



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO
RIO DE JANEIRO

**CONSTITUINTES QUÍMICOS DE
LUXEMBURGIA NOBILIS EICHL.**

MARCIA CRISTINA CAMPOS DE OLIVEIRA

TESE DE DOUTORADO

2000

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

**CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *LUXEMBURGIA*
NOBILIS EICHL**

**MÁRCIA CRISTINA CAMPOS DE OLIVEIRA
SOB A ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR DOUTOR
MÁRIO GERALDO DE CARVALHO**

**Tese de Doutorado submetida ao Departamento de Química
da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
como parte dos requisitos necessários à obtenção
do grau de Doutor em Química Orgânica
Área de Concentração em Fitoquímica.
Seropédica, Rio de Janeiro
Março, 2000.**

CONSTITUINTES QUÍMICOS DE LUXEMBURGIA NOBILIS EICHL

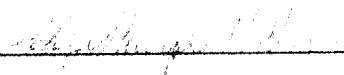
MÁRCIA CRISTINA CAMPOS DE OLIVEIRA

APROVADA EM: 17/03/2000

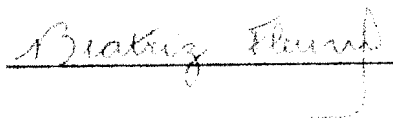
Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho
ICE-DQ-UFRRJ



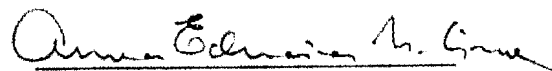
Prof. Dr. Adolfo Henrique Muller
DQ-CCEN-UFPA



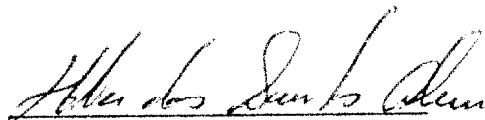
Prof^a. Beatriz Grosso Fleury
IB-UFF



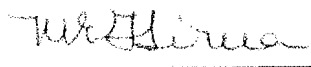
Prof^a. Aurea Echevarria Aznar Neves Lima
ICE-DQ-UFRRJ



Prof. Heber dos Santos Abreu
IF-DPF-UFRRJ



Marco Edilson Freire de Lima
ICE-DQ-UFRRJ (Suplente)



A minha vida

*Sandro Augusto da Costa Dias (in
memorian)*

Aos meus pais

*Reinaldo de Oliveira e
Eivone Campos de Oliveira*

AGRADECIMENTOS

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

À professora Dr.^a Aurea Echevarria pelo seu estímulo e principalmente por sua amizade.

Ao professor Dr. Raimundo Braz-Filho pelas múltiplas contribuições.

Ao grupo de docentes, alunos e funcionários do curso de pós-graduação em química orgânica da UFRRJ pela força e as observações.

Aos amigos que me acompanharam nesta caminhada e aos novos conquistados: Geizi Jane, Tânia, Celso, Cleber, Daniela, Frances, Heloísa, Marco Antônio e Edson.

Ao técnico do herbário Jorge Luís e a professora Alcení pela coleta da planta.

Aos amigos de sempre: Maria Raquel, Edna, Letícia, Miguel, Marco Antônio Maria.

À Margareth Rose por sua amizade verdadeira e sincera por tantos anos.

Aos funcionários Osmar, Reginaldo, Eli, Carlão, Frances, arlete e Aurea pela sua permanente colaboração.

Ao Dr. Kingston da Virginia Polytechnic Institute and Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, USA, por Ter permitido o uso dos espectrômetros de RMN e massas.

A CAPES pelo apoio financeiro.

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

SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ESQUEMAS	xviii
ABREVIATURA E SÍMBOLOS	xviii
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxiii
CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2- OBJETIVOS	26
CAPÍTULO 3- OS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>LUXEMBURGIA NOBILIS</i> EICHL	27
CAPÍTULO 4- PARTE EXPERIMENTAL	
4.1- Métodos gerais	34
4.2- Estudo fitoquímico de <i>Luxemburgia nobilis</i>	37
4.3- Procedimentos gerais	53

CAPÍTULO 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Resumo do estudo fitoquímico	56
5.2- Identificação dos constituintes isolados do extrato hexânico do caule (LNGH)	
5.2.1- Substâncias 53 e 56	57
5.2.2- Substâncias 54 e 55	61
5.2.3- Substâncias 56, 57 e 64	65
5.2.4- Substância 58	76
5.2.5- Substâncias 59 e 60	83
5.2.6- Substâncias 61 e 62	100
5.2.7- Substância 65	112
5.3- Identificação dos constituintes isolados do extrato metanólico do caule (LNGM)	
5.3.1- Substância 63	117
5.3.2- Substâncias 66, 67 e 68	128
5.3.4- Substância 74	136
5.3.5- Substâncias 75 e 76	151
5.3.6- Substância 77	160
5.4- Identificação dos constituintes isolados do extrato hexânico das folhas (LNFH)	167
5.5- Identificação dos constituintes isolados do extrato em acetato de etila das folhas (LNFA)	
5.5.1- Substância 70	168
5.5.2- Substância 71	174
5.5.3- Substância 73	189
5.6- Identificação dos constituintes isolados do extrato metanólico das folhas (LNFM)	
5.6.1- Substância 69	217
5.6.2- Substância 72	221

CAPÍTULO 6- BIOENSAIO DE LETALIDADE FRENTE A <i>ARTEMIA SALINA</i> LEACH.	225
CAPÍTULO 7- CONCLUSÃO	228
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	229

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 1: Constituintes químicos isolados das espécies de Ochnaceae	7
Tabela 2: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbonos do anel C.	17
Tabela 3: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C em CDCl_3 das substância 53 e 56 comparados com os dados de RMN de ^{13}C em CDCl_3 descritos na literatura.	59
Tabela 4: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C das substâncias 54+55 comparados com dados da literatura.	63
Tabela 5: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 57 comparados com a literatura.	74
Tabela 6: Dados de RMN ^{13}C da substância 64 comparados com a literatura.	75
Tabela 7: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 58 comparados com a literatura.	81
Tabela 8: Dados de RMN ^{13}C das substância 61 e 62 comparados com os dados da literatura.	109
Tabela 9: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 65 comparados com a literatura.	116
Tabela 10: Dados de RMN ^1H e ^{13}C do derivado 63a comparados com a literatura.	127
Tabela 11: Dados de RMN ^{13}C das substâncias 66 , 67 e 68 comparados com dados da literatura.	135
Tabela 12: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 74 comparados com a literatura e de ^{13}C do derivado 74a .	150
Tabela 13: Dados de RMN ^1H e ^{13}C , incluindo acoplamento heteronuclear (HMQC e HMBC) das chalconas 75 e 76 e comparação com δ_{C} da isoquilirritigenina.	159

Tabela 14: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C do anel B de 76 com o modelo A .	159
Tabela 15: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 77 e dos δ_{C} registrados na literatura.	166
Tabela 16: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 70 e comparação com dados de carbono-13 registrados na literatura.	173
Tabela 17: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 71 e comparação com dados de δ_{C} registrados na literatura da amentoflavona.	188
Tabela 18: Dados de RMN ^1H e ^{13}C do biflavonóide 73 comparados com os dados da literatura para a 2,3-diidroochnaflavona.	204
Tabela 19: Dados de RMN ^1H e ^{13}C do derivado 73a comparados com os dados da literatura para o pentaacetato da 2,3-diidroochnaflavona.	209
Tabela 20: Dados de RMN ^1H e ^{13}C do derivado 73m	215
Tabela 21: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 69 e comparação com dados de carbono-13 registrados na literatura.	220
Tabela 22: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 72 e comparação com os δ_{C} registrados na literatura da podocarpusflavona A.	224

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: <i>Luxemburgia nobilis</i> – Local Ouro Preto, Morro de São Sebastião-MG	28
Figura 1a: Espécimen de <i>Luxemburgia nobilis</i> Eichl	29
Figura 2: Espectro de massas de 53 .	58
Figura 3: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) dos ácidos graxos 53 + 56	60
Figura 4: Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 90° e 135° (100 MHz, CDCl_3) dos ácidos graxos 53 + 56 .	60
Figura 5: Espectro de massas de 54 e 55 .	61
Figura 6: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos ácidos graxos 54 e 55 .	64
Figura 7: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da mistura dos ácidos graxos 54 + 55 .	64
Figura 8: Cromatograma de CG da mistura de 56, 57 e 64 . Coluna HP-5 (30 m x 0,32 mm), $5^\circ\text{C}/\text{min}$. até 200°C .	65
Figura 8: Espectro de massas de 56 .	66
Figura 9: Espectro de massas de 57 .	67
Figura 10: Espectro de massas de 64 comparado com dados da biblioteca do aparelho.	69
Figura 11: Espectro de I.V. da mistura de 56, 57 e 64	70
Figura 12: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura de 56 57 e 64 .	72
Figura 13: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da mistura de 56, 57 e 64 .	72
Figura 14: Diferenças estruturais para os depsídeos.	75
Figura 15: Espectro de infra-vermelho de 58 .	77
Figura 16: Espectro de RMN de ^1H da substância 58 em CDCl_3 (400 MHz).	78

Figura 17: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância 58 .	79
Figura 18: Espectro de massas de 58 .	81
Figura 19: Espectro de infra-vermelho das substâncias 59 e 60 .	84
Figura 20: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) das substâncias 58 , 59 e 60 .	85
Figura 21: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 da mistura das substâncias 59 e 60 .	86
Figura 22: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz) em CDCl_3 das substâncias 59 e 60 .	87
Figura 23: Espectro DEPT em CDCl_3 das substâncias 59 e 60 .	88
Figura 24: Espectro bidimensional de correlação homonuclear hidrogênio-hidrogênio (^1H , ^1H -Cosy , Homocosy) em CDCl_3 das substâncias 59 e 60 .	90
Figura 25: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear hidrogênio-carbono (^1H , ^{13}C -COSY- ^1J , HMQC) em CDCl_3 das substâncias 59 e 60 .	91
Figura 26: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear hidrogênio-carbono (^1H , ^{13}C -COSY- J^n , $n=2, 3$, HMBC) em CDCl_3 das substâncias 59 e 60 .	92
Figura 27: Espectro de massas das substâncias 59 e 60 .	93
Figura 28: Espectro de massas dos derivados tioésteres 59-1 e 60-1 .	95
Figura 29: Espectro de massas do derivado tiometil do ácido linoleico (DTAL).	97
Figura 30: Conversão do acetil-CoA em AMV. Enzimas: 1- acetoacetyl CoA tiolase; 2- HMG-CoA sintase; 3- HMG-CoA redutase.	100

Figura 31: Conversão do AMV em IPP. Enzimas: 1- AMV quinase; 2- mevalonato-5-fosfato quinase; 3- mevanolato-5-difosfato decarboxilase.	100
Figura 32: Isomerização do IPP e reações através de prenil transferase. Enzimas: 1-IPP isomerase; 2- prenil transferase.	101
Figura 33: Via geral da biossíntese de isoprenos.	102
Figura 34: RMN de ^1H das substâncias 61 + 62 em CDCl_3 (400 MHz).	105
Figura 34a: Expansão do espectro de RMN de ^1H entre 2,2 – 5,8 ppm de 61 + 62 .	106
Figura 35: Espectro de RMN de ^{13}C em CDCl_3 (100 MHz) das substâncias 61+62 .	107
Figura 35a: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C entre 11 – 34 ppm das substâncias 61+ 62 .	107
Figura 35b: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C entre 30 – 74 ppm das substâncias 61+62 .	108
Figura 36: Espectro de massas de 62 comparado com o espectro da biblioteca do aparelho.	110
Figura 37: Espectro de massas de 61 .	111
Figura 38: Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (400 MHz) da substância 65 .	113
Figura 39: Espectro de RMN de ^{13}C em CDCl_3 (100 MHz) de 65 .	114
Figura 40: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT em CDCl_3 (100 MHz) da substância 65 .	115
Figura 41: Espectro de I.V da substância 63 .	117
Figura 42: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da substância 63 em MeD_3OD .	118
Figura 43: RMN de ^{13}C (100 MHz) da substância 63 em DMSO.	119

Figura 44: Espectro de RMN ^{13}C DEPT da substância 63 em DMSO entre 12 –42 ppm.	120
Figura 44a: Espectro de RMN ^{13}C DEPT da substância 63 em DMSO entre 20 –160 ppm.	121
Figura 45: Espectro de I.V da substância 63a .	122
Figura 46: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) do derivado 63a em CDCl_3 .	123
Figura 47: Espectro bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio-hidrogênio ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY) de 63a em CDCl_3 .	124
Figura 48: espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) do derivado 63a em CDCl_3 .	125
Figura 48a: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C entre 10-75 ppm do derivado 63a .	126
Figura 49: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da mistura das substâncias 66 , 67 e 68 em CDCl_3 .	129
Figura 50: Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz) da mistura das substâncias 66 , 67 e 68 em CDCl_3 .	130
Figura 50a: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C entre 14-60 ppm.	131
Figura 51: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT (50 MHz) da mistura de 66 , 67 e 68 em CDCl_3 .	132
Figura 51a: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C DEPT da mistura de 66 , 67 e 68 entre 15 –30 ppm.	133
Figura 51b: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C DEPT da mistura de 66 , 67 e 68 entre 30 –60 ppm.	134
Figura 52: Espectro de infra-vermelho da substância 74 .	140

- Figura 53:** Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da substância **74** em D_3CCOCD_3 . 141
- Figura 54:** Espectro de correlação homonuclear de hidrogênio-hidrogênio (^1H , ^1H -COSY) de **74** em D_3CCOD_3 . 142
- Figura 55:** Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) da substância **74** em D_3CCOD_3 . 143
- Figura 56:** Espectro de RMN de ^{13}C DEPT (50 MHz) da substância **74** em D_3CCOD_3 . 144
- Figura 57:** Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) do derivado **74a** em CDCl_3 . 146
- Figura 58:** Espectro de correlação homonuclear de Hidrogênio-hidrogênio (^1H , ^1H -COSY) da substância **74a** em CDCl_3 . 147
- Figura 59:** Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) do derivado **74a** em CDCl_3 . 148
- Figura 60:** Espectro de RMN de ^{13}C DEPT (50 MHz) do derivado **74a** em CDCl_3 . 149
- Figura 61:** Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da mistura de **75** e **76** em D_3CCOD_3 . 152
- Figura 62:** Espectro de correlação homonuclear de hidrogênio-hidrogênio (^1H , ^1H -COSY, Homocosy) da mistura de **75** e **76** em D_3CCOD_3 . 153
- Figura 63:** Espectro de RMN de ^{13}C (100MHz) da mistura de **75** e **76** em D_3CCOD_3 . 154
- Figura 64:** Espectro de RMN de ^{13}C DEPT (100 MHz) da mistura de **75** e **76** em D_3CCOD_3 . 155
- Figura 65:** Espectro bidimensional de correlação heteronuclear hidrogênio-carbono (^1H , ^{13}C -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$, HMQC) da mistura de **75** e **76** em D_3CCOD_3 . 156

- Figura 66:** Espectro bidimensional de correlação Heteronuclear hidrogênio-carbono (^1H , ^{13}C -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3 , HMBC) entre 115 à 143 ppm da mistura de **75** e **76** em D_3CCOD_3 . 157
- Figura 66a:** Espectro bidimensional de correlação heteronuclear hidrogênio-carbono (^1H , ^{13}C -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3 , HMBC) entre 155 à 195 ppm da mistura de **75** e **76** em D_3CCOD_3 . 158
- Figura 67:** Espectro de I.V da substância **77**. 160
- Figura 68:** Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da substância **77** em DMSO. 161
- Figura 69:** Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) da substância **77** em DMSO. 162
- Figura 70:** Espectro de RMN de ^{13}C DEPT (50 MHz) da substância **77** em DMSO. 163
- Figura 71:** Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) do derivado acetilado da substância **77** (**77a**) em CDCl_3 . 164
- Figura 72:** Espectro resultante da irradiação dupla e subtração de espectros (NOE) do derivado **77am** em CDCl_3 . 165
- Figura 73:** Espectro de I.V da substância **70**. 168
- Figura 74:** Espectro de RMN ^1H (200 MHz) da substância **70** em CDCl_3 . 169
- Figura 74a:** Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância **70** na região entre 0,7-2,4 ppm. 170
- Figura 75:** RMN de ^{13}C (50 MHz) da substância **70** em CDCl_3 . 171
- Figura 76:** Espectro de RMN ^{13}C DEPT da substância **70**. 172
- Figura 77:** Espectro de I.V da substância **71**. 174

- Figura 78:** Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da substância **71** em D_3CCOD_3 com a expansão na região entre 6,0-8,5 ppm. 176
- Figura 79:** Espectro bidimensional de correlação homonuclear hidrogênio-hidrogênio ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY) da substância **71** em D_3CCOD_3 . 177
- Figura 80:** Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância **71** em D_3CCOD_3 . 178
- Figura 81:** Espectro de RMN de ^{13}C DEPT da substância **71** em D_3CCOD_3 . 179
- Figura 82:** Espectro de correlação heteronuclear de hidrogênio-carbono ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$, HMQC) em D_3CCOD_3 . 180
- Figura 83:** Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio- carbono ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2,3$; HMBC) da substância **71** em D_3CCOD_3 , expandido na região δ_{C} : 90-110 ppm. 183
- Figura 83-1:** Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio- carbono ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2,3$; HMBC) da substância **71** em D_3CCOD_3 , expandido na região δ_{C} : 115-140 ppm. 184
- Figura 83-2:** Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio- carbono ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2,3$; HMBC) da substância **71** em D_3CCOD_3 , expandido na região δ_{C} : 155-185 ppm. 185
- Figura 83-3:** Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio- carbono ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2,3$; HMBC) da substância **71** em D_3CCOD_3 , expandido na região δ_{H} : 12,7-13,3 ppm. 186
- Figura 84:** espectro de I.V da substância **73**. 189

Figura 85: Espectro de U.V em metanol da substância 73 .	190
Figura 86: Espectro de massas por impacto de elétrons da substância 73 .	191
Figura 87: Espectro de massas de alta resolução da substância 73 .	191
Figura 88: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da substância 73 em DMSO.	194
Figura 88a: Espectro de RMN de ^1H da substância 73 expandido na região de 5,0 a 8,0 ppm.	194
Figura 89: Espectro de correlação homonuclear de hidrogênio-hidrogênio (^1H , ^1H -COSY) da substância 73 em DMSO.	195
Figura 89a: Espectro de Homocosy da substância 73 expandido na região entre 5 a 8 ppm.	196
Figura 90: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância 73 em DMSO.	197
Figura 90a: Espectro de RMN de ^{13}C da substância 73 expandido na região entre 153 a 168 ppm.	197
Figura 91: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT da substância 73 em DMSO.	198
Figura 91a: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT da substância 73 expandido na região de 94 a 129 ppm.	199
Figura 92: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio- carbono (^1H , ^{13}C -COSY- $^1\text{J}_{\text{CH}}$, HMQC) da substância 73 em DMSO.	199
Figura 92a: Espectro de HMQC da substância 73 expandido na região entre 5 a 8 ppm.	199
Figura 93: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio-carbono (^1H , ^{13}C -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3 , HMBC) da substância 73 em DMSO.	200

- Figura 93a:** Espectros de HMBC da substância **73** expandidos nas regiões em δ_C : 60 a 90 ppm e 100 a 180 ppm. 201
- Figura 93b:** Espectro de HMBC da substância **73** expandido na regiões em δ_C : 70 a 105 ppm. 201
- Figura 93c:** Espectros de HMBC da substância **73** expandidos nas regiões em δ_C : 95 a 170 ppm e 110 a 140 ppm. 202
- Figura 93d:** Espectro de HMBC da substância **73** expandido na região em δ_C : 140 a 180ppm. 202
- Figura 94:** Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) do derivado **73a** em CDCl_3 . 205
- Figura 94a:** Espectro de RMN de ^1H do derivado **73a** ampliado. 205
- Figura 95:** Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) do derivado **73a** em CDCl_3 . 206
- Figura 96:** Espectro de RMN de ^{13}C DEPT do derivado **73a** em CDCl_3 . 207
- Figura 97:** Espectro bidimensional de correlação homonuclear hidrogênio-hidrogênio ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY, Homocosity) do derivado **73a** em CDCl_3 . 207
- Figura 98:** Espectro bidimensional de correlação heteronuclear hidrogênio-carbono ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -COSY- $^1J_{\text{CH}}$, Heterocosity) do derivado **73a** em CDCl_3 . 208
- Figura 99:** Espectro bidimensional de correlação Heteronuclear hidrogênio-carbono ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -COSY, $^nJ_{\text{CH}}$, $n = 2$ e 3 , COLOC) do derivado **73a** em CDCl_3 . 208
- Figura 100:** Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) do derivado **73m** em CDCl_3 . 210

Figura 101: Espectro de RMN de ^{13}C (PND e DEPT) (50 MHz) do derivado 73m em CDCl_3 .	211
Figura 102: Espectro resultante da irradiação dupla e subtração de espectros (NOE) do derivado 73m em CDCl_3 .	212
Figura 103: Espectro bidimensional ROESY do derivado 73m em CDCl_3 .	213
Figura 104: Espectro de correlação heteronuclear de hidrogênio-carbono (^1H , ^{13}C -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$) do derivado 73m em CDCl_3 .	214
Figura 105: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da substância 69 em CDCl_3 .	218
Figura 106: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) da substância 69 em CDCl_3 .	219
Figura 107: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da substância 72 em DMSO.	221
Figura 108: Espectro de correlação homonuclear hidrogênio-hidrogênio (^1H , ^1H -COSY, Homocosy) da substância 72 em DMSO.	222
Figura 109: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) da substância 72 em DMSO.	223

LISTA DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 1: Principais fragmentações para flavonóides.	22
Esquema 2: Preparação dos extratos do caule de <i>Luxemburgia Nobilis</i> .	38
Esquema 3: Preparação dos extratos das folhas de <i>Luxemburgia Nobilis</i> .	39
Esquema 4: Fracionamento do extrato hexânico do caule de <i>Luxemburgia nobilis</i> .	41
Esquema 5: Fracionamento do extrato metanólico do caule de <i>Luxemburgia nobilis</i> .	44
Esquema 6: Fracionamento do extrato hexânico das folhas de <i>Luxemburgia nobilis</i> .	48
Esquema 7: Fracionamento do extrato em acetato de etila das folhas de <i>Luxemburgia nobilis</i> .	49
Esquema 8: Fracionamento do extrato metanólico das folhas de <i>Luxemburgia nobilis</i> .	51
Esquema 9: Fragmentações de massas da substância 53 .	59
Esquema 10: Fragmentações de massas das substâncias 54 e 55 .	62
Esquema 11: Fragmentações de massas da substância 56 .	66
Esquema 12: Fragmentações de massas da substância 57 .	68
Esquema 13: Fragmentações de massas da substância 64 .	68
Esquema 14: Fragmentações de massas da substância 58 .	82
Esquema 15: Fragmentação de massas das substâncias 59 e 60 .	94
Esquema 16: Fragmentações de massas dos derivados tioésteres 59-1 e 60-1 .	97
Esquema 17: Fragmentações de massas do DTAL .	99

Esquema 18: Reações envolvidas na conversão do esqualeno em esteróides	104
Esquema 19: Biossíntese dos flavonóides	137
Esquema 20: Metilação pelo cofator S-adenosil metionina	138
Esquema 21: Transformação do grupo prenila	139
Esquema 22: Fragmentações de massas da substância 73 .	192

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

λ	comprimento de onda de absorção
δ	deslocamento químico
α_D	ângulo de desvio da luz polarizada
μl	microlitros
$[\text{M}^+]$	pico de íon molecular
AcOEt	acetato de etila
CC	cromatografia em coluna
CCDA	cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CCDC	cromatografia em camada delgada circular
CCR	cromatografia circular rotacional
CG-EM	cromatografia de gás acoplada a espectro de massas
CH_2Cl_2	diclorometano
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CoA	coenzima A
COLOC	correlation spectroscopy via long-range couplings
COSY	correlated spectroscopy
d	dubleto
dd	duplo dubleto
DEPT	distortionless enhancement by polarisation transfer
DL_{50}	dose letal
DMSO- d_6	dimetilsufóxido deuterado
EM-FAB	espectroscopia de massas com ionização por bombardeio rápido de átomos
EM-IE	espectroscopia de massas com ionização por impacto de elétrons
ev	elétron volts

FM	fase móvel
FE	fase estacionária
h	horas
HCl	ácido clorídrico
HMBC	heteronuclear multi bond connectivity
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HOMOCOSY	homonuclear correlated spectroscopy
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
Hz	hertz
IV	infra vermelho
J	constante de acoplamento
KBr	brometo de potássio
KOH	hidróxido de sódio
m	multiplete
MeOH	metanol
MHz	mega hertz
ml	mililitros
min.	minutos
m/z	relação massa carga
NaOH	hidróxido de sódio
NaCl	cloreto de sódio
nm	nanômetro
NOE	nuclear overhause effect
NOEDIF	nuclear overhause effect difference spectroscopy
pág.	página
P.F	ponto de fusão
PND	proton noise decoupling
PVP	polivinilpirrolidina

RMN de ^{13}C	ressonância magnética de carbono
RMN de ^1H	ressonância magnética de hidrogênio
ROESY	rotating frame overhause enhancement spectroscopy
s	singleto
sl	singleto largo
t	tripleto
UV	ultravioleta

RESUMO

O presente trabalho descreve o estudo químico das folhas e caule de um espécimen de *Luxemburgia nobilis* (Ochnaceae). As substâncias foram isoladas através de processos cromatográficos dos extratos em hexano, acetato de etila e metanol do caule e folhas da planta. As estruturas das substâncias isoladas foram determinadas através da análise dos dados espectroscópicos no infravermelho, ultravioleta, massas e RMN de ^1H e de ^{13}C uni- e bidimensional das substâncias naturais e de derivados, incluindo comparação com dados da literatura.

O extrato hexânico do caule forneceu β -sitosterol, estigmasterol, ácido betunílico, os ácidos graxos hexadecanóico, tetraeicosanóico, hexaeicosanóico e linoleico, 14-metilpentadecanoato de metila, óxido de 13-epimanoíla, o depsídeo atranorina e dois novos triglicerídeos 2,3-dihexadecanoil-1-*cis,cis*-8,11-eicosadienoil glicerol e 2,3-dihexadecanoil-1-*cis,cis*-6,9-octadecadienoil glicerol. O extrato metanólico do caule forneceu 3-O- β -D-glicopiranosil-sitosterol, α -amirina, β -amirina, lupeol, 4,2',4'-triidroxichalcona, 2,5,3',4'-tetraidroxichalcona, rutina e epicatequina.

Foram isolados do extrato hexânico das folhas o β -sitosterol, os ácidos graxos hexadecanóico, tetraeicosanóico e hexaeicosanóico.

O extrato em acetato de etila forneceu amentoflavona, podocarpusflavona A e um novo biflavonóide 5,7,4'-triidroxiflavona-(3'-O-4')-5,7-diidroxiflavanona (2'',3''diidrochnaflavona) e o extrato metanólico das folhas forneceu friedelinol, 5,7,4'-triidroxiflavona-(3'-O-4')-5,7-diidroxiflavanona (2'',3''diidrochnaflavona) e podocarpusflavona A.

Os dois triglicerídeos e o biflavonóide 2'',3''-diidrochnaflavona são classificados como inéditos na literatura.

Os extratos e o biflavonóide 2'',3''-diidrochnaflavona foram submetidos ao ensaio de letalidade frente a *Artemia salina* Leach e não apresentaram citotoxicidade nas concentrações usadas.

ABSTRACT

This work reports the results from the chemical study of leaves and branches of *Luxemburgia nobilis* (Ochnacea). The compounds were isolated from the hexane and methanol extracts of the branches and hexane, ethyl acetate and methanol of the leaves by chromatographic process. The structures were established by IR, UV, MS and NMR spectral analyses including 2D NMR experiments of the natural compounds and the derivatives and also by comparison from literature data. The hexane extract of the branches afforded β -sitosterol, stigmasterol, betunilic acid, hexadecanoic acid, tetraeicosanoic acid, hexaeicosanoic acid, linoleic acid, methyl-14-methylpentadecanoate, 13-epimanoil oxide, atranorin and two new triglycerides 2,3-diexadecanoyl-1-*cis,cis*-8-11-eicosadienoyl glycerol and 2,3-diexadecanoyl-1-*cis,cis*-6-9-octadecadienoyl glycerol. The methanol extract of the branches afforded 3 β -O-D-glucopyranosil-sitosterol, α -amirin, β -amirin, lupeol, 4,2',4'-trihydroxychalcone, 2,5,3',4'-tetrahydroxychalcone, rutin and epicatequin. The hexane extract of the leaves afforded β -sitosterol, hexadecanoic acid, tetraeicosanoic acid, hexaeicosanoic acid. The ethyl acetate extract of the leaves afforded amentoflavone, podocarpusflavone A, friedelin and the new biflavonoid 5,7,4'-trihydroxyflavone-(3'-O-4')-5,7-dihydroxyflavanone. The methanol extract afforded friedelinol, podocarpusflavone A and 5,7,4'-trihydroxyflavone-(3'-O-4')-5,7-

dihydroxyflavanone. The extracts and 5,7,4'-trihydroxiflavone-(3'-O-4')-5,7-dihydroxyflavanone were not active with *Artemia salina* test.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

A fitoquímica está sendo cada vez mais reconhecida como o principal meio para a busca de princípios ativos e inclusive como uma das mais relevantes áreas relacionadas com a biodiversidade. Neste sentido os estudos relacionados com produtos naturais tem se concentrado principalmente em tópicos biológicos tais como: estudos enzimáticos, ecologia química e quimiotaxonomia. Apesar de se saber pouco sobre as enzimas (suas estruturas, funções, modos de ação, etc.) muitos bioquímicos estão avançando nesta área de conhecimento. Os estudos relacionados com a ecologia química, química, quimiotaxonomia, biotaxonomia e a busca de substâncias com atividade biológica estão relacionados diretamente com o trabalho dos químicos de produtos naturais.

A ecologia química procura entender as funções dos produtos naturais nas plantas e suas interações com o meio ambiente. Na interrelação inseto - planta há várias propriedades orgonolépticas, tais como: odor e cor das flores, valor nutritivo do néctar e pólen. Em relação a cor das flores o grupo mais importante de pigmentos florais são os flavonóides, que contribuem com as cores ciânicas, amarelo e branca¹.

A quimiotaxonomia utiliza a composição química para estabelecer correlações com a classificação morfológica. Como exemplo pode-se citar o caso de alguns gêneros da família Ochnaceae (*Ourateae*, *Luxemburgia*, *Ochna*,...) que são considerados muito complexos morfológicamente, devido ao fato de que várias de suas características se interceptam com as de outros gêneros. Existem trabalhos sobre gêneros da família Ochnaceae onde são citados a frequência de flavonóides sugerindo o possível uso destes metabólitos como marcador sistemático da família.

Ressalta-se que não se deve considerar apenas os esqueletos básicos, já que a ocorrência natural de várias classes de flavonóides não permite estabelecer uma nítida diferenciação entre os gêneros. Neste sentido, Gomes e col. tem levado em consideração os valores médios de oxidação e metilação

para correlacionar os gêneros *Derris* e *Lonchocarpus* pertencentes a família Leguminosae².

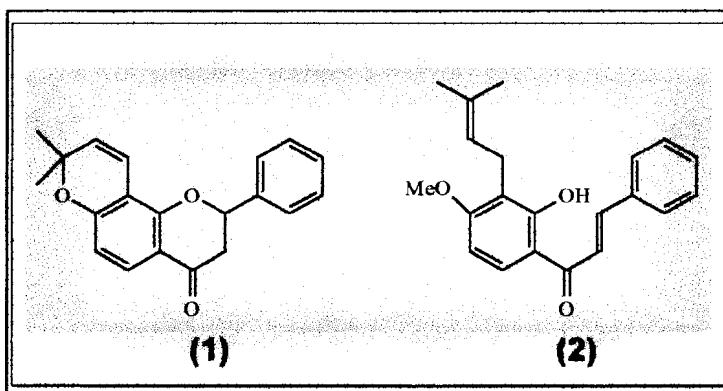
A biotaxonomia visa relacionar o parentesco filogenético entre famílias e tribos através de linhagens químicas. Seguindo esta área sabe-se que Apiaceae e Campanulaceae são os ancestrais mais próximos de Asteraceae, já que as Apiaceae contém lactonas sesquiterpênicas do tipo simples e muitos acetilenos biogeneticamente similares a Apiaceae e Campanulaceae junto com Asteraceae formam os dois únicos grupos conhecidos por acumular inulina (carboidrato tipo frutano). Cálculos de oxidação (para os anéis A e B dos flavonóides), e de proteção (glicosilação e/ou metilação), muito comum em flavonóides, foram feitos por Emerenciano e Gottlieb com a finalidade de montar uma correlação da química com a biotaxonomia das tribos pertencentes a família Asteraceae.^{3,4}

A busca da longevidade e melhoria de vida através de homens mais saudáveis faz com que haja uma síndrome da procura de substâncias naturais bioativas. Entre os mais importantes grupos do metabolismo secundário vegetal citam-se tradicionalmente os alcalóides, os terpenóides e os flavonóides. Os flavonóides possuem várias atividades, podendo atuar como antioxidantes, reguladores de crescimento, polinizadores. Além disso são corantes e tem

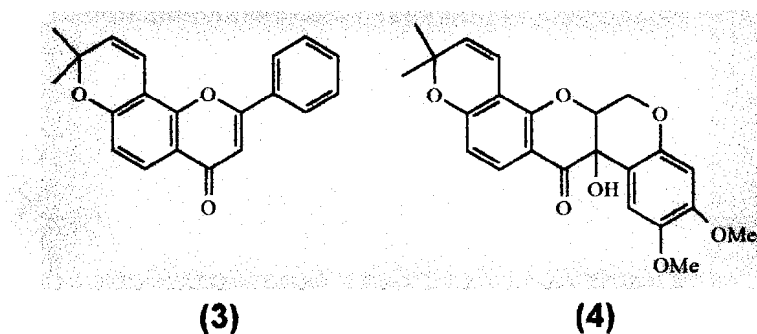
sabor cítrico. A seguir daremos alguns exemplos de atividades de flavonóides citados na literatura:

A- Atividade Antiestimulante Alimentar:

Os flavonóides contendo grupos metil, prenil ou dimetilcromeno são mais ativos do que os correspondentes hidroxilados. Como exemplo temos a flavanona (1) e a chalcona (2).⁵

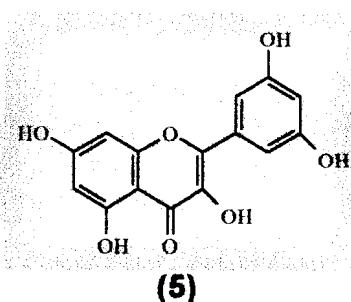


Outro exemplo é a flavona isopongaflavona (3) e o rotenóide tephrosina (4) isolados de *Tephrosia elata*, que apresentam alta atividade contra as espécies de moscas *Spodoptera testulais* e *Eldana saccharina*.⁶

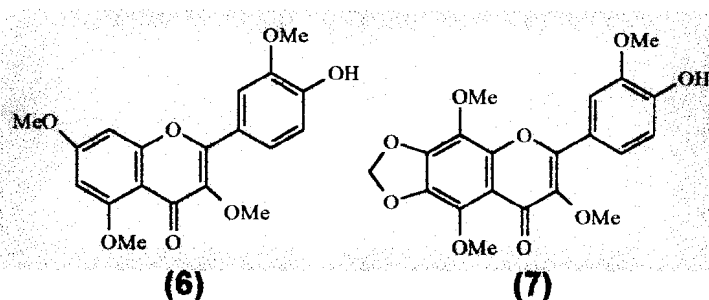


B- Atividade Farmacológica:

Alguns flavonóides podem acelerar ou inibir certas enzimas de crescimento, um exemplo é o flavonol quercetina (5) que inibe o crescimento e proliferação de células malignas e promoção de tumores. Estudos revelaram que 5 inibe a enzima CAMP a qual está associada com tumores mamários.⁷

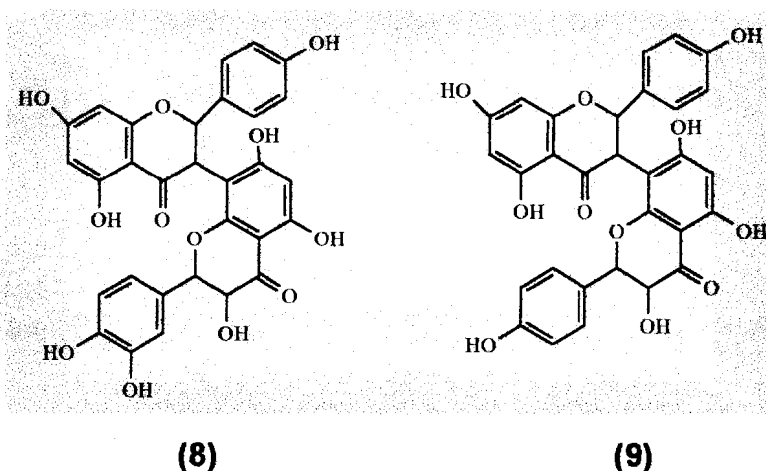


Dois flavonóides muito oxigenados (6 e 7) isolados de *Milocope triphylla* apresentaram atividade citotóxica em sistemas de cultura de células P-388 (leucemia linfocítica de ratos).⁸



Biflavonóides isolados de *Ouratea hexasperma* (28, pág.12) e *Ouratea semiserrata* (71, pág.32) apresentaram inibição do crescimento de tumor murino, efeito antiproliferativo e ativação da apoptosis em tumor de Erlich.^{9,10}

Kolaviron, uma mistura de GB1(8) e GB2(9), foi patenteado para o tratamento de desordens hepáticas, inflamação e infecções da boca.¹¹



Tebonim, medicamento fabricado pela BYK-Química à base de extratos de folhas de *Ginkgo biloba*, a qual é rica em glicosilflavonóides é indicado para insuficiência cérebro vascular, transtornos vasculares periféricos e distúrbios neurosensoriais.¹²

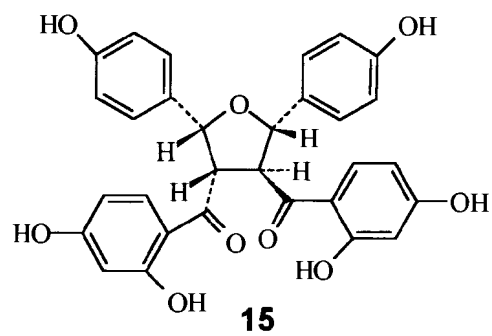
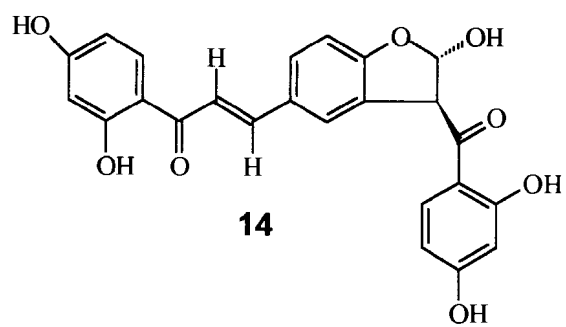
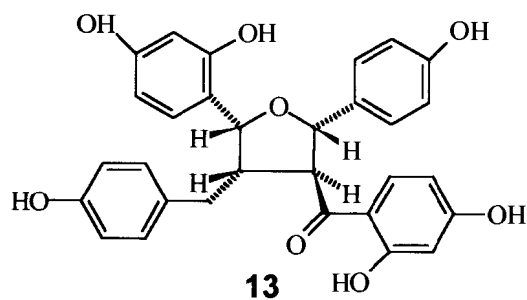
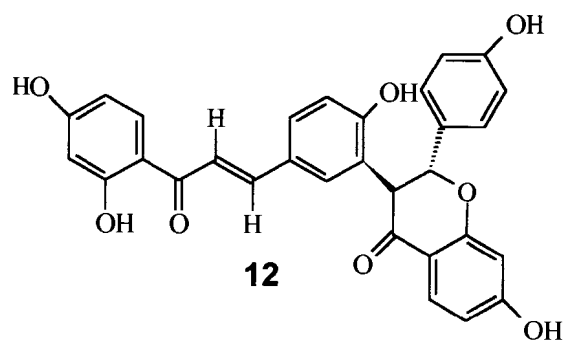
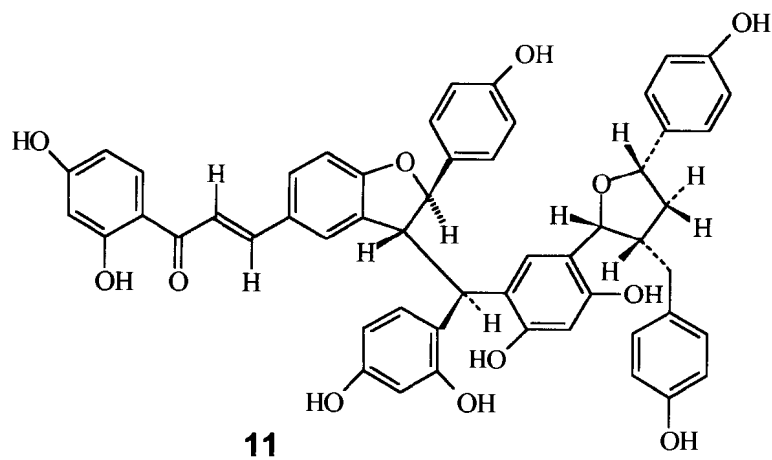
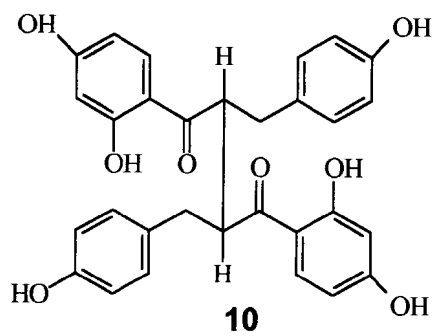
A Ochnaceae tem se destacado por possuir espécies ricas em flavonóides e, com base nos exemplos acima, revelou alguns fatos que

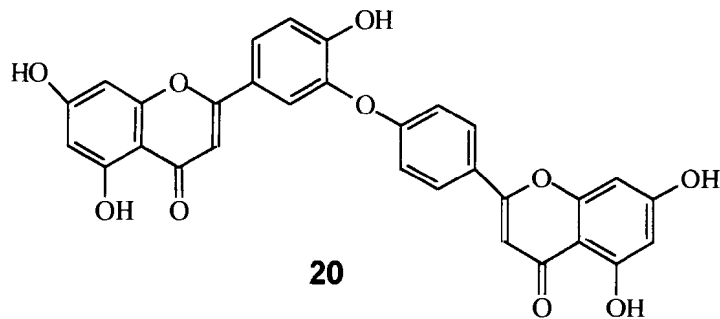
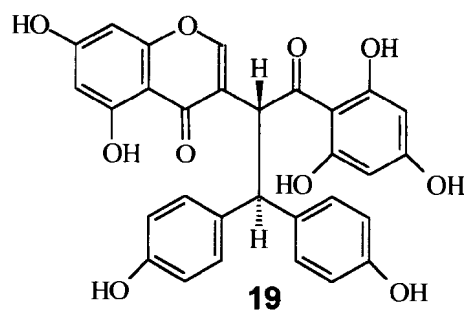
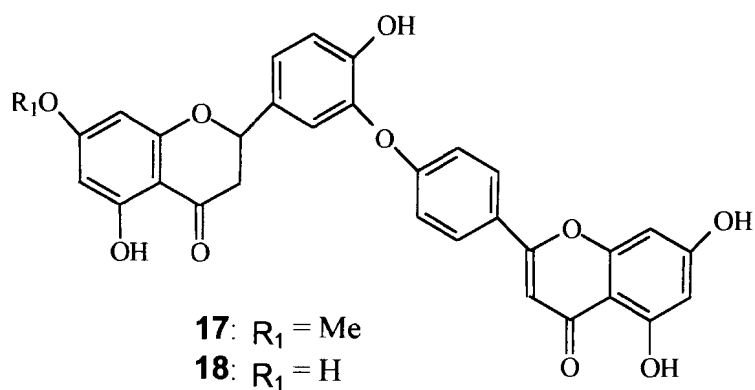
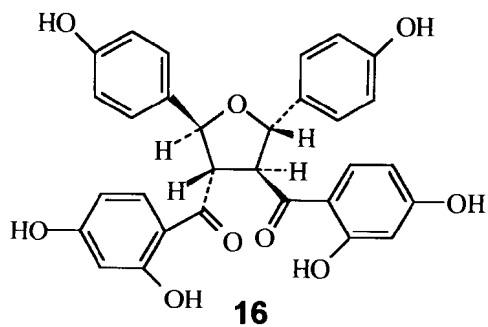
induziram ao desenvolvimento de trabalhos relacionados à química de espécies desta família. A **Tabela 1** mostra todos os constituintes isolados de algumas espécies desta família e a classe dos flavonóides mais freqüentes. Pode-se destacar os biflavonóides como marcadores químicos desta família.

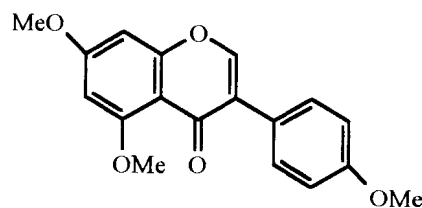
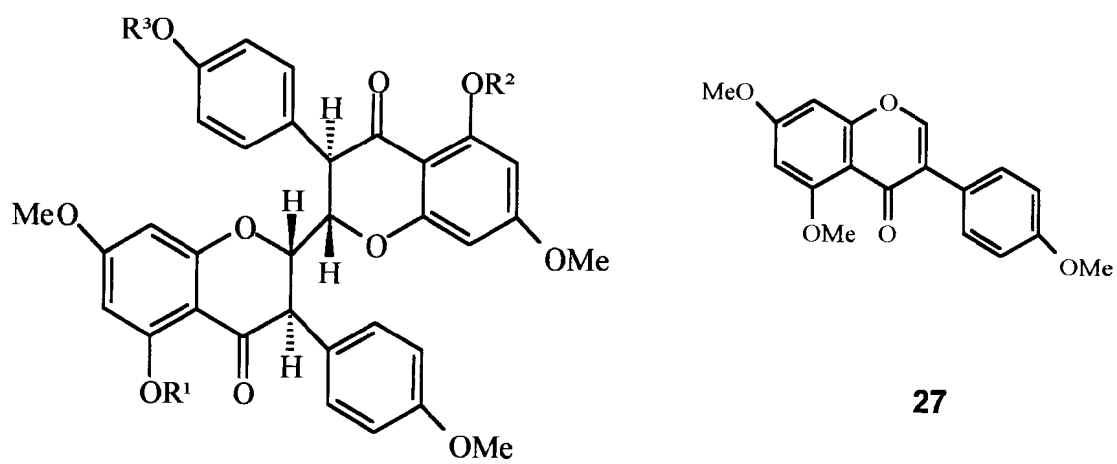
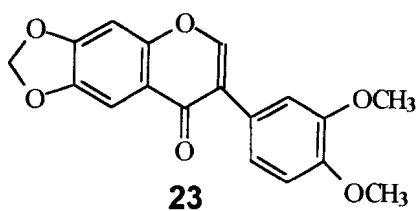
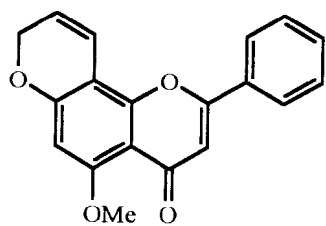
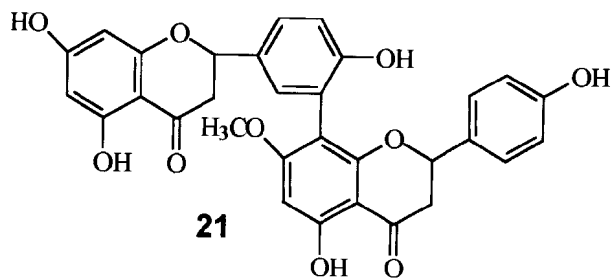
Tabela 1: Constituintes químicos isolados de algumas espécies de Ochnaceae.

ESPÉCIE	CLASSE DAS SUBSTÂNCIAS	REFERÊNCIA
<i>Brackenridgea zanguebarica</i>	-diidrochalcona dimérica: 10 -chalcona: 75	13, 14
<i>Lophira alata</i>	-chalcona dimérica: 11	15
<i>Lophira lanceolata</i>	-biflavonóides: 12, 13	16
	-tetraflavonóide: 14	17
	-chalcona dimérica: 11 -bichalconas: 15, 16	18
<i>Ochna calodendron</i>	-isobiflavonóide: 17	19
<i>Ochna obtusata</i>	-biflavonóides: 18, 19	20
<i>Ochna pumila</i>	-biflavonóides: 20, 21	21

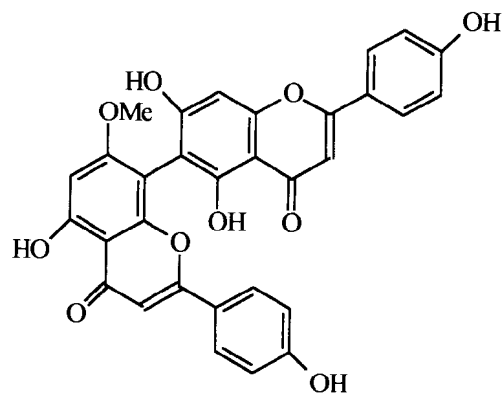
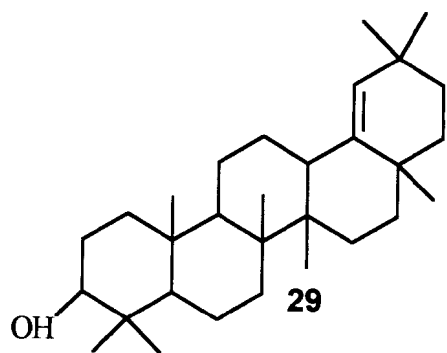
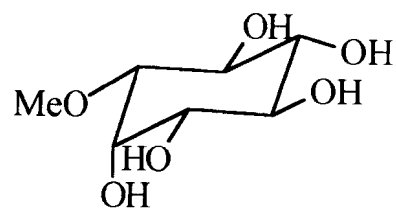
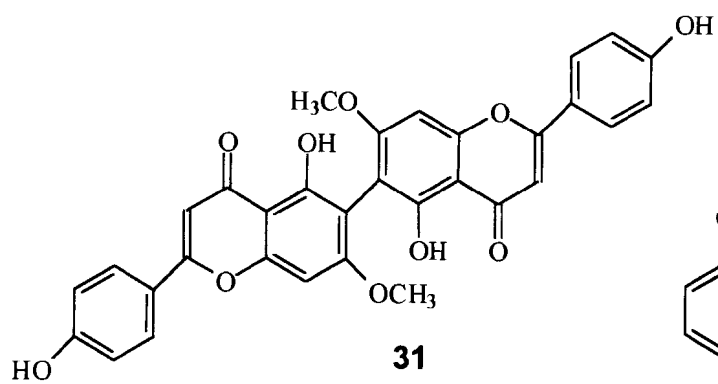
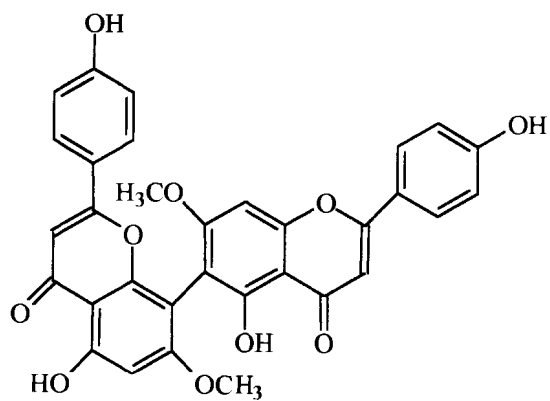
<i>Ochna squarrosa</i>	-biflavonóide: 20 -flavona: 22 -isoflavona: 23	22 23 24
<i>Ouratea affinis</i>	-cianidina, flavonóides	25
<i>Ouratea cuspidata</i>	-carboidratos: sacarose, frutose e 3,6-metoxi-anidro- α -D-glucopiranosose	26
<i>Ouratea floribunda</i>	-terpenóides: 69-70 -depsídio: 58	27
<i>Ouratea hexasperma</i>	-biisoflavonas: 24-26 -isoflavona: 27 -biflavanóide: 28 -terpenos: 29, 66- 68 -carboidrato: 30	28 29 30
<i>Ouratea spectabilis</i>	- biflavonóides: 31- 32	31
<i>Ouratea semiserrata</i>	-flavonóide: 77 ; -biflavonóides: 33-36 e 71-72 ; - isoflavonas: 37-38 ; -carboidratos: 39-40 ; -derivados da glicose: 41-43 ; -esteróides: 44-45 e 61-62 ; - triterpenos: 66 e 70 ; -diterpeno: 46 ; -lignanas: 47- 48 ; -norisoprenóide: 49	32
<i>Ouratea sp.</i>	Ourateacatequina: 50 ; proantocianidina: 51 biscatequina: 52	33 34
<i>Ouratea parviflora</i>	- biflavonóide: 32	35
<i>Luxemburgia nobilis</i>	Capítulo 3	Este trabalho

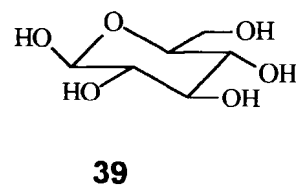
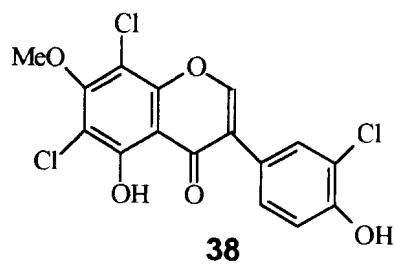
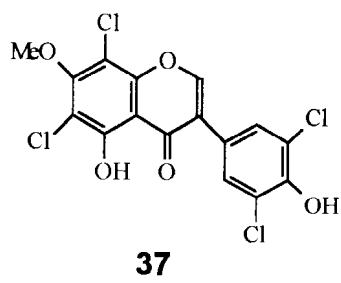
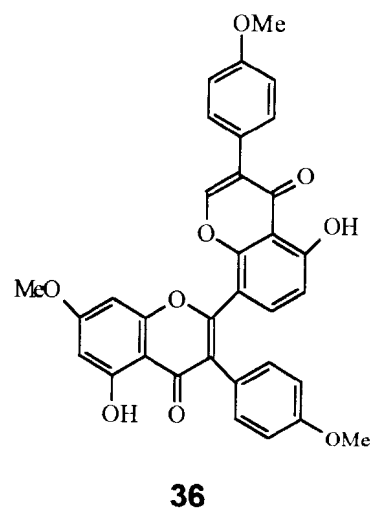
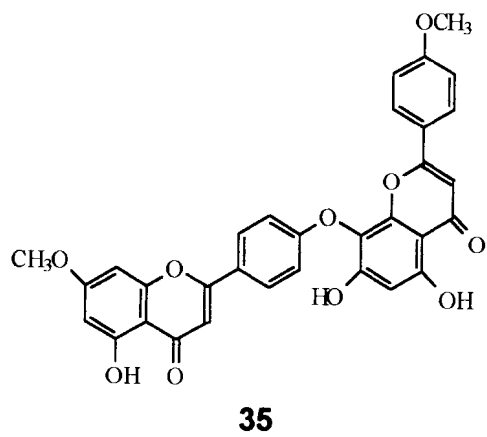
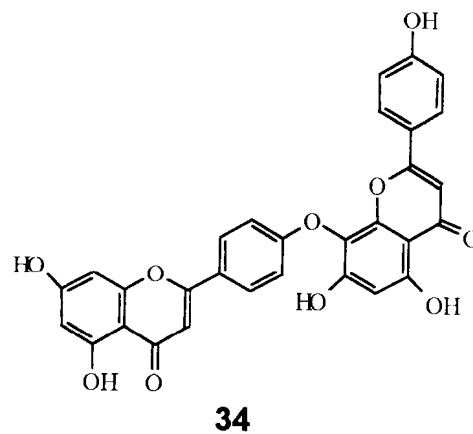
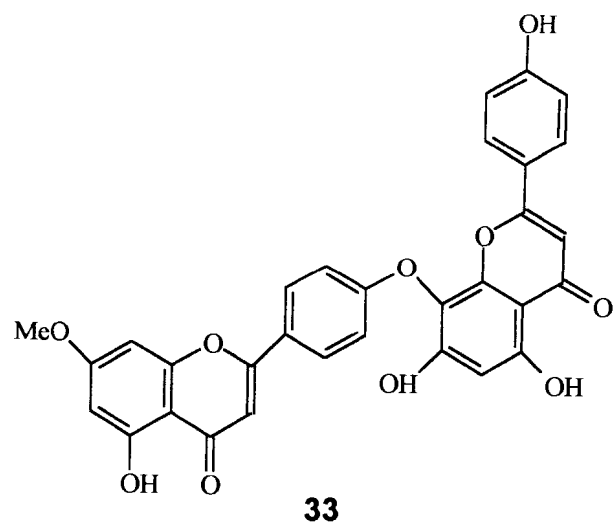


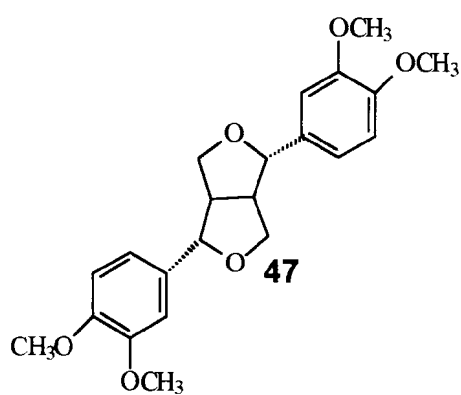
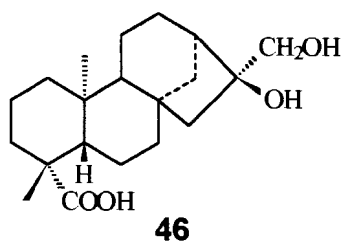
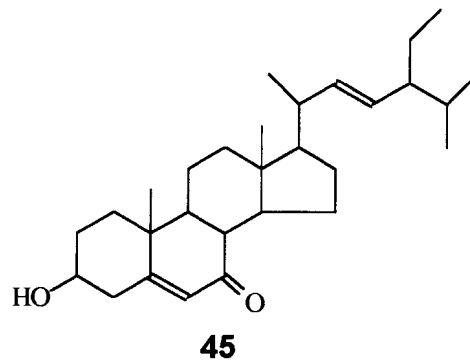
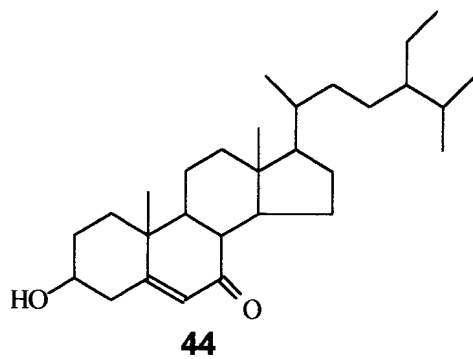
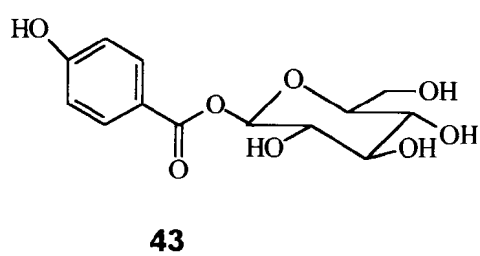
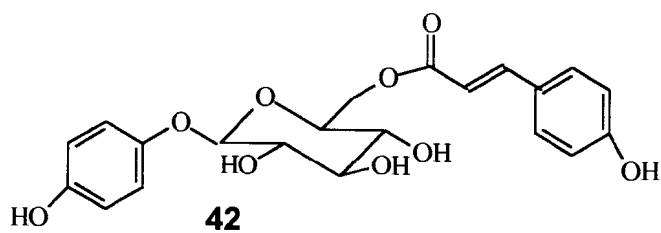
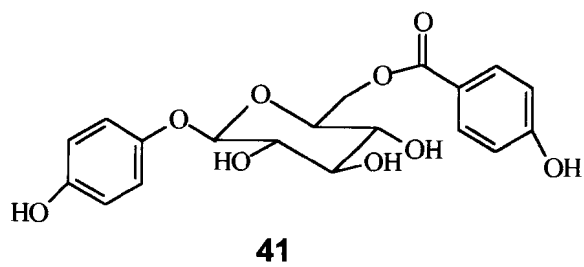
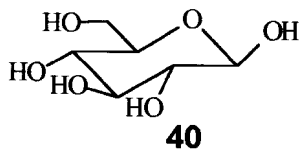


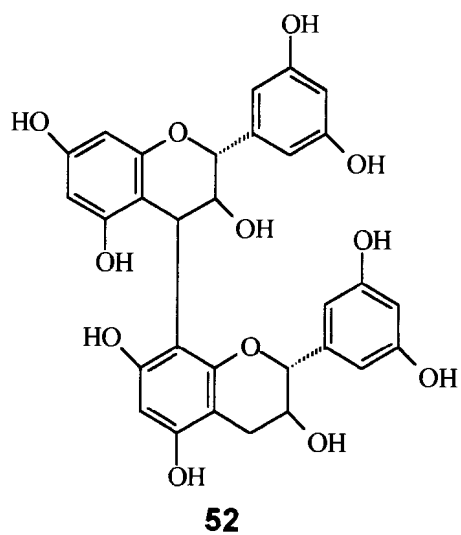
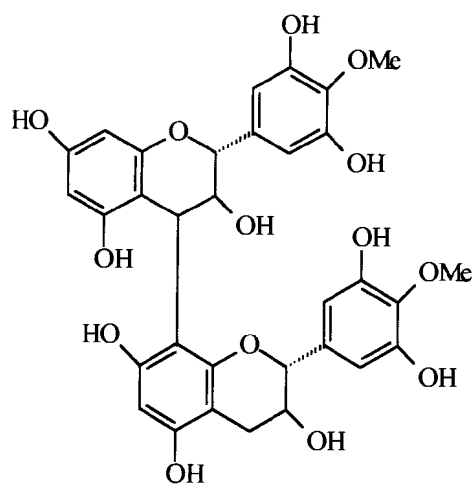
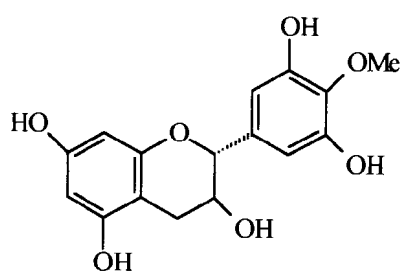
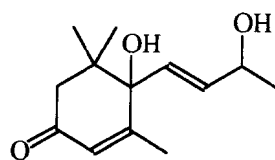
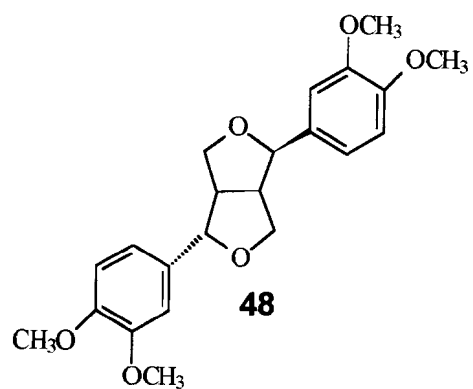


	R ¹	R ²	R ³
24	H	H	Me
25	H	Me	H
26	H	H	H

**28****29****30****31****32**







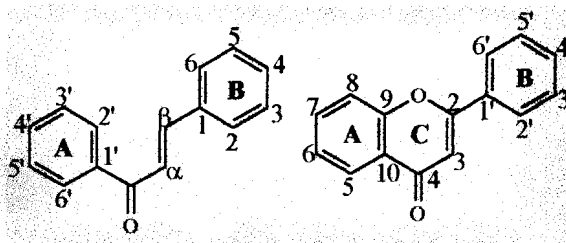
Via de regra os flavonóides são substâncias muito estáveis e facilmente isoláveis dos extratos de plantas através de diversos métodos cromatográficos. Nos últimos anos a aplicação de CLAE para a detecção e isolamento destes compostos vem se destacando na literatura, um bom exemplo é o estudo que resultou na detecção de vários flavonóides em amostras de própolis.³⁶

As estruturas dos flavonóides podem ser elucidadas através do uso de métodos físicos de análise estrutural como: infravermelho, ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas e ultra-violeta.

A seguir, descreveremos brevemente a importância de cada método espectroscópico na análise de flavonóides, sendo que os detalhes, quando necessários, serão discutidos durante o texto.

- Ressonância Magnética Nuclear : os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C são os mais informativos, a literatura revela excelentes trabalhos de revisão.^{37,38,39} Com o avanço de novas técnicas, tais como ROESY, NOE e espectros bidimensionais (COSY, HMQC e HMBC), é possível atribuir muitos dados com segurança, dentre eles os deslocamentos químicos dos carbonos quaternários. A **Tabela 2** mostra os deslocamentos químicos característicos esperados para hidrogênios e carbonos do anel C ou da unidade C_3 dos flavonóides.

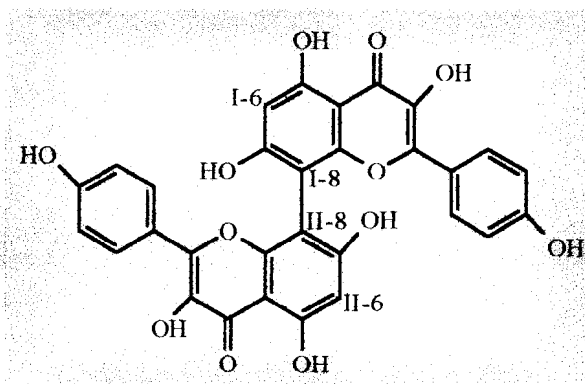
Tabela 2: Deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos do anel C.*



Flavonóides (pág. 136)	H-2 (C-2)	H-3 (C-3)	(C-4)
Flavona (87)	----- (162,2)	6,3 (107,2)	(177,4)
Isoflavona (88)	7,6-7,9 (151,5)	----- (124,6)	(175,5)
Flavanona (79)	5,0-5,5 (79,5)	2,8 (43,9)	(190,2)
Flavanonol (81)	4,8-5,0 (84,3)	4,1-4,3 (73,1)	(192,2)
Flavana 3, 4-diol (83)	----- (81,1)	----- (71,4)	(74,0)
	H- α (C- α)	H- β (C- β)	(C=O)
Chalcona(78)	6,7-7,4 (116,6- 128,1)	7,3-7,7 (136,2- 145,4)	(188,6-194,6)
Diidrochalcona(80)	----- (44,5)	----- (30,0)	(200,7-203,1)

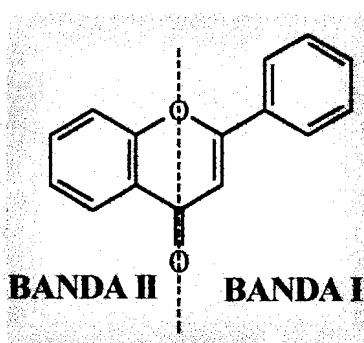
*Os valores de deslocamento químico são dados em ppm.

Para a elucidação estrutural de biflavonóides, as técnicas bidimensionais de RMN tem contribuído significativamente na determinação da posição da ligação entre as unidades flavonoídicas. Na maioria dos biflavonóides os monômeros estão ligados através da ligação C-C tendo geralmente o anel A envolvido. As combinações mais comuns são: (I-6, II-6), (I-6, II-8), (I-3', II-6), (I-8, II-8), (I-3', II-8) e (I-3, II-8). Biflavonóides com ligação C-O-C são minoritários. Na determinação estrutural de biflavonóides o problema maior está na definição da união entre as unidades. Para isso, além de verificar a presença ou ausência de sinais de hidrogênio e carbono, usa-se os espectros 2D (^1H - ^{13}C -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$) para tirar esta conclusão. Como modelo tem-se a (I-8, II-8 cupressuflavona), onde o δ_{CH} de I-6 e II-6 é de 99,0 ppm e não apresenta outro valor de δ_{CH} nesta região, entretanto a presença δ_{C} 98,7 ppm revela a possibilidade da ligação interflavonoídica entre I-8 e II-8. Através do ^{13}C - ^1H -COSY- $^3\text{J}_{\text{CH}}$ foi observado o acoplamento do carbono I-8 com o hidrogênio I-6, confirmando que o C-8 do anel A esta envolvido na ligação entre os monômeros⁴⁰. Outra forma de confirmar esta ligação é a preparação de derivados acetilados ou metilados para uso de outras técnicas na definição da ligação entre os monômeros.



Cupressuflavona

- Ultravioleta: é muito útil para análise de flavonóides,⁴¹ pois estes dão espectros característicos conforme o esqueleto, onde a diferença se encontra na intensidade e deslocamento das duas bandas características observadas (Banda I - sistema cinamoíla e banda II – sistema benzoíla).



A obtenção dos espectros de U.V com aditivos fornecem informações do padrão de substituição, os aditivos são:

☛ Solução Aquosa de NaOH 20%

A base forte ioniza o grupo –OH localizado em qualquer posição do esqueleto flavanoídico. A inalteração do espectro de U.V. indica a ausência do grupo –OH.

☛ Solução de HCl concentrado (d= 1,18)

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

☛ Acetato de sódio anidro

Confirmada a presença de grupamento –OH através da adição de NaOH, o uso de acetato de sódio anidro proporciona a ionização somente dos grupos –OH em C-7 nos flavonóides e C-4' nas flavonas. Deslocamento batocrômico de 5 a 20 nm da banda II em presença de acetato de sódio é indicativo da existência de grupo –OH em C-7.

☛ Acetato de sódio + ácido bórico.

O ácido bórico em presença de acetato de sódio forma complexo com sistema orto-dihidroxiado. A formação de complexos envolvendo sistema orto-dihidroxi localizado no anel B de flavonas, provoca deslocamento batocrômico de ordem de 12 a 30 nm da banda I.

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

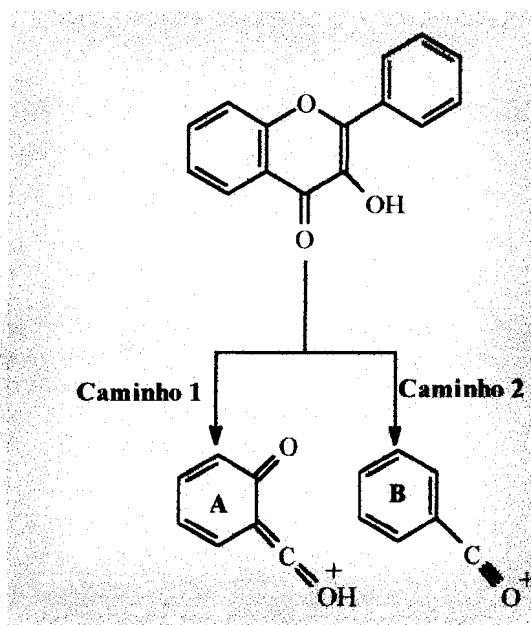
O tricloreto de alumínio forma complexo com sistema orto-dihidroxi e 5-hidroxi ou 3-dihidroxiado. A formação de tais complexos é revelada pelos deslocamentos batocrômicos observados nos máximos de absorção do espectro U.V. em presença deste aditivo. Os complexos que envolvem o sistema orto-dihidroxi são decompostos pela adição de ácidos e os complexos que envolvem o grupo carbonila e o grupo hidroxila em 3 ou 5 apresentam-se estáveis com adição de ácido.

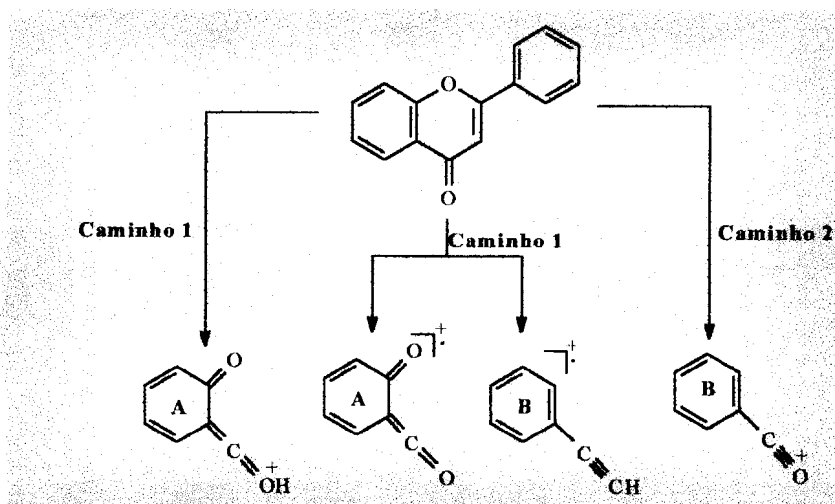
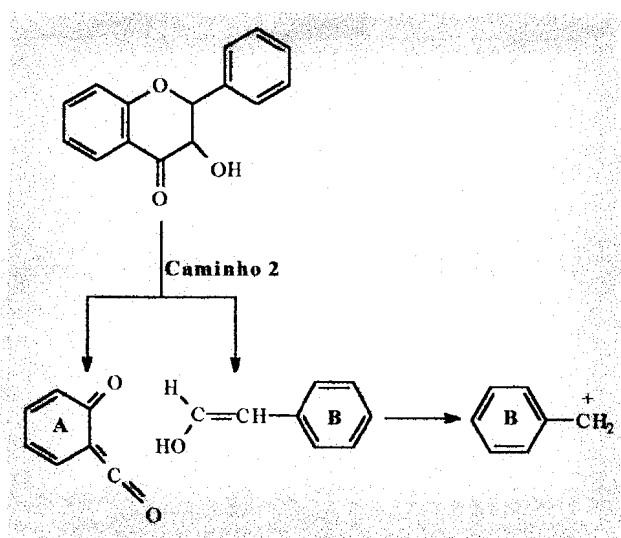
- Espectrometria de massas:⁴¹ é muito usada para confirmar a localização dos substituintes presentes nos anéis A e B. Geralmente apresentam íons moleculares intensos e no caso de flavonóides contendo o anel C (heterociclo), propõe-se dois caminhos de

fragmentação principais (**Esquema 1**), sendo que o caminho 1 ocorre com transferência de elétrons e o caminho 2 corresponde a uma clivagem retro Diels-Alder do anel C.

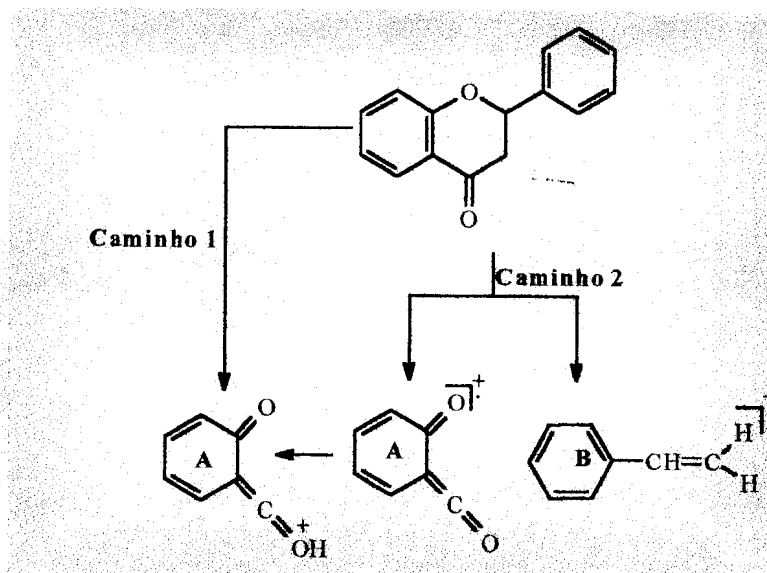
Esquema 1: Principais fragmentações para flavonóides.

* **Flavonóis**



* Flavonas* Flavanonóis

Flavanonas



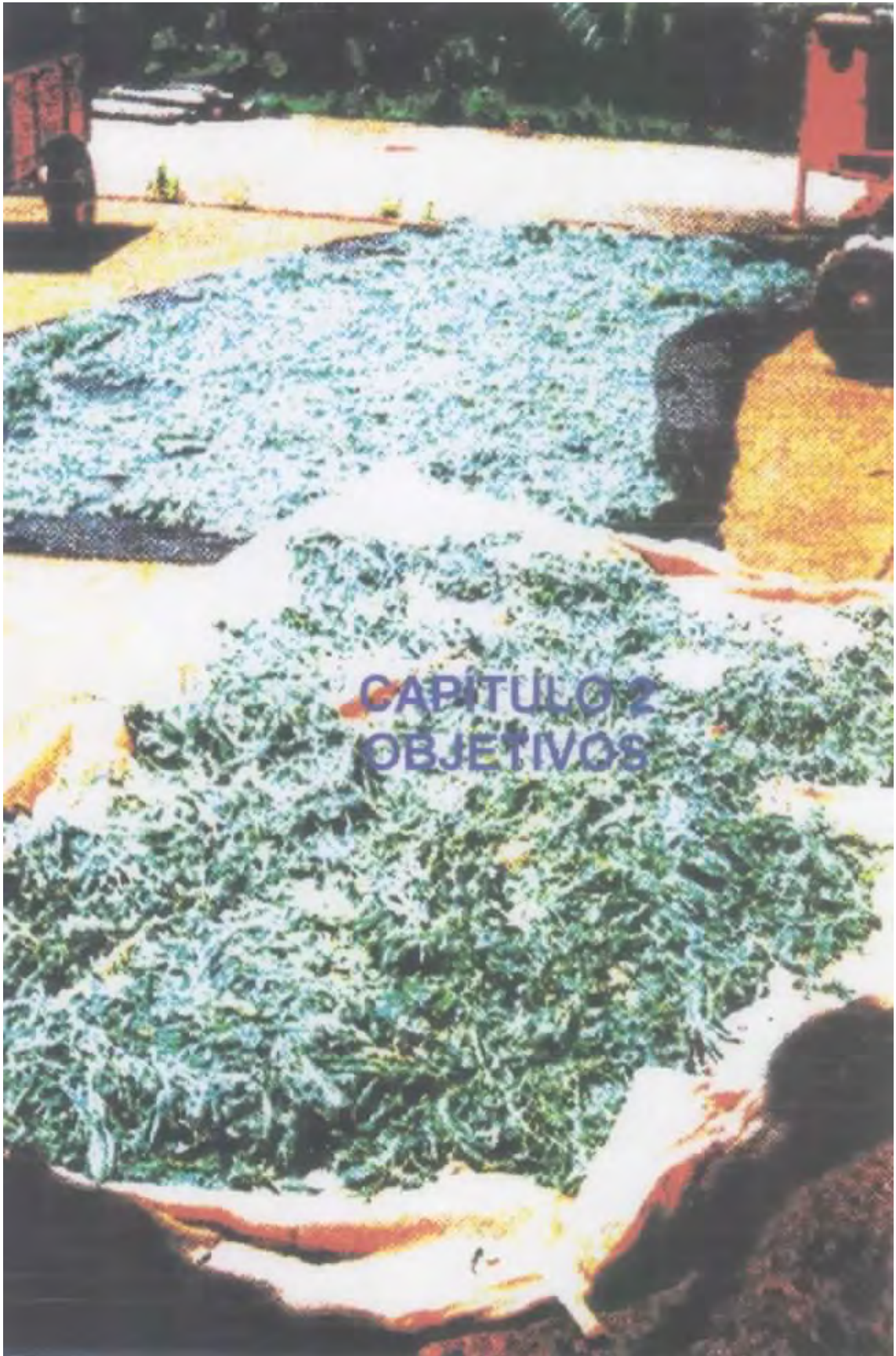
Dispersão óptica rotatória e dicroísmo circular:^{42,43} As propriedades quirópticas estão relacionadas com substâncias opticamente ativas e são detectadas através da interação destas com a luz polarizada. As técnicas usadas para avaliar esta rotação óptica são: dispersão óptica rotatória (DOR) e dicroísmo circular (DC).

Estas técnicas são usadas na análise conformacional ou determinação da configuração absoluta de uma substância. A princípio a atividade óptica é determinada através da avaliação da

magnitude do efeito Cotton (anomalia na curva de DOR ou máximos na curva de DC), que é usado na definição da configuração relativa, análise conformacional e configuração absoluta de estereocentros.

Sabe-se que para as 2S-flavanonas o efeito Cotton é positivo e independe do padrão de substituição do anel B. As biflavanonas não possuem um centro quiral mas, são opticamente ativas e estáveis à temperatura ambiente em uma dada conformação devido ao atropisomerismo. Este tipo de isomeria óptica resulta da rotação restrita em ligações simples quando a barreira rotacional é suficientemente elevada e isto pode ser usado na distinção destes isômeros através da comparação das curva de DC.

Infravermelho: o desenvolvimento das técnicas modernas de RMN está fornecendo informações estruturais cada vez mais completas, deixando a análise dos espectros no infravermelho rotineiramente limitada à constatação da presença de grupos funcionais tais como: hidroxila, carbonila, alceno, aromático.



CAPÍTULO 2
OBJETIVOS

2- OBJETIVO

O objetivo deste trabalho está dividido em duas partes:

1º) ESTUDO FITOQUÍMICO de *Luxemburgia nobilis*.

2º) AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE dos extratos e substâncias isoladas quantitativamente, através do bioensaio preliminar conhecido como Ensaio de Letalidade de *Artemia salina* Leach (ELAs).

CAPÍTULO 3
OS CONSTITUENTES QUÍMICOS DE
LUXEMBURGIA NOBILIS

3- LUXEMBURGIA NOBILIS EICHL E SEUS CONSTITUINTES QUÍMICOS

A família Ochnaceae possui cerca de 28 gêneros e 400 espécies tropicais e subtropicais. No Brasil, ocorrem aproximadamente 9 gêneros com 105 espécies⁴⁴. Dentre elas encontra-se *Luxemburgia nobilis* Eichl cujo trabalho fitoquímico esta sendo realizado pela primeira vez pelo Grupo de Produtos Naturais (GPN) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Luxemburgia nobils Eichl (**Figura 1a e 1b**) é uma espécie arbórea de médio porte, de efeito decorativo durante o período de floração e ocorre predominantemente no sudeste do Brasil. O material do espécime em estudo tem a seguinte classificação:

Classe:	Angiospermae
Subclasse:	Dilleniaceae
Superordem:	Dillenidae
Ordem:	Theales
Família:	Ochnaceae
Gênero:	<i>Luxemburgia</i>
Espécie:	<i>Luxemburgia nobilis</i>



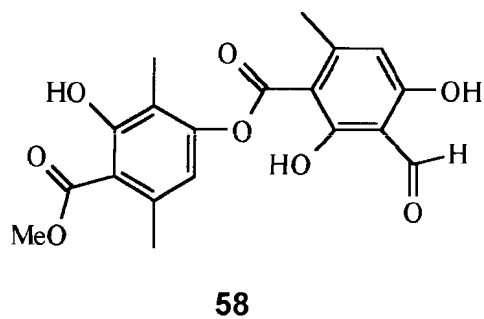
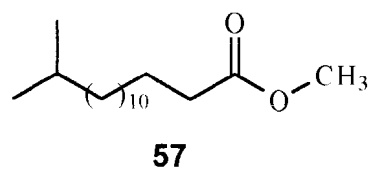
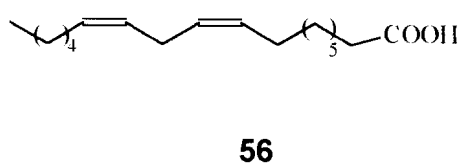
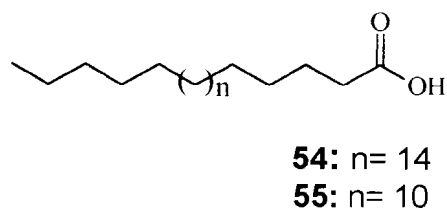
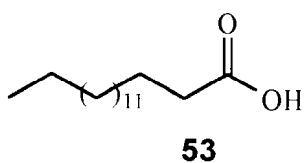
Figura 1a: *Luxemburgia nobilis* – Local Ouro Preto, Morro de São Sebastião - MG.



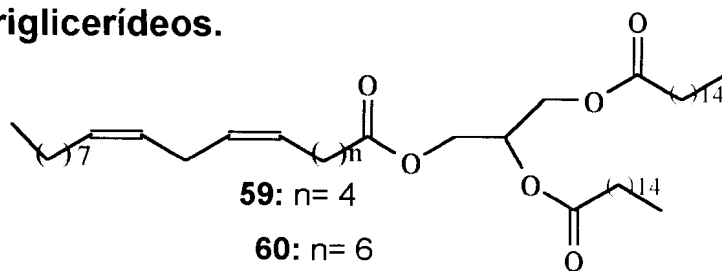
Figura 1a: Espécime de *Luxemburgia nobilis* Eichl

O estudo das folhas e caule de *Luxemburgia nobilis* Eichl permitiu o isolamento e a caracterização de ácidos graxos (**53-56**), ésteres (**57**), depsídeo (**58**), triglicerídeos (**59-60**), esteróides (**61-63**), terpenóides (**64-70**), flavonóides (**71-77**).

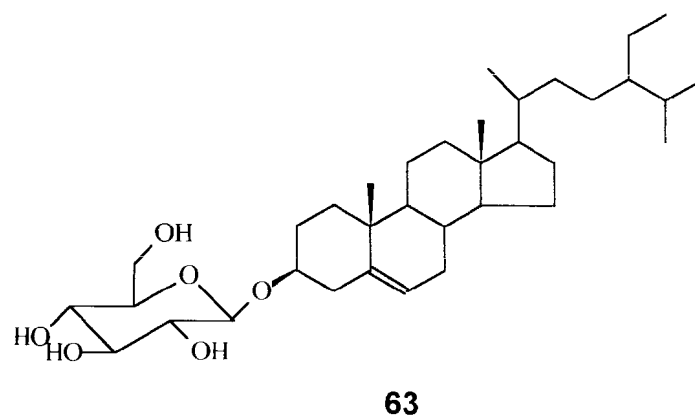
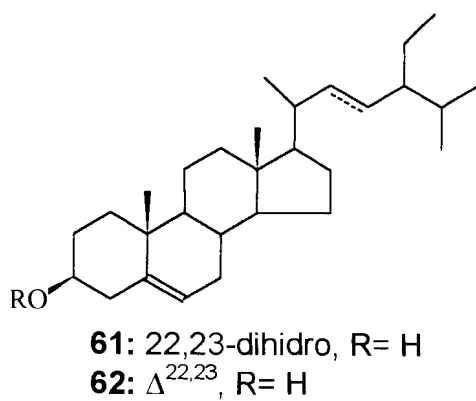
3.1- Ácidos graxos, ésteres e depsídeo.



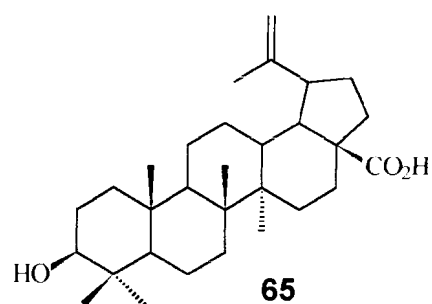
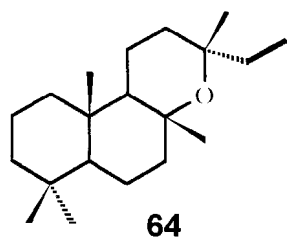
3.2- Triglicerídeos.

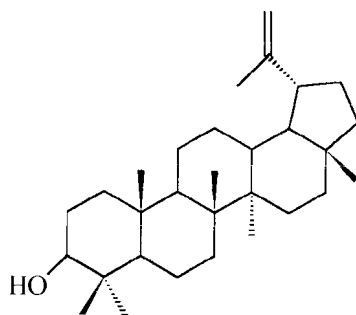


3.3- Esteróides.

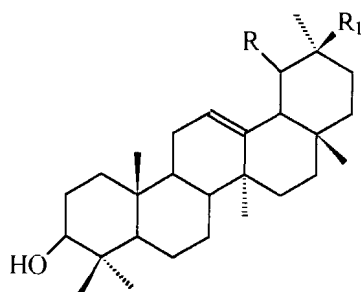


3.4- Terpenóides.

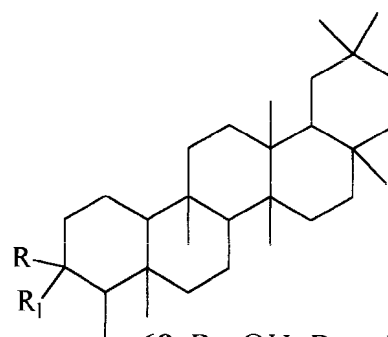




66

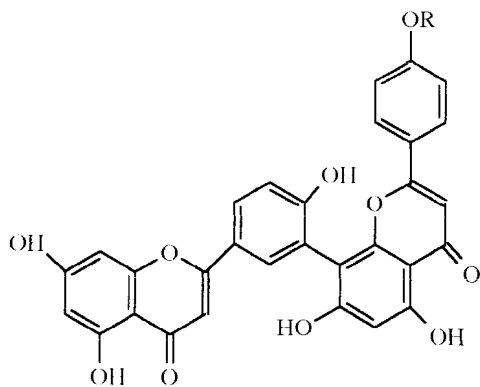


67: R= Me, R₁= H
 68: R= H, R₁= Me

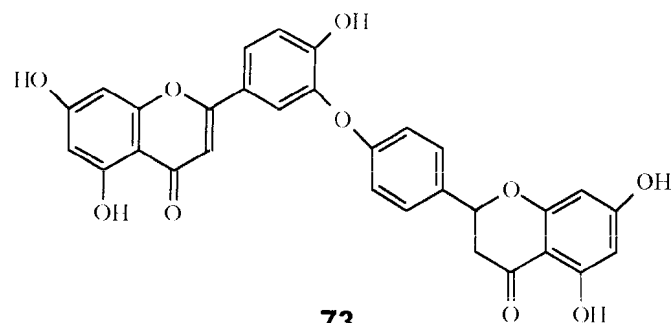


69: R= OH, R₁= H
 70: R, R₁= O

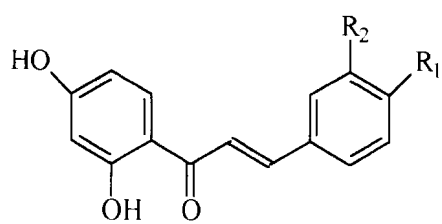
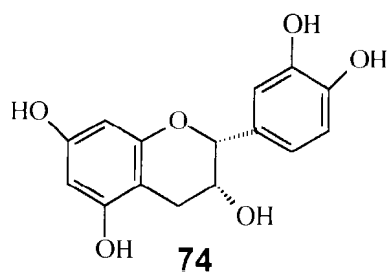
3.5- Flavonóides



71: R= H
 72: R= Me

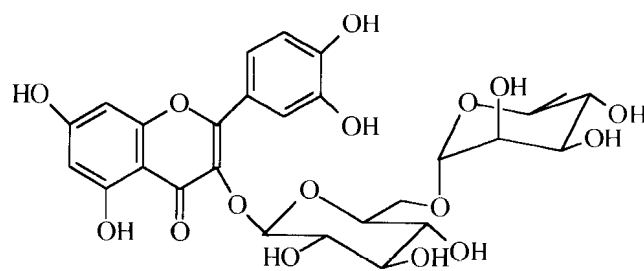


73



75: R₁ = OH, R₂ = H

76: R₁ = R₂ = OH



CAPÍTULO 4
PARTE EXPERIMENTAL

4- PARTE EXPERIMENTAL

4.1- Métodos gerais:

- Os pontos de fusão foram determinados com a ajuda de uma placa aquecedora de Reicherd, acoplada a um microscópio ou em aparelho melt-temp e, não foram corrigidos.
- Os espectros de absorção no infra-vermelho (I.V.) foram registrados em um espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo 1600 com transformada de Fourier, em pastilhas de KBr ou em filmes sobre cela de NaCl.
- O espectro de absorção no ultravioleta (U.V.) foi registrado em um espectrofotômetro UV/VIS DMS-80 da Varian. O solvente utilizado foi metanol (grau espectroscópico) e cela de quartzo de 1 cm.

- Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono (RMN ^{13}C) foram registrados em espectrômetros Varian Gemini-300 (300 MHz), Varian Unit-400 (400 MHz), Bruker AC-200 (200 MHz) e Bruker AC-400 (400MHz). Os solventes utilizados foram clorofórmio deuterado (CDCl_3), metanol deuterado (MeOD), acetona deuterada (D_3CCOCD_3), dimetilsufóxido (DMSO), utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) são indicados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).
- Os espectros de massas (E.M.) foram obtidos em um espectrômetro VG Quatro-GC 8000 triple quatripolo/GD/MS-MS, com um fluxo de gás de 15ml/min (12 psi He), temperatura final de 200 °C, pressão 1.10^{-4} mbar, coluna HP-5 (30m x 0,32 mm), tendo como solvente CH_2Cl_2 , e espectrômetro Varian Mat 311 por impacto eletrônico à 70 eV e em um espectrômetro Perkin-Elmer 1500.
- As cromatografias em camada analítica foram realizadas em sílica gel PF₂₅₄ da Merck, sobre suporte de vidro ou alumínio (espessura 0,25 mm). A detecção dos compostos foi feita por irradiação com lâmpada ultravioleta (254 e 356 nm), com vapores de iodo e com solução de vanilina (0,5 g)/ $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}$ (40:10) -100 ml.

- As cromatografias em camada preparativa (CCP) foram realizadas em sílica gel PF₂₅₄ da Merck, sobre suporte de vidro (espessura 1 mm). Os compostos foram detectados por irradiação com lâmpada ultravioleta.
- As cromatografias em coluna rápida (flash) foram realizadas em sílica gel-60 0,037 a 0,062 mm da Merck.
- As cromatografias em coluna foram feitas com sílica gel-60 da Merck, partículas 0,063 a 0,210 mm e sephadex LH-20 (0,025 a 0,100 mm) da Sigma.
- A cromatografia rotacional circular foi realizada em aparelho Chromatotron®, utilizando como adsorvente sílica gel-60 da Merck com espessura de 2 mm.

4.2- Estudo fitoquímico de *Luxemburgia nobilis*:

4.2.1- Material vegetal:

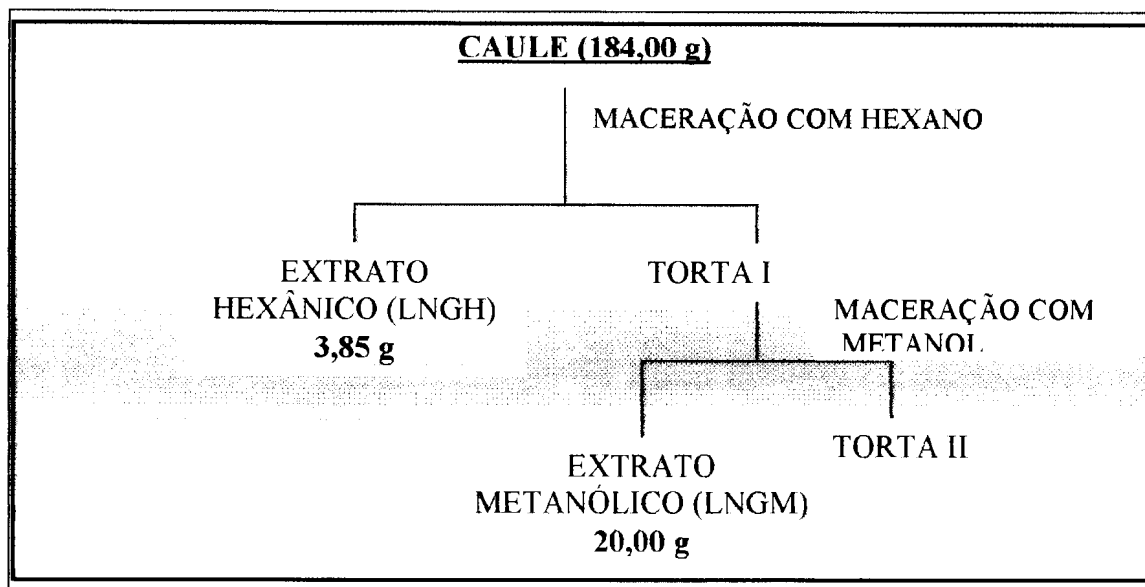
As folhas e caule de um espécimen de *Luxemburgia nobilis* foram coletadas em Morro de São Sebastião, Ouro Preto, Minas Gerais, em 1995 pelo técnico de herbário Jorge Luís da Silva com o auxílio da Doutora Alcení Augusta Werle. A identificação foi feita comparando com a exicata #6737, preservada no Herbarium José Badini do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

4.2.2- Elaboração dos extratos

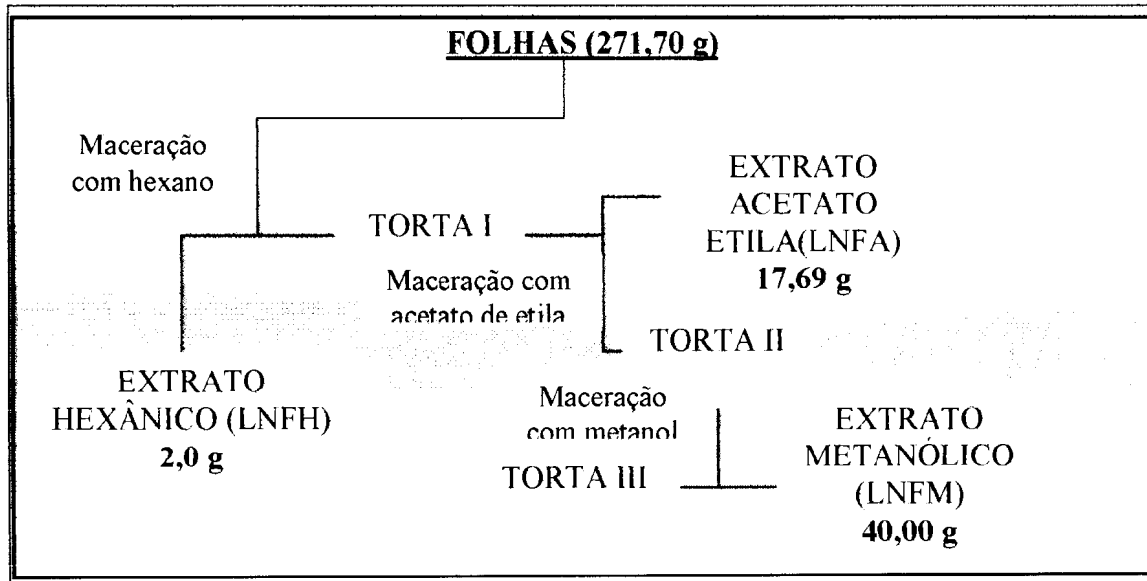
O caule e folhas foram secos a temperatura ambiente e moídos em moinho de facas e submetidos a maceração.

Partindo-se de 184,00 g do caule e 271,70 g das folhas foram preparados extratos com os solventes hexano (caule e folha), acetato de etila (caule) e metanol (caule e folha), de acordo com os **Esquemas 2 e 3**. Os extratos foram filtrados e então concentrados até a secura em evaporador rotativo, sob pressão reduzida, fornecendo as quantidades indicadas.

ESQUEMA 2: Preparação dos extratos do caule de *Luxemburgia nobilis*.



ESQUEMA 3: Preparação dos extratos das folhas de *Luxemburgia nobilis*.



4.2.3- Fracionamento dos extratos:

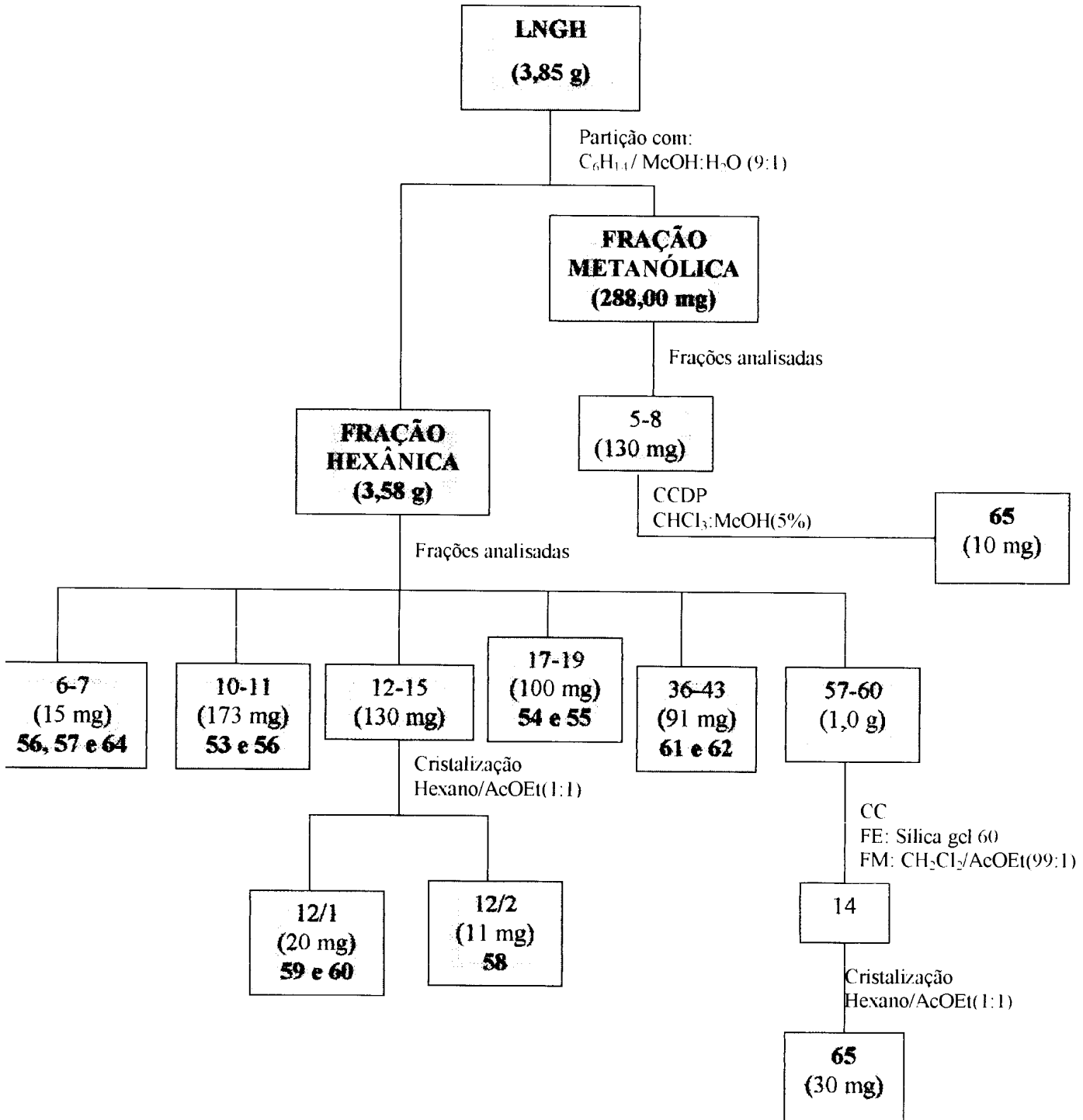
Após fracionamento cromatográfico dos extratos as frações foram analisadas por CCD e reveladas sob lâmpada de UV, em cuba com iodo ou em solução de vanilina (5,0 g) em 100 ml de ácido sulfúrico:etanol (80:20). As frações iguais foram agrupadas. Com base na quantidade de material contido e complexidade da mistura das frações, estabeleceu-se a ordem de prioridade para prosseguir a análise dos grupos de frações.

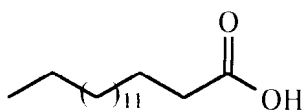
A metodologia empregada envolveu sucessivas análises cromatográficas (CCDC, CCP e CG-EM) e encontram-se especificadas nos **Esquemas 4; 5; 6; 7 e 8**.

a- Extrato hexânico do caule: O extrato hexânico foi submetido a partição entre hexano e metanol/água (9:1), a fração hexânica (3,58 g) foi

fracionada numa coluna cromatográfica, contendo sílica gel. Iniciou-se a eluição com hexano-clorofórmio (1:1) aumentando-se a polaridade do eluente pela adição gradativa de clorofórmio seguida de clorofórmio-metanol até metanol (100%), obtendo-se 64 frações de 20 ml. A fração metanólica (288,00 mg), obtida através da partição do extrato original, foi cromatografada numa coluna contendo sílica-gel e eluída com CH_2Cl_2 – MeOH (9:1) até MeOH 100%, fornecendo 31 frações (**Esquema 4**).

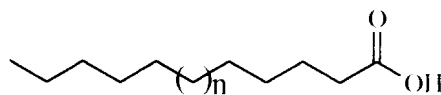
ESQUEMA 4: Fracionamento do extrato hexânico do caule de *Luxemburgia nobilis*.





53

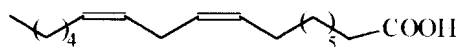
P.F: 68 °C
Solúvel em: CHCl₃
RMN ¹H: (Figura 3)
RMN ¹³C: (Figura 4)
EM: (Figura 2) (Esquema 9)



54: n= 14

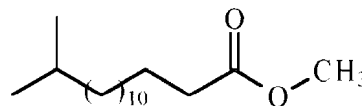
55: n= 10

P.F da mistura: 72 °C
Solúvel em: CHCl₃
RMN ¹H: (Figura 6)
RMN ¹³C: (Figura 7)
EM: (Figura 5) (Esquema 10)



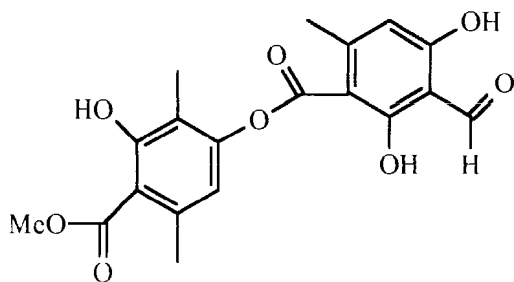
56

Solúvel em: CHCl₃
RMN ¹H: (Figuras 3 e 12) (Tabela 3).
RMN ¹³C: (Figuras 4 e 13) (Tabela 3)
IV: (Figura 11) $\nu_{\text{máx.}} \text{ cm}^{-1}$ (filme)
EM: (Figura 8) (Esquema 11)



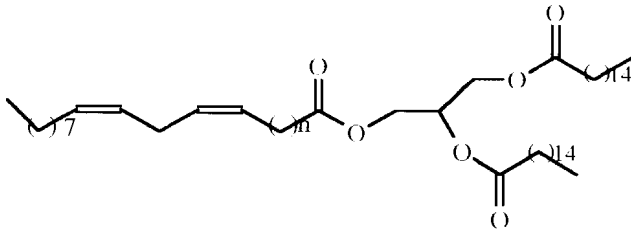
57

Solúvel em: CHCl₃
RMN ¹H: (Figura 11) (Tabela 5).
RMN ¹³C: (Figura 12) (Tabela 5)
IV: (Figura 11) $\nu_{\text{máx.}} \text{ cm}^{-1}$ (filme)
EM: (Figura 9) (Esquema 12)



58

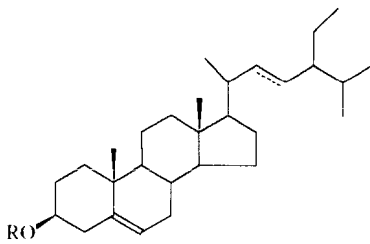
P.F: 192 °C
Solúvel em: DMSO
RMN ¹H: (Figura 16) (Tabela 7).
RMN ¹³C: (Figura 17) (Tabela 7)
IV: (Figura 15) $\nu_{\text{máx.}} \text{ cm}^{-1}$ (filme)
EM: (Figura 18) (Esquema 14)



59: $n=4$

60: $n=6$

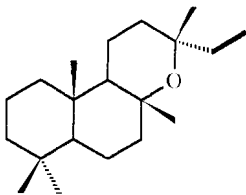
P.F: óleo
 α_D : +0,8 (c 2,5, CHCl₃)
Solúvel em: CHCl₃
RMN ¹H: (Figura 21)
RMN ¹³C: (Figura 22)
Homocosy: (Figura 224)
HMQC: (Figura 25)
HMBC: (Figura 26)
IV: (Figura 19) $\nu_{\text{máx.}}$ cm⁻¹ (filme)
EM: (Figura 27) (Esquema 15)



61: 22,23-dihidro, R= H

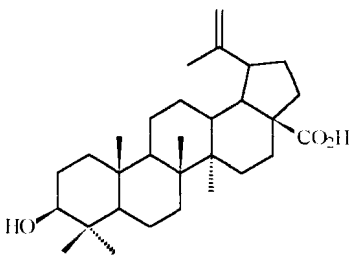
62: $\Delta^{22,23}$, R= H

P.F: 115 °C
Solúvel em: CHCl₃
RMN ¹H: (Figura 34)
RMN ¹³C: (Figura 35) (tabela 8)
EM: (Figuras 36 e 37)



64

Solúvel em: CHCl₃
RMN ¹H: (Figura 12)
RMN ¹³C: (Figura 13) (Tabela 6)
IV: (Figura 11) $\nu_{\text{máx.}}$ cm⁻¹ (filme)
EM: (Figura 10) (Esquema 13)

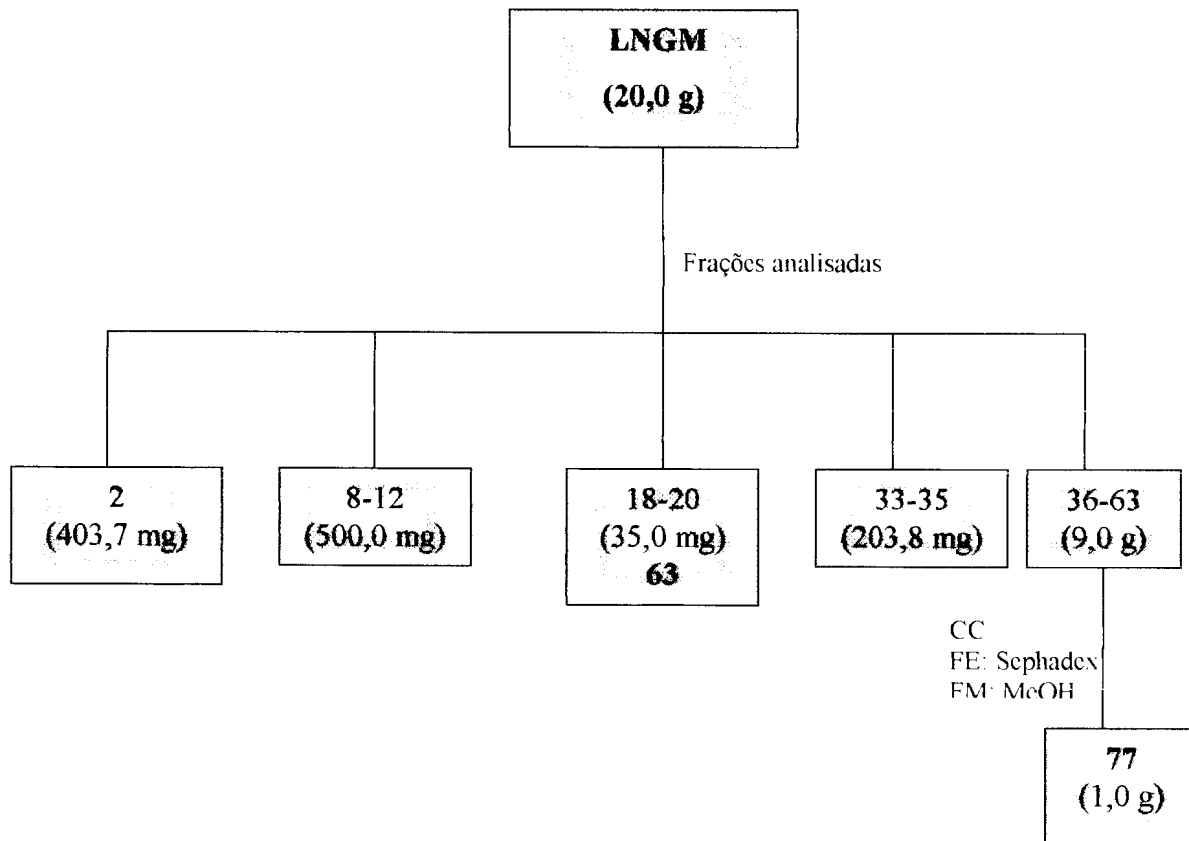


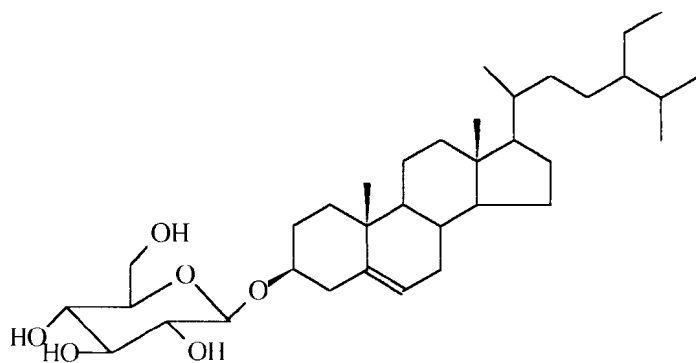
65

P.F: 295 °C
Solúvel em: MeOH
RMN ¹H: (Figura 38) (Tabela 9).
RMN ¹³C: (Figura 39) (Tabela 9)

b- Extrato metanólico do caule: O extrato metanólico (20,0 g) foi fracionado numa coluna de cromatografia, contendo sílica gel. Iniciou-se a eluição com acetato de etila aumentando-se a polaridade do eluente pela adição gradativa de metanol até metanol (100%), obtendo-se 150 frações de 200 ml (**Esquema 5**).

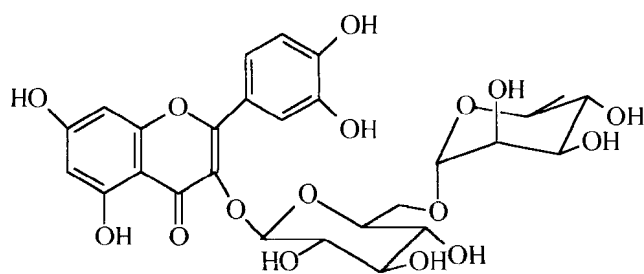
ESQUEMA 5: Fracionamento do extrato metanólico do caule de *Luxemburgia nobilis*.





63

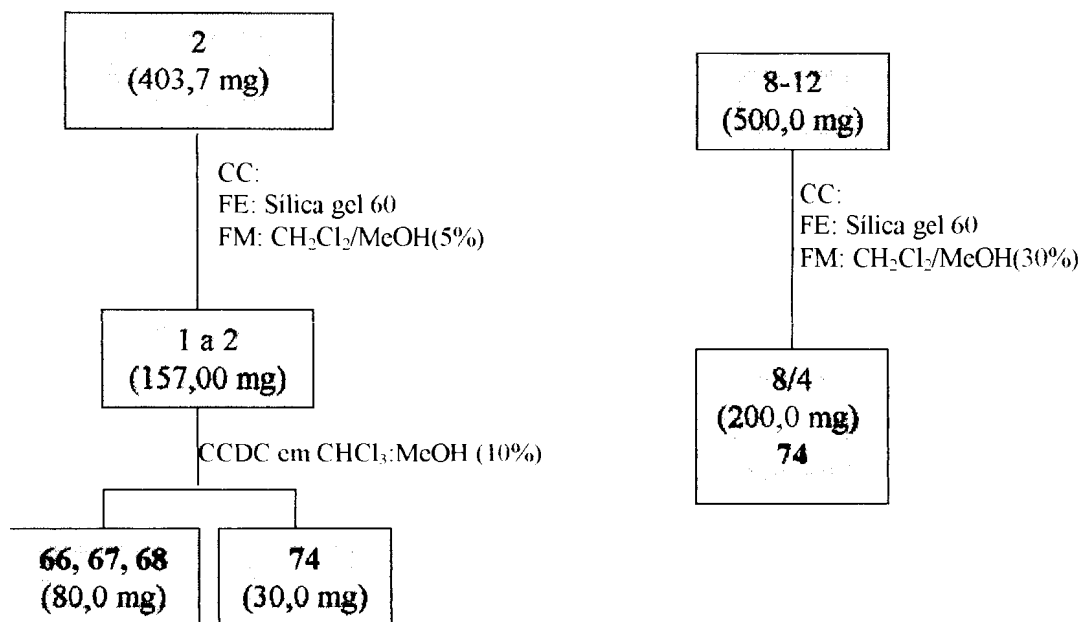
P.F: 300 °C
 Solúvel em: DMSO
 IV: (Figura 41) $\nu_{\text{máx.}} \text{ cm}^{-1}$ (filme)
 RMN ^1H : (Figura 42)
 RMN ^{13}C : (Figura 43)

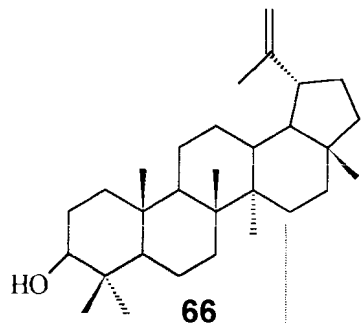


77

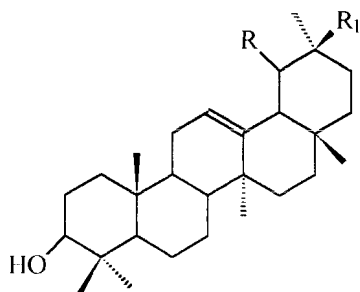
P.F: 190 °C
 Solúvel em: metanol
 RMN ^1H : (Figura 68) (Tabela 15).
 RMN ^{13}C : (Figura 69) (Tabela 15)
 IV: (Figura 67) $\nu_{\text{máx.}} \text{ cm}^{-1}$ (filme)

➔ Continuação do Esquema 5.



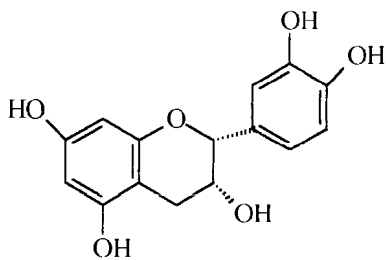


P.F: 180 °C
Solúvel em: CHCl₃
RMN ¹H: (Figura 49)
RMN ¹³C: (Figura 50) (Tabela 11)



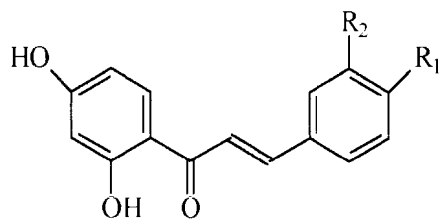
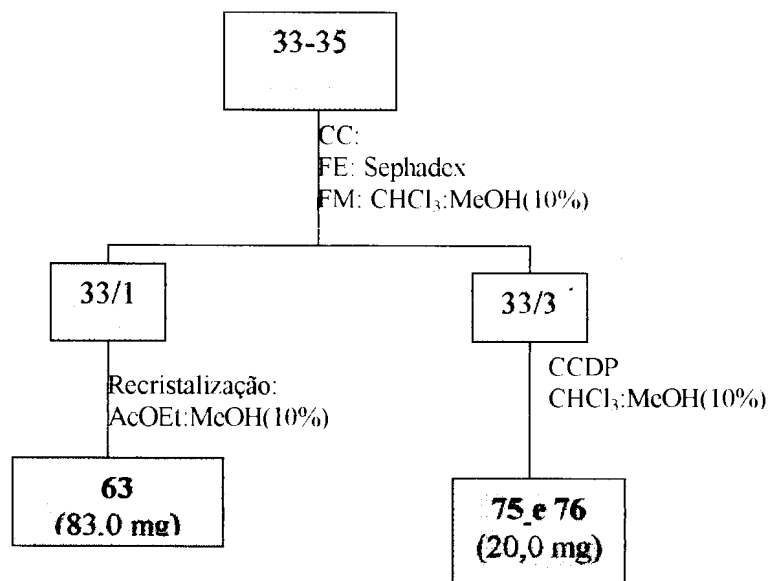
67: R= Me, R₁= H

68: R= H, R₁= Me



Solúvel em: acetona
RMN ¹H: (Figura 53) (Tabela 12).
Homocosy: (Figura 54)
RMN ¹³C: (Figura 55) (Tabela 12)
IV: (Figura 52) $\nu_{\text{máx. cm}^{-1}}$ (filme)

➔ Continuação do Esquema 5.



75: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$

76: $R_1 = R_2 = \text{OH}$

Solúvel em: acetona

RMN ^1H : (Figura 61) (Tabelas 13).

Homocosy: (Figura 62)

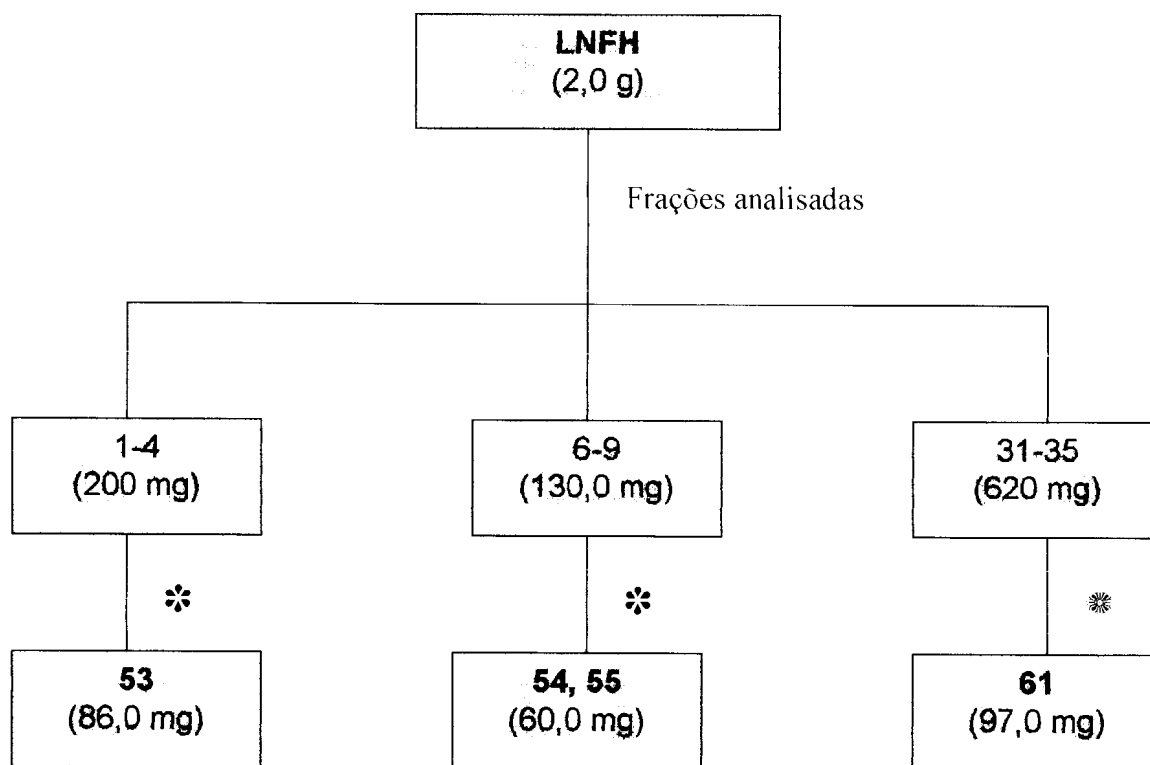
RMN ^{13}C : (Figura 63) (Tabela 13 e 14)

HMQC: (Figura 65)

HMBC: (Figura 66, 66a)

C- Extrato hexânico das folhas: O extrato hexânico (2,0 g) foi fracionado numa coluna de cromatografia, contendo sílica-gel 60. Iniciou-se a eluição com hexano, hexano-diclorometano, aumentando a polaridade do eluente pela adição gradativa de dicloro seguida de diclorometano-acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila-metanol, até metanol (100%), obtendo-se 40 frações de 50 ml (**Esquema 6**).

ESQUEMA 6: Fracionamento do extrato hexânico das folhas de *Luxemburgia nobilis*.

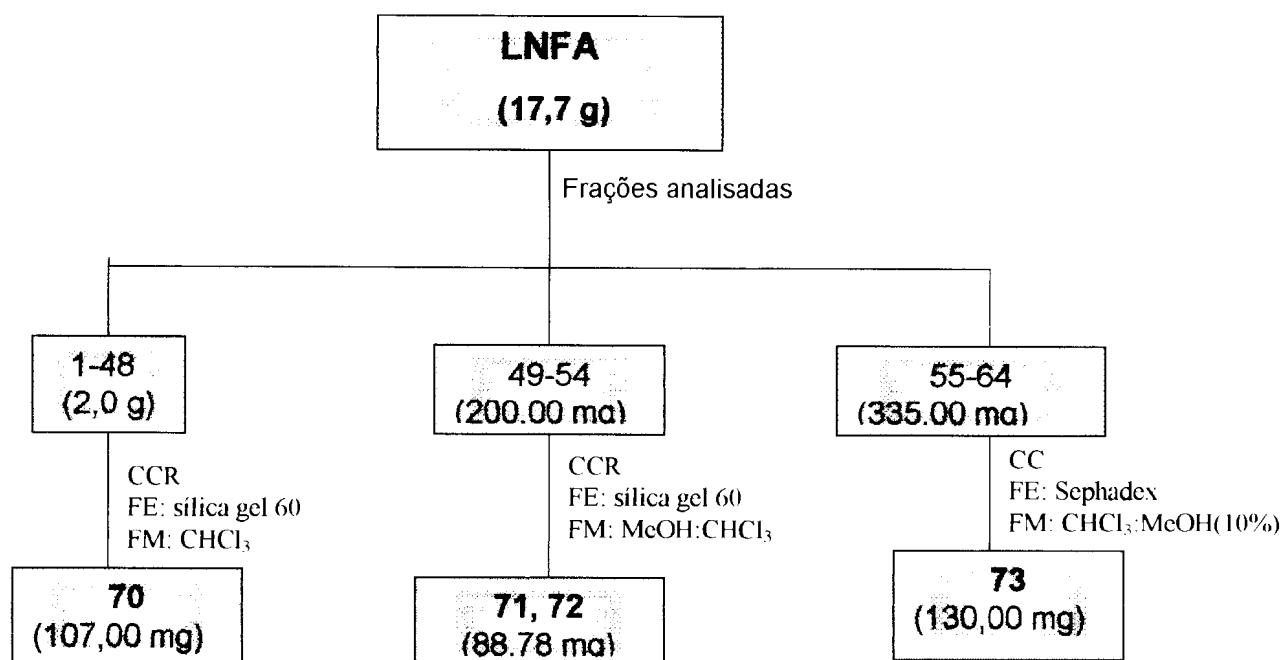


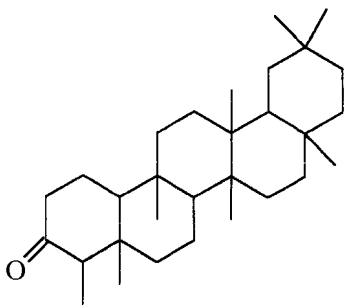
* Fração em CH₂Cl₂ que na presença de acetona forneceu um precipitado

⊛ Fração em CHCl₃ que na presença de hexano forneceu um precipitado.

d- Extrato em acetato de etila das folhas: O extrato em acetato de etila (17,7 g) foi fracionado numa coluna de cromatografia, contendo sílica gel. Iniciou-se a eluição com diclorometano (100%) aumentando-se a polaridade do eluente pela adição gradativa de acetato de etila, seguida de acetato de etila-metanol até metanol (100%), obtendo-se 95 frações de 250 ml (**Esquema 7**).

ESQUEMA 7: Fracionamento do extrato em acetato de etila das folhas de *Luxemburgia nobilis*.



**70**

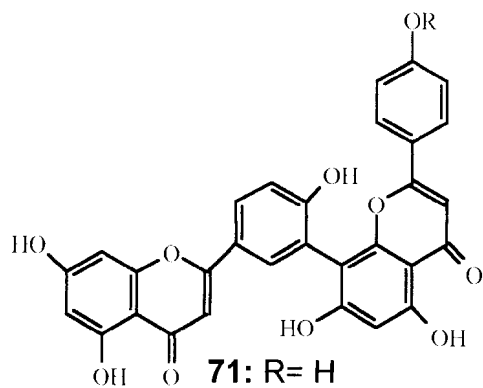
P.F: 300 °C

Solúvel em: CHCl₃

RMN ¹H: (Figura 74a) (Tabela 16).

RMN ¹³C: (figura 75) (Tabela 16)

IV: (Figura 73) $\nu_{\text{máx. cm}^{-1}}$ (filme)

**71:** R= H**72:** R= Me

Solúvel em: Metanol

RMN ¹H: (Figura 78) (Tabela 17)

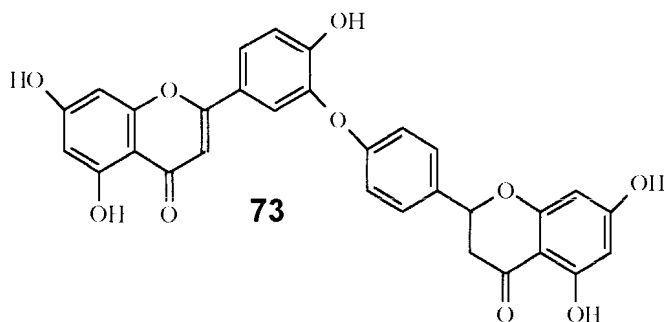
Homocosy: (Figura 79)

RMN ¹³C: (Figura 80) (Tabela 17)

HMQC: (Figura 82)

HMBC: (Figura 83)

IV: (Figura 77) $\nu_{\text{máx. cm}^{-1}}$ (filme)

**73**

P.F: 220 °C

$[\alpha]_D^{20}$: +7,0 (acetona, c 0,6)

Solúvel em: Metanol

RMN ¹H: (Figura 88) (Tabela 18)

Homocosy: (Figura 89)

RMN ¹³C: (Figura 90) (Tabela 18)

HMQC: (Figura 92)

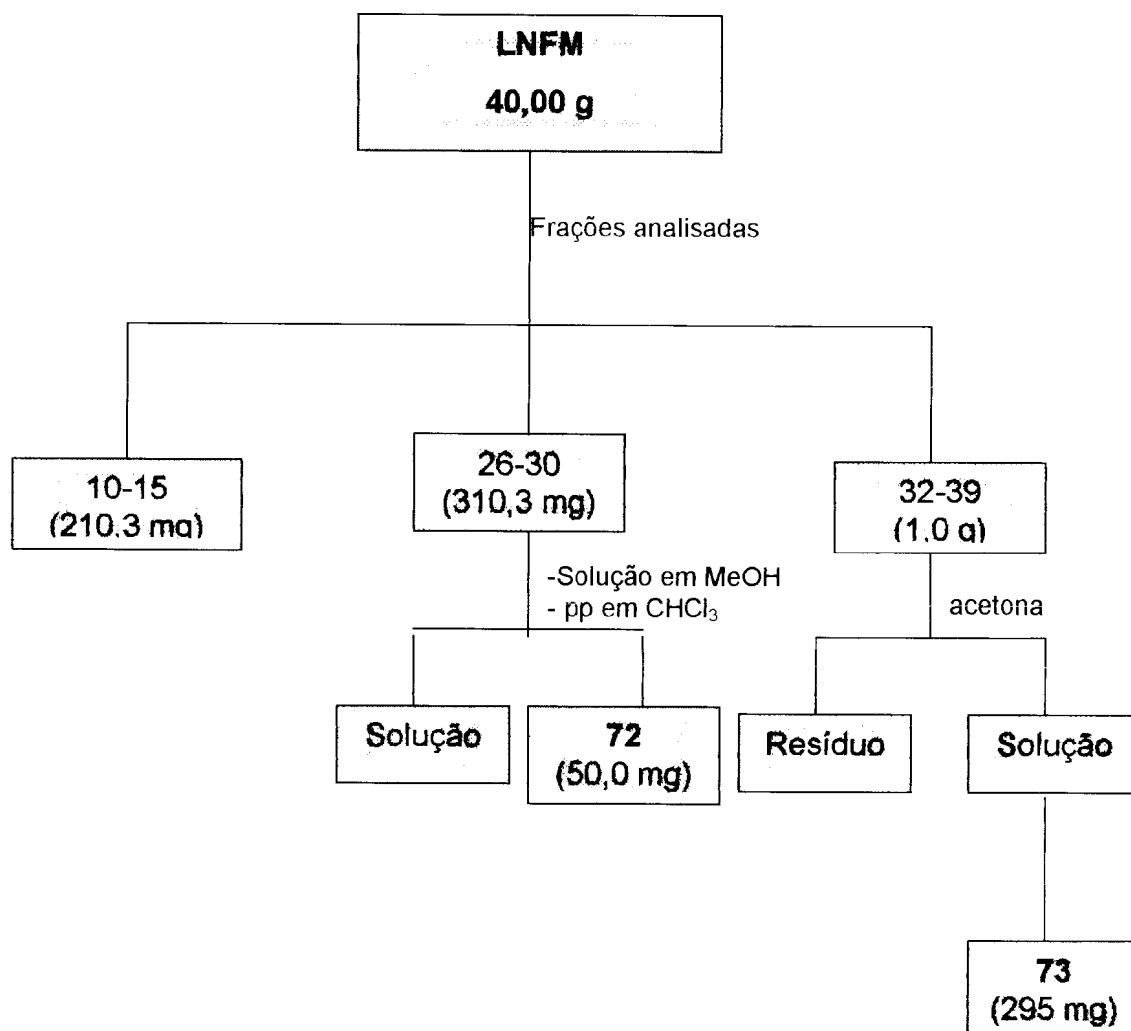
HMBC: (Figura 93)

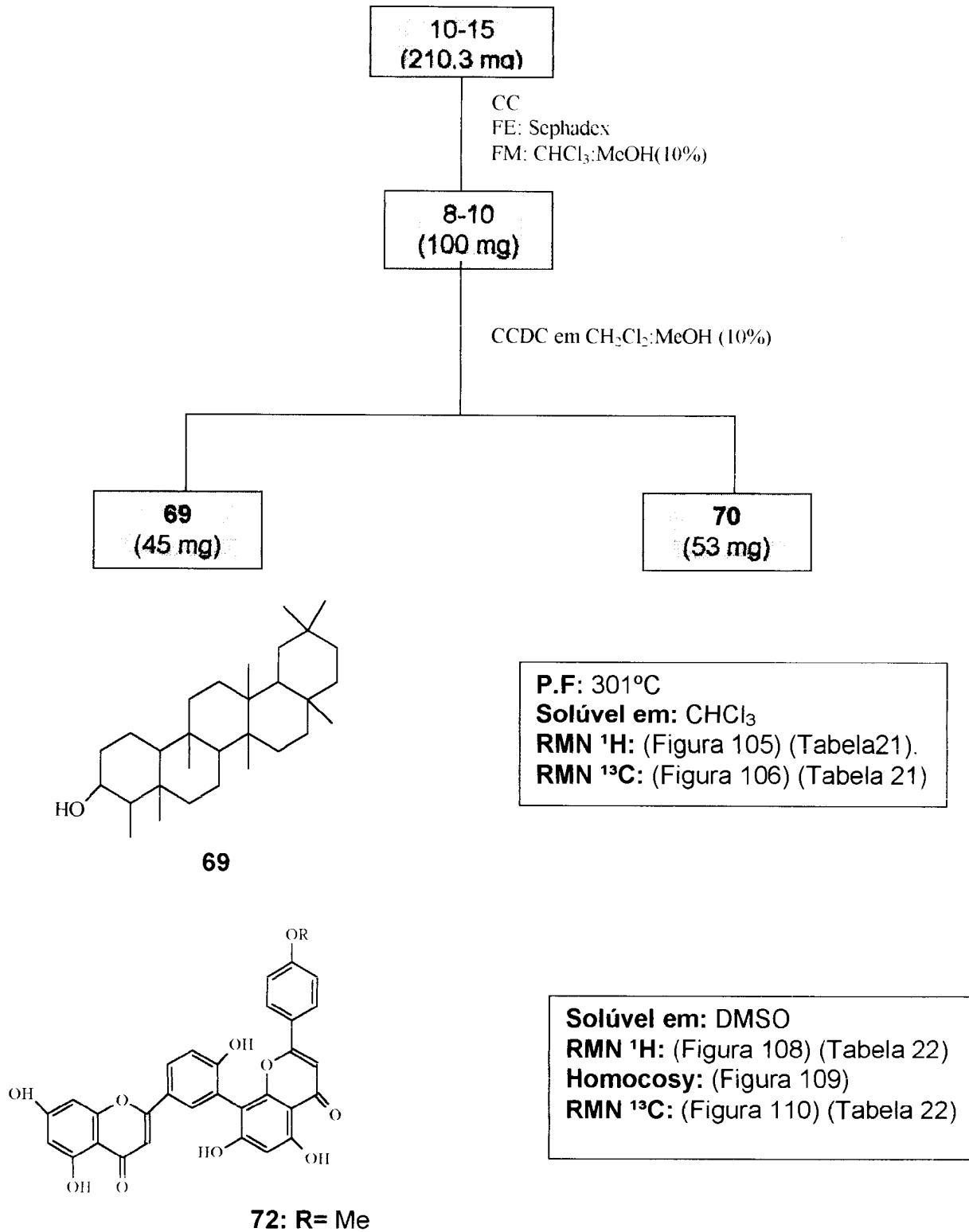
IV: (Figura 84) $\nu_{\text{máx. cm}^{-1}}$ (filme)

U.V: (Figura 85) em metanol

d- Extrato metanólico das folhas: O extrato metanólico (40,0 g) foi fracionado numa coluna de cromatografia, contendo sílica gel. Iniciou-se a eluição com diclorometano aumentando-se a polaridade do eluente pela adição gradativa de acetato de etila, seguida de acetato de etila-metanol até metanol (100%), obtendo-se 168 frações de 250 ml (**Esquema 8**).

ESQUEMA 8: Fracionamento do extrato metanólico das folhas de *Luxemburgia nobilis*.





4.3- Procedimentos experimentais gerais.

4.3.1- Acetilação

As amostras acetiladas foram tratadas com piridina e anidrido acético (2:1) e usado como catalisador dimetilamino piridina (DMAP), a solução foi mantida em repouso a temperatura ambiente por 24 horas. Após este período adicionou-se água gelada e extraiu-se com clorofórmio. A solução clorofórmica foi lavada primeiro com solução de HCl 10% (três vezes) e depois com água destilada (três vezes). Após secagem com sulfato de sódio anidro, o solvente foi destilado e obteve-se o correspondente ao material acetilado.

4.3.2- Metilação com diazometano

O diazometano foi preparado por destilação de uma solução etérea de N-metil-N-nitroso-*p*-tolueno-sulfonamida (Diazald) (2,14g de diazald em 30 ml de éter) tratada com uma solução alcoólica de KOH (0,4g de KOH em 10 ml de etanol).

As amostras a serem metiladas foram dissolvidas em metanol e tratadas com excesso de diazometano recentemente preparado. Os derivados metilados foram obtidos após evaporação do solvente.

4.3.3- Preparação do tiometil éter

O dimetil dissulfeto (2ml) e a mistura de triglicerídeos (5,0 mg) foram colocados em um balão de vidro equipado com um septo e agitador magnético. 0,5 ml de uma solução de iodo em dimetil dissulfeto foi adicionada a mistura. O balão foi purgado com argônio e a solução deixada sob agitação por 24 h a temperatura ambiente. O produto foi submetido diretamente a análise de EM-IE e EM-FAB.

A mesma metodologia foi usada na preparação do derivado tiometila para o ácido linoleico.

4.3.4- Metodologia para ELAs dos extratos de *Luxemburgia nobilis* e da substância 73.

Os extratos testados, LNGH (46,30 mg), LNGM (52,90 mg), LNFH (47,33 mg), LNFA (51,16 mg), LNFM (52,30 mg) e a substância **73** (26,70 mg) foram submetidos a uma solução de DMSO:H₂O:PVP (2,0 ml:3,0ml:80,0 mg). Tomaram-se alíquotas de 500, 300, 200, 100 e 50 µl desta solução que foram colocadas em tubos de ensaios, os quais foram completados com 5 ml de água do mar artificial e posteriormente adicionadas as larvas de *Artemia salina* (10 larvas por tubo).

Após 24 horas as larvas vivas e mortas foram contadas e a DL₅₀ determinada.

CAPÍTULO 5
RESULTADO E DISCUSSÃO

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Resumo do estudo fitoquímico:

As folhas e caule de *Luxemburgia nobilis* foram sucessivamente extraídas com hexano, acetato de etila e metanol através da maceração, fornecendo os respectivos extratos, após filtração e evaporação dos solventes em evaporador rotatório.

Após a análise dos extratos por CCDA fez-se o fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel.

As frações coletadas foram agrupadas, após terem sido analisadas por CCDA e reunidas em grupos de frações. Visando o isolamento de substâncias naturais, foi estabelecida a ordem de prioridade para o estudo de cada grupo de frações, partindo daquelas que apresentavam uma relação quantidade de amostra x complexidade (número de substâncias) suficiente para prosseguir o trabalho de isolamento. Os extratos em acetato de etila

(folhas) e metanólico (folhas e caule) apresentaram quantidades qualitativas de material resinoso, constituindo aproximadamente 20% do peso do extrato.

As frações selecionadas para estudo foram purificadas usando CC, CCDP e/ou CCDC, resultando no isolamento de ácidos graxos, triglicerídeos, terpenos e flavonóides. Os procedimentos usados nestas etapas estão reunidos no **capítulo 4**. A identificação das substâncias foi feita com base na análise de dados espectrais ou comparação com padrões da literatura.

5.2- Identificação dos constituintes isolados do extrato hexânico do caule (LNGH).

5.2.1- Substâncias 53 e 56

As substâncias **53** e **56** foram analisadas em CG-MS e identificadas como ácido hexadecanóico e ácido linoleico (173,0 mg) através do espectro de massas pela observação do íon molecular em m/z : 256 para **53**, o qual é idêntico ao padrão (**Figura 2, Esquema 9**).

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C destas substâncias são compatíveis com a mistura de ácidos graxos (**Figuras 3 e 4**). O espectro de RMN de ^1H mostra sinais correspondentes a hidrogênios em carbonos metílicos δ_{CH_3} : 0,85 (t), 0,86 (t), em carbonos metilênicos δ_{CH_2} : 1,29 (m), 1,61 (m), 2,02 (m), 2,32 (t), 2,75 (t) e em carbonos metínicos δ_{CH} : 5,33 (m) (**Tabela 3**). O espectro de RMN de ^{13}C mostra sinais correspondentes aos carbonos

metílicos δ_{CH_3} : 14,06, em carbonos metilênicos δ_{CH_2} : 22,66; 24,66; 25,45; 25,65; 27,17; 29,04 - 29,67; 31,90; 34,07 e carbonos metínicos δ_{CH} : 127,90; 128,00; 129,9; 130,10 (Tabela 3).

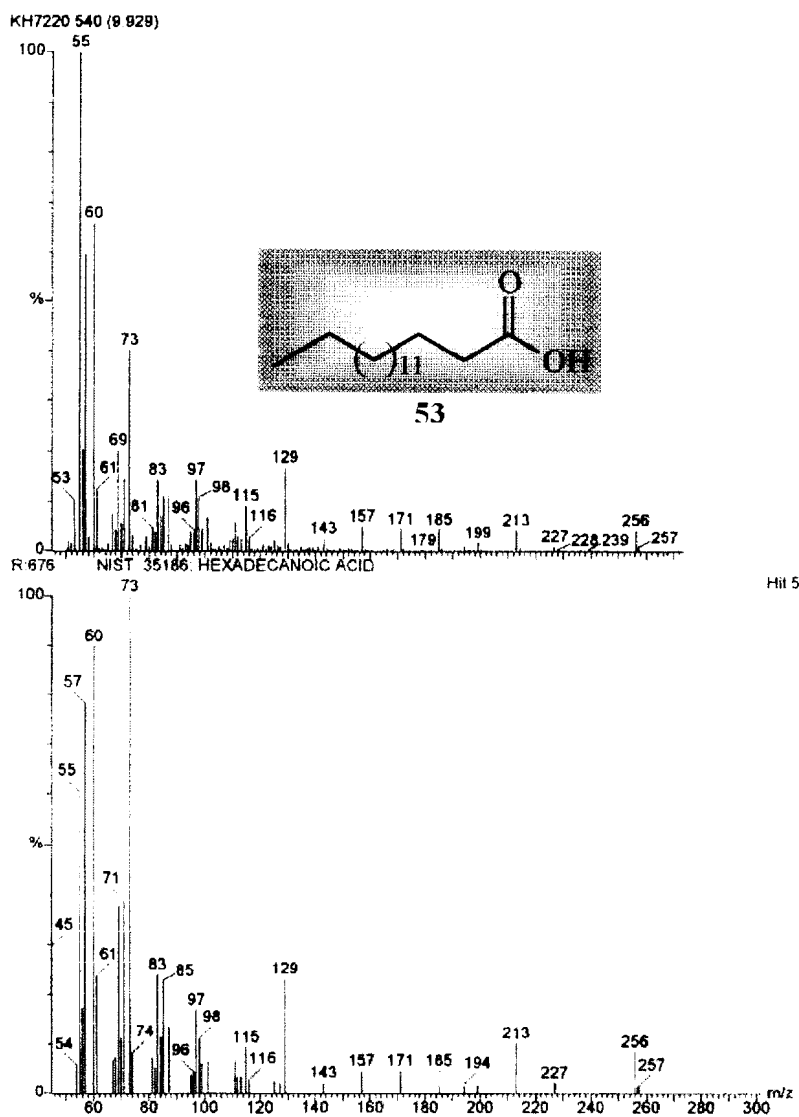
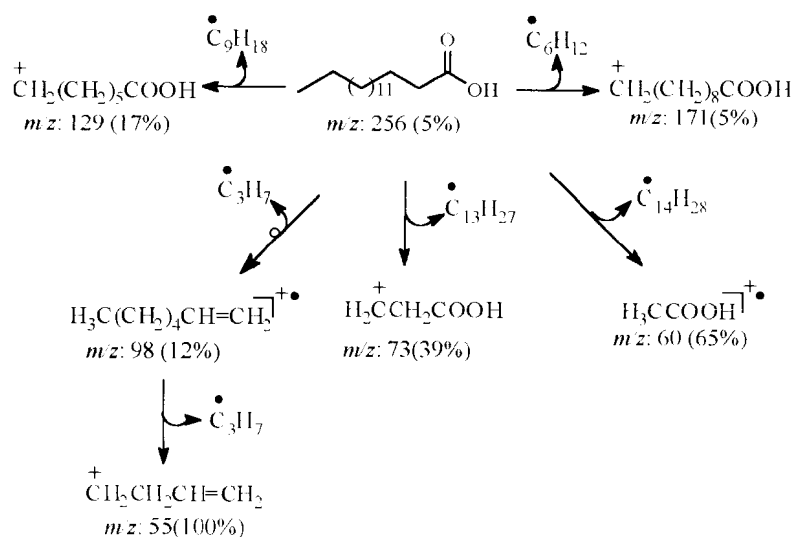


Figura 2: Espectro de massas de 53.



Esquema 9: Fragmentações de massas da substância **53**.

Tabela 3: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C em CDCl_3 das substâncias **53** e **56** comparados com os dados de RMN de ^{13}C em CDCl_3 descritos na literatura.⁴⁵

	53		Literatura⁴⁵		56	
	δ_{H}	δ_{C}	Ácido hexadecanóico δ_{C}	Ácido linoleico δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}
CH ₃	0,85(t)	14,06	14,11	14,07	14,06	0,87 (t)
CH ₂	2,02 (m)	22,40	22,69	22,58	22,66	2,02 (m)
	1,61 (m)	25,45	24,69	24,66	24,66	1,61 (m)
	1,29 (m)	25,65	29,04 – 29,67	27,19	27,17	1,29 (m)
	1,29 (m)	29,11-29,57	31,91	29,03-29,58	29,04-29,67	1,29 (m)
	2,33 (t)	31,07	34,16	31,53	31,90	2,75 (t)
CH	-	-	-	127,84; 128,01; 129,96; 130,16	127,90; 128,00; 129,90; 130,10	5,33 (m)
C=O	-	179,80	180,59	180,07	180,10	-

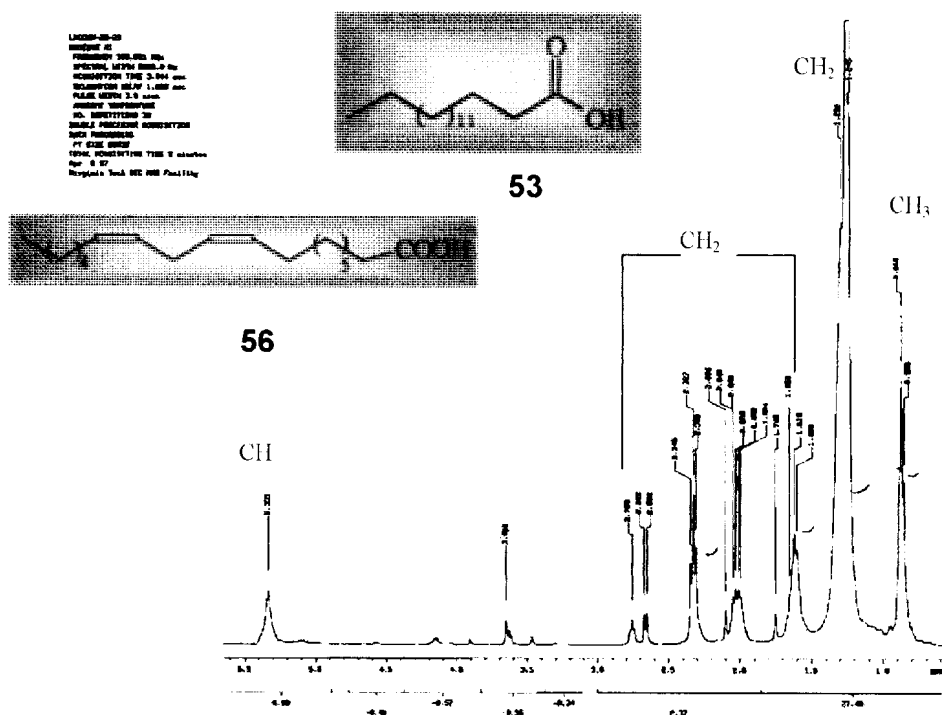


Figura 3: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) dos ácidos graxos 53 + 56.

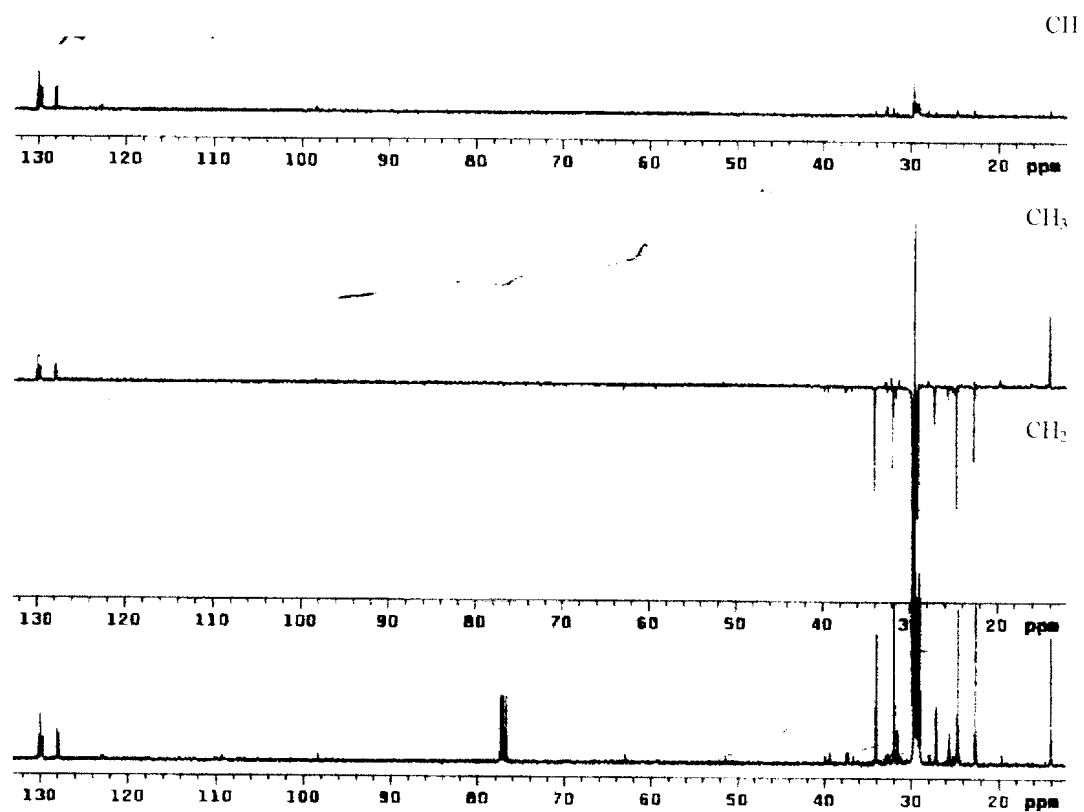


Figura 4: Espectro de RMN de ¹³C e DEPT 90° e 135° (100 MHz, CDCl₃) dos ácidos graxos 53 + 56.

5.2.2- Substâncias 54 e 55

A mistura das substâncias **54** e **55** foi analisada em CG-EM e identificada como ácido hexaeicosanóico e ácido tetraeicosanóico (100,5 mg) através do espectro de massas pela observação do íons moleculares m/z : 368 para **54** e m/z : 396 para **55** (Figura 5, Esquema 10) e pela análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (Figuras 6 e 7) (Tabela 4).

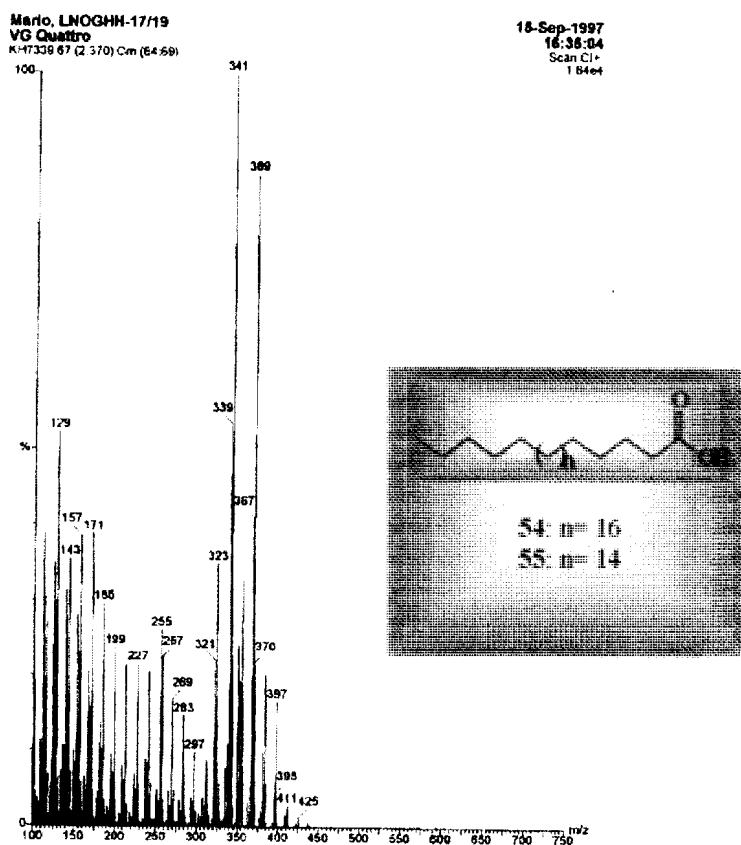
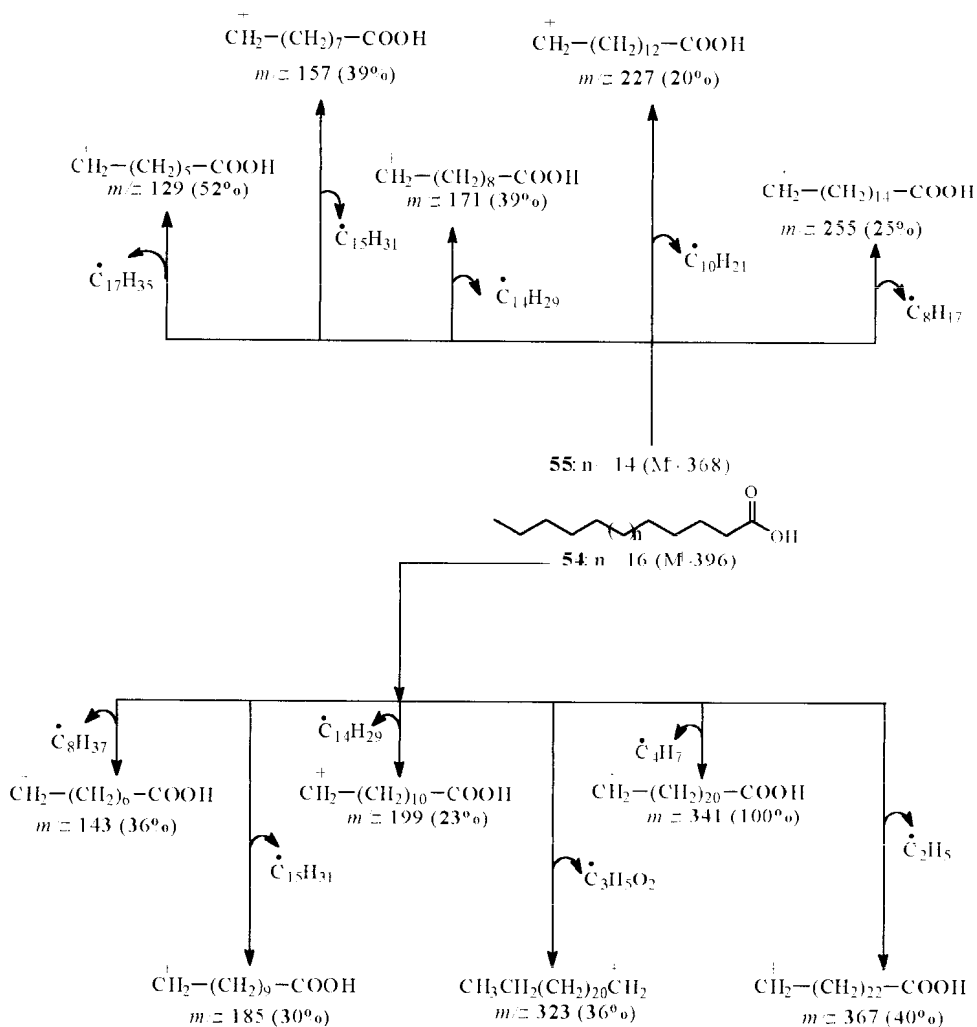


Figura 5: Espectro de massas de **54** e **55**



Esquema 10: Fragmentações de massas da substância **54** e **55**.

Os espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C destas substâncias são compatíveis com a mistura de ácidos graxos (**Figuras 4 e 5**). O espectro de RMN de ^1H mostra sinais correspondentes a hidrogênios em carbonos metílicos δ_{CH_3} : 0,95 (t, 6,2 Hz), em carbonos metilênicos δ_{CH_2} : 1,24 (m), 1,63 (m), 2,40 (t) (**Tabela 4**). O espectro de RMN de ^{13}C mostra sinais correspondentes aos carbonos metílicos δ_{CH_3} : 14,11 em carbonos

metilênicos δ_{CH_2} : 22,68; 24,66; 29,05 - 29,89; 31,91; 33,98 e carbono carbonílico $\delta_{\text{C=O}}$: 179,8 (**Tabela 4**).

Tabela 4: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C das substância **54 + 55** comparados com a literatura.⁴⁵

	54 + 55		Literatura ⁴⁵
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
CH_3	14,11	0,95 (t, 6,5 Hz)	14,12
CH_2	33,98	2,40 (t, 6,2 Hz)	34,16
	31,91	1,63 (m)	31,91
	29,05 - 29,89	1,24 (m)	29,09-29-60
C=O	179,80	-	180,59

STANDARD IN RESERVE
 CHANNEL 02
 PULSED 999.621 MHz
 OPTICAL METER 2000.0 Hz
 ACQUISITION TIME 2.744 sec
 DELAY/BLOCK 1.000 sec
 PULSE WIDTH 3.0 usec
 ACQUISITION TEMPERATURE
 00.000000000000000000
 SAMPLE PREPARATION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 FT SIZE 65120
 TOTAL ACQUISITION TIME 2.00000000
 Mar 11 87
 Virginia Tech NMR Facility

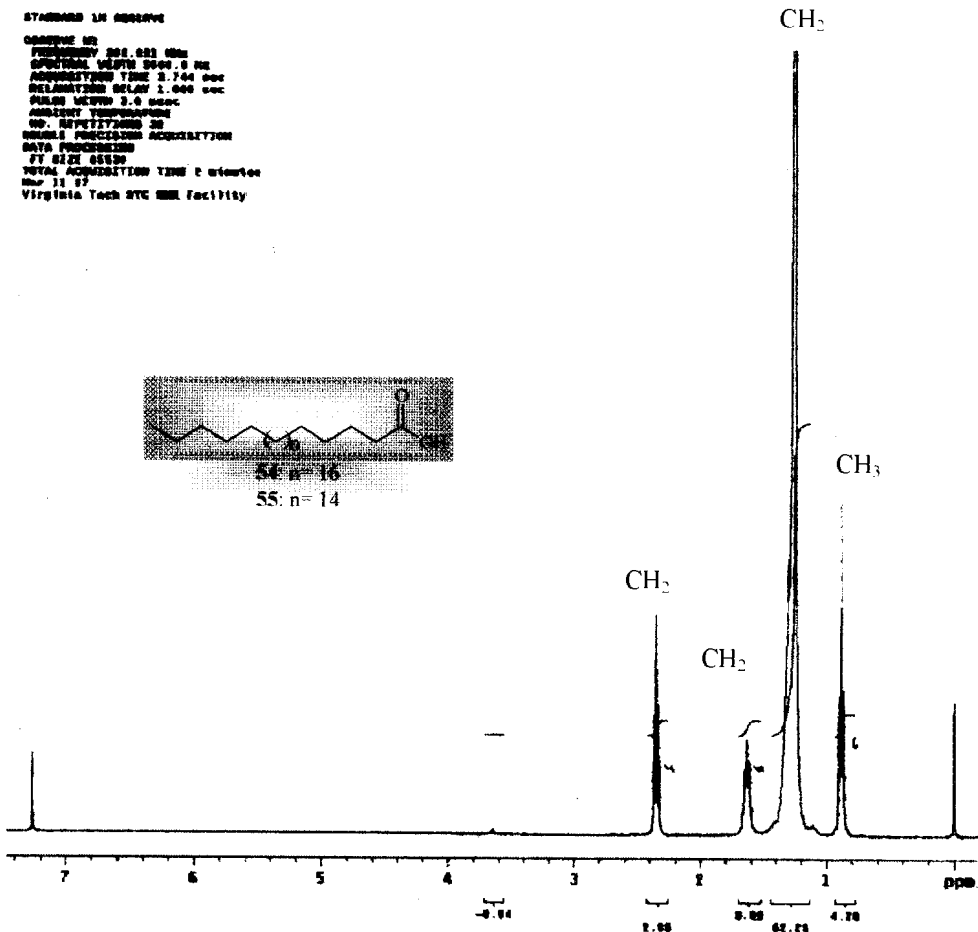


Figura 6: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura dos ácidos graxos **54** e **55**.

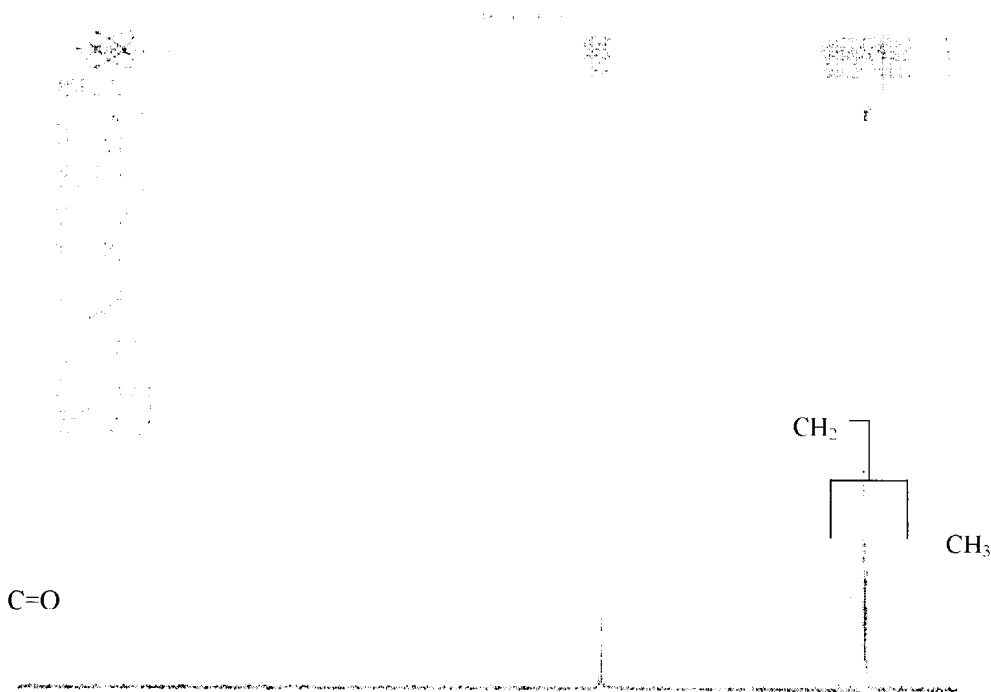


Figura 7: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da mistura dos ácidos graxos **54** + **55**.

5.2.3- Substâncias 56, 57 e 64.

O caule de *luxemburgia nobilis* forneceu frações oleosas a partir do extrato hexânico, estes óleos foram analisados por CG-EM, após fracionamento em coluna de sílica gel (**Esquema 4**, pág. 41). A mistura das substâncias **56**, **57** e **64** foi analisada por CG-EM (**Figura 8**) e comparação com a biblioteca de espectros de massas (**Figura 8a e 10**) permitindo a identificação do ácido linoleico [**56**(10,7%)], 14-metil-pentadecanoato de metila [**57**(56,6%)] e do óxido de 13-epimanoila [**64** (32,7%)].

A **Figura 8a** apresenta o pico do íon molecular [M^+] em m/z : 280(M^+ , 1%) e picos importantes em m/z : 109(39%), 81(80%), 79(57%) e o pico base em m/z : 55(100%) correspondentes aos fragmentos da substância **56** mostrados no **Esquema 11**.

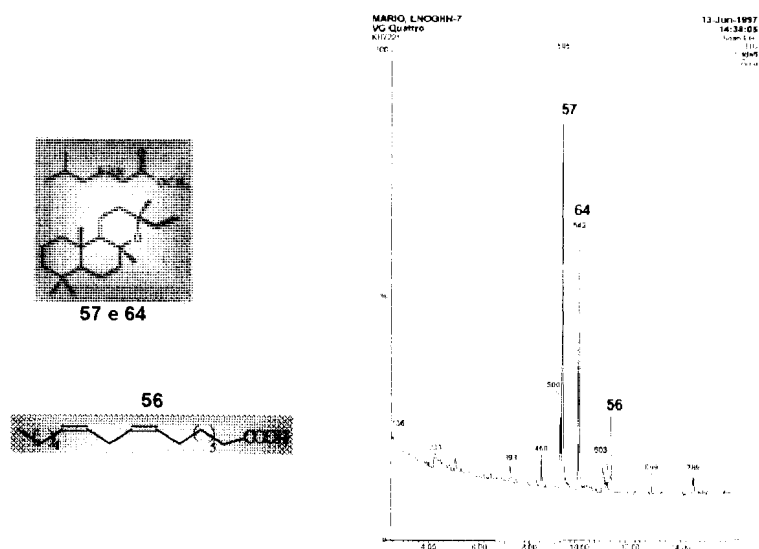


Figura 8: Cromatograma de CG da mistura de **56**, **57** e **64** em CH_2Cl_2 . Coluna HP-5 (30 m x 0,32 mm), 50 °C (2 min.), 5 °C/min até 200 °C.

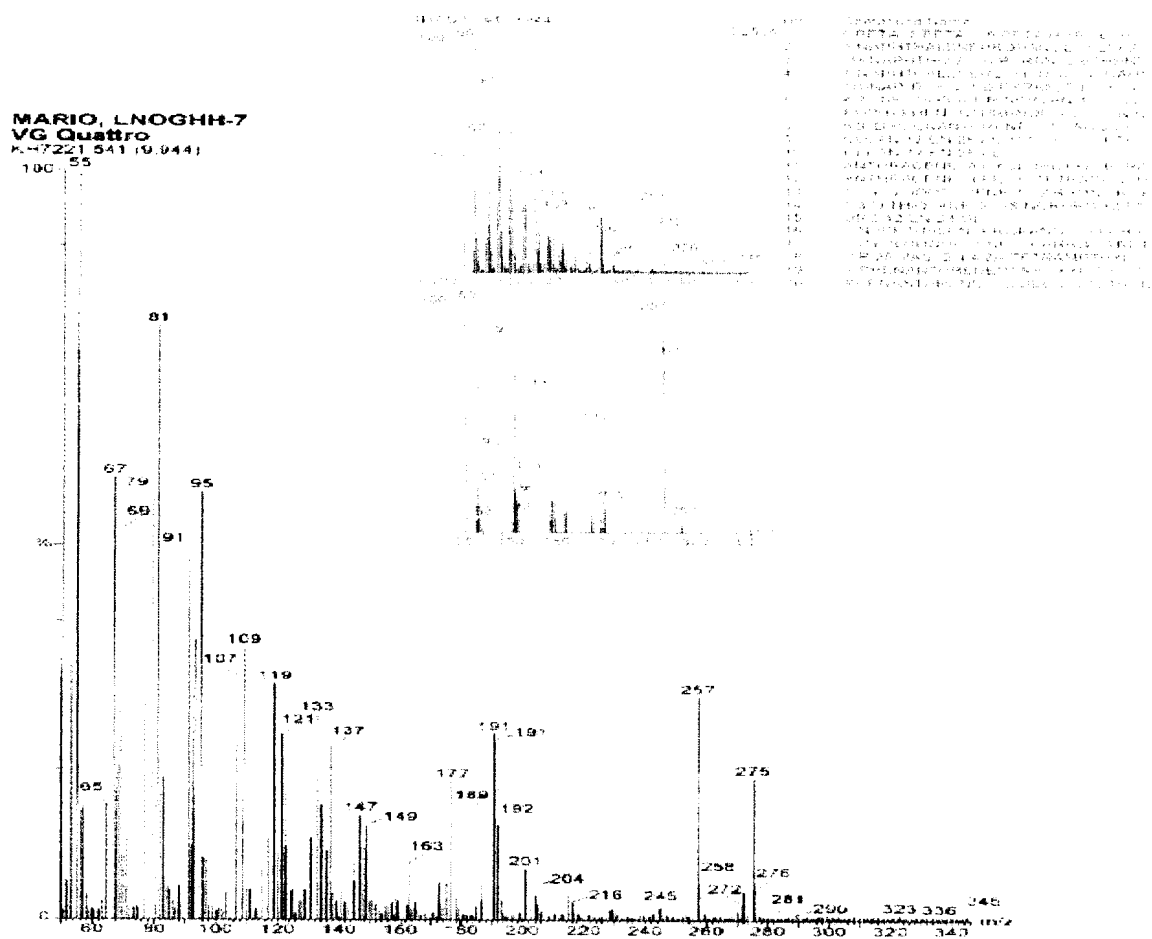
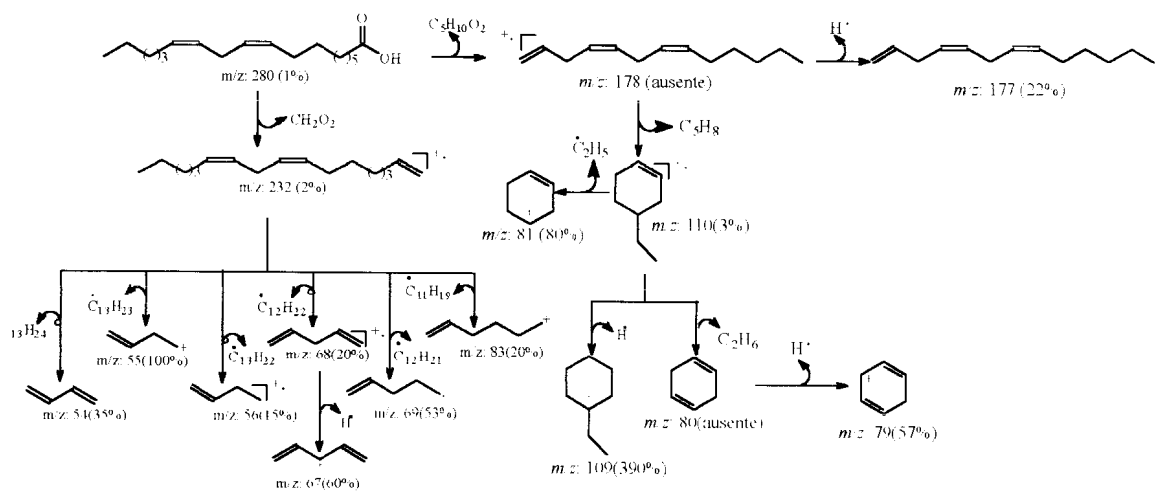


Figura 8a: Espectro de massas de 56.



Esquema 11: Fragmentações de massas da substância 56.

A **Figura 9** apresenta o pico do íon molecular $[M^+]$ em m/z : 270(3%), picos importantes em m/z : 227(5%), 199(3%), 143(13%), 87(68%) e o pico base em m/z : 74(100%), correspondentes às estruturas mostradas no **Esquema 12**.

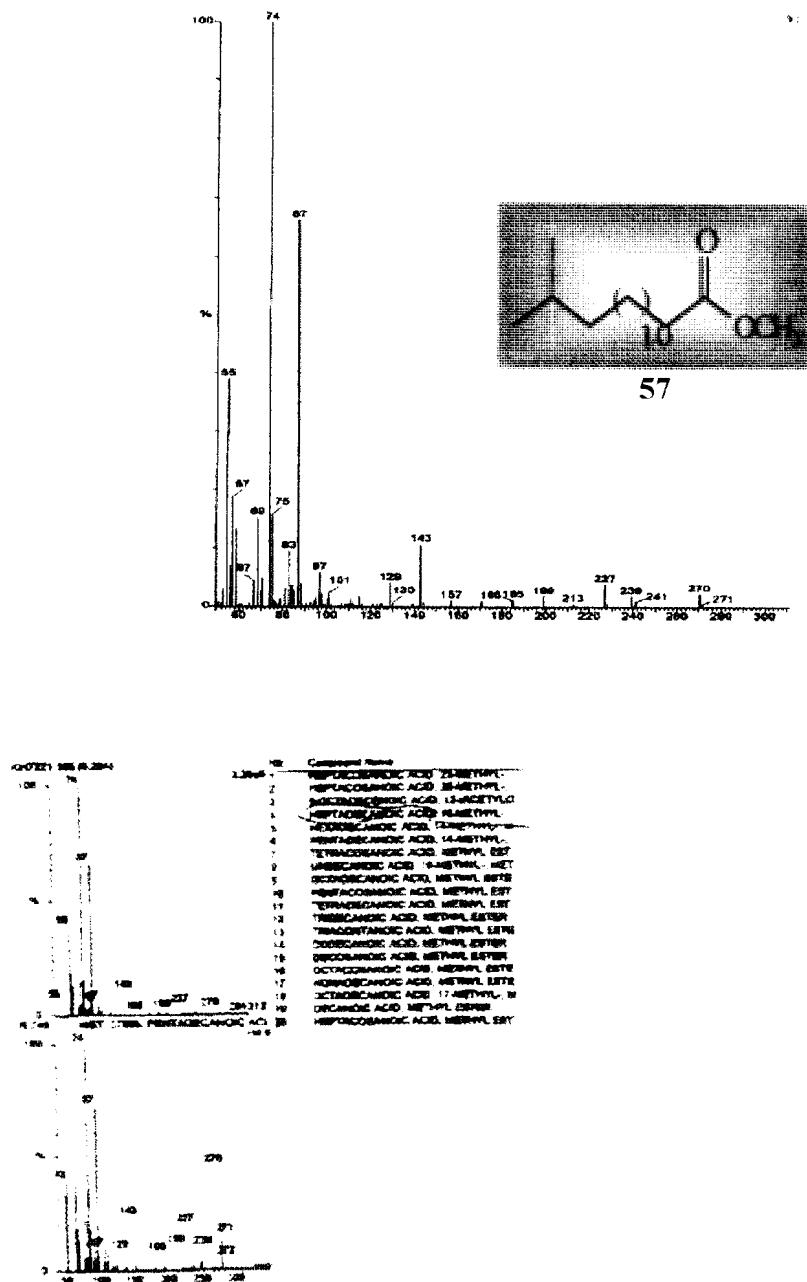
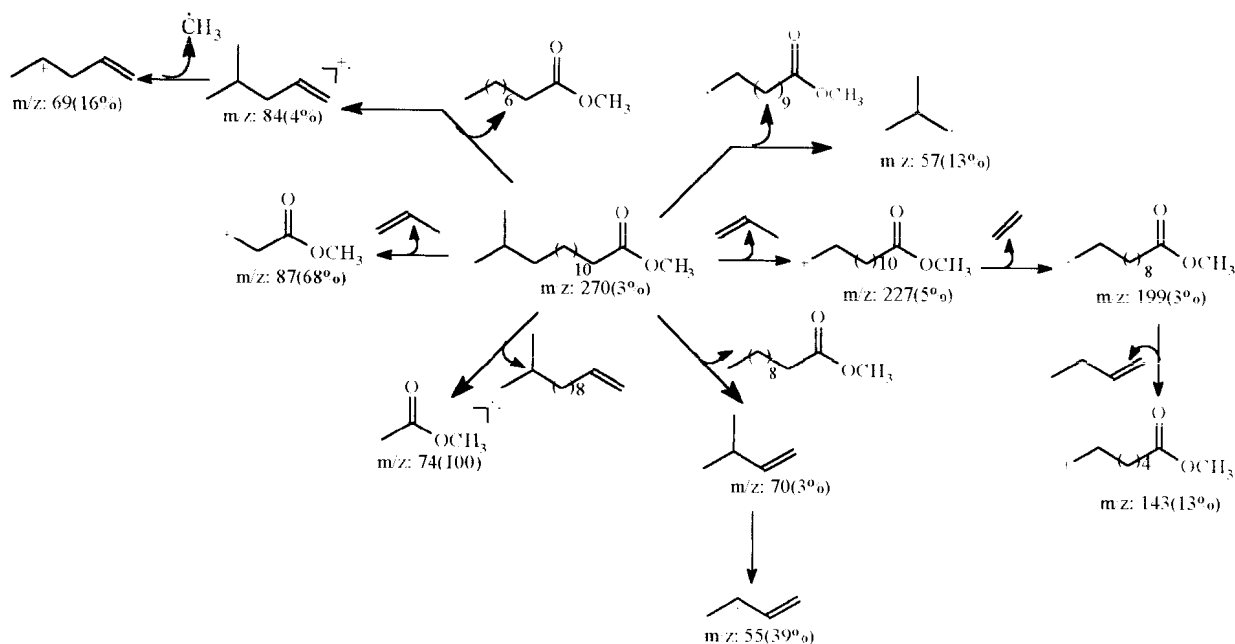
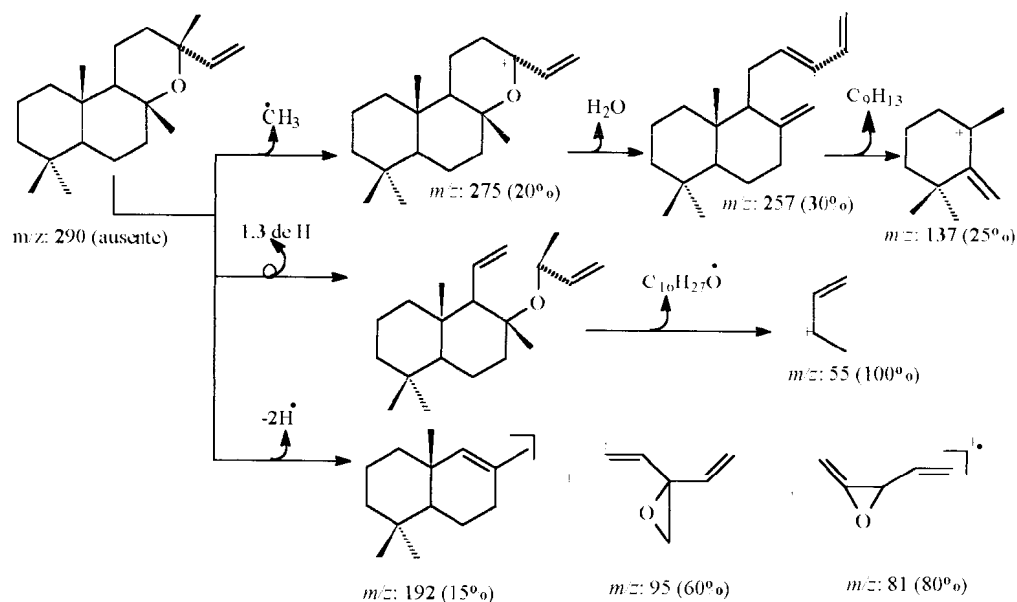


Figura 9: Espectro de massas de 57.



Esquema 12: Fragmentações de massas da substância 57.

A Figura 10 apresenta picos importantes em m/z : 275(20%), 257(30%), 81(80%) e o pico principal em m/z : 55(100%) correspondentes às estruturas mostradas no Esquema 13.



Esquema 13: Fragmentações de massas da substância 64.

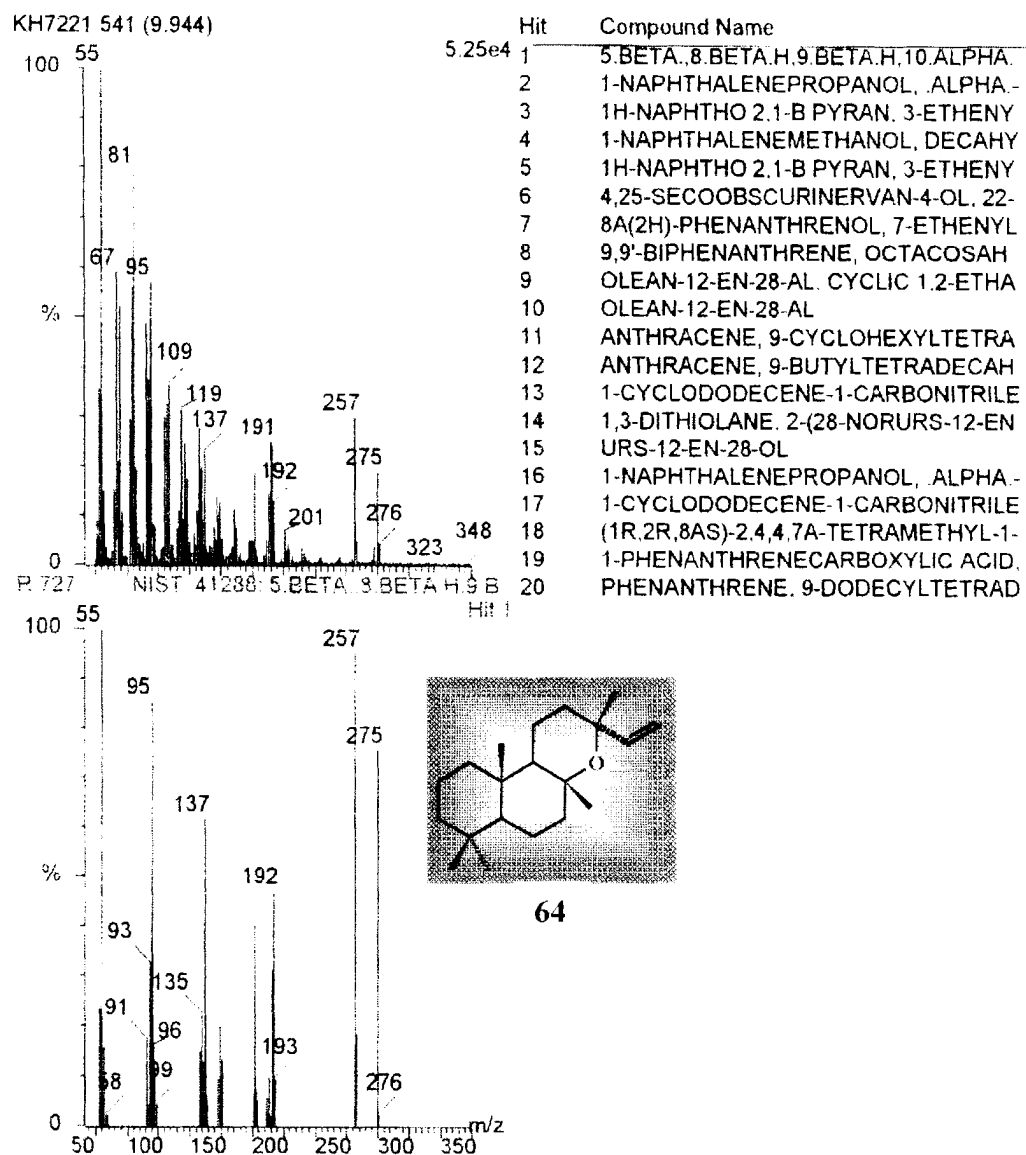
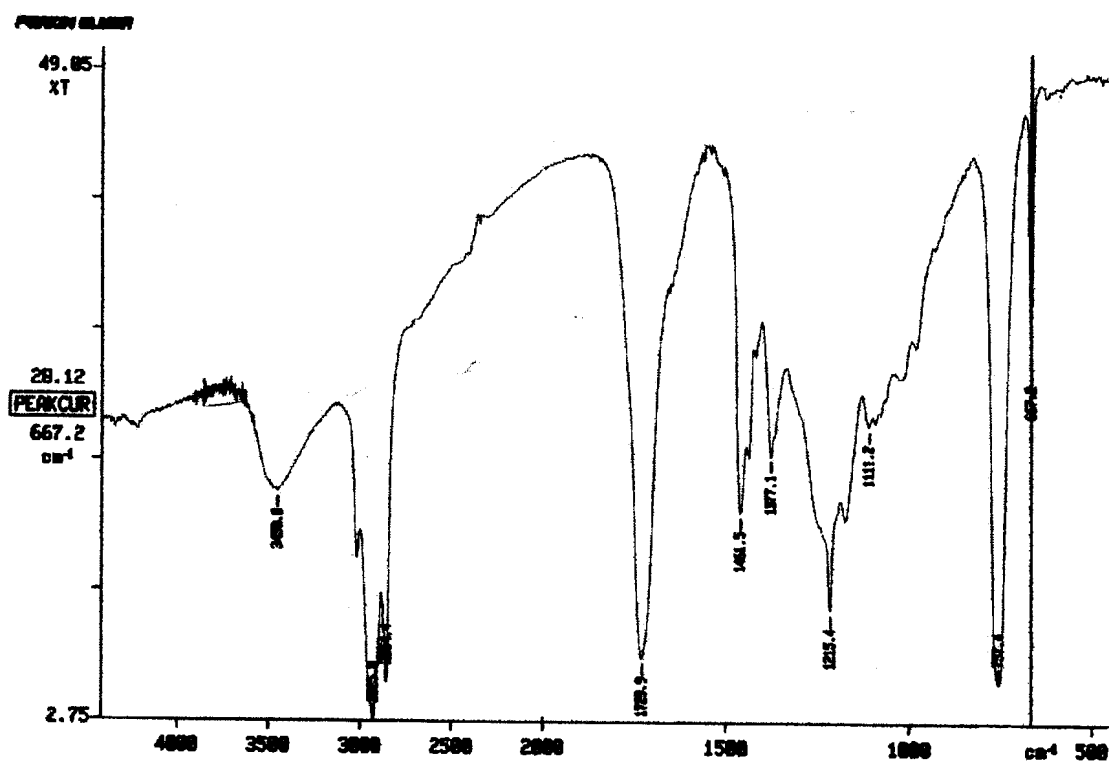


Figura 10: Espectro de massas de **64** comparado com dados da biblioteca do aparelho.

Após as deduções das análises dos espectros de massas fez-se a análise dos dados espectrais de I.V., RMN de ^1H e de ^{13}C (**Figuras 11, 12 e 13**) e comparou-se os dados com os da literatura^{45, 46} conforme descrito abaixo.

O espectro de I.V mostrou absorções a $3450,8\text{ cm}^{-1}$ (hidroxila de ácido), $2925,8$; $2854,4$ e $757,4\text{ cm}^{-1}$ (cadeia alquílica) e $1729,9\text{ cm}^{-1}$ (carbonila de éster).



97/10/29 11:26
X: 4 scans, 4.0cm-1

Figura 11: Espectro de I.V. da mistura de 56, 57 e 64

O espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C destas substâncias são compatíveis com a mistura de ácido graxo, éster metílico e um diterpeno (**Figuras 12, 13 e 13a**). O espectro de RMN ^1H mostra sinais correspondentes a hidrogênios em carbonos metílicos δ_{CH_3} : 0,85 (d, $J= 6,5$ Hz), 3,67 (s), em carbonos metilênicos δ_{CH_2} : 1,24 (m), 1,60 (m), 2,34 (t, $J= 6,2$ Hz) (**Tabelas 4**, pág. 63). O espectro de RMN de ^{13}C mostra sinais correspondentes aos carbonos metílicos δ_{CH_3} : 14,09 em carbonos metilênicos δ_{CH_2} : 18,40(**64**); 19,50 (**64**); 22,68; 24,91; 25,58; 27,16; 28,79 - 29,67; 31,89; 34,07; 34,10; 39,69(**64**); 42,50(**64**); carbonos metínicos δ_{CH} : 147,30 (**64**) e carbono carbonílico $\delta_{\text{C=O}}$: 174,50 (**Tabelas 5 e 6**).

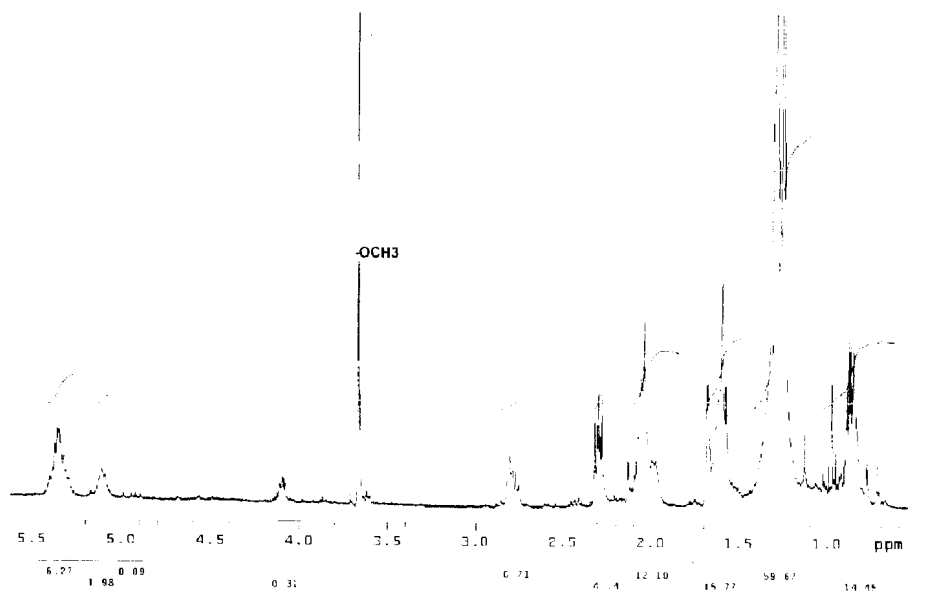


Figura 12: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura de **56**, **57** e **64**.

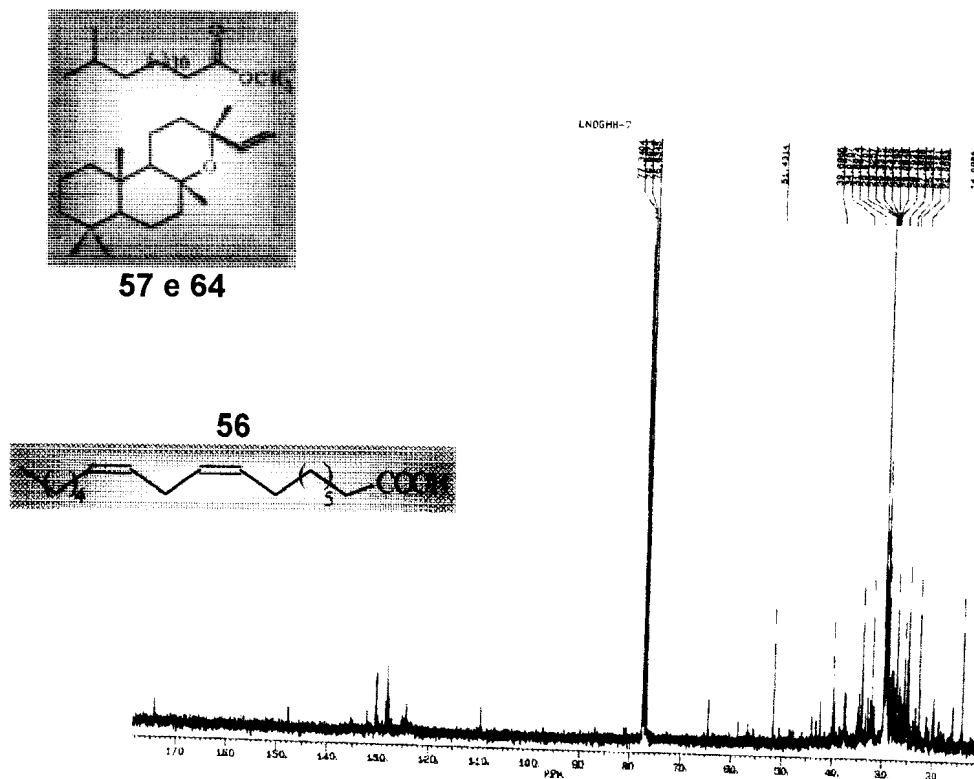


Figura 13: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da mistura de **56**, **57** e **64**.

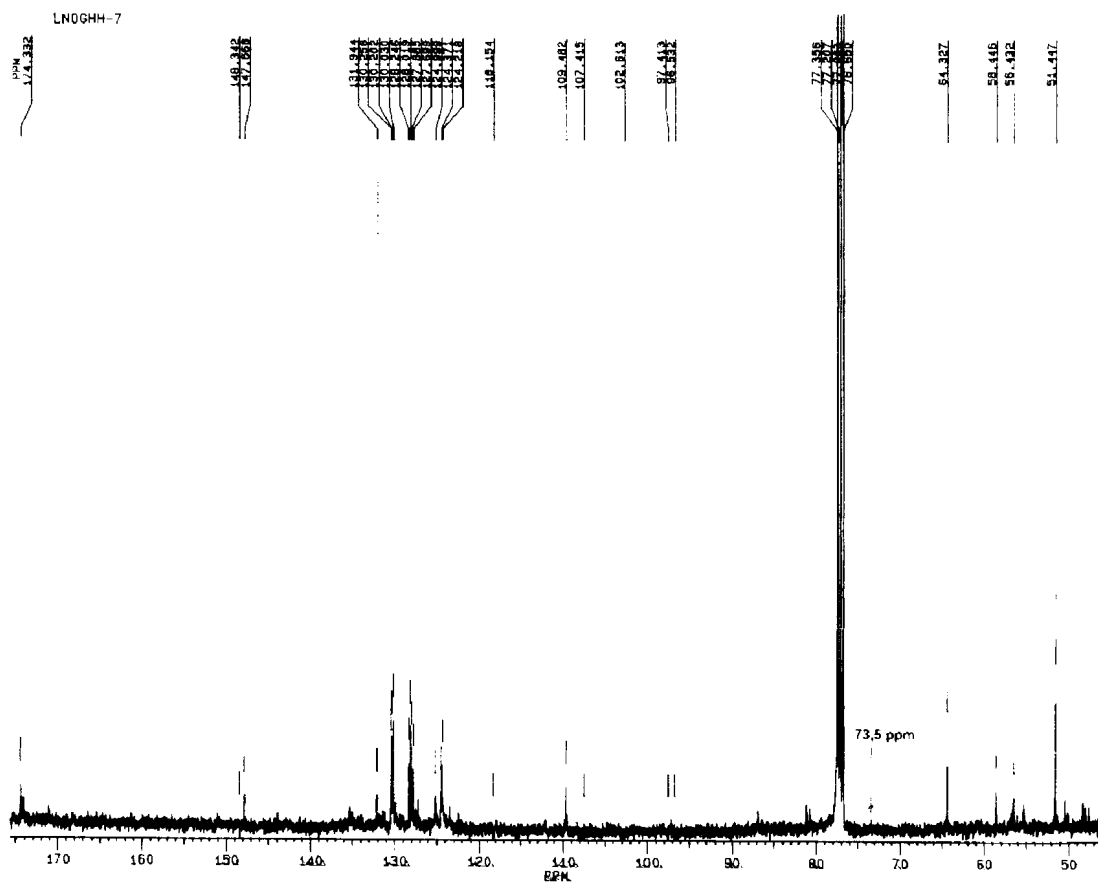
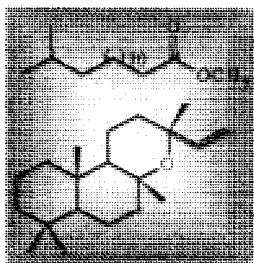
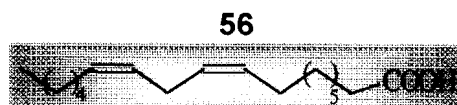


Figura 13a: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C entre 50-175 ppm da mistura de **56**, **57** e **64**.



57 e 64



56

➡ Substância **56**: ácido linoleico (dados discutidos pág. 57-58).

Tabela 5: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C das substância **57** comparados com a literatura.⁴⁶

C	57		Octadecanoato de metila ⁴⁶
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
1	-	174,50	173,00
2	2,34 (t)	34,07	34,13
3	1,24-1,60 (m)	24,91	25,01
4	1,24-0,85 (m)	29,23	29,21
5	1,24-0,85 (m)	29,33	29,31
6	1,24-0,85 (m)	29,42	29,50
7-12	1,24-0,85 (m)	29,67	29,64-29,67
13	1,24-0,85 (m)	29,42	29,41
14	1,24-0,85 (m)	28,79	31,97
15	1,24-0,85 (m)	22,66	22,73
16	1,24-0,85 (m)	22,66	14,10
1'	3,65 (s)	51,43	Não consta na referência

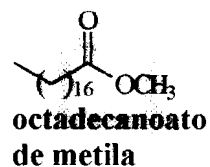
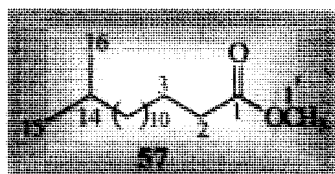
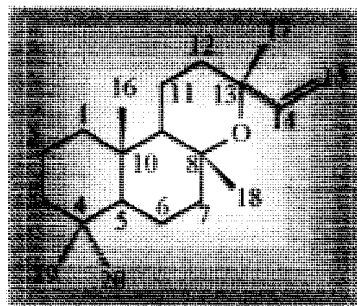


Tabela 6: Dados de RMN de ^{13}C da substância **64** comparados com a literatura.⁴⁶

	64	Óxido de 13-epimanoíla ⁴⁶
C	δ_c	δ_c
1	39,69	39,40
2	18,40	18,70
3	42,50	42,20
4	33,40	33,40
5	57,00	56,50
6	19,50	19,90
7	43,30	43,10
8	76,10	76,10
9	59,00	58,50
10	39,80	39,60
11	16,00	15,90
12	34,80	34,90
13	73,50	73,30
14	147,60	147,80
15	109,50	109,50
16	32,60	32,70
17	33,00	33,30
18	21,00	21,30
19	16,50	15,90
20	24,00	24,00



5.2.4- Substância 58

Os depsídeos são substâncias aromáticas, encontradas nos líquens, formadas a partir de policetídeos. As substâncias aromáticas mais comuns em líquens são formadas pela esterificação de duas ou ocasionalmente de três unidades fenólicas, como por exemplo, derivados do ácido orselínico. O processo biossintético inicia-se como no caso dos ácidos graxos, com a condensação do acetilSCoA e manoilSCoA. A acetoacetilSCoA, resultante desta condensação, pode condensar com duas outras moléculas de malonilSCoA em etapas sucessivas, formando um policetídeo de oito carbonos. Este último pode ciclizar através de dois processos distintos: um deles por condensação aldólica produzindo ácido orselínico, e o outro por condensação tipo Claisen, produzindo floroacetofenona (**Figura 14**)⁴⁷.

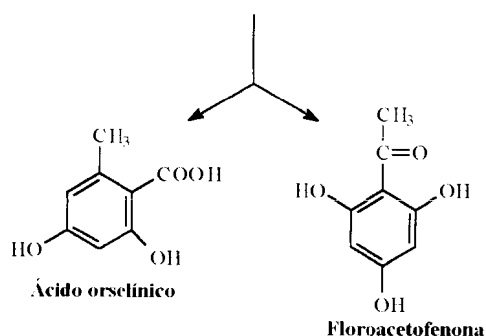


Figura 14: Biossíntese do ácido orselínico e floroacetofenona

O ácido orselínico é o precursor de depsídeos derivados do orcinol. A formação desses compostos ocorre por esterificação entre unidades derivadas deste ácido.

Substâncias aromáticas de líquens possuem potencial alergênico podendo causar dermatites, como exemplo tem-se o trabalho feito por Solberg e col. onde durante um período de dois anos e meio, sete pacientes habitualmente testados em seu laboratório revelaram alergia de contato a musgo de carvalho em perfumes. Todos reagiram a uma mistura de líquenes diferentes e alguns a combinações específicas de líquens. A sensibilidade provavelmente foi induzida por cosméticos que contêm substâncias de líquenes. Três combinações causaram reações em todos os pacientes testados: atranorina, ácido evernico e ácido usnico. Três pacientes eram fotossensíveis, mas as reações mais fortes foram através do contato prolongado durante a proteção completa contra a luz. Os dados sugerem que a capacidade sensibilizante das combinações de líquens seja principalmente de contato e não de fotocontacto.⁴⁸

O depsídeo **58** foi isolado do extrato hexânico do caule de *Luxemburgia nobilis* (**Esquema 4**, pág. 41). A fórmula molecular foi deduzida como $C_{19}H_{18}O_8$ através do espectro de massas de baixa

resolução [m/z : 375 (M^{+1} , 15%)] (Figura 18, Esquema 14) e por espectros de RMN 1H e ^{13}C (Figuras 16 e 17).

O espectro de I.V mostrou absorções a $3448,1\text{ cm}^{-1}$ (hidroxilas fenólicas), $2931,0$; $2848,7$; $755,6\text{ cm}^{-1}$ (CH_3), $1736,7\text{ cm}^{-1}$ (carbonila de éster), $1654,6\text{ cm}^{-1}$ (carbonila de aldeído), $1454,8\text{ cm}^{-1}$ (aromático) (Figura 15).

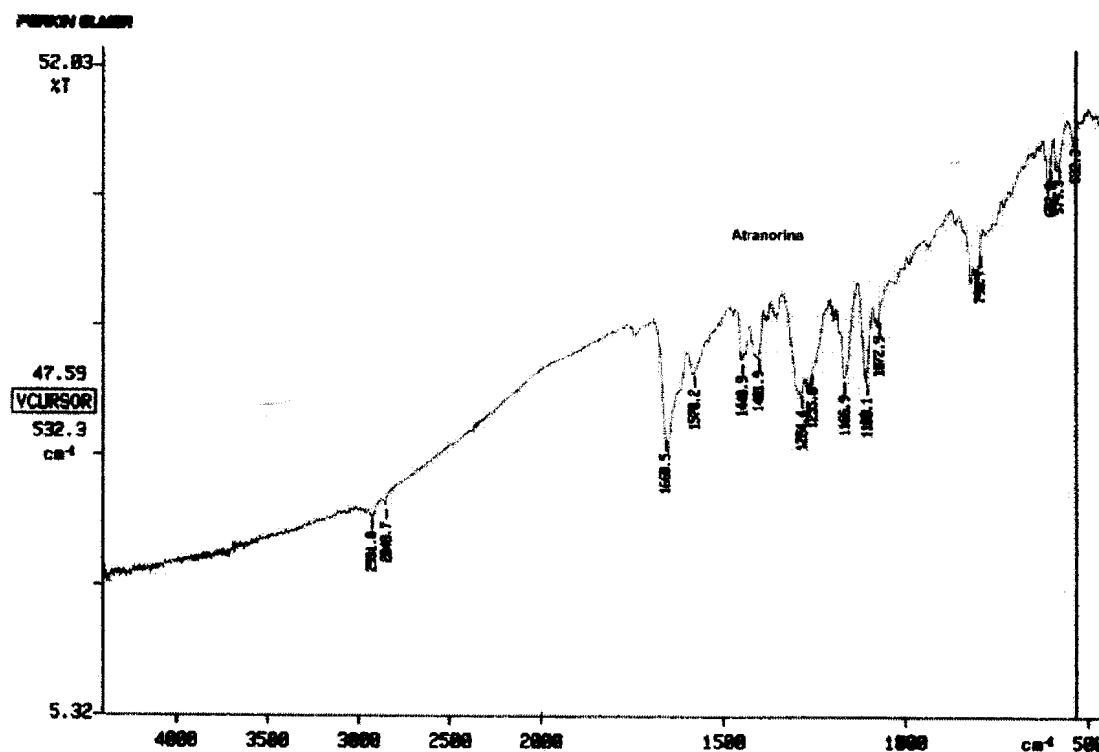


Figura 15: Espectro de infra-vermelho de 58.

O espectro de RMN de 1H mostrou a presença dos singletos a δ_H : 2,07 (3H); 2,53 (3H); 2,67 (3H) correspondentes aos três grupos metílicos ligados a carbono sp^2 , 3,97 ($-OCH_3$), 10,3 ($-COH$), 11,94; 12,49; 12,54 (3 x $-OH$) e em 6,50; 6,39 (2H benzílicos).

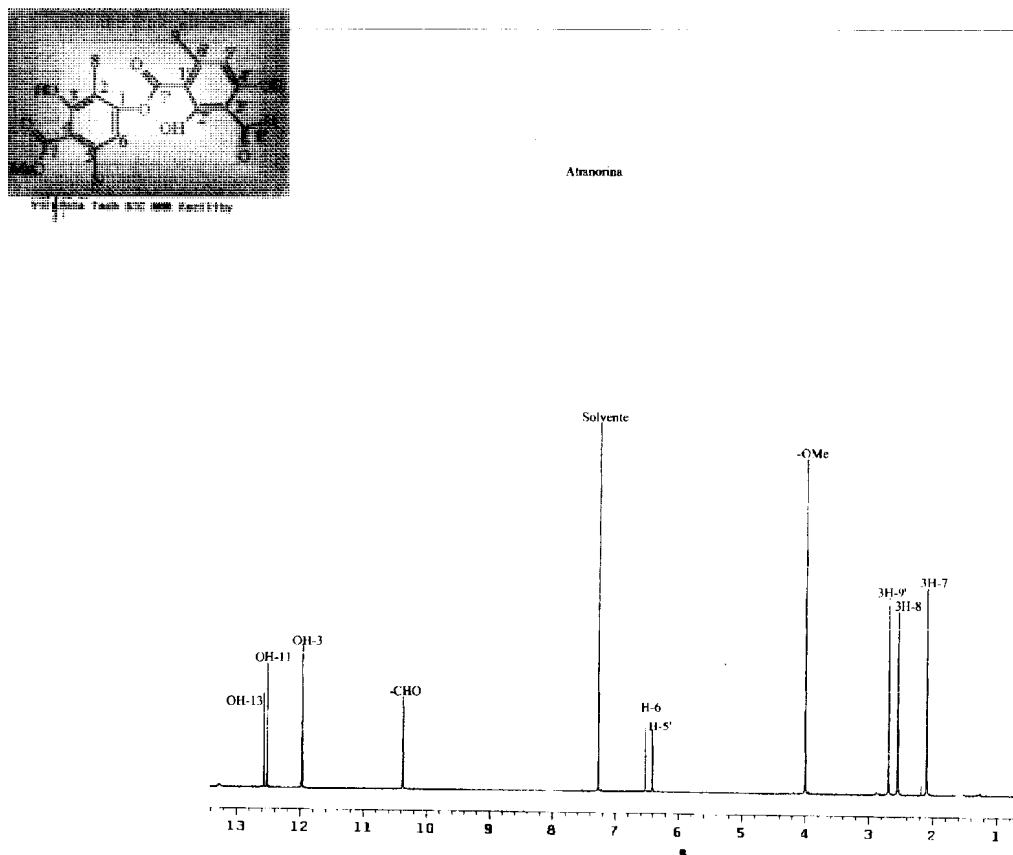


Figura 16: Espectro de RMN de ^1H da substância **58** em CDCl_3 (400 MHz).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 17**) mostrou a presença de três $-\text{CH}$ (δ_{C} 193,80; 115,90; 112,80) e quatro $-\text{CH}_3$ (δ_{C} 9,36; 24,03; 25,60; 56,30) que confere com os dados obtidos através da análise de RMN de ^1H (**Tabela 7**, **Figura 16**). Os deslocamentos químicos dos carbonos sp^2 quaternários ($\delta_{\text{C}=\text{C}-\text{O}}$ 162,80; 152,40; 167,50; 169,70; $\delta_{\text{C}=\text{C}}$ 102,80; 108,50; 110,30; 116,70; 139,90; 152,40; $\delta_{\text{C}=\text{O}}$ 172,20; 169,70) levou a proposta estrutural de uma substância com dois anéis aromáticos com oito substituintes e dois hidrogênios. As duas metilas ligadas a carbono

sp^2 ($\delta_{C=C}$ 139,90; 152,40) mostram valores compatíveis com as posições *orto* e *para* carbonila.

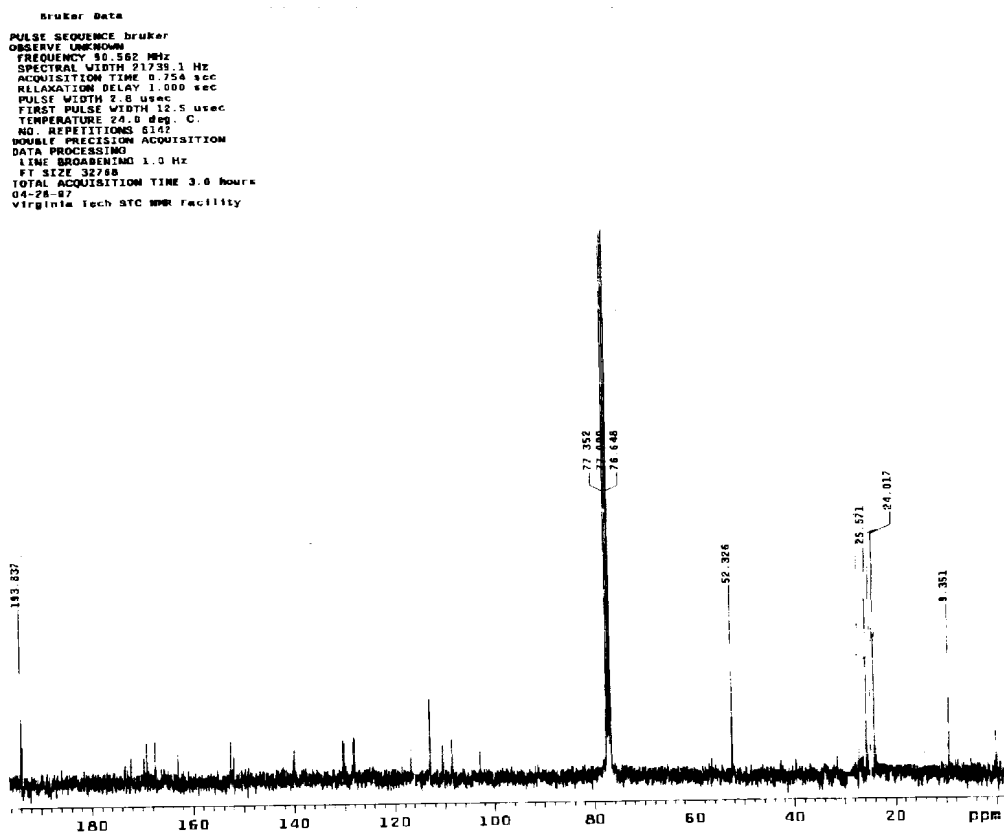


Figura 17: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) da substância **58**.

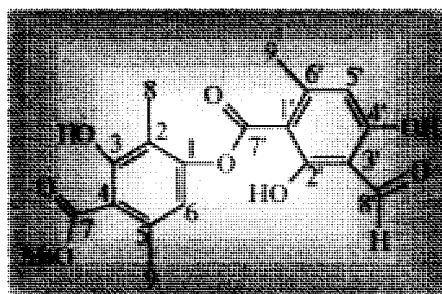
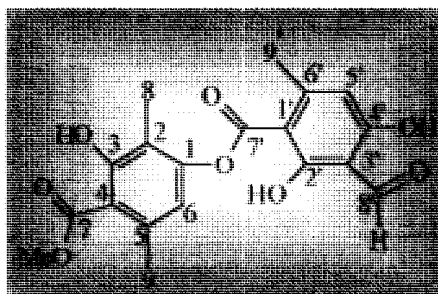


Tabela 7: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância **58** comparados com a literatura.⁴⁹

C	58		Atranorina ⁴⁹
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{H}
1	152,00	-	-
2	116,70	-	-
3	162,80	-	-
4	110,30	-	-
5	139,90	6,50 (s, 1H)	6,52 (s)
6	115,90	-	-
7	172,20	-	-
8	9,36	2,07 (s, 3H)	2,08 (s)
9	24,03	2,53 (s, 3H)	2,54 (s)
1'	102,80	-	-
2'	169,70	-	-
3'	108,50	-	-
4'	167,50	-	-
5'	112,80	6,39 (s, 1H)	6,40 (s)
6'	152,40	-	-
7'	169,70	-	-
8'	193,80	10,30 (s, 1H)	10,38 (s)
9'	25,60	2,67 (s, 3H)	2,69 (s)
-Ome	52,30	3,97 (s, 3H)	3,96 (s)
HO-3	-	11,94 (s, 1H)	-
HO-2'	-	12,49 (s, 1H)	12,35 (s)
HO-4'	-	12,54 (s, 1H)	12,53 (s)



Atranorina

Estas informações e os picos m/z 196 (100), 194 (90), 179 (95) e 137 (20) mostrados no E.M (Figura 18, Esquema 14) e comparação com dados da literatura⁴⁹ mostra que a substância **58** se refere a 4- (2', 4'- dihidroxi - 3'- formil- 6'- metilbenzoiloxi) -2,5-dimetil-3 - hidroxibenzoato de metila, conhecida como atranorina.

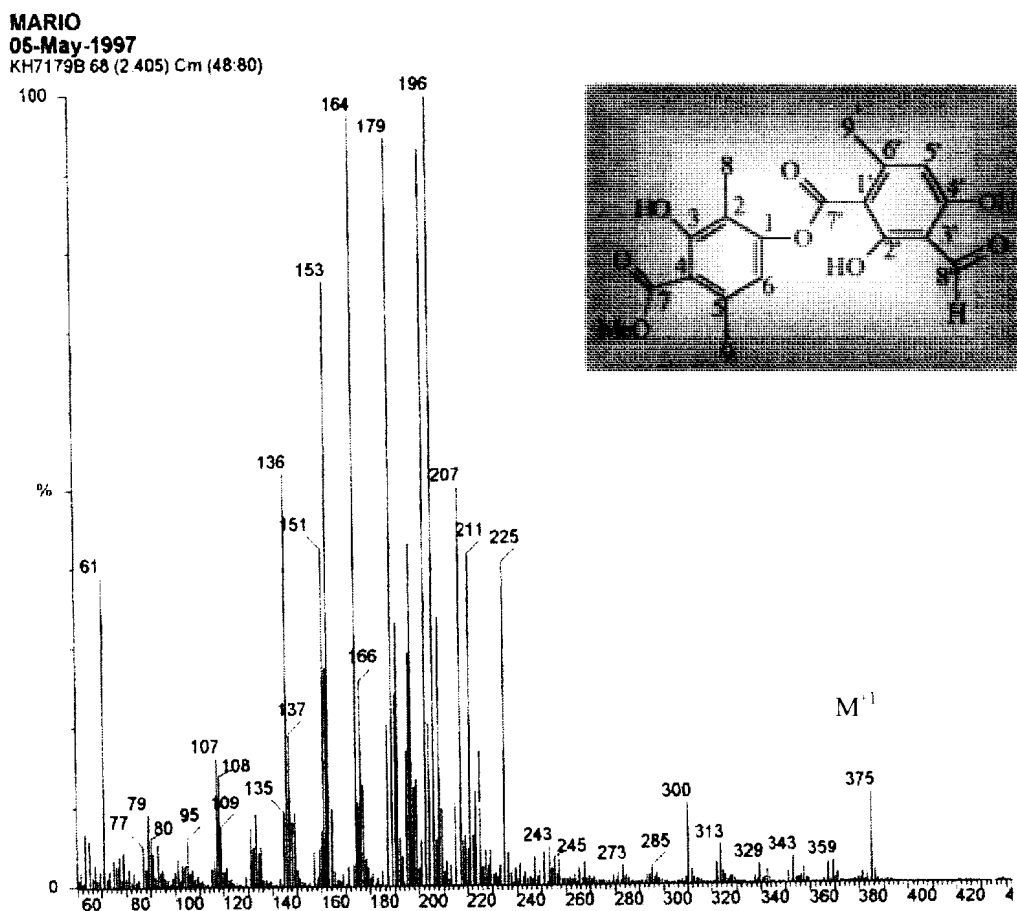
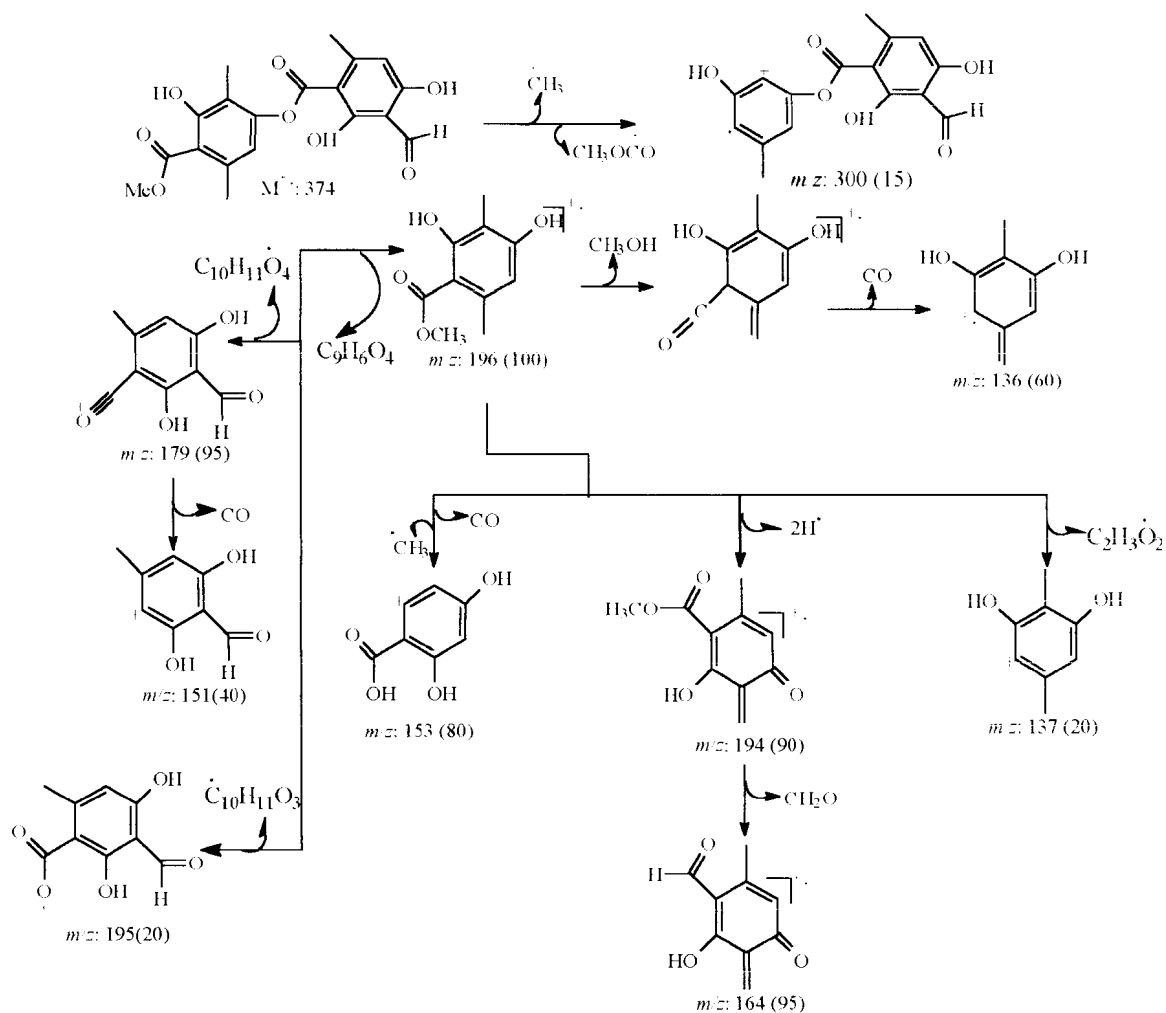


Figura 18: Espectro de massas de **58**



Esquema 14: Fragmentações de massas da substância **58**.

5.2.5- Substâncias 59 e 60.

A mistura das substâncias **59** e **60** foi identificada como 1-octadeca-6,9-dienoil-2,3-dihexadecanoilglicerol (**59**) e 1-eicosa-8,11-dienoil-2,3-dihexadecanoilglicerol (**60**). A determinação da posição da dupla ligação na cadeia alifática não é possível através dos métodos espectrométricos sendo necessário adotar uma estratégia que consiste em uma clivagem oxidativa onde os

produtos podem ser identificados por técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Já que os produtos formados são estáveis durante a CG e, as fragmentações de massas são facilmente interpretadas em relação a estrutura original, o método de escolha para a investigação desses produtos foi a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM).

A literatura descreve que para a determinação da posição da dupla ligação em alquenos lineares é usado o método de adição de dimetil dissulfeto catalisada por iodo, gerando α , β -bis-tiometil-alcanos⁵⁰.

Este método foi utilizado para a derivatização da mistura dos triglicerídeos **59** e **60** (**Capítulo 4**, pág.54) e esta comparado com o derivado tiometílico obtido do ácido linoleico, através do espectro de massas, que também possui duas duplas ligações separadas por um grupo metilênico.

A mistura dos triglicerídeos foi obtida como um óleo viscoso e em um primeiro momento em mistura com a substância **58** (atranorina, **Figura 20**), sendo separados através da cristalização de **58**. No espectro de I.V (**Figura 19**) observa-se bandas a 2919, 2848 e 726 cm^{-1} (CH_2 , CH_3), 1655 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$) e 1737 cm^{-1} (carbonila de éster).

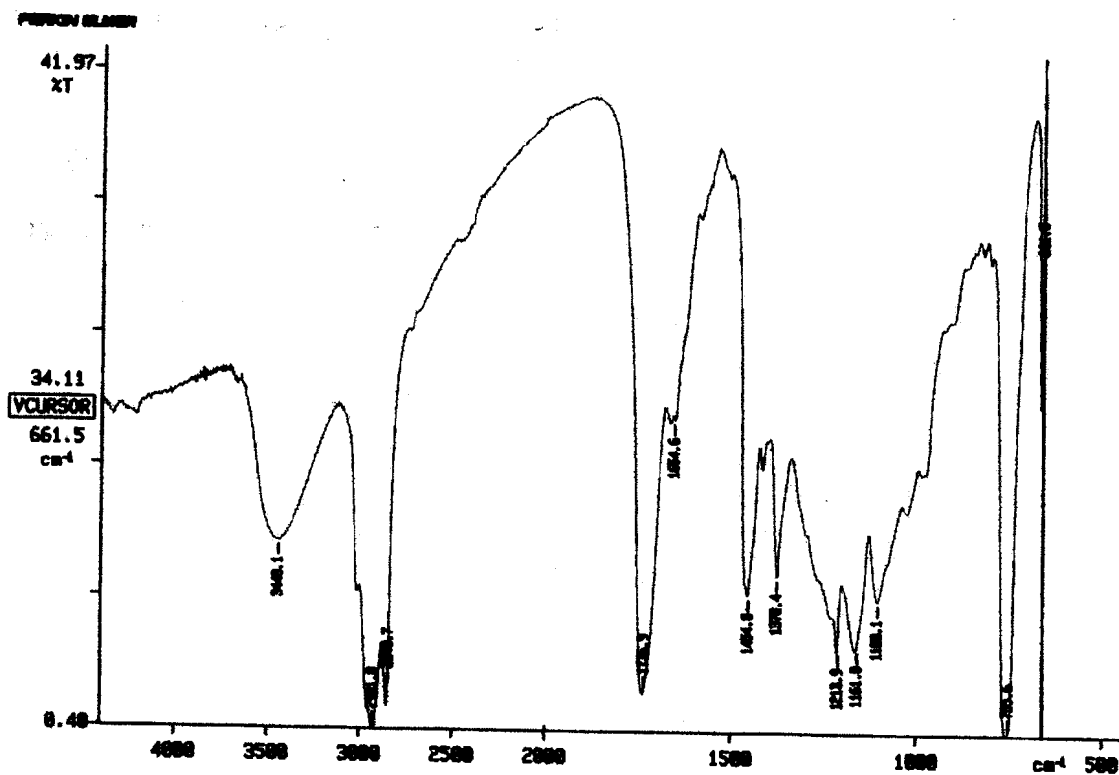


Figura 19: Espectro de infra-vermelho das substâncias 59 e 60.

Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C (PND e DEPT) (Figuras 21, 22 e 23) mostraram sinais de hidrogênios olefínicos em $\delta_{\text{H}} = 5,33$ (m) ligados aos carbonos a $\delta_{\text{C}} = 129,9$ e $127,9$ ppm. Estes sinais juntos com a ausência da banda de absorção em 970 cm^{-1} no espectro de I.V, indicou geometria *cis* para as duplas ligações.

Buffer Data: **LW0271**
 PULSED SEQUENCE: **brker**
 NS: **PRF: LW0271**
 FREQUENCY: **400.146 MHz**
 NUCLEAR: **VIA NUC: 13C**
 ACQUISITION TIME: **1.439 sec**
 RELAXATION DELAY: **1.000 sec**
 PULSE WIDTH: **6.00000**
 FIRST PULSE WIDTH: **10.00000**
 TEMPERATURE: **30.0 deg C**
 NO. ACQUISITIONS: **12**
 DOUBLE PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 13C NUC: **000006**
 TOTAL ACQUISITION TIME: **1 minutes**
30-70-87
 VIRGINIA TECH NMR FACILITY

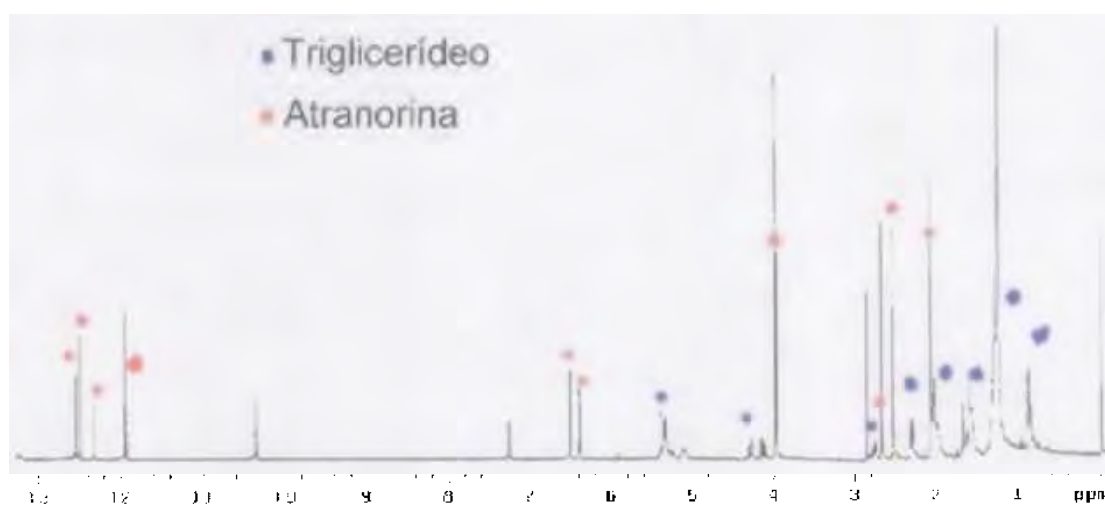


Figura 20: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) das substâncias **58**, **59** e **60**.

LNOGH-10-11-H1
OBSERVE H1
FREQUENCY 399.951 MHz
SPECTRAL WIDTH 5000.0 Hz
ACQUISITION TIME 3.244 sec
RELAXATION DELAY 1.000 sec
PULSE WIDTH 2.1 usec
AMBIENT TEMPERATURE
NO REPEATITIONS 32
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
F1 SIZE 65536
TOTAL ACQUISITION TIME 2 minutes
Oct 15 97
Virginia Tech STC NMR Facility

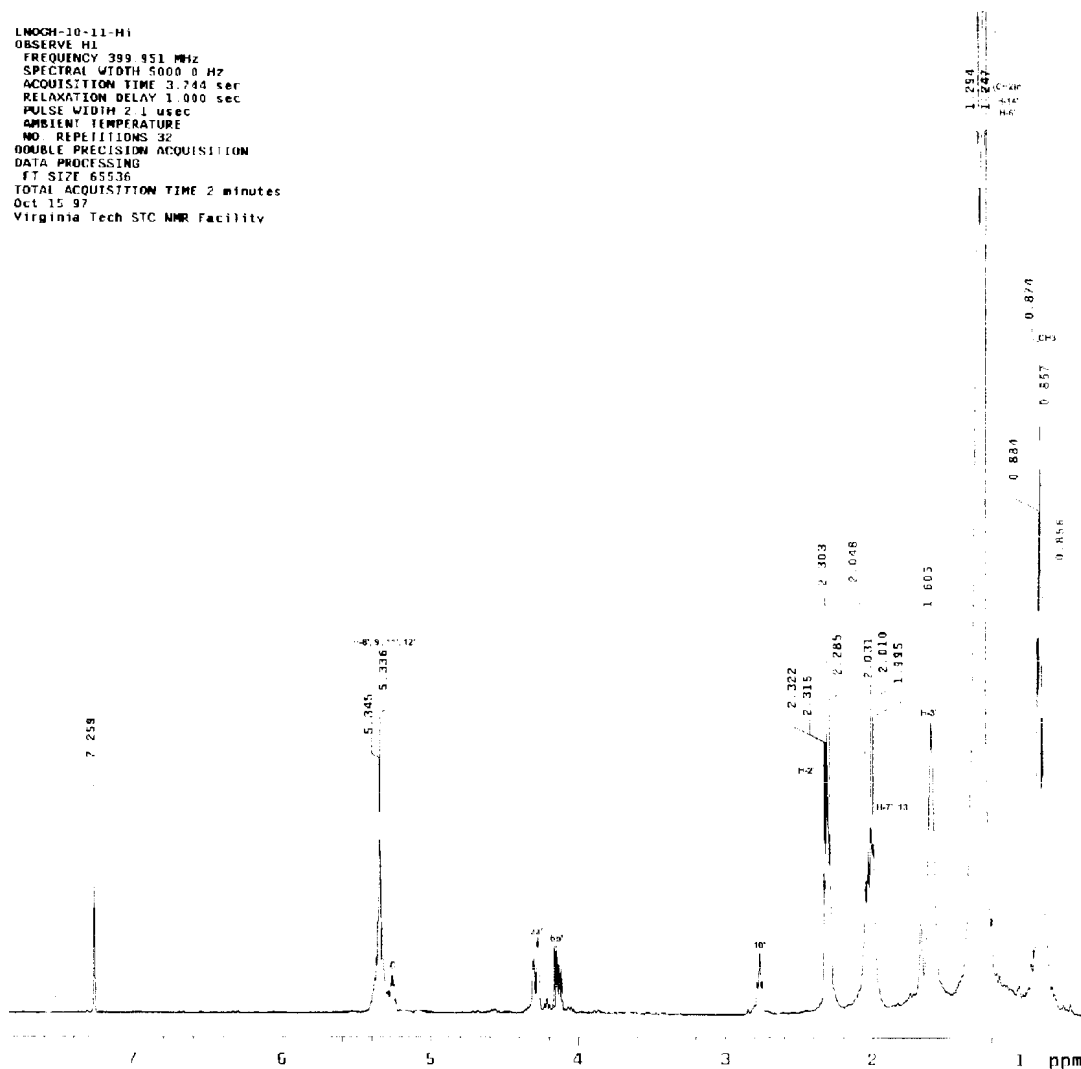
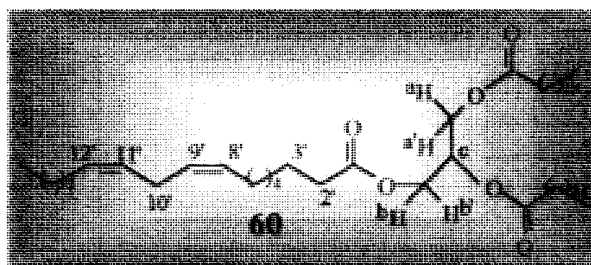
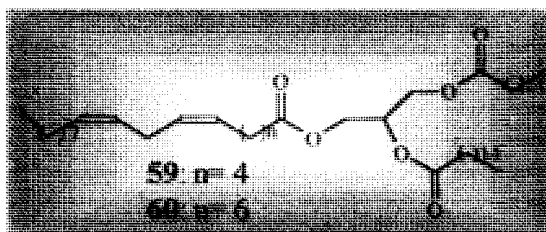


Figura 21: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) em CDCl_3 da mistura das substâncias **59** e **60**.



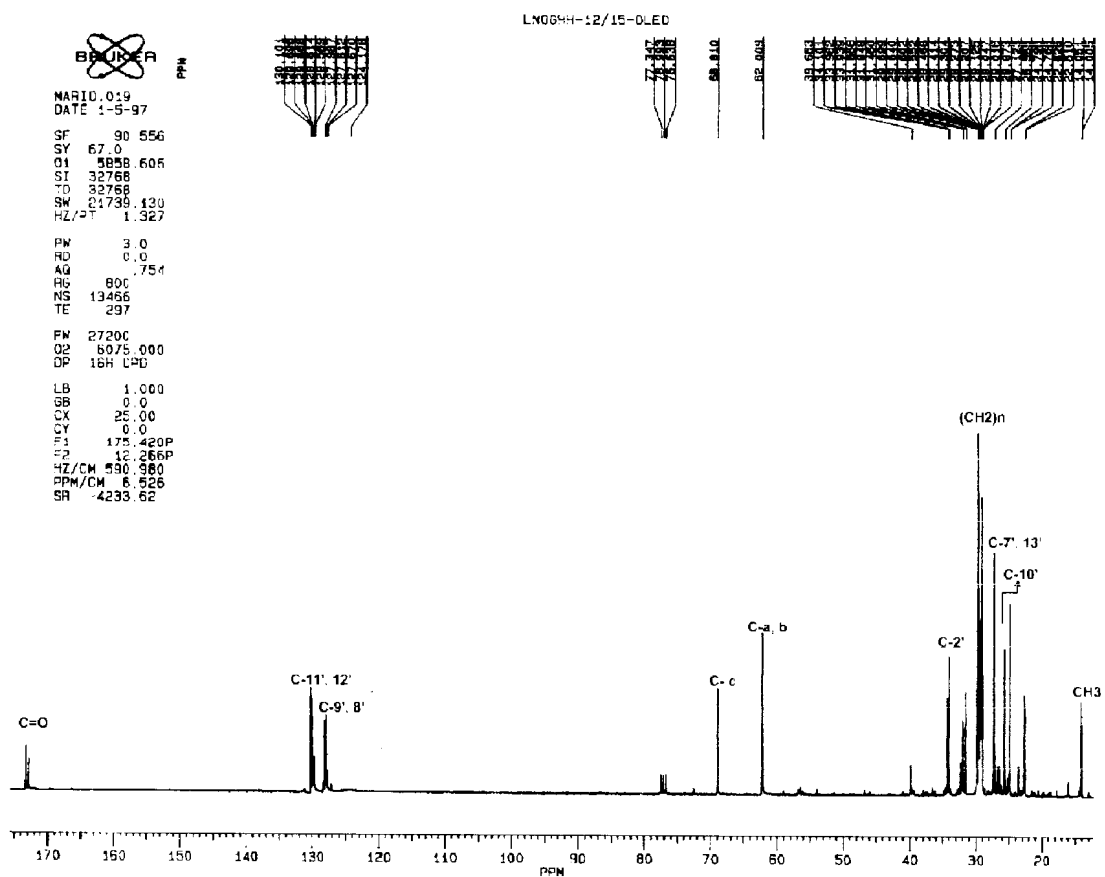
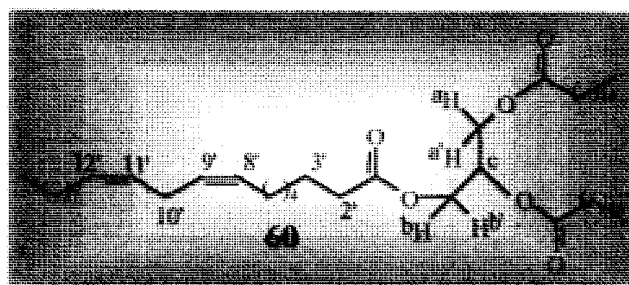
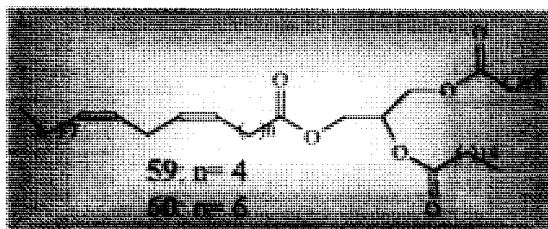


Figura 22: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz) em CDCl_3 das substâncias 59 e 60.



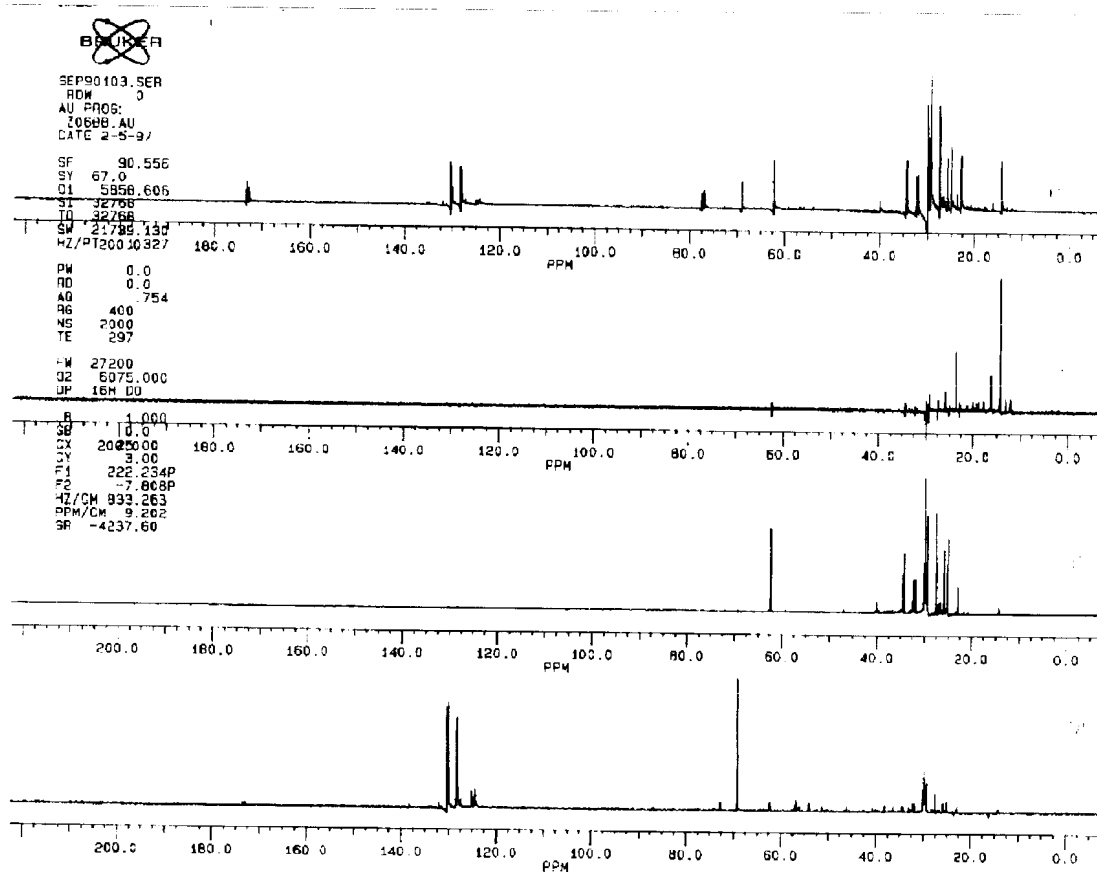
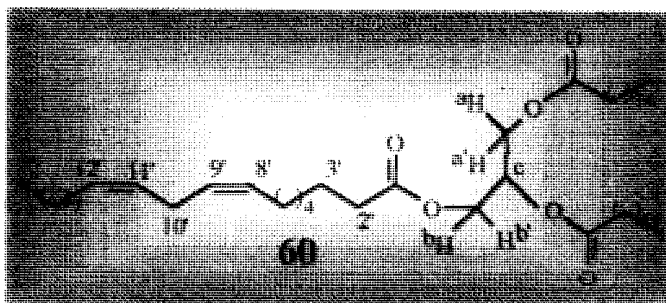
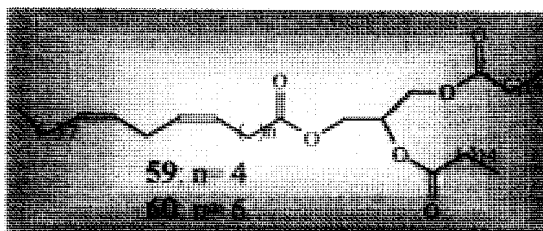


Figura 23: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT em CDCl_3 das substâncias **59** e **60**.



O acoplamento observado no espectro de HOMOCOSY (**Figura 24**) entre um hidrogênio a $\delta_{\text{H}} = 2,78$ (dd, 14,0 e 6,0 Hz, CH_2), e os hidrogênios em $\delta_{\text{H}} = 5,34$ (m) indicou que o CH_2 está ligado a dois carbonos olefínicos. A ligação do CH_2 a $\delta_{\text{H}}: 2,03$ com $\delta_{\text{C}}: 27,2$ ppm, a $\delta_{\text{H}}: 2,78$ com $\delta_{\text{C}}: 25,59$ ($^1J_{\text{CH}}$), 129,9 e 127,9 ppm ($^{2,3}J_{\text{CH}}$) observados nos espectros de HMQC e HMBC (**Figuras 25 e 26**), respectivamente, permitiu propor um éster insaturado onde as duplas estão separadas por um $-\text{CH}_2$ com $\delta_{\text{H}}: 2,78$ e $\delta_{\text{C}}: 25,59$ ppm. A comparação dos dados de RMN dos triglicerídeos com os dados do éster linoleico⁴⁵ confirmou a natureza dessa unidade nos triglicerídeos.

Outros sinais a $\delta_{\text{H}}: 5,25$ (m), 4,25 (dd, $J = 12,0$ e 5,0 Hz), 4,15 (dd, $J = 12,0$ e 6,0 Hz), 2,3 (t, $J = 8,0$ Hz), 1,68 (m), 1,25 (m) e 0,87 (t, $J = 8,0$ Hz) ligados, respectivamente, aos carbonos a $\delta_{\text{C}}: 68,9$ (CH), 62,1 (CH_2), 34,2 (CH_2), 24,8 (CH_2), 31,9-29,0 (CH_2) e 14,1 (CH_3) estão coerentes com um trigliceril éster.

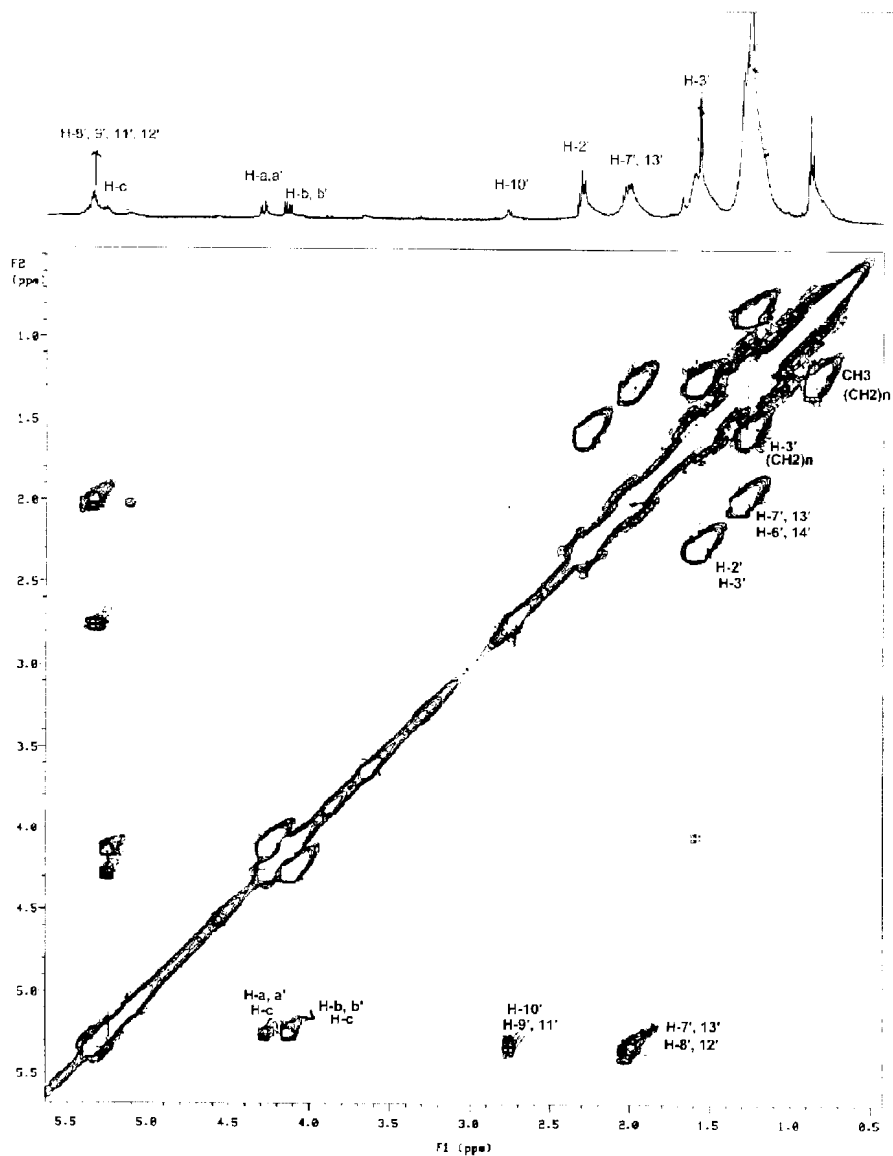
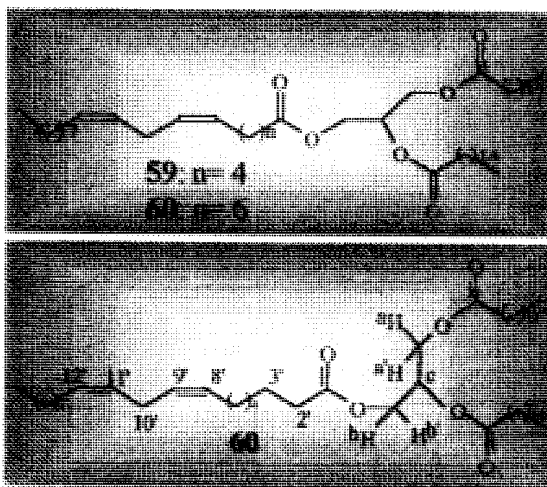


Figura 24: Espectro bidimensional de correlação homonuclear hidrogênio-hidrogênio (^1H , ^1H -Cosy, Homocosy) em CDCl_3 das substâncias **59** e **60**.



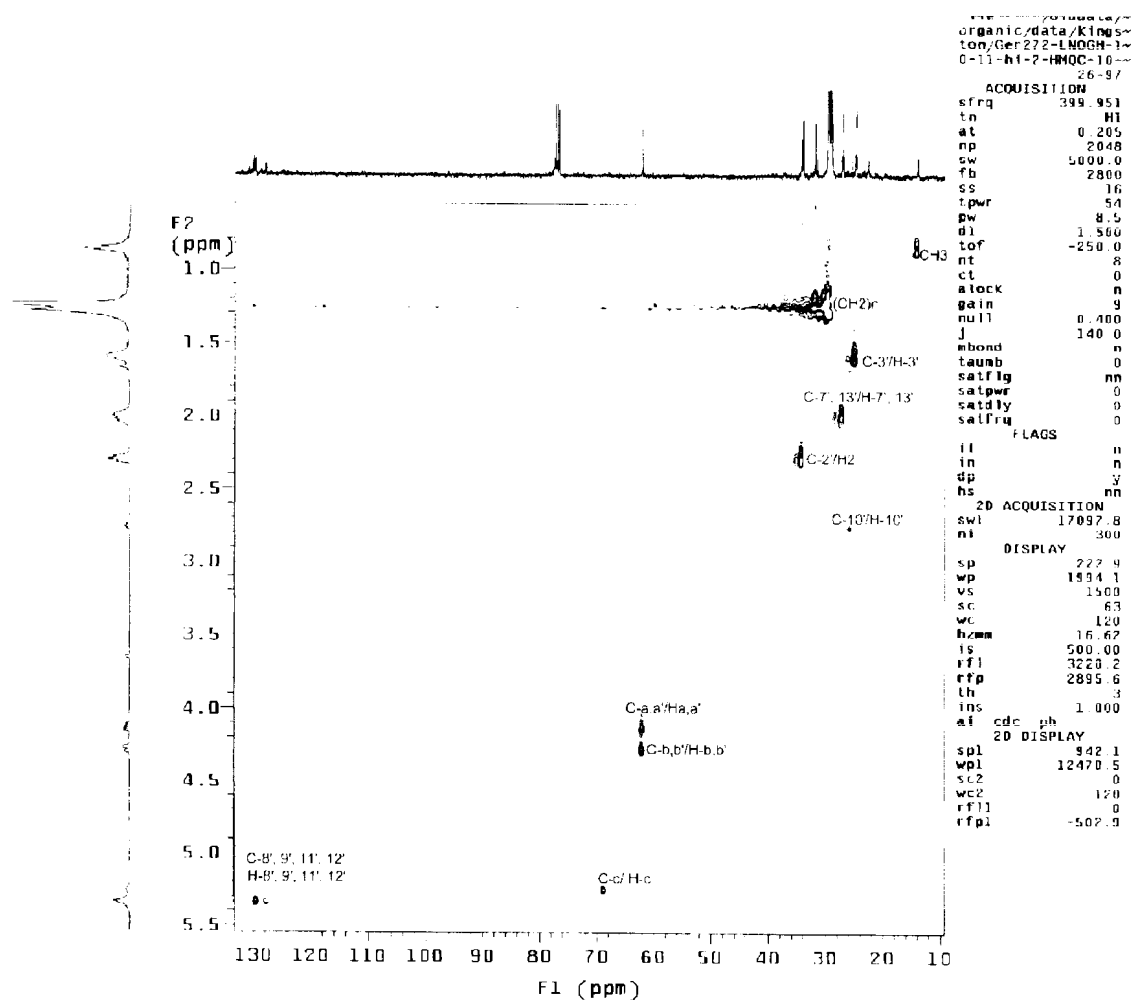
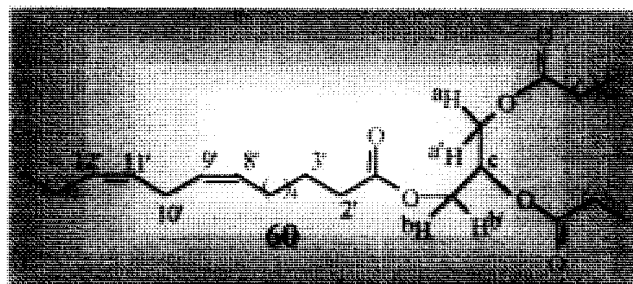
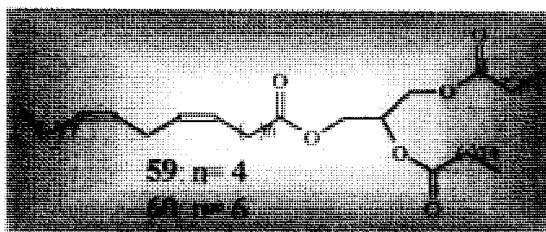


Figura 25: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear hidrogênio-carbono (^1H , ^{13}C -COSY- ^1J , HMQC) em CDCl_3 das substâncias **59** e **60**.



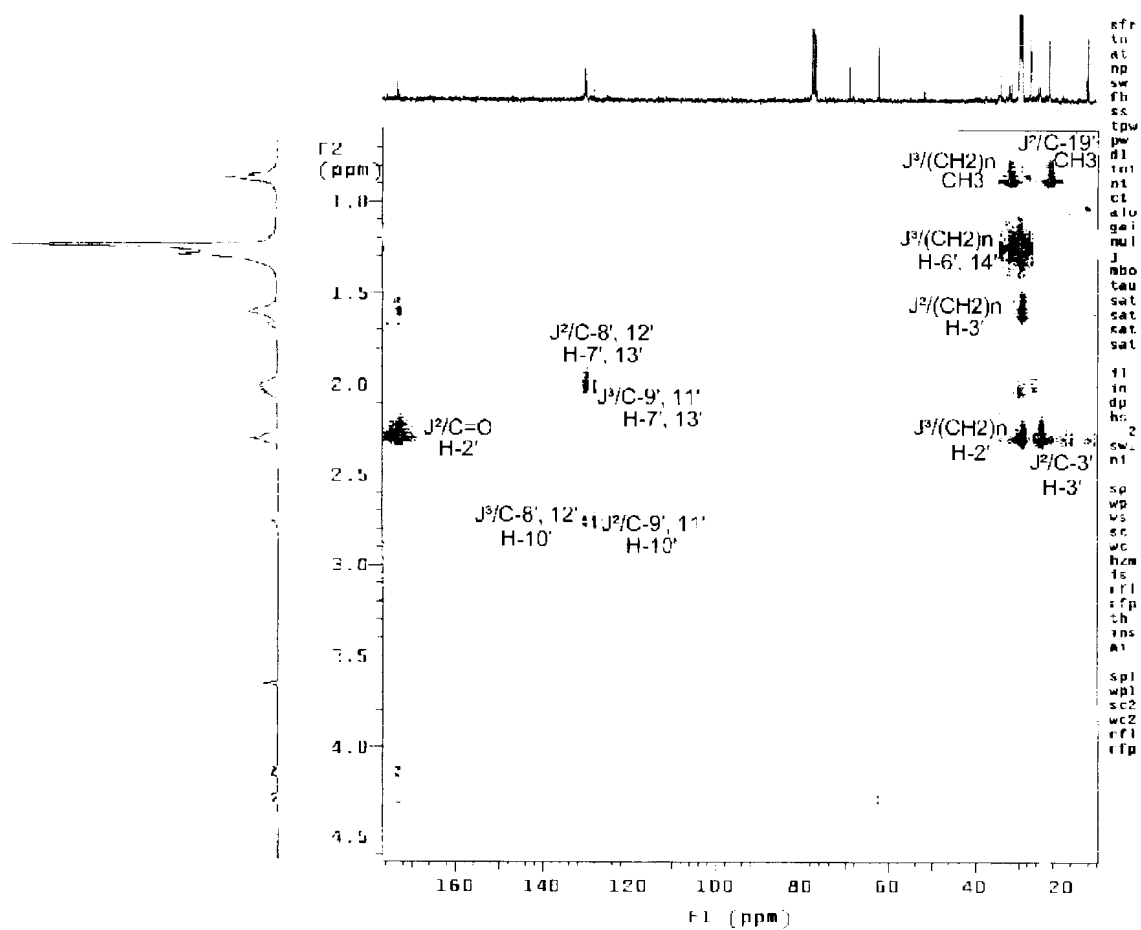
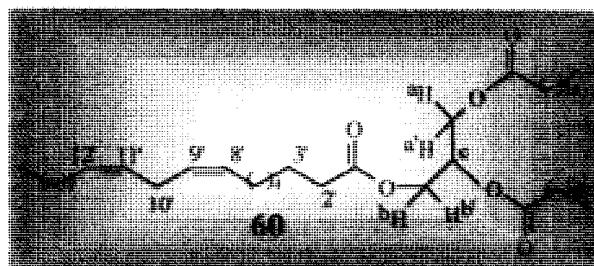
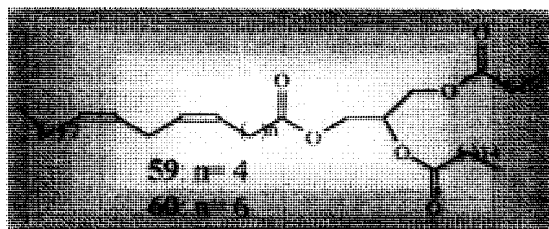


Figura 26: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear hidrogênio-carbono (^1H , ^{13}C -COSY- J^n , $n = 2, 3$, HMBC) em CDCl_3 das substâncias **59** e **60**.



O espectro de massas (FAB) da amostra original mostrou picos com m/z 603 (60a), 575(59a), 551 (59 e 60), 365 (60b), 337 (59b), 313 (59c e 60c), 239 (59 e 60) (Figura 27, Esquema 15).

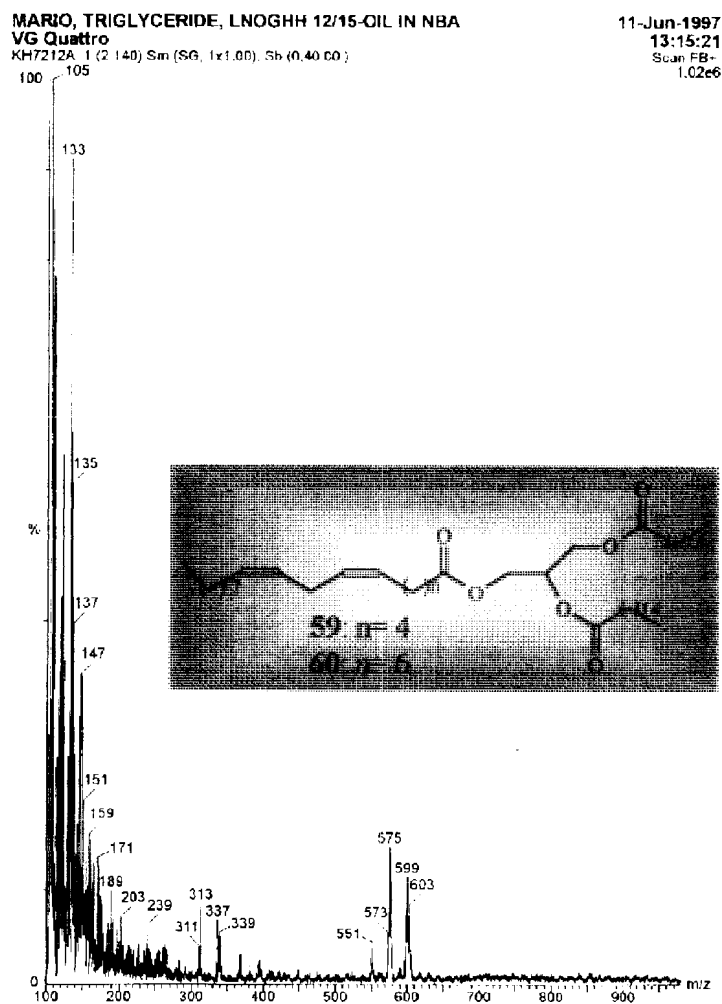
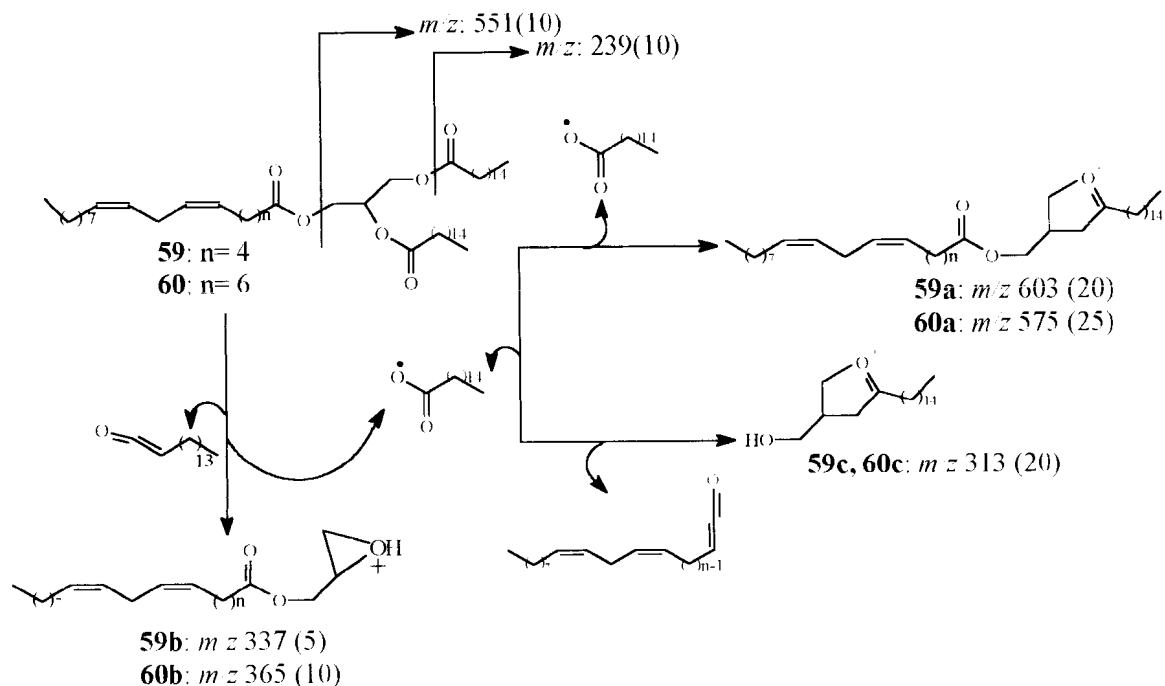
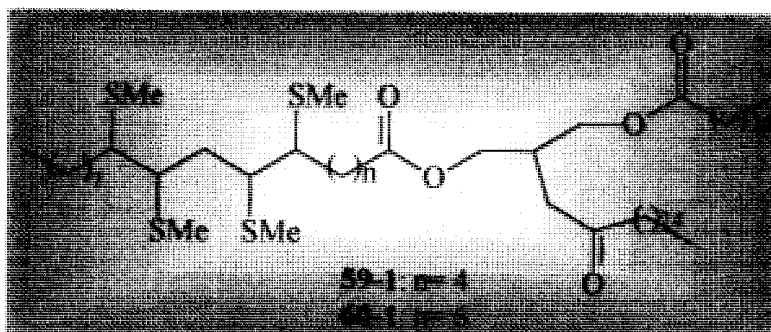


Figura 27: Espectro de massas das substâncias 59 e 60.



Esquema 15: Fragmentação de massas das substâncias **59** e **60**.

O espectro de massas do derivado tiometílico de **59** e **60** (**59-1** e **60-1**) (**Figura 28**) mostrou pico intenso a m/z : 173 (98%) junto com outros picos de menor massa (111, 97, 83, 69, 55 e 41) os quais representam fragmentos de alcenos (**Esquema 16**).⁵⁰ A análise do espectro de massas de **59-1** e **60-1** mostrou com os picos de m/z 385, 367, 313, 311, 227, 185 e 187 para **59-1** e m/z 413, 397, 367, 341, 339, 227, 185 e 187 para **60-1**, que as duplas ligações estão entre os carbonos 6,9 para **59** e 8,11 para **60**.



MARIO, TRIMETHYLGLYCERIDE
VG Quartz
KH7410 50 (4.275) Cm (50:70)

29-Oct-1997
14:12:06
Scan E1+
1.31e6

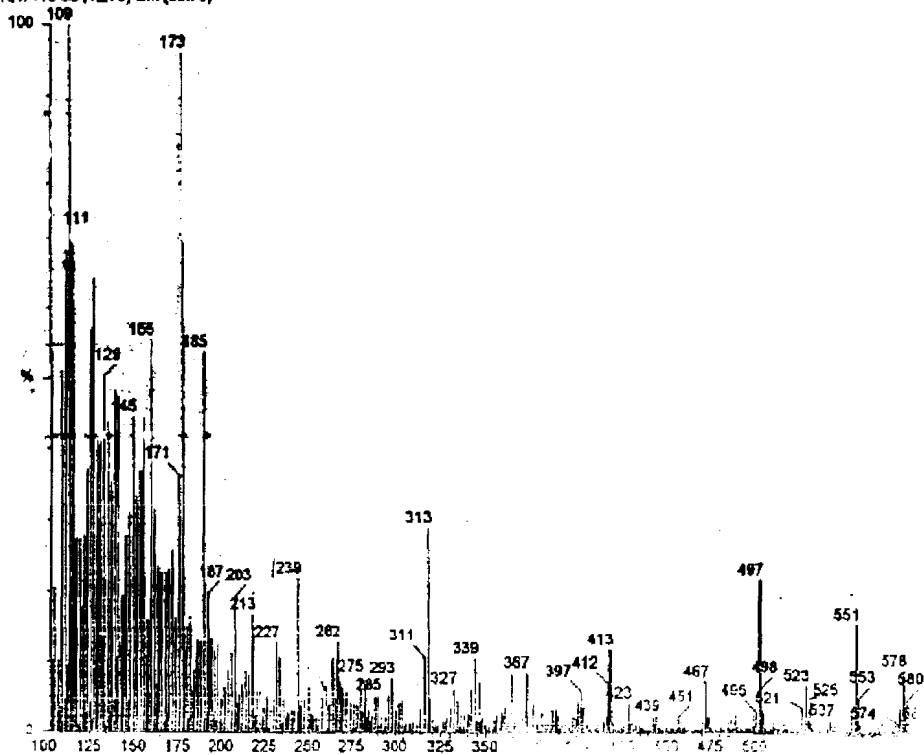
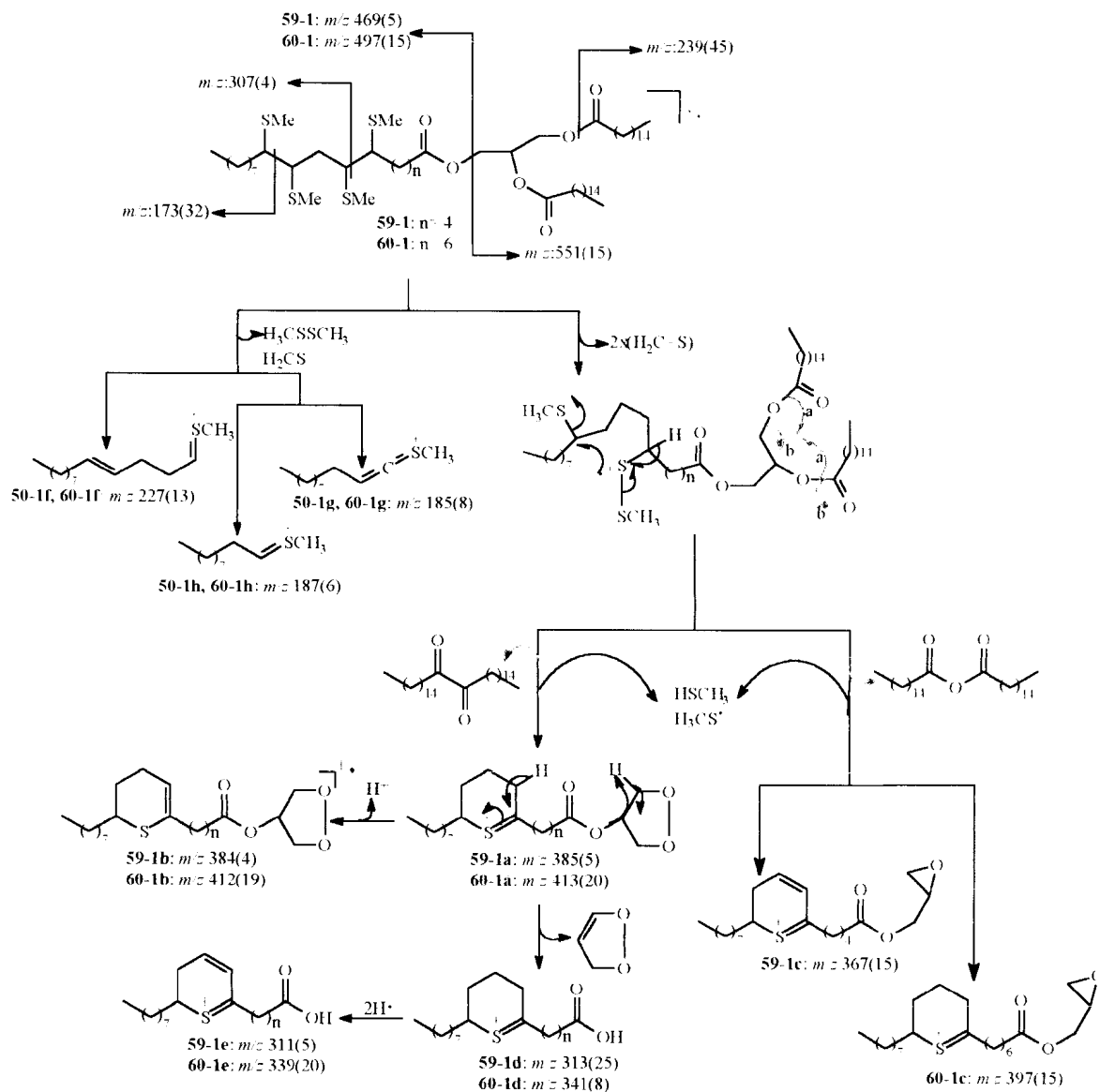


Figura 28: Espectro de massas dos derivados tiométicos 59-1 e 60-1.



Esquema 16: Fragmentação de massas dos derivados tiométicos **59-1** e **60-1**

O espectro de massas do derivado tiometílico do ácido linoleico (**Figura 29**) mostrou sinais que correspondem a fragmentações similares dos derivados **59-1** e **60-1**. Os fragmentos de maior interesse são aqueles obtidos através da clivagem das duplas ligações (**Esquema 17**).

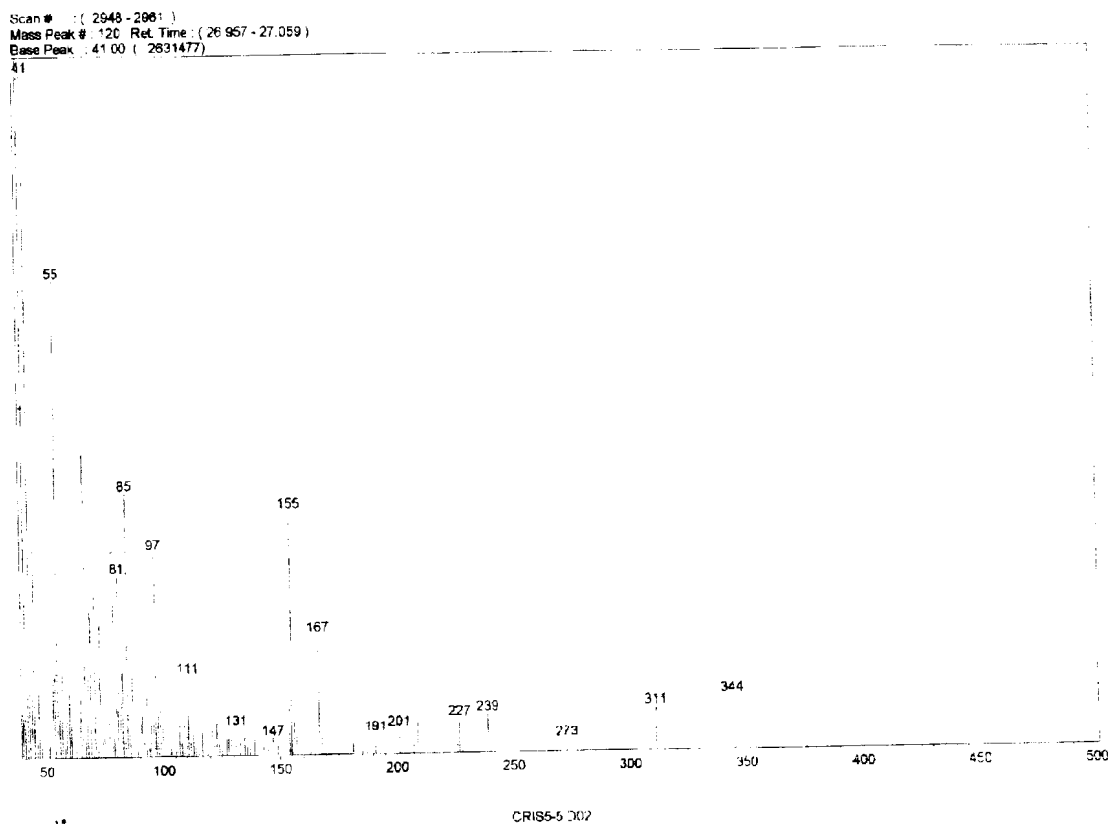
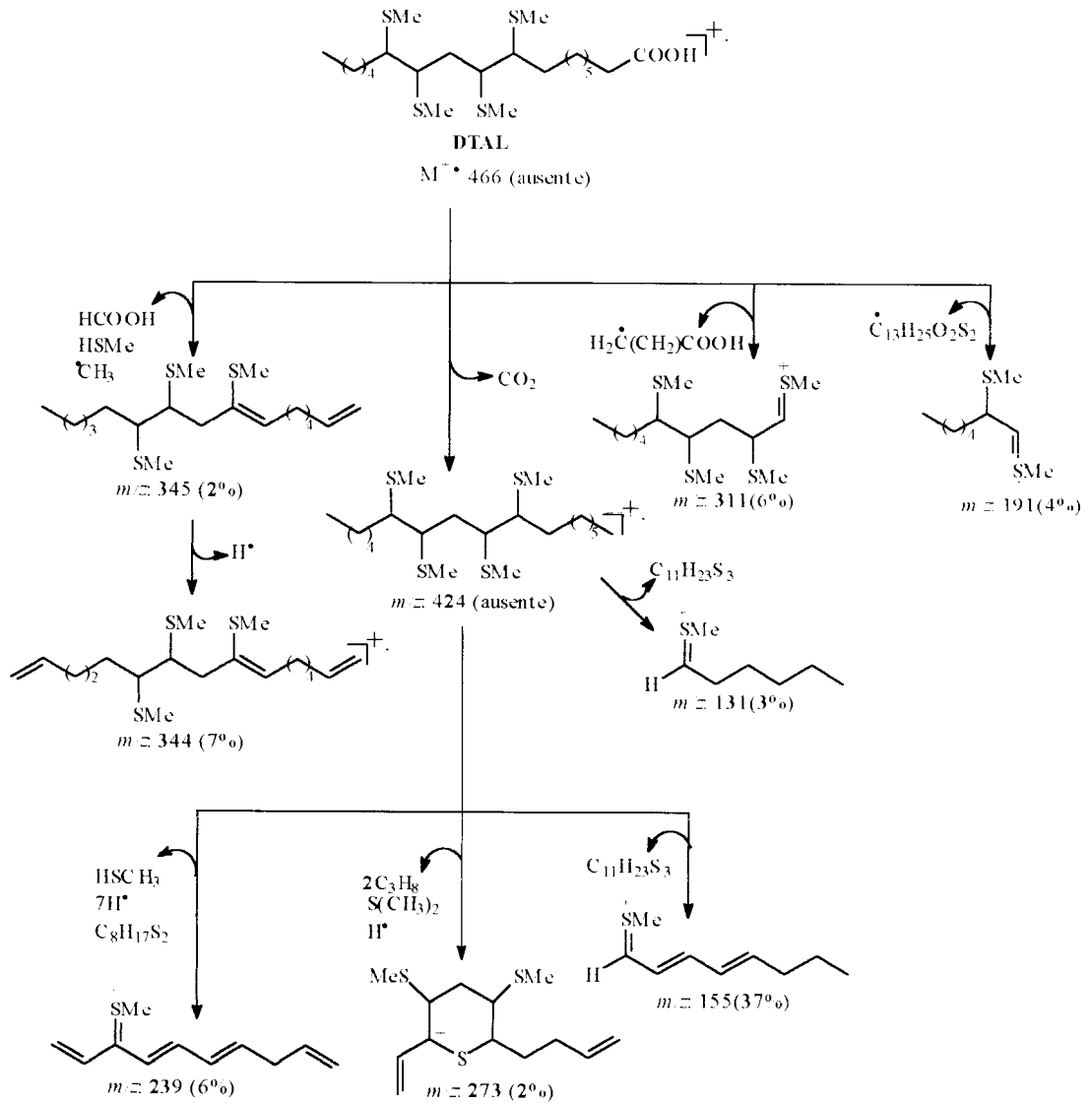


Figura 29: Espectro de massas do derivado tiometílico do ácido linoleico (DTAL).



Esquema 17: Fragmentações de massas do DTAL.

5.2.6- Substâncias 61 e 62

Os terpenóides C_{30} são formados pela condensação cabeça-cabeça de duas unidades de farnesil pirofosfato (FPP) formando o esqualeno. Mais de 4000 triterpenos já foram isolados, com 40 esqueletos diferentes sendo os mais comuns os anéis pentacíclicos, como a β -amirina (68).

Os esteróis pertencem a classe dos triterpenos sendo caracterizados por um anel 3β -monohidroxi-peridro-1,2-ciclopentanofenantreno. Dos 4000 triterpenos isolados, somente 300 esteróis foram encontrados em plantas, tendo como característica a esterificação da hidroxila em C-3 por um ácido graxo. A maioria das plantas produzem esteróis alquilados no C-24, como no sitosterol (61) e estigmasterol (62). A combinação de métodos cromatográficos, espectrometria de massas e RMN é usada para purificação e identificação de esteróis.

A biossíntese de isoprenóides foi inicialmente elucidada através do estudo de esteróis em animais e fungos. A chave para a biossíntese dos terpenóides foi a descoberta da via do ácido mevalônico (AMV) (Figura 30) e mais tarde da via do acetil-CoA na formação do isopentenil pirofosfato (IPP), o qual é isomerizado a dimetilalilpirofosfato (DMAPP) (Figura 31).

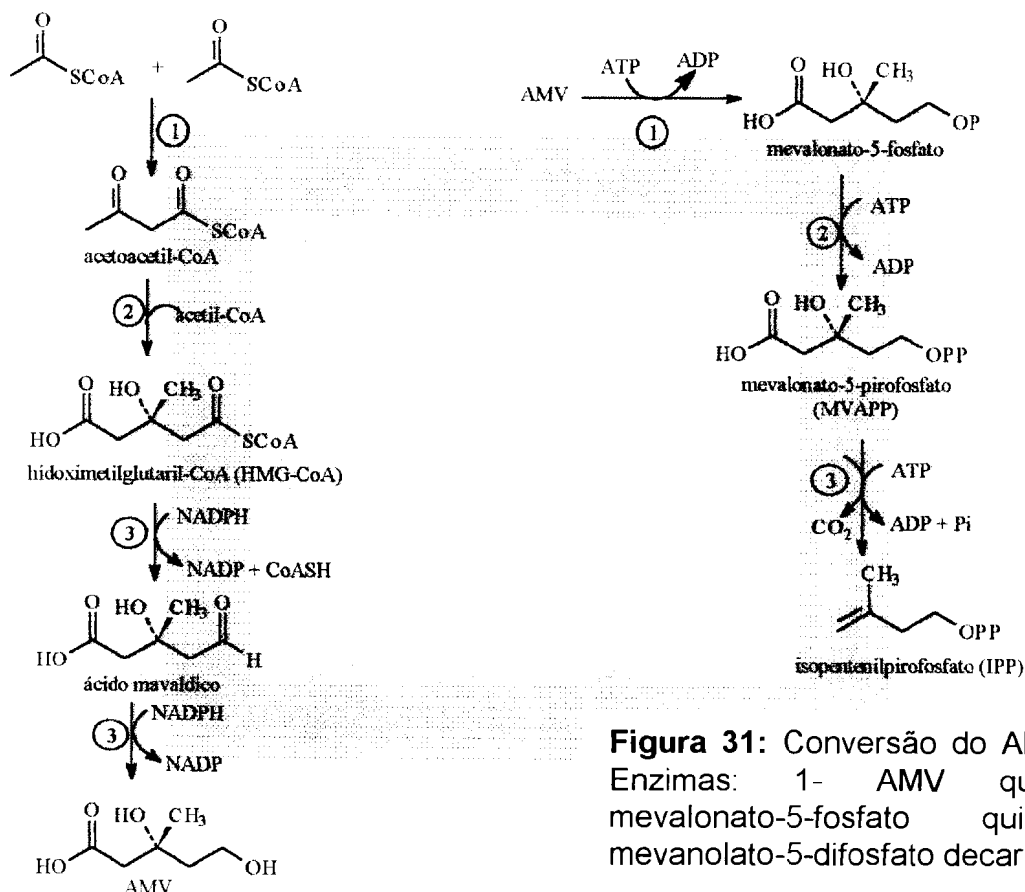


Figura 30: Conversão do acetil-CoA em AMV. Enzimas: 1- acetoacetyl CoA tiolase; 2- HMG-CoA sintase; 3- HMG-CoA redutase.

Figura 31: Conversão do AMV em IPP. Enzimas: 1- AMV quinase; 2- mevalonato-5-fosfato quinase; 3- mevalonato-5-difosfato decarboxilase.

O DMAPP age como doador de prenila à molécula de IPP, formando o geranyl pirofosfato (GPP) através da reação de condensação “cabeça - cauda”. O GPP também age como doador de prenila a outra unidade de IPP formando FPP, as reações de condensação cabeça-cauda continuam formando prenil pirofosfatos de alto peso molecular (**Figura 32**). Os

terpenóides são formados por várias ciclizações, rearranjos, perda ou ganho de átomos de carbono através do arranjo linear das unidades isoprênicas.

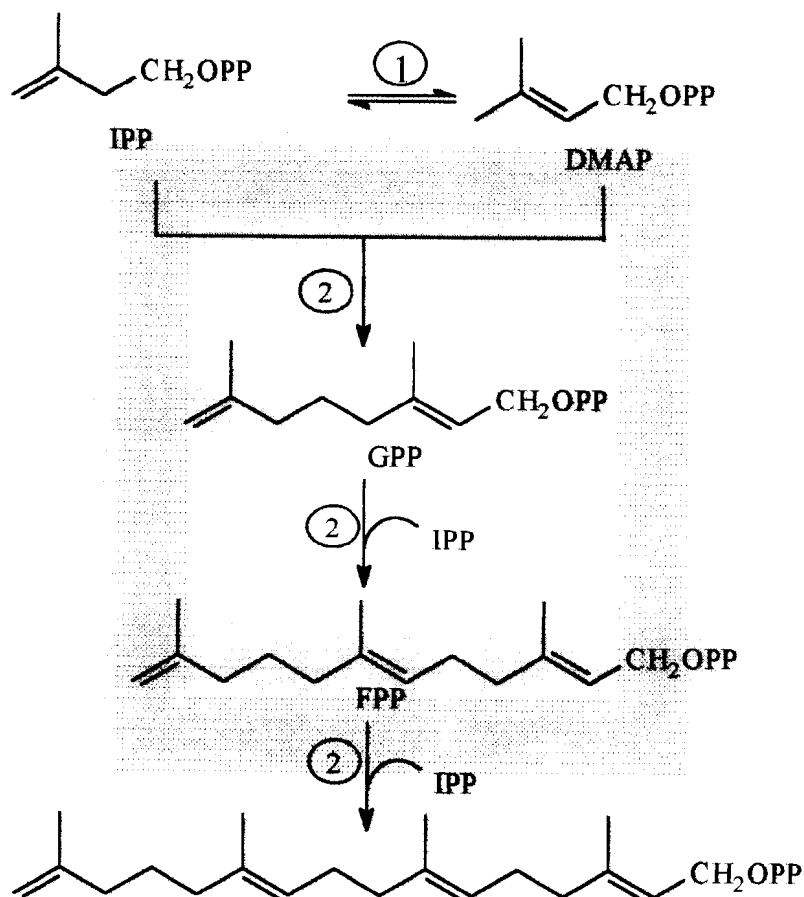


Figura 32: Isomerização do IPP e reações através de prenil transferase. Enzimas: 1- IPP isomerase; 2- prenil transferase.

A formação de tri e tetra terpenóides envolve no final a reação de condensação “cabeça–cabeça” do FPP e geranylgeranyl pirofosfato, respectivamente (Figura 33, Esquema 18)⁵¹.

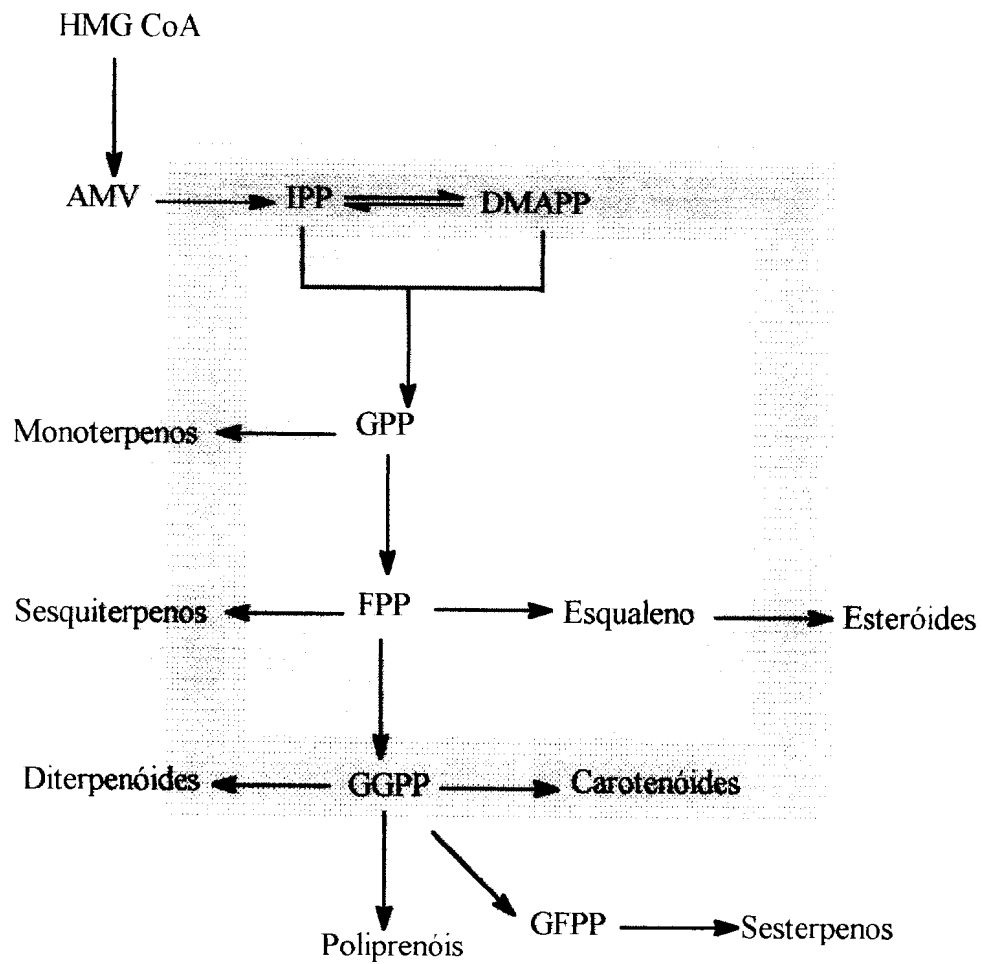
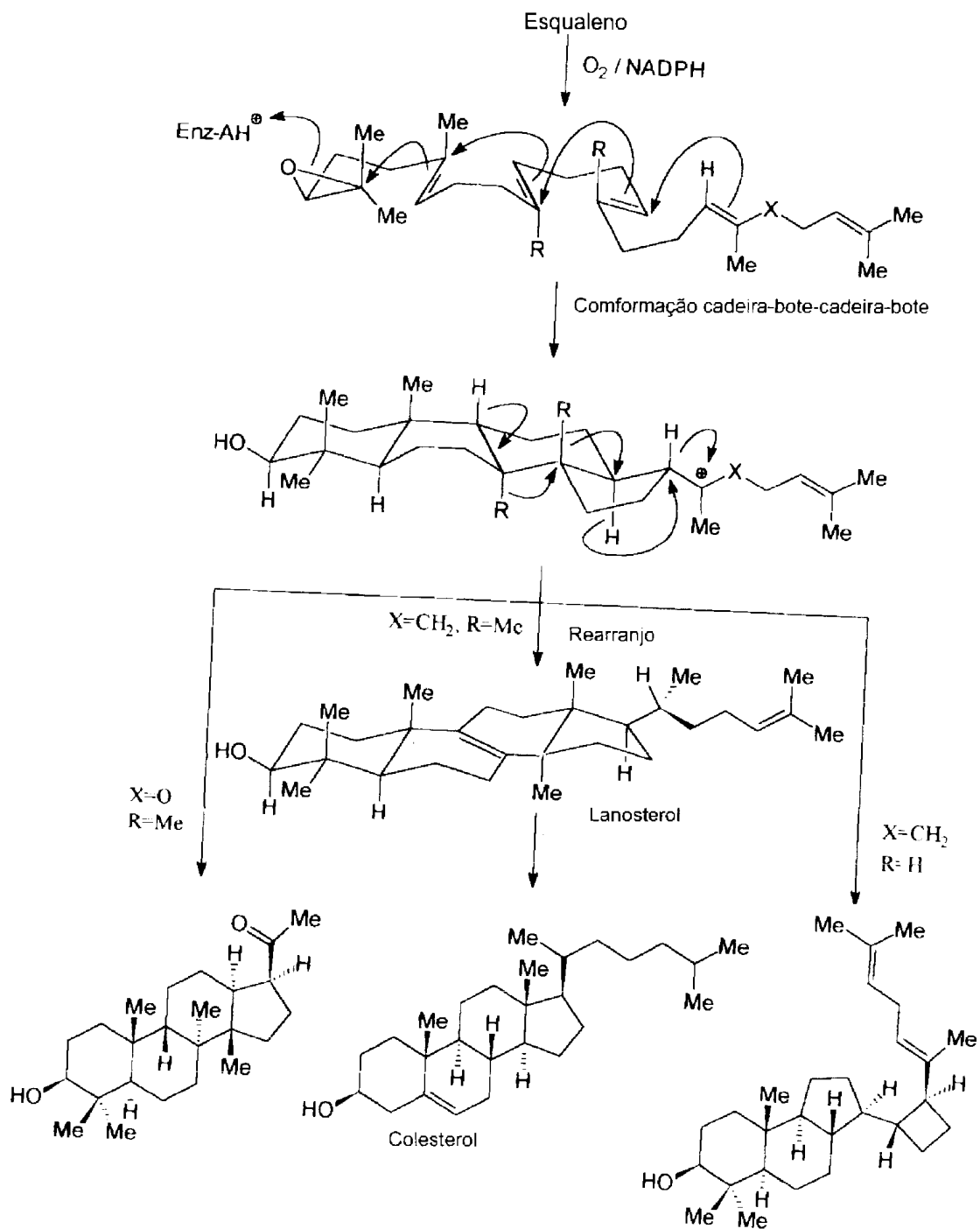


Figura 33: Via geral da biossíntese de isoprenos.



Esquema 18: Reações envolvidas na conversão do esqualeno em esteróides⁵².

Os esteróides **61** e **62** foram obtidos em mistura e identificados como sitosterol (**61**) e estigmasterol (**62**) através da análise dos espectros de massas, RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados descritos na literatura⁵³. O espectro de RMN ^1H (**Figura 34**) mostra sinais entre δ_{H} : 0,8-1,0 correspondentes as metilas. O multiplete em δ_{H} : 3,53 corresponde ao hidrogênio carbinólico C-3, o singlete largo em δ_{H} : 5,35 representa o hidrogênio olefínico H-6 e os duplos-dubletos em δ_{H} : 5,12 e 5,16 correspondem aos hidrogênios 22 e 23 para o estigmasterol.

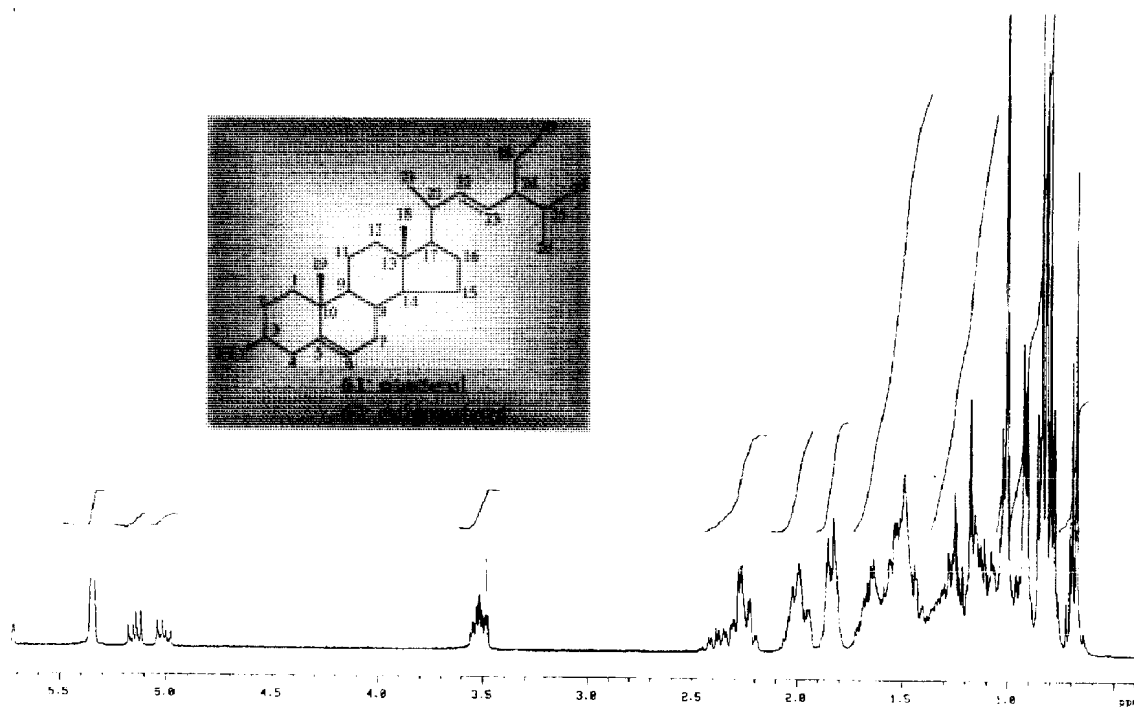


Figura 34: RMN de ^1H das substâncias **61** + **62** em CDCl_3 (400 MHz).

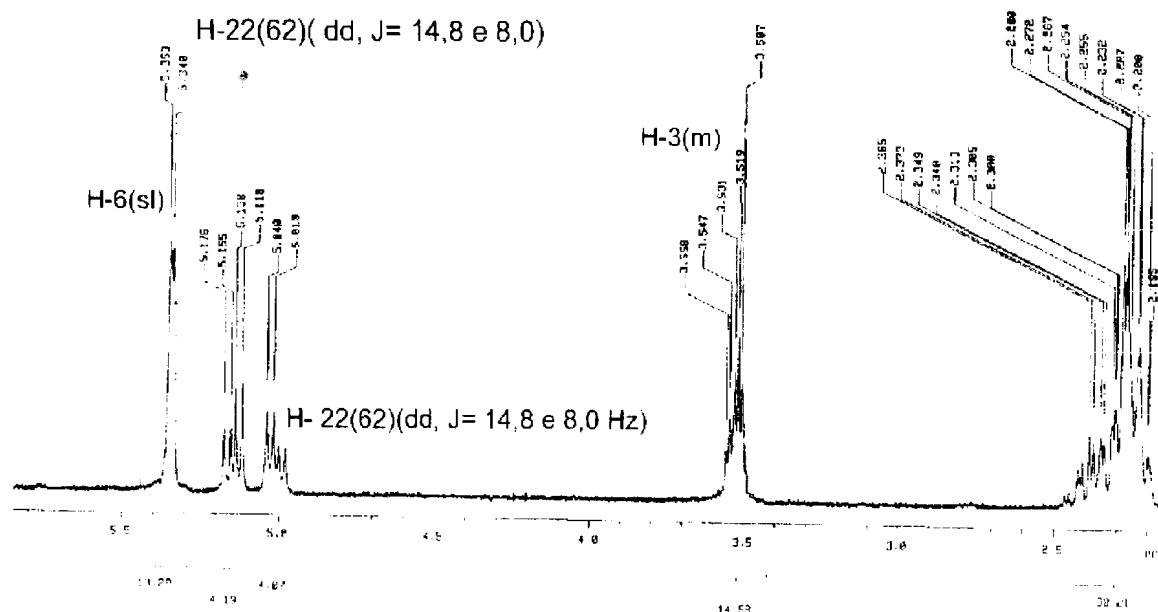
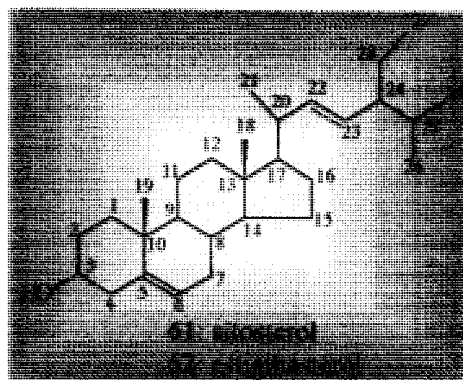


Figura 34a: Expansão do espectro de RMN ¹H entre 2,2 – 5,8 ppm de **61** + **62**.



Os espectros de RMN de ¹³C (PND e DEPT) (Figura 35, Tabela 8), mostram sinais de carbonos olefínicos atribuídos aos carbonos C-6 (δ_C : 121,70) do sitosterol (**61**) e estigmasterol (**62**), um carbono quaternário olefínico atribuído ao C-5 (δ_C : 140,70) e um carbono carbinólico C-3 (δ_C : 71,70) comum aos dois esteróides.

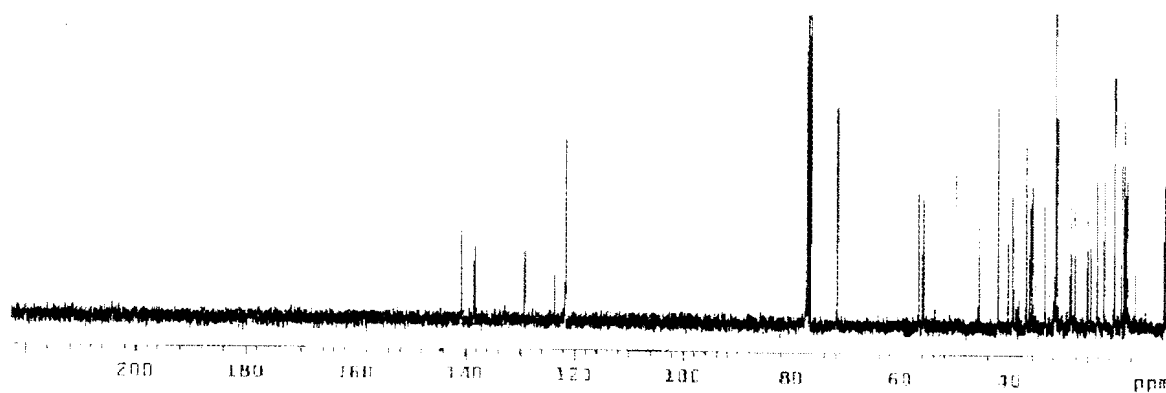


Figura 35: Espectro de RMN de ^{13}C em CDCl_3 (100 MHz) das substâncias **61+62**.

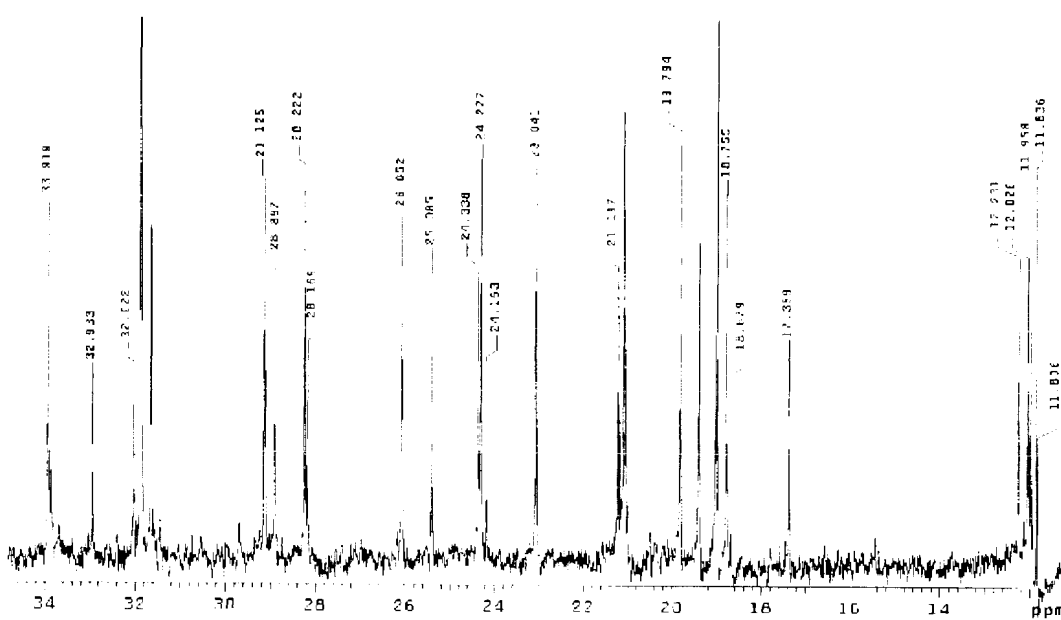
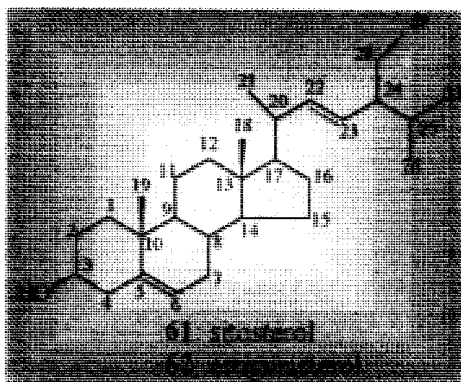


Figura 35a: Expansão do espectro de RMN ^{13}C entre 11 – 34 ppm das substâncias **61+62**.



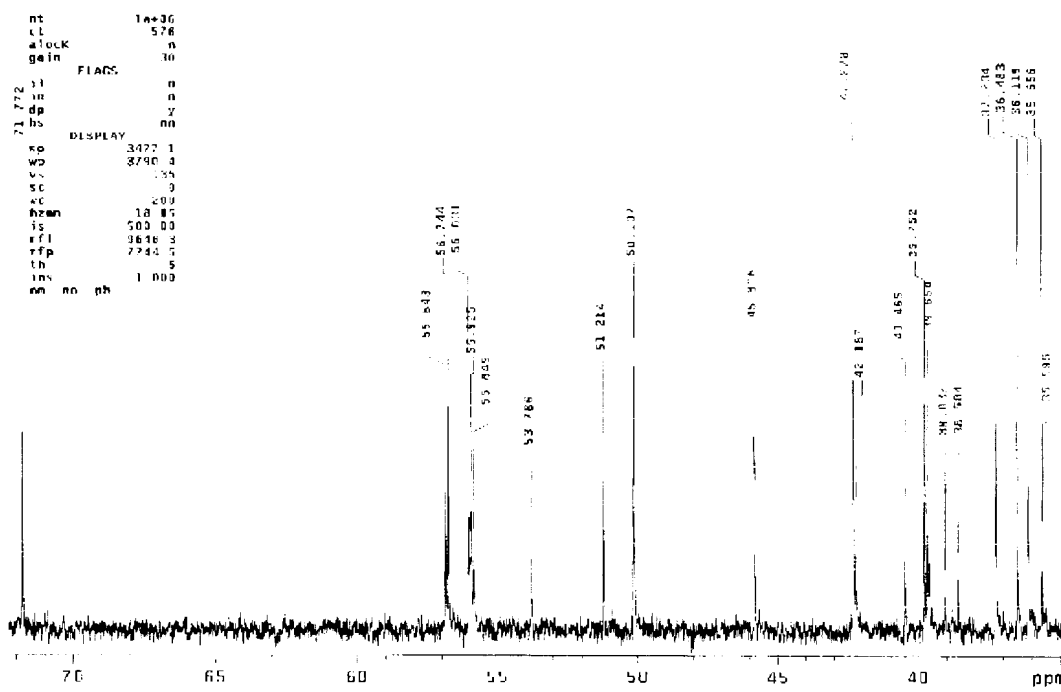


Figura 35b: Expansão do espectro de RMN ^{13}C entre 30 – 74 ppm das substâncias 61+62.

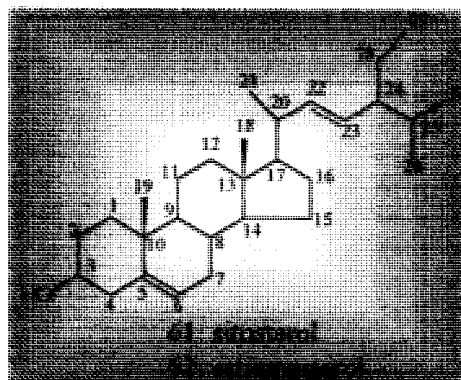


Tabela 8: Dados de RMN ^{13}C das substâncias **61** e **62** comparados com os dados da literatura⁵³.

	61	Sitosterol ⁵³	62	Estigmasterol ⁵³
C	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
1	37,23	37,20	37,23	37,23
2	31,63	31,60	31,63	31,63
3	71,77	71,80	71,77	71,77
4	42,27	42,30	42,27	42,27
5	140,70	140,70	140,70	140,70
6	121,70	121,70	121,70	121,70
7	31,87	42,30	31,87	42,30
8	31,63	31,90	31,63	31,90
9	50,11	50,10	50,11	50,10
10	36,48	36,50	36,48	36,50
11	21,19	21,10	21,19	21,10
12	39,75	39,80	39,75	39,70
13	42,18	42,30	42,18	42,20
14	56,74	56,80	56,85	56,80
15	24,33	24,30	24,33	24,40
16	28,22	28,20	28,22	28,90
17	56,03	56,00	55,92	55,90
18	11,83	11,90	11,95	12,00
19	19,37	19,40	19,37	19,40
20	36,11	36,10	40,46	40,50
21	18,96	18,80	21,06	21,20
22	33,91	33,90	138,30	138,30
23	26,05	26,10	129,20	130,90
24	45,80	45,00	51,21	51,20
25	29,12	29,10	31,87	31,90
26	18,75	19,80	21,19	21,10
27	19,79	19,00	19,01	19,00
28	23,04	23,00	25,38	25,40
29	12,02	12,00	12,23	12,30

O espectro de massas obtido através do CG-MS, mostra os íons M^+ 412 (50%) para o estigmasterol (**Figura 36**) e 414 (100%) para o sitosterol (**Figura 37**).

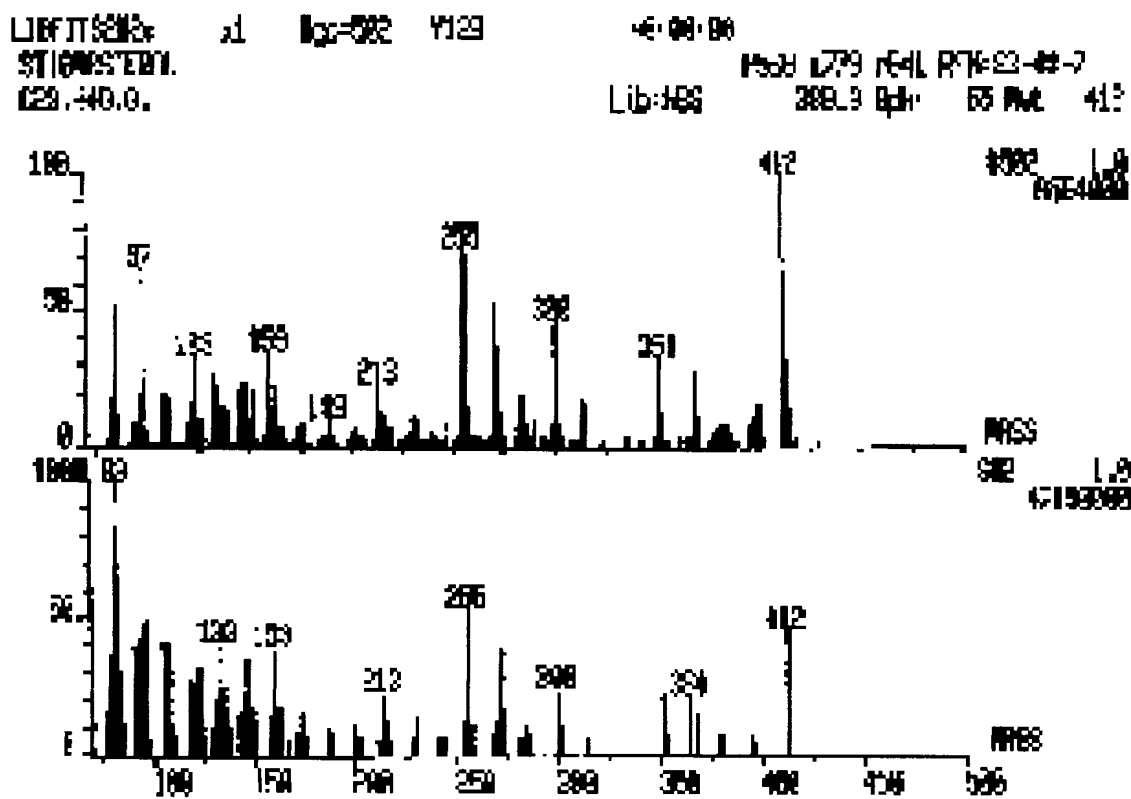
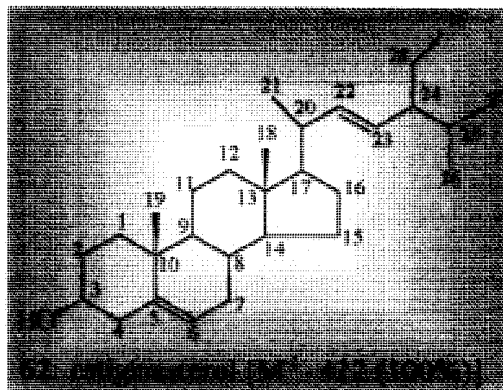


Figura 36: Espectro de massas de 62 comparado com o espectro de biblioteca do aparelho.



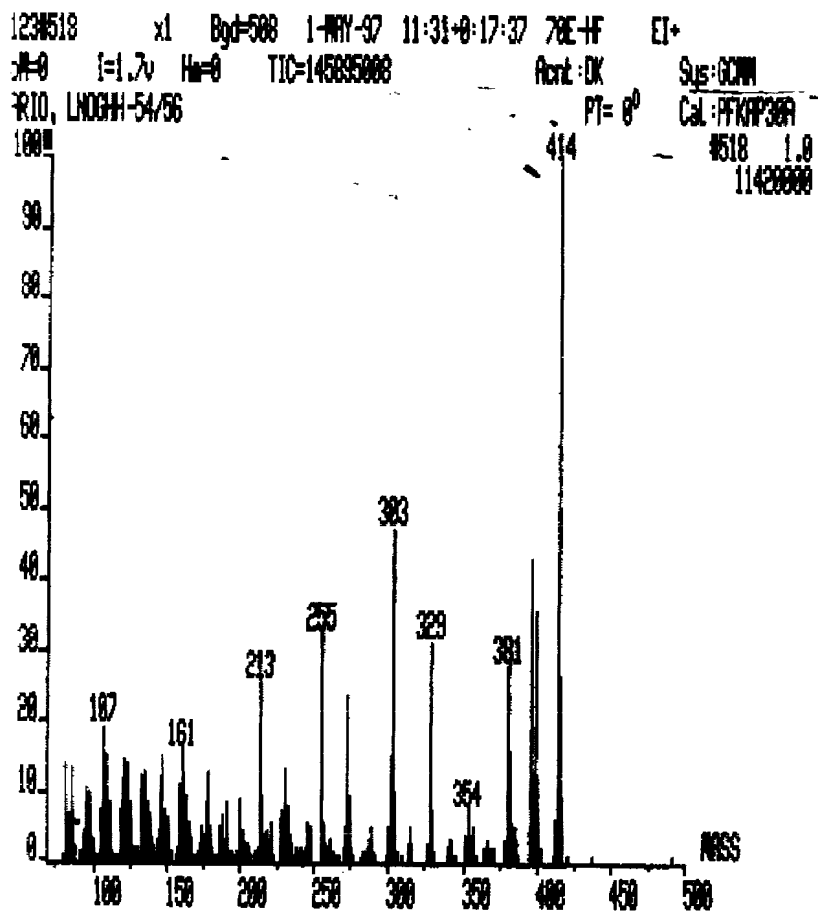
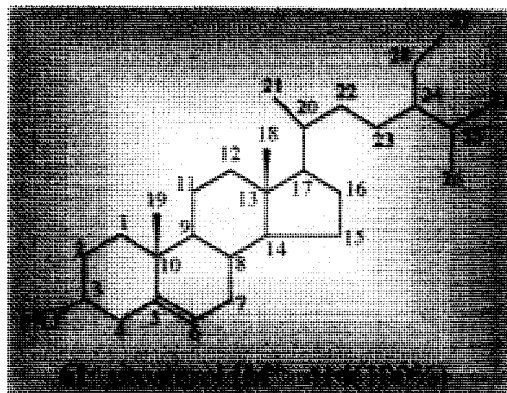


Figura 37: Espectro de massas de 61.



5.2.7- Substância 65

A substância **65** foi isolada do extrato hexânico do caule de *Luxemburgia nobilis* e da fração metanólica obtida da partição do extrato hexânico [C₆H₁₄:MeOH/H₂O (9:1)] (**Esquema 4**, pág. 41).

O triterpeno **65** foi identificado através da análise dos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C (PND e DEPT). Os sinais presentes no espectro de RMN de ¹H (**Figura 38**) mostram a presença de seis sinais simples correspondentes as metilas, sendo que uma delas em δ_H : 1,62 corresponde a metila ligada a carbono sp². Também foram observados dois singletos largos em δ_H : 4,53 e 4,66 correspondentes a hidrogênios olefínicos e um multiplete entre δ_H : 2,9-3,0 atribuído ao hidrogênio carbinólico H-3, sugerindo assim um esqueleto do tipo lup-20(29)-eno.

LNUGRM-57-60-14
 PULSE SEQUENCE bruker
 OBSERVE UNKNOWN
 FREQUENCY 360.143 MHz
 SPECTRAL WIDTH 6024.1 Hz
 ACQUISITION TIME 5.439 sec
 RELAXATION DELAY 1.000 sec
 PULSE WIDTH 6.0 usec
 FIRST PULSE WIDTH 12.2 usec
 TEMPERATURE 24.0 deg C
 NO. REPLICATIONS 16
 DOUBLE PRECISION ACQUISITION
 DATA PROCESSING
 FT SIZE 65536
 TOTAL ACQUISITION TIME 1 minutes
 99-24-97
 Virginia Tech SIC NMR Facility

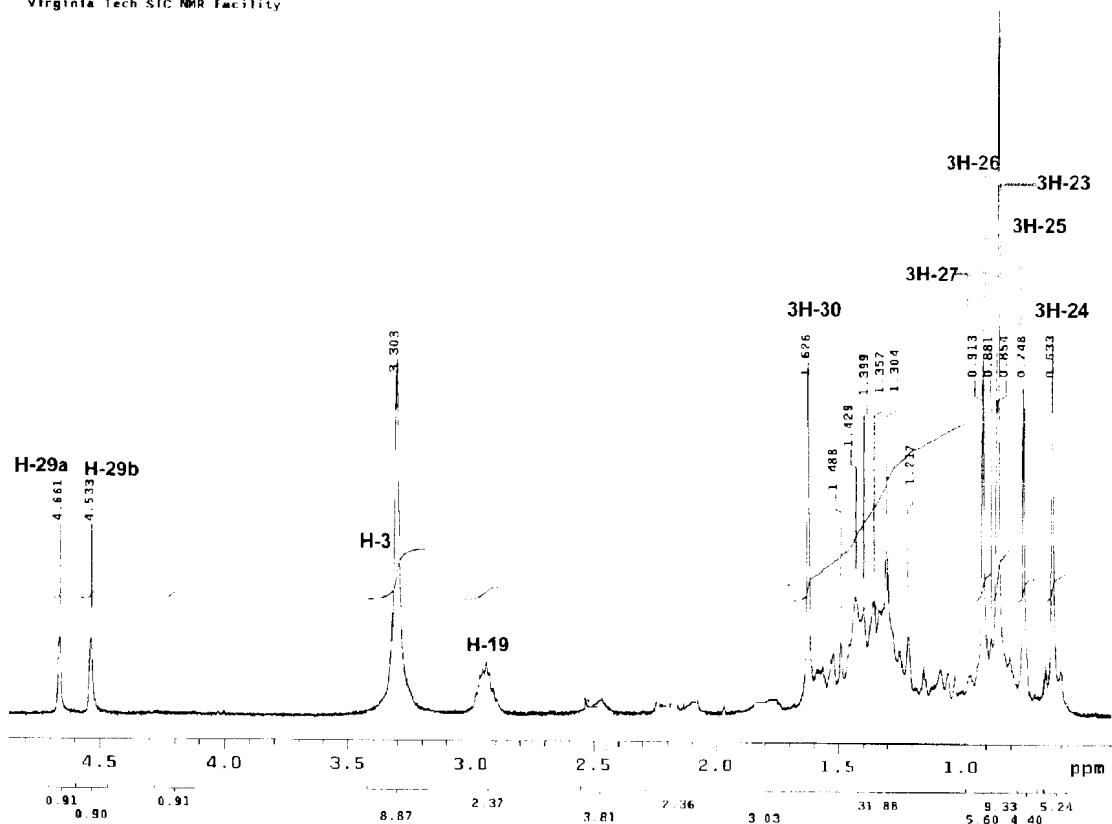
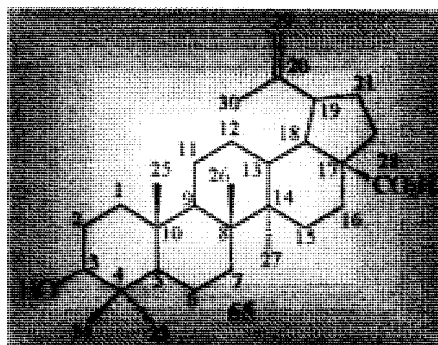


Figura 38: Espectro de RMN de ¹H em CDCl₃ (400 MHz) da substância 65.



No espectro de RMN de ^{13}C -PND e ^{13}C -DEPT (Figuras 39 e 40) foram observados a presença de dois carbonos sp^2 sendo um deles quaternário em δ_{C} : 150,21 e outro metilênico em δ_{C} : 109,53, um carbinólico δ_{C} : 76,74, um carboxílico δ_{C} : 177,17. Os outros sinais de carbonos sp^3 quaternários, metínicos, metilênicos e metílicos. Estes dados comparados com os descritos na literatura⁵⁴, estão de acordo para a estrutura do ácido betuliníco (Tabela 9).

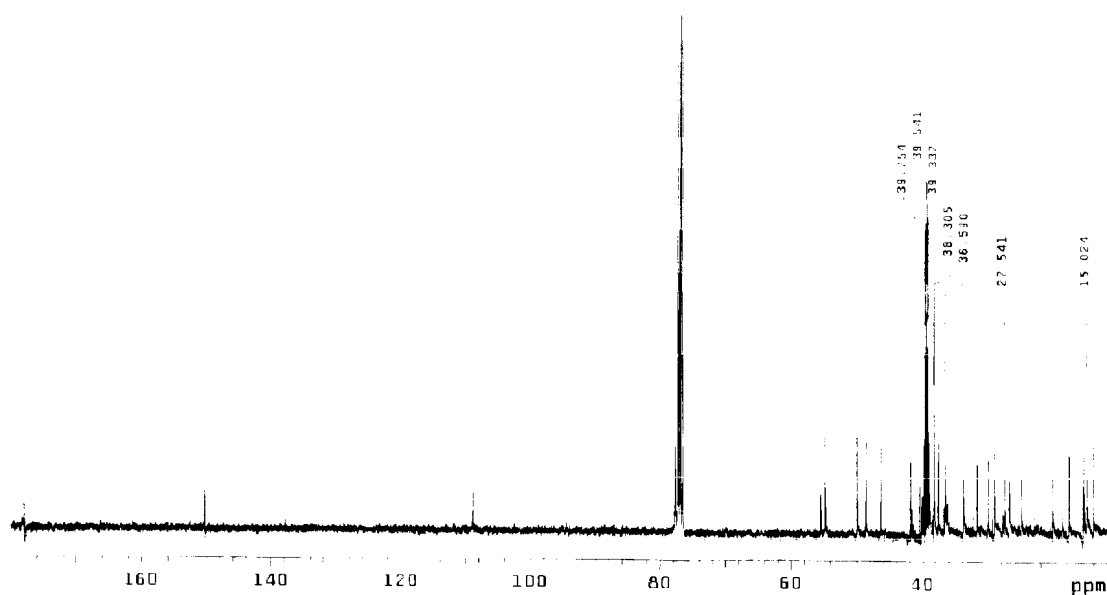
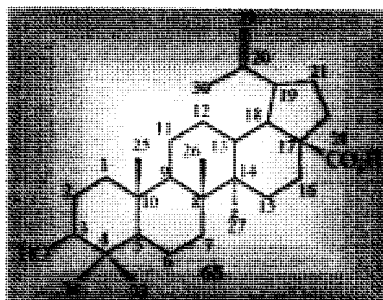


Figura 39: Espectro de RMN de ^{13}C em CDCl_3 (100 MHz) de **65**.



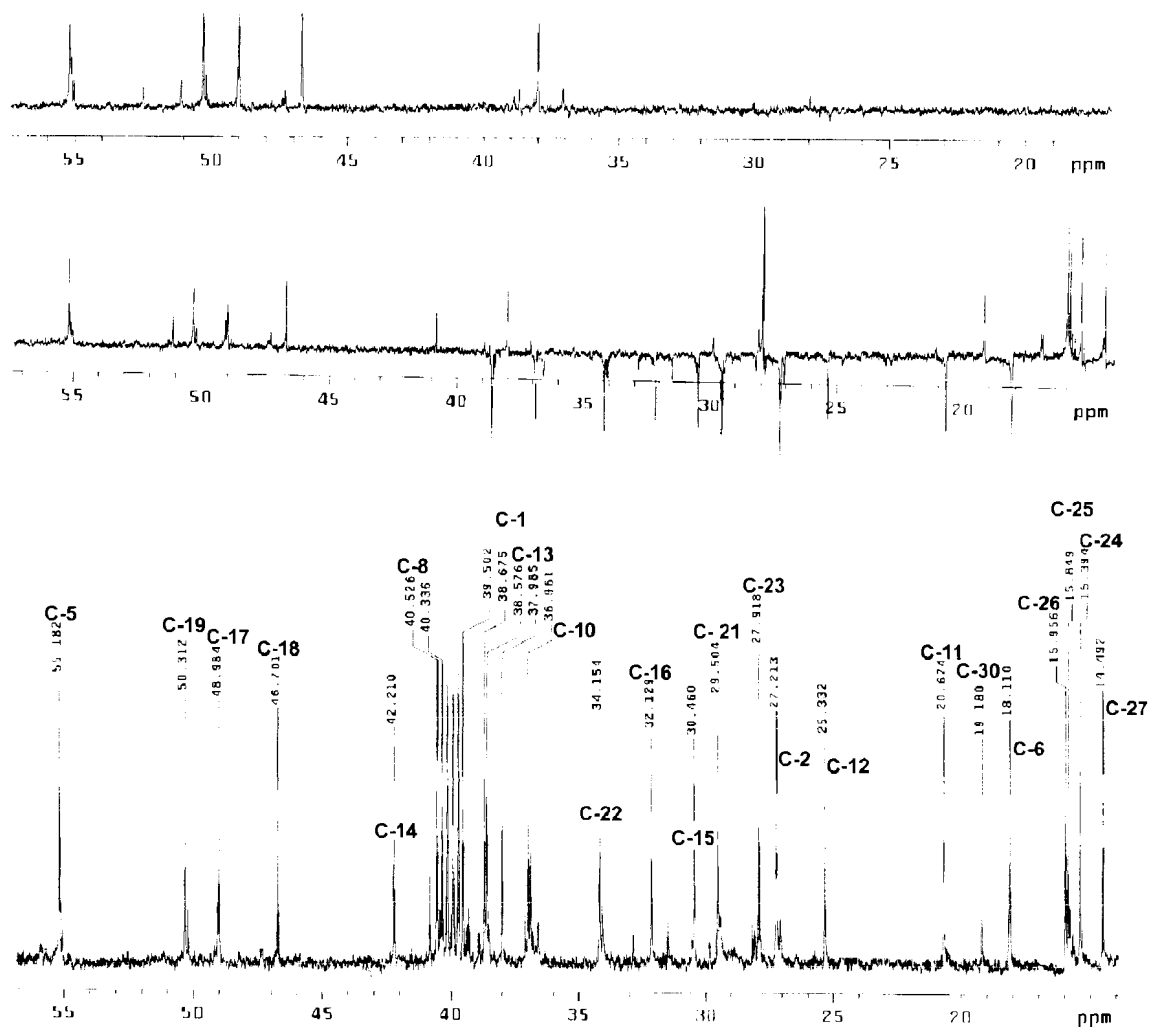


Figura 40: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT em CDCl_3 (100 MHz) da substância 65.

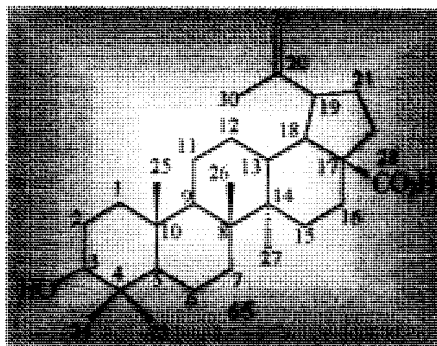
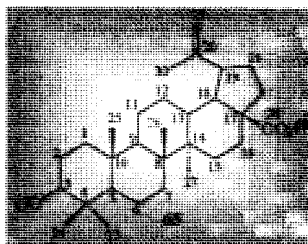


Tabela 9: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **65** comparados com a literatura⁵⁴.

C	65		Ácido betulínico ⁵⁴
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
1		38,67	38,70
2		27,21	27,30
3	3,30 (sl)	76,74	78,90
4		38,57	38,90
5		55,18	55,40
6		18,11	18,30
7		34,15	34,30
8		40,52	40,70
9		50,31	50,40
10		36,96	37,20
11		20,67	20,90
12		25,33	25,60
13		38,57	38,50
14		42,21	42,50
15		30,46	30,60
16		32,13	29,30
17		48,98	48,00
18	2,49 (sl)	46,70	48,00
19	2,95 (m)	50,31	48,80
20		150,21	150,40
21		29,50	30,00
22		34,15	34,00
23	0,85 (s)	27,91	28,00
24	0,63 (s)	15,39	15,20
25	0,74 (s)	15,84	15,90
26	0,88 (s)	15,95	16,00
27	0,91 (s)	14,49	14,70
28		177,17	181,00
29	4,53 (sl) e 4,66 (sl)	109,53	109,60
30	1,62 (s)	19,18	19,40



5.3- Identificação dos constituintes isolados do extrato metanólico do caule (LNGM).

5.3.1- Substância 63.

A substância **63** foi encontrada nas frações 18-20 e 33-35 (**Esquema 5**, págs. 44 e 47), sendo que na fração 33-35 ela apresentou melhor grau de pureza.

O espectro I.V. (**Figura 41**) da substância natural **63** apresentou absorções em: 3370 cm^{-1} devido a estiramento de OH e as absorções em 2950 , 2850 , 1420 , 1380 cm^{-1} que são dos grupos -CH, -CH₂ e -CH₃ da substância analisada.

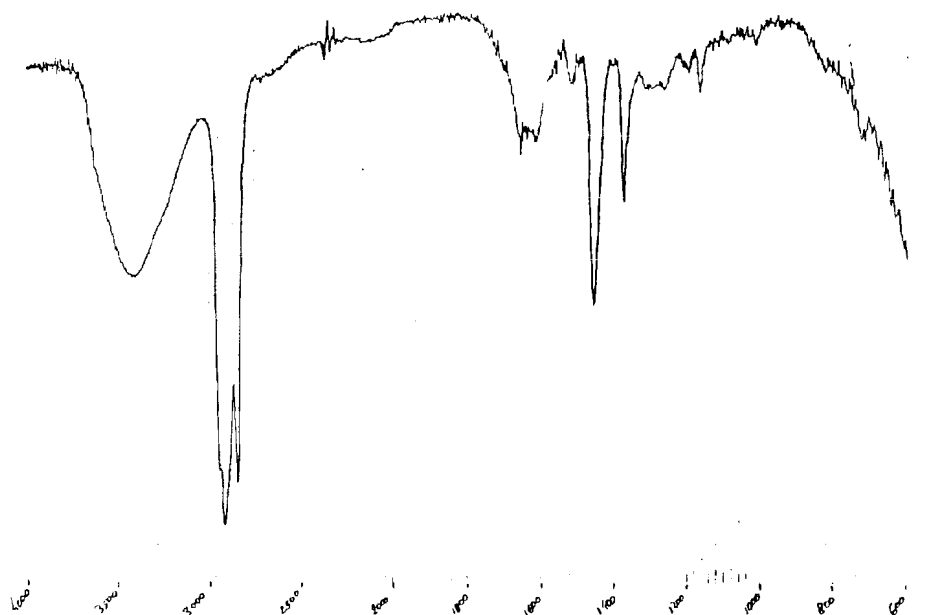


Figura 41: Espectro de I.V da substância **63**.

Devido a baixa solubilidade desta substância nos solventes orgânicos usuais para registro de espectro de RMN ^1H e ^{13}C , foi necessário preparar o derivado acetilado (**63a**).

Em primeiro momento foram obtidos os espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (PND e DEPT) para a substância natural. No espectro de RMN de ^1H (**Figura 42**) foi observado um sinal em δ_{H} : 4,30 (d, $J=9,0$ Hz, H-1') correspondente a um próton anomérico, sinais correspondentes a grupos metila entre δ_{H} : 0,87-1,05 e um sinal da hidrogênio olefínico em δ_{H} : 5,40.

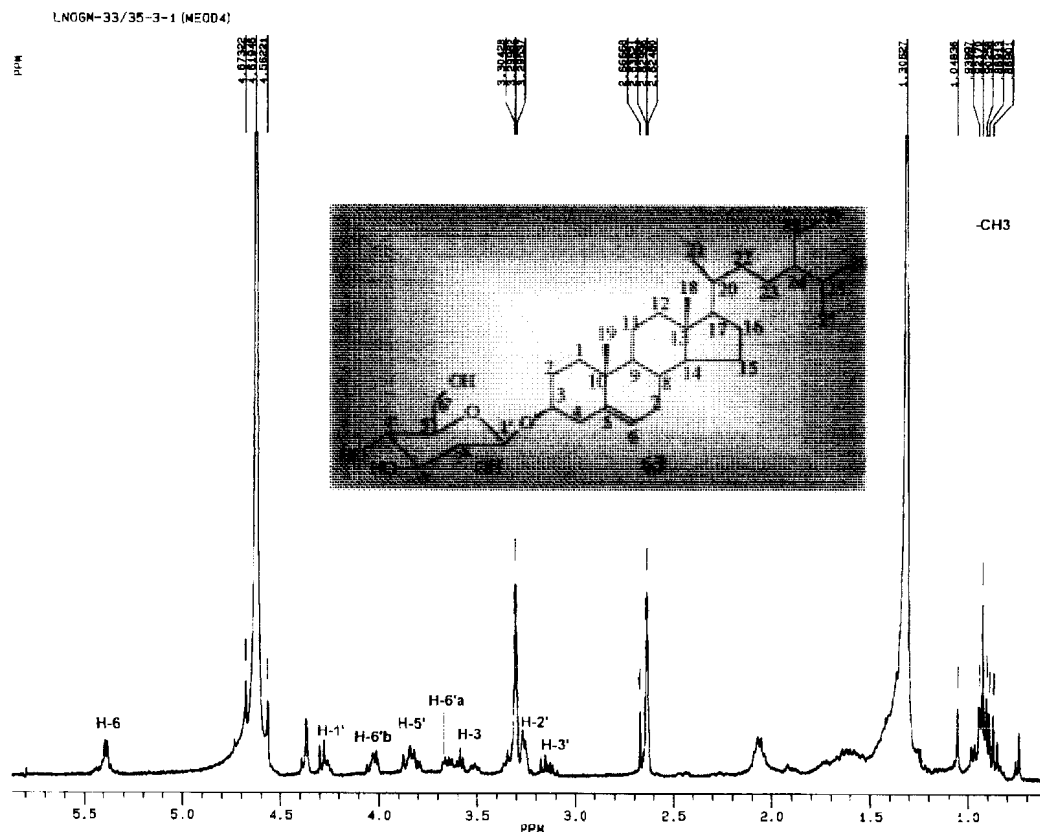


Figura 42: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da substância **63** em MeD_3OD .

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 43**) mostrou sinais de átomos de carbonos carbinólicos, olefínicos e não oxigenados. Suas multiplicidades foram determinadas através do experimento DEPT (**Figura 44**). Dentre estes sinais foram observados quatro sinais de CH-O, um de OCH-O e um H_2CO que justificam a unidade de açúcar (hexose) ligada em C-3. Os demais sinais de CH são compatíveis a um esteróide. Estas informações nos levou a identificar a substância **63** como um esteróide glicosilado, o qual foi confirmado através da análise dos dados do derivado acetilado discutidos a seguir.

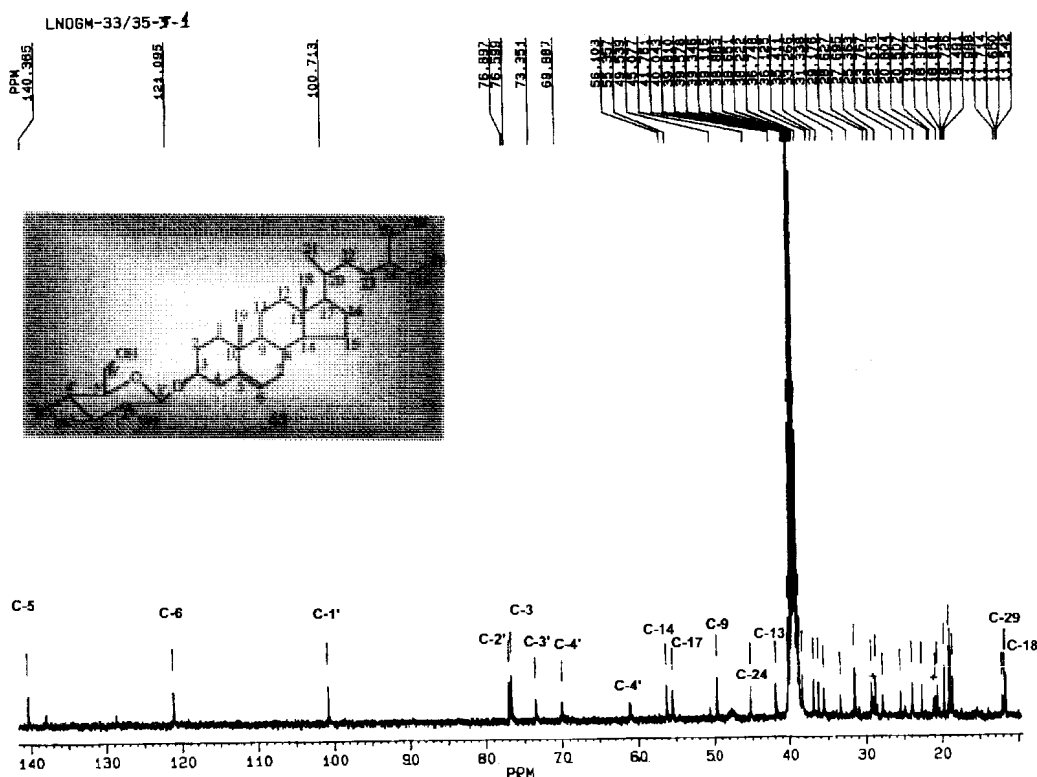


Figura 43: RMN de ^{13}C (100 MHz) da substância **63** em DMSO.

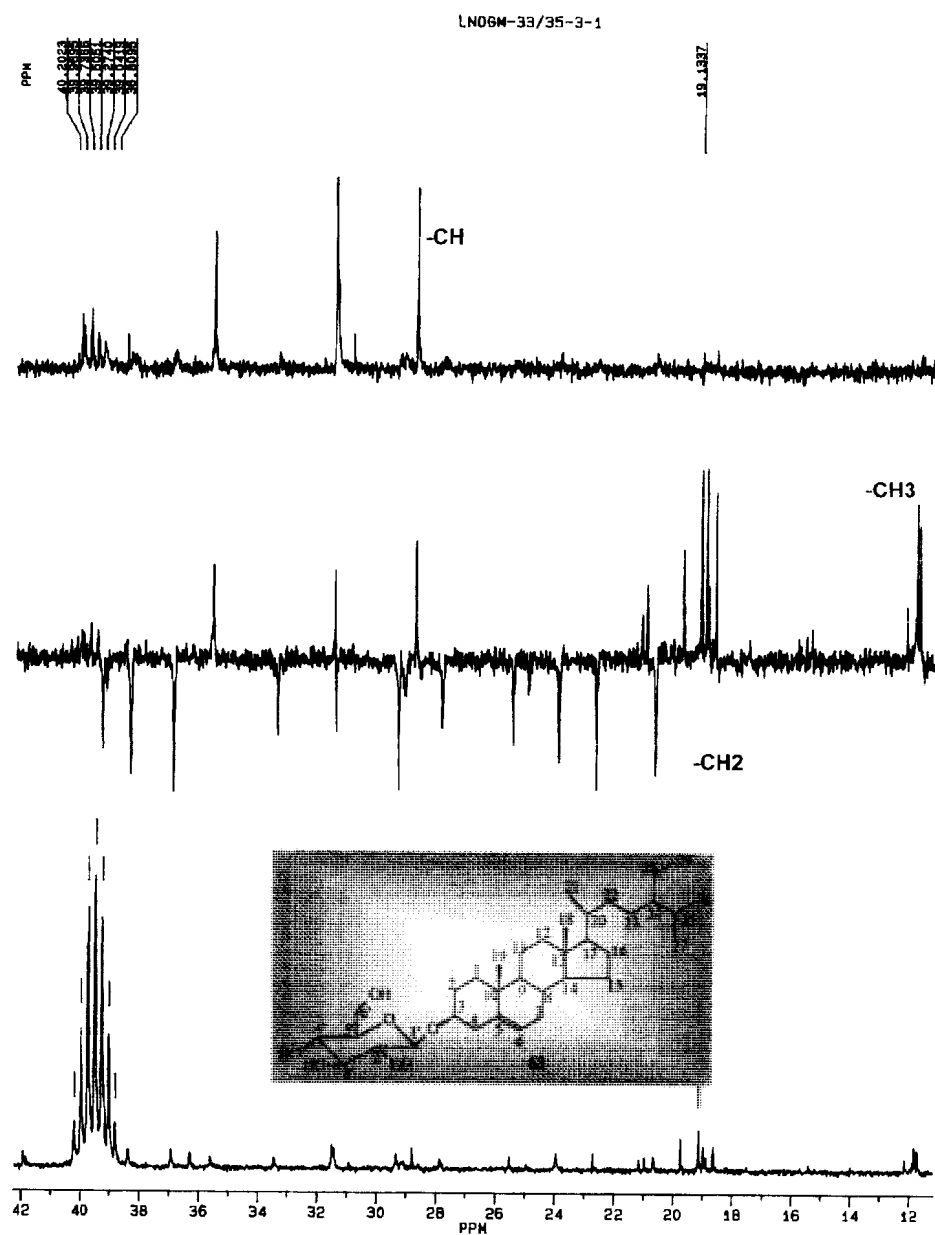


Figura 44: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT da substância **63** em DMSO entre 12 –42 ppm.

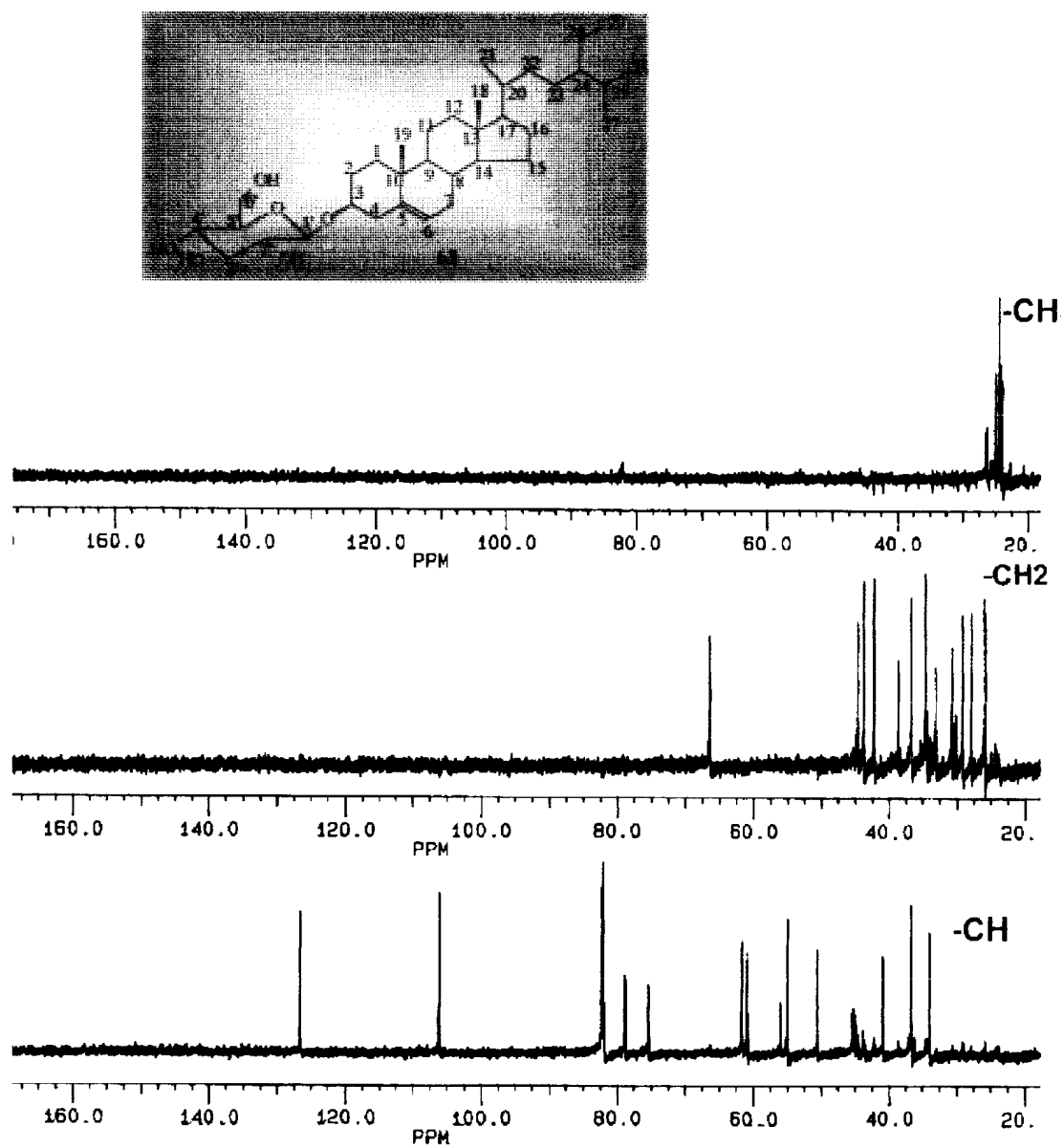


Figura 44a: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT da substância 63 em DMSO entre 20 –160 ppm.

A preparação do derivado acetilado forneceu espectros de melhor resolução, fornecendo informações mais precisas para a determinação estrutural desta substância.

O espectro de I.V de **63a** (**Figura 45**) mostrou absorção em $1751,60\text{ cm}^{-1}$ referente a carbonila de éster e o desaparecimento da banda em 3370 cm^{-1} referente a hidroxilas, confirmando a formação do derivado acetilado.

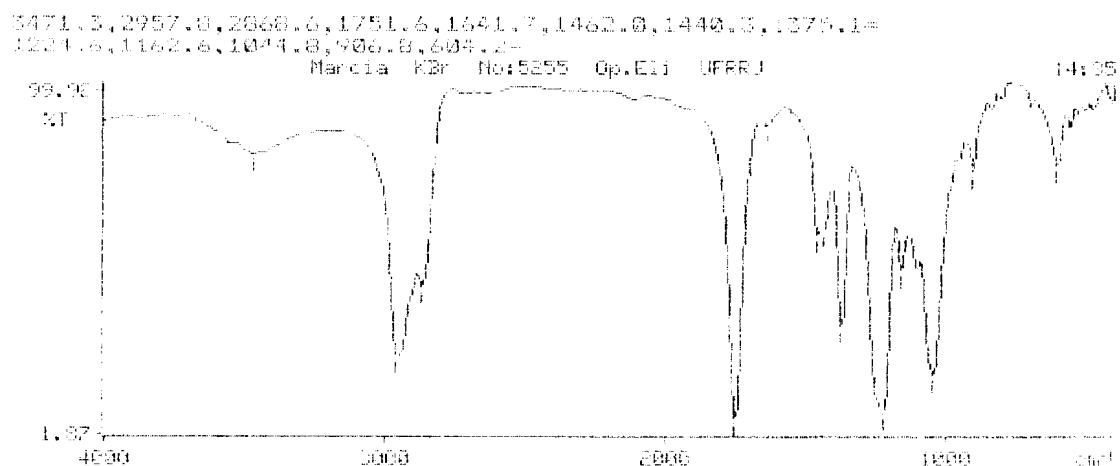


Figura 45: Espectro de I.V da substância **63a**.

Os espectros de RMN de ^1H unidimensional (1D) (**Figura 46**) e bidimensional (2D, $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY) (**Figura 47**) de **63a**, apresentaram vários sinais compatíveis com a presença de grupos metila característicos de esteróide (δ_{H} : 0,65-1,05). Os sinais para hidrogênios

carbinólico [δ_H : 3,68(m)] e olefínico [δ_H : 5,10(m)] contribuiram para confirmar a presença de uma unidade aglicônica correspondente ao β -sitosterol. Os sinais observados na região compreendida entre δ_H : 5,35 e 3,63 e as interações de acoplamentos verificadas no espectro de RMN 1H , 1H -COSY (Figura 47), permitiram caracterizar os hidrogênios de uma unidade de glicose na molécula.

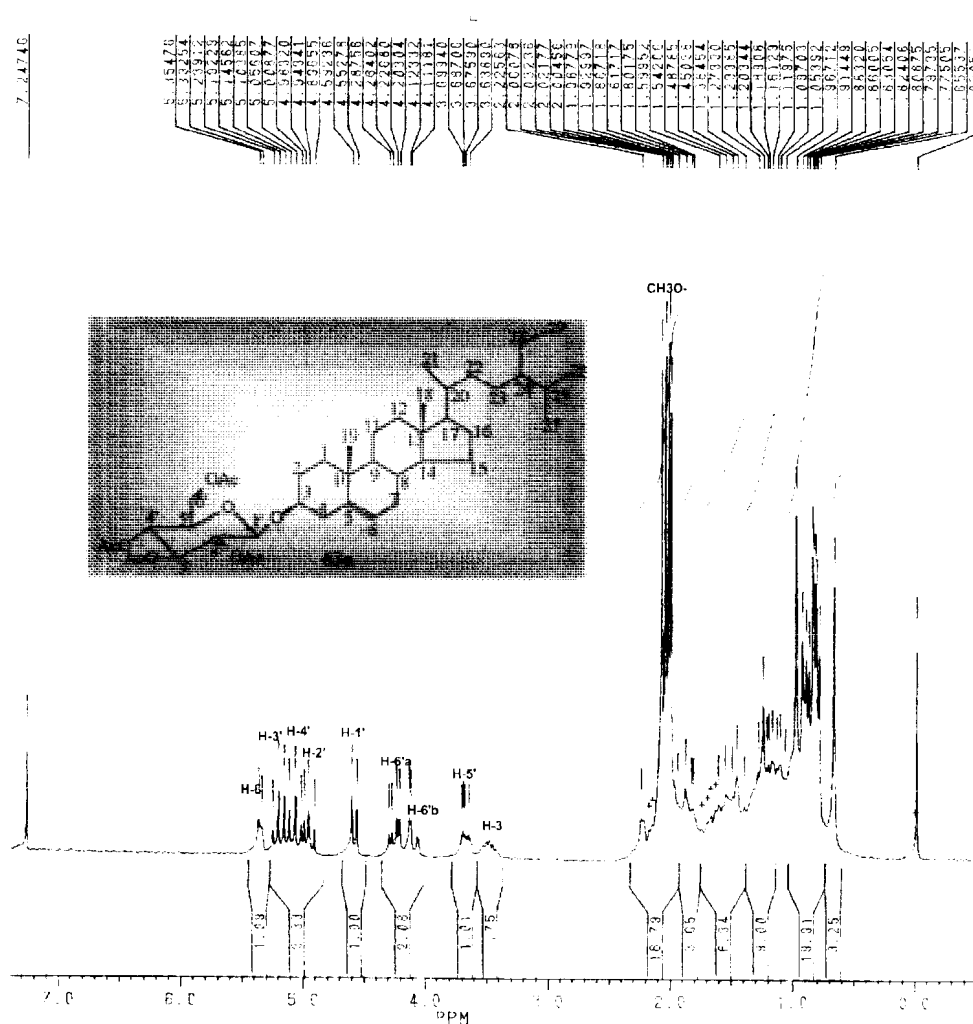


Figura 46: Espectro de RMN de 1H (200 MHz) do derivado **63a** em $CDCl_3$.

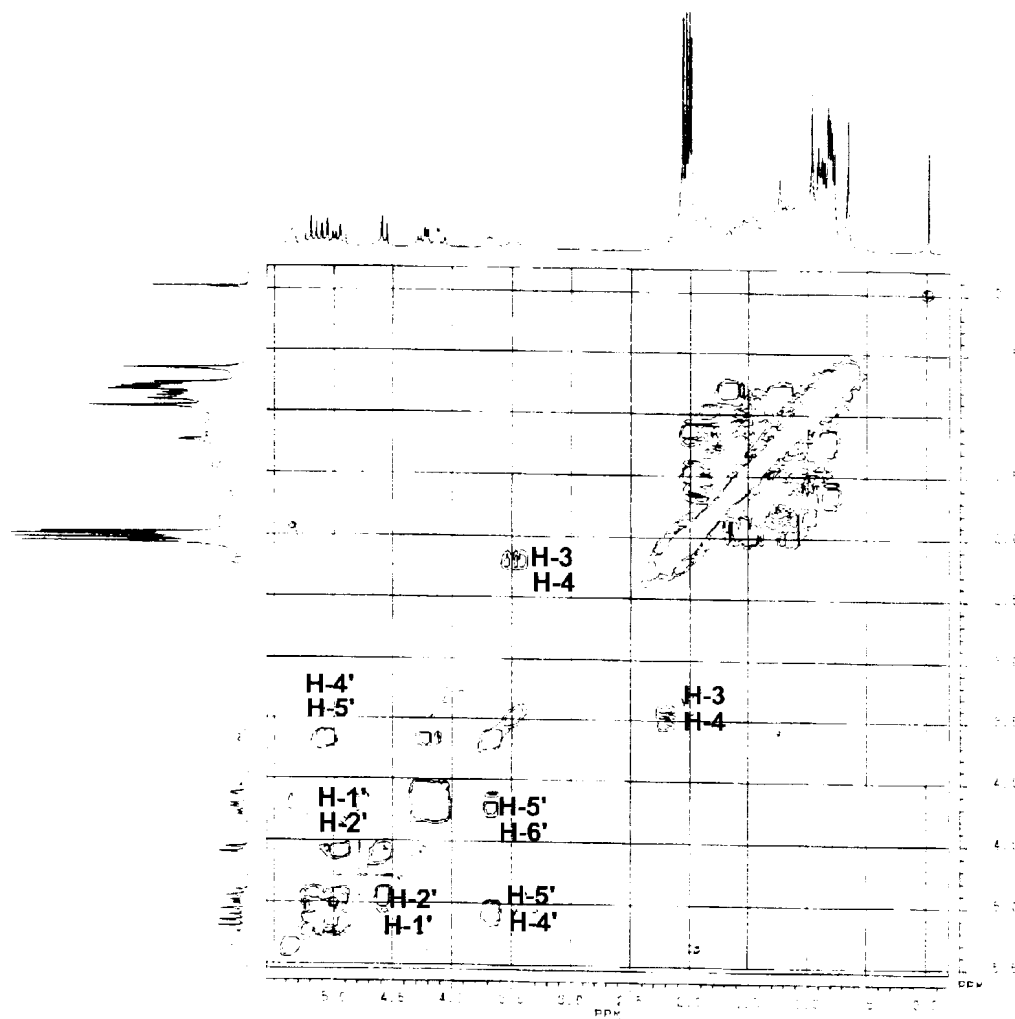
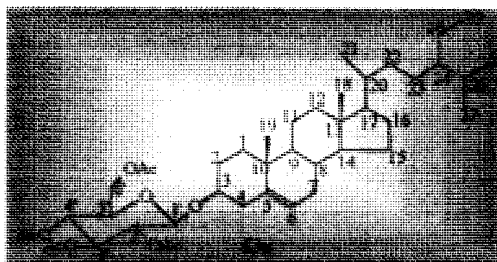


Figura 47: Espectro bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio-hidrogênio (^1H , ^1H -COSY) de **63a** em CDCl_3 .



Os deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^{13}C -PND de **63a** (Figura 48 e 48a), comparados com dados da literatura^{53, 55} (Tabela 10), permitiram identificá-la como tetra-O-acetil- 3β -O-D-glicopiranosil-sitosterol e confirmando a substância natural como 3β -O-D-glicopiranosil-sitosterol.

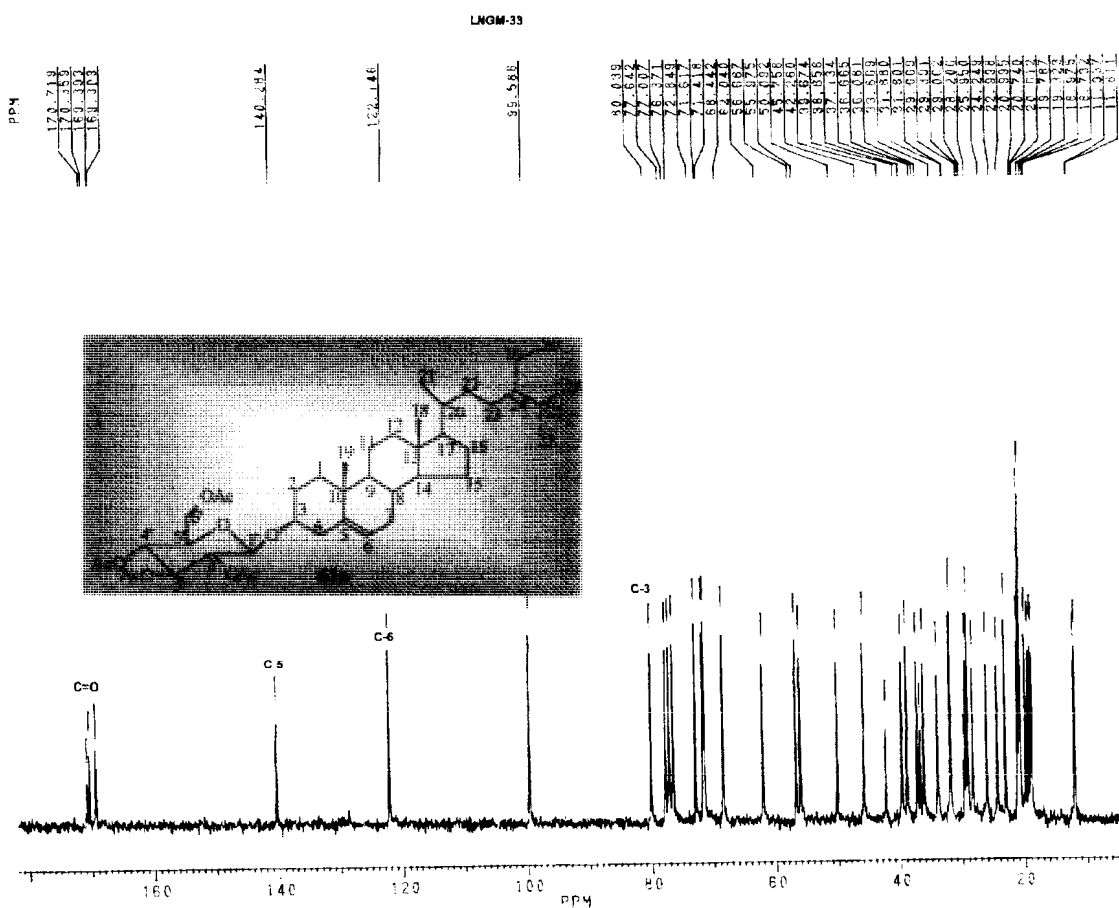


Figura 48: espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) do derivado **63a** em CDCl_3 .

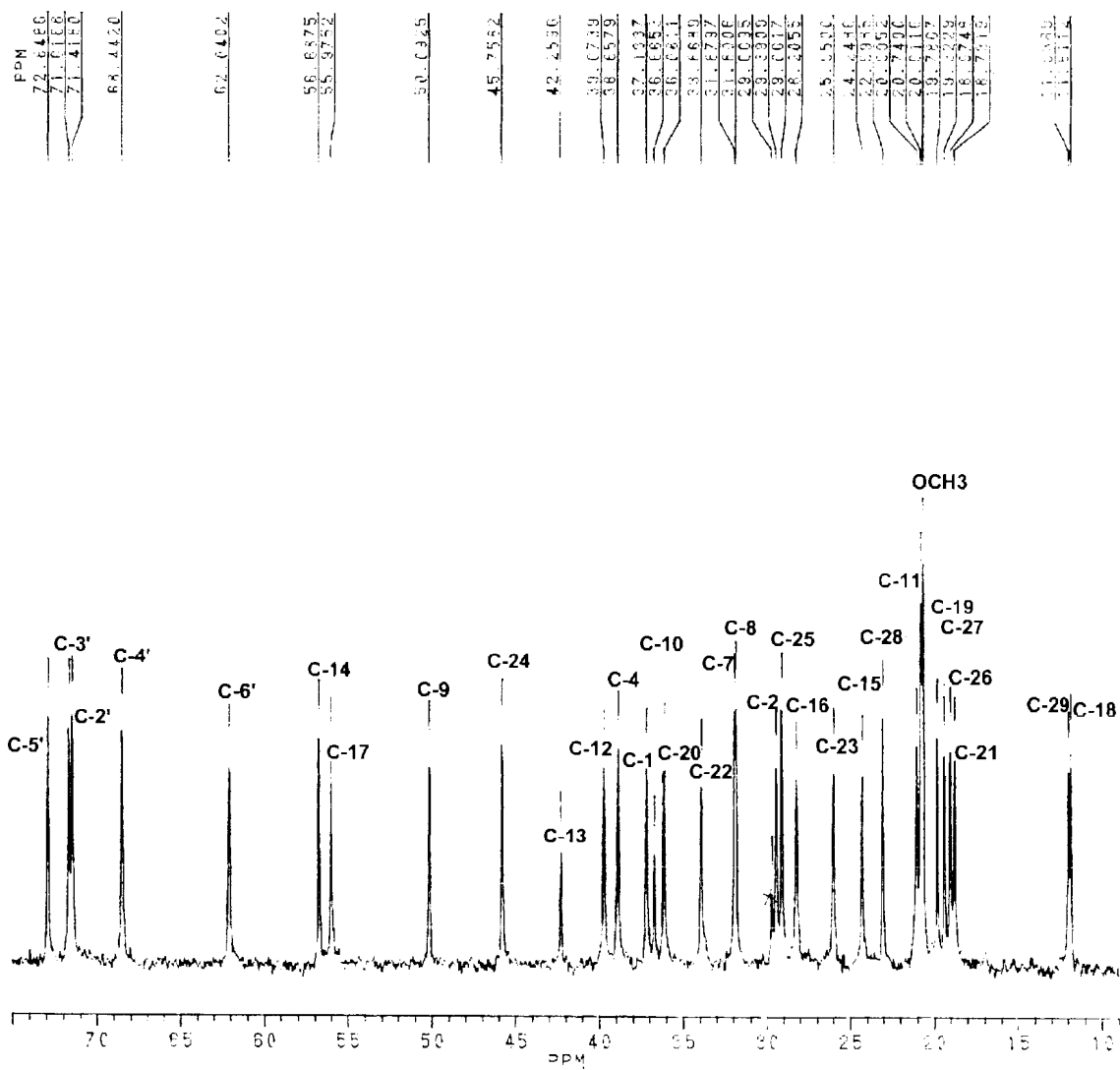


Figura 48a: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C entre 10-75 ppm do derivado 63a.

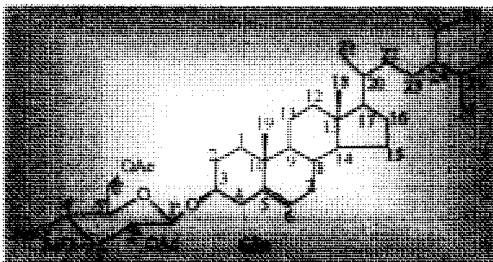


Tabela 10: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado **63a** comparados com a literatura⁵³.

C	63a			Literatura ⁵³
	δ_{H}	$^1\text{H}, \text{H-COSY}$	δ_{C}	δ_{C}
1	1,11(m), 1,92 (m)		37,13	37,28
2	1,11 (m), 1,92 (m)		29,39	29,56
3	3,45 (m)		80,04	79,59
4	1,11 (m), 2,06 (m)		38,85	38,91
5	-		140,28	140,31
6	5,34 (dl, J= 4,4 Hz)		122,14	122,14
7	1,38 (m), 1,86 (m)		31,88	31,94
8	1,54 (m)		31,80	31,94
9	1,80 (m)		50,09	50,20
10	-		36,66	26,15
11	0,88 (m), 1,45 (m)		20,99	21,08
12	1,20 (m), 1,92(m)		39,67	38,78
13	-		42,26	42,34
14	0,96 (m)		56,69	56,78
15	1,16 (m)		24,25	24,30
16	1,20 (m)		28,20	28,23
17	1,11 (m)		55,97	55,97
18	0,65 (s)		11,81	11,94
19	0,96 (s)		19,79	19,35
20	1,38 (m)		36,08	36,73
21	0,89 (d)		18,73	19,04
22	1,45 (m)		33,87	33,97
23	1,20 (m)		25,95	26,16
24	0,96 (m)		45,76	45,87
25	1,20 (m)		29,06	29,19
26	0,88 (d)		18,97	18,79
27	0,88 (d)		19,32	19,80
28	1,38 (m)		22,99	23,10
29	0,83 (t)		11,94	11,98
1'	4,57 (d, J= 8,0 Hz)	←	99,58	99,70
2'	4,94 (t, J=9,3 Hz)	←	71,42	71,70
3'	5,19 (t, J= 9,3 Hz))		71,61	71,70
4'	5,05 (t, J= 9,3 Hz)	←	68,44	68,70
5'	3,67 (m)	←	72,84	73,00
6'a	4,11(dd, J= 17,0 e 4,5 Hz)	←	62,04	62,20
6'b	4,24 (dd, J= 17,0 e 2,0 Hz)		62,04	62,20
H ₃ C-CO			20,61; 20,74	-
CO			170,71; 170,35, 169,39; 169,30	-

5.3.2- Substâncias 66, 67 e 68.

A mistura das substâncias **66**, **67** e **68** foi observada pela análise de dados espectrais, destacando-se os fornecidos pelos espectros de RMN de ^{13}C PND e DEPT.

As estruturas dos três componentes da mistura foram definidas pela interpretação dos espectros de RMN de ^1H (**Figura 49**), reconhecendo-se a presença dos sinais correspondentes aos grupos metila ligados a carbono sp^3 em δ_{H} : 0,76 –1,13 e sp^2 δ_{H} : 1,59 de próton carbinólico metínico δ_{H} : 3,22 (dd, $J= 8,0$ Hz, e $J= 6,7$ Hz, $\text{H}\beta\text{-3}$) e de prótons olefínicos em δ_{H} : 5,19 (m, H-12 de **68**), 5,14 (m, H-12 de **67**), 4,56 (s, H-29a de **66**) e 4,68 (H-29b de **66**).

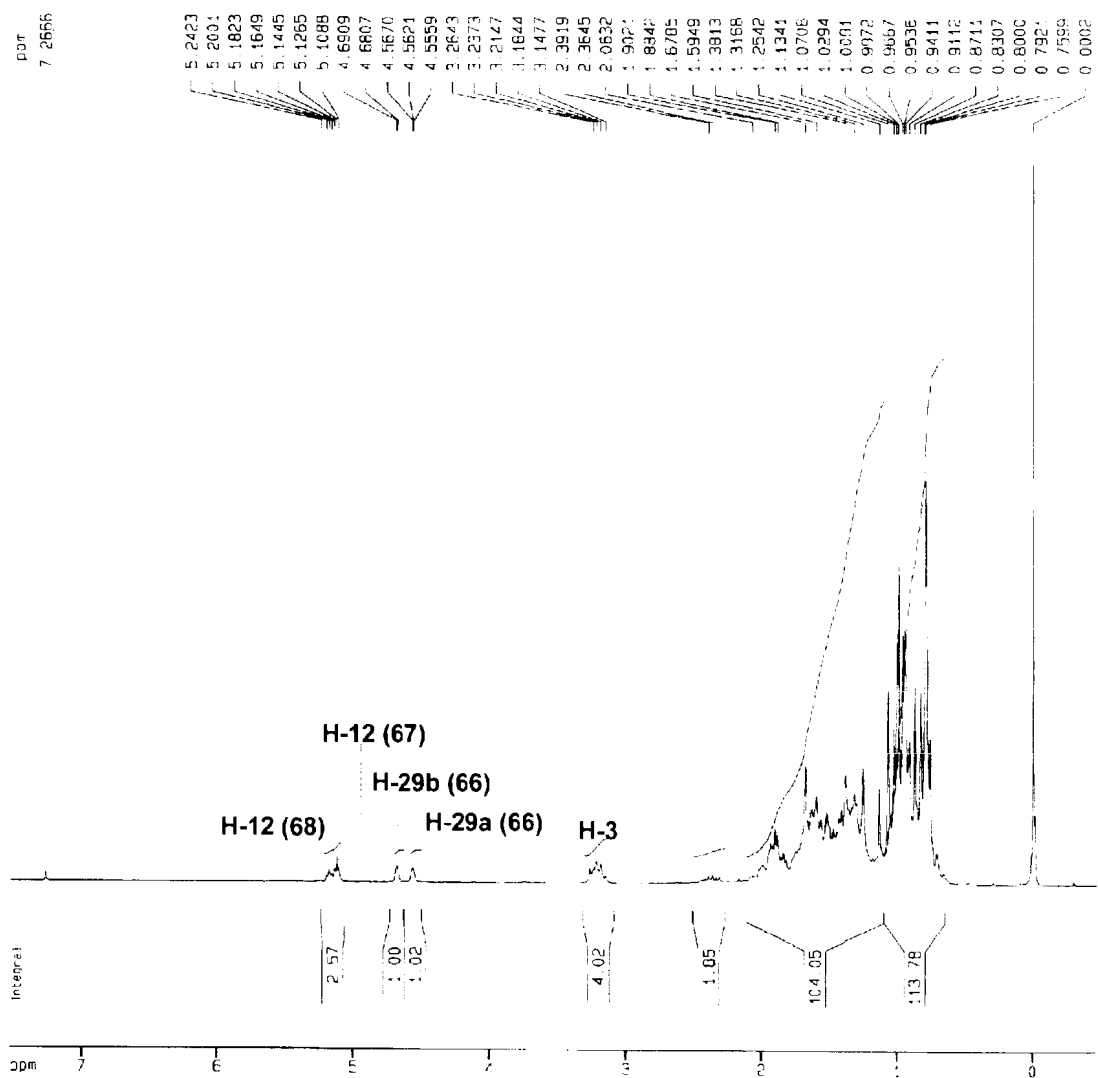
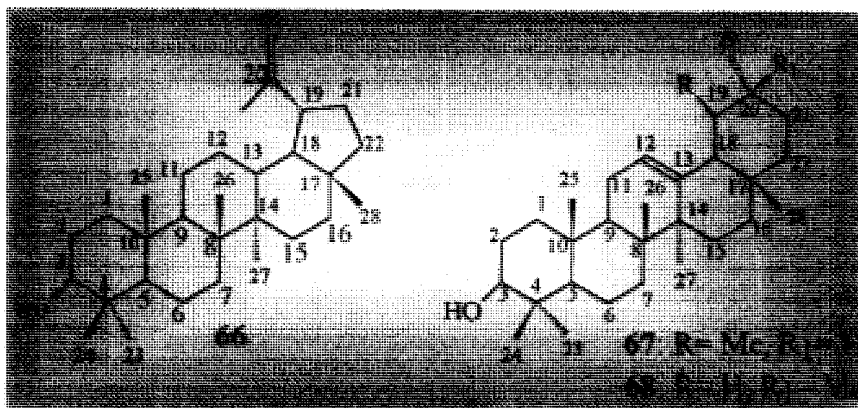


Figura 49: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da mistura das substâncias **66**, **67** e **68** em CDCl_3 .



A análise comparativa dos espectros de RMN de ^{13}C (PND e DEPT) (**Figuras 50 e 51**) permitiu identificar os sinais de átomos de carbono primários (CH_3), secundários (CH_2), terciários (CH) e quaternários (C). Os deslocamentos químicos de carbono sp^2 em δ_{C} : 150,91 e 109,31; 139,55 e 124,40 e 145,16 e 121,70, foram atribuídos aos átomos de carbono das ligações duplas de **66**, **67** e **68** respectivamente. Esta análise para identificação de mistura de terpenóides é proposta por Olea e Roque⁵⁶.

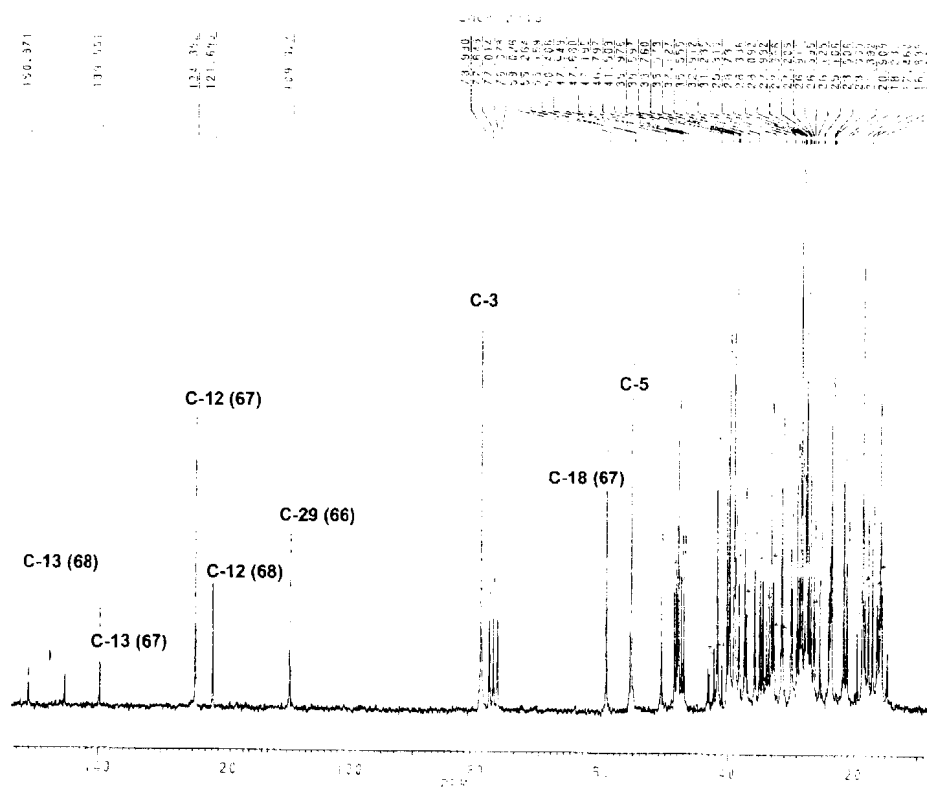
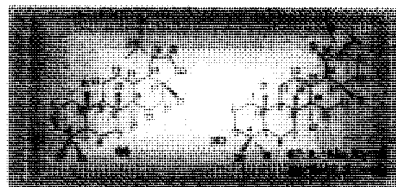


Figura 50: Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz) da mistura das substâncias **66**, **67** e **68** em CDCl_3 .



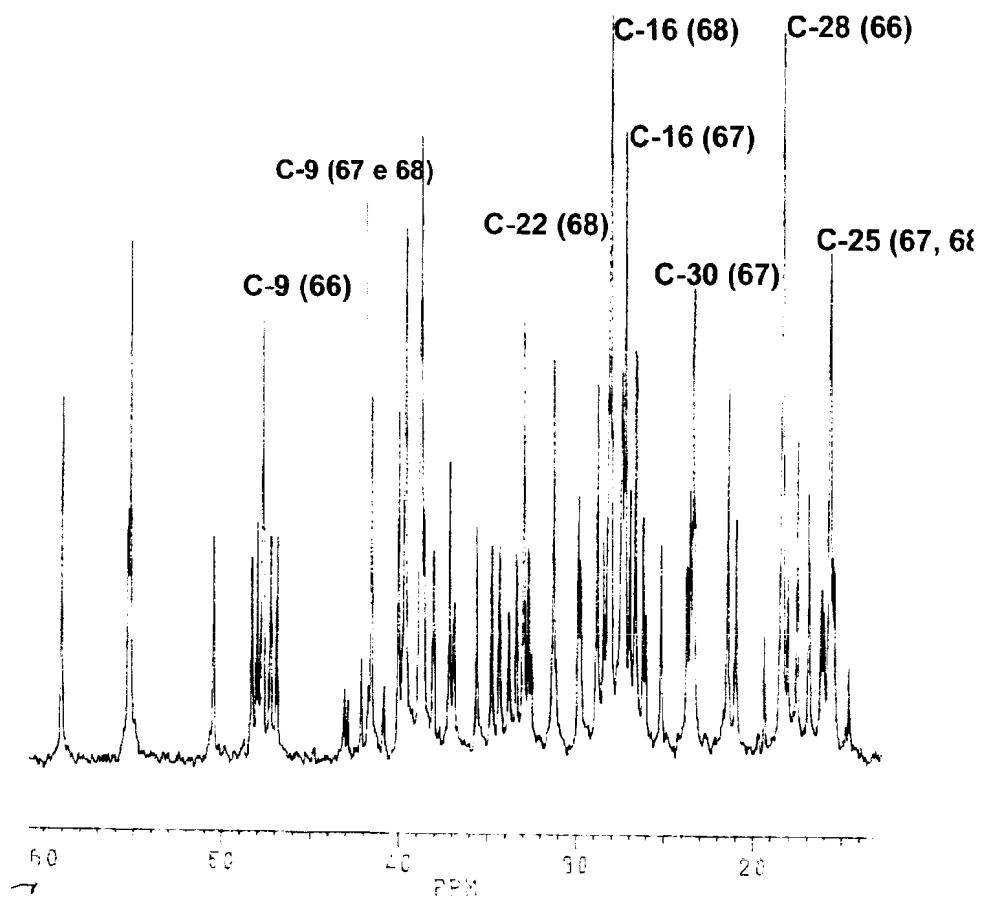
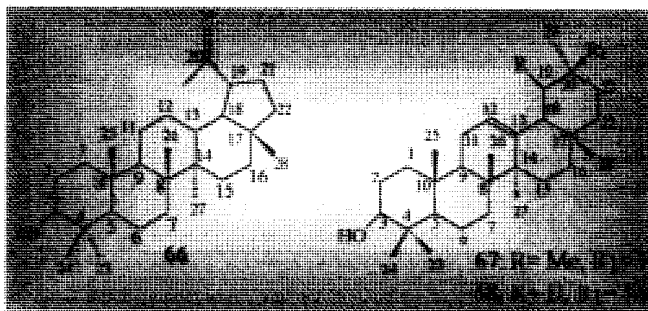


Figura 50a: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C entre 14-60 ppm.



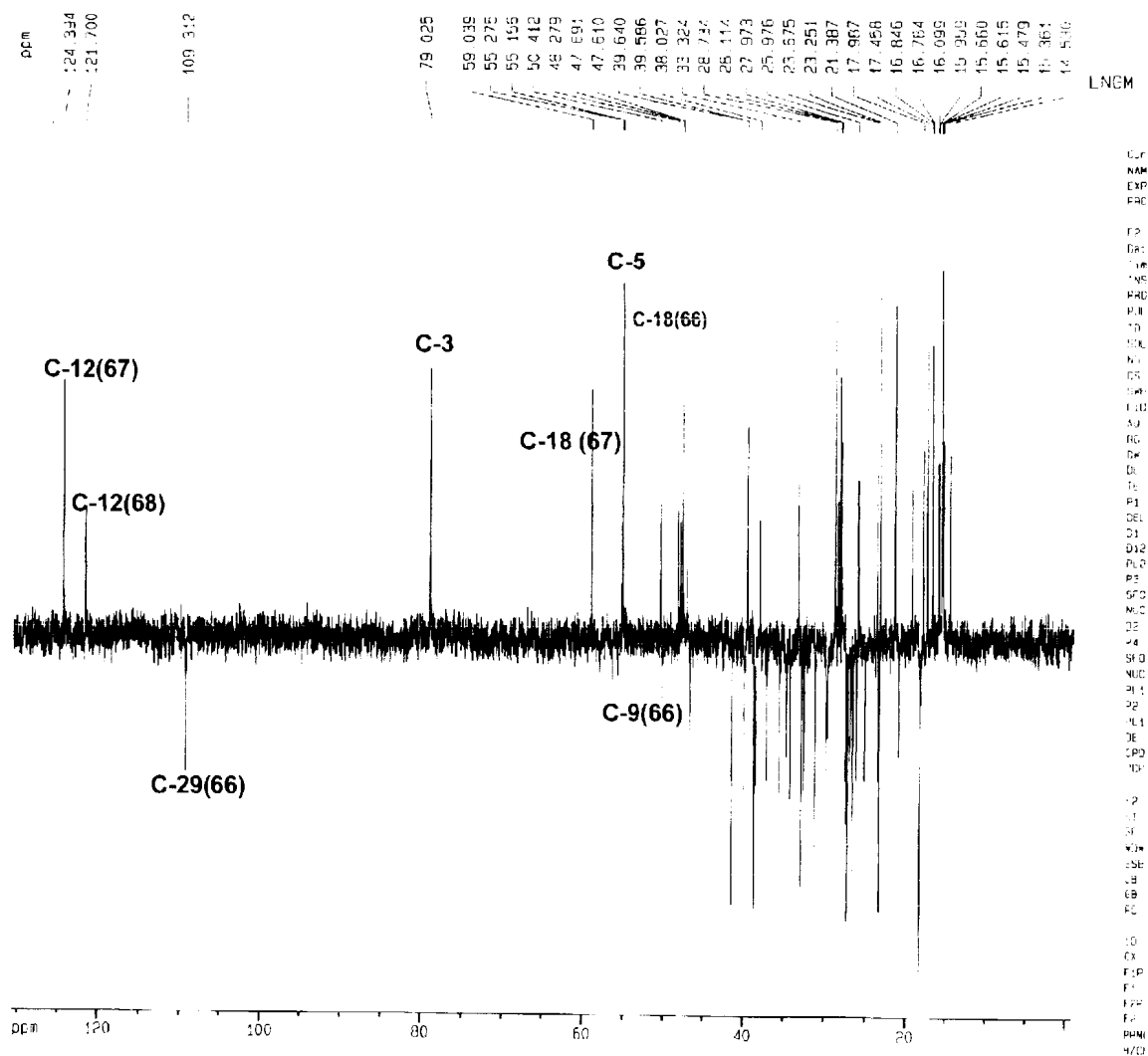
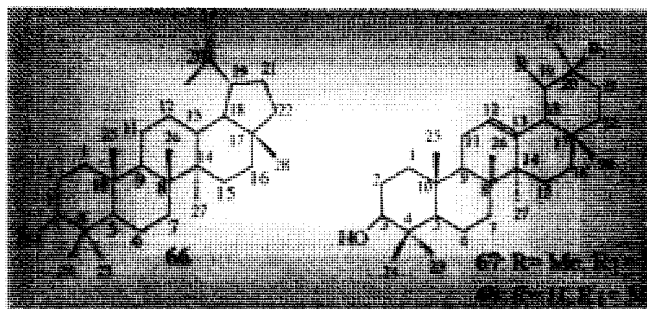


Figura 51: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT (50 MHz) da mistura de **66**, **67** e **68** em CDCl_3 .



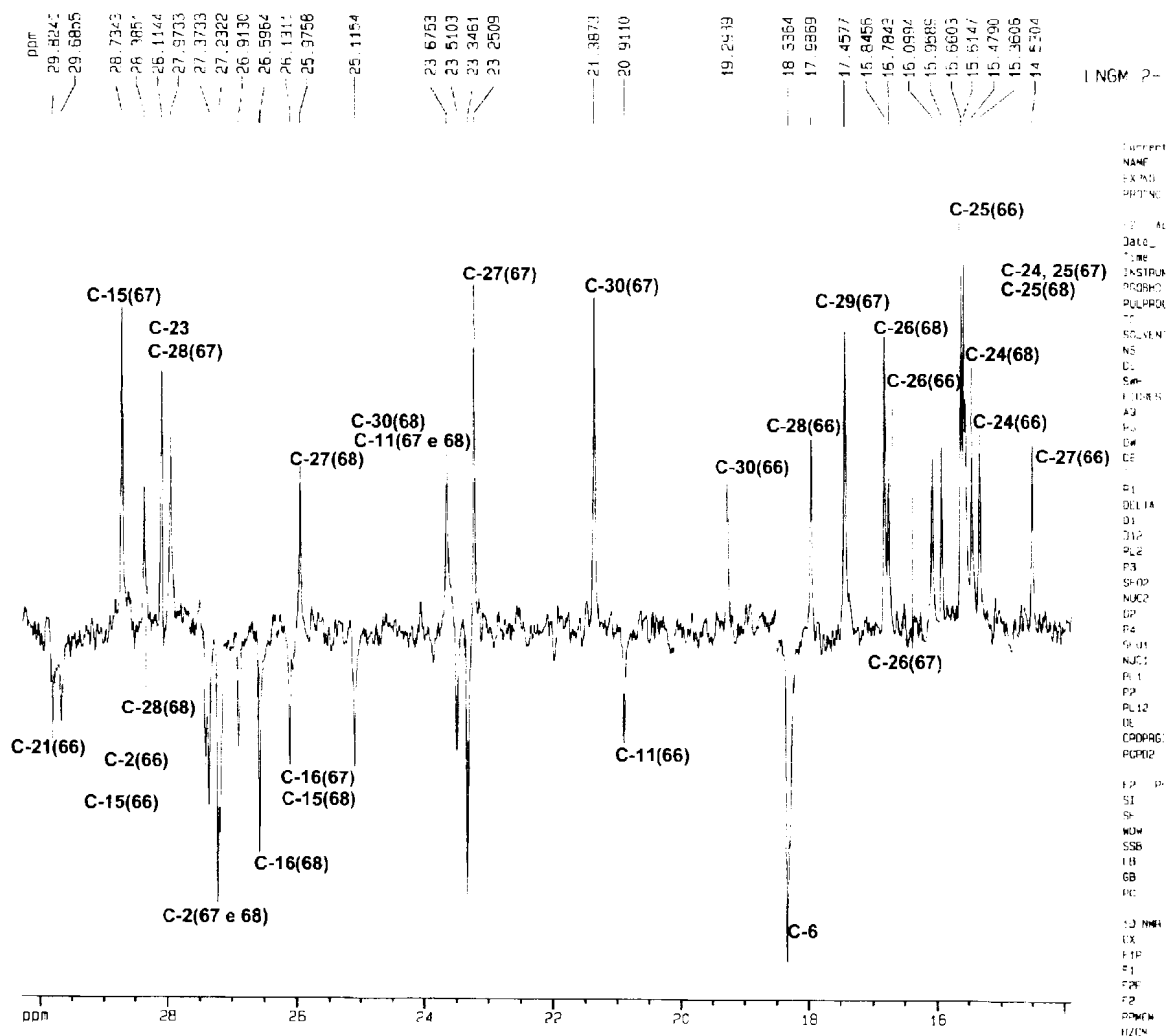
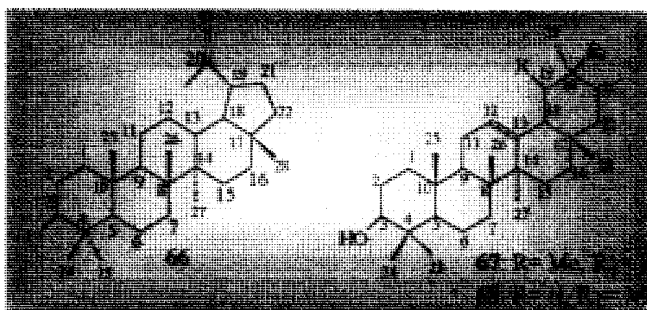


Figura 51a: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C DEPT da mistura de **66**, **67** e **68** entre 15 –30 ppm.



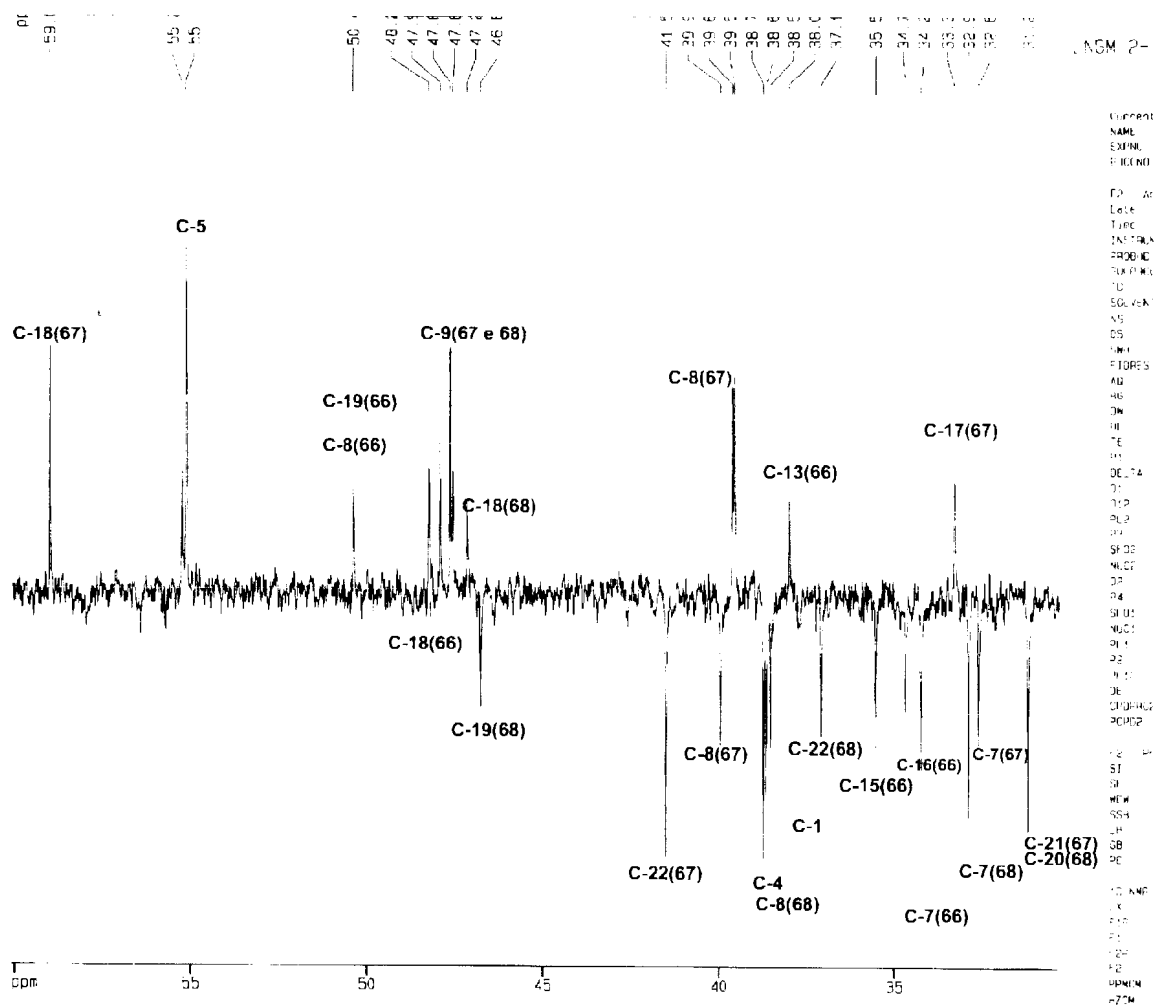
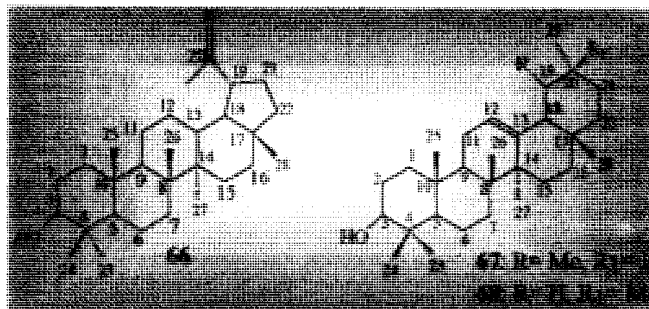


Figura 51b: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C DEPT da mistura de **66**, **67** e **68** entre 30–60 ppm.



A análise destes dados espectrais e a comparação com dados registrados na literatura⁵⁷ (**Tabela 11**), permitiu identificar os três isômeros triterpênicos da mistura como sendo lupeol (**66**), α -amirina (**67**) e β -amirina (**68**).

Tabela 11: Dados de RMN de ^{13}C das substâncias **66**, **67** e **68**. Comparados com dados da literatura⁵⁷.

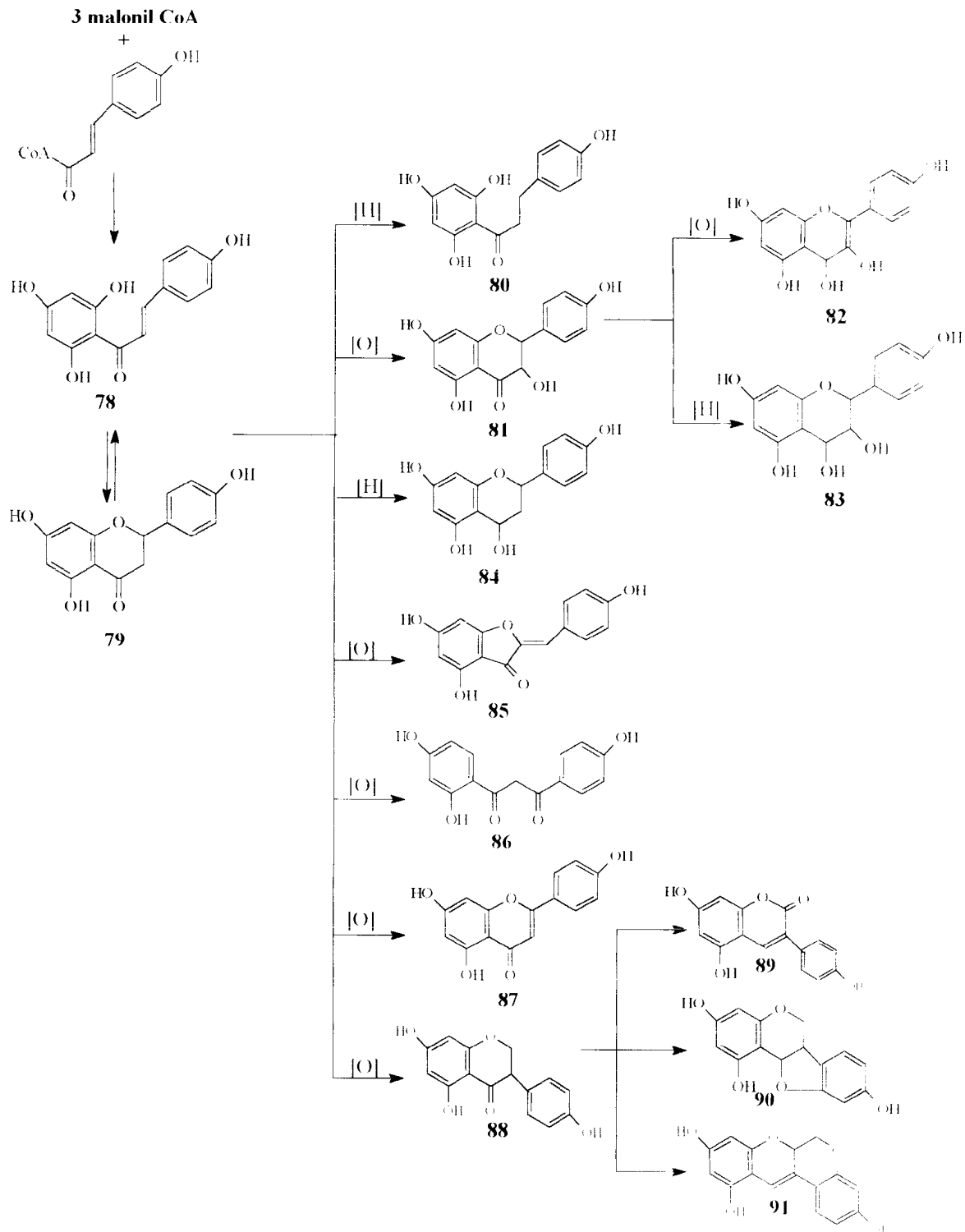
C	66, 67 e 68	lupeol	α -amirina	β -amirina
1	38,68	38,70	38,70	38,70
2	27,23/27,37	27,40	27,20	27,30
3	79,02	78,90	78,30	78,80
4	38,68/38,76	38,80	38,70	38,80
5	55,27	55,30	55,20	55,30
6	18,34	18,30	18,30	18,30
7	34,26/32,92	34,20	32,29	32,80
8	41,51/39,99/38,75	40,80	40,00	38,80
9	50,41/47,69	50,40	47,70	47,70
10	50,40/37,00/38,00	50,40	36,90	37,60
11	20,91/23,67	20,90	23,60	23,60
12	25,11/124,39/121,69	25,10	124,30	121,80
13	38,00/139,55/145,16	38,00	139,30	145,10
14	42,80/42,00/41,50	42,60	42,00	41,80
15	27,37/28,73/26,13	27,40	28,70	26,20
16	35,56/27,23/26,60	35,50	26,60	27,00
17	42,95/33,70/32,45	43,00	33,70	32,50
18	48,28/59,04/47,20	48,20	58,90	47,40
19	39,64/46,80/47,96	47,90	39,60	46,90
20	31,23/39,64/150,87	150,90	39,60	31,10
21	29,82/31,23/34,71	29,80	31,20	34,80
22	37,12/39,97/41,51	40,00	41,50	37,20
23	28,11	28,00	28,10	28,20
24	15,48/15,66	15,40	15,60	15,50
25	15,66/16,09	16,10	15,60	15,60
26	15,95/16,84	15,90	16,80	16,90
27	14,53/23,34/26,13	14,50	23,30	26,00
28	18,33/28,11/28,38	18,00	28,10	28,40
29	17,45/33,32/109,30	109,30	17,40	33,50
30	19,29/21,38/23,67	19,30	21,30	23,70

5.3.3- Substância 74.

Os flavonóides constituem um dos mais numerosos grupos de produtos naturais englobando cerca de 4000 substâncias caracterizadas até o início da década de 90⁵⁸.

Através de estudos biossintéticos, sabe-se que seus esqueletos básicos são formados por unidades C₆-C₃-C₆ (bi-aril propanóide), biogeneticamente originados pela condensação de uma cadeia policetídica (encadeiamento de 3 unidades do éster CoA do ácido malônico) com uma do éster CoA do ácido cinâmico, gerando uma chalcona (**78**) em equilíbrio com a flavanona (**79**) correspondente (**Esquema 19**). Através de uma série de reações enzimáticas envolvendo oxidações, reduções e alquilações formam-se os diversos tipos de flavonóides. Os esqueletos básicos são nitidamente diferenciados pela forma como apresentam a unidade propanoídica, ora ciclizando no anel C [flavona (**87**), flavanona (**79**), isoflavona (**88**), flavana (**83**), flavonol (**82**), flavanonol (**81**), aurona (**84**)], ora mantendo-se uma cadeia aberta [chalcona (**78**), diidrochalcona (**80**), β-hidroxichalcona (**86**)]. Os rotenóides (**91**), pterocarpanos (**90**) e 3-fenilcumarinas (**89**) derivam das isoflavonas (**Esquema 19**)^{41, 59}.

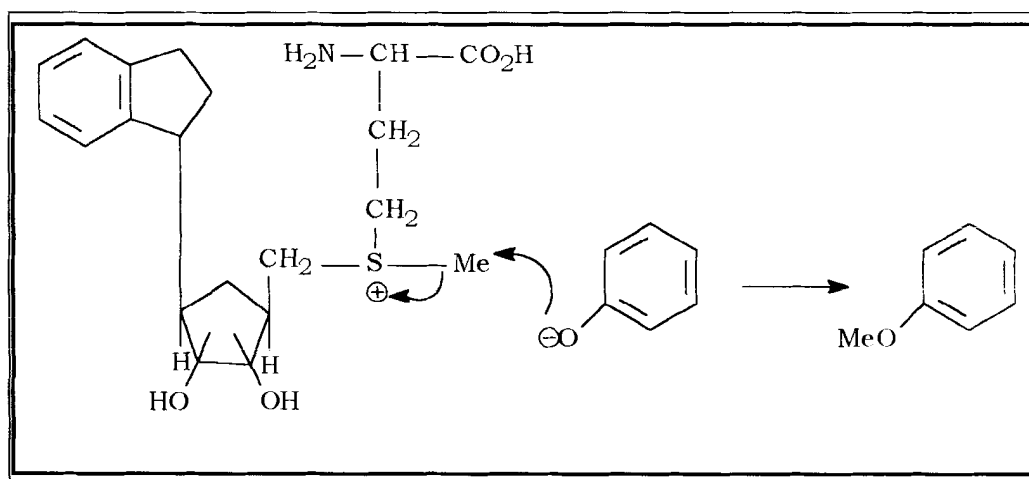
ESQUEMA 19: Biossíntese dos flavonóides



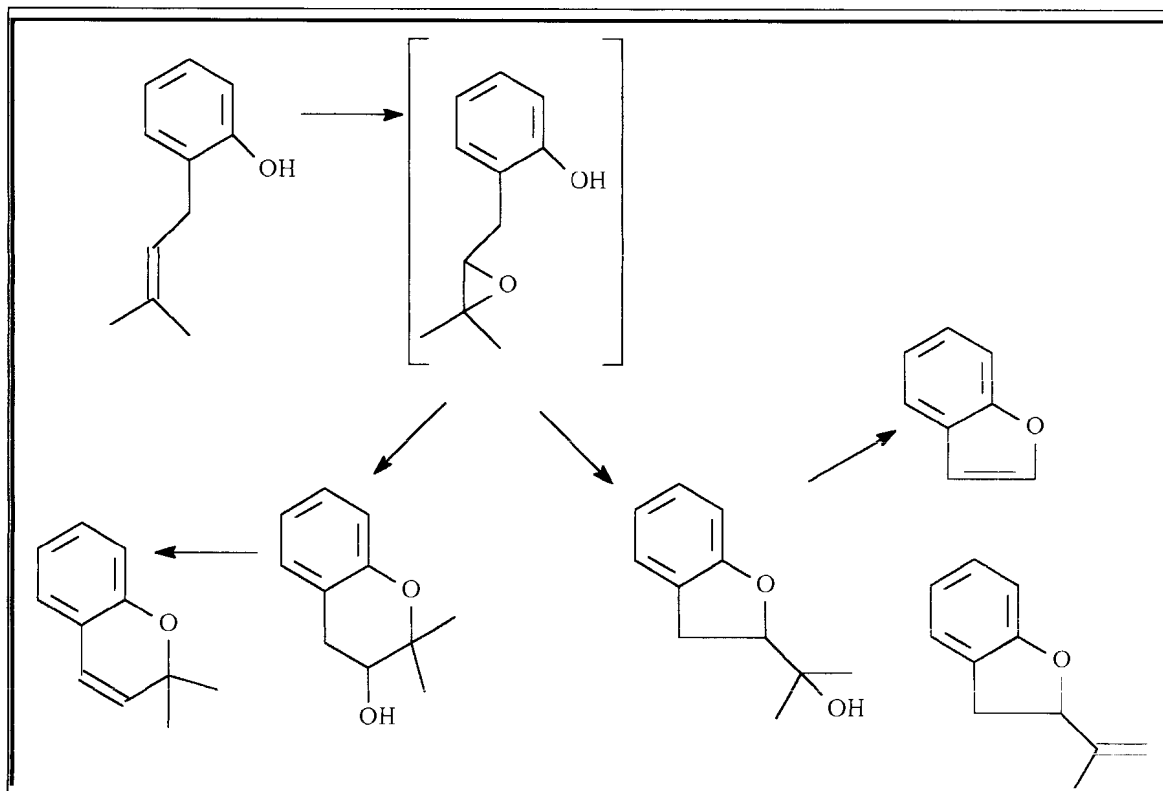
Como mencionado acima, o padrão de oxigenação original do anel A (5, 7-diidroxi) é determinado pelo precursor biossintético, enquanto que no anel B é variável. Isto depende do número de hidroxila presente no ácido. As vezes pode ocorrer modificação no padrão de oxigenação após a formação da chalcona / flavanona.⁶⁰

Muitos flavonóides contém grupos O-metil e/ou grupos prenila. Estes grupos metila são normalmente derivados do cofator enzimático S-adenosil metionina (**Esquema 20**).⁶¹ Os grupos prenila são derivados da via do mevalonato, tendo-se as diversas variações possíveis (**Esquema 21**).^{62, 63, 64}

ESQUEMA 20: Metilação pelo cofator S-adenosil metionina



ESQUEMA 21: Transformação do grupo prenila



As identificações dos flavonóides de *Luxemburgia nobilis* foram realizadas através das análises de seus espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (PND, DEPT, uni- e bidimensionais) e considerações biossintéticas. Dos sete flavanóides isolados, cinco são conhecidos, portanto suas identificações foram confirmadas através da comparação com os dados da literatura.

O flavonóide **74** foi identificado como (+) epicatequina através da análise dos espectros de I.V (Figura 52), RMN de ^1H uni- e bidimensional (Figuras 53 e 54), RMN de ^{13}C PND (Figura 55) e DEPT (Figura 56).

O espectro de I.V (Figura 52) apresentou banda de absorção em $3256,10\text{ cm}^{-1}$ que é atribuída ao estiramento de grupos hidroxílicos, absorção em $1625,30$ e $1466,50\text{ cm}^{-1}$ referentes a presença de anel aromático.

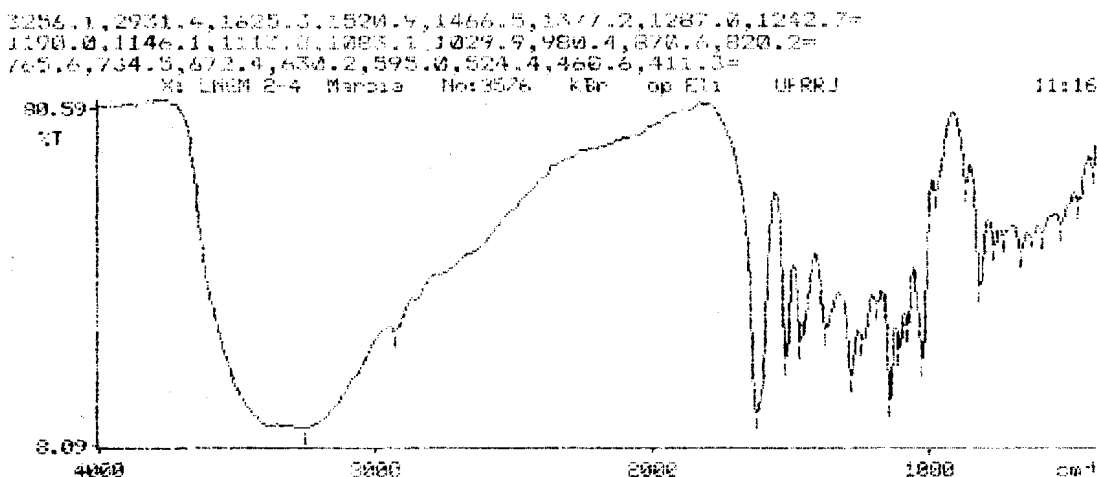


Figura 52: Espectro de infra-vermelho da substância 74.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 53) possui 5 sinais na região de aromáticos em δ_{H} : 5,86 (sl, H-8), δ_{H} : 6,01 (d, $J= 2,00\text{ Hz}$, H-6), δ_{H} : 6,75-6,80 (m, H-5' e 6') e δ_{H} : 6,88 (s, H-2').

A constante de acoplamento do hidrogênio carbinólico em δ_{H} : 4,54 (d, $J= 6,8\text{ Hz}$, H-2) e dos hidrogênios metilênicos em δ_{H} : 2,51 (dd, $J= 6,8$ e $16,0\text{ Hz}$, H-4_{anti}) e δ_{H} : 2,90 (dd, $J= 4,2$ e $16,0\text{ Hz}$, H-4_{syn}) em relação ao H-3 (sl), mostra se tratar de uma catequina. Devido as interações de H-3 axial-axial entre H-4_{anti}, equatorial-axial entre H-4_{sin} e axial-axial entre H-2 pode-se propor a estrutura da epicatequina.

Estas identificações foram confirmadas após a comparação do espectro de RMN¹H de **74** com o da epicatequina divulgado na literatura⁶⁵.

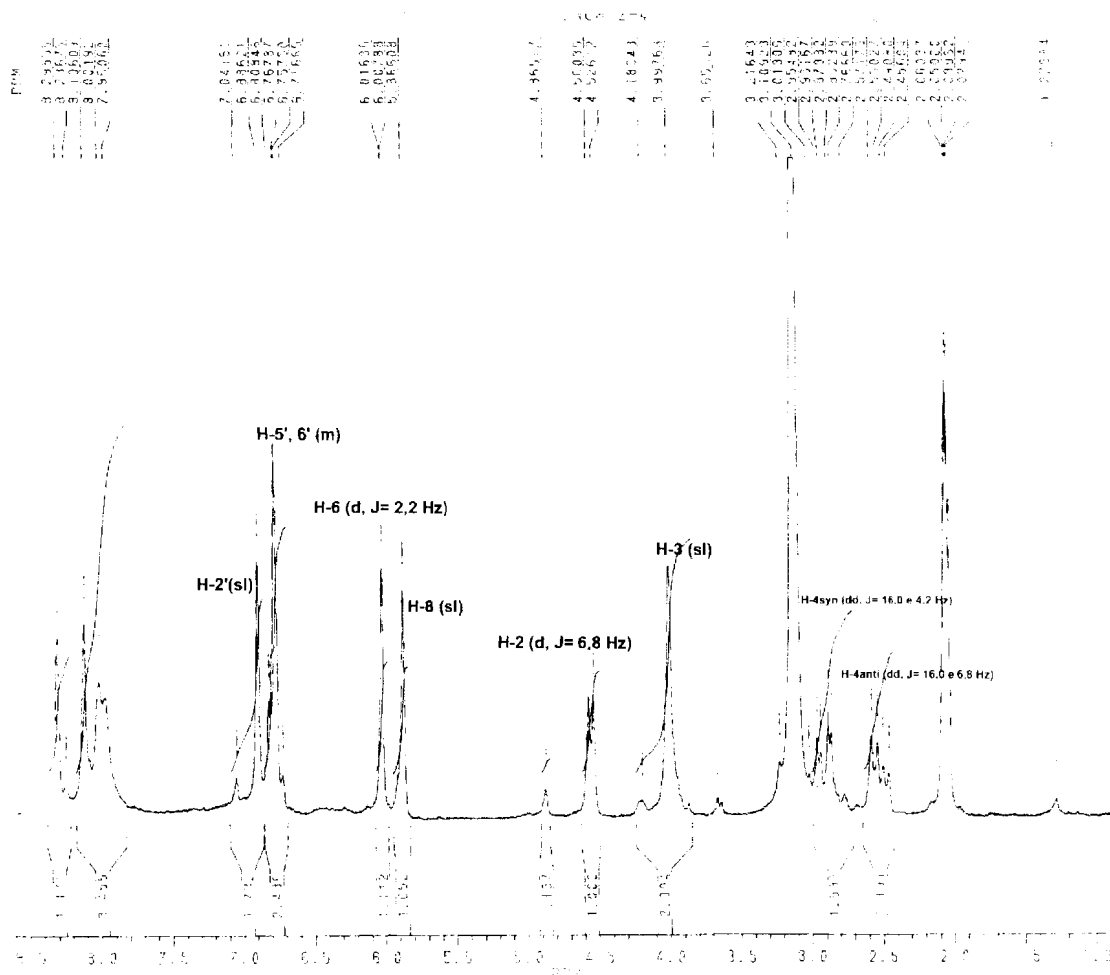
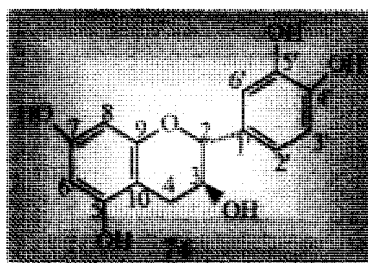


Figura 53: Espectro de RMN de ¹H (200 MHz) da substância **74** em D₃CCOCD₃.



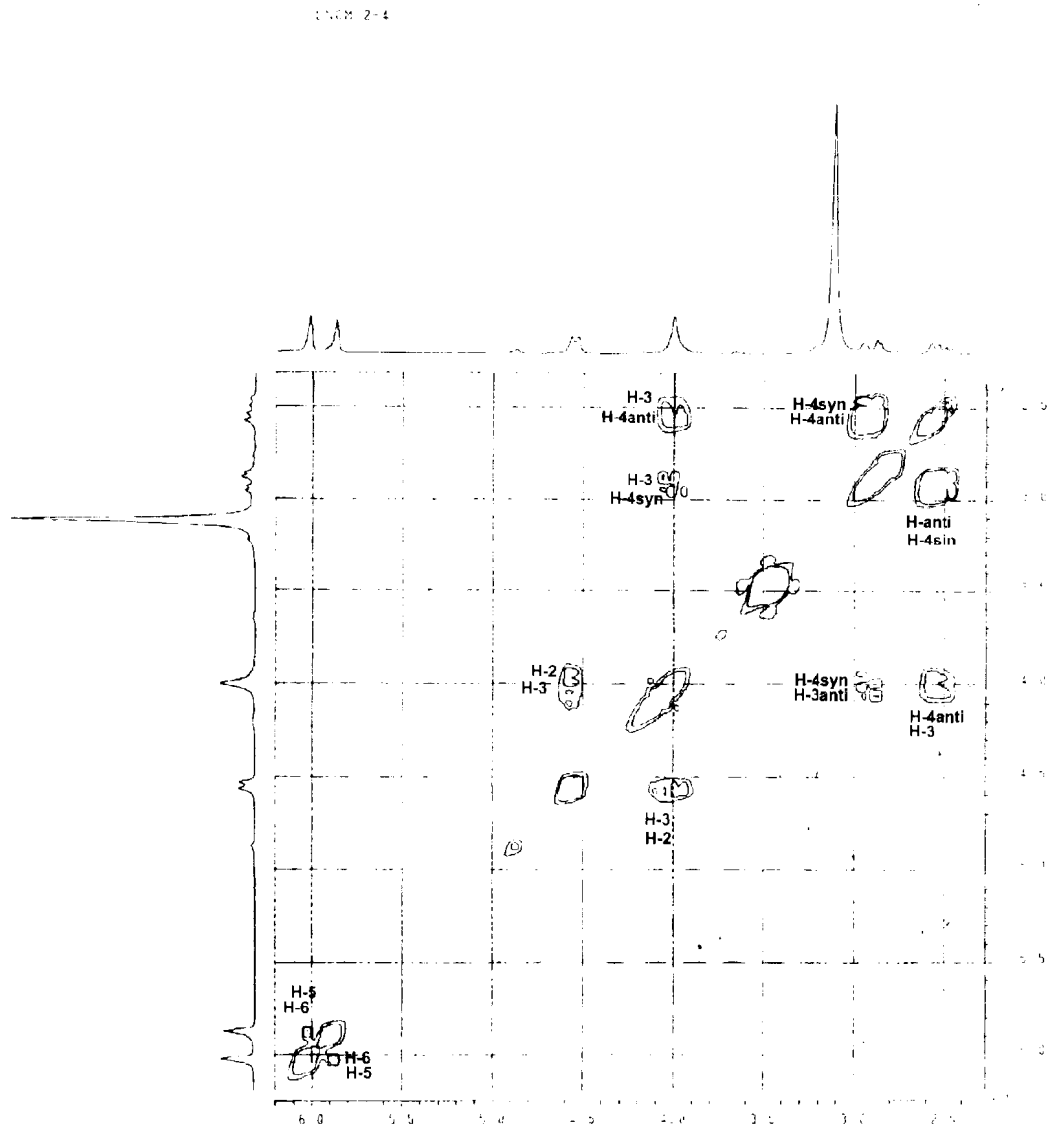
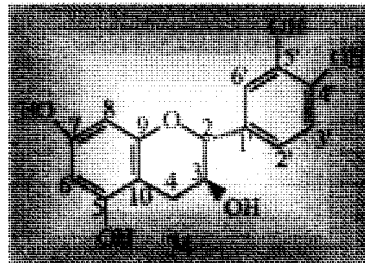


Figura 54: Espectro de correlação homonuclear de hidrogênio-hidrogênio (^1H , ^1H -COSY) na região de 2,0 – 6,2 ppm de **74** em D_3CCOCD_3 .



O espectro de RMN de ^{13}C (PND, **Figura 55**) apresenta 14 sinais atribuíveis a (+) epicatequina, sendo um sinal atribuído a dois carbonos C-3' e C-4'. A ausência do sinal correspondente a carbonila e a presença dos sinais correspondentes aos carbonos C-2 em 79,25 ppm (CH), C-3 em 66,84 ppm (CH) e C-4 em 28,68 ppm (CH_2) levaram a proposta de um esqueleto do tipo flavan-3-ol.

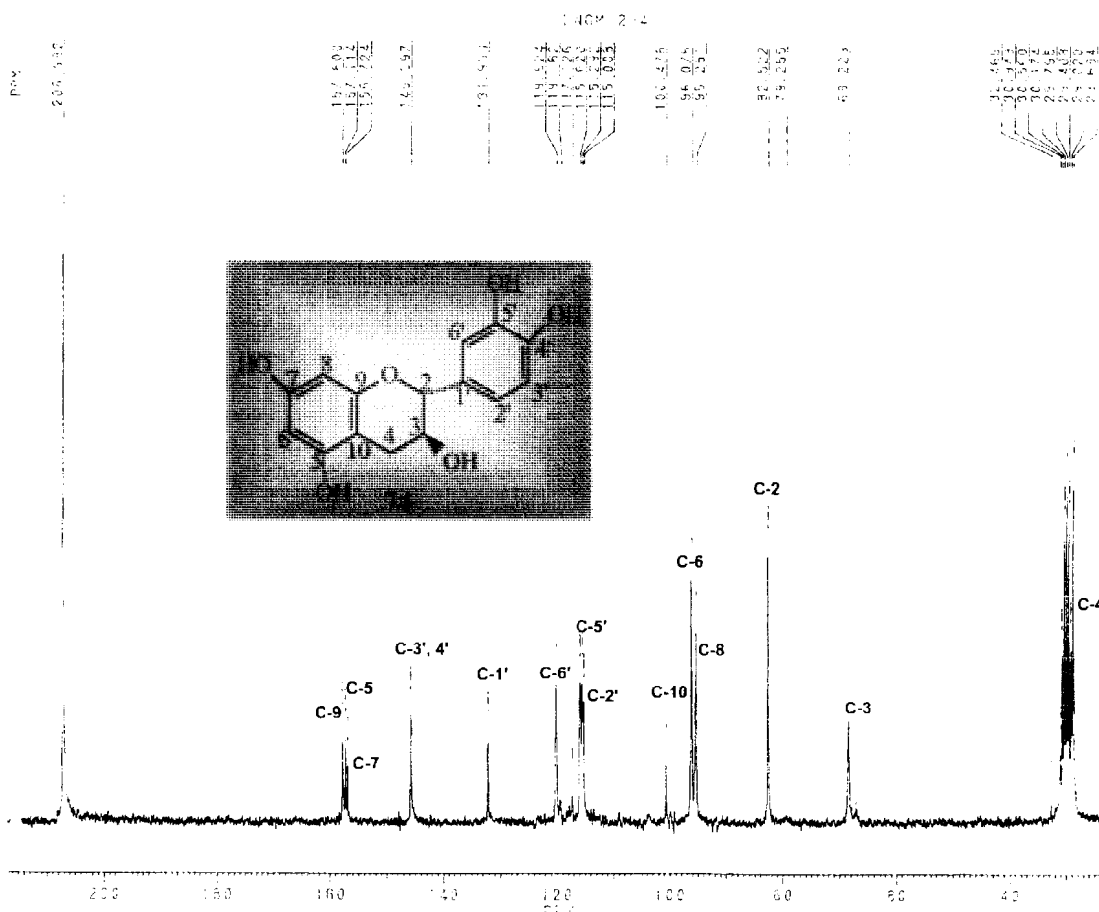


Figura 55: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) da substância **74** em D_3CCOCD_3 .

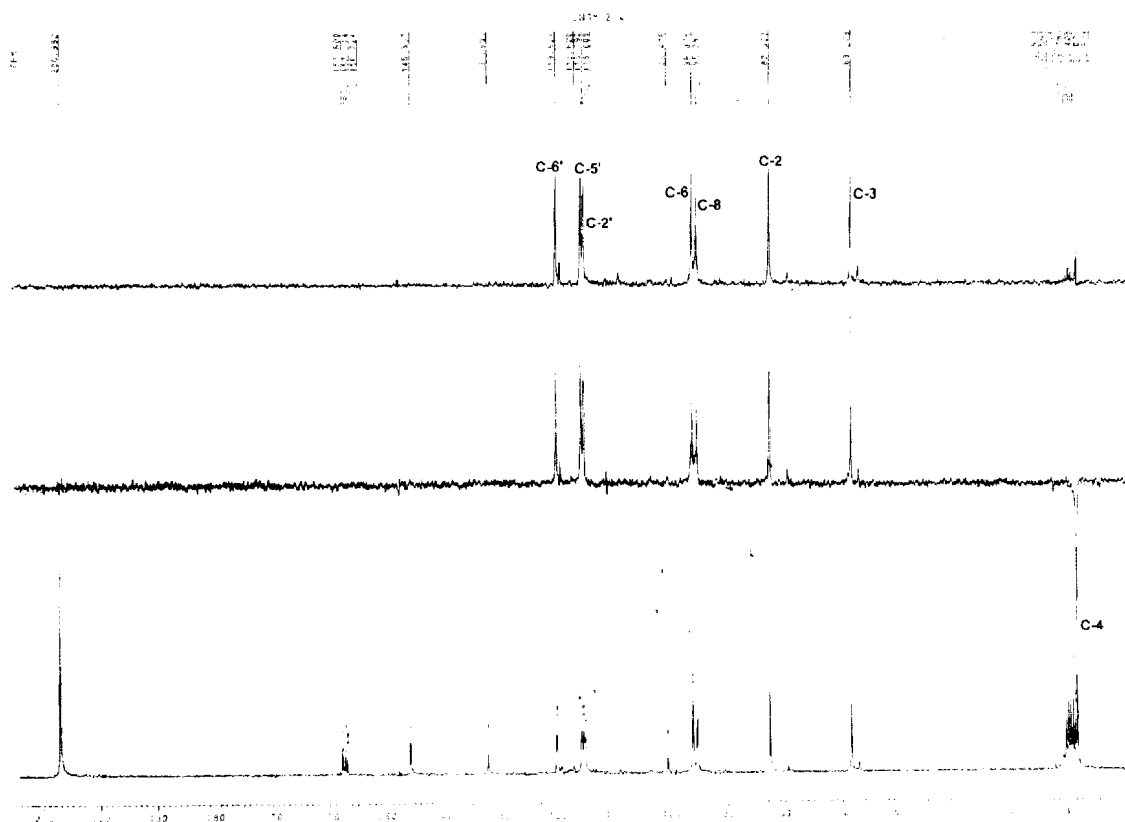
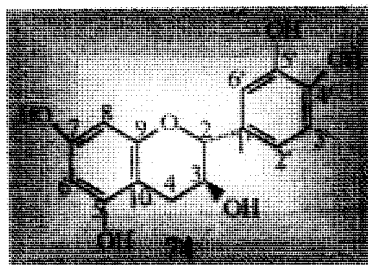


Figura 56: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT (50 MHz) da substância **74** em D_3CCOCD_3 .



A **Tabela 12** apresenta as atribuições dos dados de RMN de ^{13}C de **74**, que se mostram semelhantes aos publicados na literatura⁶⁶ para (+)-epicatequina.

A obtenção do derivado acetilado de **74** (**74a**), permitiu a confirmação da estrutura através dos deslocamentos químicos e multiplicidade dos sinais no espectro de RMN de ^1H (**Figura 57**) dos grupos acetoxilas em δ_{H} : 1,89-2,09 introduzidos pela reação de acetilação, além da melhor resolução do espectro deste derivado.

A análise dos sinais de hidrogênios aromáticos mostra claramente que houve deslocamentos paramagnéticos de H-6 ($\Delta\delta = 0,62$ ppm) e H-8 ($\Delta\delta = 0,71$), devido a redução da proteção por mesomeria dos pares de elétrons dos oxigênios que passam a sofrer conjugação com o grupo acetoxi⁶⁷. Este efeito também é verificado em H-2, H-3 e 2H-4.

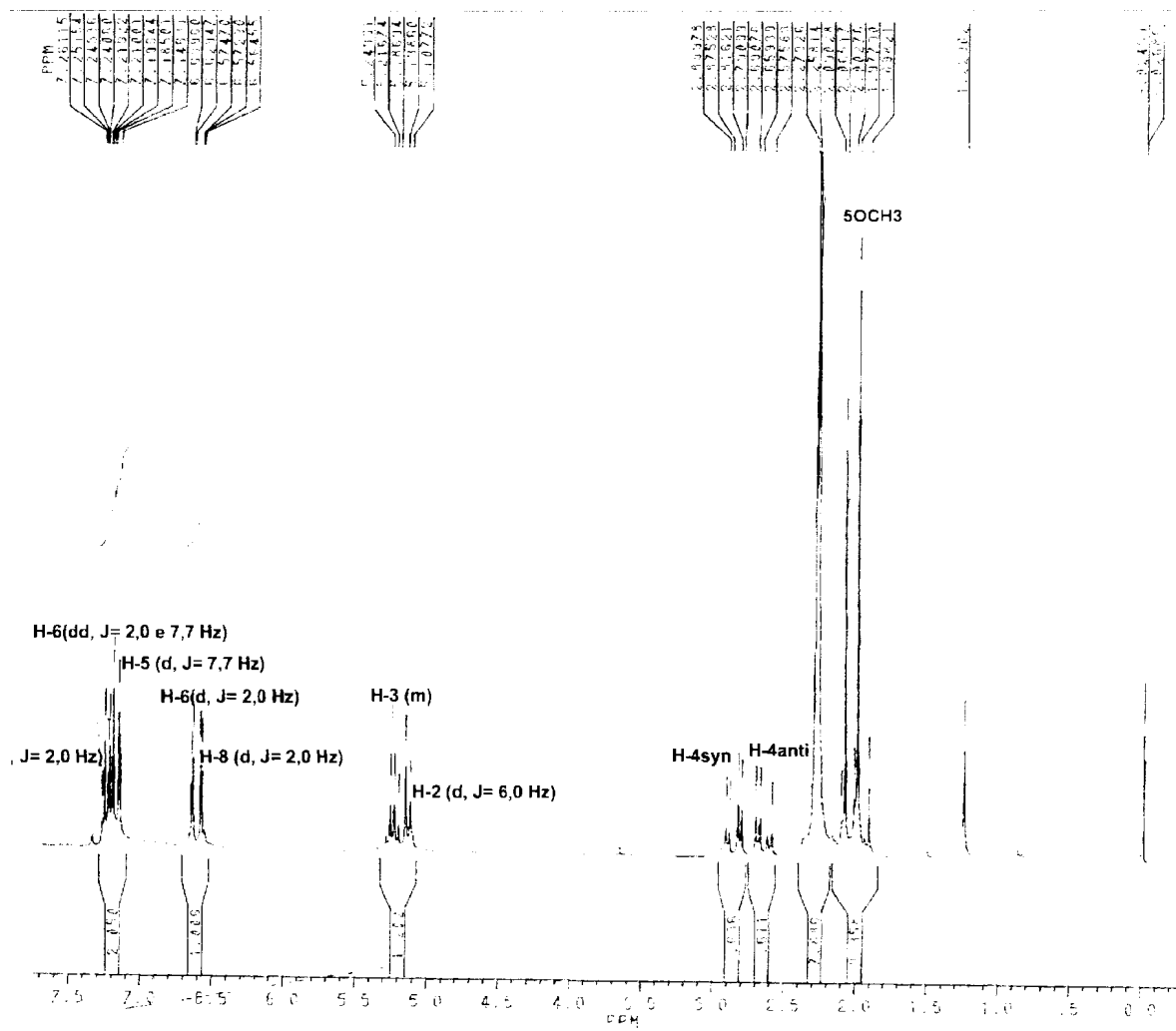
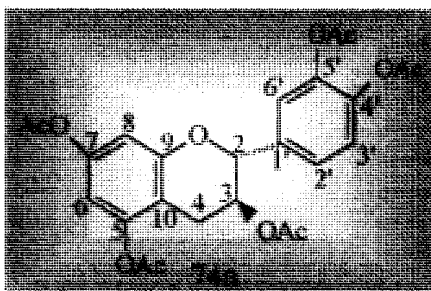


Figura 57: Espectro de RMN de ${}^1\text{H}$ (200 MHz) do derivado 74a em CDCl_3 .



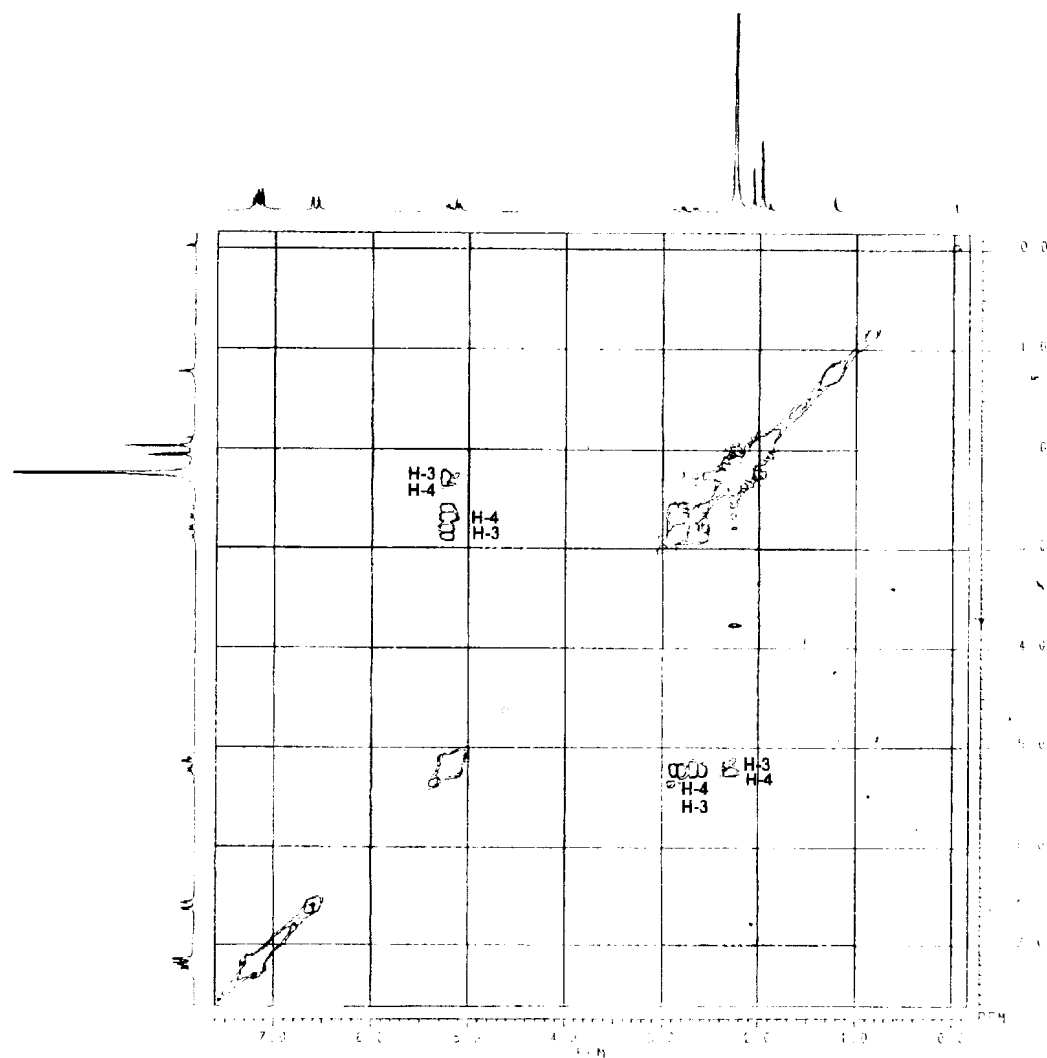
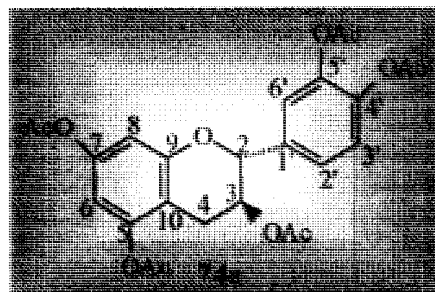


Figura 58: Espectro de correlação homonuclear de hidrogênio–hidrogênio (^1H , ^1H -COSY) da substância **74a** em CDCl_3 .



As diferenças significativas dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono aromáticos observados no espectro de RMN de ^{13}C (PND e DEPT, Figuras 59 e 60) de **74a**, são consistentes com as alterações eletrônicas provocadas pela conversão dos grupos hidroxílicos em acetoxílicos, confirmando assim a proposta estrutural da substância natural (+) epicatequina (Tabela 12).

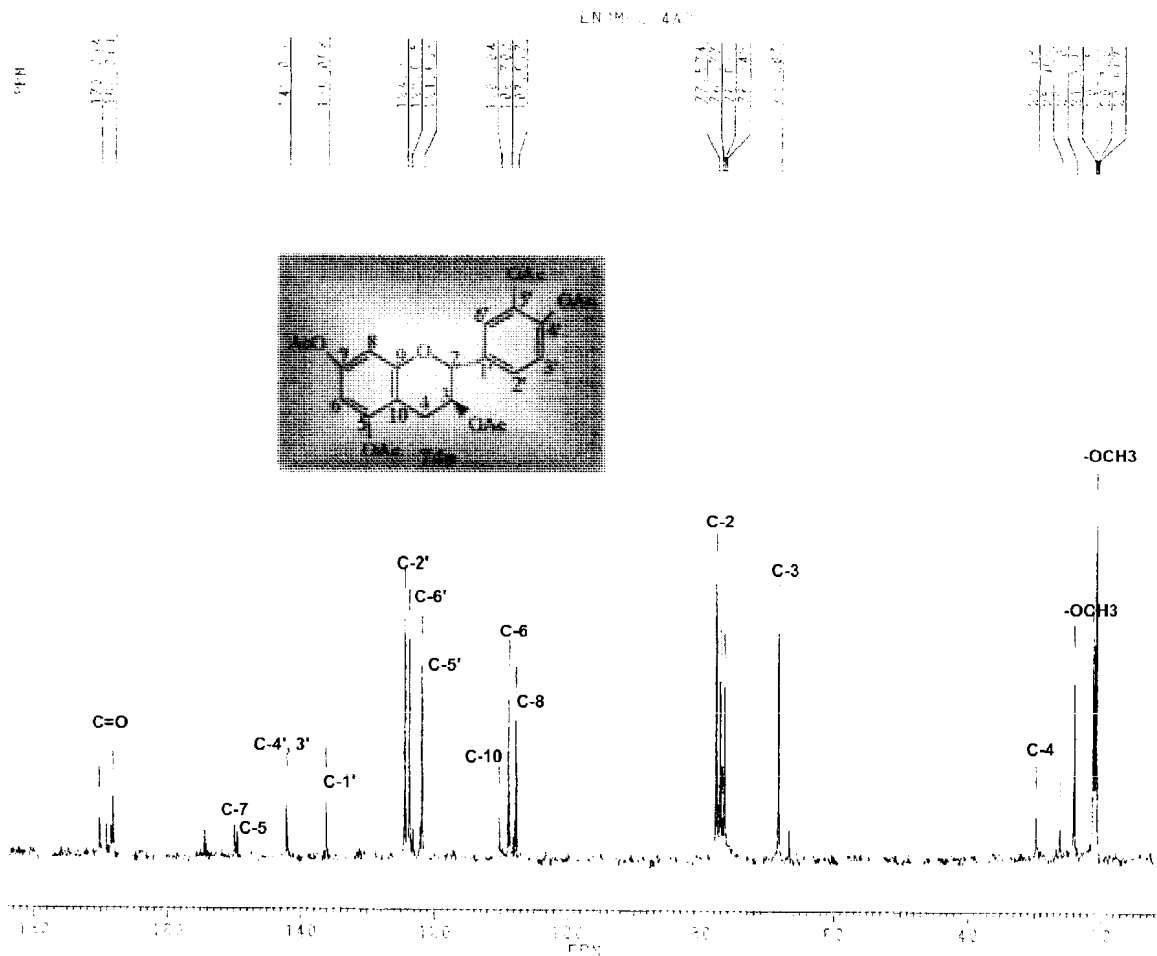


Figura 59: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) do derivado **74a** em CDCl_3 .

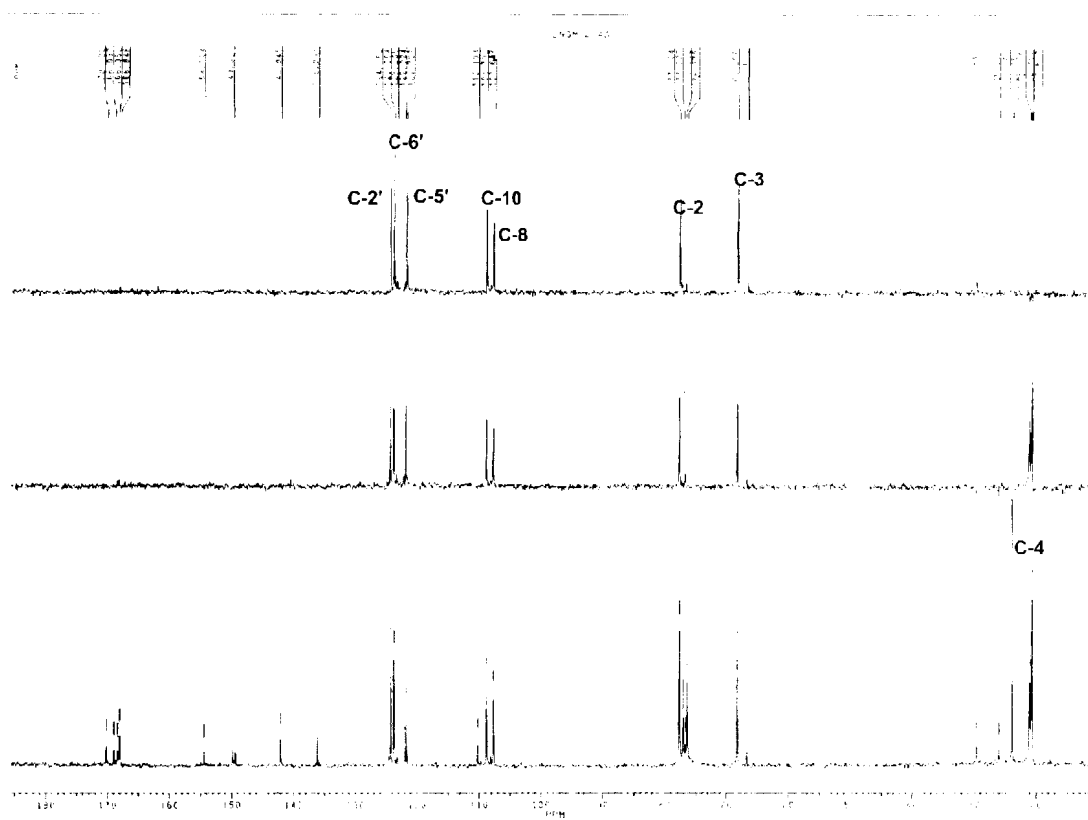


Figura 60: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT (50 MHz) do derivado **74a** em CDCl_3 .

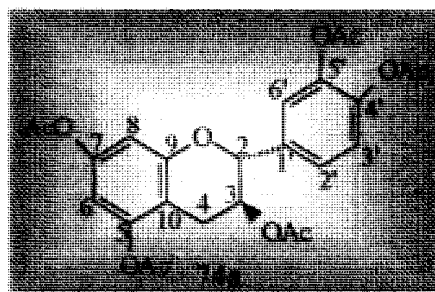
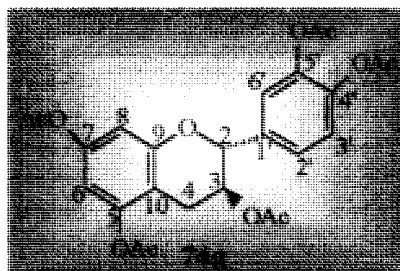
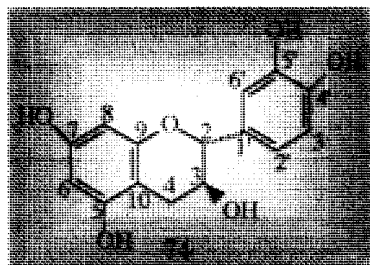


Tabela 12: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **74** comparados com dados da literatura⁶⁶ e de ^{13}C do derivado **74a**.

C	74			(+) Epicatequina ⁶⁶	74a
	δ_{H}	$^1\text{H}, ^1\text{H-COSY}$	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
2	4,54 (d, J= 6,8 Hz)		82,52	79,40	77,50
3	3,99 (sl)	←	68,23	66,90	68,20
4	2,51 (dd, J= 6,8 e 16,0 Hz) 2,90 (dd, J= 4,2 e 16,0 Hz)	←	28,68	29,10	23,86
5	-		157,11	157,40	148,00
6	6,01 (d, J= 2,0 Hz)		96,07	96,20	108,70
7	-		156,72	157,40	149,00
8	5,86 (sl)		95,28	95,70	107,61
9	-		157,60	157,00	154,00
10	-		100,47	99,70	110,10
1'	-		131,93	132,10	136,06
2'	6,88 (s)		115,00	115,20	124,33
3'	-		145,59	145,20	142,01
4'	-		145,59	145,20	142,01
5'	6,75-6,80 (m)	←	115,62	115,50	121,69
6'	6,75-6,80 (m)	←	119,9	119,40	123,63
OCH ₃	-	-	-	-	20,56- 23,83
C=O	-	-	-	-	168,00- 170,00



5.3.4- Substâncias 75 e 76.

A mistura de **75** e **76** apresentou no espectro de RMN de ^1H (uni- e bidimensional, **Figuras 61, 62**) a presença de singletos atribuídos a duas hidroxilas queladas (δ_{H} : 13,4), cinco sinais em δ_{H} : 6,38(**75**) e 6,32(**76**) (d, J= 2,4 Hz, H-3), 6,45(**75**) e 6,40(**76**) (dd, J= 8,8 e 2,4 Hz, H-5), 8,08(**75** e **76**) (d, J= 8,8 Hz, H-6) pertencentes a dois sistemas ABC, dois dubletos em δ_{H} : 6,99 (H-3', 5') e 7,83 (H-2', 6') que corresponde a um sistema AA'BB' de **75** e outro sistema ABC representado por três sinais em 7,11 (d, J= 8,2 Hz, H-5'), 7,61 (dd, J= 8,2 e 2,0 Hz, H-6') e 7,71 (d, J= 2,0 Hz, H-2') de **76**. Dois singletos adicionais em δ_{H} : 7,81 e 7,84 foram atribuídos aos hidrogênios 8 e 9 de **75** e **76** (**Tabela 13**).

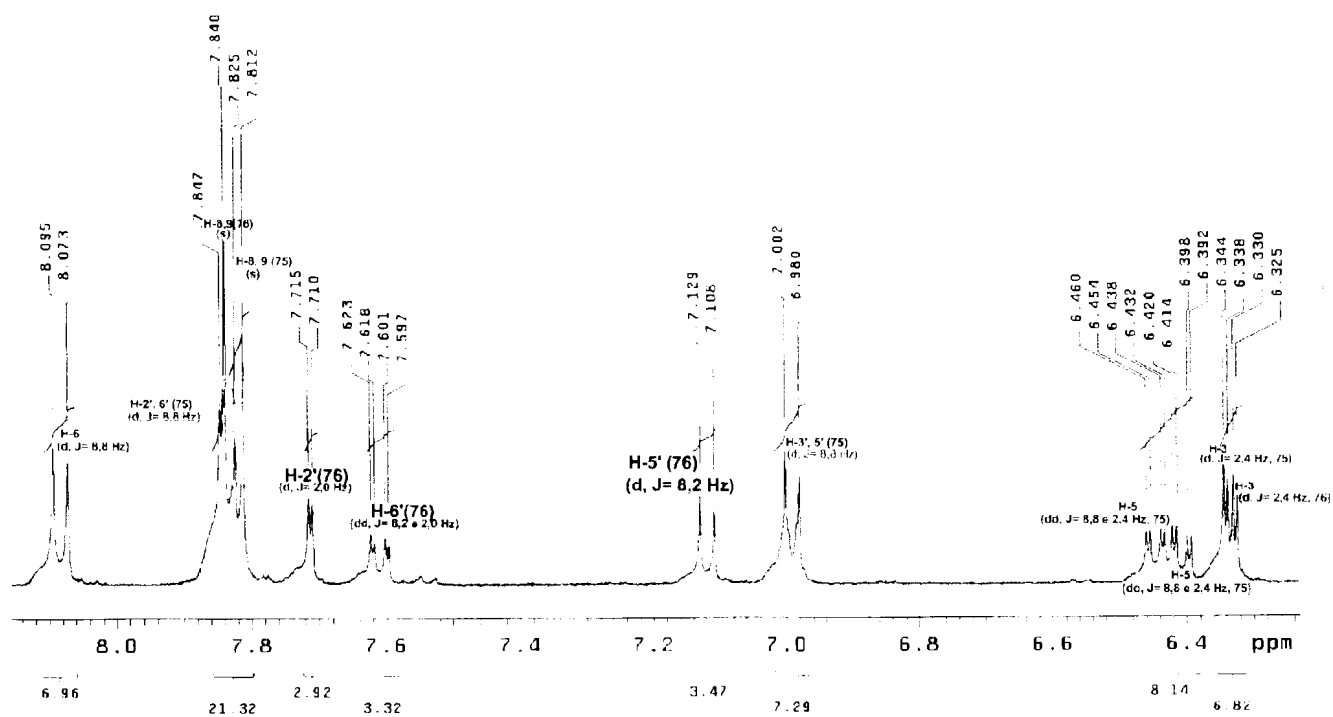
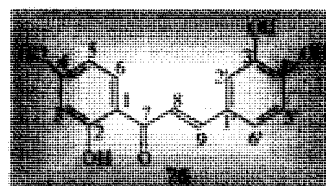
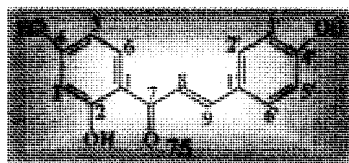


Figura 61: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) da mistura de **75** e **76** em D_3CCOCD_3 .



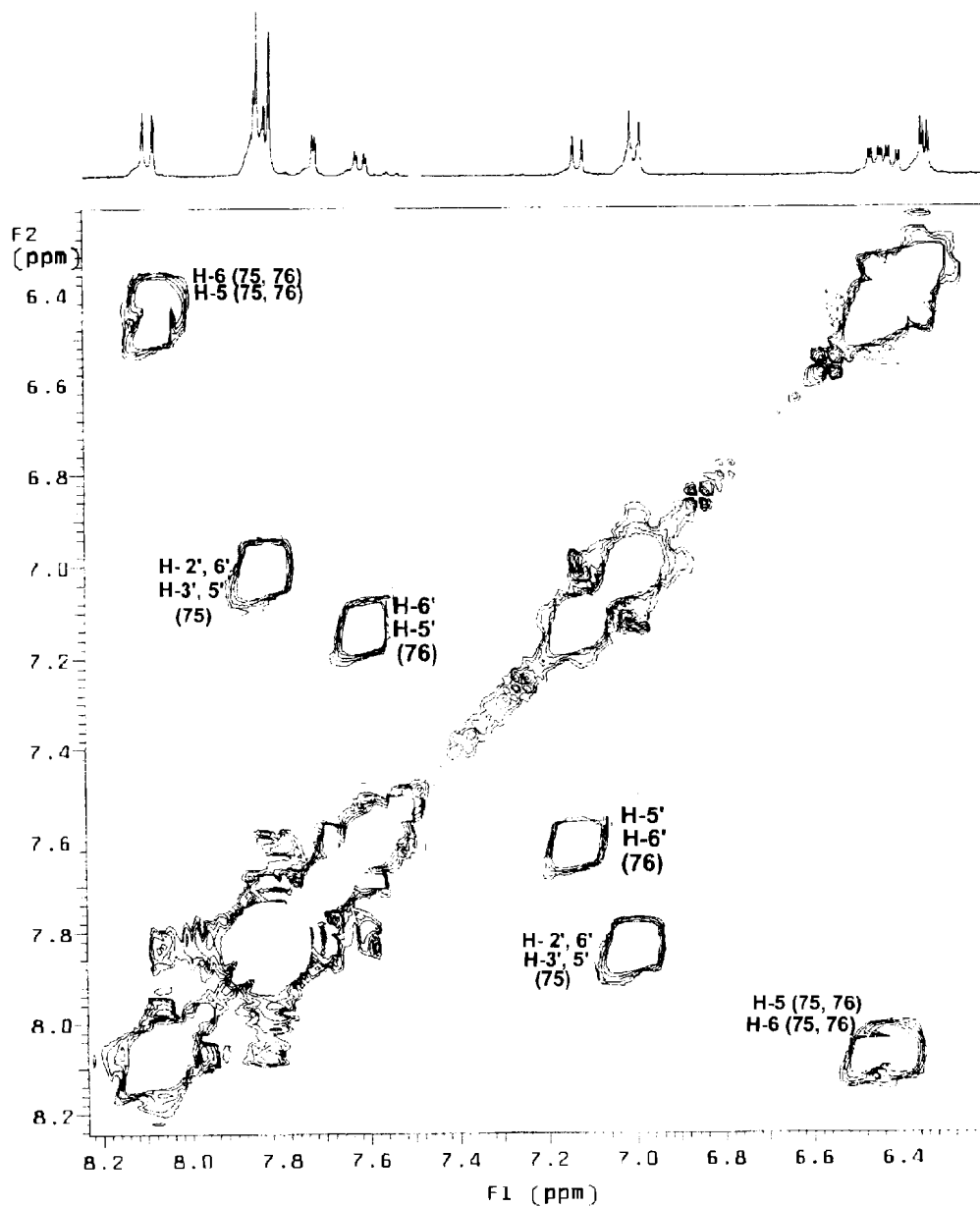
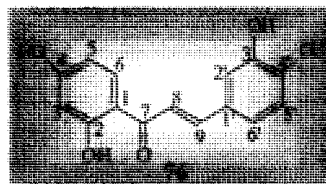
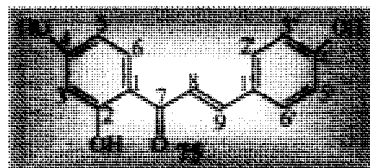


Figura 62: Espectro de correlação homonuclear de hidrogênio-hidrogênio ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY, Homocopy) da mistura de **75** e **76** em D_3CCOCD_3 .



O espectro de RMN de ^{13}C PND (Figura 63) mostra a presença de 23 carbonos sendo 15 metínicos, confirmados através do DEPT (Figura 64), e 13 carbonos não hidrogenados.

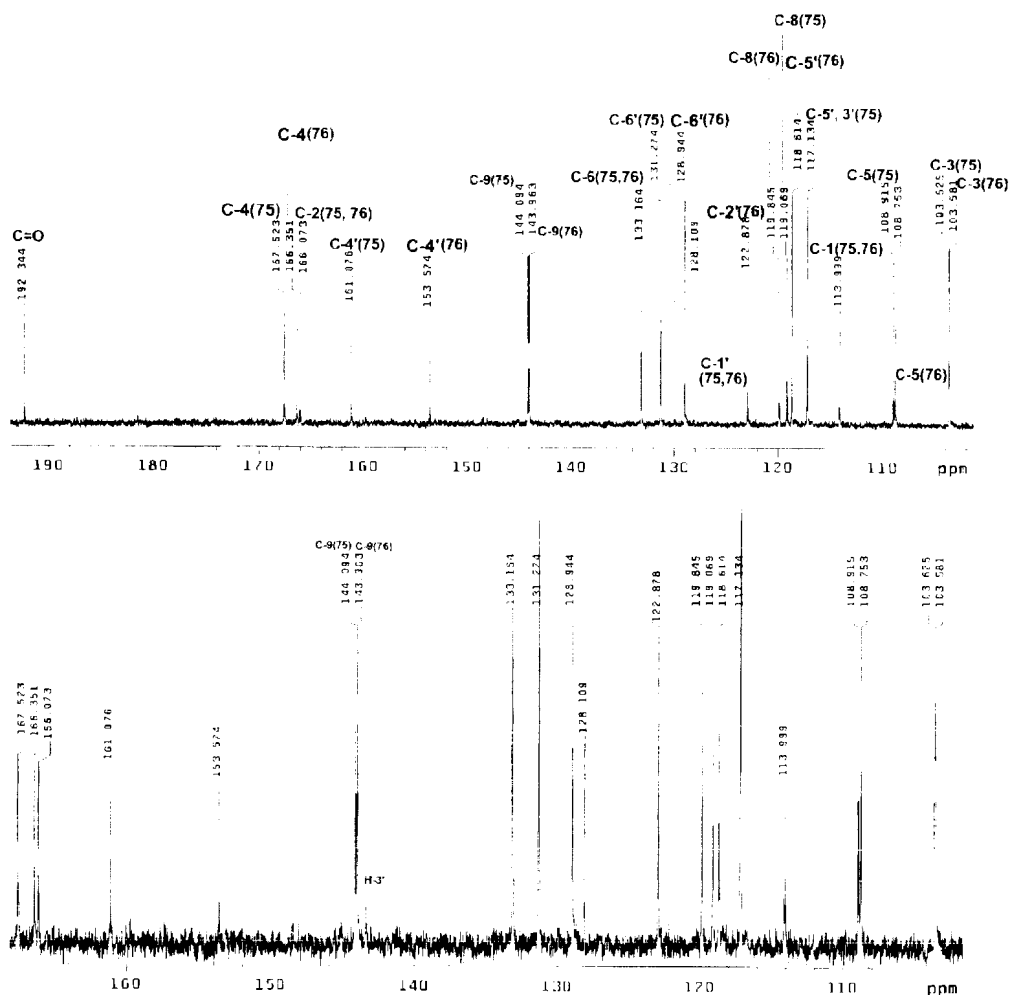
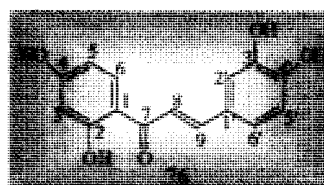
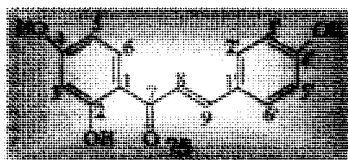


Figura 63: Espectro de RMN de ^{13}C (100MHz) da mistura de 75 e 76 em D_3CCOD_3 .



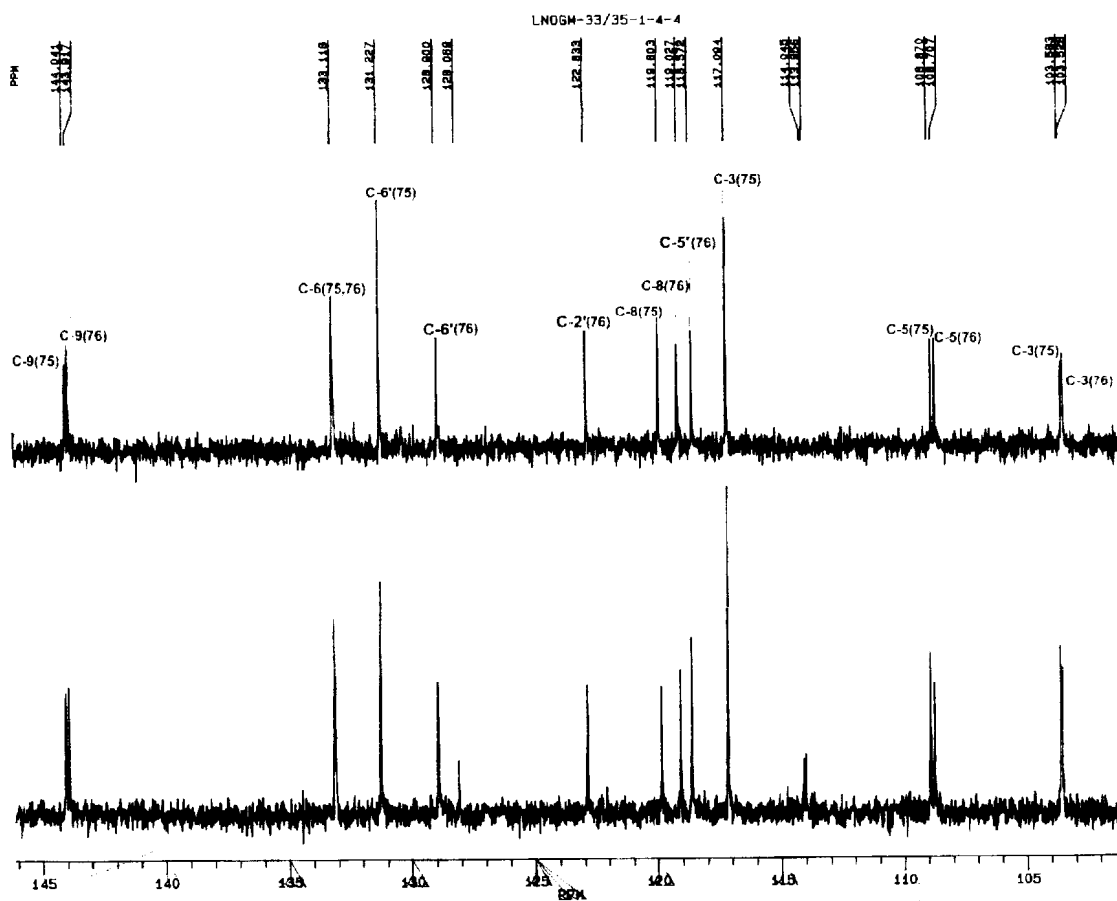
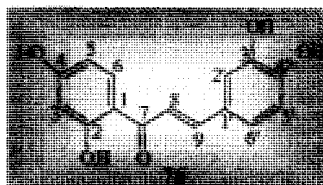
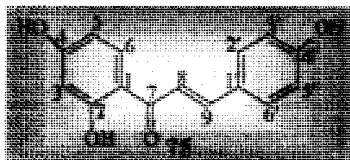


Figura 64: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT (100 MHz) da mistura de **75** e **76** em D_3CCOD_3 .



Os espectros bidimensionais (HMQC e HMBC, **Figuras 65, 66 e 66a**), mostraram as interações a uma ligação ($^1J_{\text{CH}}$) e a longa distância ($^{2,3}J_{\text{CH}}$), favorecendo a elucidação estrutural das substâncias **75** e **76**. O espectro de HMQC ($^1J_{\text{CH}}$) mostra interação entre hidrogênio e carbono em δ_{H} : 7,11 (H-5')

com δ_C : 118,60 (C-5'), δ_H : 7,61 (H-6') com δ_C : 128,90 (C-6') e 7,71 (H-2') com δ_C : 122,90 (C-2') para **76**, além dos acoplamentos que confirmam os deslocamentos químico de carbonos do sistema ABC e AA'BB' de **75** (Tabela 13) que são os mesmos registrados na literatura⁶⁸ para a isoliquiritigenina (2,4,4'-triidroxichalcona).

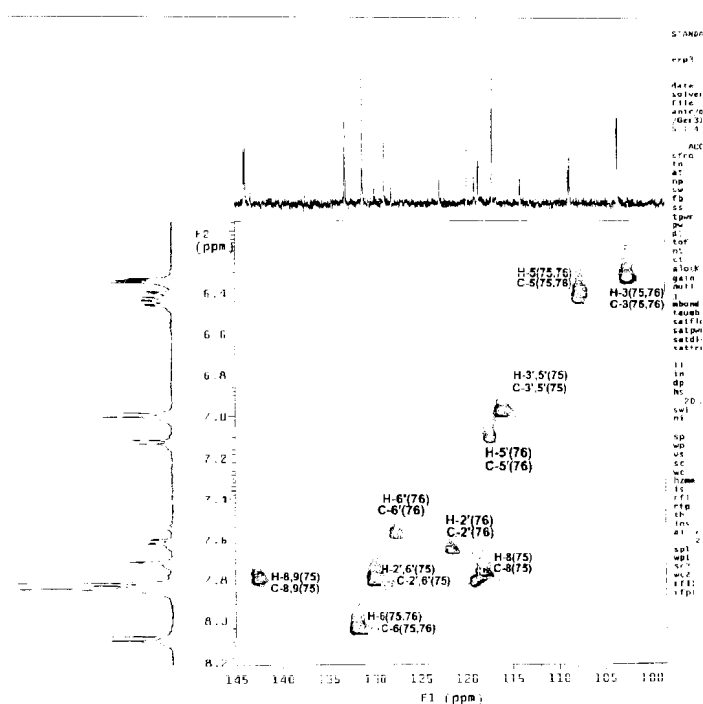
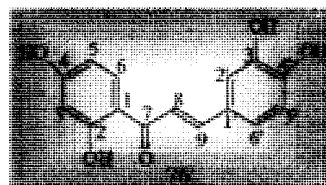
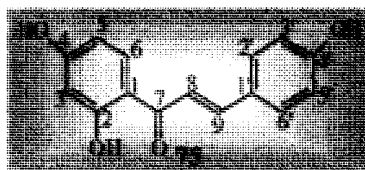


Figura 65: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear hidrogênio-carbono (^1H , ^{13}C -COSY, $^1\text{J}_{\text{CH}}$, HMQC) da mistura de **75** e **76** em D_3CCOD_3 .



Os sinais observados no espectro de HMBC (^{13}C - ^1H -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3) da mistura de **75** e **76** (Figura 66 e 66a) mostram os acoplamentos heteronucleares a longa distância de C-1' (δ_{C} : 128,10) com H-5' (δ_{H} : 7,11) e com H-8, 9 (δ_{H} : 7,84) para **76** e C-1' com H-2', 6' (7,83) para **75**, confirmando assim o valor de δ_{C} para o C-1' nas duas substâncias. Outro acoplamento importante é observado entre C-4' (δ_{C} : 153,60) com H-6' (δ_{H} : 7,61) e com H-2' (δ_{H} : 7,71) para **76**. Os deslocamentos químicos destes carbonos são equivalentes apresentados na literatura para o modelo **A** e estão de acordo com um sistema diidroxilado (Tabela 14).

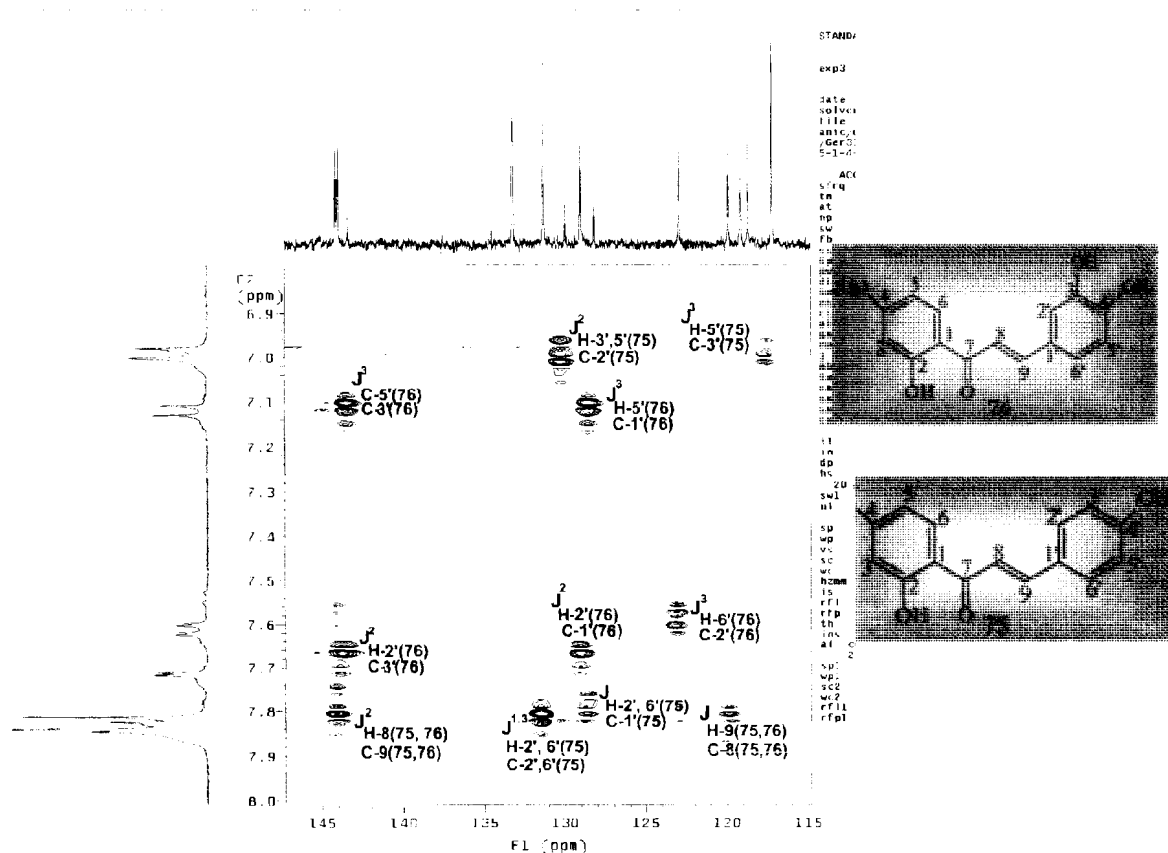


Figura 66: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear (^1H , ^{13}C -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3 , HMBC) entre 115 - 146 ppm da mistura de **75** e **76** em D_3CCOD_3 .

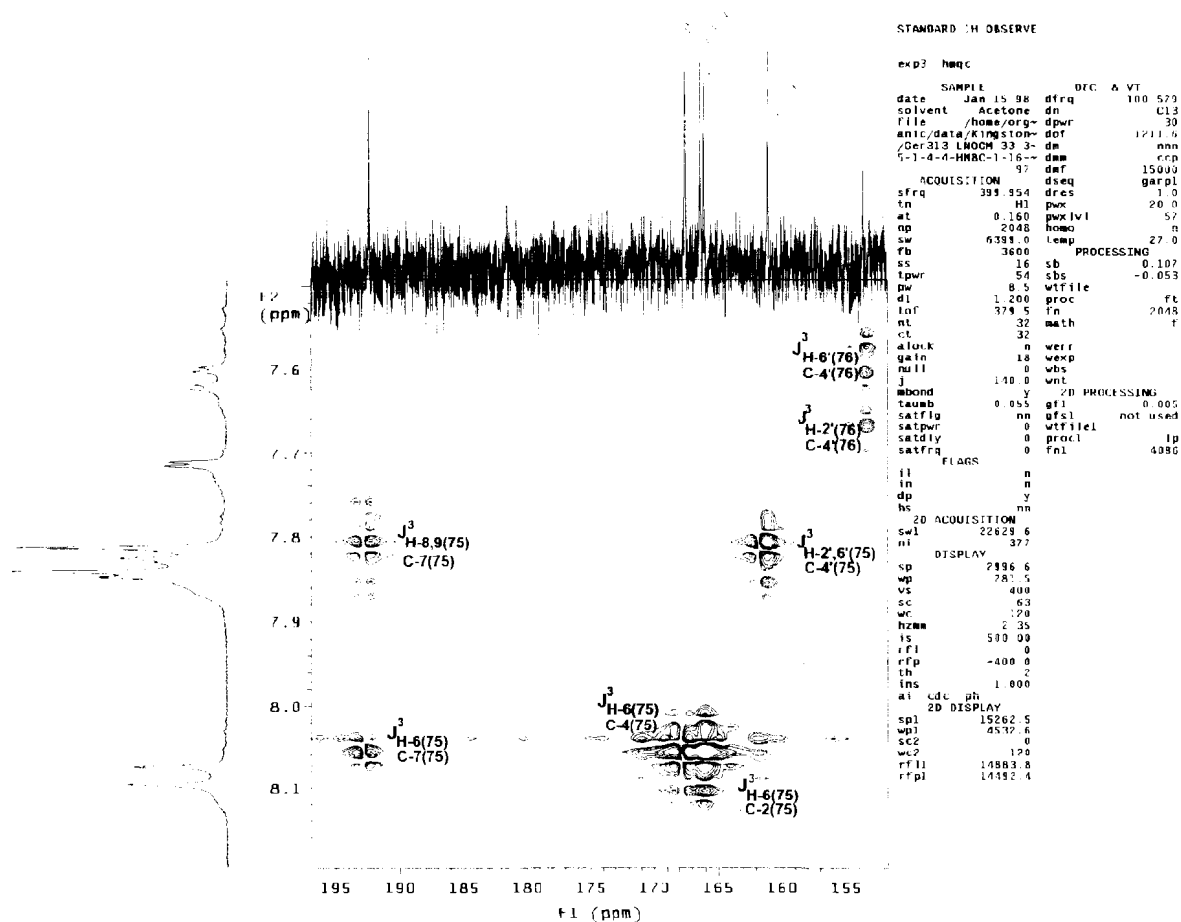
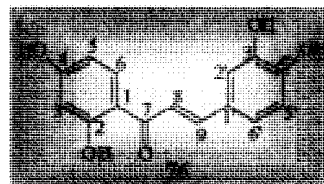
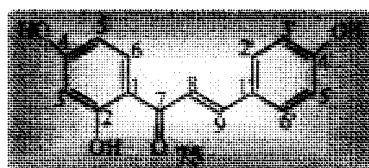


Figura 66a: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear (^1H , ^{13}C -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3 , HMBC) entre 155 à 195 ppm da mistura de **75** e **76** em D_3CCOD_3 .



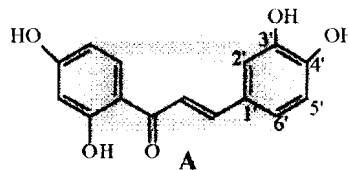
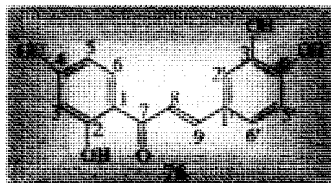
Estas informações foram usadas para estabelecer a estrutura da chalcona 2,4,3',4'-tetraidroxichalcona (**76**).

Tabela 13: Dados de RMN ^1H e ^{13}C , incluindo acoplamento heteronuclear (HMQC e HMBC) das chalconas **75** e **76** e comparação com δ_{C} da isoquiritigenina.⁶⁸

C	76			75	Isoliquiritigenina ⁶⁸
	δ_{C}	HMQC(δ_{H})	HMBC($^{2,3,4}\text{J}$)	δ_{C}	δ_{C}
1	113,99	-		113,99	114,13
2	166,07	-		166,35	166,33
3	103,58	6,32 (d, J= 2,4 Hz)		103,62	103,70
4	167,52	-		167,52	167,44
5	108,75	6,40(dd, J= 8,8 e 2,4 Hz)		108,91	108,80
6	133,16	8,08(d, J= 8,8 Hz)		133,16	131,70
7	192,34	-		192,34	191,56
8	119,84	7,84 (s)	H-9	119,06	117,80
9	143,96	7,84 (s)	H-3',6'	144,09	144,75
1'	128,10	-	H-3',6'	128,10	125,93
2'	122,87	7,71 (d, J= 2,0 Hz)		131,27	130,04
3'	143,40	-		117,13	116,25
4'	153,57	-		161,07	160,34
5'	118,61	7,11(d, J= 8,2 Hz)	H-4',6'	117,13	116,25
6'	128,94	7,61(dd, J= 8,2 e 2,0 Hz)	H-4'	131,27	130,67

Tabela 14: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C do anel B de **76** com o modelo **A**.^{69,70}

C	76	A
1'	128,10	128,30
2'	122,87	116,50
3'	143,40	146,40
4'	153,57	149,20
5'	118,61	123,40
6'	128,94	123,40
8	119,84	118,50
9	143,96	145,30



5.3.5- Substância 77

A substância **77** apresentou bandas de absorção no I.V (**Figura 67**) em $1654,5 \text{ cm}^{-1}$ (C=O), $3419,0 \text{ cm}^{-1}$ (-OH), $1601,10$ e $1504,2 \text{ cm}^{-1}$ (anel aromático).

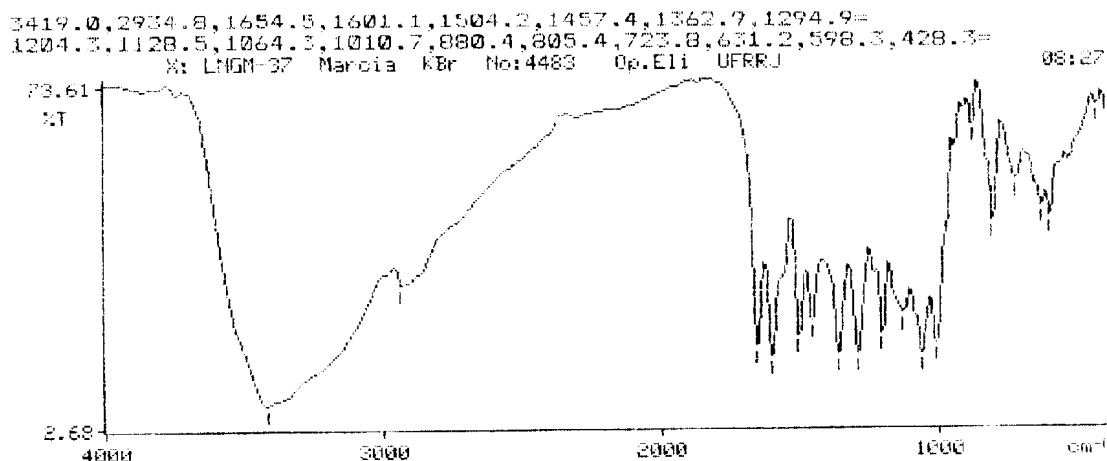


Figura 67: Espectro de I.V da substância **77**.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 68, Tabela 15**) de **77** apresentou os sinais em δ_{H} 6.19 (d, $J = 1,6 \text{ Hz}$, H-6), 6.39 (d, $J = 1,6 \text{ Hz}$, H-8) de um sistema AX, 7.52-7.55 (m, H-2',6'), 6.84 (d, $J = 8,9 \text{ Hz}$, H-5') de um sistema AMX e em 12,58 (s, OH-5), compatíveis com a quercetina. As duas unidades de carboidrato foram reconhecidas pelos sinais correspondentes aos hidrogênios anoméricos em δ_{H} : 5,08 (sl, H-1'') e 5,33 (d, $J = 7,0 \text{ Hz}$, H-1') ligados aos respectivos carbonos com δ_{C} : 100,86 e 101,33 ppm.

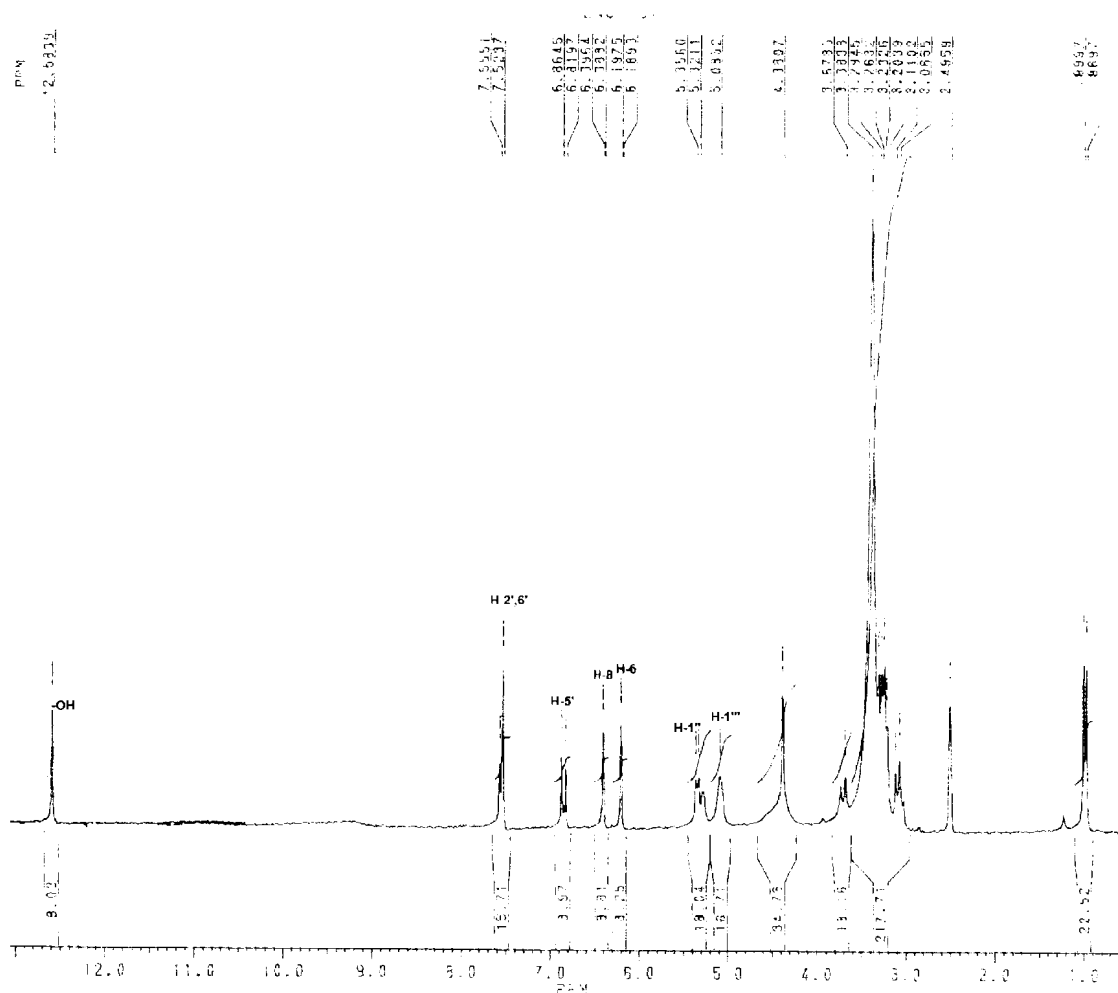
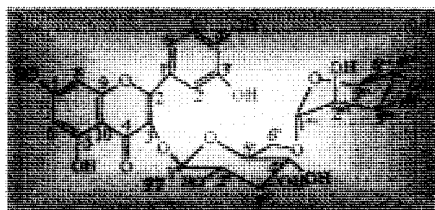


Figura 68: espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da substância **77** em DMSO.



O sinal em δ_{H} 0.97 (d, $J = 6,0$ Hz, $\text{H6}'''$) e a comparação dos demais sinais de deslocamentos químico de carbono presentes nos espectros de RMN de ^{13}C (PND e DEPT, **Figuras 69 e 70, Tabela 15**) com os valores atribuídos para a glicose e rhaminose permitiram identificar estas duas unidades de açúcar. O valor de δ_{CH_2} em 67,14 ppm está compatível com a

ligação do C-1''' da rhamnose no C-6'' da glicose. Os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos 2, 3, 4 e 10 permitiu propor para **77** a estrutura do 3-O- β -D-glicopiranosil (6-1-O- β -L-rhamnopiranosil) quercetina, conhecida como rutina³⁸.

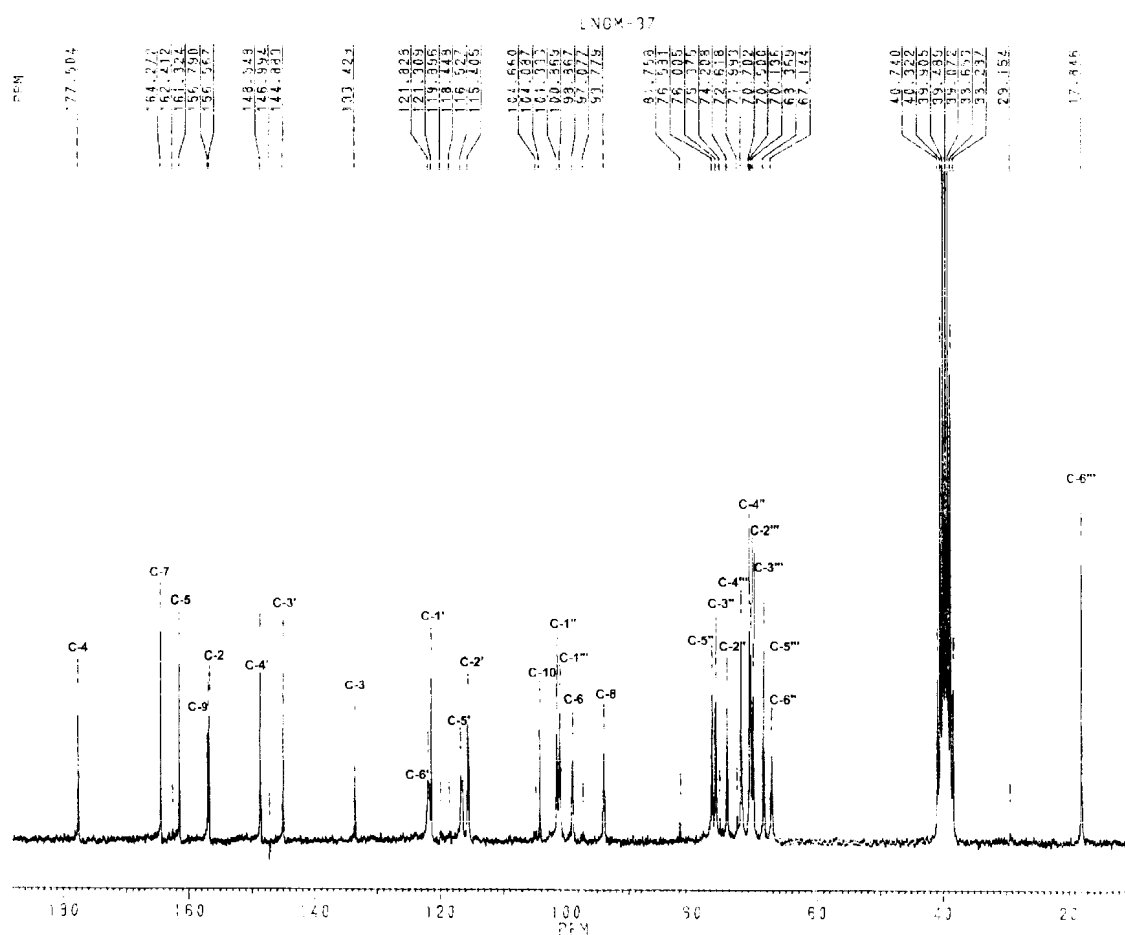
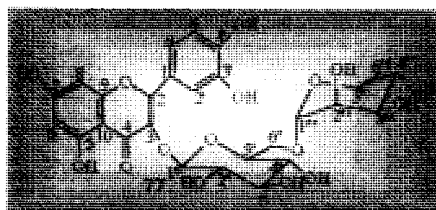


Figura 69: Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz) da substância **77** em DMSO.



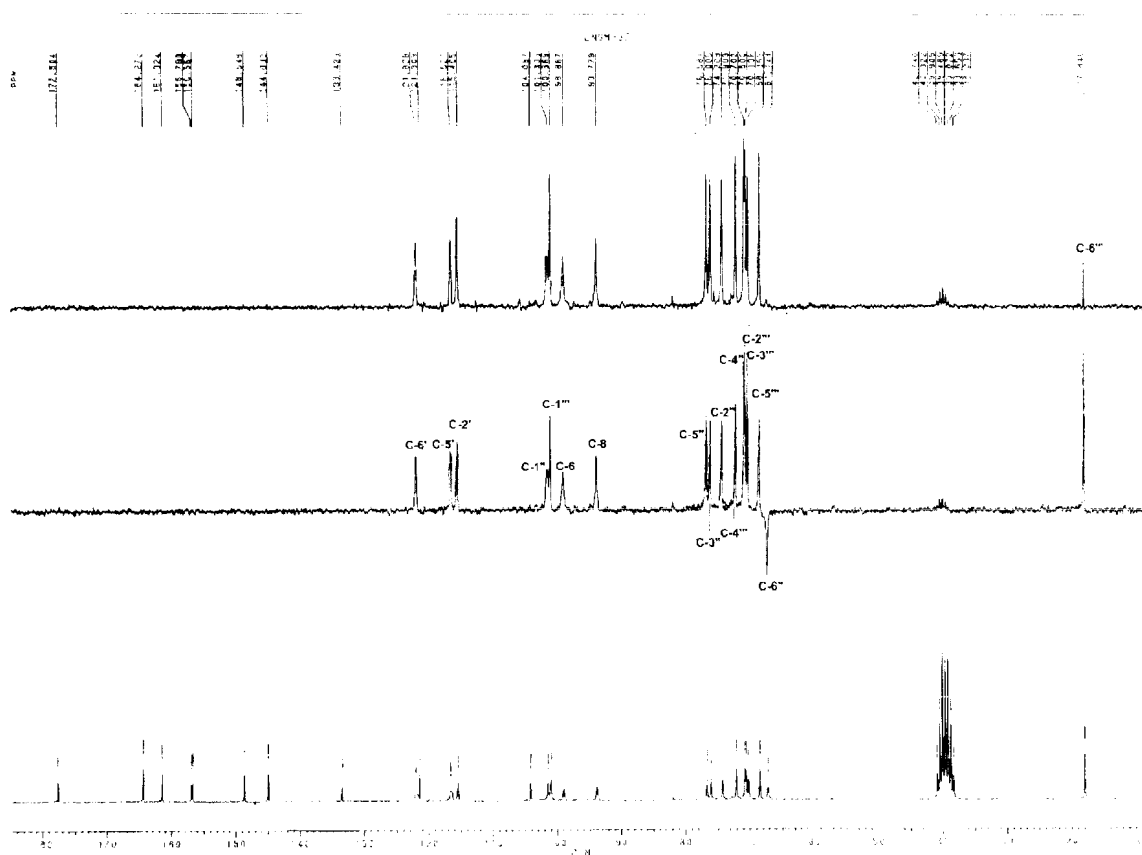
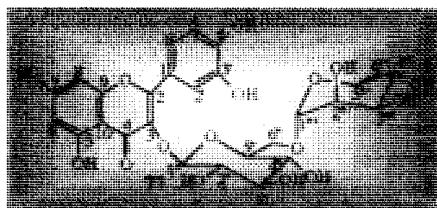


Figura 70: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT (50 MHz) da substância **77** em DMSO.



Os derivados acetilado (**77a**) e metilado-acetilado (**77am**) confirmaram os deslocamentos químicos de hidrogênio atribuídos a esta substância (**Figuras 71 e 72**). O nOe nos hidrogênios 6, 8, 2' e 5' da rutina após irradiação das metoxilas (**Figura 72**) confirma a localização da unidade glicosídica em C-3 e não em C-7.

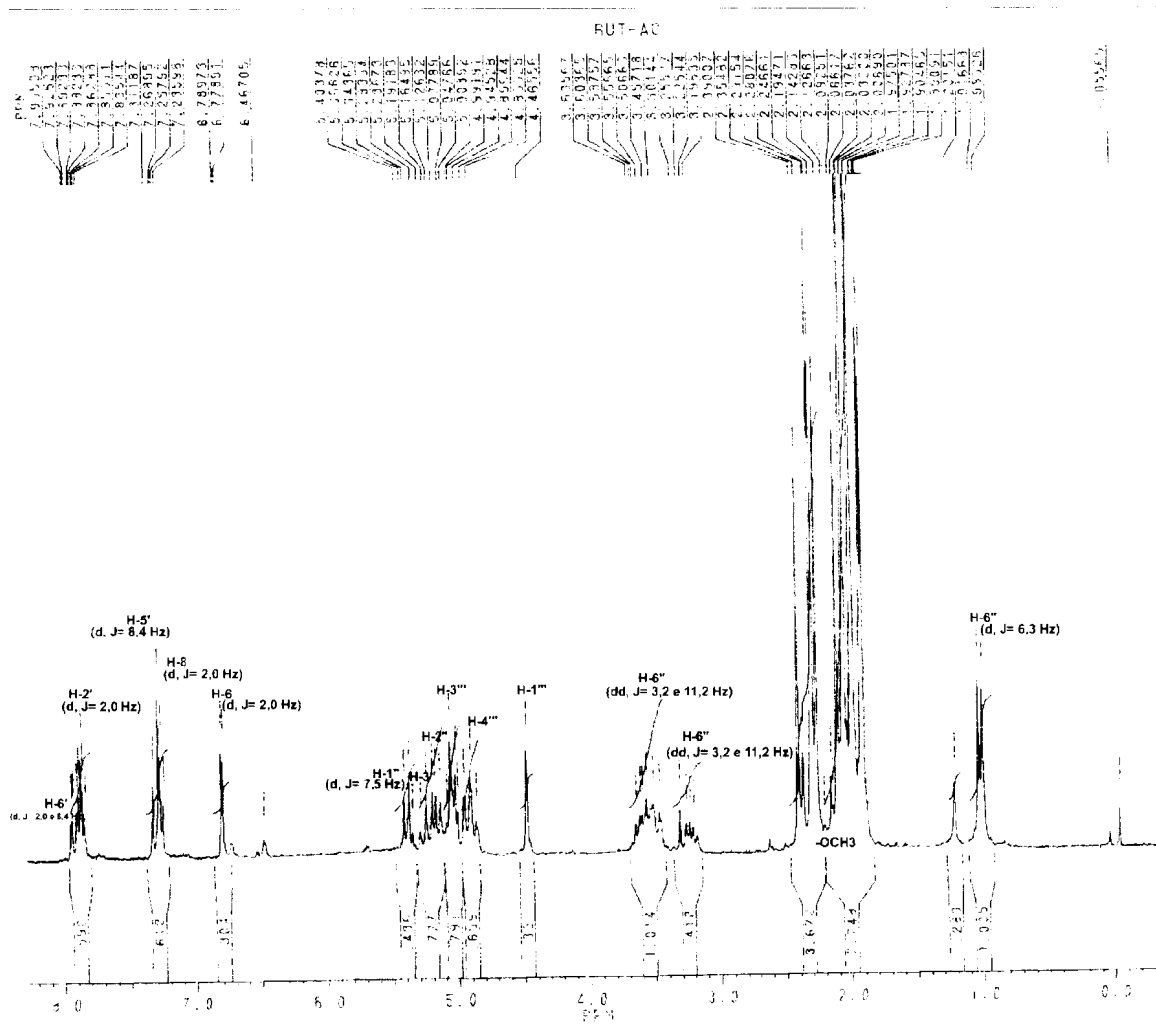
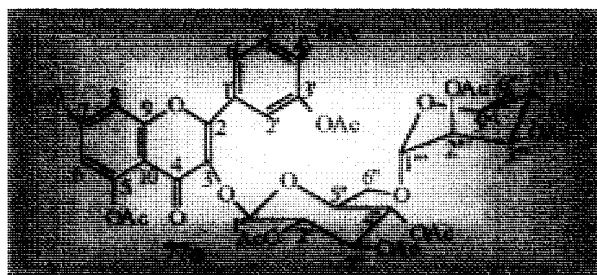


Figura 71: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) do derivado acetilado da substância **77** (**77a**) em CDCl_3 .



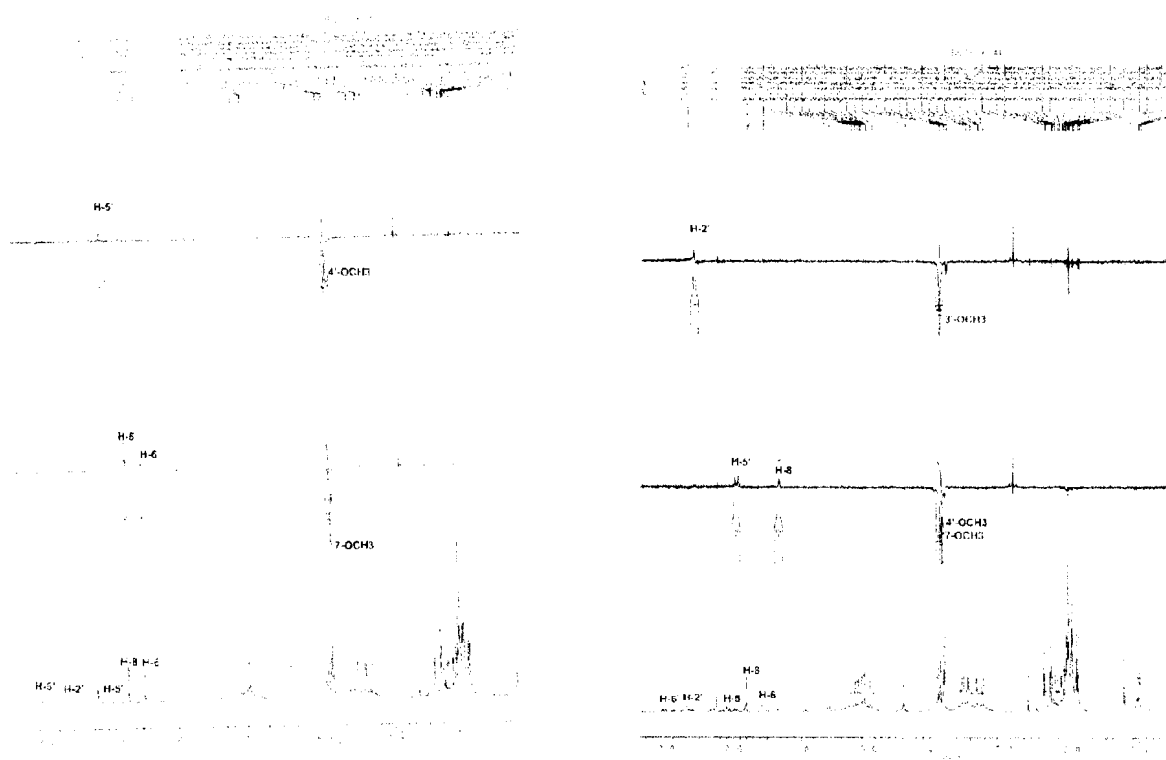


Figura 72: Espectro resultante da irradiação dupla e subtração de espectros (NOE) do derivado **77am** em CDCl_3 .

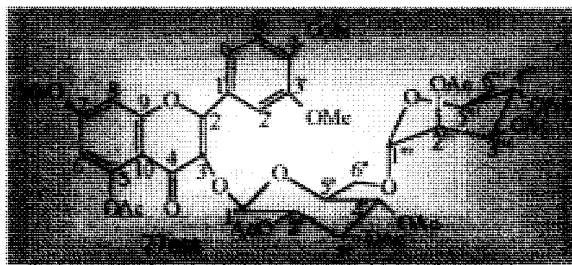


Tabela 15: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância **77** e comparação dos δ_{C} registrados na literatura³⁸.

C	77		Rutina ³⁸
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
2	-	156,80	156,60
3	-	133,40	133,60
4	-	177,50	177,40
5	-	161,30	161,20
6	6,19 (d, J= 2,0 Hz)	98,90	98,80
7	-	164,30	163,90
8	6,39 (d, J= 2,0 Hz)	93,80	93,60
9	-	156,60	156,40
10	-	104,10	104,20
1'	-	121,30	121,60
2'	7,52-7,55 (m)	115,40	115,30
3'	-	144,90	144,60
4'	-	148,50	148,30
5'	6,84 (d, J= 8,9 Hz)	116,50	116,50
6'	7,52-7,55 (m)	121,80	121,60
1''	5,40 (d, J= 7,0 Hz)	101,30	101,50
2''	3,26 (sl)	74,20	74,20
3''	3,29 (sl)	76,00	76,10
4''	3,67(sl)	70,70	70,80
5''	3,22(sl)	76,60	76,80
6''	3,70(sl)	67,10	67,10
1'''	5,08(sl)	100,90	100,70
2'''	3,20(sl)	70,50	70,40
3'''	3,29(sl)	70,10	70,40
4'''	3,11(sl)	72,00	72,20
5'''	3,26(sl)	68,40	68,20
6'''	0,98 (d, J= 6,0 Hz)	17,80	17,50

5.4- Identificação dos constituintes isolados do extrato

hexânico das folhas de *Luxemburgia nobilis*(LNFH).

O extrato hexânico (**Esquema 6**, pág.48) das folhas de *Luxemburgia nobilis* forneceu as substâncias **53** (ácido hexadecanóico), **54** (ácido hexaeicosanóico), **55** (ácido tetraeicosanóico) e **61**(sitosterol), as quais já foram discutidas anteriormente (páginas 57, 61 e 104).

5.5- Identificação dos constituintes isolados do extrato em acetato de etila das folhas (LNFA).

5.4.1- Substância 70.

A substância 70 refere-se ao triterpeno pentacíclico friedelina, cuja identificação estrutural foi proposta basicamente através da análise dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , além da comparação com dados da literatura⁵⁶ (Tabela 16).

O espectro de I.V (Figura 73) mostra a presença de uma banda correspondente a estiramento de grupo carbonila cetônico em $1714,9\text{ cm}^{-1}$, além de outras bandas características de uma molécula alifática.

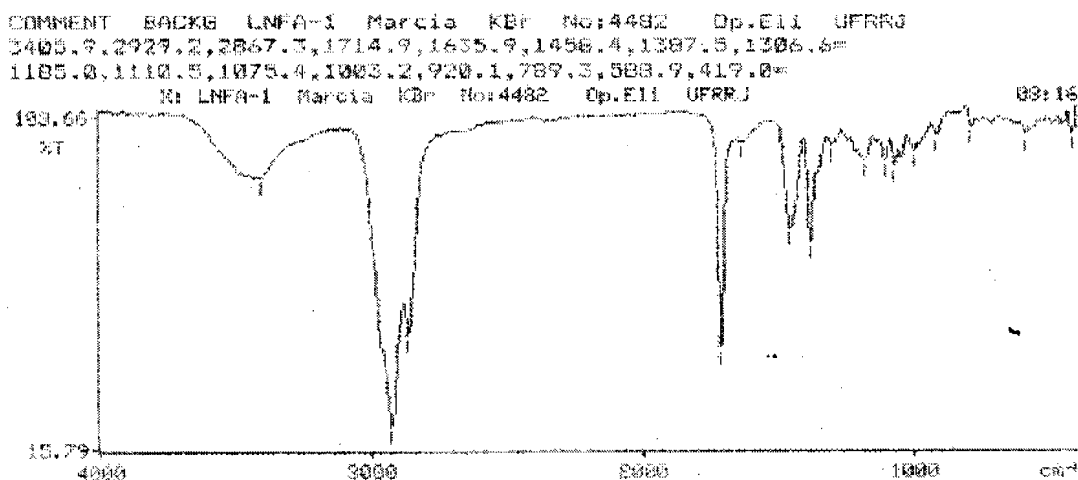


Figura 73: espectro de I.V da substância 70.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 74) mostra sinais de oito metilas alifáticas entre δ_{H} : 0,70-1,15, sendo sete metilas representadas por singletos e uma por um dubleto em δ_{H} : 0,85 (d, $J= 6,6$ Hz). A ausência dos sinais de hidrogênios ligados ao C-3 mostra que este triterpeno é oxidado à carbonila na posição C-3.

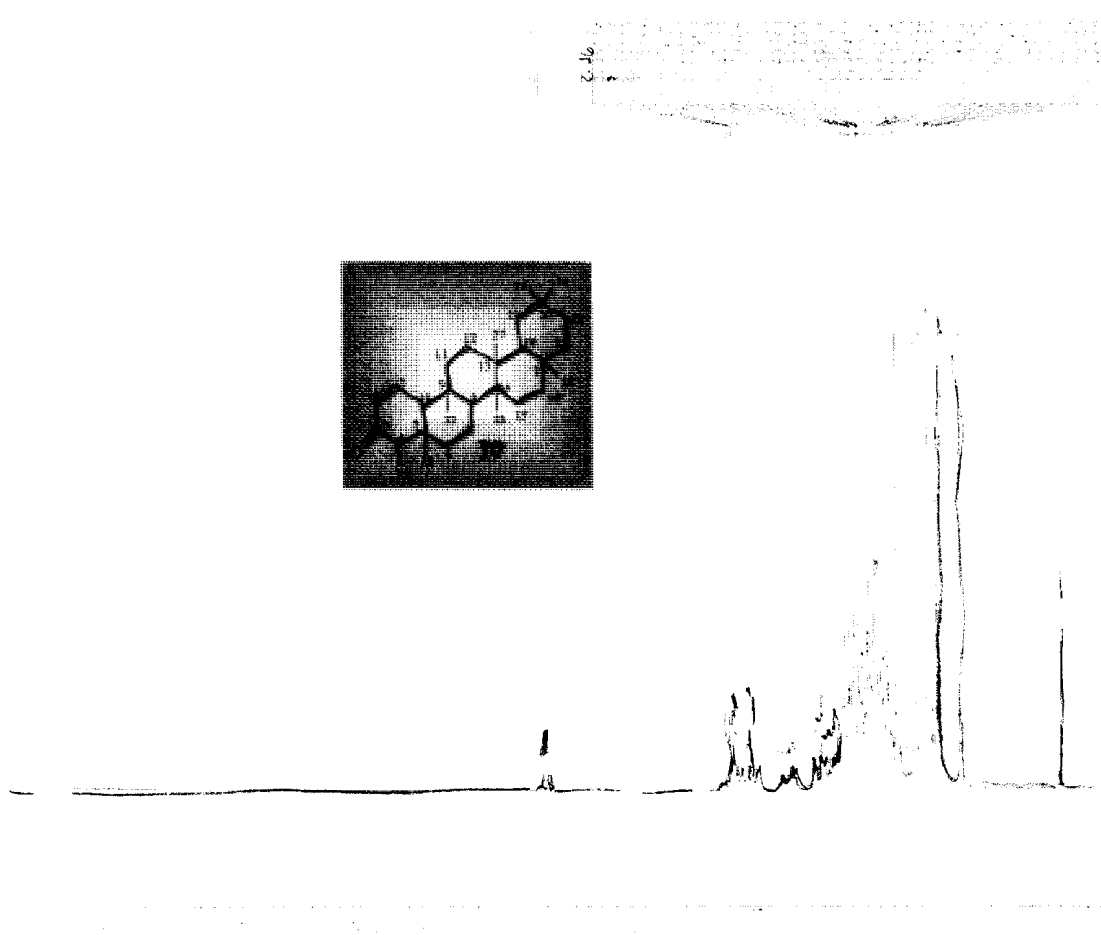


Figura 74: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) da substância **70** em CDCl_3 .

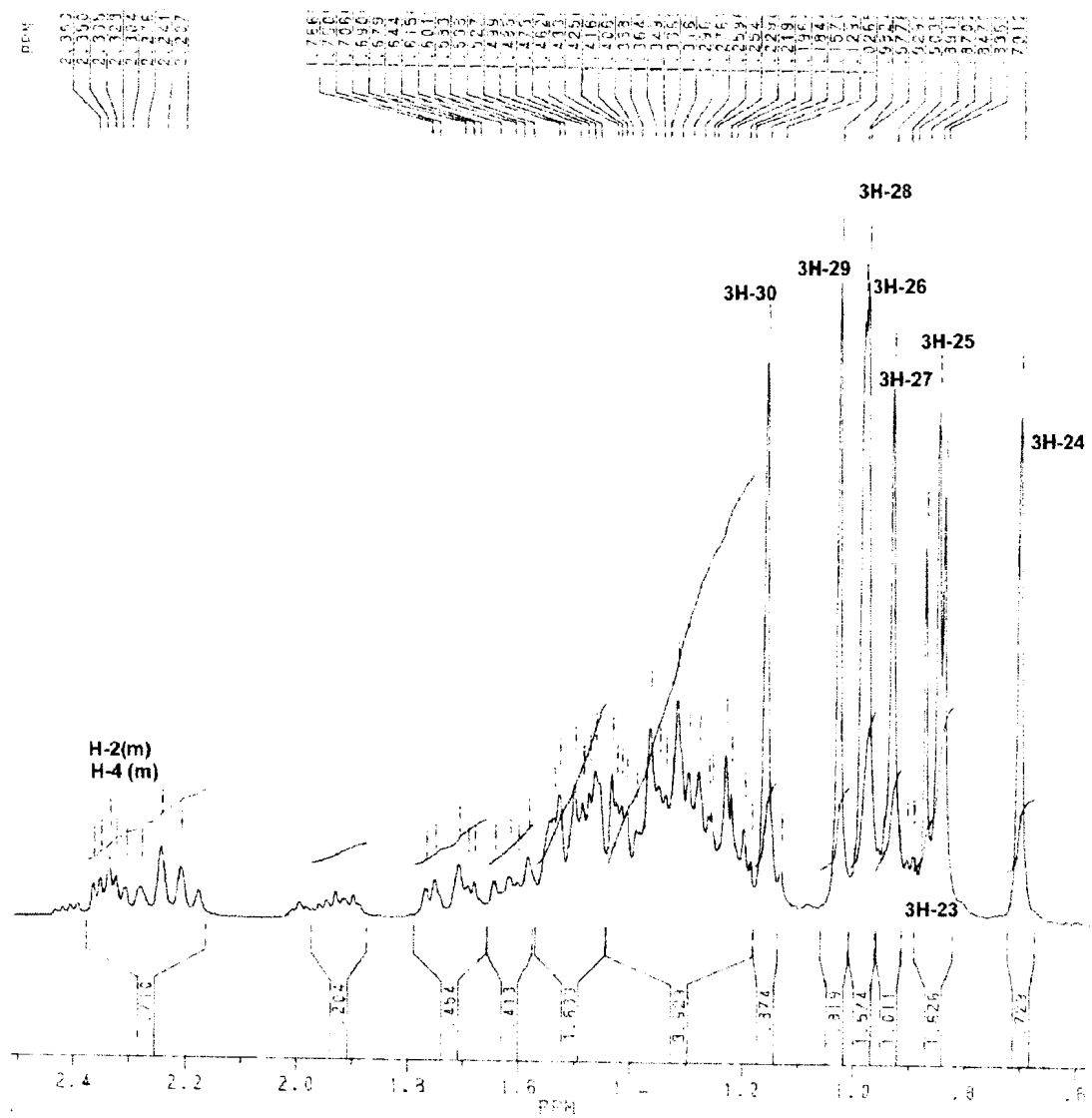
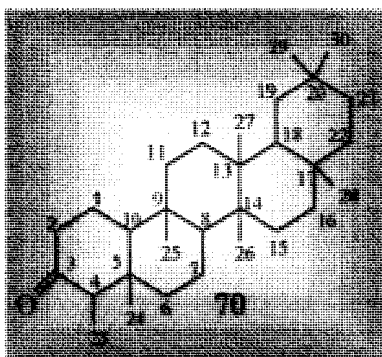


Figura 74a: Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância **70** na região entre 0,7-2,4 ppm.



A presença dos grupos metila foi confirmada pela análise do espectro de RMN de ^{13}C PND e DEPT (**Figuras 75 e 76**). O sinal C-23 em δ_{C} : 6,82 indica um esqueleto triterpênico do tipo 3-oxo-friedelano. Observando também sinais adicionais para quatro carbonos metínicos, onze metilênicos e sete quaternários, sendo um correspondente a uma carbonila cetônica em δ_{H} : 213,29 ppm (**Tabela 16**).

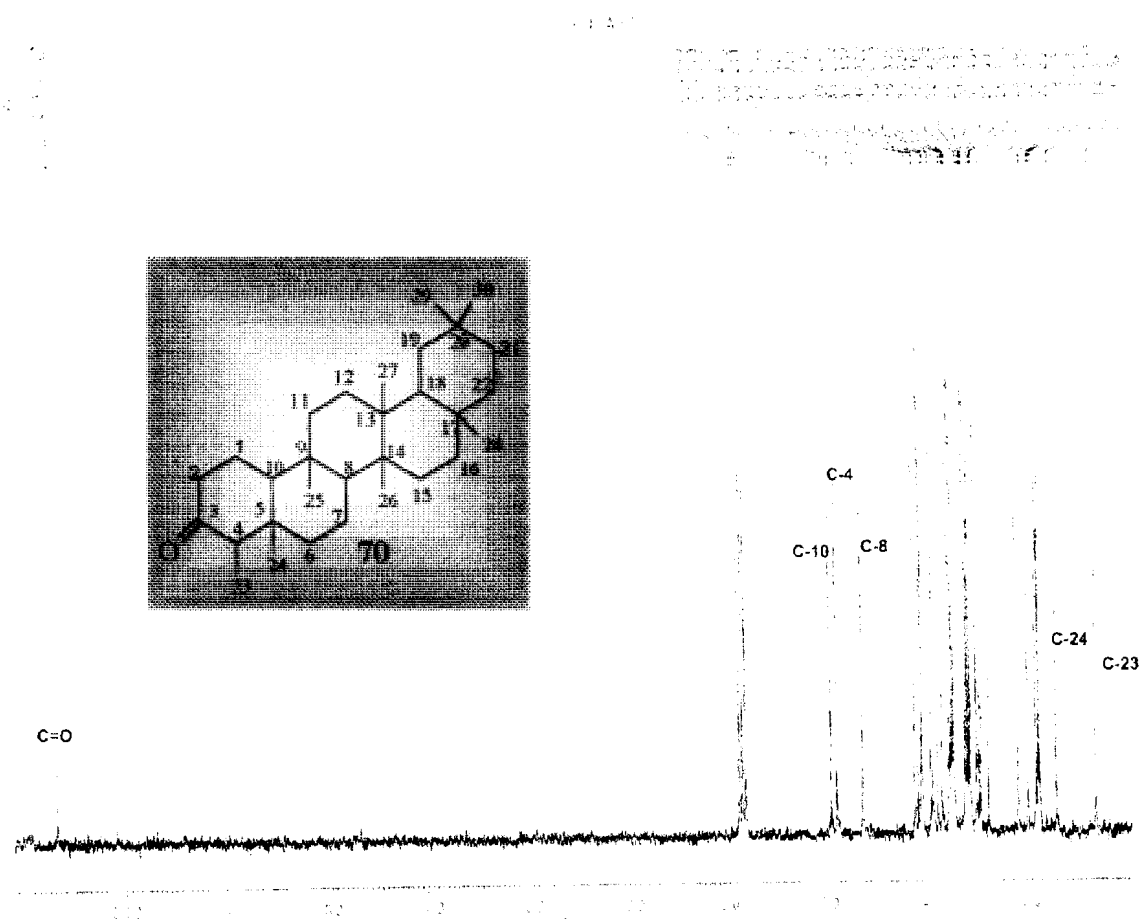


Figura 75: RMN de ^{13}C (50 MHz) da substância **70** em CDCl_3 .

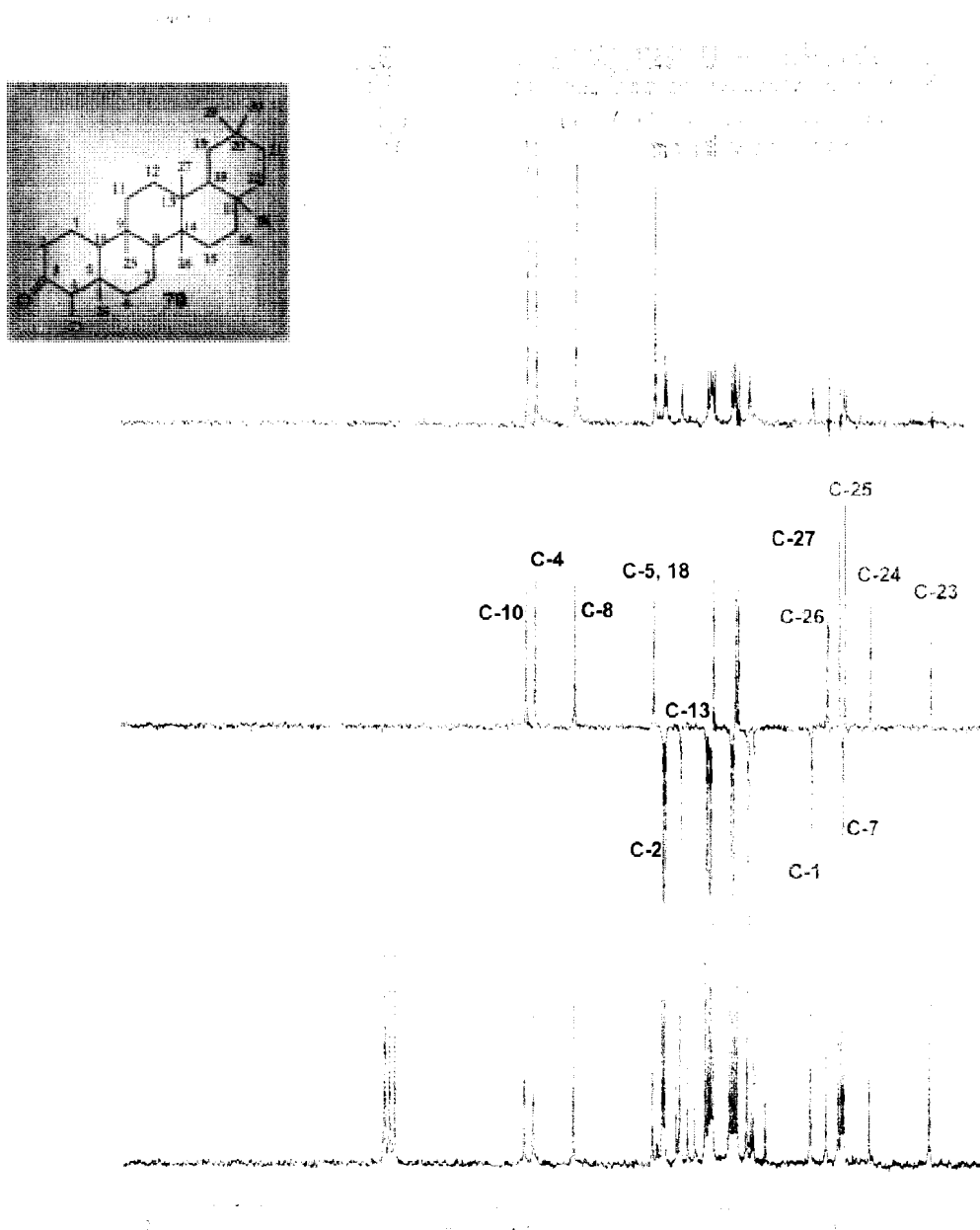
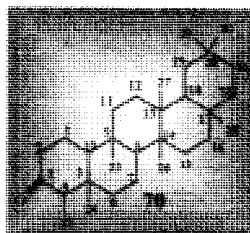


Figura 76: Espectro de RMN ^{13}C DEPT da substância 70.

Tabela 16: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **70** e comparação com dados de carbono-13 registrados na literatura⁵⁶.

C	70		Friedelina ⁵⁶
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
1	-	22,27	22,30
2	2,15-2,50 (m)	41,52	41,50
3	-	213,29	213,20
4	2,15-2,50 (m)	58,21	58,20
5	-	42,77	42,10
6	-	41,27	41,30
7	-	18,23	18,20
8	-	53,09	53,10
9	-	37,43	37,40
10	-	59,45	59,40
11	-	35,61	35,60
12	-	30,49	30,50
13	-	39,68	39,70
14	-	38,28	38,30
15	-	32,40	32,40
16	-	36,00	36,00
17	-	29,99	30,00
18	-	42,77	42,80
19	-	35,33	35,30
20	-	28,16	28,10
21	-	32,76	32,70
22	-	39,24	39,20
23	0,85 (d, J=- 6,6 Hz)	6,82	6,80
24	0,70 (s)	14,65	14,60
25	0,85 (s)	17,93	17,90
26	0,97(s)	20,25	20,20
27	0,92 (s)	18,66	18,60
28	0,98 (s)	32,08	32,10
29	1,02 (s)	35,02	35,00
30	1,13 (s)	31,78	31,80



5.5.2- Substância 71.

A substância 71 mostrou bandas de absorção no I.V (Figura 77) para grupo carbonila conjugada e quelada em 1653 cm^{-1} , para o anel aromático em 1607 , 1424 cm^{-1} e para hidroxila em 3156 cm^{-1} .

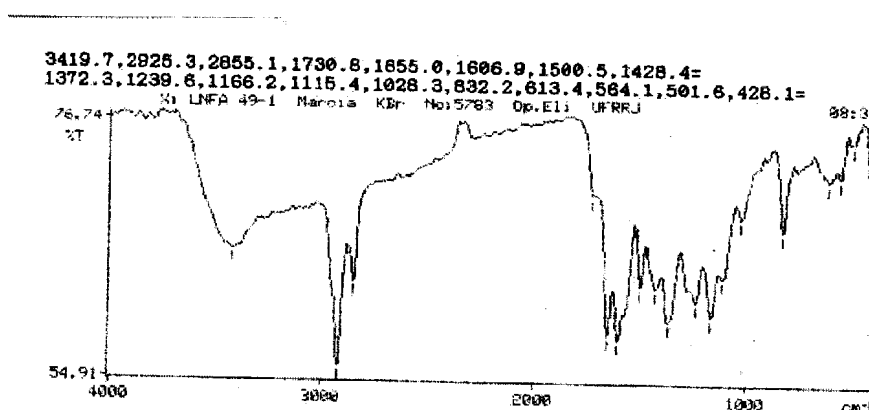


Figura 77: Espectro de I.V da substância 71.

O espectro RMN de ^1H [uni-(1D) (Figura 78, Tabela 17) e bidimensional (2D) $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (Figura 79)] apresentou dois sinais simples para grupos hidroxila formando ligação de hidrogênio intramolecular (δ_{H} : 12,97 e 13,13). Na região de absorção de hidrogênios aromáticos observa-se:

➤ dois sistemas representando hidrogênios que mostram interação *meta* em δ_{H} : 6,21 (d, $J = 2,0\text{ Hz}$, H-6) e 6,48 (d, $J = 2,0\text{ Hz}$, H-8) compatíveis com um anel A 5,7-dioxigenado de uma unidade de flavonóide;

➤ três sinais de hidrogênios aromáticos em δ_H : 8,0 (dd, $J = 8,7$ e $2,1$ Hz, H-6'), 8,10 (d, $J = 2,4$ Hz, H-2') e 7,22 (d, $J = 8,7$ Hz, H-5') que estão coerentes com o anel B 3',4'-dissubstituído de um flavonóide.

➤ quatro sinais de hidrogênios formando sistema AA'BB' em um anel aromático *para* substituído em δ_H : 7,61 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H-2'',6'') e 6,80 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H-3'',5'').

➤ três singletos em δ_H : 6,63 (H-3), 6,42 (H-6'') e 6,69 (H-3'').

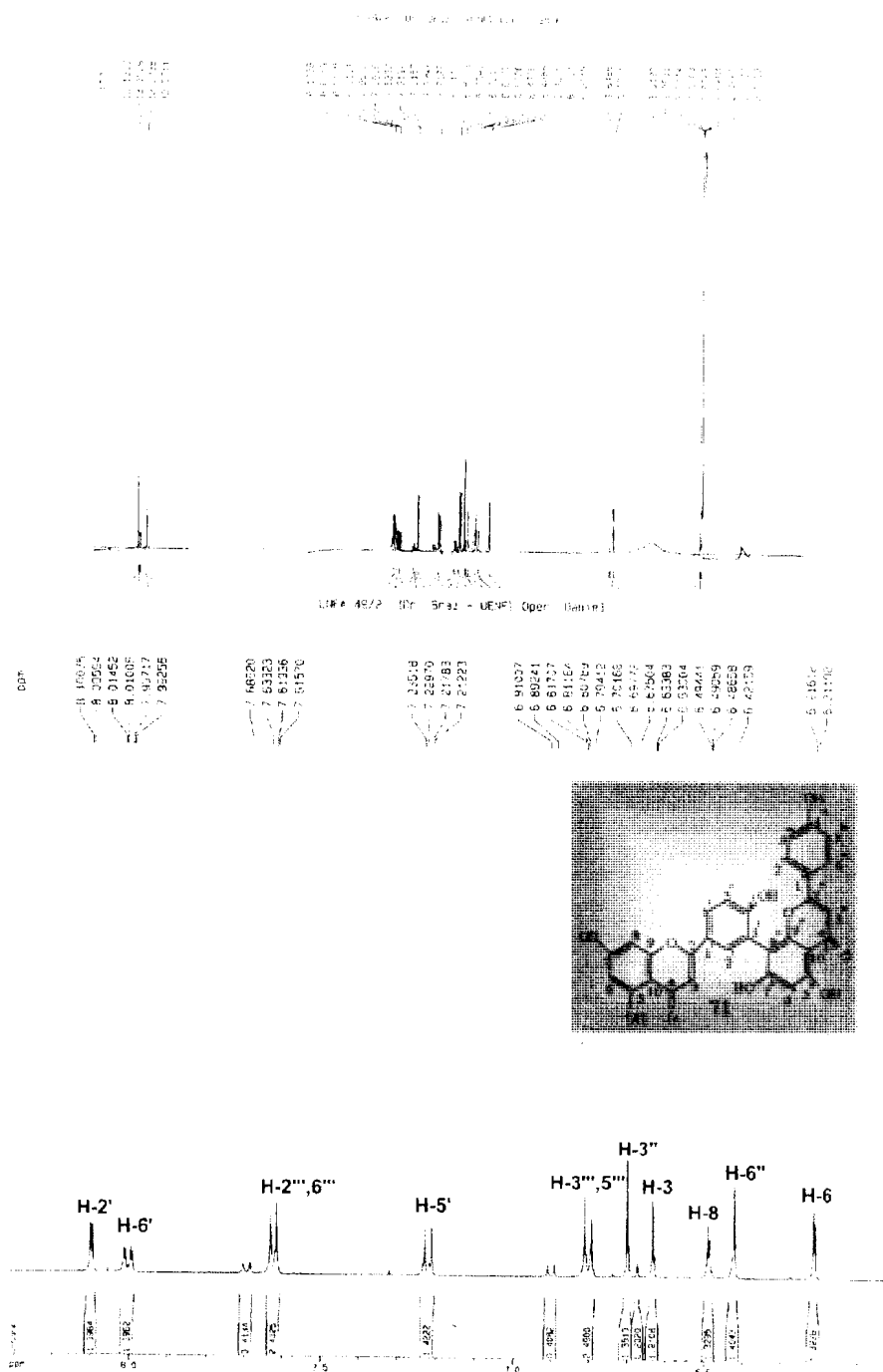


Figura 78: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da substância **71** em D_3CCOD_3 com a expansão na região entre 6,0-8,5 ppm.

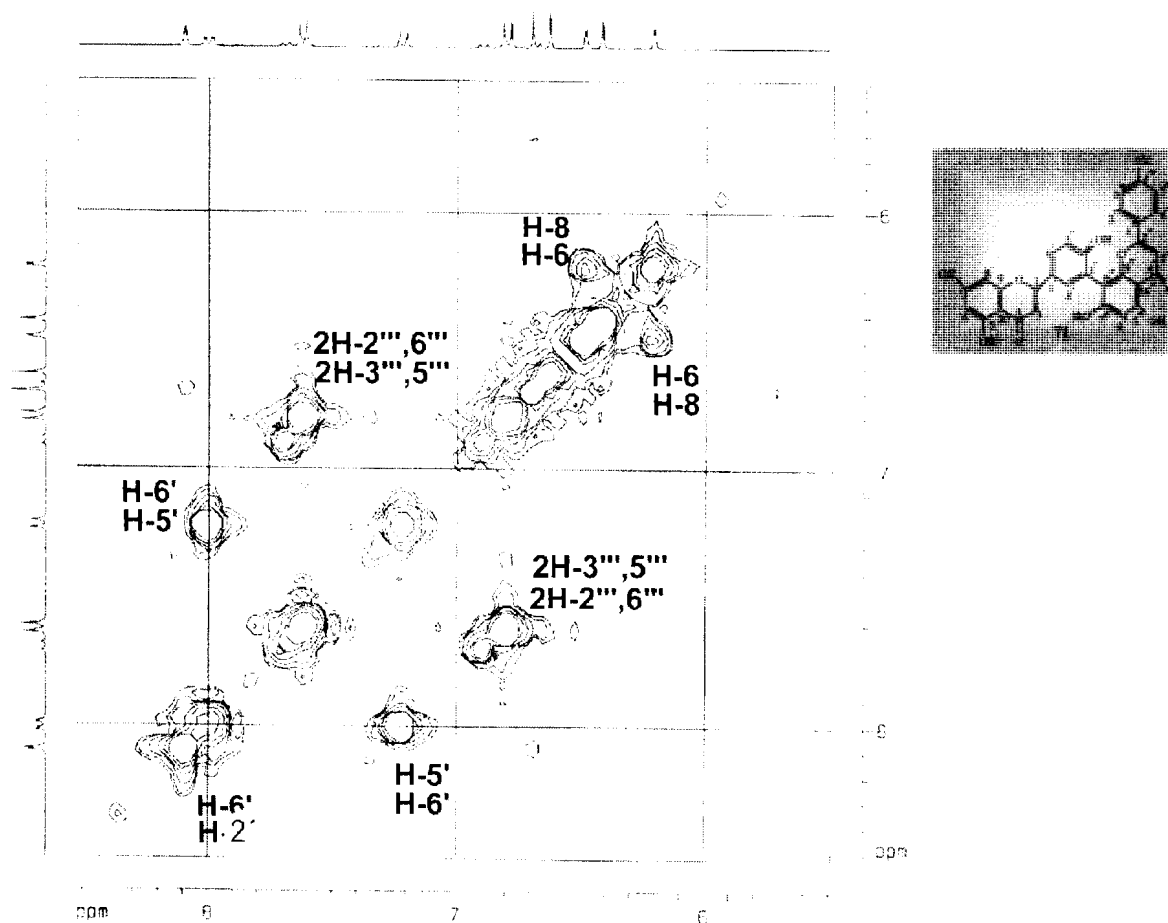


Figura 79: Espectro bidimensional de correlação homonuclear hidrogênio-hidrogênio ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY) da substância **71** em D_3CCOD_3 .

Os espectros de RMN de ^{13}C PND e DEPT (**Figuras 80 e 81**) mostram a presença de vinte e oito sinais de carbonos aromáticos, sendo doze sinais de carbonos metínicos aromáticos e dezesseis carbonos aromáticos quaternários além de duas carbonilas conjugadas.

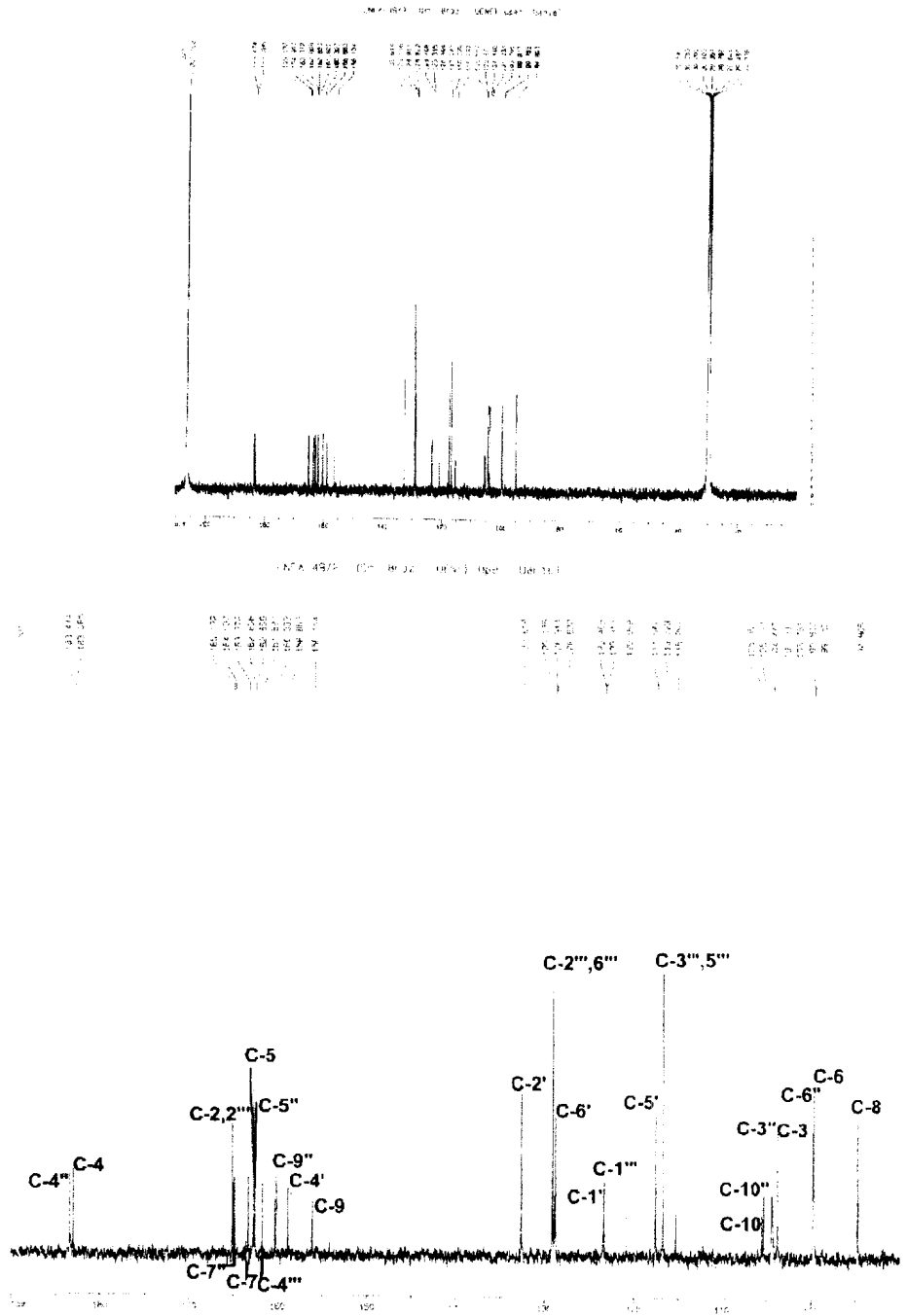
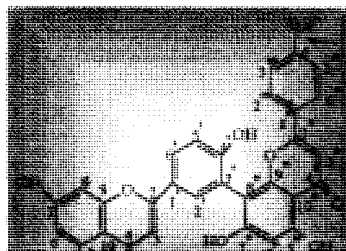


Figura 80: Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz) da substância **71** em D₃CCOD₃.



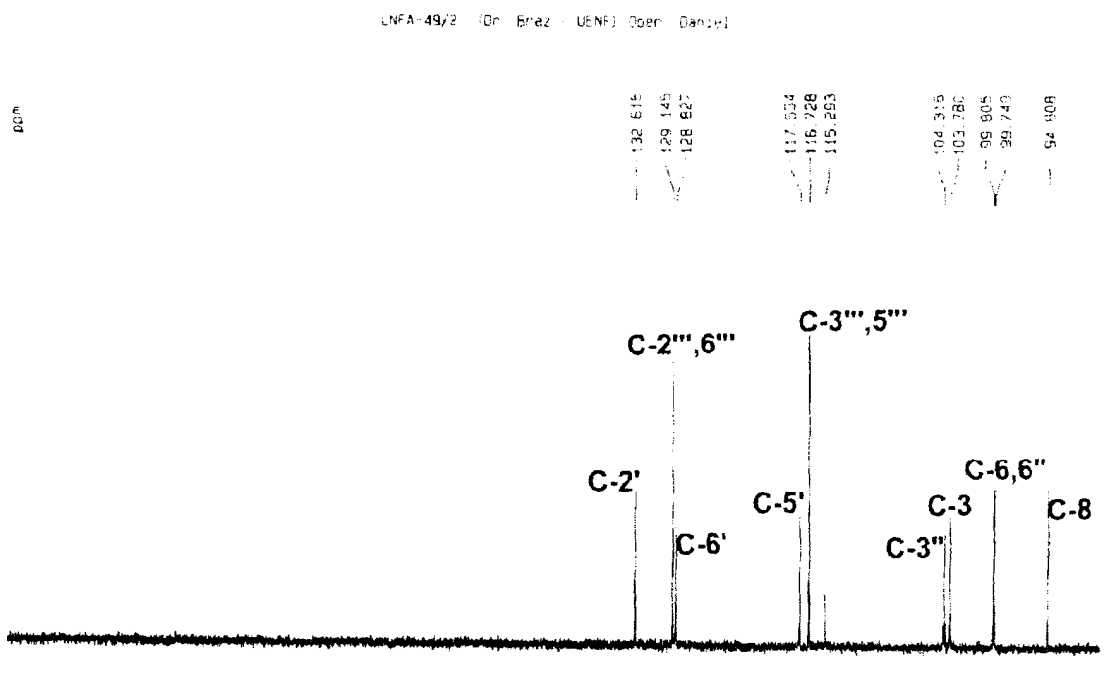
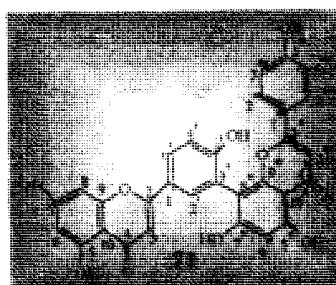


Figura 81: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT da substância **71** em D_3CCOD_3 .



A análise do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono-13 (HMQC, **Figura 82**) permitiu a atribuição dos deslocamentos dos carbonos metínicos.

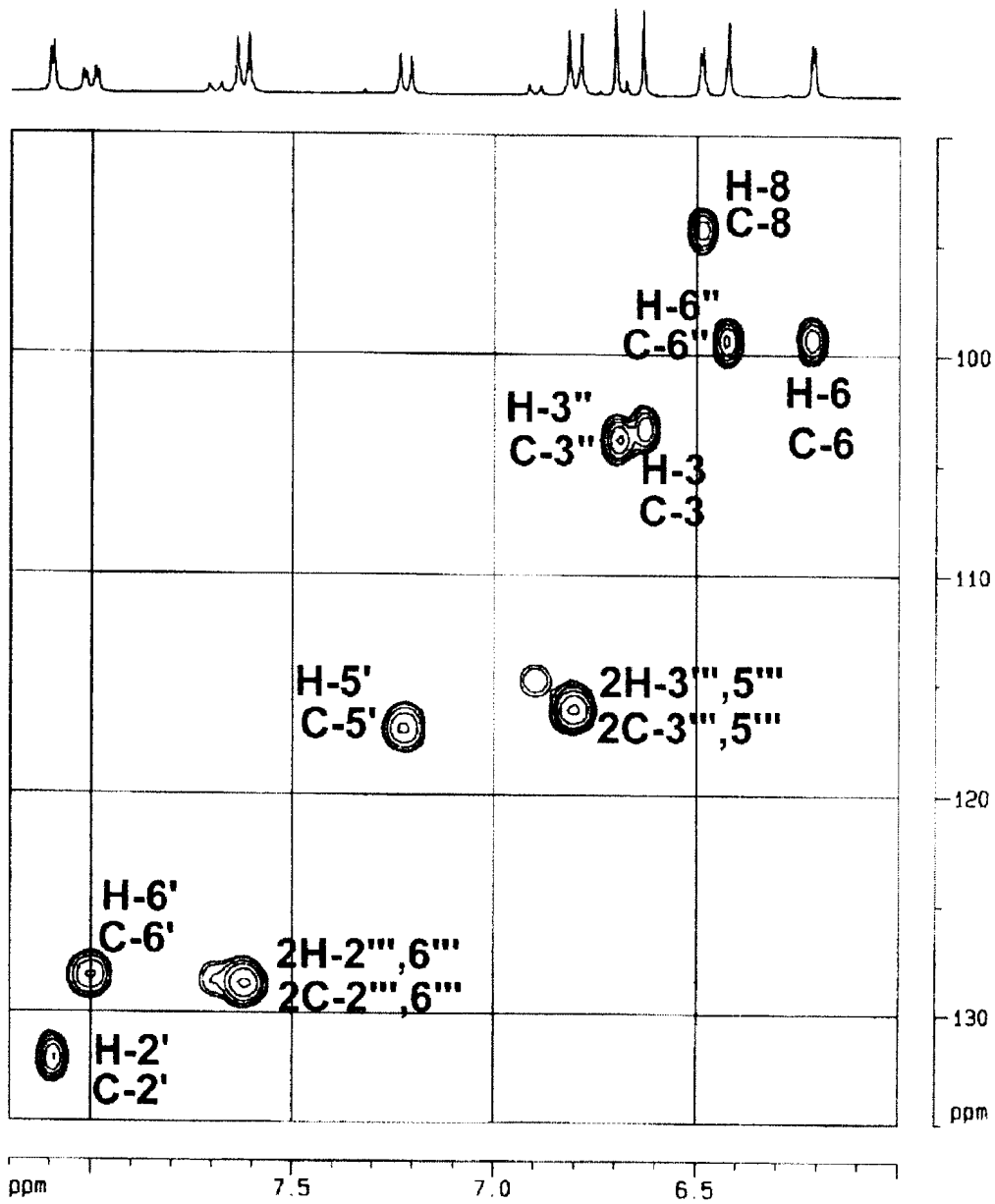
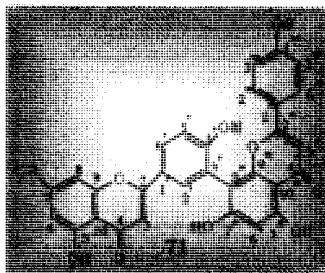
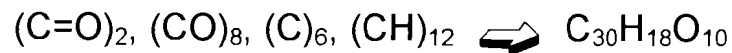


Figura 82: Espectro de correlação heteronuclear de hidrogênio-carbono (^1H , ^{13}C -COSY, $^1J_{\text{CH}}$, HMQC) em D_3CCOD_3 .

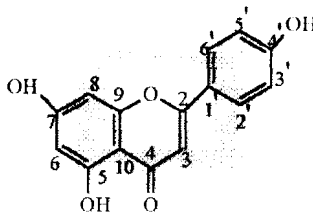


Considerando-se o número de carbonos, os valores dos deslocamentos químicos e os substituintes caracterizados, foi possível deduzir a fórmula expandida:



Os dados analisados mostram que uma das unidades do biflavonóide **71** possui o padrão de oxigenação encontrado na apigenina³⁸.

Apigenina



Os sinais com deslocamentos químicos de átomos de carbonos aromáticos entre δ_C : 94,80-105,55 permitiram, através de comparação com os dados descritos na literatura para apigenina³⁸, estabelecer a posição da união das unidades flavanoídicas do biflavonóide **71**. A análise comparativa mostra modificações significativas nos δ_C dos carbonos C-3 e C-8 da apigenina, observando-se um $\Delta\delta_C = 4,80$ ppm para C-3' [$\Delta\delta_C = 120,89$ (71) – 116,09 (apigenina) = 4,80] e $\Delta\delta_C = 11,37$ ppm para C-8'' [$\Delta\delta_C = 105,37$ (71) – 94,00 (apigenina) = 11,37], permitindo deduzir que o carbono C-3' de uma unidade de apigenina está ligada ao C-8 da outra unidade.

Esta dedução foi confirmada pelo espectro de RMN de correlação bidimensional heteronuclear hidrogênio-carbono (HMBC, **Figuras 83, 83-1, 83-2, 83-3 e 83-4**), através de acoplamentos característicos para as unidades flavanoídicas descritas:

➤ acoplamento a três ligações ($^3J_{CH}$) entre o carbono C-3' (δ_C : 120,90) e o hidrogênio H-5' (δ_H : 7,22), que confirma a posição da ligação na primeira unidade.

➤ acoplamentos a duas ligações ($^2J_{CH}$) entre o carbono C-5'' (δ_C : 162,66) e o hidrogênio H-6'' (δ_H : 6,42) e a três ligações ($^3J_{CH}$) entre o C-6'' (δ_C : 99,80) e o OH-5, que indicaram a presença de hidrogênio na posição 6'' desta unidade e conseqüentemente, o carbono C-8'' encontra-se envolvido na ligação entre as duas unidades flavonoídicas (**71**).

➤ A ligação interflavonoídica C-3'-C-8'' foi confirmada pelo acoplamento via três ligações ($^3J_{CH}$) entre o carbono C-8'' (δ_C : 104,44) e o hidrogênio H-2' (δ_H : 8,10) e H-6'' (δ_H : 6,42).

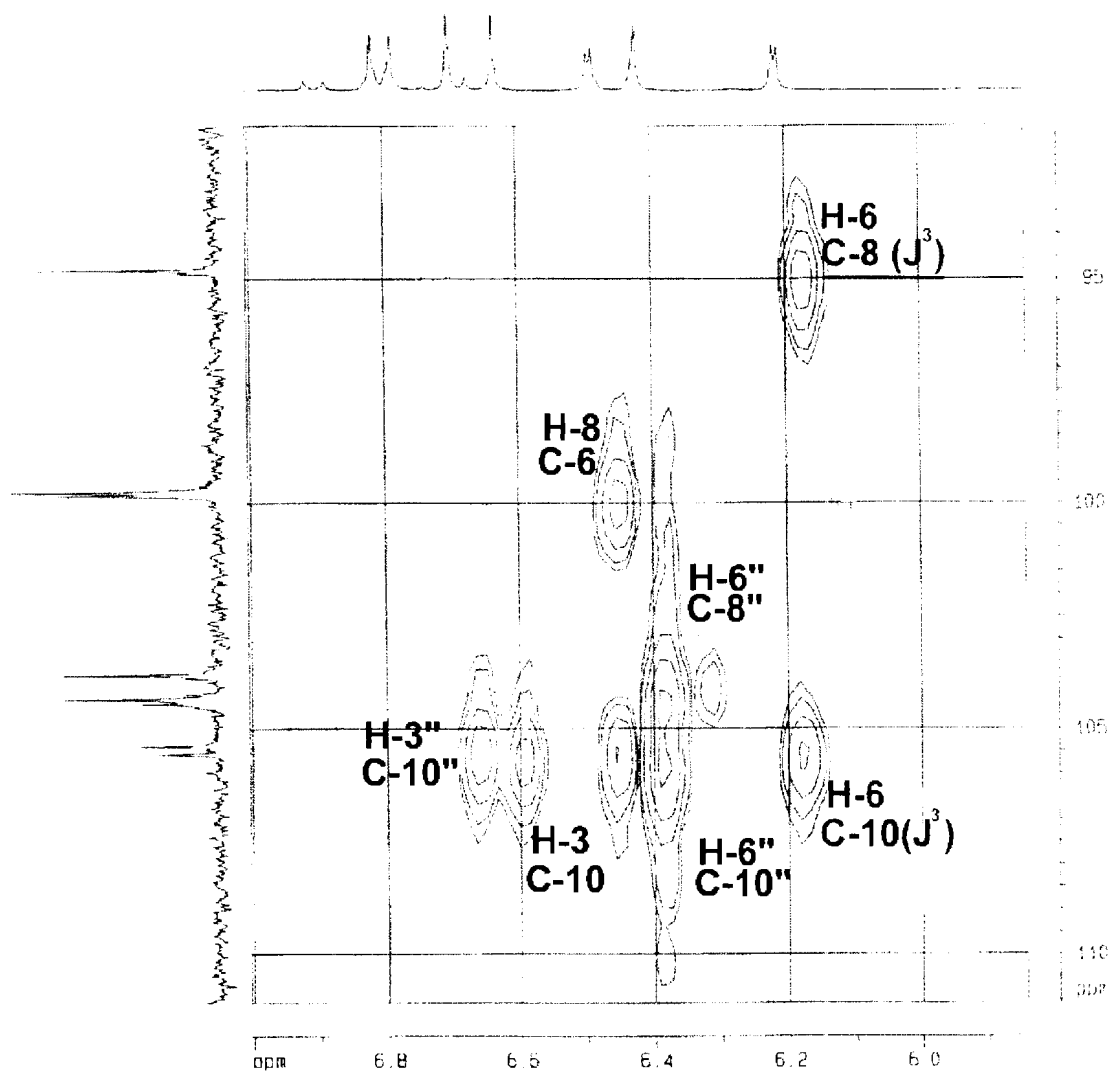
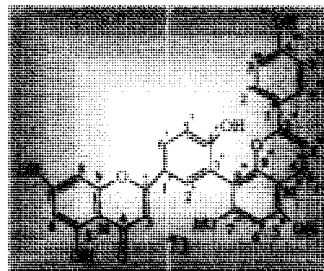


Figura 83: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio-carbono (^1H , ^{13}C -COSY, $^nJ_{\text{CH}}$, $n=2,3$; HMBC) da substância **71** em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, expandido na região δ_{C} : 90-110 ppm.



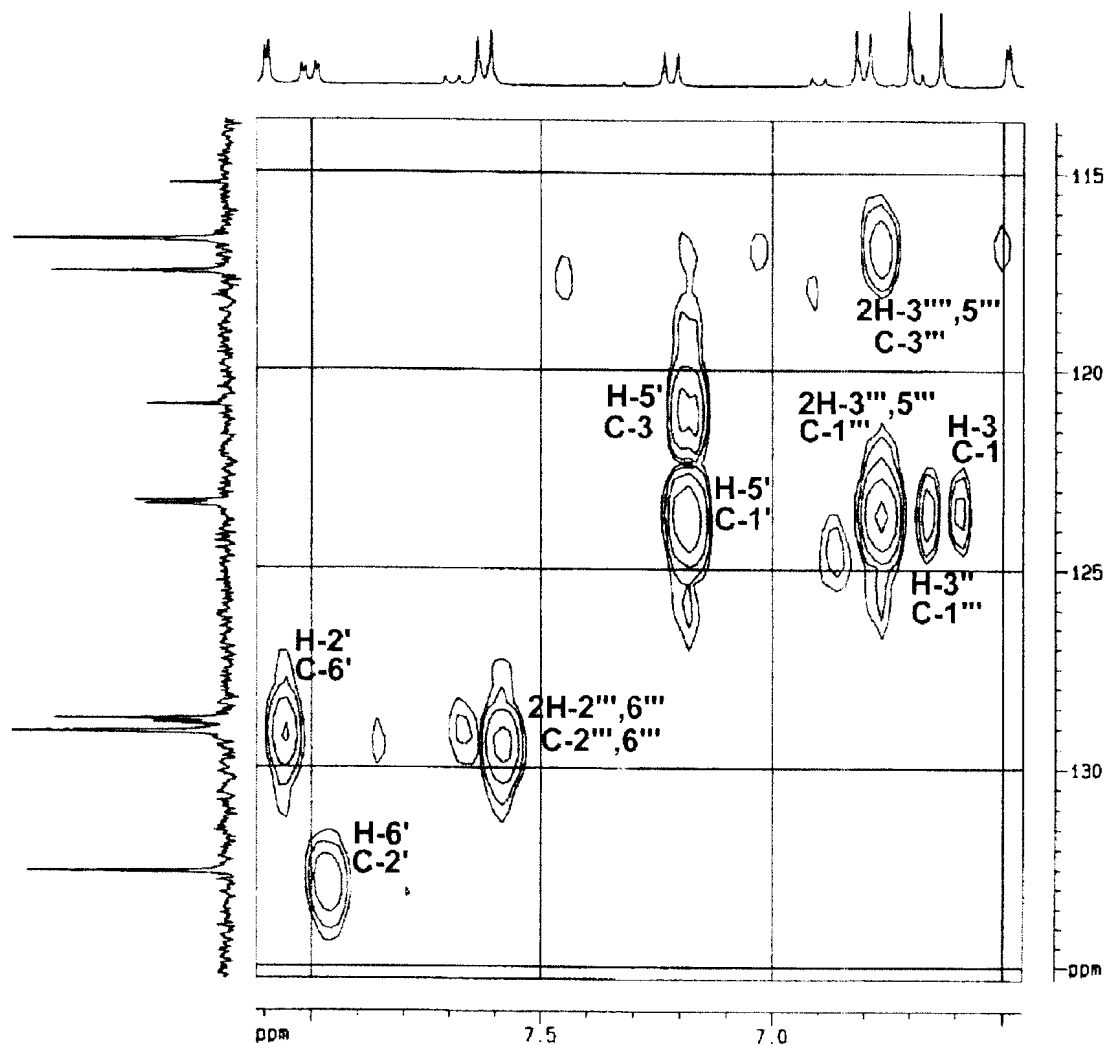
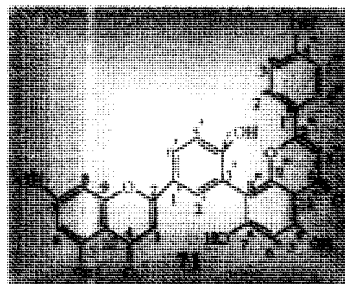


Figura 83-1: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio-carbono (^1H , ^{13}C -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n = 2, 3$; HMBC) da substância **71** em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, expandido na região δ_{C} : 115-140 ppm.



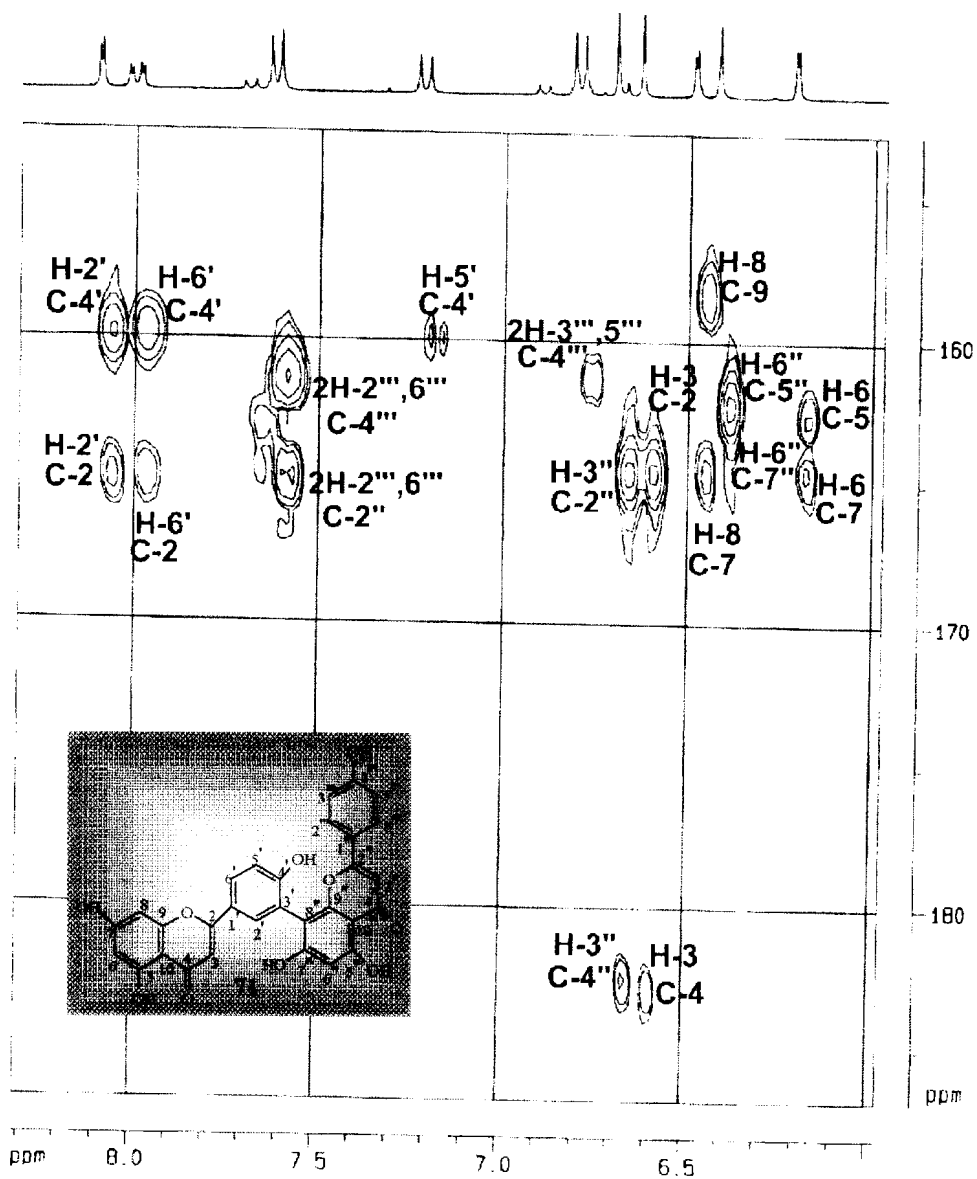


Figura 83-2: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio-carbono (^1H , ^{13}C -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n = 2,3$; HMBC) da substância **71** em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, expandido na região δ_{C} : 155-185 ppm.

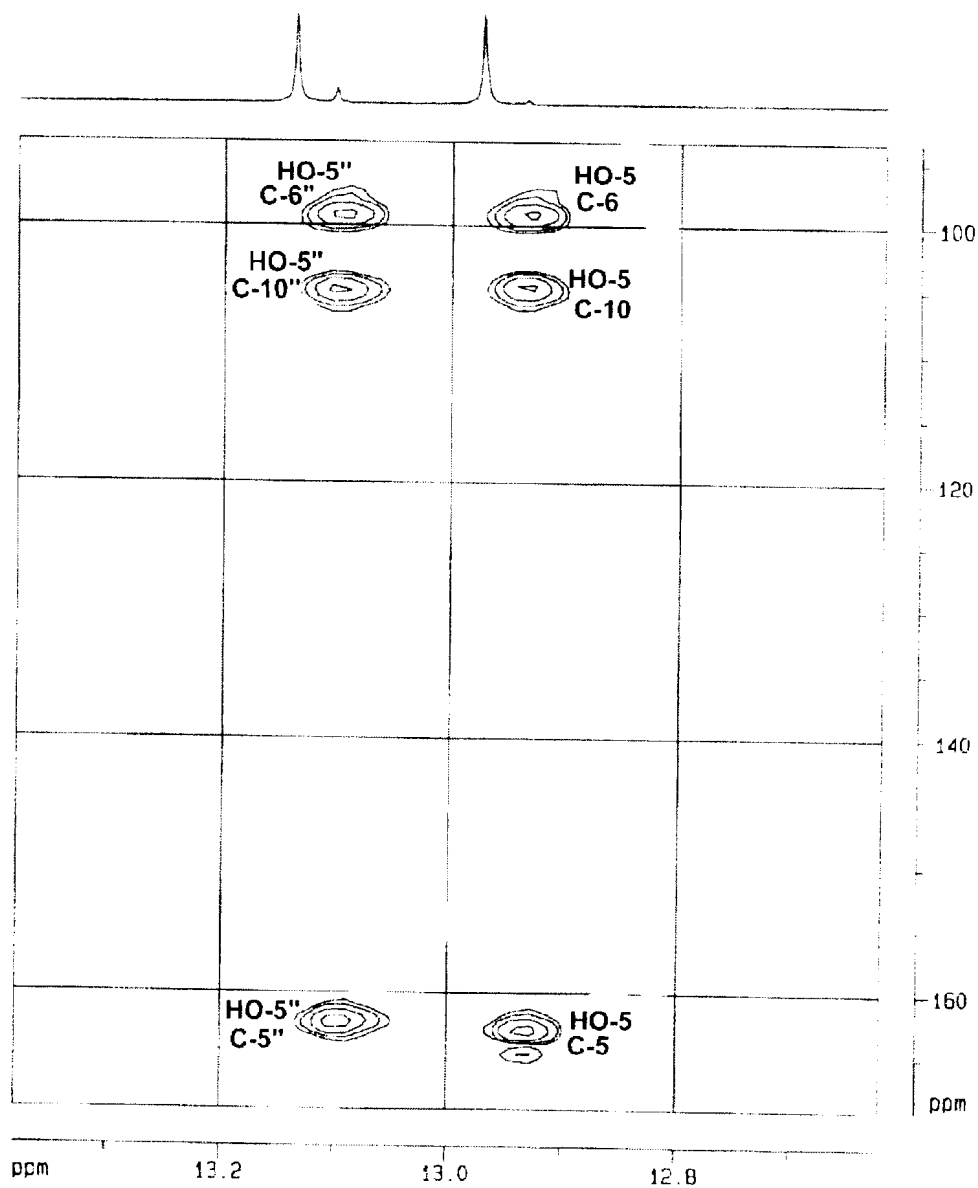
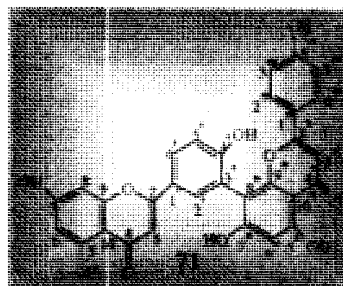


Figura 83-3: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio-carbono (^1H , ^{13}C -COSY, $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n = 2,3$; HMBC) da substância **71** em $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, expandido na região δ_{H} : 12,7-13,3 ppm.



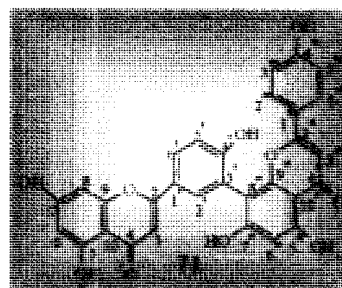
As outras interações spin-spin encontram-se descritas na **Tabela 17**. Assim, a estrutura da biflavona (**71**) foi definida como 5,7,4'-trihidroxiavon(3' 8'')-5'',7'',4''-trihidroxiavona, conhecida como amentoflavona³⁸.

Nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (PND e DEPT), aparecem alguns sinais de menor intensidade referente a um outro biflavonóide, o qual foi isolado do extrato metanólico das folhas de *Luxemburgia nobilis*, sendo discutido mais adiante.

Tabela 17: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **71** e comparação com os δ_{C} registrados na literatura da amentoflavona³⁸.

C	71				Amentoflavona ³⁸
	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{C}
2	-	H-3	H-2',6'	165,12	165,80
3	6,63 (s)	-	-	103,78	104,00
4	-	H-3	-	183,47	183,60
5	-	H-6, OH-5	-	162,83	162,30
6	6,21 (d, J= 2,0 Hz)	-	H-8, HO-5	99,75	100,00
7	-	H-6,8	-	163,37	163,30
8	6,48 (d, J= 2,0 Hz)	-	H-6	94,81	95,20
9	-	H-8	-	156,15	159,10
10	-	-	H-3,6,8, HO-5	105,38	105,38
1'	-	-	H-3, 5'	123,31	123,10
2'	8,10 (d, J= 2,4 Hz)	-	H-6'	132,61	132,80
3'	-	-	H-5'	120,90	117,30
4'	-	H-2',5',6'	H-2',5',6'	158,51	160,80
5'	7,22 (d, J= 8,7 Hz)	-	-	117,53	123,10
6'	8,0(dd, J= 2,4 e 8,7	-	H-2'	128,83	128,90
2''	-	H-3''	H-2'',6''	165,12	165,80
3''	6,69 (s)	-	-	104,32	103,20
4''	-	H-3''	-	183,08	184,00
5''	-	H-6'', HO-5''	-	162,66	162,30
6''	6,42 (s)	-	HO-5''	99,80	100,30
7''	-	-	-	164,91	163,00
8''	-	-	H-2',6''	104,44	105,20
9''	-	-	-	160,30	156,30
10''	-	-	H-3'',6'', HO-5''	105,56	105,20
1'''	-	-	H-3'',3'',5''	123,41	121,40
2''', 6'''	7,61 (d, J= 8,7 Hz)	-	-	129,14	129,20
3''', 5'''	6,80 (d, J- 8,7 Hz)	-	-	116,73	116,80
4'''	-	H-3''',5'''	H-2''',6'''	161,83	162,30

Os valores de C-9 e C-9'' estão invertidos na literatura e confirmados neste trabalho através do HMBC (**Figura 82-3**)

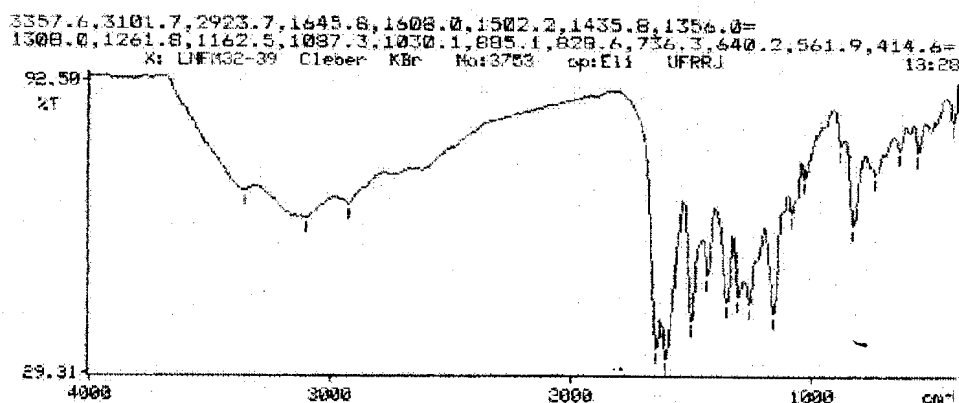


5.4.3- Substância 73.

O novo biflavonóide **73** isolado das folhas de *Luxemburgia nobilis* (Esquemas 7 e 8, páginas 49 e 51) foi caracterizado através da análise de I.V, U.V, RMN de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensional), E.M, além da preparação de derivados metilado e acetilado que confirmaram a proposta estrutural da substância natural.

O espectro de I.V (Figura 84) mostra bandas de absorção em $3357,6\text{ cm}^{-1}$ correspondente a hidroxila quelada e em $1645,8\text{ cm}^{-1}$ correspondente a carbonila quelada. O espectro de U.V (Figura 85) mostrou máximos de absorção em λ 288 e 330 nm, característicos de flavonóide.

Figura 84: espectro de I.V da substância 73.



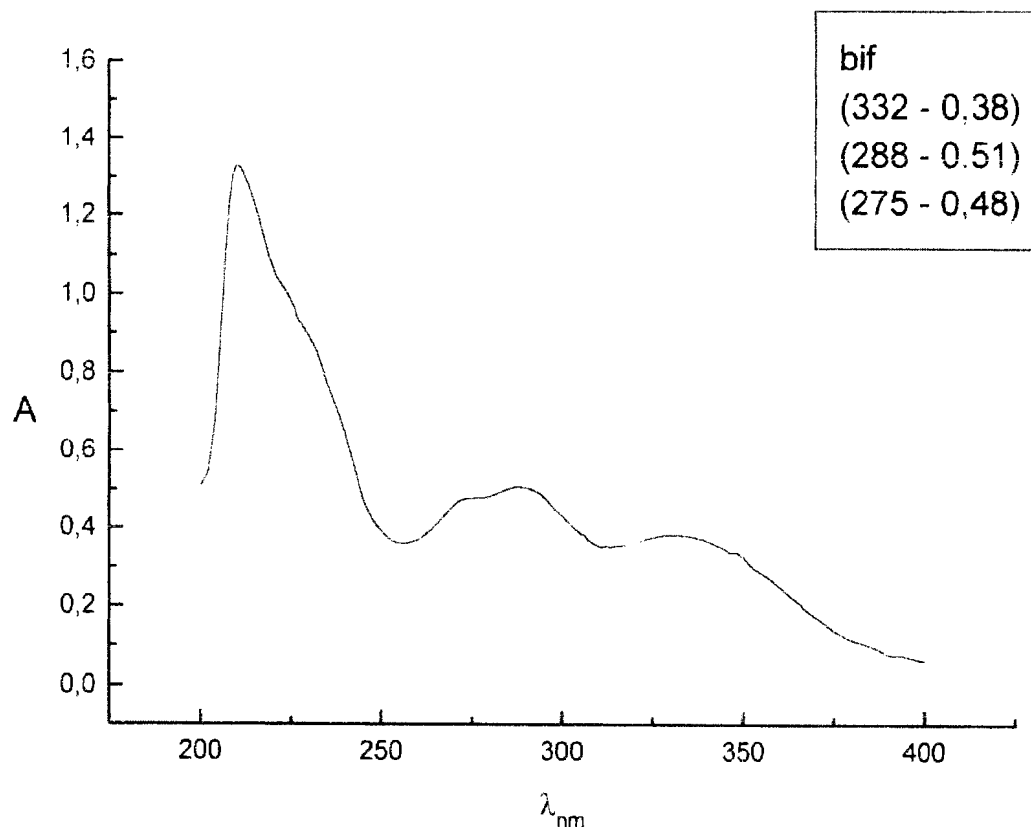


Figura 85: Espectro de U.V em metanol da substância **73**.

O espectro de massas por impacto de elétrons (**Figura 86, Esquema 22**) mostra o pico correspondente ao íon molecular em m/z 540 (M^+ , 13%), confirmado pelo espectro de massas de alta resolução (**Figura 87**) que mostra o pico do íon molecular em m/z [M^+] 540,10592 [calculado= 540,105 para $C_{30}H_{20}O_{10}$, $\Delta m/z= 0,00092$].

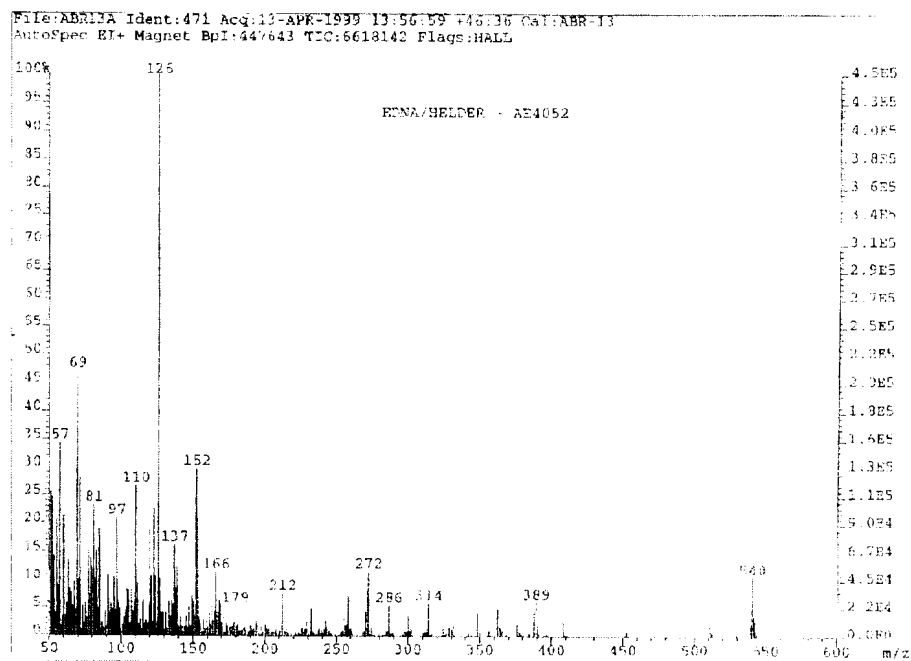


Figura 86: Espectro de massas por impacto de elétrons da substância 73.

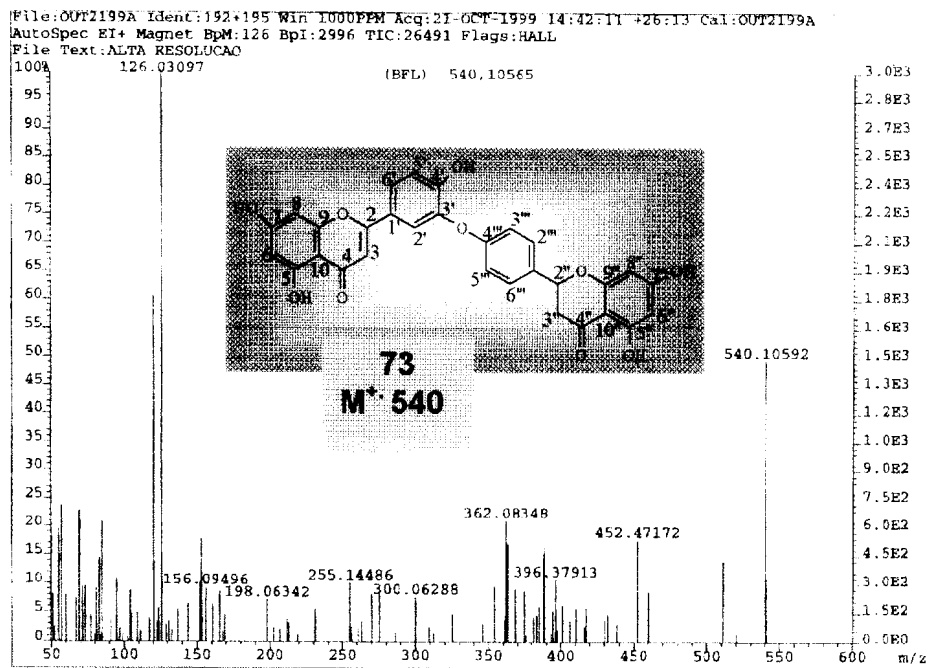
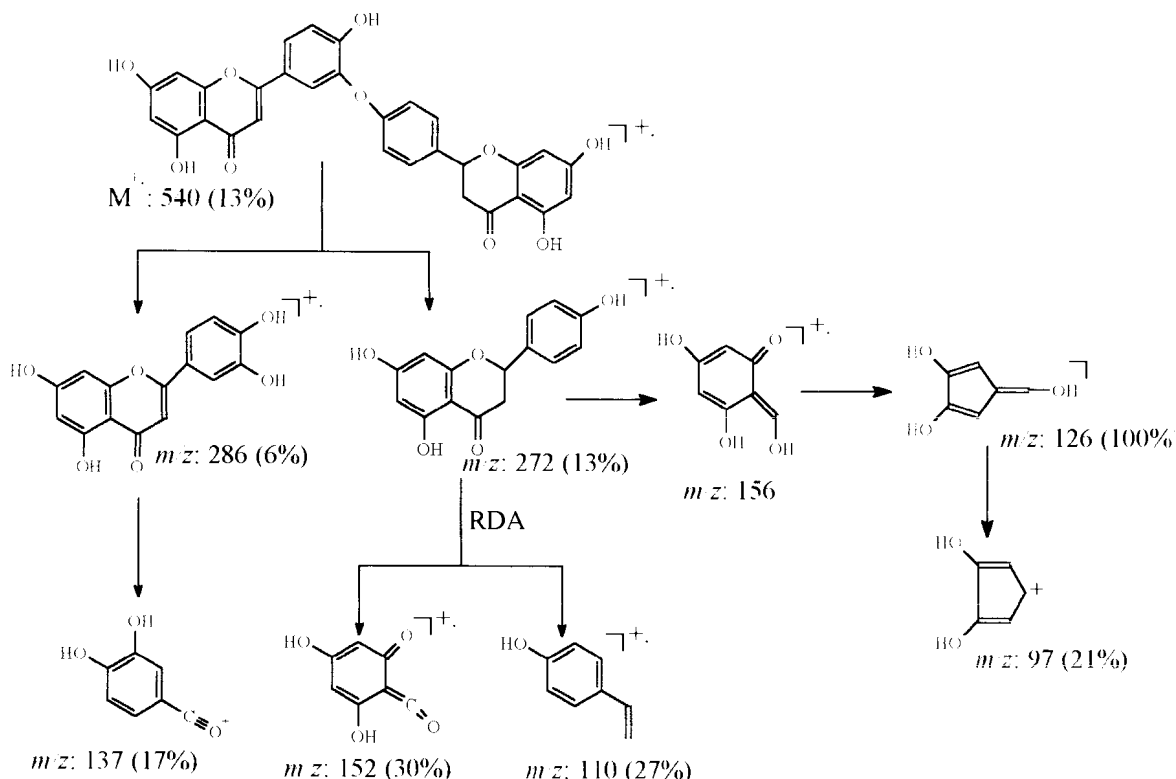


Figura 87: Espectro de massas de alta resolução da substância 73.



Esquema 22: Fragmentações de massas da substância **73**.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 88 e 88a**) mostra dois sinais de hidroxila em campo baixo a δ_{H} : 11,99 e 12,71 indicando a presença de duas hidroxilas queladas, as quais aparecem no I.V (**Figura 84**). A presença de dez sinais de hidrogênios aromáticos incluindo dois sinais de dubletos com acoplamento meta, que são observados no HOMOCOSY (**Figura 89 e 89a**), em δ_{H} : 6,11 (H-6) com 6,37 (H-8) e 5,81 (H-6'') com 5,82 (H-8''), descartam a possibilidade das duas unidades estarem ligadas através de um desses carbonos, o que é mais comum em biflavonóides.

A presença do sinal em δ_{H} : 6,62 (s) e três duplo dubletos em δ_{H} : 5,39 (12,7 e 6,0 Hz), 3,11 (16,6 e 12,7 Hz) e 2,66 (16,0 e 6,0 Hz), indica que a substância **73** é um dímero de flavona e flavanona, confirmando que os carbonos C-6 e C-8 não estão envolvidos na ligação interflavonoídica.

O anel B da unidade da flavona foi identificado pelos três sinais de hidrogênios em δ_{H} : 7,06 (d, J= 8,7 Hz, H-5'), 7,62 (d, J= 2,0 Hz, H-2') e 7,71 (dd, J= 2,0 e 8,7 Hz, H-6'). Além disso, o espectro de RMN de ^1H (**Figura 88 e 88a**) também mostra dubletos em δ_{H} : 7,36 (d, J= 7,8 Hz, 2H-2'',6'') e 6,83 (d, J= 7,8 Hz, 2H-3'',5''), indicando um sistema AA'BB' para a unidade da flavanona.

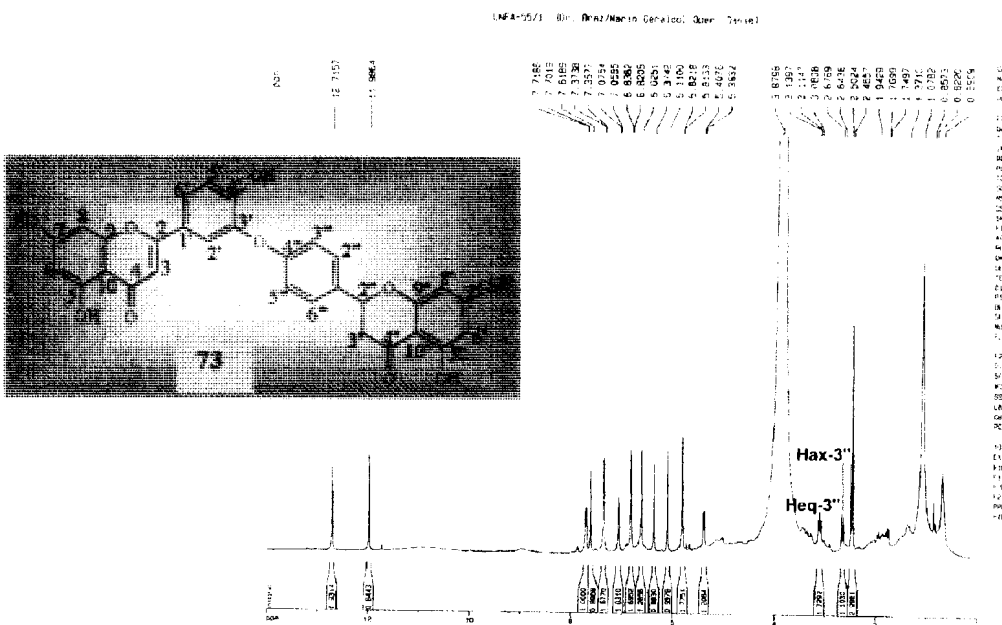


Figura 88: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da substância **73** em DMSO.

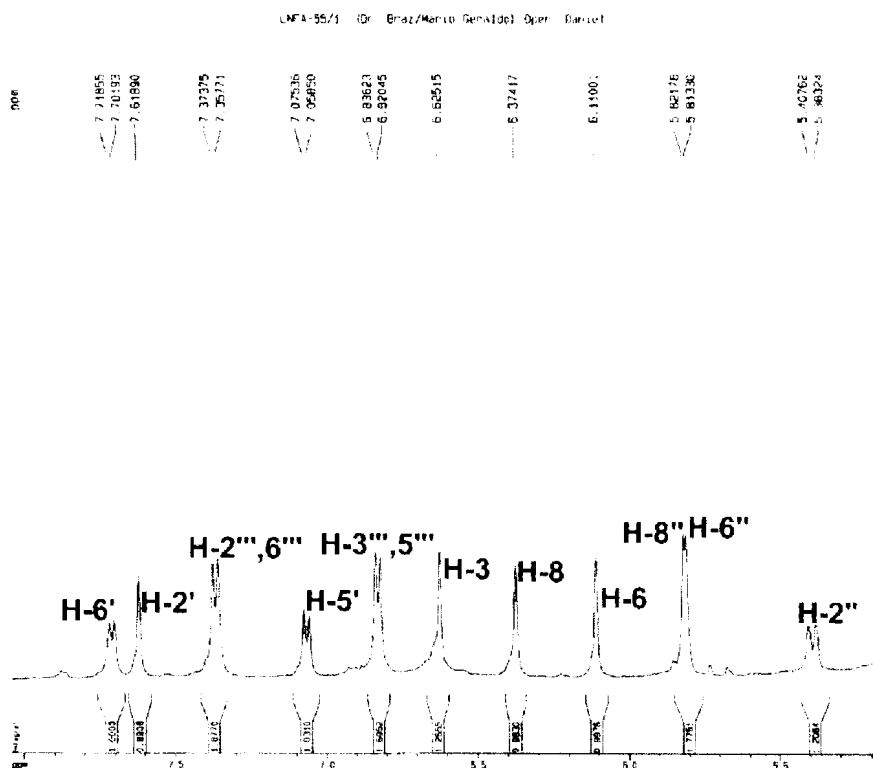


Figura 88a: Espectro de RMN de ^1H da substância **73** expandido na região de 5,0 a 8,0 ppm.

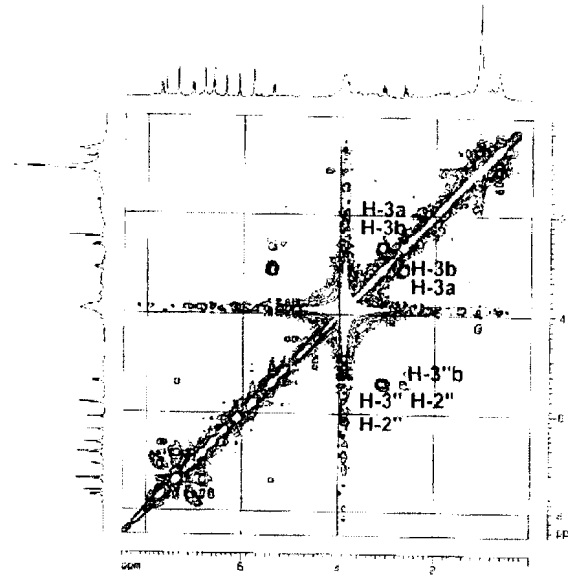


Figura 89: Espectro de correlação homonuclear de hidrogênio-hidrogênio ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY) da substância **73** em DMSO.

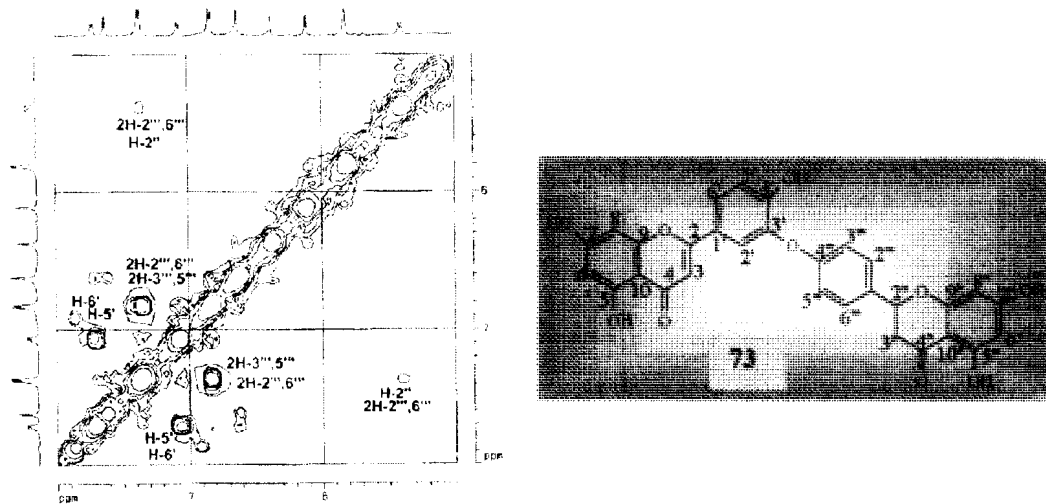


Figura 89a: Espectro de Homocopy da substância **73** expandido na região entre 5 a 8 ppm.

O espectro de RMN de ^{13}C PND e DEPT (Figuras 90, 90a, 91 e 91a) da substância **73** mostra 28 sinais incluindo dois sinais em δ_{C} : 128,80 e 116,30 que correspondem a dois carbonos cada, oito carbonos sp^2 (CH), dois carbonos sp^3 em δ_{CH} : 78,57 e δ_{CH_2} : 42,38, catorze carbonos sp^2 quaternários [(C)₄ e (C-O)₁₀] e dois grupos carbonílicos em δ_{C} : 182,22 e 196,48.

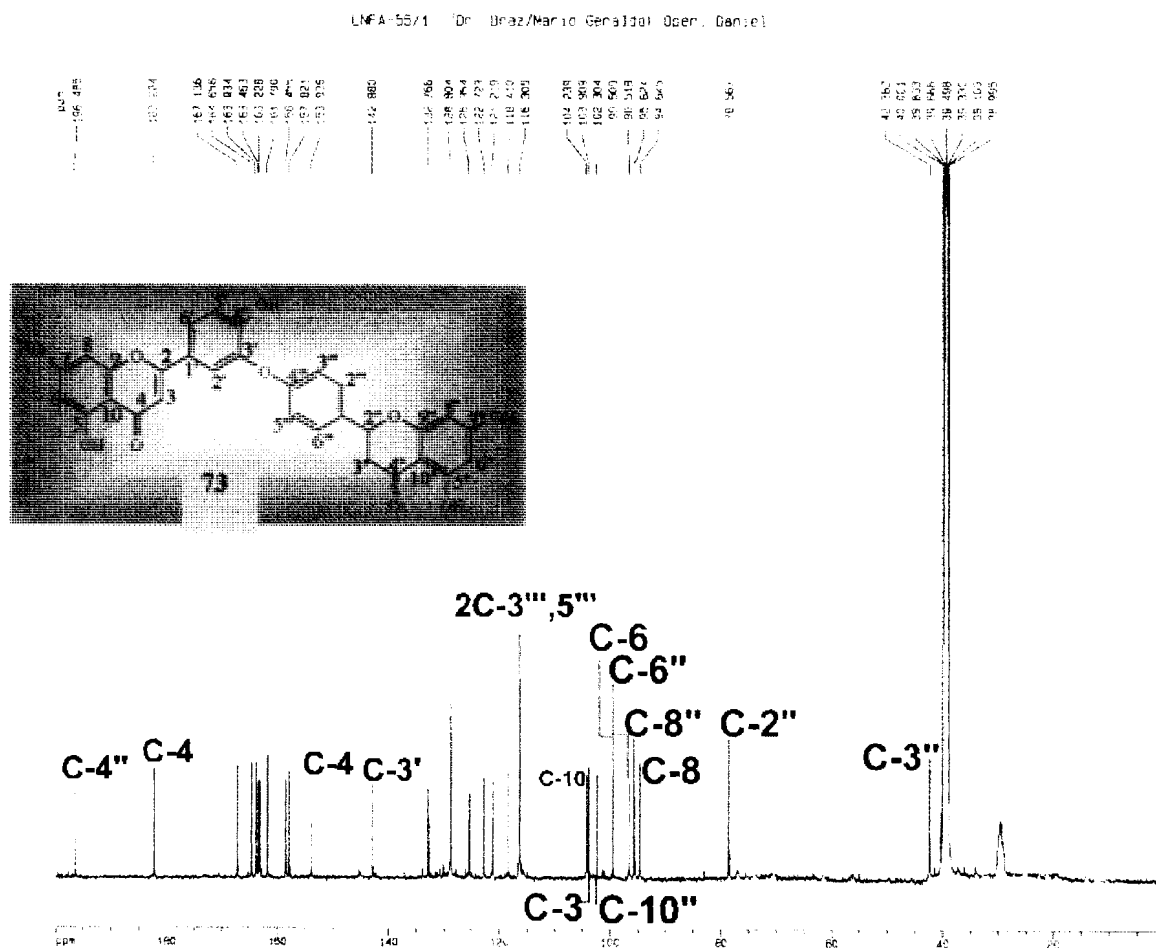


Figura 90: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) da substância **73** em DMSO.

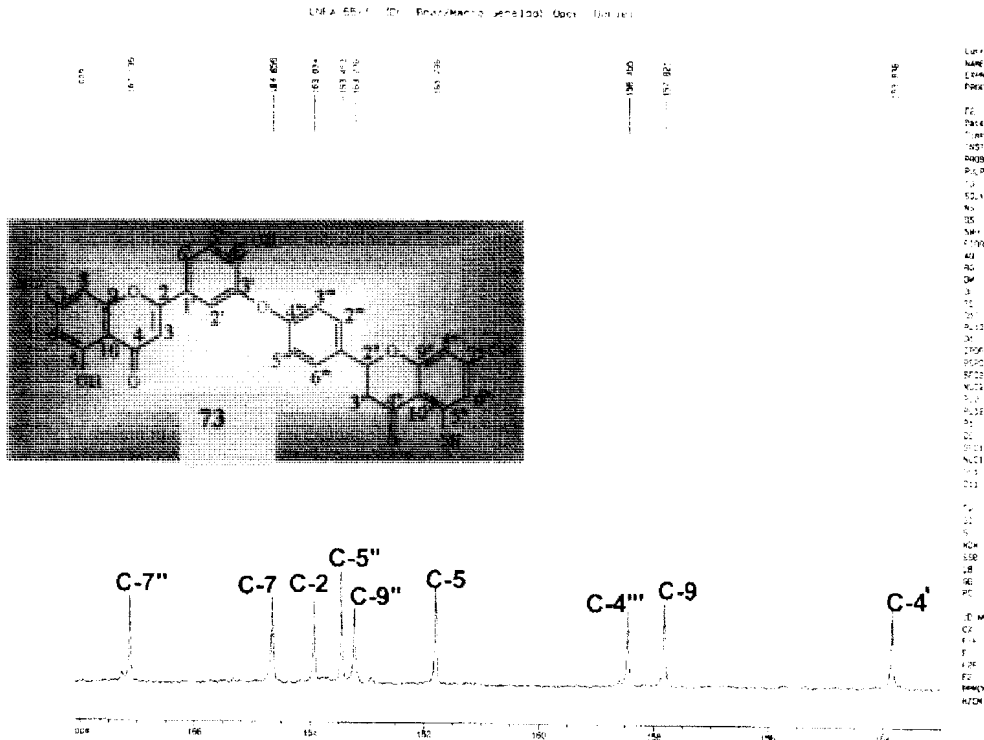


Figura 90a: Espectro de RMN de ^{13}C da substância 73 expandido na região entre 153 a 168 ppm.

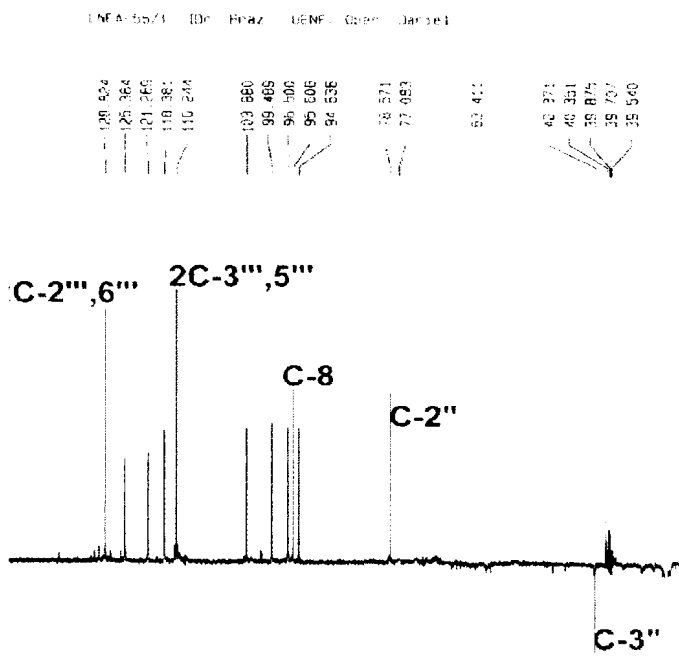


Figura 91: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT da substância 73 em DMSO.

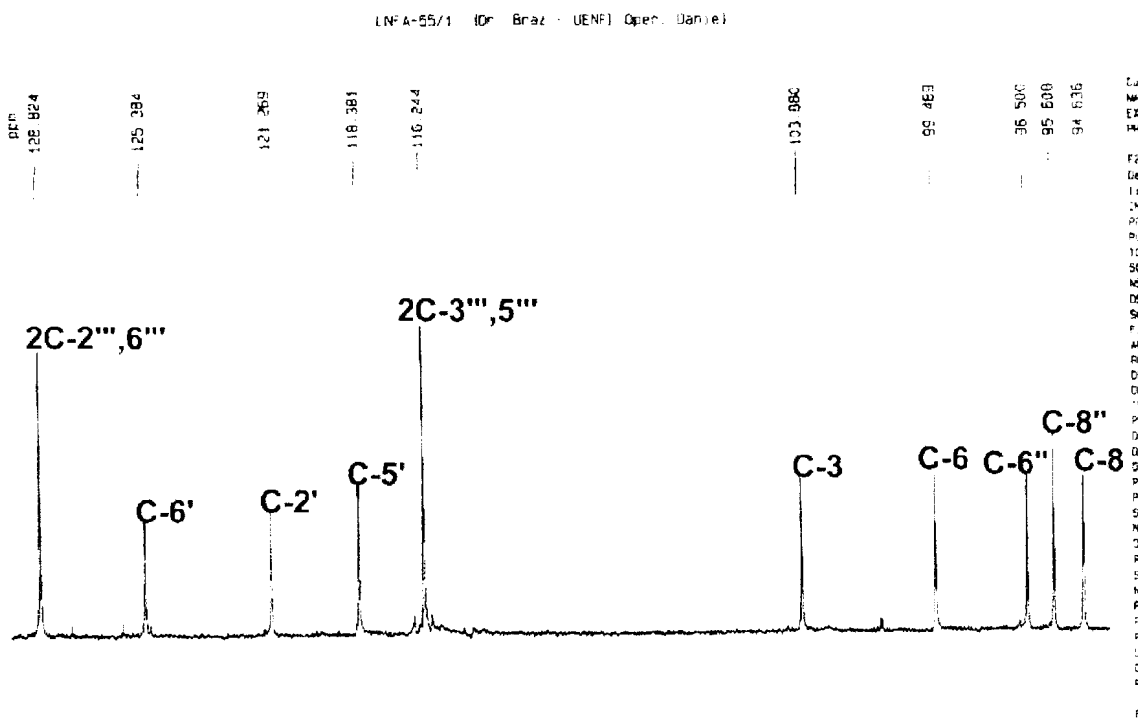
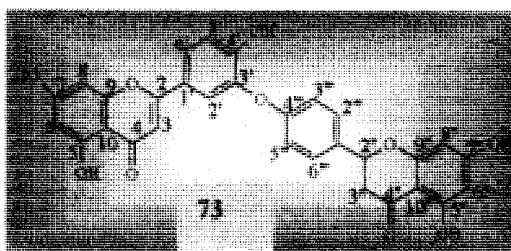


Figura 91a: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT da substância **73** expandido na região de 94 a 129 ppm.



A análise do espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio-carbono ($^1\text{H},^{13}\text{C}$ -COSY- $^1\text{J}_{\text{CH}}$, HMQC, **Figura 92** e **92a**) permitiu a atribuição dos deslocamentos químicos dos carbonos metínicos.

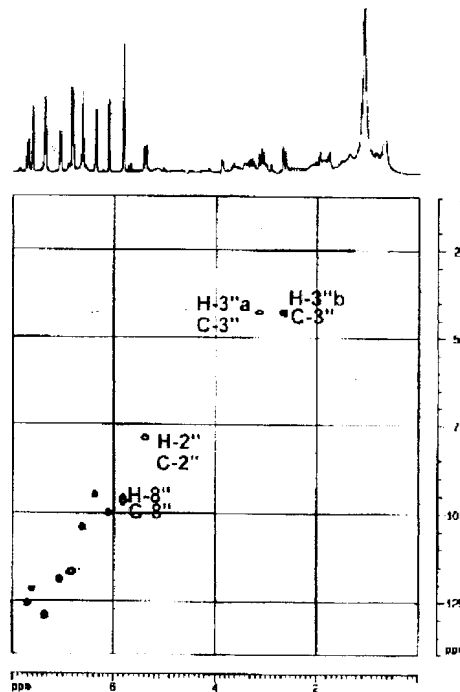


Figura 92: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio-carbono (^1H , ^{13}C -COSY- $^1\text{J}_{\text{CH}}$, HMQC) da substância **73** em DMSO.

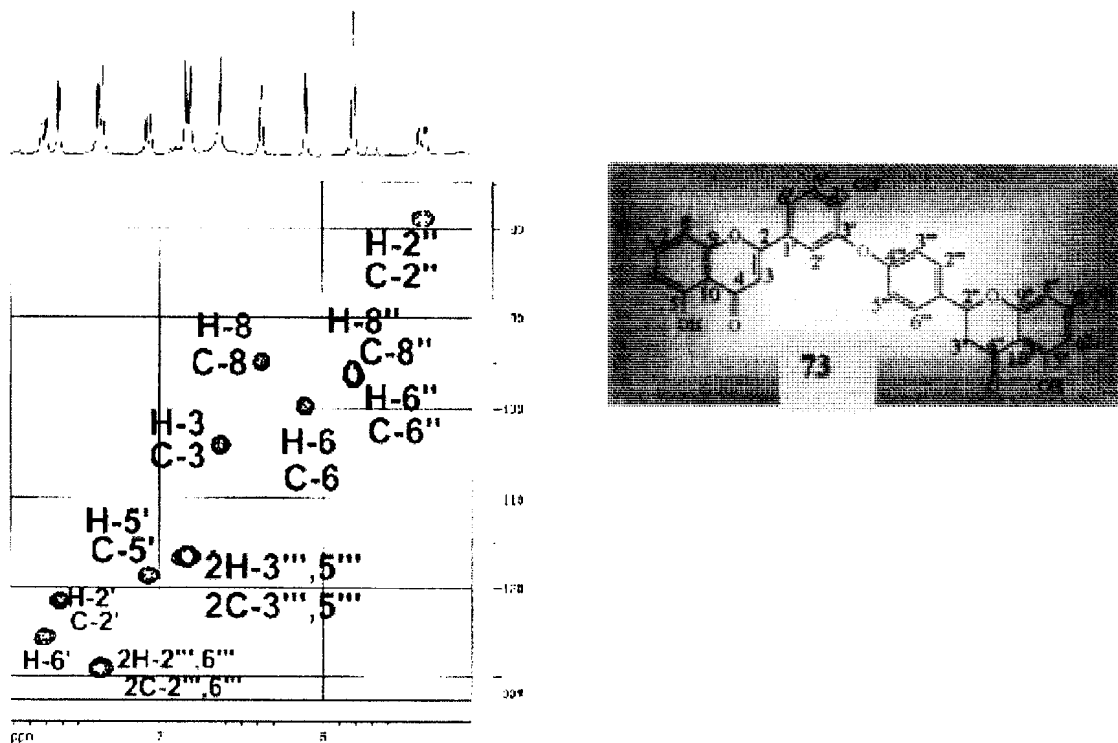


Figura 92a: Espectro de HMQC da substância **73** expandido na região entre 5 a 8 ppm.

A análise do espectro bidimensional heteronuclear de hidrogênio-carbono de **73** ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n = 2$ e 3 , HMBC) (**Figuras 93, 93a, 93b, 93c e 93d**) mostra acoplamentos entre C-1' (δ_{C} : 122,72) com H-2',6' e C-1'' (δ_{C} : 132,77) com H-2'',6'', indicando que o anel B da flavanona é dioxigenado e o sistema AA'BB' pertence a unidade da flavona.

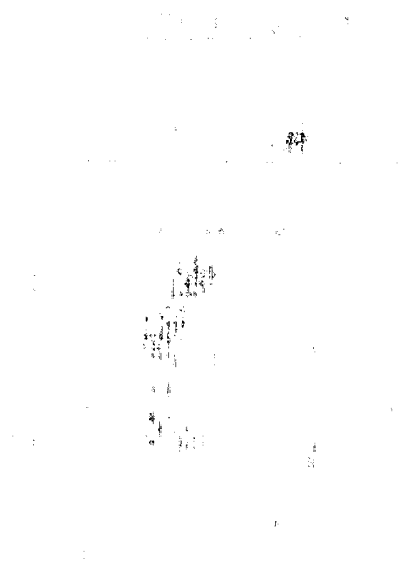


Figura 93: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear de hidrogênio-carbono ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n = 2$ e 3 , HMBC) da substância **73** em DMSO.

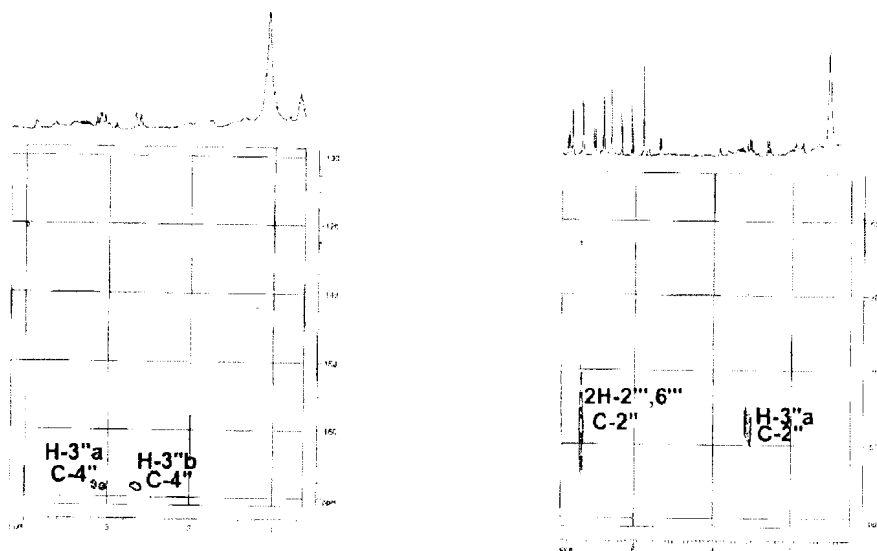


Figura 93a: Espectros de HMBC da substância **73** expandidos nas regiões em δ_C : 60 a 90 ppm e 100 a 180 ppm.

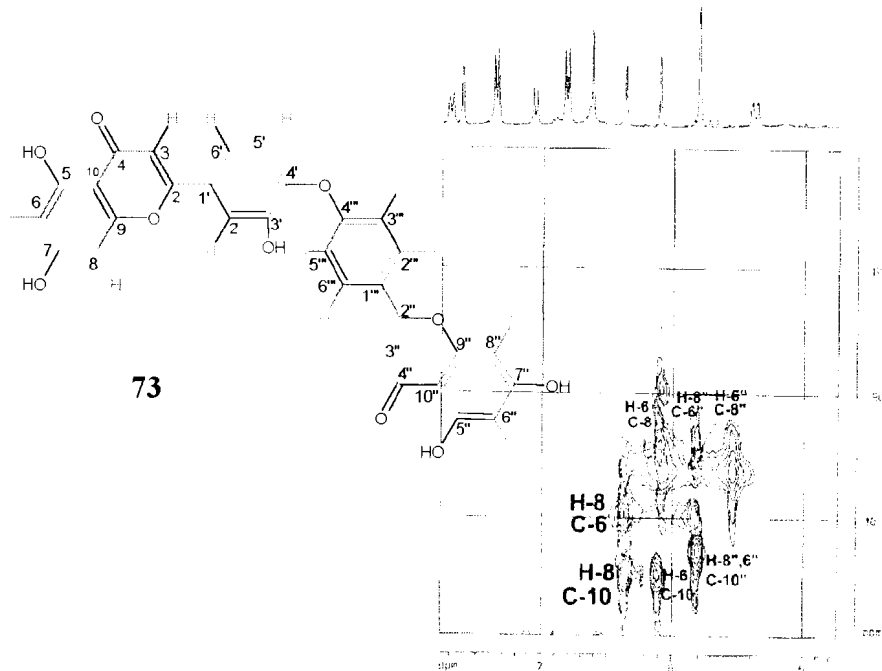


Figura 93b: Espectro de HMBC da substância **73** expandido na região em δ_C : 70 a 105 ppm.

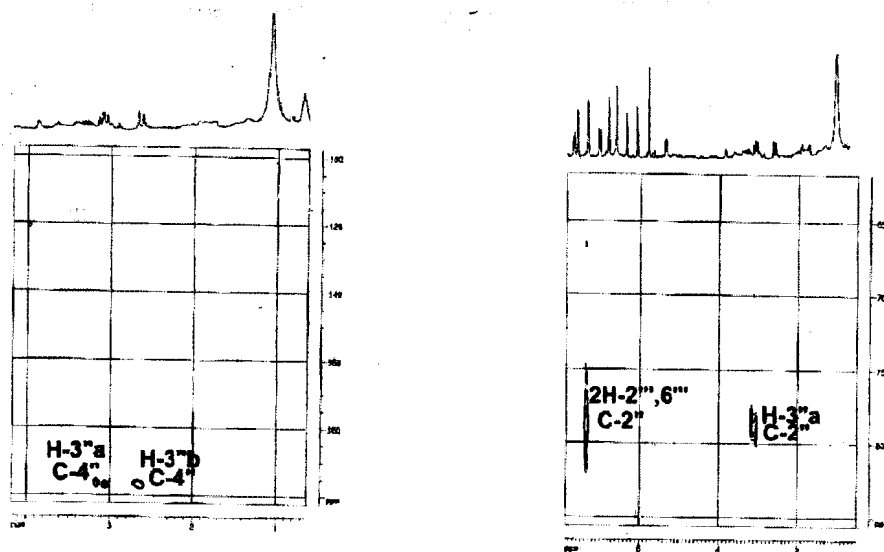


Figura 93a: Espectros de HMBC da substância 73 expandidos nas regiões em δ_c : 60 a 90 ppm e 100 a 180 ppm.

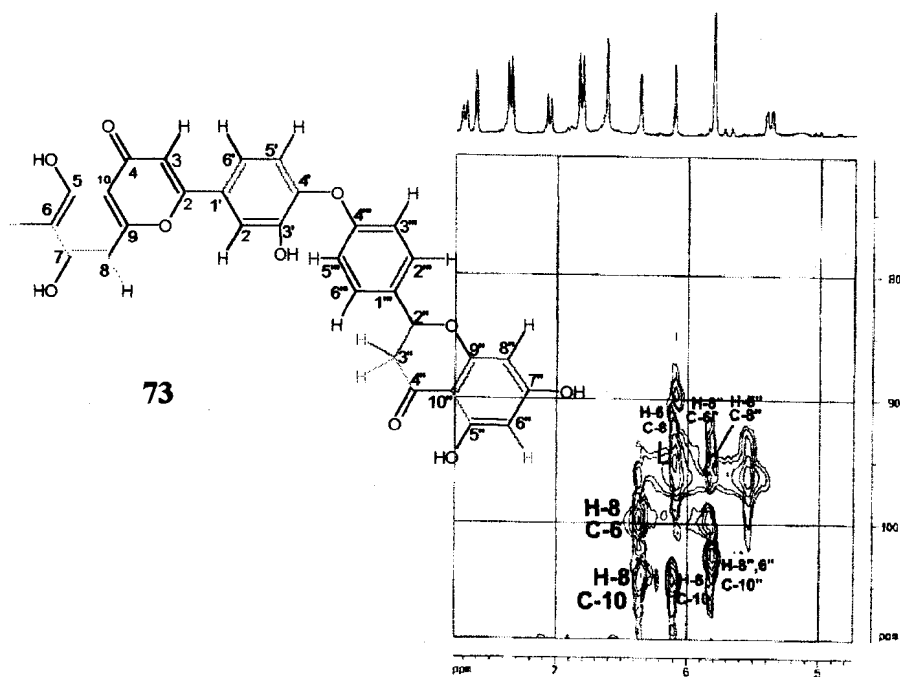


Figura 93b: Espectro de HMBC da substância 73 expandido na regiões em δ_c : 70 a 105 ppm.

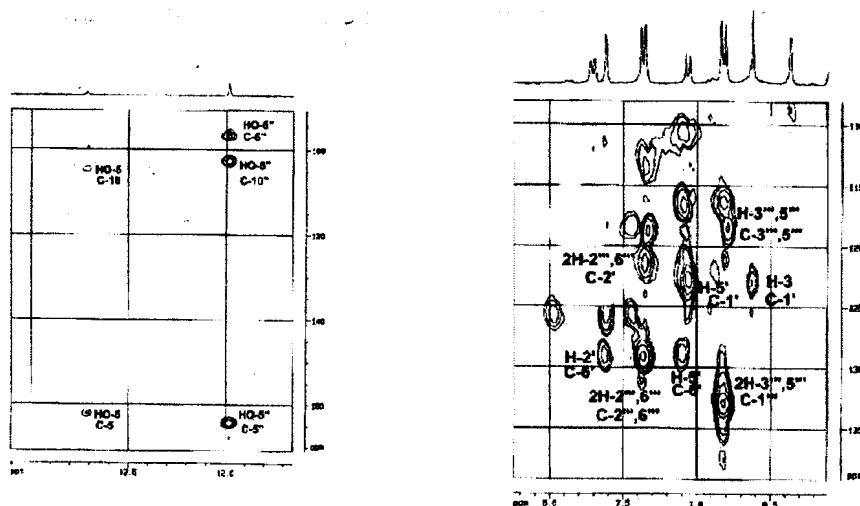


Figura 93c: Espectros de HMBC da substância **73** expandidos nas regiões em δ_c : 95 a 170 ppm e 110 a 140 ppm.

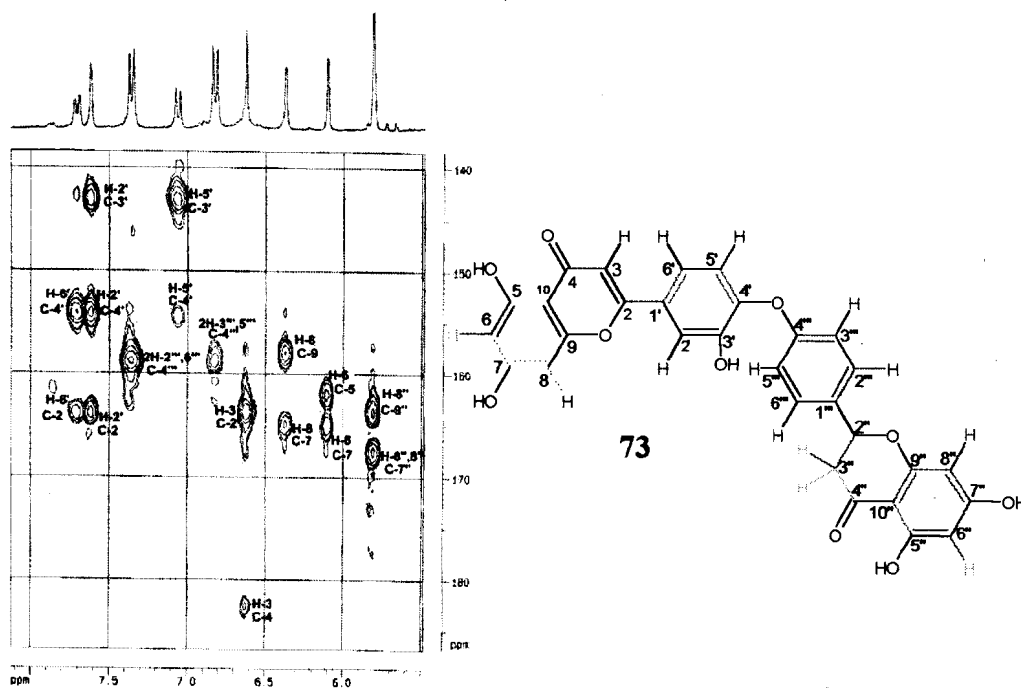


Figura 93d: Espectro de HMBC da substância **73** expandido na região em δ_c : 140 a 180 ppm.

Estas observações e comparação com dados da literatura para a 2,3-diidroochnaflavona (Tabela 18), isolada de *Ochna obtusata* (Ochnaceae)²⁰, mostra que a substância **73** é similar a esta substância. A diferença nos deslocamentos químicos dos hidrogênios pertencentes ao sistema AA'BB' de **73** [δ_H :7,36 (2H-2''',6''') e 6,83 (2H-3''',5''')] e da 2,3-diidroochnaflavona [δ_H :8,03 (d, J= 8,8 Hz, 2H-2''',6''') e 7,10 (d, J= 8,8 Hz, 2H-3''',5''')], revela que a substância **73** possui este sistema na unidade da flavanona (não conjugada com sistema AA'BB'), sendo assim do tipo 2'',3''-diidroochnaflavona.

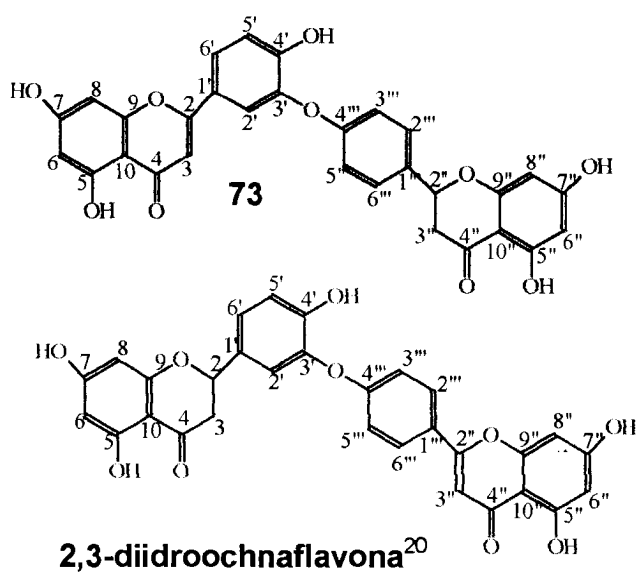


Tabela 18: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do biflavonóide **73** comparados com os dados da literatura para a 2,3-diidroochnaflavona²⁰.

C	73		2,3-diidroochnaflavona ²⁰		
	$^1\text{Hx}^{13}\text{C-HMQC-}^1\text{J}_{\text{CH}}$			δ_{C}	δ_{H}
	δ_{C}	δ_{H}		δ_{C}	δ_{H}
2	163,94	-	2	79,30	5,52(dd)
3	103,91	6,62(s)	3	43,50	3,19(dd); 2,81(dd)
4	182,22	-	4	196,90	-
5	161,80	12,71 (s, OH)	5	166,30	12,13 (s, OH)
6	99,51	6,11(d, J= 2,0 Hz)	6	96,90	5,94 (d)
7	164,80	-	7	167,40	9,68(s, OH)
8	94,64	6,37(d, J= 2,0 Hz)	8	95,90	5,96 (d)
9	157,82	-	9	164,10	-
10	104,29	-	10	103,20	-
1'	122,72	-	1'	132,30	-
2'	121,22	7,62(d, J= 7,8 Hz)	2'	121,50	7,34 (d)
3'	142,88	-	3'	142,80	-
4'	153,84	-	4'	150,50	8,61 (s, OH)
5'	118,41	7,06(d, J= 7,8 Hz)	5'	118,40	7,13 (d)
6'	125,35	7,71(dd, J= 2,0 e 7,8 Hz)	6'	125,50	7,35 (d)
2''	78,57	5,39(dd, J= 12,7 e 6,0 Hz)	2''	164,40	-
3''	42,38	3,11(dd, J= 16,6 e 12,7 Hz); 2,66(dd, 16,6 e 6,0 Hz)	3''	105,10	6,68(s)
4''	196,48	-	4''	183,10	-
5''	163,45	11,99 (s, OH)	5''	163,40	12,92 (s, OH)
6''	96,58	5,81 (d, J= 2,0 Hz)	6''	99,90	6,26 (d)
7''	167,14	-	7''	165,00	9,73 (s, OH)
8''	95,62	5,82 (d, J= 2,0 Hz)	8''	94,80	6,53(d)
9''	163,28	-	9''	158,80	-
10''	102,30	-	10''	105,40	-
1'''	132,77	-	1'''	126,00	-
2'''	128,80	7,36 (d, J= 7,8 Hz)	2'''	129,10	8,03(d)
3'''	116,30	6,83 (d, J= 7,8 Hz)	3'''	117,50	-
4'''	158,45	-	4'''	162,10	-
5'''	116,30	6,83 (d, 7,8 Hz)	5'''	171,50	7,10(d)
6'''	128,80	7,36 (d, J= 7,8 Hz)	6'''	129,10	8,03(d)

Os deslocamentos químicos de hidrogênios apresentados no espectro de RMN de ^1H (Figura 94, Tabela 19) do derivado acetilado de 73(73a), foram comparados com o tetraacetato da 2,3-diidroocnaflavona²⁰ confirmando o sistema AA'BB' da unidade da flavanona de 73.

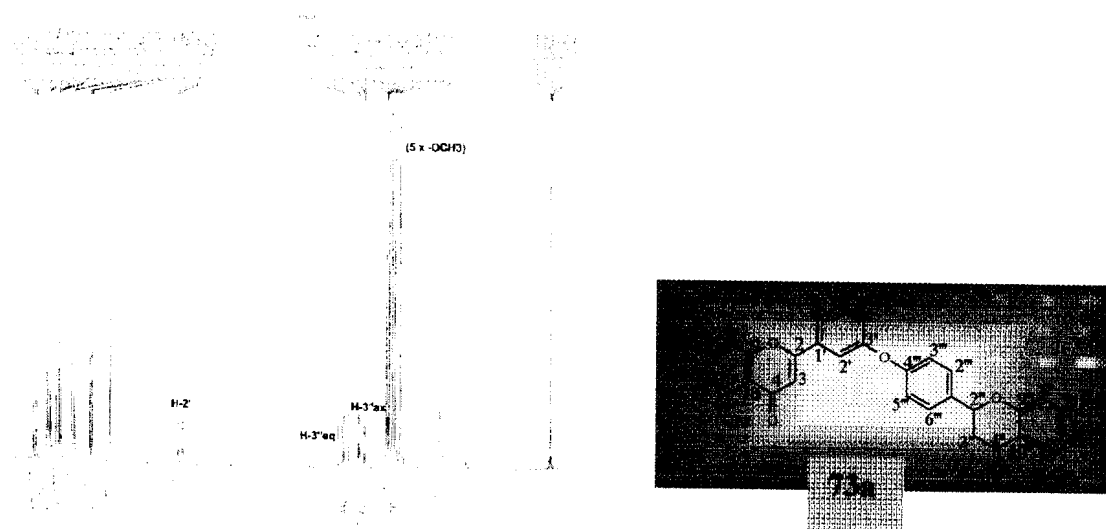


Figura 94: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) do derivado 73a em CDCl_3 .

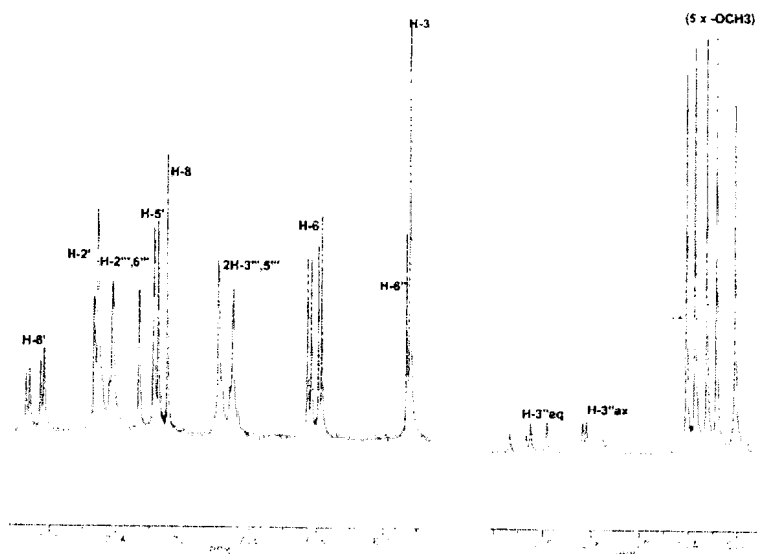


Figura 94a: espectro de RMN de ^1H do derivado 73a ampliado.

Outros experimentos de RMN para **73a** foram realizados para a ratificação da proposta estrutural e fazer atribuições dados de δ_H e δ_C dos derivados que, também, estão sendo registrados pela primeira vez na literatura [RMN de ^{13}C PND e DEPT (Figuras 95 e 96, Tabela 19), Homocosy (Figura 97), Heterocosy (Figura 98) e COLOC (Figura 99)].

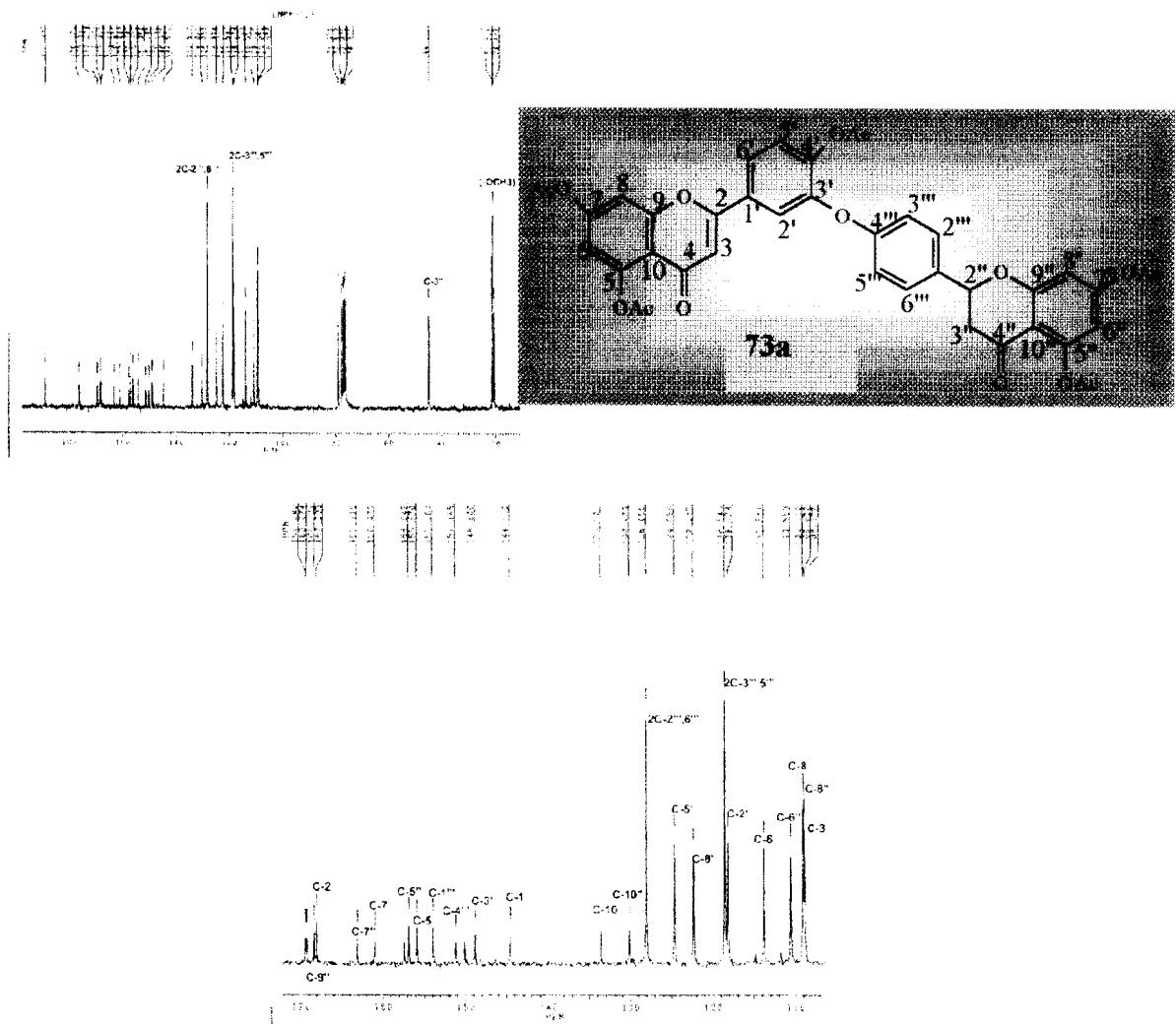


Figura 95: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) do derivado **73a** em $CDCl_3$.

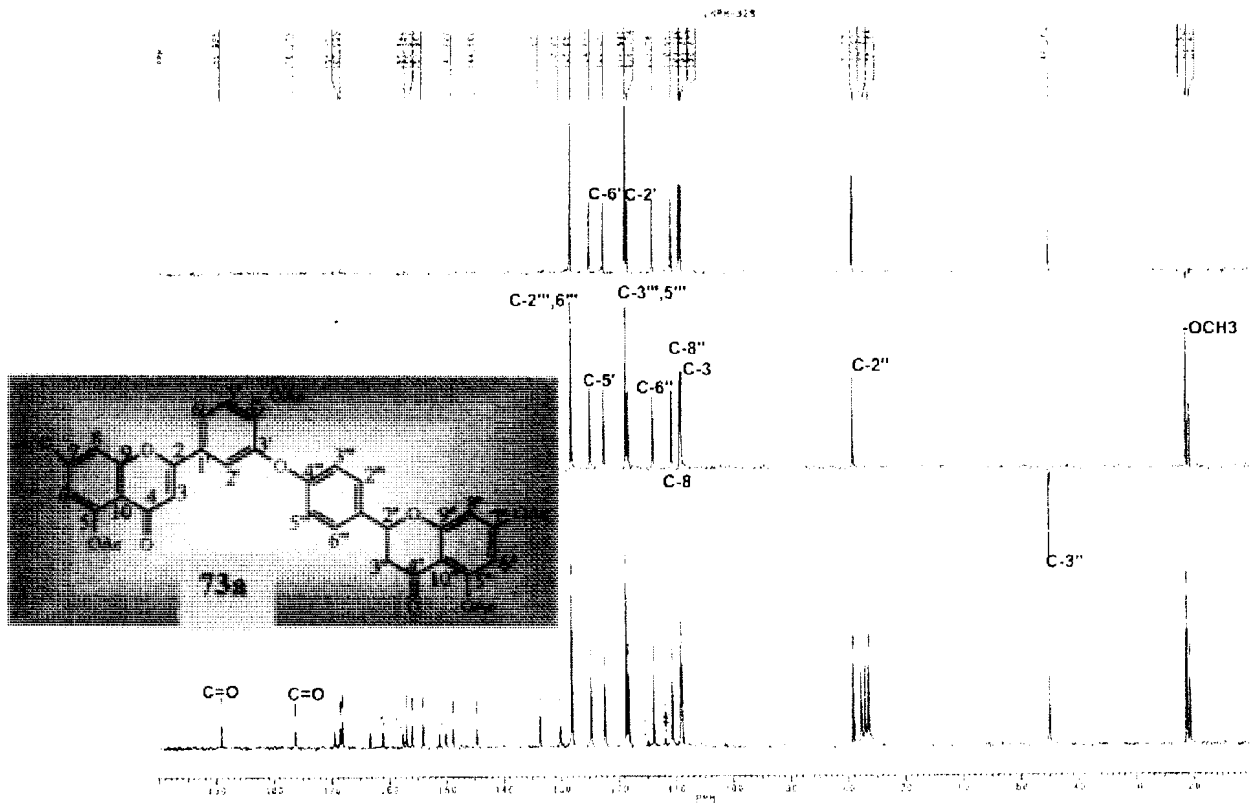


Figura 96: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT do derivado **73a** em CDCl_3 .

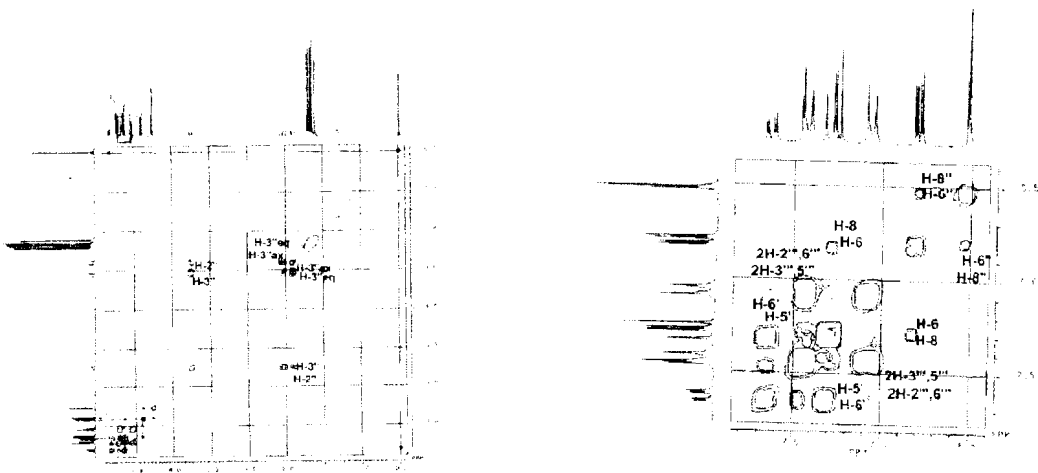


Figura 97: Espectro bidimensional de correlação homonuclear hidrogênio-hidrogênio (^1H , ^1H -COSY, Homocopy) do derivado **73a** em CDCl_3 .

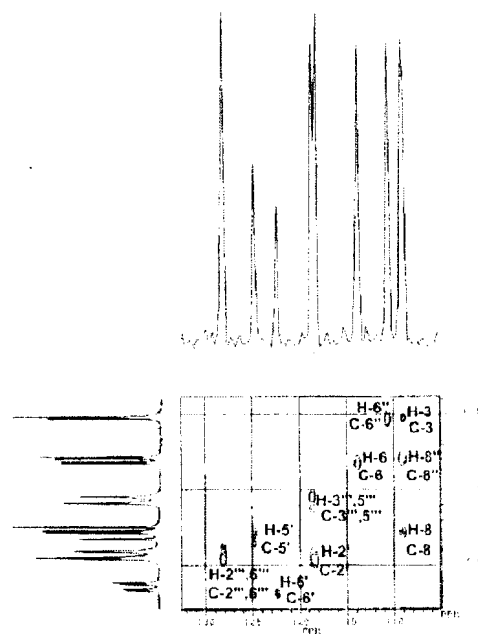


Figura 98: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear hidrogênio-carbono (^1H , ^{13}C -COSY- $^1J_{\text{CH}}$, Heterocosy) do derivado **73a** em CDCl_3 .

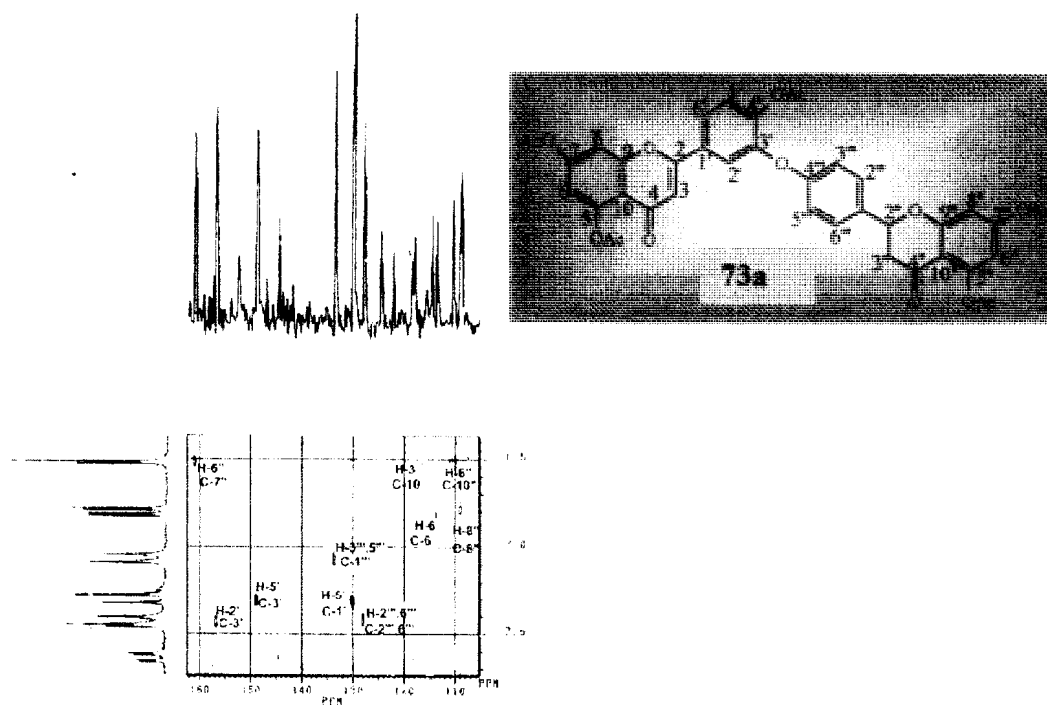


Figura 99: Espectro bidimensional de correlação heteronuclear hidrogênio-carbono (^1H , ^{13}C -COSY, $^nJ_{\text{CH}}$, $n = 2$ e 3 , COLOC) do derivado **73a** em CDCl_3 .

Tabela 19: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado **73a** comparados com os dados da literatura para o pentaacetato da 2,3-diidroचनाflavona²⁰.

73a			Pentaacetato da 2,3-diidroचनाflavona ²⁰	
$^1\text{Hx}^{13}\text{C-HMQC-}^1\text{J}_{\text{CH}}$				
	δ_{C}	δ_{H}		δ_{H}
C			C	
2	167,90	-	2	5,50(dd)
3	108,87	6,51(s)	3	3,00 e 2,82(dd)
4	176,17	-	4	-
5	155,87	12,88 (s, OH)	5	12,92 (s, OH)
6	113,85	6,82(d, J= 2,2 Hz)	6	6,49(d)
7	160,97	-	7	9,73 (s, OH)
8	109,11	7,27(d, J= 2,2 Hz)	8	6,52(d)
9	160,97	-	9	-
10	133,60	-	10	-
1'	144,56	-	1'	-
2'	118,17	7,45(d, J= 2,0 Hz)	2'	7,20(m)
3'	148,80	-	3'	-
4'	150,11	-	4'	-
5'	124,66	7,30(d, J= 8,5 Hz)	5'	7,35(d)
6'	122,29	7,64(dd, J= 2,0 e 8,5 Hz)	6'	7,20(m)
2''	78,97	5,48(dd, J= 13,08 e 2,8 Hz)	2''	5,52(dd)
3''	44,96	3,05(dd, J= 16,7 e 13,08 Hz); 2,78(dd,	3''	6,70(s)
4''	188,99	-	4''	-
5''	156,84	11,99 (s, OH)	5''	12,13 (s, OH)
6''	110,55	5,81 (d, J= 2,0 Hz)	6''	6,83 (d)
7''	163,11	-	7''	9,68 (s, OH)
8''	109,05	5,82 (d, J= 2,0 Hz)	8''	6,86 (d)
9''	168,33	-	9''	-
10''	130,07	-	10''	-
1'''	153,96	-	1'''	-
2'''	128,06	7,36 (d, J= 7,8 Hz)	2'''	7,84 (d)
3'''	118,54	6,83 (d, J= 7,8 Hz)	3'''	7,10 (d)
4'''	151,16	-	4'''	8,61 (s, OH)
5'''	118,54	6,83 (d, 7,8 Hz)	5'''	7,13 (d)
6'''	128,06	7,36 (d, J= 7,8 Hz)	6'''	7,84 (d)
OCH	56,21-	3,75-3,91 (s)	OCH ₃	2,20-2,46

confirmação da proposta estrutural de **73**. Os espectro de RMN de ^1H e (Figura 100) ^{13}C (PND e DEPT, Figura 101, Tabela 20) confirmam a obtenção do derivado devido a presença de três sinais correspondentes as metoxilas. Isto confirma que uma posição oxigenada esta envolvida na junção da unidades.

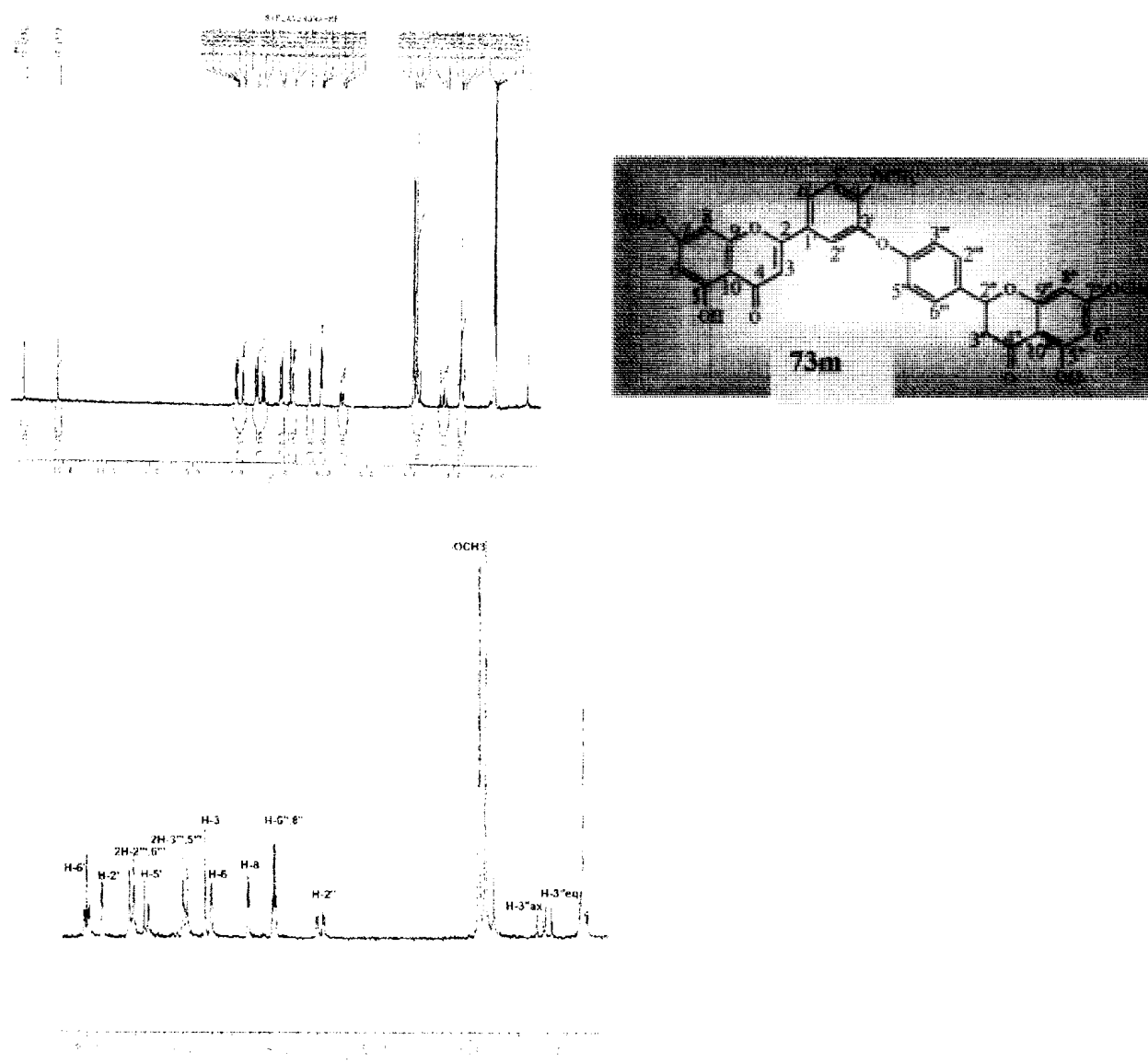


Figura 100: espectro de RMN de ^1H (200 MHz) do derivado **73m** em CDCl_3 .

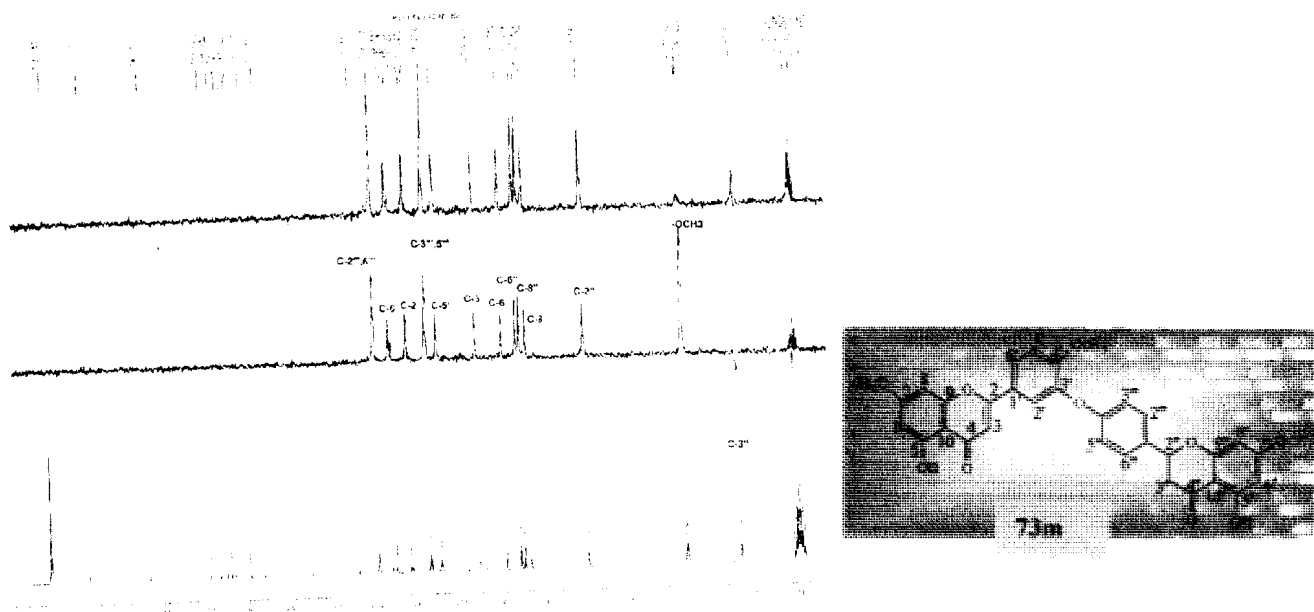


Figura 101: Espectro de RMN de ^{13}C (PND e DEPT) (50 MHz) do derivado **73m** em CDCl_3 .

O derivado **73m** foi submetido ao experimento de RMN-NOEDIFF (**Figura 102**) através da irradiação na frequência dos grupos metoxila, apresentando nOe somente nos dubletos em δ_{H} : 6,11(H-6), 6,37(H-8), 7,06(H-5'), 5,81(H-6'') e 5,82(H-8''). O experimento ROESY também mostra o efeito nOe das metilas em H-6,8; H-5' e H-6'',8'', além das interações homonuclear hidrogênio-hidrogênio (**Figura 103**).

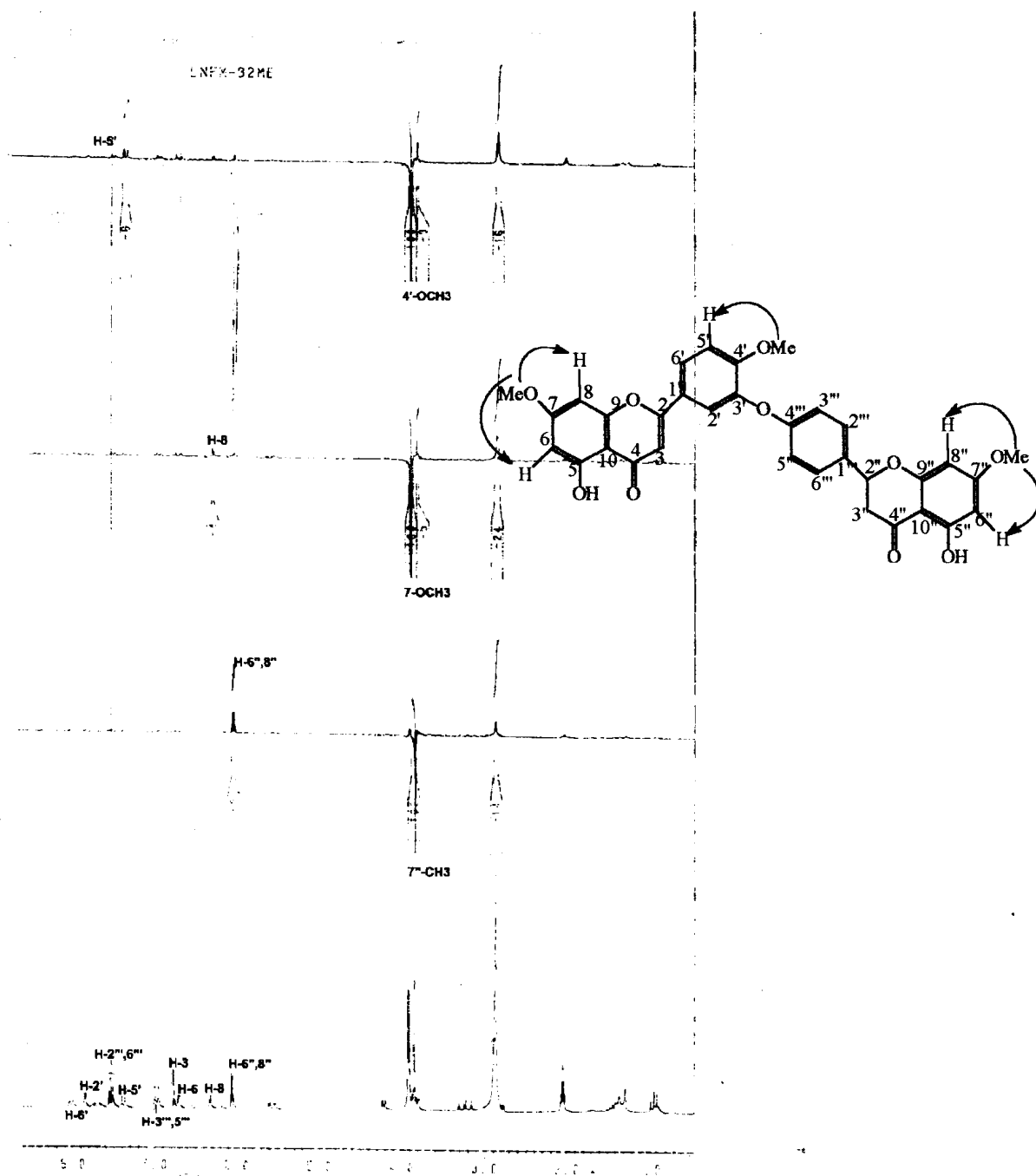


Figura 102: Espectro resultante da irradiação dupla e subtração de espectros (NOE) do derivado **73m** em CDCl_3 .

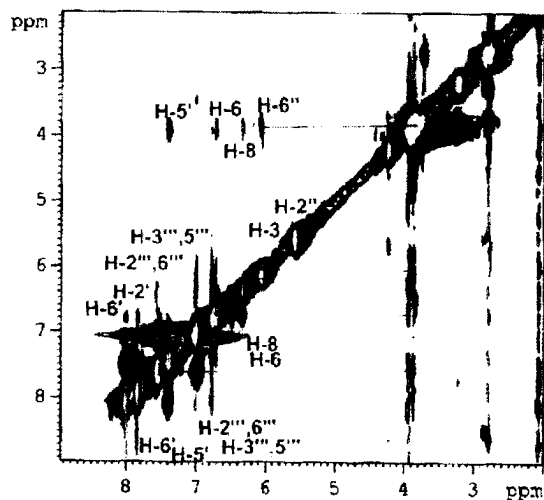
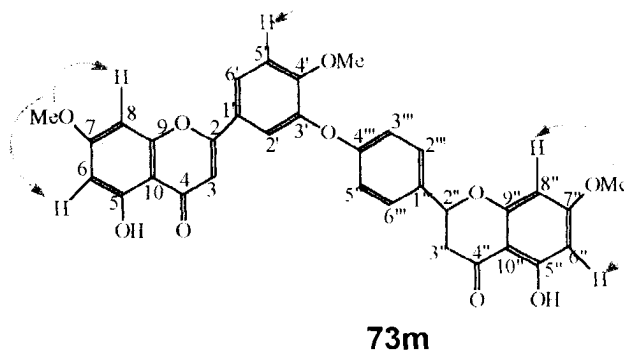


Figura 103: Espectro bidimensional ROESY do derivado **73m** em CDCl_3 .



Os sinais observados no espectro bidimensional de correlação heteronuclear hidrogênio-carbono ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n = 2$ e 3 , HMBC) (**Figura 104**) do derivado **73m**, mostram acoplamentos a longa distância entre C-2 e H-2', C-2 e H-6', C-2'' e H-2''', 6''', C-1' e H-3 e C-1''' e H-3'', os quais confirmam o padrão de substituição do anel B da unidade flavona e flavanona de **73**.

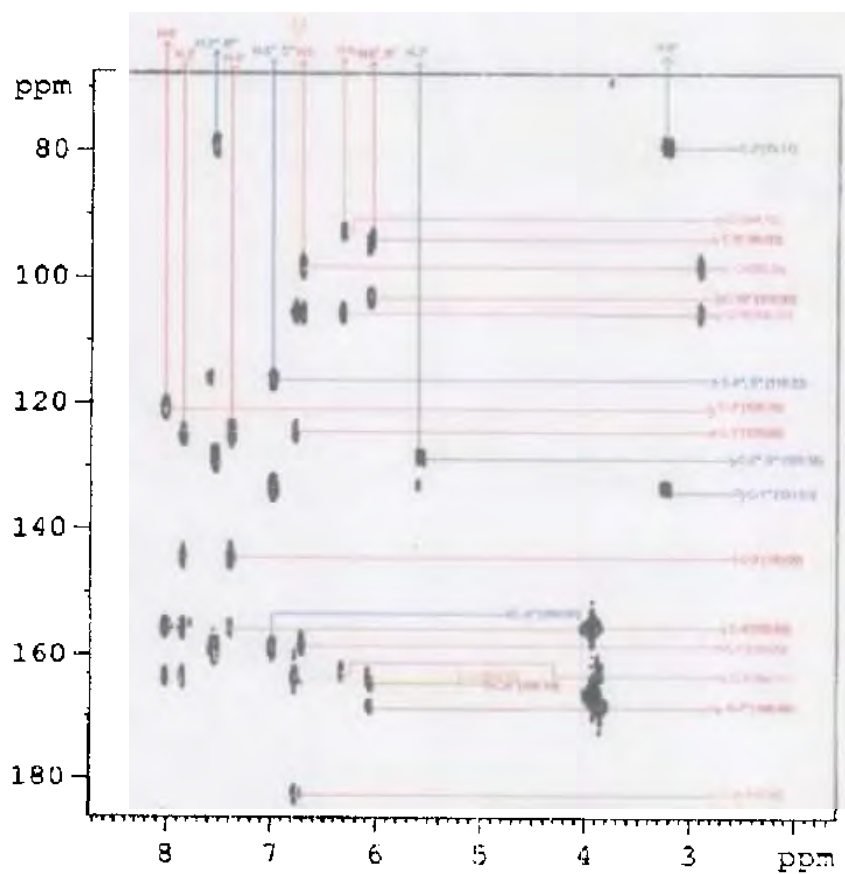


Figura 104: Espectro de correlação heteronuclear de hidrogênio-carbono (^1H , ^{13}C -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$) do derivado **73m** em CDCl_3 .

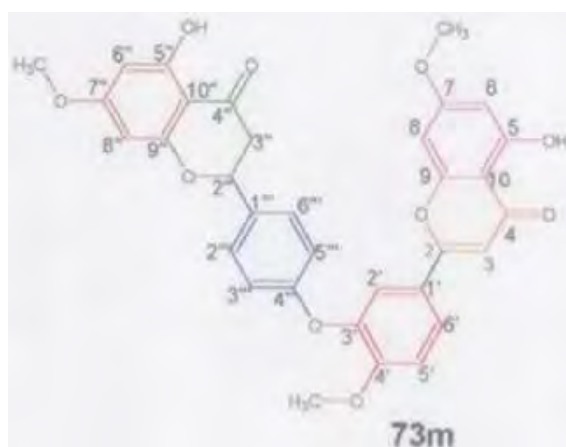
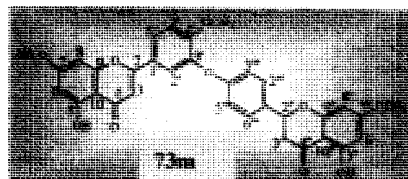


Tabela 20: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do derivado **73m**

73m		
$^1\text{Hx}^{13}\text{C-HMQC-}^1\text{J}_{\text{CH}}$		
C	δ_{C}	δ_{H}
2	162,92	-
3	105,20	6,76(s)
4	183,04	-
5	159,38	12,88 (s, OH)
6	98,78	6,70(d, J= 2,0 Hz)
7	164,96	-
8	94,59	6,30(d, J= 2,0 Hz)
9	159,38	-
10	105,20	-
1'	124,92	-
2'	121,07	7,84(d, J= 2,0 Hz)
3'	144,80	-
4'	156,08	-
5'	114,31	7,37(d, J= 8,7 Hz)
6'	125,19	8,01(dd, J= 2,0 e 8,7 Hz)
2''	79,64	5,53(dd, J= 10,00 e 2,0 Hz)
3''	43,43	3,21(dd, J= 16,7 e 10,00 Hz); 2,82(dd, 16,7 e 2,0 Hz)
4''	197,27	-
5''	163,93	12,11 (s, OH)
6''	95,47	6,04 (d, J= 2,0 Hz)
7''	168,80	-
8''	94,59	6,04 (d, J= 2,0 Hz)
9''	166,57	-
10''	105,20	-
1'''	129,01	-
2'''	133,66	7,54 (d, J= 7,8 Hz)
3'''	116,82	6,83 (d, J= 7,8 Hz)
4'''	156,08	-
5'''	116,82	6,83 (d, 7,8 Hz)
6'''	133,66	6,97 (d, J= 7,8 Hz)
OCH ₃	56,21-56,52	3,75-3,91 (s)



Estas observações confirmam que as duas unidades flavonoídicas estão ligadas através de uma ligação etérea entre os carbonos C-3' e C-4'' (C-3'-O-C-4''). Sendo assim a substância **73** foi definida como um novo biflavonóide 5,7,4'-trihidroxi-flavona-(3'-O-4'')-5,7-dihidroxi-flavanona ou 2'',3''-diidrochnaflavona.

5.6- Identificação dos constituintes isolados do extrato

metanólico das folhas de *Luxemburgia nobilis*(LNFM).

O extrato metanólico das folhas de *Luxemburgia nobilis* forneceu as substâncias **70**(friedelina) e **73**(2",3"-diidroochnaflavona), as quais já foram discutidas anteriormente (páginas 169 e 190). Além desses componentes foram isolados mais um triterpeno (**69**) e um biflavonóide (**72**), os quais serão discutidos a seguir.

5.6.1- Substância **69**.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 105**) da substância **69** apresenta sinal em δ_{H} : 3,33(m) referente ao H-3, além dos sinais para as oito metilas alifáticas entre δ_{H} : 0,74-1,14, sendo sete singletos e um dubleto em δ_{H} : 0,84 (d, $J= 6,4$ Hz). Esta substância apresenta características espectroscópicas semelhantes as observadas para a substância **70** (friedelina) discutida anteriormente (páginas 169-173), o que levou a comparação da substância **69** com os triterpenos pentacíclicos do tipo friedelanos.

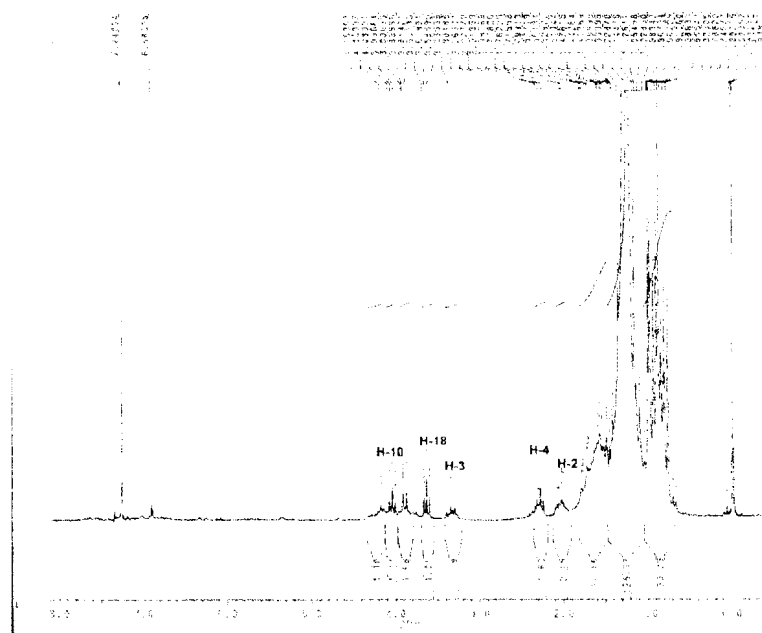
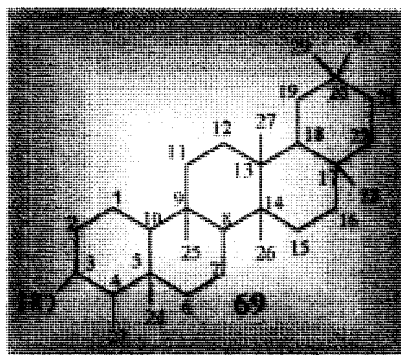


Figura 105: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) da substância **69** em CDCl_3 .



A presença dos grupos metila foi confirmada pelos espectros de RMN de ^{13}C PND (**Figura 106**). A ausência do sinal correspondente a carbonila e a presença do sinal em δ_{C} : 72,18 referente a carbono carbinólico C-3, revela que esta substância corresponde ao *epi*-friedelinol.

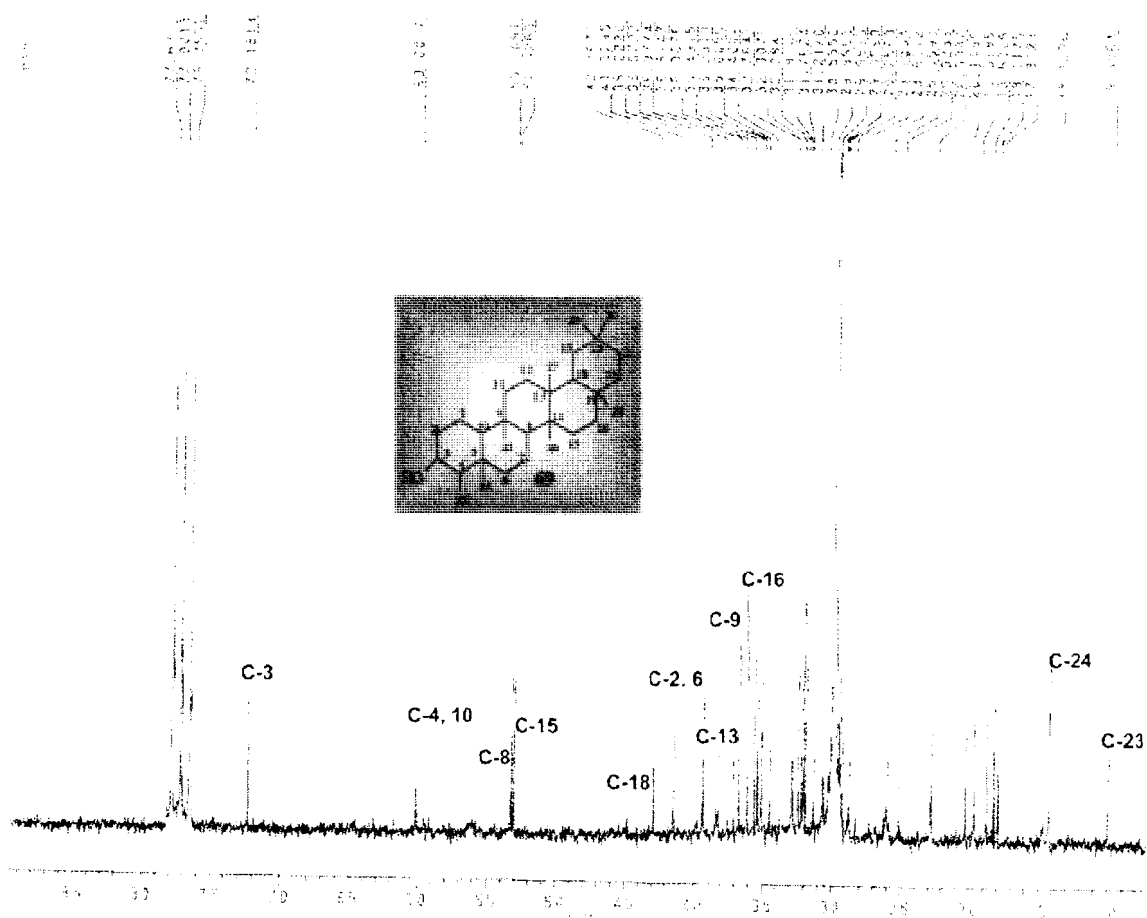
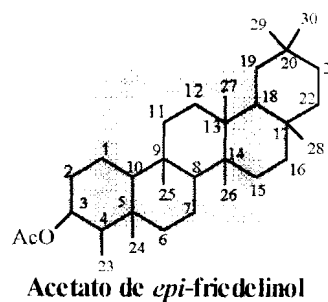
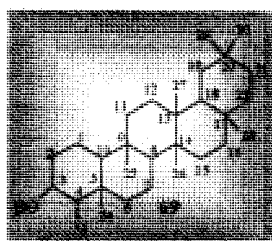


Figura 105: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) da substância **69** em CDCl_3 .

Dados de RMN de ^{13}C registrados na literatura⁷¹ comparados com os dados de **69** (**Tabela 21**) confirmam a proposta estrutural.

Tabela 21: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **69** e comparação com dados de carbono-13 registrados na literatura⁷¹.

C	70		Acetato de <i>epi</i> -friedelinil ⁷¹
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
1		38,07	16,30
2	1,99-2,01 (m)	32,76	32,10
3		72,18	74,50
4	2,22-2,30 (m)	42,76	48,00
5		38,07	37,80
6		41,32	41,60
7		17,81	17,60
8	4,03 (t)	53,11	53,10
9		36,97	37,00
10		60,00	60,90
11		35,28	35,30
12		30,55	30,50
13		38,07	38,30
14		39,22	39,60
15		32,30	32,30
16		36,00	36,00
17		29,96	29,90
18	3,61(t)	42,76	42,80
19		35,28	35,50
20		28,69	28,10
21		32,76	32,80
22		39,22	39,20
23	0,86 (d, J= 6,6 Hz)	9,89	11,20
24	0,74 (s)	14,11	15,70
25	0,85 (s)	18,11	18,10
26	0,96(s)	18,63	18,50
27	0,92 (s)	20,14	20,00
28	0,98 (s)	32,06	32,00
29	1,02 (s)	35,00	34,90
30	1,12(s)	31,76	31,70



5.6.2 Substância 72.

A substância **72** apresentou características espectroscópicas semelhantes às observadas para a biflavona **71** (página 175), estando presente em pequena porcentagem com a **71**. A principal diferença está na presença de um singlete em δ_H : 3,81 (s) no espectro de RMN de 1H (**Figura 107**) correspondente a um grupo metoxila. O espectro de correlação homonuclear hidrogênio-hidrogênio (Homocopy, **Figura 108**), mostra os acoplamentos entre um sistema AA'BB' (H-2''',6''' com H-3''',5''') para uma das unidades do biflavonóide e entre os hidrogênios aromáticos H-6' com H-5' pertencentes ao anel B 3', 4'- dissustituído.

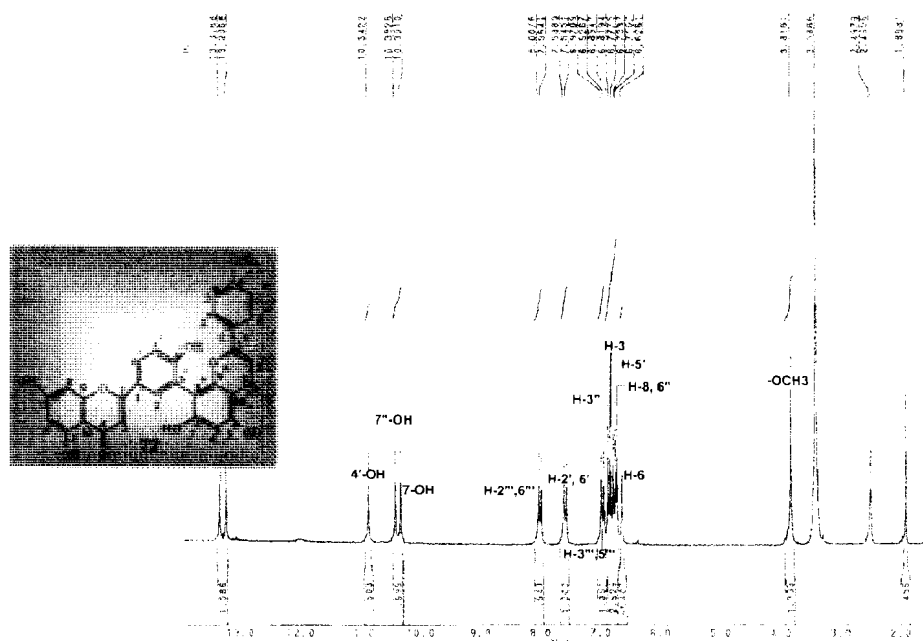


Figura 107: Espectro de RMN de 1H (200 MHz) da substância **72** em DMSO.

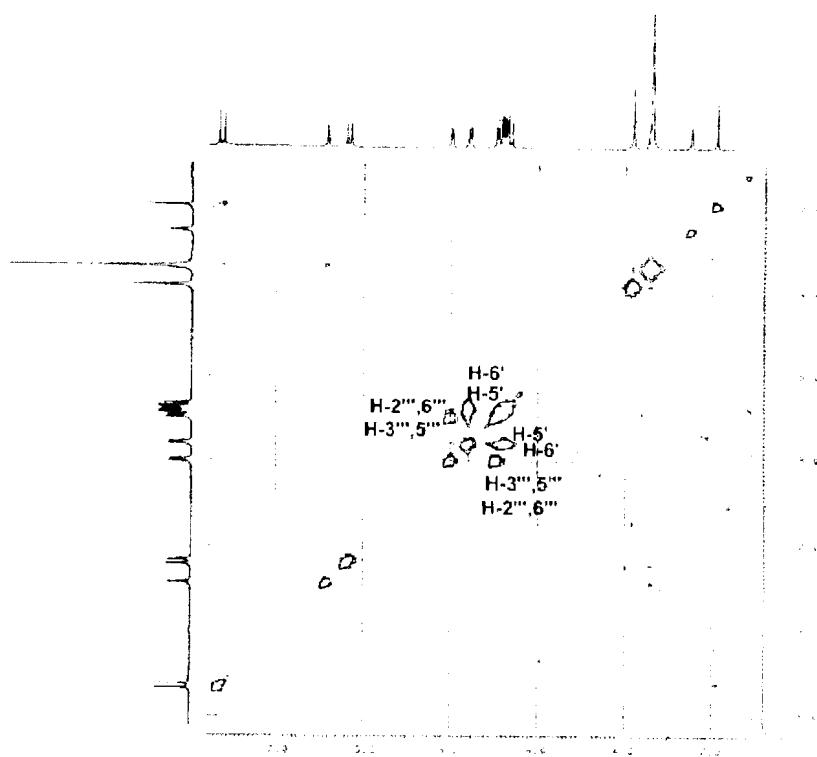
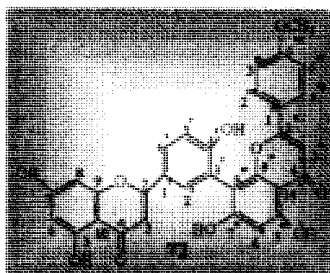


Figura 108: Espectro de correlação homonuclear hidrogênio-hidrogênio (^1H , ^1H -COSY, Homocosy) da substância **72** em DMSO.



A presença do grupo metila foi confirmada pelos espectros de RMN de ^{13}C PND em δ_{C} : 56,44 ppm (Figura 109, Tabela 22). Comparação dos dados de RMN ^{13}C da substância 72 com dados da literatura⁷² (Tabela 22), mostra que esta substância é o biflavonóide podocarpusflavona A.

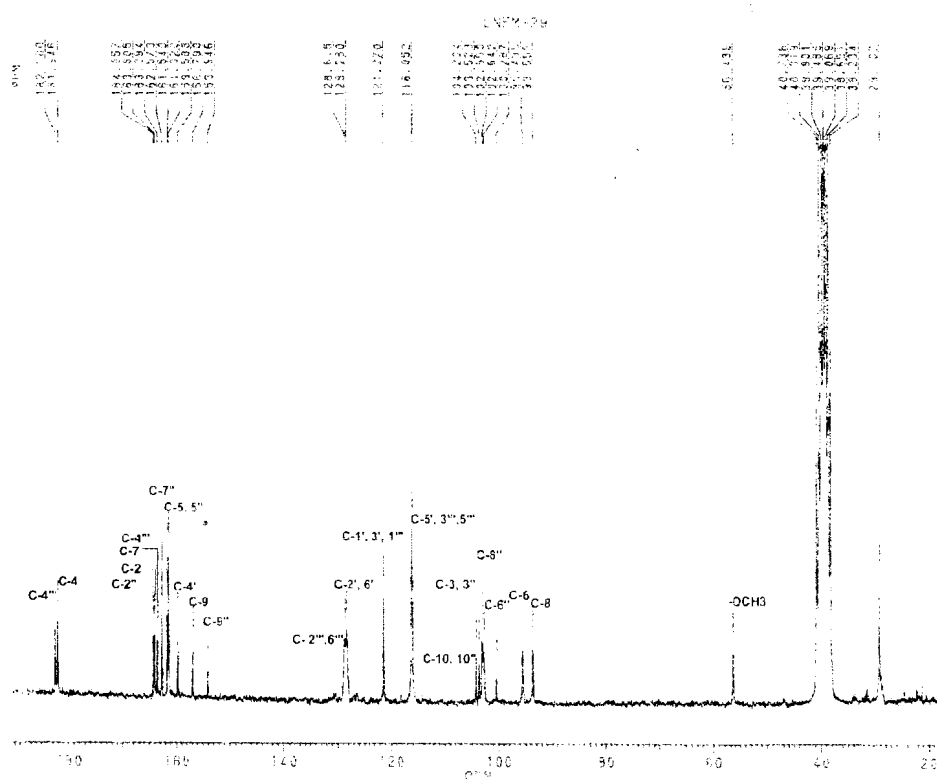


Figura 109: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz) da substância 72 em DMSO.

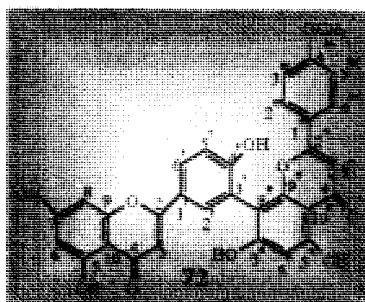
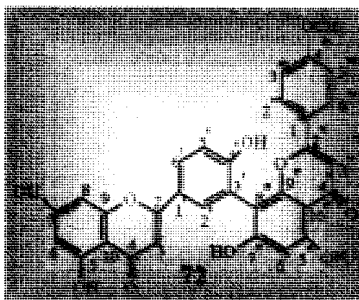
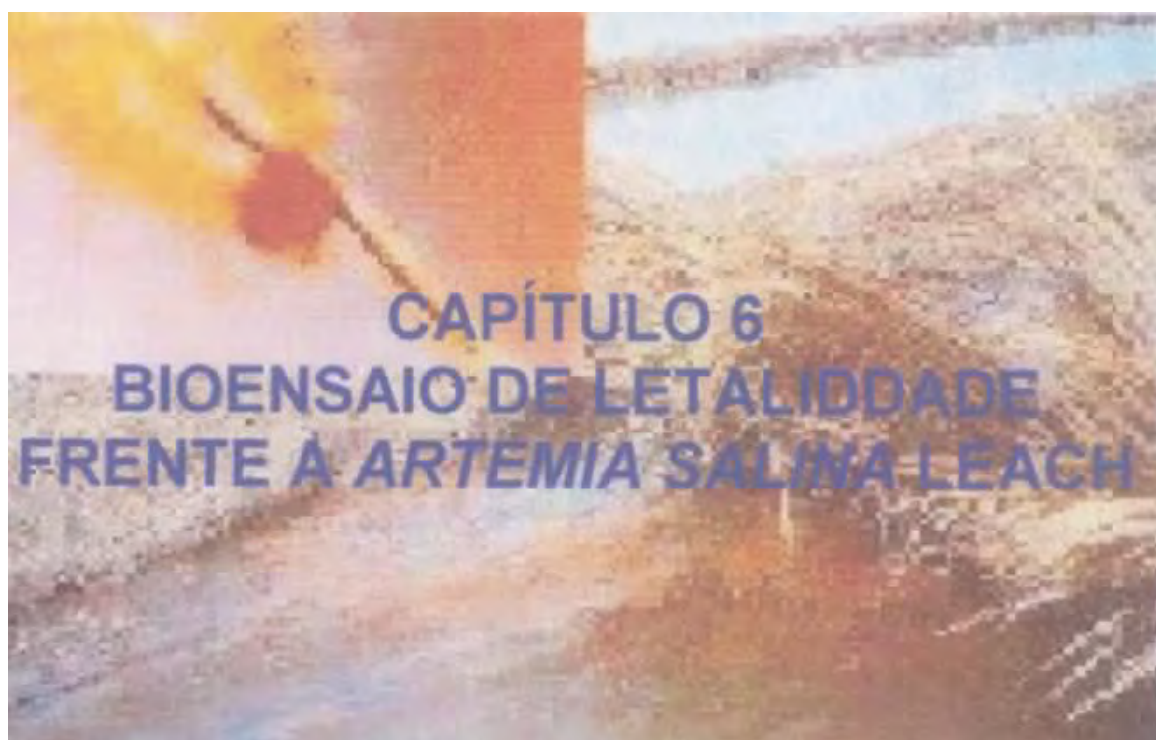


Tabela 22: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **72** e comparação com os δ_{C} registrados na literatura da podocarpusflavona A⁷².

C	72		Podocarpusflavona A ⁷²
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
2	-	163,90	163,90
3	6,63 (s)	103,52	103,20
4	-	181,94	181,60
5	-	161,54	161,50
6	6,73 (s)	95,49	98,90
7	-	163,39	163,30
8	6,62 (s)	93,55	94,00
9	-	156,79	157,40
10	-	104,20	104,10
1'	-	121,27	120,10
2'	8,10 (d, J= 2,4 Hz)	128,28	127,70
3'	-	121,27	121,30
4'	-	159,58	159,40
5'	7,22 (d, J= 8,7 Hz)	116,05	116,30
6'	8,0(dd, J= 2,4 e 8,7	128,28	131,30
2''	-	164,05	164,10
3''	6,62 (s)	103,52	103,20
4''	-	182,38	182,10
5''	-	161,32	160,60
6''	6,71 (s)	102,64	98,90
7''	-	161,54	161,90
8''	-	102,95	103,20
9''	-	153,94	154,60
10''	-	104,20	103,80
1'''	-	121,27	122,60
2''', 6'''	7,98 (d, J= 8,7 Hz)	128,28	127,90
3''', 5'''	6,94 (d, J= 8,7 Hz)	116,05	114,50
4'''	-	162,57	162,30





CAPÍTULO 6
BIOENSAIO DE LETALIDADE
FRENTE A ARTEMIA SALINA LEACH

6 - BIOENSAIO DE LETALIDADE FRENTE A *ARTEMIA SALINA* LEACH.

Pesquisar a atividade biológica de extratos de plantas e de substâncias naturais isoladas destes extratos é uma estratégia importante na procura de substâncias bioativas. Na pesquisa com produtos naturais, as técnicas de separação, os métodos de elucidação estrutural e os bioensaios, devem ser combinados para que os resultados sejam mais completos.

O teste de letalidade frente a *Artemia salina* Leach é proposto como um bioensaio simples para a investigação de produtos naturais. *Artemia salina* tem sido previamente utilizado em vários sistemas de bioensaios, através dessas aplicações tem sido analisados resíduos de pesticidas, micotoxinas, anestésicos, substâncias carcinogênicas entre outros⁷³.

O bioensaio utilizando *Artemia salina* determina valores de DL₅₀ em µg/ml de substâncias ativas em meio de salmoura. O método é rápido, confiável e

barato além de utilizar pequenas quantidades de material, sendo assim uma ótima ferramenta para bioensaios⁷⁴.

A finalidade deste método é prover uma avaliação primária que pode servir de apoio para bioensaios mais específicos. As ovas de *Artemia salina* são oferecidas comercialmente a baixo custo e podem ser usadas, se mantidas secas e refrigeradas, por vários meses.

As larvas quando colocadas em água de mar artificial eclodem no período de 48 horas e são atraídas por luz artificial. As substâncias são tratadas a várias concentrações, por replicata, em tubos de vidro tendo água de mar artificial e um número determinado de larvas (**Capítulo 4**, pág.54). As larvas mortas e vivas são contadas após de 24 horas e os valores de DL₅₀ (Dose Letal-50%) são calculados utilizando métodos estatísticos. Os resultados para os extratos testados foram:

<i>Extratos Testados</i>	<i>DL₅₀ (ppm)</i>
Hexânico do caule (LNGH)	>841,81
Metanólico do caule (LNGM)	>961,81
Hexânico das Folhas (LNFH)	>860,66
Acetato de etila das folhas (LNFA)	>930,33
Metanólico das folhas (LNFM)	>950,90

Os extratos ou as substâncias com valores de DL_{50} menores que 1000 ppm tem sido considerados como ativos⁷⁴. Os dados obtidos para os extratos mostram que estes não apresentam citotoxicidade frente a *Artemia salina*, com isto o fracionamento guiado por este bioensaio não foi realizado. Mas o novo biflavonóide 2",3"-diidroochnaflavona foi testado e apresentou como resultado uma $DL_{50} > 485,45$ ppm ou $DL_{50} > 1,11$ μ M, não apresentando também citotoxicidade frente a este microcrustáceo. Este biflavonóide também foi testado contra *Tripanossoma cruzi* (teste in vitro, forma sanguínea) pelo professor doutor Egler Giari (ICB –Univ. Fed. de MG.), não sendo ativo.

7. CONCLUSÃO

Este trabalho gerou informações novas quanto a química da família Ochnaceae e em particular para o gênero *Luxemburgia* pois este é o primeiro estudo fitoquímico do mesmo.

O presente estudo permitiu o isolamento de metabólitos especiais pertencentes a diferentes classes de substâncias naturais. Os resultados obtidos confirmam a tendência das plantas pertencentes a Ochnaceae biossintetizarem biflavonóides com diferentes formas de ligação entre as unidades. É reportado neste trabalho a inclusão de três substâncias novas na literatura, incluindo dados espectrométricos.

A discussão dos dados espectrométricos de algumas das substâncias isoladas permitiram esclarecer várias dúvidas da literatura.

A avaliação preliminar de atividade dos extratos e substâncias isoladas desta planta com *Artemia salina* não forneceu resultados positivos mas não se deve desconsiderar a avaliação com outros ensaios mais específicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Harborne, J. B.; Introducción a la Bioquímica Ecológica, Editorial Alhambra, S.A., 46, (1985).
- 2- Gomes, C.M.R.; Gottlieb, O.R.; Bettolo, G.B.M.; Monache, F.D. e Polhill, R.M. *Biochem. Syst. And Ecol.*, **9**, 129 (1981).
- 3 - Emerenciano, V.P.; Ferreira, Z. S.; Kaplan, M.A.C.; Gottlieb, O.R. *Phytochemistry*, **26**, 3103 (1987).
- 4 - Gottlieb, O. R. *Phytochemistry*, **28**, 2545 (1989).
- 5 - Hegnauer, R.; Grayer-Barkmeijer, R.J.; *Phytochemistry*, **34**, 3(1993).
- 6- Bently, M.D.; Hassanali, A.; Lwande, W.; Niorage, P.G.W.; Ole Sitayo, E.N.; Yatagai, M.; *Insect. Sci. Its Appl.*, **8**, 85(1987); *Chem. Abstr.*, **108**: 128914s(1988).
- 7- Ashendel, C.L.; Staller, J.M.; Boutwell, R.K.; *Cancer Res.*, **43**, 4333(1983)
- 8- Hou, R.S.; Dah, C.Y.; Wang, S.K.; Chang, T.T.; *Phytochemistry*, **35**, 271(1994).
- 9 - Grynberg, N.F.; Martorrelli, R.A.; Carvalho, M.G. de; Moreira, I.C.; Santos, A.C.S.; Echevarria, A.; *Proceedings of the XVI International Cancer Congress*, 63(1994).
- 10 - Grynberg, N.F.; Martorrelli, R.A.; Carvalho, M.G. de; Velandia, J.R; Brioso, P.S.T.; Echevarria, A.; Braz-Filho, R.; *Proceedings of the XVII International Cancer Congress*, 317(1998).
- 11- Cody, V.; Junior, E.M.; Harborne, J.B.; Plant Flavonoids in Biology and Medicine, Alan R. Liss, Inc., 486(1986).
- 12- Krieglstein, J.; Beck, T.; Seibert, A.; *Life Science*, **39**, 2327(1986), *Chem. Abstr.*, **106**:436996f (1987).
- 13- Drewes, S.E.; Hudson, N. A.; Bates, R. B.; Linz, G. S.; *Tetrahedron Lett.*, **25**, 105(1984).
- 14- Drewes, S.E.; Hudson, N. A.; *Phytochemistry*, **22**, 2823(1983).
- 15- Thi, R.G.; Sondegam, M. T.; Martin, M.T.; Bodo, B.; *Tetrahedron Lett.*, **29**, 5797(1988).

- 16- Thi, R.G.; Sondegam, M. T.; Martin, M.T.; Bodo, B.; *Phytochemistry*, **28**, 1557(1989).
- 17- Thi, R.G.; Sondegam, M. T.; Martin, M.T.; Bodo, B.; *Tetrahedron Lett.*, **30**, 1807(1989).
- 18- Thi, R.G.; Sondegam, M. T.; Martin, M.T.; Bodo, B.; *Phytochemistry*, **29**, 2289(1990).
- 19- Messanga, B.B.; Tihn, R.G.; Kimbu, S.F.; Sondegam, B.L.; *J. Nat. Prod.*, **55(2)**, 245 (1992).
- 20- Rao, K. V.; Sreeramulu, K.; Rao, C. V.; Gunasekar, D.; *J. Nat. Prod.*, **60**, 632 (1997).
- 21- Kamil, M.; Khan, N. A.; Alam, M.S.; Ilyas, M.; *Phytochemistry*, **26**, 1171(1987).
- 22- Okigawa, M.; Kawano, N.; Alquik, M.; Rahman, W.; *J. Chem. Soc. Perkin I*; 580 (1976).
- 23- Reddi, K.C.; Kumar, K. A.; Srimannarayana, G.; *Phytochemistry*, **26**, 580(1989).
- 24- Rao, C.V.; Gunasekar, D.; *Ind. Journ. Chem.*, **28B**, 780(1989).
- 25- Key, M.C., Watermam, P.G.; *Biochem. Syst. Ecol.*, **8**, 401(1980).
- 26- Silva, C.J.; Oliveira, M.C.C.; Carvalho, M.G.de; Livro de Resumos do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, **03.201**, 165 (1998).
- 27- Carvalho, G.J.A.; Cranji, D.C.; Carvalho M.G.de; Braz-Filho, R.; Livro de Resumos da 20ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **2**, PN-026(1997).
- 28- Craveiro, M. I.; Sobrinho, D.C.; De Carvalho, M.G.de; Braz-Filho, R.; *Phytochemistry*, **35**, 1567(1994).
- 29- Moreira, I.C.; Carvalho de, M.G.de; Bastos, A.B.F.O.; Braz-Filho, R.; *Phytochemistry*, **51**, 833 (1999).
- 30- Moreira, I.C.; Estudo Químico de *Ouratea hexasperma*, Tese de Mestrado, ICE-Departamento de Química – CPGQO-da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, (1994).
- 31- Felício, J.D.; Gonçalves, E.; Braggio, M.M.; Constantino, L.; Albasini, A.; Lins, A. P.; *Planta Med.*, **61**, 217 (1995).

- 32- Velandia, J.R.; Constituintes Químicos de Ouratea Semiserrata e Transformações Químicas da Neolignana Aureina, Tese de Doutorado, Departamento de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, (1997).
- 33- Monache, F. D.; Albuquerque, L. I.; Ferrari, F.; Bettolo, G. B. M.; *Tetrahedron Lett.*, **43**, 4211(1967).
- 34- De Oliveira, M.M.; Sampaio, M.P.; Simon, F.; Gilbert, B.; Mors, W.B.; *Annais da Academia Brasileira de Ciências*, **44**, 42(1972).
- 35- Pak, A.; Felício, J.D.; Braggio, M.M.; Gonzalez, E.; Cordeiro, I.; *Livro de Resumos da Soc. Bras. de Quím.*, PN-052, (1997).
- 36- Bankova, V.S.; Popov, S.S.; Marekov, N.L.; *J. Chrom.*, **242**, 135(1982)
- 37- Agrawal, P.K.; Rastogi, R.P.; *Heterocycles*, **16**, 2181(1981).
- 38- Agrawal, P.K.; Carbon-13 NMR of Flavonoids, Elsevier, Amsterdam (1989).
- 39- Harborne, J. B.; The Flavonoids: Advances in Research since 1986, Chapman & Hall , London, (1993).
- 40- Chari, V. M.; Ilyas, M.; Wagner, H.; Neszmélyi, A.; Chen, F.; Chen, L.; Lin, Y.; *Phytochemistry*, **16**, 1273 (1977).
- 41- Harborne, J. B.; Mabry, T.J.; Mabry, H.; The Flavonoids, Chapman & Hall , London, (1975).
- 42- Eliel, E.L.; Wilen, S.H.; Stereochemistry of Organic Compounds, John Wiley & Sons, INC., 1007 e 1142, (1994).
- 43- Rahman, A.; Studies in Natural Products Chemistry, Elsevier, **2**, 170 (1988).
- 44 - Barroso, G. M.; Sistemática de Angiospermas do Brasil, UFV-MG, 130 (1986).
- 45- Pouchert, C. J.; Behnke, J.; Aldrich Livrary of ¹³C and ¹H NMR Spectra, Ed I, Vol. L and 2 (1993).
- 46- Pereira Junior, O. L. ; Wolter Filho, W.; Rocha, A. F. I. da; Carvalho, M. G. de; Braz-Filho, R.; *Química Nova*, **13**(4), 247-49 (1990).
- 47 - Honda, N. K.; Vilegas, W.; *Química Nova*, **21**(6), 113 (1998).

- 48- Thune, P.; Solberg, Y.; McFadden, N.; Starefelt, F.; Sandberg, M.; *Contact Dermatitis*, **8**(6), 396-400, (1982).
- 49 - Huneck, S.; Linscheid, P.; *Z. Naturforschg*, **23**(b), 717, (1968).
- 50 - Francis, G. W.; Veland, K.; *J. Chromatography*, **219**, 379, (1981).
- 51- Dey, P.M.; Harborne, J.B.; Plant Biochemistry, Academic Press, Inc., USA, (1997), 417.
- 52 - Mann, J.; Chemical Aspects of Biosynthesis, Oxford University Press Inc., New York, (1994), 42.
- 53- Goulart, M.O.F.; Sant'Ana, A.G.E.; Lima, R.A. de; Cavalcante, S. H.; Carvalho, M.G.de; Braz-Filho, R.; ; *Química Nova*, (1993), **16**(2), 95.
- 54-Bilia, A. R.; Mendez, J.; Morelli, I.; *Pharm. Acta Helv.*, **71**, 191-197 (1996).
- 55 - Itoh, T.; Yoshid, K.; Tamura, T.; Matsunceto, T.; *Phytochemistry* , **21** (3), 727 (1982).
- 56- Olea, R. S. G.; Roque, N. F.; *Química Nova*, **13**(4), 278 (1990).
- 57 - Mahato, S. B.; Kundu, P.; *Phytochemistry* , **37**(6), 1517 e 1558 (1994).
- 58 - Hegnauer, R.; Grayer-Barkmeijer, R.J.; *Phytochemistry*, **34**, 3 (1993).
- 59 - Harborne, J.B.; *The Flavanoids*, Chapman and Hall, London (1996).
- 60 - Harbone, J. B.; Recent Advanceces in Phytochemistry, **4**, 107(1972).
- 61- Mann, J.; Secondary Metabolism, Claredon Press, Oxford (1987).
- 62 - Grundon, M.F.; *Tetrahedron*, **34**, 143(1978).
- 63 - Crombie, L.; Dewick, P.M.; Whiting, D.A.; *J. Chem. Soc., Perkin I*, 1285 (1973).
- 64 - Crombie, L.; Holden, I.; Kilbee, G.W.; Whiting, D.A.; *J. Chem. Soc. Perkin I*, 789 (1982).
- 65- Markham, K. R.; Geiger, H.; "¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids and Their Glycosides in Hexadeuterodimethylsulfoxide" in The Flavonoids, Advances in Research Since 1986, ed. by J. B. Harborne, 1st ed., 1994, Chapman & Hall, N.Y., USA.
- 66- Agrawal, K. P.; Bansal, M. C.; Porter, L. J.; Foo, L. Y.; Carbon-13 NMR of Flavonoids, Elsevier Science Publishers B. V., New York – USA. 432-496 (1989).

- 67 - Oliveira, M.C.C. de; Carvalho, M.G. de; *Química Nova*, **22** (2), 182 (1999).
- 68- Achembach, H.; Stocher, M.; Constenia, M.A.; *Phytochemistry*, **27**(6), 1835 (1988).
- 69- Hano, Y.; Suzuki, S.; Nomura, T. Veda, S.; *Heterocycles*, **29**, 807 (1989).
- 70- Linuma, M.; Mizuno, M.; *Phytochemistry*, **28**, 681 (1989).
- 71- Patra, A.; Mukhopadhyay, A. K.; Mitra, A.; *Org. Magn. Reson.*, **17** (3), 166 (1981)
- 72 - Markam, R. K.; Sheppard, C.; Geiger, H.; *Phytochemistry*, **26** (12), 3335 (1987).
- 73- Ateekul, S.; *J. Ag. Food Chem. S.*, 32 (1960).
- 74- Brown, R. F.; *J. Assoc. Oil. Anal. Chem.*, **51**, 905 (1968).