

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Stiffitia chrysantha* Mikam**

**MARCIA CRISTINA CAMPOS DE OLIVEIRA**

**1994**

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

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Stiffitia chrysantha* Mikam

MARCIA CRISTINA CAMPOS DE OLIVEIRA

SOB A ORIENTAÇÃO DOS PROFESSORES DOUTORES  
MÁRIO GERALDO DE CARVALHO E DALVA T. FERREIRA

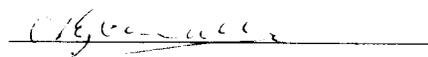
Tese submetida como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
Mestre em Química Orgânica Área  
de Concentração em Fitoquímica.  
Itaguaí, Rio de Janeiro  
- Novembro, 1994.

# ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Stiffitia chrysantha* Mikam

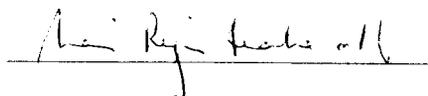
MARCIA CRISTINA CAMPOS DE OLIVEIRA

APROVADA EM: 25 / 11 /1994

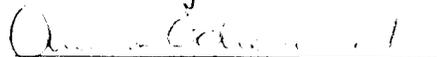
Dr.Mário Geraldo de Carvalho



Dr. Nei Regis Seabra de Brito



Dr. Aurea Echevarria A. N. Lima



Dr. Silas Varella F. Júnior (Suplente)



Aos meus pais  
Reinaldo de Oliveira e  
Eivone Campos de Oliveira

## AGRADECIMENTOS

Esta tese é o resultado de uma conjugação de afetos e amizade. Ao Professor Dr. Mário Geraldo de Carvalho pela dedicada orientação, amizade, estímulo e apoio que foram indispensáveis para a realização deste trabalho.

À Professora Dalva T. Ferreira pela valiosa colaboração.

Ao Professor Doutor Raimundo Bras Filho um reiteirado obrigado pelas múltiplas contribuições e orientações.

Ao Professor Doutor Victor Marcos Rumjanek por suas contribuições

Ao Grupo de Docentes da Pós-Graduação em Química Orgânica da UFRuRJ, a força e as observações.

Ao Professor Porfírio Jesus das Neves fico devendo por seu apoio concreto no final deste trabalho.

À Graduanda de Biologia da USP Nádia Roque, por sua atenção e ajuda em alguns tópicos desse trabalho.

À Helena de Mello, pela colaboração na confecção deste trabalho.

À Sandro Augusto da Costa Dias, pelo apoio moral e afetivo no decorrer de todo o trabalho.

Aos amigos que sempre me acompanharam nas minhas caminhadas: Marcos Antônio Maria, Margareth Rose Santos e Marcelo Silva.

Hã muitos a quem agradecer: aos meus ex- professores pela minha formaçãõ profissional; á turma de mestrado de 1992 da UFRuRJ; Aos amigos do laboratório Geizi Jane, Javier Rincón e Solange Aparecida; aos funcionários do departamento de química da UFRuRJ, pelo atendimento que me deram durante toda a minha trajetória pela universidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA

Márcia Cristina Campos de Oliveira, nascida em 01 de junho de 1969 na cidade de Duque de Caxias, RJ, filha de Reinaldo de Oliveira e Eivone Campos de Oliveira. Coursou o 1º Grau no Instituto Educacional Dom Bosco e 2º Grau no Colégio São José, tendo sido graduada em Licenciatura em Química em 1991 pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRuRJ.

Morrer não é pecado,  
pecar é deixar de viver

## SUMÁRIO

	PÁGINA
ÍNDICE DE TABELAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE ESQUEMAS	xvi
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx
CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO	
1.1- Família das Asteraceas	2
1.2Tribo-Mutisieae	4
1.2.1 - Descrição	
1.2.2- Divisão das Subtribos	
1.3- <i>Stiffitia chrysantha</i> Mikan	6
1.3.1- Sistema de Classificação vegetal de <i>Stiffitia chrysantha</i>	
1.4- Química das Asteraceae	7
1.5- Flavonóides	9
1.5.1- Em Asteraceae	
1.5.1.1- Antocianinas	
1.5.1.2-Chalconas/Auronas	
1.5.1.3-Flavonóis(ocorrência e função)	

1.5.2- Função dos Flavonóides	
1.5.3- Biossíntese de Flavonóides	
1.5.4- Técnicas usadas para o isolamento de Flavonóides	
1.5.5- Técnicas usadas na elucidação estrutural dos Flavonóides	
1.6- Importância do estudo fitoquímico de plantas que contém Flavonóides	26

## CAPÍTULO II- PARTE EXPERIMENTAL

2.1- Material vegetal e preparação dos extratos	30
2.1.1- Constituintes químicos isolados	
2.2- Metodologia e isolamento dos constituintes químicos	31
2.3- Preparação dos Derivados	32
2.4- Material e Método	33

## CAPÍTULO III- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Determinação estrutural das substâncias I e II (S-830)	36
3.2- Determinação estrutural dos derivados dos Flavonóides	39
3.3- Determinação estrutural da substância III(S-728)	41
3.4- Determinação estrutural da substância IV(S-1203)	43
3.5- Dados espectrométricos das substâncias de RMN 1D( $^1\text{H}_x$ e $^{13}\text{C}$ ) e 2D[ $^1\text{H}_x^1\text{H}$ - COSY e $^1\text{H}_x^{13}\text{C}$ - COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}(n=1,2e3)$ ]	46

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA	72
--------------------------	----

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I- Tribo Asteraceae classificadas por Bentham(1873)	4
Tabela II- Distribuição geográfica e classificação subtribal da Mutisieae	6
Tabela III- Metabólitos secundários nas tribos de Astraceae	9
Tabela 1- Atribuições dos deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ (200,13MHz) e $^{13}\text{C}$ (50,3MHz) obtidas da análise dos espectros $^1\text{D}$ ( $^1\text{H}$ e PND)e 2D [ $^1\text{H}_x^1\text{H}$ - COSY e $^1\text{H}_x^{13}\text{C}$ - COSY $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ( $n=1,2e3$ )] de S-830(I) em $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$	46
Tabela 2- Atribuições dos deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ (200,13MHz) e $^{13}\text{C}$ (50,3MHz) obtidas da análise dos espectros $^1\text{D}$ ( $^1\text{H}$ e PND) e 2D [ $^1\text{H}_x^1\text{H}$ - COSY e $^1\text{H}_x^{13}\text{C}$ - COSY $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ( $n= 1,2e3$ )] de S-830(II) em $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$	47

## PÁGINA

Tabela 3- Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ da mistura de Quercetina e Luteolina com valores descritos na literatura	48
Tabela 4- Atribuições dos deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ (200,13MHz) e $^{13}\text{C}$ (50,3MHz) obtidas da análise dos espectros $^1\text{D}$ ( $^1\text{H}$ e PND) e 2D [ $^1\text{Hx}^1\text{H}$ - COSY e $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ - COSY $^n\text{JCH}$ ( $n=1,2e3$ )] do derivado acetilado da amostra S-830 em $\text{D}_6\text{C}_2\text{O}$	49
Tabela 5- Atribuições dos deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ (200,13MHz) e $^{13}\text{C}$ (50,3MHz) obtidas da análise dos espectros $^1\text{D}$ ( $^1\text{H}$ e PND) do derivado metilado da amostra S-830(I-OMe e II-OMe) $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$	50
Tabela 6- Atribuições dos deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ (200,13MHz) e $^{13}\text{C}$ (50,3MHz) de S-728 em $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$	51
Tabela 7- Porcentagem dos acréscimos dos sinais dos prótons resultantes da irradiação dupla nas frequências dos grupos metoxílicos de S-728	52

Tabela 8- Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ do Eriodictiol com valores descritos na literatura.	52
Tabela 9- Atribuições dos deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ (200,13MHz) e $^{13}\text{C}$ (50,3MHz) obtidas da análise dos espectros $^1\text{D}$ ( $^1\text{H}$ e PND) e 2D [ $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY] do derivado IV-Ac em $\text{CDCl}_3$	53
Tabela 10- Dados de RMN $^{13}\text{C}$ (50MHz) do derivado IV-Ac, registrados em $\text{CDCl}_3$ comparados com os dados do modelo I	54
Tabela 11- Análise comparativa dos espectros de RMN $^{13}\text{C}$ - PND e DEPT( $\theta=90^\circ$ e $\theta=135^\circ$ ) e dedução dos números de átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio(multiplicidade e deslocamento químico) da substância IV-Ac	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1- Flor de <i>Stiffitia chrysantha</i>	7
Figura 2- Produtos naturais em Asteraceae	8
Figura 3- Padrões representativos de Antocianinas em Compositae, Solanaceae e Umbeliferae (Apiaceae)	11
Figura 4- Cianidina	13
Figura 5- Formação de chalcona a partir do 4- coumarato e acetato, postulado por Birch e Donavam(1953)	14
Figura 6- Rota biossintética para os Flavonóides	15
Figura 7- Isolamento de Flavonóides glicosilados de <i>Securitaca diversifolia</i>	18
Figura 8- Quercetina(I) e Luteolina(II)	38
Figura 9- Derivados acetilados e metilados de Quercetina(Ia e Ib) e Luteolina(IIa e IIb)	41
Figura 10- Eriodctiol	42
Figura 11- Estereoquímica relativa do Eriodctiol	42
Figura 12- Derivado metilado do Eriodctiol	43
Figura 13- $\beta$ -D-glicosil-Sitosterol(IV), derivado acetilado de IV (IV-Ac) e modelo com parativo(modelo I)	45

## PÁGINA

Figura 14- Espectro de infra- vermelho em pastilha de KBr de S-830	56
Figura 15- Espectro unidimensional de RMN $^1\text{H}$ (200,13MHz) de S-830 em $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$	57
Figura 16- Espectro unidimensional de RMN $^{13}\text{C}$ (50,3MHz) de S-830 em $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$	58
Figura 17- Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e hidrogênio ( $^1\text{H}_x\ ^1\text{H}$ - COSY) de S-830 em $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$	59
Figura 18- Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 ( $^1\text{H}_x^{13}\text{C}$ - COSY- $^1\text{J}_{\text{CH}}$ ) de S-830 em $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$	60
Figura 19- Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 a longa distância [ $^1\text{H}_x^{13}\text{C}$ - COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=1, 2 e 3), COLOC] de S- 830 em $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$	61
Figura 20- Espectro unidimensional de RMN $^1\text{H}$ (200,13MHz) de S-830-Ac em $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$	62
Figura 21- Espectro unidimensional de RMN de $^{13}\text{C}$ (50,3MHz) de S-830-Ac em $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$	63
Figura 22- Espectro bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio e hidrogênio ( $^1\text{H}_x^1\text{H}$ - COSY) de S-830-Ac em $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$	64

## PÁGINA

Figura 23- Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono a longa distância [ $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -COSY $^n\text{JCH}$ ( $n= 2$ e $3$ ), COLOC] de S-830-Ac em $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$	65
Figura 24- Espectro unidimensional de RMN $^1\text{H}$ (200,13MHz) de S-830-Me em $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$	66
Figura 25- Espectro bidimensional de RMN $^{13}\text{C}$ (50,3MHz) de S-830-OMe em $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$	67
Figura 26- Espectro de massas por impacto de elétrons de S-830	68
Figura 27- Espectro de infra- vermelho em pastilha de KBr de S-728	70
Figura 28- Espectro unidimensional de RMN $^1\text{H}$ (200,13 MHz) de S-728 em $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$	71
Figura 29- Espectro unidimensional de RMN $^{13}\text{C}$ (50,3MHz) de S-728 em $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$	72
Figura 30- Espectro resultante da irradiação dupla subtração de espectros (NOE) de S-728-OMe	73
Figura 31- Espectro de infra-vermelho em pastilha de KBr de S- 1203-Ac	74
Figura 32- Espectro unidimensional de RMN $^1\text{H}$ (200,13MHz) de S-1203-Ac em $\text{CDCl}_3$	75
Figura 33- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ PND e DEPT de S-1203 em $\text{CDCl}_3$	76

## PÁGINA

Figura 34- Espectro bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio e hidrogênio( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY) de S-1203 em $\text{CDCl}_3$	77
Figura 35- Espectro de massas obtido por impacto de elétrons de S-1203Ac	78

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

	PÁGINA
Esquema 1- Sequência de pulsos utilizada no experimento DEPT	21
Esquema 2- Sequência de pulsos utilizada no experimento HOMOCOSY	23
Esquema 3- Sequência de pulsos utilizada no experimento HETEROCOSY	23
Esquema 4- Sequência de pulsos utilizada no COLOC	24
Esquema 5- Sequência de pulsos utilizada no experimento NOE	25
Esquema 6- Preparção e fracionamento dos extratos das flores de <i>Stiffitia chrysantha</i>	32
Esquema 7- Fragmentação de massas da amostra S-830	69
Esquema 8- Fragmentação de massas da substância S-1203	79

## RESUMO

Um espécimen de *Stiffitia chrysantha* foi coletado no campus da Universidade Estadual de Londrina e classificada pela botânica Professora Doutora Ana Odete dos Santos Vieira do centro de ciências biológicas (CCB, UEL).

O estudo fitoquímico das flores desta planta utilizando extração com solventes orgânicos, partição com solvente, fracionamento cromatográfico e cristalização, conduziu ao isolamento da 3',4',5,7- tetraidroxiflavanona, de uma mistura de 3,3',4',5,7,- pentaidroxiflavona (Quercetina), e 3',4',5,7-tetrahidroxiflavona(Luteolina), sendo a Quercetina o composto em maior percentagem, e de um esteróide glicosilado ( $\beta$ - D glicosil-sitosterol).

As estruturas das substâncias foram determinadas com base em dados fornecidos por espectros no I.V, E.M e RMN  $^1\text{H}$ (200,13MHz) e RMN  $^{13}\text{C}$  (50,13MHz) incluindo experiências bidimensionais (2D) de correlação heteronuclear de carbono-13 e hidrogênio [ $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ - COSY-  $^n\text{JCH}$ (n=1, 2 e 3, COLOC)]. O uso destas técnicas permitiu atribuir inequivocamente os deslocamentos químicos dos átomos de carbono e afastar as dúvidas referentes aos sinais de C-5 e C-9 para a quercetina e de C-23 e C-25 para ( $\beta$ - D glicosil-sitosterol) registrados na literatura.

## ABSTRACT

From the flowers of *Stiffitia chrysantha* were isolated 3',4',5,7-tetrahydroxyflavanone (Eriodictiol), a mixture of 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone (Quercetin) and 3',4',5,7-tetrahydroxyflavone (Luteolina) and  $\beta$ -D-glycosyl-Sitosterol. These compounds were identified by their  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ , infra-red and mass-spectra. The 2D heteronuclear NMR techniques for observing coupling through one bond ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ -COSY- $^1\text{J}_{\text{CH}}$ ) and two or three bonds ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$  (n= 2 e 3), COLOC] were used to confirm the assignments of the proton's and carbon's chemical shifts and to eliminate definitively the ambiguous correlations reported in the literature for C-5 and C-9 of Quercetin and C-23 and C-25 of  $\beta$ -D-glycosyl Sitosterol.

## ***CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO***

## 1.1 FAMÍLIA DAS ASTERACEAE

As Asteraceae ou Compositae é constituída de cerca de 1.100 gêneros com aproximadamente 25.000 espécies de ampla distribuição, ocorrem frequentemente em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. São, na verdade, plantas que podem ocorrer tanto em localidades ao nível do mar como atingir os picos das mais altas montanhas, tendo invadido, com sucesso, todos os tipos de habitat.

São mais abundantes nas regiões áridas do que nas florestas tropicais úmidas. No Brasil, estão representadas por aproximadamente 180 gêneros.

Turner, em seu trabalho sobre a história e geografia das Asteraceae, chegou a conclusão de que o local de origem das Asteraceae deve ter sido a América do Sul, ao norte da região andina. Informa também que as impressões de aquênios, quase todos do Oligoceno Inferior, dão bom testemunho de sua presença nas camadas geológicas desse período<sup>1</sup>.

Várias impressões de aquênios, encontradas em depósitos terciários do Mioceno Superior da Europa Central, que puderam ser identificados e comparados com formas atuais, bem como o achado importante de um capítulo de estratos do Mioceno Inferior de Montana e que foi classificado como *Vigueira cronquist*, podem testemunhar que nesse período

já existiam Asteraceae como características bem diferenciadas como as de espécies atuais e que, portanto, elas já deveriam ter se estabelecido em data muito antiga, conquanto não tivessem deixado marcas de sua existência anterior.

As coleções polinológicas comprovam que o pólen das Asteraceae tornou-se muito abundante no testemunho fóssil do Mioceno. Se o testemunho fóssil das Asteraceae não nos dá referências muito concretas sobre o tempo e local de sua origem, informa-nos, porém, que a família já estava bem estabelecida no Oligoceno, e dá suporte à hipótese de que a família constitui um grupo muito antigo de plantas<sup>1</sup>.

Segundo Jeffrey, na obra editada por Heywood (1978), a família Asteraceae fica dividida em duas subfamílias:

I. Subfamília Lатуcoideae: Mutisieae, Arctotideae, Vernonieae, Eupatorieae, Lатуceae, Eremothamneae, Liabeae, Carduceae.

II. Subfamília Asteroideae: Senecioneae, Tageteae, Heliantheae, Inuleae, Anthemideae, Ursineae, Cotuleae, Calenduleae, Astereae.

Bentham subdividiu as Asteraceae em 13 tribos (Tabela I). Dessas 13 tribos somente duas - Astereae e Senecioneae - são cosmopolitas ou quase cosmopolitas; Cichoriae, Cynareae e Arthemideae pertencem ao Hemisfério Norte, com principais centros de dispersão nas regiões mediterrâneas e asiática central, Calenduleae e Arctoteae são africanas; Vernonieae, Eupatorieae, Heliantheae, Helenieae e Mutisieae são predominantemente americanas, com poucos tipos originados nas regiões tropicais e subtropicais da África e da Ásia. A tribo Inuleae é, em geral, do Velho Mundo, embora as subtribos Plucheineae e Gnaphalineae tenham-se estabelecido na América<sup>1</sup>.

Na grande maioria, as Asteraceae estão representadas por espécies herbáceas, anuais ou perenes, subarborescentes ou arbustivas e, só raramente por espécies arbóreas. Como exemplos de Asteraceae arbóreas citam-se espécies de *Vanillosmopsis*, *Vernonia*, *Poptocarpha*, *Eremanthus*, *Stiffitia*, *Gochnatia*, entre outras<sup>1</sup>.

TABELA I: Tribos das Asteraceae classificadas por Bentham (1873).  
A ortografia original para as tribos estão entre parenteses<sup>2</sup>.

Tribo	01	Vernonieae	( Vernoniaceae )
Tribo	02	Eupatorieae	( Eupatoriaceae )
Tribo	03	Astereae	( Asteroideae )
Tribo	04	Inuleae	( Inuloideae )
Tribo	05	Heliantheae	( Helianthoideae )
Tribo	06	Anthemideae	
Tribo	07	Senecioneae	( Senecionideae )
Tribo	08	Calenduleae	( Calendulaceae )
Tribo	09	Arctotideae	
Tribo	10	Helenieae	( Helianthoideae )
Tribo	11	Cynareae	( Cynaroideae )
Tribo	12	Mutysieae	( Mutisaceae )
Tribo	13	Cichorieae	( Cichoriaceae )

## 1.2 TRIBO MUTISIEAE

### 1.2.1 DESCRIÇÃO

Apresenta cerca de 89 gêneros e 974 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da América, África, Ásia, Austrália e Havaí, com grande concentração de gênero e espécies em regiões montanhosas e áridas<sup>1</sup>.

Dos 89 gêneros aceitos por Cabrera (1978), 67 são americanos. Dois deles, *Gochnatia* e *Trichocline*, estendem-se além da América e fazem-se representar, o primeiro por duas espécies asiáticas e o segundo por uma espécie australiana, *Gerbera*, que é natural da África e da Ásia, tem uma espécie nos Andes do Perú<sup>1</sup>.

No Brasil são registrados 22 gêneros, dos quais quatro *Stiffitia*, *Cephalopappus*, *Wunderlichia* e *Moquina* - são estritamente brasileiros; *Schlechtendalia*, *Actinoseris*, *Holocheilus* e *Pamphalea* dividem seu centro de dispersão com o Brasil, Uruguai, Paraguai e Noroeste da Argentina;

*Barnadesia*, *Dasyphyllum*, *Onoseris*, *Mutisia* e *Perezia* ocorrem no Brasil, nos Andes tropicais da Colômbia ao noroeste da Argentina; *Trixis*, *Jungia*, *Chaptalia* e *Lycoseris* são encontrados na América tropical, Estados Unidos, México, Norte da Argentina, Chile e Uruguai; *Stomatochaeta*, *Gongylolepis* e *Neblinaea* estão representados na região Norte do Brasil, Guianas e Venezuela; *Gochnatia* e *Trichocline* tem dispersão mais ampla<sup>1</sup>.

Uma característica desta tribo é o grande número de gêneros monotípicos, ou gênero com poucas espécies, que ocorrem em áreas restritas, às vezes completamente isoladas de gêneros com descrição próxima a sua. Muitos desses gêneros podem ser considerados relíquias, especialmente quando estão isolados ou quando não apresentam afinidades com outras Mutisieae da mesma região<sup>2</sup>.

### 1.2.2 DIVISÃO DAS SUBTRIBOS

Cabrera admite quatro subtribos: Barnadesinae, Gochnatinae, Mutisinae e Nassauvinae.

A subtribo Nassauvinae é provavelmente a mais natural na tribo, bem uniforme morfológicamente e ocupa uma certa área geográfica.

As três outras subtribos são mais heterogêneas e futuras investigações serão necessárias para posicionar os gêneros entre estas subtribos com um grau maior de certeza<sup>3</sup>.

Nassauvinae e Barnadesinae, são exclusivamente neotropical, a primeira na América tropical e subtropical, a segunda somente na América do Sul.

A Mutisiinae é predominantemente Americana e menos da metade dos gêneros e um quarto das espécies ocorrem fora da América. A Gochnatiinae é a mais fragmentada, extremamente distribuída, com 21 gêneros na América e 15 no Velho Mundo (Tabela II)<sup>3</sup>.

TABELA II: DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E CLASSIFICAÇÃO SUBTRIBAL DA MUTISIEAE

Subtribo	América		Velho Mundo e Havái	
	Gênero	Espécie	Gênero	Espécie
Barnadesiinae	08	91	00	00
Gochnatiinae	21	180	15	149
Mutisiinae	16	203	07	50
Nassauviinae	22	301	00	00
Total	67	775	22	199

### 1.3 *Stiffitia chrysantha* Mikan

Pertence à família das Asteraceae, apresenta-se como arbusto alto muito ramificado, liso, folhas curta-pecialadas, alternas, inteiras, agudas, rígidas; capítulos grandes, solitários com 30-40 flores hemafroditas, com corola tubulosa, pentassecta, amarelo-ouro, papo castanho-avermelhado. Ocorre desde a Bahia até São Paulo é comum nas matas do Estado do Rio de Janeiro. É muito ornamental, o arbusto carrega-se de flores vistosas servindo também para arranjos florais e são muito exploradas neste sentido. São vendidas nas feiras livres e nas casas de flores (figura 1).

Sinônimia - Pincel, Esponja de Ouro e Rabo de Cutia<sup>4</sup>



Foto de *Stiffitia chrysantha* (arbusto)– Jardim Botânico (RJ)



Foto de *Stiffitia chrysantha* (flor) – Jardim Botânico (RJ)



FIGURA 1: FLOR DE *Stiffitia chrysantha*

### 1.3.1 SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO VEGETAL DE STIFFITIA CHRYSANTHA

Classe	Magnoliatae	Subfamélia	Latucoideae
Subclasse	Asteridae	Tribo	Mutisieae
Superordem	Asteranae	Subtribo	Gochnatiinae
Ordem	Asterales	Gênero	Stiffitia
Família	Asteraceae	Espécie	Stiffitia chrysantha

### 1.4 QUÍMICA DAS ASTERACEAE

Todos os membros da família contém flavonóides e a maioria, óleos voláteis e triterpenos, mas há duas classes de produtos naturais que caracterizam o grupo : lactonas sesquiterpênicas e uma variedade de diferentes tipos de acetilenos. Esta família caracteriza-se pela ausência de ácidos aminados não protéicos, iridóides e com exceção da ocorrência de alcalóides pirrolizidínicos na tribo Senecioneae e, em menor grau em Eupatorieae, nenhuma classe maior de alcalóides tem sido registrada nesta família (figura 2).

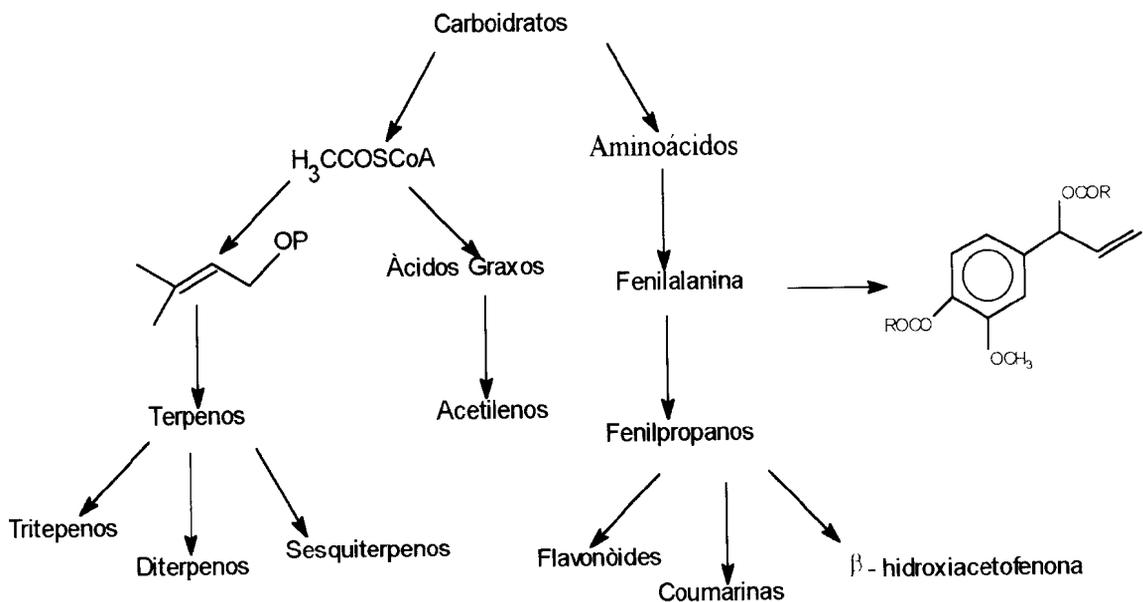


FIGURA 2: Produtos Naturais em Asteraceae

Na Tabela III há uma síntese dos principais compostos secundários nas tribos de Asteraceae. São resultados parciais mas que representam em linhas gerais, suas importâncias e frequências para o grupo, já com o fato de que lactonas e acetilenos sejam metabólitos característicos na família.

A relação de parentesco filogenético com outras famílias através de linhagens químicas, sugere as Apiaceae e Campanulaceae como mais próximas aos ancestrais de Asteraceae. As Apiaceae contém lactonas sesquiterpênicas do tipo simples e muitos acetilenos biogeneticamente similares às Asteraceae. Campanulaceae junto com Asteraceae formam os dois únicos grupos conhecidos por acumular inulina.

A linhagem química entre as tribos é variável mas todas as tribos são mais relacionadas quimicamente entre si do que com qualquer outra família<sup>2</sup>.

TABELA III: Metabólitos Secundários nas Tribos de Asteraceae.

Tribo	Poli Acet	Mono Terp.	Lact. Sesquit.	Diterp.	Outros Terp.	Latex	Alc. Pirrol.	Comp. Fenol.	Flavonoides
Eup.	•	•	•	x	•		x	•	•
Vern.	•	•	x					•	x
Ast.	•	•		•	•			•	•
Inul.	x	•	x	•	x			•	x
Hel.	x		x					•	•
Tag.	•	x			•				•
Sene.	•	•	x		•		x		•
Anth	x	x	x					•	x
Cale.	•			•	•				•
Card	x	•	x						•
Mut.									
Cich	•	•	x			x		•	
Arct	•	•	•		•				•

• Compostos comuns à família Asteraceae e em outras angiospermas.

x Compostos característicos e/ou de interesse taxônomico na família Asteraceae.

## 1.5 FLAVONÓIDES

### 1.5.1 EM ASTERACEAE

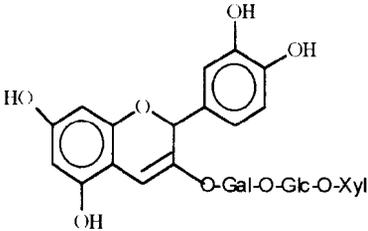
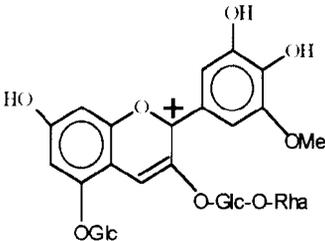
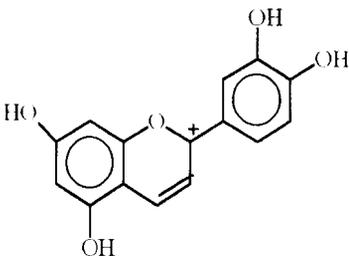
Poucos tem sido os flavonóides estudados em Asteraceae. O grupo é significativamente heterogêneo nos padrões flavonoídicos. Nas folhas flavonóis são muito comuns (quercetina 64% e kampterol 56%). Entretanto, flavonas como luteolina e apigenina são frequentes nos tecidos forais. Não há uma estrutura especial de flavonóides que possa ser associada imediatamente com a família, mas ela pode ser caracterizada por uma síndrome de características de estrutura de flavonóides:

- 1 - Padrão de Antocianina simples.
- 2 - Flavonas glicosídicas simples.
- 3 - Chalconas e/ou Auronas.
- 4 - Flavonas e Flavonóides com hidroxilas no C-6 e/ou C-8.
- 5 - Polimetilação dos grupos hidroxilas de flavonas e flavonóis.
- 6 - Ausência de hidroxila no C-5.

Tal combinação de características não é encontrada em nenhuma família que tem sido colocada próxima taxonômicamente à Asteraceae. Somente as leguminosas possuem as mesmas características<sup>2</sup>.

#### 1.5.1.1 ANTOCIANINAS

A habilidade de produzir antocianina é indubitavelmente universal na família. São importantes contribuidores para a cor das flores na maioria das Asteraceae ornamentais. O padrão de antocianinas no grupo é simples. Cianidina é a antocianidina mais frequente e a delphinidina ocorre ocasionalmente. Sua simplicidade em um grupo tão evoluído é frisada quando comparada com Apiaceae e Solanaceae (figura 3).

Antocianina	Tipo e Ocorrência
<p data-bbox="232 369 410 403"><b>Umbelliferae</b></p> 	<p data-bbox="816 369 926 403">Acilada</p> <p data-bbox="816 424 1147 457">Cianidina Triglicosídica</p> <p data-bbox="816 478 1201 516">Ocorrência: <u>Daucus carota</u></p>
<p data-bbox="248 695 400 728"><b>Solanacea</b></p> 	<p data-bbox="816 695 926 728">Acilada</p> <p data-bbox="816 749 1147 783">Malvidina Triglicosídica</p> <p data-bbox="816 804 1268 842">Ocorrência: <u>Brunfelsia calycina</u></p>
<p data-bbox="256 1066 428 1100"><b>Compositae</b></p> 	<p data-bbox="824 1037 937 1071">Simples</p> <p data-bbox="824 1083 1126 1117">Cianidina Monosídica</p> <p data-bbox="824 1117 1346 1155">Ocorrência: <u>Denchatema morifolium</u></p>

**FIGURA 3: Padrões Representativos de Antocianina em Asteraceae, Solanaceae e Umbelliferae (Apiáceae).**

### 1.5.1.2. CHALCONAS/AURONAS

Estes pigmentos ocorrem em um considerável número de famílias de vegetais e sua presença em Asteraceae pode não ser registrada como tendo muita significância flogenética. As chalconas, do ponto de vista de biossíntese e distribuição, são pigmentos primitivos, enquanto as auronas representam estado avançado nas angiospermas<sup>2</sup>.

### 1.5.1.3. FLAVONÓIS (OCORRÊNCIA E FUNÇÃO)

Contribuem para a cor amarela da flor na família. A quercetina (flavonol) dá a cor creme pálida ou branca às flores tão características de Asteraceae. Eles ocorrem em pétalas com carotenóides, onde há distribuição espacial. Os carotenóides ocorrem por cima de toda pétala enquanto os flavonóides são encontrados exclusivamente nas bases das pétalas, onde absorvem o ultra-violeta. Flavonóis funcionam na família como guias de néctar para abelhas e outros insetos visitantes<sup>2</sup>.

## 1.5.2. FUNÇÃO DOS FLAVONÓIDES.

Os flavonóides são compostos fenólicos e portanto agem como potentes antioxidantes e formam quelatos com metais. Esta propriedade é maior quando há grupo hidroxílicos em C-5 ou C-3. Os anéis aromáticos A e B, funcionam como protetores contra os raios ultra-violetas. Além dessa propriedade, agem como sinais coloridos para interação entre plantas e animais<sup>5</sup>. Eles agem contra vírus, bactérias, fungos e na alimentação, reprodução e desenvolvimento animal<sup>6,7</sup>.

Também podem interferir na germinação de sementes e reprodução das mudas<sup>8</sup>.

## 1.5.3. BIOSÍNTESE DE FLAVONÓIDES.

Trabalhos sobre determinação estrutural de flavonas, flavonóis e antocianinas, revelam que estes compostos possuem uma estrutura básica comum  $C_6 - C_3 - C_6$ <sup>9,10</sup>.

Foi sugerido que este esqueleto  $C_6 - C_3 - C_6$  é derivado de uma unidade  $C_6 - C_3$  e uma unidade  $C_6$  como é mostrada para a Cyanidina<sup>11</sup> (Figura 4).

### 1.5.3. BIOSÍNTESE DE FLAVONÓIDES.

Trabalhos sobre determinação estrutural de flavonas, flavonóis e antocianinas, revelam que estes compostos possuem uma estrutura básica comum  $C_6 - C_3 - C_6$ <sup>9,10</sup>. Foi sugerido que este esqueleto  $C_6 - C_3 - C_6$  é derivado de uma unidade  $C_6 - C_3$  e uma unidade  $C_6$  como é mostrada para a Cyanidina<sup>11</sup> (Figura 4).

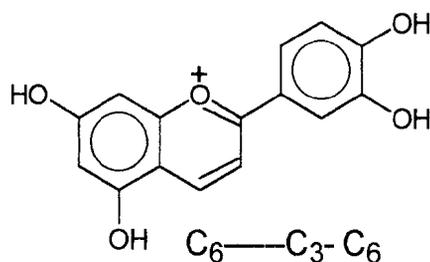
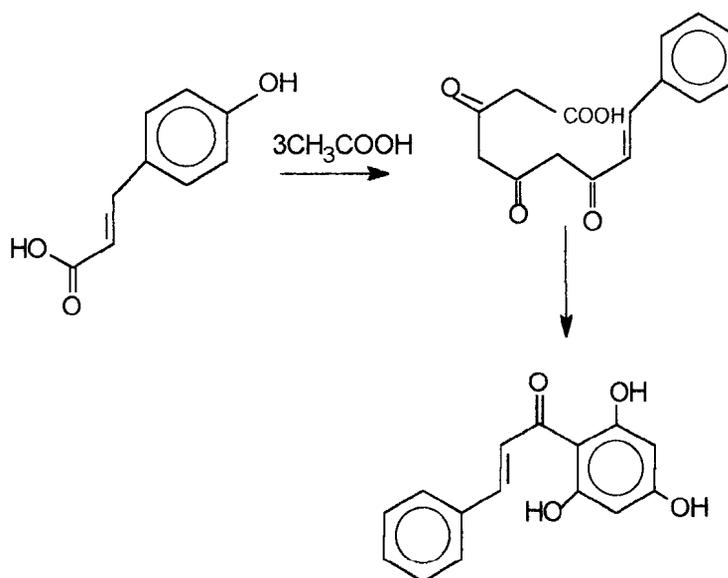


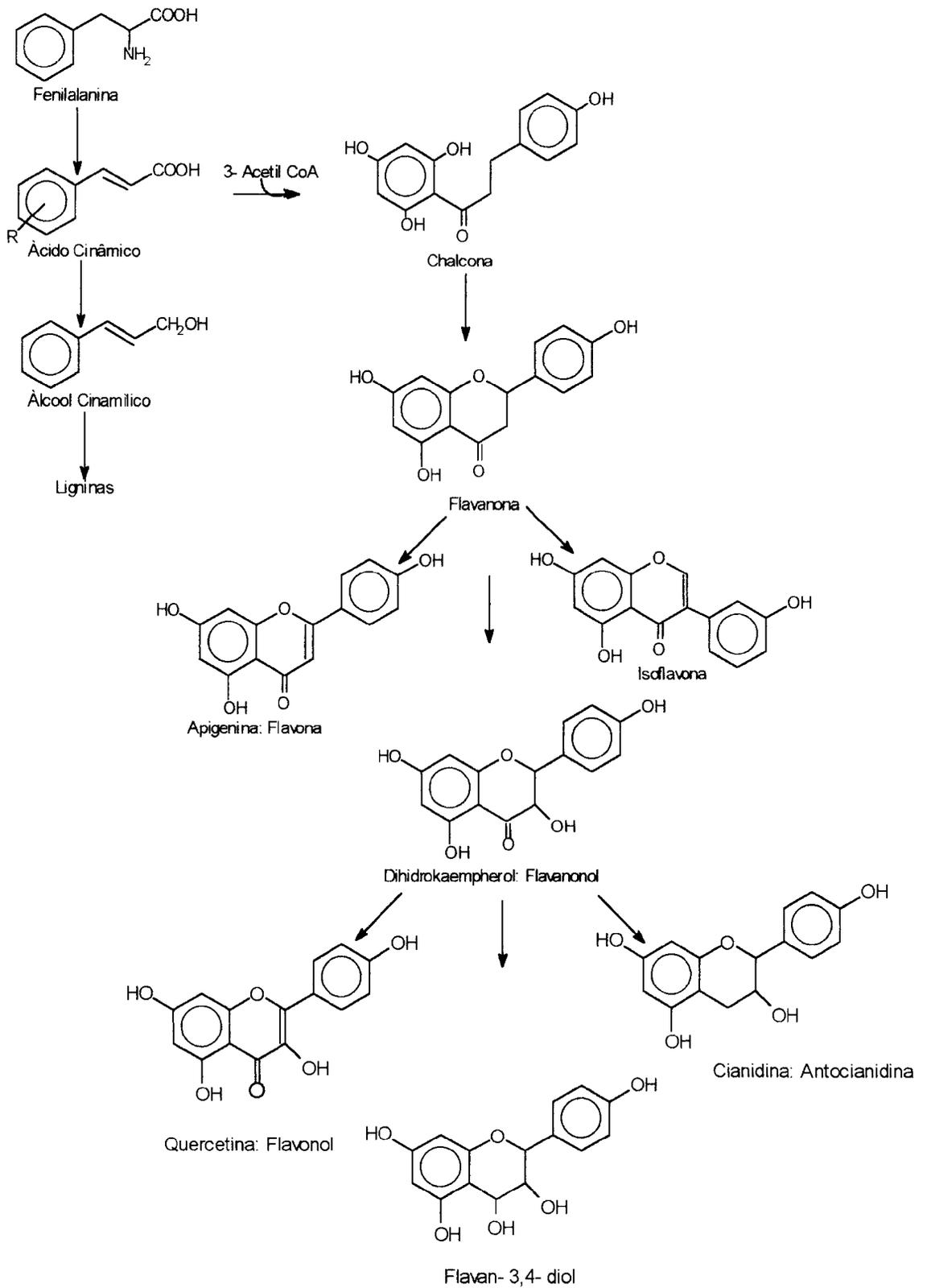
FIGURA 4: Cyanidina

Em 1953, Birch e Donovam formularam a hipótese do poliacetato para a biossíntese do resorcinol e derivados do floriglucinol incluindo flavonóides. Eles postularam que um intermediário policetoácido é formado através da adição de três unidades de acetato a uma unidade de ácido hidroxicinâmico e, daí o triceto-ácido formado ciclizaria a uma chalcona, que é o intermediário central para a formação de flavonóides<sup>12</sup> (Figura 5).



**FIGURA 5: Formação de Chalcona a partir do 4-coumarato e acetato, postulado por Birch e Donovan (1953).**

A figura 6 mostra a rota biossintética para os flavonóides e compostos afins<sup>13,14</sup>.



**FIGURA 6: Rota biosintética para os Flavonóides**

#### 1.5.4 TÉCNICAS USADAS PARA O ISOLAMENTO DE FLAVONÓIDES

A técnica de cromatografia de adsorção é muito simples, rápida e eficiente para a rotina de purificação de compostos orgânicos<sup>15</sup>.

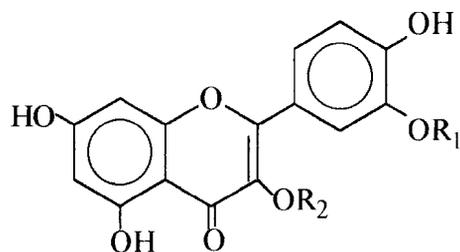
O sistema, denominado cromatografia flash, é econômico na montagem e operação além de permitir a separação de amostras com peso de 100 mg a 10 g em menos de meia hora. O método é especialmente indicado para uma separação rápida, com baixa resolução do extrato bruto da planta. A cromatografia flash é frequentemente usada combinada com o cromatotron<sup>16,17,18</sup>

Tentativas para acelerar a separação através do aumento da velocidade do fluxo da fase móvel usando a força centrífuga, foram descritos a muitos anos atrás<sup>19,20</sup>. De qualquer modo esta técnica atraiu poucos químicos. Após o início da comercialização de um instrumento chamado cromatotron, a TLC centrífuga tem tido grande interesse. A mistura (0,01 - 1 g) é separada em um disco o qual leva uma camada de sílica com 1 a 4mm de espessura. A eluição com o solvente faz com que os componentes formem bandas concêntricas, as quais são prolongadas até a borda do disco junto com o solvente. As frações são recolhidas com eficiência já que o disco do cromatotron está na posição inclinada. A TLC centrífuga foi aplicada sucessivamente para o isolamento de vários compostos fenólicos de extratos bruto de plantas<sup>21,22</sup>.

As técnicas mencionadas acima empregam uma fase estacionária sólida e uma fase móvel líquida. Como consequência, há frequentes absorções irreversíveis e decomposições do soluto na interface líquido-sólido. Para evitar

estes inconvenientes várias técnicas sem o uso de suporte tem sido desenvolvidas<sup>23</sup>. Entre estas técnicas a cromatografia contracorrente de gotejamento (DCCC) e a cromatografia contracorrente de rotação locular, já tem encontrado aplicações muito interessantes no campo dos flavonóides, taninos e outros polifenóis<sup>24</sup>. A maioria das separações em DCCC envolve compostos polares, especialmente glicosídeos, os quais são difíceis de purificar e o sistema de solvente mais utilizado é  $\text{CHCl}_3$ :  $\text{CH}_3\text{OH}$ :  $\text{H}_2\text{O}$ .

De qualquer modo, pode-se notar que a constante necessidade em separar produtos naturais utilizando grande ou pequena quantidade da mistura de maneira eficiente e rápida infelizmente não é satisfeita utilizando-se somente uma única técnica cromatográfica. Bons resultados só podem ser obtidos através de uma combinação de todas as técnicas as quais são geralmente complementares. Isto é exemplificado no isolamento de 12 flavonóides glicosilados de *Securidaca diversifolia* (Polygalacea)<sup>25</sup>. Os flavonóides puros foram obtidos pela combinação de DCCC, coluna cromatográfica com Sephadex LH-20 e cromatografia em fase reversa a baixa pressão (Figura 7).



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
1	OH	glc(2-1)glc
2	OH	glc(2-1)apiose
3	OH	glc(2-1)apiose
4	OH	glc(2-1)apiose
5	OH	ara(2-1)apiose
6	OH	Xyl(2-1)apiose
7	OH	gal
8	OH	glc
9	OH	ara
10	OH	Xyl
11	H	ara
12	OH	rha

FIGURA 7: Flavonóides glicosilados isolados de *Securidaca diversifolia*

### 1.5.5 TÉCNICAS USADAS PARA ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE FLAVONÓIDES

Geralmente são usados métodos padrões, tais como espectrometria de U.V, I.V, RMN e E.M.

A espectrometria no ultra violeta tem sido muito valiosa nos trabalhos de investigação estrutural de flavonóides.

As posições dos máximos de absorção e respectiva intensidade podem ser utilizadas para a classificação de um flavonóide<sup>26,27</sup>. Neste caso a

obtenção dos espectros de U.V<sup>28</sup> com aditivos dão informações do padrão de substituição do esqueleto. Os aditivos utilizados são:

1) Solução aquosa da NaOH 20%

A base forte é capaz de ionizar o grupo -OH localizado em qualquer posição do esqueleto flavonoídico. A inalteração do espectro U.V. indica a ausência do grupo -OH.

2) Solução de HCl concentrado (d=1.18).

A comparação entre as curvas obtidas em presença destes aditivos com a curva obtida em meio neutro, permite verificar se a modificação espectral correspondente à ionização é reversível ou não.

3) Acetato de Sódio Anidro.

Confirmada a presença de grupamento - OH através da adição de NaOH, o uso de acetato de sódio anidro proporciona a ionização somente dos grupos OH em 7 nos flavonóides. Deslocamento batocrômico de 5 a 20nm da banda II em presença de acetato de sódio é indicativo da existência de grupo -OH em C-7.

4 ) Acetato de Sódio + ácido bórico.

O ácido bórico em presença de acetato de sódio forma complexo com sistema orto-dihidroxilado. A formação de

complexos envolvendo sistema orto-dihidroxi localizado no anel B de flavonas provoca deslocamento batocrômico de ordem de 12 a 30 nm da banda I.

5) Solução etanólica de tricloreto de alumínio 5 a 10%.

O tricloreto de alumínio forma complexo com sistema orto-dihidroxi e 5-hidroxi ou 3-dihidroxi. A formação de tais complexos é revelado pelos deslocamentos batocrômicos observados nos máximos de absorção do espectro U.V. em presença deste aditivo.

5-a) Solução aquosa de ácidos aproximadamente 18%

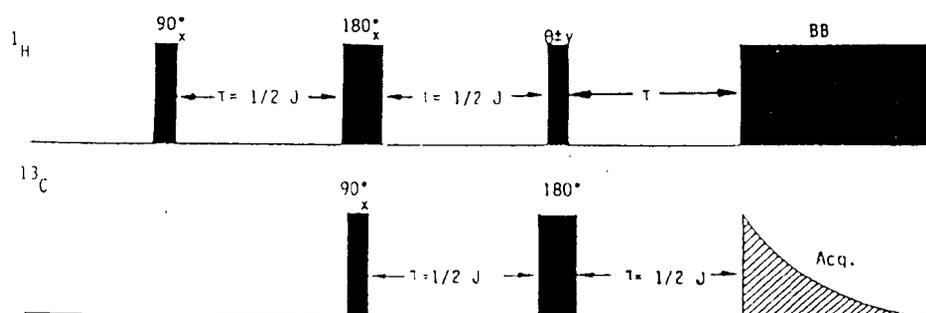
Os complexos que envolvem sistema orto- dihidroxi são decompostos pela adição de ácidos e os complexos que envolvem o grupo carbonila e o grupo hidroxila em 3 ou 5 apresentam-se estáveis com a adição de ácido.

A espectrometria no I.V., informa sobre a presença ou ausência de grupos -OH e -C=O, natureza aromática, aparecendo frequentemente 4 a 6 bandas identificáveis entre  $1625-1400\text{ cm}^{-1}$  <sup>28</sup>.

As novas técnicas de ressonância magnética nuclear atualmente disponíveis, através de equipamentos modernos, tais como: DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer),  $^1\text{Hx}^1\text{H}$  - COSY [CORrelation SpectroscopY, correlação espectroscópica homonuclear bidimensional de hidrogênio-hidrogênio],  $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ -COSY [Correlação

espectroscópica heteronuclear bidimensional de hidrogênio-carbono-13, através de uma ligação ( $^1J_{CH}$ ) e a longa distância [duas ( $^2J_{CH}$ ) e três ( $^3J_{CH}$ ) ligações, COLOC = COrrrelation Spectroscopy via LOng-range Couplings] e NOE (Nuclear Overhauser Effect) obtido por irradiação dupla e subtração de espectros<sup>29,30</sup>, tem facilitado a determinação estrutural de substâncias orgânicas.

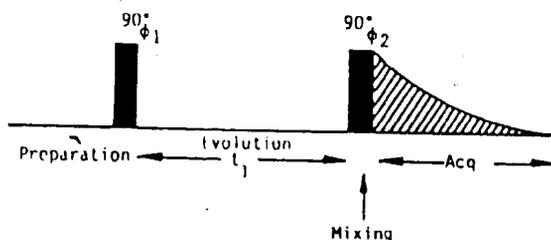
O DEPT permite reconhecer os sinais correspondentes a carbonos metínicos ( $\theta=90^\circ$ , pulso de  $90^\circ$  na modulação de  $^1H$  e aparecimento somente de sinais CH), metilênicos e metílicos ( $\theta=135^\circ$ , aparecimento dos sinais de CH e  $CH_3$  em fase oposta dos de  $CH_2$  que, após a subtração dos sinais de CH obtidos com  $\theta=90^\circ$  fornece o número de  $CH_2$  e  $CH_3$ ). Os sinais de carbonos quaternários são aqueles presentes no espectro PND (Próton Noise Decoupling, todos sinais de carbono como singletos) e não aparecem no espectro de DEPT com  $\theta=135^\circ$  (Figura 33). O esquema 1 mostra a sequência de pulsos utilizada neste experimento.



Esquema 1: Sequência de pulsos utilizada no experimento DEPT.

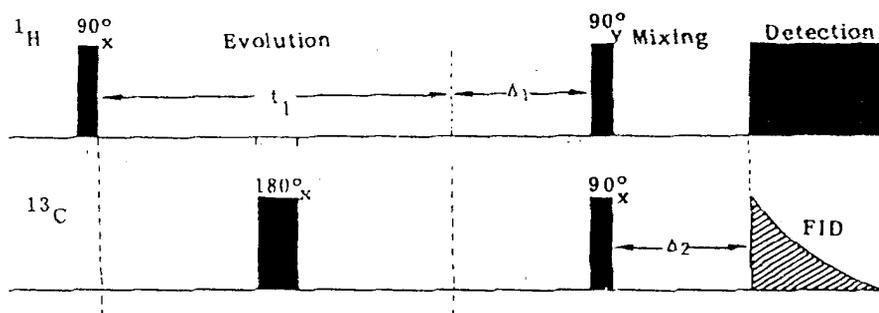
As interações spin-spin entre átomos de hidrogênio e hidrogênio e entre hidrogênio e carbono-13 são reveladas por experiências bidimensionais de correlação homonuclear ( $^1\text{Hx}^1\text{H}$ - COSY) e heteronuclear ( $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ :  $^1\text{JCH}$  e  $^2\text{JCH}$  e  $^3\text{JCH}$ ), respectivamente. O espectro  $^1\text{Hx}^1\text{H}$  - COSY mostra os sinais de interação entre hidrogênios que acoplam entre si. A sequência básica de pulso empregada na correlação homonuclear é mostrada no esquema 2. O primeiro pulso ( $90^\circ$ ) cria uma magnetização transversal no plano x'y'. Os vetores de magnetização correspondem aos diferentes prótons na molécula separados de acordo com seus deslocamentos químicos e constantes de acoplamento spin-spin. Uma segunda combinação de pulsos é então aplicada na qual  $\theta$  pode ser de  $90^\circ$  (COSY-  $90^\circ$ ),  $45^\circ$  (COSY-  $45^\circ$ ) ou algum outro  $\theta$  intermediário.

Durante  $t_1$  (tempo de evolução), a amplitude de cada próton é modulada pela frequência de todos os outros prótons aos quais ele está acoplado. Cada próton, portanto, recebe duas diferentes modulações durante  $t_1$  e  $t_2$ . Durante  $t_2$  a modulação ocorre sobre o deslocamento químico, e pela frequência de acoplamento, que também ocorre durante  $t_1$ , o próton é modulado pela frequência de todos os outros prótons aos quais ele está acoplado. Os picos na diagonal ( $\nu_1$  e  $\nu_2$ ) correspondem a diferentes modulações durante  $t_2$ , enquanto os picos fora da diagonal correspondem à modulação durante  $t_1$  <sup>31</sup>(Figuras: 17, 22 e 34).



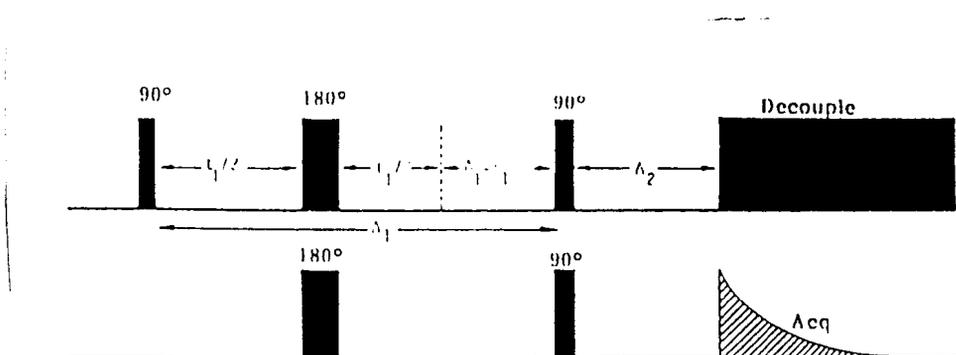
Esquema 2: Sequência de pulsos utilizada no experimento HOMOCOSY

Na correlação heteronuclear os sinais de  $^{13}\text{C}$  são modulados pelas frequências dos deslocamentos químicos dos prótons aos quais eles estão acoplados. O princípio do experimento é o mesmo utilizado na correlação homonuclear. Na correlação heteronuclear, os pulsos de  $90^\circ$  são aplicados simultaneamente nos núcleos que estão acoplados ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) (Esquema 3)<sup>31</sup> (Figura 18).



Esquema 3: Sequência de pulsos utilizada no experimento HETEROCOSY

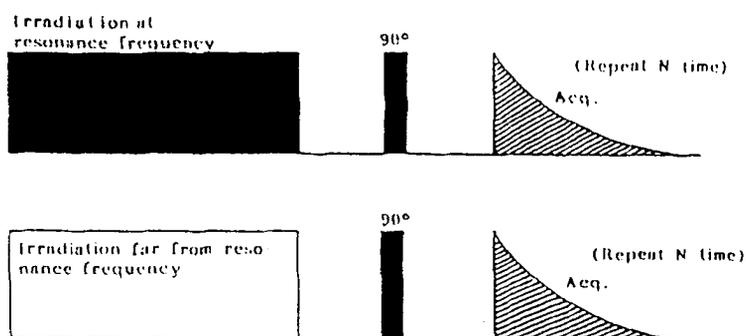
A Correlação heteronuclear a Longa distância (COLOC) permite definir, principalmente frequências de carbonos quaternários. Este experimento é similar a técnica de Heterocopy, sendo que no COLOC um pulso adicional ( $\theta = 180^\circ$ ) é fornecido simultaneamente ao próton e carbono na metade do tempo de evolução ( $t_1$ ), Esquema 4, isto gera a modulação dos sinais dos núcleos que estão distantes a duas e/ou três ligações. Esta correlação é garantida, também, pela constante de acoplamento ( ${}^nJ_{CH}$ ;  $n = 2$  e  $3$ ) entre 3 a 13Hz, utilizada na modulação.



Esquema 4: Sequência de pulsos utilizada no COLOC

Um dos mais importantes experimentos usados em RMN para determinação estrutural moderna é o NOE obtido por diferença de espectros após irradiação dupla. Esta técnica envolve duas etapas diferentes: em uma o próton é sujeito a irradiação que gera um efeito NOE (aumento de sinal) nos prótons próximos espacialmente; em outra etapa, tal irradiação é feita em uma região onde não há absorção e, portanto, não é gerada perturbação e um espectro normal é obtido. A subtração do FID perturbado do FID não

perturbado e subsequente transformação de Fourier fornece um novo espectro no qual somente os efeitos NOE são registrados. Esta técnica permite medir interações que podem inclusive ser menores do que 1%. A sequência de pulsos usada para o NOE é mostrada no Esquema 5<sup>31</sup>. O NOE identifica os hidrogênios que acoplam entre si e os que estão próximos espacialmente (Figura 30).



Esquema 5: Sequência de pulsos utilizada no experimento NOE

As informações adquiridas com estas técnicas, entre outras, torna a ressonância magnética nuclear um dos métodos de rotina mais úteis e eficientes na elucidação estrutural de flavonóides, como também de qualquer substância orgânica natural ou sintética do que quaisquer outra técnica de rotina utilizada.

A técnica de espectrometria de massas tem sido, frequentemente usada na elucidação estrutural de flavonóides e xantonas glicosiladas e outras classes de substâncias. Esta técnica informa o peso molecular, a sequência do

açúcar e a estrutura da aglicona. A E.M. usando diferentes técnicas de ionização, é muito eficiente na elucidação de flavonóides glicosilados, além da vantagem de se usar microgramas de amostra<sup>25</sup>.

## 1.6- IMPORTÂNCIA DO ESTUDO QUÍMICO DE PLANTAS PRODUTORAS DE FLAVONÓIDES

A medicina moderna alelopática utiliza universalmente 119 drogas, com estruturas definidas, que são extraídas de cerca de 90 espécies de plantas superiores. A existência de aproximadamente de 250.000 espécies de plantas superiores permite deduzir que muitas substâncias com atividade medicinal podem ser isoladas destes organismos vegetais e caracterizadas estruturalmente. O potencial químico dos organismos vivos estimula o interesse das indústrias farmacêuticas como fonte de fármacos e agroquímicos, pelo fornecimento de fungicidas e inseticidas naturais<sup>32</sup>.

Nos últimos anos, tem sido observado um interesse no estudo da atividade biológica de plantas que contém flavonóides. Pesquisas sobre ação dos flavonóides na biologia da planta, bioquímica, fisiologia, bioquímica ecológica, quimiotaxonomia, tecnologia de alimentos e farmacologia, são consideradas importantes a nível comercial.

Nos estudos da atividade biológica dos flavonóides é importante a identificação e quantificação correta dos flavonóides nos extratos da planta, até mesmo quando eles se apresentam como traços<sup>32</sup>.

Como exemplo de algumas atividades de flavonóides que justificam o desenvolvimento da pesquisa em relação a esta classe de substância, podemos citar os fatos abaixo:

- A presença das isoflavonas fonnonetina e genisteína na espécie vegetal *Trifolium subterraneum* reduz drasticamente a capacidade reprodutiva (a menos de 10%) de ovelhas. Esta informação científica assumiu importância para o desenvolvimento da pecuária australiana, com reflexo na capacidade reprodutiva para a alimentação humana<sup>33</sup>.

- A quercetina, flavonóide de ocorrência natural, apresenta atividade inibidora de crescimento e proliferação de células malignas e promoção de tumores. Recentes estudos tem indicado que a quercetina inibi a atividade de várias enzimas incluindo a CAMP(- independente proteína quimase, Ca<sup>++</sup>-fosfolípídeo dependente proteína quinase) associada com tumores mamários. Logo a quercetina possui atividade anti-tumoral e tem sido usada como parâmetro de avaliação da atividade de outros flavonóides<sup>5</sup>.

-Trabalhos recentes revelam avaliações da ação de flavonóides na luta contra os agentes da AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome). O flavonóide 7-O- $\beta$ -D- galactopiranosilacetina, isolado da espécie vegetal *Chrysanthemum morifolium* (Asteraceae), revelou atividade anti-HIV (Human Immunodeficiency Vírus). Esta planta é utilizada na medicina popular da China, conhecida como "Ju-Hua", e aparece descrita no dicionário de medicina chinesa com atividade anti-bacteriana, anti-fúngica, anti-viral e anti-inflamatória. Foram isolados oito flavonóides desta planta. Além destes os autores do artigo testaram mais treze conhecidos: quatro flavonas, quatro flavonóis e cinco flavanonas. A flavona crisina revelou-se mais eficiente do que o 7-O- $\beta$ -D- galactopiranosilacetina mostrando maior atividade e menos tóxica. A comparação dos resultados da luteolina e quercetina, mostrou que a adição de um grupo hidroxila no C-3 reduz drasticamente a atividade<sup>34</sup>.

Diversos flavonóides foram isolados de plantas brasileiras e a avaliação de atividade biológica da maioria destas substâncias naturais permanece na dependência de investigação biológica.

As próximas fases da química de produtos naturais relacionado com metabolismo secundário não devem se restringir à descoberta de novas estruturas e catalogação dos constituintes das espécies estudadas. Devem, no entanto, desenvolver para investigar exhaustivamente as propriedades farmacológicas e ecológicas de metabólitos secundários isolados. E, inclusive, explorar a capacidade bioprodutiva de cultura de células e tecidos e, também, investigar microorganismos em meios de cultura preparados artificialmente. A biopreparação de produtos com estereoquímicas definidas, incluindo a introdução e modificação biosseletiva de grupos funcionais em substratos naturais ou sintéticos, dependem de rotas biogénéticas que precisam ser conhecidas cientificamente. Devido a importância e a potencialidade química dos flavonóides, evidencia-se a necessidade da intensificação das investigações de diversos substratos de plantas que contenha estas substâncias.

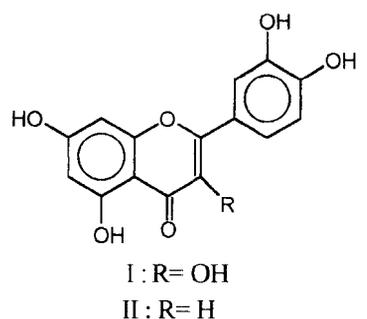
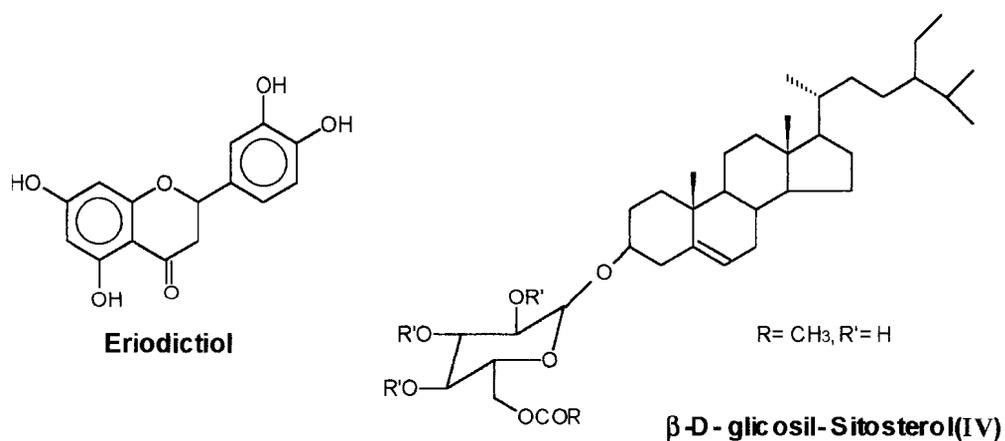
A espécie *Stiffitia chrysantha* esta sendo analisada pela primeira vez neste trabalho e se apresenta como uma produtora em potencial de flavonóides.

## ***CAPÍTULO II - PARTE EXPERIMENTAL***

## 2.1 MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DO EXTRATO.

As flores de *Stiffitia chrysantha* de um espécimen coletado no campus da UEL (Universidade Estadual de Londrina) foram submetidas a secagem em estufa a 60°C. O material seco (267 g) foi exaustivamente extraído com etanol 95% resultando em 130,99 g de extrato bruto.

### 2.1.1- CONSTITUÍNTES QUÍMICOS ISOLADOS



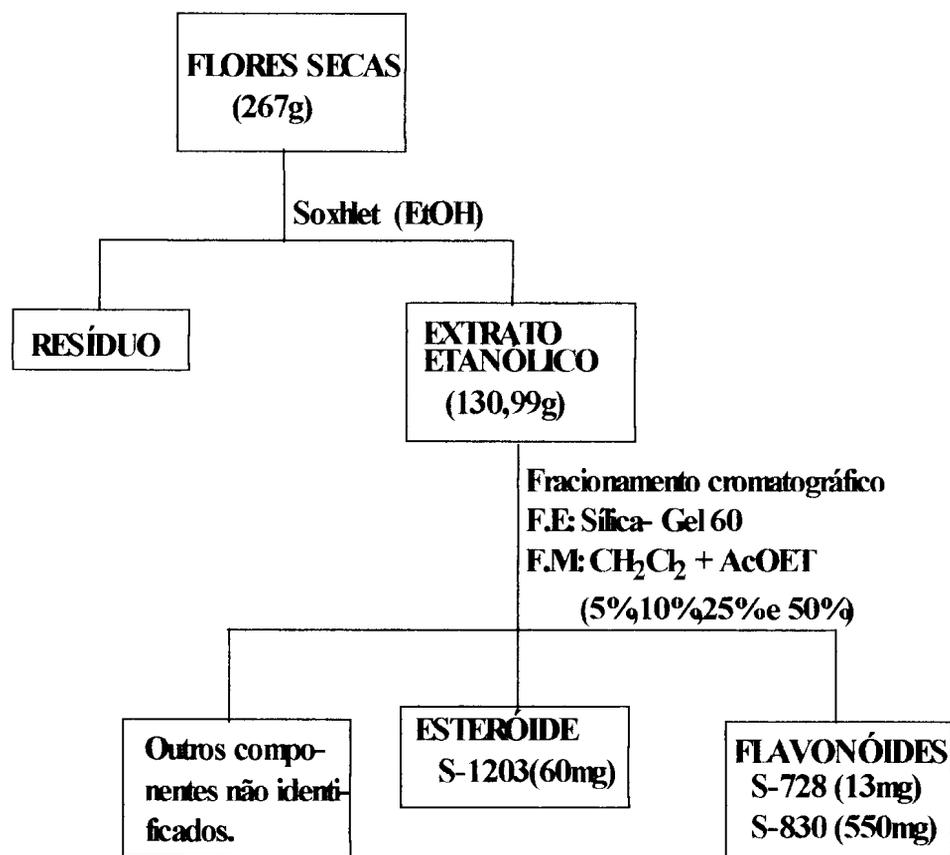
**Quercetina(I) e Luteolina(II)**

## 2.2 METODOLOGIA E ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS.

O extrato bruto foi fracionado por meio de cromatografia em coluna, utilizando-se Sílica-Gel 60 e eluentes em polaridades crescentes (diclorometano e acetato de etila), com estes solventes foram eluídas 554 frações de 500 ml cada (Esquema 6).

A análise das frações por cromatografia em camada delgada revelou que as frações de 3 a 449 eram análogas. Após destilação do solvente destas frações, obteve-se um sólido amarelo (p.f. 278-280°C). Esta substância foi codificada como S-830. As frações 1 e 2 apresentaram-se como um sólido vermelho após evaporação do solvente (p.f. 278-280°C). Esta substância foi codificada como S-728.

As frações de 500-554 foram reunidas com base em análise por cromatografia em camada delgada e forneceu um precipitado branco após a evaporação do solvente (p.f. 295-300°C). Esta substância foi denominada S-1203.



Esquema 6: Preparação e fracionamento dos extratos das flores de *Stiffitia crhysantha*

### 2.3 PREPARAÇÃO DOS DERIVADOS.

A mistura dos componentes em S-830 (116,7mg) e da amostra S-1203 (100mg), foram acetiladas com anidro acético (2,0 ml) na presença de piridina (1,0 ml) a temperatura ambiente. Após 24 horas, as amostras foram submetidas ao tratamento usual de extração: H<sub>2</sub>O, HCl (5%), e secagem com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

A metilação das amostras S-830 e S-728 foi realizada utilizando-se diazometano. Este reagente foi preparado usando Diazald em éter e KOH alcoólico em banho-maria (40°C) seguido de destilação para fornecer a solução

etérea do diazometano. Após adição do reagente o produto foi submetido a uma partição com hexano e clorofórmio. A fase clorofórmica que continha o derivado metilado foi concentrada em evaporador rotatório e o produto seco (8,0 e 3,0 mg) em pistola de secagem Abder Haldem.

## 2.4 MATERIAL E MÉTODO

A análise das frações foi feita por cromatografia em camada delgada de Sílica-gel da Merck para coluna e GF 254 para camada fina analítica e preparativa

Os cromatogramas foram revelados utilizando vapores de iodo e/ou irradiação ultravioleta nos comprimentos de onda 254nm e 366nm

Os solventes (Merck, Grupo Química e Vetec) foram redestilados para serem utilizados na preparação do extrato, para as diferentes técnicas cromatográficas e para recristalização das substâncias isoladas.

A eliminação dos solventes do extrato e das frações de colunas cromatográficas foi feita em evaporador rotatório BUCHI à pressão reduzida.

Os pontos de fusão foram determinados em aparelhos MEL-TEMP II e não foram corrigidos.

Os espectros de I.V. foram registrados em pastilhas de KBr num espectrômetro Perkin-Elmer 1420, existente no departamento de Química da UFRuRJ.

Os espectros uni-(1D) e bidimensionais (2D) foram registrados em um espectrômetro AC-200 do Bruker, operando a 200 MHz para hidrogênio (RMN<sup>1</sup>H) e 50,3 MHz para carbono-13 (RMN<sup>13</sup>C) com pulsos de frequência e transformada de Fourier. As amostras para análise foram dissolvidas em

acetona- $d_6$  ou em  $CDCl_3$ , tendo TMS como referência interna e colocada em tubo de 5 mm de diâmetro.

Os espectros de massas foram registrados em AutoSpecQ EI + Magnet Bpm: 55, existente no Núcleo de Produtos Naturais (NPPN) da UFRJ.

## ***CAPÍTULO III- RESULTADOS E DISCUSSÃO***

### 3.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS I E II (S-830)

O espectro de I.V. (Figura 14) revelou absorção em  $3450\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento de hidroxila fenólica, absorções em  $1450$  e  $1610\text{ cm}^{-1}$  são referentes a presença de estiramento de C=C de anel aromático e a banda em  $1640\text{ cm}^{-1}$  correspondente a estiramento de carbonila conjugada.

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 15) mostrou a presença de sinais de absorção de hidrogênios aromáticos. Nesta região há dois dubletos ( $J=2,0\text{ Hz}$ ) em  $6,25\text{ ppm}$  e  $6,51\text{ ppm}$  que foram atribuídos a prótons protegidos com interação meta (Figura 15) correspondentes aos prótons de anel derivado de três unidades de acetato (anel A) de um flavonóide. O espectro de RMN 2D [ $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$  - COSY -  $^1J_{\text{CH}}$  (Figura 18)] mostra o sinal de acoplamento a uma ligação destes prótons, respectivamente, com os carbonos  $98,46$  e  $93,60\text{ ppm}$ .

Os sinais mais intensos de carbonos quaternários oxigenados presente no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (PND) e 2D ( $^1J_{\text{CH}}$ ), (Figuras 16 e 18):  $164,30$ ;  $161,13$ ;  $156,63$  são compatíveis com as frequências dos carbonos oxigenados do anel A do flavonóide.

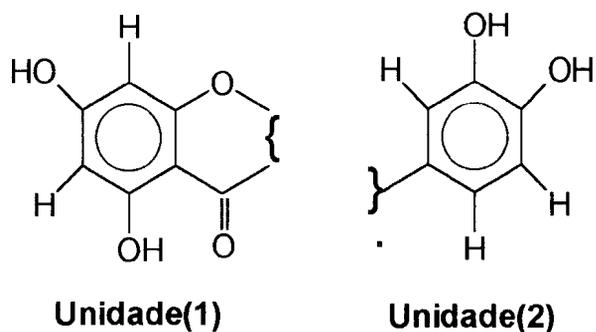
O sinal em  $\delta_{\text{H}}:12,77(\text{s})$  (Figura 15) confirma a presença de OH em ponte com a carbonila que absorve em  $176,13\text{ ppm}$  (Figura 16). Estes dados, aliados aos sinais de carbonos quaternários não oxigenados em  $136,08$  e  $103,30\text{ ppm}$ , a presença dos sinais em  $9,74$ ;  $8,60$ ;  $8,35$  e  $8,04$  presentes no espectro de RMN de

$^1\text{H}$  (Figura 15) que não correspondem a H ligados a carbonos permitem propor a estrutura parcial (1) da flavona.

Restam no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 15) dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$ : 7,82 (d;  $J= 2,0\text{Hz}$ ) e  $\delta_{\text{H}}$ : 6,88 (d;  $J= 8,0\text{Hz}$ ) e um duplo dubleto  $\delta_{\text{H}}$ : 7,71 (dd;  $J= 8,5\text{Hz}$  e  $J= 2,0\text{Hz}$ ) que estão ligados, respectivamente, aos carbonos que absorvem em  $\delta_{\text{C}}$ : 115,45;  $\delta_{\text{C}}$ : 116,27 e  $\delta_{\text{C}}$ : 120,36ppm [espectro 2D; ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$  - COSY), (Figuras 18 e 19)]. Estes sinais são compatíveis com o anel B dissustituído de uma flavona.

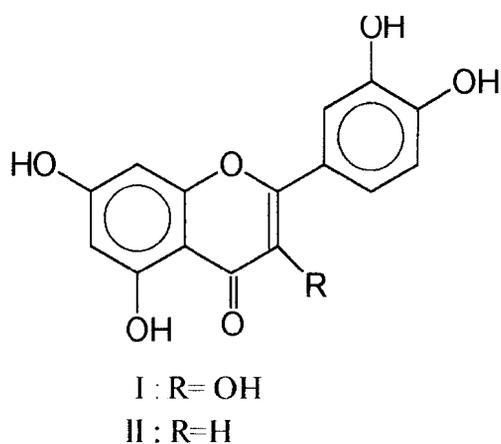
O espectro de RMN 2D ( $^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY, Figura 17) mostra um sinal de interação dos prótons que absorvem em 7,71ppm com os prótons em 6,98 e 7,82ppm. O número de hidrogênios hidroxílicos revelados no espectro de próton (Figura 15) e o número de  $=\text{C}-\text{O}$  aromáticos (145,38 e 147,99ppm) observados no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  permitem propor a unidade (2) para o anel B da flavona, que possui o padrão de substituição compatível com estes valores e os da literatura<sup>35</sup>.

Os sinais de carbono em 120,36; 116,27; e 115,45ppm ligados aos prótons que absorvem, respectivamente, em 7,71; 6,98 e 7,80 ppm (Figura 18), são compatíveis com a unidade aromática (2). O sinal intenso em 136,08ppm correspondente a carbono quaternário é compatível com um carbono carbinólico protegido como o C-3 da quercetina (I) (Tabela 1) registrado na literatura<sup>35</sup>.



A presença dos sinais de menor intensidade em 6,58(s); 6,51 (d); 7,47(dd) e 7,51(d) presentes no espectro de RMN de próton (Figura 15) e os demais sinais de menor intensidade presentes no espectro de RMN de carbono-13 (Figura 16), permitiram identificar outra flavona na amostra analisada.

O acoplamento do sinal em 103,30ppm (C-3) com o sinal em 6,58ppm (H-3) ( $^1J_{CH}$ ) é compatível com a presença da luteolina (II) como um componente em menor percentagem na mistura (Tabela 2). A tabela 3 faz comparações dos  $\delta_C$  de I e II com os modelos da literatura<sup>35</sup>.



**Figura 8: Quercetina(I) e Luteolina(II)**

A literatura faz atribuições diferentes para as frequências dos carbonos C-5 e C-9 (Tabela 3) e os sinais de interação a duas ligações ( $^2J_{CH}$ ) observado no espectro bidimensional (Figura 19) do H-6 e OH-5 com C-5 e do H-8 com C-9 permitiu atribuir inequivocamente os deslocamentos químicos dos átomos de carbono dos componentes na mistura (Tabelas 1 e 2).

O Esquema 7 (Página 67) mostra os caminhos plausíveis para se chegar aos principais íons fragmentários correspondentes aos picos registrados no espectro de massas por impacto de elétrons (Figura 26). Os sinais em m/z: 137(100) e 95(27), sevem para a confirmação do padrão de substituição do anel B de I e II.

### 3.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS DERIVADOS DOS FLAVONÓIDES

A obtenção do derivado acetilado (Figura 20) da mistura contendo as substâncias I e II, permitiu a confirmação das estruturas através dos deslocamentos químicos e multiplicidade dos sinais dos grupos acetoxilas introduzidos pela reação de acetilação.

O espectro de RMN<sup>1</sup>H do derivado acetilado da mistura revelou três sinais simples correspondentes a grupos acetoxila (2,32; 2,34; 2,42ppm) (Tabela 4, Figura 20). A análise dos sinais de prótons aromáticos mostra claramente que houve deslocamentos paramagnéticos de H-6 ( $\Delta\delta= 0,63\text{ppm}$ ) e H-8 ( $\Delta\delta= 0,81\text{ppm}$ ), devido ao efeito do grupo acetoxila. O efeito maior observado para H-8 contraria a afirmação generalizada quando atribui efeito de acetilação maior para átomos de hidrogênio localizados em posição orto do que em para de sistemas aromáticos benzenóides. Quando a carbonila do grupo acetoxila (-OAc)

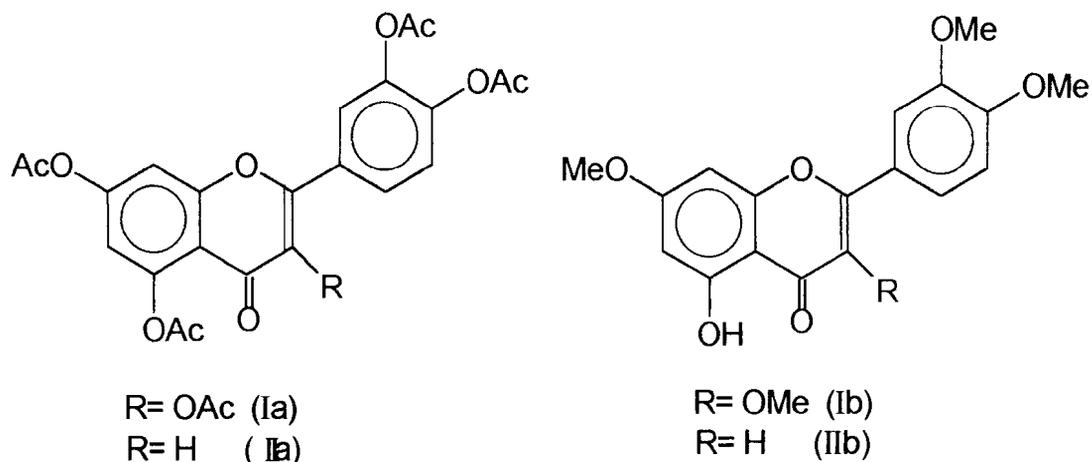
encontra dificuldade estérica para assumir coplanaridade com o anel aromático, os átomos de hidrogênio podem atingir a região de blindagem anisotrópica da carbonila e, conseqüentemente, o deslocamento paramagnético de hidrogênio localizado em posição orto torna-se menor do que em para.

O espectro 2D de interação homonuclear ( $^1\text{Hx}^1\text{H-COSY}$ , Figura 22) do derivado acetilado mostra a interação entre H-6 ( $\delta_{\text{H}}$ : 6,88 d) com H-8 ( $\delta_{\text{H}}$ : 7,24 d) e de H-6' ( $\delta_{\text{H}}$ : 7,75 dd) com H-5' ( $\delta_{\text{H}}$ : 7,40 d), confirmando assim, a atribuição do deslocamento químico de H-2' ( $\delta_{\text{H}}$ : 7,75 d) em campo mais baixo do que o H-5' (Figura 22, Tabela 4).

As diferenças significativas dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono-13 aromáticos da mistura de I+II observadas pela comparação dos  $\delta_{\text{C}}$  de I e II com os dados correspondentes do derivado acetilado (Ia+IIa) (Tabelas 1, 2 e 4) são consistentes com as alterações eletrônicas provocadas pela conversão dos grupos hidroxílicos em acetoxílicos. A blindagem dos carbonos ipso C-3', C-4', C-3(2), C-5 e C-7 é devido ao efeito  $\alpha$  de proteção exercido pelo átomo de oxigênio carbonílico e pelo grupo metila da função acetoxila. Os carbonos em posição orto e para ao grupo acetoxila sofrem um efeito desprotetor devido a diminuição da capacidade de blindagem resultante do efeito mesomérico de átomos de oxigênio. Isto ocorre devido a presença de grupo carbonila [-OAc-retirador de elétrons (efeito indutivo e mesomérico)] que, atenua a deslocalização dos elétrons não compartilhados do heteroátomo.

A tabela 5 mostra os valores dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono do derivado metilado (I-b e II-b) (Figura 24).

Os dados espectrométricos de RMN de próton e carbono-13 destes derivados serviram para confirmar a proposta estrutural de I e II.



**Figura 9: Derivados Acetilados e Metilados de Quercetina(Ia e Ib) e Luteolina(IIa e IIb).**

### 3.3 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA III (S- 728).

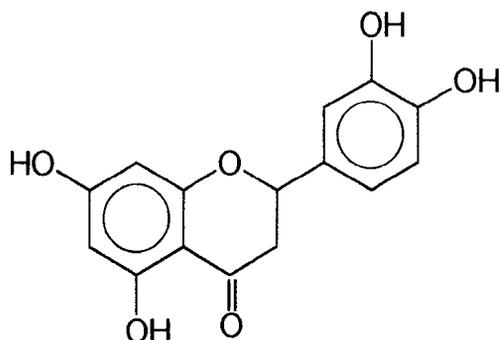
O espectro de I.V. (Figura 27) apresentou banda de absorção em  $3300\text{ cm}^{-1}$  atribuída a estiramento de grupos hidroxílicos, absorção em  $1650\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento do grupo carbonila conjugado e as bandas em  $1600$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$  que são referentes a presença de anel aromático.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 28) possui dois sinais na região de prótons aromáticos:  $\delta_{\text{H}}$ : 7,02 (d,  $J= 2,0\text{Hz}$ ,  $^1\text{H}$ );  $\delta_{\text{H}}$ : 6,86 (d,  $J= 2,0\text{Hz}$ , 2H), e o sinal de 2H em  $\delta_{\text{H}}$ : 5,94 (d,  $J = 2,0\text{Hz}$ ).

Os sinais de absorção de Carbono-13 presentes no espectro 1D (PND) (Figura 29) em  $\delta_{\text{C}}$ : 114,74; 115,94; 119,20; 96,74 e 95,83ppm, (Tabela 6), são compatíveis com sinais de cinco carbonos metínico aromáticos protegidos.

O sinal de próton carbinólico:  $\delta_{\text{H}}$ : 5,38(dd,  $J= 12,60$  e  $J= 3,10\text{Hz}$ ) e dois duplos dubletos de dois prótons metilênicos em  $\delta_{\text{H}}$ : 2,74 (dd,  $J = 17,10$  e  $J=$

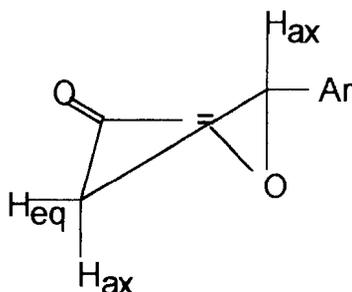
3,10Hz) e  $\delta_H$ : 3,13 (dd,  $J = 12,60$  e  $J = 3,10$ Hz) permitem propor a estrutura da flavona III para esta substância. (Figura 10).



**Figura 10: Eriodictiol**

Os valores das constantes de acoplamento ( $J = 3,1$ Hz e  $J = 12,6$ Hz) permitiram sugerir a posição axial para H-2 (Figura 11).

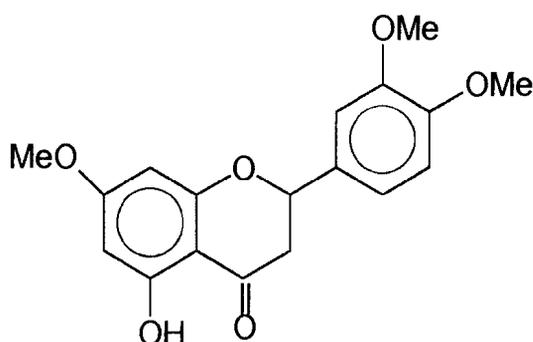
O valor dos deslocamentos químicos de H-3<sub>ax</sub> e H-3<sub>eq</sub>, contrariam a generalização de maior proteção para hidrogênios em posição axial em relação ao hidrogênio em posição equatorial. Isto mostra que o hidrogênio em posição equatorial (H-3<sub>eq</sub>) está dentro do cone de proteção da carbonila. (Figura 11).



**Figura 11: Estereoquímica relativa do Eriodictiol (III-Me)**

A obtenção do derivado metilado da substância III, permitiu a confirmação da estrutura através da análise do espectro obtido pela experiência com irradiação dupla nas frequências dos prótons metoxílicos e posterior diferença de espectro (Figura 30, Tabela 7). A irradiação em  $\delta_H$ : 3,82 (MeO-7) gerou efeito NOE de 11% em  $\delta_H$ : 6,06 (H-6 e H-8), esta interação espacial entre os prótons revela claramente a proximidade de H-6 e H-8 com este grupo metoxila (Figura 12).

A posição orto das hidroxilas do anel B, foi confirmada com a irradiação dos prótons metoxílicos do derivado (MeO-4': 3,86 e MeO-3': 3,91ppm) que exerceu efeito NOE em H-5' (6,89ppm; 5%) e em H-2' (6,98ppm; 7%), respectivamente (Tabela 7).



**Figura 12: Derivado Metilado do Eriodictiol (III-Me)**

#### 3.4 Determinação Estrutural da Substância IV (S-1203)

A amostra foi insolúvel nos solventes orgânicos usuais para registro de espectro de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e, conseqüentemente, foi necessário preparar o derivado acetilado (IV-Ac).

O espectro I.V. da substância natural (Figura 31) apresentou absorções em:  $3370\text{ cm}^{-1}$  devido a estiramento de OH e as absorções em 2950, 2850, 1420,  $1380\text{ cm}^{-1}$  que são dos grupos  $-\text{CH}$ ,  $-\text{CH}_2$  e  $-\text{CH}_3$  da substância analisada.

Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT  $\theta = 90^\circ$  e  $135^\circ$  (Figura 33) forneceram o número de átomos de carbono correspondentes a C, -CH, -CH<sub>2</sub> e -CH<sub>3</sub> (Tabela 11) e permitiu identificar o derivado IV-Ac como um esteróide glicosilado.

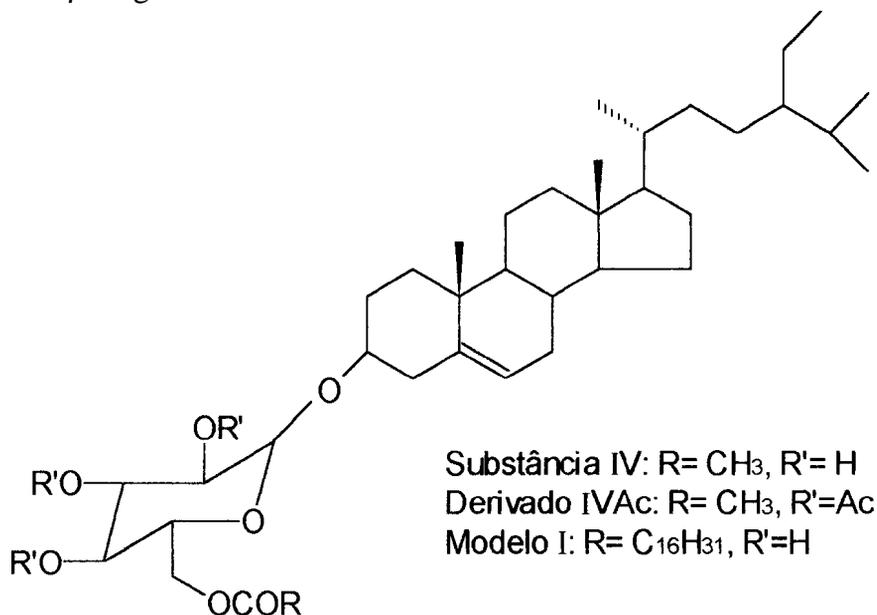
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 32, Tabela 9) possui três sinais triplos  $\delta_{\text{H}}$ : 4,94 (t; J= 9,5Hz),  $\delta_{\text{H}}$ : 5,05 (t; J= 9,5Hz) e  $\delta_{\text{H}}$ : 5,14 (t; J= 9,5Hz). O espectro bidimensional de correlação homonuclear 2D ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -HOMOCOSY) (Figura 34) revelou acoplamento entre estes prótons metílicos consistente com um sistema onde os prótons se encontram em posições axiais. Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$ : 4,57 (d, J= 8,0Hz),  $\delta_{\text{H}}$ : 4,24 (dd, J= 17,09 e J= 4,52 Hz),  $\delta_{\text{H}}$ : 4,08 (dd; J= 17,09 e J= 2,0Hz), e o sinal em 3,65 (m) que acopla com o próton que absorve em 5,05 (t) e em 5,14 são compatíveis a uma unidade de carboidrato na molécula. Os carbonos carbinólicos identificados no espectro de carbono-13 justificam, também, a presença desta unidade glicosídica. Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$ : 0,65-0,96(s) representam as frequências de absorção de duas metilas terciárias. A feição dos sinais entre 0,78 e 1,01 e os sinais em 3,47(m) e 5,35(dl) são compatíveis com a estrutura do Sitosterol, o número de C, CH, CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> restantes estão de acordo com esta aglicona (Figura 33, Tabelas 10 e 11).

A análise destes dados confirmou a classificação da amostra IV como um esteróide glicosilado. À caracterização destas unidades como  $\beta$ -sitosterol e 2', 3', 4', 5', tetra-0-acetilglicopiranosil, foi confirmada com a análise comparativa destes dados com o modelo citado na referência [36] (Tabela 10).

Os resultados obtidos através dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  do derivado acetilado, foram utilizados para analisar corretamente os deslocamentos químicos dos átomos de carbono-23 (-CH<sub>2</sub>: 25,94ppm) e 25 (CH: 29,06ppm), confirmando-se as atribuições feitas por Itoh e col.<sup>36</sup> e que tem sido feitos incorretamente por outros autores<sup>37</sup> (Tabela 13).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do derivado acetilado (IV-Ac), e o espectro com acoplamento spin-spin de núcleos de  $^1\text{H}$  obtido pela experiência bidimensional (2D) de correlação homonuclear ( $^1\text{Hx}^1\text{H}$ -HOMOCOSY) (Figura 34), confirmaram as deduções obtidas com o DEPT (Figura 33).

Todos esses dados permitiram definir a estrutura da substância IV original como  $\beta$ -D-glicosil-sitosterol.



**Figura 13:  $\beta$ -D- glicosil- Sitosterol(IV), Derivado Acetilado de IV(IVAc) e Modelo Comparativo(Modelo I)**

O Esquema III mostra os íons fragmentários correspondentes aos picos m/z: 256(21), 169(17), 97942) e 69(65), entre outros (Figura 35, Esquema 8), que estão de acordo com o padrão de substituição proposta para esta substância. O pico m/z: 109 (20) confirma a presença da dupla ligação entre os carbonos 5 e 6.

### 3.5 DADOS ESPECTROMÉTRICOS DE RMN 1D( $^1\text{H}$ E $^{13}\text{C}$ ) E 2D ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ -COSY)

Tabela 1 : Atribuições dos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$ (200,13MHz) e  $^{13}\text{C}$ (50,3MHz) obtidas da análise dos espectros 1D( $^1\text{H}$  e PND) e 2D[ $^1\text{H}\times^1\text{H}$ - COSY  $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$  COSY  $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n= 1, 2 e 3)] de S-830(I) em  $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$ .

C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}(\text{J},\text{HZ})1\text{J}_{\text{CH}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
2	149,97			
3	136,08			H-2': H-6'
4	176,13			
5	161,13		H-6;HO-5	
6	98,46	6,25(d,J=2,0)		H-8; HO-5
7	164,30		H-6; H-8	
8	93,60	6,51(d,J=2,0)		H-6
9	156,63		H-8	
10	103,30			H-6; H-8; HO-5
1'	122,40		H-2'	
2'	115,45	7,80(d,J=2,0)		H-6'
3'	145,38		H-2'	H-5'
4'	147,99		H-5'	H-2'
5'	116,27	6,98(d,J=8,0)	H-6'	
6'	120,36	7,71(dd,J $_{6',2'}$ =2,0 e J $_{6',5'}$ =8,0)	H-5'	
(OH)-7,3'4'		8,04; 8,35; 8,60		
(OH)3,5		9,74; 12,77		

**Tabela 2:** Atribuições dos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$ (200,13MHz) e  $^{13}\text{C}$ (50,3MHz) obtidas da análise dos espectros 1D( $^1\text{H}$  e PND) e 2D[ $^1\text{H}\times^1\text{H}$ - COSY  $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$  COSY  $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n= 1, 2 e 3)] de S-830(II) em  $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$ .

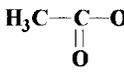
C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}(\text{J},\text{HZ})1\text{J}_{\text{CH}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
2	164,49			H-2', H-6'
3	103,30	6,58(S)		
4	182,00			
5	161,91		H-6;H0-5	
6	99,10	6,25(d,J=2,0)		H-8; HO-5
7	164,50		H-6; H-8	
8	94,08	6,51(d,J=2,0)		H-6
9	157,66		H-8	
10	104,03			H-6; H-8; HO-5
1'	119,11		H-2'	
2'	113,66	7,51(d,J=2,0)		H-6'
3'	146,06		H-2'	H-5'
4'	147,01		H-5'	H-6'
5'	115,82	6,98(d,J=8,0)	H-6'	
6'	121,95	7,47(dd,J $_{6'.2'}$ =2,0 e J $_{6'.5'}$ =8,0)	H-5'	
(OH)- 7,3'4'		8,04; 8,35; 8,60		
(OH)-5		12,7		

**Tabela 3: Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura de Quercetina e Luteolina com valores descritos na literatura<sup>35</sup>.**

	S-830	S-830	Literatura	Literatura
C	Quercetina	Luteolina	Quercetina	Luteolina
2	149,97	164,49	147,5	164,50
3	136,08	103,10	136,5	103,30
4	176,13	182,00	176,5	182,20
5	161,13	161,91	161,00	157,5- 161,0 <sup>a</sup>
6	98,46	99,10	99,50	99,20
7	164,30	164,50	166,00	164,70
8	93,60	94,08	94,50	94,20
9	156,63	157,66	156,70	156,2- 161,4 <sup>a</sup>
10	103,40	104,03	104,00	104,20
1'	122,36	119,11	123,00	119,30
2'	115,45	113,66	116,00	113,80
3'	145,38	146,06	145,70	146,20
4'	147,99	147,01	148,10	150,10
5'	116,27	115,82	116,50	116,40
6'	120,36	121,95	121,00	122,10

a- Faixas de valores atribuídos para os diferentes exemplos na literatura.

Tabela 4: Atribuições dos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$ (200,13MHz) e  $^{13}\text{C}$ (50,3MHz) obtidas da análise dos espectros 1D( $^1\text{H}$  e PND) e 2D[ $^1\text{H}\times^1\text{H}$ - COSY ,  $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$  COSY  $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n= 1, 2 e 3)] do Derivado Acetilado da amostra S-830 em  $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$ .

C	$\delta_{\text{C}}$ de I-Ac / II-Ac	$\delta_{\text{H}}$ (J, Hz) $^1\text{J}_{\text{CH}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$^1\text{H}\times\text{H}$ -COSy
2	153,53/ 161,00		/H-3	H-6';H-2'/	
3	133,82/				
4	176,03				
5	150,13		H-6		
6	113,78	6,88(d,J=2,0)		H-8	
7	154,11/ 153,89		H-6; H-8		
8	114,51	7,31(d, J=2,0)		H-6	
9	156,63/ 157,37		H-8		
10	108,89/ 108,60				
1'	123,64		H-2';H-6'	H-5'	
2'	126,25	7,70(d,J=2,0)		H-3';H-1'	
3'	144,23		H-2'	H-5'	
4'	142,04		H-5'	H-2'	
5'	127,45/127, 0	7,40(d,J=8,0)			
6'	123,76	7,75(dd,J $_{2',6'}$ = 2,0 e J $_{5',6'}$ =8,0)		H-2'	
	20,36;20,40 20,96;167,6 167,81; 169,1; 169,90			-CH <sub>3</sub>	

**Tabela 5: Atribuições dos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$ (200,13MHz)  $^{13}\text{C}$ (50,3MHz) obtidas da análise dos espectros 1D( $^1\text{H}$  e PND) do derivado metilado da amostra S-830(I-OMe e II-OMe) em  $\text{CDCl}_3$**

C	$\delta_{\text{C}}$ de I-OMe / II-OMe	$\delta_{\text{H}}$ (J, Hz) $^1\text{J}_{\text{CH}}$
2	152,00	/6,57(s)
3	139,00/108,61	
4	-	-
5	161,90	
6	97,97/98,01	6,35(d,J=2,0)
7	165,36	
8	92,11/92,55	6,24(d, J=2,0)
9	156,63	
10	104,53/105,93	
1'	120,03	
2'	111,03/111,10	7,70(d,J=2,0)
3'	148,65	
4'	151,25	
5'	110,72	7,00(d,J=8,0)
6'	122,78/122,09	7,69(dd, $J_{2',6'}=2,0$ e $J_{5',6'}=8,0$ )
OMe- 3,7,3'e4'	60,13; 55,97; 55,76; 55,97	3,84-3,97
OH-5		12,63

**Tabela 6 : Atribuições dos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$ (200,13MHz) e  $^{13}\text{C}$ (50,3MHz) obtidas da análise dos espectros 1D( $^1\text{H}$  e PND) de S-728 em  $\text{D}_2\text{C}_6\text{CO}$ .**

C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J, Hz) $^1\text{J}_{\text{CH}}$
2	80,06	5,38(dd, $\text{J}_{\text{ax-eq}}=3,1$ ; $\text{J}_{\text{ax-ax}}=12,6$ )
3	43,51	2,74(dd, $\text{J}_{\text{ax-eq}}=3,1$ ; $\text{J}_{\text{gem}}=17,1$ ) 3,13(dd, $\text{J}_{\text{ax-ax}}=12,6$ ; $\text{J}_{\text{gem}}=17,1$ )
4	206,29	
5	166,50	
6	96,74	5,94(d, $\text{J}_{6,8}=2,0$ )
7	167,23	
8	95,83	5,94(d, $\text{J}_{8,6}=2,0$ )
9	159,0	
10	103,0	
1'	132,00	
2'	114,74	7,02(d, $\text{J}=2,0$ )
3'	146,20	
4'	145,97	
5'	115,94	6,86(d, $\text{J}=8,5$ )
6'	119,20	6,86(dd, $\text{J}_{2',6'}=2,0$ e $\text{J}_{5',6'}=8,5$ )
OH- 5,7,3',4'		12,17

**Tabela 7: Porcentagem dos crescimentos dos sinais dos prótons resultantes da irradiação dupla nas frequências dos grupos metoxílicos de S-728.**

Irradiado		NOE Observado		
H	$\delta$ H	H	$\delta$ H	%
MeO-7	3,82	6 e 8	6,1-6,0	11
MeO-4'	3,86	5'	6,89	5
MeO-3'	3,91	2'	6,98	7

**Tabela 8: Comparação dos dados de RMN  $^{13}$ C do Eriodictiol com Valores Descritos na Literatura<sup>35</sup>.**

C	Eriodictiol S-728	Eriodictiol. [33]
2	80,06	78,30
3	43,51	42,20
4	206,29	196,20
5	166,50	163,4
6	96,74	95,70
7	167,23	166,6
8	95,83	94,80
9	159,0	162,80
10	103,0	101,70
1'	132,00	129,40
2'	114,74	114,20
3'	146,20	145,10
4'	145,97	145,60
5'	115,94	115,30
6'	119,20	117,8

**Tabela 9: Atribuições dos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$ (200,13MHz) e  $^{13}\text{C}$ (50,3MHz) obtidas da análise dos espectros 1D( $^1\text{H}$  e PND) e 2D[ $^1\text{H}\times^1\text{H}$ - COSY] do derivado IV-Ac em  $\text{CDCl}_3$ .**

$\delta_{\text{H}}(\text{J,Hz})$ $^1\text{J}_{\text{CH}}$	$^1\text{H}\times^1\text{H}$ - COSY
5,35(dl; J=4,0)	H-6
5,14(t;J=9,5)	H-3'
5,05(t; J=9,5)	H-4'
4,97(t;J=9,5 e J= 8,0)	H-2'
4,57(d;J=8,0)	H-1'
4,24(dd; J=17,09 e J= 4,52)	H-6'a
4,08(dd, J=17,09 e J= 2,0)	H-6'b
3,65(m)	H-5'
3,47(m)	H-3
2,19(d, J= 2,0)	H-4
1,98- 2,05(s)	(OAc) <sub>4</sub>
0,65- 0,96	(CH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub>

**Tabela 10: Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (50MHz) do Derivado IV-Ac, Registrados em  $\text{CDCl}_3$  Comparados com os dados do Modelo I<sup>36</sup>.**

C	$\delta\text{C}$	$\delta\text{C}$ ( Modelo I)
1	37,14	37,28
2	29,40	29,56
3	80,40	79,59
4	38,85	38,91
5	140,28	140,31
6	122,14	122,14
7	31,81	31,94
8	31,81	31,94
9	50,10	50,20
10	36,67	26,15
11	20,66	21,08
12	39,67	38,78
13	42,25	42,34
14	56,68	56,78
15	24,26	24,30
16	28,22	28,23
17	55,97	55,97
18	11,84	11,94
19	19,79	19,35
20	36,90	36,73
21	19,36	19,04
22	33,88	33,97
23	25,94	26,16
24	45,76	45,87
25	29,06	29,19
26	18,97	18,79
27	19,79	19,80
28	22,99	23,10
28	11,84	11,98
1'	99,58	99,70
2'	71,40	71,70
3'	71,62	71,70
4'	68,42	68,70
5'	72,84	73,00
6'	62,03	62,20
-OAc	170,69;170,35; 169,38; 169,29	

**Tabela 11: Análise Comparativa dos Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ - PND e RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT ( $\theta=91^\circ$  e  $\theta= 135^\circ$ ) e dedução dos números de átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio (multiplicidade e deslocamento químico) da substância IV-Ac.**

C	CH	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
140,28	122,14	37,14	11,84
36,67	31,81	29,40	19,79
42,25	50,10	38,85	19,36
170,69	56,68	31,81	18,97
169,38	36,90	39,67	11,84
169,29	45,76	24,26	(CH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub>
C2 + C= + (C=O) <sub>4</sub>	29,06	28,22	
	99,58	33,88	
	71,40	25,94	
	71,62	22,99	
	68,42	62,03	
	72,84	CH <sub>2</sub> O + (CH <sub>2</sub> )	
	=CH+ OCH + (CH) <sub>7</sub>		

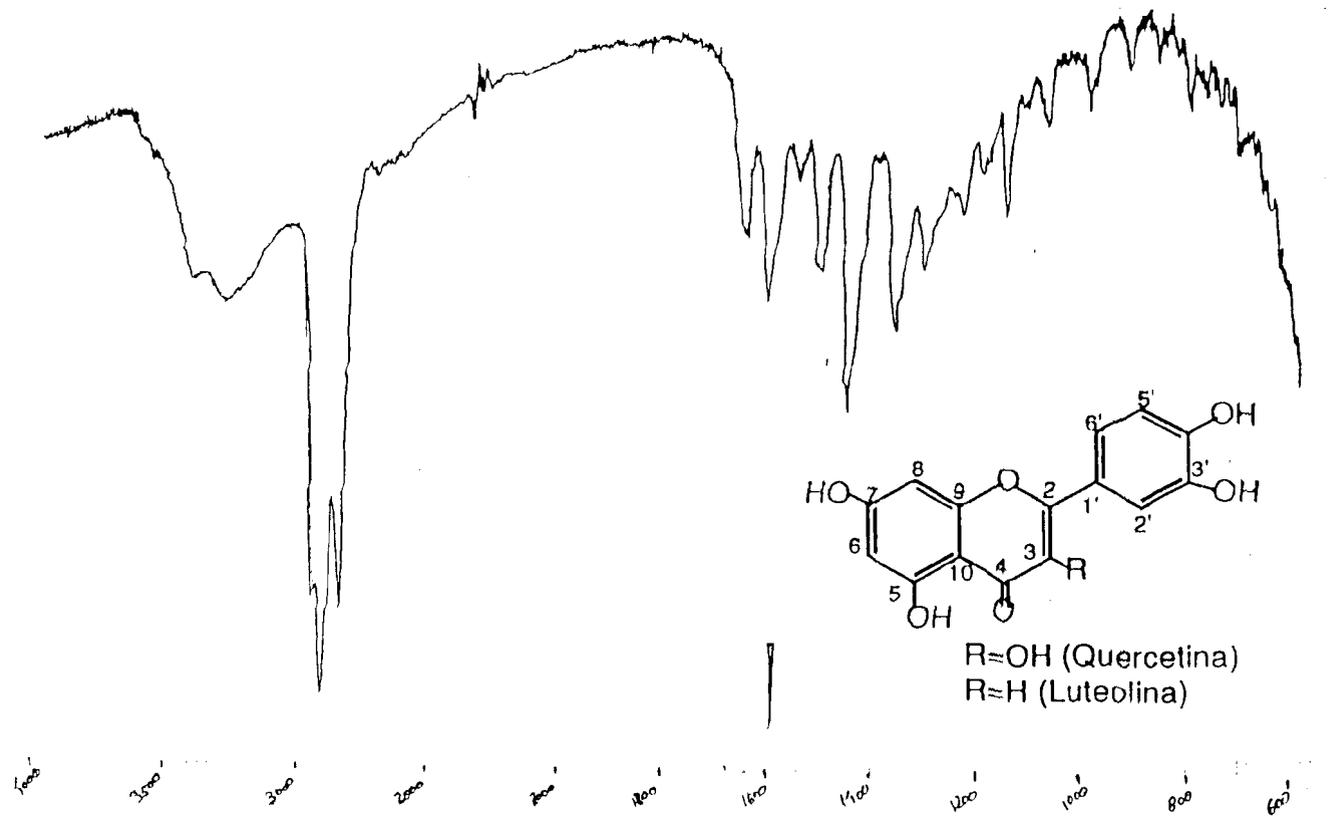


Figura 14- Espectro de infra- vermelho em pastilha de KBr de S-830

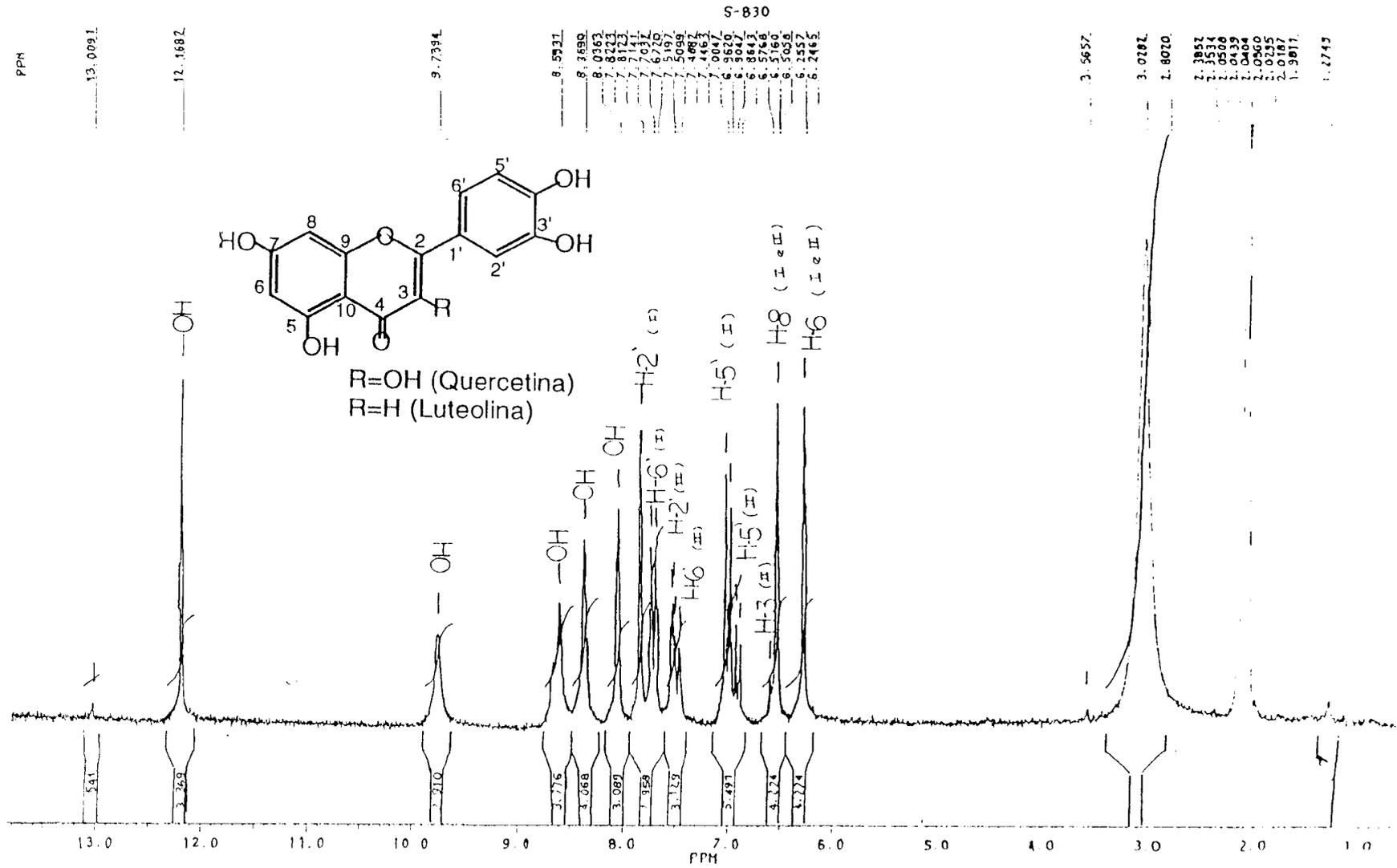


Figura 15- Espectro unidimensional de RMN <sup>1</sup>H(200,13MHz) de S-830 em D<sub>6</sub>C<sub>2</sub>CO

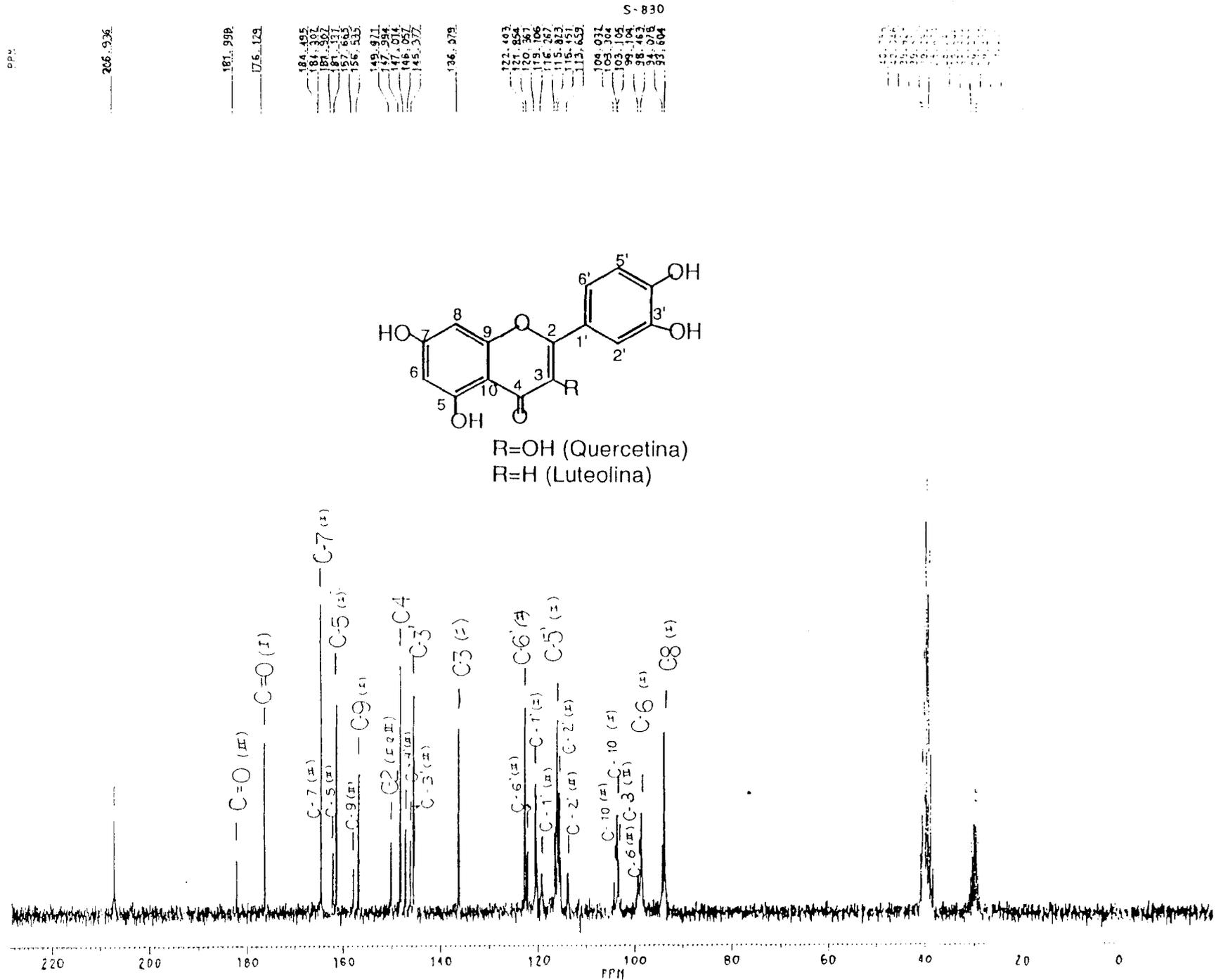


Figura 16: Espectro unidimensional de RMN de  $^{13}\text{C}$  (50,3MHz) de S-830 em  $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$ .

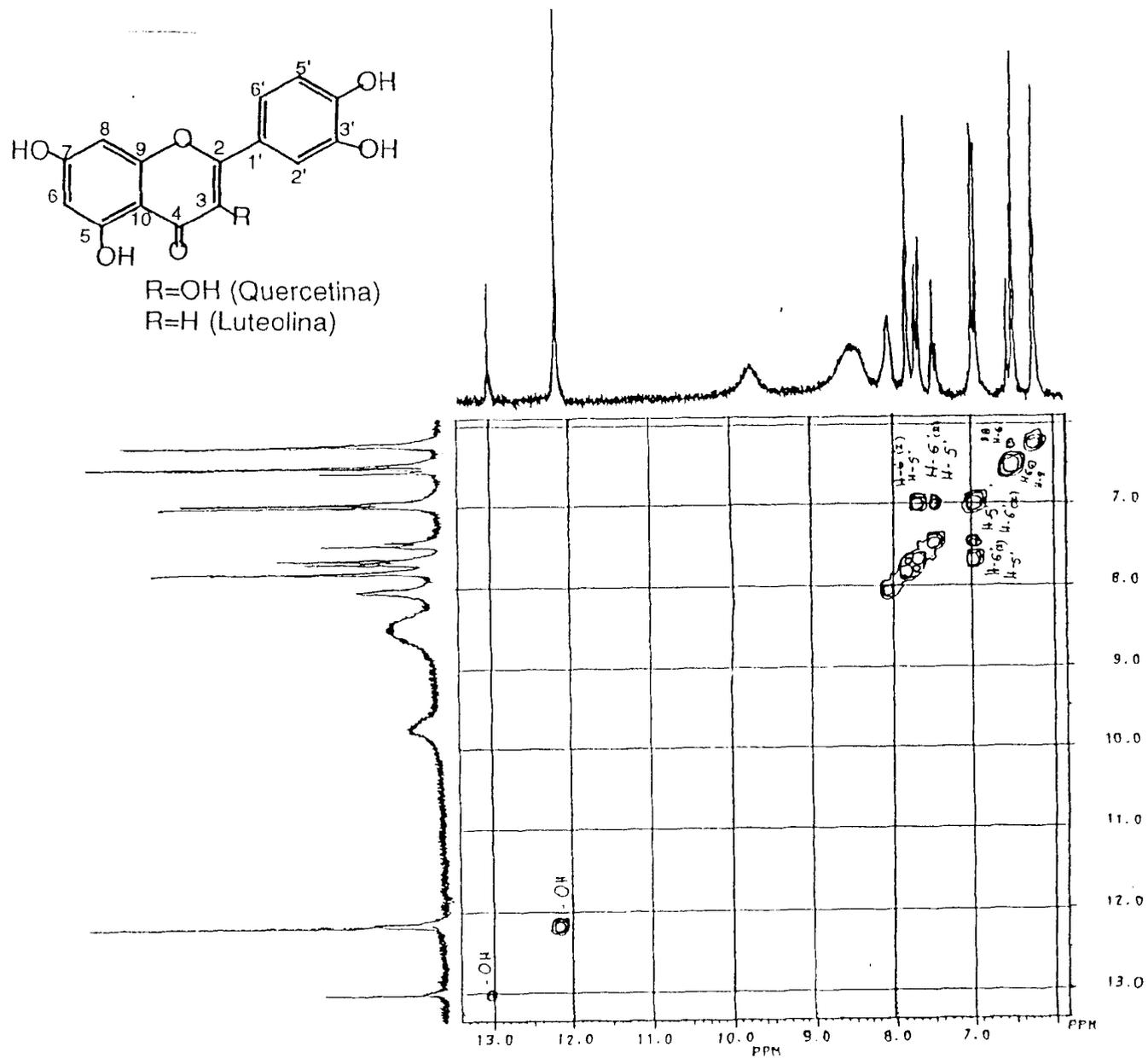


Figura 17- Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio  
 e hidrogênio ( $^1H \times ^1H$ - COSY) de S-830 em  $D_6C_2CO$

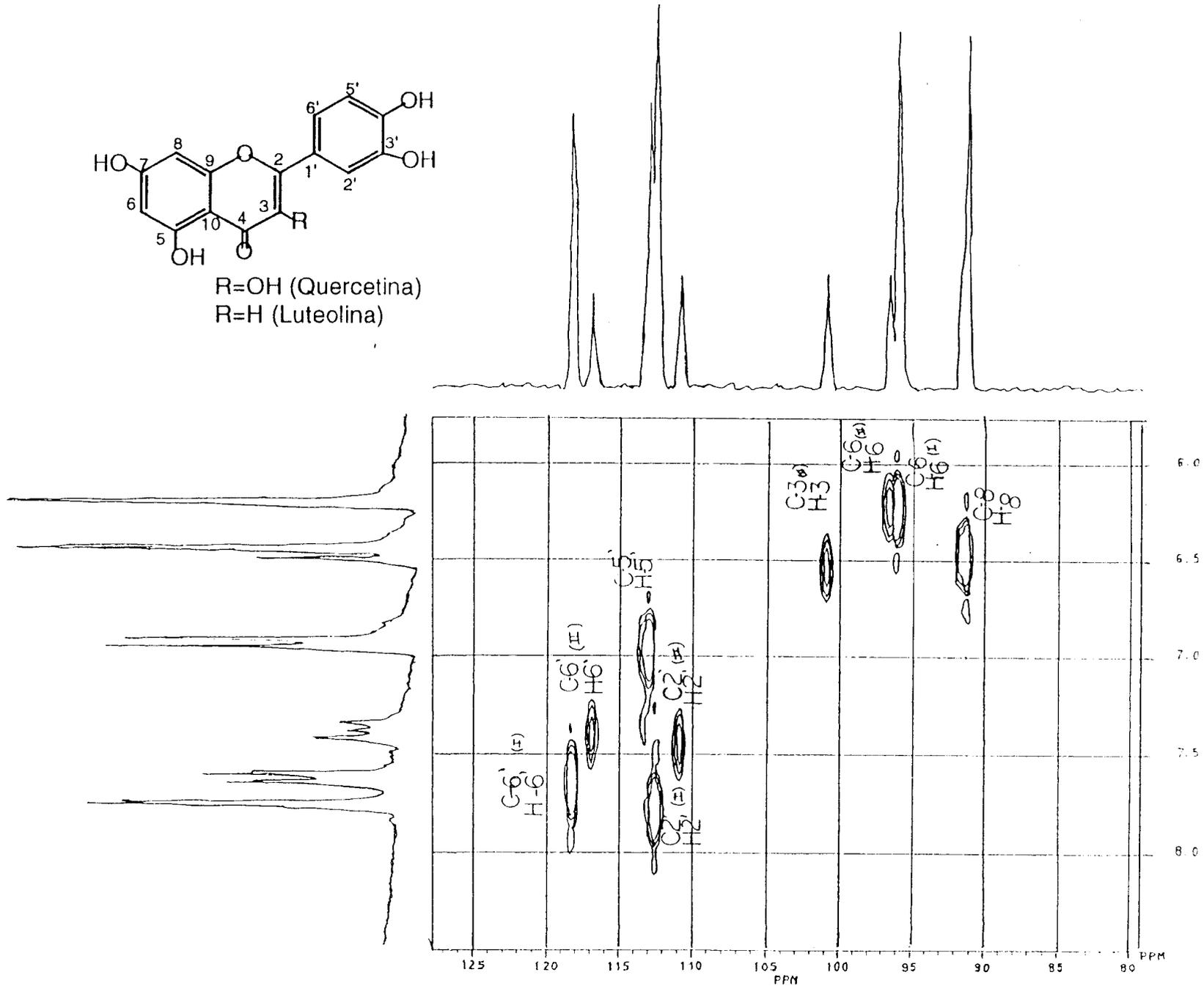


Figura 18- Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ - COSY-  $^1\text{J}_{\text{CH}}$ ) de S-830 em  $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$

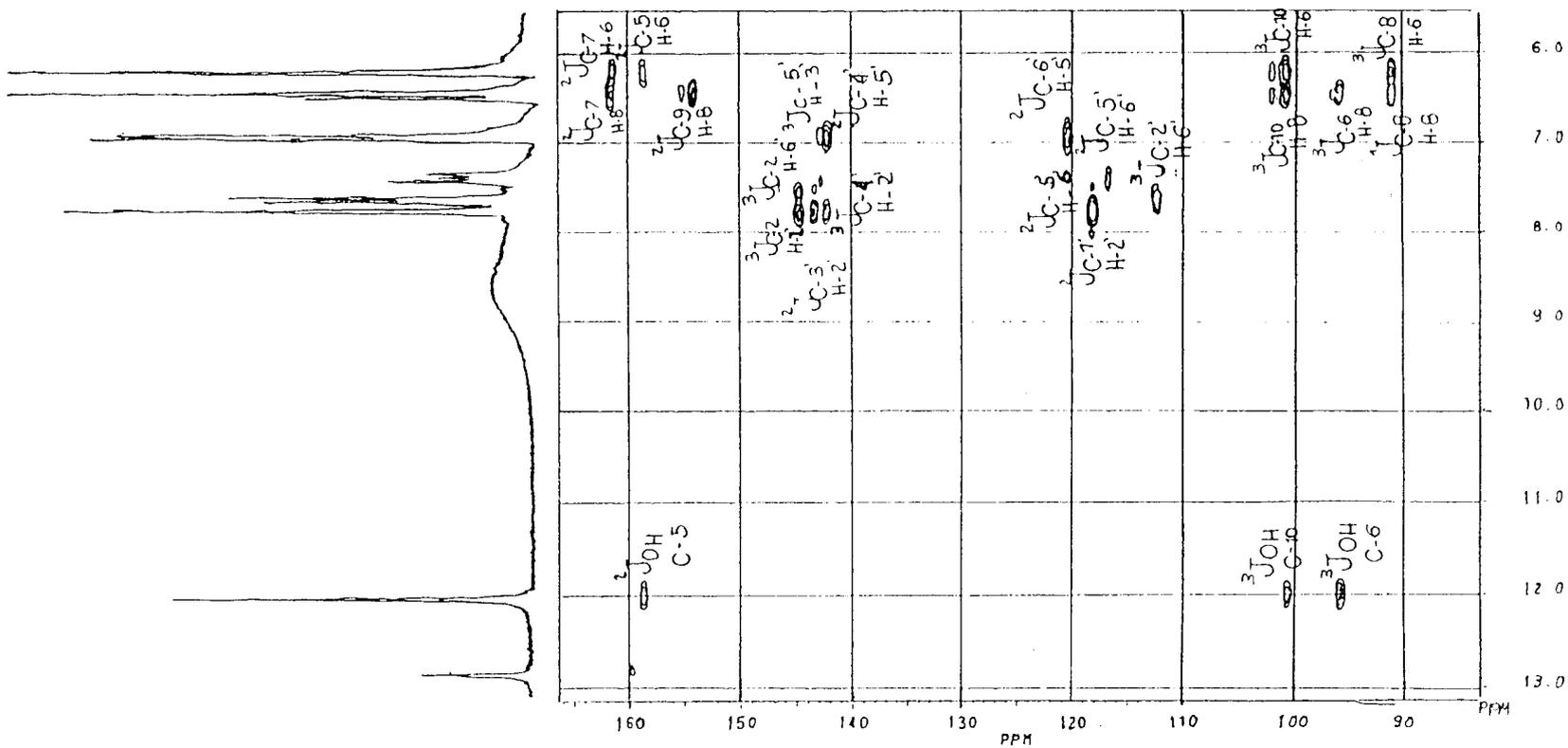
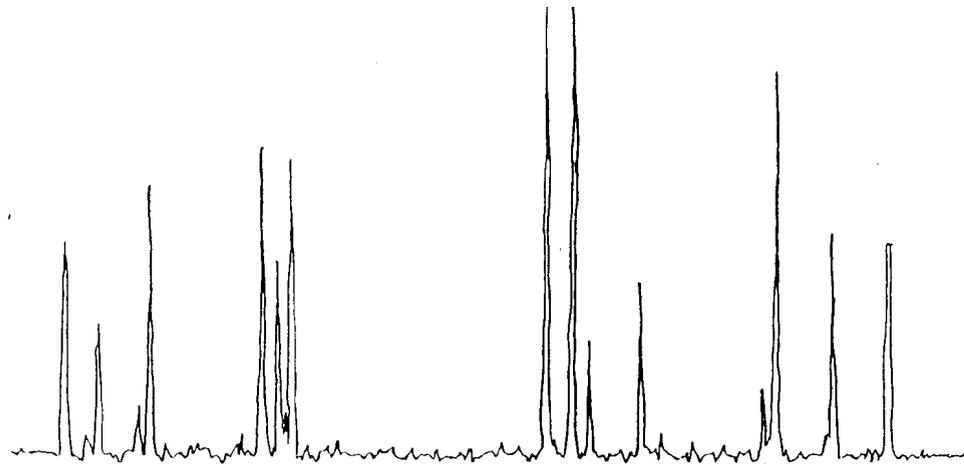
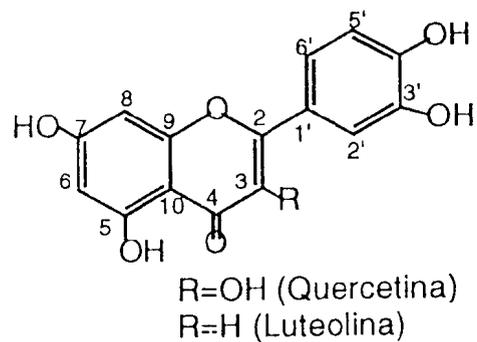


Figura 19- Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 a longa distância [ $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - COSY-  $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=1, 2 e 3), COLOC] de S- 830 em  $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$

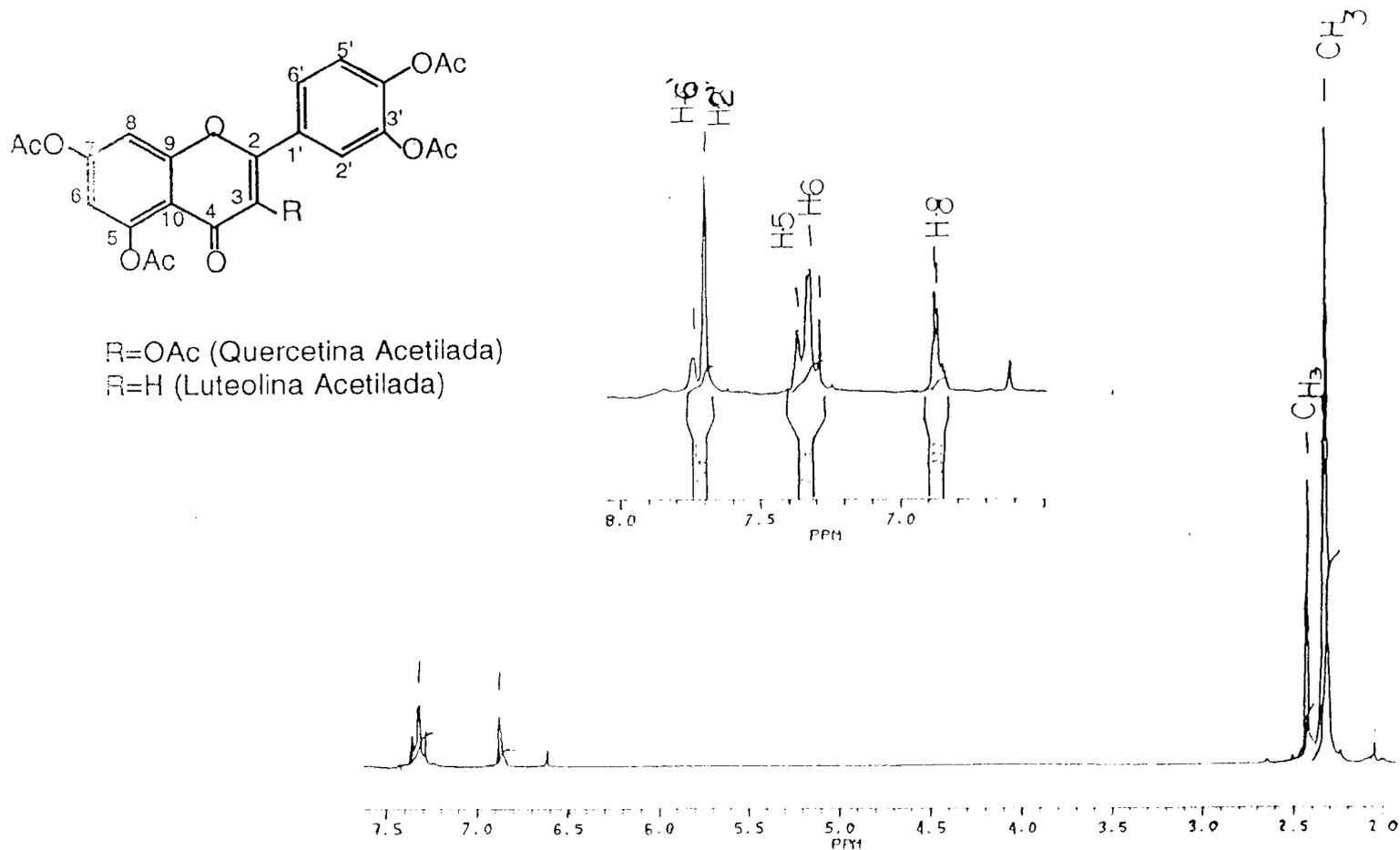


Figura 20- Espectro unidimensional de RMN <sup>1</sup>H(200,13MHz) de S-830-Ac em CDCl<sub>3</sub>.

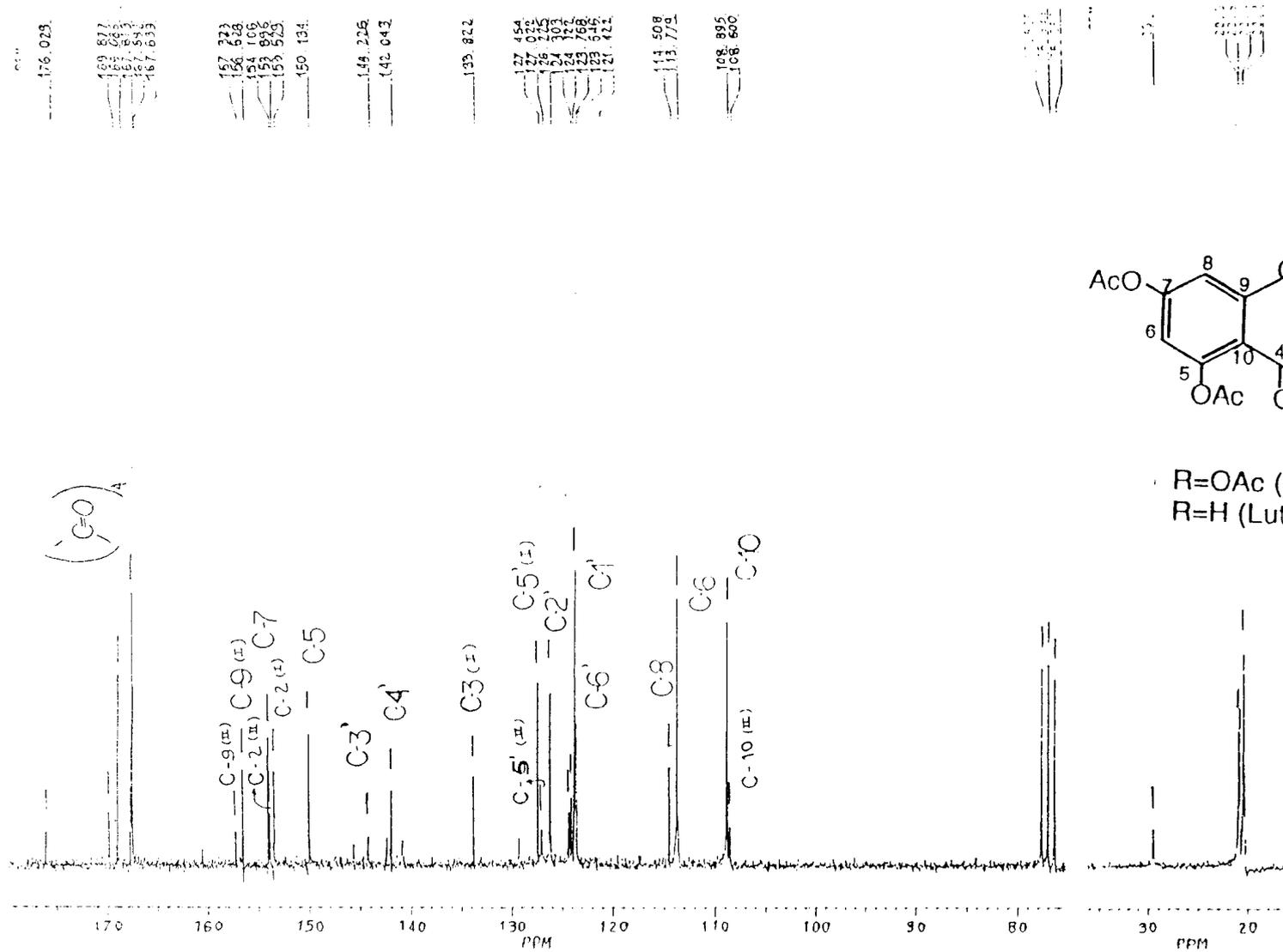


Figura 21- Espectro unidimensional de RMN de  $^{13}\text{C}$ (50,3MHz) de S-830-Ac em  $\text{CDCl}_3$ .

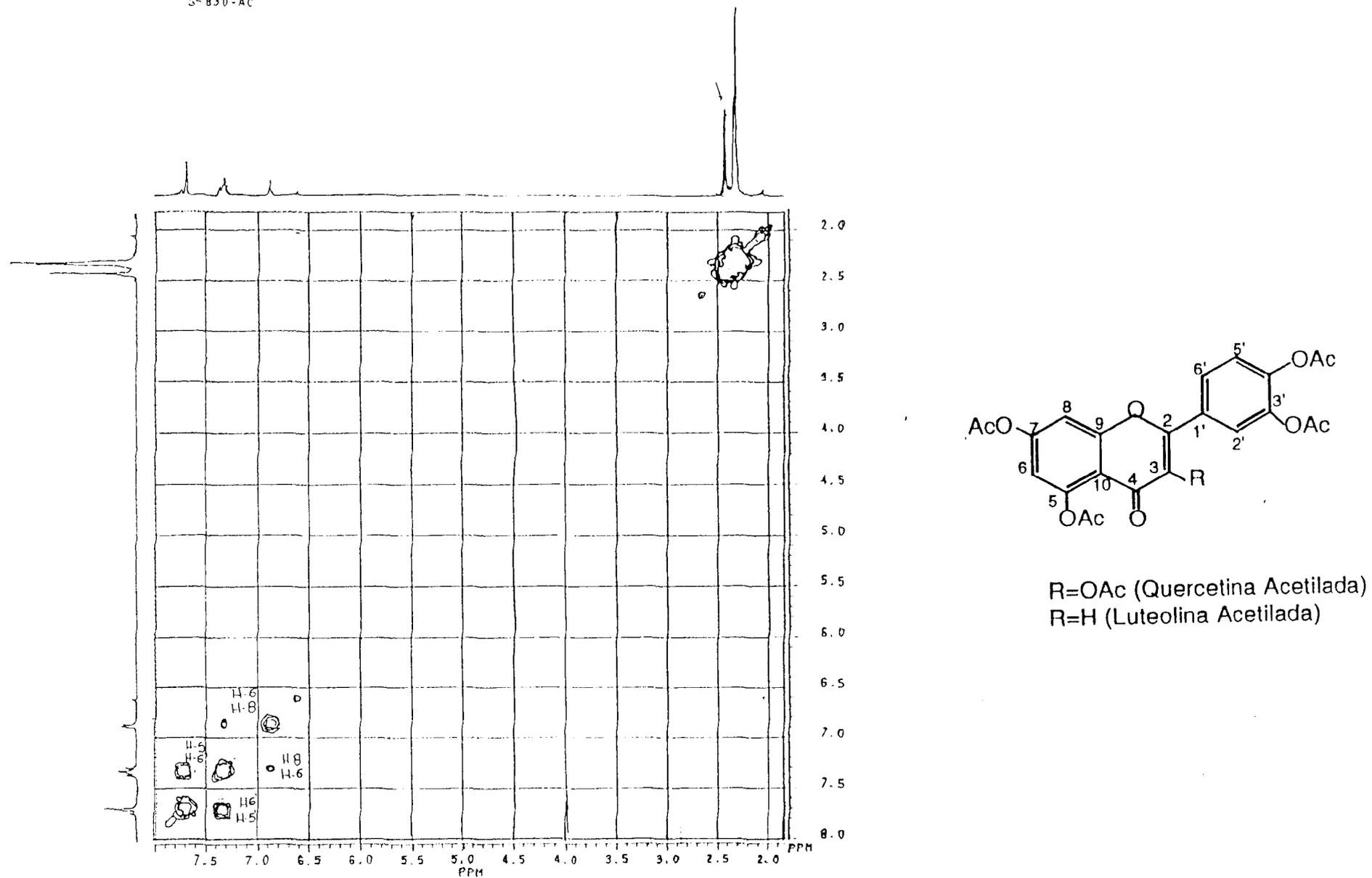
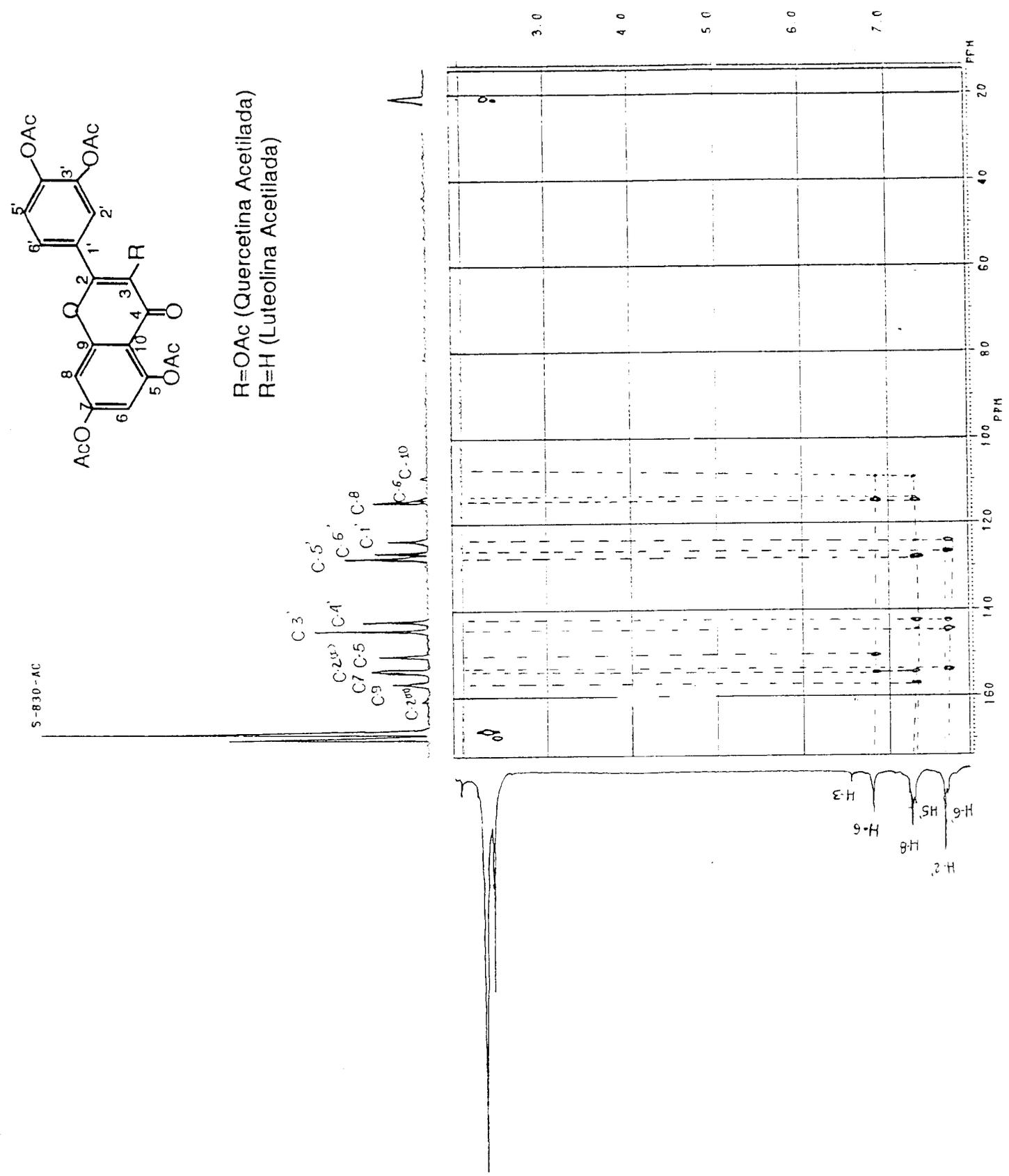


Figura 22- Espectro bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio e hidrogênio ( $^1Hx^1H$ - COSY) de S-830-Ac em  $CDCl_3$ .

Figura 23- Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono a longa distância [ $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ -COSY  $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ( $n= 2$  e  $3$ ), COLOC] de S-830-Ac em  $\text{CDCl}_3$ .



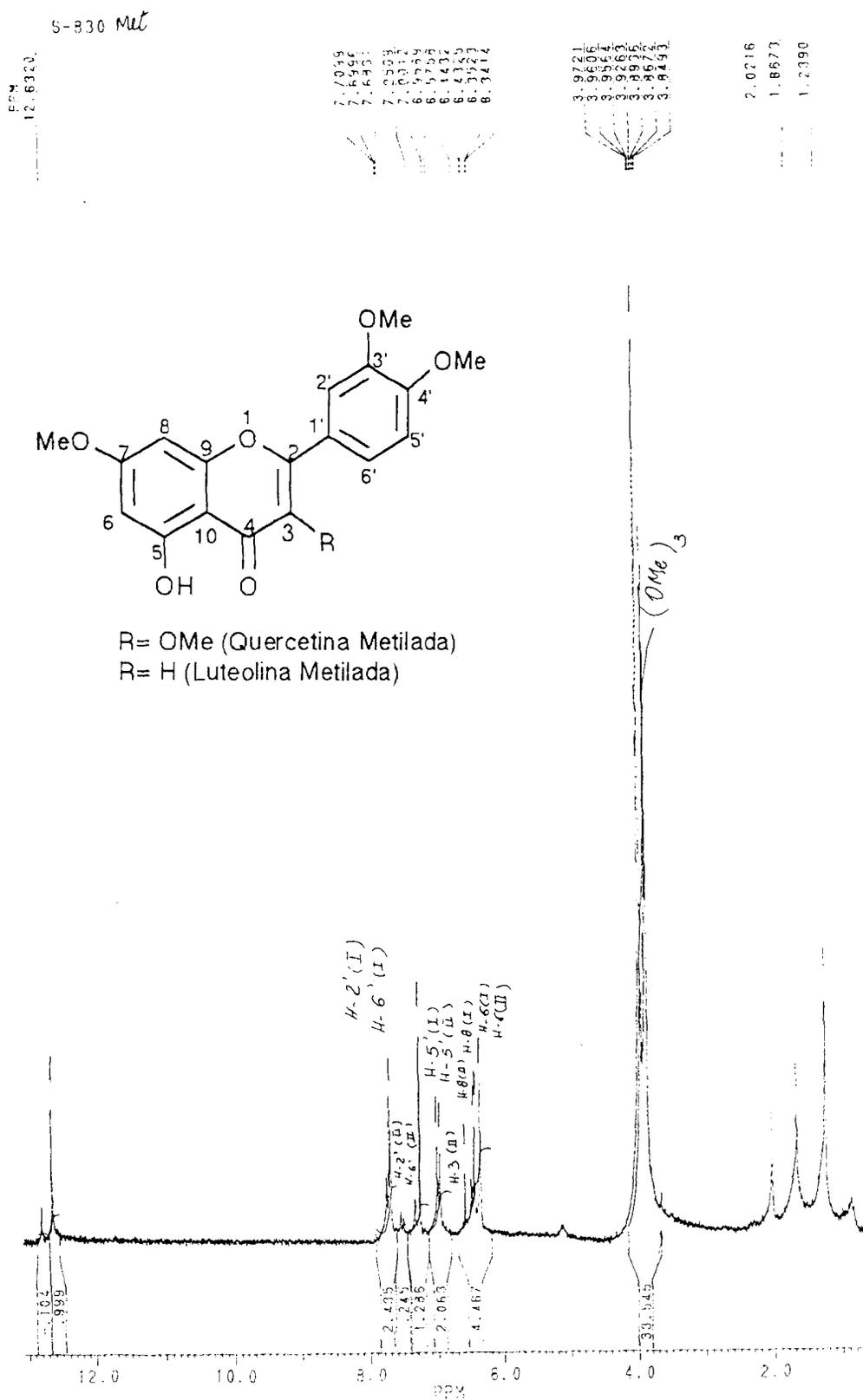


Figura 24- Espectro unidimensional de RMN  $^1\text{H}$ (200,13MHz) de S-830-Me em  $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$



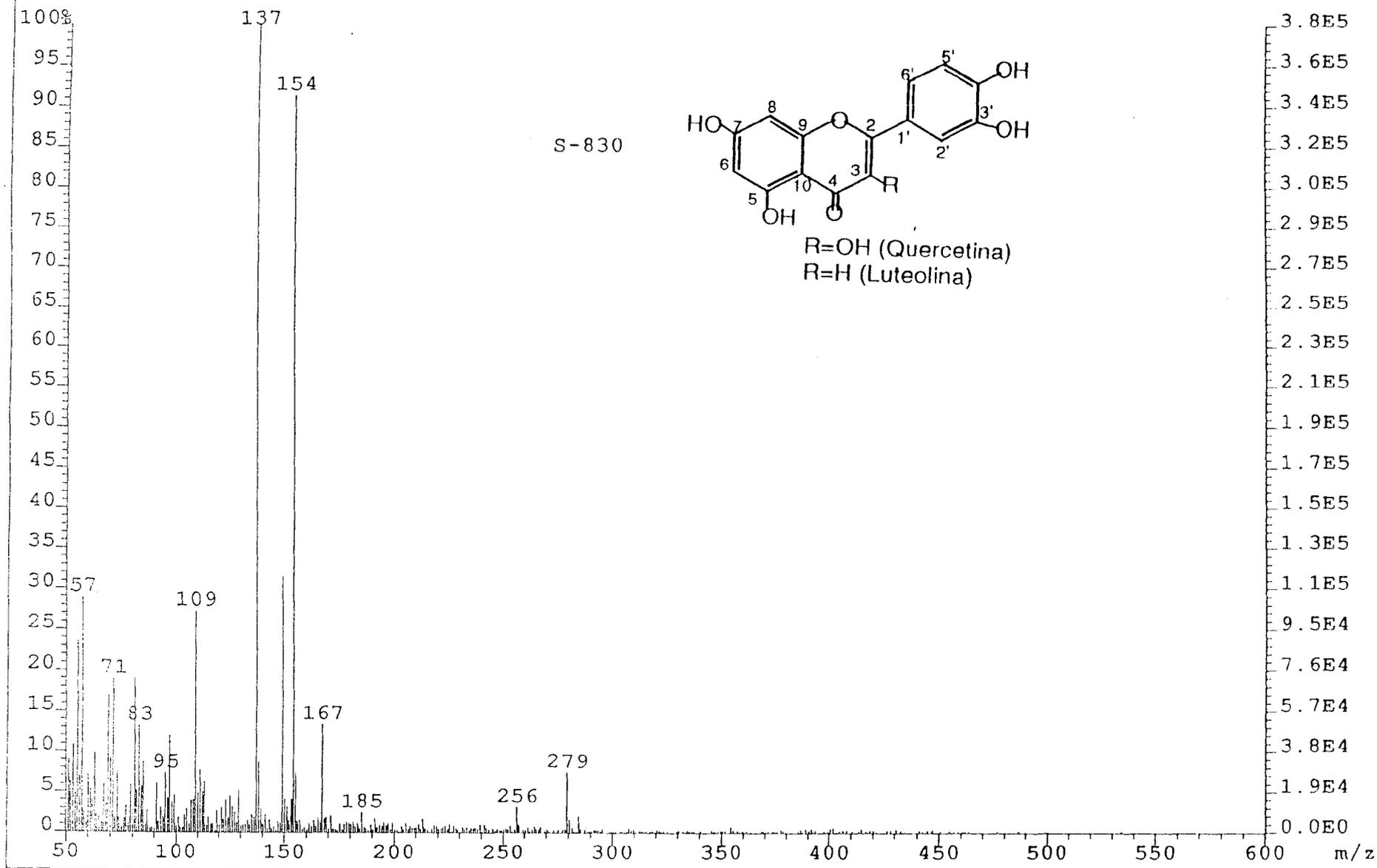
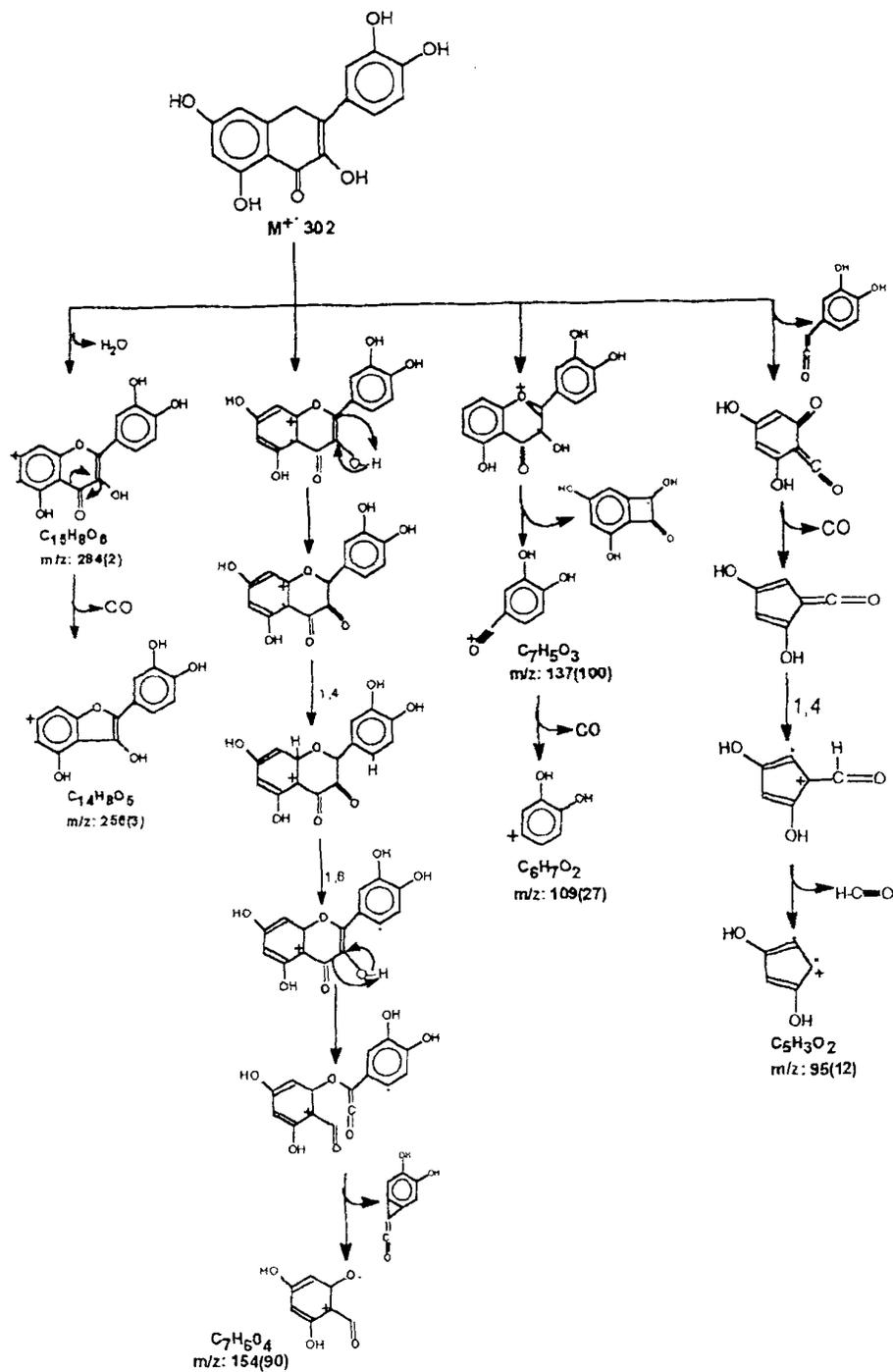


Figura 26- Espectro de massas por impacto de elétrons de S-830



Esquema 7: Fragmentação de massas da amostra S-830.

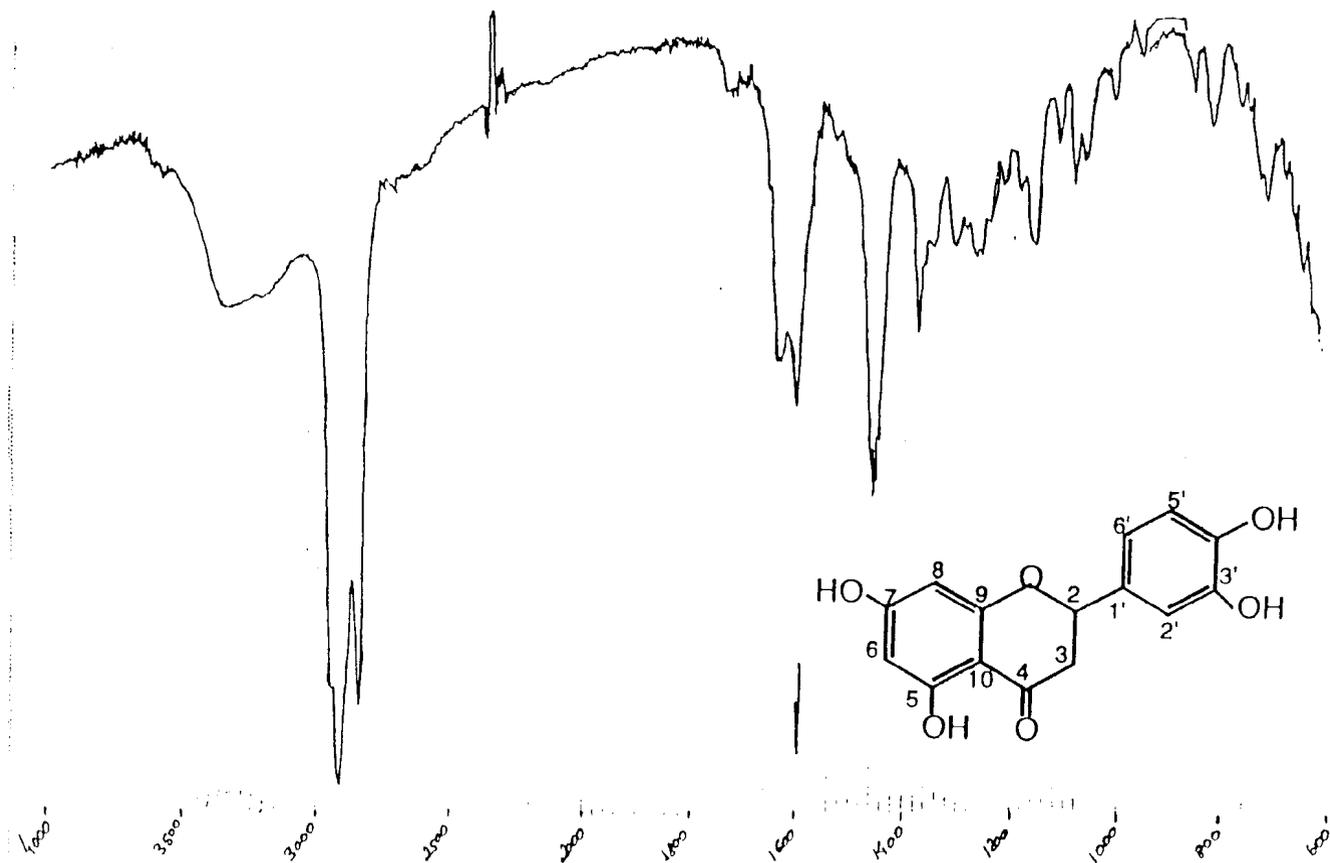


Figura 27- Espectro de infra- vermelho em pastilha de KBr de S-728

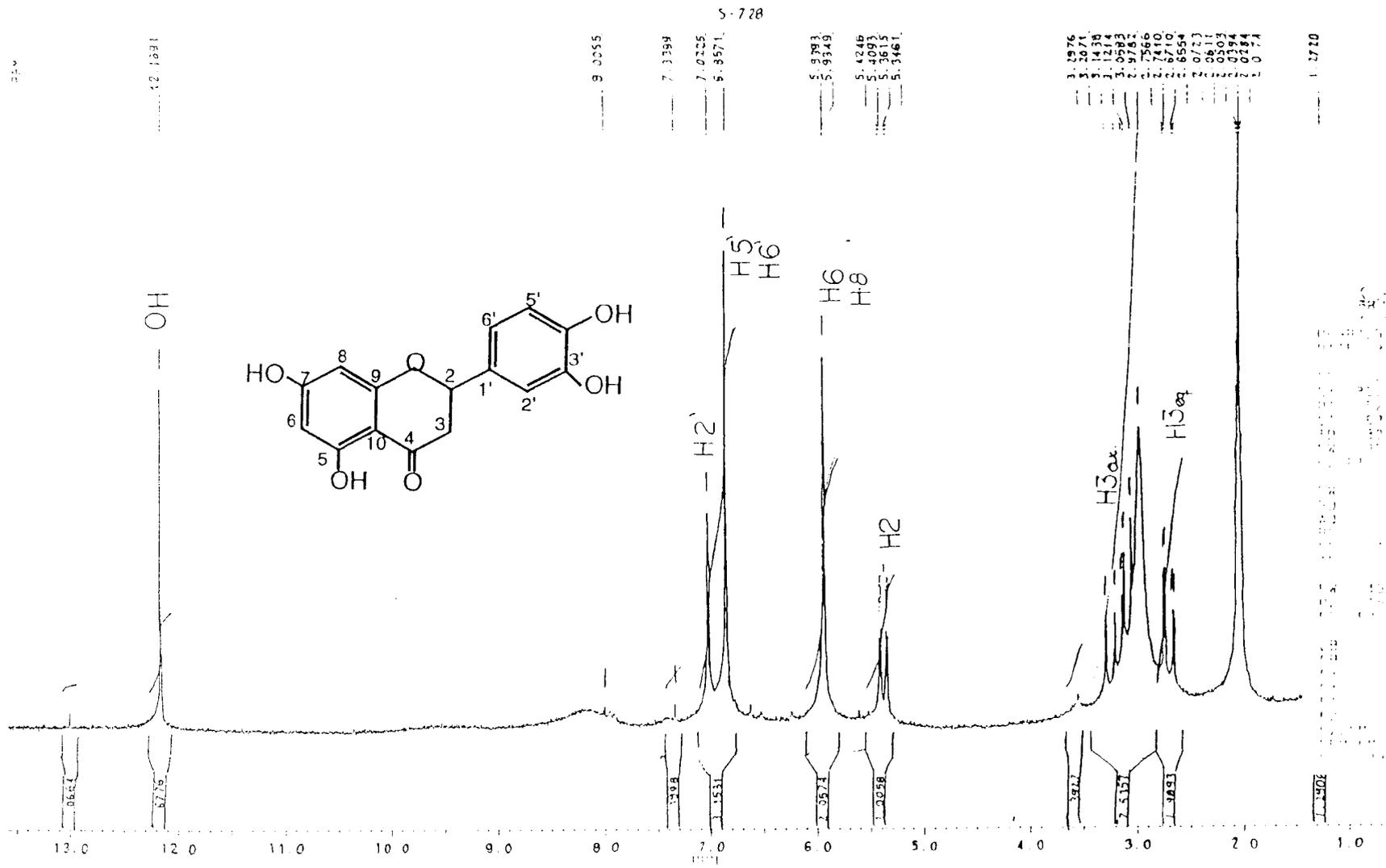


Figura 28- Espectro unidimensional de RMN  $^1\text{H}$ (200,13MHz) de S-728 em

$\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$

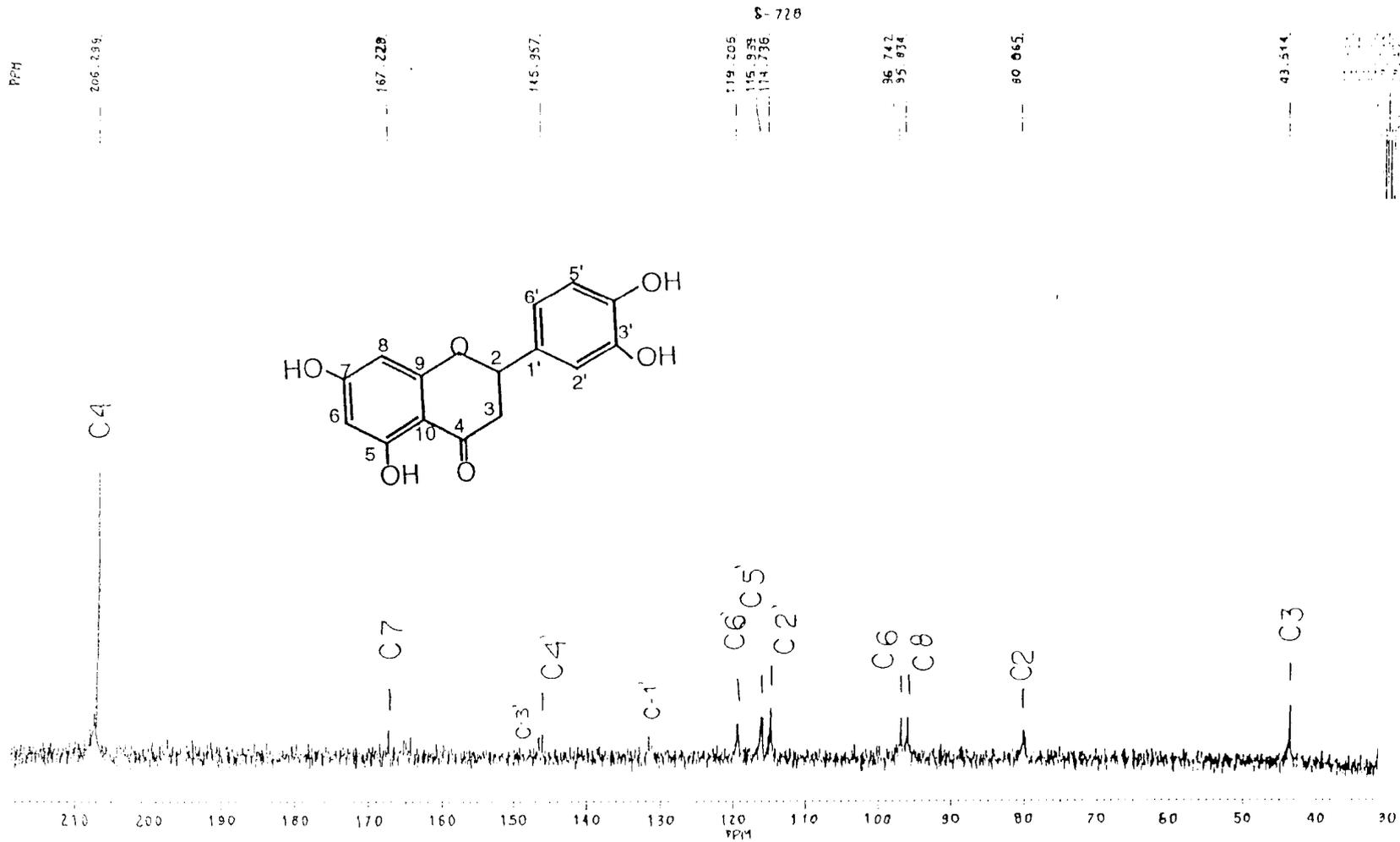


Figura 29- Espectro unidimensional de RMN  $^{13}\text{C}$ (50,3MHz) de S-728 em  $\text{D}_6\text{C}_2\text{CO}$

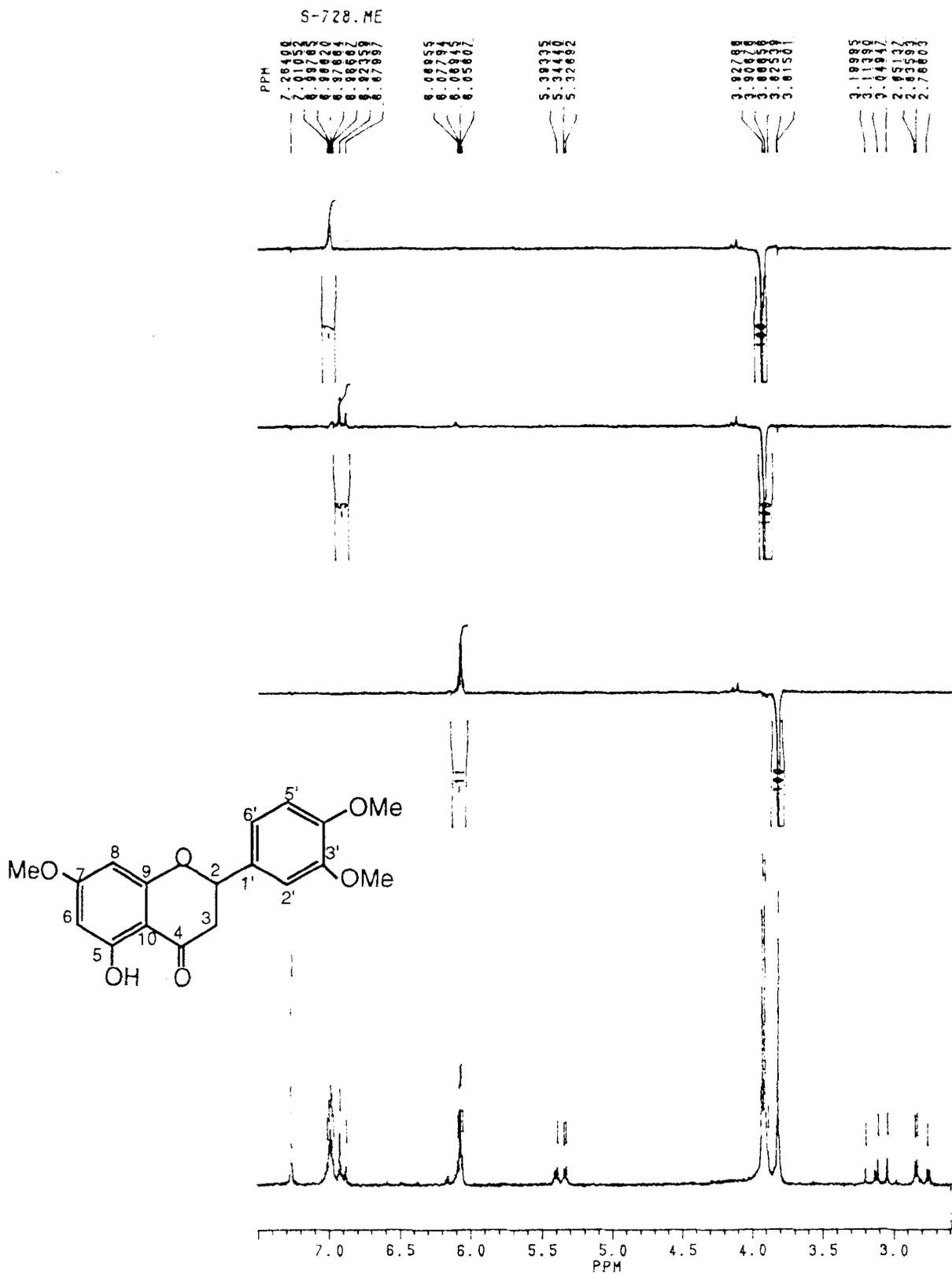


Figura 30- Espectro resultante da irradiação dupla subtração de espectros (NOE) de S-728-OMe

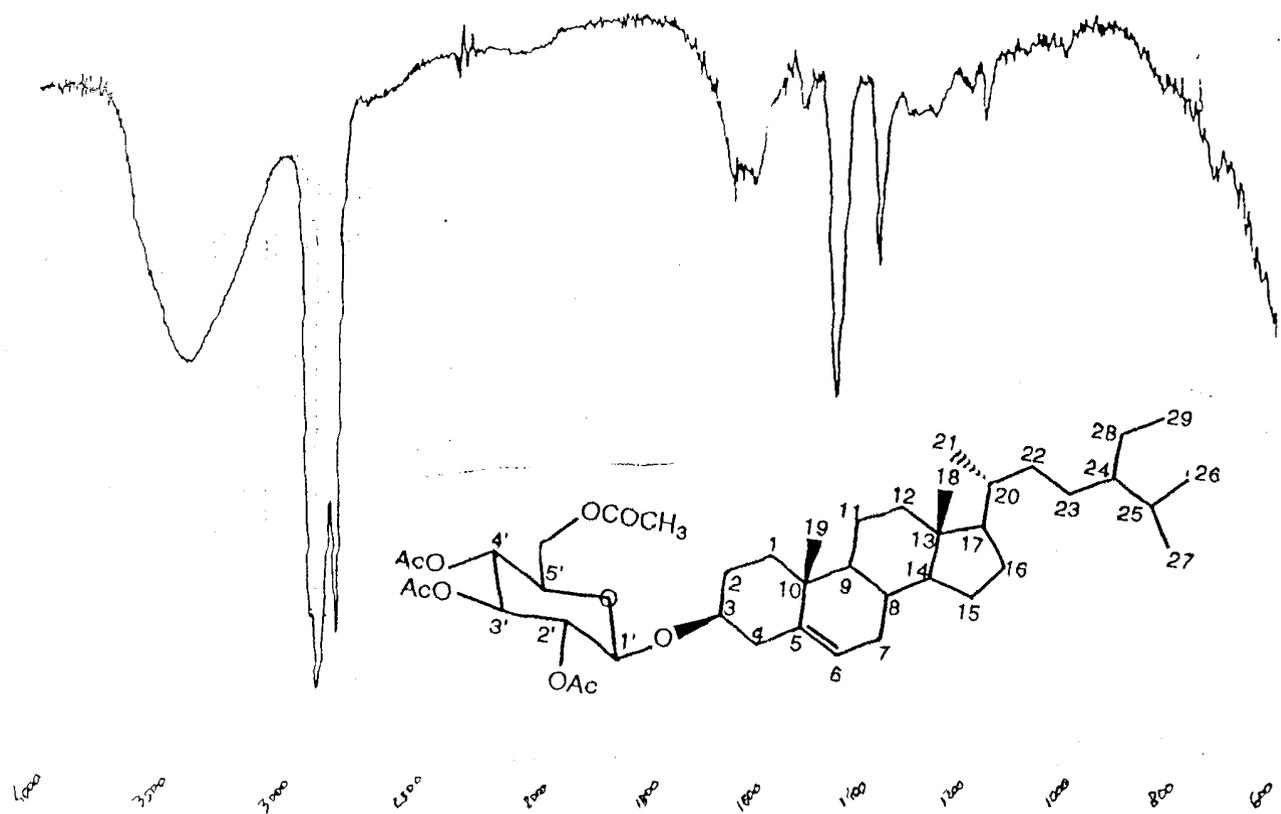


Figura 31- Espectro de infra-vermelho em pastilha de KBr de S-1203-Ac

SC-1203-AC

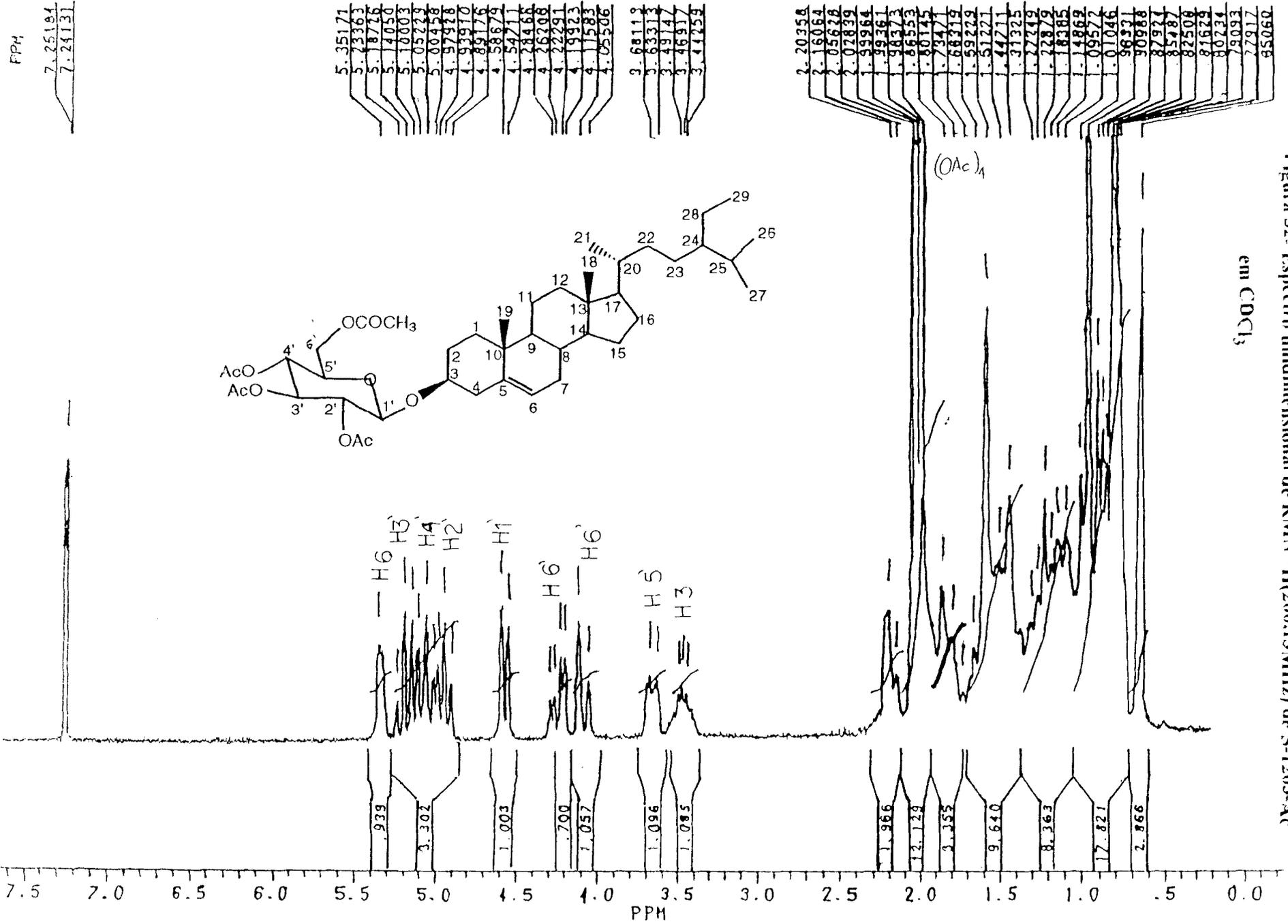


Figura 32. Espectro unidimensional de RMN <sup>1</sup>H(200.13MHz) de S-1203-AC em CDCl<sub>3</sub>

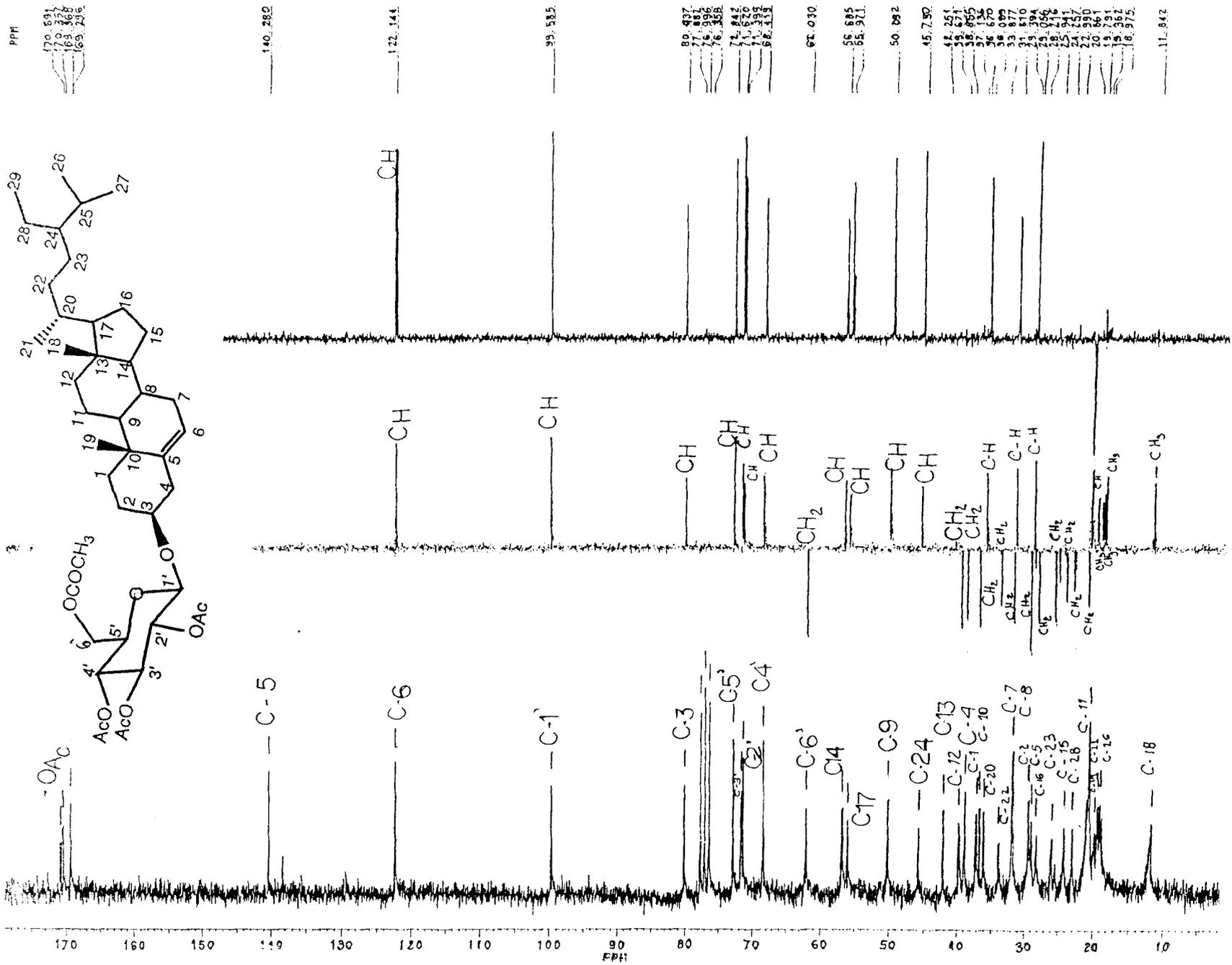


Figura 33- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  PND e DEPT de S-1203-Ac em  $\text{CDCl}_3$ .

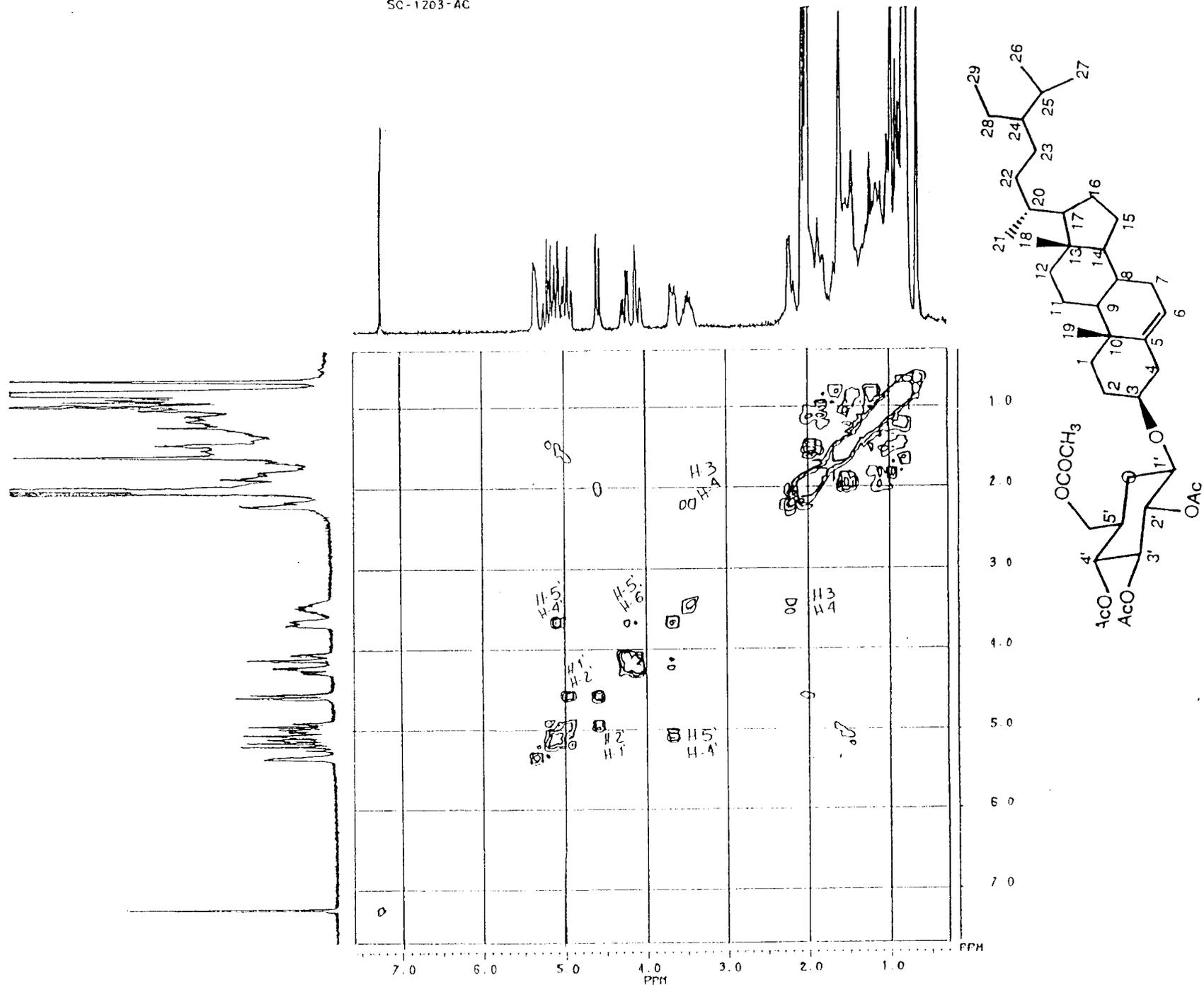


Figura 34- Espectro bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio e hidrogênio ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY) de S-1203 em  $\text{CDCl}_3$

File:CRIS1 Ident:815-719 Mer Def 0.25 Acq: 1-AUG-1991 12:15:28 +28:57 Cal:PFK108  
AutoSpecQ EI+ Magnet BpM:55 BpI:370656 TIC:8125649 Flags:HALL

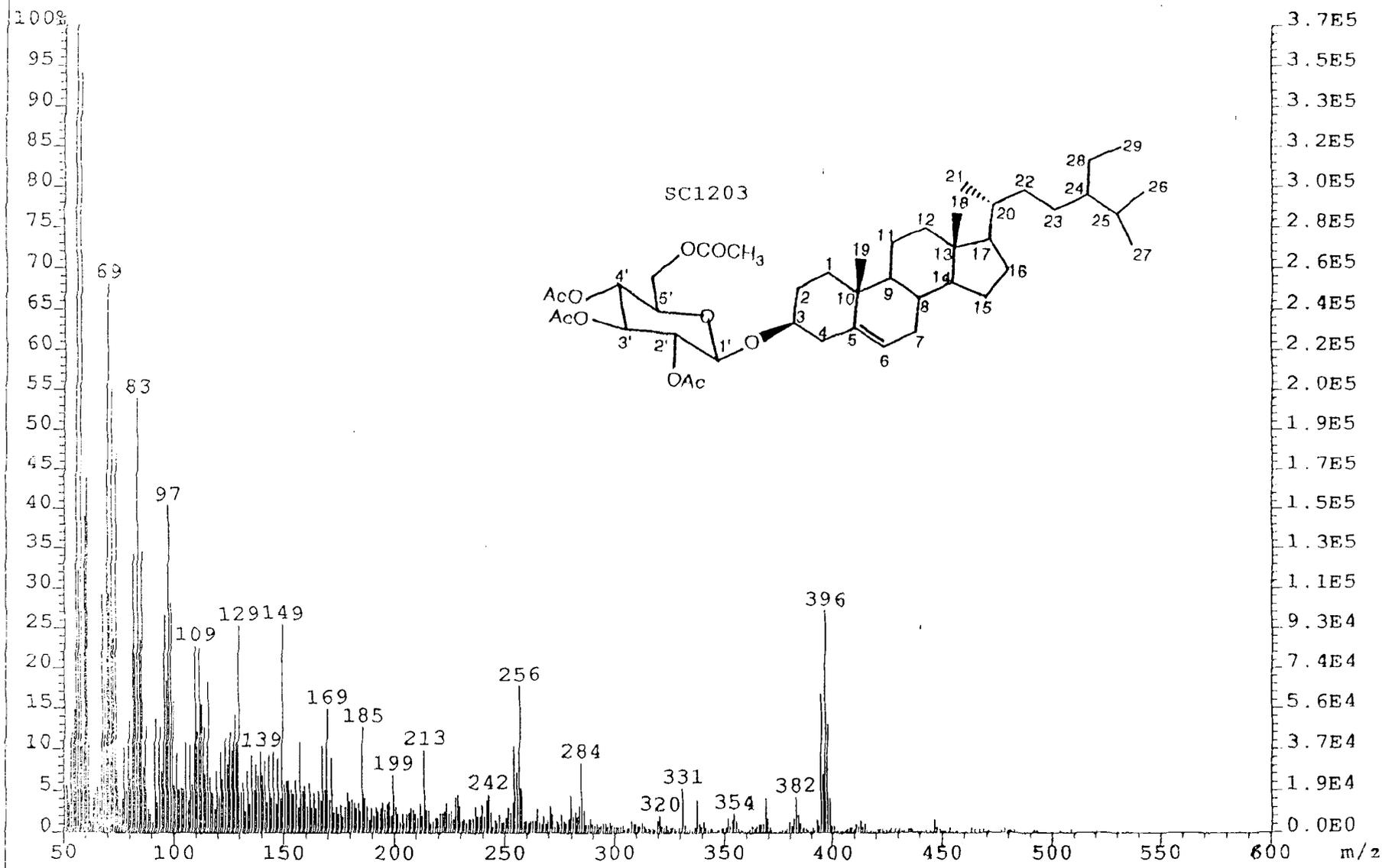


Figura 35- Espectro de massas obtido por impacto de elétrons de S-1203Ac



### Referências Bibliográficas:

- 1- Barroso, G. M. Sistemática de Angiospermas do Brasil. UFV-MG, 1986. 3. p237- 239, 249p.
- 2- Heywood, V. H.; Harbone, J. B. & Turner, B. L. The Biology and Chemistry of the Compositae, Academic Press London, 1977.
- 3- Cabrera, A.L. Compuesta Argentinas. Clave para la Determinacion de los Genêros. Revta Mus Argent. Ciênci. Nat. Bot., 1961. 2. p291-362.
- 4- Côrrea, M. P. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Ministério da Agricultura; Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. 5. 588p.
- 5- Vivian, C.; Elliot, M.; Jeffrey, H. Plant Flavonóides in Biology and Medicine. Alan R. Liss, Inc. New York, 1987. 23. 8p.
- 6- Denno, R. F.; McClure, M. S. Variable Plants and Herbivoros in Natural end Managed Systems. Academic Press New York, 1983.
- 7- Wood, R. S.; Jellis, G. J. Plant Diseases. Oxford, Blackwell, 1984.
- 8- Rice, E. Allelopaty. Orlando, Academic Press, 1984
- 9- Hayashi, K.. Fortschr Chemie Org. Naturst. 1959. 17. p248-285.
- 10- Venkataraman, K. Fortschr Chemie Org. Naturst. 1959. 17. p1-69.
- 11- Robinson, R. Nature. 1936. 137. p172-173.
- 12- Birch, A. J.; Donovan, F. W. Austral J. Chem. 1953. 6. p360-368.
- 13- Harbone, J. B.; Mabry, T. J. The Flavonoids. London, Chapman and Hall, 1901.

- 14- Vickey, M. L.; Vickerey, B. Secondary Plant Metabolism. London, McMillan, 1901.
- 15- Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. Rapid Chromatographia Technic for Preparative Separations with Moderat Resolution. *J. Org. Chem.*, 1987. **43**. 2923p.
- 16- Hamburguer, M.; Gupta, M.; Hostetman, K. Coumarins from *Polygala paniculata*. *Planta Medica*, 1985. 215p.
- 17- Schaufelberger, D.; Hamburguer, M.; Hostetman, K. Isolement de Flavonoids à L'échelle Preparative. Bull Liais Group Polyphenóis (Narbone), 1982. **11**. 347p.
- 18- Hostetman, K. Hostetman, M. Isolation Techniques for Flavonóides. In: harbone, J. B.; Mabry, T. J. The Flavonoids Advances in Reasarch. London, Chapman and Hall, 1982. p1-8.
- 19- Coronna, G. Chromatographia su Carta a Disco Rotante. *Chim. Ind.* (Millano), 1955. **37**. 113p.
- 20- Hopf, P. P. Radial Chromatography in Industry. *Ind. Eng. Chem.*, 1947. **39**. 938p.
- 21- Hostetman, K. Hostetman, M. K.; Sticher, O. Rapid Preparative Separation of Natural Products by Centrifugal Thin- Layer Chromatography. *Chromatography*, 1980. **202**. 154p.
- 22- Sthal, E.; Muller, J. Parameters of Preparative Centrifugal Thin-Layer Cromatography. *J. Cromatography*, 1982. **15**. 493p.
- 23- Mandava, N. B.; Ito, Y.; Conway, W. D. Countecurrente Chromatography: Recent Instrumentation and Application 1982. **14**. 63p.
- 24- Hostetman, K. Hostetman, M.; Marston, A. Isolation of Natural Products by Droplet Counter-Currente Chromatography and Relative Methods. *Nat. Prod. Rep*, 1984(b). **1**. 471p.

- 25- Hamburger, M.; Gupta, M.; Hostetman, K. Flavonol Glicosides from *Securidaca diversifolia*. *Phytochemistry*, In Press, 1985(b).
- 26- Iurd, L. In: Geissman, T. A. The Chemistry of Flavonoids Compounds. London, Pergamon Press, 1962. 107p.
- 27- Mabry, T. J.; Markan, K. R.; thomas, M. B. The Sistematic Identification of Flavonóides. New York, Usa, Spriger- Verlag New York Inc., 1969.
- 28- Filho, R. B. Estudo Químico de Apuleia leiocarpa. Rio de Janeiro, 1977. p8-10. [ Tese de dout. Quím.- UFRuRJ].
- 29- Derome, A. E. Modern NMR Techniques for Chemistry Research Oxford,Pergamon Press, 1988.
- 30- Breitmaier, E. & Voelter, w. Carbon-13 NMR Spectroscopy: High-Resolution Methods and .Aplications in Organic Chemistry and Biochemistry. 3rd. ed., Weinheim, VCH, 1987.
- 31- Rahman, A. U. One and Two Dimensional NMR Spectroscopy. 1989.186, 277-280, 412p.
- 32- Buckingham, J. Dictionary of Natural Products. London, Chapman & Hall, 1993.
- 33- Bradbury, R.B.; White, D. E. Vitamins and Hormones. 1954. **12**. 207p.
- 34- Hu, C-Q.; Chen, K.; Shi, Q.; Kilkuskie, R. E.; Cheng, Y. C.; Lee, K. H. J. Anti- Aids Agents, 10- Acacetin- 7- O-  $\beta$ - D- Galacto Piranoside, an Anti-HIV Principle from *Chrysantemum morifolium* and a Struture Activity Correlation with some related Flavonóides. *J. Nat. Prod.*, 1994. **57**. 42p.
- 35- Agrwal, P. K. Carbon- 13 NMR of Flavonoides. 1989. 103, 135 e 155p.
- 36- Itoh, T.; Yoshid, K.; Tamura, T.; Matsunceto, T. *Phytochemistry*. 1982. (21) **3**. 727p.
- 37- Chaubasia, N. & Wichtt, M. *J. Nat. Prod.* 1987. (50) **5**. 881p.