



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA



**CONSTITUINTES MICROMOLECULARES DE  
*ARISTOLOCHIA MELASTOMA* MANSO: COMPOSTOS  
NITRADOS**

CLÁUDIO RODRIGO NOGUEIRA

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. LUCIA MARIA XAVIER LOPES  
ORIENTADORA

ARARAQUARA  
2010

CLÁUDIO RODRIGO NOGUEIRA

**CONSTITUINTES MICROMOLECULARES DE  
*ARISTOLOCHIA MELASTOMA* MANSO: COMPOSTOS  
NITRADOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia Maria Xavier Lopes

ARARAQUARA  
2010

CLAUDIO RODRIGO NOGUEIRA

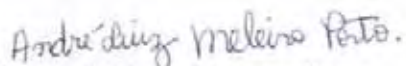
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 19 de janeiro de 2010.

BANCA EXAMINADORA



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lucia Maria Xavier Lopes (Orientadora)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto  
Instituto de Química – USP, São Carlos



Dr<sup>a</sup> Lidilhone Hamerski Carbonezi  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro

FICHA CATALOGRÁFICA

N778c Nogueira, Cláudio Rodrigo  
Constituintes micromoleculares de *Aristolochia melastoma* Manso :  
compostos nitrados / Cláudio Rodrigo Nogueira. – Araraquara : [s.n], 2010  
125 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de  
Química

Orientador: Lucia Maria Xavier Lopes

1. Produtos naturais. 2. Ressonância magnética nuclear.  
3. Cromatografia líquida. I. Título.

**Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de  
Araraquara**

Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

## DADOS CURRICULARES

CLÁUDIO RODRIGO NOGUEIRA

### DADOS PESSOAIS

Nascimento: 31/07/1986

Nacionalidade: Brasileiro

Naturalidade: Americana - SP

Estado Civil: Solteiro

Filiação: Pai: Cláudio Martins Nogueira

Mãe: Meire Teixeira

Profissão: Químico

Documento de Identidade (RG): 13.382.091 (SSP-MG)

Cadastro de Pessoa Física (CPF): 080.760.166-73

Endereço: Av. Itápolis, nº. 2161, Quitinete nº. 4, Quitandinha, CEP 14.800-040, Araraquara - SP.

Endereço Profissional: Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara - UNESP, C.P. 355, CEP 14801-970, Araraquara - SP.

Endereço eletrônico: mineiro\_quimica2007@yahoo.com.br

### FORMAÇÃO ACADÊMICA

Graduação: Química bacharelado em química tecnológica

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Monografia: Sesquiterpenos das folhas de *Ocotea minarum* (Lauraceae)

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Rodrigues Garcez

Bolsista: Grupo PET-Química

Data de conclusão: 05/12/2007

Mestrado: Mestrado em Química

Instituição: Instituto de Química de Araraquara - UNESP

Dissertação: Constituintes micromoleculares de *Aristolochia melastoma* Manso: compostos nitrados

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia Maria Xavier Lopes

Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

## **PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS E EVENTOS CIENTÍFICOS**

NOGUEIRA, C. R.; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; HAMERSKI, L.; VIZZOTO, L. Sesquiterpenos das folhas de *Ocotea minarum* (Lauraceae). In: **30<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007, Águas de Lindóia - SP.

NOGUEIRA, C. R.; TIEPPO, C.; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; HAMERSKI, L. Novos terpenóides das folhas de *Ocotea minarum* (Lauraceae). In: **31<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2008, Águas de Lindóia - SP.

NOGUEIRA, C. R.; LOPES, L. M. X. Constituintes micromoleculares de *Aristolochia melastoma* Manso. In: **32<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2009, Fortaleza - CE.

FUZZATO, J.; NOGUEIRA, C. R.; LOPES, L. M. X. Estudo fitoquímico de constituintes polares do extrato etanólico de *Aristolochia pubescens*. In: **32<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2009, Fortaleza - CE.

NOGUEIRA, C. R.; LOPES, L. M. X. Nitro derivatives and other constituents from *Aristolochia melastoma*. In: **2nd Brazilian Conference on Natural Products & XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (RESEM)**, 2009, Águas de São Pedro - SP.

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus adoráveis pais, Cláudio Martins Nogueira e Meire Teixeira, com imensa Gratidão.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por não me dar tudo aquilo que eu desejava, mas sim tudo aquilo que eu necessitava.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia Maria Xavier Lopes, meus cordiais agradecimentos pela orientação sublime e pelos conhecimentos de Ressonância Magnética Nuclear.

Aos meus queridos pais, Cláudio Martins Nogueira e Meire Teixeira, eu gostaria de deixar meus mais sinceros e profundos agradecimentos. Eu amo muito vocês dois.

Aos meus irmãos Cláudia Fernanda e Anderson, por serem tão especiais e importantes na minha vida.

A minha namorada Luciana Nuñez, por fazer parte da minha vida, estar sempre ao meu lado, ser minha companheira e por alegrar e transformar o meu cotidiano.

A todos os meus amigos, em especial à Daniela Fogliatto, Dirce Fogliatto, Anésia de Jesus, Célia Fernanda, Letícia Caetano, Rosilene, Mércia Bezerra, Aline Silva, Prudência, Lidilhone Hamerski, Roberta Coelho, Patrícia, Marcos Machado, Cristine, Alessandra, Gisele Baraldi, Carolina Mendes Viana, Júlia Fuzzato, Caroline Tieppo, Marcos Donizete, Juliana, Mike, Vanessa, Cristiana, Daniara, Marco Aurélio, Vânia, Fernando, Alessandra, Kelly, Thaís, Beatriz, entre outros que guardo no coração.

Aos professores do Departamento de Química da UFMS, em especial à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Rodrigues Garcez, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Neli Kika Honda, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Neuza Somera, Prof. Dr. Onofre Salgado Siqueira e Prof. Dr. Waldir Silva Garcez, por serem incríveis e terem me dado uma formação de excelência.

Aos professores de pós-graduação do IQ-UNESP, em especial à Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa, Prof. Dr. Wagner Vilegas e Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro, pelos valiosos ensinamentos.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isabele Rodrigues Nascimento, a qual eu tenho imenso respeito e grande admiração, por ter sempre me ouvido e dado conselhos que serão inesquecíveis para mim e sem dúvida transformaram a maneira de encarar o meu cotidiano.



Ao Dr. Nivaldo Boralle, pela amizade, sabedoria e obtenção dos espectros de RMN.

Ao Dr. Alberto Alécio, pela amizade, disposição e obtenção dos espectros de massas.

Ao Instituto de Química da Unesp de Araraquara, pela oportunidade, acolhimento e pela excelência acadêmica.

Ao CNPq e a Fapesp, pelo suporte financeiro, imprescindível para execução desse trabalho.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, seja de forma direta ou indireta.

*Informações aparentemente não concatenáveis,  
se analisadas mediante abordagem holística,  
podem revelar, de forma inconspícua, mistérios  
do funcionamento da natureza.*

**CLÁUDIO RODRIGO NOGUEIRA**

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>22</b>
<b>1.1 Aspectos botânicos e químicos da família Aristolochiaceae</b>	<b>22</b>
<b>1.2 Ocorrência e biogênese de compostos nitrados</b>	<b>24</b>
1.2.1 Nitração direta	24
1.2.2 <i>N</i> -Oxidação enzimática de aminas	25
<b>1.3 Ocorrência e biogênese de derivados nitrofeniléticos</b>	<b>27</b>
<b>1.4 Ácidos aristolóquicos (AAs)</b>	<b>33</b>
1.4.1 Ocorrência e biogênese	33
1.4.2 Atividades biológicas e efeitos deletérios dos AAs	36
<b>1.5 A espécie <i>A. melastoma</i> Manso (Aristolochiaceae)</b>	<b>37</b>
1.5.1 Descrição botânica	37
1.5.2 Estudo fitoquímico	37
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>39</b>
<b>3 EXPERIMENTAL</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Especificações dos materiais e equipamentos utilizados</b>	<b>40</b>
<b>3.2 Estudo fitoquímico de <i>A. melastoma</i></b>	<b>41</b>
3.2.1 Coleta e identificação do material vegetal	41
3.2.2 Preparação dos extratos orgânicos e fracionamento preliminar do extrato acetônico de caules e raízes de <i>A. melastoma</i>	41
3.2.3 Estudo químico da fração A-05	42
3.2.4 Estudo químico da fração A-06	42
3.2.5 Estudo químico da fração A-07	42
3.2.6 Estudo químico da fração A-08	43
3.2.7 Estudo químico da fração A-09	43
<b>3.3 Dados físicos e espectrométricos dos compostos isolados</b>	<b>45</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>50</b>
<b>4.1 Derivados fenantrênicos (1 e 6-11)</b>	<b>50</b>
4.1.1 Aristolactama All (1)	50

4.1.2 Ácidos aristolóquicos I e II (6 e 7) e aristolocatos de sódio IIIa, IVa e I (8, 9 e 11)	53
4.1.3 Alcalóide 4,5-dioxoaporfínico (10)	57
<b>4.2 Lignana dibenzilbutânica, 9,9'-diacetato secoisolariciresinol dimetil éter (2)</b>	<b>60</b>
<b>4.3 Derivados C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub></b>	<b>64</b>
4.3.1 Tirosol (3)	64
4.3.2 Icarisídeo D2 (17)	66
4.3.4 Derivado C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -NO <sub>2</sub> glicosidado, talictosídeo (14)	80
<b>4.4 Derivados C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub></b>	<b>83</b>
4.4.1 Ácidos <i>p</i> -hidroxibenzóico (4) e vanilínico (5)	83
<b>4.5 Esteróide glicosilado</b>	<b>88</b>
4.5.1 Sitosterol 3-O-β-D-glucopiranosídeo (12)	88
<b>4.6 Poliól</b>	<b>91</b>
4.6.1 Glicerol (13)	91
<b>4.7 Nucleosídeos</b>	<b>93</b>
4.7.1 Nucleosídeo uridina (15)	93
4.7.1 Nucleosídeo adenosina (18)	95
<b>4.8 Flavonóides glicosilados</b>	<b>98</b>
4.8.1 Kaempferol 3-O-β-robinobiosídeo (19)	98
4.8.2 Isoramnetina 3-O-β-robinobiosídeo (20)	110
<b>4.9 Compostos nitrofeniletílicos e evolução de vegetais</b>	<b>115</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>116</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>117</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Sistemas de classificação da família Aristolochiaceae (reproduzida e adaptada a partir de Lopes <i>et al.</i> , 2001) <sup>3</sup> .....	23
Tabela 2: Exemplos de compostos orgânicos nitrados .....	26
Tabela 3: Ocorrência de compostos C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -NO <sub>2</sub> (Busca nas bases de dados “Dictionary of Natural Products” e “SciFinder Scholar – Chemical Abstracts Service”). .....	30
Tabela 3: Dados de RMN de <sup>1</sup> H de <b>1</b> (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> em Hz). .....	53
Tabela 4: Dados de RMN de <sup>1</sup> H de <b>6-9 e 11</b> (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> em Hz). .....	57
Tabela 5: Dados de RMN de <sup>1</sup> H de <b>10</b> (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> em Hz). .....	59
Tabela 6: Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>2</b> (11,7 T, CDCl <sub>3</sub> , δ, <i>J</i> em Hz).....	64
Tabela 7: Dados de RMN de <sup>1</sup> H de <b>3</b> (500 MHz, δ, <i>J</i> em Hz). .....	65
Tabela 8: Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>17</b> (11,7 T, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> em Hz). .....	68
Tabela 9: Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>16</b> (11,7 T, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , <i>J</i> em Hz). .....	80
Tabela 10: Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>14</b> (11,7 T, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , <i>J</i> em Hz). .....	81
Tabela 11: Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>4</b> (11,7 T, *DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> e **CDCl <sub>3</sub> , <i>J</i> em Hz).....	88
Tabela 12: Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>5</b> (11,7 T, *DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> e **CDCl <sub>3</sub> , <i>J</i> em Hz).....	88
Tabela 13: Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>12</b> (11,7 T, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , <i>J</i> em Hz). .....	90
Tabela 14: Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>13</b> (11,7 T, D <sub>2</sub> O, δ, <i>J</i> em Hz).....	91
Tabela 15: Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>15</b> (11,7 T, D <sub>2</sub> O, δ, <i>J</i> em Hz).....	95
Tabela 16: Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>18</b> (11,7 T, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> em Hz). ...	97
Tabela 17: Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>19</b> (11,7 T, CD <sub>3</sub> OD, δ, <i>J</i> em Hz).....	109
Tabela 18: Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>20</b> (11,7 T, CD <sub>3</sub> OD, δ, <i>J</i> em Hz).....	114

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Oxidação enzimática de ácido <i>p</i> -aminobenzóico (reproduzido a partir da ref. 21).....	27
Esquema 2: Proposta biossintética de glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos (baseado nas refs. 35, 36, 42, 43 e 50).....	29
Esquema 3: Biogênese dos AAs (reproduzido a partir das refs. 57 e 58).....	34
Esquema 4: Biogênese de ácidos aristolóquicos e aristolactamas (reproduzido a partir da ref. 64).....	35
Esquema 5: Fracionamento do extrato acetônico de caules e raízes de <i>A. melastoma</i> .....	44
Esquema 6: Proposta de fragmentação do composto <b>16</b> .....	77
Esquema 7: Proposta de fragmentação do flavonóide <b>19</b> .....	102
Esquema 8: Proposta de fragmentação do flavonóide <b>20</b> .....	114

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>A. melastoma</i> – Partes aéreas (Folhas e flores em destaque).....	37
Figura 2: Constituintes químicos isolados de <i>A. melastoma</i> neste estudo.....	38
Figura 3: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da aristolactama AII ( <b>1</b> ) (DMSO- $d_6$ , 500 MHz). ...	51
Figura 4: Espectro de massas do composto <b>1</b> (ESI, + 50 eV).....	51
Figura 5: Espectro $g\text{NOESY}$ 1D da aristolactama AII ( <b>1</b> ) (DMSO- $d_6$ , 500 MHz). ....	52
Figura 6: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do ácido aristolóquico I ( <b>6</b> ) (DMSO- $d_6$ , 500 MHz). .....	54
Figura 7: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do ácido aristolóquico II ( <b>7</b> ) (DMSO- $d_6$ , 500 MHz). .....	55
Figura 8: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do aristocato de sódio IIIa ( <b>8</b> ) (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).....	55
Figura 9: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do aristocato de sódio IVa ( <b>9</b> ) (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).....	56
Figura 10: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do aristocato de sódio I ( <b>11</b> ) (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).....	56
Figura 11: Valores de $\delta$ para o H-9 em ácidos aristolóquicos e aristocatos de sódio (*R = Na; **R = H). ....	57
Figura 12: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>10</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).....	58
Figura 13: Espectro de massas do composto <b>10</b> (ESI, + 30 eV).....	58
Figura 14: Valores de RMN de $^{13}\text{C}$ para metoxilas em C-1 e/ou C-2 de alcalóides dioxoaporfínicos .....	59
Figura 15: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>2</b> (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz). ....	61
Figura 16: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>2</b> (CDCl <sub>3</sub> , 126 MHz). ....	61
Figura 17: Espectro de massas do composto <b>2</b> (ESI, + 50 eV).....	62
Figura 18: Valores das constantes de acoplamento dos H-9,9' nos compostos modelos.....	62
Figura 19: Expansão do mapa de contornos $g\text{HMBC}$ de <b>2</b> (CDCl <sub>3</sub> , 11,7 T).....	63
Figura 20: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>3</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).....	65
Figura 21: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>17</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).....	66
Figura 22: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>17</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz). ....	67

Figura 23: Valores selecionados de $\delta$ de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ (DMSO- $d_6$ ) para icarisídeo D2 e salidrosideo. ....	68
Figura 24: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>16</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).....	70
Figura 25: Expansão do mapa de contornos $g\text{COSY } ^1\text{H}-^1\text{H}$ de <b>16</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).....	70
Figura 26: Espectro $g\text{TOCSY 1D}$ de <b>16</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz). ....	71
Figura 27: Espectro $g\text{TOCSY 1D}$ de <b>16</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz). ....	71
Figura 28: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>16</b> (DMSO- $d_6$ , 126 MHz).....	72
Figura 29: Espectro de DEPT $90^\circ$ de <b>16</b> (DMSO- $d_6$ , 126 MHz). ....	72
Figura 30: Expansão do mapa de contornos $g\text{HMBC}$ de <b>16</b> (11,7 T, DMSO- $d_6$ ).....	73
Figura 31: Expansão do mapa de contornos $g\text{HMBC}$ de <b>16</b> (DMSO- $d_6$ , 11,7 T).....	74
Figura 32: Expansão do mapa de contornos $g\text{HMBC}$ de <b>16</b> (DMSO- $d_6$ , 11,7 T).....	74
Figura 33: Expansão do mapa de contornos $g\text{HMBC}$ de <b>16</b> (DMSO- $d_6$ , 11,7 T).....	75
Figura 34: Expansão do mapa de contornos $g\text{HMBC}$ de <b>16</b> (DMSO- $d_6$ , 11,7 T).....	75
Figura 35: Expansão do mapa de contornos $g\text{HMBC}$ de <b>16</b> (DMSO- $d_6$ , 11,7 T).....	76
Figura 36: Expansão do mapa de contornos $g\text{HMBC}$ de <b>16</b> (DMSO- $d_6$ , 11,7 T).....	76
Figura 37: Espectro de massas do composto <b>16</b> (ESI, + 35 eV).....	77
Figura 38: Expansão do mapa de contornos $g\text{HMQC}$ de <b>16</b> (DMSO- $d_6$ , 11,7 T). ....	78
Figura 39: Expansão do mapa de contornos $g\text{HMQC}$ de <b>16</b> (DMSO- $d_6$ , 11,7 T). ....	78
Figura 40: Expansão do mapa de contornos $g\text{HMQC}$ de <b>16</b> (DMSO- $d_6$ , 11,7 T). ....	79
Figura 41: Expansão do mapa de contornos $g\text{HMQC}$ de <b>16</b> (DMSO- $d_6$ , 11,7 T). ....	79
Figura 42: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>14</b> em mistura com <b>16</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz; os principais sinais de <b>16</b> estão destacados no espectro). ....	82
Figura 43: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>14</b> em mistura com <b>16</b> (DMSO- $d_6$ , 126 MHz). ....	82
Figura 44: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da mistura de <b>4</b> e <b>5</b> (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).....	84
Figura 45: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da mistura de <b>4</b> e <b>5</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz). ....	84
Figura 46: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da mistura de <b>4</b> e <b>5</b> (DMSO- $d_6$ , 126 MHz). ....	85
Figura 47: Expansão do mapa de contornos $g\text{HMBC}$ da mistura de <b>4</b> e <b>5</b> (DMSO- $d_6$ , 11,7 T).....	85
Figura 48: Expansão do mapa de contornos $g\text{HMBC}$ da mistura de <b>4</b> e <b>5</b> (DMSO- $d_6$ , 11,7 T).....	86
Figura 49: Expansão do mapa de contornos $g\text{HMBC}$ da mistura de <b>4</b> e <b>5</b> (DMSO- $d_6$ , 11,7 T).....	86



Figura 50: Expansão do mapa de contornos <i>g</i> HMQC da mistura de <b>4</b> e <b>5</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 11,7 T).....	87
Figura 51: Espectro de <i>g</i> NOESY 1D da mistura de <b>4</b> e <b>5</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).....	87
Figura 52: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de <b>12</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz). ....	89
Figura 53: Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de <b>12</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz).....	90
Figura 54: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de <b>13</b> (D <sub>2</sub> O, 500 MHz).....	92
Figura 55: Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de <b>13</b> (D <sub>2</sub> O, 126 MHz). ....	92
Figura 56: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de <b>15</b> (D <sub>2</sub> O, 500 MHz).....	93
Figura 57: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de <b>15</b> (D <sub>2</sub> O, 126 MHz).....	94
Figura 58: Espectro de massas do composto <b>15</b> (ESI, + 35 eV).....	94
Figura 59: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de <b>18</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz). ....	96
Figura 60: Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de <b>18</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 126 MHz).....	96
Figura 61: Espectro de massas do composto <b>18</b> (ESI, + 35 eV).....	97
Figura 62: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de <b>19</b> (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).....	99
Figura 63: Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de <b>19</b> (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz). ....	99
Figura 64: Expansão do mapa de contornos <i>g</i> COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H de <b>19</b> (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).....	100
Figura 65: Expansão do mapa de contornos <i>g</i> COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H de <b>19</b> (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).....	100
Figura 66: Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de <b>19</b> (CD <sub>3</sub> OD, 126 MHz). ....	101
Figura 67: Espectro de DEPT 90° de <b>19</b> (CD <sub>3</sub> OD, 126 MHz).....	101
Figura 68: Espectro de massas do composto <b>19</b> (ESI, - 70 eV).....	102
Figura 69: Espectro de massas do composto <b>19</b> (ESI, + 70 eV).....	102
Figura 70: Expansão do mapa de contornos <i>g</i> HMBC de <b>19</b> (CD <sub>3</sub> OD, 11,7 T). ....	104
Figura 71: Expansão do mapa de contornos <i>g</i> HMBC de <b>19</b> (CD <sub>3</sub> OD, 11,7 T). ....	104
Figura 72: Expansão do mapa de contornos <i>g</i> HMBC de <b>19</b> (CD <sub>3</sub> OD, 11,7 T). ....	105
Figura 73: Expansão do mapa de contornos <i>g</i> HMBC de <b>19</b> (CD <sub>3</sub> OD, 11,7 T). ....	105
Figura 74: Expansão do mapa de contornos <i>g</i> HMBC de <b>19</b> (CD <sub>3</sub> OD, 11,7 T). ....	106
Figura 75: Expansão do mapa de contornos <i>g</i> HMBC de <b>19</b> (CD <sub>3</sub> OD, 11,7 T). ....	106
Figura 76: Expansão do mapa de contornos <i>g</i> HMBC de <b>19</b> (CD <sub>3</sub> OD, 11,7 T). ....	107
Figura 77: Expansão do mapa de contornos <i>g</i> HMBC de <b>19</b> (CD <sub>3</sub> OD, 11,7 T). ....	107
Figura 78: Espectro <i>g</i> TOCSY 1D de <b>19</b> (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).....	108
Figura 79: Espectro <i>g</i> TOCSY 1D de <b>19</b> (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).....	108
Figura 80: Espectro <i>g</i> NOESY 1D do flavonóide <b>19</b> (CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz). ....	110

Figura 81: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>20</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).....	111
Figura 82: Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>20</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz). .....	112
Figura 83: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>20</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz). .....	112
Figura 84: Espectro <i>g</i> NOESY 1D do flavonóide <b>20</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz). .....	113
Figura 85: Espectro <i>g</i> NOESY 1D do flavonóide <b>20</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz). .....	113
Figura 86: Espectro de massas do composto <b>20</b> (ESI, + 70 eV).....	113

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
AcOH	Ácido acético
CC	Cromatografia em coluna
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLV	Cromatografia líquida a vácuo
<i>d</i>	Dubleto
D <sub>2</sub> O	Água deuterada
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
DEPT	“Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsufóxido hexadeuterado
<i>dt</i>	Duplo tripleto
ESI	“Electrospray Ionization Mass Spectrometry”
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
<i>g</i> COSY	“Gradient Correlated Spectroscopy”
<i>g</i> HMBC	“Gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation”
<i>g</i> HMQC	“Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Correlation”
<i>g</i> NOESY	“Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy”
<i>g</i> TOCSY	“Total Correlation Spectroscopy”
hex	Hexano
int. rel.	Intensidade relativa
<i>J</i>	Constante de acoplamento
lit.	Literatura
<i>m</i>	Multipleto
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MeOH	Metanol

NO	Óxido nítrico
p.	Página
p.f.	Ponto de fusão
$q$	Quadrupletto
RMN	Ressonância magnética nuclear
$s$	Singleto
s. str.	<i>Sensu stricto</i>
$s/$	Singleto largo
$t$	Tripletto
UV	Ultravioleta
$W_{1/2}$	Constante de acoplamento aparente
$\delta$	Deslocamento químico
$\lambda$	Comprimento de onda
$[\alpha]_D$	Rotação óptica específica

## RESUMO

O presente trabalho descreve o isolamento e identificação dos constituintes químicos de *Aristolochia melastoma* Manso. O extrato acetônico de caules e raízes foi fracionado por cromatografia em coluna de sílica gel, e as frações obtidas foram submetidas a outros fracionamentos cromatográficos (CCDP, Sephadex LH-20, CC de C-18 e CLAE) e/ou lavagens com solventes orgânicos, resultando no isolamento de vinte compostos conhecidos: aristolactama AII, 9,9'-diacetato-secoisolariciresinol dimetil éter, tirosol, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vanilínico, ácidos aristolóquicos I e II, aristolocatos de sódio IIIa e IVa, 4,5-dioxodeidroasimilobíneo, aristolocato de sódio I, sitosterol 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, glicerol, talictosídeo, uridina, talictricosídeo, icarisídeo D2, adenosina, kaempferol 3-O- $\beta$ -robinobiosídeo e isorhamnetina 3-O- $\beta$ -robinobiosídeo. A lignana 9,9'-diacetato-secoisolariciresinol dimetil éter e talictricosídeo são relatados pela primeira vez na família Aristolochiaceae. As identificações desses compostos foram baseadas nas análises dos seus dados espectrométricos (RMN 1D e 2D, UV e EM). Além disso, a análise dos dados obtidos a partir de literatura especializada acerca da ocorrência e biogênese de derivados nitrofeniléticos sugere que a família Aristolochiaceae pode ter evoluído no sentido de formação de compostos nitrados.

Palavras-chave: Aristolochiaceae, *A. melastoma*, ácidos aristolóquicos, derivados nitrofeniléticos e alcalóides.

## ABSTRACT

This work describes the isolation and identification of the chemical constituents of *A. melastoma* Manso. The acetone extract from stems and roots was fractionated by CC over silica gel and the resultant fractions were subjected to other chromatographic methods (PTLC, Sephadex LH-20, CC RP-18, and HPLC) and/or washed with organic solvents to give twenty known compounds: aristolactam AII, secoisolariciresinol dimethyl ether diacetate, tyrosol, *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, sodium aristolochates I, IIIa, and IVa, 4,5-dioxodehydroasimilobine, aristolochic acids I and II, sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, glycerol, uridine, thalictoside, icariside D2, adenosine, thalictricoside, kaempferol 3-O- $\beta$ -robinobioside, and isorhamnetin 3-O- $\beta$ -robinobioside. Among these, secoisolariciresinol dimethyl ether diacetate and thalictricoside have being reported for the first time in the Aristolochiaceae family. The identifications of these compounds were based on analyses of their spectroscopic data (1D- and 2D-NMR, UV, and MS). Furthermore, an analysis of data obtained from specialized literature on the occurrence and biogenesis of nitrophenylethyl derivatives suggests that the Aristolochiaceae family may have evolved towards nitro compounds.

Keywords: Aristolochiaceae, *A. melastoma*, aristolochic acid, nitrophenylethyl derivatives, and alkaloids.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos botânicos e químicos da família Aristolochiaceae

Aristolochiaceae, considerada membro de Piperales <sup>1</sup>, compreende um grupo de plantas floríferas, com distribuição predominante nas regiões tropicais e subtropicais do planeta <sup>2</sup>. Diversos sistemas de classificação foram propostos para a família Aristolochiaceae (Tabela 1, p. 23) <sup>3, 4</sup>. Entretanto, a classificação taxonômica dentro da família Aristolochiaceae ainda apresenta controvérsias e permanece assunto de debate na literatura. Esta família é usualmente dividida em duas subfamílias: Asaroideae, a qual inclui os gêneros *Asarum* e *Saruma*; e Aristolochioideae, a qual inclui os gêneros *Aristolochia* sensu lato e *Thottea* <sup>5</sup>. González e Stevenson (2002), baseando-se em análise cladística de caracteres morfológicos, revisaram as relações filogenéticas de Aristolochioideae e dividiram *Aristolochia* s.l. em quatro gêneros (*Aristolochia* s. str., *Pararistolochia*, *Endodeca*, e *Isotrema*) dentro de duas subtribos <sup>6</sup>. Esta análise é congruente com o esquema das subtribos Aristolochiinae e Isotrematinae originalmente estabelecido por Huber <sup>7</sup>. Em concordância com González e Stevenson, a estrutura taxonômica apresentada por Ohi-Toma *et al.* (2006), construída com base em número de cromossomos, bem como caracteres morfológicos e dados moleculares, evidencia diferenças dentro de Aristolochiaceae apenas no reconhecimento dos seus níveis taxonômicos <sup>8</sup>.

O gênero *Aristolochia* s.l. é o mais numeroso da família Aristolochiaceae, compreendendo cerca de 500 espécies (ervas, arbustos ou subarbustos e trepadeiras volúveis) <sup>9, 10</sup>. Da flora brasileira foram catalogadas, como *Aristolochia*, cerca de 100 espécies distribuídas por todo o país <sup>11</sup>. A maioria das espécies habita bordas de matas <sup>12</sup>. Contudo, há espécies que são encontradas em regiões descampadas <sup>12</sup>.

A química da família Aristolochiaceae tem sido amplamente estudada; e alguns textos de revisão estão disponíveis na literatura <sup>3, 13-16</sup>. Esses trabalhos fornecem uma visão abrangente da química das espécies pertencentes aos gêneros *Aristolochia*, *Asarum* e *Heterotropa*. No gênero *Aristolochia* estão descritas diversas classes de metabólitos secundários (especiais), ocorrendo com maior frequência os lignóides, terpenóides, alcalóides, alcalmidas e flavonóides <sup>3, 13, 14</sup>.

Tabela 1. Sistemas de classificação da família Aristolochiaceae (reproduzida e adaptada a partir de Lopes *et al.*, 2001) <sup>3</sup>.

Autor	Subfamília	Tribo	Subtribo	Gênero
Klotzsch (1859); Scmidt (1935); Hoehne (1942);	Asaroideae	Sarumeae		<i>Saruma</i>
		Asareae		<i>Asarum</i>
		Bragantieae		<i>Thottea</i> <i>Apama</i>
	Aristolochioideae	Aristolochieae		<i>Aristolochia</i> <i>Holostylis</i>
Euglypheae			<i>Euglypha</i>	
Duchartre (1864); Hoehne (1927); Gregory (1956);	Asaroideae			<i>Asarum</i> <i>Saruma</i>
	Bragantioideae (Apamoideae)			<i>Thottea</i> <i>Apama</i> <i>Bragantia</i>
	Aristolochioideae			<i>Aristolochia</i> <i>Euglypha</i> <i>Holostylis</i>
Schmidt in: Hegnauer (1964)		Sarumeae		<i>Saruma</i> <i>Asarum</i> s. str. <i>Asiasarum</i> <i>Heterotropa</i> <i>Hexastylis</i> <i>Japonasarum</i> <i>Geotaenium</i>
		Bragantieae		<i>Thottea</i> <i>Apama</i>
		Aristolochieae		<i>Holostylis</i> <i>Euglypha</i> <i>Aristolochia</i>
Huber (1993)	Asaroideae			<i>Asarum</i> <i>Saruma</i>
	Aristolochioideae	Bragantieae		<i>Asiphonia</i> <i>Thottea</i> s. str.
		Aristolochieae	Isotrematinae	
	Aristolochiinae			<i>Pararistolochia</i> <i>Howardia</i> <i>Einomeia</i> <i>Euglypha</i> <i>Holostylis</i> <i>Aristolochia</i> s. str.
González (1997)	Asaroideae			<i>Asarum</i> <i>Saruma</i>
	Aristolochioideae			<i>Thottea</i> <i>Aristolochia</i> s.l.*
González e Steveson (2002)	Asaroideae			<i>Asarum</i> <i>Saruma</i>
	Aristolochioideae			<i>Thottea</i>
		Isotrematinae		<i>Isotrema</i> <i>Endodeca</i>
	Aristolochiinae		<i>Pararistolochia</i> <i>Aristolochia</i> s. str	

\* O gênero *Aristolochia* s.l. é subdividido em três subgêneros: *Orthoaristolochia*, *Pararistolochia* e *Siphisia*.



Os perfis metabolômicos das espécies brasileiras de Aristolochiaceae diferem-se significativamente. Embora, alantóina, açúcares, ácidos aristolóquicos e lignanas furofurânicas e butirolactônicas ocorram em muitas espécies, elas também contêm categorias micromoleculares específicas, tais como bicubebinas em *Aristolochia lagesiana* e *Aristolochia pubescens*, lignanas ariltetralônicas em *Holostylis reniformis*, neolignanas benzofurânicas e ácidos aristolóquicos esterificados com diterpenos caurânicos em *A. pubescens*, diterpenos caurânicos em *Aristolochia elegans*, diterpenos labdânicos e clerodânicos em *Aristolochia esperanzae*, *Aristolochia galeata* e *Aristolochia chamissonis*, sesquiterpenos aristolânicos, alcalóides dibenzoquinolizidínicos e tetraidroisoquinolínico em *Aristolochia arcuata*, alcalóides benzilberberínicos em *Aristolochia gigantea*, alcanidas em *Aristolochia gehrtii* e bi- e tetraflavonóides em *Aristolochia ridicula* <sup>11</sup>.

## 1.2 Ocorrência e biogênese de compostos nitrados

Raros, e, portanto com ocorrência esporádica na natureza, os compostos orgânicos nitrados foram descritos como produtos do metabolismo secundário (especializado) de microorganismos, organismos marinhos e plantas superiores <sup>17-20</sup>; exemplos incluem ácidos aristolóquicos, dioxapirrolomicina, taxtomina A, fidolopina, aureotina e 1-nitroacdinina (Tabela 2, p. 26) <sup>17-20</sup>.

Alguns dos compostos orgânicos nitrados co-ocorrem com seus análogos não substituídos e/ou aminados. Com base nessa observação, dois caminhos para a formação de compostos nitrados na natureza são aceitáveis: nitração direta ou *N*-oxidação enzimática de aminas <sup>21, 22</sup>.

### 1.2.1 Nitração direta

A primeira evidência experimental para a nitração biológica de compostos orgânicos foi obtida por Carter *et al.* (1989) <sup>23</sup>. Mediante experimento de marcação isotópica em culturas de *Streptomyces fumanus*, onde a única fonte de nitrogênio foi o  $K^{15}N^{18}O_3$ , eles demonstraram que o grupo nitro do antibiótico dioxapirrolomicina é introduzido na estrutura por processo de nitração direta <sup>23</sup>. Além disso, eles

sugeriram que a reação *in vivo* ocorre de maneira análoga a nitração eletrofílica *in vitro* de compostos aromáticos<sup>23</sup>.

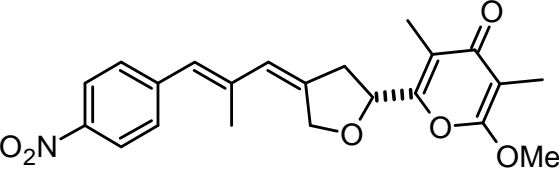
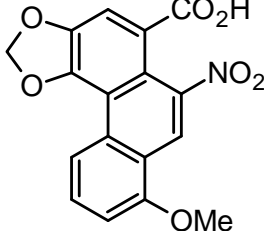
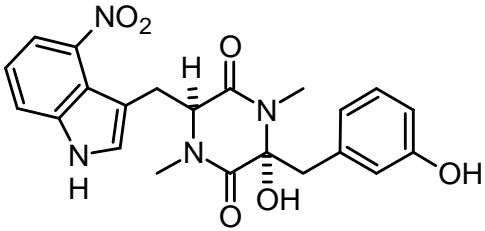
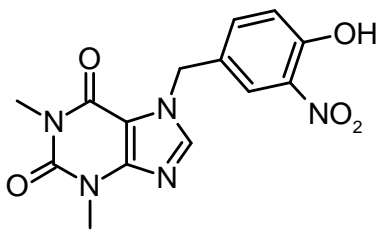
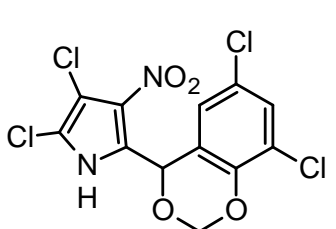
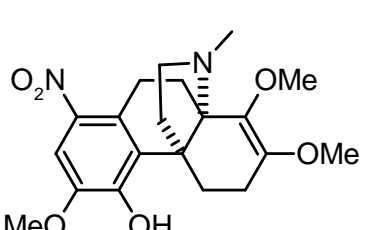
Embora avanços estejam sendo alcançados no entendimento da biogênese de compostos nitrados, o mecanismo biológico de formação da espécie reativa (eletrofílica) de nitrogênio continua ambíguo<sup>21, 22</sup>. Em 2004, Kers *et al.*, baseando-se em estudos biossintéticos do dipeptídeo cíclico taxtomina A, evidenciaram que esta espécie é gerada a partir do óxido nítrico (NO)<sup>24</sup>, o qual é formado pela oxidação da L-arginina por processo enzimático semelhante àquele observado em mamíferos<sup>24, 25</sup>. Conforme dados genômicos, a reação de formação do NO nos mamíferos e microorganismos é catalisada por sintases de óxido nítrico (SON) homólogas<sup>24</sup>. Não necessariamente contrariando Kers *et al.*, Ratnayake *et al.* (2008) demonstraram que inibidores de SON não afetam a biossíntese do metabólito dioxapirrolomicina<sup>22</sup>. Além disso, Ratnayake *et al.* (2008) mostraram que a bactéria *S. fumanus* é capaz de fixar e utilizar o N<sub>2</sub> atmosférico na biossíntese deste composto nitrado<sup>22</sup>.

### 1.2.2 N-Oxidação enzimática de aminas

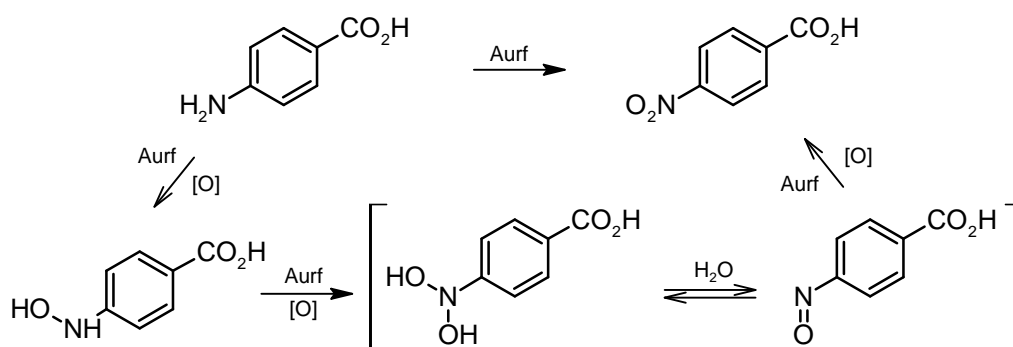
Atualmente são conhecidas duas classes de enzimas que catalisam a oxidação de aminas: haloperoxidases e N-oxigenases genuínas<sup>21</sup>. Diferentemente das N-oxigenases, as haloperoxidases catalisam essas reações apenas sob determinadas condições não fisiológicas, p. ex., baixo pH, excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e na ausência de íons haleto<sup>21</sup>.

O ácido 3-nitropropanóico é um dos compostos orgânicos nitrados conhecidos mais simples<sup>21, 26</sup>. Estudos biossintéticos sugerem precursores distintos para a produção deste metabólito em fungos e plantas superiores<sup>26, 27</sup>. Embora, rota alternativa empregando fonte inorgânica de nitrogênio foi proposta para a biogênese em fungos<sup>26</sup>, a maioria dos autores concorda que o precursor biogenético é o L-aspartato<sup>20, 26</sup>. Segundo Baxter *et al.* (1992), a via biossintética envolveria a conversão enzimática do L-aspartato para (S)-nitrosuccinato, seguido por descarboxilação espontânea<sup>26</sup>. Em contrapartida, Candlish *et al.* (1969), após experimentos preliminares com L-aspartato isotopicamente marcado, devido a não incorporação de radioatividade no produto final, sugerem que, em plantas, o ácido 3-nitropropanóico seja biossintetizado a partir de malonato e malonilidroximato<sup>26, 27</sup>.

Tabela 2: Exemplos de compostos orgânicos nitrados

Estrutura	Nome
	Aureotina
	Ácido aristolóquico I
	Taxtomina A
	Fidolopina
	Dioxapirrolomicina
	1-Nitroacdinina

Um exemplo de oxidação biológica de amina é o processo catalisado pelo *N*-oxigenase *Aurf* (“Aureothin Biosynthesis Gene”) <sup>21, 28, 29</sup>. Este gene catalisa a oxidação do ácido *p*-aminobenzóico para ácido *p*-nitrobenzóico <sup>21, 28, 29</sup>. Estudo monitorado por cromatografia líquida mostrou que a reação enzimática inicia-se com a formação de hidroxilamina, seguido por hidroxilação, desidratação e subsequente oxidação do intermediário nitroso <sup>21, 29</sup> (Esquema 1, p. 27). Recentemente, via similar empregando-se *N*-mono-oxidações foi identificada na atuação catalítica do gene *pnrD* (“Pyrrolnitrin Biosynthetic Gene”) sob arilaminas <sup>21, 30</sup>. Além disso, não há relato na literatura de *N*-dioxigenase capaz de introduzir simultaneamente dois átomos de oxigênio de uma molécula de oxigênio num substrato amina <sup>21</sup>. Isso levou Winkler e Hertweck (2007) a presumirem que na natureza existe um mecanismo geral de atuação das *N*-oxigenases, e que este englobará reações de *N*-mono-oxidações sequenciais <sup>21</sup>.



Esquema 1: Oxidação enzimática de ácido *p*-aminobenzóico (reproduzido a partir da ref. 21).

### 1.3 Ocorrência e biogênese de derivados nitrofeniléticos

Os derivados nitrofeniléticos foram encontrados em espécies pertencentes ao Clado das Magnolídeas e as ordens Ranunculales, Alismatales, Malpighiales, Solanales, Poales e Austrobaileyales (Tabela 3, p. 30-32).

O 1-nitro-2-feniletano foi o primeiro composto  $C_6-C_2-NO_2$  isolado de plantas superiores <sup>31</sup>. Segundo Gottlieb *et al.* (1961), a biogênese deste composto envolveria a oxidação enzimática da fenilalanina para ácido 2-nitro-3-fenilpropanóico, seguido de descarboxilação espontânea <sup>20</sup>. Em 1972, Matsuo *et al.*, baseando-se em estudos biossintéticos de benzilglucosinolatos, sugeriram que a proposta de Gottlieb *et al.*

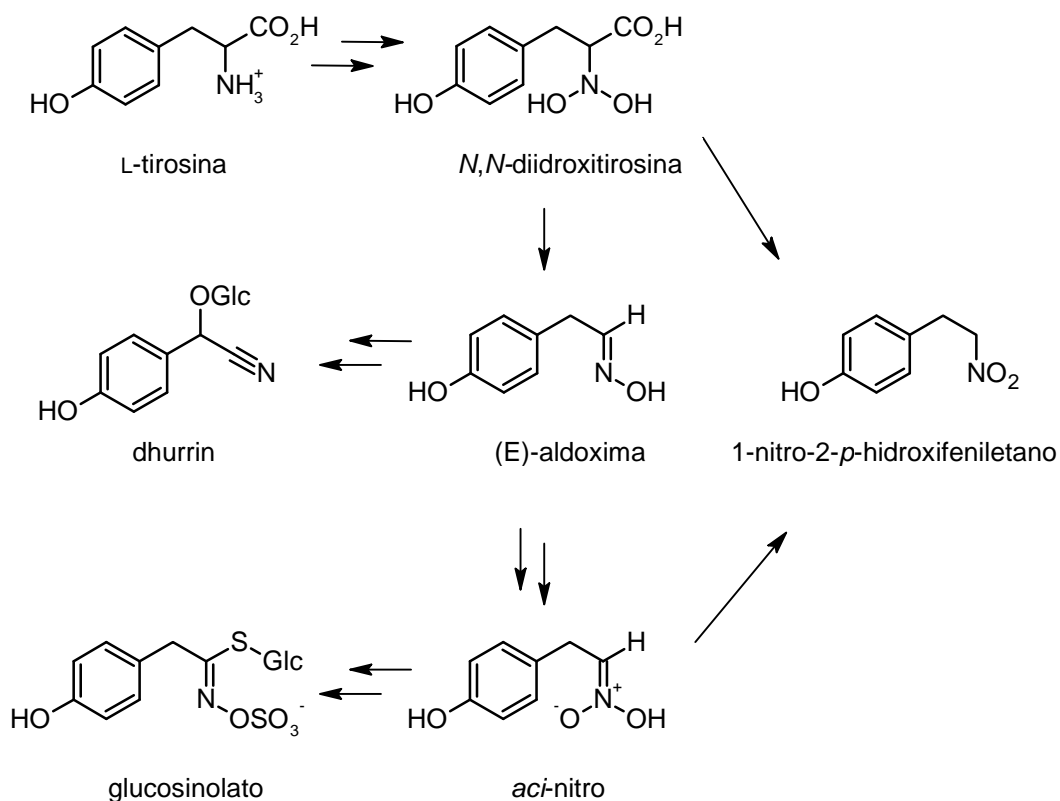
(1961) deveria ser estendida para incluir as oximas como prováveis intermediários dos compostos  $C_6-C_2-NO_2$ <sup>32</sup>. Recentemente, Tieman *et al.* (2006) sugeriram uma rota alternativa para a biogênese do 1-nitro-2-feniletano em *Solanum lycopersicum* transgênico<sup>33</sup>. Diferente das propostas anteriores, a oxidação do grupo amino não precederia a etapa de descarboxilação<sup>33</sup>.

Representantes da categoria micromolecular referida,  $C_6-C_2-NO_2$ , foram isolados e/ou detectados tanto em *taxa* não detentores de glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos como em plantas produtoras desses metabólitos secundários (especiais)<sup>34-36</sup>.

Os glucosinolatos ocorrem em espécies da ordem Brassicales e do gênero *Drypetes* da família Euphorbiaceae<sup>35</sup>, enquanto os glicosídeos cianogênicos são largamente distribuídos no reino vegetal, sendo encontrados em Pteridófitas, Gimnospermas e Angiospermas<sup>34, 36</sup>. De Pteridófitas e Gimnospermas foram isolados somente glicosídeos cianogênicos aromáticos, enquanto de Angiospermas foram isolados ambos os glicosídeos cianogênicos aromáticos e alifáticos<sup>36</sup>. De acordo com Bak *et al.* (2006), essa distribuição é indicativa de que os glicosídeos cianogênicos aromáticos foram os progenitores na natureza dos glicosídeos cianogênicos alifáticos<sup>36</sup>. Essa hipótese é suportada pelo fato que Angiospermas basais, como Magnoliales, contêm glicosídeos cianogênicos derivados da tirosina<sup>36</sup>.

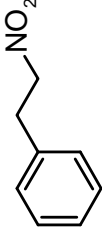
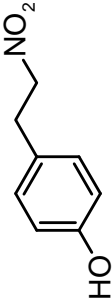
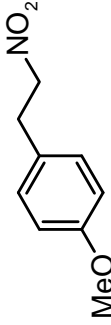
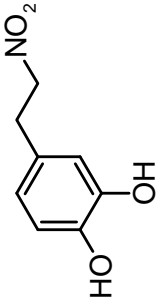
As rotas biogênicas dos glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos foram elucidadas por meio de abordagens bioquímicas e genéticas<sup>17, 32, 34-54</sup>. Segundo Sibbesen *et al.* (1995), nas plantas produtoras de glicosídeos cianogênicos, os derivados  $C_6-C_2-NO_2$  são subprodutos, provavelmente gerados em decorrência de estresses<sup>42</sup> (Esquema 2, p. 29). Além disso, os autores observaram que perturbação do citocromo P-450, provocada durante a preparação da fração microssomal, gera confômero enzimático que favorece a formação do composto nitrado em detrimento da oxima<sup>42</sup>. Diante dessas premissas, eles sugeriram que compostos nitrados podem facilmente originar da via cianogênica (Esquema 2, p. 29)<sup>42</sup>. Por outro lado, de acordo com Halkier e Gershenzon (2006), nas plantas produtoras de glucosinolatos, os derivados nitrofeniléticos, ou mais formalmente seus tautômeros *aci*-nitro, são somente intermediários efêmeros obtidos pela subsequente oxidação das oximas pela enzima CYP83 (enzima pós-oxima da via dos glucosinolatos) (Esquema 2, p. 29)<sup>35</sup>.

Conforme mostrado pelo esquema 2 (p. 29), os glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos são derivados de aminoácidos e possuem oximas como intermediários comuns <sup>35, 36, 42, 43</sup>. Esse indicativo de ancestralidade tem significância evolutiva e levou alguns autores a proporem que glucosinolatos evoluíram baseando-se na pré-disposição para glicosídeos cianogênicos <sup>35, 36</sup>. Esta teoria foi inicialmente suportada pela demonstração de que enzimas homólogas estão envolvidas na oxidação dos aminoácidos para oximas em ambas as vias biogênicas <sup>35</sup>. Evidência adicional para elo evolutivo entre glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos foi fornecida por Hansen *et al.* (2001) <sup>52</sup>. Mediante estudo genético, Hansen *et al.* obtiveram dados consistentes com a hipótese de que a enzima pós-oxima da via cianogênica sofreu mutação para uma enzima que converte oximas em compostos nitrados (p. ex. derivados nitrofeniletílicos); que por sua vez são convertidos em glucosinolatos <sup>35, 52</sup>.

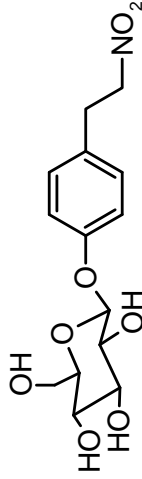


Esquema 2: Proposta biossintética de glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos (baseado nas refs. 35, 36, 42, 43 e 50).

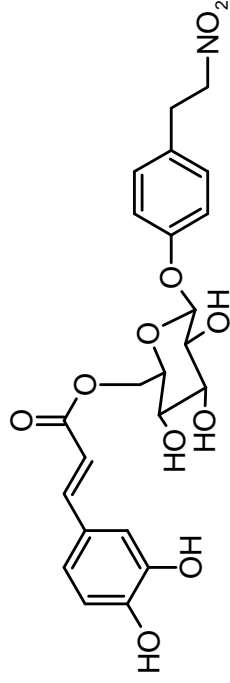
Tabela 3: Ocorrência de compostos C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-NO<sub>2</sub> (Busca nas bases de dados “Dictionary of Natural Products” e “SciFinder Scholar – Chemical Abstracts Service”).

Composto	Nome	Ocorrência
	1-nitro-2-feniletano	<i>Aniba canellila</i> (Lauraceae) <i>Dennettia tripetala</i> (Annonaceae) <i>Lycopersicon esculentum</i> (Solanaceae) <i>Ocotea pretiosa</i> (Lauraceae) <i>Parinari curatellifolia</i> (Chrysobalanaceae) <i>Solanum lycopersicum</i> (Solanaceae)
	1-nitro-2- <i>p</i> -hidroxifeniletano	<i>Aristolochia gehrtii</i> (Aristolochiaceae) <i>Eschscholtzia californica</i> (Papaveraceae) <i>Lysichitum americanum</i> (Araceae)* <i>Sorghum bicolor</i> (Poaceae) <i>Thalictrum aquilegifolium</i> (Ranunculaceae)
	1-nitro-2- <i>p</i> -metoxifeniletano	<i>Lysichitum americanum</i> (Araceae)*
	1-nitro-2-3,4-dihidroxifeniletano	<i>Streptomyces</i> sp.**

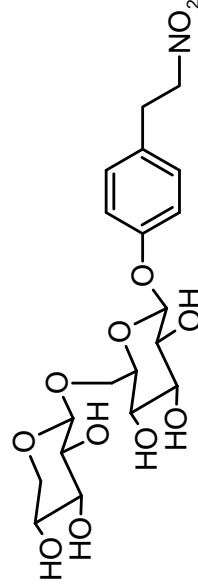
*Aquilegia hybrida* (Ranunculaceae)  
*Annona cherimola* (Annonaceae)  
*Aristolochia gehrtii* (Aristolochiaceae)  
*Epimedium diphylum* (Berberidaceae)  
*Epimedium grandiflorum* (Berberidaceae)  
*Epimedium hunanense* (Berberidaceae)  
*Epimedium leptorrhizum* (Berberidaceae)  
*Ocotea vellosiana* (Lauraceae)  
*Parabenzoin praecox* (Lauraceae)  
*Sagittaria trifolia* (Alismataceae)  
*Schisandra propinqua* (Schisandraceae)  
*Thalictrum aquilegifolium* (Ranunculaceae)



talictosídeo

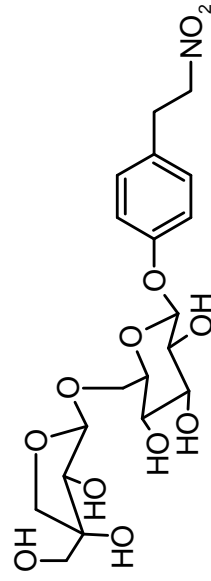
O-[3,4-dihydroxycinnamoyl-( $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosídeo]

*Parabenzoin praecox* (Lauraceae)

O-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1  $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosídeo] ou talictrosídeo

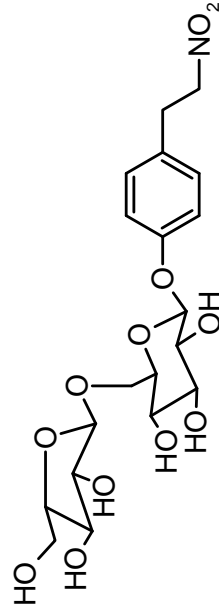
*Annona squamosa* (Annonaceae)  
*Diplocisia glaucescens* (Menispermaceae)  
*Radix semiaquilgiae* (Ranunculaceae)  
*Semiaquilegia aldoxoides* (Ranunculaceae)  
*Thalictrum orientale* (Ranunculaceae)





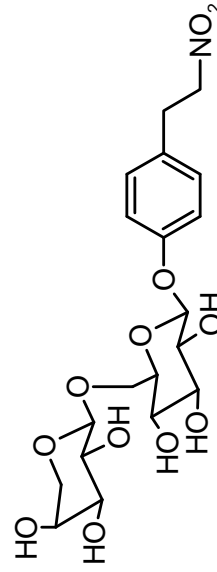
6'-O-β-D-  
apiofuranosilalictosídeo ou 6'-  
apiofuranosilalictosídeo

*Schisandra propinqua* (Schisandraceae)



6'-O-α-L-  
arabinofuranosilalictosídeo ou 6'-  
arabinofuranosilalictosídeo

*Schisandra propinqua* (Schisandraceae)



O-[α-L-arabinopiranosil-(1→6)-β-D-  
glucopiranosídeo] ou  
arabinotalictosídeo

*Sagittaria trifolia* (Alismataceae)

\*Tratado com CuCl<sub>2</sub>  
\*\* Produção em microorganismo (Patente chinesa)

## 1.4 Ácidos aristolóquicos (AAs)

### 1.4.1 Ocorrência e biogênese

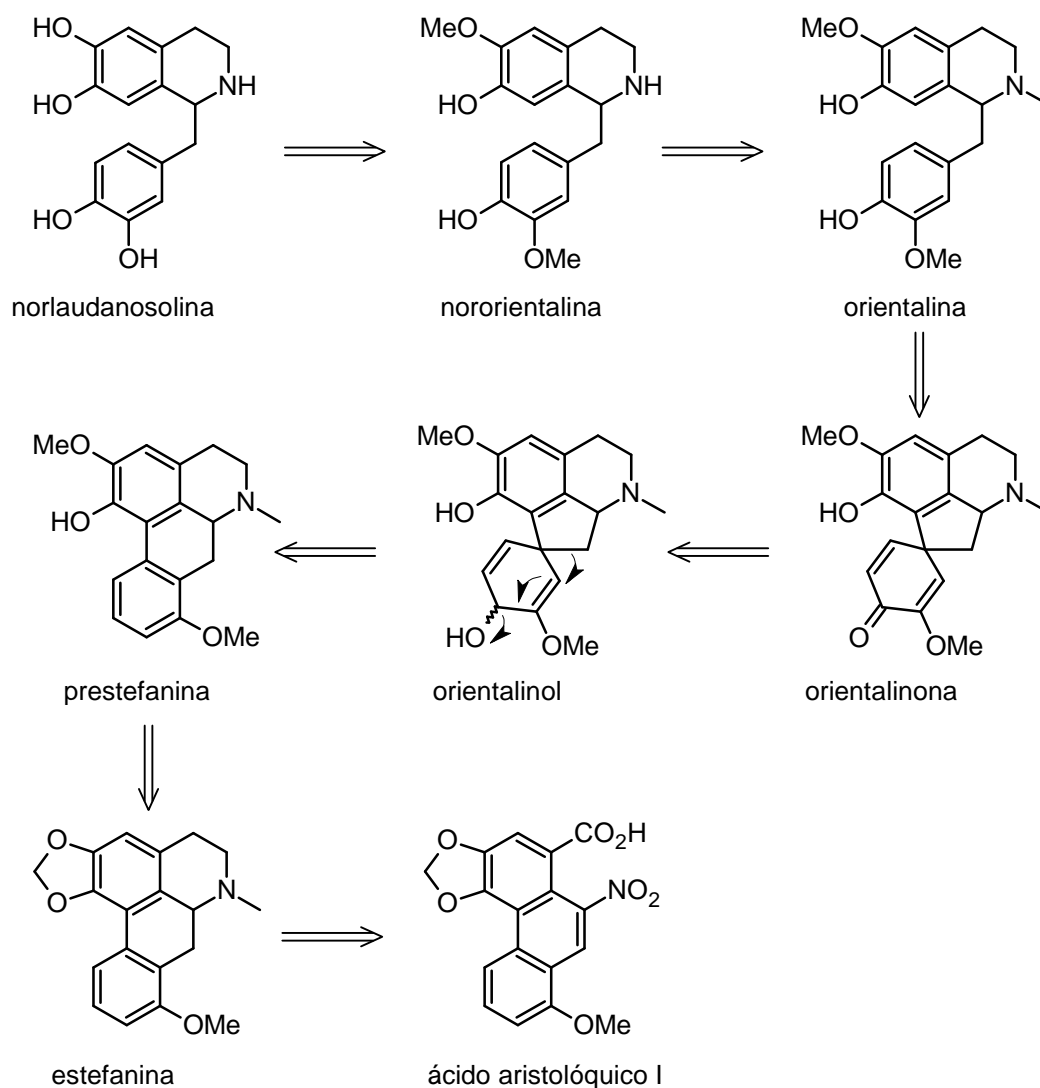
Os ácidos aristolóquicos (AAs) – derivados nitrofenantrênicos – ocorrem em diversos membros da família Aristolochiaceae (pelo menos 60 espécies) e em borboletas (Lepidópteras: Papilionidae), as quais em seus estágios larvais se alimentam dessas plantas <sup>3</sup>.

Uma provável relação biogenética entre AAs e alcalóides aporfínicos foi objeto de especulação na literatura até meados da década de 60. Em 1966, Spender e Tiwari, baseando-se em estudos de incorporação de [3-<sup>14</sup>C]-tirosina, [2-<sup>14</sup>C]-diidroxifenilalanina, [2-<sup>14</sup>C]-diidrofenetanamina e [2-<sup>14</sup>C]-noradrenalina em *Aristolochia sipho*, forneceram a primeira evidência experimental condizente com essa relação biogenética <sup>55</sup>. Segundo Spender e Tiwari, os dados obtidos foram consistentes com a rota previamente postulada: norlaudanosolina → orientalina → orientalinona → orientalinol → estefanina → ácido aristolóquico I, mas insuficientes para comprovar que o alcalóide norlaudanosolina era obrigatoriamente um intermediário biogenético do ácido aristolóquico I (AA I) <sup>55</sup>. Esta comprovação foi obtida em 1967 por Schütte *et al.*, uma vez que ao administrarem [4-<sup>14</sup>C]-norlaudanosolina.HCl às raízes e rizomas em *A. sipho* obtiveram AA1 contendo grupo carboxílico com 69 % de radioatividade <sup>56</sup>.

Em continuidade ao estudo efetuado em 1966, Comer *et al.* (1969) administraram [β-<sup>14</sup>C]-DL-tirosina, [β-<sup>14</sup>C,<sup>15</sup>N]-tirosina, [α-<sup>14</sup>C]-diidroxifenilalanina (dopa), [2-<sup>14</sup>C]-diidroxifeniletanamina (dopamina) e [2-<sup>14</sup>C]-DL-noradrenalina às partes subterrâneas em *A. sipho* <sup>57</sup>. Além de comprovarem que tirosina, dopa, dopamina e noradrenalina são precursores dos AAs, eles evidenciaram que o grupo nitro desses compostos deriva do grupo amino da tirosina <sup>57</sup>. Com base nessas informações, eles propuseram uma rota biogenética para os AAs (mostrada no esquema 3, exceto pelo alcalóide nororientalina, p. 34) <sup>57</sup>.

Em 1982, Sharma *et al.* (Esquema 3. p. 34), baseando-se em estudos de incorporação de tirosina, 3,4-diidroxifenilalanina, nororientalina, orientalina, prestefanina e estefanina em *Aristolochia bracteata*, forneceram dados compatíveis com o esquema biogenético apresentado por Comer *et al.* (1969): noraludanosolina

→ orientalina → orientalnona → orientalol → prestefanina → estefanina → ácido aristolóquico <sup>58</sup>. Além disso, eles evidenciaram a participação do alcalóide nororientalina, confirmaram que o grupo metilendioxílico é formado a partir do precursor *o*-metoxifenol e demonstraram que a estereoquímica do alcalóide nororientalina é preservada durante a biossíntese do AAI <sup>58</sup>.



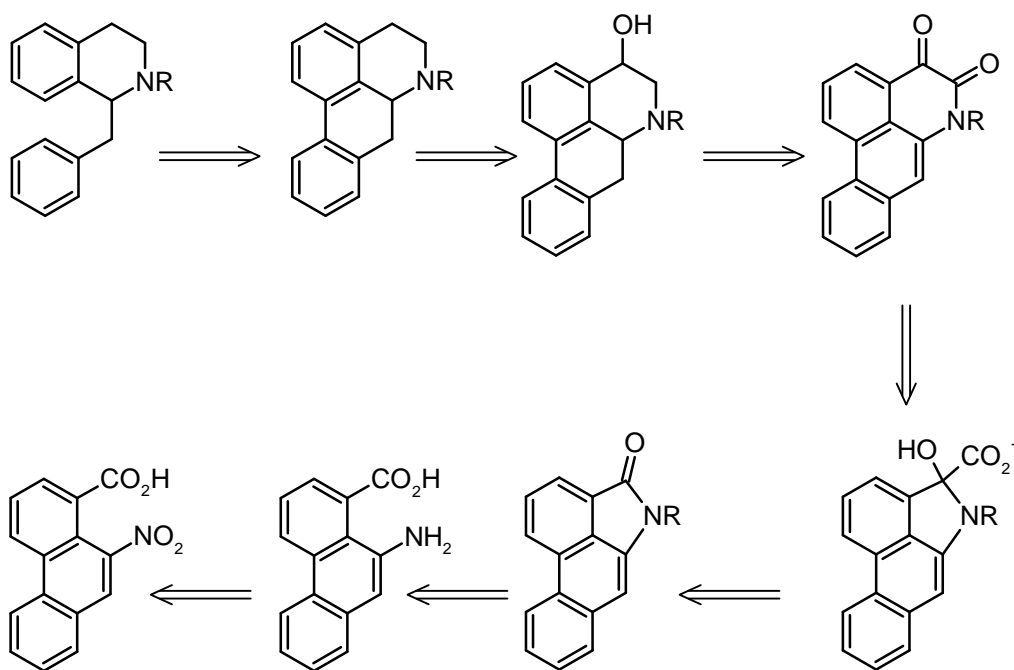
Esquema 3: Biogênese dos AAs (reproduzido a partir das refs. 57 e 58).

Embora pouco seja conhecido sobre a biogênese de aristolactamas (ALs), acredita-se que estejam biogeneticamente relacionadas a alcalóides aporfínicos <sup>14</sup>. Castedo *et al.* (1976) <sup>59</sup>, baseando-se na co-ocorrência de alcalóides 4,5-dioxaporfínicos e aristolactamas, e, sobretudo em dados obtidos por transformação *in vitro*, sugeriram que a via biogenética das aristolactamas poderia ser ampliada

para introduzir alcalóides C-4-O-aporfínicos e 4,5-dioxoaporfínicos como prováveis intermediários <sup>59</sup>. Posteriormente, Priestap (1985) sugeriu que ácidos aristolóquicos derivem de aristolactamas, e que estas poderiam originar a partir de 3-carboxifenilalanina ou 3-carboxi-4-hidroxifenilalanina <sup>60, 61</sup>. Outras rotas alternativas para a formação de aristolactamas são a redução ou degradação dos AAs. Embora sejam conhecidas condições experimentais para tais processos *in vitro* <sup>57, 62</sup>, não há registro de estudo biossintético compatível com tais processos em sistema biológico.

Lee e Han (1992), basendo-se na co-ocorrência de ácidos aristolóquicos com alcalóides 4,5-dioxoaporfínicos, alcalóides 7-aporfínicos, aristolactamas e aristolactamas *N*-glicosiladas em *A. contorta*, sugeriram que esses constituintes são intermediários biogênicos destes ácidos <sup>63</sup>.

Em 1997, Lin *et al.* propuseram um esquema biogênico para os ácidos aristolóquicos e aristolactamas (Esquema 4, p. 35) <sup>64</sup>. Segundo Lin *et al.* (1997), os alcalóides 4,5-dioxoaporfínicos seriam intermediários das aristolactamas, enquanto os ácidos aristolóquicos seriam originados a partir da hidrólise das aristolactamas e subsequente oxidação do grupo amino <sup>64</sup>. Contudo, até o momento, não há relato na literatura que comprove que aristolactamas sejam precursores de AAs ou vice-versa.



Esquema 4: Biogênese de ácidos aristolóquicos e aristolactamas (reproduzido a partir da ref. 64).

### 1.4.2 Atividades biológicas e efeitos deletérios dos AAs

Os ácidos aristolóquicos I e II são os princípios ativos mais importantes em formulações contendo material vegetal proveniente de espécies de Aristolochiaceae<sup>3</sup>. As plantas desta família estão em uso para propósitos medicinais desde de a antiguidade, sendo empregadas, por exemplo, para o tratamento de picadas de cobras, artrite, gota e reumatismo<sup>65</sup>.

O AA I possui um amplo espectro de atividades comprovadas, incluindo-se antialimentar, inseticida, antitumoral, imunomodulante, abortiva, antiofídica e antifertilizante<sup>3, 14</sup>. Clinicamente, foi demonstrado que este composto é efetivo antitumoral e antileucêmico, nos tratamentos da tuberculose, bronquite crônica, asma bronquial e doenças pneumocárdicas<sup>3, 14</sup>.

Atualmente, existe uma “campanha” contra o uso de ervas medicinais e medicamentos que contenham AAs<sup>3, 65, 66</sup>, devido à ocorrência de um tipo de doença nos rins conhecida por “aristolochic acid nephrotoxic - AAN”, causada por AAs presente em medicamentos utilizados por um longo período, os quais são oriundos principalmente de preparações fitoterápicas empregadas em regimes para o emagrecimento, como suplementos dietéticos e chás<sup>3, 65, 66</sup>.

Na literatura, há relatos de carcinomas em camundongos e ratos provocados por administração de AAs<sup>65</sup>, e, portanto estudos de genotoxicidade vêm sendo conduzidos com a finalidade de avaliar os potenciais efeitos mutagênicos e citotóxicos desses compostos<sup>3, 65, 67, 68</sup>. Alguns autores atribuem esses efeitos deletérios aos produtos de transformação dos AAs<sup>3, 65</sup>. Estudos metabólicos evidenciaram que os principais produtos de transformação dos AAs I e II são as ALs I e II<sup>3, 65</sup>. De acordo com Chen (2007), as aristolactamas podem gerar íons nitrênios capazes de formar adutos covalentes com os grupos aminos exocíclicos de adenina e guanina<sup>65</sup>. Há ainda autores que atribuem os efeitos mutagênicos e citotóxicos dos AAs ao grupo nitro ou ao grau de planaridade do sistema fenantrênico<sup>3</sup>. Com base nesse tipo de evidência, a “International Agency for Research on Cancer (IARC)” classifica formulações contendo espécies pertencentes ao gênero *Aristolochia* dentro do Grupo I de carcinogênicos em humanos<sup>65</sup>. Isso levou diversos países tais como, Alemanha, Reino Unido, Canadá e Austrália a banirem esses produtos de seus mercados<sup>3, 65</sup>.

## 1.5 A espécie *A. melastoma* Manso (Aristolochiaceae)

### 1.5.1 Descrição botânica

*A. melastoma*, conhecida popularmente como “Capitãozinho” ou “Jarrinha”, é uma trepadeira volúvel ou prostrada, com ocorrência nas regiões Sul e Sudeste do Brasil <sup>10, 69, 70</sup> (Figura 1, p. 37). Esta espécie habita sub-bosques de matas ciliares, matas de altitude e áreas reflorestadas <sup>10, 69, 70</sup>. A análise de alguns caracteres morfológicos de *A. melastoma* levou Capellari (1991) a sugerir uma posição basal dentro de *Aristolochia* para esta espécie <sup>69</sup>. Estudo recente efetuado sob base de dados morfológicos, químicos e moleculares corroborou com a proposta de Capellari (1991) <sup>71</sup>.



Figura 1: *A. melastoma* – Partes aéreas (Folhas e flores em destaque)

### 1.5.2 Estudo fitoquímico

Na literatura, há apenas dois relatos sobre a química dessa espécie, os quais descrevem as composições do óleo essencial dos caules e raízes coletados em Araraquara-SP <sup>11</sup> e da fração diclorometânica das folhas coletadas em Campinas-SP <sup>71</sup>. O óleo essencial dos caules e raízes de *A. melastoma* é rico em hidrocarbonetos monoterpênicos, onde limoneno,  $\alpha$ -pineno e canfeno são os compostos majoritários no óleo <sup>11</sup>. Por outro lado, o extrato  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  das folhas mostrou alta concentração de *Z*- e *E*-cariofileno <sup>71</sup>. Além destes relatos, existe um estudo fitoquímico preliminar realizado pelo nosso grupo de pesquisa que resultou no isolamento de  $\beta$ -sitosterol, 4-(2-nitroetil)-1,2-benzenodiol, loliolídeo e icarisídeo D2 <sup>72</sup>.

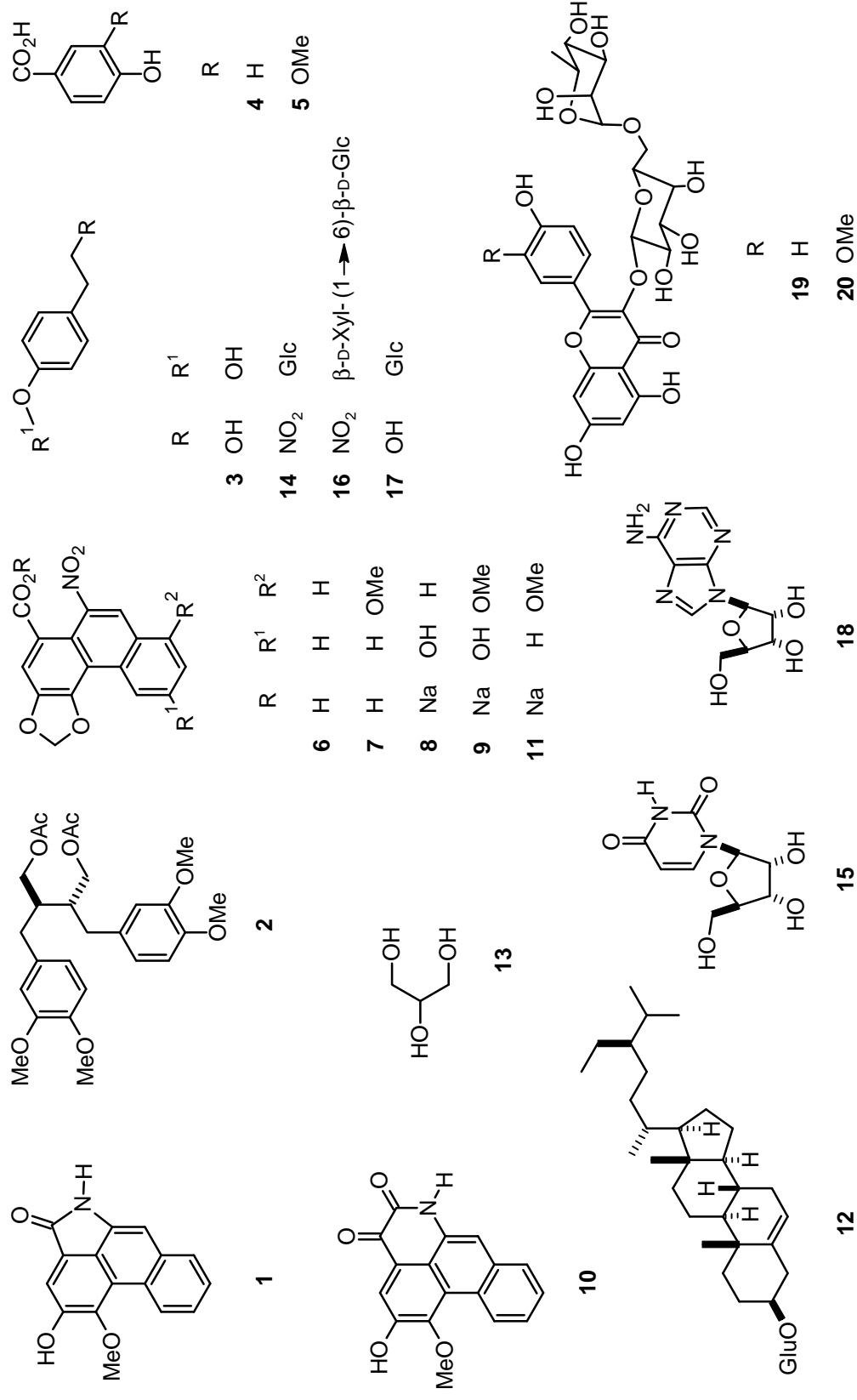


Figura 2: Constituintes químicos isolados de *A. melastoma* neste estudo.

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos: o isolamento e elucidação estrutural dos constituintes químicos do extrato acetônico de caules e raízes de *A. melastoma* Manso; avaliar o potencial taxonômico dos derivados nitrofeniléticos; e sugerir hipóteses evolutivas em Aristolochiaceae mediante análise dos dados disponíveis na literatura acerca da ocorrência e biogênese de compostos C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-NO<sub>2</sub>.



### 3 EXPERIMENTAL

#### 3.1 Especificações dos materiais e equipamentos utilizados

1. Os solventes orgânicos empregados nos processos cromatográficos e nas etapas de lavagem foram de grau cromatográfico, enquanto a água utilizada foi destilada e deionizada (resistividade mínima de 18,2 M $\Omega$ .cm a 25<sup>o</sup> C).
2. Para CCDC e CCDP foram utilizadas placas ativadas de sílica gel 60 G e PF<sub>254</sub>, respectivamente. As revelações das cromatoplasmas foram efetuadas por irradiações UV (254 nm e 365 nm) ou em cuba com vapores de iodo.
3. As separações cromatográficas em coluna foram realizadas utilizando-se sílica gel de 70-230 mesh (Merck), sílica gel de fase reversa C-18 de 230-400 mesh (Merck) e Sephadex LH-20, partículas de 25-100  $\mu$ m (Sigma).
4. Todas as frações e/ou subfrações obtidas foram concentradas em capela com exaustão e/ou com auxílio de evaporador rotatório (Büchi <sup>TM</sup>, RE 111 e B 461).
5. As análises por CLAE foram realizadas em Cromatógrafos da Shimadzu<sup>TM</sup>: controlador SCL-10Avp, bomba quaternária (SPD-10AVp) para analítico e bomba isocrática (SPD-10AVvp) para semi-preparativo, detector SPD-10AVvp UV-vis e injetores manuais com alças de amostragem de 20  $\mu$ L (analítico) e 5 mL (semi-preparativo). As colunas cromatográficas utilizadas foram: coluna analítica de fase reversa C-18 (Varian, 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) e coluna semi-preparativa de fase reversa C-18 (Shimpack, 250 x 20 mm, 10  $\mu$ m).
6. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz e 300 MHz) e de <sup>13</sup>C (126 MHz) uni- e bidimensionais foram adquiridos em espectrômetros Varian INOVA 500 (11,7 T) e Varian INOVA 300 (7,05 T), empregando-se sequências de pulso tradicionais para os experimentos de correlação homo- e heteronucleares. Como referência interna foram utilizados os sinais relativos aos hidrogênios residuais do solvente para RMN <sup>1</sup>H e dos carbonos do solvente para RMN de <sup>13</sup>C.
7. As medidas de rotação óptica específica,  $[\alpha]_D$ , foram feitas em polarímetro digital Perkin Elmer TM 341 LC, com filtro de sódio (589 nm) e cela de quartzo com caminho óptico de 1,00 dm.
8. Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetro Fisons <sup>TM</sup> Platform II por injeção direta com detecção em modo positivo ou negativo por “ESI”.

9. As medidas de ponto fusão foram registradas em aparelho digital Microquímica Ind. e Com. Ltda MQAPF-301.

### **3.2 Estudo fitoquímico de *A. melastoma***

#### **3.2.1 Coleta e identificação do material vegetal**

O material vegetal (caules e raízes) foi coletado em Araraquara – SP em Março de 2006 e 2008, pelo grupo de pesquisa coordenado pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lucia Maria Xavier Lopes. O material botânico foi identificado como sendo *A. melastoma* Manso pelos Dr. Condorcet Aranha e Dr. Lindolpho Capellari Jr. A exsicata de nº. ESA88883 foi depositada no Herbário da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba – SP.

#### **3.2.2 Preparação dos extratos orgânicos e fracionamento preliminar do extrato acetônico de caules e raízes de *A. melastoma***

Os caules e raízes (405 g), secos e moídos, de *A. melastoma* foram extraídos à temperatura ambiente com hex,  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$  e EtOH, sucessivamente. Os extratos foram individualmente concentrados sob pressão reduzida, secos em capela com exaustão e analisados por CCDC e RMN de  $^1\text{H}$ . Com base no perfil cromatográfico e na análise dos espectros foi inicialmente selecionado o extrato acetônico (9,1 g) para estudo químico. Uma parte deste extrato (4,7 g) foi submetida a fracionamento por cromatografia líquida a vácuo (CLV), utilizando-se sílica gel de 70-230 mesh (6 cm  $\Phi$  x 6 cm, 100 g). A coluna foi eluída isocraticamente e com misturas binárias de hex, AcOEt e MeOH, em gradiente de polaridade crescente, obtendo-se vinte e uma frações de aproximadamente 125 mL cada. As frações coletadas foram analisadas por CCDC e RMN de  $^1\text{H}$ , sendo que aquelas que aparentemente continham as mesmas substâncias foram agrupadas, chegando-se a um total de 11 frações (A-01 a A-11). A partir da análise desses resultados foram selecionadas as seguintes frações para isolamento dos constituintes: A-05, A-06, A-07, A-08 e A-09 (Esquema 5, p. 40).

### 3.2.3 Estudo químico da fração A-05

A fração A-05 (50,7 mg) foi fracionada por CCDP, eluída com hex-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO-EtOH 6:4:0,5 v/v/v, obtendo-se sete subfrações (A-05-1 a A-05-7). A subfração cinco (5,5 mg) foi lavada com CHCl<sub>3</sub> e o material insolúvel foi identificado por RMN de <sup>1</sup>H e gNOESY 1D como sendo a aristolactama AII (**1**; 2,1 mg).

### 3.2.4 Estudo químico da fração A-06

A fração A-06 (113,4 mg) foi fracionada por CC de Sephadex LH-20 [AcOEt-PrOH (1:1 v/v)], obtendo-se 50 subfrações de aproximadamente 4 mL cada (A-06-1 a A-06-50). As análises espectroscópicas das subfrações 16, 24 e 27 resultaram na identificação da lignana dibenzilbutânica (**2**; 3,0 mg) contaminada com material graxo, do derivado C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub> conhecido como tirosol (**3**; 10,5 mg) e de uma mistura (**4** e **5**; 10,2 mg) dos ácidos *p*-hidroxibenzóico (**4**) e vanilínico (**5**), respectivamente.

### 3.2.5 Estudo químico da fração A-07

A fração A-07 (274,6 mg) foi lavada com CHCl<sub>3</sub> e (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, sucessivamente. O material solúvel em (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO (42,8 mg) foi subsequentemente submetido a uma separação por CLAE, obtendo-se oito subfrações. Os parâmetros cromatográficos otimizados foram: coluna analítica de fase reversa C-18 (Varian, 5 µm), fase móvel MeOH-H<sub>2</sub>O (AcOH 1,2%) 65:35 v/v, λ = 254 nm e vazão de 0,9 mL/min. As análises espectroscópicas de RMN de <sup>1</sup>H das subfrações sete, cinco, dois, três e quatro resultaram, respectivamente, na identificação dos ácidos aristolóquicos I (**6**; 3,0 mg) e II (**7**; 1,8 mg), dos aristolocatos de sódio IIIa (**8**; 2,4 mg) e IVa (**9**; 3,4 mg) e do alcaloide 4,5-dioxoaporfínico (**10**; 0,5 mg). Além disso, o resíduo insolúvel em (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO (38,8 mg) foi fracionado por CLAE em coluna semi-preparativa de fase reversa C-18 (Shimpack, 250 x 20 mm, 10 µm, λ = 254 nm, MeOH-H<sub>2</sub>O 34:66 v/v). Neste processo cromatográfico foram obtidas duas subfrações principais, e de uma delas foi isolado o aristolocato de sódio I (**11**; 4,7 mg).

### 3.2.6 Estudo químico da fração A-08

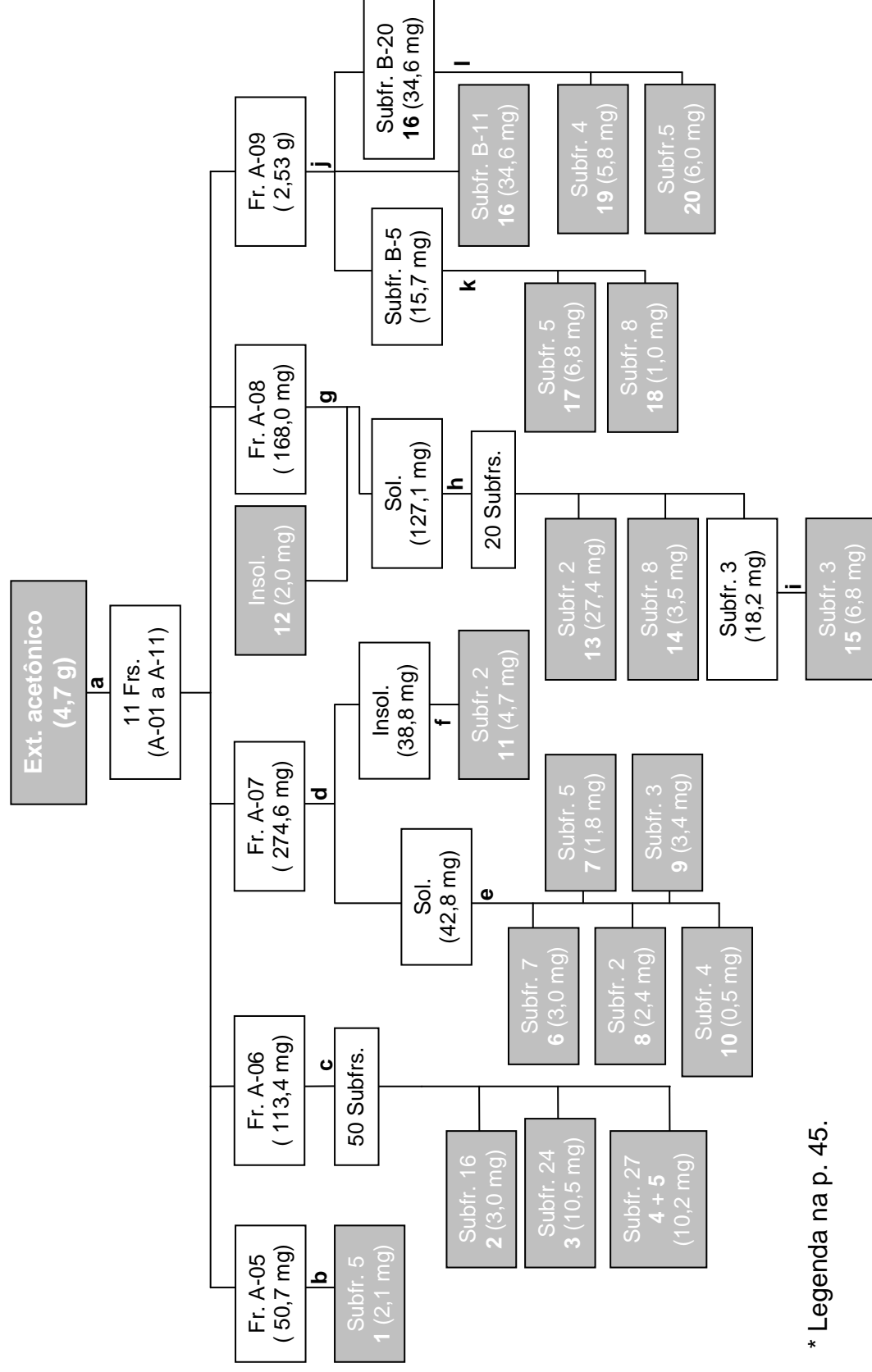
De modo similar ao descrito para a fração A-07, a fração A-08 (168,0 mg) foi lavada com  $\text{CHCl}_3$  e  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ , seguida por lavagem com  $\text{H}_2\text{O}$ . O resíduo insolúvel em  $\text{H}_2\text{O}$  (sólido incolor amorfo) foi identificado por métodos espectroscópicos (RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ ) e físicos ( $[\alpha]_D$ ) como sendo o esteróide glicosilado sitosterol 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (**12**; 2,0 mg). O material solúvel em  $\text{H}_2\text{O}$  (127,1 mg) foi submetido a fracionamento cromatográfico por CC de fase reversa C-18 (230-400 mesh, 4,5 cm  $\Phi$  x 6,5 cm), eluída com MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ , em gradiente de polaridade decrescente. Nesta etapa de separação foram obtidas 20 subfrações de aproximadamente 125 mL cada. Nas subfrações dois e oito foram obtidos o glicerol (**13**; 27,4 mg) e o talictosídeo (**14**; 3,5 mg), respectivamente. Na subfração três, após purificação por CC de Sephadex LH-20 (1 cm  $\Phi$  x 19 cm), eluída com metanol, foi obtido o nucleosídeo uridina (**15**; 6,8 mg).

### 3.2.7 Estudo químico da fração A-09

A fração A-09 foi submetida a fracionamento por CC de fase reversa C-18, eluída com MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ , em gradiente de polaridade decrescente. Desse processo cromatográfico foram obtidas 25 subfrações (B-01 a B-25), as quais foram analisadas por CCDC e RMN de  $^1\text{H}$ . Na subfração B-11 (34,6 mg) foi obtido um sólido cristalino que foi identificado por métodos espectroscópicos (RMN 1D e 2D, EM) e propriedades físicas (ponto de fusão e  $[\alpha]_D$ ) como sendo o derivado  $\text{C}_6\text{-C}_2\text{-NO}_2$  glicosilado talictricosídeo (**16**).

A subfração B-05 (15,7 mg) foi fracionada por CC de Sephadex LH-20, eluída com metanol, obtendo-se dez subfrações de 2 mL cada. Nas subfrações cinco e oito foram identificados o icarisídeo D2 (**17**; 6,8 mg) e o nucleosídeo adenosina (**18**; 1,0 mg), respectivamente.

A subfração B-20 (58,6 mg) foi fracionada por CLAE (coluna analítica C-18 da Varian, eluente ACN-MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  7:10:83 v/v/v, vazão 1,0 mL/min e  $\lambda = 254$  nm), obtendo-se cinco subfrações. Nas subfrações quatro e cinco foram identificados por métodos espectroscópicos uni- e bidimensionais os flavonóides glicosilados (**19**; 5,8 mg) e (**20**; 6,0 mg), respectivamente.



\* Legenda na p. 45.

Esquema 5: Fracionamento do extrato acetônico de caules e raízes de *A. melastoma*.

Continuação do esquema 8:

Legenda

- a) CLV [sílica gel de 70-230 mesh; hex→AcOEt→MeOH, gradiente polaridade crescente];
- b) CCDP [hex-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO-EtOH (6:4:0,5 v/v/v)];
- c) CC de Sephadex LH-20 [AcOEt-propanol (1:1 v/v)];
- d) Lavagem com CHCl<sub>3</sub> e (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, sucessivamente;
- e) CLAE [C-18; MeOH-H<sub>2</sub>O (ACOH 1,2%) 65:35 v/v];
- f) CLAE [C-18; MeOH-H<sub>2</sub>O 34:66 v/v];
- g) Lavagem com CHCl<sub>3</sub>, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO e H<sub>2</sub>O, sucessivamente;
- h e j) CC (C-18 ;230-400 mesh; MeOH-H<sub>2</sub>O, gradiente polaridade decrescente);
- i e l) CC de Sephadex LH-20 (MeOH) e
- k) CLAE (C-18; ACN-MeOH-H<sub>2</sub>O 7:10:83 v/v/v).

### 3.3 Dados físicos e espectrométricos dos compostos isolados

– Aristolactama AII (**1**): ESI + 50 eV *m/z* (rel. int.) 266 [M+H]<sup>+</sup> (100); RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,64 (1H, s, H-2), 9,11 (1H, *dd*, *J* = 8,0, 1,0 Hz, H-5), 7,57 (1H, *m*, H-6), 7,57 (1H, *m*, H-7), 7,94 (1H, *dd*, *J* = 8,0, 1,5 Hz, H-8), 7,10 (1H, s, H-9), 10,76 (1H, s, NH), 4,03 (3H, s, OMe-4), 10,27 (1H, *sl*, OH).

– 9,9'-Diacetato-secoisolariciresinol dimetil éter (**2**). ESI + 50 eV *m/z* (rel. int.) 497 [M+Na]<sup>+</sup> (80), 295 (100); RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6,58 (2H, *d*, *J* = 2,0 Hz, H-2,2'), 6,78 (2H, *d*, *J* = 8,0 Hz, H-5,5'), 6,61 (2H, *dd*, *J* = 8,0, 2,0 Hz, H-6,6'), 2,67 (4H, *m*, H-7,7'), 2,12 (2H, *m*, H-8,8'), 4,05 (2H, *dd*, *J* = 11,5, 5,5 Hz, H-9,9'), 4,22 (2H, *m*, H-9,9'), 3,83, (6H, s, OMe-3,3'), 3,87 (6H, s, OMe-4,4'), 2,08 (6H, s, Me); RMN de <sup>13</sup>C (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 132,2 (C-1,1'), 112,1 (C-2,2'), 148,9 (C-3,3'), 147,5 (C-4,4'), 111,2 (C-5,5'), 121,0 (C-6,6'), 34,9 (C-7,7'), 39,7 (C-8,8'), 64,4 (C-9,9'), 55,8, 55,9 (OMe-3,3',4,4'), 171,0 (C=O), 21,0 (Me).

– Tirosol (**3**). RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 6,97 (2H, *d*, *J* = 8,5 Hz, H-2,6), 6,63 (2H, *d*, *J* = 8,5 Hz, H-3,5), 2,58 (2H, *t*, *J* = 7,2 Hz, H-7), 3,50 (2H, *tl*, *W*<sub>1/2</sub> = 7,2 Hz, H-8), 9,05 (1H, *sl*, OH-4) e 4,50 (1H, *sl*, OH-5).

- Ácido *p*-hidroxibenzóico (**4**). RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,77 (2H, *d*,  $J = 8,5$  Hz, H-2,6) e 6,81 (2H, *d*,  $J = 8,5$  Hz, H-3,5); RMN de  $^{13}\text{C}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  121,4 (C-1), 131,4 (C-2,6), 115,0 (C-3,5), 161,5 (C-4) e 167,1 (C-7).
- Ácido vanilínico (**5**). RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,42 (1H, *s*, H-2), 6,83 (1H, *d*,  $J = 7,5$  Hz, H-5), 7,43 (1H, *dd*,  $J = 7,5, 2,0$  Hz, H-6) e 3,80 (3H, *s*, OMe-3); RMN de  $^{13}\text{C}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  121,6 (C-1), 112,7 (C-2), 147,2 (C-3), 151,1 (C-4), 115,0 (C-5), 123,4 (C-6), 167,1 (C-7) e 55,5 (OMe-3).
- Ácido aristolóquico I (**6**). Sólido amarelo; RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  7,81 (1H, *s*, H-2), 8,68 (1H, *d*,  $J = 8,5$  Hz, H-5), 7,86 (1H, *t*,  $W_{1/2} = 8,3$  Hz, H-6), 7,38 (1H, *d*,  $J = 8,0$ , H-7), 8,58 (1H, *sl*, H-9), 6,48 (2H, *s*,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ) e 4,06 (3H, *s*, OMe-8).
- Ácido aristolóquico II (**7**). Sólido amarelo; RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  7,80 (1H, *s*, H-2), 9,10 (1H, *dl*,  $J = 8,5$  Hz, H-5), 7,91 (1H, *ddd*,  $J = 8,5, 8,0, 1,5$  Hz, H-6), 7,80 (1H, *dt*,  $J = 8,0, 1,5$  Hz, H-7), 8,26 (1H, *dl*,  $J = 8,0$  Hz, H-8), 8,56 (1H, *sl*, H-9) e 6,50 (2H, *s*,  $-\text{OCH}_2\text{O}-$ ).
- Aristolocato de sódio IIIa (**8**). Sólido amarelo; RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  7,68 (1H, *sl*, H-2), 8,46 (1H, *d*,  $J = 2,5$  Hz, H-5), 7,24 (1H, *dd*,  $J = 8,5, 2,5$  Hz, H-7), 8,04 (1H, *d*,  $J = 8,5$  Hz, H-8), 8,31 (1H, *sl*, H-9) e 6,42 (2H, *s*,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ).
- Aristolocato de sódio IVa (**9**). Sólido amarelo; RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  7,65 (1H, *sl*, H-2), 8,06 (1H, *s*, H-5), 6,78 (1H, *s*, H-7), 8,29 (1H, *sl*, H-9), 6,37 (2H, *s*,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ) e 3,99 (3H, *s*, OMe-8).
- Alcalóide 4,5-dioxoaporfínico (**10**). Sólido amarelo e fluorescente; ESI + 30 eV  $m/z$  (rel. int.) 294  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (10) e 316  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (15); RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  8,07 (1H, *s*, H-3), 7,48 (1H, *s*, H-7), 7,92 (1H, *dd*,  $J = 9,0, 2,5$  Hz, H-8), 7,64 (1H, *m*, H-9), 7,64 (1H, *m*, H-10), 9,45 (1H, *dd*,  $J = 8,0, 2,0$  Hz, H-11), 4,05 (3H, *s*, OMe-1) e 11,98 (1H, *sl*, NH); RMN de  $^{13}\text{C}$  (126 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  59,8 (C-1).

– Aristolocato de sódio I (**11**). Sólido amarelo; RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7,66 (1H, *sl*, H-2), 8,65 (1H, *d*,  $J = 8,5$  Hz, H-5), 7,76 (1H, *t*,  $W_{1/2} = 8,3$  Hz, H-6), 7,30 (1H, *d*,  $J = 8,0$ , H-7), 8,33 (1H, *sl*, H-9), 6,37 (2H, *s*,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ) e 4,05 (3H, *s*,  $\text{OMe-8}$ ).

– Sitosterol 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (**12**). Sólido incolor amorfo;  $[\alpha]_D^{31} -43,1^\circ$  (c. 0,1, Piridina); RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  3,44 (1H, *m*, H-3), 2,11 (1H, *m*, H-4), 2,35 (1H, *m*, H-4), 5,31 (1H, *m*, H-6), 0,64 (3H, *s*, Me-18), 0,94 (3H, *s*, Me-19), 0,89 (3H, *d*,  $J = 6,5$ , H-21), 0,78 (3H, *d*,  $J = 6,5$ , H-26), 4,20 (1H, *d*,  $J = 8,0$  Hz, H-1'), 2,88 (1H, *dt*,  $J = 8,0, 4,5$  Hz, H-2'), 3,11 (1H, *m*, H-3'), 3,01 (1H, *m*, H-4'), 3,05 (1H, *m*, H-5'), 3,63 (1H, *ddd*,  $J = 11,8, 5,5, 1,5$ , H-6) e 3,40 (1H, *m*, H-6); RMN de  $^{13}\text{C}$  (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  36,78 (C-1), 29,22 (C-2), 76,89 (C-3), 38,27 (C-4), 140,42 (C-5), 121,3 (C-6), 31,31 (C-7), 31,38 (C-8), 49,56 (C-9), 36,17 (C-10), 20,54 (C-11), 39,17 (C-12), 41,81 (C-13), 56,12 (C-14), 23,80 (C-15), 27,71 (C-16), 55,39 (C-17), 11,62 (C-18), 19,04 (C-19), 35,41 (C-20), 18,89 (C-21), 33,31 (C-22), 25,44 (C-23), 45,11 (C-24), 28,69 (C-25), 18,55 (C-26), 19,64 (C-27), 22,57 (C-28), 11,73 (C-29), 100,74 (C-1'), 73,43 (C-2'), 76,69 (C-3'), 70,10 (C-4'), 76,73 (C-5') e 61,08 (C-6').

– Glicerol (**13**). RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  3,51 (2H, *dd*,  $J = 11,7, 6,5$  Hz, H-1,3), 3,60 (2H, *dd*,  $J = 11,7, 4,5$  Hz, H-1,3) e 3,79 (1H, *m*, H-2).

– Talictosídeo (**14**). RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  7,18 (2H, *d*,  $J = 8,5$  Hz, H-2,6), 6,96 (2H, *d*,  $J = 8,5$  Hz, H-3,5), 3,16 (2H, *t*,  $J = 7,0$  Hz, H-7), 4,80 (2H, *t*,  $J = 7,0$  Hz, H-8) e 4,80 (1H, *d*,  $J = 7,5$  Hz); RMN de  $^{13}\text{C}$  (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  129,6 (C-1), 129,5 (C-2,6), 116,2 (C-3,5), 156,4 (C-4), 31,6 (C-7), 76,3 (C-8), 100,4 (C-1'), 73,2 (C-2'), 76,6 (C-3'), 69,7 (C-4'), 77,0 (C-5') e 60,7 (C-6').

– Uridina (**15**). Sólido incolor; ESI + 35 eV  $m/z$  (rel. int.) 267  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (45); RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  5,87 (1H, *d*,  $J = 8,5$  Hz, H-5), 7,83 (1H, *d*,  $J = 8,5$  Hz, H-6), 5,88 (1H, *d*,  $J = 4,5$  Hz, H-1'), 4,32 (1H, *t*,  $W_{1/2} 4,8$  Hz, H-2'), 4,19 (1H, *t*,  $J = 5,0$  Hz, H-3'), 4,10 (1H, *m*, H-4'), 3,77 (1H, *dd*,  $J = 13,0, 4,5$  Hz, H-5') e 3,88 (1H, *dd*,  $J = 13,0, 3,0$  Hz, H-5'); RMN de  $^{13}\text{C}$  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  151,9 (C-2), 166,4 (C-4), 102,5 (C-5), 142,1 (C-6), 89,6 (C-1'), 73,9 (C-2'), 69,7 (C-3'), 84,5 (C-4') e 61,0 (C-5').



– Talictricosídeo (**16**). Sólido cristalino; p.f. 124.5–124.9°C (MeOH);  $[\alpha]_D^{29} -63.3^\circ$  (c. 0,13, MeOH); Positivo ESI + 35 eV  $m/z$  (int. rel.) 484  $[M+Na]^+$  (100); RMN de  $^1H$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  4,79 (2H, *t*,  $J = 7,0$ , H-8), 3,17 (2H, *t*,  $J = 7,0$  Hz, H-7), 7,18 (2H, *d*,  $J = 8,8$  Hz, H-2,6), 7,00 (2H, *d*,  $J = 8,8$  Hz, H-3,5), 4,78 (1H, *d*,  $J = 7,5$ , H-1'), 3,23 (1H, *m*, H-2'), 3,25 (1H, *m*, H-3'), 3,16 (1H, *dd*,  $W_{1/2} = 9,5, 8,5$  Hz, H-4'), 3,51 (1H, *ddd*,  $W_{1/2} = 9,5, 6,5, 1,4$  Hz, H-5'), 3,95 (1H, *dd*,  $J = 11,4, 1,4$  Hz, H-6'), 3,57 (1H, *dd*,  $W_{1/2} = 11,4, 6,5$  Hz, H-6'), 4,18 (1H, *d*,  $J = 7,7$  Hz, H-1''), 2,98 (1H, *dd*,  $W_{1/2} = 8,8, 7,7$  Hz, H-2''), 3,08 (1H, *t*,  $W_{1/2} = 8,8$  Hz, H-3''), 3,27 (1H, *m*, H-4''), 2,94 (1H, *dd*,  $J = 11,3, 10,3$  Hz, H-5''), 3,67 (1H, *dd*,  $J = 11,3, 5,3$  Hz, H-5''); RMN de  $^{13}C$  (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  76,2 (C-8), 31,7 (C-7), 129,6 (C-1), 129,6 (C-2,6), 116,4 (C-3,5), 156,3 (C-4), 100,5 (C-1'), 73,2 (C-2'), 76,4 (C-3'), 69,6, 69,5 (C-4',4''), 75,8 (C-5'), 68,1 (C-6'), 103,8 (C-1''), 73,3 (C-2''), 76,4 (C-3''), 65,6 (C-5'').

– Icarisídeo D2 (**17**). RMN de  $^1H$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7,10 (2H, *d*,  $J = 8,5$  Hz, H-2,6), 6,92 (2H, *d*,  $J = 8,5$  Hz, H-3,5), 2,65 (2H, *t*,  $J = 7,0$  Hz, H-7), 3,55 (2H, *t*,  $J = 7,0$  Hz, H-8) e 4,78 (1H, *d*,  $J = 7,5$  Hz, H-1'); RMN de  $^{13}C$  (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  132,7 (C-1), 129,6 (C-2,6), 116,0 (C-3,5), 155,7 (C-4), 38,1 (C-7), 62,3 (C-8), 100,6 (C-1'), 73,2 (C-2'), 77,0 (C-3'), 69,7 (C-4'), 76,6 (C-5') e 60,7 (C-6').

– Adenosina (**18**). RMN de  $^1H$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  8,12 (1H, *s*, H-2), 8,32 (1H, *s*, H-8), 7,28 (2H, *sl*,  $NH_2$ ), 5,87 (1H, *d*,  $J = 6,0$  Hz, H-1' $\alpha$ ), 4,60 (1H, *m*, H-2' $\beta$ ), 4,14 (1H, *m*, H-3'), 3,95 (1H, *q*,  $J = 3,5$  Hz, H-4'), 3,66 (1H, *dt*,  $J = 12,5, 3,5$  Hz, H-5'), 3,54 (1H, *m*, H-5'), 5,37 (1H, *m*, OH-2'), 5,12 (1H, *m*, OH-3') e 5,37 (1H, *m*, OH-5'); RMN de  $^{13}C$  (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  152,3 (C-2), 149,0 (C-4), 119,3 (C-5), 156,1 (C-6), 139,8 (C-8), 87,9 (C-1'), 73,4 (C-2'), 70,6 (C-3'), 85,8 (C-4') e 61,6 (C-5').

– Kaempferol 3-O- $\beta$ -robinobiosídeo (**19**). Sólido branco,  $[\alpha]_D^{29} -29.5^\circ$  (c. 0,04, MeOH); ESI – 70 eV  $m/z$  (rel. int.) 593  $[M-H]^-$  (100); RMN de  $^1H$  (500 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  6,22 (1H, *d*,  $J = 1,9$  Hz, H-6), 6,41 (1H, *d*,  $J = 1,9$  Hz, H-8), 8,09 (2H, *d*,  $J = 9,0$  Hz, H-2',6'), 6,89 (2H, *d*,  $J = 9,0$  Hz, H-3',5'), 5,04 (1H, *d*,  $J = 8,0$  Hz, H-1''), 3,79 (1H, *dd*,  $J = 9,8, 8,0$  Hz, H-2''), 3,54 (1H, *dd*,  $J = 9,8, 3,3$  Hz, H-3''), 3,77 (1H, *dd*,  $J = 3,3, 0,9$  Hz, H-4''), 3,62 (1H, *ddd*,  $J = 7,0, 5,5, 0,9$  Hz, H-5''), 3,40 (1H, *dd*,  $J = 10,5, 7,0$  Hz, H-6''), 3,73 (1H, *dd*,  $J = 10,5, 5,5$  Hz, H-6''), 4,52 (1H, *d*,  $J = 1,5$  Hz, H-1'''), 3,59 (1H, *dd*,  $J =$

3,3, 1,5 Hz, H-2'''), 3,50 (1H, *dd*,  $J = 9,3, 3,3$  Hz, H-3'''), 3,27 (1H, *t*,  $J = 9,3$  Hz, H-4'''), 3,53 (1H, *m*, H-5'''), 1,18 (3H, *d*,  $J = 6,5$  Hz, H-6'''); RMN de  $^{13}\text{C}$  (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  159,4 (C-2), 135,7 (C-3), 179,6 (C-4), 163,0 (C-5), 100,0 (C-6), 166,3 (C-7), 94,9 (C-8), 158,6 (C-9), 105,6 (C-10), 122,7 (C-1'), 132,4 (C-2',6'), 116,1 (C-3',5'), 161,0 (C-4'), 105,6 (C-1''), 73,0 (C-2''), 75,1 (C-3''), 70,2 (C-4''), 75,4 (C-5''), 67,5 (C-6''), 102,0 (C-1'''), 72,1 (C-2'''), 72,3 (C-3'''), 73,9 (C-4'''), 69,7 (C-5'''), 18,0 (C-6''').

– Isorhamnetina 3-O- $\beta$ -robinobiosídeo (**20**). Sólido amarelo,  $[\alpha]_D^{29} -25.5^\circ$  (c. 0.05, MeOH); ESI – 70 eV  $m/z$  (rel. int.) 623  $[\text{M-H}]^-$  (100). RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  3,97 (3H, *s*, OMe),  $\delta$  6,22 (1H, *d*,  $J = 1,7$  Hz, H-6), 6,42 (1H, *d*,  $J = 1,7$  Hz, H-8), 8,03 (1H, *d*,  $J = 2,0$  Hz, H-2'), 6,91 (1H, *d*,  $J = 8,5$  Hz, H-5'), 7,61 (1H, *dd*,  $J = 8,5, 2,0$  Hz, H-6'), 5,22 (1H, *d*,  $J = 7,5$  Hz, H-1''), 3,82 (1H, *dd*,  $J = 9,3, 7,5$  Hz, H-2''), 3,55 (1H, *dd*,  $J = 9,3, 3,5$  Hz H-3''), 3,79 (1H, *dl*,  $J = 3,5$  Hz, H-4''), 3,66 (1H, *m*, H-5''), 3,47 (1H, *dd*,  $J = 10,5, 7,0$  Hz, H-6''), 3,74 (1H, *dd*,  $J = 10,5, 5,5$  Hz, H-6''), 4,53 (1H, *d*,  $J = 1,5$  Hz, H-1'''), 3,58 (1H, *m*, H-2'''), 3,49 (1H, *dd*,  $J = 9,5, 3,4$  Hz, H-3'''), 3,27 (1H, *t*,  $J = 9,5$  Hz, H-4'''), 3,53 (1H, *m*, H-5'''), 1,18 (3H, *d*,  $J = 6,3$  Hz, H-6'''); RMN de  $^{13}\text{C}$  (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  57,0 (OMe), 158,9 (C-2), 135,5 (C-3), 179,5 (C-4), 163,1 (C-5), 100,0 (C-6), 166,2 (C-7), 94,9 (C-8), 158,5 (C-9), 105,7 (C-10), 123,0 (C-1'), 114,7 (C-2'), 148,4 (C-3'), 150,9 (C-4'), 116,0 (C-5'), 123,8 (C-6'), 105,0 (C-1''), 73,1 (C-2''), 75,1 (C-3''), 70,1 (C-4''), 75,6 (C-5''), 67,5 (C-6''), 102,0 (C-1'''), 72,1 (C-2'''), 72,3 (C-3'''), 73,9 (C-4'''), 69,8 (C-5'''), 18,0 (C-6''').

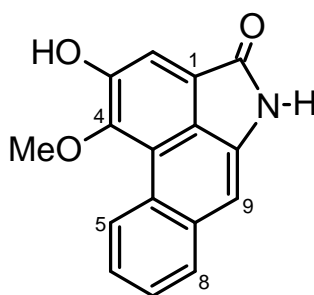
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo químico do extrato acetônico de caules e raízes de *A. melastoma* Manso resultou no isolamento e identificação de 20 compostos: aristolactama AII (**1**), 9,9'-diacetato-secoisolariciresinol dimetil éter (**2**), tirosol (**3**), ácido *p*-hidroxibenzoico (**4**), ácido vanilínico (**5**), ácidos aristolóquicos I (**6**) e II (**7**), aristolocatos de sódio IIIa (**8**) e IVa (**9**), 4,5-dioxodeidroasimilobíneo (**10**), aristolocato de sódio I (**11**), sitosterol 3-O-β-D-glucopiranosídeo (**12**), glicerol (**13**), talictosídeo (**14**), uridina (**15**), talictricosídeo (**16**), icarisídeo D2 (**17**), adenosina (**18**), kaempferol 3-O-β-robinobiosídeo (**19**) e isorhamnetina 3-O-β-robinobiosídeo (**20**) (Figura 2, p. 38).

A determinação estrutural dos compostos foi efetuada com base nas análises dos dados espectrométricos de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  uni- e bidimensionais (DEPT, *g*HMQC, *g*HMBC, *g*COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , *g*TOCSY 1D, *g*NOESY 1D) e EM, propriedades físicas (pf. e  $[\alpha]_D$ ), e pela comparação desses dados com aqueles disponibilizados na literatura.

### 4.1 Derivados fenantrênicos (**1** e **6-11**)

#### 4.1.1 Aristolactama AII (**1**)



O composto **1** (2,1 mg), sólido alaranjado parcialmente solúvel em  $\text{CHCl}_3$ , mas solúvel em MeOH e DMSO, foi obtido após fracionamento por CCDP [hex- $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ -EtOH 6:4:0,5 v/v/v] da fração A-05 (item 3.2.3; p. 42).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 3, p. 51) de **1** observam-se sinais característicos de hidrogênios aromáticos em sistema fenantrênico [ $\delta$  9,11 (*dd*;  $J = 8,0$  e  $1,0$  Hz), 7,94 (*dd*;  $J = 8,0$  e  $1,5$ ), 7,64 (*s*), 7,57 (*m*) e 7,10 (*s*)], além de um

singleto referente a hidrogênios metoxílicos ( $\delta$  4,03), um singleto largo referente a  $-OH$  ( $\delta$  10,27) e um singleto característico de  $-NH$  ( $\delta$  10,76) de amida. Além disso, o espectro de massas apresentou o pico do íon *quasi* molecular de  $m/z$  266  $[M+H]^+$  (Figura 4, p. 51). Esses dados sugeriram a estrutura de uma aristolactama, contendo grupos hidroxílico e metoxílico, substituída nos C-3 e C-4.

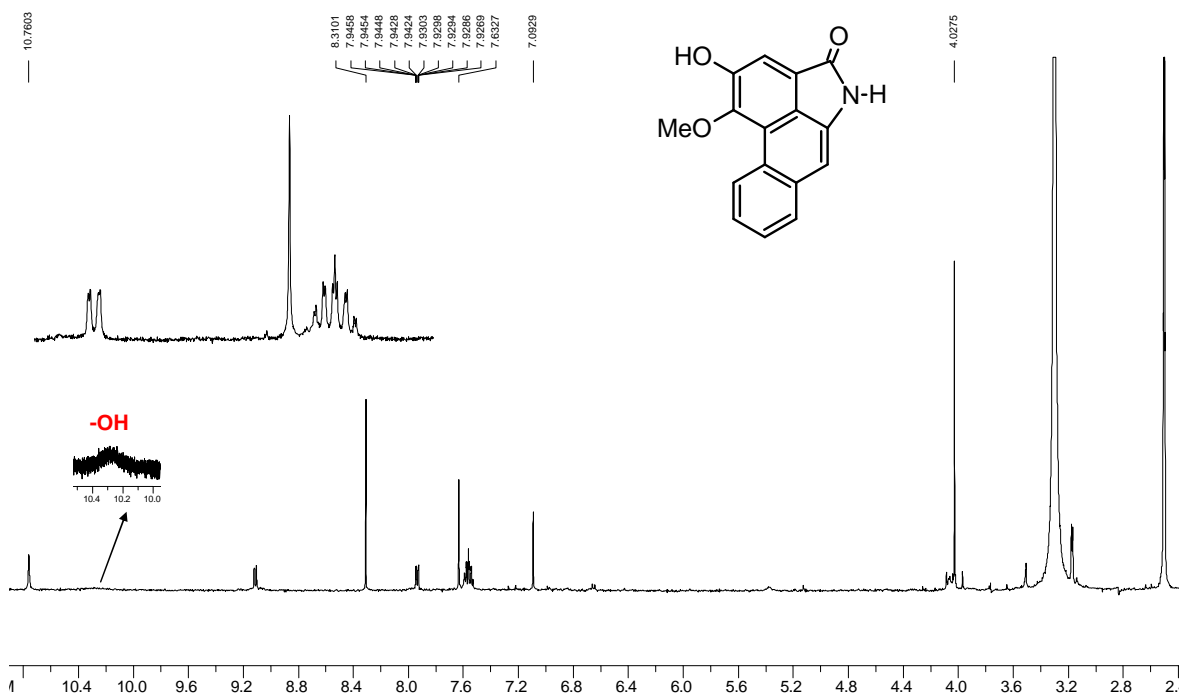


Figura 3: Espectro de RMN de  $^1H$  da aristolactama AII (1) ( $DMSO-d_6$ , 500 MHz).

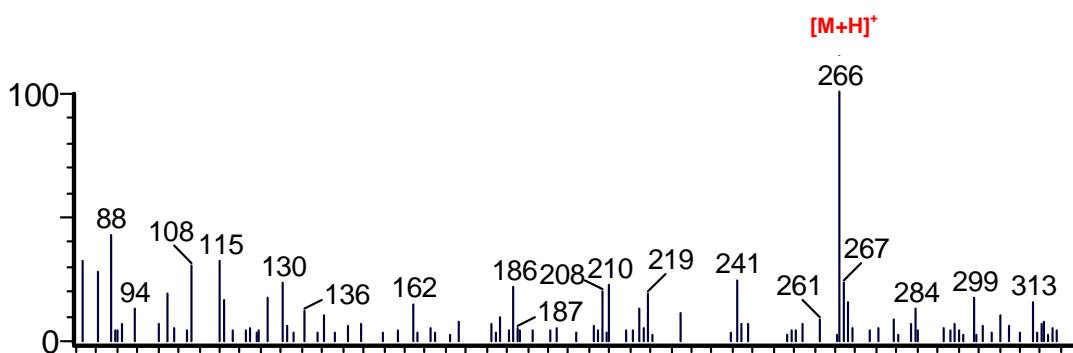


Figura 4: Espectro de massas do composto 1 (ESI, + 50 eV).

A posição do substituinte metoxílico foi estabelecida mediante experimento  $gNOESY$  1D, irradiando-se em  $\delta$  4,03 observou-se o aumento da intensidade do

sinal em  $\delta$  9,11 (H-5), o que evidenciou que o grupo metoxílico estava ligado a C-4 (Figura 5, p. 52).

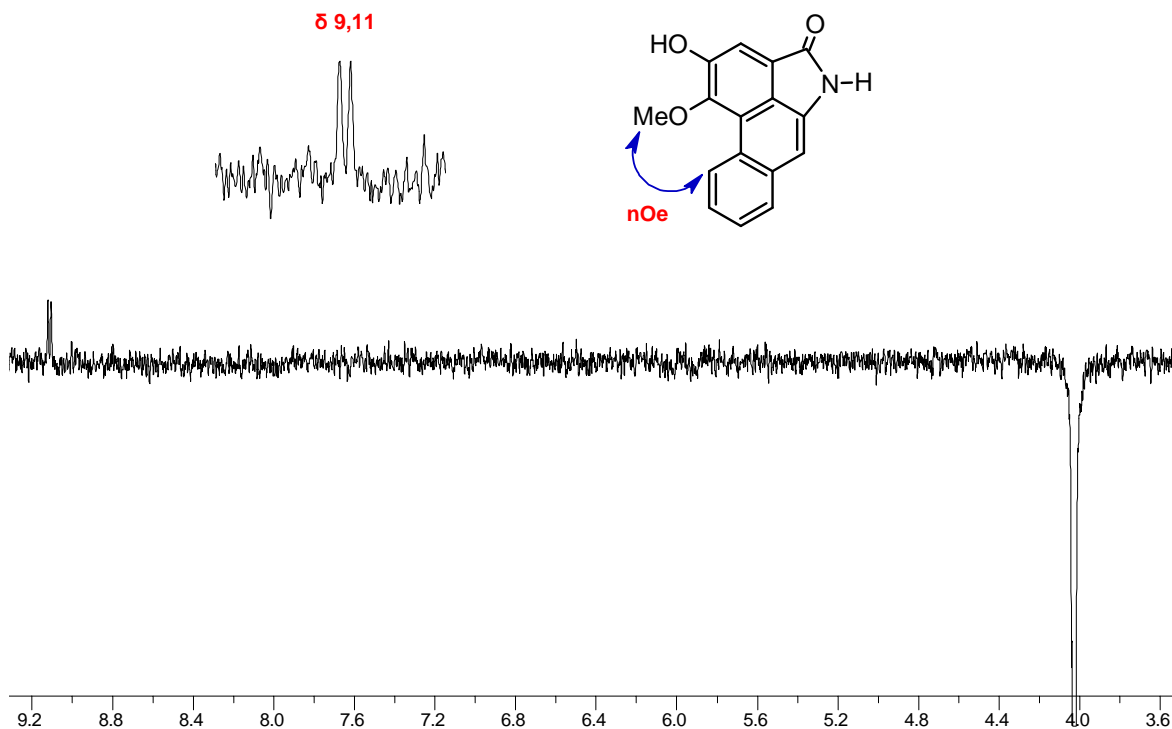


Figura 5: Espectro gNOESY 1D da aristolactama AII (1) (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz).

A atribuição dos valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios foi confirmada pela comparação dos dados espectroscópicos obtidos com aqueles disponíveis na literatura (Tabela 3, p. 53) <sup>73</sup>.

As aristolactamas são derivados fenantrênicos que possuem um grupo lactâmico ligado pelos C-1 e C-10; elas podem ser mono-, di-, tri-, tetra- ou pentaóxigenadas <sup>14</sup>. É comum também serem encontrados derivados C- e N-glicosilados, N-OH e N-OMe <sup>14</sup>. Essa classe de compostos (são conhecidos pelo menos 57 compostos distintos <sup>14</sup>) foi obtida de espécies pertencentes às famílias Saururaceae, Annonaceae, Aristolochiaceae, Menispermaceae, Piperaceae e Monimiaceae <sup>14</sup>.

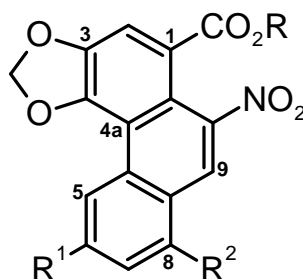
Levantamento bibliográfico executado na base de dados “SciFinder Scholar – Chemical Abstracts Service” revelou que o composto **1** foi isolado de trinta e oito espécies de plantas, todas elas pertencentes ao Clado das Magnolídeas (treze de

Annonaceae, quatro de Piperaceae, dezenove de Aristolochiaceae e duas de Saururaceae).

Tabela 3: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de **1** (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ,  $J$  em Hz).

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (Exp)	$\delta$ $^1\text{H}$ (Lit) <sup>73</sup>
2	7,64 (s)	7,62 (s)
5	9,11 ( <i>dd</i> ; 8,0 e 1,0)	9,12 ( <i>d</i> ; 8,0)
6	7,57 ( <i>m</i> )	7,58 ( <i>m</i> )
7	7,57 ( <i>m</i> )	7,58 ( <i>m</i> )
8	7,94 ( <i>dd</i> ; 8,0 e 1,5)	7,95 ( <i>d</i> ; 8,0)
9	7,10 (s)	7,10 (s)
NH	10,76 (s)	-
OMe-4	4,03 (s)	4,02 (s)
OH	10,27 (s)	-

#### 4.1.2 Ácidos aristolóquicos I e II (6 e 7) e aristolocatos de sódio IIIa, IVa e I (8, 9 e 11)



	R	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
<b>6</b>	H	H	H
<b>7</b>	H	H	OMe
<b>8</b>	Na	OH	H
<b>9</b>	Na	OH	OMe
<b>11</b>	Na	H	OMe

Os compostos **6-9** e **11**, sólidos amarelos pouco solúveis em  $\text{CHCl}_3$ , mas parcialmente solúveis em  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$  e MeOH e solúveis em DMSO, foram obtidos da fração A-07, conforme descrito no item 3.2.5 (p. 42).

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de **6-9** e **11** (Figuras 6-10, p. 54-56) apresentaram sinais típicos de hidrogênios aromáticos em sistema altamente conjugado, além de singletos característicos de hidrogênios metilenodioxílicos ( $\delta$  6,3-6,5) e de grupos metoxílicos ( $\delta$  3,9-4,1; apenas para os compostos **7**, **9** e **11**). Os valores dos deslocamentos químicos desses hidrogênios foram semelhantes aos descritos na literatura para os ácidos aristolóquicos e aristolocatos de sódio <sup>74-76</sup>. Segundo observação realizada por Leu *et al.* (1998), o H-9 nos aristolocatos de sódio absorve em frequência ligeiramente menor ( $|\Delta\delta| = 0,2-0,3$ ) do que nos respectivos ácidos (Figura 11, p. 57; **I**, **II** e **III**) <sup>75</sup>. Embora Leu *et al.* não fornecessem explicação para essa diferença, eles comprovaram a veracidade de sua observação por meio de estudos espectroscópicos de RMN e EM <sup>75</sup>. Assim sendo, em princípio foi sugerido que **6** e **7** estariam na forma protonada, enquanto **8**, **9** e **11** seriam sais de sódio. Contudo, não se pode descartar a possibilidade de que **6** e **7** estavam presentes na planta como aristolocatos de sódio, visto que a água utilizada no processo cromatográfico foi acidificada com 1,2 % de ácido acético (pH  $\sim$  2,8).

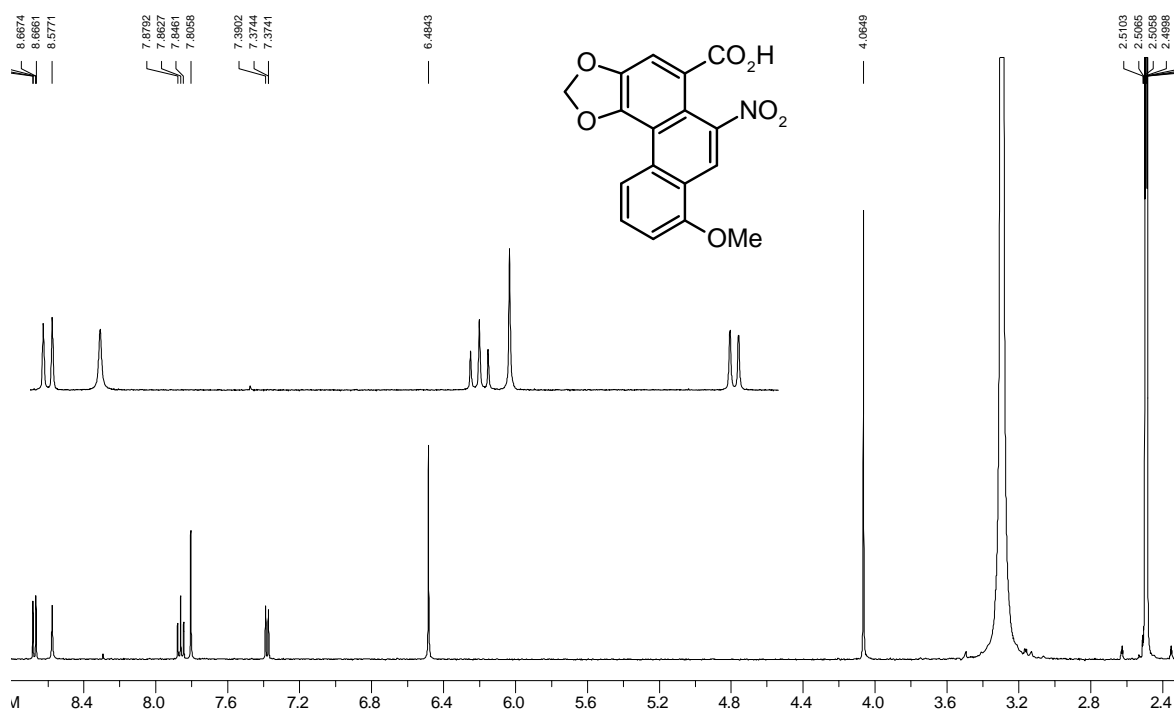


Figura 6: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ácido aristolóquico I (**6**) (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

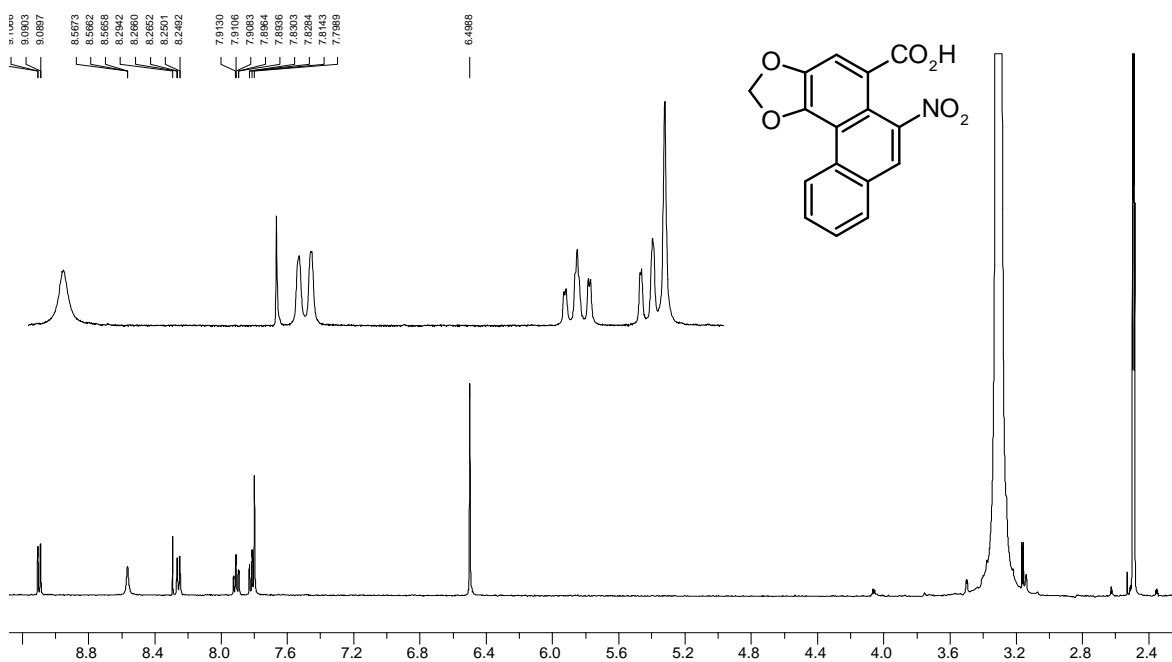


Figura 7: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ácido aristolóquico II (7) ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz).

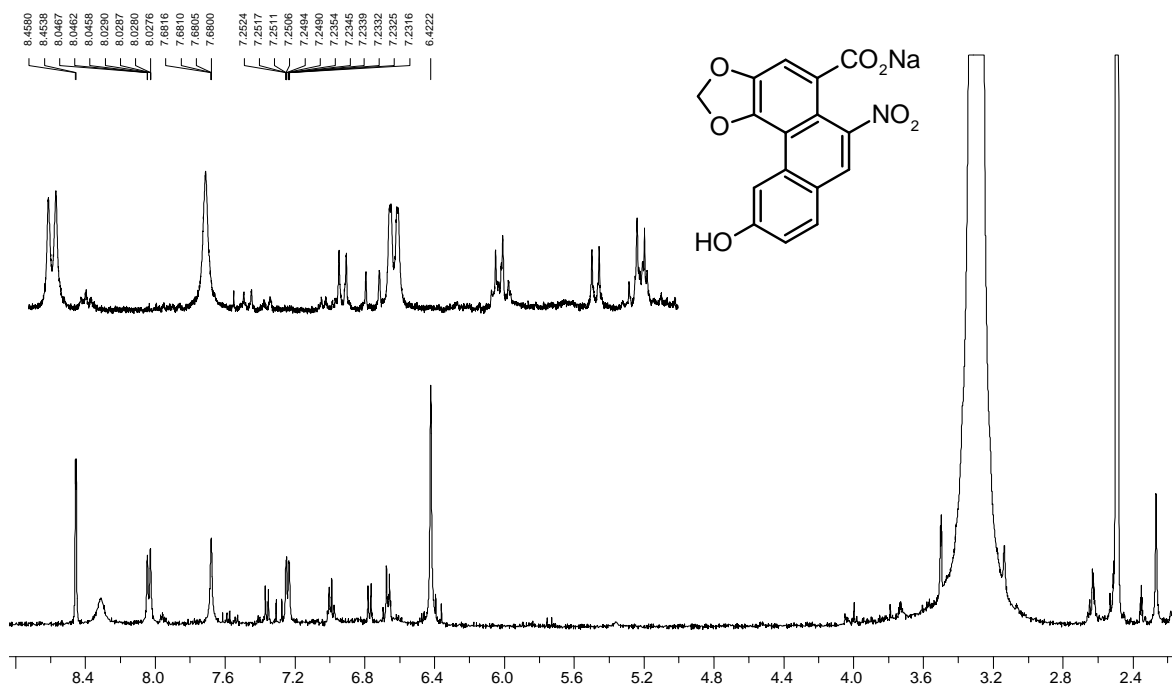
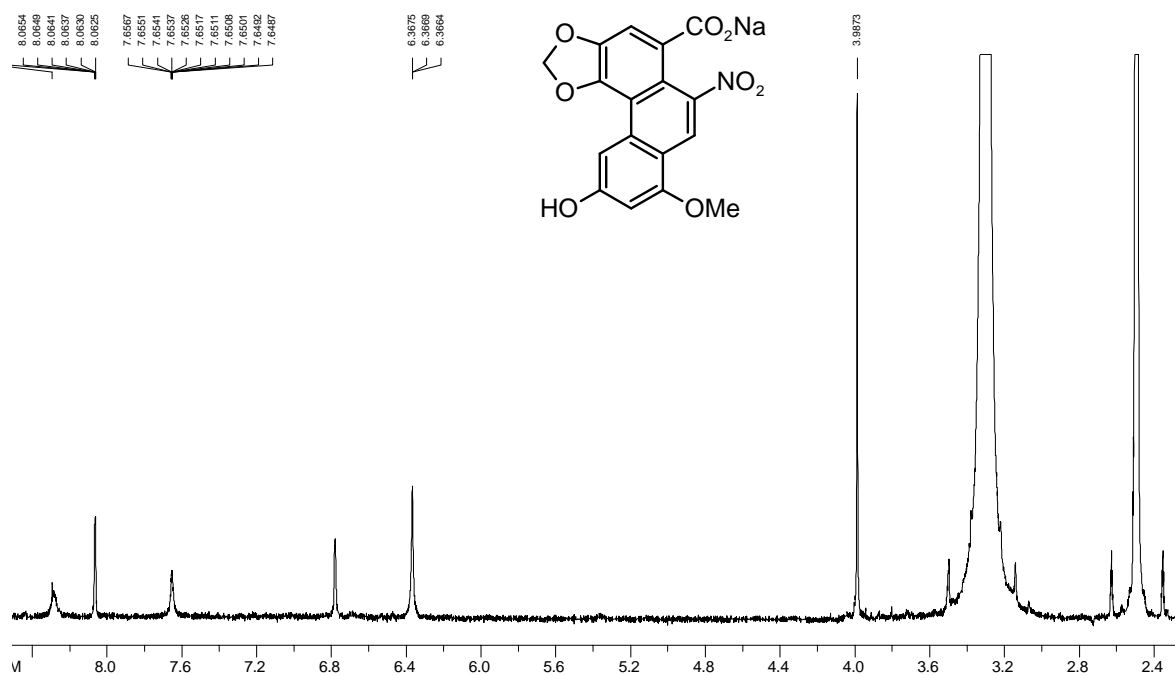
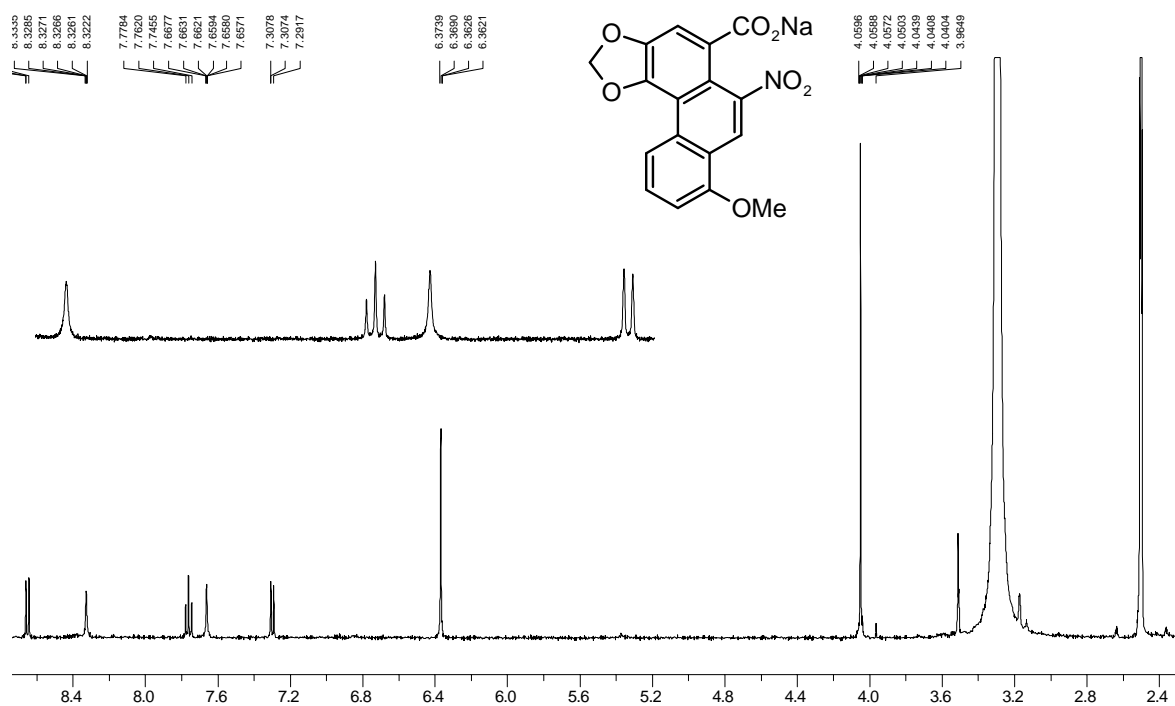


Figura 8: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do aristolocato de sódio IIIa (8) ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz).



Figura 9: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do aristolocato de sódio IVa (9) (DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz).Figura 10: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do aristolocato de sódio I (11) (DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz).

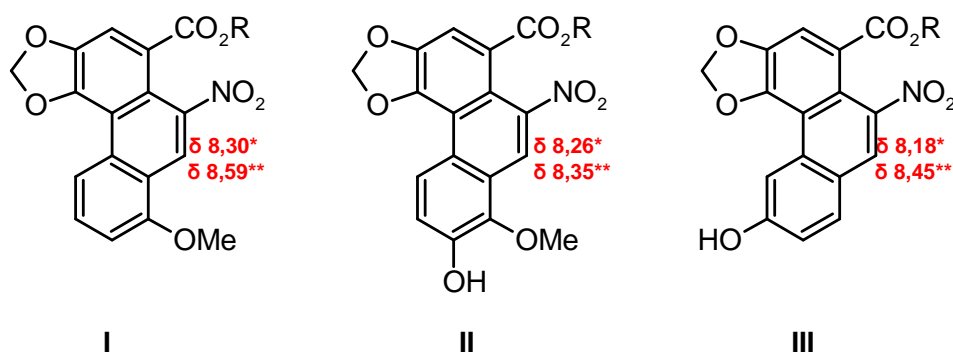


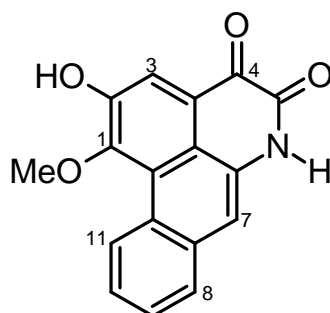
Figura 11: Valores de  $\delta$  para o H-9 em ácidos aristolóquicos e aristolocatos de sódio (\*R = Na; \*\*R = H).

Uma análise minuciosa dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H de **6-9** e **11** permitiu evidenciar que eles possuem os mesmos padrões de substituição dos ácidos aristolóquicos I e II e dos aristolocatos de sódio I, IIIa e IVa, respectivamente. Essas propostas foram confirmadas pela comparação dos dados espectroscópicos obtidos (Tabela, p. 57) com aqueles disponibilizados na literatura<sup>74-76</sup>.

Tabela 4: Dados de RMN de <sup>1</sup>H de **6-9** e **11** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ , *J* em Hz).

Posição	$\delta$ <sup>1</sup> H (6)	$\delta$ <sup>1</sup> H (7)	$\delta$ <sup>1</sup> H (8)	$\delta$ <sup>1</sup> H (9)	$\delta$ <sup>1</sup> H (11)
2	7,81 (s)	7,80 (s)	7,68 (sl)	7,65 (sl)	7,66 (sl)
5	8,68 (d; 8,5)	9,10 (dl; 8,5)	8,46 (d; 2,5)	8,06 (s)	8,65 (d; 8,5)
6	7,86 (t, <i>W</i> <sub>1/2</sub> 8,3)	7,91 (ddd; 8,5, 8,0 e 1,5)	–	–	7,76 (t, <i>W</i> <sub>1/2</sub> 8,3)
7	7,38 (d; 8,0)	7,80 (dt, 8,0 e 1,5)	7,24 (dd; 8,5 e 2,5)	6,78 (s)	7,30 (d; 8,0)
8	–	8,26 (dl; 8,0)	8,04 (d; 8,5)	–	–
9	8,58 (sl)	8,56 (sl)	8,31 (sl)	8,29 (sl)	8,33 (sl)
OCH <sub>2</sub> O	6,48 (s)	6,50 (s)	6,42 (s)	6,37 (s)	6,37 (s)
OMe	4,06 (s)	–	–	3,99 (s)	4,05 (s)

#### 4.1.3 Alcalóide 4,5-dioxoaporfínico (10)



O composto **10** (0,5 mg; sólido amarelo e fluorescente) foi obtido da fração A-07, conforme descrito no item 3.2.5 (p. 41).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **10** (Figura 12, p. 58), na região de absorção de hidrogênios aromáticos, observam-se dois duplos dubletos em  $\delta$  7,92 e 9,45, dois multipletos em  $\delta$  7,64 e dois singletos em  $\delta$  7,48 e 8,07. Foram também observados um singlete em  $\delta$  4,05 referente a hidrogênios metoxílicos e um singlete em  $\delta$  11,98 referente a hidrogênio ácido. Além disso, foram detectados por espectrometria de massas os íons de  $m/z$  294  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 316  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  e 268  $[\text{M}+\text{Na}-\text{OMe}-\text{OH}]^+$  (Figura 13, p. 58). Esses dados foram compatíveis com os de um alcalóide 4,5-dioxoaporfínico, substituído em C-1/C-2.

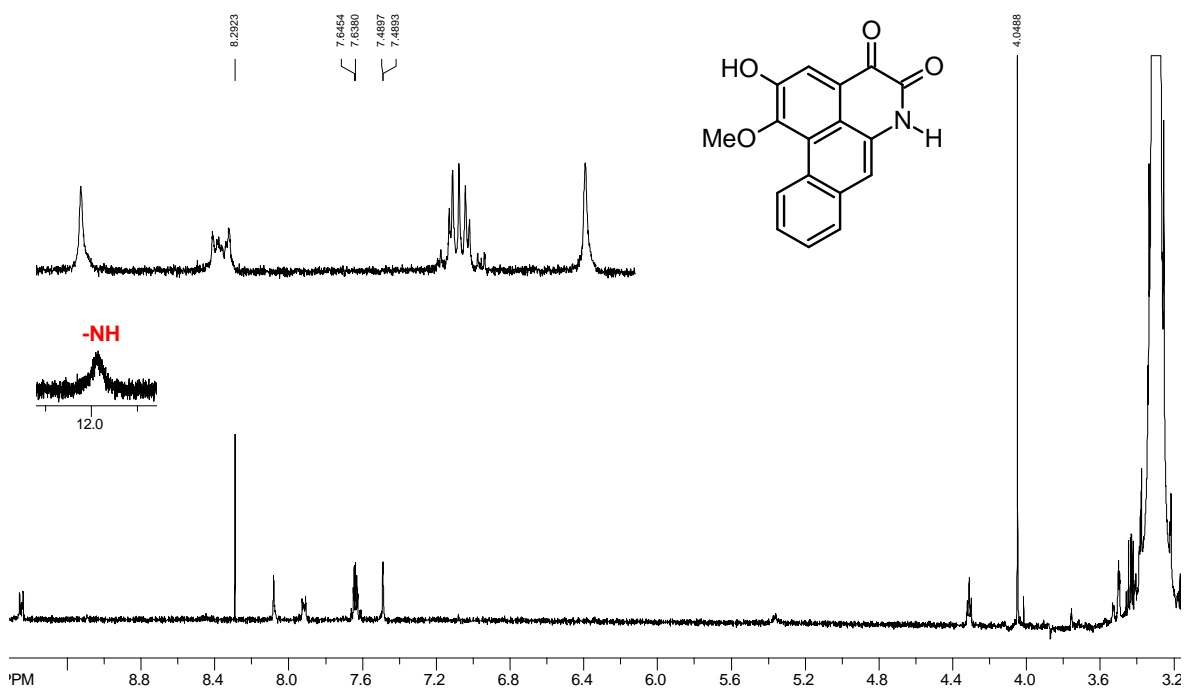


Figura 12: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **10** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz).

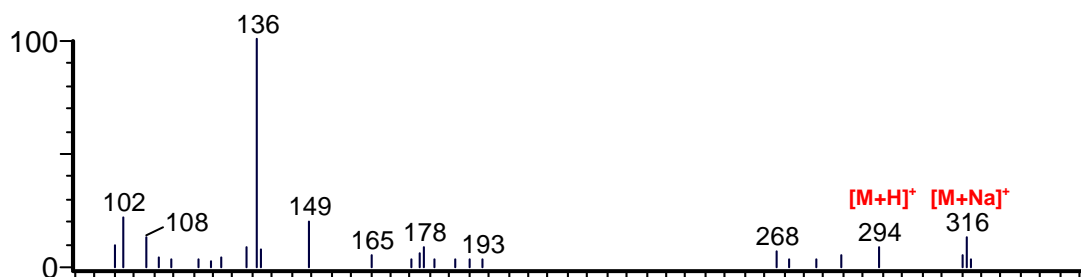


Figura 13: Espectro de massas do composto **10** (ESI, + 30 eV).

Para determinar a posição do substituinte metoxílico foi realizado experimento *g*NOESY 1D. Porém, possivelmente em decorrência da massa obtida, não foi verificado efeito *n*Oe com o tempo de acúmulo empregado (~ 1 hora). No mapa de contornos *g*HMQC foi observado a correlação entre os hidrogênios metoxílicos ( $\delta$  4,05) e o carbono metoxílico ( $\delta$  59,8). Assim sendo, duas propostas poderiam ser feitas para o composto **10**, onde o substituinte metoxílico estaria ligado à posição 1 ou 2 na estrutura molecular. Entretanto, o valor do deslocamento químico de RMN de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  59,8 foi condizente com o relatado na literatura <sup>77</sup> para o alcalóide com o grupo metoxílico em C-1. Segundo modelos da literatura (**IV**, **V** e **VI**), metoxilas ligadas a C-1 (em sistemas C-1/C-2 substituídos) são mais desprotegidas que metoxilas em C-2 (Figura 14, p. 59) <sup>77, 78</sup>.

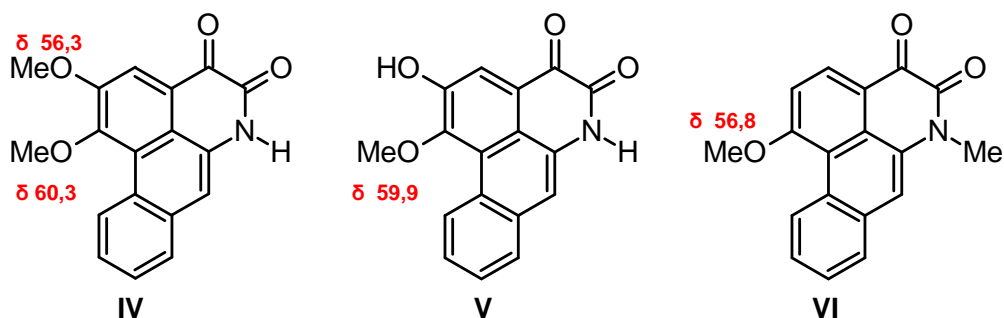


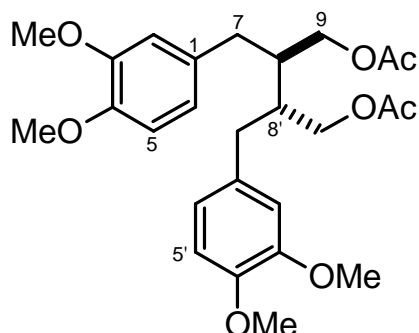
Figura 14: Valores de RMN de  $^{13}\text{C}$  para metoxilas em C-1 e/ou C-2 de alcalóides dioxoaporfínicos

Assim, com base nessas informações, e por comparação dos dados espectroscópicos obtidos (Tabela 5, p. 59) com os da literatura <sup>77-79</sup>, o composto **10** foi identificado como sendo o alcalóide 4,5-dioxodeidroasimilobíneo. Este composto já havia sido descrito em outras espécies de *Aristolochia*, por exemplo, *A. chilensis* <sup>79</sup>. Contudo está sendo relatado pela primeira vez em *A. melastoma*.

Tabela 5: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de **10** (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ,  $\delta$ , *J* em Hz).

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (Exp)	$\delta$ $^1\text{H}$ (Lit) <sup>82</sup>
3	8,07 (s)	8,08 (s)
7	7,48 (s)	7,49 (s)
8	7,92 ( <i>dd</i> ; 9,0 e 2,5)	7,93 ( <i>m</i> )
9	7,64 ( <i>m</i> )	7,65 ( <i>m</i> )
10	7,64 ( <i>m</i> )	7,65 ( <i>m</i> )
11	9,45 ( <i>dd</i> ; 8,0 e 2,0)	9,45 ( <i>m</i> )
OMe-1	4,05 (s)	4,04 (s)
NH	11,98 (s)	-

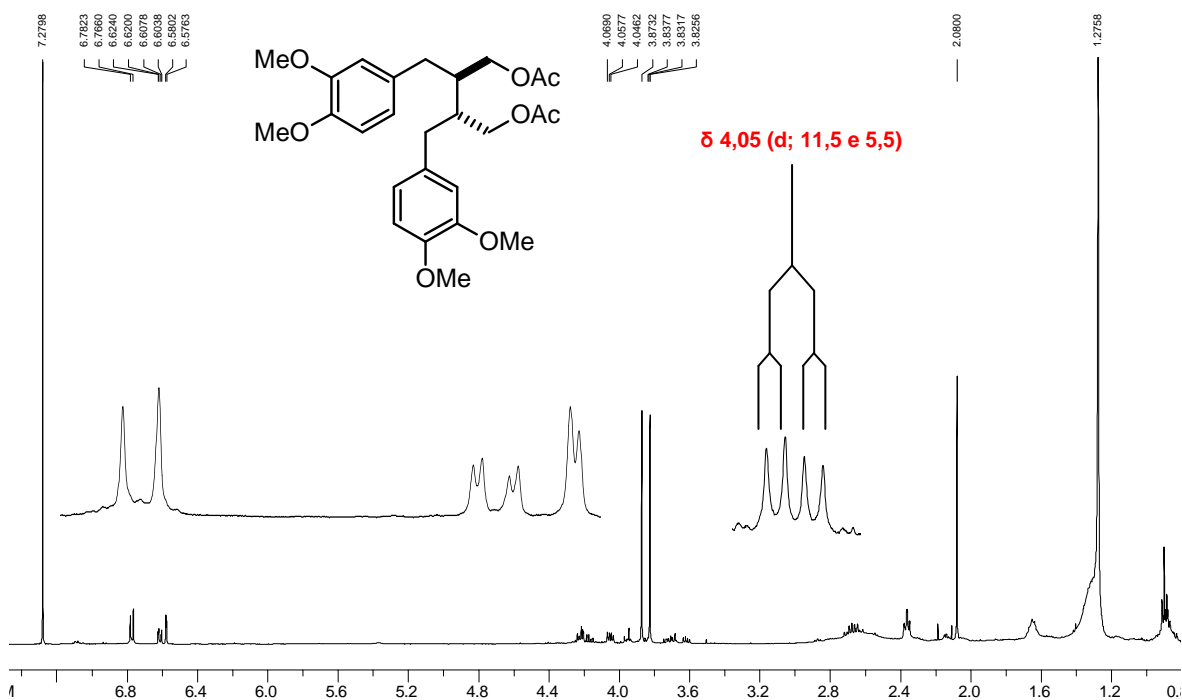
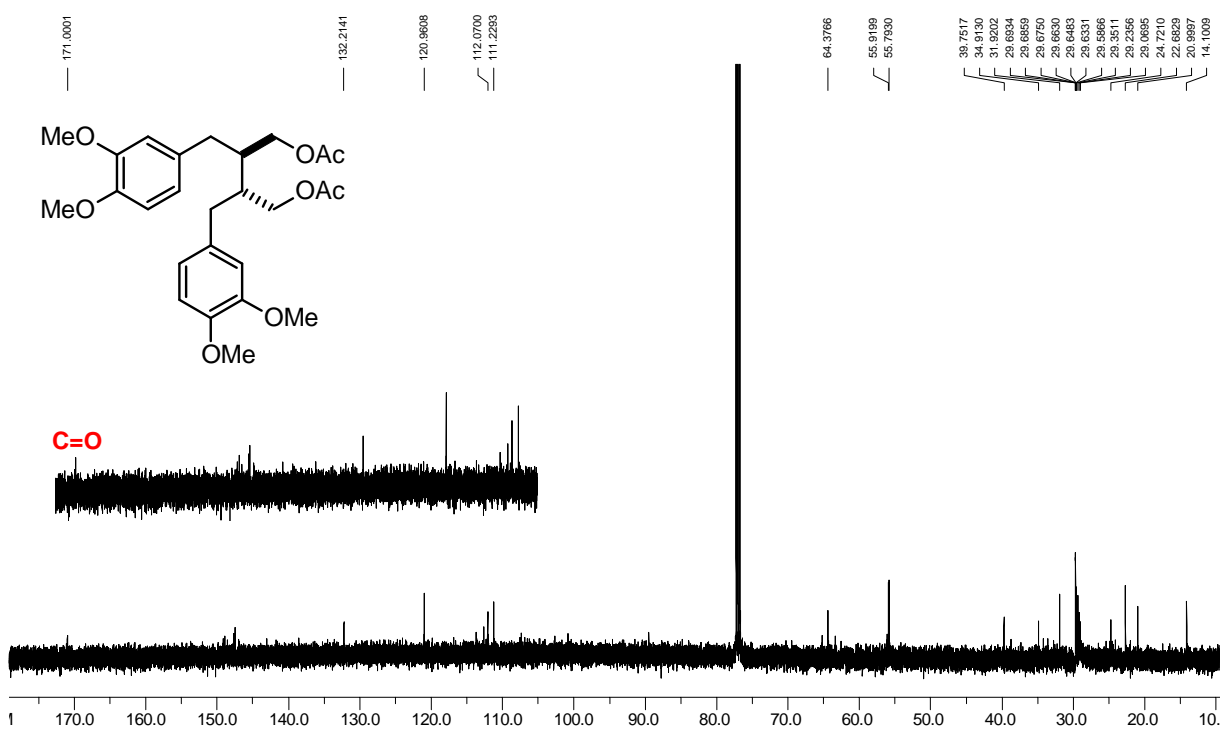
## 4.2 Lignana dibenzilbutânica, 9,9'-diacetato secoisolaricresinol dimetil éter (2)



O composto **2** [3,0 mg; contaminado por material graxo] foi obtido após fracionamento por permeação em gel da fração A-06, conforme descrito no item 3.2.4 (p. 42). Este composto foi também identificado na subfração A-05-07 (item 3.2.3, p. 42).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **2** (Figura 15, p. 61) apresentou sinais relativos a hidrogênios aromáticos de anel trissubstituído [ $\delta$  6,78 (d;  $J = 8,0$  Hz), 6,61 (dd;  $J = 8$  e 2,0 Hz) e 6,58 (d;  $J = 2$  Hz)], três singletos [sendo um deles com frequência típica de hidrogênios metílicos ligados a carbonila ( $\delta$  2,08) e outros dois com frequências características de metoxilas aromáticas ( $\delta$  3,83 e 3,87)], um duplo dubleto em  $\delta$  4,05 (dd;  $J = 11,5$  e 5,5 Hz), além de três multipletos em  $\delta$  2,15, 2,67 e 4,22.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 16, p. 61) foram observados vários sinais, dos quais treze foram atribuídos [com auxílio dos dados obtidos pelas técnicas 2D (*g*HMQC, *g*HMBC e *g*COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ )] a seis carbonos metílicos (sendo quatro metoxílicos), dois metilênicos benzílicos, dois metilênicos carbinólicos, seis metínicos aromáticos, dois metínicos alifáticos, seis quaternários (sendo quatro oxigenados) e dois carbonílicos. Além disso, o espectro de massas apresentou o pico do íon *quasi* molecular de  $m/z$  497 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ , bem como o pico do íon de  $m/z$  355 [ $\text{M}+\text{H}-120$ ] $^+$  resultante de rearranjo do tipo McLafferty (Figura 17, p. 62). Esses dados, além do diastereotopismo evidenciado (via *g*HMQC) para os hidrogênios em  $\delta$  4,05 e 4,22, foram sugestivos da existência de centros estereogênicos na estrutura molecular de **2** e levaram a proposta de um dímero de unidades  $\text{C}_6$ - $\text{C}_3$  simétrico (contendo grupos metoxílicos e acílicos), compatível com uma lignana dibenzilbutânica.

Figura 15: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto 2 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).Figura 16: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto 2 ( $\text{CDCl}_3$ , 126 MHz).

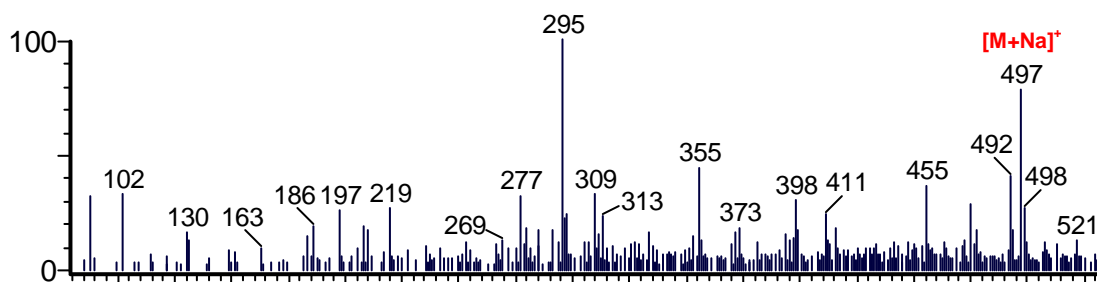


Figura 17: Espectro de massas do composto **2** (ESI, + 50 eV).

A configuração relativa de **2** foi determinada mediante comparação dos valores das constantes de acoplamento obtidas para os hidrogênios em  $\delta$  4,05 ( $J = 11,5$  e  $5,5$  Hz) com aquelas relatadas para os compostos análogos meso-secoisolariciresinol tetracetato e (–)-secoisolariciresinol tetracetato (Figura 18, p. 62; **VII** e **VIII**)<sup>80</sup>. Além disto, os valores dos deslocamentos químicos descritos para os C-7,7' [ $\delta$  33,8 (meso);  $\delta$  34,8 (quiral)] corroboraram com a proposta de estrutura quirálca<sup>81, 82</sup>. Embora os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  fossem consistentes com a configuração relativa proposta para **2**, não foi observada rotação óptica na concentração de  $2 \text{ mg. mL}^{-1}$  [mistura da lignana com material graxo]. Assim sendo, não se podem descartar as possibilidades de que **2** seja uma mistura racêmica ou contenha proporção próxima a de uma mistura racêmica.

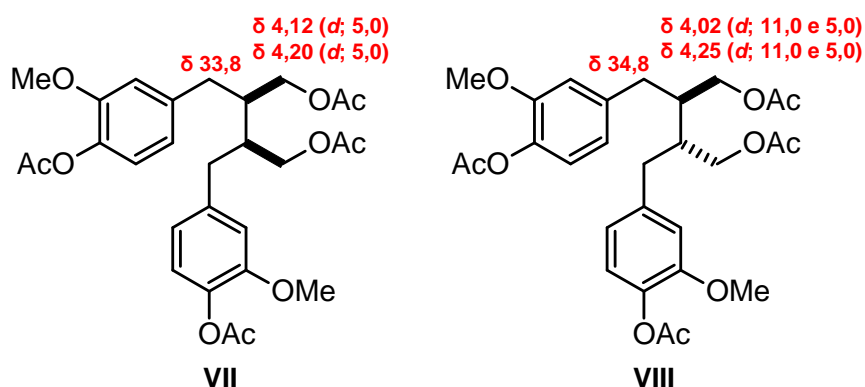


Figura 18: Valores das constantes de acoplamento dos H-9,9' nos compostos modelos.

A atribuição dos valores dos deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios foi efetuada pela análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D), e pela comparação dos dados espectroscópicos obtidos (Tabela 6, p. 64) com aqueles disponibilizados na literatura<sup>81</sup>. Todos os dados obtidos foram consistentes

com os relatados na literatura para diacetato (-)-secoisolariciresinol dimetil éter <sup>81</sup>. Entretanto, o mapa de contorno gHMBC (Figura 19, p. 63) mostrou correlação entre H-5,5' ( $\delta$  6,78) com C-3,3' ( $\delta$  148,9), bem como entre H-2,2' ( $\delta$  6,58) e H-6,6' ( $\delta$  6,61) com C-4,4' ( $\delta$  147,5), o qual levou a troca dos valores dos  $\delta$  atribuídos aos C-3,3' e C-4,4' em relação àqueles previamente descritos na literatura <sup>81</sup>.

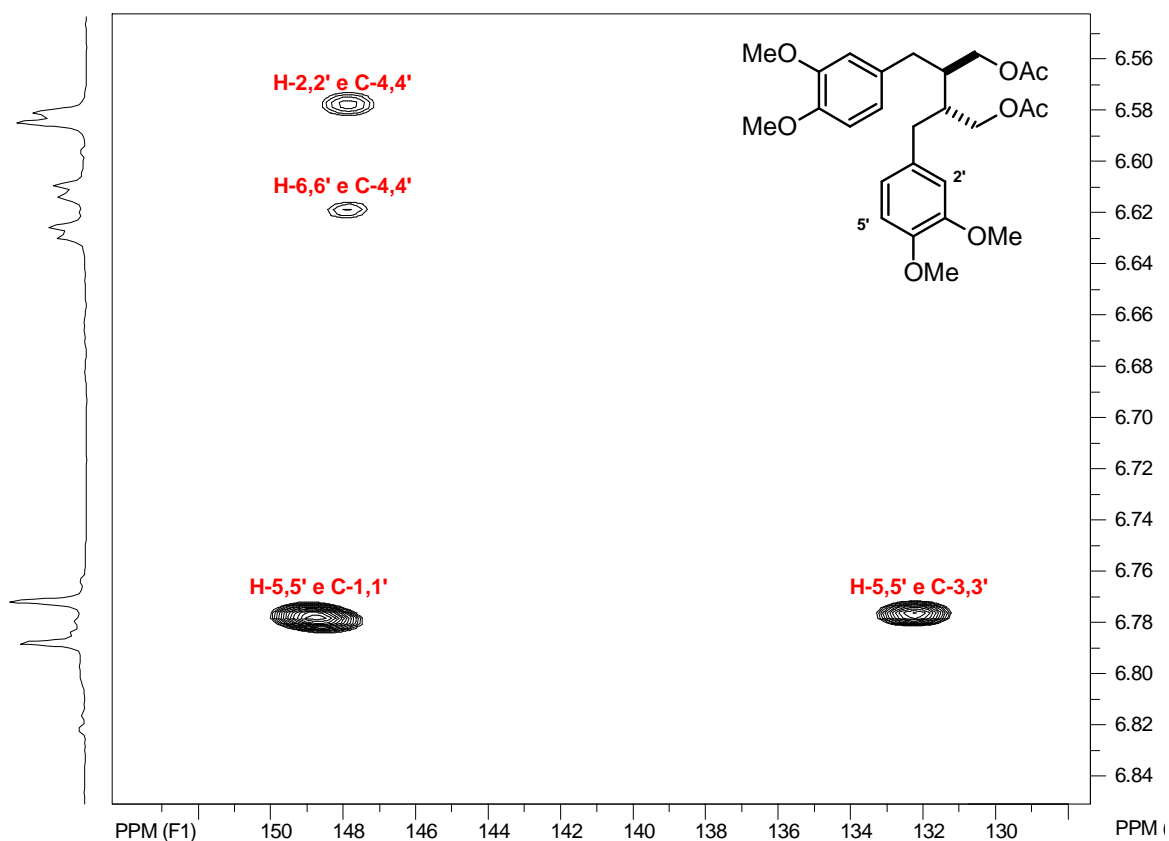


Figura 19: Expansão do mapa de contornos gHMBC de **2** (CDCl<sub>3</sub>, 11,7 T).

O composto **2** está sendo descrito pela primeira vez na família Aristolochiaceae. Na literatura, existem poucos relatos da ocorrência deste metabólito secundário (especial), restringindo-se a *Taxus baccata* e *Juniperus thurifera* (pertencentes à ordem Pinales; Gimnospermas), e *Dicliptera chinensis* e *Justicia procumbens* (pertencentes à família Acanthaceae; ordem Lamiales; Angiospermas).



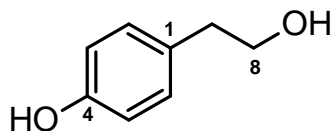
Tabela 6: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **2** (11,7 T,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ,  $J$  em Hz).

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (Exp)	$\delta$ $^1\text{H}$ (Lit) <sup>81</sup>	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (Exp)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (Lit) <sup>81</sup>
1,1'	-	-	132,2	132,1
2,2'	6,58 ( <i>d</i> ; 2,0)	6,53 ( <i>d</i> ; 1,8)	112,1	111,9
3,3'	-	-	148,9	147,3
4,4'	-	-	147,5	148,8
5,5'	6,78 ( <i>d</i> ; 8,0)	6,74 ( <i>d</i> ; 8,0)	111,2	111,0
6,6'	6,61 ( <i>dd</i> ; 8,0 e 2,0)	6,55 ( <i>dd</i> ; 8,0 e 1,8)	121,0	120,8
7,7'	2,67 ( <i>m</i> )	2,64 ( <i>m</i> )	34,9	34,8
8,8'	2,12 ( <i>m</i> )	2,10 ( <i>m</i> )	39,7	39,6
9,9'	4,05 ( <i>dd</i> ; 11,5 e 5,5)	3,95-4,25 ( <i>m</i> )	64,4	64,2
	4,22 ( <i>m</i> )			
OM-3,3'	3,83 ( <i>s</i> )	3,79 ( <i>s</i> )	55,9*	55,6
OMe-4,4'	3,87 ( <i>s</i> )	3,84 ( <i>s</i> )	55,8*	55,8
RCOOR	-	-	171,0	170,9
Me	2,08 ( <i>s</i> )	2,05 ( <i>s</i> )	21,0	20,9

\* Valores na mesma coluna que podem estar trocados

### 4.3 Derivados $\text{C}_6\text{-C}_2$

#### 4.3.1 Tirosol (**3**)



O composto **3** (10,5 mg) foi isolado (na subfração 24) após fracionamento cromatográfico (Sephadex LH-20) da fração A-06, conforme descrito no item 3.2.4 (p. 42).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 20, p. 65) de **2** foram observados um conjunto de sinais em  $\delta$  6,97 e 6,63 com multiplicidades e constantes de acoplamento típicas de hidrogênios aromáticos de anel *p*-substituído, além de um tripleto em  $\delta$  2,58 e um tripleto largo em  $\delta$  3,50 relativos a dois grupos metilênicos, sendo um benzílico e outro carbinólico, respectivamente. Neste espectro, foram ainda observados dois singletos largos em  $\delta$  4,50 e 9,06, sugerindo a presença de dois grupos hidroxílicos na estrutura molecular de **3**. Esses dados sugeriram que **3** era um derivado fenólico *p*-substituído por uma unidade hidroxietilíca.

A identidade do composto **3** foi confirmada pela comparação dos dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos (Tabela 7, p. 65) com aqueles relatados na literatura <sup>83</sup>. Além disso, co-eluição com amostra autêntica mostrou coincidência de Rf. O composto **3**, com ocorrência comum no reino vegetal, está sendo relatado pela primeira vez em *A. melastoma*.

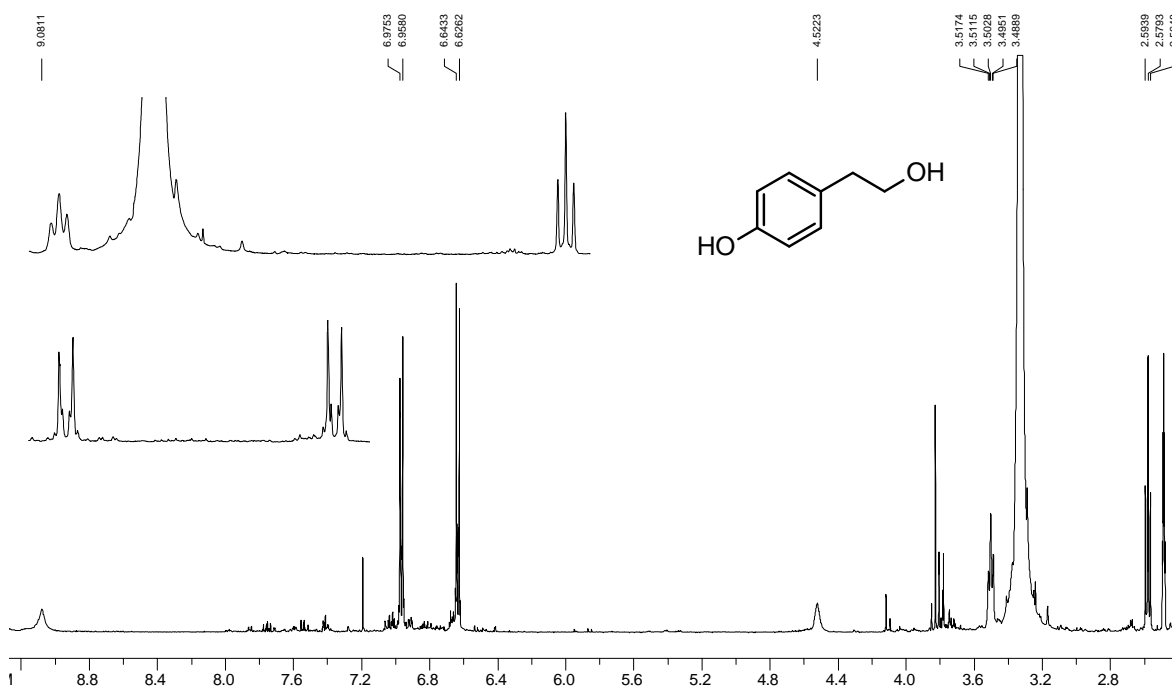
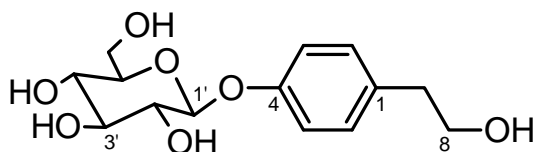


Figura 20: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **3** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz).

Tabela 7: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de **3** (500 MHz,  $\delta$ ,  $J$  em Hz).

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (Exp; $\text{DMSO-}d_6$ )	$\delta$ $^1\text{H}$ (Lit; $\text{DMSO-}d_6$ ) <sup>83</sup>	$\delta$ $^1\text{H}$ (Exp; $\text{CDCl}_3$ )	$\delta$ $^1\text{H}$ (Exp; $\text{D}_2\text{O}$ )
1	-	-	-	-
2	6,97 ( <i>d</i> ; 8,5)	6,99 ( <i>d</i> ; 8,4)	7,00 ( <i>d</i> ; 8,5)	7,17 ( <i>d</i> ; 9,0)
3	6,63 ( <i>d</i> ; 8,5)	6,66 ( <i>d</i> ; 8,4)	6,72 ( <i>d</i> ; 8,5)	6,84 ( <i>d</i> ; 9,0)
4	-	-	-	-
5	6,63 ( <i>d</i> ; 8,5)	6,66 ( <i>d</i> ; 8,4)	6,72 ( <i>d</i> ; 8,5)	6,84 ( <i>d</i> ; 9,0)
6	6,97 ( <i>d</i> ; 8,5)	6,99 ( <i>d</i> ; 8,4)	7,00 ( <i>d</i> ; 8,5)	7,17 ( <i>d</i> ; 9,0)
7	2,58 ( <i>t</i> ; 7,2)	2,60 ( <i>t</i> ; 7,2)	2,74 ( <i>t</i> ; 6,5)	2,76 ( <i>t</i> ; 6,8)
8	3,50 ( <i>tt</i> ; $W_{1/2}$ 7,2)	3,53 ( <i>m</i> )	3,76 ( <i>t</i> ; 6,5)	3,76 ( <i>t</i> ; 6,8)
OH-4	9,05 ( <i>s</i> )	9,10 ( <i>s</i> )	-	-
OH-8	4,50 ( <i>s</i> )	4,55 ( <i>t</i> ; 4,8)	-	-

### 4.3.2 Icarisídeo D2 (17)



O composto **17** (6,8 mg) foi isolado após fracionamento por CC de Sephadex LH-20 (MeOH) da fração B-05, conforme descrito no item 3.2.7 (p. 43).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **17** (Figura 21, p. 66), de maneira similar ao descrito para o tirosol (**3**), foram observados dois dubletos [ $\delta$  6,92 e 7,10 ( $J = 8,5$  Hz; ambos os sinais)] e dois tripletos [ $\delta$  2,65 e 3,55 ( $J = 7,0$  Hz; ambos os sinais)] relativos a uma unidade  $\text{C}_6\text{-C}_2$  *p*-substituída. Nesse espectro também foi possível observar um dubleto referente a hidrogênio anomérico em  $\delta$  4,78, além de vários multipletos na região entre  $\delta$  3,16 a 3,80, característicos de uma unidade glicosídica.

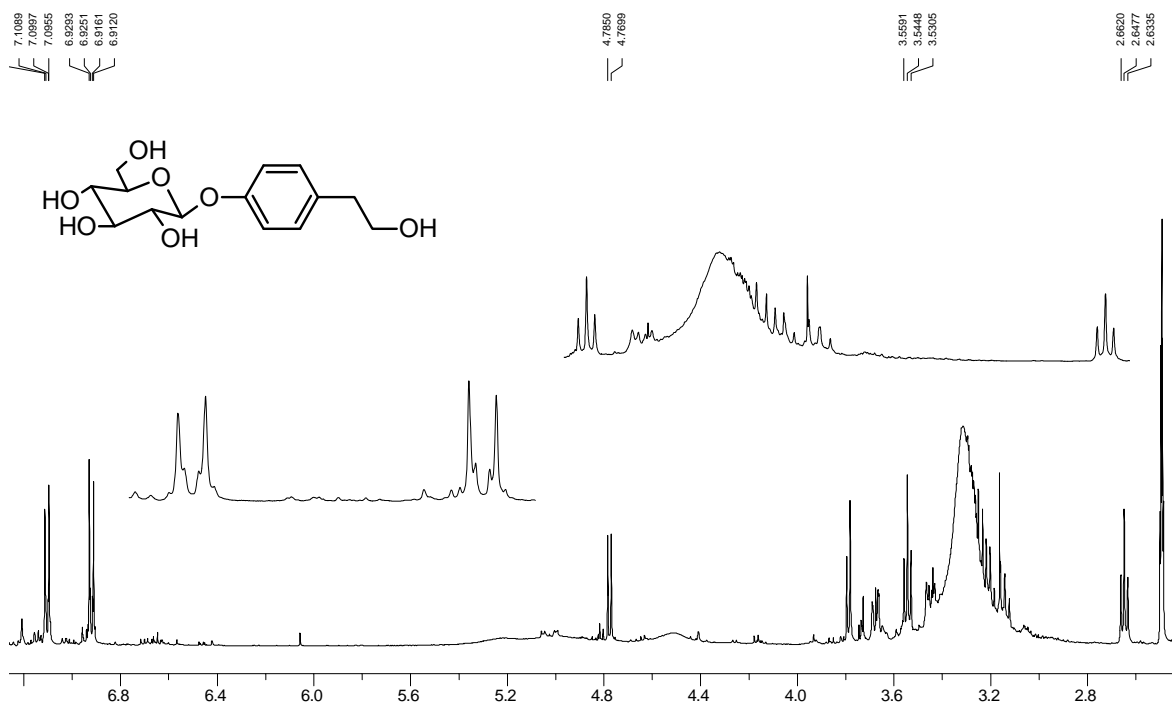


Figura 21: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **17** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz).

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **17** foram observados doze sinais, incluindo dois deles com intensidade nitidamente duplicada. Destes sinais, seis foram atribuídos aos carbonos da unidade glicosídica, dois aos grupos metilênicos

benílico e carbinólico, dois a carbonos quaternários aromáticos e dois aos carbonos metínicos do sistema aromático *p*-substituído. A análise conjunta dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  sugeriu para o composto **17** uma estrutura semelhante àquela do tirosol (**3**), mas glicosilado em C-4 ou C-8.

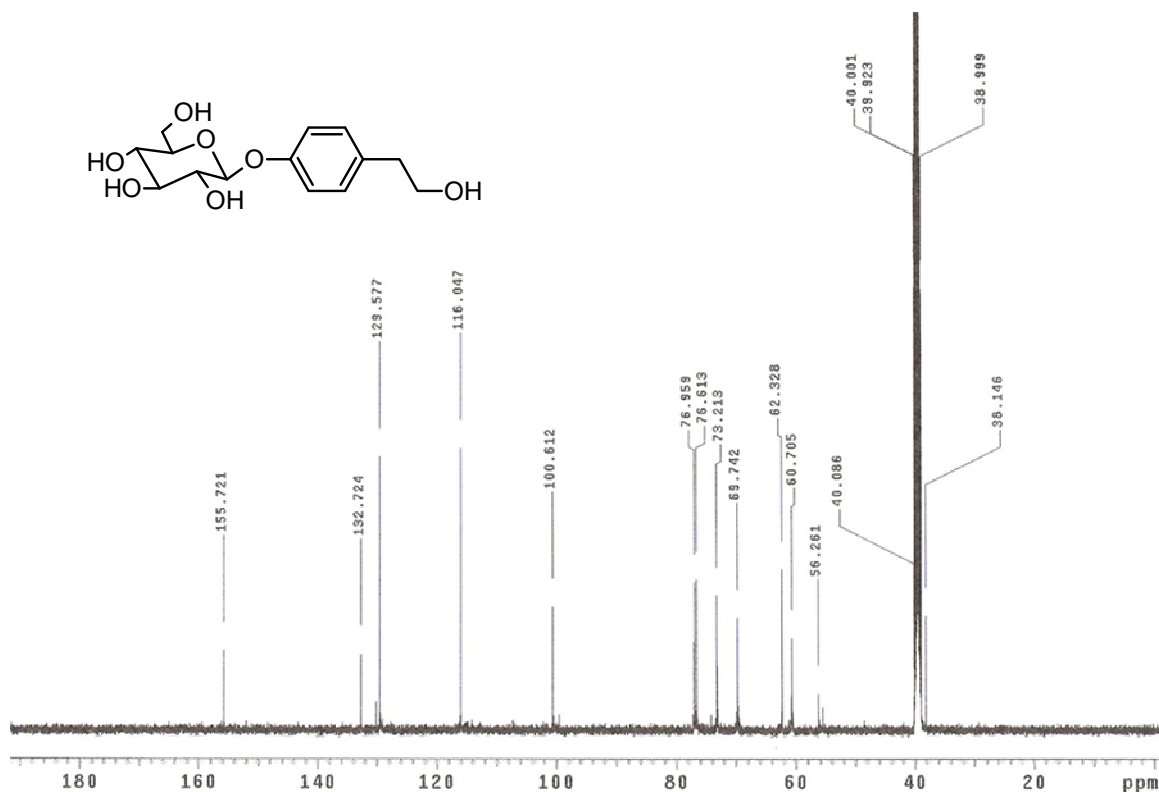


Figura 22: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **17** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

A posição e a identidade da unidade glicosídica ( $\beta$ -D-glucopiranosila) na estrutura molecular de **17** foram estabelecidas pela comparação dos dados espectrométricos de RMN de  $^1\text{H}$ , e, principalmente de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtidos com aqueles de modelos disponibilizados da literatura<sup>84, 85</sup>. De acordo com os modelos (Figura 23, p. 68; **VIII** e **IX**), os C-1, C-3, C-5 e C-7 no isômero glicosilado em C-4 são mais desprotegidos que no isômero glicosilado em C-8, enquanto o C-8 é mais protegido<sup>84, 85</sup>. O comportamento observado para os C-1, C-3 e C-5 está coerente com o que seria previsto (proteção) pelos efeitos estereoeletrônicos de ressonância e de hiperconjugação negativa, os quais são mais significativos para um substituinte  $-\text{OH}$  que para um  $-\text{OGlc}$ . Por outro lado, os comportamentos observados para os C-7 e C-8 podem ser explicados pelos efeitos  $\beta$  (desproteção) e  $\gamma$  gauche (proteção), respectivamente.

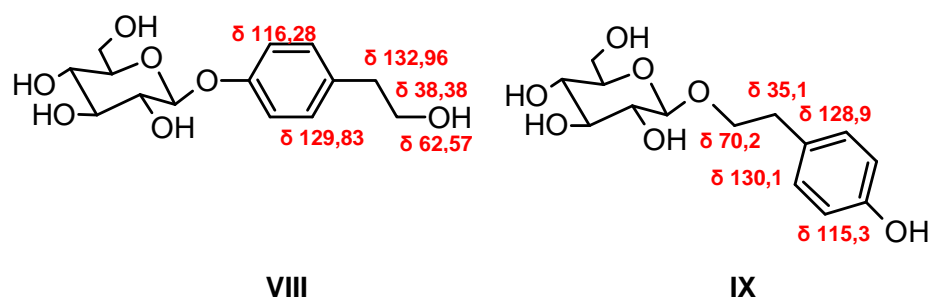


Figura 23: Valores selecionados de  $\delta$  de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ) para icarisídeo D2 e salidrosideo.

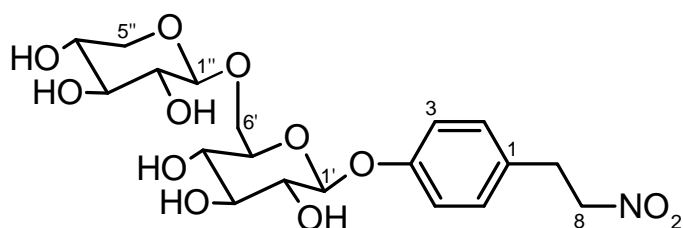
A identidade do composto **17** foi confirmada pela comparação dos dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  obtidos (Tabela 8, p. 68) com aqueles relatados na literatura <sup>84</sup>. O valor de rotação óptica específica medido para **17** foi  $[\alpha]_D^{33} -42,8^\circ$  (c. 0,13, MeOH). A configuração absoluta do composto **17** foi determinada por comparação deste valor com aquele descrito na literatura <sup>86</sup>. Este composto já havia sido identificado em *A. melastoma* <sup>72</sup>.

Tabela 8: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **17** (11,7 T, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ,  $J$  em Hz).

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (Exp)	$\delta$ $^1\text{H}$ (Lit) <sup>84</sup>	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (Exp)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (Lit) <sup>84</sup>
1	-	-	132,7	132,96
2	7,10 ( <i>d</i> ; 8,5)	7,12 ( <i>d</i> ; 8,5)	129,6	129,83
3	6,92 ( <i>d</i> ; 8,5)	6,93 ( <i>d</i> ; 8,5)	116,0	116,28
4	-	-	155,7	155,95
5	6,92 ( <i>d</i> ; 8,5)	6,93 ( <i>d</i> ; 8,5)	116,0	116,28
6	7,10 ( <i>d</i> ; 8,5)	7,12 ( <i>d</i> ; 8,5)	129,6	129,83
7	2,65 ( <i>t</i> ; 7,0)	2,65-2,67 ( <i>m</i> )	38,1	38,38
8	3,55 ( <i>t</i> ; 7,0)	3,54-3,57 ( <i>m</i> )	62,3	62,57
1'	4,78 ( <i>d</i> ; 7,5)	4,79 ( <i>d</i> ; 7,5)	100,6	100,83
2'	n.d	3,25-3,28 ( <i>m</i> )	73,2	73,45
3'	n.d	3,14-3,18 ( <i>m</i> )	77,0	77,19
4'	n.d	3,20-3,24 ( <i>m</i> )	69,7	69,97
5'	n.d	3,28-3,31 ( <i>m</i> )	76,6	76,85
6'	n.d	3,45-3,48 ( <i>m</i> )	60,7	60,94
	n.d	3,68-3,70 ( <i>m</i> )		

\* n.d (não determinado)

#### 4.3.3 Derivado C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-NO<sub>2</sub> glicosidado, talictricosídeo (16)



O composto **16** (34,6 mg; cristais brancos) foi obtido na subfração B-11, após fracionamento cromatográfico (CC de C-18; 230-400 mesh; eluída em H<sub>2</sub>O-MeOH) da fração A-09, conforme descrito no item 3.2.7 (p. 43).

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **16** (Figura 24, p. 70), assim como os espectros de **3** e **17** (Figuras 20 e 21, p. 65 e 66), apresentou sinais em δ 7,17 e 7,00, característicos da subestrutura C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub> *p*-substituída. Foram ainda observados dois tripletos em δ 3,17 (*J* = 7,2 Hz) e 4,79 (*J* = 7,2 Hz) com correlação no mapa de contorno gCOSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (Figura 25, p. 70), além de vários sinais na região entre δ 2,9 a 5,3, característicos de glicosídeos. Os sinais observados em δ 3,17 (H-7) e 4,79 (H-8), os quais estão significativamente deslocados (para frequências mais altas) em relação àqueles observados para os compostos **3** e **17**, foram sugestivos da existência de um grupo nitro ligado a C-1. Além disso, os sinais em δ 4,19 e 4,78 evidenciaram a presença de duas unidades glicosídicas na estrutura molecular de **16**. Esses dados foram compatíveis com um diglicosídeo nitrofenilético.

A análise detalhada (auxiliada, sobretudo pelos experimentos gCOSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H e gTOCSY 1D; Figuras 26-27, p. 71) das multiplicidades e constantes de acoplamento dos hidrogênios carbinólicos [4,78 (1H, *d*, *J* = 7,5, H-1'), 3,23 (1H, *m*, H-2'), 3,25 (1H, *m*, H-3'), 3,16 (1H, *dd*, *W*<sub>1/2</sub> = 9,5, 8,5 Hz, H-4'), 3,51 (1H, *ddd*, *W*<sub>1/2</sub> = 9,5, 6,5, 1,4 Hz, H-5'), 3,95 (1H, *dd*, *J* = 11,4, 1,4 Hz, H-6'), 3,57 (1H, *dd*, *W*<sub>1/2</sub> = 11,4, 6,5 Hz, H-6'), 4,18 (1H, *d*, *J* = 7,7 Hz, H-1''), 2,98 (1H, *dd*, *W*<sub>1/2</sub> = 8,8, 7,7 Hz, H-2''), 3,08 (1H, *t*, *W*<sub>1/2</sub> = 8,8 Hz, H-3''), 3,27 (1H, *m*, H-4''), 2,94 (1H, *dd*, *J* = 11,3, 10,3 Hz, H-5''), 3,67 (1H, *dd*, *J* = 11,3, 5,3 Hz, H-5'')] sugeriu para **16** unidades glicosídicas com configuração relativa idêntica à das aldohexoses β-xilopiranosose e β-glucopiranosose.

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 28, p. 72), com auxílio do espectro DEPT 90° (Figura 29, p. 69), mostrou um total de dezessete carbonos. Desses sinais, onze foram atribuídos a carbonos de unidades glicosídicas, quatro a carbonos de sistema

aromático *p*-substituído e dois a carbonos metilênicos: um benzílico e outro ligado a grupo nitro.

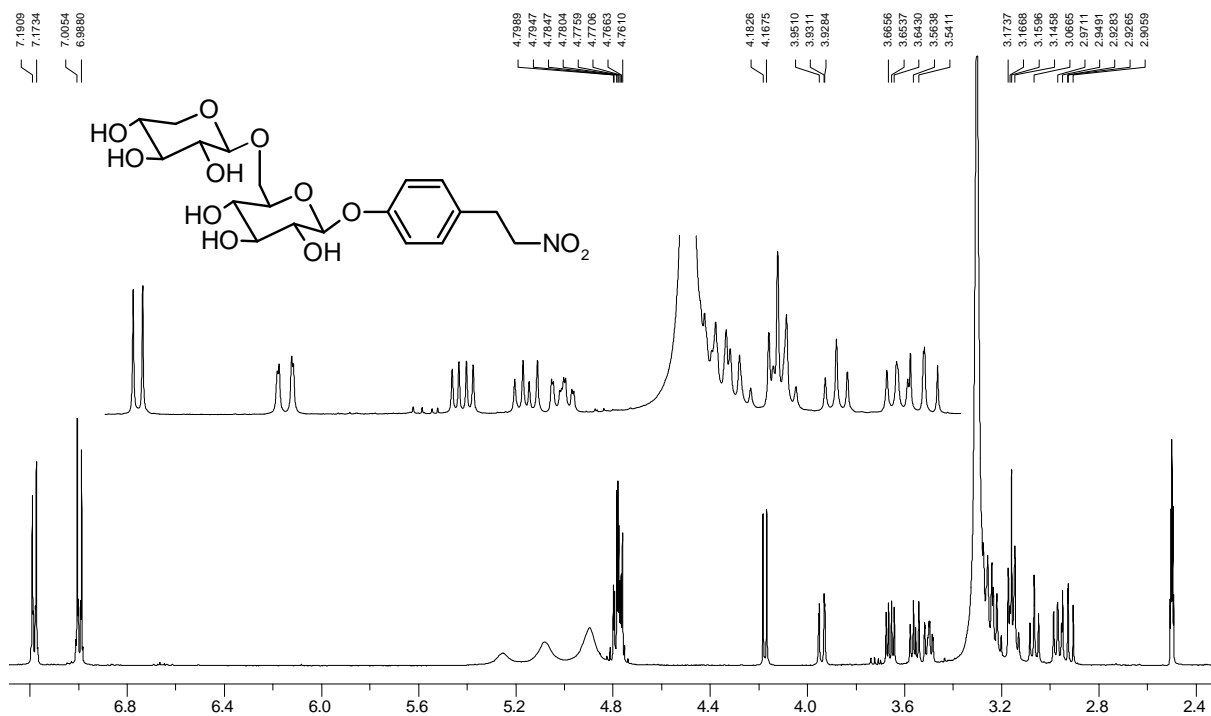


Figura 24: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **16** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz).

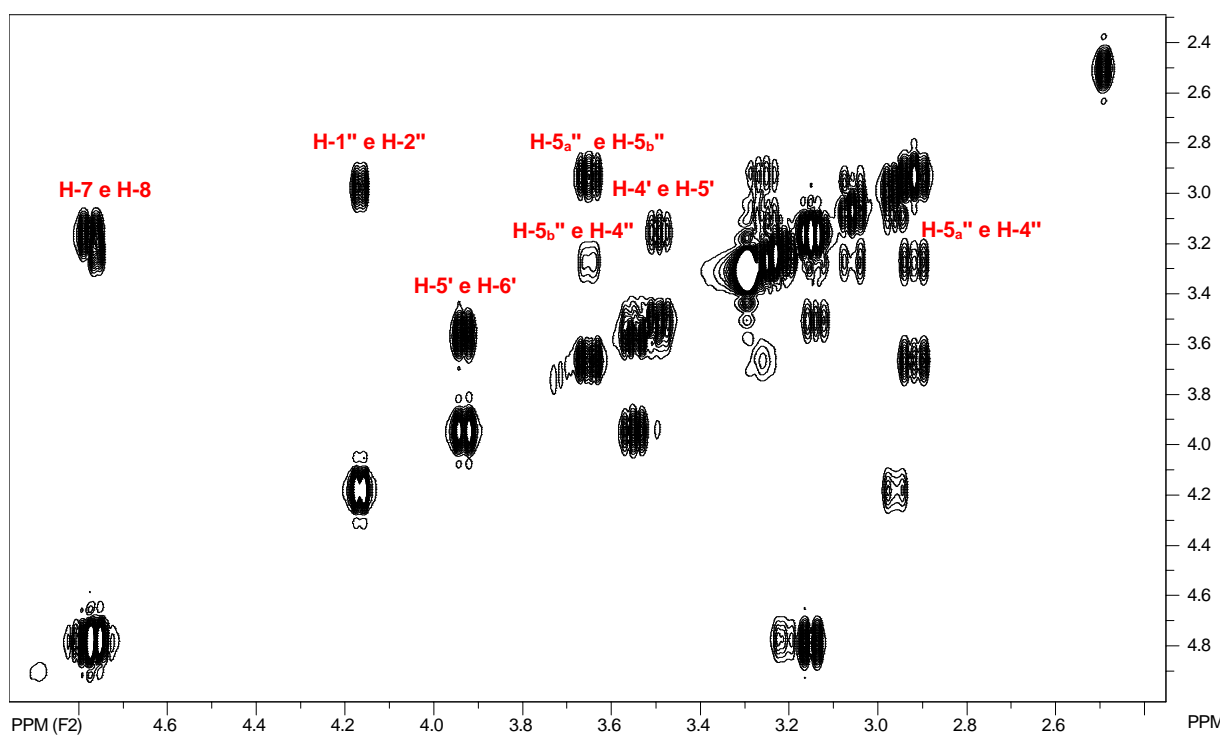


Figura 25: Expansão do mapa de contornos  $g\text{COSY } ^1\text{H-}^1\text{H}$  de **16** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz).

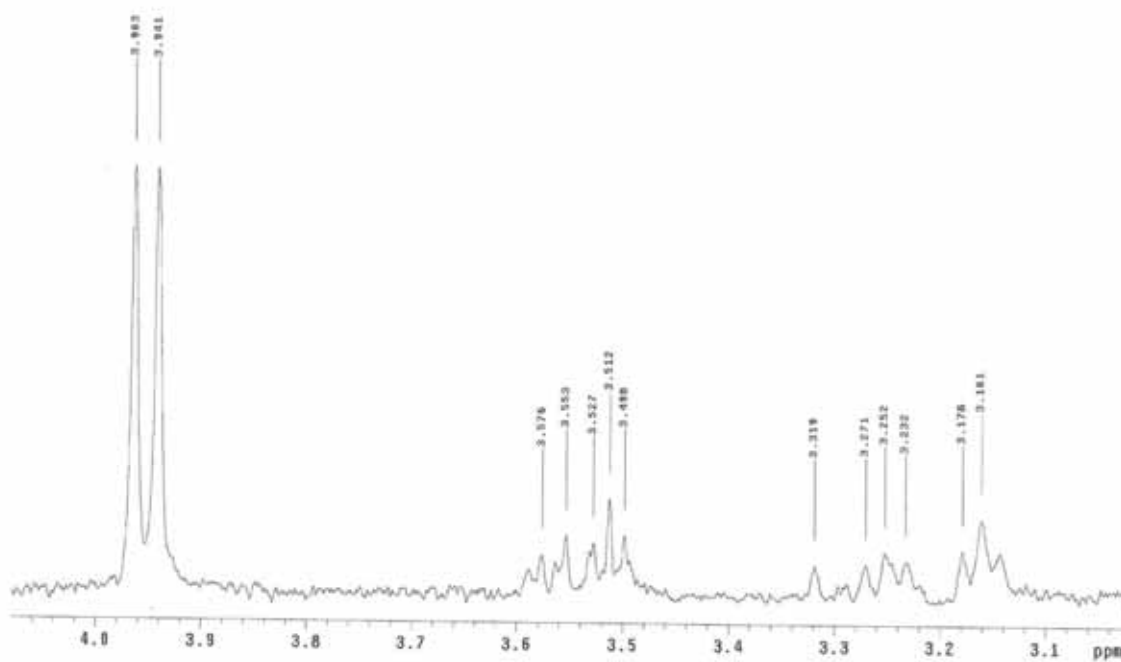


Figura 26: Espectro gTOCSY 1D de **16** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

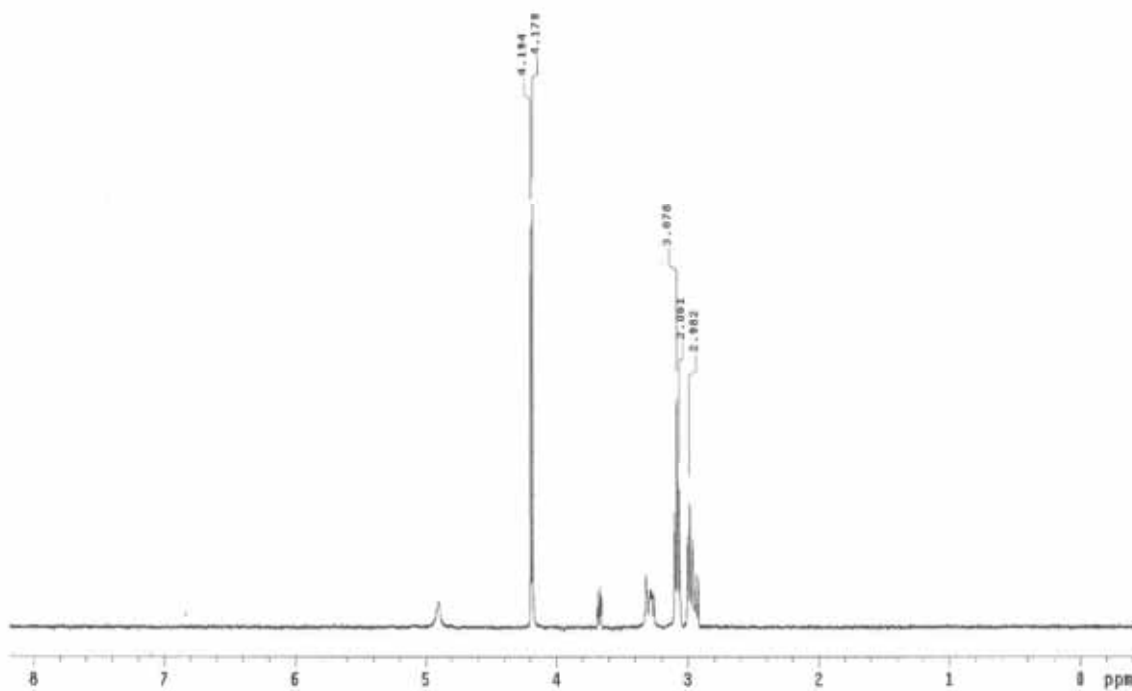
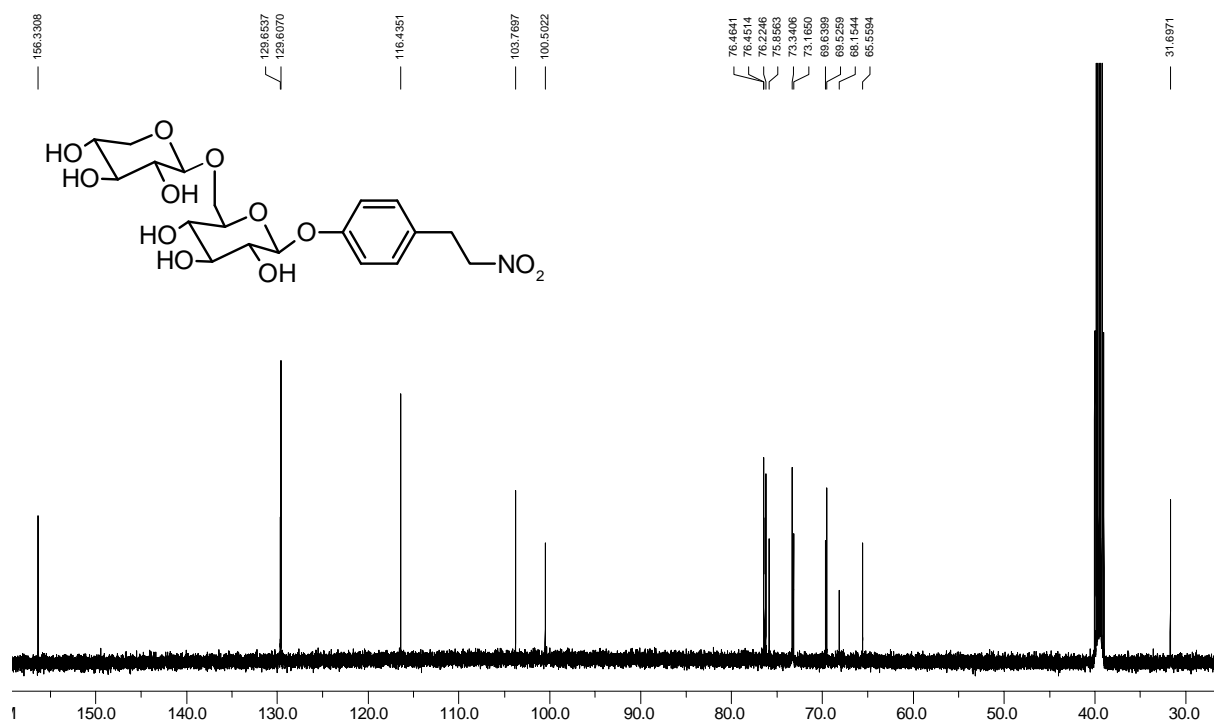
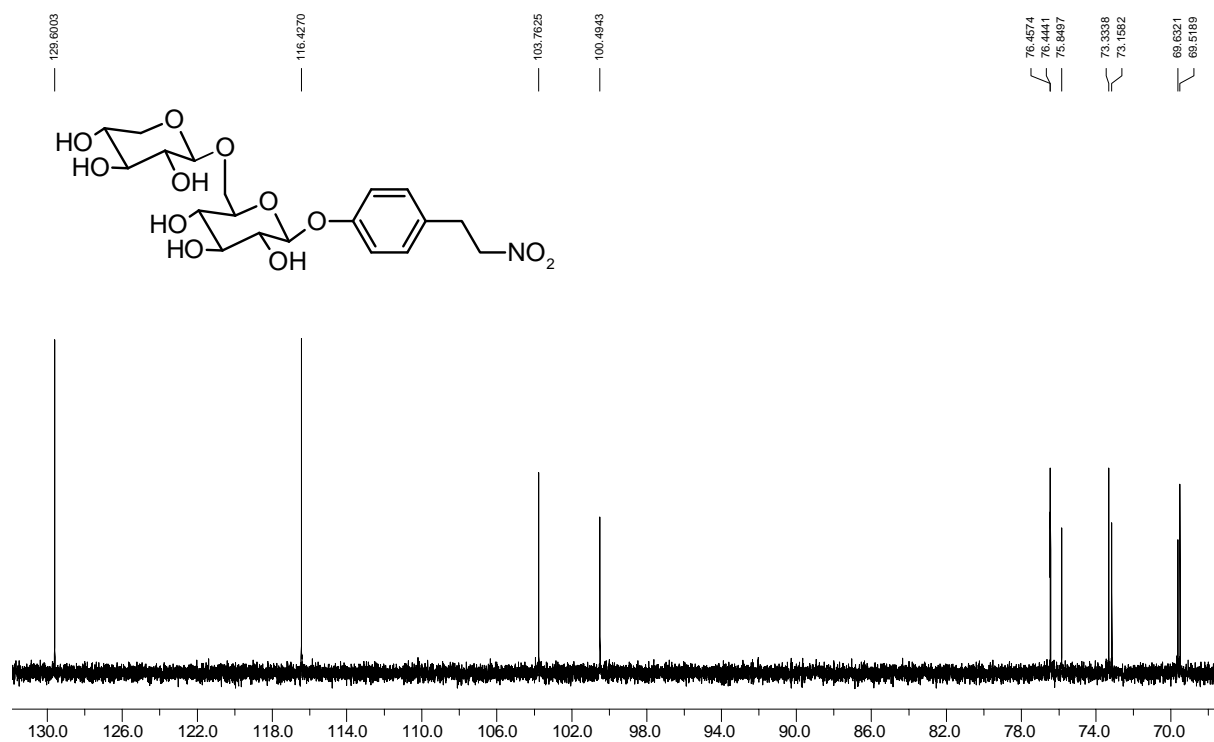


Figura 27: Espectro gTOCSY 1D de **16** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



Figura 28: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **16** (DMSO- $d_6$ , 126 MHz).Figura 29: Espectro de DEPT  $90^\circ$  de **16** (DMSO- $d_6$ , 126 MHz).

A conectividade entre os fragmentos subestruturais de **16** foi estabelecida pelas correlações a longa distância observadas no mapa de contornos *g*HMBC (Figuras 30-36, p. 73-76). A correlação a longa distância entre o hidrogênio anomérico H-1' ( $\delta$  4,79) com o C-4 ( $\delta$  156,3) mostrou que a unidade  $\beta$ -glucopiranosídica estava ligada à subestrutura C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>, enquanto a correlação entre o hidrogênio anomérico em  $\delta$  4,19 (H-1'') com o C-6' ( $\delta$  68,2) evidenciou que a unidade  $\beta$ -xilopiranosídica estava ligada à unidade  $\beta$ -glucopiranosídica por uma ligação do tipo 1'' $\rightarrow$ 6'. Além disso, o valor do deslocamento químico de C-6' ( $\delta$  68,2) corroborou com a proposta de ligação do tipo 1'' $\rightarrow$ 6', desde que seria previsto desproteção relativa para este carbono em decorrência do efeito  $\beta$  ocasionado pela unidade glicosídica adicional.

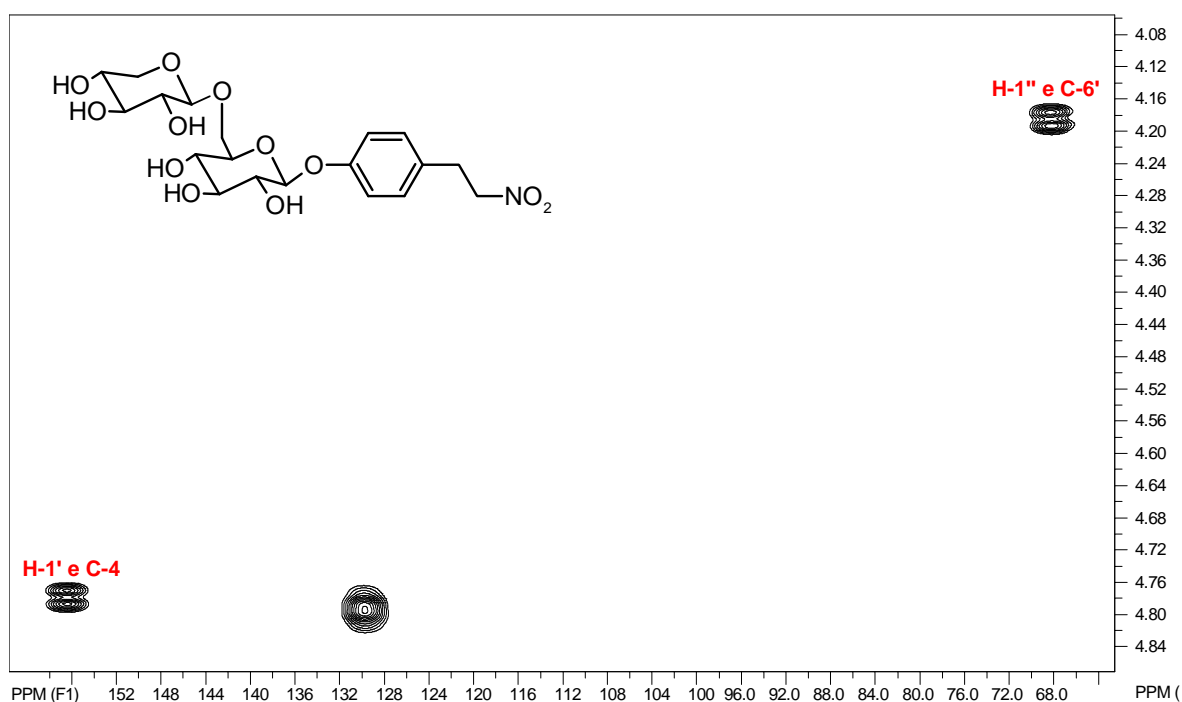
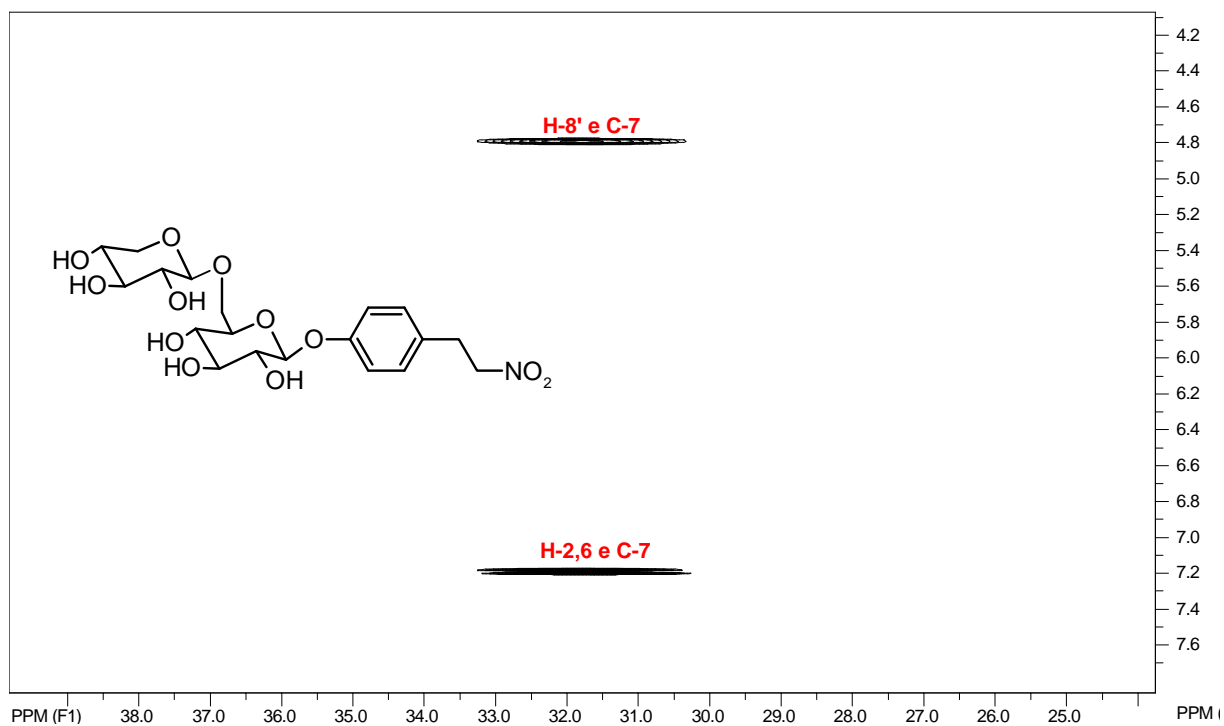
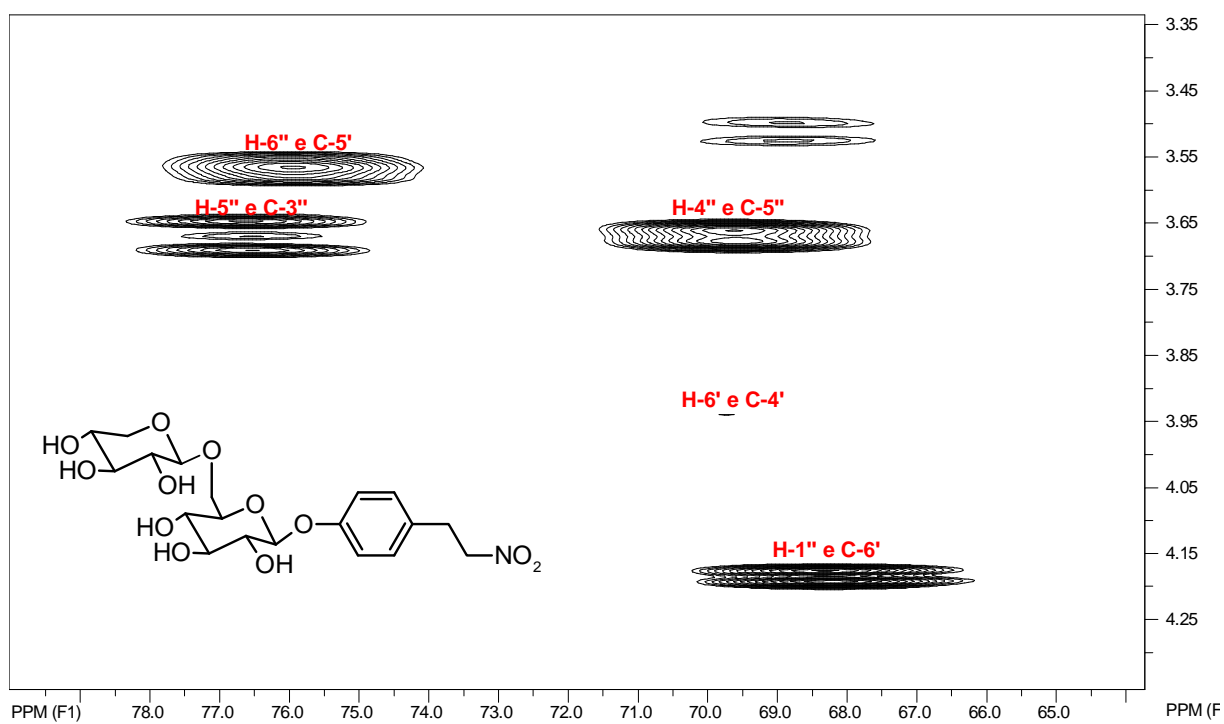


Figura 30: Expansão do mapa de contornos *g*HMBC de **16** (11,7 T, DMSO-*d*<sub>6</sub>).

O espectro de massas apresentou o íon *quasi* molecular de  $m/z$  484 [M+Na]<sup>+</sup>. Foram também observados picos minoritários resultantes de clivagens acetálicas das unidades glicosídicas, além de um pico de  $m/z$  115 resultante da desidratação do fragmento de  $m/z$  133 (Figura 37; Esquema 6; p. 77).

Figura 31: Expansão do mapa de contornos  $g$ HMBC de **16** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 11,7 T).Figura 32: Expansão do mapa de contornos  $g$ HMBC de **16** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 11,7 T).

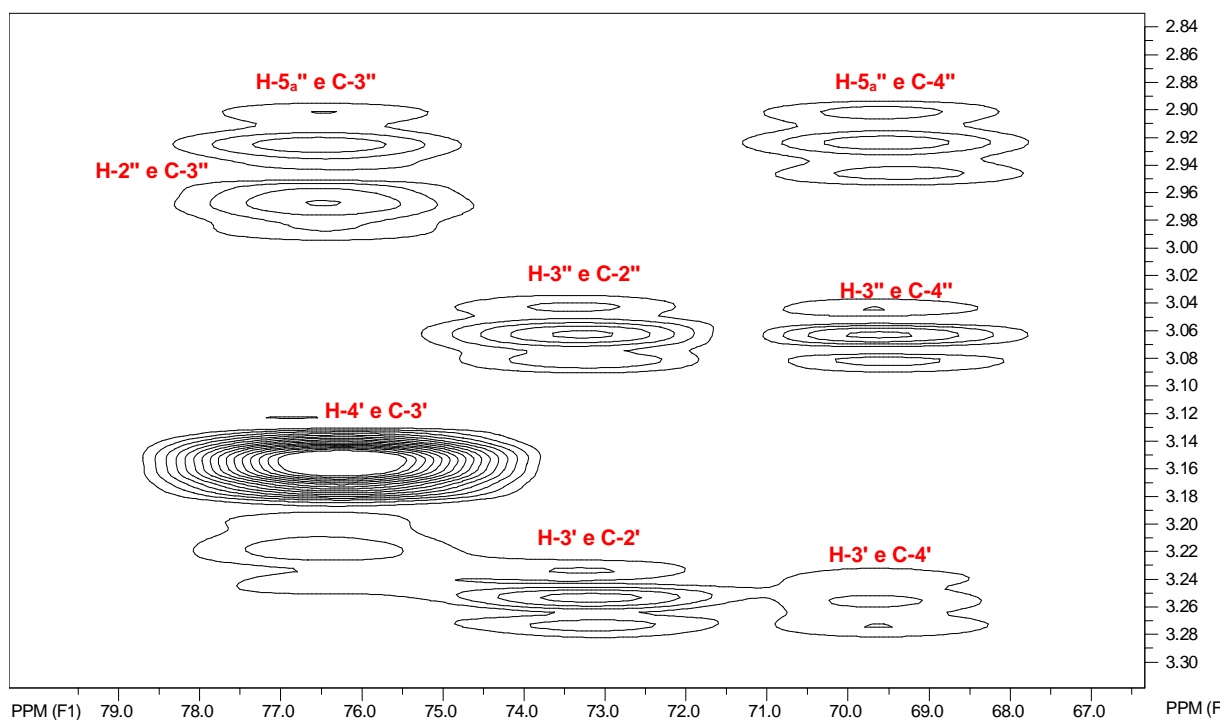


Figura 33: Expansão do mapa de contornos gHMBC de **16** (DMSO- $d_6$ , 11,7 T).

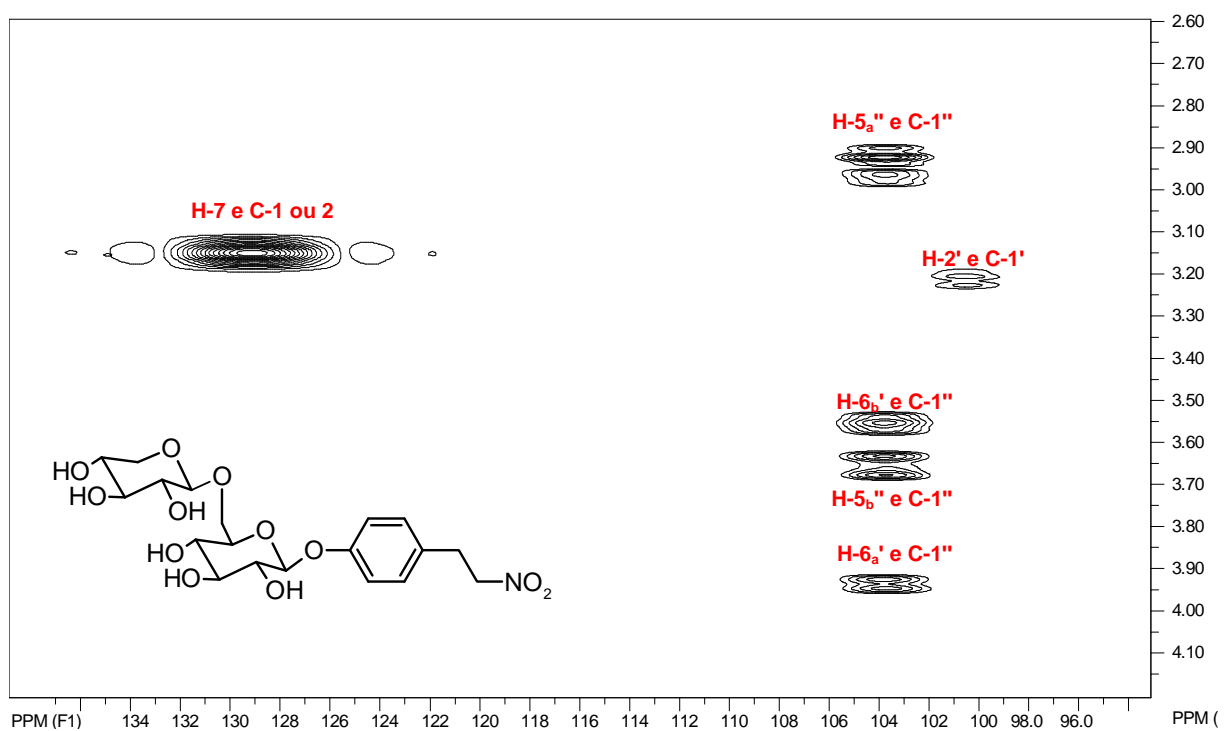


Figura 34: Expansão do mapa de contornos gHMBC de **16** (DMSO- $d_6$ , 11,7 T).

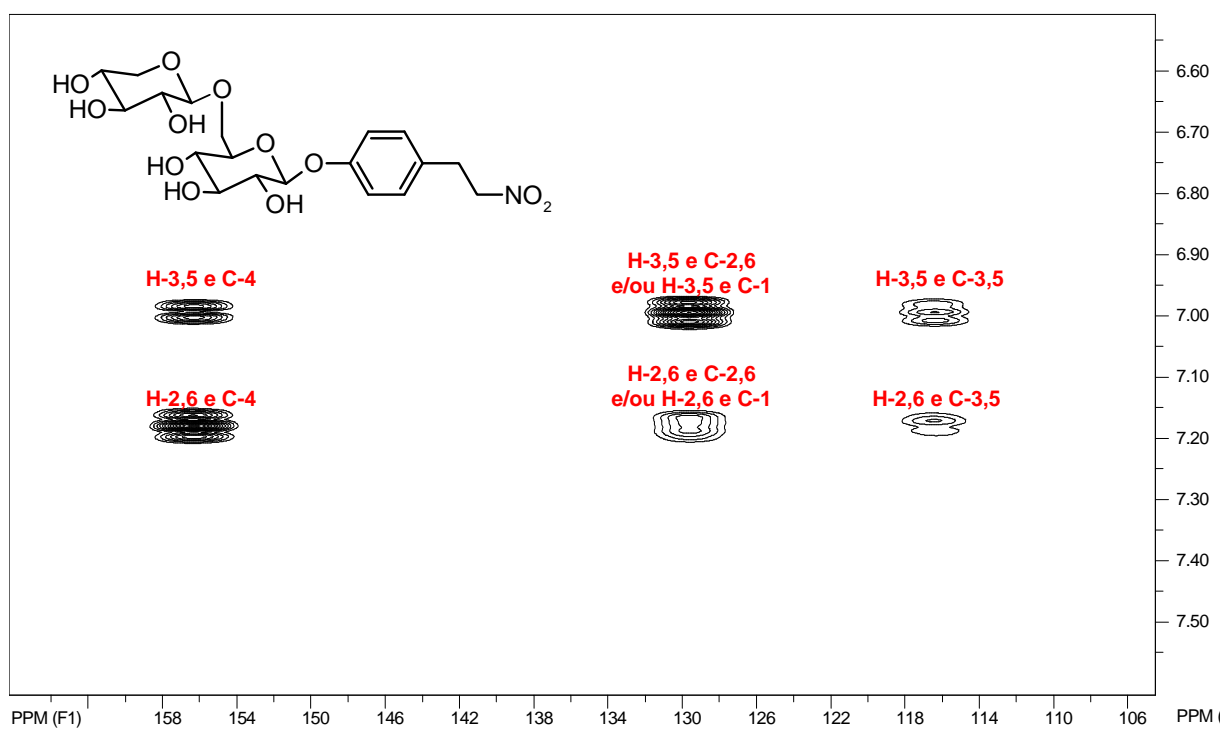


Figura 35: Expansão do mapa de contornos gHMBC de **16** (DMSO- $d_6$ , 11,7 T).

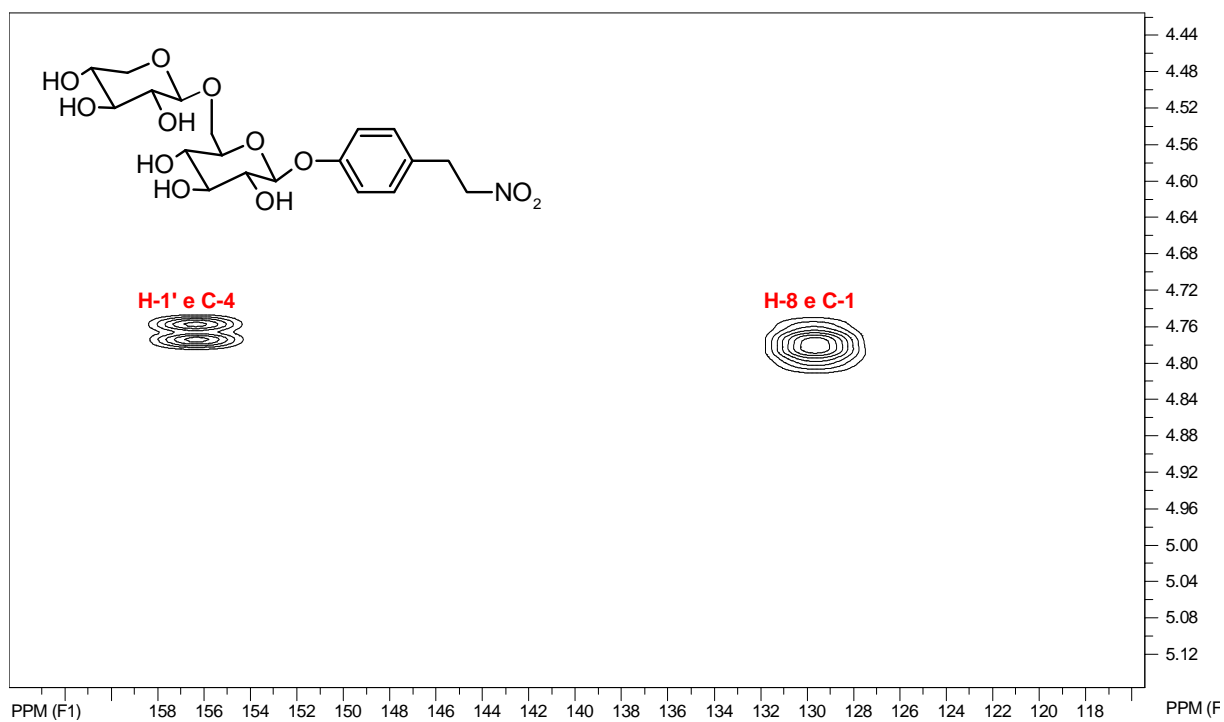


Figura 36: Expansão do mapa de contornos gHMBC de **16** (DMSO- $d_6$ , 11,7 T).

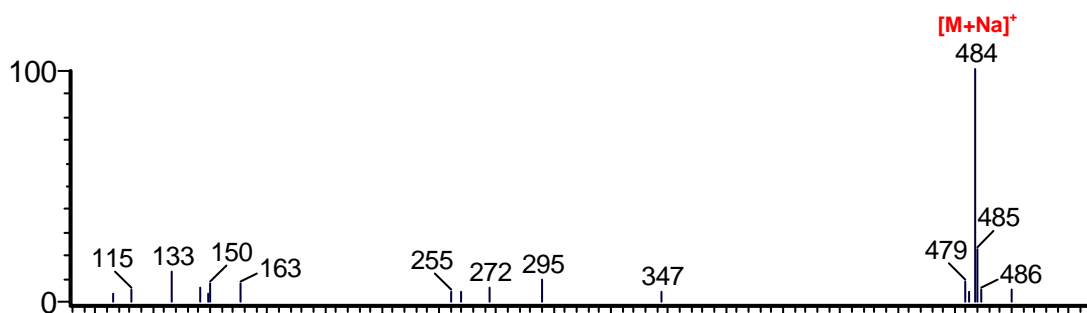
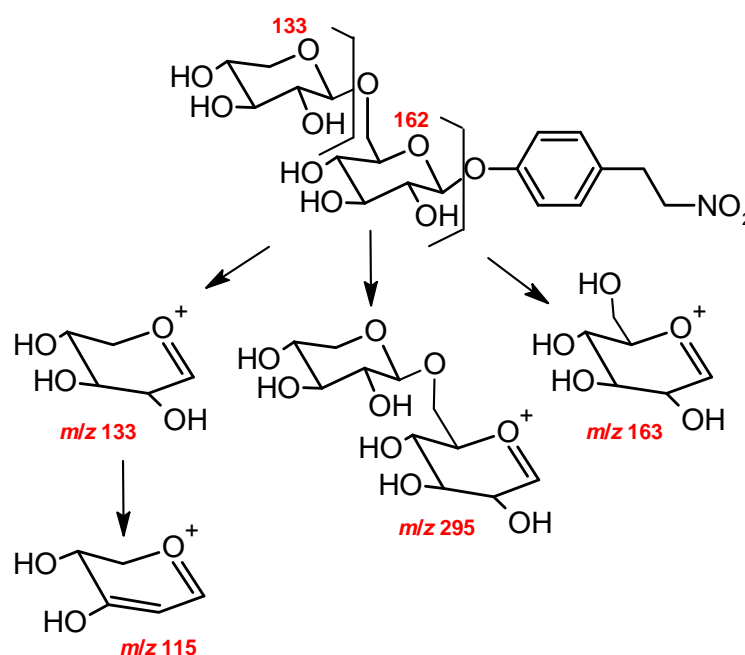
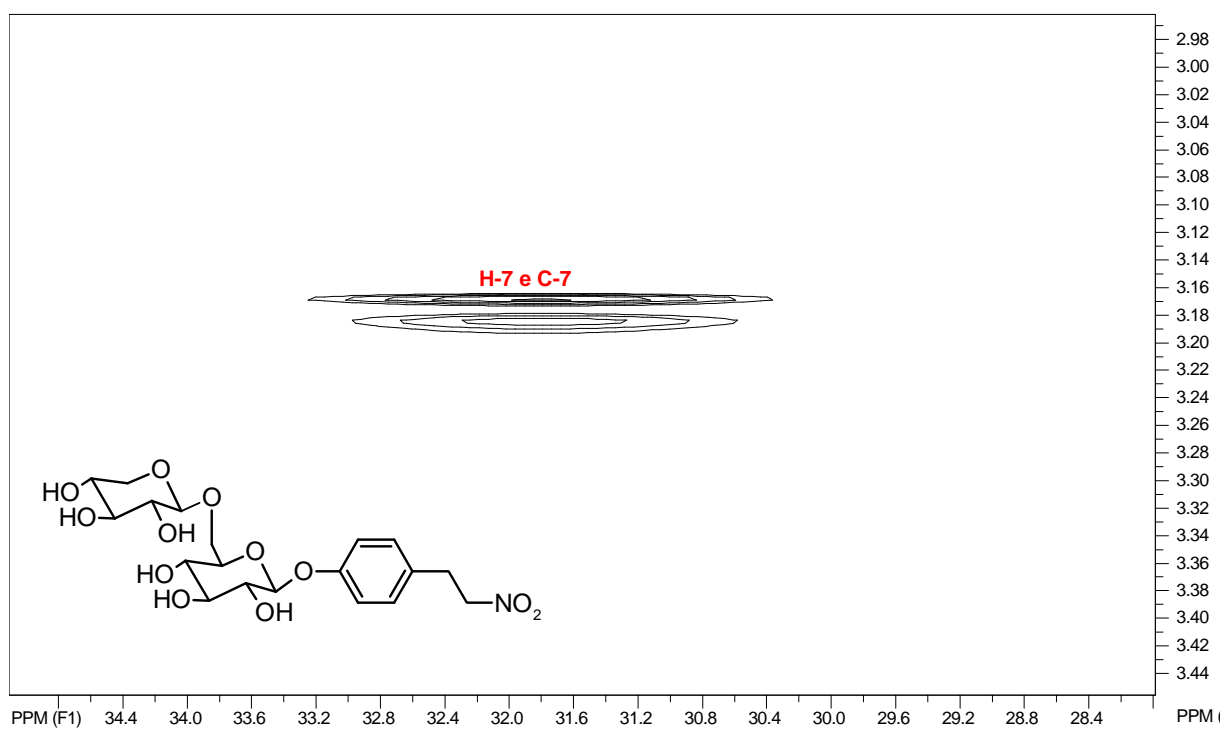
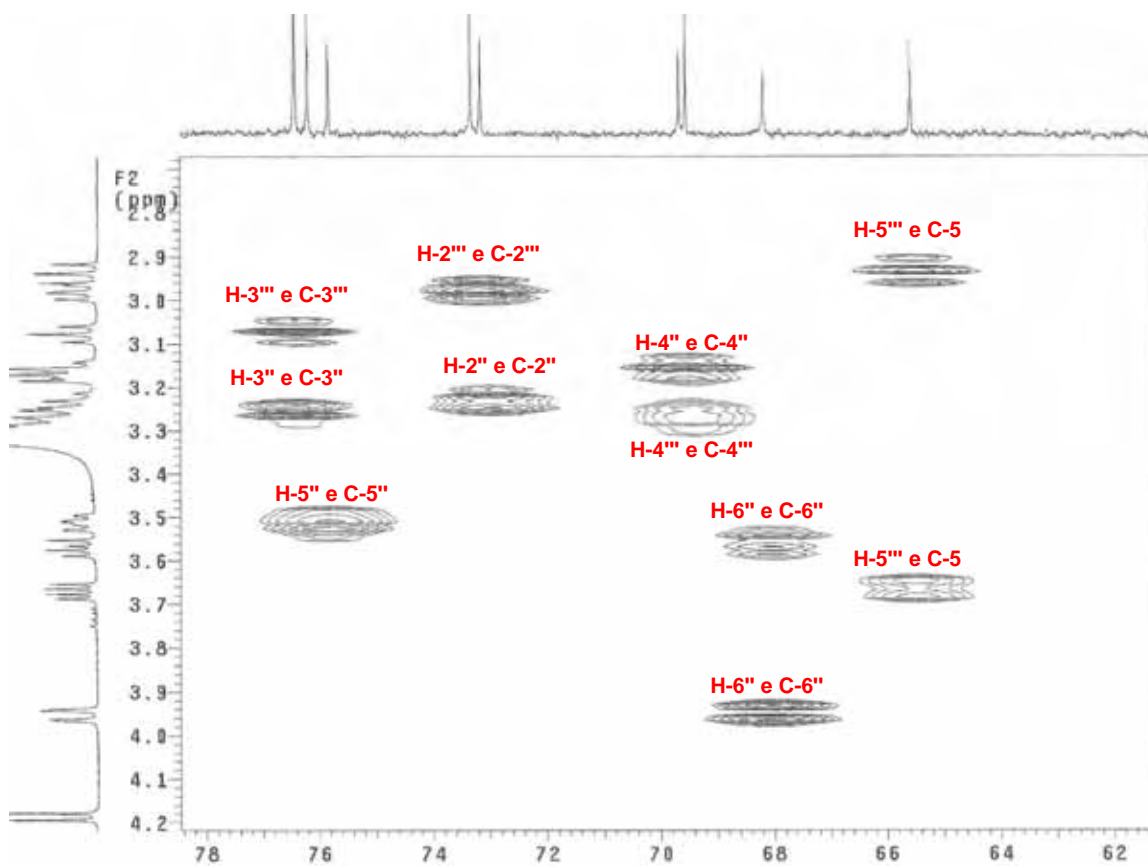


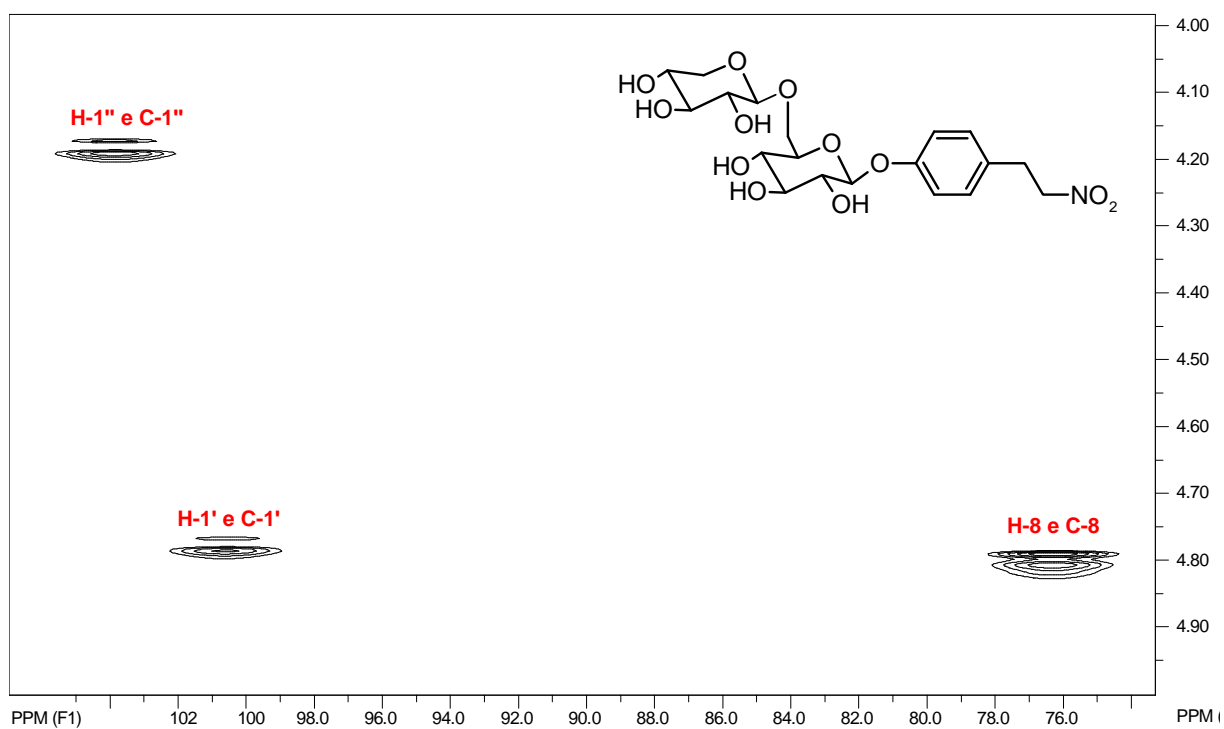
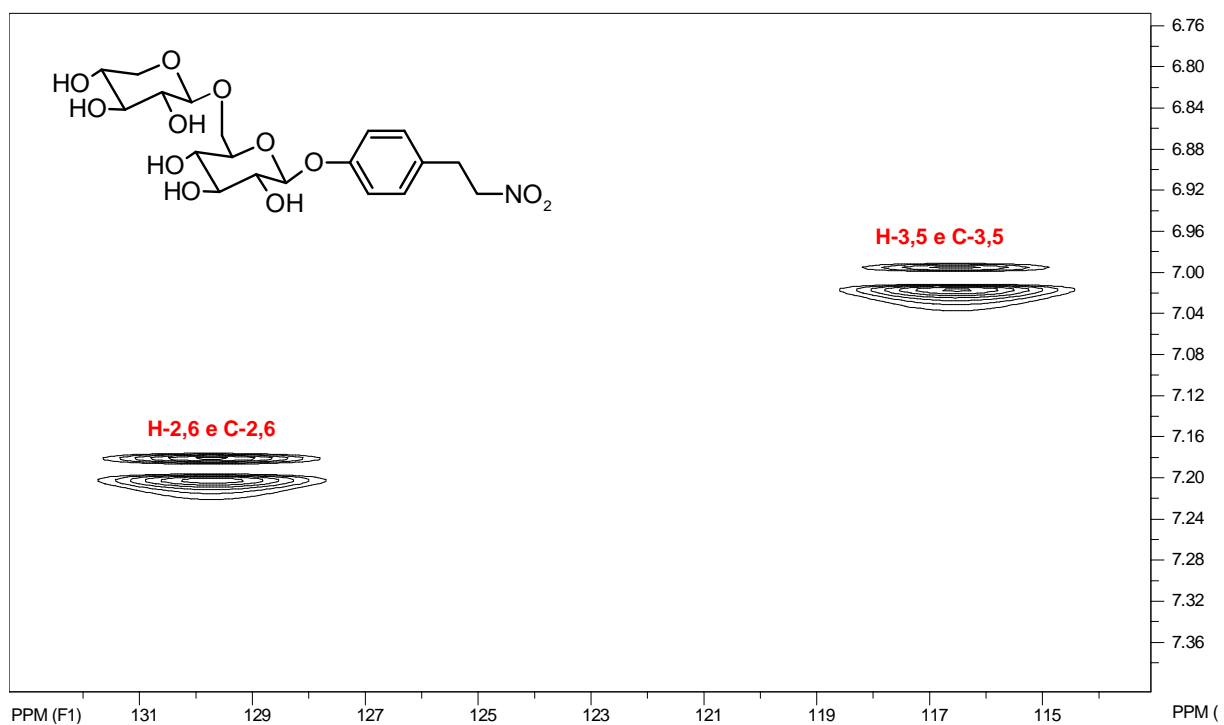
Figura 37: Espectro de massas do composto **16** (ESI, +35 eV).



Esquema 6: Proposta de fragmentação do composto **16**.

A atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foi efetuada pela análise dos dados espectroscópicos de RMN 1D e 2D (Tabela 9, p. 80), e por comparação desses dados com aqueles de modelos disponibilizados na literatura<sup>87, 88</sup>. O valor de rotação óptica específica observado para **16** foi  $[\alpha]_D^{29} -63,3^\circ$  (c. 0,13, MeOH), enquanto o ponto de fusão medido foi  $124,5-124,9^\circ$  C. A configuração absoluta do composto **16** foi estabelecida por comparação desses valores com aqueles relatados na literatura ( $[\alpha]_D^{20} -57,9^\circ$ ; ponto de fusão de  $125^\circ$  C)<sup>87, 88</sup>. Assim sendo, **16** foi caracterizado como sendo o 2-(4'-hidroxifenil)nitroetano-4'-O-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosídeo], o qual é conhecido como talictrosídeo.

Figura 38: Expansão do mapa de contornos gHMQC de **16** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 11,7 T).Figura 39: Expansão do mapa de contornos gHMQC de **16** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 11,7 T).

Figura 40: Expansão do mapa de contornos gHMQC de **16** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 11,7 T).Figura 41: Expansão do mapa de contornos gHMQC de **16** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 11,7 T).



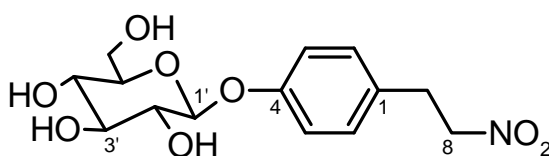
Conforme mostrada na tabela 2, o composto **16** já havia sido descrito em cinco espécies pertencentes às famílias Annonaceae, Menispermaceae e Ranunculaceae. Embora haja relatos desta classe de compostos na família Aristolochiaceae, este metabólito secundário (especial) está sendo descrito pela primeira vez nesta família de plantas floríferas.

Tabela 9: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **16** (11,7 T, DMSO- $d_6$ ,  $J$  em Hz).

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	–	129,6
2	7,18 ( <i>d</i> ; 8,8)	129,6
3	7,00 ( <i>d</i> ; 8,8)	116,4
4	–	156,3
5	7,00 ( <i>d</i> ; 8,8)	116,4
6	7,18 ( <i>d</i> ; 8,8)	129,6
7	3,17 ( <i>t</i> ; 7,0)	31,7
8	4,79 ( <i>t</i> ; 7,0)	76,2
1'	4,78 ( <i>d</i> ; 7,5)	100,5
2'	3,23 ( <i>m</i> )	73,2
3'	3,25 ( <i>m</i> )	76,4
4'	3,16 ( <i>dd</i> ; $W_{1/2}$ 9,5 e 8,5)	69,6*
5'	3,51 ( <i>ddd</i> ; $W_{1/2}$ 9,5, 6,5 e 1,4)	75,8
6	3,95 ( <i>dd</i> ; 11,4 e 1,4)	68,1
	3,57 ( <i>dd</i> ; $W_{1/2}$ 11,4 e 6,5)	
1''	4,18 ( <i>d</i> ; 7,7)	103,8
2''	2,98 ( <i>dd</i> ; $W_{1/2}$ 8,8 e 7,7)	73,3
3''	3,08 ( <i>t</i> ; $W_{1/2}$ 8,8)	76,4
4''	3,27 ( <i>m</i> )	69,5*
5''	2,94 ( <i>dd</i> ; 11,3 e 10,3)	65,6
	3,67 ( <i>dd</i> ; 11,3 e 5,3)	

\* Sinais que podem estar trocados

#### 4.3.4 Derivado $\text{C}_6\text{-C}_2\text{-NO}_2$ glicosidado, talictosídeo (**14**)



O composto **14** (3,5 mg; contaminado com **16**) foi obtido após fracionamentos por solubilização e cromatográfico (CC de fase reversa C-18) da fração A-08, conforme descrito no item 3.2.6 (p. 43).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **14** (Figura 42, p. 82) apresentou um aspecto geral semelhante ao de **16**, destacando-se os sinais em  $\delta$  3,16, 4,80, 7,00 e 7,16 atribuídos aos hidrogênios da unidade fenilética *p*-substituída idêntica a de **16**. Neste espectro, foram também observados um dubleto de hidrogênio anomérico em  $\delta$  4,80 e vários sinais entre  $\delta$  2,9-4,0, característicos de glicosídeos.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 43, p. 82) foram observados doze sinais, dos quais seis foram atribuídos à unidade glicosídica e seis ao fragmento fenilético. Os valores dos  $\delta$  observados para os carbonos da unidade glicosídica em  $\delta$  100,4, 73,2, 76,6, 69,7, 77,0 e 60,7 foram compatíveis com os de uma  $\beta$ -glucosila<sup>89, 90</sup>.

Assim, por comparação desses dados com aqueles descritos na literatura, o composto **14** foi identificado como sendo o derivado nitrofenilético talictosídeo<sup>90</sup>. A configuração absoluta deste composto foi estabelecida pela comparação do valor de  $[\alpha]_D$  ( $[\alpha]_D^{33} -44,1^\circ$ ; c. 0,07, MeOH) obtido com aquele da literatura<sup>91</sup> ( $[\alpha]_D^{25} -48,8^\circ$ ; c. 1,1, MeOH). Este composto já havia sido descrito em espécies pertencentes às Magnolídeas, incluindo *A. gehrtii* (Aristolochiaceae), bem como em espécies dentro das ordens Ranunculales, Alismatales e Austrobaileyales (Tabela 2, p. 30-32). Contudo, está sendo relatado pela primeira vez em *A. melastoma*.

Tabela 10: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **14** (11,7 T, DMSO- $d_6$ , J em Hz).

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	-	129,6
2	7,18 (d; 8,5)	129,5
3	6,96 (d; 8,5)	116,2
4	-	156,4
5	6,96 (d; 8,5)	116,2
6	7,18 (d; 8,5)	129,5
7	3,16 (t; 7,0)	31,6
8	4,80 (t; 7,0)	76,3
1'	4,80 (d; 7,5)	100,4
2'	-	73,2
3'	-	76,6
4'	-	69,7
5'	-	77,0
6'	-	60,7

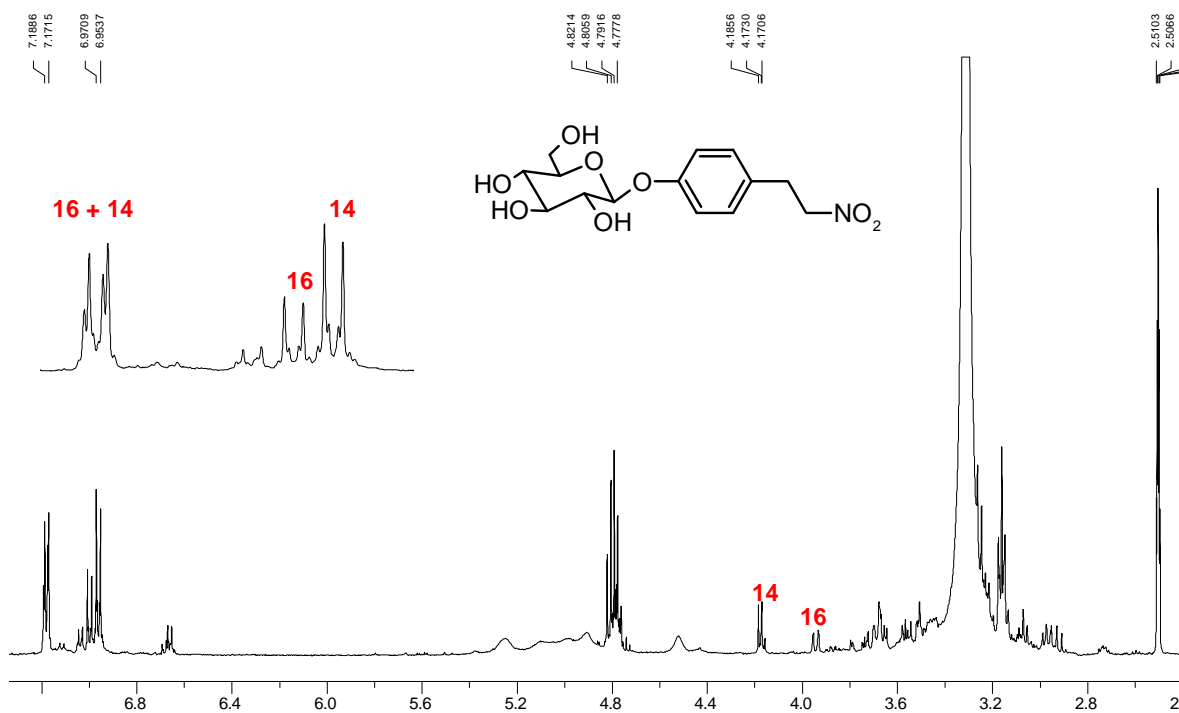


Figura 42: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **14** em mistura com **16** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz; os principais sinais de **16** estão destacados no espectro).

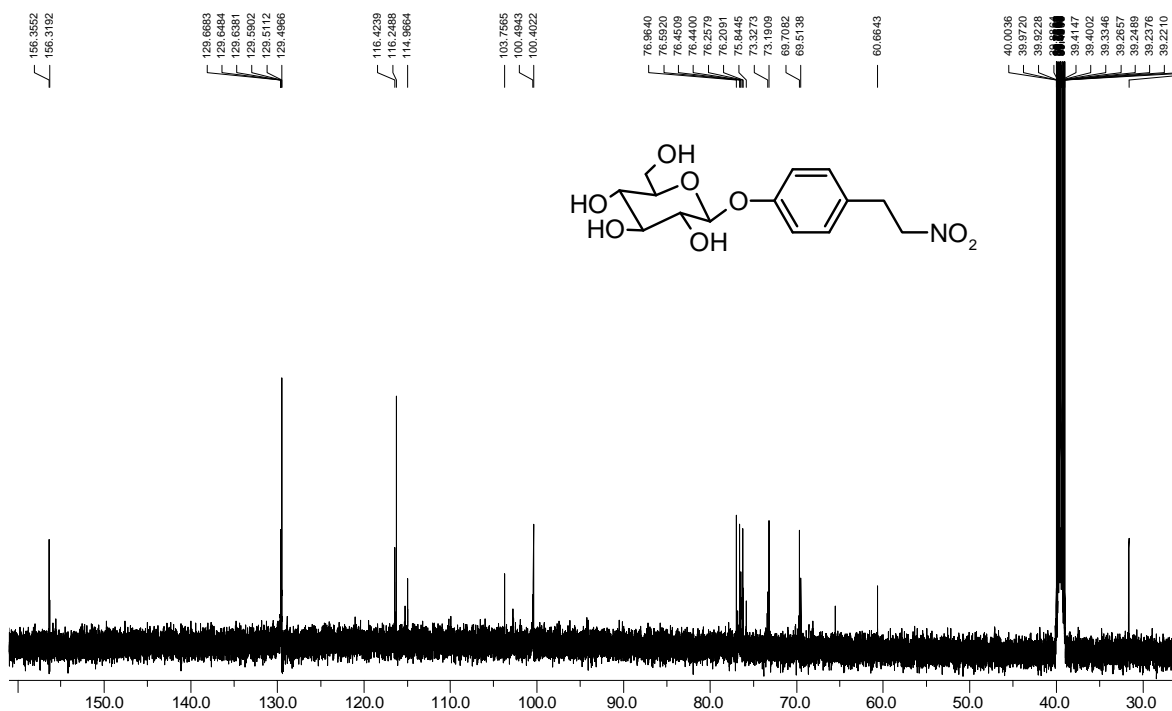
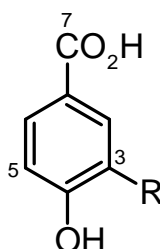


Figura 43: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **14** em mistura com **16** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 126 MHz).

#### 4.4 Derivados C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>

##### 4.4.1 Ácidos *p*-hidroxibenzóico (4) e vanilínico (5)



R

4 H

5 OMe

Os compostos **4** e **5** foram obtidos após fracionamento por permeação em gel [AcOEt-PrOH (1:1)] da fração A-06, conforme descrito no item 3.2.4 (p. 42).

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 44, p. 84), em DMSO-*d*<sub>6</sub>, foram observados sinais em δ 7,77 e 6,81, além de um singlete em δ 7,42, enquanto no espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 45, p. 84), em CDCl<sub>3</sub>, foram observados quatro dubletos [δ 7,94 (*J* = 9,0 Hz), 7,52 (*J* = 2,0 Hz), 6,90 (*J* = 8,0 Hz) e 6,82 (*J* = 9,0 Hz)] e um duplo dubleto [δ 7,64 (*J* = 8,0 e 2,0 Hz)], evidenciando a presença de dois anéis aromáticos, sendo um trissubstituído e outro *p*-substituído.

No espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 46, p. 85) foram observados treze sinais, os quais foram atribuídos a cinco carbonos metínicos (incluindo dois com intensidades duplicadas), três quaternários oxigenados, dois quaternários, um metoxílico e dois carboxílicos.

Estes dados, a não observação de correlação a longa distância [no mapa de contorno *g*HMBC (Figuras 47-49, p. 85-86)] que conectasse os dois anéis aromáticos e a integração dos sinais de RMN de <sup>1</sup>H sugeriram que a subfração A-06-27 era uma mistura de dois compostos em proporção molar ~1:1.

As estruturas dos compostos **4** e **5** foram determinadas a partir da análise dos dados espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C uni- e bidimensionais (Tabela 11-12, p. 88), e por comparação desses dados com aqueles descritos na literatura para os ácidos *p*-hidroxibenzóico<sup>92</sup> e vanilínico<sup>93</sup>.

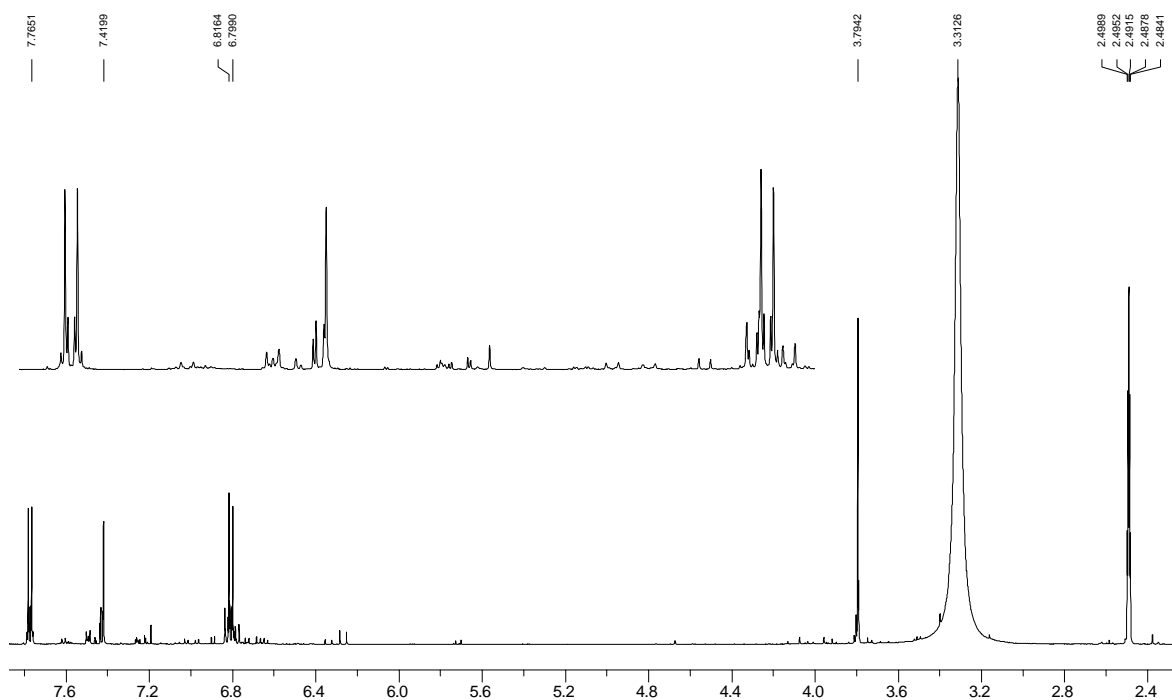


Figura 44: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura de **4** e **5** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz).

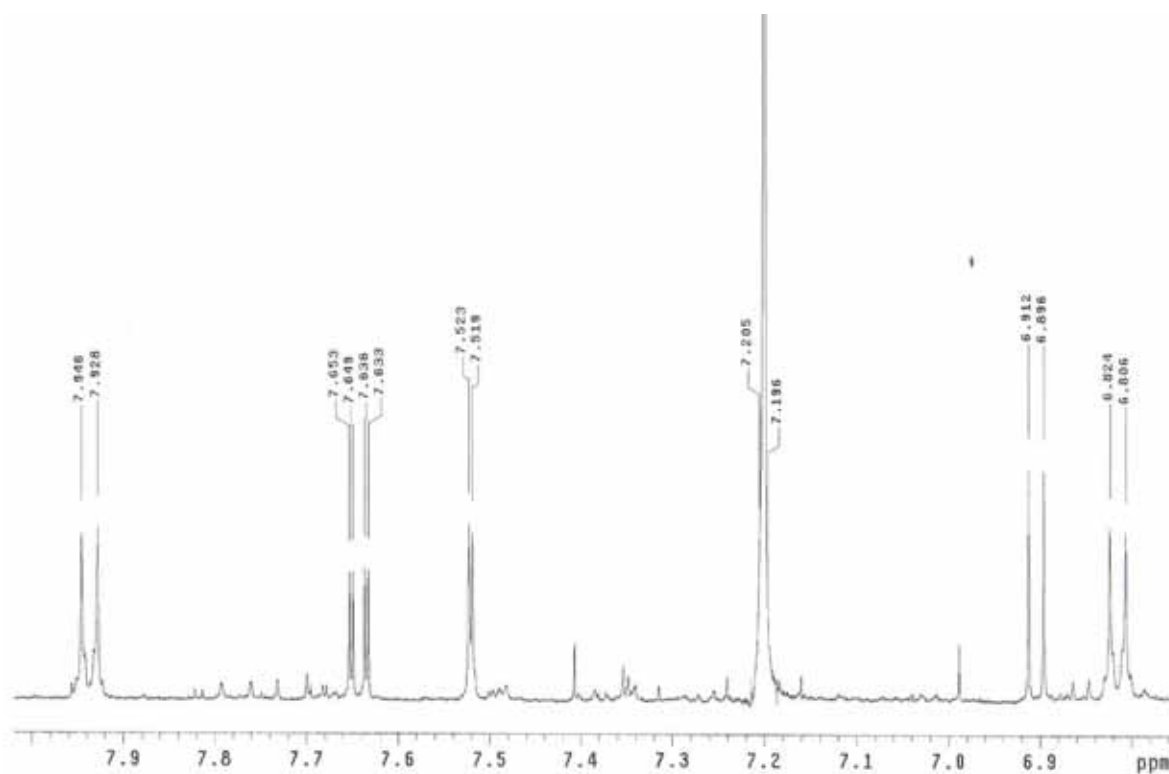


Figura 45: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura de **4** e **5** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

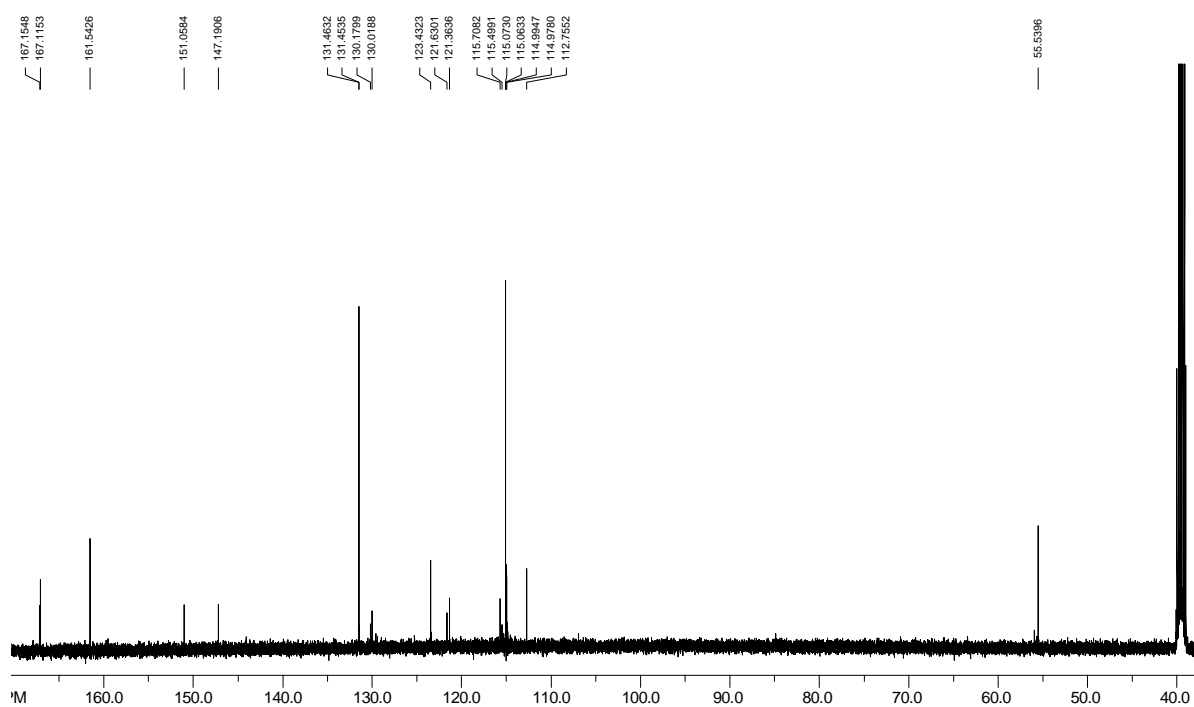


Figura 46: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da mistura de **4** e **5** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 126 MHz).

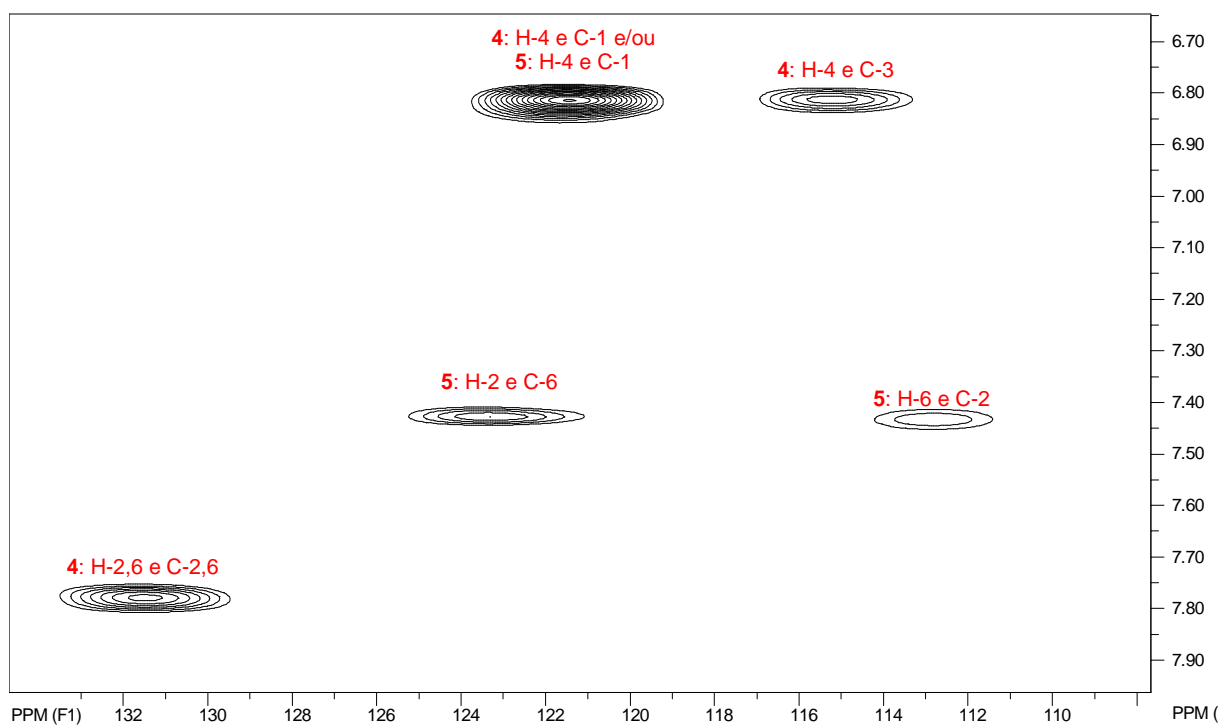


Figura 47: Expansão do mapa de contornos gHMBC da mistura de **4** e **5** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 11,7 T).

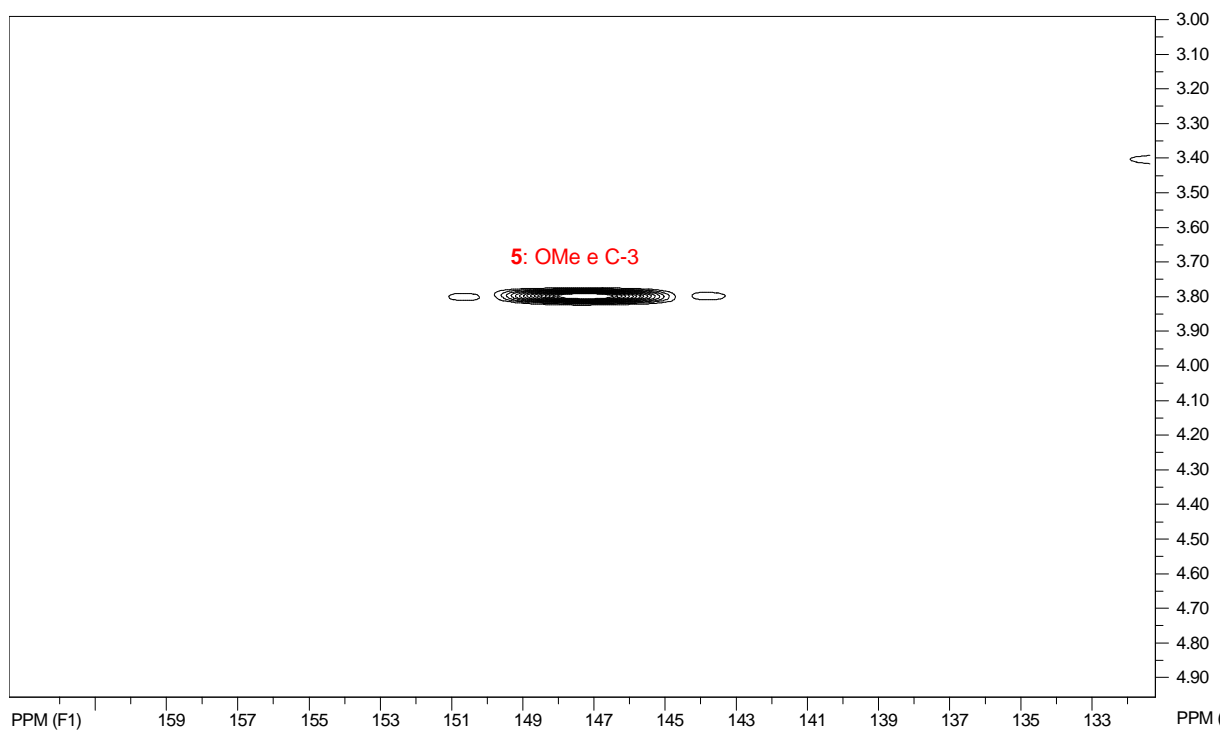


Figura 48: Expansão do mapa de contornos gHMBC da mistura de **4** e **5** (DMSO- $d_6$ , 11,7 T).

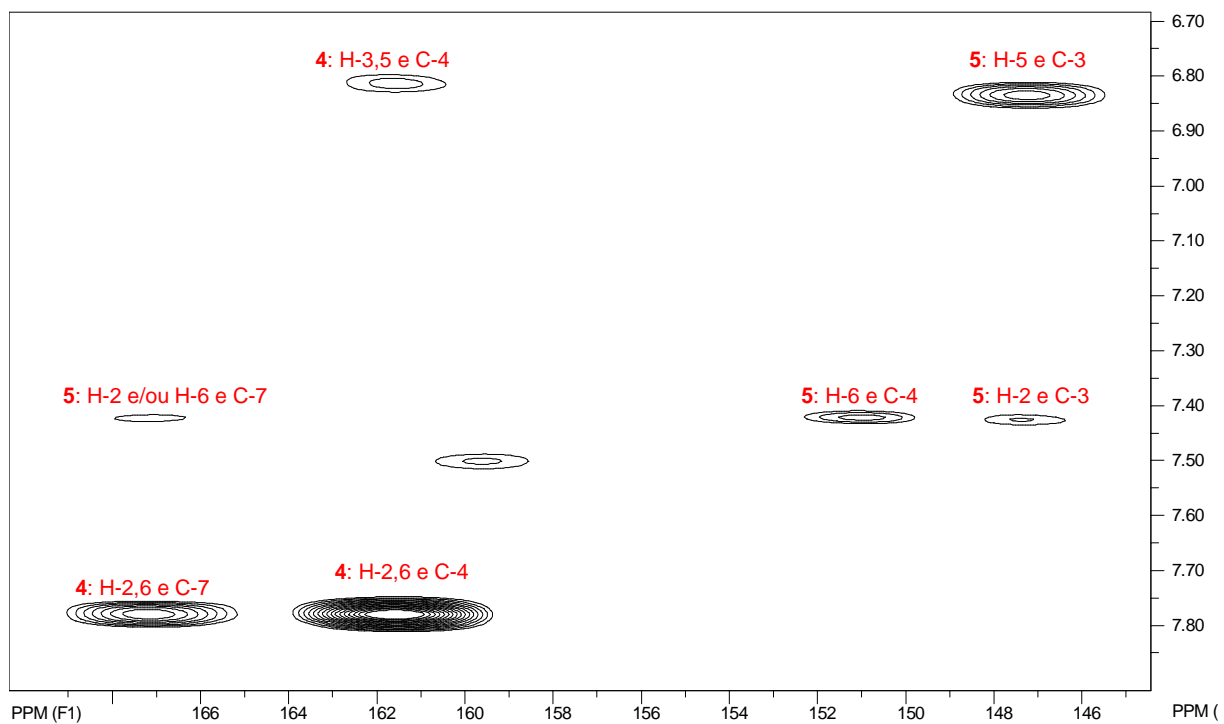


Figura 49: Expansão do mapa de contornos gHMBC da mistura de **4** e **5** (DMSO- $d_6$ , 11,7 T).

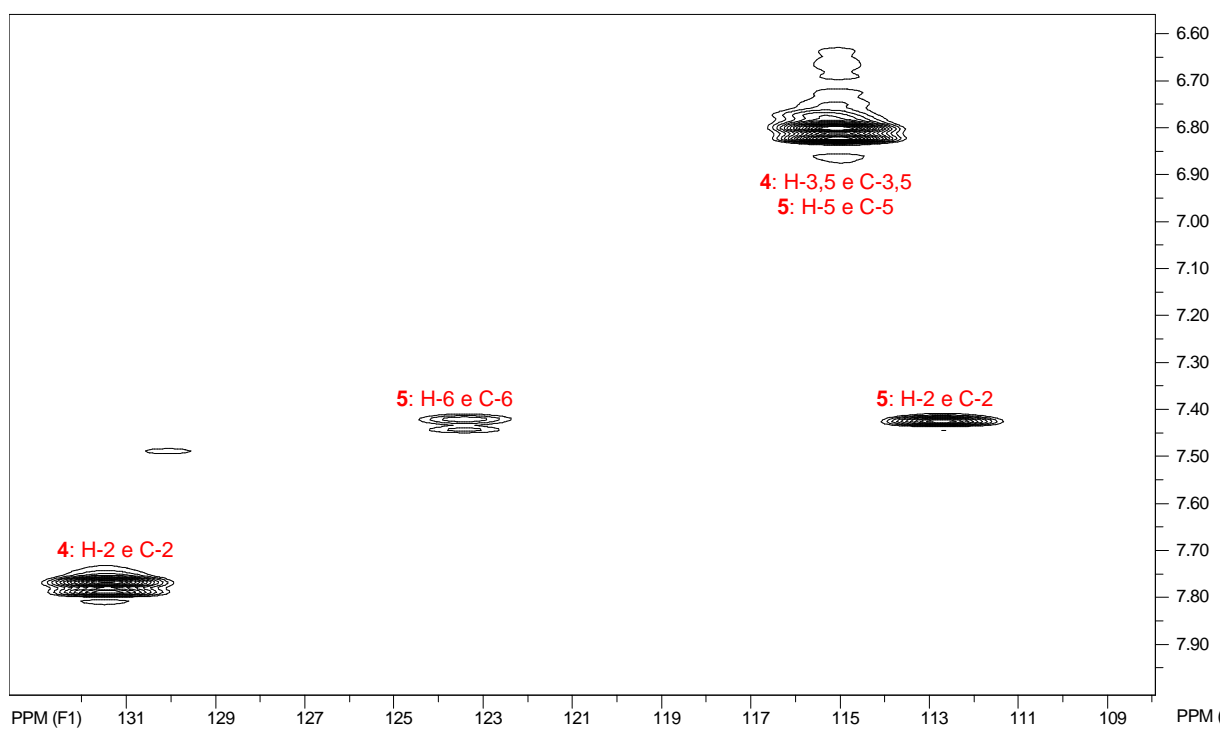


Figura 50: Expansão do mapa de contornos gHMQC da mistura de **4** e **5** (DMSO- $d_6$ , 11,7 T).

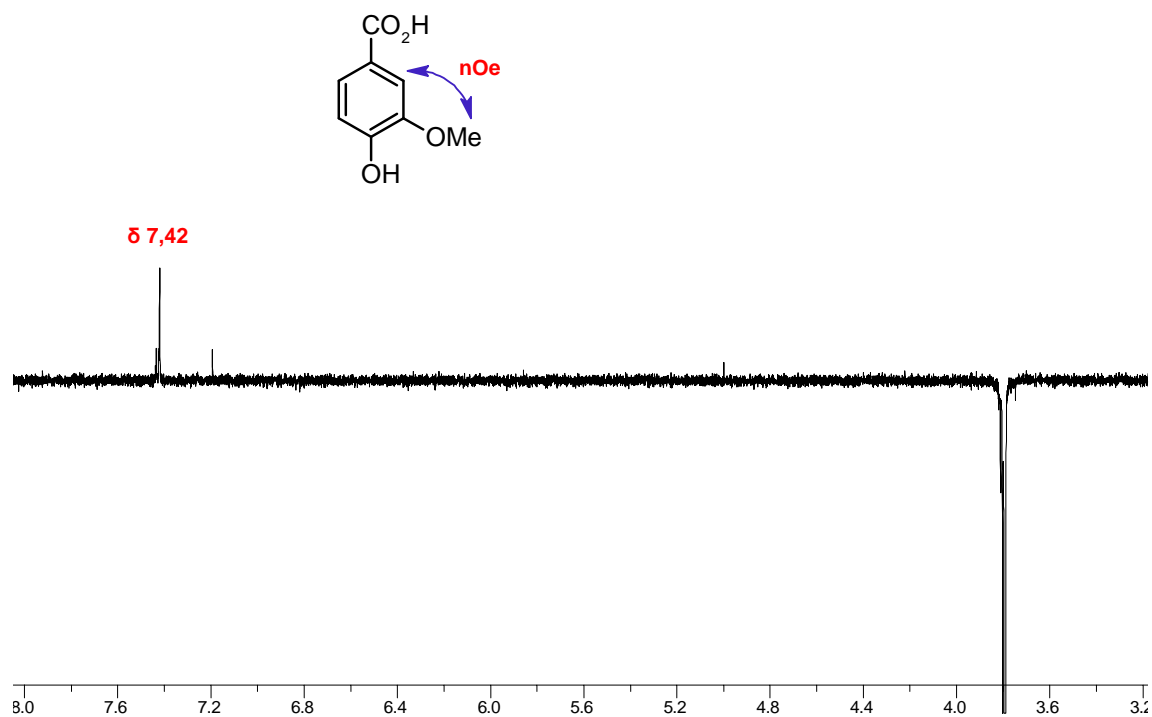


Figura 51: Espectro de gNOESY 1D da mistura de **4** e **5** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).



Tabela 11: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **4** (11,7 T, \*DMSO- $d_6$  e \*\*CDCl $_3$ , J em Hz).

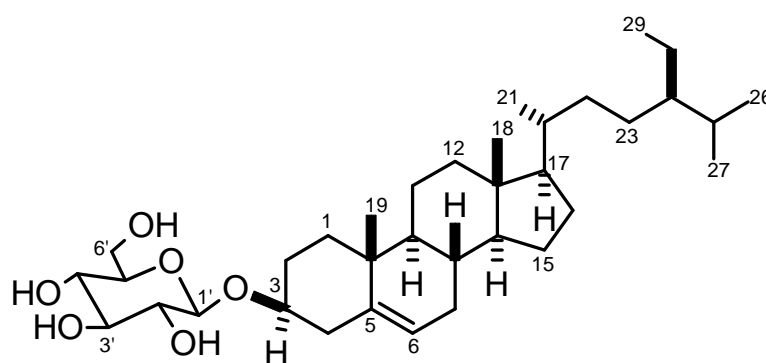
Posição	$\delta$ $^1\text{H}^*$ (Exp)	$\delta$ $^{13}\text{C}^*$ (Exp)	$\delta$ $^{13}\text{C}^*$ (Lit)	$\delta$ $^1\text{H}^{**}$ (Exp)	$\delta$ $^1\text{H}^{**}$ (Lit)
1	–	121,4	121,25	–	–
2	7,77 (d; 8,5)	131,4	131,42	7,94 (d; 9,0)	7,88 (d; 9,0)
3	6,81 (d; 8,5)	115,0	114,99	6,81 (d; 9,0)	6,83 (d; 9,0)
4	–	161,5	161,45	–	–
5	6,81 (d; 8,5)	115,0	114,99	6,81 (d; 9,0)	6,83 (d; 9,0)
6	7,77 (d; 8,5)	131,4	131,42	7,94 (d; 9,0)	7,88 (d; 9,0)
7	–	167,1	–	–	–

Tabela 12: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **5** (11,7 T, \*DMSO- $d_6$  e \*\*CDCl $_3$ , J em Hz).

Posição	$\delta$ $^1\text{H}^*$ (Exp)	$\delta$ $^1\text{H}^*$ (Lit)	$\delta$ $^{13}\text{C}^*$ (Exp)	$\delta$ $^{13}\text{C}^*$ (Lit)	$\delta$ $^1\text{H}^{**}$ (Exp)	$\delta$ $^1\text{H}^{**}$ (Lit)
1	–	–	121,6	121,64	–	–
2	7,42 (s)	7,44	112,7	112,72	7,52 (d; 2,0)	7,57 (d; 1,6)
3	–	–	147,2	147,24	–	–
4	–	–	151,1	151,12	–	–
5	6,83 (d; 7,5)	6,82	115,0	115,05	6,90 (d; 8,0)	6,95 (d; 8,5)
6	7,43 (dd; 7,5 e 2,0)	7,44	123,4	123,51	7,64 (dd; 8,0 e 2,0)	7,72 (dd; 8,5 e 1,6)
7	–	–	167,1	167,26	–	–
OMe	3,80 (s)	3,92	55,5	55,55	3,90 (s)	3,90 (s)

## 4.5 Esteróide glicosilado

### 4.5.1 Sitosterol 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (12)



A fração A-08 forneceu um sólido branco amorfo (**12**; 2,0 mg; item 3.2.6, p. 43) pouco solúvel em  $\text{CHCl}_3$ , mas solúvel em piridina.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **12** (Figura 52, p. 89) mostrou um conjunto de sinais na região de  $\delta$  0,63 a 2,00, além de sinais atribuíveis a hidrogênio olefínico em  $\delta$  5,31 e a hidrogênio carbinólico em  $\delta$  3,44. Foram ainda observados sinais sugestivos de unidade glicosídica, representados por um dubleto de hidrogênio anomérico em  $\delta$  4,20 e vários sinais na região de  $\delta$  2,88 a 4,84.

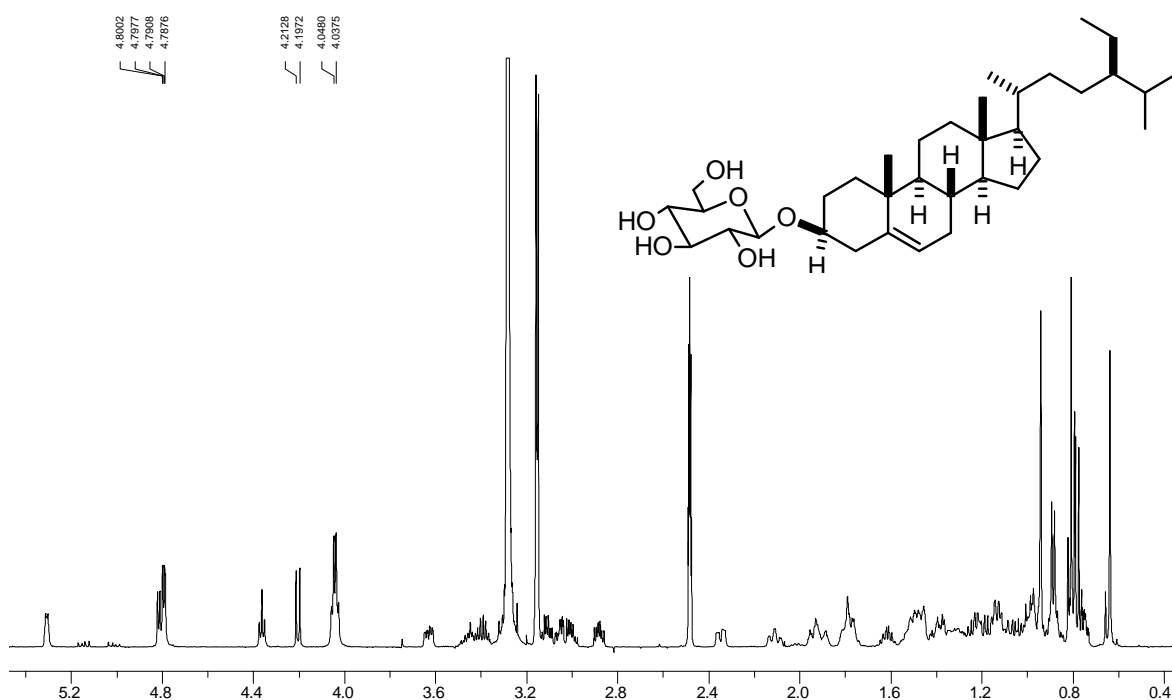


Figura 52: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **12** ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 53, p. 90), juntamente com o espectro DEPT 135 $^\circ$ , mostrou sinais de 35 carbonos, dos quais vinte e nove foram atribuídos à aglicona e seis à unidade glicosídica. Os valores dos deslocamentos químicos relativos aos carbonos da unidade glicosídica em  $\delta$  100,74, 73,43, 76,69, 70,10, 76,73 e 61,08 foram compatíveis com os de uma  $\beta$ -glucosila<sup>89, 94</sup>.

A comparação dos  $\delta$  dos carbonos e hidrogênios de **12** com os descritos na literatura para o sitosterol 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo permitiu a identificação deste composto<sup>94</sup>. Além disso, co-eluição (em diferentes sistemas de solvente) em CCDC com amostra autêntica de sitosterol glicosilado disponível no laboratório evidenciou a identidade deste composto.

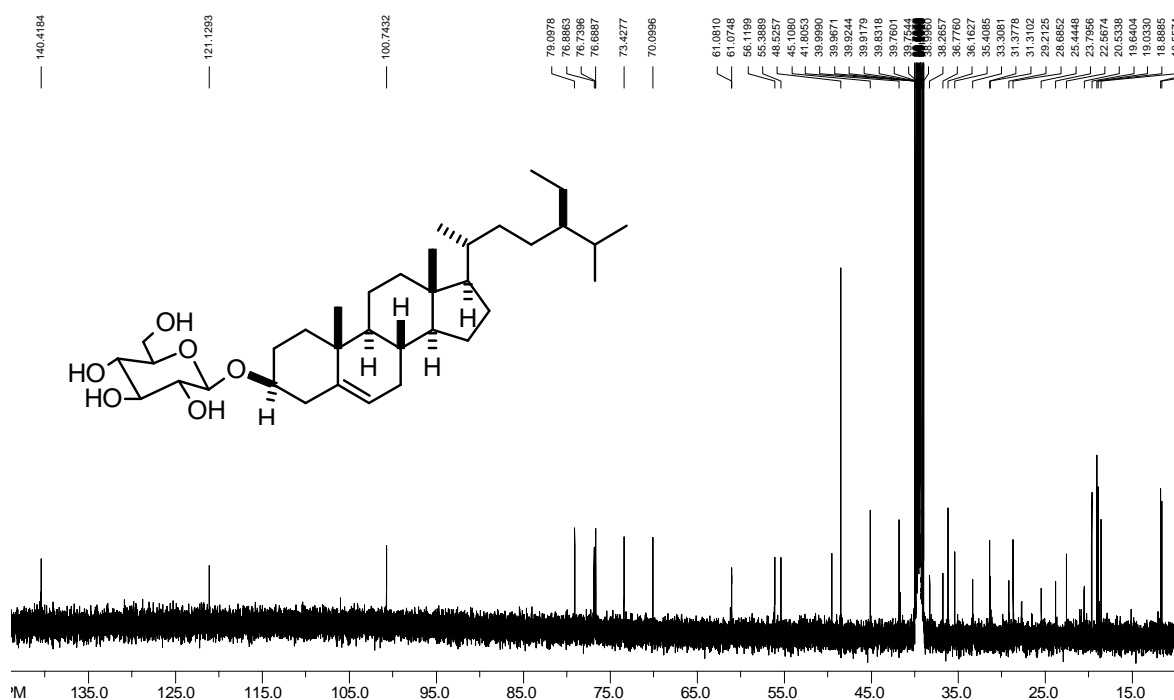


Figura 53: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **12** (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).

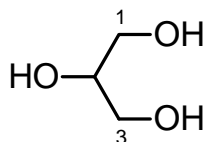
A configuração absoluta de **12** foi determinada pela comparação do seu valor de  $[\alpha]_D^{25} -43,1^\circ$  (c. 0,1, Piridina) com aquele descrito na literatura  $[[\alpha]_D^{26} -41,7^\circ$  (c. 0,2, Piridina) <sup>95</sup>].

Tabela 13: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **12** (11,7 T, DMSO- $d_6$ ,  $J$  em Hz).

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	Posição	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	-	36,78	19	0,94 (s)	19,04
2	-	29,22	20	-	35,41
3	3,44 (m)	76,89	21	0,89 (d, 6,5)	18,89
4	2,11 (m) e 2,35 (m)	38,27	22	-	33,31
5	-	140,42	23	-	25,44
6	5,31 (m)	121,13	24	-	45,11
7	-	31,31	25	-	28,69
8	-	31,38	26	0,78 (d, 6,5)	18,55
9	-	49,56	27	-	19,64
10	-	36,17	28	-	22,57
11	-	20,54	29	-	11,73
12	-	39,17	1'	4,20 (d, 8,0)	100,74
13	-	41,81	2'	2,88 (dt, 8,0 e 4,5)	73,43
14	-	56,12	3'	3,11 (m)	76,69
15	-	23,80	4'	3,01 (m)	70,10
16	-	27,71	5'	3,05 (m)	76,73
17	-	55,39	6	3,63 (ddd, 11,8, 5,5 e 1,5)	61,08
18	0,64 (s)	11,62		3,40 (m)	

## 4.6 Poliól

### 4.6.1 Glicerol (13)



O composto **13** (27,4 mg) foi obtido após CC (C-18) da fração A-08, conforme descrito no item 3.2.6 (p. 43).

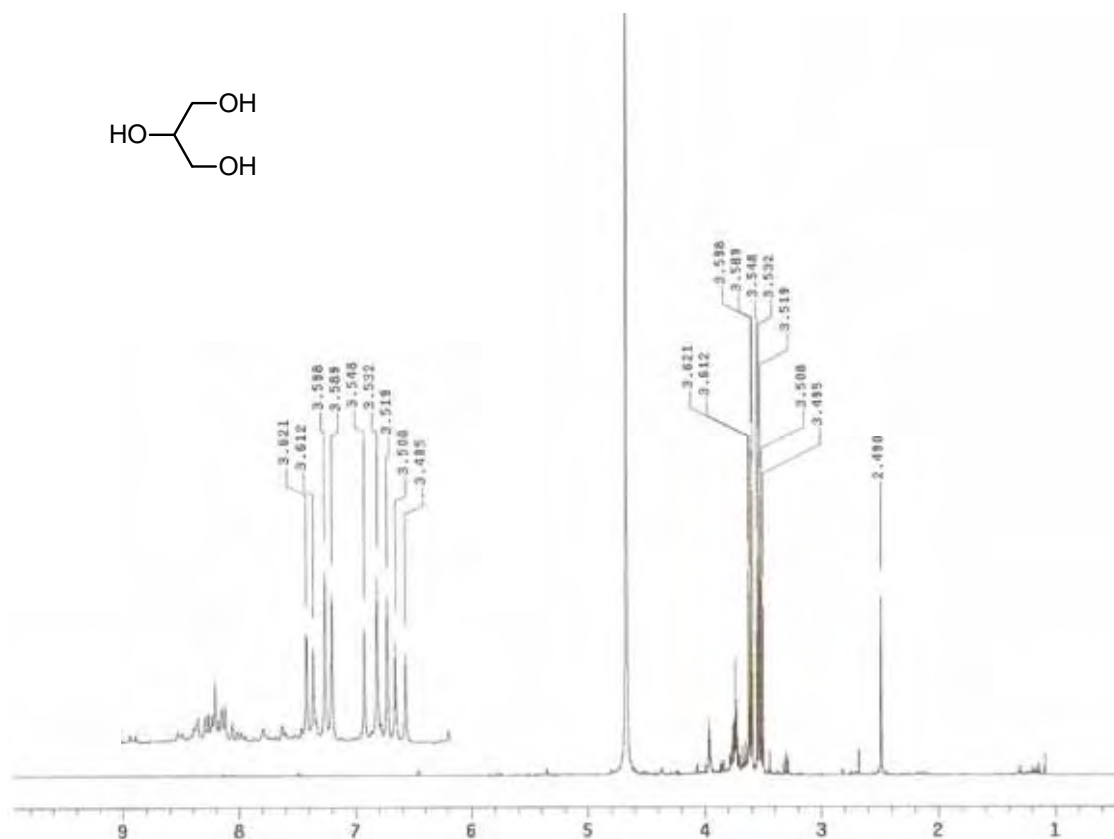
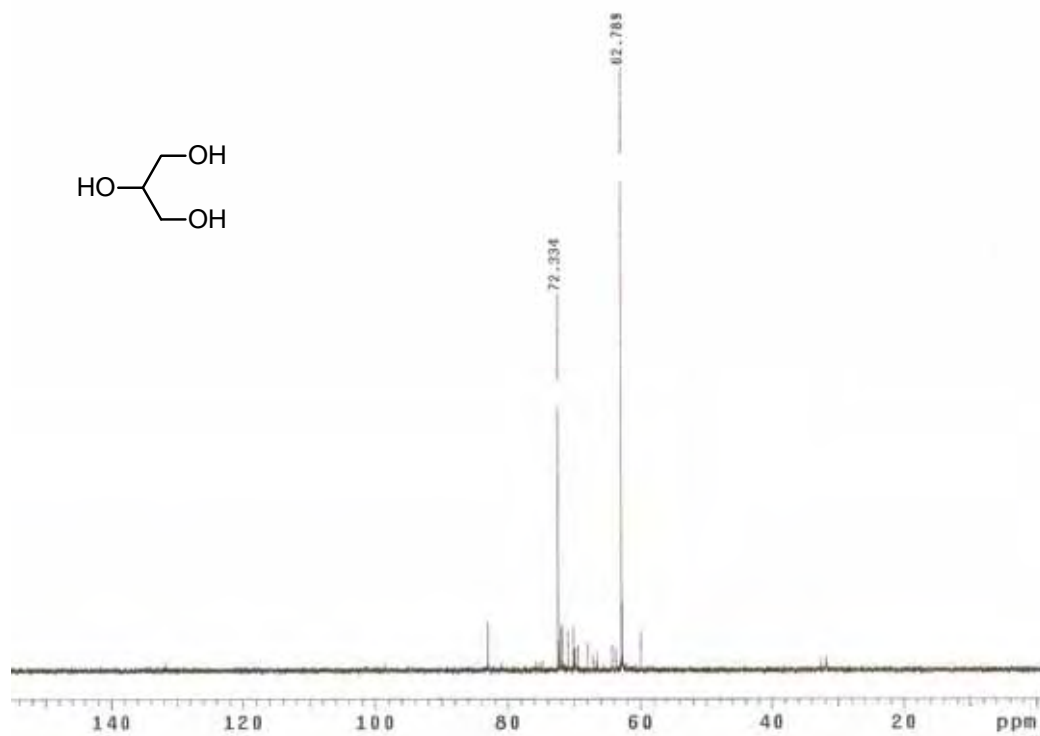
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 54, p. 92) de **13** foram observados dois duplos dubletos em  $\delta$  3,50 e 3,59 e um multipletto em  $\delta$  3,73, enquanto no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 55, p. 92) foram observados dois sinais ( $\delta$  72,3 e 62,8), dos quais um deles apresentou intensidade duplicada. Esses dados foram compatíveis com os relatado na literatura para o glicerol <sup>96</sup>.

A equivalência magnética observada para os C-1 e C-3 é reflexo da existência de plano de simetria passando por C-2 (carbono proquiral) <sup>96</sup>. Em contrapartida, o acoplamento geminal observado para os hidrogênios metilênicos (em C-1 e C-3) é decorrente de restrição nas rotações livre em torno das ligações carbono-carbono, e, portanto, de uma preferência conformacional <sup>96</sup>.

Em Aristolochiaceae, o glicerol (**12**) foi detectado somente em *A. lagesiana* <sup>97</sup>. Este composto foi descoberto em 1779, e desde então sua aplicação comercial cresceu significativamente. Atualmente, ele é um dos “ingredientes” essenciais, por exemplo, do biodiesel, das indústrias de fabricação de resinas sintéticas, gomas de éster, remédios, cosméticos e pastas de dentes <sup>98</sup>.

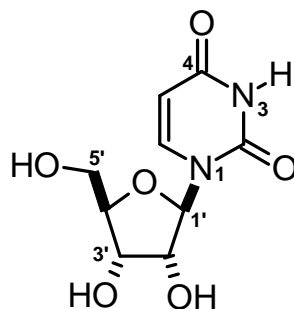
Tabela 14: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **13** (11,7 T,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ,  $J$  em Hz).

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	3,51 ( <i>dd</i> ; 11,7 e 6,5) 3,60 ( <i>dd</i> ; 11,7 e 4,5)	62,8
2	3,74 ( <i>m</i> )	72,3
3	3,51 ( <i>dd</i> ; 11,7 e 6,5) 3,60 ( <i>dd</i> ; 11,7 e 4,5)	62,8

Figura 54: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **13** ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz).Figura 55: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **13** ( $\text{D}_2\text{O}$ , 126 MHz).

## 4.7 Nucleosídeos

### 4.7.1 Nucleosídeo uridina (15)



O composto **15** (6,8 mg) foi obtido após fracionamento cromatográfico (CC de fase reversa C-18, eluída com misturas de MeOH-H<sub>2</sub>O, em gradiente de polaridade decrescente) da fração A-08, conforme descrito no item 3.2.6 (p. 43).

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 56, p. 93) de **15** foram observados um duplete em  $\delta$  7,83, dois dupletos em  $\delta$  5,86, um tripleto em  $\delta$  4,20, um tripleto largo em  $\delta$  4,32, dois duplos dupletos em  $\delta$  3,86 e 3,77 e um multiplete em  $\delta$  4,11.

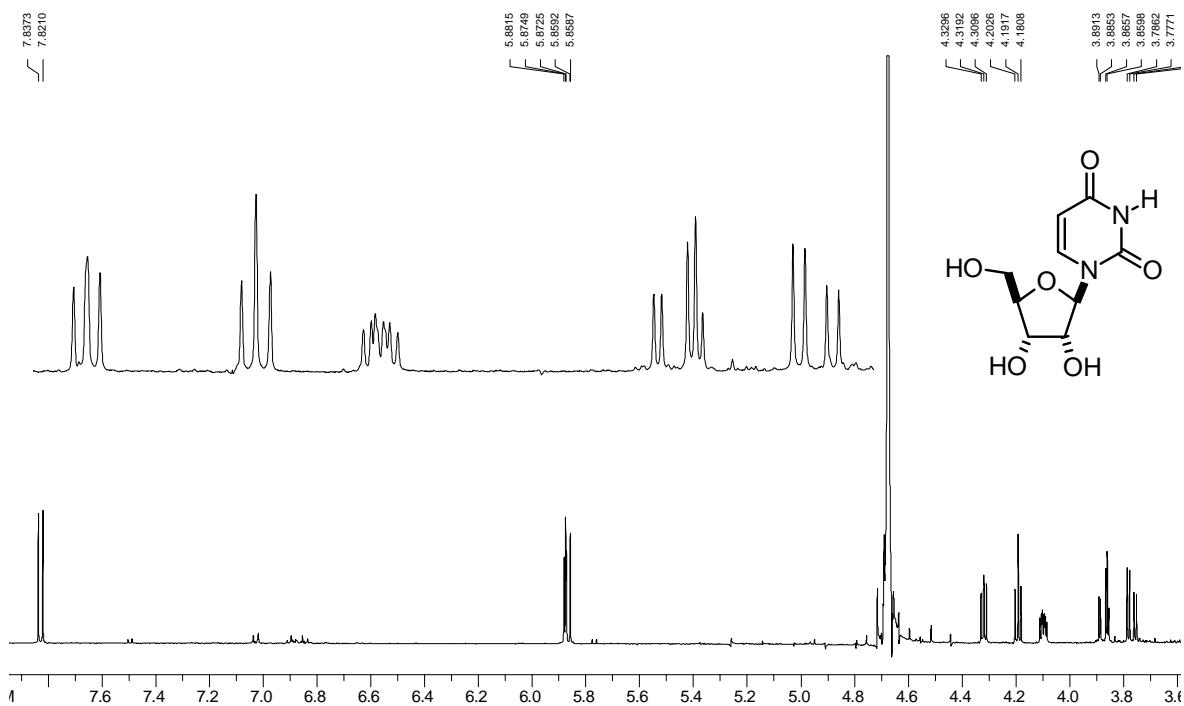


Figura 56: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **15** (D<sub>2</sub>O, 500 MHz).

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 57, p. 94) foram observados nove sinais, os quais foram atribuídos a cinco carbonos carbinólicos de unidade glicosídica ( $\delta$  61,0, 69,7, 73,9, 84,5 e 89,6), dois olefínicos ( $\delta$  102,5 e 142,1) e dois acílicos ( $\delta$  166,4 e 151,9). Os sinais em  $\delta$  84,5 e 89,6 sugeriram uma unidade furanosídica na estrutura molecular de **15**.

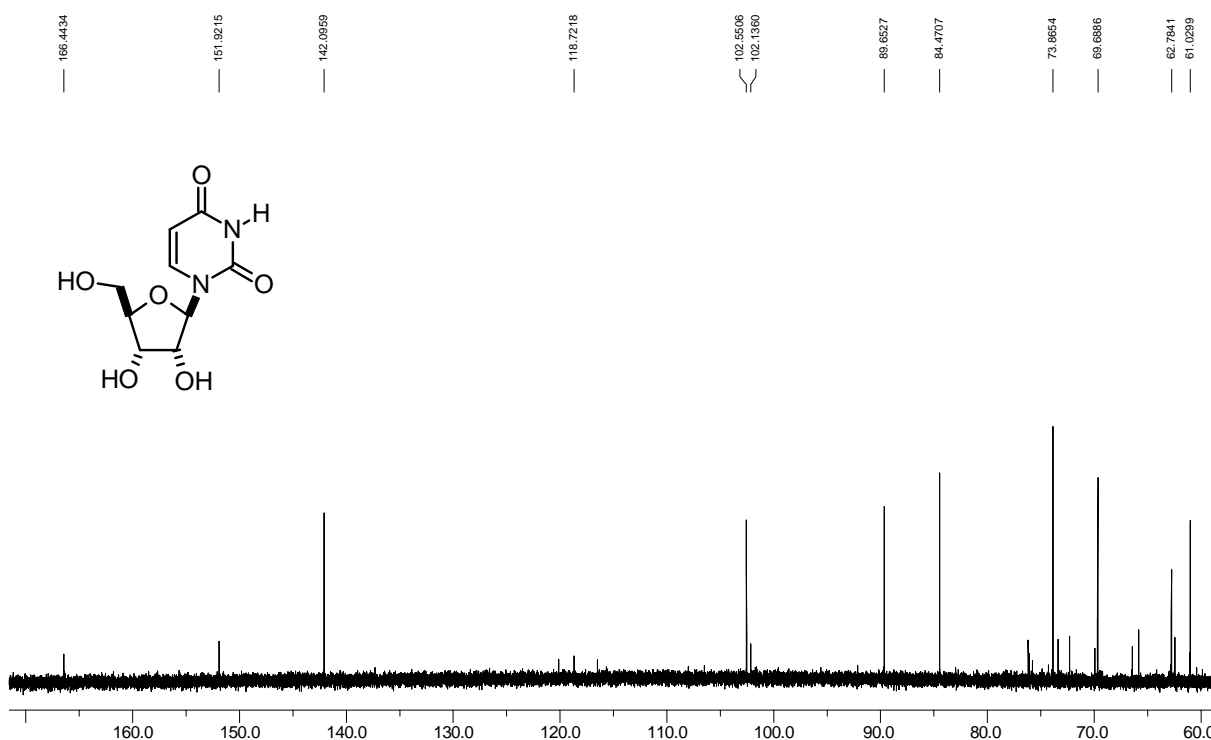


Figura 57: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **15** ( $\text{D}_2\text{O}$ , 126 MHz).

No espectro de massas foram observados os picos de  $m/z$  267  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  e 113 (Figura 58, p. 94). Todos os dados espectroscópicos obtidos foram consistentes com um nucleosídeo, contendo a base nitrogenada uracila.

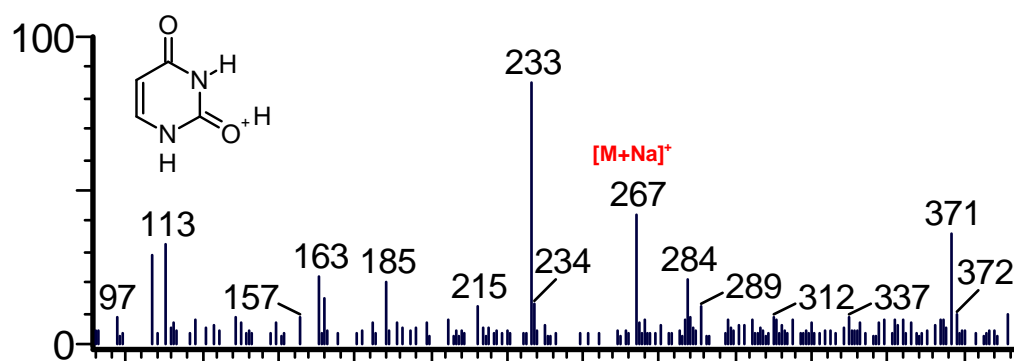


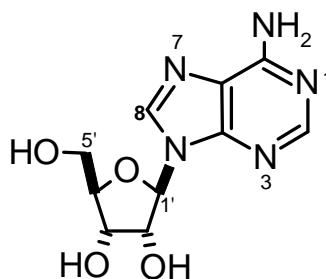
Figura 58: Espectro de massas do composto **15** (ESI, + 35 eV).

A comparação dos dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  obtidos (Tabela 15, p. 95) com aqueles disponibilizados na literatura<sup>99, 100</sup> permitiu confirmar **15** como sendo o nucleosídeo uridina, ainda não descrito em *A. melastoma*.

Tabela 15: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **15** (11,7 T,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ ,  $J$  em Hz).

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (Exp)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (Exp)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (Lit) <sup>99, 100</sup>
1	-	-	-
2	-	151,9	151,1
3	-	-	-
4	-	166,4	166,0
5	5,87 ( <i>d</i> ; 8,5)	102,5	102,1
6	7,83 ( <i>d</i> ; 8,5)	142,1	141,7
1'	5,88 ( <i>d</i> ; 4,5)	89,6	89,2
2'	4,32 ( <i>t</i> ; $W_{1/2}$ 4,8)	73,9	-
3'	4,19 ( <i>t</i> ; 5,0)	69,7	69,2
4'	4,10 ( <i>m</i> )	84,5	84,0
5'	3,77 ( <i>dd</i> ; 13,0 e 4,5) 3,88 ( <i>dd</i> ; 13,0 e 3,0)	61,0	60,6

#### 4.7.1 Nucleosídeo adenosina (**18**)



O composto **18** (1,0 mg) foi isolado após fracionamento por CC de Sephadex LH-20 (MeOH) da fração B-05, conforme descrito no item 3.2.7 (p. 43).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 59, p. 96) de **18** apresentou três singletos em  $\delta$  8,32, 8,12 e 7,28, um dubleto em  $\delta$  5,87 ( $J = 6,0$  Hz), além de vários sinais entre  $\delta$  3,50 a 5,40. Os sinais observados acima de  $\delta$  8,00 foram sugestivos de anéis heteroaromáticos conjugados. Esses dados sugeriram para **18** uma estrutura semelhante a do nucleosídeo uridina, diferendo-se apenas na base nitrogenada.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 60, p. 96) foram observados dez sinais, dos quais cinco foram atribuídos a unidade glicosídica ( $\delta$  87,9, 85,8, 73,4, 70,6 e



61,6) e os outros cinco ( $\delta$  152,3, 149,0, 119,3, 156,1 e 139,8) foram atribuídos ao sistema heterocíclico aromático.

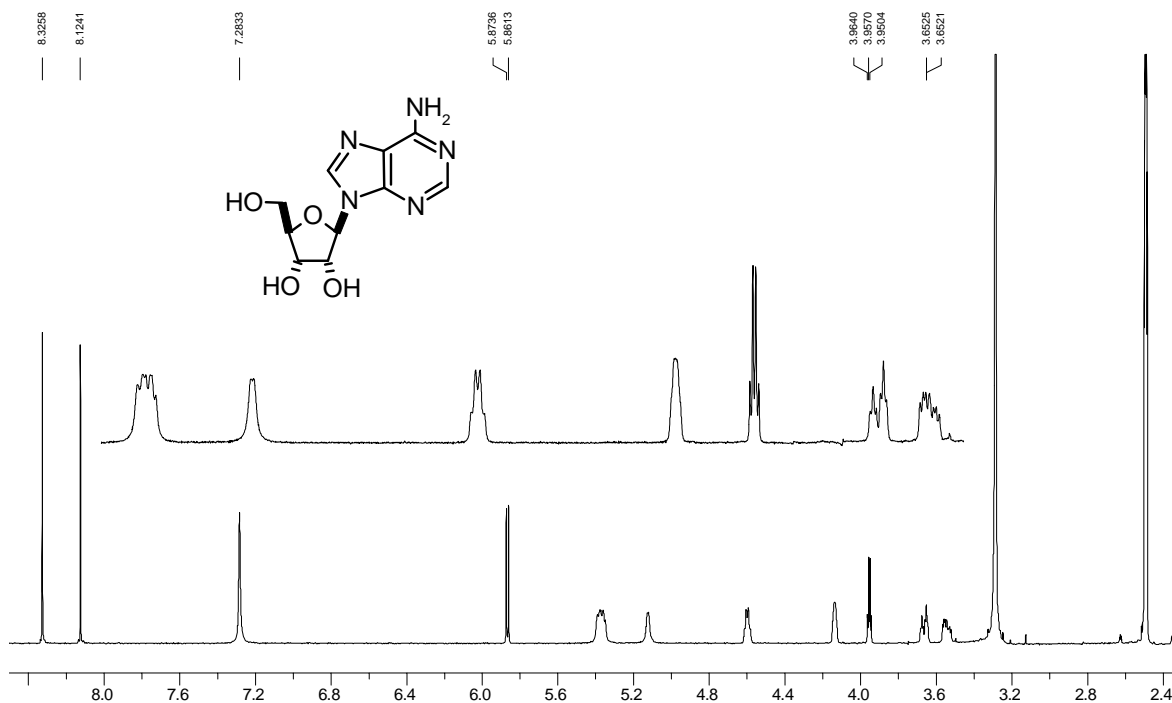


Figura 59: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **18** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz).

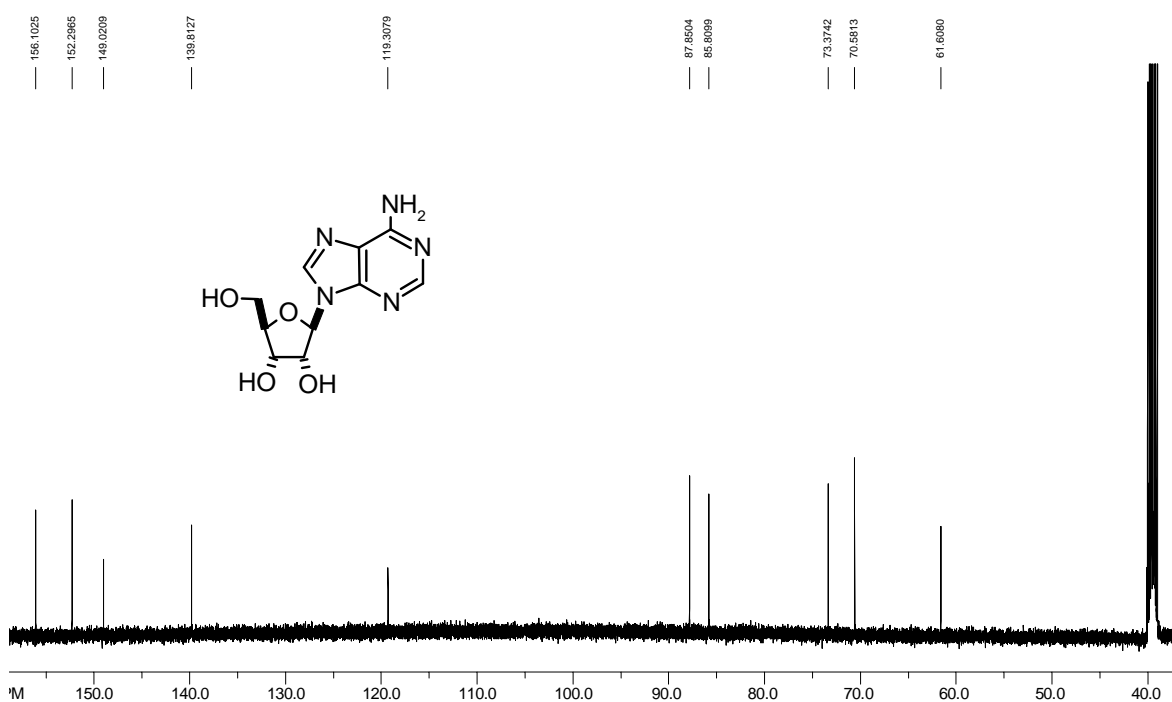


Figura 60: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **18** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 126 MHz).

O espectro de massas apresentou o pico do íon *quasi* molecular de  $m/z$  268  $[M+H]^+$ , bem como o pico de  $m/z$  136 (aglicona protonada) resultante de clivagem da ligação glicosídica (Figura 61, p. 97).

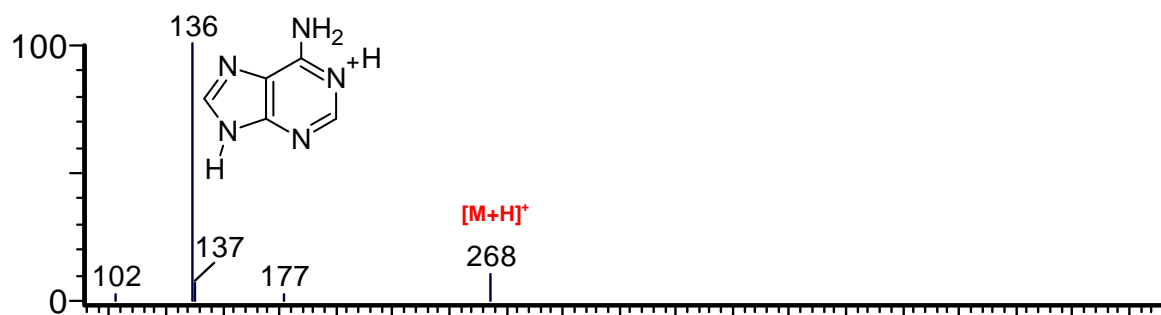


Figura 61: Espectro de massas do composto **18** (ESI, + 35 eV).

Assim, com base nessas informações, e por comparação dos valores de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  obtidos com aqueles relatados na literatura <sup>101</sup> foi possível identificar **18** como sendo a adenosina, a qual teve sua configuração relativa determinada, sobretudo pela comparação dos seus dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  <sup>101</sup>.

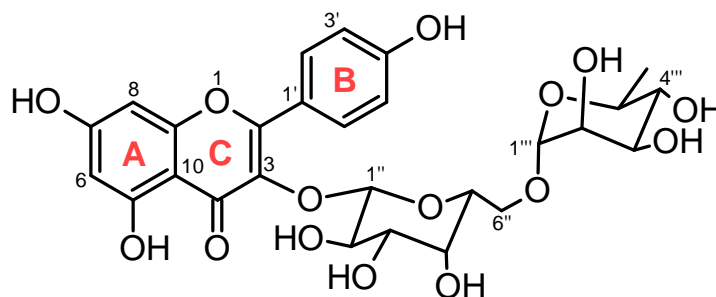
A configuração absoluta de **18** foi estabelecida mediante comparação dos seus valores de  $[\alpha]_D$  com aquele descrito na literatura [**18**:  $[\alpha]_D^{27} -59,0^\circ$  (c. 0,06,  $\text{H}_2\text{O}$ ) e  $[\alpha]_D^{29} -50,9^\circ$  (c. 0,06, MeOH); lit:  $[\alpha]_D^{25} -59,7^\circ$  (c. 0,6,  $\text{H}_2\text{O}$ ) <sup>102</sup>].

Tabela 16: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **18** (11,7 T,  $\text{DMSO}-d_6$ ,  $\delta$ ,  $J$  em Hz).

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (Exp)	$\delta$ $^1\text{H}$ (Lit) <sup>101</sup>	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (Exp)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (Lit) <sup>101</sup>
2	8,12 (s)	8,13 (s)	152,3	152,4
4	-	-	149,0	149,0
5	-	-	119,3	119,3
6	-	-	156,1	156,2
8	8,32 (s)	8,34 (s)	139,8	139,9
NH <sub>2</sub>	7,28 (sl)	7,33 (sl)	-	-
1'α	5,87 (d; 6,0)	5,87 (d; 6,2)	87,9	87,9
1'β	-	-	-	-
2' α	-	-	73,4	73,4
2' β	4,60 (m)	4,61 (ddd; 6,3, 6,2 e 5,1)	-	-
3'	4,14 (m)	4,14 (ddd; 5,1, 4,6 e 3,0)	70,6	70,6
4'	3,95 (q; 3,5)	3,96 (ddd; 3,7, 3,6 e 3,0)	85,8	85,9
5' <sub>a</sub>	3,66 (dt; 12,5 e 3,5)	3,67 (ddd; -12,1, 4,4 e 3,6)	61,6	61,6
5' <sub>b</sub>	3,54 (m)	3,55 (ddd; -12,1, 7,2 e 3,7)	-	-
2'-OH	5,37 (m)	5,43 (d; 6,3)	-	-
3'-OH	5,12 (m)	5,17 (d; 4,6)	-	-
5'-OH	5,37 (m)	5,41 (dd; 7,2 e 4,4)	-	-

## 4.8 Flavonóides glicosilados

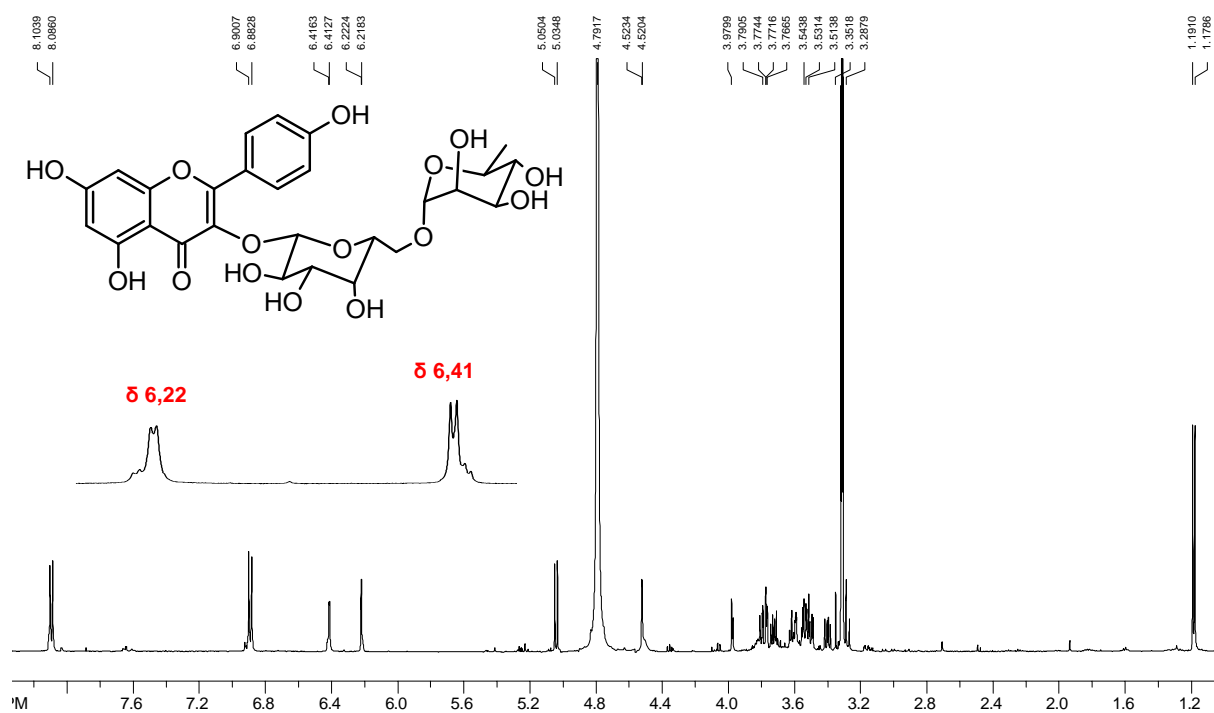
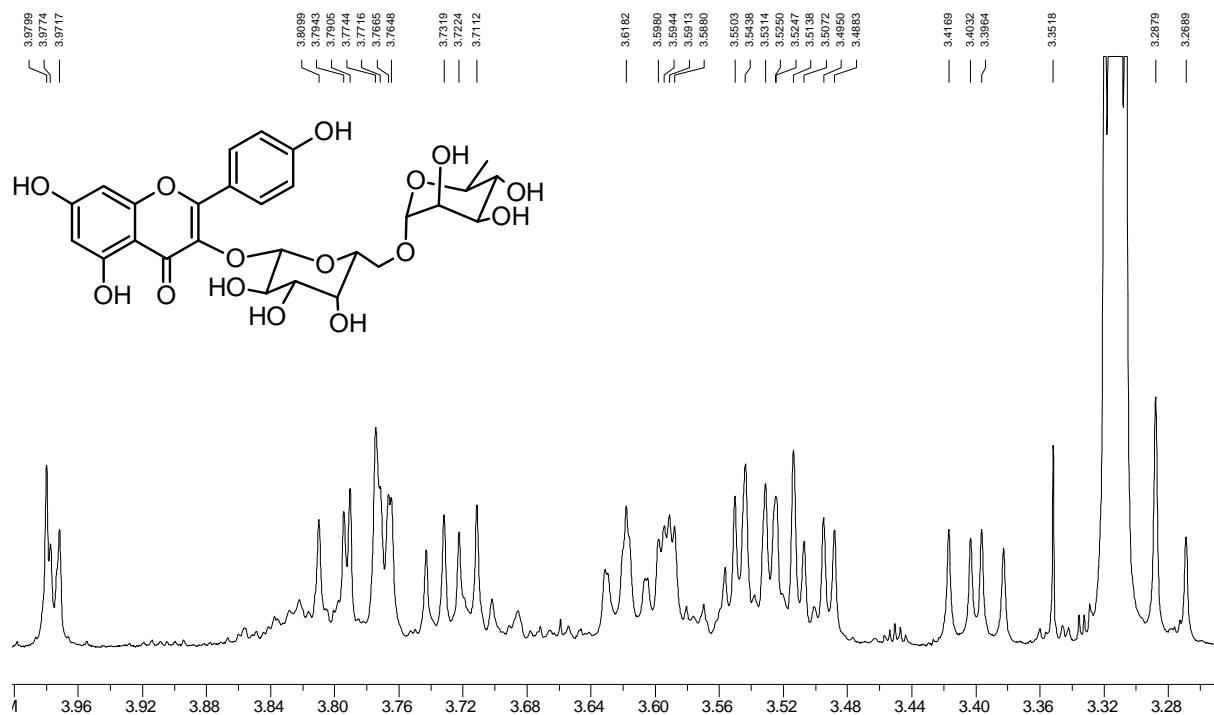
### 4.8.1 Kaempferol 3-O- $\beta$ -robinobiosídeo (19)



O composto **19** (5,8 mg; sólido cristalino) foi obtido após fracionamento por CLAE da subfração B-20 [ACN-MeOH-H<sub>2</sub>O (7:10:83 v/v/v)], conforme descrito no item 3.2.7 (p. 43).

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **19** (Figuras 62-63, p. 99) observam-se quatro dubletos [ $\delta$  6,22 ( $J = 1,9$  Hz), 6,41 ( $J = 1,9$  Hz), 6,89 ( $J = 9,0$  Hz) e 8,09 ( $J = 9,0$  Hz)], sendo que os dubletos em  $\delta$  6,22 e 6,41 apresentaram correlação no mapa de contornos gCOSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (Figuras 64-65, p. 100), bem como os dubletos em  $\delta$  6,89 e 8,09. Neste mesmo espectro, foram ainda observados sinais entre  $\delta$  1,18 e 5,04 [ $\delta$  5,04 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz, H-1''), 3,79 (1H, dd,  $J = 9,8, 8,0$  Hz, H-2''), 3,54 (1H, dd,  $J = 9,8, 3,3$  Hz, H-3''), 3,77 (1H, dd,  $J = 3,3, 0,9$  Hz, H-4''), 3,62 (1H, ddd,  $J = 7,0, 5,5, 0,9$  Hz, H-5''), 3,40 (1H, dd,  $J = 10,5, 7,0$  Hz, H-6''), 3,73 (1H, dd,  $J = 10,5, 5,5$  Hz, H-6''), 4,52 (1H, d,  $J = 1,5$  Hz, H-1'''), 3,59 (1H, dd,  $J = 3,3, 1,5$  Hz, H-2'''), 3,50 (1H, dd,  $J = 9,3, 3,3$  Hz, H-3'''), 3,27 (1H, t,  $J = 9,3$  Hz, H-4'''), 3,53 (1H, m, H-5'''), 1,18 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, H-6''')], característicos de unidades glicosídicas. Os sinais em  $\delta$  5,04 e 4,52 atribuídos (com auxílio dos experimentos 1D e 2D) a hidrogênios anoméricos evidenciaram duas unidades glicosídicas na estrutura molecular de **19**.

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C (figura 66, p. 98), auxiliado pelo espectro DEPT 90° (Figura 67, p. 98), mostrou um total de vinte e quatro sinais, os quais foram atribuídos a quatro carbonos metínicos, incluindo dois do sistema aromático *p*-substituído, dois quaternários, seis quaternários oxigenados, um carbonílico, dois anoméricos, nove carbinólicos e um metílico.

Figura 62: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **19** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).Figura 63: Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **19** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).

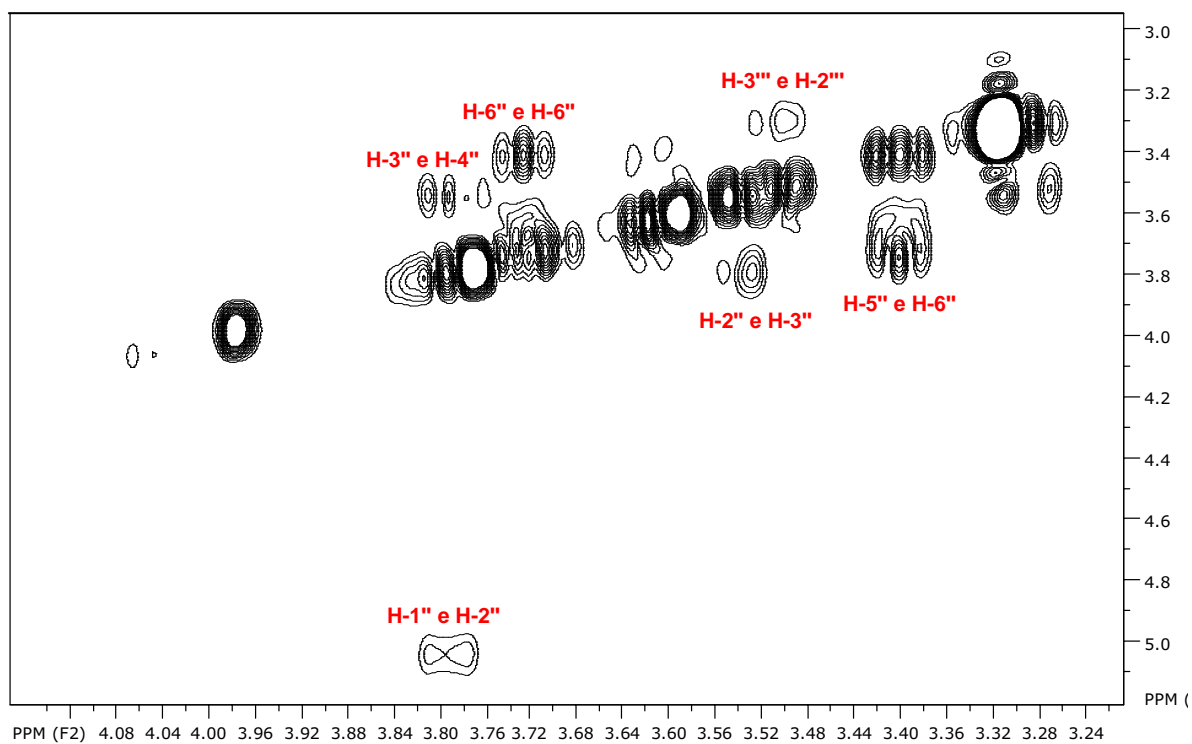


Figura 64: Expansão do mapa de contornos gCOSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de **19** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).

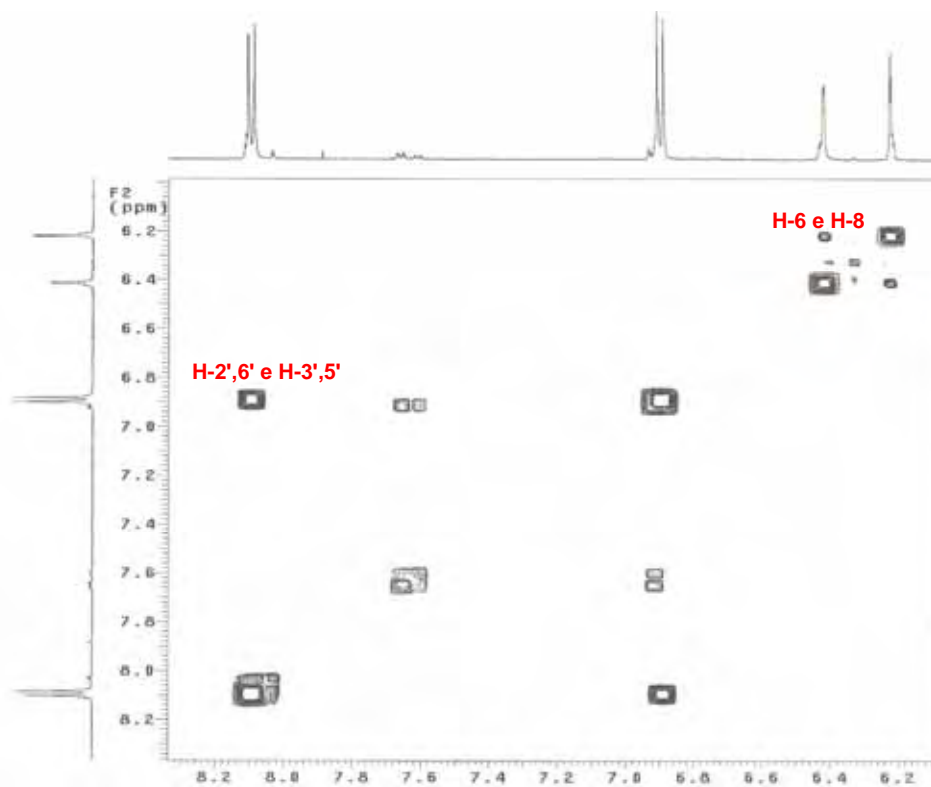


Figura 65: Expansão do mapa de contornos gCOSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de **19** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).

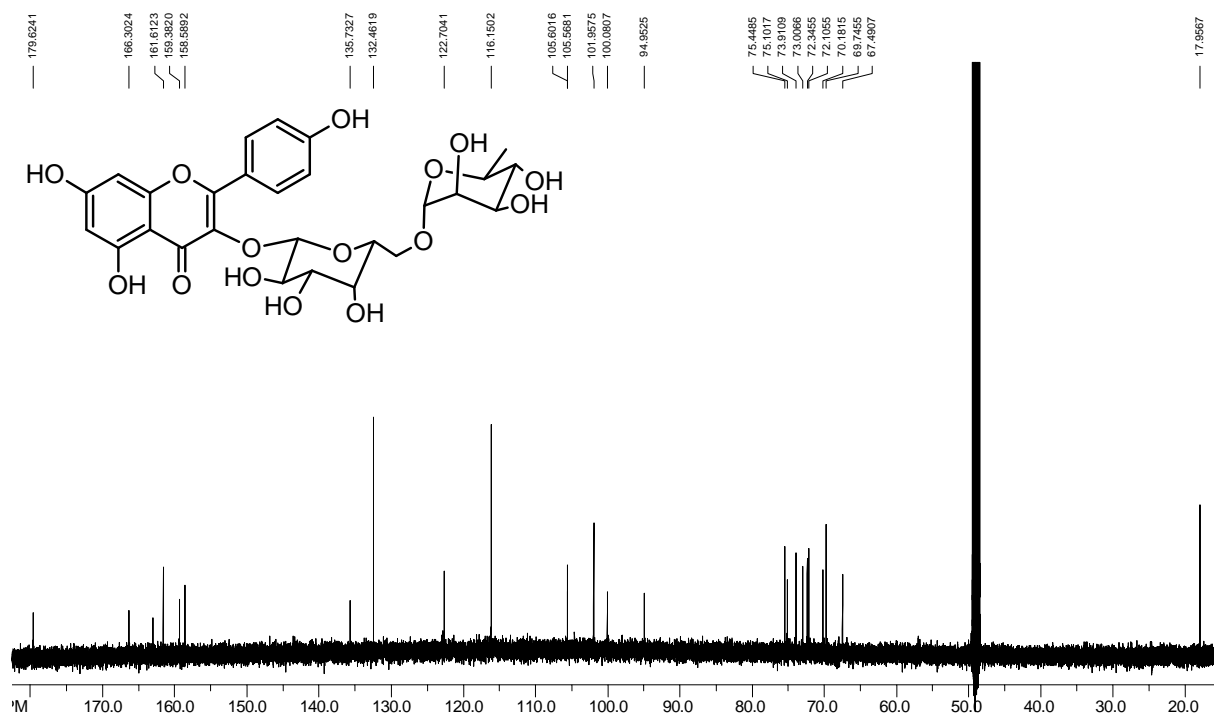


Figura 66: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **19** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 126 MHz).

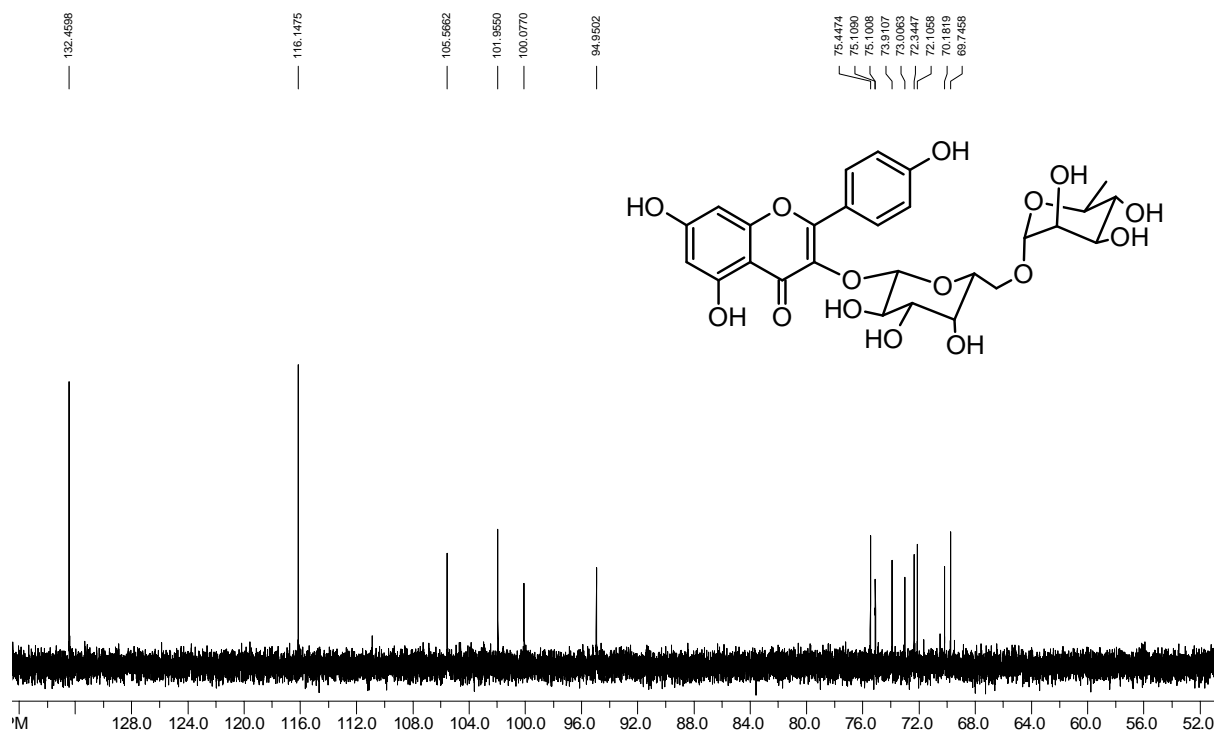


Figura 67: Espectro de DEPT  $90^\circ$  de **19** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 126 MHz).

No espectro de massas no modo negativo foi detectado o íon *quasi* molecular de  $m/z$  593  $[M-H]^-$  (Figuras 68, p. 102), enquanto no modo positivo foram detectados diversos íons *quasi* moleculares ( $595 [M+H]^+$ ,  $617 [M+Na]^+$  e  $633 [M+K]^+$ ), bem como fragmentos resultantes de clivagens das ligações glicosídicas (Figura 69, p. 102; Esquema 7, p. 102).

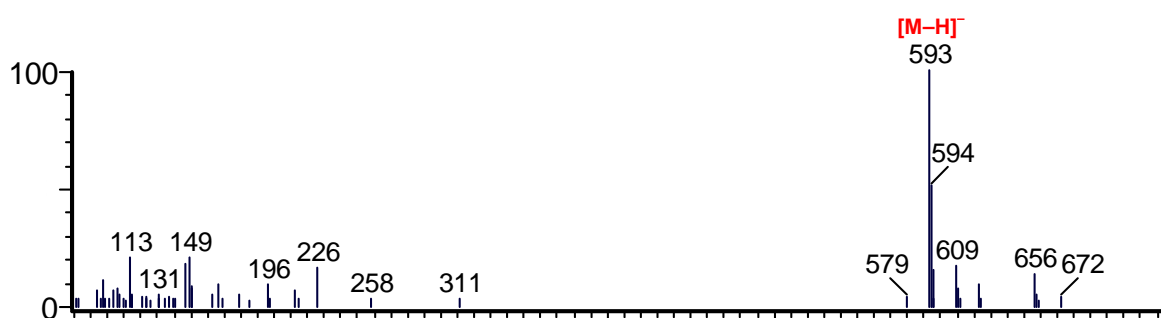


Figura 68: Espectro de massas do composto **19** (ESI, - 70 eV).

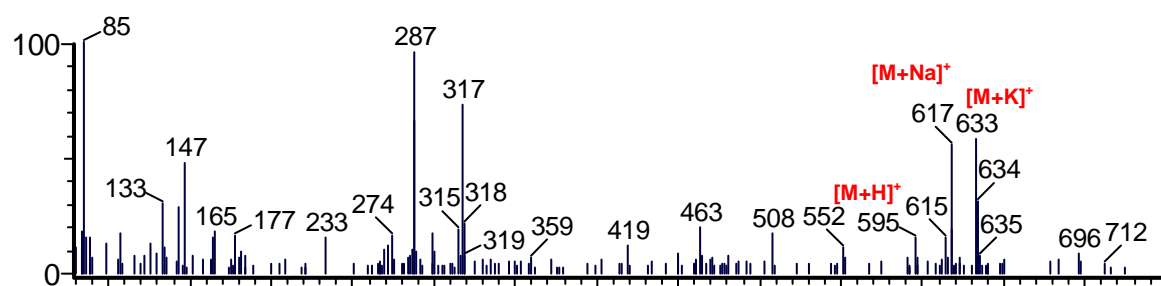
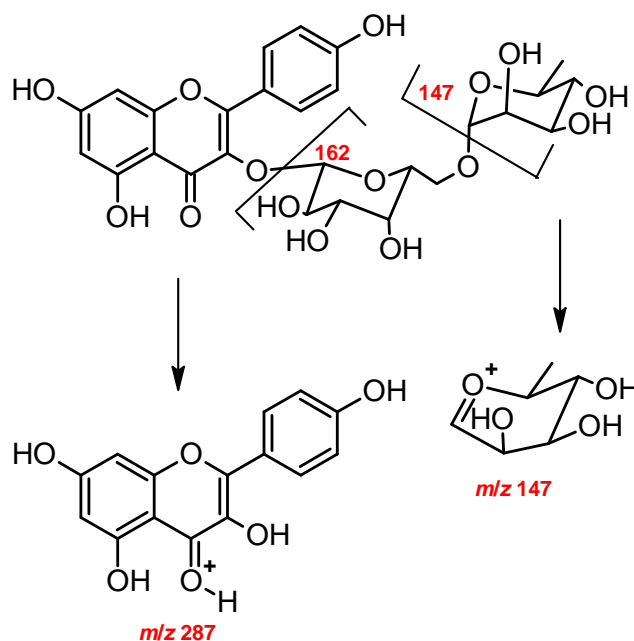


Figura 69: Espectro de massas do composto **19** (ESI, + 70 eV).



Esquema 7: Proposta de fragmentação do flavonóide **19**.

A análise conjunta dos dados espectrométricos obtidos pelas diferentes técnicas (EM, RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  uni- e bidimensionais) sugeriu para **19** uma estrutura flavonoídica, contendo uma unidade diglicosídica ligada em uma aglicona com padrão de substituição idêntico àquele descrito para o flavonóide kaempferol.

O valor do deslocamento químico observado para C-6'' foi sugestivo de ligação do tipo 1'''→6'' entre as unidades glicosídicas. Esta proposta foi posteriormente confirmada pela correlação existente no mapa de contornos gHMBC (Figura 73, p. 105) entre os H-6'' e o C-1'''. Além disso, no mapa de contornos gHMBC (Figura 75, p. 106) foi observada correlação entre o H-1'' e C-3, sendo que esta permitiu estabelecer a posição de ligação entre o diglicosídico e a aglicona.

Uma vez estabelecido o esqueleto geral de **19**, bem como a conectividade entre os fragmentos subestruturais, restava somente determinar a natureza das unidades glicosídicas. A análise minuciosa [assistenciada, sobretudo por gCOSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  e gTOCSY 1D (Figuras 78-79, p. 108)] das multiplicidades dos sinais relativos aos hidrogênios glicosídicos revelou constantes de acoplamento do tipo diaxial entre H-1'' e H-2'', diaxial entre H-2'' e H-3'', axial-equatorial ou diequatorial entre H-4'' e H-5'', diequatorial entre H-1''' e H-2''' e diaxiais entre H-3''' e H-4''' e entre H-4''' e H-5'''. Com base nessas informações, no fragmento observado por EM ( $m/z$  147) e nos valores dos deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi possível identificar a unidade glicosídica terminal como sendo um  $\alpha$ -ramnopiranosídeo. Entretanto, foram encontradas discrepâncias quando comparados com dados da literatura que dificultaram a identificação da primeira unidade glicosídica. O valor de constante de acoplamento 0,9 Hz, observado para o acoplamento vicinal ( $^3J$ ) entre H-3'' e H-4'', poderia ser compatível com acoplamentos do tipo diequatorial ou axial-equatorial. Isso levou a uma proposta alternativa ( $\alpha$ -altropiranosídeo) para a primeira unidade glicosídica, a qual foi subsequentemente descartada por experimento gNOESY 1D (Figura 80, p. 110). Irradiando-se na frequência de absorção do hidrogênio anomérico H-1'', houve aumento da intensidade dos sinais relativos aos H-3'' e H-5'', o que mostrou que a primeira unidade glicosídica era um  $\beta$ -galactopiranosídeo, e, portanto o diglicosídeo era um  $\beta$ -robinobiosídeo. Além disso, o valor de deslocamento químico observado para C-1'' corroborou com esta proposta, uma vez que para C-1'' de um  $\alpha$ -altropiranosídeo seria esperado (devido ao efeito  $\gamma$  gauche) um valor ligeiramente menor do que para C-1'' de um  $\beta$ -galactopiranosídeo.



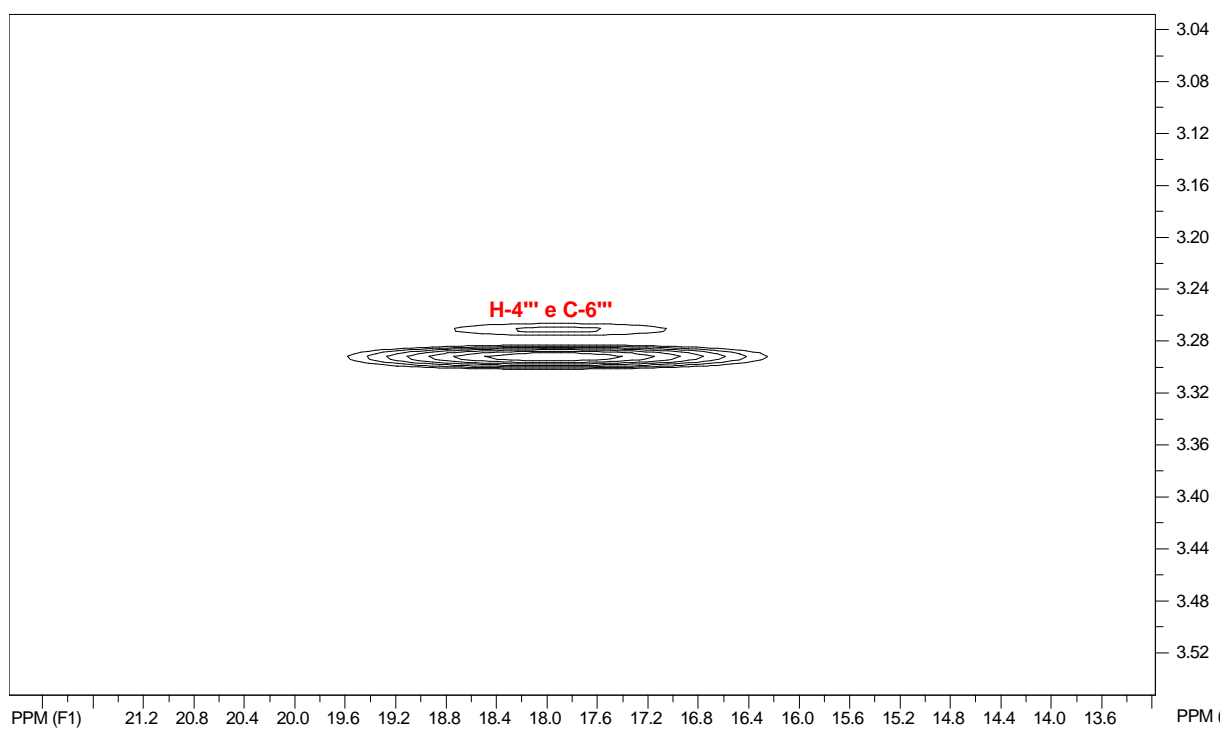


Figura 70: Expansão do mapa de contornos gHMBC de **19** (CD<sub>3</sub>OD, 11,7 T).

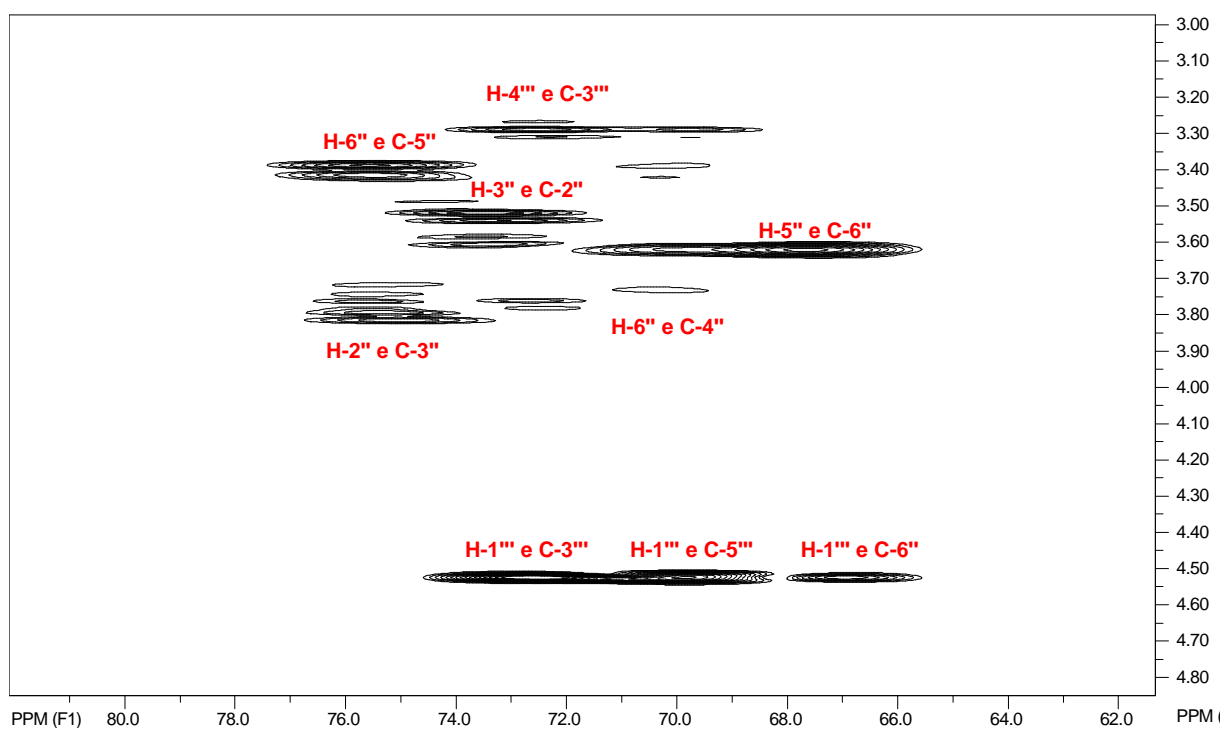
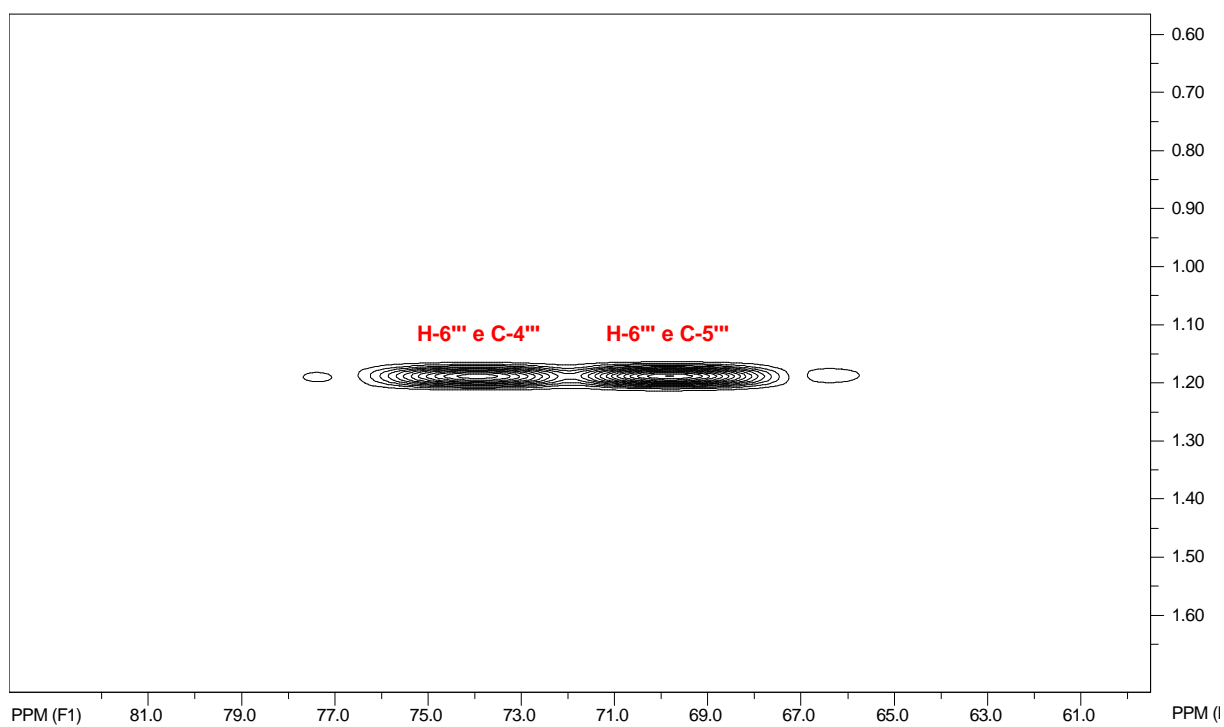
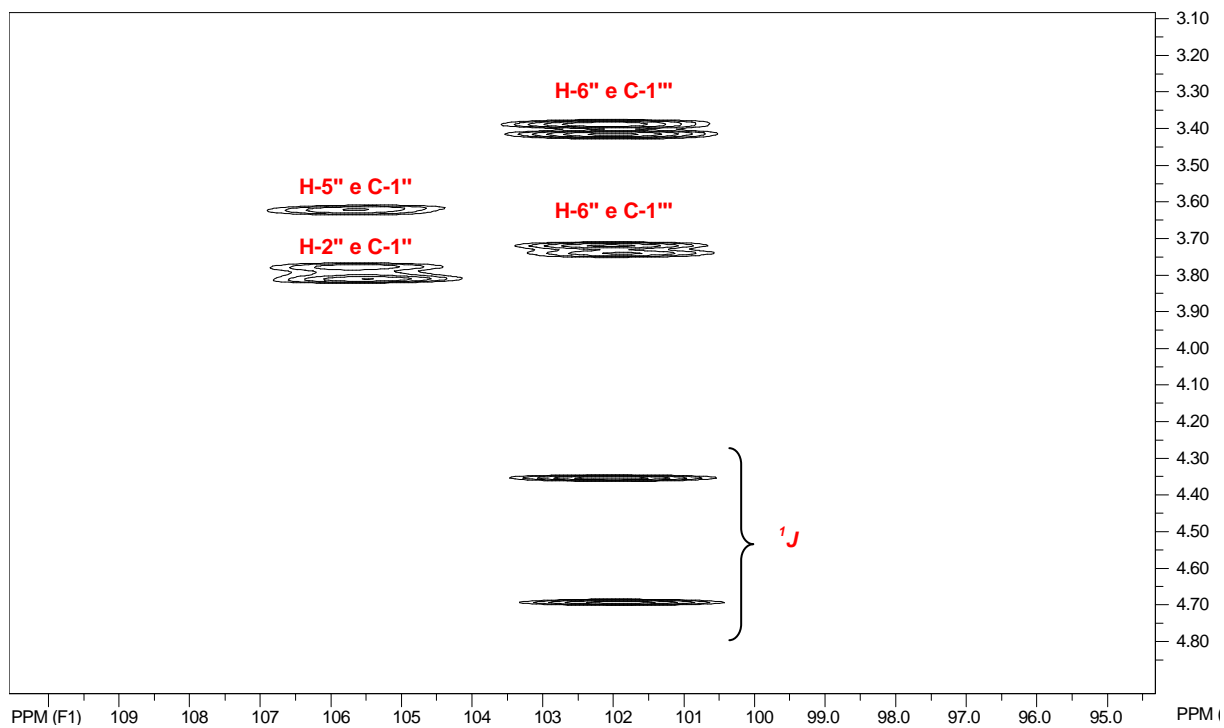


Figura 71: Expansão do mapa de contornos gHMBC de **19** (CD<sub>3</sub>OD, 11,7 T).

Figura 72: Expansão do mapa de contornos gHMBC de **19** (CD<sub>3</sub>OD, 11,7 T).Figura 73: Expansão do mapa de contornos gHMBC de **19** (CD<sub>3</sub>OD, 11,7 T).

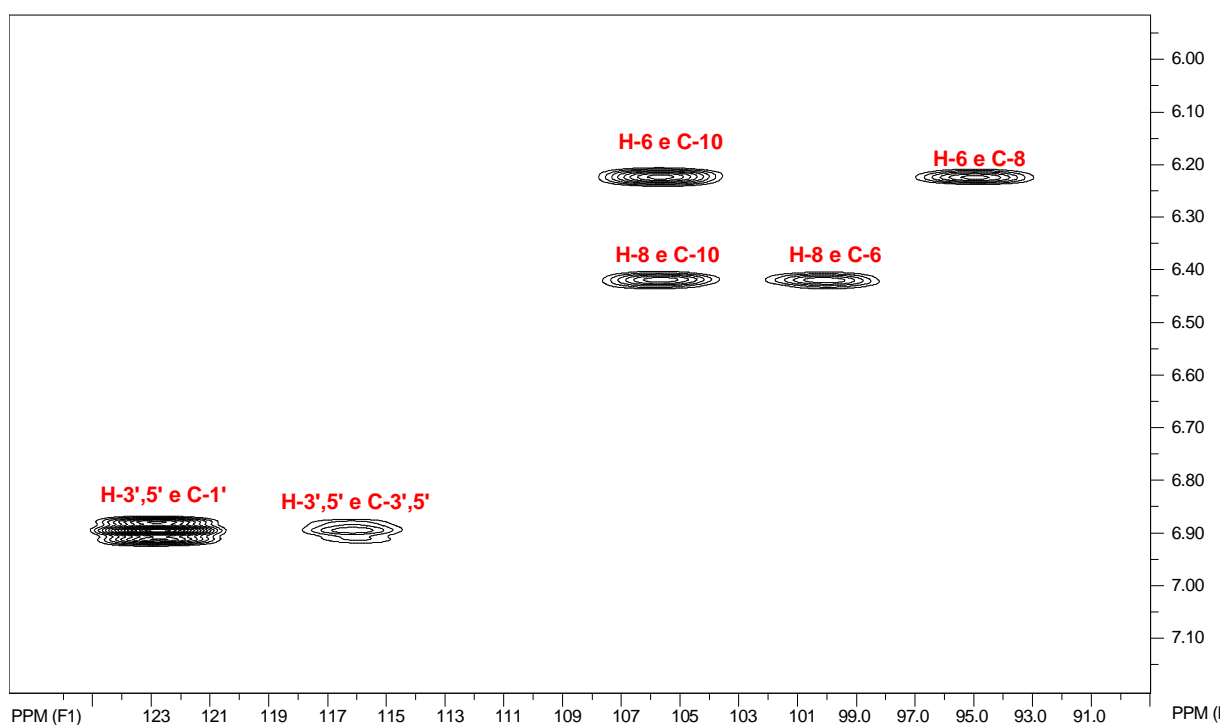


Figura 74: Expansão do mapa de contornos gHMBC de **19** (CD<sub>3</sub>OD, 11,7 T).

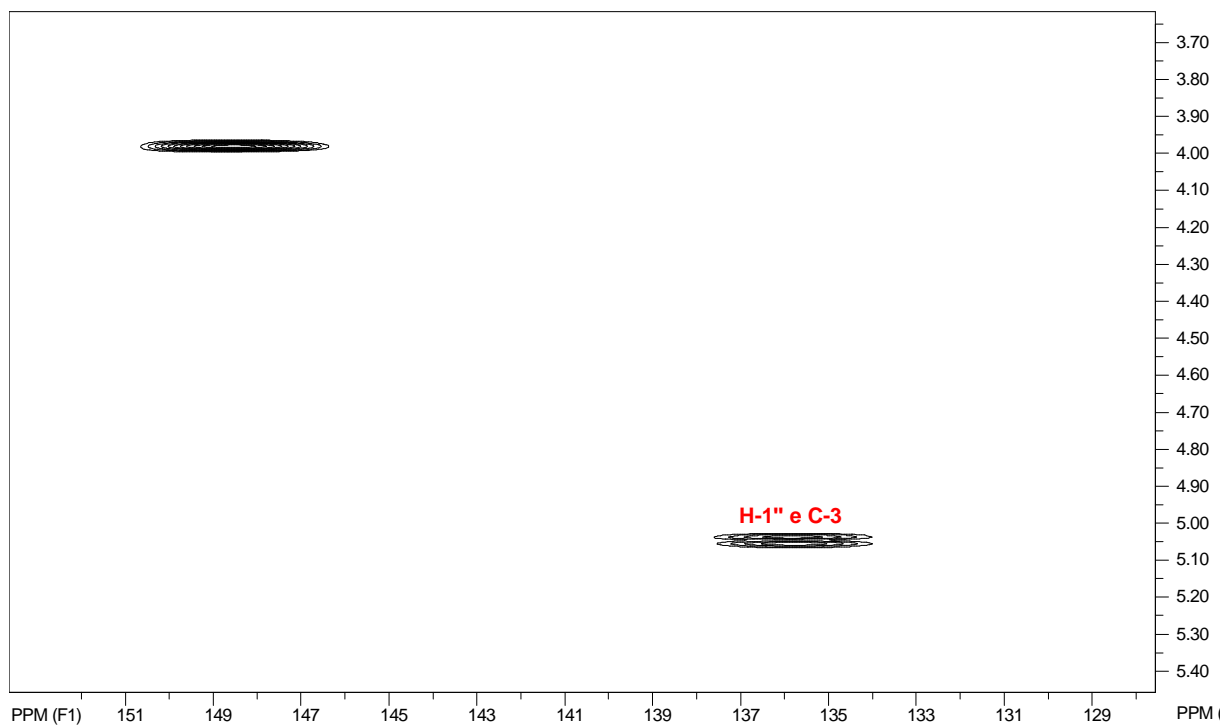


Figura 75: Expansão do mapa de contornos gHMBC de **19** (CD<sub>3</sub>OD, 11,7 T).



Figura 76: Expansão do mapa de contornos gHMBC de **19** (CD<sub>3</sub>OD, 11,7 T).

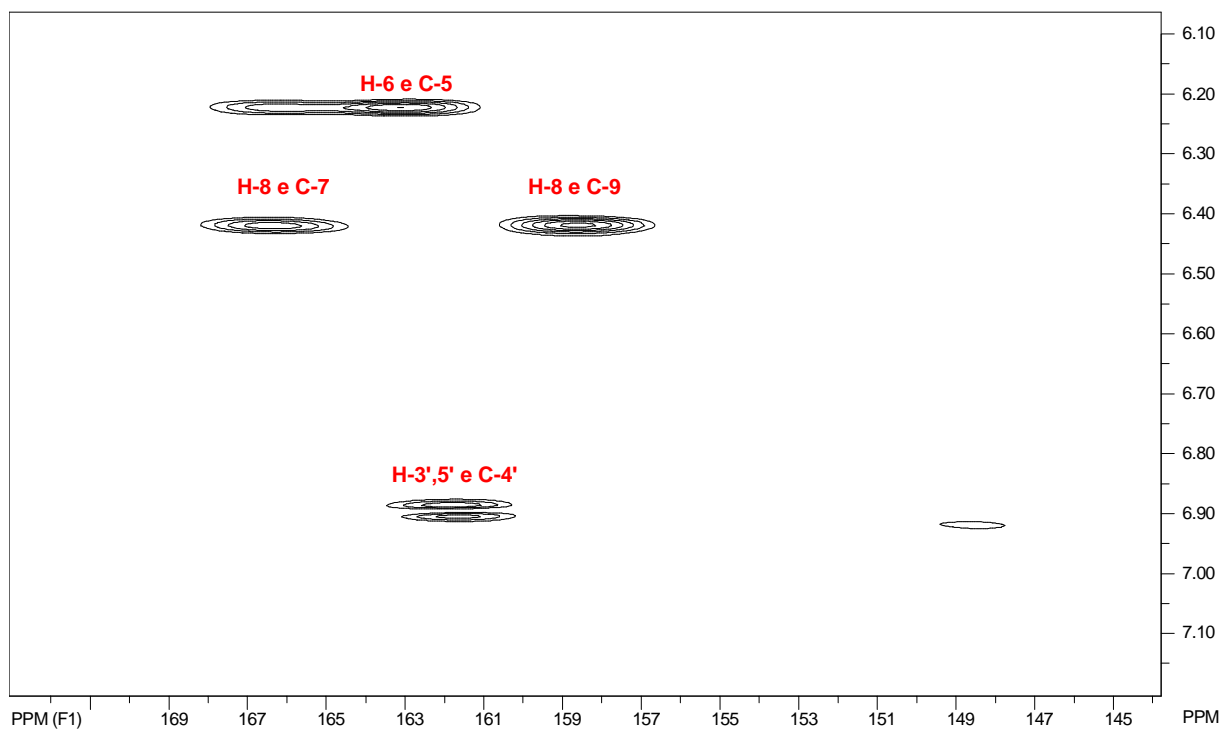
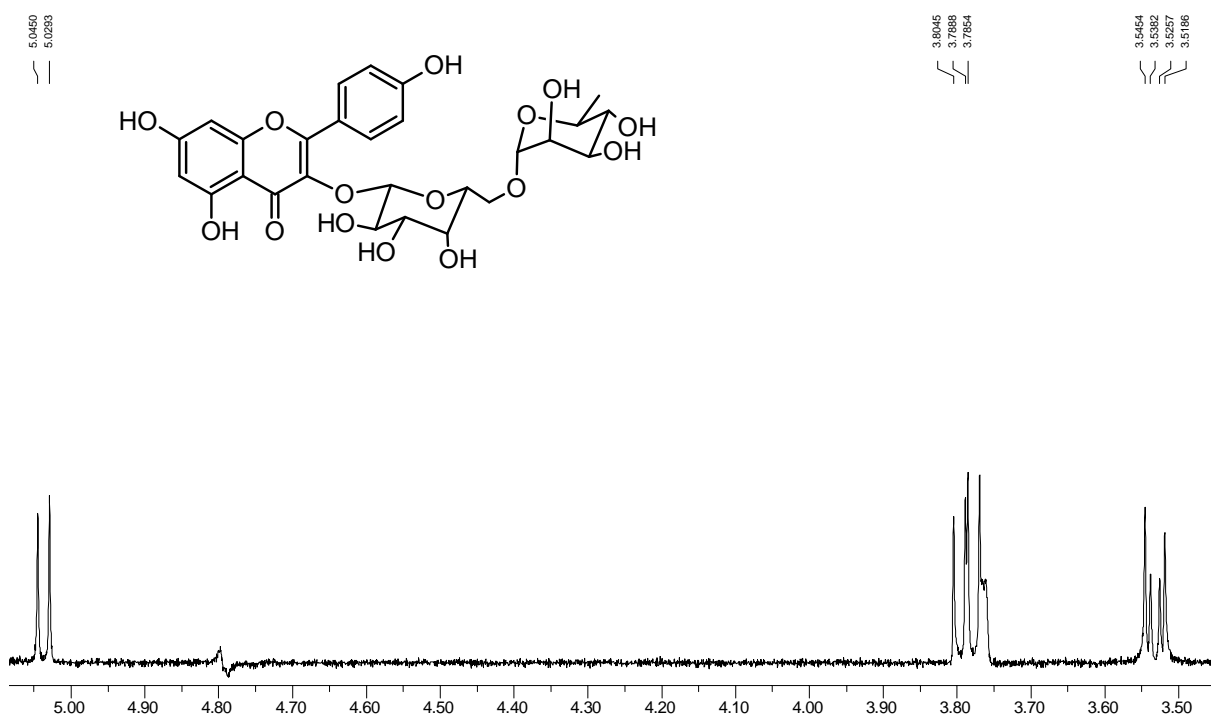
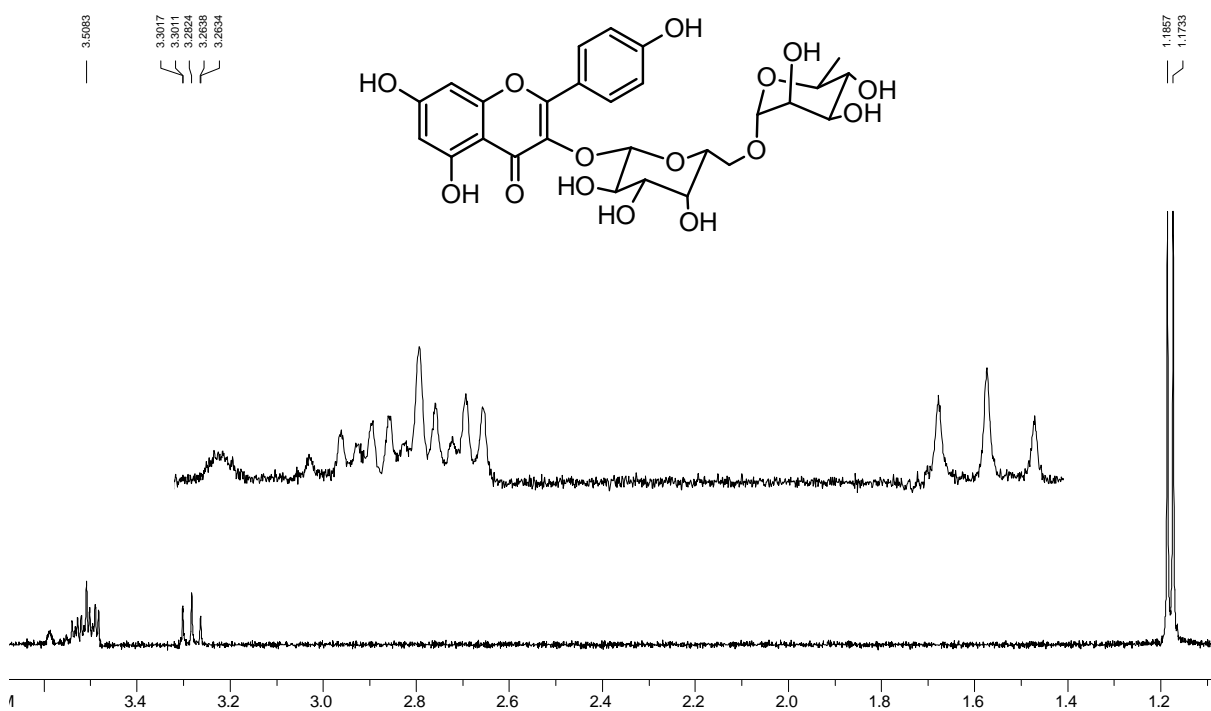


Figura 77: Expansão do mapa de contornos gHMBC de **19** (CD<sub>3</sub>OD, 11,7 T).

Figura 78: Espectro gTOCSY 1D de **19** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).Figura 79: Espectro gTOCSY 1D de **19** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz).

A atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foi confirmada mediante a comparação dos dados espectroscópicos obtidos (Tabela 17, p. 109) com aqueles de modelos disponibilizados na literatura <sup>103</sup>. O valor de rotação óptica específica obtido para **19** foi  $[\alpha]_D^{29} -29,5^\circ$  (c. 0,04, MeOH). Este composto já havia sido descrito em outras espécies pertencentes à família Aristolochiaceae. Entretanto, este é o primeiro relato da ocorrência deste flavonóide, bem como do composto **20** (discutido no item 4.8.2), em espécie de Aristolochiaceae brasileira.

Tabela 17: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **19** (11,7 T,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ,  $J$  em Hz).

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	–	–
2	–	159,2
3	–	135,7
4	–	179,6
5	–	163,0
6	6,22 ( <i>d</i> ; 1,9)	100,0
7	–	166,3
8	6,41 ( <i>d</i> ; 1,9)	94,9
9	–	158,6
10	–	105,6
1'	–	122,7
2'	8,09 ( <i>d</i> ; 9,0)	132,4
3'	6,89 ( <i>d</i> ; 9,0)	116,1
4'	–	161,0
5'	6,89 ( <i>d</i> ; 9,0)	116,1
6'	8,09 ( <i>d</i> ; 9,0)	132,4
1''	5,04 ( <i>d</i> ; 8,0)	105,6
2''	3,79 ( <i>dd</i> ; 9,8 e 8,0)	73,0
3''	3,54 ( <i>dd</i> ; 9,8, 3,3)	75,1
4''	3,77 ( <i>dd</i> ; 3,3 e 0,9)	70,2
5''	3,62 ( <i>ddd</i> ; 7,0, 5,5 e 0,9)	75,4
6''	3,40 ( <i>dd</i> ; 10,5 e 7,0)	67,5
	3,73 ( <i>dd</i> ; 10,5 e 5,5)	67,5
1'''	4,52 ( <i>d</i> ; 1,5)	102,0
2'''	3,59 ( <i>dd</i> ; 3,3 e 1,5)	72,1
3'''	3,50 ( <i>dd</i> ; 9,3 e 3,3)	72,3
4'''	3,27 ( <i>t</i> ; 9,3)	73,9
5'''	3,53 ( <i>m</i> )	69,7
6'''	1,18 ( <i>d</i> ; 6,5)	18,0

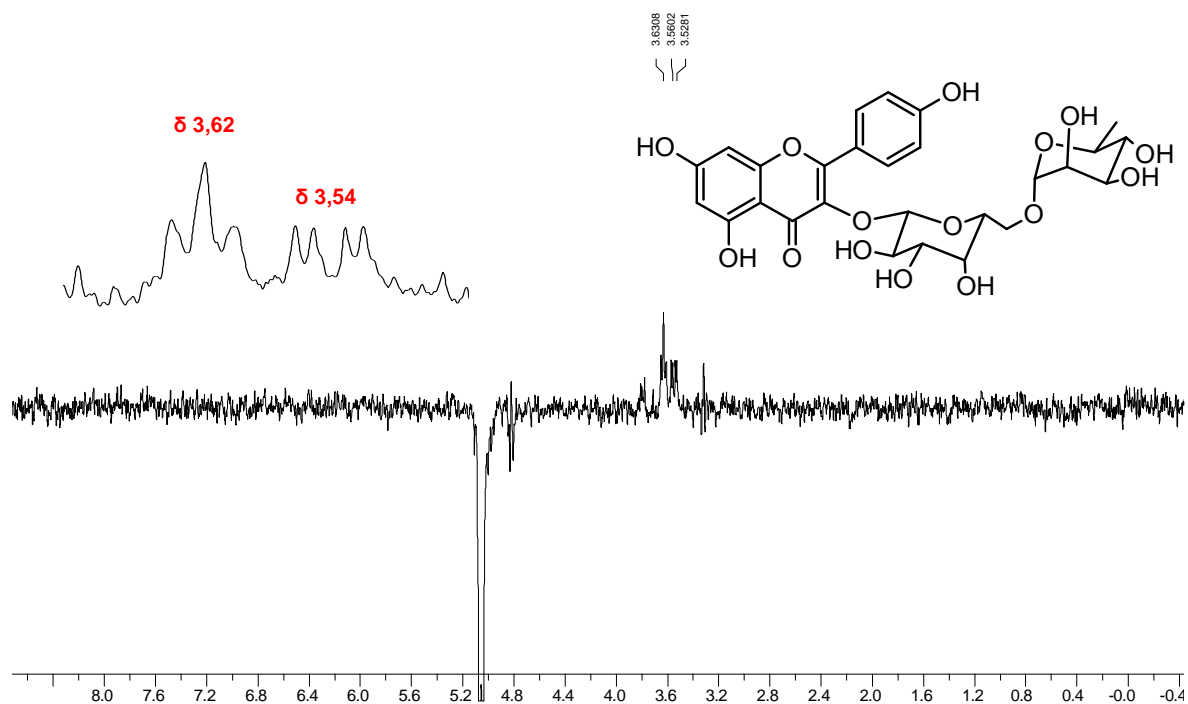
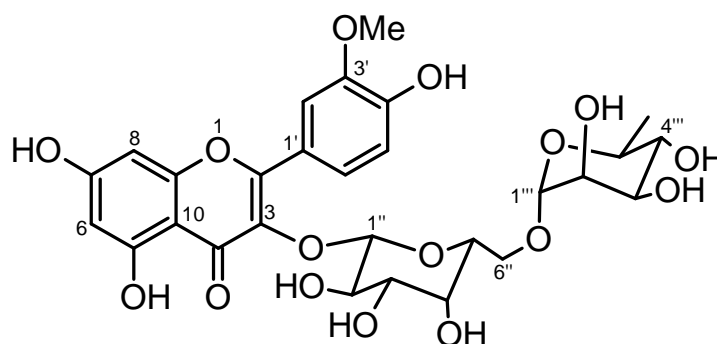


Figura 80: Espectro gNOESY 1D do flavonóide **19** (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz).

#### 4.8.2 Isoramnetina 3-O-β-robinobiosídeo (**20**)



O composto **20** (6,0 mg; sólido amarelado) foi obtido mediante fracionamento por CLAE da subfração B-20, conforme descrito no item 3.2.7 (p. 43).

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C de **20** (Figuras 81-83, p. 111-112) são muito semelhantes ao do flavonóide glicosilado **19**, destacando-se os sinais referentes à unidade diglicosídica e ao anel A da aglicona. No espectro de RMN de <sup>1</sup>H, foram ainda observados dois dubletos em δ 8,00 (*J* = 2,0 Hz) e 6,91 (*J* = 8,5 Hz), um duplo dubleto em δ 7,61 (*J* = 8,5 e 2,0 Hz) e um singlete de hidrogênios metoxílicos em δ 3,97. Logo, a análise desses dados sugeriu para **20** uma estrutura

flavonoídica semelhante à de **19**, diferindo-se apenas no padrão de substituição do anel B da aglicona. Os sinais em  $\delta$  8,00, 7,61 e 6,91 evidenciaram um aromático trissubstituído na estrutura molecular de **20**, e, portanto um esqueleto com padrão de substituição similar àquele descrito para a quercetina, mas contendo uma metoxila. A posição desta metoxila foi estabelecida pelas correlações a longa distância observadas no mapa de contornos gHMBC e pelo efeito nOe observado entre o H-2' e o grupo metoxílico (OMe-3') no experimento gNOESY 1D (Figuras 84-85, p. 113).

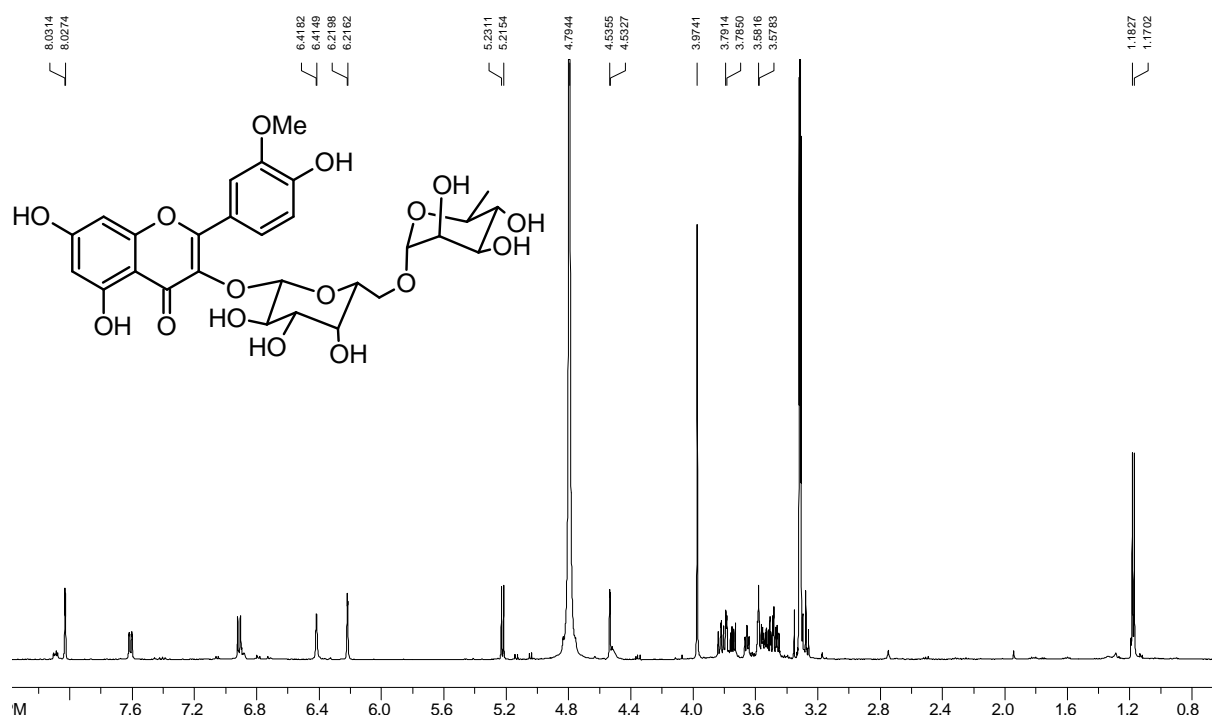


Figura 81: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **20** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).

De modo similar ao discutido para **19**, nos espectros de massas de **20** foram observados picos de íons *quasi* moleculares (623  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 625  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 647  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  e 663  $[\text{M}+\text{K}]^+$ ) e de fragmentos resultantes de clivagens acetálicas (Figura 86, p. 113, Esquema 8, p. 114). No entanto, as espécies iônicas relativas aos íons *quasi* moleculares apresentaram 30 u.m.a a mais que as de **19**.

Assim, com base nessas informações, e por comparação com modelos da literatura <sup>103, 104</sup>, o composto **20** foi identificado como sendo o flavonóide glicosilado isoramnetina 3-O- $\beta$ -robinobiosídeo. A configuração absoluta de **20** foi estabelecida pela comparação do seu valor de rotação óptica específica  $[[\alpha]_D^{29}] -25,5^\circ$  (MeOH, c. 0,05)] com aquele de modelo disponível na literatura <sup>105</sup>  $[[\alpha]_D] -21,4^\circ$  (MeOH)]. Além



disso, a quase coincidência dos dados espectroscópicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  (para as unidades diglicosídicas) e a similaridade dos valores de  $[\alpha]_{\text{D}}$  de **19** e **20** permitiram sugerir para **19** uma configuração absoluta idêntica a de **20**.

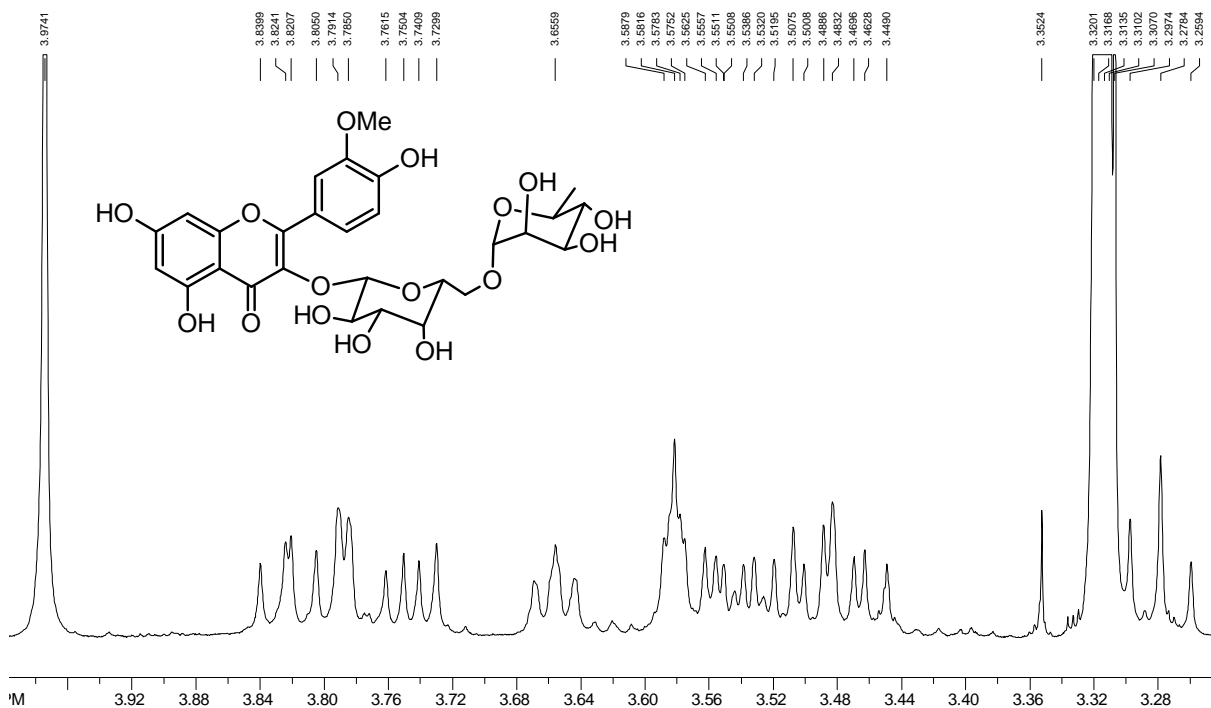


Figura 82: Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **20** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).

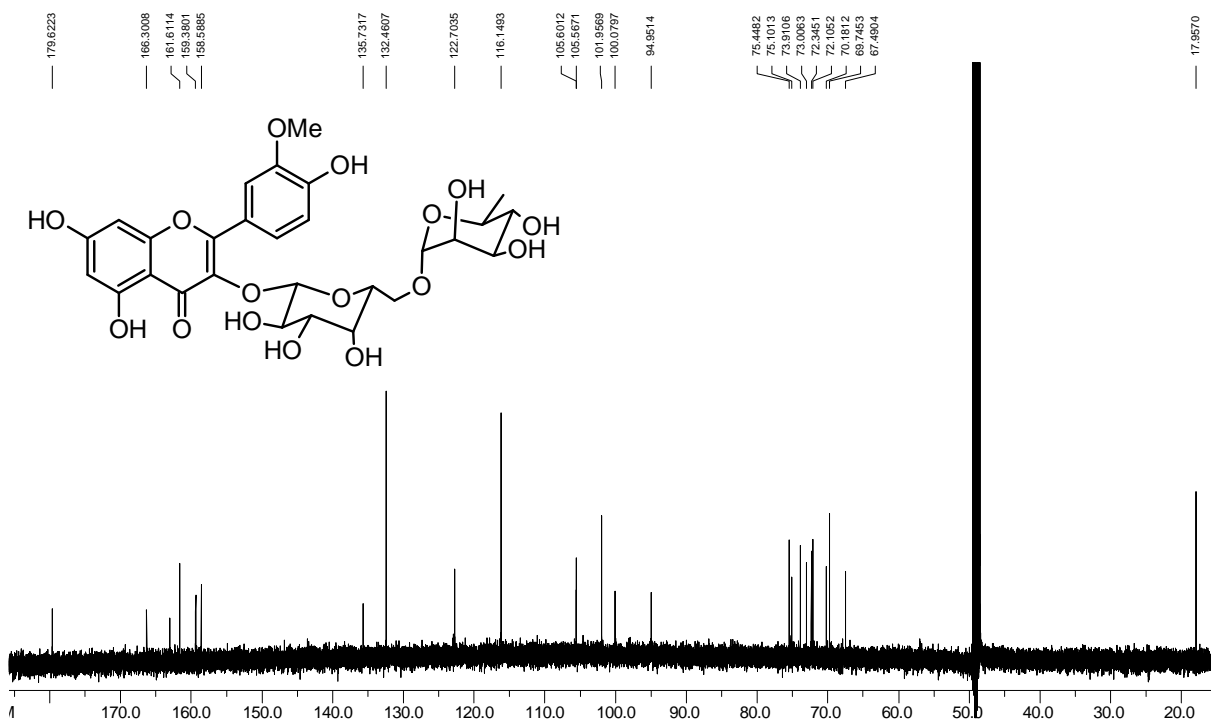
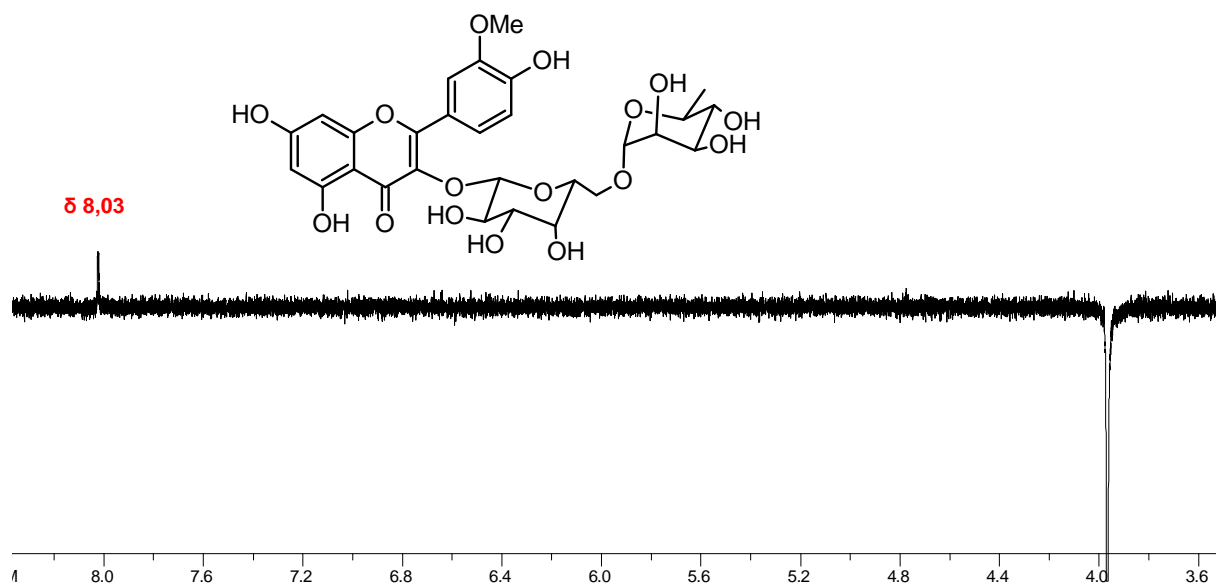
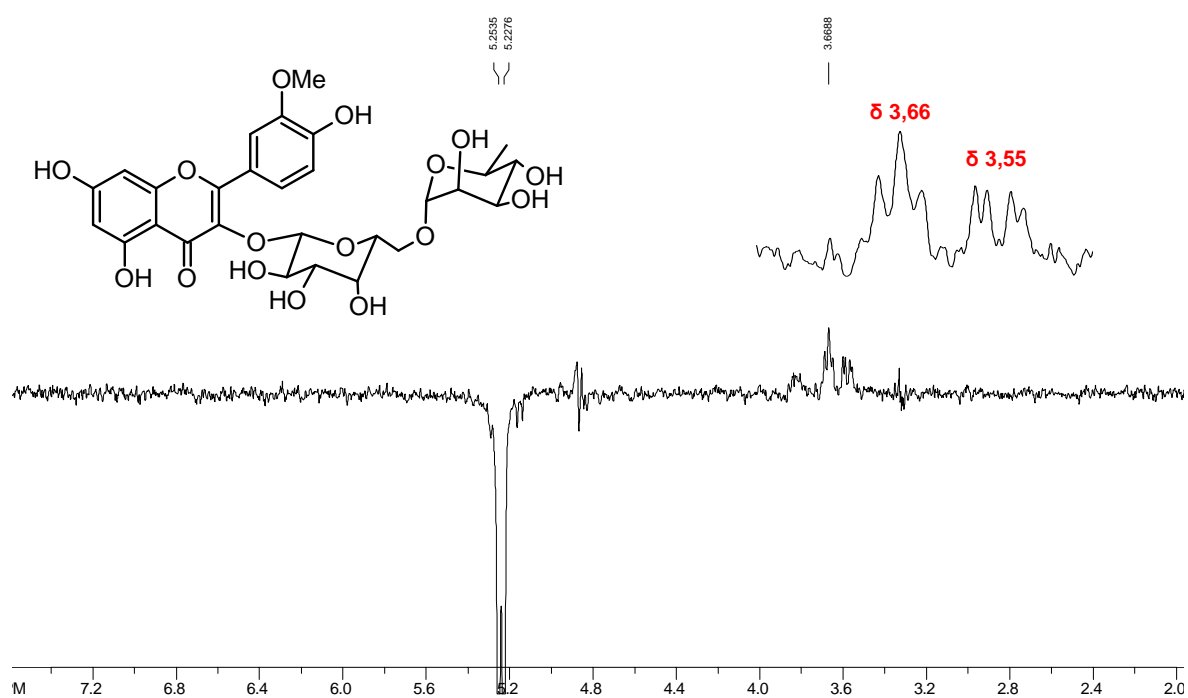
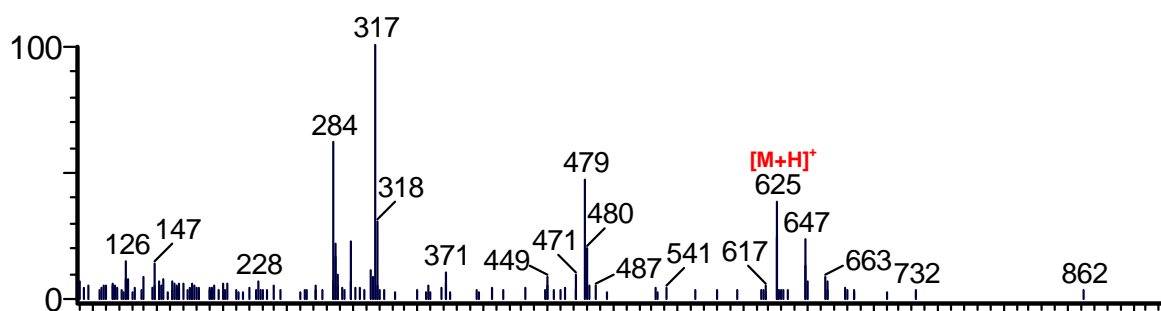
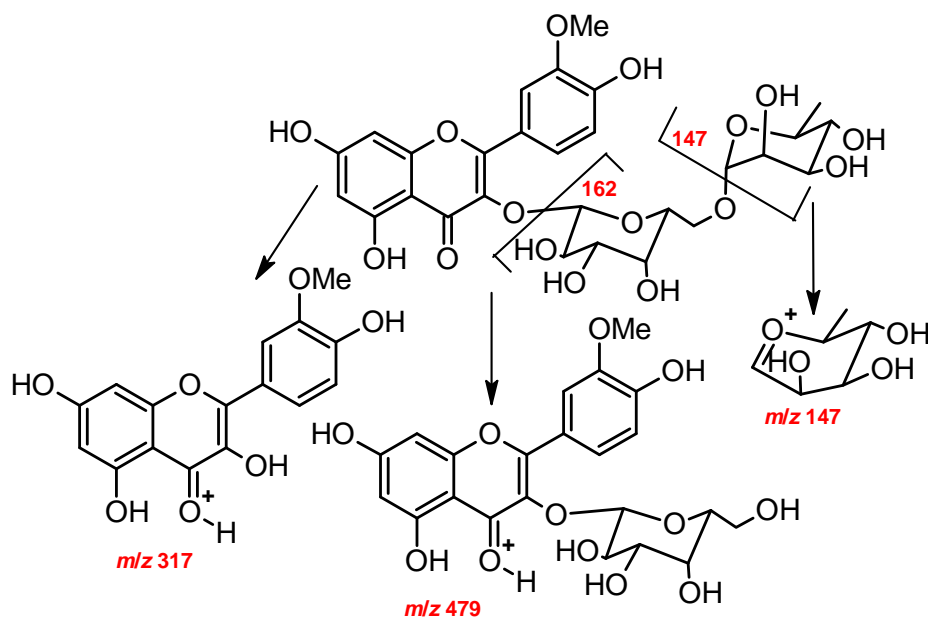


Figura 83: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **20** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).

Figura 84: Espectro gNOESY 1D do flavonóide **20** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz).Figura 85: Espectro gNOESY 1D do flavonóide **20** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz).Figura 86: Espectro de massas do composto **20** (ESI, + 70 eV).

Esquema 8: Proposta de fragmentação do flavonóide **20**.Tabela 18: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **20** (11,7 T,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ,  $J$  em Hz).

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	—	—
2	—	158,9
3	—	135,5
4	—	179,5
5	—	163,1
6	6,22 ( <i>d</i> ; 1,7)	100,0
7	—	166,2
8	6,42 ( <i>d</i> ; 1,7)	94,9
9	—	158,5
10	—	105,7
1'	—	123,0
2'	8,03 ( <i>d</i> ; 2,0)	114,7
3'	—	148,4
4'	—	150,9
5'	6,91 ( <i>d</i> ; 8,5)	116,0
6'	7,61 ( <i>dd</i> ; 8,5 e 2,0)	123,8
1''	5,22 ( <i>d</i> ; 7,5)	105,0
2''	3,82 ( <i>dd</i> ; 9,3 e 7,5)	73,1
3''	3,55 ( <i>dd</i> ; 9,3 e 3,5)	75,1
4''	3,79 ( <i>dl</i> ; 3,5)	70,1
5''	3,66 ( <i>m</i> )	75,6
6 <sub>a</sub> ''	3,47 ( <i>dd</i> ; 10,5 e 7,0)	67,5
6 <sub>b</sub> ''	3,74 ( <i>dd</i> ; 10,5 e 5,5)	67,5
1'''	4,53 ( <i>d</i> ; 1,5)	102,0
2'''	3,58 ( <i>m</i> )	72,1
3'''	3,49 ( <i>dd</i> ; 9,5 e 3,4)	72,3
4'''	3,27 ( <i>t</i> ; 9,5)	73,9
5'''	3,53 ( <i>m</i> )	69,8
6'''	1,18 ( <i>d</i> ; 6,3)	18,0
OMe-3'	3,97 ( <i>s</i> )	57,0

#### 4.9 Compostos nitrofeniletílicos e evolução de vegetais

Conforme mostrado pela tabela 3 (p. 30-32), os derivados nitrofeniletílicos foram identificados em diversas famílias botânicas. Além disso, essa classe de produtos naturais possui origens distintas dependendo da família angiospérmica (item 1.3; p. 27-29), e, portanto tem significância taxonômica somente quando sua distribuição é analisada por meio de abordagem holística que incluam dados metabolômicos, biossintéticos, quimiosistemáticos, genéticos e proteômicos.

De acordo com alguns autores, os glucosinolatos evoluíram baseando-se na pré-disposição para glicosídeos cianogênicos<sup>35, 36</sup>. Dados genéticos evidenciam que a enzima pós-oxima da via cianogênica sofreu alteração para uma enzima que converte oximas em compostos nitrados; estes por reações enzimáticas posteriores são convertidos em glucosinolatos<sup>35, 36, 52</sup>. Deste modo, esta alteração genética seria o marco divisório entre as vias dos glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos. Contudo, na literatura ainda persiste a questão se as enzimas pós-oxima da via dos glucosinolatos teriam evoluído a partir de enzimas ortólogas da via cianogênica, ou se foram recrutadas outras enzimas homólogas para catalisar esta etapa<sup>35, 36</sup>.

Baseando-se nos dados da literatura acerca da ocorrência e biogênese dos compostos C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-NO<sub>2</sub>, existem no mínimo duas hipóteses razoáveis que explicam a presença destes compostos nitrados em Aristolochiaceae, bem como sugerem a inserção desta família angiospérmica dentro de um contexto evolutivo: I) ocorreram mutações nos genes que codificam as enzimas envolvidas na oxidação dos aminoácidos para oximas; ou II) ocorreram alterações nos genes envolvidos na metabolização das oximas. Porém, dependendo da hipótese, Aristolochiaceae seria inserida dentro de contextos evolutivos distintos.

Considerando a hipótese I, os compostos C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-NO<sub>2</sub>, em Aristolochiaceae, seriam originados por um caminho diferente do observado para plantas produtoras de glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos. Por outro lado, considerando a hipótese II, os genes biossintéticos de compostos C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-NO<sub>2</sub>, em Aristolochiaceae, poderiam conter informações valiosas acerca da passagem da via dos glicosídeos cianogênicos para a via dos glucosinolatos. Contudo, independente da hipótese, I ou II, Aristolochiaceae pode ter evoluído no sentido de formação de compostos nitrados, visando atender alguma necessidade adaptativa ao longo da evolução.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo químico do extrato acetônico de caules e raízes de *A. melastoma* resultou no isolamento e identificação de 20 compostos conhecidos [aristolactama (1); lignana dibenzilbutânica (2); derivados C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub> (3, 14, 16 e 17); derivados C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> (4 e 5); ácidos aristolóquicos e aristolocatos de sódio (6-9 e 11); alcalóide (10); esteróide glicosilado (12); poliól (13); nucleosídeos (15 e 18) e flavonóides glicosilados (19 e 20)]. Os compostos 1, 3-15 e 17-20 já foram descritos em outras espécies de Aristolochiaceae, enquanto os compostos 2 e 16 são relatados pela primeira vez nesta família angiospérmica.

Neste estudo, os valores dos  $\delta$  dos C-3,3' e C-4,4' da lignana dibenzilbutânica (2) são revisados. Além disso, os dados espectroscópicos (RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C) de 16, em DMSO-*d*<sub>6</sub>, e a atribuição completa dos valores de  $\delta$  relativos aos hidrogênios dos flavonóides 19 e 20 são apresentados.

A análise dos dados acerca da ocorrência e biogênese de derivados nitrofeniléticos sugere hipóteses evolutivas em Aristolochiaceae: 1) esta família pode ter evoluído no sentido de formação de compostos nitrados; 2) o sequenciamento dos genes biossintéticos de derivados nitrofeniléticos, presentes em espécies pertencentes à Aristolochiaceae, poderia ampliar o conhecimento atual da biogênese dos glucosinolatos, glicosídeos cianogênicos e compostos C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-NO<sub>2</sub>, bem como da evolução de plantas produtoras desses metabólitos secundários (especiais).

Além da relevância dos resultados citados, pode-se ressaltar ainda nesse trabalho a contribuição dada para o conhecimento da composição química das espécies de Aristolochiaceae, particularmente as do gênero *Aristolochia* que ocorrem no Estado de São Paulo, bem como o fornecimento de dados que poderão facilitar futuros estudos sobre isolamento e identificação de compostos afins.

## REFERÊNCIAS

- 1 THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.141, p. 399-436, 2003.
- 2 WANKE, S.; GONZÁLEZ, F.; NEINHUIS, C. Systematics of Pipevines: combining morphological and fast-evolving molecular characters to investigate the relationships within subfamily Aristolochioideae (Aristolochiaceae). **International Journal of Plant Sciences**, v. 167, n. 6, p. 1215-1227, 2006.
- 3 LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R.; SILVA, T. Phytochemistry of the Aristolochiaceae family. **Research Advances in Phytochemistry**, v. 2, p. 19-108, 2001.
- 4 GONZÁLEZ, F. Hacia una filogenia de *Aristolochia* y sus congeneres neotropicales. **Caldasia**, v. 19, n. 1-2, p. 115-130, 1997.
- 5 WATANABE, K.; KAJITA, T.; MURATA, J. Chloroplast DNA variation and geographical structure of the *Aristolochia kaempferi* group (Aristolochiaceae). **American Journal of Botany**, v. 93, n. 3, p. 442-453, 2006.
- 6 GONZÁLEZ, F.; STEVENSON, D. W. A phylogenetic analysis of the subfamily Aristolochioideae (Aristolochiaceae). **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 26, p. 25-60, 2002.
- 7 HUBER, H. Aristolochiaceae. In: KUBITZKI, K.; ROHWER, J. G.; BITTRICH, V. **The families and genera of vascular plants**. Berlin: Springer, 1993. v. 2, p. 129-137.
- 8 OHI-TOMA, T.; SUGAWARA, T.; MURATA, H.; WANKE, S.; NEINHUIS, C.; MURATA, J. Molecular Phylogeny of *Aristolochia* sensu lato (Aristolochiaceae) based on sequences of *rbcL*, *matK*, and *phyA* genes, with special reference to differentiation of chromosome numbers. **Systematic Botany**, v. 31, n. 3, p. 481-492, 2006.
- 9 BERJANO, R.; ROA, F.; TALAVERA, S.; GUERRA, M. Cytotaxonomy of diploid and polyploid *Aristolochia* (Aristolochiaceae) species based on the distribution of CMA/DAPI bands and 5S and 45S rDNA sites. **Plant Systematics and Evolution**, v. 280, p. 219-227, 2009.
- 10 HOEHNE, F. C. **Flora brasileira: Aristolochiaceae**. São Paulo: Instituto de Botânica de São Paulo, 1942. v. 15, pt. 2.
- 11 FRANCISCO, C. S.; MESSIANO, G. B.; LOPES, L. M. X.; TININIS, A. G.; OLIVEIRA, J. E. de; CAPPELARI JUNIOR, L. Classification of *Aristolochia* species based on GC-MS and chemometric analyses of essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, n. 1, p. 168-175, 2008.

- 12 SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: um guia para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.
- 13 LEITÃO, G. G.; KAPLAN, M. A. C. Química do gênero *Aristolochia*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 73, p. 65-75, 1992.
- 14 KUMAR, V.; POONAM; PRASAD, A. K.; PARMAR, V. S. Naturally occurring aristolactams, aristolochic acids and dioxoaporphines and their biological activities. **Natural Products Reports**, v. 20, p. 565-583, 2003.
- 15 WU, T-S.; DAMU, A. G.; SU, C-R.; KUO, P-C. Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities. **Natural Products Reports**, v. 21, p. 594-624, 2004.
- 16 PACHECO, A. G.; OLIVEIRA, P. M. de; PILÓ-VELOSO, D.; ALCÂNTARA, A. F. C. <sup>13</sup>C-NMR data of diterpenes isolated from *Aristolochia* species. **Molecules**, v. 14, p. 1245-1262, 2009.
- 17 HALKIER, B. A.; MØLLER, B. L. The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants. Identification of three hydroxylation steps in the biosynthesis of dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench and the involvement of 1-*aci*-nitro-2-(*p*-hydroxyphenyl)ethane as an intermediate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 3, p. 21114-21121, 1990.
- 18 BRAKUNI, D. S.; RAWAT, D. S. **Bioactive marine natural products**. New Delhi: Springer, 2005.
- 19 WANG, X-K.; ZHAO, Y-R.; ZHAO, T-F.; LAI, S.; CHE, C-T. 1-Nitroaknadinine from *Stephania sutchuenensis*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 1, p. 263-265, 1994.
- 20 GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T.; MORS, W. B. On the biogenesis of organic nitroderivatives and propenylbenzenes. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 33, n. 3-4, p. 301-303, 1961.
- 21 WINKLER, R.; HERTWECK, C. Biosynthesis of nitro compounds. **ChemBioChem**, v. 8, p. 973-977, 2007.
- 22 RATNAYAKE, A. S.; HALTLI, B.; FENG, X.; BERNAN, V. S.; SINGH, M. P.; HE, H.; CARTER, G. T. Investigating the biosynthetic origin of the nitro group in Pyrrolomycin. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 11, p. 1923-1926, 2008.
- 23 CARTER, G. T.; NIETSCHKE, J. A.; GOODMAN, J. J.; TORREY, M. J.; DUNNE, T. S.; SIEGEL, M. M.; BORDERS, D. B. Direct biochemical nitration in the biosynthesis of dioxapyrrolomycin. A unique mechanism for the introduction of nitro groups in microbial products. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p. 1271-1273, 1989.
- 24 KERS, J. A.; WACH, M. J.; KRASNOFF, S. B.; WIDOM, J.; CAMERON, K. D.; BUKHALID, R. A.; GIBSON, D. M.; CRANE, B. R.; LORIA, R. Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase. **Nature**, v. 429, p. 79-82, 2004.

- 25 PATAI, S. **The chemistry of amino, nitroso, nitro and related groups. Part 1.** Chichester: John Wiley & Sons, 1996.
- 26 BAXTER, R. L.; HANLEY, A. B.; CHAN, H. W. S.; GREENWOOD, S. L.; ABBOT, E. M.; McFARLANE, I. J.; MILNE, K. Fungal biosynthesis of 3-nitropropanoic acid. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1**, p. 2495-2502, 1992.
- 27 CANDLISH, E.; LA CROIX, L. J.; UNRAU, A. M. The biosynthesis of 3-nitropropionic acid in creeping indigo (*Indigofera spicata*). **Biochemistry**, v. 8, n. 8, p. 182-186, 1969.
- 28 HE, J.; HERTWECK, C. Iteration as programmed event during polyketide assembly; molecular analysis of the aureothin biosynthesis gene cluster. **Chemistry & Biology**, v. 10, p. 1225-1232, 2003.
- 29 WINKLER, R.; HERTWECK, C. Sequential enzymatic oxidation of aminoarenes to nitroarenes via hydroxylamines. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, p. 4083-4087, 2005.
- 30 LEE, J.; ZHAO, H. Mechanistic studies on the conversion of arylamines into aryl nitro compounds by aminopyrrolnitrin oxygenase: identification of intermediates and kinetic studies. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, p. 622-625, 2006.
- 31 GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Occurrence of 1-nitro-2-phenylethane in *Ocotea pretiosa* and *Aniba canelilla*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 24, n. 12, 2070-2071, 1959.
- 32 MATSUO, M.; KIRKLAND, D. F.; UNDERHILL, E. W. 1-nitro-2-phenylethane, a possible intermediate in the biosynthesis of benzylglucosinolate. **Phytochemistry**, v. 11, p. 697-701, 1972.
- 33 TIEMAN, D.; TAYLOR, M.; SCHAUER, N.; FERNIE, A. R.; HANSON, A. D.; KLEE, H. J. Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 21, p. 8287-8292, 2006.
- 34 SEIGLER, D. S.; PAULI, G. F.; FRÖHLICH, R.; WEGELIUS, E.; NAHRSTEDT, A.; GLANDER, K. E.; EBINGER, J. E. Cyanogenic glycosides and menisdaurin from *Guazuma ulmifolia*, *Ostrya virginiana*, *Tiquilia plicata*, and *Tiquilia canescens*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 13, p. 1567-1580, 2005.
- 35 HALKIER, B. A.; GERSHENZON, J. Biology and biochemistry of glucosinolates. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 303-333, 2006.
- 36 BAK, S.; PAQUETTE, S. M.; MORANT, M.; MORANT, A. V.; SAITO, S.; BJARNHOLT, N.; ZAGROBELNY, M.; JØRGENSEN, K.; OSMANI, S.; SIMONSEN, H. T.; PÉREZ, R. S.; BORDIER, VAN HEESWIJCK, T. B.; JØRGENSEN, B.; MØLLER, B. L. Cyanogenic glycosides: a case study for evolution and application of cytochromes P450. **Phytochemistry Review**, v. 5, p. 309-329, 2006.



- 37 UNDERHILL, E. W. Biosynthesis of mustard oil glucosides: conversion of phenylacetaldehyde oxime and 3-phenylpropionaldehyde oxime to glucotropaeolin and gluconasturtiin. **European Journal of Biochemistry**, v. 2, p. 61-63, 1967.
- 38 MØLLER, B. L.; CONN, E. E. The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants. *N*-Hydroxytyrosine as an intermediate in the biosynthesis of dhurrin by *Sorghum bicolor* (Linn) Moench. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 17, p. 8575-8583, 1979.
- 39 HALKIER, B. A.; OLSENS, C. E.; MØLLER, B. L. The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants. The (E)- and (Z)-isomers of *p*-hydroxyphenylacetaldehyde oxime as intermediates in the biosynthesis of dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 33, p. 19487-19494, 1989.
- 40 HALKIER, B. A.; LYKKESFELDT, J.; MØLLER, B. L. 2-Nitro-3-(*p*-hydroxyphenyl)propionate and *aci*-1-nitro-2-(*p*-hydroxyphenyl)ethane, two intermediates in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 487-491, 1991.
- 41 SIBBESEN, O.; KOCH, B.; HALKIER, B. A.; MØLLER, B. L. Isolation of the heme-thiolate enzyme cytochrome P-450<sub>TYR</sub>, which catalyzes the committed step in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 9740-9744, 1994.
- 42 SIBBESEN, O.; KOCH, B.; HALKIER, B. A.; MØLLER, B. L. Cytochrome P-450<sub>TYR</sub> is a multifunctional heme-thiolate enzyme catalyzing the conversion of L-tyrosine to *p*-hydroxyphenylacetaldehyde oxime in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 8, p. 3506-3511, 1995.
- 43 DU, L.; LYKKESFELDT, J.; OLSEN, C. E.; HALKIER, B. A. Involvement of cytochrome P450 in oxime production in glucosinolate biosynthesis as demonstrated by an *in vitro* microsomal enzyme system isolated from jasmonic acid-induced seedlings of *Sinapis alba* L. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 12505-12509, 1995.
- 44 DU, L.; HALKIER, B. A. Isolation of a microsomal enzyme system involved in glucosinolate biosynthesis from seedlings of *Tropaeolum majus* L. **Plant Physiology**, v. 111, p. 831-837, 1996.
- 45 HALKIER, B. A.; DU, L. The biosynthesis of glucosinolates. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 11, p. 425-431, 1997.
- 46 KAHN, R. A.; BAK, S.; SVENDSEN, I. B.; HALKIER, B. A.; MØLLER, B. L. Isolation and reconstitution of cytochrome P450<sub>ox</sub> and *in vitro* reconstitution of the entire biosynthetic pathway of the cyanogenic glucoside dhurrin from *Sorghum*. **Plant Physiology**, v. 115, p. 1661-1670, 1997.

- 47 JONES, P. R.; MØLLER, B. L.; HØJ, P. B. The UDP-glucose: *p*-hydroxymandelonitrile-*O*-glucosyltransferase that catalyzes the last step in synthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 50, p. 35483-35491, 1999.
- 48 KAHN, R. A.; FAHRENDORF, T.; HALKIER, B. A.; MØLLER, B. L. Substrate specificity of the cytochrome P450 enzymes CYP79A1 and CYP71E1 involved in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside ehurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 363, n. 1, p. 9-18, 1999.
- 49 ANDERSEN, M. D.; BUSK, P. K.; SVENDSEN, I. B.; MØLLER, B. L. Cytochromes P-450 from Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) catalyzing the first steps in the biosynthesis of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 3, p. 1966-1975, 2000.
- 50 CHENA, S.; ANDREASSON, E. Update on glucosinolate metabolism and transport. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 743-758, 2001.
- 51 BAK, S.; FEYEREISEN, R. The involvement of two P450 enzymes, CYP83B1 and CYP83A1, in auxin homeostasis and glucosinolate biosynthesis. **Plant Physiology**, v. 127, p. 108-118, 2001.
- 52 HANSEN, C. H.; DU, L.; NAUR, P.; OLSEN, C. E.; AXELSEN, K. B.; HICK, A. J.; PICKET, J. A.; HALKIER, B. A. CYP83B1 is the oxime-metabolizing enzyme in the glucosinolate pathway in *Arabidopsis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 27, p. 24790-24796, 2001.
- 53 FORSLUND, K.; MORANT, M.; JØRGENSEN, B.; OLSEN, C. E.; ASAMIZU, E.; SATO, S.; TABATA, S.; BAK, S. Biosynthesis of the nitrile glucosides rhodiocyanoside A and D and the cyanogenic glucosides lotaustralin and linamarin in *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, v. 135, p. 71-84, 2004.
- 54 YAN, X.; CHEN, S. Regulation of plant glucosinolate metabolism. **Planta**, v. 226, p. 1343-1352, 2007.
- 55 SPENDER, I. D.; TIWARI, H. P. Biosynthesis of aristolochic acid. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 2, p. 55-56, 1966.
- 56 SCHÜTTE, H. R.; ORBAN, U.; MOTHES, K. Biosynthesis of aristolochic acid. **European Journal of Biochemistry**, v. 1, p. 70-72, 1967.
- 57 COMER, F.; TIWARI, H. P.; SPENDER, I. D. Biosynthesis of aristolochic acid. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 47, p. 481-487, 1969.
- 58 SHARMA, V.; JAIN, S.; BHAKUNI, D. S.; KAPIL, R. S. Biosynthesis of aristolochic acid. **Journal of Chemical Society, Perkin Transactions I**, v. 5, p. 1153-1155, 1982.
- 59 CASTEDO, L.; SUAU, R.; MOURIÑO, A. A revised structure for pontevodrine. **Tetrahedron Letters**, v. 6, p. 501-502, 1976.

- 60 PRIESTAP, H. A. Seven aristololactams from *Aristolochia argentina*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 4, p. 849-852, 1985.
- 61 PRIESTAP, H. A. Two carboxy- and two hydroxymethyl-sustituted aristololactams from *Aristolochia argentina*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 12, p. 3035-3039, 1985.
- 62 YUAN, J.; LIU, Q.; ZHU, W.; DING, L.; TANG, F.; YAO, S. Simultaneous analysis of six aristolochic acids and five aristolactams in herbal plants and their preparations by high-performance liquid chromatography-diode array detection-fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1182, p. 85-92, 2008.
- 63 LEE, H. S.; HAN, D. S. A new acylated *N*-glycosyl lactam from *Aristolochia contorta*. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 1165-1169, 1992.
- 64 LIN, W.; FU, H-Z.; HANO, Y.; NOMURA, T. Alkaloids from the roots of *Aristolochia triangularis* (l). **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 8-13, 1997.
- 65 CHEN, T. Genotoxicity of aristolochic acid: a review. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 15, n. 4, p. 387-399, 2007.
- 66 MARTENA, M. J.; WIELEN, J. C. A.; LAAK, L. F. J.; KONINGS, E. J. M.; GROOT, H. N.; RIETJENS, I. M. C. M. Enforcement of the ban on aristolochic acids in chinese traditional herbal preparations on the dutch market. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 263-275, 2007.
- 67 HOUGHTON, P. J.; OGUTVEREN, M. Aristolochic acids and aristolactams from *Aristolochia auricularia*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 1, p. 253-254, 1991.
- 68 WU, T. S.; OU, L. F.; TENG, C. M. Aristolochic acids, aristolactam alkaloids and amides from *Aristolochia kankauensis*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 4, p. 1063-1068, 1994.
- 69 BARROS, F. de; CAPELLARI JUNIOR, L. Flora da serra do cipó, Minas Gerais: Aristolochiaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 22, n. 1, p. 15-18, 2004.
- 70 CAPELLARI JUNIOR, L. **Espécies de Aristolochia L. (Aristolochiaceae) ocorrentes no estado de São Paulo**. 1991. 221 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.
- 71 SILVA-BRANDÃO, K. L.; SOLFERINI, V. N.; TRIGO, J. R. Chemical and phylogenetic relationships among *Aristolochia* L. (Aristolochiaceae) from southeastern Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 291-302, 2006.
- 72 PORTO, A. L. M. **Estudo fitoquímico de *Aristolochia melastoma* Manso**. 1994. 32 f. Monografia (Bacharelado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1994.

- 73 TSURUTA, A.Y.; BOMM, M. E.; LOPES, M. N.; LOPES, L. M. X. Aristolactams and further constituents from *Aristolochia chamissonis*. **Eclética Química**, v. 27, p. 103, 2002.
- 74 CHIANG, C-Y.; LEU, Y-L.; CHAN, Y-Y.; WU, T-S. Sodium aristolochates from the flowers and fruits of *Aristolochia zollingeriana*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 45, p. 93-97, 1998.
- 75 LEU, Y-L.; CHAN, Y-Y.; WU, T-S. Sodium aristolochate derivatives from leaves of *Aristolochia faveolata*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 4, p. 743-745, 1998.
- 76 NASCIMENTO, I. R. **Síntese estereosseletiva de neolignanas diidrobenzofurânicas e estudo fitoquímico de *Aristolochia pubescens* Will.** 2002. 245 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.
- 77 ACHENBACH, H.; FREY, D.; WAIBEL, R. 6a,7-Dehydro-2-hydroxy-4,5-dioxonoraporphine and other alkaloids from *Monocyclanthys vignei*: <sup>13</sup>C-NMR studies on 4,5-dioxoaporphines. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 5, p. 1331-1336, 1991.
- 78 HECHT, S. M.; ELBAN, M. A.; CHAPUIS, J. C.; LI, M. Synthesis and biological evaluation of cepharadiones A and B and related dioxoaporphines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 6119-6125, 2007.
- 79 URZÚA, A.; FREYER, A. J.; SHAMMA, M. Aristolodione, a 4,5-dioxoaporphine from *Aristolochia chilensis*. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 2, p. 305-306, 1987.
- 80 AGRAWAL, P. K.; RASTOGI, R. P. Two lignans from *Cedrus deodara*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 6, p. 1459-1461, 1982.
- 81 CHEN, C. C.; HSIN, W. C.; HUANG, Y. L. Six new diarylbutane lignans from *Justicia procumbens*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 2, p. 227-229, 1998.
- 82 CHÊNEVERT, R.; ROSE, Y. S. A chemoenzymatic synthesis of both enantiomers of a *cis*-lignan lactone. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 9, p. 2827-2831, 1998.
- 83 ZHOU, Y.; GAO, G.; LI, H.; QU, J. A convenient method to reduce hydroxyl-substituted aromatic carboxylic acid with NaBH<sub>4</sub>/Me<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/B(OMe)<sub>3</sub>. **Tetrahedron Letter**, v. 49, p. 3260-3263, 2008.
- 84 PENG, Y.; LUO, L.; LU, Q.; CHEN, X.; XIE, Y.; CHEN, L.; YANG, W.; DU, S. HPLC analysis, semi-preparative HPLC preparation and identification of three impurities in salidroside bulk drug. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 828-832, 2009.
- 85 YU, P.; HU, C.; MEEHAN, E. J.; CHEN, L. X-ray crystal structure and antioxidant activity of salidroside, a phenylethanoid glycoside. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, p. 508-513, 2007.

- 86 MIYASE, T.; UENO, A.; TAKIZAWA, N.; KOBAYASHI, H.; OGUCHI, H. Ionone and lignan glycosides from *Epimedium diphyllum*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 3483-3485, 1989.
- 87 ERDEMGIL, F. Z.; BASE, K. H. C.; AKBAY, P.; STICHER, O.; ÇALIS, I. Thalictricoside, a new phenolic compounds from *Thalictrum orientale*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 58c, p. 632-636, 2003.
- 88 SU, Y.; ZHANG, Z.; GUO, C. A new nitroethylpenolic glycoside from *Semiaquilegia adoxoides*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 3-4, p. 420-423, 2004.
- 89 COLLINS, P. M.; FERRIER, R. J. **Monosacharides their chemistry and their roles in natural products**. New York: John Willey & Sons, 1980.
- 90 INA, H.; IIDA, H. Isolation and structure of thalictoside. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, p. 726-729, 1986.
- 91 FORGACS, P.; DESCONCLOIS, J. F.; PROVOST, J.; TIBERGHEN, R.; TOUCHÉ, A. Un nouvel heteroside nitré extrait d' *Annona squamosa*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 6, p. 1251-1252, 1980.
- 92 O'CONNOR, C. J.; McLENNAN, D. J.; CALVERT, D. J.; MITHA, A. S. H. Substituent effects on the N.M.R. spectra of carboxylic acid derivatives. IV. <sup>13</sup>C N.M.R. spectra of *para*-substituted phenols, phenylureas and phenyl propionates. **Australian Journal of Chemistry**, v. 40, p. 677-86, 1987.
- 93 GONZÁLEZ-BARÓ, A. C.; PARAJÓN-COSTA, B. S.; FRANCA, C. A.; PIS-DIEZ. Theoretical and spectroscopic study of vanillic acid. **Journal of Molecular Structure**, v. 889, p. 204-210, 2009.
- 94 FAIZI, S.; ALI, M.; SALEEM, R.; IRFANULLAH.; BIBI, S. Complete <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C NMR assignments of stigma-5-em-3-O-β-glucoside and its acetyl derivative. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 39, p. 399-405, 2001.
- 95 KIM, Y. J.; YEAN, M. H.; LEE, E. J.; KIM, J. S.; LEE, J-H.; KANG, S. S. Phytochemical studies on paeoniae radix (4) – cerebrosides and other constituents. **Natural Product Sciences**, v. 14, n. 3, p. 161-166, 2008.
- 96 BREITMAIER, E. **Structure elucidation by NMR in organic chemistry**. Chichester: John Willey & Sons, 2002.
- 97 PASCOLI, I. C. **Estudo fitoquímico de *Aristolochia lagesiana* Ule. var. *intermedia* Hoehne (Aristolochiaceae)**. 2006. 277 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- 98 ARRUDA, P. V. de; RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, n. 27, p. 56-62, 2007.

- 99 SAITO, Y.; NYILAS, A.; AGROFOGLIO, L. A. Synthesis of isotopically labeled -[1'-<sup>13</sup>C]ribonucleoside phosphoramidites. **Carbohydrate Research**, v. 331, p. 83-90, 2001.
- 100 FÖLDESI, A.; KUNDU, M. K.; DINYA, Z.; CHATTOPADHYAYA, J. Synthesis of [2-<sup>2</sup>H<sup>1</sup>]-ribonucleosides. **Helvetica Chimica Acta**, v. 87, p. 742-757, 2004.
- 101 MANZOCCHI, A.; CIUFFREDA, P. Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectral assignment of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adenosine, 2'-deoxyadenosine and their acetate derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 45, p. 781-784, 2007.
- 102 BUTORA, G.; SCHMITT, C.; LEVORSE, D. A.; STRECKFUSS, E.; DOSS, G. A.; MacCOSS, M. The elusive 8-fluoroadenosine: a simple non-enzymatic synthesis and characterization. **Tetrahedron**, v. 63, p. 3781-3789, 2007.
- 103 RASTRELLI, L.; SATURNINO, P.; SCHETTINO, O.; DINI, A. Studies on the constituents of *Chenopodium pallidicaule* (Canihua) seeds. Isolation and characterization of two new flavonol glycosides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2020-2024, 1995.
- 104 MBARK, A. N.; CHARROUF, Z.; GUILLAUME, D.; KOL, O. Studies in plant science: book review. **Phytochemistry**, v. 52, n. 6, p. 1177-1180, 1999.
- 105 KOMISSARENKO, N. F.; CHERNOBAI, V. T.; KOLESNIKOV, D. G. Keioside, a new flavonoglucoside of *Convallaria keiskei*. **Chemical Pharmaceutical Research Institute**, v. 158, n. 4, p. 904-906, 1964.