

JULIANA CRISTINA HOLZBACH

**INVESTIGAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ESPÉCIES DE *Aristolochia* DO  
CERRADO: ESTUDO DOS CAULES DE *Aristolochia urupaensis* E DE FLORES  
DE *Aristolochia trulliformis***

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

Orientadora: Profa. Dra. Isabele  
Rodrigues Nascimento

Araraquara

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

H762i Holzbach, Juliana Cristina  
Investigação da composição química de espécies de *Aristolochia* do cerrado: estudo dos caules de *Aristolochia urupaensis* e de flores de *Aristolochia trulliformis* / Juliana Cristina Holzbach. – Araraquara : [s.n.], 2018  
188 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química  
Orientador: Isabele Rodrigues Nascimento

1. Produtos naturais. 2. *Aristolochia*. 3. Cerrados.  
4. Flores. 5. Química orgânica. I. Título.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação  
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

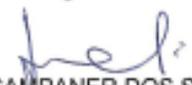
TÍTULO DA TESE: "Investigação da Composição Química de Espécies de *Aristolochia* do Cerrado: Estudo dos Caules de *Aristolochia urupaensis* e de Flores de *Aristolochia trulliformis*"

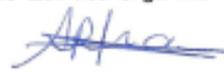
**AUTORA: JULIANA CRISTINA HOLZBACH**

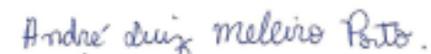
**ORIENTADORA: ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof.ª Dr.ª ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO  
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

  
Prof.ª Dr.ª LOURDES CAMPANER DOS SANTOS  
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

  
Prof.ª Dr.ª ÂNGELA REGINA ARAUJO  
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

  
Prof. Dr. ANDRÉ LUIZ MELEIRO PORTO  
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - USP - São Carlos

  
Prof. Dr. JOÃO HENRIQUE GHILARDI LAGO  
Centro de Ciências Naturais e Humanas / Universidade Federal do ABC - UFABC - Santo André

Araraquara, 26 de abril de 2018

## DADOS CURRICULARES

### JULIANA CRISTINA HOLZBACH

#### DADOS PESSOAIS

Nascimento: 28/07/1986

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Toledo – PR

Profissão: Química

Endereço Profissional: Rua Badejós, Lote 7, Chácaras 69/72, Zona Rural, Caixa Postal 66, 77402-970, Gurupi –TO.

Endereço eletrônico: juholzbach@uft.edu.br

#### FORMAÇÃO ACADÊMICA

Graduação: Bacharelado em Química

Instituição: Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Monografia: Produtos Naturais: Importância e conflitos na variabilidade de espécies utilizadas com a mesma denominação popular.

Orientadora: Profa. Dra. Conceição de Fátima Alves Olguin

Período: 01/03/2004 – 21/12/2007

Mestrado: Química, Área de Concentração – Química Orgânica

Instituição: Universidade Estadual Paulista – Unesp, Instituto de Química de Araraquara

Dissertação: Aristolactamas e alcanidas isoladas de *Aristolochia gigantea* Mart.

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Maria Xavier Lopes

Bolsa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior – CAPES

Período: 01/03/2009 – 28/02/2011

## ATUAÇÃO PROFISSIONAL

- 2008 – 2009** Professora substituta na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Medianeira
- 2011 – 2012** Professora no Centro Universitário de Gurupi (Unirg)
- 2012 – Atual** Professora adjunta nível I na Universidade Federal do Tocantins – Campus de Gurupi

## PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

### Artigos completos publicados em periódicos

HOLZBACH, J. C.; NASCIMENTO, I. R.; LOPES, L. M. X. Phenylethylpyranone and aristolochic acid derivatives from *Aristolochia urupaensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 2275-2279, 2017.

HOLZBACH, J. C.; BARROS, E. I. T. M.; KRAUSER, M. O.; LEAL, P. V. B. Chumbo: Uma introdução à extração e a fitorremediação. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, p. 178-183, 2012.

LEAL, P. V. B.; GREGORIO, A. M.; FARIA, E. O.; SILVA, P. R.; KRAUSER, M. O.; HOLZBACH, J. C. Estudo da adsorção do corante azul de metileno em resíduos de babaçu. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, p. 166-171, 2012.

HOLZBACH, J. C.; LOPES, L. M. X. Aristolactams and alkaloids of *Aristolochia gigantea*. **Molecules**, v. 15, p. 9462-9472, 2010.

SIMÕES, M. R.; COSTA, T. A.; SOUZA, M. L.; HOLZBACH, J. C.; CARNEIRO, L. B.; GUBIANI, A. M. Análise físico-química de linguiças coloniais comercializadas no município de Toledo, Estado do Paraná e comparação com valores fornecidos pelos fabricantes. **Acta Scientiarum Technology**, v. 31, p. 221-224, 2009.

## Apresentação de trabalhos

HOLZBACH, J. C.; SOARES FILHO, W. A.; NASCIMENTO, I. R. Flavonols from flowers of *Aristolochia trulliformis* Mast. In: 6th Brazilian Conference on Natural Products and XXXII RESEM, 2017, Vitória.

SOARES FILHO, W. A.; NASCIMENTO, I. R.; CUNHA, C. L.; HOLZBACH, J. C. Flavonoides e lignanas de flores de *Aristolochia* sp. In: XXIX Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2017, Araraquara.

SOARES, D. F.; HOLZBACH, J. C. Análise química e biológica dos extratos obtidos das folhas da espécie *Clitoria guianensis* Benth. In: XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2016, Belo Horizonte.

CUNHA, C. L.; SOARES, D. F.; AMUI, G. C.; FARIA, E. O.; HOLZBACH, J. C. Avaliação da atividade antioxidante e de toxicidade frente à *Artemia salina* dos extratos das folhas e raízes de *Clitoria guianensis*. In: 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2015, Águas de Lindóia.

CUNHA, C. L.; HOLZBACH, J. C. Estudo fitoquímico do extrato de acetato de etila das raízes da espécie *Clitoria guianensis*. In: 11º Seminário de Iniciação Científica da UFT, Universidade Federal do Tocantins, 2015, Gurupi-TO.

SOARES, D. F.; HOLZBACH, J. C. Análise das classes de metabólitos secundários presente no extrato de acetato de etila das folhas de *Clitoria guianensis*. In: 11º Seminário de Iniciação Científica da UFT, Universidade Federal do Tocantins, 2015, Gurupi-TO.

SANTOS, N. B. S.; LEAL, P. V. B.; HOLZBACH, J. C. Análise da água do córrego Mutuca de Gurupi-TO. In: VII Encontro Nacional de Química Ambiental, 2014, Brasília-DF.

CUNHA, C. L.; SOARES, D. F.; HOLZBACH, J. C. Diferentes abordagens para a seleção de espécies vegetais para estudos fitoquímicos. In: 1º Semana Acadêmica Integrada de Biotecnologia e Química, 2014, Gurupi-TO.

SOARES, D. F.; AMUI, G. C.; FARIA, E. O.; HOLZBACH, J. C. Avaliação da atividade antioxidante e de toxicidade frente à *Artemia salina* dos extratos das folhas de *Clitoria guianensis*. In: 10º Seminário de Iniciação Científica da UFT, Universidade Federal do Tocantins, 2014, Palmas-TO.

SANTOS, N. B. S.; LEAL, P. V. B.; HOLZBACH, J. C. Monitoramento da qualidade da água do córrego Mutuca - Gurupi/TO. In: 9º Seminário de Iniciação Científica da UFT, Universidade Federal do Tocantins, 2013, Palmas-TO.

HOLZBACH, J. C.; LOPES, L. M. X. Constituintes químicos isolados de *Aristolochia gigantea* Mart. In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia.

HOLZBACH, J. C.; SEBASTIEN, N. Y.; GABRIEL, E. A.; FORNARI, G. G.; OLSEN, M. F.; DIMER, O.; SOUZA, B. V. C.; ÁVILA, A. P.; JOHANN, A. S. T.; BENASSI, S. F. Avaliação da qualidade ambiental das microbacias dos rios São Francisco verdadeiro (SFV), São Francisco Falso (SFF) e do Ocoi-Paraná. In: XI Congresso Brasileiro de Limnologia, 2007, Macaé.

### **Participação em eventos**

XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2016, Belo Horizonte.

11º Seminário de Iniciação Científica da UFT, 2015, Gurupi.

10º Seminário de Iniciação Científica da UFT, 2014, Palmas.

52º Congresso Brasileiro de Química, 2012, Recife.

33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia.

Workshop dos Programas de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, 2009, Araraquara.

XVII Encontro Anual de Iniciação Científica, 2008, Foz do Iguaçu.

I Congresso Nacional de Engenharia de Pesca, Engenharia Química e Química, 2007, Toledo.

I Simpósio Regional de Gestão de Recursos Naturais e Educação Ambiental e IV Semana Acadêmica de Meio Ambiente da Unioeste/Campus de Toledo, 2007, Toledo.

IX Semana Acadêmica do Curso de Química e I Workshop de Educação em Química, 2006, Toledo.

XIV SBQSUL - "Química na Sociedade: significados e implicações", 2006, Erechim.

I Encontro Paranaense de Engenharia e Ciência, 2004, Toledo.

### **Orientações e supervisões concluídas**

SOARES FILHO, W. A. Estudo dos constituintes químicos presentes na fração acetato de etila do extrato etanólico Soxhlet de caules de *Aristolochia urupaensis*. 2017. Supervisão Científica, Graduação em Bacharelado em Química Tecnológica, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara.

SOARES, D. F. Análise química e biológica dos extratos brutos hexânico e acetato de etila obtidos das folhas de *Clitoria guianensis* Benth. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso, Graduação em Química Ambiental, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi.

CUNHA, C. L. Estudo do potencial químico e biológico das raízes de *Clitoria guianensis*. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso, Graduação em Química Ambiental, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, que sempre me incentivaram e me ajudaram a superar os obstáculos que surgiram em meu caminho, e que mesmo tão longe se fazem presentes em minha vida a cada instante do dia.

Aos meus irmãos, pelas conversas, risadas, por serem meus melhores amigos e por sempre estarem ao meu lado.

Ao meu amor Maike, por me apoiar e confortar em todos os momentos que precisei e por ser o pai mais incrível que já conheci.

À minha orientadora Profa. Dra. Isabele R. Nascimento, pelos ensinamentos, por ser uma pessoa a qual eu tenho um imenso carinho, sempre disposta a me escutar e aconselhar nos momentos em que mais precisei, por saber lidar com todas as adversidades que surgiram no decorrer desta Tese, sempre me amparando, consolando e preocupando com minha integridade física, psicológica e profissional. À ela sempre terei uma profunda admiração e respeito pelo ser humano que ela é.

À Profa. Dra. Lucia M. X. Lopes, pela orientação, apoio, incentivo e paciência que teve comigo durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Nivaldo Boralle, Dra. Lucinéia, Dra. Juliana Rodrigues e Ms. João pelas amizades e pela realização dos experimentos de RMN, dicroísmo circular e espectrometria de massas.

Aos colegas e amigos, em especial para o Dony, Camila, Marcelo, Maraylla, Rebeca e Walter. As minhas grandes amigas Carolina e Andressa por toda a amizade e esforço que fizeram para que esta Tese fosse entregue a tempo.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP, pelo auxílio financeiro.

*“O preço de qualquer coisa é a quantidade de vida que você troca por isso.”*

**Henry David Thoreau**

## RESUMO

Este trabalho descreve a elucidação estrutural dos constituintes químicos de duas espécies presentes no Cerrado: *Aristolochia urupaensis* Hoehne e *Aristolochia trulliformis* Mast. Os extratos etanólico e etanólico Soxhlet dos caules de *A. urupaensis* foram submetidos a processos cromatográficos, resultando no isolamento e identificação de 36 substâncias, entre as quais uma nova piranona, (2S)-2-[2'-(4-hidroxifenil)etil]-6-metil-2,3-diidro-4H-piran-4-ona, e três novos derivados de ácido aristolóquico (ácido 7-O-metil-aristolóquico F, aristolocato de sódio F e 7-O-metil-aristolocato de sódio F); além de outras cinco substâncias que estão sendo descritas pela primeira vez na família Aristolochiaceae: tirosol-1-O- $\beta$ -glicopiranosil-(6 $\rightarrow$ 1)-O- $\beta$ -xilopiranosídeo, a lignana (-)-9,9'-O-di-(E)-feruloil-secoisolariciresinol e os flavonoides quercetina-3-O- $\beta$ -glicopiranosil-(6 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -glicopiranosídeo, isoquercitrina e kaempferol-3-O-gentiobiosídeo. O extrato metanólico das flores de *A. trulliformis* foi submetido a processos cromatográficos e resultou no isolamento de doze substâncias, sendo sete flavonoides. Destaca-se o isolamento e elucidação estrutural do flavonoide kaempferol-3-O- $\beta$ -glicopiranosil-(6'' $\rightarrow$ 1''')-O- $\alpha$ -ramnopiranosil-(4''' $\rightarrow$ 1''')-O- $\beta$ -glicopiranosídeo descrito pela primeira vez na literatura. Todas as estruturas foram determinadas por análises espectroscópicas (RMN 1D e 2D, IV, UV, DC e  $[\alpha]_D$ ) e espectrométricas (EM).

**Palavras-chave:** *Aristolochia urupaensis*. *Aristolochia trulliformis*. Aristolochiaceae. Piranona. Ácido aristolóquico. Flavonoide.

## ABSTRACT

This work describes the structural elucidation of the chemical constituents of two species present in the Cerrado: *Aristolochia urupaensis* Hoehne and *Aristolochia trulliformis* Mast. The ethanolic and ethanolic Soxhlet extracts from the stems of *A. urupaensis* were submitted to chromatographic processes, resulting in 36 compounds, including a new pyranone, (S)-2-(4-hydroxyphenylethyl)-6-methyl-2,3-dihydro-4H-pyran-4-one, and three new aristolochic acid derivatives (7-O-methylaristolochic acid F, sodium 7-O-methylaristolochate F and sodium aristolochate F); in addition to five other compounds that were first reported in the Aristolochiaceae family: tyrosol-1-O- $\beta$ -xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-O- $\beta$ -glucopyranoside, the lignan (-)-9,9'-di-[O-(E)-feruloyl]secoisolariciresinol, and the flavonoids quercetin-3-O- $\beta$ -glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucopyranoside, isoquercitrin and kaempferol-3-O- $\beta$ -glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucopyranoside. Mast. were also studied. The methanolic extract of *Aristolochia trulliformis* flowers was submitted to chromatographic processes, resulting in the isolation of twelve compounds, including seven flavonoids. The flavonoid kaempferol-3-O- $\beta$ -glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucopyranoside is being described for the first time in the literature. All chemical structures were determined by spectroscopic (NMR 1D and 2D, IR, UV, CD and  $[\alpha]_D$ ) and spectrometric analyzes (MS).

**Keywords:** *Aristolochia urupaensis*. *Aristolochia trulliformis*. Aristolochiaceae. Piranone. Aristolochic acid. Flavonoid.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Exemplos de substâncias presentes em espécies da família Aristolochiaceae .....	23
<b>Figura 2</b> – Esqueleto químico de ácidos aristolóquicos (a) e aristolactamas (b) .....	24
<b>Figura 3</b> – Biossíntese dos ácidos aristolóquicos. Fonte: Adaptado de Tian-Shung et al. (2005) <sup>9</sup> .....	26
<b>Figura 4</b> – Biogênese de aristolactamas. Fonte: Adaptado de Tian-Shung et al. (2005) <sup>9</sup> e Lin et al. (1997) <sup>26</sup> .....	27
<b>Figura 5</b> – Ativação metabólica de AAs e análogos e formação de adutos com o DNA. Fonte: JADOT et al. (2017) <sup>30</sup> .....	29
<b>Figura 6</b> – Folha e flor de <i>A. urupaensis</i> . Fonte: Foto obtida por Juliana C. Holzbach .....	30
<b>Figura 7</b> – Substâncias isoladas e/ou identificadas dos caules de <i>A. urupaensis</i> ...	32
<b>Figura 8</b> - Procedimento para preparação dos extratos .....	36
<b>Figura 9</b> - Fracionamento do extrato etanólico de caules de <i>A. urupaensis</i> .....	38
<b>Figura 10</b> - Fracionamento do extrato etanólico Soxhlet de caules de <i>A. urupaensis</i> .....	39
<b>Figura 11</b> – Espectros de RMN de <sup>1</sup> H dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico, (c) etanólico e (d) etanólico Soxhlet dos caules de <i>A. urupaensis</i> .....	40
<b>Figura 12</b> – Espectros de RMN de <sup>1</sup> H dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico, (c) etanólico e (d) etanólico Soxhlet das folhas de <i>A. urupaensis</i> .....	41
<b>Figura 13</b> – Espectros de RMN de <sup>1</sup> H de: (a) extrato etanólico Soxhlet, (b) fração aquosa XAD-16, (c) fração metanólica XAD-16, (d) fração acetato de etila XAD-16	42
<b>Figura 14</b> – Correlações observadas no mapa de contornos HMBC (→) e no <sup>1</sup> H – <sup>1</sup> H COSY (↔) para a substância <b>1</b> .....	44
<b>Figura 15</b> – Comparação da feição espectral dos sinais de H-2, H-1' a/b e H-2' a/b com os resultados obtidos na simulação .....	45
<b>Figura 16</b> – Estrutura química da substância hepialona .....	46
<b>Figura 17</b> – Correlações observadas no mapa de contornos HMBC para estrutura <b>5</b> .....	49
<b>Figura 18</b> – Estrutura química do ácido aristolóquico F. ....	49
<b>Figura 19</b> – Formas α e β da D-glicose .....	65
<b>Figura 20</b> – Constantes de acoplamento para α e β-D-glicopiranosose <sup>64</sup> .....	66
<b>Figura 21</b> – Conformações propostas para os isômeros geométricos (a) <i>trans</i> e (b) <i>cis</i> . .....	68
<b>Figura 22</b> – Correlações observadas no mapa de contornos HMBC para a substância <b>34</b> .....	76
<b>Figura 23</b> – Detalhes das flores de <i>Aristolochia trulliformis</i> Mast. Fonte: Foto obtida por Juliana C. Holzbach .....	85
<b>Figura 24</b> – Estruturas florais em <i>Aristolochia</i> : limbo (lim), tubo (tub) e utrículo (utr). Flor em visão lateral (A) e frontal (B). Fonte: Imagens cedidas por Freitas, J. (2016) <sup>86</sup> .....	86

<b>Figura 25</b> – Sequência da visita de polinizadores e polinização das flores de <i>A. gigantea</i> . Fonte: Adaptado de Martin <i>et al.</i> (2016) <sup>80</sup> .....	88
<b>Figura 26</b> – Exemplos de substâncias isoladas das flores de espécies de <i>Aristolochia</i> .....	90
<b>Figura 27</b> – Imagem das flores da espécie <i>Ludwigia peruviana</i> sob radiação na região do visível (A) e do ultravioleta (B). Fonte: Gronquist, M. <i>et al.</i> (2001) <sup>95</sup> .....	91
<b>Figura 28</b> – Substâncias isoladas e/ou identificadas das flores de <i>Aristolochia trulliformis</i> .....	94
<b>Figura 29</b> – Fracionamento do extrato bruto das flores de <i>A. trulliformis</i> .....	97
<b>Figura 30</b> – Espectros de RMN de <sup>1</sup> H do extrato bruto (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ), fração aquosa (D <sub>2</sub> O), metanólica (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) e acetato de etila (CDCl <sub>3</sub> ) (14,1 T) .....	99
<b>Figura 31</b> – Perfis cromatográficos do (a) extrato bruto, (b) fração aquosa, (c) fração metanólica e (d) fração de acetato de etila (CLAE C-18, fase móvel MeOH/H <sub>2</sub> O 5→100% de MeOH em 60 minutos, λ 274 nm, vazão 1 mL/min) .....	99
<b>Figura 32</b> – Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para a substância <b>44</b> .....	106
<b>Figura 33</b> – Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para a substância <b>47</b> .....	110
<b>Figura 34</b> – Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para a substância <b>48</b> .....	113

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Classificação taxonômica da espécie <i>Aristolochia urupaensis</i> <sup>5</sup> .....	30
<b>Tabela 2</b> – Massas do material seco (g) e dos extratos da espécie <i>A. urupaensis</i> ..	40
<b>Tabela 3</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H de <b>1</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T).....	45
<b>Tabela 4</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H de <b>2</b> e <b>3</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T).....	47
<b>Tabela 5</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H de <b>4</b> e <b>5</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T).....	50
<b>Tabela 6</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H de <b>6</b> e <b>7</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T).....	51
<b>Tabela 7</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de <b>8</b> e <b>9</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T). .....	53
<b>Tabela 8</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H de <b>10</b> e <b>11</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T).....	55
<b>Tabela 9</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H <b>12</b> – <b>14</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T).....	56
<b>Tabela 10</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H de <b>15</b> e <b>16</b> (δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T). .....	58
<b>Tabela 11</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H de <b>17</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> = Hz, 7,1 T).....	59
<b>Tabela 12</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>18</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T).....	60
<b>Tabela 13</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>19</b> e <b>20</b> (δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T).....	63
<b>Tabela 14</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H de <b>21</b> e <b>24</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T).....	65
<b>Tabela 15</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H de <b>22</b> e <b>25</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T).....	65
<b>Tabela 16</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de <b>23</b> e <b>26</b> (δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T).....	67
<b>Tabela 17</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H de <b>27</b> – <b>29</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T).....	70
<b>Tabela 18</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de <b>30</b> (δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T).....	73
<b>Tabela 19</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de <b>31</b> (CD <sub>3</sub> OD, δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T).....	77
<b>Tabela 20</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>32</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T).....	78
<b>Tabela 21</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>33</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T).....	79
<b>Tabela 22</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>34</b> (CD <sub>3</sub> OD, δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T).....	80
<b>Tabela 23</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>35</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> = Hz, 7,1 T).....	81
<b>Tabela 24</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H de <b>36</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T).....	82
<b>Tabela 25</b> – Classificação taxonômica da espécie <i>Aristolochia trulliformis</i> <sup>5</sup> .....	85
<b>Tabela 26</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>37</b> , <b>38</b> e <b>39</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T) .....	102
<b>Tabela 27</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>40</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T)...	103
<b>Tabela 28</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>41</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T)...	104
<b>Tabela 29</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H de <b>42</b> e <b>43</b> (CD <sub>3</sub> OD, δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T) .....	105
<b>Tabela 30</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>44</b> (CD <sub>3</sub> OD, δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T).....	107
<b>Tabela 31</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>45</b> (CD <sub>3</sub> OD, δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T).....	108
<b>Tabela 32</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>46</b> (CD <sub>3</sub> OD, δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T).....	110
<b>Tabela 33</b> - Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>47</b> (CD <sub>3</sub> OD, δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T).....	111
<b>Tabela 34</b> - Dados de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C de <b>48</b> (CD <sub>3</sub> OD, δ, <i>J</i> = Hz, 14,1 T).....	113

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
AA	Ácidos aristolóquicos
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
AL	Aristolactamas
ATR	Reflexão Total Atenuada
BEM	Balkan Endemic Nephropathy
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
<i>d</i>	Dubleto
DAD	Detector de arranjo de diodos
DC	Dicroísmo circular
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
<i>dddd</i>	Duplo duplo duplo dubleto
<i>ddl</i>	Duplo dubleto largo
<i>dl</i>	Dubleto largo
<i>dq</i>	Duplo quadrupeto
<i>ddq</i>	Duplo duplo quadrupeto
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometria de massas
EtOH	Etanol
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
CG-EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HRMS	Espectro de massas de alta resolução
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>
IV	Infravermelho

<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multipleteo
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MeOH	Metanol
NAA	Nefropatia por Ácidos Aristolóquicos
NOESY	<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
<i>s</i>	Singleto
<i>s/</i>	Singleto largo
<i>t</i>	Tripleteo
UV	Ultravioleta
TOCSY	<i>Total correlation spectroscopy</i>
$\delta$	Deslocamento químico
$\Delta\delta$	Varição de deslocamento químico
$\lambda_{\max}$	Comprimento de onda de máxima absorção
$[\alpha]_D$	Rotação óptica

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO 1 – ESTUDO FITOQUÍMICO DOS CAULES DE *Aristolochia urupaensis*

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>1.1 Aspectos gerais da família Aristolochiaceae</b> .....	<b>21</b>
<b>1.2 Aspectos metabólicos</b> .....	<b>22</b>
<b>1.2 Ácidos aristolóquicos e aristolactamas</b> .....	<b>24</b>
1.3.1 Biossíntese dos AAs .....	24
1.3.2 Biogênese das ALs .....	26
1.3.3 Problemas de saúde associados ao consumo de AAs .....	27
<b>1.4 <i>Aristolochia urupaensis</i> Hoehne</b> .....	<b>29</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
<b>2.1 Objetivos específicos</b> .....	<b>31</b>
<b>3 CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DOS CAULES DE <i>A. urupaensis</i></b> ..	<b>32</b>
<b>4 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>34</b>
<b>4.1 Especificações dos materiais e equipamentos utilizados</b> .....	<b>34</b>
4.1.1 Cromatografia em camada delgada e em coluna .....	34
4.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	34
4.1.3 Espectrômetros .....	35
<b>4.2 Coleta e identificação do material vegetal</b> .....	<b>36</b>
<b>4.3 Obtenção dos extratos de <i>A. urupaensis</i></b> .....	<b>36</b>
<b>4.4 Fracionamento do extrato etanólico de caules de <i>A. urupaensis</i></b> .....	<b>37</b>
<b>4.5 Fracionamento do extrato etanólico Soxhlet de caules de <i>A. urupaensis</i></b>	<b>37</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>5.1 Determinação estrutural dos constituintes químicos presentes nos extratos etanólico e etanólico Soxhlet dos caules de <i>A. urupaensis</i></b> .....	<b>42</b>
5.1.1 2,3-dihidro-4 <i>H</i> -piran-4-ona (1) .....	43
5.1.2 Ácidos aristolóquicos (2 – 5) .....	46
5.1.3 Aristolocatos de sódio (6 – 9) .....	50
5.1.4 Aristolactamas (10 – 14) .....	53
5.1.5 Alcaloides 4,5-dioxoaporfínicos (15 e 16) .....	57
5.1.6 Magnoflorina (17) .....	58
5.1.7 Derivado C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> (18).....	60
5.1.8 Derivados C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> (19 e 20).....	61

5.1.9 Derivados C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> (21 – 26).....	64
5.1.10 Alcamidas (27 – 29).....	68
5.1.11 Lignana dibenzilbutânica (30).....	71
5.1.12 Flavonoides glicosilados (31 – 34).....	74
5.1.13 Alantoína (35) .....	81
5.1.14 Nucleosídeo adenosina (36).....	81
<b>6 CONSIDERAÇÕES .....</b>	<b>83</b>

**CAPÍTULO 2 – ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FLORES DE *Aristolochia trulliformis***

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>1.1 Características florais do gênero <i>Aristolochia</i>.....</b>	<b>85</b>
<b>1.2 Isolamento de constituintes químicos de flores de <i>Aristolochia</i> .....</b>	<b>89</b>
<b>1.3 Flavonoides .....</b>	<b>90</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>93</b>
<b>2.1 Objetivos específicos.....</b>	<b>93</b>
<b>3 CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DAS FLORES <i>Aristolochia trulliformis</i>.....</b>	<b>94</b>
<b>4 PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>95</b>
<b>4.1 Coleta e identificação do material vegetal .....</b>	<b>95</b>
<b>4.2 Obtenção do extrato bruto .....</b>	<b>95</b>
<b>4.3 Fracionamento do extrato bruto .....</b>	<b>95</b>
<b>4.4 Estudo da fração metanólica.....</b>	<b>96</b>
<b>4.4.1 Estudo químico das subfrações .....</b>	<b>96</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>98</b>
<b>5.1 Determinação estrutural dos constituintes químicos das flores de <i>Aristolochia trulliformis</i>.....</b>	<b>100</b>
<b>5.1.1 Derivados C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub> e C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (37 – 39).....</b>	<b>100</b>
<b>5.1.2 Derivado C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> (40) e alcaloide tetrahydroisoquinolínico (41).....</b>	<b>101</b>
<b>5.1.3 Flavonoides (42 – 48).....</b>	<b>104</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES .....</b>	<b>114</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>115</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>116</b>

## CAPÍTULO 1

### Estudo fitoquímico dos caules de *Aristolochia urupaensis*



## 1 INTRODUÇÃO

O cerrado é o segundo maior bioma do país, estando presente principalmente nos estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal, além dos encaves no Amapá, Roraima e Amazonas. A abundância de espécies endêmicas do Cerrado, com cerca de 11.627 espécies de plantas nativas catalogadas, faz com que este bioma seja reconhecido como o mais rico do mundo. Estudos sobre o conhecimento tradicional da biodiversidade das populações nativas do Cerrado mostram que mais de 220 espécies de plantas têm uso medicinal.<sup>1</sup>

Porém, estimativas do Ministério do Meio Ambiente apontam que 20% das espécies nativas e endêmicas do Cerrado não são mais encontradas nas áreas protegidas, uma vez que o Cerrado é, depois da Mata Atlântica, o bioma que mais sofreu alterações pelo homem.<sup>1</sup>

Este bioma apresenta um potencial significativo para estudos da composição química de sua flora, uma vez que estudos fitoquímicos das espécies vegetais auxiliam no conhecimento da biodiversidade, agregando valor econômico e cultural, além de favorecer estratégias de desenvolvimento e gestão dos recursos naturais.

Neste contexto, o seguinte trabalho apresenta o estudo fitoquímico das espécies *Aristolochia urupaensis* e *Aristolochia trulliformis*.

### 1.1 Aspectos Gerais da Família Aristolochiaceae

A família Aristolochiaceae compreende aproximadamente 600 espécies de trepadeiras, decumbentes ou não, herbáceas eretas ou prostadas, sendo geralmente providas de rizomas e tubérculos. Estas espécies são encontradas em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo.<sup>2; 3</sup>

A posição sistemática desta família apresentou várias modificações no decorrer dos anos. Em 2003, a família Aristolochiaceae foi inserida na ordem Piperales,<sup>4</sup> que compreende também as famílias Saururaceae e Piperaceae. A ordem Piperales juntamente com Canellales, Laurales e Magnoliales apresentam características genéticas próximas e formam o grupo das Magnoliideas.<sup>5</sup>

A literatura apresenta divergências em relação ao número de gêneros pertencentes a esta família, existindo classificações de quatro até dezenove gêneros. Atualmente, com base em caracteres morfológicos e de biologia molecular, são reconhecidas duas subfamílias para a família Aristolochiaceae. A subfamília Asaroideae consiste dos gêneros *Asarum* e *Saruma* e a subfamília Aristolochioideae com os gêneros *Aristolochia sensu lato* e *Thottea*.<sup>3; 6</sup>

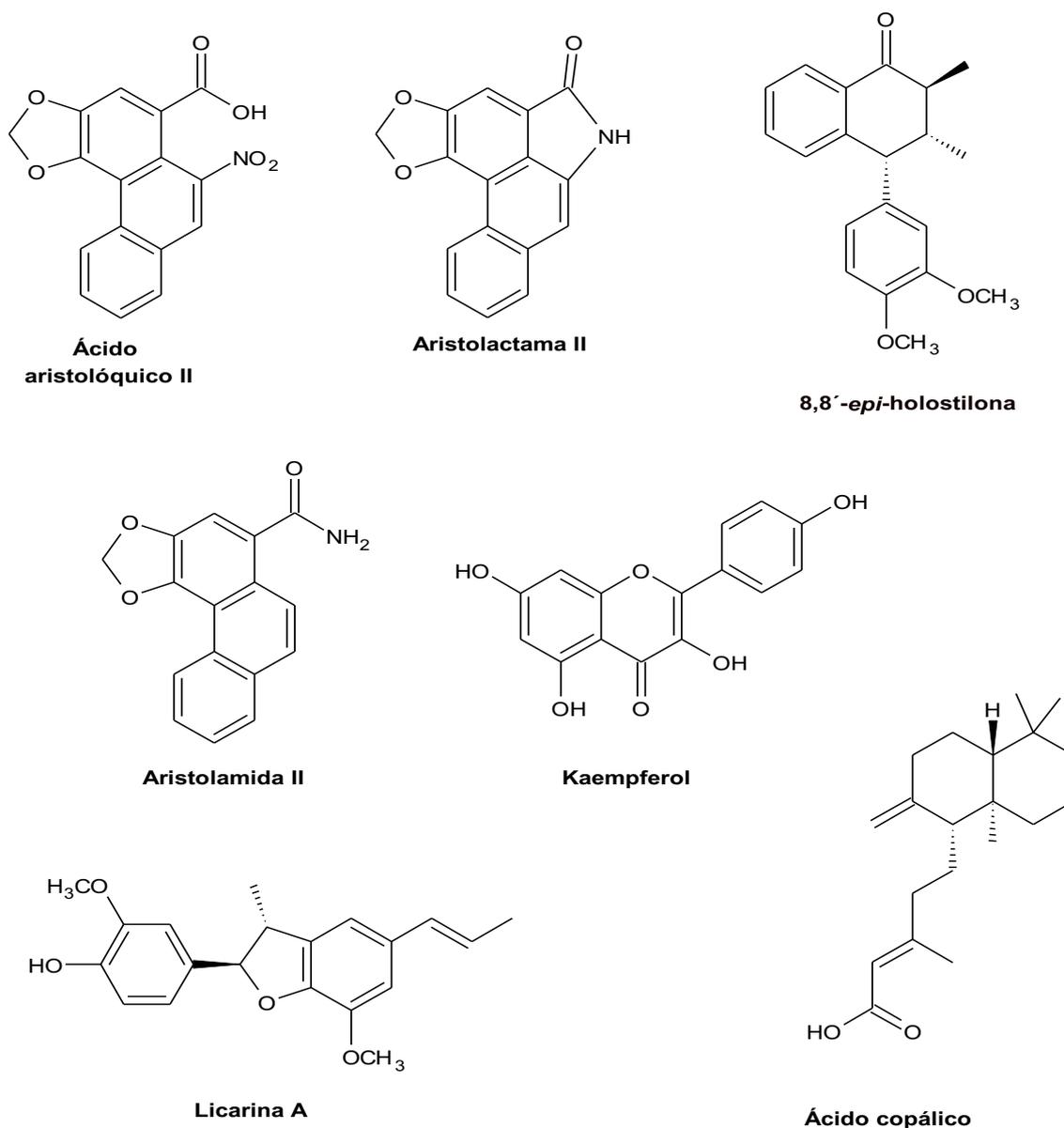
O maior gênero desta família é *Aristolochia* que apresenta cerca de 550 espécies. No Brasil estima-se a presença de 92 espécies até o momento, uma vez que novas espécies estão sendo descritas na literatura nos últimos anos. Este gênero é dividido em quatro subgêneros: *Isotrema*, *Endoteca*, *Pararistolochia* e *Aristolochia*.<sup>3; 6</sup>

O nome da família tem origem da palavra grega “aristos” que significa “melhor” e “lochia” referente a “entrega”, em alusão ao uso original destas espécies para expelir a placenta após o nascimento das crianças.<sup>7</sup>

O interesse pelos estudos fitoquímicos da família Aristolochiaceae deve-se ao amplo uso de suas espécies na medicina tradicional e homeopática. As espécies são utilizadas como antissépticas, estomáquicas, sedativas, antitérmicas, anti-inflamatórias, antiofídicas, depurativas, diuréticas, vulnerárias, antirreumáticas, antitussígenas, antiasmáticas, febrífugas, expectorantes, emenagogas, abortivas, antiarréicas, além de serem utilizadas no tratamento de inflamações pulmonares e de vários tipos de câncer.<sup>8; 9</sup>

## 1.2 Aspectos metabólicos

A composição química das espécies pertencentes à família Aristolochiaceae é bastante diversificada. Nas últimas décadas, cerca de 700 substâncias foram isoladas de espécies da família Aristolochiaceae.<sup>10</sup> Embora metabólitos secundários como ácidos aristolóquicos, lignanas e alantoína ocorram frequentemente nas espécies de Aristolochiaceae (Figura 1), algumas classes de metabólitos são específicas, tais como: bicubebinas em *Aristolochia lagesiana* e *A. pubescens*<sup>11</sup> e bi-tetraflavonoides em *A. ridícula*.<sup>12</sup>



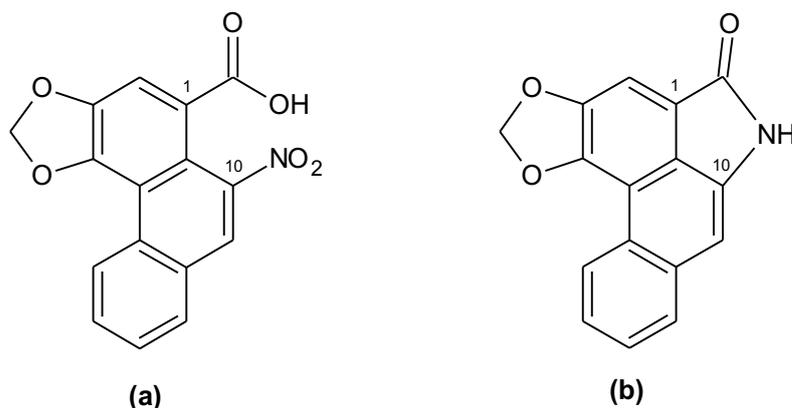
**Figura 1** – Exemplos de substâncias presentes em espécies da família Aristolochiaceae

Os metabólitos especiais isolados principalmente do gênero *Aristolochia* apresentam várias atividades biológicas comprovadas, como exemplo: lignanas ariltetralônicas antiplasmódicas de *Aristolochia holostylis* (antiga *Holostylis reniformes*),<sup>13</sup> a aristolamida II isolada de *A. manshurienses* que possui atividade anti-inflamatória<sup>14</sup> e a neolignana licarina A que possui atividade contra tuberculose.<sup>15</sup> Estudos com a espécie *A. cymbifera* mostraram que o extrato metanólico de folhas apresentaram uma alta atividade contra promastigotas de *Leishmania chagasi*. Após fracionamento biomonitorado, o diterpeno ácido copálico demonstrou uma alta toxicidade para a forma extracelular desse parasita.<sup>16; 17</sup>

Apesar do uso popular de espécies de Aristolochiaceae, evidências experimentais indicam que a presença dos ácidos aristolóquicos I, II e IIIa, comumente presentes em plantas desta família, está associada a efeitos carcinogênicos, genotóxicos e nefrotóxicos.<sup>18</sup>

### 1.3 Ácidos aristolóquicos e aristolactamas

Os ácidos aristolóquicos (AA) e as aristolactamas (AL) são derivados fenântrenicos que apresentam um grupo nitro (NO<sub>2</sub>) ou um grupamento lactâmico (CONH) em C-10, respectivamente (Figura 2). Estas substâncias são amplamente distribuídas em espécies da família Aristolochiaceae, principalmente nos gêneros *Aristolochia* e *Asarum*, mas existem relatos da presença de ácidos aristolóquicos em alguns tipos de borboletas e de aristolactamas em plantas de outras famílias.<sup>19; 20</sup>



**Figura 2** – Esqueleto químico de ácidos aristolóquicos (a) e aristolactamas (b)

#### 1.3.1 Biossíntese dos AAs

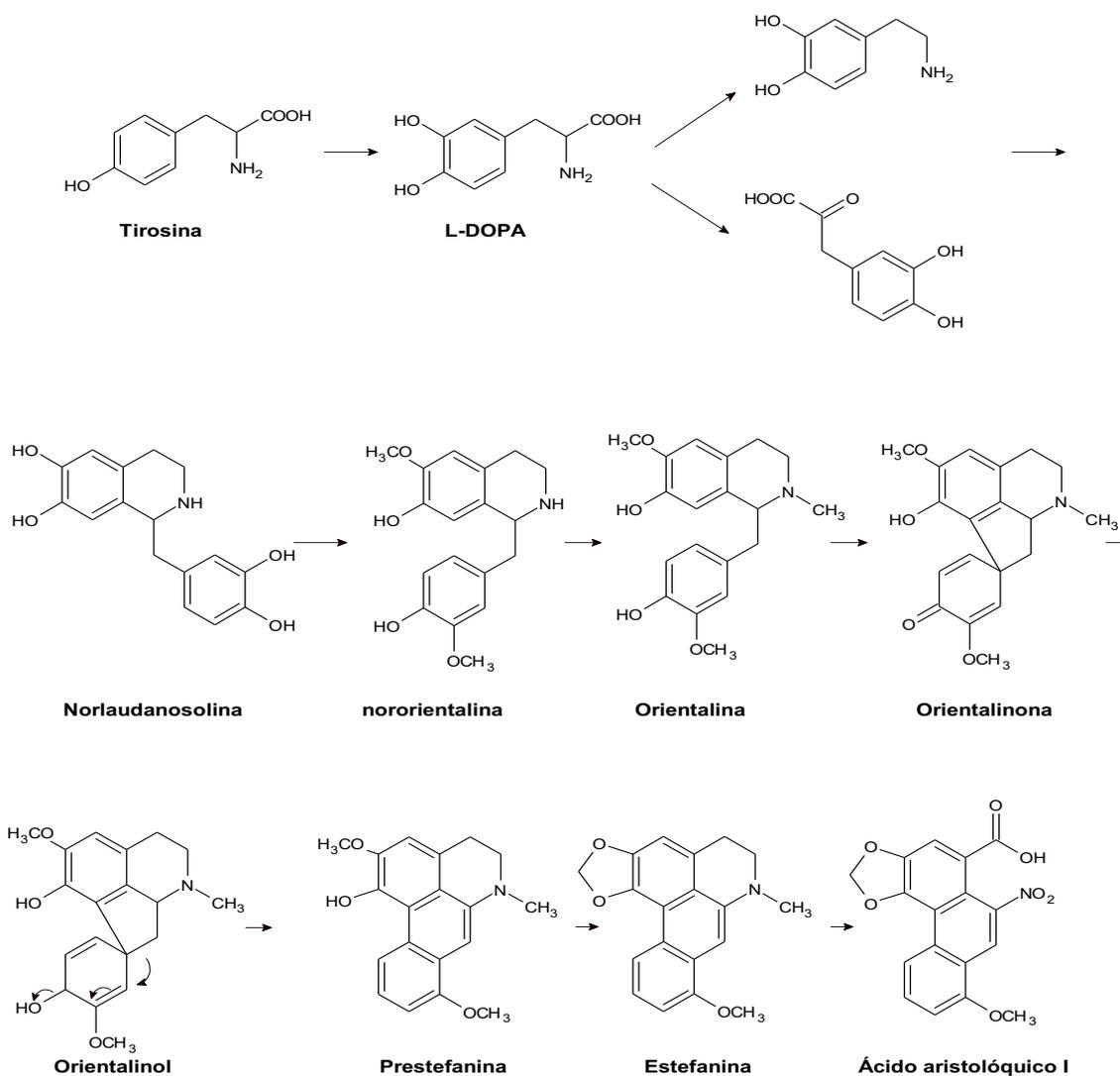
A semelhança na estrutura química dos ácidos aristolóquicos com os alcaloides aporfínicos sugere uma relação biogenética entre os mesmos. Em 1966 Spender e Tiwari<sup>21</sup> incorporaram na espécie *Aristolochia sipho* as substâncias: [3-<sup>14</sup>C]-tirosina, [2-<sup>14</sup>C]-diidroxifenilalanina, [2-<sup>14</sup>C]-diidrofenetanamina e [2-<sup>14</sup>C]-noradrenalina. Em todos os experimentos foi possível isolar o ácido aristolóquico I marcado isotopicamente e por meio dos dados obtidos pode-se sugerir a biogênese

nas seguintes etapas: norlaudanosolina → orientalina → orientalinona → orientalinol → estefanina → ácido aristolóquico I.

Em 1967 Schütte *et al.*<sup>22</sup> comprovou a proposta de biogênese anteriormente descrita por meio de um experimento com incorporação da [4-<sup>14</sup>C]-norlaudanosolina.HCl na espécie *A. siphon* que resultou na obtenção do AAI radioativo e também confirmou que o carbono da posição 4 da norlaudanosolina é transformado no grupamento carboxílico do ácido aristolóquico I.

Em 1969 Comer *et al.*<sup>23</sup> utilizaram [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 para demonstrar que o grupamento nitro do AAI deriva do grupo amino presente na tirosina. Com base nesses resultados, eles propuseram a rota presente na Figura 3, onde as substâncias orientalina, orientalinol e prestefanina são mostradas como hipotéticos estágios da via postulada, o que envolve uma etapa de oxidação do fenol e um rearranjo.

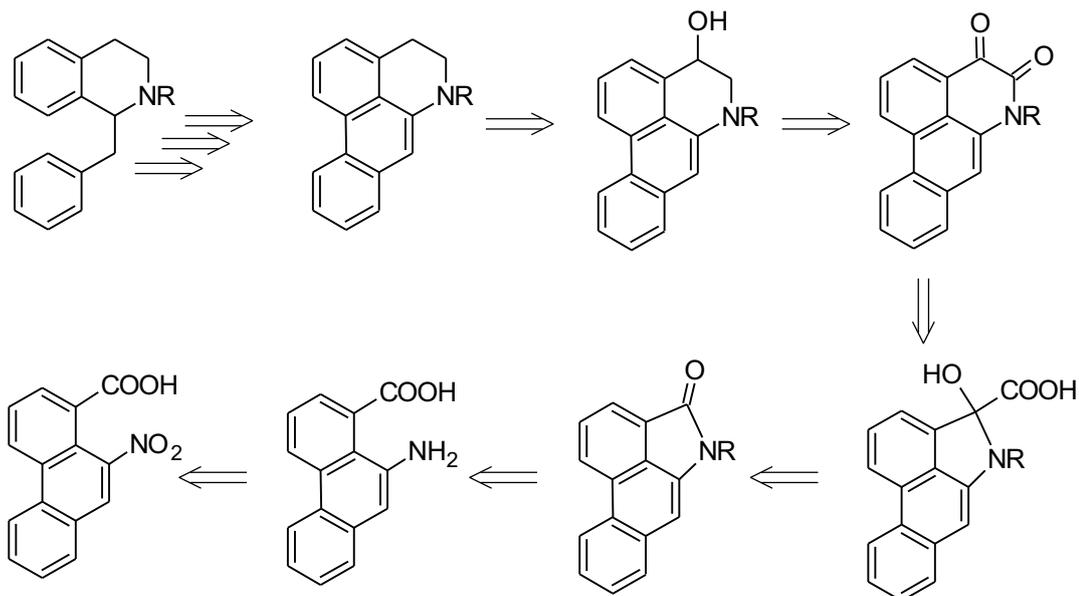
No ano de 1982 Sharma *et al.*<sup>24</sup> confirmou que as substâncias nororientalina, orientalina e estefanina fazem parte da biossíntese do AAI por meio de experimentos na espécie *A. bracteata*. As evidências apoiaram fortemente a hipótese de que o acoplamento oxidativo de orientalina fornece a prestefanina, que é convertida em estefanina. A clivagem oxidativa da stephanina, em seguida, fornece o ácido aristolóquico I. Também foi demonstrado que o grupo metilendioxílico é formado a partir do precursor o-metoxifenol e demonstraram que a estereoquímica do alcaloide nororientalina é preservada durante a biossíntese do AAI.



**Figura 3** – Biossíntese dos ácidos aristolóquicos. Fonte: Adaptado de Tian-Shung et al. (2005)<sup>9</sup>

### 1.3.2 Biogênese das ALs

A biossíntese das aristolactamas ainda é desconhecida. De acordo com Lee e Han (1992)<sup>25</sup> e Lin (1997)<sup>26</sup>, a rota biossintética para a formação dos ácidos aristolóquicos, aristolactamas, alcaloides 4,5-dioxoaporfínicos e aporfínicos poderia ser explicada como mostrada na Figura 4. Sendo que os alcaloides 4,5-dioxoaporfínicos, derivados dos aporfínicos, seriam os intermediários da biossíntese das aristolactamas, que por sua vez, seriam as precursoras dos ácidos aristolóquicos.



**Figura 4** – Biogênese de aristolactamas. Fonte: Adaptado de Tian-Shung et al. (2005)<sup>9</sup> e Lin et al. (1997)<sup>26</sup>

Até o momento, não se encontram descritos na literatura estudos que comprovem que as aristolactamas são precursores biossintéticos dos ácidos aristolóquicos ou que estes seriam os precursores das aristolactamas.

### 1.3.3 Problemas de saúde associados ao consumo de AAs

Desde a década de 50 inúmeros casos de uma doença renal crônica, chamada de nefropatia endêmica dos Balcãs (*Balkan Endemic Nephropathy*, BEN), são relatados em pessoas que moram na região sudeste da Europa, conhecida como região dos Balcãs. Dentre as várias hipóteses relacionadas à causa desta doença, está o consumo de sementes da espécie *Aristolochia clematitis* pela população.<sup>27</sup>

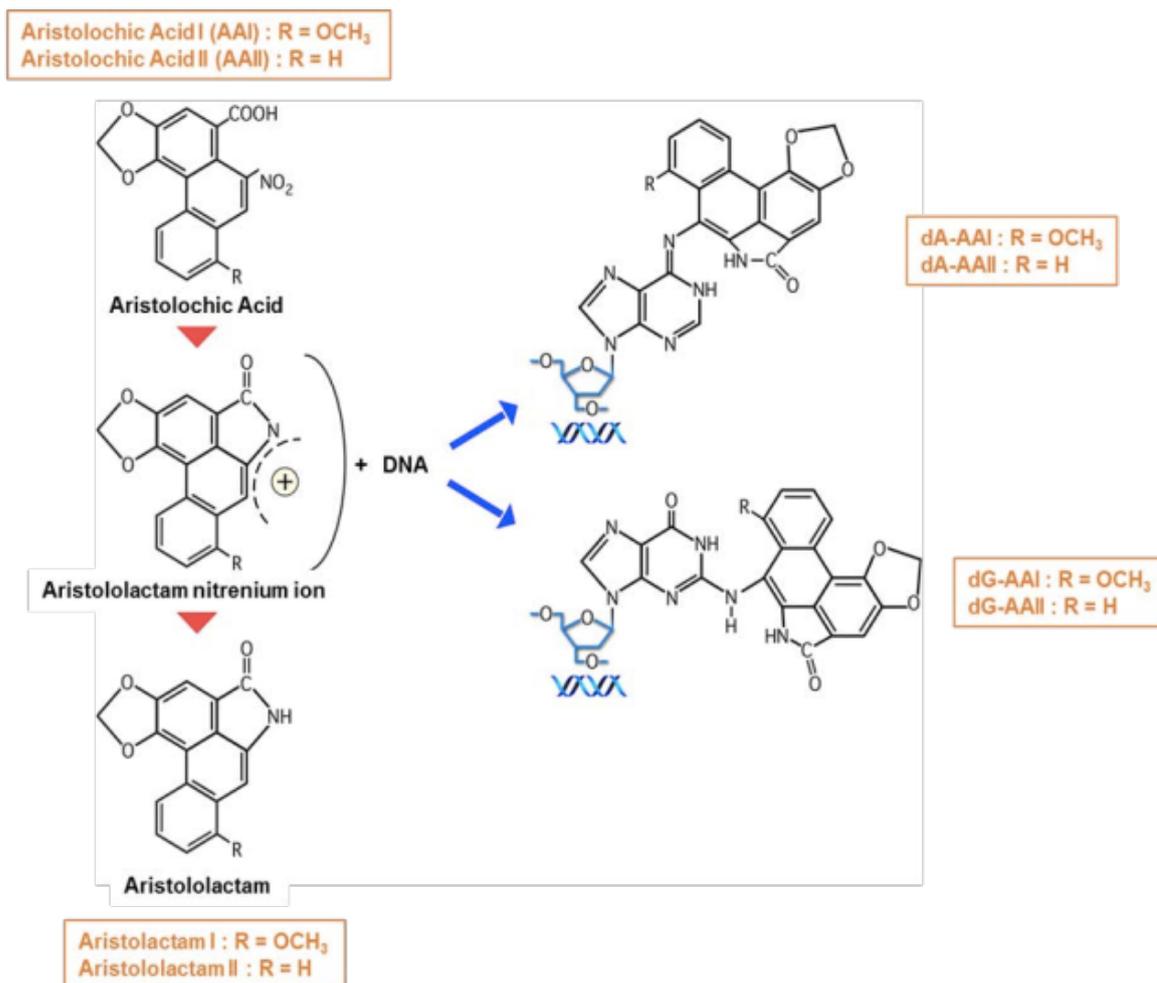
Estudos de Chan e colaboradores (2016)<sup>28</sup>; <sup>29</sup> mostraram que amostras de solos de algumas regiões da Sérvia, onde a espécie *Aristolochia clematitis* é endêmica, apresentaram quantidades de ácidos aristolóquicos expressivas. Ao analisarem as culturas alimentares de milho, trigo, alface, tomate e cebolinha desenvolvidas nestas regiões, os pesquisadores também detectaram a presença de ácidos aristolóquicos, obtendo, com isso, a primeira evidência de contaminação dos

solos e alimentos por ácidos aristolóquicos e, possivelmente, a via de introdução dos AAs na cadeia alimentar que justificaria a nefropatia endêmica dos Balcãs.

Na década de 90, uma série de relatos envolvendo severas falhas renais em mulheres jovens despertou o interesse dos profissionais na área de saúde da Bélgica. Biópsias realizadas apontaram graves perdas nas funções renais e, em questão de meses, a maioria das pacientes necessitava de transplantes de rins ou sessões de diálise. Ao investigar as pacientes, constatou-se que todas utilizavam pílulas para emagrecimento contendo ervas chinesas, denominadas popularmente como Pin Yin (*Stephania tetrandra* e *Aristolochia fangchii*), em suas formulações. Após análise da composição química e testes biológicos constatou-se que a presença dos ácidos aristolóquicos da espécie *Aristolochia fangchii* era a causa da nefropatia. Esta nefropatia foi inicialmente chamada de Nefropatia das Ervas Chinesas e posteriormente conhecida como Nefropatia por Ácidos Aristolóquicos (NAA).<sup>30</sup>

O mecanismo associado à carcinogênese e nefrotoxicidade dos AAs e análogos está relacionado a metabolização dos AAs pelo organismo, uma vez que, quando ingeridos os AAs e análogos são rapidamente convertidos por diversas enzimas no íon nitrenium. O íon nitrenium formado reage rapidamente com as bases purinas (adenina e guanina) formando adutos de AAs com o DNA (Figura 5). Esses adutos foram detectados em tecidos renais de pacientes com NAA.<sup>20</sup>

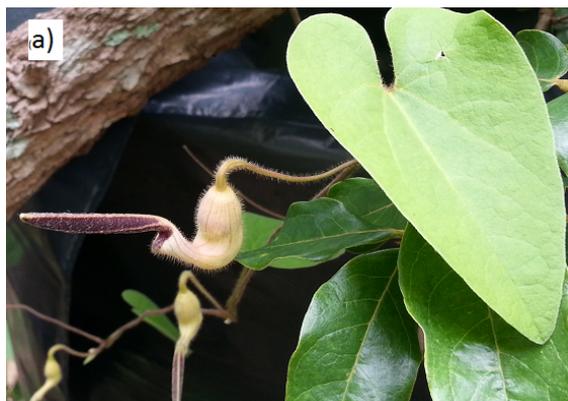
Devido ao alto consumo de espécies de Aristolochiaceae, estima-se que na China cerca de 100 milhões de pessoas correm o risco de desenvolver NAA, podendo desencadear problemas de saúde pública consideráveis.<sup>20</sup> Com isso, o uso de espécies *in natura* ou de formulações contendo espécies de *Aristolochia* foi banido de diversos países, principalmente na Europa.<sup>28</sup>



**Figura 5** – Ativação metabólica de AAs e análogos e formação de adutos com o DNA.  
 Fonte: JADOT et al. (2017)<sup>30</sup>

#### 1.4 *Aristolochia urupaensis* Hoehne

Presente em áreas do cerrado, a espécie *Aristolochia urupaensis* (Figura 6) é conhecida popularmente como “cipó-mil-homens” ou “jarrinha-pilosa”. As características morfológicas principais envolvem a presença de pelos finos por toda a estrutura da planta, folhas com pecíolos de 5 – 6 cm de comprimento com sete nervuras principais e flores axilares solitárias com cerca de 7 cm de comprimento.<sup>2</sup> Sua classificação taxonômica é apresentada na Tabela 1.



**Figura 6** – Folha e flor de *A. urupaensis*. Fonte: Foto obtida por Juliana C. Holzbach

Tabela 1 – Classificação taxonômica da espécie *Aristolochia urupaensis*<sup>5</sup>

Classe	Angiospermae
Subclasse	Magnoliídea
Ordem	Piperales
Superordem	Magnoliiflorae
Família	Aristolochiaceae
Gênero	<i>Aristolochia</i>
Espécie	<i>Aristolochia urupaensis</i>

Segundo relatos da população do local de coleta desta espécie, município de Porto Nacional – TO, esta planta é utilizada para o tratamento de dores estomacais e cicatrização de ferimentos. No entanto, de acordo com um levantamento bibliográfico realizado em diferentes bases de dados, não há relatos sobre utilização popular, atividades biológicas e sobre estudos fitoquímicos da espécies *Aristolochia urupaensis*, demonstrando que esta espécie possui potencial para pesquisas sobre composição química e atividades farmacológicas.

## 2 OBJETIVOS

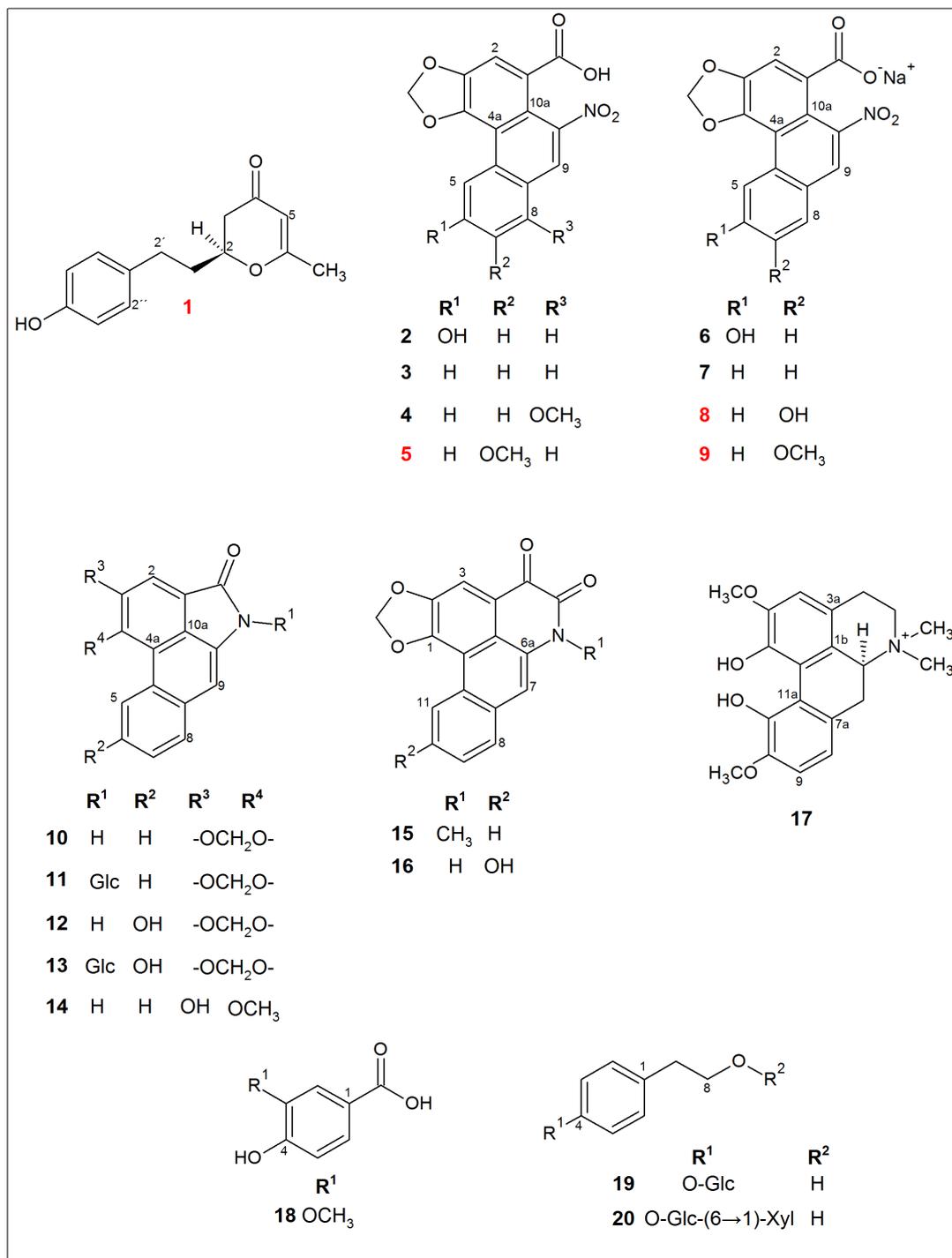
Este capítulo do trabalho teve como objetivo investigar a composição química dos caules da espécie *Aristolochia urupaensis*, ampliando o conhecimento acerca da constituição química de espécies da família Aristolochiaceae.

### 2.1 Objetivos específicos

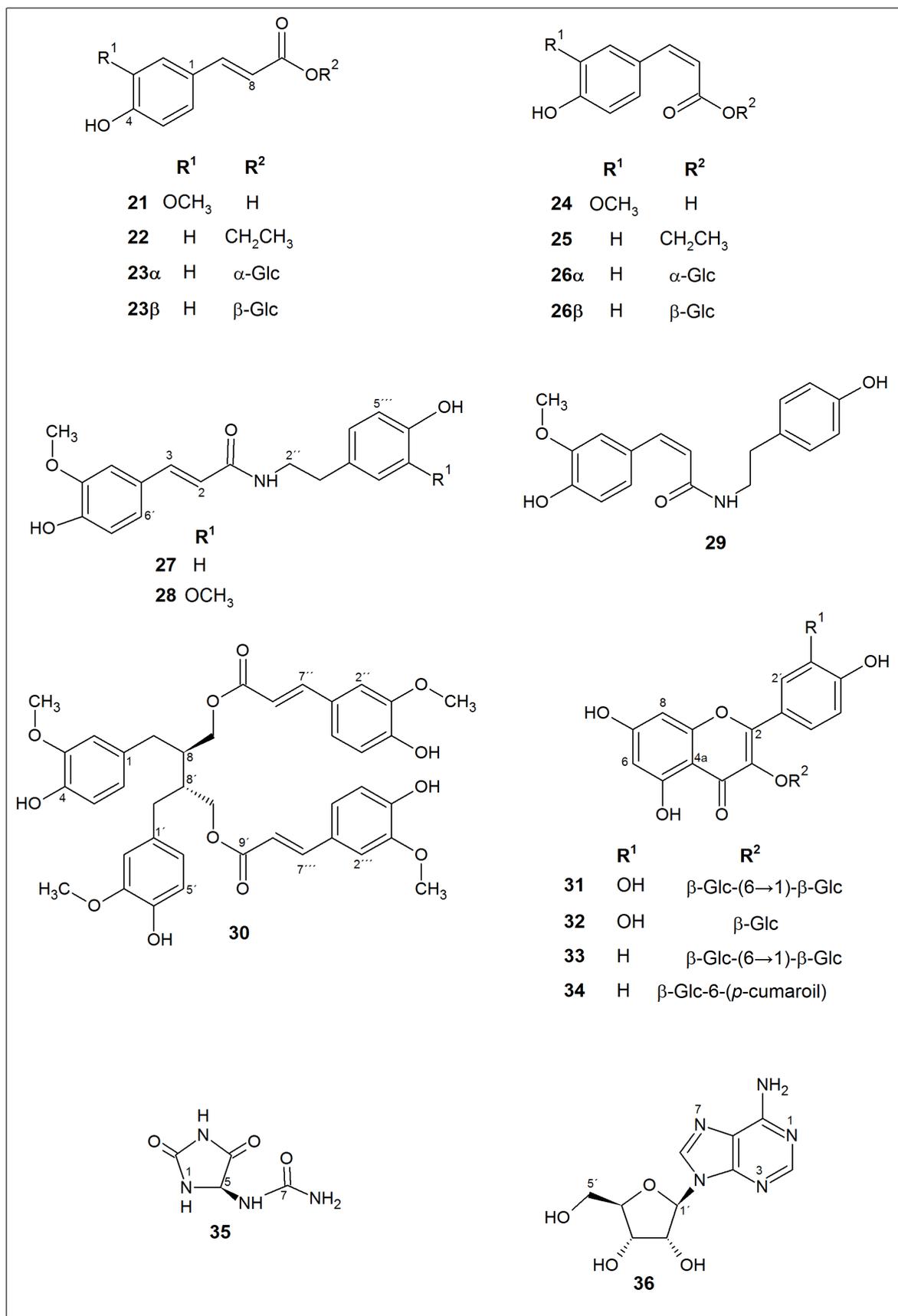
- Isolamento de substâncias por meio de técnicas cromatográficas
- Identificação estrutural dos metabólitos especiais por técnicas espectrométricas (RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais, EM, UV, IV).

### 3 CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DOS CAULES DE *A. urupaensis*

Este capítulo descreve o isolamento e/ou identificação das substâncias majoritárias presentes nos extratos etanólico e etanólico de Soxhlet dos caules de *A. urupaensis* (**Figura 7**).



**Figura 7** – Substâncias isoladas e/ou identificadas dos caules de *A. urupaensis*



**Continuação Figura 7** - Substâncias isoladas e/ou identificadas dos caules de *A. urupaensis*

## **4 PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1 Especificações dos materiais e equipamentos utilizados**

Os solventes deuterados [ $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  (D, 99,8%) e  $\text{DMSO-}d_6$  (D, 99,9%)] utilizados nos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram da marca CIL<sup>®</sup>.

Os solventes não deuterados empregados nos processos cromatográficos, nas lavagens e nas etapas de partição das frações foram das marcas Merck<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich<sup>®</sup> e J. T. Baker<sup>®</sup> em grau HPLC. A água foi destilada e deionizada em aparelho da marca Milli-Q (resistividade mínima 18,2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$  a 25 °C). A eliminação dos solventes das amostras foi feita à pressão reduzida, utilizando-se evaporador rotatório Büchi<sup>®</sup> (Waterbath B-480) e capela de exaustão.

#### **4.1.1 Cromatografia em camada delgada e em coluna**

Para a cromatografia em camada delgada foi utilizada sílica G (2-25  $\mu\text{m}$ , 60 Å, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) e placas comerciais de sílica gel F254 da Whatman<sup>®</sup>. As revelações das cromatoplasmas foram efetuadas mediante o uso de iodo sublimado e por irradiações na região de absorção no UV (254 e 365 nm).

Para as separações e os fracionamentos cromatográficos em coluna foram utilizadas colunas de vidro de diâmetros variados preenchidas com sílica gel 60 Å (230-400 mesh, Merck<sup>®</sup>), sílica gel de fase reversa C-18 de 40  $\mu\text{m}$  (7025-00, J. T. Baker<sup>®</sup>), Sephadex LH-20 (Sigma<sup>®</sup>) partículas de 25-100  $\mu\text{m}$  e resina Amberlite<sup>®</sup> XAD-16.

#### **4.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

As amostras analisadas por CLAE foram previamente submetidas a extrações em fase sólida com cartuchos de fase reversa SampliQ C18 ODS (500 mg, 6,0 mL, Agilent<sup>®</sup>) e, na sequência, filtradas em microfiltro de PTFE (25 mm, 0,2  $\mu\text{m}$ , Minisart<sup>®</sup> SRP25).

As análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram realizadas utilizando cromatógrafo JASCO® com controlador LC-Net II/ADC, detector de arranjo de fotodiodos MD-2018 plus, bomba PU-2086 plus, injetor automático AS-2055 e detector de dicroísmo circular (CD-2095). No modo analítico foi empregada coluna C-18 ChromSep SS (Varian®, 4,6 × 250 mm, 5 µm); coluna Zorbax RX C-18 ODS (Agilent®, 4,6 × 250 mm, 5 µm) e Microsorb 100Å Fenil (Agilent®, 4,6 × 250 mm, 5 µm), enquanto que no modo semipreparativo foi utilizada coluna Zorbax RX C-18 ODS (Agilent®, 9,6 × 250 mm, 5 µm).

### 4.1.3 Espectrômetros

Os espectros de RMN unidimensional ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , TOCSY e NOESY) e bidimensional ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HSQC e HMBC) foram adquiridos em espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear Bruker Avance III 600 (14,1 T) a 600 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 151 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) com sonda criogênica de 5 mm e detecção inversa de três canais ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$ ), e Bruker 300 (7,0 T) a 300 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ).

Os espectros de dicroísmo circular eletrônico (DCE) foram realizados em espectropolarímetro JASCO (J 815). Para as medidas, utilizou-se uma cubeta de 0,2 mm, e a varredura foi efetuada de 190 a 400 nm.

As medidas de rotação óptica específica,  $[\alpha]_D$ , foram feitas em polarímetro digital Perkin Elmer™ 341 LC, com filtro de sódio (589 nm) e cela de quartzo com caminho óptico de 1,00 dm.

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos no equipamento TOF Bruker MaXis Impact™, voltagem do capilar variável, faixa de aquisição de  $m/z$  50-1500, pressão do gás nebulizador 0,5 Bar, vazão do gás de secagem 4,0 L/min na temperatura de 180 °C.

Os espectros vibracionais de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Bruker VERTEX 70, no intervalo de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando-se suporte ATR (reflexão total atenuada).

## 4.2 Coleta e identificação do material vegetal

A espécie *Aristolochia urupaensis* Hoehne foi coletada na região de Porto Nacional-TO, em dezembro de 2014. A identificação da espécie vegetal foi feita pelo Dr. Vinicius Castro Souza (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba/SP) e Ms. Joelcio Freitas. A espécie *A. urupaensis* foi depositada no herbário do Museu de Biologia Prof. Mello Leitão, Santa Teresa-ES (número 50517).

## 4.3 Obtenção dos extratos de *A. urupaensis*

As folhas e os caules de *A. urupaensis* foram, individualmente, secos em estufa climatizada (35 °C) e moídos por processo mecânico utilizando moinho de facas. As partes foram, separadamente, submetidas à extração a temperatura ambiente com hexanos, acetona, etanol, sucessivamente (cada solvente: 3 × ~ 300 mL, agitação manual a cada 12 h por 2 min), e em seguida com etanol em aparelho Soxhlet, conforme (Figura 8). Os extratos foram concentrados sob pressão reduzida e secos em capela de exaustão para obtenção das massas.

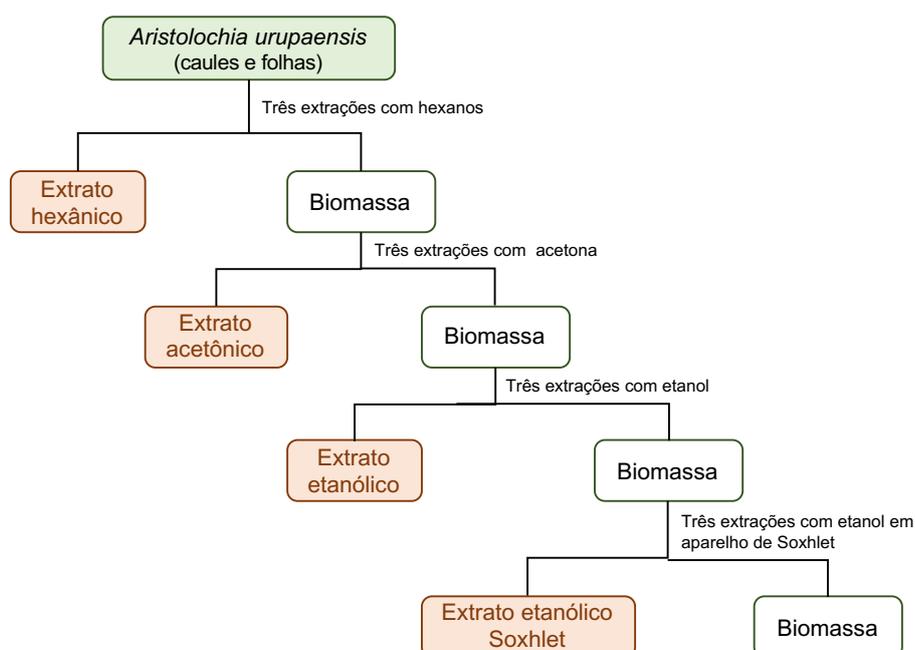


Figura 8 - Procedimento para preparação dos extratos

#### 4.4 Fracionamento do extrato etanólico de caules de *A. urupaensis*

Uma parte do extrato etanólico de caules de *A. urupaensis* (3,5 g) foi lavada com metanol ( $3 \times 10$  mL) obtendo-se uma parte insolúvel (codificada como P.I; 530,0 mg) e uma parte solúvel (codificada como P.S; 3,0 g). A fração P.S foi submetida à coluna cromatográfica com sílica C-18 de  $40 \mu\text{m}$  ( $\phi = 3,0$  cm,  $h = 18,7$  cm,  $m = 60,0$  g), eluída com sistema em gradiente  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  (10-100% MeOH), conforme Figura 9. Deste processo cromatográfico resultaram 11 frações (aproximadamente 200 mL cada), as quais foram analisadas por CCD e RMN de  $^1\text{H}$ .

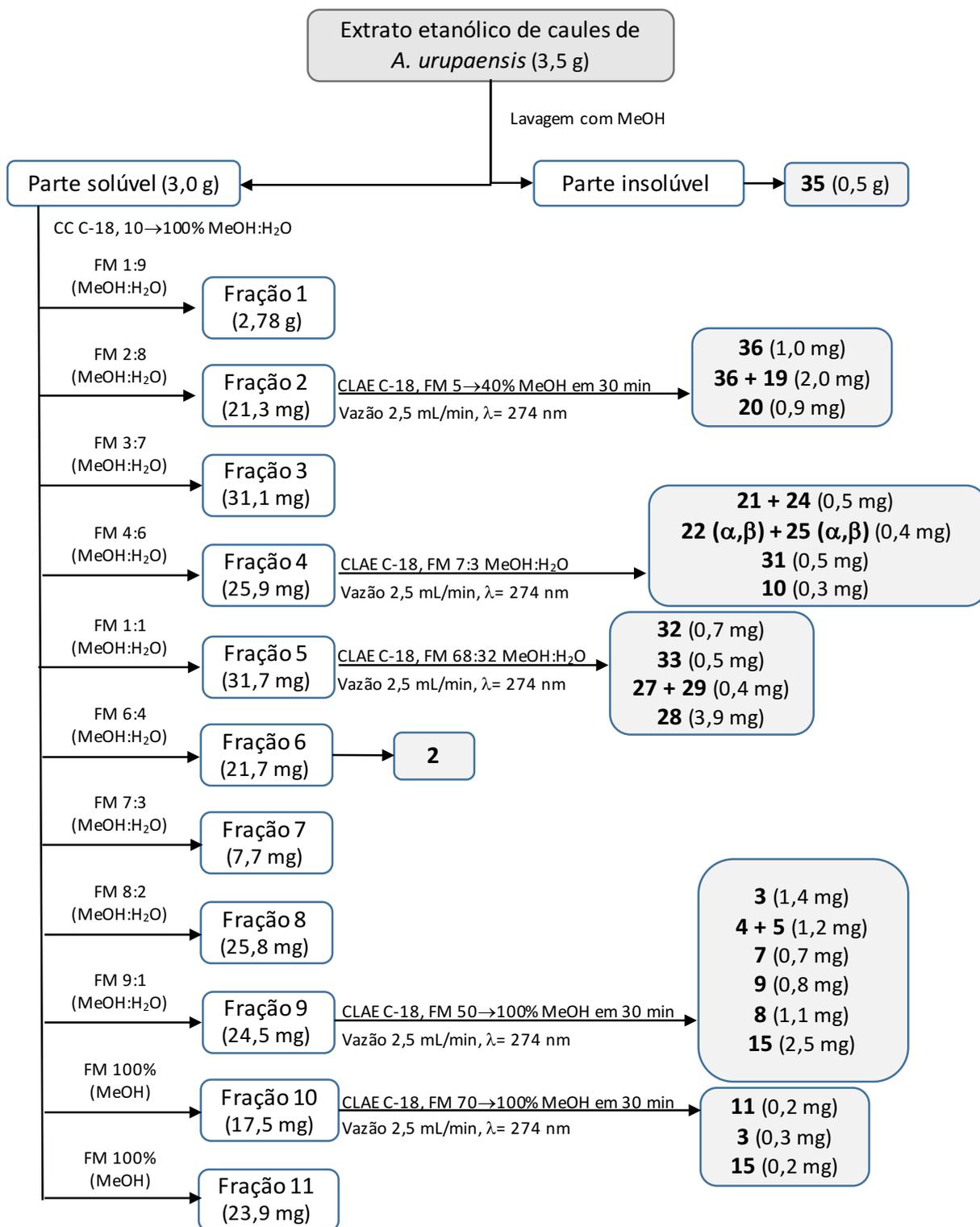
A fração 1, que continha maior massa, é constituída por açúcares e ciclitóis. As demais frações selecionadas foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala semipreparativa, conforme especificado na Figura 9.

#### 4.5 Fracionamento do extrato etanólico Soxhlet de caules de *A. urupaensis*

O extrato etanólico Soxhlet de caules de *A. urupaensis* (7,67 g) foi submetido a coluna cromatográfica com resina Amberlite<sup>®</sup> XAD-16 ( $\phi = 4,0$  cm,  $h = 25,0$  cm,  $m = 10,00$  g) e eluída primeiramente com água ( $\sim 2$  L), seguido de metanol ( $\sim 1$  L) e acetato de etila ( $\sim 0,8$  L), gerando três frações distintas.

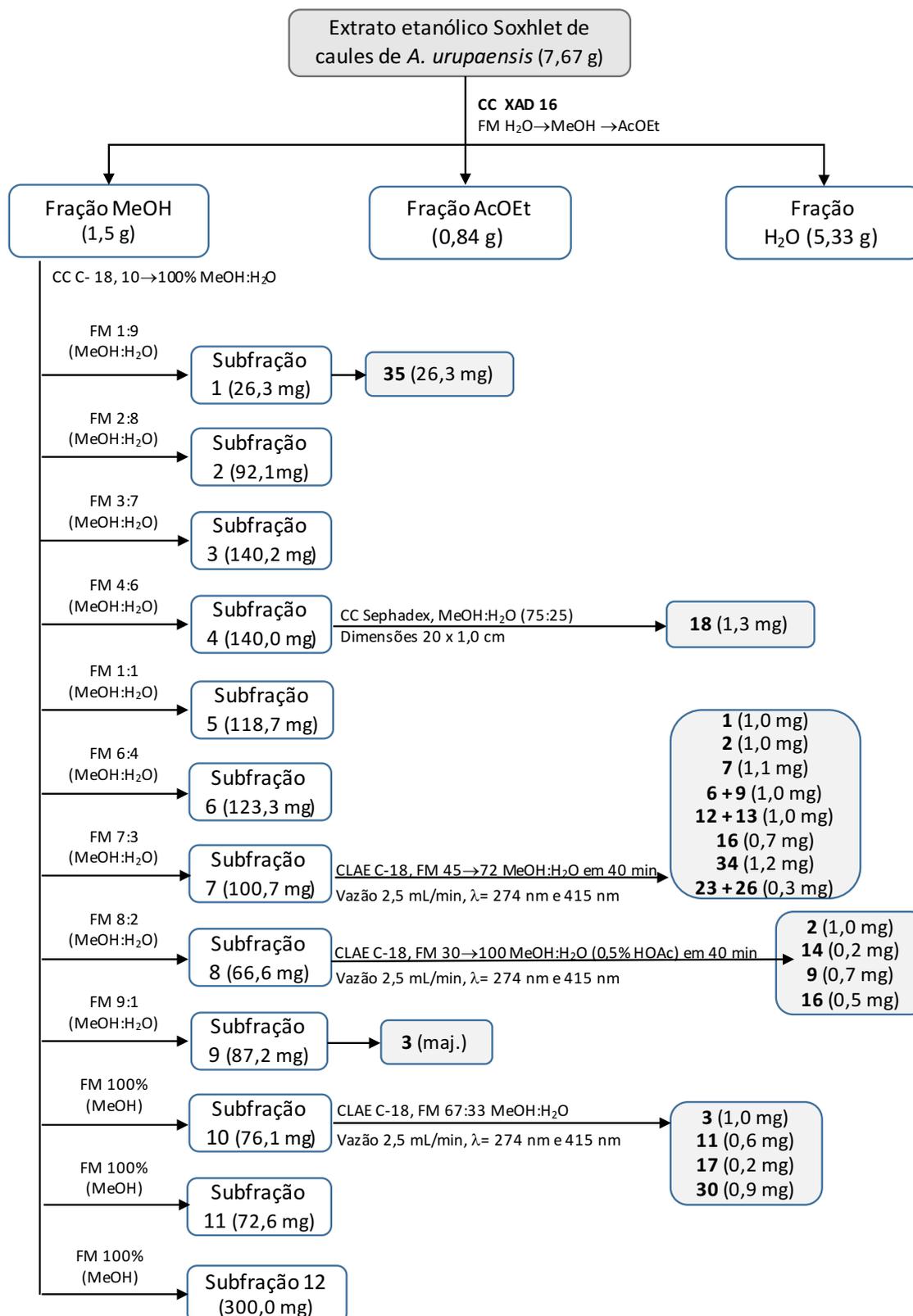
A fração metanólica (1,5 g) foi submetida a coluna cromatográfica com fase estacionária C-18 de  $40 \mu\text{m}$  ( $\phi = 3,2$  cm,  $h = 13,0$  cm,  $m = 26,0$  g), eluída com sistema em gradiente  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  (10-100% MeOH), conforme Figura 10. Este processo resultou em 12 subfrações, as quais foram analisadas por CCD e RMN de  $^1\text{H}$ .

A subfração 4 foi submetida a cromatografia por exclusão com fase estacionária de Sephadex LH-20 ( $\phi = 1,0$  cm,  $h = 20,0$  cm,  $m = 18,0$  g) e fase móvel isocrática de  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (75:25). As subfrações 7-10 foram submetidas a cromatografia líquida de alta eficiência com condições específicas conforme (Figura 10).



Onde: CC = cromatografia em coluna; FM = fase móvel e CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência

Figura 9 - Fracionamento do extrato etanólico de caules de *A. urupaensis*



Onde: CC = cromatografia em coluna; FM = fase móvel e CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência

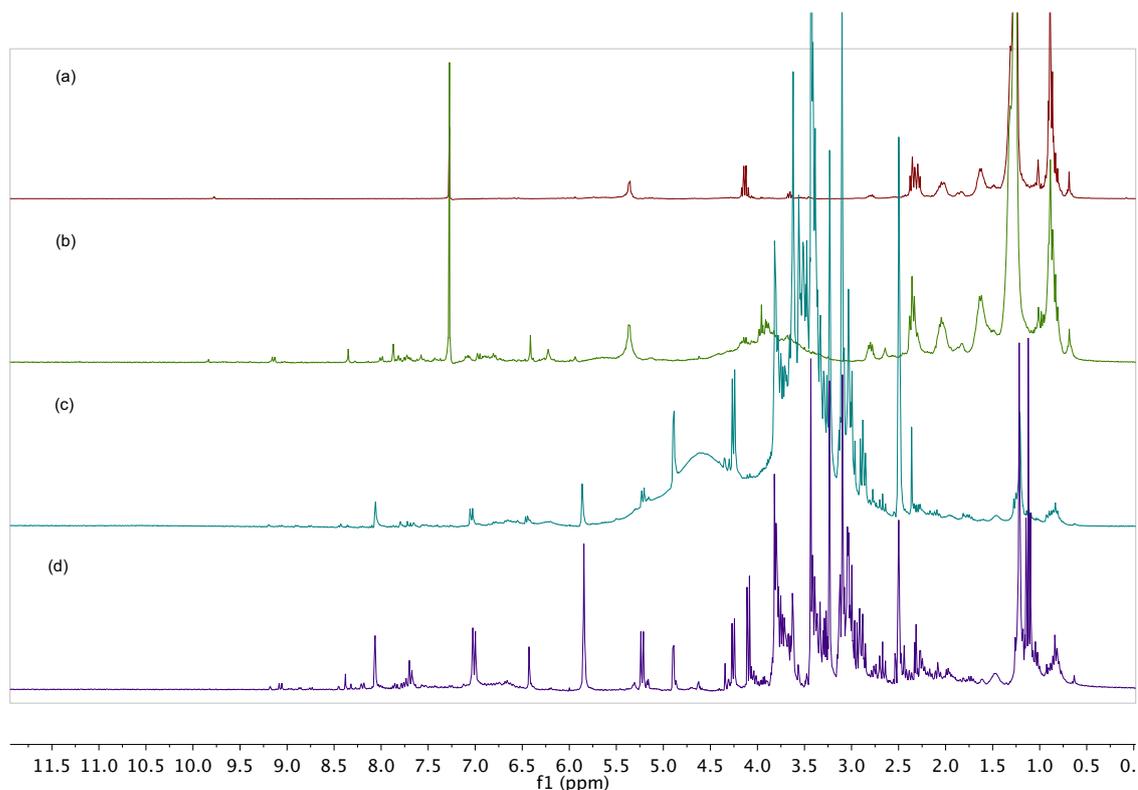
**Figura 10** - Fracionamento do extrato etanólico Soxhlet de caules de *A. urupaensis*

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

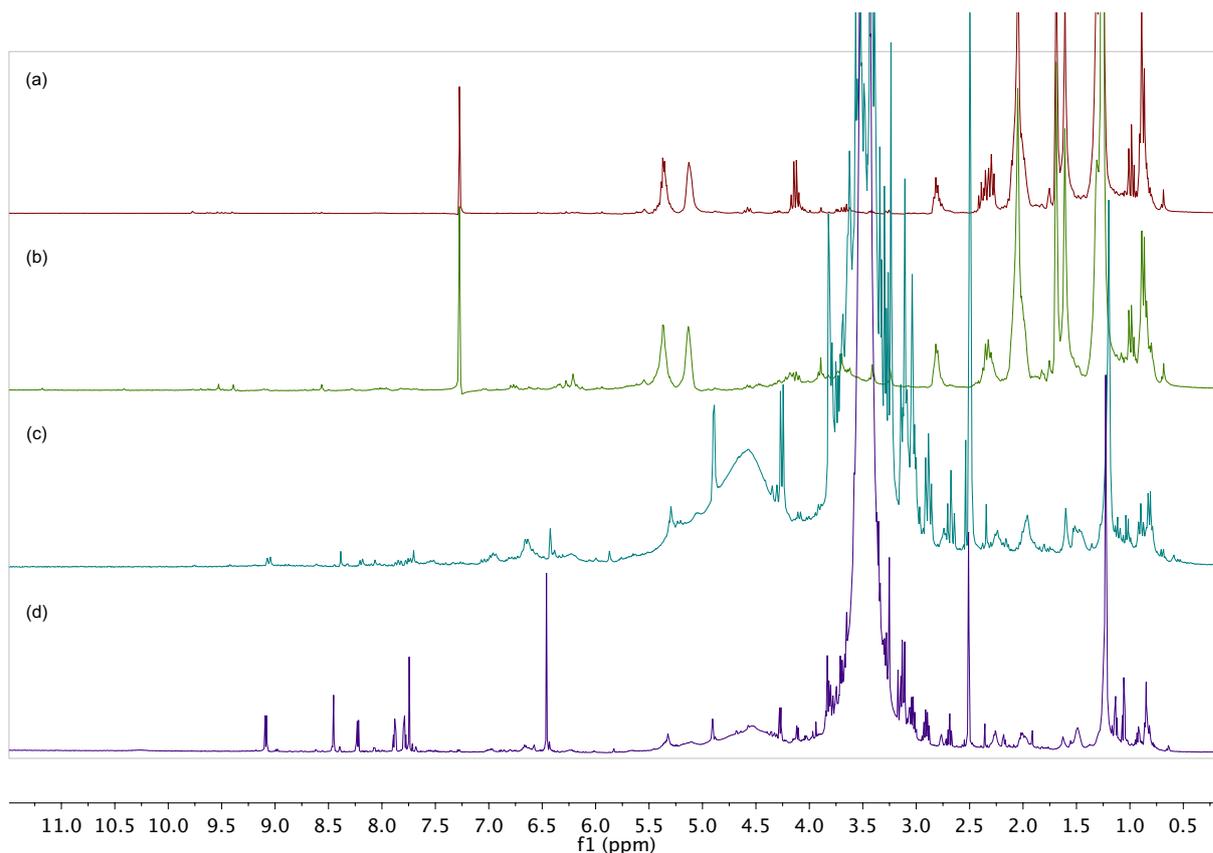
Os extratos obtidos (Tabela 2) foram analisados por CCD e RMN de  $^1\text{H}$ . Na comparação entre os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos obtidos (Figura 11 e Figura 12), tanto para folhas quanto para caules, os extratos etanólico e etanólico Soxhlet de caules de *A. urupaensis* apresentaram maior massa e número de sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , sendo selecionados para estudos químicos.

**Tabela 2** – Massas do material seco (g) e dos extratos da espécie *A. urupaensis*

	Folhas massa (g)	Caules massa (g)
Material vegetal seco	178,5	194,7
Extrato hexânico	2,0	1,1
Extrato acetônico	3,8	1,7
Extrato etanólico	6,3	5,0
Extrato etanólico Soxhlet	18,2	7,6



**Figura 11** – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico, (c) etanólico e (d) etanólico Soxhlet dos caules de *A. urupaensis*



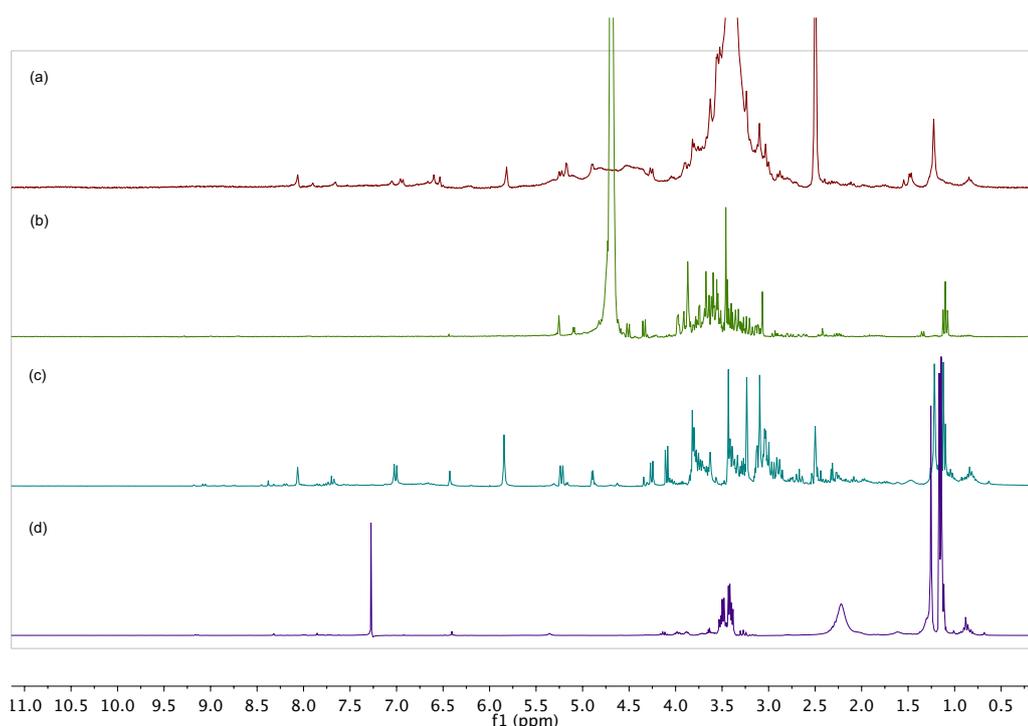
**Figura 12** – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos: (a) hexânico, (b) acetônico, (c) etanólico e (d) etanólico Soxhlet das folhas de *A. urupaensis*

Após o fracionamento do extrato etanólico dos caules de *A. urupaensis*, conforme citado no item 4.4, constatou-se que a primeira fração da coluna de C-18 (fase móvel  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  9:1) representava cerca de 90% da massa aplicada. A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  permitiu concluir que esta fração era constituída, majoritariamente, por açúcares e ciclitóis devido a presença de vários sinais na região dos hidrogênios oxigenados.

Sendo assim, a fim de remover a maioria dos açúcares e ciclitóis presentes no extrato etanólico Soxhlet, inicialmente foi utilizada uma coluna com fase estacionária Amberlite<sup>®</sup> XAD-16, conforme descrito no item 4.5. Esta resina consiste em adsorventes poliméricos, não-iônica e hidrofóbica, que tem suas propriedades adsorptivas originadas de sua estrutura macroporosa (macroporos), o qual contém tanto uma fase polimérica como uma fase porosa contínua. A adsorção das substâncias ocorre por meio de interações de Van der Waals entre os anéis aromáticos.<sup>31; 32</sup>

As XADs (XAD-2, 4, 7, dentre outras) diferem entre si na composição química, polaridade, porosidade e área superficial. A XAD-16 possui um tamanho médio de 0,56 – 0,71 mm, com uma área superficial de aproximadamente 800 m<sup>2</sup>/g e porosidade de 0,55 mL/g.<sup>31; 32</sup>

Na Figura 13 pode-se observar que, por meio da utilização da fase estacionária Amberlite® XAD-16, foi possível separar a maioria dos açúcares e ciclitóis presentes no extrato etanólico Soxhlet, facilitando os processos cromatográficos posteriores e minimizando a quantidade de sílica e solventes utilizados.



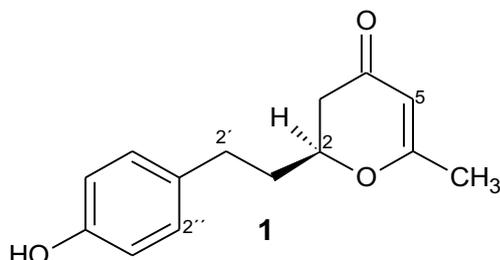
**Figura 13** – Espectros de RMN de <sup>1</sup>H de: (a) extrato etanólico Soxhlet, (b) fração aquosa XAD-16, (c) fração metanólica XAD-16, (d) fração acetato de etila XAD-16

### 5.1 Determinação estrutural dos constituintes químicos presentes nos extratos etanólico e etanólico Soxhlet dos caules de *A. urupaensis*

A elucidação estrutural das substâncias obtidas foi realizada por meio da análise dos dados de RMN uni e bidimensionais, além dos espectros de massas e de absorção nas regiões do ultravioleta (UV) e infravermelho (IV). A determinação da configuração absoluta das moléculas foi realizada por experimentos de rotação

óptica e dicroísmo circular. Os espectros das substâncias **1** – **36** são apresentados no Apêndice.

### 5.1.1 2,3-diidro-4*H*-piran-4-ona (**1**)



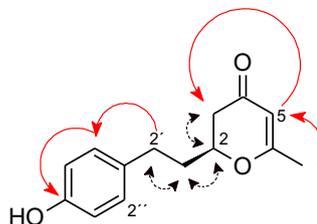
O espectro de IV da substância **1** (APÊNDICE A) apresenta uma banda de absorção em  $1647\text{ cm}^{-1}$ , característica de cetona  $\alpha,\beta$  insaturada, além da banda de absorção do grupo hidroxílico em  $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ .

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (APÊNDICE B) apresentou dois dubletos na região de campo baixo ( $\delta$  7,00 e 6,67;  $J = 8,4\text{ Hz}$ ) que sugerem a existência de um anel aromático *para*-substituído. Observou-se também a existência de um singlete largo em  $\delta$  5,26, característico de hidrogênios olefínicos e outro singlete em  $\delta$  1,98 com integral para três hidrogênios. A análise do mapa de contornos HSQC (APÊNDICE C) confirmou que seis sinais presentes no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  tratavam-se de hidrogênios metilênicos não equivalentes: H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  2,40 e 2,31;  $\delta_{\text{C}}$  40,3); H-1' ( $\delta_{\text{H}}$  1,95 e 1,87,  $\delta_{\text{C}}$  35,8) e H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  2,64 e 2,58;  $\delta_{\text{C}}$  29,7).

A análise dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (APÊNDICE D) permitiu a determinação dos carbonos acima descritos e de três carbonos quaternários: em  $\delta$  192,6 característico de carbonila cetônica, em  $\delta$  174,2 referente a um carbono olefínico oxigenado e em  $\delta$  155,6 característico de carbonos aromáticos oxigenados.

A estrutura de **1** foi elucidada com auxílio de experimentos de RMN bidimensionais. No mapa de contornos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (APÊNDICE E) observam-se as correlações entre H-3 e H-2 e de H-1' com H-2' e H-2. As principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC (APÊNDICE F) são entre H-2''/6'' ( $\delta_{\text{H}}$  7,00) e C-2' ( $\delta_{\text{C}}$  29,7); H-5 ( $\delta_{\text{H}}$  5,26) e C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  40,3); a posição da metila foi confirmada pela correlação H-7 ( $\delta_{\text{H}}$  1,98) e C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  104,4) (Figura 14).

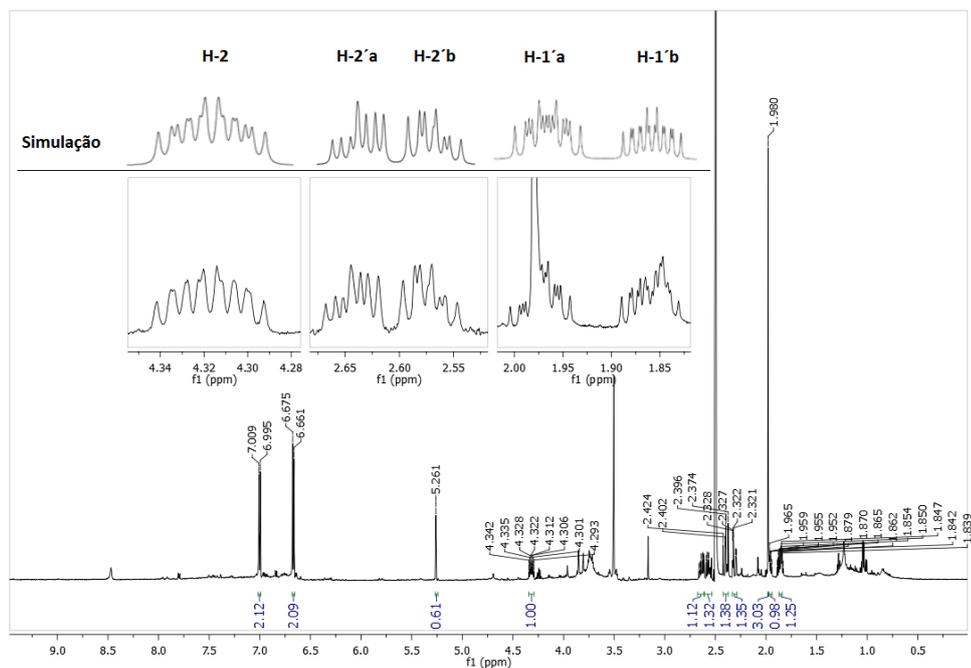
A sugestão da estrutura de **1** como sendo 2-[2'-(4-hidroxifenil)etil]-6-metil-2,3-diidro-4*H*-piran-4-ona foi corroborada pelas correlações observadas no experimento de TOCSY-1D entre H-2 e H-3, H-1' e H-2' (APÊNDICE G).



**Figura 14** – Correlações observadas no mapa de contornos HMBC ( $\rightarrow$ ) e no  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY ( $\leftrightarrow$ ) para a substância **1**

A existência de hidrogênios metilênicos não equivalentes sugere a presença de um centro estereogênico na estrutura, que para a substância **1** está situado na posição 2 do núcleo diidro-4*H*-piran-4-ona. Pela análise das constantes de acoplamento dos hidrogênios H-3a ( $\delta$  2,40 *dd*,  $J = 16,8$  e 13,2 Hz) e H-3b ( $\delta$  2,31 *ddd*,  $J = 16,8$ ; 3,7 e 0,7) com H-2  $\delta$  4,32 pode-se propor uma conformação *pseudo*-axial para H-2.

A fim de corroborar com a análise conformacional e sugerir as constantes de acoplamento para os hidrogênios H-2, H-1' a/b e H-2' a/b, foram realizadas simulações das constantes de acoplamento por meio do programa WINDNMR-Pro (Dnmr71),<sup>33</sup> as quais resultaram no espectro simulado observado na Figura 15 e nos valores de constantes de acoplamento relacionados na Tabela 3.



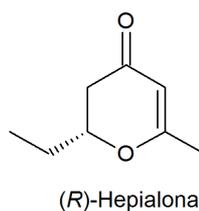
**Figura 15** – Comparação da feição espectral dos sinais de H-2, H-1' a/b e H-2' a/b com os resultados obtidos na simulação

**Tabela 3** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de **1** (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ,  $J$  = Hz, 14,1 T)

Posição	<b>1</b>	
	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
2	78,4	4,32 <i>dddd</i> (13,2; 8,1; 5,6; 3,7)*
3a	40,3	2,40 <i>dd</i> (16,8; 13,2)
3b		2,31 <i>ddd</i> (16,8; 3,7; 0,7)
4	192,6	-
5	104,4	5,26 <i>sl</i>
6	174,2	-
7	20,8	1,98 <i>sl</i>
1'a	35,8	1,95 <i>dddd</i> (13,1; 9,6; 8,1; 5,9)*
1'b		1,87 <i>dddd</i> (13,1; 9,0; 5,6; 4,4)*
2'a	29,7	2,64 <i>ddd</i> (13,1; 9,6; 4,4)*
2'b		2,58 <i>ddd</i> (13,1; 9,0; 5,9)*
1''	131,3	-
2''/6''	129,4	7,00 <i>d</i> (8,4)
3''/5''	115,3	6,67 <i>d</i> (8,4)
4''	155,6	-

\* Constantes de acoplamento e multiplicidades simuladas

A determinação da configuração absoluta de C-2 foi feita mediante comparação com os dados da substância (*R*)-hepialona (Figura 16) descritos na literatura.<sup>34</sup> A curva de dicroísmo circular (DC) da substância modelo hepialona, de configuração absoluta 2*R*, possui efeitos Cotton positivos em 261 e 312 nm e valor de  $[\alpha]_D + 106,4$  (*c* 1,09, EtOH).<sup>35</sup> No entanto, como **1** apresenta um perfil oposto  $[\alpha]_D - 12,85$  (*c* 0,001, MeOH) e a curva de DC exibe efeitos Cotton negativos em 270 nm ( $- 40,0$ ) e 318 nm ( $- 61,5$ ) (APÊNDICE H), determinou-se a configuração absoluta da substância.

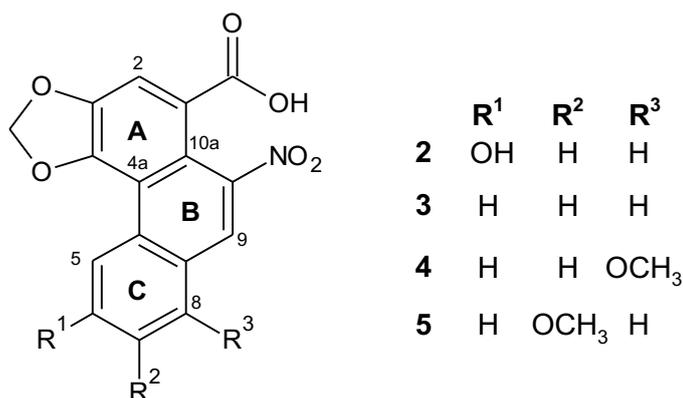


**Figura 16** – Estrutura química da substância hepialona

No espectro de HRMS (APÊNDICE I) observa-se o pico referente a molécula protonada com  $m/z$  233,1175  $[M + H]^+$  e o pico com  $m/z$  255,0991  $[M + Na]^+$  compatíveis com a fórmula molecular  $C_{14}H_{16}O_3$  (calculado para  $C_{14}H_{17}O_3$ , 233,1178), confirmando, juntamente com as demais informações, com isso a substância foi identificado como (2*S*)-2-[2'-(4-hidroxifenil)etil]-6-metil-2,3-dihidro-4*H*-piran-4-ona (**1**). Esta substância está sendo relatada pela primeira vez na literatura.

Na literatura há relatos de substâncias análogas a **1**, mas de origem sintética.<sup>36</sup> Enquanto que de origem natural, as estruturas mais similares são os derivados de ericanona,<sup>37; 38</sup> os quais apresentam uma unidade  $C_6C_2$  ligada ao C-6 da dihidro-4*H*-piran-4-ona.

### 5.1.2 Ácidos aristolóquicos (2 – 5)



Os ácidos aristolóquicos são compostos presentes em várias espécies de Aristolochiaceae. Estes apresentam estruturas fenantrênicas contendo um grupo ácido carboxílico (–COOH) ligado em C-1 e um grupamento nitro (–NO<sub>2</sub>) em C-10.

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H de **2** – **5** apresentam sinais típicos de hidrogênios aromáticos em sistema altamente conjugado, além de singletos característicos de hidrogênios metilenodioxílicos ( $\delta$  6,4-6,5).

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **2** (APÊNDICE J) apresenta um padrão de deslocamento químico e multiplicidade dos hidrogênios H-5, H-7 e H-8 que evidenciam a presença de um substituinte no anel C ( $\delta$  8,47, *d*, *J* = 2,2 Hz; 7,28, *dd*, *J* = 8,7, 2,2 Hz; 8,10, *d*, *J* = 8,7 Hz). A posição do substituinte foi estabelecida com base no valor de deslocamento químico do hidrogênio com acoplamento *meta*, uma vez que a posição 5 normalmente apresenta hidrogênios mais desprotegidos devido a interação com o oxigênio do grupamento metilenodioxílico. Comparando-se os dados obtidos (Tabela 4) com os descritos na literatura,<sup>39</sup> identificou-se a substância **2** como ácido aristolóquico IIIa.

Por meio da análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **3** (APÊNDICE K), nota-se a presença de dois singletos referentes aos hidrogênios H-2 e H-9 e a presença de outros quatro hidrogênios aromáticos pertencentes às posições 5 a 8. As multiplicidades, os valores de deslocamentos químicos, a comparação com a literatura<sup>39</sup> e com substâncias isoladas e identificadas em nosso grupo de pesquisa<sup>40</sup> auxiliaram na identificação da substância **3** como sendo o ácido aristolóquico II (Tabela 4).

**Tabela 4** – Dados de RMN de <sup>1</sup>H de **2** e **3** (DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ , *J* = Hz, 14,1 T)

Posição	<b>2</b>	ácido aristolóquico IIIa <sup>39</sup>	<b>3</b>	ácido aristolóquico II <sup>39</sup>
2	7,76 <i>s</i>	7,76 <i>s</i>	7,75 <i>s</i>	7,81 <i>s</i>
5	8,47 <i>d</i> (2,2)	8,48 <i>d</i> (2,5)	9,07 <i>d</i> (8,4)	9,07 <i>d</i> (8,3)
6	-	-	7,86 <i>t</i> (7,5)	7,90 <i>t</i> (8,3)
7	7,28 <i>dd</i> (8,7; 2,2)	7,29 <i>dd</i> (8,5; 2,5)	7,77 <i>t</i> (7,5)	7,82 <i>t</i> (8,3)
8	8,10 <i>d</i> (8,7)	8,10 <i>d</i> (8,5)	8,21 <i>d</i> (7,5)	8,25 <i>m</i>
9	8,49 <i>s</i>	8,49 <i>s</i>	8,41 <i>s</i>	8,58 <i>s</i>
OCH <sub>2</sub> O	6,49 <i>s</i>	6,48 <i>s</i>	6,44 <i>s</i>	6,51 <i>s</i>

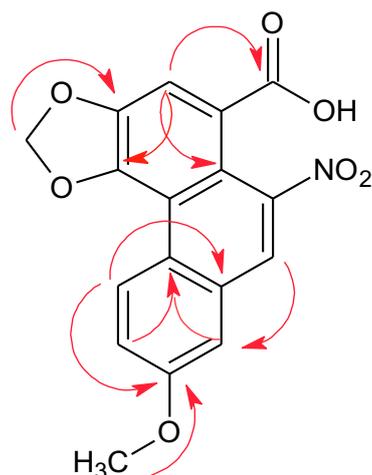
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura de **4** e **5** (APÊNDICE L) apresenta sinais que indicam a presença de duas metoxilas aromáticas e quatro hidrogênios metilenodioxílicos. As diferenças nas integrais confirmam a presença de duas substâncias distintas, sendo que a majoritária é a substância **5**.

Os deslocamentos químicos e multiplicidades dos hidrogênios aromáticos evidenciam a presença de substituintes no anel C. Para a substância **4** o substituinte está na posição 8 e, por meio da comparação com um padrão e os dados da literatura, foi possível identificar a substância como o ácido aristolóquico I<sup>41</sup> (Tabela 5).

Para a substância **5**, as multiplicidades e constantes de acoplamento para os hidrogênios do anel C evidenciam a presença de um substituinte nas posições 6 ou 7. Existem duas posições que poderiam resultar em um dubleto com constante de acoplamento *meta*: a posição 5 (no caso do substituinte estar no carbono 6) ou a posição 8 (no caso do substituinte estar na posição 7).

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (APÊNDICE M) observam-se 15 sinais majoritários, com ausência de dois carbonos quaternários oxigenados em  $\delta \sim 145$ , mas que são visualizados no mapa de contornos HMBC. Observa-se, em alta frequência, um sinal referente a carbonila de um ácido carboxílico em  $\delta 168,5$ , um carbono aromático oxigenado em  $\delta 159,3$  e um carbono aromático ligado a um grupamento nitro em  $\delta 146,3$ ; os carbonos aromáticos estão entre  $\delta 131 - 111$ , já o carbono em  $\delta 103,2$  refere-se ao grupo metilenodioxílico e o  $\delta 56,0$  ao carbono metoxílico aromático, que sugerem a estrutura de um ácido aristolóquico metoxilado.

A posição do substituinte em C-7 foi determinada com base nas correlações observadas no mapa de contornos HMBC (APÊNDICE N) entre H-9 ( $\delta_{\text{H}} 8,47$  *s*,  $\delta_{\text{C}} 125,5$ ) e C-8 ( $\delta_{\text{C}} 111,6$ ,  $\delta_{\text{H}} 7,79$  *d*,  $J = 1,8$  Hz), e a correlação entre H-5 ( $\delta 8,99$  *d*,  $J = 9,0$  Hz) e C-7 ( $\delta 159,3$ ) (Figura 17). A confirmação que o substituinte aromático trata-se de uma metoxila foi obtida por meio da correlação entre o hidrogênio metílico em  $\delta 3,94$  com o C-7 ( $\delta 159,3$ ). Os demais valores deslocamento químico de  $^{13}\text{C}$  foram atribuídos com auxílio do mapa de contornos HSQC (APÊNDICE O).

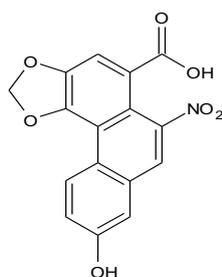


**Figura 17** – Correlações observadas no mapa de contornos HMBC para estrutura **5**

A fim de confirmar a estrutura da substância **5** foi efetuada a separação por CLAE das substâncias **4** e **5**, pela qual conseguiu-se obter quantidade de material suficiente para realizar o experimento de espectrometria de massas de alta resolução (APÊNDICE P).

O espectro de massas de alta resolução apresenta um pico  $m/z$  342,0610 [ $M + H$ ]<sup>+</sup> referente a fórmula  $C_{17}H_{11}NO_7$  e compatível com a estrutura determinada pelos demais experimentos realizados (calculado para  $C_{17}H_{12}NO_7$ , 342,0613). O espectro de absorção na região do infravermelho evidenciou a presença de estiramentos referentes a uma carbonila em  $1699\text{ cm}^{-1}$ , um grupo hidroxílico em  $3145\text{ cm}^{-1}$  e um grupamento nitro em  $1340$  e  $1521\text{ cm}^{-1}$  (APÊNDICE Q).

Sendo assim, a substância **5** foi denominada de ácido 7-O-metil-aristolóquico F e está sendo descrita pela primeira vez na literatura. Até o momento, o ácido aristolóquico F, que possui uma hidroxila em C-7 (Figura 18), era a única substância descrita com esse padrão de substituição no anel C de ácidos aristolóquicos.<sup>42</sup>

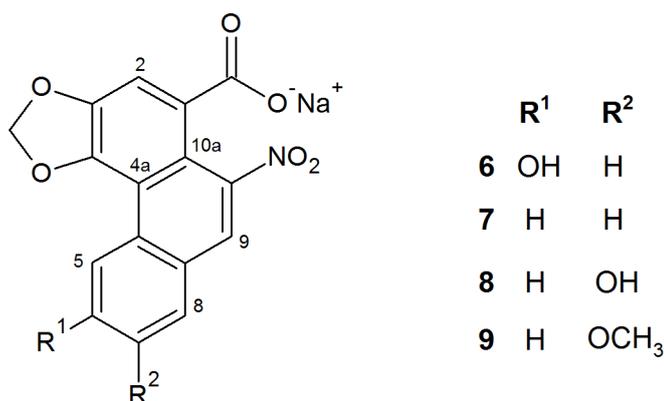


**Figura 18** – Estrutura química do ácido aristolóquico F.

**Tabela 5** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de **4** e **5** (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ,  $J$  = Hz, 14,1 T).

Posição	<b>4</b>	<b>ácido aristolóquico I<sup>41</sup></b>	<b>5</b>	$^{13}\text{C}$
	$^1\text{H}$	$^1\text{H}$	$^1\text{H}$	
1	-	-	-	125,7
2	7,80 <i>s</i>	7,82 <i>s</i>	7,72 <i>s</i>	111,5
3	-	-	-	145,9*
4	-	-	-	145,3*
4a	-	-	-	117,9
4b	-	-	-	123,2
5	8,67 <i>d</i> (8,4)	8,66 <i>d</i> (8,0)	8,99 <i>d</i> (9,0)	128,6
6	7,86 <i>t</i> (7,8)	7,86 <i>t</i> (8,0)	7,51 <i>dd</i> (9,0; 2,4)	120,5
7	7,38 <i>d</i> (7,8)	7,38 <i>d</i> (8,0)	-	159,3
8	-	-	7,79 <i>d</i> (2,4)	111,6
8a	-	-	-	131,1
9	8,55 <i>sl</i>	8,59 <i>s</i>	8,47 <i>sl</i>	125,5
10	-	-	-	146,3
10a	-	-	-	116,1
11	-	-	-	168,5
OCH <sub>2</sub> O	6,48 <i>s</i>	6,50 <i>s</i>	6,46 <i>s</i>	103,2
OCH <sub>3</sub>	4,06 <i>s</i>	4,07 <i>s</i>	3,94 <i>s</i>	56,0

\*Dados obtidos por meio de experimentos de HMBC

**5.1.3 Aristolocatos de sódio (6 – 9)**

As substâncias **6 – 9** são sais de alguns dos ácidos aristolóquicos isolados. Os sinais presentes nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  destes compostos são similares aos dos ácidos aristolóquicos, nos quais observam-se sinais de hidrogênios

aromáticos em sistemas altamente conjugados e sinais referentes a hidrogênios metilenodioxílicos.

De acordo com Leu e colaboradores (1998),<sup>41</sup> a principal distinção observada nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  entre os ácidos aristolóquicos e seus sais refere-se aos deslocamentos químicos de H-9, sendo que nos aristolocatos este hidrogênio absorve em frequência ligeiramente menor ( $\Delta\delta = 0,2-0,3$ ) do que nos respectivos ácidos. Outra diferença que pode ser observada, refere-se à diminuição da frequência de absorção no infravermelho da carbonila dos aristolocatos em relação aos ácidos aristolóquicos, que pode ser justificada pela diminuição da força da ligação entre o átomo de carbono e oxigênio ocasionada pela maior deslocalização dos elétrons, resultando em absorções em menores números de onda.

A substância **6** possui um padrão de substituição do anel C similar ao observado para o ácido aristolóquico IIIa (**2**) e mediante análise dos deslocamentos químicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (APÊNDICE R) e comparação com a literatura<sup>43</sup> pode-se identificar a substância com o aristolocato de sódio IIIa.

Uma análise minuciosa dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de **7** (APÊNDICE S) permitiu evidenciar que não há substituição no anel C, sendo, portanto, o sal do ácido aristolóquico II (**3**). Essa proposta foi confirmada pela comparação dos dados espectroscópicos obtidos (Tabela 6) com os disponíveis na literatura.<sup>43</sup>

**Tabela 6** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de **6** e **7** (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ,  $J$  = Hz, 14,1 T).

Posição	<b>6</b>	Aristolocato de sódio IIIa <sup>43</sup>	<b>7</b>	Aristolocato de sódio II <sup>43</sup>
2	7,65 s	7,69 s	7,65 s	7,80 s
5	8,43 <i>d</i> (2,2)	8,43 <i>d</i> (2,2)	9,06 <i>d</i> (8,4)	9,05 <i>d</i> (8,0)
6	-	-	7,81 <i>dd</i> (8,4, 7,8)	7,79 <i>t</i> (8,0)
7	7,21 <i>dd</i> (8,6; 2,2)	7,21 <i>dd</i> (8,4; 2,2)	7,73 <i>t</i> (7,8)	7,74 <i>t</i> (8,0)
8	7,99 <i>d</i> (8,6)	7,98 <i>d</i> (8,4)	8,16 <i>d</i> (7,8)	8,17 <i>d</i> (8,0)
9	8,17 <i>sl</i>	8,18 s	8,26 s	8,33 s
OCH <sub>2</sub> O	6,37 s	6,36 s	6,39 s	6,41 s

As substâncias **8** e **9** apresentam espectros de absorção no infravermelho característicos de sais de ácidos aristolóquicos, nos quais a banda de absorção da

carbonila é em menor número de onda (1540 - 1580  $\text{cm}^{-1}$ ) do que para os ácidos carboxílicos (1700 – 1730  $\text{cm}^{-1}$ ) (APÊNDICE T e APÊNDICE U).

O espectro de massas de alta resolução da substância **8** (APÊNDICE V) apresenta, em modo positivo, um pico  $m/z$  350,0268  $[\text{M} + \text{H}]^+$  compatível com a fórmula  $\text{C}_{16}\text{H}_8\text{NO}_7\text{Na}$  (calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{NO}_7\text{Na}$ , 350,0271) e em modo negativo um pico base de  $m/z$  326,0315  $[\text{M} - \text{Na}]^-$ . Para a substância **9** (APÊNDICE W) observa-se um pico de  $m/z$  364,0428  $[\text{M} + \text{H}]^+$  e outro em  $m/z$  342,0608  $[\text{M} + \text{H} - \text{Na}]^+$  que resultam na fórmula  $\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{NO}_7\text{Na}$  (calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{NO}_7\text{Na}$ , 364,0428).

As duas substâncias em questão apresentam nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (APÊNDICE X e APÊNDICE Y) deslocamentos químicos e multiplicidades que sugerem o mesmo padrão de substituição do anel C, no qual há um substituinte na posição 7. A ausência de outros sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , assim como a fórmula determinada pela espectrometria de massas sugerem que a substância **8** possui uma hidroxila nesta posição. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (APÊNDICE Z) de **8** nota-se a presença de três carbonos oxigenados aromáticos que, juntamente com as correlações nos mapas de contornos HSQC (APÊNDICE AA) e HMBC (APÊNDICE BB) que confirmam esta sugestão.

Já para a substância **9**, a existência de um sinal em  $\delta$  3,91 com correlação em  $\delta$  55,8 no mapa de contornos HSQC (APÊNDICE CC) sugere que a esta substância possui uma metoxila. A posição da metoxila foi confirmada por meio das correlações observadas entre H-5 e  $\text{OCH}_3$  com C-7 no mapa de contornos HMBC (APÊNDICE DD), portanto esta substância trata-se do sal da substância **5**. As demais correlações observadas nos mapas de contornos HMBC entre os carbonos oxigenados C-4, C-11 e H-2; assim como C-8 e H-9 corroboram com a determinação estrutural destas substâncias.

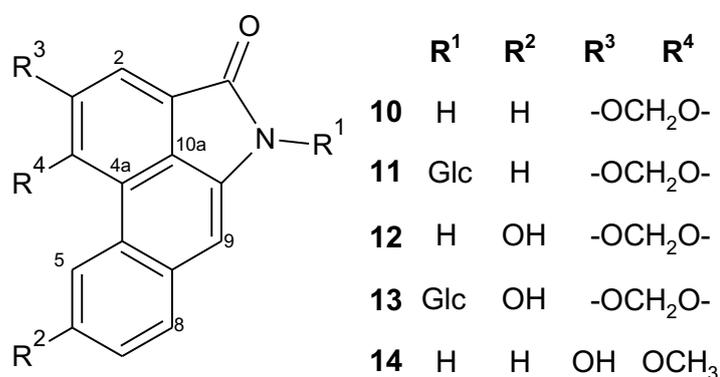
Por fim, pode-se identificar a substância **8** como sendo o aristolcato de sódio F e a substância **9** como 7-O-metil-aristolcato de sódio F. Estas substâncias são descritas pela primeira vez na literatura.

**Tabela 7** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **8** e **9** (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ,  $J$  = Hz, 14,1 T).

Posição	<b>8</b>		<b>9</b>	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}^*$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	-	125,3	-	<sup>a</sup>
2	7,67 <i>s</i>	111,1	7,61 <i>s</i>	113,9
3	-	147,4	-	145,7
4	-	147,5	-	143,4
4a	-	118,1	-	117,6
4b	-	122,0	-	122,3
5	8,92 <i>d</i> (9,0)	128,8	8,97 <i>d</i> (9,0)	128,5
6	7,37 <i>dd</i> (9,0; 1,8)	120,8	7,44 <i>dd</i> (9,0; 3,0)	119,5
7	-	157,8	-	158,0
8	7,50 <i>d</i> (1,8)	114,0	7,69 <i>sl</i>	111,0
8a	-	131,2	-	130,5
9	8,37 <i>sl</i>	125,2	8,24 <i>sl</i>	123,8
10	-	146,1	-	146,6
10a	-	115,9	-	117,3
11	-	168,7	-	168,0
OCH <sub>2</sub> O	6,44 <i>s</i>	103,0	6,36 <i>s</i>	101,6
OCH <sub>3</sub>	-	-	3,91 <i>s</i>	55,8

\*Dados obtidos por meio de experimentos de HSQC e HMBC

#### 5.1.4 Aristolactamas (10 – 14)



As substâncias **10** – **14** apresentam em seus espectros de RMN de  $^1\text{H}$  sinais correspondentes a hidrogênios aromáticos em sistemas com alto grau de

conjugação ( $\delta$  7,1 – 8,5), hidrogênios metilenodioxílicos aromáticos ( $\delta \sim 6,5$ ) e, para as substâncias **11** e **13**, hidrogênios anoméricos ( $\delta \sim 5,3$ ).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **10** (APÊNDICE EE) revela a presença de dois dubletos largos com constante de acoplamento *orto* em  $\delta$  8,55 e 7,98, em conjunto com dois triplos dubletos em  $\delta$  7,61 e 7,58 que evidenciam a ausência de substituintes no anel C da estrutura. Além desses sinais, também são observados quatro singletos: um em  $\delta$  6,49, referente aos hidrogênios metilenodioxílicos, dois em  $\delta$  7,16 e 7,67 pertencentes a H-2 e H-9, respectivamente, e um em  $\delta$  10,84 relacionado a um hidrogênio ligado a um heteroátomo. A atribuição dos deslocamentos químicos observados é condizente com a estrutura da aristolactama II (Tabela 8).<sup>44</sup>

A substância **11** foi isolada em mistura com a substância **12** (APÊNDICE FF), porém é possível observar no espectro sinais com deslocamentos químicos e multiplicidades semelhantes à substância **10**. A integração dos sinais presentes no espectro mostram que o dubleto em  $\delta$  5,34 pertence a substância **11**. Portanto, com base na comparação dos dados obtidos com os da literatura,<sup>45</sup> foi possível identificar a substância **11** como sendo a aristolactama II *N*- $\beta$ -glicosídeo ou também chamada de cepharanona A *N*- $\beta$ -glicosídeo.

A substância **12** também foi obtida isoladamente. As multiplicidades e os deslocamentos químicos dos hidrogênios aromáticos do anel C sugerem uma substituição em C-6 e, juntamente com os demais dados de RMN de  $^1\text{H}$  (APÊNDICE GG), possibilitaram a confirmação de **12** como sendo aristolactama IIIa (Tabela 9).<sup>46</sup>

A análise dos deslocamentos químicos e das multiplicidades dos sinais dos hidrogênios aromáticos referentes ao anel C presentes no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (APÊNDICE HH) sugere que a substância **13** possui substituinte em C-6, assim como a substância anterior. A ausência de singlete em  $\delta \sim 10$  referente a NH, juntamente com a presença de um dubleto em  $\delta$  5,32 com constante de acoplamento de 9,0 Hz e de sinais em  $\delta$  4,0-3,1 sugerem que a estrutura apresenta um glicosídeo ligado ao nitrogênio lactâmico.

**Tabela 8** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de **10** e **11** (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ,  $J$  = Hz, 14,1 T).

Posição	10	Aristolactama II <sup>44</sup>	11	Aristolactama II N- $\beta$ -glicosídeo <sup>45</sup>
2	7,67 <i>s</i>	7,60 <i>s</i>	7,63 <i>s</i>	7,64 <i>s</i>
5	8,55 <i>dl</i> (7,8)	8,5 <i>m</i>	8,59 <i>dl</i> (7,8)	8,57 <i>m</i>
6	7,61 <i>td</i> (7,8; 1,2)	7,5-7,7 <i>m</i>	7,66 <i>m</i>	7,67 <i>m</i>
7	7,58 <i>td</i> (7,8; 1,2)	7,5-7,7 <i>m</i>	7,66 <i>m</i>	7,67 <i>m</i>
8	7,98 <i>d</i> (7,8)	7,9 <i>m</i>	8,05 <i>dl</i> (7,8)	8,04 <i>m</i>
9	7,16 <i>s</i>	7,10 <i>s</i>	7,47 <i>s</i>	7,45 <i>s</i>
NH	10,84 <i>s</i>	10,75 <i>s</i>	-	-
OCH <sub>2</sub> O	6,49 <i>s</i>	6,45 <i>s</i>	6,53 <i>sl</i>	6,51 <i>s</i>
	-	-	6,51 <i>sl</i>	-
1'	-	-	5,33 <i>d</i> (9,6)	5,32 <i>d</i> (9,3)
2'	-	-	3,30 – 4,0 <i>m</i>	3,10 – 3,50 <i>m</i>
3'	-	-	3,30 – 4,0 <i>m</i>	3,10 – 3,50 <i>m</i>
4'	-	-	3,30 – 4,0 <i>m</i>	3,10 – 3,50 <i>m</i>
5'	-	-	3,30 – 4,0 <i>m</i>	3,10 – 3,50 <i>m</i>
6'	-	-	3,30 – 4,0 <i>m</i>	3,73 <i>m</i>

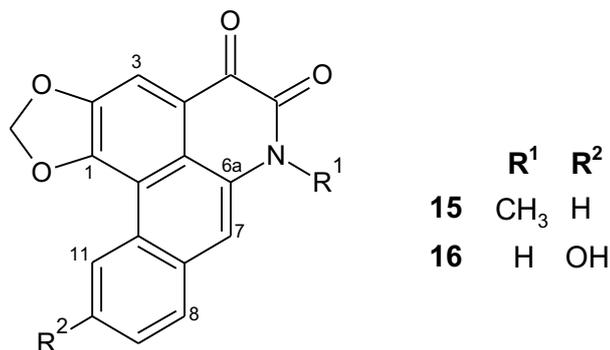
Por meio do experimento de TOCSY 1D (APÊNDICE II) com irradiação no hidrogênio anomérico, foi possível atribuir os deslocamentos químicos dos hidrogênios pertencentes a unidade glicosídica. As correlações observadas no mapa de contornos HMBC entre H-1' com C-10 e com o carbono carbonílico confirmam a posição *N*-glicosídica. Com base nos dados descritos na literatura<sup>47</sup> pode-se afirmar que a substância **13** é a aristolactama IIIa *N*- $\beta$ -glicosídeo.

A aristolactama **14** se diferencia das demais devido à ausência do sinal referente aos hidrogênios metilenodioxílicos e a presença de um singlete em  $\delta$  4,02 no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (APÊNDICE JJ). Além deste sinal também são observados três singletos:  $\delta$  10,80 referente ao grupamento amida,  $\delta$  7,62 e  $\delta$  7,09 relacionados a H-2 e H-9, respectivamente. Os deslocamentos químicos e multiplicidades dos demais sinais sugerem a ausência de substituintes no anel C da estrutura química. Com base nos dados experimentais e comparação com a literatura<sup>48</sup> foi possível identificar a aristolactama AII.

Tabela 9 – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  12 – 14 (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ,  $J$  = Hz, 14,1 T).

Posição	12	Aristolactama IIIa <sup>46</sup>	13	Aristolactama IIIa N- $\beta$ -glicosídeo <sup>47</sup>	14	Aristolactama AII <sup>48</sup>
2	7,62 s	7,60 s	7,72 s	7,69 s	7,62 s	7,62 s
5	7,97 d (2,5)	7,96 d (2,5)	8,0 d (2,4)	7,98 d (2,5)	9,10 d (7,8)	9,07 m
6	-	-	-	-	7,57 td (7,8; 1,2)	7,53 m
7	7,10 dd (8,6; 2,5)	7,14 dd (7,8; 2,5)	7,13 dd (8,4; 2,4)	7,11 dd (9,0; 2,5)	7,54 td (7,8; 1,2)	7,53 m
8	7,79 d (8,6)	7,78 d (7,8)	7,86 d (8,4)	7,84 d (9,0)	7,94 dd (7,8; 1,8)	7,90 m
9	7,05 s	7,05 s	7,35 s	7,32 s	7,09 s	7,09 s
NH	10,66 s	10,68 s	-	-	10,80 s	10,79 sl
OCH <sub>2</sub> O	6,48 s	6,47 s	6,51 d (0,6)	6,49 sl	-	-
	-	-	6,50 sl	6,48 sl	-	-
OCH <sub>3</sub>	-	-	-	-	4,02 s	4,00 s
1'	-	-	5,32 d (9,0)	5,31 d (9,0)	-	-
2'	-	-	3,99 t (8,4)	3,97 m	-	-
3'	-	-	3,35 m	3,34 m	-	-
4'	-	-	3,37 m	3,48 m	-	-
5'	-	-	3,39 m	3,73 m	-	-
6'	-	-	3,77 d (6,4)	3,70 m	-	-
			3,50 dd (12,0; 6,4)		-	-

### 5.1.5 Alcaloides 4,5-dioxoaporfínicos (15 e 16)



Os alcaloides 4,5-dioxoaporfínicos são derivados fenantrênicos que, assim como os ácidos aristolóquicos, apresentam um sistema conjugado que resulta em sinais de RMN na região de alta frequência. A principal distinção entre esses alcaloides e os ácidos aristolóquicos está no deslocamento químico do hidrogênio da posição 3, que se apresenta mais desprotegido nos alcaloides 4,5-dioxoaporfínicos devido a presença de dois grupos eletrofílicos carbonílicos.

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto **15** (APÊNDICE KK) nota-se a existência de quatro singletos: dois relativos a H-3 e H-7 em  $\delta$  8,17 e 7,56, respectivamente, um em  $\delta$  6,47 relacionado aos dois hidrogênios metilenodioxílicos e um em  $\delta$  3,88 referente aos hidrogênios metílicos ligados ao nitrogênio.

A posição da metila foi confirmada por meio de experimento de NOESY 1D (APÊNDICE LL) com irradiação em H-7 ( $\delta$  7,56), no qual é possível observar a interação espacial existente entre este com a metila ( $\delta$  3,88) e com H-8 ( $\delta$  7,92-7,91). Por meio das correlações observadas no mapa de contornos HMBC (APÊNDICE MM) entre a metila ( $\delta$  3,88) com os carbonos C-5 ( $\delta$  156,6) e C-6a ( $\delta$  132,2) foi possível confirmar que a estrutura se trata de um derivado de alcaloide 4,5-dioxoaporfínico. A análise dos dados, e posterior comparação com a literatura,<sup>49</sup> resultou na identificação da substância **15** como sendo a cepharadiona A (Tabela 10), comumente encontrada em espécies de Aristolochiaceae.

A substância **16** também apresenta singletos referentes aos hidrogênios das posições 3 e 7 com maior deslocamento químico do que o observado para as demais substâncias isoladas. Cabe ressaltar que o solvente utilizado (DMSO-*d*<sub>6</sub>) para a obtenção dos espectros é distinto do utilizado para a substância **15**. No espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **16** (APÊNDICE NN) não se observam sinais

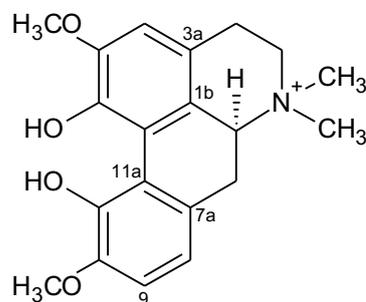
referentes a hidrogênios metílicos, porém observam-se dois singletos na região de alta frequência:  $\delta$  10,23 e 12,03. As multiplicidades dos hidrogênios presentes no anel C e a existência de uma correlação entre H-8 ( $\delta$  7,83) com C-10 ( $\delta$  157,1) no mapa de contornos HMBC confirmaram a existência de um substituinte oxigenado na posição 10. A comparação dos deslocamentos químicos da substância **16** com a literatura<sup>50</sup> permitiu a identificação da tuberosinona.

**Tabela 10** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de **15** e **16** ( $\delta$ ,  $J$  = Hz, 14,1 T).

Posição	15 <sup>a</sup>	Cepharadiona A <sup>49a</sup>	16 <sup>b</sup>	Tuberosinona <sup>50b</sup>
3	8,17 s	8,15 s	7,99 s	7,86 s
11	9,03-9,01 m	9,01 m	8,34 d (2,4)	8,24 d (2,0)
10	7,69-7,67 m	7,68 m	-	-
9	7,69-7,67 m	7,68 m	7,20 dd (8,6; 2,4)	7,14 dd (8,0; 2,0)
8	7,92-7,91 m	7,91 m	7,83 d (8,6)	7,74 d (8,0)
7	7,56 s	7,54 s	7,51 s	7,39 s
OCH <sub>2</sub> O	6,47 s	6,46 s	6,59 s	6,50 s
NCH <sub>3</sub>	3,88 s	3,86 s	-	-
NH	-	-	12,00 s/	12,00 s/
OH	-	-	10,23 s/	10,00 s/

<sup>a</sup> Espectro obtido em CDCl<sub>3</sub>; <sup>b</sup> Espectro obtido em DMSO-*d*<sub>6</sub>

### 5.1.6 Magnoflorina (17)



**17**

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **17** (APÊNDICE OO) observa-se a presença de sinais referentes a três hidrogênios aromáticos, cujas multiplicidades e constantes de

acoplamento sugerem ser de dois anéis aromáticos e sinais correspondentes a hidrogênios alifáticos em  $\delta \sim 2,5 - 4,4$ ; e de dois grupos metoxílicos aromáticos em  $\delta$  3,66 e 3,69.

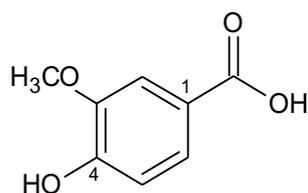
Por tratar-se de uma substância comumente isolada de espécies de Aristolochiaceae, a feição espectral possibilitou a identificação da substância como sendo o sal de alcaloide aporfínico magnoflorina.

A rotação óptica específica determinada foi de + 100 (MeOH,  $c$  0,03), e a descrita na literatura<sup>51</sup> é  $[\alpha]_D^{25} + 150,0$  ( $c$  0,1, MeOH) para a (+)-magnoflorina; com isso, pode-se definir a configuração absoluta do centro estereogênico e identificar a substância **17**.

**Tabela 11** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de **17** (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ,  $J$  = Hz, 7,1 T).

Posição	<b>17</b>	Magnoflorina <sup>52</sup>
3	6,51 s	6,51 s
4	2,82 <i>dd</i> (17,5; 3,6)	2,86 <i>m</i>
	3,16 <i>m</i>	3,15 <i>m</i>
5	3,66 <i>m</i>	3,66 <i>m</i>
	3,58 <i>m</i>	3,59 <i>m</i>
6a	4,37 <i>dd</i> (13,9; 2,6)	4,38 <i>dl</i> (12,0)
7	3,11 <i>dd</i> (12,5; 3,3)	3,11 <i>dl</i> (12,0)
	2,61 <i>t</i> (13,0)	2,62 <i>t</i> (12,0)
8	6,36 <i>dl</i> (7,8)	6,36 <i>dl</i> (7,5)
9	6,60 <i>d</i> (7,8)	6,60 <i>d</i> (7,5)
OCH <sub>3</sub> -10	3,66 s	3,67 s
OCH <sub>3</sub> -2	3,69 s	3,70 s
N-CH <sub>3</sub>	2,90 s	2,91 s
N-CH <sub>3</sub>	<sup>a</sup>	3,31 s

<sup>a</sup> Sinal obscurecido pela água da solvente

5.1.7 Derivado C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> (18)

18

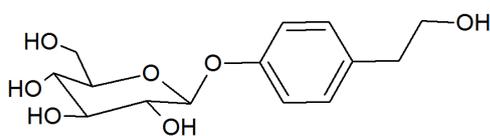
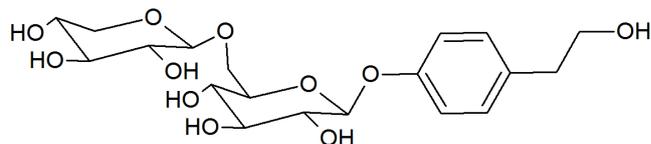
A substância **18** foi identificada com base nos espectros de RMN de <sup>1</sup>H (APÊNDICE PP) e nos mapas de contornos HSQC e HMBC (APÊNDICE QQ e APÊNDICE RR). No espectro de RMN de <sup>1</sup>H observam-se apenas três sinais: um singlete largo em  $\delta$  7,42 referente aos hidrogênios das posições 2 e 6; um dubleto em  $\delta$  6,82 ( $J = 8,5$  Hz, H-5) e um singlete em  $\delta$  3,79 relativo aos hidrogênios metoxílicos. A posição da metoxila foi confirmada por meio das correlações observadas no mapa de contornos HMBC entre os hidrogênios metoxílicos e H-5 com C-3 em  $\delta$  147,5. Por meio dos dados obtidos (Tabela 12) e comparação com os da literatura<sup>53</sup>, e amostra padrão isolada previamente no grupo de pesquisa, foi possível identificar a substância como sendo o ácido vanílico.

**Tabela 12** – Dados de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C de **18** (DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ ,  $J =$  Hz, 14,1 T)

Posição	18		Ácido vanílico <sup>53</sup>	
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C*	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
1		122,6		122,6
2	7,42 <i>sl</i>	112,7	7,42 <i>s</i>	112,6
3		147,5		147,1
4		150,9		151,0
5	6,82 <i>d</i> (8,5)	114,9	6,82 <i>d</i> (7,8)	114,9
6	7,42 <i>sl</i>	123,4	7,43 <i>d</i> (7,6)	123,4
7		167,8		166,8
OCH <sub>3</sub>	3,78 <i>s</i>	55,4	3,80	55,5

\*Dados obtidos por meio de experimentos de HSQC e HMBC

### 5.1.8 Derivados C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub> (19 e 20)

**19****20**

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H dos derivados C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub> obtidos apresentam dois dubletos na região hidrogênios dos aromáticos ( $\delta \sim 7,15$  e  $6,97$ ), com integração relativa a dois hidrogênios e correlações no mapa de contornos HSQC com carbonos em  $\delta$  130 e 116, aproximadamente, indicando a existência de um anel aromático *para*-substituído. A existência de dois tripletos em  $\delta \sim 2,7$  e  $3,5$  sugere a presença de uma cadeia alifática lateral ligada a um heteroátomo.

A substância **19** foi obtida em mistura com a substância **36**. O espectro feito em D<sub>2</sub>O (APÊNDICE SS) apresenta os dubletos referentes aos hidrogênios aromáticos em  $\delta$  7,15 ( $J = 9,0$  Hz) e 6,97 ( $J = 9,0$  Hz), os tripletos relativos à parte alifática acíclica em  $\delta$  2,71 ( $J = 6,6$  Hz) e 3,70 ( $J = 6,6$  Hz) e um dubleto atribuído ao hidrogênio anomérico da unidade glicosídica em  $\delta$  4,99 ( $J = 7,8$  Hz). Os demais sinais dos hidrogênios glicosídicos foram atribuídos com auxílio dos experimentos de TOCSY 1D (APÊNDICE TT) e de HMBC (APÊNDICE UU). A posição da unidade glicosídica foi confirmada pela correlação entre o hidrogênio anomérico (H-1') e o C-4. A comparação dos dados (Tabela 13) com a literatura<sup>54</sup> confirmou a estrutura como sendo o icarisídeo D<sub>2</sub>. Este composto já foi relatado nas espécies *A. melastoma*<sup>55</sup> e *A. gehrtii*<sup>56</sup>.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **20** (APÊNDICE VV) apresenta sinais com deslocamentos químicos semelhantes ao da substância **19**. A distinção entre os dois espectros está no número de hidrogênios anoméricos, uma vez que a substância **20** apresenta dois dubletos em  $\delta$  4,73 ( $J = 7,8$  Hz) e  $\delta$  4,16 ( $J = 7,8$  Hz).

Por meio do número de sinais relativos a cada unidade de açúcar presente tanto no espectro de RMN de <sup>1</sup>H quanto no TOCSY 1D (APÊNDICE WW), juntamente com número de sinais e os deslocamentos químicos dos átomos de carbono das unidades, foi possível identificar a presença de uma unidade de glicose e outra de xilose na substância **20**.

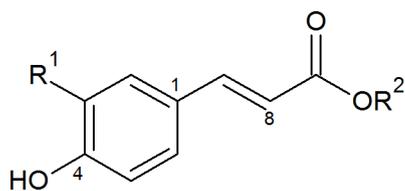
Os demais hidrogênios da unidade de glicose e da xilopiranosose foram atribuídos com auxílio de experimentos de TOCSY 1D, irradiando nos hidrogênios anoméricos, e nas correlações no mapa de contornos HMBC (APÊNDICE XX). A posição da unidade glicosídica foi atribuída com base na correlação existente no mapa de contornos HMBC entre o H-1' ( $\delta$  4,73) e o C-4 ( $\delta$  156,0). Já a conectividade entre o xilopiranosídeo e a unidade glicosídica foi confirmada pela correlação entre o H-1'' ( $\delta$  4,16) e o C-6' ( $\delta$  68,3).

A rotação óptica da substância **20** é  $[\alpha]_D - 20,0$  (c 0,04; MeOH). Portanto, com a análise dos dados (Tabela 13) e comparação com a literatura<sup>57</sup> ( $[\alpha]_D - 48,7$ ; c 0,08; MeOH), foi possível a identificação do tirosol-1-O- $\beta$ -glicopiranosil-(6 $\rightarrow$ 1)-O- $\beta$ -xilopiranosídeo. Este é o primeiro relato desta substância na família Aristolochiaceae.

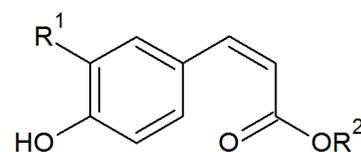
Tabela 13 – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **19** e **20** ( $\delta$ ,  $J$  = Hz, 14,1 T)

Posição	<b>19<sup>a</sup></b>		Icarisídeo <b>D<sub>2</sub><sup>b,55</sup></b>	<b>20<sup>b</sup></b>		tirosol-1- <i>O</i> - $\beta$ -glicopiranosil-(6 $\rightarrow$ 1)- <i>O</i> - $\beta$ -xilopiranosídeo <sup>b,57</sup>
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}^{\text{d}}$		$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}^{\text{d}}$	
2 e 6	7,15 <i>d</i> (9,0)	130,2	7,12 <i>d</i> (8,5)	7,11 <i>d</i> (8,4)	130,0	7,10 <i>d</i> (8,6)
3 e 5	6,97 <i>d</i> (9,0)	116,5	6,93 <i>d</i> (8,5)	6,95 <i>d</i> (8,4)	116,4	6,95 <i>d</i> (8,6)
4		155,3			156,0	
7	2,71 <i>t</i> (6,6)	36,8	2,65-2,67 <i>m</i>	2,64 <i>t</i> (7,2)	38,3	2,64 <i>t</i> (6,5)
8	3,70 <i>t</i> (6,6)	61,2	3,54-3,57 <i>m</i>	<sup>c</sup>	62,7	3,54 <i>t</i> (6,5)
Glc 1'	4,99 <i>d</i> (7,8)	100,2	4,79 <i>d</i> (7,5)	4,73 <i>d</i> (7,8)		4,73 <i>d</i> (7,3)
2'	3,44 <i>dd</i> (9,0; 7,8)	72,6	3,25-3,28 <i>m</i>	3,21-3,25 <i>m</i>		3,22 <i>m</i>
3'	3,49 <i>t</i> (9,0)	75,7	3,14-3,18 <i>m</i>	3,21-3,25 <i>m</i>		3,22 <i>m</i>
4'	3,37 <i>t</i> (9,0)	69,3	3,20-3,24 <i>m</i>	3,16 <i>m</i>		3,14 <i>t</i> (8,8)
5'	3,81 <i>dl</i> (12,0)	70,8	3,28-3,31 <i>m</i>	3,48 <i>m</i>		3,48 <i>dd</i> (8,8; 6,6)
6'	3,64 <i>dd</i> (12,0; 6,0)	60,3	3,45-3,48 <i>m</i>	3,55 <i>m</i>	68,3	3,55 <i>dd</i> (10,9; 6,6)
	3,50 <i>m</i>		3,68-3,70 <i>m</i>	3,91 <i>dl</i> (10,8)		3,93 <i>dd</i> (10,9; 8,8)
Xyl 1''	-		-	4,16 <i>d</i> (7,8)	103,9	4,17 <i>d</i> (7,6)
2''	-		-	2,96 <i>dd</i> (9,0; 7,8)		2,96 <i>dd</i> (8,7; 7,6)
3''	-		-	3,07 <i>t</i> (9,0)		3,06 <i>t</i> (8,7)
4''	-		-	3,22 <i>m</i>		3,22 <i>m</i>
5''	-		-	2,92 <i>m</i>		2,94 <i>t</i> (11,3)
	-		-	3,65 <i>m</i>		3,65 <i>dd</i> (11,3; 5,3)

<sup>a</sup> Dados obtidos em D<sub>2</sub>O; <sup>b</sup> Dados obtidos em DMSO-*d*<sub>6</sub>; <sup>c</sup> Sinal sobreposto ao sinal da água no solvente; <sup>d</sup> Dados obtidos de mapas de contornos

5.1.9 Derivados C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (21 – 26)

	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
<b>21</b>	OCH <sub>3</sub>	H
<b>22</b>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<b>23<math>\alpha</math></b>	H	$\alpha$ -Glc
<b>23<math>\beta</math></b>	H	$\beta$ -Glc



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
<b>24</b>	OCH <sub>3</sub>	H
<b>25</b>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<b>26<math>\alpha</math></b>	H	$\alpha$ -Glc
<b>26<math>\beta</math></b>	H	$\beta$ -Glc

Os compostos C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> encontrados englobam o ácido ferúlico e derivados do ácido cumárico, nas configurações *cis* e *trans*. Estes compostos apresentam fotoisomerização da dupla ligação resultando em amostras que, com o decorrer do tempo, apresentam distintas proporções isoméricas.<sup>58</sup>

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H do ácido ferúlico (**21** + **24**) (APÊNDICE YY) apresenta sinais na região dos hidrogênios aromáticos referentes a um sistema trissubstituído, hidrogênios vinílicos com constantes de acoplamentos referentes às configurações *trans* e *cis* e singletos relativos as metoxilas aromáticas (Tabela 14). A proporção entre os isômeros é de 4:3 *trans/cis*.

As substâncias **22** e **25** apresentam sinais na região de baixa frequência que as diferem das substâncias **21** e **24** anteriormente descritas. Pela análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (APÊNDICE ZZ), observam-se sinais característicos de hidrogênios oxigenados em  $\delta$  4,15 e 4,11; além de dois tripletos em  $\delta$  1,24 e 1,20 referentes às metilas.

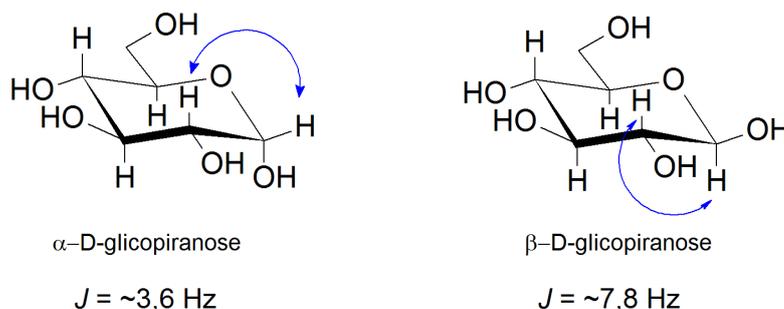
Por meio das correlações observadas no mapa de contornos COSY (APÊNDICE AAA) pode-se confirmar o acoplamento existente entre H-2'' e H-3'', os hidrogênios vinílicos (H-7 e H-8), além dos hidrogênios aromáticos (H-2/6 e H-3/5). A comparação dos dados obtidos (Tabela 15) com os da literatura<sup>59</sup> resultou na identificação de (*E*)-4-hidroxicinamato de etila (**22**) e (*Z*)-4-hidroxicinamato de etila (**25**).



O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  desses compostos (APÊNDICE BBB) evidencia a existência de um sistema AA'XX' com dois dubletos em  $\delta$  7,55 (2H;  $J = 8,4$  Hz) e  $\delta$  6,78 (2H;  $J = 8,4$  Hz) correlacionados entre si no mapa de contornos COSY (APÊNDICE DDD) e com os carbonos em  $\delta$  130,4 e 115,7 no mapa de contornos HSQC (APÊNDICE EEE), respectivamente. Os hidrogênios vinílicos apresentam-se como dois dubletos, referentes às configurações *trans*  $\delta \sim 6,4$  e  $7,3$  ( $J = \sim 15$  Hz) e *cis* em  $\delta \sim 5,7$  e  $6,4$  ( $J = \sim 12$  Hz).

A modificação do ambiente químico na molécula de glicose pela mutarrotação de  $\beta$  para  $\alpha$  promove uma distinção no deslocamento químico do sinal de C-1' e do H-1', o que permite diferenciar e sugerir a presença destes dois anômeros na amostra. A diferença nos valores de deslocamento químico dos hidrogênios anoméricos está relacionada ao efeito de hiperconjugação com os orbitais do átomo de oxigênio e ao efeito de anisotropia do ciclo, onde a circulação dos elétrons que formam as ligações C-C resulta em um cone de desproteção na região do hidrogênio da posição equatorial (configuração  $\alpha$ ). Pela análise da constante de acoplamento é possível distinguir a configuração dos hidrogênios anoméricos  $\alpha$  e  $\beta$  (Figura 20) e, com isso, identificar os demais hidrogênios de cada unidade por experimento de TOCSY 1D (APÊNDICE CCC). Os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram confirmados por meio de correlações observadas nos mapas de contornos COSY, HSQC e HMBC (APÊNDICE FFF). A comparação com os dados da literatura<sup>63</sup> possibilitou a identificação dos compostos como *trans*-6-*O*-*p*-cumaroil-*D*-( $\alpha$  e  $\beta$ )-glicopiranosose (**23 $\alpha$**  e **23 $\beta$** ) e *cis*-6-*O*-*p*-cumaroil-*D*-( $\alpha$  e  $\beta$ )-glicopiranosose (**26 $\alpha$**  e **26 $\beta$** ) (Tabela 16).

Estas substâncias já foram isoladas de outras espécies de *Aristolochia*, como *A. cinnabarina*, *A. cucurbitifolia* e *A. manshuriensis*.<sup>9</sup>



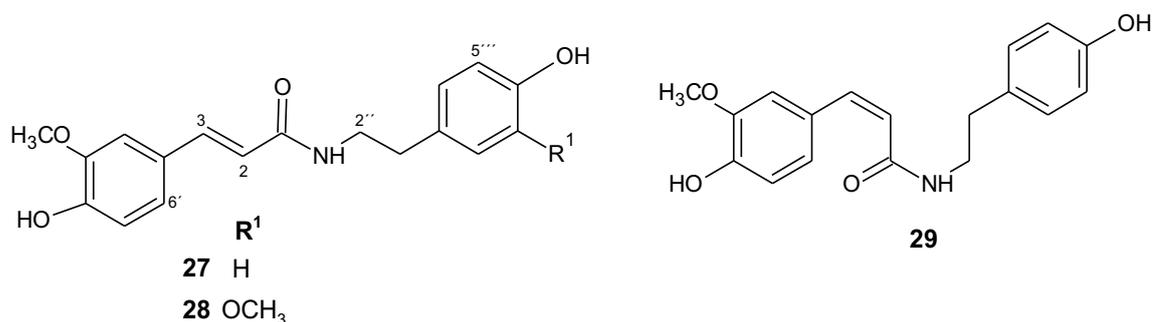
**Figura 20** – Constantes de acoplamento para  $\alpha$  e  $\beta$ -D-glicopiranosose<sup>64</sup>

Tabela 16 – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **23** e **26** ( $\delta$ ,  $J$  = Hz, 14,1 T)

Posição	23 <sup>a</sup>		<i>trans</i> -6- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroil- <i>D</i> -glicopirano <sup>a,63</sup>		26 <sup>a</sup>		<i>cis</i> -6- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroil- <i>D</i> -glicopirano <sup>b,63</sup>	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	-	125,4	-	125,7	-		-	
2 e 6	7,55 <i>d</i> (8,4)	130,4	7,54 <i>d</i> (8,6)	131,0	7,65 <i>d</i> (9,0)		7,65 <i>d</i> (8,4)	
3 e 5	6,78 <i>d</i> (8,4)	115,7	6,78 <i>d</i> (8,6)	116,4	6,75 <i>d</i> (9,0)		6,75 <i>d</i> (8,4)	
7	7,54 <i>d</i> (16,2)	144,9	7,53 <i>d</i> (15,8)	145,6	6,85 <i>d</i> (12,6)		6,81 <i>d</i> (12,9)	
8	6,38 <i>d</i> (16,2)	114,2	6,38 <i>d</i> (15,8)	114,6	5,76 <i>d</i> (12,6)		5,77 <i>d</i> (12,9)	
$\beta$ -glc-1'	4,31 <i>d</i> (7,8)	96,8	4,31 <i>d</i> (7,3)	97,6	4,31 <i>d</i> (7,8)		4,51 <i>d</i> (7,8)	
$\beta$ -glc-2'	2,92 <i>dd</i> (8,4; 7,8)	74,6	<sup>d</sup>	73,6	2,92 <i>dd</i> (8,4; 7,8)		3,14 <i>dd</i> (7,8; 8,7)	
$\beta$ -glc-3'	3,13-3,16 <i>m</i>	76,2	<sup>d</sup>	77,1	3,13-3,16 <i>m</i>		3,33 <sup>c</sup>	
$\beta$ -glc-4'	3,07 <i>t</i> (9,6)	70,2	<sup>d</sup>	70,9	3,07 <i>t</i> (9,6)		4,02 <i>m</i>	
$\beta$ -glc-5'	3,40-3,37 <i>m</i> <sup>c</sup>		<sup>d</sup>	75,4	3,40-3,37 <i>m</i> <sup>c</sup>		3,52 <i>m</i>	
$\beta$ -glc-6'	4,38 <i>dd</i> (12,0; 1,8)	63,7	<sup>d</sup>	64,6	4,38 <i>dd</i> (12,0; 1,8)		4,44 <i>dd</i> (11,8; 2,4)	
	4,09 <i>m</i>		<sup>d</sup>		4,09 <i>m</i>		4,33 <i>dd</i> (11,8; 6,0)	
$\alpha$ -glc-1'	4,91 <i>d</i> (3,6)	92,2	4,91 <i>d</i> (4,1)	92,9	4,91 <i>d</i> (3,6)		5,09 <i>d</i> (3,3)	
$\alpha$ -glc-2'	3,35 <i>m</i> <sup>c</sup>	73,6	<sup>d</sup>	74,2	3,35 <i>m</i> <sup>c</sup>		3,36 <sup>c</sup>	
$\alpha$ -glc-3'	3,13-3,16 <i>m</i>	72,3	<sup>d</sup>	72,8	3,13-3,16 <i>m</i>		3,66 <i>t</i> (9,3)	
$\alpha$ -glc-4'	3,81 <i>m</i>	69,2	<sup>d</sup>	69,6	3,81 <i>m</i>		3,38 <sup>c</sup>	
$\alpha$ -glc-5'	3,09 <i>m</i>	70,3	<sup>d</sup>	71,3	3,09 <i>m</i>		3,33 <sup>c</sup>	
$\alpha$ -glc-6'	4,13 <i>dd</i> (12,0; 5,4)	63,9	<sup>d</sup>	64,7	4,13 <i>dd</i> (12,0; 5,4)		4,29 <i>dd</i> (12,0; 5,1)	
	4,33 <i>m</i>		<sup>d</sup>		4,33 <i>m</i>		4,46 <i>dd</i> (12,0; 2,5)	
CO	-	166,0	<sup>d</sup>	167,3	-		-	

<sup>a</sup> Dados obtidos em DMSO- $d_6$ ; <sup>b</sup> Dados obtidos em CD<sub>3</sub>OD; <sup>c</sup> Sinal sobreposto ao sinal da água no solvente; <sup>d</sup> Dados não fornecidos

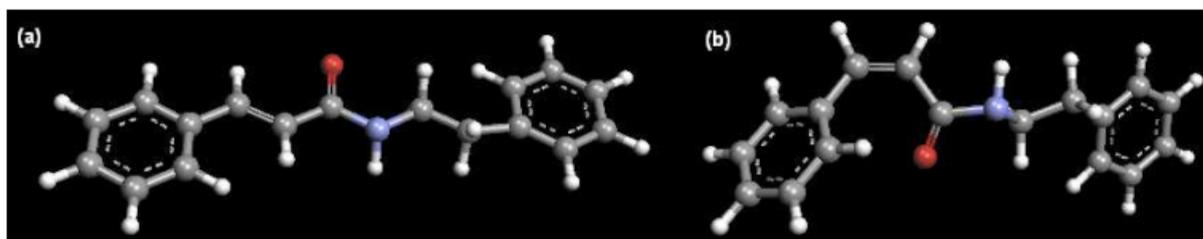
## 5.1.10 Alcamidas (27 – 29)



Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  evidenciam para as substâncias **27** - **29** sinais referentes a dois anéis aromáticos ( $\delta$  6,5 – 7,7), hidrogênios metilenobenzílicos ( $\delta$  ~2,6), hidrogênios olefínicos com configuração *trans* ( $\delta$  ~6,4 e 7,3,  $J = 15,6$  Hz) e *cis* ( $\delta$  ~5,7 e 6,4,  $J = 13,2$  Hz), além de hidrogênios metilênicos ligados a um heteroátomo ( $\delta$  ~3,3, sinal este sobreposto ao sinal da água residual do solvente DMSO- $d_6$ ).

A análise das multiplicidades dos hidrogênios aromáticos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **27** + **29** (APÊNDICE GGG) confirmou a presença de um anel aromático *para*-substituído e outro trissubstituído na estrutura. Pelos valores de deslocamentos mais elevados pode-se concluir que o anel trissubstituído está conjugado a dupla ligação.

Para os hidrogênios relativos às ligações duplas do isômero geométrico *cis* é observado um deslocamento para a região de baixa frequência ( $\delta$  5,7 e 6,4) em relação aos hidrogênios do isômero *trans* ( $\delta$  6,4 e 7,3). Este efeito resulta da perda de planaridade da molécula (Figura 21); com isso a conjugação entre a ligação dupla e o anel aromático deixa de ser efetiva.<sup>65</sup>



**Figura 21** – Conformações propostas para os isômeros geométricos (a) *trans* e (b) *cis*.

A integração dos sinais no espectro permitiu estabelecer a proporção 2:1 entre os isômeros *trans* e *cis* da amostra. A interconversão entre os isômeros é possibilitada pela quebra da ligação  $\pi$ , que requer energia, ocorrendo a transição de um elétron do orbital  $\pi$  (ligante) para o orbital  $\pi^*$  (antiligante), mantendo a ligação  $\sigma$  existente e proporcionando a rotação.<sup>66</sup>

No experimento de NOESY 1D (APÊNDICE HHH) observou-se a interação espacial da metoxila aromática ( $\delta$  3,79) com o H-2' ( $\delta$  7,10), confirmando a posição desta em C-3'. Comparando-se os dados obtidos (Tabela 17) com os descritos na literatura<sup>52</sup> e de substâncias previamente isoladas e identificadas pelo grupo de pesquisa, constatou-se que a substância **27** trata-se da *trans-N-feruloiltiramina* e **29** da *cis-N-feruloiltiramina*.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **28** (APÊNDICE III) observaram-se, além do tripleto em  $\delta$  2,65, sinais referentes a dois sistemas aromáticos trissubstituídos, hidrogênios vinílicos *trans* conjugados, e dois sinais referentes a duas metoxilas aromáticas.

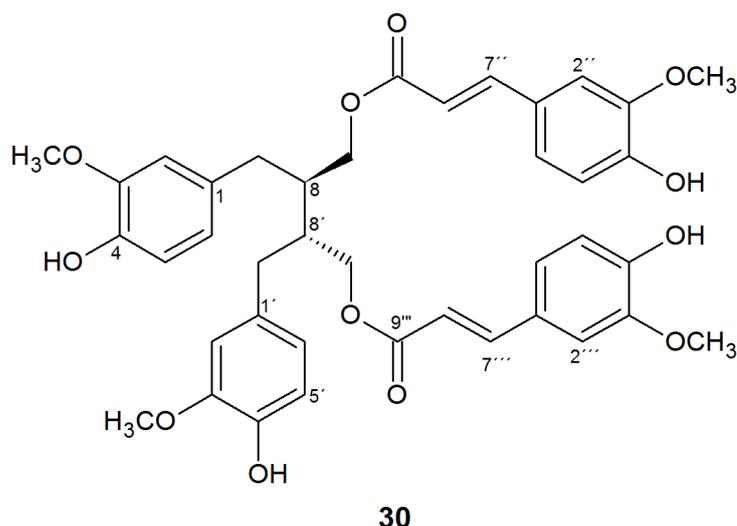
O experimento de NOESY 1D (APÊNDICE JJJ) revelou as interações espaciais entre uma das metoxilas ( $\delta$  3,79) ligada a C-3' com H-2' ( $\delta$  7,10), e a outra metoxila ( $\delta$  3,74) ligada a C-3''' com H-2'' ( $\delta$  6,77). Comparando os dados obtidos com os descritos na literatura (Tabela 17), identificou-se a substância **28** com a *trans-N-feruloil-3-O-metildopamina*. Nota-se no espectro a presença minoritária do isômero *cis* da substância.

Tabela 17 – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de 27 – 29 (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ,  $J$  = Hz, 14,1 T).

Posição	27	<i>trans-N-feruloiltiramina</i> <sup>52</sup>	28	<i>trans-N-feruloil-3-O-metildopamina</i> <sup>52</sup>	29	<i>cis-N-feruloiltiramina</i> <sup>52</sup>
2	6,42 <i>d</i> (15,6)	6,43 <i>d</i> (15,9)	6,43 <i>d</i> (15,6)	6,43 <i>d</i> (15,3)	5,76 <i>d</i> (12,6)	5,76 <i>d</i> (12,9)
3	7,29 <i>d</i> (15,6)	7,31 <i>d</i> (15,9)	7,30 <i>d</i> (15,6)	7,30 <i>d</i> (15,3)	6,48 <i>d</i> (12,6)	6,48 <i>d</i> (12,9)
2'	7,10 <i>d</i> (1,8)	7,11 <i>d</i> (1,8)	7,10 <i>d</i> (1,8)	7,10 <i>d</i> (2,1)	7,69 <i>d</i> (1,8)	7,67 <i>d</i> (1,8)
5'	6,78 <i>d</i> (8,4)	6,79 <i>d</i> (8,1)	6,78 <i>d</i> (8,4)	6,78 <i>d</i> (7,8)	6,70 <i>d</i> (8,4)	6,71 <i>d</i> (8,1)
6'	6,97 <i>dd</i> (8,4; 1,8) <sub>a</sub>	6,98 <i>dd</i> (8,1; 1,8)	6,97 <i>dd</i> (8,4; 1,8) <sub>a</sub>	6,97 <i>dd</i> (7,8; 2,1) 3,32 <i>m</i>	7,08 <i>dd</i> (8,4; 1,8) <sub>a</sub>	7,03 <i>dd</i> (8,1; 1,8) <sub>a</sub>
2''		3,32 <i>m</i>				
3''	2,63 <i>m</i>	2,65 <i>t</i> (7,2)	2,65 <i>t</i> (7,2)	2,65 <i>t</i> (6,9)	2,63 <i>m</i>	2,64 <i>t</i> (7,2)
2'''	7,01 <i>d</i> (8,4)	7,00 <i>d</i> (8,5)	6,77 <i>d</i> (1,8)	6,77 <i>d</i> (2,1)	6,98 <i>d</i> (8,4)	7,01 <i>d</i> (8,5)
3'''	6,67 <i>d</i> (8,4)	6,68 <i>d</i> (8,5)	-	-	6,66 <i>d</i> (8,4)	6,68 <i>d</i> (8,5)
5'''	6,67 <i>d</i> (8,4)	6,68 <i>d</i> (8,5)	6,67 <i>d</i> (7,8)	6,68 <i>d</i> (7,8)	6,66 <i>d</i> (8,4)	6,68 <i>d</i> (8,5)
6'''	7,01 <i>d</i> (8,4)	7,00 <i>d</i> (8,5)	6,59 <i>dd</i> (7,8; 1,8)	6,60 <i>dd</i> (7,8; 2,1)	6,98 <i>d</i> (8,4)	7,01 <i>d</i> (8,5)
OCH <sub>3</sub> -3'	3,79 <i>s</i>	3,80 <i>s</i>	3,79 <i>s</i>	3,79 <i>s</i>	3,73 <i>s</i>	3,74 <i>s</i>
OCH <sub>3</sub> -3'''	-	-	3,74 <i>s</i>	3,74 <i>s</i>	-	-
NH	7,98 <i>t</i> (5,4)	7,95 <i>t</i> (5,7)	7,97 <i>t</i> (5,4)	7,94 <i>m</i>	8,10 <i>t</i> (5,4)	7,94 <i>t</i> (5,7)

<sup>a</sup> Sinal sobreposto ao sinal da água do solvente.

### 5.1.11 Lignana dibenzilbutânica (30)



As lignanas representam uma importante classe de substâncias derivadas de compostos fenólicos provenientes de dimerizações de unidades fenilpropanoídicas ( $C_6C_3$ ) com ligação entre os carbonos C-8 e C-8'.<sup>67</sup>

O espectro de RMN de  $^1H$  de **30** (APÊNDICE KKK) também apresenta hidrogênios vinílicos ( $\delta$  7,52 e 6,46) em configuração *trans* ( $J = 15,9$  Hz), além de hidrogênios metilênicos oxigenados ( $\delta$  4,26 e 4,06); hidrogênios metilênicos benzílicos ( $\delta$  2,74 e 2,56) e um hidrogênio metínico ( $\delta$  2,18). Observam-se também sinais referentes a dois sistemas aromáticos 1,3,4-trissubstituídos ( $\delta$  7,28 – 6,76 e  $\delta$  6,65 – 6,53), sendo que um dos sistemas apresenta maior desproteção devido à conjugação com a carbonila  $\alpha,\beta$  insaturada.

Com a realização do experimento de TOCSY 1D (APÊNDICE LLL) e com as correlações no mapa de contornos COSY  $^1H$ - $^1H$  entre H-8,8' com H-7,7' e H-9,9' (APÊNDICE MMM) foi possível determinar a sequência da parte alifática saturada da estrutura. Por meio das correlações entre H-6'',6''' ( $\delta$  7,08 *d*) e C-7'',7''' ( $\delta$  145,7); H-2,2' ( $\delta$  6,65 *d*) e C-7,7' ( $\delta$  34,2) existentes no mapa de contornos HMBC (APÊNDICE NNN) pôde-se confirmar a presença de uma porção derivada do ácido ferúlico e outra do dihidro-coniferol. A conectividade entre as duas partes foi baseada nas correlações das carbonilas C-9'',9''' ( $\delta$  167,4) com H-9,9' ( $\delta$  4,26 *dd*) e H-7'',7''' ( $\delta$  7,58 *d*). Os deslocamentos químicos dos carbonos foram atribuídos com auxílio do experimento de HSQC (APÊNDICE OOO).

A observação de hidrogênios não equivalentes em C-7,7' e C-9,9' juntamente com a existência de um carbono metínico na parte alifática saturada da estrutura sugere a presença de um substituinte em C-8. A hipótese de substituintes oxigenados ou nitrogenados foi descartada com base no valor do deslocamento químico do carbono ( $\delta$  40,1). A ausência de outros sinais nos espectros de RMN sugere que a estrutura se trata de uma lignana do tipo dibenzilbutânica.

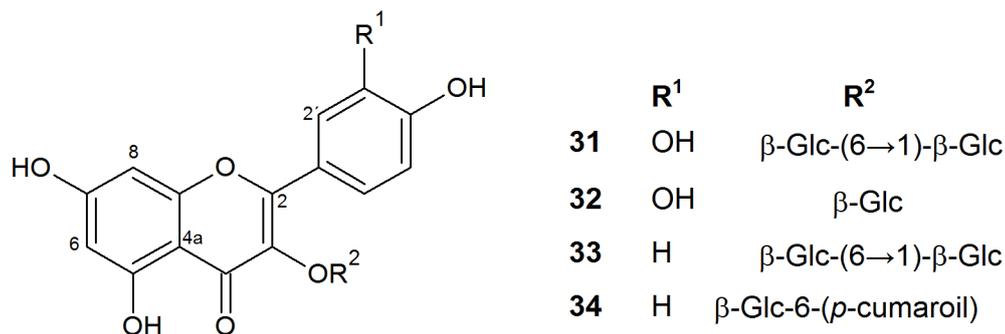
A posição das metoxilas aromáticas ( $\delta$  3,66 e 3,79) foram estabelecidas com base no experimento de NOESY 1D (APÊNDICE PPP), no qual se observa a interação espacial entre as metoxilas OCH<sub>3</sub>-3,3' ( $\delta$  3,66) e os hidrogênios H-2,2' ( $\delta$  6,65) e a interação entre OCH<sub>3</sub>-3'',3''' ( $\delta$  3,79) e os hidrogênios H-2'',2''' ( $\delta$  7,28).

A fim de confirmar a elucidação estrutural fez-se o espectro de RMN de <sup>1</sup>H em solvente CDCl<sub>3</sub> (APÊNDICE QQQ) e comparou-se a literatura<sup>68</sup> (Tabela 18). A medida de rotação óptica específica para a substância **30** foi de  $[\alpha]_D - 12,5$  (c 0,04, MeOH). A comparação com os dados da literatura ( $[\alpha]_D - 42,6$ ; c 0,11, MeOH) sugere a estrutura da lignana (-)-9,9'-O-di-(*E*)-feruloil-secoisolariciresinol.

**Tabela 18** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **30** ( $\delta$ ,  $J$  = Hz, 14,1 T)

Posição	<b>30</b> (DMSO- $d_6$ )		<b>30</b> (CDCl $_3$ )		<b>9,9'-O-di-(E)-feruloil-(-)-secoisolariciresinol</b> <sup>68</sup> (CDCl $_3$ )	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1 e 1'		131,2				131,9
2 e 2'	6,65 <i>sl</i>	113,1	6,52 <i>d</i> (1,8)		6,53 <i>d</i> (2,0)	111,5
3 e 3'		147,7				146,7
4 e 4'		145,2				144,1
5 e 5'	6,65 <i>d</i> (8,0)	115,6	6,80 <i>d</i> (8,0)		6,81 <i>d</i> (8,0)	114,4
6 e 6'	6,53 <i>dd</i> (8,0; 1,8)	123,5	6,61 <i>dd</i> (8,0; 1,8)		6,62 <i>dd</i> (8,0; 2,0)	122,0
7 e 7'	2,74 <i>dd</i> (14,3; 5,8)	33,9	2,72 <i>dd</i> (12,6; 7,5)		2,75 <i>dd</i> (13,8; 7,2)	35,5
	2,56 <i>m</i>		2,70 <i>m</i>		2,70 <i>dd</i> (13,8; 7,2)	
8 e 8'	2,18 <i>m</i>	40,1	2,21 <i>m</i>		2,22 <i>m</i>	40,1
9 e 9'	4,26 <i>dd</i> (11,3; 6,5)	64,3	4,39 <i>dd</i> (11,3; 5,7)		4,40 <i>dd</i> (11,4; 5,6)	64,5
	4,06 <i>dd</i> (11,3; 5,4)		4,21 <i>dd</i> (11,3; 5,4)		4,22 <i>dd</i> (11,4; 5,4)	
1'' e 1'''		126,3				127,3
2'' e 2'''	7,28 <i>sl</i>	111,5	7,01 <i>d</i> (1,7)		7,01 <i>d</i> (2,0)	113,1
3'' e 3'''		148,3				146,2
4'' e 4'''		149,3				147,4
5'' e 5'''	6,76 <i>d</i> (7,7)	115,8	6,91 <i>d</i> (8,2)		6,91 <i>d</i> (8,0)	114,1
6'' e 6'''	7,08 <i>dl</i> (7,7)	123,7	7,07 <i>dd</i> (8,2; 1,7)		7,07 <i>dd</i> (8,0; 2,0)	126,0
7'' e 7'''	7,52 <i>d</i> (15,8)	145,7	7,58 <i>d</i> (15,9)		7,59 <i>d</i> (15,8)	144,9
8'' e 8'''	6,46 <i>d</i> (15,8)	114,7	6,28 <i>d</i> (15,9)		6,29 <i>d</i> (15,8)	116,5
9'' e 9'''		167,3				166,6
OCH $_3$ 3,3'	3,66 <i>s</i>	55,7	3,77 <i>s</i>		3,78 <i>s</i>	56,0
OCH $_3$ 3'',3'''	3,79 <i>s</i>	56,0	3,92 <i>s</i>		3,93 <i>s</i>	56,2

### 5.1.12 Flavonoides glicosilados (31 – 34)



As substâncias **31** e **32** apresentam em seus espectros de RMN de <sup>1</sup>H dois dubletos em δ 6,2 e 6,4 com constante de acoplamento de 1,8 Hz para os hidrogênios do anel A e, pela multiplicidade dos hidrogênios presentes no anel B sugere-se a existência de substituintes nas posições 3' e 4' do mesmo, sendo assim pode-se concluir que as substâncias obtidas são derivadas da quercetina.

Para a substância **31** é possível observar no espectro de RMN de <sup>1</sup>H (APÊNDICE RRR) a presença de dois hidrogênios anoméricos com configuração β em δ 5,24 (7,8 Hz) e δ 4,15 (7,8 Hz), os quais apresentam correlação com os carbonos δ 103,5 e 104,3, respectivamente, no mapa de contornos HSQC (APÊNDICE SSS). 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 HMBC (APÊNDICE TTT) entre H-6" e C-1". Além disso, no mapa de contornos HMBC foi observada correlação entre H-1" e C-3, sendo que esta permitiu estabelecer a posição de ligação entre o diglicosídico e a aglicona.

Os hidrogênios de cada unidade glicosídica foram determinados com base nos experimentos de HSQC, HMBC e suas multiplicidades foram determinadas com o auxílio do espectro de TOCSY 1D (APÊNDICE UUU) com irradiação em cada um dos hidrogênios anoméricos. Os dados obtidos (Tabela 19) foram comparados com os dados da literatura<sup>69</sup> que confirmaram a estrutura como sendo quercetina-3-O-β-glicopiranosil-(6→1)-β-glicopiranosídeo (**31**). Este é o primeiro relato desta substância na família Aristolochiaceae.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **32** (APÊNDICE VVV) apresenta multiplicidades semelhantes às da substância **31**, corroborando com a hipótese de

ser um derivado da quercetina. A principal distinção entre as duas substâncias está na ausência de um dos hidrogênios anoméricos. Por meio do mapa de contornos HMBC (APÊNDICE WWW) pode-se observar a correlação entre o hidrogênio anomérico H-1" ( $\delta$  5,45) com C-3 ( $\delta$  132,5), confirmando a posição do glicosídeo na estrutura. A substância **32** foi obtida juntamente com uma pequena quantidade da substância **29**.

Pela análise dos dados de **32** e comparação com os dados da literatura<sup>70</sup> (Tabela 20) pode-se concluir que a substância **32** trata-se da isoquercitrina ou quercetina-3-O- $\beta$ -glicopiranosídeo.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **33** (APÊNDICE XXX) observam-se dois singletos largos ( $\delta$  6,32 e 6,11), além de dois dubletos em  $\delta$  6,86 ( $J = 9,0$  Hz) e  $\delta$  8,00 ( $J = 9,0$  Hz). Os sinais em  $\delta$  5,33 e 4,02 foram atribuídos (com auxílio dos experimentos 1D e 2D) a hidrogênios anoméricos e evidenciaram duas unidades glicosídicas na estrutura molecular de **33**.

Os demais sinais das unidades glicosídicas foram determinados com auxílio dos experimentos de TOCSY 1D (APÊNDICE YYY), HSQC (APÊNDICE ZZZ). Por meio da correlação observada no mapa de contornos HMBC (APÊNDICE AAAA) entre H-1" ( $\delta$  5,33) e C-3 ( $\delta$  133,7) foi possível determinar que as unidades glicosídicas estão ligadas na posição C-3. A correlação existente entre H-1'" ( $\delta$  4,02) e C-6" ( $\delta$  68,6) possibilitou a atribuição da ligação do tipo 6 $\rightarrow$ 1 entre as unidades de glicose.

Com base nos dados obtidos e a comparação com a literatura<sup>71</sup> (Tabela 21), foi possível a identificação da estrutura de **33** com o kaempferol-3-O-gentiobiosídeo. Este é o primeiro relato desta substância na família Aristolochiaceae.

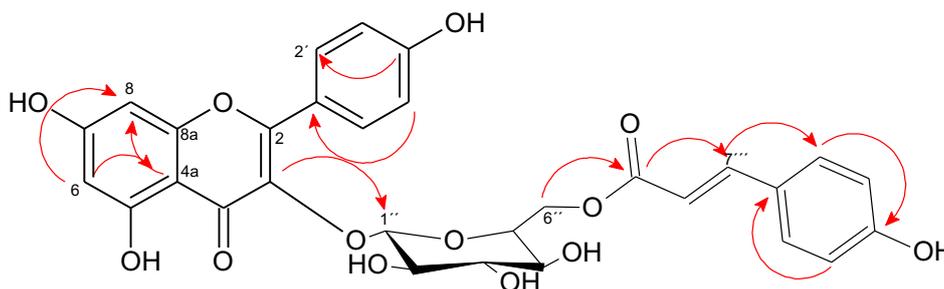
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **34** (APÊNDICE BBBB) observa-se o mesmo padrão de substituição da substância **33**, indicando tratar-se de um derivado do kaempferol. Porém, a existência de hidrogênios olefínicos e de outro sistema aromático *para*-substituído ( $\delta$  7,30 *d* e 6,80 *d*,  $J = 8,4$  Hz) diferencia esta estrutura da substância previamente descrita.

A existência de um dubleto em  $\delta$  5,24 com constante de acoplamento de 7,6 Hz sugere a presença de uma unidade  $\beta$ -glicosídica. Esta confirmação foi obtida mediante realização de experimento de TOCSY 1D (APÊNDICE CCCC) e das correlações observadas no mapa de contornos HSQC (APÊNDICE DDDD) que

possibilitaram a atribuição dos valores de deslocamento químico dos demais hidrogênios e carbonos glicosídicos.

O deslocamento químico dos hidrogênios olefínicos em alta frequência sugere a ocorrência de um sistema conjugado e as constantes de acoplamento de 15,9 Hz caracterizam uma configuração *trans* entre os hidrogênios. As correlações presentes no mapa de contornos HMBC (APÊNDICE EEEE) entre o hidrogênio olefínico H-7''' ( $\delta$  7,39) e os carbonos C-2'''/5''' ( $\delta$  129,8) e o carbono carbonílico C-9''' ( $\delta$  167,3) possibilitaram a identificação do substituinte *para*-cumaroil presente na estrutura.

Com a análise do mapa de contornos HMBC determinou-se a posição da unidade glicosídica por intermédio da correlação entre H-1'' ( $\delta$  5,24) e C-3 ( $\delta$  133,5); já a posição do substituinte *para*-cumaroil foi determinada por meio da correlação do H-6'' ( $\delta$  4,30) com a carbonila C-9''' ( $\delta$  167,3) (Figura 22).



**Figura 22** – Correlações observadas no mapa de contornos HMBC para a substância **34**

A comparação dos dados obtidos com a literatura<sup>72</sup> possibilitaram a identificação da substância **34** com o flavonoide glicosídico *trans*-tilirosídeo [kaempferol 3-O- $\beta$ -(6''-*E*-*p*-cumaroil)-glicopiranosídeo] (Tabela 22). Esta substância foi isolada de duas espécies de *Aristolochia*: *A. heterophylla* e *A. kaempferi*.<sup>9</sup>

Tabela 19 – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **31** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ,  $J = \text{Hz}$ , 14,1 T)

Posição	31		quercetina-3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(6 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo <sup>69</sup>	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}^{\text{a}}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
2	-	157,3	-	157,1
3	-	134,1	-	134,2
4	-	c	b	178,0
5	-	161,5	-	161,6
6	6,20 <i>d</i> (1,8)	99,6	6,19 <i>d</i> (1,8)	98,5
7	-	164,7	-	164,7
8	6,41 <i>d</i> (1,8)	94,5	6,39 <i>d</i> (1,8)	93,5
8a	-	157,0	-	157,5
4a	-	104,3	-	104,4
1'	-	121,5	-	121,7
2'	7,70 <i>d</i> (2,4)	117,2	7,69 <i>d</i> (1,8)	116,2
3'	-	144,6	-	144,5
4'	-	148,5	-	148,5
5'	6,87 <i>d</i> (8,4)	115,8	6,86 <i>d</i> (8,2)	114,7
6'	7,67 <i>dd</i> (8,4; 2,4)	123,2	7,65 <i>dd</i> (8,2; 1,8)	122,2
glc-1''	5,24 <i>d</i> (7,8)	103,5	5,23 <i>d</i> (7,3)	103,2
glc-2''	3,49 <i>dd</i> (8,4; 7,8)	75,3	b	74,4
glc-3''	3,43 <i>t</i> (8,4)	77,5	b	76,6
glc-4''	3,37 <i>t</i> (8,4)	70,9	b	70,1
glc-5''	3,39-3,42 <i>m</i>	77,6	b	76,2
glc-6''	3,97 <i>dd</i> (12,0; 1,8)	69,2	b	68,2
	3,66 <i>dd</i> (12,0; 5,4)		b	
glc-1'''	4,15 <i>d</i> (7,8)	104,3	4,14 <i>d</i> (7,7)	102,6
glc-2'''	3,06 <i>dd</i> (9,0; 7,8)	74,7	b	73,7
glc-3'''	3,17 <i>t</i> (9,0)	77,4	b	76,4
glc-4'''	3,22 <i>t</i> (9,0)	70,9	b	70,0
glc-5'''	2,99-3,02 <i>m</i>	77,3	b	76,5
glc-6'''	3,75 <i>dd</i> (12,0; 2,4)	62,1	b	61,2
	3,59 <i>dd</i> (12,0; 5,4)		b	

<sup>a</sup> Dados obtidos por meio de experimentos de HSQC e HMBC; <sup>b</sup> Dados não fornecidos; <sup>c</sup> Sinal não observado

**Tabela 20** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **32** (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ,  $J = \text{Hz}$ , 14,1 T)

Posição	<b>32</b>		<b>Isoquercitrina<sup>70</sup></b>	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}^{\text{a}}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
2	-	a	-	155,9
3	-	132,5	-	133,2
4	-	b	-	176,2
5	-	161,4	-	161,2
6	6,18 <i>d</i> (1,8)	99,0	6,18 <i>s</i>	99,6
7	-	164,4	-	164,8
8	6,39 <i>d</i> (1,8)	93,9	6,39 <i>s</i>	93,6
8a	-	156,4	-	156,3
4a	-	104,3	-	103,6
1'	-	121,4	-	121,5
2'	7,56 <i>d</i> (1,8)	116,5	7,58 <i>d</i> (6,4)	115,2
3'	-	145,1	-	144,9
4'	-	148,4	-	148,6
5'	6,83 <i>d</i> (9,0)	115,6	6,84 <i>d</i> (8,8)	116,1
6'	7,57 <i>dd</i> (9,0; 1,8)	122,0	7,58 <i>d</i> (6,4)	121,0
glc-1''	5,45 <i>d</i> (7,2)	101,2	5,46 <i>d</i> (7,2)	100,9
glc-2''	3,23-3,21 <i>m</i>	74,3	3,60-3,09 <i>m</i>	74,1
glc-3''	3,08-3,06 <i>m</i>	77,9	3,60-3,09 <i>m</i>	77,5
glc-4''	3,08-3,06 <i>m</i>	70,2	3,60-3,09 <i>m</i>	69,9
glc-5''	3,23-3,21 <i>m</i>	76,8	3,60-3,09 <i>m</i>	76,5
glc-6''	3,31-3,27 <i>m</i>	61,3	3,60-3,09 <i>m</i>	60,9
	a		3,60-3,09 <i>m</i>	

<sup>a</sup>Dados obtidos por meio de experimentos de HSQC e HMBC; <sup>b</sup>Sinais não observados

**Tabela 21** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **33** (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ,  $J = \text{Hz}$ , 14,1 T)

Posição	<b>33</b>		<b>kaempferol-3-O-gentiobiosideo<sup>71</sup></b>	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}^{\text{a}}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
2	-	156,7	-	156,5
3	-	133,7	-	133,2
4	-	b	c	177,3
5	-	a	-	161,1
6	6,11 <i>d</i> (1,8)	99,6	6,21 <i>d</i> (2,0)	98,6
7	-	a	-	164,0
8	6,32 <i>d</i> (1,8)	94,5	6,41 <i>d</i> (2,0)	93,6
8a	-	a	-	156,3
4a	-	103,8	-	104,0
1'	-	121,2	-	120,8
2' e 6'	8,00 <i>d</i> (9,0)	131,4	8,10 <i>d</i> (9,0)	130,8
3' e 5'	6,86 <i>d</i> (9,0)	115,6	6,89 <i>d</i> (9,0)	115,0
4'	-	160,1	-	159,8
glc-1''	5,33 <i>d</i> (7,2)	101,5	5,22 <i>d</i> (7,5)	101,0
glc-2''	3,17-3,14 <i>m</i>	74,4	c	73,3
glc-3''	3,29-3,26 <i>m</i>	76,6	c	76,4
glc-4''	3,46 <i>dd</i> (12,0; 6,0)	70,2	c	69,6
glc-5''	3,23-3,21 <i>m</i>	76,6	c	78,9
glc-6''	3,71-3,69 <i>m</i>	68,6	c	67,9
	3,82 <i>dl</i> (11,4)		c	
glc-1'''	4,02 <i>d</i> (7,8)	103,5	4,14 <i>d</i> (8,0)	103,1
glc-2'''	2,84-2,81 <i>m</i>	73,6	c	74,0
glc-3'''	2,84-2,81 <i>m</i>	76,8	c	76,5
glc-4'''	2,97 <i>t</i> (7,8)	70,1	c	69,7
glc-5'''	2,97 <i>dd</i> (7,8; 6,0)	76,8	c	76,2
glc-6'''	3,34 <i>dd</i> (12,0; 6,0)	61,2	c	60,7
	3,84 <i>dl</i> (12,0)		c	

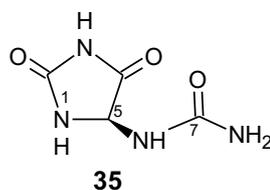
<sup>a</sup> Dados obtidos por meio de experimentos de HSQC e HMBC; <sup>b</sup> Sinais não observados, <sup>c</sup> Dados não fornecidos

Tabela 22 – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **34** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ,  $J = \text{Hz}$ , 14,1 T)

Posição	<b>34</b>		<i>trans</i> -tilirosídeo <sup>72</sup>	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}^a$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
2	-	b	-	158,4
3	-	133,5	-	135,2
4	-	b	-	179,4
5	-	162,2	-	162,9
6	6,13 <i>d</i> (1,5)	98,5	6,12 <i>d</i> (2,2)	100,1
7	-	164,4	-	166,2
8	6,30 <i>d</i> (1,5)	93,4	6,29 <i>d</i> (2,2)	94,9
8a	-	157,2	-	159,3
4a	-	104,2	-	105,5
1'	-	121,2	-	122,7
2'/6'	7,98 <i>d</i> (9,0)	130,8	7,96 <i>d</i> (8,8)	131,1
3'/5'	6,81 <i>d</i> (9,0)	114,7	6,80 <i>d</i> (8,8)	116,0
4'	-	159,7	-	161,4
1''	5,24 <i>d</i> (7,6)	102,3	5,21 <i>d</i> (6,9)	104,3
2''	3,49-3,44 <i>m</i>	74,1	3,30 <i>m</i>	75,7
3''	3,49-3,44 <i>m</i>	76,5	3,44 <i>m</i>	78,1
4''	3,35-3,33 <i>m</i>	70,2	3,28 <i>m</i>	71,4
5''	3,49-3,44 <i>m</i>	74,1	3,45 <i>m</i>	75,8
6''	4,30 <i>dd</i> (11,8; 2,2)	62,8	4,27 <i>dd</i> (11,7; 2,0)	64,3
	4,19 <i>dd</i> (11,8; 6,7)		4,15 <i>dd</i> (11,7; 6,6)	
1'''	-	125,7	-	127,1
2'''/6'''	7,30 <i>d</i> (8,4)	129,8	7,29 <i>d</i> (8,6)	132,1
3'''/5'''	6,80 <i>d</i> (8,4)	115,3	6,78 <i>d</i> (8,6)	116,8
4'''	-	159,6	-	161,1
7'''	7,39 <i>d</i> (15,9)	145,3	7,37 <i>d</i> (16,0)	146,5
8'''	6,06 <i>d</i> (15,9)	113,2	6,04 <i>d</i> (16,0)	114,7
9'''	-	167,3	-	168,7

<sup>a</sup>Dados obtidos por meio de experimentos de HSQC e HMBC; <sup>b</sup>Sinais não observados

## 5.1.13 Alantoína (35)



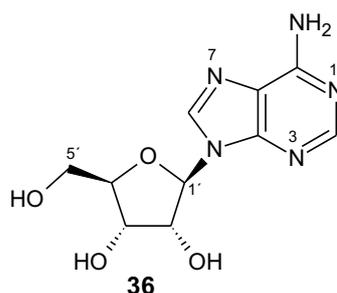
A substância **35** foi recristalizada em metanol formando cristais incolores. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em  $\text{DMSO-}d_6$  (APÊNDICE FFFF) apresenta somente sinais na região de alta frequência, referentes a três singletos em  $\delta$  5,79 ( $\text{NH}_2$ -8), 8,05 (NH-1) e 10,52 (NH-3); um dubleto em  $\delta$  6,90 (NH-6) e outro dubleto em  $\delta$  5,24 (H-5) referentes ao hidrogênio metínico (Tabela 23).

A medida de rotação óptica foi obtida  $[\alpha]_D - 80,0$  ( $c$  0,016;  $\text{H}_2\text{O}$ ). A comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **35** com os dados da literatura<sup>73; 74</sup> corroboraram a identificação com (-)-(S)-alantoína.

**Tabela 23** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **35** ( $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$ ,  $J = \text{Hz}$ , 7,1 T)

Posição	<b>35</b>		Alantoína <sup>73</sup>	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	8,05 s	-	8,04 s	-
2	-	157,2	-	156,6
3	10,52 s	-	10,54 s	-
4	-	174,0	-	173,4
5	5,24 <i>d</i> (8,1)	62,8	5,24 <i>d</i> (8,2)	62,2
6	6,90 <i>d</i> (8,1)	-	6,89 <i>d</i> (8,2)	-
7	-	157,8	-	157,2
8	5,79 s	-	5,78 s	-

## 5.1.14 Nucleosídeo adenosina (36)



No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (APÊNDICE GGGG) da substância **36** observam-se três singletos na região de alta frequência, que sugerem a presença de hidrogênios heterocíclicos aromáticos e um dubleto em  $\delta$  5,86 ( $J = 6,0$  Hz) proveniente da unidade glicosídica. Os demais hidrogênios do glicosídeo apresentam deslocamento químico no intervalo entre  $\delta$  3,55 – 4,60. A comparação com substâncias isoladas no grupo de pesquisa e os dados da literatura<sup>75</sup> permitiu a identificação de **36** como o nucleosídeo adenosina (Tabela 24).

**Tabela 24** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de **36** (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ,  $J = \text{Hz}$ , 14,1 T)

Posição	<b>36</b>	Adenosina <sup>75</sup>
2	8,13 s	8,13 s
8	8,34 s	8,34 s
NH <sub>2</sub>	7,35 <i>sl</i>	7,33 <i>sl</i>
1'	5,87 <i>d</i> (6,2)	5,87 <i>d</i> (6,2)
2'	4,60 <i>dd</i> (6,2; 5,4)	4,61 <i>ddd</i> (6,3; 6,2 e 5,1)
3'	4,13 <i>dd</i> (5,4; 3,6)	4,14 <i>ddd</i> (5,1; 4,6 e 3,0)
4'	3,95 <i>ddl</i> (6,6; 3,6)	3,96 <i>ddd</i> (3,7; 3,6 e 3,0)
5' $\alpha$	3,66 <i>dd</i> (12,0; 3,6)	3,67 <i>ddd</i> (12,1; 4,4 e 3,6)
5' $\beta$	3,55 <i>m</i>	3,55 <i>ddd</i> (12,1; 7,2 e 3,7)

## 6 CONSIDERAÇÕES

Foram isoladas 36 substâncias dos extratos etanólico e etanólico Soxhlet dos caules da espécie *A. urupaensis*. Dentre estas substâncias, pode-se destacar o isolamento e elucidação estrutural da 2,3-dihidro-4*H*-piran-4-ona (**1**), por tratar-se de uma substância inédita na literatura e com esqueleto incomum para espécies vegetais.

Com base nos tipos de substâncias isoladas de espécies de *Aristolochia*, torna-se evidente que a existência de aristolactamas e ácidos aristolóquicos neste gênero é comum. No entanto, exemplos destas substâncias com substituintes oxigenados apenas na posição C-7 são raros (ácido aristolóquico F). Com isso é importante destacar que a espécie em estudo apresenta três substâncias com essa característica (**5**, **8** e **9**) e que estão sendo descritas pela primeira vez na literatura.

Além das substâncias inéditas, ressalta-se também que o tirosol-1-*O*- $\beta$ -glicopiranosil-(6 $\rightarrow$ 1)-*O*- $\beta$ -xilopiranosideo (**20**), a lignana (-)-9,9'-*O*-di-(*E*)-feruloil-secoisolariciresinol (**30**) e os flavonoides **31** – **33** foram isoladas pela primeira vez de espécies de Aristolochiaceae.

Por tratar-se de uma espécie presente no bioma com maior risco de extinção no país e que não apresenta nenhum estudo sobre sua composição química, afirma-se que o estudo fitoquímico da espécie *Aristolochia urupaensis* tende a contribuir para o conhecimento do cerrado, da espécie e da fitoquímica da família Aristolochiaceae.

## CAPÍTULO 2

**Estudo fitoquímico das flores de *Aristolochia trulliformis***



## 1 INTRODUÇÃO

A espécie *Aristolochia trulliformis* Mast. (Figura 23) tem ocorrência confirmada nos estados do Pará e Piauí, onde os principais tipos de vegetação são caatinga e amazônica.<sup>2; 5</sup> Esta espécie não possui estudos fitoquímico ou biológico descritos na literatura e sua classificação taxonômica é apresentada na Tabela 25.



**Figura 23** – Detalhes das flores de *Aristolochia trulliformis* Mast. Fonte: Foto obtida por Juliana C. Holzbach

**Tabela 25** – Classificação taxonômica da espécie *Aristolochia trulliformis*<sup>5</sup>

Classe	Angiospermae
Subclasse	Magnoliídea
Ordem	Piperales
Superordem	Magnoliiflorae
Família	Aristolochiaceae
Gênero	<i>Aristolochia</i>
Espécie	<i>Aristolochia trulliformis</i>

### 1.1 Características florais do gênero *Aristolochia*

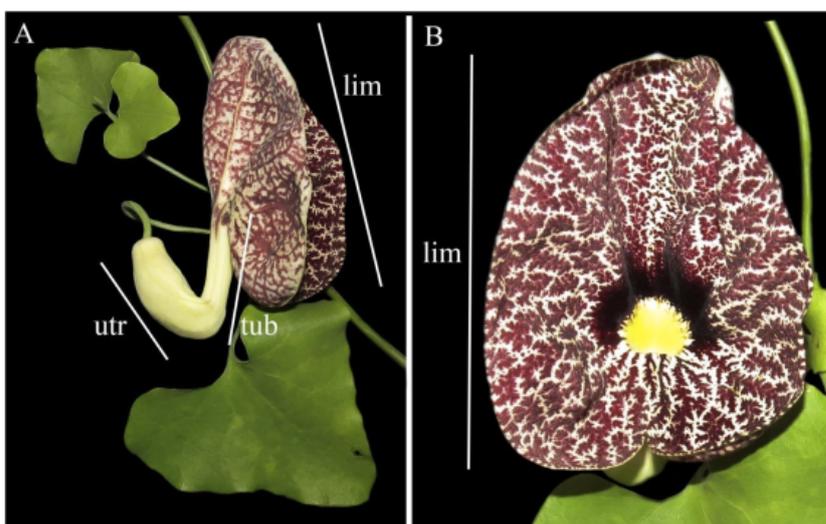
As espécies do gênero *Aristolochia* são conhecidas popularmente no Brasil como cipó-mil-homens, papo-peru, jarrinha, chaleira-de-judeu, erva-de-urubu, dentre outros.<sup>76</sup> Estas denominações, em sua maioria, estão relacionadas as características florais das espécies desta família.

Segundo Hoehne (1942),<sup>2</sup> as flores de Aristolochiaceae são isoladas, ou reunidas em racimos, bissexuadas e protogínicas, possuem perianto com estrutura

variável com lábio inteiro ou bipartido. As flores de Aristolochiaceae apresentam tamanho que pouco varia (5 – 10 cm), porém existem exceções como a *Aristolochia gigantea* (~ 28 cm) que contém as maiores flores do mundo.<sup>2; 77</sup>

Uma característica relevante, que abrange a maioria das espécies de *Aristolochia*, está relacionada ao odor extremamente desagradável das flores, semelhante a carne em putrefação.<sup>78; 79</sup> Apesar disto, em poucas espécies a composição química do aroma floral foi estudada, podendo citar, como exemplo, alguns estudos de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM): *A. gigantea* na qual identificou-se principalmente (*E*)- e (*Z*)-citral, linalol, citronelol e citronela, além de dissulfeto de dimetila, 2-heptanona e 3-metil-1-butanol;<sup>80</sup> *A. arborea* onde encontram-se diversos terpenoides ( $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno, limoneno, cariofileno, germacreno A e D, dentre outros);<sup>74, 81</sup> *A. cymbifera* que apresenta substâncias de diferentes classes onde dissulfeto de dimetila e álcool benzílico são os mais abundantes;<sup>82</sup> *A. rotunda* que apresenta ésteres, álcoois e hidrocarbonetos alifáticos<sup>83</sup> e *A. ringens* que tem em sua composição aldeídos voláteis e ácidos carboxílicos de cadeia carbônica pequena.<sup>84</sup>

Além do odor característico, as flores do gênero *Aristolochia* apresentam formato diferenciado em relação à maioria das angiospermas, uma vez que seu perianto é extremamente modificado, sendo subdividido em três principais partes: limbo, tubo floral e utrículo (bojo) (Figura 24).<sup>85</sup> A coloração das flores varia entre amarelo, verde, castanho, vermelho e vermelho-escuro.<sup>2</sup>

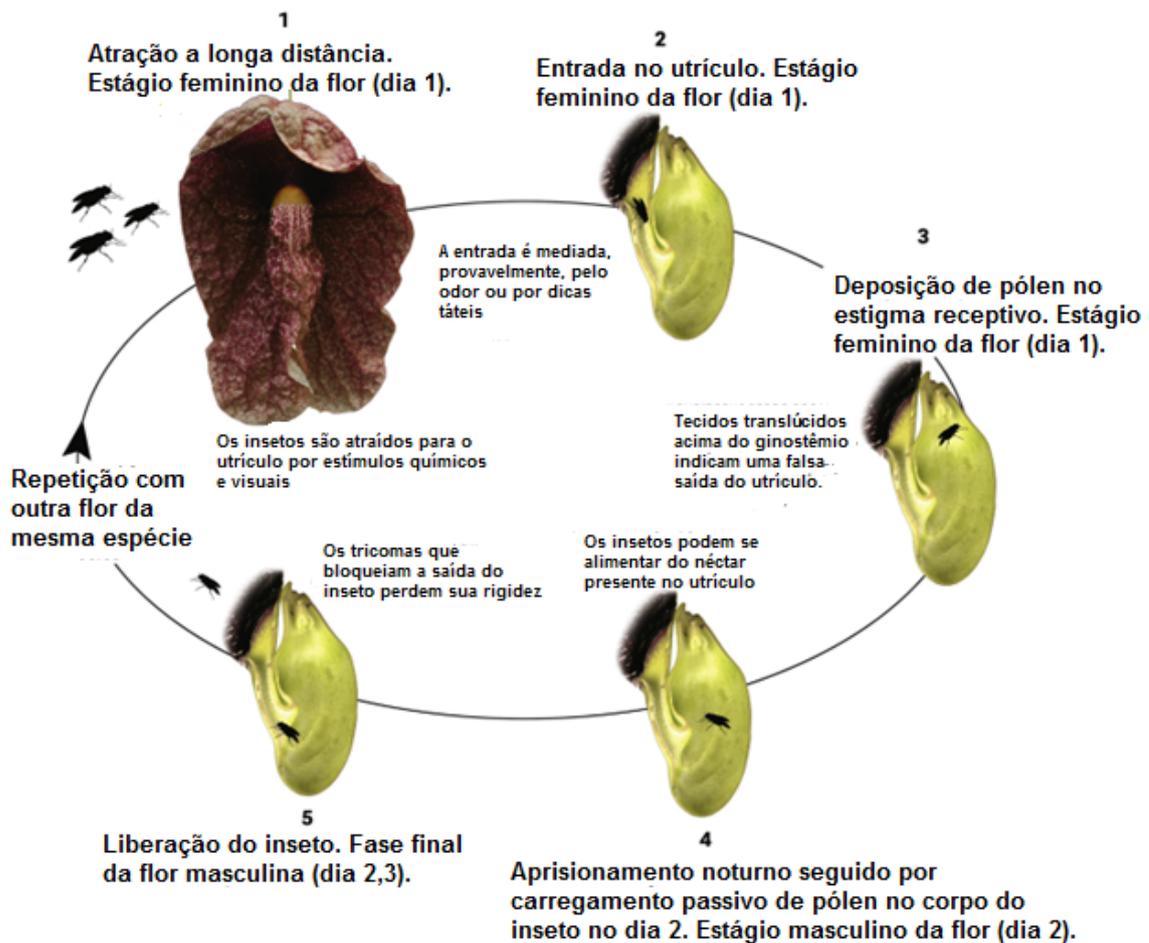


**Figura 24** – Estruturas florais em *Aristolochia*: limbo (lim), tubo (tub) e utrículo (utr). Flor em visão lateral (A) e frontal (B). Fonte: Imagens cedidas por Freitas, J. (2016)<sup>86</sup>

Segundo Oelschlagel et al. (2015),<sup>83</sup> “*Aristolochia* representa um dos mais fascinantes gêneros de plantas e é bem conhecido por sua peculiar flor”. As características morfológicas e olfativas das flores de *Aristolochia* estão intimamente relacionadas ao tipo de polinização. Enquanto que a maioria das angiospermas apresenta uma relação mutualística com seu polinizador, na qual as plantas são polinizadas e seus polinizadores consomem o pólen ou néctar, as *Aristolochias* apresentam um tipo de polinização denominada polinização por engodo. Neste tipo de polinização, as flores simulam a existência de parceiros sexuais, locais de alimentação, oviposição ou abrigo de insetos. Dentre as estratégias das plantas para atrair os polinizadores estão a emissão de odores, a cor, o tamanho e a morfologia das flores.<sup>78</sup>

Dentre as aproximadamente 400 famílias existentes nas angiospermas, onze apresentam espécies que se enquadram na polinização por engodo: Annonaceae, Araceae, Aristolochiaceae, Apocynaceae, Burmanniaceae, Hydnoraceae, Orchidaceae, Rafflesiaceae, Sterculiaceae, Taccaceae e Hyacinthaceae.<sup>87</sup> São vários os insetos descritos como polinizadores em espécies de *Aristolochia*, porém os dípteros (moscas, mosquitos, dentre outros) são os mais comuns.<sup>88</sup>

Filogeneticamente, as Aristolochiaceae representam a primeira linhagem de Angiospermas que desenvolveu flores consideradas como armadilha para os polinizadores, possivelmente visando tipos específicos de polinizadores. O mecanismo de polinização destas espécies é dividido em quatro etapas: atração, aprisionamento, retenção e soltura (Figura 25).<sup>85</sup>



**Figura 25** – Sequência da visita de polinizadores e polinização das flores de *A. gigantea*.

Fonte: Adaptado de Martin *et al.* (2016)<sup>80</sup>

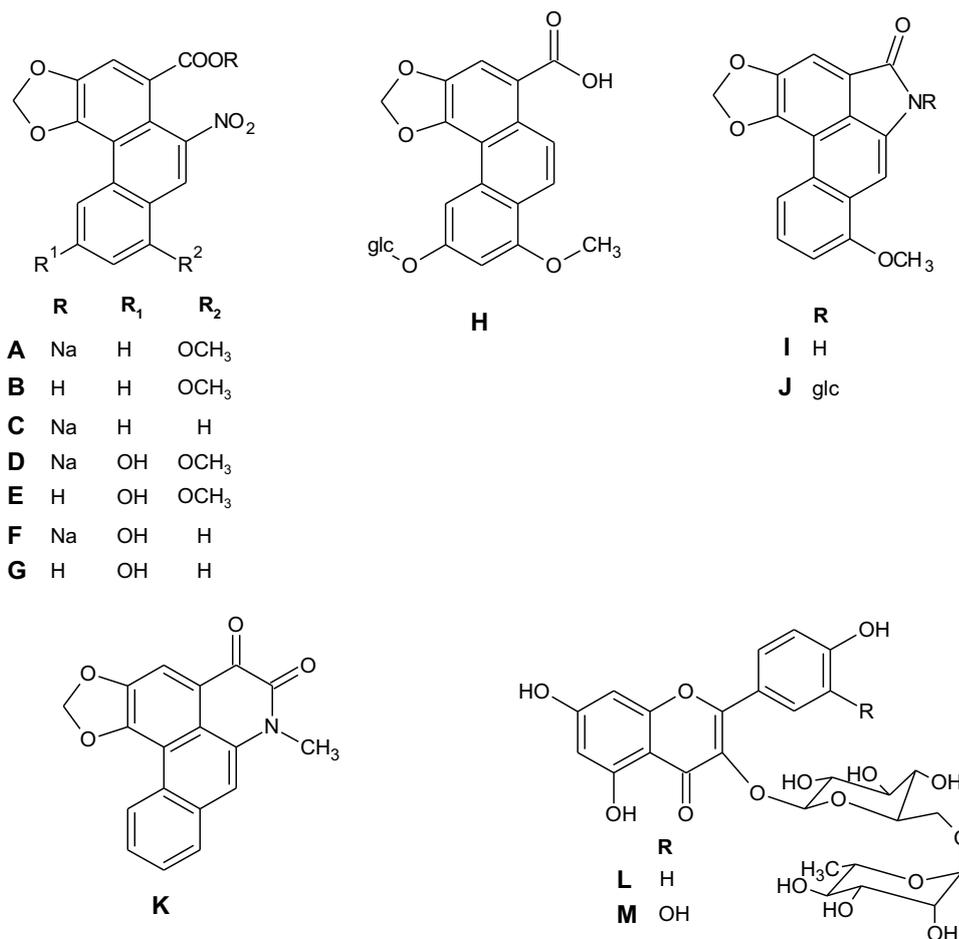
Porém estudos realizados com *A. rotunda* propõem que esta espécie, e possivelmente outras espécies do gênero *Aristolochia*, não se enquadra na polinização por engodo e sugerem uma nova forma de polinização, a qual denominaram de cleptomiofilia. As duas principais características desta forma de polinização estão relacionadas, primeiramente, a liberação de semioquímicos pelas flores, mimetizando substâncias liberadas por insetos recém mortos, ao contrário das formas de polinização comuns na qual ocorre a liberação de semioquímicos que simulam animais vivos. A segunda característica refere-se ao fato de que as moscas polinizadoras enganadas pela espécie *A. rotunda*, não estão em busca de alimentos para suas larvas e sim para si. Com isso, os pesquisadores concluíram que o número de substâncias voláteis presentes nas flores de *A. rotunda* está ligado ao complexo sistema de polinização por cleptomiofilia.<sup>83</sup>

A composição química das flores está diretamente relacionada ao odor e a coloração. Porém, mesmo com uma forma de polinização diferenciada da maioria das angiospermas, apenas dois estudos fitoquímicos envolvendo o isolamento dos constituintes químicos de flores de espécies de *Aristolochia* são descritos na literatura.

## 1.2 Isolamento de constituintes químicos de flores de *Aristolochia*

Ao estudarem o conjunto de flores e frutos de *A. zollingeriana*, uma espécie nativa de Taiwan, Chiang e colaboradores (1998)<sup>43</sup> isolaram as seguintes substâncias: aristolocatos de sódio I (**A**), II (**C**), IVa (**D**) e C (**F**); aristolactama I (**I**) e I-N- $\beta$ -glicosídeo (**J**); cepharadiona A (**K**); 3,5-piridina-carboxamida; *p*-hidroxibenzaldeído; *trans*-metil-*p*-cumarato; 6-hidroxi-sitost-4-en-3-ona;  $\beta$ -sitosterona;  $\beta$ -sitosterol e stigmasterol (Figura 26).

Wu *et al.* (1998),<sup>89</sup> ao estudarem as flores de *A. kaempferi*, descobriram o primeiro ácido aristolóquico denitro (**H**). Foram isolados também os ácidos aristolóquicos I (**B**), IVa (**E**) e C (**G**); aristolocatos de sódio I (**A**) e II (**C**);  $\beta$ -sitosterol e  $\beta$ -sitosterol-glicosídeo, asparagina e os flavonoides: kaempferol-3-O-rutinosídeo (**L**) e quercetina-3-O-rutinosídeo (**M**) (Figura 26).



**Figura 26** – Exemplos de substâncias isoladas das flores de espécies de *Aristolochia*

### 1.3 Flavonoides

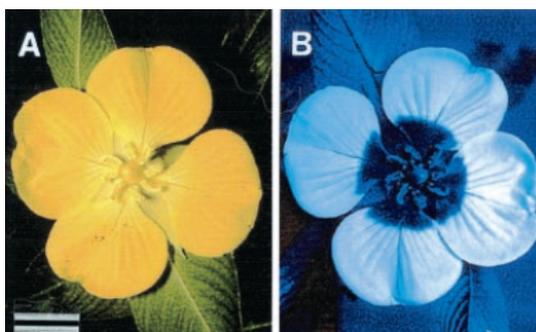
Os pigmentos presentes na maioria das flores, frutos e sementes podem estar associados à existência dos flavonoides. Os flavonoides são metabólitos secundários com ampla distribuição no reino vegetal e que possuem diferentes funções nas plantas.<sup>90</sup>

Os flavonoides possuem uma estrutura química com um núcleo composto por 15 átomos de carbono, no qual os anéis aromáticos (A e B) são interconectados por meio de um anel pirano (C).<sup>91</sup> De acordo com variações estruturais no anel pirano, os flavonoides são subdivididos, normalmente, em seis categorias: chalconas, flavonas, flavonóis, flavanodióis, antocianinas e proantocianidinas.<sup>92</sup>

Nas plantas, diferentes flavonoides desempenham diversas funções biológicas incluindo combate ao estresse oxidativo, proteção contra radiação

ultravioleta e fitopatógenos, sinalização durante nodulação, transporte de auxina, assim como atração de polinizadores por meio da coloração das flores.<sup>93</sup>

A combinação de diferentes flavonoides em cada espécie resulta em espectros de reflectância na região do visível e do ultravioleta que podem ser detectados por determinados insetos, facilitando a polinização da espécie (Figura 27). Os flavonoides são os maiores responsáveis pela coloração amarela do pólen e podem chegar de 2 a 4% do peso do material vegetal seco.<sup>94</sup>



**Figura 27** – Imagem das flores da espécie *Ludwigia peruviana* sob radiação na região do visível (A) e do ultravioleta (B). Fonte: Gronquist, M. *et al.* (2001)<sup>95</sup>

Bohm (1998)<sup>96</sup> descreve que as espécies de *Aristolochia* apresentam uma deposição de antocianinas no tubo floral, e que a combinação da pigmentação juntamente com o aroma das flores serve para “seduzir” insetos para dentro do tubo e com isso efetuarem a polinização.

Além de atrair os polinizadores por meio da coloração, alguns flavonoides, como naringenina, hesperetina-7-O-rutinosídeo e quercetina-3-O-rutinosídeo são estimulantes de oviposição de borboletas *Papilio* (que são responsáveis pela polinização de algumas espécies de *Aristolochia*).<sup>88; 93</sup> Outros flavonoides, como a luteolina-7-O-(6"-malonil)-glicosídeo e a isoramnetina glicosilada, estimulam a oviposição de espécies de *Papilio polyxenes* e *Luehdorfia japonica*, respectivamente, em plantas do gênero *Asarum* (Aristolochiaceae).<sup>93</sup>

Os flavonoides também atuam na proteção das plantas contra herbívoros, alterando a palatabilidade ou atuando como repelentes. Como exemplo tem-se a rutina e a quercetina-3-O-glicosídeo que inibem o desenvolvimento e aumentam a mortalidade de *Lymantria dispar* (mariposa) e *Spodoptera litura*.<sup>97</sup>

Por meio do contexto exposto pode-se ressaltar que as espécies de *Aristolochia* possuem flores e formas de polinização distintas da grande maioria das angiospermas e são poucos os estudos referentes à composição química das partes florais. Sendo assim, o conhecimento acerca da química das flores de espécies deste gênero pode auxiliar na compreensão sobre o processo de polinização e os polinizadores envolvidos.

## 2 OBJETIVOS

Esta parte do trabalho teve como objetivo estudar a composição química das flores de *Aristolochia trulliformis*, parte da planta ainda não abordada nos estudos fitoquímicos do nosso grupo de pesquisa e com poucos relatos em espécies de Aristolochiaceae, viabilizando o isolamento e elucidação estrutural dos principais metabólitos especiais presentes.

### 2.1 Objetivos específicos

- Determinar um processo de extração para as flores de *A. trulliformis*
- Isolamento de substâncias por meio de técnicas cromatográficas
- Identificação estrutural dos metabólitos especiais por técnicas espectrométricas (RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais, EM, UV, IV).

### 3 CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DAS FLORES *Aristolochia trulliformis*

Este capítulo descreve o isolamento e/ou identificação das substâncias majoritárias presentes nas flores de *Aristolochia trulliformis*. (Figura 28).

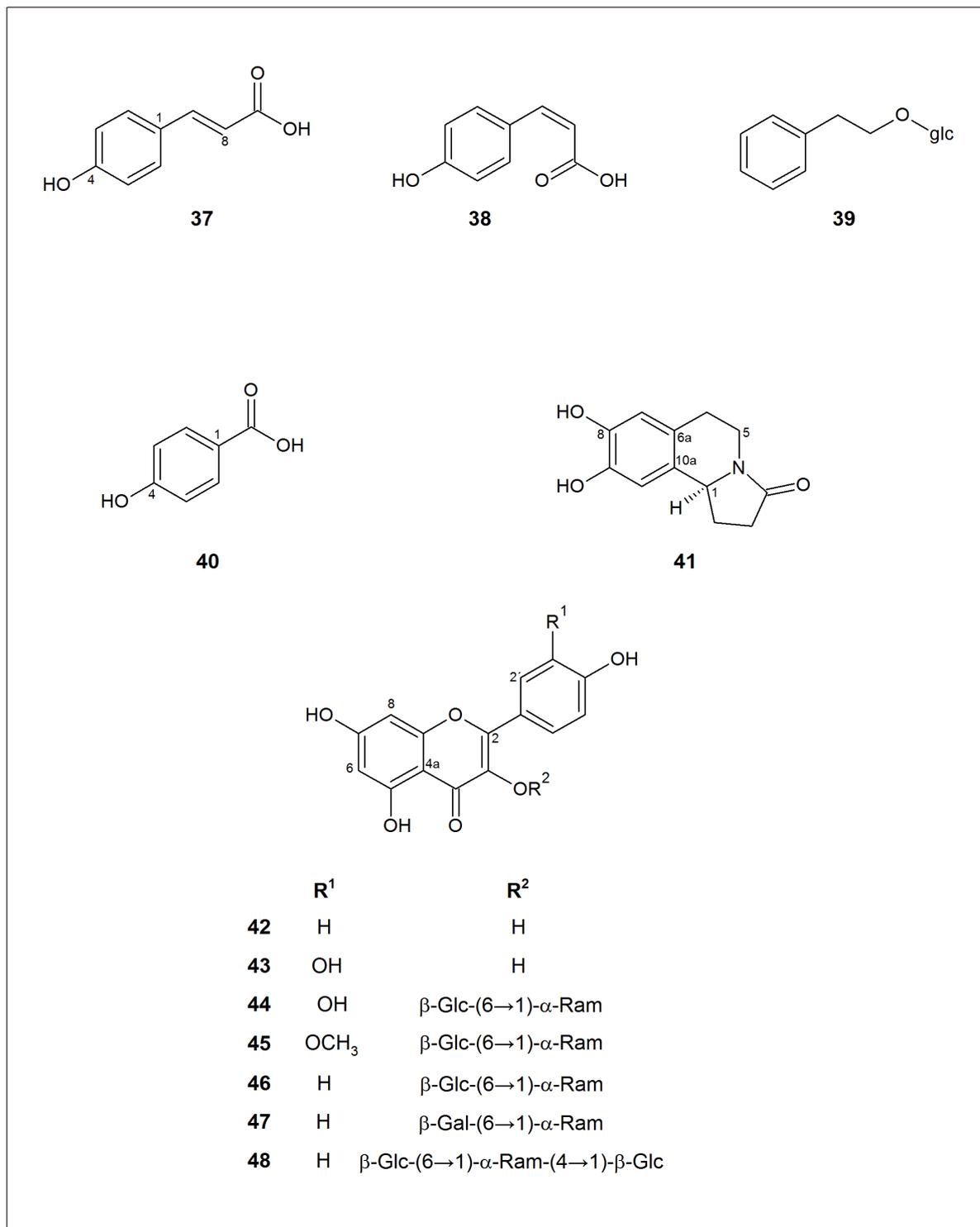


Figura 28 – Substâncias isoladas e/ou identificadas das flores de *Aristolochia trulliformis*

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

O sistema hifenado HPLC-SPE-TT (High Performance Liquid Chromatography - Solid Phase Extraction - Transfer Tube) é composto por um cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo 1260 Infinity (Agilent®) com bomba quaternária 1260 Quat Pum, auto sampler 1260 ALS, detector de arranjo de fotodiodos 1260 DAD VL e injetor automático; um sistema de extração em fase sólida Bruker/Spark Prospekt II e um transferidor e preparador automático de amostras Automatic Liquid Handling (Gilson®).

Os demais materiais e equipamentos utilizados são os mesmos especificados na seção 4.1 do Capítulo 1 (página 34).

### 4.1 Coleta e identificação do material vegetal

O material vegetal foi coletado durante o segundo semestre de 2015, no município de Gurupi-TO (11°44'46.62"S e 49° 4'20.78"O). As flores foram cortadas no início do utrículo e dispostas em local seco e arejado. A espécie *Aristolochia trulliformis* Mast. foi identificada pelo Ms. Joelcio Freitas e depositada no herbário do Museu de Biologia Prof. Mello Leitão, Santa Teresa-ES (número 50516).

### 4.2 Obtenção do extrato bruto

As flores secas (22,5 g) foram trituradas manualmente e extraídas com metanol a temperatura ambiente (4 × 80 mL) durante 24 horas, para cada extração. O extrato bruto foi concentrado sob pressão reduzida e seco em capela de exaustão.

### 4.3 Fracionamento do extrato bruto

O extrato bruto obtido (7,0 g) foi submetido à coluna cromatográfica com resina Amberlite XAD-16 (2,0 × 29,0 cm) e eluído primeiramente com água, seguido de metanol e acetato de etila, gerando três frações distintas (Figura 29). As frações

foram concentradas sob pressão reduzida, secas em capela de exaustão e analisadas por CCD e RMN de  $^1\text{H}$ . Com base nos perfis cromatográficos e feições espectrais das frações, foi selecionada a fração metanólica para estudos químicos.

#### 4.4 Estudo da fração metanólica

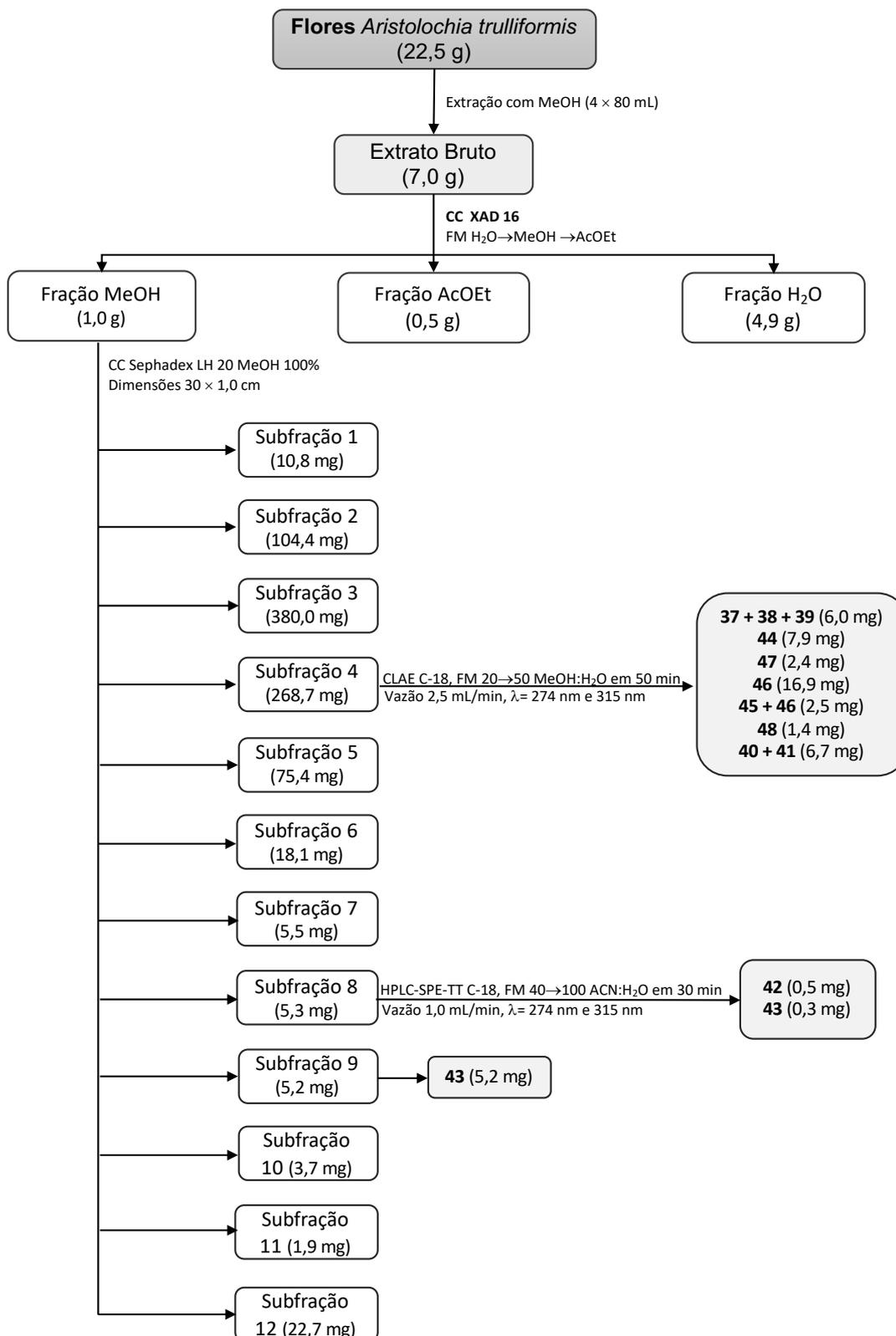
A parte solúvel em metanol (1,0 g) foi fracionada por cromatografia por exclusão com fase estacionária de Sephadex LH-20 ( $\phi$  1,0  $\times$  30,0 cm) e fase móvel isocrática de MeOH 100% (Figura 29). As subfrações ( ~ 20 mL) foram analisadas por CLAE-DAD (gradiente exploratório de MeOH/H<sub>2</sub>O 5 $\rightarrow$ 100% de MeOH em 60 minutos) e RMN de  $^1\text{H}$ .

##### 4.4.1 Estudo químico das subfrações

A subfração 4 (268,7 mg) foi submetida a CLAE-DAD, fase estacionária C-18 e fase móvel MeOH/H<sub>2</sub>O com proporção variando de 20 $\rightarrow$ 50% de MeOH em 50 minutos, resultando no isolamento e/ou identificação de dez substâncias (**37 – 41, 44 – 48**).

A subfração 8 foi submetida a separação em sistema hifenado HPLC-SPE-TT com fase estacionária C-18 e fase móvel ACN/H<sub>2</sub>O com proporção variando de 40 $\rightarrow$ 100% de MeOH em 30 minutos. Dois sinais foram obtidos e selecionados. Após múltiplas coletas e secagem obtiveram-se os flavonoides **42** e **43**.

A subfração 9 (5,2 mg), ao ser analisada por cromatografia líquida de alta eficiência, apresentou apenas uma substância, obtendo-se o flavonoide **43**.



Onde: CC = cromatografia em coluna; FM = fase móvel e CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; HPLC-SPE-TT = *High Performance Liquid Chromatography - Solid Phase Extraction - Transfer Tube*

**Figura 29** – Fracionamento do extrato bruto das flores de *A. trulliformis*

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

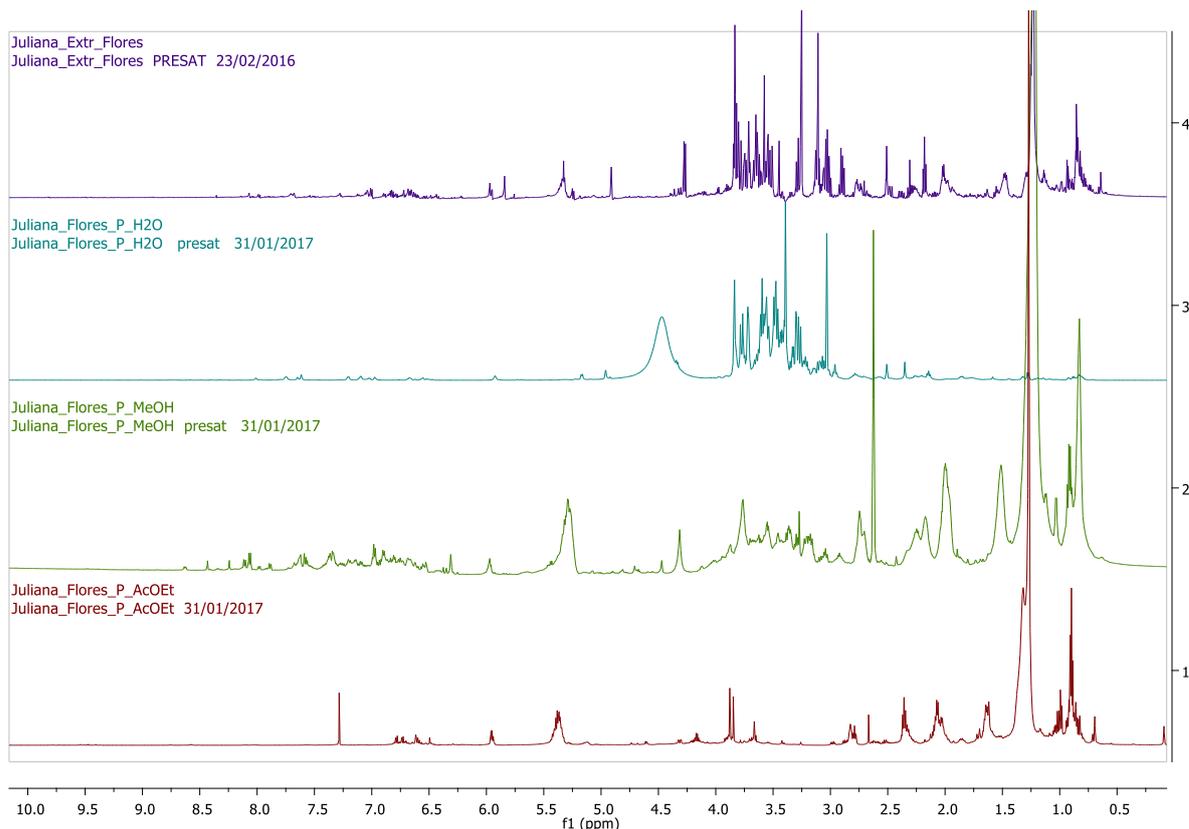
Apesar da tradição e reconhecimento do nosso grupo de pesquisa no estudo fitoquímico de espécies da família Aristolochiaceae, este é o primeiro trabalho envolvendo o isolamento e a elucidação estrutural dos principais componentes químicos presentes nas flores de uma espécie de *Aristolochia*.

A análise por RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto (Figura 30) sugere a presença de uma quantidade significativa de açúcares, ciclitóis e ácidos graxos na amostra, devido ao elevado número de sinais na região de  $\delta$  2,0 – 4,5. Esta análise corrobora com o aroma adocicado do extrato e pode ser compreendida por tratar-se de flores.

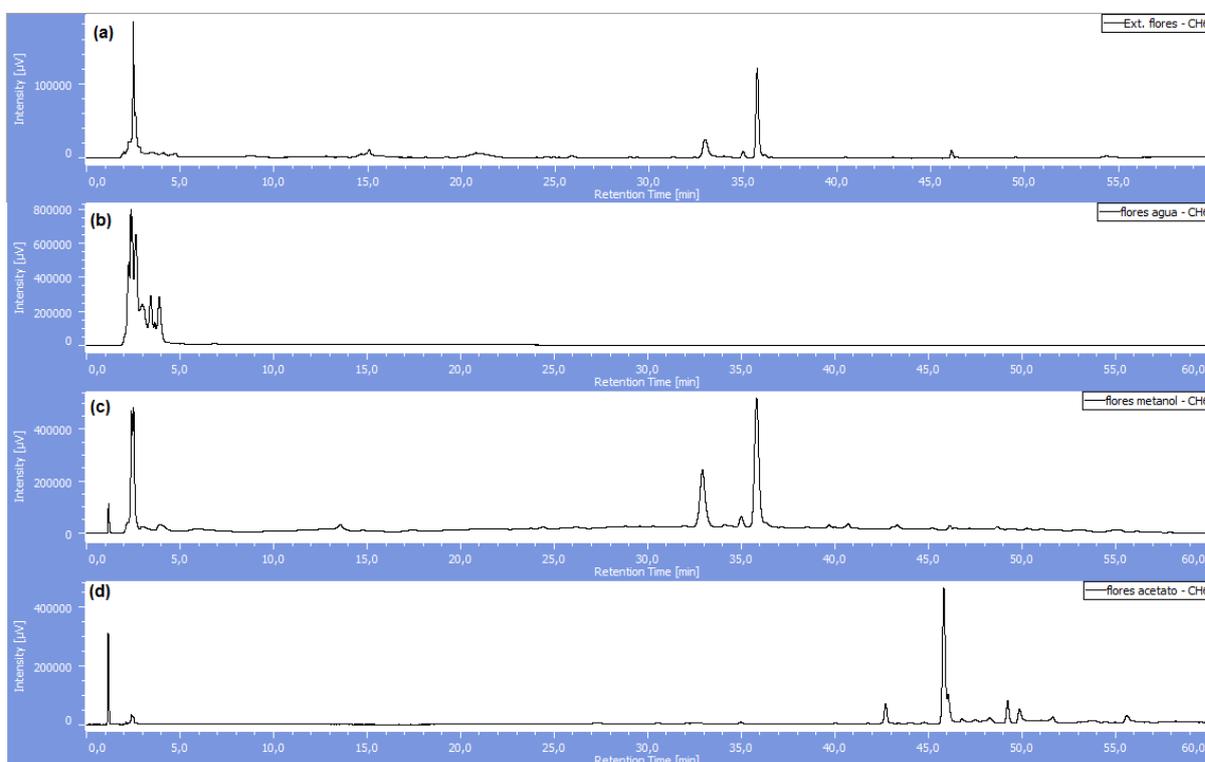
A fim de separar os açúcares e ciclitóis das demais substâncias presentes no extrato bruto, optou-se pela cromatografia em coluna com fase estacionária de resina Amberlite XAD-16.

Na comparação entre os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato bruto com os das frações aquosa, metanólica e de acetato de etila (Figura 30), pode-se notar que a maioria dos açúcares e ciclitóis ficaram na fração aquosa, a qual apresenta a maior massa (4,9 g). As frações metanólicas (1,0 g) e de acetato de etila (0,5 g) apresentam um conjunto maior de sinais na região de absorção de hidrogênios aromáticos.

A comparação dos perfis cromatográficos do extrato bruto com os das frações aquosa, metanólica e de acetato de etila (Figura 31) demonstra a presença de uma substância majoritária presente no extrato bruto ( $t_r \sim 35$  min) e que, pela comparação dos espectros de absorção na região do ultravioleta e tempo de retenção, sugere-se que também seja a substância predominante na fração metanólica. Esta substância posteriormente foi identificada como sendo o flavonoide kaempferol-3-O-rutinosídeo (46).



**Figura 30** – Espectros de RMN de <sup>1</sup>H do extrato bruto (DMSO-*d*<sub>6</sub>), fração aquosa (D<sub>2</sub>O), metanólica (DMSO-*d*<sub>6</sub>) e acetato de etila (CDCl<sub>3</sub>) (14,1 T).

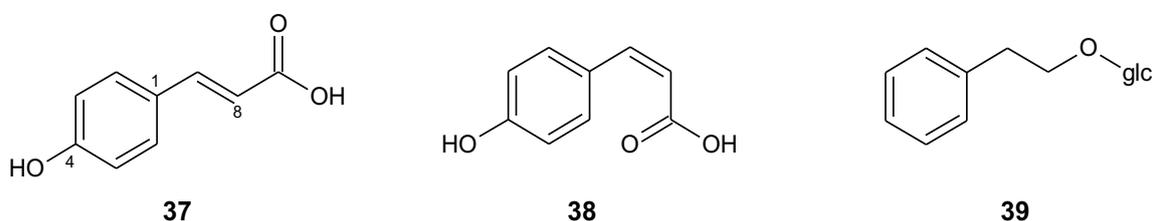


**Figura 31** – Perfis cromatográficos do (a) extrato bruto, (b) fração aquosa, (c) fração metanólica e (d) fração de acetato de etila (CLAE C-18, fase móvel MeOH/H<sub>2</sub>O 5→100% de MeOH em 60 minutos, λ 274 nm, vazão 1 mL/min)

## 5.1 Determinação estrutural dos constituintes químicos das flores de *Aristolochia trulliformis*

A elucidação estrutural das substâncias foi realizada por técnicas espectroscópicas (RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  uni- e bidimensionais) e espectrometria de massas.

### 5.1.1 Derivados $\text{C}_6\text{-C}_2$ e $\text{C}_6\text{-C}_3$ (37 – 39)



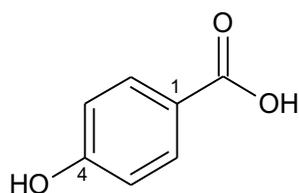
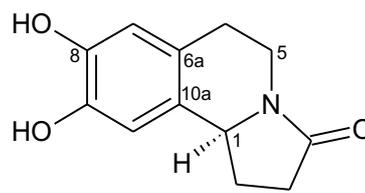
A mistura das substâncias **37**, **38** e **39** apresenta deslocamentos químicos semelhantes aos dos derivados  $\text{C}_6\text{-C}_3$  descritos no item 5.1.9 do Capítulo 1. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (APÊNDICE HHHH) apresenta, para as substâncias **37** e **38**, sinais na região dos hidrogênios aromáticos referentes a um sistema *para*-substituído e hidrogênios vinílicos com constantes de acoplamentos referentes às configurações *trans* e *cis* (Tabela 26). A proporção entre os isômeros é de aproximadamente 1:1 *trans/cis*. Comparando os valores de deslocamentos químicos obtidos com os descritos na literatura,<sup>98</sup> pode-se confirmar que **37** e **38** são os isômeros (*E*) e (*Z*) do ácido *p*-cumárico, respectivamente.

A substância **39** está presente na mistura com **37** e **38** em uma proporção aproximada de 1:1. Esta substância apresenta um multiplete entre  $\delta$  7,26 – 7,27 relativo a cinco hidrogênios aromáticos, um duplo dublete em  $\delta$  2,85 e dois duplos tripletos em  $\delta$  3,65 e 3,93 referentes a hidrogênios metilênicos, além de um dublete em  $\delta$  4,18, que, por estar correlacionado a um carbono em  $\delta$  102,8 no mapa de contornos HSQC (APÊNDICE IIII), sugere-se que seja um hidrogênio anomérico.

Os experimentos de HSQC e TOCSY 1D (APÊNDICE JJJJ), irradiando em  $\delta$  4,18, auxiliaram na determinação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos da unidade glicosídica. A posição da glicose na estrutura foi determinada

por meio da correlação no mapa de contornos HMBC (APÊNDICE KKKK) entre os hidrogênios metilênicos CH<sub>2</sub>-8 ( $\delta$  3,65 e 3,93 ppm) com o carbono anomérico  $\delta$  102,8. Portanto, comparando os dados experimentais com os da literatura<sup>99</sup> identificou-se a substância **39** como feniletil- $\beta$ -glicosídeo.

### 5.1.2 Derivado C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> (**40**) e alcaloide tetraidroisoquinolínico (**41**)

**40****41**

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H das substâncias **40** + **41** (APÊNDICE LLLL) apresenta dois dubletos em  $\delta$  7,78 e  $\delta$  6,81 com constantes de acoplamento de 8,7 Hz que indicam a existência de um anel aromático *para*-substituído. Os valores de deslocamento químico dos átomos de carbono, aliado as correlações observadas no mapa de contornos HSQC e HMBC (APÊNDICE PPPP e APÊNDICE QQQQ): H-2/6 ( $\delta$  7,78) com C-4 ( $\delta$  161,7) e C-7 ( $\delta$  167,4), possibilitaram a identificação de **40** como sendo o ácido *p*-hidroxibenzóico<sup>53</sup> (Tabela 27).

Tabela 26 – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **37**, **38** e **39** (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ,  $J$  = Hz, 14,1 T)

Posição	37		38		(E)-ácido <i>p</i> -cumárico <sup>98</sup> $^1\text{H}$	39		Feniletil- $\beta$ - glicosídeo <sup>99</sup> $^1\text{H}$	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}^a$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}^a$		$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}^a$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1		125,2		125,2			138,9		139,4
2 e 6	7,51 <i>d</i> (8,7)	130,0	7,63 <i>d</i> (8,6)	132,2	7,51 <i>d</i> (8,5)	7,26 – 7,27 <i>m</i>	127 <sup>b</sup>	7,16 – 7,28 <i>m</i>	128,9
3 e 5	6,79 <i>d</i> (8,7)	115,6	6,74 <i>d</i> (8,6)	114,8	6,78 <i>d</i> (8,6)	7,26 – 7,27 <i>m</i>	127 <sup>b</sup>	7,16 – 7,28 <i>m</i>	129,6
4		159,7		158,5		7,26 – 7,27 <i>m</i>	127 <sup>b</sup>	7,16 – 7,28 <i>m</i>	126,7
7	7,48 <i>d</i> (15,9)	144,2	6,73 <i>d</i> (12,9)	141,3	7,48 <i>d</i> (15,7)	2,85 <i>dd</i> (15,0; 7,1)	35,5	2,85 <i>t</i> (6,5)	36,5
8	6,28 <i>d</i> (15,9)	115,3	5,72 <i>d</i> (12,9)	117,2	6,28 <i>d</i> (15,9)	3,65 <i>dt</i> (8,6; 6,7)	69,4	3,64 <i>m</i>	70,2
						3,93 <i>dt</i> (8,6; 7,1)		3,93 <i>m</i>	
Glc 1'	-	-	-	-	-	4,18 <i>d</i> (7,8)	102,8	4,17 <i>d</i> (8,0)	103,5
2'	-	-	-	-	-	2,96 <i>t</i> (8,4)	73,2	3,30 – 3,50 <i>m</i>	74,1
3'	-	--	-	-	-	3,07 – 3,10 <i>m</i>	76,7	3,30 – 3,50 <i>m</i>	77,6
4'	-	-	-	-	-	3,03 <i>t</i> (8,8)	70,0	3,30 – 3,50 <i>m</i>	70,8
5'	-	-	-	-	-	3,13 <i>t</i> (8,8)	76,6	3,30 – 3,50 <i>m</i>	77,5
6'	-	-	-	-	-	3,67 <i>dl</i> (10,4)	60,9	3,30 – 3,50 <i>m</i>	61,8
						3,42 <i>dd</i> (10,4; 5,9)		3,30 – 3,50 <i>m</i>	
CO	-	168,1		167,9					

<sup>a</sup>Dados obtidos por meio de experimentos de HSQC e HMBC, <sup>b</sup> Sinais sobrepostos

**Tabela 27** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **40** (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ,  $J = \text{Hz}$ , 14,1 T)

Posição	<b>40</b>		<b>Ácido <i>p</i>-hidroxibenzóico<sup>53</sup></b>	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	-	121,5	-	122,3
2 e 6	7,78 <i>d</i> (8,7)	131,7	7,79 <i>d</i> (8,0)	131,6
3 e 5	6,81 <i>d</i> (8,7)	115,3	6,82 <i>d</i> (8,0)	115,1
4	-	161,7	-	161,4
CO	-	167,4	-	167,8

A substância **41** apresenta, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (APÊNDICE LLLL), dois singletos na região de campo baixo em  $\delta$  6,50 e  $\delta$  6,49, um tripleto em  $\delta$  4,57 e sinais na região de  $\delta$  3,95 – 1,55 referentes a hidrogênios alifáticos. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (APÊNDICE MMMM) observa-se um sinal em  $\delta$  172,3 que sugere a existência de uma carbonila na estrutura, dois sinais em  $\delta$  ~144,0 relacionados a carbonos aromáticos oxigenados, sinais entre  $\delta$  128,5-111,8 referentes a carbonos aromáticos, um sinal em  $\delta$  55,7 indicando a existência de carbonos ligados a um heteroátomo e sinais de carbonos alifáticos entre  $\delta$  36,8 e 27,4 (Tabela 28).

No espectro de COSY (APÊNDICE NNNN) observam as correlações entre os hidrogênios metilênicos: H-5 e H-6, entre H-2 e H-3 e entre o hidrogênio metínico H-1 com H-2. Os experimentos de TOCSY 1D (APÊNDICE OOOO) e HSQC (APÊNDICE PPPP) auxiliaram na atribuição dos hidrogênios e carbonos alifáticos da estrutura. A definição da estrutura do alcaloide tetraidroisoquinolínico só foi possível por meio das correlações observadas no mapa de contornos HMBC (APÊNDICE QQQQ) entre: H-1 ( $\delta$  4,57) e C-6a ( $\delta$  123,8); H-5 ( $\delta$  3,96) e C-6a; H-2 ( $\delta$  2,57 – 2,50 e  $\delta$  1,55 – 1,61) com C-4 ( $\delta$  172,3) e C-10a ( $\delta$  128,5); H-7 ( $\delta$  6,49) com C-6 ( $\delta$  27,4).

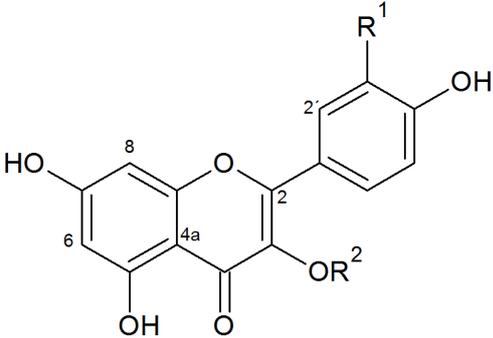
Esta substância identificada como sendo o alcaloide Trolina (**41**) que foi isolada primeiramente das flores da espécie *Trollius chinensis*, possui atividade antibacteriana<sup>100</sup> e está sendo descrito pela primeira vez na família Aristolochiaceae.

**Tabela 28** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **41** (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ,  $J$  = Hz, 14,1 T)

Posição	<b>41</b>		Trolina <sup>100</sup>	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	4,57 <i>t</i> (7,7)	55,7	4,57 <i>t</i> (7,8)	55,6
2	2,57 – 2,50 <i>m</i>	27,4	2,63 – 2,46 <i>m</i>	27,3
	1,55 – 1,61 <i>m</i>		1,59 <i>m</i>	
3	2,40 <i>dt</i> (17,1; 10,0)	31,4	2,40 <i>m</i>	31,3
	2,22 <i>ddd</i> (17,1; 9,2; 1,7)		2,21 <i>m</i>	
4	-	172,3	-	172,0
5	3,96 <i>ddd</i> (12,7; 5,8; 2,6)	36,8	3,95 <i>m</i>	36,6
	2,90 <i>dt</i> (12,7; 5,9)		2,91 <i>m</i>	
6	2,57 – 2,50 <i>m</i>	27,5	2,63 – 2,46 <i>m</i>	27,4
6a	-	123,8	-	123,7
7	6,49 <i>s</i>	115,5	6,49 <i>s</i>	115,4
8	-	144,3*	-	144,2
9	-	144,1*	-	144,0
10	6,50 <i>s</i>	111,8	6,51 <i>s</i>	111,7
10a	-	128,5	-	128,4

\* Os sinais podem estar trocados

**5.1.3 Flavonoides (42 – 48)**

	<b>42</b>	$\text{R}^1$ H	$\text{R}^2$ H
	<b>43</b>	OH	H
	<b>44</b>	OH	$\beta\text{-Glc-(6}\rightarrow\text{1)-}\alpha\text{-Ram}$
	<b>45</b>	$\text{OCH}_3$	$\beta\text{-Glc-(6}\rightarrow\text{1)-}\alpha\text{-Ram}$
	<b>46</b>	H	$\beta\text{-Glc-(6}\rightarrow\text{1)-}\alpha\text{-Ram}$
	<b>47</b>	H	$\beta\text{-Gal-(6}\rightarrow\text{1)-}\alpha\text{-Ram}$
	<b>48</b>	H	$\beta\text{-Glc-(6}\rightarrow\text{1)-}\alpha\text{-Ram-(4}\rightarrow\text{1)-}\beta\text{-Glc}$

Assim como descrito para as substâncias **31** – **34** (seção 5.1.12, página 74), as substâncias **42** – **48** apresentam dois dubletos em  $\delta \sim 6,2$  e  $6,4$  com constante de acoplamento de  $\sim 1,8$  Hz para os hidrogênios do anel A. As multiplicidades dos

demais hidrogênios aromáticos das substâncias **43** – **45**, sugerem a trissubstituição do anel B, enquanto que para as demais substâncias o anel B é *para*-substituído.

A substância **42** apresenta, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (APÊNDICE RRRR), dois dubletos na região de campo baixo em  $\delta$  6,92 e 8,11 com constantes de acoplamento de 8,9 Hz, e dois dubletos em  $\delta$  6,20 e 6,41 com constantes de 2,0 Hz, referentes aos hidrogênios dos anéis B e A, respectivamente. A comparação dos dados obtidos com a literatura<sup>101</sup> resultou na identificação da substância **42** como sendo o flavonoide kaempferol (Tabela 29).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **43** (APÊNDICE SSSS), observa-se apenas a existência dos hidrogênios aromáticos dos anéis A e B. A comparação destes valores de deslocamento químicos com os da literatura<sup>101</sup> permitiu a identificação de **43** como sendo a quercetina (Tabela 29).

**Tabela 29** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  de **42** e **43** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ,  $J = \text{Hz}$ , 14,1 T)

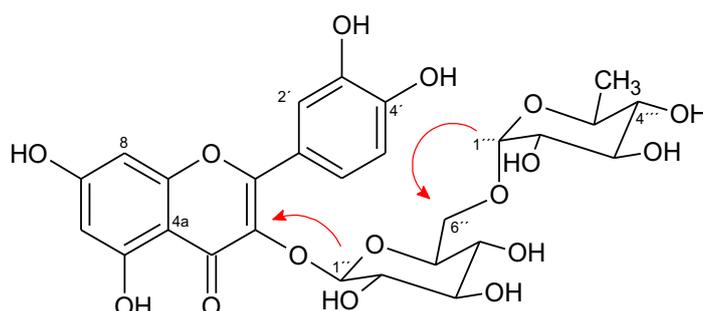
Posição	<b>42</b>	Kaempferol <sup>101</sup>	<b>43</b>	Quercetina <sup>101</sup>
2'	8,11 <i>d</i> (8,9)	8,09 <i>d</i> (8,8)	7,74 <i>d</i> (2,2)	7,73 <i>d</i> (2,0)
3'	6,92 <i>d</i> (8,9)	6,91 <i>d</i> (8,8)	-	-
5'	6,92 <i>d</i> (8,9)	6,91 <i>d</i> (8,8)	6,89 <i>d</i> (8,5)	6,89 <i>d</i> (8,5)
6'	8,11 <i>d</i> (8,9)	8,09 <i>d</i> (8,8)	7,63 <i>dd</i> (8,5; 2,2)	7,63 <i>dd</i> (8,5; 2,0)
6	6,20 <i>d</i> (2,0)	6,19 <i>d</i> (2,0)	6,18 <i>d</i> (2,1)	6,19 <i>d</i> (1,9)
8	6,41 <i>d</i> (2,0)	6,40 <i>d</i> (2,0)	6,39 <i>d</i> (2,1)	6,39 <i>d</i> (1,9)

A substância **44** apresenta no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (APÊNDICE TTTT), além dos sinais de hidrogênios aromáticos, dois dubletos em  $\delta$  5,11 ( $J = 7,7 \text{ Hz}$ ) e 4,52 ( $J = 1,3 \text{ Hz}$ ) com correlações em  $\delta$  104,3 e 102,0, respectivamente, no mapa de contornos HSQC (

APÊNDICE UUUU), sugerindo a existência de um açúcar com configuração  $\beta$  e outro com configuração  $\alpha$ .

Por meio da análise dos espectros de TOCSY 1D (APÊNDICE VVVV), HSQC (APÊNDICE UUUU) e HMBC (APÊNDICE WWW) foram atribuídos os deslocamentos químicos das duas unidades de hexoses. As unidades de  $\beta$ -glicose e de  $\alpha$ -ramnose foram confirmadas principalmente pelos valores de deslocamentos químicos dos carbonos e a existência de um carbono metilênico na primeira unidade

e de um carbono metílico na segunda unidade. A conexão do tipo 6''→1''' entre a unidade de glicose e a de ramnose foi determinada por meio da correlação observada no mapa de contornos HMBC entre H-1''' ( $\delta$  4,52) e C-6'' ( $\delta$  68,2); enquanto que a posição da glicose foi determinada pela correlação existente entre H-1'' ( $\delta$  5,11) e C-3 ( $\delta$  134,1) (Figura 32). Os dados obtidos permitiram a identificação de **44** com o flavonoide quercetina-3-O-rutinosídeo, conhecido como rutina<sup>102</sup> (Tabela 30).



**Figura 32** – Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para a substância **44**

A substância **45** foi obtida em mistura com a substância **46**. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **45** (APÊNDICE XXXX) apresenta sinais semelhantes aos do flavonoide **44**. A principal distinção está na presença de um singlete em  $\delta$  3,95, com integral para três hidrogênios e correlação com um carbono em  $\delta$  55,3 no mapa de contornos HSQC (APÊNDICE YYYY), sugerindo tratar-se de uma metoxila aromática. A posição da metoxila na aglicona foi confirmada por meio da correlação entre  $\text{OCH}_3$  ( $\delta$  3,95) e H-5' ( $\delta$  6,92) com C-3' ( $\delta$  146,9) no mapa de contornos HMBC (APÊNDICE ZZZZ).

A identificação das unidades de hexoses e os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos foram atribuídos com auxílio dos experimentos de TOCSY 1D (APÊNDICE AAAAA), HSQC e HMBC. A ligação entre as unidades de ramnose e glicose e a posição dos glicosídeos na estrutura foram determinadas por meio das correlações entre H-1''' ( $\delta$  4,53) com C-6'' ( $\delta$  67,8) e H-1'' ( $\delta$  5,25) com C-3 ( $\delta$  133,8), respectivamente. Assim, com base nessas informações, o composto **45** foi identificado como sendo o flavonoide isoramnetina-3-O-rutinosídeo<sup>103</sup> (Tabela 31).

Tabela 30 – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **44** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ,  $J = \text{Hz}$ , 14,1 T)

Posição	<b>44</b>		rutina <sup>102</sup>	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}^a$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
2	-	157,9	-	158,5
3	-	134,1	-	135,6
4	-	<sup>b</sup>	-	179,3
5	-	161,4	-	162,9
6	6,20 <i>d</i> (1,9)	99,6	6,20 <i>s</i>	100,0
7	-	165,1	-	166,2
8	6,39 <i>d</i> (1,9)	94,4	6,38 <i>s</i>	94,9
8a	-	156,9	-	159,3
4a	-	104,1	-	105,5
1'	-	121,5	-	123,1
2'	7,67 <i>d</i> (2,1)	117,4	7,64 <i>s</i>	116,0
3'	-	144,4	-	145,8
4'	-	148,4	-	149,8
5'	6,87 <i>d</i> (8,5)	115,8	6,87 <i>d</i> (8,5)	117,6
6'	7,63 <i>dd</i> (8,5; 2,1)	123,2	7,62 <i>d</i> (8,5)	123,5
glc-1"	5,11 <i>d</i> (7,7)	104,3	5,10 <i>d</i> (7,5)	104,7
glc-2"	3,45 <i>t</i> (7,1)	74,4	3,47 <i>t</i> (7,5)	75,7
glc-3"	3,43-3,44 <i>m</i>	76,8	3,45 <i>m</i>	78,2
glc-4"	3,27-3,28 <i>m</i>	70,1	3,26 <i>m</i>	71,4
glc-5"	3,33-3,35 <i>m</i>	75,8	3,30 <i>m</i>	77,2
glc-6"	3,82 <i>dl</i> (10,0)	68,2	3,81 <i>d</i> (12,0)	68,5
	3,39 <i>m</i>		3,40 <i>m</i>	
ram-1'''	4,52 <i>d</i> (1,3)	102,0	4,52 <i>s</i>	102,4
ram-2'''	3,64 <i>sl</i>	70,6	3,64 <i>sl</i>	72,1
ram-3'''	3,55 <i>dd</i> (9,5; 3,4)	71,9	3,54 <i>dd</i> (9,5; 3,0)	72,2
ram-4'''	3,29-3,28 <i>m</i>	73,6	3,28 <i>m</i>	73,9
ram-5'''	3,44-3,46 <i>m</i>	68,3	3,45 <i>m</i>	69,7
ram-6'''	1,12 <i>d</i> (6,2)	17,5	1,12 <i>d</i> (6,0)	17,9

<sup>a</sup> Dados obtidos por meio de experimentos de HSQC e HMBC; <sup>b</sup> Sinal não observado

**Tabela 31** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **45** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ,  $J = \text{Hz}$ , 14,1 T)

Posição	<b>45</b>		<b>isoramnetina-3-O-rutinosídeo</b> <sup>103</sup>	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}^{\text{a}}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
2	-	157,4	-	159,3
3	-	133,8	-	135,9
4	-	<sup>b</sup>	-	179,7
5	-	161,3	-	163,4
6	6,22 <i>d</i> (2,0)	98,5	6,22 <i>d</i> (2,1)	100,4
7	-	164,6	-	166,4
8	6,42 <i>d</i> (2,0)	93,4	6,42 <i>d</i> (2,1)	95,4
8a	-	156,9	-	158,8
4a	-	104,2	-	106,1
1'	-	121,4	-	123,4
2'	7,95 <i>d</i> (2,0)	113,1	7,95 <i>d</i> (2,0)	115,0
3'	-	146,9	-	148,7
4'	-	149,2	-	151,2
5'	6,92 <i>d</i> (8,5)	114,7	6,92 <i>d</i> (8,5)	116,5
6'	7,63 <i>dd</i> (8,5; 2,0)	122,6	7,64 <i>dd</i> (8,5; 2,1)	124,4
OCH <sub>3</sub>	3,95 <i>s</i>	55,3	3,95 <i>s</i>	57,2
glc-1"	5,25 <i>d</i> (7,5)	103,5	5,24 <i>d</i> (7,5)	104,9
glc-2"	3,46 <i>t</i> (7,1)	74,1	3,26-3,47 <i>m</i>	76,3
glc-3"	3,43-3,44 <i>m</i>	76,8	3,26-3,47 <i>m</i>	77,7
glc-4"	3,45-3,49 <i>m</i>	70,8	3,26-3,47 <i>m</i>	72,0
glc-5"	3,35-3,38 <i>m</i>	76,0	3,26-3,47 <i>m</i>	78,6
glc-6"	3,82 <i>dl</i> (10,0)	67,8	3,84 <i>dl</i> (10,0)	68,9
	3,41-3,42 <i>m</i>		3,26-3,47 <i>m</i>	
ram-1'''	4,53 <i>d</i> (1,4)	104,3	4,54 <i>d</i> (1,3)	102,9
ram-2'''	3,62-3,63 <i>m</i>	70,6	3,26-3,47 <i>m</i>	72,5
ram-3'''	3,52 <i>dd</i> (9,3; 3,2)	70,8	3,26-3,47 <i>m</i>	72,7
ram-4'''	3,25-3,27 <i>m</i>	72,5	3,26-3,47 <i>m</i>	74,2
ram-5'''	3,39-3,41 <i>m</i>	68,3	3,26-3,47 <i>m</i>	70,2
ram-6'''	1,10 <i>d</i> (6,2)	16,4	1,11 <i>d</i> (6,2)	18,3

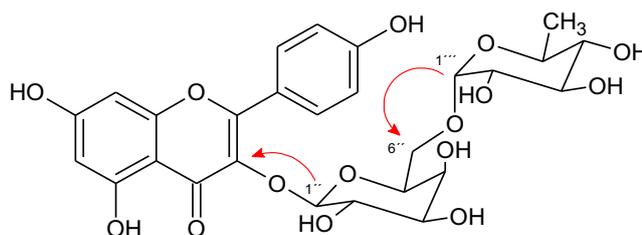
<sup>a</sup> Dados obtidos por meio de experimentos de HSQC e HMBC; <sup>b</sup> Sinal não observado

Os espectros dos flavonoides **46** – **48** apresentam dois dubletos com constantes de acoplamento *orto* indicando que o anel B é *para*-substituído. Portanto pode-se sugerir que estas substâncias são derivadas do kaempferol.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **46** (APÊNDICE BBBBB) observa-se, além dos hidrogênios aromáticos, um dubleto em  $\delta$  5,13 ( $J = 6,9$  Hz) e um singlete largo em  $\delta$  4,52 referentes a hidrogênios anoméricos com configuração  $\beta$  e  $\alpha$ , respectivamente. Os sinais entre  $\delta$  3,24 – 3,81 e o dubleto em  $\delta$  1,12 estão relacionados aos demais hidrogênios das unidades glicosídicas, sendo que uma trata-se da ramnose. Os experimentos de TOCSY 1D (APÊNDICE CCCCC), HSQC (APÊNDICE DDDDD) e HMBC (APÊNDICE EEEEE) confirmaram a existência de uma unidade de glicose e outra de ramnose, onde a glicose está ligada na posição 3 da aglicona, uma vez que se observa a correlação entre H-1" ( $\delta$  5,13) com C-3 ( $\delta$  135,2) no mapa de contornos HMBC, e que a unidade de ramnose encontra-se ligada a posição 6" da glicose por meio da correlação H-1'" ( $\delta$  4,52) com C-6" ( $\delta$  68,3). Comparando os dados obtidos com a literatura<sup>104</sup> (Tabela 32), pode-se identificar a substância **46** com o flavonoide kaempferol-3-O-rutinosídeo.

O flavonoide **47** apresenta sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (APÊNDICE FFFFF) muito semelhantes aos da substância **46**. A diferença mais perceptível está apenas na variação de deslocamento químico da primeira unidade de hexose, de  $\delta$  5,13 em **46** para  $\delta$  5,04 em **47**. Já o experimento de TOCSY 1D (APÊNDICE GGGGG) com irradiação em 5,04 ppm apresenta apenas correlações com dois sinais ( $\delta$  3,78 – 3,84 *m* e 3,53 – 3,55 *m*), o que representa uma diferença significativa no número de sinais em relação ao experimento de TOCSY da unidade de glicose presente em **46**. Estas informações, juntamente com a diferença no tempo de retenção entre **47** ( $t_r$  24,8 min) e **46** ( $t_r$  25,4 min), corroboram com a sugestão de que a diferença entre as estruturas de **46** e **47** está relacionada a primeira unidade de hexose.

A análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (APÊNDICE HHHHH), TOCSY 1D e dos mapas de contornos HSQC (APÊNDICE IIIII) e HMBC (APÊNDICE JJJJJ) permitiram a identificação da primeira unidade de hexose como sendo uma galactose (Figura 33). Com base nas informações obtidas (Tabela 33) foi possível identificar **47** como sendo o flavonoide kaempferol-3-O-robinobiosídeo.<sup>105</sup>



**Figura 33** – Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para a substância **47**

**Tabela 32** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **46** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ,  $J$  = Hz, 14,1 T)

Posição	<b>46</b>		<b>Kaempferol-3-O-rutinosídeo</b> <sup>104</sup>	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}^{\text{a}}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
2	-	<sup>b</sup>	-	158,7
3	-	135,2	-	135,5
4	-	<sup>b</sup>	-	179,4
5	-	162,6	-	163,1
6	6,21 <i>sl</i>	99,7	6,21 <i>sl</i>	100,0
7	-	165,6	-	166,2
8	6,40 <i>sl</i>	94,7	6,40 <i>sl</i>	95,0
8a	-	158,1	-	159,4
4a	-	105,2	-	105,6
1'	-	122,4	-	122,8
2' e 6'	8,06 <i>d</i> (8,7)	132,3	8,06 <i>d</i> (9,0)	132,4
3' e 5'	6,90 <i>d</i> (8,7)	116,1	6,90 <i>d</i> (9,0)	116,2
4'	-	161,1	-	161,5
glc-1''	5,13 <i>d</i> (6,9)	104,4	5,11 <i>d</i> (7,5)	104,6
glc-2''	3,24-3,28 <i>m</i>	76,7	3,27-3,80 <i>m</i>	76,8
glc-3''	3,43-3,44 <i>m</i>	78,0	3,27-3,80 <i>m</i>	78,2
glc-4''	3,24-3,26 <i>m</i>	71,3	3,27-3,80 <i>m</i>	71,5
glc-5''	3,34-3,38 <i>m</i>	77,0	3,27-3,80 <i>m</i>	77,2
glc-6''	3,81 <i>dl</i> (10,5)	68,3	3,27-3,80 <i>m</i>	68,6
	3,39-3,41 <i>m</i>		3,27-3,80 <i>m</i>	
ram-1'''	4,52 <i>sl</i>	102,2	4,52 <i>sl</i>	102,4
ram-2'''	3,64 <i>sl</i>	71,8	3,27-3,80 <i>m</i>	72,1
ram-3'''	3,53 <i>dd</i> (9,3; 3,2)	72,1	3,27-3,80 <i>m</i>	72,3
ram-4'''	3,24-3,26 <i>m</i>	73,6	3,27-3,80 <i>m</i>	74,0
ram-5'''	3,43-3,47 <i>m</i>	69,5	3,27-3,80 <i>m</i>	69,7
ram-6'''	1,12 <i>d</i> (6,2)	17,6	1,12 <i>d</i> (6,0)	17,9

<sup>a</sup> Dados obtidos por meio de experimentos de HSQC e HMBC; <sup>b</sup> Sinal não observado

**Tabela 33** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **47** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ,  $J = \text{Hz}$ , 14,1 T)

Posição	<b>47</b>		<b>kaempferol-3-O-robinobiosídeo<sup>105</sup></b>	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
2	-	158,5	-	158,7
3	-	135,7	-	135,9
4	-	179,6	-	179,7
5	-	162,9	-	163,1
6	6,22 <i>sl</i>	100,0	6,21 <i>sl</i>	100,2
7	-	166,2	-	166,2
8	6,42 <i>sl</i>	94,9	6,41 <i>sl</i>	95,1
8a	-	159,3	-	159,5
4a	-	105,5	-	105,7
1'	-	122,6	-	122,8
2' e 6'	8,10 <i>d</i> (8,7)	132,5	8,09 <i>d</i> (8,4)	132,6
3' e 5'	6,89 <i>d</i> (8,7)	116,1	6,88 <i>d</i> (8,4)	116,3
4'	-	161,6	-	161,7
gal-1"	5,04 <i>d</i> (7,8)	103,8	5,03 <i>d</i> (7,6)	105,7
gal-2"	3,40-3,84 <i>m</i>	72,0	3,49-3,81 <i>m</i>	72,2
gal-3"	3,40-3,84 <i>m</i>	74,9	3,49-3,81 <i>m</i>	75,1
gal-4"	3,40-3,84 <i>m</i>	70,1	3,49-3,81 <i>m</i>	70,3
gal-5"	3,40-3,84 <i>m</i>	75,3	3,49-3,81 <i>m</i>	75,5
gal-6"	3,72 <i>dd</i> (10,2; 5,7) 3,39 <i>dd</i> (10,2; 6,8)	67,3	3,72 <i>dd</i> (10,4; 5,6) 3,39 <i>dd</i> (10,6; 6,4)	67,6
ram-1'''	4,52 <i>d</i> (1,3)	101,8	4,52 <i>s</i>	102,1
ram-2'''	3,40-3,84 <i>m</i>	72,9	3,49-3,81 <i>m</i>	73,1
ram-3'''	3,40-3,84 <i>m</i>	72,2	3,49-3,81 <i>m</i>	72,4
ram-4'''	3,40-3,84 <i>m</i>	73,8	3,49-3,81 <i>m</i>	74,0
ram-5'''	3,40-3,84 <i>m</i>	69,7	3,49-3,81 <i>m</i>	69,9
ram-6'''	1,18 <i>d</i> (6,2)	18,0	1,18 <i>d</i> (6,0)	18,1

A substância **48** apresenta sinais de deslocamentos químicos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (APÊNDICE KKKKK) similares aos da substância **46**, porém são observados três dubletos em  $\delta$  5,17 ( $J = 7,5 \text{ Hz}$ );  $\delta$  4,50 ( $J = 1,4 \text{ Hz}$ ) e  $\delta$  4,52 ( $J = 7,8$

Hz) sugerindo a existência de três unidades de hexoses, uma com configuração  $\alpha$  e duas  $\beta$ .

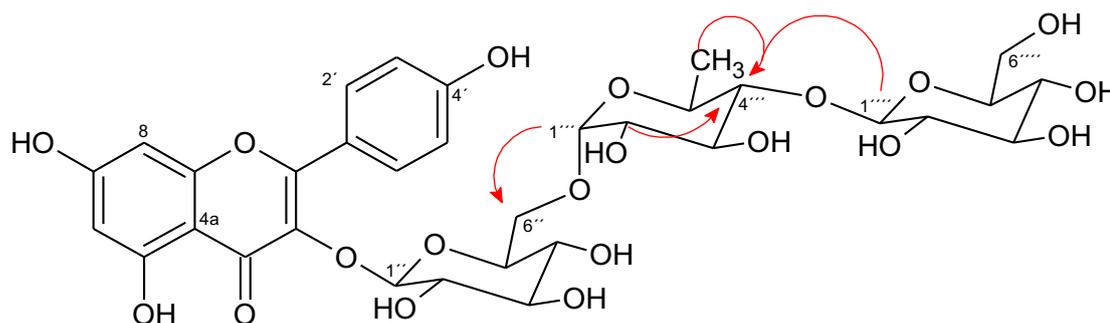
O espectro de massas de alta resolução de **48** (APÊNDICE LLLLL) apresentou o pico referente a molécula desprotonada com  $m/z$  755,2065  $[M - H]^-$ . O conjunto de informações fornecidos pelos espectros de RMN e HRMS sugere a fórmula molecular  $C_{33}H_{40}O_{20}$  (calculado para  $C_{33}H_{39}O_{20}$ , 755,2033). O espectro de MS/MS do íon 755,2065 forneceu um pico com  $m/z$  285,0386, sugerindo tratar-se de um derivado do flavonoide kaempferol. Por meio da diferença de 470 Da entre o pico  $[M - H]^-$  e a aglicona, juntamente com a sugestão de fórmula molecular e os dados de RMN pode-se propor a existência de três unidades de açúcares, onde uma unidade é de ramnose (146 Da).

Ao comparar os valores de deslocamento químico dos átomos de carbono da aglicona com os da literatura<sup>81</sup> sugere-se que os glicosídeos estão conectados na posição 3 do kaempferol.

A análise dos experimentos de TOCSY 1D (APÊNDICE MMMMM), HSQC (APÊNDICE NNNNN) e HMBC (APÊNDICE OOOOO) sugere que os hidrogênios anoméricos em  $\delta$  5,17 e 4,52 são de unidades de glicose, devido aos valores de deslocamento químico dos átomos de carbono, enquanto que o hidrogênio em  $\delta$  4,50 pertence a uma unidade de ramnose.

A sequência na qual as duas unidades de glicose e a ramnose estão conectadas foi determinada por meio das correlações observadas no mapa de contornos HMBC (Figura 34). A conectividade entre a primeira unidade de glicose e a ramnose foi determinada por meio da correlação entre H-1''' ( $\delta$  4,50) com C-6'' ( $\delta$  68,2). Já a ligação entre a ramnose e a segunda unidade de glicose foi estabelecida com base na correlação existente entre os prótons metílicos H-6''' ( $\delta$  1,13) e o hidrogênio anomérico H-1'''' ( $\delta$  4,52) com C-4''' ( $\delta$  83,2) da ramnose. O deslocamento químico para campo baixo de C-4''' ( $\sim \Delta\delta$  10) é de comum ocorrência quando ocorre uma glicosilação nesta posição.<sup>106</sup>

Este é o primeiro relato em literatura do kaempferol-3-*O*- $\beta$ -glicopiranosil-(6'' $\rightarrow$ 1''')-*O*- $\alpha$ -ramnopiranosil-(4''' $\rightarrow$ 1''''')-*O*- $\beta$ -glicopiranosídeo.



**Figura 34** – Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para a substância **48**

**Tabela 34** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **48** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ,  $J$  = Hz, 14,1 T)

Posição	48		Posição	48	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}^a$		$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}^a$
2	-	156,1	glc-5''	3,24-3,43 <i>m</i>	77,3
3	-	<sup>b</sup>	glc-6''	3,78 <i>dl</i> (10,9)	68,2
4	-	<sup>b</sup>		3,24-3,43 <i>m</i>	
5	-	162,3	ram-1'''	4,50 <i>d</i> (1,4)	102,0
6	6,21 <i>d</i> (2,1)	99,8	ram-2'''	3,24-3,72 <i>m</i>	71,7
7	-	165,9	ram-3'''	3,24-3,72 <i>m</i>	71,5
8	6,46 <i>d</i> (2,1)	94,6	ram-4'''	3,45-3,47 <i>m</i>	83,2
8a	-	157,9	ram-5'''	3,45-3,47 <i>m</i>	68,0
4a	-	105,2	ram-6'''	1,13 <i>d</i> (5,7)	17,6
1'	-	122,5	glc-1''''	4,52 <i>d</i> (7,8)	105,5
2' e 6'	8,08 <i>d</i> (8,9)	132,2	glc-2''''	3,24-3,43 <i>m</i>	75,8
3' e 5'	6,91 <i>d</i> (8,9)	116,0	glc-3''''	3,24-3,43 <i>m</i>	77,6
4'	-	160,7	glc-4''''	3,24-3,43 <i>m</i>	71,1
glc-1''	5,17 <i>d</i> (7,5)	103,7	glc-5''''	3,24-3,43 <i>m</i>	77,2
glc-2''	3,24-3,43 <i>m</i>	74,8	glc-6''''	3,85 <i>dl</i> (10,2)	62,3
glc-3''	3,24-3,43 <i>m</i>	77,6		3,67-3,70 <i>m</i>	
glc-4''	3,24-3,43 <i>m</i>	71,1			

<sup>a</sup>Dados obtidos por meio de experimentos de HSQC e HMBC; <sup>b</sup> Sinal não observado

## 6 CONSIDERAÇÕES

O estudo da composição química das flores de *Aristolochia trulliformis* resultou, até o momento, no isolamento e/ou identificação de doze substâncias: quatro derivados C<sub>6</sub>-C<sub>n</sub>, um alcaloide tetraidroisoquinolínico e sete flavonoides. Dentre os flavonoides isolados destaca-se o flavonoide kaempferol-3-O-β-glicopiranosil-(6"→1"-O-α-ramnopiranosil-(4"→1"")-O-β-glicopiranosídeo que está sendo descrito pela primeira vez na literatura.

As flores de *Aristolochia trulliformis* apresentaram como substância majoritária no extrato bruto o flavonoide kaempferol-3-O-rutinosídeo (**46**). Considerando o número de flavonoides glicosilados isolados das flores pode sugerir uma relação entre a composição química e a atração de polinizadores nesta espécie.

## 7 CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico das espécies *Aristolochia urupaensis* e *Aristolochia trulliformis* resultou no isolamento de 48 substâncias. Dentre as substâncias obtidas destacam-se cinco substâncias que estão sendo descritas pela primeira vez na literatura: (2*S*)-2-[2'-(4-hidroxifenil)etil]-6-metil-2,3-diidro-4*H*-piran-4-ona (**1**), três novos derivados de ácido aristolóquico [ácido 7-*O*-metil-aristolóquico F (**5**), aristolocato de sódio F (**8**) e 7-*O*-metil-aristolocato de sódio F (**9**)] e o flavonoide kaempferol-3-*O*- $\beta$ -glicopiranosil-(6'' $\rightarrow$ 1''')-*O*- $\alpha$ -ramnopiranosil-(4''' $\rightarrow$ 1''''')-*O*- $\beta$ -glicopiranosídeo (**48**).

Mesmo a família Aristolochiaceae apresentando um número significativo de substâncias isoladas de diversas espécies, neste trabalho estão sendo descritas pela primeira vez na família, além das substâncias inéditas, outras seis substâncias: tirosol-1-*O*- $\beta$ -glicopiranosil-(6 $\rightarrow$ 1)-*O*- $\beta$ -xilopiranosídeo (**20**), a lignana (-)-9,9'-*O*-di-(*E*)-feruloil-secoisolariciresinol (**30**), os flavonoides quercetina-3-*O*- $\beta$ -glicopiranosil-(6 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -glicopiranosídeo (**31**), quercetina-3-*O*- $\beta$ -glicopiranosídeo (**32**), kaempferol-3-*O*-gentiobiosídeo (**33**) e o alcaloide tetraidroisoquinolínico trolina (**41**).

## REFERÊNCIAS

- 1 BRASIL, M. D. Ministério do Meio Ambiente. **O bioma cerrado**. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado> >. Acesso em: 18 mar. 2018.
- 2 HOEHNE, F. C. **Flora brasílica: Aristolochiaceae**. São Paulo: Instituto de Botânica de São Paulo, 1942. 141 p.
- 3 GONZÁLEZ, F. Florística y sistemática filogenética innecesariamente disyuntas: el caso de *Aristolochia*, *Euglypha* y *Holostylis* (Aristolochiaceae). **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 36, p. 193-202, 2012.
- 4 THE ANGIOSPERM PHYLOGENY, G. 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, n. 4, p. 399-436, 2003.
- 5 THE ANGIOSPERM PHYLOGENY, G. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1-20, 2016.
- 6 FREITAS, J.; LÍRIO, E. J.; GONZÁLEZ, F. A new cauliflorous species of *Aristolochia* (Aristolochiaceae) from Espírito Santo, Brazil. **Phytotaxa**, v. 124, n. 1, p. 55-59, 2013.
- 7 AL-BARHAM, M. B. et al. New aristolochic acid and other chemical constituents of *Aristolochia maurorum* growing wild in Jordan. **Natural Product Research**, v. 31, n. 3, p. 245-252, 2017.
- 8 PACHECO, A. G. et al. <sup>13</sup>C-NMR data of diterpenes isolated from *Aristolochia* Species. **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 1245-62, 2009.
- 9 TIAN-SHUNG, W. et al. Chemical constituents and pharmacology of *Aristolochia* species. In: ATTA UR, R. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**. Amsterdam: Elsevier, v. 32, Part L, 2005. p.855-1018.
- 10 LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R.; SILVA, T. D. Phytochemistry of the Aristolochiaceae family. **Research Advances in Phytochemistry**, v. 2, p. 19-108, 2001.
- 11 DE PASCOLI, I. C.; NASCIMENTO, I. R.; LOPES, L. M. X. Configurational analysis of cubebins and bicubebin from *Aristolochia lagesiana* and *Aristolochia pubescens*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 7, p. 735-742, 2006.

- 12 MACHADO, M. B.; LOPES, L. M. X. Tetraflavonoid and biflavonoids from *Aristolochia ridicula*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 18, p. 3095-3102, 2008.
- 13 DA SILVA, T.; LOPES, L. M. X. Aryltetralol and aryltetralone lignans from *Holostylis reniformis*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 9, p. 929-937, 2006.
- 14 CHUNG, Y.-M. et al. A novel alkaloid, aristopyridinone A and anti-inflammatory phenanthrenes isolated from *Aristolochia manshuriensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 6, p. 1792-1794, 2011.
- 15 LEÓN-DÍAZ, R. et al. Antitubercular Activity and the Subacute Toxicity of (-)-Licarin A in BALB/c Mice: A Neolignan Isolated from *Aristolochia taliscana*. **Archives of Medical Research**, v. 44, n. 2, p. 99-104, 2013.
- 16 CARVALHO, C. S. et al. **Diterpeno com atividade anti-Leishmania isolado de folhas de *Aristolochia cymbifera* (Aristolochiaceae)**. Resumos... Águas de Lindóia 2008.
- 17 TEMPONE, A. G. et al. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 443-449, 2008.
- 18 MICHL, J. et al. LC-MS- and <sup>1</sup>H NMR-Based metabolomic analysis and *in vitro* toxicological assessment of 43 *Aristolochia* species. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 1, p. 30-7, 2016.
- 19 YU, J. et al. Analysis of aristolochic acids, aristololactams and their analogues using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Chinese Journal of Natural Medicine**, v. 14, n. 8, p. 626-40, 2016.
- 20 MICHL, J. et al. Naturally occurring aristolochic acid analogues and their toxicities. **Natural Products Report**, v. 31, n. 5, p. 676-93, 2014.
- 21 SPENDER, I. D.; TIWARI, H. P. Biosynthesis of aristolochic acid. **Journal of the Chemical Society**, n. 2, p. 55-56, 1966.
- 22 SCHÜTTE, H. R.; ORBAN, U.; MOTHES, K. Biosynthesis of Aristolochic Acid. **European Journal of Biochemistry**, v. 1, n. 1, p. 70-72, 1967.
- 23 COMER, F.; TIWARI, H. P.; SPENSER, I. D. Biosynthesis of aristolochic acid. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 481-487, 1969.

- 24 SHARMA, V. et al. Biosynthesis of aristolochic acid. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions** **1**, n. 0, p. 1153-1155, 1982.
- 25 LEE, H. S.; HAN, D. S. A new acylated *N*-glycosyl lactam from *Aristolochia contorta*. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 9, p. 1165-9, 1992.
- 26 LIN, W. H. et al. Alkaloids from the Roots of *Aristolochia Triangularis* (l). **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 8-13, 1997.
- 27 PAVLOVIĆ, N. M. Balkan endemic nephropathy—current status and future perspectives. **Clinical Kidney Journal**, v. 6, n. 3, p. 257-265, 2013.
- 28 CHAN, W. et al. Quantitation of aristolochic acids in corn, wheat grain, and soil samples collected in Serbia: identifying a novel exposure pathway in the etiology of Balkan Endemic Nephropathy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 29, p. 5928-34, 2016.
- 29 LI, W.; HU, Q.; CHAN, W. Uptake and accumulation of nephrotoxic and carcinogenic aristolochic acids in food crops grown in *Aristolochia clematitis*-contaminated soil and water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 107-112, 2016.
- 30 JADOT, I. et al. An integrated view of aristolochic acid nephropathy: update of the literature. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, 2017.
- 31 JUAN-PEIRÓ, L. et al. The Use of Amberlite Adsorbents for Green Chromatography Determination of Volatile Organic Compounds in Air. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2012, p. 728143, 2012.
- 32 SIGMA-ALDRICH. Disponível em: <  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/xad16?lang=pt&region=BR>>.  
Acesso em: 19 de mar. de 2018.
- 33 REICH, H. J. **Simulating NMR spectra with WINDNMR-Pro**. Madison, 2002.  
Disponível em: <http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/plt/windnrmr.htm>: University of Wisconsin. Acesso em: 10 fev. 2017.
- 34 KUBO, I. et al. Isolation and structure of hepialone; principal component from male sex scales of *Hepialus californicus* (Lepidoptera). **Tetrahedron Letters**, v. 26, n. 5, p. 563-566, 1985.
- 35 UCHINO, K. et al. Synthesis of hepialone; principal component from male sex scales of hepialus californicus (lepidoptera). **Tetrahedron Letters**, v. 26, n. 10, p. 1319-1320, 1985.

- 36 ZIPP, G. G.; HILFIKER, M. A.; NELSON, S. G. Enantioenriched dihydropyrone from  $\beta$ -lactone templates. **Organic Letters**, v. 4, n. 11, p. 1823-1826, 2002.
- 37 BENNINI, B. et al. Diarylnonanoids and their glucosides from *Erica cinerea*. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 14, p. 1597-1600, 2011.
- 38 KAOUADJI, M.; BENNINI, B.; CHULIA, A. J. Three further 1,9-diarylnonanoid 3-O-glycosides from *Erica cinerea* **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 3, 2013.
- 39 ZHANG, Y.-T.; JIANG, J.-Q. Alkaloids from *Aristolochia manshuriensis* (Aristolochiaceae). **Helvetica Chimica Acta**, v. 89, n. 11, p. 2665-2670, 2006.
- 40 NASCIMENTO, I. R.; LOPES, L. M. X. Diterpene esters of aristolochic acids from *Aristolochia pubescens*. **Phytochemistry**, v. 63, n. 8, p. 953-957, 2003.
- 41 LEU, Y.-L. et al. The constituents of the stem and roots of *Aristolochia foveolata*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 45, n. 4, p. 539-541, 1998.
- 42 CAI, Y.; CAI, T.-G. Two new aristolochic acid derivatives from the roots of *Aristolochia fangchi* and their cytotoxicities. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 8, p. 1093-1095, 2010.
- 43 CHIANG, C.-Y. et al. Sodium aristolochates from the flowers and fruits of *Aristolochia zollingeriana*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 45, n. 1, p. 93-97, 1998.
- 44 AKASU, M.; ITOKAWA, H.; FUJITA, M. Four new fluorescent components isolated from the callus tissue of *Stephania cepharantha*. **Tetrahedron Letters**, v. 15, n. 41, p. 3609-3612, 1974.
- 45 WU, T.-S.; LEU, Y.-L.; CHAN, Y.-Y. Aristolochic acids as a defensive substance for the aristolochiaceae plant-feeding swallowtail butterfly, *Pachliopta aristolochiae interpositus*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 47, n. 1, p. 221-226, 2000.
- 46 PRIESTAP, H. A. Seven aristololactams from *Aristolochia argentina*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 4, p. 849-852, 1985.
- 47 NASCIMENTO, I. R. **Síntese estereosseletiva de neolignanas diidrobenezofurânicas e estudo fitoquímico de *Aristolochia pubescens* Will.** 2002. 245 f (Tese de doutorado). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

- 48 TSURUTA, A. Y. et al. Aristolactams and further constituents from *Aristolochia chamissonis*. **Eclética Química**, v. 27, p. 1-7, 2002.
- 49 MA, J. et al. A DNA-Damaging oxoaporphine alkaloid from *Piper caninum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 7, p. 1162-1164, 2004.
- 50 DAYUN, Z. et al. Two new oxoaporphine alkaloids isolated from *Aristolochia tuberosa*. **Acta Chimica Sinica**, v. 41, n. 1, p. 74-78, 1983.
- 51 CHEN, J.-H. et al. Aporphine alkaloids from *Clematis parviloba* and their antifungal activity. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 1, p. 3-5, 2009.
- 52 HOLZBACH, J. C.; LOPES, L. M. X. Aristolactams and alkamides of *Aristolochia gigantea*. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9462, 2010.
- 53 REN, Q. et al. Organic acids from *Capparis spinosa* fruit. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 48, n. 5, p. 868-869, 2012.
- 54 PENG, Y. et al. HPLC analysis, semi-preparative HPLC preparation and identification of three impurities in solidoside bulk drug. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 3, p. 828-832, 2009.
- 55 NOGUEIRA, C. R. **Constituintes micromoleculares de *Aristolochia melastoma* Manso: compostos nitrados**. 2010. 125 f (Dissertação de Mestrado). Instituto de Química, Universidade Paulista Júlio de Mesquita Araraquara, Araraquara, 2010.
- 56 NAVICKIENE, H. M. D.; LOPES, L. M. X. Alkamides and phenethyl derivatives from *Aristolochia gehrtii*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, p. 467-472, 2001.
- 57 SAWASDEE, K.; CHAOWASKU, T.; LIKHITWITAYAWUID, K. New neolignans and a phenylpropanoid glycoside from twigs of *Milium mollis*. **Molecules**, v. 15, n. 2, p. 639-48, 2010.
- 58 KORT, R. et al. Evidence for *trans-cis* isomerization of the *p*-coumaric acid chromophore as the photochemical basis of the photocycle of photoactive yellow protein. **FEBS Letters**, v. 382, n. 1, p. 73-78, 1996.
- 59 CARTA, F. et al. Mono-/dihydroxybenzoic acid esters and phenol pyridinium derivatives as inhibitors of the mammalian carbonic anhydrase isoforms I, II, VII, IX, XII and XIV. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 1564-9, 2013.

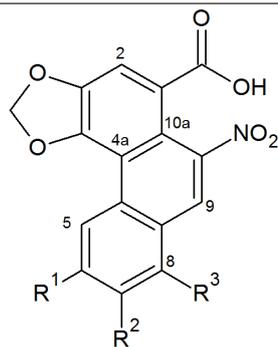
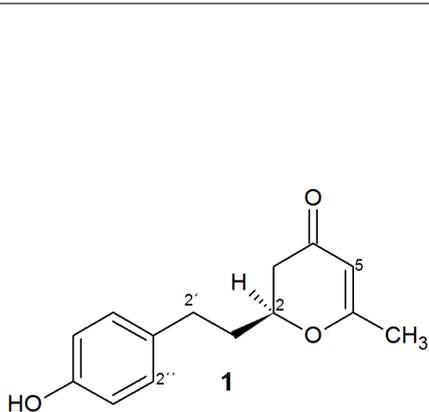
- 60 SALUM, M. L.; ROBLES, C. J.; ERRA-BALSELLS, R. Photoisomerization of ionic liquid ammonium cinnamates: one-pot synthesis-isolation of Z-cinnamic acids. **Organic Letters**, v. 12, n. 21, p. 4808-11, 2010.
- 61 RASMUSSEN, S.; WOLFF, C.; RUDOLPH, H. 4'-O- $\beta$ -d-glucosyl-cis-p-coumaric acid—a natural constituent of *Sphagnum fallax* cultivated in bioreactors. **Phytochemistry**, v. 42, n. 1, p. 81-87, 1996.
- 62 D'ABROSCA, B. et al. Structural characterization and radical scavenging activity of monomeric and dimeric cinnamoyl glucose esters from *Petrorhagia velutina* leaves. **Phytochemistry Letters**, v. 3, n. 1, p. 38-44, 2010.
- 63 HUANG, S.-X. et al. Phenyl and phenylethyl glycosides from *Picrorhiza scrophulariiflora*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 87, n. 3, p. 598-604, 2004.
- 64 BUBB, W. A. NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity. **Concepts in Magnetic Resonance Part A**, v. 19A, n. 1, p. 1-19, 2003.
- 65 HANAI, K. et al. A comparative vibrational and NMR study of cis-cinnamic acid polymorphs and trans-cinnamic acid. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 57, n. 3, p. 513-519, 2001.
- 66 CLAYDEN, J. **Organic Chemistry**. New York: Oxford University, 2001. 1490 p.
- 67 TEPONNO, R. B.; KUSARI, S.; SPITELLER, M. Recent advances in research on lignans and neolignans. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 9, p. 1044-1092, 2016.
- 68 CHEN, J.-J. et al. Dihydroagarofuranoid sesquiterpenes, a lignan derivative, a benzenoid, and antitubercular constituents from the stem of *Microtropis japonica*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 6, p. 1016-1021, 2008.
- 69 BYUN, E. et al. *Tribuli fructus* constituents protect against tacrine-induced cytotoxicity in HepG2 cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 1, p. 67-70, 2010.
- 70 HE, D. et al. Separation and purification of flavonoids from black currant leaves by high-speed countercurrent chromatography and preparative HPLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 33, n. 5, p. 615-628, 2010.
- 71 MORIYAMA, H.; IIZUKA, T.; NAGAI, M. A stabilized flavonoid glycoside in heat-treated *Cassia alata* leaves and its structural elucidation. **Yakugaku Zasshi**, v. 121, n. 11, p. 817-820, 2001.

- 72 REFAAT, J. et al. Chemical constituents from *Chorisia chodatii* flowers and their biological activities. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 7, p. 2939-2949, 2015.
- 73 SANG, S. et al. A phenylpropanoid glycoside from *Vaccaria segetalis*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 3, p. 569-571, 1998.
- 74 S-GRAVENMADE, E. J.; VOGELS, G. D.; VAN PELT, C. Preparation, properties and absolute configuration of (-)-allantoin. **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**, v. 88, n. 8, p. 929-939, 1969.
- 75 CIUFFREDA, P.; CASATI, S.; MANZOCCHI, A. Complete  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectral assignment of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adenosine, 2'-deoxyadenosine and their acetate derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 781-784, 2007.
- 76 NASCIMENTO, D. S. D.; CERVI, A. C.; GUIMARÃES, O. A. A família Aristolochiaceae Juss. no estado do Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, p. 414-422, 2010.
- 77 ENDRESS, P. K. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. p.
- 78 ERBAR, C.; HEILER, A.; LEINS, P. Nectaries in fly-deceptive pitcher-trap blossoms of *Aristolochia*. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 232, p. 128-141, 2017.
- 79 KAISER, R. Flowers and fungi use scents to mimic each other. **Science**, v. 311, n. 5762, p. 806, 2006.
- 80 MARTIN, K. R. et al. Spatial and temporal variation in volatile composition suggests olfactory division of labor within the trap flowers of *Aristolochia gigantea*. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 232, p. 153-168, 2017.
- 81 AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. Amsterdam: Elsevier Science 1989. p.
- 82 JOHNSON, S. D.; JÜRGENS, A. Convergent evolution of carrion and faecal scent mimicry in fly-pollinated angiosperm flowers and a stinkhorn fungus. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, p. 796-807, 2010.
- 83 OELSCHLAGEL, B. et al. The betrayed thief - the extraordinary strategy of *Aristolochia rotunda* to deceive its pollinators. **New Phytologist**, v. 206, n. 1, p. 342-51, 2015.

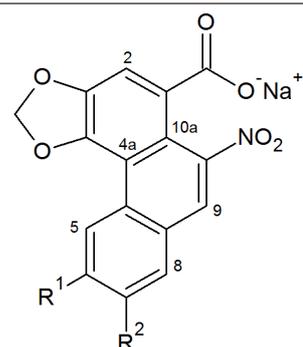
- 84 STASHENKO, E. E. et al. Determination of the volatile and semi-volatile secondary metabolites, and aristolochic acids in *Aristolochia ringens* Vahl. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, n. 9, p. 817-21, 2009.
- 85 OELSCHLAGEL, B. et al. Structure and biomechanics of trapping flower trichomes and their role in the pollination biology of *Aristolochia* plants (Aristolochiaceae). **New Phytologist**, v. 184, n. 4, p. 988-1002, 2009.
- 86 FREITAS, J. **Aristolochiaceae Juss. no Espírito Santo, Brasil**. 2016. 142 f (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus.
- 87 URRU, I.; STENSMYR, M. C.; HANSSON, B. S. Pollination by brood-site deception. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1655-66, 2011.
- 88 BERJANO, R. et al. Pollinators, flowering phenology and floral longevity in two mediterranean *Aristolochia* species, with a review of flower visitor records for the genus. **Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 6-16, 2009.
- 89 WU, T. S.; LEU, Y.-L.; CHAN, Y.-Y. Aristofolin-A, a denitro-aristolochic acid glycoside and other constituents from *Aristolochia kaempferi*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 8, p. 2509-2510, 1998.
- 90 AGATI, G. et al. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. **Plant Science**, v. 196, p. 67-76, 2012.
- 91 MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, p. 1218-1223, 2008.
- 92 KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 16, 2013.
- 93 MIERZIAK, J.; KOSTYN, K.; KULMA, A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16240, 2014.
- 94 FALCONE FERREYRA, M. L.; RIUS, S. P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, p. 222, 2012.
- 95 GRONQUIST, M. et al. Attractive and defensive functions of the ultraviolet pigments of a flower (*Hypericum calycinum*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 24, p. 13745-13750, 2001.

- 96 BOHM, B. A. **Introduction to flavonoids**. Australia: Hardwood academic publisher, 1998. 503 p.
- 97 MALLIKARJUNA, N. et al. Influence of foliar chemical compounds on the development of *Spodoptera litura* (Fab.) in interspecific derivatives of groundnut. **Journal of Applied Entomology**, v. 128, n. 5, p. 321-328, 2004.
- 98 ZHU, L. et al.  $\beta$ -Alanine-DBU: A highly efficient catalytic system for Knoevenagel-Doebner reaction under mild conditions. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 139-143, 2012.
- 99 MEI SHAN, P. et al. Antioxidative constituents from *Buddleia officinalis*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 6, p. 453, 2003.
- 100 KAWAI, N.; MATSUDA, M.; UENISHI, J. I. Stereoselective synthesis of tetrahydroisoquinoline alkaloids: (-)-trolline, (+)-crispin A, (+)-oleracein E. **Tetrahedron**, v. 67, n. 45, p. 8648-8653, 2011.
- 101 KIPCHAKBAEVA, A. K. et al. Method for obtaining total flavonoids from *Climacoptera subcrassa* and their biological activity. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 52, n. 2, p. 322-323, 2016.
- 102 CHANG, Y. et al. Cytotoxic activities of flavonoids from a traditional Mongolian medicinal herb *Clematis aethusifolia* Turcz. **Natural Product Research**, v. 31, n. 10, p. 1223-1227, 2017.
- 103 LEE, E. H. et al. Constituents of the stems and fruits of *Opuntia ficus-indica* var. saboten. **Archives Pharmacal Research**, v. 26, n. 12, p. 1018-23, 2003.
- 104 SOUSA, E. A. D. et al. A new flavonoid derivative from leaves of *Oxandra Sessiliflora* R. E. Fries. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 704-708, 2014.
- 105 SONG, J. L. et al. Chemical constituents from flowers of *Gardenia jasminoides*. **Zhong Yao Cai**, v. 36, n. 5, p. 752-5, 2013.
- 106 LIU, X. et al. Two new flavonol glycosides from *Gymnema sylvestre* and *Euphorbia ebracteolata*. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 4, p. 891-5, 2004.

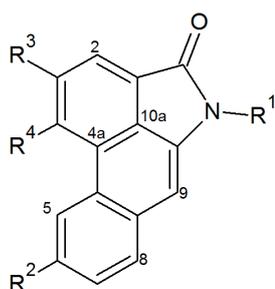
## **APÉNDICE**



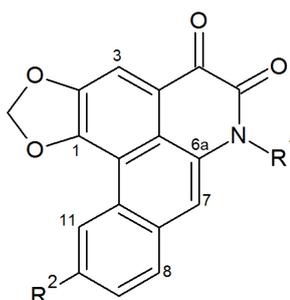
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
<b>2</b>	OH	H	H
<b>3</b>	H	H	H
<b>4</b>	H	H	OCH <sub>3</sub>
<b>5</b>	H	OCH <sub>3</sub>	H



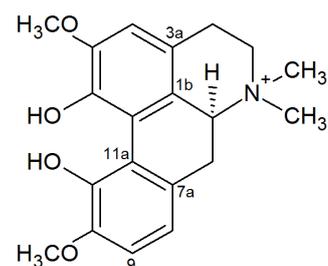
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
<b>6</b>	OH	H
<b>7</b>	H	H
<b>8</b>	H	OH
<b>9</b>	H	OCH <sub>3</sub>



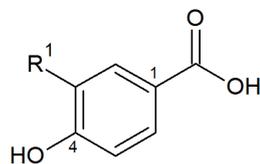
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
<b>10</b>	H	H	-OCH <sub>2</sub> O-	
<b>11</b>	Glc	H	-OCH <sub>2</sub> O-	
<b>12</b>	H	OH	-OCH <sub>2</sub> O-	
<b>13</b>	Glc	OH	-OCH <sub>2</sub> O-	
<b>14</b>	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>



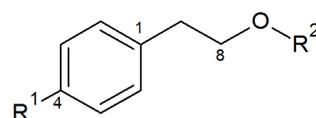
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
<b>15</b>	CH <sub>3</sub>	H
<b>16</b>	H	OH



**17**



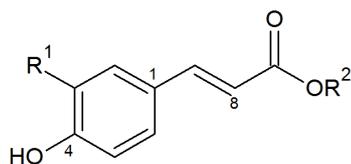
	R <sup>1</sup>
<b>18</b>	OCH <sub>3</sub>
<b>40</b>	H



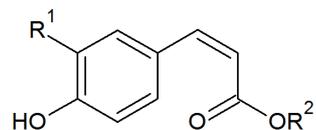
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
<b>19</b>	O-Glc	H
<b>20</b>	O-Glc-(6→1)-Xyl	H
<b>39</b>	H	Glc

■ Substâncias isoladas/identificadas dos caules de *Aristolochia urupaensis*

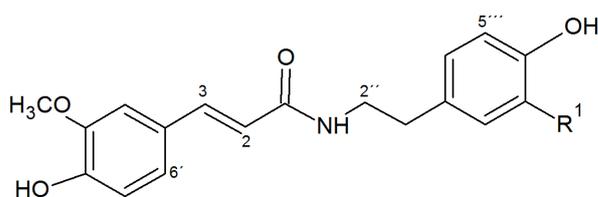
■ Substâncias isoladas/identificadas das flores de *Aristolochia trulliformis*



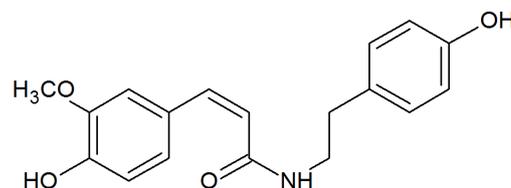
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
<b>21</b>	OCH <sub>3</sub>	H
<b>22</b>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<b>23<math>\alpha</math></b>	H	$\alpha$ -Glc
<b>23<math>\beta</math></b>	H	$\beta$ -Glc
<b>37</b>	H	H



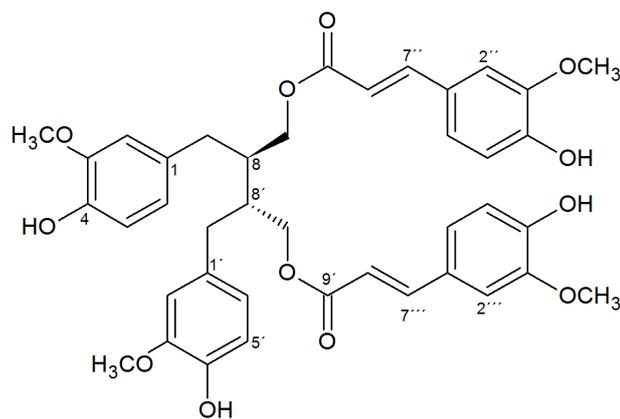
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
<b>24</b>	OCH <sub>3</sub>	H
<b>25</b>	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<b>26<math>\alpha</math></b>	H	$\alpha$ -Glc
<b>26<math>\beta</math></b>	H	$\beta$ -Glc
<b>38</b>	H	H



	R <sup>1</sup>
<b>27</b>	H
<b>28</b>	OCH <sub>3</sub>

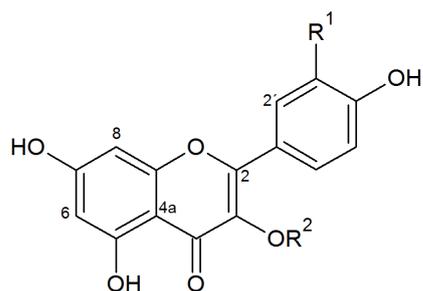


**29**

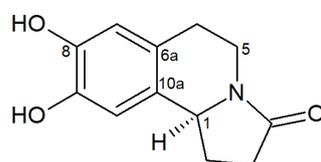
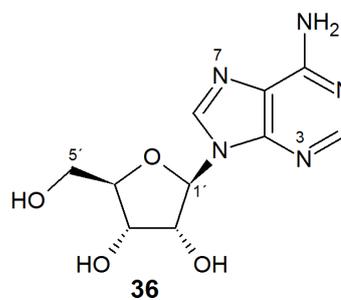
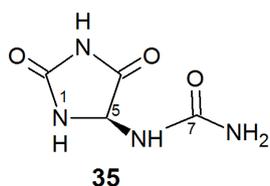


**30**

- Substâncias isoladas/identificadas dos caules de *Aristolochia urupaensis*
- Substâncias isoladas/identificadas das flores de *Aristolochia trulliformis*



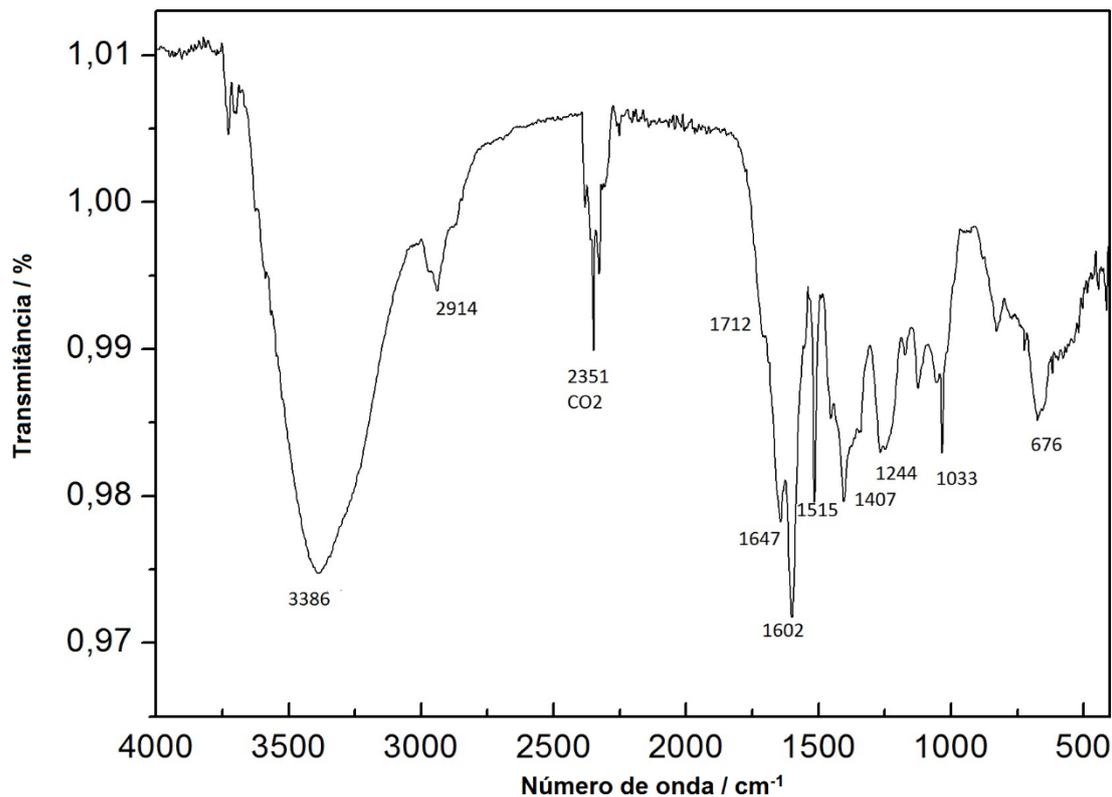
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
31	OH	$\beta$ -Glc-(6 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -Glc
32	OH	$\beta$ -Glc
33	H	$\beta$ -Glc-(6 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -Glc
34	H	$\beta$ -Glc-6-( <i>p</i> -cumaroil)
42	H	H
43	OH	H
44	OH	$\beta$ -Glc-(6 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -Ram
45	OCH <sub>3</sub>	$\beta$ -Glc-(6 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -Ram
46	H	$\beta$ -Glc-(6 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -Ram
47	H	$\beta$ -Gal-(6 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -Ram
48	H	$\beta$ -Glc-(6 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -Ram-(4 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -Glc



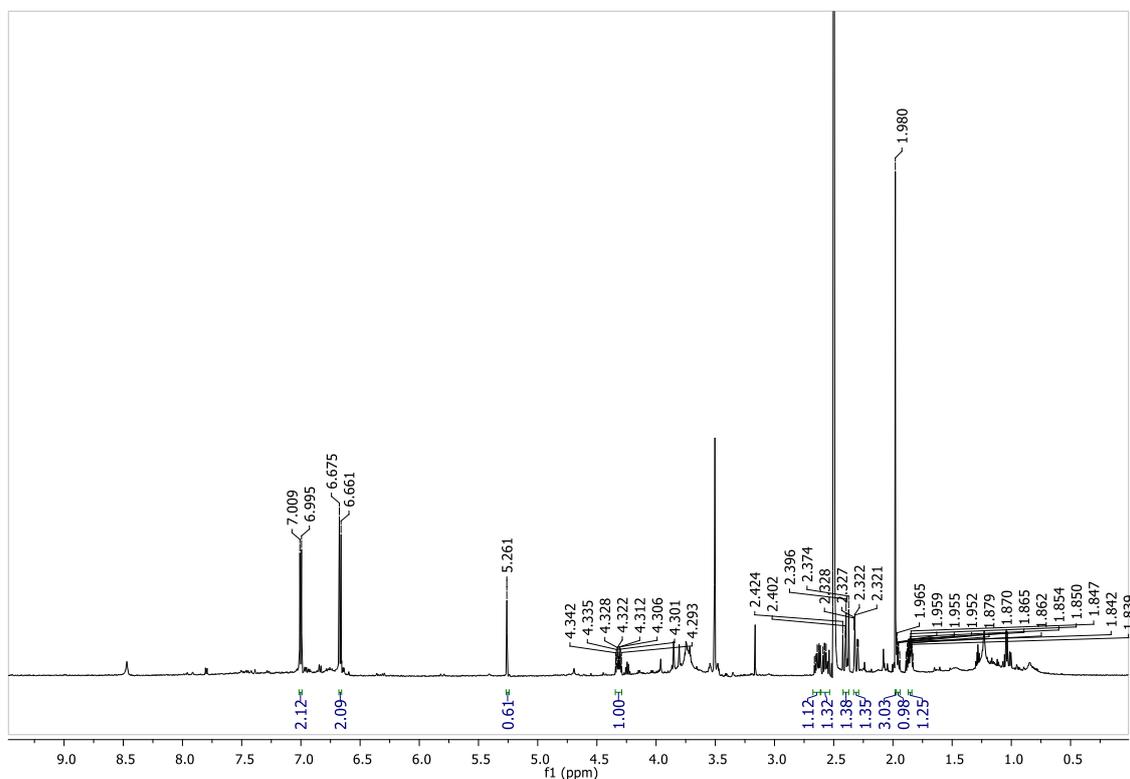
■ Substâncias isoladas/identificadas dos caules de *Aristolochia urupaensis*

■ Substâncias isoladas/identificadas das flores de *Aristolochia trulliformis*

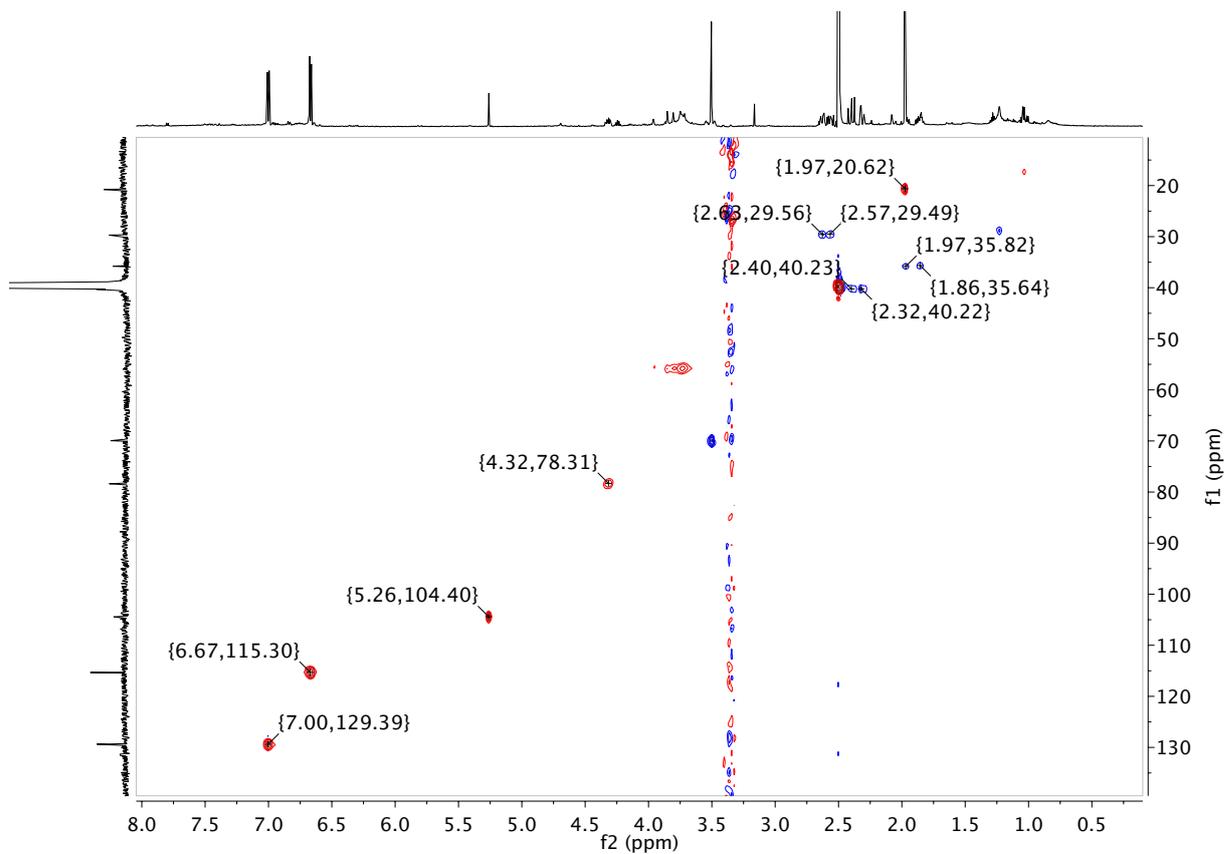
**APÊNDICE A - Espectro de absorção na região do infravermelho de 1**



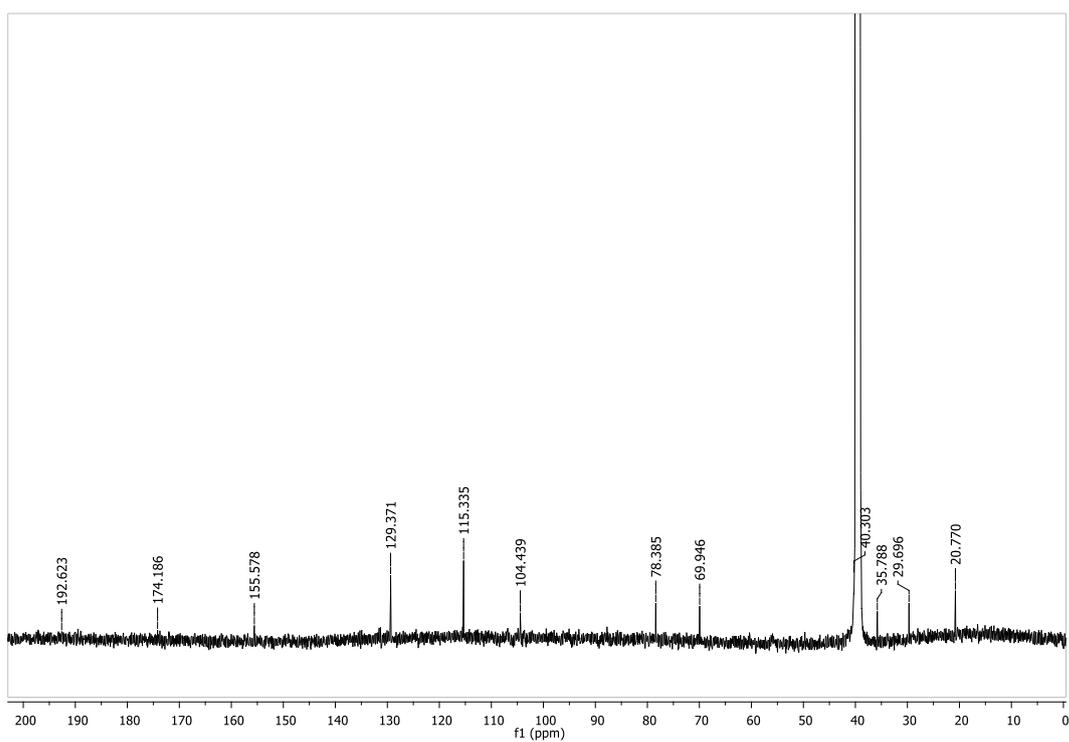
**APÊNDICE B - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de 1 (DMSO-d<sub>6</sub>, 14,1 T)**



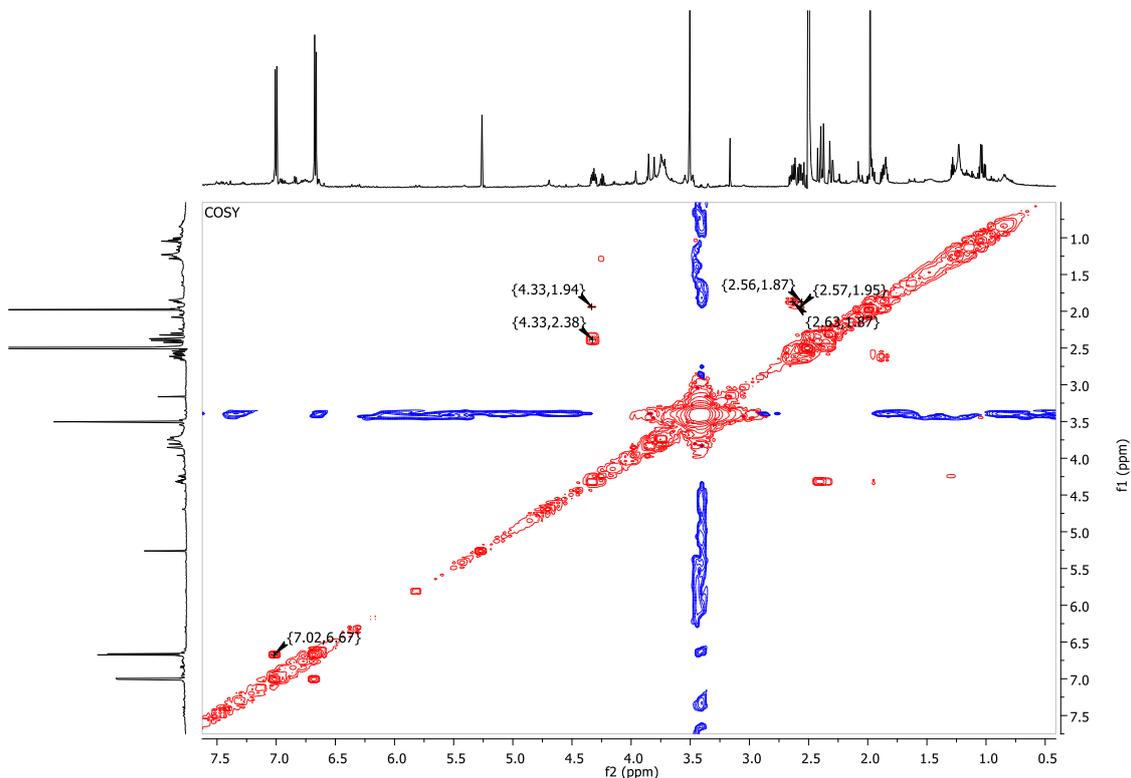
APÊNDICE C - Mapa de contornos HSQC de **1** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 14,1 T)



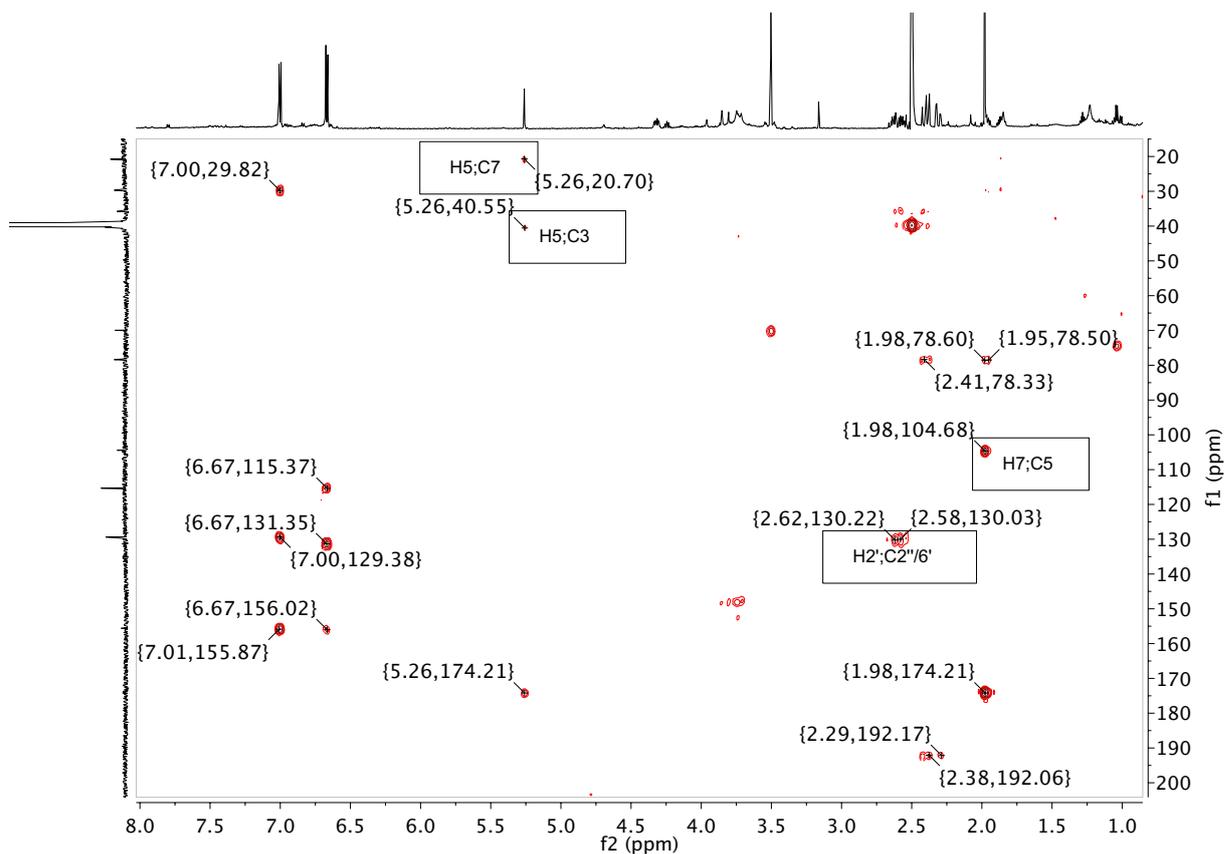
APÊNDICE D - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de **1** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 14,1 T)

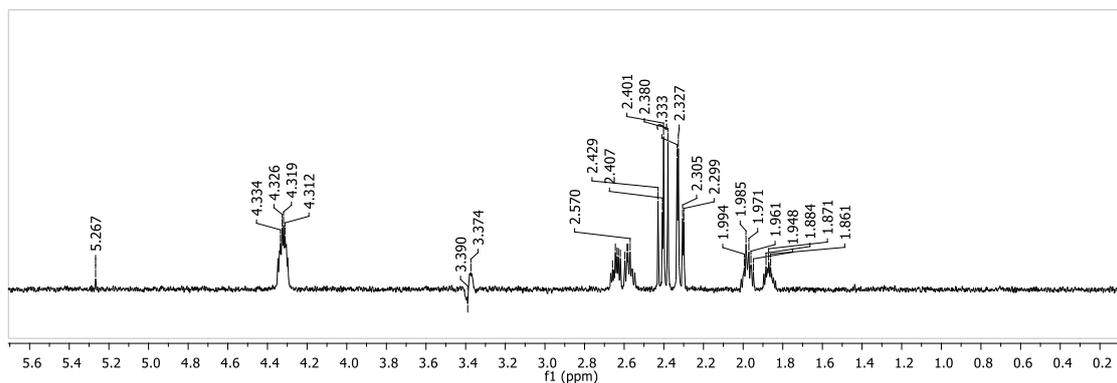
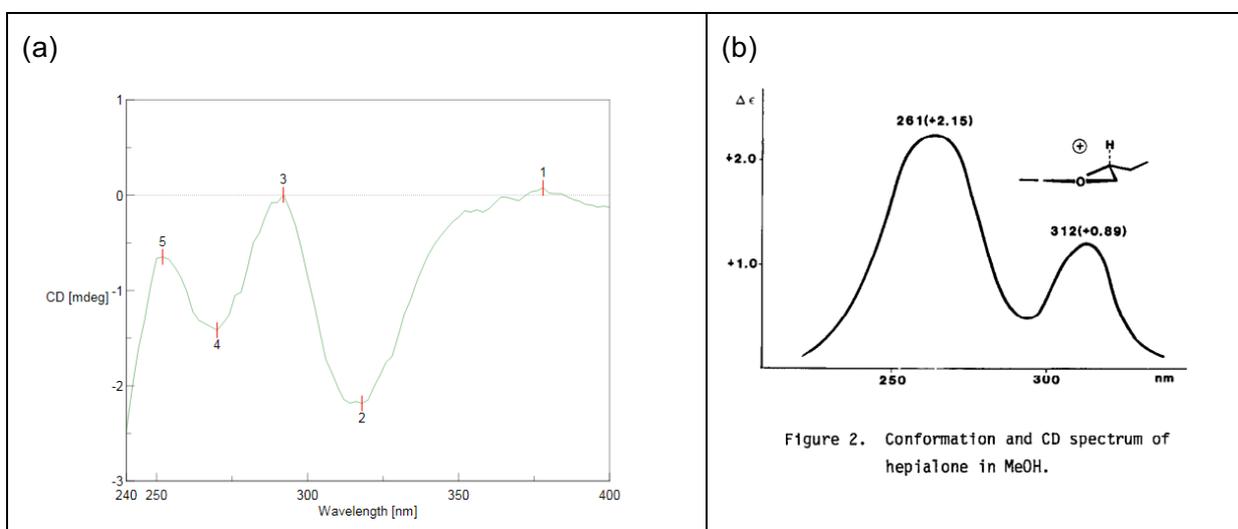
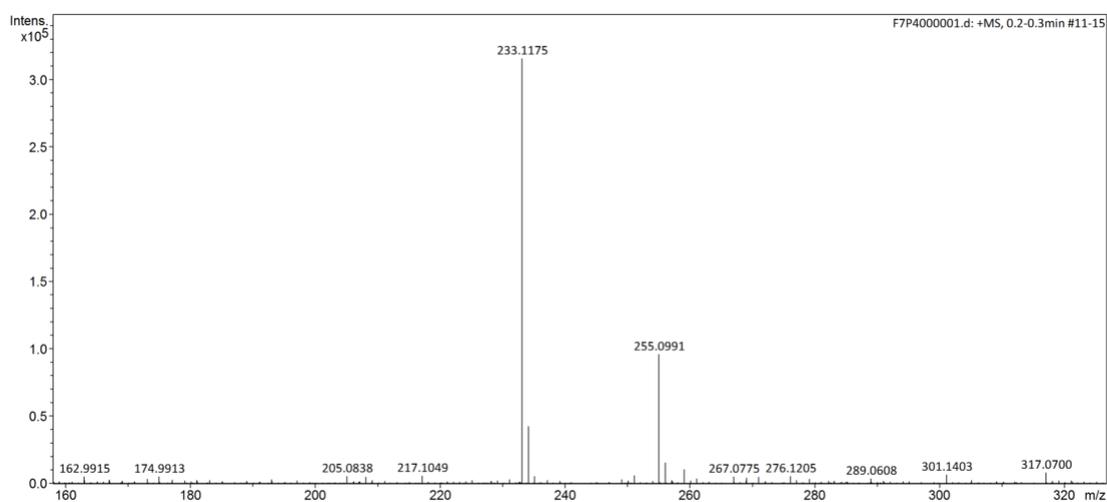


APÊNDICE E - Mapa de contornos COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de **1** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)

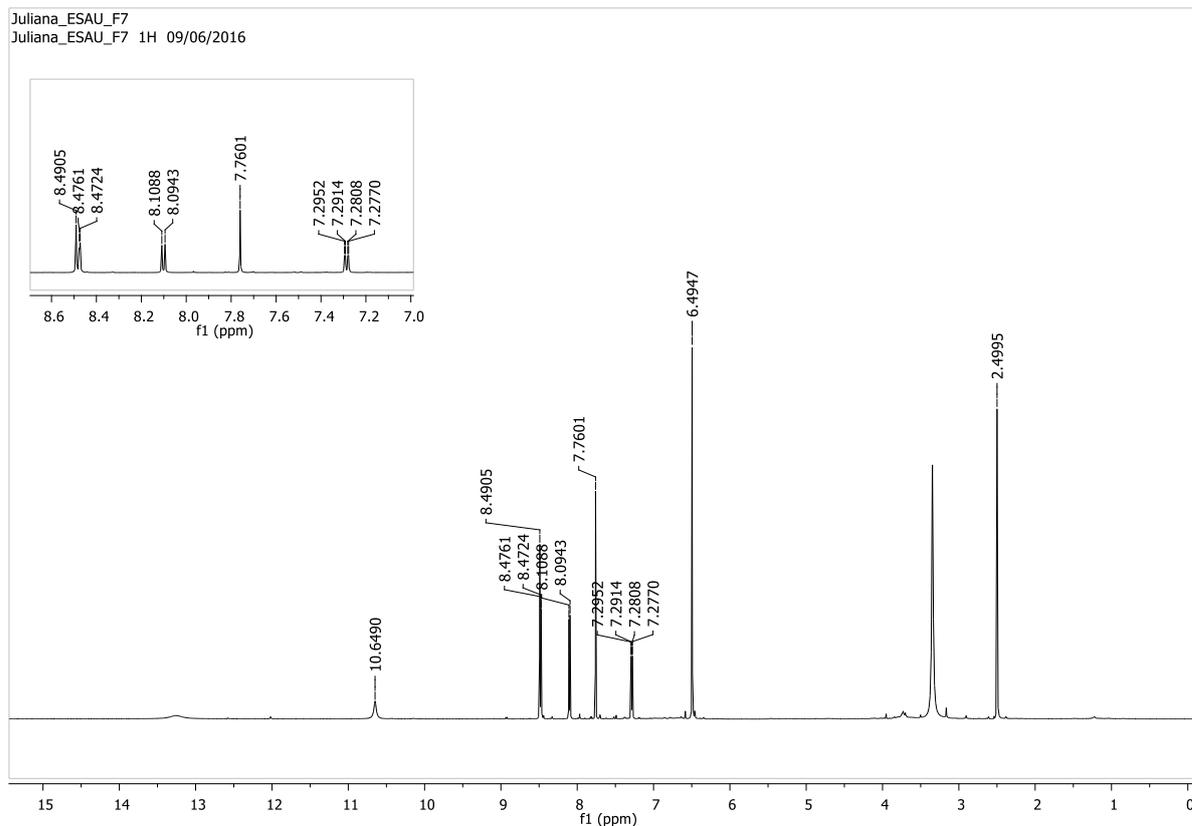


APÊNDICE F - Mapa de contornos HMBC de **1** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)

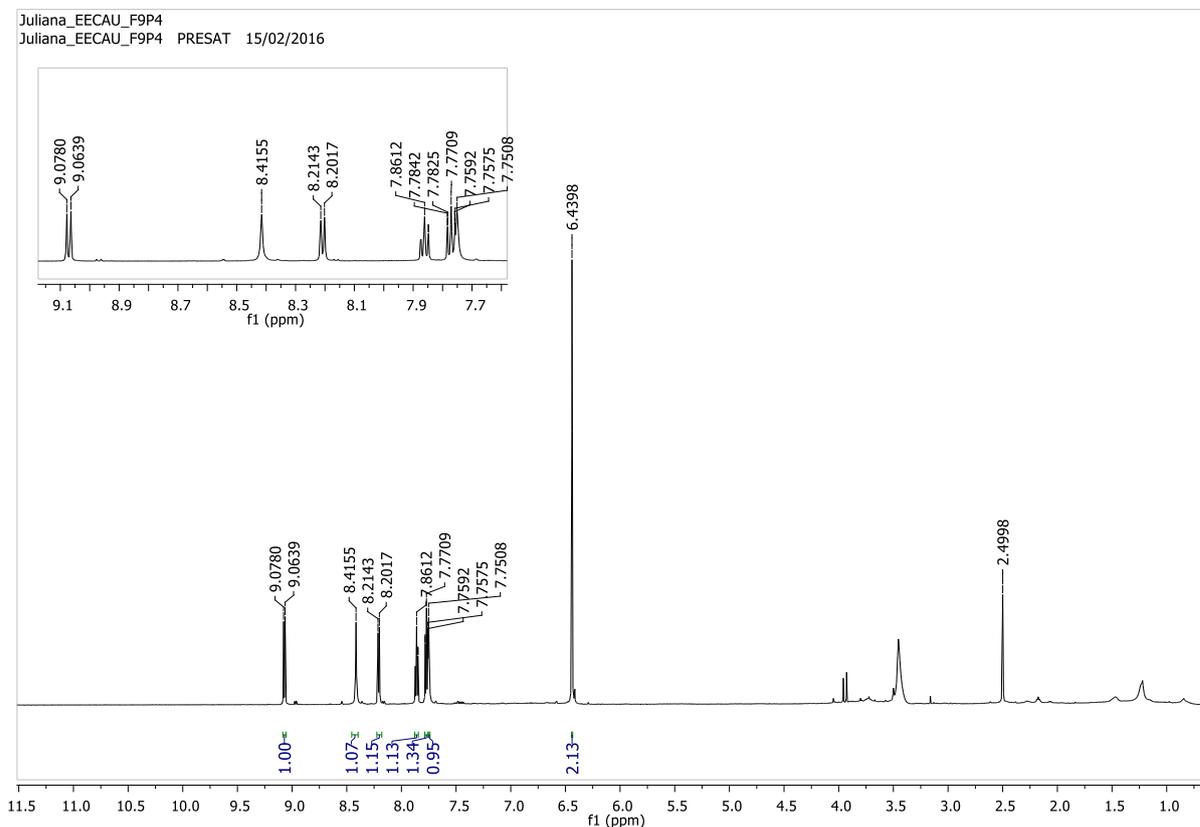


APÊNDICE G - Espectro TOCSY 1D de **1** com irradiação em  $\delta$  4,32 (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)APÊNDICE H - Espectro de dicroísmo circular de **1** (a) e *R*-hepialona (b)APÊNDICE I - Espectro de massas de alta resolução de **1** (ESI, + 4,5 eV)

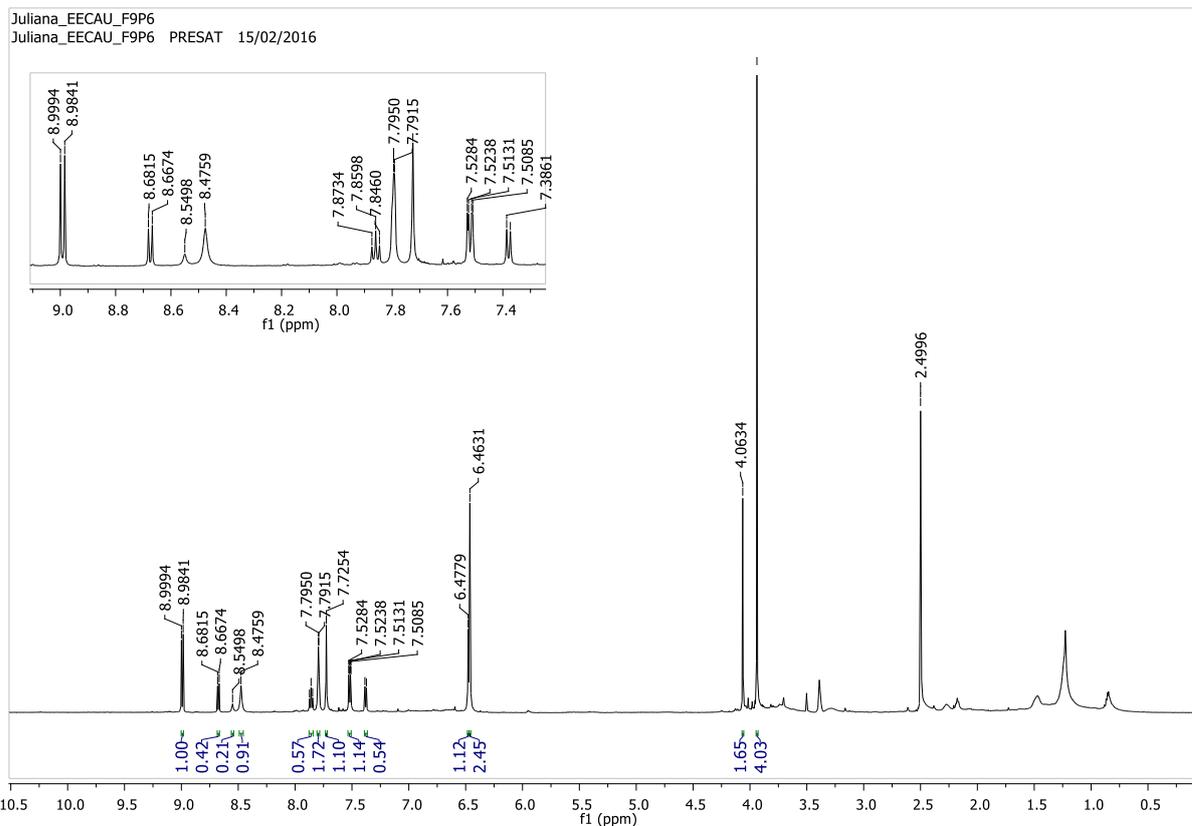
APÊNDICE J - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de 2 (DMSO-d<sub>6</sub>, 14,1 T)



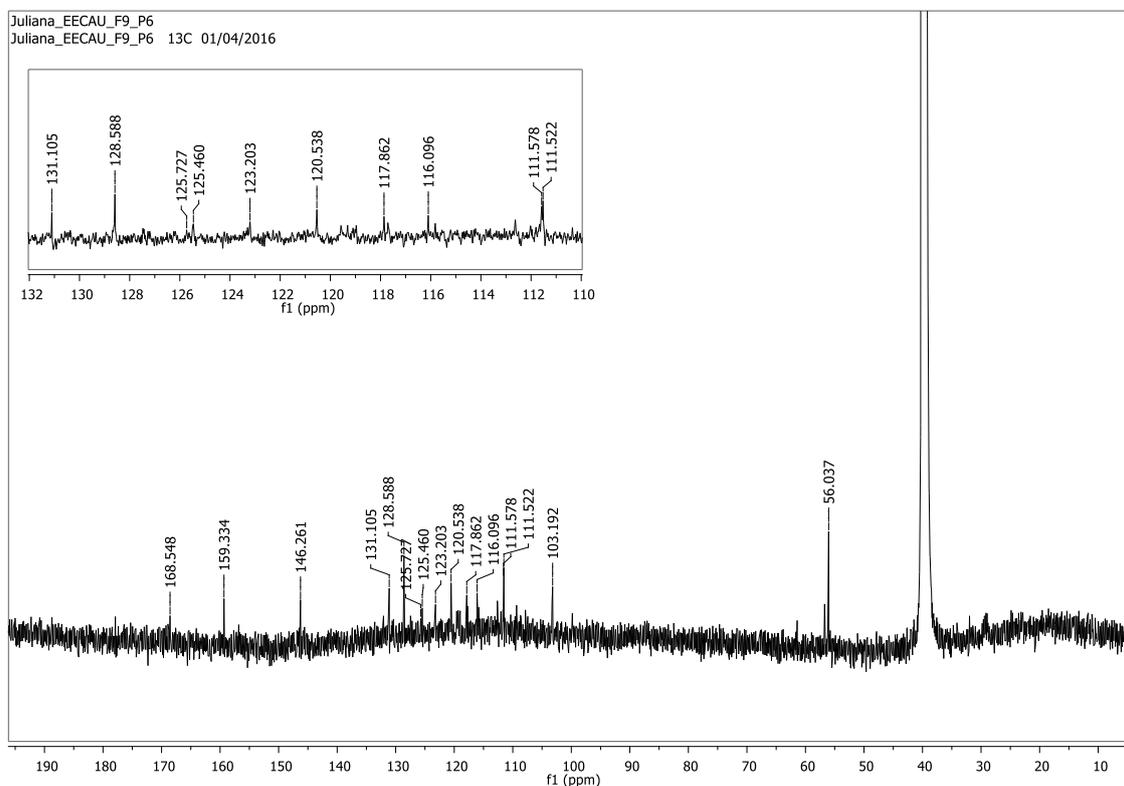
APÊNDICE K - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de 3 (DMSO-d<sub>6</sub>, 14,1 T)



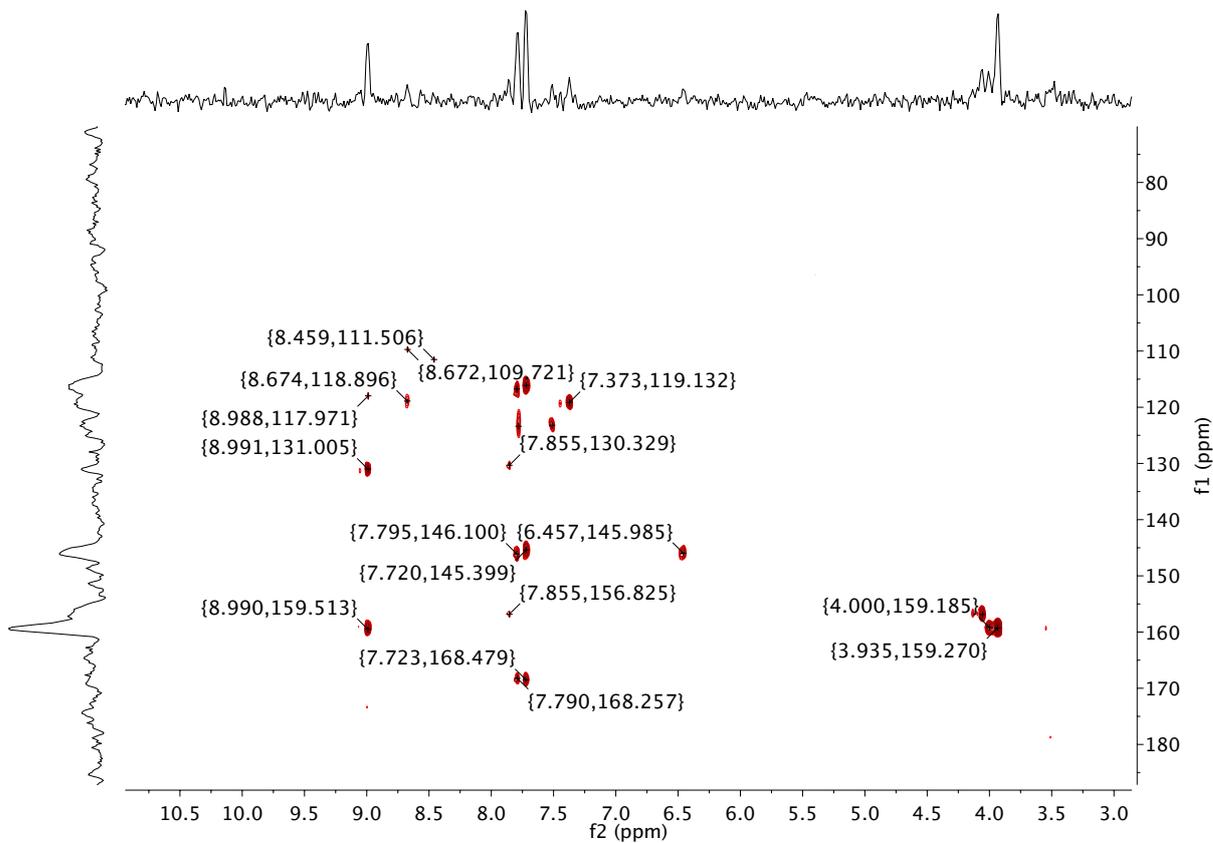
APÊNDICE L - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **4** + **5** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



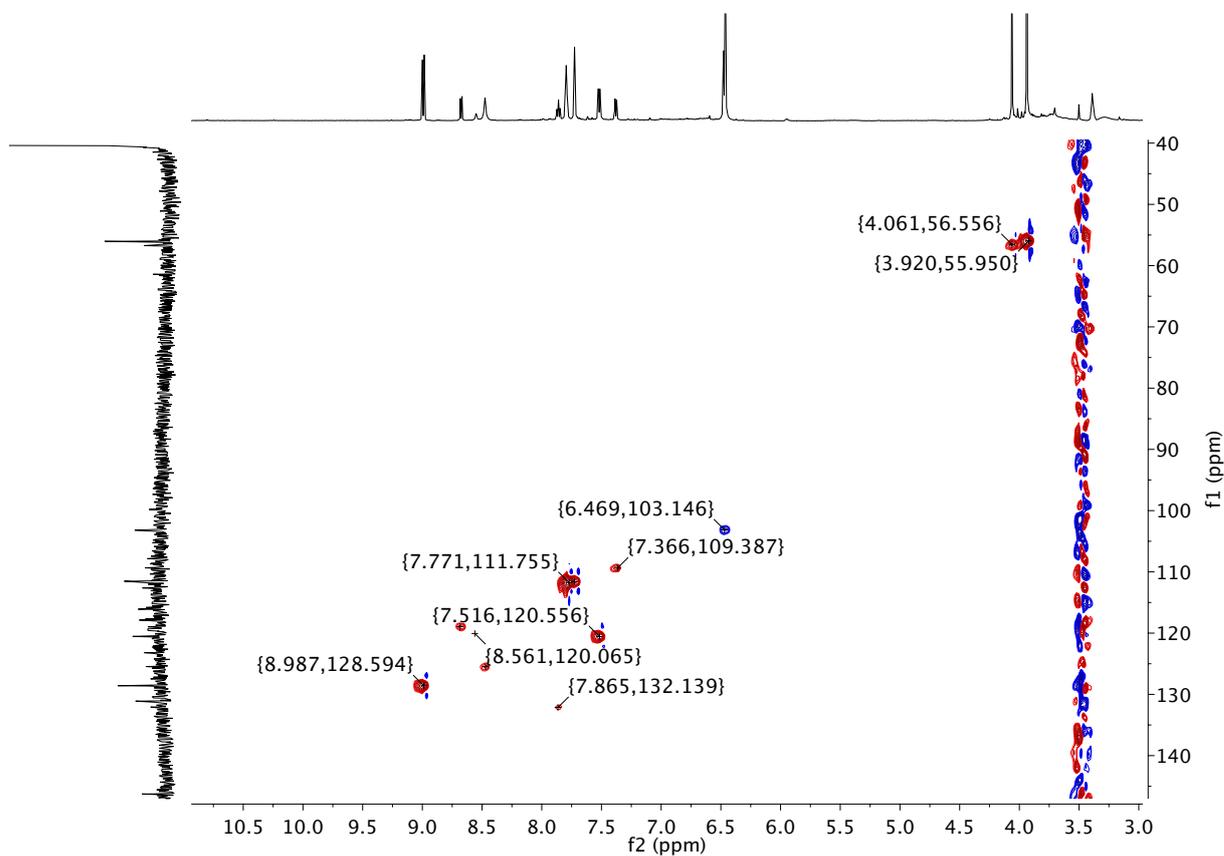
APÊNDICE M - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **4** + **5** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)

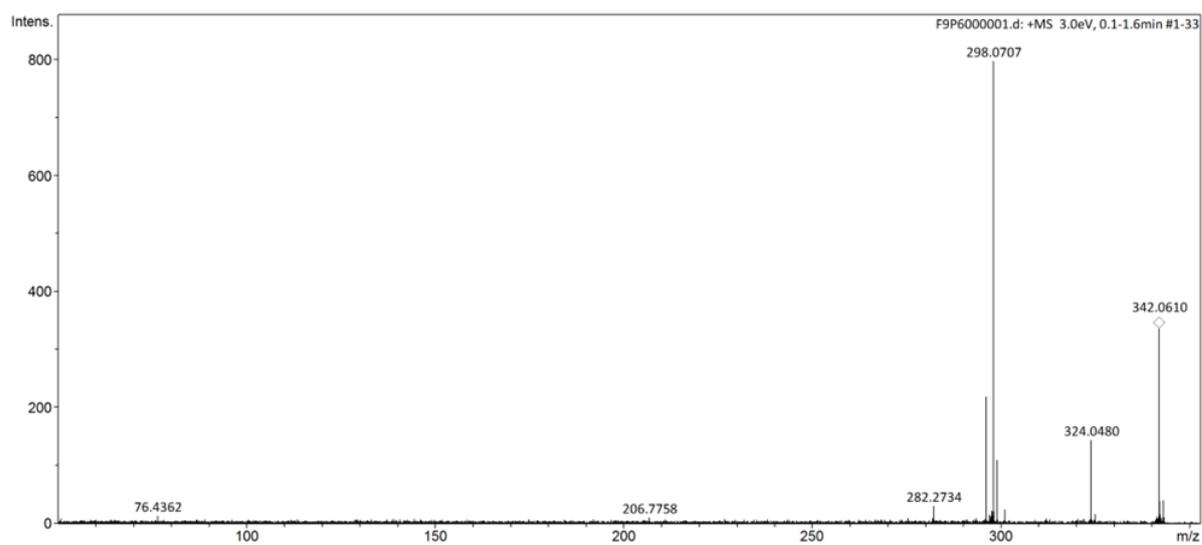
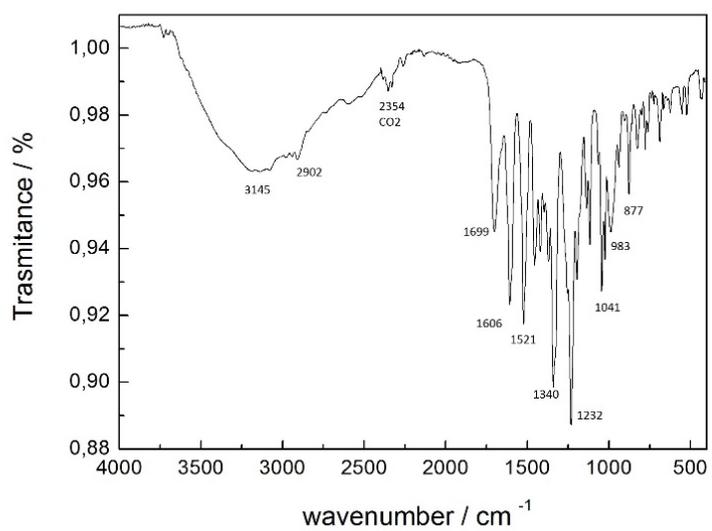


**APÊNDICE N - Mapa de contornos HMBC de 4 + 5 (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 14,1 T)**

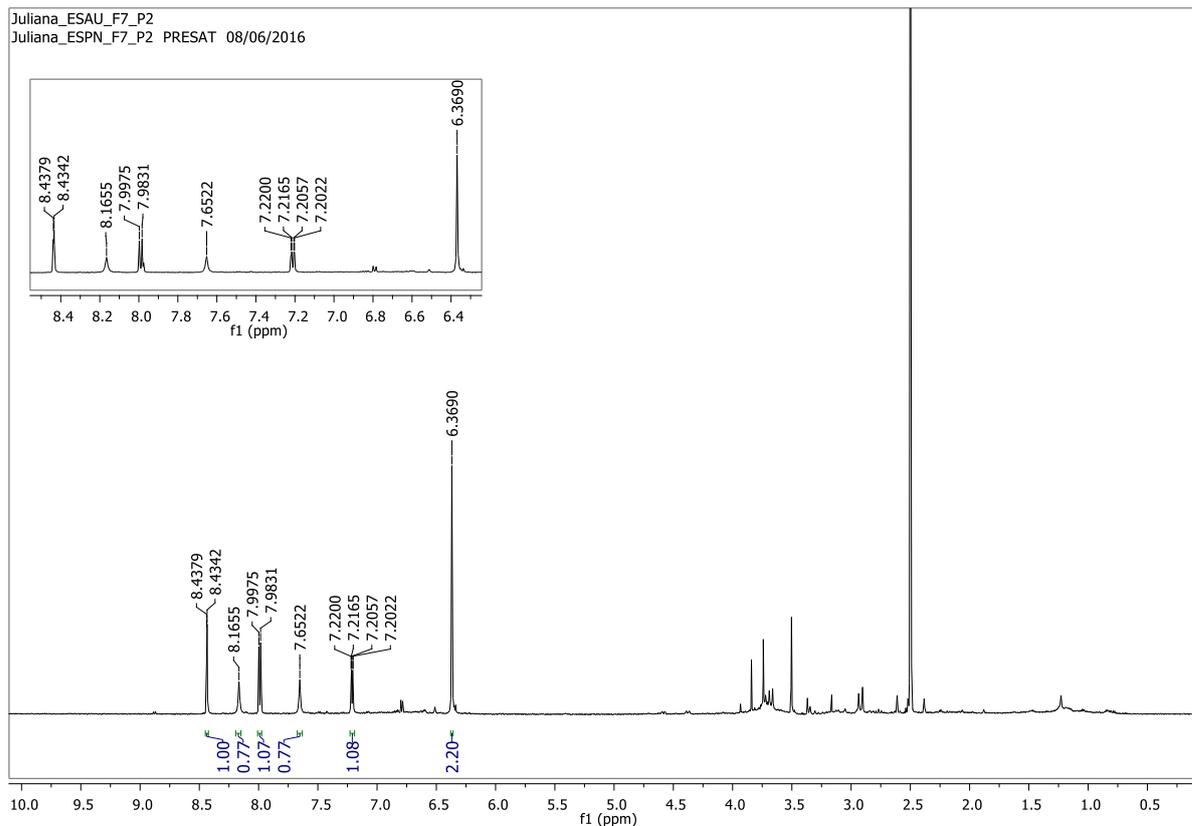


**APÊNDICE O - Mapa de contornos HSQC de 4 + 5 (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 14,1 T)**

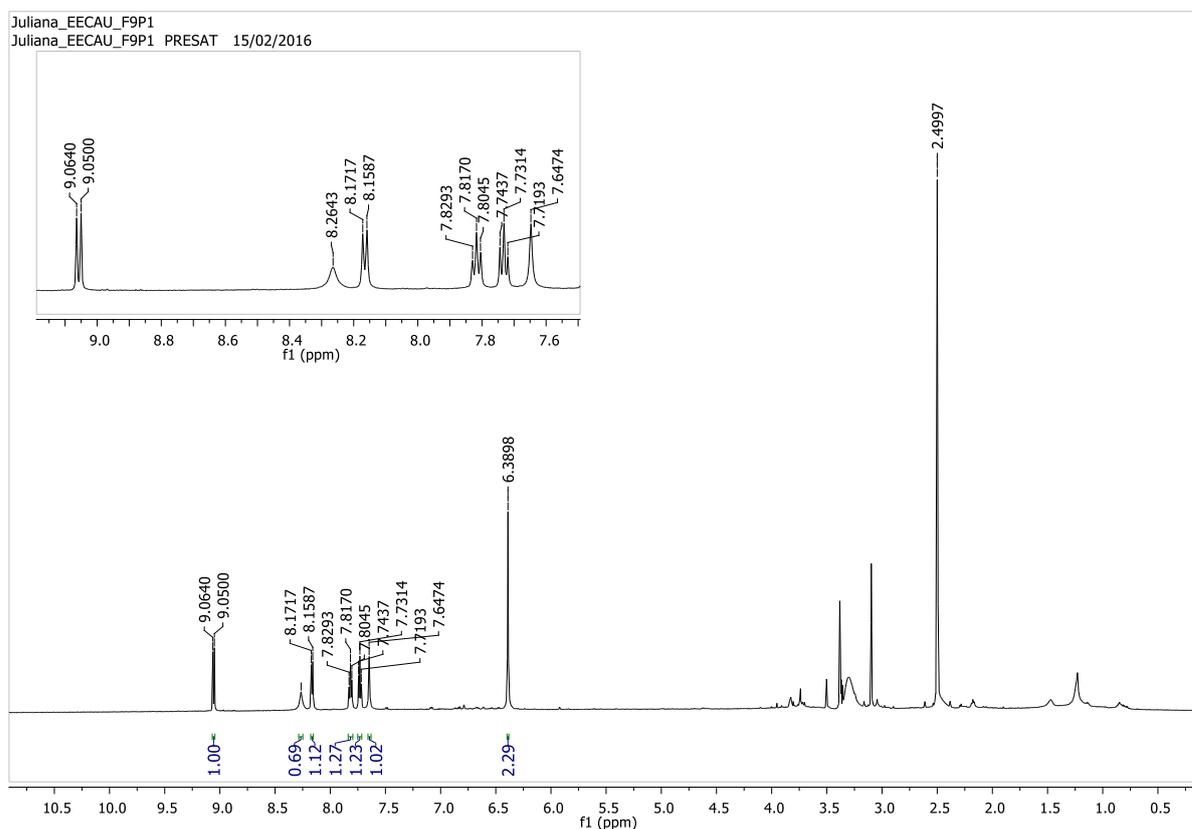


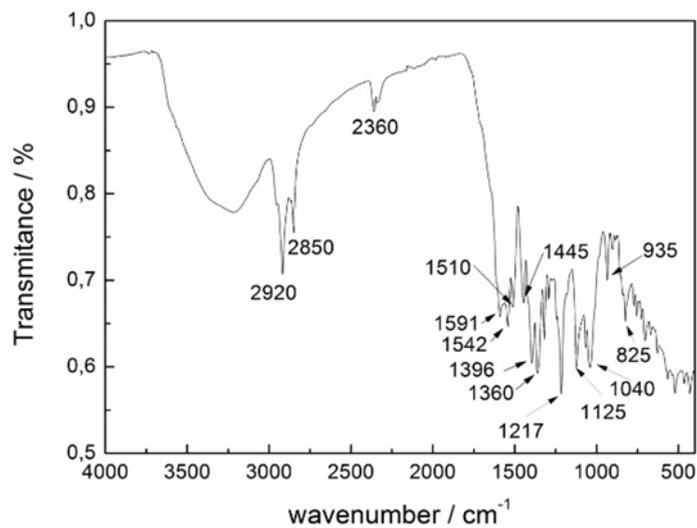
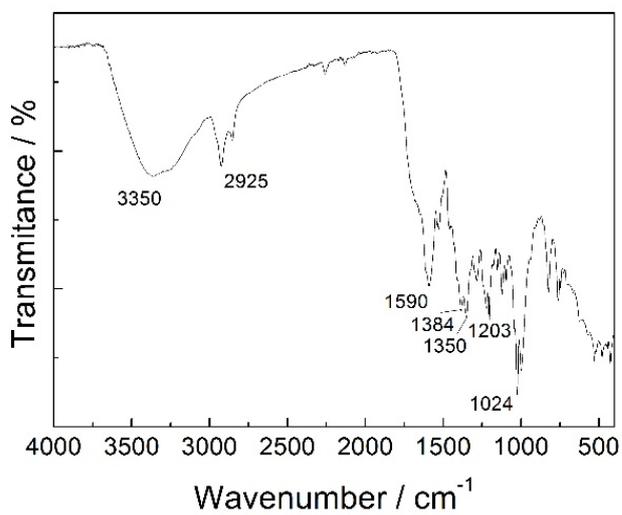
**APÊNDICE P** - Espectro de massas de alta resolução de **5** (ESI, + 3,0 eV)**APÊNDICE Q** - Espectro de absorção na região do infravermelho de **5**.

APÊNDICE R - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **6** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)

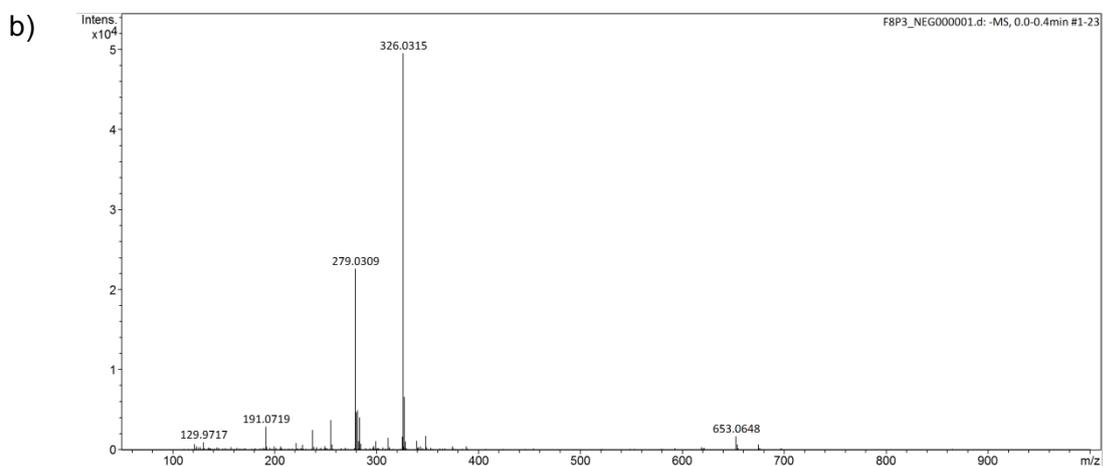
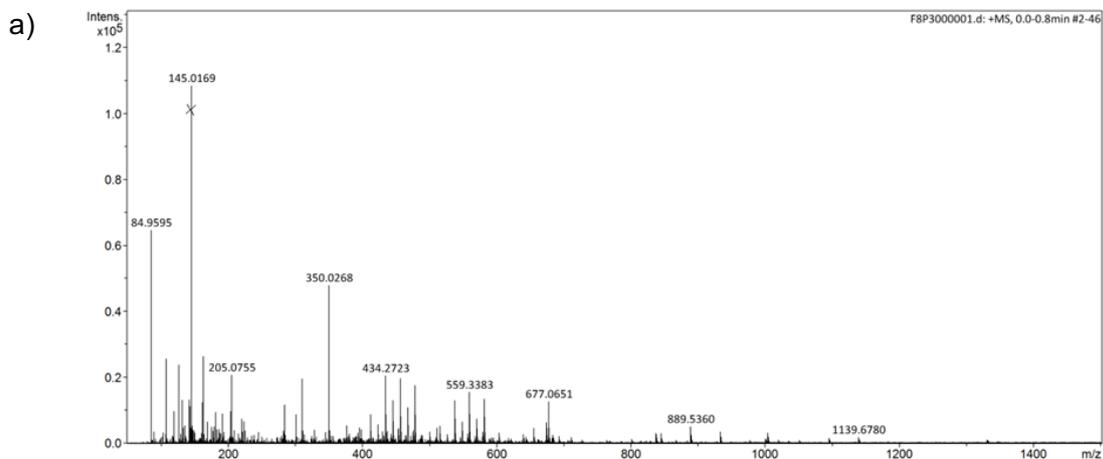


APÊNDICE S - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **7** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)

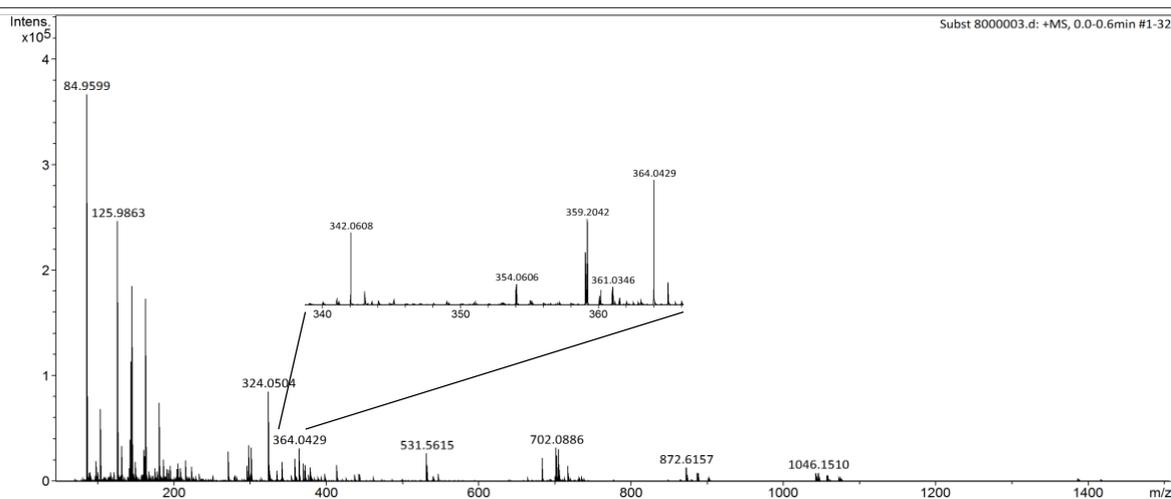


**APÊNDICE T - Espectro de absorção na região do Infravermelho de 8.****APÊNDICE U - Espectro de absorção na região do infravermelho de 9.**

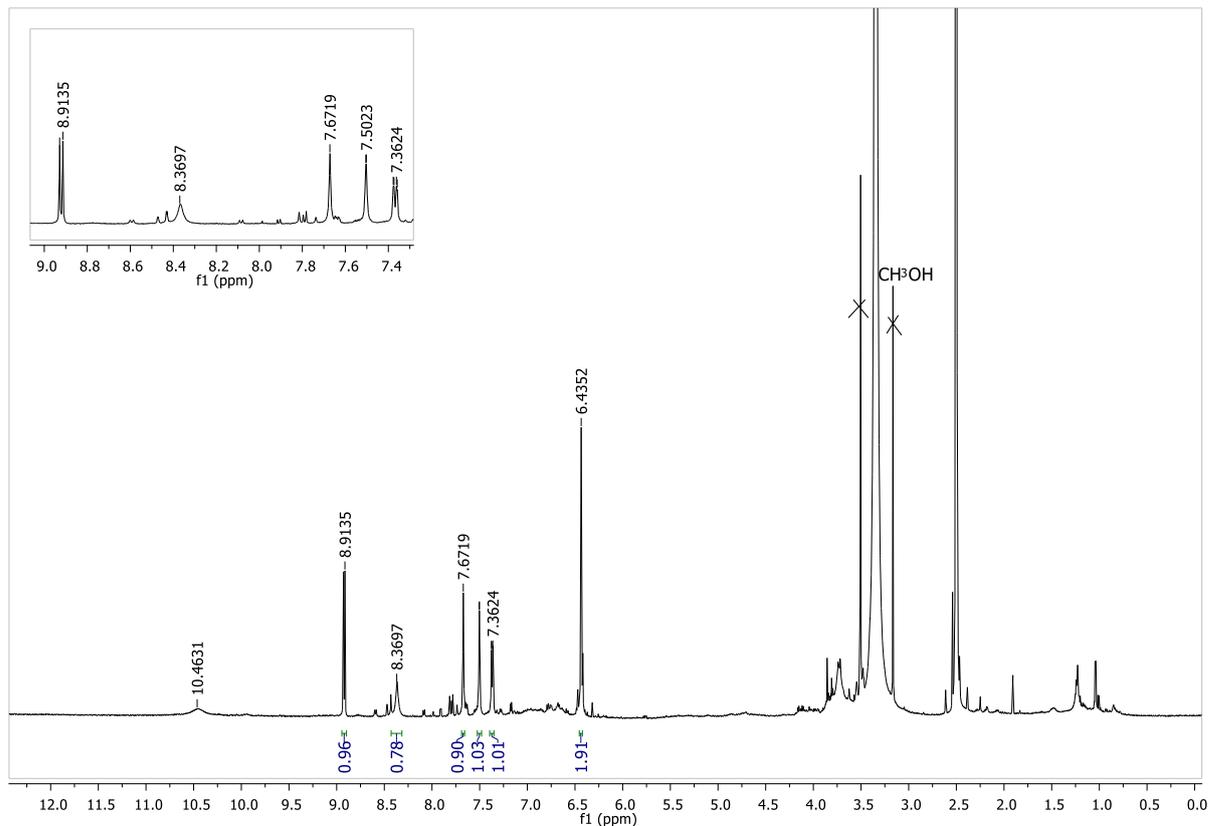
**APÊNDICE V - Espectro de massas de alta de resolução de 8: a) ESI, + 2,5 eV; b) ESI, - 2,5 eV.**



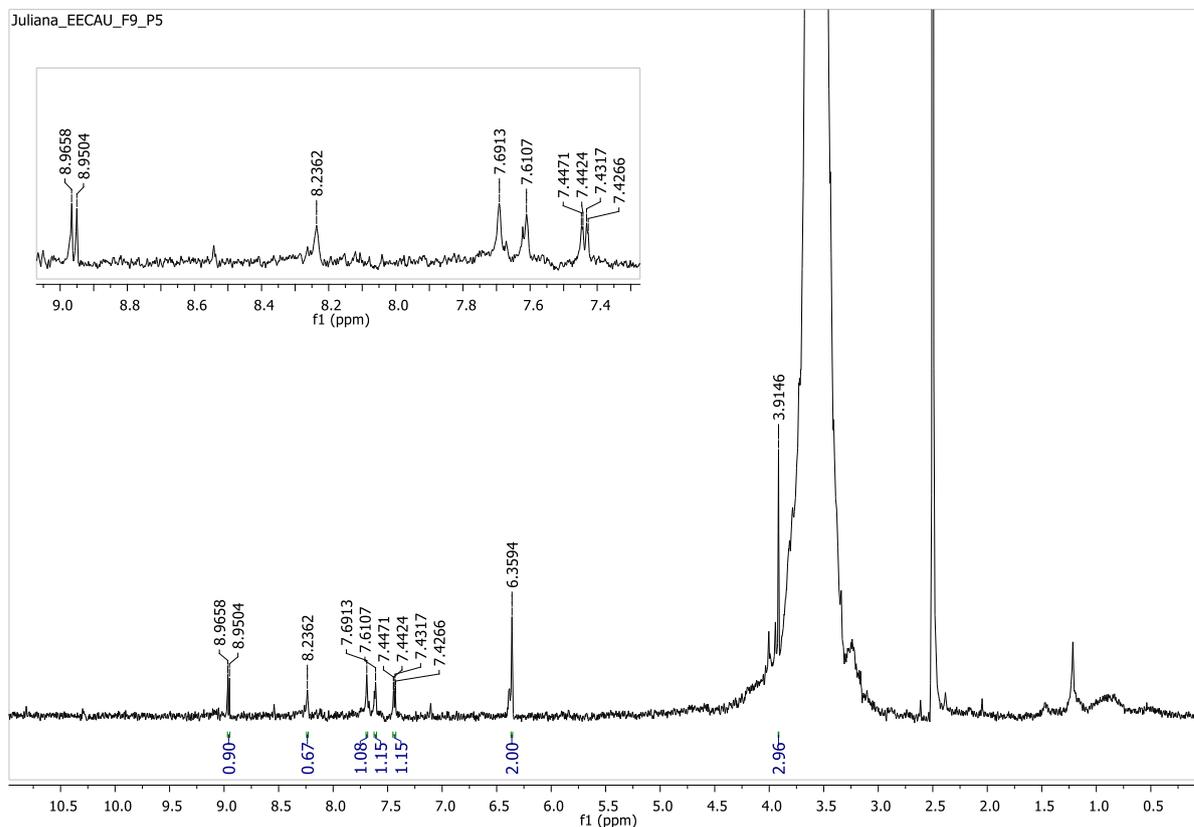
**APÊNDICE W - Espectro de massas de alta de resolução de 9 (ESI, + 2,5 eV).**



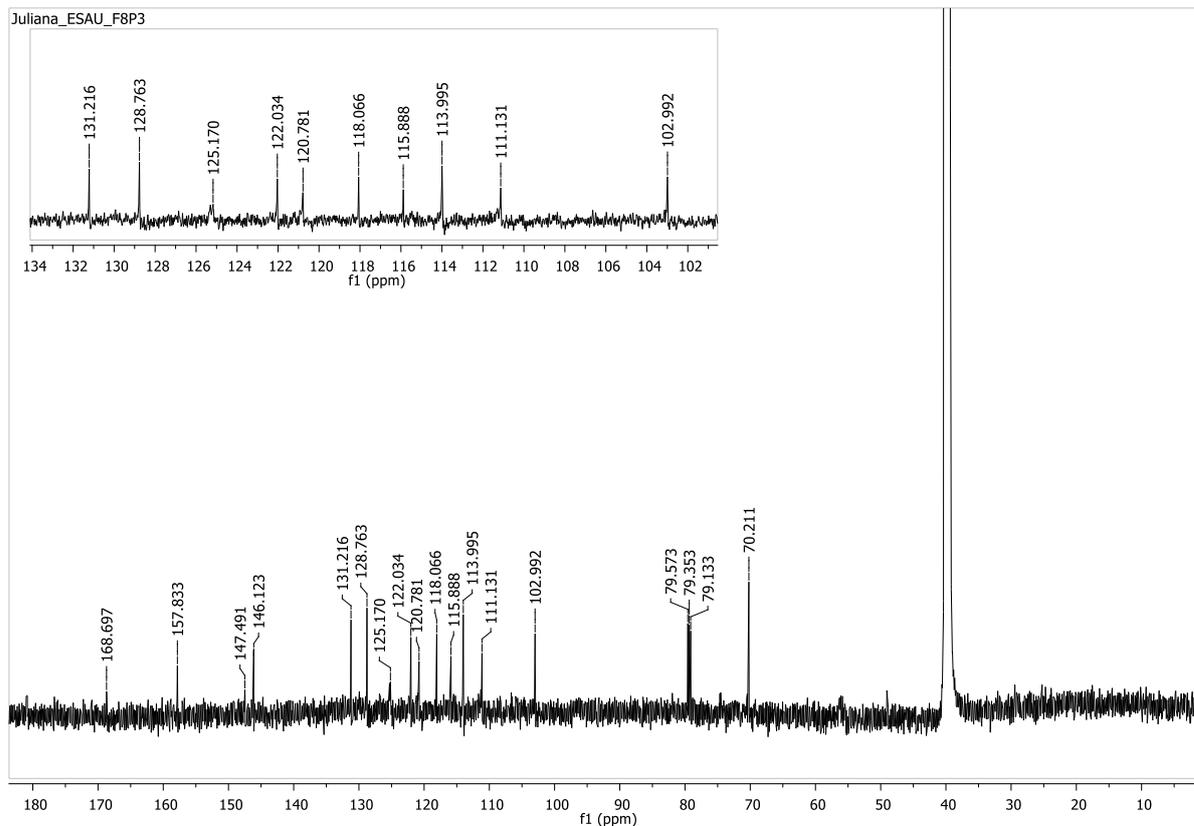
APÊNDICE X - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **8** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



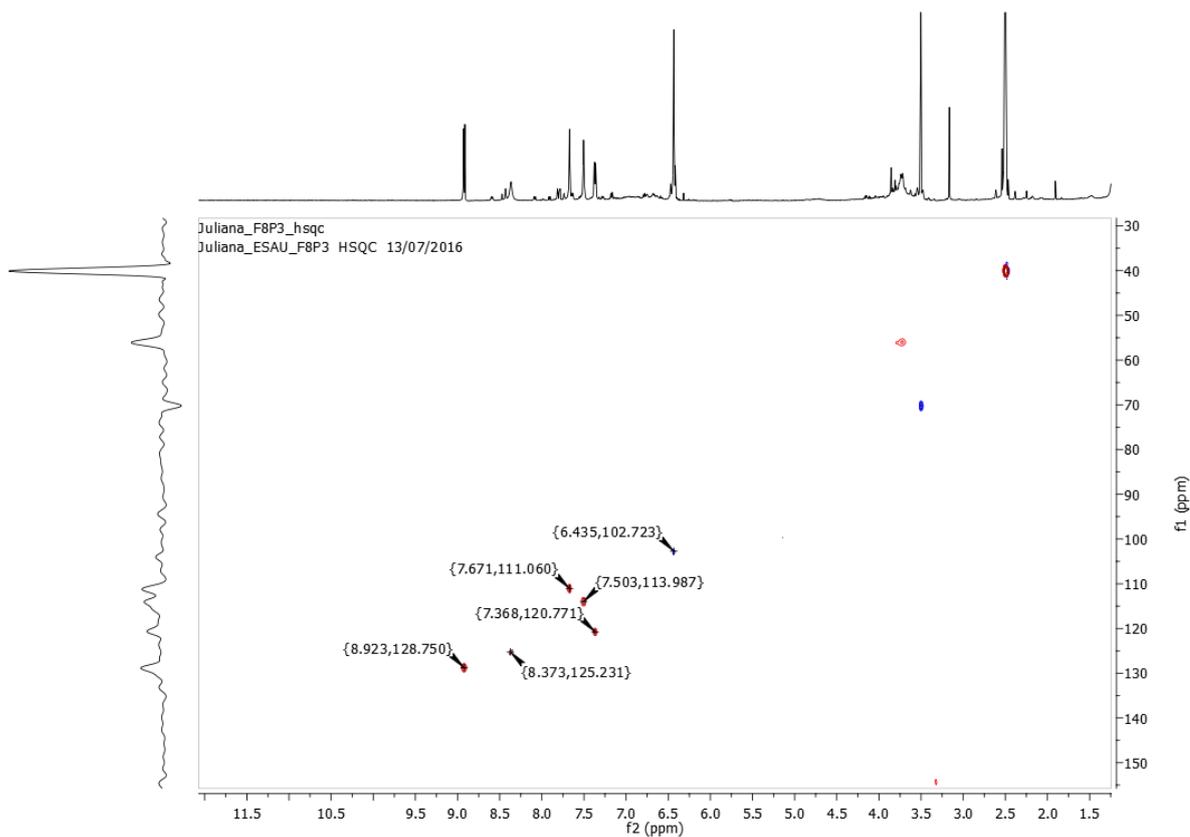
APÊNDICE Y - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **9** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



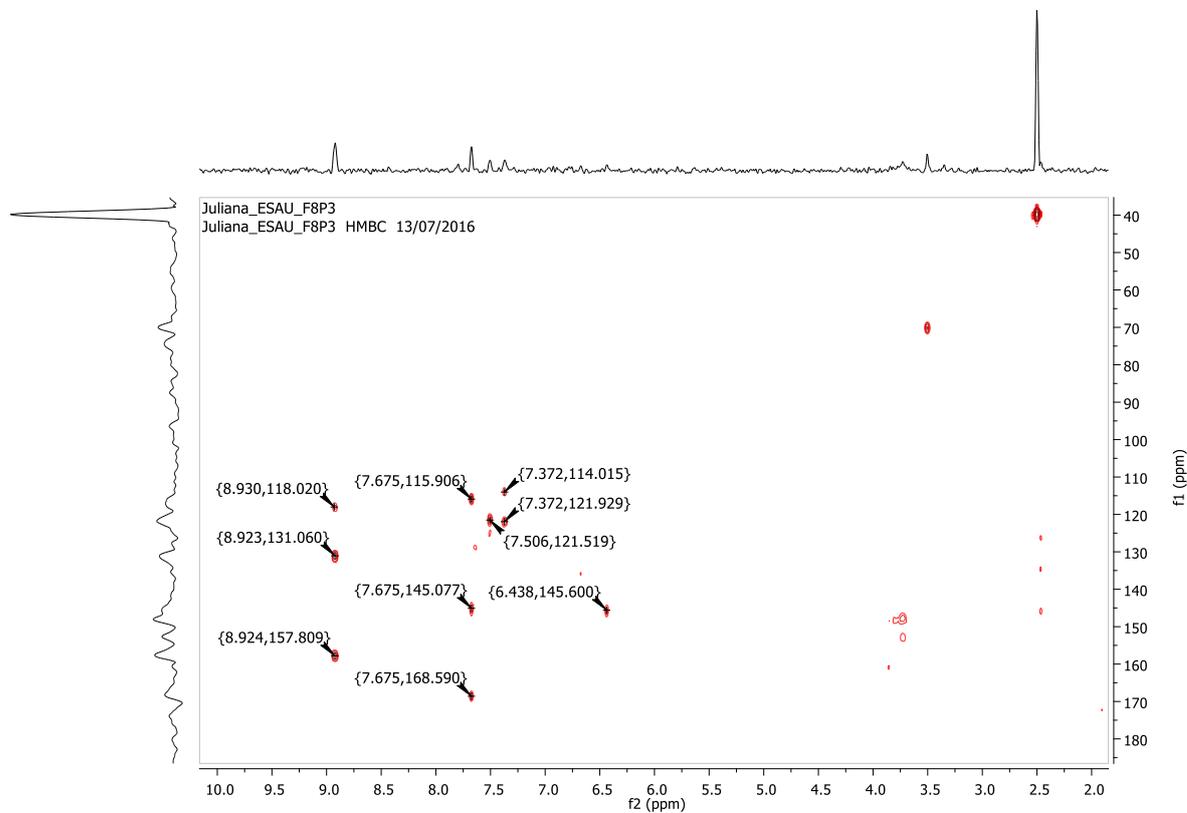
APÊNDICE Z - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **8** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



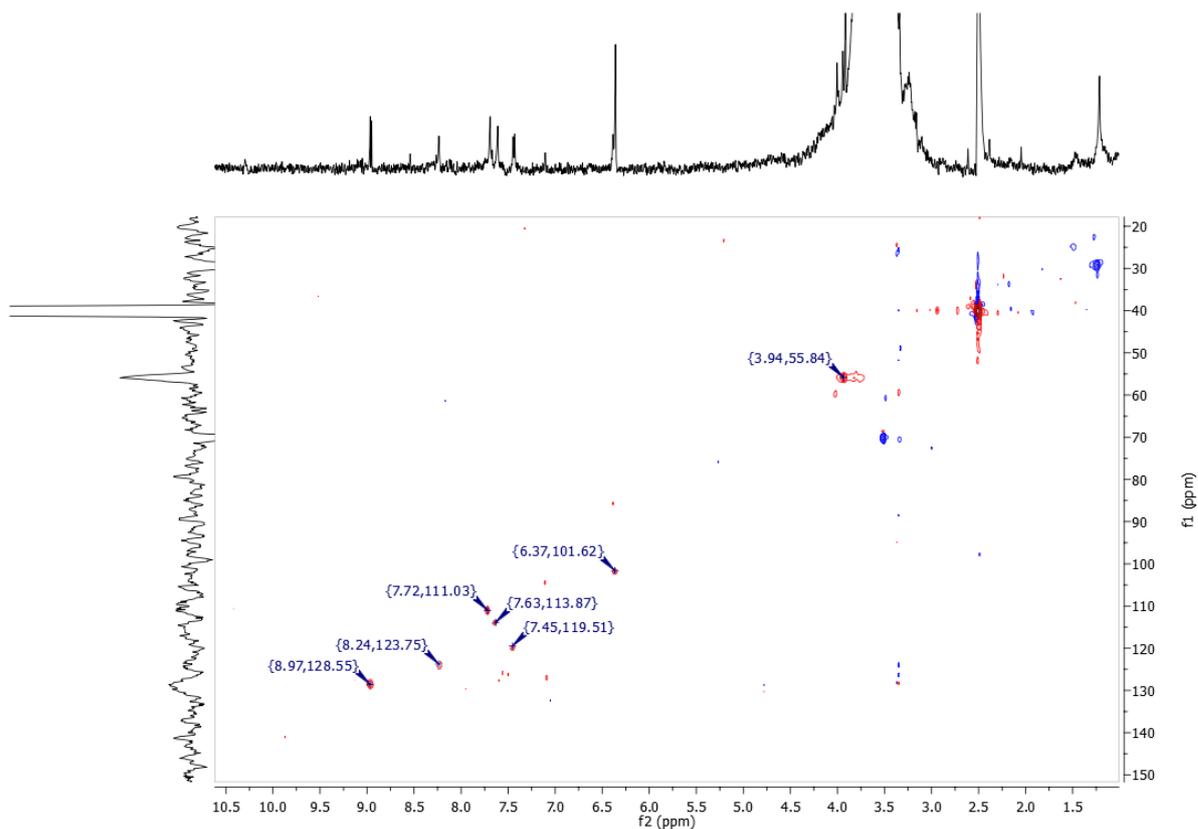
APÊNDICE AA - Mapa de contornos HSQC de **8** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



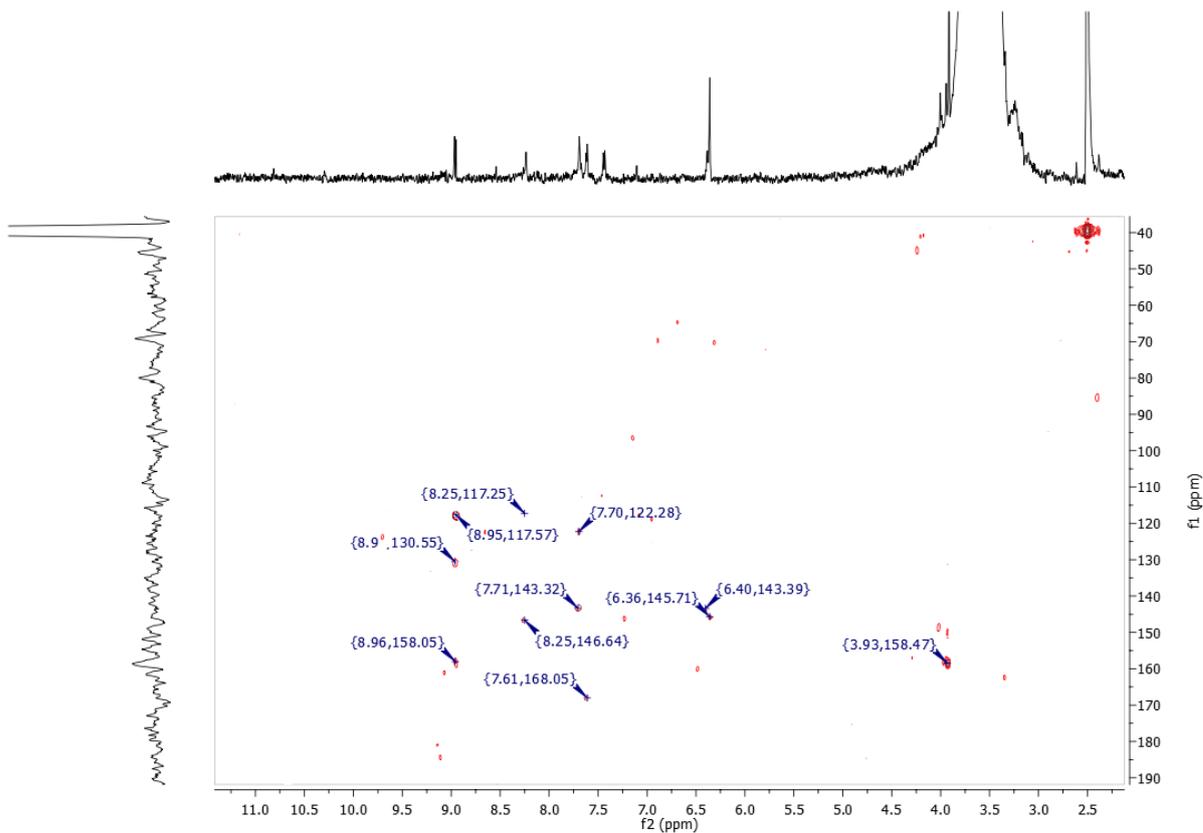
**APÊNDICE BB - Mapa de contornos HMBC de 8 (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 14,1 T)**



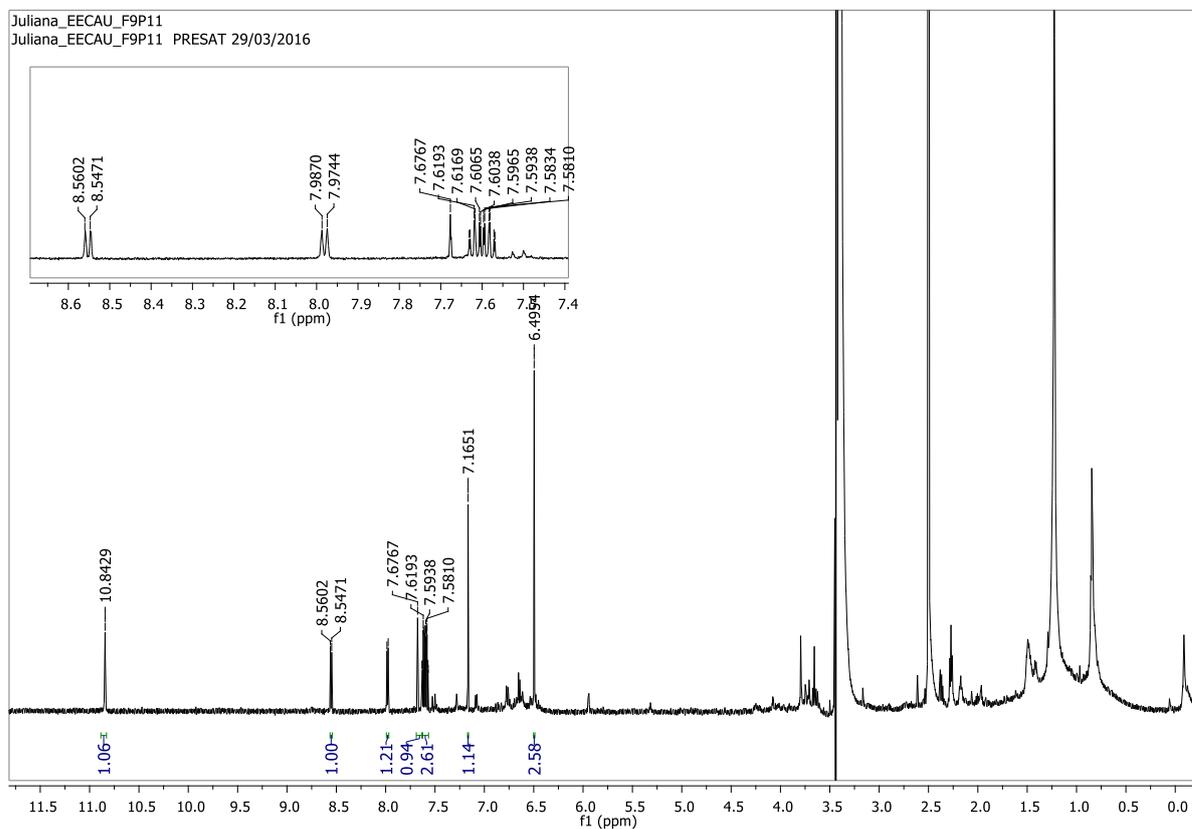
**APÊNDICE CC – Mapa de contornos HSQC de 9 (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 14,1 T)**



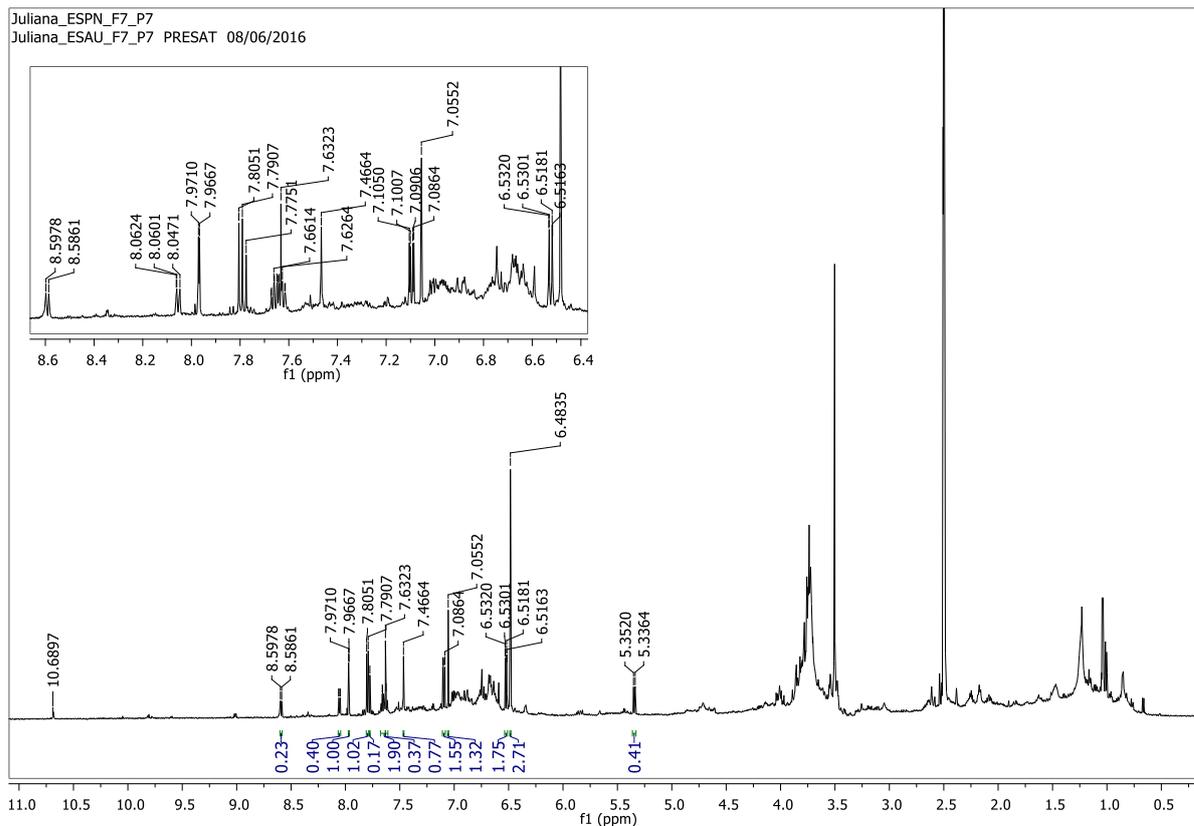
APÊNDICE DD - Mapa de contornos HMBC de **9** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 14,1 T)



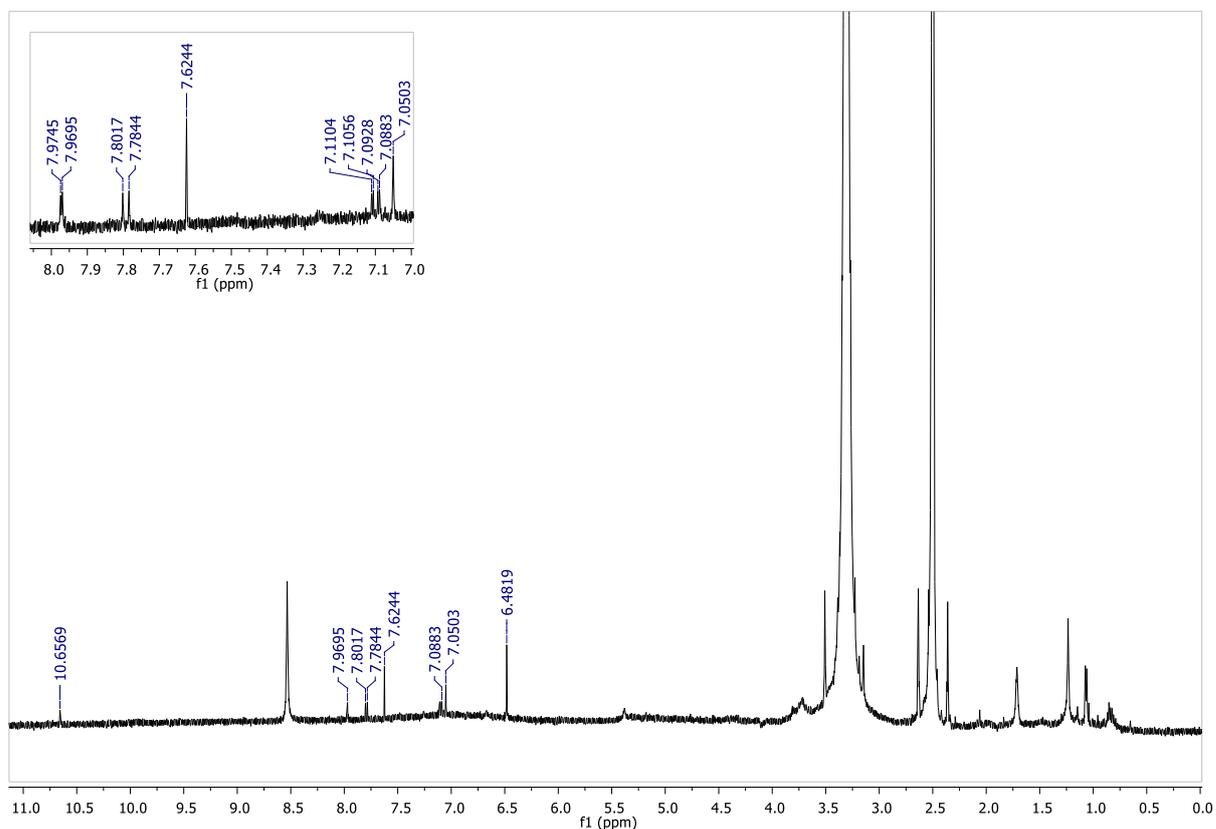
APÊNDICE EE - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **10** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 14,1 T)



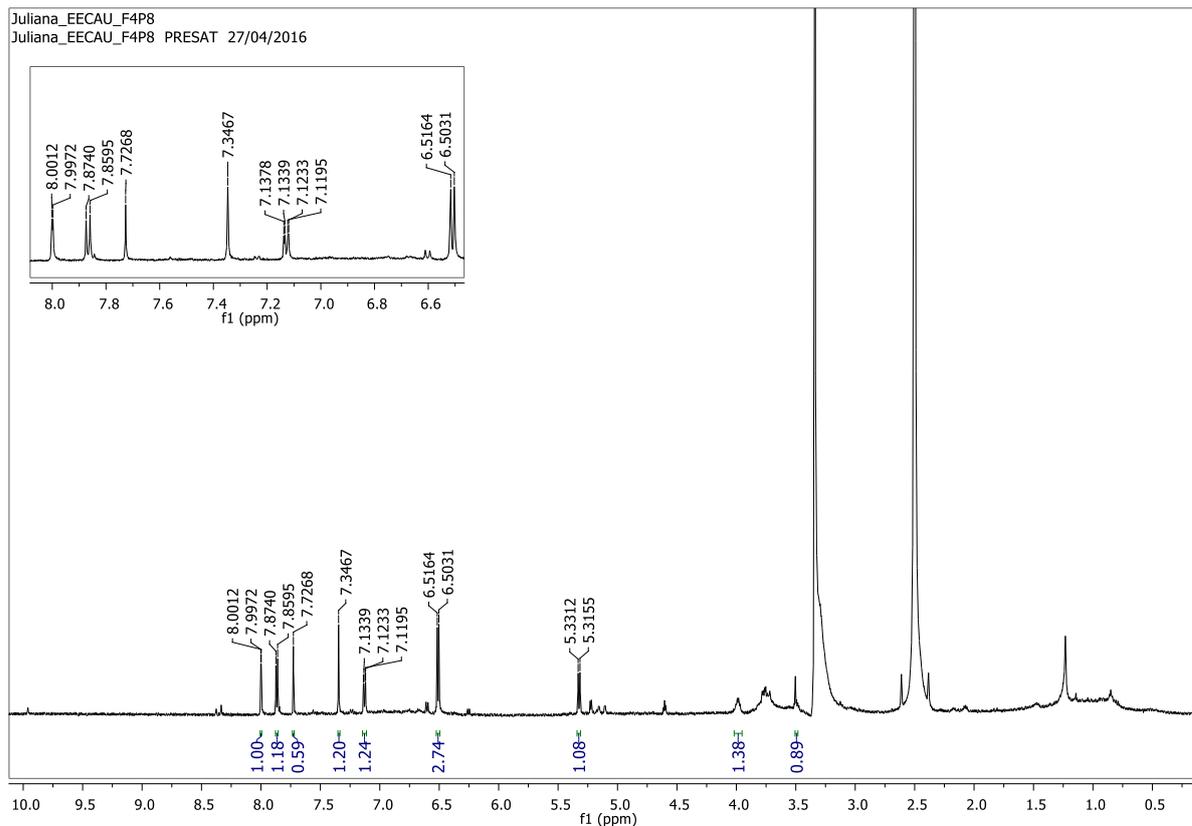
APÊNDICE FF - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de 11 + 12 (DMSO-d<sub>6</sub>, 14,1 T)



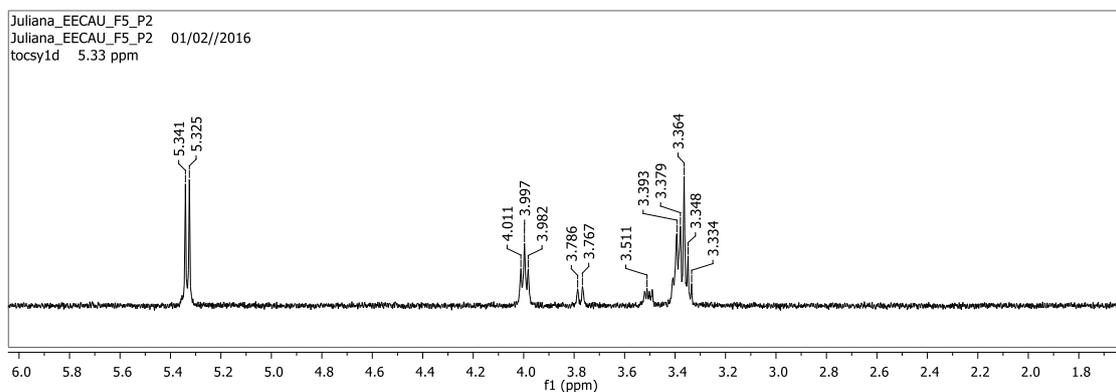
APÊNDICE GG - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de 12 (DMSO-d<sub>6</sub>, 7,1 T)



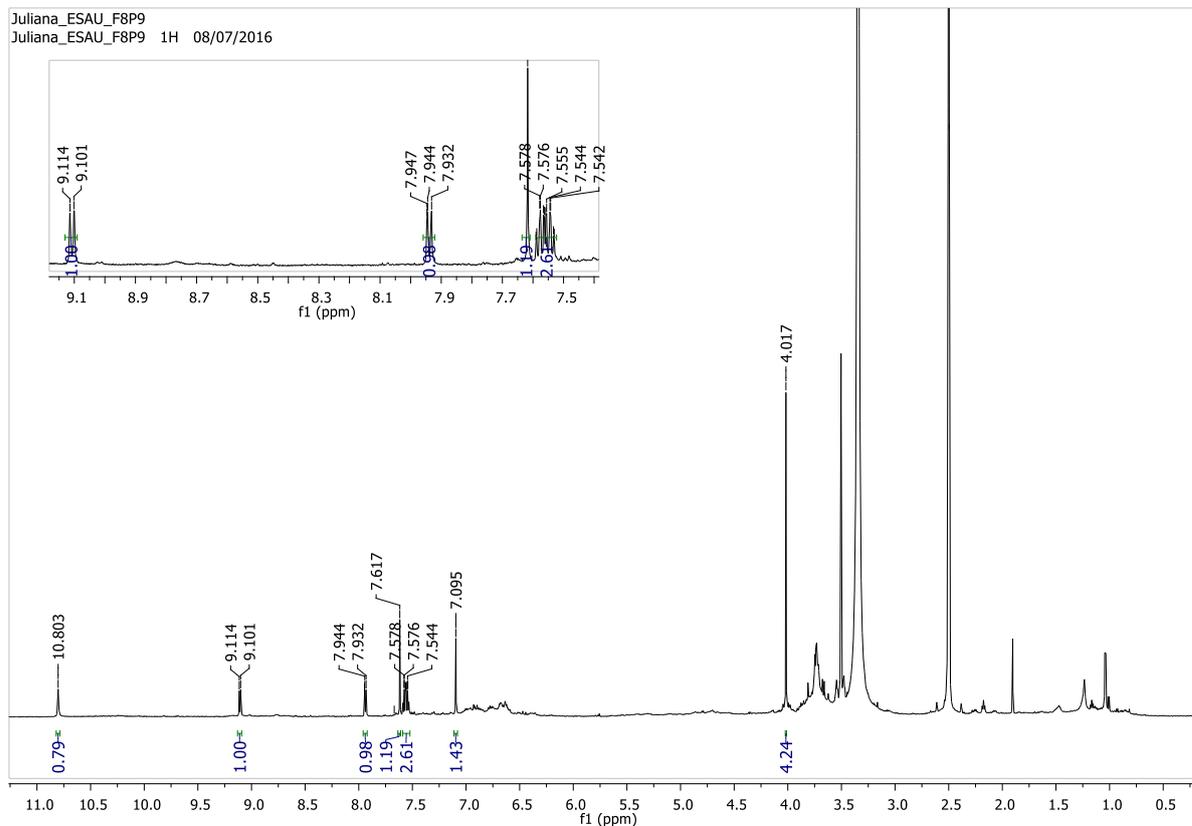
**APÊNDICE HH-** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **13** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



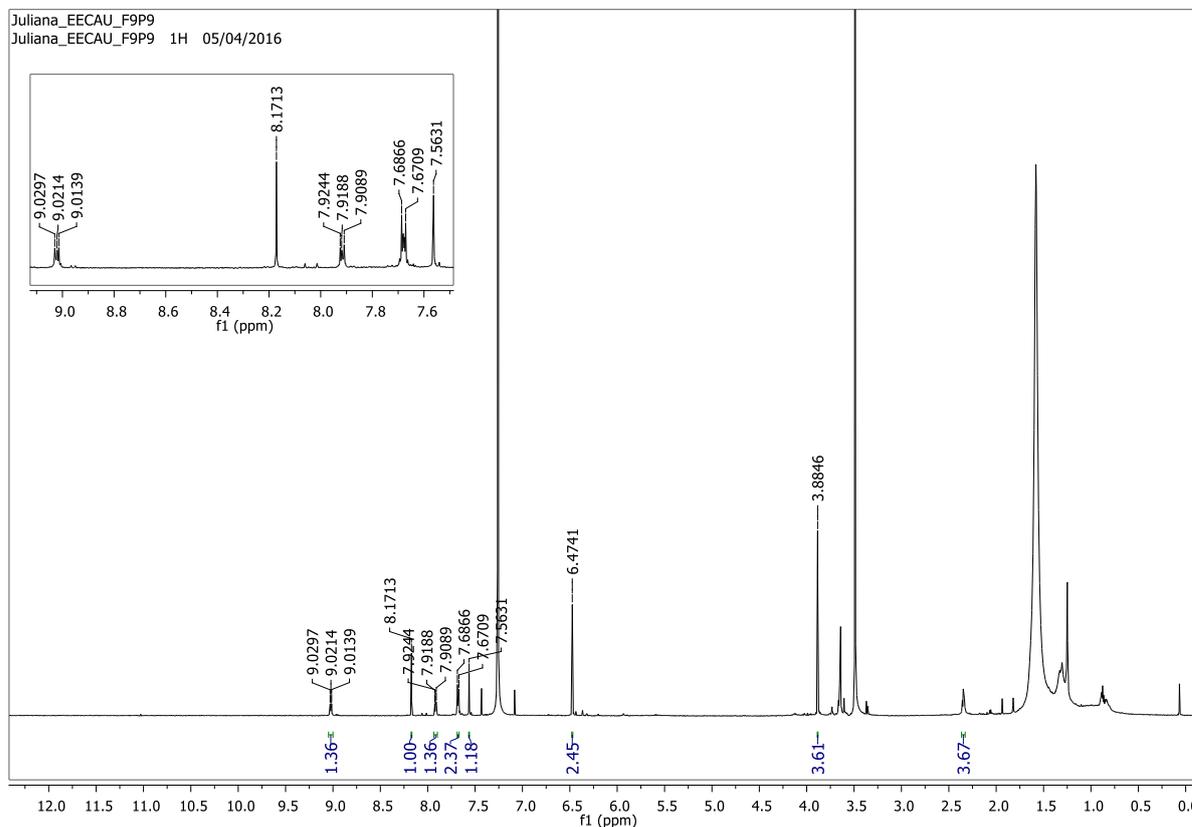
**APÊNDICE II -** Espectro TOCSY 1D de **13** com irradiação em  $\delta$  5,32 (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



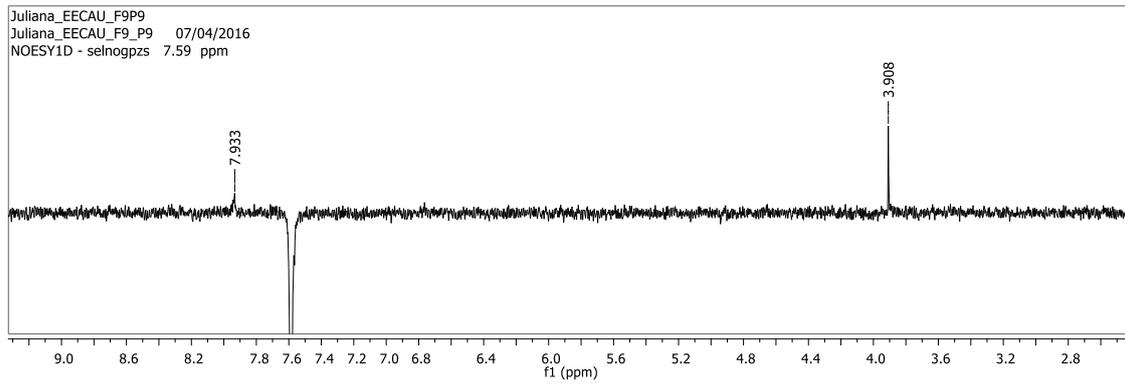
APÊNDICE JJ - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **14** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 14,1 T)



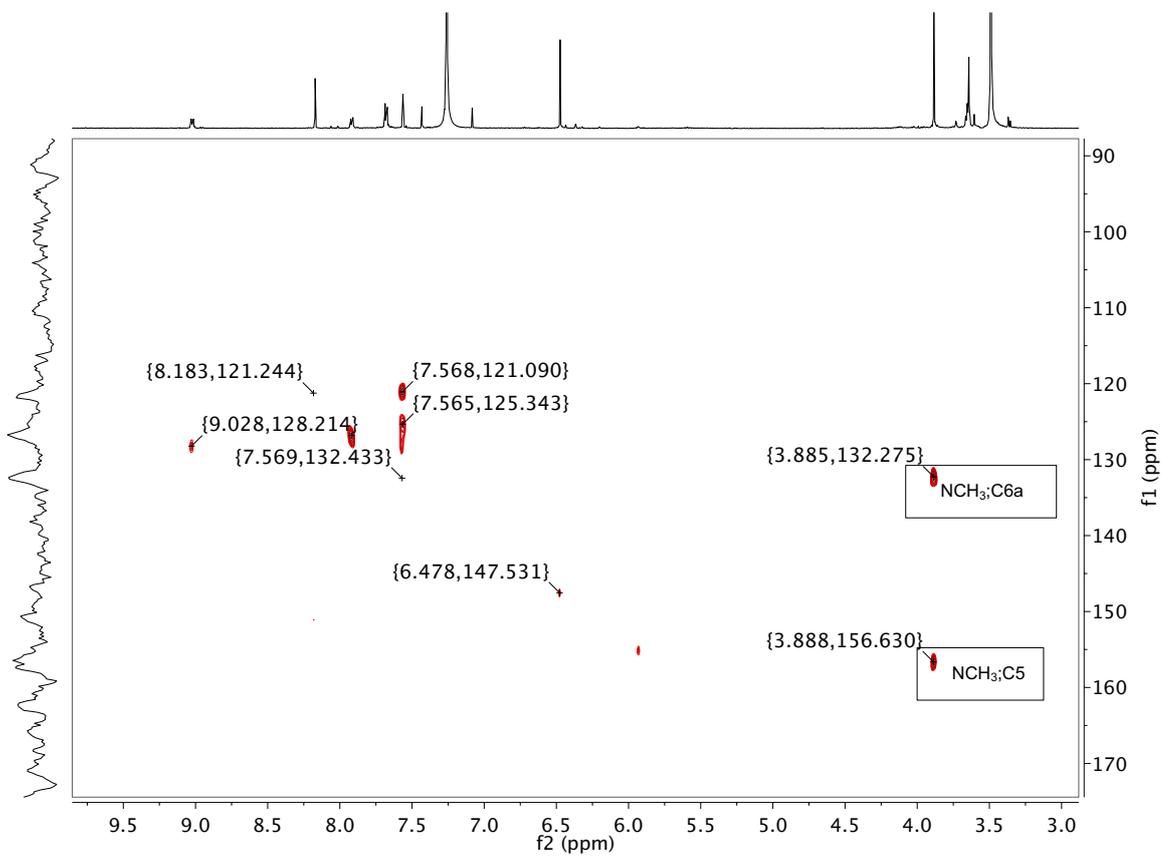
APÊNDICE KK - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **15** ( $\text{CDCl}_3$ , 14,1 T)



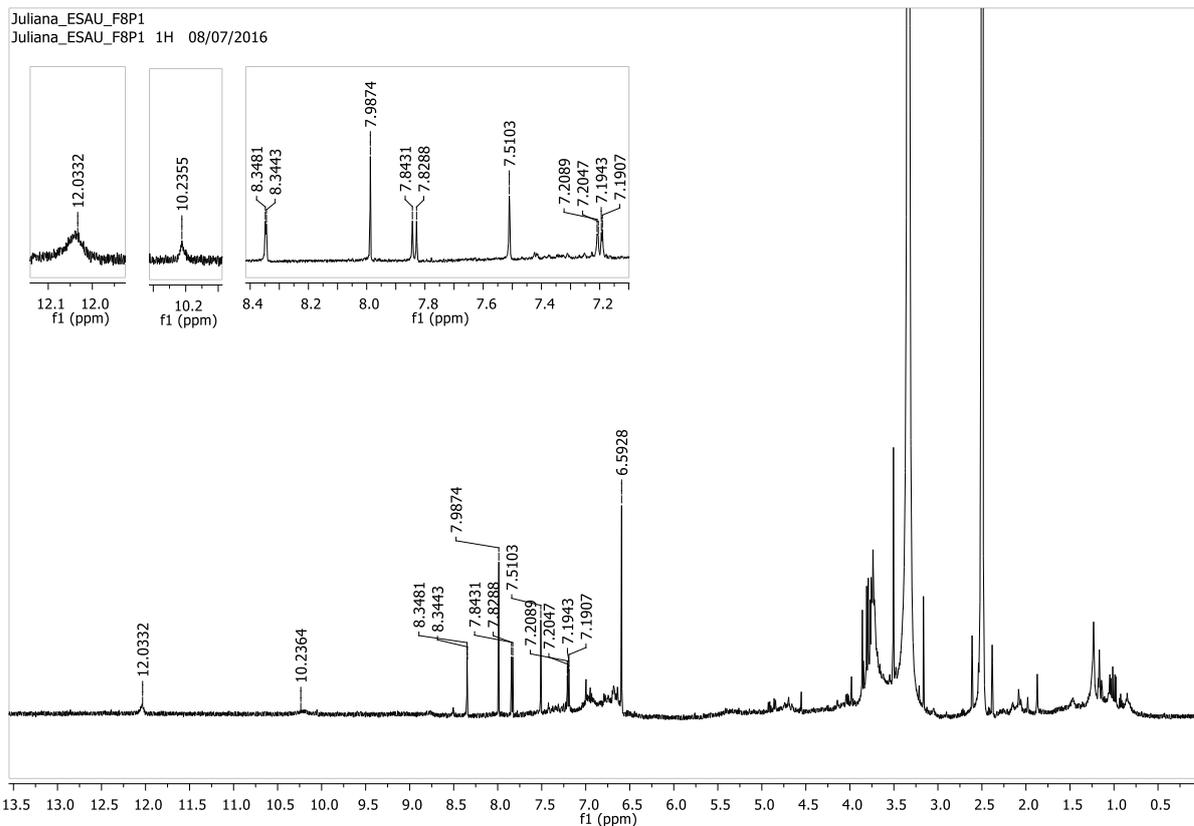
**APÊNDICE LL - Espectro de NOESY 1D de 15 com irradiação em  $\delta$  7,56 (CDCl<sub>3</sub>, 14,1 T)**



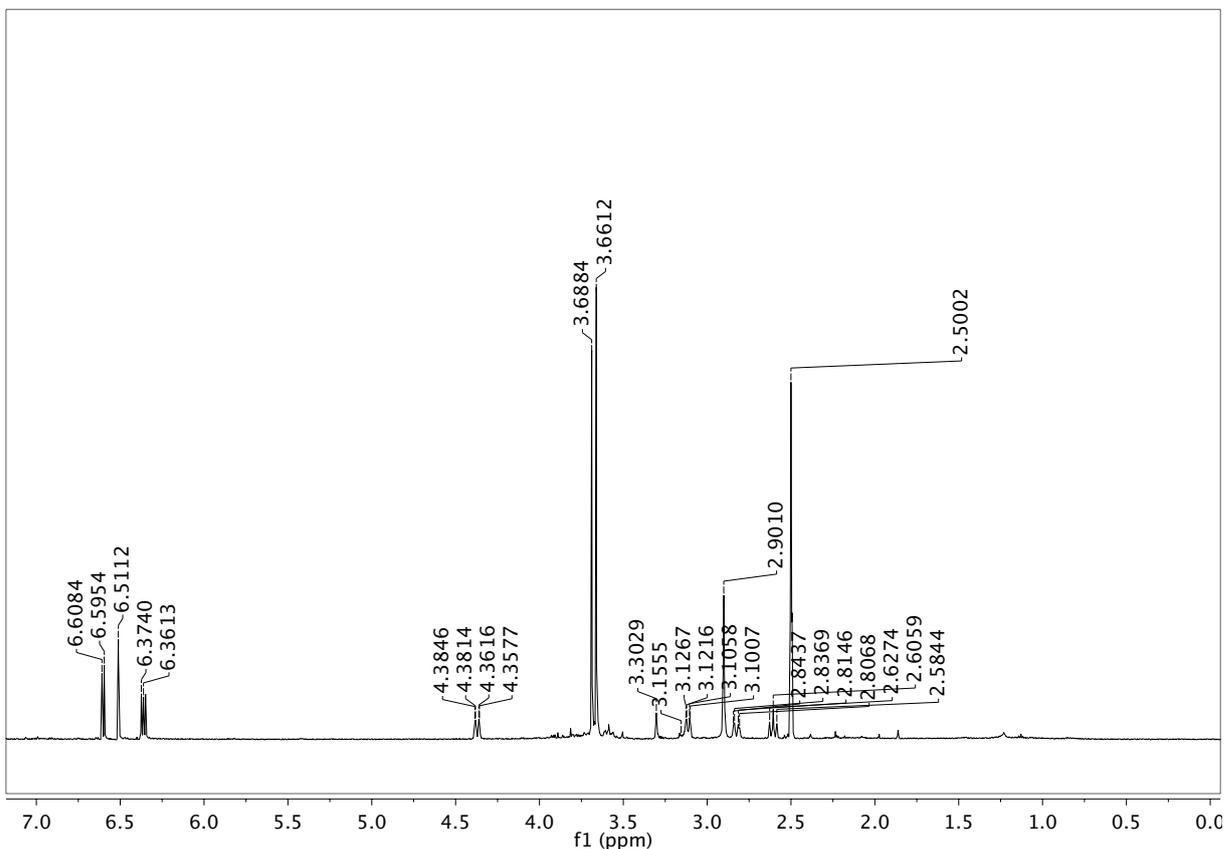
**APÊNDICE MM - Mapa de contornos HMBC de 15 (CDCl<sub>3</sub>, 14,1 T)**



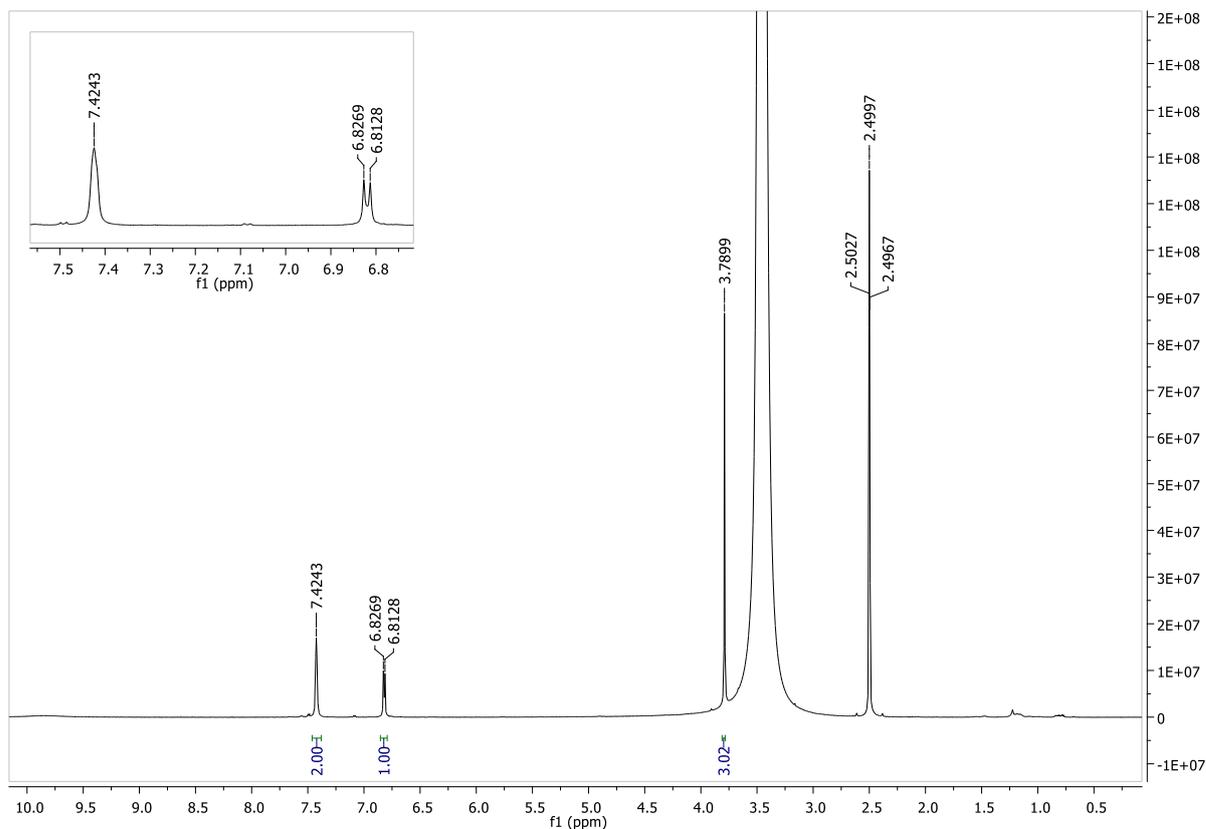
APÊNDICE NN - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de 16 (DMSO-d<sub>6</sub>, 14,1 T)



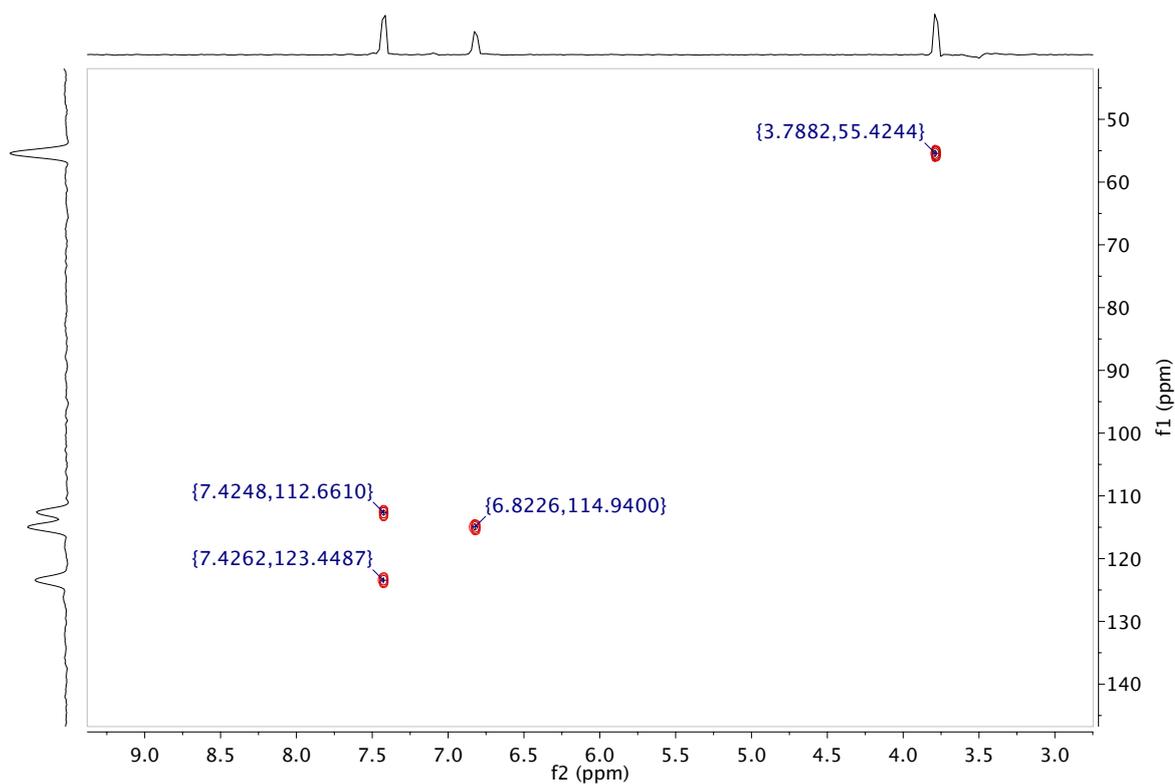
APÊNDICE OO – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de 17 (DMSO-d<sub>6</sub>, 14,1 T)



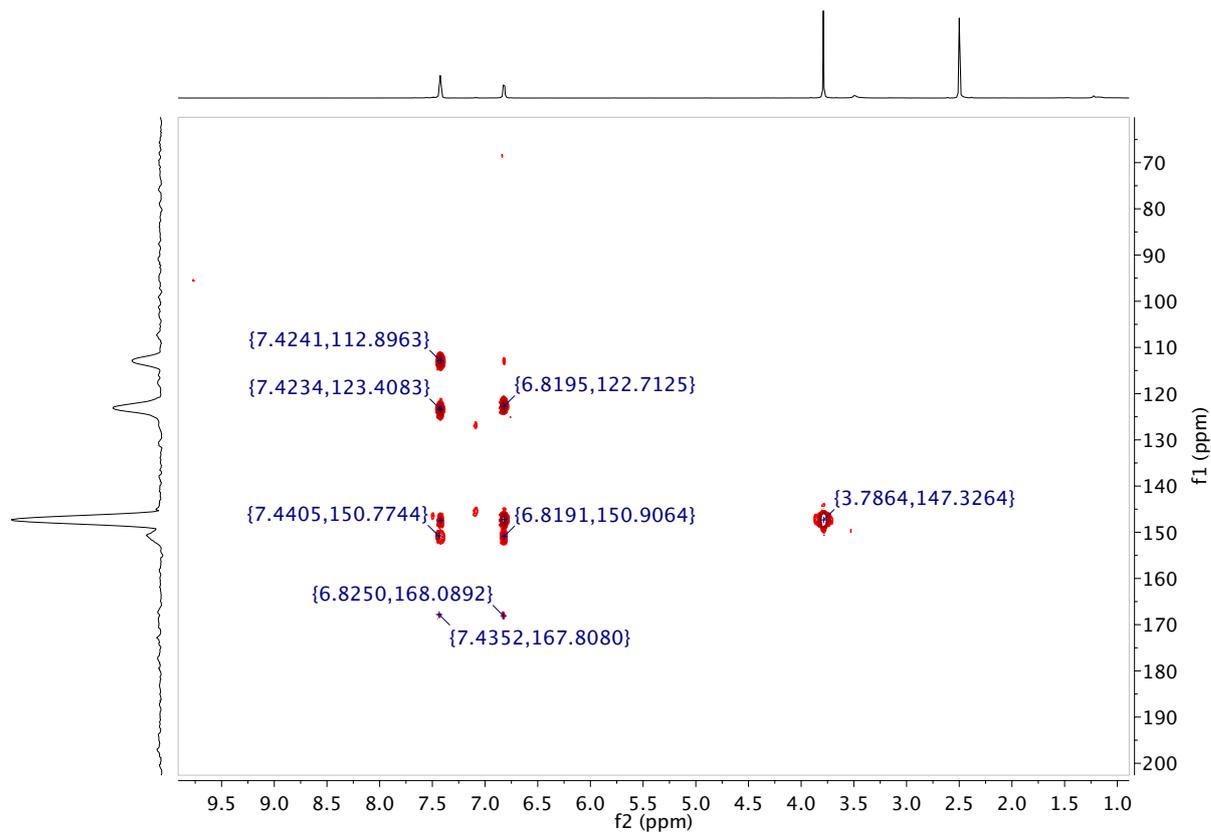
APÊNDICE PP - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **18** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 14,1 T)



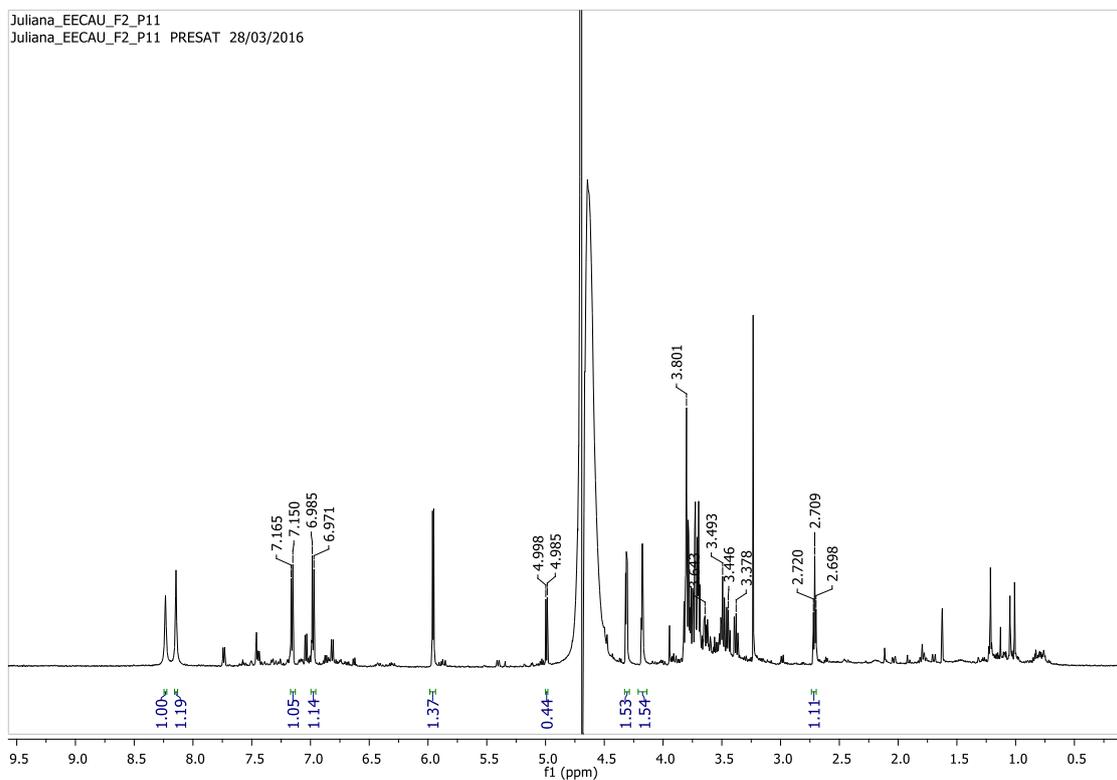
APÊNDICE QQ - Mapa de contornos HSQC de **18** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 14,1 T)



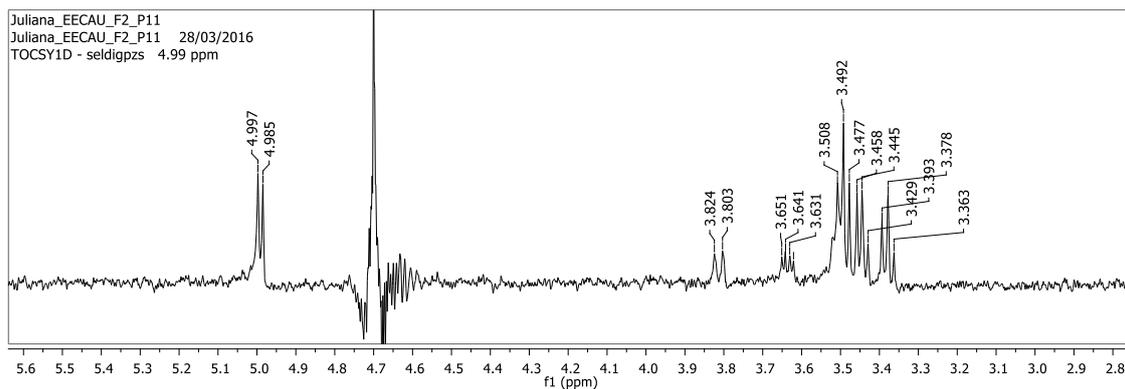
APÊNDICE RR - Mapa de contornos HMBC de **18** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 14,1 T)



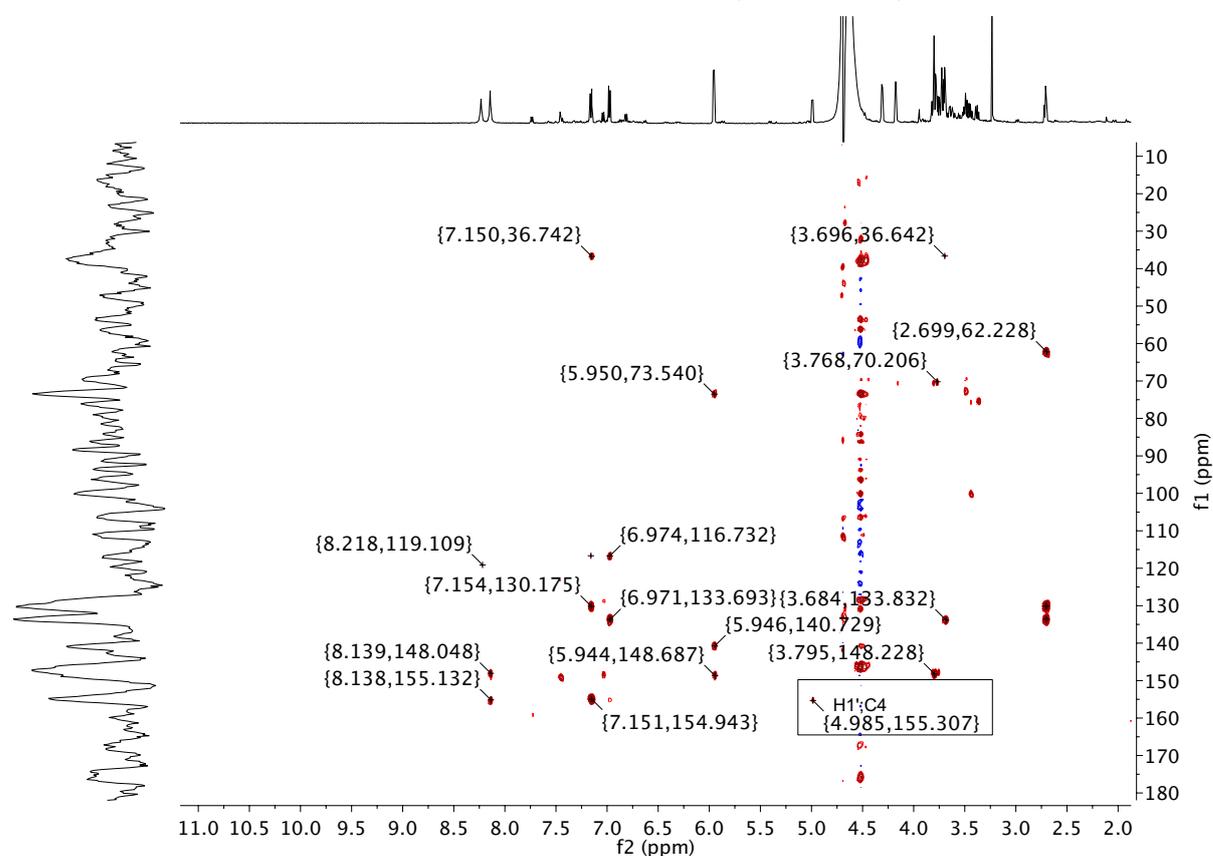
APÊNDICE SS - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **19 + 36** (D<sub>2</sub>O, 14,1 T)



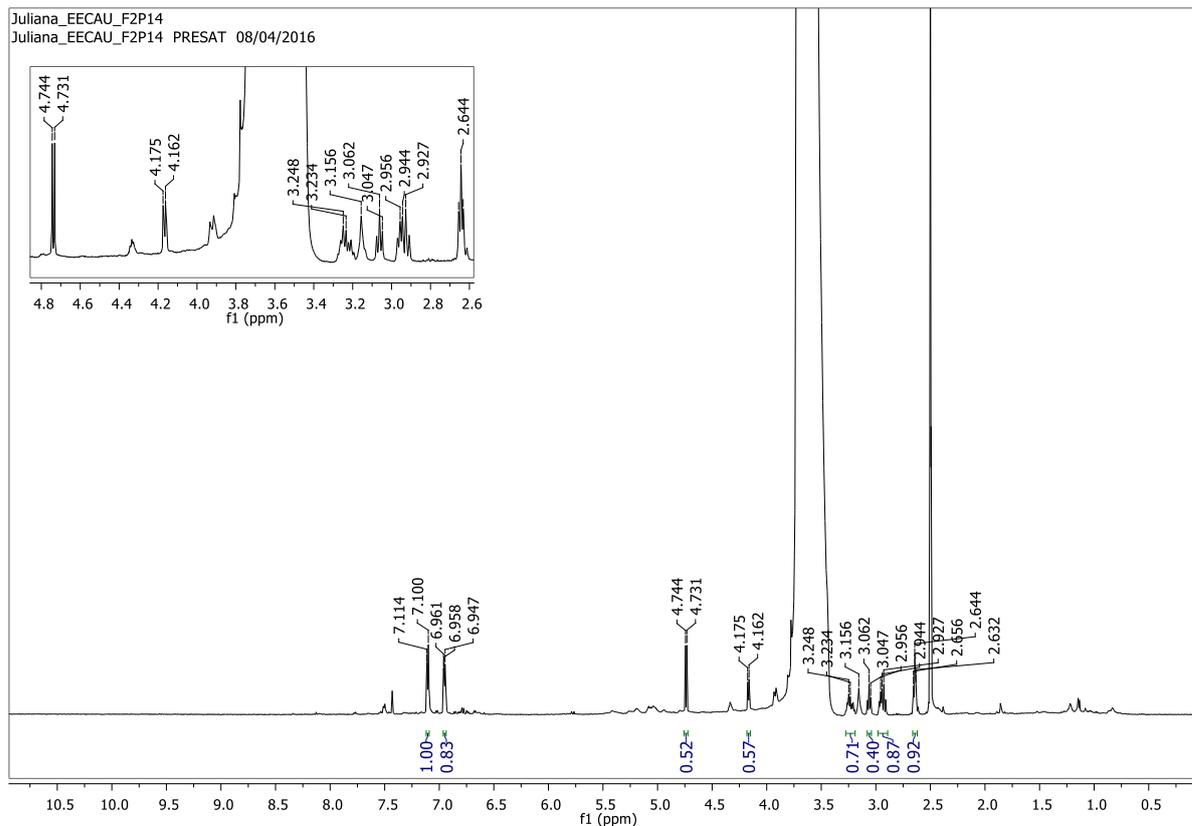
APÊNDICE TT - Espectro TOCSY 1D de 19 + 36 com irradiação em  $\delta$  4,99 (D<sub>2</sub>O, 14,1 T)



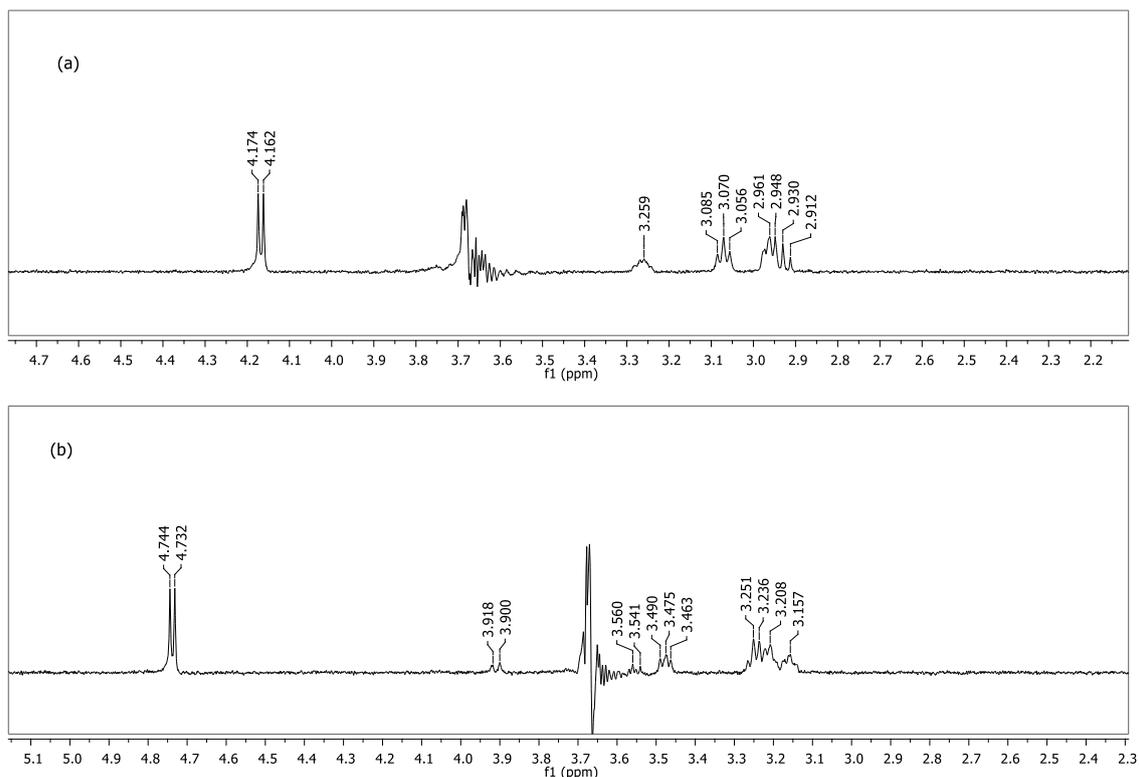
APÊNDICE UU - Mapa de contornos HMBC de 19 + 36 (D<sub>2</sub>O, 14,1 T)



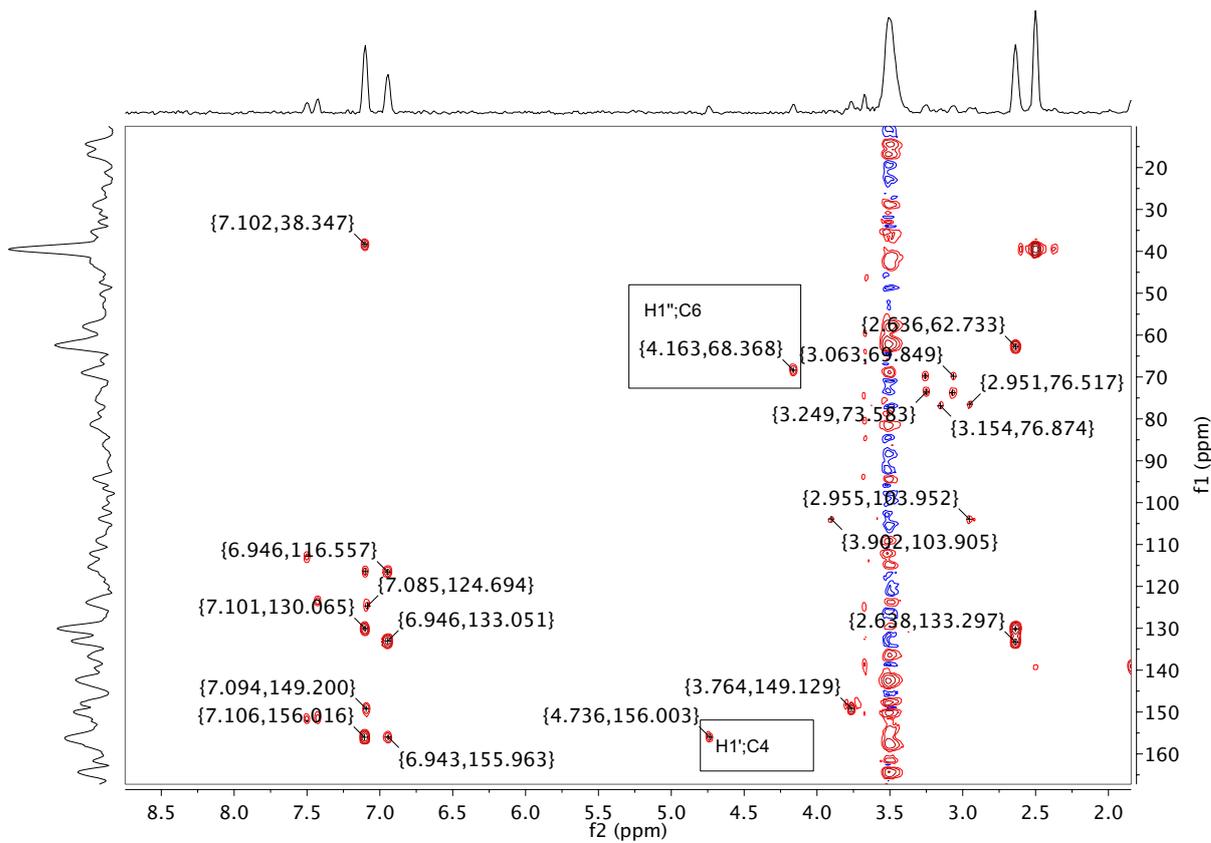
**APÊNDICE VV-** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **20** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



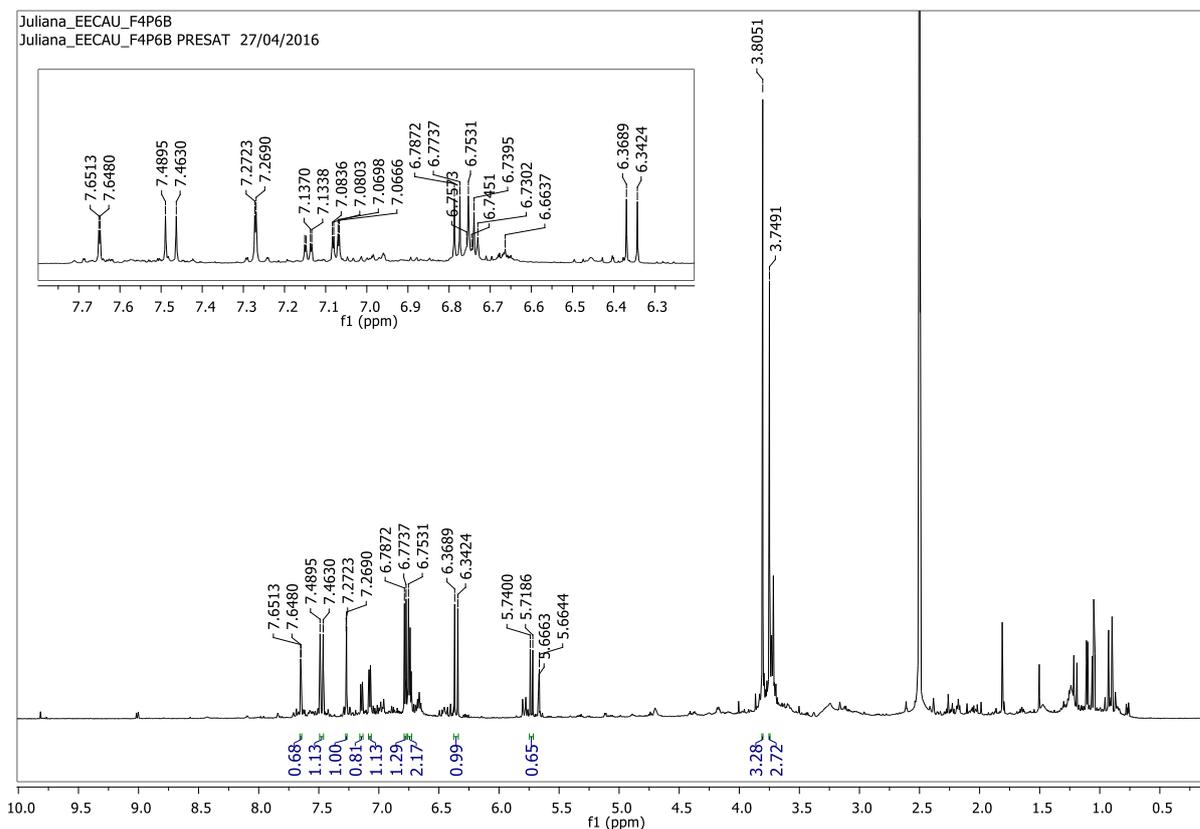
**APÊNDICE WW -** Espectro TOCSY 1D de **20** com irradiação em  $\delta$  4,16 (a) e 4,73 (b) (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



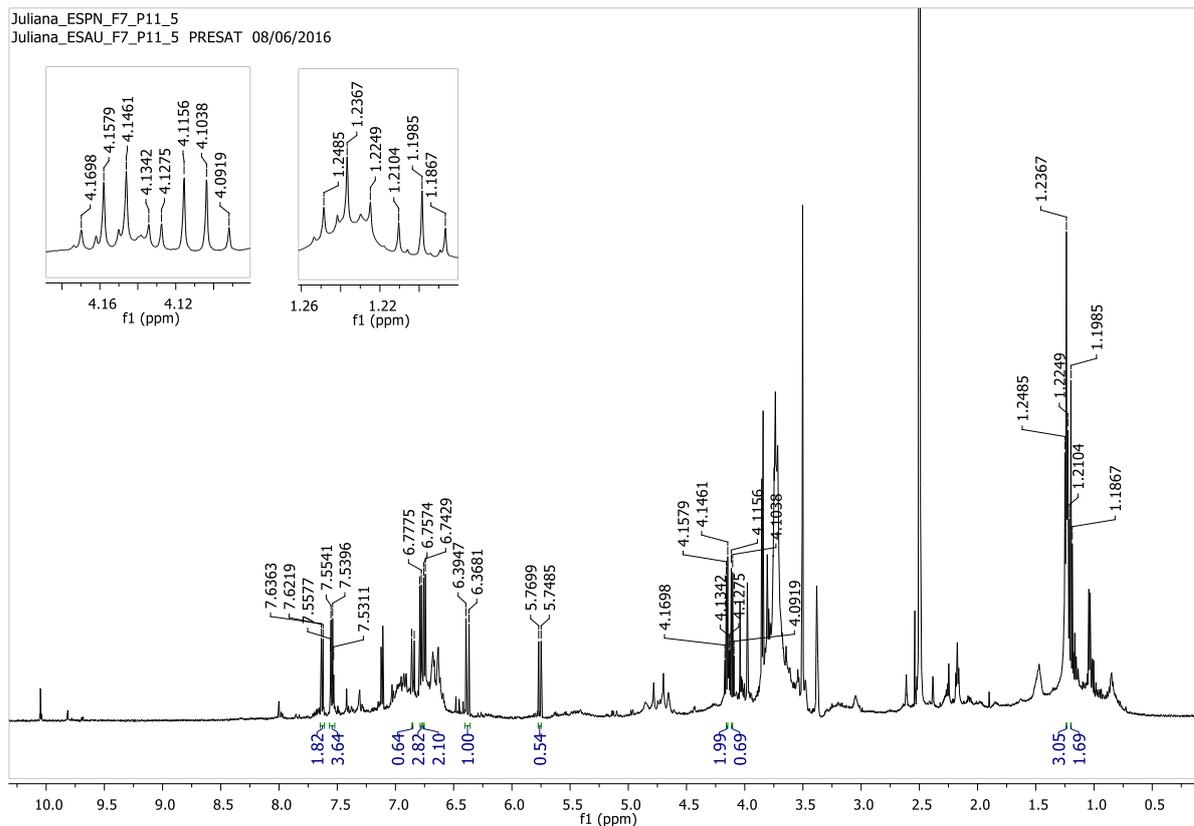
APÊNDICE XX - Mapa de contornos HMBC de 20 (DMSO-d<sub>6</sub>, 14,1 T)



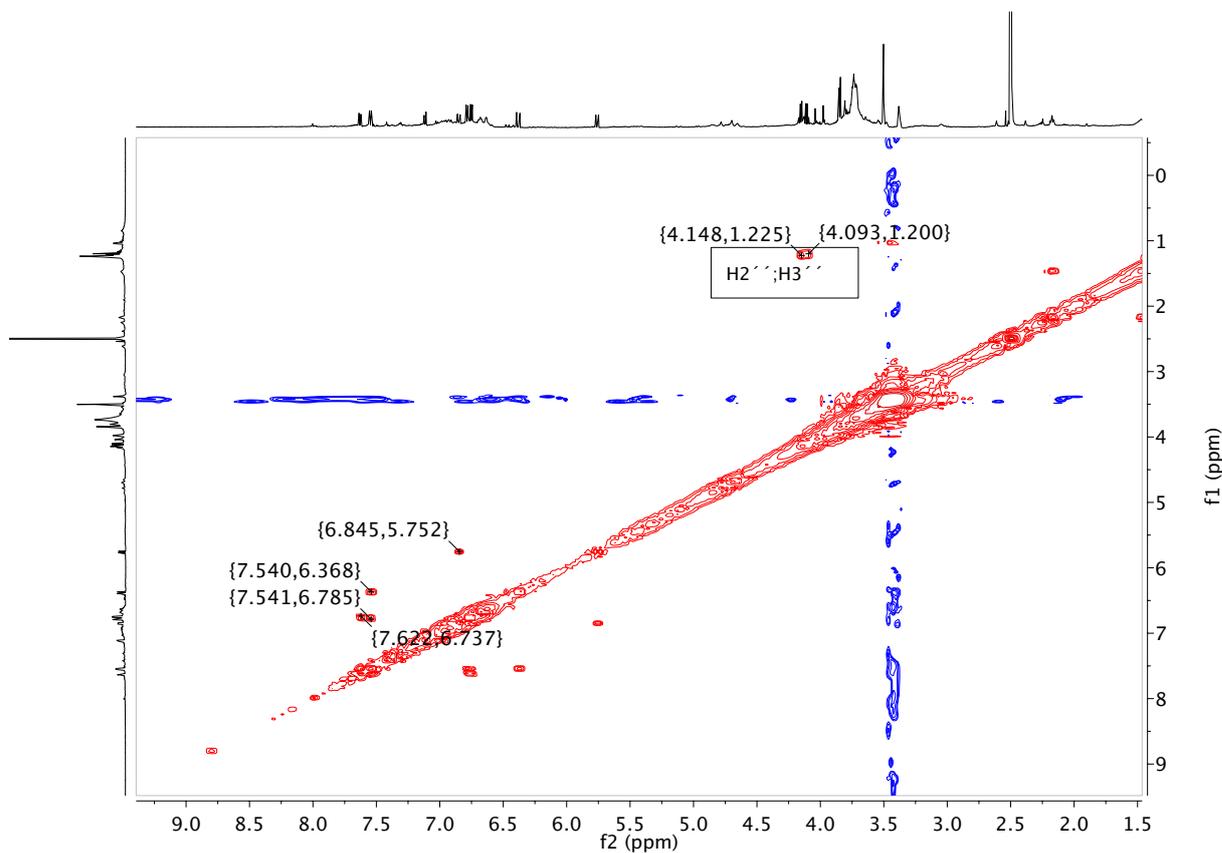
APÊNDICE YY - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de 21 + 24 (DMSO-d<sub>6</sub>, 14,1 T)



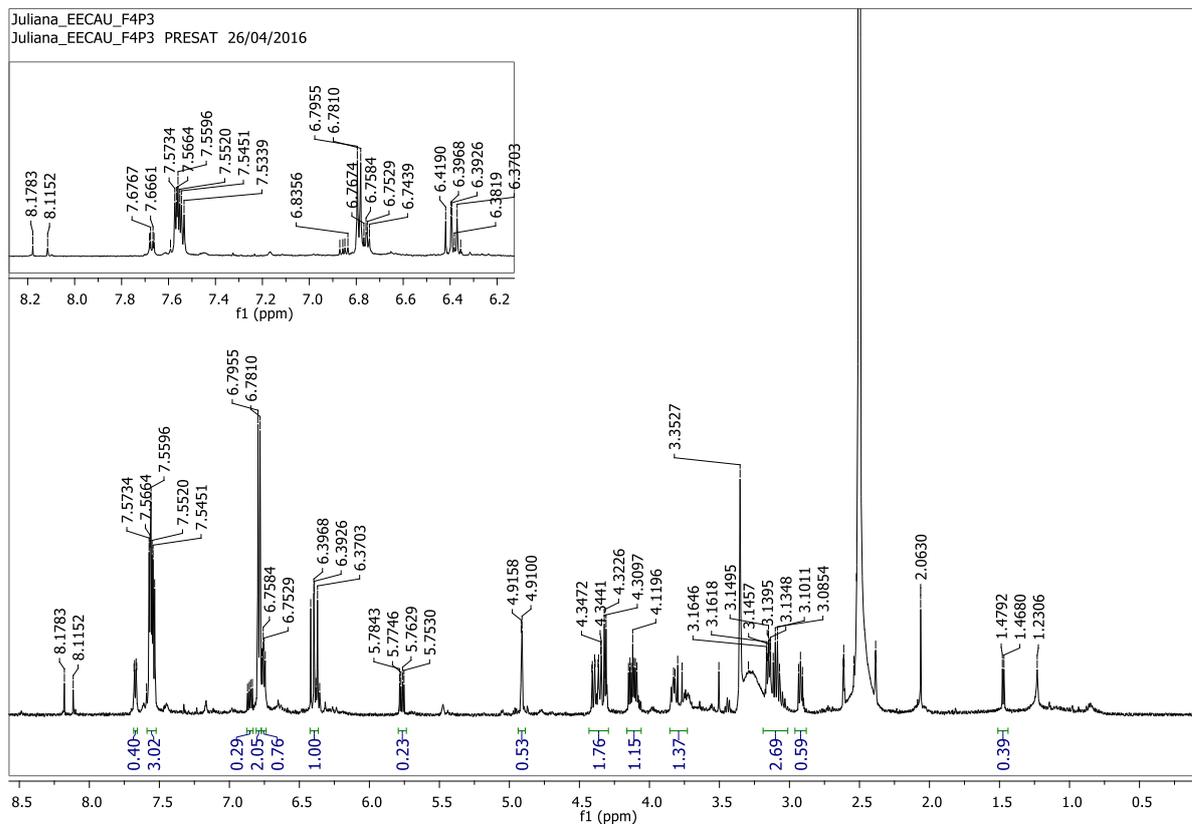
APÊNDICE ZZ- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **22** + **25** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



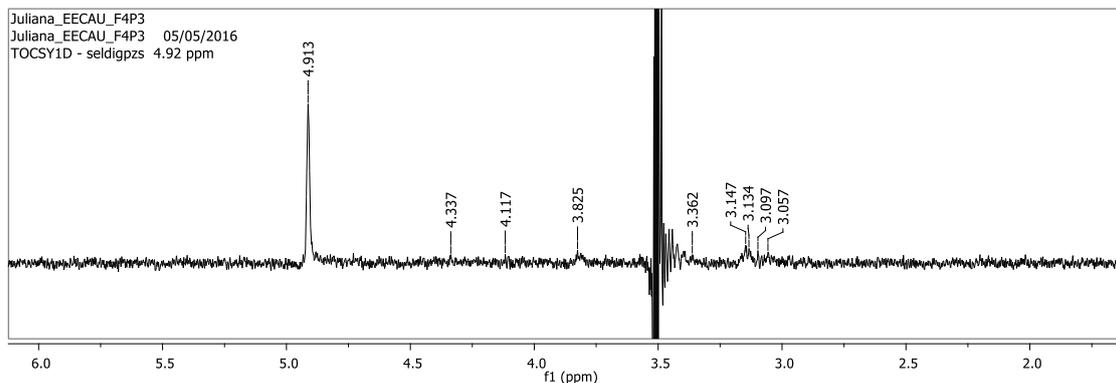
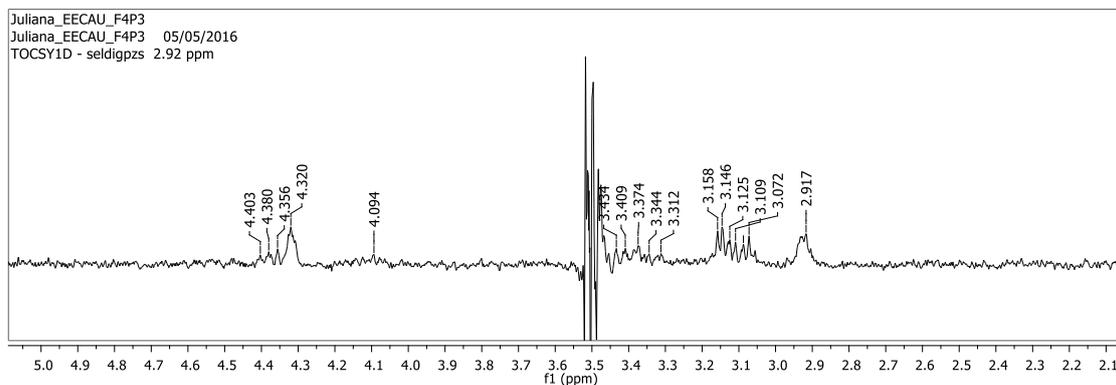
APÊNDICE AAA- Mapa de contornos COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de **22** + **25** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



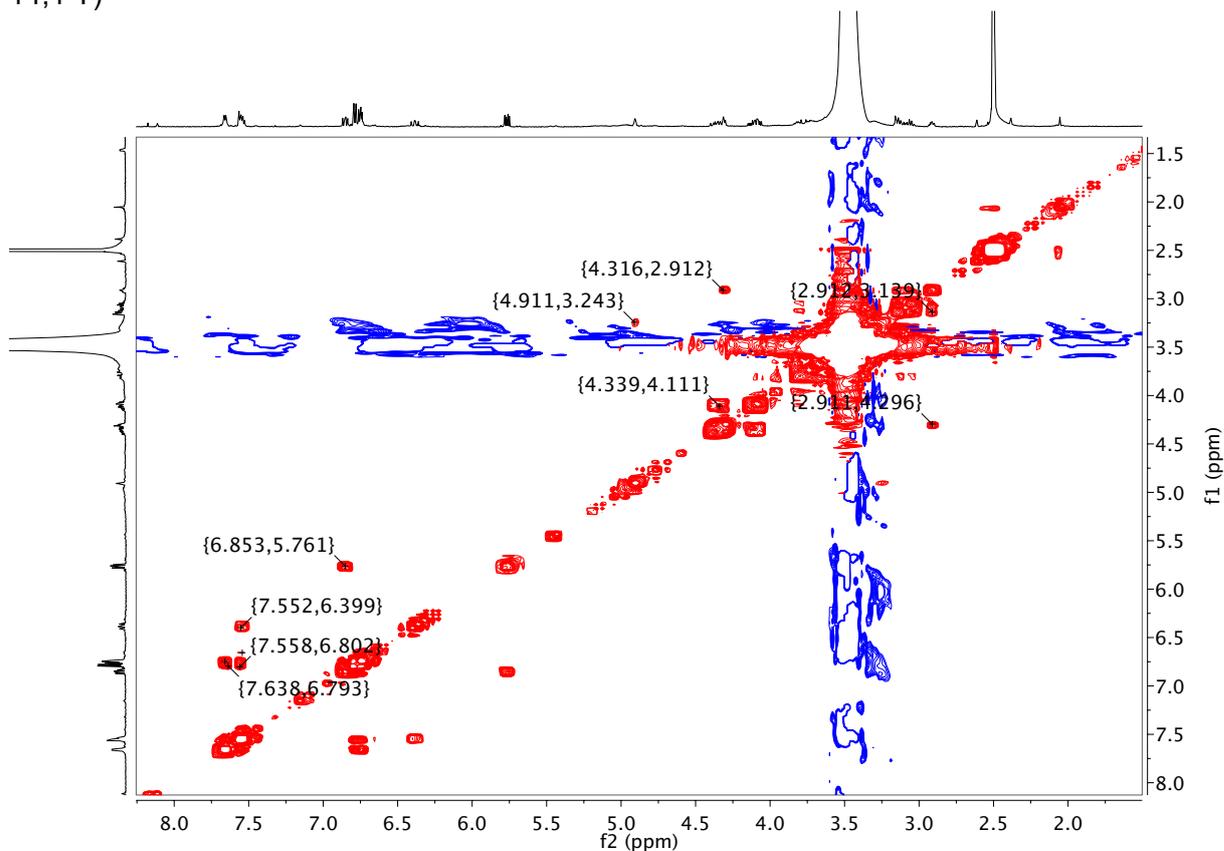
**APÊNDICE BBB - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de  $23\alpha$  e  $23\beta$  +  $26\alpha$  e  $26\beta$  (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)**



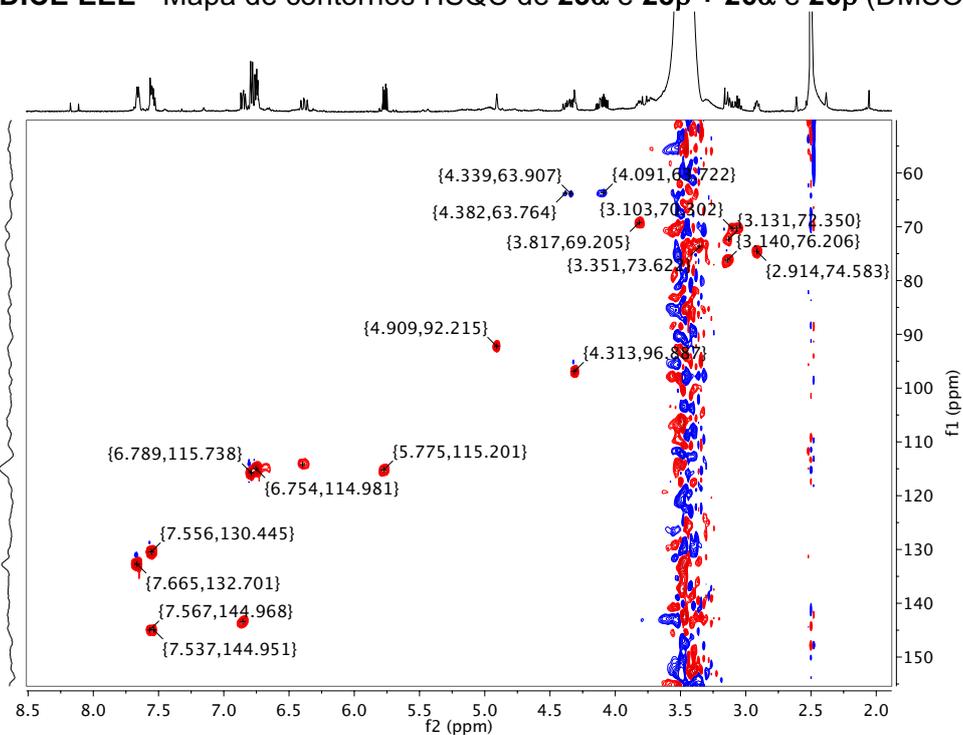
**APÊNDICE CCC - Espectro TOCSY 1D de  $23\alpha$  e  $23\beta$  +  $26\alpha$  e  $26\beta$  com irradiação em  $\delta$  2,92 (a) e 4,91 (b) (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)**



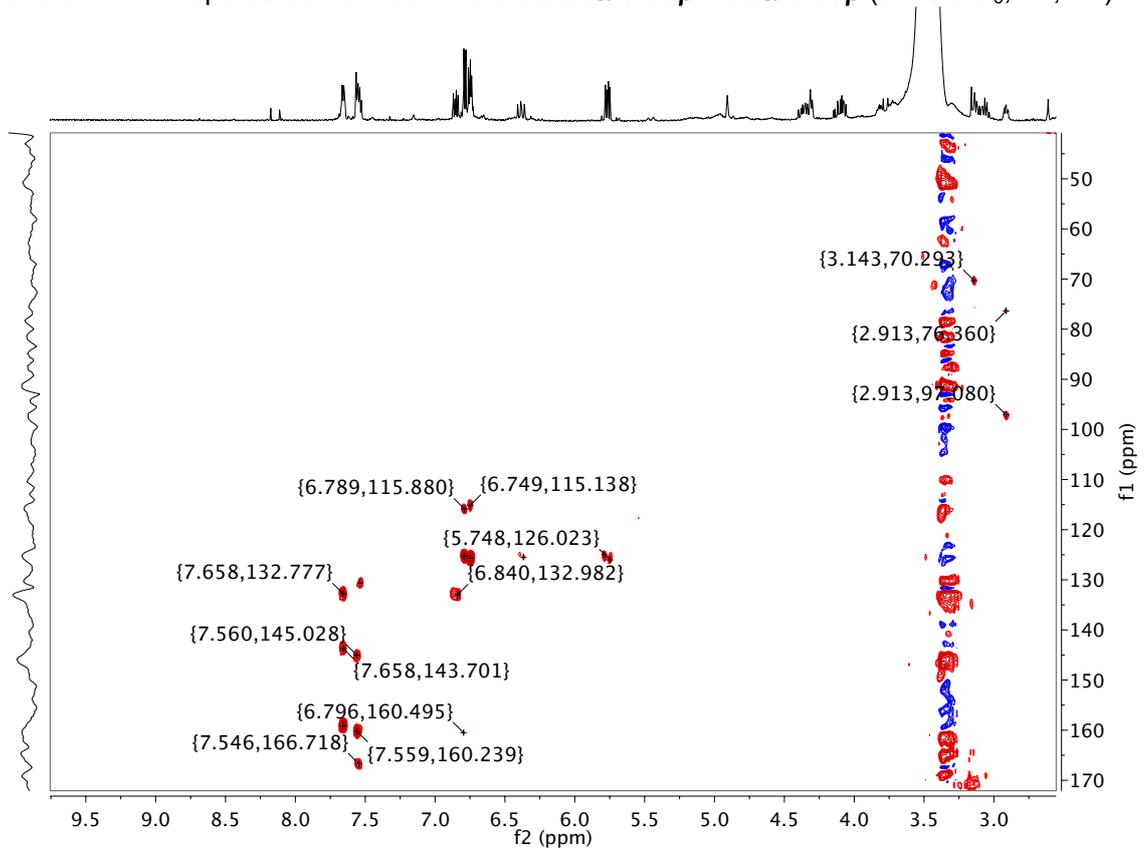
**APÊNDICE DDD** - Mapa de contornos COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de  $23\alpha$  e  $23\beta + 26\alpha$  e  $26\beta$  (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



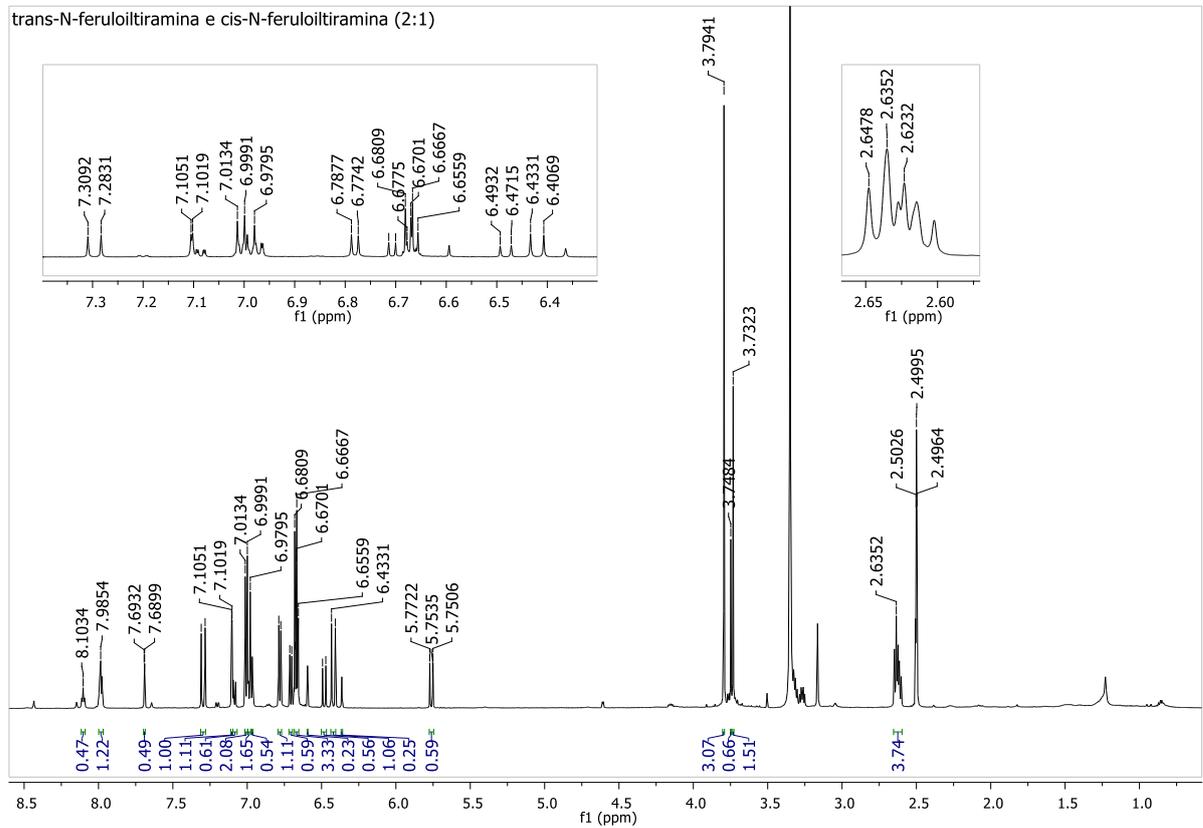
**APÊNDICE EEE** - Mapa de contornos HSQC de  $23\alpha$  e  $23\beta + 26\alpha$  e  $26\beta$  (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



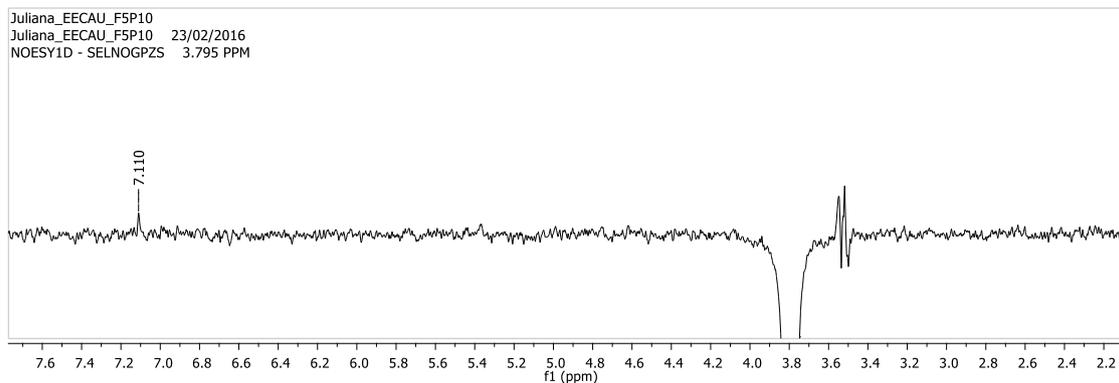
APÊNDICE FFF - Mapa de contornos HMBC de 23 $\alpha$  e 23 $\beta$  + 26 $\alpha$  e 26 $\beta$  (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 14,1 T)



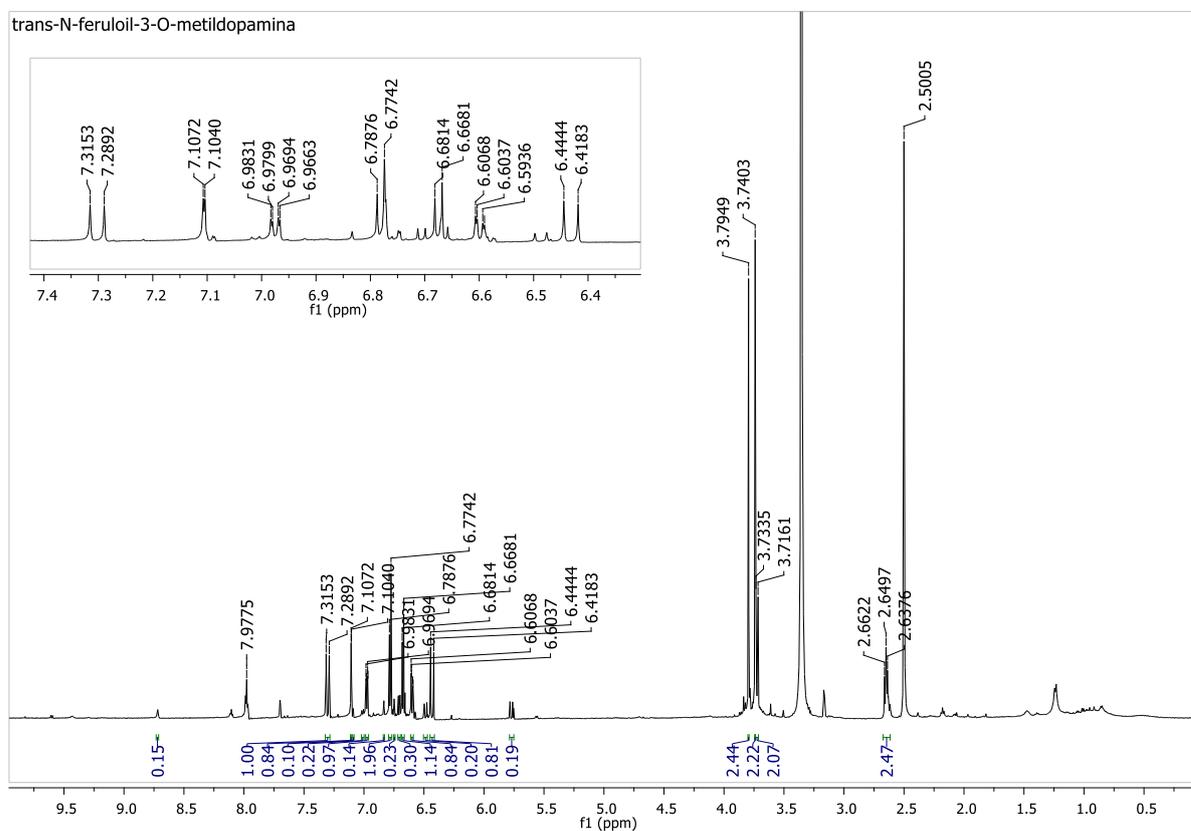
APÊNDICE GGG - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de 27 + 29 (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 14,1 T)



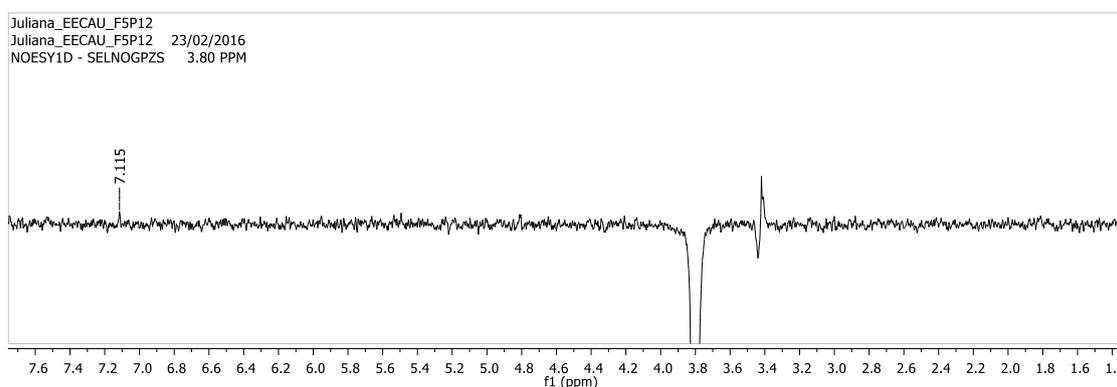
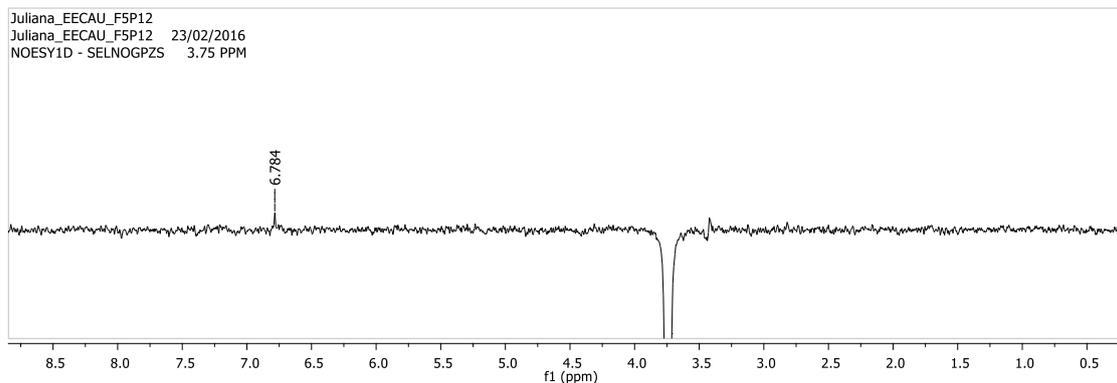
**APÊNDICE HHH - Espectro de NOESY 1D de 27 + 29 com irradiação em  $\delta$  3,79 (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)**



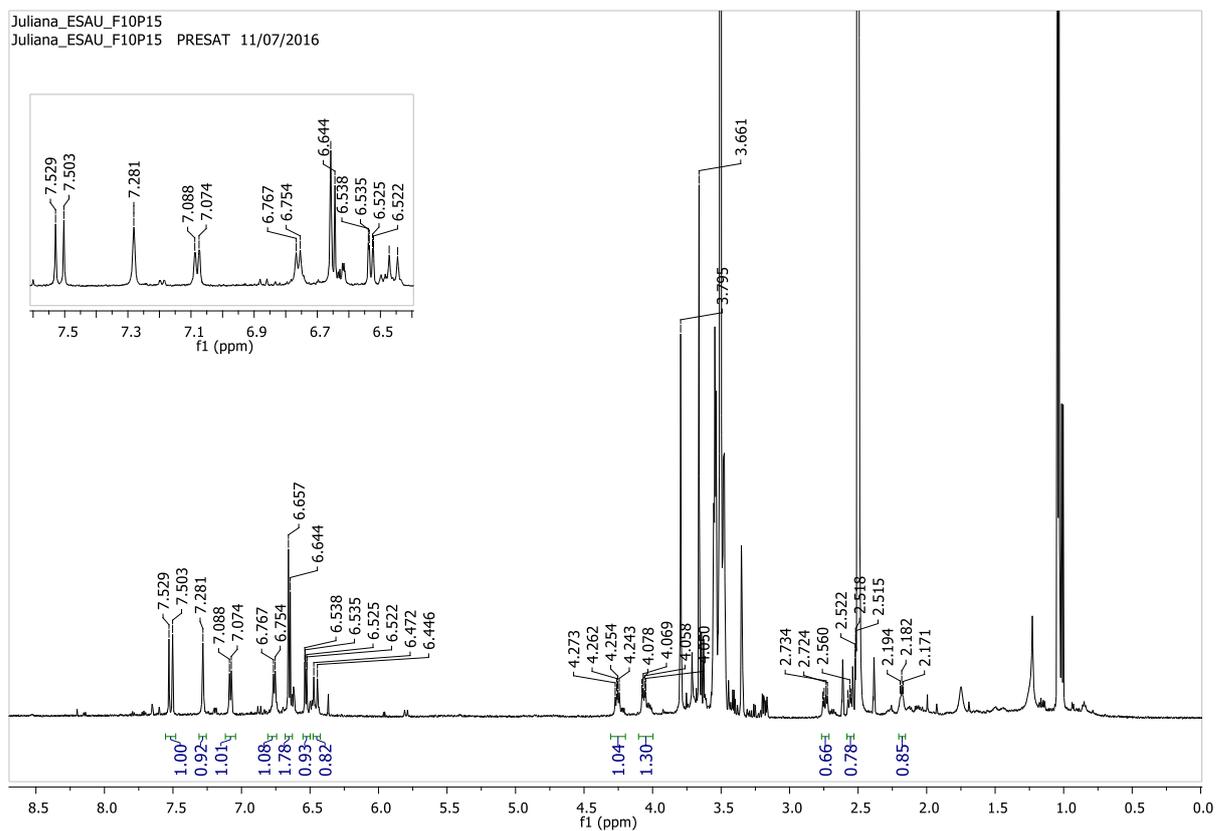
**APÊNDICE III - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de 28 (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)**



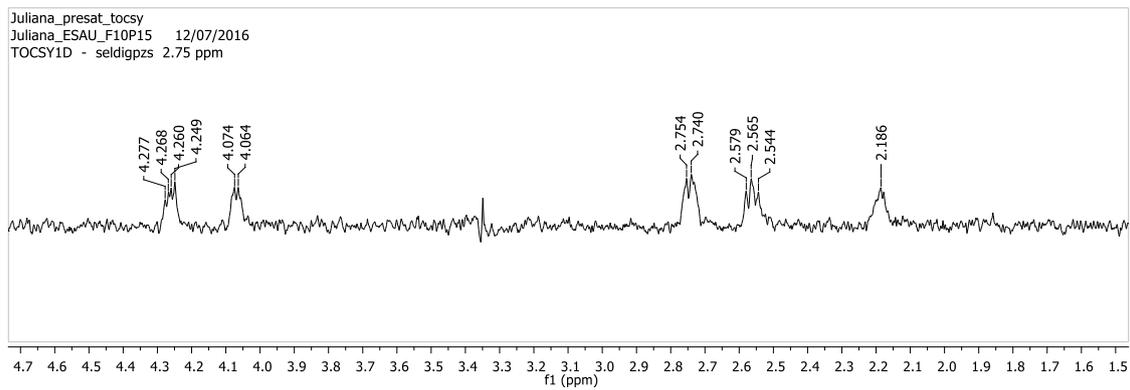
**APÊNDICE JJJ** - Espectro de NOESY 1D de **28** com irradiação em  $\delta$  3,74 (a) e 3,79 (b) (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



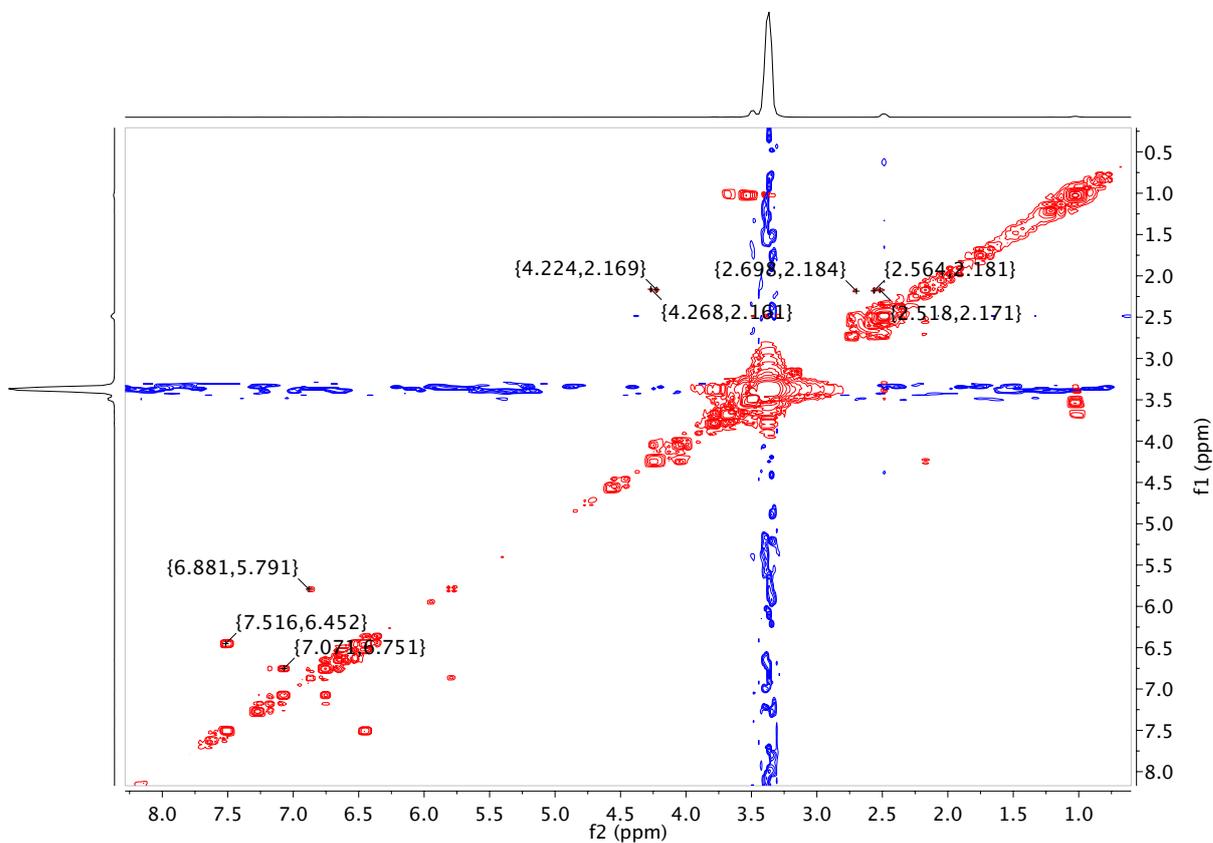
**APÊNDICE KKK** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **30** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



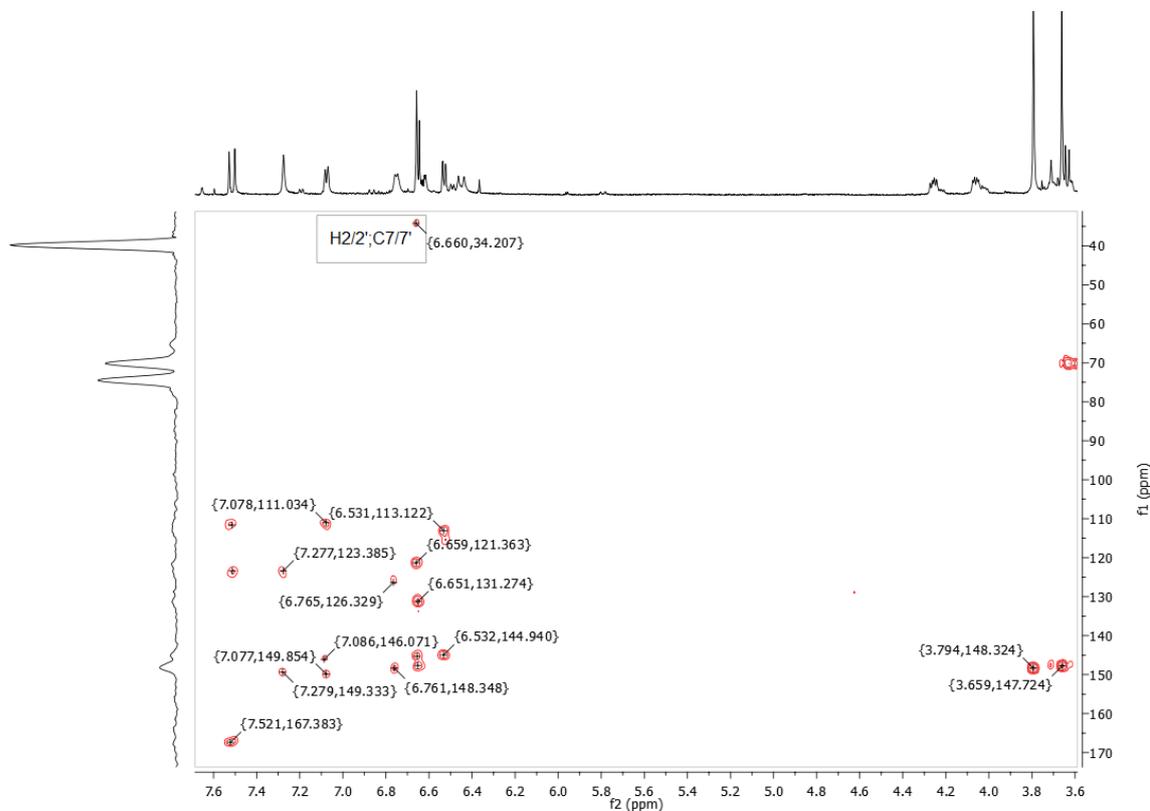
**APÊNDICE LLL - Espectro TOCSY 1D de **30** com irradiação em  $\delta$  2,75 (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)**



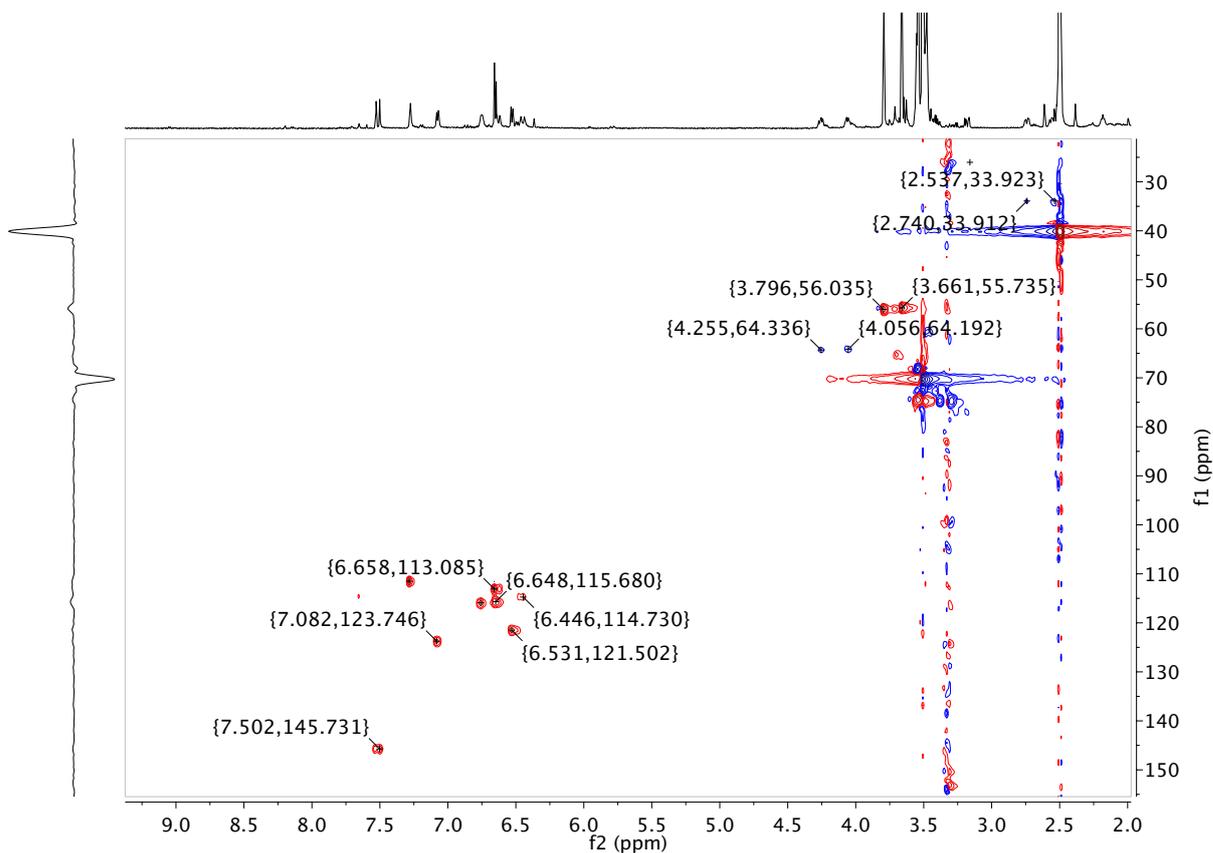
**APÊNDICE MMM- Mapa de contornos COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de **30** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)**



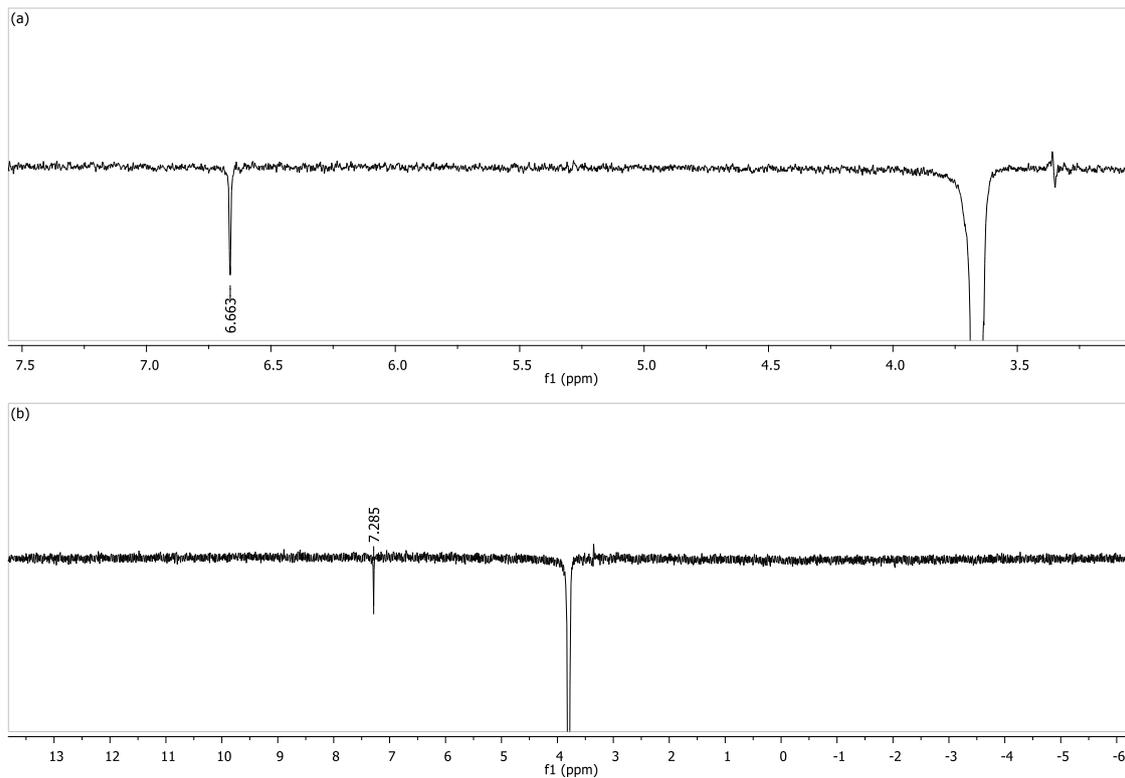
APÊNDICE NNN - Mapa de contornos HMBC de **30** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



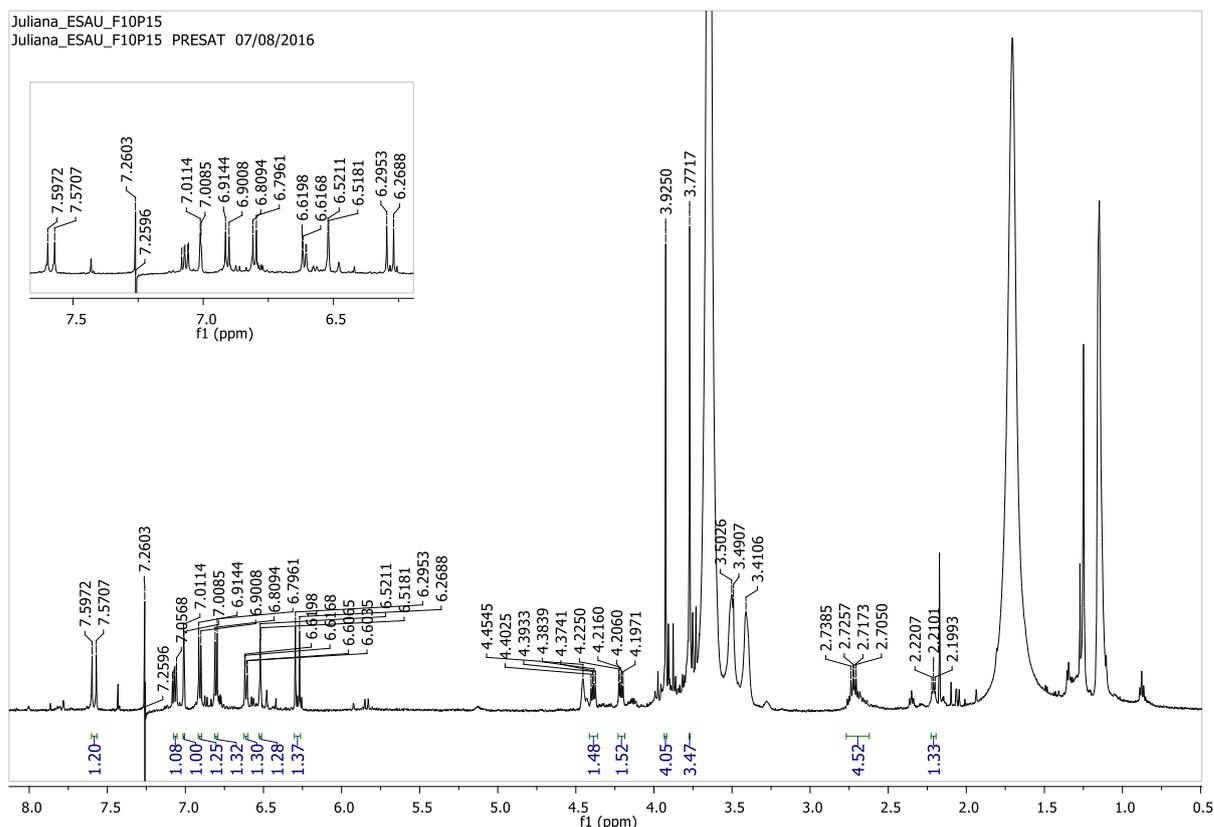
APÊNDICE OOO - Mapa de contornos HSQC de **30** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



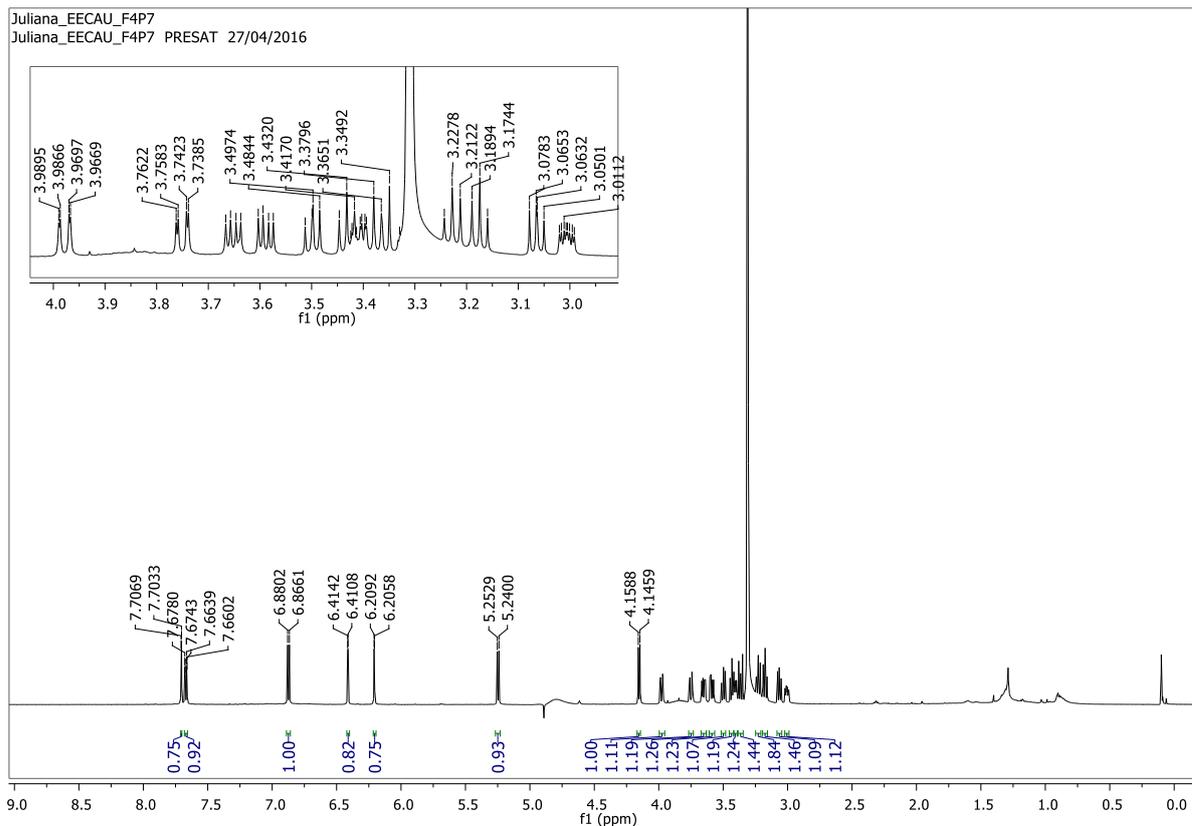
**APÊNDICE PPP** - Espectro de NOESY 1D de **30** com irradiação em (a)  $\delta$  3,66 ppm e (b)  $\delta$  3,79 ppm (DMSO- $d_6$ , 14,1 T).



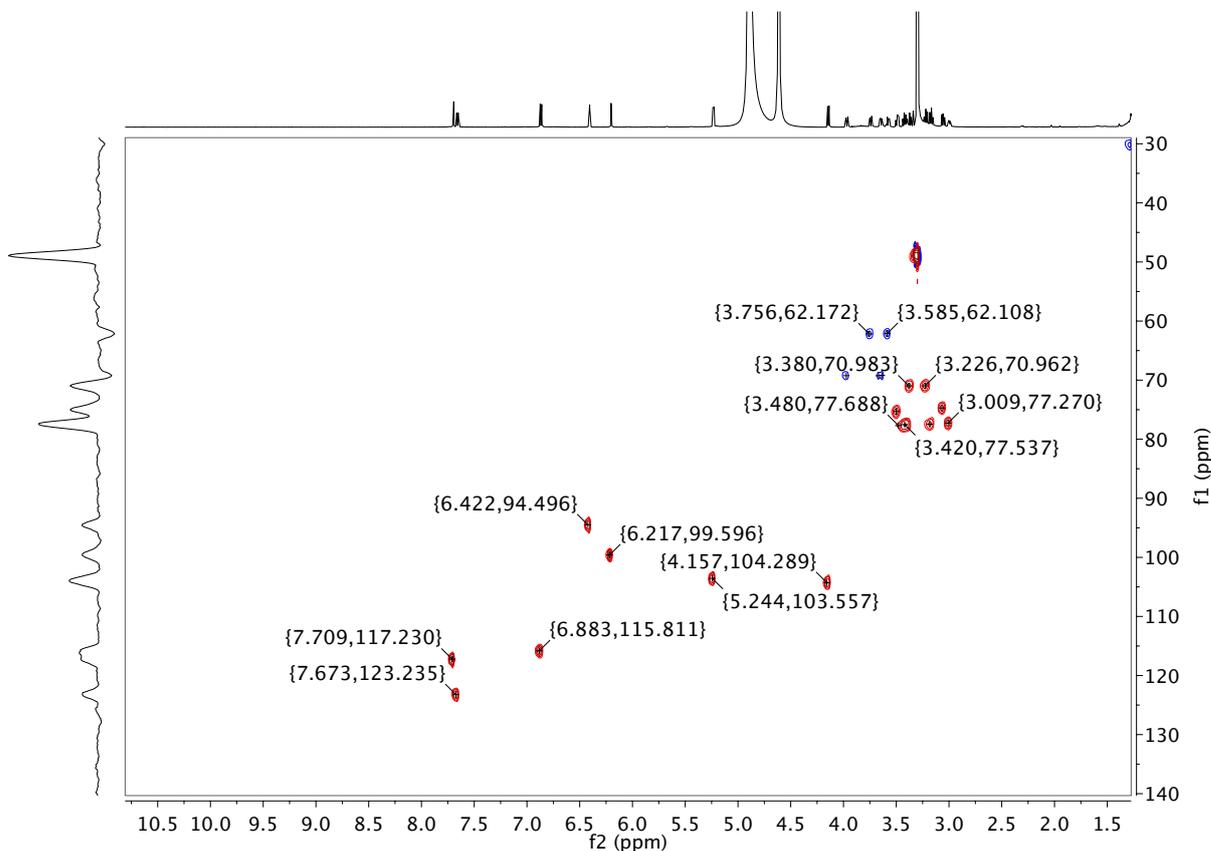
**APÊNDICE QQQ** - Espectro de RMN de  $^1H$  de **30** (CDCl $_3$ , 14,1 T)



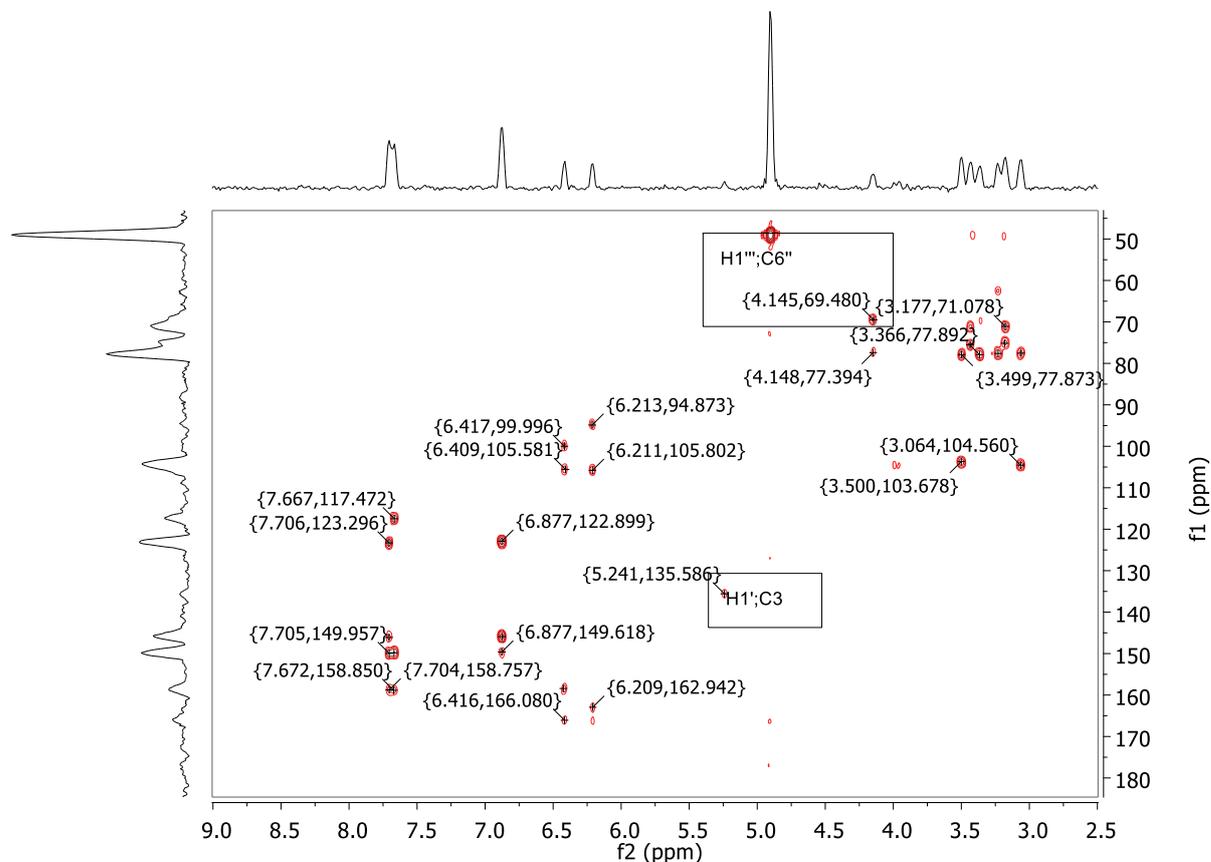
APÊNDICE RRR - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **31** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T)



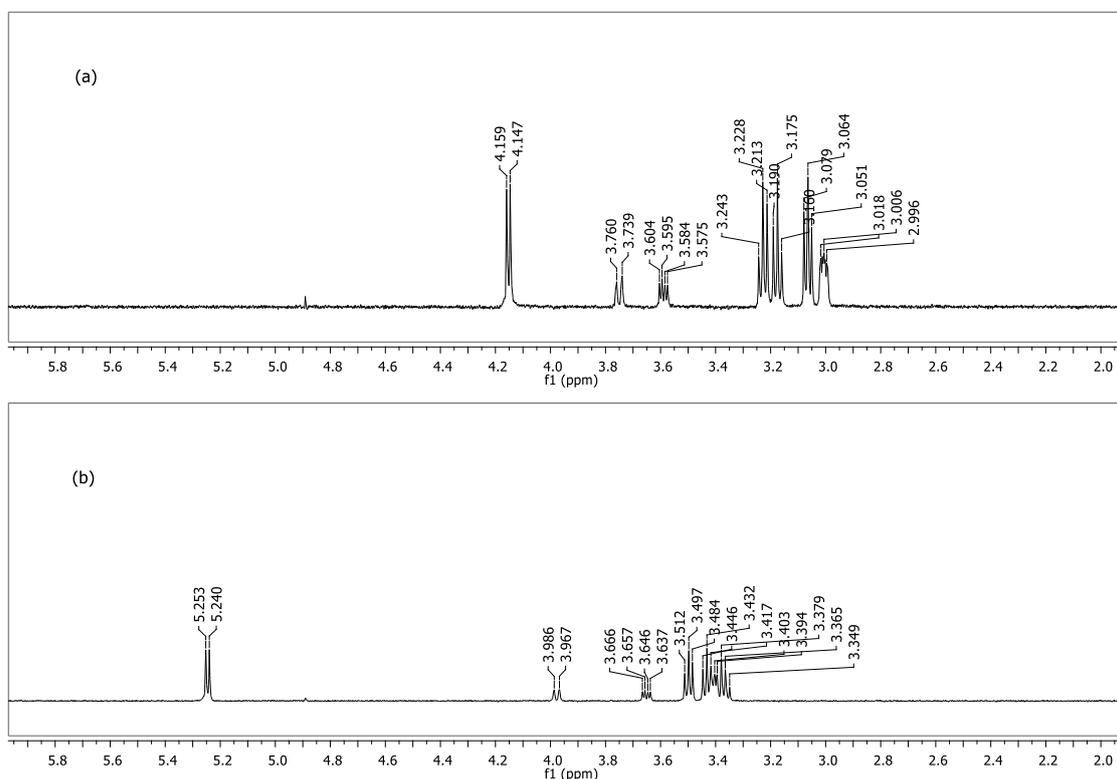
APÊNDICE SSS - Mapa de contornos HSQC de **31** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T)



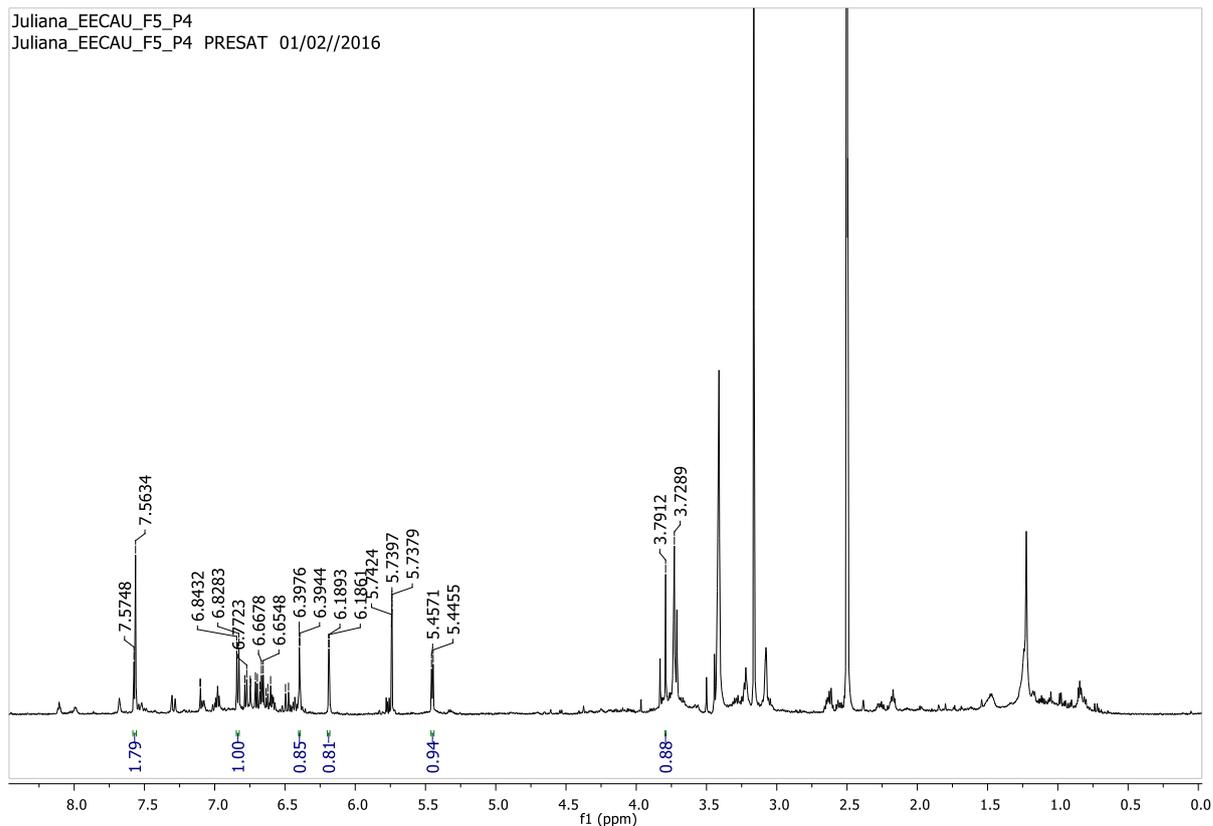
APÊNDICE TTT - Mapa de contornos HMBC de **31** (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)



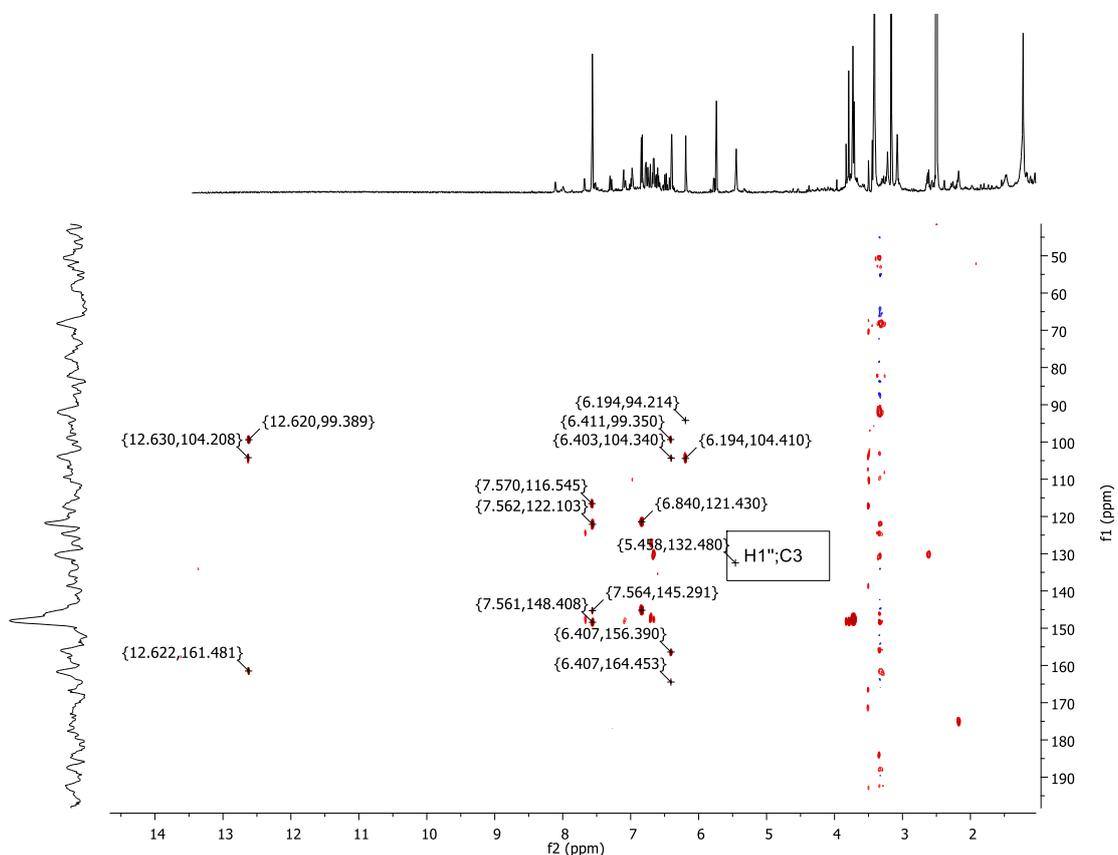
APÊNDICE UUU - Espectro TOCSY 1D de **31** com irradiação em δ 4,15 (a) e 5,24 (b) (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)



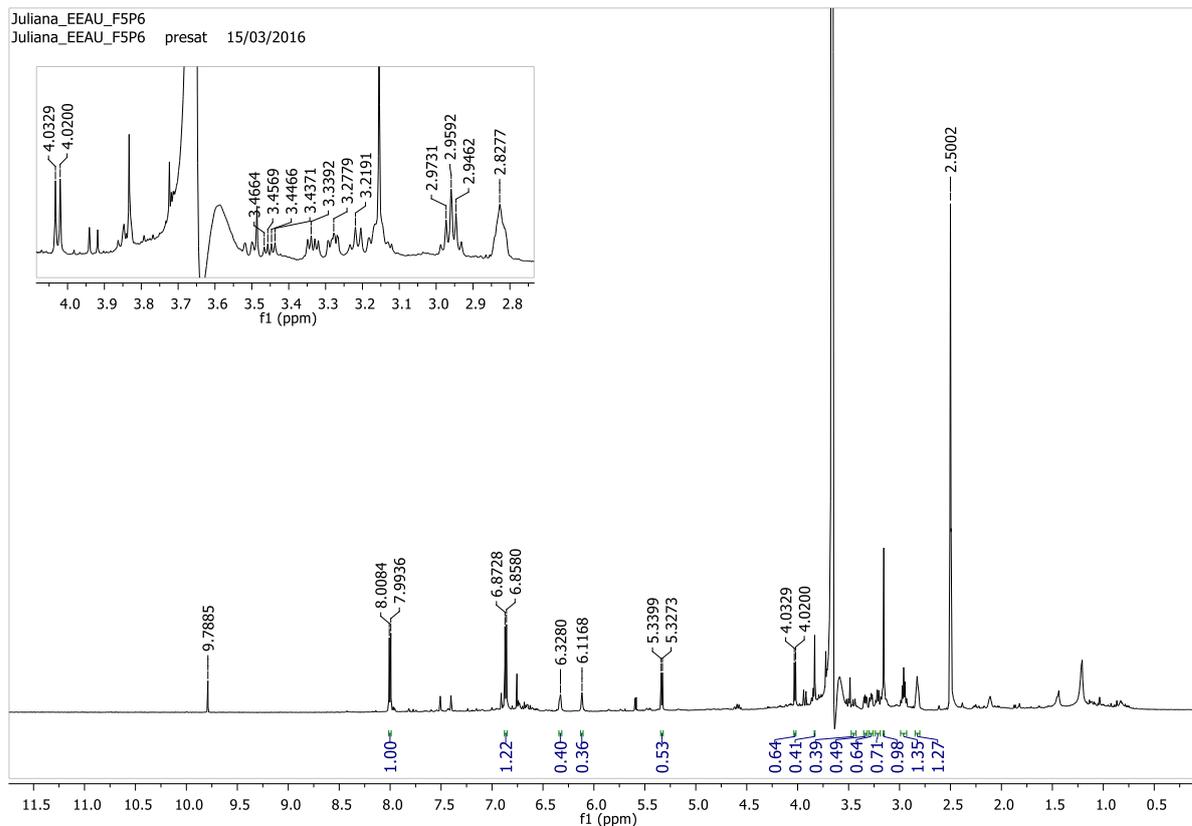
APÊNDICE VVV - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **32** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



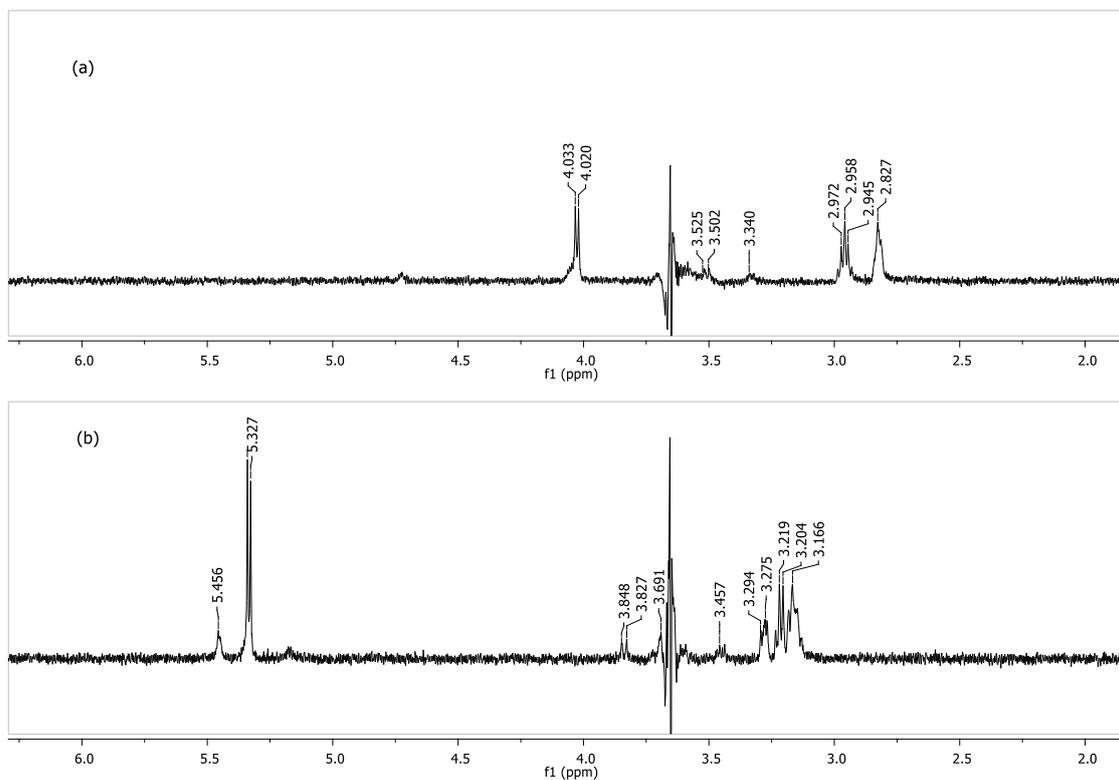
APÊNDICE WWW - Mapa de contornos HMBC de **32** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



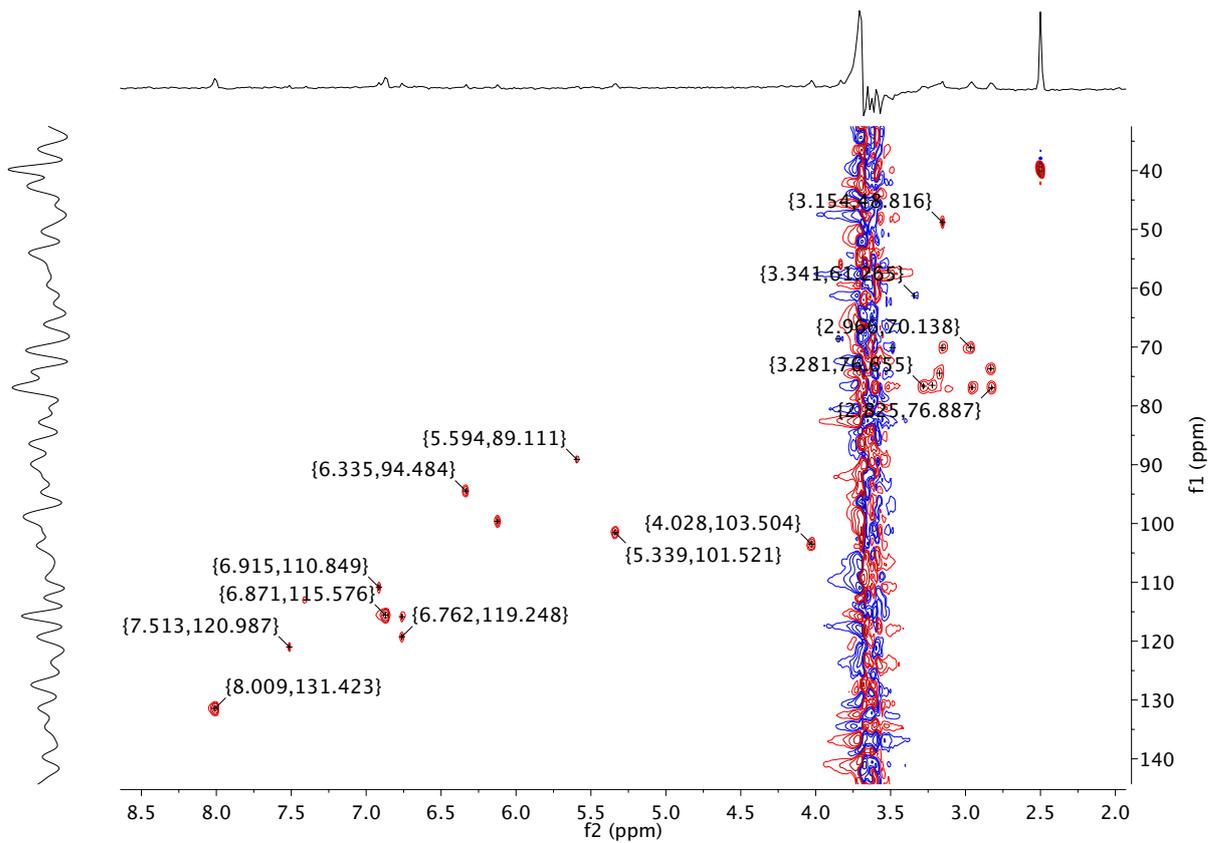
**APÊNDICE XXX - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **33** (DMSO-d<sub>6</sub>, 14,1 T)**



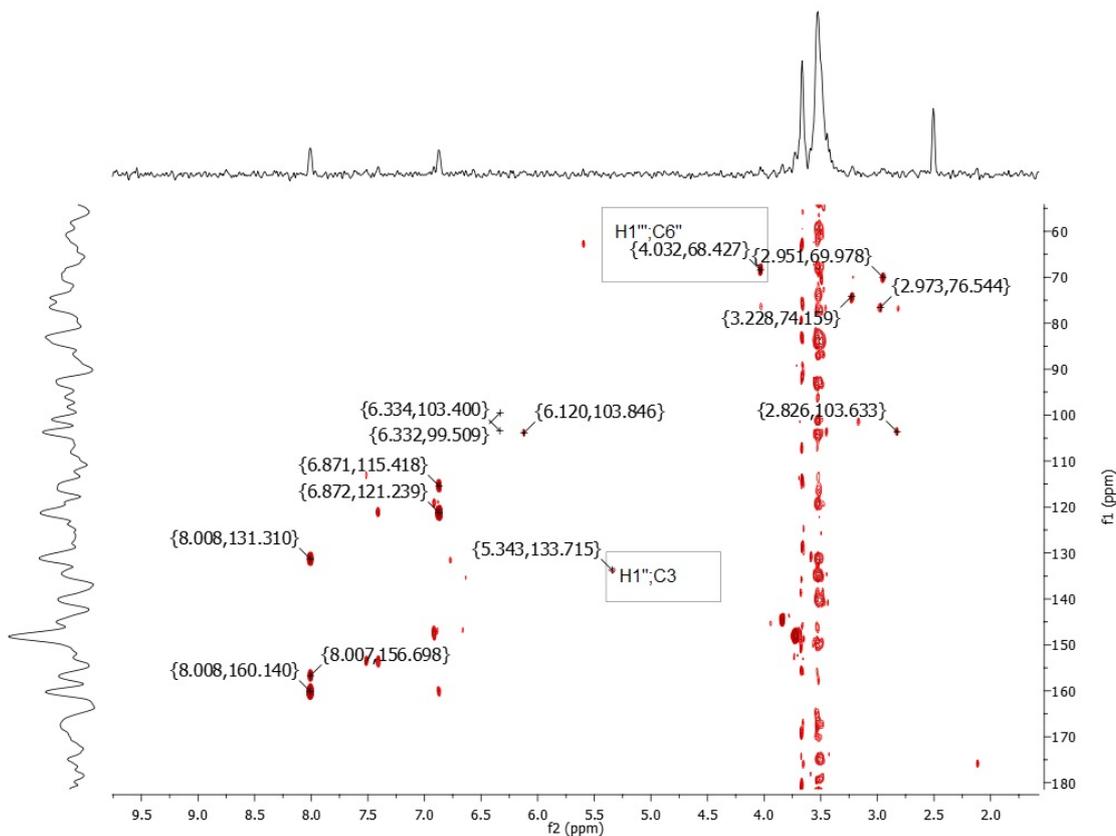
**APÊNDICE YYY - Espectro TOCSY 1D de **33** com irradiação em  $\delta$  4,02 (a) e 5,33 (b) (DMSO-d<sub>6</sub>, 14,1 T)**



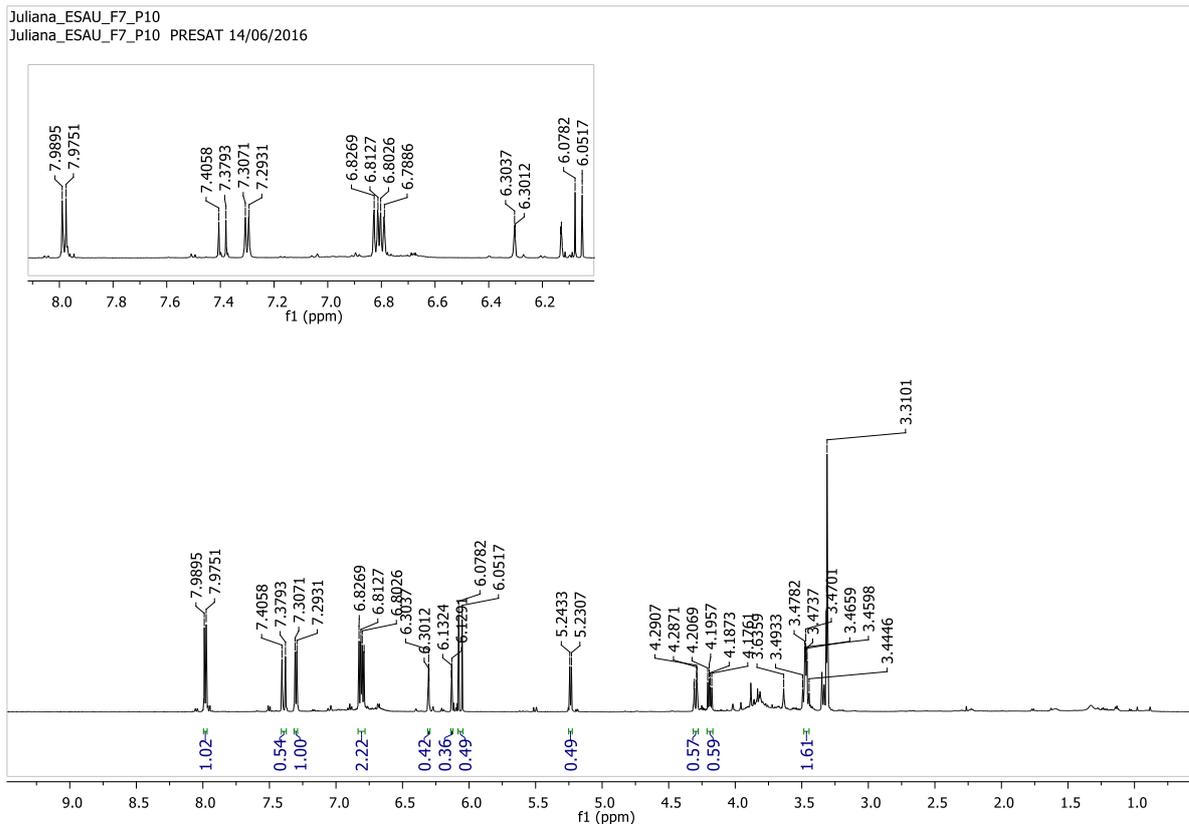
**APÊNDICE ZZZ - Mapa de contornos HSQC de 33 (DMSO-d<sub>6</sub>, 14,1 T)**



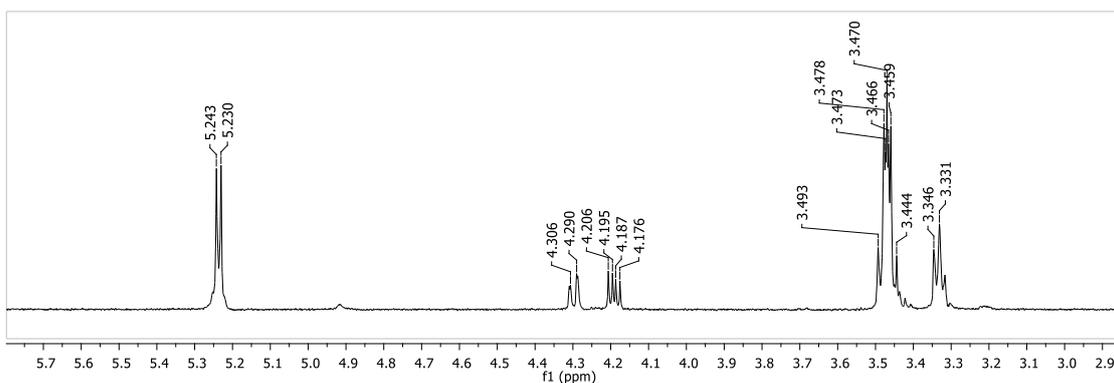
**APÊNDICE AAAA- Mapa de contornos HMBC de 33 (DMSO-d<sub>6</sub>, 14,1 T)**



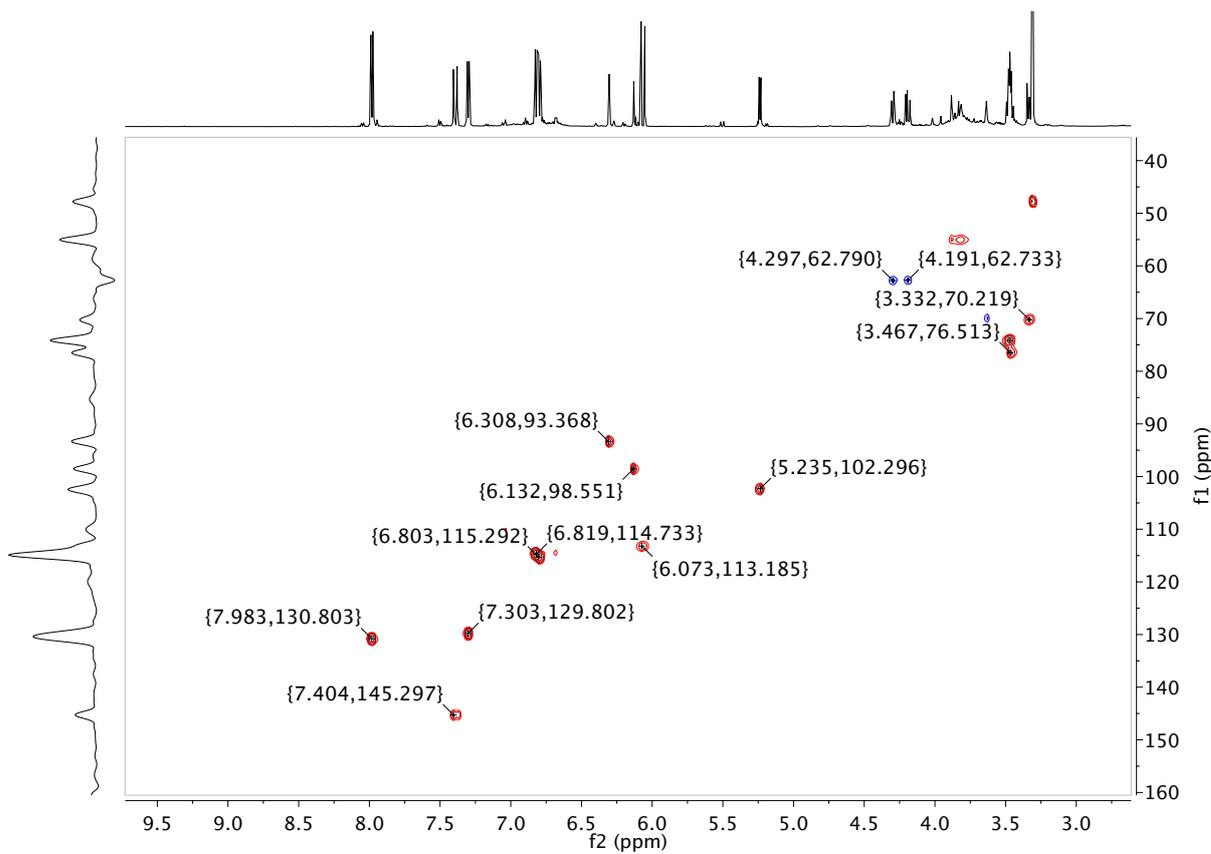
APÊNDICE BBBB - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **34** (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)



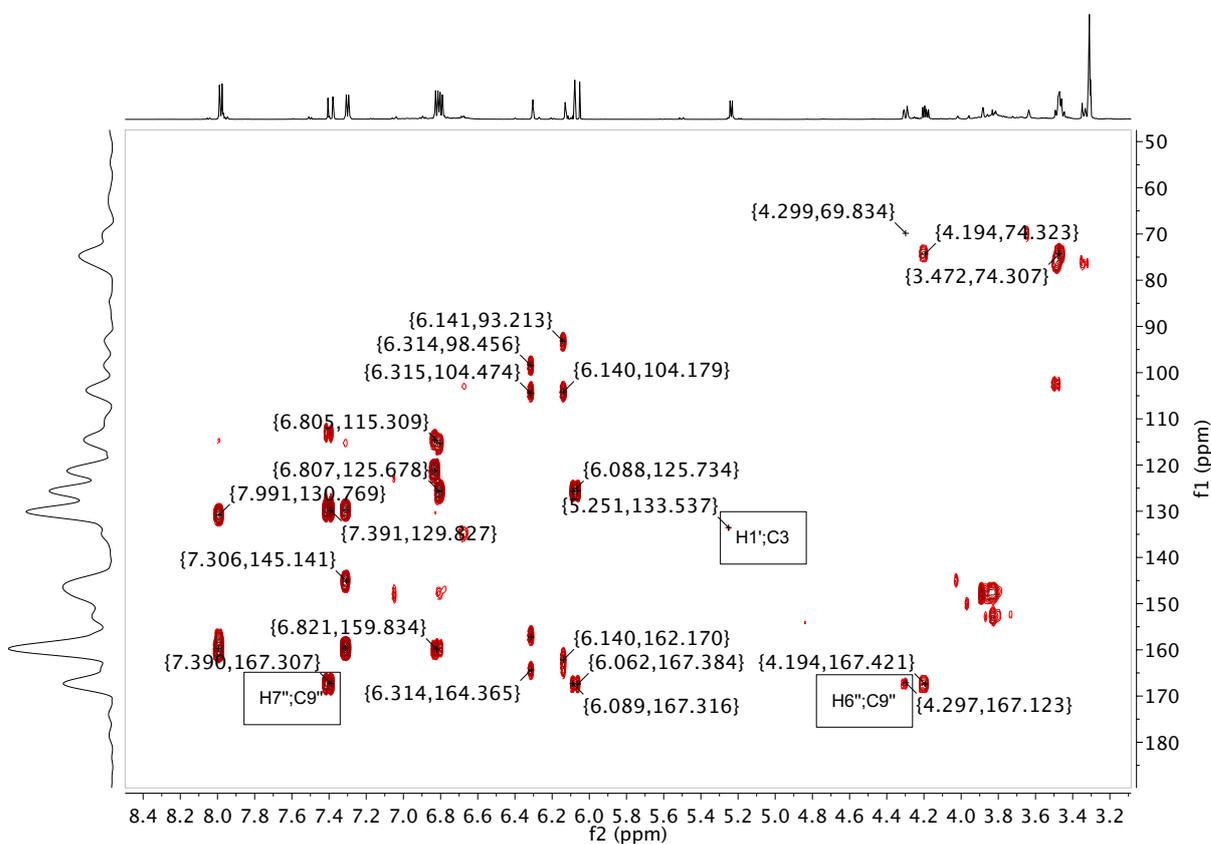
APÊNDICE CCCC - Espectro TOCSY 1D de **34** com irradiação em  $\delta$  5,24



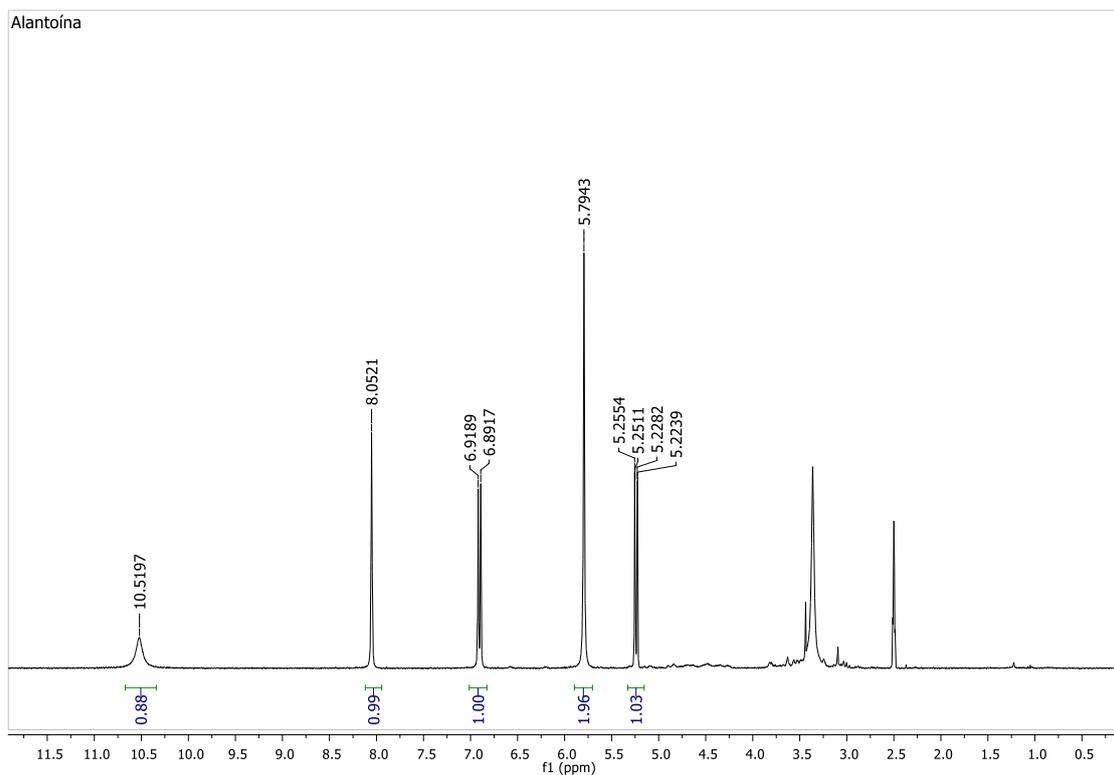
APÊNDICE DDDD - Mapa de contornos HSQC de **34** (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)



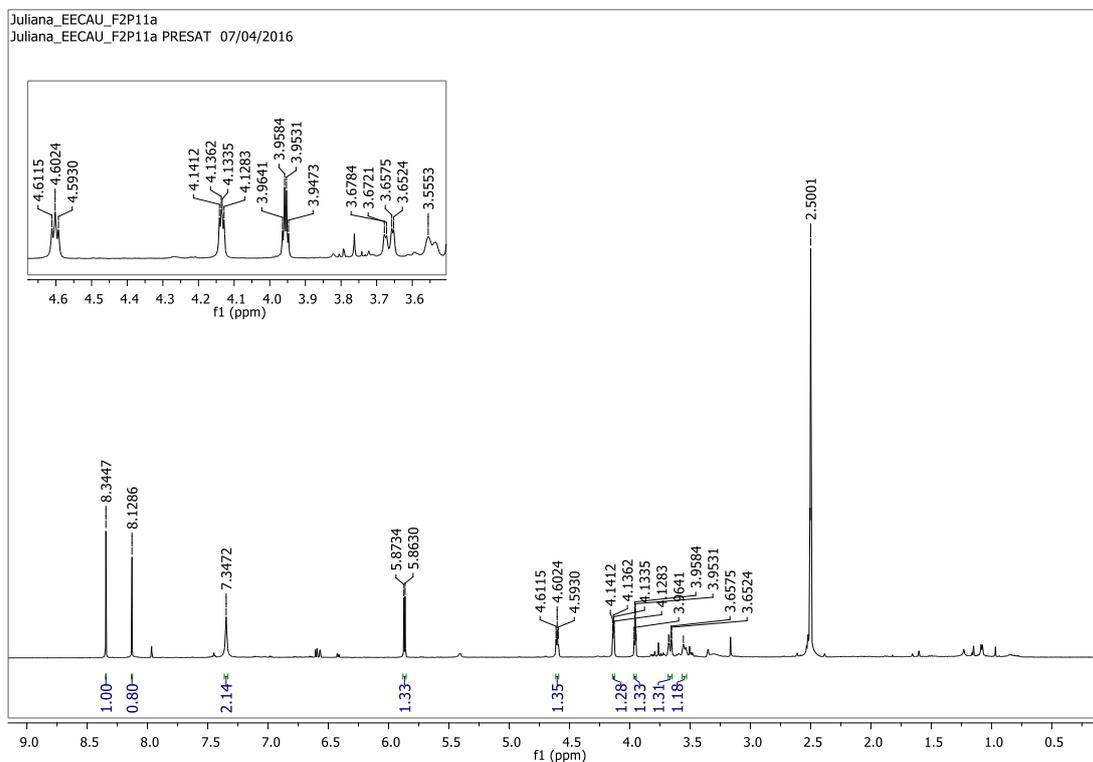
APÊNDICE EEEE- Mapa de contornos HMBC de **34** (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)



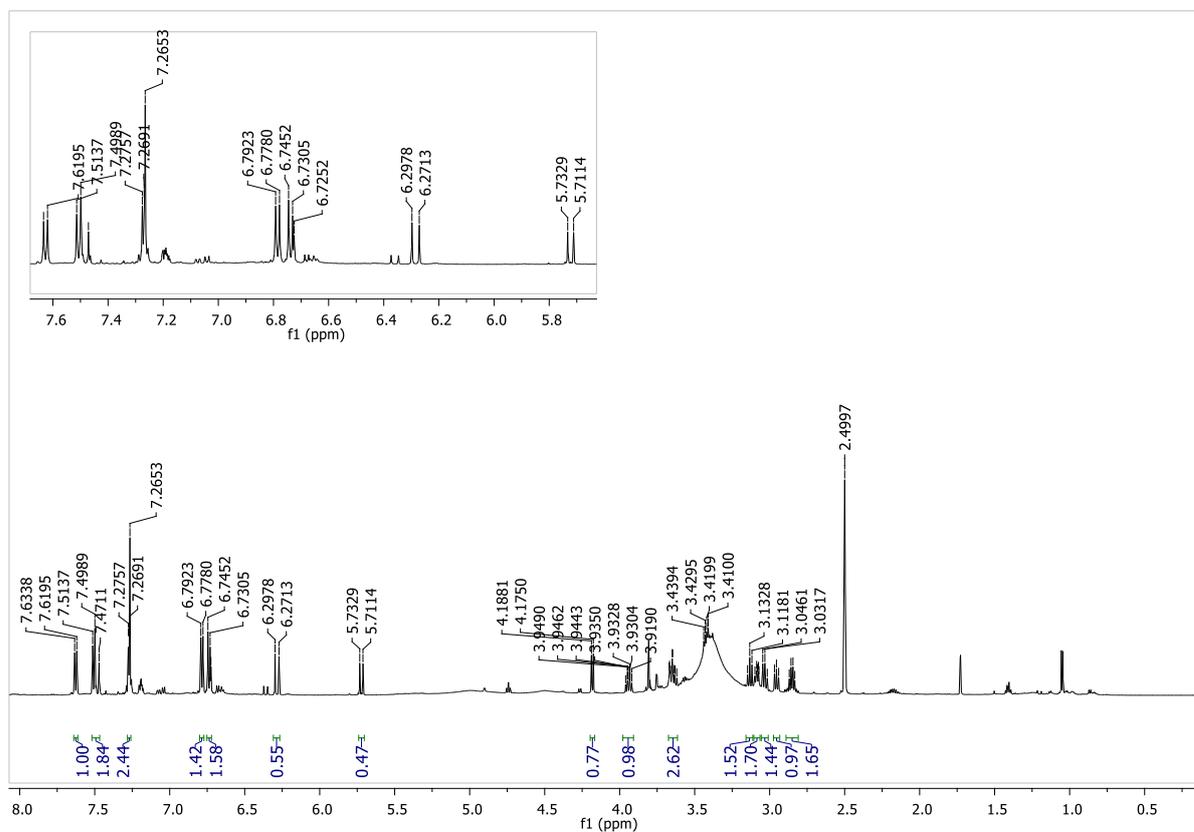
APÊNDICE FFFF - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **35** (DMSO- $d_6$ , 7,1 T)



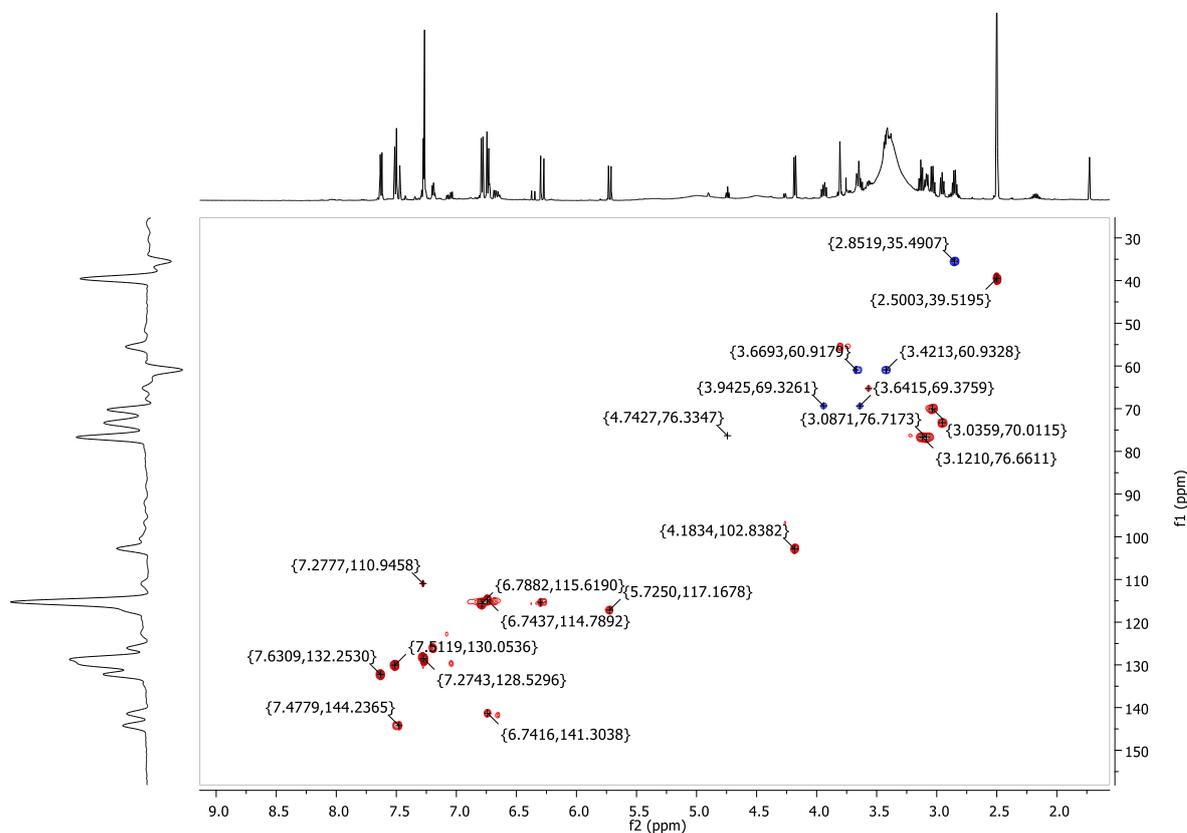
APÊNDICE GGGG - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **36** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



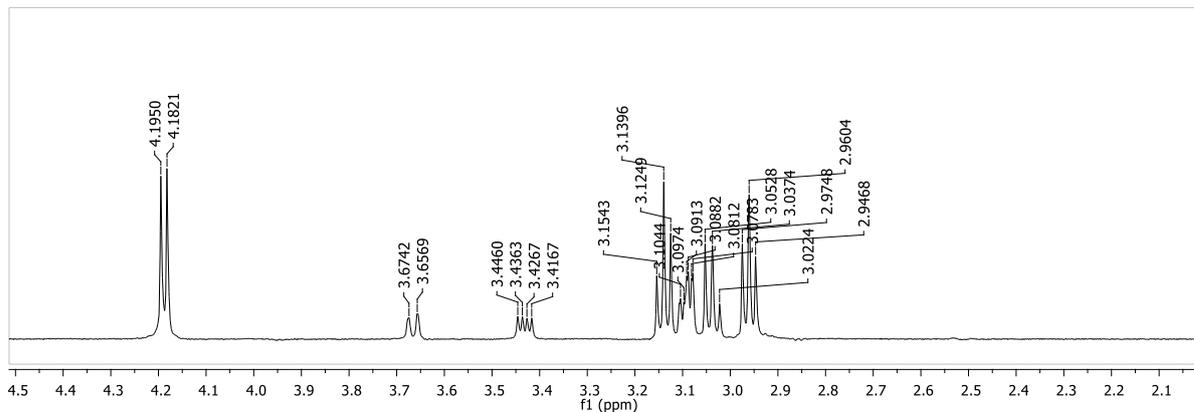
APÊNDICE HHHH - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **37** + **38** + **39** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



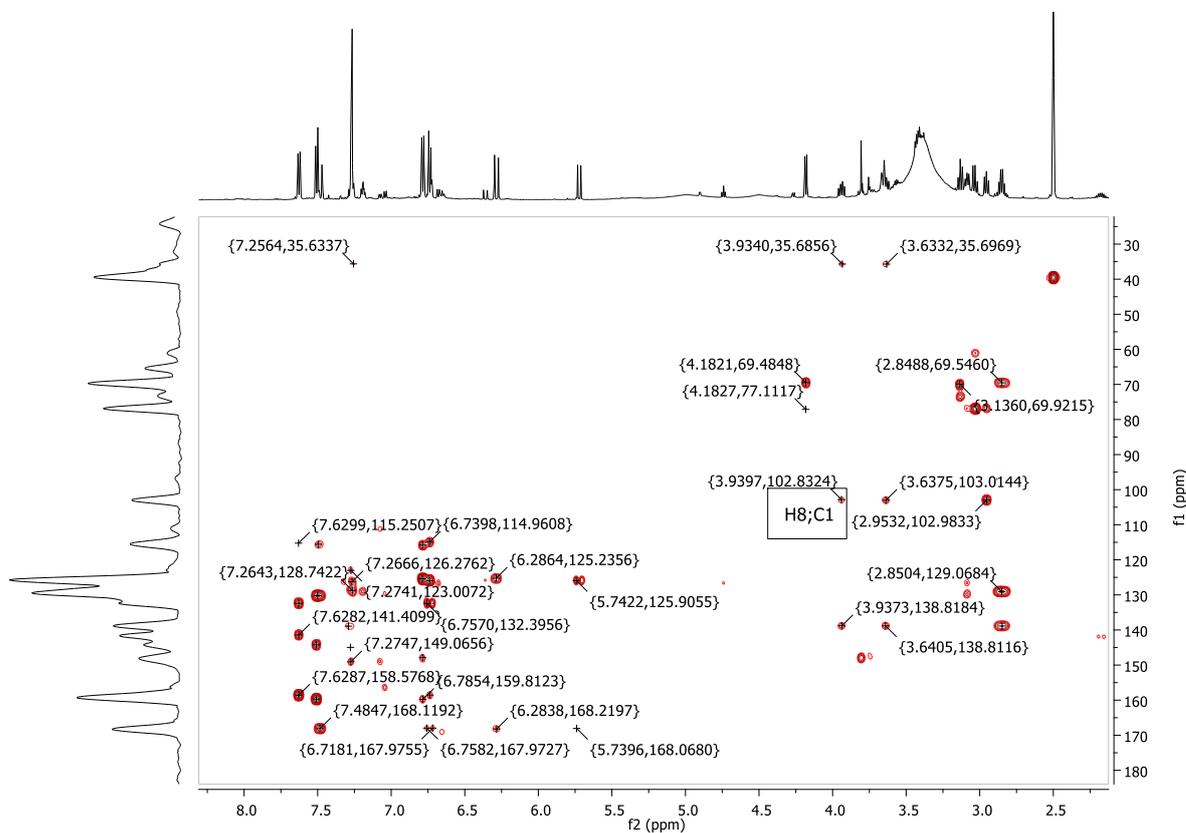
APÊNDICE IIII - Mapa de contornos HSQC de **37** + **38** + **39** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



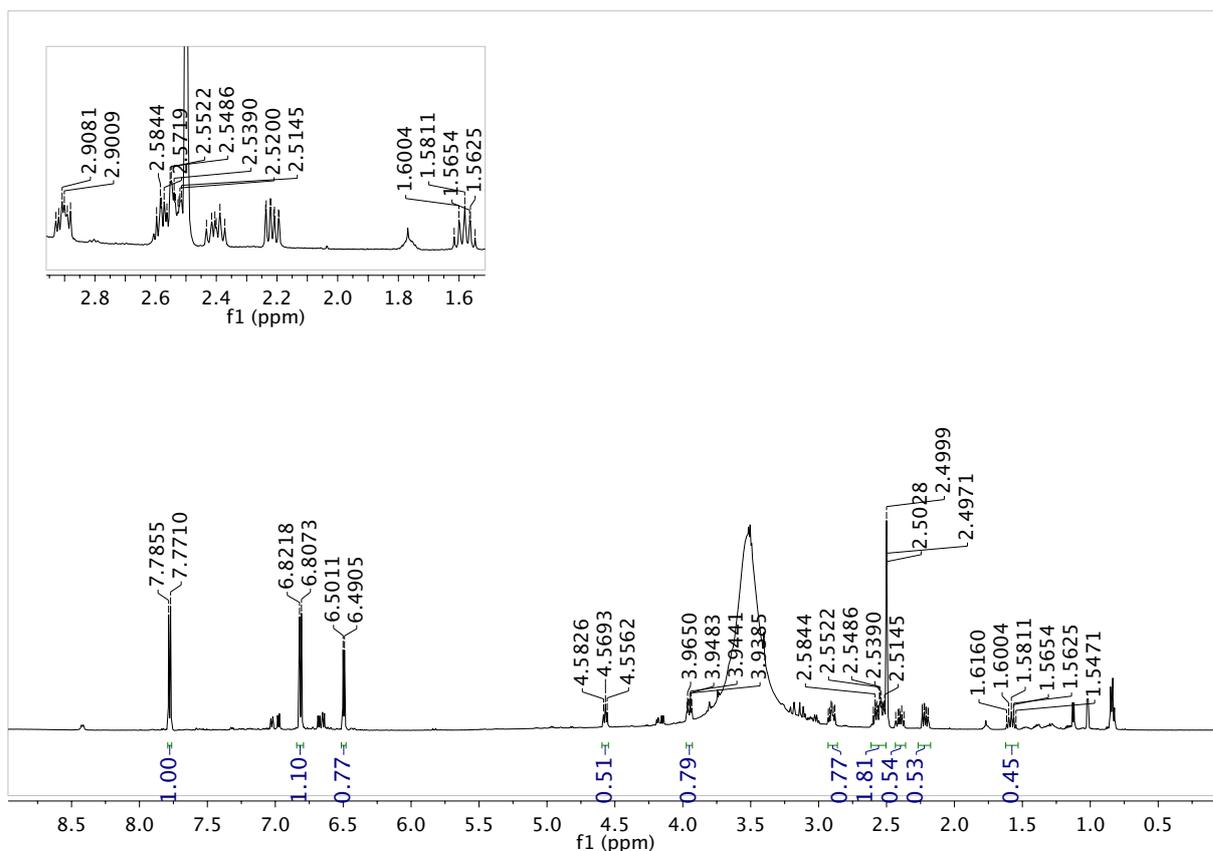
**APÊNDICE JJJJ - Espectro TOCSY 1D de 37 + 38 + 39 com irradiação em  $\delta$  4,18 (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)**



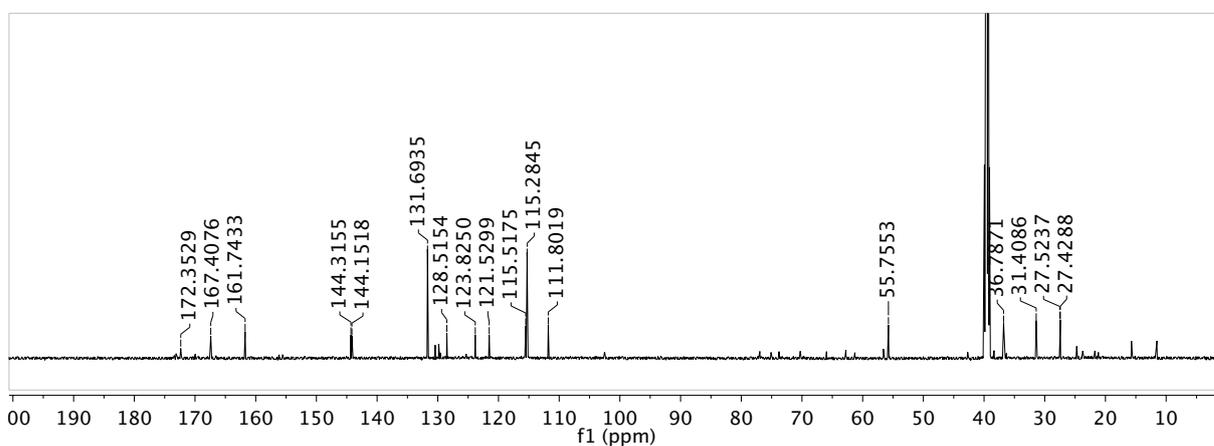
**APÊNDICE KKKK - Mapa de contornos HMBC de 37 + 38 + 39 (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)**



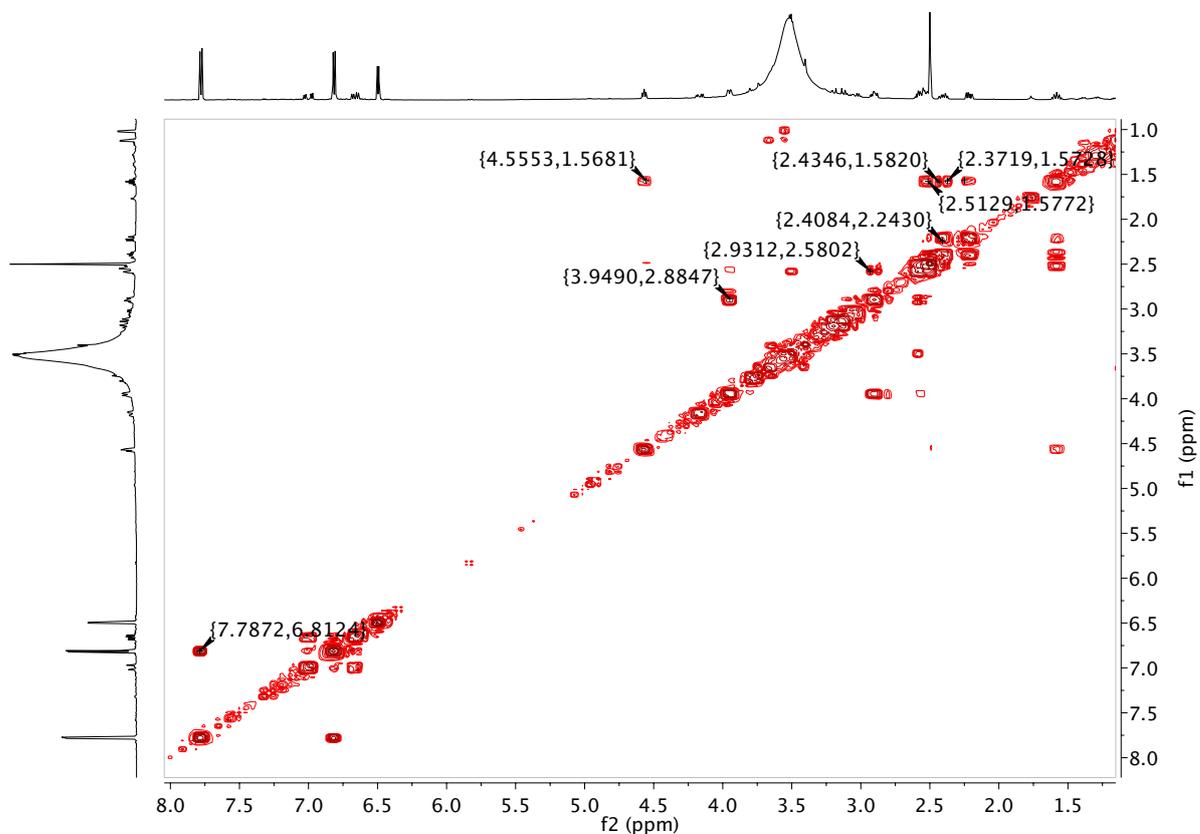
APÊNDICE LLLL - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **40** + **41** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



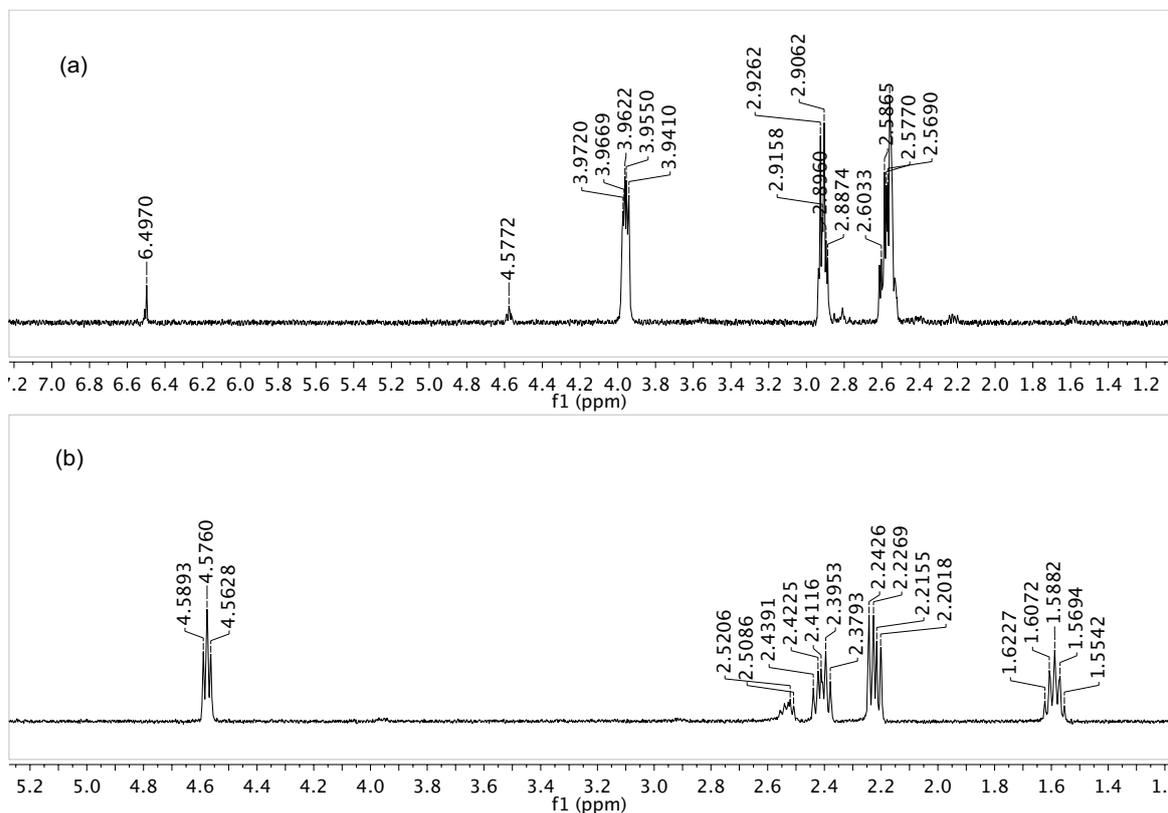
APÊNDICE MMMM - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **40** + **41** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



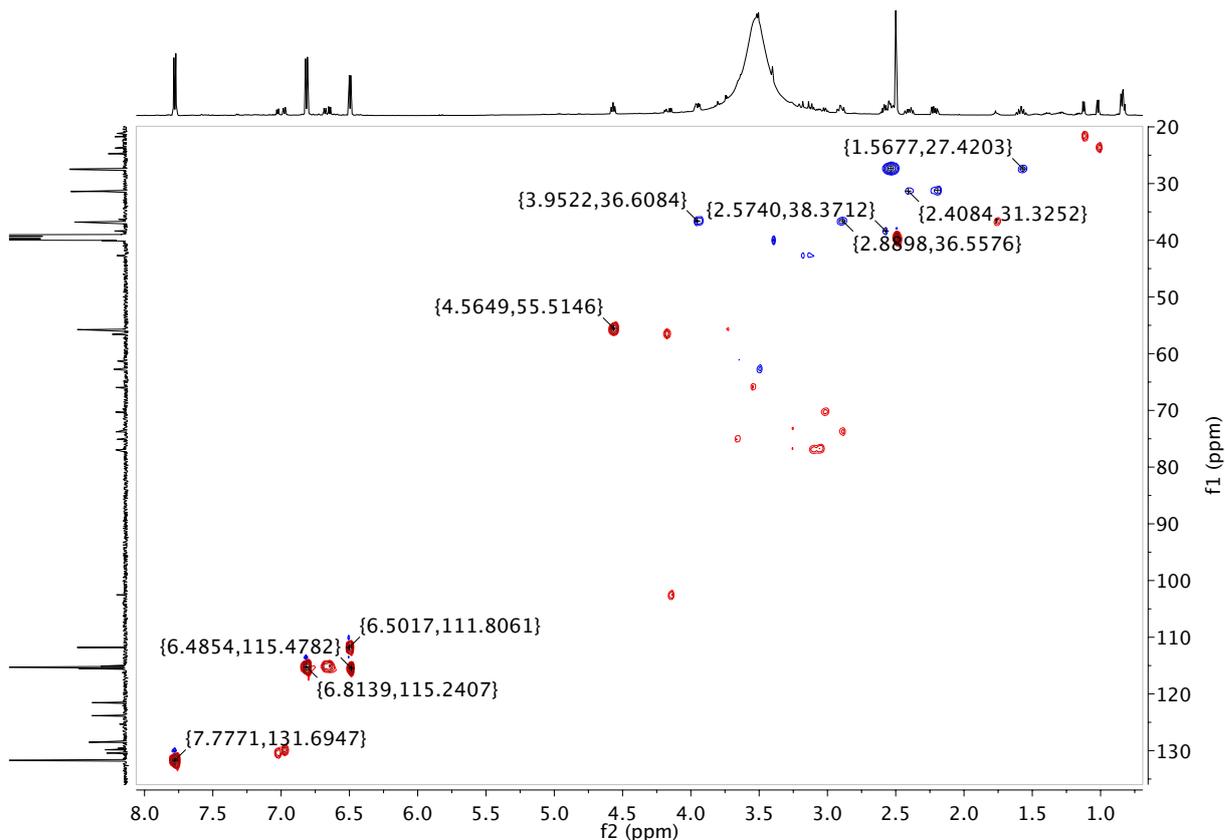
APÊNDICE NNNN – Mapa de contornos COSY  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  de **40** + **41** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



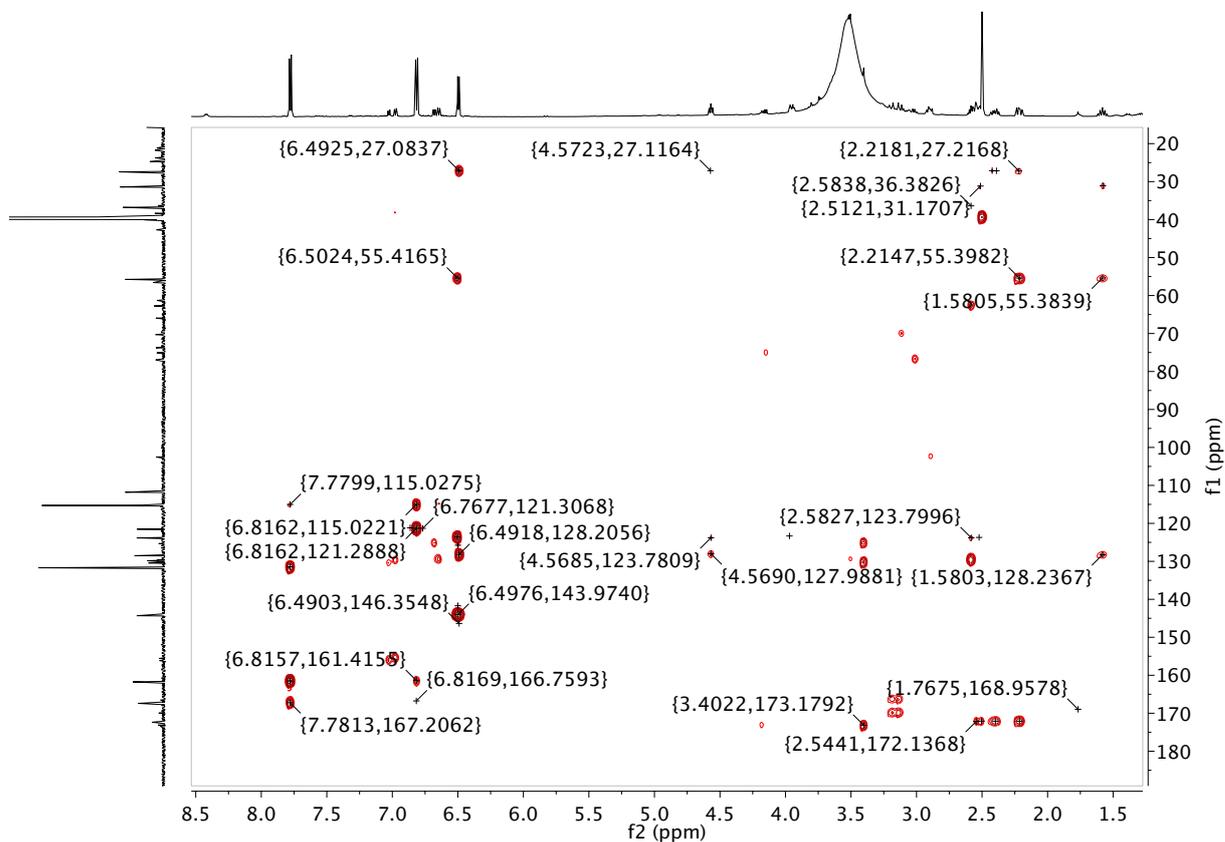
APÊNDICE OOOO - Espectro TOCSY 1D de **40** + **41** com irradiação em: (a)  $\delta$  3,96 e (b)  $\delta$  4,57 (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



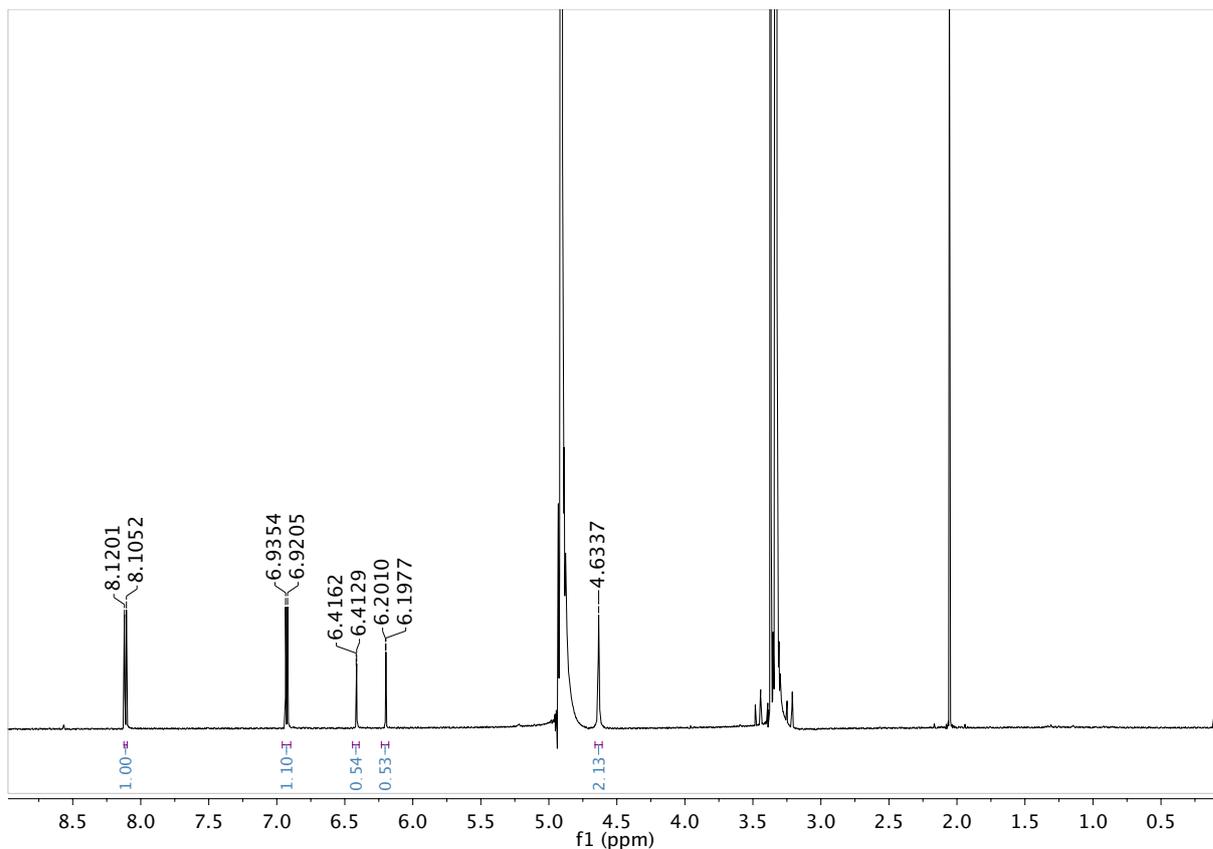
APÊNDICE PPPP - Mapa de contornos HSQC de **40** + **41** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



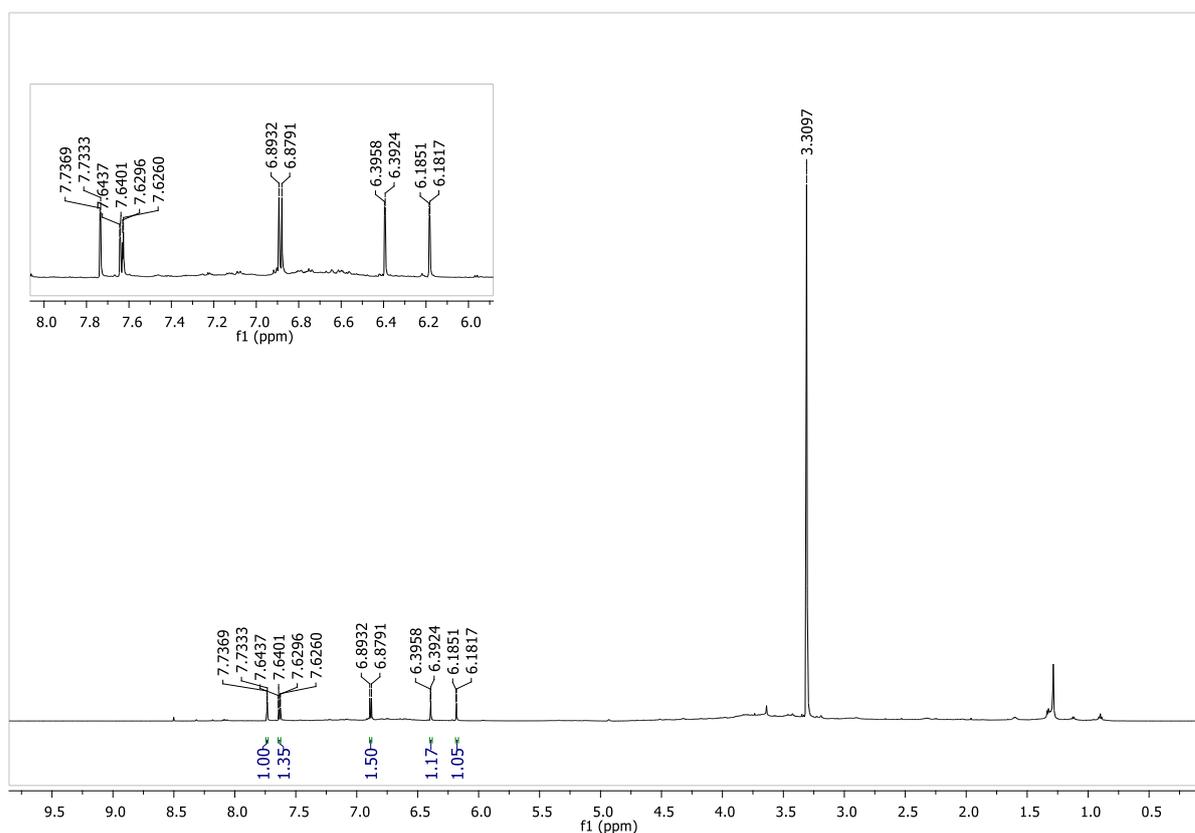
APÊNDICE QQQQ - Mapa de contornos HMBC de **40** + **41** (DMSO- $d_6$ , 14,1 T)



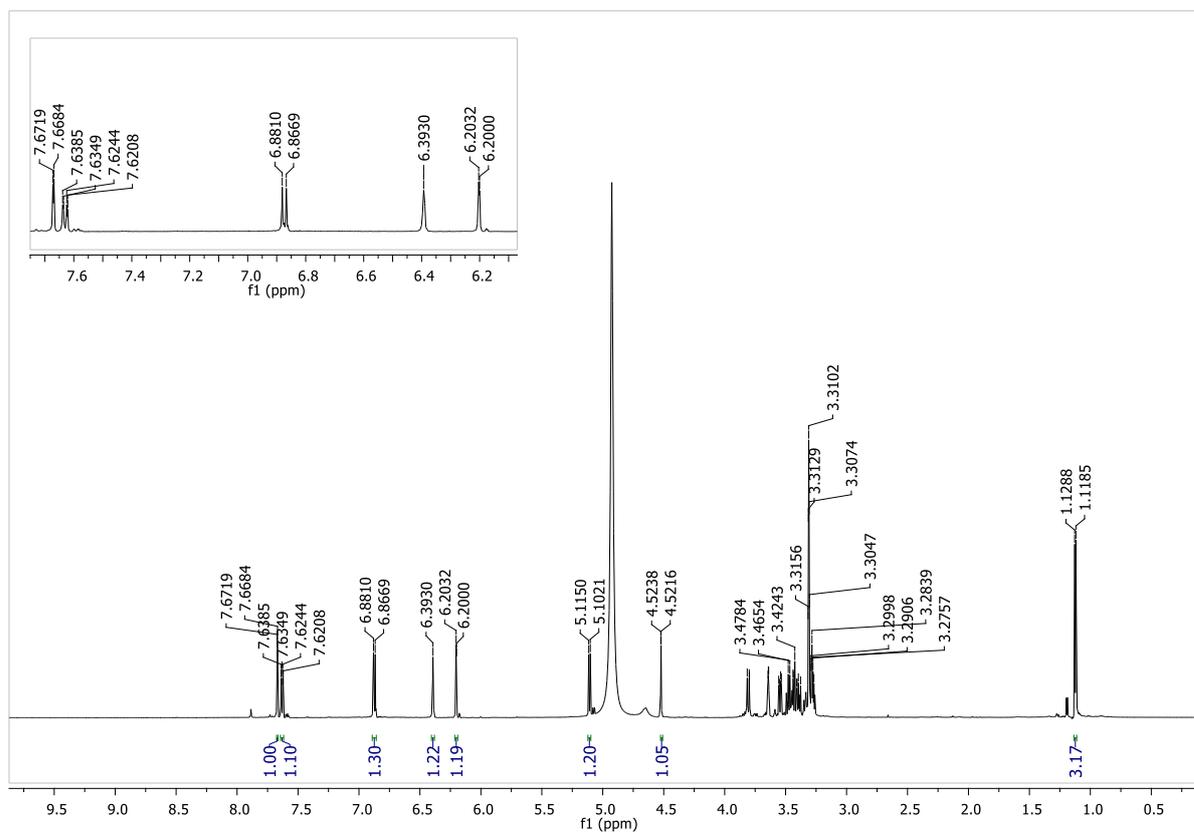
APÊNDICE RRRR - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **42** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T)



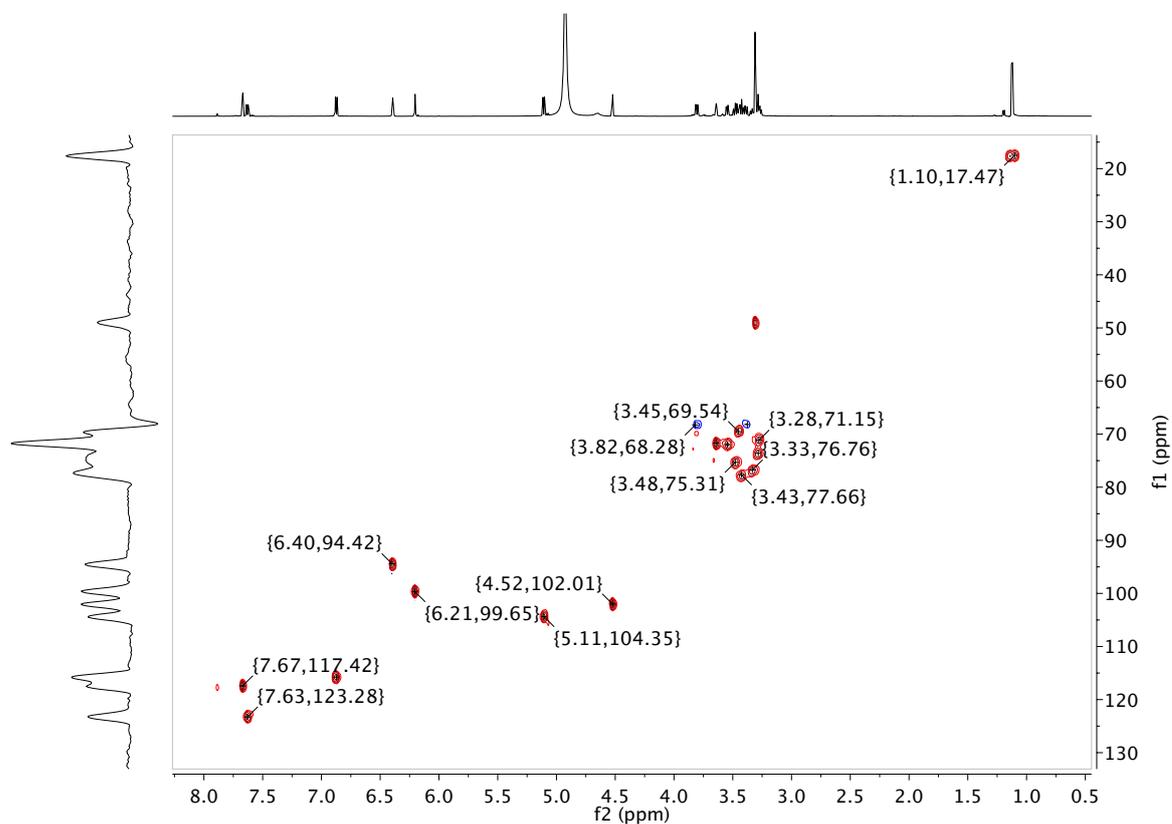
APÊNDICE SSSS - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **43** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T)



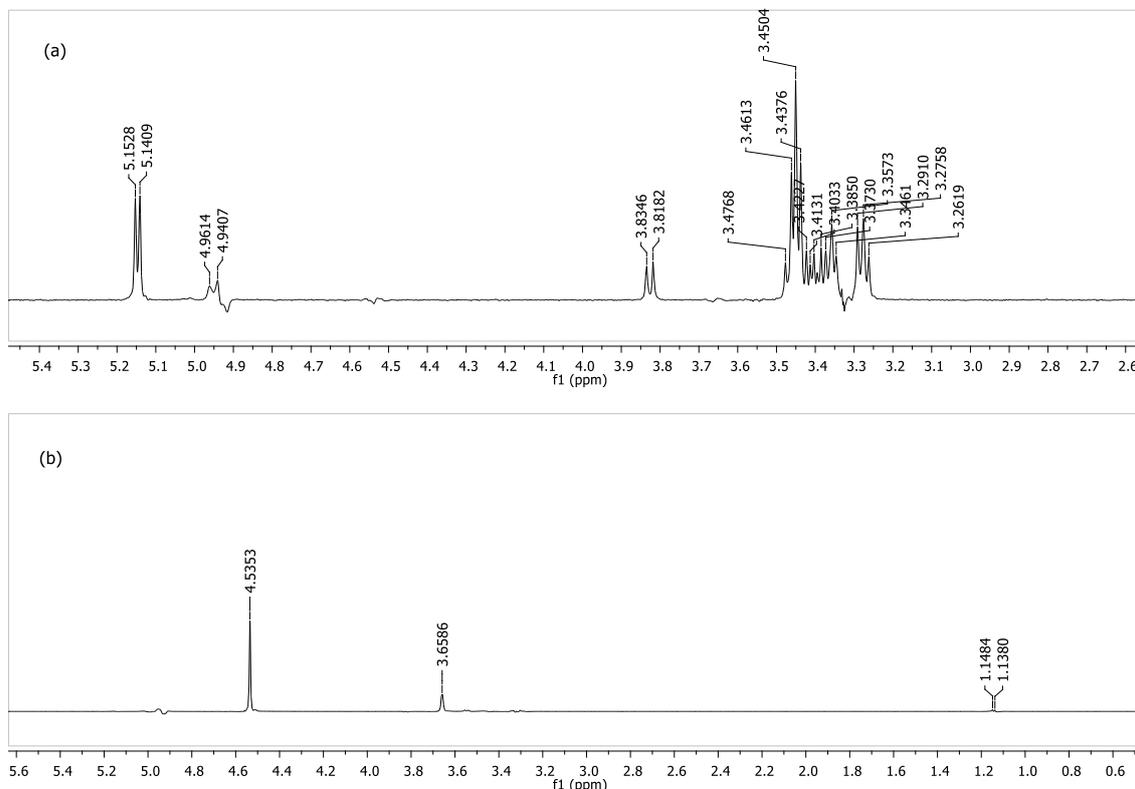
APÊNDICE TTTT - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **44** (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)



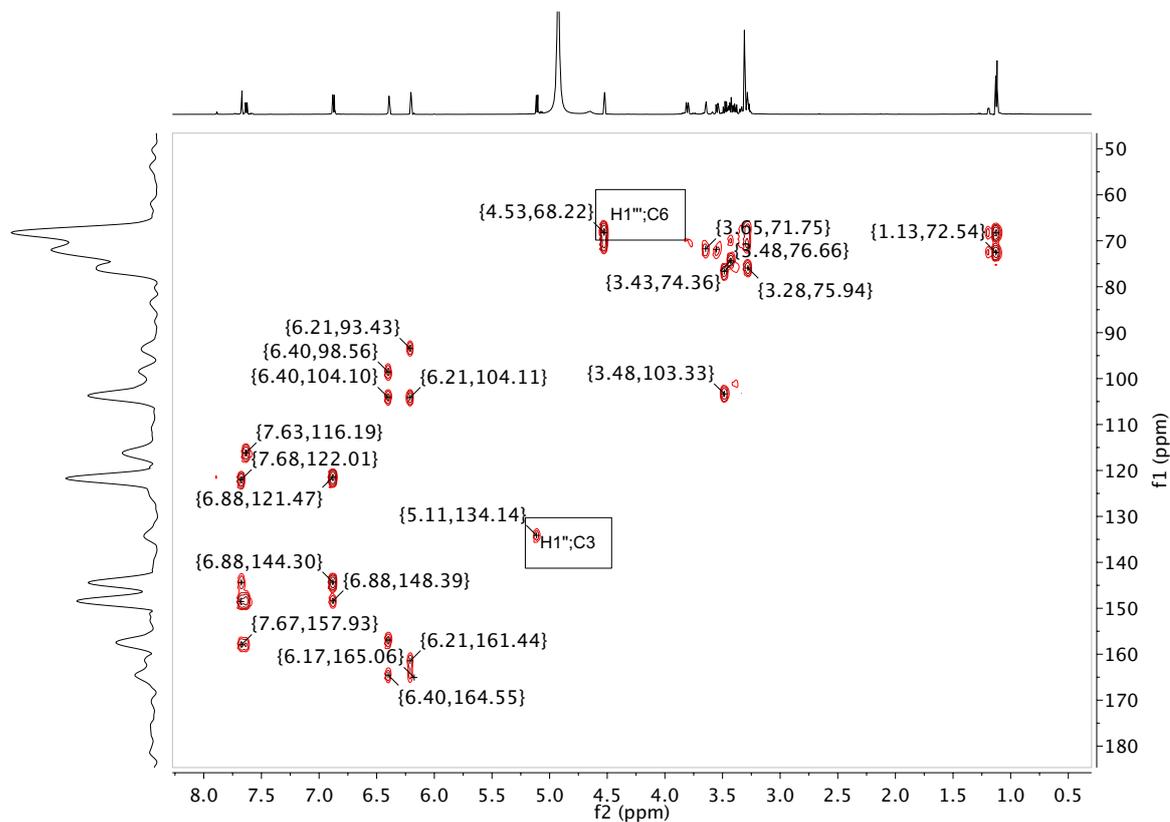
APÊNDICE UUUU - Mapa de contornos HSQC de **44** (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)



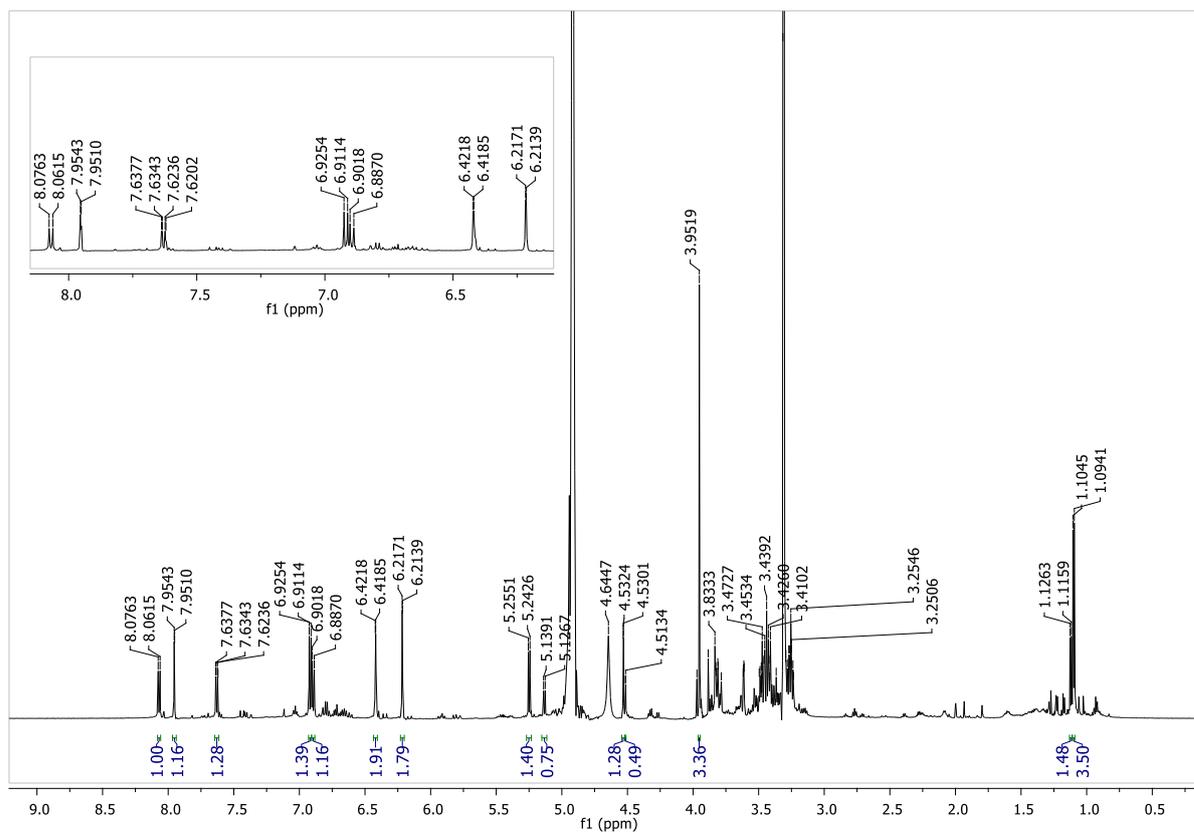
**APÊNDICE VVVV** - Espectro TOCSY 1D de **44** com irradiação em: (a)  $\delta$  5,11 e (b)  $\delta$  4,52 (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)



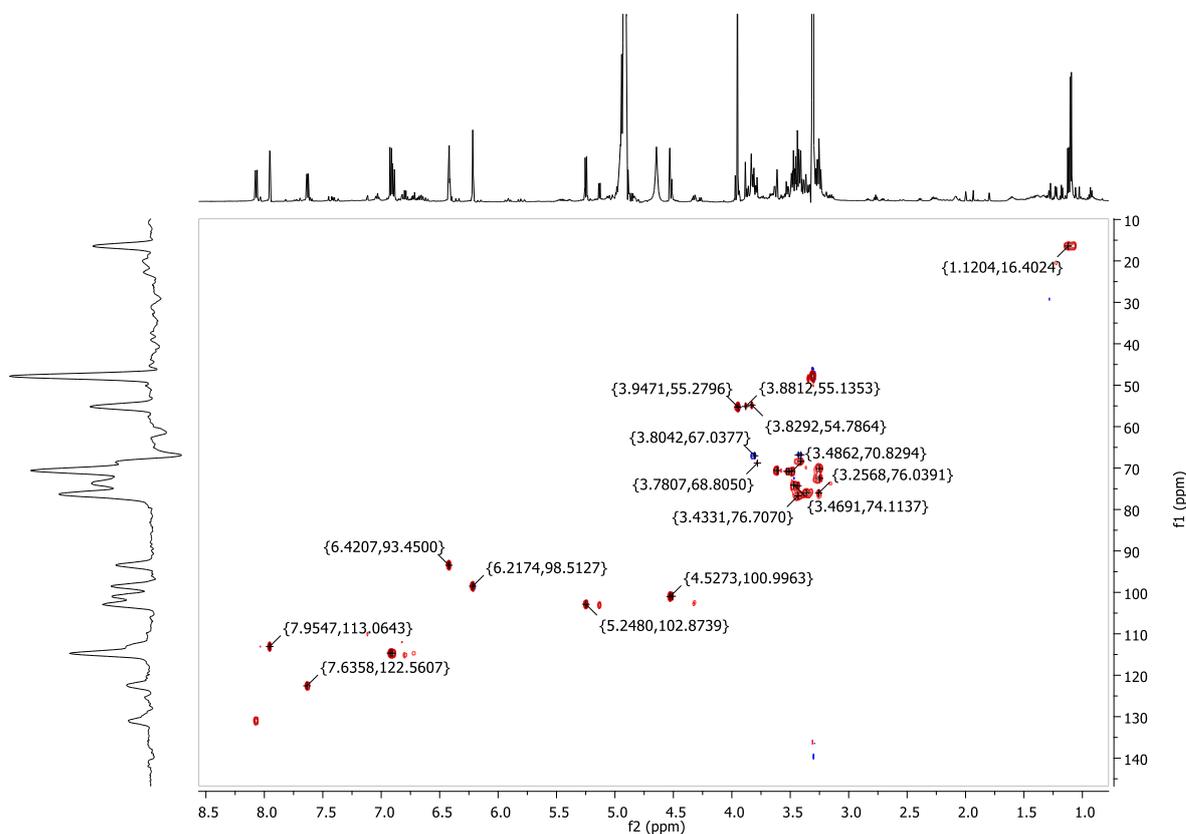
**APÊNDICE WWWW** - Mapa de contornos HMBC de **44** (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)



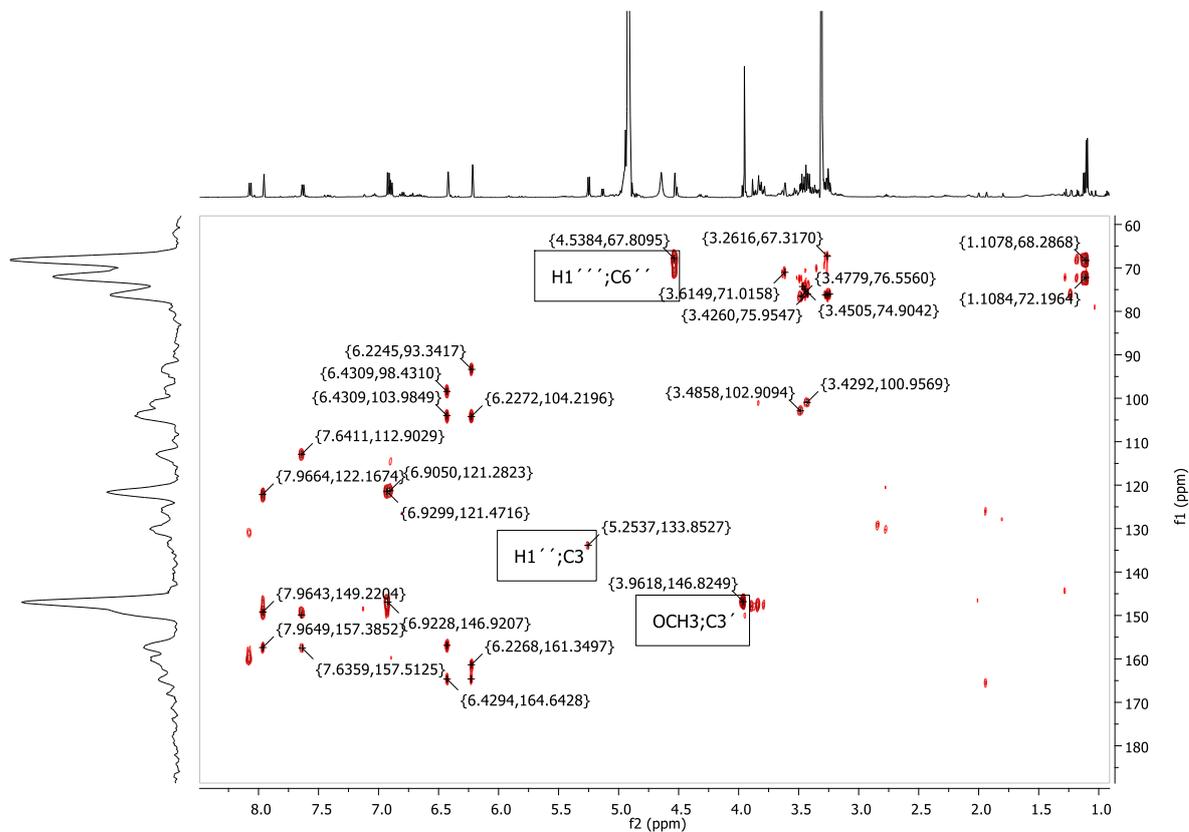
APÊNDICE XXXX - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de 45 + 46 (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)



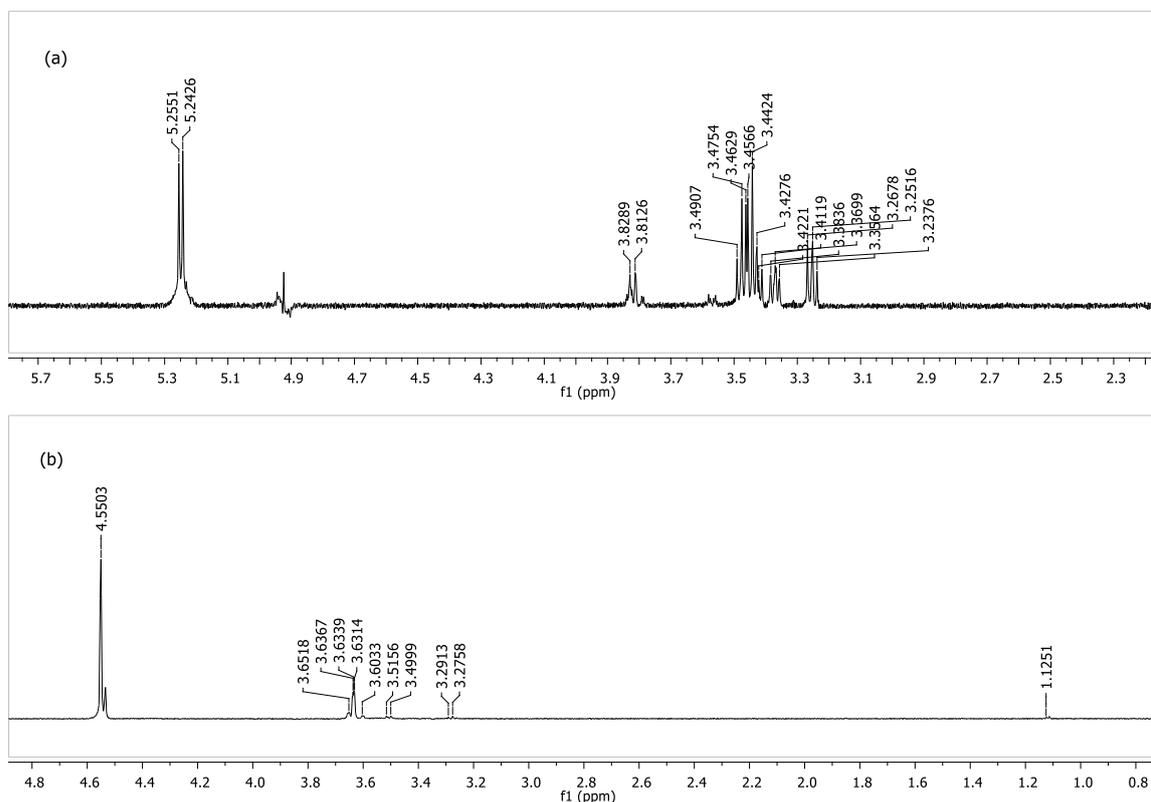
APÊNDICE YYYY – Mapa de contornos HSQC de 45 + 46 (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)



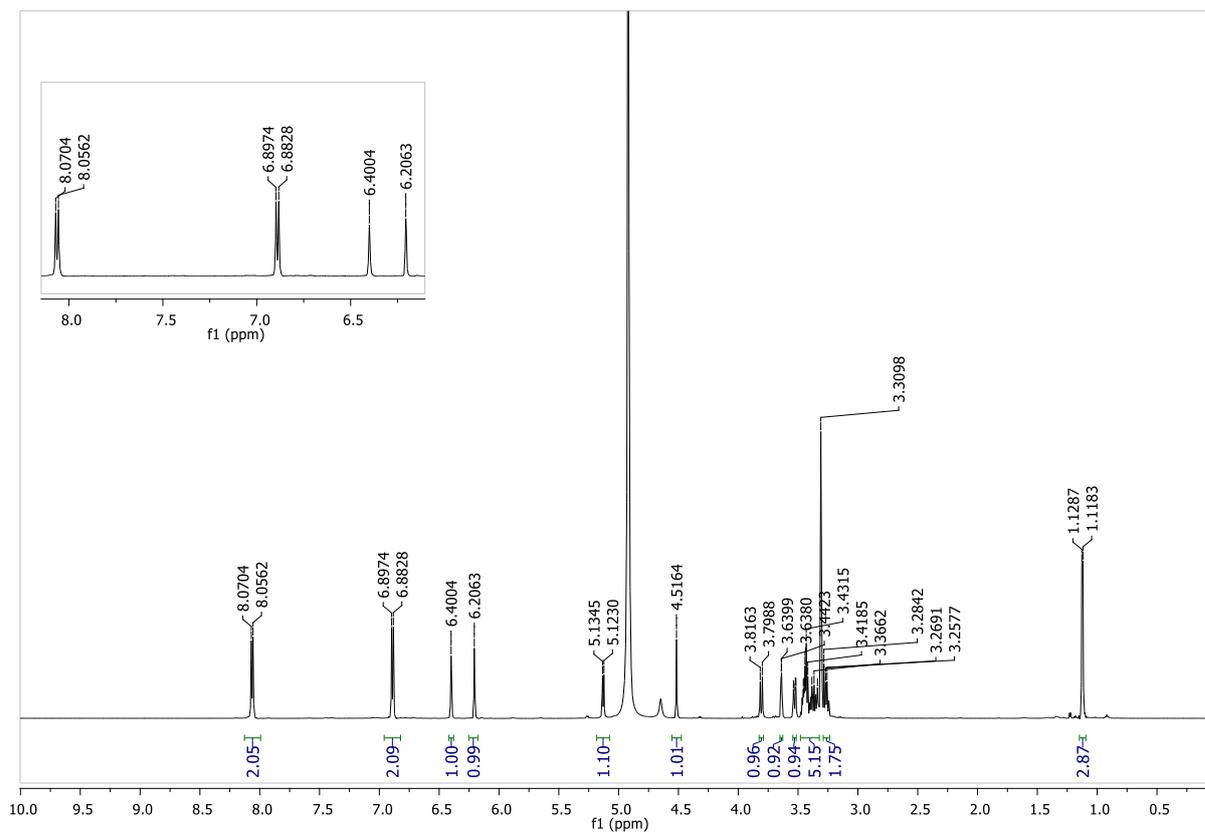
APÊNDICE ZZZZ - Mapa de contornos HMBC de **45** + **46** (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)



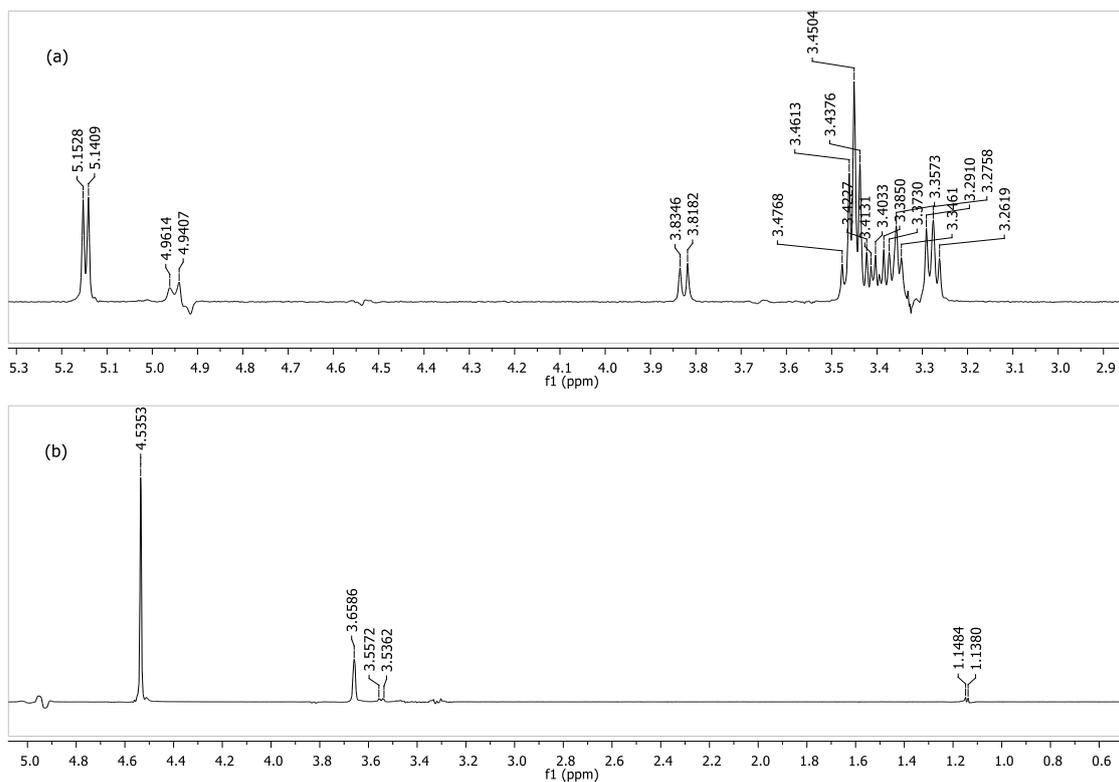
APÊNDICE AAAAA - Espectro TOCSY 1D de **45** + **46** com irradiação em: (a)  $\delta$  5,25 e (b)  $\delta$  4,53 (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)



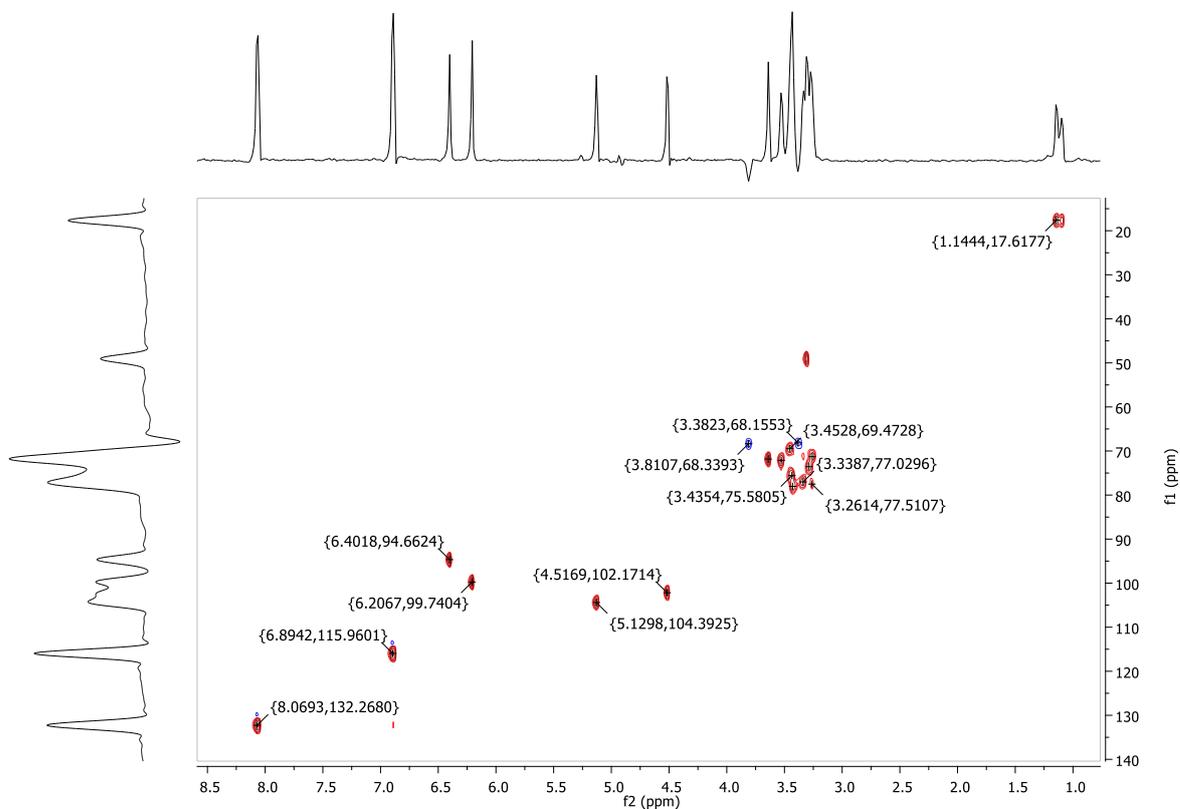
APÊNDICE BBBB - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **46** (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)



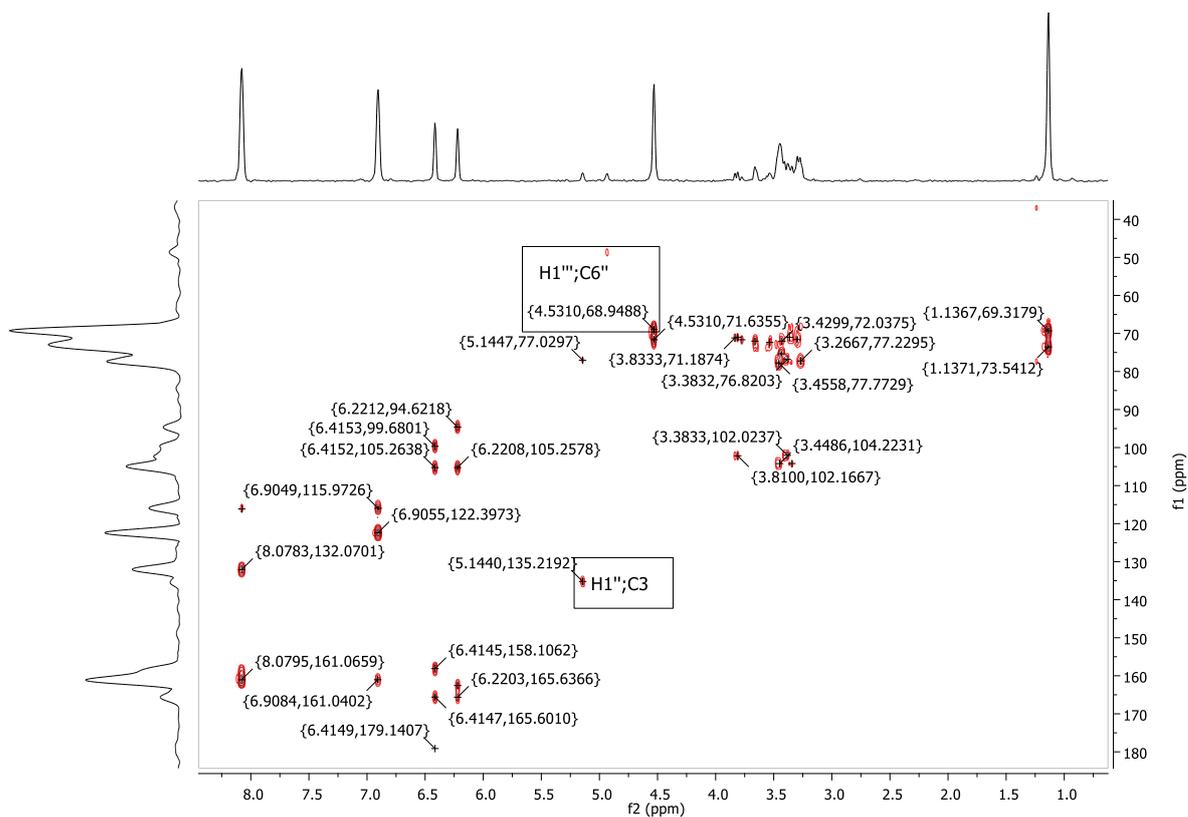
APÊNDICE CCCC - Espectro TOCSY 1D de **46** com irradiação em: (a) δ 5,13 e (b) δ 4,52 (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)



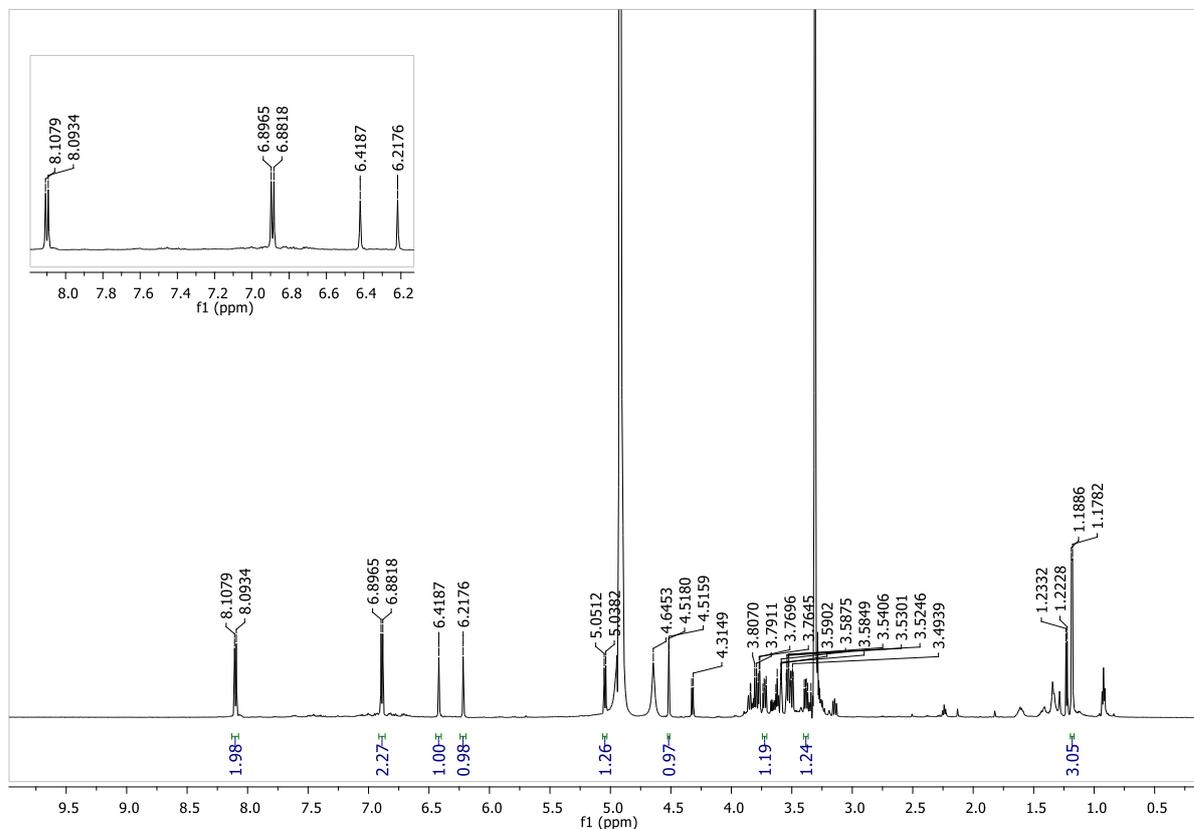
APÊNDICE DDDDD - Mapa de contornos HSQC de **46** (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)



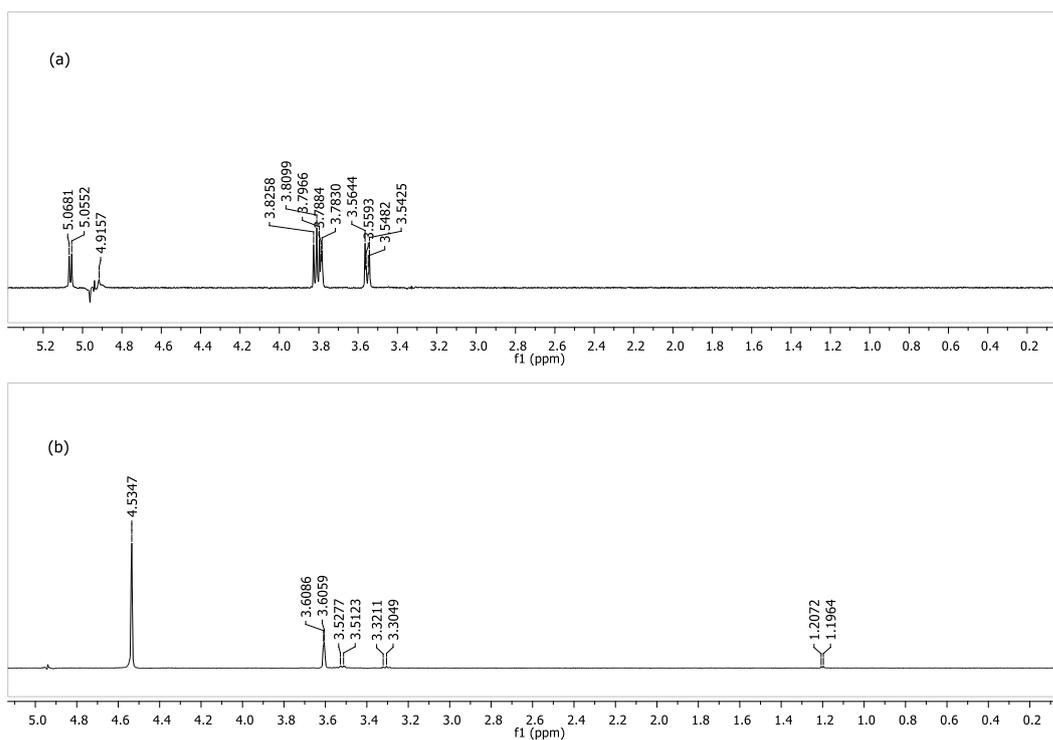
APÊNDICE EEEEE - Mapa de contornos HMBC de **46** (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)



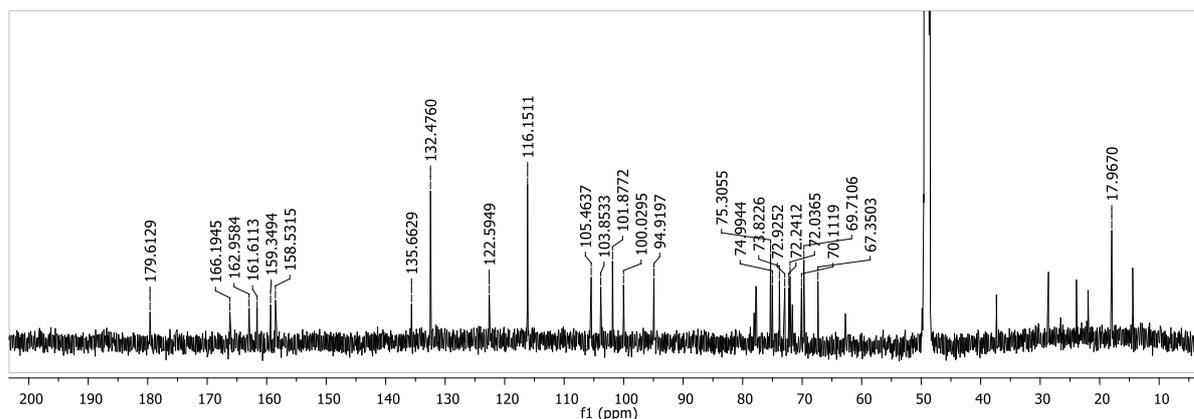
**APÊNDICE FFFFF** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **47** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T)



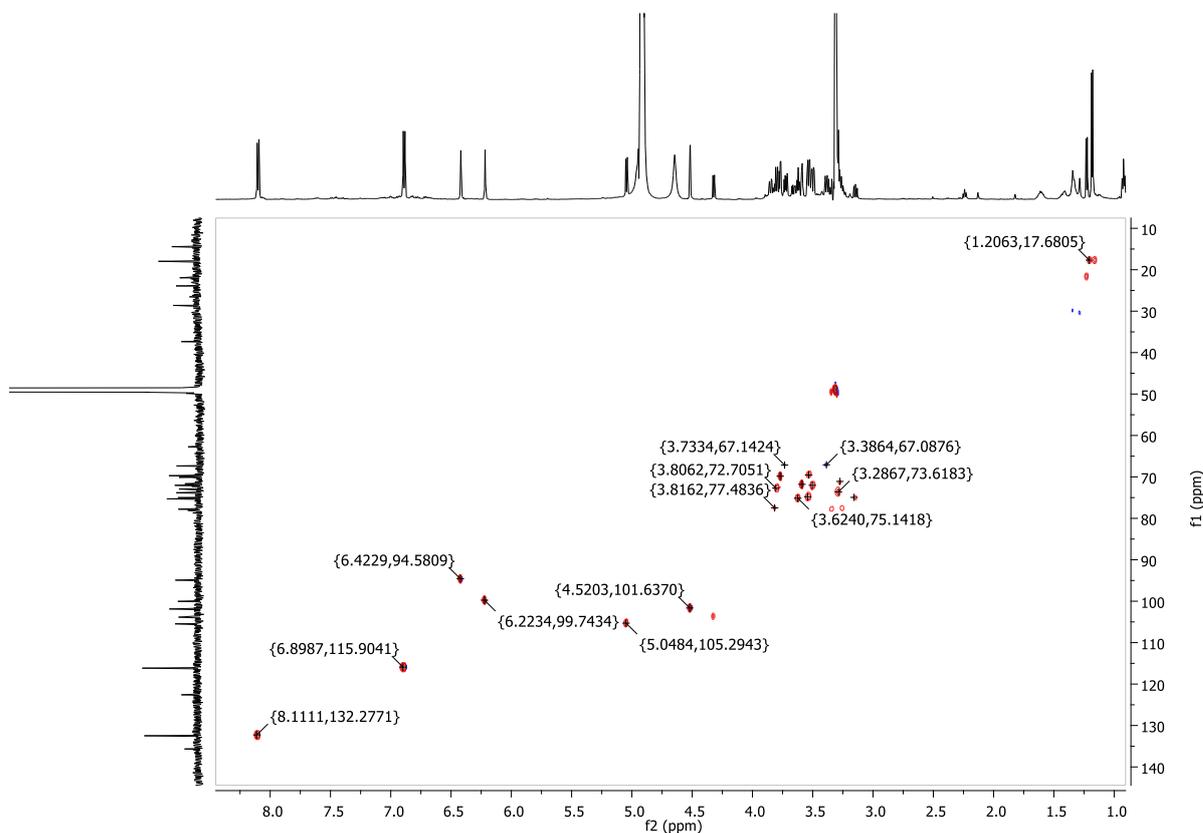
**APÊNDICE GGGGG** – Espectro TOCSY 1D de **47** com irradiação em: (a)  $\delta$  5,05 e (b)  $\delta$  4,52 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T)



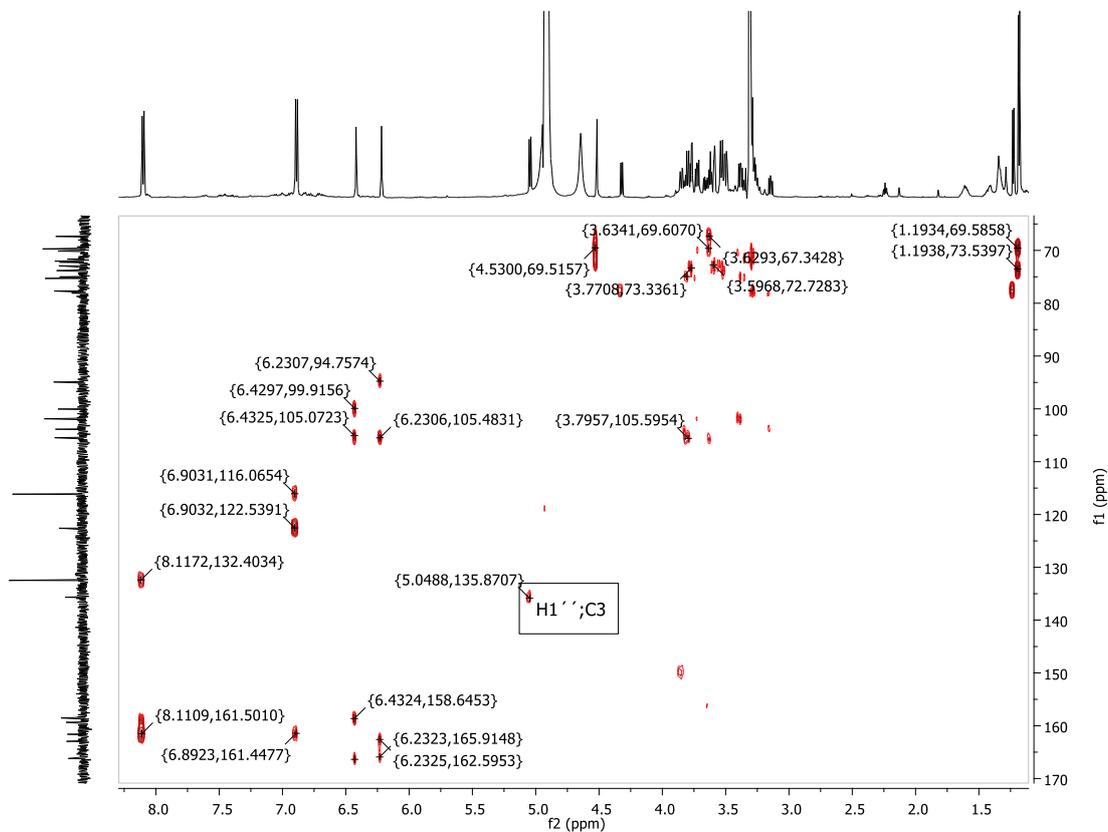
APÊNDICE HHHHH - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **47** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T)



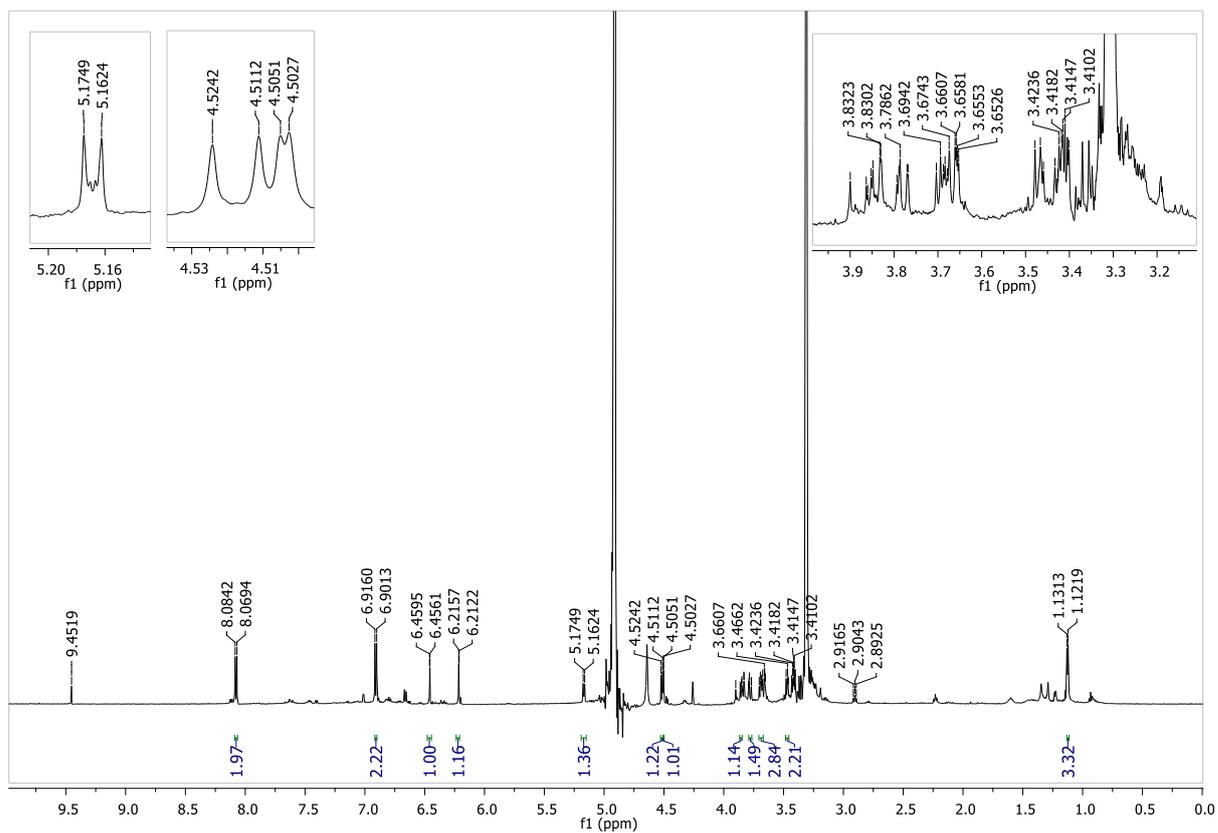
APÊNDICE IIIII - Mapa de contornos HSQC de **47** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 14,1 T)



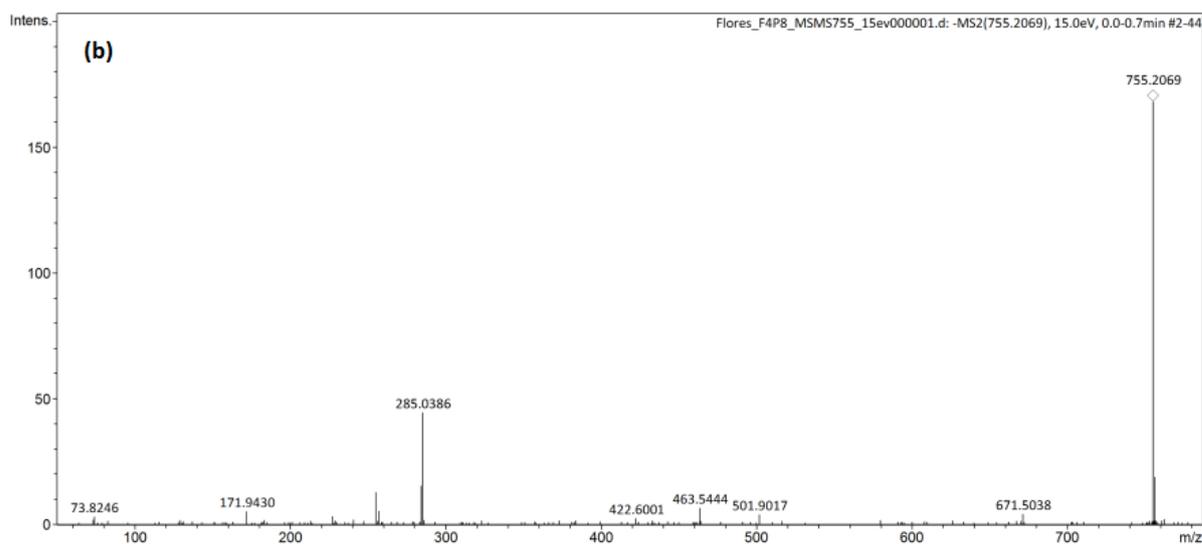
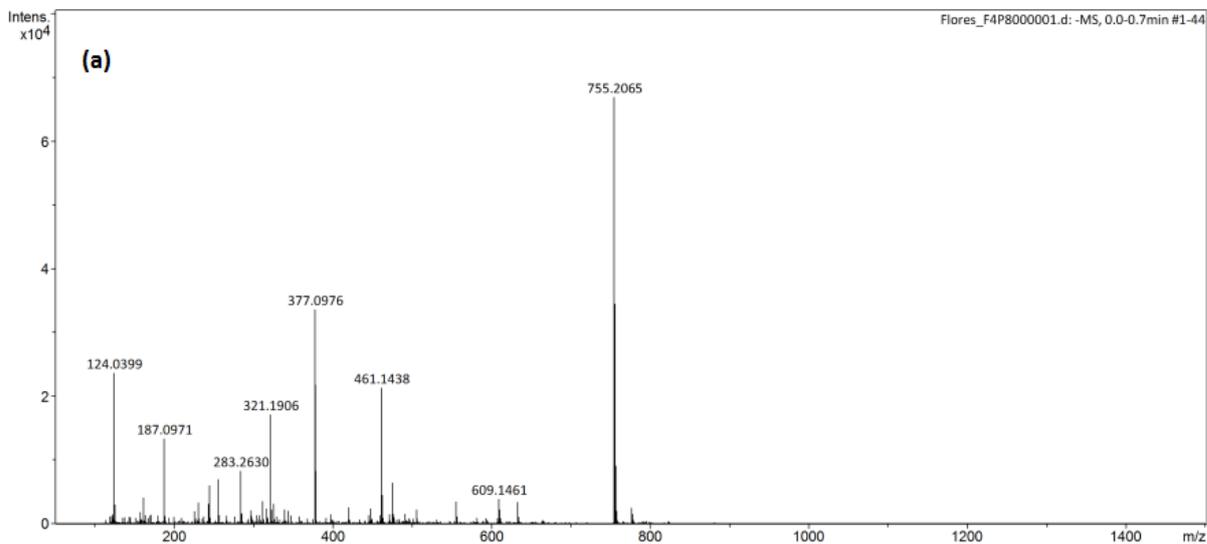
APÊNDICE JJJJJ - Mapa de contornos HMBC de **47** (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)



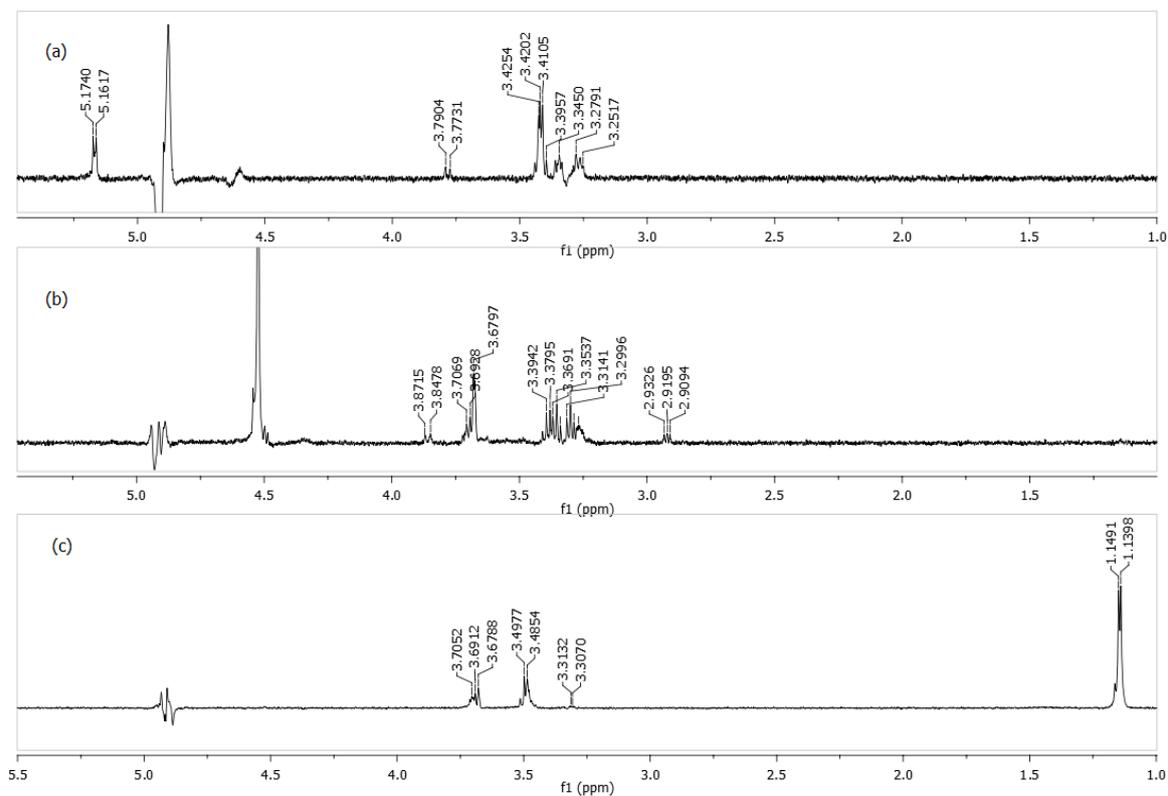
APÊNDICE KKKKK - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **48** (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)



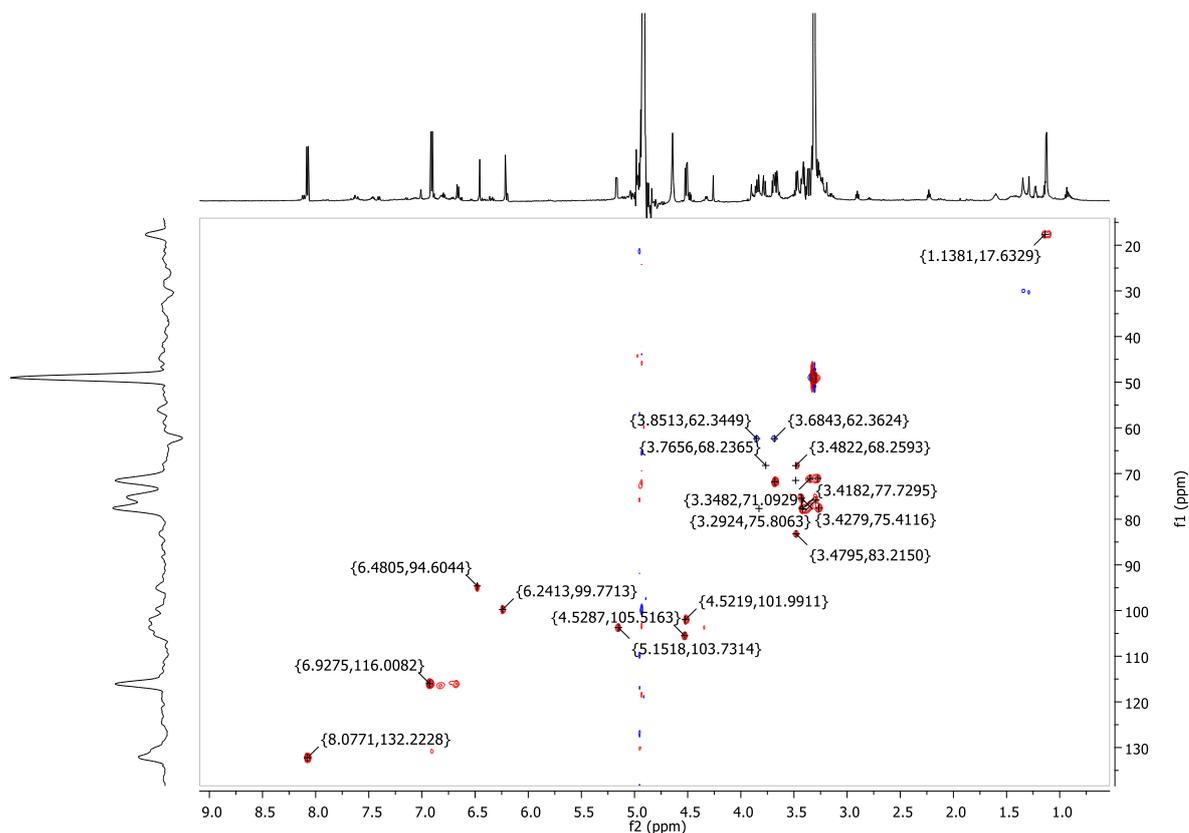
**APÊNDICE LLLLL** – (a) Espectro de massas de alta resolução de **48** (ESI, – 3,0 eV) e (b) Espectro de massas de alta resolução do íon 755,2069.



**APÊNDICE MMMMM** – Espectro TOCSY 1D de **48** com irradiação em: (a)  $\delta$  5,17; (b)  $\delta$  4,52 e (c)  $\delta$  1,13 (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)



**APÊNDICE NNNNN** - Mapa de contornos HSQC de **48** (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)



APÊNDICE OOOO - Mapa de contornos HMBC de **48** (CD<sub>3</sub>OD, 14,1 T)

