

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

**Outros constituintes isolados de espécies de *Ouratea*, estudo
de *Ochna serrulata* e avaliação de atividades biológicas**

QUELI CRISTINA FIDELIS

2015



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

**Outros constituintes isolados de espécies de *Ouratea*, estudo
de *Ochna serrulata* e avaliação de atividades biológicas**

QUELI CRISTINA FIDELIS

Sob a orientação do Professor
Dr. Mario Geraldo de Carvalho
e Co-Orientação da Professora
Dra. Marisa Fernandes Mendes

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau
de Doutor em Ciências, Área de
Concentração em Química
Orgânica

Seropédica-RJ

Março-2015

547
F451o
T

Fidelis, Queli Cristina, 1984-

Outros constituintes isolados de espécies de *Ouratea*, estudo de *Ochna serrulata* e avaliação de atividades biológicas / Queli Cristina Fidelis - 2015.

251 f.

Orientador: Mario Geraldo de Carvalho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Química.

Inclui bibliografias.

1. Química orgânica - Teses. 2. Ochnaceae - Teses. 3. *Ouratea* - Cuspidata - Teses. 4. *Ouratea* - Hexasperma - Teses. 5. Extração com fluído supercrítico - Teses. 6. Análise cromatográfica - Teses. I. Carvalho, Mario Geraldo de, 1952-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Química. III. Título.

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

QUELI CRISTINA FIDELIS

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Química,
no Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química
Orgânica.

TESE APROVADA EM 20/03/2015



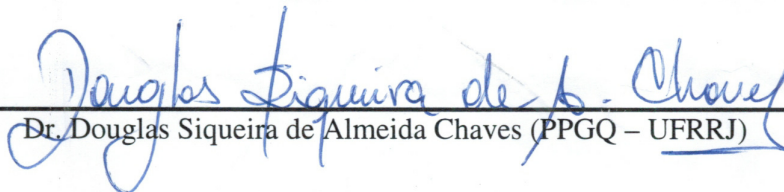
Dr. Mario Geraldo de Carvalho (PPGQ-UFRRJ, Orientador, Presidente)



Dra. Renata Trentin Perdomo (CCBS – UFMS)



Dra. Maria Auxiliadora Coelho Kaplan (IPPN – UFRJ)



Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves (PPGQ – UFRRJ)



Dra. Marise Maleck (CCS – USS)

*A meus pais Dalmo e Maria Ap. Fidelis, e
meu esposo Eduardo Aragão*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho pela orientação, conhecimento e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Marisa Fernandes Mendes pela co-orientação, pelas aulas, pela oportunidade de aplicar a técnica de extração com fluido supercrítico neste trabalho.

À Profa. Dra. Rosane Nora Castro pela colaboração nas análises de CLAE e pela paciência e boa vontade de se colocar a disposição para ajudar no que fosse preciso.

Ao Prof. Norberto Peporine da Faculdade de Farmácia da USP-Riberão Preto, pelas análises de CL-EM-IES e EM-EM.

Ao Prof. João B. Salles da UEZO, a Profa. Cristiane M. C. de Salles e a doutoranda Taís da Silva Rosa do DEQUIM-UFRRJ pela colaboração nos ensaios enzimáticos (CYP e GST).

Ao Prof. Paulo Cezar Vieira da UFSCAR pela colaboração nos ensaios com as enzimas catepsinas.

À Profa. Dra. Renata Trentin Perdomo da UFMS pela colaboração nos ensaios de atividade antiproliferativa.

Ao Doutorando Leonardo pelas análises de dicroísmo circular.

Aos técnicos do ICE-UFRRJ, Francis, Carlão, Fábio, Maurício e Vitor pela ajuda e paciência.

As minhas amigas Tereza, Débora e Mirza pela amizade, pelos momentos alegres e descontraídos no Laboratório.

As alunas de iniciação científica do LQPN que contribuíram na realização deste trabalho Dianne Magalhães Coutinho e Viviana Cerqueira Ongaratto.

A todos do Laboratório de Termodinâmica Aplicada que colaboraram nos experimentos com Fluido Supercrítico, Cristiane, Ana Lucia, Murilo, Matheus e Robson.

A todos os amigos do lab. LQPN (Renata, Giovane, Ilna, Nayde, Lisieux, Ana Paula, Carlos Henrique, Débora, Mirza e Alan) pela amizade e por compartilhar experiências que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do alojamento da Pós-Graduação da UFRRJ, pela amizade e pelos momentos de alegria e tristeza, que ficarão na memória.

Ao meu esposo Eduardo Aragão (Ceará) e meus pais, Maria Ap. Fidelis e Dalmo Fidelis, pelo apoio e paciência em todos os momentos.

A CNPq pela bolsa de estudo concedida e à CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro aos projetos de nosso grupo de pesquisa.

E acima de tudo a Deus, por criar caminhos que não existiam, colocando na minha vida pessoas de Boa Vontade.

MAIS UM POUCO

“Quando estiveres à beira da cólera, cala-te mais um pouco e o silêncio te poupará enormes desgostos. Quando fores tentado a colaborar na maledicência, guarda os princípios do respeito e da fraternidade mais um pouco e a benevolência te livrará de muitas complicações.

Quando o desânimo impuser a paralisação de tuas forças na tarefa a que foste chamado, prossegue agindo no dever mais um pouco e a obra realizada ser-te-á gloriosa benção de luz.

Quando a revolta espicaçar-te o coração, usa a humildade e o bom entendimento mais um pouco e não sofrerás o remorso de haver ferido corações que devemos proteger e considerar.

Quando a lição oferecer dificuldades à tua mente, compelindo-te à desistência do progresso individual, aplica-te ao problema ou ao ensinamento mais um pouco e a solução será divina resposta à tua expectativa.

Quando a ideia de repouso sugerir o adiamento da obra que te cabe fazer, persiste com a disciplina mais um pouco e o dever bem cumprido ser-te-á coroa santificante.

Quando o trabalho lhe parecer monótono e inexpressivo, guarda fidelidade aos compromissos assumidos mais um pouco e o estímulo voltará ao teu campo de ação.

Quando a enfermidade do corpo trazer pensamentos de inatividade, procurando imobilizar-te os braços e o coração, persevera com Jesus mais um pouco e prossegue ajudando a todos, agindo e servindo como puderes, porque o Divino médico jamais nos recebe as rogativas em vão.

Em qualquer dificuldade ou impedimento, não te esqueças de usar um pouco de paciência, amor, renúncia e boa vontade, a favor de teu próprio bem estar.

O segredo da vitória em todos os setores da vida permanece na arte de aprender, imaginar, esperar e fazer mais um pouco”.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	V
LISTA DE ESQUEMAS.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	VII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE OUTROS CONSTITUINTES DE ESPÉCIES de <i>Ouratea</i> E <i>Ochna</i>.....	3
2.1. INTRODUÇÃO.....	4
2.2. OBJETIVOS.....	6
2.2.1. Objetivo Geral.....	6
2.2.2. Objetivos Específicos.....	6
2.3. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.3.1. Gênero <i>Ouratea</i>	8
2.3.2. Estudos anteriores realizados com as espécies de <i>O. ferruginea</i> , <i>O. cuspidata</i> , <i>O. hexasperma</i> , <i>O. semisserrata</i> e <i>O. stipulata</i>	20
2.3.3. Gênero <i>Ochna</i> – aspectos químicos e biológicos.....	21
2.4. RELEVÂNCIA DO TRABALHO.....	25
2.5. PARTE EXPERIMENTAL.....	25
2.5.1. Fracionamento Cromatográfico.....	25
2.5.2. Análises Cromatográficas.....	26
2.5.3. Equipamentos.....	26
2.5.4. Preparação de derivados.....	27
2.5.4.1. Acetilação com anidrido acético e piridina.....	27
2.5.4.2. Transesterificação em meio ácido.....	27
2.5.5. Material Vegetal.....	28
2.5.6. Elaboração dos extratos.....	29
2.5.7. Partição líquido-líquido.....	30
2.5.8. Fracionamento de extratos e frações de <i>Ouratea</i> para obtenção de biflavonoides.....	31
2.5.9. Fracionamento cromatográfico de OHCD.....	32
2.5.10. Fracionamento cromatográfico de OHCM-PD.....	33
2.5.11. Fracionamento cromatográfico de OHCM-PA.....	34
2.5.12. Fracionamento cromatográfico de OHIM.....	35
2.5.13. Fracionamento cromatográfico de OFFM-PD.....	35
2.5.14. Fracionamento cromatográfico de OSFM-PD.....	36
2.5.15. Fracionamento cromatográfico de OSFM-PA.....	37
2.5.16. Fracionamento cromatográfico de OCFAPH.....	37
2.5.17. Fracionamento cromatográfico de OCSFM.....	38
2.6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
2.6.1. 2,5-dimetoxibenzoquinona (1) isolada de OHCD.....	41
2.6.2. Betulina (2) isolada de OHCD.....	43
2.6.3. Prunetina (3) isoladas de OHCD.....	46
2.6.4. <i>Trans</i> -3- <i>O</i> -metil-resveratrol-2- <i>C</i> - β -glucosídeo (4) isolada de OHCM-PD.....	52
2.6.5. Lithospermosídeo (5) isolado de OHCM-PAB.....	61
2.6.6. Derivado acetilado da substância (5 ^a).....	68
2.6.7. Apigenina (6) isolada de OHIM.....	73
2.6.8. Luteolina (7) isolada de OHIM.....	75
2.6.9. Amentoflavona (8) isolada de OHIM.....	77
2.6.10. Putraflavona (9) isolada de OFFM-PD.....	80

2.6.11. Heveaflavona (10) isolada de OSFM-PD.....	85
2.6.12. Derivado acetilado (10a)	90
2.6.13. Ácido p-hidroxi-benzóico (11) isolado de OSFM-PA.....	92
2.6.14. Ácido 3,4-dihidroxi-benzóico (12) isolada de OSFM-PA.....	94
2.6.15. Ácido 2-hidroxi-5- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -(4-hidroxibenzoil)- β -D-glicopiranosil)-benzóico (13) isolado de OSFM-PA.....	95
2.6.16. Ácido 2-hidroxi-5- <i>O</i> -(β -D-glicopiranosil)-benzóico (14) isolada de OSFM-PA.....	104
2.6.17. Ácido 3 β - <i>O</i> -acil-maslínico (15) isolada de OCFAPH.....	109
2.6.18. Mistura dos ácidos 3 β - <i>O</i> -acil-maslínico (15) e 2 α - <i>O</i> -acil-maslínico (16) isolada de OCFAPH.....	113
2.6.19. Ácido maslínico (17) isolada de OCFAPH.....	125
2.6.20. Diidroochnaflavona (18) isolada de OCHSFM.....	129
2.6.21. Ochnaflavona (19) isolada de OCHSFM.....	133
2.6.22. 6''-acetil-scoparosídeo (20) isolada de OCHSFM.....	138
2.6.23. Análise por CLAE das frações contendo biflavonoides.....	142
2.6.24. Considerações biogenéticas sobre os constituintes isolados de <i>Ouratea</i> e <i>Ochna</i>	162
2.7. CONSIDERAÇÕES.....	168
2.8. REFERÊNCIAS.....	169
3. ESTUDO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Ouratea</i>.....	177
3.1. INTRODUÇÃO.....	178
3.2. OBJETIVOS.....	178
3.2.1. Objetivo Geral.....	178
3.2.2. Objetivos Específicos.....	178
3.3. REVISÃO DA LITERATURA.....	178
3.3.1. Atividades biológicas apresentadas por espécies do gênero <i>Ouratea</i>	178
3.3.1.1. Atividade antiviral.....	179
3.3.1.2. Atividade antitumoral.....	180
3.3.1.3. Atividade anti-inflamatória.....	181
3.3.1.4. Atividade hepatoprotetora	182
3.3.1.5. Atividade enzimática.....	183
3.3.1.6. Atividade vasodilatadora.....	185
3.3.1.7. Atividade antimalarial.....	185
3.3.1.8. Atividade antimicrobiana.....	186
3.3.1.9. Atividade antioxidante.....	188
3.3.2. Aspectos etnofarmacológicos.....	188
3.3.3. Análise dos estudos biológicos realizados com as espécies de <i>Ouratea</i> e suas correlações com os usos encontrados na medicina popular.....	189
3.3.4. Flavonoides como moduladores de enzimas.....	191
3.3.4.1. Enzimas de biotransformação.....	192
3.3.4.2. Catepsinas.....	193
3.3.5. Relevância do Trabalho.....	193
3.4. PARTE EXPERIMENTAL.....	193
3.4.1. Ensaio de avaliação do efeito modulatório de flavonoides sobre a atividade enzimática de CYP1A e GST.....	193
3.4.2. Ensaio de avaliação do efeito modulatório de flavonoides sobre a atividade enzimática de catepsina K, L e V.....	195
3.4.3. Ensaio de avaliação do efeito citotóxico frente a linhagens tumorais.....	195
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	196
3.5.1. Avaliação do efeito modulatório de flavonoides sobre a atividade de enzimas CYP1A e GST.....	196
3.5.2. Avaliação do efeito modulatório de flavonoides sobre a atividade de enzimas catepsinas K, V e L.....	198

3.5.3. Avaliação do efeito antiproliferativo de flavonoides frente à linhagem tumorais.....	199
3.6. CONSIDERAÇÕES.....	201
3.7. REFERÊNCIAS.....	202
4. EXTRAÇÃO COM CO₂ SUPERCRÍTICO DO ÓLEO DE FOLHAS DE <i>Ouratea hexasperma</i>: ANÁLISE DE BIFLAVONOIDES.....	206
4.1. INTRODUÇÃO.....	207
4.2. OBJETIVOS.....	208
4.2.1. Objetivo Geral.....	208
4.2.2. Objetivos Específicos.....	208
4.3. REVISÃO DA LITERATURA.....	209
4.3.1. Extração com fluido supercrítico.....	209
4.3.2. Variáveis que influenciam a extração de flavonoides por EFS.....	211
4.3.3. Relevância do Trabalho.....	219
4.4. PARTE EXPERIMENTAL.....	220
4.4.1. Material Vegetal.....	220
4.4.2. Equipamentos e reagentes.....	220
4.4.3. Extração - Ensaios preliminares.....	221
4.4.4. Experimentos do delineamento.....	222
4.4.5. Extração usando Soxhlet.....	222
4.4.6. Análise dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	223
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	223
4.5.1. Análise do Rendimento (R1) por Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).....	223
4.5.2. Análise qualitativa de biflavonoides.....	227
4.5.3. Análise quantitativa de biflavonoides.....	236
4.5.4. Rendimento de biflavonoides totais (R2)	237
4.6. CONSIDERAÇÕES	239
4.7. REFERÊNCIAS.....	240
5. CONCLUSÕES.....	242

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas de biflavonoides encontrados nos gêneros <i>Lophira</i> , <i>Luxemburgia</i> , <i>Ochna</i> e <i>Ouratea</i> .	8
Figura 2. Estruturas de flavonoides 1-31 , e biflavonoides 32-56 .	14
Figura 3. Estruturas de biflavonoides 57-72 isolados de espécies do gênero <i>Ouratea</i>	15
Figura 4. Estruturas de terpenos 73-86 e esteroides 87-93	17
Figura 5. Estruturas de outras substâncias isoladas de espécies do gênero <i>Ouratea</i> 94-137	19
Figura 6. Estruturas de flavonoides isolados de espécies do gênero <i>Ochna</i> 138-151	24
Figura 7. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 1	42
Figura 8. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da substância 1	42
Figura 9. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 2	45
Figura 10. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da substância 2	45
Figura 11. Expansão do espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da substância 2 de 7,5 à 65,0 ppm	45
Figura 12. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 3	48
Figura 13. Mapa do contorno RMN-HSQC (500/125 MHz, MeOD) da substância 3	48
Figura 14. Mapa do contorno RMN-HMBC (500/125 MHz, MeOD) da substância 3	49
Figura 15. Expansão do mapa de contorno RMN-HMBC (500/125 MHz, MeOD) da substância 3	50
Figura 16. Cromatograma (CG) de OHCD-116-120, sinal 1 (t _R = 23,620 min) corresponde a substância 3	51
Figura 17. Espectro de Massa do sinal com TR = 23,620 s, substância 4	51
Figura 18. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 4	54
Figura 19. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 4	54
Figura 20. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, DMSO-d ₆) da substância 4	55
Figura 21. Espectro de massas (TOF-MS-ESI) da substância 4	55
Figura 22. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, MeOD) da substância 4	56
Figura 23. Espectro de NOEDIFF (500 MHz, MeOD) da substância 4	56
Figura 24. Mapa do contorno RMN-HSQC (500/125 MHz, DMSO-d ₆) da substância 4	57
Figura 25. Expansão do mapa do contorno RMN-HMBC (500/125 MHz, DMSO-d ₆) da substância 4 , de 3,0 a 5,0 ppm.	58
Figura 26. Expansão do mapa do contorno RMN-HMBC (500/125 MHz, DMSO-d ₆) da substância 4 , de 6,2 a 6,9 ppm.	59
Figura 27. Expansão do mapa do contorno RMN-HMBC (500/125 MHz, DMSO-d ₆) da substância 4 , de 7,2 a 8,1 ppm.	60
Figura 28. Espectro de IV (KBr) da substância 5	62
Figura 29. Expansão espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 5	62
Figura 30. Expansão espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 5	62
Figura 31. Espectro de RMN ¹³ C (400 MHz, DMSO-d ₆) da substância 5	63
Figura 32. Expansão do espectro de RMN ¹³ C (400 MHz, DMSO-d ₆) da substância 5	63
Figura 33. Mapa de contorno de COSY (400 MHz, DMSO-d ₆) da substância 5	64
Figura 34. Mapa de contorno de HSQC (400 MHz, DMSO-d ₆) da substância 5	65
Figura 35. Mapa de contorno de HMBC (400 MHz, DMSO-d ₆) da substância 5	66
Figura 36. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância 5a	69
Figura 37. Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância 5a	69
Figura 38. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da substância 5a	69
Figura 39. Expansão do mapa de contorno de COSY (400 MHz, CDCl ₃) da substância 5a	70
Figura 40. Mapa de contorno de HSQC (400 MHz, CDCl ₃) da substância 5a	71
Figura 41. Mapa de contorno de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) da substância 5a	72
Figura 42. Espectro de NOEDIFF com irradiação na frequência de δ _H 6,31	73
Figura 43. Espectro de dicróísmo circular (DC) e UV da substância 5a em metanol.	73

Figura 44. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) da substância 6	74
Figura 45. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 7	76
Figura 46. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, DMSO-d ₆) da substância 7	77
Figura 47. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 8	79
Figura 48. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 8	79
Figura 49. Espectro de RMN ¹³ C (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 8	80
Figura 50. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substância 9	82
Figura 51. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substância 9	82
Figura 52. Espectro de NOEDIF (500 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substância 9 com irradiação frequência da metoxila 3,89 ppm	83
Figura 53. Espectro de NOEDIF (500 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substância 7 com irradiação na frequência da metoxila 3,79 ppm	83
Figura 54. Expansão do mapa do contorno RMN HSQC (500 MHz, CD ₃ COCD ₃) da substância 9	84
Figura 55. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 10	87
Figura 56. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 10	87
Figura 57. Espectro de RMN ¹³ C (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 10	88
Figura 58. Expansão do espectro de RMN ¹³ C (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 10	88
Figura 59. Expansão do espectro de RMN ¹³ C (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 10	89
Figura 60. Expansão do espectro de RMN ¹³ C (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 10	89
Figura 61. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 10a	90
Figura 62. Expansão espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 10a	91
Figura 63. Espectro de NOEDIFF (500 MHz, CDCl ₃) da substância 10a com irradiação na frequência 3,78.	91
Figura 64. Espectro de NOEDIFF (500 MHz, CDCl ₃) da substância 10a com irradiação na frequência 3,88-3,89	92
Figura 65. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 11	93
Figura 66. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, DMSO-d ₆) da substância 11	93
Figura 67. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 12	94
Figura 68. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, DMSO-d ₆) da substância 12	95
Figura 69. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 13	97
Figura 70. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 13	97
Figura 71. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, DMSO-d ₆) da substância 13	98
Figura 72. Expansão do espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, DMSO-d ₆) da substância 13	98
Figura 73. Expansão do mapa de contorno de HSQC (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 13	99
Figura 74. Expansão do mapa de contorno de HSQC (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 13	100
Figura 75. Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 13	101
Figura 76. Expansão do mapa de contorno de HMBC (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 13	102
Figura 77. Expansão do mapa de contorno de HMBC (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 13	103
Figura 78. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, MeOD) da substância 13 .	104
Figura 79. Espectro de NOEDIFF (500 MHz, MeOD) da substância 13 com irradiação na frequência 4,87	104
Figura 80. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, MeOD) da substância 14	106
Figura 81. Expansão do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, MeOD) da substância 14	106
Figura 82. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, MeOD) da substância 14	106
Figura 83. Mapa do contorno de HSQC (400 MHz, MeOD) da substância 14	107
Figura 84. Mapa do contorno de HMBC (400 MHz, MeOD) da substância 14	108
Figura 85. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 15	111
Figura 86. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 15	111
Figura 87. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da substância 15	112
Figura 88. Expansão do espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da substância 15	112
Figura 89. Espectros de EM-IES 1 ^a ionização e 2 ^a ionização da substância 15	113

Figura 90. Espectros de EM-IES 2ª ionização da mistura de 15+16	114
Figura 91. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância 15+16	114
Figura 92. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da mistura de 15+16	115
Figura 93. Espectros de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) da mistura de 15+16	115
Figura 94. Mapa de contorno de HxH COSY (500 MHz, CDCl ₃) da substância 15 +16	119
Figura 95. Mapa de contorno de HSQC (500 MHz, CDCl ₃) da mistura de 15 + 16	120
Figura 96. Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) da mistura de 15 + 16	121
Figura 97. Expansão do mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CDCl ₃) da mistura de 15 + 16	122
Figura 98. Cromatograma de CG-EM da mistura de 15+16 .	123
Figura 99. Espectro de massa do pico 1, t _R = 16,1 min, compatível com a estrutura do palmitato de metila.	123
Figura 100. Espectro de massa do palmitato de metila obtido da Livraria NIST08.	123
Figura 101. Espectro de massa do pico 2, t _R = 17,9 min, compatível com a estrutura do estearato de metila.	123
Figura 102. Espectro de massa do estearato de metila obtido da Livraria NIST08.	124
Figura 103. Espectro de massa do pico 3, t _R = 21,4 min, compatível com a estrutura de um ftalato (impureza do solvente).	124
Figura 104. Espectro de massa do dioctil éster do ácido ftálico obtido da Livraria NIST08.	124
Figura 105. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, Piridina-d ₆) da substância 17	127
Figura 106. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, Piridina-d ₆) da substância 17	127
Figura 107. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, Piridina-d ₆) da substância 17	128
Figura 108. Expansão do espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, Piridina-d ₆) da substância 17	128
Figura 109. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) da substância 18	131
Figura 110. Expansão espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) da substância 18	131
Figura 111. Expansão espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) da substância 18	132
Figura 112. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, DMSO-d ₆) da substância 18	132
Figura 113. Expansão espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, DMSO-d ₆) da substância 18	132
Figura 114. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, MeOD) da substância 18	133
Figura 115. Espectro de NOEDIFF (500 MHz, MeOD) da substância 18 com irradiação na frequência 6,52.	133
Figura 116. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) da substância 19	136
Figura 117. Expansão espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) da substância 19	136
Figura 118. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, DMSO-d ₆) da substância 19	132
Figura 119. Expansão do espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, DMSO-d ₆) da substância 19	137
Figura 120. Expansão do espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, DMSO-d ₆) da substância 19	137
Figura 121. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) da mistura de 20	140
Figura 122. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) da mistura de 20	140
Figura 123. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, DMSO-d ₆) da mistura 20	141
Figura 124. Expansão do espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, DMSO-d ₆) da mistura de 20	141
Figura 125. Mapa de contorno de HSQC (500 MHz, DMSO-d ₆) da mistura de 20	142
Figura 126. Mapa de contorno de HSQC (500 MHz, DMSO-d ₆) da mistura de 20	143
Figura 127. Mapa de contorno de HSQC (500 MHz, DMSO-d ₆) da mistura de 20	144
Figura 128. Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, DMSO-d ₆) da mistura de 20	145
Figura 129. Espectros de EM-IES 1ª ionização e 2ª ionização da mistura de 20	146
Figura 130. Cromatogramas e espectros no UV dos padrões: a) agatisflavona, t _R : 4,36 min (λ _{máx} = 272 e 334 nm); b) amentoflavona t _R : 5,95 min (λ _{máx} = 269 e 337 nm); c) dimetilamentoflavona, t _R : 12,00 min (λ _{máx} = 269 e 335 nm); d) lanaraflavona, t _R : 14,08 min (λ _{máx} = 270 e 326 nm); e) podocarpusflavona t _R : 9,44 min (λ _{máx} = 269 e 336 nm), f) sequoiaflavona, t _R : 9,37 min (λ _{máx} = 269 e 336 nm) e g) 7,7''-di-O-metilnaraflavona, t _R : 14,78 min (λ _{máx} = 269 e 326 nm).	148

Figura 131. Cromatograma de CLAE da fração OHFM-PD-ppt, (a) $t_R = 5.785$ e (b) $t_R = 8,995$ min	150
Figura 132. Espectros no UV obtido por CLAE das substâncias com (a) $t_R = 5.785$ e (b) $t_R = 8,995$ min presentes na fração OHFM-PD	150
Figura 133. Cromatograma de CLAE da fração OHFM-PD 49-53	150
Figura 134. Espectros no UV obtido por CLAE das substâncias com (a) $t_R = 4,210$; (b) $t_R = 5,711$; (c) $t_R = 8,939$; (d) $t_R = 9,301$ min presentes na fração OHFM-PD 49-53	151
Figura 135. Cromatograma de CLAE da fração OFFM-PD 52-58	151
Figura 136. Espectros no UV obtido por CLAE das substâncias com (a) $t_R = 5,711$; (b) $t_R = 6,872$; (c) $t_R = 7,890$ e (d) $t_R = 9,286$ min presentes na fração OFFM-PD 52-58	152
Figura 137. Cromatograma de CLAE da fração OSFC-82-96	152
Figura 138. Espectros no UV obtido por CLAE das substâncias com (a) $t_R = 9,731$ min; (b) $t_R = 10,167$ min; (c) $t_R = 11,964$ min; (d) $t_R = 12,657$ min; (e) $t_R = 13,015$ min; (f) $t_R = 13,576$ min e (g) $t_R = 15,858$ min presentes na fração OSFC 82-96	153
Figura 139. Cromatograma de CL-EM da fração OSFC 82-94	154
Figura 140. Cromatograma de CLAE da fração OSFC-ppt	154
Figura 141. Espectros no UV obtido por CLAE das substâncias com (a) $t_R = 11,164$; (b) $t_R = 11,484$; (c) $t_R = 12,022$; (d) $t_R = 12,682$; (e) $t_R = 13,048$ e (f) $t_R = 13,598$ min presentes na fração OSFC-ppt	155
Figura 142. Cromatograma de CL-EM da fração OSFC-ppt	156
Figura 143. Cromatograma de CLAE da fração OSFM-PD 21-29	157
Figura 144. Espectros no UV obtido por CLAE das substâncias com (a) $t_R = 5,736$; (b) $t_R = 6,907$; (c) $t_R = 7,504$; (d) $t_R = 8,409$; (e) $t_R = 8,937$; (f) $t_R = 9,295$; (g) $t_R = 9,728$; (h) $t_R = 9,936$; (i) $t_R = 10,153$; (j) $t_R = 11,448$; (l) $t_R = 11,961$ e (m) $t_R = 12,652$ min presentes na fração OSFCM-PD 21-29	158
Figura 145. Cromatograma de CL-EM da fração OSFM-PD 21-29	159
Figura 146. Cromatograma de CLAE da fração OStFM 44-47	160
Figura 147. Espectros no UV obtido por CLAE das substâncias com (a) $t_R = 6,411$ (b) $t_R = 10,098$ (c) $t_R = 12,251$; (d) $t_R = 12,717$ min presentes na fração OStFM 44-47	161
Figura 148. Diagrama de fases mostrando a região do fluido supercrítico para uma substância pura	209
Figura 149. Estruturas das substâncias 1 à 15 extraídas com EFS.	218
Figura 150. Unidade experimental de extração com fluido supercrítico presente no Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis (DEQ/UFRRJ)	221
Figura 151. a) Superfície de resposta e b) curva de contorno para o rendimento (R1) em função da pressão (bar) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	225
Figura 152. a) Superfície de resposta e b) curva de contorno para o rendimento (R1) em função da pressão (bar) e tempo (min)	226
Figura 153. a) Superfície de resposta e b) curva de contorno para o rendimento (R1) em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e tempo (min)	226
Figura 154. Cromatogramas dos padrões autênticos de agatisflavona e amentoflavona por CLAE e seus espectros de absorção no UV	228
Figura 155. Espectro de massa (EM-IES) do extrato SC 10, modo negativo.	229
Figura 156. Cromatograma de CLAE do extrato obtido por soxhlet, Coluna; C-18 (250 mm x 4,6 mm x 5mm), fase móvel [90% (metanol) e 10% água acidificada com 1% de ácido acético]. Ag – Agatisflavona, Am – amentoflavona, AB – ácido benzóico, B – biflavona	229
Figura 157. Cromatogramas de CLAE dos extratos SC 1-8 e 10-11, Coluna; C-18 (250 mm x 4,6 mm x 5mm), fase móvel [90% (metanol) e 10% água acidificada com 1% de ácido acético]. Ag – Agatisflavona, Am – amentoflavona, AB – ácido benzóico, B – biflavona	230
Figura 158. Cromatogramas de CLAE-DAD dos extratos SC 12-17, Coluna; C-18 (250 mm x 4,6 mm x 5mm), fase móvel [90% (metanol) e 10% água acidificada com 1% de ácido acético]. Ag – Agatisflavona, Am – amentoflavona, AB – ácido benzóico, B – biflavona	231

Figura 159. Espectros na região do UV (320 nm) dos principais constituintes presentes nos extratos SC analisados por CLAE	231
Figura 160. Cromatograma de CG-EM do óleo SC-9.	232
Figura 161. Espectro de massa do pico 1, $t_R= 2,83$ min, em comparação com espectro de massa do hexanal obtido da biblioteca NIST.	232
Figura 162. Espectro de massa do pico 2, $t_R= 9,36$ min, em comparação com espectro de massa do (<i>E</i>)-trans-decenal obtido da biblioteca NIST.	233
Figura 163. Espectro de massa do pico 3, $t_R= 17,18$ min, em comparação com espectro de massa do hexadecanoato de metila obtido da biblioteca NIST.	233
Figura 164. Espectro de massa do pico 4, $t_R= 17,62$ min, em comparação com espectro de massa do ácido hexadecanóico obtido da biblioteca NIST.	233
Figura 165. Espectro de massa do pico 5, $t_R= 18,83$ min, em comparação com espectro de massa do linoleato de metila obtido da biblioteca NIST.	234
Figura 166. Espectro de massa do pico 6, $t_R= 18,88$ min, em comparação com espectro de massa do 9-octadecenoato de metila obtido da biblioteca NIST.	234
Figura 167. Espectro de massa do pico 7, $t_R= 19,31$ min, em comparação com espectro de massa do ácido 6-octadecenóico obtido da biblioteca NIST.	234
Figura 168. Espectro de massa do pico 8, $t_R= 19,49$ min, em comparação com espectro de massa do ácido esteárico obtido da biblioteca NIST.	235
Figura 169. Espectro de massa do pico 9, $t_R= 22,08$ min, em comparação com espectro de massa do cloreto de 9,12-octadecadienoila obtido da biblioteca NIST.	235
Figura 170. Espectro de massa do pico 10, $t_R= 25,28$ min, em comparação com espectro de massa do hidrocarboneto obtido da biblioteca NIST.	235
Figura 171. Espectro de massa do pico 11, $t_R= 27,38$ min, em comparação com espectro de massa do hidrocarboneto obtido da biblioteca NIST.	236
Figura 172. Curva analítica da relação entre a concentração e área do pico de amentoflavona do cromatograma de CLAE	237

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Flavonoides (1-31) e biflavonoides (32-72) de espécies de <i>Ouratea</i>	11
Tabela 2. Terpenoides (73-86) e esteroides (87-93) de espécies do gênero <i>Ouratea</i>	15
Tabela 3. Outras substâncias (94-137) isoladas de espécies do gênero <i>Ouratea</i>	17
Tabela 4. Relação das espécies, extratos e frações na elaboração das siglas	29
Tabela 5. Relação dos extratos que conduziram a identificação de outros constituintes	30
Tabela 6. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 1 em comparação com dados da literatura para 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona (HARASAWA & TAGASHIRA, 1994)	41
Tabela 7. Dados de RMN ^1H da substância 2 em comparação com dados da literatura para betulina (SOUZA, 2006)	44
Tabela 8. Dados de RMN ^1H da substância 3 em comparação com dados da literatura para prunetina (DEMUNER <i>et al.</i> , 2003)	47
Tabela 9. Dados de RMN ^1H da substância 4 e comparação com dados da literatura para trans-3- <i>O</i> -metil-resveratrol-2- <i>C</i> - β -glicosídeo (WANG <i>et al.</i> , 2007)	53
Tabela 10. Dados de RMN ^1H da substância 5 em comparação com dados da literatura para lithospermosídeo (NIRANJAN KUMAR <i>et al.</i> , 2013)	61
Tabela 11. Dados de RMN ^1H da substância 5a	68
Tabela 12. Dados de RMN ^1H da substância 6 em comparação com dados da literatura para apigenina (ERSÖZ <i>et al.</i> , 2002)	74
Tabela 13. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 7 em comparação com dados da literatura para luteolina (EL-SHAFFEY & ABDELGAWAD, 2012)	76
Tabela 14. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 8 em comparação com dados da literatura para amentoflavona (VELANDIA, 1997).	78

Tabela 15. Dados de RMN ¹ H da substância 9 em comparação com dados da literatura para putraflavona (SUZART, 2007)	81
Tabela 16. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 10 em comparação com dados da literatura para heveaflavona (CARBONEZI et al., 2007)	86
Tabela 17. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 11 em comparação com dados da literatura para ácido p-hidroxi-benzóico (RUKACHAISIRIKUL et al., 2010).	93
Tabela 18. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 12 em comparação com dados da literatura para ácido 3,4-dihidroxi-benzóico (FLAMINI et al., 2001)	94
Tabela 19. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 13	96
Tabela 20. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 14	105
Tabela 21. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 16 em comparação com dados da literatura para os ácidos maslínico e oleanólico (TANIGUCHI et al., 2002; SUZART et al., 2006)	110
Tabela 22. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 18 em comparação com dados da literatura para ácido maslínico (TANIGUCHI et al., 2002)	126
Tabela 23. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 19 em comparação com dados da literatura para 2'',3''-diidrochnaflavona (LIKHITWITAYAWUID et al., 2001)	130
Tabela 24. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 20 em comparação com dados da literatura para ochnaflavona (SON et al., 1992)	135
Tabela 25. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 21 em comparação com dados da literatura para 6''-acetil-scoparosídeo (BRUM-BOUSQUET, et al. 1977)	139
Tabela 26. Valores de tempo de retenção (t _R) dos constituintes presentes na fração OSFC 82-96 obtidos por CL-EM e CLAE e seus respectivos valores de massa (m/z)	151
Tabela 27. Valores de tempo de retenção (t _R) dos constituintes presentes na fração OSFC-B obtidos por CL-EM e CLAE e seus respectivos valores de massa (m/z)	154
Tabela 28. Valores de tempo de retenção (t _R) dos constituintes presentes na fração OSFCM-PD 21-29 obtidos por CL-EM e CLAE e seus respectivos valores de massa (m/z)	157
Tabela 29. Ensaios biológicos de extratos e substâncias isoladas de espécies do gênero <i>Ouratea</i>	178
Tabela 30. Atividade modulatória de fitoquímicos frente às enzimas EROD, MROD e PROD	197
Tabela 31. Atividade modulatória de fitoquímicos frente a enzimas GST.	197
Tabela 32. Atividade inibitória (%) de Catepsinas K, L e V na presença de fitoquímicos	198
Tabela 33. Atividade antiproliferativa de fitoquímicos frente a linhagens tumorais	199
Tabela 34. Avaliação do índice de seletividade da atividade antiproliferativa de fitoquímicos frente a linhagens tumorais	200
Tabela 35. Valores dos níveis codificados e reais das variáveis independentes	222
Tabela 36. Delineamento composto central rotacional 2 ³ , contendo as respostas R1(extrato %) e R2 (biflavonoides totais) obtidas em função de pressão (bar), temperatura (°C) e tempo (min) representadas pelas variáveis codificadas e reais.	224
Tabela 37. ANOVA para a resposta R1(%)	225
Tabela 38. Teores médios de biflavonoides em extratos SC quantificados por CLAE	237

LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1. Marcha de isolamento dos constituintes da fração OHCD.	33
Esquema 2. Marcha de isolamento dos constituintes da fração OHCM-PD.	34
Esquema 3. Marcha de isolamento dos constituintes da fração OHCM-PA.	34
Esquema 4. Marcha de isolamento dos constituintes da fração OHIM.	35
Esquema 5. Marcha de isolamento dos constituintes da fração OFFM-PD.	36
Esquema 6. Marcha de isolamento dos constituintes da fração OSFM-PD.	36
Esquema 7. Marcha de isolamento dos constituintes da fração OSFM-PA.	37
Esquema 8. Marcha de isolamento dos constituintes da fração OCFAPH.	38
Esquema 9. Marcha de isolamento dos constituintes da fração OCFAPH.	39
Esquema 10. Proposta de fragmentação para a substância 3 .	51

Esquema 11. Proposta de fragmentação para a substância 15 .	113
Esquema 12. Proposta de fragmentação para os ésteres metílicos analisados por CG-EM.	124
Esquema 13. Proposta de fragmentação para substância 21 .	146
Esquema 14. Proposta biossintética para cianoglicosídeos (SEIGLER et al., 2005).	162
Esquema 15. Proposta biossintética para Flavonoides e Estilbenos (DEWICK, 1998).	164
Esquema 16. Proposta biossintética para Isoflavonas (DEWICK, 1998).	164
Esquema 17. Proposta biossintética para Biflavonoides com esqueleto tipo amentoflavona (DEWICK, 1998).	165
Esquema 18. Proposta biossintética para biflavonoides com esqueleto tipo ochnaflavona (DEWICK, 1998).	166
Esquema 19. Proposta biossintética para triterpenos com esqueleto tipo oleanano e lupano (DEWICK, 1998).	167

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

1D	unidimensional
2D	bidimensional
786	linhagem de câncer de rim humano
δ_H	deslocamento químico de hidrogênio (ppm)
δ_C	deslocamento químico de carbono (ppm)
n	estiramento
δ	dobramento
λ	comprimento de onda
CCDA	cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
CG-EM	cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CL-EM-IES	cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com fonte de ionização de elétron-spray
CO ₂ -SC	dióxido de carbono - supercrítico
COSY	C orrelation S pectroscopy
CYP1A	Citocromo P-450, membro 1A
<i>d</i>	duplete
<i>dd</i>	duplo duplete
D ₃ CCOCD ₃	Acetona deuterada
DCCR	delineamento composto central rotacional 2 ³
DMSO-d ₆	dimetilsulfóxido deuterado
E _A	Equivalentes de amentoflavona
EFS	Extração com Fluido Supercrítico
EM	espectrometria de massas
EROD	7-etoxi-resofurina- <i>O</i> -dealquilase
ESC	Extração com soxhlet convencional
EtOH	etanol
GST	Glutathione <i>S</i> -transferase
HMBC	H eteronuclear M ultiple- B ond C orrelation
HSQC	H eteronuclear S ingle- Q uantum C oherence
HT	linhagem de câncer de cólon humano
Hz	Hertz
IS	Índice de Seletividade
IV	infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento em Hertz

<i>m</i>	multipleteo
M ⁺	íon molecular
MCF-7	Linhagem de câncer de mama humano
MeOH	metanol
MeOD	Metanol deuterado
Me	metila
MHz	Mega Hertz
MROD	7-metoxi-resorufina- <i>O</i> -desalquilase
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
<i>m/z</i>	relação massa/carga
NIH/3T3	linhagem de célula normal
NOESY	N uclear O verhauser and E xchange S pectroscop Y
OCFAPH	<i>Ouratea cuspidata</i> , folha, acetato de etila, partição em hexano
OCHSFM	<i>Ochna serrulata</i> , folha, metanol
OFCD	<i>Ouratea ferruginea</i> , caule, hexano
OFCM	<i>Ouratea ferruginea</i> , caule, metanol
OFFH	<i>Ouratea ferruginea</i> , folha, hexano
OFFM	<i>Ouratea ferruginea</i> , folha, metanol
OFFM-PD	<i>Ouratea ferruginea</i> , folha, metanol, partição em diclorometano
OHCD	<i>Ouratea hexasperma</i> , caule, diclorometano
OHCM	<i>Ouratea hexasperma</i> , caule, metanol
OHCM-PD	<i>Ouratea hexasperma</i> , caule, metanol, partição diclorometano
OHCM-PA	<i>Ouratea hexasperma</i> , caule, metanol, partição acetato de etila
OHFH	<i>Ouratea hexasperma</i> , folha, hexano
OHFM	<i>Ouratea hexasperma</i> , folha, metanol
OHFM-PD	<i>Ouratea hexasperma</i> , folha, metanol, partição diclorometano
OHID	<i>Ouratea hexasperma</i> , inflorescência, diclorometano
OHIM	<i>Ouratea hexasperma</i> , inflorescência, metanol
OSFM-PA	<i>Ouratea semisserrata</i> , folha, metanol, partição acetato de etila
OSFM-PD	<i>Ouratea semisserrata</i> , folha, metanol, partição diclorometano
OSTFM	<i>Ouratea stipulata</i> , folha, metanol
OMe	Metoxila
PC	linhagem de câncer de prostata humano
PROD	pentoxi-resorufina- <i>O</i> -desetilase
R1	rendimento
R2	Teor de biflavonoides totais
RMN ¹ H	R essonância M agnética N uclear de P róton
RMN ¹³ C	R essonância M agnética N uclear de C arbono -13
Rf	F ator de R etenção
<i>s</i>	simpleto
<i>sl</i>	simpleto largo
SC	supercrítico
<i>t</i>	tripleto
tR	tempo de retenção
TMS	tetrametilsilano
UV	ultravioleta

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

FIDELIS, Queli Cristina. **Outros constituintes isolados de espécies de *Ouratea*, estudo de *Ochna serrulata* e avaliação de atividades biológicas**. 2015. 231p. Tese (Doutorado em Química Orgânica, Química de Produtos Naturais). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Resumo

O presente trabalho descreve o estudo fitoquímico de cinco espécies do gênero *Ouratea* e uma do gênero *Ochna*, *Ochna serrulata*, família Ochnaceae, além de uma análise crítica sobre os aspectos químicos e farmacológicos do gênero *Ouratea*. Esse é o primeiro trabalho fitoquímico de *Ouratea stipulata* que conduziu à identificação de quatro biflavonoides, amentoflavona, podocarpusflavona, putraflavona e 7,7''-di-*O*-metil-lanaraflavona, através de análises por CLAE. As substâncias obtidas na investigação fitoquímica das espécies *Ouratea hexasperma*, *O. ferruginea*, *O. semisserrata*, *O. cuspidata* e *Ochna serrulata* foram isoladas por meio de partição com solventes orgânicos e técnicas cromatográfica, a partir dos extratos obtidos por maceração a frio com hexano, diclorometano e metanol. As estruturas foram determinadas através da análise de dados fornecidos por espectrometria na região do infravermelho, RMN ¹H e ¹³C (técnicas 1D e 2D), de massas incluindo CG-EM e CLAE-EM das substâncias naturais e de alguns derivados. O extrato em acetato de etila das folhas de *O. cuspidata* forneceu os triterpenos: ácido 3β-*O*-acil-maslínico, ácido 2α-*O*-acil-maslínico e ácido maslínico. Na fração em diclorometano das folhas de *O. semisserrata* foi identificado e isolado um biflavonoide, heveaflavona, e da fração em acetato de etila das folhas dessa mesma espécie foram isolados: ácido benzóico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido 2-hidroxi-5-*O*-(6'-*O*-(4-hidroxibenzoil)-β-D-glucopiranosil)-benzóico e o ácido 2-hidroxi-5-*O*-(β-D-glucopiranosil)-benzóico. A fração em diclorometano das folhas de *O. ferruginea* forneceu a putraflavona. O fracionamento do extrato em diclorometano das folhas de *O. hexasperma* conduziu ao isolamento de 2,5-dimetoxibenzoquinona, betulina e prunetina. O fracionamento do extrato metanólico da inflorescência de *O. hexasperma* resultou no isolamento de amentoflavona, apigenina e luteolina. Do fracionamento cromatográfico da fração em acetato de etila do caule de *O. hexasperma* foi isolado o lithospermosídeo e da fração em diclorometano o *trans*-3-*O*-metil-resveratrol-2-C-β-glicosídeo. O extrato metanólico de folhas de *Ochna serrulata* forneceu as biflavonas 2'',3''-dihidroochnaflavona e ochnaflavona, além do 6''-acetil-scoparosídeo. Cinco diferentes frações contendo mistura de biflavonoides foram

obtidas de *O. hexasperma*, *O. ferruginea* e *O. semisserrata*. Essas frações foram analisadas por CLAE e CL-EM e avaliada em ensaios anticâncer e enzimático. As frações biflavonoídicas apresentaram atividade antiproliferativa frente a todas as linhagens de células neoplásicas testadas. Os ensaios enzimáticos realizados com as frações biflavonoídicas apresentaram moderada atividade inibitória frente às enzimas CYP1A e alta atividade inibitória frente as enzimas catepsinas. Esse estudo também avaliou a viabilidade técnica do uso do dióxido de carbono como solvente supercrítico na extração de óleo contendo biflavonoides de folhas de *O. hexasperma*. O experimento levou a obtenção de extratos com alta concentração de biflavonoides usando dióxido de carbono supercrítico e etanol como co-solvente.

Palavras-chave: *Ouratea*, *Ochna*, biflavonoides, anticâncer, fluido supercrítico.

FIDELIS, Queli Cristina. **Others constituents isolated from the *Ouratea* species, study from the *Ochna serrulata* and evaluation biologic activity**. 2015. 231p. These (Doctor in Science, Organic Chemistry, Natural products Chemistry). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Abstract

This work describes the phytochemical study of five *Ouratea* species and *Ochna serrulata*, Ochnaceae, beside of the critical analyze from chemical and pharmacological aspects. This is the first phytochemical study of the context of a specimen of *Ouratea stipulata* with identification of four biflavonoids, amentoflavone, podocarpusflavone, putraflavone and 7,7''-di-*O*-methyl-lanaraflavone, by HPLC. Compounds obtained from *Ouratea hexasperma*, *O. ferruginea*, *O. semisserrata*, *O. cuspidata* and *Ochna serrulata* were isolated by the solvents partition and chromatographic techniques of the extracts obtained by maceration at room temperature with hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol. The structures were determined through analysis of data provided by IR, ¹H and ¹³C NMR (1D and 2D techniques), mass spectrometry including GC-MS and HPLC-MS of natural compounds and some derivatives. From the leaves ethyl acetate extract of *O. cuspidate* were isolated three triterpene: 3β-*O*-acyl-maslinic acid, 2α-*O*-acyl-maslinic acid and maslinic acid. From leaves dichloromethane fraction of *O. semisserrata* was isolated a biflavonoid, heveaflavone, and from leaves ethyl acetate fraction the benzoic acid, p-hydroxy-benzoic acid, 2-hydroxy-5-*O*-(6'-*O*-(4-hydroxybenzoyl)-β-D-glucopiranosyl)-benzoic acid and 2-hydroxy-5-*O*-(β-D-glucopiranosyl)-benzoic acid were isolated. From leaves dichloromethane fraction of *O. ferruginea* was isolated putraflavone. Dichloromethane extract of *O. hexasperma* yielded the compounds: 2,6-dimethoxybenzoquinone, betulin and prunetin. The inflorescence methanol extract of *O. hexasperma* obtained amentoflavona, apigenin and luteolin. From stem ethyl acetate fraction of *O. hexasperma* afforded lithospermosideo and from fraction of the dichloromethane trans-3-*O*-methyl-resveratrol-2-*C*-β-glucoside. The leaves methanol extract of *Ochna serrulata* afforded two biflavones, 2'',3''-dihydroochnaflavone and ochnaflavone. Five different fraction containing moisture of biflavonoids were obtained de *O. hexasperma*, *O. ferruginea* and *O. semisserrata*. Thoses fractions were analyzed by HPLC and LC-MS, and evaluated by anticancer and enzymatic assays. Biflavonoids fractions showed antiproliferative activity

against all cancer cell lines evaluated. The enzymatic assays (realized biflavonoids fractions) showed moderate inhibitory activity against CYP1A enzymes and high inhibitory activity against cathepsins enzymes. This study also evaluated the technical feasibility of carbon dioxide use, as a solvent in supercritical state, in the oil extraction containing biflavonoids from leaves of *Ouratea hexasperma*. The experiment led to obtain extracts with high concentration of biflavonoids used supercritical carbon dioxide and ethanol as co-solvent.

Palavras-chave: *Ouratea*, *Ochna*, biflavonoids, anticancer, supercritical fluid.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A química de produtos naturais representa hoje uma das áreas com maior interdisciplinaridade, contribuindo com o desenvolvimento de diversas áreas da ciência, tais como: Farmacologia, Botânica, Agricultura, Evolução e Ecologia Química. Outro fator relevante e que mais tem motivado o investimento em pesquisa nesta área é o elevado valor econômico que alguns constituintes químicos apresentam. A obtenção por fontes naturais é, muitas vezes, a única forma de obtê-los. A estrutura complexa e vários centros estereogênicos dificultam a síntese de substância natural que podem apresentar aplicações relevantes, como o taxol (anticancerígeno) e a azadiractina (pesticida agrícola) (BUCKINGHAM *et al.*, 1998; WALL & WANI, 1996, 1998; CHADWICK & MARSH, 1990).

Um mesmo material vegetal pode fornecer diferentes derivados de droga como: sumo, cera, exsudato, óleo, extrato, tintura ou frações seletas; dependendo do tipo de extração a que ele seja submetido. O uso destes derivados para fins medicinais vem estimulando cada vez mais pesquisas na área de fitoterápico na intenção de obter novos agentes terapêuticos. Como exemplo encontramos o fitoterápico *Ginkgo biloba*, no qual o seu efeito deve-se a um extrato padronizado rico em flavonóides (24%) e lactonas terpênicas (6%) obtida dos extratos das suas folhas. Fitoterápico *Ginkgo biloba* tem cerca de 20 substâncias ativas que respondem juntas pelo efeito terapêutico, sem a totalidade simultânea das quais, o mesmo efeito não se alcança na plenitude. O extrato padronizado EGb761 é a mais ativa de *Ginkgo biloba* e é um dos fitoterápicos mais usados em todo o mundo (MACARENO *et al.*, 2001).

A demanda por produtos de alto valor agregado obtidos de matéria-prima vegetal tem aumentado o interesse por novos processos de extração, principalmente devido às exigências das indústrias alimentícia e farmacêutica quanto a produtos livres de resíduos de solvente e impurezas de processo. A tecnologia de extração com fluido supercrítico atende a essas exigências, com o uso de CO₂ como solvente, e tem se mostrado eficiente na obtenção de vários produtos de origem natural como óleos essenciais, lipídios, carotenoides, ácidos cinâmicos, esteroides, terpenoides, alcaloides e flavonoides (REVERCHON & MARCO, 2006).

Dentre as diversas classes de metabólitos especiais, tem-se observado um interesse crescente no estudo da atividade biológica de plantas que contém flavonoides. Os flavonoides estão diretamente ligados ao mecanismo de defesa das plantas, proteção contra radiação

ultravioleta, agentes polinizadores e pigmentação em flores. Na literatura destacam-se as inúmeras atividades biológicas como: antioxidante, anti-inflamatório, antitumoral, antibacteriano, entre outros (ANDERSEN & MARKHAM, 2006).

Flavonoides são encontrados em diversas famílias, no entanto, algumas famílias ou gêneros são capazes de biossintetizar biflavonoides com grande diversidade estrutural. Em levantamento na literatura verificou-se que a família Ochnaceae apresenta essa característica. O grupo de pesquisa em Química de Produtos Naturais da UFRRJ tem realizado estudos com algumas espécies de Ochnaceae, como as pertencentes aos gêneros *Ouratea*, *Luxemburgia* e *Salvagesia*. O estudo de novas espécies e/ou a continuação do estudo de espécies anteriormente trabalhadas pode conduzir a novas informações e direcionar a melhor aplicação e utilização de plantas da nossa flora.

O presente trabalho teve como objetivo aprofundar o conhecimento sobre a família Ochnaceae, por meio do estudo químico e biológico de espécies dos gêneros *Ouratea* e *Ochna*, além de investigar o uso da extração com fluido supercrítico, como técnica alternativa, na obtenção dos constituintes bioativos, como biflavonoides. Considerações sobre aspectos quimiossistemáticos, etnofarmacológicos e biológicos foram realizadas para melhor compreensão do perfil do gênero *Ouratea*.

2. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE OUTROS CONSTITUINTES DE ESPÉCIES de
Ouratea E *Ochna*

2.1. INTRODUÇÃO

A pesquisa em Química de Produtos Naturais tem sido intensificada em quase a totalidade dos países considerados desenvolvidos e em desenvolvimento (BRAZ-FILHO, 1994). Diversos trabalhos são conduzidos em diferentes áreas da ciência em parceria com a Química de Produtos Naturais. A multidisciplinaridade é decorrente da necessidade de obter informações sobre a composição química de plantas e outros organismos vivos que possam ser utilizados para alimentação humana e animal, para obtenção de medicamentos, cosméticos, pesticidas e etc. Uma das razões mais relevantes para o desenvolvimento de trabalhos na área de Química de Produtos Naturais é a necessidade de se obter fontes naturais de novos medicamentos. À exemplo tem-se a medicina tradicional chinesa que desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que muitas espécies medicinais continuam sendo estudadas na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (VIEGAS JR et al., 2006).

A família Ochnaceae apresenta ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo e muitas de suas espécies são utilizadas na medicina caseira de países como Brasil, Camarões, Nigéria, Congo e Gabão da África (BOUQUET, 1969). Os estudos científicos realizados até o momento são, principalmente, de espécies de *Lophira*, *Luxemburgia*, *Ouratea* e *Ochna*, os quais apresentam a descrição de espécies com composição química rica em flavonoides de estrutura complexa como bi, tri e pentaflavonoides (FIDELIS et al., 2014; BANDI et al., 2012).

No Brasil, o gênero *Ouratea* apresenta o maior número de espécies. Algumas dessas espécies foram estudadas pelo Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e revelaram a presença de várias classes de substâncias, flavonoides (principalmente biflavonoides), terpenoides, esteroides, ligninas, norisoprenoides, benzofuranonas, depsídeo, alcaloides, carboidrato, derivados de ácido benzóico e cinâmico, além de ésteres de ácido graxo. Dentre essas classes, os dímeros de flavonoides se destacam devido à frequência e diversidade estrutural decorrente, principalmente, dos diferentes padrões de ligações entre seus monômeros (SUZART, 2007).

As espécies de *Ouratea* avaliadas em ensaios biológicos, utilizando frações ou biflavonoides isolados, mostraram um potencial bioativo promissor, principalmente em ensaios antitumorais, enzimáticos e antimicrobianos.

Alguns trabalhos relevantes como a atividade citotóxica contra células de sarcoma 180 (GRYNBERG *et al.*, 1994), a atividade inibitória das enzimas DNA topoisomerase humana tipo I e II- α e do crescimento de células de carcinoma de Ehrlich e células de leucemia humana K562 apresentadas por biflavonoides de *O. hexasperma* e *O. semiserrata* (GRYNBERG *et al.*, 2002) são exemplos do potencial anticâncer dos biflavonoides de *Ouratea*. Há também a atividade inibitória sobre a enzima aldose redutase de cristalino bovino promovida por biflavonas isoladas da *O. spectabilis* (FELÍCIO, *et al.*, 1995) que indica uma possível aplicação terapêutica contra cataratas, retinopatia e neuropatia, patogêneses relacionadas as complicações da diabetes.

A bioatividade não está restrita aos biflavonoides isolados, os extratos e frações também apresentam efeitos terapêuticos, como o extrato hidroalcoólico e a fração acetato de etila de caules de *O. semiserrata* que inibiram a conversão da enzima angiotensina I *in vitro* apresentando atividade vasodilatadora (BRAGA *et al.*, 2000), o mesmo extrato hidroalcoólico também mostrou atividade vasodilatadora em anéis de aorta (*in vitro*) pré-contraídos com fenilefrina, sugerindo a espécie como fonte de substâncias bioativas, potencialmente úteis para o tratamento da hipertensão primária (VALADARES *et al.*, 2003).

Verifica-se que as espécies do gênero *Ouratea* apresentam um arsenal bioativo que inclui, não apenas constituintes isolados como os biflavonoides, mas também extratos e frações, os quais podem vir a se tornarem possíveis medicamentos com o aprofundamento desses estudos.

O material oriundo de espécies deste gênero deve ser submetido à estudos adicionais, visando não apenas a busca de outros constituintes, mas também para detectar novas propriedades e aprofundar os estudos já realizados que apresentam potencial bioativo de frações ou constituintes isolados. Neste sentido, foi realizado neste trabalho o isolamento de frações contendo biflavonoide para avaliação biológica e o isolamento de outros constituintes de espécies de *Ouratea* e *Ochna*, além de considerações sobre os aspectos químicos e farmacológicos, os quais são apresentados nos capítulos I e II.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivo Geral

- Realizar extração, isolamento e purificação de frações contendo flavonoides e outros constituintes, por meio de técnicas cromatográficas e métodos espectrométricos, para acrescentar informação sobre as espécies de *Ouratea* e *Ochna*.
- Obter material para ensaios biológicos.

2.2.2. Objetivos Específicos

- Realizar a coleta de material vegetal em colaboração com o técnico botânico responsável pela identificação das espécies,
- Preparar extratos do material vegetal de cada espécie por maceração à frio,
- Realizar partição líquido-líquido dos extratos,
- Realizar o fracionamento cromatográfico de extratos e frações, empregando a cada um a técnica cromatográfica mais adequada de acordo com suas características químicas,
- Purificar as frações contendo biflavonoides e substâncias isoladas no fracionamento cromatográfico usando técnicas cromatográficas preparativas e técnicas de precipitação e recristalização.
- Identificar os constituintes isolados e presentes nas frações por RMN, IV, CLAE, LC-EM e comparação com padrões e dados da literatura de acordo com a necessidade de cada um.
- Avaliar frações e constituintes isolados para ensaios biológicos

2.3. REVISÃO DA LITERATURA

A família Ochnaceae pertence à ordem Theales (CRONQUIST *et al.*, 1988; DAHLGREN *et al.*, 1980) ou Ochnales (TAKHTAJAN *et al.*, 1997) e têm sido incluída na subclasse Dilleniidae (AMARAL *et al.*, 1998). Encontram-se nesta família cerca de 35 gêneros e 600 espécies de ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (WATSON & DALLWITZ, 2000). No Brasil, ocorrem aproximadamente nove gêneros com 105 espécies (JOLY *et al.*, 1988). São plantas essencialmente arbóreas ou arbustivas (CURTIS *et al.*, 1960). São encontrados na literatura trabalhos que descrevem o estudo químico e biológico de espécies de apenas alguns gêneros, como *Brackenridgea*, *Campylospermus*, *Cepedesia*, *Godoya*, *Lophira*, *Luxemburgia*, *Ochna* e *Ouratea* (STEENKAMP *et al.*, 2007; MANGA *et al.* 2009; LOBSTEIN *et al.*, 2004; BENEDEK *et al.*, 2006; TIH *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2000; BANDI *et al.*, 2012; SUZART *et al.*, 2007).

As espécies de Ochnaceae já estudadas são biprodutoras principalmente de flavonoides (MOREIRA *et al.*, 1994) e biflavonoides (MBING *et al.*, 2003a, 2003b), sendo os gêneros *Ouratea*, *Luxemburgia*, *Ochna* e *Lophira*, os representantes da família que possuem mais informações quanto à composição química até o momento. Na espécie *Luxemburgia* foram detectados os biflavonóides derivados de chalconas, como luxenchalcona (C-3'→O-C-4''), **Figura 1**, p. 8) estrutura semelhante às encontradas em *Lophira* (TIH *et al.*, 1990; GHOGOMU TIH *et al.*, 1990) e *Ochna* (PEGNYEMB *et al.*, 2001). Analisando os metabolitos isolados de *Luxemburgia*, *Lophira* e *Ochna* observa-se um perfil biossintético semelhante entre eles. A presença de biflavonoides com padrão de ligação C-3'→O-C-4''), como ochnaflavona (**Figura 1**, p. 8), em espécies desses gêneros confirma a semelhança dos gêneros (CARVALHO *et al.*, 2004). Por outro lado, *Ouratea* tem tendência em metabolizar os dímeros de flavonas com esqueleto do tipo amentoflavona e agatisflavona. A frequência e a diversidade estrutural dos biflavonóides em espécies desses gêneros permitem utilizá-los como marcadores quimiotaxonômicos (SUZART *et al.*, 2007).

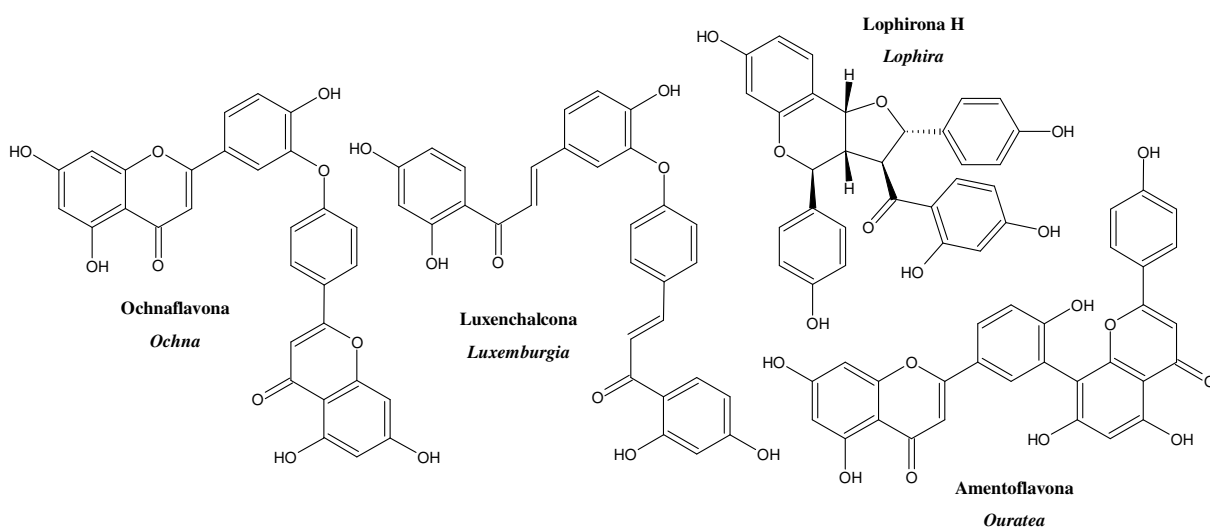


Figura 1. Estruturas de biflavonoides encontrados nos gêneros *Lophira*, *Luxemburgia*, *Ochna* e *Ouratea*.

2.3.1. Gênero *Ouratea*

Em espécies do gênero *Ouratea* foram encontrados vários monoflavonoides como flavona, **1-10**; flavonóis, **11-16**; flavanonóis, **17**; isoflavonas, **18-27** e flavan-3-ol, **28-31** (Tabela 1, p. 11; Figura 2, p. 14).

Pode-se verificar uma predominância de monoflavonoides glicosilados, que apresentam tanto ligações *C*-glicosídeo como *O*-glicosídeo, as unidade glicosídicas mais comuns são glicose e galactose, sendo que dentre os diversos esqueletos de monoflavonoides encontrados nestas espécies, apenas o esqueleto de isoflavona não apresentou glicosilação. Cinco *C*-glicosilflavonas foram isoladas de *O. hexasperma*, 6-*C*-glucopiranosil-luteolina (**4**), de folhas (DANIEL et al., 2005), e swertisina (**5**), swertiajaponina (**6**), vitexina (**7**), e orientina (**8**) de inflorescência (SUZART et al., 2012). Acetil derivados de vitexina foram isolados de folhas de *O. gilgiana*, 6''-*O*-acetilvitexina (**9**, NJOCK et al., 2012), e de *O. turnarea*, 2''-*O*-acetil-7-*O*-metil vitexina (**10**, MBING et al., 2009).

Flavonoides prenilados também foram encontrados no gênero. Dois novos prenilflavonoides, 6- β - β -dimetilalilkaempferol-7-*O*- β -glicosídeo (**16**) e 6- β - β -dimetilalilaromadendrin-7-*O*- β -glicosídeo (**17**), foram isolados de galhos de *O. hexasperma* (CARVALHO et al., 2008b).

Dentre as isoflavona isoladas, encontra-se a lanceolona (**23**) que também apresenta uma unidade prenila, que nesta substância aparece na forma de um anel heterocíclico.

Isoflavonas metiladas são as mais frequentemente isoladas de espécies de *Ouratea*, no entanto, algumas isoflavonas raras como a 3',6,8-tricloro-4',5-diidroxio-7-metoxi-isoflavona (**26**) e 3',5',6,8-tetracloro-4',5-diidroxio-7-metoxi-isoflavona (**27**) foram encontradas apenas em extratos de galhos de *O. semisserrata* (VELANDIA et al., 1998b; 2002).

Os biflavonoides encontrados neste gênero são substâncias diméricas como flavona-flavona **32-53**; flavona-flavanona, **54-56**; flavona-flavanonol, **57**; flavanonol-flavanonol, **58-59**; chalcona-chalcona, **63-68**; chalcona-flavona, **66**; e raramente, biisoflavanona, **60-62**, além de dímeros de flavan-3-ol **70-72** apresentados na **Figura 3**, p. 15.

No gênero *Ouratea* as biflavonas, amentoflavona (**32**, C-3'→C-8''), agathisflavone (42, C-6→C-8''), e seus derivados O-Me, 33-46, foram relatados principalmente nas folhas de diversas espécies. Estes biflavonoides são os mais indicados como marcadores quimiotaxonômicos deste gênero. No entanto, outros dímeros foram descritos ocasionalmente, tal como 4'''-O-metil-robustaflavone (**47**, C-3'→C-6''), obtido de folhas de *O. semisserrata* (BOSSO, 2003), e (C-6→C-6'')-bigenkwanin (**48**), isolado em conjunto com **45**, de folhas de *O. spectabilis* (FELÍCIO et al., 1995). O padrão de ligação entre os monômeros (C-6→C-8'') também foi observado em dímeros do tipo flavona-flavanona como zenkeriana A (**54**), zenkeriana B (**55**) e rhusflavona (**56**), obtidas de folhas de *O. zenkeri* (MBING et al., 2009), e um novo biflavanonol, 3-hidroxi-4',5,7-trimetoxiflavona-(C-6→C-8'')-3''-hidroxi-3''',4''',5'',7''-tetrametoxiflavona (**59**), isolado de folhas de *O. multiflora* (FELÍCIO et al., 2001a).

Alguns biflavonoides com ligação C-O-C entre os monômeros já foram encontrados em espécies de *Ouratea*. Lanaraflavona (C-4'-O→C-8'') (**49**) e seus O-metil derivados, **50-51**, foram isolados de folhas de *O. semisserrata* e **52** foi obtido de folhas de *O. hexasperma* (VELANDIA et al, 2002; DANIEL et al, 2005). Ochnaflavona (C-3'-O→C-4''') (**53**) é comumente encontrado em espécies de *Ochna* e foi encontrado apenas em *O. staudtii* (ZINTCHEM et al., 2007). No entanto, o padrão de ligação (C-3'-O→C-4''') característico de ochnaflavona, também é encontrado em sulcatona A (**57**), uma flavona-flavanonol, e em 3-hidroxi-2,3-diidroapigenil-(C-4'''-O→C-3')-diidrokaempferol (**58**), uma flavanona-flavanonol, isolada de folhas de *O. sulcata* (PEGNYEMB et al., 2005).

A presença de lophirona A (**63**) e lophirona G (**64**) em folhas de espécies de *Ouratea* de origem africana revela a proximidade destas espécies com as espécies do gênero *Lophira* e

Ochna, onde estas bichalconas são comumente encontradas (ver **Tabela 1**, p. 11 e **Figura 2**, p. 14).

A ocorrência de biflavonoides em caule, casca do caule, galhos ou raízes de espécies de *Ouratea* é marcada por dímeros de chalcona encontrados em várias espécies de *Ouratea*, principalmente em espécies do continente africano.

As bichalconas flavumona A (**65**), calodenina B (**66**), e o dímero chalcona-flavona, flavumona B (**66**), foram isolados de cascas do caule de *O. flava* (MBING et al., 2003a; ZINTCHEM et al., 2008). Já as raízes de *O. turnarea* forneceram a lophirona C (**67**) e a isolophirona C (**68**), biflavonoides não encontrados nas espécies de *Ouratea* do Brasil.

As raízes de *O. hexasperma*, coletadas no cerrado Amazonense, mostram ser bioprodutoras de biisoflavanonas raras como a hexaspermona A (**60**), B (**61**) e C (**62**), as quais foram relatadas, nesta espécie, pela primeira vez na literatura (MOREIRA et al., 1994).

Dentre os primeiros trabalhos fitoquímicos realizados com espécies de *Ouratea*, encontram-se o isolamento e identificação de dímeros de proantocianidina, os epímeros proantocianidina A (**71**) e B (**72**), isolados de raízes de *Ouratea* sp. (MONACHE et al., 1967a,b,c; 1970). Em trabalho mais recente, o dímeros de flavanol calodenina C foi isolado de cascas do caule de *O. flava* (MBING et al., 2003a).

São encontradas substâncias da classe dos terpenoides em folhas, ramos, flores e caule de espécies de *Ouratea*. Os mais comuns são α -amyrina (**73**), β -amyrina (**74**), lupeol (**75**) e friedelina (**78**). Um novo triterpenos com esqueleto lupano, lup-15,20(29)-dien-3 β ,28-diol (**83**), foi isolado do extrato etanólico de folhas de *O. multiflora* (FELÍCIO et al., 2001a). Três diterpenos foram isolados de duas espécies de *Ouratea*, 16 α -hidroxikaurano (**84**) e o ácido 16 α -hidroxikauran-19-oico (**85**) de *O. parviflora* (FELÍCIO et al., 2004), e ácido 16 α ,17-diidroxikauran-19-oico (**86**) de *O. semisserrata* (VELANDIA et al., 1998a), ver **Figura 4**, p. 17 e **Tabela 2**, p. 15.

A presença de esteroides em misturas como a de sitosterol (**87**), estigmasterol (**88**) e campesterol (**89**) é comum nas espécies desse gênero (ver **Figura 4**, p. 17 e **Tabela 2**, p. 15). Outros esteroides, como 7-oxoestigmat-5-en-3 β -ol (**92**) e 7-oxoestigmasta-5,22-dien-3 β -ol (**93**), foram encontrados apenas em *O. semisserrata* (VELANDIA et al., 2002). Esteroides glicosilados também são encontrados como mistura de 3-*O*- β -glicopiranosilsitosterol (**90**) e 3-*O*- β -glicopiranosilestigmasterol (**91**).

Vários outros metabólitos de diferentes classes já foram encontrados no gênero *Ouratea*, sendo estes menos frequentes, como lignina (94-95), norisoprenoide (96), diidrobenzofuranona (105-106), depsídeo (107), alcaloide indólico (108), carboidrato, derivados de ácido benzóico e cinâmico, além de ésteres de ácido graxo (ESTEVAM et al., 2006; ROSA, 1939a,b). Tabela 3 apresenta os constituintes 94-137 (Figura 5, p. 19).

Além desta compilação sobre a ocorrência de constituintes químicos deste gênero foram feitas considerações sobre as propriedades biológicas (Capítulo II; pág. 173) (FIDELIS et al., 2014). Todas essas descrições e considerações sobre o gênero *Ouratea* revelam que, apesar dos vários estudos químicos e biológicos já realizados, ainda se faz necessário investigar melhor outras possíveis propriedades que as espécies de *Ouratea* podem ter, gerando mais informações sobre o gênero.

Tabela 1. Flavonoides (1-31) e biflavonoides (32-72) de espécies de *Ouratea*

No.	Substâncias	Planta	Parte	Ref
1	Apigenina	<i>O. parviflora</i>	Folhas	Araújo et al., 2011
2	5,4'-diidroxí-3',5',7-trimetoxiflavona	<i>O. castaneifolia</i>	Caule	Nascimento et al., 2009
3	5,7,4'-triidroxí-3',5'-dimetoxiflavona	<i>O. cuspidata</i>	Folhas	Suzart, 2007b
4	6-C-glicopiranosil-luteolina	<i>O. hexasperma</i>	Folhas	Daniel et al, 2005
5	Swertisina	<i>O. hexasperma</i>	Flor	Suzart et al., 2012
6	Swertiajaponina	<i>O. hexasperma</i>	Flor	Suzart et al., 2012
7	Vitexina	<i>O. hexasperma</i>	Flor	Suzart et al., 2012
8	Orientina	<i>O. hexasperma</i>	Flor	Suzart et al., 2012
9	6"-O-acetilvitexina	<i>O. gilgiana</i>	Folhas	Njock et al., 2012
10	2"-O-acetil-7-O-metilvitexina	<i>O. turnarea</i>	Folhas	Mbing et al., 2009
11	3'-O-metil-quercetina	<i>O. cuspidata</i>	Caule	Suzart, 2007b
12	5,7,4'-triidroxí-3'-metoxi-3-β-O-D-galactopiranosilflavona	<i>O. cuspidata</i>	Caule	Suzart, 2007b
13	Gossypetin-3-O-β-galactopiranosídeo	<i>O. parviflora</i>	Folhas	Felicio et al., 2004
14	Rutina	<i>O. hexasperma</i>	Flor	Suzart et al., 2012
15	Quercetin-3-O-glicosídeo	<i>O. hexasperma</i>	Folhas	Daniel et al, 2005
16	6-β-β-dimetilalilkaempferol-7-O-β-glicosídeo	<i>O. hexasperma</i>	Ramos	Carvalho et al., 2008b
17	6-β-β-dimetilalilaromadendrin-7-O-β-glicosídeo	<i>O. hexasperma</i>	Ramos	Carvalho et al., 2008b
18	5,4'-diidroxí-7,5',3'-trimetoxi-isoflavona	<i>O. ferruginea</i>	Caule	Fidelis et al., 2012
19	7,3'-di-O-metilorobol	<i>O. ferruginea</i>	Caule	Fidelis et al., 2012
20	5-hidroxí-7,3'4'5'-tetrametoxi-isoflavona	<i>O. ferruginea</i>	Caule	Fidelis et al., 2012
21	Piscigenina	<i>O. ferruginea</i>	Caule	Fidelis et al., 2012
22	4',5,7-trimetoxiisoflavona	<i>O. hexasperma</i>	Raiz	Moreira et al., 1994
23	Lanceolona	<i>O. turnarea</i>	Folhas	Mbing et al., 2009
24	4',5-dimetoxi-6,7-metilenedioxiisoflavona	<i>O. turnarea</i> <i>O. flava</i>	Folhas Casca do caule	Mbing et al., 2009 Mbing et al., 2006
25	3'-metoxiirilona	<i>O. flava</i>	Casca do caule	Mbing et al., 2006
26	3',6,8-tricloro-4',5-diidroxí-7-	<i>O. semisserrata</i>	Madeira	Velandia et al., 1998b

	metoxiisoflavona			
27	3',5',6,8-tetracloro-4',5-diidroxi-7-metoxiisoflavona	<i>O. semisserrata</i> <i>O. semisserrata</i>	Ramos Madeira	Velandia et al., 2002 Velandia et al., 1998b
28	Epicatequina	<i>O. semisserrata</i> <i>O. ferruginea</i> <i>O. hexasperma</i>	Ramos Folhas Folhas	Velandia et al., 2002 Fidelis et al., 2012 Daniel et al., 2005
29	(-)-3,3',5,5',7-pentaidroxi-4'-metoxiepicatecol	<i>O. sp.</i>	Raiz	Monache et al., 1967a,b
30	Catequina	<i>O. sp.</i>	Raiz	Monache et al., 1967c
31	Cianidina	<i>O. affins</i> <i>O. calantha</i>	- -	Gartlan et al., 1980 Gartlan et al., 1980
32	Amentoflavona	<i>O. aquatica</i> <i>O. castaneifolia</i> <i>O. cuspidata</i> <i>O. elongata</i> <i>O. ferruginea</i> <i>O. gilgiana</i> <i>O. microdonta</i> <i>O. multiflora</i> <i>O. parviflora</i> <i>O. semisserrata</i> <i>O. staudtii</i> <i>O. sulcata</i> <i>O. turnarea</i> <i>O. zenkeri</i>	Folhas Folhas Folhas Folhas Folhas Folhas Folhas Folhas Folhas Folhas Folhas Raiz Folhas	Lima et al., 2006 Nascimento et al., 2009 Suzart et al., 2007b Bikobo et al., 2009 Fidelis et al., 2012 Njock et al., 2012 Carvalho et al., 2008a Felício et al., 2001a Araújo et al., 2011 Velandia et al., 2002 Zintchem et al., 2007 Pegnyemb et al., 2005 Zintchem et al., 2008
33	Bilobentina	<i>O. elongata</i> <i>O. staudtii</i>	Folhas Folhas	Mbing et al., 2009 Bikobo et al., 2009
34	Sequoielflavona	<i>O. ferruginea</i> <i>O. elongata</i>	Folhas Folhas	Fidelis et al., 2012 Bikobo et al., 2009
35	Podocarpusflavona A	<i>O. elongata</i> <i>O. multiflora</i> <i>O. semisserrata</i> <i>O. semisserrata</i> <i>O. staudtii</i>	Folhas Folhas Folhas Ramos Folhas	Bikobo et al., 2009 Carbonezi et al., 2007 Velandia et al., 2002 Velandia et al., 2002 Zintchem et al., 2007
36	7,7"-di-O-metilamentoflavona	<i>O. castaneifolia</i>	Folhas	Nascimento et al., 2009
37	7'',4''"-di-O-metilamentoflavona	<i>O. multiflora</i>	Folhas	Carbonezi et al., 2007
38	7,4'-di-O-metilamentoflavona	<i>O. semisserrata</i>	Folhas	Bosso, 2003
39	Putraflavona	<i>O. cuspidata</i>	Folhas	Suzart, 2007b
40	Heveaflavona	<i>O. castaneifolia</i> <i>O. multiflora</i>	Folhas Folhas	Nascimento et al., 2009 Carbonezi et al., 2007
41	4',4''',7,7"-tetra-O-metilamentoflavona	<i>O. castaneifolia</i>	Folhas	Nascimento et al., 2009
42	Agathisflavona	<i>O. gilgiana</i> <i>O. hexasperma</i> <i>O. microdonta</i> <i>O.</i> <i>nigroviolacea</i> <i>O. parviflora</i> <i>O. staudtii</i> <i>O. sulcata</i>	Folhas Folhas Folhas Folhas Folhas Folhas Folhas Folhas	Njock et al., 2012 Daniel et al., 2005 Carvalho et al., 2008a Mbing et al., 2006 Araújo et al., 2011 Zintchem et al., 2007 Pegnyemb et al., 2005
43	7''-O-metilagatisflavona	<i>O. hexasperma</i>	Folhas	Daniel et al., 2005

		<i>O. microdonta</i>	Folhas	Carvalho et al., 2008a
		<i>O. parviflora</i>	Folhas	Araújo et al., 2011
44	Ouratina B	<i>O.</i>	Folhas	Mbing et al., 2006
		<i>nigroviolacea</i>		
45	7,7''-di- <i>O</i> -metilagatisflavona	<i>O. spectabilis</i>	Folhas	Felício et al., 1995
		<i>O. parviflora</i>	Folhas	Felício et al., 2004
46	Ouratina A	<i>O.</i>	Folhas	Mbing et al., 2006
		<i>nigroviolacea</i>		
47	4'''- <i>O</i> -metilrobustaflavona	<i>O. semisserrata</i>	Folhas	Bosso, 2003
48	(6→6'')-bigenkwana	<i>O. spectabilis</i>	Folhas	Felício et al., 1995
49	Lanaraflavona	<i>O. semisserrata</i>	Folhas	Velandia et al., 2002
50	7- <i>O</i> -metillanaraflavona	<i>O. semisserrata</i>	Folhas	Velandia et al., 2002
51	7,4'''-di- <i>O</i> -metillanaraflavona	<i>O. semisserrata</i>	Folhas	Velandia et al., 2002
52	7,7''-di- <i>O</i> -metillanaraflavona	<i>O. hexasperma</i>	Folhas	Daniel et al., 2005
53	Ochnaflavona	<i>O. staudtii</i>	Folhas	Zintchem et al., 2007
54	Zenkeriana A	<i>O. zenkeri</i>	Folhas	Mbing et al., 2009
55	Zenkeriana B	<i>O. zenkeri</i>	Folhas	Mbing et al., 2009
56	Rhusflavona	<i>O. zenkeri</i>	Folhas	Mbing et al., 2009
57	Sulcatona A	<i>O. sulcata</i>	Folhas	Pegnyemb et al., 2005
58	3-hidroxi-2,3-diidroapigenil-(C-4'- <i>O</i> →C-3')- diidrokaempferol	<i>O. sulcata</i>	Folhas	Pegnyemb et al., 2005
59	3-hidroxi-4',5,7-trimetoxiflavona-(C-6- <i>O</i> →C- 8'')-3''-hidroxi-3''',4''',5'',7''- tetrametoxiflavona	<i>O. multiflora</i>	Folhas	Carbonezi et al., 2007
60	Hexaspermona A	<i>O. hexasperma</i>	Raiz	Moreira et al., 1999
61	Hexaspermona B	<i>O. hexasperma</i>	Raiz	Moreira et al., 1999
62	Hexaspermona C	<i>O. hexasperma</i>	Raiz	Moreira et al., 1999
63	Lophirona A	<i>O. elongata</i>	Folhas	Bikobo et al., 2009
		<i>O. flava</i>	Folhas	Mbing et al., 2003b
		<i>O. flava</i>	Casca do caule	Mbing et al., 2003a
		<i>O. staudtii</i>	Folhas	Zintchem et al., 2007
		<i>O. sulcata</i>	Folhas	Pegnyemb et al., 2005
		<i>O. turnarea</i>	Folhas	Mbing et al., 2009
		<i>O. zenkeri</i>	Folhas	Mbing et al., 2009
64	Lophirona G	<i>O. flava</i>	Folhas	Mbing et al., 2003b
65	Flavumona A	<i>O. flava</i>	Casca do caule	Mbing et al., 2003a
66	Calodenin B	<i>O. flava</i>	Casca do caule	Mbing et al., 2003a
		<i>O. turnarea</i>	Raiz	Zintchem et al., 2008
67	Lophirona C	<i>O. turnarea</i>	Raiz	Zintchem et al., 2008
68	Isolophirona C	<i>O. turnarea</i>	Raiz	Zintchem et al., 2008
69	Flavumona B	<i>O. flava</i>	Casca do caule	Mbing et al., 2003a
70	Calodenin C	<i>O. flava</i>	Casca do caule	Mbing et al., 2003a
71	Proantocianidina A	<i>O. sp.</i>	Raiz	Oliveira et al., 1972
72	Proantocianidina B	<i>O. sp.</i>	Raiz	Oliveira et al., 1972

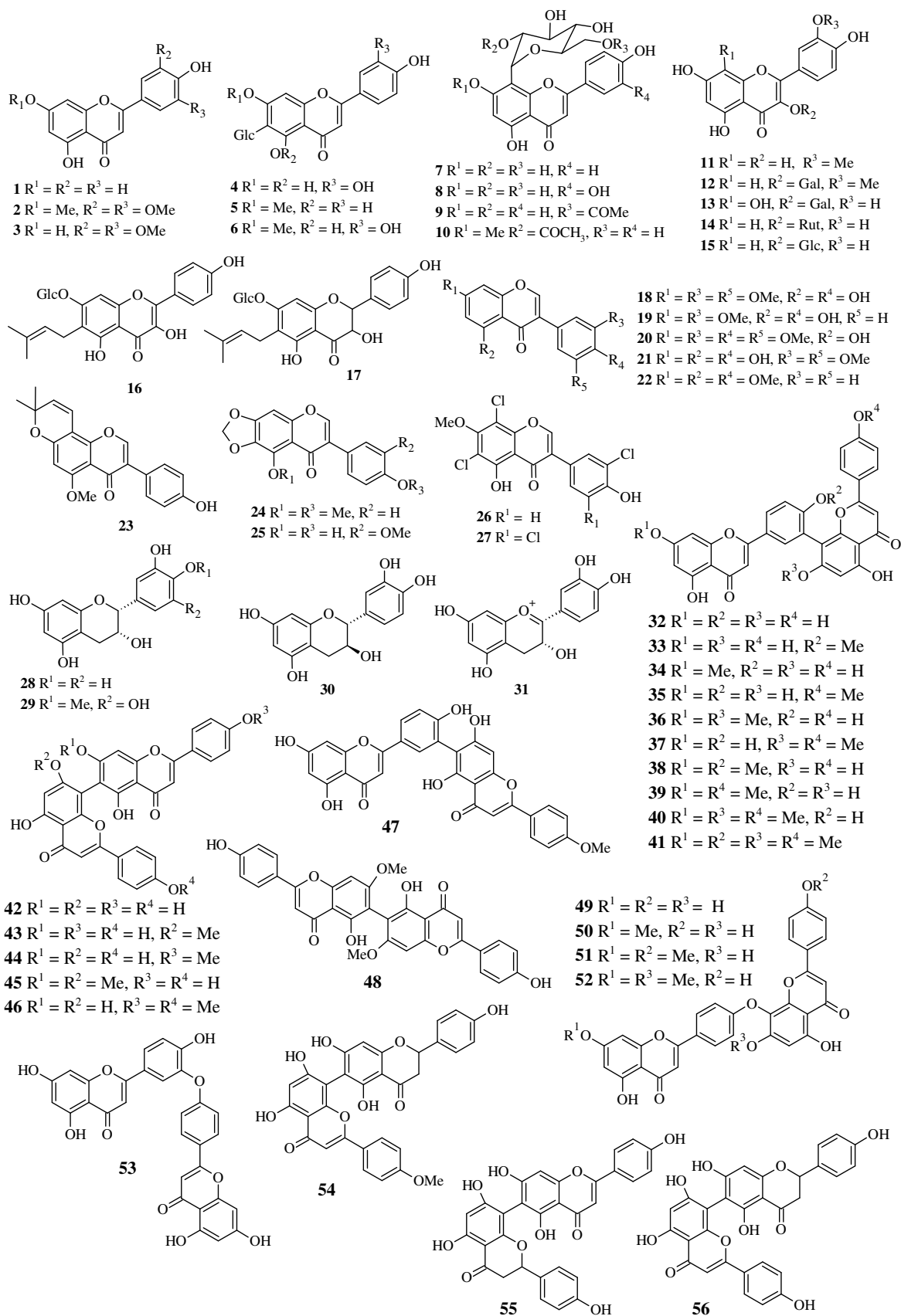


Figura 2. Estruturas de flavonoides 1-31, e biflavonoides 32-56.

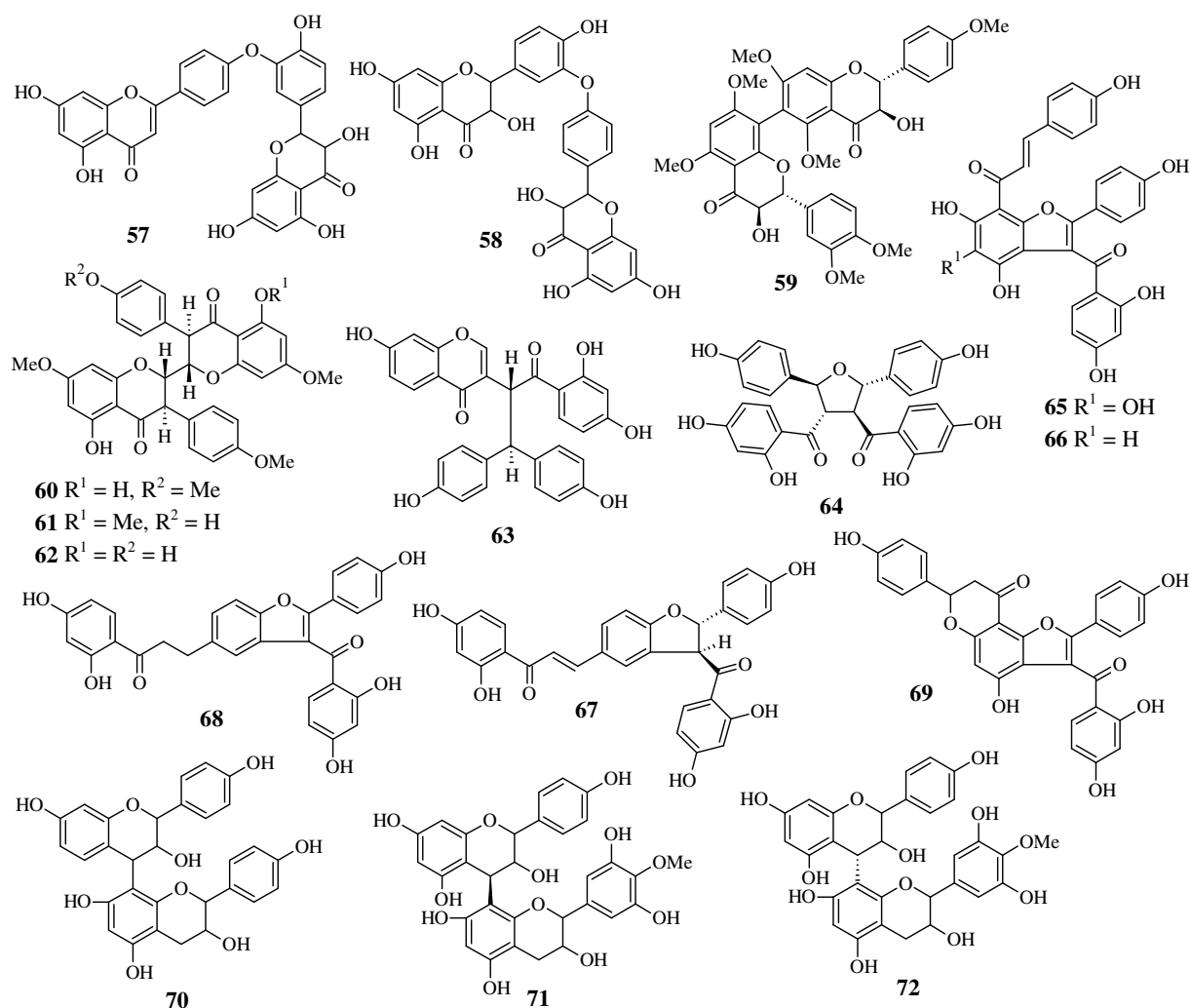


Figura 3. Estruturas de biflavonoides **57-72** isolados de espécies do gênero *Ouratea*

Tabela 2. Terpenoides (**73-86**) e esteroides (**87-93**) de espécies do gênero *Ouratea*

No.	Compounds	Plant	Part	Ref.
73	α -amirina	<i>O. castaneifolia</i>	Folhas	Nascimento et al., 2009
		<i>O. cuspidata</i>	Folhas	Suzart et al., 2007a
		<i>O. microdonta</i>	Folhas	Carvalho et al., 2008a
74	β -amirina	<i>O. castaneifolia</i>	Folhas	Nascimento et al., 2009
		<i>O. cuspidata</i>	Folhas	Suzart et al., 2007a
		<i>O. microdonta</i>	Folhas	Carvalho et al., 2008a
		<i>O. nitida</i>	Folhas	Estevam et al., 2006
75	Lupeol	<i>O. castaneifolia</i>	Folhas	Nascimento et al., 2009
		<i>O. cuspidata</i>	Folhas	Suzart et al., 2007a
		<i>O. flava</i>	Folhas	Mbing et al., 2003b
		<i>O. floribunda</i>	Madeira	Carvalho et al., 2000
		<i>O. hexasperma</i>	Ramos	Carvalho et al., 2008b
		<i>O. microdonta</i>	Folhas	Carvalho et al., 2008a
		<i>O. semiserrata</i>	Folhas	Velandia et al., 2002

76	Taraxerol	<i>O. castaneifolia</i>	Folhas	Nascimento et al., 2009
		<i>O. castaneifolia</i>	Caule	Nascimento et al., 2009
77	Germanicol	<i>O. castaneifolia</i>	Folhas	Nascimento et al., 2009
78	Friedelina	<i>O. castaneifolia</i>	Caule	Nascimento et al., 2009
		<i>O. ferruginea</i>	Folhas	Fidelis et al., 2012
		<i>O. floribunda</i>	Madeira	Carvalho et al., 2000
		<i>O. nitida</i>	Folhas	Estevam et al., 2006
		<i>O. parviflora</i>	Folhas	Araújo et al., 2012
		<i>O. semiserrata</i>	Folhas	Velandia et al., 2002
		<i>O. castaneifolia</i>	Caule	Nascimento et al., 2009
79	3- β -friedelinol	<i>O. ferruginea</i>	Folhas	Fidelis et al., 2012
		<i>O. floribunda</i>	Madeira	Carvalho et al., 2000
		<i>O. ferruginea</i>	Folhas	Fidelis et al., 2012
80	Lupeona	<i>O. ferruginea</i>	Folhas	Fidelis et al., 2012
		<i>O. flava</i>	Folhas	Mbing et al., 2003b
81	Ácido 3- β - <i>O</i> -acil-olean-12-en-28-óico	<i>O. hexasperma</i>	Flor	Suzart et al., 2012
82	Ácido 3,4-seco-friedelan-3-óico	<i>O. nitida</i>	Folhas	Estevam et al., 2006
83	Lup-15,20(29)-dien-3 β ,28-diol	<i>O. multiflora</i>	Folhas	Felício et al., 2001b
84	16 α -hidroxikaurano	<i>O. parviflora</i>	Folhas	Felício et al., 2004
85	Ácido 16 α -hidroxikauran-19-óico	<i>O. parviflora</i>	Folhas	Felício et al., 2004
86	Ácido 16 α ,17-diidroxikauran-19-óico	<i>O. semiserrata</i>	Folhas	Velandia et al., 1998a
87	Sitosterol	<i>O. castaneifolia</i>	Folhas	Nascimento et al., 2009
		<i>O. ferruginea</i>	Folhas	Fidelis et al., 2012
		<i>O. hexasperma</i>	Ramos	Carvalho et al., 2008b
		<i>O. hexasperma</i>	Flor	Suzart et al., 2012
		<i>O. microdonta</i>	Folhas	Carvalho et al., 2008a
		<i>O. parviflora</i>	Folhas	Araújo et al., 2012
		<i>O. semiserrata</i>	Folhas	Velandia et al., 2002
		<i>O. semiserrata</i>	Ramos	Velandia et al., 2002
		<i>O. castaneifolia</i>	Folhas	Nascimento et al., 2009
		<i>O. ferruginea</i>	Folhas	Fidelis et al., 2012
		<i>O. hexasperma</i>	Ramos	Carvalho et al., 2008b
		<i>O. hexasperma</i>	Flor	Suzart et al., 2012
		<i>O. microdonta</i>	Folhas	Carvalho et al., 2008a
		<i>O.</i>	Folhas	Mbing et al., 2006
88	Estigmasterol	<i>nigroviolacea</i>		
		<i>O. parviflora</i>	Folhas	Felício et al., 2004
		<i>O. semiserrata</i>	Folhas	Velandia et al., 2002
		<i>O. semiserrata</i>	Ramos	Velandia et al., 2002
		<i>O. sulcata</i>	Folhas	Pegnyemb et al., 2005
		<i>O. ferruginea</i>	Folhas	Fidelis et al., 2012
		<i>O. hexasperma</i>	Ramos	Carvalho et al., 2008b
89	Campesterol	<i>O. parviflora</i>	Folhas	Araújo et al., 2012
		<i>O. ferruginea</i>	Folhas	Fidelis et al., 2012
		<i>O. hexasperma</i>	Ramos	Carvalho et al., 2008b
90	3- <i>O</i> - β -glicopiranosilsitosterol	<i>O. ferruginea</i>	Folhas	Fidelis et al., 2012
		<i>O. gilgiana</i>	Folhas	Njock et al., 2012
		<i>O. hexasperma</i>	Ramos	Carvalho et al., 2008b
		<i>O. hexasperma</i>	Flor	Suzart et al., 2012
		<i>O. ferruginea</i>	Folhas	Fidelis et al., 2012
91	3- <i>O</i> - β -glicopiranosilestigmasterol	<i>O. sulcata</i>	Folhas	Pegnyemb et al., 2005
		<i>O. semiserrata</i>	Ramos	Velandia et al., 2002
92	7-oxostigmat-5-en-3 β -ol	<i>O. semiserrata</i>	Ramos	Velandia et al., 2002
93	7-oxostigmata-5,22-dien-3 β -ol	<i>O. semiserrata</i>	Ramos	Velandia et al., 2002

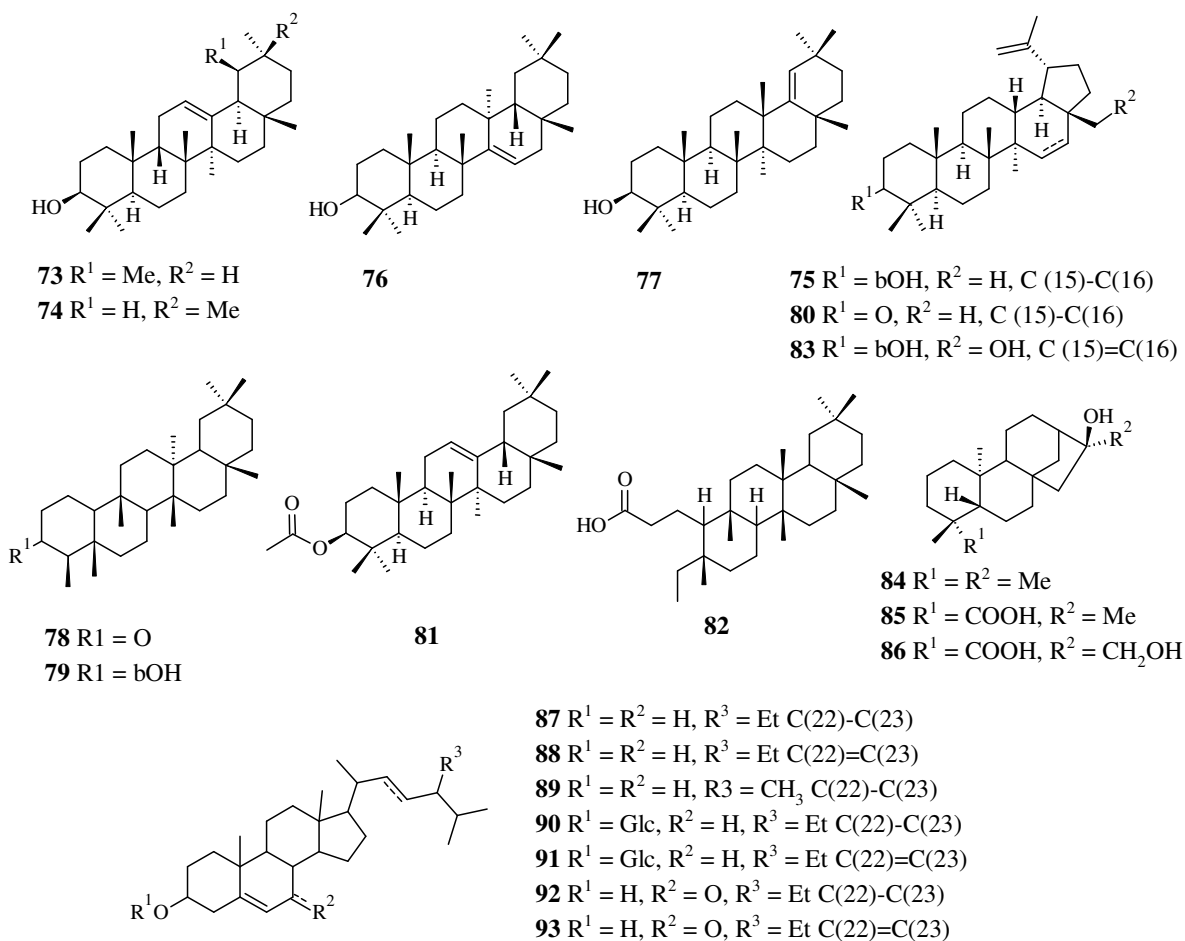


Figura 4. Estruturas de terpenos **73-86** e esteroides **87-93**

Tabela 3. Outras substâncias (**94-137**) isoladas de espécies do gênero *Ouratea*

No.	Compounds	Plant	Part	Ref.
94	Eudesmina	<i>O. semisserrata</i>	Ramos	Velandia et al., 2002
95	Epieudesmina	<i>O. semisserrata</i>	Ramos	Velandia et al., 2002
96	6,9-diidroximegastigma-4,7-dien-3-ona	<i>O. parviflora</i>	Folhas	Araújo et al., 2012
		<i>O. semisserrata</i>	Folhas	Velandia et al., 2002
97	Tocoferol	<i>O. parviflora</i>	Folhas	Araújo et al., 2012
		<i>O. semisserrata</i>	Folhas	Velandia et al., 2002
98	1β-O-(4-hidroxibenzoil)-β-D-glicopiranosídeo	<i>O. semisserrata</i>	Folhas	Velandia et al., 2002
99	1β-O-(4-hidroxifenil)-6-O-(4-metoxicinamoil)-D-glicopiranosídeo	<i>O. semisserrata</i>	Folhas	Velandia et al., 2002
100	1β-O-(4-hidroxifenil)-6-O-(4-hidroxibenzoil)-D-glicopiranosídeo	<i>O. parviflora</i>	Folhas	Felício et al., 2004
		<i>O. semisserrata</i>	Folhas	Velandia et al., 2002
101	α-D-glicopiranosose	<i>O. semisserrata</i>	Folhas	Velandia et al., 2002
102	β-D-glicopiranosose	<i>O. semisserrata</i>	Folhas	Velandia et al., 2002
103	metil-β-D-glicopiranosídeo	<i>O. cuspidata</i>	Caule	Suzart et al., 2007a
104	Metil-myoinositol	<i>O. hexasperma</i>	Folhas	Moreira et al., 1999

105	Aquilegiolida	<i>O. reticulata</i>	Casca da raiz	Manga et al., 2001
106	Menisdaurina	<i>O. reticulata</i>	Casca da raiz	Manga et al., 2001
107	Atranorin	<i>O. floribunda</i>	Madeira	Carvalho et al., 2000
108	Serotobenina	<i>O. gilgiana</i>	Folhas	Njock et al., 2012
		<i>O. turnarea</i>	Raiz	Zintchem et al., 2008
109	Ácido Siríngico	<i>O. gilgiana</i>	Folhas	Njock et al., 2012
		<i>O. ferruginea</i>	Folhas	Fidelis et al., 2012
110	Aldeído siríngico	<i>O. ferruginea</i>	Caule	Fidelis et al., 2012
111	2,6-dimetoxihidroquinona	<i>O. ferruginea</i>	Caule	Fidelis et al., 2012
112	Aldeído ferúlico	<i>O. ferruginea</i>	Caule	Fidelis et al., 2012
113	Ácido vanílico	<i>O. ferruginea</i>	Caule	Fidelis et al., 2012
114	1-hidroxi-2-metoxi-4-(1E-3-hidroxi-1-propenil)-benzeno	<i>O. ferruginea</i>	Caule	Fidelis et al., 2012
115	3,5-dimetoxi-4-hidroxi-diidrocinamaldeído	<i>O. ferruginea</i>	Caule	Fidelis et al., 2012
116	2,6-dimetoxibenzoquinona	<i>O. ferruginea</i>	Caule	Fidelis et al., 2012
117	Ácido 4-metoxi-2,5-diidroxi-benzóico	<i>O. microdonta</i>	Folhas	Carvalho et al., 2008a
118	Etil éster do ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	<i>O. nitida</i>	Folhas	Estevam et al., 2006
119	Tetracosano	<i>O. nitida</i>	Folhas	Estevam et al., 2006
120	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	<i>O. nitida</i>	Folhas	Estevam et al., 2006
121	Metil éster do ácido laúrico	<i>O. nitida</i>	Folhas	Estevam et al., 2006
122	Etil éster do ácido laúrico	<i>O. nitida</i>	Folhas	Estevam et al., 2006
123	Metil éster do ácido mirístico	<i>O. nitida</i>	Folhas	Estevam et al., 2006
124	Etil éster do ácido mirístico	<i>O. nitida</i>	Folhas	Estevam et al., 2006
125	Metil éster do ácido palmítico	<i>O. nitida</i>	Folhas	Estevam et al., 2006
126	Etil éster do ácido palmítico	<i>O. nitida</i>	Folhas	Estevam et al., 2006
127	Metil éster do ácido esteárico	<i>O. nitida</i>	Folhas	Estevam et al., 2006
128	Etil éster do ácido esteárico	<i>O. nitida</i>	Folhas	Estevam et al., 2006
129	Metil éster do ácido pentadecanóico			
130	Metil éster do ácido heptadecanóico			
131	Metil éster do ácido beénico			
132	Metil éster do ácido lignocérico			
133	<i>n</i> -butil estearato			
134	Metil éster do ácido oleico	<i>O. nitida</i>	Folhas	Estevam et al., 2006
135	Etil éster do ácido oleico	<i>O. nitida</i>	Folhas	Estevam et al., 2006
136	Metil éster do ácido araquidónico	<i>O. nitida</i>	Folhas	Estevam et al., 2006
137	Etil éster do ácido linoléico	<i>O. nitida</i>	Folhas	Estevam et al., 2006

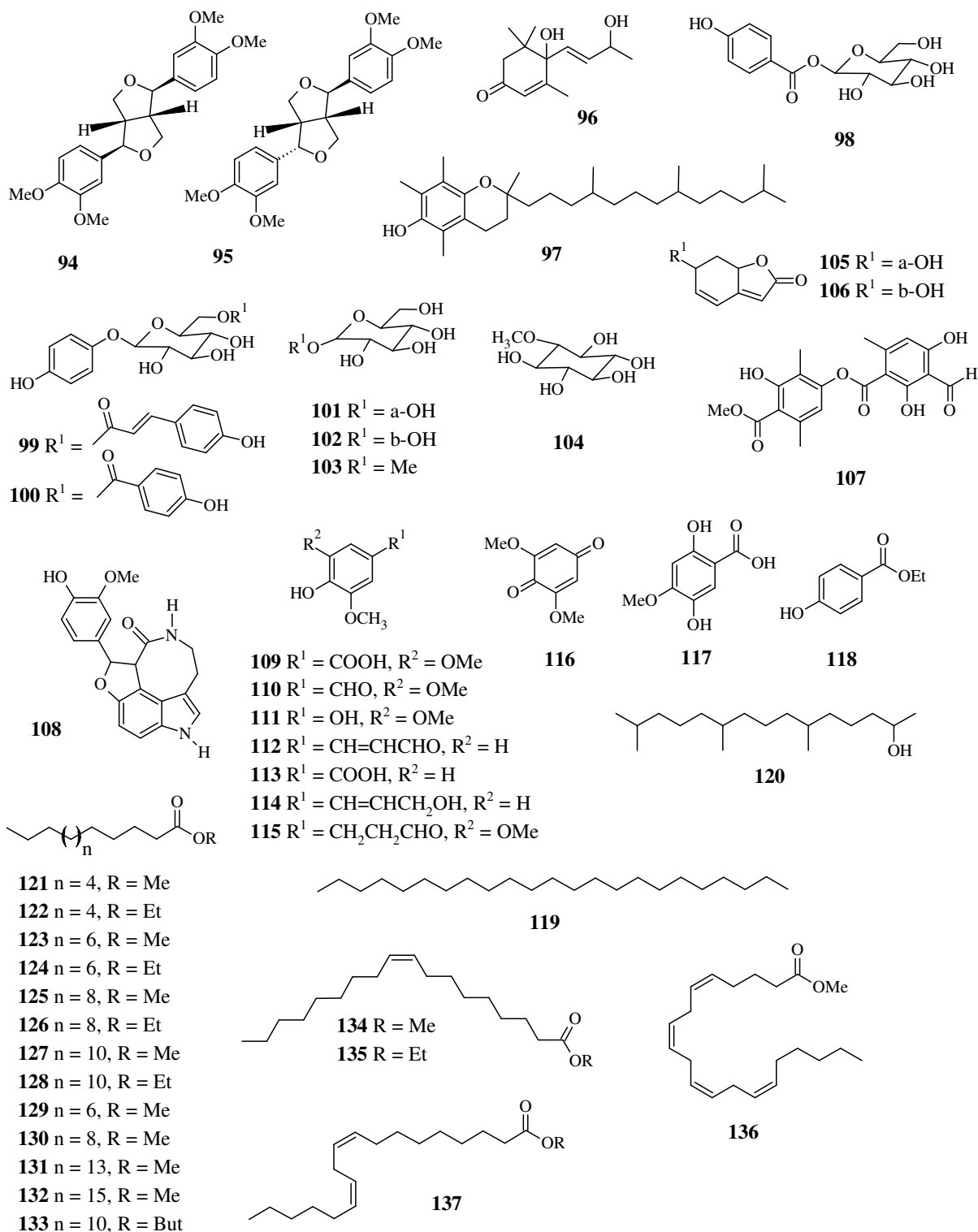


Figura 5. Estruturas de outras substâncias isoladas de espécies do gênero *Ouratea* **94-137**

2.3.2. Estudos anteriores realizados com as espécies de *O. ferruginea*, *O. cuspidata*, *O. hexasperma*, *O. semisserrata* e *O. stipulata*

A espécie *O. ferruginea* foi estudada pela primeira vez por Fidelis e colaboradores (2012). Neste trabalho foram identificadas 23 substâncias. Dos extratos do galho foram isolados dois triterpenos, friedelina e friedelinol; uma mistura de esteroides, sitosterol, estigmasterol e campesterol e esteroides glicosilados, sitosteril e estigmasteril-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo; as isoflavononas, 7,3'-di-*O*-metilorobol, 5,4'-hidroxi-7,5',3'-trimetoxi-isoflavona, piscigenina e 5-hidroxi-7,3',4',5'-tetrametoxi-isoflavona; os aldeído siríngico e ferúlico; 2,6-dimetoxi-hidroquinona; 2,6-dimetoxibenzoquinona; a mistura de ácido vanílico, 1-hidroxi-2-metoxi-4-(1*E*-3-hidroxipropenil)benzeno e 3,5-dimetoxi-4-hidroxiidrocinnamaldeído. Os triterpenos friedelina e friedelinol e a mistura de esteroides também foram isolados de extratos das folhas dessa espécie, junto com lupeona, amentoflavona, sequoiaflavona, ácido siríngico e 2*R*,3*R*-epicatequina. Os flavonoides sequoiaflavona, 7,3'-di-*O*-metilorobol, 5,4'-hidroxi-7,5',3'-trimetoxi-isoflavona e piscigenina apresentaram atividade inibitória frente as enzimas do metabolismo de xenobióticos de Fase I (ECOD) e Fase II (GST) (FIDELIS et al., 2012).

Até o momento, foram realizados estudos com a *Ouratea cuspidata* apenas de folhas e galhos que conduziu a identificação de 11 substâncias. De folhas foram isoladas uma de mistura de sitosterol, estigmasterol; uma mistura de lupeol, α - e β -amirina; dois biflavonoides, amentoflavona e putraflavona; flavonoides 4',5,7-trihidroxi-3',5'-dimetoxi-flavona, 3,5,7,4'-tetrahidroxi-3'-metoxi-flavona. Dos extratos dos galhos foram isolados apenas a 5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxi-3-*O*- β -D-galactopiranosil-flavona e metil- β -D-glicopiranosídeo (SUZART, 2007).

A *Ouratea hexasperma* é a espécie do gênero que apresenta o estudo químico mais completo, este inclui, folhas, galhos, raízes e inflorescência. De extratos de folhas foram isolados a epicatequina, a 2''-*O*- β -D-glicopiranosil-8-*C*- β -D-glicopiranosil-luteolina, o metil-myoinositol e 3 biflavonas, 7,7''-di-*O*-metillanarafaflavona, 7''-*O*-metilagatisflavona e agatisflavona (DANIEL et al., 2005). Os biflavonoides isolados das folhas apresentaram potente atividade antiproliferativa contra varias linhagens de câncer humano (DANIEL et al., 2007). Do extrato do caule foram isolados o ácido 2,4-dihidroxifenil acético e os flavonoides prenilados, 3,4',5-trihidroxi-6- δ , δ -dimetilalil-7-*O*- β -D-glicopiranosil-flavanona e 3,4',5-trihidroxi-6- δ , δ -dimetilalil-7-*O*- β -D-glicopiranosil-flavona (CARVALHO et al., 2008b). Das inflorescências foram isolados, uma mistura de esteroides, campesterol, sitosterol e estigmasterol; o 3- β -*O*- β -D-glicopiranosil-sitosterol; e os flavonoides 3- β -*O*-acil-olean-12-em-28-óico; rutina, swertisina,

swertiajaponina e a mistura de vitexina e orientina (SUZART et al., 2012). Das raízes foram isoladas três biisoflavanonas, hexaspermona A, B e C além da 7,5,4'-tri-*O*-metil-isoflavona (MOREIRA et al. 1994).

O estudo químico realizado até o momento com a espécie *O. semisserrata* é restrito as folhas e galhos, o mesmo permitiu a identificação de 25 substâncias. Dos extratos das folhas foram isolados terpenoides, o ácido *ent*-16 α ,17-dihidroxikauran-19-óico, friedelina, lupeol e 6,9-dihidroxi-megastigma-4,7-dien-3-ona; as biflavonas, 7-*O*-metillanaraflavona, 7,4''-di-*O*-metillanaraflavona, lanaraflavona, amentoflavona e podocarpusflavona; rutina; 3- β -*O*- β -D-glicopiranosil-sitosterol; 1-*O*-(4-hidroxibenzoil)- β -D-glicopiranosídeo; 1-*O*-(4-hidroxifenil)-6-*O*-(4-hidroxibenzoil)- β -D-glicopiranosídeo e os carboidratos, α - e β -D-glicopiranosose. Dos extratos dos galhos foram isoladas duas lignanas eudesmina e epieudesmina, as isoflavonas cloradas, 3',6,8-tricloro-4',5'-dihidroxi-7-metoxiisoflavona e 3',5',6,8-tetracloro-4',5'-dihidroxi-7-metoxiisoflavona e os esteroides β -sitosterol, estigmasterol, 7-oxoestigmast-5-en-3 β -ol e 7-oxoestigmast-5,22-dien-3 β -ol (VELANDIA et al., 1998b, 2002).

Em levantamento bibliográfico não foi encontrado qualquer estudo químico ou biológico com a espécie *O. stipulata*.

2.3.3. Gênero *Ochna* – aspectos químicos e biológicos

O gênero *Ochna* é o segundo maior da família Ochnaceae com aproximadamente 85 espécies. O gênero compreende espécies arbóreas e arbustivas com distribuição na Ásia, África e América (MA et al., 2011).

Muitas espécies são usadas na ornamentação, como *Ochna integerrima*, *O. thomasi*, *O. serrulata*, por apresentarem flores amarelas e frutos exóticos (BANDI et al., 2012). No Vietnã, as flores de coloração amarela de espécies de *Ochna* simbolizam sorte e prosperidade. As espécies popularmente conhecidas por *Ochnas* ou Mickey Mouse (MA et al., 2010). As espécies são utilizadas na medicina popular de países como Tailândia, Indonésia, Tasmânia, Camarões e Nigéria. As indicações incluem asma, disenteria, epilepsia, gastrite, úlcera, desordem menstrual e antídoto contra veneno de cobra (BANDI et al., 2012). Também é relatado o uso do óleo da semente de *O. squarrosa* e *O. atropurpurea* na alimentação, estes geralmente são ricos em ácidos palmítico, oleico, linoleico e palmitoleico (AHMAD et al., 1982; LIAQUAT ALI et al., 1980).

O gênero *Ochna*, assim como o gênero *Ouratea*, é bioprodutor de flavonoides. Dentre estes, destacam-se os bi, tri e pentaflavonoides, como mostrado na **Figura 6**, p. 24. Ochnaflavona (C-3'-O→C-4'') (**53**) é uma biflavona comumente encontrado em espécies de *Ochna*, e por essa razão é usada como marcador quimiotaxonômico do gênero. Outras biflavonas são encontradas nesse gênero com o mesmo padrão de ligação entre os monômeros (C-3'-O→C-4''), geralmente dímeros contendo monômeros diferentes como a diidroochnaflavona (**137**, flavona-flavanona). Dímeros de chalconas também são frequentemente encontrados nas espécies de *Ochna* e apresentam diversos padrões de ligação entre os monômeros. A formação de derivados mais complexos, como triflavonoides (folhas) e pentaflavonoides (casca do caule), respectivamente, foi observada apenas na espécie *O. calodendron* (MESSANGA et al., 2001; MESSANGA et al., 2002). Likhitwitayawuid e colaboradores (2005) relatam a predominância de monômeros de flavonoides e derivados de ochnaflavona nas folhas, enquanto que na madeira do caule, casca e madeira da raiz foram encontradas isoflavonas e derivado. Os dímeros de chalconas, no entanto, já foram isolados de folhas, casca do caule, madeira do caule e raízes. Antranoides, triterpenos e esteroides também foram encontrados em espécies de *Ochna*, mas são constituintes pouco frequentes no gênero. Recentemente foi publicado um trabalho de revisão sobre a composição química e atividade biológica de espécies do gênero *Ochna* (BANDI et al., 2012).

Há várias atividades biológicas descritas para constituintes químicos isolados de espécies de *Ochna*, como a atividade antimicrobiana de biflavonoides isolados de *O. macrocalyx*. Estes constituintes também foram avaliados em ensaios de citotoxicidade contra MCF-7 células de câncer de mama, no qual apresentaram atividade moderada à fraca, e em ensaios de inibição da atividade inibitória NF-κB, onde não apresentaram efeito inibitório, no entanto, os extratos e subfrações exibiram moderada atividade inibitória (TANG et al., 2003). Atividade antimicrobiana também foi observada em ensaios com extratos de folhas de *O. schweinfurthiana* (ABDULLAHI et al., 2010). A fração de acetato de etila da casca da raiz de *O. squarrosa* apresentou atividade analgésica e anti-inflamatória *in vivo* (ANURADLHA et al., 2006). O extrato etanólico e biflavanonas de casca de *O. integerrima* mostraram elevada atividade antimalarial contra *Plasmodium falciparum in vitro* (ICHINO et al., 2006). Flavonoides e biflavonóides de folhas e ramos de *O. integerrima* mostraram potente atividade anti-HIV-1 por ensaios de transcriptase reversa e linhagem celular 1A2 infectada por

DTat/revMC99 vírus (REUTRAKUL et al., 2007). Extratos de *O. afzelii* apresentaram atividade inibitória contra enzimas β -lactamase (GANGOUÉ-PIÉ BOJI et al., 2007).

Ochna serrulata é uma espécie originária da Ásia e África e foi introduzida no Brasil como uma espécie ornamental. Até o momento, foram encontrados na literatura dois trabalhos científicos para esta espécie.

COLLA e colaboradores (2011) descrevem a atividade antioxidante, toxicidade contra *Artemia salina* e alelopática realizada frente à *Lactuca sativa* em testes de germinação, de frações de *Oc. serrulata*. Todas as avaliadas frações apresentaram significativa atividade antioxidante em ensaios com DPPH e fraca atividade alelopática e toxicidade frente a *Artemia salina*. A fração em acetato de etila apresentou o maior potencial antioxidante e de seu fracionamento cromatográfico em sílica gel foi isolada a epicatequina.

MAKHAFOLA e ELOFF (2011) realizaram ensaios antimicrobianos com extratos em acetona de algumas espécies de do gênero *Ochna*, entre elas a espécie *O. serrulata*. Os ensaios foram realizados em métodos de concentração inibitória mínima e o extrato de *O. serrulata* apresentou fraca atividade antimicrobiana.

Devido a pouca informação obtida para a espécie *Ochna serrulata* através trabalhos realizados até o momento, faz-se necessário realizar estudo químico e biológico mais aprofundado. O gênero *Ochna* apresenta-se como uma fonte de flavonoides complexos com bi, tri e pentaflavonoides, e muitos desses flavonoides não apresentam nenhuma avaliação biológica.

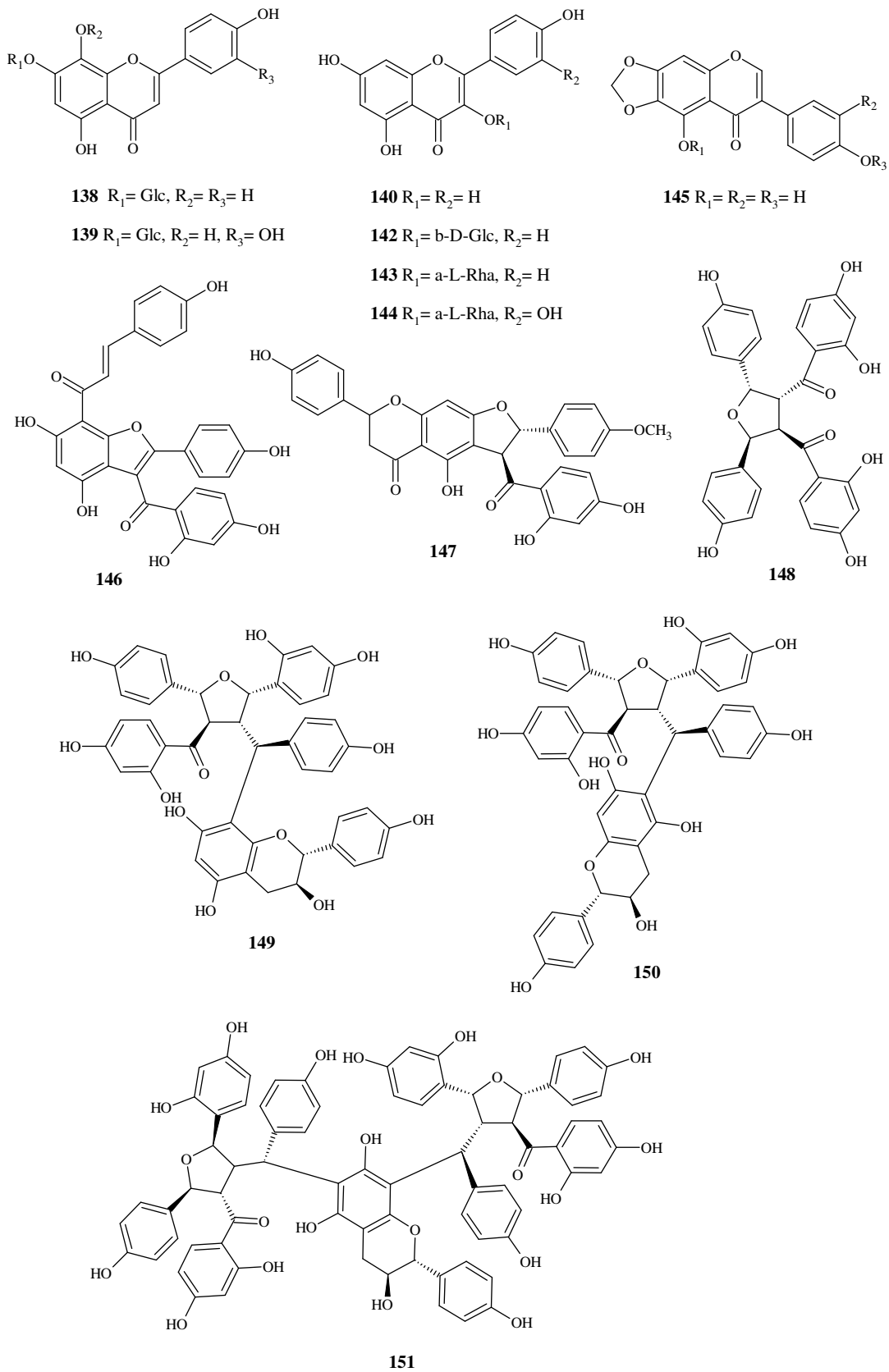


Figura 6. Estruturas de flavonoides isolados de espécies do gênero *Ochna* 138-151

2.4. RELEVÂNCIA DO TRABALHO

As espécies *Ouratea cuspidata*, *O. ferruginea*, *O. floribunda*, *O. hexasperma*, *O. microdonta*, *O. parviflora* e *O. semisserrata* foram estudadas em trabalhos de Teses e Dissertações do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) que conduziram a identificação de diversos constituintes químicos e avaliação de algumas atividades biológicas. Algumas dessas espécies foram novamente coletadas para trabalhos adicionais com o propósito de aprofundar o estudo químico e avaliar sua atividade biológica, ainda pouco estudada, considerando o potencial bioativo apresentado por biflavonoides frente a ensaios antitumorais (DANIEL et al., 2007; GRYNBERG et al., 2002). Neste estudo foi escolhido avaliar frações biflavonoídicas e/ou outros constituintes que apresentassem quantidade. A escolha tem como exemplo os fitoterápicos: *Ginkgo biloba* (Tebonin®, TruNature®, EGB761®, extratos de folhas que apresentam como princípio ativo flavonoides e terpenos lactonas) e *Silybum marianum* (Forfig®, Legalon®, extratos de frutos que apresenta como princípio ativo os flavonoides silibina, silidianina e silicristina) medicamentos que apresentam flavonoides como constituintes ativos.

No presente trabalho foram obtidas frações biflavonoídica de três espécies de *Ouratea* e a avaliação das atividades biológicas foi realizada (ver Capítulo II, p. 177). Este estudo também possibilitou a identificação de outros constituintes químicos de *O. hexasperma*, *O. cuspidata*, *O. ferruginea* e *O. semisserrata*. Além das espécies *Ouratea stipulata*, estudada pela primeira vez, e *Ochna serrulata* que ainda não apresenta um estudo químico e biológico aprofundado. Dentre os constituintes químicos isolados neste trabalho destacam-se o isolamento de um estilbeno e um cianoglicosídeo de *O. hexasperma*, dois ácidos benzóicos glicosilados e um biflavonoide de *O. semisserrata*, um biflavonoide de *O. ferruginea* e uma mistura de novos triterpenos de *O. cuspidata*. Essas espécies estudadas revelam a rica composição química e promissora fonte de substâncias bioativas de espécies da família Ochnaceae, o que justifica a realização de estudos químicos e biológicos adicionais.

2.5. PARTE EXPERIMENTAL

2.5.1. Fracionamento Cromatográfico

O fracionamento cromatográfico foi realizado em coluna de vidro usando gel de sílica, como adsorvente (fase normal, 70-230 mesh) e solventes orgânicos como eluentes, ambos da

marca Vetec. Para cromatografia por exclusão molecular foi usado o gel Sephadex LH-20 e metanol como solvente.

2.5.2. Análises Cromatográficas

As análises em cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas em cromatofolhas de alumínio 20x20 cm com gel sílica 60 F₂₅₄ Merck. Os eluentes usados foram solventes orgânicos P.A. da marca Vetec. As substâncias foram visualizadas com irradiação ultravioleta com comprimento de onda de 254nm e 365nm e/ou pulverizadas com os seguintes reagentes cromogênicos (adquiridos da Vetec, Sigma-Aldrich e Merck):

- Solução de AlCl₃-EtOH (1%), seguido de aquecimento, reagente para flavonoides.
- Vanilina sulfúrica (vanilina: 0,5 g em 100 mL de H₂SO₄ e EtOH).
- Vapores de iodo.

2.5.3. Equipamentos

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho Mel–Temp II da Laboratory devices U.S.A., utilizando capilar sem correção dos valores.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e carbono-13 (RMN ¹³C), incluindo experimentos em 2D, foram obtidos em aparelhos, Brücker modelo AC-200 (400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C) e Bruker (500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C) existente no Departamento de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Como padrão interno de referência foi usado tetrametilsilano (TMS) e/ou o sinal do resíduo do solvente clorofórmio (δ_H 7.27) e o sinal em δ_C 77.00 do clorofórmio deuterado (CDCl₃) e do solvente piridina, três simpletos largos (δ_H 8,71; 7,55; 7,19) e três triplete δ_C 123,5 para C-3 e 5; 135,5 para C-4; 149,2 para C-2 e 6 da piridina deuterada (Piridina-d₅). Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (*J*) foram medidos em Hertz (Hz).

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos no espectrofotômetro Perkin Elmer modelo 1600/1605 FT-IR. As amostras foram preparadas sob forma de disco prensado ou pastilha de KBr ou como filme em placa de NaCl. Os valores para as absorções foram medidos em unidades de número de ondas (cm⁻¹) e os espectros calibrados com filme de poliestireno de 0,5 mm de espessura.

Os espectros de massa (EM) foram obtidos nos aparelhos CG/MS – QP-5050 A e Saturno 2000 da VARIAN, com injeção direta, utilizando impacto de elétrons (IE) existentes na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), espectrômetro de Massas de Alta Resolução (tipo quadrupolo-tempo de voo) Bruker Impact HD pela colaboração do técnico Luiz F. Santos da Experiments performed at Bruker do Brasil e espectrômetro de Massas mocrOTOF Bruker, Faculdade de Farmácia, USP – Ribeirão Preto, com a colaboração do Prof. Norberto Peporine.

As análises por CLAE foram realizadas em aparelho Shimadzu LC-20AT, detector fotodiodo, usando coluna C18 Betasil-Thermo (25cm x 4,6mm x 5µm) e método de análise para flavonoide: fase móvel B, MeOH (90%), e A, H₂O:AcOH-1% (10%), vazão de fase móvel de 1ml/min, volume de injeção de 20.0 µL, detecção no UV em 320 nm.

2.5.4. Preparação de derivados

Foram preparados derivados de frações e substâncias isoladas para facilitar o isolamento ou obtenção de espectros de RMN em clorofórmio deuterado e análise em CG-EM.

2.5.4.1. Acetilação com anidrido acético e piridina

A reação de acetilação das substâncias foi feita adicionando-se piridina (3 mL/100 mg) e anidrido acético (4 mL/100 mg) nas amostras. A mistura reacional permaneceu sob agitação por 24 horas a temperatura de 60 °C. Após esse intervalo, adicionou-se água gelada à solução. O material acetilado foi extraído com clorofórmio (3x) e a solução clorofórmica lavada com HCl (10%) para eliminar a piridina, e em seguida, lavou-se várias vezes com água destilada. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada em rota evaporador, obtendo-se as substâncias acetiladas (MOREIRA et al., 1999).

2.5.4.2. Transesterificação em meio ácido

Para está reação foi usado o método descrito por JHAM et al., (1982) modificado. A reação foi realizada com 10,0 mg de amostra solubilizada em 1,6 mL metanol e 0,4 mL de HCl concentrado. A mistura foi aquecida por 15 minutos a 100 °C. Após resfriamento da mistura reacional foram adicionados a ela 3,0 mL de água destilada. A solução foi transferida para um funil de separação e lavada com clorofórmio (5x) para extrair a fase orgânica. A fase

orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada em rota evaporador, obtendo-se as substâncias transesterificadas (JHAM et al., 1982).

2.5.5. Material Vegetal

O material para estudo, folhas e caule da espécie *Ouratea ferruginea* Engl., foi coletada na Embrapa de Belém, no estado do Pará, com a colaboração da Profa. Dra. Giselle M. S. P. Guilhon e identificado pela MSc. Silvane Tavares Rodrigues. A exsicata está depositada no Herbário IAN da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, com o registro de N° 183954.

Folhas, caules e inflorescências da espécie *Ouratea hexasperma*, foram coletados na região do tabuleiro, município de João Pessoa, no estado da Paraíba em dezembro de 2011 e identificado pela Dra Maria de Fátma Agra. Uma exsicata deste espécime (N° 3497) está depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

As folhas de *Ouratea cuspidata* foram coletadas na restinga do município de Barra de Maricá, Rio de Janeiro, RJ, em 2012 e identificado pela Dra. Luci de Senna Valle. Uma exsicata (N° 206313) desta espécie esta depositada no Herbário do Museu Nacional do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

As folhas de *Ouratea semiserrata* foram coletadas em Cachoeira Andorinhas, Município de Ouro Preto, Estado de Minas Gerais, em 2011. A planta foi identificada pelo técnico, Jorge Luis da Silva, do Herbário José Badini, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

Folhas de *Ouratea stipulata* (Vell.) Engl. foram coletadas no Parque Natural Municipal do Curió, Paracambí, Rio de Janeiro, em 2013, A planta foi identificada pelo técnico Msc. Thiago de Azevedo Amorim. A exsicata encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Botânica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (RBR) com o N° 35802.

Folhas e galhos de *Ochna serrulata* foram coletados no campus da UFRRJ (estrada da floresta), Seropédica, Rio de Janeiro. A planta foi identificada pelo Técnico Herbário Thiago Azevedo Amorim. A exsicata encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Botânica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (RBR) com o N° 36366.

2.5.6. Elaboração dos extratos

Os extratos foram obtidos por maceração a frio usando solventes de polaridades diferentes individualmente. Para folha, foi utilizado o hexano como primeiro solvente extrator, para o caule e a inflorescências, foi usado o diclorometano. O metanol foi o segundo solvente extrator usado em todas as partes da planta. A extração foi realizada de forma exaustiva. As soluções foram concentradas em evaporador rotatório, o extrato obtido, após estar totalmente seco foi armazenado em frasco de vidro e permaneceu sob refrigeração. Os extratos foram nomeados da seguinte forma: primeiramente nome da espécie, *Ouratea ferruginea* (OF), *O. hexasperma* (OH), *O. semisserrata* (OS), *O. stipulata* (OST), *Ochna serrulata* (OCS); em segundo parte da planta, folhas (F), caule (C), inflorescências (I), em terceiro solvente extrator, hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (A) e metanol (M). Para frações obtidas pela técnica de partição usa-se (P) acompanhado da letra do solvente usado, conforme mencionado acima, ou apenas resíduo (R). Na tabela 4 são apresentadas as descrições dos extratos estudados, enquanto que na tabela 5, p. 30, as massas de material vegetal e de extrato obtidos por maceração a frio.

Tabela 4. Relação das espécies, extratos e frações na elaboração das siglas

Espécie	Material Vegetal	Solvente Extrator	Fração (P)	Sigla
<i>O. cuspidata</i> (OC)	Folha (F)	MeOH (M)	AcOEt (A)	OCFAPH
<i>O. ferruginea</i> (OF)	Folha (F)	MeOH (M)	CH ₂ Cl ₂ (D)	OFFM-PD
<i>O. hexasperma</i> (OH)	Folha (F)	MeOH (M)	CH ₂ Cl ₂ (D)	OHFM-PD
	Caule (C)	CH ₂ Cl ₂ (D)	-	OHCD
	Caule (C)	MeOH (M)	CH ₂ Cl ₂ (D)	OHCM-PD
	Caule (C)	MeOH (M)	AcOEt (A)	OHCM-PA
	Inflorescência (I)	MeOH (M)	-	OHIM
<i>O. semisserrata</i> (OS)	Folha (F)	MeOH (M)	CH ₂ Cl ₂ (D)	OSFM-PD
	Folha (F)	MeOH (M)	AcOEt (A)	OSFM-PA
<i>O. stipulata</i> (OST)	Folha (F)	MeOH (M)	-	OSTFM
<i>Ochna serrulata</i> (OCS)	Folha (F)	MeOH (M)	-	OCSFM

Tabela 5. Relação de massas de material vegetal e extratos obtidos

Espécie	Material Vegetal	Extrato Apolar	Extrato Polar
<i>O. ferruginea</i> (OF)	Folha (344,72 g)	OFFH (5,40 g)	OFFM (26,40 g)
	Caule (1382,00 g)	OFCD (5,02g)	OFM (58,91 g)
<i>O. hexasperma</i> (OH)	Folha (1679,80 g)	OHFH (17,28 g)	OHFM (61,81 g)
	Caule (2567,50 g)	OHCD (9,48 g)	OHCM (182,90 g)
	Inflorescência (1094,62 g)	OHID (81,75 g)	OHIM (125,30 g)
<i>O. stipulata</i> (OST)	Folha (13,55g)	-	OSTFM (2,80 g)
<i>Ochna serrulata</i> (OCS)	Folha (18,10 g)	-	OCSFM (3,37 g)
<i>Ochna serrulata</i> (OCHS)	Caule (21,3 g)	-	OCSCM (1,25 g)

As espécies *O. ferruginea* e *O. hexasperma*, cujo material vegetal foi obtido em maior quantidade, foram submetidas a maceração a frio com dois solventes (um apolar e um polar). O extrato metanólico foi submetido a partição líquido-líquido. As demais espécies foram submetidas a maceração a frio somente com solvente polar (metanol). As frações OCFAPH (1,60 g) e OSFM-PD (8,54 g) e OSFM-PA (1,954 g) foram obtidas de trabalhos anteriores.

2.5.7. Partição líquido-líquido

Os extratos metanólicos foram solubilizado em MeOH:H₂O – 8:2, na razão 50g de extrato seco /150 mL de solução. A mistura foi transferida para um funil de separação de 2 L e extraída com os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila. Cada fração foi concentrada em evaporador rotatório e armazenada em frasco de vidro sob refrigeração.

O extrato OFFM (26,40 g), fracionado através de partição líquido-líquido, gerou as frações OFFM-PD (5,30 g) e OFFM-PA (3,90 g). Outro extrato OFFM (40,05 g) remanescentes de um trabalho anterior, também foi fracionado e forneceu as frações OFFM-PH (4,15 g), OFFM-PD (4,06 g) e OFFM-PA (7,80 g).

O extrato OFCM (58,91 g) foi fracionado apenas com os solventes, diclorometano e acetato de etila, pois com hexano não houve extração satisfatória. As frações obtidas foram OFCM-PD (1,02 g) e OFCM-PA (1,38 g).

A partição do extrato OHFM (61,81 g) gerou as frações OHFM-PH (3,35 g), OHFM-PD (5,30 g) e OHFM-PA (22,64 g). Durante a partição do extrato OHFM houve a formação de precipitado de coloração amarelada ao iniciar a lavagem com acetato de etila. O precipitado foi lavado com metanol e acetato de etila e identificado com sendo a amentoflavona por experimentos de RMN.

A partição de 70,05 g de extrato OHCM gerou as frações OHCM-PH (0,34 g), OHCM-PD (3,10 g) E OHCM-PA (4,85 g).

O extrato metanólico OHIM apresentou aroma adocicado e tendência a proliferação de micro-organismos como fungos, portanto não foi submetido a partição.

2.5.8. Fracionamento de extratos e frações de *Ouratea* para obtenção de biflavonoides

Foram aplicados em coluna de sílica, fase normal, 2,5 g da fração de OFFM-PD. A eluição foi realizada utilizando solventes orgânicos (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol), puros e em misturas binárias, em polaridade crescente. Foram recolhidas 84 frações. Flavonoides foram encontrados nas frações OFFM-PD 47 a 58 como constituintes majoritários em mistura com clorofila. As frações foram reunidas de acordo com suas características. As frações resultantes da reunião foram OFFM-PD 47-49 (3mg) e 50-58 (61 mg). As frações OFFM-PD 47-49 e 50-58 geraram precipitados 3 e 20 mg, respectivamente.

A fração OHFM-PD (4,07 g) foi fracionada em coluna de gel de sílica usando a mesma sequência de eluente utilizados no fracionamento de OFFM-PD. Foram recolhidas 76 frações de 250 mL. Os biflavonoides foram encontrados na fração 49-53 (18 mg).

O extrato OSFC foi aplicado em coluna cromatográfica de gel de sílica usando a mesma sequência de eluente utilizados no fracionamento de OFFM-PD. Foram recolhidas 126 frações de 100 mL. Nas frações 82 à 96 (421 mg) foram encontrados biflavonoides em mistura com clorofila, as mesmas foram reunidas. A fração 82-96 foi submetida a coluna cromatográfica de sílica flash para retirar a clorofila. No fracionamento foi utilizado o eluente diclorometano:metanol 1:1. Foram obtidas 9 frações de 50 mL. As frações 6 e 9 foram escolhidas para testes biológicos por apresentarem maior pureza dos flavonoides.

A fração OSFM-PD (5,05g) foi aplicada em coluna cromatográfica de gel de sílica e eluída com a mesma sequência de eluentes usada para OFFM-PD. Foram recolhidas 54 frações de 250 mL. Os biflavonoides foram encontrados na fração 21-24 (442 mg).

A fração OSTFM (2,80 g) foi aplicada em coluna cromatográfica de gel de sílica e eluída com hexano, diclorometano e metanol em polaridade crescente. Foram recolhidas 83 frações de 100 mL. A fração 44-47 (3,0 mg) apresentou precipitado contendo biflavonoides.

As frações obtidas foram analisadas por CLAE em comparação com padrões de biflavonoides isolados e identificados de espécies de *Ouratea* de trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais da UFRRJ.

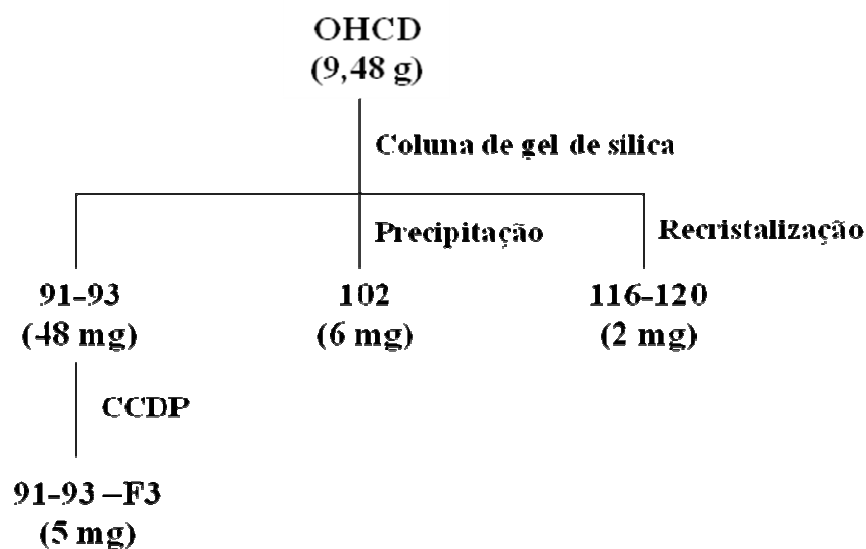
Os padrões e as frações 26-27a, 27b-29 e foram solubilizados em metanol grau espectroscópico e analisados por CLAE-DAD (Shimadzu) usando coluna C18 Betasil-Thermo (25cm x 4,6mm x 5µm) e método de análise para flavonoide: fase movel B, MeOH (90%), e A, H₂O:AcOH-1% (10%), a detecção foi realizada em 320 nm.

As frações que apresentaram constituintes incompatíveis com os padrões usados foram analisadas também por Espectrometria de Massas, método por injeção direta.

Estas frações, com exceção da OSTFM-44-47 que apresentou pouca quantidade, e alguns dos biflavonoides purificados foram encaminhados para ensaios biológicos para avaliar o potencial bioativo dos mesmos.

2.5.9. Fracionamento cromatográfico de OHCD

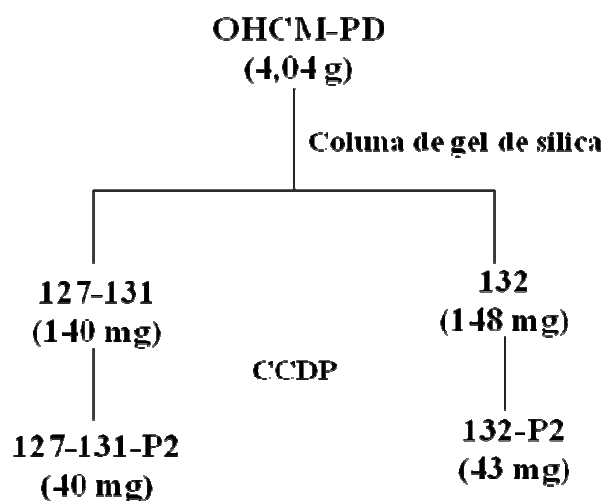
Preparou-se uma coluna cromatográfica de gel de sílica para o fracionamento de 9,48 g de extrato OHCD (*O. hexasperma*, caule, diclorometano). O extrato foi solubilizado em diclorometano e incorporado em gel de sílica. A coluna foi eluída com solventes orgânicos, hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, na forma pura e em misturas binárias com polaridade crescente. Foram retiradas 168 frações de 200 ml. Essas frações foram analisadas por CCDA e reunidas conforme seu perfil cromatográfico. A fração 62-67 apresentou um sólido branco, o mesmo foi recristalizado em diclorometano. Uma amostra desse cristais foi injetada em CG-EM e identificou-se o triterpeno lupeol; nas frações seguintes, 69-78, houve formação de precipitado branco identificado por CG-EM como a mistura de esteroides, campesterol, estigmasterol e sitosterol. A fração 91-93 (48,0 mg) foi submetida a CCDP, utilizando como eluente diclorometano, forneceu 6 subfrações. A subfração 3 (5,0 mg) apresentou um sólido cristalino de coloração amarelo alaranjado identificado por RMN¹H como 2,6-dimetoxibenzoquinona (**1**). Na fração 102 (6,0 mg) obteve-se um precipitado purificado por diversas precipitações em metanol e acetona, o mesmo foi determinado por RMN¹H como o triterpeno betulina (**2**). A fração 116-120 (2,0 mg) forneceu um precipitado de cor amarelo pálido o qual foi purificado por recristalização em diclorometano/metanol. A estrutura molecular do precipitado foi determinada por RMN¹H e CG-EM como sendo a isoflavona prunetina (**3**). O lupeol e a mistura de esteroides já haviam sido relatados nesta espécie em trabalhos anteriores. A marcha de isolamento é mostrada no **Esquema 1** p. 33.



Esquema 1. Marcha de isolamento dos constituintes da fração OHCD.

2.5.10. Fracionamento cromatográfico de OHCM-PD

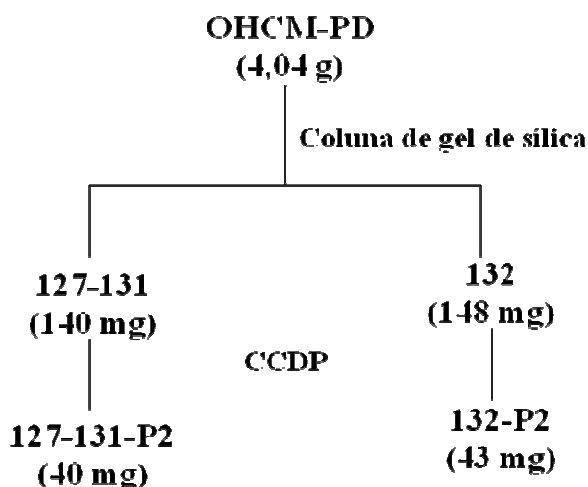
Para o fracionamento da fração OHCM-PD (*O. hexasperma*, caule, metanol, partição em diclorometano) foi montada uma coluna de sílica, na qual adicionou-se 4,04g da fração incorporada previamente em gel de sílica. Como eluente foram usados hexano, diclorometano e metanol, na forma pura e em misturas binárias com polaridade crescente. Deste fracionamento foram recolhidas 186 frações. Essas foram analisadas por CCDA e reunidas conforme seu perfil cromatográfico. As frações 127-131 (140,0 mg) e 132 (148,0 mg) apresentaram coloração castanho avermelhadas e aspecto viscoso, quando analisadas em CCDA e quando reveladas com solução de vanilina sulfúrica mostraram mancha vermelha intensa. Ambas as frações foram submetidas à CCDP eluídas em diclorometano:metanol 85:15, que resultou na separação da substância de coloração vermelha gerando as subfrações 127-131-P2 (40,0 mg) e 132-P2 (43,0 mg) como mostrado no **Esquema 2** (p. 34). A análise dos espectros RMN ^1H e ^{13}C , HSQC e HMBC permitiram determinar a estrutura de um estilbeno glicosilado, *trans*-3-*O*-metil-resveratrol-2-*C*- β -glicosídeo (4).



Esquema 2. Marcha de isolamento dos constituintes da fração OHCM-PD.

2.5.11. Fracionamento cromatográfico de OHCM-PA

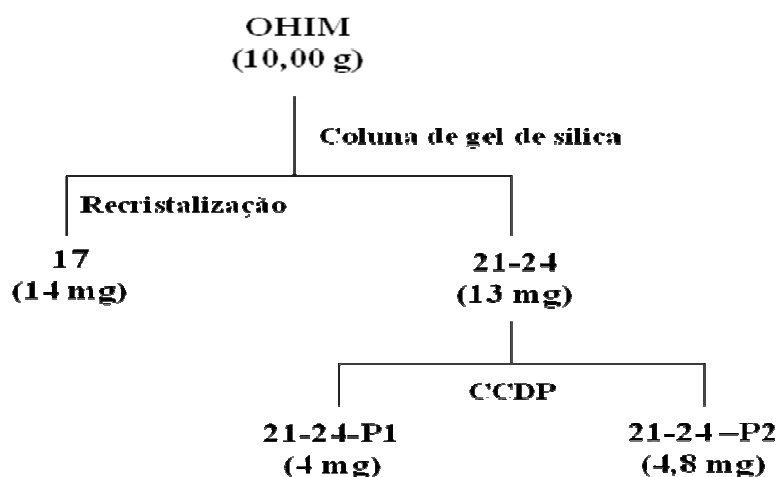
A fração OHCM-PA (*O. hexasperma*, caule, metanol, partição em acetato de etila; 11,00 g) foi solubilizada em metanol e forneceu um precipitado de coloração branca (95,0 mg). O precipitado foi purificado por recristalização em metanol/água. As análises por IV, RMN¹H e ¹³C, COSY, HSQC e HMBC permitiram propor a estrutura de um cianoglicosídeo (5). O sobrenadante foi aplicado a coluna filtrante de gel de sílica e forneceu 3 frações (A-C). A fração A (CHCl₃/MeOH – 90:10; 0,04 g), B (CHCl₃/MeOH – 75:25; 8,47 g), C (CHCl₃/MeOH – 50/50; 2,15 g) como mostrado no **Esquema 3** (p. 34). Estas frações foram fracionadas em coluna cromatográfica de gel de sílica e em Sephadex LH-20. Os fracionamentos e purificações conduziram apenas ao isolamento da substância 4.



Esquema 3. Marcha de isolamento dos constituintes da fração OHCM-PA.

2.5.12. Fracionamento cromatográfico de OHIM

A fração OHIM (*O. hexasperma*, inflorescência, metanol; 10,0 g) foi incorporada em gel de sílica e fracionada em coluna de gel de sílica usando solventes orgânicos puros e em misturas binárias. O fracionamento foi conduzido com o aumento gradativo da polaridade. Foram recolhidas 99 frações com volume de 250 mL. A fração OHIM-17 (14,0 mg) gerou um precipitado amarelo pálido, o qual foi purificado por recristalização. Experimentos de RMN ^1H revelaram a presença de sinais característicos de flavona, identificada como apigenina (**6**). A fração OHIM-21-24 apresentou duas manchas em CCDA e foi aplicada em CCDP ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acetona}$ 70:30) para isolamento das substâncias. A fração OHIM-21-24-P1 (4,0 mg) foi identificada como sendo a flavona luteolina (**7**) e a OHIM-21-24-P2 (4,8 mg) como sendo o biflavonoide amentoflavona (**8**), ambas foram analisadas por RMN (**Esquema 4**, p. 35). A fração OHIM-38-43 forneceu um precipitado amarelo identificado com por RMN ^1H como uma mistura de orientina e vitexina, ambas isoladas em trabalho anterior (SUZART, 2006). Em OHIM-81 foi obtido um precipitado de coloração castanho, o mesmo foi identificado por experimentos de RMN ^1H e ^{13}C como sendo a rutina, também isolada anteriormente por SUZART (2006).

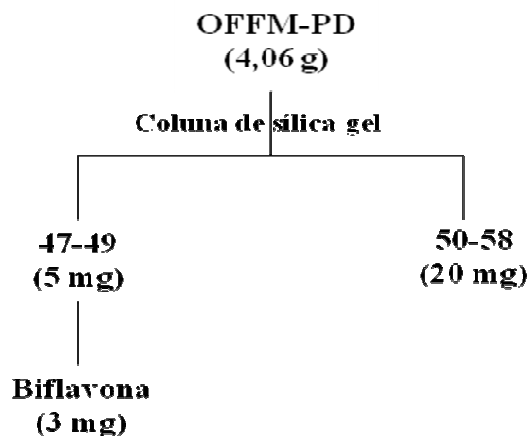


Esquema 4. Marcha de isolamento dos constituintes da fração OHIM.

2.5.13. Fracionamento cromatográfico de OFFM-PD

A fração OFFM-PD-47-49 (5,0 mg) obtida do fracionamento de OFFM-PD (*O. ferruginea*, folha, metanol, partição em diclorometano), ver **2.5.7**. A fração gerou um precipitado que foi lavado para retirar a clorofila. A análise em RMN ^1H do precipitado

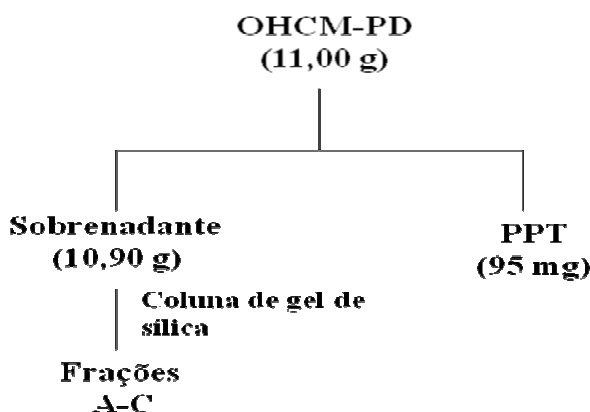
permitiu a identificação do biflavonoide, putraflavona (**9**; 3 mg). A marcha do isolamento é mostrada no **Esquema 5**, p. 36.



Esquema 5. Marcha de isolamento dos constituintes da fração OFFM-PD.

2.5.14. Fracionamento cromatográfico de OSFM-PD

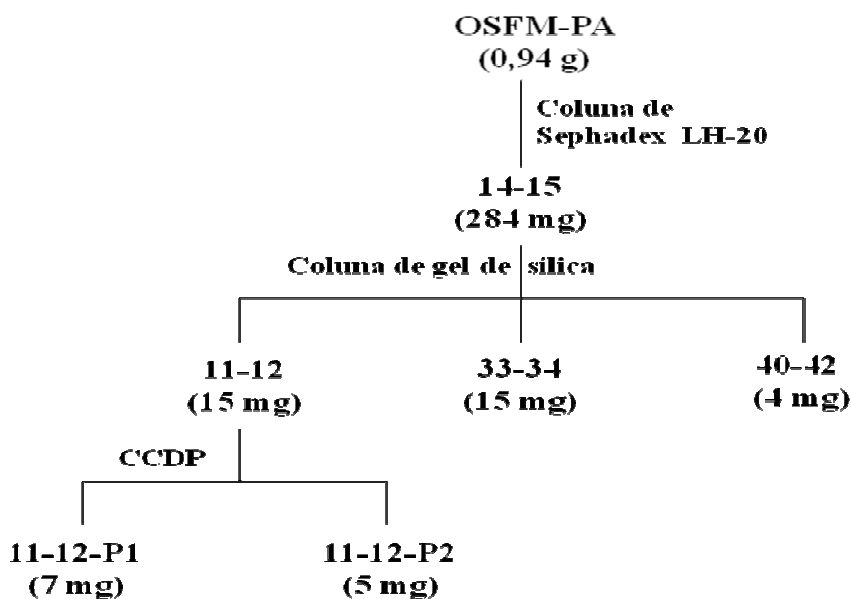
A fração OSFM-PD (*O. semisserrata*, folha, metanol, partição em diclorometano; 5,05 g) foi solubilizada em metanol e incorporada à gel de sílica. A coluna cromatográfica de gel de sílica foi eluída com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade. Foram recolhidas 54 frações de 250 mL. As frações foram analisadas por CCDA, as que apresentaram perfil semelhante foram reunidas. A fração OSFM-PD-15-17 forneceu um precipitado de coloração amarelada, o mesmo foi purificado por recristalização. A análise desta fração por RMN ^1H e ^{13}C conduziu a identificação do biflavonoide heveaflavona (**10**, 7,0 mg). Na fração OSFM-PD-21-24 (442,0 mg) foi obtida uma mistura de biflavonoides identificada por CLAE e CL-EM. A marcha do isolamento é **Esquema 6**, p. 36.



Esquema 6. Marcha de isolamento dos constituintes da fração OSFM-PD.

2.5.15. Fracionamento cromatográfico de OSFM-PA

Foram aplicados 0,94 g da fração OSFM-PA (*O. semisserrata*, folha, metanol, partição em acetato de etila) em coluna de Sephadex LH-20. Foram recolhidas 35 frações de 10 ml. A fração OSFM-PA-14-15 (284, mg) foi submetida a coluna cromatográfica de gel de sílica usando como eluente diclorometano e metanol. Foram obtidas 56 frações de 50 ml. A fração OSFM-PA-14-15-S-11-12 foi submetida a CCDP (CH_2Cl_2 :Acetona 7:3) e forneceu duas frações OSFM-PA-14-15-S-11-12-P1 (7,0 mg) e OSFM-PA-14-15-S-11-12-P2 (5,0 mg). As análises de RMN das frações permitiram identificar os ácidos p-hidroxi-benzóico (**11**) em P1 e 3,4-diidroxi-benzóico (**12**) em P2. A análise de RMN da fração OSFM-PA-33-34 conduziu a identificação do glicosídeo esterificado, ácido 2-hidroxi-5-*O*-(6'-*O*-(4-hidroxibenzoil)- β -D-glucopiranosil)-benzóico (**13**, 15,0 mg), enquanto que na fração OSFM-PA-40-42 foi identificado um glicosil derivado ácido 2-hidroxi-5-*O*-(β -D-glucopiranosil)-benzóico (**14**, 4,0 mg). A marcha do isolamento é mostrado no **Esquema 7**, p. 37.

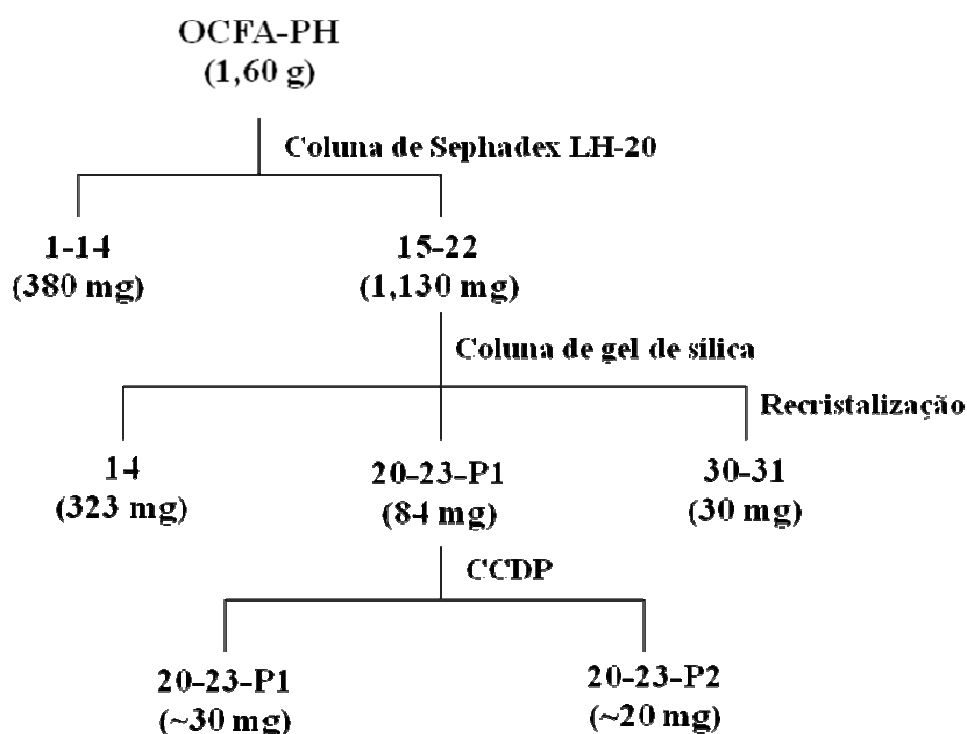


Esquema 7. Marcha de isolamento dos constituintes da fração OSFM-PA.

2.5.16. Fracionamento cromatográfico de OCFAPH

A fração OCFAPH (*O. cuspidata*, folha, acetato de etila, partição em hexano; 1,598 g) foi aplicada em coluna Sephadex LH-20 e eluída com metanol. Foram recolhidas 24 frações de 10 ml. As frações 15 à 22 foram reunidas (1,130 g) e submetidas a fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica utilizando como eluente misturas binárias de hexano:diclorometano, diclorometano:acetato de etila e diclorometano:metanol. Para a

limpeza da coluna foi usado apenas metanol. Foram recolhidas 55 frações de 100 ml. As frações com perfis cromatográficos (CCDA) semelhantes foram reunidas. A fração 14 apresentou um sólido amorfo o qual foi analisado por RMN e EM. Essas análises conduziram a identificação da mistura de (3- β -*O*-acil)-maslínico (**15**) e ácidos (2- α -*O*-acil)-maslínico (**16**). A fração 20-23 foi submetida a isolamento em CCDP e gerou as frações 20-23-P1 e 20-23-P2. Ambas as frações foram analisadas por RMN ^1H e ^{13}C , e EM-IES. Na fração 20-23-P1 foi identificado o ácido (3- β -*O*-acil)-maslínico (**1**). Na fração 30-31 foi obtido um precipitado branco, purificado por recristalização em acetona e identificado por RMN ^1H e ^{13}C como ácido maslínico (**17**). A marcha do isolamento é mestrado no **Esquema 8**, p. 38.

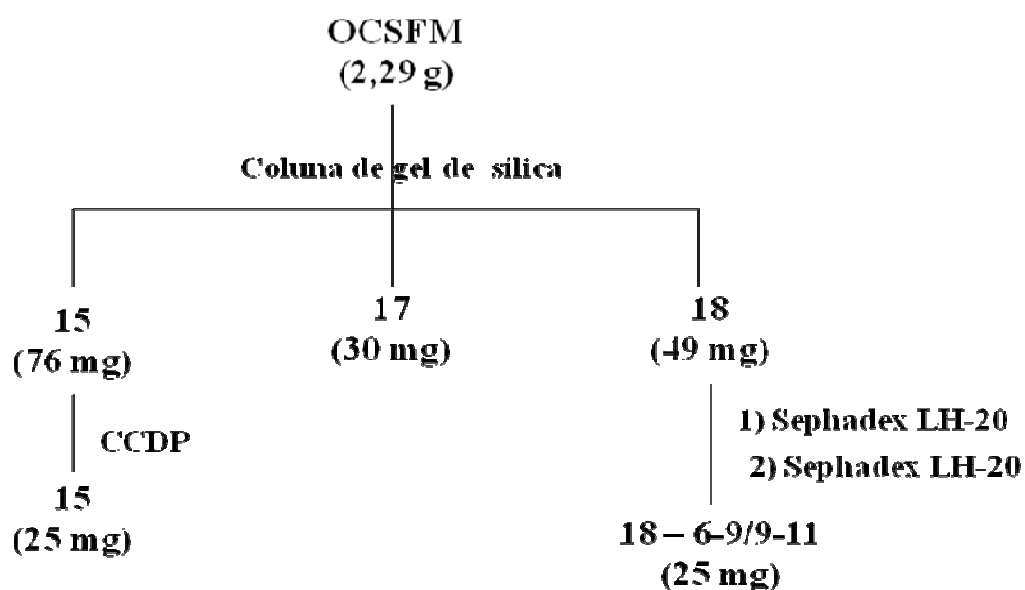


Esquema 8. Marcha de isolamento dos constituintes da fração OCFAPH.

2.5.17. Fracionamento cromatográfico de OCSFM

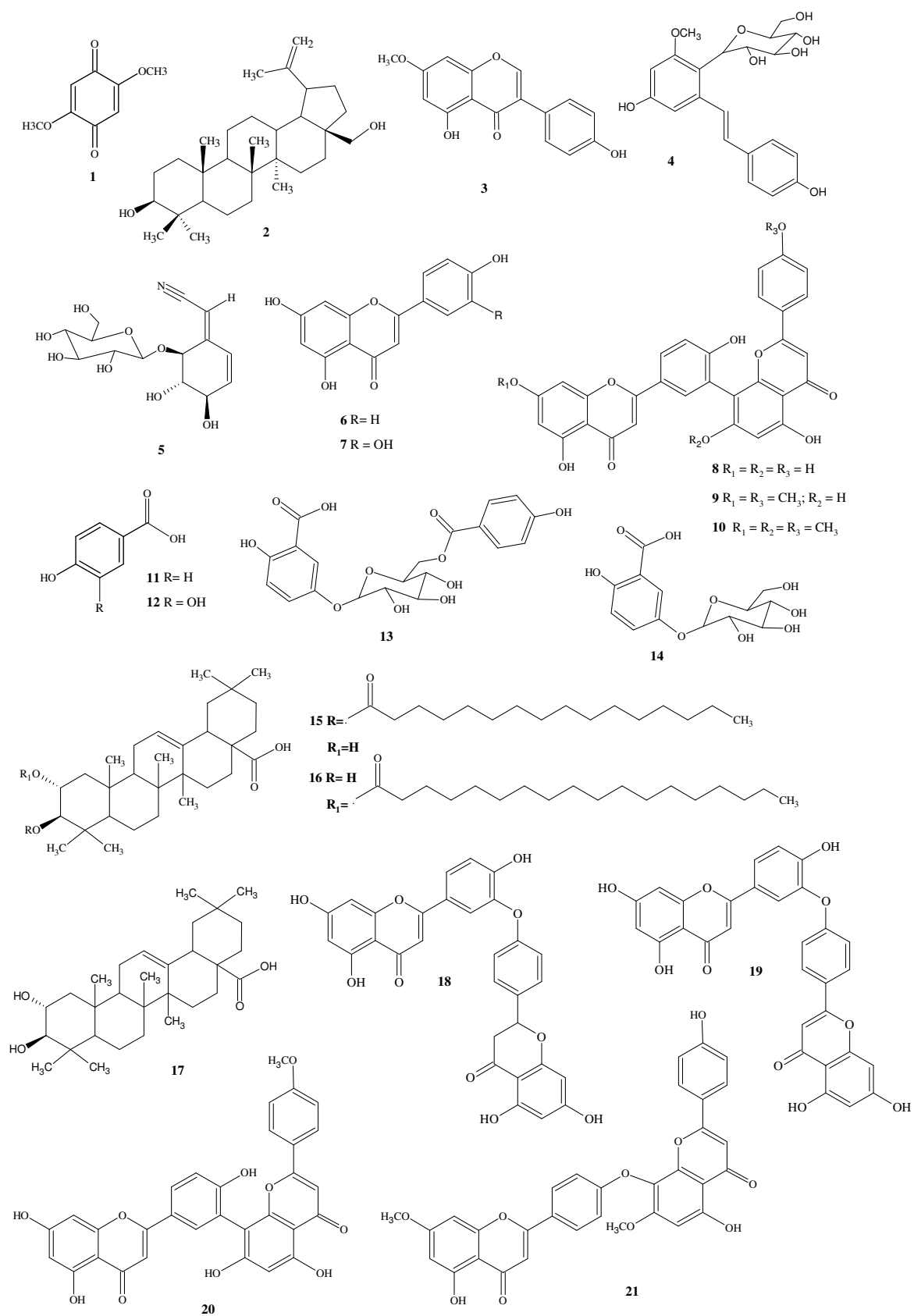
Foram incorporados 2,29 g de extrato OCSFM em gel de sílica e inseridos em coluna cromatográfica. O fracionamento foi realizado utilizando hexano, diclorometano e metanol como eluentes. Foram coletadas 48 frações de 100 ml, a marcha do isolamento é mostrada no **Esquema 9**, p. 39. A fração OCSFM-15 (76,0 mg) foi purificada por CCDP (diclorometano/acetona 75:25) e analisada por técnicas de RMN que conduziram a identificação do biflavonoide diidroochnaflavona (25,0 mg; **18**). A fração OCSFM-17 (30,0

mg) gerou um precipitado que foi analisado em CCDA e mostrou uma única mancha. O precipitado foi submetido a experimentos de RMN que conduziram a identificação do biflavonoide ochnaflavona (**19**). A fração OCSFM-18 (49,0 mg) foi aplicada em coluna de gel Sephadex LH-20 e recolhidas 14 frações de 10 ml. A fração OCSFM-18-S-6-9 obtida do primeiro fracionamento foi novamente aplicada em gel Sephadex LH-20 fornecendo 12 subfrações. As frações 9 à 11 foram reunidas e analisados por RMN. Pela análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C observou-se uma mistura de flavonoides glicosilados que levou a identificação apenas de um, 6''-acetil-scoparosídeo (**20**). A fração OCSFM-19 (51,0 mg) também foi purificada por exclusão molecular em gel Sephadex LH-20 obtendo-se 21 frações. A reunião das frações 17 e 18 resultou na fração OCSFM-19-S-17-18, a mesma foi analisada por espectros de RMN conduzindo a identificação de epicatequina, já identificada anteriormente nesta espécie (COLLA et al., 2011).



Esquema 9. Marcha do isolamento dos constituintes da fração OCFAPH.

2.6. RESULTADOS E DISCUSSÃO



2.6.1. 2,5-dimetoxibenzoquinona (1) isolada de OHCD

A identificação da substância **1** foi realizada por interpretação de espectro de RMN de ^1H e ^{13}C . O experimento de RMN ^1H (**Figura 7**, p. 42) apresentou dois simpletos, um em δ_{H} 5,84 (s), característico de hidrogênio olefínico, e outro em δ_{H} 3,80 (s), atribuído aos hidrogênios de metoxila. No espectro de RMN ^{13}C (**Figura 8**, p. 42) foi observado um sinal em δ_{C} 186,9 característico de carbonila, o qual foi atribuído aos carbonos C-1/4. Devido a simetria da molécula os demais sinais também correspondem a dois carbonos, o sinal em δ_{C} 157,3 foi atribuído aos carbonos C2/5, em δ_{C} 107,4 a C-3/6 e em δ_{C} 56,5 aos carbonos de ambas as metoxilas. Esses valores estão de acordo com os dados da 2,5-dimetoxi-1,4-benzoquinona isolada de *Hydrangea macrophylla* Seringe var. *otaksa* Makino (KIM et al., 2001) apresentados na **Tabela 6**.

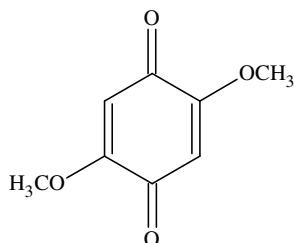


Tabela 6. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **1** em comparação com dados da literatura para 2,5-dimetoxi-1,4-benzoquinona (KIM et al., 2001).

C	Substância 1 (CDCl_3)		2,5-dimetoxi-1,4-benzoquinona (CDCl_3)	
	δ_{C}	δ_{H} (mult. J)	δ_{C}	δ_{H} (mult. J)
1	186,9		186,3	
2	157,3		157,3	
3	107,4	5,84 s	107,4	5,83 s
4	186,9		186,3	
5	157,3	5,84 s	107,4	5,83 s
6	107,4		157,3	
7	56,5	3,80 s	56,5	3,63 s
8	56,5	3,80 s	56,5	3,63 s

E:\queli_036001r

AMOSTRA: OHCD-91-93-P3 (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: CDCl3

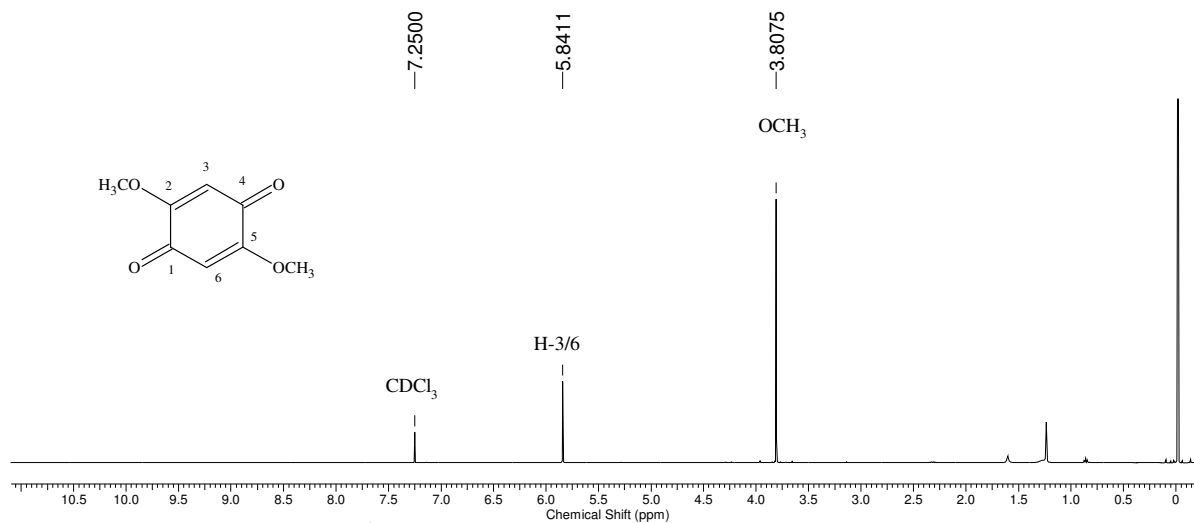


Figura 7. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) da substância 1

E:\queli\193\data\111r

AMOSTRA: OHCD - 9196 (DEPT Q) - 500MHZ SOLVENTE: CDCl3 OPERADOR DO NMR - MAURICIO

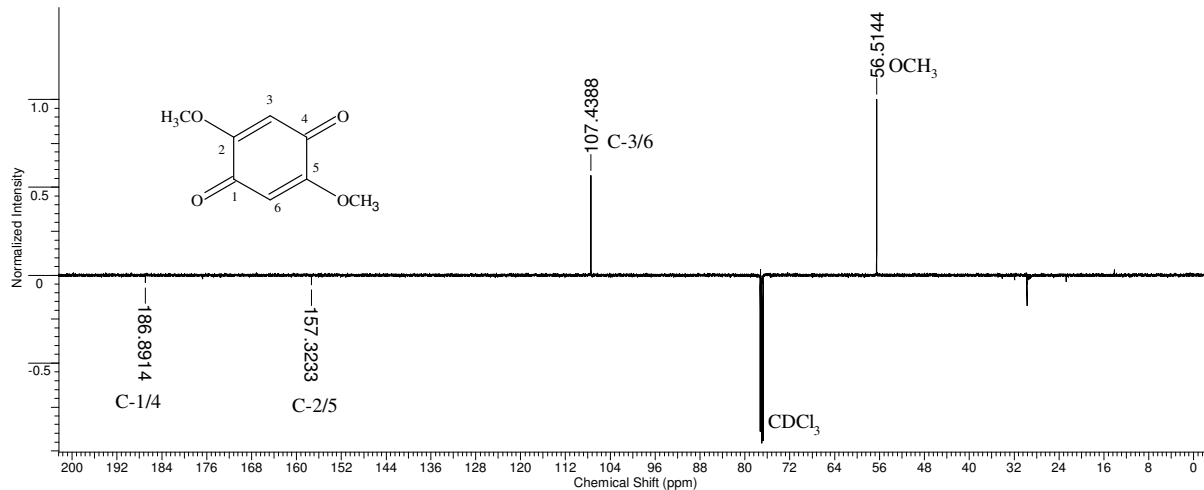
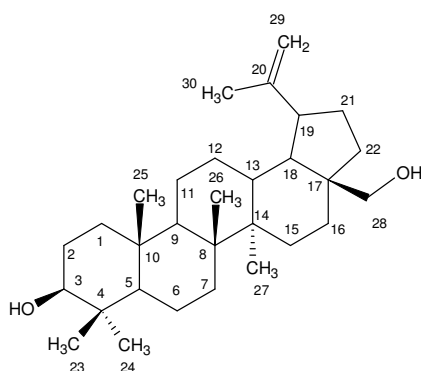


Figura 8. Espectro de RMN ¹³C DEPTQ (125 MHz, CDCl₃) da substância 1

2.6.2. Betulina (2) isolada de OHCD

O espectro de RMN¹H (**Figura 9**, p. 45) corresponde à substância **2** e mostra sinais característicos de metilas de triterpeno (**Tabela 7**, p. 44), δ_H 0,74(*s*), 0,80(*s*), 0,95(*s*), 0,96(*s*) e 1,00(*d*), em δ_H 1,66 verificou-se a presença de um simplete característico de metila adjacente a carbono vinílico. Um multiplete em δ_H 3,16 foi atribuído a hidrogênio carbinólico característico a de hidrogênio ligado ao carbono C-3 de esqueleto de triterpeno pentacíclico. Um duplo duplete em δ_H 3,30 e 3,77 mostrou-se compatível com a presença de um metileno carbinólico. Outro duplo duplete aparece em δ_H 4,56 e 4,66 sendo este atribuído a hidrogênios vinílicos. O espectro de RMN ¹³C (**Figura 10 e 11**, p. 45) apresentou sinais de grupos metílicos, δ_C 15,4 (23); 28,0 (24); 16,0 (25); 16,1 (26); 14,7 (27) e 19,0 (30). Foram observados sinais de dois carbonos sp² sendo um deles quaternário em δ_C 150,5 (C-20) e outro metilênico em δ_{CH_2} 109,7 (C-29), além de dois sinais característicos de carbono carbinólico em δ_C 79,0 e 60,5, os quais foram atribuídos ao carbonos C-3 e C-28, respectivamente. Os demais sinais são de carbonos sp³ quaternários, metínicos, metilênicos e metílicos. A análise desses dados, aliados a considerações biossintéticas e comparação com valores da literatura (SOUZA, 2006), além de comparação com padrão em placa de cromatografia em camada fina analítica, permitiu propor a estrutura da betulina.



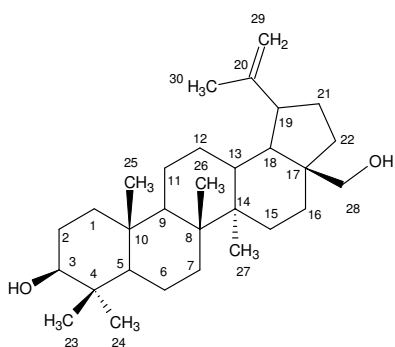


Tabela 7. Dados de RMN ^1H da substância **2** em comparação com dados da literatura para betulina (SOUZA, 2006)

		substância 2		Betulina		substância 2		Betulina	
		(CDCl ₃)		(CDCl ₃)		(CDCl ₃)		(CDCl ₃)	
C	δ_C	δ_H (mult. J)	δ_H (mult. J)	C	δ_C	δ_H (mult. J)	δ_H (mult. J)	C	δ_C
1	38,6			16	29,1				
2	27,4			17	47,8				
3	79,0	3,16 <i>m</i>	3,16 <i>dd</i>	18	48,7				
4	38,9			19	48,7	2,36 <i>m</i>	2,38 <i>td</i>		
5	55,3			20	150,5				
6	18,3			21	29,7				
7	34,2			22	34,0				
8	40,9			23	15,4	0,77 <i>s</i>	0,66 <i>s</i>		
9	50,4			24	28,0	0,80 <i>s</i>			
10	37,1			25	16,0	0,95 <i>s</i>	0,76 <i>s</i>		
11	20,8			26	16,1	0,96 <i>s</i>	0,83 <i>s</i>		
12	25,2			27	14,7	1,00 <i>s</i>	0,95 <i>s</i>		
13	37,3			28	60,5	3,77/3,30 <i>dd</i>	3,82/3,30 <i>dd</i>		
14	42,7			29	109,7	4,66/4,56 <i>s</i>	4,68/4,57 <i>s</i>		
15	27,0			30	19,0	1,66 <i>s</i>	1,68 <i>s</i>		

E:\queli_030001r

AMOSTRA: OHCD-102 (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: CDCl3

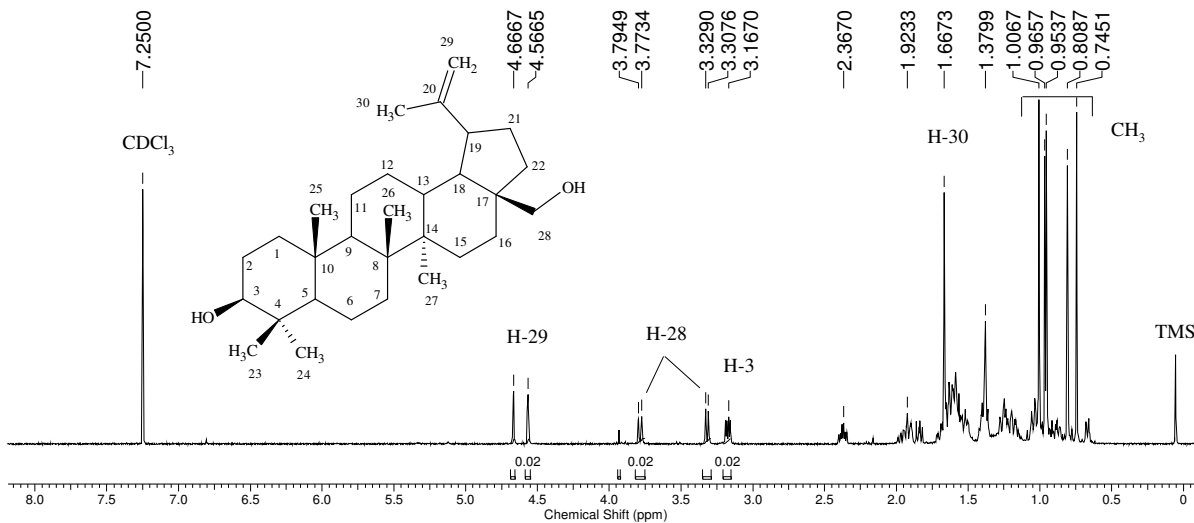


Figura 9. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) da substância 2

E:\queli\195\data\1\1r

AMOSTRA: OHCD - 102 (DEPT Q) - 500MHZ SOLVENTE: CDCl3 OPERADOR DO NMR - MAURICIO

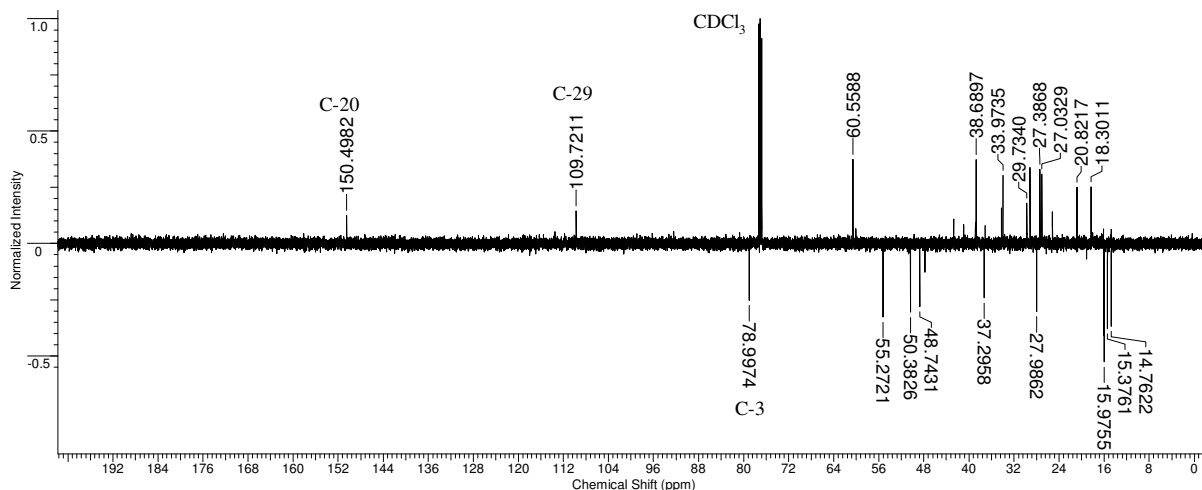


Figura 10. Espectro de RMN ¹³C DEPTQ (125 MHz, CDCl₃) da substância 2

AMOSTRA: OHCD - 102 (DEPT Q) - 500MHZ SOLVENTE: CDCl3 OPERADOR DO NMR - MAURICIO

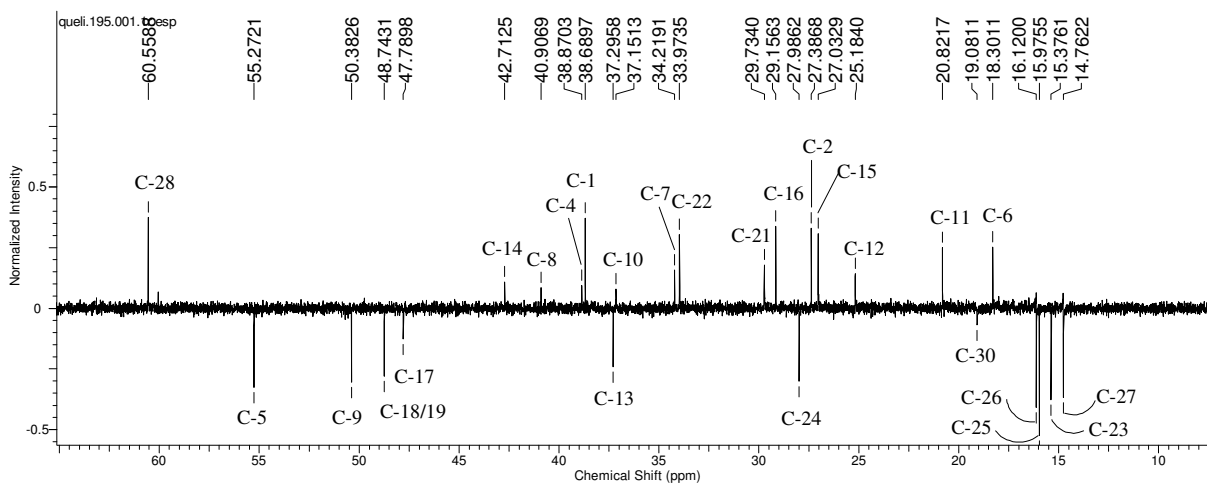
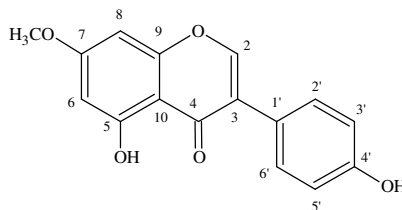


Figura 11. Expansão do espectro de RMN ¹³C DEPTQ (125 MHz, CDCl₃) da substância 2 de 7,5 à 65,0 ppm

2.6.3. Prunetina (3) isoladas de OHCD

A fração OHCD-116-120 após o processo de purificação foi submetido a experimento de RMN ^1H , o qual mostrou sinais compatíveis com o esqueleto molecular de isoflavona. No espectro de RMN ^1H (**Figura 12**, p. 48 e **Tabela 8**, p. 47) foi observado um simpleto em δ_{H} 8,15 característico de H-2 de anel heterocíclico de isoflavona. Um sistema AA'BB' foi identificado pela presença de dois dupletos em δ_{H} 7,42, atribuídos a H-2',6', e δ_{H} 6,88 atribuído ao H-3',5'. Os dupletos apresentaram $J=8,5$ Hz. Foi observada a presença de dois dupletos, um em δ_{H} 6,39 e outro em 6,57; ambos com $J=2,2$ Hz, os quais foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-6 e H-8. O espectro de HSQC (**Figura 13**, p. 48) mostrou interações heteronuclear de H-6/C-6, H-8/C-8, H-2',5'/C-2',5'; H-3',5'/C-3',5' e H-Me/C-Me. O simpleto intenso observado em δ_{H} 3,91 (3H) no espectro de RMN ^1H , é característicos de metoxila e foi atribuído à metoxila ligada ao carbono C-7, pois foi observado no espectro de HMBC (**Figura 14**, p. 49 e **15**, p. 50) um acoplamento entre os hidrogênios da metila com o carbono 7. A análise do espectro de massa da substância **3** mostra um padrão de fragmentação compatível com essa proposta. No espectro de massa (CG-EM) verificou-se a presença de um fragmento com valor $m/z = 166$ que justificou o padrão de substituição no anel A (**Figuras 16 e 17**, p. 51); as propostas de fragmentação de cada substância encontram-se nos **Esquema 10**, p. 51. O cromatograma de CG-EM mostra a presença de mais 5 componentes os quais foram identificados como ésteres contaminantes presentes no eppendorf que continha a amostra e foram extraídos com diclorometano no momento da análise. A análise de todos estes dados e a comparação com dados da literatura (DEMUNER *et al.*, 2003), permitiram propor a estrutura de 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-isoflavona (**3**).



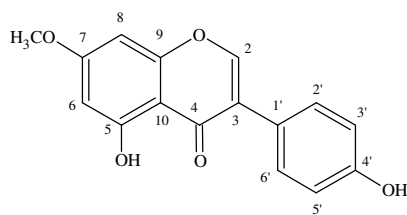


Tabela 8. Dados de RMN ^1H da substância **3** em comparação com dados da literatura para prunetina (DEMUNER *et al.*, 2003)

C	Substância 3 (MeOD)		Prunetina (DMSO- d_6)	
	δ_C	δ_H (mult. <i>J</i>)	δ_C	δ_H (mult. <i>J</i>)
2	153,5	8,15 <i>s</i>	154,3	8,40 <i>s</i>
3	122,6		122,4	
4	180,8		180,3	
5			161,7	
6	98,0	6,39 <i>d</i> ; 2,2 Hz	97,9	6,41 <i>d</i> ; 2,2 Hz
7	165,3		165,2	
8	91,9	6,57 <i>d</i> ; 2,2 Hz	92,3	6,65 <i>d</i> ; 2,2 Hz
9	157,5		157,4	
10	105,5		105,4	
1'	121,6		121,0	
2', 6'	129,6	7,42 <i>d</i> ; 8,5 Hz	130,0	7,39 <i>d</i> ; 8,6 Hz
3', 5'	114,7	6,88 <i>d</i> ; 8,5 Hz	115,0	6,82 <i>d</i> ; 8,6 Hz
4'			157,5	
7-OCH ₃	55,0	3,91 <i>s</i>	55,9	3,86 <i>s</i>
5-OH		-		12,96 <i>s</i>
4'-OH				9,60 <i>s</i>

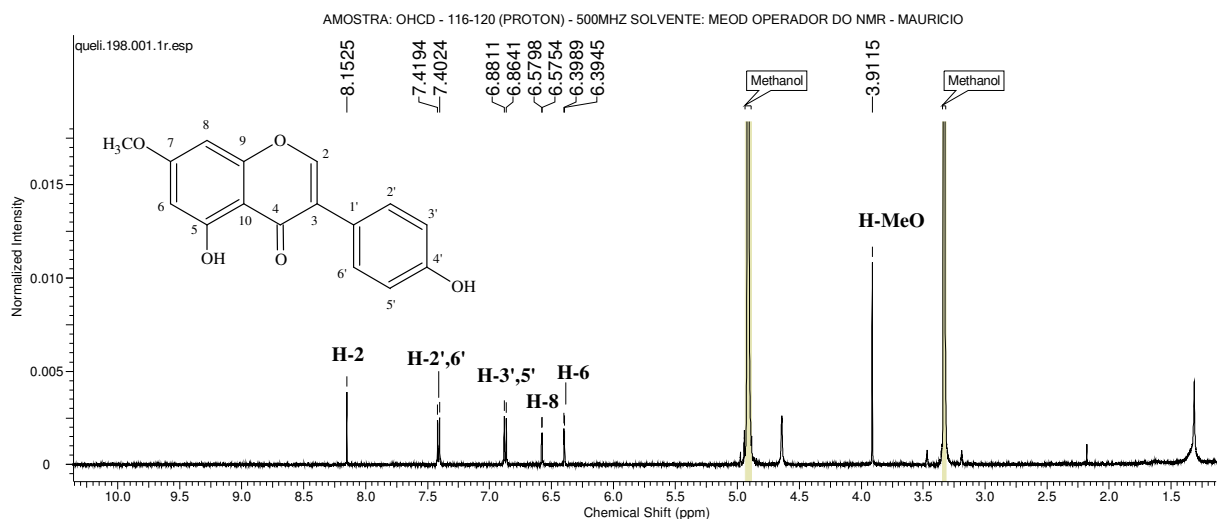


Figura 12. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância 3

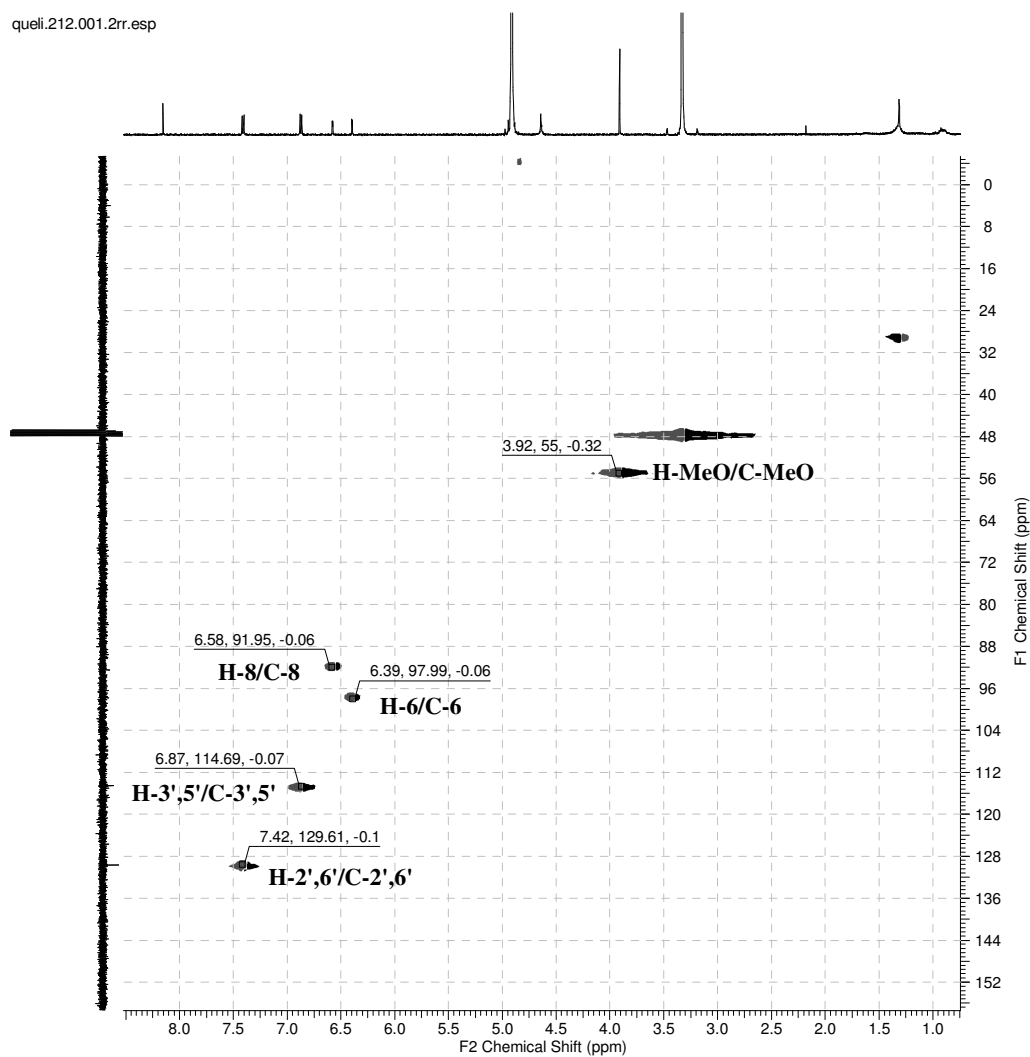


Figura 13. Mapa do contorno RMN-HSQC (500/125 MHz, MeOD) da substância 3

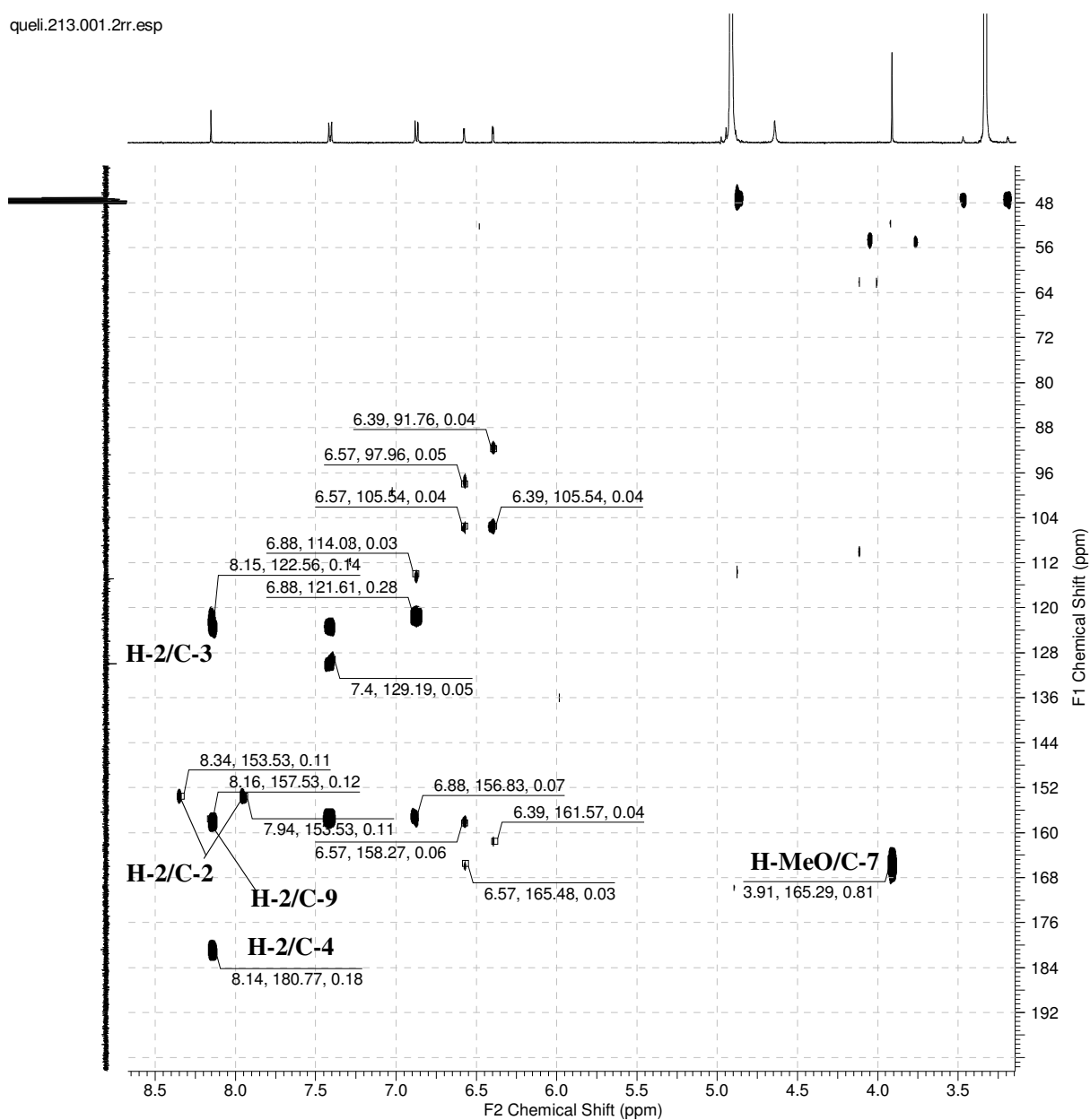
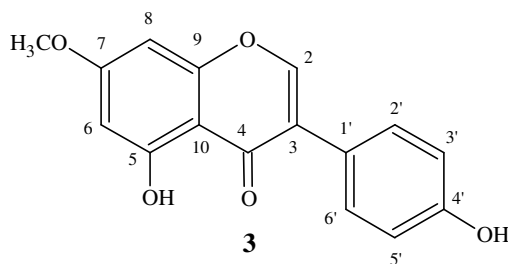


Figura 14. Mapa do contorno RMN-HMBC (500/125 MHz, MeOD) da substância 3



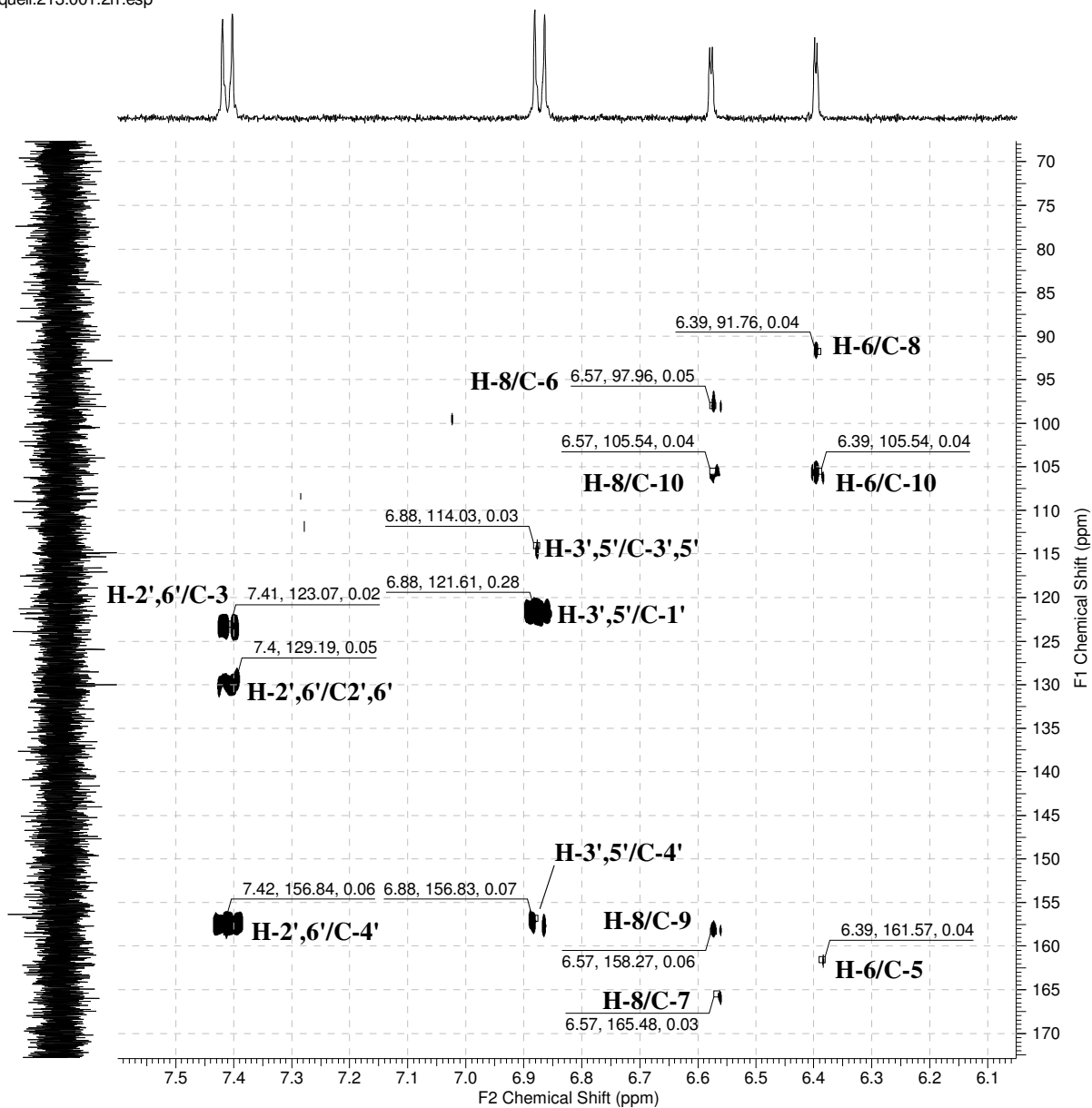
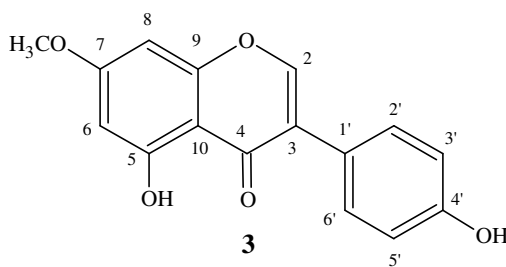


Figura 15. Expansão do mapa do contorno RMN-HMBC (500/125 MHz, MeOD) da substância **3**



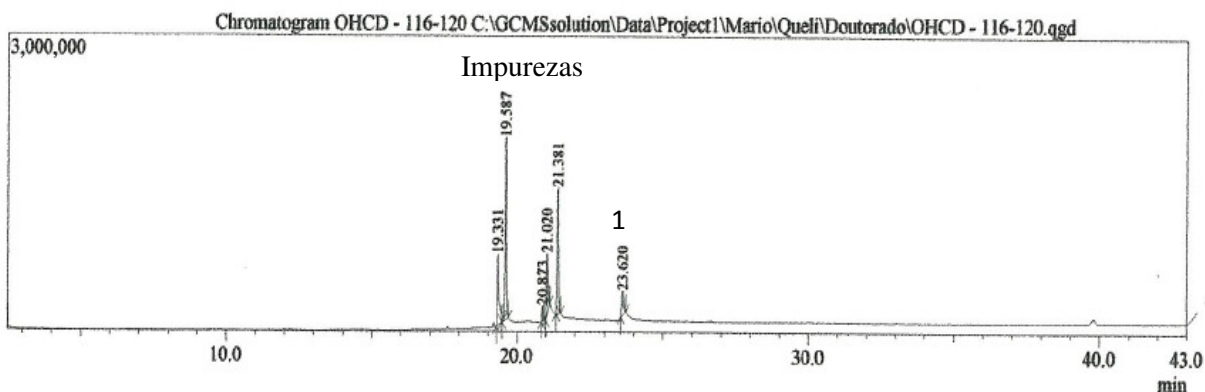


Figura 16. Cromatogramade (CG) de OHCD-116-120, sinal 1 ($t_R = 23,620$ min) corresponde a substância **3**

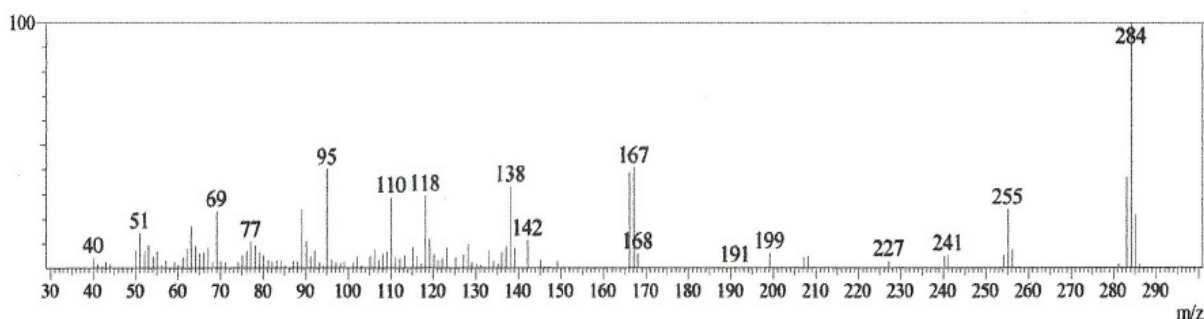
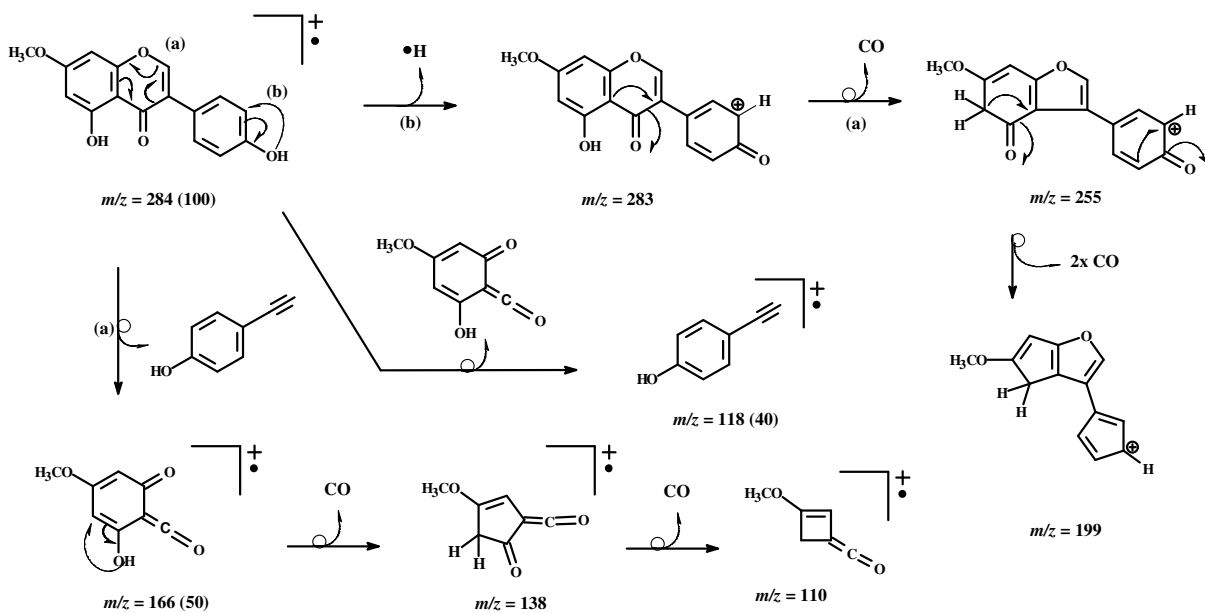


Figura 17. Espectro de Massa do sinal com TR = 23,620 s, substância **3**



Esquema 10. Proposta de fragmentação para a substância **3**

2.6.4. *Trans*-3-*O*-metil-resveratrol-2-*C*- β -glucosideo (**4**) isolada de OHCM-PD

A substância **4** foi primeiramente analisada por RMN ^1H (**Figuras 18 e 19**, p. 54), o qual apresentou sinais na região de sistema aromático e de hidrogênio carbinólico. Em δ_{H} 7,38 e 6,79 ppm foram observado sinais compatíveis com um sistema AA'BB', com constante de acoplamento de 8,5 Hz, a estes dois dupletos foram atribuídos os hidrogênios 2'/6' e 3'/5', respectivamente. Em δ_{H} 7,82 ppm encontramos um duplete com $J= 16,4$ Hz compatível com hidrogênio de olefinico, a presença de outro duplete em δ_{H} 6,77, com $J= 16,4$ Hz, confirma a presença de uma dupla ligação *trans*. Os sinais δ_{H} 7,82 e 6,77 ppm foram atribuídos aos hidrogênios H-7 e H-8, respectivamente. Dois simpletos largos foram encontrados em δ_{H} 6,32 e 6,65 ppm e foram atribuídos aos hidrogênios H-4 e H-6, respectivamente. Um simpleto em δ_{H} 3,71 foi atribuído a metoxila ligada a anel aromático. A metoxila foi localizada no C-3, proposta que foi confirmada pela análise do espectro de NOEDIFF (**Figura 23**, p. 56, comparar com o espectro de RMN ^1H da **Figura 22**, p. 56) pela irradiação do sinal em 3,71 (OCH₃) que apresentou nOe em 4,81 (H-1'') e um sinal referente ao acoplamento do hidrogênio H-1'' com o carbono C-3 (δ_{C} 159,4) observado no espectro de HMBC. O duplete em δ_{H} 4,81, com $J= 9,8$ Hz, foi atribuído ao hidrogênio anomérico H-1'' da glicose. No entanto, no espectro de HSQC (**Figuras 24**, p. 57) foi possível observar os valores de δ_{H} 3,57 para o H-2'', δ_{H} 3,27 para o H-3'', δ_{H} 3,37 para o H-4'', δ_{H} 3,18 para o H-5'' e δ_{H} 3,34 para o H-6''. No espectro de RMN ^{13}C (**Figuras 20**, p. 55) não foi observado o sinal correspondente ao C-2, o deslocamento químico de C-2 foi observado através do experimento HMBC (**Figuras 25**, p. 58; **26**, p. 59 a **27**, p. 60) sendo igual a δ_{C} 116,2 ppm. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C encontram-se na **Tabela 9**, p. 53. No espectro de HSQC foram observados os acoplamentos H-4/C-4; H-6/C-6; H-7/C-7; H-8/C-8; H-2'',6''/C-2'',6''; H-3'',5''/C-3'',5''; H-1''/C-1''; H-2''/C-2''; H-3''/C-3''; H-4''/C-4''; H-5''/C-5''; H-6''/C-6'' e H₃C-O/O-CH₃. No experimento de HMBC foram observados os acoplamentos de H-7/C-2''; H-7/C-6; H-7/C-2; H-7/C-8; H-7/C-1; H-7/C-5; H-2',6'/C-2'/6'; H-2',6'/C-1'; H-2',6'/C-4'; H-6/C-Me; H-6/C-4; H-6/C-2; H-6/C-7; H-6/C-5; H-8/C-3',5'; H-8/C-7; H-8/C-1'; H-8/C-1; H-8/C-3; H-4/C-6; H-4/C-2; H-4/C-5; H-4/C-3; H-1''/C-2''; H-1''/C-5''; H-1''/C-2; H-1''/C-1; H-1''/C-3; H-Me/C-3; H-4''/C-6''; H-4''/C-3''; H-4''/C-5''; H-4''/C-2''; H-3''/C-4''; H-3''/C-6; H-2''/C-4 e H-2''/C-4''. O Espectro de massas (TOF-MS-ES – **Figura 21**, p. 55) apresentou íon molecular de m/z 403,1386 correspondente a M-H e m/z 404,1445 (M⁻) compatível com a massa molecular 404,147 a qual confere com a estrutura proposta. Com a análise de todos

estes experimentos e comparação com dados da literatura (WANG *et al.*, 2007), a substância **4** foi determinada como *trans*-3-*O*-metil-resveratrol-2-*C*- β -glicosídeo isolado pela primeira vez em Ochnaceae.

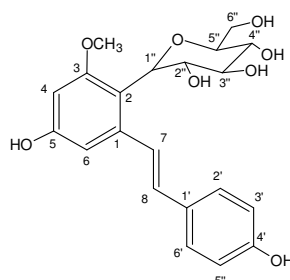


Tabela 9. Dados de RMN ^1H da substância **4** e comparação com dados da literatura para *trans*-3-*O*-metil-resveratrol-2-*C*- β -glicosídeo (WANG *et al.*, 2007)

C	Substância 4 (DMSO- d_6)		<i>Trans</i> -3- <i>O</i> -metil-resveratrol -2- <i>C</i> - β -glicosídeo (CD $_3$ OD)	
	δ_{H} (mult. <i>J</i>)		δ_{H} (mult. <i>J</i>)	
1	139,6		141,3	
2	116,2		116,8	
3	159,4		160,8	
4	98,5	6,32 <i>sl</i>	98,8	6,27 <i>s</i>
5	157,8		158,8	
6	105,3	6,65 <i>sl</i>	106,4	6,60 <i>s</i>
7	125,9	7,82 <i>d</i> ; 16,4 Hz	126,5	7,80 <i>d</i> ; 16,0 Hz
8	128,2	6,77 <i>d</i> ; 16,4 Hz	130,7	6,71 <i>d</i> ; 16,0 Hz
1'	128,8		130,9	
2'/6'	129,3	7,38 <i>d</i> ; 8,5 Hz	128,9	7,28 <i>d</i> ; 8,3 Hz
3'/5'	115,6	6,79 <i>d</i> ; 8,5 Hz	116,4	6,68 <i>d</i> ; 8,3 Hz
4'	157,5		158,0	
1''	74,1	4,81 <i>d</i> ; 9,8 Hz	75,7	4,97 <i>d</i> ; 9,9 Hz
2''	73,7	3,57 <i>s</i>	74,7	3,76 <i>s</i>
3''	79,3	3,27 <i>s</i>	80,2	3,38 <i>s</i>
4''	70,5	3,37 <i>s</i>	71,7	3,48 <i>s</i>
5''	81,3	3,18 <i>s</i>	81,8	3,30 <i>s</i>
6''	63,5	3,34 <i>s</i>	62,8	3,71 <i>s</i>
OMe	56,3	3,71 <i>s</i>	56,2	3,65 <i>s</i>

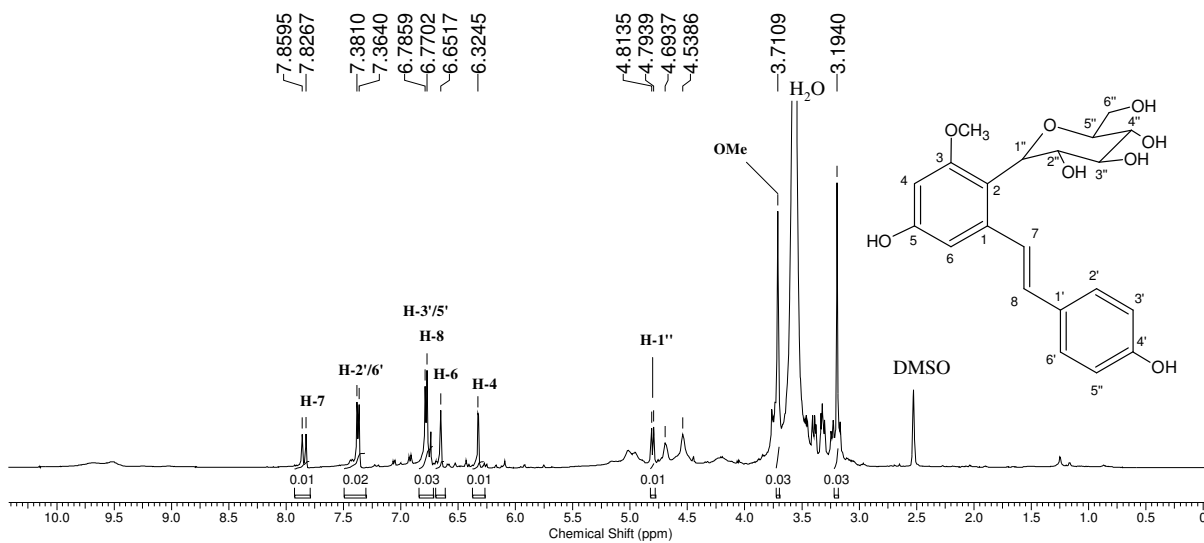


Figura 18. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da substância **4**

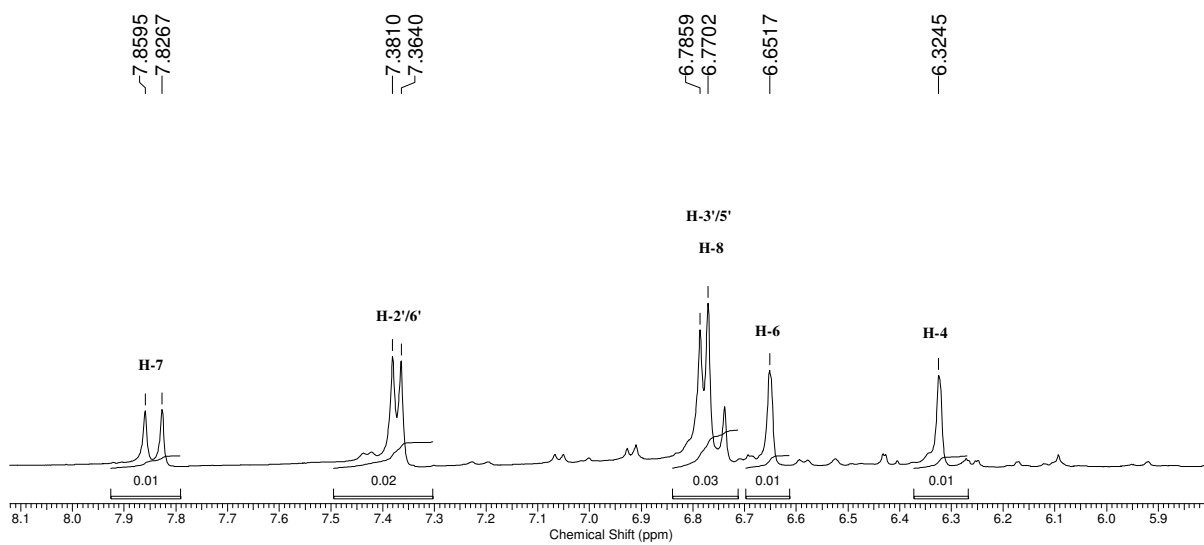


Figura 19. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da substância **4**

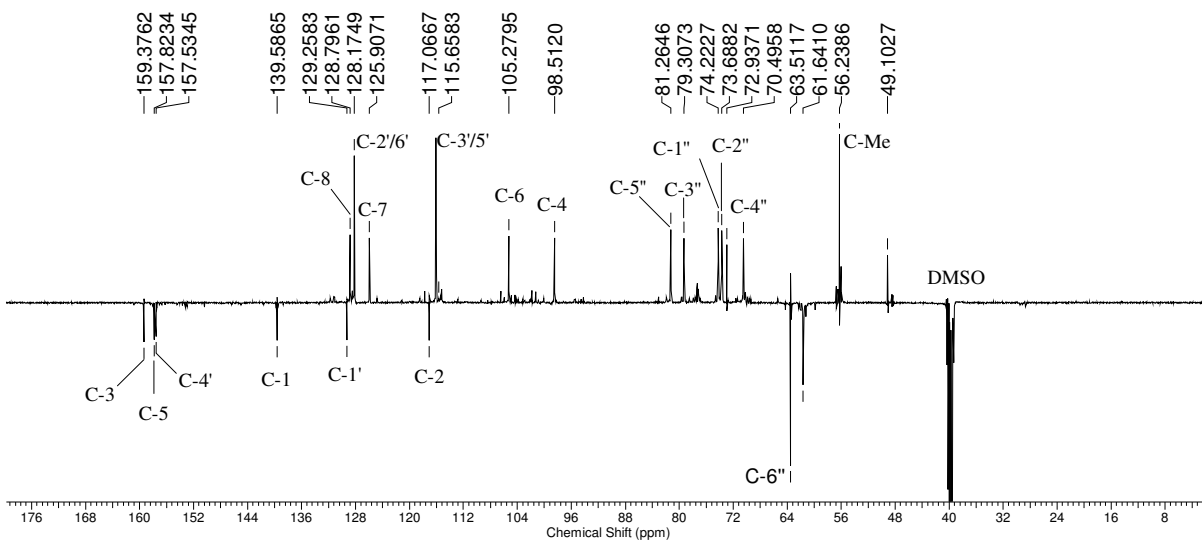


Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C DEPTQ (125 MHz, DMSO- d_6) da substância **4**

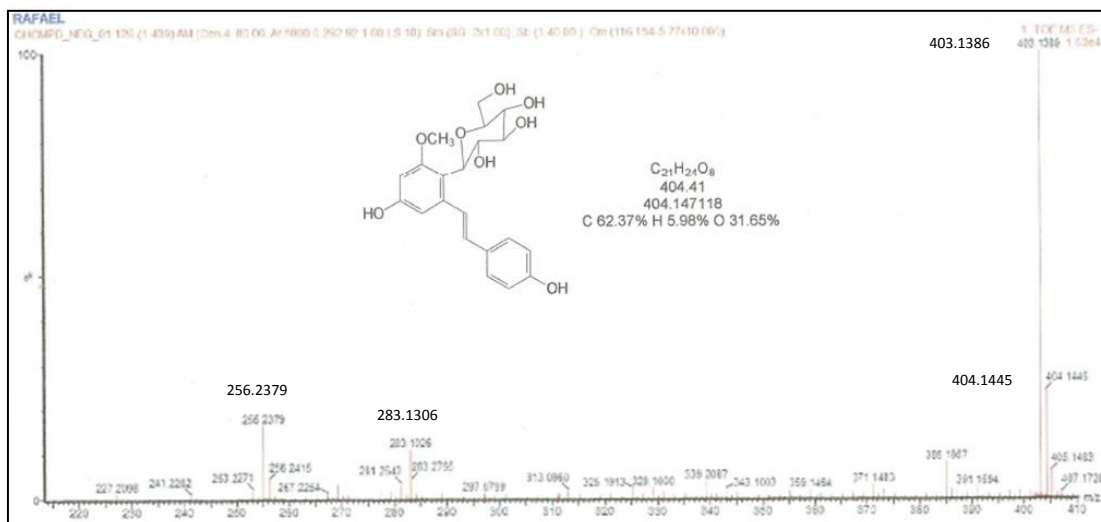


Figura 21. Espectro de massas (TOF-MS-ESI) da substância **4**

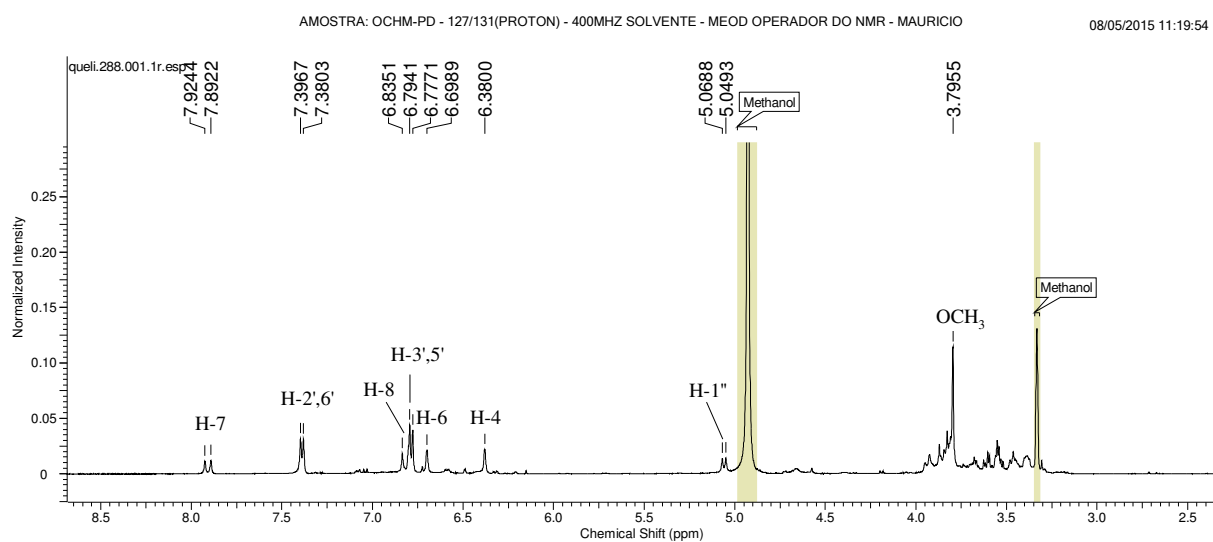


Figura 22. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, MeOD) da substância **4**

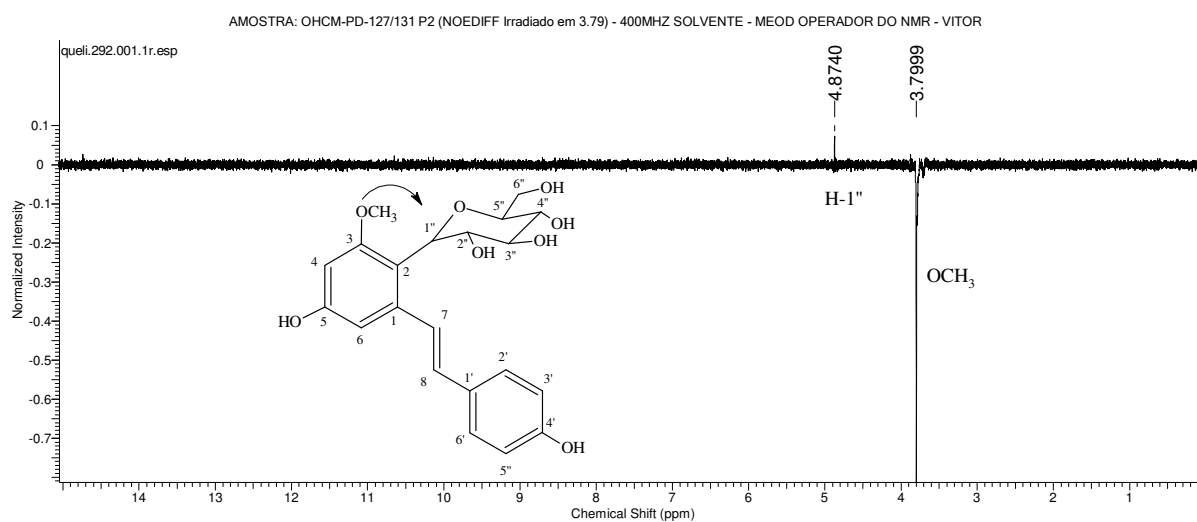


Figura 23. Espectro de NOEDIFF (400 MHz, MeOD) da substância **4**

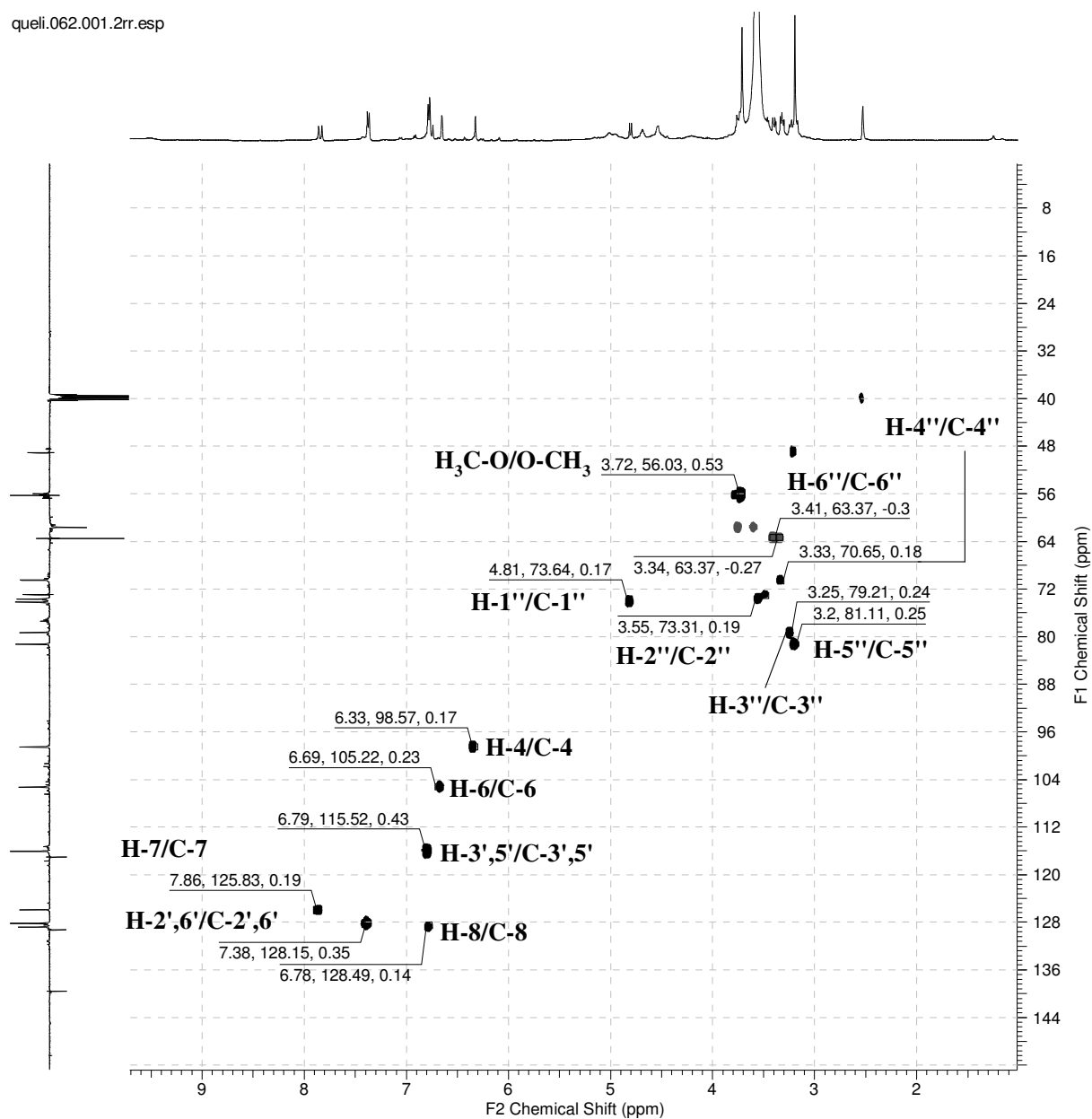
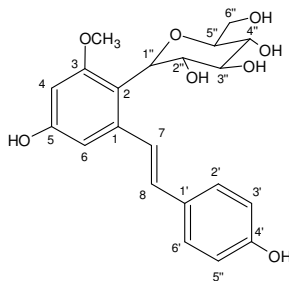


Figura 24. Mapa do contorno RMN-HSQC (500/125 MHz, DMSO-d₆) da substância 4



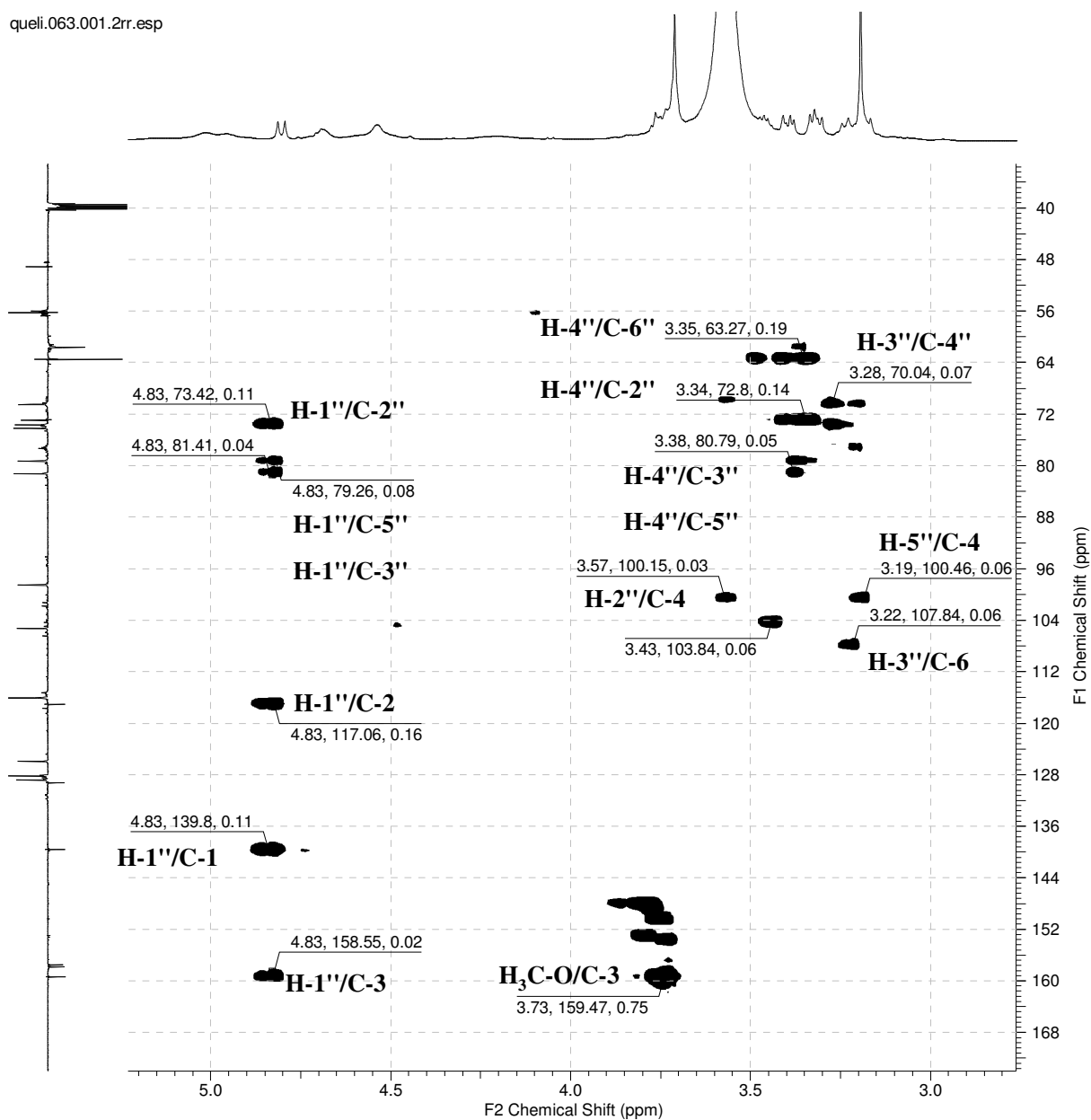
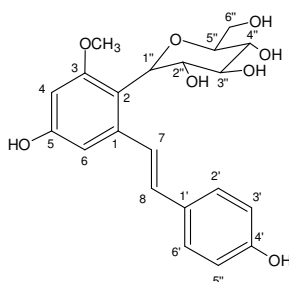


Figura 25. Expansão do mapa do contorno RMN-HMBC (500/125 MHz, DMSO-d₆) da substância **4**, de 3,0 a 5,0 ppm.



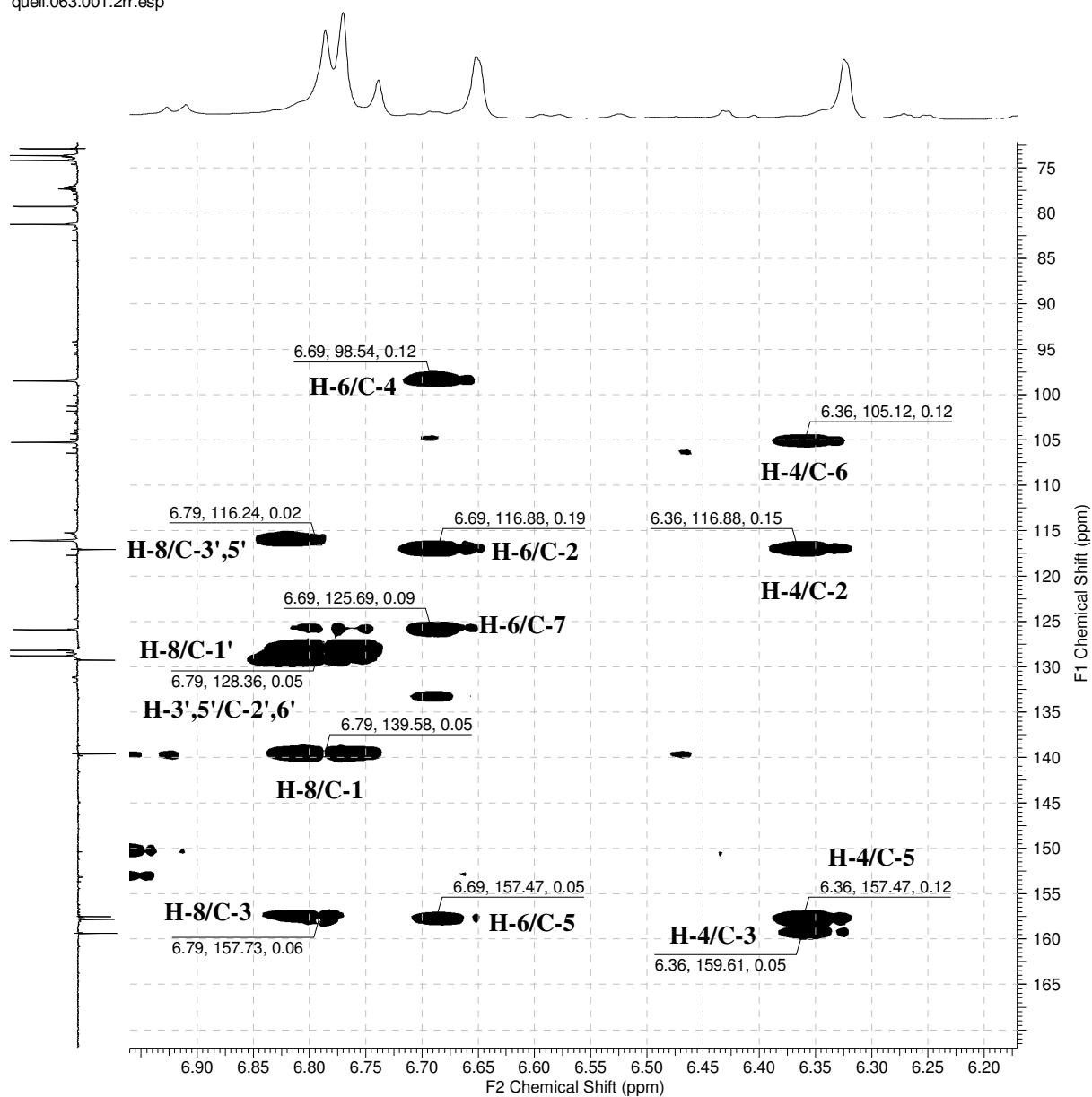
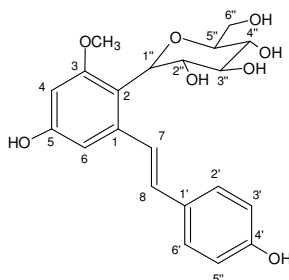


Figura 26. Expansão do mapa do contorno RMN-HMBC (500/125 MHz, DMSO-d₆) da substância **4**, de 6,2 a 6,9 ppm.



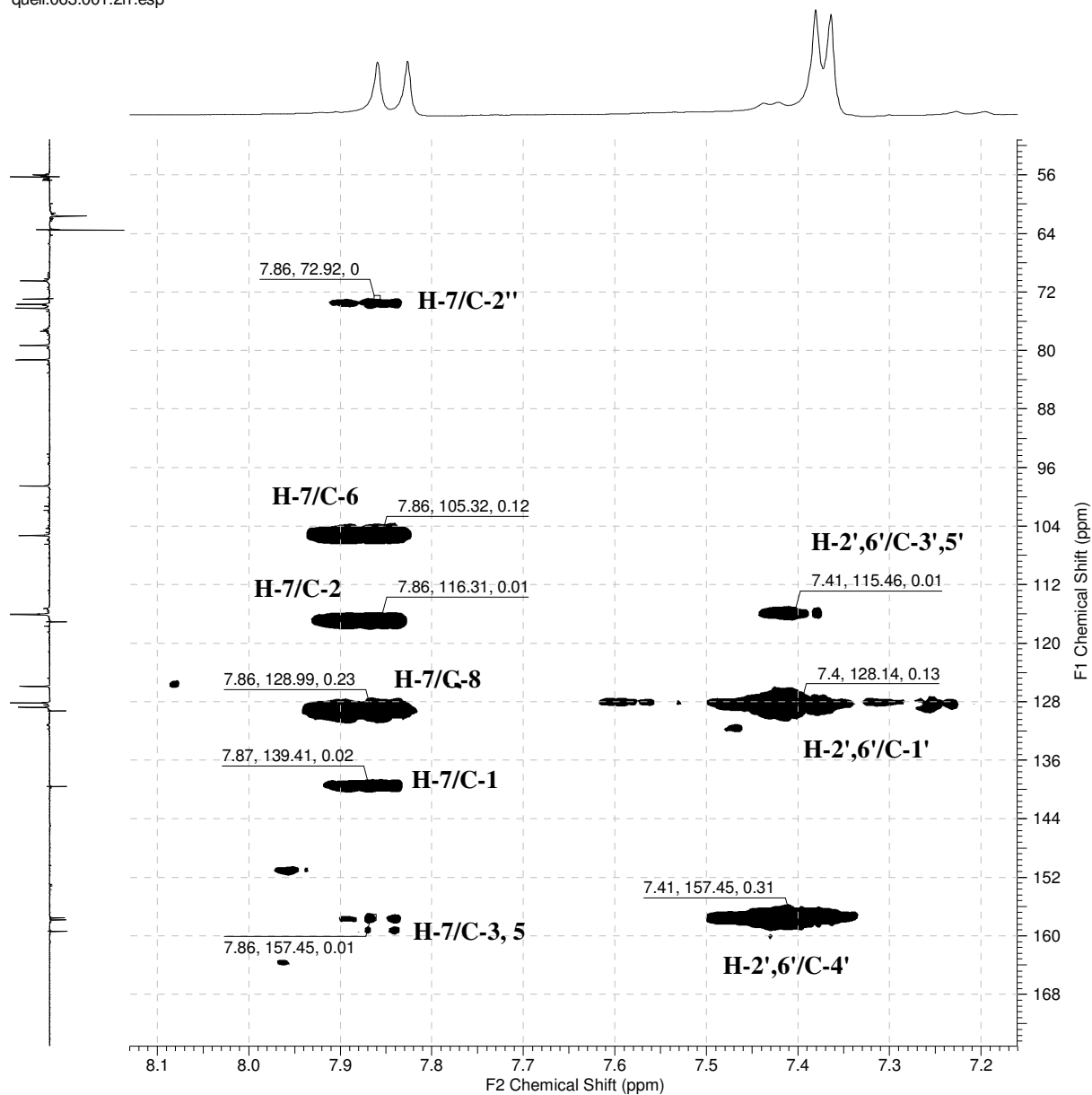
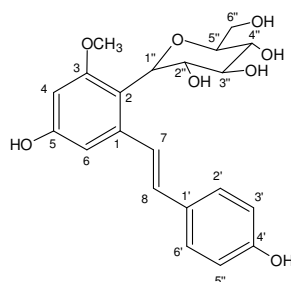


Figura 27. Expansão do mapa do contorno RMN-HMBC (500/125 MHz, DMSO-d₆) da substância 4, de 7,2 a 8,1 ppm.



2.6.5. Lithospermosídeo (5) isolado de OHCM-PAB

A subfração OHCM-PAB após ser solubilizada em metanol apresentou um precipitado de coloração branca. Uma parte desse material foi submetido a experimentos de RMN ^1H e ^{13}C e IV. O espectro de IV (**Figura 28**, p. 62) da substância **5** apresentou sinais em 3425 cm^{-1} (ν_{OH}), 2923 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-H, ass}}$), 2893 e 2852 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-H, sim}}$), 2223 cm^{-1} ($\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$), 1407 e 1379 cm^{-1} ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$), 1066 e 1037 cm^{-1} ($\nu_{\text{C-O}}$). A análise do espectro de IV permitiu verificar a presença do grupo funcional nitrila ($\text{C}\equiv\text{N}$), informação que somada às informações obtidas pelas análises de RMN ^1H e ^{13}C permitiram propor a estrutura de um cianoglicosídeo. O espectro de RMN ^1H (**Figuras 28 e 29**, p. 62) mostrou sinais típicos de hidrogênios olefínico em δ_{H} 6,21 (*d*; 9,7 Hz; H-2); 5,95 (*d*; 9,7 Hz; H-3) e em δ_{H} 5,74 (*s*, H-7). Em δ_{H} 4,39 (*d*; 7,8 Hz; H-1') foi observado um duplete característico de hidrogênio anomérico que junto com outros sinais entre δ_{H} 2,5 à 4,0 ppm revelam a presença de um carboidrato. Outros sinais de hidrogênios carbinólicos foram observados em δ_{H} 4,57 (*d*; 4,1 Hz; H-6), 4,45 (*dd*; 2,5 e 7,5 Hz; H-4) e 4,06 (*dl*, H-5), os quais foram atribuídos a estrutura aglicona. O espectro de RMN ^{13}C (**Figuras 30 e 31**, p. 63) apresentou 14 sinais de carbono. Em δ_{C} 117,7 foi observado um sinal de carbono quaternário característico de nitrila (C-8) e em δ_{C} 154,2 um segundo carbono quaternário típico de carbono sp^2 (C-1). Os demais sinais observados no espectro de RMN ^{13}C correspondem a carbonos metínicos δ_{C} 125,1 (C-2), 139,6 (C-3), 68,6 (C-4), 65,3 (C-5), 77,2 (C-6), 98,7 (C-7) do dieno no anel trioxigenado, e os sinais em δ_{C} 103,1 (C-1'), 73,4 (C-2'), 77,1 (C-3'), 69,9 (C-4'), 77,0 (C-5') de CH e o CH_2 em 61,3 (C-6') da glicose. Estes também foram observados nos experimentos bidimensionais HSQC (**Figura 33**, p. 65) e HMBC (**Figura 34**, p. 66) que mostraram interações heteronuclear, 1J e ^{2-3}J , respectivamente, que confirmou a proposta. No mapa de contorno de HMBC foi observado o H-7 (δ_{H} 5,74) acoplando com C-1, C-2 e C-4; H-6 (δ_{H} 4,57) acoplando com C-4, hidrogênio de HO-5 (δ_{H} 4,94) acoplando com C-1 e H-1' (δ_{H} 4,40) acoplando com C-1. No mapa de contorno $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (**Figuras 32**, p. 64), H-6 foram observados os seguintes acoplamentos H-3/H-2, H-5/H-3, H-5/H-6, HO-4/H-4, HO-5/H-5, HO-6'/H-6', HO-3'/H-3', HO-2'/H-2', H-1'/H-2', H-3'/H-2', além dos acoplamentos em W observados para os hidrogênios H-6/H-2, H-5/H-3 e H-4/H-2 que permitiram propor a estereoquímica da aglicona. As demais interações observadas nos espectros de COSY e HMBC também confirmaram a estrutura cíclica da aglicona. A estereoquímica de dos três centros quirais foi determinada por dicroísmo circular e comparação com dados da literatura como sendo 6S, 5S, 4R e a da dupla ligação foi definida como Z através do experimento de NOEDIFF, ambos realizado com o derivado acetilado de **5**

(ver 2.6.6, p. 66) A interpretação dos espectros de RMN, IV e DC e a comparação com dados da literatura, mostrados na **tabela 10**, conduziram a definição estrutural de **5** como sendo o cianoglicosídeo, lithospermosídeo. Uma busca na literatura possibilitou identificar alguns cianoglicosídeos isolados de outras espécies da família Ochnaceae. Lithospermosídeo já foi isolado de *Lophira alata* (TIH et al., 2003), sendo este o primeiro registro de cianoglicosídeo em *Ouratea*.

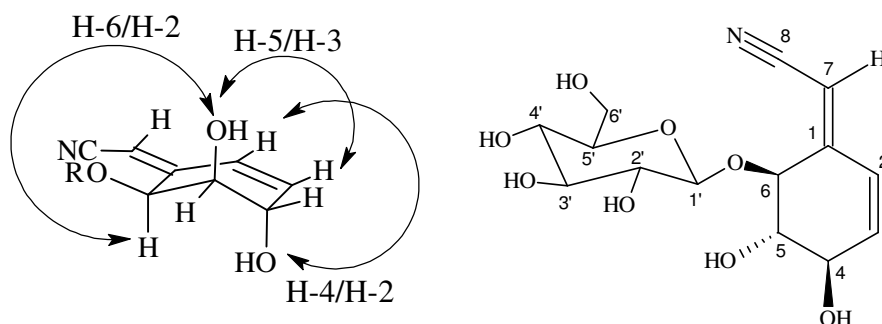


Tabela 10. Dados de RMN ^1H da substância **5** em comparação com dados da literatura para lithospermosídeo (NIRANJAN KUMAR *et al.*, 2013)

	Substância 5		COSY	HMBC	$^1\text{Lithospermosídeo}$	
	δ_{C}	δ_{H} (mult. <i>J</i>)			δ_{C}	δ_{H} (mult. <i>J</i>)
1	154,2	-	$^1\text{H} \times ^1\text{H}$	$^{2-3}J_{\text{HC}}$ H-7, 5, 1'	157,5	-
2	125,1	6,21 d; 9,7 Hz	H-3, 5	H-7	127,8	6,23
3	139,6	5,95 dl; 9,7 Hz	H-2, 4		140,8	6,36
4	68,6	4,45 dd; 2,5; 7,5 Hz	H-2, 3, HO-4	H-6, 7	72,7	4,69
5	65,3	4,06 dl	H-6, 3, HO-5		77,1	4,48
6	77,2	4,57 d; 4,1 Hz	H-2, 5		78,7	5,26
7	98,7	5,74 s			98,5	5,62
8	117,7	-			117,8	-
1'	103,1	4,39 d; 7,8 Hz	H-2'		105,7	5,64 d; 7,7 Hz
2'	73,4	2,90 m	H-1', 3', HO-2'		76,3	4,37 ddd
3'	77,1	3,15 m	HO-3'		79,8	4,23 dd
4'	69,9	3,52 m			72,8	4,20 dd
5'	77,0	3,11 m			79,7	3,97 dd
6'	61,3	3,66 m	HO-6'		64,4	4,55; 4,34 dd
HO-4	5,01		H-4			
HO-5	4,98		H-5			
HO-2'	5,14		H-2'			
HO-3'	4,93		H-3'			
HO-4'	5,06		H-4'			
HO-6'	3,96		H-6'			

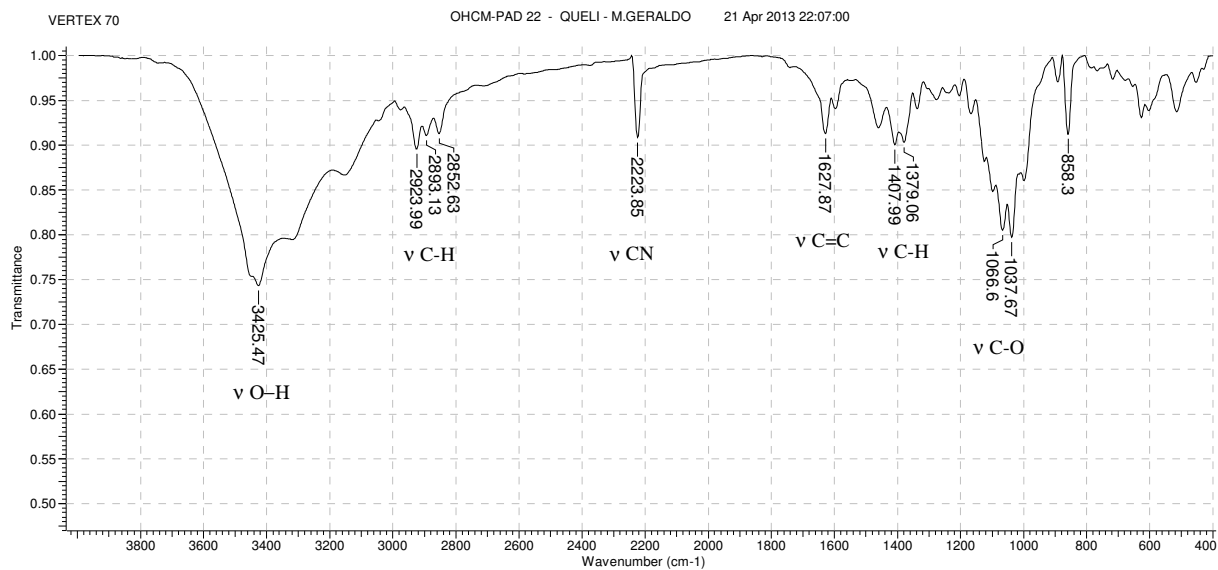


Figura 28. Espectro de IV (KBr) da substância **5**

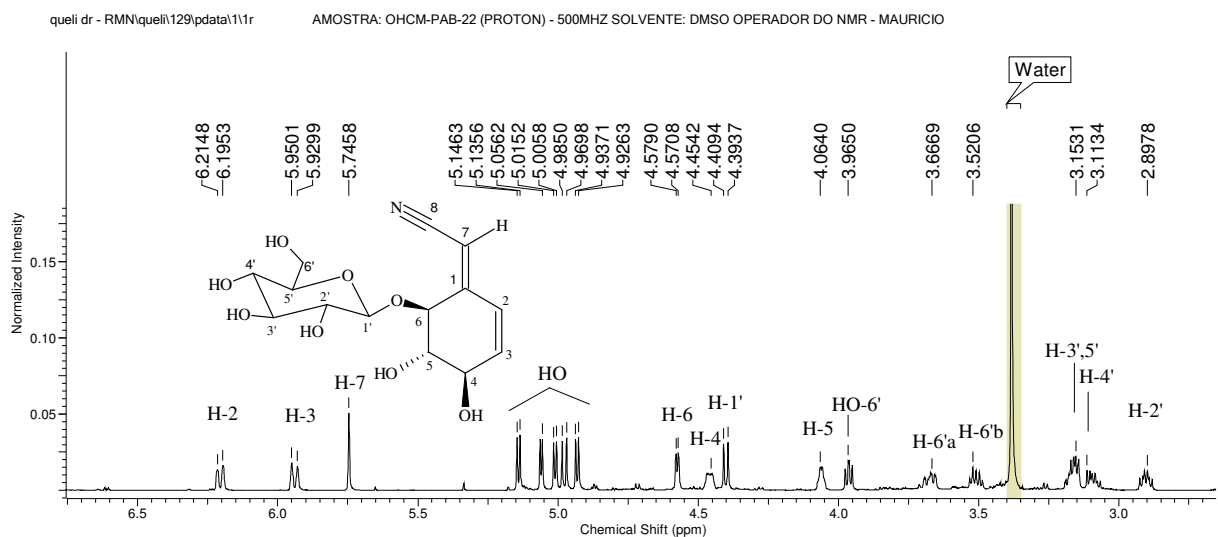


Figura 29. Expansão espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) da substância **5**

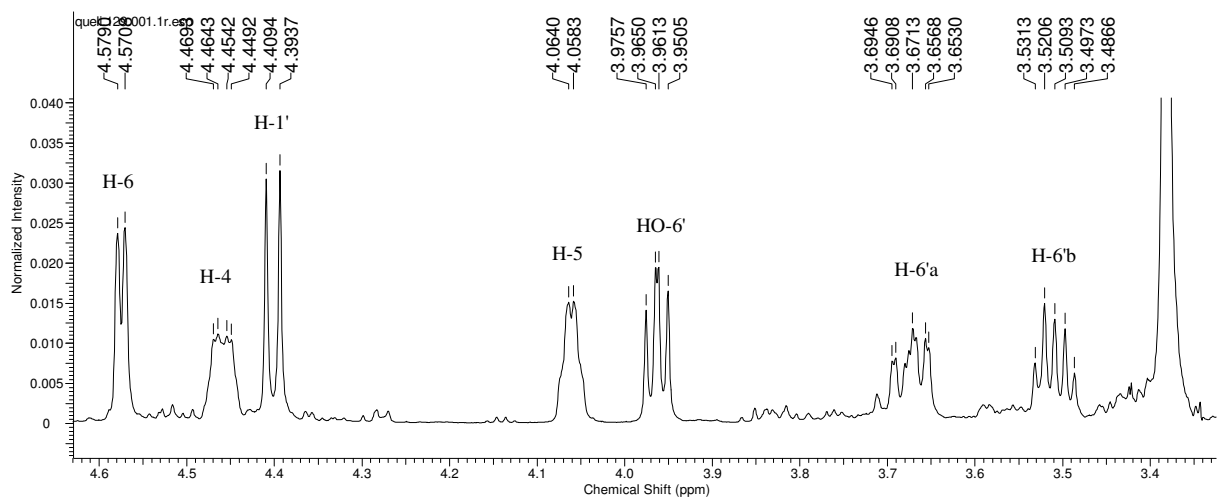


Figura 30. Expansão espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) da substância **5**

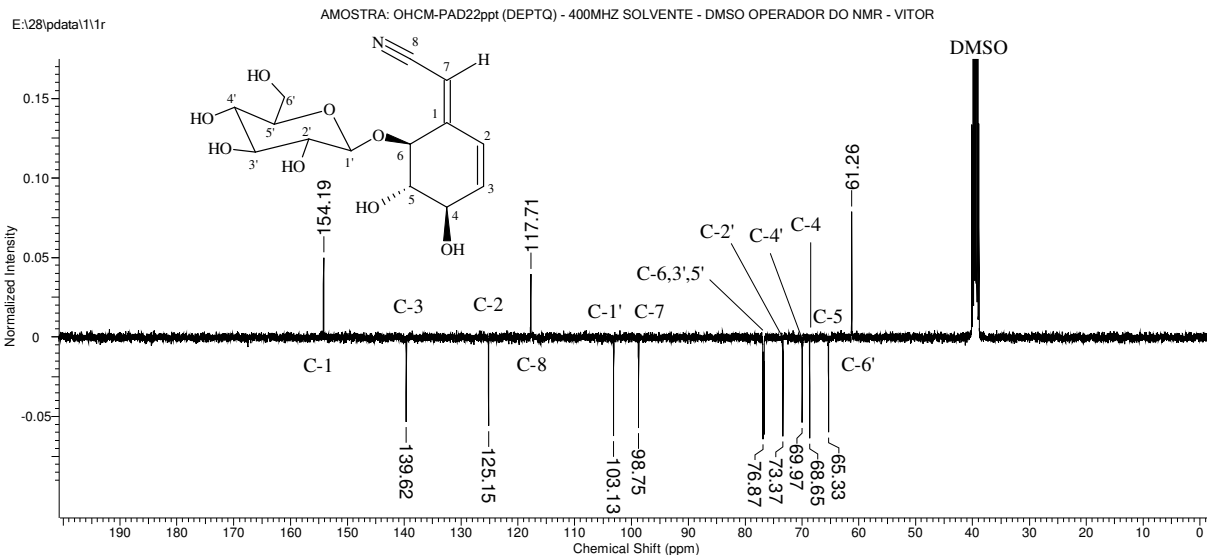


Figura 31. Espectro de RMN ^{13}C DEPTQ (100 MHz, DMSO- d_6) da substância **5**

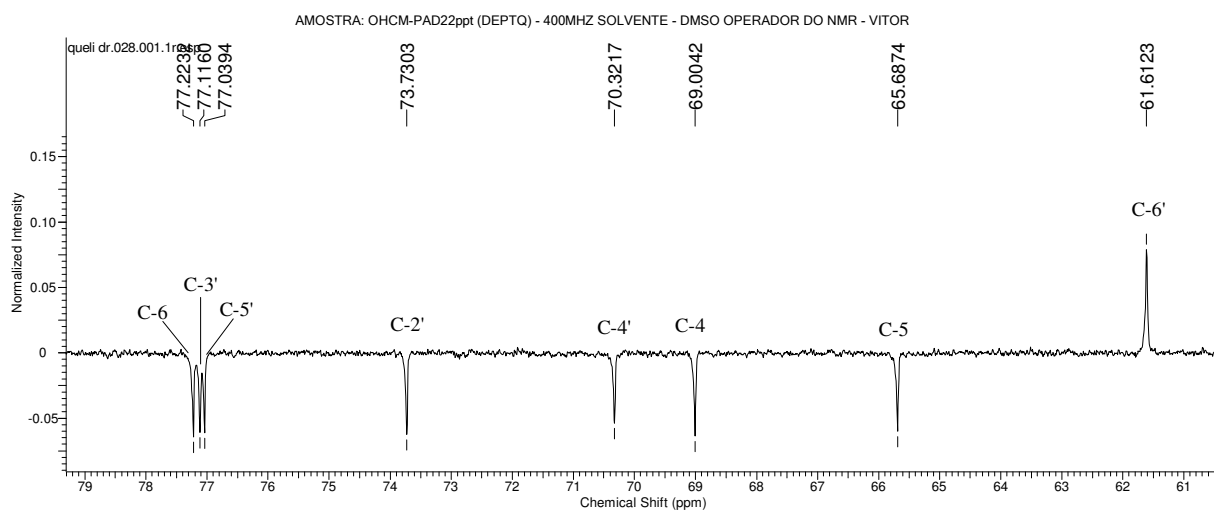


Figura 32. Expansão do espectro de RMN ^{13}C DEPTQ (100 MHz, DMSO- d_6) da substância **5**

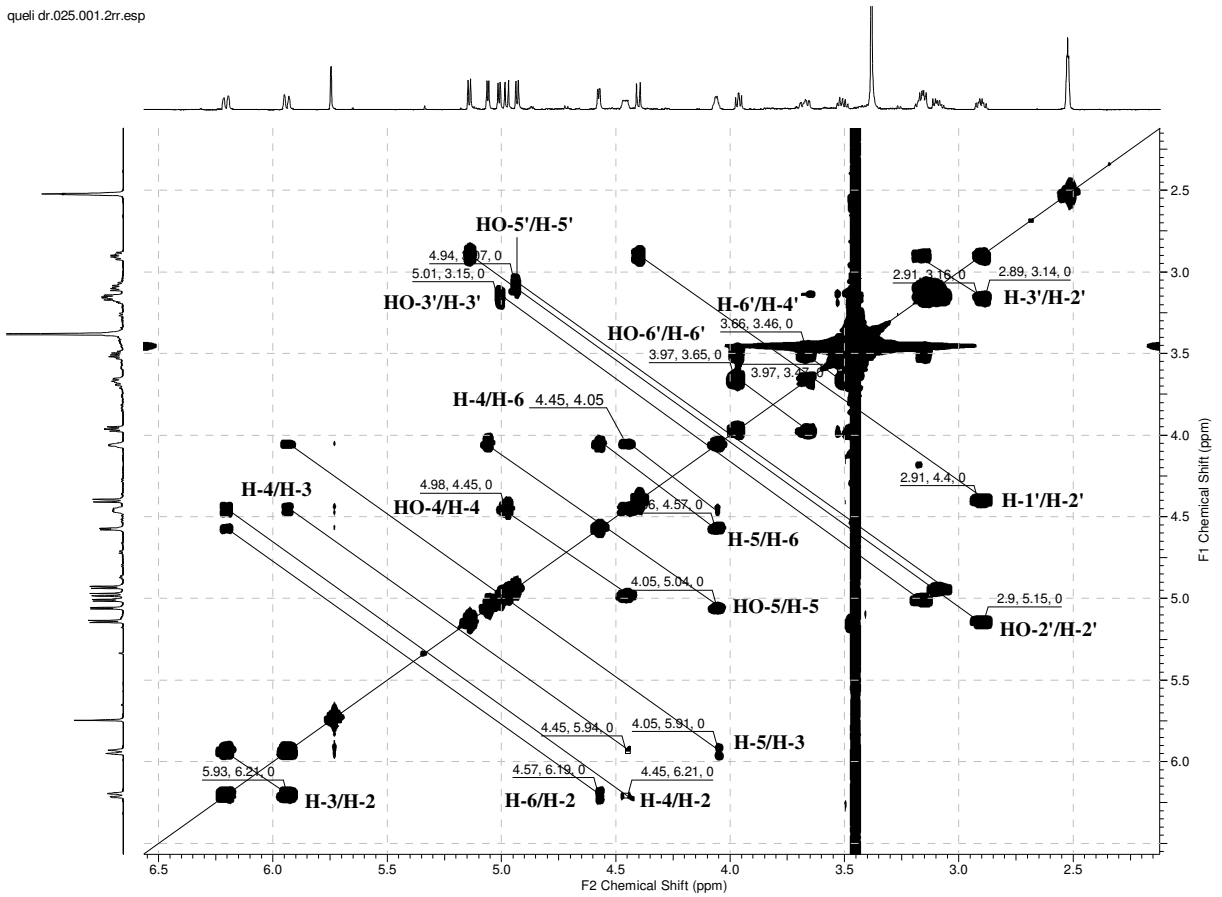
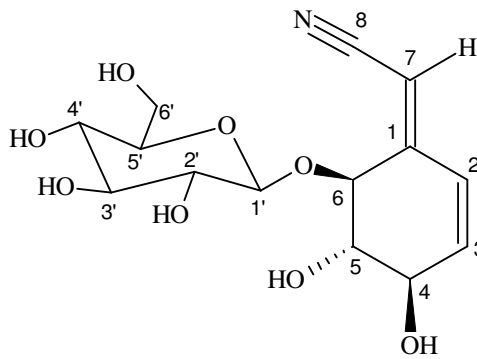


Figura 33. Mapa de contorno de COSY (400 MHz, DMSO-d₆) da substância **5**



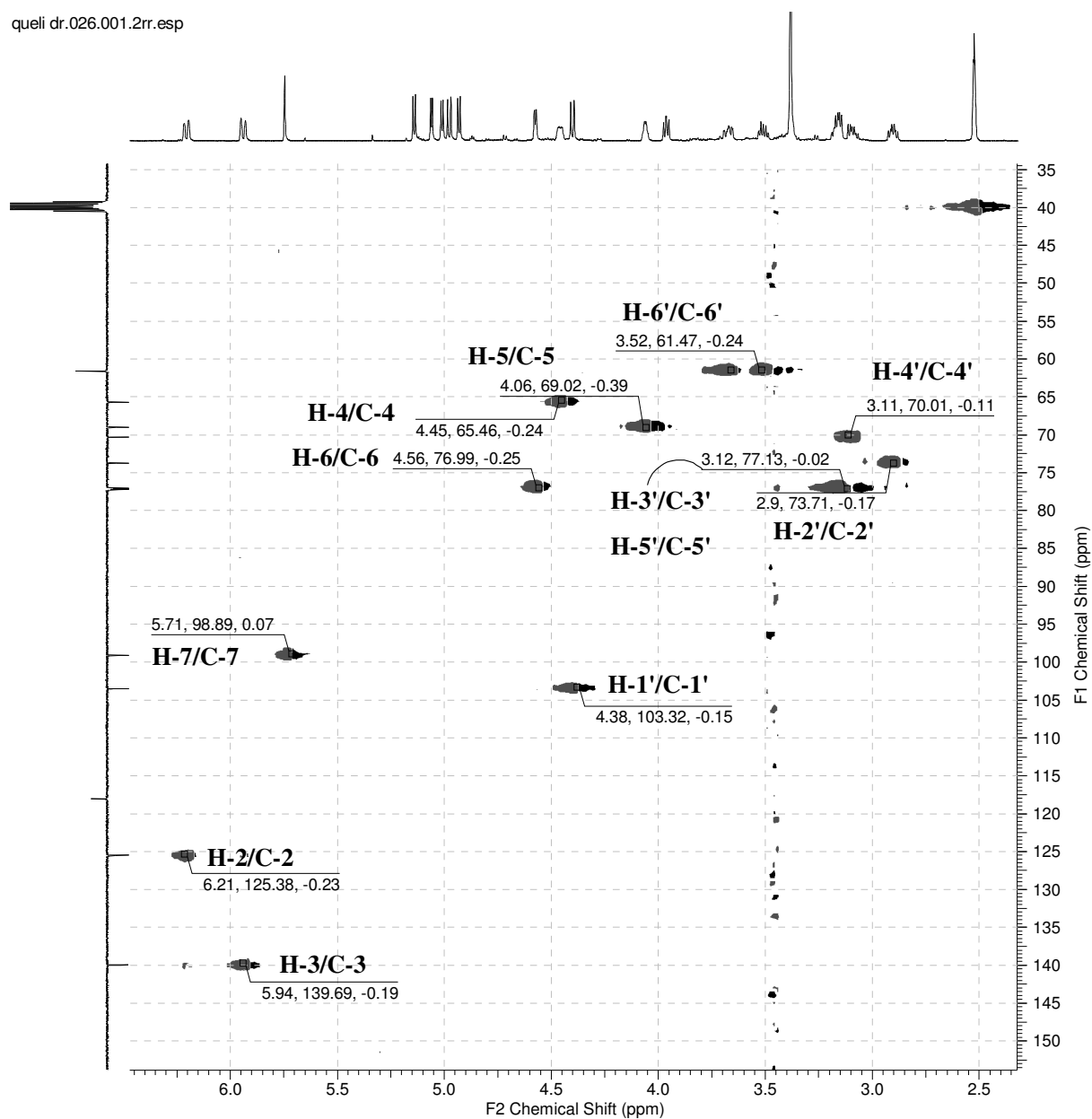
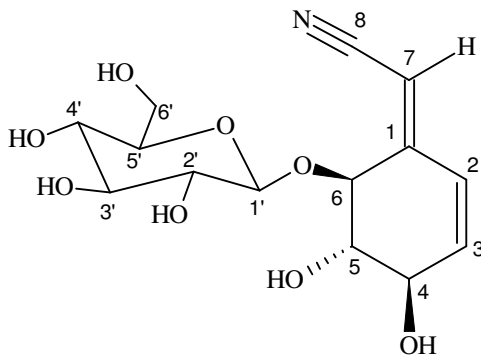


Figura 34. Mapa de contorno de HSQC (400 MHz, DMSO-d₆) da substância 5



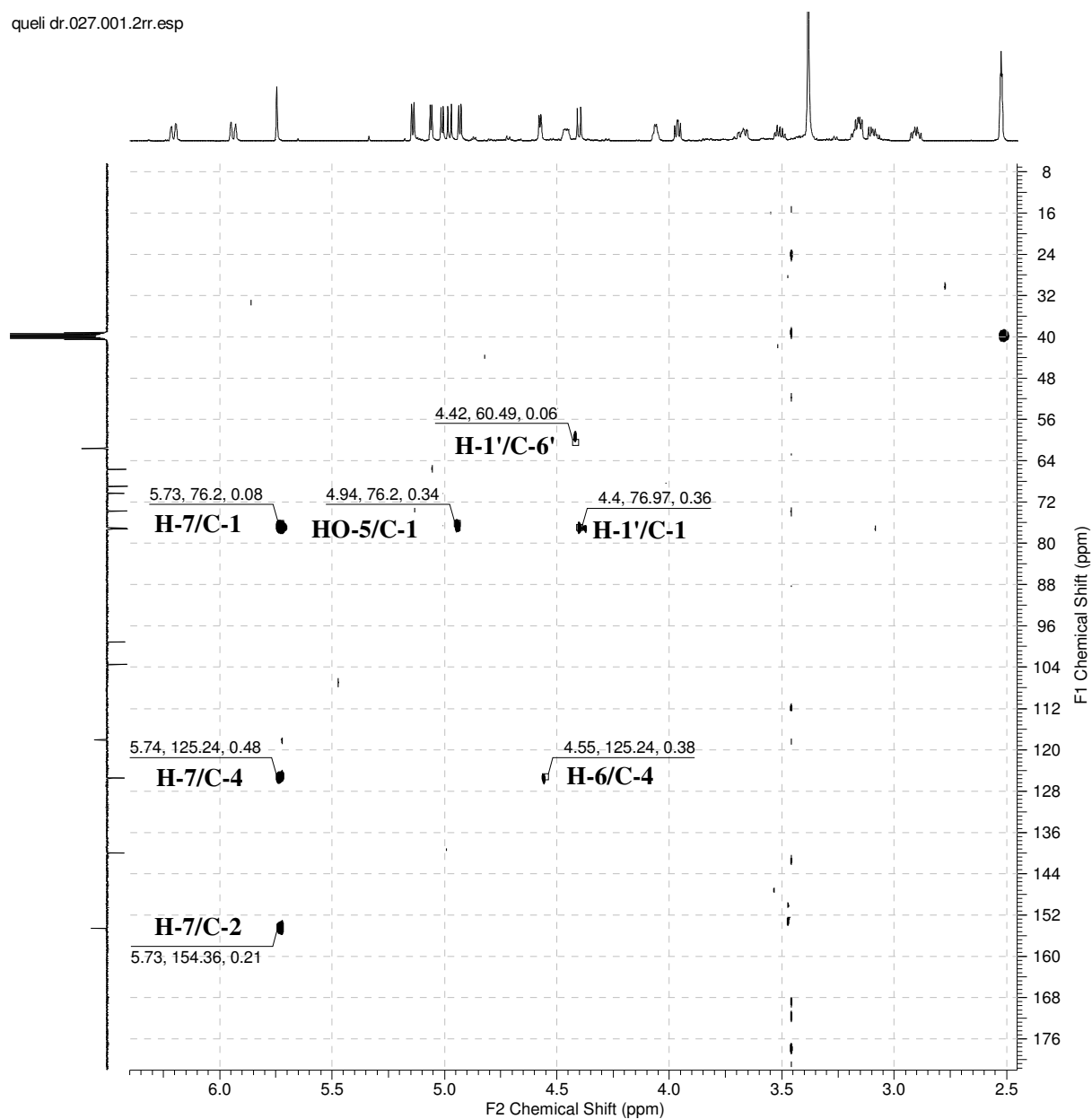
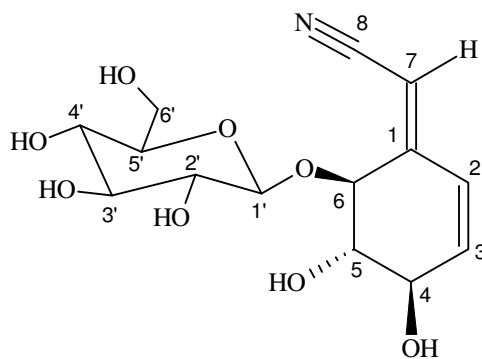


Figura 35. Mapa de contorno de HMBC (400 MHz, DMSO- d_6) da substância **5**



2.6.6. Derivado acetilado da substância (5a)

A substância 5 foi submetida a reação de acetilação e forneceu o produto 6a peracetilado. O mesmo foi analisado por RMN ^1H e ^{13}C (**Figuras 36, 37 e 38**, p. 69) confirmando a formação do produto pela presença de cinco metilas em δ_{H} 2,00 a 2,16 (ver **Tabela 11**). Os espectros de COSY (**Figuras 39**, p. 70), HSQC (**Figuras 40**, p. 71) e HMBC (**Figura 41**, p. 72) corroboram a identificação. O experimento de NOEDIFF (**Figuras 42**, p. 73) permitiu propor a estereoquímica da ligação dupla como sendo de configuração Z, pela irradiação do sinal 6,30 (H-2) que mostrou NOE em 5,93 (H-3) e 5,46 (H-7). O derivado **5a** foi analisado por dicroísmo circular (DC, **Figuras 43**, p. 73) e apresentou uma curva com efeito Cotton negativo na região de 260-270 nm, mesma região que apresentou máxima absorção no espectro de UV (**Figuras 43**, p. 73) semelhante ao valor de efeito Cotton (260 nm) para o lithospermosídeo descrito na literatura (WU et al., 1979). A comparação com curvas de DC da literatura para alguns cianoglicosídeo permitiu elucidar a estereoquímica do derivado e conseqüentemente da substância **5**, como 4*R*,5*S*,6*S*-4,5-dihidroxi-6-glucopiranosil-8-ciano-ciclohexa-1-7,2-3-dieno.

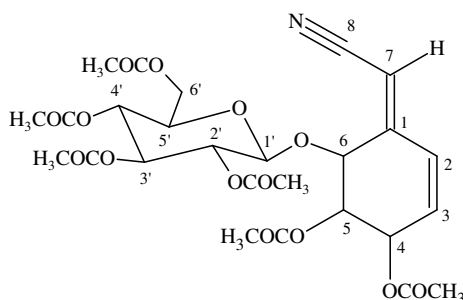


Tabela 11. Dados de RMN ^1H da substância **5a**

Substância 5a (CDCl_3)					
C	δ_{C}	δ_{H} (mult. J)	C	δ_{C}	δ_{H} (mult. J)
1	150,2	-	1'	102,2	4,86 d; 8,0 Hz
2	127,2	6,31 d; 10,0 Hz	2'	70,8	5,04 t
3	133,0	5,93 dl; 10,0 Hz	3'	72,6	5,25 t
4	67,8	5,67 dl	4'	67,9	5,15 t
5	66,7	5,48 dl	5'	72,3	3,82 m
6	75,2	4,77 d; 4,5 Hz	6'	61,2	4,35 e 4,25 m
7	101,1	5,44 s	Me	20,6	2,02 s
8	116,0	-	C=O	169,3-170,6	

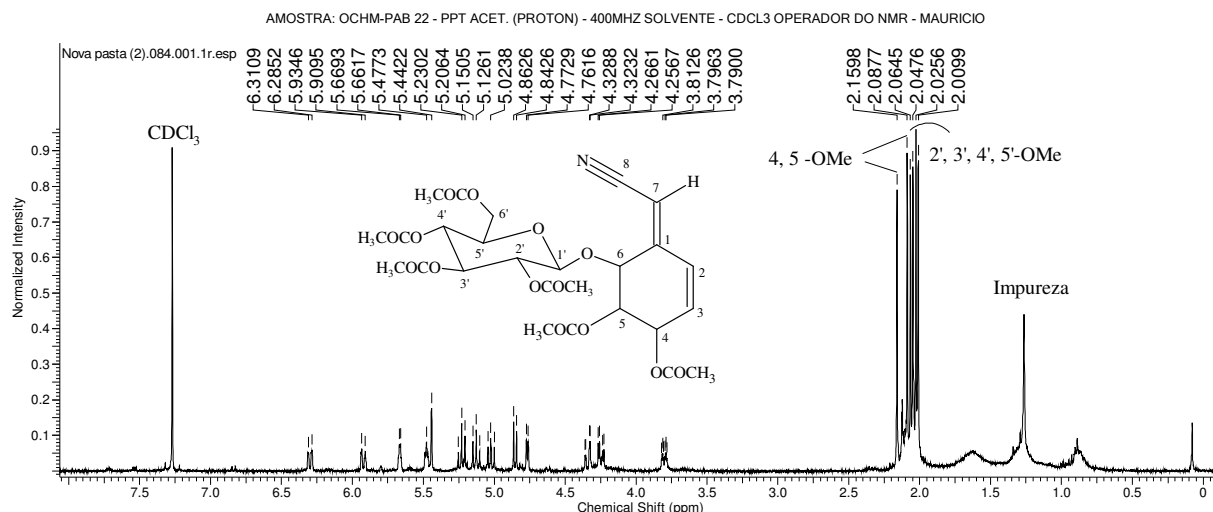


Figura 36. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) da substância **5a**

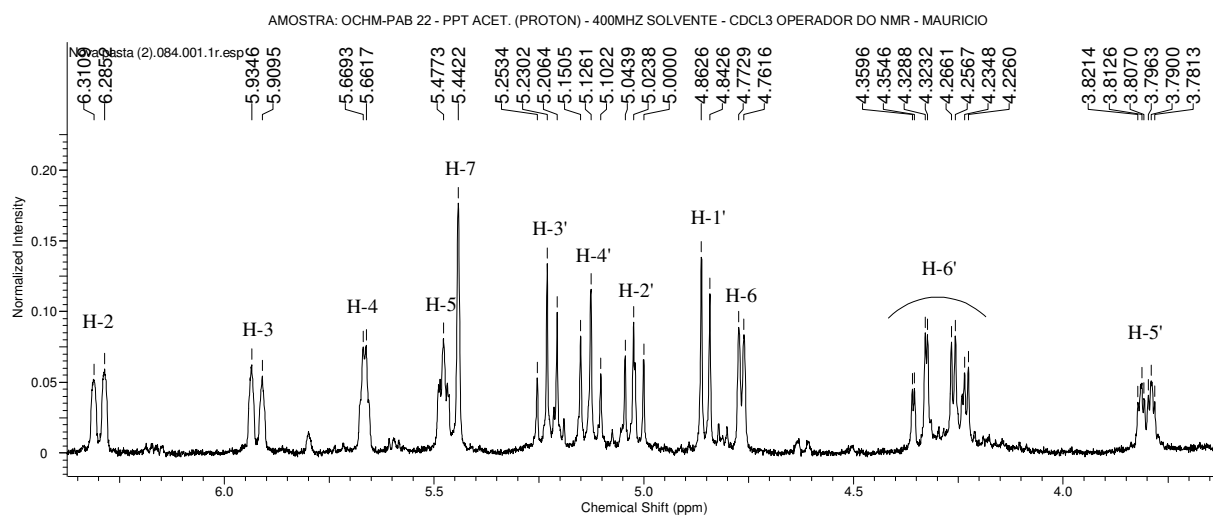


Figura 37. Expansão do espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) da substância **5a**

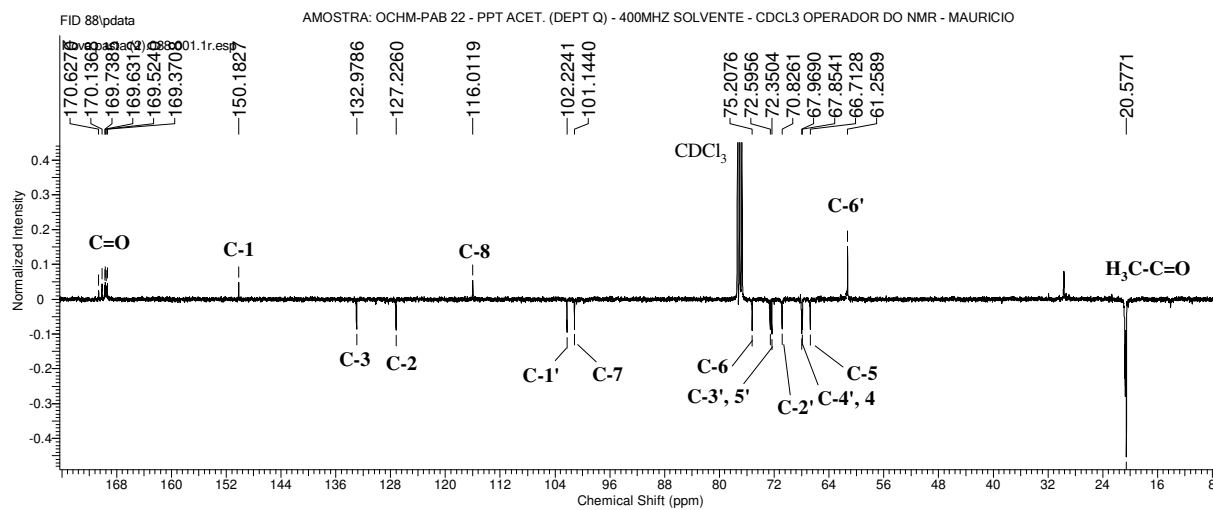


Figura 38. Espectro de RMN ¹³C DEPTQ (100 MHz, CDCl₃) da substância **5a**

Nova pasta (2).085.001.2rr.esp

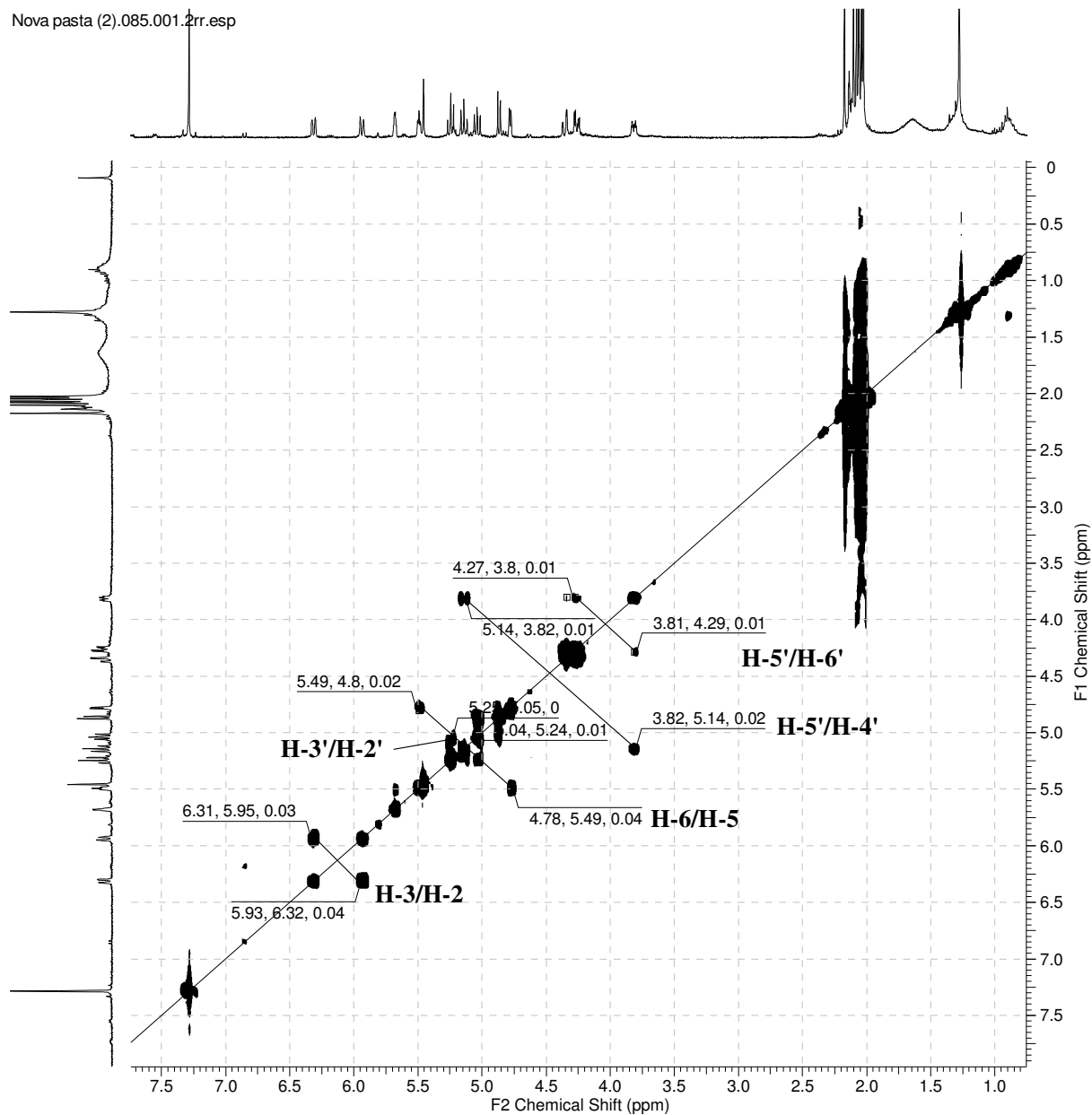
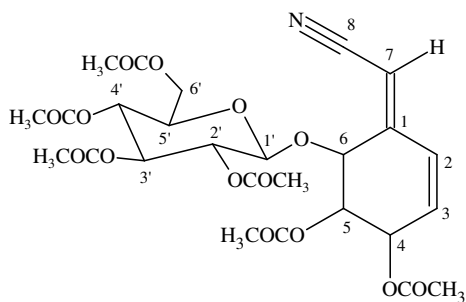


Figura 39. Expansão do mapa de contorno de COSY (400 MHz, CDCl₃) da substância 5a



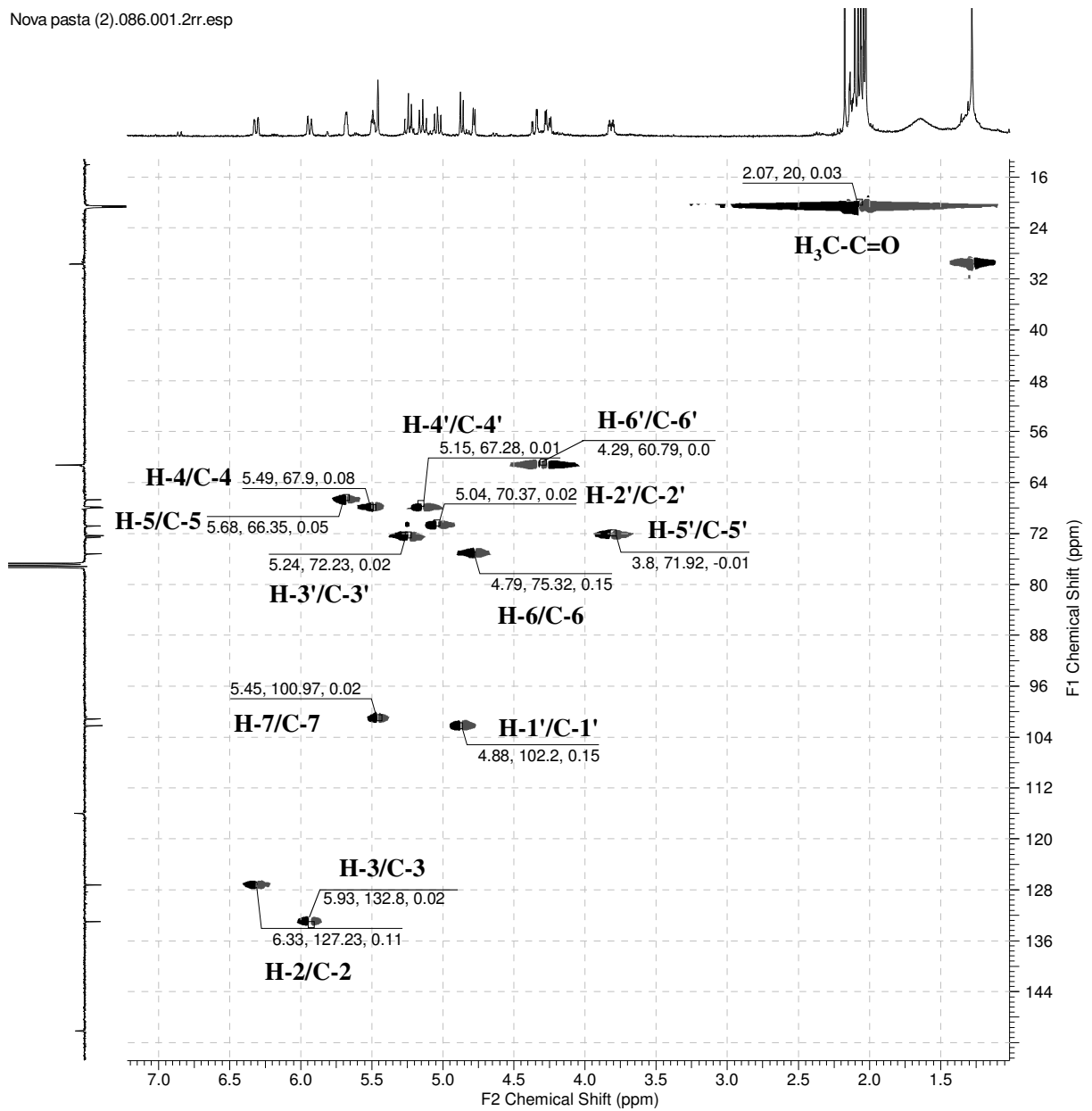
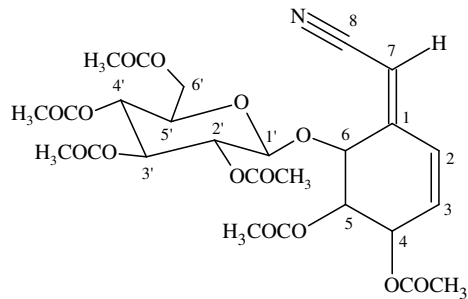


Figura 40. Mapa de contorno de HSQC (400 MHz, CDCl₃) da substância 5a



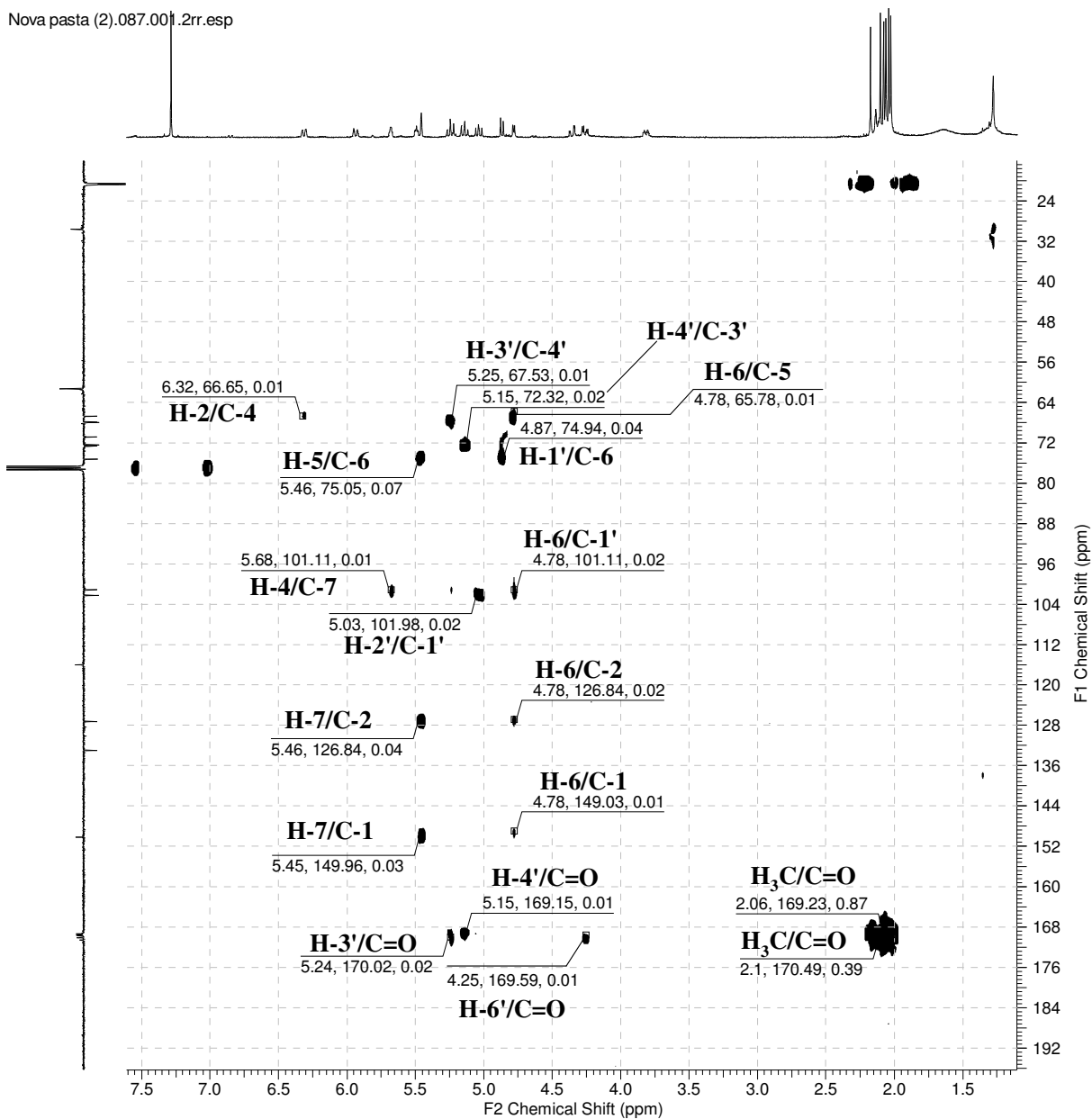
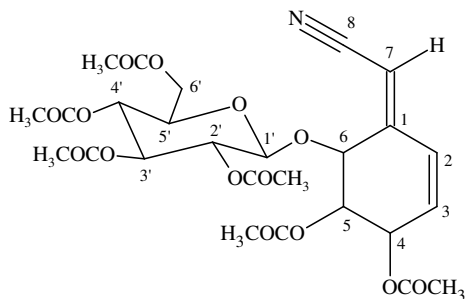


Figura 41. Mapa de contorno de HMBC (400 MHz, CDCl₃) da substância 5a



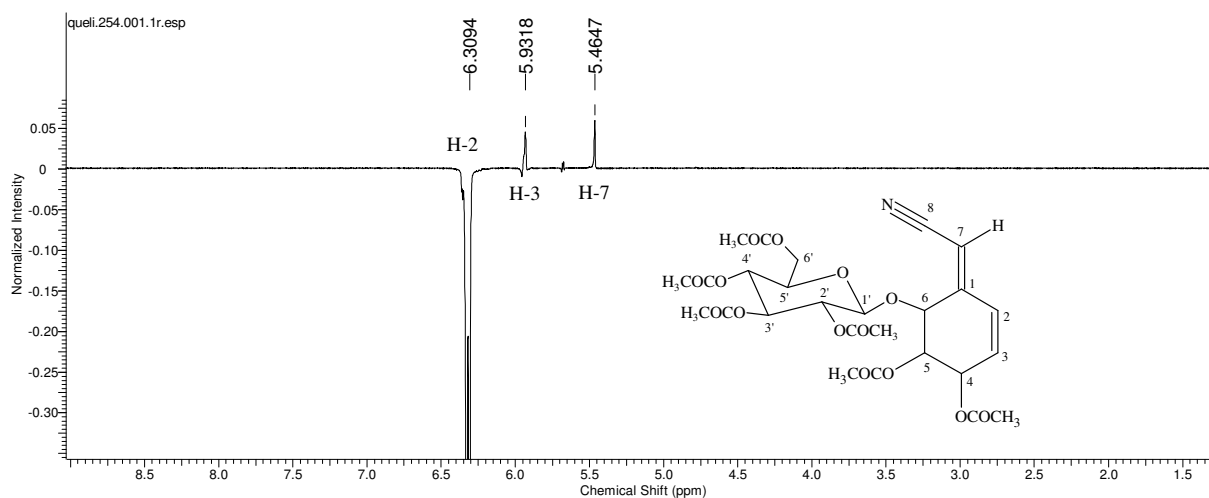


Figura 42. Espectro de NOEDIFF com irradiação na frequência de δ_{H} 6,31

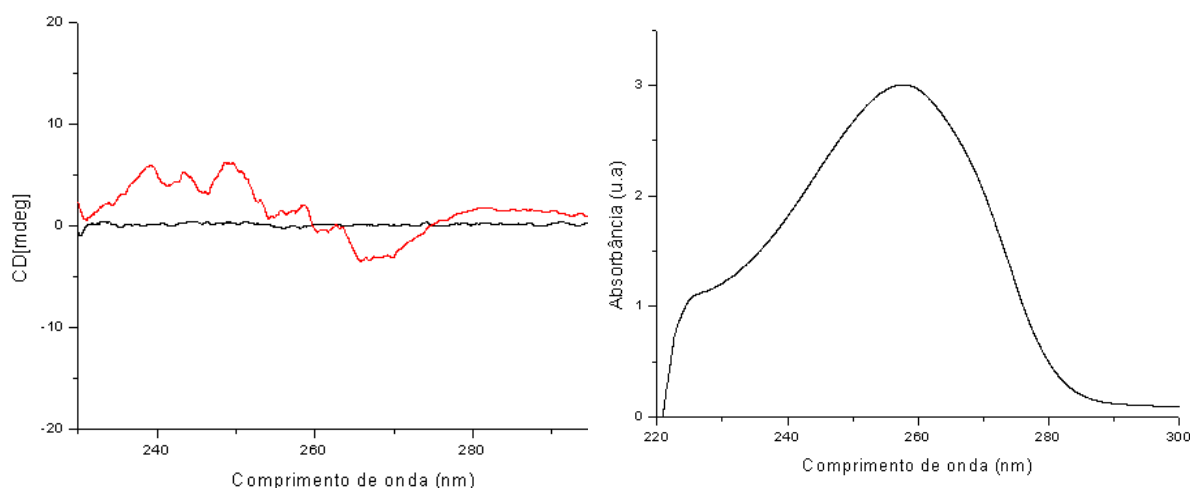


Figura 43. Espectro de dicroísmo circular (DC) e UV da substância **5a** em metanol.

2.6.7. Apigenina (**6**) isolada de OHIM

O precipitado obtido da fração OHIM-17 foi analisado por RMN¹H (**Figura 43**, p. 74) e revelou sinais característicos de flavona. Foi observado em δ_{H} 7,90 e 6,90 um par de dupletos com $J = 8,8$ Hz, compatível com um sistema AA'-BB', o qual foi atribuído aos hidrogênios H-2',6' e H-3',5', respectivamente. A presença de três simpletos em δ_{H} 6,78; 6,47 e 6,18 mostraram compatibilidade com os hidrogênios H-3, H-8 e H-6. A análise do espectro de RMN¹H conduziu a identificação da apigenina (**6**). A comparação dos valores δ_{H} com dados da literatura (ERSÖZ *et al.*, 2002) são apresentados na tabela **12**, p. 73 e confirmaram a proposta para apigenina isolado pela primeira vez na espécie *O. hexasperma*.

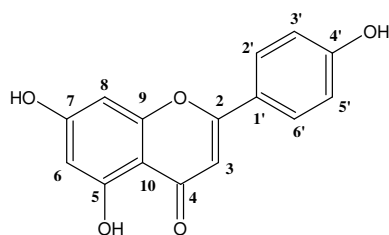


Tabela 12. Dados de RMN ^1H da substância **6** em comparação com dados da literatura para apigenina (ERSÖZ *et al.*, 2002)

C	Substância 6 (DMSO- d_6)	Apigenina (CD $_3$ OD)
	δ_{H} (mult. <i>J</i>)	δ_{H} (mult. <i>J</i>)
2		164,4
3	6,78 <i>s</i>	106,6
4		180,4
5		164,9
6	6,18 <i>s</i>	104,8
7		160,1
8	6,47 <i>s</i>	99,3
9		160,7
10		109,4
1'		123,1
2',6'	7,90 <i>d</i>	129,3
3',5'	6,90 <i>d</i>	117,0
4'		162,6
5-OH	12,95 <i>s</i>	-

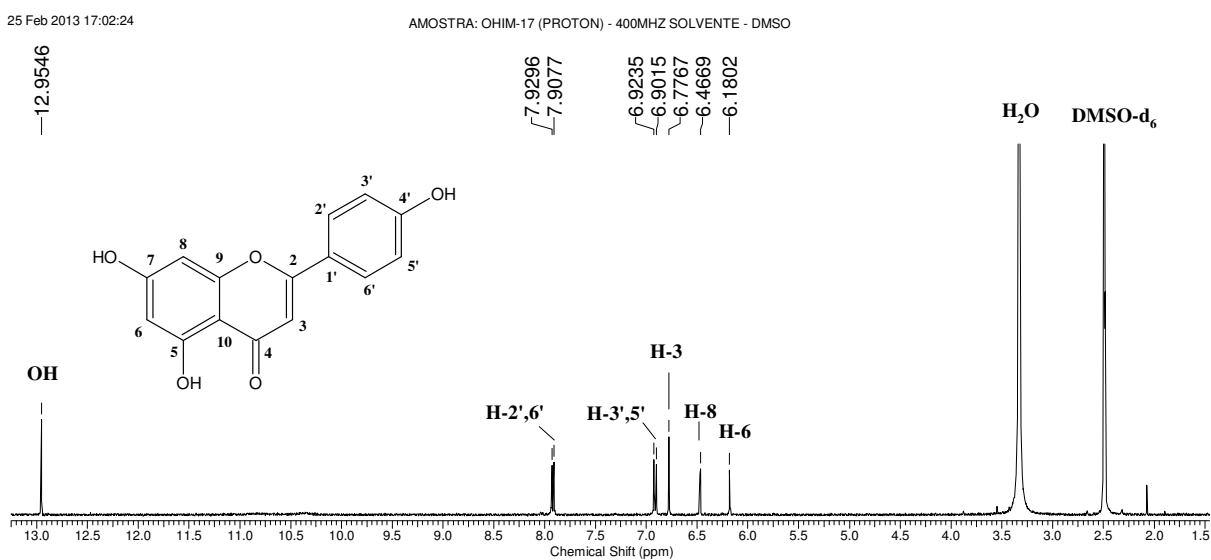
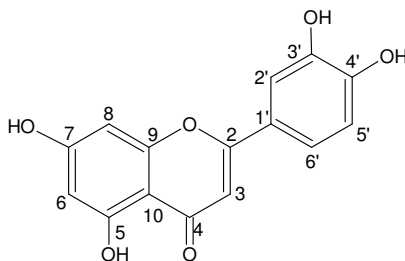


Figura 44. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) da substância **6**

2.6.8. Luteolina (7) isolada de OHIM

A substância **7** foi isolada por cromatografia em camada preparativa e identificada por RMN ^1H e ^{13}C (**Figura 45**, p. 76 e **46**, p. 77). O espectro de RMN ^1H apresentou sinais característicos com o de esqueleto de flavona. Foram observados sinais típicos de anel trissubstituído, em δ_{H} 7,41(*d*, H-6'), 7,39 (*s*, H-2') e 6,88 (*d*, $J = 7,8$ Hz, H-5'). Um simpleto intenso foi observado em δ_{H} 6,65 e atribuído a H-3. Em δ_{H} 6,44 e 6,17 foram encontrados dois simpletos largos referentes a H-8 e H-6, respectivamente. O espectro de RMN ^{13}C mostrou em δ_{C} 181,6 um sinal compatível ao de carbonila com a frequência reduzida. Os sinais em δ_{C} 119,0 (C-6'), 113,4 (C-5') e 116,2 (C-2') são típicos de sistema ABC e foram atribuídos aos carbonos do anel B de flavona. Seis sinais referentes a carbono quaternários foram observados em δ_{C} 146,0 (C-3'); 150,4 (C-4'); 161,6 (C-5); 157,5 (C-9), 164,0 (C-2) e 164,9 (C-7), os mesmos foram atribuídos a carbonos de sistema aromático, ligados a hidroxila. Outros dois carbonos quaternários foram identificados pelos sinais em δ_{C} 121,3 (C-1) e 103,5 (C-10). Em δ_{C} 99,1 e 94,0 verificou-se a presença de sinais compatíveis com os esperados para H-6 e H-8, respectivamente. Em δ_{C} 102,8 foi observado sinal referente ao C-3. A comparação com dados da literatura (EL-SHAFFEY & ABDELGAWAD, 2012) confirmaram a proposta para o flavonoide luteolina (ver a **Tabela 13**, p. 76).



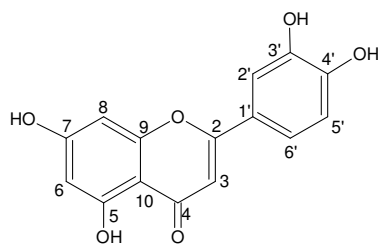


Tabela 13. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **7** em comparação com dados da literatura para luteolina (EL-SHAFFEY & ABDELGAWAD, 2012)

C	Substância 7 (DMSO- d_6)		Luteolina (DMSO- d_6)	
	δ_{H} (mult. <i>J</i>)		δ_{H} (mult. <i>J</i>)	
2	164,0		164,1	
3	102,8	6,65 s	102,9	6,65 s
4	181,7		181,6	
5	161,6		161,2	
6	99,1	6,17 s	99,8	6,19 d; 2,0 Hz
7	164,9		163,7	
8	94,1	6,44 s	93,7	6,45 d; 2,0 Hz
9	157,5		156,9	
10	103,5		104,4	
1'	121,3		121,5	
2'	113,4	7,39 sl	113,3	7,52 m
3'	146,1		145,7	
4'	150,4		149,6	
5'	116,1	6,88 d; 7,8 Hz	116,0	6,85 d; 7,8 Hz
6'	119,0	7,41 dd,	119,9	7,52 m
5-OH		12,98 s		-

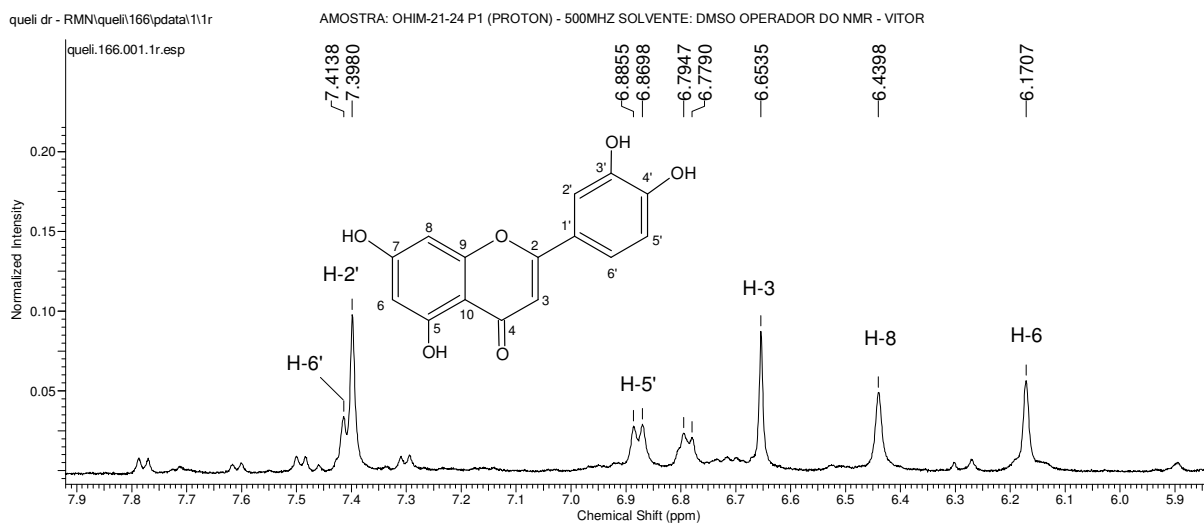


Figura 45. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da substância **7**

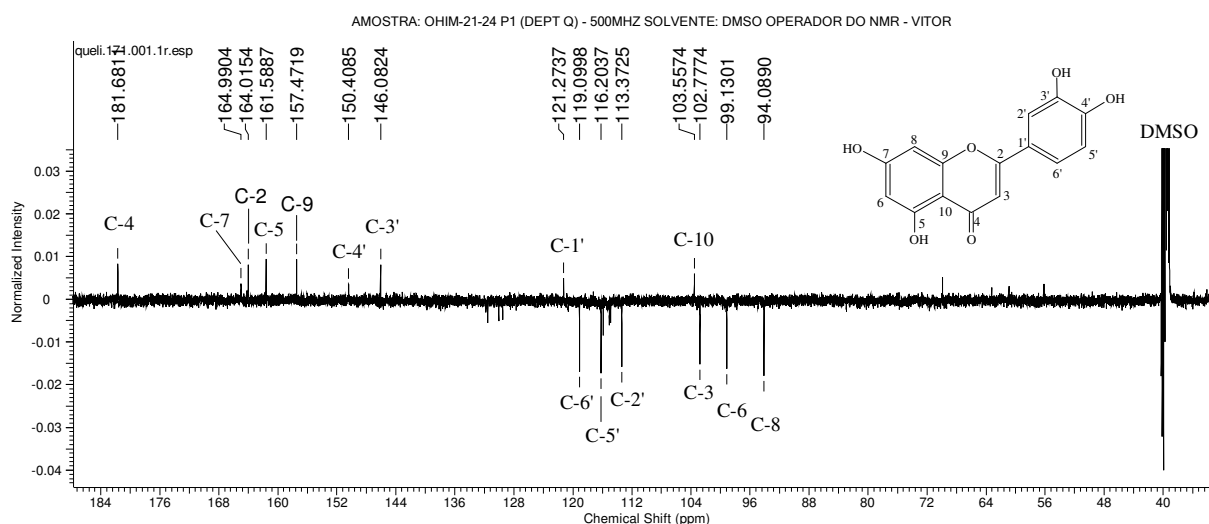


Figura 46. Espectro de RMN ^{13}C DEPTQ (125 MHz, DMSO- d_6) da substância **7**

2.6.9. Amentoflavona (**8**) isolada de OHIM

A substância **8** foi isolada da mesma fração que a substância **8** por CCDP, foi obtido pouca quantidade. A análise de RMN ^1H e ^{13}C permitiu identificar a substância **8** e mostrou a presença de impurezas. O espectro de RMN ^1H (**Figura 47**, p. 79), apresentou sinais na região de sistema aromático, além de dois sinais típicos de hidroxila quelada em δ_{H} 13,22 e 13,10, característicos de biflavonóides. Na região de hidrogênios em anel aromáticos foi observado os sinais: em δ_{H} 8,31 (*sl*, H-2''); 7,87 (*dd*, $J = 2,2$ e $8,5$ Hz, H-6') e 6,84 (*d*, $J = 8,5$ Hz, H-5') compatíveis com um sistema ABC de um anel B com 3' e 4' quaternário de um flavonoide; em δ_{H} 7,69 (*d*, $J = 8,8$ Hz H-2''' e 6'''); 6,52 (*d*, $J = 8,8$ Hz, H-3''' e 5''') característico de um anel *para* substituído, δ_{H} 6,26 (*sl*, H-8), 6,14 (*sl*, H-6) indicando um sistema de hidrogênios em anel aromático com acoplamento *meta*; e δ_{H} 6,76 (*s*, H-3''); 6,67 (*s*, H-3), 5,94 (*s*, H-6'') sugere que a substância **8** seja o biflavonoide amentoflavona isolada anteriormente em outras espécies deste gênero (*O. ferruginea*, *O. semisserrata*, *O. cuspidata*). O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 48**, p. 79 e **49**, p. 80) mostrou sinais compatíveis para a proposta de biflavona. Foi observada a presença de sinais típicos de carbonos metínicos do sistema de acoplamento *meta* no anel A de flavonoide δ_{C} 94,3 (C-8) e δ_{C} 99,2 (C-6). Carbonos metínicos do sistema AA'BB' δ_{C} 115,8 (C-3''' e C-5'''), δ_{C} 128,5 (C-2''' e C-6'''). O sinal de CH em δ_{C} 102,1 (C-6'') esta de acordo com dados de amentoflavonas. Além dos sinais para as duas carbonilas conjugadas δ_{C} 182,0 e 181,8. A ligação interflavonoídica pôde ser confirmada através do deslocamento químico do C-3' esperado para δ_{C} 120,54 e C-8'' para δ_{C} 105,19; segundo SUZART (2007). Foi observada a presença de um sinal em δ_{C} 101,8 (C-8'') e sinal de carbono metínico somente para C-6'', como mencionado acima. Não foi observado sinal

corespondente ao C-3'. Considerando todas as informações obtidas, juntamente com a comparação dos valores de deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono com valores descritos na literatura (VELANDIA, 1997), como mostrado na **Tabela 14**, além da comparação com amostra padrão em CCDA, confirmou-se a identificação da substância **8** como sendo a amentoflavona.

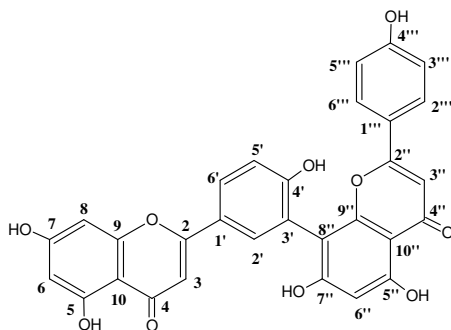


Tabela 14. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **8** em comparação com dados da literatura para amentoflavona (VELANDIA, 1997).

C	Substância 8		Amentoflavona	
	500 MHz (DMSO- d_6)		200 MHz (DMSO- d_6)	
	δC	δH (mult. J =Hz)	δC	δH (mult. J =Hz)
2	164,3		163,8	
3	102,8	6,67 <i>s</i>	102,8	6,79 <i>s</i>
4	181,8		182,2	
5	160,9		161,6	
6	99,2	6,14 <i>sl</i>	98,8	6,18 <i>d</i> , 2,0 Hz
7	161,8		164,2	
8	94,3	6,26 <i>sl</i>	94,2	6,46 <i>d</i> , 2,0 Hz
9	155,2		157,5	
10	103,9		103,5	
1'	122,3		121,1	
2'	131,7	8,31 <i>sl</i>	128,3	8,1-7,9 <i>m</i>
3'	120,1		120,1	
4'	-		159,6	
5'	115,4	6,84 <i>d</i> , 8,5 Hz	116,3	7,14 <i>d</i> , 9,3 Hz
6'	130,7	7,85 <i>dd</i> , 2,2 e 8,5 Hz	131,4	8,1-7,9 <i>m</i>
2''	165,2		163,9	
3''	102,8	6,76 <i>s</i>	103,1	6,84 <i>s</i>
4''	182,0		181,8	
5''	160,9		160,7	
6''	102,1	5,93 <i>s</i>	98,7	6,39 <i>s</i>
7''	163,0		162,0	
8''	101,8		104,1	
9''	157,7		154,6	
10''	103,9		103,7	
1'''	-		121,5	
2'''/6'''	128,5	7,68 <i>d</i> , 8,8 Hz	128,3	7,57 <i>d</i> , 8,7 Hz
3'''/5'''	115,8	6,52 <i>d</i> , 8,8 Hz	115,9	6,71 <i>d</i> , 8,7 Hz
4'''			161,1	
OH-5''		13,22 <i>s</i>		13,10 <i>s</i>
OH-5		13,10 <i>s</i>		12,97 <i>s</i>

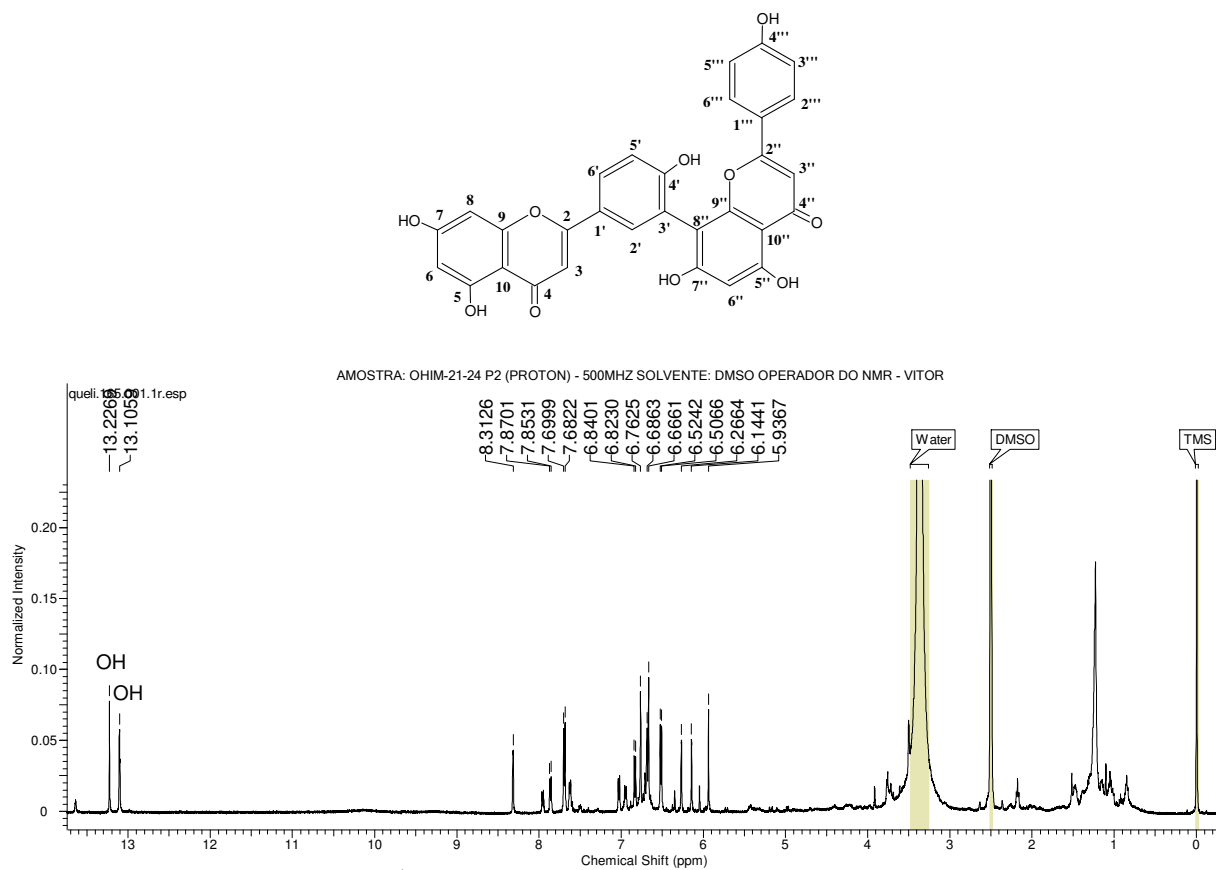


Figura 47. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da substância **8**

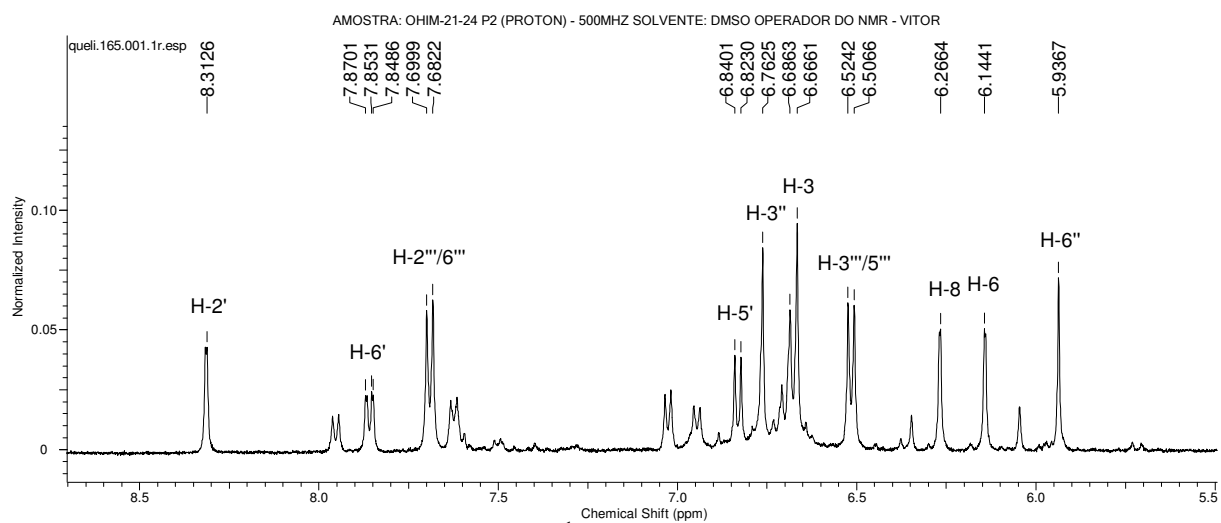


Figura 48. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da substância **8**

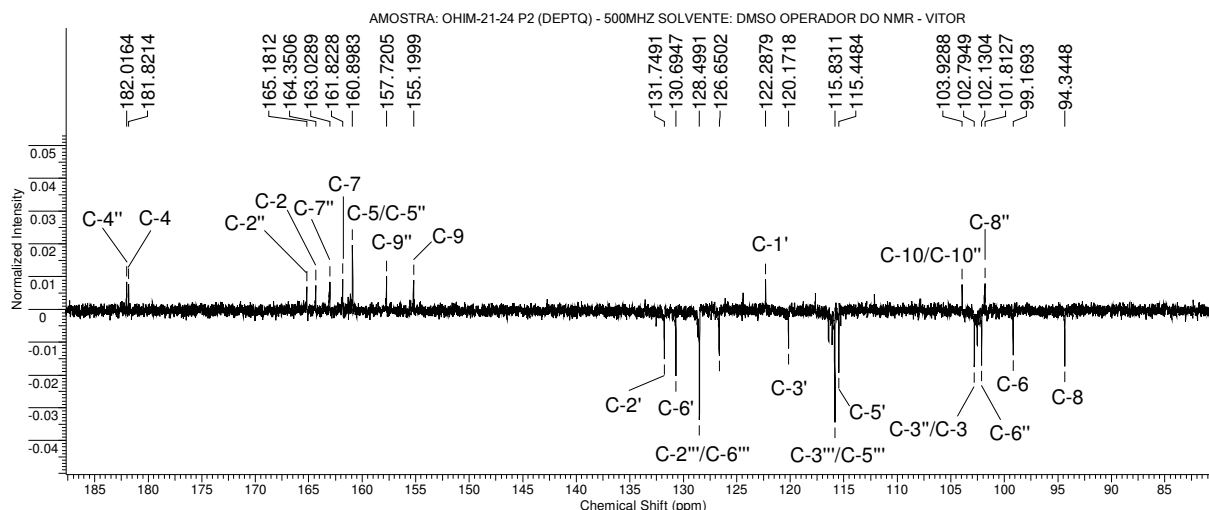


Figura 48. Espectro de RMN ^{13}C DEPTQ (125 MHz, DMSO- d_6) da substância **8**

2.6.10. Putraflavona (**9**) isolada de OFFM-PD

O espectro de RMN ^1H (**Figura 50 e 51**, p. 82) apresentou perfil característico de biflavona, com sinais em δ_{H} 13,19 e 13,05 (s) atribuídos a duas hidroxilas queladas. Na região de hidrogênios de sistema aromáticos foram observados os sinais: em δ_{H} 8,21 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-2'); 8,03 (*dd*, $J = 2,0$ e 8,5 Hz, H-6') e 7,20 (*d*, $J = 8,5$ Hz, H-5') compatíveis com um sistema ABC de um anel B de um flavonoide com substituintes nas posições 3',4'; δ_{H} em 7,77 (*d*, $J = 8,8$ Hz, H-2''' e 6'''); 6,91 (*d*, $J = 8,8$ Hz, H-3''' e 5''') característico de um anel *para* substituído, δ_{H} 6,61 (*sl*, H-8), 6,31 (*sl*, H-6) indicando um sistema de hidrogênios em anel aromático com acoplamento *meta*; e δ_{H} 6,77 (*s*, H-3''); 6,71 (*s*, H-3), 6,41 (*s*, H-6''). Foram encontrados dois sinais compatíveis com a presença de metoxilas ligadas ao anel aromático, em δ_{H} 3,79 *s* e 3,89 *s*. Para determinar a posição das metoxilas, foi utilizado o experimento NOEDIFF (**Figura 52 e 53**, p. 83). O espectro obtido com irradiação na frequência do sinal da metoxila (δ_{H} 3,79) apresentou nOe em δ_{H} 6,94 (*d*, H-3'''/5'''), e é compatível com a presença de uma metoxila ligada no C-4'''. A irradiação na frequência de metoxila (δ_{H} 3,89) apresentou nOe na região de δ_{H} 6,31 e 6,61 *sl*, que correspondem aos hidrogênios H-6 e H-8, confirmando a presença de uma metoxila ligada no C-7. A pouca quantidade impossibilitou a aquisição de sinais de ^{13}C . O experimento de RMN 2D HSQC (**Figura 54**, p. 84) permitiu identificar alguns sinais que estão apresentados na **Tabela 15**, p. 81. Estas informações e a comparação dos valores de RMN com dados da literatura para esta substância (SUZART, 2007b) conduziram a estrutura da putraflavona. Esta substância já havia sido isolada das folhas de *O. cuspidata*.

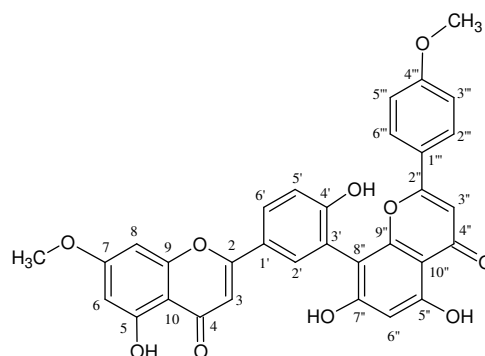


Tabela 15. Dados de RMN ^1H da substância **9** em comparação com dados da literatura para putraflavona (SUZART, 2007b)

C	Substância 9 (CD_3COCD_3)		Putraflavona (DMSO-d_6)	
	δ_c	δ_H (mult. <i>J</i>)	δ_c	δ_H (mult. <i>J</i>)
2			164,1	
3	103,0	6,71 <i>s</i>	103,1	6,90 <i>s</i>
4			182,1	
5			161,1	
6	97,5	6,31 <i>sl</i>	98,0	6,36 <i>d</i> ; 1,9 Hz
7			165,1	
8	92,1	6,61 <i>sl</i>	92,6	6,76 <i>sl</i>
9			157,3	
10			104,7	
1'			120,8	
2'	131,5	8,21 <i>sl</i>	131,4	8,06 <i>m</i>
3'			120,2	
4'			157,3	
5'	116,6	7,20 <i>d</i> ; 8,5 Hz	116,4	7,15 <i>d</i> ; 9,1 Hz
6'		8,03 <i>d</i> ; 8,5 Hz	127,9	8,06 <i>m</i>
2''			163,1	
3''		6,77 <i>s</i>	103,5	6,91 <i>s</i>
4''			181,9	
5''			160,5	
6''	99,2	6,41 <i>s</i>	98,9	6,40 <i>s</i>
7''				
8''			104,2	
9''			154,5	
10''			104,2	
1'''			122,9	
2'''/6'''	128,0	7,77 <i>d</i> ; 8,8 Hz	127,9	7,68 <i>d</i> ; 8,7 Hz
3'''/5'''	114,4	6,93 <i>d</i> ; 8,8 Hz	114,4	6,93 <i>d</i> ; 8,7 Hz
4'''			162,2	
5-OH		13,05 <i>s</i>		12,91 <i>s</i>
7-OMe	55,4	3,89 <i>s</i>	56,0	3,83 <i>s</i>
5''-OH		13,19 <i>s</i>		13,07
4'''-OMe	55,1	3,79 <i>s</i>	55,5	3,75 <i>s</i>

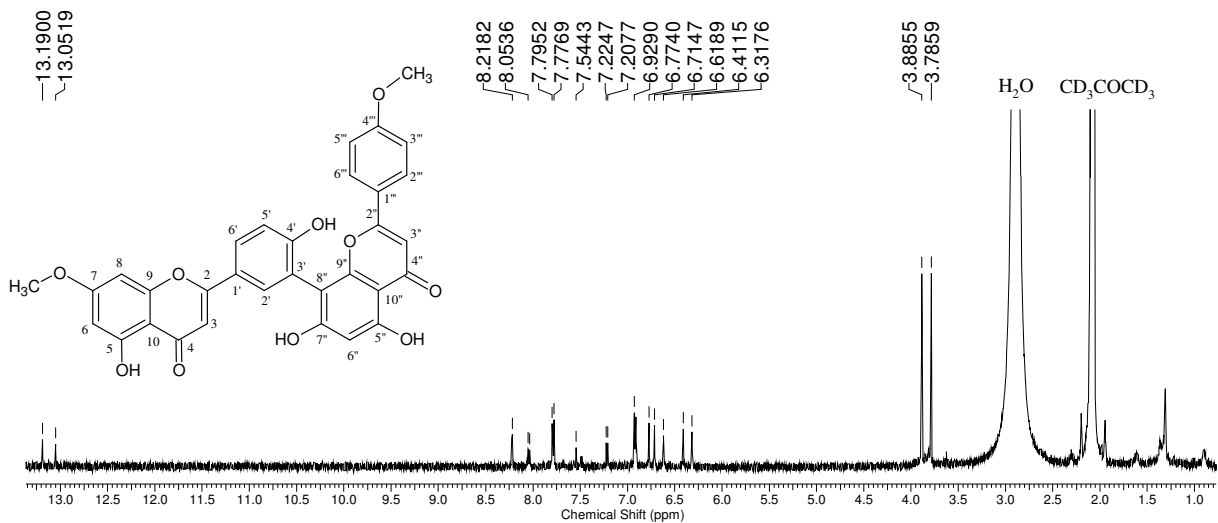


Figura 50. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3COCD_3) da substância **9**

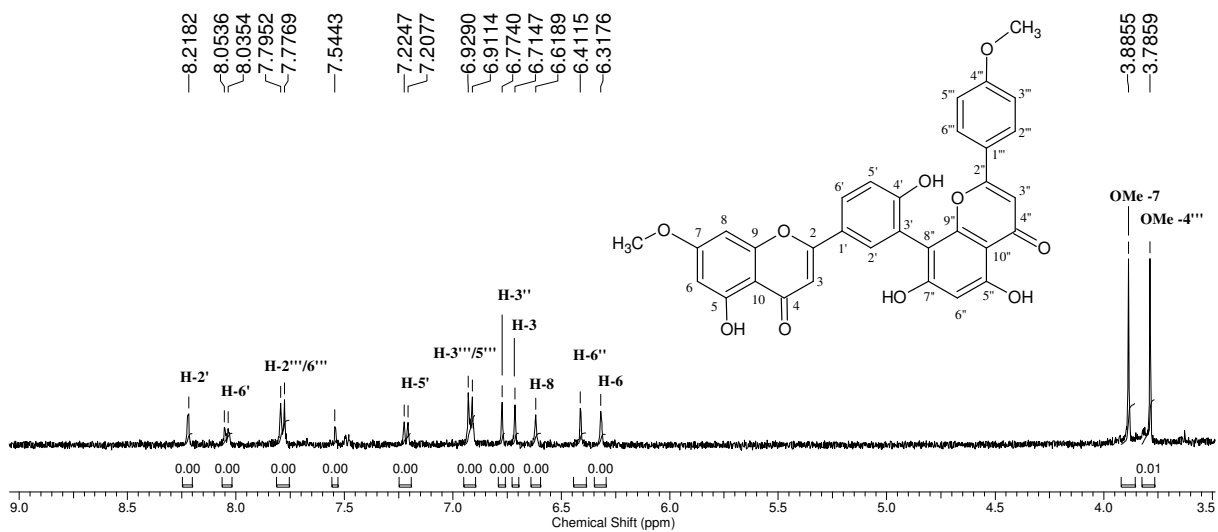


Figura 51. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3COCD_3) da substância **9**

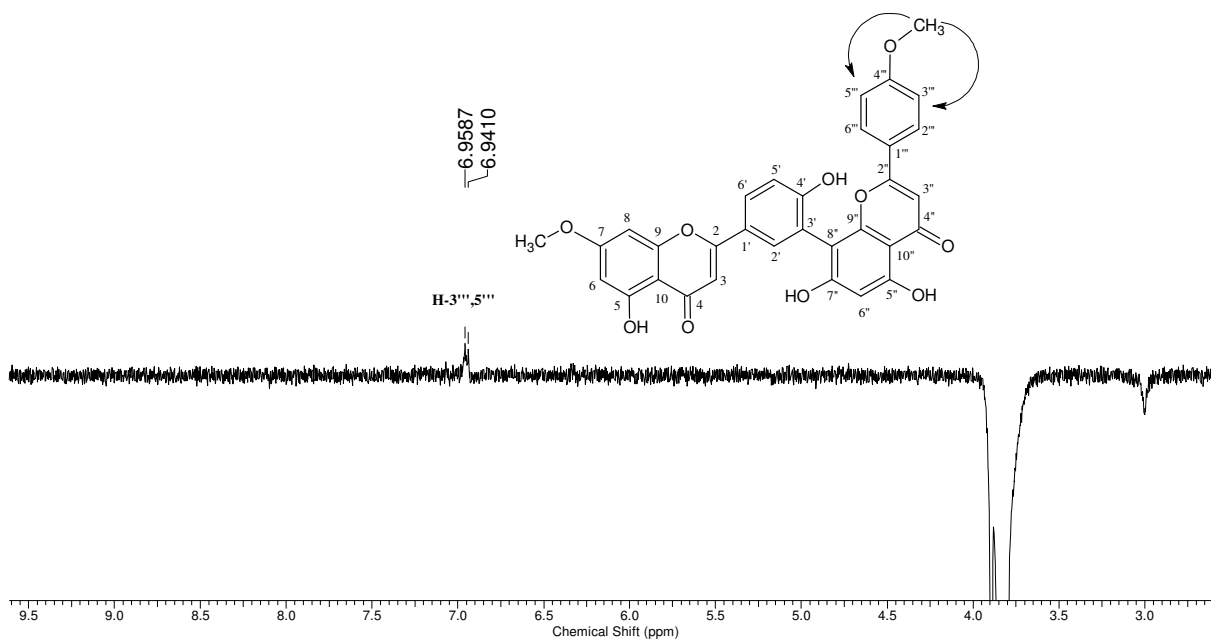


Figura 52. Espectro de NOEDIF (500 MHz, CD_3COCD_3) da substância **9** com irradiação frequência da metoxila 3,89 ppm

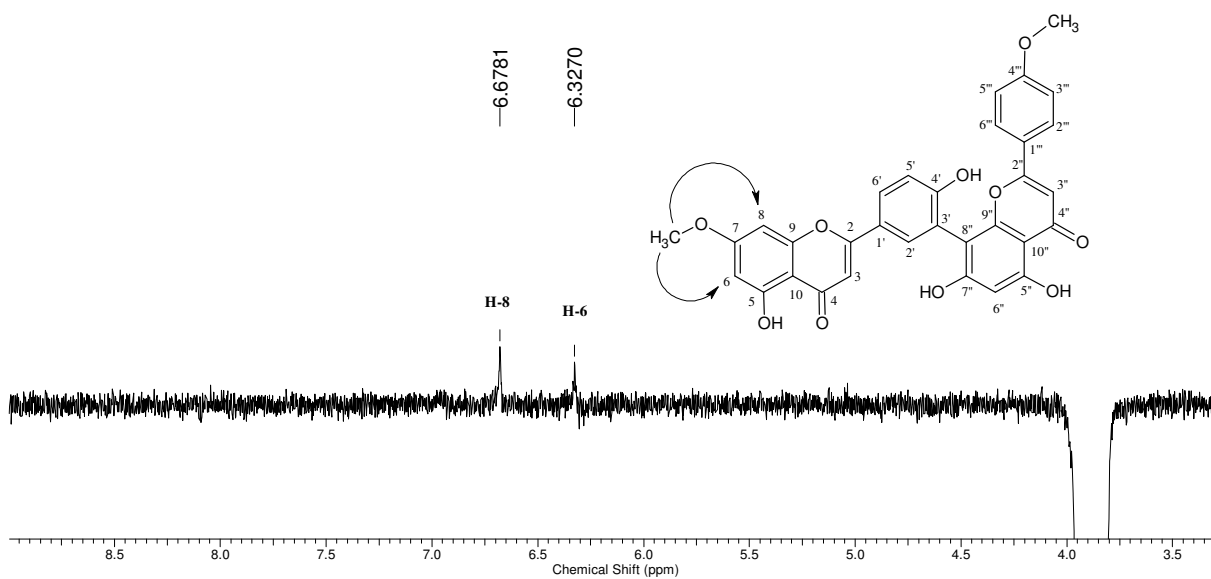


Figura 53. Espectro de NOEDIF (500 MHz, CD_3COCD_3) da substância **9** com irradiação na frequência da metoxila 3,79 ppm

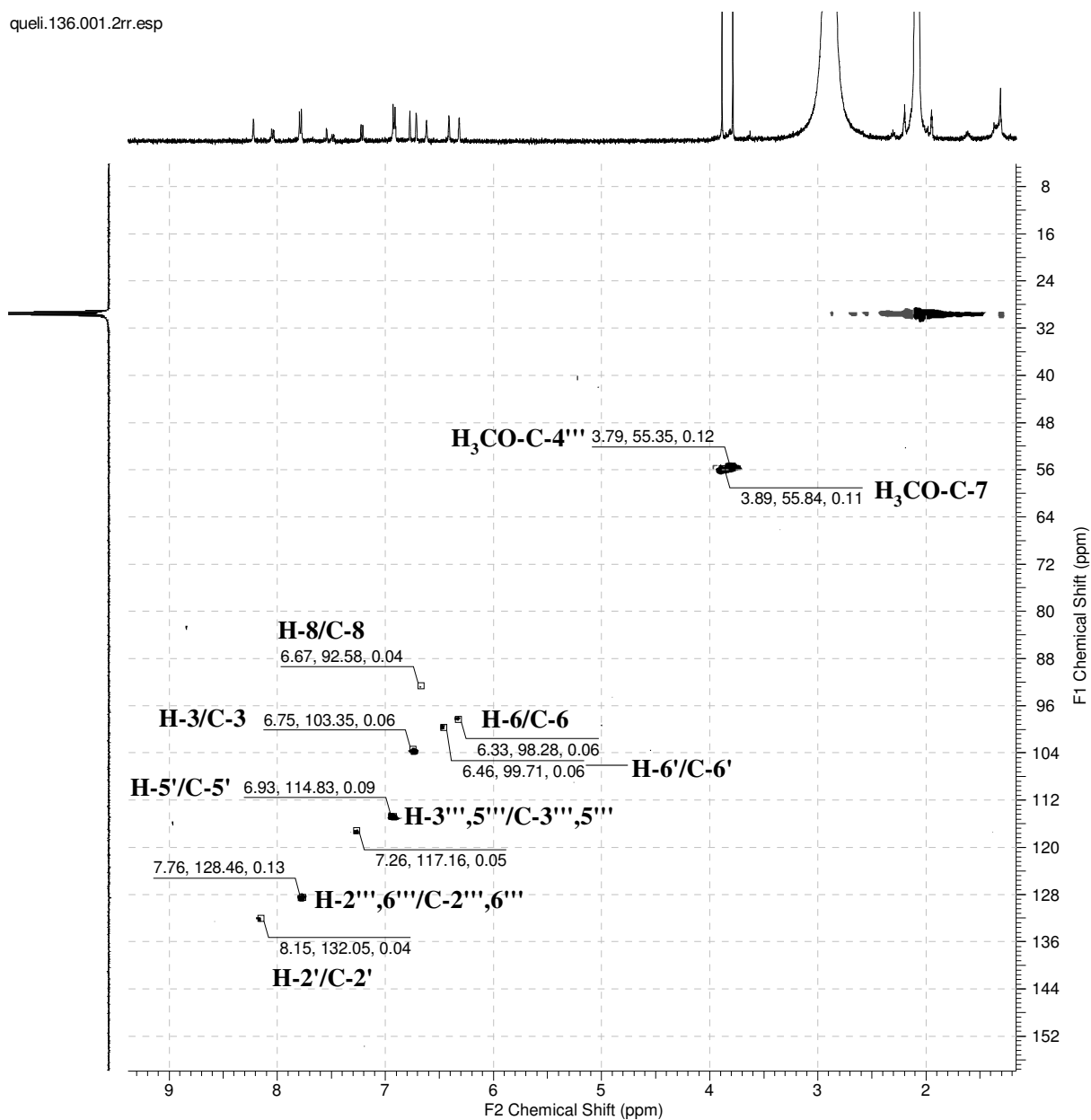
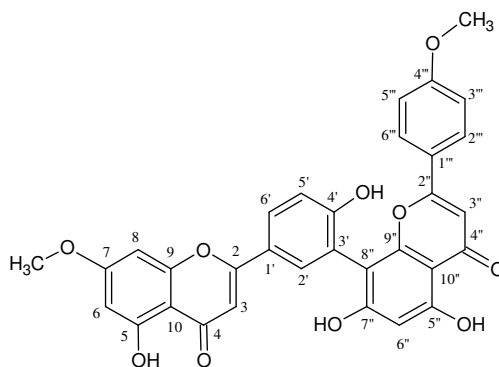
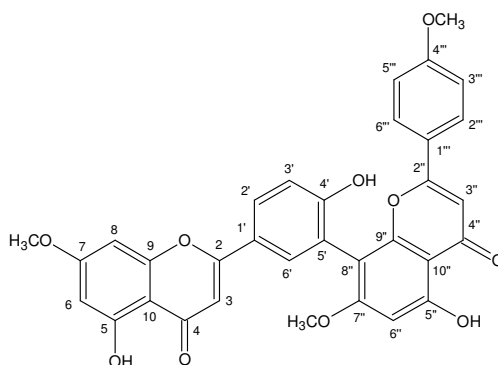


Figura 54. Expansão do mapa do contorno RMN HSQC (500 MHz, CD₃COCD₃) da substância **9**



2.6.11. Heveaflavona (10) isolada de OSFM-PD

A substância **10** apresentou perfil de biflavona em análise por RMN ^1H e ^{13}C . No espectro de RMN ^1H (**Figuras 55 e 56**, p. 87) verificou-se a presença de sinais típicos de sistema *para* substituído em δ_{H} 7,68 (*d*; 8,8 Hz; H-2''/6'') e 6,96 (*d*; 8,8 Hz; H-3''/5''), um sistema ABC também foi observado pelo conjunto de sinais em δ_{H} 8,07 (*d*; 8,5 Hz; H-2'), 8,03 (*sl*, H-6') e 7,17 (*dd*; 8,5 Hz; H-5). Um sistema de hidrogênios em anel aromático com acoplamento *meta* foi observado em δ_{H} 6,69 (*sl*, H-6) e 6,76 (*sl*, H-8). Um simpleto intenso em δ_{H} 6,92 foi atribuído a H-3 e H3''. O sinal em δ_{H} 6,35 (*s*) foi atribuído a H-6''. Três simpletos foram encontrados na região de metoxila (δ_{H} 3,76; 3,82 e 3,84), os mesmo foram submetidos a experimento de NOEDIFF para determinar as posições das metoxilas na estrutura da substância **10**. Neste experimento foi utilizado um derivado acetilado da substância **10** para facilitar a determinação. A presença de duas hidroxilas queladas em δ_{H} 12,96 (HO-5'') e 13,22 (HO-5), e a ausência de um sinal para H-8'' indicam que a substância **10** seja um derivado metilado de amentoflavona. Os sinais observados no espectro de RMN ^{13}C (**Figura 57-58**, p. 88 e **59-60**, p. 89) são compatíveis com esqueleto de amentoflavona. Em δ_{C} 182,8 (C-4) e 182,4 (C-4'') foram observados dois sinais típicos de carbonila conjugada de flavona. Ao C-3' foi conferido o sinal em δ_{C} 122,2 e para C-8'' o sinal em δ_{C} 105,1. Os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono (**Tabela 16**, p. 86) foram comparados com dados adquiridos na literatura para heveaflavona (CARBONEZI et al, 2007), apesar da semelhança entre os valores a confirmação só foi obtida após a confirmação da posição das metoxilas por experimento de NOEDIFF (ver derivado **10a**, pag. 86).



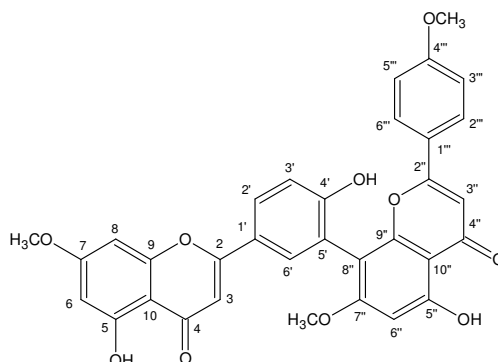


Tabela 16. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **10** em comparação com dados da literatura para heveaflavona (CARBONEZI et al., 2007)

C	Substância 10 (500MHz; DMSO-d ₆)		Heveaflavona (500 MHz; DMSO-d ₆)	
	δ_{C}	δ_{H} (mult. <i>J</i>)	δ_{C}	δ_{H} (mult. <i>J</i>)
2	164,4		163,9	
3	103,6	6,92 <i>s</i>	103,1	6,90 <i>s</i>
4	182,8		181,6	
5	163,2		162,0	
6	98,4	6,69 <i>sl</i>	97,7	6,36 <i>d</i> ; 1,9Hz
7	165,5		164,8	
8	93,1	6,76 <i>sl</i>	92,0	6,76 <i>sl</i>
9	161,6		157,1	
10	105,4		104,6	
1'	121,5		120,9	
2'	131,7	8,07 <i>d</i> ; 8,5 Hz	130,9	8,06 <i>m</i>
3'	122,2		119,4	
4'	157,7		154,3	
5'	116,5	7,17 <i>d</i> ; 8,5 Hz	116,0	7,15 <i>d</i> ; 9,1 Hz
6'	128,6	8,03 <i>sl</i>	127,5	8,06 <i>m</i>
2''	164,0		163,4	
3''	103,6	6,92 <i>s</i>	102,9	6,91 <i>s</i>
4''	182,4		182,2	
5''	161,9		161,5	
6''	95,9	6,35 <i>s</i>	95,0	6,40 <i>s</i>
7''	159,9		161,2	
8''	105,1		104,7	
9''	154,1		153,6	
10''	104,6		104,2	
1'''	123,3		122,8	
2'''/6'''	128,5	7,68 <i>d</i> ; 8,8 Hz	127,6	7,68 <i>d</i> ; 8,7 Hz
3'''/5'''	114,9	6,96 <i>d</i> ; 8,8 Hz	114,1	6,93 <i>d</i> ; 8,7 Hz
4'''	162,7		162,4	
5-OH		13,22 <i>s</i>		12,91 <i>s</i>
7-OMe	56,9	3,84 <i>s</i>	55,9	3,83 <i>s</i>
7''-OMe	56,4	3,82 <i>s</i>	55,5	
5''-OH		12,96 <i>s</i>		13,07
4'''-OMe	55,9	3,76 <i>s</i>	55,1	3,75 <i>s</i>

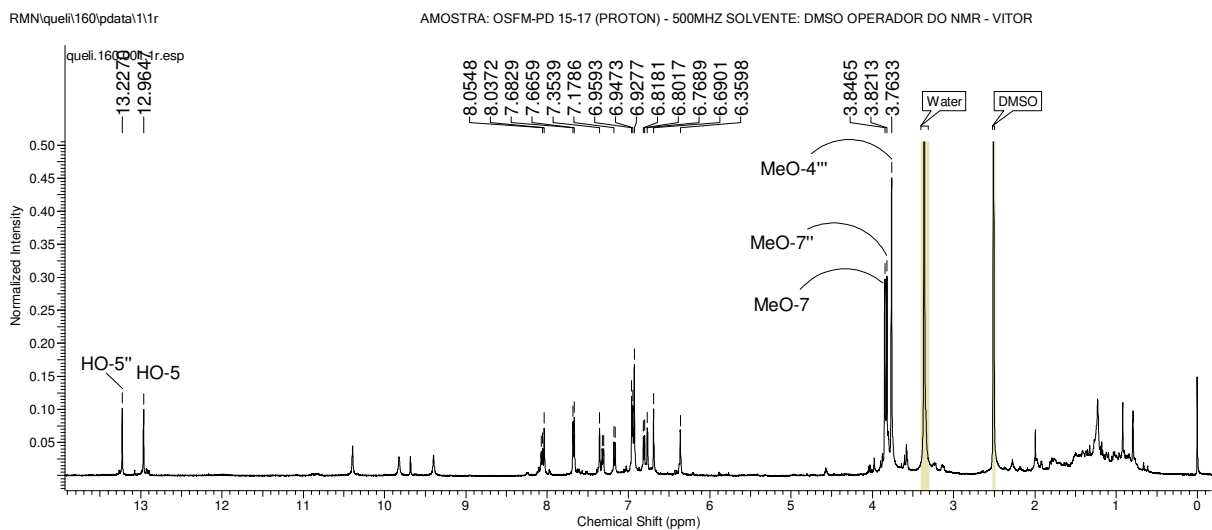
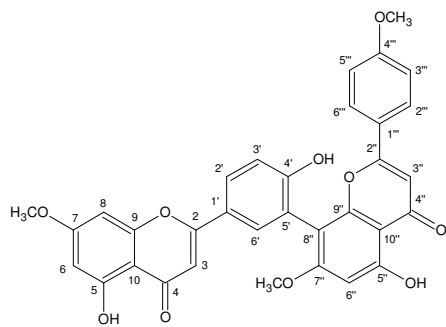


Figura 55. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) da substância **10**

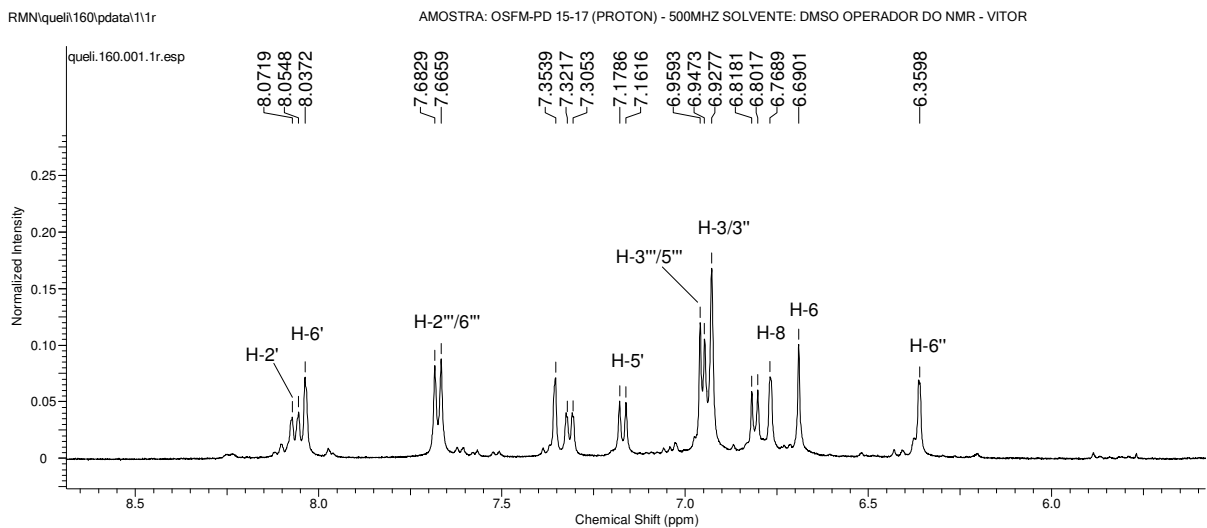


Figura 56. Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) da substância **10**

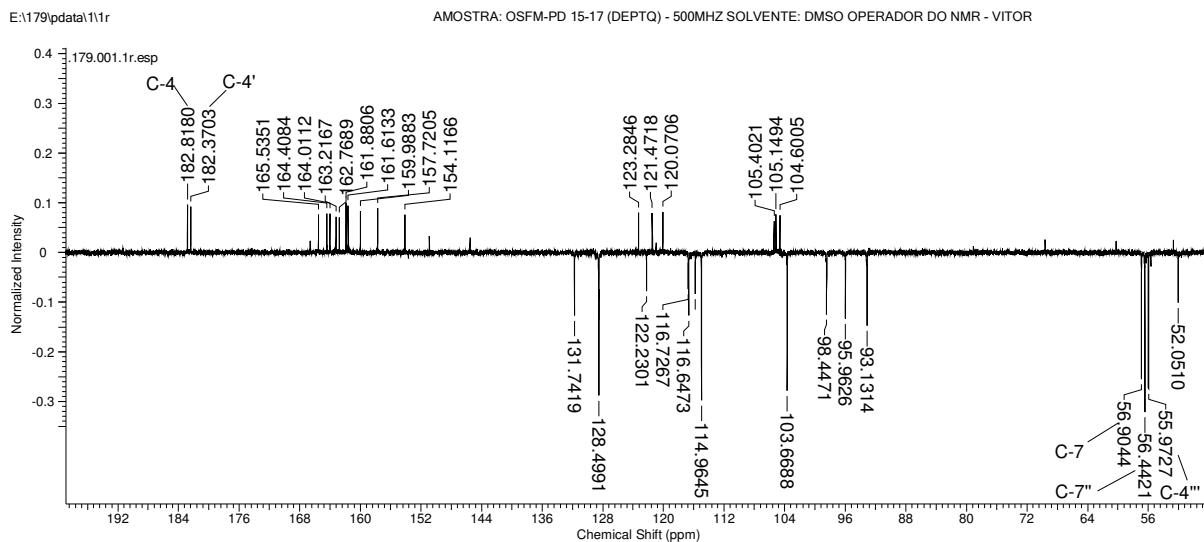


Figura 57. Espectro de RMN ^{13}C DEPTQ (125 MHz, DMSO- d_6) da substância **10**

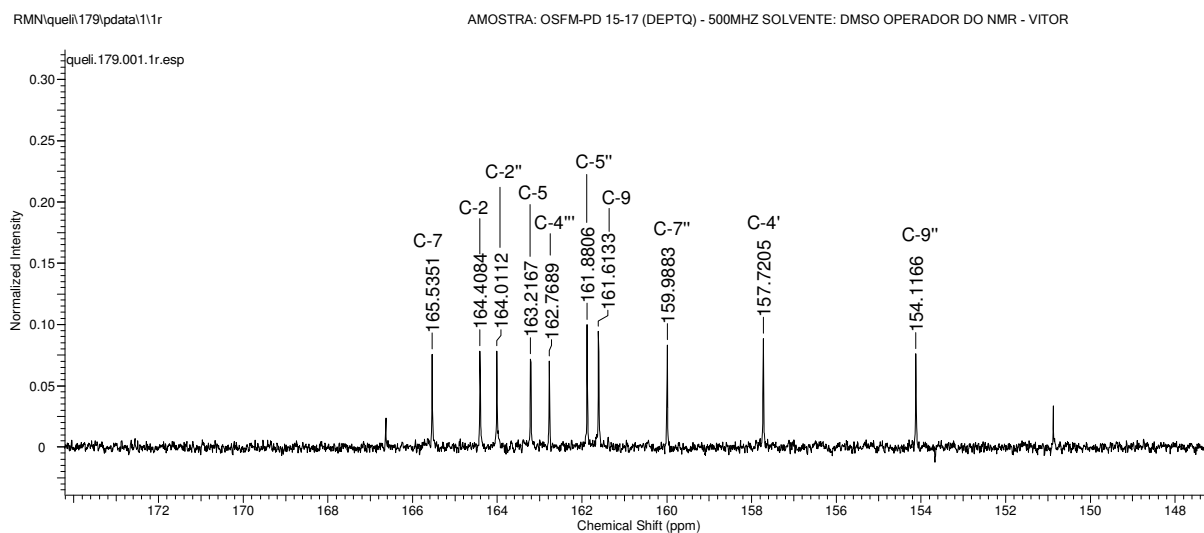
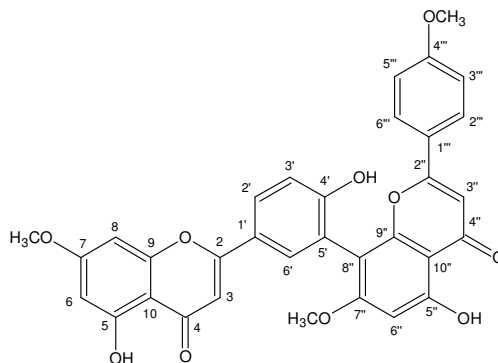


Figura 58. Expansão do espectro de RMN ^{13}C DEPTQ (125 MHz, DMSO- d_6) da substância **10**



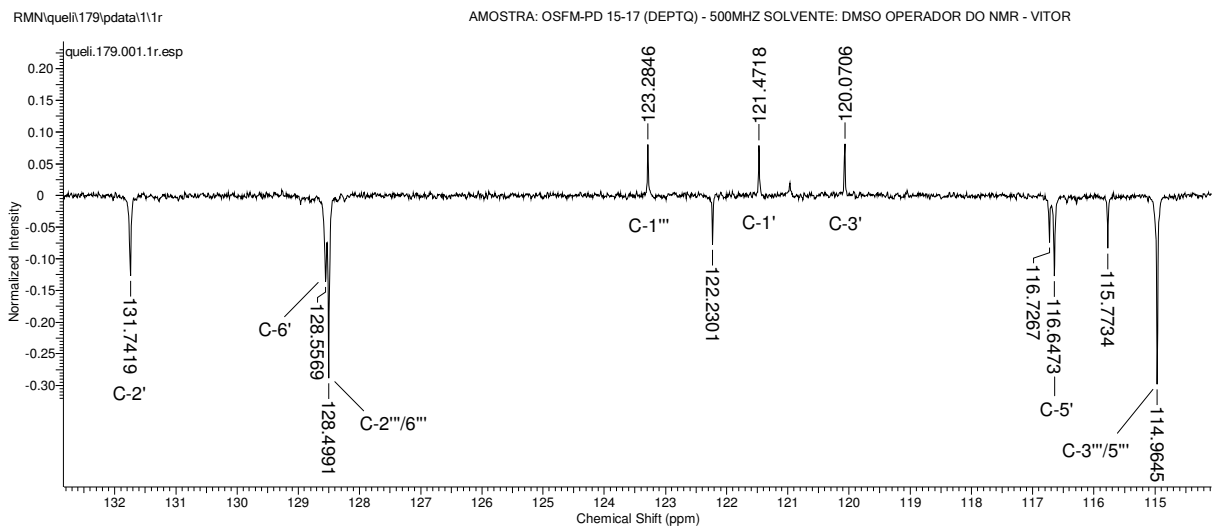


Figura 59. Expansão do espectro de RMN ^{13}C DEPTQ (125 MHz, DMSO- d_6) da substância **10**

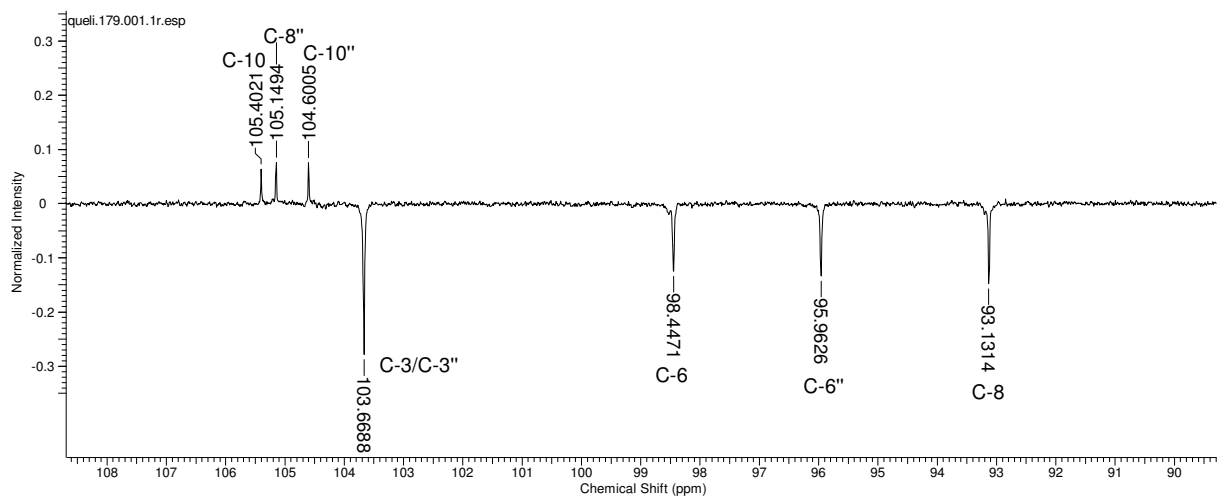
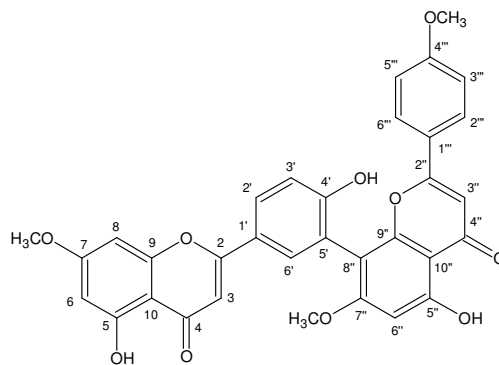


Figura 60. Expansão do espectro de RMN ^{13}C DEPTQ (125 MHz, DMSO- d_6) da substância **10**



2.6.12. Derivado acetilado (10a)

O produto **10a** foi obtido da reação de acetilação, com piridina e anidrido acético, da substância heveaflavona **10**. Esta reação incorpora unidades acila às hidroxilas, mesmos as que se encontram queladas pela ligação de hidrogênio com a carbonila. O espectro de RMN ^1H de **10a** (Figuras 61, p. 90 e 62, p. 91) quando comparado com o da substância **10** revelou a ausência dos simpletos δ_{H} 12,96 (HO-5'') e 13,22 (HO-5), e o surgimento de sinais adicionais referentes a três simpletos em δ_{H} 2,52; 2,45 e 2,33 ppm referentes aos grupos acetoxilas incorporados à molécula. Em δ_{H} 3,89; 3,88 e 3,78 foram observados os sinais das metoxilas. Cada sinal foi selecionado e irradiado, no entanto não foi possível isolar as metoxilas em 3,89 e 3,88 devido a proximidade de ambas. A irradiação na frequência do sinal em 3,76 (Figura 63, p. 91) gerou nOe em 6,83 (H-3''',5''') e a irradiação na frequência do sinal em 3,89 e 3,88 (Figura 64, p. 92) gerou nOe em 6,78 (H-8), 6,58 (H-6) e 6,54 (H-6''). Esses dados permitiram localizar as metoxilas δ_{H} 3,76 em 4''' e as metoxilas δ_{H} 3,89 e 3,88 em 7 e 7''.

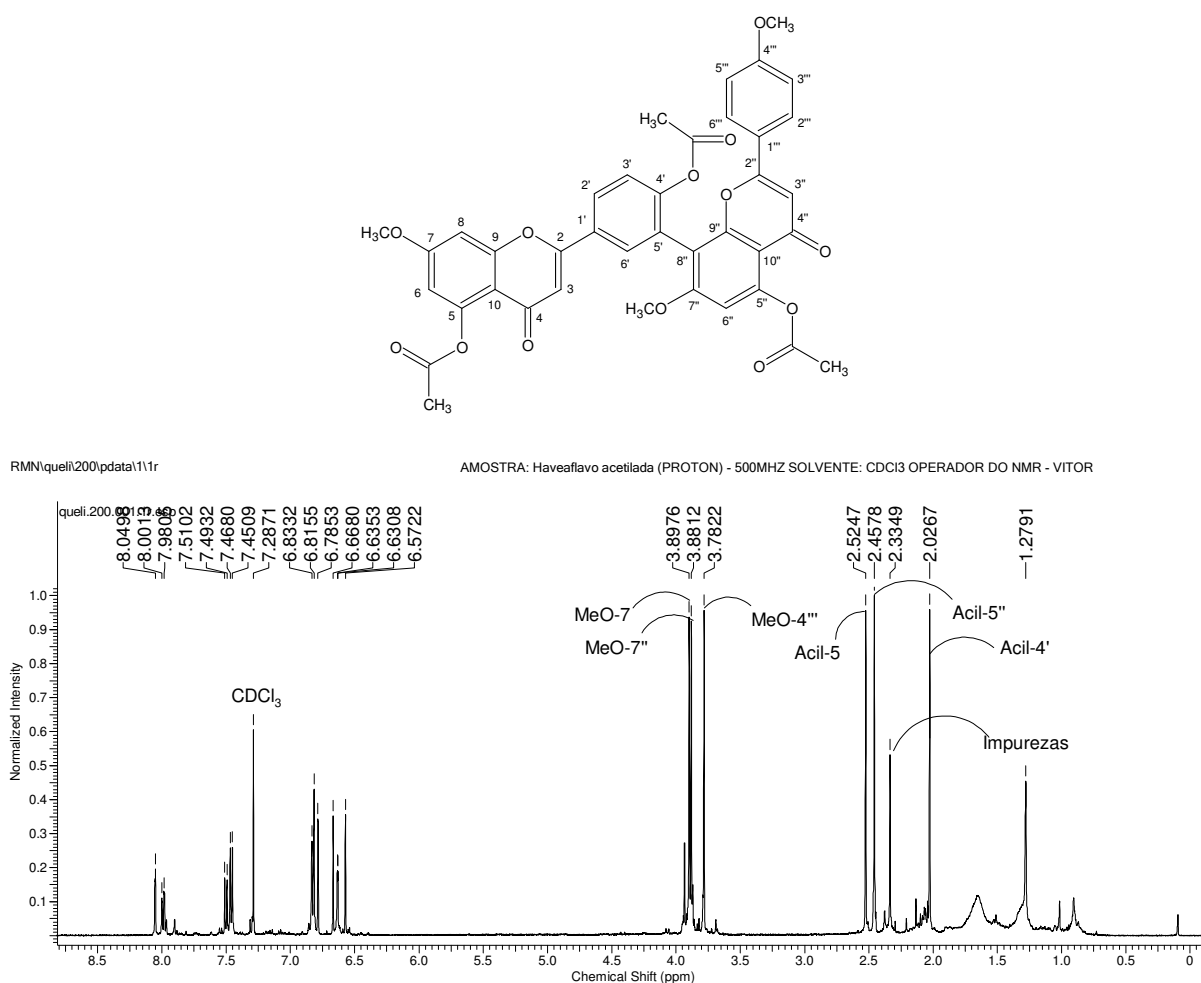


Figura 61. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **10a**

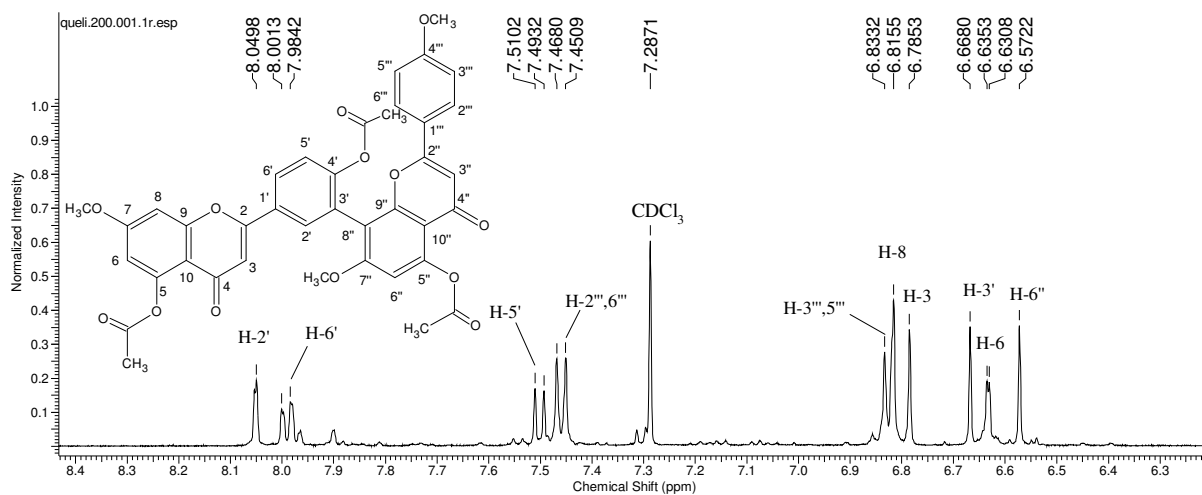


Figura 62. Expansão espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância **10a**

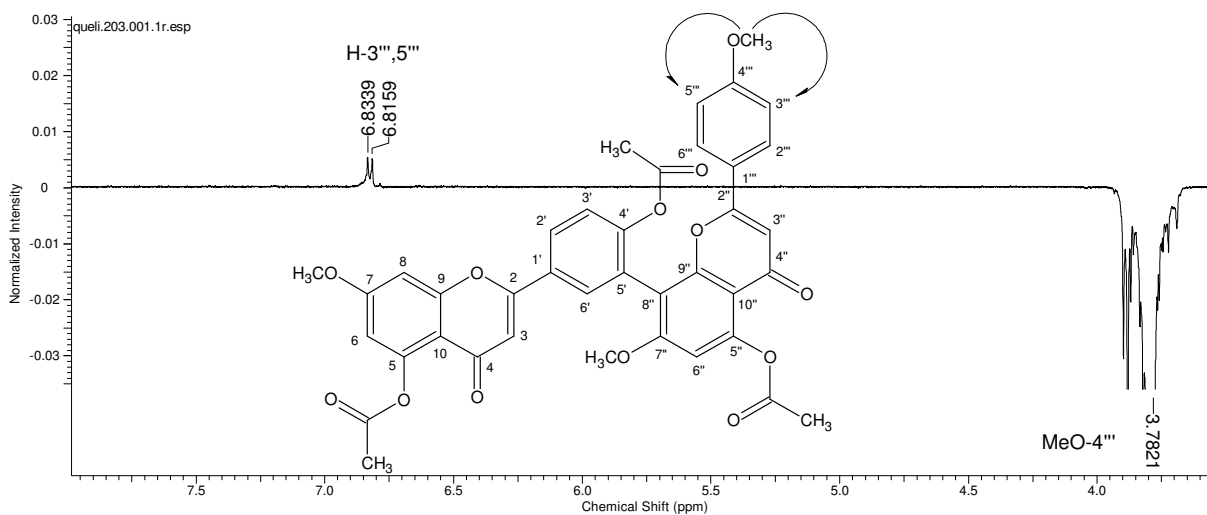


Figura 63. Espectro de NOEDIFF (500 MHz, CDCl_3) da substância **10a** com irradiação na frequência 3,78.

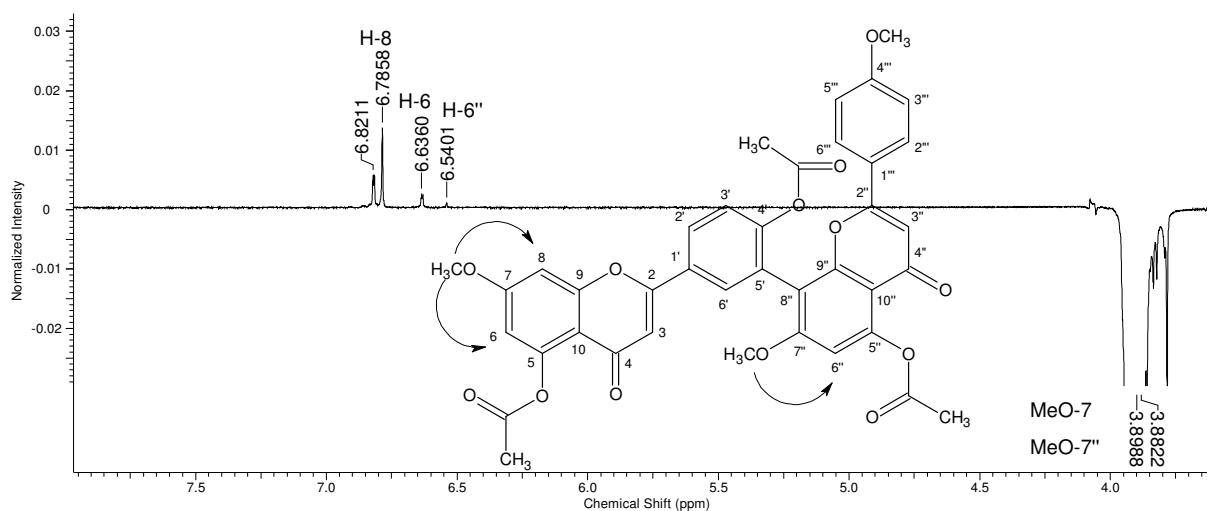


Figura 64. Espectro de NOEDIFF (500 MHz, CDCl_3) da substância **10a** com irradiação na frequência 3,88-3,89.

2.6.13. Ácido p-hidroxi-benzóico (11) isolado de OSFM-PA

Os experimentos de RMN ^1H e ^{13}C (**Figura 65 e 66**, p. 93) mostraram sinais compatíveis para esqueleto de composto aromático para-substituído. Foi observado um par de duplete em δ_{H} 7,72 (H-2/6) e 6,67 (H-3/5), com $J = 8,5$ Hz, no espectro de RMN ^1H . No experimento de RMN ^{13}C foram observados os sinais: δ_{C} 170,6 atribuído ao carbono de carboxila ligado a sistema aromático, 159,2 característico de carbono de sistema aromático ligado a hidroxila e os sinais 131,2 (C-2/6) e 114,3 (3/5) foram conferidos aos carbonos metínicos de sistema AA'XX'. A análise desses espectros e comparação com os dados da literatura (RUKACHAISIRIKUL et al., 2010) permitiram chegar na estrutura do ácido p-hidroxi-benzóico (11), como mostrado na **Tabela 17**, p. 93.

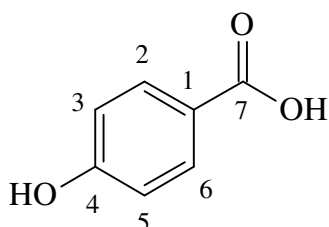


Tabela 17. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **11** em comparação com dados da literatura para ácido p-hidroxi-benzóico (RUKACHAISIRIKUL et al., 2010).

C	Substância 11 500 MHz, (DMSO- d_6)		Ácido p-hidroxibenzoico 300 MHz, (CDCl_3)	
	δ_{C}	δ_{H} (mult. J)	δ_{C}	δ_{H} (mult. J)
1	-		121,7	
2/6	131,2	7,72 d; 8,5 Hz	131,8	7,93 d, 8,7 Hz
3/5	114,3	6,67 d; 8,5 Hz	115,1	6,93 d, 8,7 Hz
4	159,2		161,8	
7	170,6		166,9	

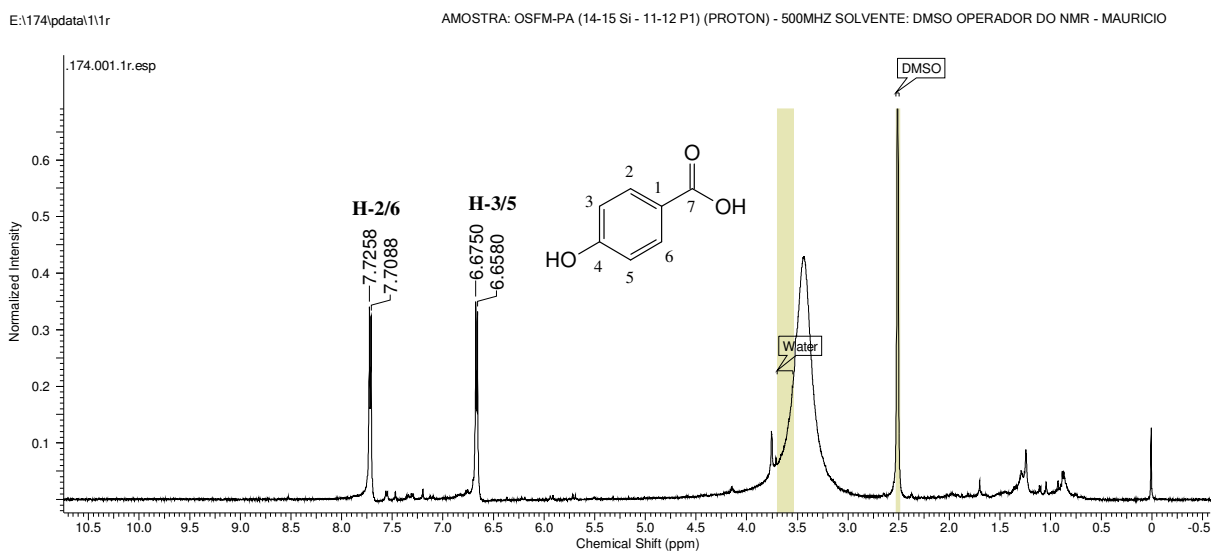


Figura 65. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da substância **11**

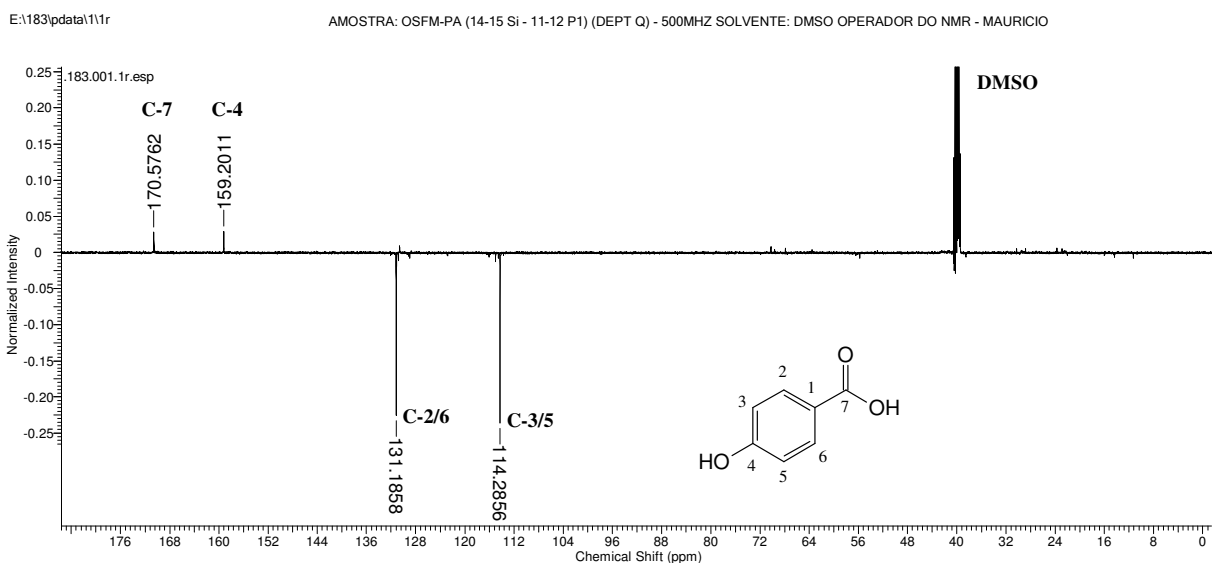


Figura 66. Espectro de RMN ^{13}C DEPTQ (125 MHz, DMSO- d_6) da substância **11**

2.6.14. Ácido 3,4-diidroxi-benzóico (**12**) isolada de OSFM-PA

Os experimentos de RMN ^1H e ^{13}C (**Figura 67**, p. 94 e **68**, p. 95) mostraram sinais compatíveis com os sinais esperados para esqueleto de composto aromático tri-substituído. No espectro de RMN ^1H foram observados sinais de hidrogênios em δ_{H} 7,32 (s, H-6) e 7,21 (dd; H-7; 8,2; -) 6,53 (d, H-3, 8,2 Hz). No experimento de RMN ^{13}C foram observados os sinais: 170,7 atribuído ao carbono de carboxila ligado a sistema aromático, 144,9 foi atribuído ao carbono C-4 e 148,6 ao carbono C-5 e os demais sinais 121,5 (C-7), 117,8 (C-3) e 115,3 (C-6) foram atribuídos aos carbonos metínicos do anel aromático de sistema ABC. A análise desses espectros e comparação com os dados da literatura (FLAMINI et al., 2001) permitiram chegar na estrutura do ácido 4,5-dihidroxi-benzóico ou ácido protocatecuíco (**12**), como mostrado na **Tabela 18**.

Tabela 18. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **12** em comparação com dados da literatura para ácido 3,4-dihidroxi-benzóico (FLAMINI et al., 2001)

	Substância 12 500 MHz (CDCl ₃)	Ácido protocatecuíco 50 MHz (CD ₃ OD)
1		-
2	7,32 (s)	115,3
3		144,9
4		148,6
5	7,21 (dd, 8,2 Hz)	117,8
6	6,63 (d, 8,2 Hz)	121,5
7		170,7

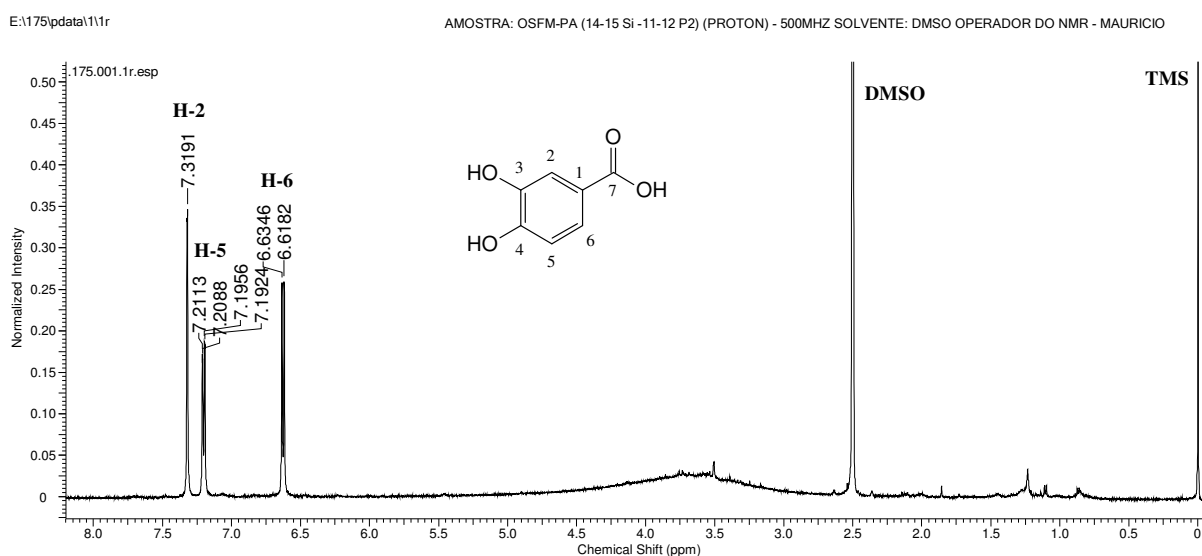


Figura 67. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da substância **12**

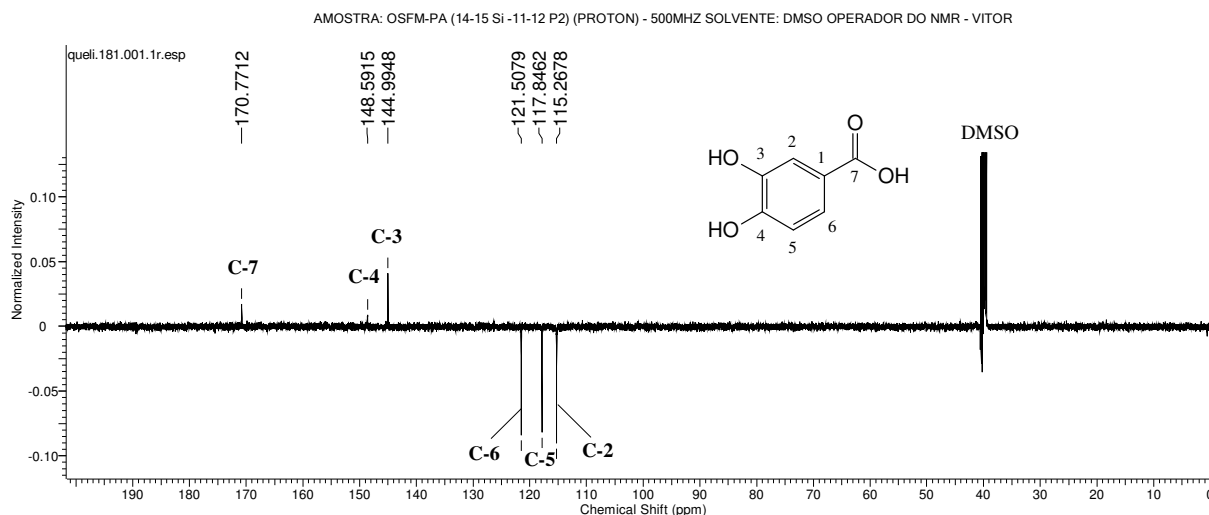


Figura 68. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) da substância **12**

2.6.15. Ácido 2-hidroxi-5-*O*-(6'-*O*-(4-hidroxybenzoyl)- β -D-glicopiranosil)-benzóico (**13**) isolado de OSFM-PA

A substância **13** foi identificada por RMN ^1H e ^{13}C , HSQC e HMBC os quais evidenciaram a presença de um carboidrato com uma porção aromática. No espectro de RMN ^1H (**Figuras 69 e 70**, p. 97) foi observado um sistema AA'XX' em δ_{H} 7,83 (d; 8,5 Hz) e 6,89 (d; 8,5 Hz) e um sistema ABC em δ_{H} 7,42 (d; 3,1 Hz; H-6'), 6,94 (dd; 8,8 e 3,1 Hz; H-4') e 6,47 (d; 8,8 Hz; H-3'). Na região de carboidrato foi observado um duplete em 4,72 com $J=7,5$ Hz atribuído a H-1. Os sinais em δ_{H} 4,53(d; 10,4 Hz; H-6); 4,18 (m, H-6) e entre δ_{H} 3,59 e 3,24 (H-2, H-3, H-4, H-5) são atribuídos aos hidrogênios da unidade de glicose. No espectro de RMN ^{13}C (**Figuras 71 e 72**, p. 98) foi observado um sinal em δ_{C} 102,3 típico de carbono anomérico (C-1), em δ_{C} 76,8 (C-3); 74,1 (C-5); 73,7 (C-2); 70,7 (C-4) e 64,3 (C-6) são encontrados os demais sinais que confirmam a estrutura da glicose. Os sinais em δ_{C} 171,9 (C-7') e 165,9 (C-7'') foram atribuídos a carboxila e carbonila de éster conjugada, respectivamente. Carbonos quaternários foram observados em δ_{C} 162,6; 157,8 e 148,6 e atribuídos a H-4'', H-2' e H-5', respectivamente. Os sistemas AA'XX' [132,0 (C-2'/6') e 115,8 (C-3'/5')] e ABC [121,1 (C-4'); 118,5 (C-6') e 116,1 (C-3')] observados no espectro de RMN ^1H foram confirmados no espectro de RMN ^{13}C . O espectro de HSQC (**Figuras 73**, p. 99 e **74**, p. 100) mostrou acoplamentos heteronucleares (1J) que estão de acordo com os sinais observados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C . O espectro de HMBC mostrou acoplamentos heteronucleares (^{2-3}J) (**Figuras 75**, p. 101; **76**, p. 102 e **77**, p. 103). O sistema ABC aparece ligado a glicose por uma ligação C-O-C entre o oxigênio em C-5' com o carbono anomérico C-1, o acoplamento de δ_{H} 4,73 (H-1) com δ_{C} 148 (C-5') confirma a proposta. Já o sistema

AA'BB' esta ligado ao oxigênio do C-6 por uma ligação de esterificação confirmada pelos acoplamentos de δ_H 4,53 (H-6a) e 4,18 (H-6b) com δ_C 165,2 (C-7''). Devido a presença de dois átomos de oxigênio no sistema ABC foi realizado o experimento de NOEIFF (**Figura 79**, p. 104, comparar com o espectro de RMN 1H , **Figura 78**) para verificar quais hidrogênios do sistema ABC estão próximos do hidrogênio anomérico. O sinal em δ_H 4,72 (H-1) foi irradiado e observou-se nOe em (H-4') e (H-6') que confirmaram a proposta. Na tabela **19** encontram-se os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para a substância **13**. A análise desses dados foi comparada com dados da literatura que permitiram identificar a substância **13** como sendo a parmentina B (ABDEL-WAHAB et al., 2014).

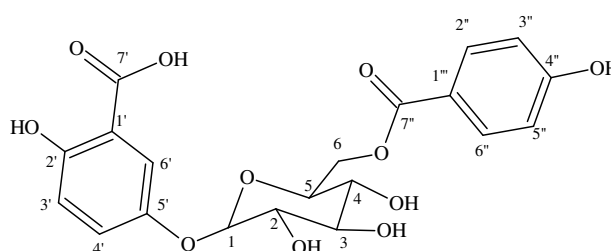
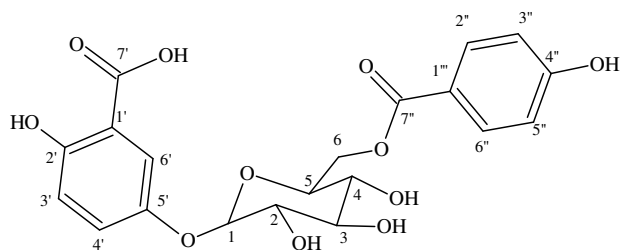


Tabela 19. Dados de RMN 1H e ^{13}C da substância **13**

	Substância 13 (500 MHz, DMSO-d ₆)		Parmentina B (400 MHz, CD ₃ OD)	
	δ_C	δ_H (mult. J)	δ_C	δ_H (mult. J)
1	102,3	4,72 (d; 7,5 Hz)	103,5	4,82 (d; 9,0 Hz)
2	73,7	3,52 m	75,5	3,74 m
3	76,8	-	78,3	3,52 m
4	70,7	3,24 m	72,0	3,42 m
5	74,5	3,52 m	75,0	3,40 m
6	64,3	4,53 (d; 10,4 Hz) 4,18 (dd; 7,2 e 11,5 Hz)	65,1	4,64 (dd; 12,0 e 2,4 Hz) 4,33 (dd; 12,0 e 7,2 Hz)
1'	120,7	-	120,5	-
2'	157,8	-	158,0	-
3'	116,1	6,47 (d; 8,8 Hz)	117,5	6,63 (d; 9,0 Hz)
4'	121,2	6,93 (dd; 2,8 e 8,8 Hz)	124,5	6,87 (d; 8,9 Hz)
5'	148,6	-	150,7	-
6'	118,5	7,42 (d; 2,8 Hz)	119,9	7,52 (d; 3,0 Hz)
7'	171,9	-	175,0	-
1''	120,6	-	122,2	-
2''/6''	132,0	7,83 (d; 8,5 Hz)	133,1	7,87 (d; 8,9 Hz)
3''/5''	115,9	6,89 (d; 8,5 Hz)	116,3	6,81 (d; 8,9 Hz)
4''	162,6	-	163,7	-
7''	166,0	-	167,5	-



RMN\queil\157\pdata\111r

AMOSTRA: OSFM-PA 14-15/Si33-34 (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - VITOR

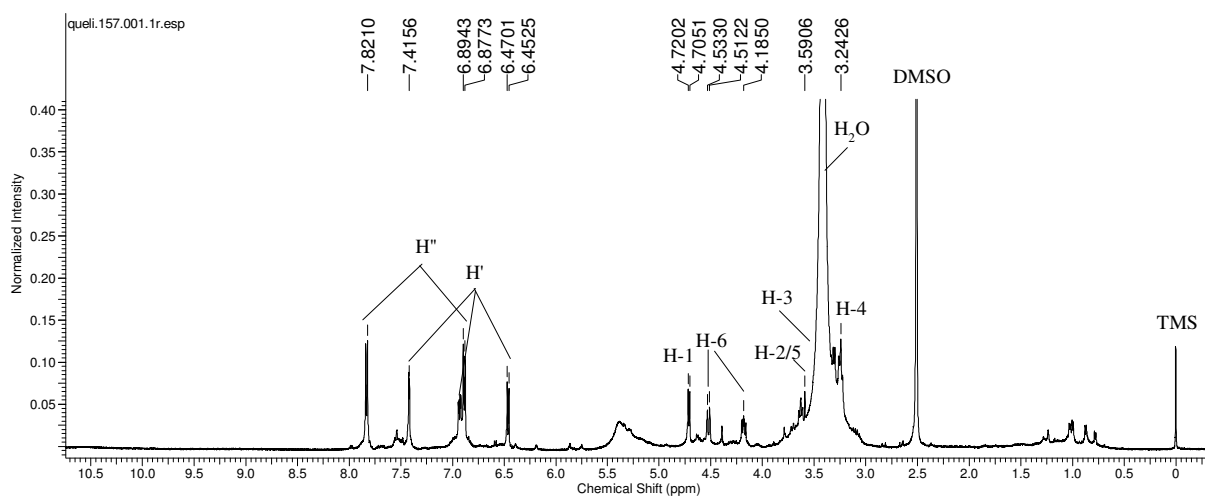


Figura 69. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da substância **13**

RMN\queil\157\pdata\111r

AMOSTRA: OSFM-PA 14-15/Si33-34 (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - VITOR

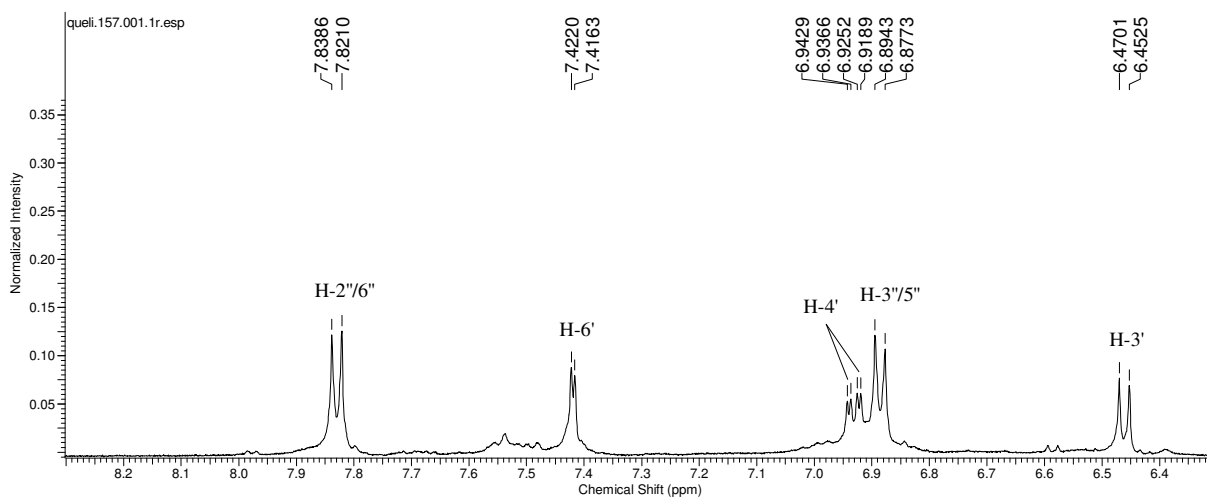


Figura 70. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da substância **13**

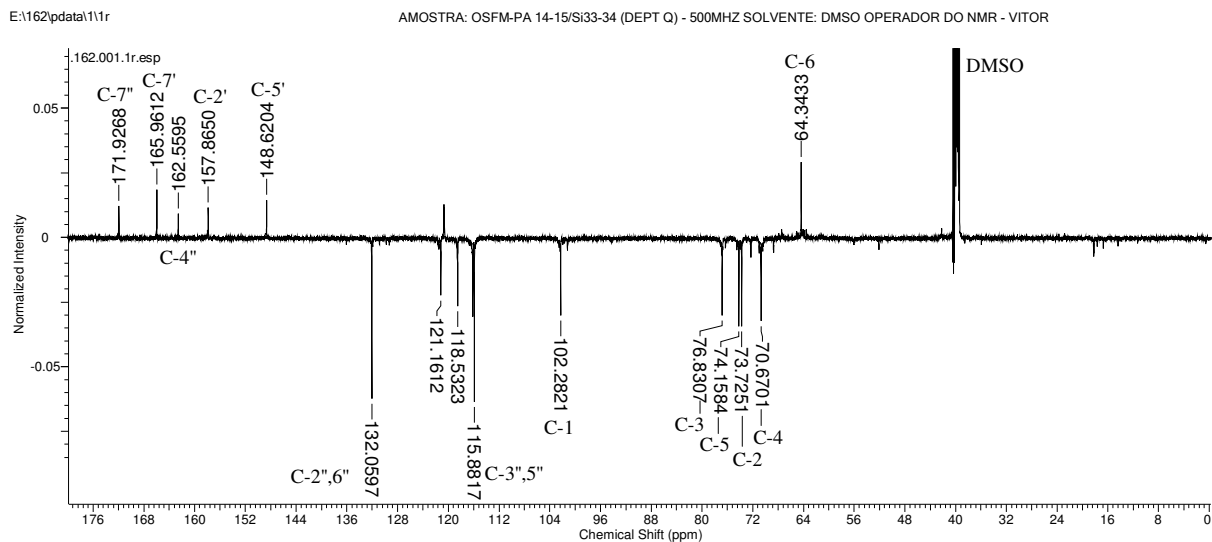


Figura 71. Espectro de RMN ^{13}C DEPTQ (125 MHz, DMSO- d_6) da substância **13**

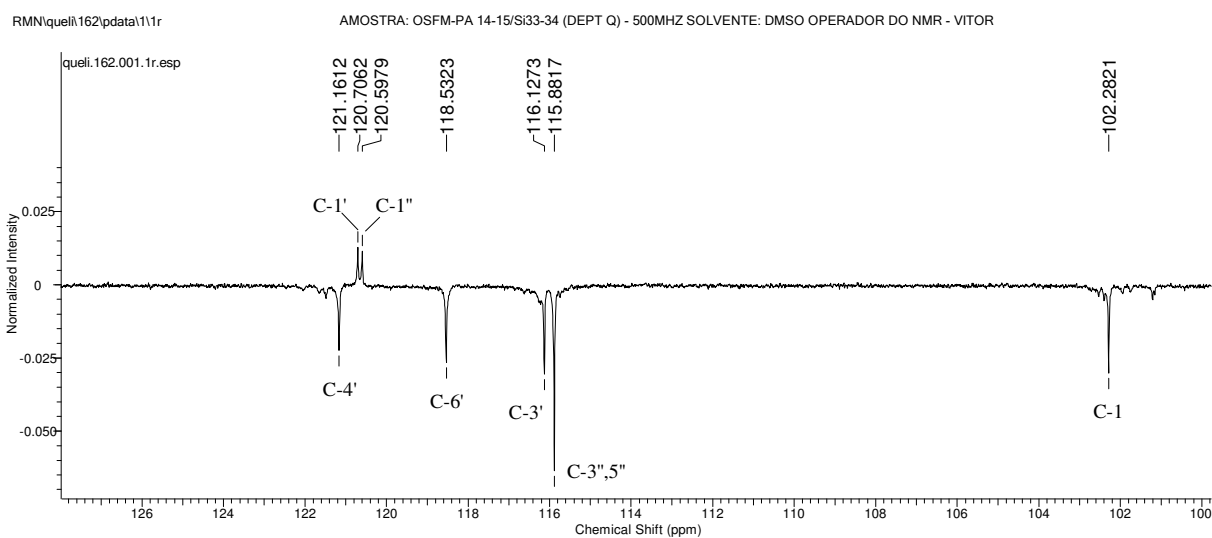
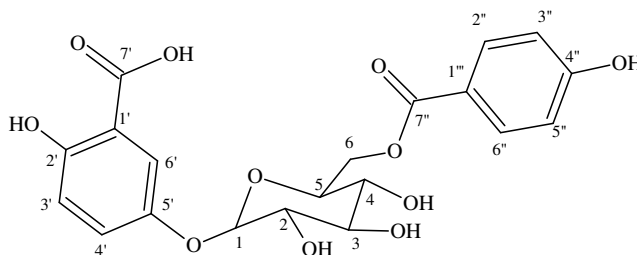


Figura 72. Expansão do espectro de RMN ^{13}C DEPTQ (125 MHz, DMSO- d_6) da substância **13**



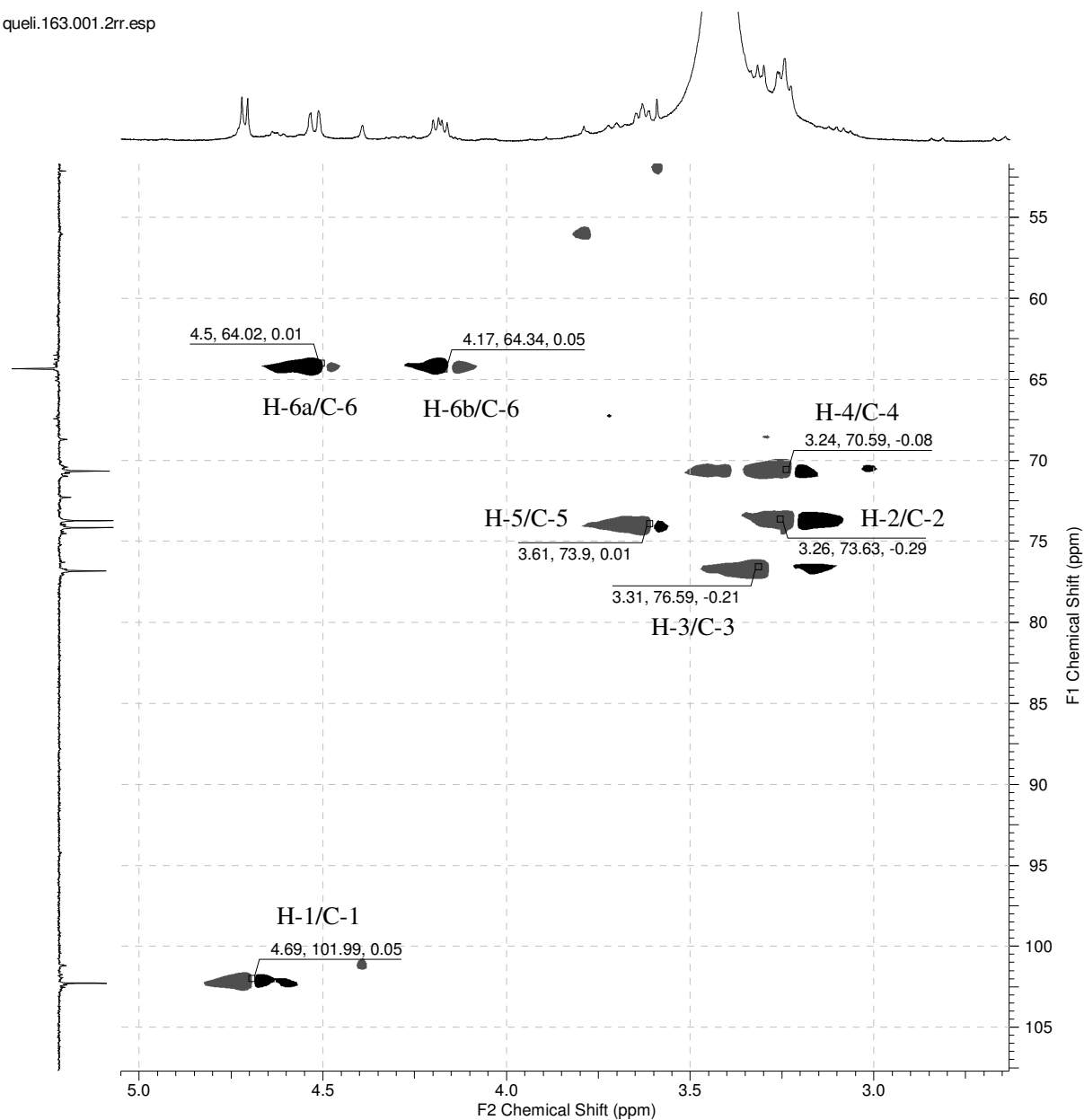
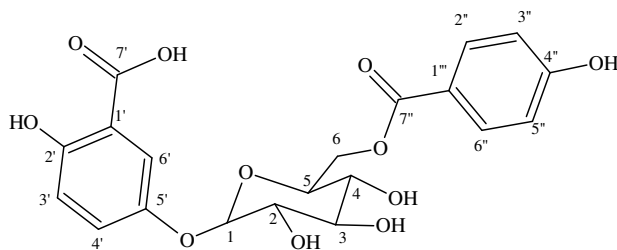


Figura 73. Expansão do mapa de contorno de HSQC (500 MHz, DMSO-d₆) da substância **13**



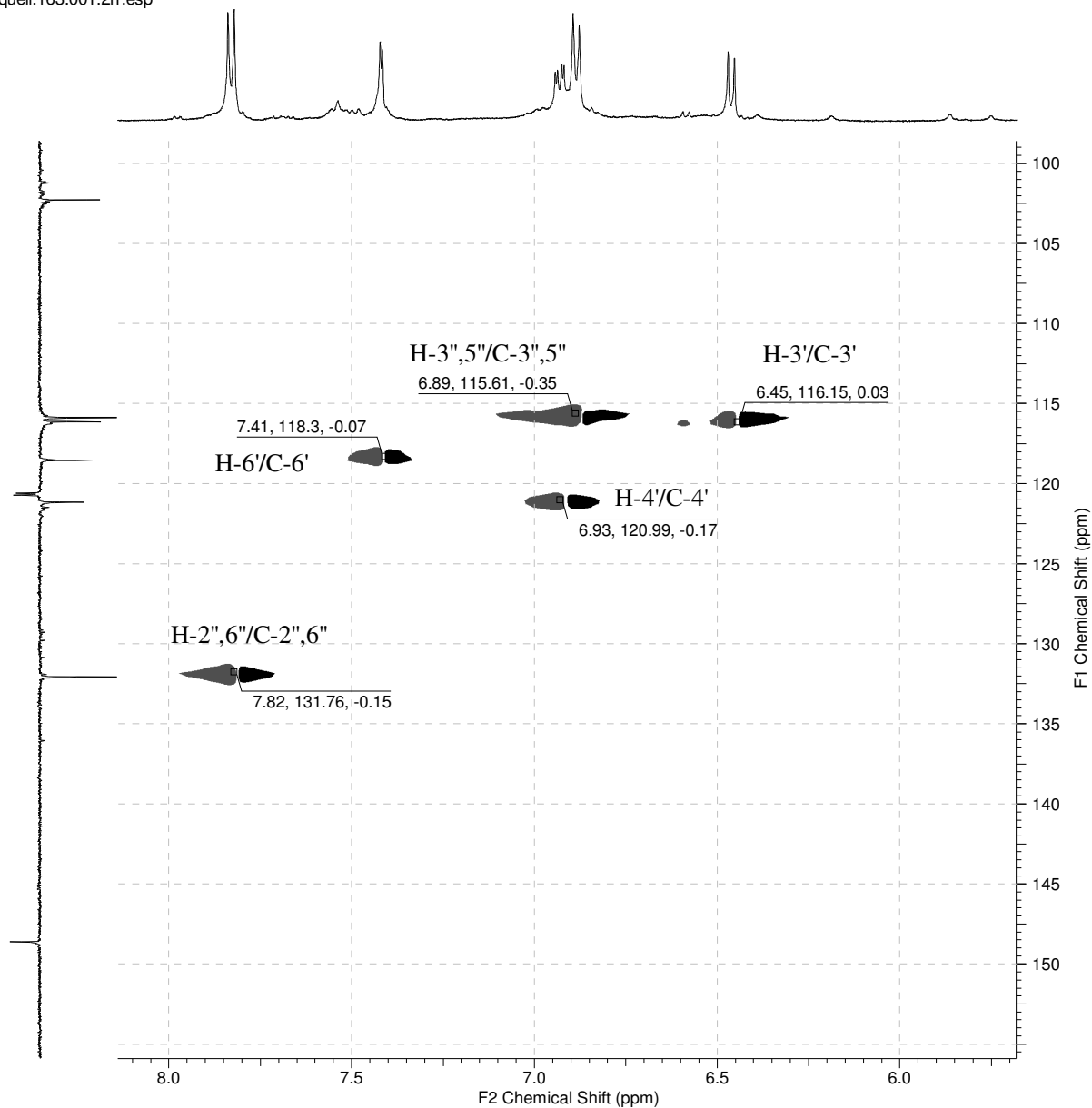
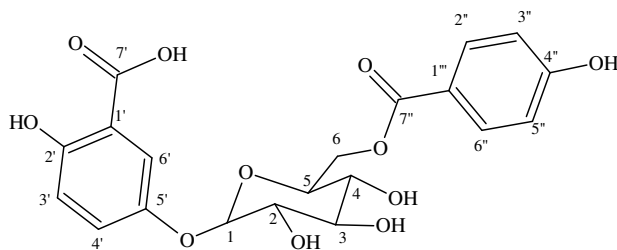


Figura 74. Expansão do mapa de contorno de HSQC (500 MHz, DMSO- d_6) da substância **13**



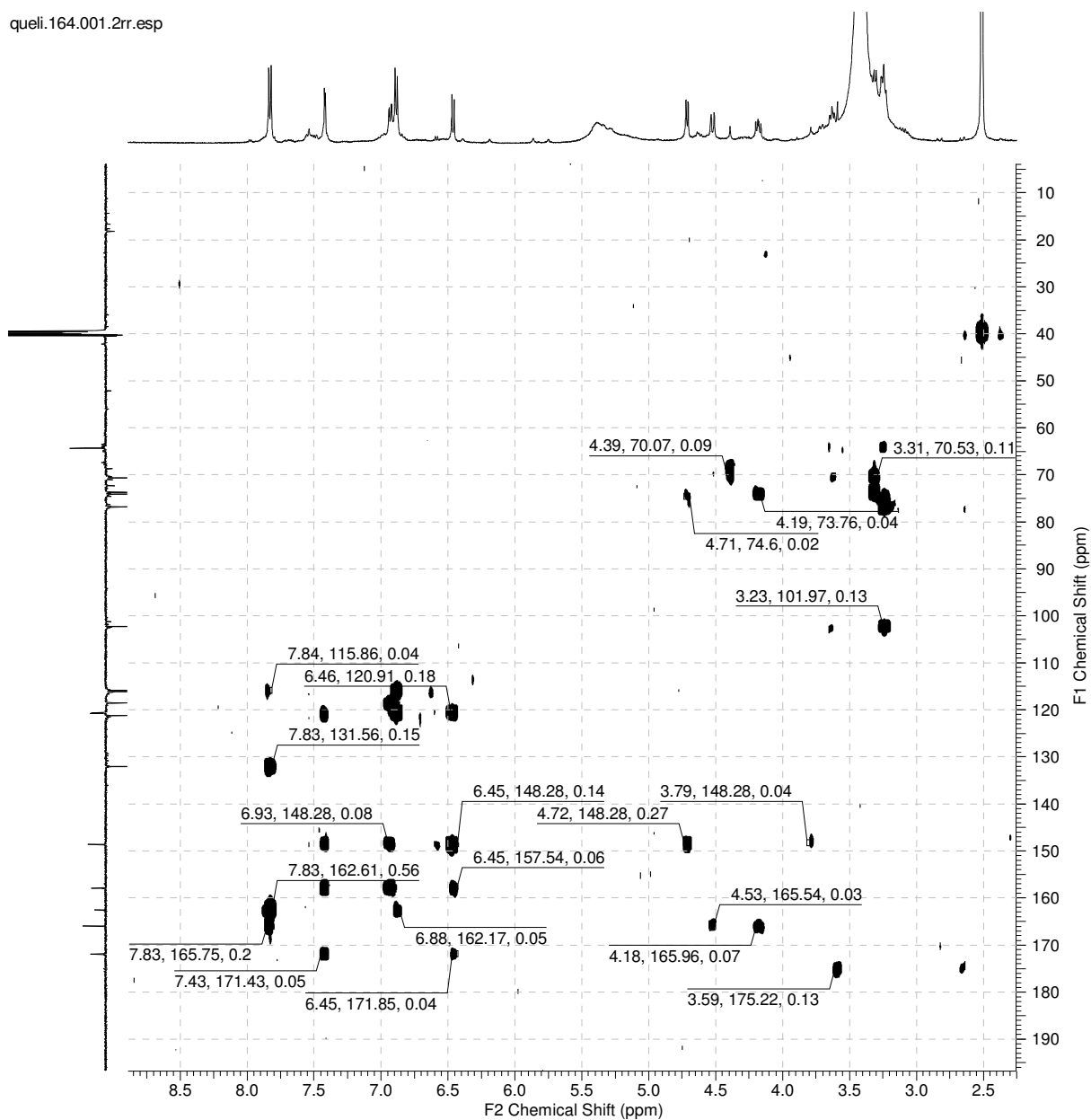
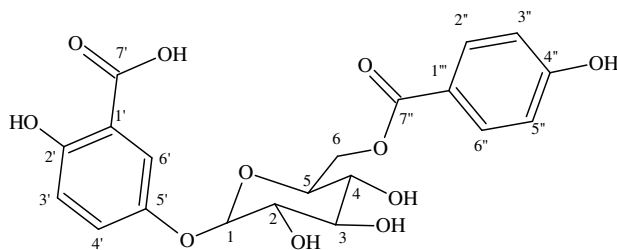


Figura 75. Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, DMSO-d₆) da substância 13



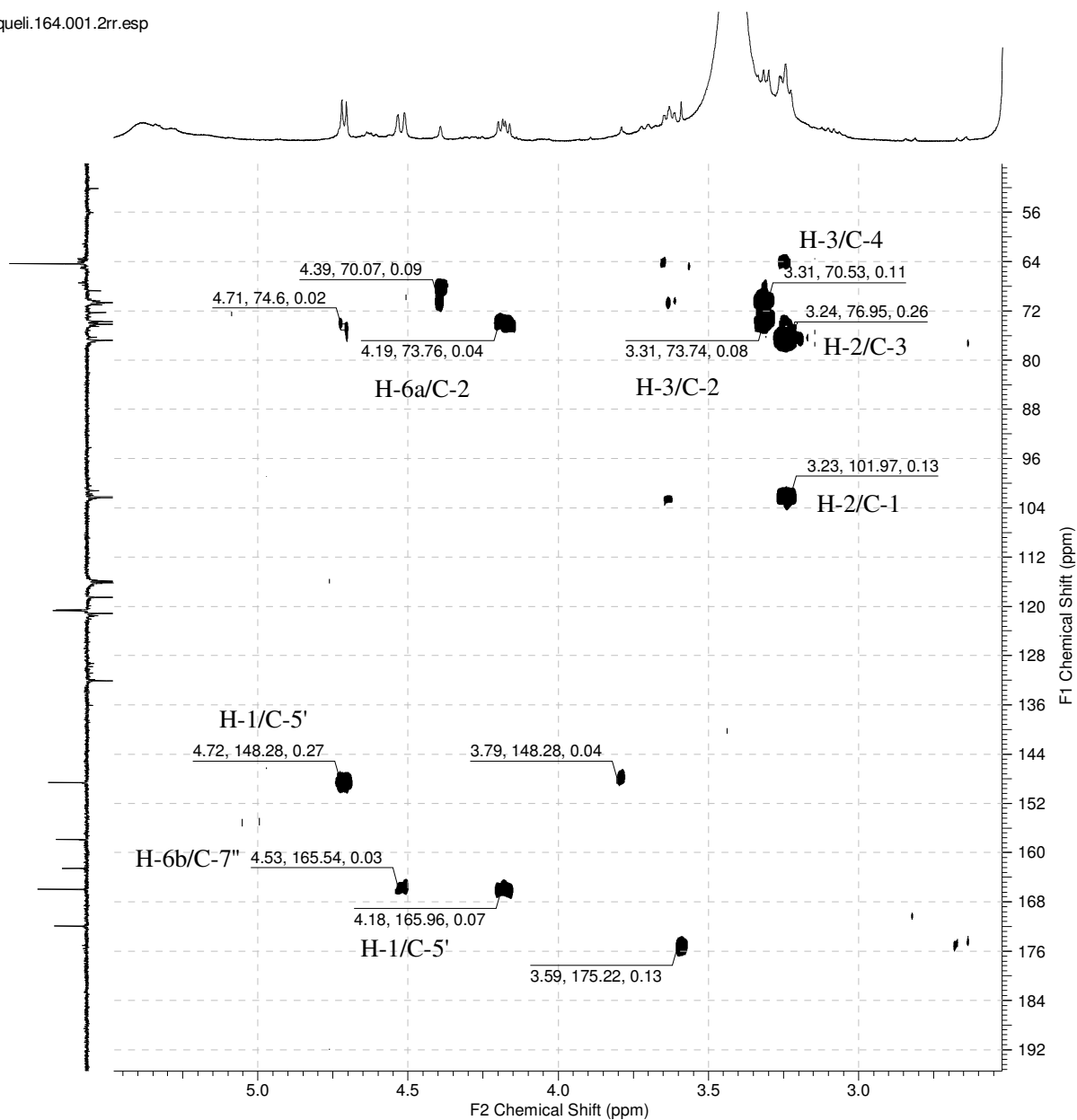
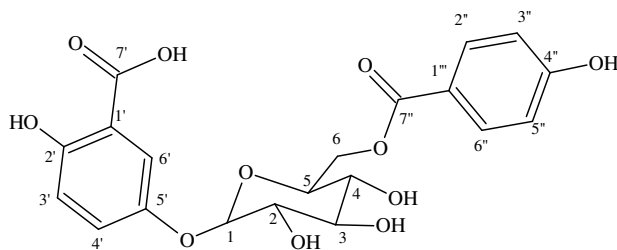


Figura 76. Expansão do mapa de contorno de HMBC (500 MHz, DMSO-d₆) da substância **13**



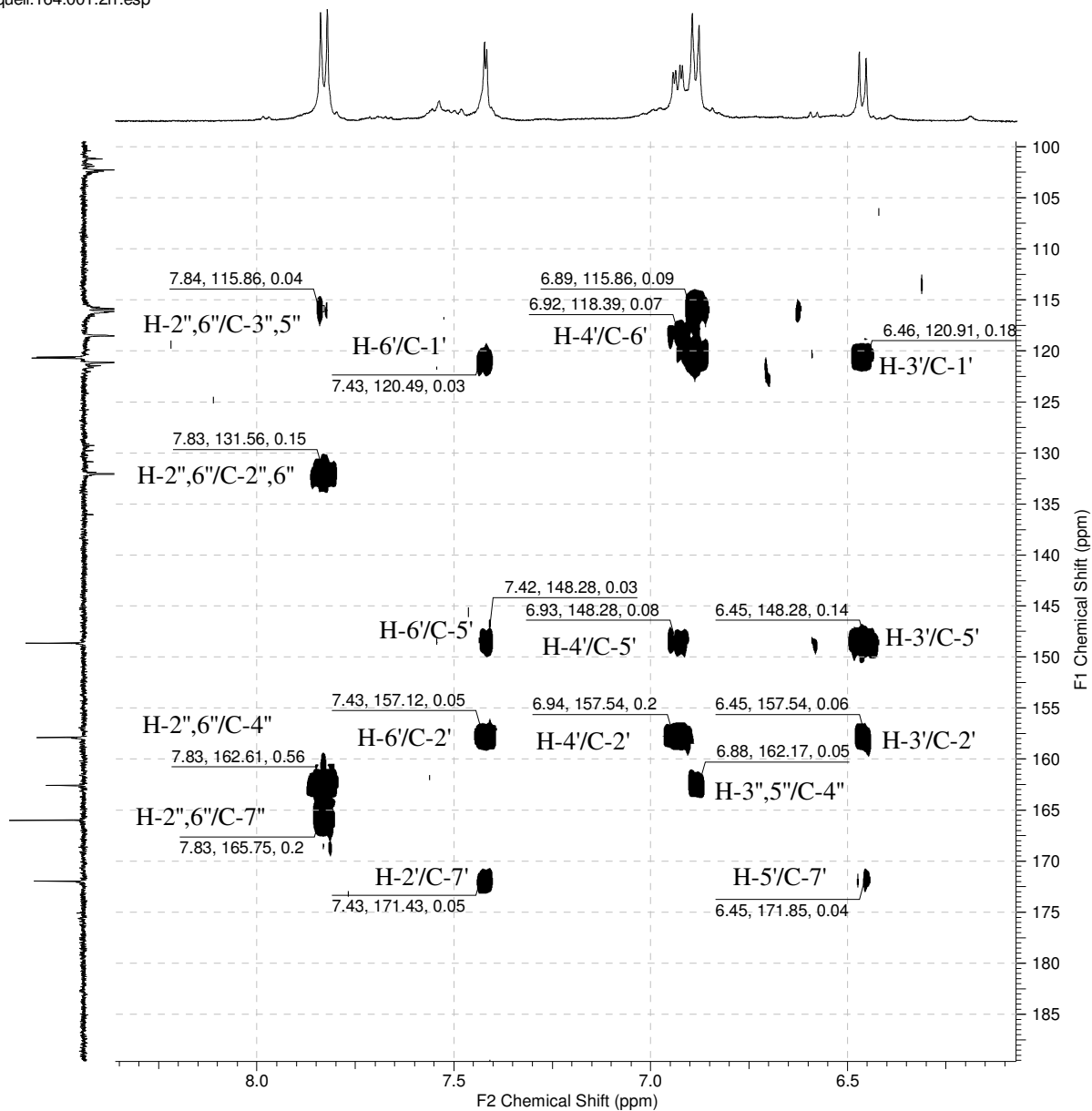
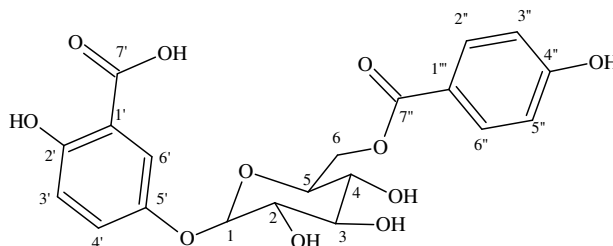


Figura 77. Expansão do mapa de contorno de HMBC (500 MHz, DMSO-d₆) da substância 13



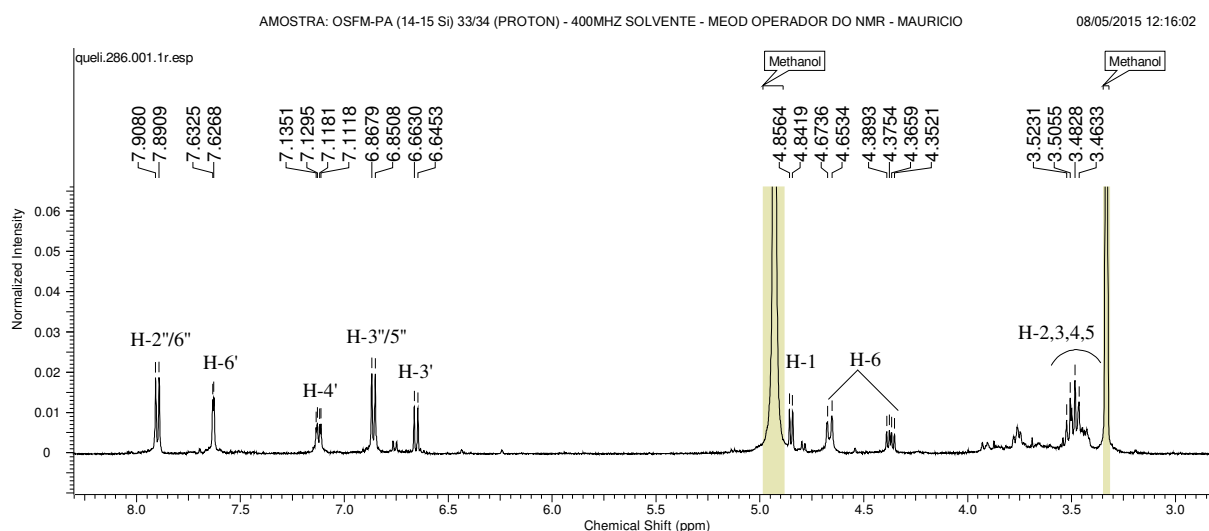


Figura 78. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da substância **13**.

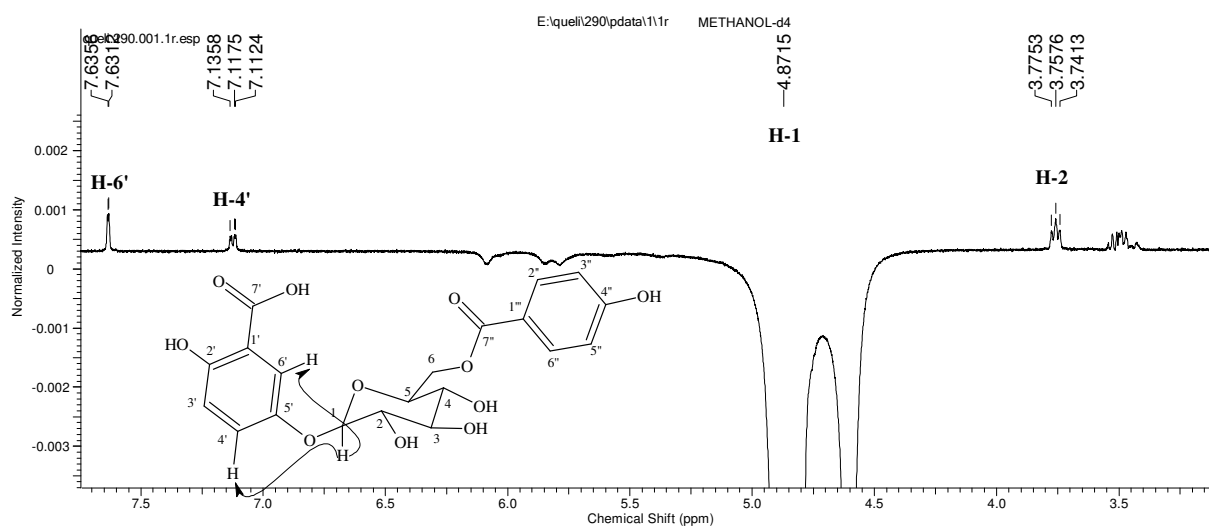


Figura 79. Espectro de NOEDIFF (500 MHz, MeOD) da substância **13** com irradiação na frequência 4,87.

2.6.16. Ácido 2-hidroxi-5-O-(β -D-glicopiranosil)-benzóico (**14**) isolada de OSFM-PA

A substância **14** apresentou coloração castanho-avermelhada e foi identificada por RMN ^1H e ^{13}C e técnicas bidimensionais. O espectro de RMN ^1H (**Figura 80**, p. 106 e **81**, p. 106) apresentou sinais em δ_{H} 7,61 (d; 2,5 Hz; H-6'); 7,11 (dd; 2,5 e 7,0 Hz; H-4') e 6,74 (d; 7,0 Hz; H-3') na região de hidrogênio aromático, os quais são compatíveis para sistema ABC. Em δ_{H} 4,79 (d; 5,8 Hz; H-1') foi observado um sinal característico de hidrogênio carbinólico indicando a presença de uma unidade de glicose, a qual foi confirmada pelos demais sinais em δ_{H} 3,92 (H-6'); 3,46 (H-2' e H-5') e 3,42 (H-3' e H-4'). No espectro de RMN ^{13}C (**Figura 82**, p. 106) foi observado sinais de carbono metínicos, δ_{C} 116,1 (C-3); 118,2 (C-6) e 122,3 (C-4)

que confirmam a o sistema ABC, além de dois sinais de carbono quaternários em δ_C 156,6 (C-2) e 149,5 (C-5). Os sinais característicos de glicose foram observados em δ_C 102,3 (H-1'); 76,6 (H-5'); 76,6 (H-3'); 73,6 (H-2'); 69,9 (H-4') e 61,0 (H-6'). O espectro de HSQC, **Figura 83**, p. 107, apresentou interações heteronucleares (1J) que confirmam a atribuição feita para os sinais de 1H e ^{13}C . O espectro de HMBC, **Figura 84**, p. 108, mostrou interações heteronucleares (^{2-3}J), foram observadas as interações: H-3/C-5, H-3/C-6, H-4/C-2, e H-1'/C-5, este último acoplamento mostra que o C-1' da glicose está ligada ao oxigênio ligado a C-5. Um simpleto em δ_H 8,56 evidencia a presença de uma hidroxila de ácido confirmando a proposta. Os dados da substância **14** foram comparados à dados da literatura que levaram a identificação do ácido gentísico-5-O- β -D-glicosídeo, e seus dados de RMN 1H e ^{13}C são mostrados na **Tabela 20**, p. 104.

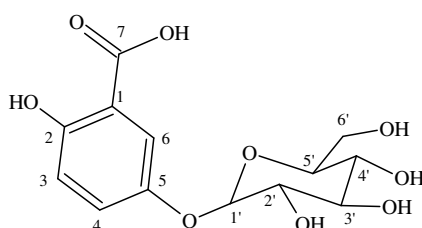


Tabela 20. Dados de RMN 1H e ^{13}C da substância **14**

	Substância 14 (500 MHz, MeOD)		Ácido gentísico 5-O-β-D-glicosídeo	
	δ_C	δ_H (mult. <i>J</i>)	δ_C	δ_H (mult. <i>J</i>)
1	–		113,8	
2	156,6		158,7	
3	116,1	6,74 (d; 7,0 Hz)	119,1	6,85 (d; 9,3 Hz)
4	122,3	7,11 (dd; 2,5 e 7,0 Hz)	126,9	7,29 (dd; 2,9 e 8,8 Hz)
5	149,5		151,3	
6	118,2	7,61 (d; 2,5 Hz)	118,8	7,59 (dd, 2,9 Hz, -)
7	-		173,1	
1'	102,3	4,79 (d; 5,8 Hz)	103,6	4,78 (d, 7,3 Hz)
2'	73,6	3,46 m	74,9	3,44 - 3,39 m
3'	76,6	3,42 m	78,1	3,44 - 3,39 m
4'	69,9	3,42 m	71,3	3,44 - 3,39 m
5'	76,6	3,46 m	77,9	3,44 - 3,39 m
6'	61,0	3,90 e 3,74 (dd; 9,8 Hz e -)	62,4	3,88 e 3,71 (dd; 4,2 e 11,7 Hz)

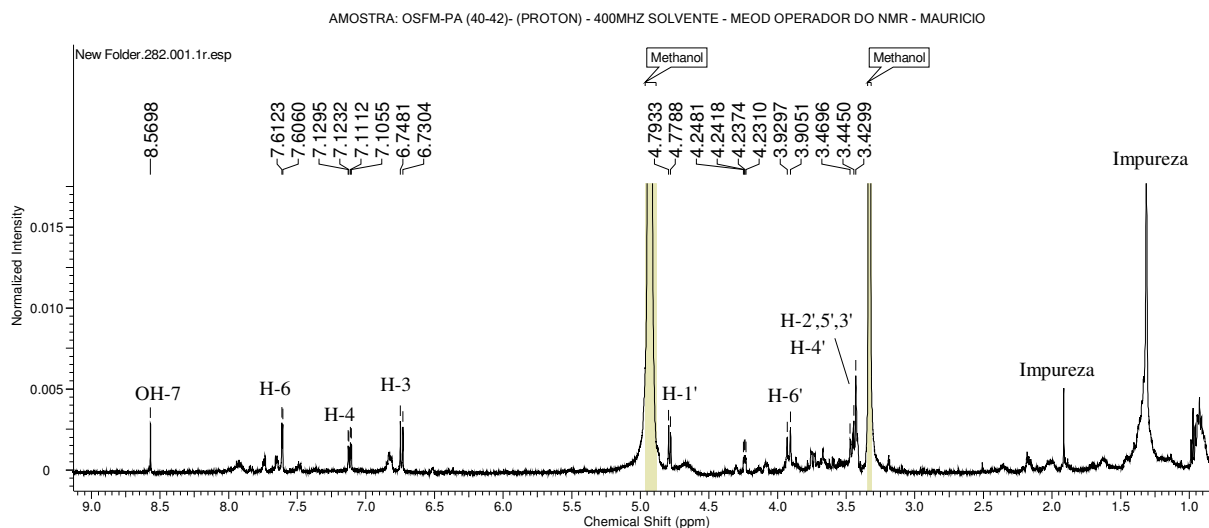


Figura 80. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD) da substância **14**

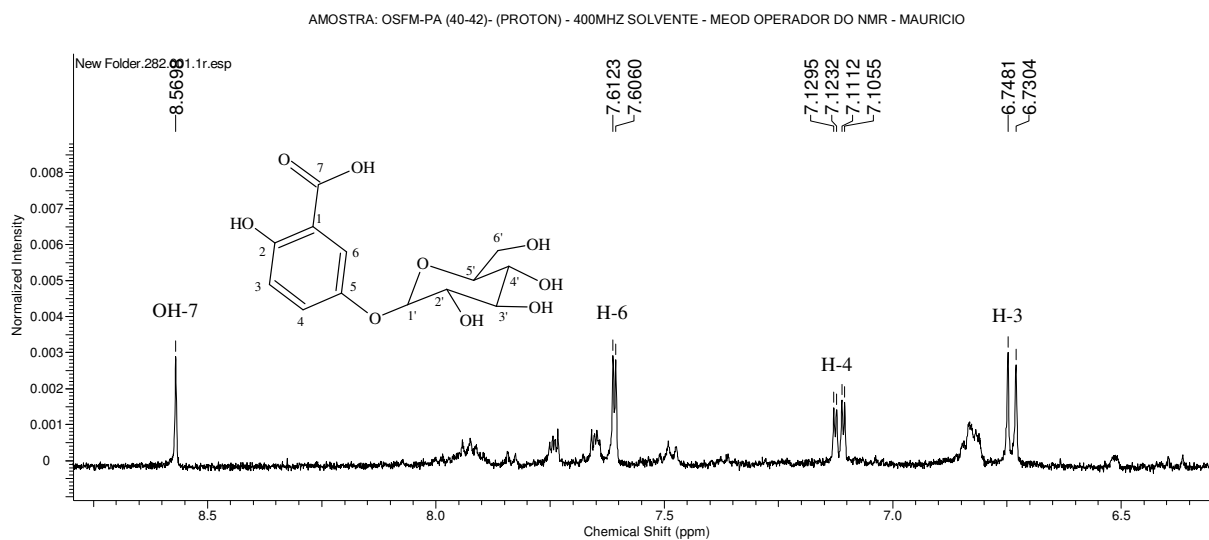


Figura 81. Expansão do espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD) da substância **14**

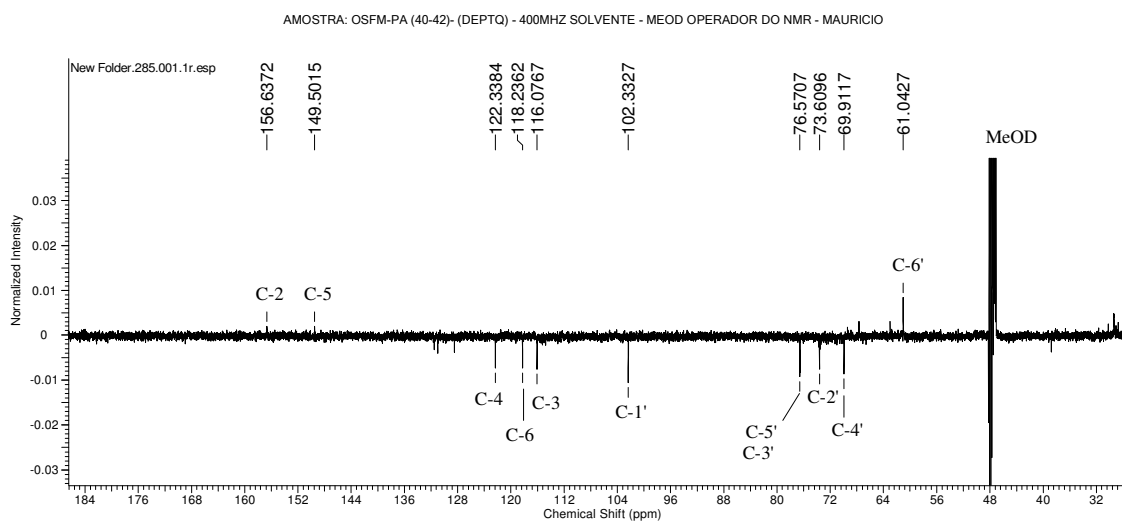


Figura 82. Espectro de RMN ^{13}C DEPTQ (100 MHz, MeOD) da substância **14**

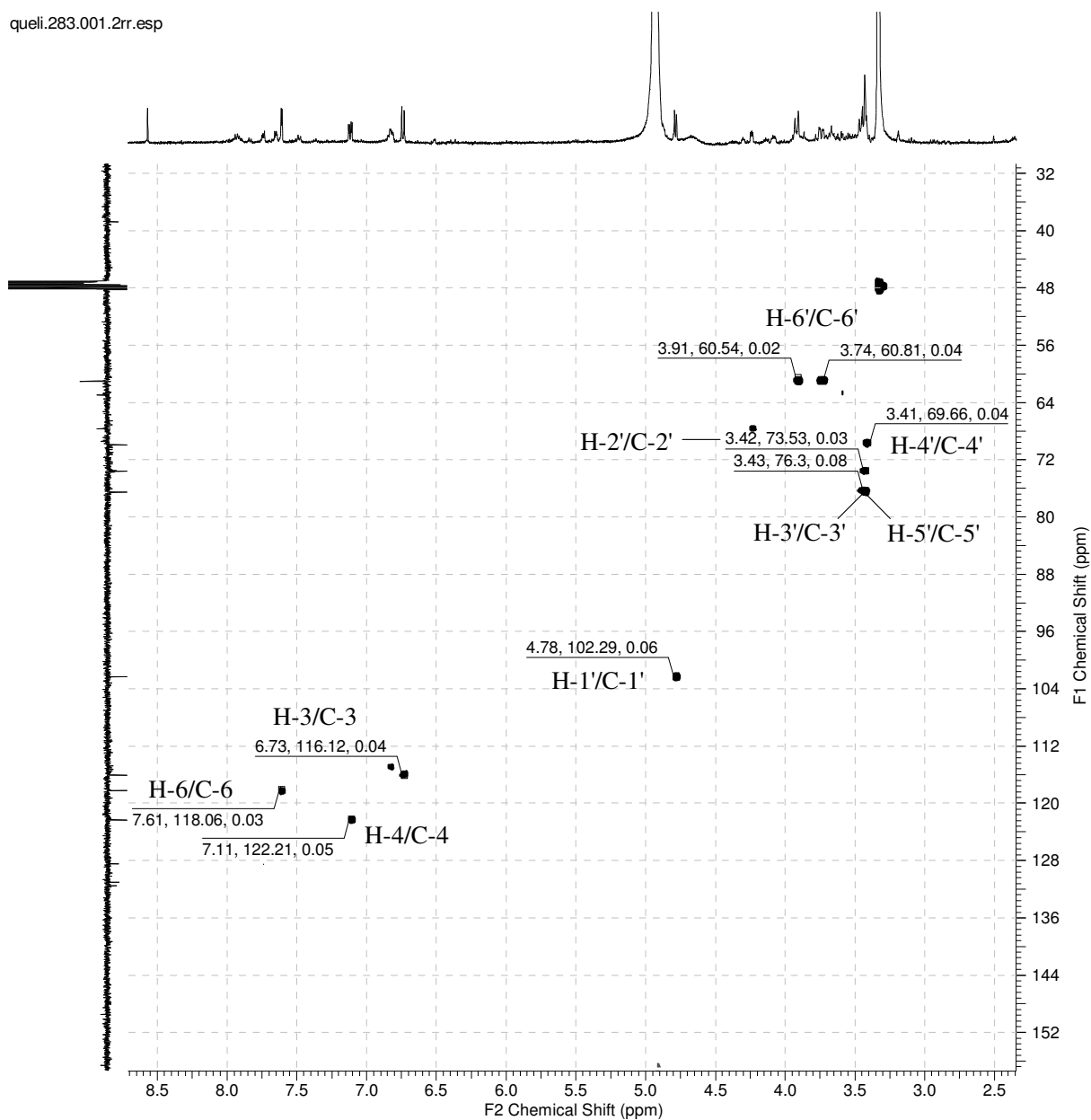
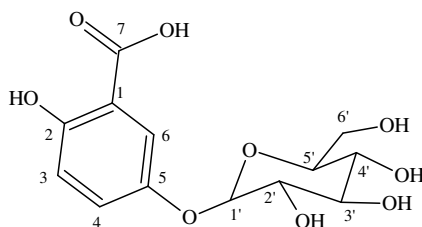


Figura 83. Mapa do contorno de HSQC (400 MHz, MeOD) da substância 14



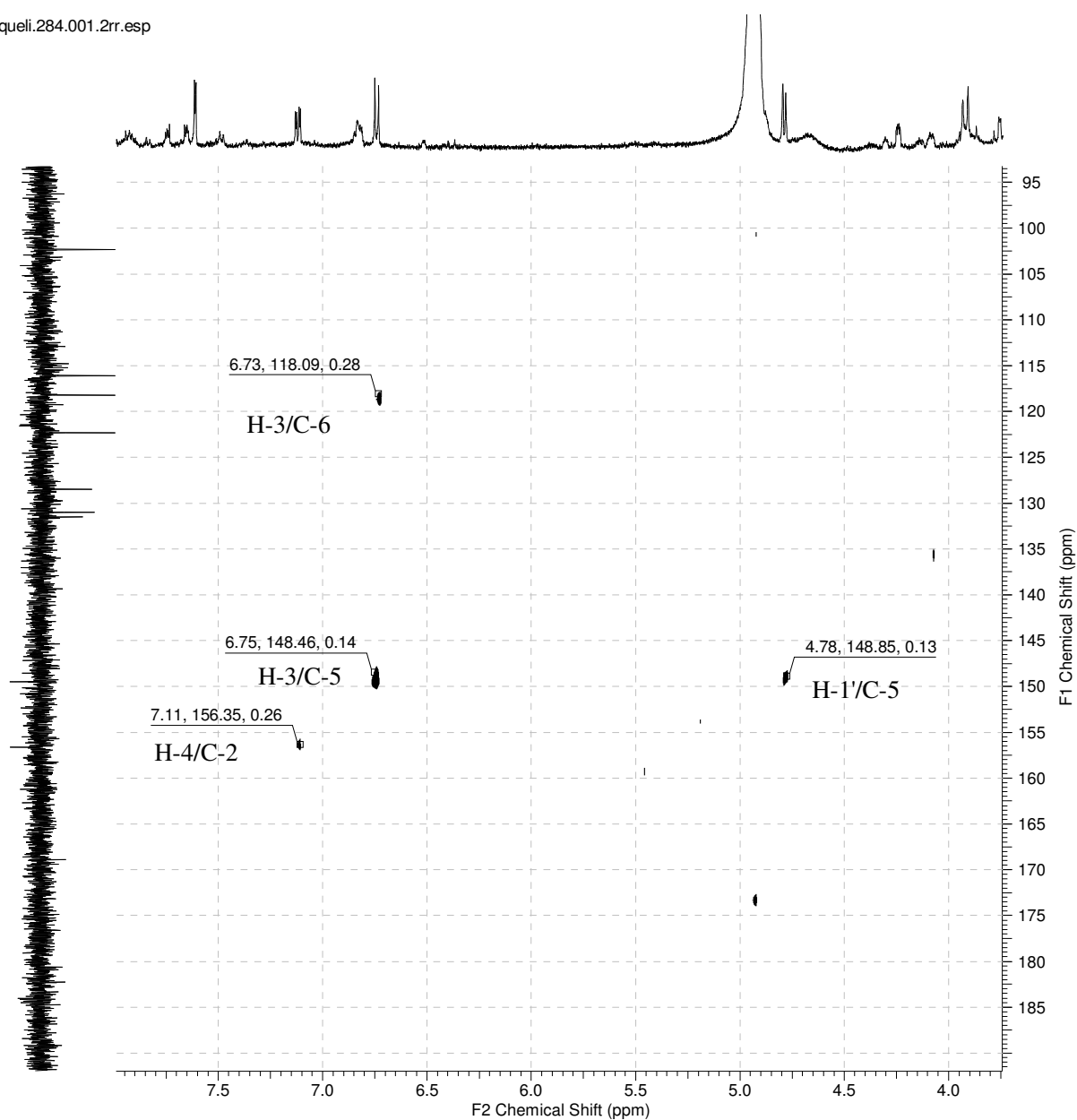
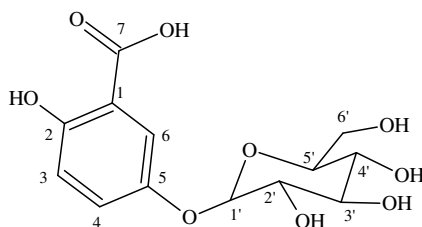
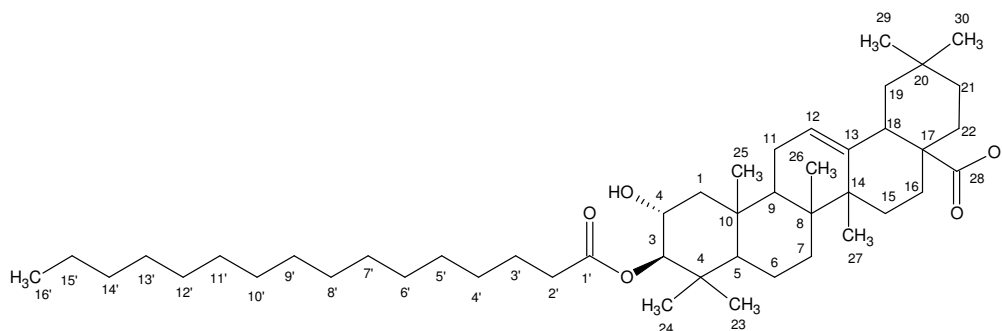


Figura 84. Mapa do contorno de HMBC (400 MHz, MeOD) da substância **14**



2.6.17. Ácido 3 β -*O*-acil-maslínico (15) isolada de OCFAPH

A substância **15** foi determinada por RMN ^1H e ^{13}C e EM. O espectro de RMN ^1H (**Figura 85 e 86**, p. 111) mostrou sinais em δ_{H} 0,75; 0,88; 0,90; 0,92; 0,94; 1,00 e 1,15 correspondentes a sete grupos metila podendo então se tratar de uma estrutura triterpênica, em δ_{H} 2,40 foi observado um sinal característico de grupo metilênico alfa a carbonila (*t*, $J= 7,2$ Hz, H- 2'), δ_{H} 5,29 (*sl*, H-12) sinal típico de hidrogênio olefínico, δ_{H} 4,53 (*d*, $J= 10,1$ Hz, H-3) e 3,80 (*t*, H-2) sinais característicos de hidrogênio carbinólico e em δ_{H} 2,85 (*dl*, $J= 11,0$ Hz, H-18) um sinal com perfil de H-18 típico da série oleanano com carboxila em C-28. O espectro de RMN ^{13}C (**Figuras 87 e 88**, p. 112) apresentou além dos sinais de grupos metílicos [δ_{C} 16,5 (C-25), 17,6 (C-26), 17,1 (C-24), 23,6 (C-30), 25,9 (C-27), 28,5 (C-23), 33,0 (C-29)], os sinais de carbonos olefínicos em 122,48, e 143,55, duas carbonilas δ_{C} 175,5 (éster) e 184,2 (ácido). O sinal em δ_{C} 84,8 é compatível com o valor do deslocamento químico para C-3 ligado a uma hidroxila, sustentando o grupo *O*-acila. Em δ_{C} 67,8 foi observado um sinal compatível com o deslocamento químico esperado para um carbono carbinólico. Estes estão de acordo com o duplete em δ_{H} 4,56 (H-3) e um tripleto em δ_{H} 3,81 (H-2), que justificam a presença de oxidações em C-2 e C-3 do esqueleto triterpênico. A análise de espectrometria de massa (EM-IES) da substância, realizado em modo negativo, mostrou o pico m/z 709,5766 sendo reconhecido como o do íon molecular (**Figura 89**, p. 113). O valor do íon molecular é compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{46}\text{H}_{78}\text{O}_5$. O espectro obtido da segunda ionização (EM/EM) mostrou poucos fragmentos sendo o principal o de massa m/z 255,2327 que confirma a cadeia alifática com 16 carbonos ($\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}_2$). A análise destes dados espectrais e a comparação com dados registrados na literatura para o ácido maslínico (TANIGUCHI et al., 2002) e ácido oleanólico (SUZART et al., 2006) (**Tabela 21**, p.110), permitiram identificar o triterpeno como sendo o ácido 3 β -*O*-acil-maslínico (**15**). Não foram encontrados dados específicos para este triterpeno na literatura.



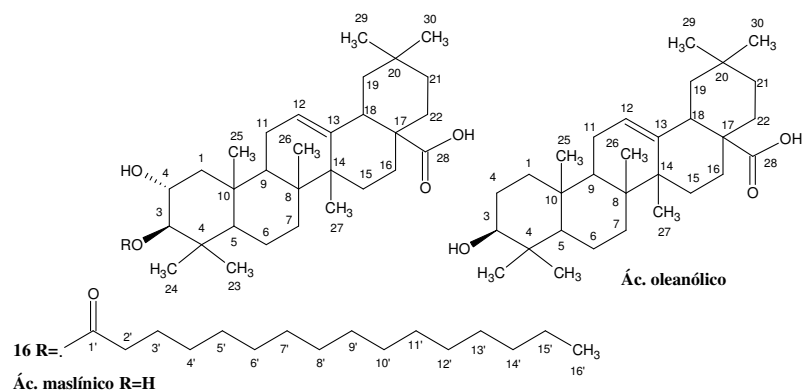


Tabela 21. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **15** em comparação com dados da literatura para os ácidos maslínico e oleanólico (TANIGUCHI et al., 2002; SUZART et al., 2006)

C	Substância 15 500 MHz (CDCl ₃)		Ác. oleanólico 200 MHz (CDCl ₃)		Ác. maslínico 500 MHz (Piridina-d ₆)
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}	
1	47,6	2,07 m	38,0	47,8	
2	67,8	3,80 t	23,5	68,6	4,09 ddd, 4,5; 9,5; 11,0 Hz
3	84,8	4,53 d, 10,1 Hz	80,5	83,8	3,38 d, 9,5 Hz
4	38,2		37,7	39,8	
5	55,1		55,2	55,9	
6	18,3		18,1	18,9	
7	30,7		32,4	33,2	
8	39,3		39,2	48,2	
9	47,5		47,5	48,2	
10	39,3		36,9	38,6	
11	23,5		22,8	-	
12	122,6	5,29 sl	122,5	122,5	5,45 sl
13	143,8		143,5	144,9	
14	41,6		41,5	42,2	
15	27,6		27,6	28,3	
16	22,8		25,9	23,7	
17	46,5		31,9	46,7	
18	40,9	2,85 d, 11,0 Hz	46,5	-	3,28 dd; 4,5; 14,5 Hz
19	45,8		45,8	42,0	
20	30,6		30,6	31,0	
21	33,8		33,7	34,3	
22	32,4		34,8	33,3	
23	28,5	0,88 s	28,0	29,4	
24	17,1	0,90 s	17,1	16,9	
25	16,5	0,75 s	15,3	17,5	
26	17,6	0,92 s	16,7	17,7	
27	25,9	0,94 s	25,1	26,2	
28	184,2	-	184,6	180,2	
29	33,0	1,00 s	33,0	33,3	
30	23,6	1,15 s	22,6	23,8	
1'	175,5				
2'	34,7	2,40 dd, 7,2 Hz			
3'	25,0				
4'-13'	29,7-29,2	1,27			
14'	31,9				
15'	22,7				
16'	14,1				

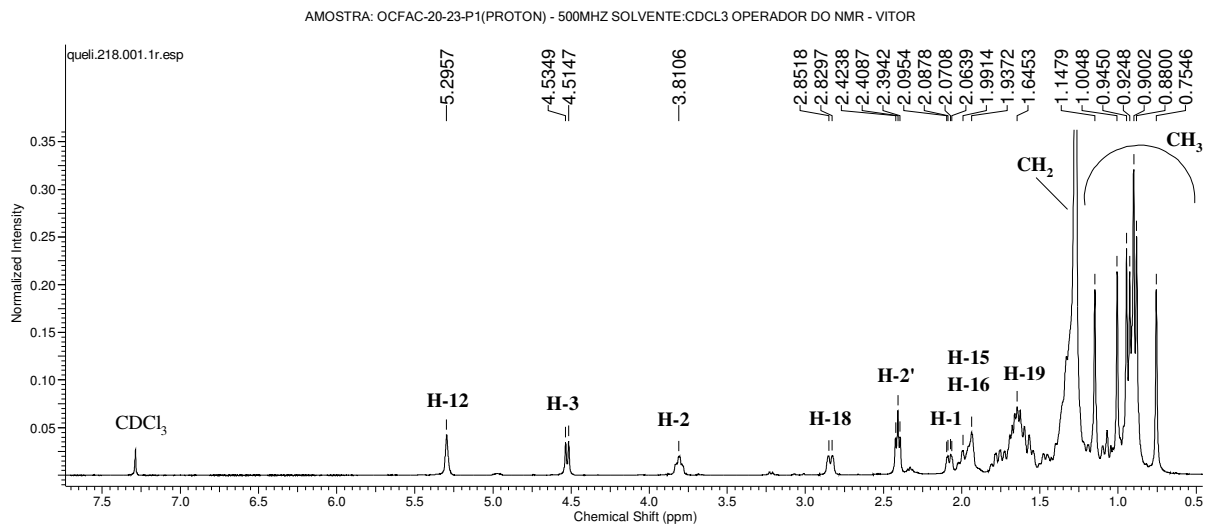


Figura 85. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) da substância **15**

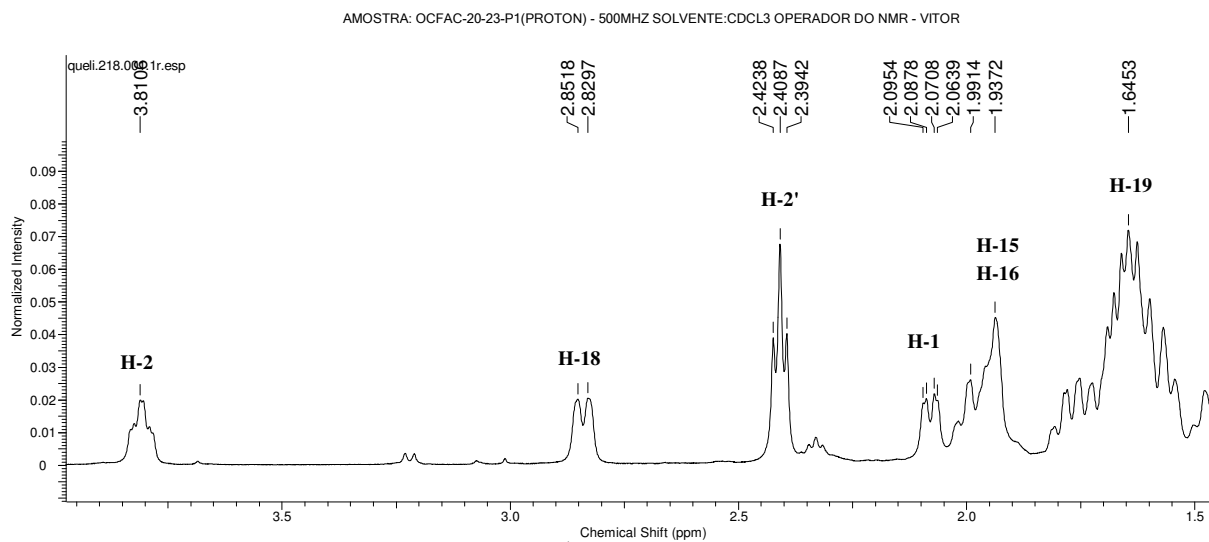
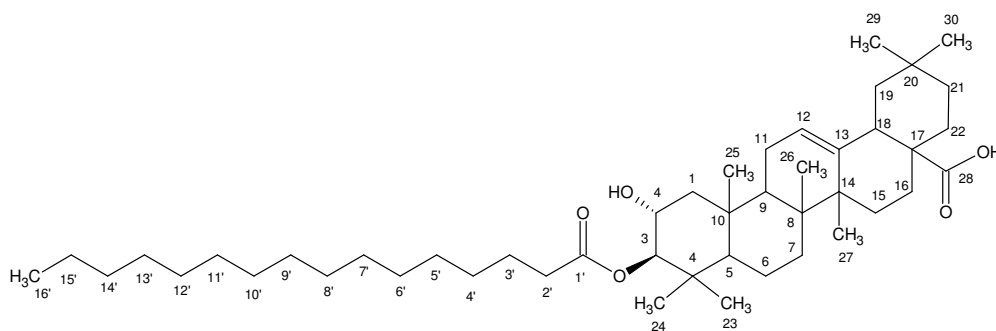


Figura 86. Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) da substância **15**



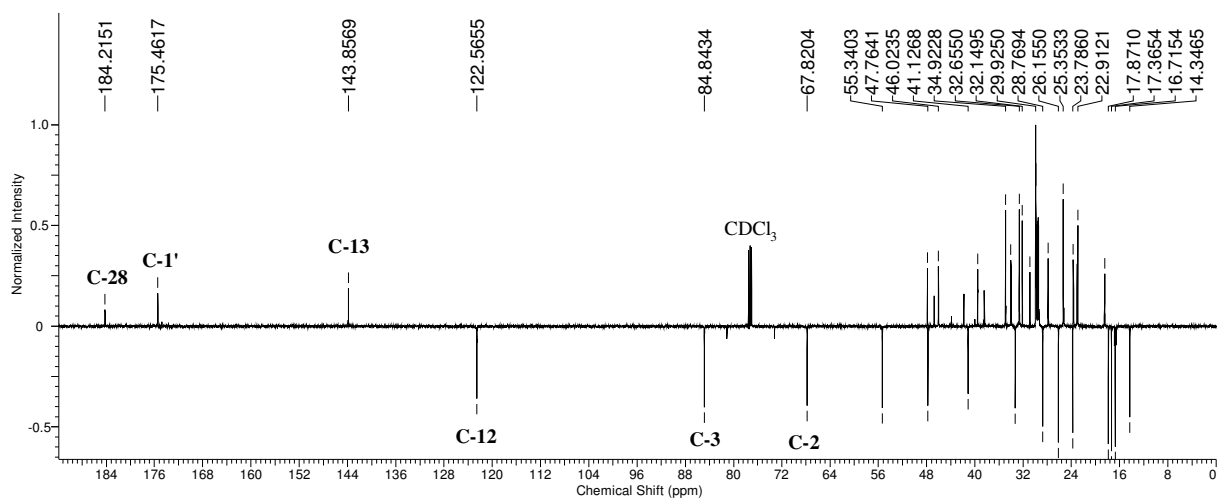


Figura 87. Espectro de RMN ^{13}C DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) da substância 15

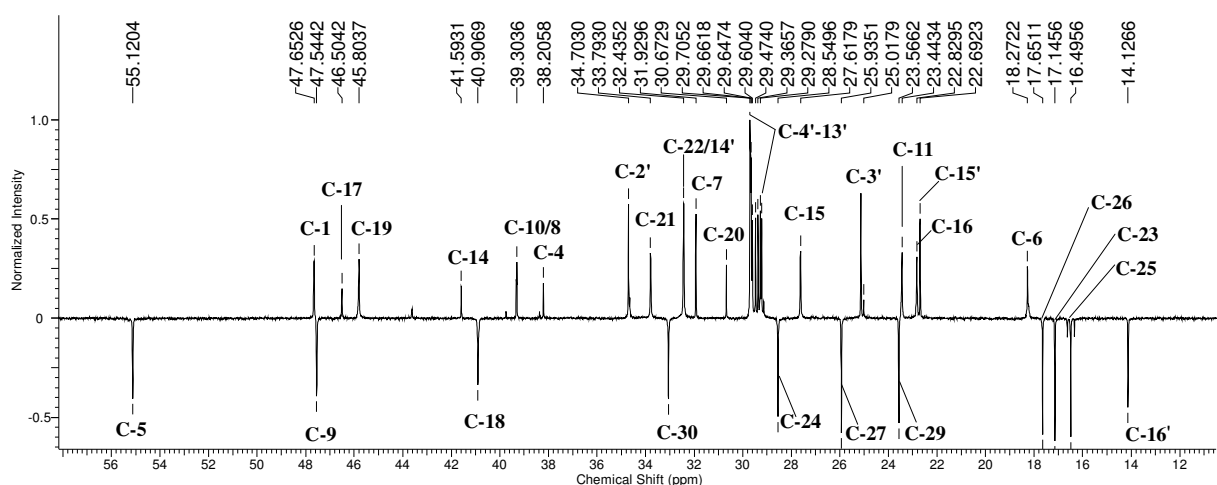
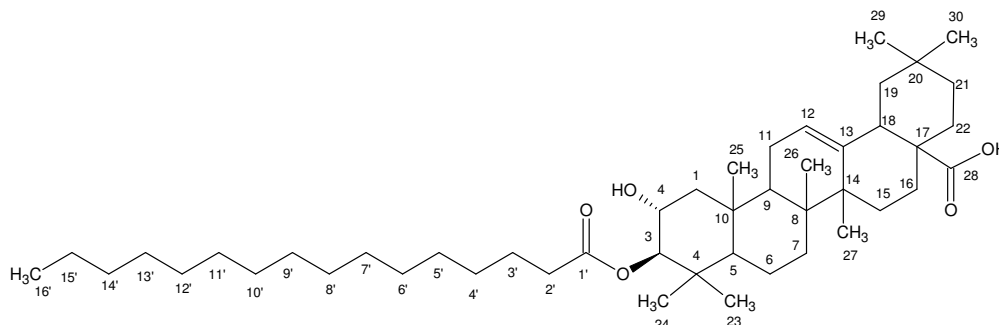


Figura 88. Expansão do espectro de RMN ^{13}C DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) da substância 15



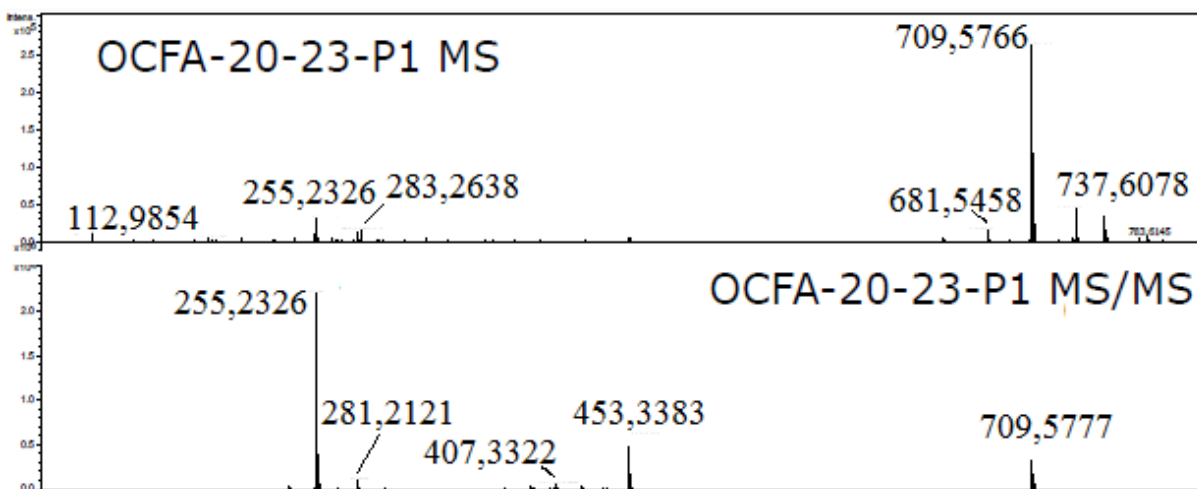
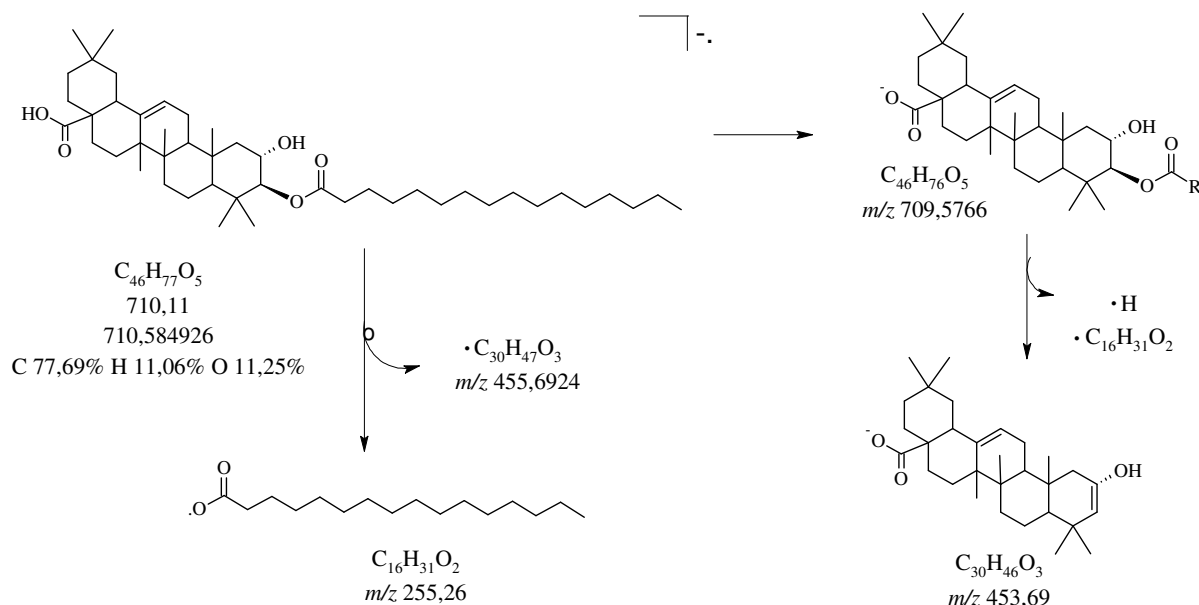


Figura 89. Espectros de EM-IES 1ª ionização e 2ª ionização da substância 15



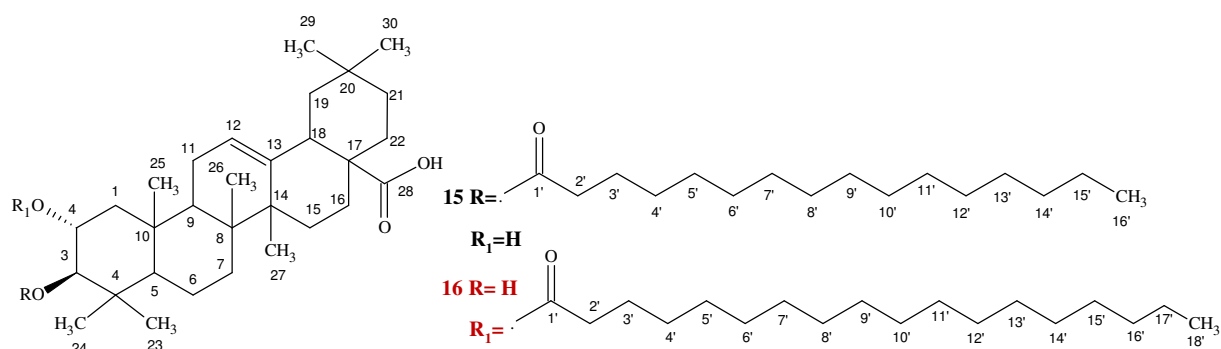
Esquema 11. Proposta de fragmentação para a substância 15.

2.6.18. Mistura dos ácidos 3β-O-acil-maslínico (15) e 2α-O-acil-maslínico (16) isolada de OCFAPH

Os espectros de RMN 1H e ^{13}C mostraram sinais compatíveis com a proposta de duas substâncias com esqueleto oleanano. No espectro de RMN 1H (Figura 91, p. 114 e 92, p. 115) foi observado dois dupletos sobrepostos em δ_H 5,30 e 5,28, os mesmos foram atribuídos ao H-12 da estrutura das substâncias 15 e 16, respectivamente. Foram observados dois acoplamento entre hidrogênios carbinólicos em δ_H 4,97 (*ddd*, $J = 4,7; 11,0; 10,1$ Hz, H-2) e 3,23(*d*, $J = 10,1$ Hz, H-3) e entre δ_H 4,53 (*d*, 10,1 Hz) e 3,81 (*ddd*, 4,8; 11,0; 11,0) esses pares de duplo-duplo-dupletos e dupletos confirmam a mistura de duas substâncias com esqueleto de oleanano. A

diferença de deslocamento entre os pares revela que na substância **15** o grupo acil está ligado de C-3, enquanto que na substância **16** o grupo acil está ligado ao C-2. Dois sinais de tripleto, em δ_H 2,34 e 2,31, foram atribuídos ao H-2' de **15** e **16**, respectivamente, por serem característicos de metileno adjacente a carbonila. No espectro de RMN 1H , bem como nos demais espectros, são assinalados os sinais atribuídos à substância **15** na cor preta e na cor vermelha para a substância **16**. No espectro de RMN ^{13}C (**Figura 93**, p. 118) foram observados os sinais em δ_C 174,5 (C-1'); 80,9 (C-3) e 73,0 (C-2), os quais foram conferidos a substância **16**. A proposta foi confirmada pelos experimentos de COSY, HSQC e HMBC. O espectro de COSY (**Figura 94**, p. 119) mostrou acoplamento homonuclear de δ_H 4,55 (H-3)/3,80 (H-2) e δ_H 2,06 (H-1eq)/3,83 (H-2), 3,82 (H-2)/1,03 (H-1ax) e 2,43 (H-2')/1,65 (H-3') para **15** e 4,98 (H-2)/0,94 (H-1ax), 4,98 (H-2)/1,99 (H-1eq) e 4,98 (H-2)/3,21 (H-3) para **16**, além de 1,18 (H-18)/ 2,80 (H-19eq), 2,85 (H-18)/1,62 (H-19 ax), e 5,30 (H-12)/1,90 (H-11). O experimento de HSQC (**Figura 95**, p. 120) mostrou interação heteronuclear $^1J_{HC}$. Para a substância **15** as principais foram: 2,08/47,1 (H-1/C-1); 3,81/67,0 (H-2/C-2); 4,52/84,2 (H-3/C-3) e para **16**: 4,97/72,3 (H-2/C-2) e 3,21/80,4 (H-3/C-3), as demais interações foram atribuídas para ambas às substâncias: 5,30/121,6 (H-12/C-12); 2,82/40,5 (H-18/C-18) e 2,35/33,8 (H-2'/C-2'). No mapa do contorno de HMBC (**Figura 96**, p. 121 e **97**, p. 122) foram observados os acoplamentos da substância **15**: H-12/C-14, C-9; H-3/C-1', C-2, C-4, C-23, C-24; H-18/C-12, C-13, C-14, C-16, C-28; H-1/C-2, C-3, C-10, C-25; H-2'/C-1'. Para substância **16** foram observados os acoplamentos: H-3/C-2, C-4, C-23, C-24; H-2/C-3, C-1'; H-1/C-2, C-3, C-4, C-5, C-25; H-2'/C-1'. O espectro de massas EM-IES da fração OCFAPH-14 (**Figura 90**, p. 116) apresentou dois picos, com valores de íon $[M-H]^-$ de m/z 709,5777 ($C_{46}H_{78}O_5$, calc 709,5771) e 737,6074 ($C_{48}H_{82}O_5$, calc 737,6984). No espectro obtido da 2ª ionização de m/z 709,5777 (60%) foram identificados os picos 453,3370 (30%, fragmento de triterpeno ácido, $C_{30}H_{31}O_2$, calc. 255,2324) e 255,2326 (100%, fragmento de unidade acila, $C_{16}H_{31}O_2$, calc. 255,2324) que permitiram deduzir a estrutura da substância **15**. Não foi possível obter um espectro da 2ª ionização de m/z 737,6074, mas o espectro da 1ª ionização mostra um fragmento que justifica a presença de uma unidade acila de m/z 283,2636. Esses dados permitem deduzir a presença de duas unidades acila hexanodecanoil/octadecanoil ligadas aos carbonos C-3 na substância **15** e C-2 na substância **16**. A determinação estrutural da mistura de **15** e **16** conduziu a identificação de 3 β -O-acil-maslínico e 2 α -O-acil-maslínico, respectivamente. A cadeia acila ligada à estrutura triterpênica pode conter 16 ou 18 carbonos. A proposta foi confirmada pela análise em CG-EM (**Figura 98-104**, p. 123 e 124) do produto obtido da derivatização (transesterificação) da mistura de **15+16**. Foram identificados dois

ésteres graxos, hexanoato de metila (pico 1, no cromatograma de CG-EM **Figura 98**, p. 123, $m/z = 270$, espectro de massas mostrado na **Figura 97**, p. 123) e octanoato de metila (pico 2, no cromatograma de CG-EM, $m/z = 298$, espectro de massa mostrado na **Figura 101**, p. 123). Uma impureza também foi detectada no produto de derivatização. O pico 3 corresponde a um ftalato, $m/z = 279$ (espectro de massa, **Figura 103**, p. 124). A partir dessa informação, sugeriu-se a presença da unidade acila de 16 carbonos ligada à posição 3- β da estrutura triterpênica, considerando que o constituinte majoritário na análise de massas apresentou massa compatível com unidade acila de 16 carbonos e a análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C revelaram que os sinais atribuídos à estrutura triterpênica com grupo acila na posição 3- β é a majoritária, por ter apresentado sinais mais intensos em relação à estrutura triterpênica com grupo acila na posição 2- α .



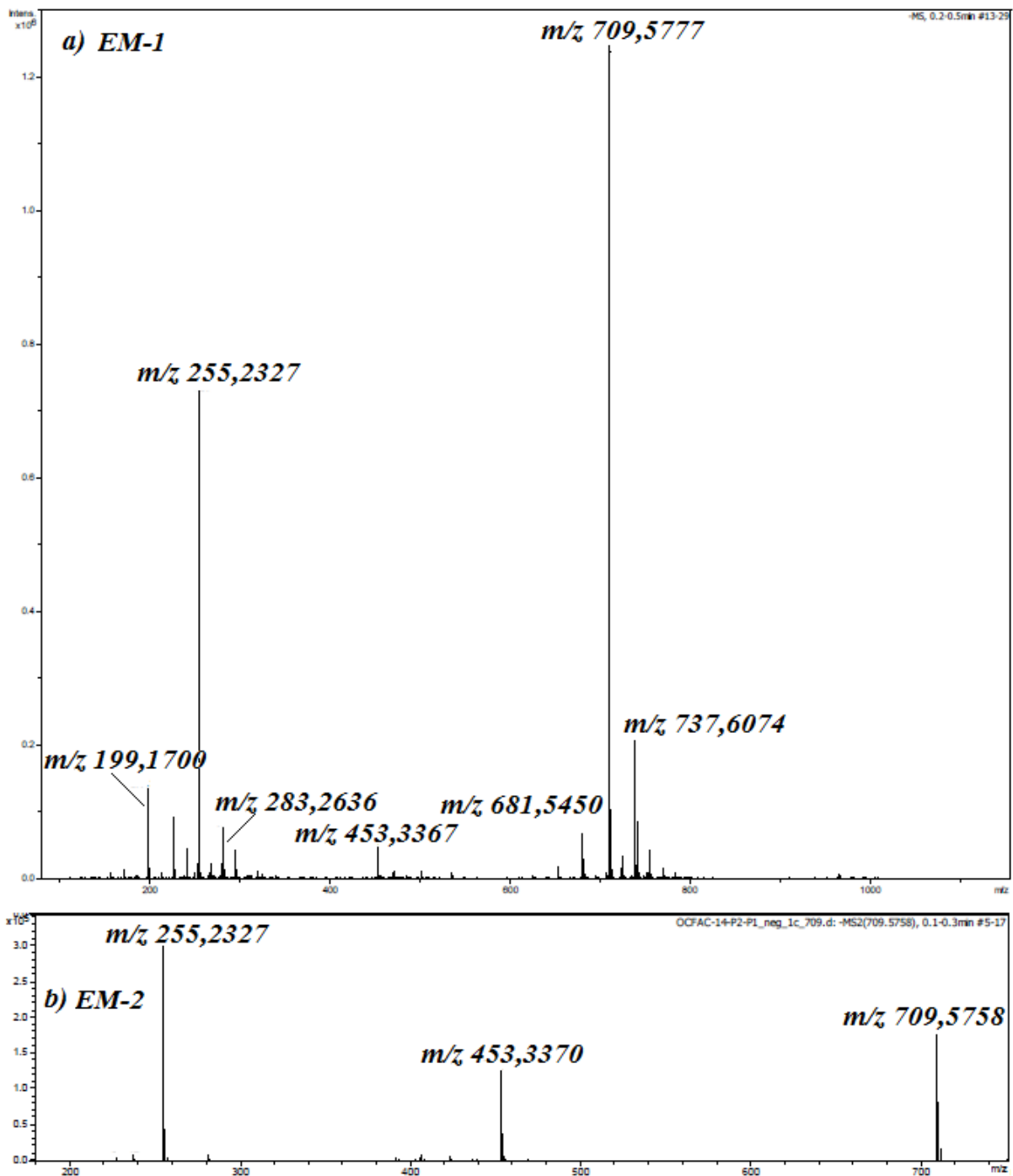
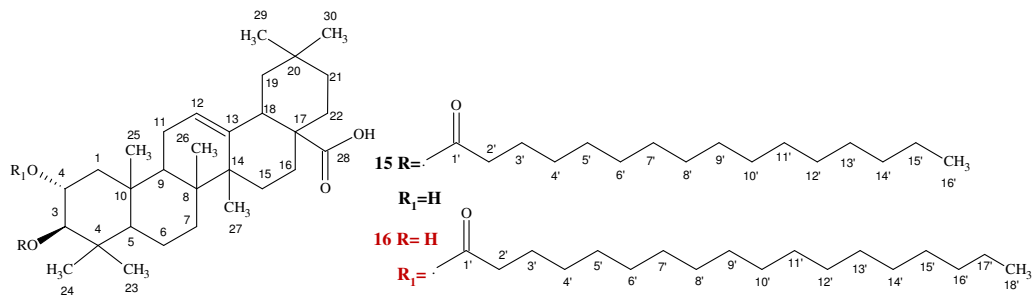


Figura 90. a) Espectros de EM-IES da mistura de **15** + **16**, b) Espectro da 2^a ionização de m/z 709,5758 (EM-2).



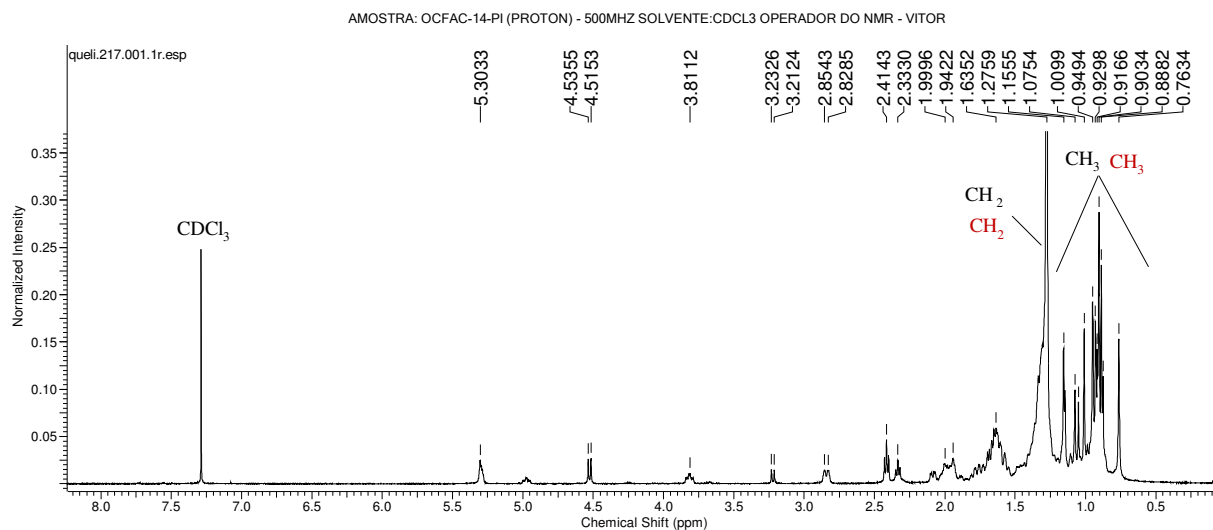


Figura 91. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) da substância **15 + 16**

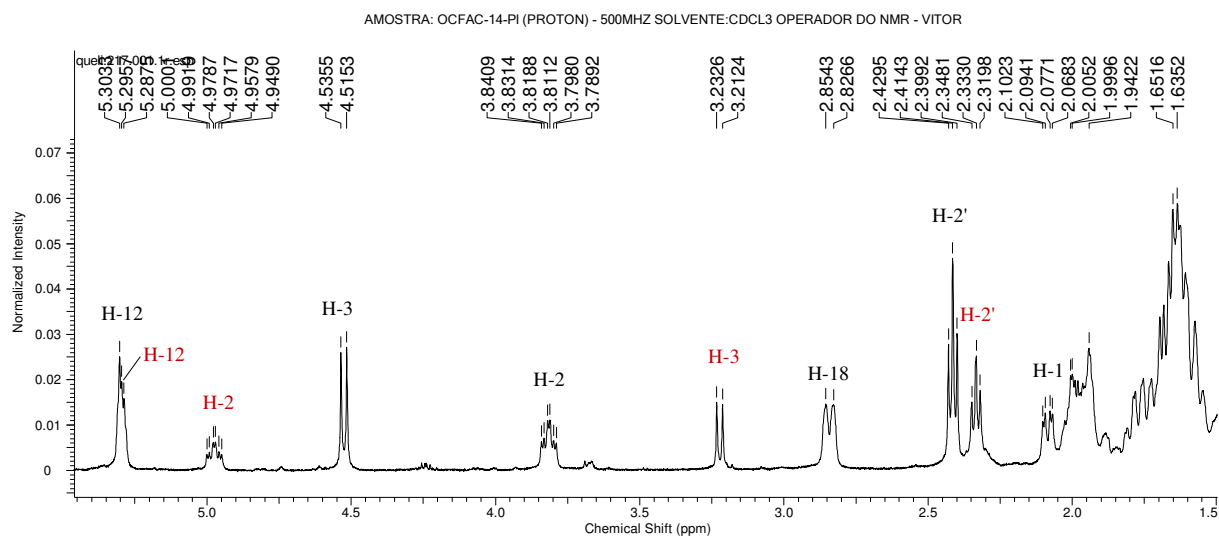
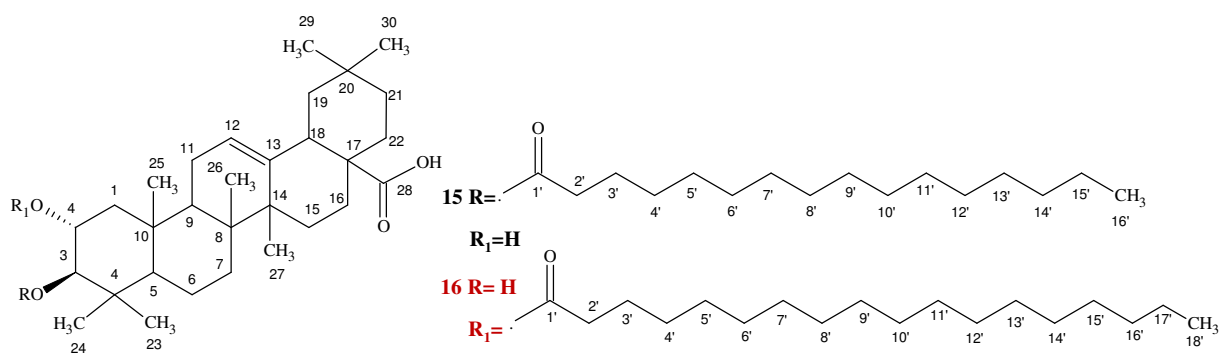


Figura 92. Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) da mistura de **15 + 16**

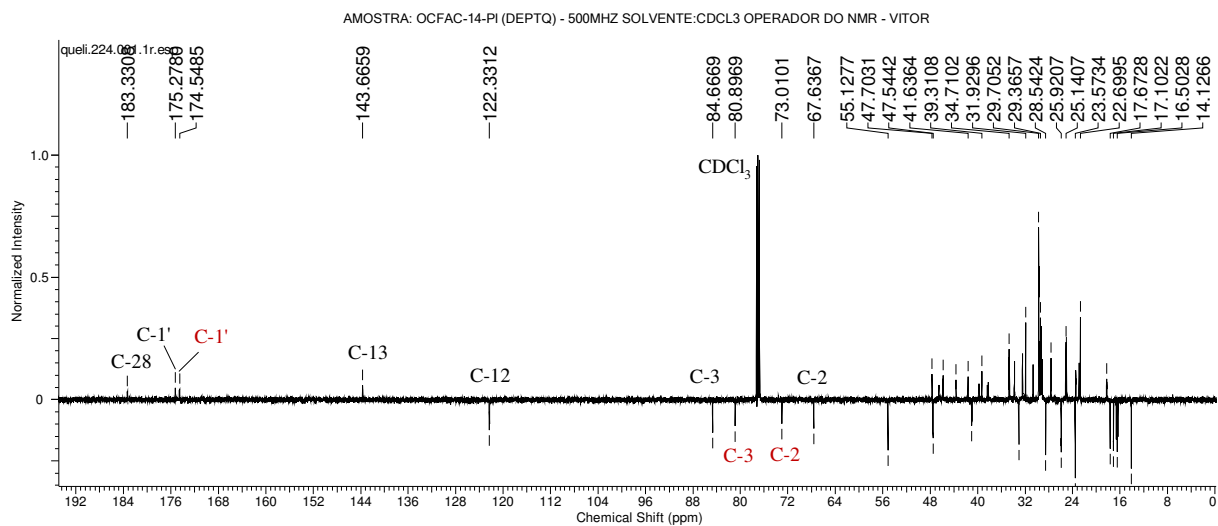
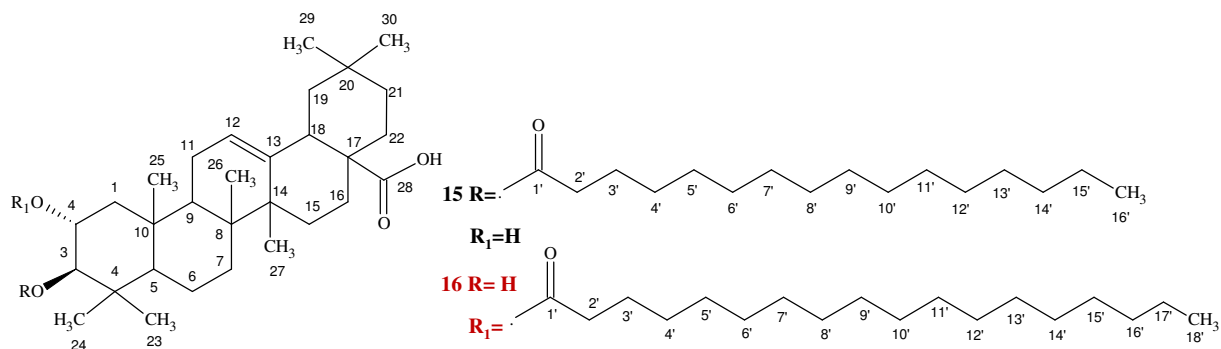


Figura 93. Espectros de RMN ¹³C DEPTQ (125 MHz, CDCl₃) da mistura de **15** + **16**



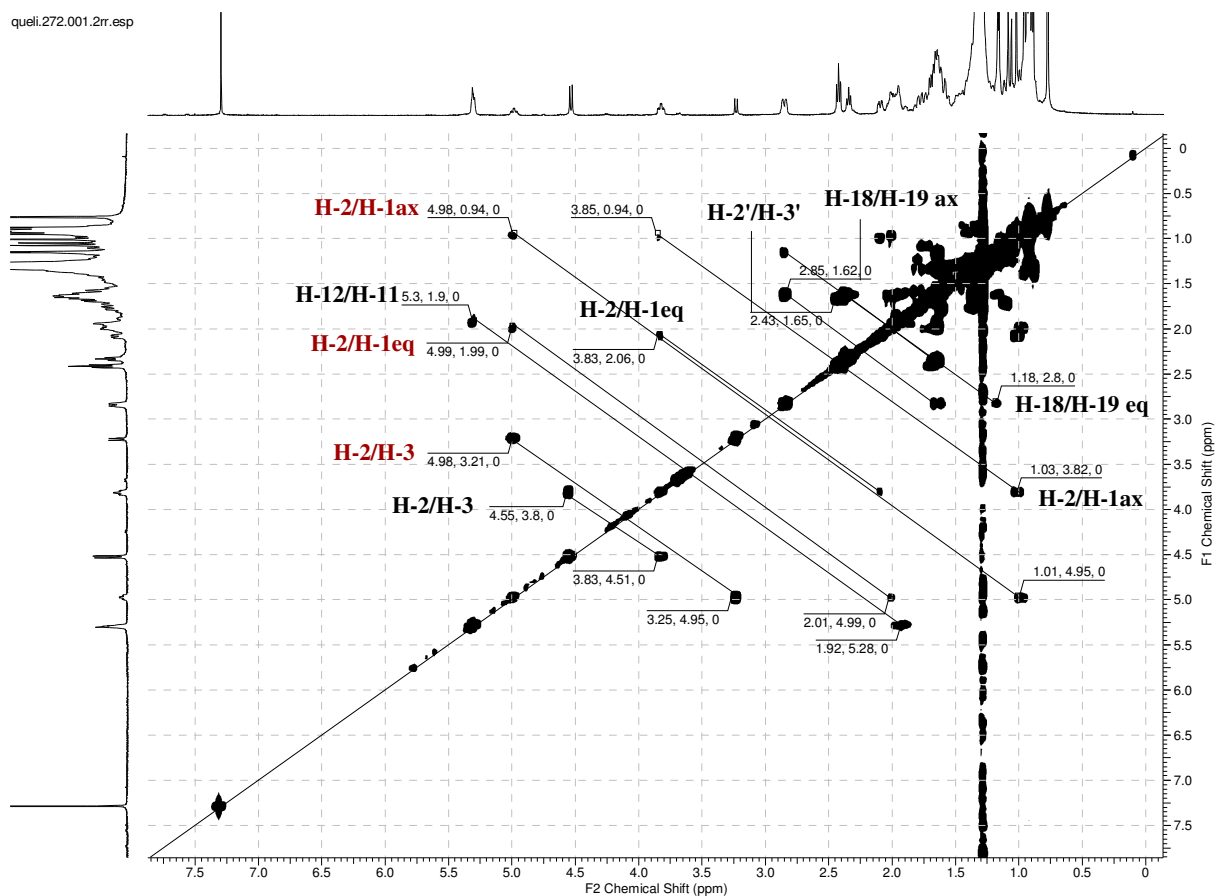
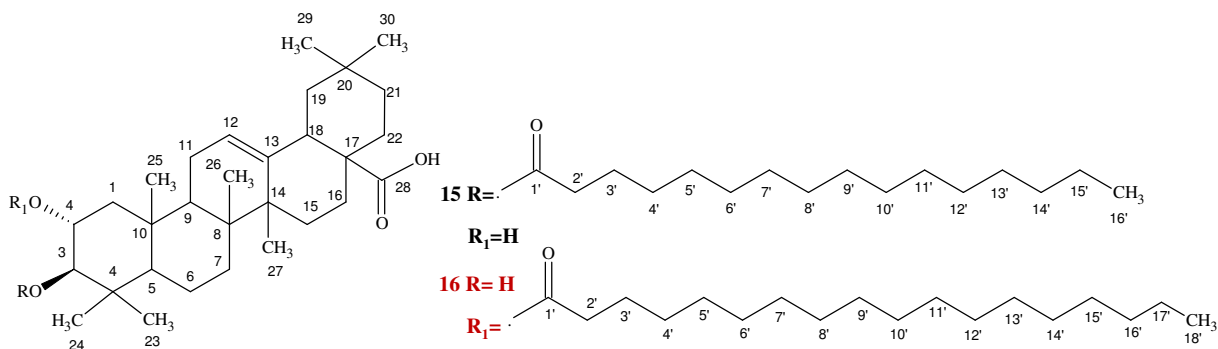


Figura 94. Mapa de contorno de HxH COSY (500 MHz, CDCl₃) da substância 15 +16



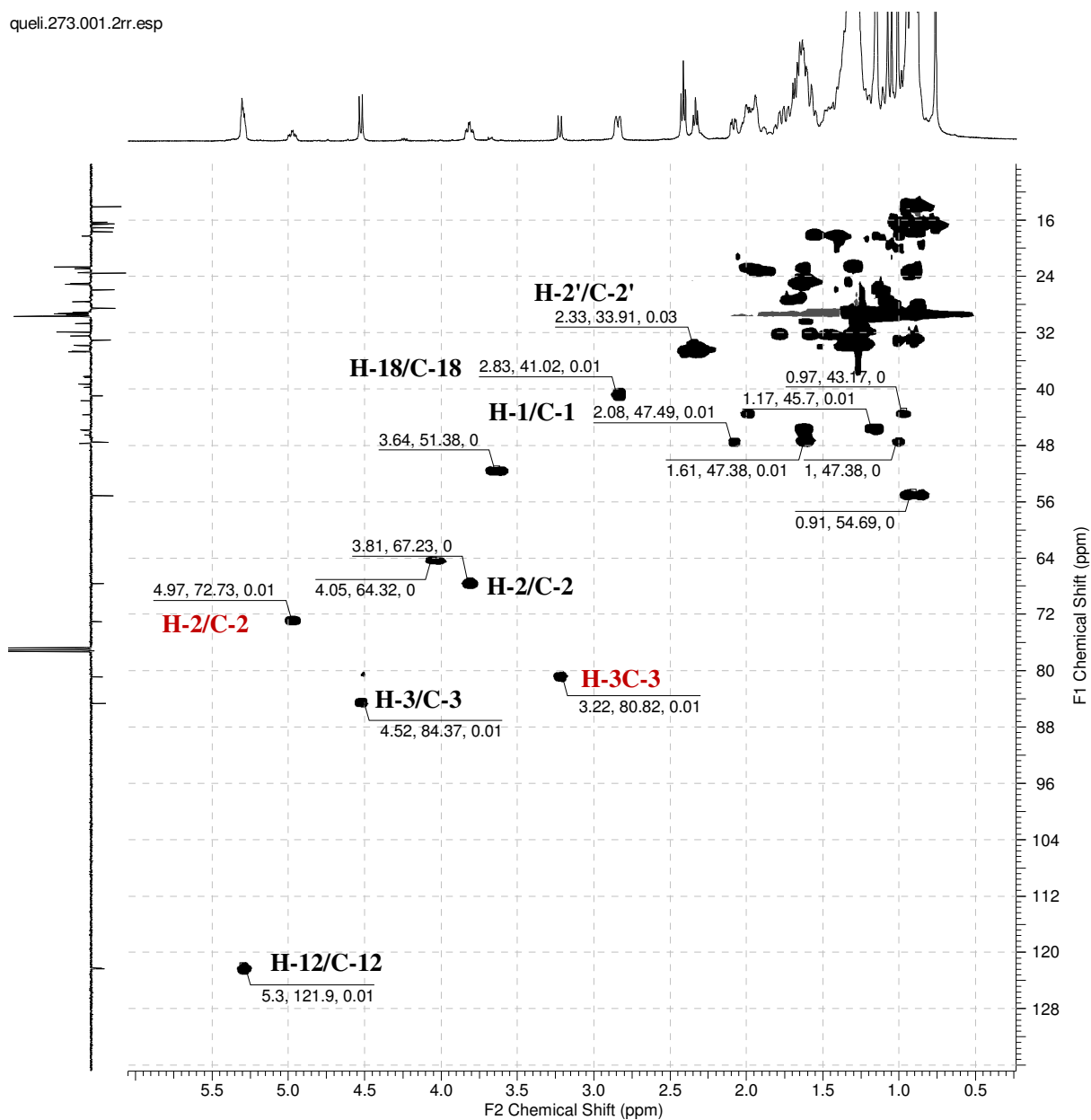
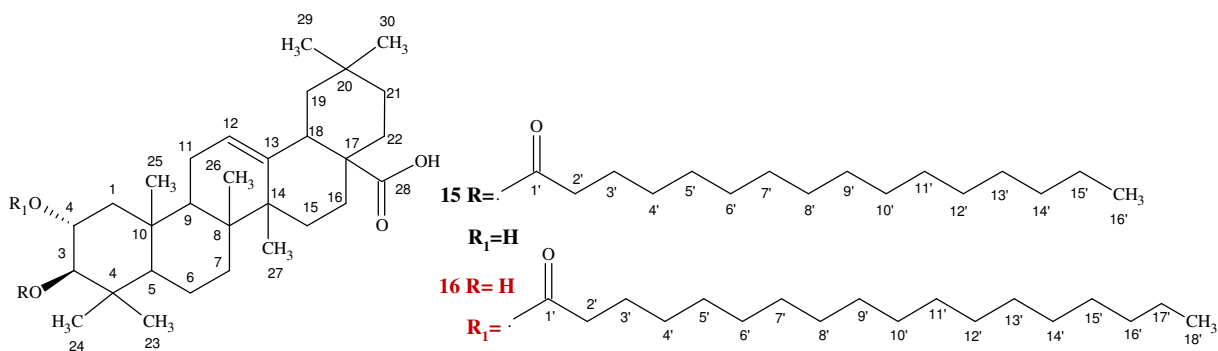


Figura 95. Mapa de contorno de HSQC (500 MHz, CDCl₃) da mistura de 15 + 16



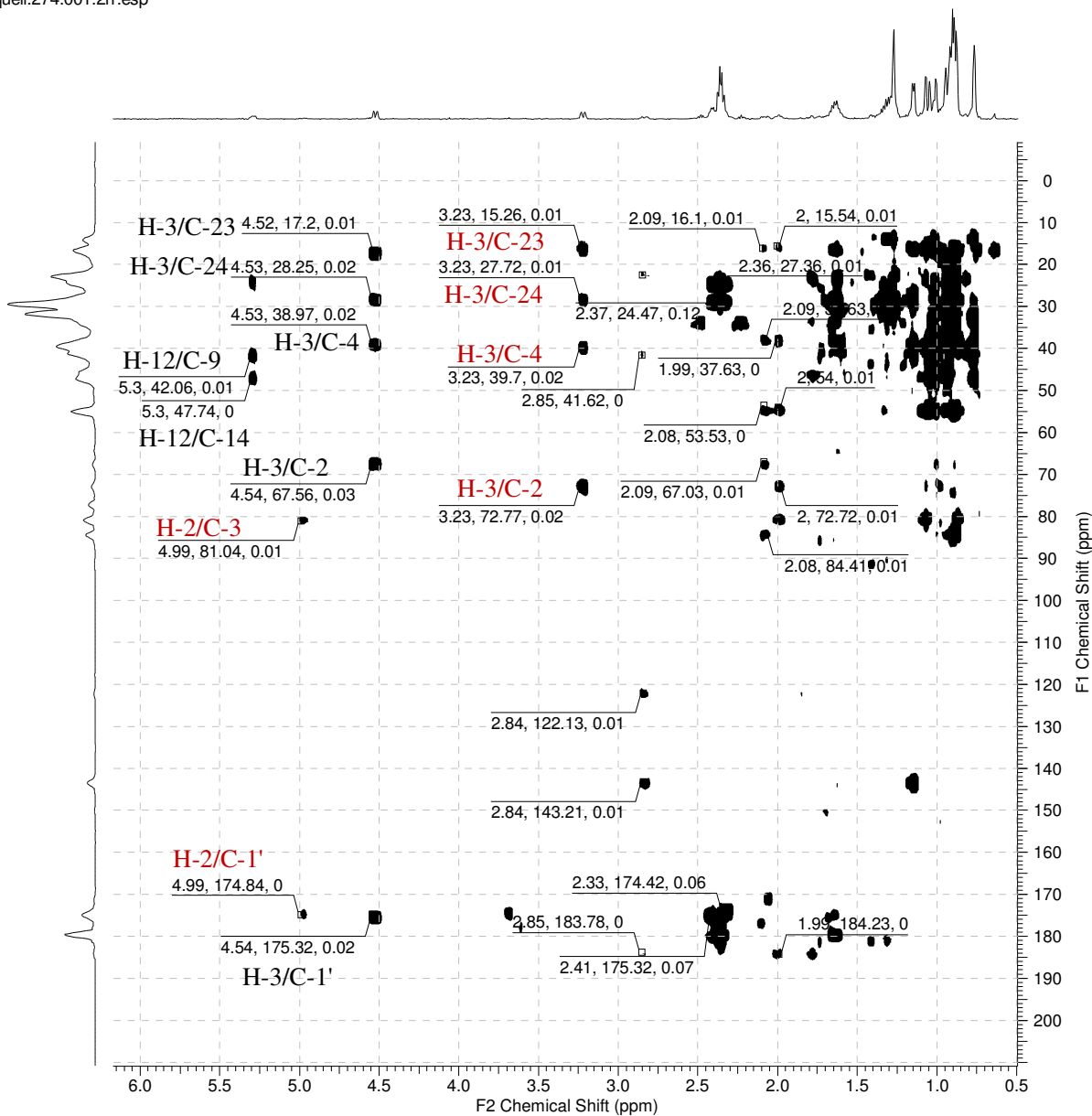
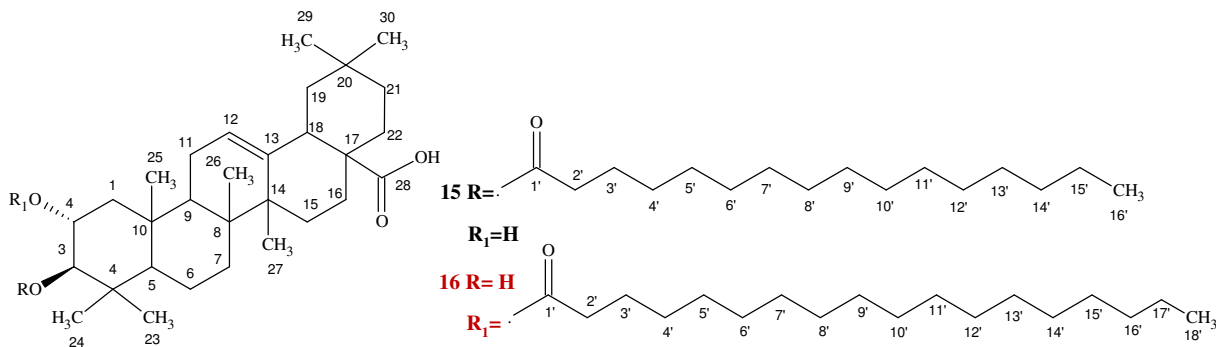


Figura 96. Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CDCl_3) da mistura de 15 + 16



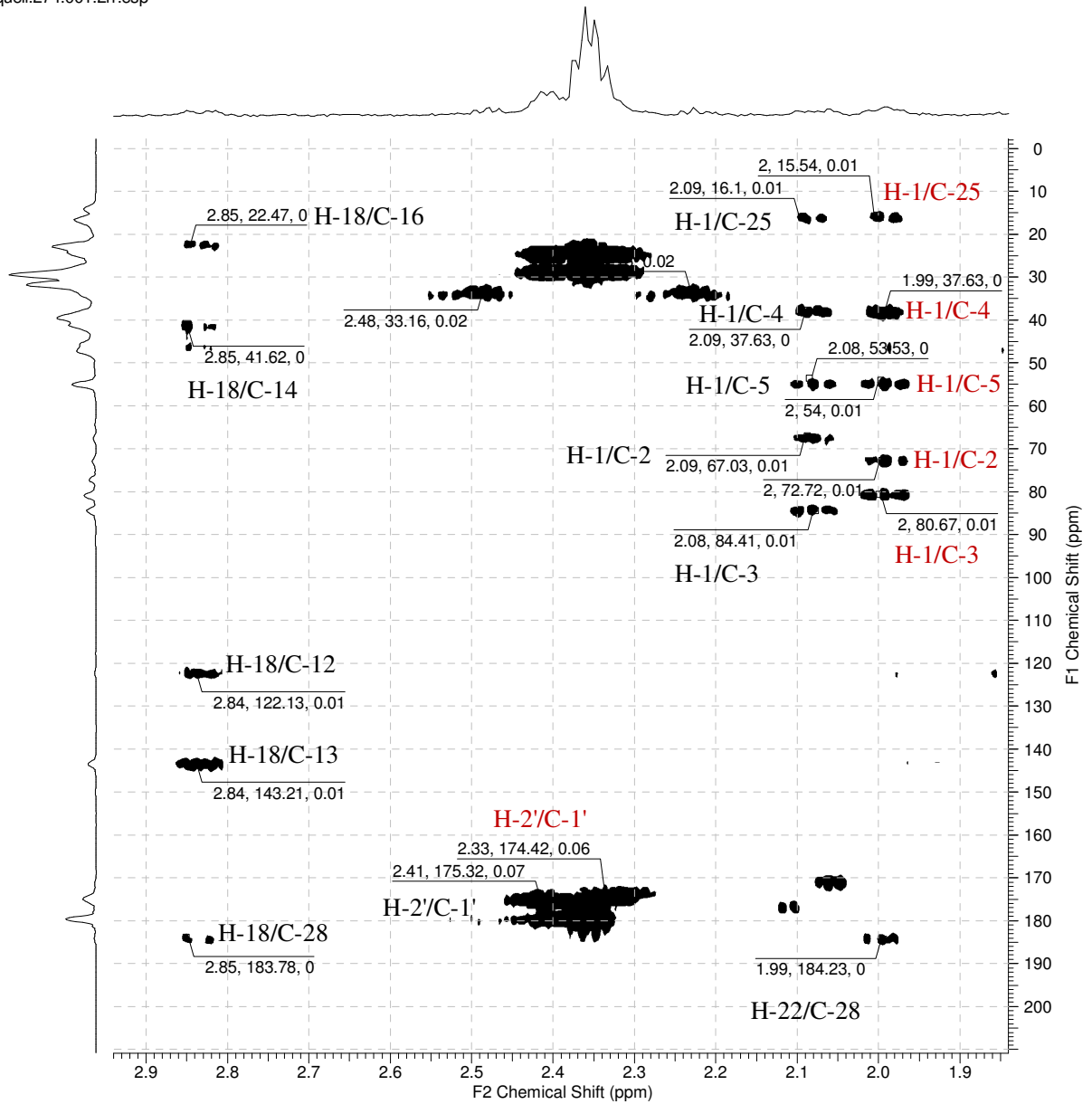
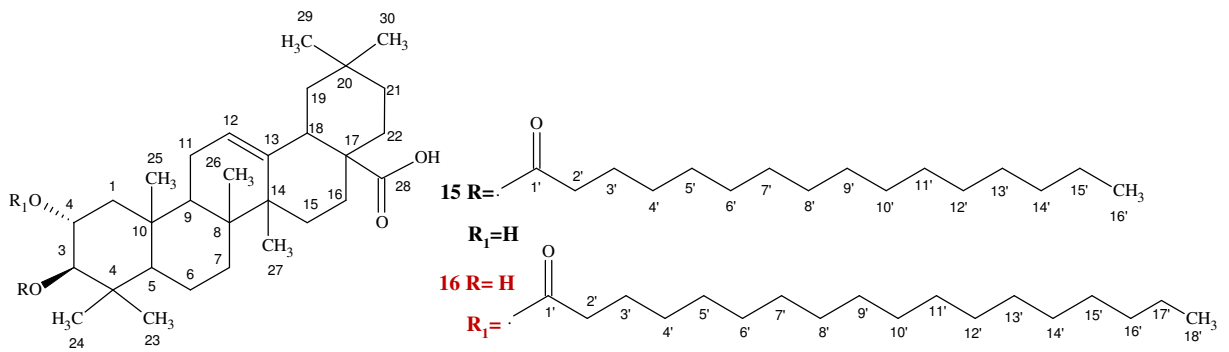


Figura 97. Expansão do mapa de contorno de HMBC (500 MHz, CDCl₃) da mistura de **15** + **16**



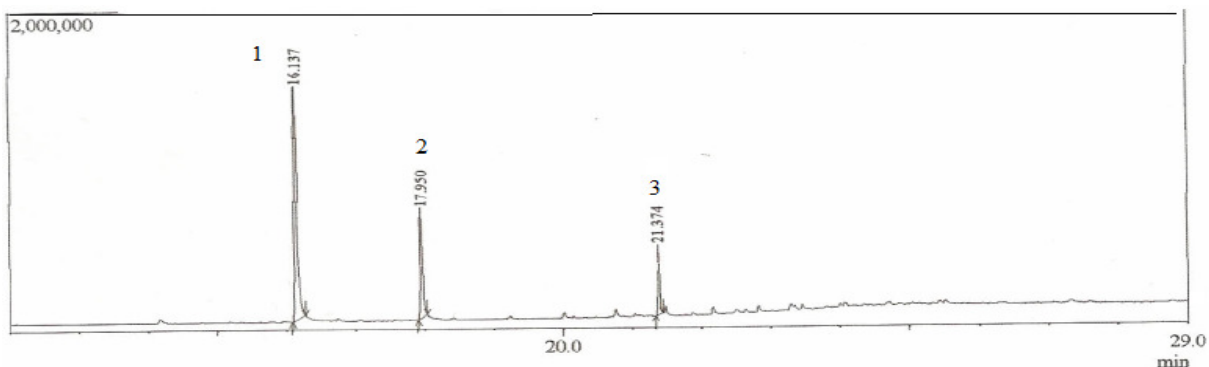


Figura 98. Cromatograma de CG-EM da mistura de ésteres metílicos transesterificados de 15+16.

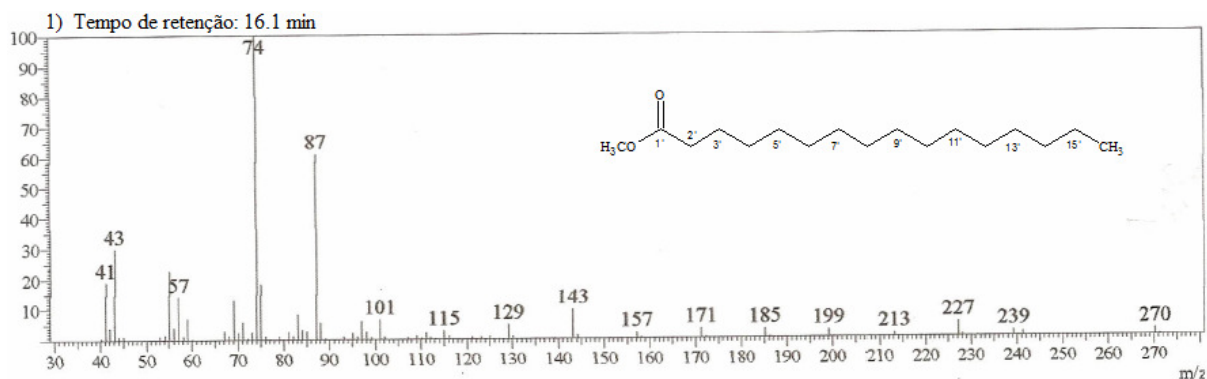


Figura 99. Espectro de massa do pico 1, tR = 16,1 min, compatível com a estrutura do hexanoato de metila.

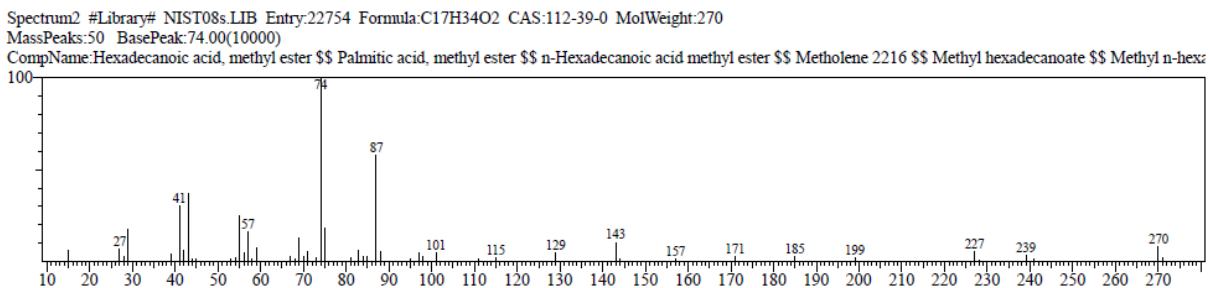


Figura 100. Espectro de massa do hexanoato de metila obtido da Livraria NIST08.

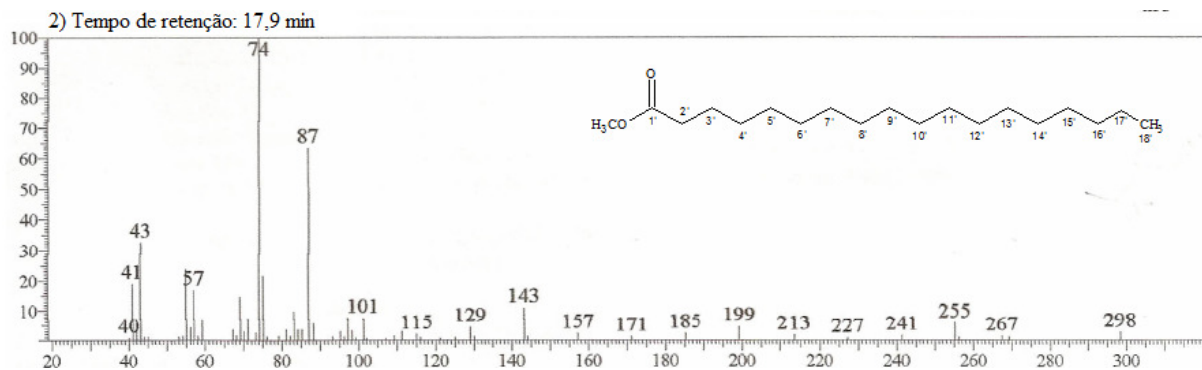


Figura 101. Espectro de massa do pico 2, tR = 17,9 min, compatível com a estrutura do octanoato de metila.

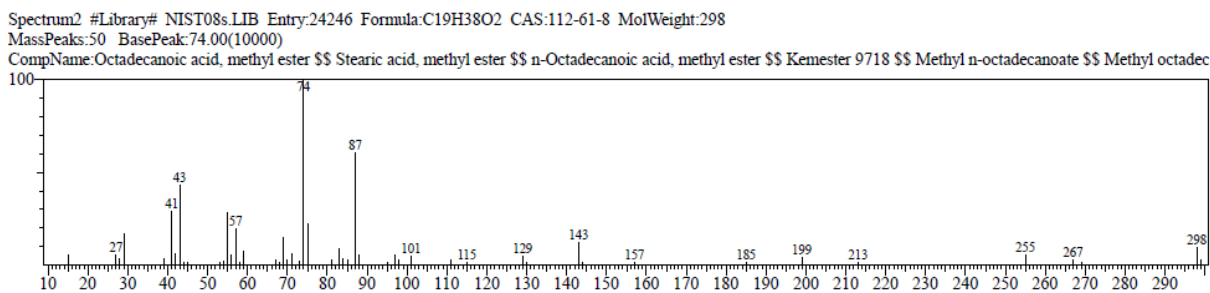


Figura 102. Espectro de massa do octanoato de metila obtido da Livraria NIST08.

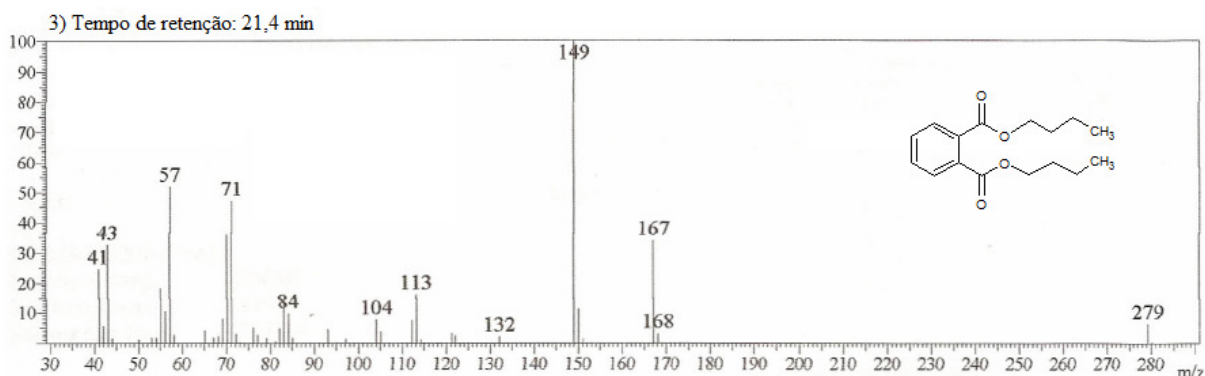


Figura 103. Espectro de massa do pico 3, tR = 21,4 min, compatível com a estrutura de um ftalato (impureza do solvente).

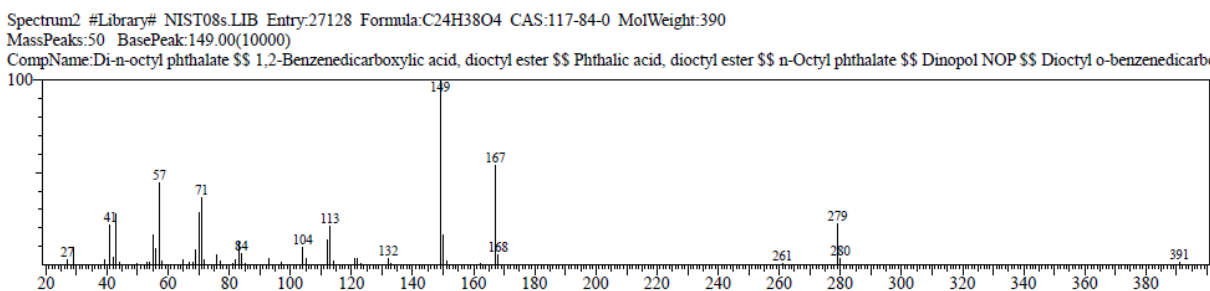
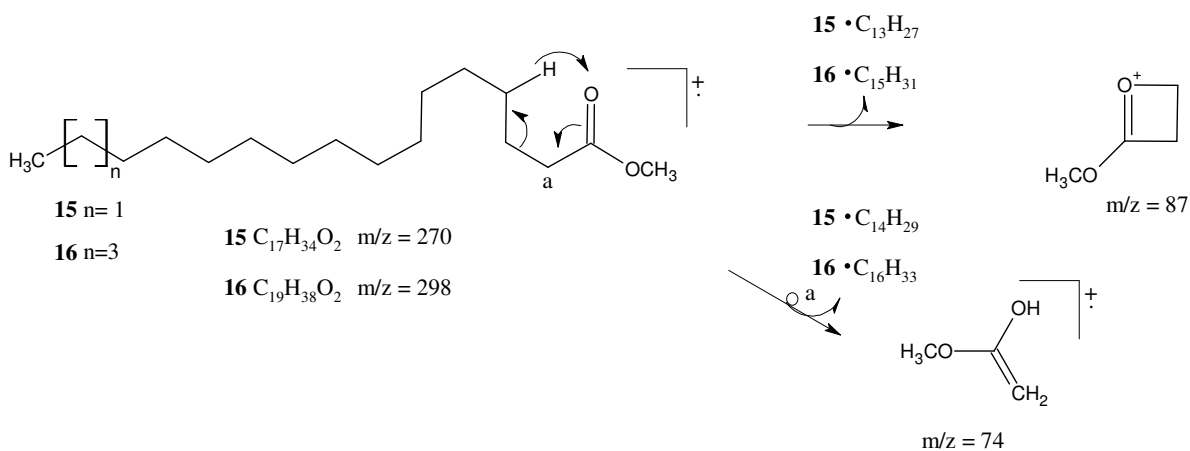


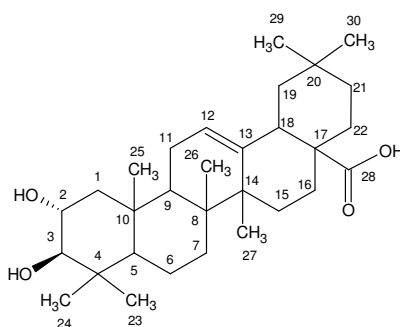
Figura 104. Espectro de massa do dioctil éster do ácido ftálico obtido da Livraria NIST08.



Esquema 12. Proposta de fragmentação para os ésteres metílicos analisados por CG-EM.

2.6.19. Ácido maslínico (17) isolada de OCFAPH

O precipitado OCFAPH-30-31 apresentou um perfil semelhante ao observado para a substância **15** nos espectros de RMN ^1H (**Figuras 105-106**, p. 127) e ^{13}C (**Figuras 107-108**, p. 128) quanto ao esqueleto triterpênico. Os sinais de hidrogênio foram: δ_{H} 1,84 (H-19); 2,02 (H-15,16); 2,20 (H-1), 3,34 (H-18); 3,43 (H-3); 4,13 (H-2) e 5,48 (H-12). O espectro de RMN ^{13}C apresentou apenas sete metilas 17,8 (C-23), 27,0 (C-24), 18,5 (C-25), 18,6 (C-26), 27,0 (C-27), 24,7 (C-29) e 30,2 (C-30). Um sinal em 178,0 foi atribuído ao carbono da carboxila (C-28) e os sinais em 69,2 e 84,4 foram atribuídos aos carbonos carbinólicos C-2 e C-3, respectivamente. Em 48,4 foi encontrado um sinal de carbono metilênico o qual foi atribuído ao C-1. Os sinais em 122,9 e 145,6 de carbonos metínicos e quartenário foram atribuídos a C-12 e C-13, respectivamente. Os demais sinais são apresentados na **Tabela 22**, p. 126. A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura permitiram identificar a substância **17** como sendo o ácido maslínico.



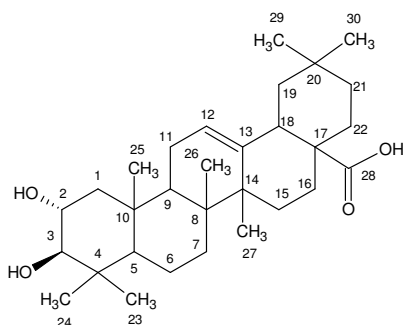


Tabela 22. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **17** em comparação com dados da literatura para ácido maslínico (TANIGUCHI et al., 2002)

C	Substância 17		Ácido maslínico	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	
1	47,6	2,07 m	47,8	
2	67,8	3,80 t	68,6	4,09 ddd, 4,5; 9,5; 11,0 Hz
3	84,8	4,53 d, 10,1 Hz	83,8	3,38 d, 9,5 Hz
4	38,2		39,8	
5	55,1		55,9	
6	18,3		18,9	
7	30,7		33,2	
8	39,3		48,2	
9	47,5		48,2	
10	39,3		38,6	
11	23,5		-	
12	122,6	5,29 sl	122,5	5,45 sl
13	143,8		144,9	
14	41,6		42,2	
15	27,6		28,3	
16	22,8		23,7	
17	46,5		46,7	
18	40,9	2,85 d, 11,0 Hz	-	3,28 dd; 4,5; 14,5 Hz
19	45,8		42,0	
20	30,6		31,0	
21	33,8		34,3	
22	32,4		33,3	
23	28,5	0,88 s	29,4	
24	17,1	0,90 s	16,9	
25	16,5	0,75 s	17,5	
26	17,6	0,92 s	17,7	
27	25,9	0,94 s	26,2	
28	184,2	-	180,2	
29	33,0	1,00 s	33,3	
30	23,6	1,15 s	23,8	

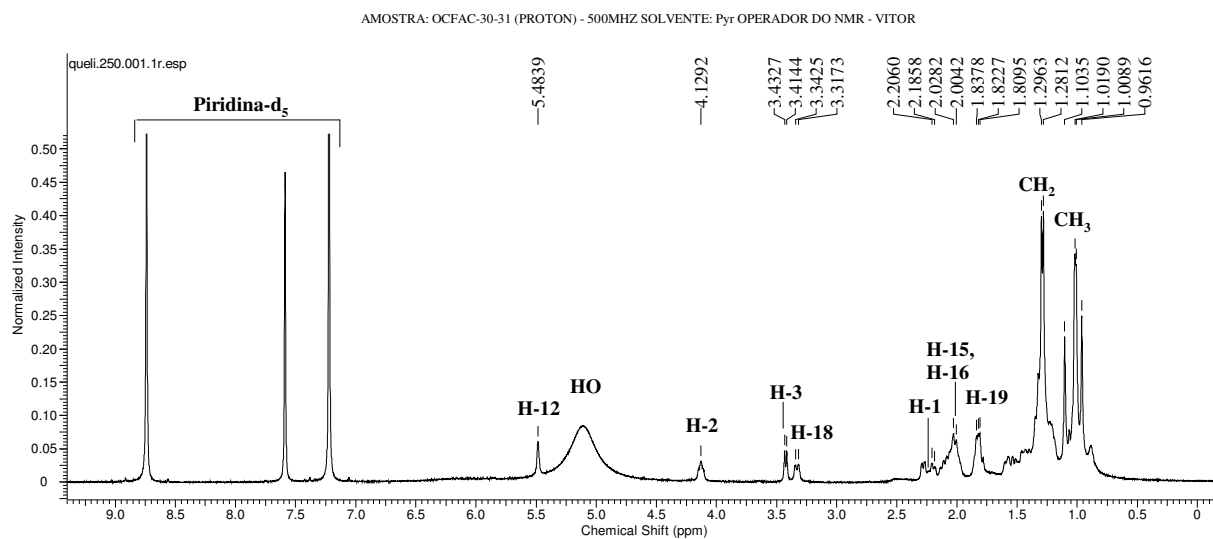


Figura 105. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, Piridina- d_6) da substância **17**

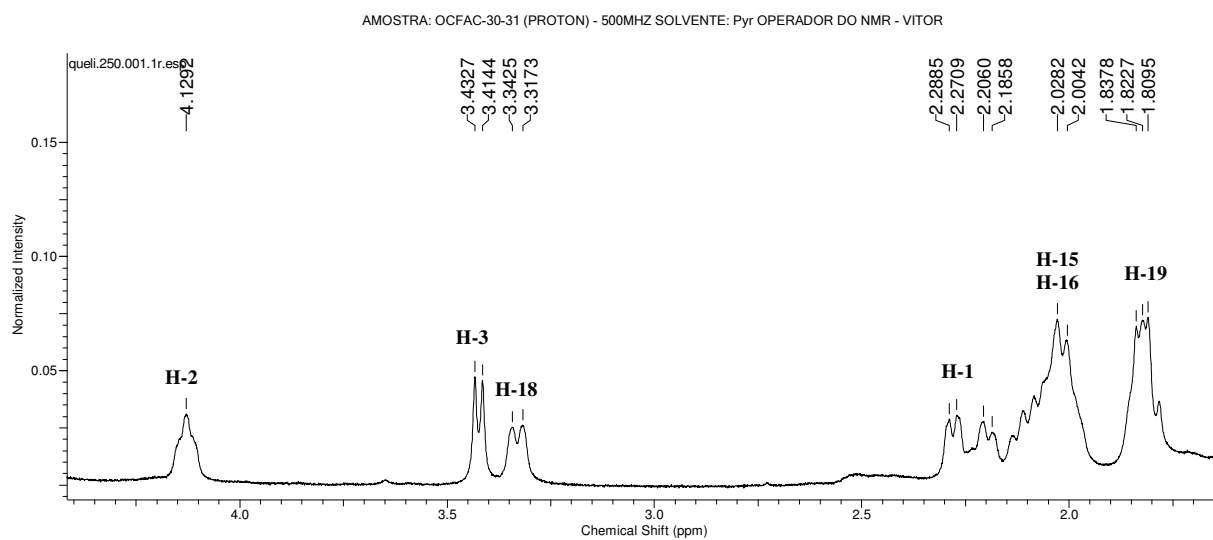
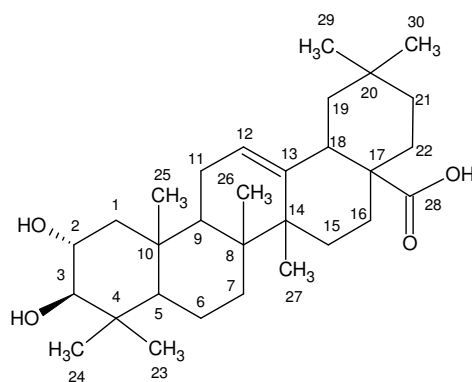


Figura 106. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, Piridina- d_6) da substância **17**



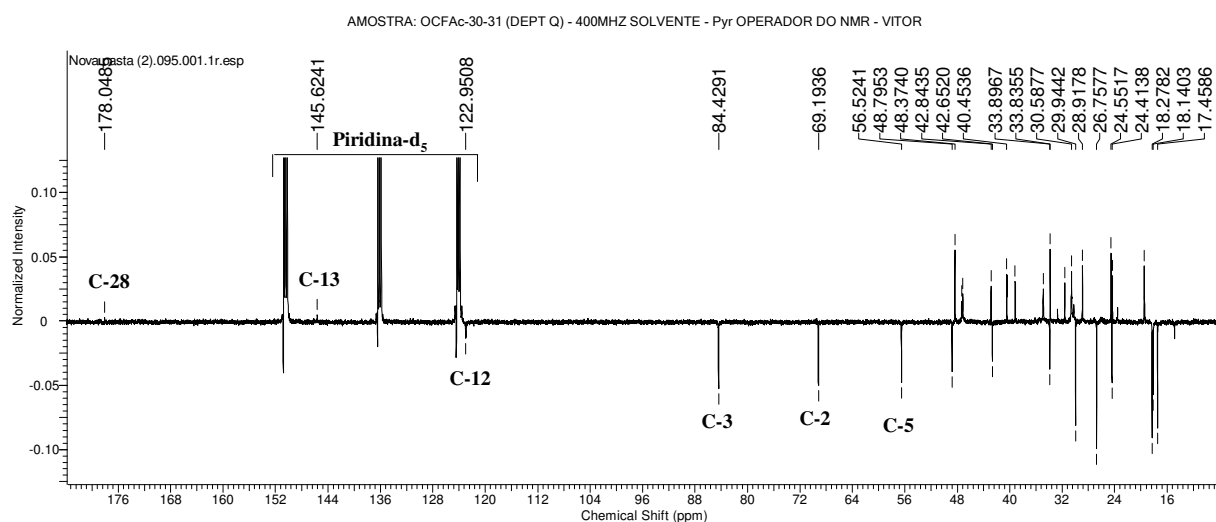


Figura 107. Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, Piridina-d₆) da substância 17

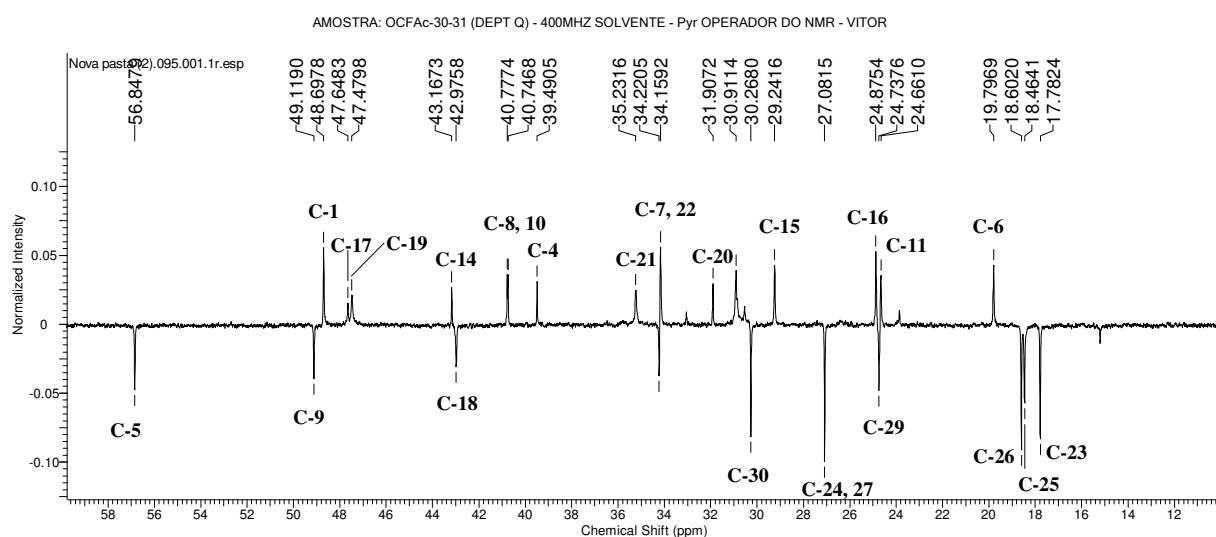
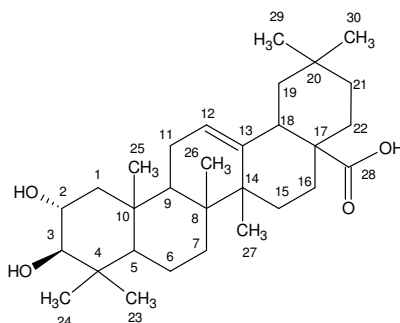


Figura 108. Expansão do espectro de RMN ¹³C (100 MHz, Piridina-d₆) da substância 17



2.6.20. Diidrochrysoflavona (18) isolada de OCHSFM

A fração OCHSFM-15-P3 forneceu um precipitado amarelo e solúvel em metanol. O espectro de RMN ^1H (**Figuras 109-111**, p. 131 e 132) mostrou sinais compatíveis com estrutura de biflavonoide pela quantidade de sinais e a presença dos sistemas AA'BB' e ABC em anel aromático. O sistema AA'BB' apresentou um par de dubletos em δ_{H} 6,96 e 7,48 com $J = 8,8$ Hz, atribuídos aos hidrogênios H-3'''/5''' e H-2'''/6''' , respectivamente. O sistema ABC foi determinado pelos sinais em δ_{H} 7,70 (*sl*, H-2'), 7,83-7,81 (*dd*, 8,5 e 2,3 Hz, H-6') e 7,12 (*d*, 8,5 Hz, H-5'). Foi observado em δ_{H} 5,53 e 5,56 um duplo dubleto característico de H-2'' acoplado com H-3'' de esqueleto de flavanona, com $J = 3,0$ e 11,0 Hz. Em δ_{H} 5,85 (*d*, 2,4 Hz) e 5,81 (*d*, 2,4 Hz), foram observados dois dubletos os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-6'' , respectivamente. Os simpletos em δ_{H} 6,14 e 6,37 foram atribuídos a H-8'' e H-8, respectivamente. Em δ_{H} 6,79 foi observado um simpleto que foi atribuído ao H-3 e em δ_{H} 3,27 (*dd*, 16,0 e 11,0 Hz) e 2,82 (*dd*, 16,0 e 3,2 Hz) duplo dupletos atribuídos ao H-3''. Em δ_{H} 12,94 (HO-5'') e 12,17 (HO-5) foram observados sinais compatíveis com hidrogênio de hidroxila quelada. A atribuição feita para os hidrogênios H-3 e H-3'' foi confirmada pelo espectro de NOEDIFF (**Figura 115**, p. 133, comparar com o espectro de RMN ^1H **Figura 114**, p. 133) através da irradiação do sinal em 6,52 ppm (H-3) que deu nOe em 7,71 (*dd*, H-6') e 7,56 (*d*, H-2') e permitiu propor o esqueleto da flavona com sistema ABC no anel B e da flavanona com sistema AA'BB' no anel B. O espectro de RMN ^{13}C (**Figuras 112 e 113**, p. 132) mostrou sinais compatíveis com um biflavonoide formado por uma unidade flavanona e outra flavona, com ligação C-O-C entre os monômeros. Os sinais em δ_{C} 195,7 (C-4) e 181,9 (C-4'') são sinais característicos de carbonila, sendo atribuído à estrutura da flavanona o sinal de maior valor e a flavona o de menor, uma vez que na estrutura de flavona a carbonila encontra-se conjugada com a dupla ligação nos carbonos C-2 e C-3. Os sinais δ_{C} 164,0; 163,2; 162,9; 161,8; 158,1; 157,8 e 143,3 foram atribuídos a carbonos de sistema aromático, ligados a hidroxila C-7, C-7'', C-2'', C-5, C-5'', C-9/9'' e C-3', respectivamente. Os sinais correspondentes aos carbonos C-4' e C-4''' não foram observados. Em δ_{C} 128,8 (C-2'''/6''') e 116,5 (C-3'''/5''') foram observados os carbonos do anel B com sistema AA'BB'. Os carbonos C-6'', C-8'', C-3'', C-1''' e C-10'' foram atribuídos aos sinais δ_{C} 96,7; 94,6; 103,6; 121,7 e 101,7; respectivamente. Foi observado um sistema ABC com os sinais em δ_{C} 118,4; 120,5 e 125,1 conferidos aos carbonos C-2', C-5' e C-6'. Os demais sinais característicos de flavanona foram observados em δ_{C} 42,1; 78,2; 96,1; 99,6; 103,7; 133,0 e atribuídos aos carbonos C-3, C-2, C-8, C-6, C-10 e C-1', respectivamente. Através dessas análises e comparação com a literatura (LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 2001) foi possível

propor a estrutura de biflavonoides conhecido como 2'',3''-diidrochnaflavona, isolado em várias espécies do gênero *Ochna*.

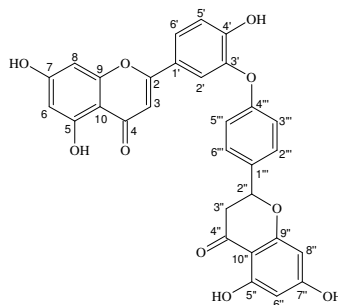


Tabela 23. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **18** em comparação com dados da literatura para 2'',3''-diidrochnaflavona (LIKHITWITAYAWUID *et al.*,2001).

C	Substância 18 (500MHz; DMSO-d ₆)		2'',3''-diidrochnaflavona (500 MHz; DMSO-d ₆)	
	δ_{H} (mult. J)		δ_{H} (mult. J)	
2	163,2		163,3	
3	103,6	6,79 (s)	104,0	6,83
4	181,9		182,2	
5	161,8		161,9	
6	99,6	5,85 (d; 2,0 Hz)	99,4	6,18 (d; 2,1 Hz)
7	163,9		164,7	
8	96,1	6,37 (sl)	94,6	6,47 (d; 2,1 Hz)
9	157,8		157,8	
10	103,7		104,2	
1'	121,7		122,7	
2'	120,5	7,70 (sl)	121,5	7,79 (d; 2,5 Hz)
3'	143,3		142,8	
4'	-		154,0	
5'	118,4	7,12 (d, 8,5 Hz)	118,3	7,13 (d; 8,5 Hz)
6'	125,1	7,83 (dd; 2,0 e 8,5 Hz)	125,3	7,85 (dd; 2,5 e 8,5 Hz)
2''	78,2	5,56 (dd, 3,0 e 11,0 Hz)	78,5	5,53 (dd; 12,6 e 3,0 Hz)
3''	42,1	3,27 (dd, 16,0 e 11,0 Hz)	42,5	3,27 (dd; 17,1 e 12,6 Hz)
		2,82 (dd, 16,0 e 3,2 Hz)		2,74 (dd, 17,1 e 3,0 Hz)
4''	195,8		196,5	
5''	158,1		164,0	
6''	96,7	5,81 (d; 2,0 Hz)	96,4	5,87 (d, 2,2 Hz)
7''	163,2		167,2	
8''	94,6	6,15 (sl)	95,5	5,89 (d, 2,2 Hz)
9''	157,8		163,3	
10''	101,7		102,2	
1'''	132,9		132,8	
2'''/6'''	128,8	7,49 (d, 8,8 Hz)	128,8	7,47 (d; 8,9 Hz)
3'''/5'''	116,6	6,96 (d, 8,8 Hz)	116,2	6,92 (d; 8,9 Hz)
4'''	161,8		158,5	
5-OH		12,17 (s)		12,90 (s)
5''-OH		12,94 (s)		12,13 (s)

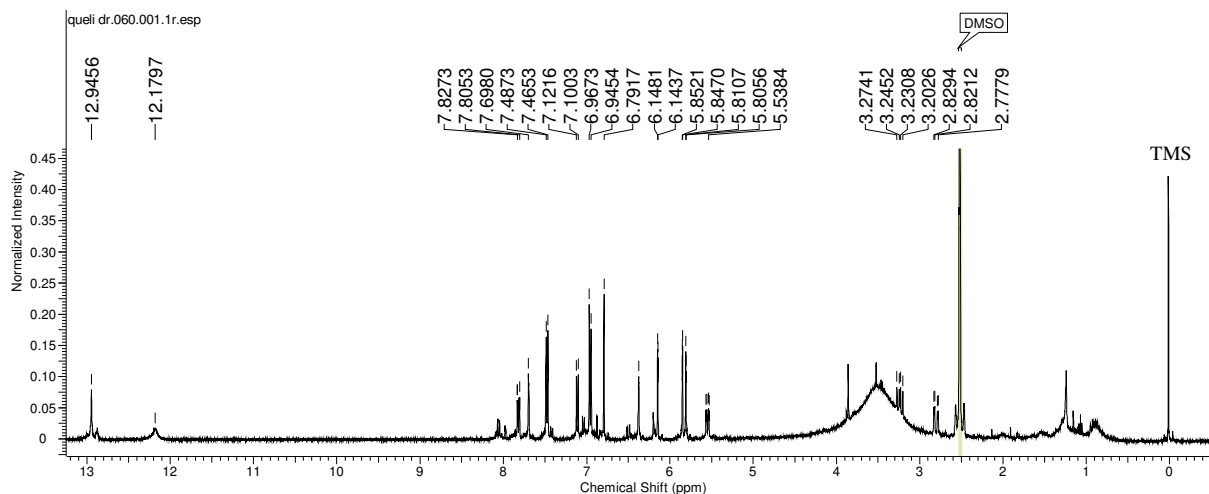


Figura 109. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) da substância 18

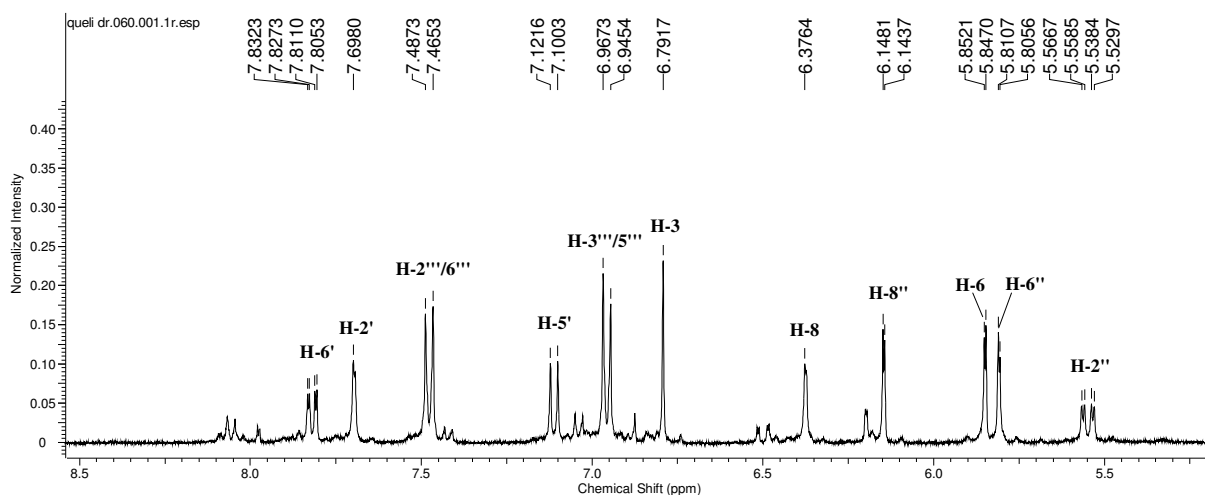
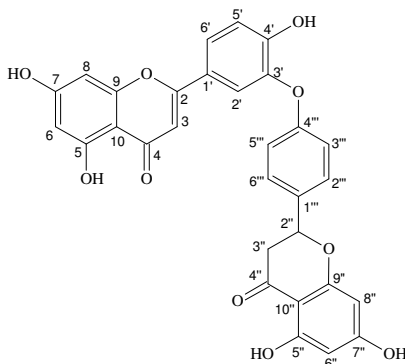


Figura 110. Expansão espectro de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) da substância 18



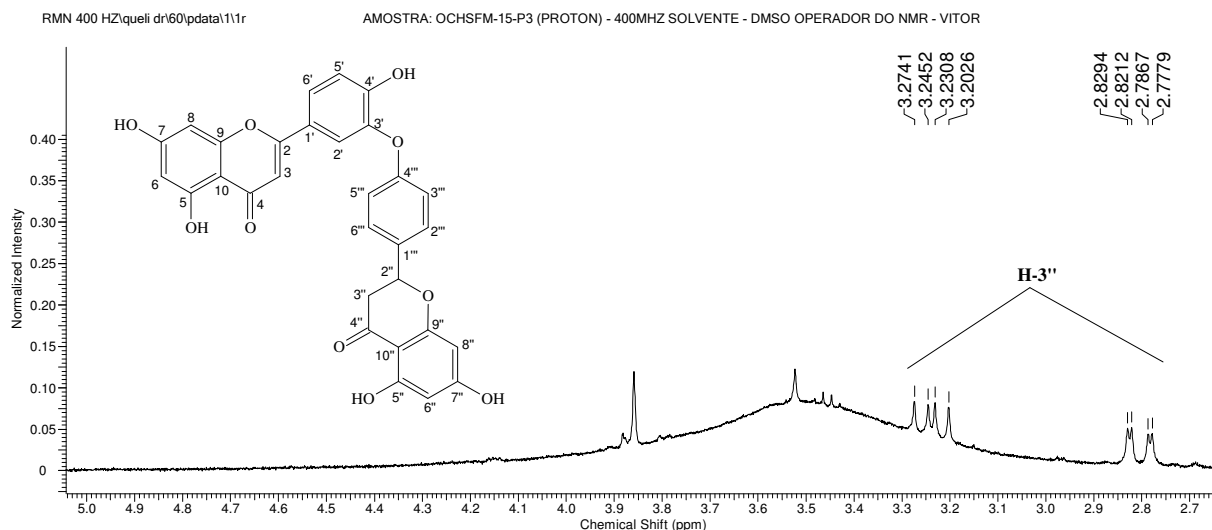


Figura 111. Expansão espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) da substância 18

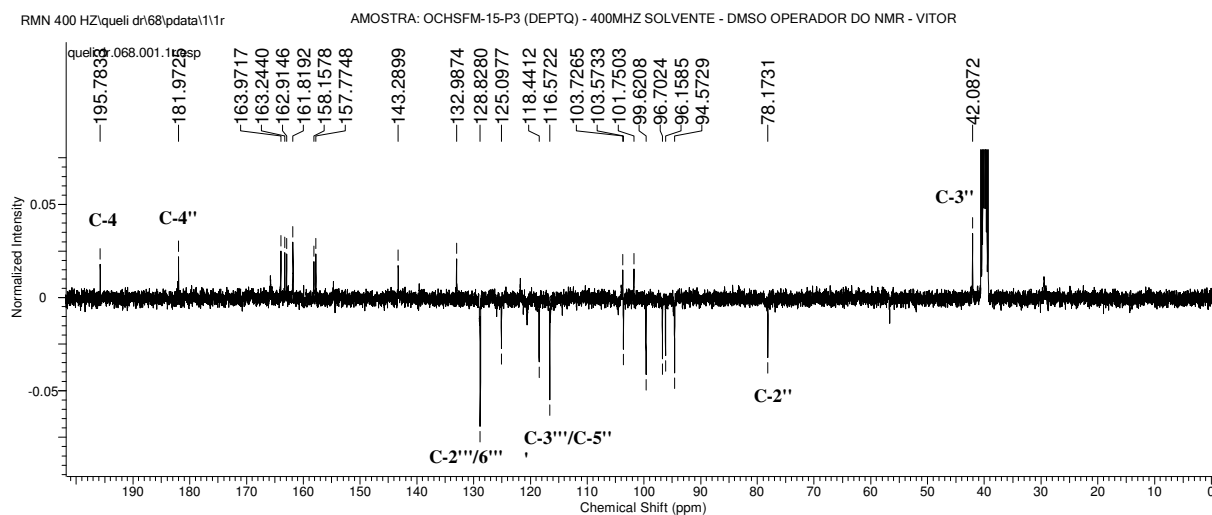


Figura 112. Espectro de RMN ^{13}C DEPTQ (100 MHz, DMSO- d_6) da substância 18

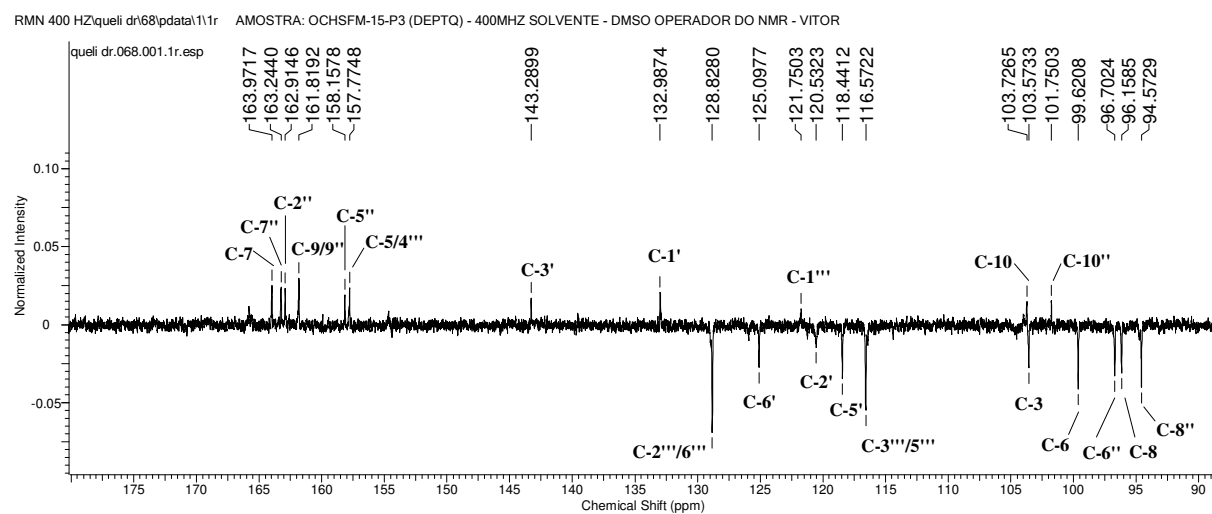


Figura 113. Expansão espectro de RMN ^{13}C DEPTQ (100 MHz, DMSO- d_6) da substância 18

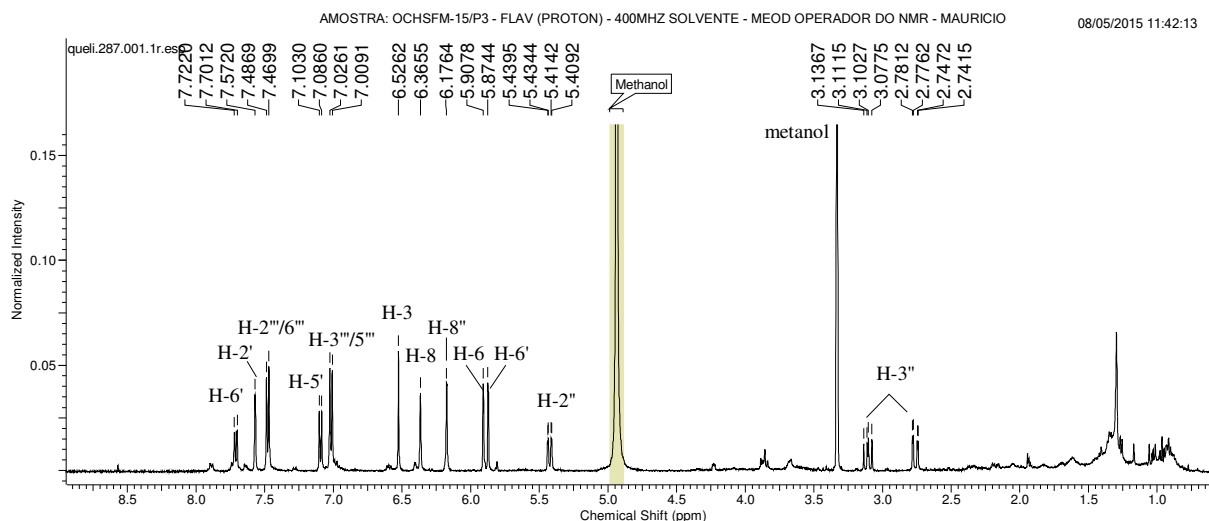


Figura 114. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD) da substância **18**

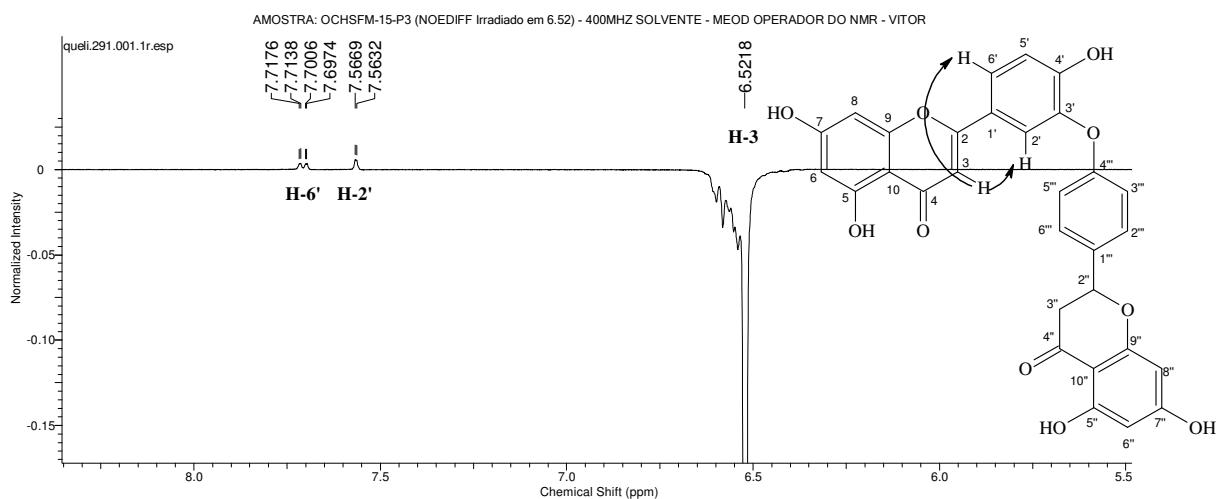
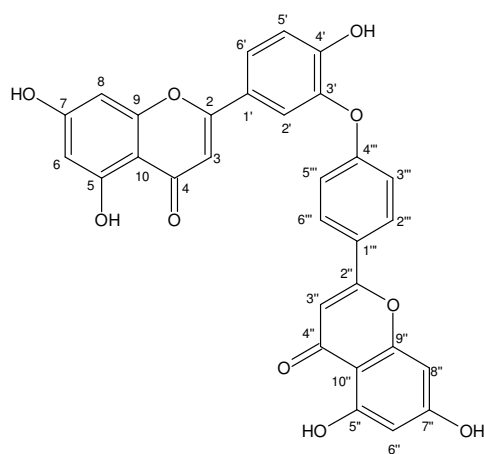


Figura 115. Espectro de NOEDIFF (400 MHz, MeOD) da substância **18** com irradiação na frequência 6,52.

2.6.21. Ochnaflavona (**19**) isolada de OCHSFM

O espectro de RMN de ^1H (**Figuras 116 e 117**, p. 136) apresentou dois grupos hidroxilas em ligação de hidrogênio com a carbonila, δ_{H} 12,89 (HO-5) e 12,92 (HO-5''). Foi observado um par de dubletos em δ_{H} 8,07 (d, 9,0 Hz, H-2'''/6''') e 7,06 (d, 9,0 Hz, H-3'''/5''') correspondendo a um sistema AA'-BB' atribuído ao anel B de flavonoides. Os sinais observados em δ_{H} 6,89 (s, H-3) e 6,88 (s, H-3'') mostram ser compatíveis com o esqueleto de flavona. Um par de dubletos foi observado em δ_{H} 6,22 (d, 2,0 Hz, H-8'') e 6,20 (d, 2,0 Hz, H-6'') e em δ_{H} 6,51 foi observado um tripleto formado pelo par de dubletos esperado para os hidrogênios H-8/6. Os sinais em δ_{H} 7,92 (H-6'); 7,18 (H-5') e 7,91 (H-2') foram conferidos aos hidrogênios de um sistema ABC de anel B. No espectro de RMN ^{13}C (**Figuras 118-120**, p. 137) foram observados sinais compatíveis com um esqueleto de

biflavonoides apresentando flavonas como monômeros. Em δ_C 182,2 foi observado sinal característico de carbonila conjugada. Em δ_C 164,8 (C-7''), 164,7 (C-2''), 163,5 (C-2), 163,1 (C-7), 161,9 (C-5''), 161,8 (C-5), 161,3 (C-4'''), 157,8 (C-9/9''), 153,8 (C-4') e 142,1 (C-3') foram observados sinais compatíveis a carbonos de sistema aromático ligados a hidroxila. O sistema AA'-BB' foi comprovado pelos sinais em δ_C 128,9 (C-2'''/6''') e 118,5 (C-3'''/5'''), bem como o sistema ABC pelos sinais δ_C 126,8 (C-6'), 121,7 (C-5') e 118,4 (C-2'). Os sinais em δ_C 104,5 e 104,0, atribuídos aos carbonos C-3 e C-3'', respectivamente, confirma a proposta de flavonas como monômeros. Os demais sinais δ_C 124,8(C-1'), 122,8 (C-1'''), 104,3 (C-10), 104,2 (C-10''), 99,4 (C-6), 99,3 (C-6''), 94,6 (C-8) e 94,5 (C-8'') são compatíveis com a proposta de biflavonoide. A análise destes espectros e a comparação com dados da literatura (SON et al., 1992) permitiu chegar na estrutura da Ochnaflavona (ver **Tabela 24**, p. 135), um biflavonoide comum no gênero *Ochna* e considerado um marcador quimiotaxonômico desse gênero.



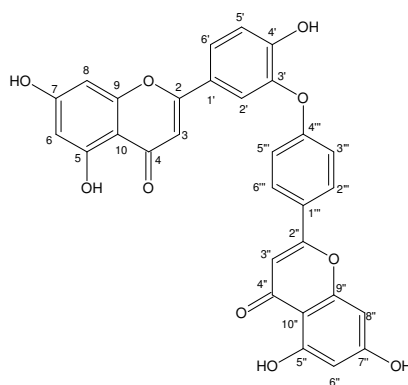
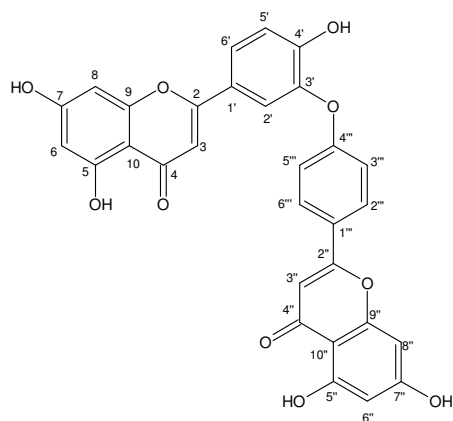


Tabela 24. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **19** em comparação com dados da literatura para ochnaflavona (SON et al., 1992)

C	Substância 19 (500MHz; DMSO- d_6)		Ochnaflavona (300 MHz; DMSO- d_6)	
	δ_C	δ_H (mult. J)	δ_C	δ_H (mult. J)
2	163,5		163,0	
3	104,5	6,89 s	103,6	6,86 s
4	182,2		181,7	
5	161,9		161,4	
6	99,4	6,20 d; 2,0 Hz	98,9	6,20 d; 1,8 Hz
7	163,1		164,1	
8	94,6	6,51 d; 2,0 Hz	94,0	6,49 d; 1,8 Hz
9	157,8		157,3	
10	104,3		103,8	
1'	124,8		122,3	
2'	118,4	7,91 sl	121,2	7,91 d; 1,8 Hz
3'	142,1		141,6	
4'	153,8		153,2	
5'	121,7	7,20 d; 9,2 Hz	117,9	7,17 d; 9,2 Hz
6'	125,8	7,93 m	125,3	7,90 dd; 9,2 e 1,8 Hz
2''	164,7		162,2	
3''	104,1	6,88 s	104,1	6,86 s
4''	182,2		181,7	
5''	161,9		161,4	
6''	99,4	6,22 d; 2,0 Hz	98,9	6,20 d; 1,8 Hz
7''	164,8		164,2	
8''	94,5	6,50 d; 2,0 Hz	94,0	6,49 d; 1,8 Hz
9''	157,8		157,3	
10''	104,2		103,8	
1'''	122,8		124,4	
2'''/6'''	128,9	8,08 d; 8,8 Hz	128,4	8,04 d; 8,8 Hz
3'''/5'''	116,6	7,06 d; 8,8 Hz	116,1	7,04 d; 8,8 Hz
4'''	161,3		160,7	
5-OH		12,89		12,86 s
5''-OH		12,92		12,89



RMN 400 HZ\quei dr\54\pdata\1\1r

AMOSTRA: OCHSFM-17 (PROTON) - 400MHZ SOLVENTE - DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO

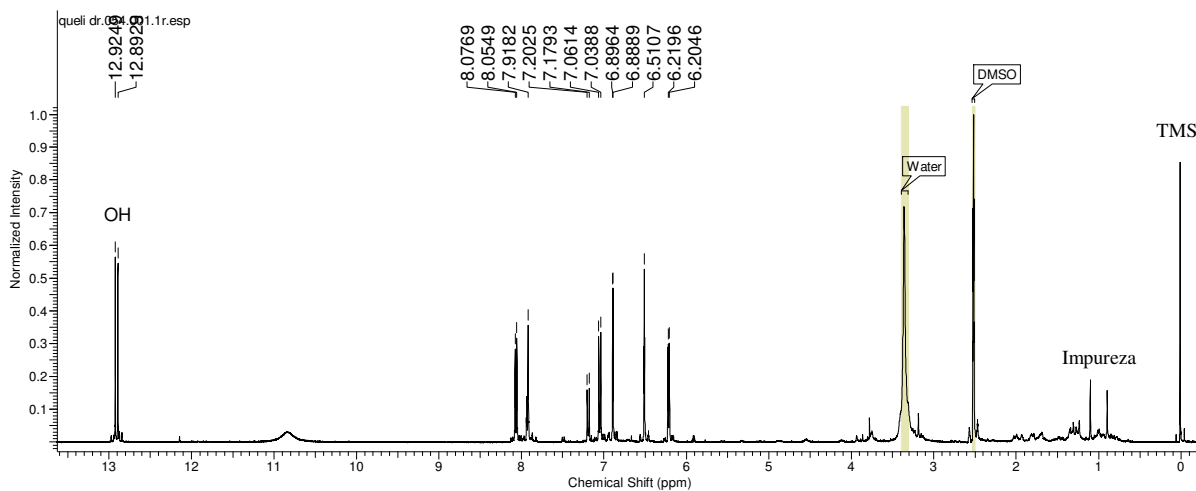


Figura 116. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) da substância **19**

RMN 400 HZ\quei dr\54\pdata\1\1r

AMOSTRA: OCHSFM-17 (PROTON) - 400MHZ SOLVENTE - DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO

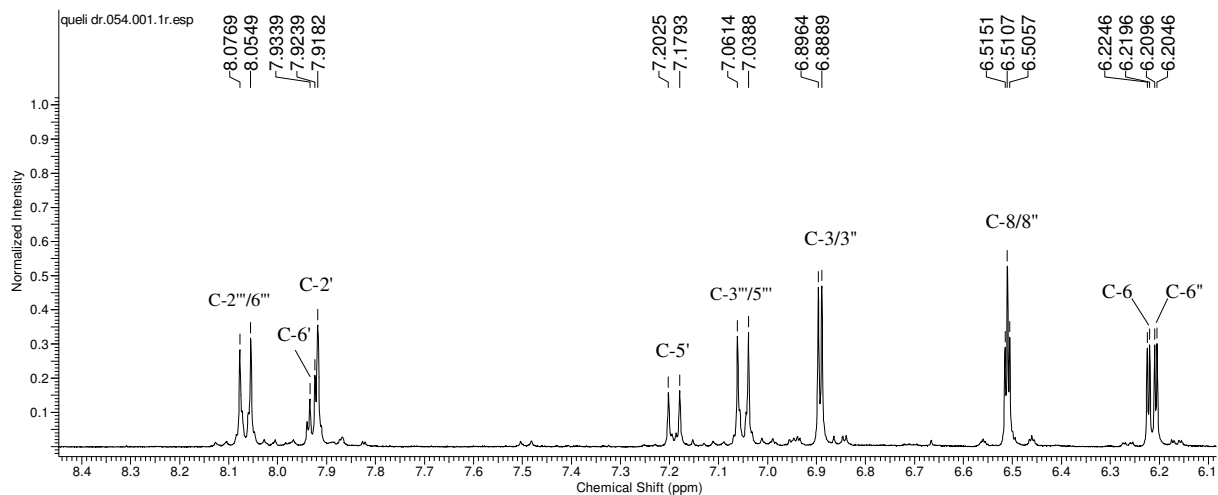


Figura 117. Expansão espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) da substância **19**

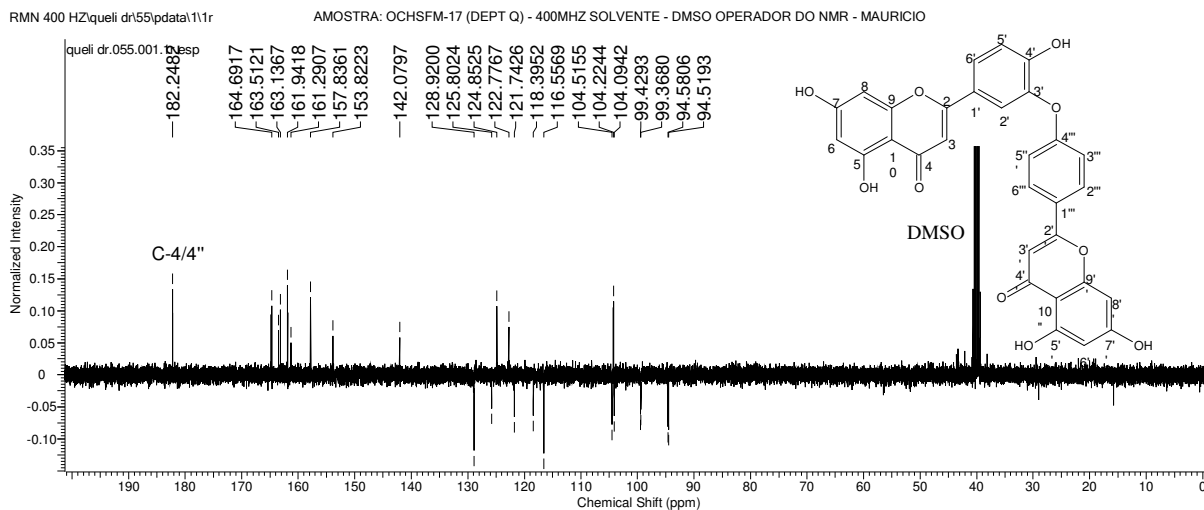


Figura 118. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) da substância 19

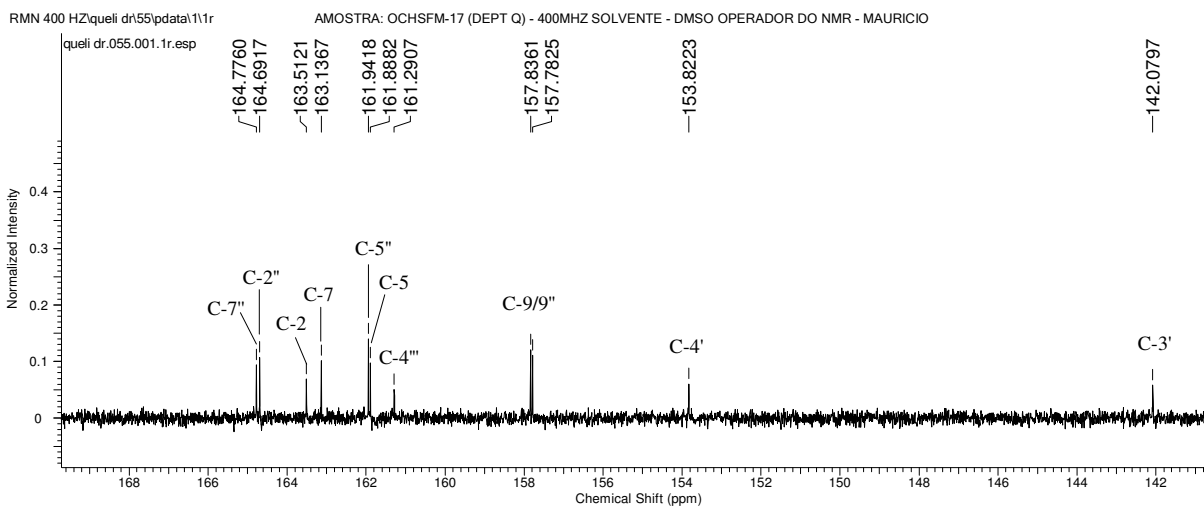


Figura 119. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) da substância 19

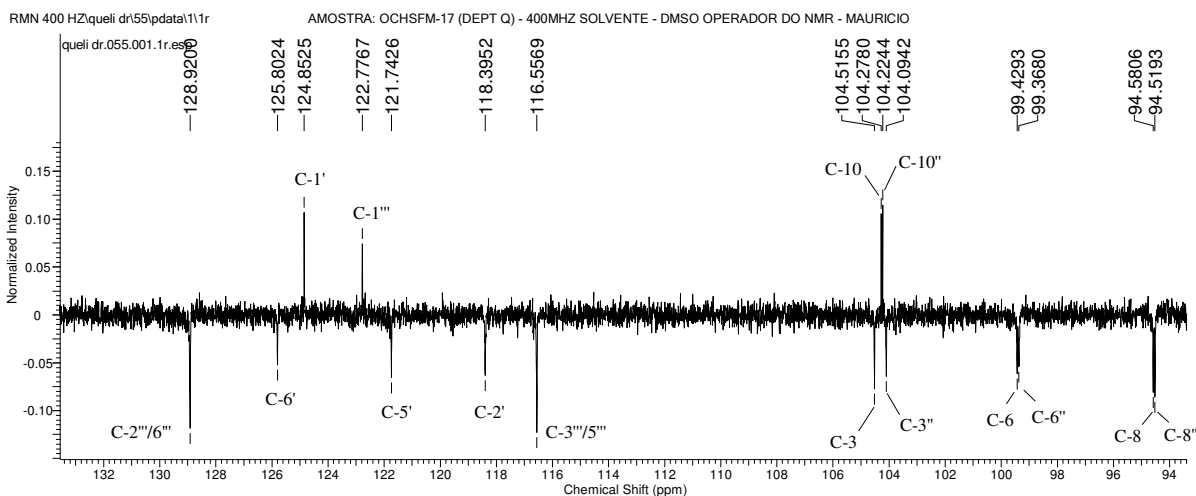


Figura 120. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) da substância 19

2.6.22. 6''-acetil-scoparosídeo (20) isolada de OCHSFM

A fração OCHSFM-18(S-6-9/9-11) foi obtida do fracionamento em Sephadex LH-20 e analisada inicialmente por RMN ^1H e ^{13}C . O espectro de RMN ^1H (**Figura 121 e 122**, p. 140) apresentou sinais característicos de flavonoide em mistura contendo uma unidade de glicose. A estrutura da substância **20** aparenta ser a majoritária e foi possível atribuir a ela todos os hidrogênios e carbonos. Em δ_{H} 6,21 e 6,77 foram observados dois simpletos típicos de H-6 e H-3 de esqueleto de flavona, respectivamente. Em δ_{H} 6,88 à 6,90 foram encontrados sinais sobrepostos atribuídos a H-2' e H-5' do anel B. Um simpleto largo em δ_{H} 8,26 foi atribuído ao H-6 e em δ_{H} 13,29 foi observado um sinal típico de hidroxila quelada. Dois simpletos intensos foram observados em δ_{H} 3,89 e 1,98, estes foram atribuídos aos hidrogênios de metoxila e metila, respectivamente. Foram observados sinais característicos de carboidratos, em δ_{H} 4,74 (*sl*, H-1''); 4,21 (*sl*, H-2''); 3,46 (*m*, H-3''); 3,85 (*m*, H-4'', 5''), 4,10 (*t*, H-6''); os mesmos estão de acordo para a estrutura da glicose ligada ao esqueleto de flavona por uma ligação C-glicosídeo. Pela ausência de um sinal típico de H-8 no anel A, foi proposta a ligação C-glicosídeo ao C-8. A análise de RMN ^{13}C (**Figuras 123-124**, p. 141) confirma a proposta, bem como o experimento de HSCQ (**Figuras 125-127**, p. 142-144). Os deslocamentos químicos de ^{13}C são apresentados na **tabela 25**, p. 139. Em δ_{C} 99,0 (C-6) aparece um sinal de carbono ligado ao hidrogênio com valor de δ_{H} 6,21. O sinal em 105,1 foi atribuído ao C-8, o aumento no deslocamento químico é o esperado para uma ligação C-glicosídeo com uma unidade de glicose. A presença de sinais em δ_{C} 170,8 (C=O) e 21,2 (CH₃) permitiu propor a presença de um grupo acila ligada ao C-6'' do carboidrato. Foi observado no espectro de carbono um sinal característico de metileno em δ_{C} 65,5; o qual está de acordo com o valor de deslocamento químico esperado para o C-6'' contendo um grupo acila ligado a ele. A análise do espectro de HMBC (**Figura 128**, p. 145) mostrou a interação MeO/C-3' confirmando a posição da metoxila. A substância **21** foi analisada por espectrometria de massa (EM-IES). O espectro de EM/EM realizado em modo negativo, mostrou um pico m/z 503,1195 sendo este reconhecido como o íon molecular (**Figura 126**, p. 146). O valor do íon molecular é compatível com a fórmula molecular C₂₄H₂₄O₁₂. No espectro da segunda ionização (EM/EM) foram observados os fragmentos m/z 443,0981; 371,0769 e 341,0667. As fragmentações foram justificadas (**Esquema 11**, p. 146) e confirmam a estrutura proposta para a substância **20**. A análise de todos esses dados conduziu a determinação da substância de **20** como sendo a 6''-acetil-scoparosídeo.

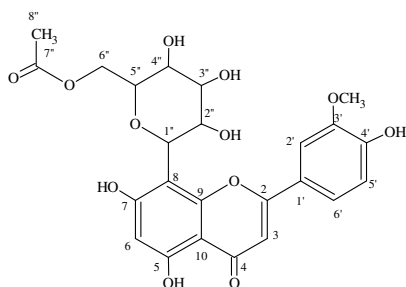


Tabela 25. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **20** em comparação com dados da literatura para 6''-acetil-scoparosídeo (BRUM-BOUSQUET, et al. 1977)

C	Substância 20 (DMSO- d_4)		6''-acetil-scoparosídeo (DMSO- d_4)	
	^{13}C δ_{C} (ppm)	^1H δ_{H} (mult. J =Hz)	^{13}C δ_{C} (ppm)	^1H δ_{H} (mult. J =Hz)
2	160,9	-		
3	102,8	6,88 (<i>s</i>)		6,90 (<i>s</i>)
4	182,3	-		
5	161,0	-		
6	99,0	6,21 (<i>s</i>)		6,27 (<i>s</i>)
7	161,6	-		
8	105,1	-		
9	161,1	-		
10	104,8	-		
1''	121,8	-		
2''	110,4	7,56 (<i>sl</i>)		7,57 (<i>m</i>)
3''	148,3	-		
4''	151,2	-		
5''	116,4	6,90 (<i>sl</i>)		6,98 (<i>m</i>)
6''	120,6	7,56 (<i>sl</i>)		7,57 (<i>m</i>)
1''	74,4	4,74 (<i>sl</i>)		5,14 (<i>d</i> , 10 Hz)
2''	68,4	4,21 (<i>sl</i>)		
3''	75,6	3,46 (<i>m</i>)		
4''	69,9	3,85 (<i>m</i>)		
5''	77,2	3,85 (<i>m</i>)		
6''	65,5	4,10 (<i>t</i>)		
7''	170,8	-		
8''	21,2	1,98 (<i>s</i>)		1,86 (<i>s</i>)
5-OH				13,20 (<i>s</i>)
OMe	56,5	3,89 (<i>s</i>)		3,90 (<i>s</i>)

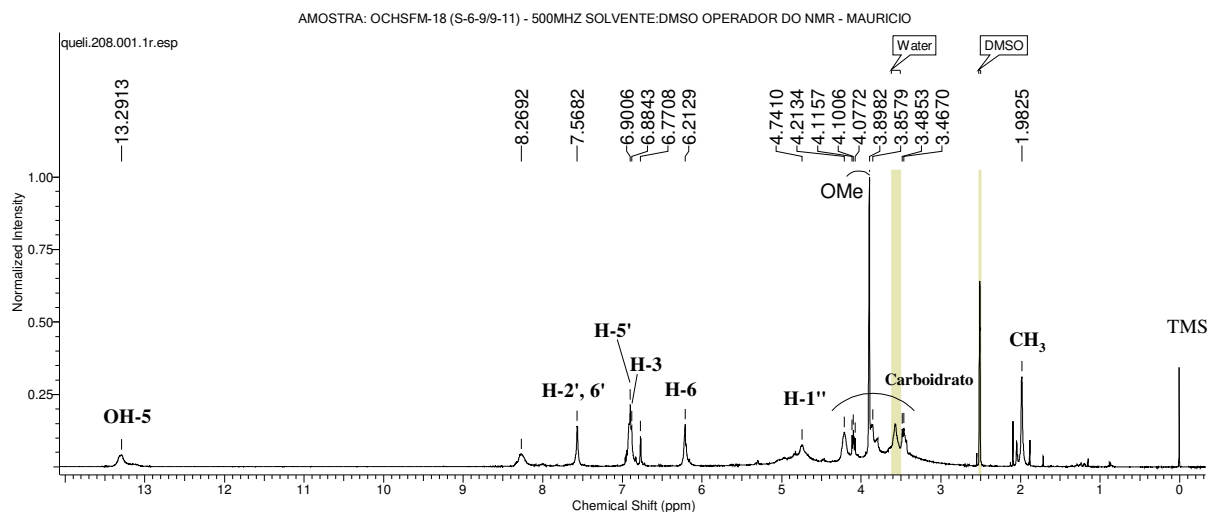


Figura 121. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da mistura de **21**

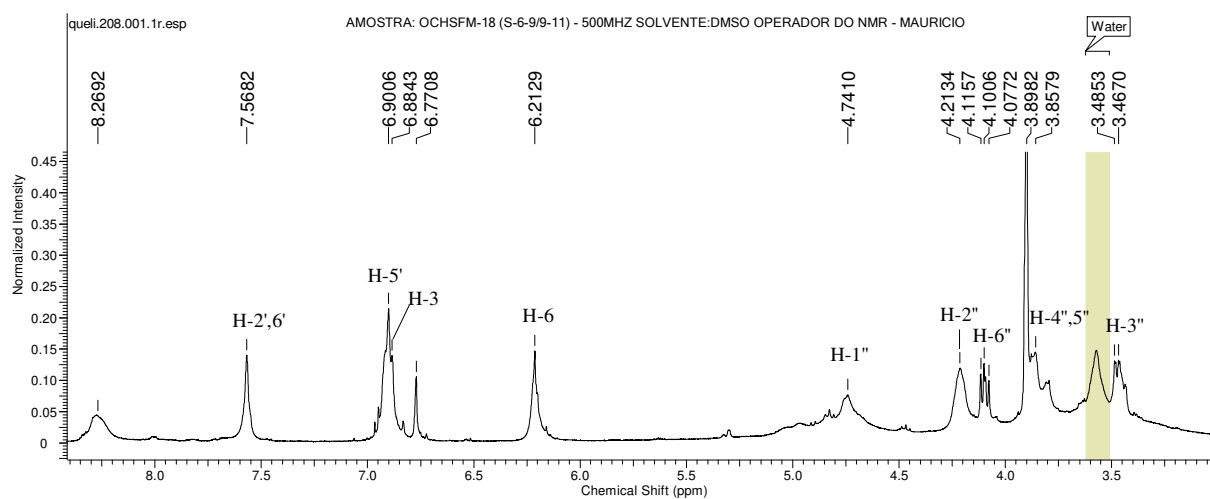
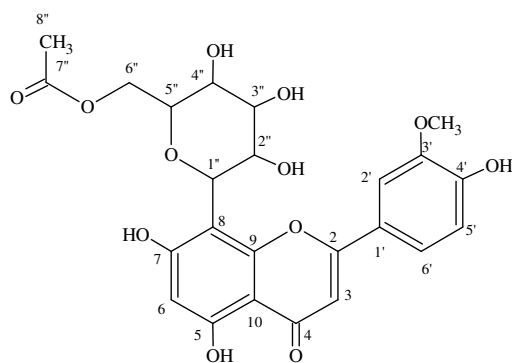


Figura 122. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da mistura de **21**



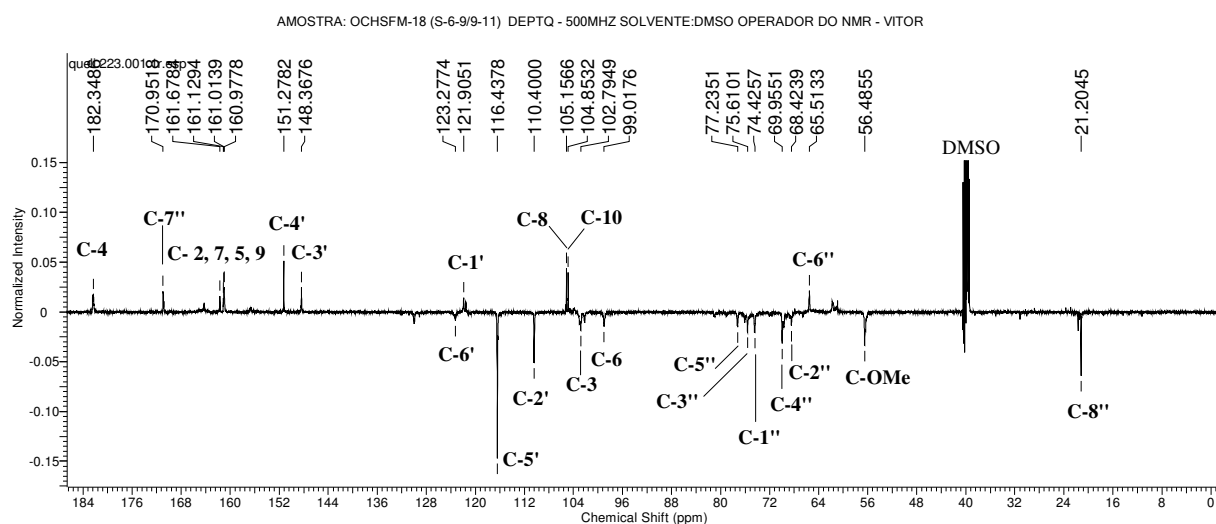


Figura 123. Espectro de RMN ^{13}C DEPTQ (125 MHz, DMSO- d_6) da mistura **21**

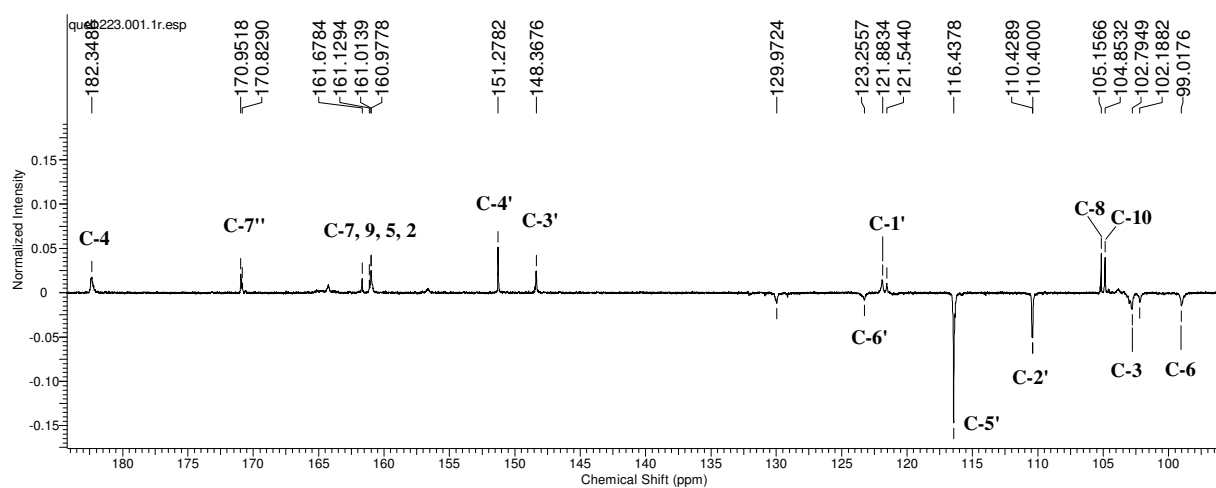
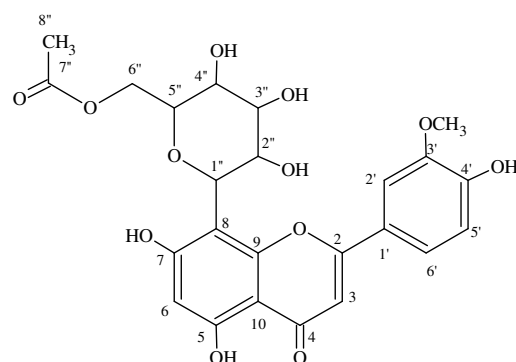


Figura 124. Expansão do espectro de RMN ^{13}C DEPTQ (125 MHz, DMSO- d_6) da mistura de **21**



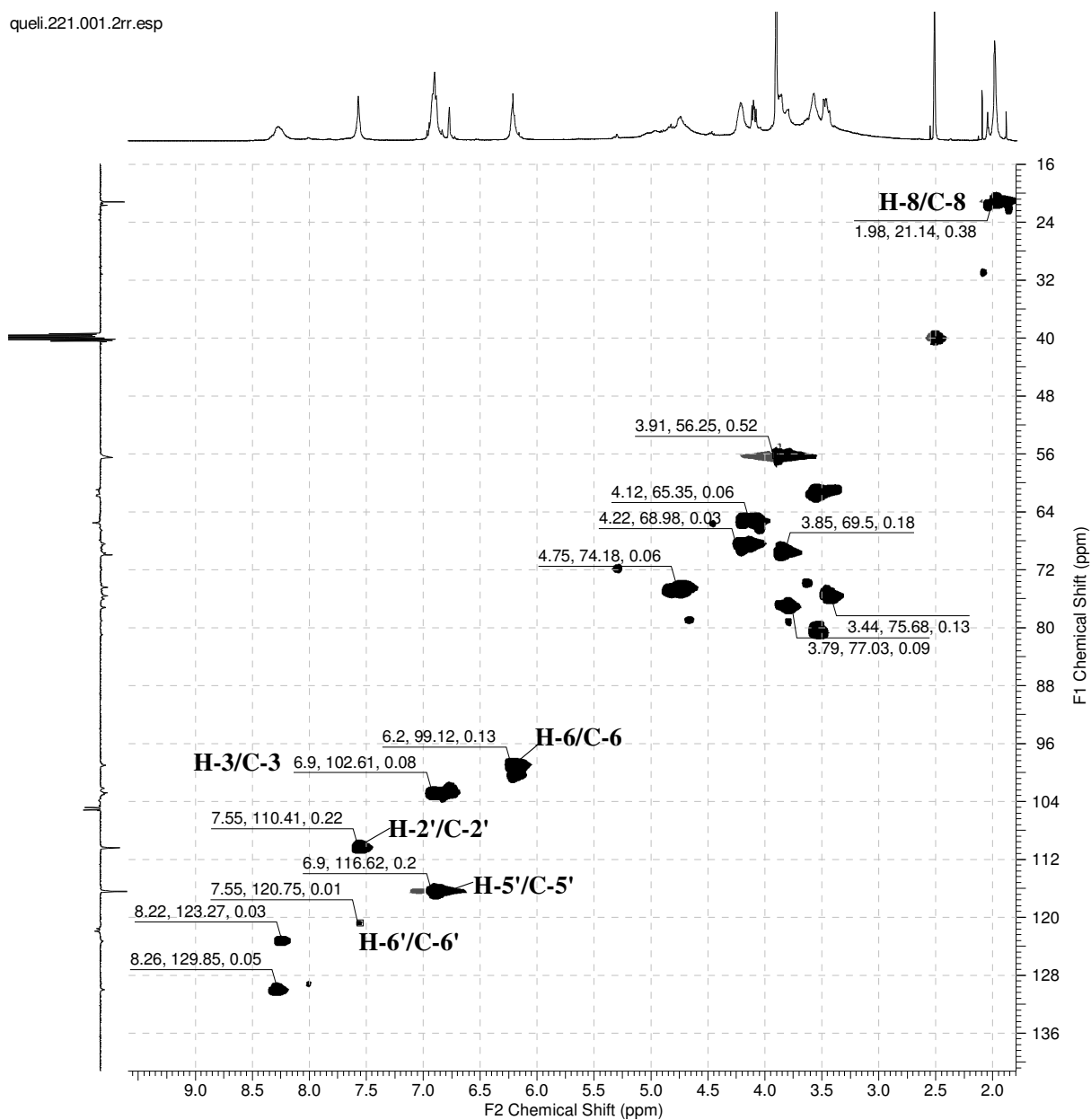
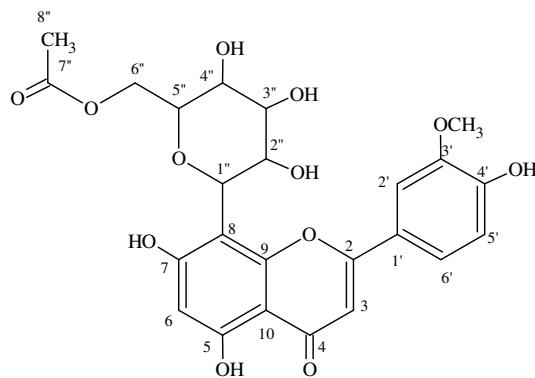


Figura 125. Mapa de contorno de HSQC (500 MHz, DMSO-d₆) da mistura de **21**



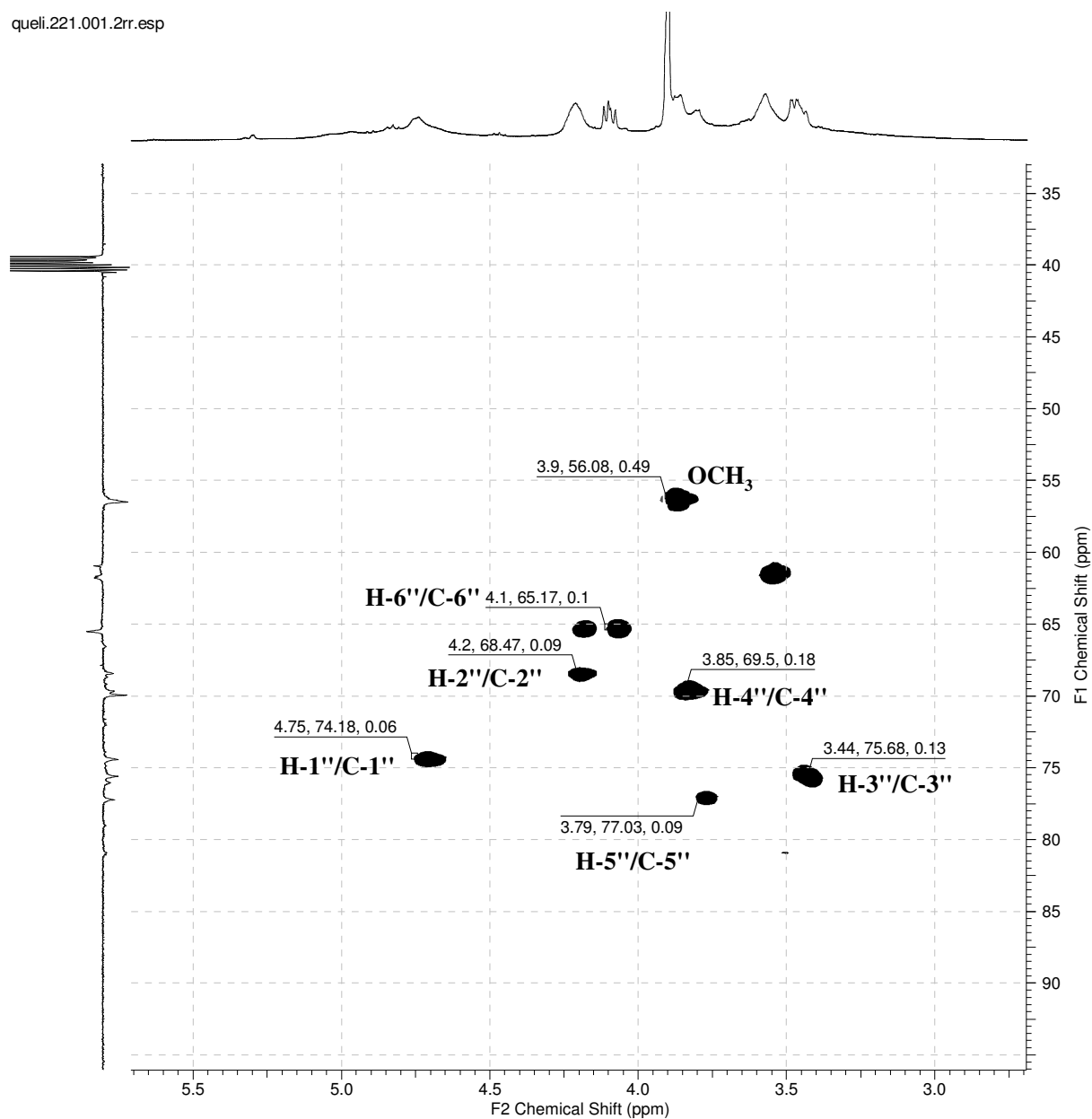
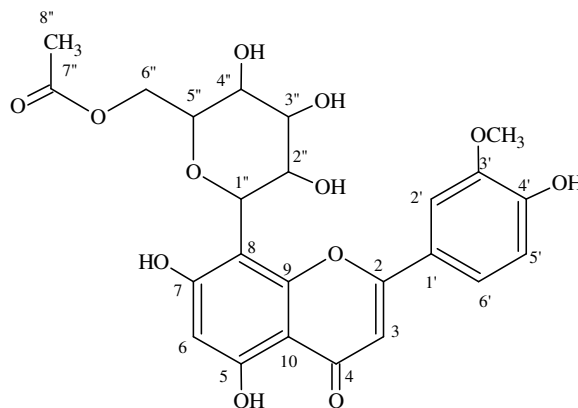


Figura 126. Mapa de contorno de HSQC (500 MHz, DMSO-d₆) da mistura de **21**



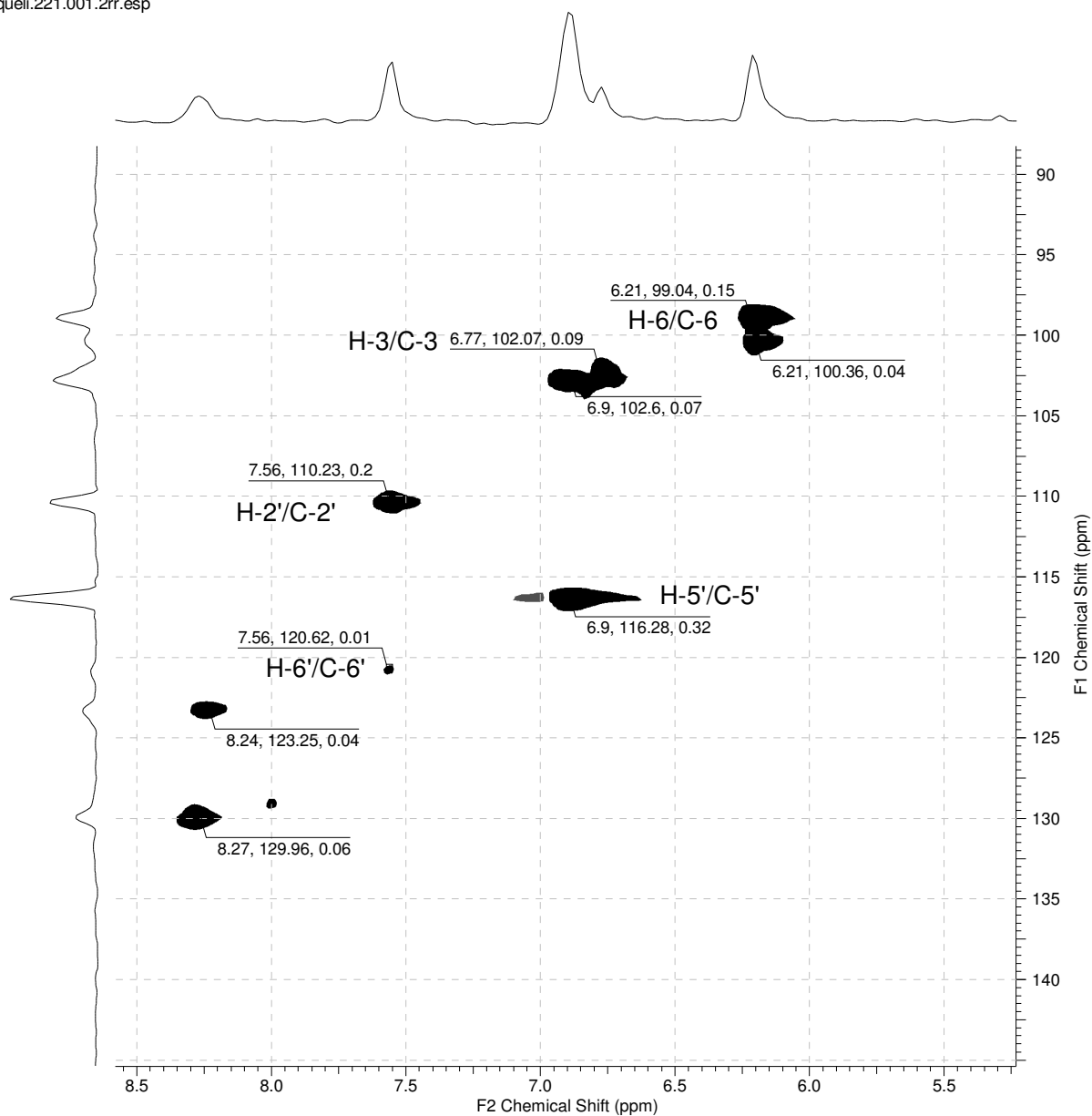
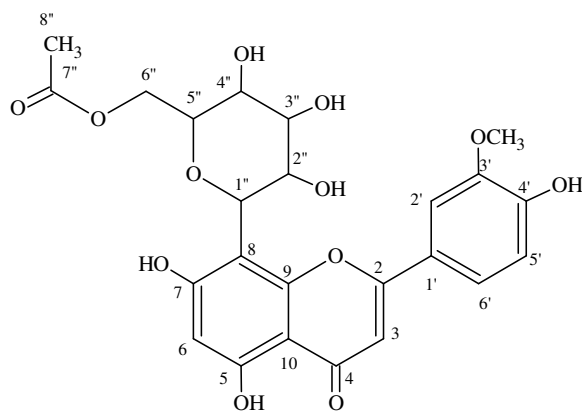


Figura 127. Mapa de contorno de HSQC (500 MHz, DMSO- d_6) da mistura de **21**



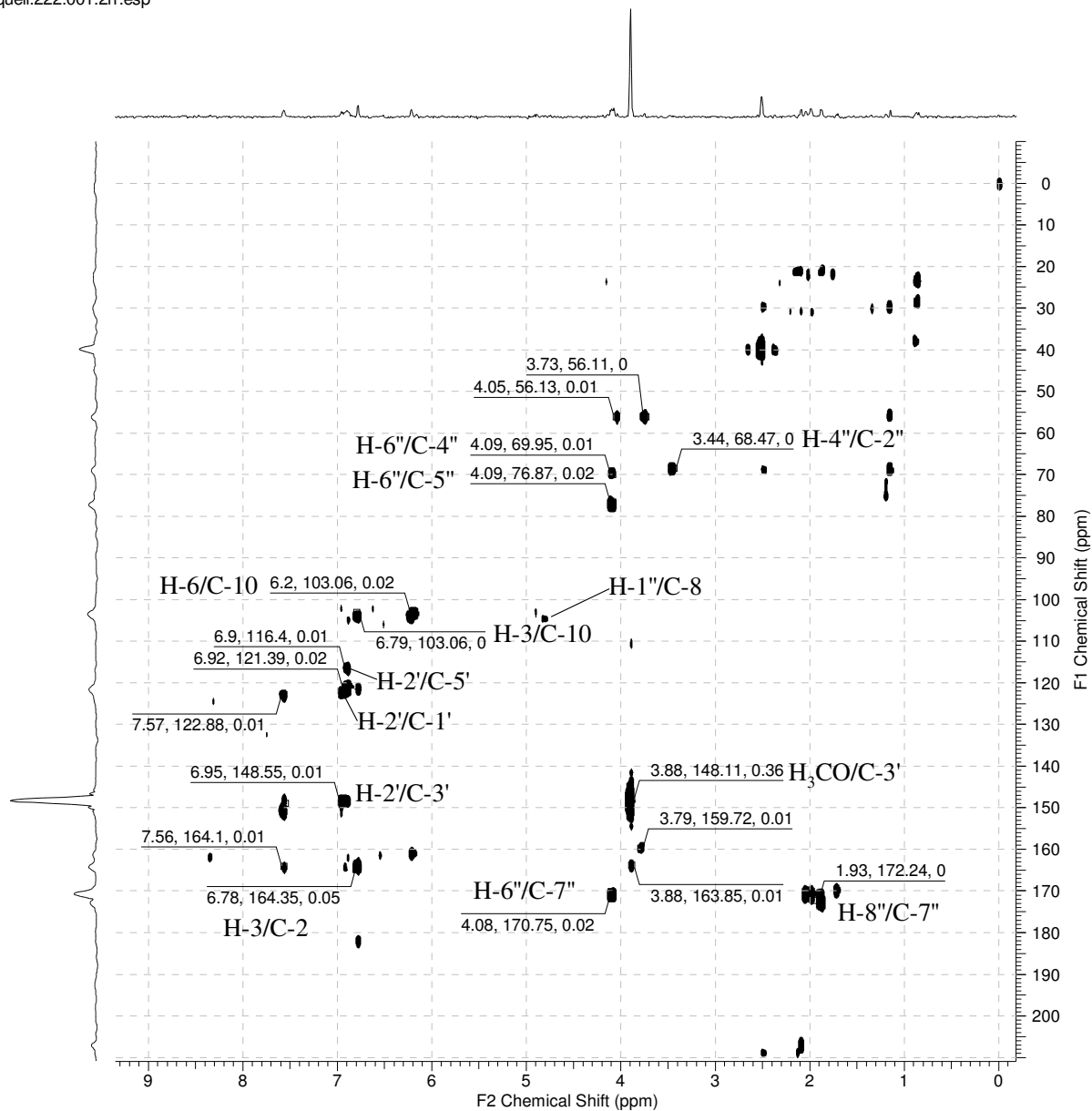
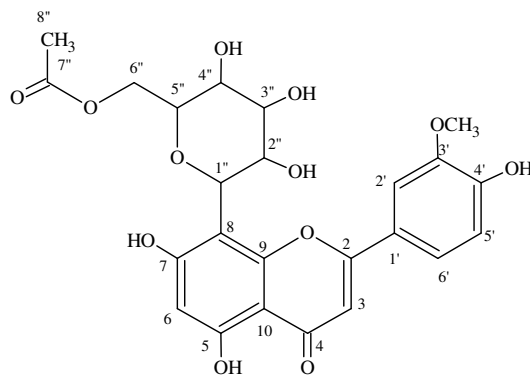


Figura 128. Mapa de contorno de HMBC (500 MHz, DMSO-d₆) da mistura de 21



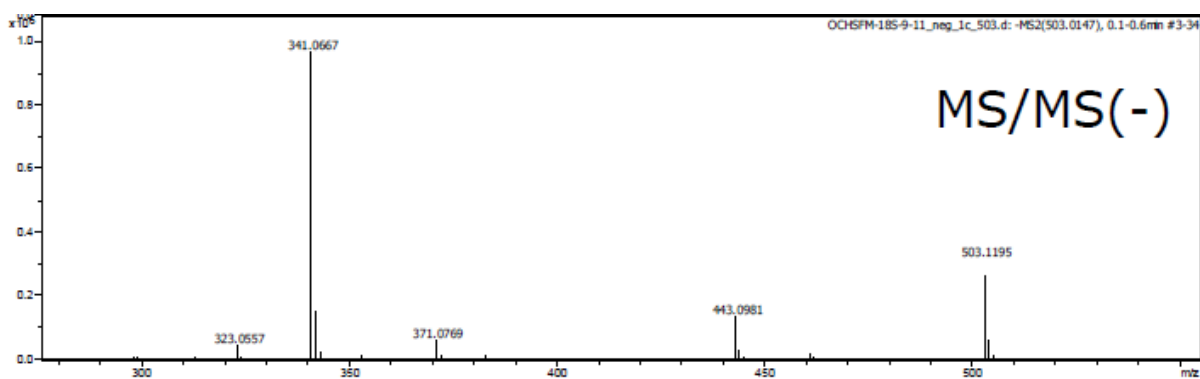
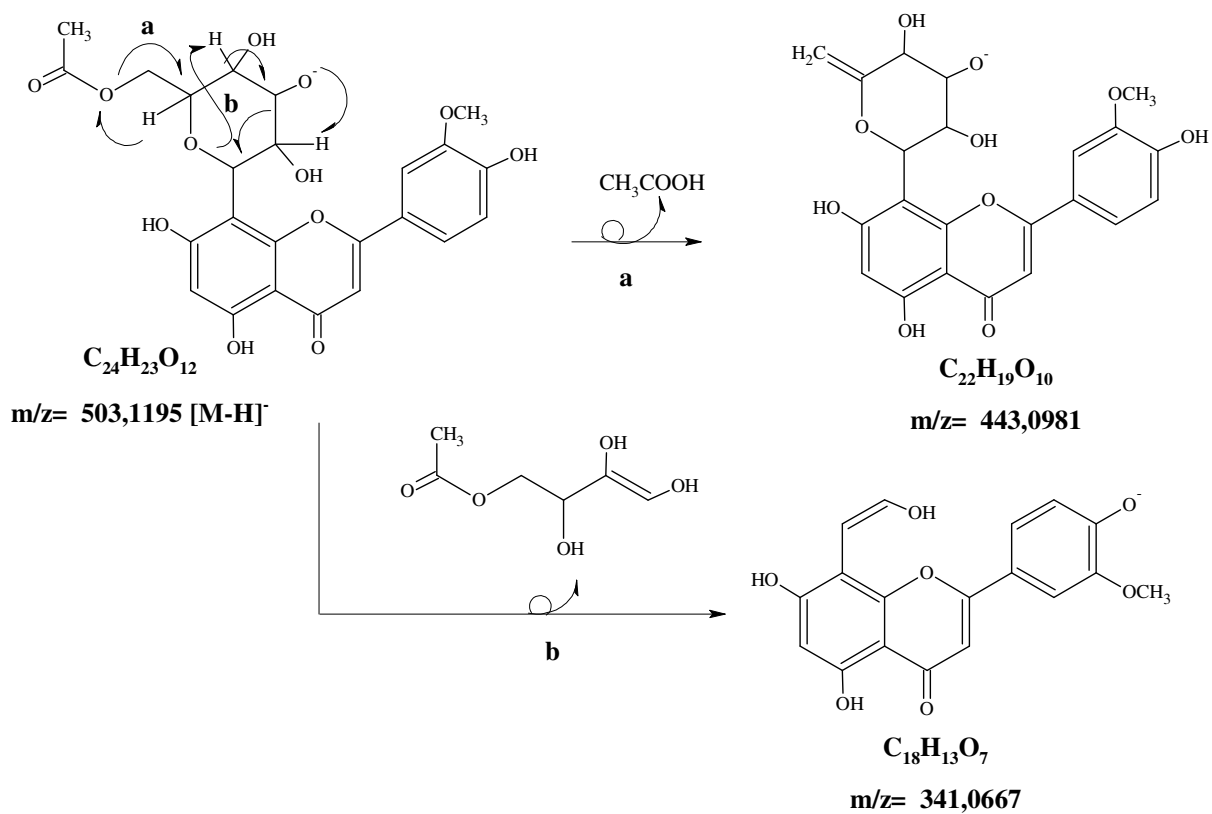


Figura 129. Espectros de EM-IES 1^a ionização e 2^a ionização da mistura de **21**



Esquema 13. Proposta de fragmentação para substância **21**.

2.6.23. Análise por CLAE das frações contendo biflavonoides

As frações que indicaram a presença de biflavonóides em CCDA, pela comparação com o padrão amentoflavona, foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de fotodiodo (CLAE-DAD) e comparada aos tempos de retenção (t_R) e curvas de UV de padrões de biflavonóides isolados anteriormente de outras espécies de Ochnaceae, para identificar os constituintes presentes na mistura. A escolha dos parâmetros cromatográficos (comprimento de onda no UV, dimensões e fase estacionária da coluna, fase móvel, velocidade de fluxo, etc) foram feitas com base na consulta de trabalhos anteriores (BOSSO, 2004; DANIEL, 2004) e testes prévios com os padrões. Esta atividade teve a colaboração da profa. Rosane Nora Castro.

Foram analisadas as seguintes frações:

- OSTFM-44-47 – *Ouratea stipulata*, folhas, extrato metanólico, fração 44-47
- OHFM-PD-ppt – *O. hexasperma*, folhas, extrato metanólico, precipitado
- OHFM-PD-49-53 – *O. hexasperma*, folhas, extrato metanólico, fração 49-53
- OFFM-PD-52-58 – *O. ferruginea*, folhas, extrato metanólico, fração 52-58
- OSFM-PD-21-23 – *O. semisserrata*, folhas, extrato metanólico, fração 21-23
- OSFC-82-96 – *O. semisserrata*, folhas, extrato metanólico, fração 82-96
- OSFC-ppt – *O. semisserrata*, folhas, extrato metanólico, precipitado

Os padrões, agatisflavona, amentoflavona, putraflavona, podocarpusflavona, sequoiaflavona, lanaraflavona e dimetilamentoflavona, foram submetidos à cromatografia (CLAE-DAD) separadamente, para determinação dos tempos de retenção e obtenção dos espectros de UV. Os cromatogramas e os seus respectivos espectros no UV obtidos por CLAE-DAD são mostrados na **Figura 130**, p. 148.

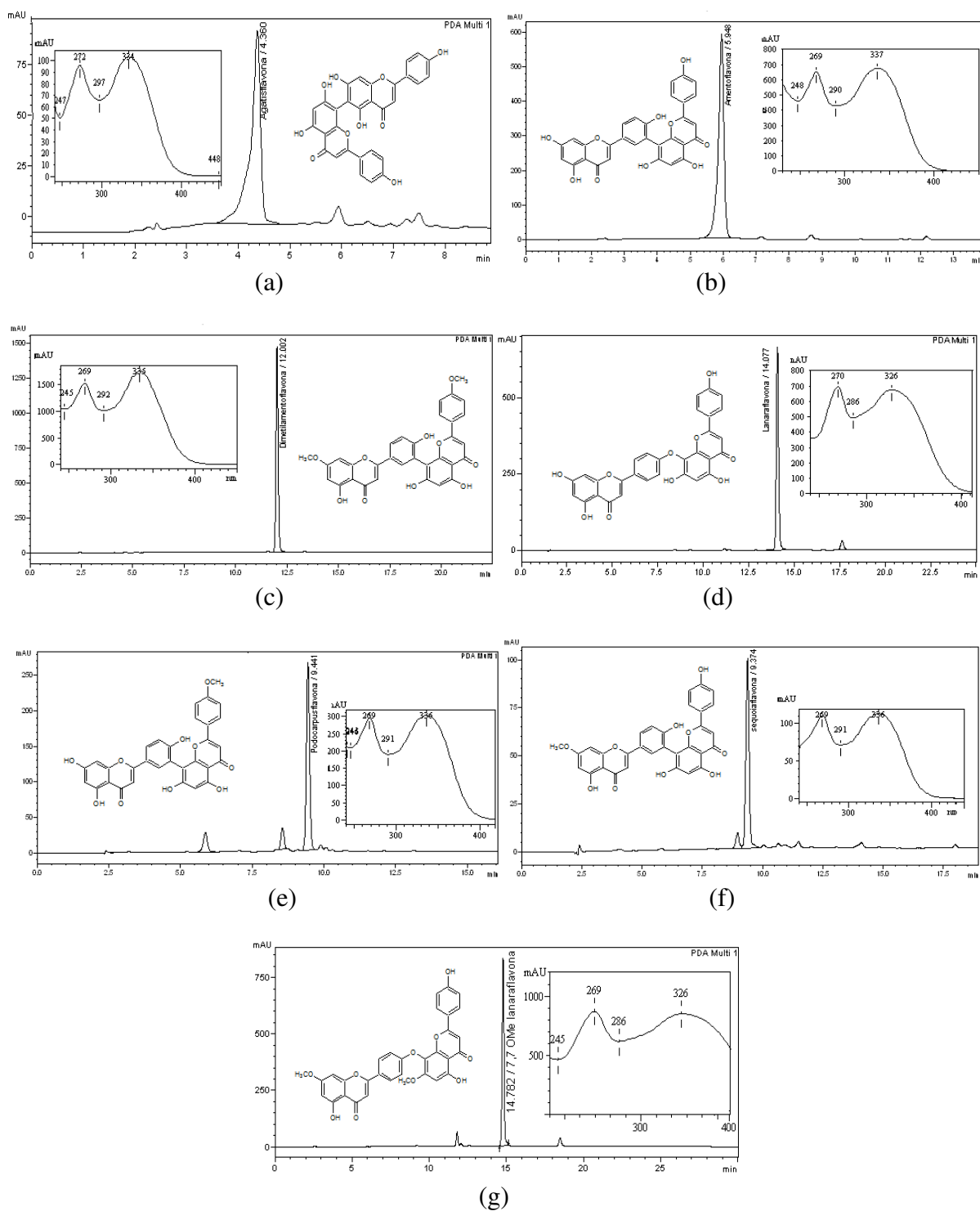


Figura 130. Cromatogramas e espectros no UV dos padrões: **a)** agatisflavona, t_R : 4,36 min ($\lambda_{m\acute{a}x}$ = 272 e 334 nm); **b)** amentoflavona t_R : 5,95 min ($\lambda_{m\acute{a}x}$ = 269 e 337 nm); **c)** dimetilamentoflavona, t_R : 12,00 min ($\lambda_{m\acute{a}x}$ = 269 e 335 nm); **d)** lanaraflavona, t_R : 14,08 min ($\lambda_{m\acute{a}x}$ = 270 e 326 nm); **e)** podocarpusflavona t_R : 9,44 min ($\lambda_{m\acute{a}x}$ = 269 e 336 nm), **f)** sequoiaflavona, t_R : 9,37 min ($\lambda_{m\acute{a}x}$ = 269 e 336 nm) e **g)** 7,7''-di-O-metilanaflavona, t_R : 14,78 min ($\lambda_{m\acute{a}x}$ = 269 e 326 nm).

A fração OHFM-PD-ppt obtida por precipitação durante a partição do extrato OHFM de *O. hexasperma* apresentou, através do cromatograma de CLAE, uma substância com $t_R = 5,785$ (**Figura 131**, p. 150) compatível com o $t_R = 5,948$ de amentoflavona. A fração OHFM-PD 49-53, obtida por fracionamento cromatográfico, apresentou uma mistura de 4 constituintes (**Figura 133**, p. 150), os majoritários foram compatíveis com os padrões de amentoflavona e agatisflavona; $t_R = 4,210$ min (agatisflavona), $t_R = 5,711$ min (amentoflavona), $t_R = 8,939$ min e $t_R = 9,301$ min (não identificados). Em trabalhos anteriores foram isolados das folhas de *O. hexasperma* apenas agatisflavona e 7''-O-metil-agatisflavona (DANIEL, 2004; FERNANDES, 2008). A fração OFFM-PD 52-58 apresentou dois constituintes majoritários em seu cromatograma (**Figura 135**, p. 151), amentoflavona ($t_R = 5,711$ min) e sequoiaflavona ($t_R = 9,288$ min), ambos já foram isolados anteriormente (FIDELIS *et al.*, 2012). As frações OSFC 82-96 (**Figura 137**, p. 152), OSFC-ppt (**Figura 140**, p. 154) e OSFM-PD 21-29 (**Figura 143**, p. 157) apresentaram misturas complexas, sendo estas as com maiores números de constituintes. Na fração OSFM-PD 21-29 foram identificados dois biflavonoides, amentoflavona ($t_R = 5,736$ min) e podocarpusflavona ($t_R = 9,295$ min), como mostrado no cromatograma da **Figura 143**, p. 157. As frações OSFM-PD 21-29, OSFC 82-96 e OSFC-ppt foram submetidas a análise em CL-EM para identificar os valores de massa de cada constituintes na mistura, as análises foram feitas em modo negativo. A presença de amentoflavona foi confirmada apenas na fração OSFM-PD 21-29 (**Figura 145** e **Tabela 27**, p. 159), nas frações OSFC-82-94 (**Figura 139** e **Tabela 25**, p. 154) e OSFC-ppt (**Figura 142**, p.156 e **Tabela 26**, p. 156) foram observados fragmentos com m/z 579, que confirma a presença da heveaflavona na mistura, biflavona isolada em outra fração desta espécie. Nessas três frações obtidas de *Ouratea semisserrata* foram observados vários fragmentos de massa com valores semelhantes o que indica a presença de isômeros, que dificulta a identificação principalmente a dos constituintes minoritários que não possibilitou a fragmentação EM/EM. Os espectros de UV (**Figuras 132** p. 150; **134** p. 151; **136** p. 152; **138** p. 153; **141** p. 155 e **144** p. 158) de cada substância presentes nos cromatogramas (**Figuras 131**, **133**, **135**, **137**, **140** e **143**) mostraram ser compatíveis com os de biflavonoides contendo máximos de absorção em λ 269 e 337 nm.

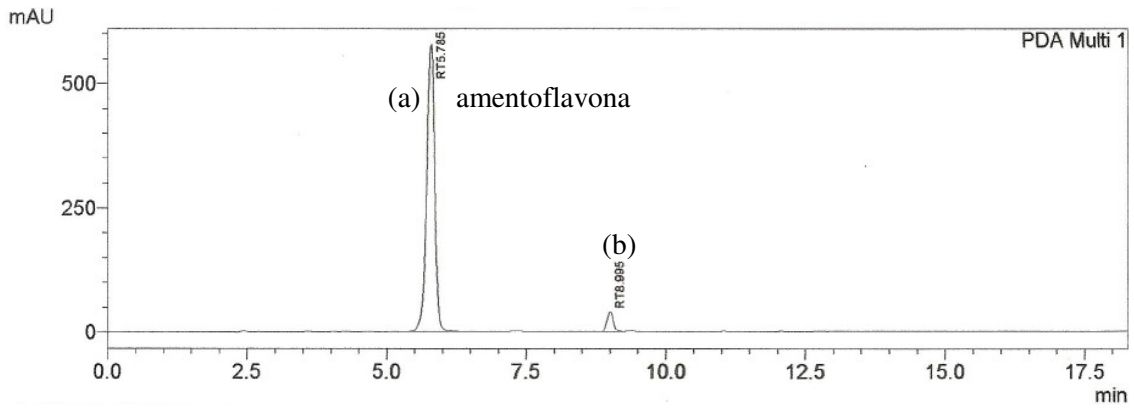


Figura 131. Cromatograma de CLAE da fração OHFM-PD-ppt, (a) $t_R = 5.785$ e (b) $t_R = 8,995$ min

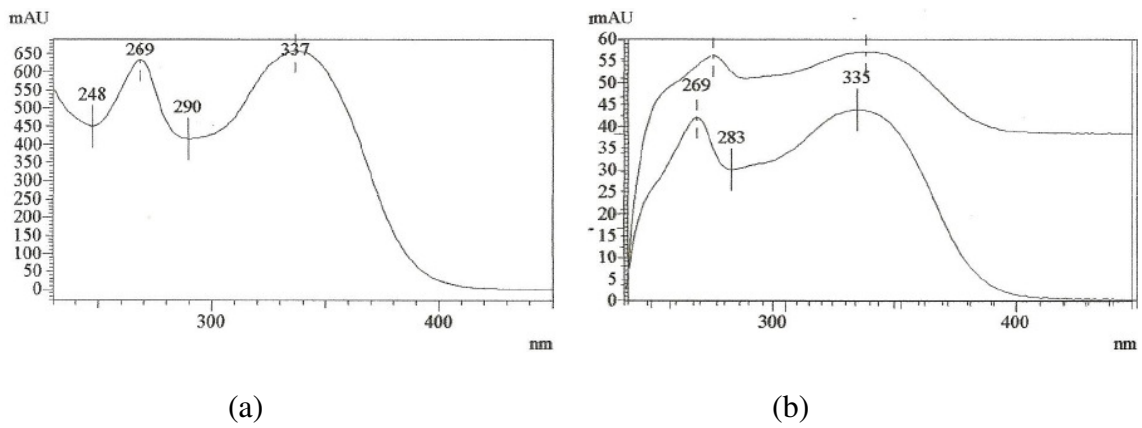


Figura 132 Espectros no UV obtido por CLAE das substâncias com (a) $t_R = 5.785$ e (b) $t_R = 8,995$ min presentes na fração OHFM-PD

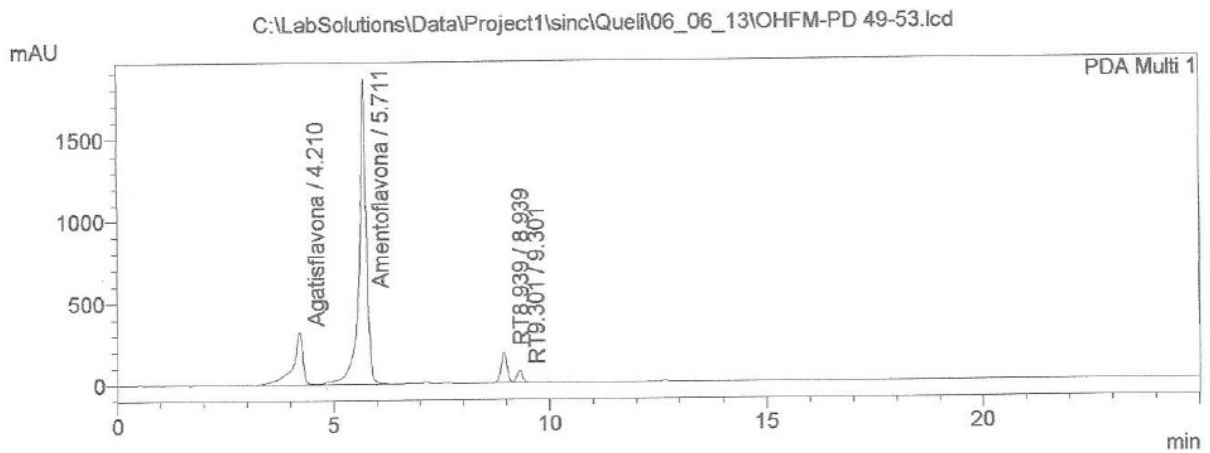
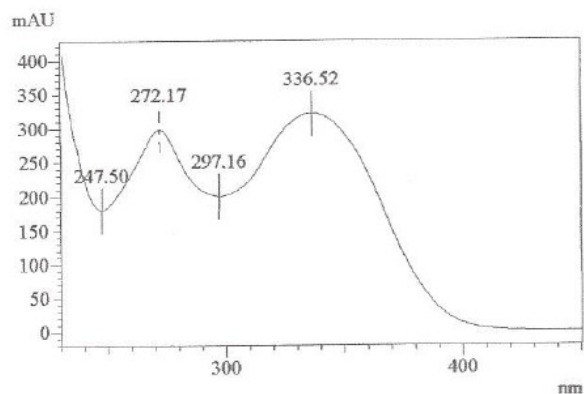


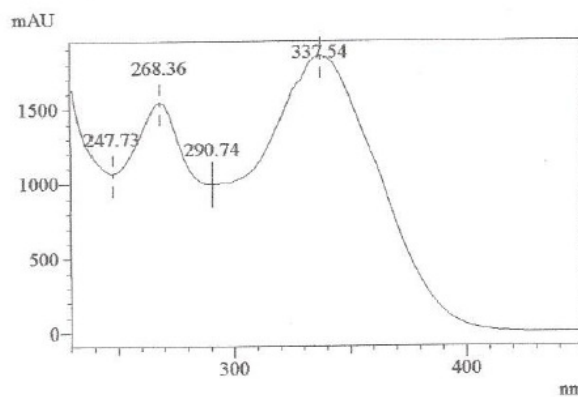
Figura 133. Cromatograma de CLAE da fração OHFM-PD 49-53

ID# : 1
Retention Time : 4.210
Compound Name : Agatisflavona



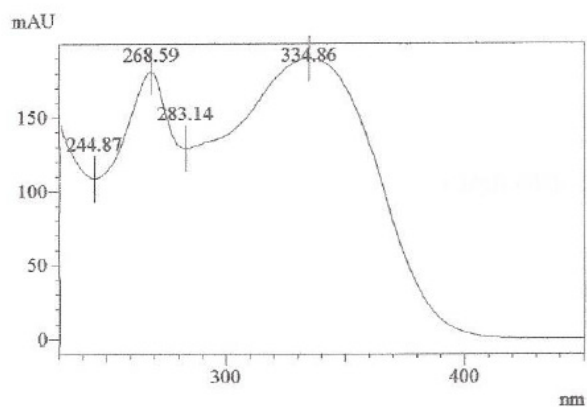
(a)

ID# : 2
Retention Time : 5.711
Compound Name : Amentoflavona



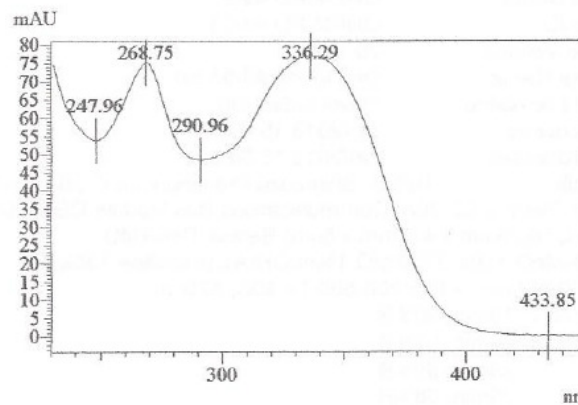
(b)

ID# : 3
Retention Time : 8.939
Compound Name : RT8.939



(c)

ID# : 4
Retention Time : 9.301
Compound Name : RT9.301



(d)

Figura 134. Espectros no UV obtido por CLAE das substâncias com (a) tR = 4,210; (b) tR = 5,711; (c) tR = 8,939; (d) tR = 9,301 min presentes na fração OHFM-PD 49-53

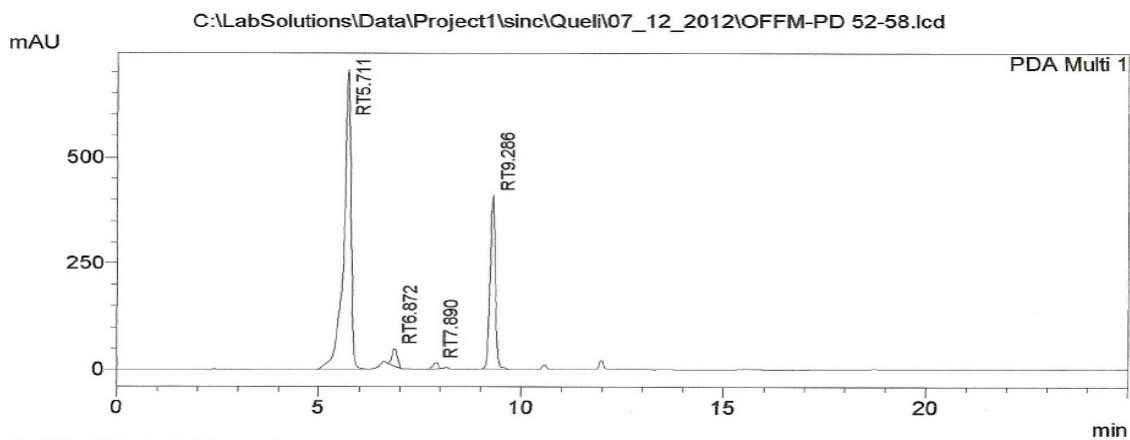
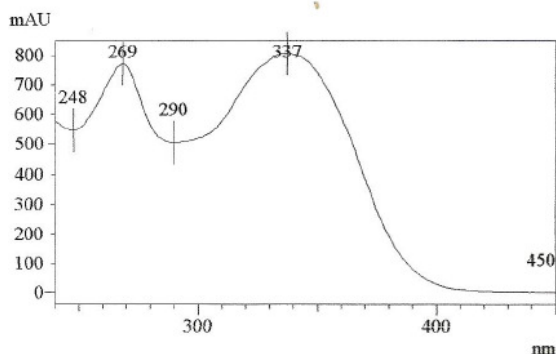


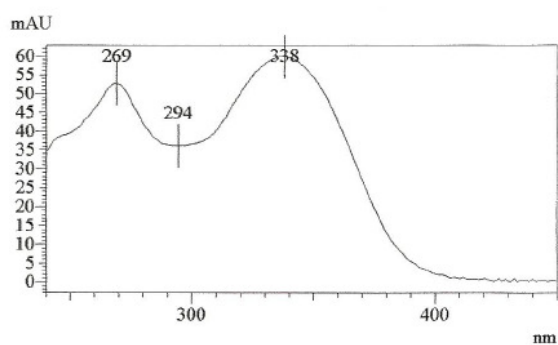
Figura 135. Cromatograma de CLAE da fração OFFM-PD 52-58

ID# : 1
Retention Time : 5.711
Compound Name : RT5.711



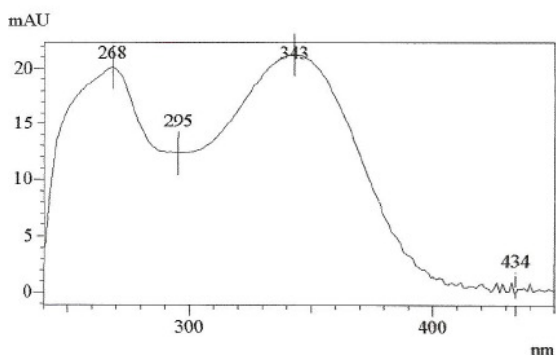
(a)

ID# : 2
Retention Time : 6.872
Compound Name : RT6.872



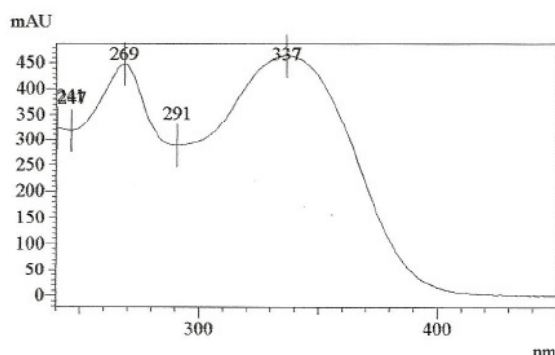
(b)

ID# : 3
Retention Time : 7.890
Compound Name : RT7.890



(c)

ID# : 4
Retention Time : 9.286
Compound Name : RT9.286



(d)

Figura 136. Espectros no UV obtido por CLAE das substâncias com (a) tR = 5,711; (b) tR = 6,872; (c) tR = 7,890 e (d) tR = 9,286 min presentes na fração OFFM-PD 52-58

C:\LabSolutions\Data\Project1\sinc\Quel\07_12_2012\OSFC82-96.lcd

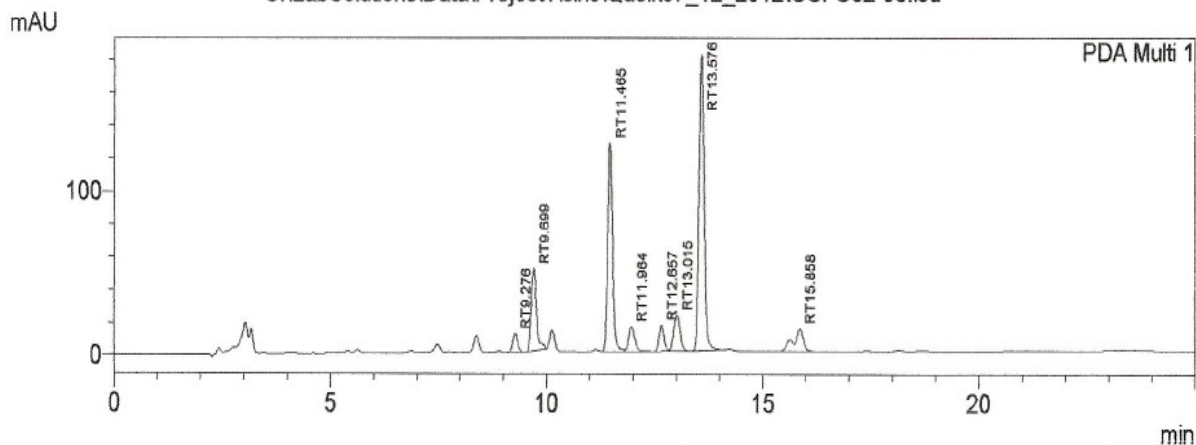


Figura 137. Cromatograma de CLAE da fração OSFC-82-96

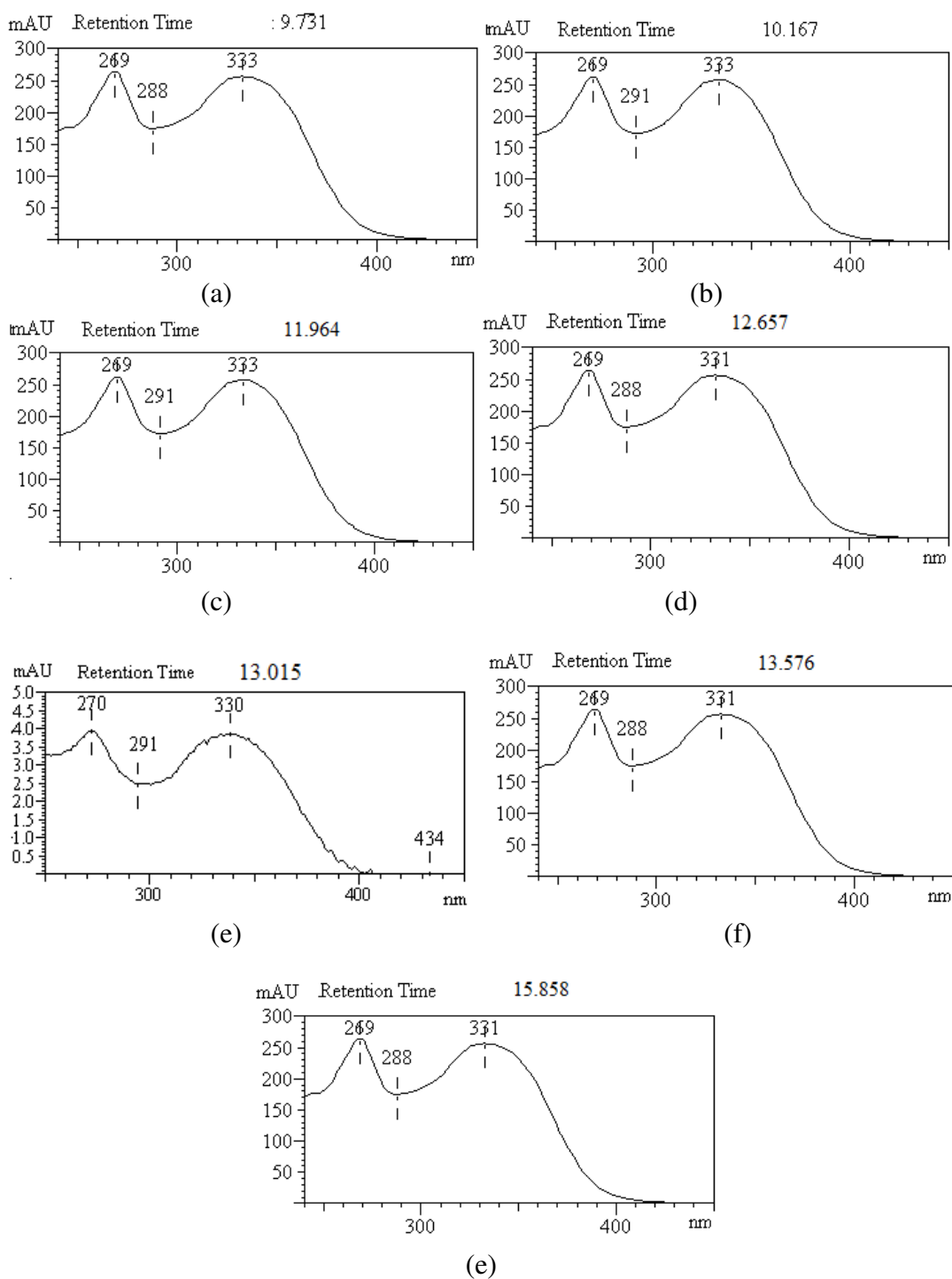


Figura 138. Espectros no UV obtido por CLAE das substâncias com (a) $t_R = 9,731$ min; (b) $t_R = 10,167$ min; (c) $t_R = 11,964$ min; (d) $t_R = 12,657$ min; (e) $t_R = 13,015$ min; (f) $t_R = 13,576$ min e (g) $t_R = 15,858$ min presentes na fração OSFC 82-96

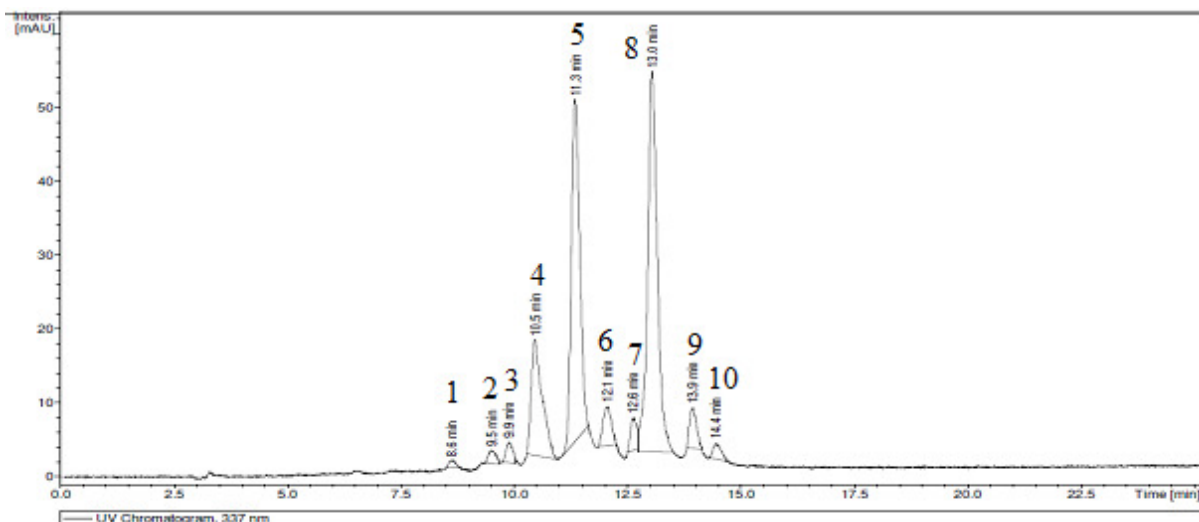


Figura 139. Cromatograma de CL-EM da fração OSFC 82-96

Tabela 26. Valores de tempo de retenção (t_R) dos constituintes presentes na fração OSFC 82-96 obtidos por CL-EM e CLAE e seus respectivos valores de massa (m/z)

Pico	t_R (min) ^a	m/z	t_R (min) ^b	$\lambda_{(máx)}$
1	8,60	551	-	-
2	9,50	551	-	-
3	9,90	551	-	-
4	10,50	565	9,70	269 e 333
5	11,30	565	11,46	269 e 333
6	12,10	565	11,96	269 e 331
7	12,60	579	12,66	269 e 333
8	13,00	579	13,57	269 e 332
9	13,90	565	-	-
10	14,40	305	-	-

^aCL-EM; ^bCLAE-DAD

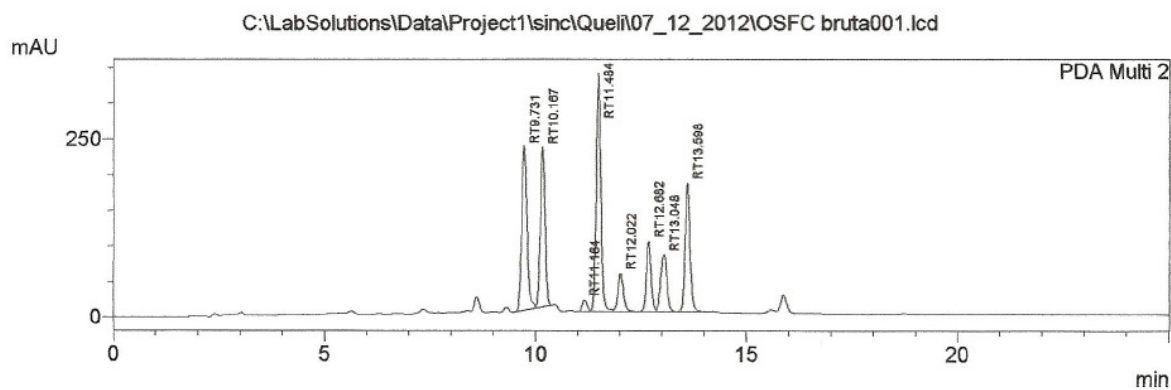


Figura 140. Cromatograma de CLAE da fração OSFC-ppt

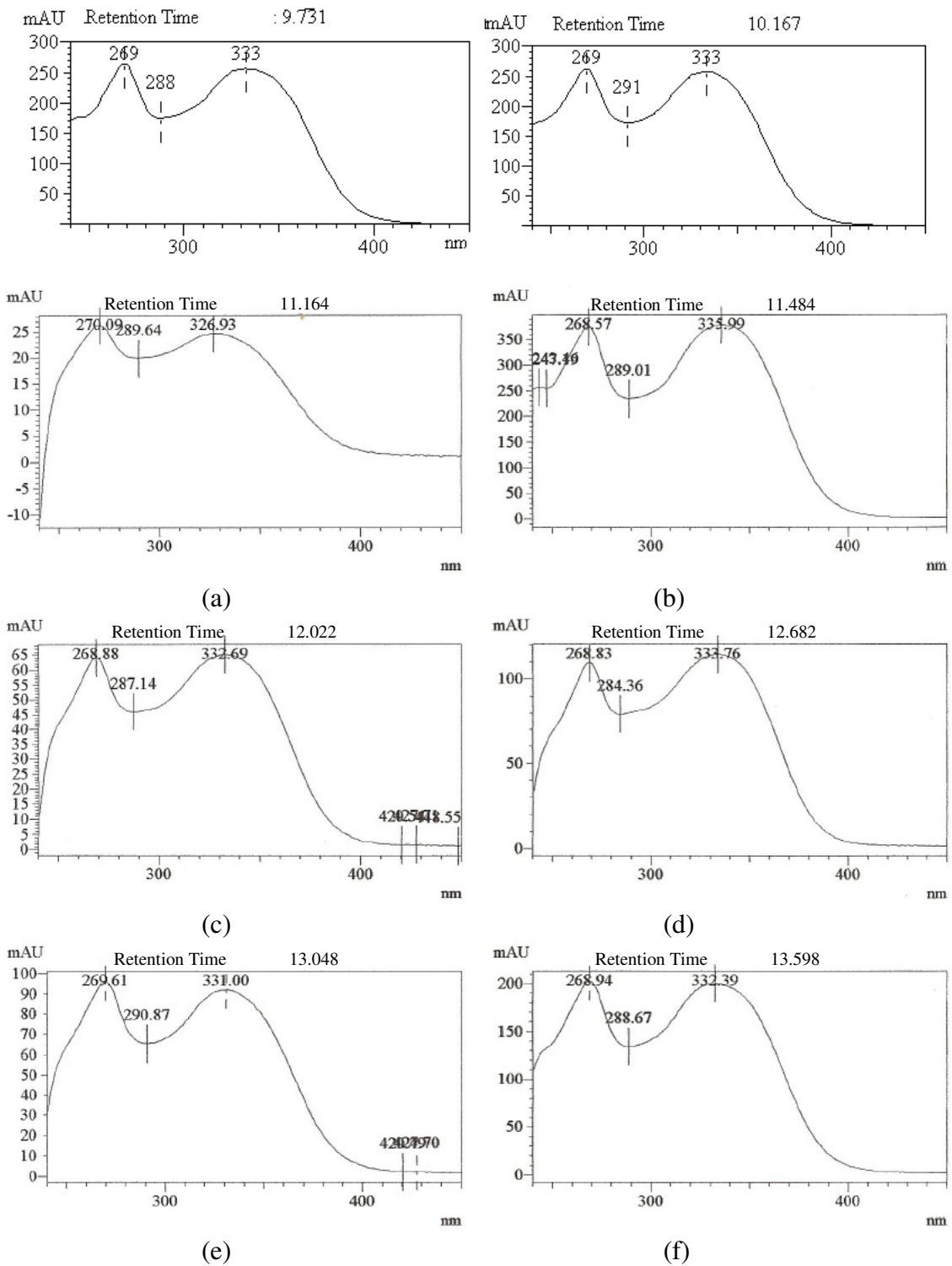


Figura 141. Espectros no UV obtido por CLAE das substâncias com (a) $t_R = 11,164$; (b) $t_R = 11,484$; (c) $t_R = 12,022$; (d) $t_R = 12,682$; (e) $t_R = 13,048$ e (f) $t_R = 13,598$ min presentes na fração OSFC-B

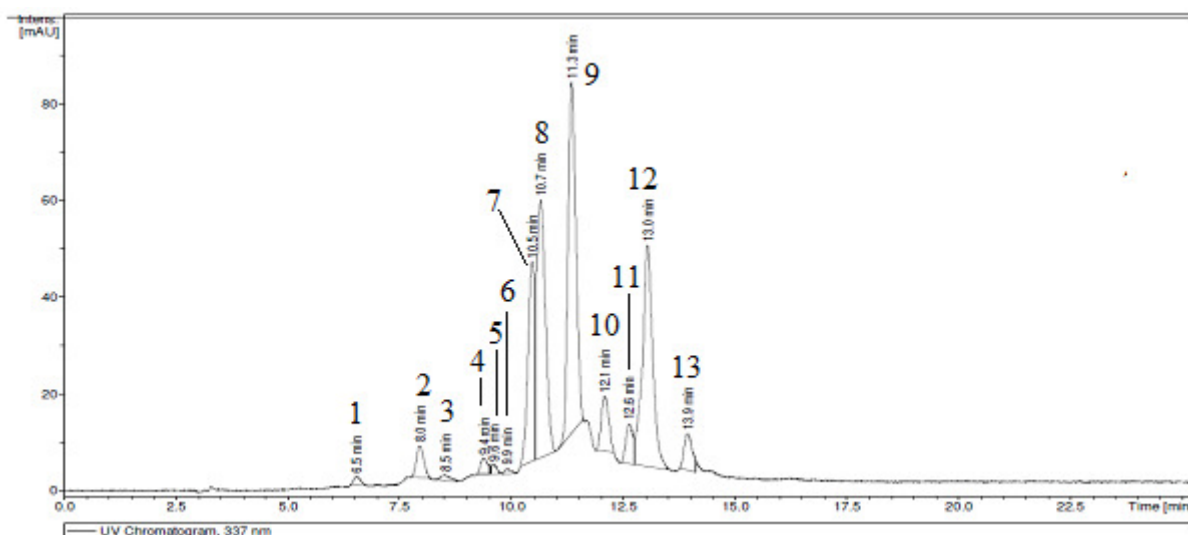


Figura 142. Cromatograma de CL-EM da fração OSFC-ppt

Tabela 26. Valores de tempo de retenção (t_R) dos constituintes presentes na fração OSFC-ppt obtidos por CL-EM e CLAE e seus respectivos valores de massa (m/z)

Pico	t_R (min) ^a	m/z	t_R (min) ^b	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
1	6,50	433	-	
2	8,00	283	-	
3	8,50	223	-	
4	9,40	417	-	
5	9,60	417	-	
6	9,90	551	-	
7	10,50	565	9,73	269 e 333
8	10,70	565	10,17	269 e 333
9	11,30	565	11,48	268 e 335
10	12,10	551	-	
11	12,60	579	12,68	268 e 334
12	13,00	579	13,05	269 e 331
13	13,90	565	13,60	269 e 332

^aCL-EM; ^bCLAE-DAD

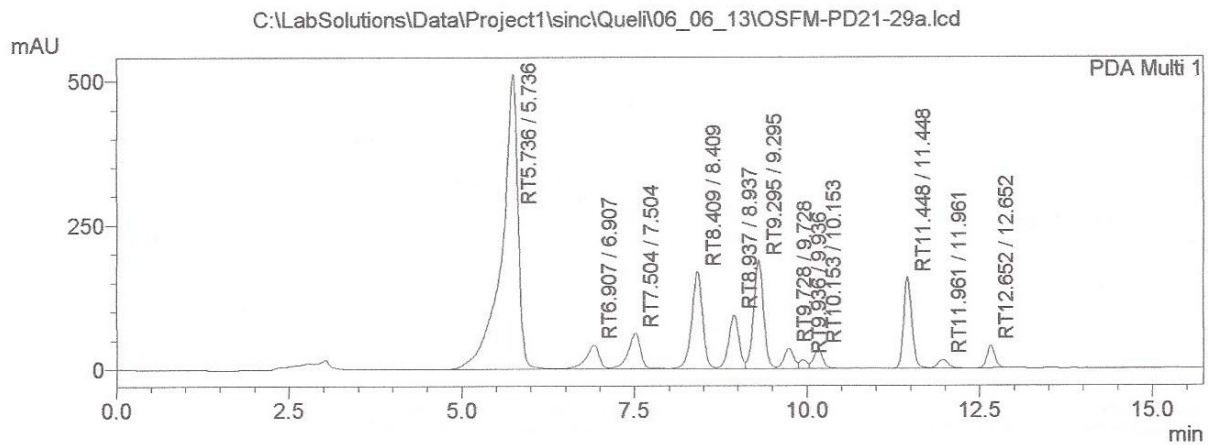
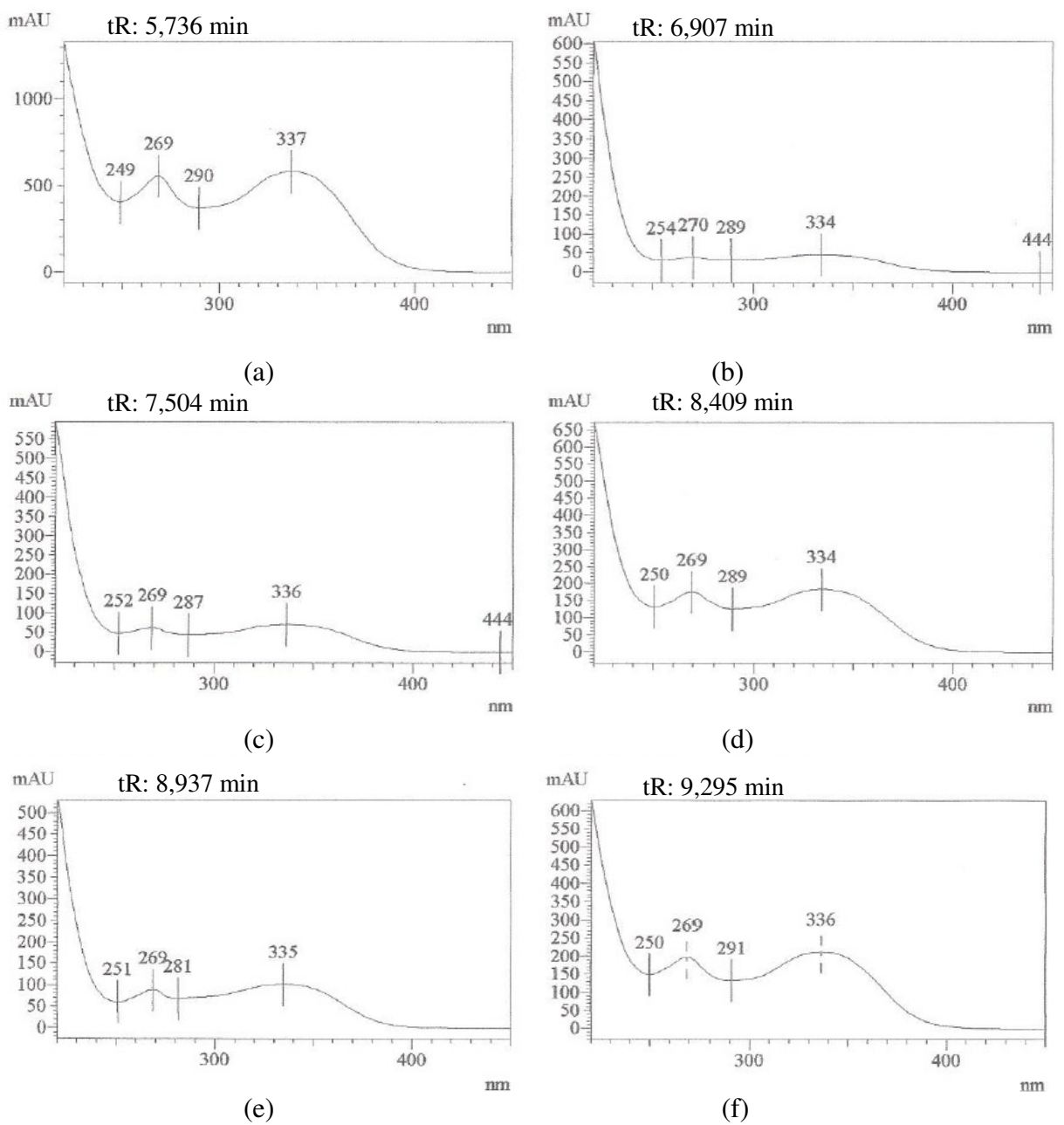


Figura 143. Cromatograma de CLAE da fração OSFM-PD 21-29



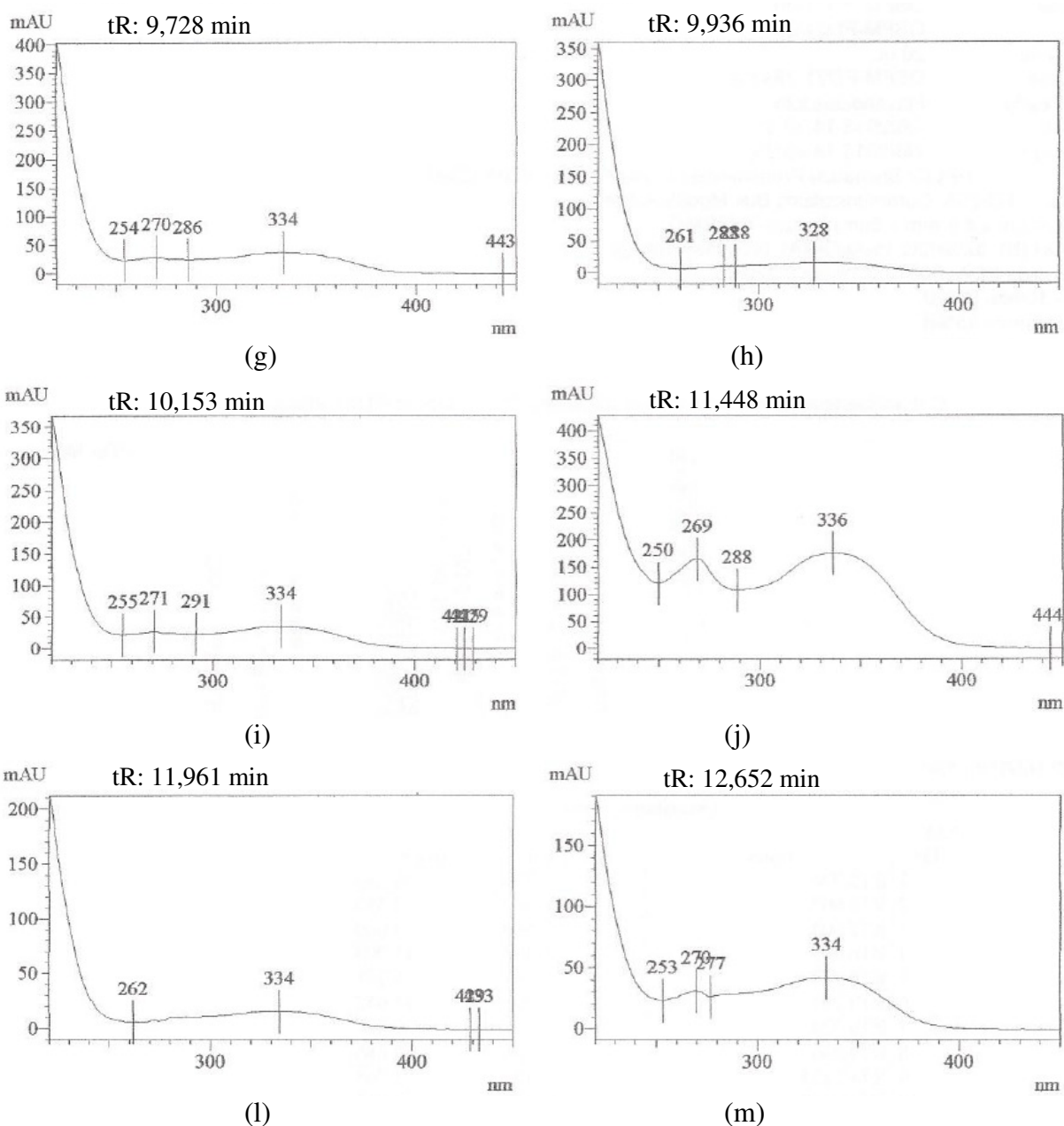


Figura 144. Espectros no UV obtido por CLAE das substâncias com (a) $t_R = 5,736$; (b) $t_R = 6,907$; (c) $t_R = 7,504$; (d) $t_R = 8,409$; (e) $t_R = 8,937$; (f) $t_R = 9,295$; (g) $t_R = 9,728$; (h) $t_R = 9,936$; (i) $t_R = 10,153$; (j) $t_R = 11,448$; (l) $t_R = 11,961$ e (m) $t_R = 12,652$ min presentes na fração OSFCM-PD 21-29

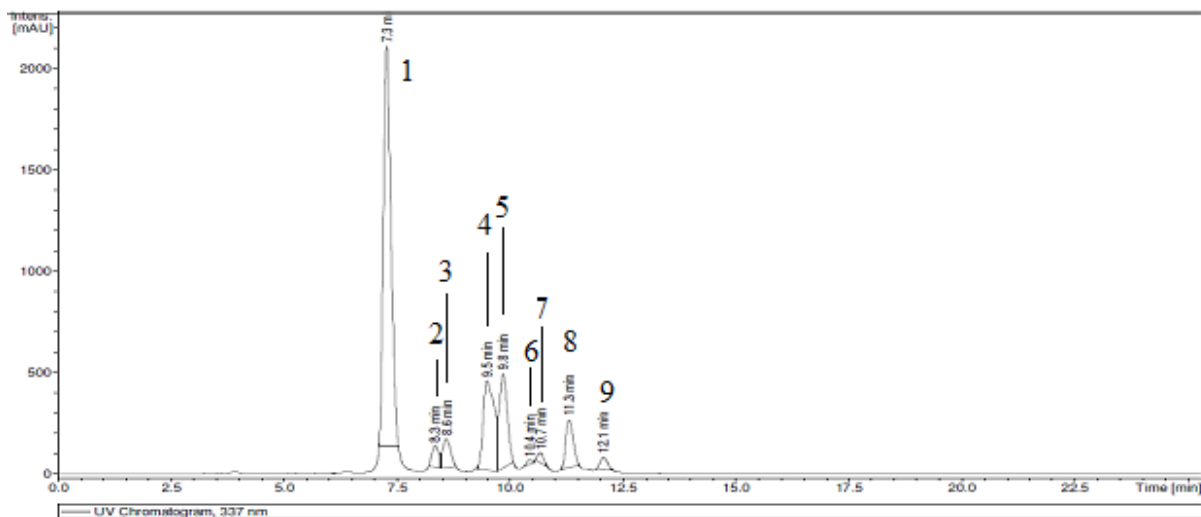


Figura 145. Cromatograma de CL-EM da fração OSFM-PD 21-29

Tabela 27. Valores de tempo de retenção (t_R) dos constituintes presentes na fração OSFM-PD 21-29 obtidos por CL-EM e CLAE e seus respectivos valores de massa (m/z)

Pico	t_R (min) ^a	m/z	t_R (min) ^b	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)
1	7,30	537	5,74	269 e 337
2	8,30	551	6,90	269 e 334
3	8,60	551	7,50	269 e 336
4	9,50	551	8,41	269 e 334
5	9,80	551	9,25	269 e 335
6	10,40		-	
7	10,70		-	
8	11,30	565	11,44	269 e 336
9	12,10	565	12,65	270 e 334

^aCL-EM; ^bCLAE-DAD

No cromatograma da fração OSTFM 44-47 (**Figura 146**, p. 160) foram observados sete constituintes, sendo dois majoritários. A comparação com os padrões de biflavonoides permitiu identificar quatro dos setes constituintes da mistura. A substância com $t_R= 6,411$ min foi identificada como amentoflavona (**8**), a $t_R= 10,098$ min como podocarpusflavona (**20**), $t_R= 12,717$ min com putraflavona (**9**) e a $t_R= 14,358$ min como 7,7''-di-*O*-metil-lanaraflavona (**21**). As substâncias com $t_R= 12,251$; 14,880 e 17,631 min não foram identificadas. Os espectros de UV (**Figura 147**, p. 161) obtidos por CLAE-DAD dos constituintes presentes na mistura apresentaram máximos de absorção característicos de biflavonoides com esqueleto tipo amentoflavona e lanaraflavona, λ 268 e 336 nm. Na **Tabela 28**, p. 162, são mostrados os tempos de retenção de todos os componentes da fração e o λ_{max} da cada um.

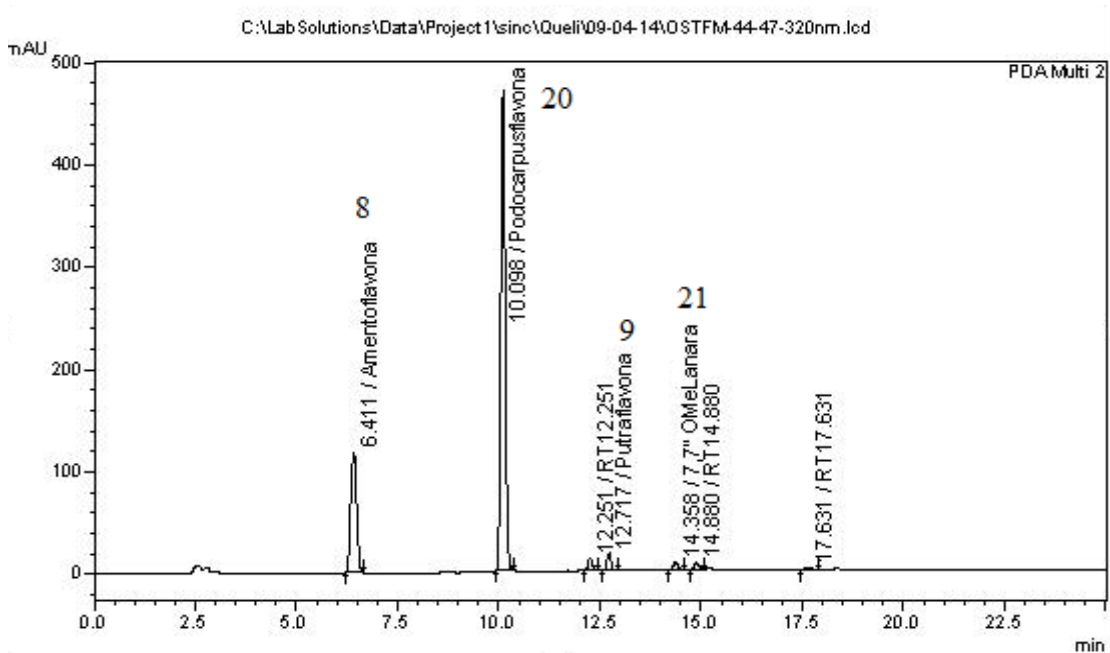
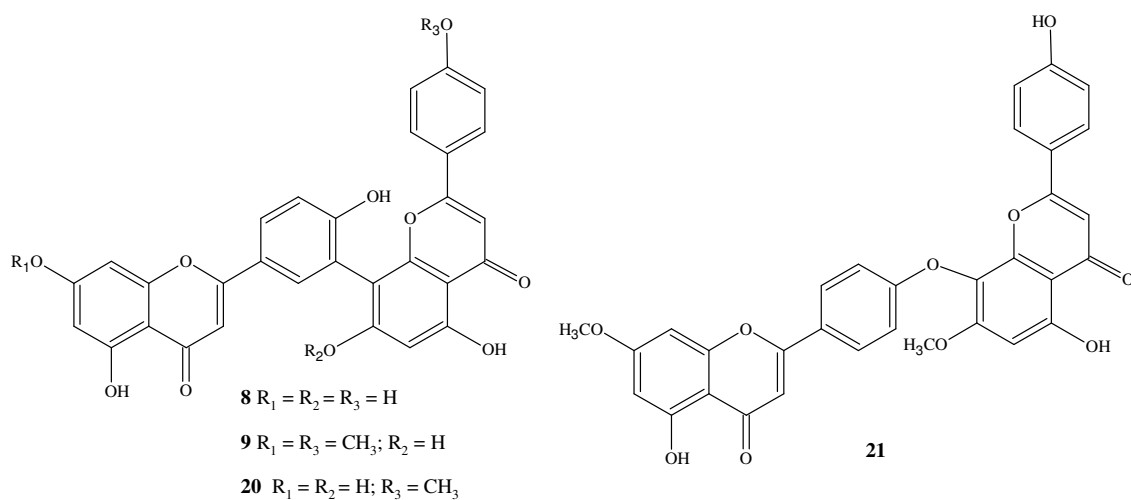


Figura 146. Cromatograma de CLAE da fração OSTFM 44-47



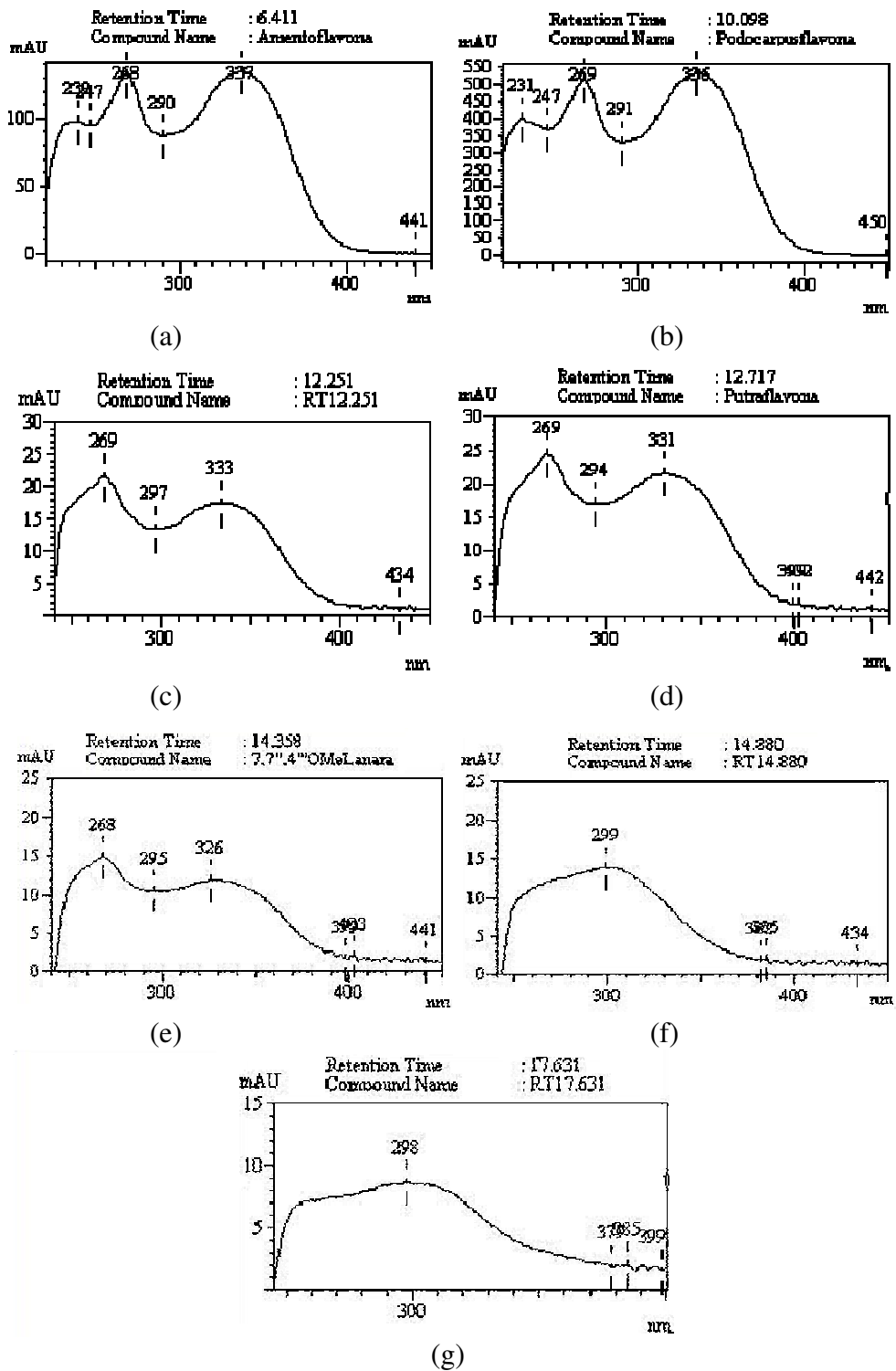


Figura 147. Espectros no UV obtido por CLAE das substâncias com (a) $t_R = 6,411$ (b) $t_R = 10,098$ (c) $t_R = 12,251$; (d) $t_R = 12,717$ min presentes na fração OStFM 44-47

Tabela 28. Valores de tempo de retenção (t_R) dos constituintes presentes na fração OSFCM-PD 21-29 obtidos por CL-EM e CLAE e seus respectivos valores de massa (m/z)

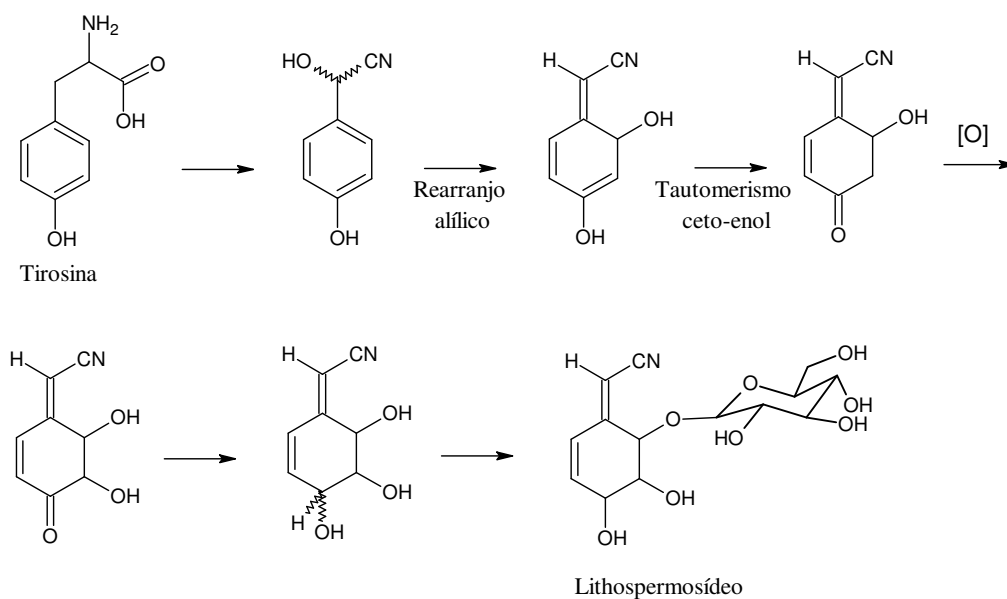
Pico	t_R (min) ^a	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)
1	6,14	268 e 337
2	10,10	269 e 336
3	12,25	269 e 333
4	12,72	269 e 331
5	14,36	268 e 326
6	14,88	299
7	17,63	298

^aCLAE-DAD

2.6.24. Considerações biogenéticas sobre os constituintes isolados de *Ouratea* e *Ochna*

- **Biossíntese de Cianoglicosídeo**

Até o momento, a biossíntese de cianoglicosídeos não tem sido explorada. Uma série de substâncias com estrutura semelhante tem sido relatada em várias plantas dicotiledôneas. A biossíntese de cianoglicosídeos com estrutura de ciclohexenilcianometileno é proposta por SEIGLER et al., (2005) mostrada no **Esquema 14**, e se baseia na rota biossintética de cianoglicosídeos acíclicos que derivam da tirosina. Uma oxidação no carbono do anel aromático leva a um rearranjo alílico, que seguido de outras oxidações resulta na estrutura de um ciclohexenilcianometileno.



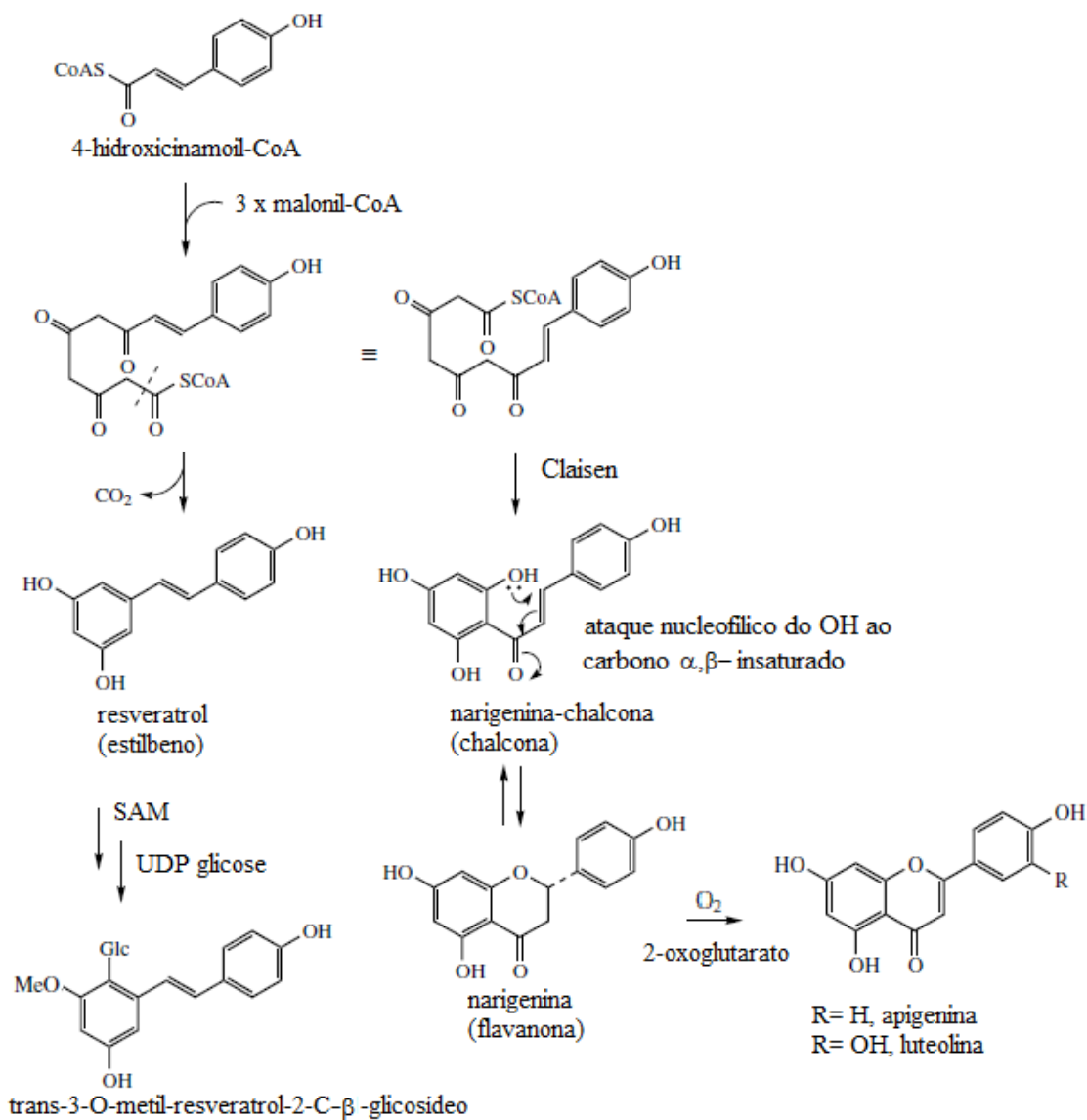
Esquema 14. Proposta biossintética para cianoglicosídeos (SEIGLER et al., 2005).

- **Biossíntese de Flavonoides**

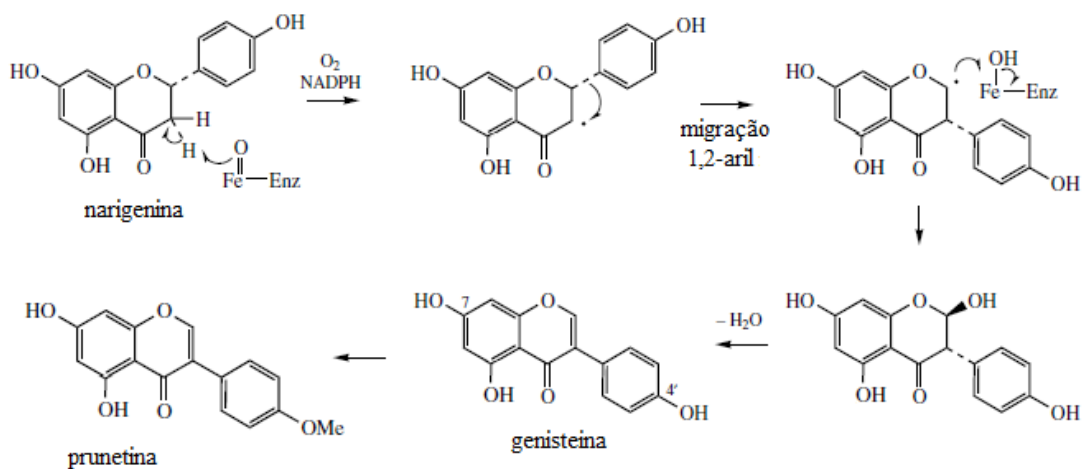
Os flavonóides são metabólitos biossintetizados por duas vias metabólicas distintas, a via do chiquimato e da via acetato. Sua biossíntese procede pela junção de uma unidade de *p*-cumaroil-CoA e de três unidades de malonil-CoA, que pela via de condensação de Claisen leva a formação de chalconas (narigenina) e pela via de condensação de aldólica produz estilbeno (resveratrol). A formação de estilbeno ou chalcona depende da natureza da enzima que catalisa a reação, chalcona sintase ou estilbeno sintase, respectivamente. A junção das duas unidades se dá pela substituição nucleofílica à carbonila na unidade *p*-cumaril CoA através de um enolato formado no anel **A**. Esta junção gera a classe denominada de chalconas. A adição de Michael 1,4 ao carbono do sistema carbonílico α,β insaturado gera a classe, as flavanonas com formação do anel **C**. A partir desse flavonoide, podem ocorrer outras modificações produzindo, dessa forma, outros representantes da variedade estrutural desta classe de metabólitos (**Esquema 15**, p. 164). Esses constituintes estruturais podem, inclusive, sofrer hidroxilações, metilações, isoprenilações ou glicosilações (DEWICK, 1998).

As isoflavonas constituem uma subclasse que apresenta o anel aromático B migrado para o carbono adjacente à carbonila do heterociclo (C-3). Esse rearranjo é induzido por enzimas da família citocromo P-450, na presença dos cofatores NADPH e O₂. O mecanismo é via radicalar, tendo como substrato flavanonas como liquiritigenina ou narigenina, para formar respectivamente as isoflavonas daidzeina e genisteina (**Esquema 16**, p. 164), além da formação de hidroxí-isoflavanonas intermediárias (DEWICK, 1998).

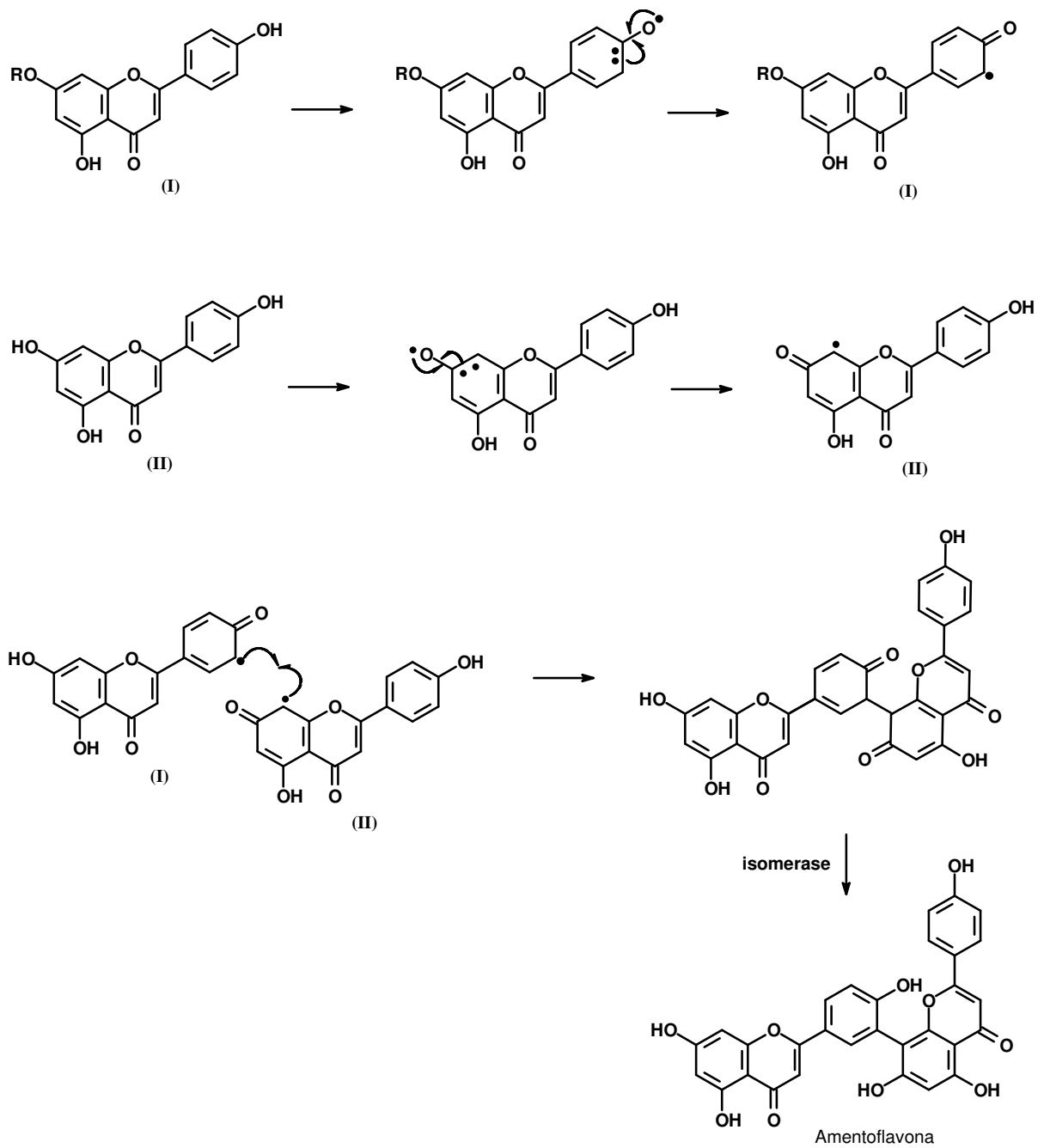
Os biflavonóides constituem um grupo de flavonoides, diferenciando-se de outros oligômeros como as proantocianidinas, devido à origem biogénica das unidades constituintes. A maioria dos representantes dessa classe de produtos naturais é formada pelos dímeros flavona-flavona, flavona-flavanona, flavanona-flavanona além de ocorrerem, mais raramente, os dímeros de chalconas e de isoflavonas (SUZART *et al.*, 2007). Quando as duas unidades são iguais, constituem os bisflavonoides e quando as duas unidades são diferentes, os biflavonóides (SUZART *et al.*, 2007). O entendimento da biossíntese das diferentes classes de metabólitos facilita a determinação estrutural (**Esquema 17**, p. 165 e **18**, p. 166). No caso de flavonoides, o padrão de oxidação e a forma de ligação entre as unidades contribuem na dedução dos sistemas de núcleos constituintes com base em dados espectrométricos. Isso facilita, inclusive, propor inicialmente a fórmula molecular incorporando os substituintes no esqueleto básico proposto.



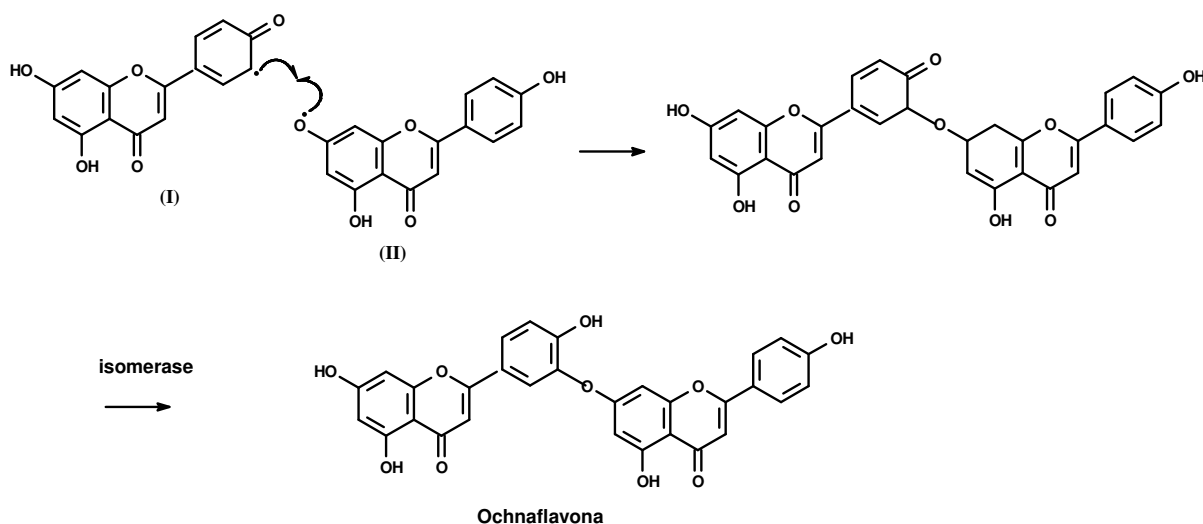
Esquema 15. Proposta biossintética para Flavonoides e Estilbenos (DEWICK, 1998).



Esquema 16. Proposta biossintética para Isoflavonas (DEWICK, 1998).



Esquema 17. Proposta biossintética para Biflavonoides com esqueleto tipo amentoflavona (DEWICK, 1998).

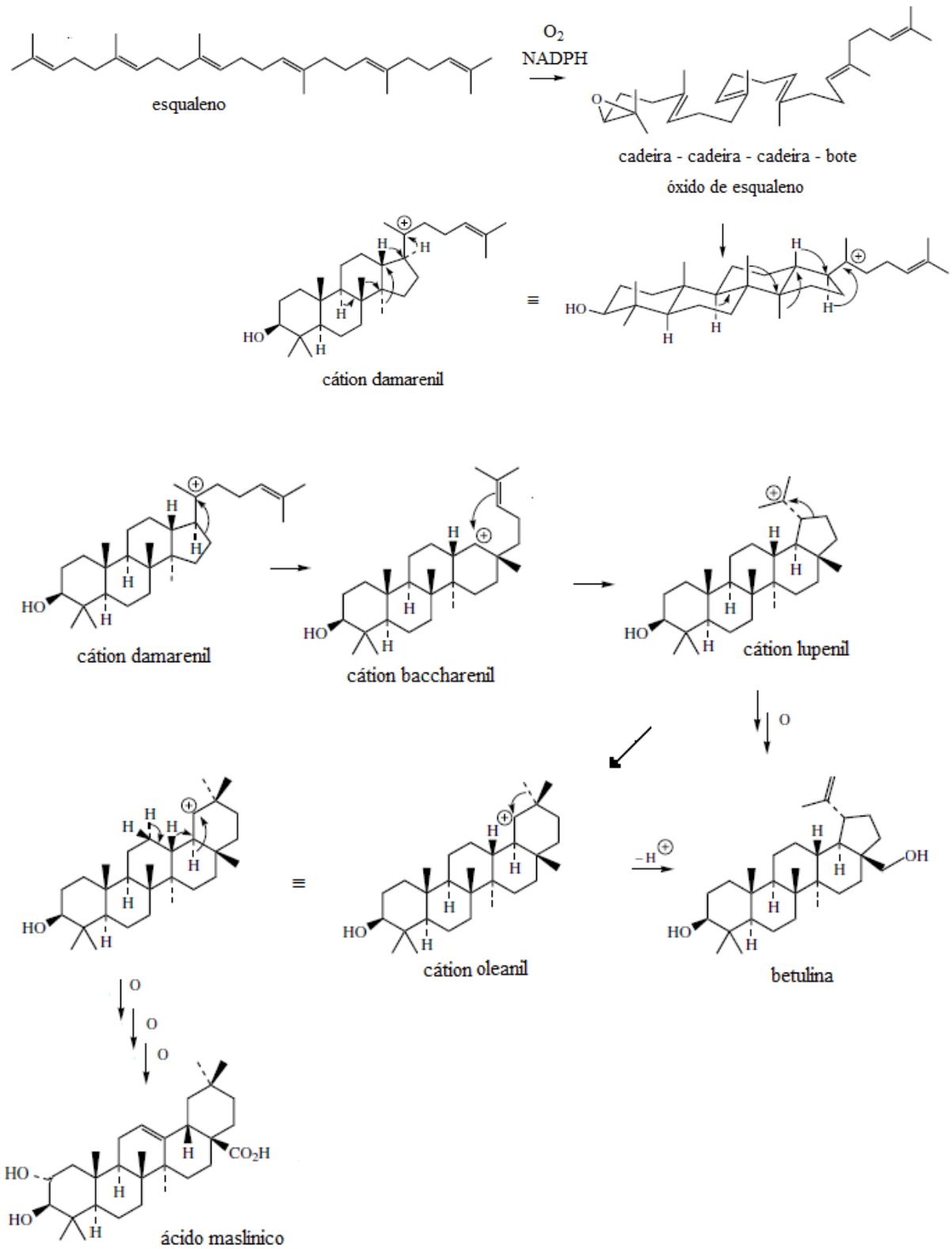


Esquema 18. Proposta biossintética para biflavonoides com esqueleto tipo ochnaflavona (DEWICK, 1998).

- **Biossíntese de triterpenos**

Os triterpenoides são formados pela via do ácido mevalônico. Nessa via, ocorre a condensação de três unidades de AcetilCoA para formar o isopentenil pirofosfato (IPP) que sofre isomerização para dimetilalilpirofosfato (DMAPP). Estes são os precursores básicos dos terpenoides e esteroides que sofrerão polimerização dando origem as moléculas de cadeias carbônicas crescentes de cinco átomos de carbono. A reação de IPP com seu isômero DMAPP formam o trans-geranilpirofosfato (GPP), a partir do qual podem ser formados os demais terpenos. Novas ligações cabeça-cauda entre GPP e IPP resultarão em farnesilpirofosfato (FPP) e geranilgeranilpirofosfato (GGPP) com 15 e 20 átomos de carbono, respectivamente. O FPP é o intermediário para a biossíntese dos sesquiterpenos (C15), triterpenos (C30) e esteroides (C18-C30). Duas moléculas de farnesil pirofosfato (FPP) se unem cauda-cauda para formar o hidrocarboneto esqualeno, principal precursor de triterpenos e esteroides. A ciclização do esqualeno ocorre via intermediário óxido-2,3-esqualeno produzido em uma reação catalisada por uma flavoproteína e pelos cofatores NADPH e O₂. Na etapa seguinte uma enzima ciclase modifica a conformação do óxido de esqualeno para cadeira-cadeira-cadeira-bote, e através de vários rearranjos 1,2-metil é formado o carbocátion damarenil. O carbocátion damarenil é muito instável e sofre novamente migrações do tipo 1,2-alkil para formar o cátion bacharenil. Acredita-se que a passagem do cátion terciário (damarenil) para o secundário (bacharenil) seja resultado de transformações enzimáticas. Novas migrações formam o sistema pentacíclico do cátion lupenil terciário precursor dos esqueletos do tipo

ursano e oleanano (DEWICK, 1998). A proposta biossintética para os triterpenos com esqueletos tipo oleanano e lupano são apresentados nos **Esquemas 17**, p. 162.



Esquema 19. Proposta biossintética para triterpenos com esqueleto tipo oleanano e lupano (DEWICK, 1998).

2.8. CONSIDERAÇÕES

Este trabalho permitiu a identificação e caracterização estrutural de 20 substâncias de espécies do gênero *Ouratea* e *Ochna*.

Da espécie *Ouratea hexasperma* foram isolados dois estilbenos inéditos na família Ochnaceae, um cianoglicosídeo inédito no gênero, uma isoflavona, duas flavonas, um triterpeno pentacíclico e uma quinona isoladas pela primeira vez na espécie, além da biflavona, amentoflavona, identificadas nas inflorescências.

Em extratos de *O. semisserrata* foram encontrados dois derivados de ácido benzóico e um biflavonoide, heveaflavona, ainda não identificados nesta espécie além de dois glicosídeos derivados ainda não registrados na família Ochnaceae.

Dois novos acil-triterpenos derivados do ácido maslínico foram isolados da espécie *O. cuspidata* juntamente com o ácido maslínico.

Na espécie *O. ferruginea* foi isolada e determinada a biflavona, putraflavona.

A análise por CLAE de uma fração da espécie *O. stipulata* conduziu a identificação de quatro biflavonoides característicos do gênero. Este é o primeiro estudo químico desta espécie.

Da espécie *Ochna serrulata* foram isolados os marcadores quimiotaxômicos do gênero, ochnaflavona e 2,3-diidroochnaflavona e um acil-glicosídeo derivado da vitexina.

A análise por CLAE das frações contendo biflavonoides mostraram perfis químicos diferentes, a espécie *O. semisserrata* apresentou uma mistura complexa com vários componentes.

Os resultados obtidos contribuíram para ampliar o conhecimento dos gêneros e família Ochnaceae

2.9. REFERÊNCIAS

- ABDEL-WAHAB, N. M.; HAMED, A. N. E.; KHALIL, H. E.; SAMY, M. N.; WANAS, A. S.; FOUAD, M. A.; KAMEL, M. S. Phenolic acid glycosides from *Parmentiera cereifera* Seem. (Candle tree). **Phytochem Lett**, v. 9, p. 74-77, 2014.
- AHMAD, M. S.; RAUF, A.; HASHMI, M.; OSMAN, S. M. *Ochna artorpurpuria* seed oil: a new source of palmitoleic acid. **Chem Ind**, London, v. 6, p. 199-200, 1982.
- AMARAL, M. DO C. E.; BITTRICH, V. Ontogenia inicial do androceu de espécies de Ochnaceae subfam. Sauvagesioideae através da análise em microscopia eletrônica de varredura. **Revta Brasil Bot**, São Paulo, v. 21, n. 3, 1998.
- ANURADHA, V.; SRINIVAS, P. V.; RANGA RAO, R.; MANJULATHA, K.; PUROHIT, M. G.; RAO, J. M. Isolation and synthesis of analgesic and anti-inflammatory compounds from *Ochna squarrosa* L. **Bioorg Med Chem**, v. 14, p. 6820–6826, 2006.
- ARAÚJO, M. F.; SANTOS, C. B.; CAVALCANTI, J. F.; PEREIRA, F. S.; MENDES, G. S.; WERLE, A. A.; ROMANOS, M. T. V.; CARVALHO, M. G. Proposed active compounds from *Ouratea parviflora*. **J Med Plants Res**, v. 5, p. 2489-2493, 2011.
- BANDI, A. K. R.; LEE, D.; GHOGOMU, R. T.; GUNASEKAR, D.; BODO, B. Phytochemical and biological studies of *Ochna* species. **Chem Biodivers**, v. 9, p. 251-271, 2012.
- BENEDEK, B.; WENIGER, B.; PAREJO, I.; BASTIDA, J.; ARANGO, G. J.; LOBSTEIN, A.; CODINA, C. Antioxidant activity of isoflavones and biflavones isolated from *Godoya antioquiensis*. **Arzneimittelforschung**, v. 56, n. 9, p. 661-664, 2006.
- BIKOBO, D. S. N.; ATCHADE, A. T.; TIH, R. G.; PIEBOJI, J. G.; BLOND, A.; PEGNYEMB, D. E.; BODO, B. Antimicrobial activities of some *Ouratea* species (Ochnaceae) and biflavonoids from *Ouratea elongate*. **Asian Chem Lett**, v. 13, p. 59-66, 2009.
- BOSSO, A. A. **Identificação de bisflavonoides de *Luxemburgia nobilis* e *Ouratea semiserrata* (Ochnaceae) por cromatografia líquida de alta eficiência**. 2003, 150p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2003.
- BOUQUET, A. **Féticheurs et Médecines Traditionnelles du Congo Brazzaville**. Paris: ORSTOM. 1969.
- BRAGA, F. C.; WAGNER, H.; LOMBARDI, J. A.; OLIVEIRA, A. B. Screening of the Brazilian flora for antihypertensive plant species for *in vitro* angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. **Phytomedicine**, Jena, v. 245, p.245-50, 2000.
- BRAZ-FILHO, R. Importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. **Quim Nova**, v. 17, n. 5, p. 405-445, 1994.
- BRUM-BOUSQUET, M.; TILLEQUIN, F.; PARIS, R. Su les C-flavonosides de *Salothamnus scoparius*. Isolement d'un nouveau compose, Le 6''-O-acetylscoparoside. **Llodya** v. 40, n. 6, p. 591-592, 1977.
- CARBONEZI, C. A.; HAMERSKI, L.; GUNATILAKA, A. A. L.; CAVALHEIRO, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C. M.; LOPES, M.

- N.; BOLZANI, V. S. Bioactive flavone dimers from *Ouratea multiflora* (Ochnaceae). **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, p. 319-324, 2007.
- CARVALHO, M. G.; OLIVEIRA, M. C. C.; WERLE, A. A.; Chemical constituents from *Luxemburgia nobilis* (EICHL). **J Braz Chem Soc**, v. 11 (1), 232-236, 2000.
- CARVALHO, M. G.; CARVALHO, G. J. A.; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents from *Ouratea floribunda*: complete ¹H and ¹³C NMR assignments of atranorin and its new acetyl derivative. **J Braz Chem Soc**, v. 11, p. 143-147, 2000.
- CARVALHO, M. G. de; ALVES, C. C.; DA SILVA, K. G. S.; EBERLIN, M. N.; WERLE, A. A. Luxenchalcone, a new bichalcone and other constituents from *Luxemburgia octandra*. **J Braz Chem Soc**, v.15, n. 1, p. 146-149, 2004.
- CARVALHO, M. G. de; ALBUQUERQUE, L. R. M. de; MENDES A, L. de S.; GUILHON, G M. S. P.; RODRIGUES, S. T. Biflavonoids and terpenoids isolated from the leaves of *Ouratea microdonta* Engl. (Ochnaceae). **Rev Latinoamer Quím**, v. 36, n. 3, p. 71-75, 2008a.
- CARVALHO, M. G.; SUZART, L. R.; CAVATTI, L. C.; KAPLAN, M. A. C. New flavonoids and other constituents from *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae). **J Braz Chem Soc**, v. 19, p. 1423-1428, 2008b.
- COLLA, G.; SILVA, M. A. da; QUEIROZ, G. S.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Antioxidant, allelopathic and toxic activity of *Ochna serrulata*. **Lat Am J Pharm**, v. 30, n. 4, p. 809-13, 2011.
- CRONQUIST, A. (ed.) **The evolution and classification of flowering plants**. 2a. Ed. The New York Botanical Garden, Bronx, New York. 1988.
- CURTIS, BRAGA R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Fortaleza: Imprensa Oficial, 1960.
- DAHLGREN, R. M. T.; A revised system of classification of the angiosperms. **Bot J Linn Soc**, v. 80, n. 2, p. 91, 1980.
- DANIEL, J. F. de S.; CARVALHO, M. G. de; CARDOSO, R. da S.; AGRA, M. de F.; EBERLIN, M. N. Others flavonoids from *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae). **J. Braz. Chem. Soc**. v.16, p. 634-638, 2005.
- DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A.; NASCIMENTO, J. C.; VIEIRA, J. J.; SANTOS, M. A. Isolamento e avaliação da atividade nematocida de constituintes químicos de *Mucuna cinérea* contra *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*. **Quim Nova**, v. 26. n. 3, 335-339, 2003.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**, 2nd edition, Jonh Wiley & Sons. 1998.
- EL-SHAFFEY, N. M.; ABDELGAWAD, H. Luteolin, a bioactive flavones compound extracted from *Cichorium endivia* L. *divaricatum* alleviates the harmful effect of salinity on maize. **Acta Physiol Plant** v. 34, p. 2165-2177, 2012.
- ESTEVAM, C. S.; OLIVEIRA, F. M.; CONSERVA, L. M.; LIMA, L. F. C. O.; BARROS, E. C. P.; BARROS, A. C. P.; ROCHA, E. M. M.; ANDRADE, E. H. A. Constituintes

químicos e avaliação preliminar *in-vivo* da atividade antimalárica de *Ouratea nítida* Aubl (Ochnaceae). **Rev Bras Farmacogn**, v. 15, p. 195-198, 2006.

ERSÖZ, T. Ü.; HARPUT, S.; SARACOGLU, İ.; ÇALIŞ, İ. Phenolic compounds from *Scutellaria pontica*. **Turk J Chem**, 26, 581-588, 2002.

FLAMINI, G., ANTOGNOLI, E., MORELLI, I. Two flavonoids and other compounds from the aerial parts *Centaurea bracteata* from Italy. **Phytochemistry**, v. 57, p. 559-564, 2001.

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

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

FELÍCIO, J. D.; ROSSI, M. H.; GONÇALES, E.; DAVID, J. M. A new lupane derivative from *Ouratea multiflora*. **Rev Latinoamer Quim**, v. 29, p. 132-134, 2001b.

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

FIDELIS, Q. C.; CASTRO, R. N.; GUILHON, G. M. S. P.; RODRIGUES, S. T.; SALLES, C. M. C.; SALLES, J. B.; CARVALHO, M. G. Flavonoids and other compounds from *Ouratea ferruginea* (Ochnaceae) as anticancer and chemopreventive agents. **Molecules**, v. 17, p. 7989-8000, 2012.

FIDELIS, Q. C.; RIBEIRO, T. A. N.; ARAÚJO, M. F.; CARVALHO, M. G. *Ouratea* genus: chemical and pharmacological aspects. **Rev Bras Farmacogn**, v. 24, p. 1-19, 2014.

GANGOUÉ-PIÉBOJI, J.; BAURIN, S.; FRÈRE, J.; NGASSAM, P.; NGAMENI, B.; AZEBAZE, A.; PEGNYEMB, D. E.; WATCHUENG, J. GOFFIN, C.; GALLEN, M. Screening of some medicinal plants from cameroon for β -Lactamase inhibitory activity. **Phytother Res**, v. 21, n. 3, p. 284-284, 2007.

GARTLAN, S.; MCKEY, D. B.; WATERMAN, P. G.; MBI, C. N.; STRUHSACKER, T. T. A Comparative study of the phytochemistry of two African rain forests. **Biochem Syst Ecol**, v. 8, 401-422, 1980.

GHOZOMU TIH, R.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Structure of the chalcone dimers lophirone F, G and H from *Lophira lanceolata* stem bark. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2289-93. 1990.

GRYNBERG, N.F., MARTORELLI, R.A., CARVALHO, M.G., BRAZ FILHO, R., MOREIRA, I.C., SANTOS, A.C.S., ECHEVARRIA, A. *Inhibition of murine tumour growth by natural biflavone and mesoionic compounds*. In Rao RS (ed) Proceedings of the International Cancer Congress. 1994. New Delhi, India. Anais... New Delhi, 1994. p. 63-66.

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

ICHINO, C.; KIYOHARA, H.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; CHUAKUL, W.; ISHIYAMA, A.; SEKIGUCHI, H.; NAMATAME, M.; OTOGURO, K.; OMURA, S.; YAMADA, H. Antimalarial activity of biflavonoids from *Ochna integerrima*. **Planta Medica** v. 72, n. 7, p. 611-614, 2006.

JHAM, G. N.; TELES, F. F. F.; CAMPOS, L. G. Use of aqueous HCl/MeOH as esterification reagent for analysis of fatty acid derived from soybean. **J Am Oil Chem Soc**, v. 59, n. 3, p. 132-133, 1982.

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

KIM, C. Y.; IM, H. W.; KIM, H. K.; HUH, H. Accumulation of 2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone in suspension cultures of *Panax ginseng* by a fungal elicitor preparation and a yeast elicitor preparation. **Appl Microbiol Biotechnol**, p. 56, p. 239-242, 2001.

LIAQUAT ALI, M.; AHMAD, M. S.; AHMAD, F.; OSMAN, S. M. *Ochna squarrosa* seed oil: a rich source of tripalmitin. **Chem Ind**, v. 6, p. 237-238, 1980.

LIKHITWITAYAWUID, K.; KAEWAMATAWONG, R.; RUANGRUNGSI, N. Mono- and biflavonoids of *Ochna integerrima*. **Biochem Syst Ecol**, v. 33, p. 527-536, 2005.

LIMA, J. D. de; FONSECA, M. do S. R.; NASCIMENTO, L. A. S. do; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, L. S.; MÜLLER, A. H.; ARRUDA, M. S. P.; ARRUDA, A. C.; RODRIGUES, S. T.; CARVALHO, M. G. Estudo químico de duas espécies de *Ouratea* da Amazônia. In: 29º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia-SP. Resumo PN-121.

LOBSTEIN, A.; WENIGER, B.; UM, B. H.; VONTHRON, C.; ALZATE, F.; ANTON, R. Polyphenols from *Cepedesia spathulata* and *Cepedesia macrophylla* (Ochnaceae). **Biochem Syst Ecol**, v. 32, p. 229-231, 2004.

MA, G.; LU, J.; SILVA, J. A. T. DA, ZHANG, X. ZHAO, J. Shoot organogenesis and somatic embryogenesis from leaf and shoot explants of *Ochna integerrima* (Lour). **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 104, p. 157-162, 2011.

MANGA, S. S. E.; MESSANGA, B. B.; SONDEGAM, B. L. 7,8-dihydrobenzofuranones from *Ouratea reticulata*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 706-708, 2001.

MANGA, S. S. E.; TIH, A. E.; GHOGOMU, R.T.; BLOND, A.; BODO, B. Biflavonoids constituents of *Campylospermum mannii*. **Biochem Syst Ecol**. v. 27, p. 402-404, 2009.

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

MBING, J. N.; BASSOMO, M. Y.; PEGNYEMB, D. E.; TIH, R. G.; SONDEMGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Constituents of *Ouratea flava*. **Biochem Syst Ecol**, v. 31, p. 215-217, 2003b.

MBING, J. N.; ENGUEHARD-GUEIFFIER, C.; ATECHADÉ, A. de T.; ALLOUCHI, H.; GANGOUÉ-PIÉBOJI, J.; MBAFOR, J. T.; TIH, G. R.; POTHIER, J.; PEGNYEMB, D. E.;

- GUEIFFIER, A. Two biflavonoids from *Ouratea nigroviolacea*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2666–2670, 2006.
- MBING, J. N.; NDONGO, J. T.; ENGUEHARD-GUEIFFIER, C.; ATCHADE, A. T.; PIEBOJI, J. G.; TIH, R. G.; POTHIER, J.; PEGNYEMB, D. E.; GUEIFFIER, A. Flavonoids from the leaves of *Ouratea zenkeri* and *Ouratea turnerae*. **Asian Chem Lett**, v. 13, p. 81-88, 2009.
- MESSANGA, B. B.; KIMBU, S. F.; SONDEGAM, B. L.; BODO, B. Isolation and structural elucidation of a new pentaflavonoid from *Ochna calodendron*. **New J Chem**, v. 25, p. 1098-1100, 2001.
- MESSANGA, B. B.; KIMBU, S. F.; SONDEGAM, B. L.; BODO, B. Triflavonoids of *Ochna calodendron*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 435-438, 2002.
- MONACHE, F. D.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; FERRARI, F.; MARINI-BETTOLO, G. B. New catechin and a dimeric proanthocyanidin from *Ouratea* species. **Tetrahedron Lett**, v. 43, p. 4211-4214, 1967a. Resumo do Chemical Abstracts, v. 68:104905u, p. 10120, 1968.
- MONACHE, F. D.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; FERRARI, F.; MARINI-BETTOLO, G. B. New proanthocyanidin dimer from *Ouratea*. **Annali Chim**, v. 57, p. 1364-1371, 1967b. Resumo do Chemical Abstract, v. 68:114366u, 1968.
- MONACHE, F. D.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; FERRARI, F.; MARINI-BETTOLO, G. B. New catechol, (-)-3,3',5,5',7-pentahydroxy-4'-methoxyepicatechol. **Annali Chim**, v. 57, p. 964-971, 1967c. Resumo do Chemical Abstract, v. 68:78077u, 1968.
- MONACHE, F. D.; FERRARI, F.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; MARINI-BETTOLO, G. B. Stereochemistry of proanthocyanidins from *Ouratea* sp. (Ochnaceae). **Farmaco**, v. 25, p. 96-105, 1970. Resumo do Chemical Abstract, v. 72:132438u, 1970.
- MOREIRA, I. C.; SOBRINHO, D. C.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R.; Isoflavanone dimers hexaspermone A, B and C from *Ouratea hexasperma*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 6, p. 1567-1572, 1994.
- MOREIRA, I. C.; CARVALHO, M. G. de; BASTOS A B. F.; BRAZ-FILHO, R.; A flavone dimer from *Ouratea hexasperma*. **Phytochemistry**, v. 51, p.833-838, 1999.
- NASCIMENTO, L. A. S. do; GUILHON, G. M. S. P.; ARRUDA, M. S. P.; SANTOS, L. S.; ARRUDA, A. C.; MÜLLER, A. H.; SILVA, M. N. da; RODRIGUES, S. T.; CARVALHO, M. G. de. Biflavones and triterpenoids isolated from *Ouratea castaneifolia* (DC.) Engl., Ochnaceae. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 19, n. 4, p. 823-827, 2009.
- NJOCK, G. B. B.; BARTHOLOMEUSZ, T. A.; FOROOZANDEH, M.; PEGNYEMB, D. E.; CHRISTEN, P.; JEANNERAT, D. NASCA-HMBC, a new NMR methodology for the resolution of severely overlapping signals: application to the study of agathisflavone. **Phytochem Anal**, v. 23, p. 126-130, 2012.

- NIRANJAN KUMAR, A.; SATYA SRINIVAS, K. V. N.; KOTESH KUMAR, J.; SASTRY, K. P. Rare cyano glucosides from *Coldenia procumbens* Linn. **J Chem Pharm Res**, v. 5, n. 12, p. 1394-1397, 2013.
- OLIVEIRA; M. M. de; SAMPAIO, M. P.; SIMON, F.; GILBERT, B; MORS, W. B.; Antitumor activity of condensed flavanols. **An Acad Bras Ciênc**, v. 44, n. 1, p. 41-43, 1972.
- PEGNYEMB, D. E.; GHOGOMU TIH, R.; SONDEGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Biflavonoids from *Ochna afzelii*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 579-582, 2001.
- PEGNYEMB, D. E.; MBING, J. N.; ATCHADÉ, A. de T.; TIH, R. G.; SONDEGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Antimicrobial biflavonoids from the aerial parts of *Ouratea sulcata*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1922-1926, 2005.
- REUTRAKUL, V.; NINGNUEK, N.; POHMAKOTR, M.; YOOSOOK, C.; NAPASWAD, C.; KASISIT, J.; SANTISUK, T.; TUCHINDA, P. Anti HIV-1 flavonoid glycosides from *Ochna integerrima*. **Planta Medica**, v. 73, n. 7, p. 683-688, 2007.
- ROSA, J. S. Oil of bati (batiputa). **Rev Química Industrial**, v. 8, p. 11-15, 1939a. Resumo do Chemical Abstract, v. 35:31849u, 1940.
- ROSA, J. S. Bati oil: factors of its industrial exploitation. **Inst nacl tec**, p. 19. 1939b. Resumo do Chemical Abstract, v. 34:46568u, 1940.
- RUKACHAISIRIKUL, V., KHAMTHONG, N., SUKPODMA, Y., PHONGPAICHIT, S., HUTADILOK-TOWATANA, N., GRAIDIST, P., SAKAYAROJ, J., KIRTIKARA, K. Cyclohexene, diketopiperazine, lactone and phenol derivatives from the sea fan-derived fungi *Nigrospora* sp. PSU-F11 and PSU-F12. **Arch Pharm Res**, v. 33, p. 3, p 375-380, 2010.
- SAKUSHIMA, A.; COSKUN, M.; MAOKA, T. Hydroxybenzoic acids from *Boreava orientalis*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 257-261, 1995.
- SON, K. H.; PARK, J. O.; CHUNG, K. C.; CHANG, H. W.; KIM, H. P.; KIM, J. S.; KANG, S. S. Flavonoids from the aerial parts of *Lonicera japonica*. **Arch Pharm Res**, v. 15, n. 4, p. 365-370, 1992.
- SOUZA, M. T. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de *Matayba elaeagnoides* Radlk.** 2006, p. 85. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade do vale do Itajaí, Itajaí, 2006.
- STEENKAMP, V. FERNANDES, A. C.; VAN RENSBURG, C. E. J. Screening of vended medicinal plants for antifungal activity against *Candida albicans*. **S Afr J Bot**, v. 73, p. 256-258, 2007.
- SUZART, L. R.; DANIEL, J. F. de S.; CARVALHO, M. G. de; KAPLAN, M. A. C. Biodiversidade flavonoídica e aspectos farmacológicos de espécies dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* (Ochnaceae). **Quím Nova**, v. 30, n. 4, p. 984-987, 2007a.
- SUZART, L. R. **Considerações sobre os gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia*, estudo químico de duas espécies de Ochnaceae: *Ouratea hexasperma* St. Hil e *Ouratea cuspidata* St. Hil e**

atividade biológica. 2007b, 163p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, 2007b.

SUZART, L. R.; CARVALHO, M. G.; CAVATI, L. C.; KAPLAN, M. A. C. Chemical constituents from the inflorescences of *Ouratea hexasperma*. **Chem Nat Comp**, v. 48, p. 472-473, 2012.

TANG, S.; BREMNER, P.; KORTENKAMP, A.; SCHLAGE, C.; GRAY, A. I.; GIBBONS, S.; HEINRICH, M. Biflavonoids with cytotoxic and antibacterial activity from *Ochna macrocalyx*. **Planta Medica**, v. 69, n. 3, p. 247-253, 2003.

TANIGUCHI, S.; IMAYOSHI, Y.; KOBAYASHI, E.; TAKAMATSU, Y.; ITO, H.; HATANO, T.; SAKAGAMI, H.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; SUGITA, D.; SHIMURA, S.; YOSHIDA, T. Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. **Phytochemistry**, v. 59, p. 315-323, 2002.

TIH, A. E.; GHOGOMU *TIH*, R.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Bongosin: A new chalcone-dimer from *Lophira alata*. **J Nat Prod**, v. 53, n. 4, p. 964-967, 1990.

TIH, A. E.; GHOGOMU, R. T.; SONDEGAM, B. L.; CAUX, C.; BODO, B. Constituents of *Lophira alata* leaves. **Biochem Syst Ecol**, v. 31, p. 549-551, 2003.

VALADARES, Y. M.; OLIVEIRA, A. B.; CÔRTEZ, S. F.; LOMBARDI, J. A.; BRAGA, F. C. Atividade vasodilatadora *in vitro* de espécies de *Ouratea* (Ochnaceae) e de frações de *Ouratea Semiserrata* (Mart.) Engl. **Rev Bras Cienc Farm**, v. 39, n. 1, p. 83-91, 2003.

VELANDIA, J. R.; CARVALHO M. G. de; BRAZ-FILHO, R. Ent-16 α ,17-Dihydroxykauran-19-oic acid isolated from *Ouratea semiserrata* and the stereochemistry defiances of the chiral carbons C-4 and C-16. **Quím Nova**, v. 21, n. 4, p.397-404, 1998a.

VELANDIA, J. R.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R. Novel trichloro and tetrachloroisoflavone isolated from *Ouratea semiserrata*. **Nat Prod Lett**, v. 12, n. 3, p. 191-198, 1998b.

VELANDIA J. R.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R.; WERLE A A. Biflavonoids and a glucopyranoside derivative from *Ouratea semiserrata*. **Phytochem Anal**, v. 13, n. 5, p. 283-292, 2002.

VELANDIA, J. R. **Constituintes químicos de *Ouratea semiserrata* e transformações químicas da neolignana aureina.** 1997, 179 p. Tese (Doutorado em Ciência) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 1997.

VIEGAS-JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARRETO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím Nova**, v. 29, p. 2, p. 326-337, 2006.

WANG, Y. H.; ZHANG, Z. K.; HE H. P.; WANG, J. S.; ZHOU, H.; DING, M.; HAO, X. J. Stilbene C-glycosides from *Cissus repens*. **J Asian Nat Prod Res**, v. 9, n. 7, 631-636, 2007.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. 1992 onwards. The Families of Flowering Plants. Version: 14th December 2000. Disponível em: <http://biodiversity.uno.edu.delta>. Acesso em 29/06/2011.

WU, J.; FAIRCHILD, E. H.; BEAL, J. L.; TOMIMATSU, T.; DOSKOTCH, R. W. Lithospermoside and dasycarponin, cyanoglucosides from *Thalictrum*. **J Nat Prod**, v. 42, n. 5, p. 500-511, 1979.

ZINTCHEM, A. A.; ATCHADÉ, A. T.; GHOGOMU, R.; MBAFOR, J. T.; BLOND, A.; PEGNYEMB, D. E.; BODO, B. Flavonoids from *Ouratea staudtii* Van Tiegh. (ex Keay) (Ochnaceae). **Biochem Syst Ecol**, v, 35, p. 255-256, 2007.

ZINTCHEM, A. A.; BIKOBO, D. N.; ATCHADÉ, A. T.; MBING, J. N.; GANGOUE-PIEBOJI, J.; TIH, R. G.; BLOND, A.; PEGNYEMB, D. E.; BODO, B. Nitrile glucosides and serotobenine from *Campylospermum glaucum* and *Ouratea turnarea*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2209-2213, 2008.

3. ESTUDO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Ouratea*

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Objetivo Geral

- Avaliar a atividade biológica das frações biflavonoídicas e biflavonoides puros em ensaios enzimáticos e anticâncer

3.2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade anticâncer in vitro
- Avaliar o efeito das frações e biflavonoides puros na atividade das enzimas CYP1A, GST e Catepsinas

3.3. REVISÃO DA LITERATURA

3.3.1. Atividades biológicas apresentadas por espécies do gênero *Ouratea*

A avaliação dos trabalhos na literatura permitiu verificar a existência de vários estudos farmacológicos, tanto com extratos, frações de extratos como com biflavonóides naturais e seus derivados isolados de espécies do gênero *Ouratea*. Na tabela 29 são apresentados os ensaios realizados com cada espécie.

Tabela 29. Ensaios biológicos de extratos e substâncias de isoladas de espécies do gênero *Ouratea*

Espécie	Amostra	Atividade	Referência
<i>O. castaneifolia</i>	Extratos de folhas	Antiviral	Brandão et al., 2011
	Extratos do caule	Vasodilatadora	Valadares et al., 2003
<i>O. elongata</i>	Extrato de folhas	Antimicrobiana	Gangoué-Piéboji et al., 2006
<i>O. flava</i>	Extrato de folhas	Antimicrobiana	Gangoué-Piéboji et al., 2006
<i>O. ferruginea</i>	Substâncias	Inibição enzimática	Fidelis et al., 2012
<i>O. hexasperma</i>	Substância	Antitumoral	Grynberg et al., 1994; 2002
	Substância	Anticancer	Daniel et al., 2007
<i>O. lucens</i>	Extratos de folhas	Antiviral	Roming et al., 1992
<i>O. multiflora</i>	Substância	Anticancer	Carbonezi et al., 2007
	Substância	Anti-aflatoxina	Gonzalez et al., 2001
	Substância	Antioxidante	Carbonezi et al., 2007
<i>O. nitida</i>	Extratos de folhas	Antimalarial	Estevam et al., 2005
<i>O. parviflora</i>	Substância	Antiviral	Araújo et al., 2011
	Extratos de folhas	Anti-inflamatório	Carbonari et al., 2006
	Extratos de folhas	Hepatoprotetora	Carbonari et al., 2006
	Substâncias	Inibição enzimática	Carbonezi et al., 2007
	Substância	Anti-aflatoxina	Gonzalez et al., 2001
<i>O. reticulata</i>	extrato	Antimicrobiana	Bikobo et al., 2009
<i>O. semisserrata</i>	Extratos de folhas	Antiviral	Brandão et al., 2011
	Substância	Antitumoral	Grynberg et al., 1994; 2002
	Extratos de folhas e caule	Anti-inflamatório	Braga et al. 2000
	Extratos do caule	Vasodilatadora	Valadares et al., 2003
<i>O. sp</i>	Substância	Antitumoral	Oliveira et al., 1972
<i>O. spectabilis</i>	Extratos de folhas	Antiviral	Brandão et al., 2011

	Substâncias	Inibição enzimática	Felício et al., 1995; Simoni et al., 2002
<i>O. staudtii</i>	Extratos do caule	Vasodilatadora	Valadares et al., 2003
	Substância	Anti-aflatoxina	Gonzalez et al., 2001
	Extrato	Antimicrobiana	Bikobo et al., 2009
<i>O. sulcata</i>	Substância	Antimicrobiana	Pegnyemb et al., 2005
	Extrato de folhas	Antimicrobiana	Gangoué-Piéboji et al., 2006
<i>O. turnarea</i>	Extrato de raiz e folhas	Antimicrobiana	Mbing et al., 2009
	Substância	Antimicrobiana	Zintchem et al., 2008
<i>O. zenkeri</i>	Extrato de folhas	Antimicrobiana	Mbing et al., 2009

3.3.1.1. Atividade antiviral

Extratos das folhas de *Ouratea lucens* foram avaliados contra vírus de herpes tipo 1 (HSV-1) e (HSV-2), poliovírus (Polio-1), vírus vesicular da estomatite (VSV) e parainfluenza-3 (Para-3) em ensaios VR e DPI. Foi observada forte atividade antiviral para os extratos etanólicos e aquosos contra o HSV-1 e HSV-2 e com o extrato em éter de petróleo em HSV-1, já o extrato em diclorometano mostrou fraca atividade contra o HSV-1 e HSV-2, em ensaio VR. Resultados semelhantes foram observados em ensaios de DPI. O extrato etanólico apresentou uma atividade mais elevada contra VSV, enquanto o extrato aquoso foi mais ativo contra HSV-1, para uma DE₅₀ a 9 µg/ml (DE: dose efetiva). Para infecções do Para-3, os extratos aquosos foram mais ativos, com uma DE₅₀ a 20 µg/ml, enquanto o extrato de etanol teve a melhor atividade contra Polio-1 com um DE₅₀ de 30 µg/ml. As concentrações utilizadas não apresentaram efeito citotóxico em células normais (ROMING et al., 1992).

Os extratos etanólicos de *Ouratea castaneifolia*, *O. semisserrata* e *O. spectabilis* apresentaram atividade contra herpes humano vírus do tipo 1 (HSV-1), vírus vaccinia (VACV) e vírus da encefalomiocardite (EMCV), os ensaios foram realizados por MTT, usando como controles positivos (aciclovir/Calbiochem e α -2a interferon/Bergamo). Extratos de folhas de *O. spectabilis* mostrou atividade contra HSV-1, com valores de DE₅₀ inferiores a 50 µg/ml, enquanto extratos de folhas de *O. castaneifolia* e *O. semisserrata* foram moderadamente ativo, com valores de DE₅₀ 56,5-97,24 µg/ml, respectivamente. Moderada a baixa atividade contra EMCV, foi observada para os extratos de *O. castaneifolia* (DE₅₀ 185,9 µg/ml) e *O. semisserrata* (DE₅₀ 465,7 µg/ml). Para VACV-WR, os extratos de *O. spectabilis*, *O. castaneifolia* e *O. semisserrata* inibiram a replicação do vírus, com valores de DE₅₀ inferiores a 50 µg/ml. Entre os extratos ativos frente a VACV-WR, o de *O. semisserrata* deve ser destacado pelo DE₅₀ de 7,4 µg/ml (BRANDÃO et al., 2011).

Agatisflavona (42), 7 "-metil-agatisflavona (43) e lupeol (75), obtidos de *O. parviflora*, foram ensaiados para antiviral atividades contra HSV-1 e apresentaram valores de

DE₅₀ de 11,2, 25,8 e 47,5 µg/ml, respectivamente. Relativamente à atividade anti-HSV-2, **42** e **43** apresentaram valores de DE₅₀ de 2,8 e 1,5, respectivamente, enquanto que **75** não apresentou atividade frente a HSV-2 (ARAÚJO et al., 2011).

3.3.1.2. Atividade antitumorar

Uma proantocianidina (71-72) isolada de *Ouratea sp.*, cuja configuração absoluta não foi mencionado pelos autores, foi ensaiada contra o Sarcoma 180 em camundongos e Walker 256 em ratos. Os autores relataram potente atividade antitumoral. Doses de 300 mg / kg / dia, i.p. durante cinco dias reduziu o crescimento do tumor em 50-70% (OLIVEIRA et al., 1972).

As atividades citotóxicas e antitumoral contra tumores murina foram avaliadas *in vivo* usando os biflavonoides 7'-O-metil-agathisflavone **43** isolado de *Ouratea hexasperma*, amentoflavona (**32**) obtida de *O. semisserrata* e o derivado acetilado de 32, amentoflavona peracetilada (**32a**), por MTT ensaios. A biflavona **43** apresentou o melhor resultado, com redução significativa do crescimento de células de sarcoma 180, com valores de CI₅₀ de síntese de DNA e proteína em 3 e 6,8 µM, respectivamente. A atividade antitumoral contra um tumor ascítico em S180 na dose de 80 mg / kg (T / C% 140), foi igual a 5-fluorouracil, usado como um controlo positivo, na dose de 38 mg / kg (T / C% 140) (GRYNBERG et al., 1994).

As DNA-topoisomerasas são uma classe de enzimas envolvidas na regulação do enovelamento do DNA, crucial para a replicação e transcrição do mesmo. Consequentemente, essas enzimas são alvos de intervenção quimioterápicos em terapias antibacterianas e anticâncer (ISHAR et al., 2006).

Em 2002, GRYNBERG et al. relataram o efeito dos biflavonóides 7''-O-metilagathisflavona (**43**), amentoflavona (**32**), e o derivado **32a** frente enzimas topoisomerasas I e II-α humana. Todos os compostos se mostraram inibidores da DNA-topoisomerase I em 200 µM, e apenas 7'' - O-metil-agathisflavone (**43**) inibe a DNA-topoisomerasas II-α na concentração de 200 µM (GRYNBERG et al., 2002).

As biflavonas também mostraram atividade de retardo do crescimento por inibição das enzimas topoisomerasas, com CI₅₀ de 24 µM para I, 26 µM para II e 10 µM para IIα, frente a células de carcinoma de Ehrlich, em ensaios usando método tetrazólio e cultura de 45 h. No entanto, quando testadas frente a linhagens leucêmica K562 humana em cultura 45 h, apenas 7''-O-metil-agathisflavona (**43**) mostrou 42% de atividade inibidora de crescimento a 90 µM (GRYNBERG et al., 2002).

Os biflavonóides 7,7''-dimetil-lanaraflavona (**52**), agatisflavona (**42**) e 7''-metilagatisflavona (**43**) isolados de folhas de *O. hexasperma*, além de uma mistura de **52** e **43**, foram testadas contra células de adenocarcinoma do cólon HT-29, de carcinoma pulmonar NCI-H460, de mama MCF-7, de adenocarcinoma do ovário OVCAR-3 e de carcinoma de renais RXF-393, usando como controle positivo etoposídeo. A biflavona **52** promoveu a inibição do crescimento em concentrações de 3-5 µg/ml (<25% do crescimento de controle) em células NCI-H460, MCF-7 e OVCAR-3. No entanto, para as linhagens celulares de RXF-393 e HT-29, este composto induziu a um baixo efeito citotóxico. Composto **43** mostrou uma atividade mais elevada, com um valor de CI_{50} de cerca de 4 µg/ml para todas cinco linhagens celulares testadas. A mistura de **52** e **43** mostrou uma inibição de crescimento menor que 25% em relação ao controle para todas as linhagens de células testadas nas concentrações de 18-20 µg/ml, com valores de CI_{50} variando de 8-10 µg/ml. Composto **42** não apresentou qualquer efeito sobre o crescimento celular nas linhagens de células testadas (DANIEL et al., 2007).

Biflavonóides heveaflavone (**40**), 7'',4'''- di -*O*-metilamentoflavona (**37**), podocarpusflavona-A (**35**), e amentoflavona (**32**), obtido a partir de folhas de *Ouratea multiflora*, foram analisadas quanto à citotoxicidade para o linfoma de rato (L5178) e melanoma (KB). Nenhum dos compostos foram ativos contra estas linhagens celulares (CARBONEZI et al., 2007).

3.3.1.3. Atividade anti-inflamatória

As espécies reativas de oxigênio (ROS) estão intimamente envolvidas na patogênese dos processos inflamatórios e podem agravar o dano tecidual. Em adição aos efeitos protetores de defesa antioxidante endógeno, os produtos naturais com atividade antioxidante também são importantes para atenuar o dano oxidativo, complementando essas defesas (CARBONARI et al., 2006). O elevado potencial antioxidante apresentado pelo extrato bruto (CEOP) e fração (OP4) de folhas de *O. parviflora in vitro* através da eliminação de radicais de 2-difenil-1-picril-hidrazilo-hidrato (DPPH), radical hidroxila (HO•, pelo método de desoxirribose), ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$, de acordo com Robak & Gryglewski, 2002) e peroxidação lipídica (pelo método de TBA) em homogeneizado de fígado de rato, indica ações anti-inflamatórias. O CEOP e OP4 mostrou forte atividade inibitória de peroxidação lipídica induzida pelo peróxido de terc-butilo (CI_{50} = 2,3 e 1,9 µg/ml, respectivamente), inibição de oxidação da desoxirribose por concentração dependente (CI_{50} = 14,9 e 0,2 µg/ml, respectivamente), atividade antioxidante contra $O_2^{\bullet -}$ (CI_{50} = 87,3 e 73,1 µg/ml,

respectivamente) e os radicais DPPH ($CI_{50} = 55,4$ e $38,3$ $\mu\text{g/ml}$, respectivamente) (CARBONERI et al., 2006).

Lipoxigenases constituem uma família de dioxigenases amplamente distribuídas em animais e plantas. Essas enzimas catalisam a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, contendo o *cis,cis*-1,4-pentadieno, para formar hidroperóxidos para hidroperóxidos. Foi observado que seus produtos de reação desempenham um papel vital em uma variedade de distúrbios, como asma brônquica, inflamação e angiogênese tumoral (Zargar et al., 2013). Extratos de folhas e de caule de *O. semisserrata* apresentava 29,2 e 7,8% de inibição da 5-lipoxigenase, respectivamente. O ensaio *in vitro* de inibição da 5-lipoxigenase, constitui um bom modelo para a triagem de plantas com atividade anti-asmáticos (BRAGA et al., 2000).

3.3.1.4. Atividade hepatoprotetora

O tetracloreto de carbono (CCl_4) ataca os hepatócitos, causando danos às membranas do plasma por peroxidação lipídica. As enzimas citosólicas presentes nos hepatócitos feridos vazam para a corrente sanguínea, assim o dano celular pode ser avaliado pela concentração destas enzimas no sangue. Aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) são exemplos de enzimas citosólicas. O extrato bruto (CEOP) e fração hidroalcoólica (OP4) de *O. parviflora* foram considerados como sendo os responsáveis pela atividade hepatoprotetora contra danos induzidos por CCl_4 em hepatócitos de rato. O pré-tratamento com CEOP e OP4 (300 mg/kg, durante sete dias) impediu a peroxidação lipídica, danos no DNA e liberação de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), sem afetar o conteúdo de GSH hepática em animais tratados com CCl_4 . O tratamento com CCl_4 aumentou significativamente (por 90%) os níveis de hidroperóxidos de lipídios, o teor de proteína carbonil (64%), o índice de dano do DNA (133%), a AST (261%), a ALT (212%), a atividade da catalase (23%), e também causou uma diminuição de 60% na concentração de GSH (CARBONARI et al., 2006).

3.3.1.5. Atividade enzimática

Durante muito tempo, as atividades biológicas dos polifenóis vegetais sobre as plantas e seres humanos, têm sido atribuídas a sua ação antioxidante e/ou a sua propensão para formar complexos com proteínas de forma não específica (HASLAM, 1996). Hoje, há evidências convincentes sobre os mecanismos pelos quais os polifenóis vegetais exercem a sua atividade de proteção contra doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, além de câncer e diabetes, os quais não são simplesmente atribuídos as suas propriedades redox, mas sim à sua capacidade de se ligar diretamente a proteínas ou peptídeos alvo (QUIDEAU et al., 2011).

Aldose redutase é responsável por catalisar a redução de glicose para sorbitol na via do poliol. O excesso de sorbitol tem sido associado a várias complicações diabéticas oculares incluindo, queratopatia, catarata e retinopatia (KADOR, 1988; SUGIYAMA et al. 2000). A administração de inibidores da aldose redutase no aparecimento da diabetes ou galactosemia mostrou evitar estas complicações (SUGIYAMA et al. 2000).

A 7,7'' -di-*O*-metilagatisflavona (**45**) e 6,6''-bigenkwanina (**48**), isoladas do extrato etanólico de *O. spectabilis*, exibiram atividades inibidoras contra a aldose redutase. As concentrações das substâncias estudadas, necessária para produzir 50% de inibição da reação catalisada pela enzima (**45**, CI_{50} 27,7 μ M e **48**, CI_{50} 11,9 μ M) foram menores que a do controle positivo (quercetina, CI_{50} 31,4 μ M) (FELÍCIO et al., 1995).

Posteriormente, foi avaliada a citotoxicidade de **45**, **48** e **48a** (derivado obtido por metilação da substância **48**) usando uma linhagem celular de córnea de coelho SIRC por método espectrofotométrico. As substâncias **45**, **48** e **48a** apresentaram CI_{50} de $381,9 \pm 22,29$; $426,74 \pm 22,05$ e $359,7 \pm 24,25$ μ g/ml, respectivamente (SIMONI et al., 2002). Estes resultados indicam que as concentrações que causam inibição no crescimento das células SIRC em 50% são muito maiores do que as concentrações necessárias para inibir a atividade da aldose redutase. A atividade inibidora contra *aldose redutase* apresentada por **45** e **48** representa um relevante potencial terapêutico na patologia da diabetes (SIMONI et al., 2002).

A inibição da acetilcolinesterase por drogas aumenta os níveis da acetilcolina e, assim, oferece um tratamento sintomático para a doença de Alzheimer (Darvesh et al., 2013). As substâncias heveaflavona (**40**), 7'', 4'''- di-*O*-metilamentoflavona (**37**), podocarpusflavona-A (**35**) e amentoflavona (**32**) foram submetidas a uma triagem preliminar por TLC para avaliar a atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase. Nenhuma das substâncias apresentou atividade nas concentrações de 0,1 à 1,0 μ M (CARBONEZI et al. 2007).

Metabolismo de xenobióticos (fase I e II) é conhecido pelo seu papel no metabolismo de drogas e outras substâncias nocivas. Os metabólitos reativos podem sofrer metabolismo adicional, por enzimas fase I ou II, levando a formação de produtos inativos. Dessa forma, a indução de qualquer das fases I ou II das enzimas podem resultar num aumento da desintoxicação de carcinogênicos ou a formação de produtos altamente reativos. Muitos agentes cancerígenos são metabolizados pelas enzimas citocromo P-450 (CYP) tanto para metabólitos biologicamente inativos quanto para metabólitos reativos, quimicamente eletrofílicos, que se ligam covalentemente ao DNA produzindo carcinogenicidade (MOON et al., 2006). A indução do metabolismo de fase II está relacionado a prevenção de câncer. No entanto, enzimas de fase II como a glutathione S-transferase (GST) também estão envolvidas em mecanismos de resistência e drogas antitumorais (TOWNSEND & TEW, 2003).

Os flavonoides de *Ouratea ferruginea*, 5,4'-diidroxí-7,3',5'-trimetoxiisoflavona (**18**), 7,3'-di-*O*-metilrobol (**19**), piscigenina (**21**) e sequoiaflavona (**34**), foram avaliados em ensaios *in vitro* com a GST (enzima de fase II) e ECOD (enzima de fase I). As substâncias **21** e **18** demonstraram os melhores efeitos inibitórios, com uma inibição de 67,8% e 74,7% de atividade de GST, respectivamente. O efeito inibitório de **19** não foi observado sobre a atividade de GST. As GSTs são alvos terapêuticos promissores, pois são encontradas superexpressadas numa ampla variedade de tumores. Portanto, sua inibição diminui a resistência de tumores a drogas antitumorais. O estudo também revelou que os compostos inibiram a atividade da ECOD *in vitro*. A sequoiaflavone (**34**) foi o inibidor mais potente da ECOD com inibição de 75,2% em comparação com o controle. As isoflavonas **18**, **19** e **21** inibiram a atividade da ECOD em 33,1; 22,2 e 56,5%, respectivamente (FIDELIS et al., 2012).

3.3.1.6. Atividade vasodilatadora

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que a hipertensão afeta aproximadamente 25% dos adultos em todo o mundo (LAWES et al., 2008). A hipertensão está associada com graves complicações, incluindo danos em órgãos vitais, arteriosclerose, hipertrofia do ventrículo esquerdo (VE) e acidente vascular cerebral (AVC) (KANNEL, 2000); é indispensável o desenvolvimento de tratamentos adicionais que previnam também complicações cardiovasculares (DOLINSKY et al., 2013).

Os efeitos vasodilatadores de extrato hidroetanólico (OSE) do tronco de *O. semisserrata* e de sua fração em acetato de etila (OSR) foram avaliados com anéis aórticos de endotélio. A OSR produziu vasodilatação mais potente (CI_{50} 3,5 μ g/ml) do que OSE (CI_{50} > 30 μ g/ml). A OSR também apresentou um maior teor de proantocianidinas totais ($21,8 \pm 1,5\%$) em comparação com OSE ($6,5 \pm 0,4\%$), levando assim os autores a sugerirem que as substâncias desta classe têm um papel importante no vasorrelaxamento. A investigação do mecanismo de vasodilatação observado em OSR revelou que o seu efeito de vasorrelaxamento foi completamente abolido por L-NAME (300 μ M), um inibidor da enzima óxido nítrico síntase (NOS), mas não por um muscarínico antagonista (atropina, 1 μ M) nem por um inibidor da ciclo-oxigenase (indometacina, 10 μ M). Estes resultados mostraram que a OSR, uma fração rica em proantocianidina de *O. semisserrata*, induz a vasodilatação por um mecanismo dependente do fator relaxante derivado do endotélio, igualmente ao do óxido nítrico (Cortes et al., 2002). Posteriormente, extratos hidroetanólicos de folhas e caule de *O. castaneifolia*, *O. semisserrata* e *O. spectabilis* foram testados em anéis de aorta de ratos pré-contráídos com fenilefrina. Dentre estes, apenas extrato hidroetanólico de tronco de *O. semisserrata* produziu atividade vasodilatadora significativa ($63 \pm 3\%$, $n = 6$), em 100 mg/ml (VALADARES et al. 2003).

3.3.1.7. Atividade antimalarial

A malária é uma doença infecciosa, de origem parasitária, que é uma das principais causas de morbidade e mortalidade global. Acredita-se que cerca de 300-500 milhões de pessoas contraem a doença anualmente e mais de 1 milhão de pessoas morrem de malária todos os ano (MURRAY et al., 2012). O plasmódio, o agente causador da malária, precisa completar um ciclo complexo no interior do seu vetor, o mosquito *Anopheles*, para ser transmitido aos seres humanos (GHOSH et al., 2000). No entanto, o surgimento e a

propagação rápida de mosquitos resistentes à inseticida e plasmódios com resistência às drogas, combinados com a falta de uma vacina efetiva, minam seriamente os esforços atuais de controle (TRAPÉ et al., 2011). Claramente, os meios disponíveis para combater a doença são insuficientes (WANG et al., 2013).

ESTEVAM et al. (2005) relataram a avaliação preliminar *in vivo* da atividade antimalárica de extratos de folhas de *Ouratea nitida* Aubl. preparados em n-hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol/água utilizando camundongos (*Mus musculus*) infectados com *Plasmodium berghei*, cepas NK-65. Atividade antimalárica foi determinada pela percentagem da redução da parasitemia dos grupos tratados quando comparados com o grupo controle negativo. Dentre os extratos testados, apenas o extrato hexânico mostrou boa atividade contra o *Plasmodium berghei* com redução da parasitemia de 47,87%, 77,95% e 51,04%, para as doses de 250, 500 e 1000 mg/kg, respectivamente. Os resultados dos testes mostraram significativa atividade antimalária *in vivo*, em comparação com o controle positivo, fosfato de cloroquina, cuja atividade contra *P. berghei* foi 100%. Em contraste, o aumento da concentração de 500 a 1000 mg/kg deram resultados insatisfatórios. A purificação cromatográfica do extrato hexano levou ao isolamento de friedelina, β -amirina, 3,4-secofriedelan-3-óico e tetracosan (ESTEVAM et al., 2005).

3.3.1.8. Atividade antimicrobiana

Extratos de plantas utilizadas na medicina popular foram avaliados *in vitro* por vários grupos de pesquisa para verificar as propriedades antibacterianas. A atividade antibacteriana dos flavonoides é cada vez mais documentada (COXIM E LAMB, 2005). As substâncias sulcatona A (**57**) e 3-hidroxi-2,3-diidroapigenil-[C-4'-O→C-3']- diidrokaempferol (**58**), isoladas de partes aéreas de *O. sulcata*, apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus*, com valores de MIC= 12,50 μ g/ml (**57**) e 8,12 μ g/ml (**58**), e *Bacillus subtilis*, com MIC= 8,51 μ g/ml (**57**) e 10,05 μ g/ml (**58**), bactéria gram-positiva. Estas atividades foram quase equivalentes as demonstradas pelo sulfato de estreptomicina, com valores de MIC= 6,25 μ g/ml (**57**) e 0,85 μ g/ml (**58**). No entanto, nenhuma destas substâncias foi ativa contra o *Vibrio anguillarum* (bactéria gram-positiva) ou *Escherichia coli* (bactéria gram-negativa) em ensaios com Agar (PEGNYEMB et al. de 2005).

As biflavonas heveaflavona (**40**), 7'',4'''-di-O-metilamentoflavona (**37**), podocarpusflavona-A (**35**) e amentoflavona (**32**), obtidas de folhas de *O. multiflora*, mostraram uma atividade fraca contra as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e

Bacillus subtilis na concentração de 10,0 µg/ml, e só a heveaflavona (40) e podocarpusflavona-A (35) inibiram o crescimento de *S. aureus* na concentração de 5,0 µg/ml. As substâncias testadas apresentaram inibição moderada, com zonas de inibição de 7,0-10,0 mm, em comparação com sulfato de estreptomicina, utilizado como controle positivo na concentração de 5,0 µg/ml, que apresentou zona de inibição de 30-35 mm (CARBONEZI et al. de 2007).

Extratos de três espécies de *Ouratea*, *O. sulcata*, *O. flava* e *O. elongata*, exibiram moderada ou nenhuma inibição contra bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Enterococcus sp.*, *En. hirae*), bacilos gram-negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Serratia marsescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*) ou fungos (*Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans* sero D, *Aspergillus spp.*, *Tricophyton spp.*) em ensaios por difusão em agar usando uma concentração final de 2,0 a 1024,0 µg/ml. O extrato metanólico das folhas de *O. sulcata* apresentou atividade contra *Staphylococcus spp.*, com zonas de inibição de 10-13 mm, enquanto que extratos similares de *O. flava* e *O. elongata* só apresentaram atividade contra *Candida albicans*, com zonas de inibição de 7-13 e 7-10 mm, respectivamente (GANGOUÉ-PIÉBOJI et al., 2006). O extrato de raízes de *O. turnarea* em CH₂Cl₂:MeOH (1: 1) apresentou atividade apenas moderada contra bactérias gram-positivas. A concentração inibitória mínima desses extratos variou de 2,5 a 5,0 mg/ml. Serotobenina, isolada do extrato de raízes de *O. turnarea*, também foi avaliada frente a estes micro-organismos e não apresentou atividade para quaisquer bactérias testadas (ZINTCHEM et al., 2008). A atividade antimicrobiana de extratos metanólicos de folhas de *O. zenkeri* e *O. turnerae* foram também examinados por MBING et al. (2009) e ambos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana moderada contra estes micro-organismos.

Recentemente, Bikobo et al. (2009) avaliaram e compararam as propriedades antimicrobianas do extrato metanólico de *Ouratea sulcata*, *O. flava*, *O. elongata*, *O. reticulata* e *O. staudtii*. Novamente, foi observado que os extratos de *Ouratea* apresentam atividade contra bactérias gram-positivas e leveduras, mas não contra bactérias gram-negativa. Os extratos mais ativos foram os obtidos de *O. sulcata* e *O. flava*. Alguns biflavonóides também foram avaliados e mostraram ser mais ativos contra bactérias gram-positivas.

As aflatoxinas são metabólitos secundários de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, que demonstraram ser toxigênico, cancerígenas, mutagênico e teratogênico em diferentes espécies animais (FAN e CHEN, 1999). Os biflavonóides 6,6''-bigenkwanina (48);

tetrametoxibigenkwanina (**48a**); amentoflavona (**32**), e 7,7''-di-*O*-metilagatisflavona (**45**) obtidos de *O. spectabilis*, *O. multiflora* e *O. parviflora* demonstraram um efeito inibidor sobre a biosíntese de aflatoxinas. *A. flavus* utilizado como um controle negativo produziu 188,6 µg/ml de AFB1 e 12,58 µg/ml de AFB2, enquanto o fungo tratado com biflavonóides **48**, **48a**, **32** e **45** na concentração de 5 µg/ml produziu 56,58; 42,65; 37,42 e 45,19 µg/ml de AFB1, e 2,38; 2,87; 1,88 e 3,17 µg/ml de AFB2, respectivamente. A uma concentração de 10 µg/ml de biflavonoide, os resultados obtidos foram 22,58; 22,29; 18,41 e 27,56 µg/ml de AFB1 e 2,34; 0,75; 1,11 e 1,55 µg/ml de AFB2 para as substâncias **48**, **48a**, **32** e **45**, respectivamente (GONÇALEZ et al., 2001).

3.3.1.9. Atividade antioxidante

As atividades antioxidantes das biflavonas **32**, **35**, **37** e **40** de *O. multiflora* foram avaliadas utilizando o ensaio com DPPH. A biflavona **32** mostrou atividade moderada com valor de CI₅₀= 18,5 µg/ml, enquanto que **35**, **37** e **40** mostraram atividade sequestradora fraca, o que confirma a dependência da atividade antioxidante em relação ao número de grupos fenólicos livres presentes na estrutura da substância testada (CARBONEZI et al., 2007).

3.3.2. Aspectos etnofarmacológicos

Algumas espécies de *Ouratea* têm sido usadas na medicina popular do Brasil e de países africanos, incluindo Camarões, Nigéria, Congo e Gabão (BOUQUET, 1969). As folhas e caule são as partes mais usadas, principalmente, na forma de suco, infusões e extratos. No Brasil, as espécies de *Ouratea* são indicadas para paralisia, erisipela e feridas de útero (BARROSO, 1986). Folhas de *O. spectabilis* são utilizadas como vermífugo e em problemas gástricos (BRAGA, 1960). Infusões da folha de *O. parviflora* são prescritas para o tratamento de doenças relacionadas com inflamação, tais como reumatismo, entorses e doenças artríticas (CARBONARI et al, 2006), e doenças de pele (CORRÊA, 1975;. PAULO et al, 1986 ; FELÍCIO et al, 1995). *O. castaneifolia* é conhecida na região amazônica do Brasil como "farinha-seca", "mangue-do-mato" ou "pau-de-serra" e sua casca é um tônico adstringente, rico em taninos (LE COINTE, 1934). O extrato de folhas de *O. sulcata*, usado puro ou em combinação com outras plantas, são utilizados para tratar infecções do trato respiratório superior, disenteria, diarreia e dor de dentes (BOUQUET, 1969; PEGNYEMB et al, 2005). Sucos de folhas ou flores de *O. reticulata* também são usados como um remédio para dor de dente. As hastes são usadas internamente contra disenteria e tosse (JP KOFANI, comunicação pessoal; MANGA et al, 2001). Extratos de folhas de *O. elongata*, *O. sulcata* e *O. flava* são

usados em casos de insuficiência reumática e gástrico (GANGOUÉ-PIÉBOJI et al 2006;. MBING et al, 2003a). Muitas dessas indicações populares ainda não apresentam comprovações científicas, nem mesmo algum ensaio biológico preliminar realizado com a planta medicinal referida.

3.3.3. Análise dos estudos biológicos realizados com as espécies de *Ouratea* e suas correlações com os usos encontrados na medicina popular

A avaliação dos trabalhos na literatura permitiu verificar a existência de diversos estudos farmacológicos, tanto com extratos, frações de extratos como com biflavonóides naturais e seus derivados isolados de espécies do gênero *Ouratea*. Na **Tabela 29 (pág. 178)** são apresentados os ensaios realizados com cada espécie.

Algumas espécies são usadas na medicina popular, principalmente, para o tratamento de doenças inflamatórias e infecciosas. Tem sido relatado na literatura o efeito atenuante de extratos de folhas de *O. parviflora* em danos causados por ERO (espécies reativas oxigenadas) (CARBONARI et al., 2006) e o potencial inibitório da lipoxigenase por extratos de folhas e caule de *O. semisserrata* (BRAGA et al., 2000). No entanto, estes dois trabalhos são os únicos estudos biológicos sobre o potencial anti-inflamatório realizado com espécies desse gênero, os quais se mostraram promissores. Esses resultados têm contribuído para confirmar os efeitos anti-inflamatórios de espécies de *Ouratea* na medicina popular. Por exemplo, o uso de extratos de folhas de *O. elongata*, *O. sulcata*, *O. flava* e *O. parviflora* para tratar reumatismo, entorse, artrite e dor de dente (CARBONARI et al., 2006; BOUQUET, 1969; PEGNYEMB et al., 2005; GANGOUÉ-PIÉBOJI et al. 2006; MBING et al., 2003a). Mesmo com indicações da medicina popular do uso de várias espécies de *Ouratea* no tratamento de doenças inflamatórias, não houve avanços nos estudos de investigação farmacológica nesta área.

O uso de plantas desse gênero no tratamento de infecções de trato respiratório, disenteria, diarreia, erisipela e ferida de útero pode ser justificado pelo efeito antimicrobiano e antiviral exercidos por extratos e seus constituintes isolados. As espécies *O. elongata* (GANGOUÉ-PIÉBOJI et al. 2006), *O. flava* (GANGOUÉ-PIÉBOJI et al. 2006), *O. reticulata* (BIKOBBO et al., 2009), *O. staudtii* (BIKOBBO et al., 2009), *O. sulcata* (PEGNYEMB et al., 2005; GANGOUÉ-PIÉBOJI et al. 2006), *O. turnarea* (MBING et al., 2009; ZINTCHEM et al., 2008) e *O. zenkeri* (MBING et al., 2009) exibiram significativo potencial antimicrobiano em ensaios com extratos e substâncias isoladas.

Embora alguns flavonoides e extratos de *Ouratea* tenham mostrados maior ação antimicrobiana contra as bactérias gram-positivas do que as bactérias gram-negativas (BIKOBBO et al. 2009), outros flavonoides, tais como as catequinas, também apresentam comportamento semelhante. Em trabalho realizado por IKIGAI e colaboradores (1993), foi observada a ação do galato de epigallocatequina sobre lipossomas (utilizados como modelo de membranas bacterianas) que induziu a fuga de moléculas pequenas a partir do espaço intralipossômico, o que sugere que o flavonoide promove dano no lipossoma. Com este experimento, os autores sugeriram que a baixa susceptibilidade de bactérias gram-negativas à galato de epigallocatequina pode ser atribuída, mesmo que parcialmente, à presença da bicamada de lipopolissacarídeos que age como barreira para ação dos flavonoides, enquanto que as bactérias gram-positivas, que possuem apenas uma camada, ficam suscetíveis (IKIGAI et al, 1993; CUSHNIE et al, 2005). Nenhum estudo do mecanismo de ação antibacteriana por biflavonoides de *Ouratea* foi publicado até o momento. No entanto, estas substâncias ainda têm um papel importante na medicina tradicional, uma vez que, flavonoides ou extratos contendo flavonoides, quando usado juntamente com os antibióticos convencionais contra estirpes bacterianas bastante resistentes, exercem um efeito sinérgico significativo (STEPANOVIC et al., 2003).

Notáveis atividades antiviral (contra o HSV, parainfluenza-3 e Poliomielite-1) e antifúngica (efeito inibidor sobre a biosíntese de aflatoxina nas *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*) foram exibidas por biflavonoides e extratos de espécies de *Ouratea* (ROMING et al., 1992; GONÇALEZ et al., 2001). Biflavonoides do gênero *Ouratea* são bons candidatos para a investigação sobre os mecanismos de ação antiviral; estudos adicionais são necessários uma vez que podem contribuir para o desenvolvimento de agentes antivirais.

Várias atividades relevantes foram encontrados para as espécies *Ouratea* que não estão relacionados com os usos tradicionais, como antitumoral (OLIVEIRA et al, 1972;. DANIEL et al., 2007), quimiopreventiva (FIDELIS et al, 2012), antimalária (ESTEVAM et al., 2005), hepatoprotetora (CARBONERI et al., 2006) e anti-hipertensiva por efeito vasorelaxante (VALADARES et al., 2003). Esta última destaca-se pelo potente efeito vasorelaxante exibidos pelos extratos de *O. semiserrata*, a qual não apresenta na literatura quaisquer usos tradicionais relacionados com o tratamento de doenças hipertensivas. Assim, seria necessário investigar melhor esta propriedade considerando a possibilidade do desenvolvimento de fitoterápicos anti-hipertensivos obtidos a partir de extratos *O. semiserrata*.

Outras atividades que requerem atenção são aqueles que envolvem a inibição de enzimas por flavonoides. Bons resultados foram encontrados para a inibição da aldose

redutase utilizando biflavonoides isolados de *O. spectabilis* (FELÍCIO et al., 1995). Biflavonas de *O. hexasperma* mostraram alta inibição de DNA-topoisomerase I e II (GRYNBERG et al., 2002). É possível, portanto, que os mecanismos de ação envolvidos nas atividades, antiviral e anticâncer, estejam relacionados com a inibição de enzimas vitais ao metabolismo celular. Os biflavonoides de *Ouratea* mostraram em ensaios *in vitro* (GRYNBERG et al. 2002; DANIEL et al., 2007) e *in vivo* (OLIVEIRA et al, 1972, GRYNBERG et al., 1994) elevado potencial bioativo que necessita ser melhor investigado.

3.3.4. Flavonoides como moduladores de enzimas

Segundo QUIDEAU e colaboradores (2011), novas evidências convincentes sugerem outros mecanismos pelos quais os polifenóis exercem suas atividades. Trata-se de um efeito modulador que altera a atividade de enzimas chaves, receptores celulares, fatores de transcrição, assim como a promoção de alguma perturbação a estrutura da enzima pela presença de um agregado. Essas ações podem regular funções biológicas relacionadas com, por exemplo, o crescimento e a proliferação celular, inflamação, apoptose, angiogênese, metástase e respostas imunes. Desta forma, estas substâncias podem exercer ações de proteção contra doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, assim como câncer e diabetes, valendo-se não apenas de suas propriedades redox.

Grande número de enzimas sofre efeito modulador (inibição ou ativação) exercido por polifenóis. Algumas enzimas são alvos terapêuticos relevantes, tais como COXs e LOXs, CYPs, cinases de transdução de sinal (geralmente são mais fortemente inibida por flavonoides simples, elagitaninos e ácido elágico que por galotaninos e taninos condensados), além de xantina oxidase, NADH-oxidase, tioredoxina redutase, adenosina deaminase, metaloproteinases de matriz, telomerase, polimerases de DNA, topoisomerasas, metil-transferases, ATPase/ATP sintase, ornitina descarboxilase e uroquinase, uma enzima envolvida na formação de metástases de tumores humanos (QUIDEAU et al., 2011).

3.3.4.1. Enzimas de biotransformação

As enzimas do metabolismo de xenobióticos são responsáveis pelo processo de desintoxicação do organismo. Este metabolismo, também chamado de metabolismo de biotransformação, está dividido em duas fases, fase I e II. Na fase I ocorre a ação das enzimas da família citocromo P450 (CYP450) e na fase II atuam enzimas como glutathione S-transferase (GST) (MOON et al., 2006).

Citocromo P450 (enzimas monooxigenases) são enzimas que catalisam uma variedade de reações químicas como *O*-desalquilação, *N*-desalquilação, e hidroxilação. Elas desempenham um papel importante no metabolismo de fase I, pois ajudam a excretar substâncias nocivas ao organismo e ativar substâncias endógenas (estradiol, testosterona e ácido araquidônico) para modificar produtos que são envolvidos na regulação fisiológica e processos celulares (homeostase, controle endócrino, proliferação celular e inflamação) (WANG et al., 2009). Muitos flavonoides apresentam efeito modulador das enzimas CYP450, podendo ativar ou inibir.

A enzima glutathione-S-transferase catalisa uma grande variedade de grupos eletrofílicos para grupos sulfidrilas de glutathione, que estão envolvidos na desintoxicação de radicais oxigenados e exerce a função de ligar e transportar uma ampla variedade de substâncias nocivas (HAYES et al., 1995).

Os agentes carcinogênicos são geralmente exógenos ou espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas metabolicamente ou outras substâncias reativas geradas naturalmente pelo organismo. Elevados níveis de ERO estão envolvidos na inativação e promoção de tumores. Os efeitos protetores contra câncer apresentados por flavonoides tem sido atribuídos a uma variedade de mecanismos, que incluem captura de radicais livres e efeito modulador sobre enzimas de modificação ou desintoxicação (AMES et al., 1995). Entre as enzimas, que são susceptíveis de desempenhar papéis importantes na carcinogênese, estão as citocromos P450 (CYP) e glutathione-S-transferases (GST), como as mais extensivamente estudadas.

3.3.4.2. Catepsinas

Catepsinas são enzimas que atuam na degradação de proteínas. As catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, W e X, são cisteíno proteases encontradas no lisossoma, fazem parte da maior e mais bem descrita classes de catepsinas. Proteases lisossomais, principalmente, catepsinas estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, assim como em várias doenças. As catepsinas atuam em processos inflamatórios, como periodontite, artrite, aterosclerose, pancreatite e gastrite, mas o foco principal é o papel funcional das catepsinas na progressão tumoral e metástase (KUESTER et al., 2008).

3.3.5. Relevância do Trabalho

A potente atividade dos biflavonoides obtidos de espécies do gênero *Ouratea* em ensaios antitumorais e de inibição de enzimas DNA-topoisomerasas (DANIEL et al., 2007; GRYNBER et al., 2002) motivaram a realização de novos estudos. Neste trabalho foram avaliadas as atividades das frações contendo biflavonoides frente às enzimas de biotransformação (CYP1A e GST) e proteases (catepsinas), considerando que os flavonoides são relatados como moduladores enzimáticos, e a atividade antiproliferativa em linhagem celulares neoplásicas, uma vez que estudo com frações contendo biflavonoides de *Ouratea* não foi aprofundado.

3.4. PARTE EXPERIMENTAL

3.4.1. Ensaio de avaliação do efeito modulatório de flavonoides sobre a atividade enzimática de CYP1A

- *Preparação da fração solúvel de fígado de rato*

As amostras teciduais foram disponibilizadas pelo prof. João Bosco de Salles cujo projeto de utilização de animais foi aprovado pela CEUA da Universidade Estadual da Zona Oeste (UEZO) referência 005. Os animais (ratos machos Wistar peso entre 130 e 150 g) foram mantidos em ambiente com luz e temperatura controlada e tiveram livre acesso a alimentação e água. Os ratos foram submetidos a eutanásia para preparação das frações citossólica e microsossomais. Os fígados foram removidos, colocados em tampão de fosfato 0,1 M gelado (pH 7,4) e, em seguida, homogeneizados. As frações foram preparadas por centrifugação diferencial (GREENLEE & POLAND, 1978) e o teor de proteína foi determinado por método de Peterson (1977).

- *Preparação das amostras*

As amostras (1 mg) foram solubilizadas em 1 ml de DMSO. Alíquotas de 20 e 40 µl foram usadas nos ensaios com enzimas CYP1A e GST.

- *Ensaio da atividade enzimática de CYP1A*

As enzimas 7-etoxi-resofurina-*O*-dealquilase (EROD), 7-metoxi-resorufina-*O*-dealquilase (MROD) e pentoxi-resorufina-*O*-deetilase (PROD) de microssomas de fígado de rato foram utilizadas como uma sonda para determinar a atividade CYP1A. Substrato (1 mM), NADPH (1 mM), cloreto de magnésio (10 mM) e microssomas de fígado de rato (5,5 ug) foram incubadas em tampão de fosfato (0,1 M), pH 7,8 (0,5 mL de volume final). As incubações foram a 37 ° C durante 5 min. A reação foi terminada com ácido tricloroacético (TCA) a 2,5%, seguido por centrifugação (1000 g, 10 min). Em seguida, foram adicionados 2 mL de tampão de glicina-NaOH e na sequencia foi determinada a fluorescência da resofurina (excitação: 530 nm e emissão 590 nm). Atividade CYP foi calculada como quantidade de resofurina produzido por minuto por mg de proteína. Ensaios que contêm fitoquímicos foram comparados com o controle com DMSO (dimetilsulfóxido).

- *Ensaios da atividade enzimática de GST*

A atividade da enzima glutationa *S*-transferase (GST) foi determinada conforme metodologia descrita por Habig *et al.* (1974). O ensaio foi conduzido em duplicata, com tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 6,0; 20 µL da fração solúvel de fígado de rato na presença de 100 µL de glutationa reduzida (GSH) 50 mM, sendo a reação inicializada pela adição de 20 µL de 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 100 mM (preparado em etanol). Ensaio da mistura, sem adição da enzima, foi usado para verificar a taxa de reações não-enzimáticas (branco químico). A correção nas medidas de absorbância da reação enzimática foi realizada pela subtração da absorbância na ausência da enzima. A taxa da reação, para cada concentração da enzima, foi monitorada no espectrofotômetro a 340 nm, realizando-se leituras de 30 em 30 segundos, durante três minutos. Os dados foram representados em gráfico de atividade (µmol/min) versus concentração (mg/mL). Controles positivos foram feitos da mesma forma que nos testes não havendo, no entanto, a adição dos extratos ou chás. Para o cálculo da atividade específica da GST foi utilizado o coeficiente de absorvidade molar 9,6 mM⁻¹.cm⁻¹.

3.4.2. Ensaio de avaliação do efeito modulatório de flavonoides sobre a atividade enzimática de catepsina K, L e V

Todos os reagentes disponíveis comercialmente foram adquiridos da Aldrich Chemical Co e Sigma. Os ensaios bioquímicos foram realizados em um fluorímetro Spectra MAX M3. As soluções estoque foram preparadas a uma concentração de 4,0 mg/mL para extrato e 125 e 50 μ M para substância pura, ambos dissolvidos em DMSO, e os inibidores foram testados contra a catepsina K, L e V a uma concentração inicial de 125 mM e posteriormente a 50 mM. As medições de inibição foram realizadas em triplicata, em placas de 96 poços negros e com volume final de 200 μ L.

A atividade enzimática foi determinada através da observação do aumento de fluorescência devido à hidrólise do substrato fluorogênico Z-FR-MCA. A medida da atividade enzimática foi monitorada através de um fluorímetro de placa, com uma fenda de excitação-emissão ajustada para λ 380 nm e 460 nm, respectivamente. Nas determinações, as placas são mantidas em compartimento termostetizado a 27 °C com as enzimas catepsinas (concentração na ordem de nano molar), previamente ativadas com ditioneitol (DTT) (2,5 mM) por 5 min. Em seguida adicionaram-se 5 μ L da solução a ser testada, incubando-se por 5 min e em seguida o substrato Z-FR-MCA (1,0 μ M) fazendo-se a leitura em tempo real. DMSO foi utilizado como controle negativo e o inibidor irreversível E64 como controle positivo de inibição enzimática. A concentração final de DMSO nos ensaios foi 2,5 % (SEVERINO, 2008).

3.4.3. Ensaio de avaliação do efeito antiproliferativo de flavonoides frente a linhagem tumorais

As amostras-teste (0,1 g/mL) foram ressuspensas em dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente diluídas em meio de cultura (concentração final DMSO 0,4 %).

Para a avaliação da atividade antiproliferativa foi utilizado o corante sulforrodamina B (SRB) e se baseia na afinidade deste composto pelas proteínas básicas presentes nas células íntegras, fixadas pelo ácido tricloroacético (SKEHAN *et al.*, 1990).

O teste foi realizado após o preparo da placa TO e da placa Teste com triplicata de suspensão celular de cada linhagem e triplicata de meio de cultura. As placas ficaram incubadas por 24h, sendo as amostras-teste adicionadas nas concentrações 0,25, 2,5, 25 e 250 μ g/mL e o controle positivo (doxorubicina: 0,025, 0,25, 2,5 e 25 μ g/mL) durante 48hs. Concomitante ao preparo das placas-teste adicionando as amostras é realizada a leitura da

placa TO. Após as 48h foram adicionados 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) 20% em cada cavidade e as placas permanecerão por 30 minutos a 4°C. A placa foi lavada em água corrente e seca para adição de 50µL de SRB (Sigma, USA) 0,1% diluída em ácido acético 1% por 30 minutos. Posteriormente, retirou-se o excesso de corante livre e adicionou-se à placa seca 100µL de tampão Trizma Base (10mM, pH 10,5) (Sigma, USA) para solubilizar o corante ligado às proteínas de membrana das células fixadas. Foram obtidos os valores de absorvância (540nm) das amostras-teste (T), controle negativo (CN), controle positivo, branco das amostras e da leitura do início da incubação (TO). A porcentagem de crescimento (%) de cada amostra-teste foi calculada em programa Excel (MONKS et al. ,1991) e a dose que inibe 50% do crescimento celular, GI, foi determinada em programa Origin Versão 6.0.

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1. Avaliação do efeito modulatório de flavonoides sobre a atividade de enzimas CYP1A e GST

Os fitoquímicos (frações e substâncias isoladas) obtidos de espécies do gênero *Ouratea* foram avaliados frente às enzimas de biotransformação de Fase I da família CYP1A (EROD, MROD e PROD) e Fase II (GST). Os ensaios com as enzimas de biotransformação foram realizados em colaboração com a profa. Dra. Cristiane M. C. de Salles e a Doutoranda Tais da Silva Rosa ambas do Departamento de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e prof. Dr. João B. de Salles do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Centro Universitário da Zona Oeste (UEZO).

A enzima EROD apresentou alta inibição de sua atividade na presença de amentoflavona e OFFM-PD-52-58 e total inibição na presença de OSFM-PD-21-24. Moderadas atividades da enzima EROD foram observadas na presença de OSFC-B e OSFC-82-96. A fração OSFM-PD e a amentoflavona inibiram moderadamente a enzima MROD, enquanto que as frações OFFM-PD-52-58, OSFC-B e OSFC-82-96 inibiram fracamente. A enzima PROD foi ativada na presença de todos os fitoquímicos avaliados na concentração de 20 µL, com exceção da amentoflavona que não influenciou a atividade da enzima. Na concentração de 40 µL, Amentoflavona e OFFM-PD-52-58 inibiram fracamente a enzima PROD, enquanto que as frações OSFC-B e OSFC-82-96 mantiveram a indução da atividade da PROD, mas em porcentagem reduzida. Os valores de atividade modulatória estão apresentados na **Tabela 30**, p. 197.

Tabela 30. Atividade modulatória de fitoquímicos frente às enzimas EROD, MROD e PROD.

Amostras	EROD (5,0 µl)		MROD (5,0 µl)		PROD (5,0 µl)		PROD (10,0 µl)	
	I (%)	A (%)	I (%)	A (%)	I (%)	A (%)	I (%)	A (%)
Amentoflavona	98,37	-	54,15	-	-	0,0	46,70	-
OFFM-PD-52-58	91,63	-	22,52	-	-	13,66	26,11	-
OSFC-B	66,12	-	15,15	-	-	78,18	-	64,47
OSFC-82-96	60,63	-	6,46	-	-	105,30	-	87,21
OSFM-PD-21-24	100,00	-	52,81	-	-	-	-	44,00

I(%) – percentagem de inibição da atividade, A(%) – percentagem de ativação da atividade

As frações OHFM-PD-49-53, OFFM-PD-52-58 e OSFM-PD-21-24 foram avaliadas frente a enzima de biotransformação de fase II, glutatona *S*-transferase (GST). As frações apresentaram inibição moderada na concentração de 5,0 µl (**Tabela 31**).

Tabela 31. Atividade modulatória de fitoquímicos frente a enzimas GST.

Amostras	GST (5,0 µl)
	I (%)
OHFM-PD-49-53	33,07
OFFM-PD-52-58	100,00
OSFM-PD-21-24	63,42

I(%) – percentagem de inibição da atividade

Na literatura é relatado o efeito modulatório de flavonoides frente a enzimas de biotransformação, sendo que alguns flavonoides são utilizados como substâncias de referência como a α -naftoflavona, devido a sua potente ação inibidora. A procura por agente moduladores das enzimas de biotransformação está estritamente ligada a sua função de metabolizar xenobióticos e promover a desintoxicação do organismo, função essa que é comprometida quando o xenobiótico sofre uma biotransformação que o deixa altamente reativo. A inibição das enzimas de Fase-I seria uma alternativa para impedir a formação desses metabolitos mais reativos. As enzimas de fase II são responsáveis pela rápida excreção dos metabolitos reativos de fase-I. No entanto, vários trabalhos tem mostrado a participação das enzimas de Fase-II, como GST, promovendo a resistências a medicamentos por alguns tipos de câncer (FIDELIS et al. 2012). Desta forma, a atividade inibitória apresentada pelos biflavonoides de espécies de *Ouratea* frente às enzimas de biotransformação pode ser associada a um efeito quimioprotetor e anticâncer.

3.5.2. Avaliação do efeito modulatório de flavonoides sobre a atividade de enzimas catepsinas K, V e L

Os ensaios com as enzimas catepsinas K, L e V utilizando fitoquímicos obtidos de espécies de *Ouratea* foram realizados em parceria com o grupo de pesquisa em Produtos Naturais coordenado pelo Prof. Paulo Cezar Vieira, Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. Os fitoquímicos foram avaliados nas concentrações de 125 e 50 mM. Os valores de inibição foram considerados potentes mesmo na concentração de 50 mM. A enzima catepsina V foi a mais sensível aos biflavonoides apresentando elevada inibição mesmo com diminuição da concentração, como mostrado na **Tabela 32**. Comportamento oposto foi observado nos ensaios com a catepsina K, que exibiram moderada redução na inibição com a diminuição da concentração.

Tabela 32. Atividade inibitória (%) de Catepsinas K, L e V na presença de fitoquímicos

Amostras	Cat. K 125 mM	Cat. K 50 mM	Cat. V 125 mM	Cat. V 50 mM	Cat. L 125 mM	Cat. L 50 mM
Amentoflavona	60,23	84,29	98,12	97,25	89,10	79,99
OHFM-PD-49-53	94,94	73,65	99,06	97,97	93,26	85,45
OSFM-PD-21-24	89,78	68,33	98,83	96,95	89,63	80,56
OFFM-PD-52-58	86,39	54,04	97,87	95,62	86,49	72,18

Algumas catepsinas, como K, L, B e S, foram associadas a doenças ósseas, por serem as responsáveis pela degradação de moléculas de colágeno e gelatina. A catepsina K também é reconhecida como uma enzima-chave na degradação de componentes orgânicos da matriz óssea, estando envolvida em doenças como artrose, artrite e osteoporose (SILVA, 2011).

A potente atividade inibitória apresentada pelos biflavonoides de espécies de *Ouratea* frente às enzimas catepsinas evidencia a descoberta de promissores agentes contra doenças reumáticas e artríticas. A medicina popular relata o uso de *O. elongata*, *O. flava*, *O. sulcata* contra doenças reumática (GANGOUE-PIÉBOJI et al 2006;. MBING et al, 2003a) e *O. parviflora* contra artrite (CARBONEZI et al., 2006), no entanto não foram encontrados estudos biológicos ou farmacológicos avaliando o potencial dessas plantas frente a essas doenças.

3.5.3. Avaliação do efeito antiproliferativo de flavonoides frente à linhagem tumorais

Os ensaios de avaliação antiproliferativa foram realizados em colaboração com as professoras Dra. Renata Trentin Perdomo e Maria de Fátima Cepa Matos do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

As frações contendo biflavonoides foram avaliadas em ensaios antiproliferativos frente às seguintes linhagens tumorais e uma linhagem não tumoral.

- **MCF-7** – linhagem de câncer de mama humano
- **PC** – linhagem de câncer de próstata humano
- **HT**- linhagem de câncer de cólon humano
- **786** – linhagem de câncer de rim humano
- **NIH/3T3** – célula não neoplásica - fibroblasto murino

Tabela 33. Atividade antiproliferativa de fitoquímicos frente a linhagens tumorais.

Amostras	MCF7	PC	HT	786	NIH/3T3
GI ₅₀	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)
OFFM-PD 52-58	3,29	3,81	31,25	25,39	23,89
OHFM-PD 49-53	3,56	2,91	5,52	8,11	19,81
OSFM-PD 21-24	26,01	8,36	42,02	21,83	29,53
Amentoflavona	2,98	4,35	15,37	17,51	19,84
CP	0,02	0,23	0,25	0,15	0,26

CP, controle positivo (doxorubicina)

A atividade antiproliferativa de cada amostra-teste foi obtida a partir do teste de citotoxicidade. O potencial proliferativo de cada amostra é avaliado pelos valores de GI₅₀ (Concentração para inibir 50% do crescimento celular), como mostrado na **Tabela 33, p. 199**.

A amentoflavona, um constituinte presente em todas as frações avaliadas, também foi testada e permitiu comparar o seu efeito citotóxico com os exibidos pelas frações. Algumas frações apresentaram um GI₅₀ menor que o encontrado para a amentoflavona evidenciando a ocorrência de um possível efeito sinérgico exercido pelos biflavonoides presentes nas frações, outros estudos com os constituintes isolados serão necessários para confirmar a ação sinérgica. Nos ensaios com células de câncer de próstata humano (PC) as frações OFFM-PD 52-58 (GI₅₀ = 3,81 µg/ml) e OHFM-PD 49-53 (GI₅₀ = 2,91 µg/ml) exibiram um efeito citotóxico frente as células neoplásicas mais potente que o apresentado pela amentoflavona (GI₅₀ = 4,35 µg/ml). A fração OHFM-PD 49-53 também foi mais ativa contra a proliferação celular nos ensaios com linhagens de câncer de cólon humano (HT, GI₅₀ = 5,52 µg/ml) e de rim humano (786, GI₅₀ = 8,11

µg/ml) quando comparadas a atividade da amentoflavona (HT, GI₅₀ = 15,37 mg/ml; 786, GI₅₀ = 17,51 mg/ml).

O índice de seletividade (IS) foi utilizado para indicar a seletividade de um composto entre uma linhagem neoplásica e uma normal, indicando o potencial uso deste composto em testes clínicos (**Tabela 34**). Assim, neste estudo, o IS corresponde a divisão entre o valor da GI₅₀ de cada composto-teste na linhagem de células normais NIH/3T3 e o valor da GI₅₀ de cada composto na linhagem de células neoplásicas. (IS = GI₅₀ NIH3T3 / GI₅₀ células neoplásicas). Foi considerado significativo um valor de IS maior ou igual a 2,0 (SUFFNESS & PEZZUTO, 1991, BÉZIVIN et al., 2004), ou seja, este valor significa que o composto é duas vezes mais ativo na linhagem de células neoplásicas do que em células normais (NIH/3T3).

Tabela 34. Avaliação do índice de seletividade da atividade antiproliferativa de fitoquímicos frente a linhagens tumorais.

Amostras	Índice de Seletividade (IS)			
	MCF7	PC	HT	786
OFFM-PD 52-58	7,26	6,27	0,76	0,94
OHFM-PD 49-53	5,56	6,81	3,59	2,44
OSFM-PD 21-24	1,13	3,53	0,70	1,35
Amentoflavona	6,66	4,56	1,29	1,13
CP	13,00	1,13	1,04	1,73

CP, controle positivo (doxorrubicina)

Todos os fitoquímicos apresentaram elevada seletividade frente a alguma das linhagens testadas. As linhagens de câncer de mama humano (MCF-7) e de câncer de próstata humano (PC) foram as mais sensíveis a atividade antiproliferativa dos biflavonoides.

3.6. CONSIDERAÇÕES

Os resultados obtidos até o momento revelaram um elevado potencial biativo dos biflavonoides de espécies de *Ouratea* avaliados em mistura ou puros frente a diferentes alvos enzimáticos e linhagens cancerígenas.

Os ensaios de inibição das enzimas de biotransformação e anticâncer corroboram com a proposta de promissores agentes quimioprotetores e anticâncer.

Bons resultados foram obtidos com as frações biflavonoídicas frente todas as linhagens cancerígenas testadas, mas as linhagens de câncer de mama e de próstata foram as mais sensíveis frente as frações testadas.

A potente inibição observada pelas frações biflavonoídicas nos ensaios com as enzimas catepsinas permitiu correlacionar a ação inibidora das catepsinas com as indicações populares de espécies de *Ouratea* no tratamento de doenças reumática e artrítica.

As atividades relatadas nesse trabalho revelam a necessidade de aprofundar os estudos com frações e biflavonoides isolados de *Ouratea*. Os resultados mais promissores poderão contribuir para a obtenção de novos agente terapêuticos.

3.7. REFERÊNCIAS

- AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 90, p. 7915–7922, 1993.
- ARAÚJO, M. F.; SANTOS, C. B.; CAVALCANTI, J. F.; PEREIRA, F. S.; MENDES, G. S.; WERLE, A. A.; ROMANOS, M. T. V.; CARVALHO, M. G. Proposed active compounds from *Ouratea parviflora*. **J Med Plants Res**, v. 5, p. 2489-2493, 2011.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Minas Gerais: UFV. 1986.
- BIKOBO, D. S. N., ATCHADE, A. T.; TIH, R. G.; PIEBOJI, J. G.; BLOND, A.; PEGNYEMB, D. E.; BODO, B. Antimicrobial activities of some *Ouratea* species (Ochnaceae) and biflavonoids from *Ouratea elongate*. **Asian Chem Lett**, v. 13, p. 59-66, 2009.
- BOUQUET, A. **Féticheurs et Médecines Traditionnelles du Congo Brazzaville**. Paris: ORSTOM. 1969.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Fortaleza: Imprensa Oficial. 1960.
- BRANDÃO, G. C.; KROON, E. G.; SANTOS, J. R.; STEHMANN, J. R.; LOMBARDI, J. A.; OLIVEIRA, A. B. Antiviral activity of plants occurring in the State of Minas Gerais (Brazil): Part III. **J Chem Pharm Res**, v. 3, p. 223-236, 2011.
- CARBONARI, K. A., FERREIRA, E. A., REBELLO, J. M., FELIPE, K. B., ROSSI, M. H., FELICIO, J. D., FILHO, D. W., YUNES, R. A., PEDROSA, R. C. Free-radical scavenging by *Ouratea parviflora* in experimentally-induced liver injuries. **Redox Report**, v. 11, p. 124-130, 2006.
- CARBONEZI, C. A.; HAMERSKI, L.; GUNATILAKA, A. A. L.; CAVALHEIRO, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C. M.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. S. Bioactive flavone dimers from *Ouratea multiflora* (Ochnaceae). **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, p. 319-324, 2007.
- CORREA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: J. Di Giorgio. 1975.
- CUENDET, M.; PEZZUTO, J. M. The role of cyclooxygenase and lipoxygenase in cancer chemoprevention. **Drug metabolism and drug prevention**. v. 17, p. 109- 159, 2000.
- DANIEL, J. F. S.; ALVES, C. C. F.; GRIVICICH, I.; ROCHA, A. B.; CARVALHO, M. G. Anti-tumour activity of biflavonoids from *Ouratea* and *Luxemburgia* on human cancer cell lines. **Indian J. Pharmacol**. v. 39, p. 184-186, 2007.
- ESTEVAM, C. S.; OLIVEIRA, F. M.; CONSERVA, L. M.; LIMA, L. F. C. O.; BARROS, E. C. P.; BARROS, A. C. P.; ROCHA, E. M. M.; ANDRADE, E. H. A. Constituintes químicos e avaliação preliminar *in-vivo* da atividade antimalárica de *Ouratea nítida* Aubl (Ochnaceae). **Rev. Bras. Farmacogn**. v. 15, p. 195-198, 2006.

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

FIDELIS, Q. C.; CASTRO, R. N.; GUILHON, G. M. S. P.; RODRIGUES, S. T.; SALLES, C. M. C.; SALLES, J. B.; CARVALHO, M. G. Flavonoids and other compounds from *Ouratea ferruginea* (Ochnaceae) as anticancer and chemopreventive agents. **Molecules**, v. 17, p. 7989-8000, 2012.

GANGOUE-PIEBOJI, J.; PEGNYEMB, D. E.; NIYITEGEKA, D.; NSANGOU, A.; EZE, N.; MINYEM, C.; MBING, J. N.; NGASSAM, P.; TIH, R. G.; SODENGAM, B.L.; BODO, B. The *in-vitro* antimicrobial activities of some medicinal plants from Cameroon. **Ann. Trop Med Parasitol**, v. 100, p. 237-243, 2006.

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

GREENLEE, W. F.; POLAND, A. An improved assay of 7-ethoxycoumarin *O*-deethylase activity: Induction of hepatic enzyme activity in C57BL/6J and DBA/2J mice by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 205, p. 596–605, 1978.

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

GRYNBERG, N.F., MARTORELLI, R.A., CARVALHO, M.G., BRAZ FILHO, R., MOREIRA, I.C., SANTOS, A.C.S., ECHEVARRIA, A. *Inhibition of murine tumour growth by natural biflavone and mesoionic compounds*. In Rao RS (ed) Proceedings of the International Cancer Congress. 1994. New Delhi, India. Anais... New Delhi, 1994. p. 63-66.

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

HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The glutathione *S*-transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 30, p. 521–600, 1995.

HABIG, W. H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione *S*-Transferases: The first enzymatic in mercapturic acid formation. **J Biol Chem**, v. 249, p. 7130–7139, 1974.

KUESTER, D.; LIPPERT, H.; ROESSNER, A.; KRUEGER, S. The cathepsin family and their role in colorectal cancer. **Pathology –Research and Practice**, v. 204, p. 491-500, 2008.

LE COINTE, P. **Árvores e plantas úteis (indígenas e aclimatadas)**. Serie: A, Amazônia Brasileira, Belém: Livraria Clássica. 1934.

MANGA, S. S. E.; MESSANGA, B. B.; SONDENGAM, B. L. 7,8-dihydrobenzofuranones from *Ouratea reticulata*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 706-708, 2001.

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

MBING, J. N.; NDONGO, J. T.; ENGUEHARD-GUEIFFIER, C.; ATCHADE, A. T.; PIEBOJI, J. G.; TIH, R. G.; POTHIER, J.; PEGNYEMB, D. E.; GUEIFFIER, A. Flavonoids from the leaves of *Ouratea zenkeri* and *Ouratea turnerae*. **Asian Chem Lett**, v. 13, p. 81-88, 2009.

MOON, J. Y.; WANG, X.; MORRIS, M. E. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicol In Vitro**, v. 20, p. 187-210, 2006.

NASCIMENTO, L. A. S. do; GUILHON, G. M. S. P.; ARRUDA, M. S. P.; SANTOS, L. S.; ARRUDA, A. C.; MÜLLER, A. H.; SILVA, M. N. da; RODRIGUES, S. T.; CARVALHO, M. G. de. Biflavones and triterpenoids isolated from *Ouratea castaneifolia* (DC.) Engl., Ochnaceae. **Rev Bras Farmacogn**, v. 19, n. 4, p. 823-827, 2009.

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

PAULO, M. Q.; LIMA, E.; MAIA, R. F.; XAVIER, L. F. Antimicrobial activity of the oil of the fruit of *Ouratea parviflora* Baill (Ocnaceae), **CCS**, v. 8, p. 19-21, 1986. Resumo do Chemical Abstract, v. 108:91748u, 1986.

PEGNYEMB, D. E.; MBING, J. N.; ATCHADE, A. T.; TIH, R. G.; SONDEGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B.. Antimicrobial biflavonoids from the aerial parts of *Ouratea sulcata*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1922-1926, 2005.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of lowry *et al.* which is more generally applicable. **Anal Biochem**, v. 83, p. 346–356, 1977.

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSEGU, L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angew Chem Int Ed**, v. 50, p. 586-621, 2011.

ROMING, T. L.; WEBER, N. D.; MURRAY, B. K.; NORTH, J. A.; WOOD, S. G.; HUGHES, B. G.; CATES, R. G. Antiviral activity of Panamanian plant extracts. **Phytother Res**, v. 6, p. 38-43, 1992.

SEVERINO, R. P. **Busca de produtos naturais como Inibidores específicos de enzimas**. 2008, 244 p. Tese (Doutorado em Química) – UFSCAR, São Carlos, 2008.

SILVA, J. A. **Busca de inibidores da catepsina K em plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças osteoarticulares**. 2011, 157 p. Tese (Doutorado Química) – UFSCAR, São Carlos, 2011.

SIMONI, I. C.; FELICIO, J. D.; GONCALEZ, E.; ROSSI, M. H. Avaliação da citotoxicidade de biflavonoides isolados de *Ouratea spectabilis* (Ochnaceae) em células de córnea de coelho sirc. **Arq Inst Biol**, v. 69, p. 95-97, 2002.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. **Oncogene**, v. 22, p. 7369-7375, 2003.

VALADARES, Y. M.; OLIVEIRA, A. B.; CORTES, S. F.; LOMBARDI, J. A.; BRAGA, F. C. Atividade vasodilatadora *in vitro* de espécies de *Ouratea* (Ochnaceae) e de frações de *Ouratea semisserrata* (Mart.) Engl. **Braz J Pharm Sci**, v. 39, p. 83-91, 2003.

WANG, J. F.; ZHANG, C. C.; CHOU, K. C.; WEI, D. Q. Structure of cytochrome P-450s and personalized drug. **Curr Med Chem**, v. 16, p. 232-244, 2009.

ZINTCHEM, A. A.; BIKOBO, D. N.; ATCHADE, A. T.; MBING, J. N.; GANGOUE-PIEBOJI, J.; TIH, R. G.; BLOND, A.; PEGNYEMB, D. E.; BODO, B. Nitrile glucosides and serotobenine from *Campylospermum glaucum* and *Ouratea turnarea*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2209-2213, 2008.

4. EXTRAÇÃO COM CO₂ SUPERCRÍTICO DO ÓLEO DE FOLHAS DE *Ouratea hexasperma*: análise de biflavonoides

4.1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a extração com fluido supercrítico (EFS) tem sido muito estudada como uma técnica alternativa viável, podendo ser empregada em diferentes aplicações. Extração, síntese e destilação fracionada são apenas alguns exemplos da versatilidade da técnica. A demanda por produtos de alto valor agregado obtidos de matéria-prima vegetal tem aumentado o interesse por novos processos de extração, principalmente devido às exigências das indústrias alimentícia e farmacêutica quanto a produtos livres de resíduos de solvente e impurezas de processo. A tecnologia de extração supercrítica tem se mostrado eficiente na obtenção de vários produtos de origem natural como óleos essenciais, lipídios, carotenoides, ácidos cinâmicos, esteroides, terpenoides, alcaloides e flavonoides (REVERCHON & DE MARCO, 2006; MODEY et al., 1996).

As técnicas convencionais para obter extratos de plantas, como a extração com solvente orgânico, geralmente requerem várias horas ou mesmo dias, fazendo com que o processo de extração gaste um grande volume de solvente. A extração com fluido supercrítico tem atraído atenção porque a técnica pode reduzir consideravelmente o tempo de processo e pode proporcionar a recuperação do analito a partir de amostras sólidas ou semi-sólidas, com seletividade igual ou melhor que a obtida nas técnicas de extração clássica (WANG et al., 2008).

A técnica de extração com fluido supercrítico utilizando CO₂ como solvente é bastante utilizada na obtenção de óleo essencial e de outros constituintes apolares. Recentemente, tem ocorrido um aumento crescente do uso de EFS na obtenção de substância polares, principalmente com propriedades bioativas (CHIU et al., 2002; YILMAZ et al., 2011). A estratégia usada para contornar a baixa solubilidade de substâncias polares em CO₂ supercrítico é a adição de uma pequena quantidade de um co-solvente líquido (modificador), que promove o aumento da solvência do fluido e conseqüentemente o aumento da solubilidade dos constituintes de interesse. O etanol é o mais usado como co-solvente na extração com fluido supercrítico por causa de sua menor toxicidade (LISA et al., 2010).

Um crescente número de trabalhos tem sido publicado relatando o êxito na obtenção de flavonoides por extração com fluido supercrítico (SHAN et al., 2011; BISCAIA et al., 2009; KONG et al., 2009). O gênero *Ouratea* é relatado como um bioprodutor de biflavonoides, como as biflavonas amentoflavona e agatisflavona que são consideradas marcadores quimiotaxonômicos do gênero. Dessa forma, a espécie *Ouratea hexasperma* foi escolhida para estudo com extração com fluido supercrítico utilizando um planejamento de

experimentos e aplicação de metodologia de superfície de resposta para obtenção de óleo contendo biflavonoides como amentoflavona e agatisflavona. Em pesquisa bibliográfica realizada até o momento (*Chemical abstract, Biological chemistry*, resumos de eventos, etc.) não foram encontrados estudos da extração do óleo e de biflavonoides usando CO₂ supercrítico, de espécies do gênero *Ouratea*.

4.2. OBJETIVOS

4.2.1. Objetivo Geral

- Estudar a viabilidade técnica do dióxido de carbono, como solvente em estado supercrítico, na extração do óleo contendo biflavonoides de folhas de *Ouratea hexasperma*

4.2.2. Objetivos Específicos

- Determinar as variáveis do processo e as condições experimentais a serem utilizadas no delineamento experimental, com base em dados da literatura e ensaios prévios;
- Executar os experimentos contidos no delineamento experimental e
- Realizar análise qualitativa e quantitativa dos biflavonoides presentes nos óleos por CLAE.

4.3. REVISÃO DA LITERATURA

4.3.1. Extração com fluido supercrítico

O uso de extração com fluido supercrítico (EFS) para a extração de polifenóis bioativos e otimização das condições experimentais estão focados na avaliação do efeito das variáveis que controlam todo o processo. Os principais objetivos consistem em oferecer rendimentos máximos, preservando a alta qualidade e propriedades biológicas, tornando o produto final adequado para o uso em alimentos, cosméticos ou indústrias farmacêuticas (SPIGNO et al., 2007; JUNIOR et al., 2010).

Na extração supercrítica, o solvente extrator utilizado é um solvente que se encontra no estado de pressão e temperatura crítica ou acima, ou seja, um fluido supercrítico. O solvente mais utilizado é o dióxido de carbono (CO_2), já que não necessita de elevada pressão e temperatura, 73 atm e 31°C (**Figura 145**), para chegar à fase supercrítica e seu uso é seguro por não ser inflamável, nem tóxico, ser volátil, favorecendo sua separação do produto em questão e ser altamente disponível, com baixo custo. O CO_2 supercrítico também é considerado um solvente alternativo e sua utilização é reconhecida pelos conceitos de Química Verde e Ambiental (PRADO, 2003).

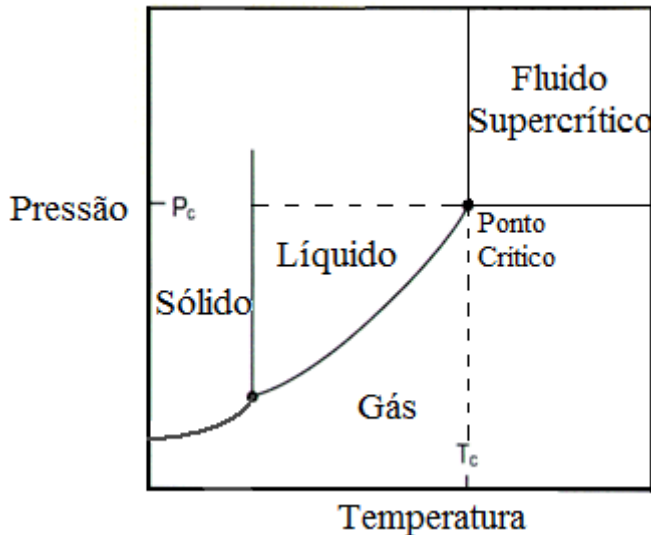


Figura 148. Diagrama de fases mostrando a região do fluido supercrítico para uma substância pura.

A principal característica da extração com fluido supercrítico baseia-se na seletividade da extração. O poder de solvência do fluido supercrítico pode ser manipulado por alteração da pressão e/ou temperatura para alcançar uma elevada seletividade. Se corretamente planejada, a extração com fluidos supercríticos permite o isolamento seletivo de classes de substâncias

da matriz vegetal, evitando a necessidade de etapas adicionais de purificação dos extratos (LANÇAS, 2002; LISA et al., 2010).

A densidade e a constante dielétrica e, portanto, o poder de solvência, do dióxido de carbono supercrítico depende de sua pressão e temperatura. Dentre as várias propriedades de uma substância alterada por este procedimento, destaca-se a mudança na constante dielétrica responsável pela mudança na polaridade do dióxido de carbono nas condições supercríticas (LANÇAS, 2002; HAMBURGER et al., 2004).

Um fluido supercrítico é caracterizado por apresentar algumas propriedades intermediárias entre um gás e um líquido, como densidade, viscosidade e difusividade, que favorecem a extração. A densidade do fluido é semelhante à de um líquido, conseqüentemente, apresenta alto poder de solvatação que promove a solubilização de constituintes da matriz. A interação entre as moléculas do fluido é maior que em um gás, devido à compressibilidade. Assim, o fluido apresenta uma viscosidade e difusividade semelhante à de um gás, capaz de promover uma eficiente permeação do fluido na matriz (ABBAS et al., 2008).

Algumas vantagens atribuídas a EFS estão relacionadas ao uso do CO₂ supercrítico como solvente. O CO₂ é um solvente ideal para a extração de produtos naturais, porque é atóxico, não inflamável e facilmente removido do extrato obtido por ser um gás em condições normais. Na EFS, o CO₂ alcança o estado supercrítico em condições de temperatura e pressão relativamente baixas, minimizando a degradação dos componentes termolábeis presentes na matriz vegetal, visto que temperaturas baixas podem ser aplicadas (LISA et al, 2010; CAVERO et al., 2006).

A desvantagem do dióxido de carbono supercrítico é que ele não é adequado a extração de substâncias polares, mas isto pode ser facilmente resolvido através da utilização de pequenas quantidades de co-solventes orgânicos (CAVERO et al., 2006). Vale ressaltar que o uso de co-solvente compromete o seu uso como solvente verde.

LANÇAS (2002) também aponta uma limitação do uso da EFS, particularmente no Brasil, a respeito do elevado custo dos equipamentos disponíveis comercialmente quando comparados a sistemas do tipo Soxhlet e extração líquido-líquido. Devido a isso, a EFS tem sido muito aplicada para a extração de compostos de alto valor agregado, em que pequenas quantidades se traduzem em elevado custo, compensando o alto investimento da técnica.

4.3.2. Variáveis que influenciam a extração de flavonoides por EFS

As variáveis, pressão, temperatura, tempo de extração e tamanho de partícula, são de grande influência no processo de extração de substâncias fenólicas. O termo substâncias fenólicas engloba várias classes de metabólitos, isso implica dizer que as condições experimentais adequadas para um fenólico simples ou metoxilado podem ser menos apropriadas para substâncias fenólicas de estrutura complexa contendo várias hidroxilas. Desta forma, a escolha das variáveis deve ser analisada com cautela.

A exemplo, observou-se a extração de flavonoides polimetoxilados somente com CO₂ supercrítico, como relatado em trabalho de SIQUEIRA *et al.* (2011), que realizou EFS de partes aéreas de *Solanum paludosum* CO₂ supercrítico sem e com uso de co-solvente. Três flavonoides foram identificados por CLAE no óleo obtido, a 3,7,8,3',4'-pentametoxigossipetina (**1**), 7-metoxikaempferol (**2**) e 3,7,3',4'-tetrametoxiquercetina (**3**) (**Figura 146**, p.211). O maior rendimento (26,85% em relação à massa da amostra) foi obtido com uso de etanol 5% (v/v) nas condições de 200 bar e 60 °C. O extrato (4,26%) obtido nas condições de 200 bar e 40 °C sem uso de co-solvente também apresentou os mesmo três flavonoides metoxilados. Os mesmos foram extraídos, em pequenas quantidades, sem a presença de co-solvente por serem constituintes aporales.

A extração de flavonoides polares é favorecida com o uso de co-solvente, como pode ser observado na obtenção de flavonoides bioativos incluindo naringenina (**7**), luteolina (**11**), (+)-catequina (**25**), (-)-epicatequina (**26**), rutina (**27**), miricetina (**28**) e apigenina (**29**), mostrados na **Figura 146**, p. 214, a partir de folhas da hortelã (*Mentha spicata* L.) utilizando extração supercrítica com dióxido de carbono (CO₂-SC) e extração soxhlet convencional (ESC). Os resultados mostraram que a extração soxhlet teve um maior rendimento de extrato bruto (257,67 mg/g; etanol 70%) em comparação com a extração CO₂-SC (60,57 mg/g; 60 °C, 200 bar, 60 min, co-solvente etanol vazão de 3 g/min). No entanto, no extrato obtido por CO₂-SC, na condição ótima, foi identificado sete flavonoides bioativos em alta concentração enquanto que apenas cinco flavonoides bioativos foram identificados no extrato obtido por soxhlet (BIMAKR *et al.*, 2011).

Como mencionado anteriormente, os efeitos da pressão e temperatura sobre o fluido alteram a densidade e portanto, seu poder de solvência. Entretanto, a alta densidade de um fluido não é a única a contribuir para a extração de um constituinte polar. O aumento da temperatura eleva a pressão de vapor das substâncias e isto favorece a transferência de massa (WANG *et al.*, 2008).

CAVERO e colaboradores (2006) avaliaram a eficiência da EFS na obtenção de dois tipos de óleos de folhas de orégano utilizando uma unidade de EFS contendo dois vasos separadores. Nas diferentes condições operacionais de pressão (350, 250, 150 bar), temperatura (40 e 60 °C) e co-solvente (4 e 7% de etanol) empregadas nas extrações foram observadas que o uso do co-solvente favoreceu a extração de ambos os óleos em diferente experimentos. O óleo retido no separador 1 apresentou os constituintes de maior densidade e o óleo obtido no separador 2 apresentou os constituintes de menor densidade. No experimento realizado a 150 bar, 60 °C e 7% de etanol foi obtido um óleo contendo predominantemente constituintes de maior densidade (separador 1 – 15,33% e separador 2 – 0,28%), já no experimento realizado a 150 bar, 40 °C e 7% de etanol o óleo extraído apresentou os constituintes de menor densidade (separador 1 – 2,67% e separador 2 – 7,02%). O aumento da temperatura favoreceu a extração de constituintes mais pesados por promover o aumento da pressão de vapor desses constituintes. A análise do óleo, contendo os constituintes de maior densidade, por CLAE e LC-EM identificou a presença de dihidroquercetina (4), eriodictiol (5), dihidrokaempferol (6), narigenina (7) e quercetina (8), flavonoides apresentados na **Figura 146**, p. 214.

CHANG e colaboradores (2007) utilizaram a extração com fluido supercrítico e aplicaram o delineamento experimental para otimizar a extração de baicalina (9, flavona glicosilada, **Figura 146**, p. 214) das raízes de *Scutellaria baicalensis* Georgi. Os parâmetros avaliados no processo foram tempo de extração dinâmica, temperatura, pressão e uso de co-solvente. O maior rendimento (82,90 mg/g) foi obtido com o uso de 1,2-propanodiol, como co-solvente, nas condições de 60 °C, 200 bar e 60 min, com alta recuperação de baicalina (8,16%). Rendimentos menores foram encontrados para os experimentos a 40 °C com 300 bar e 50 °C com 400 bar utilizando o mesmo co-solvente. O aumento da temperatura favoreceu a extração, por promover o aumento da pressão de vapor da baicalina e, conseqüentemente, promovendo a transferência de massa.

COSSUTA e colaboradores (2008) realizaram a extração de constituintes bioativos de frutos de chasteberry (*Vitex angus castus*), dentre eles, foi identificado o flavonoide casticina (10) e o mesmo foi quantificado por CLAE (**Figura 146**, p. 214). As condições operacionais avaliadas foram 100, 275 e 450 bar de pressão e 40, 50 e 60 °C de temperatura. A condição operacional que conduziu ao óleo com maior concentração de casticina foi a de 450 bar e 60 °C com o rendimento de 271 mg/100 g de polpa seca, sendo superior aos rendimentos obtidos por sohxlet (225 mg/100 g para etanol e 247 mg/100 g para hexano). Todos os experimentos, com exceção dos experimentos a 100 bar e o de 275 bar e 40 °C, apresentaram

rendimentos semelhantes aos obtidos por extração com soxhlet. A extração de casticina foi favorecida pelo aumento da pressão e da temperatura. Apesar do aumento da temperatura ocasionar a diminuição da densidade do fluido ocorre também o aumento da pressão de vapor do soluto.

Semelhante efeito da temperatura foi observado em trabalho realizado por HSU e colaboradores (2011) com a extração de óleo contendo luteolina (**11**) e zeaxantina (**12**) de flores de *Hemerocallis disticha* (**Figura 146**, p. 214). As condições experimentais usadas foram 300, 400, 500 e 600 bar de pressão e 50, 65, 80 e 95 °C de temperatura. O maior rendimento foi de 8,12%, em relação à massa seca de flor, obtido nas condições operacionais de 600 bar de pressão e 80 °C de temperatura e concentração de luteolina de 3,01 mg/g de óleo, já a maior concentração de zeaxantina foi de 2,50 mg/g de óleo obtida nas condições de 600 bar e 95 °C com rendimento de 7,86%.

Os estudos de EFS de substâncias polares geralmente utilizam co-solvente para alcançar melhores rendimentos com obtenção significativa dos constituintes de interesse. Eles são responsáveis pela mudança na polaridade do fluido e aumento do poder de solvatação. Há dois procedimentos para o estudo de co-solventes em EFS; no primeiro tem-se a necessidade de se usar duas bombas (uma para o bombeamento de CO₂ e a outra para o co-solvente), enquanto que no segundo, o co-solvente é misturado com a matéria-prima na célula de extração (ABBAS et al., 2008). Ambos os procedimentos mostraram ser eficientes na extração. A utilização de soluções hidroalcoólicas como co-solvente pode favorecer a extração de constituintes polares, assim como o aumento da razão CO₂/co-solvente.

HAMBURGER e colaboradores (2004) investigaram a extração de constituintes de plantas medicinais, *Calendula officinalis* L., *Crataegus* ssp. e *Matricaria recutita* L. Os experimentos foram conduzidos na temperatura operacional de 50 °C. As variáveis avaliadas foram pressão (300, 400, 500, 600 e 689 bar) e uso de CO₂ puro e junto com co-solvente (0,5; 5, 10 e 20% de etanol, v/v). As extrações realizadas com *Calendula officinalis* e *Crataegus* ssp forneceram oito flavonoides (**Figuras 146**, p. 214 e **147**, p. 215), isorhamnetin-3-*O*-(2'',6''-dirhamnosil)-glicosídeo (**13**), narcissina (**14**), isorhamnetin-3-*O*-(2''-rhamnosil)-glicosídeo (**15**), galato de epigallocatequina (**16**), galato de galocatequina (**17**), vitexin-2''-*O*-rhamnosídeo (**18**), hiperosídeo (**19**) e luteolina (**11**) e outros constituintes, miristoil-3-*O*-faradiol (**20**), palmitoil-3-*O*-faradiol (**21**) e espirocetal matricaria (**22**), em todas as condições operacionais avaliadas, enquanto que as extrações com *Matricaria recutita* forneceram flavonoides apenas com o uso de co-solvente. A condição operacional que conduziu ao maior rendimento de flavonoides para as três plantas foi a do experimento a 689 bar e CO₂ com 20%

etanol. As extrações realizadas sem co-solvente levaram a extração de óleo com pouca quantidade de flavonoides.

Em estudo realizado por SHAN e colaboradores (2011) foram avaliados os efeitos da pressão (25-35 MPa), temperatura (30-50 °C) e tempo de extração (40-60 min) na aplicação de EFS de frutos de *Momordica charantia* L. usando CO₂ supercrítico e co-solventes. Experimentos prévios avaliaram os efeitos de etanol puro e o uso de soluções hidroalcoólicas como co-solvente (H₂O:EtOH – 45:55, H₂O:EtOH – 30:70, H₂O:EtOH – 15:85 v/v) sobre o rendimento de flavonoide. A solução H₂O:EtOH – 15:85 apresentou o rendimento máximo de flavonoides em comparação as outras soluções e ao etanol puro. As condições que levaram a máxima extração de flavonoides (15,13 mg/g de óleo) foram 33,4 MPa, 46 °C, e 60 min. A quantificação de flavonoides foi realizada por método de nitrato de alumínio fornecendo a concentração de flavonoide total presente nos óleos. A extração de flavonoides foi mais eficiente com o uso de EFS quando comparada a técnica tradicional sohxlet (12,60 mg/g de óleo).

CHIU e colaboradores (2002) realizaram uma série de experimentos para avaliar a eficiência na extração de terpenos lactonas e flavonoides de folhas de *Ginkgo biloba*. As condições operacionais avaliadas foram: pressão de 24,2 e 31,2 MPa, temperatura de 333, 343, 353 e 393 K, 5 e 10 mL/min de vazão de CO₂, dióxido de carbono (CO₂), óxido nitroso (N₂O) e 1,1,1,2-tetrafluoroetano (R134a) como solvente supercrítico, tamanho de partícula maior e menor que 105 µm e quantidade de co-solvente (5, 10, 12 e 24% de etanol). Todos os experimentos conduziram a extração de terpeno lactonas, no entanto, flavonoides foram obtidos apenas em três experimentos. O primeiro experimento (5 mL/min de CO₂/10% de etanol, 31,2 MPa, 333 K, partícula < 105 µm) apresentou um rendimento de 18,5% em relação a extração com sohxlet e forneceu 837 µg de terpeno lactona /g de folha e 183 µg de flavonoides /g de folha. O segundo (5 mL/min de CO₂/12% de etanol, 31,2 MPa, 333 K, partícula < 105 µm) apresentou um rendimento de 24,2% e 735 µg de terpeno lactona /g de folha e 651 µg de flavonoide/g de folha. O terceiro experimento (5 mL/min de CO₂/24% de etanol, 31,2 MPa, 333 K, partícula < 105 µm) apresentou um rendimento de 40,7% e 985 µg de terpeno lactona /g de folha e 1342 µg de flavonoide/g de folha. As variáveis que favoreceram a extração de terpenos lactonas totais e flavonoides totais (os quais foram determinados por método quantitativo) foram o aumento do co-solvente, da pressão (31,2 MPa) e a diminuição da temperatura (333 K) e do tamanho de partícula (< 105 µm).

O tamanho da partícula ideal depende dos constituintes que se pretende extrair e do tipo de matriz vegetal utilizada. Em geral, uma diminuição no tamanho da partícula pode criar

uma maior área de superfície, que facilita a permeação do fluido na matriz sólida (aumento da difusividade) com beneficiamento da EFS. No entanto, se o tamanho da partícula for muito pequeno, pode levar a extrações não homogêneas, devido ao efeito de canalização de fluido, gerando caminhos preferenciais, no leito fixo, resultando em analitos reabsorvidos na superfície da matriz, o que dificulta a extração (LIU et al., 2011). Quando os constituintes de interesse são voláteis em temperaturas moderadas, maiores tamanhos de partículas favorecem a seletividade na extração (GUAN et al., 2007).

LEE e colaboradores (2010) avaliaram a extração de polimetoxiflavonas (**Figuras 147**, p. 215), nobiletina (**23**) e tangeretina (**24**), de sementes de *Citrus depress* com soluções hidroalcoólicas como co-solvente (EtOH, H₂O:EtOH – 05:95, H₂O:EtOH – 15:85, H₂O:EtOH – 10:90, H₂O:EtOH – 20:80), três condições de pressão (20, 30 e 40 MPa), temperatura (40, 60 e 80 °C) e razão CO₂/co-solvente (4,8; 9,1 e 13%) e vazão de CO₂ (1,5; 3,0 e 4,5 mL/min) para encontrar melhor condição para extrair esses flavonoides. O maior rendimento de nobiletina e tangeretina foi encontrado nas condições de 30 MPa, 80 °C; 3,0 mL/min de vazão de CO₂ e H₂O:EtOH (15:85) como co-solvente com razão de 9,1%. Dentre as variáveis estudadas, os efeitos exercidos pela temperatura, tamanho de partícula e vazão de CO₂ sobre o rendimento desses dois flavonoides polimetoxilados foram os mais significativos. O aumento do rendimento promovido pelo aumento da temperatura provoca a diminuição da densidade do fluido, no entanto, favorece o aumento da pressão de vapor dos flavonoides investigados. O aumento da vazão de CO₂ de 1,5 mL/min para 4,5 mL/min levou a um aumento do rendimento de nobiletina e tangeretina, enquanto que a diminuição do tamanho da partícula de 0,750 para 0,375 mm provocou o aumento do rendimento de flavonoides. A partícula com tamanho de 0,188 mm provocou a diminuição do rendimento por ocasionar reabsorção do soluto na superfície da matriz.

LIU e colaboradores (2011) investigaram a extração de flavonoide de flores de *Maydis stigma* usando CO₂ supercrítico e co-solvente. Nos experimentos realizados foram avaliados pressão (25, 35 e 45 MPa), temperatura (40, 50 e 60 °C), co-solvente (1, 2 e 3 mL/g). O tamanho de partícula (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,5 mm) e tempo de extração foram avaliados em ensaios prévios que mostraram um rendimento constante após 120 min para todos os tamanhos de partícula. O maior rendimento (3,97 mg de flavonoides totais/g de óleo) foi obtido com a partícula de 0,4 mm, 35 MPa, 50 °C, vazão de CO₂ de 20 L/h e etanol como co-solvente na proporção de 8:2 v/v com a água na quantidade de 2 mL/g. O rendimento de flavonoides aumentou com a diminuição do tamanho da partícula, no entanto tamanhos menores que 0,4 mm levaram a diminuição do rendimento por ocasionar reabsorção do soluto

na superfície da matriz. A avaliação da composição do co-solvente mostrou que o etanol na proporção de 8:2 v/v com a água levou ao maior rendimento de flavonoide em relação às outras soluções testadas H₂O:EtOH 10:90, H₂O:EtOH 30:70, H₂O:EtOH 40:60 e EtOH puro.

Outro fator determinante para maximizar a extração é o contato do solvente supercrítico com o material da amostra. Diversas variáveis podem influenciar o contato do solvente com material de amostra como vazão de CO₂, tempo e modo de extração (estático ou dinâmico). Determinar as melhores condições para as variáveis de contato solvente/soluto, além de aumentar a eficiência da extração, pode e deve contribuir para a redução do custo total do processo, o qual aumenta com o aumento do tempo de extração (MARÓSTICA JR *et al.*, 2010).

LISA e col. (2010) realizaram estudo de extração com CO₂ supercrítico e etanol (co-solvente) de flavonoides de folhas de *Strobilanthes crispus*. As condições estudadas foram pressão (100, 150 e 200 Bar), temperatura (40, 50 e 60 °C) e tempo (40, 60 e 80 min). Os experimentos foram realizados com razão de fluxo de CO₂/etanol (10:1) e vazão de 11 g/min. As condições que forneceram o rendimento ótimo (5,15% em relação a massa da amostra) foi de 200 bar, 50 °C e 60 min. A extração com tempo de 80 min não apresentou aumento no rendimento, revelando que em 60 min ocorre a máxima extração nas condições de pressão e temperatura ótima. Com tudo o aumento do tempo de extração de 40 min para 60 min promoveu o aumento no rendimento. O óleo obtido nas condições ótimas apresentou a maior concentração de flavonoides dentre os óleos obtidos em análise qualitativa e quantitativa por CLAE. Os flavonoides (+)-catequina (**25**; 4,83 mg/g), (-)-epicatequina (**26**; 4,55 mg/g), rutina (**27**; 8,47 mg/g), miricetina (**28**; 4,10 mg/g), luteolina (**11**, 12,52 mg/g), apigenina (**29**; 3,75 mg/g), narigenina (**7**; 3,63 mg/g) e kaempferol (**30**; 19,45 mg/g) foram quantificados por mg de flavonoide/g de óleo (**Figura 147**, p. 215).

SHAN e colaboradores (2011) observaram que o tempo de extração apresentou um efeito positivo no rendimento de extração de flavonoides de frutos de *Momordica charantia* L. A extração aumentou com o aumento do tempo de 40 para 60 minutos. O efeito da vazão de CO₂ também foi avaliado em experimentos com cinco diferentes vazões de CO₂ (10, 15, 20, 25 e 30 L/h) nas condições de 30 MPa de pressão, 40 °C de temperatura, 60 min de extração e com solução H₂O:EtOH – 15:85 (v/v) como co-solvente. Foi observado um aumento do rendimento de flavonoides com o aumento da vazão de CO₂ de 10 para 25 L/h. O aumento da vazão de CO₂ diminuiu a resistência a transferência de massa. O rendimento máximo obtido na extração de flavonoides totais foi de 15,13 mg/g de óleo.

A análise da influência da vazão de CO₂ sobre a extração de flavonoides é relatada no trabalho de KONG e colaboradores (2009). A EFS de folhas de *Cajanus cajan* (L.) Millsp utilizando CO₂ supercrítico e etanol como co-solvente forneceu um óleo contendo o ácido cajaninstilbeno (**31**, estilbeno) e a pinostrobinina (**32**, flavonoide), apresentados na **Figura 147**, p. 215. Os experimentos foram realizados nas condições operacionais de 22, 25, 30 e 40 MPa de pressão; 38, 45, 60, 65 e 72 °C de temperatura e 1,1; 1,5; 2,0; 2,5 e 2,8 h de tempo. Também foi avaliado a eficiência na extração usando como co-solvente as soluções hidroetanólica 70, 80 e 90% e vazão de CO₂ de 8, 10, 12 e 14 kg/h. A solução hidroetanólica 80% foi a mais eficiente na extração de cajaninstilbeno e pinostrobinina. O aumento da vazão de CO₂ de 8 kg/h para 12 kg/h favoreceu a extração dos constituintes de interesse e vazão de 14 kg/h apresentou o efeito semelhante ao da vazão de 12 kg/h. As condições ótimas para extração de cajaninstilbeno (12,17 mg/g de óleo) e pinostrobinina (3,22 mg/g de óleo) foram 30 MPa, 60 °C e 2 h em comparação com sohxlet (solução hidroetanólica 80%) 8,26 mg/g de cajaninstilbeno e 1,99 mg/g de pinostrobinina.

A vazão de CO₂ é um parâmetro relevante se o processo for controlado por resistência a transferência de massa externa ou equilíbrio, já que, a quantidade de solvente supercrítico que alimenta o vaso extrator determina a taxa de extração. A transferência de massa externa aumenta com o aumento da solubilidade dos analitos da matriz. A solubilidade, por sua vez, é um dado de equilíbrio que representa a máxima concentração de soluto na fase solvente e é obtida experimentalmente, uma vez que, depende da densidade do solvente e da pressão de vapor do soluto. Assim, para a obtenção da solubilidade em processos de extração em leito fixo a vazão de solvente deve ser tal que permita a saturação do solvente com o soluto de interesse (REVERCHON & DE MARCO, 2006).

A análise dos diversos parâmetros envolvidos na EFS pode ser realizada utilizando a metodologia de superfície de resposta (MSR). Esta metodologia consiste em um conjunto de técnicas estatísticas e matemáticas úteis para a melhoria e otimização de processos, e é usado para examinar a relação entre uma ou mais variáveis de resposta e um conjunto de variáveis experimentais quantitativas ou fatores (SHAN et al., 2011). Os estudos recentes com extração com fluido supercrítico que visam a otimização do processo recorrem ao uso de MSR.

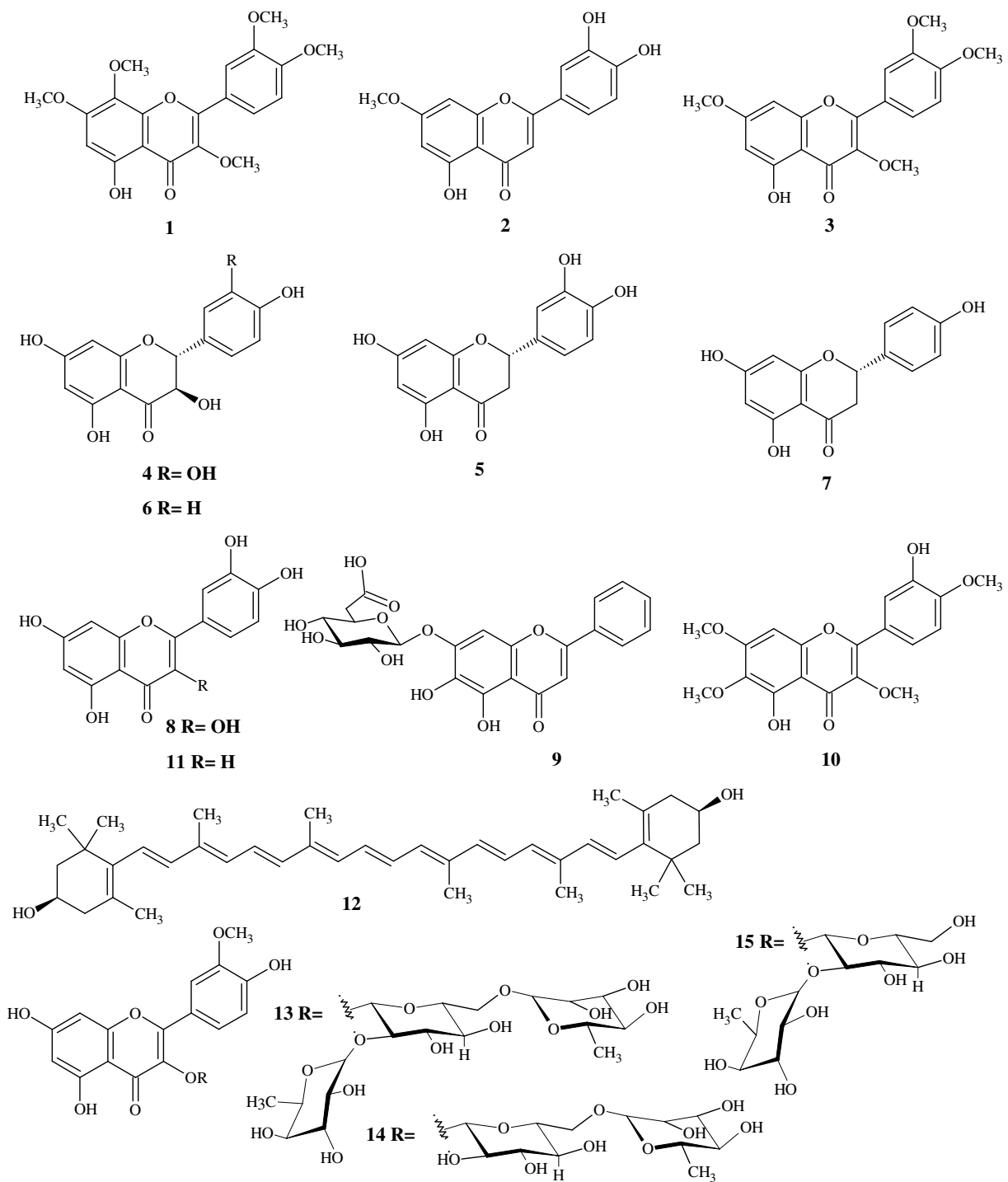


Figura 149. Estruturas das substâncias **1** à **15** extraídas com EFS.

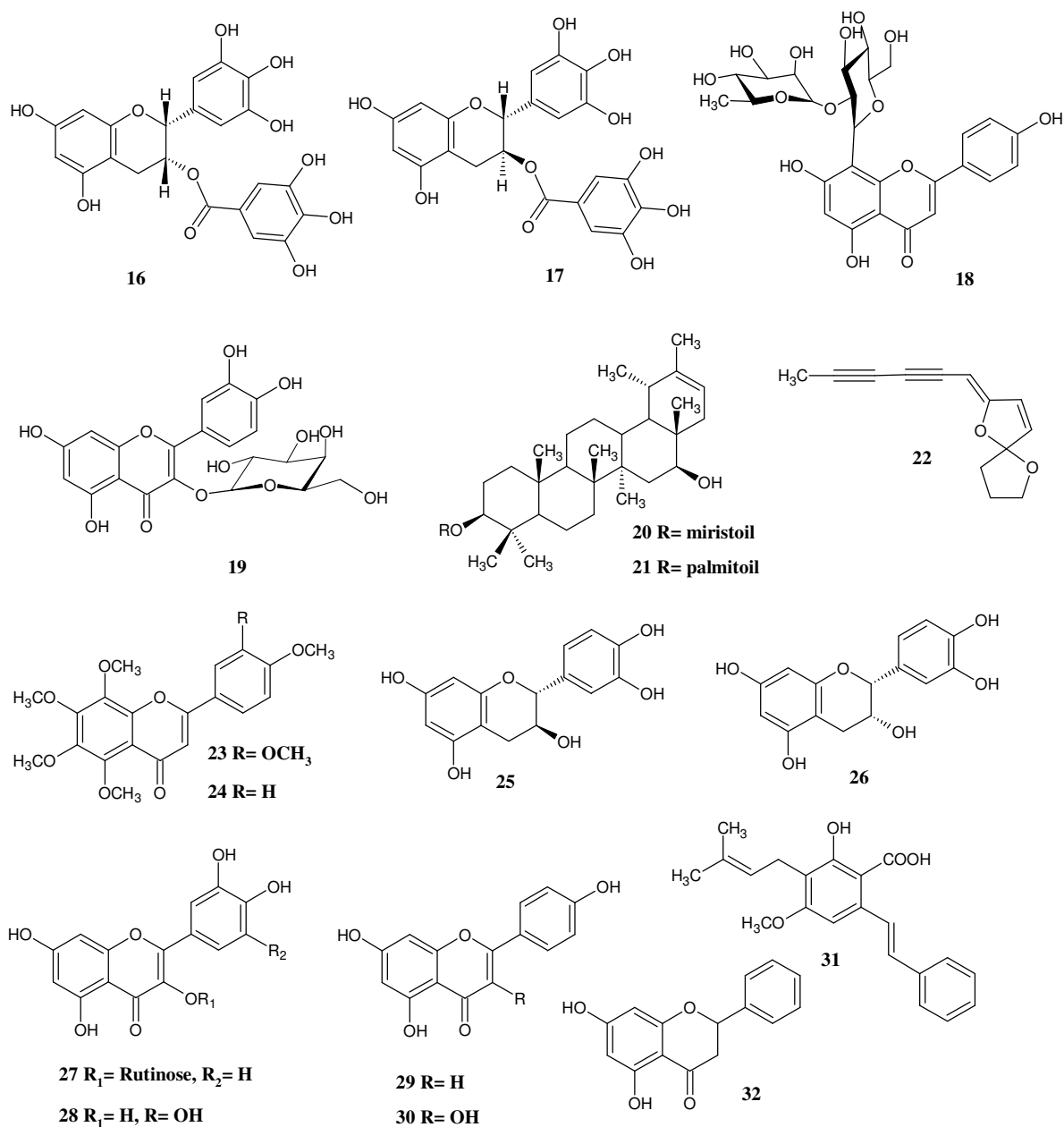


Figura 150. Estruturas das substâncias 16 à 32 extraídas com EFS.

4.3.3. Relevância do Trabalho

Devido à necessidade de aliar o estudo da Química de Produtos Naturais com os conceitos aplicados a Química Verde e Ambiental, buscou-se nesse trabalho avaliar a viabilidade de obter extratos contendo biflavonoides de espécies de *Ouratea* utilizando a técnica de extração com fluido supercrítico. Na literatura, extração com fluido supercrítico tem sido relatada como uma técnica alternativa para obtenção de substâncias bioativas, considerando a seletividade dos extratos ou óleos obtidos e o fato do CO₂ ser um solvente atóxico e de fácil remoção.

4.4. PARTE EXPERIMENTAL

4.4.1. Material Vegetal

Foram utilizadas folhas secas e trituradas de *Ouratea hexasperma*. As folhas moídas apresentavam tamanho de partícula não homogêneo. Desta forma, as mesmas foram peneiradas em peneira de 25 mesh, que retém partícula com tamanho maior que 0,707 mm. Neste processo foram escolhidas as partículas menores, uma vez que os constituintes de interesse não são voláteis.

4.4.2. Equipamentos e reagentes

A extração usando CO₂ supercrítico de frações contendo biflavonoides foi realizada na unidade experimental (**Figura 148**, p. 214) do Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis, Instituto de Tecnologia – UFRRJ, com a colaboração da Profa. Marisa Fernandes Mendes.

Foi utilizado CO₂ como solvente extrator (White Martins, 99,9% de mínima pureza, Rio de Janeiro, Brasil) e Etanol absoluto como co-solvente (Vetec Química Ltda, Rio de Janeiro, Brasil).

O aparato experimental apresentado na **Figura 148**, p. 217 é constituído por cilindro de CO₂ ligado a bomba de alta pressão (Palm modelo G100), específica para bombeamento de CO₂, usada para alimentar o extrator com o solvente. O extrator usado é de aço inoxidável 316S, apresenta 42 mL de volume interno. Nele, foram utilizadas telas de 260 mesh no topo e no fundo para evitar a passagem de qualquer material, evitando o entupimento da linha. Um banho termostático modelo Haake K15 foi acoplado ao extrator para mantê-lo na temperatura desejada durante todo o experimento. Um manômetro foi instalado na linha para o controle da pressão. A amostragem ocorreu a uma vazão máxima de 6.04 mL/min, controlada por um rotâmetro previamente calibrado.

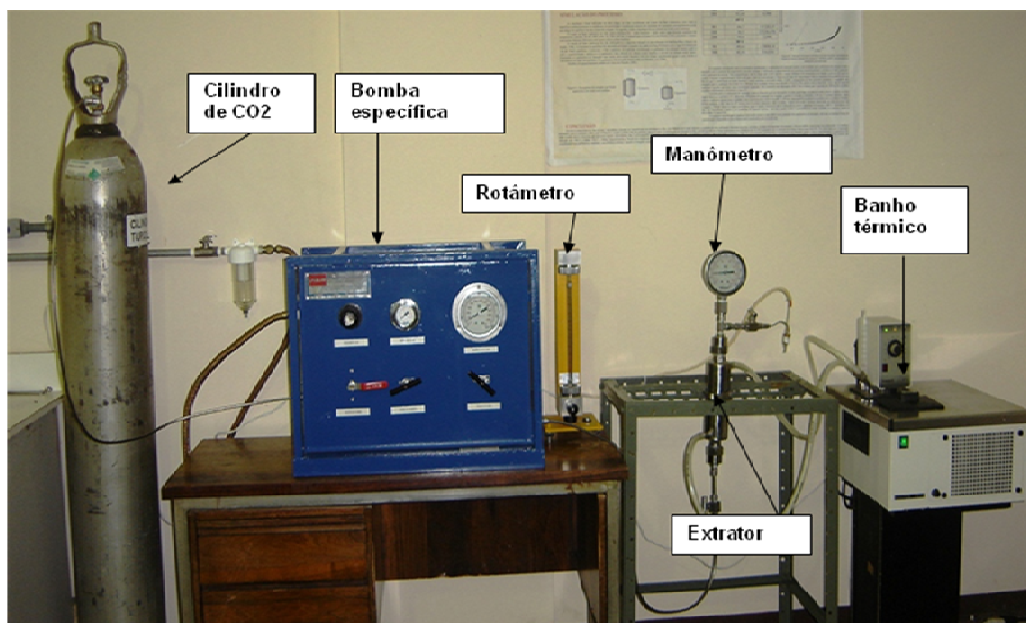


Figura 150. Unidade experimental de extração com fluido supercrítico presente no Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis (DEQ/UFRRJ).

As análises por CLAE foram realizadas em aparelho Shimadzu LC-20AT, detector fotodiodo, usando coluna C18 Betasil-Thermo (25cm x 4,6mm x 5 μ m) e método de análise para flavonoide: fase móvel B, MeOH (90%), e A, H₂O:AcOH-1% (10%), vazão de fase móvel de 1 mL/min, volume de injeção de 20,0 μ L, detecção no UV em 320 nm.

4.4.3. Extração - Ensaios preliminares

Dois experimentos foram realizados a 300 bar e 60 °C avaliando tamanho de partícula (< 0,707 e > 0,707 mm) e volume de etanol (7 e 10 mL). Foi observado que as partículas maiores não absorviam um volume maior que 7 mL de etanol e que o volume do extrator comportava aproximadamente 7,5 g de folhas secas com as partículas maiores. Para as partículas menores era possível colocar 9,0 g de folhas secas. As 9,0 g de folhas com tamanho de partícula menor foram capazes de absorver até 10 mL de etanol. O volume de etanol foi estabelecido avaliando a capacidade da amostra em absorver o solvente. A análise dos extratos foram realizada por cromatografia em camada delgada analítica utilizando como eluente CH₂Cl₂:metanol 9:1 e vanilina sulfúrica como revelador. Os extratos foram comparados com fração contendo biflavonoides de *Ouratea* e apenas o extrato obtido com as partículas menores apresentou manchas de coloração e R_f semelhantes a de biflavonoides. Assim, foram escolhidos para os experimentos do delineamento, a partícula menor, massa de 9,0 g, um volume de etanol de 9,0 mL e esferas de vidros (~ 10 unidades, usadas para evitar caminhos

preferenciais no leite, por parte de CO₂). O volume de etanol foi reduzido para adicionar as esferas de vidro.

A partir desses experimentos e consulta de dados da literatura (SHAN et al., 2011; LISA et al., 2010; KONG et al., 2009; LIU et al., 2011) foi elaborado um delineamento composto central rotacional 2³ (DCCR), contendo 17 experimentos contidos num bloco e três variáveis independentes, pressão, temperatura e tempo (**Tabela 35**). Os resultados de extração avaliados nesse processo foram o rendimento (R1) e teor de biflavonoides totais (R2).

Tabela 35. Valores dos níveis codificados e reais das variáveis independentes

Variáveis	-1,68	-1	0	1	1,68
Pressão (bar)	100	180	300	419	500
Temperatura (°C)	40	48,0	60	72,0	80
Tempo (min)	60	109	180	251	300

4.4.4. Experimentos do delineamento

Em cada experimento o extrator foi alimentado com a mistura de 9,0 g de folhas secas, esferas de vidro e 9,0 mL de etanol (co-solvente). Em seguida, o extrator foi conectado a unidade e o banho termostático foi ligado, para que o mesmo atingisse a temperatura de operação desejada. Após atingir a temperatura de operação desejada, o CO₂ foi introduzido no extrator pela ação da bomba de alta pressão até obter a pressão operacional desejada. Após os primeiros 10 min, o sistema operacional foi considerado em equilíbrio. As extrações foram realizadas por modo isocrático, nas condições operacionais de pressão, temperatura e tempo geradas pelo delineamento para cada experimento como apresentados na **Tabela 36**, p. 220.

No término de cada experimento, houve a despressurização do sistema através de uma válvula e o óleo foi recolhido em tubo polipropileno refrigerado em banho de gelo. O etanol presente nas frações foi removido por secagem em secador elétrico com fluxo de ar frio. As amostras foram acompanhadas por pesagem durante a secagem e consideradas secas após verificar massa constante. As mesmas foram mantidas em geladeira até o momento da análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM).

4.4.5. Extração usando Soxhlet

As extrações foram realizadas em extrator de soxhlet com capacidade para 500 mL. Para cada extração foram usadas 9,0 g de folhas secas, 200 mL de etanol absoluto e, aproximadamente,

6,0 g de esferas de vidro. O tempo de extração foi de 4 h. O extrato obtido foi seco em evaporador rotatório e analisado por CLAE.

4.4.6. Análise dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os extratos foram analisados por método desenvolvido para análise de flavonoides e quantificados frente a curva analítica de amentoflavona e também por equivalência à amentoflavona (E_A) para os demais biflavonoides. Foram preparadas soluções metanólicas de extratos na concentração de 2,0 mg/mL. Foram injetados 20 μ L de solução, em corridas de 25 min e detecção no UV à 320 nm. Todas as análises foram feitas em duplicata.

A amentoflavona, um biflavonoide isolado de folhas de *O. hexasperma* e identificado nos extratos obtidos por ESC foi usado como padrão na quantificação.

Para a confecção da curva analítica, foi preparada uma solução estoque na concentração de 1,0 mg/mL de amentoflavona em metanol grau espectroscópico. Cinco novas soluções, nas concentrações de 10, 25, 50, 100 e 150 μ g/mL, foram obtidas a partir da solução estoque do padrão por diluição em metanol. Foram injetados 20 μ L de solução, em corridas de 25 min e detecção no UV à 320 nm. Todas as análises foram feitas em duplicata.

A concentração dos biflavonoides presentes nas frações foi determinada utilizando uma curva analítica estabelecida com soluções de concentração conhecida para amentoflavona padrão. Os resultados foram expressos, pela média de duas determinações, em mg de equivalentes de amentoflavona por 100 mg de extrato (mg E_A /100 mg).

4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1. Análise do Rendimento (R1) por Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

Para este delineamento foram avaliadas três variáveis independentes, pressão, temperatura e tempo, e uma variável resposta, R1= rendimento (%). O rendimento experimental foi calculado de acordo com a **equação 1**. O teor de biflavonoides totais foi determinado pela soma da concentração de todos os biflavonoides presentes no extrato. Os biflavonoides foram quantificados por CLAE usando o padrão da amentoflavona (**seção 4.4.4**). Avaliando as respostas obtidas, o maior rendimento foi observado no experimento 11, enquanto que o experimento 4 apresentou maior extração de biflavonoides totais, como apresentado na **Tabela 36**.

$$e\% = \frac{\text{Massa de Extrato (g)}}{\text{Massa de folha (g)}} \times 100 \quad (1)$$

Tabela 36. Delineamento composto central rotacional 2^3 , contendo as respostas R1(extrato %) e R2 (biflavonoides totais) obtidas em função de pressão (bar), temperatura (°C) e tempo (min) representadas pelas variáveis codificadas e reais.

Experimento	Pressão (Bar)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	R* (mg)	R1 (%)	R2 (mg E _A /100 mg)**
1	180 (-1)	48,0 (-1)	109 (-1)	58,8	0,65	0,73
2	419 (+1)	48,0 (-1)	109 (-1)	270,9	3,01	2,63
3	180 (-1)	72,0 (+1)	109 (-1)	34,0	0,38	0,85
4	419 (+1)	72,0 (+1)	109 (-1)	175,5	1,95	4,00
5	180 (-1)	48,0 (-1)	251 (+1)	57,4	0,64	0,67
6	419 (+1)	48,0 (-1)	251 (+1)	278,6	3,09	2,05
7	180 (-1)	72,0 (+1)	251 (+1)	49,9	0,55	0,71
8	419 (+1)	72,0 (+1)	251 (+1)	297,7	3,31	2,88
9	100 (-1,68)	60 (0)	180 (0)	22,5	0,25	0,00
10	500 (+1,68)	60 (0)	180 (0)	259,0	2,88	3,71
11	300 (0)	40 (-1,68)	180 (0)	317,6	3,53	1,90
12	300 (0)	80 (+1,68)	180 (0)	103,3	1,15	1,39
13	300 (0)	60 (0)	60 (-1,68)	85,7	0,95	1,33
14	300 (0)	60 (0)	300 (+ 1,68)	259,4	2,88	3,86
15	300 (0)	60 (0)	180 (0)	220,7	2,45	1,00
16	300 (0)	60 (0)	180 (0)	262,6	2,92	1,51
17	300 (0)	60 (0)	180 (0)	256,1	2,85	1,11

*R= massa do extrato obtido; ** mg de E_{Amentoflavona}/ 100 mg de extrato

Para determinar a influência das variáveis independentes (pressão, temperatura e tempo) sobre o rendimento (R1), bem como a interação entre elas no processo, foi avaliado o modelo quadrático obtido a partir do cálculo do coeficiente de regressão. Foram considerados significativos os termos com p-valores menores que 5% (p < 0,05). Para o rendimento foram significativos os termos lineares da pressão e temperatura, e o termo quadrático da pressão. Os termos não significativos foram incorporados ao resíduo para o cálculo da ANOVA, representada na **Tabela 37**, p. 225.

O modelo quadrático completo é apresentado na **equação 2**:

$$R1 = 2,75 + 0,99x_1 - 0,46x_1^2 - 0,38x_2 - 0,18x_2^2 + 0,35x_3 - 0,33x_3^2 - 0,06x_1x_2 + 0,16x_1x_3 + 0,18x_2x_3 \quad (2)$$

Assim, tem-se a equação do modelo reparametrizado a partir das variáveis codificadas que contém apenas os termos estatisticamente significativos; conforme a **equação 3**:

$$R1 = 2,75 + 0,99x_1 - 0,46x_1^2 - 0,38x_2 \quad (3)$$

Tabela 37. ANOVA para a resposta R1(%)

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcal	p-valor
Regressão	17,82353	3	5,94118	12,48	<0,001
Resíduos	6,18591	13	0,47584		
Total	24,00944	16			

$R^2 = 89,84\%$; $F_{tab} = 3,26$

A análise da variância (ANOVA) indicou uma percentagem de variação explicada de 89,84% e Fcal maior que o tabelado. O valor de R^2 sugere que esse modelo é adequado para avaliar o rendimento do processo em função das variáveis independentes, pressão, temperatura e tempo. O rendimento do processo (R1) foi afetado apenas pelas variáveis independentes pressão e temperatura.

As superfícies de resposta e as curvas de contorno foram utilizadas para representar o modelo. Esse recurso facilita o entendimento das interações entre duas variáveis e prediz a região ótima que conduzirá ao melhores resultados, mesmo fora da faixa dos níveis reais escolhidos para o experimento. Na **Figura 151**, é apresentada a superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) que mostram os efeitos de pressão (bar) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) para R1, enquanto que o tempo foi fixado em seus níveis centrais. Foi observado que o maior rendimento é encontrado na região de alta pressão e baixa temperatura. O aumento da pressão (bar) propiciou o aumento da densidade do fluido e de seu poder de solvência, consequentemente a um maior rendimento.

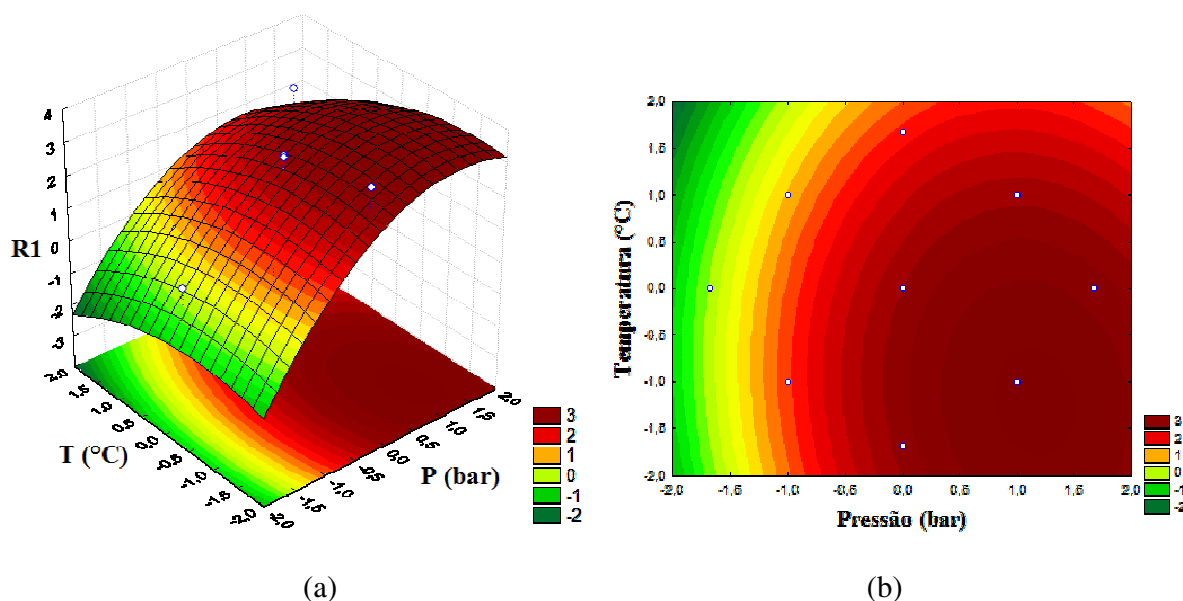


Figura 151. a) Superfície de resposta e b) curva de contorno para o rendimento (R1) em função da pressão (bar) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

Na **Figura 152**, são mostrados os efeitos de pressão (bar) e tempo (min). A região de rendimento ótimo foi observada para os níveis mais elevados de pressão e tempo.

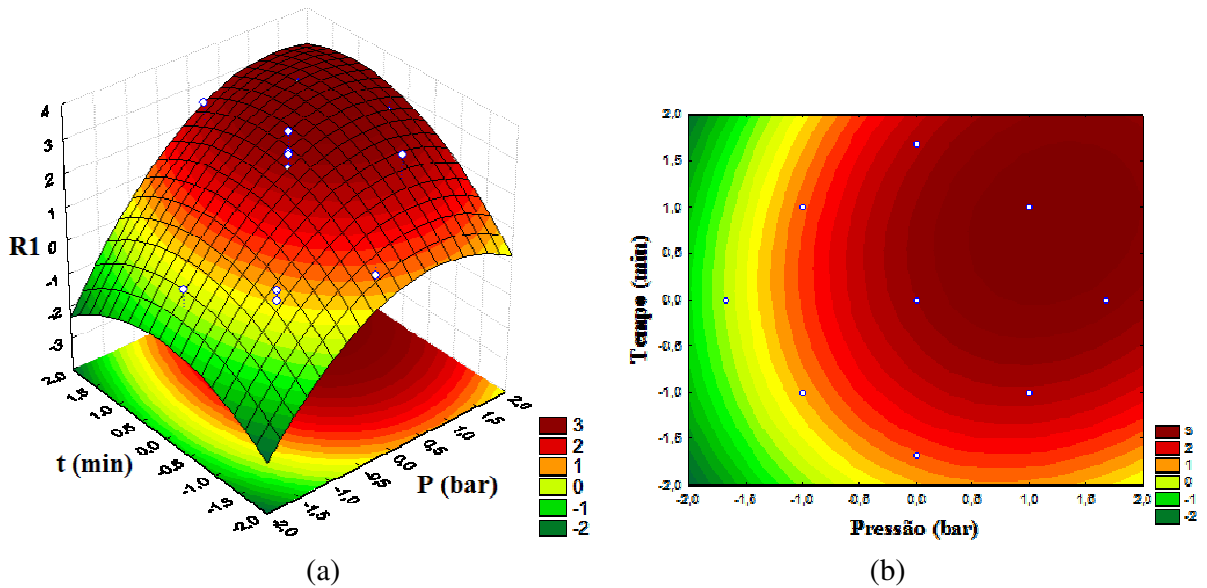


Figura 152. a) Superfície de resposta e b) curva de contorno para o rendimento (R1) em função da pressão (bar) e tempo (min)

Na **Figura 153**, p. 226, os efeitos de temperatura e tempo são apresentados. O efeito da temperatura foi semelhante ao observado na **Figura 151**, p. 225, onde a diminuição da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) leva a um aumento do rendimento. Extrações com tempo de 180 à 251 minutos, em temperaturas baixas, conduziram a altos rendimentos. Assim, tempos de extração curtos não favorece o rendimento máximo e extrações com tempo muito longo irá mostrar uma curva de extração constante.

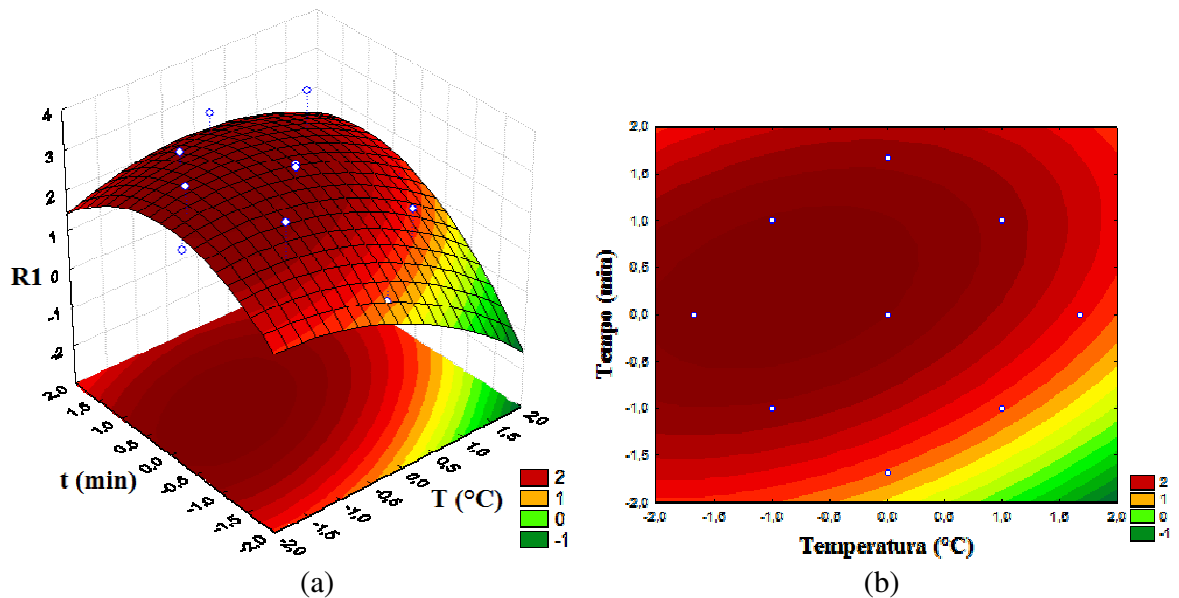


Figura 153. a) Superfície de resposta e b) curva de contorno para o rendimento (R1) em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e tempo (min)

Lisa e colaboradores observaram a diminuição da densidade do CO₂, em experimentos com pressão constante, pelo aumento da temperatura causando redução no poder de solvência do fluido (LISA et al., 2010). O aumento da temperatura pode aumentar a pressão de vapor do soluto (WANG et al., 2008). Porém nesse caso, o efeito sobre a densidade do fluido, e a consequente diminuição da solubilidade do mesmo, teve um peso maior sobre o rendimento.

Logo, dentro do intervalo de estudo pré-estabelecido o maior rendimento foi encontrado para os maiores níveis de pressão (419 à 500 bar), menores níveis de temperatura (40 °C) e níveis de tempo acima de 60 min.

Para comparar a eficiência da EFS foi realizada uma extração por uma metodologia tradicional. A extração com soxhlet foi escolhida com base em dados da literatura, que mostraram a técnica como uma das mais utilizadas em trabalhos que avaliam a eficiência da EFS frente a uma metodologia tradicional. A extração com soxhlet usando etanol foi realizada em triplicata, tendo sido obtido o rendimento de 15,77%. Um rendimento maior já era esperado para a extração com soxhlet considerando que a técnica não é seletiva e é considerada exaustiva.

4.5.2. Análise qualitativa de biflavonoides

As extrações com EFS forneceram um óleo fixo de coloração verde escuro, que se tornaram pastosos após eliminação do solvente, com exceção do óleo obtido no experimento 9 que apresentou coloração levemente esverdeada e óleo graxo. Para analisar a composição química dos óleos obtidos por EFS utilizou-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM). Todos os óleos com exceção do óleo 9, foram solúveis em etanol e metanol. Os óleos solúveis em solventes polares foram analisados por CLAE e o óleo 9 foi analisado por CG-EM.

A análise qualitativa foi realizada utilizando os padrões de biflavonoides apresentados no capítulo I, em comparação com os extratos de soxhlet e EFS. Os biflavonoides identificados nos extratos foram agastisflavona com $t_R = 4,36$ min e amentoflavona com $t_R = 5,77$ min (**Figura 154**, p. 228). Um terceiro biflavonoide foi observado no cromatograma com $t_R = 9,10$ min, o qual não apresentou t_R compatível com nenhum dos padrões utilizados, mas pela absorção na região do UV característica de esqueleto de biflavonoide, $\lambda_{max} \sim 260$ e 330 nm, confirmou-se a classe deste constituinte (**Figura 159**, p. 231). Também foi observado em $t_R = \sim 6,37$ min um constituinte com absorção na região do UV típico de derivado de ácido p-hidroxibenzóico, o qual não foi identificado (**Figura 159**, p. 231). Os outros constituintes observados no cromatograma na região de 2 à 3,5 min aparentam ser pigmentos como

clorofila. Análise do espectro de massa obtido por espectrometria de massa com ionização por eletrospray (EM-IES) do extrato 10 (**Figuras 155**, p. 229) mostrou valores de íons moleculares de massa elevada ($m/z = 745,5$; $793,5$ e $819,5$) o que confirma a presença de pigmentos. O perfil da composição química do extrato obtido por extração com soxhlet (**Figura 156**, p. 229) mostrou-se semelhante aos apresentados pelos extratos obtidos por EFS nas condições de alta pressão, como os experimentos de EFS 2 (419 bar e $48\text{ }^{\circ}\text{C}$) e 4 (419 bar e $72\text{ }^{\circ}\text{C}$), em análises por CLAE (**Figura 157**, p. 230 e **158**, p. 231). Observou-se que nos experimentos de EFS 1 (180 bar e $48\text{ }^{\circ}\text{C}$) e 3 (180 bar e $72\text{ }^{\circ}\text{C}$) houve o aumento da extração do derivado de ácido benzóico com a diminuição da pressão, independente da variação da temperatura. Nos cromatogramas dos experimentos 4, 8, 14 e 15 foram observados as menores concentrações de pigmentos em relação aos demais experimentos, com exceção do experimento 9.

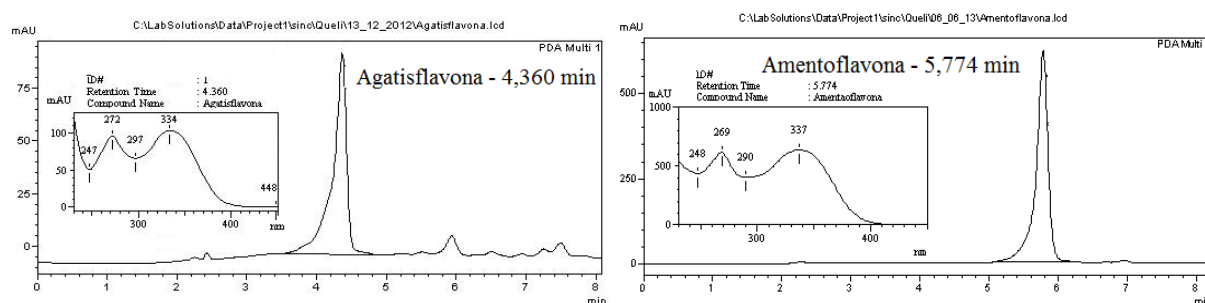
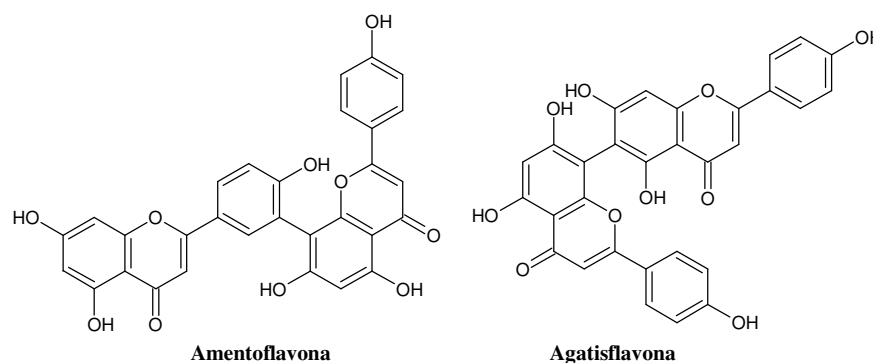


Figura 154. Cromatogramas dos padrões autênticos de agatisflavona e amentoflavona por CLAE e seus espectros de absorção no UV.



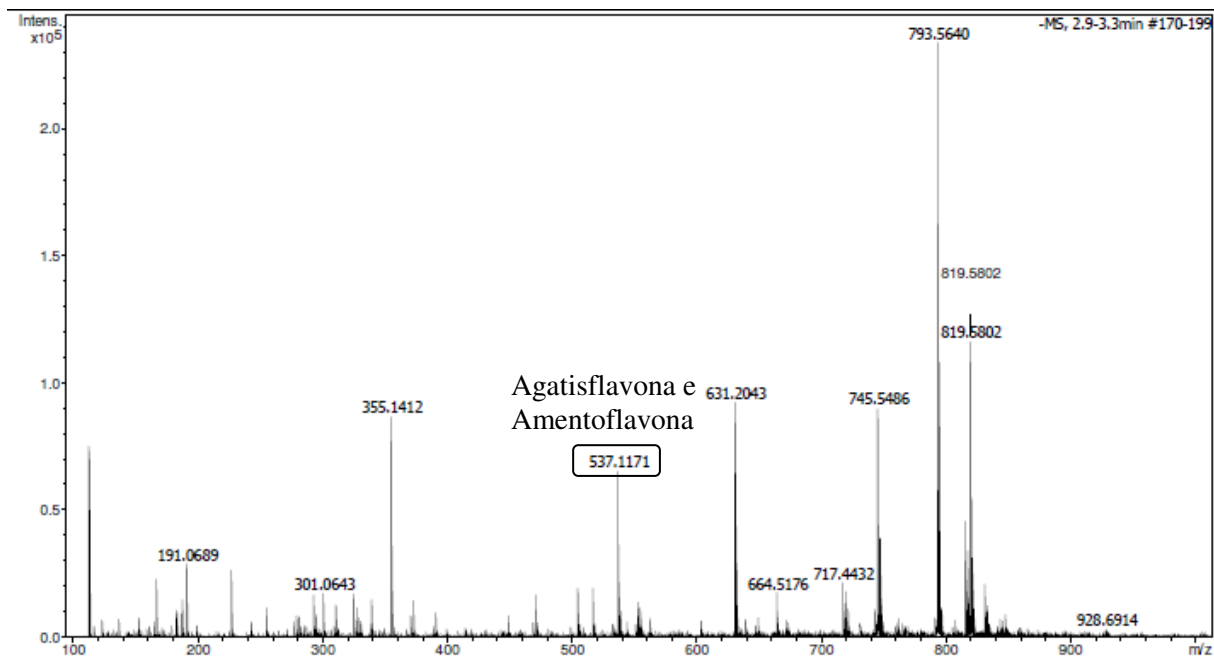


Figura 155. Espectro de massa (EM-IES) do extrato SC 10, modo negativo.

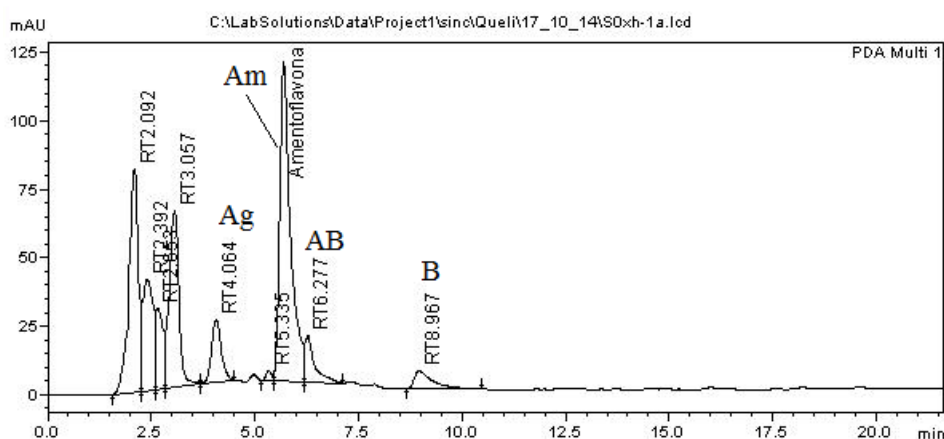


Figura 156. Cromatograma de CLAE do extrato obtido por soxhlet, Coluna; C-18 (250 mm x 4,6 mm x 5mm), fase móvel [90% (metanol) e 10% água acidificada com 1% de ácido acético]. Ag – Agatisflavona, Am – amentoflavona, AB – ácido benzóico, B – biflavona.

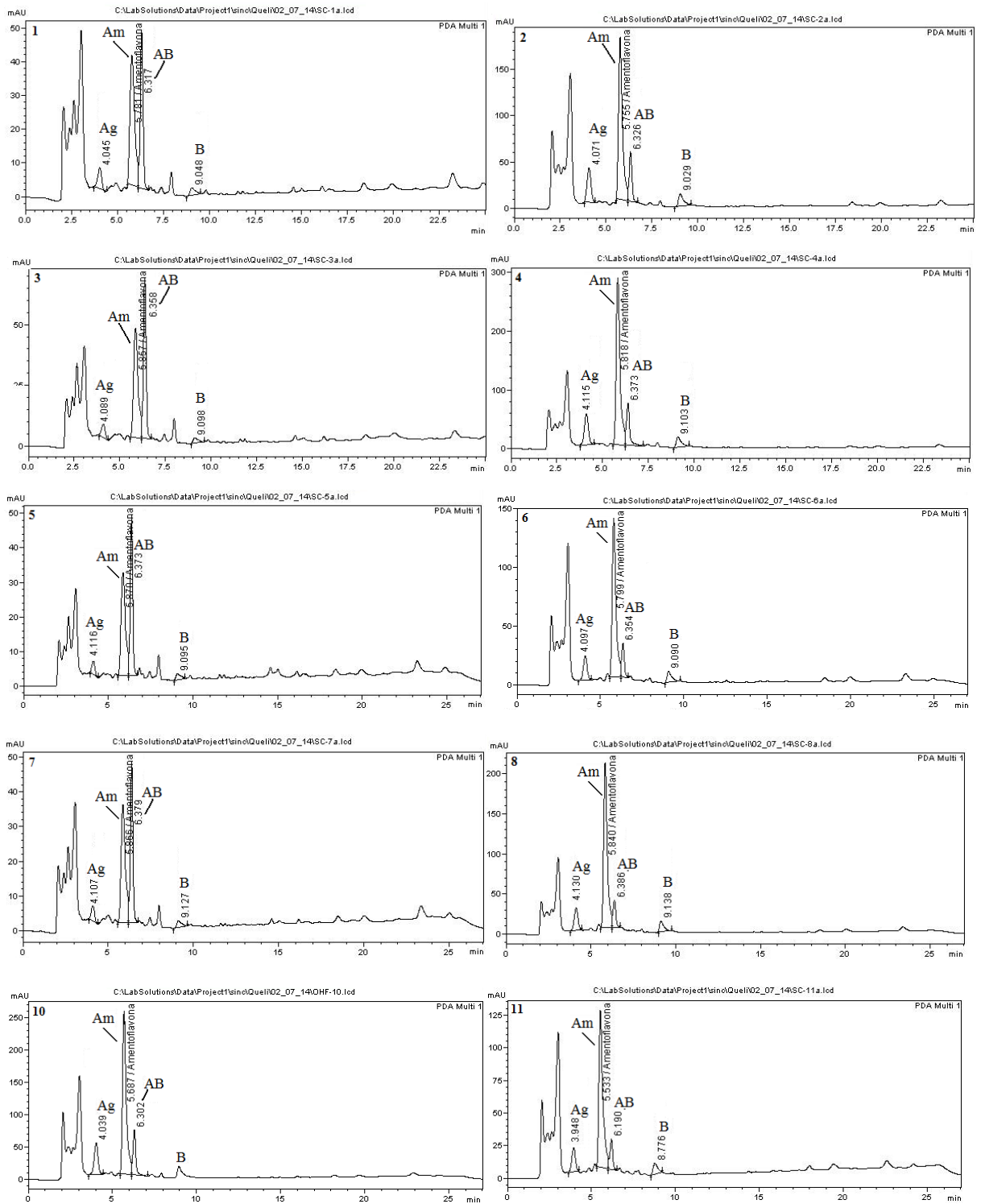


Figura 157. Cromatogramas de CLAE dos extratos SC 1-8 e 10-11, Coluna; C-18 (250 mm x 4,6 mm x 5mm), fase móvel [90% (metanol) e 10% água acidificada com 1% de ácido acético]. Ag – Agatisflavona, Am – amentoflavona, AB – ácido benzóico, B – biflavona.

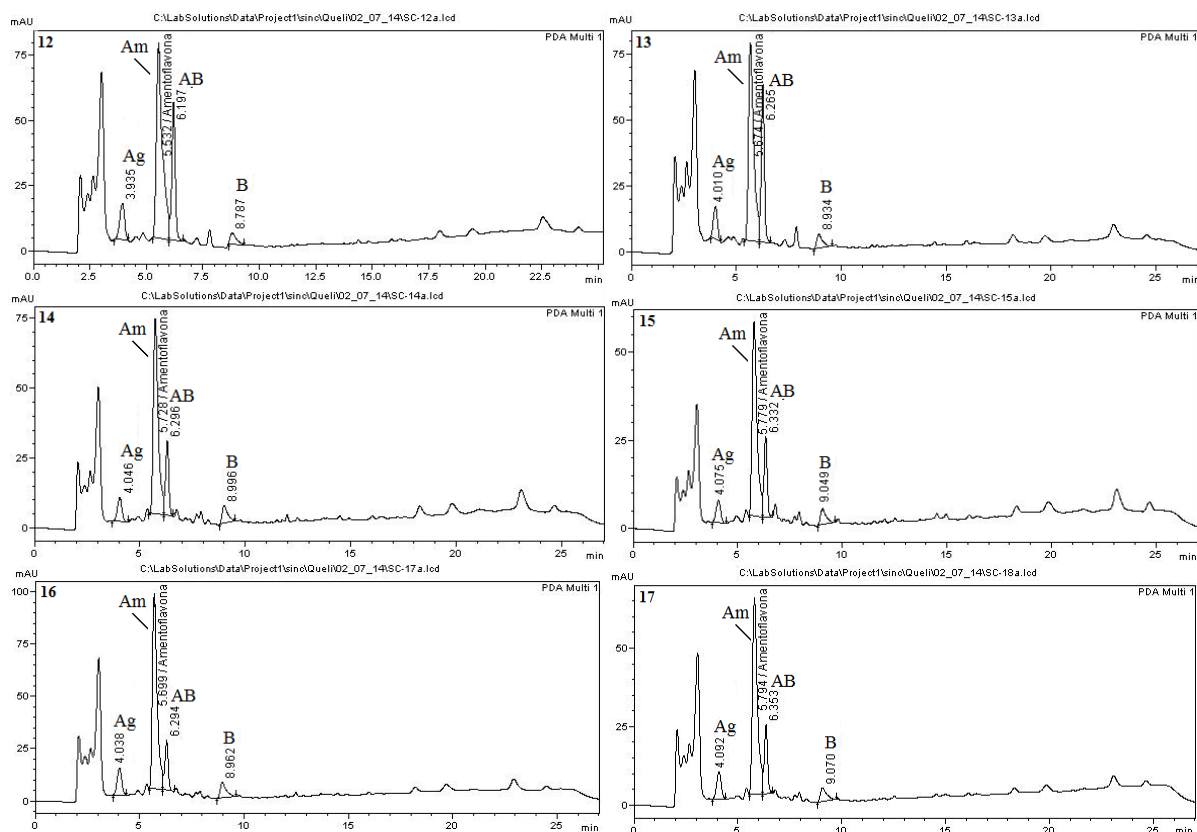


Figura 158. Cromatogramas de CLAE-DAD dos extratos SC 12-17, Coluna; C-18 (250 mm x 4,6 mm x 5mm), fase móvel [90% (metanol) e 10% água acidificada com 1% de ácido acético]. Ag – Agatisflavona, Am – amentoflavona, AB – ácido benzóico, B – biflavona.

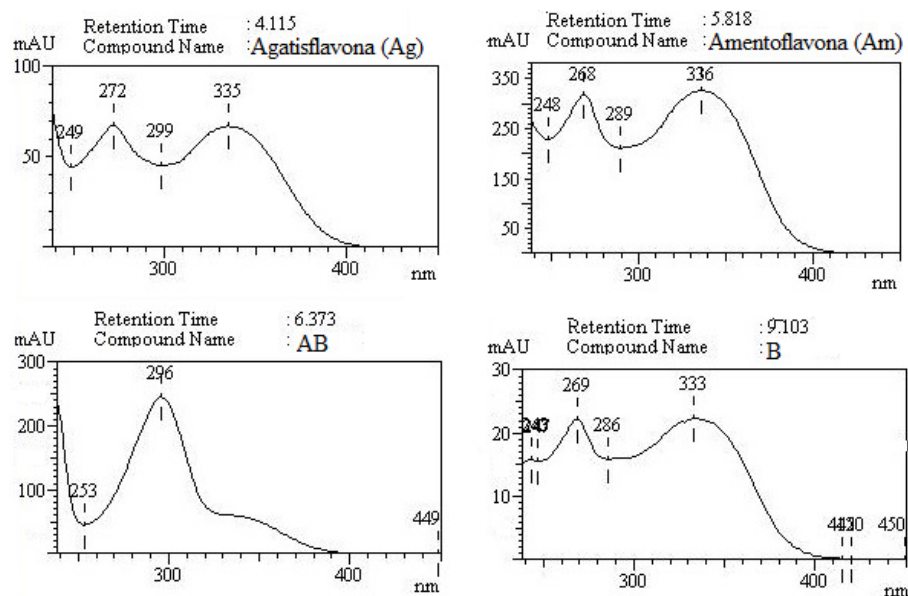


Figura 159. Espectros na região do UV (320 nm) dos principais constituintes presentes nos extratos SC analisados por CLAE.

O experimento 9 forneceu um óleo (SC-9), levemente esverdeado, solúvel em solvente orgânico apolar, como diclorometano, o qual não apresentou indicativo de presença de biflavonoide em análise por CCDA. Por apresentar baixa polaridade ele foi analisado por CG-EM e a análise mostrou que o óleo contém uma mistura de 11 constituintes majoritários, dentre eles ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos, aldeídos e hidrocarbonetos de cadeia longa. O cromatograma é mostrado na **figura 160**, com os picos enumerados. Nas **figuras 161** à **171**, p. 231 à 236, são apresentados os espectros de massas dos constituintes representado por cada pico no cromatograma. As condições usadas no experimento 9 foram as que mais se distanciaram das condições adequadas para a extração de biflavonoide dentro do delineamento escolhido. O experimento com o menor nível de pressão do delineamento (SC-9) foi o único que não levou a extração de biflavonoides o que confirma a necessidade de altas pressões para a extração de constituintes polares.

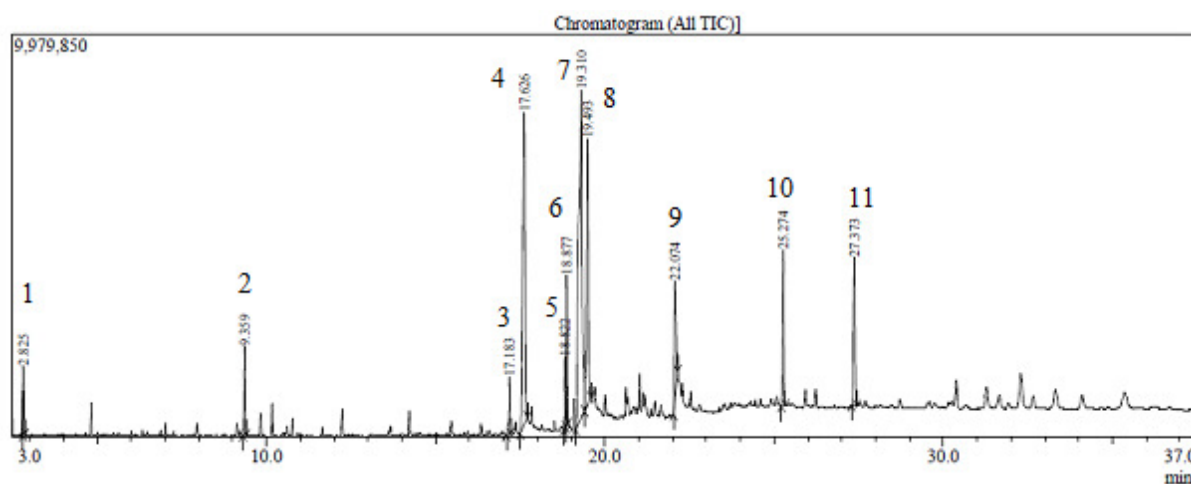


Figura 160. Cromatograma de CG-EM do óleo SC-9.

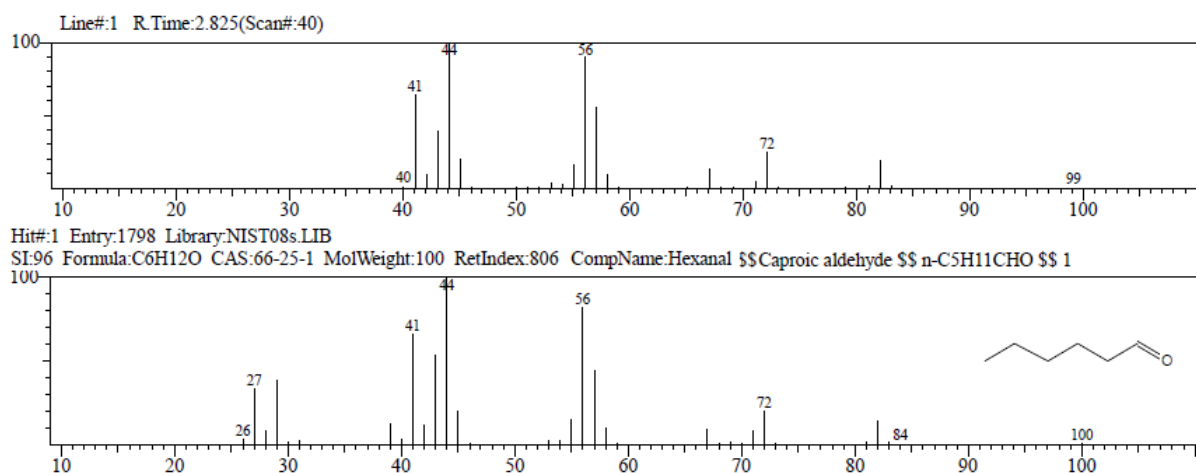


Figura 161. Espectro de massa do pico 1, $t_R = 2,83$ min, em comparação com espectro de massa do hexanal obtido da biblioteca NIST.

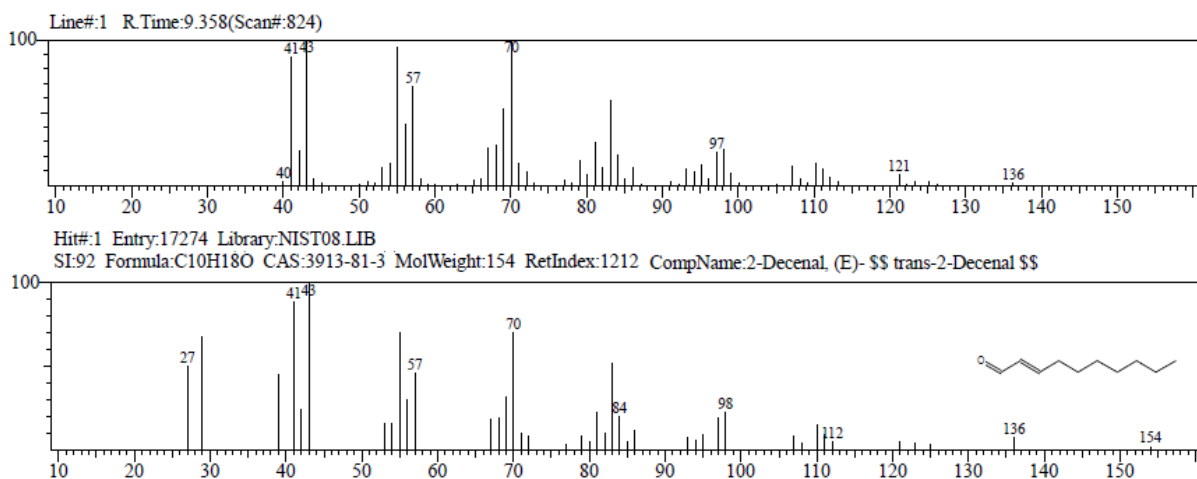


Figura 162. Espectro de massa do pico 2, $t_R = 9,36$ min, em comparação com espectro de massa do (*E*)-trans-decenal obtido da biblioteca NIST.

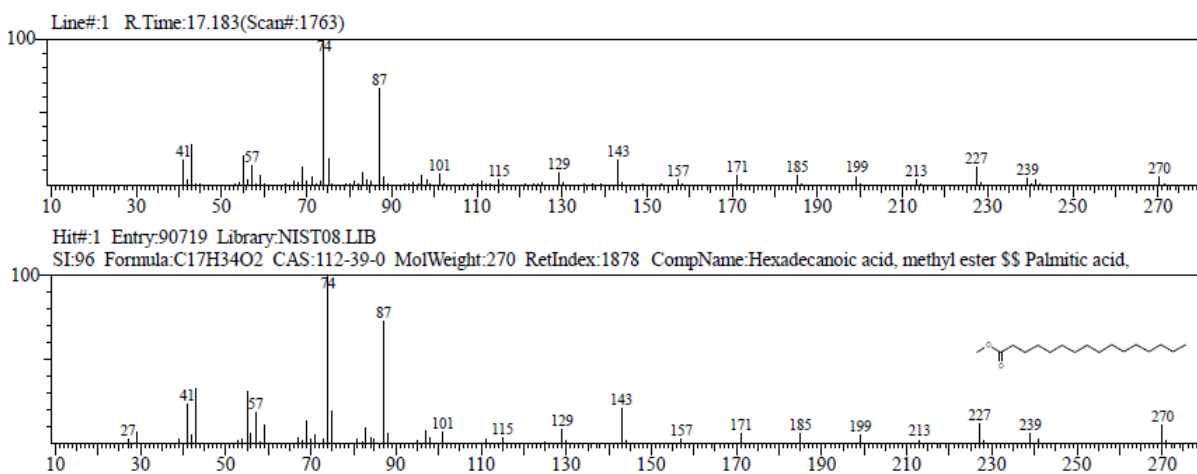


Figura 163. Espectro de massa do pico 3, $t_R = 17,18$ min, em comparação com espectro de massa do hexadecanoato de metila obtido da biblioteca NIST.

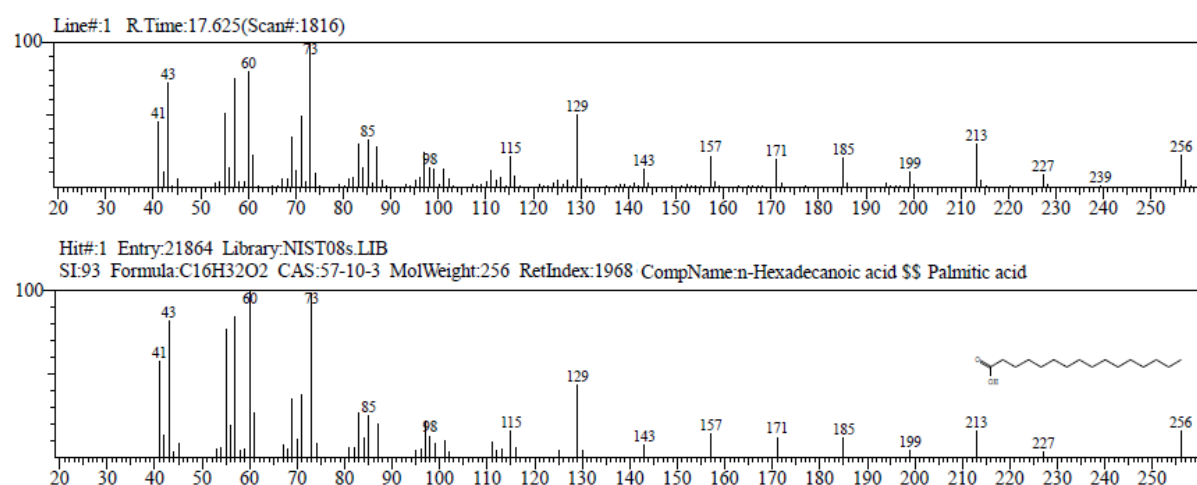


Figura 164. Espectro de massa do pico 4, $t_R = 17,62$ min, em comparação com espectro de massa do ácido hexadecanóico obtido da biblioteca NIST.

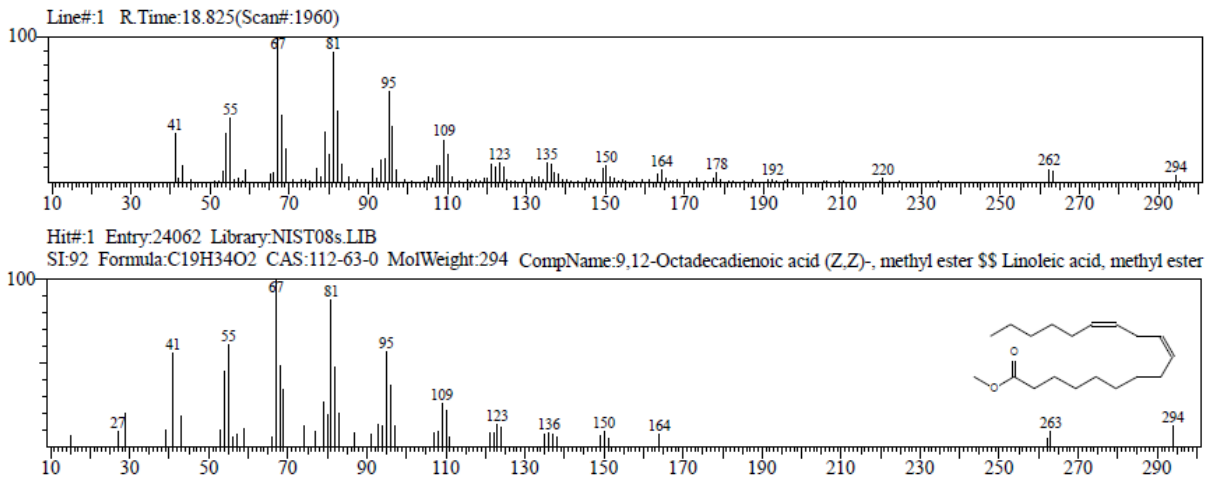


Figura 165. Espectro de massa do pico 5, $t_R = 18,83$ min, em comparação com espectro de massa do linoleato de metila obtido da biblioteca NIST.

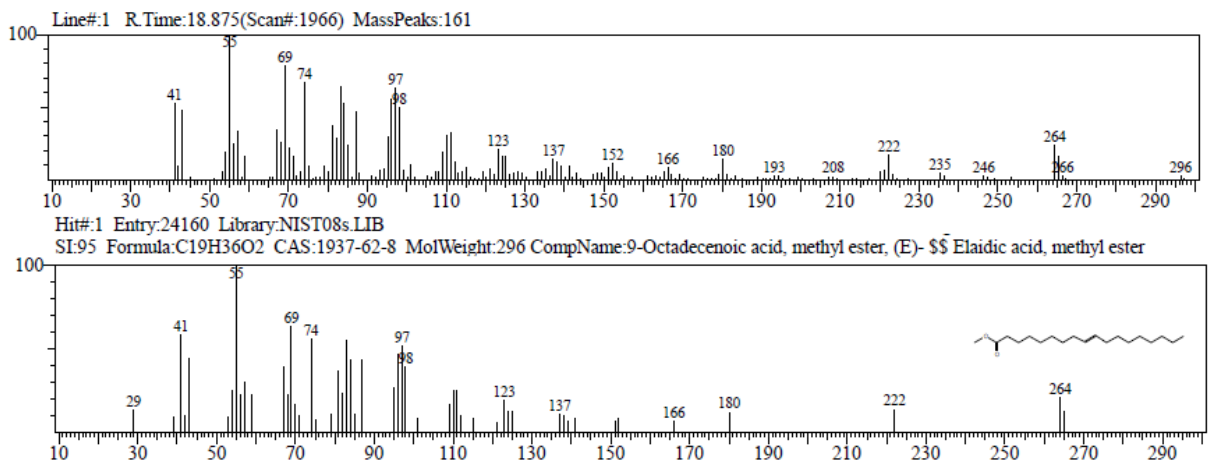


Figura 166. Espectro de massa do pico 6, $t_R = 18,88$ min, em comparação com espectro de massa do 9-octadecenoato de metila obtido da biblioteca NIST.

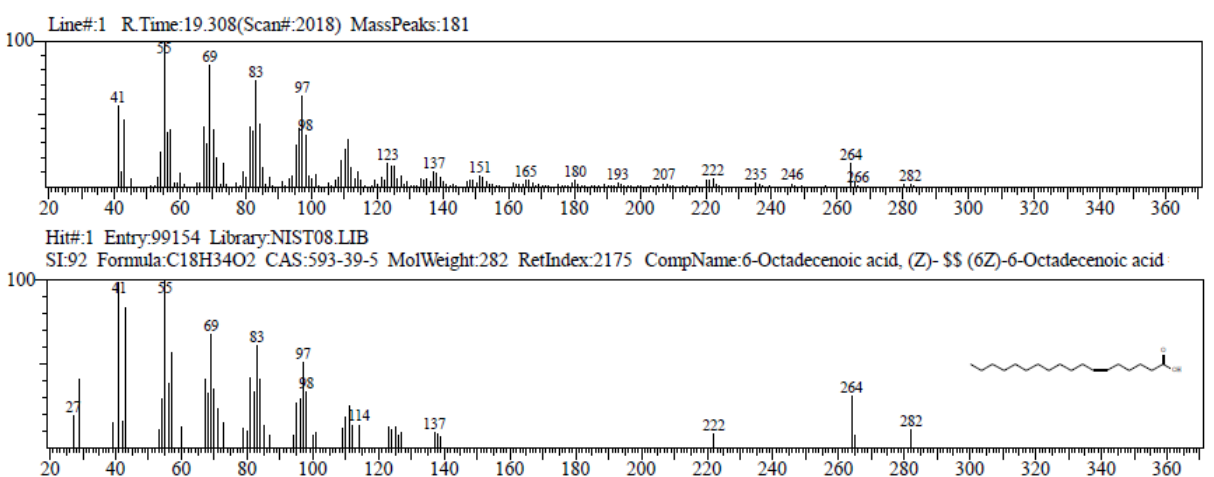
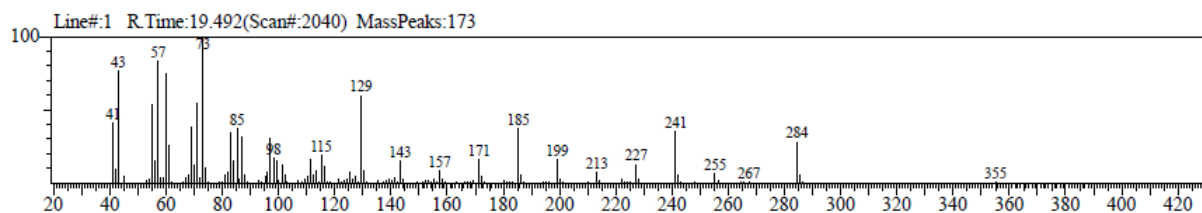


Figura 167. Espectro de massa do pico 7, $t_R = 19,31$ min, em comparação com espectro de massa do ácido 6-octadecenóico obtido da biblioteca NIST.



Hit#1 Entry:100791 Library:NIST08.LIB
 SI:90 Formula:C18H36O2 CAS:57-11-4 MolWeight:284 RetIndex:2167 CompName:Octadecanoic acid \$\$ Stearic acid

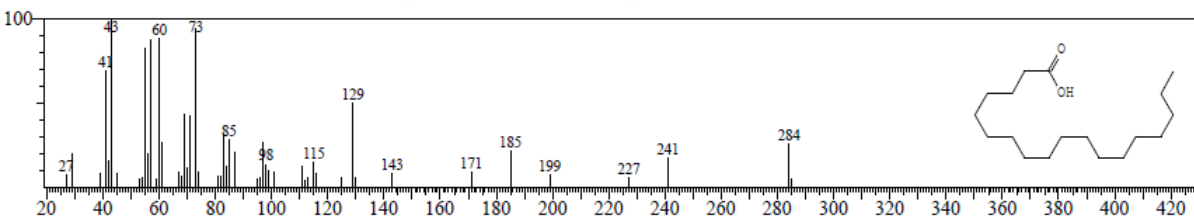
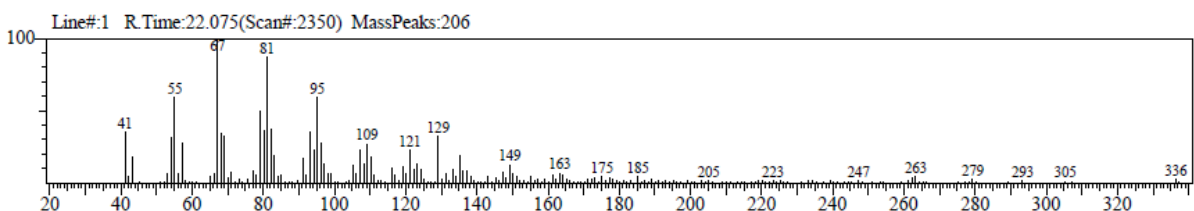


Figura 168. Espectro de massa do pico 8, $t_R = 19,49$ min, em comparação com espectro de massa do ácido esteárico obtido da biblioteca NIST.



Hit#1 Entry:110708 Library:NIST08.LIB
 SI:86 Formula:C18H31ClO CAS:7459-33-8 MolWeight:298 RetIndex:2139 CompName:9,12-Octadecadienoyl chloride, (Z,Z)- \$\$ Linoleoyl chloride

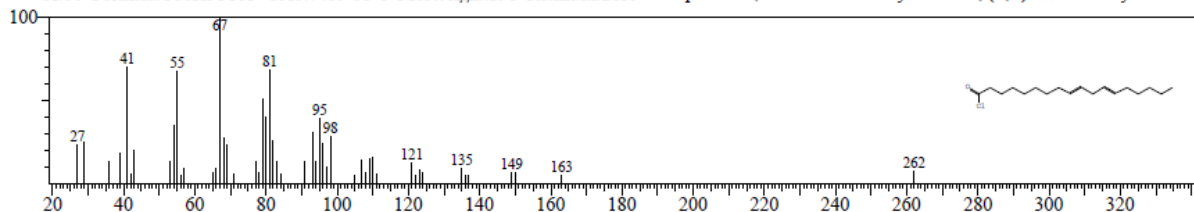
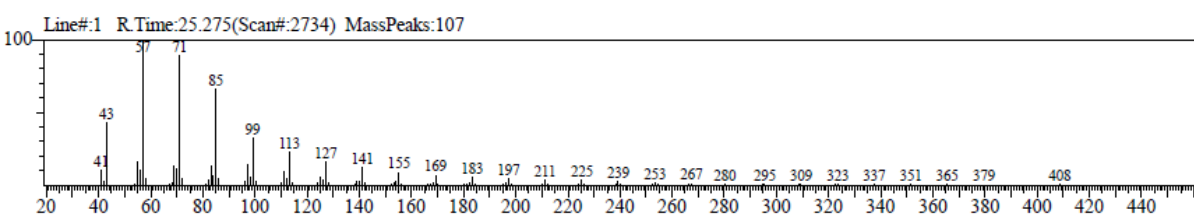


Figura 169. Espectro de massa do pico 9, $t_R = 22,08$ min, em comparação com espectro de massa do cloreto de 9,12-octadecadienoila obtido da biblioteca NIST.



Hit#1 Entry:27783 Library:NIST08s.LIB
 SI:95 Formula:C32H66 CAS:544-85-4 MolWeight:450 RetIndex:3202 CompName:Dotriacontane \$\$ n-Dotriacontane \$\$ Bicetyl \$\$

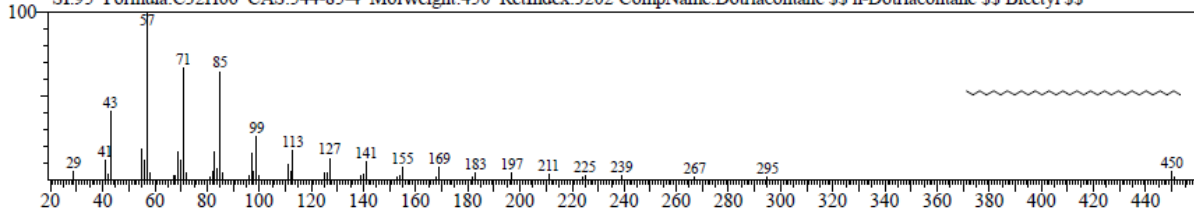


Figura 170. Espectro de massa do pico 10, $t_R = 25,28$ min, em comparação com espectro de massa do hidrocarboneto obtido da biblioteca NIST.

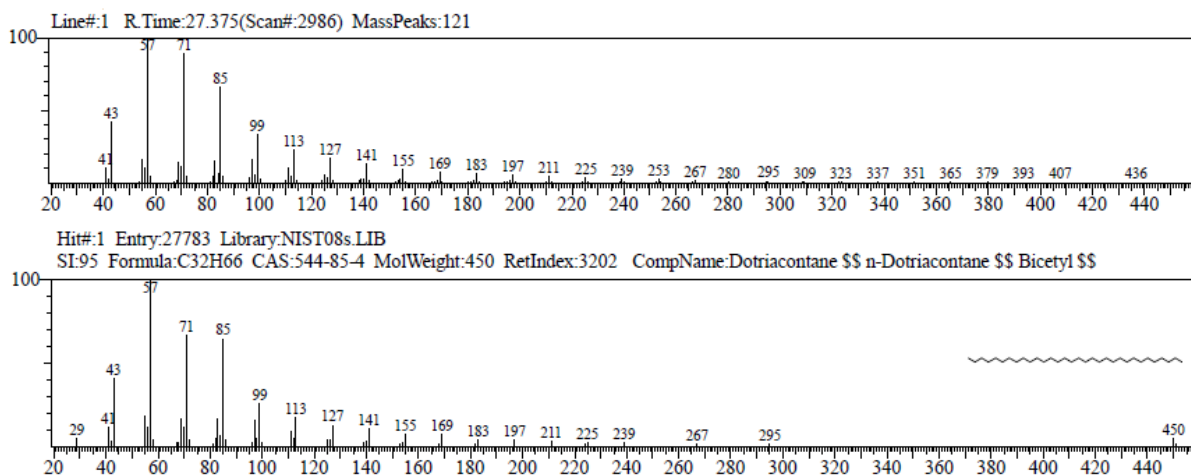


Figura 171. Espectro de massa do pico 11, $t_R = 27,38$ min, em comparação com espectro de massa do hidrocarboneto obtido da biblioteca NIST.

4.5.3. Análise quantitativa de biflavonoides

A análise quantitativa dos biflavonoides presentes nos extratos foi realizada por CLAE utilizando como padrão a amentoflavona. Além da amentoflavona, os outros biflavonoides presentes nos extratos também foram quantificados, mas por método de equivalência, $mg E_A/100$ mg de extrato. A curva analítica para a quantificação foi construída a partir de cinco soluções de amentoflavona nas concentrações de $10,0 - 150,0 \mu g/mL$. A **Figura 172**, p. 237, apresenta o gráfico da curva analítica e os valores da regressão linear. A concentração de cada biflavonoide, em $mg/100$ mg de óleo, foi obtido pela **equação 4**. Os valores de teor de BT apresentados na **Tabela 38**, p. 237 foram obtidos pelo somatório da concentração de cada biflavonoide presente no referido extrato.

$$B = [(X \cdot 100)/n]/1000 \quad (4)$$

B – concentração de biflavona presente em cada óleo ($mg/100$ mg de óleo)

X – concentração de biflavona em ($\mu L/mL$) de óleo encontrado na curva de quantificação

n – concentração de óleo (mg/mL) usada para o preparo da solução analisada

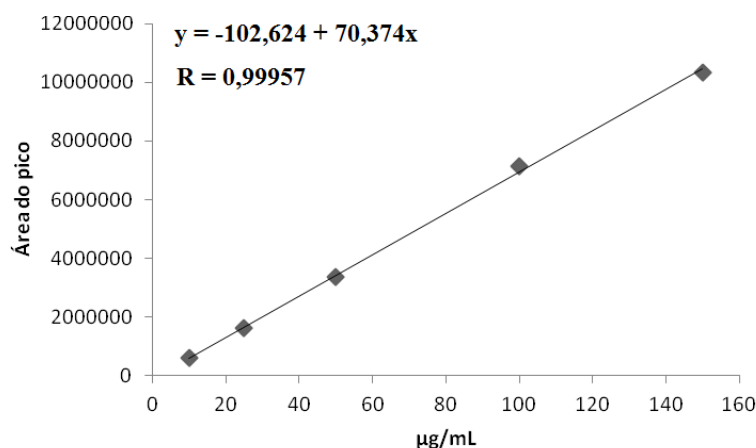


Figura 172. Curva analítica da relação entre a concentração e área do pico de amentoflavona do cromatograma de CLAE

Tabela 38. Teores médios de biflavonoides em extratos SC quantificados por CLAE

Exp.	Agatisflavona (mg/100 mg de óleo)	Amentoflavona (mg/100 mg de óleo)	Biflavona (mg/100 mg de óleo)	BT (mg/100mg de óleo)	Pressão (Bar)	Temperatura (°C)
1	0,13	0,60	nd	0,73	180	48,0
2	0,46	1,92	0,25	2,63	419	48,0
3	0,12	0,63	0,10	0,85	180	72,0
4	0,63	3,07	0,30	4,00	419	72,0
5	0,11	0,46	0,10	0,67	180	48,0
6	0,27	1,57	0,21	2,05	419	48,0
7	0,12	0,49	0,10	0,71	180	72,0
8	0,38	2,25	0,25	2,88	419	72,0
9	nd	nd	nd	nd	100	60
10	0,62	2,83	0,26	3,71	500	60
11	0,27	1,45	0,18	1,90	300	40
12	0,22	1,04	0,13	1,39	300	80
13	0,19	1,00	0,14	1,33	300	60
14	0,54	3,14	0,18	3,86	300	60
15	0,14	0,71	0,13	1,00	300	60
16	0,21	1,13	0,17	1,51	300	60
17	0,16	0,81	0,14	1,11	300	60

Biflavona - biflavonoide não identificado por CLAE; **BT**- biflavonoides totais; nd- não determinado;
Exp. - experimentos de EFS. Média, n = 2.

4.5.4. Rendimento de biflavonoides totais (R2)

O aumento do rendimento dos biflavonoides totais (R2) foi decorrente ao aumento da pressão. Esse comportamento pode ser interpretado analisando a baixa solubilidade dos biflavonoides de *Ouratea* em CO₂ supercrítico, uma vez que são moléculas relativamente grandes e polares quando comparadas a constituintes presentes em óleos essenciais.

Analisando o comportamento da extração de BT através dos rendimentos (R2) obtidos nos experimentos 1 a 4, **Tabela 36**, p. 224, pode-se ver que a pressão é a única variável que influencia a extração de BT. No experimento 1, as variáveis pressão, temperatura e tempo estão no nível (-1), ao comparar este experimento com o 2, pressão (+1) e temperatura e tempo (-1), observa-se um aumento considerado no rendimento de BT (R2). Ao comparar o experimento 1 com o 3, temperatura (+1) e pressão e tempo (-1), observou-se um rendimento semelhante. No entanto, a comparação do experimento 1 com o 4, temperatura e pressão (+1) e tempo (-1), revelou o maior rendimento dentre as condições estudadas. O efeito do tempo pode ser melhor compreendido observando os experimentos 13 e 14, que mostraram que o efeito do tempo sob o rendimento não foi significativo.

A quantidade de biflavonoides extraída no experimento 4 foi comparada com a quantidade obtida por isolamento pela metodologia de extração com Soxhlet usando etanol. Pela análise de quantificação por CLAE foi determinada a concentração de biflavonoides totais (BT) de 4,00 mg/100 mg de óleo. No experimento 4 foram obtidos 175,50 mg de extrato a partir de 9,00 g de massa de folha (MF). Em 175,50 mg de extrato encontrou-se 7,00 mg de biflavonoides totais (BT). O rendimento de biflavonoides totais calculado pela equação 1 foi de 0,078%.

A extração com soxhlet utilizou 9,00 g de folha seca que forneceram, em média, 1,42 g de extrato etanólico. A quantificação de biflavonoides totais foi realizada em CLAE por mg de equivalente de amentoflavona/100 mg de extrato. A concentração média de BT nas repetições foi de 2,42 mg E_A /100 mg de extrato. A concentração de BT em 1,42 g foi de 34,34 mg e calculado pela equação 1 chegou-se em um rendimento de BT de 0,38%.

A obtenção dos biflavonoides totais (rendimento de BT %) foi maior para o extrato obtido por extração com soxhlet em relação a EFS no (experimento 4) que mostrou maior concentração de BT. Mesmo não apresentando uma obtenção de BT tão eficiente quanto a obtida por soxhlet, a EFS favoreceu a obtenção de um extrato com elevada concentração de BT, 4 mg/100 mg de extrato (experimento 4), enquanto que por soxhlet foi obtido aproximadamente 2 mg/100 mg de extrato. Esse fato pode ser justificado considerando que por soxhlet um maior número de constituintes é extraído, promovendo a diluição dos BT no extrato.

4.6. CONSIDERAÇÕES

Este é o primeiro trabalho de extração de biflavonoides de *Ouratea hexasperma* utilizando a técnica EFS. Os biflavonoides identificados como constituintes majoritários no óleo foram a agatisflavona e amentoflavona.

As condições escolhidas para o delineamento experimental de EFS de folhas de *Ouratea hexasperma* permitiram encontrar a região ótima para obter o maior rendimento de extratos contendo biflavonoides usando a metodologia de superfície de resposta.

O maior rendimento de biflavonoides totais foi obtido nas condições de 419 bar, 72 °C e 109 min, referente ao experimento 4.

A recuperação de biflavonoides totais da matriz vegetal por ESC foi de 0,078% bem abaixo do obtido por soxhlet, 0,35%.

A EFS favoreceu a obtenção de um extrato com elevada concentração de biflavonoides totais, 4 mg/100 mg de extrato (experimento 4), resultado que evidencia a seletividade da extração, quando comparada com a extração por soxhlet que apresentou aproximadamente 2 mg/100 mg de extrato.

Comparando o soxhlet e a EFS, utilizando o mesmo tempo operacional, pode-se dizer que a quantidade de BT é expressiva para a EFS, visto que a quantidade extraída pelo soxhlet ainda necessitará de outra etapa de separação, a fim de isola-los e aumentar seu poder quanto a possível atividade biológica. A fim de alcançar a mesma % obtida no soxhlet precisaria manter a unidade de EFS em operação por 436 min, o que em nada é desfavorável ao processo em batelada.

Análise de tempo de extração:

Soxhlet → 240 min → 0,35%

EFS → 109 min → 0,078%

EFS → 436 min → 0,31%

4.7. REFERÊNCIAS

ABBAS, K. A.; MOHAMED, A.; ABDULAMIR, A. S.; ABAS, H. A. A review on supercritical fluid extraction as new analytical method. **Am J Biochem & Biotech**, v. 4, n. 4, p. 345-353, 2008.

BIMAKR, M.; RAHMAN, R. A.; TAIP, F. S.; GANJLOO, A.; SALLEH, L. M.; SELAMAT, J., HAMID, A.; ZAIDUL, I. S. M. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. **Food Bioprod Proces.** v. 89, p. 67–72, 2011.

BISCAIA, D.; FERREIRA, S. R. S. Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction. **J. of Supercritical Fluids**, v. 51, p. 17-23, 2009.

CHANG, Y.; LIU, B.; SHEN, B. Orthogonal array design for the optimization of supercritical fluid extraction of baicalin from roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi. **J Sep Sci**, v. 30, p. 1568 – 1574, 2007.

CHIU, K.; CHENG, Y.; CHEN, J.; CHANG, C. J.; YANG, P. Supercritical fluids extraction of *Ginkgo ginkgolides* and flavonoids. **J Supercritical Fluids**, v. 24, p. 77–87, 2002.

COSSUTA, D.; SIMÁNDI, B.; VÁGI, E.; HOHMANN, J.; PRECHL, A.; LEMBERKOVICS, É.; KÉRY, Á.; KEVE, T.; Supercritical fluid extraction of *Vitex agnus castus* fruit. **J. of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 188-194, 2008.

CRAVERO, S.; GARCÍA-RISCO, M. R.; MARÍN, F. R.; JAIME, L.; SANTOYO, S.; SEÑORÁNS, F. J.; REGLERO, G.; IBÁÑEZ, E. Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from orégano chemical and functional characterization via LC-MS and in vitro assays. **J. of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 62-69, 2006.

GUAN, W.; SHUFEN, L.; RUIXIANG, Y.; SHAOKUN, T.; CAN, Q. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1558-1564, 2007.

HAMBURGER, M.; BAUMANN, D.; ADLER, S. Supercritical carbon dioxide extraction of selected medicinal plants – Effects of high pressure and added ethanol on yield of extracted substances. **Phytochem Anal**, v. 15, p. 46-54, 2004.

HSU, Y.; TSAI, C.; CHEN, W.; HO, Y.; LU, F.; Determination of lutein and zeaxanthin and antioxidant capacity of supercritical carbon dioxide extract from daylily (*Heemerocallis disticha*). **Food Chemistry**, v. 129, p. 1813-1818, 2011.

JUNIOR, M. R. M.; LEITE, A. V.; DRAGANO, N. R. V. Supercritical Fluid Extraction and Stabilization of Phenolic Compounds From Natural Sources – Review (Supercritical Extraction and Stabilization of Phenolic Compounds). **The Open Chemical Engineering Journal**, v. 4, p. 51-60, 2010.

KONG, Y.; FU, Y.; ZU, Y.; LIU, W.; WANG, W.; HUA, X.; YANG, M. Ethanol modified supercritical fluid extraction and antioxidant activity of cajaninstilbene acid and pinostrobin

from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves. **Food Chemistry**, v. 117, p. 152-159, 2009.

LEE, Y.; CHARLES, A. L.; KUNG, H.; HO, C.; HUANG, T. Extraction of nobiletin and tangeretin from *Citrus depressa* Hayata by supercritical carbon dioxide with ethanol as modifier. **Industrial Crops and Products**. v. 31, p. 59-64, 2010.

LIU, J.; LIN, S.; WANG, Z.; WANG, C.; WANG, E.; ZHANG, Y.; LIU, J. Supercritical fluid extraction of flavonoids from *Maydis stigma* and its nitritescavenging ability. **Food Bioprod Process**, v. 89, p. 333-339, 2011.

LANÇAS, F. M. Extração com fluido supercr: quo vadis? **Revista Analytica**, n. 02, p. 30-37, 2002.

LISA, M. S.; RAHMAN, R. A.; MANDANA, B.; JINAP, S.; RAHMAT, A.; ZAIDUL, I. S. M.; HAMID, A. Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoids from *Strobilanthes crispus* (Pecah Kaca). **Food Bioprod Process**, v. 88, p. 319-326, 2010.

MONDEY, W. K.; MULHOLLAND, D. A.; RAYNOR, M. W. Analytical supercritical fluid extraction of natural products. **Phytochem. Anal.** v. 7, p. 1-15, 1996.

PRADO, A. G. S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. **Quim Nova**, v. 26, n. 5, p. 738-744, 2003.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **J. of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 146-166, 2006.

SHAN, B.; XIE, J.; ZHU, J.; PENG, Y. Ethanol modified supercritical carbon dioxide extraction of flavonoids from *Momordica charantia* L. and its antioxidant activity. **Food Bioprod Process**, v. 90, n. 3, p. 579-587, 2011.

SIQUEIRA, S.; FALCÃO-SILVA, V. S.; AGRA, M. F.; DARIVA, C.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; FONSECA, M. J. V. Biological activities of *Solanum paludosum* Moric. extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction. **J. of Supercritical Fluids**, v. 58, p. 391-397, 2011.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; FAVERI, D. M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics, **J. Food Eng.**, v. 81, p. 200-208, 2007.

WANG, L.; YANG, B.; DU, X.; YI, C. Optimisation of supercritical fluid extraction of flavonoids from *Pueraria lobata*. **Food Chem.** v. 108, p. 737-741, 2008.

YILMAZ, E. E.; ÖZVURAL, E. B.; VURAL, H. Extraction and identification of proanthocyanidins from grape seed (*Vitis Vinifera*) using supercritical carbon dioxide. **J. of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 924-928, 2011.

CONCLUSÕES

Este estudo permitiu ampliar o conhecimento sobre a composição química do gênero *Ouratea* e *Ochna*, através da identificação de outros constituintes de espécies já estudadas e do primeiro relato de investigação química da espécie *Ouratea stipulata*.

Dentre estes constituintes, uma mistura de acil-triterpenos são novos na literatura. Um estilbeno (4) e dois fenilglicosídeos (13 e 14) foram isolado pela primeira vez na família, e no gênero *Ouratea* um cianoglicosídeo (5) e um triterpeno (17).

Os dois biflavonoides isolados de *Ochna serrulata* são marcadores quimiotaxonômicos do gênero e confirmam a classificação botânica da espécie.

Os ensaios biológicos realizados com principais constituintes do gênero *Ouratea*, os biflavonoides, confirmam atividade anticâncer descrita na literatura. Os ensaios anticâncer e de inibição enzimática apresentaram bons resultados, e indicam que as frações podem ser uma boa opção de estudo no desenvolvimento de medicamentos para tratamento de câncer.

Considerações sobre as características: quimiotaxonômicas, etnofarmacológicas e atividades biológicas conduziram a uma análise crítica que adicionou informação ao perfil químico e biológico do gênero *Ouratea*.

A utilização da técnica de extração com fluido supercrítico na obtenção de extrato contendo biflavonoides de *O. hexasperma* mostrou-se viável e as condições utilizadas no experimento permitiram encontrar a região ótima pelo da metodologia de superfície de resposta.