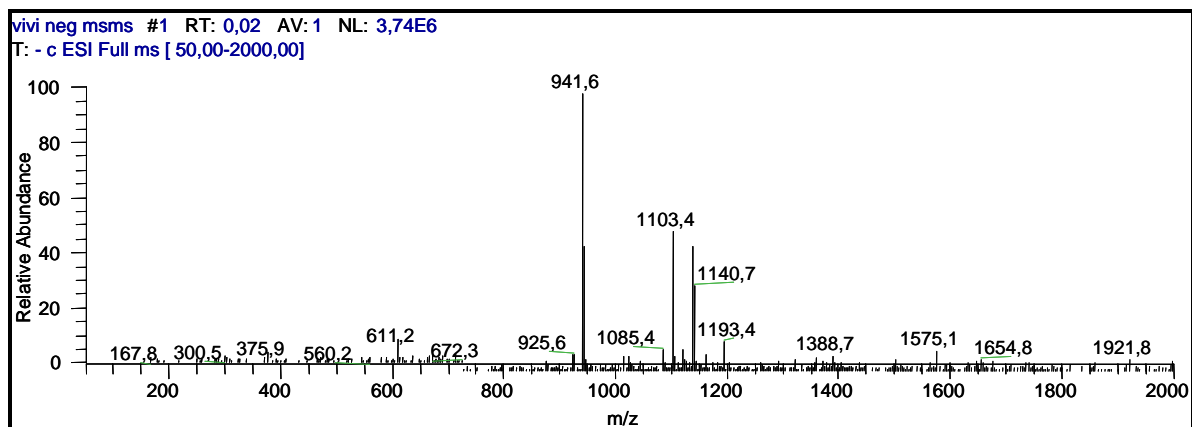
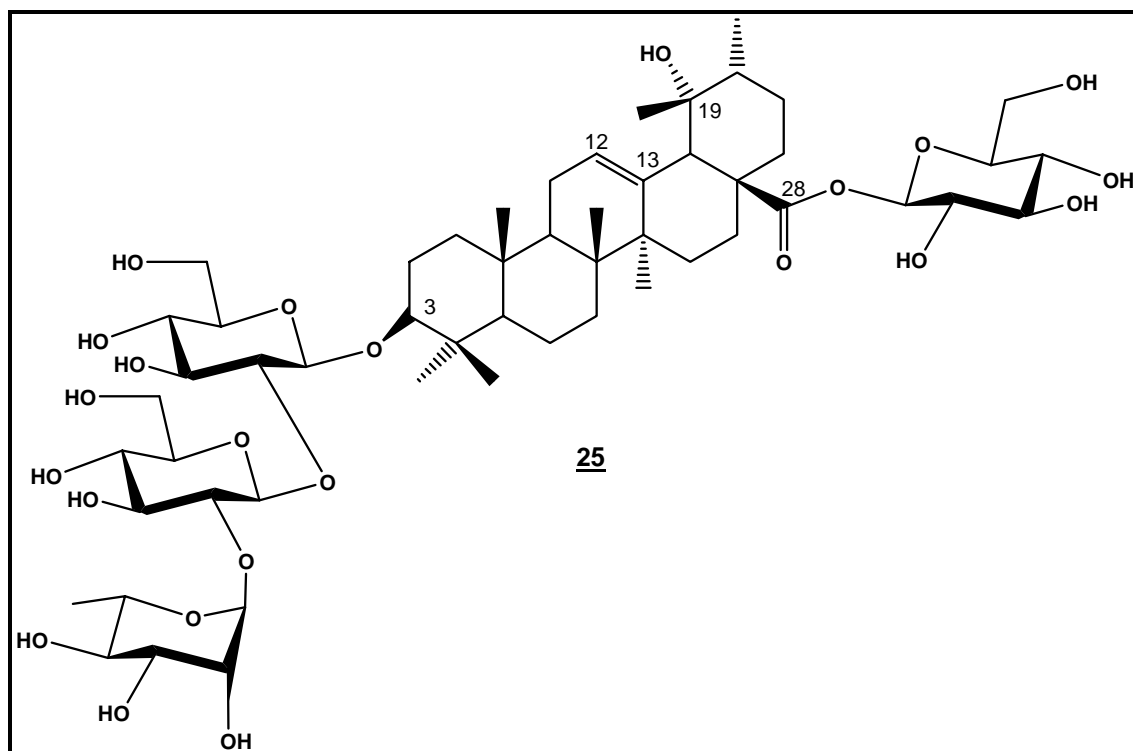


Figura 194. Espectros de massas Tandem da substância **25** (modo negativo).

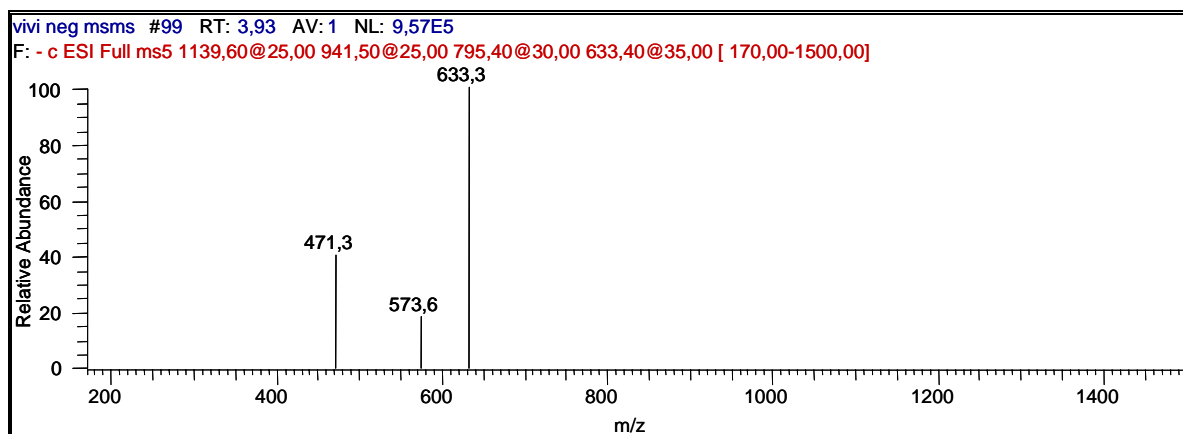
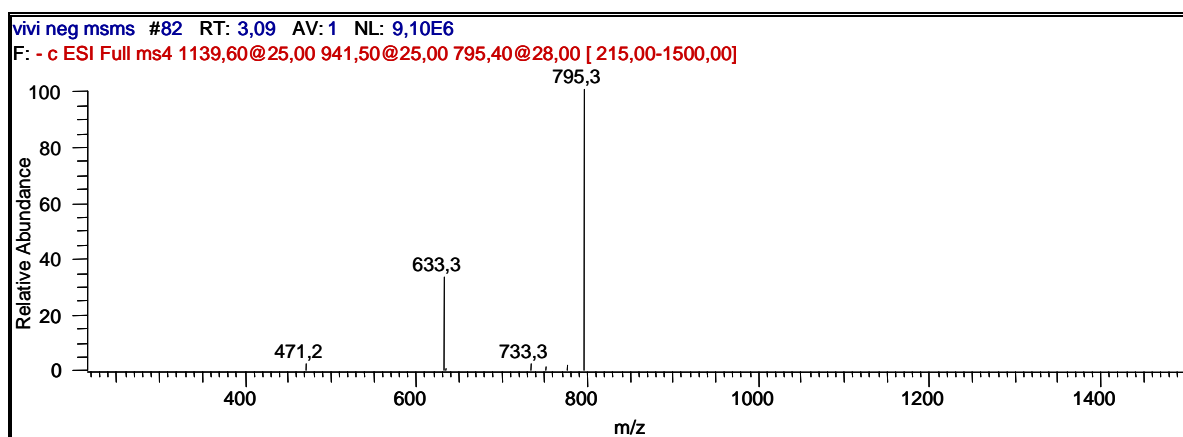
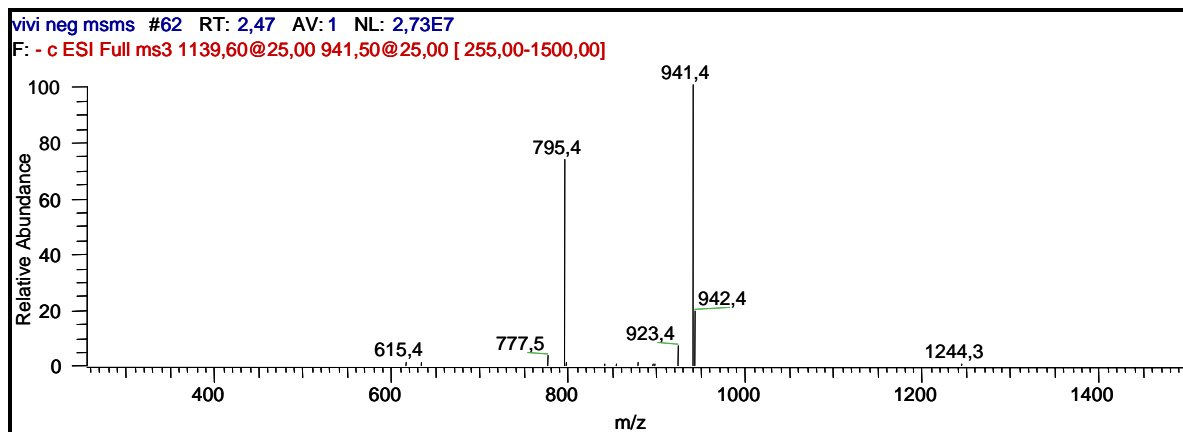


Figura 195. Espectros de massas Tandem da substância **25** (modo negativo).

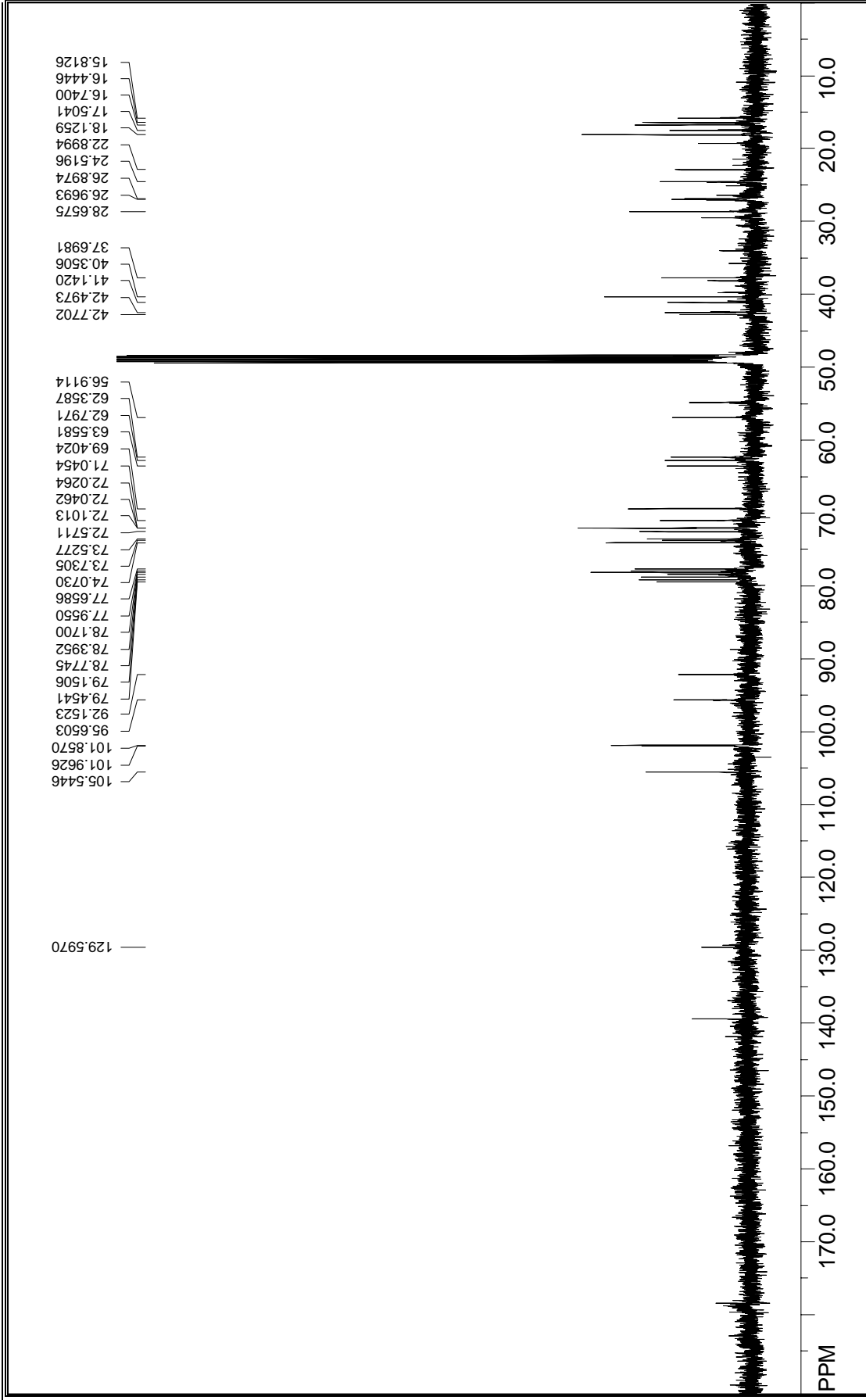


Figura 196. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **25** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz).

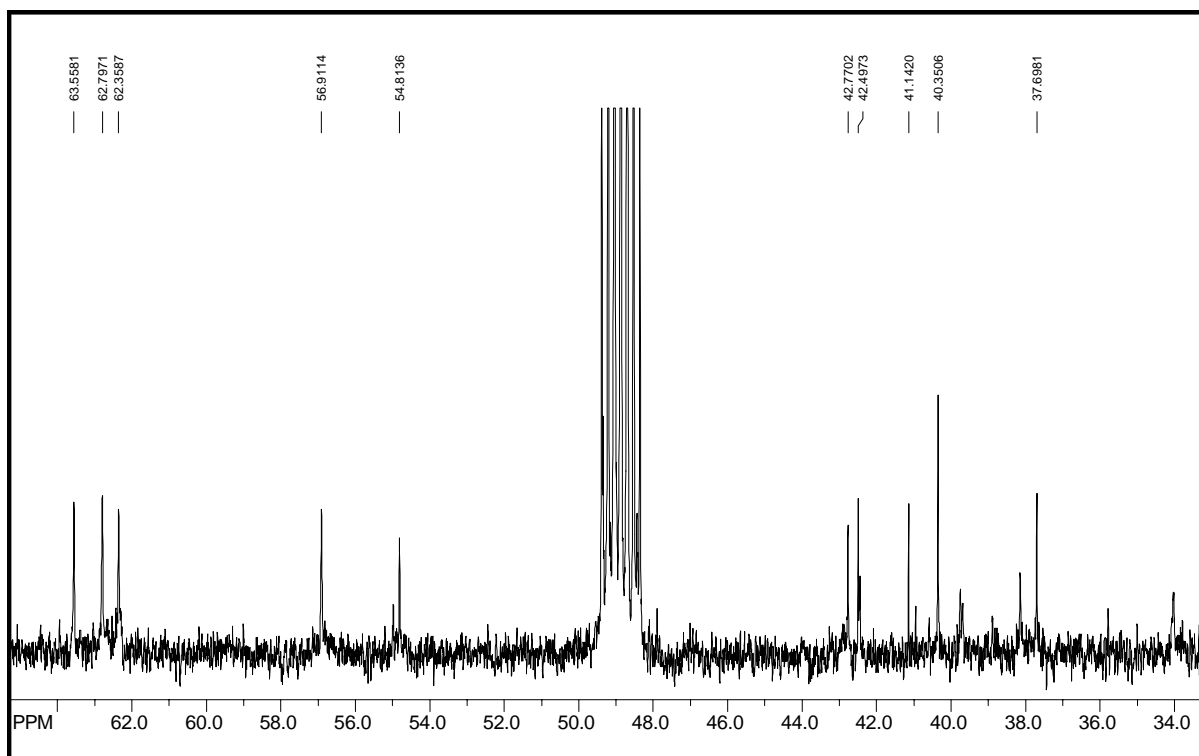
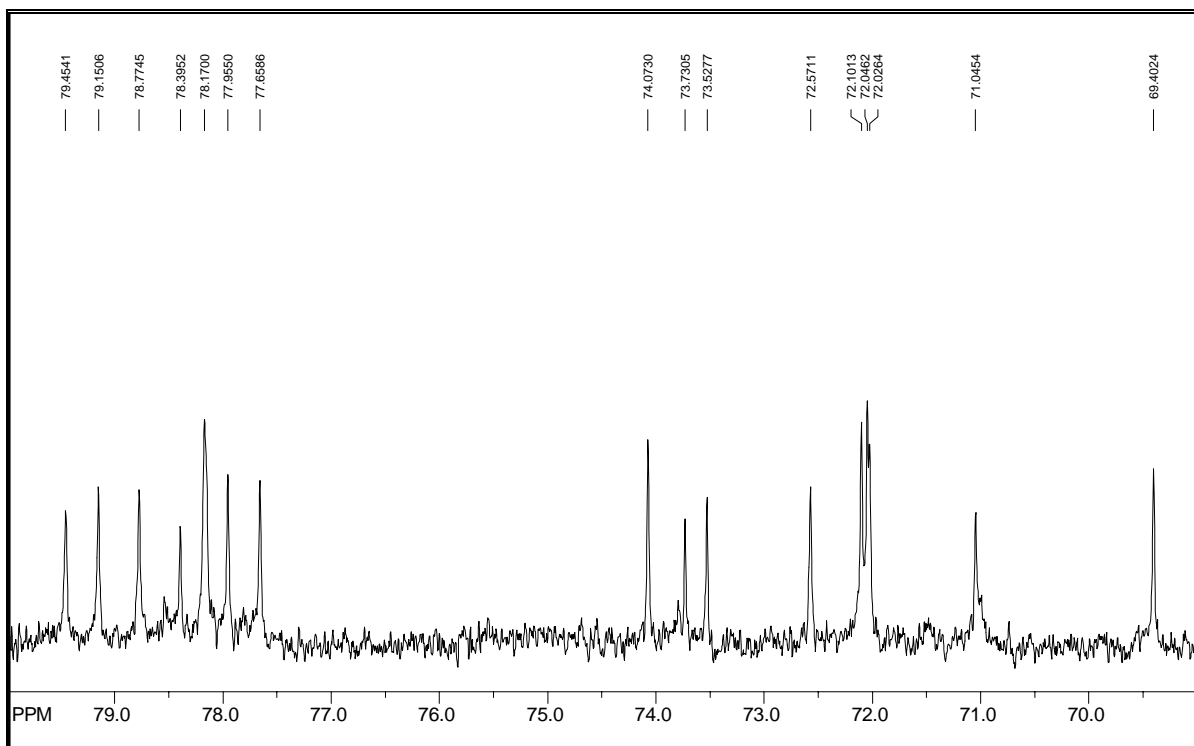
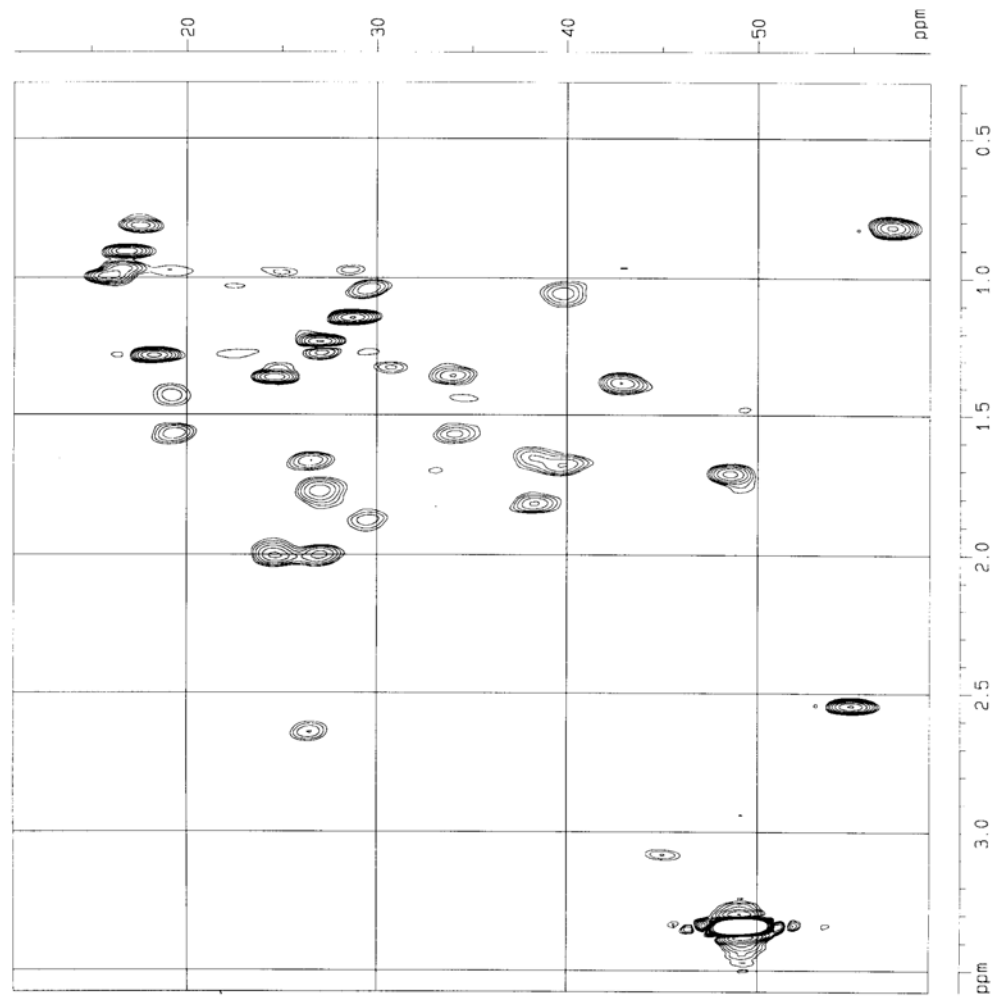
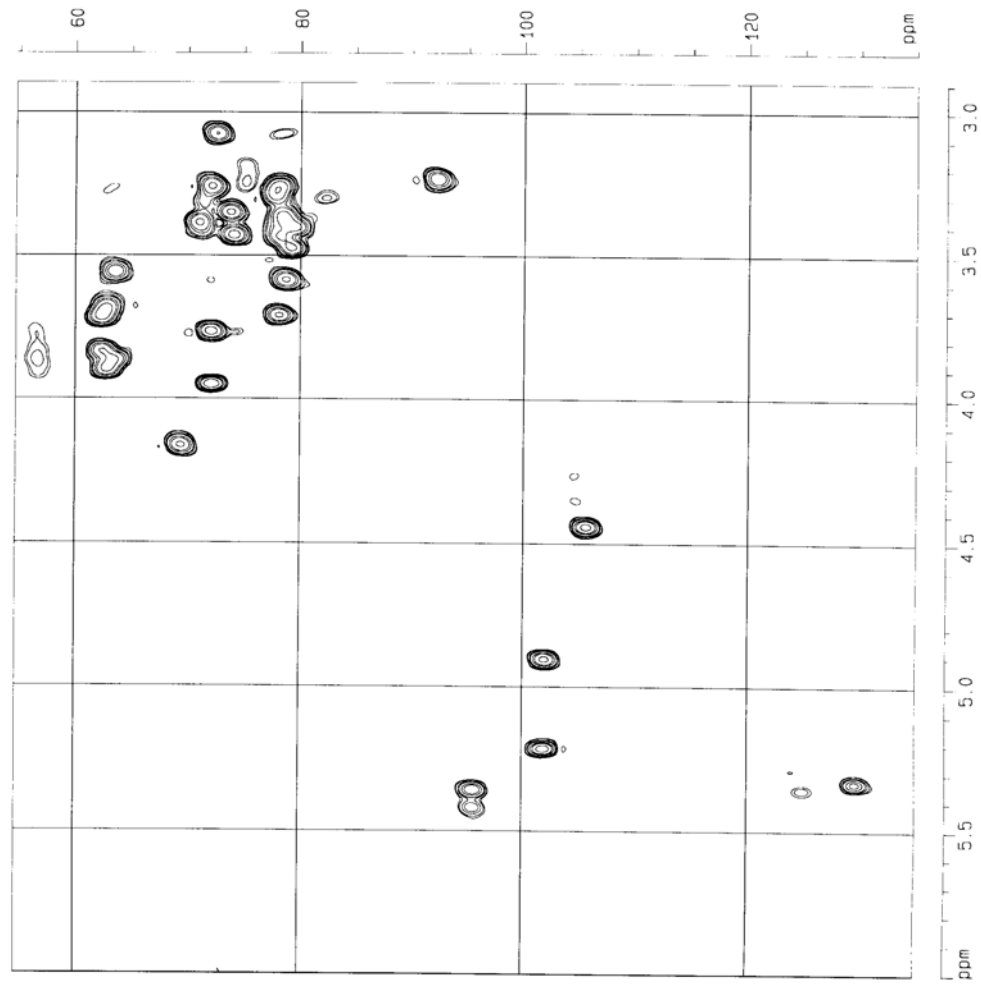


Figura 197. Ampliações do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **25** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz).



**Figura 198.** Mapa de correlação gHSQC da substância **25** (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz).



**Figura 199.** Mapa de correlação gHSQC da substância **25** (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz).

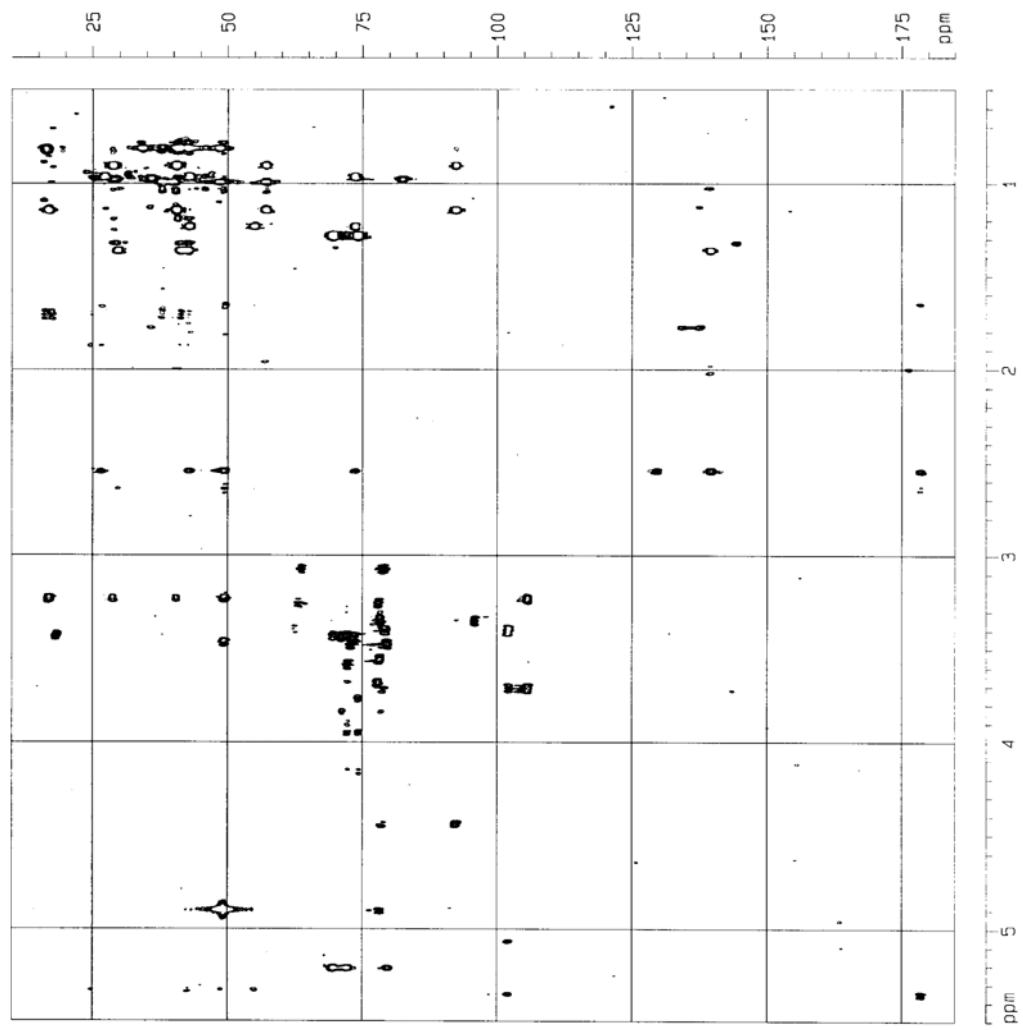


Figura 200. Mapa de correlação gHMBC da substância **25** (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz).

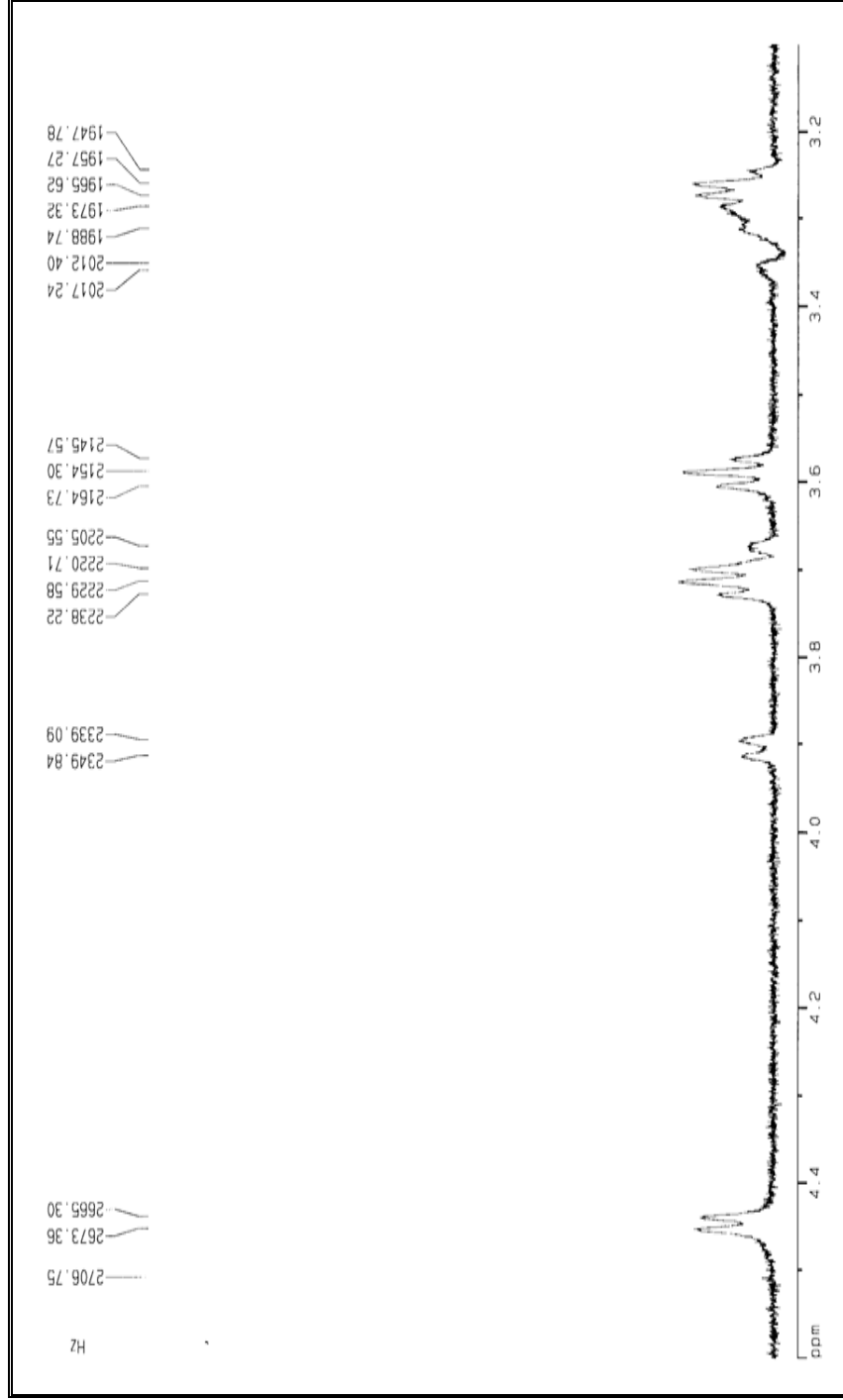


Figura 201. Espectro de TOCSY 1D da substância **25** ( $\beta$ -D-glicose') ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz).



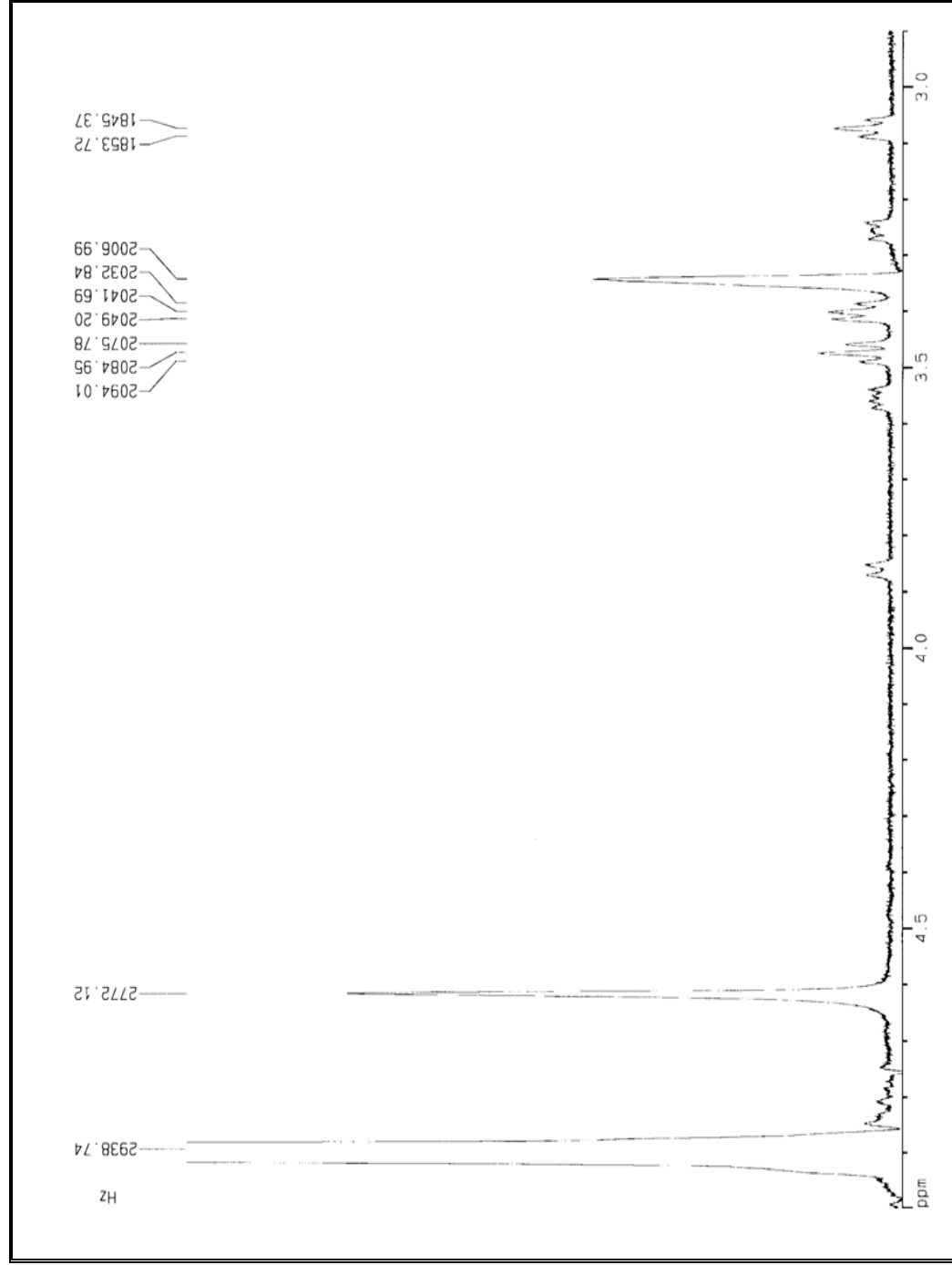


Figura 202. Espectro de TOCSY 1D da substância **25** ( $\beta$ -D-glicose") ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz).

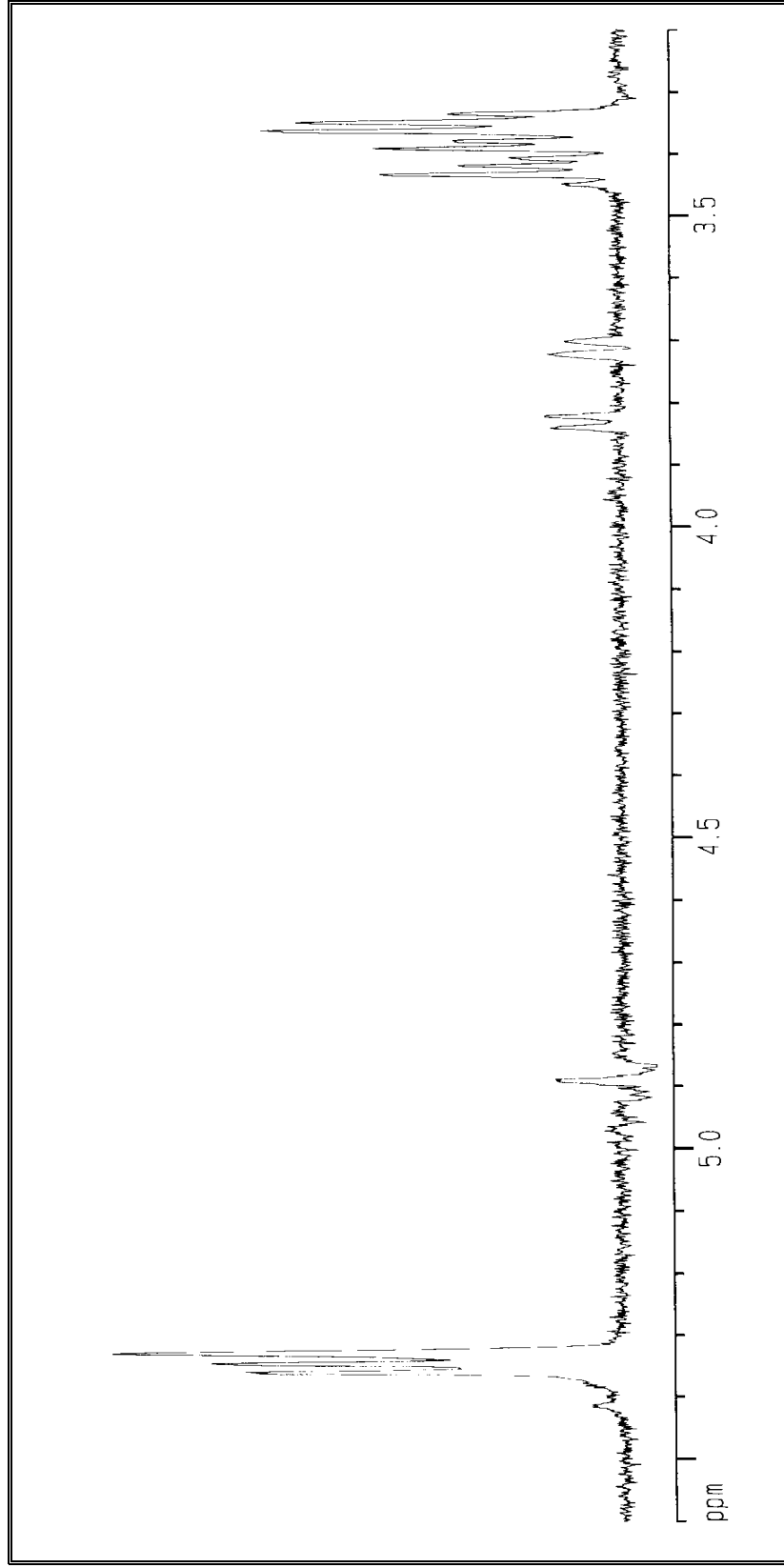


Figura 203. Espectro de TOCSY 1D da substância **25** ( $\beta$ -D-glicose<sup>m</sup>) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz).

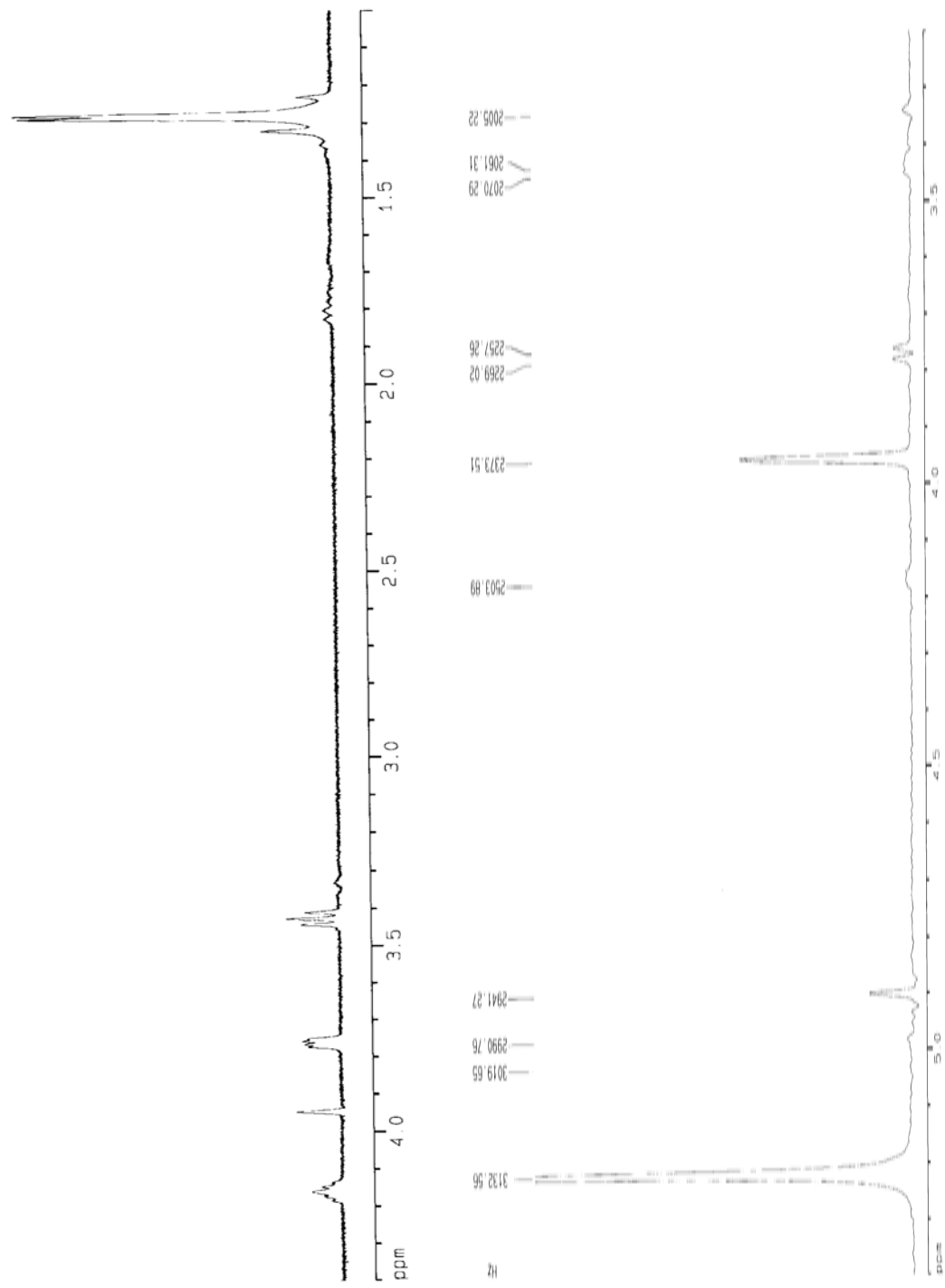


Figura 204. Espectros de TOCSY 1D da substância **25** ( $\alpha$ -L-ramnose") ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz).

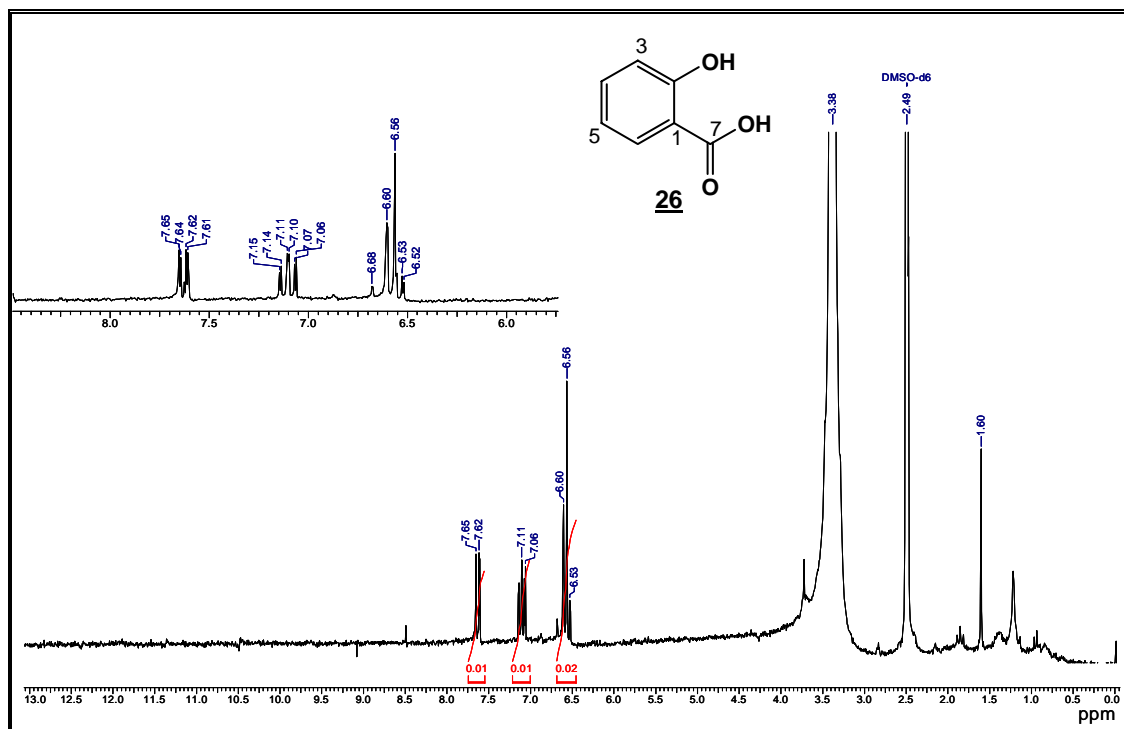


Figura 205. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **26** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 300 MHz).

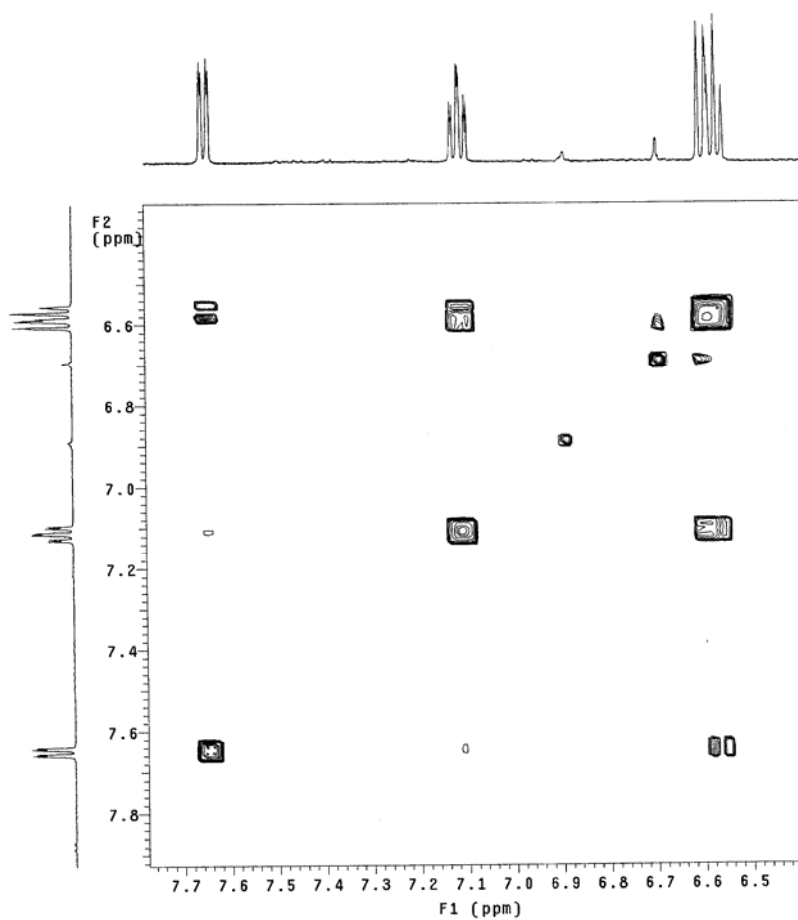


Figura 206. Espectro de COSY da substância **26** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz).

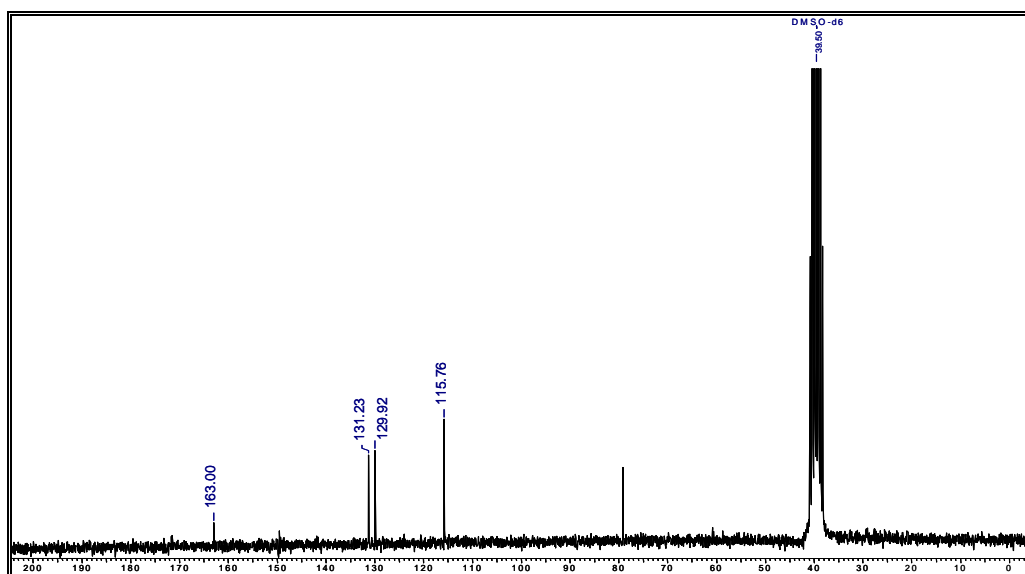


Figura 207. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **26** (DMSO- $d_6$ , 50 MHz).

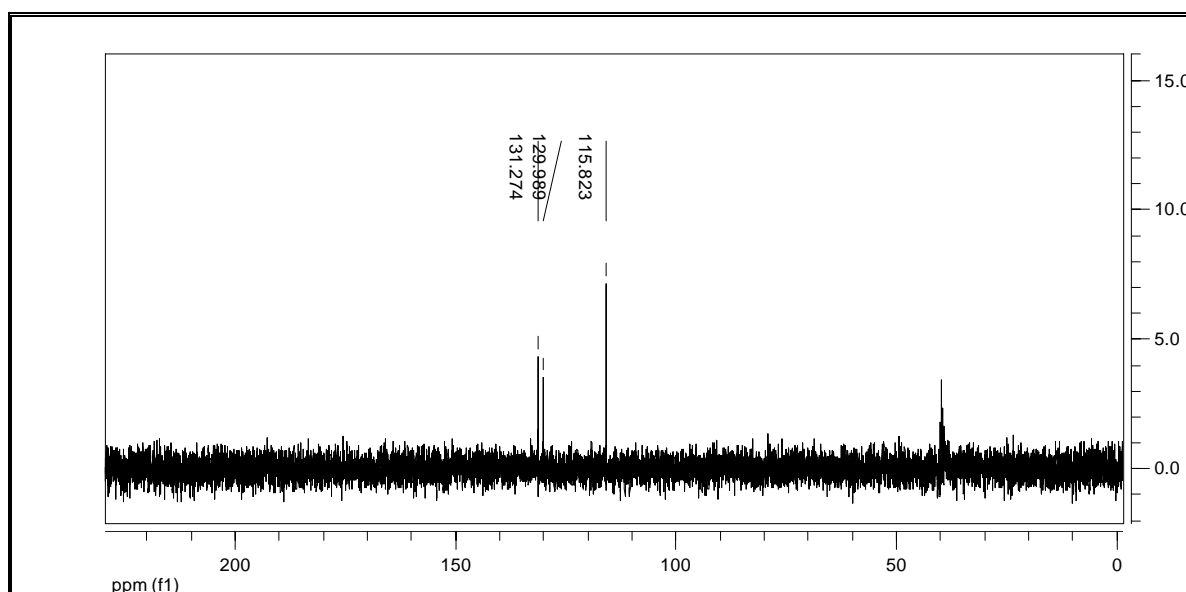


Figura 208. Espectro de DEPT 135° da substância **26** (DMSO- $d_6$ , 75 MHz).

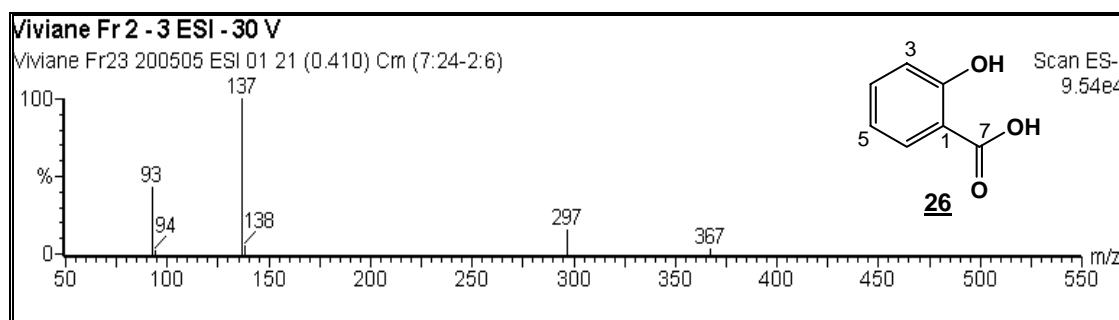


Figura 209. Espectro de massas da substância **26** (Electrospray, - 30 volts.)

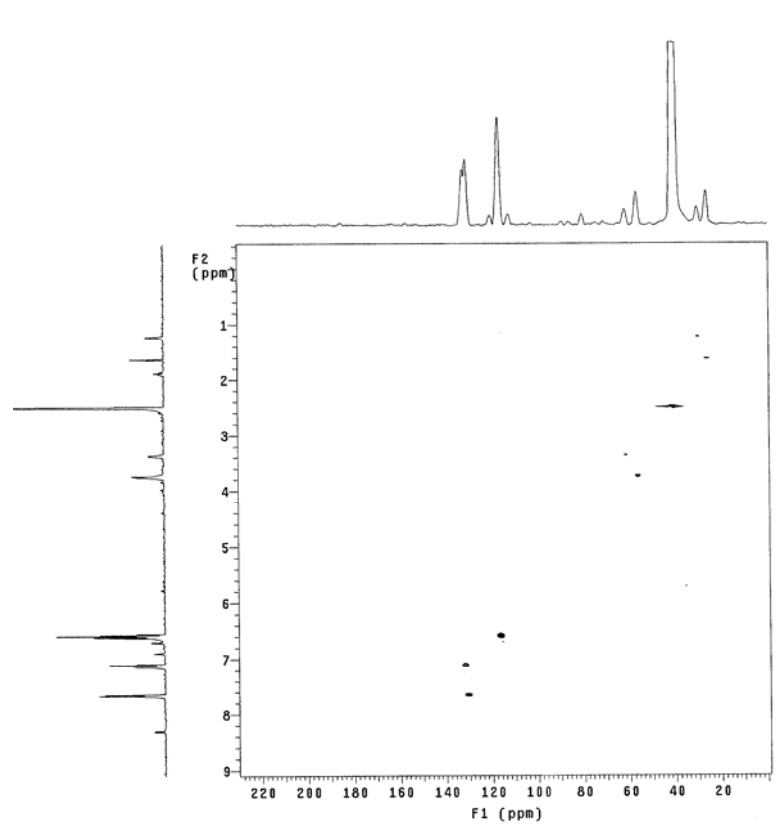


Figura 210. Mapa de correlação gHMBC da substância **26** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).

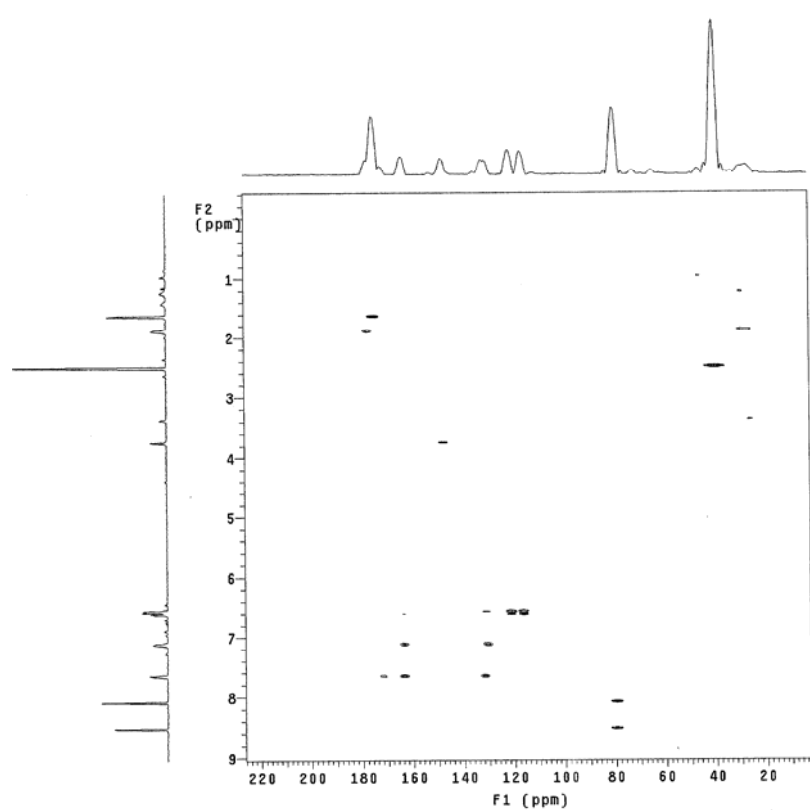


Figura 211. Mapa de correlação gHMBC da substância **26** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).

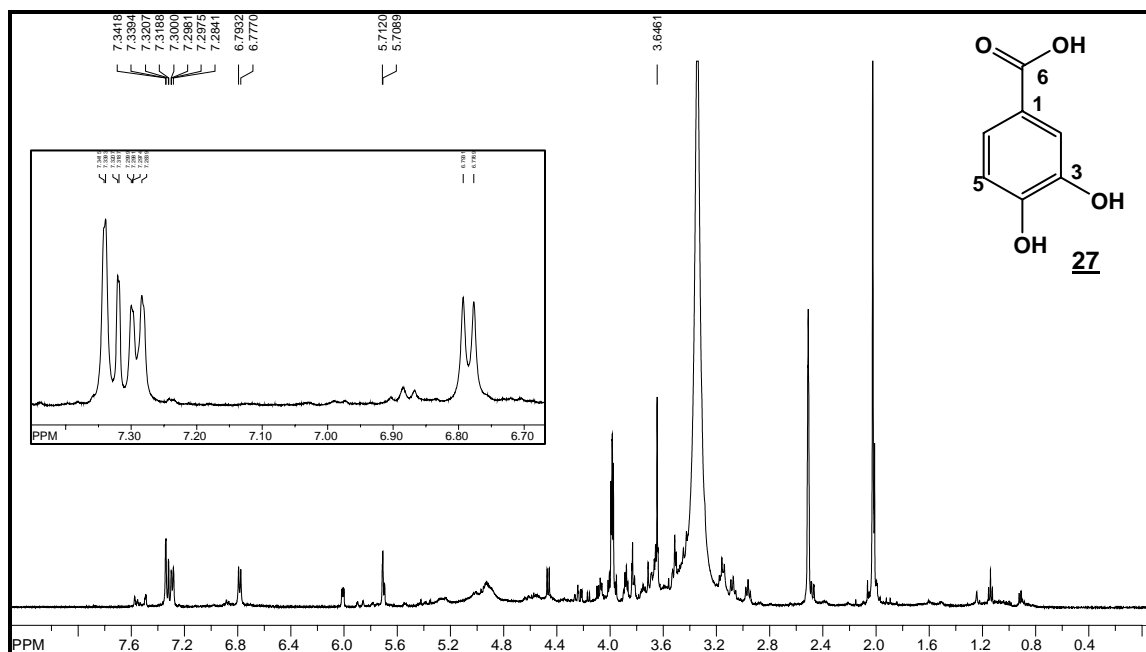


Figura 212. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **27** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz).

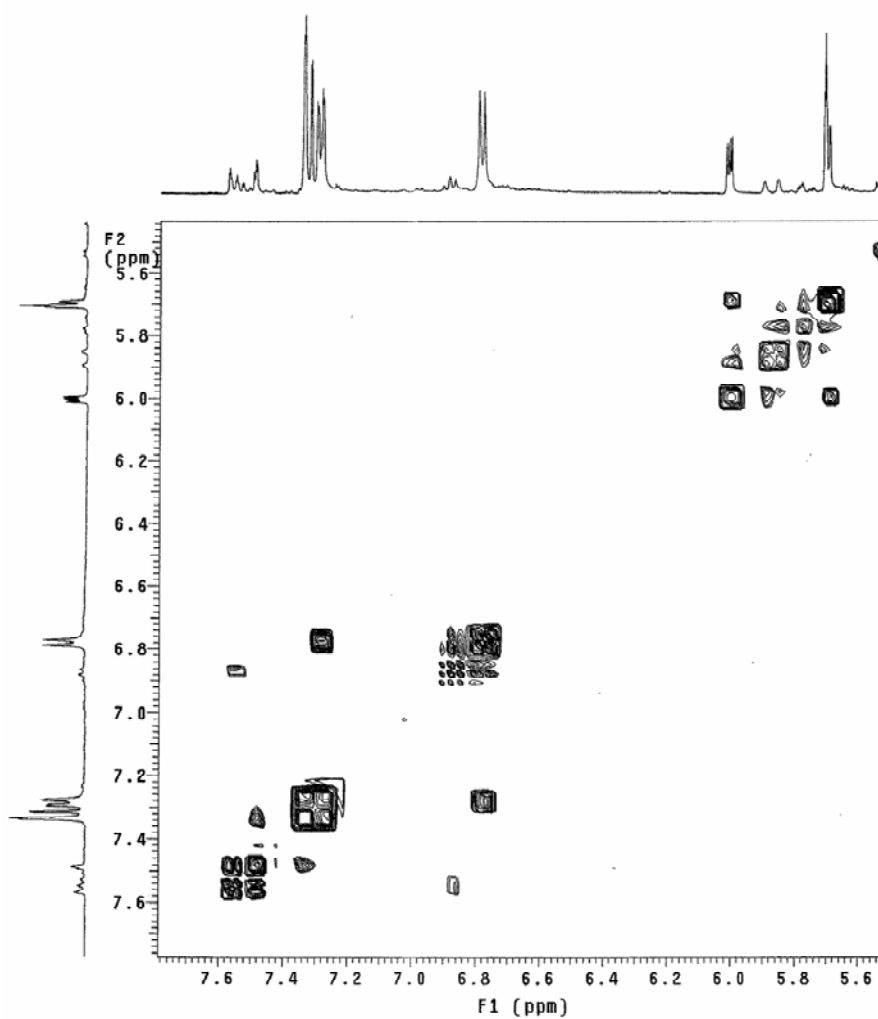


Figura 213. Espectro de gCOSY da substância **27** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz)

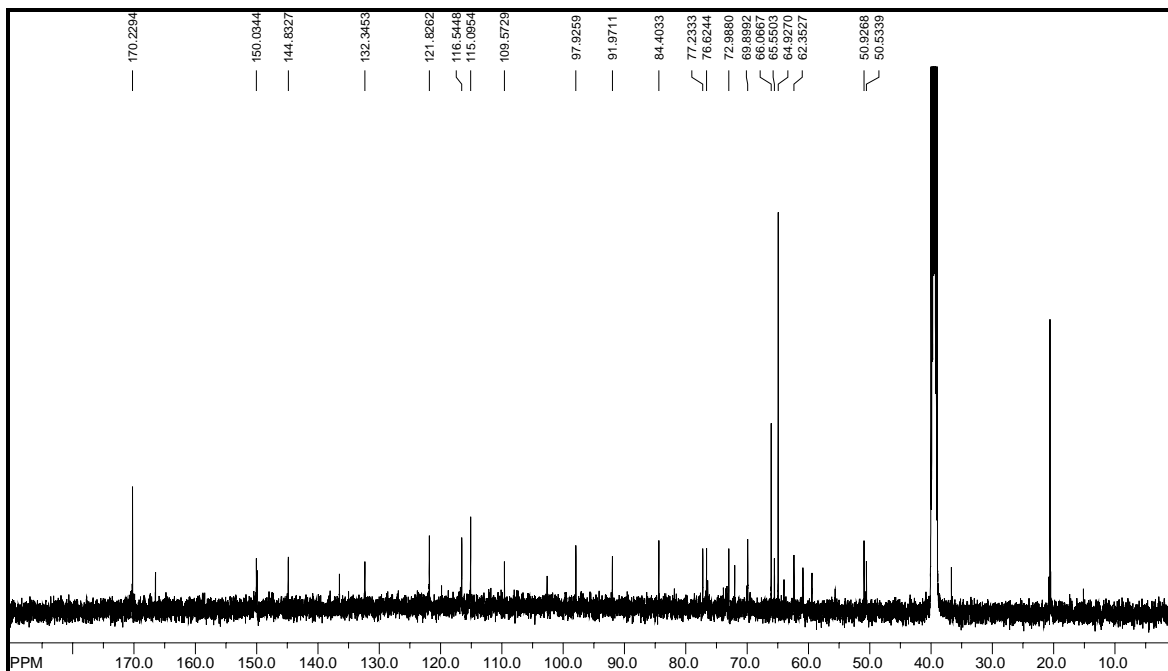


Figura 214. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **27** (DMSO- $d_6$ , 125 MHz).

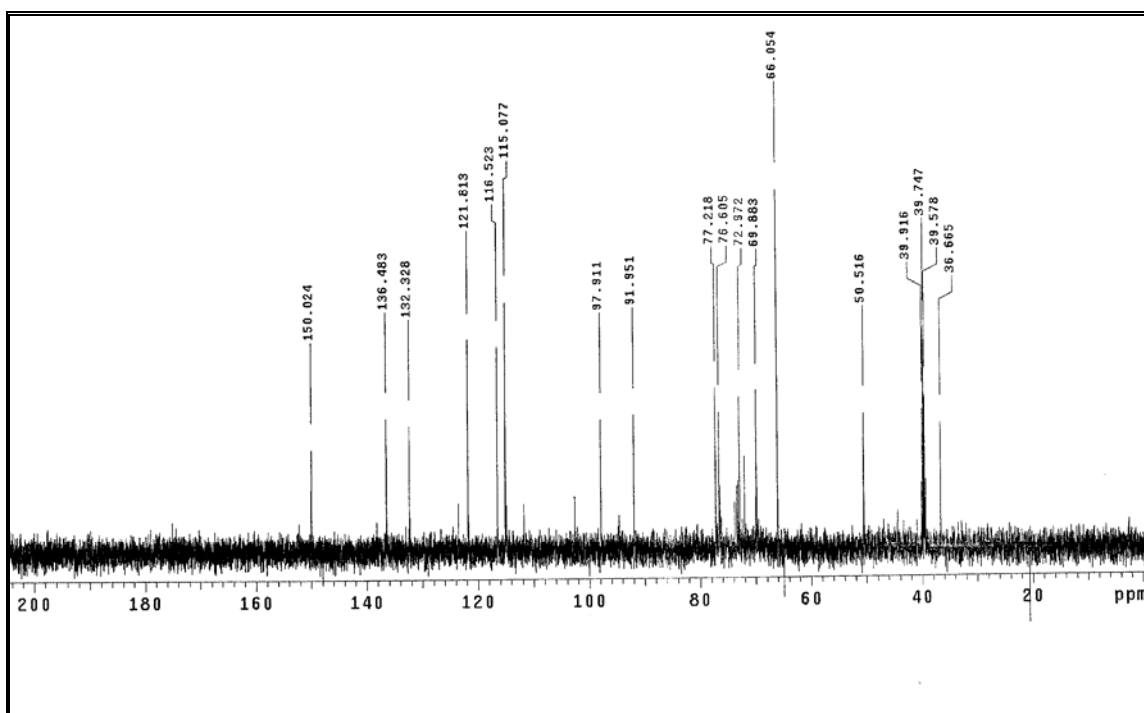


Figura 215. Espectro de DEPT 135° da substância **27** (DMSO- $d_6$ , 125 MHz)



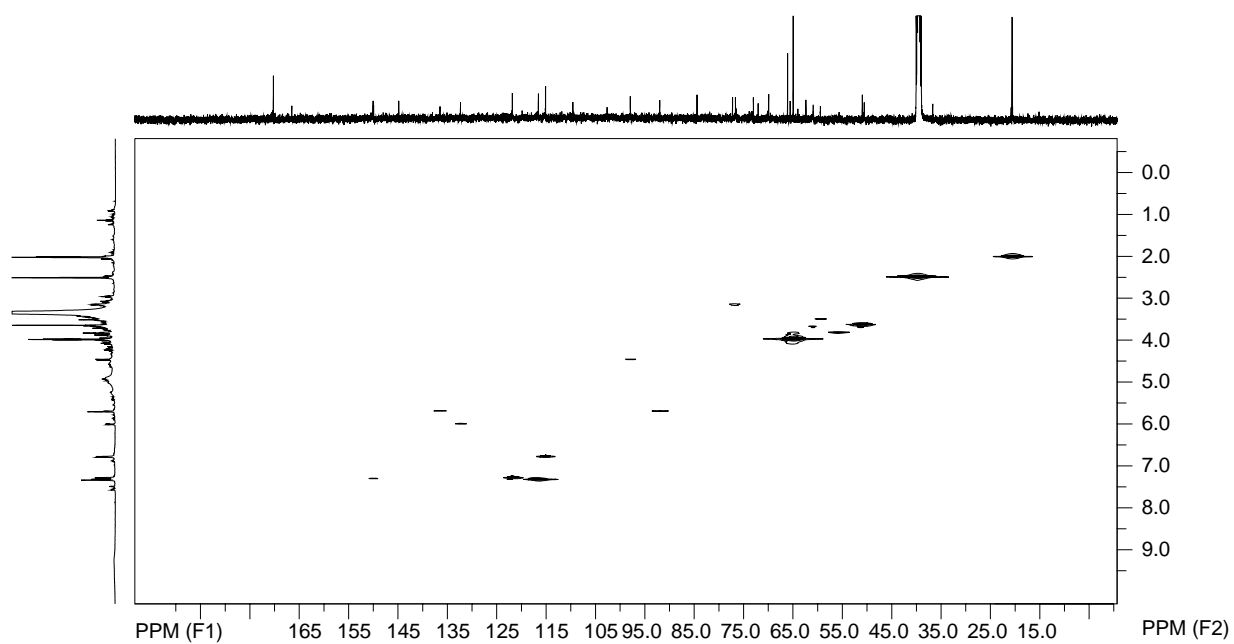


Figura 216. Mapa de correlação gHMQC da substância **27** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).

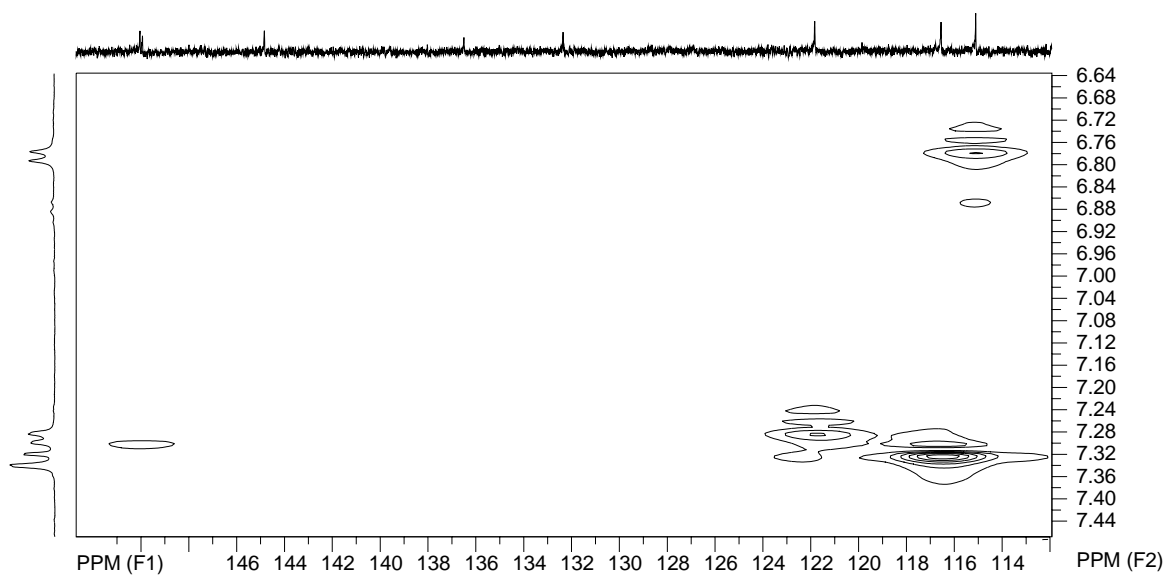


Figura 217 Ampliação do mapa de correlação gHMQC da substância **27** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz)

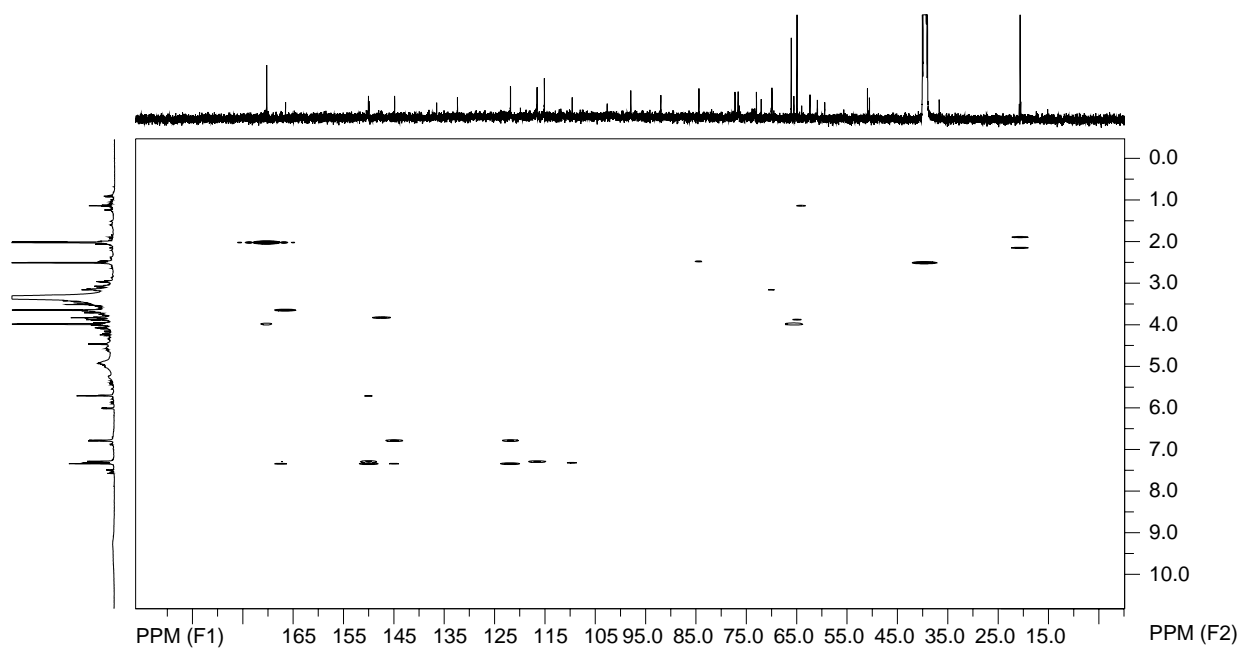


Figura 218. Mapa de correlação gHMBC da substância **27** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).

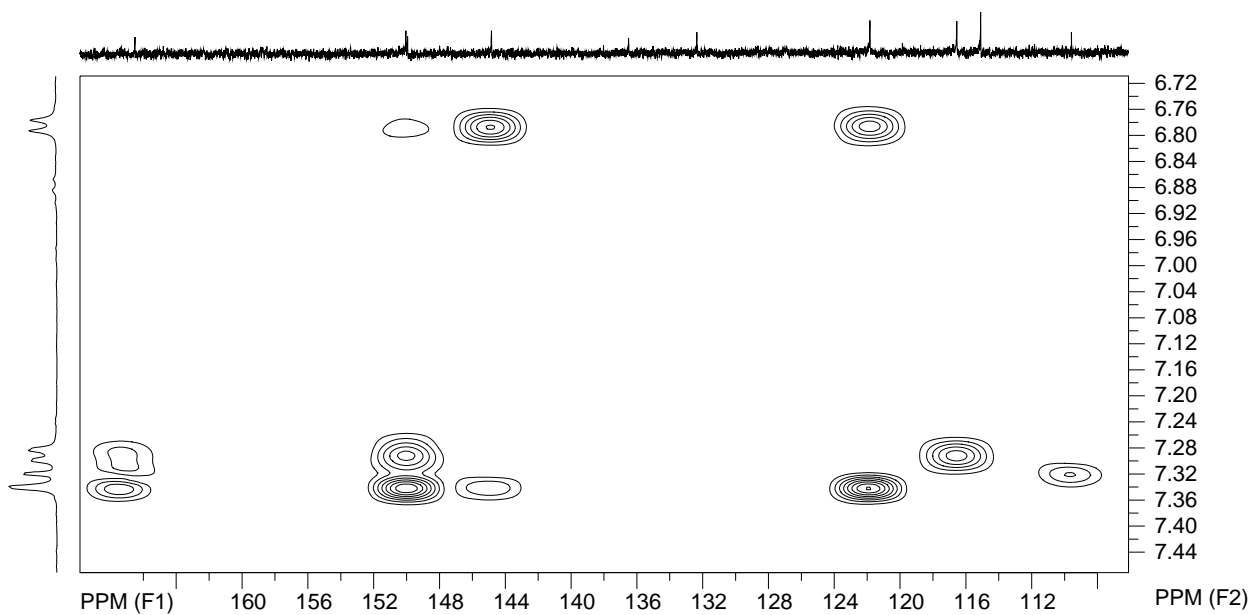


Figura 219. Ampliação do mapa de correlação gHMBC da substância **27** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).

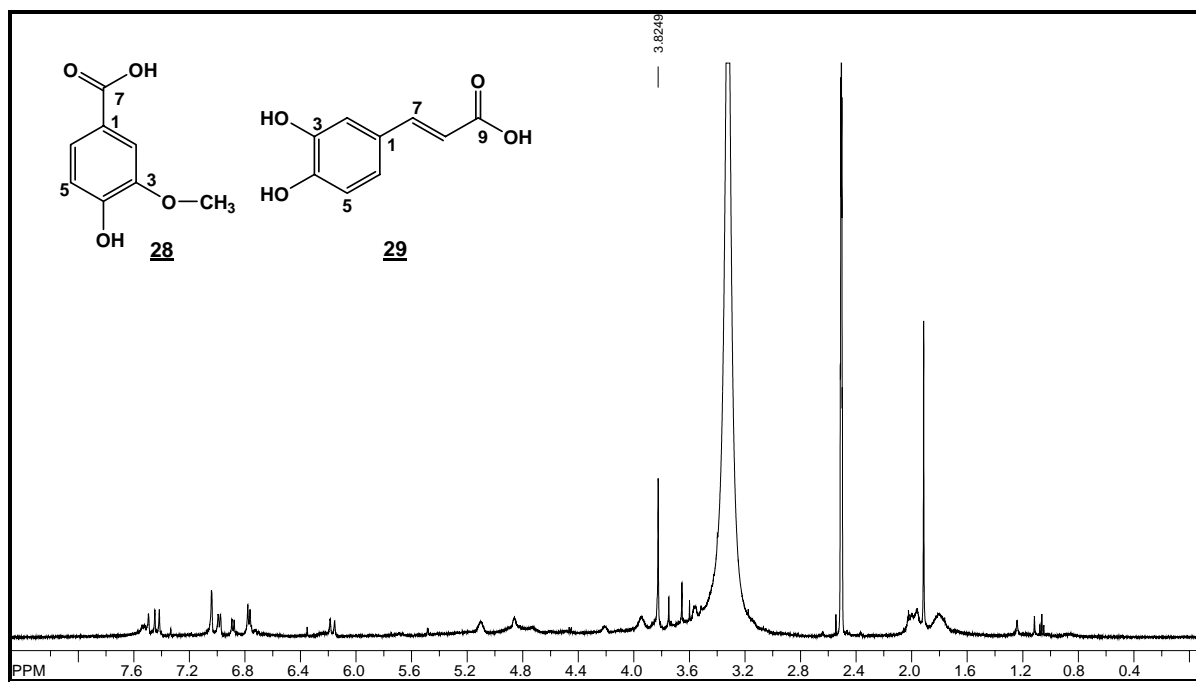


Figura 220. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **28** e **29** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz).

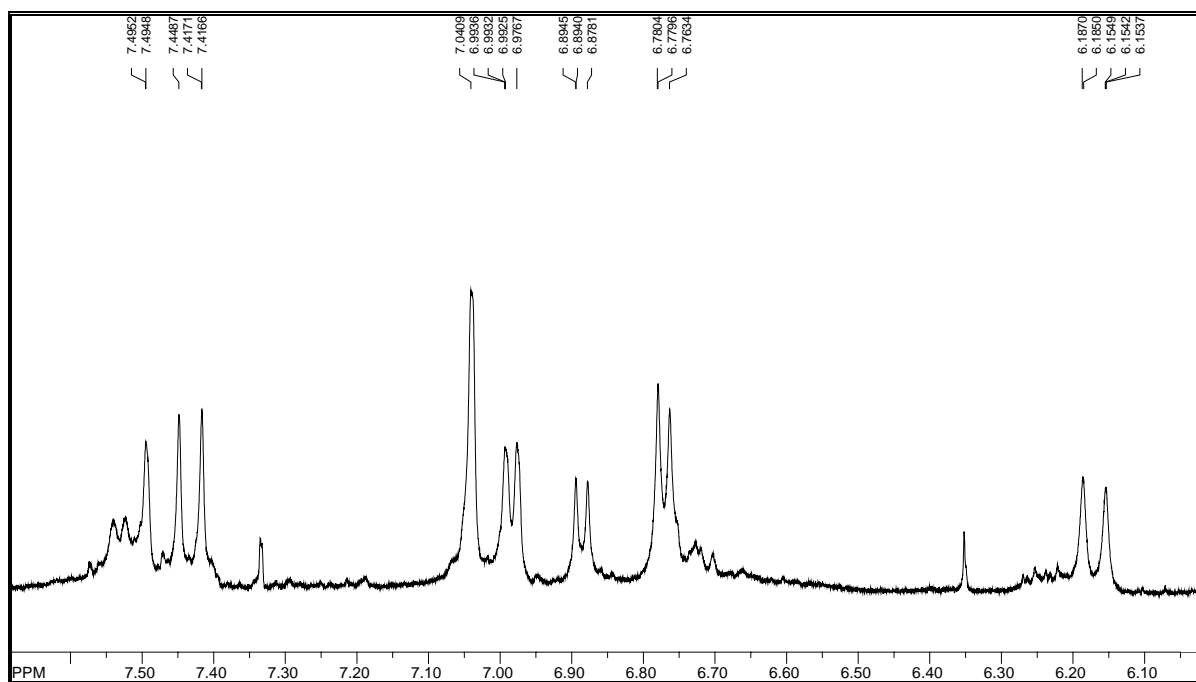


Figura 221. Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **28** e **29** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz).

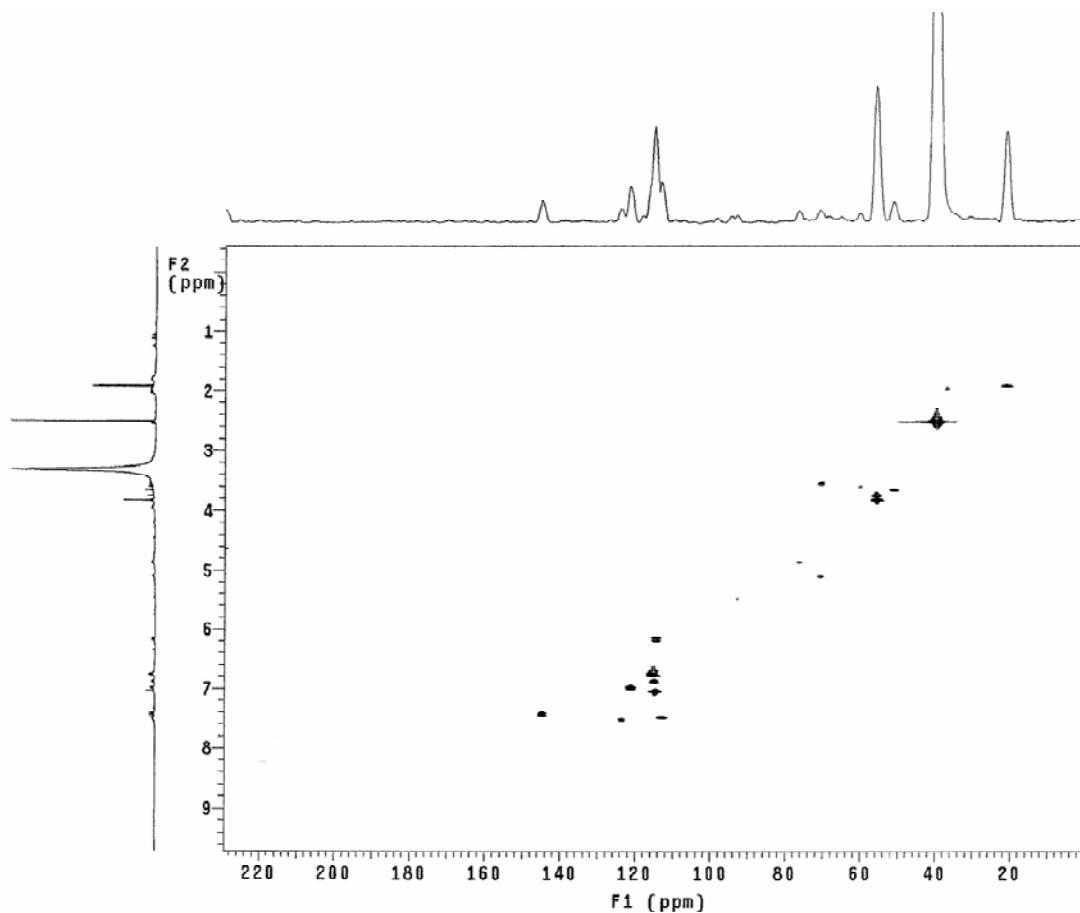


Figura 222. Mapa de correlação gHMBC das substâncias **28** e **29** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).

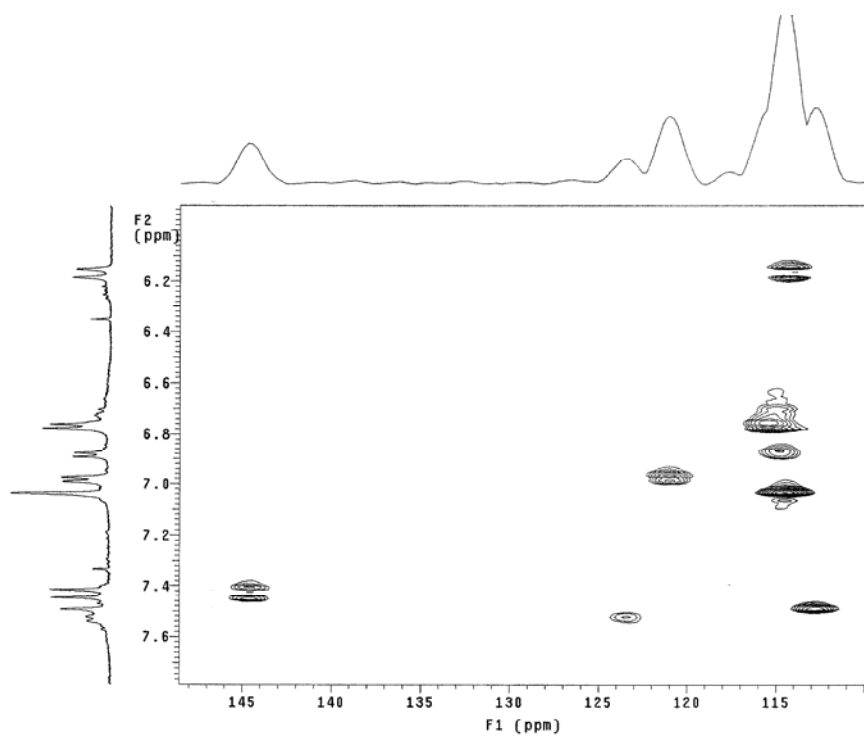


Figura 223. Ampliação do mapa de correlação gHMBC das substâncias **28** e **29** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).

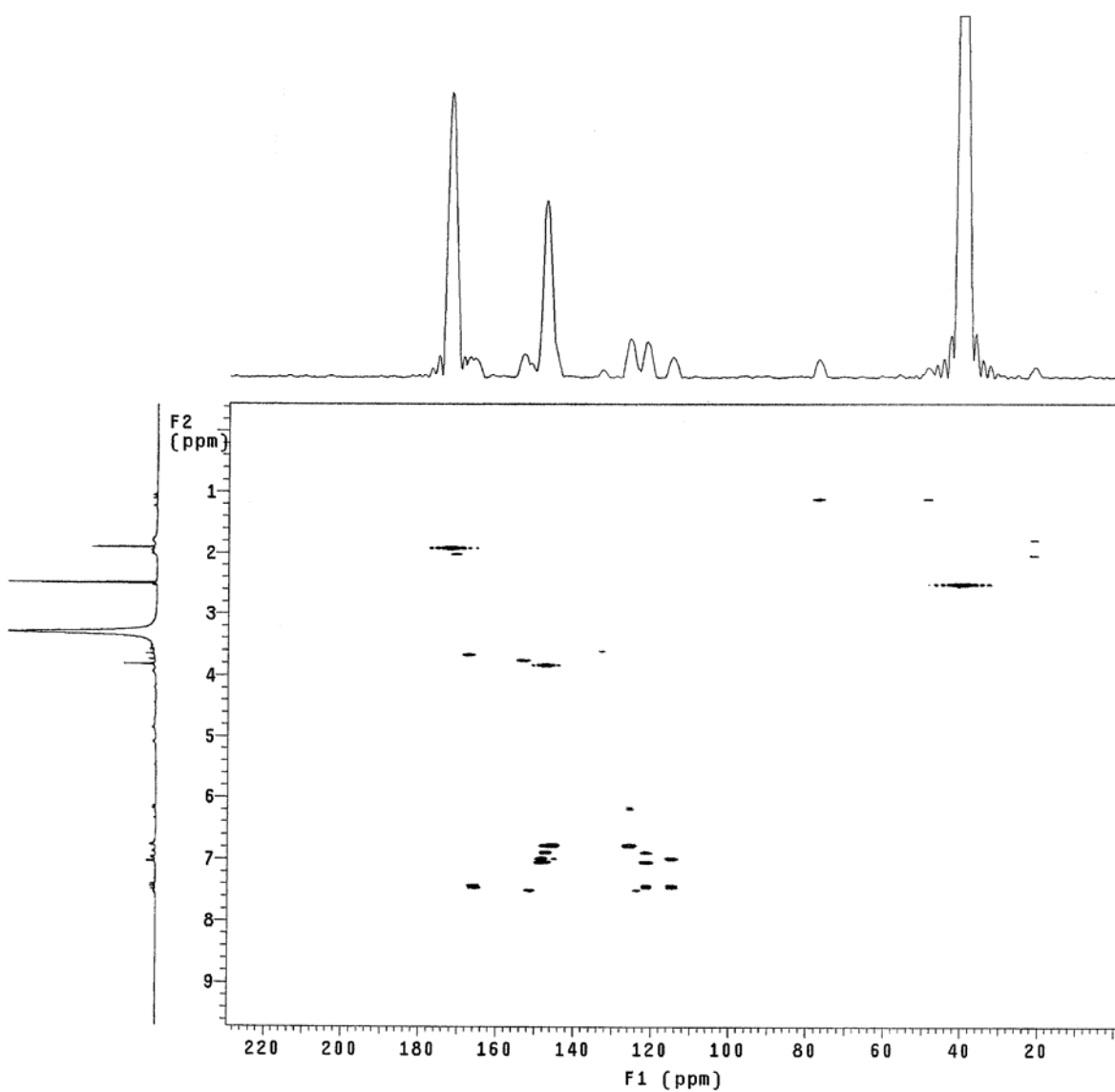
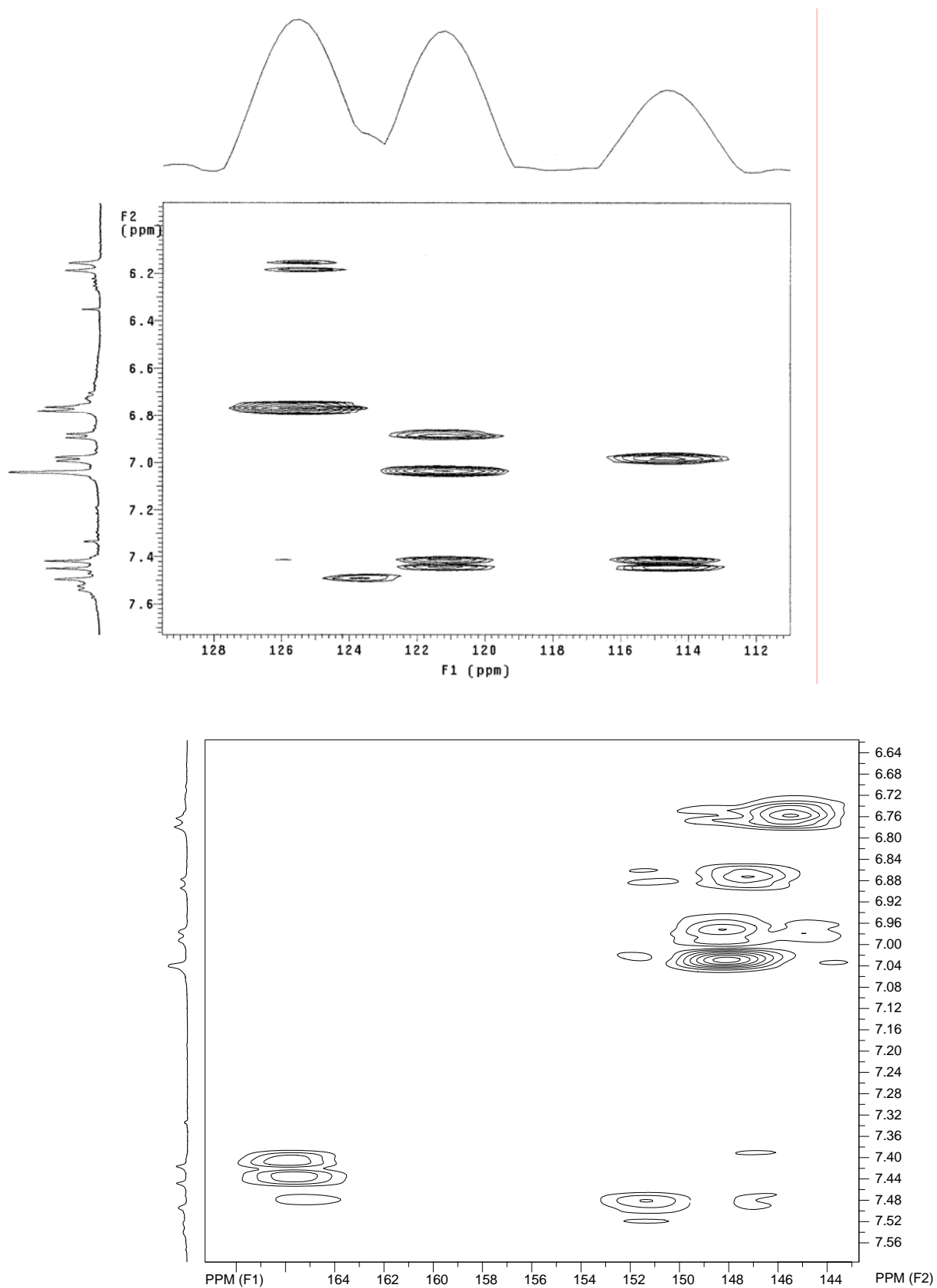


Figura 224. Mapa de correlação gHMBC das substâncias **28** e **29** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).



**Figura 225.** Ampliações do mapa de correlação gHMBC das substâncias **28** e **29** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).

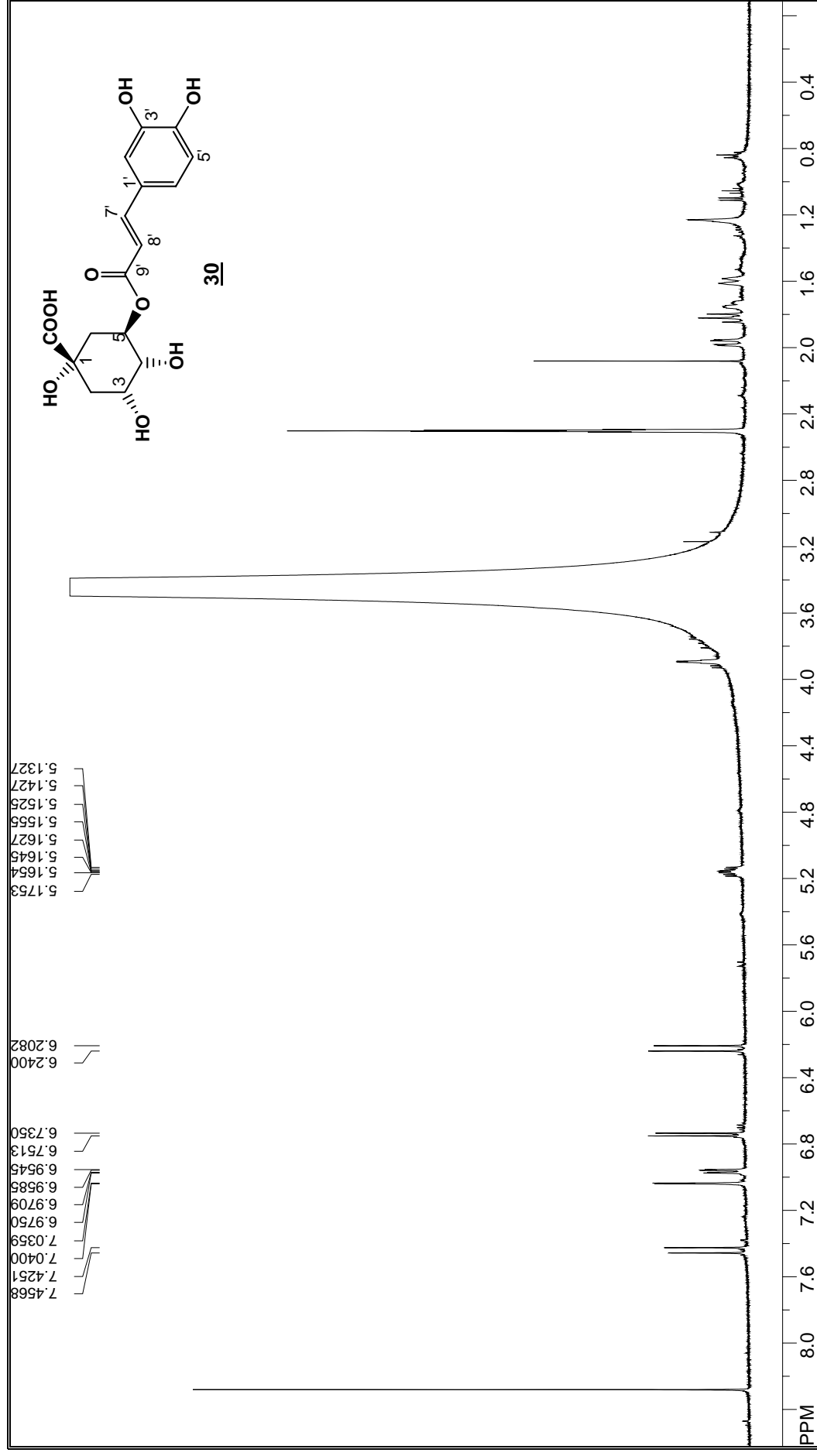


Figura 226. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **30** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).

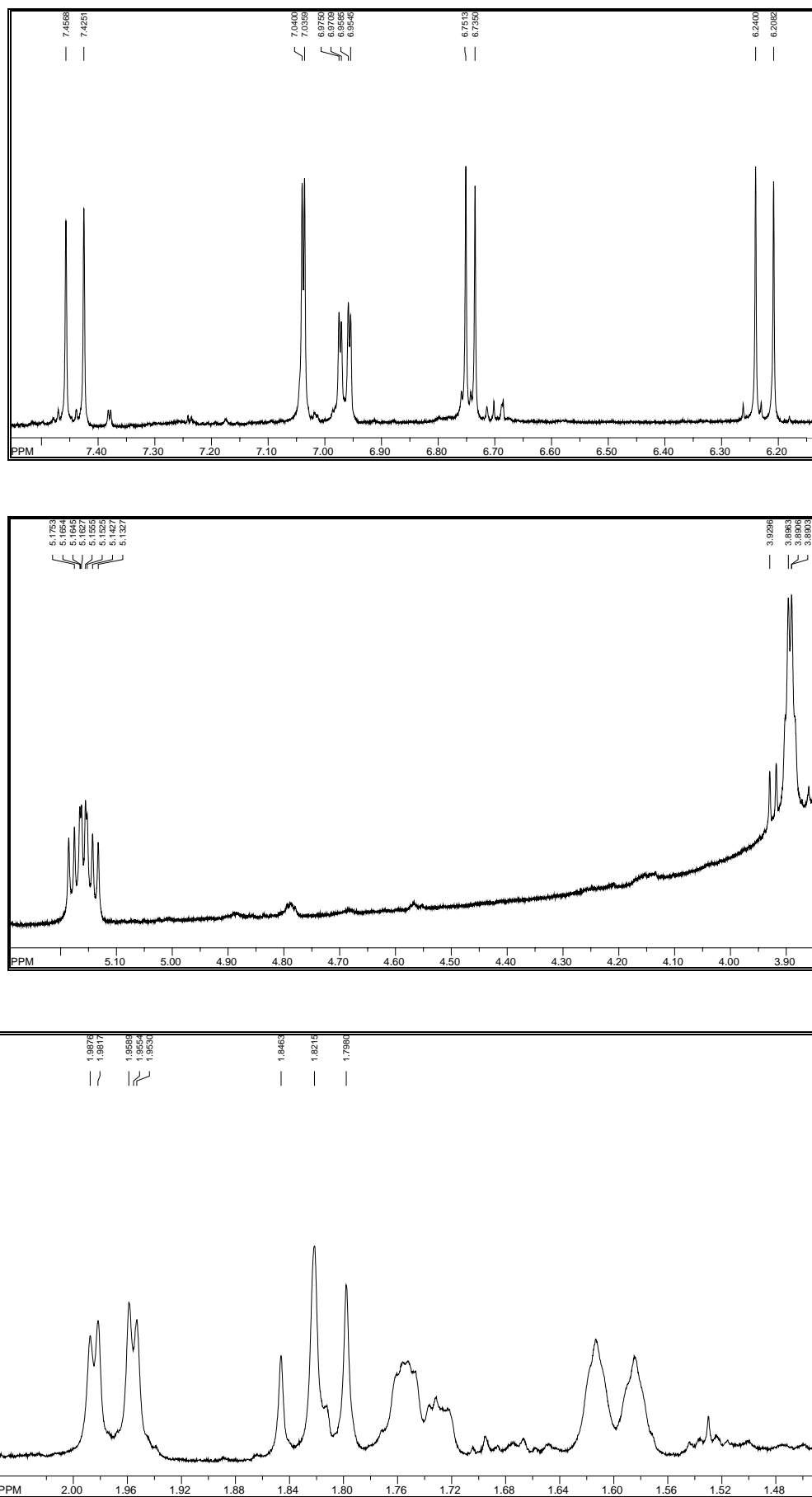


Figura 227. Ampliações do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **30** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz).



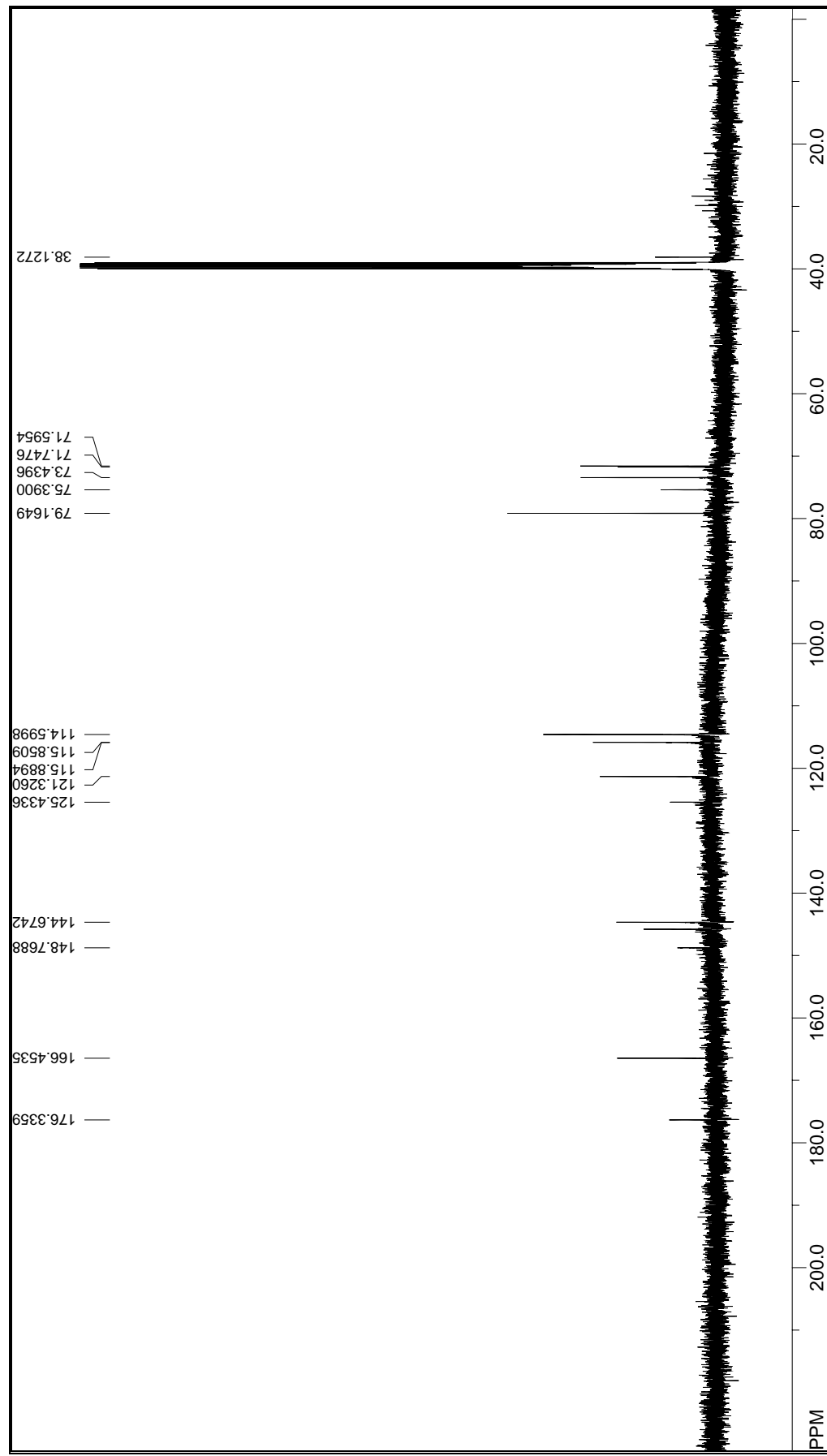


Figura 228. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **30** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 125 MHz).

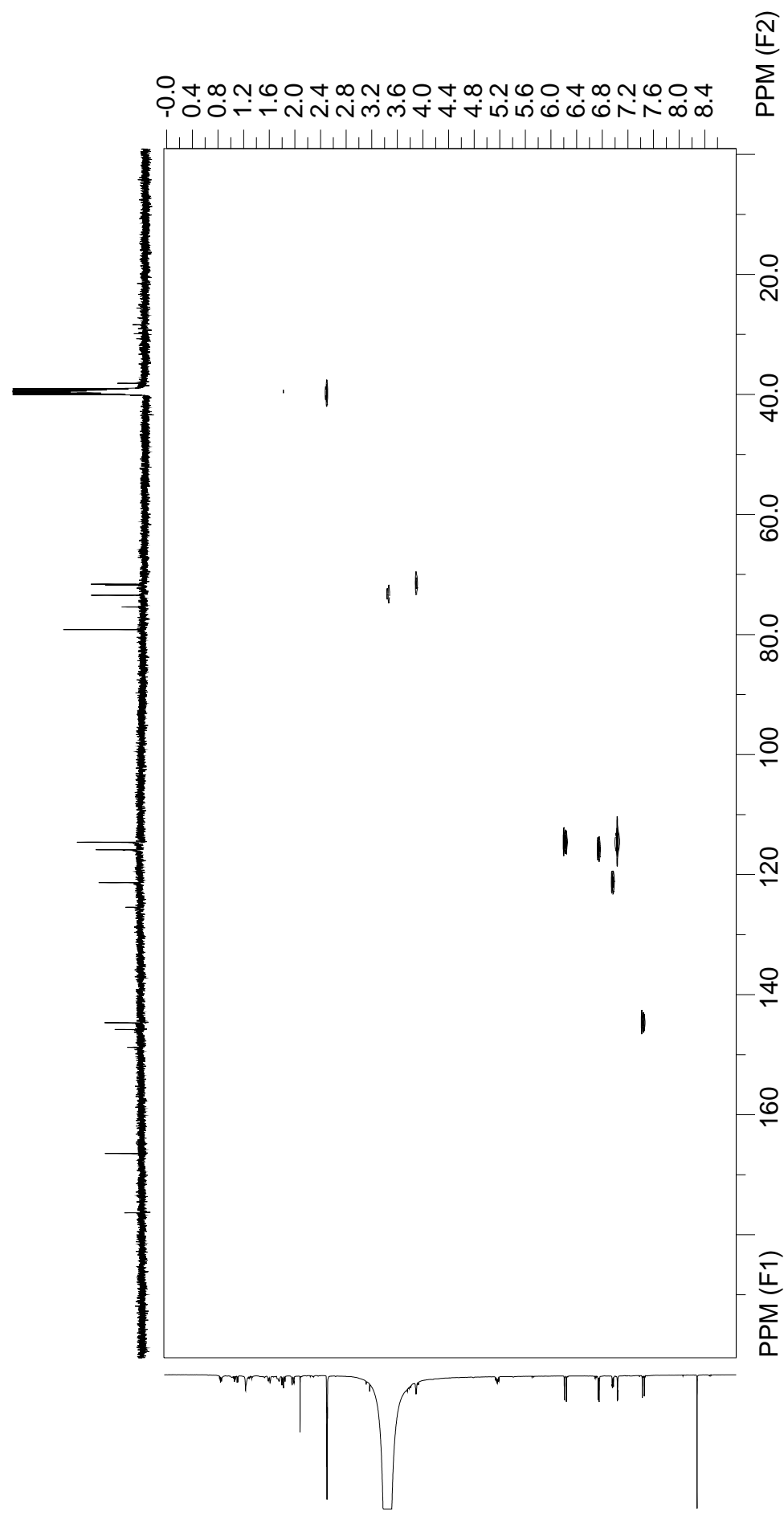
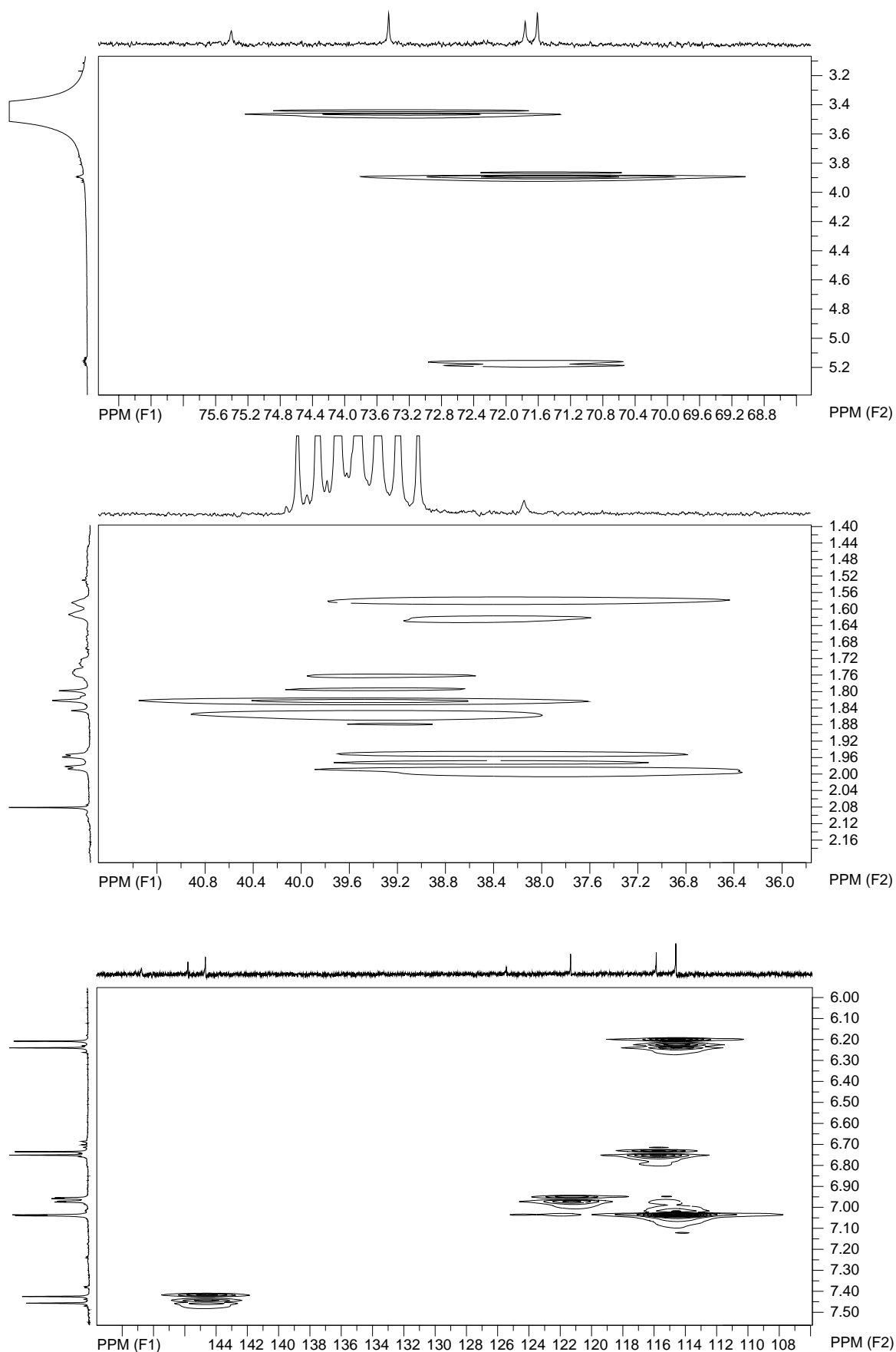


Figura 229. Mapa de correlação gHMBC da substância **30** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figura 230.** Ampliações do mapa de correlação gHMQC da substância **30** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).

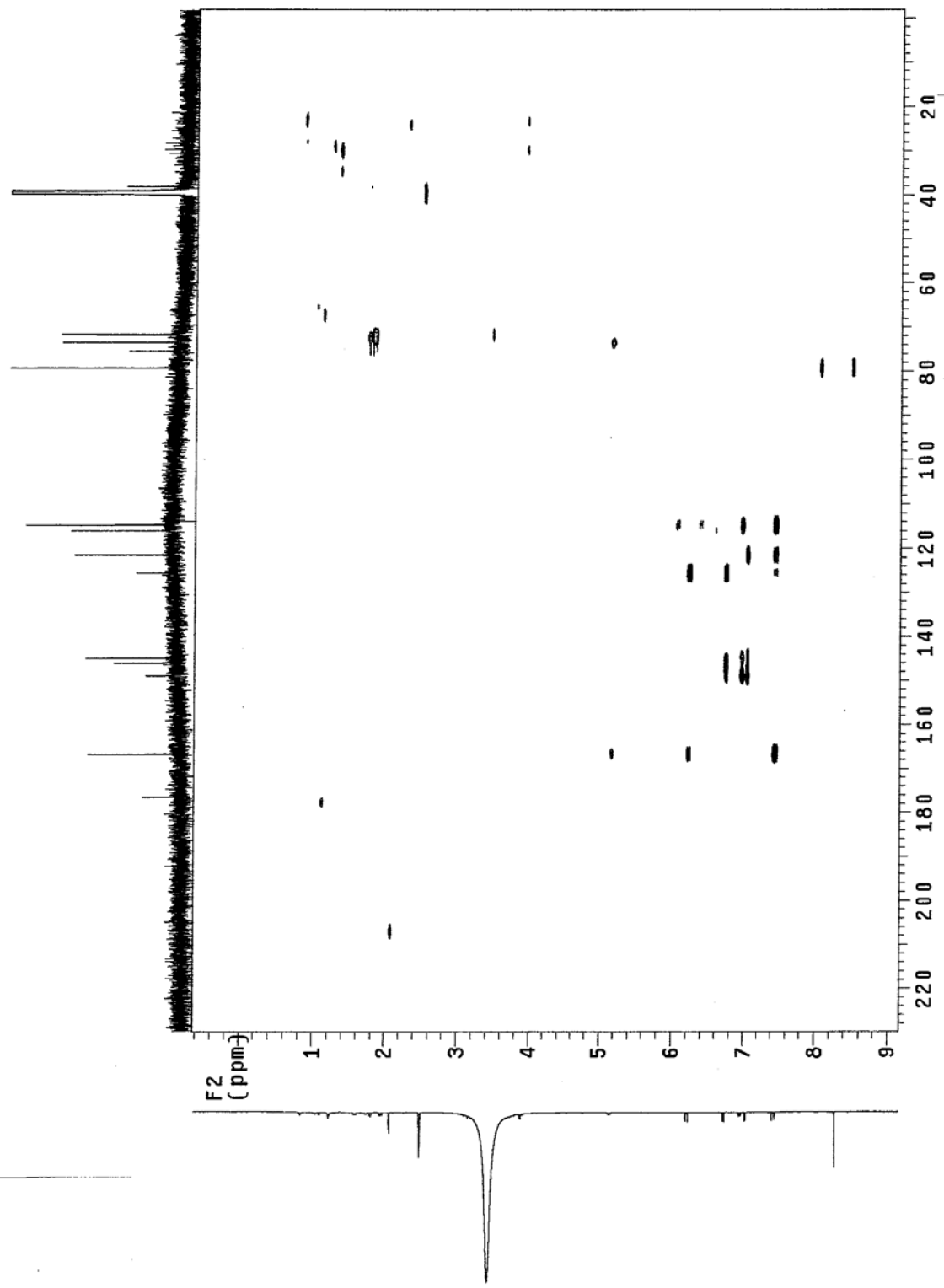


Figura 231. Mapa de correlação gHMBC da substância **30** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).

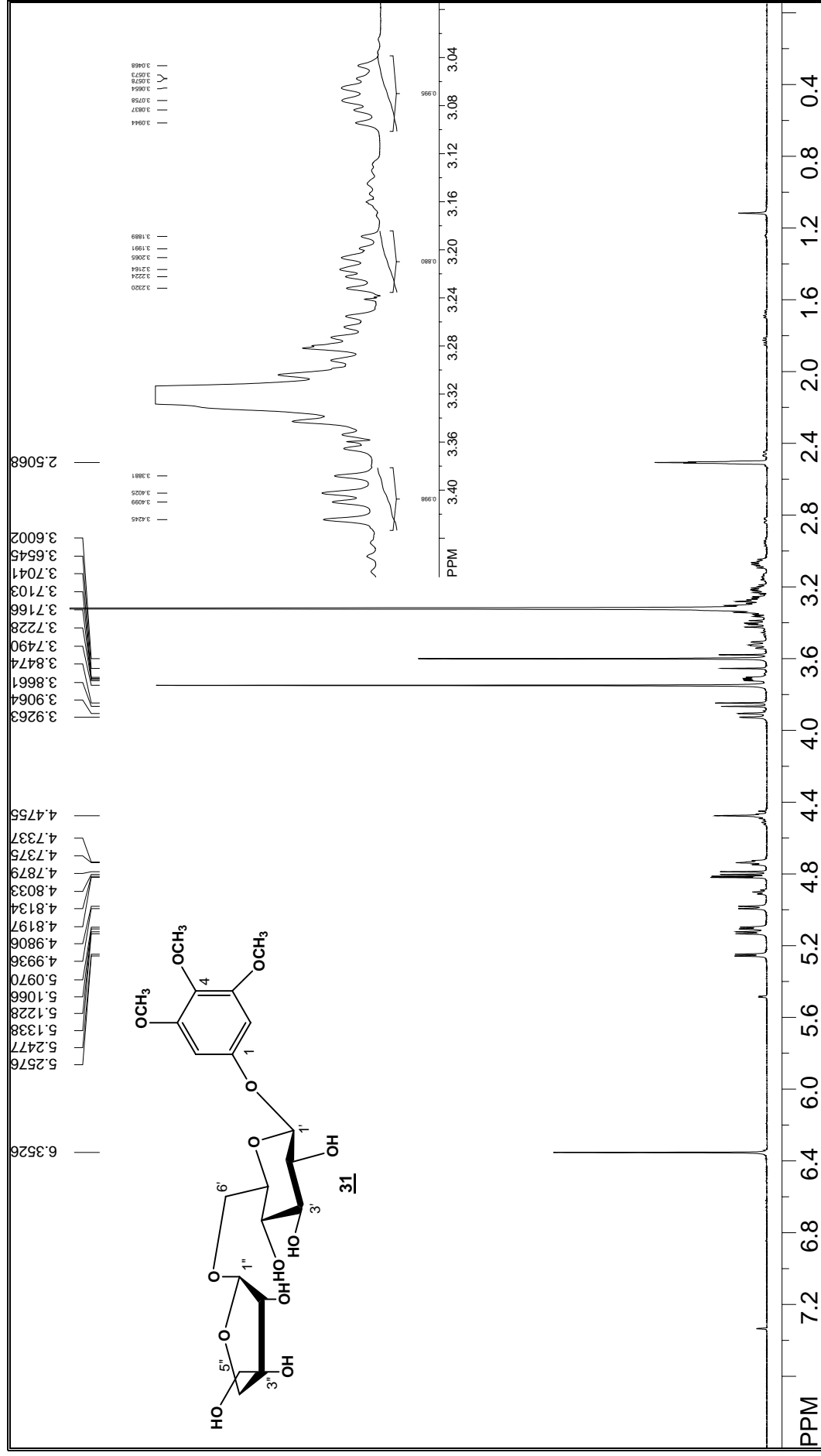


Figura 232. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **31** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

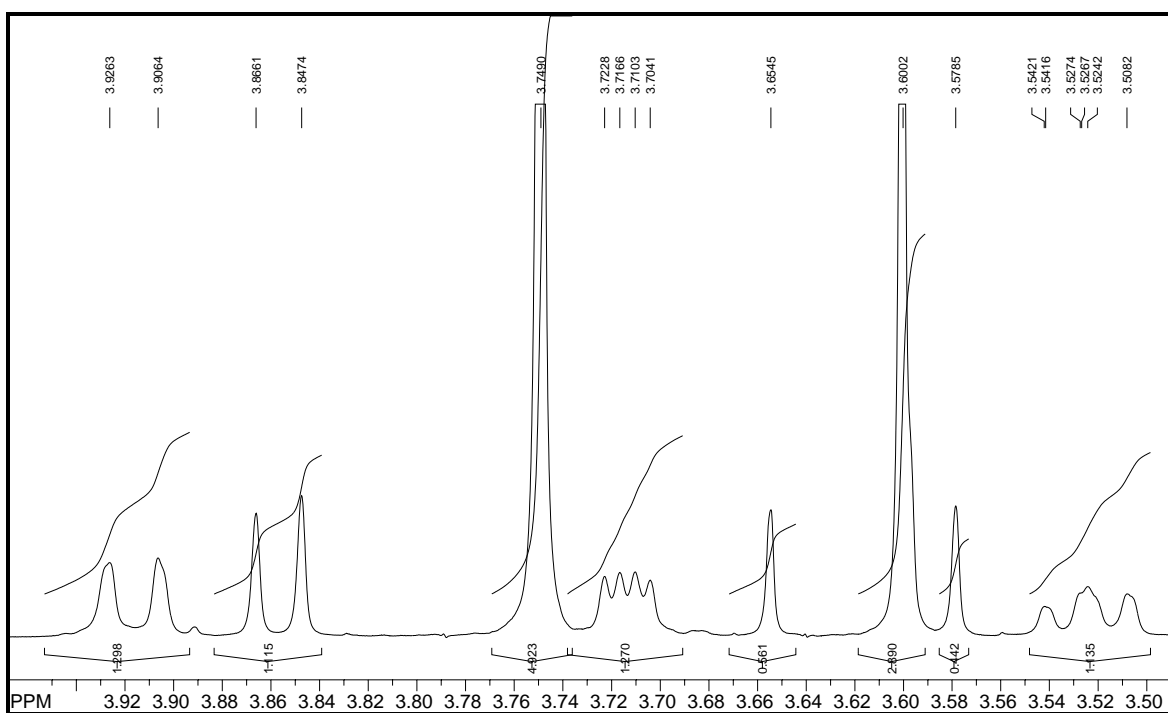
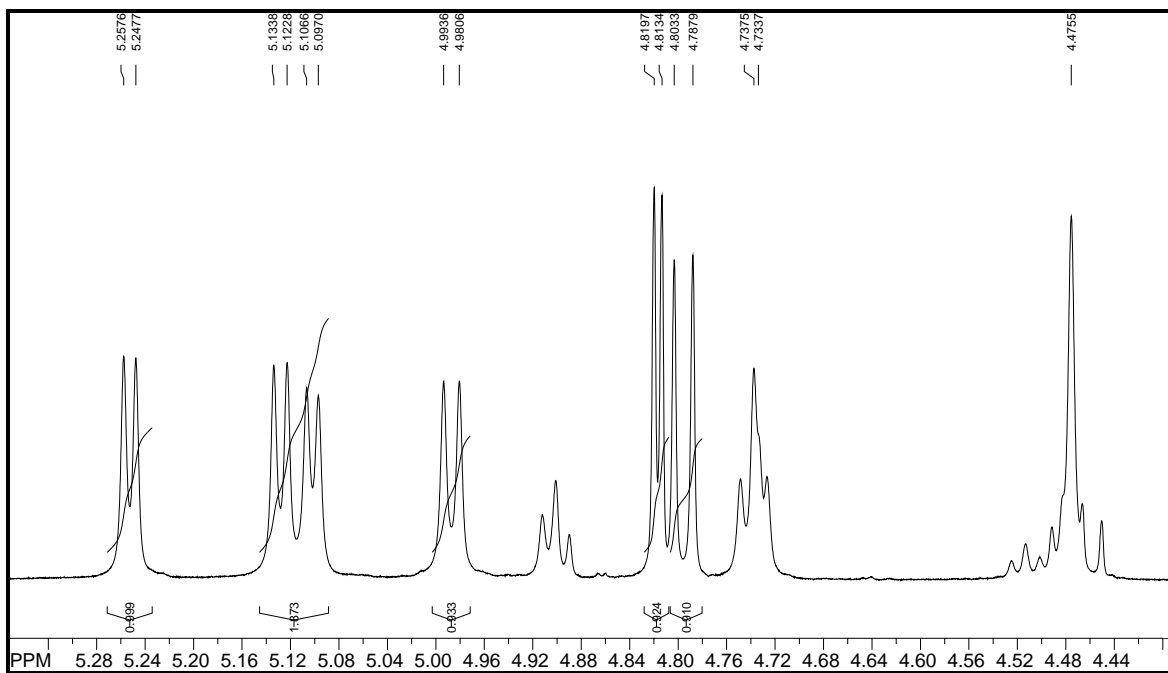


Figura 233. Ampliações do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **31** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

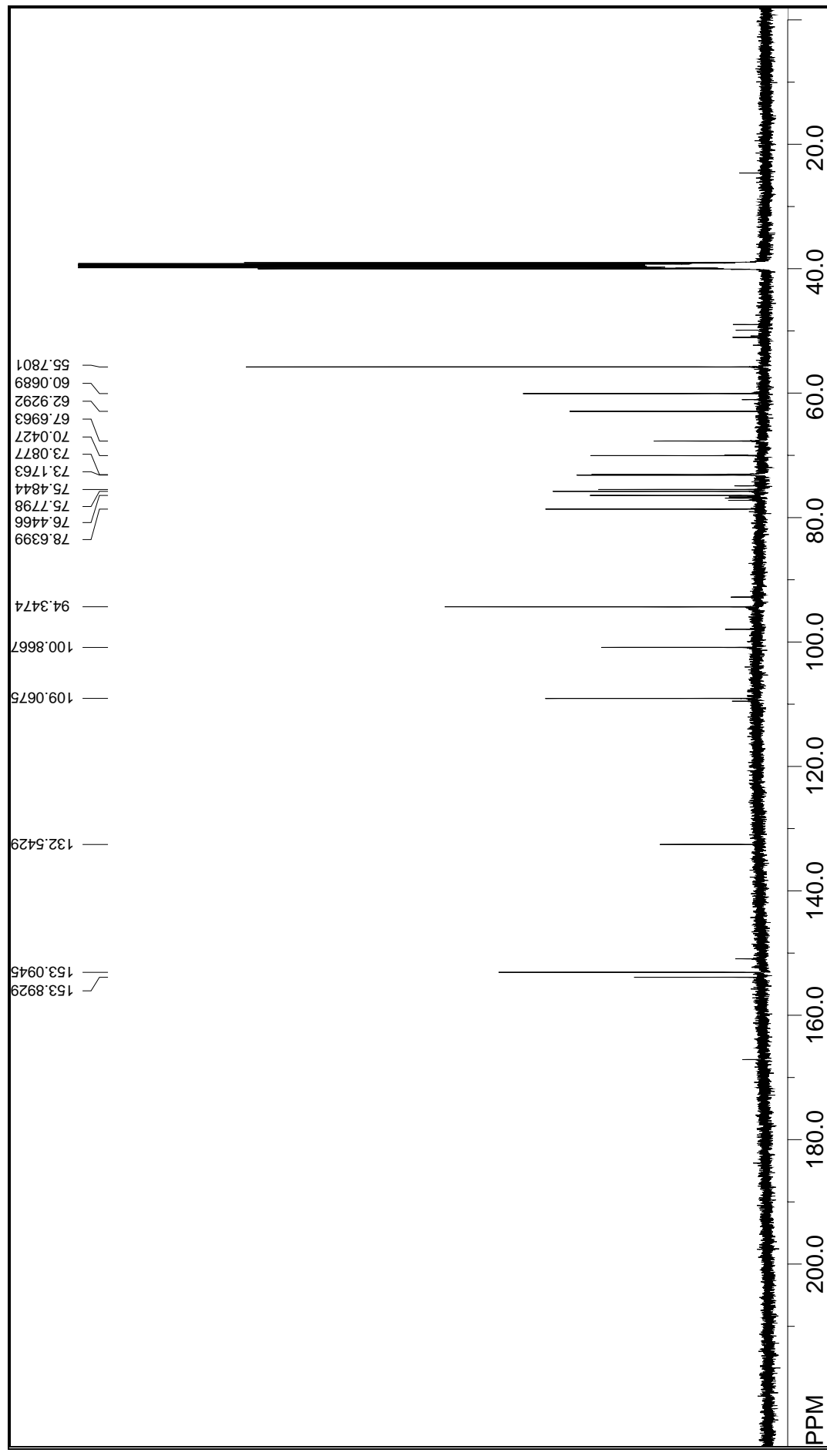


Figura 234. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **31** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 125 MHz).

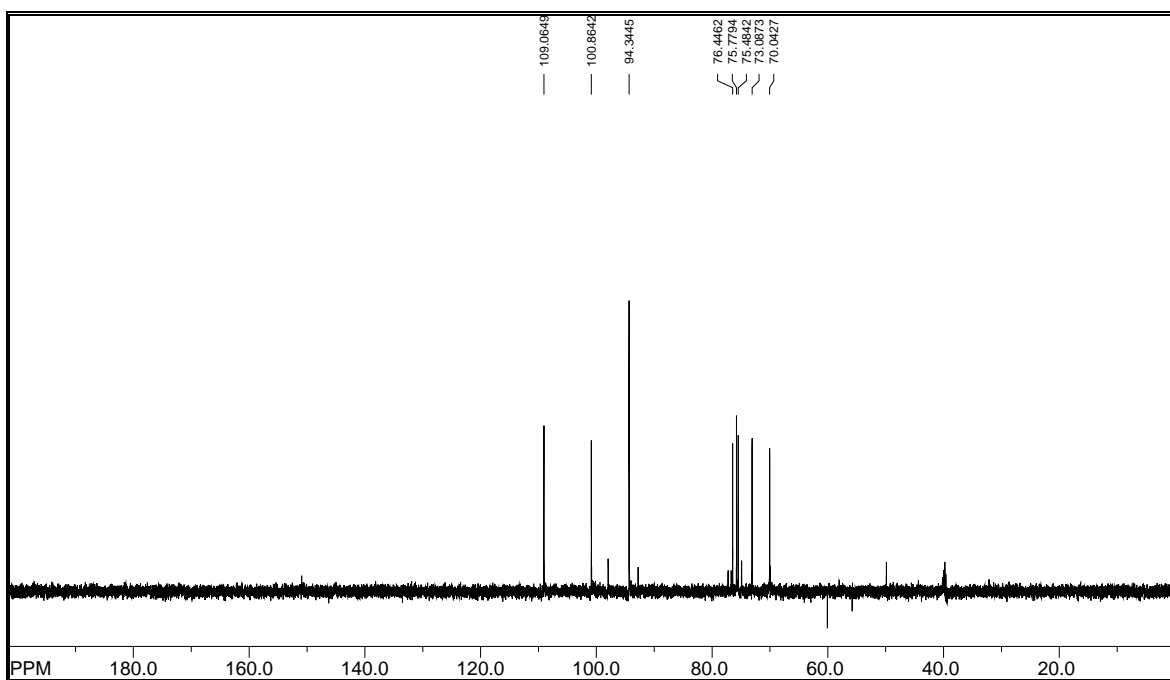


Figura 235 Espectro de DEPT 90° da substância **31** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz).

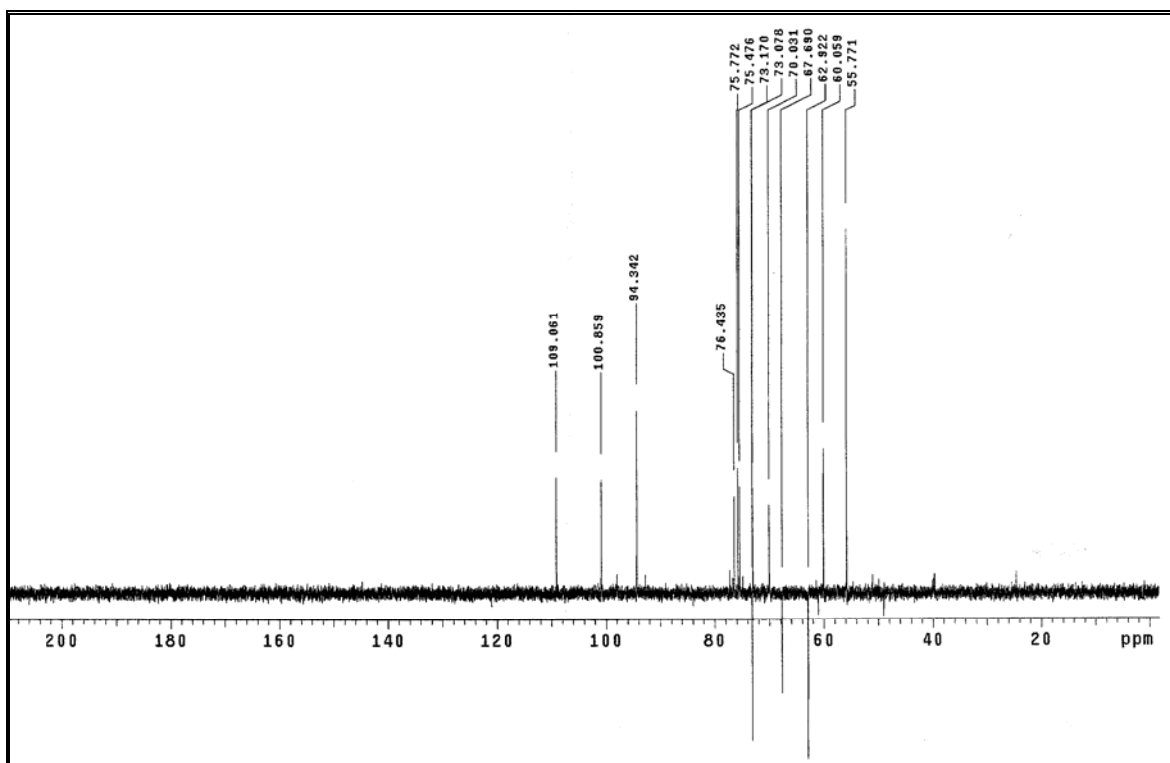


Figura 236. Espectro de DEPT 135° da substância **31** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz).



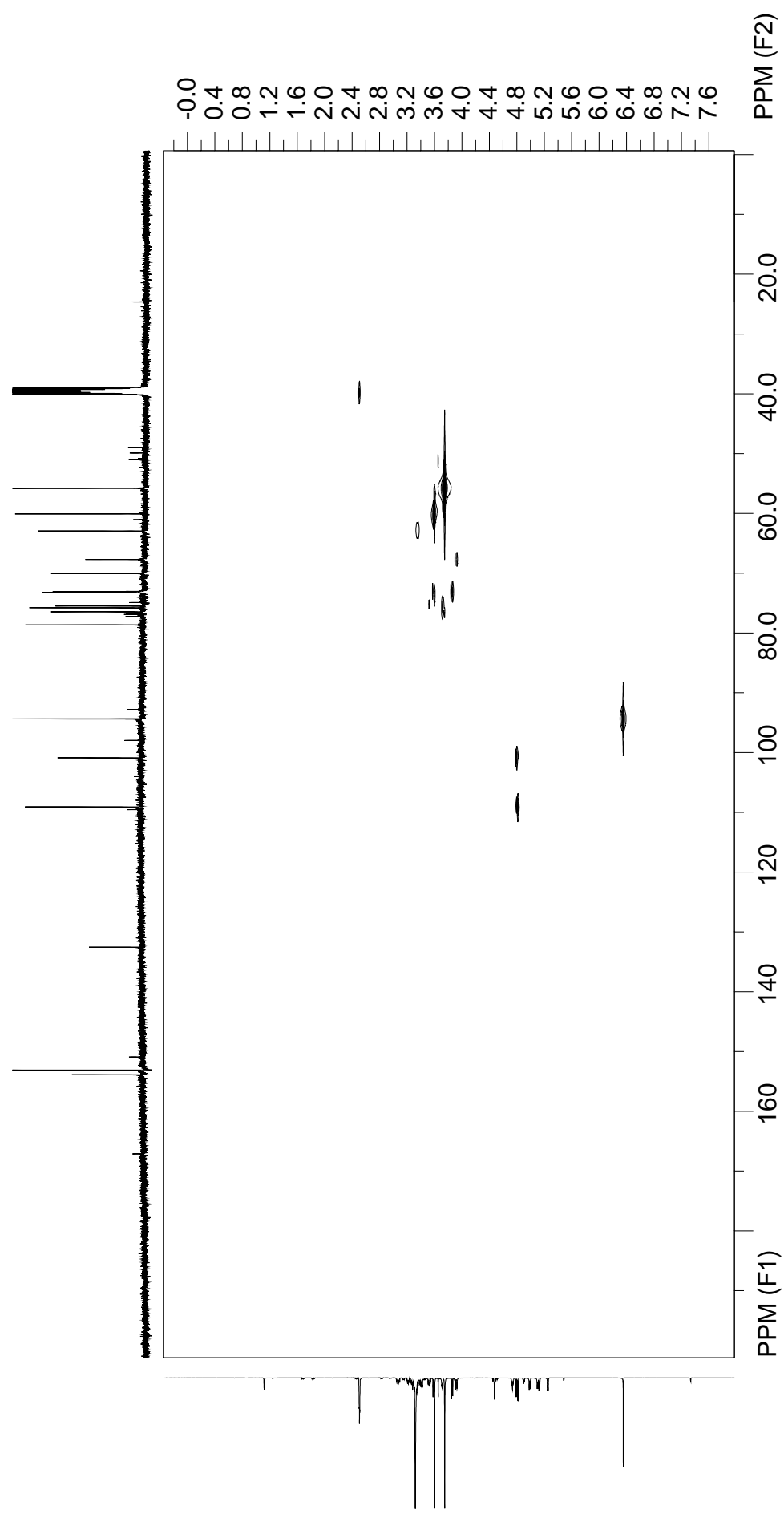
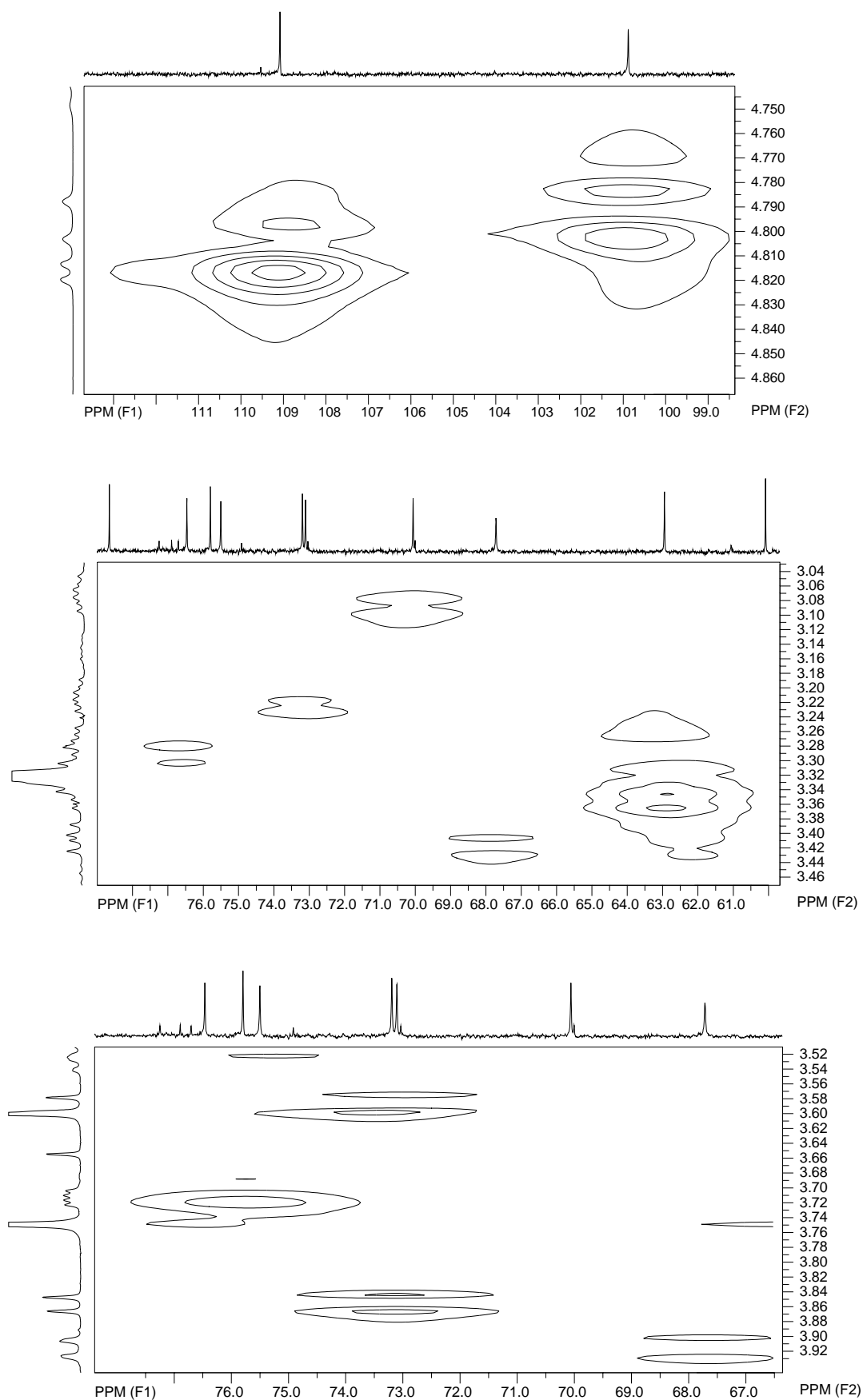


Figura 237. Mapa de correlação gHMBC da substância **31** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).



**Figura 238.** Ampliações do mapa de correlação gHMBC da substância **31** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).

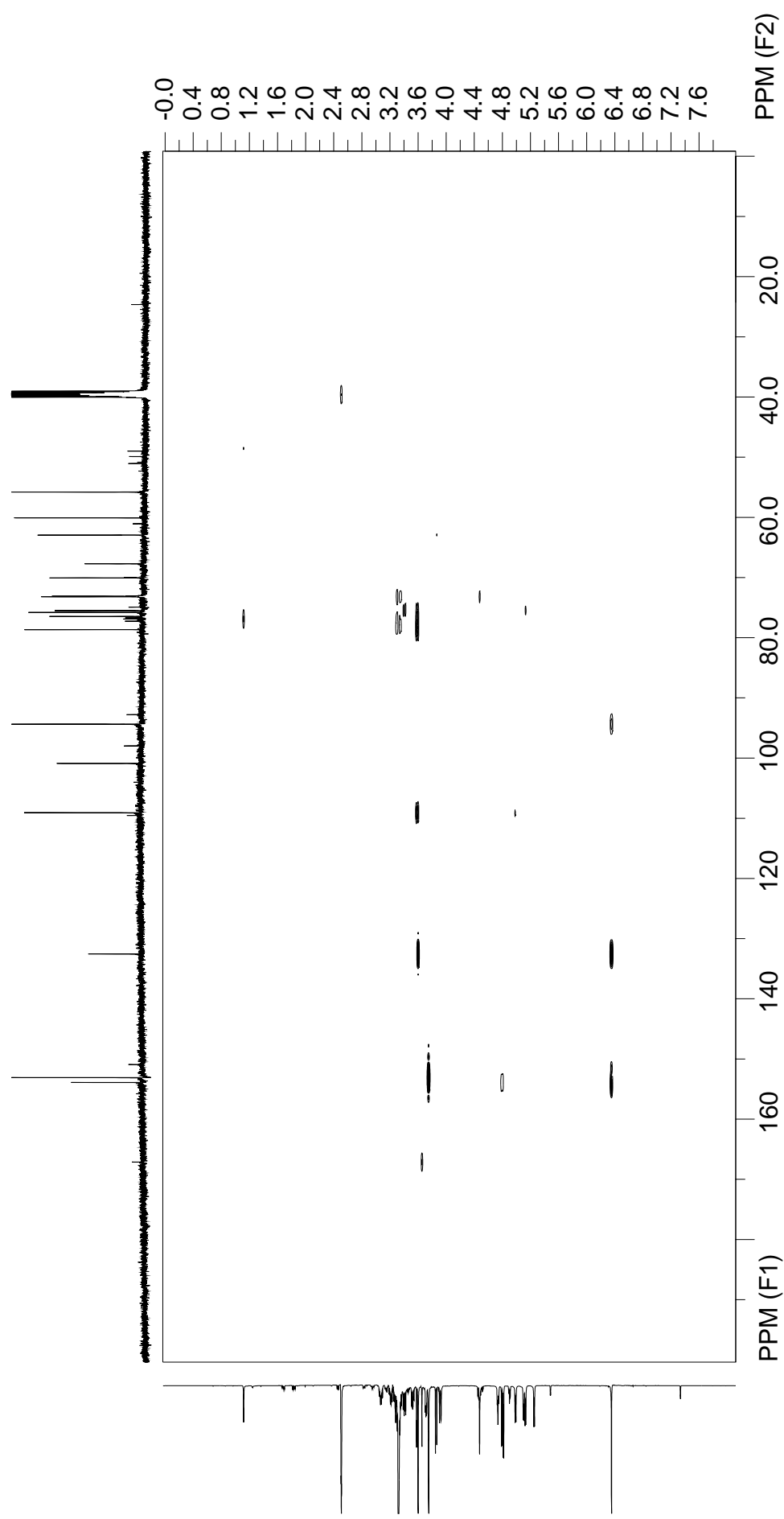
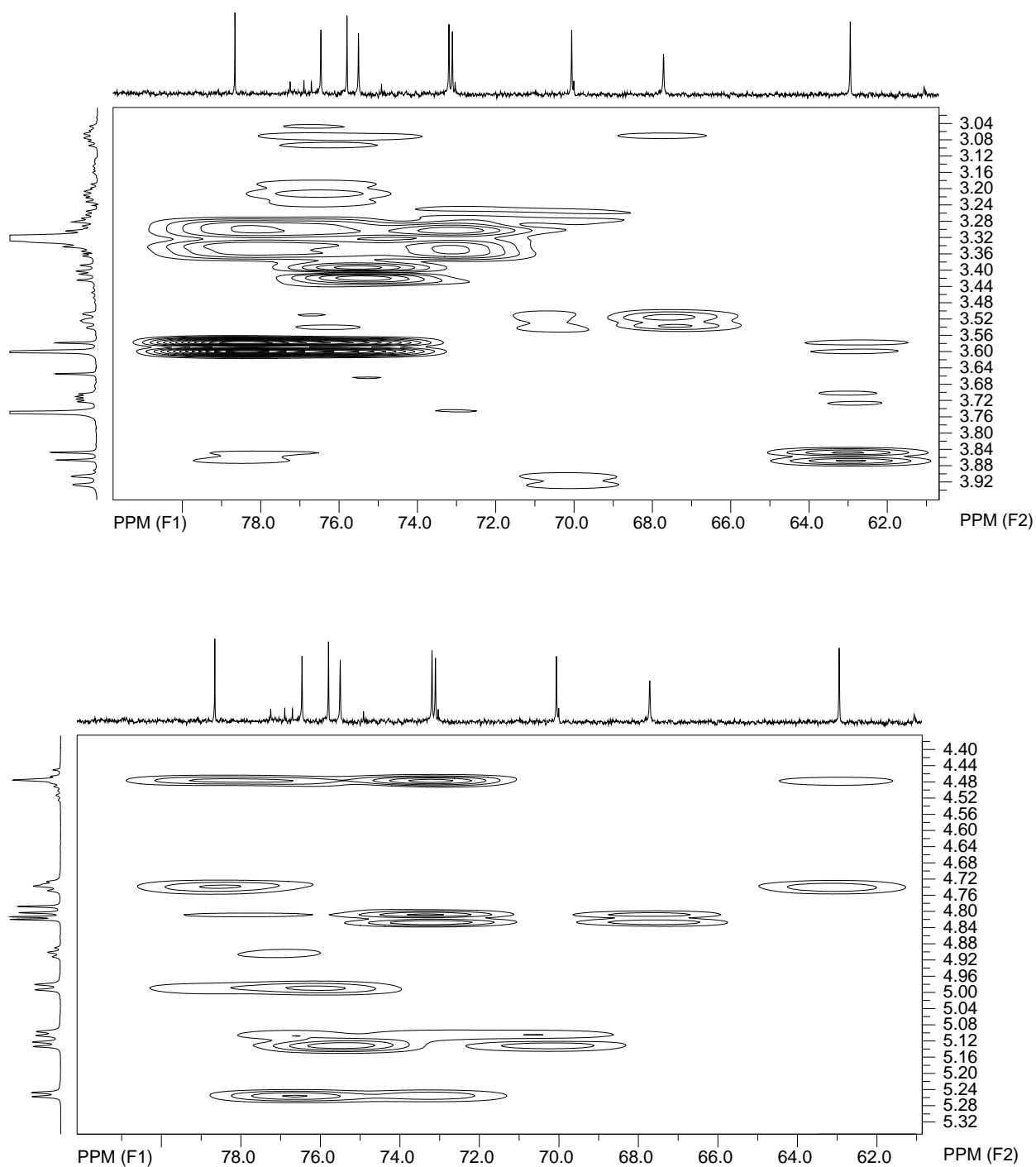


Figura 239. Mapa de correlação gHMBC da substância **31** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



**Figura 240.** Ampliações do mapa de correlação gHMBC da substância **31** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

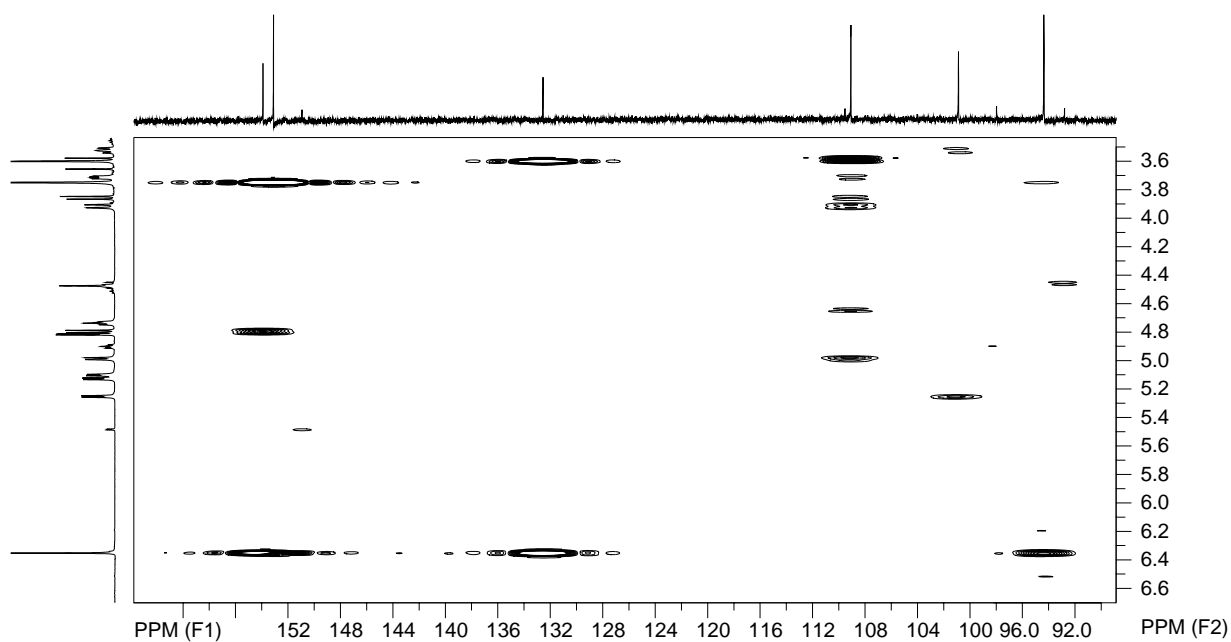


Figura 241. Ampliação do mapa de correlação gHMBC da substância **31** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

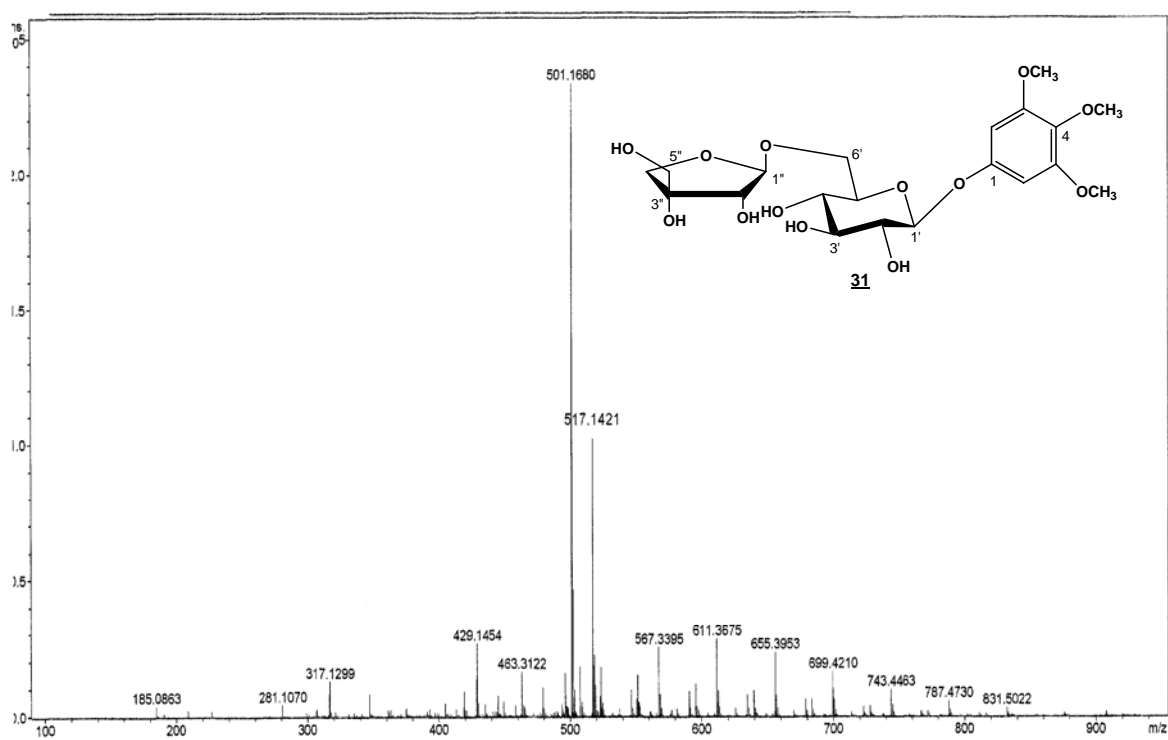


Figura 242. Espectro de Massas da substância **31** (modo positivo).

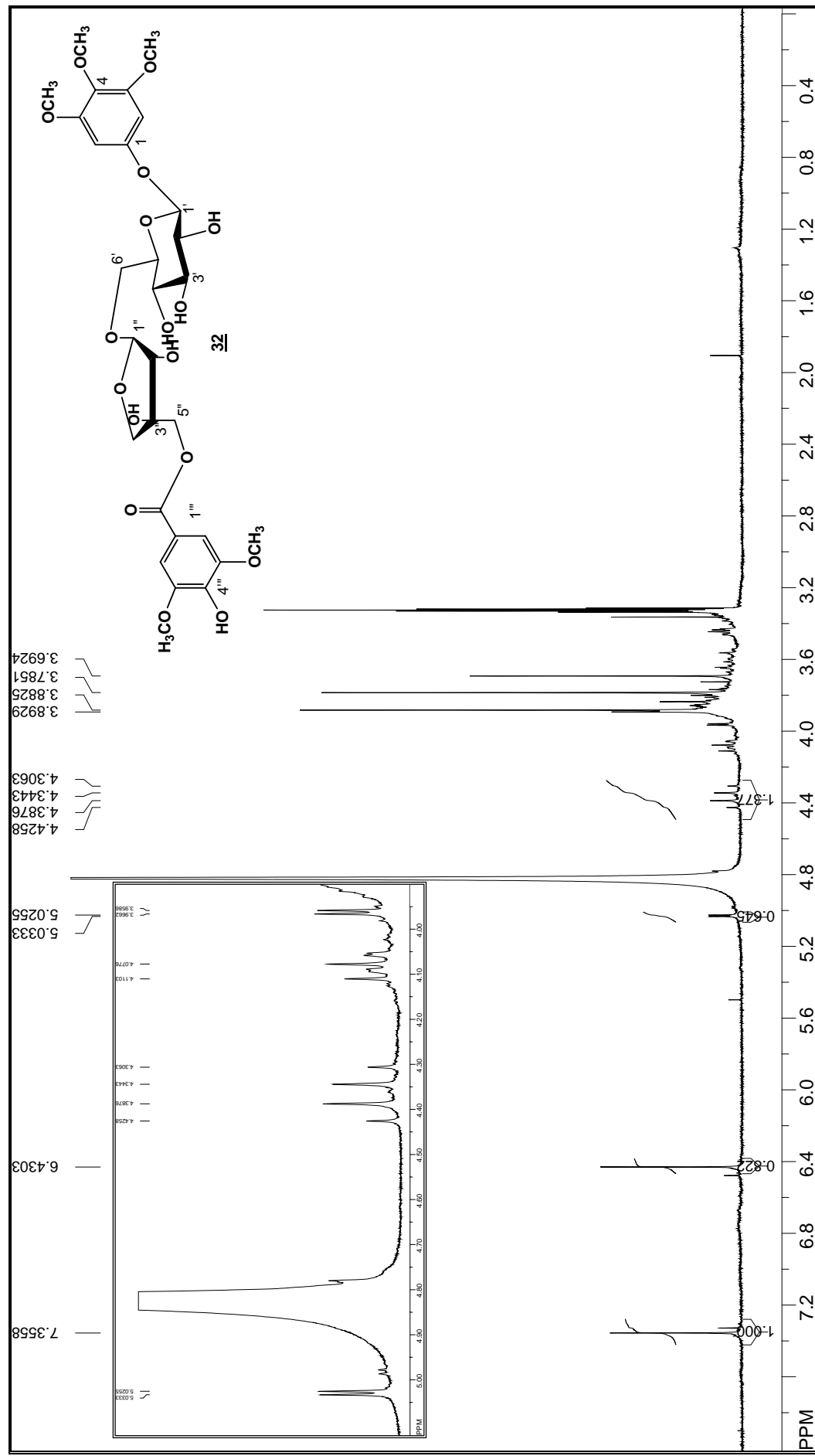


Figura 243. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **32** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).

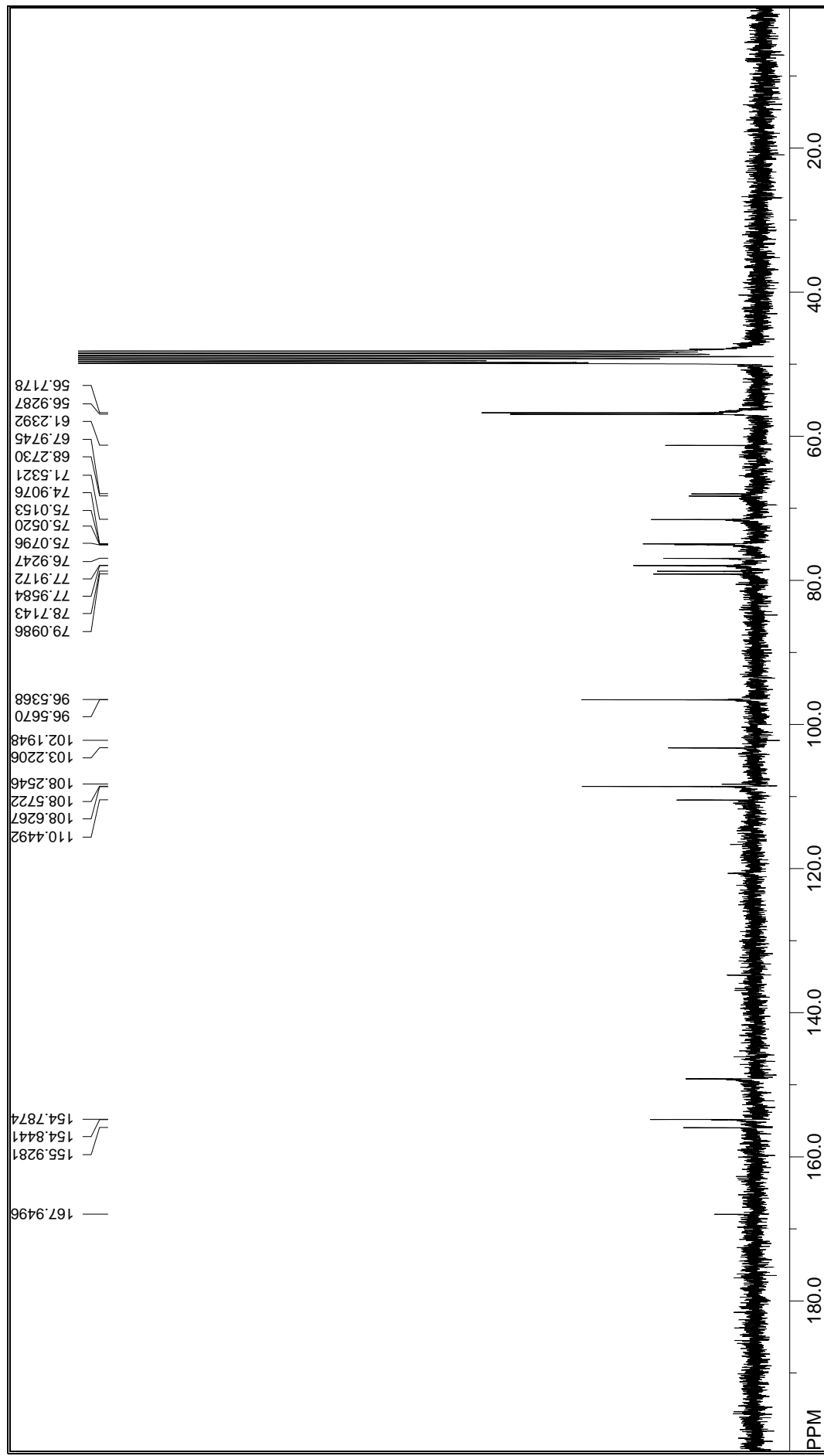


Figura 244. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **32** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz).

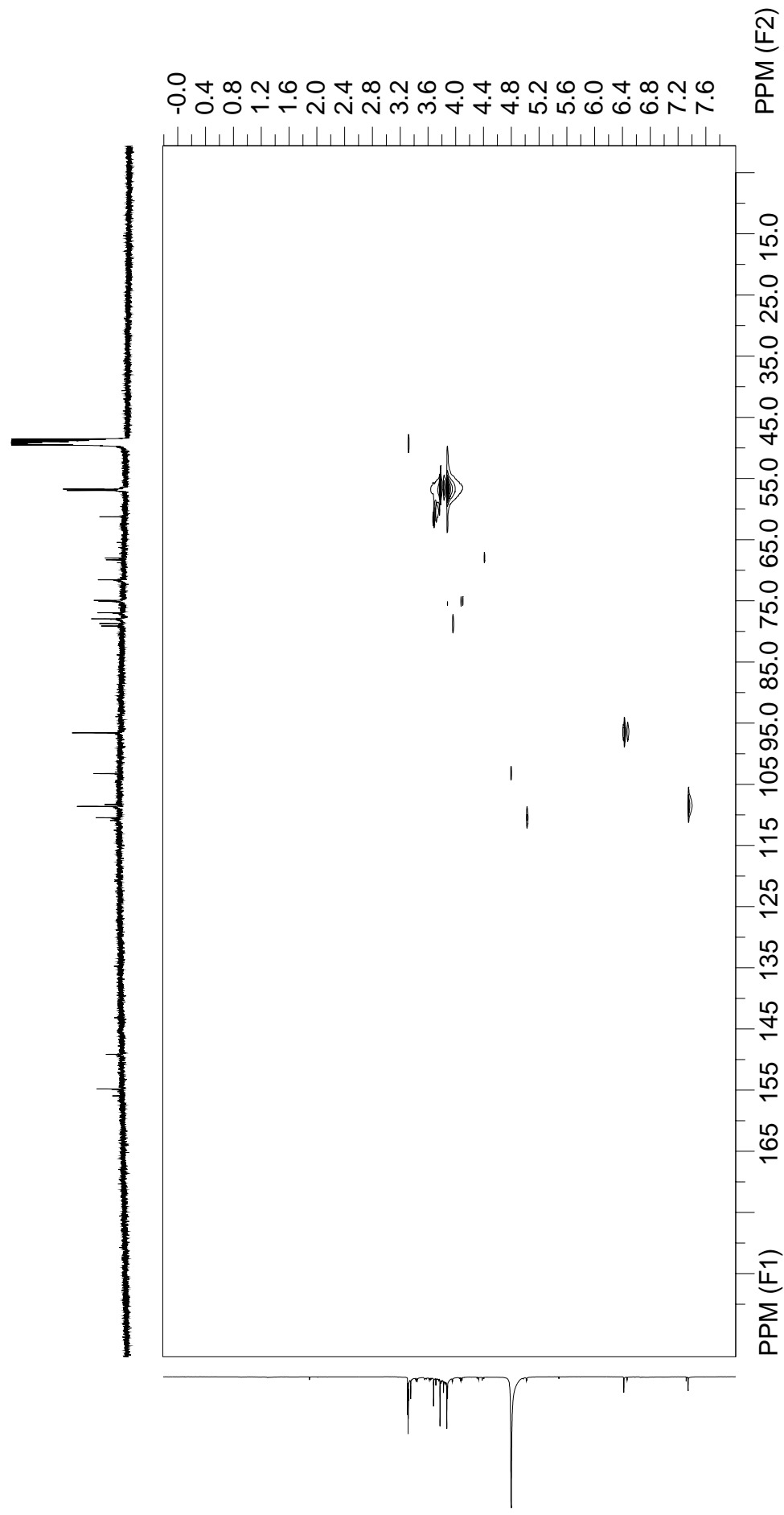
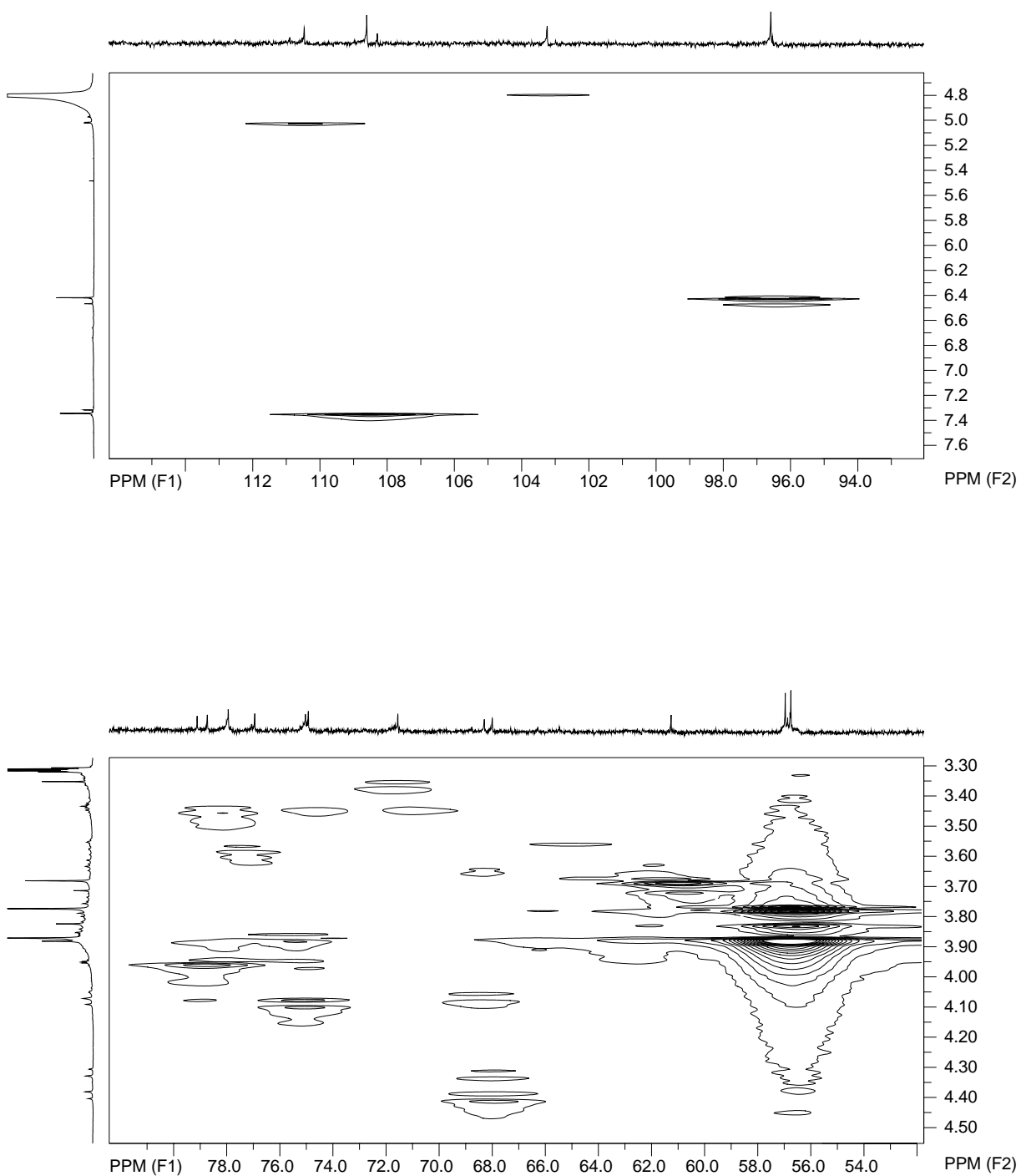
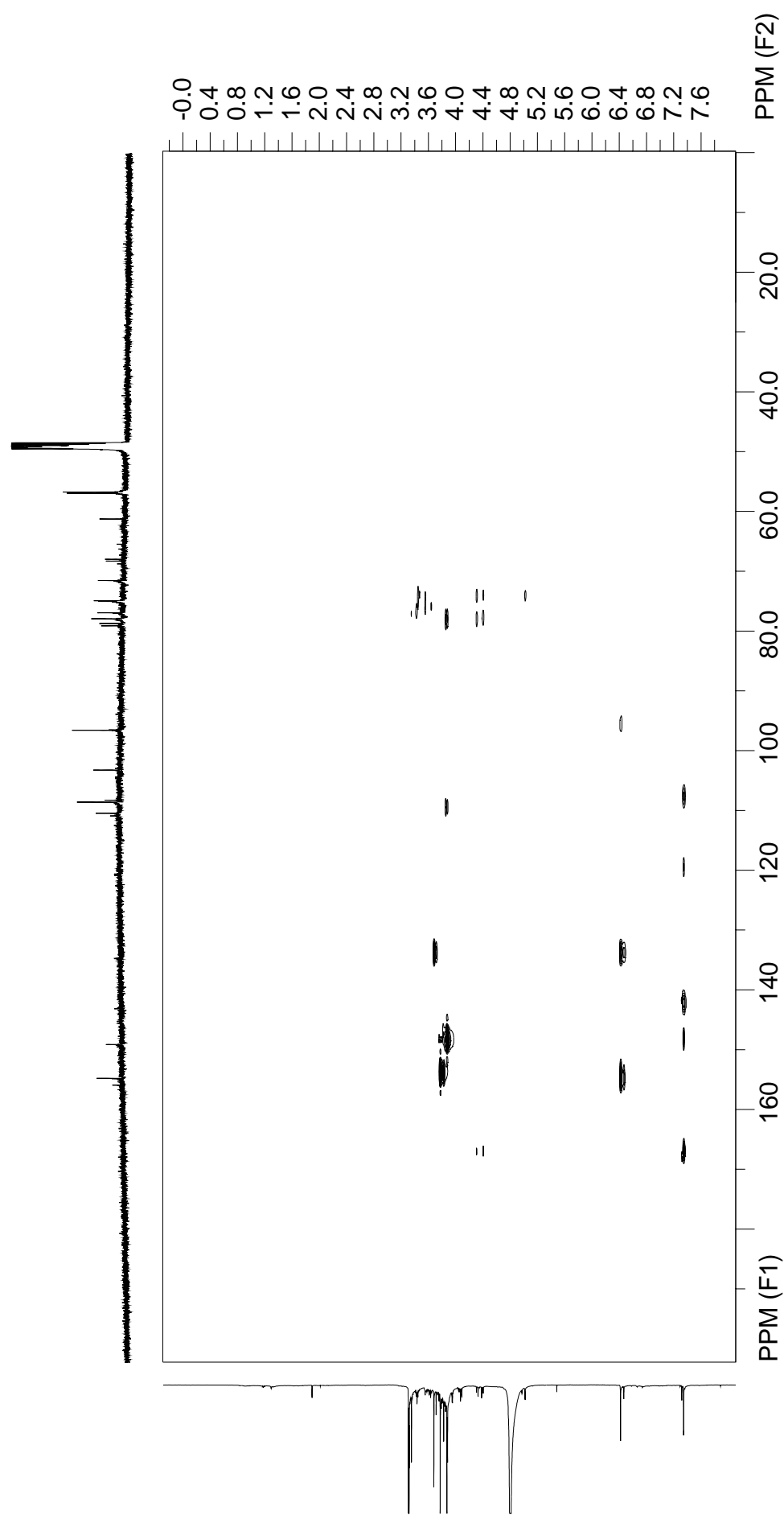


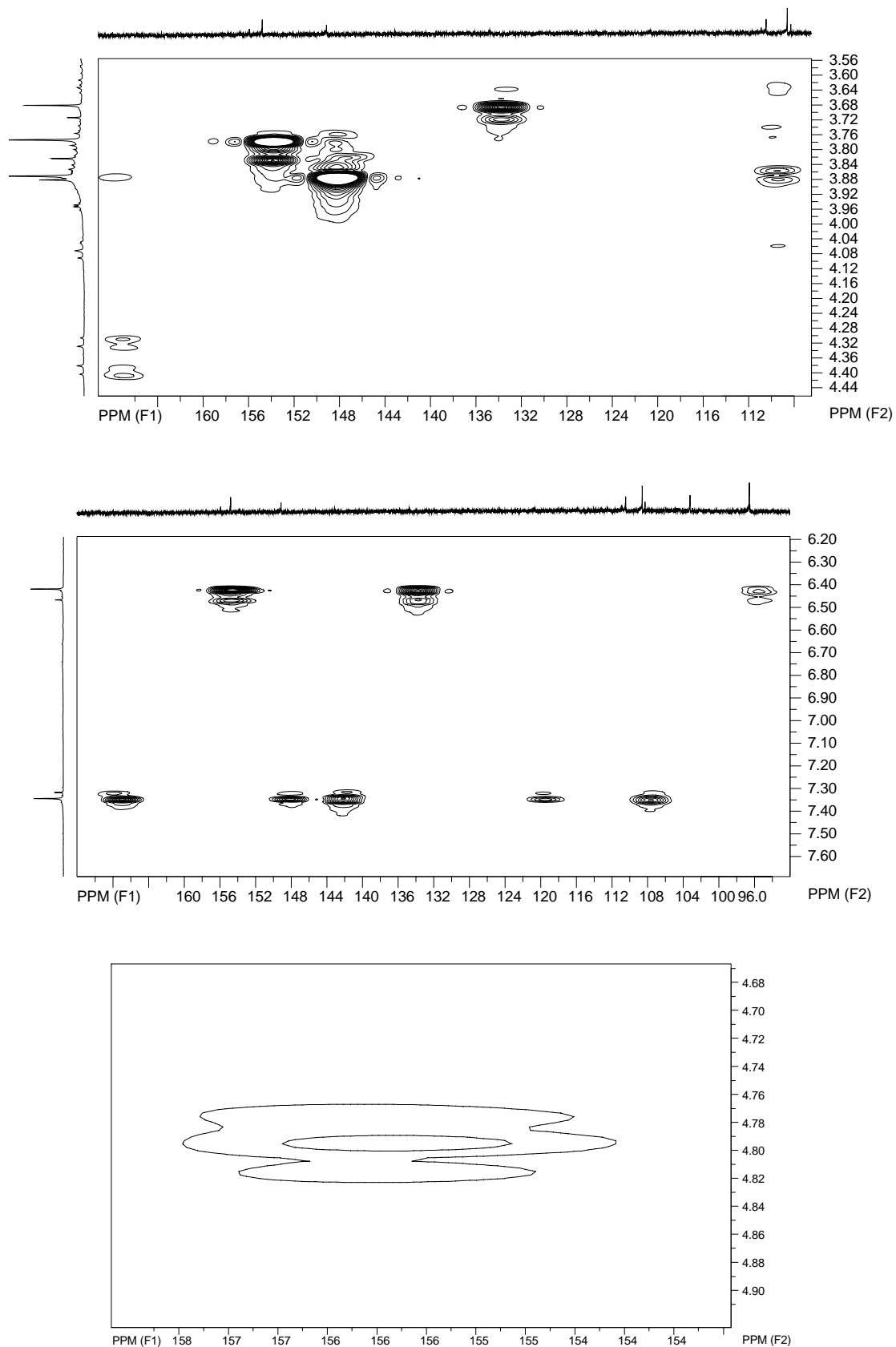
Figura 245. Mapa de correlação gHMQC da substância **32** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).



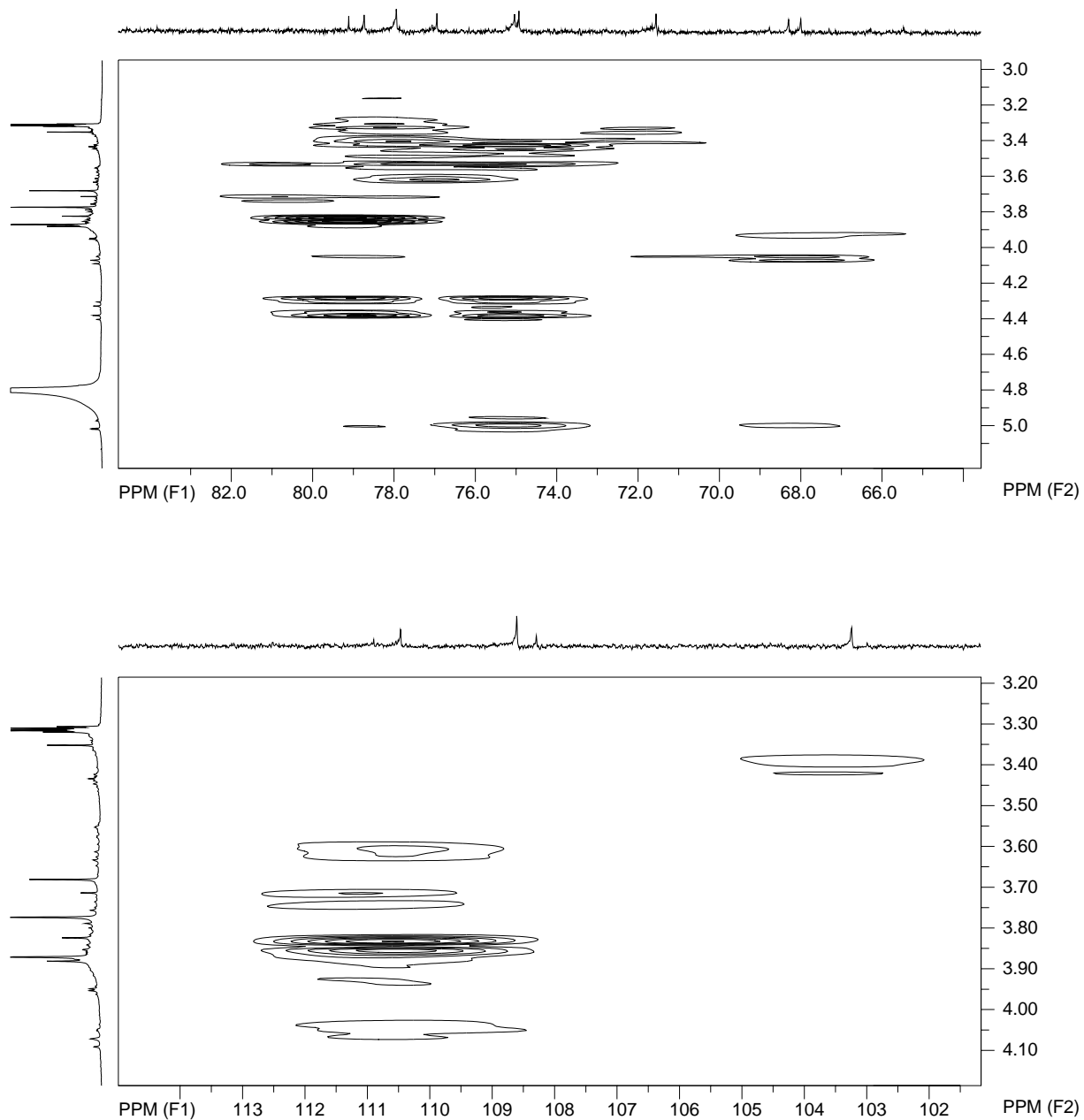


**Figura 246.** Ampliações do mapa de correlação gHMBC da substância **32** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).

Figura 247. Mapa de correlação gHMBC da substância **32** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).



**Figura 248.** Ampliações do mapa de correlação gHMBC da substância **32** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).



**Figura 249.** Ampliações do mapa de correlação gHMBC da substância **32** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).

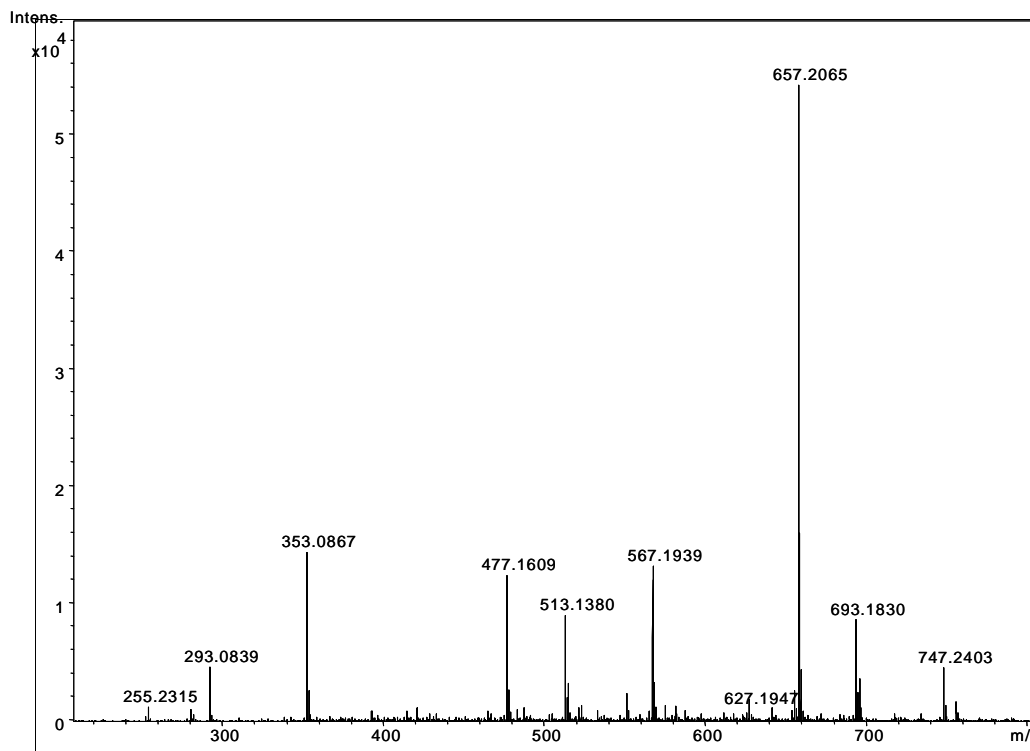
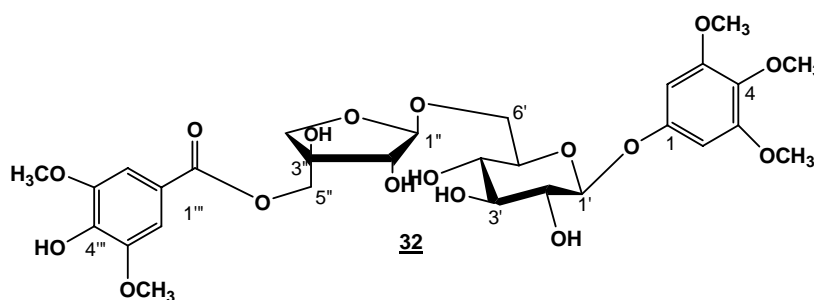


Figura 250. Espectro de Massas da substância **32** (modo negativo – alta resolução).



Viviane Fr 15 ESI - 30 V

Viviane Fr15 200505 ESI 03 10 (0.375) Cm (4:14-1:3)

Scan ES-  
3.89e4

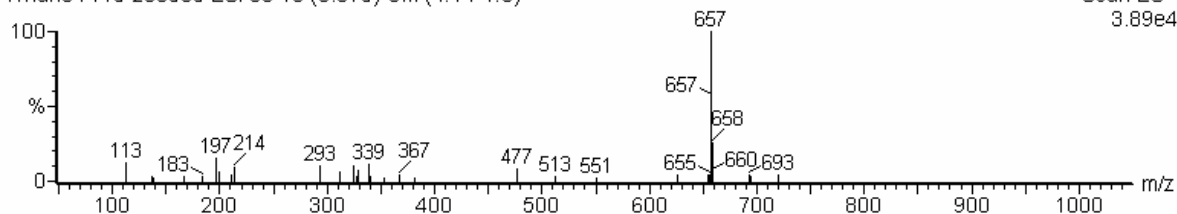


Figura 251. Espectro de Massas da substância **32** (modo negativo – baixa resolução).

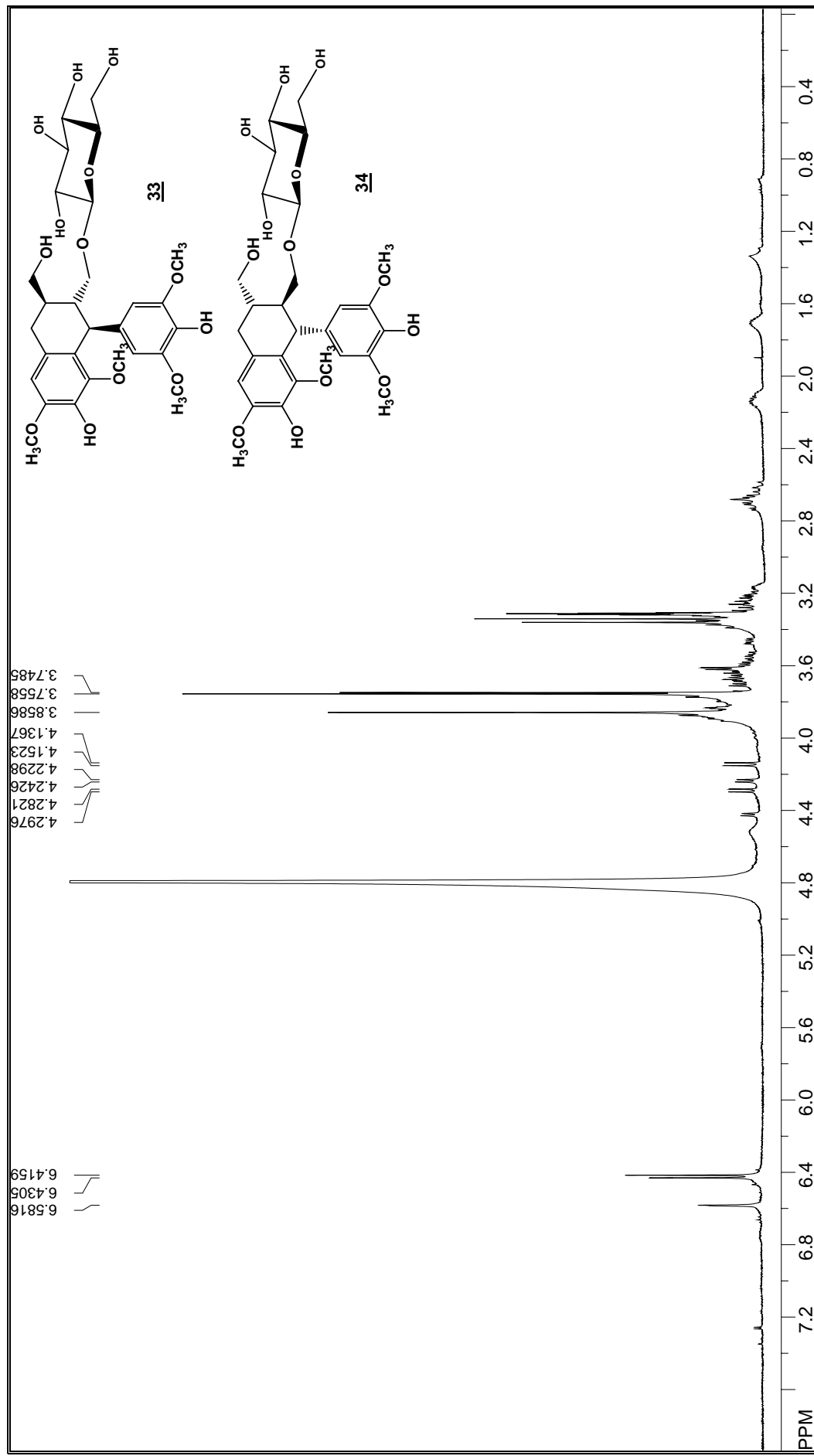


Figura 252. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura das substâncias **33** e **34** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).

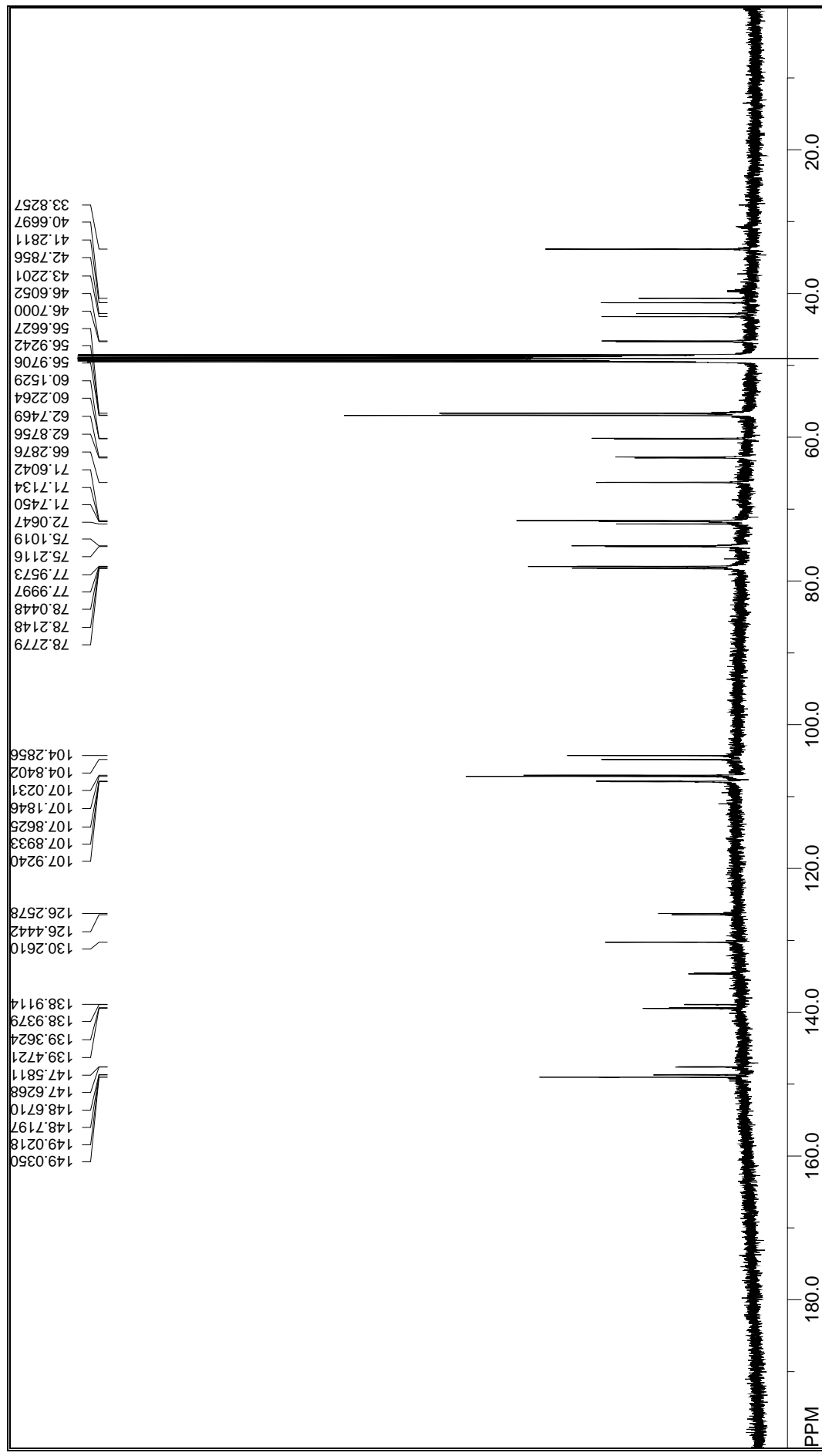
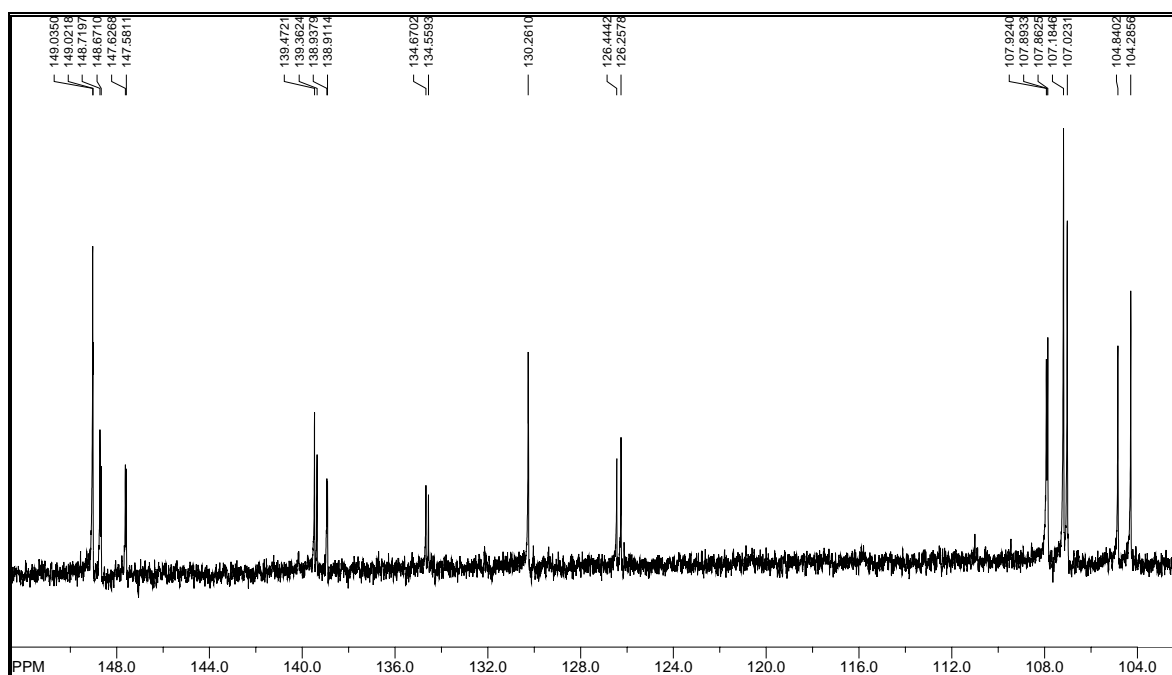
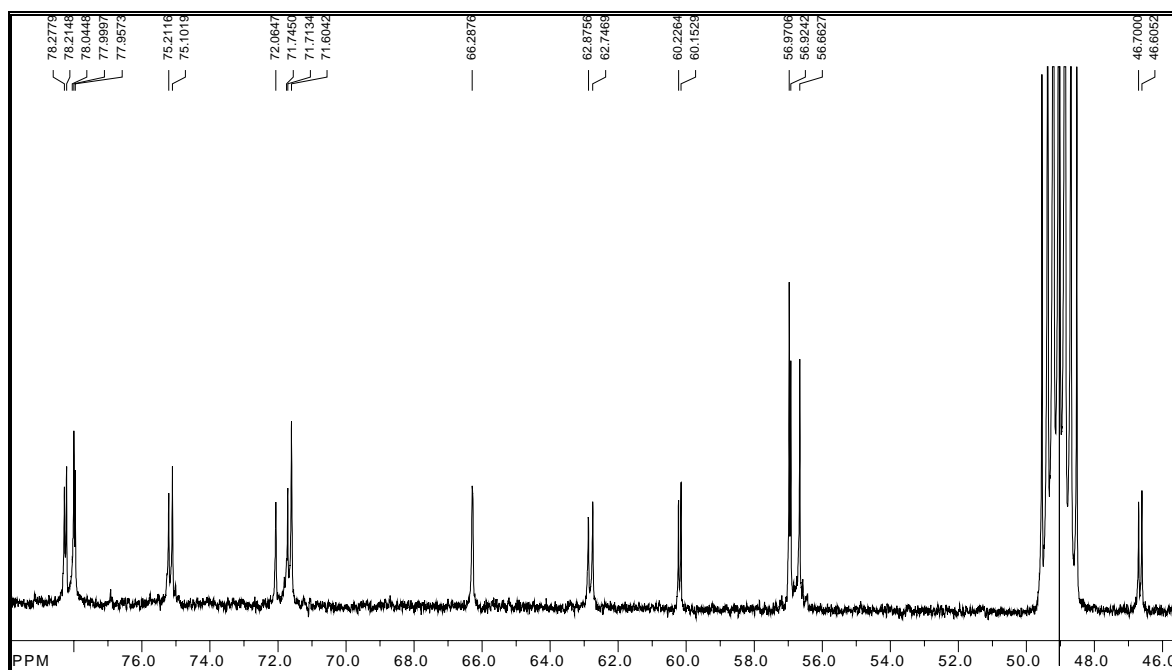


Figura 253. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da mistura das substâncias **33** e **34** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz).



**Figura 254.** Ampliações do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da mistura das substâncias **33** e **34** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz).



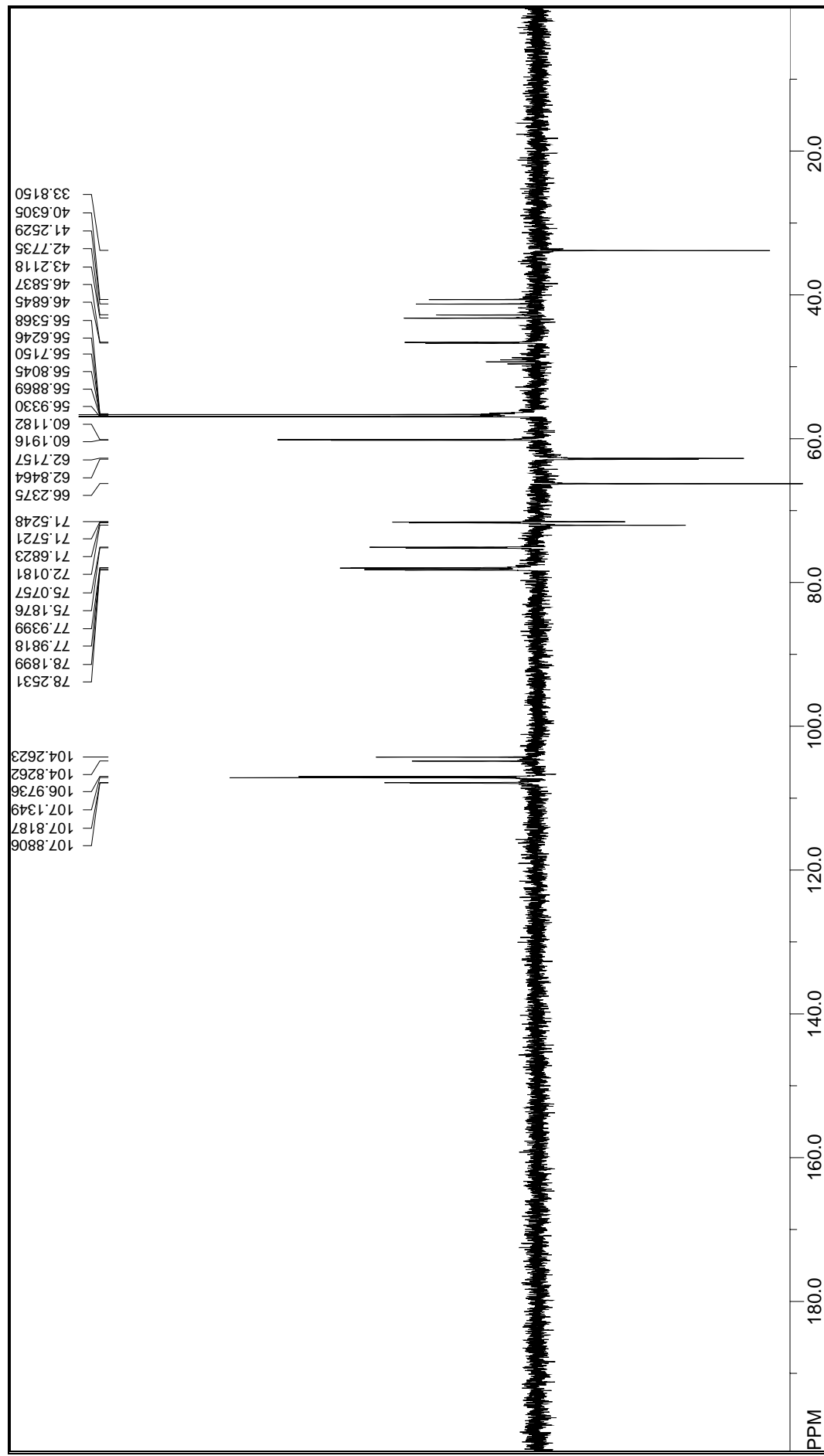


Figura 255. Espectro de DEPT 135° da mistura das substâncias **33** e **34** (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz).

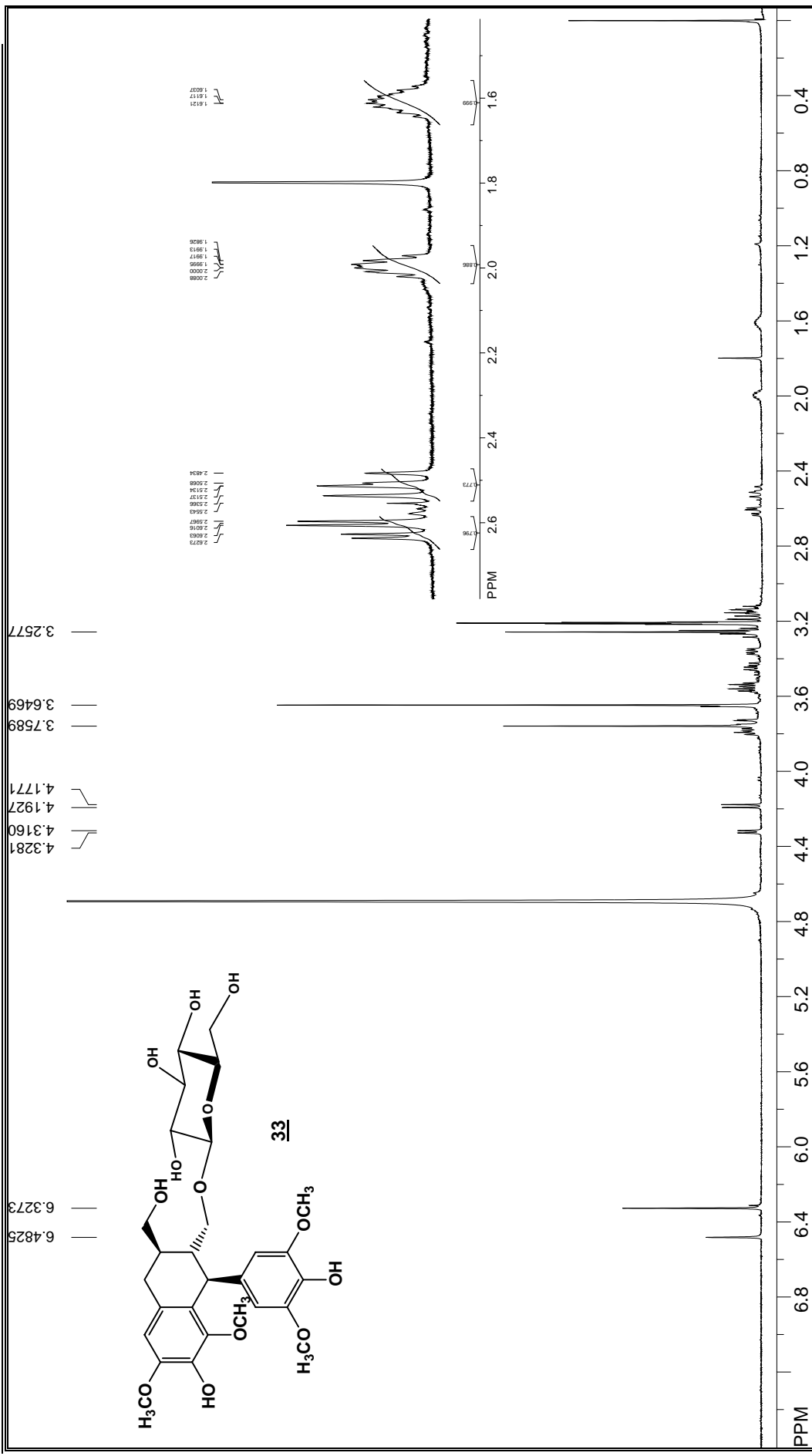


Figura 256. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **33** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).

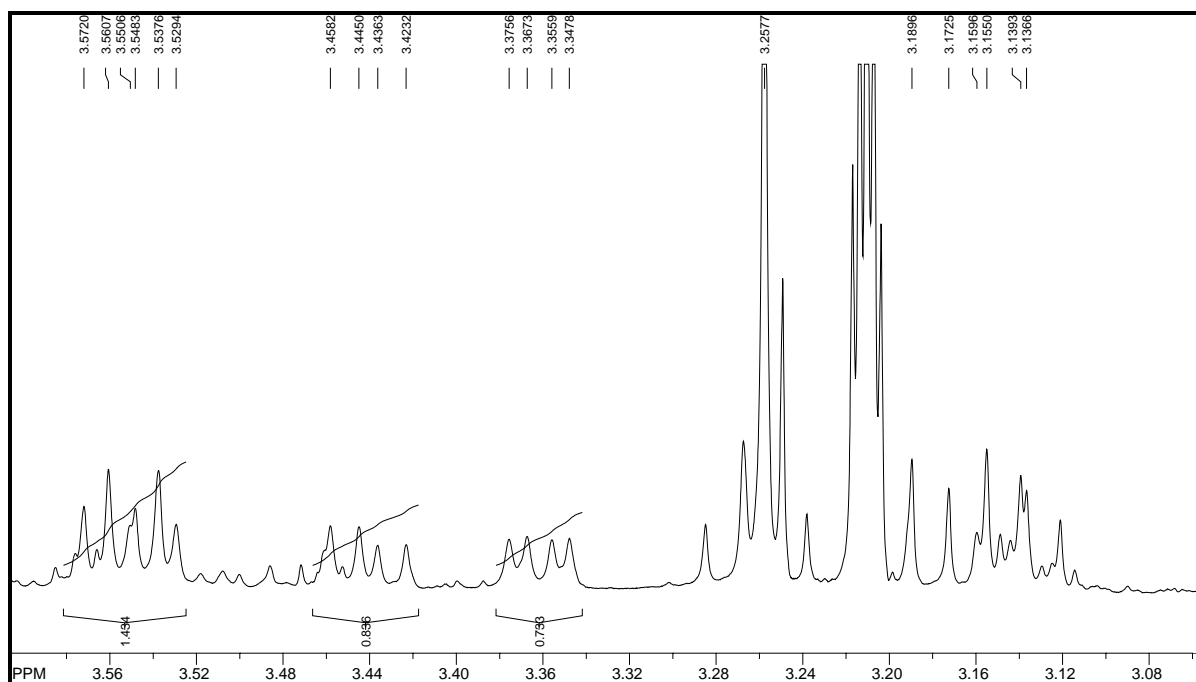
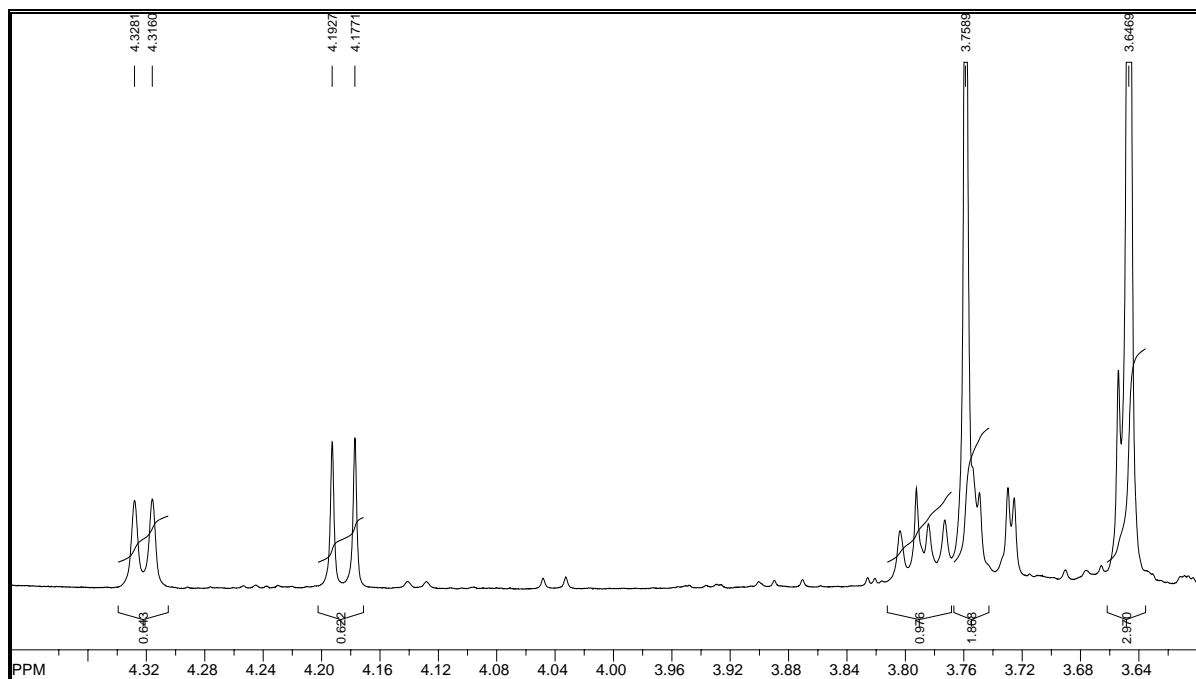


Figura 257. Ampliações do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **33** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).

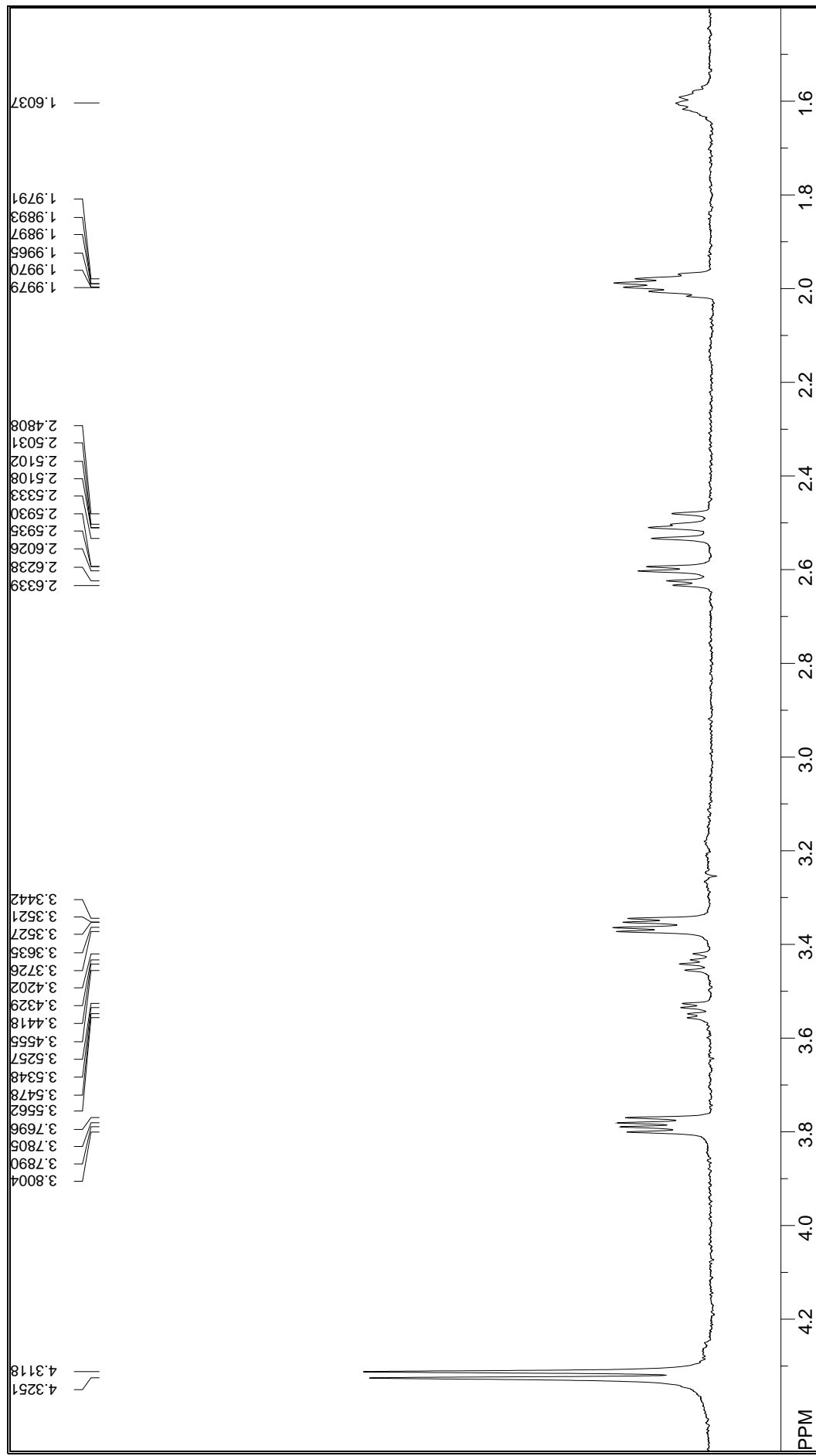


Figura 258. Espectro de TOCSY da substância **33** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).

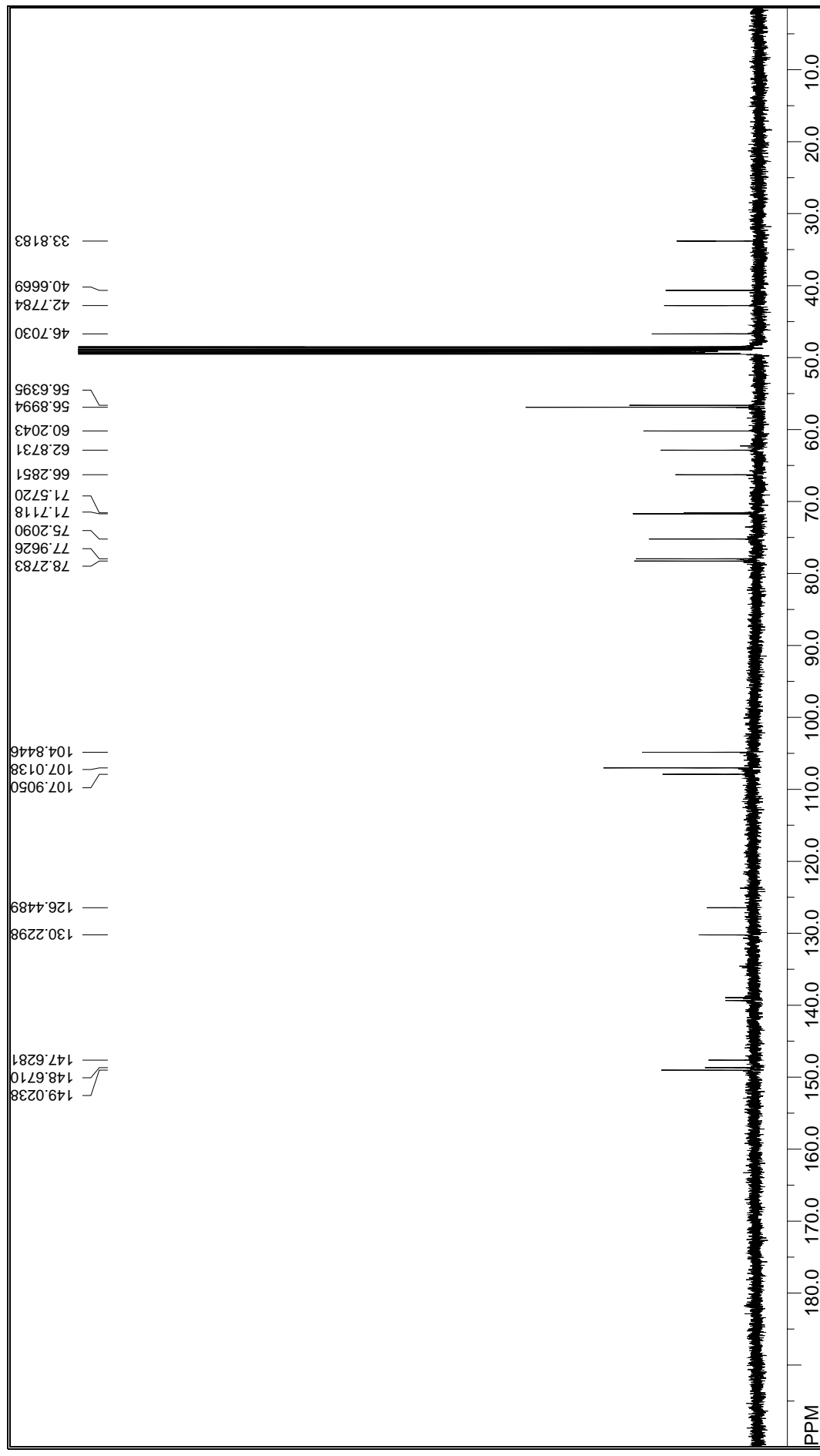


Figura 259. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **33** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz).

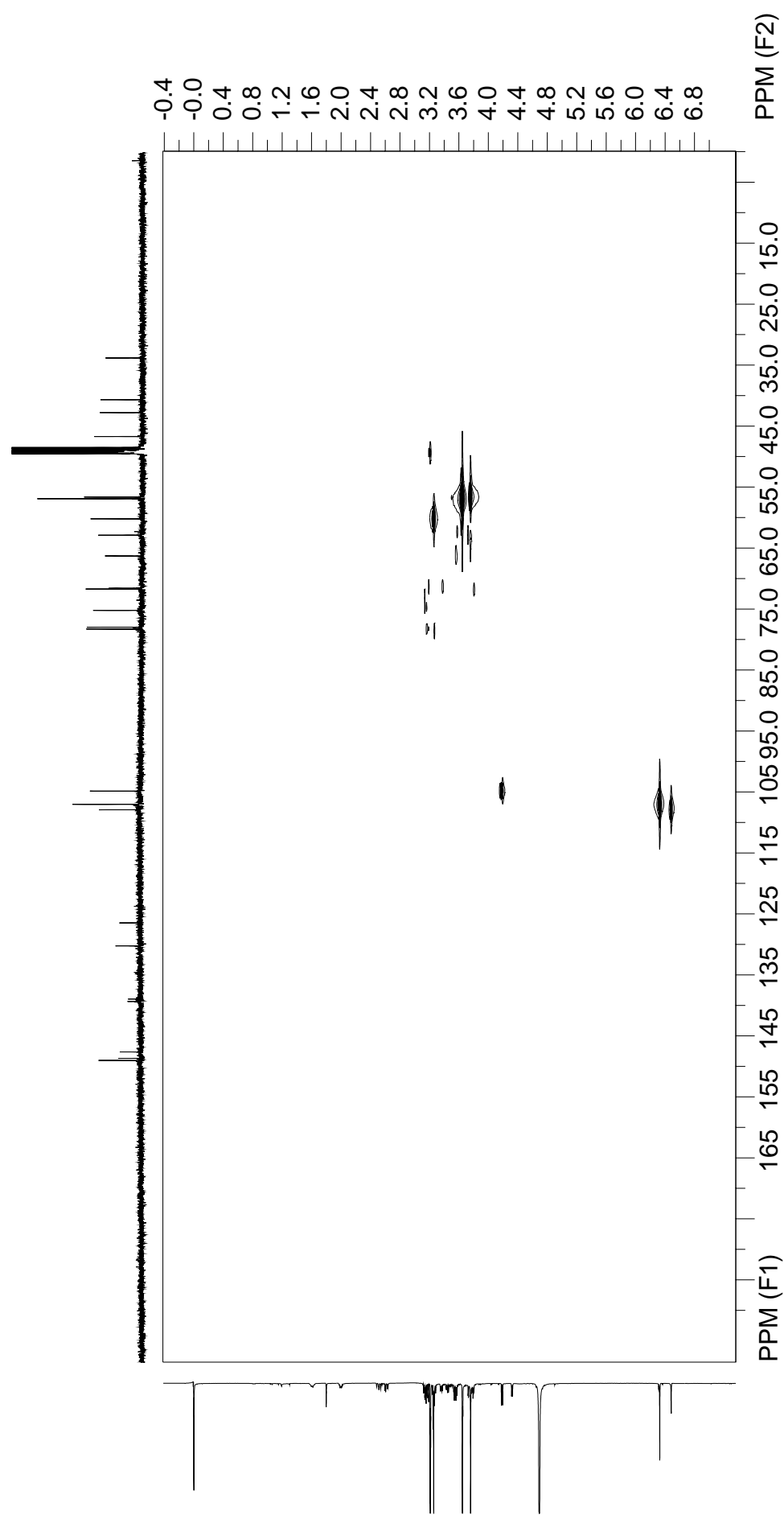
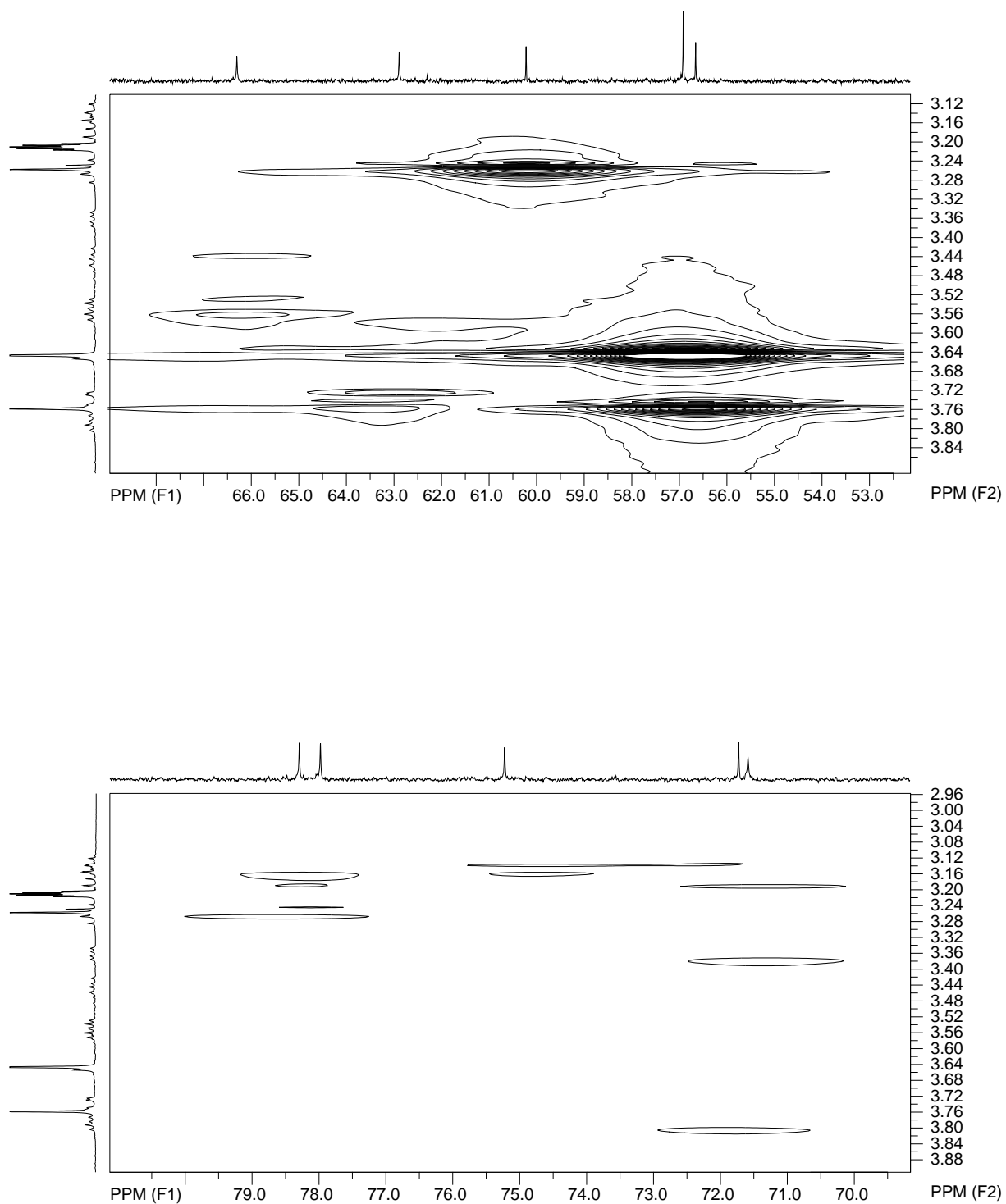
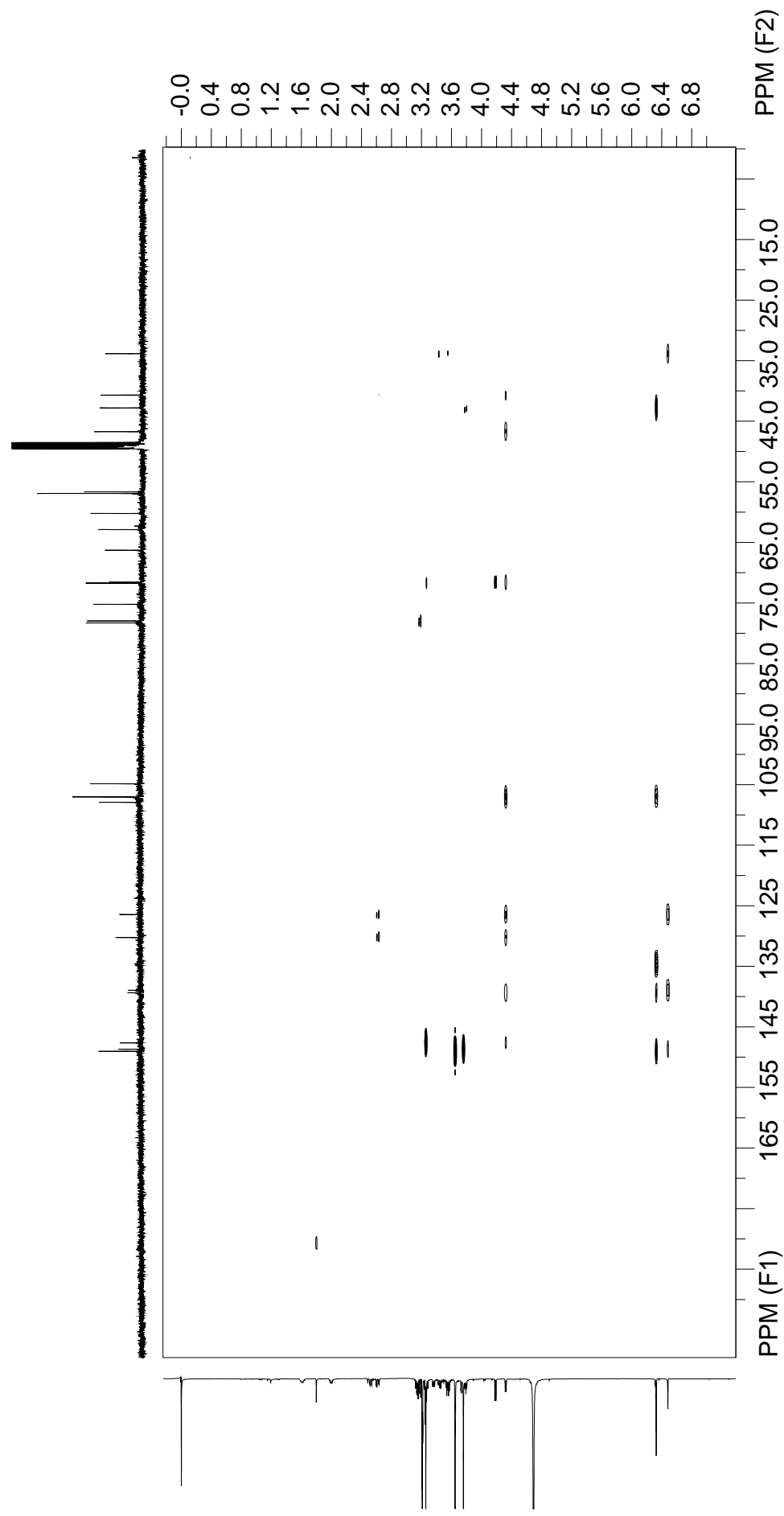


Figura 260. Mapa de correlação gHMQC da substância **33** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).

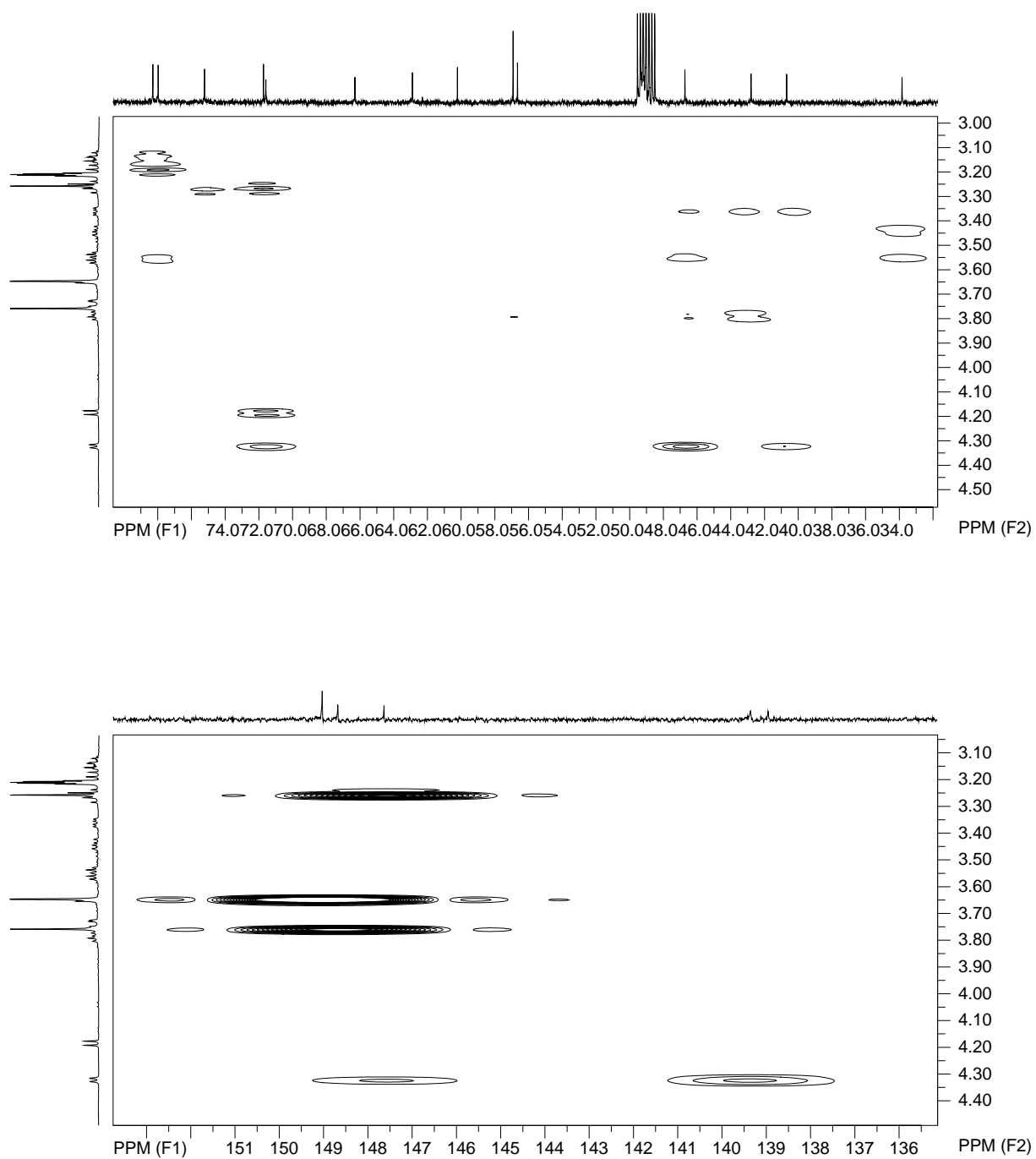


**Figura 261.** Ampliações do mapa de correlação gHMBC da substância **33** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).

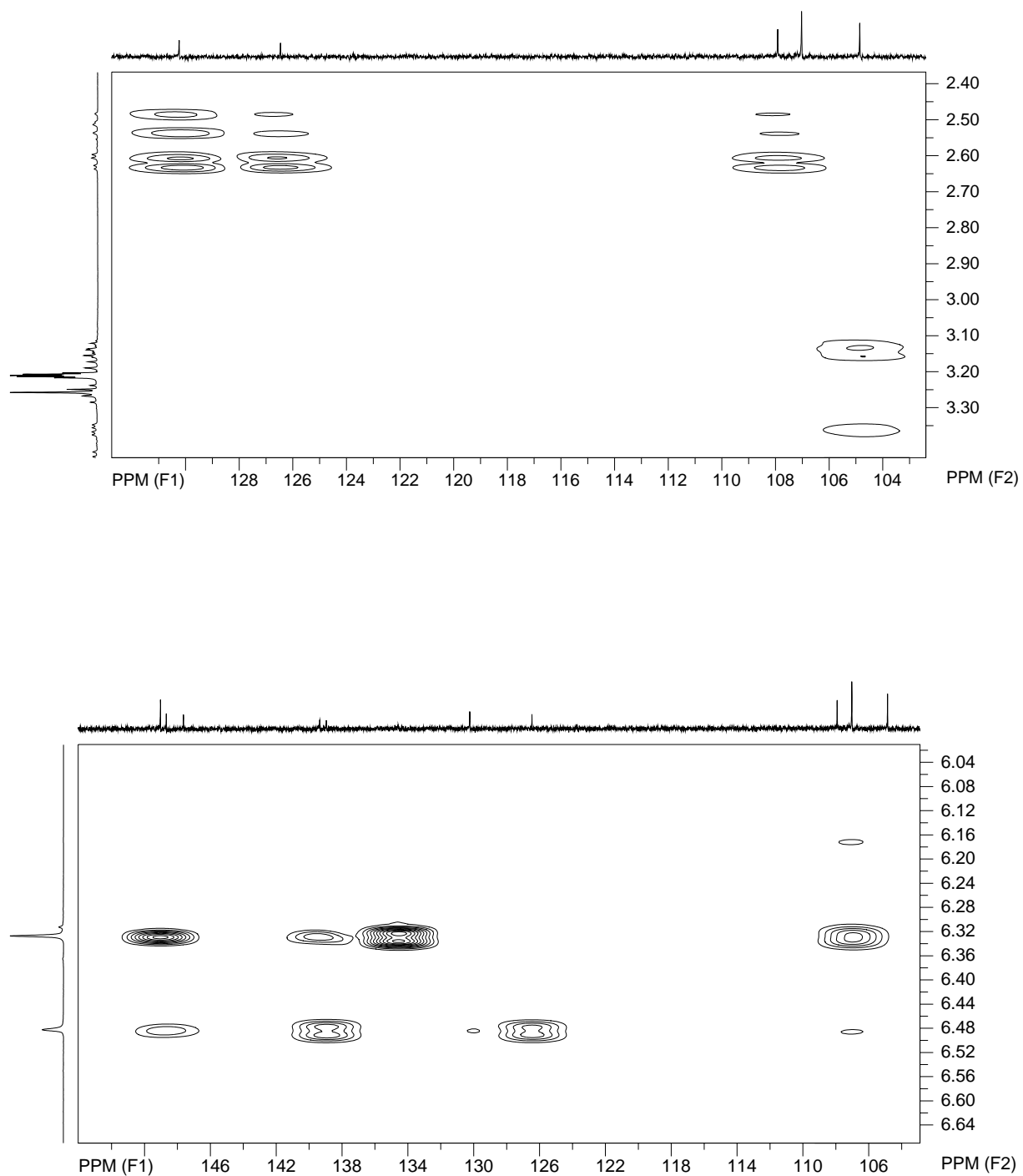


**Figura 262.** Mapa de correlação gHMBC da substância **33** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).





**Figura 263.** Ampliações do mapa de correlação gHMBC da substância **33** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).



**Figura 264.** Ampliações do mapa de correlação gHMBC da substância **33** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).

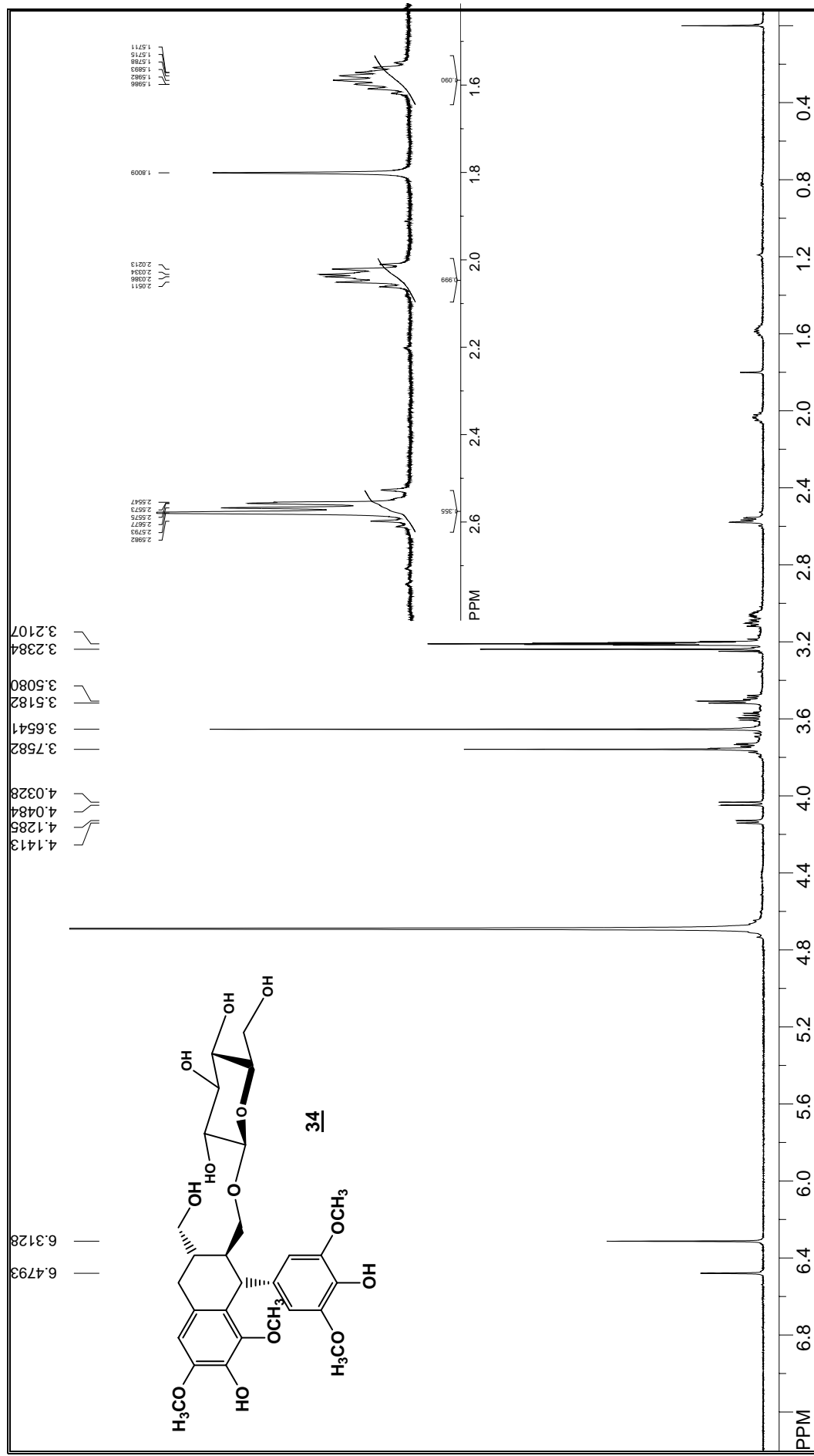


Figura 265. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **34** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).

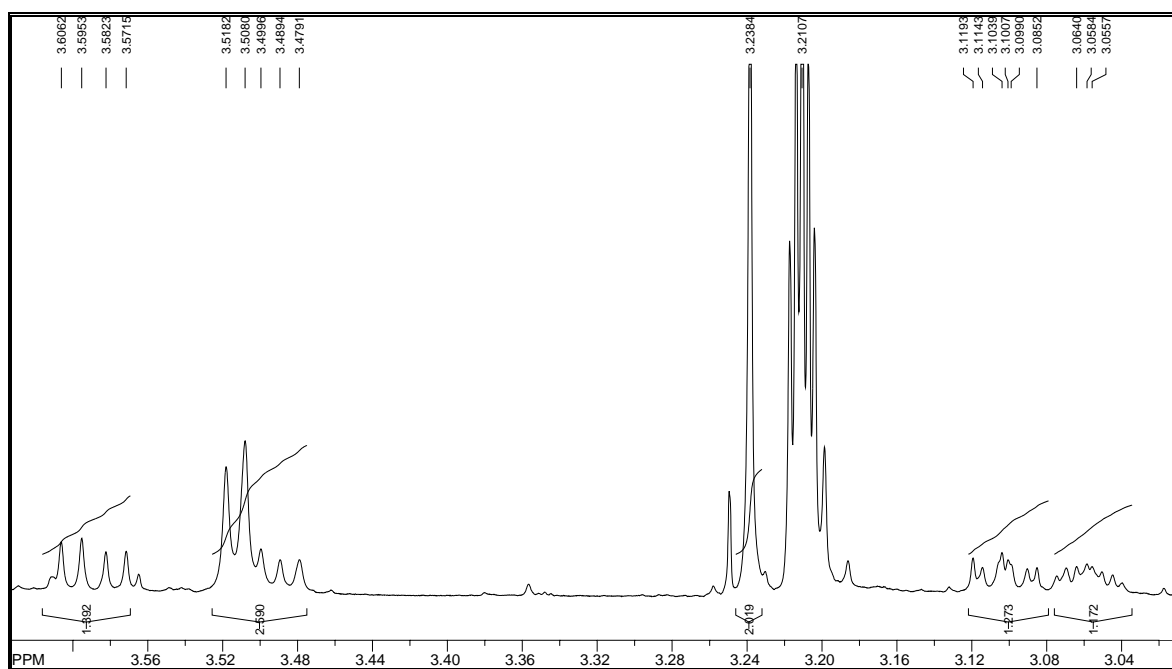
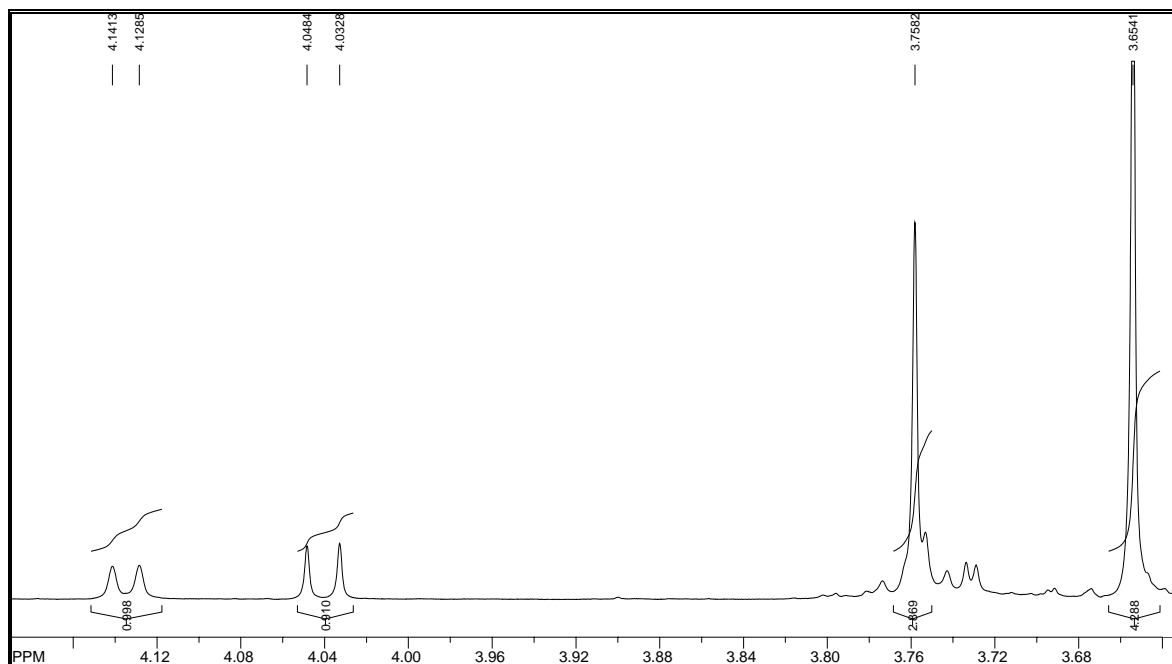


Figura 266. Ampliações do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **34** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).

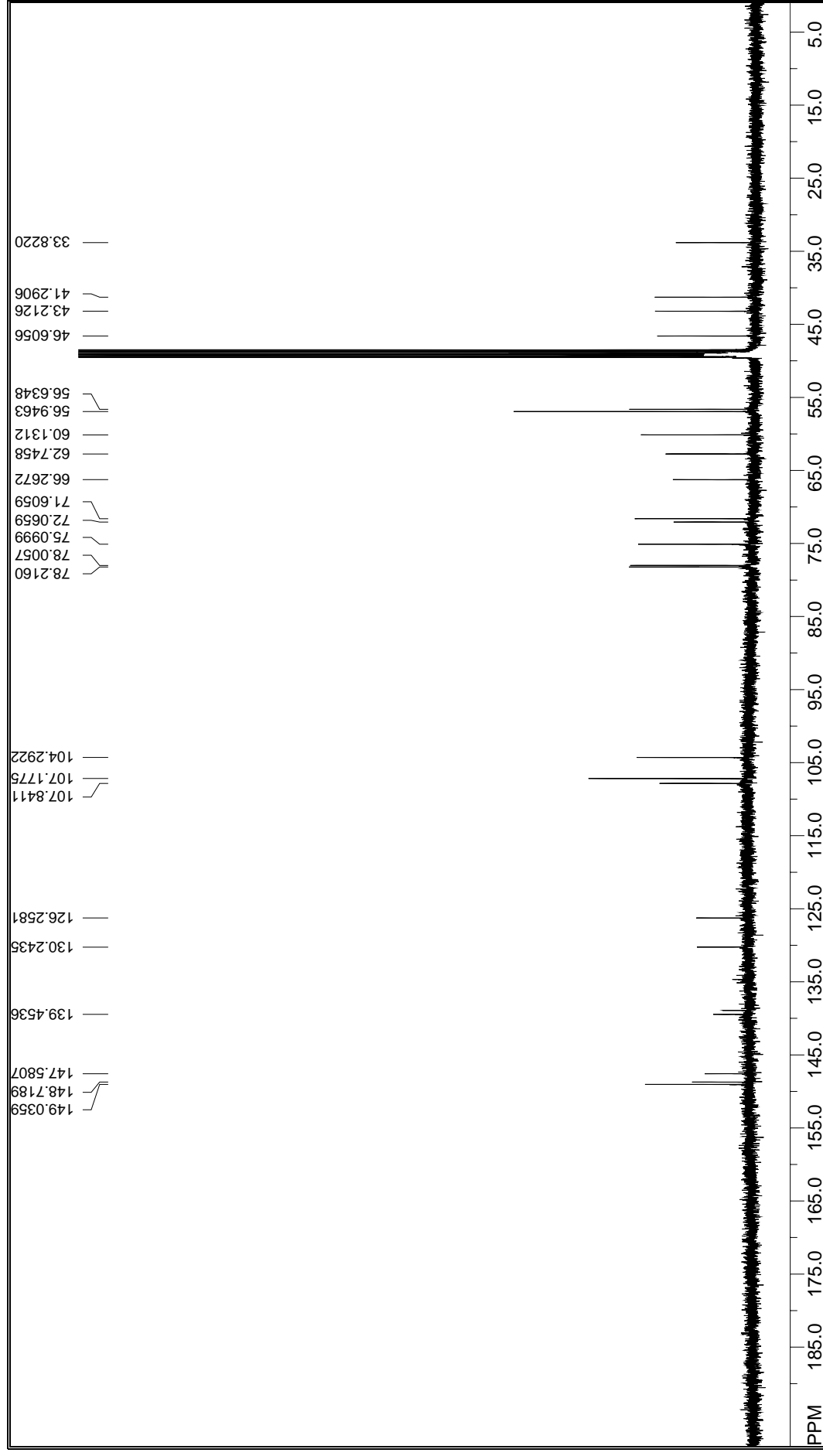


Figura 267. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **34** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz).

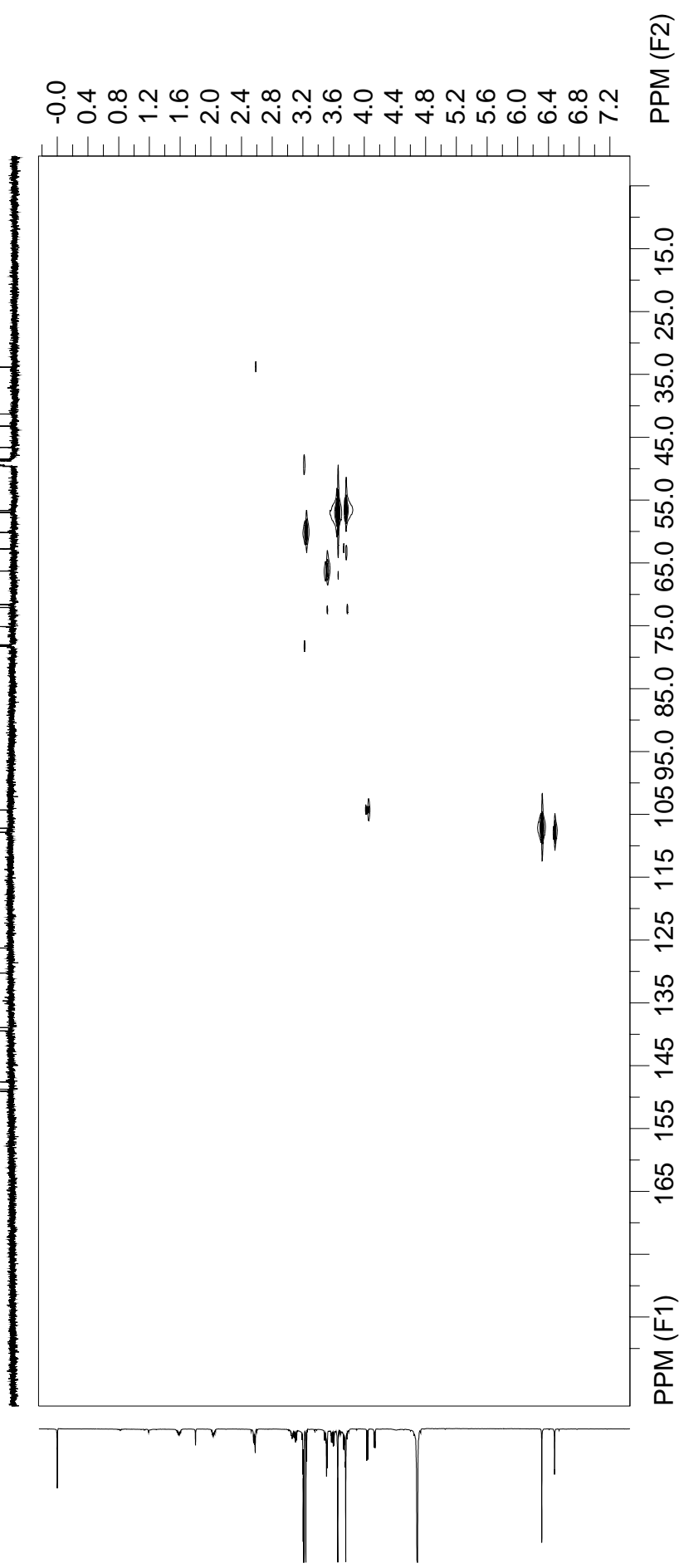
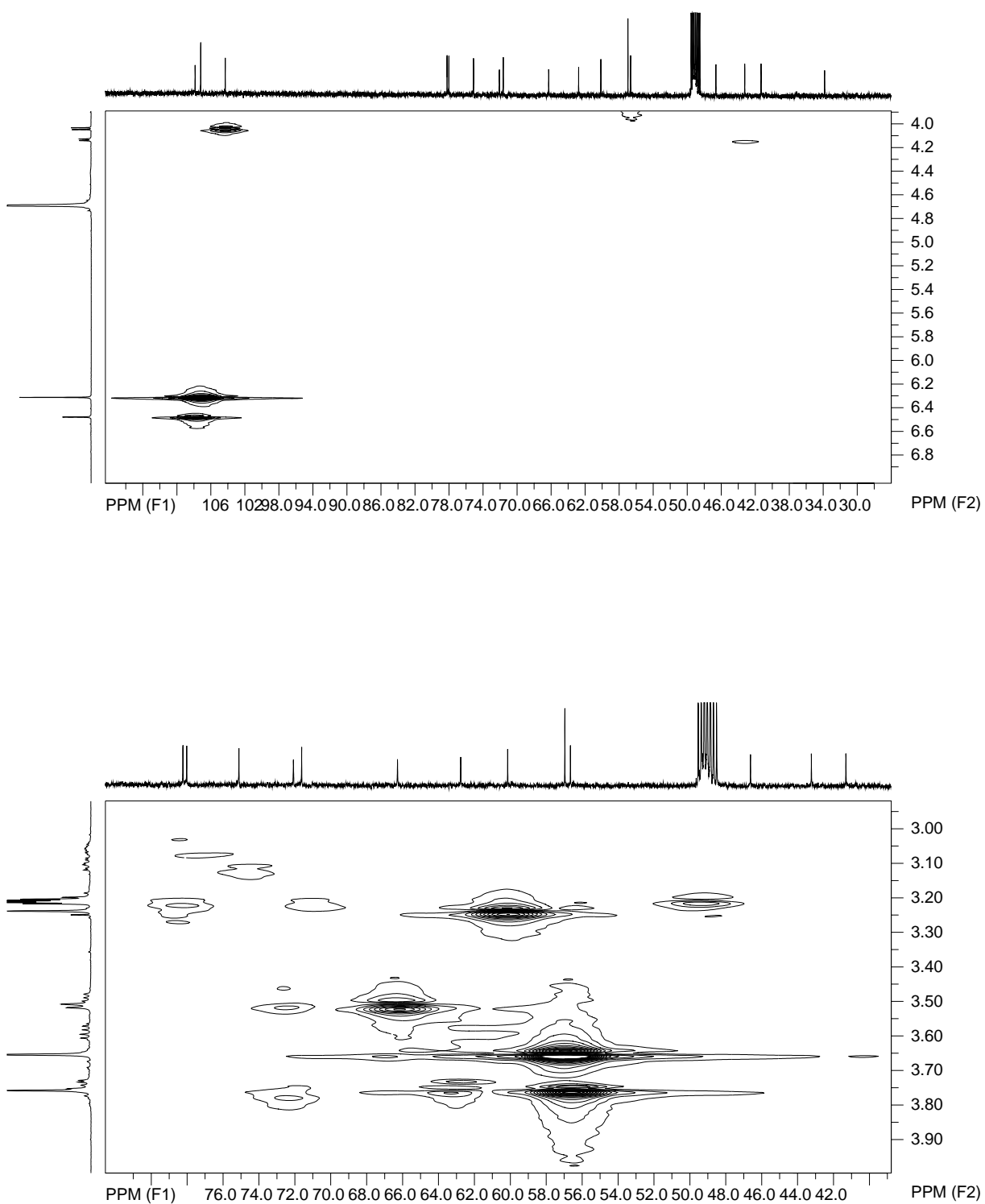
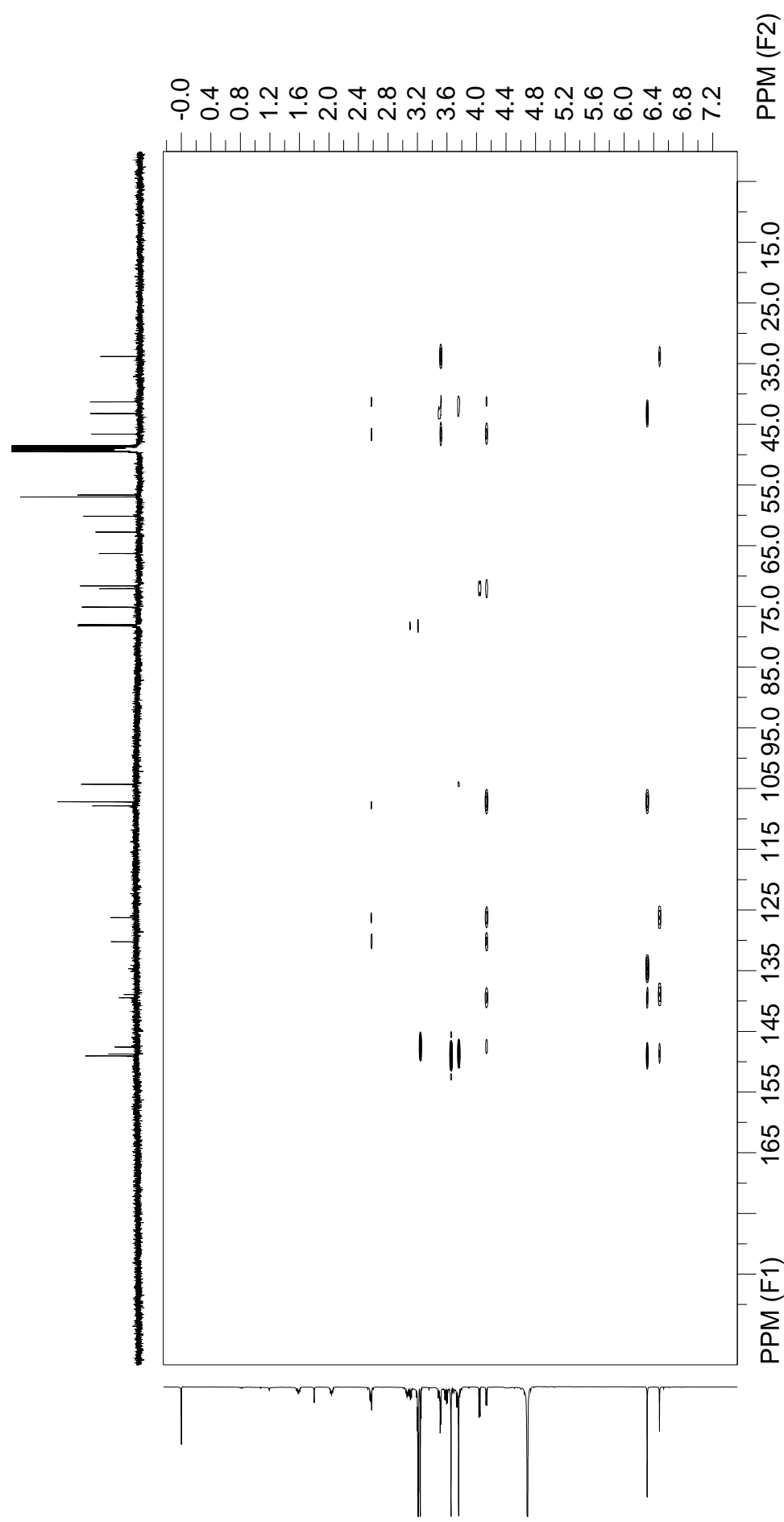


Figura 268. Mapa de correlação gHMQC da substância **34** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).

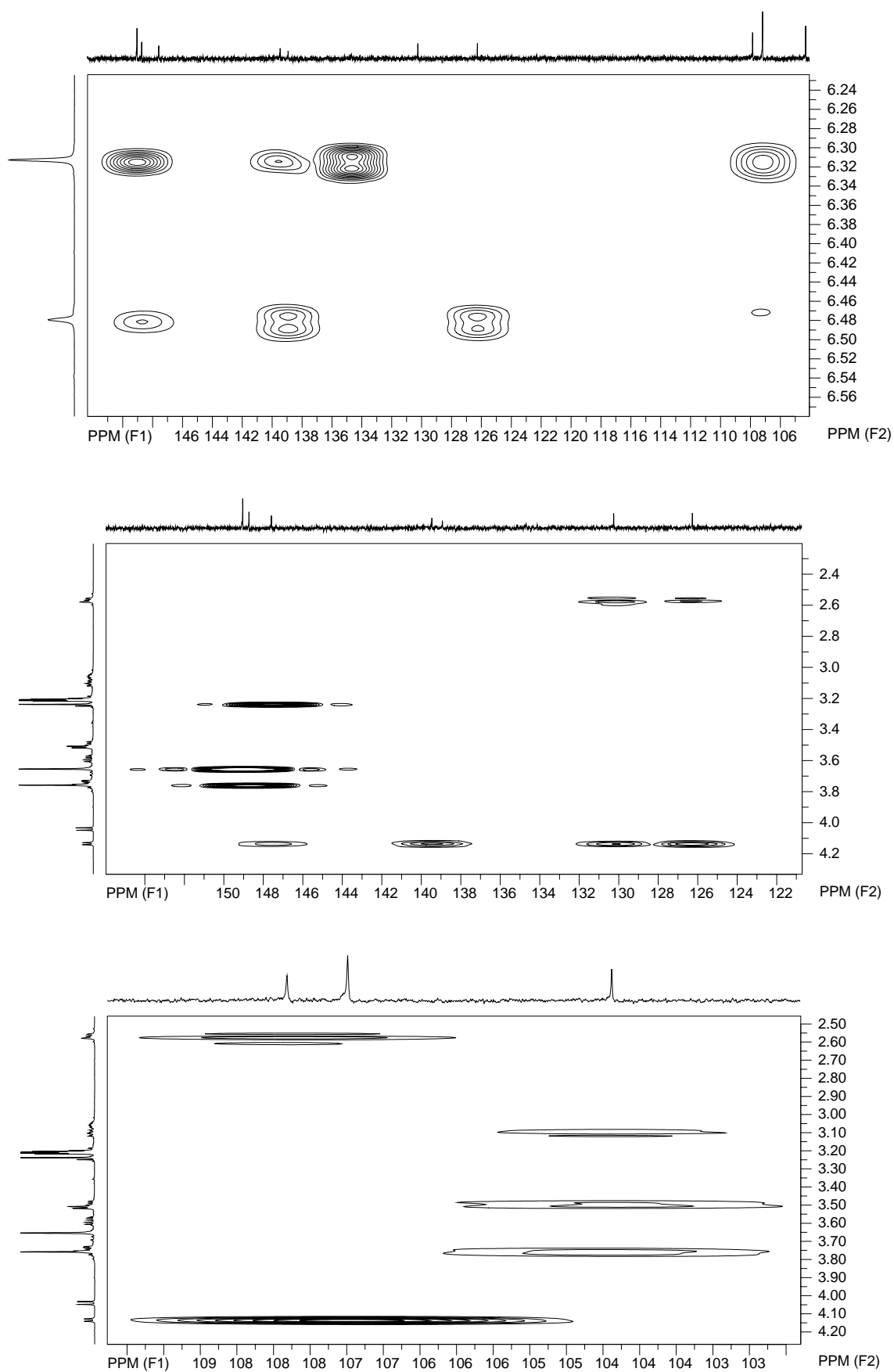


**Figura 269.** Ampliações do mapa de correlação gHMQC da substância **34** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).

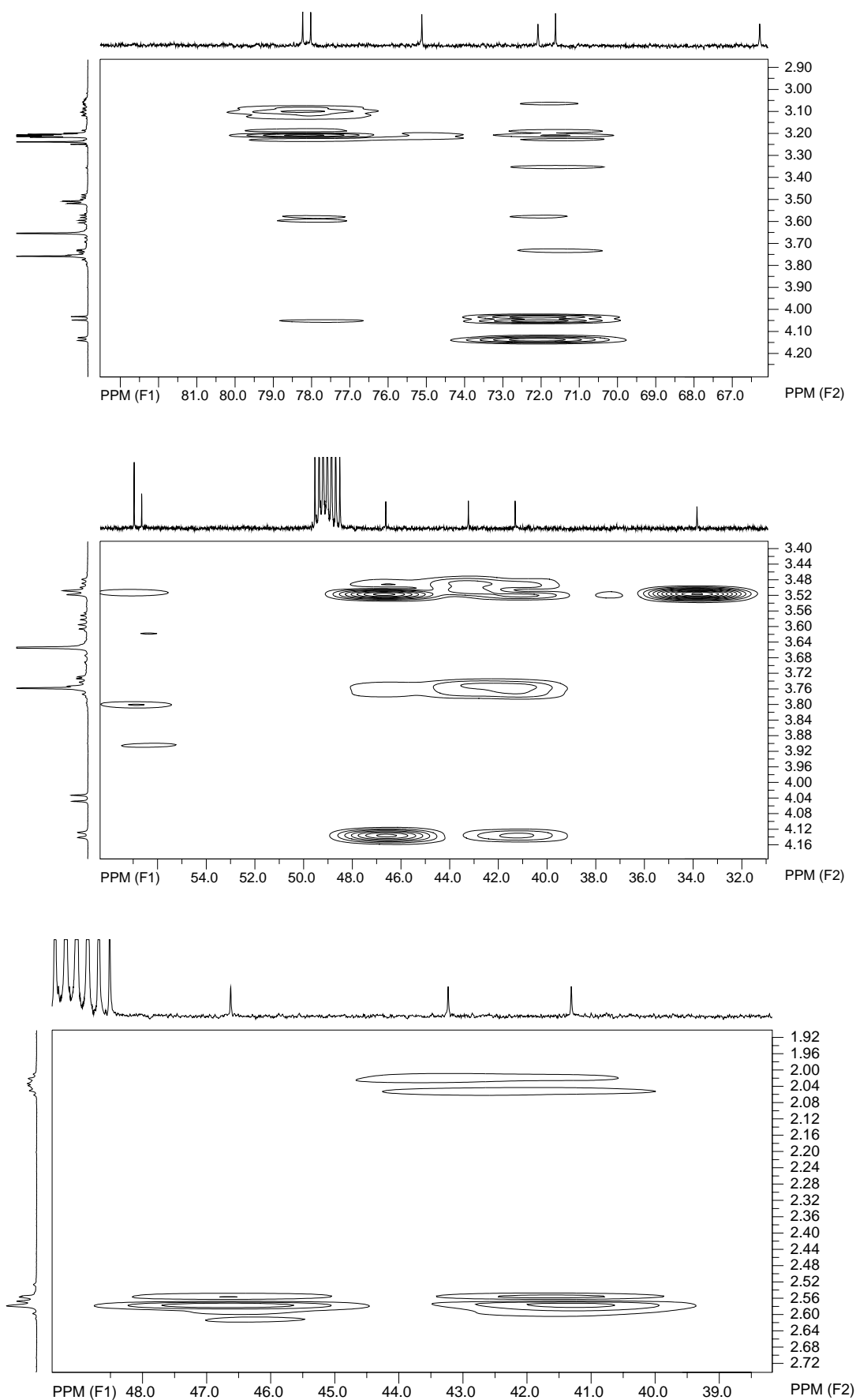


**Figura 270.** Mapa de correlação gHMBC da substância **34** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).





**Figura 271.** Ampliações do mapa de correlação gHMBC da substância **34** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).



**Figura 272.** Ampliações do mapa de correlação gHMBC da substância **34** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).

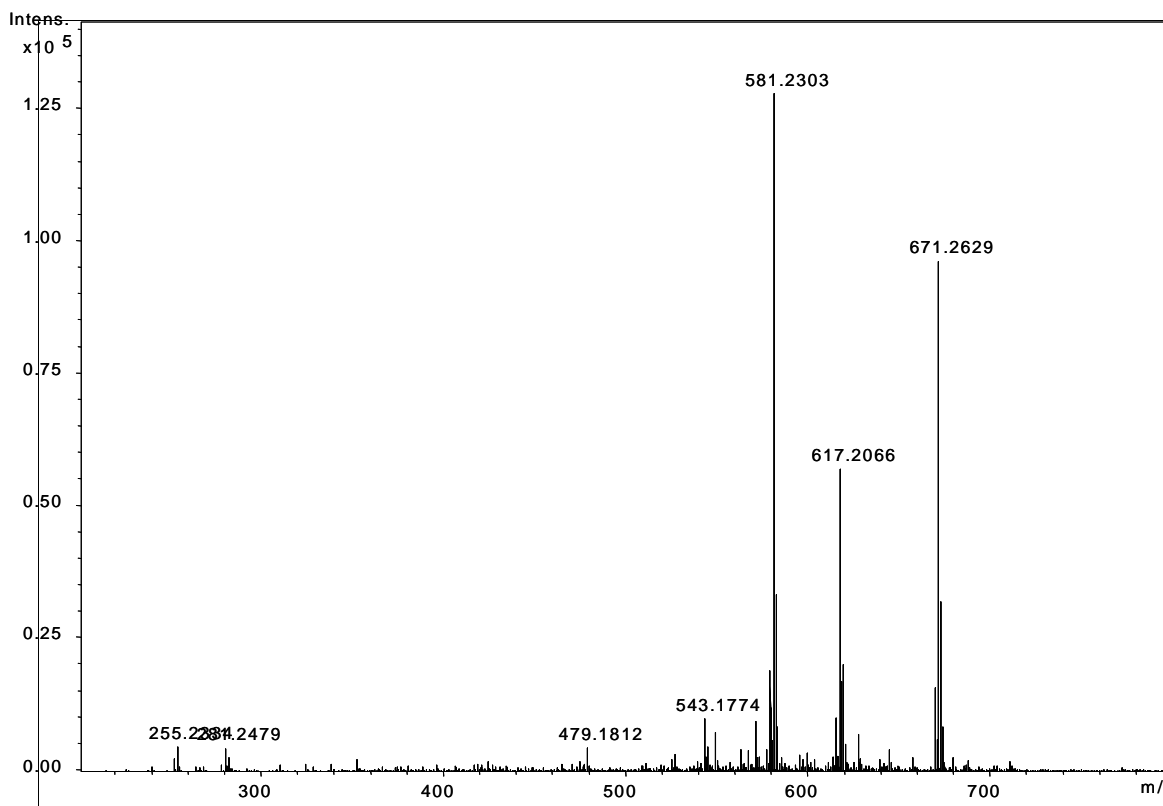
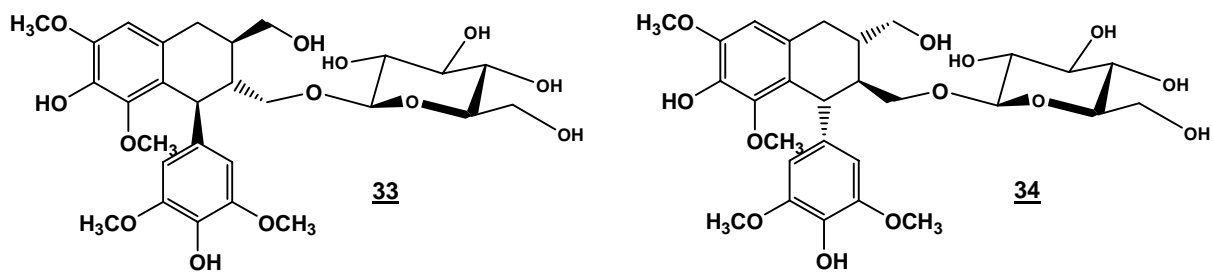


Figura 273. Espectro de Massas da mistura das substâncias **33** e **34** (modo negativo).



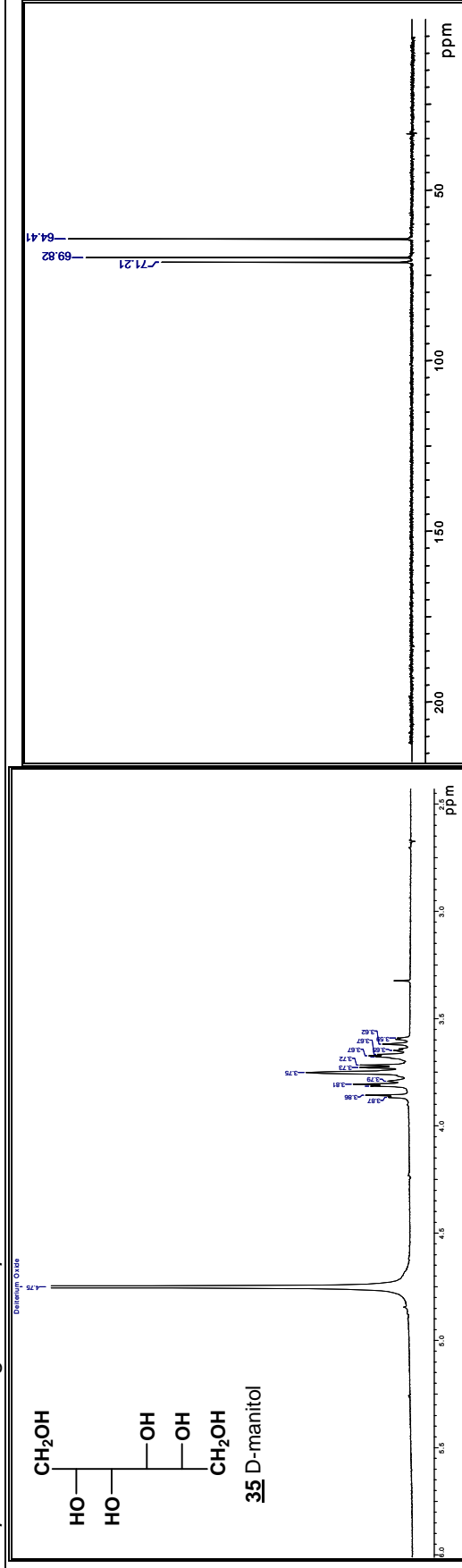


Figura 274. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **35** (D<sub>2</sub>O, 200 MHz). Figura 276. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da substância **35** (D<sub>2</sub>O, 50 MHz).

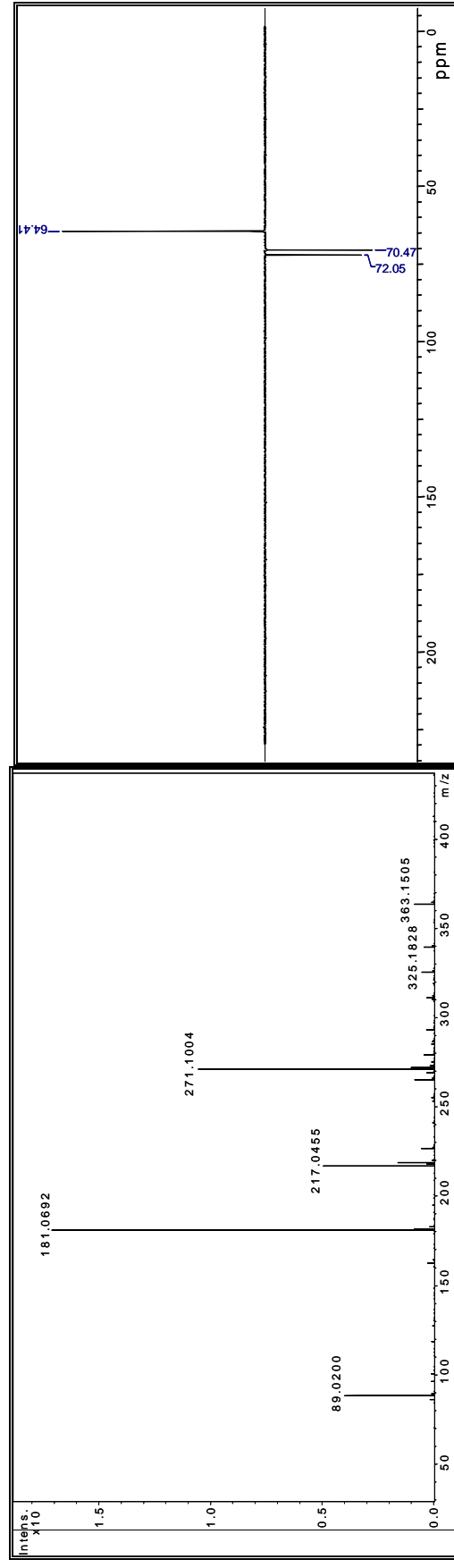


Figura 275. Espectro de massas da substância **35** (modo negativo). Figura 277. Espectro de DEPT 135° da substância **35** (D<sub>2</sub>O, 50 MHz).