

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

TESE

**Metabólitos Especiais Isolados das Raízes de *Andira
anthelmia* (Vell.) Macbr., *Andira fraxinifolia* Benth.
(Leguminosae) e das Folhas de *Palicourea coriacea*
(Cham.) K. Schum. (Rubiaceae)**

Virginia Claudia da Silva

2006

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

METABÓLITOS ESPECIAIS ISOLADOS DAS RAÍZES DE *Andira
anthelmia* (VELL.) MACBR., *Andira fraxinifolia* BENTH.
(LEGUMINOSAE) E DAS FOLHAS DE *Palicourea coriacea* (CHAM.) K.
SCHUM. (RUBIACEAE)

VIRGINIA CLAUDIA DA SILVA

Sob a Orientação do Professor
Dr. Mário Geraldo de Carvalho

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutora em Ciências, no
Programa de Pós-Graduação em
Química Orgânica, Área de
Concentração em Química de
Produtos Naturais

Seropédica, RJ
Novembro de 2006

547.7046
S586m
T

Silva, Virginia Claudia da, 1975-
Metabólitos especiais isolados
das raízes de *Andira anthelmia*
(VELL.) MACBR., *Andira*
fraxinifolia BENTH. (Leguminosae)
e das folhas de *Palicourea*
coriacea (Cham.) K. Schum.
(Rubiaceae) / Virginia Claudia da
Silva. - 2006.
236f.

Orientador: Mário Geraldo de
Carvalho.

Tese (doutorado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Instituto de Ciências
Exatas.

Bibliografia: f. 227-236.

1. Química Orgânica - Teses.
2. Produtos naturais - Teses. 3.
Leguminosa - Raízes - Análise -
Teses. 4. Rubiácea - Raízes -
Análise - Teses. 5. Química
vegetal - Teses. I. Carvalho,
Mário Geraldo de, 1952- II.
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Instituto de Ciências
Exatas. III. Título.

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

VIRGINIA CLAUDIA DA SILVA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica, área de Concentração em Química de Produtos Naturais.

TESE APROVADA EM 24/11/2006




Dr. Mário Geraldo de Carvalho DEQUIM-UFRuralRJ
(Orientador)



Dr. Marco Edilson Freire de Lima (DEQUIM-UFRuralRJ)



Dr. Walmir Silva Garcez (Dept^o. Química-UFMS)



Dr. Ronald Bastos Freire (IB-UFRuralRJ)



Dr. José Paz Parente (NPPN-UFRJ)

Dr. Raimundo Braz-Filho (CCT-LCQ-UENF)

Dra. Cláudia Moraes de Rezende (IQ-UFRJ)

Aos meus pais José Paulino e Jesuína, pelo carinho, compreensão e apoio dedicados.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

Ao Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho pela orientação segura e conhecimentos transmitidos, por sua atenção e paciência concedidas a mim durante o desenvolvimento desse trabalho e principalmente por sua amizade da qual não me esquecerei;

Aos amigos do LQPN-UFRuralRJ: Luciano, Luiz Roberto (Pilha), Mário Sérgio e Maritza, pela amizade e pelos momentos de descontração que passamos juntos e aos novos amigos Renata e Eduardo (Ceará);

Ao amigo Luciano pela amizade, troca de idéias e pelos “bons” e “maus” momentos;

À Maritza A. Rojas Cardozo pelo incentivo e otimismo. Agradeço, acima de tudo, pelo privilégio de conviver com uma excelente pessoa que se tornou uma grande amiga;

À Ana Paula, Aline, Alessandra, Lorena e José Geraldo pela amizade, agradável convivência e auxílio durante a realização deste trabalho;

A todos os colegas do PPGQO, sem exceção, pelo bom relacionamento durante este período;

Especial aos amigos Ari, Cláudio, Cléber, Janaína, Kênia, Regina, Rose e Sheilla pela amizade e apoio;

A Prof^ª. Dr^ª. Áurea Echevarria juntamente com a doutoranda Kênia pelas avaliações feitas nos ensaios de atividade antioxidante;

Ao Prof. Dr. Hélcio Borba Rezende (IB-UFRRJ) pelas avaliações de atividade anti-helmíntica;

Aos professores do PPGQO pela formação e evolução profissional;

Aos funcionários do ICE-UFRRJ, Áurea Tatagiba (In Memoriam), Carlão, Eli, Fábio, Frances, Maurício e Osmar;

Ao Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira do CENAUREMN, Curso de Pós-graduação em Química Orgânica da UFC pela obtenção dos espectros a 500 MHz;

À Universidade Estadual Fluminense pela obtenção dos espectros a 400 MHz, em especial ao Prof. Dr. Jan Schripsema;

À FIOCRUZ (CIVA) pela obtenção dos espectros a 500 MHz;

A Prof^ª. Dr^ª. Sandra Lúcia da Cunha e Silva da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESBA) pela coleta das espécies de Andira;

As amigas Ada, Ana Luisa, Ana Paula, Daniele, Eliane, Fabiana, Fernanda, Josi, Maritza, Michelle, Nídia, Renata, Sabrina, Silvana, Simone e Veridiana do alojamento da Pós Graduação pelos “bons” momentos nem um pouco comportados e felizes;

Desde já, à banca examinadora, pelas sugestões e correções sugeridas a este trabalho;

À UFRRJ, pela oportunidade e acolhimento;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos e ao CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro aos projetos do nosso grupo de pesquisas;

A todos que, de algum modo, me ajudaram na realização deste trabalho;

Aos meus pais José Paulino e Jesuína e aos meus irmãos Júnior e Cristina que mesmo distantes, me apoiaram nas decisões e me incentivaram em todos os momentos;

Enfim, muito obrigada!!!

*Posso ter defeitos, viver ansioso e
ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço
de que minha vida é a maior empresa do mundo.
E que posso evitar que ela vá à falência.
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver,
apesar de todos os desafios,
incompreensões e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e
se tornar um autor da própria história.
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz
de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.
É agradecer a Deus a cada manhã pelo
milagre da vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.
É saber falar de si mesmo.
É ter coragem para ouvir um "não".
É ter segurança para receber uma crítica,
mesmo que injusta.
Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia
vou construir um castelo..."*

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Objetivos	3
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1	Generalidades Sobre a Família Leguminosae e o Gênero <i>Andira</i>	4
2.1.1	Aspectos botânicos de <i>Andira fraxinifolia</i> Benth., 1838 e <i>Andira anthelmia</i> (Velloso, 1829) MaCbride (1934).....	5
2.1.2	Aspectos químicos e biológicos do gênero <i>Andira</i>	8
2.2	Generalidades Sobre a Família Rubiaceae e o Gênero <i>Palicourea</i>	12
2.2.1	Aspectos botânicos de <i>Palicourea coriacea</i> (Cham.) K. Schum.....	14
2.2.2	Aspectos químicos e biológicos do gênero <i>Palicourea</i>	15
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1	Materiais e Métodos Utilizados no Isolamento e Identificação Estrutural das Substâncias Isoladas	19
3.1.1	Derivatizações	19
3.1.1.1	Metilação com diazometano	19
3.1.1.2	Acetilação com anidrido acético e piridina.....	20
3.1.1.3	Reação com iodo.....	20
3.2	Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos de <i>Andira anthelmia</i>	20
3.2.1	Estudo químico da fração AARMA	21
3.2.2	Estudo químico da fração AARMB	23
3.3	Isolamento e Purificação dos Constituintes de <i>Andira fraxinifolia</i>	27
3.3.1	Estudo químico da fração AFRMH.....	28
3.3.2	Estudo químico da fração AFRMA.....	30
3.4	Ensaio da Atividade Antioxidante	35
3.4.1	Geral	35
3.4.2	Preparo das amostras.....	36
3.4.3	Preparo do teste	36
3.4.4	Análise estatística.....	36
3.5	Avaliação da Atividade Anti-helmíntica.....	37
3.5.1	Execução do teste	38
3.5.2	Análise estatística.....	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	Substâncias Isoladas das Raízes de <i>Andira anthelmia</i>	39
4.1.1	Derivados obtidos a partir das substâncias isoladas das raízes de <i>A. anthelmia</i>	40
4.1.1.1	Determinação estrutural das substâncias isoladas e derivados	40
4.1.1.1.1	Identificação da substância 1	40
4.1.1.1.2	Identificação da substância 2	44
4.1.1.1.3	Transformações químicas na substância 2.....	49
4.1.1.1.4	Identificação da substância 3	75
4.1.1.1.5	Identificação da substância 4	77
4.1.1.1.6	Identificação da substância 5	81
4.1.1.1.7	Identificação da substância 6	84
4.1.1.1.8	Identificação da substância 7	93
4.1.1.1.9	Identificação da substância 8	96
4.1.1.1.10	Identificação da substância 9	100
4.1.1.1.11	Identificação da substância 10	105

4.1.1.1.12	Identificação da substância 11	118
4.1.1.1.13	Identificação da substância 12	128
4.1.1.1.14	Identificação da substância 13	132
4.2	Substâncias Isoladas das Raízes de <i>Andira fraxinifolia</i>	147
4.2.1	Determinação estrutural das substâncias isoladas das raízes de <i>A. fraxinifolia</i>	148
4.2.1.1	Identificação das substâncias 14 e 15	148
4.2.1.2	Identificação da substância 16	150
4.2.1.3	Identificação da substância 17	152
4.2.1.4	Identificação da substância 18	155
4.2.1.5	Identificação da substância 19	158
4.2.1.6	Identificação da substância 20	161
4.2.1.7	Identificação da substância 21	167
4.2.1.8	Identificação das substâncias 22 e 23	171
4.3	Constituintes Químicos Isolados de <i>Palicourea coriacea</i>	182
4.3.1	Determinação Estrutural dos Constituintes Isolados das Folhas de <i>P. coriacea</i>	183
4.3.1.1	Identificação da substância 24	183
4.3.1.2	Identificação das substâncias 25, 26 e 27	190
4.3.1.3	Identificação da substância 28	198
4.3.1.4	Identificação da substância 29	203
4.3.1.5	Identificação das substâncias 30 e 31	211
4.3.1.6	Identificação da substância 32	214
4.4	Atividade Antioxidante	218
4.5	Atividade Anti-helmíntica	223
5	CONCLUSÕES	226
6	REFERÊNCIAS	227

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de produtos naturais de importância na terapêutica.	2
Figura 2. Aspecto geral de exemplares de <i>Andira anthelmia</i> (A) e <i>Andira fraxinifolia</i> (B) (SILVA, 2002).	7
Figura 3. Substâncias isoladas do gênero <i>Andira</i>	9
Figura 4. Número aproximado de espécies de <i>Palicourea</i> distribuídas pelas floras neotropicais (TAYLOR, 1997).	13
Figura 5. Aspecto geral de exemplar de <i>Palicourea coriacea</i> (A) (DELPRETE & CORTÉS, 2005); (B) (ARQUIVO PESSOAL, 2005).	15
Figura 6. Substâncias isoladas do gênero <i>Palicourea</i>	16
Figura 7. Molécula de DPPH e esquema mostrando sua redução pelo flavonóide.	35
Figura 8. Exemplares da espécie <i>Aspicularis tetraptera</i> , onde na extremidade anterior (A) observa-se o bulbo esofágico e as asas cervicais desenvolvidas; extremidade posterior do sexo masculino (B); e extremidade posterior do sexo feminino (C) (40X).	37
Figura 9. Espectro de I.V. (KBr) de 1.	42
Figura 10. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de 1.	42
Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de 1.	43
Figura 12. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, BBD, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de 1 na região entre δ_{C} 10,0-62,55 ppm.	43
Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DEPT 135°, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de 1.	44
Figura 14. Espectro de I.V. (KBr) de 2.	46
Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d_6) de 2.	46
Figura 16. Espectro de NOEDIFF (200 MHz, DMSO-d_6) obtido por irradiação na frequência da metoxila de 2.	47
Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, BBD, DMSO-d_6) de 2.	47
Figura 18. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de 2.	48
Figura 19. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 2A.	50
Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, BBD, CDCl_3) de 2A.	51
Figura 21. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de 2A.	51
Figura 22. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 2B.	53
Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, BBD, CDCl_3) de 2B.	54
Figura 24. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de 2B.	54
Figura 25. Projeção de Newman mostrando a configuração relativa para as substâncias 2C e 2D.	56
Figura 26. Efeito nos deslocamentos químicos nos ^{13}C do anel benzênico quando um hidrogênio é substituído por um átomo de iodo.	56
Figura 27. Espectro de I.V. (KBr) de 2C+2D.	60
Figura 28. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 2C+2D.	60
Figura 29. Expansões no espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 2C+2D nas regiões entre: [A] δ_{H} 3,0-4,4 ppm e [B] δ_{H} 5,0-7,5 ppm.	61
Figura 30. Mapa de contornos $^1\text{Hx}^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, CDCl_3) de 2C+2D.	62
Figura 31. Experimentos de NOEDIFF (200 MHz, CDCl_3) para 2C+2D.	63
Figura 32. [A] Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, BBD, CDCl_3) de 2C+2D; [B] Expansão na região entre δ_{C} 52,0-81,0 ppm.	64
Figura 33. Expansões do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, BBD, CDCl_3) de 2C+2D nas regiões entre: [A] 93,0-131,0 ppm e [B] δ_{C} 155,0-168,0 ppm.	65
Figura 34. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPT 135°, CDCl_3) de 2C+2D.	66

Figura 35. [A] Mapa de contornos HMQC (125 MHz, CDCl ₃) de 2C+2D e [B] Expansão na região entre δ_C 50,0-65,0 ppm e δ_H 3,10-4,0 ppm .	67
Figura 36. Mapa de contornos HMBC (125 MHz, CDCl ₃) e correlações observadas para 2C+2D.	68
Figura 37. Expansões do mapa de contornos HMBC (125 MHz, CDCl ₃) de 2C+2D nas regiões entre: [A] δ_C 75,0-85,0 ppm e δ_H 2,9-3,5 ppm, [B] δ_C 150,0-170,0 ppm e δ_H 3,70-7,70 ppm, [C] δ_C 190,0-195,0 ppm e δ_H 5,0-5,4 ppm, [D] δ_C 150,0-170,0 ppm e δ_H 3,70-7,70 ppm.	69
Figura 38. Expansões do mapa de contornos HMBC (125 MHz, CDCl ₃) de 2C+2D nas regiões entre: [A] δ_C 60,0-70,0 ppm e δ_H 5,9-6,5 ppm, [B] δ_C 110,0-130,0 ppm e δ_H 6,80-7,50 ppm, [C] δ_C 90,0-130,0 ppm e δ_H 12,0-12,90 ppm, [D] δ_C 50,0-75,0 ppm e δ_H 12,1-12,9 ppm.	70
Figura 39. Cromatograma a gás (CG) dos produtos 2C+2D.	71
Figura 40. Espectro de massas por I.E. (70 eV) e CG de 2C.	71
Figura 41. Espectro de massas por I.E. (70 eV) e CG de 2D.	73
Figura 42. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, DMSO-d ₆) de 3.	76
Figura 43. Expansão do mapa de contornos ¹ Hx ¹ H-COSY (200MHz, DMSO-d ₆) de 3 na região entre δ_H 6,3-8,6 ppm.	76
Figura 44. Experimento de NOEDIFF (200 MHz, DMSO-d ₆) de 3; [A] Irradiação na frequência da metoxila, [B] Irradiação na frequência do H-2.	77
Figura 45. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, DMSO-d ₆) de 4.	79
Figura 46. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, BBD, DMSO-d ₆) de 4.	79
Figura 47. Espectro de massas por IE (70 eV) de 4.	80
Figura 48. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, DMSO-d ₆) de 5.	82
Figura 49. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, BBD, DMSO-d ₆) de 5.	82
Figura 50. Espectro de massas por IE (70 ev) de 5A.	83
Figura 51. [A] Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) de 6; [B] Expansão na região entre δ_H 3,09-4,73 ppm.	86
Figura 52. [A] Mapa de contornos ¹ Hx ¹ H-COSY (500MHz, DMSO-d ₆) de 6; [B] Expansão na região entre δ_H 3,0- 5,1 ppm.	87
Figura 53. [A] Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, BBD, DMSO-d ₆) de 6; [B] Expansão na região entre δ_C 68,76-81,44 ppm.	88
Figura 54. Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, DEPT 135°, DMSO-d ₆) de 6.	89
Figura 55. Mapa de contornos HMQC (125 MHz, DMSO-d ₆) de 6; [B] Expansão na região entre δ_C 68,0-84,0 ppm e δ_H 3,10-5,4 ppm	90
Figura 56. Mapa de contornos HMBC (125 MHz, DMSO-d ₆) e correlações observadas para a substância 6.	91
Figura 57. Expansões do mapa de contornos HMBC (125 MHz, DMSO-d ₆) de 6 nas regiões entre: [A] δ_C 65,0-80,0 ppm e δ_H 3,0-4,1 ppm [B] δ_C 65,0-110,0 ppm e δ_H 4,8-7,5 ppm e [C] δ_C 155,0-170,0 ppm e δ_H 5,0-7,5 ppm	92
Figura 58. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, Acetona-d ₆) de 7.	95
Figura 59. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, BBD, Acetona-d ₆) de 7.	95
Figura 60. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) de 8.	98
Figura 61. [A] Mapa de contornos NOESY (400 MHz, DMSO-d ₆) de 8; [B] Expansão na região entre δ_H 4,2- 6,8 ppm.	98
Figura 62. Espectro de RMN de ¹³ C (APT, 100 MHz, DMSO-d ₆) de 8.	99
Figura 63. Mapa de contornos HMQC (100 MHz, DMSO-d ₆) de 8.	99
Figura 64. Mapa de contornos HMBC (125 MHz, DMSO-d ₆) e correlações observadas para a substância 8.	100
Figura 65. RMN de ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) de 9.	103

Figura 66. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de 9 nas regiões entre: [A] δ_{H} 1,0-4,0 ppm e [B] δ_{H} 5,0-8,0 ppm.....	103
Figura 67. Mapa de contornos $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, DMSO- d_6) de 9.....	104
Figura 68. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, BBD, DMSO- d_6) de 9.....	104
Figura 69. Mapa de contornos HMQC (125 MHz, DMSO- d_6) de 9.	105
Figura 70. [A] Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de 10; [B] Expansão na região entre δ_{H} 3,14-5,48 ppm.....	109
Figura 71. [A] Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, BBD, DMSO- d_6) de 10; [B] expansão na região entre δ_{C} 55,21- 78,72 ppm.....	110
Figura 72. [A] Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPT 135°, DMSO- d_6) de 10 e [B] Expansão na região entre δ_{C} 76,53-55,21 ppm.....	111
Figura 73. [A] Mapa de contornos HMQC (125 MHz, DMSO- d_6) de 10; [B] Expansão na região entre δ_{C} 53,0-77,0 ppm e δ_{H} 2,90-4,10 ppm.....	112
Figura 74. Mapa de contornos HMBC (125 MHz, DMSO- d_6) e algumas correlações observadas para a substância 10.	113
Figura 75. Expansões do mapa de contornos HMBC (125 MHz, DMSO- d_6) de 10 nas regiões entre: [A] δ_{C} 62,0-81,0 ppm e δ_{H} 3,10-5,60 ppm e [B] δ_{C} 62,0-81,0 ppm e δ_{H} 3,10-5,60 ppm.....	114
Figura 76. [A] Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 10A; [B] Expansão na região entre δ_{H} 3,50-5,5 ppm.....	115
Figura 77. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 90°[A] e 135°[B], CDCl_3) de 10A.....	116
Figura 78. Mapa de contornos $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY (50 MHz, CDCl_3) de 10A.	117
Figura 79. [A] Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de 11; [B] Expansão na região entre δ_{H} 3,11 ppm-5,46 ppm.	120
Figura 80. [A] Mapa de contornos $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (500MHz, DMSO- d_6) de 11, [B] Expansão na região entre δ_{H} 2,9- 5,2 ppm.	121
Figura 81. [A] Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, BBD, DMSO- d_6) de 11; [B] Expansão na região entre δ_{C} 130,20 ppm-94,58 ppm.....	122
Figura 82. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, BBD, DMSO- d_6) de 11 na região entre δ_{C} 79,18 ppm-55,19 ppm.....	123
Figura 83. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPT 135°, DMSO- d_6) de 11.	123
Figura 84. [A] Mapa de contornos HMQC (125 MHz, DMSO- d_6) de 11, [B] Expansão na região entre δ_{C} 55,0-80,0 ppm e δ_{H} 3,0-4,0 ppm.	124
Figura 85. Mapa de contornos HMBC (125 MHz, DMSO- d_6) e correlações observadas para a substância 11.	125
Figura 86. Expansões do mapa de contornos HMBC (125 MHz, DMSO- d_6) de 11 nas regiões entre: [A] δ_{C} 95,0-113,0 ppm e δ_{H} 3,1-3,9 ppm, [B] δ_{C} 65,0-82,0 ppm e δ_{H} 3,1- 4,9 ppm e [C] δ_{C} 155,0-167,0 ppm e δ_{H} 3,5-5,1 ppm.	126
Figura 87. Expansões do mapa de contornos HMBC (125 MHz, DMSO- d_6) de 11 nas regiões entre: [A] δ_{C} 95,0-130,0 ppm e δ_{H} 6,3-8,5 ppm e [B] δ_{C} 150,0-165,0 ppm e δ_{H} 6,3-8,6 ppm.	127
Figura 88. Representação da configuração adotada pelos hidrogênios do anel C de 12.....	128
Figura 89. [A] Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, Acetona- d_6) de 12; [B] Expansão na região entre δ_{H} 2,16-4,85 ppm.....	130
Figura 90. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, BBD, Acetona- d_6) de 12.....	131
Figura 91. Espectro de massas por IE (70 eV) de 12.	131
Figura 92. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de 13 na região entre: [A] δ_{H} 2,90-3,90 ppm e [B] δ_{H} 4,10-5,60 ppm.....	135
Figura 93. Expansões do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de 13 nas regiões entre δ_{H} 0,75-2,0 ppm.....	136
Figura 94. Mapa de contornos $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, DMSO- d_6) de 13.....	136

Figura 95. Expansões do mapa de contornos $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, DMSO- d_6) de 13 nas regiões entre: [A] δ_{H} 0,75-2,0 ppm e [B] δ_{H} 1,8-3,9 ppm.	137
Figura 96. Expansões do mapa de contornos $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, DMSO- d_6) de 13 nas regiões entre: [A] δ_{H} 2,9-3,9 ppm e [B] δ_{H} 1,8-3,9 ppm.	138
Figura 97. [A] Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, BBD, DMSO- d_6) de 13; [B] Expansão na região entre δ_{C} 24,0-35,0 ppm.	139
Figura 98. Mapa de contornos HMQC (125 MHz, DMSO- d_6) de 13.	140
Figura 99. Expansões do mapa de contornos HMQC (125 MHz, DMSO- d_6) de 13 nas regiões entre: [A] δ_{H} 1,1-2,0 ppm e δ_{C} 20,0-35,0 ppm [B] δ_{H} 3,4-3,9 ppm e δ_{C} 60,0-70,0 ppm.	141
Figura 100. Expansões do mapa de contornos HMQC (125 MHz, DMSO- d_6) de 13 nas regiões entre: [A] δ_{H} 3,0-3,8 ppm e δ_{C} 70,0-77,0 ppm [B] δ_{H} 4,0-5,5 ppm e δ_{C} 109,0-130,0 ppm.	142
Figura 101. Mapa de contornos HMBC (125 MHz, DMSO- d_6) e algumas correlações observadas para a substância 13.	143
Figura 102. Expansões do mapa de contornos (HMBC, 125 MHz, DMSO- d_6) de 13, nas regiões entre: [A] δ_{H} 0,7-2,0 ppm e δ_{C} 14,0-33,0 ppm e [B] δ_{H} 3,0-4,8 ppm e δ_{C} 49,0-62,0 ppm.	144
Figura 103. Expansões do mapa de contornos HMBC (125 MHz, DMSO- d_6) de 13, nas regiões entre: [A] δ_{H} 4,0-5,6 ppm e δ_{C} 65,0-80,0 ppm e [B] δ_{H} 2,9-3,7 ppm e δ_{C} 65,0-80,0 ppm.	145
Figura 104. Expansões do mapa de contornos HMBC (125 MHz, DMSO- d_6) de 13, nas regiões entre: [A] δ_{H} 2,7-5,0 ppm e δ_{C} 97,0-107,0 ppm e [B] δ_{H} 1,8-2,1 ppm e δ_{C} 125,0-135,0 ppm e [C] δ_{H} 3,7-4,0 ppm e δ_{C} 170,0-177,0 ppm.	146
Figura 105. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 14 e 15.	148
Figura 106. Espectro de massas da mistura do sitosterol [A], estigmasterol [B] e [C] CG da mistura de esteróides.	149
Figura 107. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 16.	151
Figura 108. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, BBD, CDCl_3) de 16.	152
Figura 109. Espectro de I.V. (KBr) de 17.	154
Figura 110. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 17.	154
Figura 111. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, BBD, CDCl_3) de 17.	155
Figura 112. Espectro de I.V. (KBr) de 18.	157
Figura 113. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 18.	157
Figura 114. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, PND, CDCl_3) de 18.	158
Figura 115. Espectro de I.V. (KBr) de 19.	159
Figura 116. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de 19.	160
Figura 117. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DEPT 90° [A] e 135° [B], $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de 19.	160
Figura 118. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de 20.	163
Figura 119. Experimento de NOEDIFF (200 MHz, DMSO- d_6) de 20, [A] Irradiação na frequência da metoxila, [B] Irradiação na frequência do hidrogênio H-2.	163
Figura 120. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, BBD, DMSO- d_6) de 20.	164
Figura 121. Mapa de contornos HMQC (125 MHz, DMSO- d_6) de 20.	164
Figura 122. Mapa de contornos (HMBC, 125 MHz, DMSO- d_6) e algumas correlações observadas para a substância 20.	165
Figura 123. Expansões do mapa de contornos (HMBC, 125 MHz, DMSO- d_6) de 20 nas regiões entre: [A] δ_{C} 143,0-152,0 ppm e δ_{H} 3,60-4,0 ppm, [B] δ_{C} 91,0-106,0 ppm e δ_{H} 5,90-6,50 ppm, [C] δ_{C} 109,0-126,0 ppm e δ_{H} 6,70-7,20 ppm e [D] δ_{C} 145,0-150,0 ppm e δ_{H} 6,90-7,10 ppm.	166
Figura 124. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6) de 21.	169

Figura 125. Espectro de NOEDIFF (200 MHz, DMSO-d ₆) de 21, [A] Irradiação na frequência do hidrogênio H-1', [B] Irradiação na frequência do hidrogênio H-2.....	169
Figura 126. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, BBD, DMSO-d ₆) de 21.....	170
Figura 127. Espectro de Massa por I.E. (70 eV) de 21.....	170
Figura 128. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) de 22+23.....	175
Figura 129. Expansões no espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) de 22+23 nas regiões entre: [A] δ _H 0,6-1,0, [B] δ _H 2,1-2,7 ppm.	175
Figura 130. Expansões no espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, DMSO-d ₆) de 22+23 nas regiões entre: [A] δ _H 4,0-5,7, [B] δ _H 5,84-6,07, [C] δ _H 6,6-7,4 e [D] δ _H 8,9-12,0 ppm.....	176
Figura 131. Mapa de contornos ¹ Hx ¹ H-COSY (400 MHz, DMSO-d ₆) de 22+23.	177
Figura 132. Mapa de contornos NOESY (400MHz, DMSO-d ₆) e algumas interações espaciais observadas para as substâncias 22+23.....	177
Figura 133. Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, APT, DMSO-d ₆) de 22+23.....	178
Figura 134. Expansões do espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, APT, DMSO-d ₆) de 22+23 nas regiões entre [A] δ _C 68,96-81,55 e [B] δ _C 95,08-117,60.	178
Figura 135. Expansões do espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, APT, DMSO-d ₆) de 22+23 nas regiões entre [A] δ _C 114,06-127,81 e [B] δ _C 144,97-167,11.....	179
Figura 136. Mapa de contornos HMQC (100 MHz, DMSO-d ₆) de 22+23.	179
Figura 137. Mapa de contornos HMBC (100 MHz, DMSO-d ₆) de 22+23, e correlações observadas para as substâncias 22+23.....	180
Figura 138. Expansões do mapa de contornos HMBC (100 MHz, DMSO-d ₆) de 22+23 nas regiões entre: [A] δ _C 65,0-84,0 e δ _H 1,0-7,0 ppm, [B] δ _C 95,0-132,0 e δ _H 5,0-11,0 ppm e [C] δ _C 143,0-171,0 e δ _H 6,0-12,0 ppm.	181
Figura 139. Espectro de I.V. (KBr) de 24.	186
Figura 140. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de 24.....	186
Figura 141. Mapa de contornos ¹ Hx ¹ H-COSY (200 MHz, CDCl ₃) de 24.	187
Figura 142. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, BBD, CDCl ₃) de 24.	187
Figura 143. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, DEPT 135°, CDCl ₃) de 24.....	188
Figura 144. Espectro de Massa por I.E. (70 eV) de 24.....	188
Figura 145. Efeito nos deslocamentos químicos nos ¹³ C do C-4 causado pela troca de substituintes.....	190
Figura 146. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de 25.....	192
Figura 147. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, BBD, CDCl ₃) de 25.	192
Figura 148. Espectro de Massa por I.E. (70 eV) de 25.....	193
Figura 149. [A] Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 26; [B] Expansão na região entre δ _H 6,8 e 7,7 ppm.....	194
Figura 150. Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, BBD, CDCl ₃) de 26.	195
Figura 151. Espectro de Massa por I.E. (70 eV) de 26.....	195
Figura 152. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CD ₃ OD) de 27.....	196
Figura 153. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, BBD, CDCl ₃) de 27.	197
Figura 154. Espectro de Massa por I.E. (70 eV) de 27.....	197
Figura 155. Expansões do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 27+28 entre as regiões: [A] δ _H 3,7-4,0 ppm e [B] δ _H 6,2-8,2 ppm.	200
Figura 156. Mapa de contornos ¹ Hx ¹ H-COSY (500 MHz, CDCl ₃) de 27+28 na região entre δ _H 6,0-8,0 ppm.....	201
Figura 157. Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, BBD, CDCl ₃) de 27+28.....	202
Figura 158. Mapa de contornos HMQC (125 MHz, CDCl ₃) de 27+28.	202
Figura 159. Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, Acetona-d ₆) de 29.	206
Figura 160. Expansões do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, Acetona-d ₆) de 29 nas regiões entre: [A] δ _H 2,0-2,40 ppm; [B] δ _H 7,65-7,95 ppm e [C] δ _H 8,0-8,30 ppm.....	206

Figura 161. Experimento de SEL-NOEDIFF (500 MHz, Acetona-d ₆) de 29.	207
Figura 162. Mapa de contornos ¹ Hx ¹ H-COSY (500 MHz, Acetona-d ₆) de 29.	207
Figura 163. [A] Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, Acetona-d ₆) de 29; [B] Expansão na região entre δ _C 116,0-136,0 ppm.	208
Figura 164. [A] Mapa de contornos HMQC (125 MHz, Acetona-d ₆) de 29; [B] Expansão na região entre δ _C 110,0-137,0 ppm e δ _H 7,5-8,3 ppm.	209
Figura 165. Espectro de massa por I.E. (70 eV) de 29.	210
Figura 166. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de 30.	212
Figura 167. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) de 30.	212
Figura 168. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de 31.	213
Figura 169. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, PND, CDCl ₃) de 31.	213
Figura 170. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, DMSO-d ₆) de 32.	217
Figura 171. Espectro de RMN de ¹³ C (50 MHz, BBD, DMSO-d ₆) de 32.	217
Figura 172. Exemplo de gráficos de CE ₅₀ obtidos para amostras que assumiram perfil sigmoidal.	219
Figura 173. Exemplo de gráficos de CE ₅₀ obtidos para amostras que assumiram perfil linear.	220
Figura 174. Atividade anti-helmíntica em camundongos tratados com as frações e substâncias isoladas de <i>A. anthelmia</i> em comparação com o mebendazol (MB) e com animais não tratados (controle). Valores expressos em média ± DP de nematóides eliminados nos diferentes grupos de animais testados. n=10. Os símbolos* e ** indicam valores de p < 0,05 e p < 0,01, respectivamente.	225

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Posição taxonômica de <i>A. fraxinifolia</i> e <i>A. anthelmia</i>	7
Tabela 2. Posição taxonômica de <i>Palicourea coriacea</i>	14
Tabela 3. Dados de RMN de ^{13}C (50 MHz) da substância 1.....	41
Tabela 4. Dados de RMN de ^{13}C (50 MHz) da substância 2.....	45
Tabela 5. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) da substância 2A.....	50
Tabela 6. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) da substância 2B.....	53
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (125 MHz) dos derivados 2C e 2D.....	59
Tabela 8. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) da substância 3.....	75
Tabela 9. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) da substância 4.....	78
Tabela 10. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e de ^{13}C (50 MHz) da substância 5.....	81
Tabela 11. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) 1D e 2D da substância 6.....	85
Tabela 12. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) da substância 7.....	94
Tabela 13. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) 1D e 2D da substância 8.....	97
Tabela 15. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) 1D e 2D da substância 10 em comparação com dados do modelo Mod-1.....	107
Tabela 16. Dados de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) do derivado 10A.....	108
Tabela 17. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) 1D e 2D da substância 11.....	119
Tabela 19. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) 1D e 2D da substância 13.....	134
Tabela 20. Dados de RMN ^{13}C (50 MHz) da substância 16.....	151
Tabela 21. Dados de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da substância 17.....	153
Tabela 22. Dados de RMN de ^{13}C (50 MHz) da substância 18.....	156
Tabela 23. Dados de RMN de ^{13}C (50 MHz) da substância 19.....	159
Tabela 24. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da substância 20.....	162
Tabela 25. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e de ^{13}C (50 MHz) de 21.....	168
Tabela 26. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) 1D e 2D de 22.....	173
Tabela 27. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) 1D e 2D de 23.....	174
Tabela 28. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e de ^{13}C (50 MHz) de 24.....	185
Tabela 29. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e de ^{13}C (50 MHz) para as substâncias 25 e 27 e de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (1250 MHz) para a substância 26.....	191
Tabela 30. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (125 MHz) da substância 28.....	199
Tabela 31. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (125 MHz) da substância 29.....	205
Tabela 32. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e de ^{13}C (50 MHz) das substâncias 30 e 31.....	211
Tabela 33. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) da substância 32.....	216
Tabela 34. Valores de CE_{50} dos extratos ($\mu\text{g}/\text{mL}$), frações ($\mu\text{g}/\text{mL}$), substâncias isoladas (μM) e padrões (μM).....	218
Tabela 35. Influência das frações e substâncias isoladas de <i>A. anthelmia</i> na eliminação de <i>A. tetraptera</i>	224

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Fracionamento do extrato metanólico das raízes de <i>Andira anthelmia</i>	21
Esquema 2. Processamento da fração AARMA.....	22
Esquema 3. Processamento da fração AARMB.....	24
Esquema 4. Processamento da fração AARMM.....	26
Esquema 5. Fracionamento do extrato metanólico das raízes de <i>Andira fraxinifolia</i>	27
Esquema 6. Processamento da fração AFRMH.....	29
Esquema 7. Processamento da fração AFRMA.....	31
Esquema 8. Processamento da fração PCFM.....	33
Esquema 9. Proposta de fragmentação para a substância 2.....	48
Esquema 10. Mecanismo de reação com diazometano para formação de 2A.....	49
Esquema 11. Mecanismo proposto para acetilação de hidroxilas fenólicas.....	52
Esquema 12. Mecanismo proposto para a formação de 2C e 2D.....	58
Esquema 15. Proposta de fragmentação para substância 4.....	80
Esquema 16. Proposta de fragmentação para substância 5A.....	83
Esquema 17. Proposta de fragmentação para substância 12.....	132
Esquema 18. Rota biossintética de formação da 5,7-diidroxí- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosilcromona encontrada nas raízes de <i>A. fraxinifolia</i> (adaptado de DEWICK, 2002).....	168
Esquema 19. Proposta de fragmentação para a substância 21.....	171
Esquema 20. Rota biossintética de formação da calicantina encontrada nas folhas de <i>P. coriacea</i>	184
Esquema 21. Proposta de fragmentação para a substância 24.....	189
Esquema 22. Proposta de fragmentação para a substância 25.....	193
Esquema 23. Proposta de fragmentação para a substância 26.....	196
Esquema 24. Proposta de fragmentação para a substância 27.....	198
Esquema 26. Proposta de fragmentação para a substância 29.....	210
Esquema 27. Rota biossintética da alantoína encontrada nas folhas de <i>P. coriacea</i>	215

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	deslocamento químico (ppm)
ν	estiramento
M^+	pico do íon molecular
Ac	acetila
AcOEt	acetato de etila
AcOH	ácido acético
Ar	aromático
APT	A ttached P roton T est
CC	cromatografia em coluna (pressão atmosférica)
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CCF	cromatografia em camada fina
CG-EM	cromatografia de gás acoplada ao espectro de massas
$CDCl_3$	clorofórmio deuterado
COSY	C Orrelated S pectroscop Y
<i>d</i>	dubleto
<i>dd</i>	duplo dubleto
DEPT	D istortionless E nhancement by P olarization T ransfer
DMSO- D_6	dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EM	espectroscopia de massas
e.V.	electron volt
HBBD(BBD)	H ydrogen B and B road D ecoupled
HMBC	H eteronuclear M ultiple- B ond C orrelation
HMQC	H eteronuclear M ultiple- Q uantum C oherence
Hz	Hertz
IE	Impacto Eletrônico
IV	Infra-vermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento em Hertz
<i>m</i>	multiplete
<i>m/z</i>	relação carga/massa
MeOH	metanol
MHz	megahertz
NOE	N uclear O verhauser E ffect
NOESY	N uclear O verhauser E ffect C orrelation S pectroscopy
P.F.	ponto de fusão
<i>r</i>	coeficiente de determinação
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
<i>s</i>	singleto
<i>sl</i>	singleto largo
<i>t</i>	tripleto
<i>td</i>	triplo dubleto

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

RESUMO

SILVA, Virginia Claudia da. **Metabólitos Especiais Isolados das Raízes de *Andira anthelmia* (Vell.) Macbr., *Andira fraxinifolia* Benth. (Leguminosae) e das Folhas de *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. (Rubiaceae).** Tese (Doutorado em Ciências, Química Orgânica). PPGQO, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, Brasil. 2006. 236 p.

A análise das frações obtidas através de partição com solventes e técnicas cromatográficas dos extratos das raízes de *Andira anthelmia*, *Andira fraxinifolia* (Leguminosae) e das folhas de *Palicourea coriacea* (Rubiaceae) conduziu ao isolamento de constituintes de diferentes classes de metabólitos especiais. De *Andira anthelmia* foram isolados o ácido ursólico, biochanina A (5,7-diidroxi-4'-metoxiisoflavona), calicosina (4',7-diidroxi-3'-metoxiisoflavona), genisteína (4',5,7-triidroxiisoflavona), biochanina A 7-O- β -D-glicopiranosídeo, biochanina A 7-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosídeo, biochanina A 7-O- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 5)- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosídeo, genisteína 7-O- β -D-glicopiranosídeo, engeletina (*rel*-2*R*,3*R*-4',5,7-triidroxi-3-O- α -L-ramnopiranosil-flavanonol) e astilbina (*rel*-2*R*,3*R*-3',4',5,7-tetraidroxi-3-O- α -L-ramnopiranosilflavanonol), ácido *p*-hidroxibenzóico e o cerebrosídeo, 1-O- β -D-glicopiranosil-2-(N-2'-hidroxiacil-*cis-en*-amida)-3,4-dihidroxi-*cis*-alquenil. Das raízes de *Andira fraxinifolia* isolaram-se sitosterol, estigmasterol, β -amirina, lupeol, uma mistura de ésteres 3 β -O-acil-lupeol, ácido betulínico, 3- β -O- β -D-glicopiranosil-sitosterol, biochanina A, prateseína (3',5,7-triidroxi-4'-metoxiisoflavona), isoengeletina (*rel*-2*R*,3*S*-4',5,7-triidroxi-3-O- α -L-ramnopiranosilflavanonol), isoastilbina (*rel*-2*R*,3*S*-3',4',5,7-tetraidroxi-3-O- α -L-ramnopiranosilflavanonol) e a 5,7-diidroxi-3-O- α -L-ramnopiranosilcromona. Das folhas de *Palicourea coriacea* foram isolados o ácido ursólico; o alcalóide calicantina, a 2-hidroxi-3-metil-antraquinona, a carboximidina conhecida como alantoína e os ésteres (*E*)-4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamato de metila, (*E*)-4-hidroxi-3-metoxicinamato de metila, (*E*)-4-hidroxicinamato de metila, (*Z*)-4-hidroxicinamato de metila, 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoato de metila e 4-metoxibenzoato de metila. As estruturas foram identificadas pela análise de espectros de IV, Massas e RMN ^1H e ^{13}C , incluindo técnicas especiais 1D e 2D das substâncias naturais e derivados. Foram preparados alguns derivados que serviram para auxiliar nas conclusões das estruturas. O tratamento da isoflavona biochanina A com diazometano seguido da reação com iodo/KOH em metanol, conduziu a formação de dois novos derivados da isoflavona: *rel*-2*R*,3*S*-2,3,7,4'-tetrametoxi-6,8-diiodoisoflavanona e *rel*-2*R*,3*S*-2,3,7,4'-tetrametoxi-8-iodoisoflavanona. Foi realizado teste de atividade anti-helmíntica com a espécie *Andira anthelmia* e ensaio de atividade antioxidante com as espécies *Andira anthelmia* e *Andira fraxinifolia*.

Palavras chave: *Andira anthelmia*, *Andira fraxinifolia*, *Palicourea coriacea*, derivados de isoflavonóides, anti-helmíntico, antioxidante.

ABSTRACT

SILVA, Virgínia Claudia. **Special Metabolites Isolated from Roots of *Andira anthelmia* (Vell.) Macbr., *Andira fraxinifolia* Benth. (Leguminosae) and the Leaves of *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. (Rubiaceae).** Thesis (Doctor in Sciences, Organic Chemistry). PPGQO, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, Brazil. 236 p 2006.

The analysis of fractions obtained by solvent partition and chromatographic techniques of the extracts from the roots of *Andira anthelmia*, *Andira fraxinifolia* (Leguminosae) and from the leaves of *Palicourea coriacea* (Rubiaceae) led to the isolation of chemical constituents which belong to different classes of special metabolites. From the *Andira anthelmia* were isolated the ursolic acid, biochanin A (5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone), calycosin (4',7-dihydroxy-3'-methoxyisoflavone), genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone), biochanin A 7-O- β -D-glucopyranoside, biochanina A 7-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside, biochanina A 7-O- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 5)- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside and genistein 7-O- β -D-glucopyranoside, engeletin (*rel*-2*R*,3*R*-4',5,7-trihydroxy-3-O- α -L-rhamnopyranosylflavanonol), astilbin (*rel*-2*R*,3*R*-3',4',5,7-tetrahydroxy-3-O- α -L-rhamnopyranosylflavanonol), catechin; *p*-hydroxybenzoic acid and a cerebroside, 1-O- β -D-glicopyranosyl-2-N(2'-hydroxyacyl-*cis*-en-amide)-*cis*-alkenyl-3,4-dihydroxy. From the *Andira fraxinifolia* were isolated β -sitosterol, stigmasterol, β -amyrin, lupeol, a mixture of 3- β -O-acyl-lupeol esters, betulinic acid, 3- β -O- β -D-glucopyranosylsitosterol, biochanin A, pratesein (3',5,7-trihydroxy-4'-methoxyisoflavone), isoengeletin (*rel*-2*R*,3*S*-4',5,7-trihydroxy-3-O- α -L-rhamnopyranosylflavanonol), isoastilbin (*rel*-2*R*,3*S*-3',4',5,7-tetrahydroxy-3-O- α -L-rhamnopyranosylflavanonol) and 5,7-dihydroxy-3-O- α -L-rhamnopyranosylchromone. From the leaves of the *Palicourea coriacea* were isolated the ursolic acid; the alkaloid calycanthine; allantoin; 2-hydroxy-3-methylanthraquinone; besides the esters, (*E*) methyl 4-hydroxy-3,5-dimethoxycinnamate, methyl (*E*)-4-hydroxy-3-methoxycinnamate, methyl (*E*)-4-hydroxycinnamate, methyl (*Z*)-4-hydroxycinnamate, methyl-4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoate and methyl-4-methoxybenzoate. The structures were identified by the IR, MS and NMR ^1H and ^{13}C spectra data analysis, including special 1D and 2D techniques of the natural substances and some derivatives. The treatment of the isoflavone biochanin A with diazomethane followed by the reaction with I_2/KOH in methanol yield two new isoflavone derivatives: *rel*-2*R*,3*S*-2,3,7,4'-tetramethoxy-6,8-diiodineisoflavanone and *rel*-2*R*,3*S*-2,3,7,4'-tetramethoxy-8-iodineisoflavanona. The anti-helminthic activity with *Andira anthelmia* and the antioxidant activity assay with *Andira anthelmia* and *Andira fraxinifolia* species were tested.

Keywords: *Andira anthelmia*, *Andira fraxinifolia*, *Palicourea coriacea*, isoflavone derivatives, anti-helminthic, antioxidant.

1 INTRODUÇÃO

A obtenção de substâncias de aplicação imediata tais como perfumes, corantes, pesticidas, medicamentos, etc., foi certamente o objetivo primordial das pesquisas em produtos naturais. Nos últimos anos essa pesquisa, tem alcançado uma larga amplitude e diversificação, fazendo com que este ramo da química orgânica seja reconhecido por abranger desde a busca dos princípios ativos bioproduzidos pelas plantas até as questões relacionadas com a biodiversidade, na tentativa de se compreender a evolução da vida na Terra.

Durante muito tempo os metabólitos especiais foram considerados como produtos de excreção do vegetal, com estruturas químicas e, algumas vezes, propriedades biológicas interessantes. Agora é reconhecido que muitos deles têm papéis vitais como mediadores em interações ecológicas, como por exemplo, a defesa contra herbívoros e microrganismos, a proteção contra os raios UV, a atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes e em interações alelopáticas (SANTOS, 2000).

A presença de metabólitos especiais em plantas é um exemplo de resposta evolutiva em um determinado ecossistema, destacando-se a função protetora destes contra outros microorganismos e fatores ambientais. Neste âmbito, nota-se a evidente relação entre a evolução química dos metabólitos e ecologia, com a possibilidade de algumas destas substâncias serem consideradas bons marcadores taxonômicos. As moléculas biomarcadas têm em comum, rotas biossintéticas complexas, assim mesmo uma molécula simples, implica na manifestação de inúmeros cofatores e enzimas, que são manifestações implícitas da espécie (GOTTLIEB, 1982).

De fato, vê-se claramente que a pesquisa dos produtos naturais tem adquirido novos horizontes; não somente se dedica à procura de substâncias que sejam biologicamente ativas como também à descoberta de novas substâncias, assim como sua localização nas diversas partes da planta como meio de identificação do gênero ou família.

O reino vegetal tem sido uma das mais ricas fontes de substâncias orgânicas, contribuindo de forma significativa para o fornecimento de uma grande diversidade de classes e estruturas de metabólitos especiais (PINTO *et al.*, 2002). No entanto, a atual velocidade de extinção da biodiversidade está causando não somente a perda de compostos com valor terapêutico e econômico, mas também a codificação de interessantes genes para enzimas com um uso potencial em melhoramento de plantas e estudos biossintéticos de novos produtos naturais (BOLZANI *et al.*, 1999). Sob este aspecto, cabe ressaltar que o Brasil possui uma das maiores biodiversidades do mundo, e precisa rapidamente, desenvolver estratégias para o uso sustentável de uma natureza bastante inexplorada científica e tecnologicamente.

Com a notável busca pela longevidade e melhoria da vida humana, a procura por substâncias naturais de importância na terapêutica tem sido cada vez mais marcante. Dados confirmam que cerca de 25% das prescrições dispensadas nos países desenvolvidos durante os últimos 25 anos estavam relacionadas a medicamentos que continham princípios ativos de origem natural ou semi sintética, normalmente oriundos de plantas superiores (NEWMAN *et al.*, 2003). Em relação ao mercado mundial, cerca de 80% das pessoas utilizam plantas como fonte primária de agentes medicinais (PHILLIPSON, 1995).

Nessa busca incessante por substâncias naturais, merecem destaque as técnicas cromatográficas modernas que aliadas aos métodos físicos atualmente disponíveis, têm contribuído muito nos trabalhos do químico de produtos naturais, que tem conseguido elucidar, com maior rapidez e precisão, as estruturas das substâncias isoladas. As técnicas utilizadas na purificação das substâncias orgânicas têm possibilitado a detecção e o isolamento de quantidades suficientes para a realização de testes biológicos e verificar a ocorrência de atividade farmacológica.

São muitas as contribuições proporcionadas pelo estudo dos produtos naturais que resultaram na descoberta de diferentes classes de substâncias de distintas categorias terapêuticas (Figura 1; p. 2). Podem ser citados os agentes antimalaríais quinina (I) e a artemisinina (II), isolados das espécies *Cinchona officinalis* e *Artemisia annua*, respectivamente, que vêm sendo usadas durante centenas de anos na América do Sul e na etnomedicina chinesa (MATOS, 1991). O alcalóide quinolínico quinina inspirou, anos após seu isolamento, a descoberta dos derivados antimalaríais do grupo das aminoquinolinas, sendo a cloroquina um dos medicamentos mais vendidos do Mundo (MURRAY, 1996). Entre os fármacos em uso até os dias de hoje também podem ser citados os alcalóides extraídos do ópio (látex da papoula - *Papaver somniferum* L.), como a morfina (III) com potente ação hipnoanalgésica e a codeína (IV) de ação antitussígena (YUNES & CALIXTO, 2001); glicosídeos cardíacos digitoxina (V) e digoxina (VI) extraídos de *Digitalis*, embora apresentem baixo índice terapêutico, são empregados no tratamento de insuficiências cardíacas severas (FRAGA & BARREIRO, 1996). Na terapia contra o câncer, um dos maiores alvos na busca por plantas bioativas, destacam-se os alcalóides indolmonoterpênicos vincristina (VII) e a vimblastina (VIII) isolados de *Catharanthus roseus*, empregados no tratamento de linfomas e leucemia infantil (YUNES & CALIXTO, 2001); o diterpenóide taxol (IX), uma das mais promissoras descobertas, isolado da casca do caule de *Taxus brevifolia* (WALL & WANI, 1996, 1998), e mais recentemente, a camptotecina (X), um alcalóide extraído da árvore chinesa *Camptotheca acuminata* e derivados (PINTO *et al.*, 2002) amplamente utilizados na clínica.

É nesse contexto e diante de resultados tão promissores que o grupo de pesquisa em química de produtos naturais da UFRRJ tem contribuído para o desenvolvimento de várias áreas de conhecimento, gerando informações imprescindíveis e complementares sobre a química e a biologia dos produtos naturais isolados das plantas brasileiras. Dentro desta linha de pesquisa, realizou-se o estudo para identificação dos principais metabólitos especiais bioproduzidos por espécies dos gêneros *Andira* e *Palicourea*. Este estudo certamente vai ampliar o conhecimento da química das famílias as quais esses gêneros pertencem revelando metabólitos que poderão ser usados como marcadores sistemáticos. Com o incentivo e a integração entre diferentes institutos de pesquisa, algumas substâncias isoladas, extratos e frações foram utilizados para avaliar atividade anti-helmíntica e antioxidante nas espécies *A. anthelmia* e *A. fraxinifolia*.

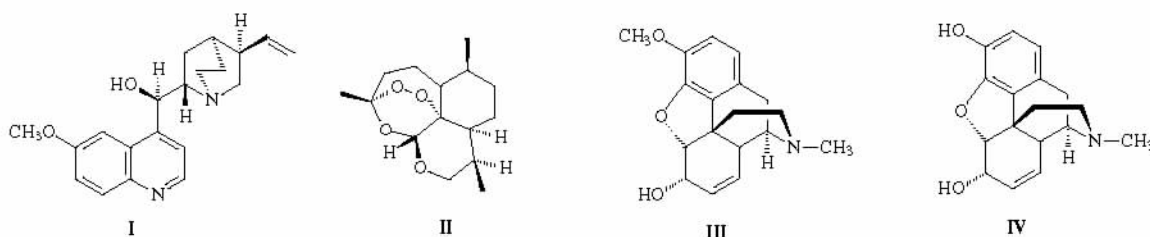
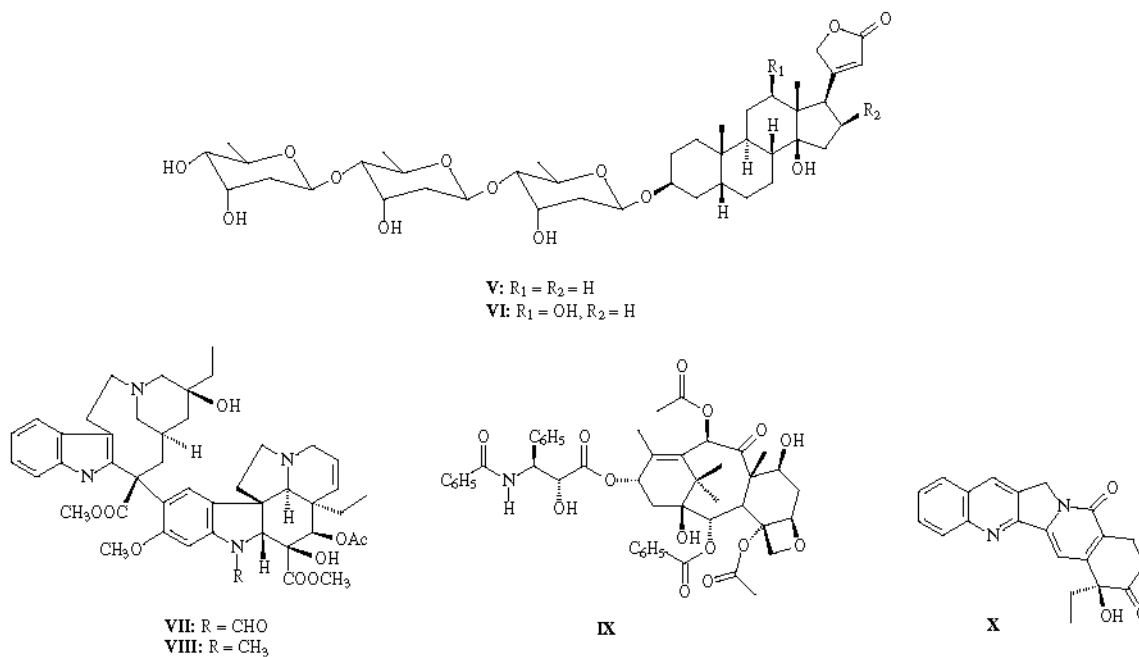


Figura 1. Exemplos de produtos naturais de importância na terapêutica.



Continuação da Figura 1. Exemplos de produtos naturais de importância na terapêutica.

1.1 Objetivos

- Isolar e purificar os constituintes químicos das raízes de *Andira anthelmia* e *Andira fraxinifolia* e das folhas de *Palicourea coriacea*.
- Identificar as substâncias isoladas utilizando-se métodos espectroscópicos como RMN ¹H e ¹³C, uni- e bidimensionais e massas.
- Preparar derivados com o propósito de facilitar a identificação das substâncias isoladas e registrar novos constituintes na literatura.
- Avaliar a atividade anti-helmíntica dos extratos, frações e substâncias isoladas de *Andira anthelmia*.
- Avaliar atividade antioxidante de extratos, frações e substâncias isoladas de *Andira anthelmia* e *Andira fraxinifolia*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Generalidades Sobre a Família Leguminosae e o Gênero *Andira*

A família Leguminosae, é constituída por cerca de 18.000 espécies, distribuídas em cerca de 650 gêneros (HU *et al.*, 2000). Ocorrem em todas as partes do planeta, com exceção das regiões Ártica e Antártica, difundidas pelas regiões tropicais e subtropicais, especialmente zonas áridas ou semi-áridas; somente poucas espécies estendem-se distintivamente em zonas temperadas (CRONQUIST, 1981). Esta família destaca-se principalmente pela sua significância na natureza, representando quase um décimo de todas as espécies de plantas floríferas, só comparável em número de espécies entre as Angiospermas às famílias Orchidaceae e Asteraceae (RAVEN *et al.*, 1996).

A taxonomia das Leguminosae tem gerado muitas controvérsias. Alguns autores como SCHULZE-MENZ (1964) e BURKART (1952, 78, 79, 87), preferem manter a unidade da família (Leguminosae), reconhecendo para as mesmas as subfamílias Mimosoideae, Caesalpinoideae e Faboideae (ou Papilionoideae). Outros elevam as três subfamílias ao grau de família (Mimosaceae, Caesalpinoideae, Fabaceae ou Papilionaceae), reunindo-as na Ordem Leguminales (HUTCHINSON, 1964) ou Fabales (CRONQUIST, 1968; TAKHATAJAN, 1969).

Uma particularidade da família Leguminosae é o seu alto teor de flavonóides. Esta característica não se deve somente ao grande número de flavonóides de rara ocorrência na natureza, mas também à diversidade de esqueletos encontrados (HARBORNE *et al.*, 1971).

A subfamília Papilionoideae e/ou Fabaceae, possui distribuição mundial, com a maioria dos seus representantes (árvores e trepadeiras) nos trópicos e hemisfério sul, sendo as espécies herbáceas e arbustivas nas zonas temperadas, principalmente na região mediterrânea. Segundo POLHILL, 1981 esta subfamília subdivide-se em 30 tribos com cerca de 440 gêneros, incluindo entre outros *Swartzia* e *Zollernia* de Swartzieae, *Andira* e *Dalbergia* de Dalbergieae, *Tephrosia*, *Derris* e *Lonchocarpus* de Millettieae, *Medicago* de Trifolieae, *Psoralea* de Psoraleae, amplamente citados na literatura como fonte de substâncias biologicamente ativas e *Phaseollus* de Phaseoleae, como fonte de alimento.

O gênero *Andira* compreende o grupo de plantas popularmente conhecido por angelins (MATOS, 1979), sendo representado por 29 espécies distribuídas na América tropical, com duas subespécies na África (PENNINGTON & GEMEINHOLZER, 2000). O gênero é muito diversificado e abundante, ocorrendo em florestas secas, úmidas e restingas da costa Atlântica do Brasil, sendo algumas espécies adaptadas à sobrevivência às queimadas, freqüentes na região central do Brasil (PENNINGTON, 1995, 1996; PENNINGTON & LIMA, 1995). No Brasil, foram encontradas 27 espécies e 7 variedades, sendo que o maior número de espécies se encontra na Amazônia, decrescendo à medida que se aproxima do sul do país, não sendo encontrado nenhum representante do gênero no Rio Grande do Sul (MATOS, 1979). As espécies mais abundantes encontradas no Brasil são *A. racemosa*, *A. fraxinifolia*, *A. nítida*, *A. frondosa*, *A. legalis* e *A. anthelmia* (FARIA *et al.*, 1986).

Todas as espécies do gênero *Andira* têm grande potencial para uso como plantas ornamentais, podendo ser empregadas tanto em jardins residenciais, parques e avenidas a exemplo de *A. fraxinifolia*. A sua folhagem é densa e bonita, em geral de tonalidade verde brilhante. Suas flores têm coloração do rosado até o violáceo (MATOS 1979).

Algumas espécies apresentam elevado grau de dificuldade na identificação botânica, particularmente devido a grande variabilidade na morfologia foliar. A confusão na denominação científica deste gênero foi citada por Lamarck em 1783, quando o destacou de *Geoffroea*, por considerá-lo um gênero independente (MATOS, 1979). Segundo

PENNINGTON (1995) as hipóteses sistemáticas existentes para o gênero, são baseadas em métodos intuitivos e não muito claros.

Os gêneros *Andira*, *Geoffroea* e *Sweetia*, todos pertencentes à mesma subfamília, são citados como possuidores de ação anti-helmíntica. Em particular, é a casca da raiz de algumas espécies destes gêneros que se atribui tal atividade, as quais tiveram aplicação terapêutica bastante difundida no fim do século XVIII sendo conhecidas como "Cortex Geoffroyae" (LAPA BAUTISTA *et al.*, 1976).

O gênero *Andira* foi bem divulgado na Europa desde 1755, onde médicos e farmacêuticos de diversos países preconizavam a industrialização da casca, transformando-a em pó, com o qual procuravam obter uma droga de aplicação anti-helmíntica (MATOS, 1979; PENNINGTON, 1996). Na América do Norte, também já era conhecido este princípio medicinal dos angelins, porém, estavam incluídos em espécies de outros gêneros como *Hymenolobium*, *Geoffroea*, *Vatairea* e *Vataireopsis*, entre outros (MATOS, 1979). No Brasil usa-se o fruto e a casca para expelir vermes (MATOS, 1979; CORRÊA, 1984).

As propriedades vermícidas de *A. anthelmia* e a eficácia do pó, feito a partir do fruto seco, contra nematóides da espécie *Ascaris lumbricoides*, foi suficientemente comprovada pela ação sobre a totalidade desses vermes intestinais, parasitas do homem (PECKOLT, 1942). Contudo, devido a sua toxidez, deve-se ter cautela no seu uso, pois em uma dose elevada podem-se produzir sintomas, tais como, vômitos, diarreia, febre e delírio, podendo até ser fatal (PECKOLT, 1942). SILVA *et al.* (2003) evidenciaram a toxidez *in vivo* dos extratos aquosos de *A. anthelmia* e indicaram as raízes como a responsável, dependendo da dose administrada.

CORRÊA (1984) cita a ação purgativa e vermífuga das sementes de *A. fraxinifolia*, alertando, também, quanto ao seu uso devido a sua toxidez.

Em 1885, dada à multiplicidade de nomes, as espécies pertencentes ao gênero *Andira* deixaram de ser usadas como anti-helmíntica, sendo substituídas por agentes comerciais mais constantes (MATOS, 1979).

2.1.1 Aspectos botânicos de *Andira fraxinifolia* Benth., 1838 e *Andira anthelmia* (Velloso, 1829) MaCbride (1934)

Segundo MATOS (1979), *A. fraxinifolia* (Figura 2; p. 7), é uma árvore pequena, com cerca de 3 m de altura, raramente atingindo porte mais elevado (15 m). Ramos novos ferrugíneos, mais ou menos tomentosos, quase glabros, subsulcados; estípulas com até 6 mm ou nulas, escuras e lanceolado-lineares, pilosas; estípulas cetáceas, de 1-5 mm de comprimento. Folhas alternas ou subopostas, de 9-11 folíolos (-15), pecíolos de 3,5-8 cm de comprimento, com cerca de 2 mm de diâmetro, glabros ou pubérulos; raque mais ou menos sulcada com até 22,5 cm de comprimento; pecíolos robustos de 1,5-3 mm de comprimento e 1,5-1,9 (-2,7) cm de largura, oblongos, ovado-oblongos ou lanceados, cartáceos ou rígido-cartáceos, glabros e opacos na face superior e pubescentes ou ligeiramente glabros, posteriormente, na face inferior, base subarredondada ou obtusa, ápice curto-acuminado, margens ligeiramente recurvas, nervuras principal impressa na face superior e saliente na inferior. Panícula laxa, multiflora, com 15 (-18) cm de comprimento, ligeiramente tomentosa, mais ou menos ruiva; brácteas com cerca de 4 mm. Cálice com 4,5-5 cm de comprimento, base obtusa, densamente adpresso-piloso, com pilosidade amarelada, dentes com cerca de 1 mm de comprimento e mais ou menos triangulares. Corola com cerca de 10 mm de comprimento. Ovário seríceo, viloso, com estipe curto. Fruto ovado-oblongo, com superfície áspera.

A. anthelmia (Figura 2; p. 7) é uma árvore pequena de casca cinzenta, ramos terminais ruivo-tomentosos ou ligeiramente glabros. Estípula de 1,5-2,5 cm de comprimento,

geralmente caducas, lanceoladas, acuminadas. Folhas com cerca de 30 cm de comprimento, pecíolos comuns com 15-20 cm de comprimento, geralmente denso-tomentosos ruivos; estípulas pequenas; folíolos 9-13, de 5-7,5 (-10 cm) de comprimento e 2,5-3 cm de largura, oboval-elípticos ou oblongos, coriáceos, glabros na face superior e molemente pubescentes na inferior, base arredondada ou largamente cuneada, ápice acuminado, retuso, subarredondado, às vezes, submarginado, margens recurvas, nervuras salientes na face inferior. Panículas menores que as folhas, ruivo-tomentosas. Brácteas e bractéolas caducas. Cálice ligeiramente campanulado, com 6 mm, base obtusa ou ligeiramente atenuada, com dentes curtíssimos, subtriangulares, obtusos. Pétalas com o dobro do tamanho do cálice; vexilo orbicular, com a base subcordada, ápice emarginado; asas oblongas, com unha de mais ou menos 1/3 do seu tamanho. Estame vexilar livre até a base, anteras ovado-oblongas. Ovário achatado, vilosos, estípite menor que o cálice; estilete muitas vezes piloso. Drupa oblonga, com cálice obtuso, possuindo semente única (MATOS, 1979).

As espécies *A. anthelmia* e *A. fraxinifolia* são praticamente indistinguíveis quando jovens. As duas são árvores ou arvoretas nativas das florestas da costa atlântica, sendo a primeira um pouco maior e freqüente em áreas periodicamente inundadas (matas ciliares ou de baixadas aluviais), ao passo que, a segunda, é da submata de florestas em áreas não inundadas e de restinga (RIZZINI, 1971).

Tabela 1. Posição taxonômica de *A. fraxinifolia* e *A. anthelmia*

Divisão: Angiospermae	Divisão: Angiospermae
Classe: Dicotyledoneae	Classe: Dicotyledoneae
Subclasse: Archichlamydeae	Subclasse: Archichlamydeae
Ordem: Rosales	Ordem: Rosales
Sub-Ordem: Leguminosineae	Sub-Ordem: Leguminosineae
Subfamília: Faboideae (Papilionoideae)	Subfamília: Faboideae (Papilionoideae)
Tribo: <i>Dalbergieae</i>	Tribo: <i>Dalbergieae</i>
Família: Leguminosae	Família: Leguminosae
Gênero: <i>Andira</i>	Gênero: <i>Andira</i>
Espécie: <i>Andira fraxinifolia</i> Benth., 1838	Espécie: <i>Andira anthelmia</i> (Velloso, 1829) Macbride, 1934



Figura 2. Aspecto geral de exemplares de *Andira anthelmia* (A) e *Andira fraxinifolia* (B) (SILVA, 2002).

2.1.2 Aspectos químicos e biológicos do gênero *Andira*

A revisão minuciosa sobre a química do gênero *Andira* (SciFinder Scholar™ 2006 e outras bases de dados) mostrou certa variedade de metabólitos, predominando especialmente isoflavonóides e pterocarpanos.

Nas folhas de *A. spectabilis* foi identificado o aminoácido *N*-metil-tirosina (XI) (ALOY & RABAUT, 1911), também encontrado nos frutos de *A. legalis* (ALMEIDA, 1973). Este aminoácido é citado na literatura com os nomes de andirina, surinamina, geoffroya, ratanhina e angelina, dependendo da espécie na qual foi isolado (MWAULUKA *et al.*, 1975).

As raízes de *A. araroba* revelaram a presença do fenol antracênico crisarobina (XII) (1,8-diidroxí-3-metil-9-antrona) (TUNMANN, 1915), utilizado como agente queratolítico na forma de unguento no tratamento local de diversas dermatoses como a psoríase, tricofitose e eczema crônico (MATOS, 1991).

BRAZ FILHO *et al.*, (1973) estudando algumas espécies de leguminosas brasileiras isolaram da casca do tronco de *A. parviflora* os esteróides cicloartenona (XIII) e cicloartenol (XIV) e a isoflavona biochanina A (XV). Biochanina A (XV) também foi identificada como o constituinte majoritário das cascas da raiz e do cerne de *A. humilis* por LAPA BAUTISTA & MORS (1975).

Dentre as espécies de *Andira*, a mais estudada até o momento é a *Andira inermis*. Os trabalhos começaram a surgir em 1962 com o grupo de COCKER *et al.* (1962a; 1962b), que citam o isolamento dos pterocarpanos pterocarpina (XVI) e inermína (XVII) e da biochanina A (XV) junto com uma pequena quantidade de ácidos graxos de cadeia longa, presentes na madeira desta planta.

LOCK de UGAZ *et al.* (1991) estudando as folhas dessa espécie isolaram as isoflavonas formononetina (XVIII), daidzeína (XIX), 3'-metoxidaidzeína ou calicosina (XX), genisteína (XXI), pseudobaptigenina (XXII) e o flavononol, taxifolina (XXIII). Isoflavonas também foram encontradas nas raízes dessa espécie, substituídas em C-7 por duas ou três unidades de açúcar: biochanina A 7-*O*-β-D-apiofuranosil-(1→5)-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glicopiranosídeo (XXIV), genisteína 7-*O*-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glicopiranosídeo (XXV) e lanceolarina 7-*O*-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glicopiranosídeo (XXVI) (SILVA *et al.*, 2000).

KRAFT *et al.* (2000; 2001; 2002) publicaram três trabalhos com relação ao estudo químico e biológico dos constituintes isolados de *A. inermis*. Em seu primeiro trabalho estudaram as frações mais lipofílicas das cascas do tronco dessa espécie, e nestas, foram isoladas seis isoflavonas: prunetina (XXVII), biochanina A (XV), genisteína (XXI), pratenseína (XXVIII), formononetina (XVIII) e calicosina (XX). Através desse fracionamento biomonitorado KRAFT *et al.* (2000) também puderam comprovar a atividade contra cepas de *Plasmodium falciparum in vitro* das isoflavonas calicosina (XX) e genisteína (XXI), responsáveis pela maior atividade antiplasmódica dentre as outras isoflavonas isoladas desse extrato lipofílico, com valores de EC₅₀ entre 2,0 µg/ml a 4,2 µg/ml para cepas sensíveis a cloroquina e entre 4,1 µg/ml a 9,8 µg/ml para cepas resistentes a cloroquina.

Em 2001, KRAFT *et al.* relatam o isolamento de compostos com esqueleto do tipo 2-arilbenzofurano-3-carbaldeídos das folhas de *A. inermis*. Esses compostos derivados de flavonóides ou pterocarpanos encontrados raramente na natureza, foram nomeados de andinermals A (XXIX), B (XXX) e C (XXXI). A presença dos *O*-glicosil-flavononóis taxifolina-3-*O*-(3''-*O*-*trans*-cinamoil)-α-L-ramnopiranosídeo (XXXII), astilbina (XXXIII), engeletina (XXXIV), e as isoflavonas afrormosina (XXXV), calicosina (XX), formononetina (XVIII) e prunetina (XXVII) também foram relatadas nas folhas dessa planta. Nesse estudo KRAFT *et al.* (2001) comprovaram o potencial antiplasmódico dos compostos andinermal-A (XXIX), andinermal-C (XXXI) e taxifolina-3-*O*-(3''-*O*-*trans*-cinamoil)-α-L-

ramnopiranosídeo (**XXXII**) com valores de EC_{50} variando de 2,3 $\mu\text{g/ml}$ a 10,3 $\mu\text{g/ml}$ contra cepas sensíveis a cloroquina e 3,9 $\mu\text{g/ml}$ a 4,2 $\mu\text{g/ml}$ contra cepas resistentes a cloroquina de *Plasmodium falciparum*.

No terceiro trabalho, KRAFT *et al.* (2002) referem-se ao isolamento de dois compostos com esqueleto tipo pterocarpano novamente nas folhas de *A. inermis*. Esses compostos com um carbono extra no anel heterocíclico, originados por ciclização oxidativa de uma 2'-metoxiisolfavona foram nomeados de andirol A (**XXXVI**) e B (**XXXVII**). Nesse trabalho também foi descrito o isolamento de um composto com esqueleto tipo 2-aril-3-hidroxi metil-benzofurano nomeado de andidermol (**XXXVIII**).

Durante essa investigação fitoquímica, KRAFT *et al.* (2000; 2001; 2002) puderam constatar que as isoflavonas calicosina (**XX**), genisteína (**XXI**), formononetina (**XVIII**) e os compostos 2-arilbenzofurano-3-carbaldeído, andinermal A (**XXIX**) e andirol A (**XXXVI**) foram detectados em folhas de espécies de *A. inermis* coletadas no Panamá e África enquanto que andirol B (**XXXVII**) e andidermol (**XXXVIII**) foram encontrados apenas em espécies africanas.

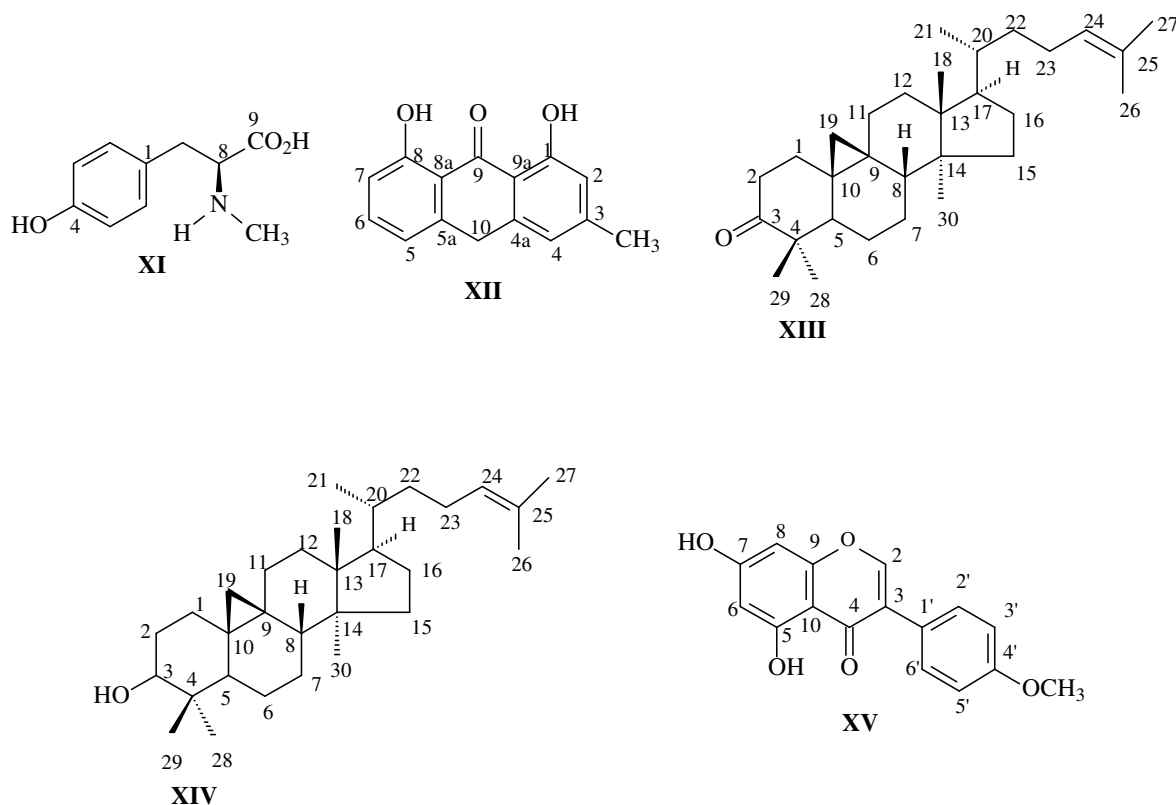
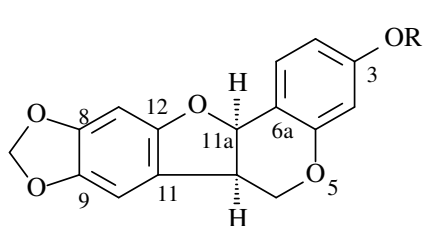
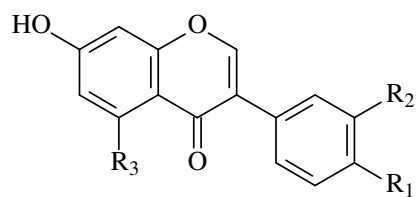


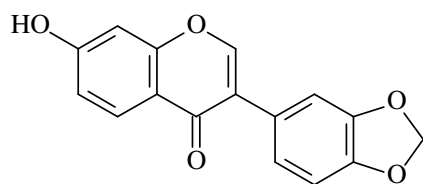
Figura 3. Substâncias isoladas do gênero *Andira*.



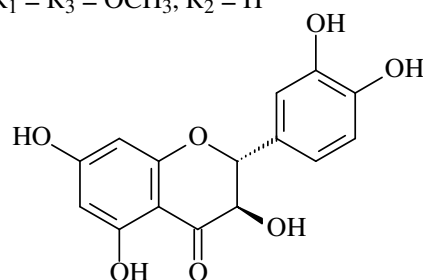
XVI: R = H
XVII: R = CH₃



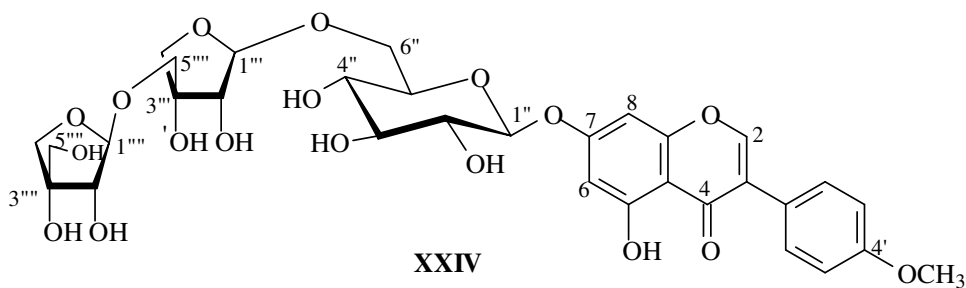
XVIII: R₁ = OCH₃, R₂ = R₃ = H
XIX: R₁ = OH, R₂ = R₃ = H
XX: R₁ = OH, R₂ = OCH₃, R₃ = H
XXI: R₁ = R₃ = OCH₃, R₂ = H



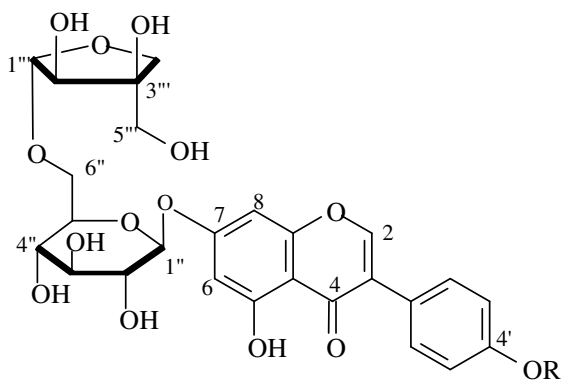
XXII



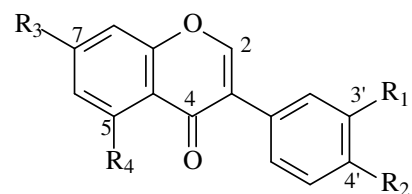
XXIII



XXIV

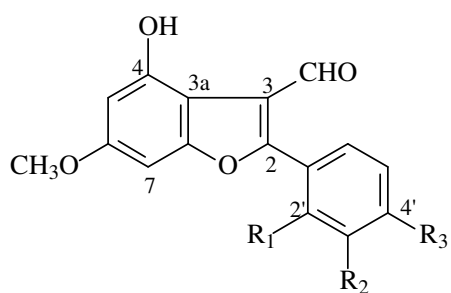


XXV: R = H
XXVI: R = OCH₃



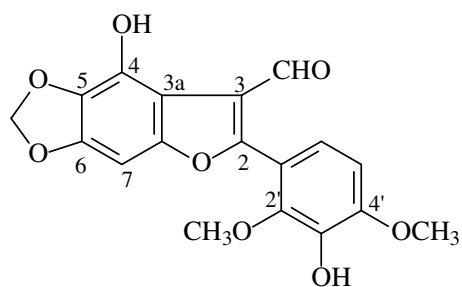
XXVII: R₁ = H, R₂ = R₄ = OH, R₃ = OCH₃
XXVIII: R₁ = R₃ = R₄ = OH, R₂ = OCH₃

Continuação da Figura 3. Substâncias isoladas do gênero *Andira*.

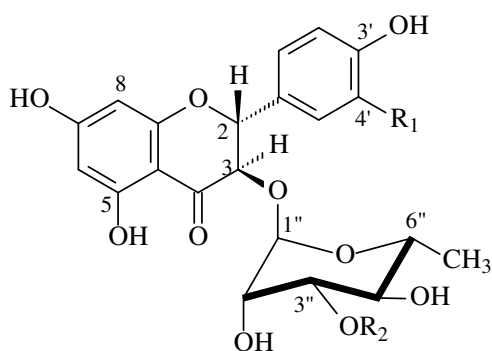


XXIX: $R_1 = R_3 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{OH}$

XXX: $R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = R_3 = \text{OH}$



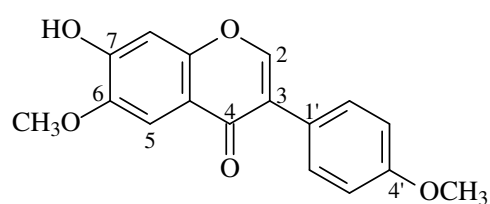
XXXI



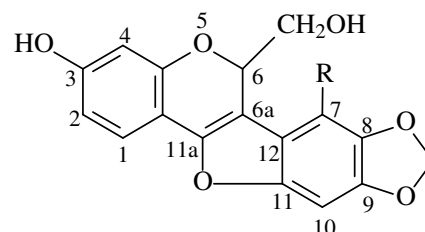
XXXII: $R_1 = \text{OH}$; $R_2 =$

XXXIII: $R_1 = \text{OH}$; $R_2 = \text{H}$

XXXIV: $R_1 = R_2 = \text{H}$

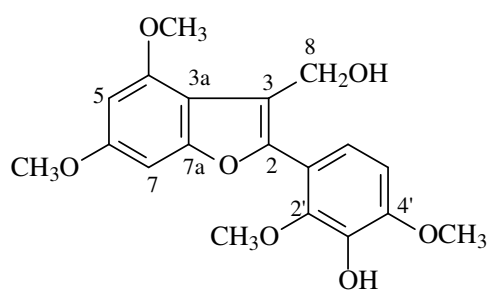


XXXV



XXXVI: $R = \text{OCH}_3$

XXXVII: $R = \text{H}$



XXXVIII

Continuação da Figura 3. Substâncias isoladas do gênero *Andira*.

2.2 Generalidades Sobre a Família Rubiaceae e o Gênero *Palicourea*

A família Rubiaceae Juss. é a quarta maior família das Angiospermas (ROBBRECHT, 1993) com cerca de 10.700 espécies, subordinadas a aproximadamente 640 gêneros, distribuídos principalmente pelas regiões tropicais do Mundo (ROBBRECHT, 1988).

Segundo CRONQUIST (1981), esta família pertence à ordem Rubiales; no entanto, DALHGREN (1989) a posiciona na ordem Gentiales. Ainda segundo CRONQUIST (1968) existem características que unem as Rubiaceae as Gentiales como um todo, e especialmente as Loganiaceae. Estas características são: endosperma nuclear; estípulas bem desenvolvidas; tricomas glandulares especializados, chamados coleteres; dispostos sobre a superfície interna das estípulas; estrutura da parede do pólen; presença de alcalóides complexos derivados do triptofano; somente conhecido das Loganiaceae, Apocynaceae e Rubiaceae. A família das Gentiales desperta interesse químico e biológico por conterem seco-iridóides e as famílias Loganiaceae e Apocynaceae, principalmente pela ampla distribuição de alcalóides (JENSEN *et al.*, 1975).

ROBBRECHT (1988) propõe a divisão de Rubiaceae em 4 subfamílias: Rubioideae, Cinchonoideae, Ixoroideae e Antirheoideae. Porém, as tentativas de uma classificação para a família Rubiaceae ainda não são bem definidas. Na medida em que novos conhecimentos de caracteres morfo-anatômicos são adquiridos, aliados as características químicas e bioquímicas novas delimitações vão sendo introduzidas na família.

As plantas da família Rubiaceae podem ser classificadas como árvores de grande, médio ou pequeno porte, arbustos, subarbustos, ervas perenes ou anuais (BARROSO, 1991).

O gênero *Palicourea* pertencente à tribo *Psychotrieae* da família Rubiaceae, compreende cerca de 200 espécies de arbustos e pequenas árvores distribuídas pelos Neotrópicos (TAYLOR, 1997) (Figura 4; p. 13). A tribo *Psychotrieae* apresenta aproximadamente 50 gêneros e ampla distribuição em toda zona tropical (LIBOT *et al.*, 1987).

As plantas desse gênero são conhecidas por serem tóxicas para o gado. As espécies mais citadas são *P. marcgravii*, *P. grandiflora* e *P. juruana* que são as maiores responsáveis pela morte de bovinos no Brasil e América tropical (TOKARNIA *et al.*, 2000).

Sua classificação é difícil e não há certezas em relação aos limites genéricos. *Palicourea* está estreitamente relacionado ao *Psychotria*, com o qual muitas espécies têm sido unidas (TAYLOR, 1997). SCHUMANN (1891) foi um dos primeiros autores a distinguir explicitamente *Palicourea* separando-o de *Psychotria*. Desde então, não há consenso quanto às características mais adequadas na separação entre as espécies incluídas nestes dois gêneros, considerados morfologicamente muito semelhantes (STANDLEY, 1936, 1938; STEYERMARK, 1972; ROBBRECHT, 1988; TAYLOR, 1989, 1993, 1996).

Grande controvérsia também é encontrada quanto à distinção entre os gêneros *Cephaelis* e *Psychotria*. ROBBRECHT (1988) separa estes dois em gêneros distintos, TAYLOR (1997) não encontra evidências suficientes para considerar *Cephaelis* como gênero distinto e inclui a maior parte das espécies antes consideradas *Cephaelis* em *Psychotria* e algumas em *Palicourea*. Ainda, segundo ROBBRECHT (1988) a tribo *Psychotrieae* (subfamília Rubioideae) possui 50 gêneros e a distinção entre alguns destes muitas vezes é difícil, como no caso de *Psychotria* e *Palicourea*, sendo que *Psychotria* é considerado um gênero muito heterogêneo.

Evidências químicas, aliadas à taxonomia, poderiam auxiliar na análise sistemática dos gêneros de Rubioideae-*Psychotrieae*, pois não apenas os gêneros *Psychotria* e *Cephaelis* apresentam distinção quanto ao tipo de alcalóides produzidos, mas também o gênero *Palicourea*, reservando-se as exceções, que eventualmente poderiam ser atribuídas justamente

às divergências encontradas e às diferentes abordagens classificatórias que podem ser utilizadas.

Cephaelis produz alcalóides tetraidroisoquinolino-monoterpênicos cujo aminoácido de origem é a tirosina, sendo o único gênero da tribo *Psychotrieae* a sintetizar este tipo de alcalóide (HEMINGWAY & PHILLIPSON, 1980).

O gênero *Psychotria* é conhecido pela presença de alcalóides cujo aminoácido de origem é o triptofano. Estes são principalmente do tipo polindólico ou derivados metil-triptamínicos (RIVIER & LINDGREN, 1972; HEMINGWAY & PHILIPSON, 1980), não havendo relação com monoterpenos.

No gênero *Palicourea*, além de alcalóides polindólicos isolados em *P. fendleri* (NAKANO & MARTIN, 1976), *P. dominguensis* (RIPPERGER, 1982) e *P. alpina* (STUART & WOO-MING, 1975) também foram encontrados alcalóides indol-monoterpênicos tipo strictosidina em *P. alpina* (STUART & WOO-MING, 1974) e *P. marcgravii* (MORITA *et al.*, 1989), todos derivados do triptofano.

Um estudo sistemático mais aprofundado das espécies de *Psychotria*, *Palicourea* e *Cephaelis*, considerando características anatomo-morfológicas acompanhadas de dados químicos, especialmente a produção de alcalóides, poderia eventualmente eliminar as exceções encontradas e contribuir para uma melhor definição taxonômica dos gêneros da tribo *Psychotrieae*.

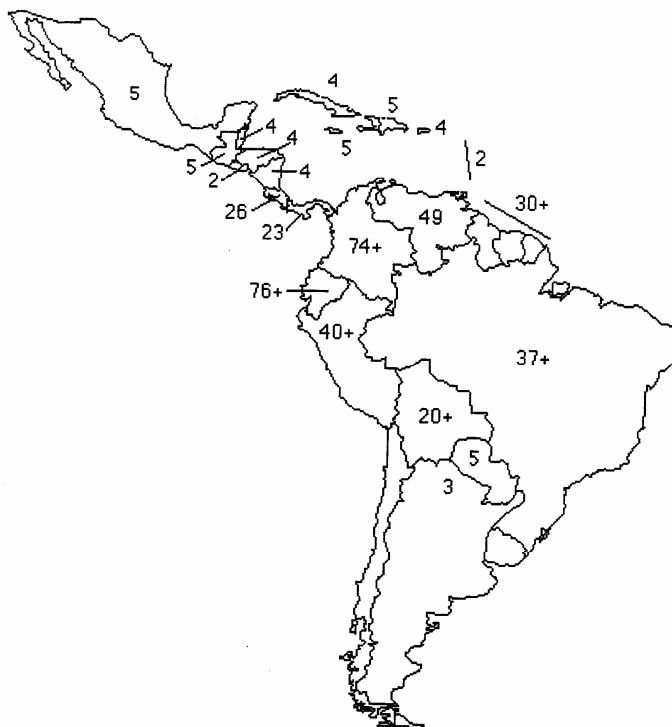


Figura 4. Número aproximado de espécies de *Palicourea* distribuídas pelas floras neotropicais (TAYLOR, 1997).

2.2.1 Aspectos botânicos de *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum

Segundo TAYLOR (1997) algumas características morfológicas servem para diagnosticar espécies de *Palicourea*: folhas emparelhadas a verticiladas, geralmente membranosas ou subcoriáceas em espécies de hábitat de savanas, normalmente pustulosas abaxialmente; estípulas unidas ao redor do talo continuamente; lóbulos reduzidos ou obsoletos; inflorescências e flores diversamente coloridas; corolas tubulares ou funiformes, intumescida ou curvada na base, externamente glabrosa ou pubescente, às vezes com tricomas multicelulares coloridos; frutos carnosos, endocarpo freqüentemente unilocular, semente única com fenda basal pré-formada. Geralmente são encontradas nas mais baixas elevações, 0-1.200 e/ou 1.500 m.

Palicourea coriacea (Figura 5; p. 15) é um arbusto ou arvoreta com flores e inflorescências amarelas, folhas sésseis, rígido-coriáceas, com nervuras e veias amarelas, ápice agudo, limbo foliar com 10 cm de comprimento e 5 cm de largura. Geralmente encontrada na América Central (sul e norte), Guianas, Bolívia, Colômbia, Equador, Venezuela, Peru (Andes-acima dos 1.000 metros) e no Brasil na Amazônia (oeste, sudoeste), costa do Atlântico, Planalto Central e margens do Rio Paraná (DELPRETE & CORTÉS, 2005).

Tabela 2. Posição taxonômica de *Palicourea coriacea*

Divisão: Magnoliophyta
Classe: Magnoliopsida
Subclasse: Asteridae
Ordem: Rubiales
Subfamília: Rubioideae
Tribo: <i>Psychotrieae</i>
Família: Rubiaceae
Gênero: <i>Palicourea</i>
Espécie: <i>Palicourea coriacea</i> (Cham.) K. Schum

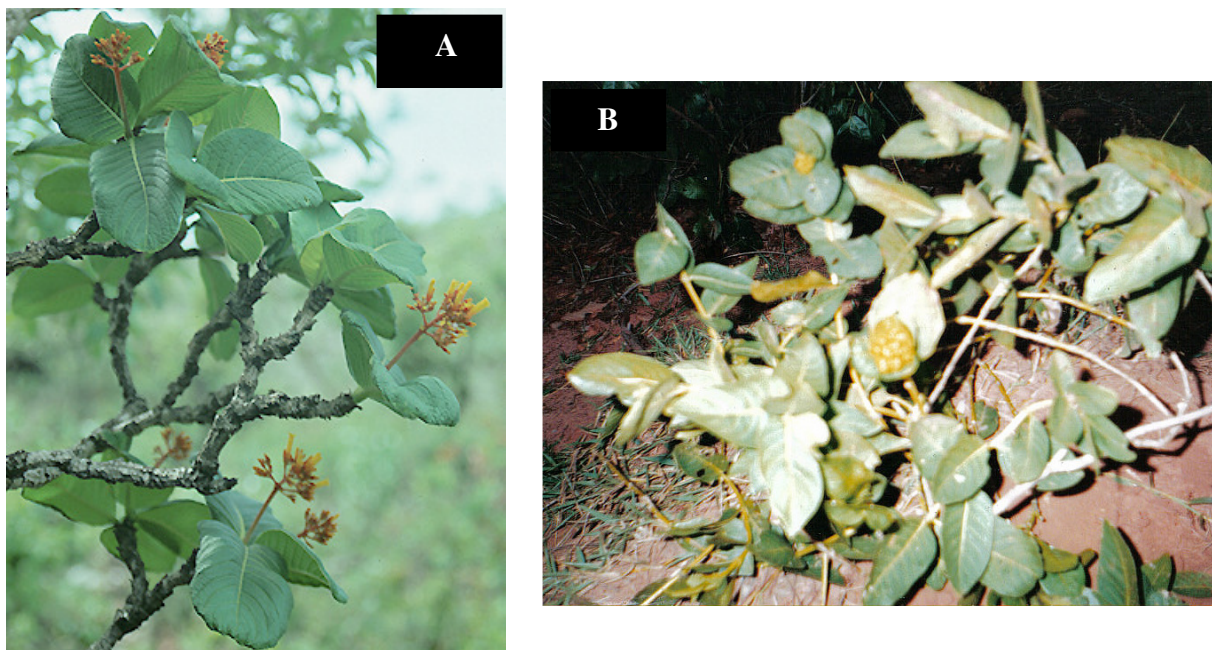


Figura 5. Aspecto geral de exemplar de *Palicourea coriacea* (A) (DELPRETE & CORTÉS, 2005); (B) (ARQUIVO PESSOAL, 2005).

2.2.2 Aspectos químicos e biológicos do gênero *Palicourea*

A revisão sobre a química deste gênero (SciFinder Scholar™ 2006) mostrou a predominância de alcalóides, em especial tipo indol-monoterpênicos.

STUART & WOO-MING (1974) em seu primeiro estudo com as folhas de *P. alpina*, planta nativa da Jamaica, identificaram a presença de harmana (XXXIX) e de palinina (XL). Em 1975, os autores isolaram o alcalóide pirrolidíndico calicantina (XLI) e o norsesquiterpeno vomifoliol (XLII).

NAKANO E MARTIN (1976) isolaram a calicantina (XLI) e o alcalóide pólindólico quimonantina (XLIII) dos frutos secos de *P. fenderli*. Quimonantina (XLIII) e calicantina (XLI) também foram isolados de *P. dominguensis* (RIPPERGER, 1982) e de *P. ovalis* (GARCIA *et al.*, 1997), respectivamente. É interessante notar que as três espécies de *Palicourea* estudadas onde foi encontrado este tipo de alcalóide apresentaram apenas dímeros.

Das folhas de *Palicourea macgravii*, foi isolado um alcalóide com esqueleto do tipo estrictosidina conhecido como palicosídeo (XLIV) (MORITA *et al.*, 1989).

Nas espécies *P. rigida* e *P. demissa* até o momento não foi detectada a presença de alcalóides. Nas folhas de *P. rigida* foram encontrados os triterpenóides estigmastenona (XLV), friedelina (XLVI), 3- β -hidroxifriedelina (XLVII), 30-hidroxifriedelanona (XLVIII) e β -sitosterol-3-*O*- β -glicopiranosídeo (XLIX) (BOLZANI *et al.*, 1992).

Investigação dos ramos e folhas de *P. demissa*, planta nativa do Equador, levou ao isolamento de ácidos graxos e seus ésteres metílicos entre eles o ácido tetradecanóico (L), eicosanóico (LI) e hexadecanóico (LII); os esteróides β -sitosterol (LIII) e estigmasterol (LIV); o triterpeno friedelina (XLVI); os ácidos fenólicos protocatecúico (LV), vanílico (LVI) e isovanílico (LVII) e as cumarinas escopoletina (LVIII), isoescopoletina (LVIX) e umbeliferona (LX) (EL-SEEDI, 1999).

Das folhas de *P. adusta* foram isolados glicosídeos de alcalóides do tipo indol-monoterpênicos, derivados da condensação da triptamina com o iridóide secologanina. Estes

foram identificados como lialosídeo (**LXI**), e seus derivados hidroxicinâmicos, (*E*)-*O*-(6')-cinamoil-4''-hidroxi-3''-metoxilialosídeo (**LXII**) e (*E*)-*O*-(6')-cinamoil-4''-hidroxi-3'',5''-dimetoxilialosídeo (**LXIII**) (VALVERDE *et al.*, 1999).

Alcalóides indol-monoterpênicos também foram isolados das folhas de *P. crocea*, e foram nomeados de croceaína A (**LXIV**) e B (**LXV**) (DÜSMAN *et al.*, 2004).

Poucos estudos sobre atividade biológica têm sido encontrados na literatura para o gênero *Palicourea*. Alguns relatos referem-se a significativa toxidez de *P. marcgravii* e *P. corymbifera*. EKSCHIMIDT *et al.* (1989) demonstraram que *P. marcgravii* possui uma DL₅₀ bastante baixa e identificaram a neurotoxidez devido à presença de ácido monofluoracético nas folhas de *P. marcgravii*. Em *P. corymbifera* a toxidez em camundongos foi relatada em suas partes aéreas, porém a quantificação por espectrometria de massas e RMN de ¹⁹F, mostrou que o ácido monofluoracético não estava presente no vegetal, e que a toxidez estaria relacionada a outro composto, talvez similar a este ácido (ASSIS *et al.*, 2006).

Outra citação interessante é atividade anti-HIV que é relatada para o peptídeo cíclico com 37 aminoácidos, isolado das cascas do caule de *P. condensata*. Este peptídeo macrocíclico, nomeado de palicoureína (**LXVI**) inibiu os efeitos da infecção de HIV-1 em linhagens de células T-linfoblastóides, e quando comparado com a ação de outros compostos com a mesma atividade, mostrou-se bastante promissor (BOKESCH *et al.*, 2001).

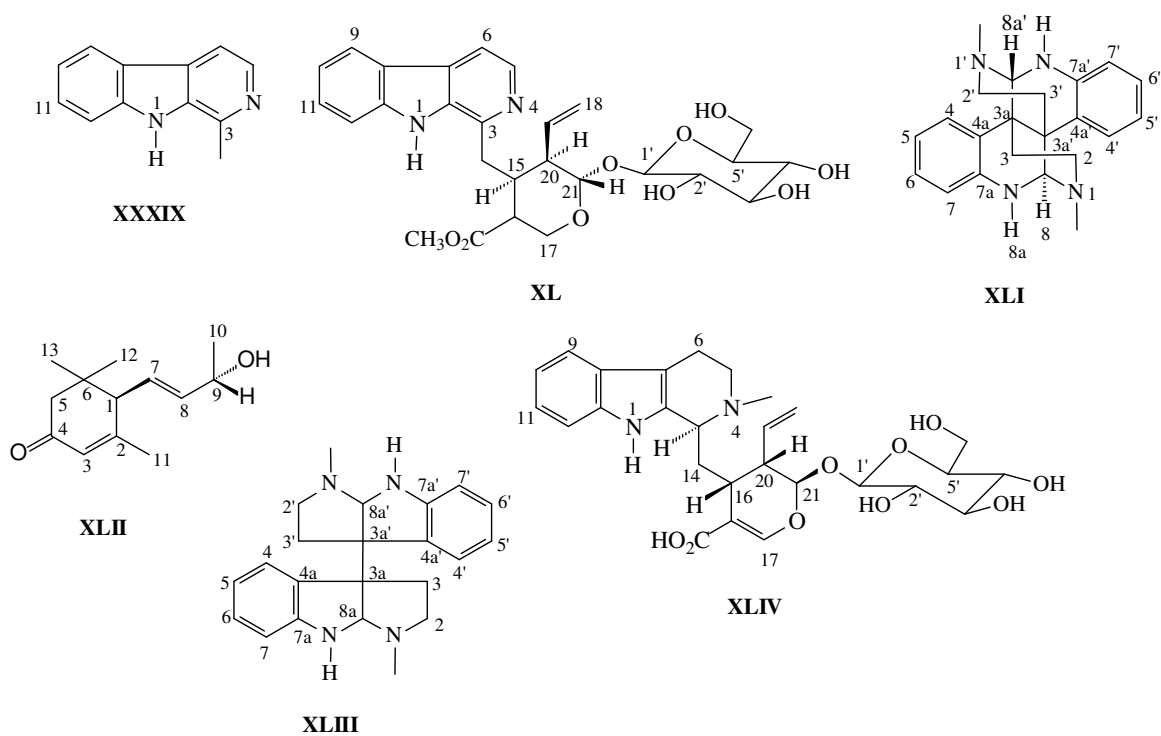
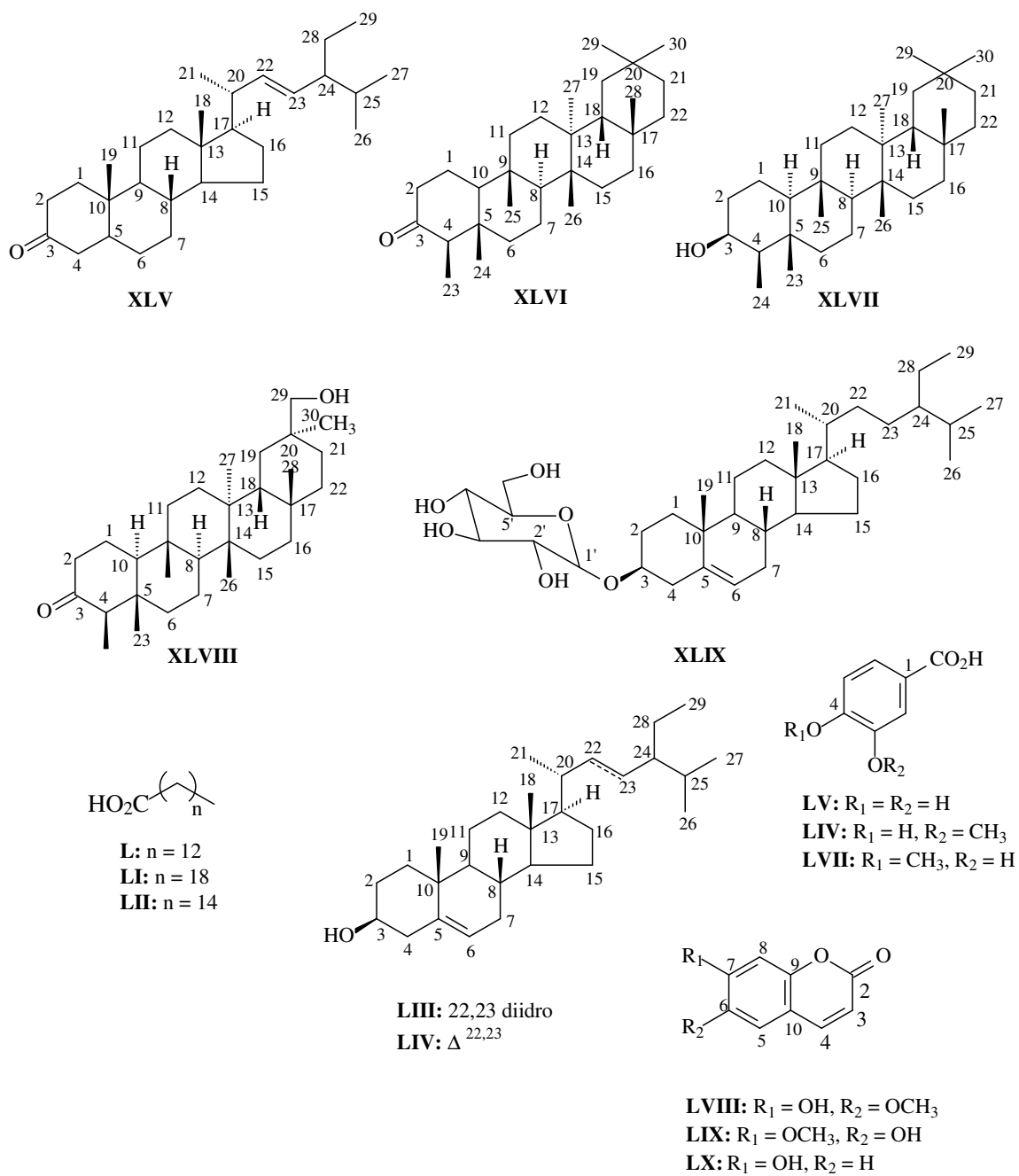
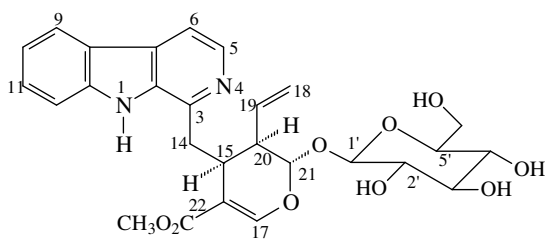


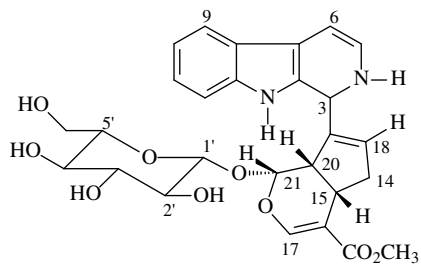
Figura 6. Substâncias isoladas do gênero *Palicourea*.



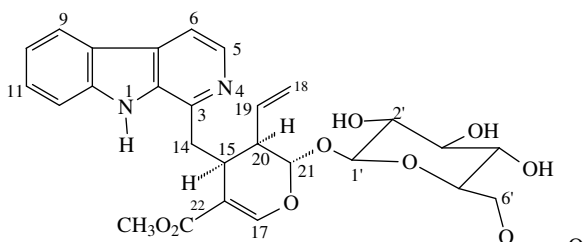
Continuação da Figura 6. Substâncias isoladas do gênero *Palicourea*.



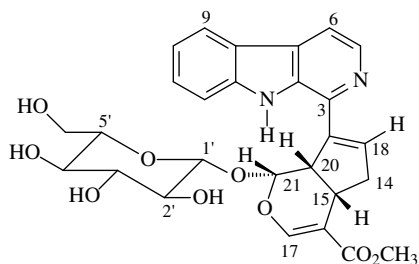
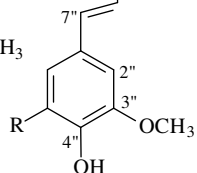
LXI



LXIV



LXII: R = H
LXIII: R = OCH₃



LXV



LXVI

Continuação da Figura 6. Substâncias isoladas do gênero *Palicourea*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais e Métodos Utilizados no Isolamento e Identificação Estrutural das Substâncias Isoladas

Para fracionar os extratos e purificar as substâncias foram utilizadas colunas de vidro fabricados na oficina de vidraria do Departamento de Química-UFRuralRJ. As colunas foram empacotadas com sílica gel (230-400 e 70-230 *mesh*, Vetec) e Sephadex LH-20 (Sigma-USA). Normalmente, optou-se por sistema de eluição por gradiente de polaridade, mediante a utilização de diferentes proporções de hexano, diclorometano, clorofórmio e acetato de etila finalizando sempre com metanol. Os solventes não deuterados utilizados foram da marca Vetec de grau p.a. sendo que alguns solventes comerciais foram previamente destilados antes de serem utilizados.

As frações obtidas foram analisadas mediante cromatografia em camada delgada (CCD), onde foram utilizadas cromatoplasas em suporte de alumínio 20x20 cm revestidas com sílica gel 60 F₂₅₄ da Merck.

Como alternativa para a purificação de algumas substâncias utilizou-se a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP). Foi preparada uma suspensão de sílica G da marca Vetec em água destilada e espalhada com espessura de 1 mm sobre placas de vidro de 20 x 20 cm com auxílio de espalhador. Em seguida as placas foram secas à temperatura ambiente e foram ativadas em estufa a 80-100 °C por 1 hora antes da aplicação da amostra. A recuperação da amostra foi feita pela extração da sílica com solventes orgânicos.

As revelações foram efetuadas por radiação ultravioleta no comprimento de onda 254 e 365 nm, reagentes de Dragendorff e Liebermann-Burchard; soluções de AlCl₃-EtOH (1%), sulfato cérico (1%)-H₂SO₄ (10%) e vapores de iodo.

Os pontos de fusão foram determinados em placa de aquecimento MEL-TEMP II, Laboratory Devices USA, utilizando capilar, sem correção dos valores.

Os espectros de infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin-Elmer 1600/1605 FT-IR em pastilhas de KBr.

Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e de ¹³C (incluindo experimentos em 2D) foram registrados em espectrômetros Bruker AC-200 (¹H: 200 MHz e ¹³C: 50 MHz); Bruker DRX-500 (¹H: 500 MHz e ¹³C: 125 MHz) e JEOL JNM-GX-400 (¹H: 400 MHz e ¹³C: 100 MHz) utilizando como padrão interno tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (*J*) foram medidos em Hertz (Hz). Os solventes deuterados utilizados na obtenção dos espectros foram das marcas Merck e Aldrich.

Os espectros de massas de baixa resolução foram registrados em cromatógrafo a gás HP-5880A acoplado a espectrômetro de massas computadorizado HP-5897A analisador de íons quadrupolo e ionização por impacto de elétrons a 70 e.V.; CG/EM Varian Saturn 2000; CG/EM HP-5989A.

3.1.1 Derivatizações

3.1.1.1 Metilação com diazometano

A solução de diazometano foi preparada de acordo com a metodologia experimental descrita por VOGEL (1989). Conforme essa descrição experimental, uma alíquota de 2,14 g do reagente *N*-metil-*N*-nitroso-*p*-toluenosulfonamida (Diazald[®]) foi solubilizada em 30,0 ml de éter etílico e colocada dentro de um balão de destilação juntamente com uma solução

etanólica de KOH (0,4 g em 10,0 ml de etanol). A mistura reacional foi então destilada com aquecimento brando em banho de óleo e a solução de diazometano foi recolhida em erlenmeyer mergulhado em banho de gelo. A substância a ser metilada foi solubilizada em metanol, tratada com excesso de diazometano e deixada em repouso por 24 horas. Após a evaporação total do solvente e comparação por CCD com a substância original obteve-se a substância metilada.

3.1.1.2 Acetilação com anidrido acético e piridina

A reação de acetilação foi feita utilizando-se 1,0 ml de anidrido acético e 1,0 ml de piridina para cada 10,0 mg de material. A mistura reacional foi mantida sob agitação por 24 horas. A seguir adicionou-se água destilada gelada e extraiu-se com clorofórmio. A solução clorofórmica foi lavada com ácido clorídrico 10%, até o completo desaparecimento do cheiro de piridina, secou-se com sulfato de sódio anidro e após evaporação obteve-se a substância acetilada (SHRINER, 1979).

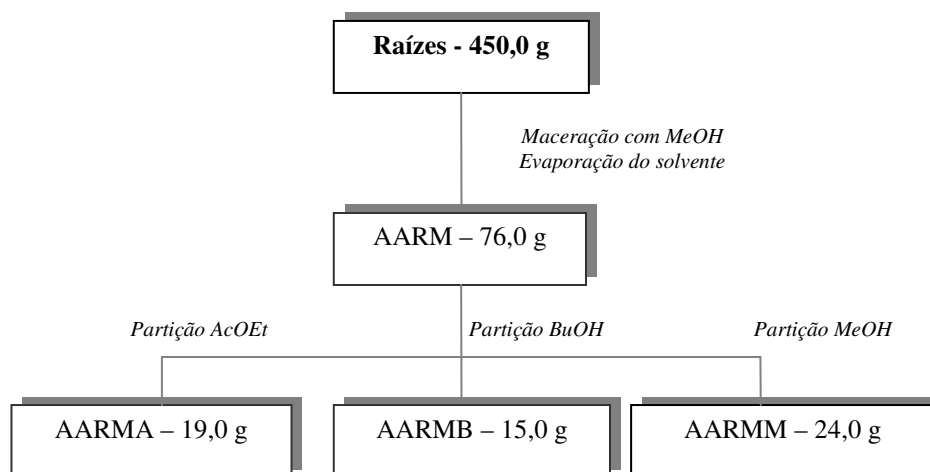
3.1.1.3 Reação com iodo

A substância **2A** contendo apenas uma hidroxila na posição 5, é um excelente substrato para a funcionalização das posições 6 e 8 livres da isoflavona. Há relatos na literatura sobre a funcionalização de moléculas análogas na síntese de bichalconas e biflavonas (ALI & ILYAS, 1986) e isso nos motivou a tentar o acoplamento oxidativo entre duas unidades de **2A** com KOH/I₂. A substância **2A** (28,0 mg, 0,093 mmol) foi dissolvida em solução etanólica de KOH (25,0 mg em 10 ml de metanol), seguido pela adição de iodo (8,5 mg, 0,0335 mmol), em pequenas porções. A mistura reacional foi agitada por 3 horas a temperatura ambiente, extraída com CH₂Cl₂, lavada com H₂O destilada e evaporada para fornecer 23,8 mg dos produtos **2C** e **2D**.

3.2 Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos de *Andira anthelmia*

Raízes de *Andira anthelmia* foram coletadas na Reserva Biológica de Poço das Antas em Silva Jardim, Estado do Rio de Janeiro, em dezembro de 2001. A identificação foi realizada pelo Dr. Haroldo Lima Cavalcanti, do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, sendo a exsiccata depositada no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (IB-UFRuralRJ), sob o registro de número 4.616.

O material coletado, após seco e moído (450,0 g), foi submetido à extração com metanol por meio de maceração à temperatura ambiente. A retirada do solvente feita por evaporador rotativo originou cerca de 76,0 g de extrato bruto metanólico (*Andira anthelmia* Raiz Metanol, **AARM**) que foi submetido ao fracionamento em funil de separação empacotado com sílica gel e utilizando-se como eluentes acetato de etila, butanol e metanol em sistema isocrático. A partir desse fracionamento, representado no Esquema 1 (p. 21), foram obtidas as seguintes frações: acetato de etila, **AARMA** (19,0 g), butanol, **AARMB** (15,0 g) e metanol, **AARMM** (24,0 g).



Esquema 1. Fracionamento do extrato metanólico das raízes de *Andira anthelmia*.

3.2.1 Estudo químico da fração AARMA

Esta foi fracionada em coluna de sílica gel (70-230 *mesh*) eluída com acetato de etila e metanol em polaridades crescentes até 100% metanol, originando 156 frações de aproximadamente 15 ml, que depois de evaporadas foram analisadas por CCD e reunidas em 16 novas frações.

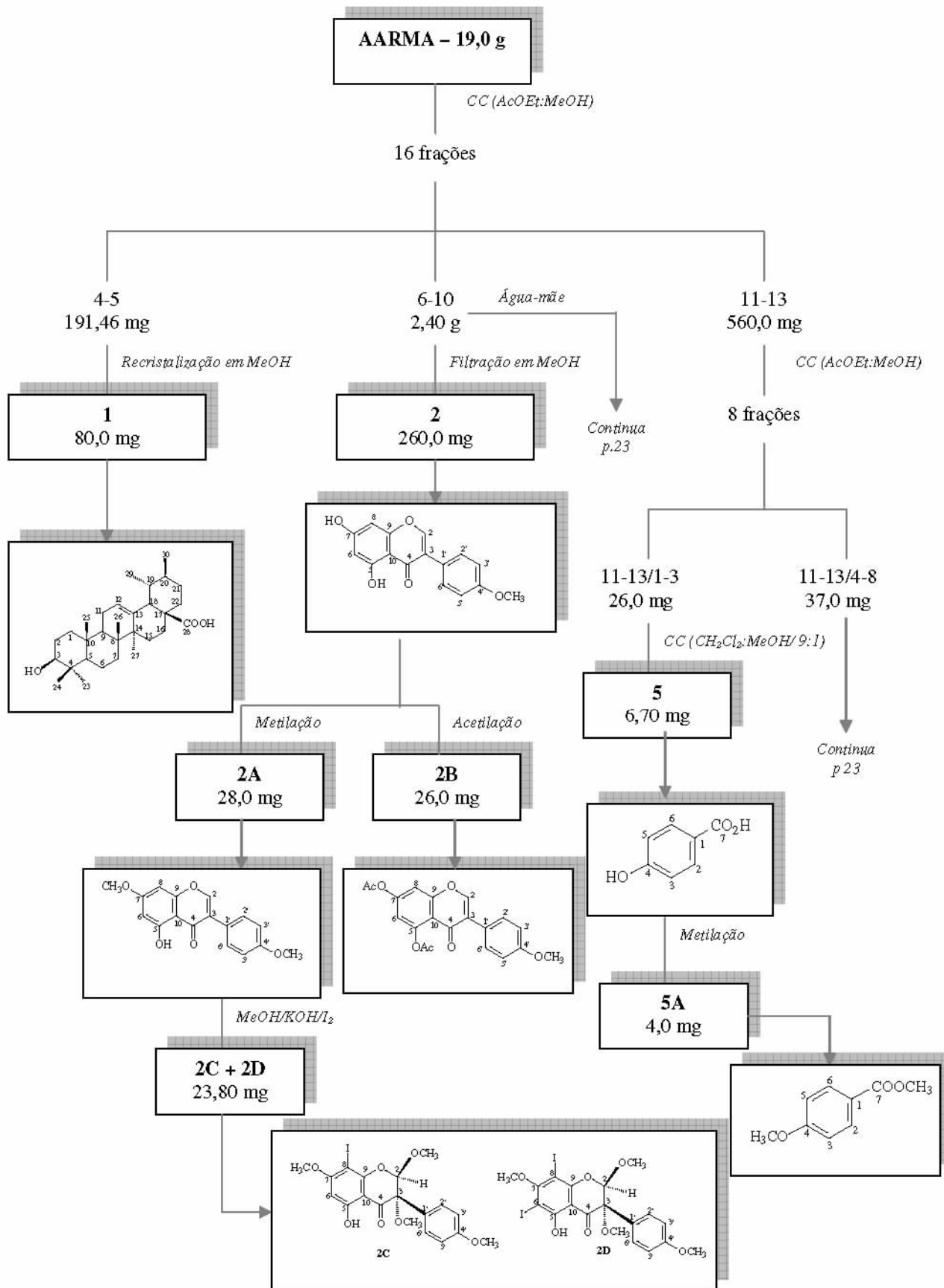
As frações 1/3 (50,30 mg) constituíam uma mistura de esteróides e triterpenos e em pouca quantidade, não sendo trabalhada.

As frações 4/5 (191,46 mg) após cristalização em metanol forneceram um precipitado branco codificado como substância **1** [80,0 mg, PF: 281-282 °C – lit.: 277-280 °C (AHMAD & RAHMAN, 1994)].

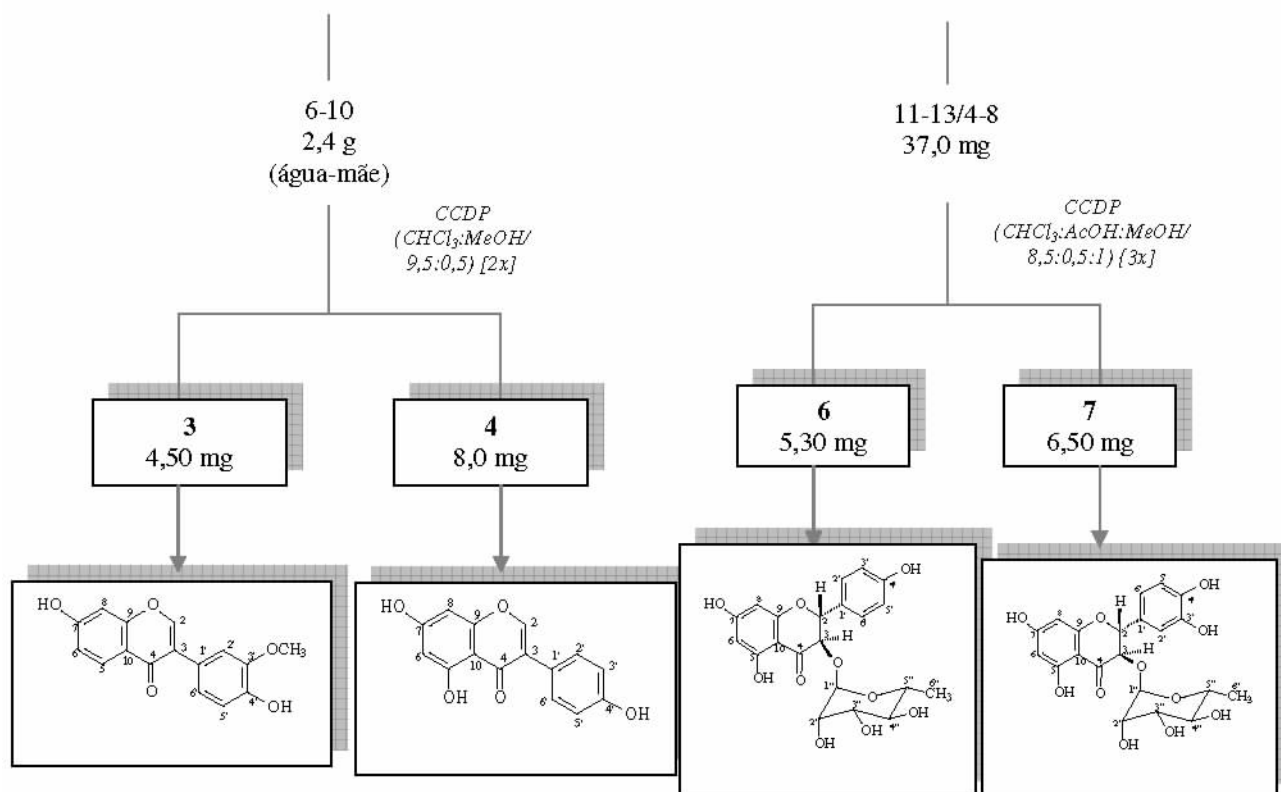
Nas frações 6/10 (2,40 g) houve a formação de uma grande quantidade de precipitado amarelado. Este foi filtrado em funil de Büchner e lavado várias vezes com metanol fornecendo a substância **2** [260,0 mg, PF: 210-212 °C - lit.: 214-216 °C (LAPA BAUTISTA & MORS, 1975)]. A água-mãe foi evaporada e submetida à CCDP eluída com CHCl₃:MeOH (9,5:0,5) [2x] fornecendo as substâncias **3** [4,5 mg, PF: 250-252 °C – lit.: 243-245 °C (KAMNAING *et al.*, 1999)] e **4** [28,0 mg, PF: 295-297 °C – lit.: 296-297 °C (DEMUNER *et al.*, 2003)]. Devido a grande quantidade da substância **2** foram preparados os derivados acetilado, metilado e iodado. A acetilação de 50,0 mg da substância **2** forneceu o produto **2A** [26,0 mg, PF: 186-188 °C]. A metilação de 50,0 mg da substância **2** forneceu o produto **2B** [28,0 mg, PF: 149-151 °C]. O produto **2B** foi solubilizado em solução alcalina de iodo fornecendo os produtos **2C+2D** [23,8 mg].

As frações 11/13 (560,20 mg) foram submetidas à cromatografia em coluna de sílica gel eluída com acetato de etila/metanol em polaridade crescente. Foram obtidas 33 frações de 50 ml, que após evaporação do solvente foram analisadas por CCD e reunidas em 8 frações. As frações 11-13/1-3 (26,0 mg) foram submetidas à cromatografia em coluna de sílica gel do tipo *flash* (230-400 *mesh*) usando sistema de solvente isocrático CH₂Cl₂: MeOH (9:1). Essa coluna originou 9 frações, e nas frações 11-13/1-3/3-5 foi obtida a substância **5** [6,7 mg, PF: 214-216 °C]. A substância **5** foi metilada com diazometano obtendo-se o derivado **5A** [4,0 mg]. As frações 11-13/4-8 (37,0 mg) foram então reunidas e submetidas à CCDP desativada com NaOAc, eluída com CHCl₃:AcOH:MeOH (8,5:0,5:1) [3x] para purificação das substâncias **6** [5,3 mg, PF: 172-174 °C – lit.: 172-173 °C (CHEN *et al.*, 2004)] e **7** [6,5 mg, PF: 173-175 °C – lit.: 189-191 °C (KASAI *et al.*, 1988)].

Um resumo dos processos de isolamento das substâncias da fração **AARMA** é mostrado no Esquema 2 (p. 22).



Esquema 2. Processamento da fração AARMA.



Continuação do Esquema 2. Processamento da fração AARMA.

3.2.2 Estudo químico da fração AARMB

Esta fração foi adicionada ao topo de uma coluna empacotada com sílica gel 60 (70-230 *mesh*) eluída com gradiente de hexano/acetato de etila e acetato de etila/metanol em polaridade crescente. Foram coletadas 185 frações de 15 ml cada. Conforme a similaridade observada pela análise em CCD essas frações foram reunidas, resultando em 35 novas frações.

As frações 1/6 (168,0 mg) estavam compostas por uma variedade de substâncias e após comparação por CCD com os padrões, constatou-se que esta possuía mistura das substâncias similares às isoladas na fração anterior.

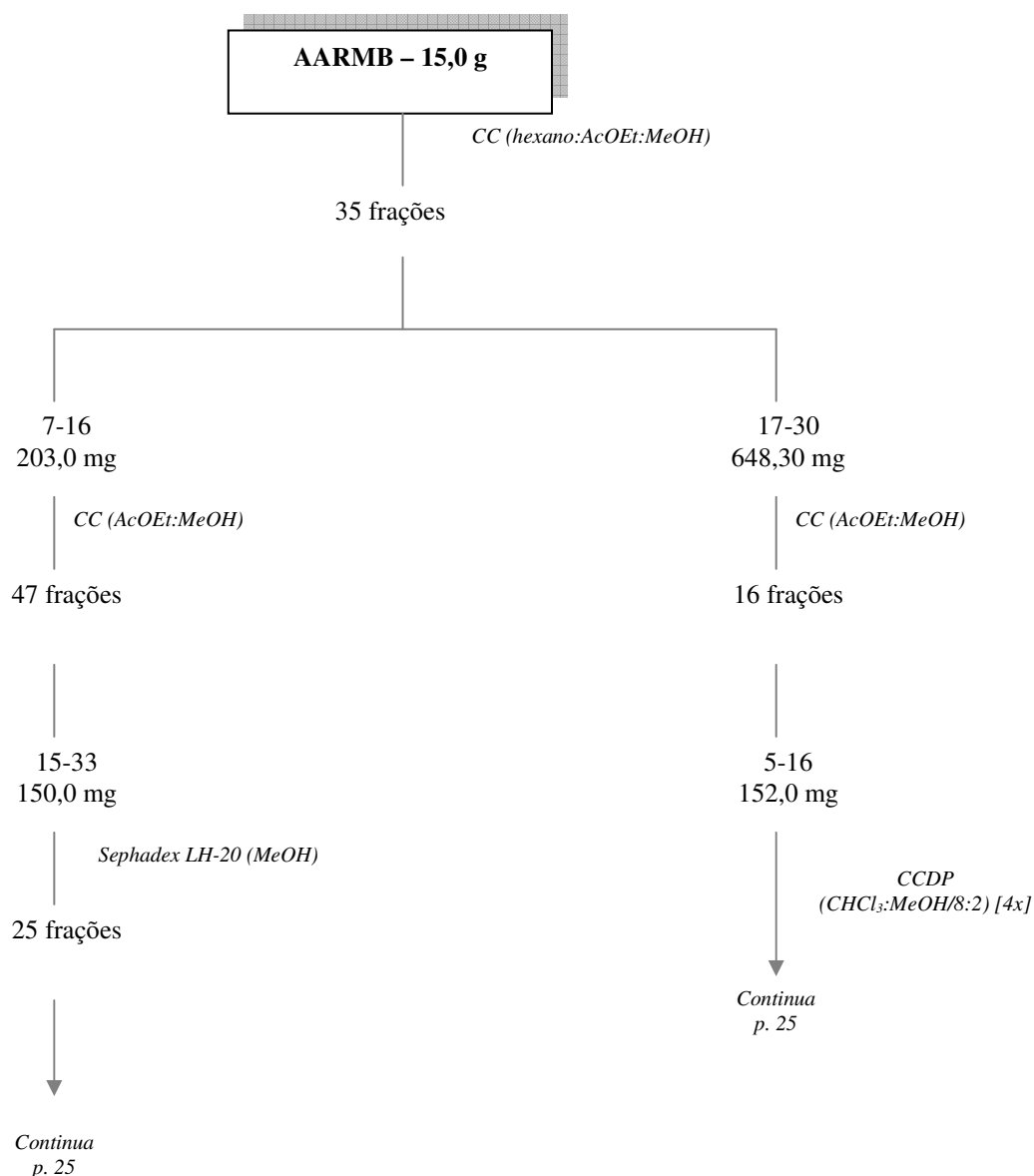
As frações 7/16 (203,0 mg) foram submetidas à cromatografia em coluna de sílica gel eluída com acetato de etila e metanol em polaridade crescente até 100% de metanol. Foram geradas 47 frações de 50 ml. As frações 15/33 (150,0 mg) foram recromatografadas em Sephadex LH 20 eluída em sistema isocrático com metanol, obtendo-se 25 frações de aproximadamente 5 ml cada sendo que as frações 11/15 geraram, após secas placas brancas codificadas como sendo a substância **8** [65,0 mg, PF: 200-202 °C – lit.: 217-218 °C (COOKE & FLETCHER, 1974)] e as frações 20/22 forneceram um líquido viscoso de coloração marrom codificado substância **9** [7,5 mg, PF: 256-258 °C].

As frações 17/30 (648,0 mg) apresentaram uma mistura de substâncias, porém duas majoritárias que correspondiam às substâncias **10** e **11**. Esta fração foi então submetida à cromatografia em coluna de sílica gel (70-230 *mesh*) eluída sob pressão com acetato de etila/metanol em polaridade crescente, onde foram obtidas 50 frações de 50 ml cada. Essas frações foram analisadas por CCD e reunidas em 16 frações. As frações 1/4 (72,0 mg) apresentaram uma mistura correspondente às substâncias **8**, **9** (em menor quantidade). As frações 5/16 (152,0 mg) apresentavam duas manchas majoritárias, que revelavam sob radiação UV λ_{254} , que facilitou a aplicação da técnica CCDP para purificá-las. Estas frações

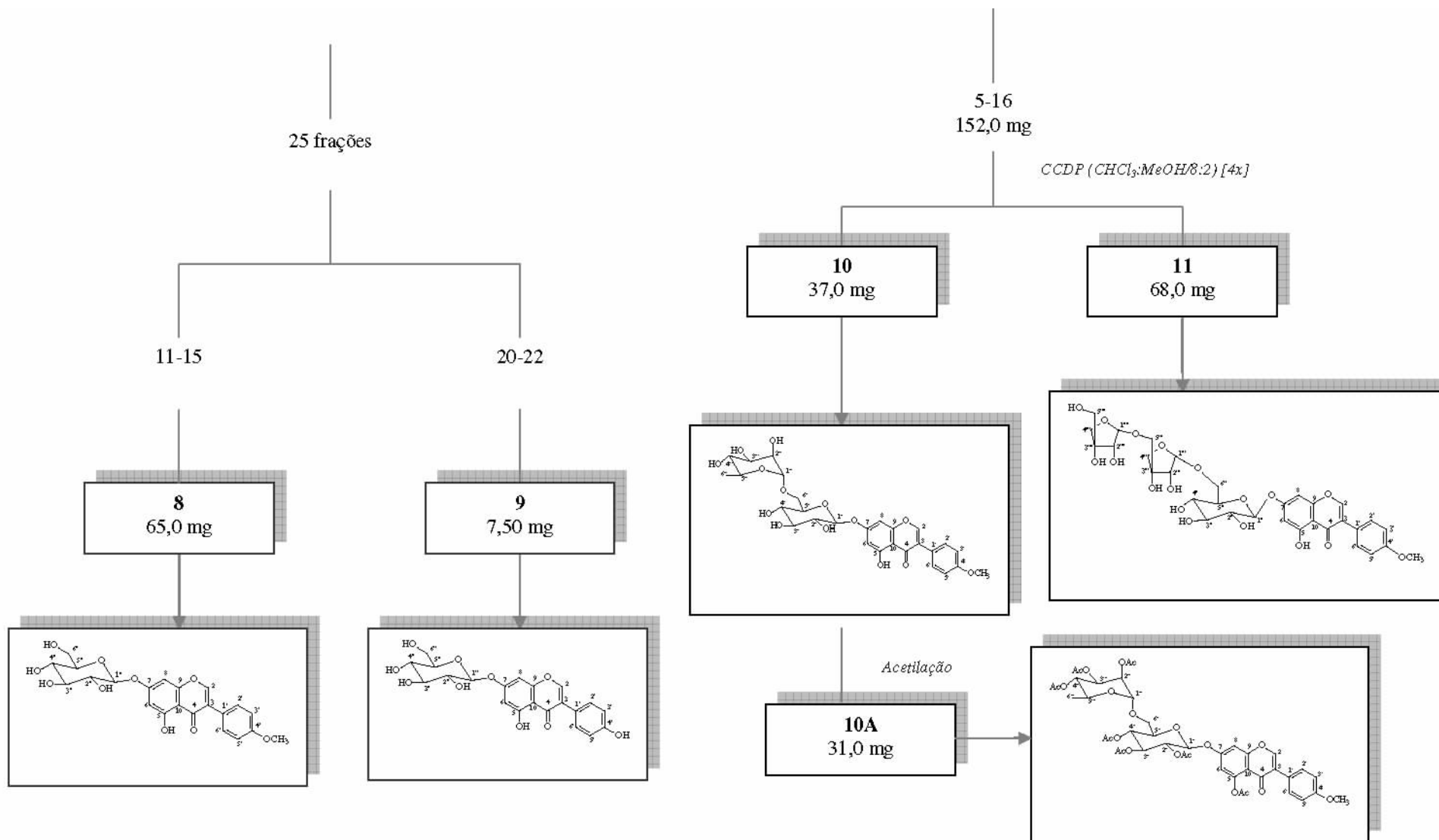
foram então reunidas e submetidas à CCDP eluída com $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (8:2) [4x] obtendo-se as substâncias **10** [37,0 mg, PF: 145-147 °C – lit.: 153-154 °C (PARTHASARATHY *et al.*, 1976)] e **11** [68,0 mg, PF: 124-126 °C – lit.: 128-130 °C (SILVA *et al.*, 2000)]. Ambas foram isoladas como um líquido bastante viscoso de coloração marrom. A substância **10** foi tratada com piridina e anidrido acético (1:1), sob agitação de 24 horas para a obtenção do derivado acetilado **10A** [31,0 mg, PF: 183-185 °C – lit.: 170-172 °C (PARTHASARATHY *et al.*, 1976)].

Um resumo dos processos de isolamento das substâncias da fração **AARMB** é mostrado no Esquema 3 (p. 24 e 25).

Algumas frações não citadas apresentaram mistura das substâncias isoladas e outras substâncias contaminantes. Estas frações foram reservadas para eventual necessidade de reisolamento das substâncias **9**, **10** e **11**.



Esquema 3. Processamento da fração AARMB.



Continuação do Esquema 3. Processamento da fração AARMB.

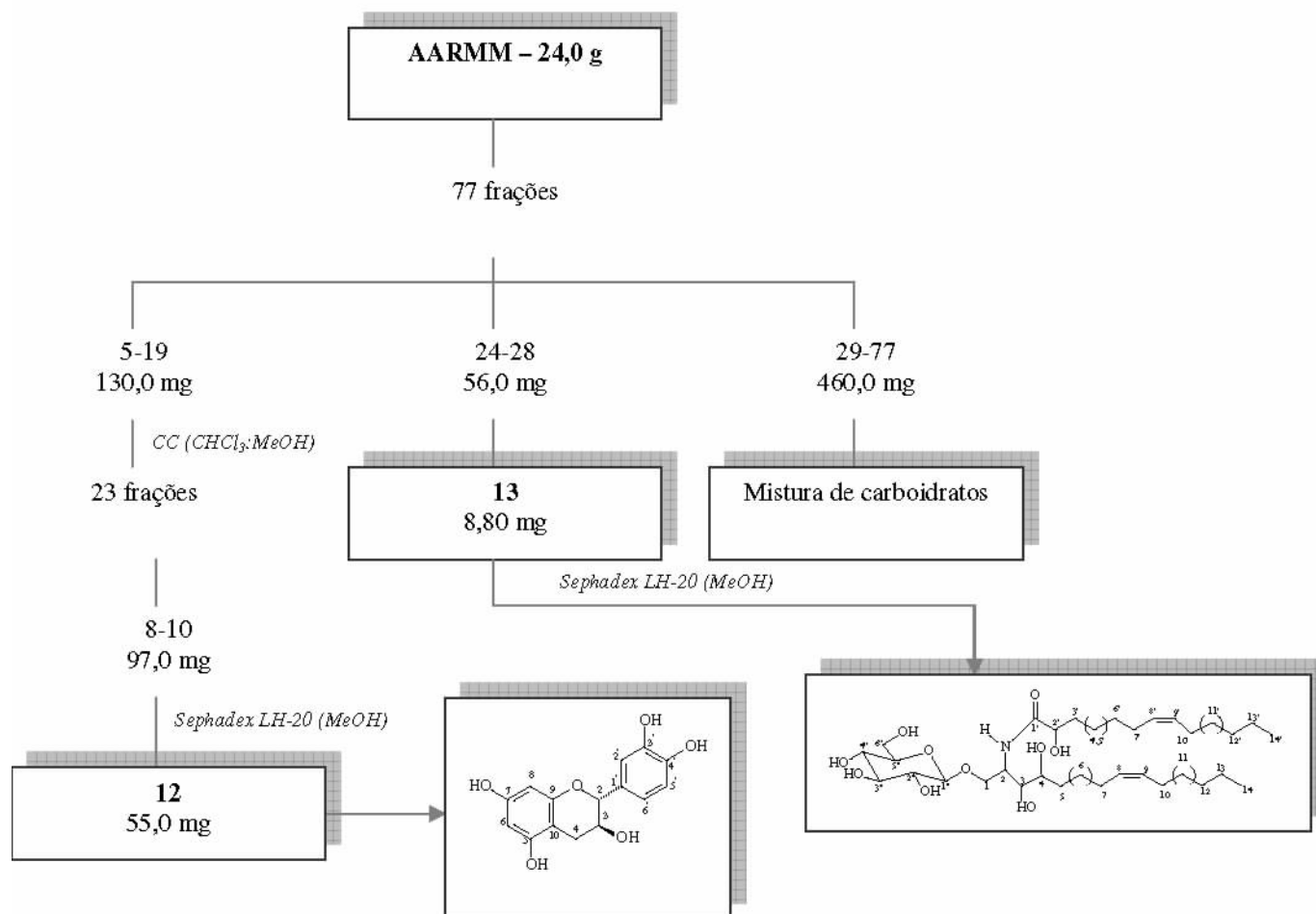
3.2.3 Estudo químico da fração AARMM

Esta fração foi cromatografada em coluna de sílica gel (70-230 *mesh*) eluída com acetato de etila/metanol em polaridade crescente até 100% metanol. Foram coletadas 77 frações de 50 ml cada.

As frações 5/19 (130,0 mg) foram submetidas à cromatografia em coluna de sílica gel (230-400 *mesh*) utilizando-se como eluente clorofórmio/metanol em polaridade crescente, obtendo-se 23 frações de 50 ml cada. As frações foram analisadas por CCD e reunidas conforme a similaridade observada.

As frações 8/10 (97,0 mg) continham um precipitado avermelhado solúvel em acetona, porém não estava puro por análise em CCD. Este precipitado foi ressolubilizado em metanol e recromatografado em coluna de Sephadex LH-20 eluída com metanol de modo isocrático fornecendo um sólido de coloração vermelha codificado como substância **12** [55,0 mg, PF: 175-178 °C]. As frações 24/28 (62,0 mg) mostraram-se bastante polares. Estas foram reunidas devido à similaridade apresentada em CCD e aplicadas ao topo de uma coluna de Sephadex LH-20 eluída com metanol de modo isocrático fornecendo a substância **13** [8,8 mg]. As frações 29/77 (7,0 g) mostraram uma mistura de substâncias muito polares reservadas para estudos posteriores.

Um resumo dos processos de isolamento das substâncias da fração **AARMM** é mostrado no Esquema 4 (p. 26 e 27).

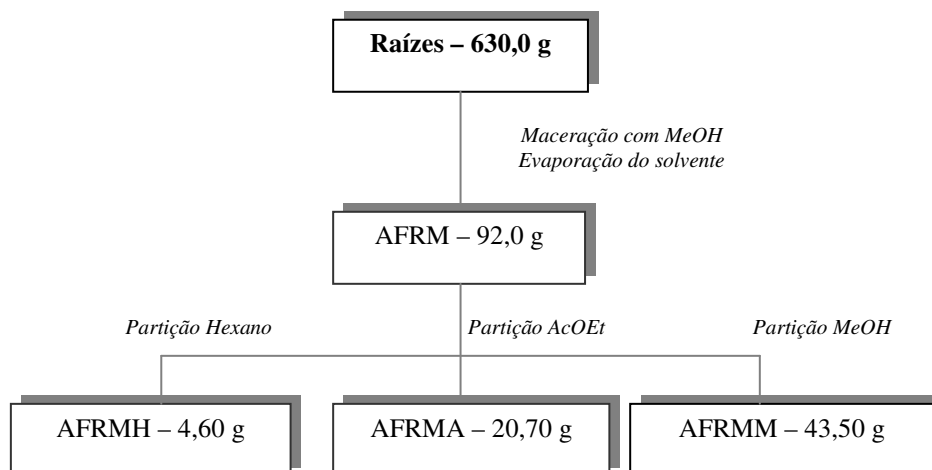


Esquema 4. Processamento da fração AARMM.

3.3 Isolamento e Purificação dos Constituintes de *Andira fraxinifolia*

As raízes de *Andira fraxinifolia* foram coletadas na Reserva Biológica de Poço das Antas em Silva Jardim, Estado do Rio de Janeiro, em dezembro de 2001. A identificação foi realizada pelo Dr. Haroldo Lima Cavalcanti, do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, sendo a exsicata depositada no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (IB-UFRuralRJ), sob o registro de número 4.617.

A extração do material coletado (630,0 g) foi realizada por meio de maceração, onde as raízes da planta moída foram submetidas a processo de extração sucessiva com metanol à temperatura ambiente. O solvente foi trocado a cada 48 horas. A retirada do solvente foi feita em evaporador rotativo, originando o extrato metanólico das raízes (92,0 g) (*Andira fraxinifolia* Raiz Metanol, **AFRM**). Esse extrato metanólico foi resolubilizado em MeOH:H₂O (9:1) e submetido à partição com hexano, acetato de etila e metanol, obtendo-se as respectivas frações: hexano, **AFRMH** (4,6 g), acetato de etila, **AFRMA** (20,70 g), e metanol, **AFRMM** (43,50 g), respectivamente, como mostrado no Esquema 5 (p. 27).



Esquema 5. Fracionamento do extrato metanólico das raízes de *Andira fraxinifolia*.

3.3.1 Estudo químico da fração AFRMH

Esta foi fracionada em coluna de sílica gel (70-230 *mesh*) e eluída inicialmente com hexano aumentando-se gradativamente a polaridade com diclorometano e metanol. Foram obtidas 176 frações de 15 ml cada. Depois de analisar as frações por CCD e revelar com Liebermann Burchard, estas resultaram em 44 novas frações. O resultado foi positivo para triterpenos e esteróides.

As frações 1/3 (156,0 mg) apresentaram um aspecto oleoso de cor amarelada, fornecendo uma mistura de compostos alifáticos.

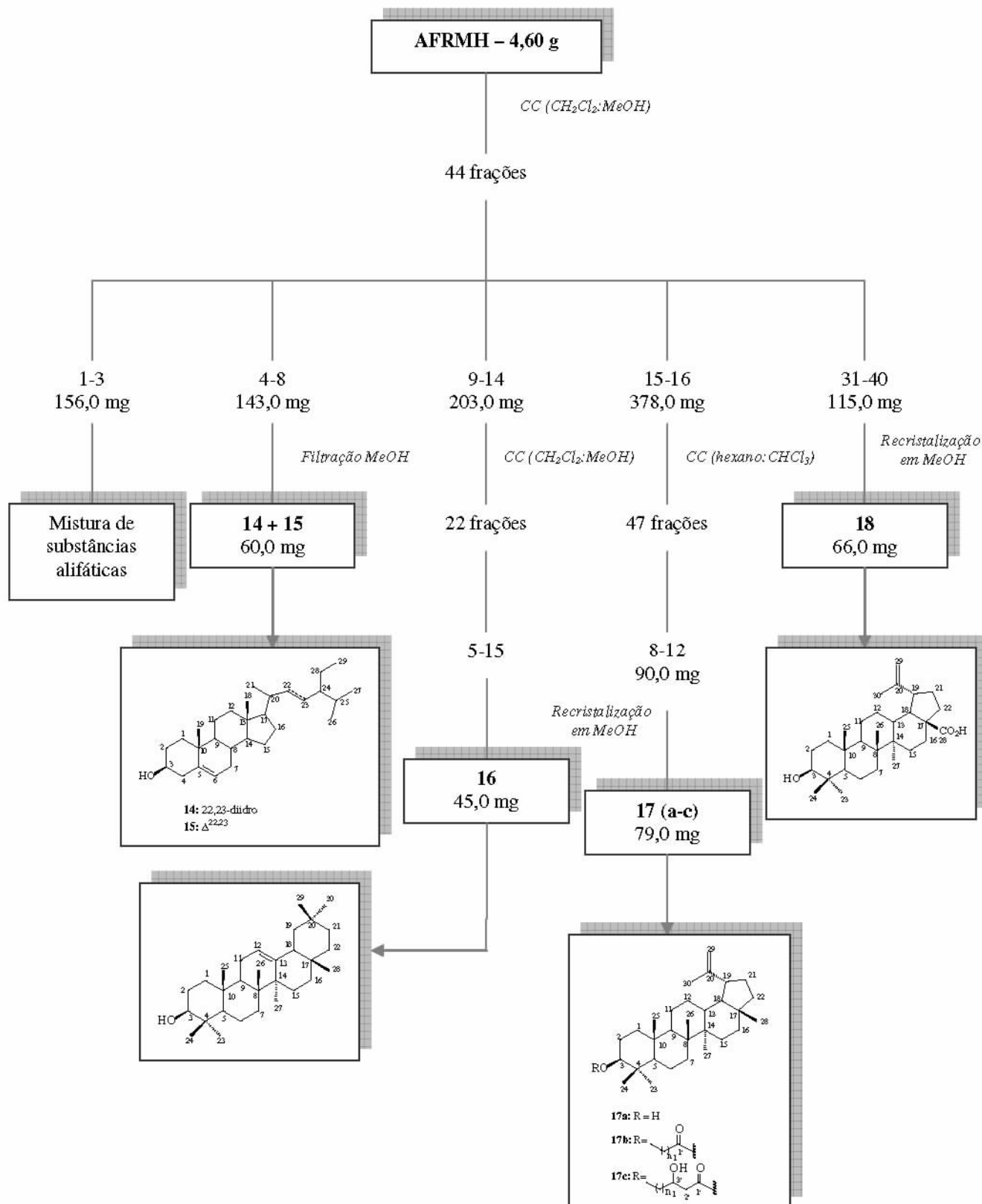
Nas frações 4/8 (143,0 mg) houve a formação de um sólido branco. Este foi lavado várias vezes com metanol e filtrado em funil de placa sinterizada obtendo-se a mistura que foi codificada como substâncias **14** e **15** [60,0 mg, PF: 114-115 °C]. A água-mãe revelou uma mistura de compostos em pouca quantidade e, portanto descartado.

As frações 9/14 (203,0 mg) foram purificadas em uma coluna de sílica gel (70-230 *mesh*) eluída com diclorometano com aumento gradativo de metanol, fornecendo 22 frações de 50 ml. Após a evaporação, nas frações 5/15 houve a formação de um precipitado que foi purificado por recristalização em metanol obtendo-se a substância **16** [45,0 mg, PF: 180-182 °C].

As frações 15/26 (378,0 mg) forneceram outro precipitado branco solúvel em clorofórmio que continha uma mistura codificada como substâncias **17 (a-c)** e **18**. Estas foram recromatografadas em coluna de sílica gel eluída com hexano/clorofórmio em polaridades crescentes. Foram coletadas 47 frações de 50 ml cada, e reunidas em grupos conforme análises em CCD, sendo que as frações 8/12 (90,0 mg) foram recristalizadas à quente em acetato de etila com gotas de metanol e após filtração em funil de placa sinterizada sob vácuo e lavagem com metanol gelado, obteve-se a substância **17 (a-c)** [79,0 mg, PF: 210-212 °C].

As frações 31/40 (115,0 mg) após solubilizadas em acetato de etila a quente para a recristalização com gotas de acetona, formaram um sólido pastoso de coloração branca que após filtração forneceu a substância **18** [66,0 mg, PF: 283-285 °C - lit.: 282-285 °C (AHMAD & RAHMAD, 1994)].

Um resumo dos processos de isolamento das substâncias da fração **AFRMH** é mostrado no Esquema 6 (p. 29).



Esquema 6. Processamento da fração AFRMH.

3.3.2 Estudo químico da fração AFRMA

Esta fração foi aplicada ao topo de uma coluna de sílica gel (70-230 *mesh*) eluída com gradientes de hexano/acetato de etila e acetato de etila/metanol em polaridades crescentes, obtendo-se 100 frações de 50 ml cada. Estas foram analisadas por CCD e reunidas em duas grandes frações.

As frações 1/42 (2,30 g) continham uma mistura muito complexa de terpenóides e esteróides não sendo trabalhada.

As frações 43/100 (15,2 g) foram submetidas à cromatografia em coluna de sílica gel tipo *flash* (230-400 *mesh*), eluída com hexano, acetato de etila e aumento gradativo de polaridade com metanol, finalizando com metanol, obtendo-se 42 frações de 50 ml.

As frações 13/16 (162,0 g) resultantes dessa coluna forneceram um precipitado em forma de placas que foi codificado como a substância **19** [50,0 mg, PF: 290-292 °C – lit.: 290-291 °C (ALVES et al., 1992)].

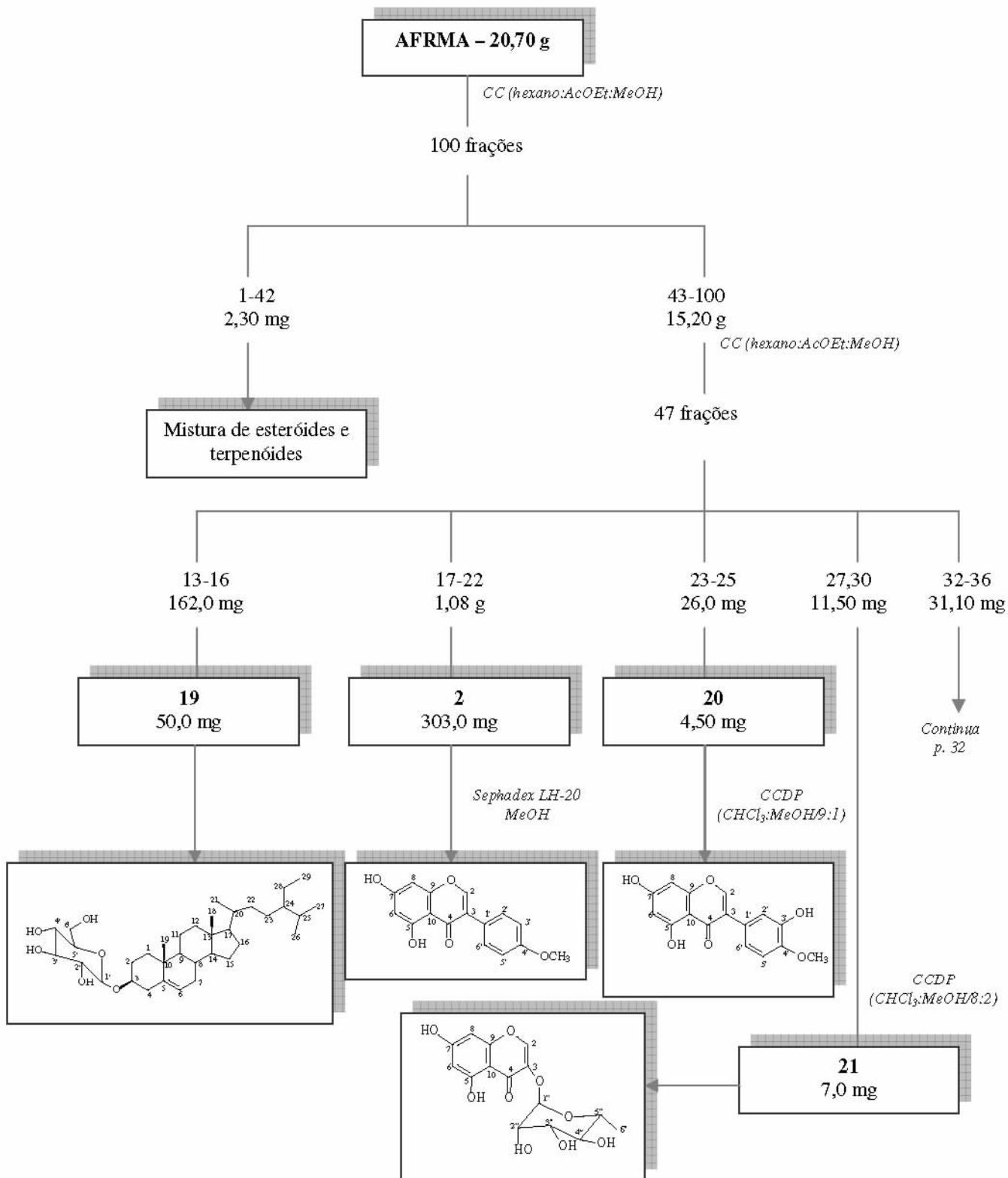
As frações 17/22 (1,08 g) foram reunidas por análise em CCD e recromatografadas em coluna empacotada com Sephadex LH-20, eluída de forma isocrática com metanol fornecendo a substância **2** [303,0 mg, PF: 210-212 °C].

Da reunião das frações 23/25 (26,0 mg) foi possível obter uma mistura majoritária das substâncias **20**, **21** e outras em menor quantidade. Esta fração foi purificada por meio de CCDDP eluída com CHCl₃/MeOH (9:1) [2x] dando origem à substância **20** [4,5 mg, PF: 258-260 °C – lit.: 272-273 (BUCKINGHAM, 1982)].

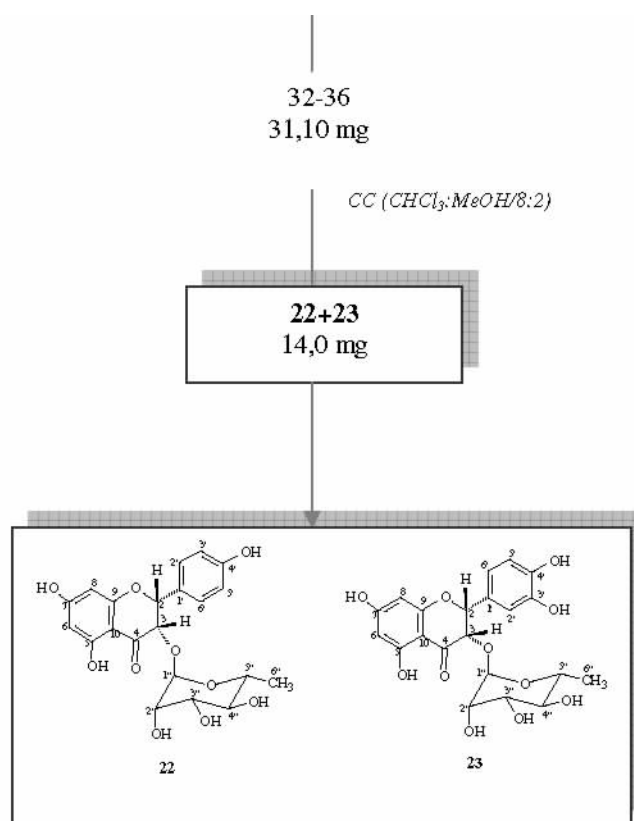
As frações 27/30 (11,5 mg) foram reunidas aplicadas em coluna sílica gel tipo *flash* (230-400 *mesh*) eluída com CHCl₃/MeOH (8:2) obtendo-se cristais incolores em forma de agulha codificados como substância **21** [7,0 mg, PF: 198-200 °C – lit.: 212-215 °C (TSCHESCHE et al., 1979)].

As frações 32/36 (31,1 mg) foram reunidas e submetidas à coluna filtrante a vácuo de sílica gel (70-230 *mesh*) usando como eluente CHCl₃/MeOH (8:2) onde foi possível obter um precipitado branco correspondente à mistura codificada como substâncias **22+23** [14,0 mg].

Um resumo dos processos de isolamento das substâncias da fração AFRMA é mostrado no Esquema 7 (p. 31).



Esquema 7. Processamento da fração AFRMA.



Continuação do Esquema 7. Processamento da fração AFRMA.

3.4 Isolamento e Purificação dos Constituintes de *Palicourea coriacea*

Folhas de *Palicourea coriacea* foram coletadas na área rural de Nova Andradina, Estado do Mato Grosso do Sul (MS) em Janeiro de 2002. A identificação da espécie foi realizada pelo botânico Gertd Hatchbach, do Museu Botânico Municipal de Curitiba, sendo a exsicata depositada no herbário do MBM sob o registro de número 269517.

O material coletado, após seco e moído (635,0 g), foi submetido à seguidas extrações com metanol por meio de maceração à temperatura ambiente. A evaporação do solvente em evaporador rotativo originou o extrato metanólico das folhas (108,0 g) (*Palicourea coriacea* Folha Metanol - PCFM) que apresentou forte resultado positivo ao ser revelado pelo reagente de Dragendorff.

Visando uma semi-purificação dos alcalóides, o extrato metanólico foi suspenso em 500 ml de ácido acético (10%), deixado por 24 horas em repouso e filtrado em celite. O filtrado ácido foi basificado com NH₄OH até pH ≈ 9,0, e novamente, deixado em repouso por mais 24 horas. Posteriormente esse extrato alcalino, foi extraído com CH₂Cl₂ em funil de separação, para obtenção da fração alcaloidal. Essa fração foi seca com Na₂SO₄ e concentrada, obtendo-se 40,0 g de resíduo.

O resíduo foi cromatografado em coluna de sílica gel (70-230 *mesh*) eluída inicialmente com clorofórmio e em gradiente com metanol, finalizando com metanol. Foram coletadas 6 grandes frações de 250 ml cada. Estas frações foram analisadas por CCD e não mostraram similaridade entre si, sendo então trabalhadas separadamente.

A primeira fração (1,70 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel (230-400 *mesh*) eluída com gradientes de hexano, clorofórmio e metanol. Foram coletadas 50 frações de 50 ml cada. As frações de 25/31 forneceram cristais amarelos codificados como

sendo substância **25** [116,0 mg, PF: 130-132 °C]. As frações 32/37 (26,0 mg) foram submetidas à CCDP eluída com $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (9:1) por duas vezes, fornecendo a substância **26** [4,40 mg] e **27** [6,40 mg]. As frações 45/47 (65,0 mg) passaram por um processo de recristalização em metanol a quente com gotas de acetona fornecendo a mistura das substâncias **27** e **28** [8,80 mg].

A fração 2 após a evaporação (2,80 g) forneceu uma grande quantidade de precipitado que basicamente consistia de uma única substância. Esta foi cromatografada em coluna de sílica gel (70-230 *mesh*) sob pressão atmosférica eluída com $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (9:1) obtendo-se 32 frações de 50 ml cada. As frações 9/14 forneceram um precipitado branco e amorfo que se tratava da substância **1** [47,0 mg], as frações 15/32 forneceram cristais incolores em abundância que foram separados da água mãe com auxílio de uma pipeta *pasteur* fornecendo a substância **24** [(350,0 mg, PF: 232-234 °C)].

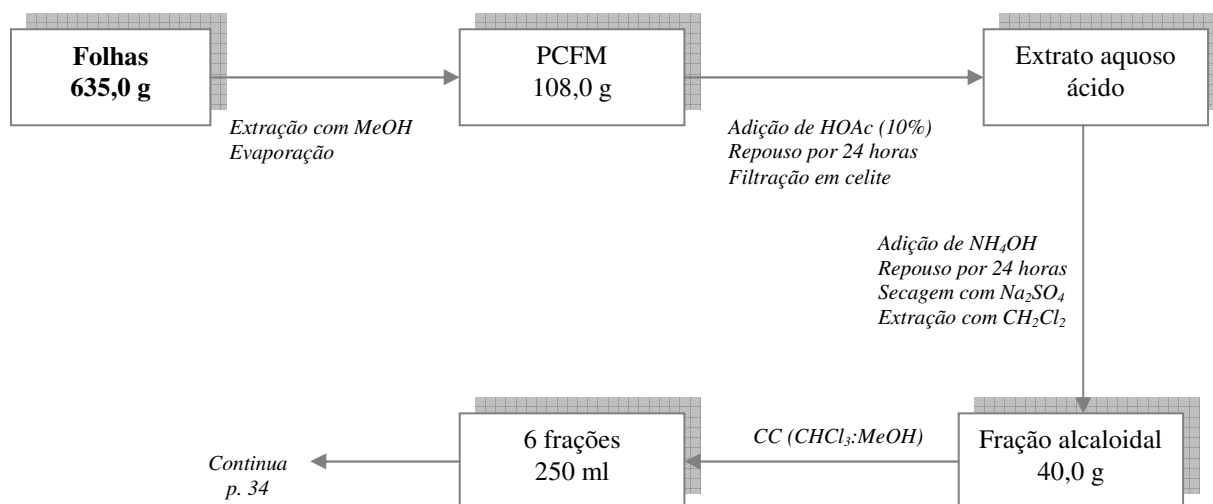
A fração 3 (2,3 g) foi cromatografada em sílica gel eluída inicialmente com o sistema $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (9:1) até $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1) e gerou 103 frações de 50 ml, sendo que as frações 15/16 forneceram um material de coloração avermelhada em pouca quantidade codificada como substância **29** [(4,40 mg, PF: 294-296 °C)].

A fração 4 (730,0 mg) foi cromatografada com a mesma metodologia descrita para a fração 3. Foram obtidas 22 frações de 50 ml. As frações 21/31 foram submetidas à recristalização fornecendo cristais em forma de agulhas amarelas codificadas como mistura das substâncias **30** e **31**. Estas foram purificadas através de CCDP eluída com $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (9,5:0,5) e gotas de ácido acético [3x] e após a raspagem foram obtidas separadamente as substâncias **30** [(5,0 mg, PF:)] e **31** [(12,0 mg, PF:)].

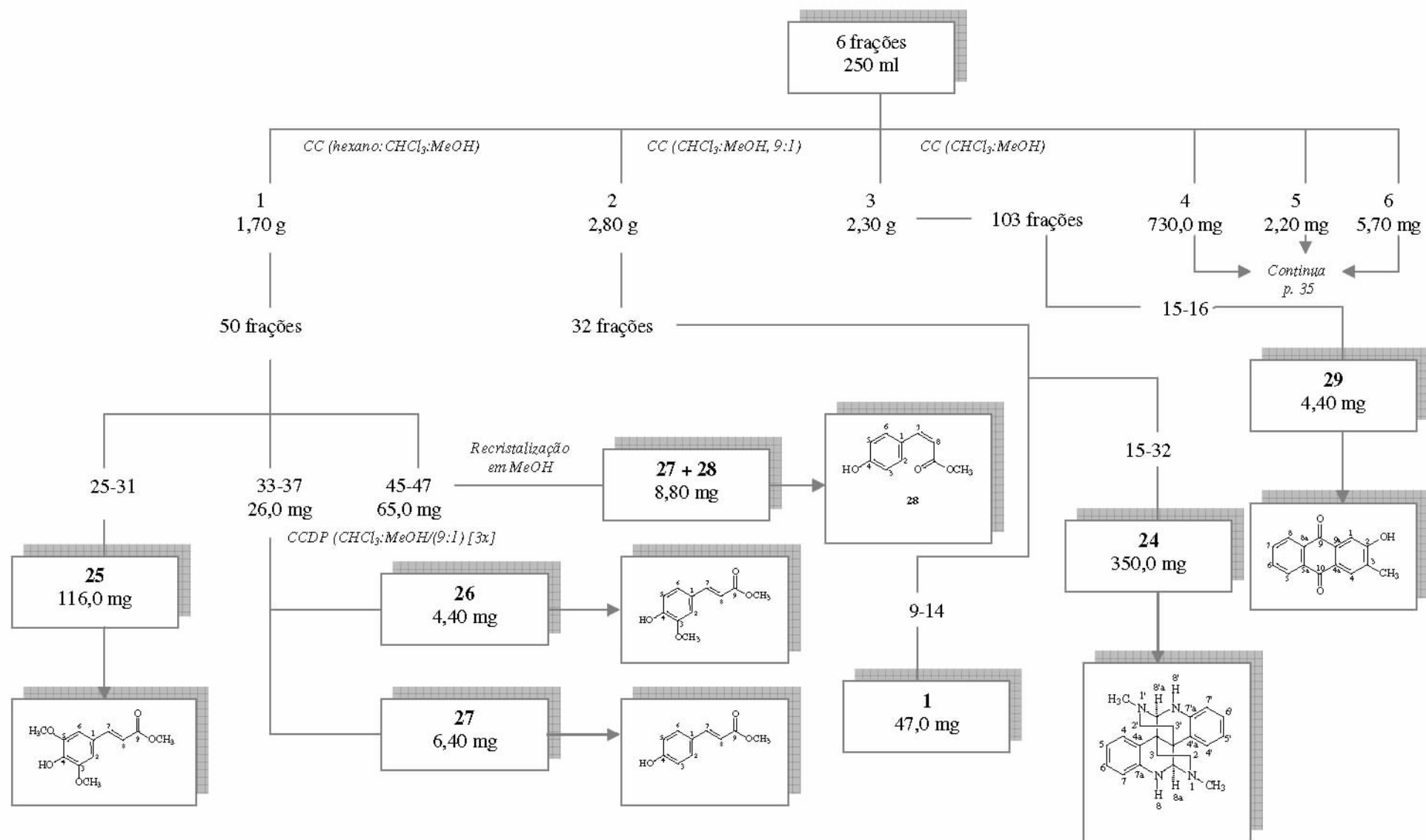
A fração 5 (2,2 g) foi recristalizada em acetona fornecendo um precipitado branco em abundância. Este precipitado solúvel em DMSO a quente foi lavado várias vezes com acetona em funil de placa sinterizada resultando na substância **32** [(260,0 mg, PF: 230-232 °C)].

A fração 6 (5,70 g) não foi trabalhada, sendo reservada para estudos posteriores.

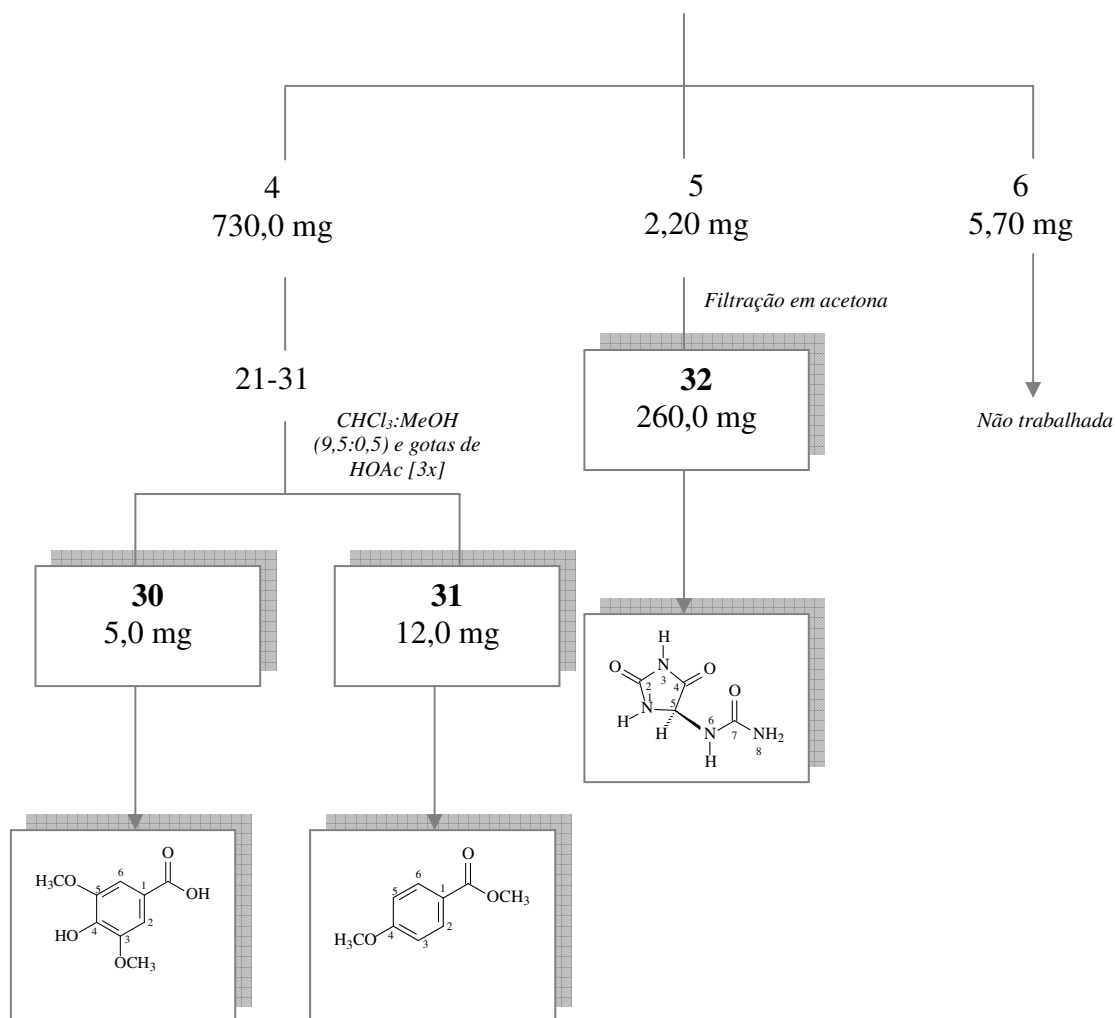
Um resumo dos processos de isolamento das substâncias do extrato **PCFM** é mostrado no Esquema 8 (p. 33, 34 e 35).



Esquema 8. Processamento da fração PCFM.



Continuação do Esquema 8. Processamento da fração PCFM.



Continuação do Esquema 8. Processamento da fração PCFM.

3.4 Ensaio da Atividade Antioxidante

3.4.1 Geral

O método utilizado para avaliação da atividade antioxidante foi o adaptado de MENSOR *et al.*, (2001). Este ensaio é feito por meio de reações usando o radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), em um processo fotométrico guiado pela descoloração da amostra (Figura 7; p. 35).

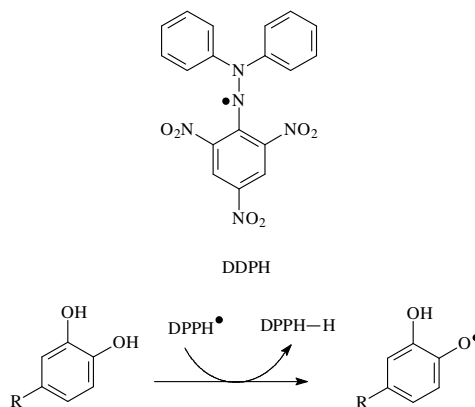


Figura 7. Molécula de DPPH e esquema mostrando sua redução pelo flavonóide.

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada no Laboratório de Síntese e Química Medicinal, sob supervisão da Prof^ª. Dr^ª. Áurea Echevarria (Instituto de Ciências Exatas - Departamento de Química – UFRRJ).

Para realização do ensaio foram utilizados os padrões rutina e quercetina doados gentilmente pela doutoranda Regina L. P. Lianda (PPGQO-UFRRJ) e, o radical DDPH da marca Sigma/USA. Para solubilização das amostras e padrões foi utilizado metanol grau P.A. marca Vetec. As leituras foram feitas em espectrofotômetro ELISA (Bio-Rad Laboratories, Model 680, Microplate Reader).

3.4.2 Preparo das amostras

Alíquotas dos extratos brutos, frações, substâncias isoladas, padrões e DDPH foram solubilizadas em metanol para a preparação das soluções estoque. Foram utilizadas concentrações de até 100 µg /ml para extratos e frações e de até 100 µM para substâncias isoladas e padrões. Foram avaliados os extratos **AARM** (*Andira anthelmia* Raiz Metanol) e **AFRM** (*Andira fraxinifolia* Raiz Metanol), as frações **AARMB** (*Andira anthelmia* Raiz Metanol Butanol), **AARMM** (*Andira anthelmia* Raiz Metanol Metanol), **AFRMA** (*Andira fraxinifolia* Raiz Metanol Acetato de Etila) e **AFRMM** (*Andira fraxinifolia* Raiz Metanol Metanol) e as substâncias isoladas **2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 20, 21, 22 e 23** (ver p. 39 e 147). A partir das soluções estoque foram realizadas diluições para concentrações de 100; 50,0; 25,0; 10,0; 0,1 e 0,01 µM para substâncias isoladas e os padrões e 100; 50,0; 25,0; 10,0; 0,1 e 0,01 µg/ml para extratos e frações. O DDPH foi utilizado na concentração de 0,3 µM.

3.4.3 Preparo do teste

As amostras em estudo foram adicionadas em doses crescentes, obtidas por diluições até 100 µM (substâncias isoladas) e até 100 µg/ml (extratos e frações) aos poços, em triplicata. Em seguida foi adicionado 0,29 µL de DDPH a 0,3 µM aos poços. A reação foi mantida no escuro à temperatura ambiente por 30 minutos. O DPPH é um radical livre, estável a temperatura ambiente e produz uma coloração violeta em metanol, sendo reduzido na presença de molécula antioxidante, dando origem a uma solução descolorida. Após esse período a placa foi então, analisada em espectrofotômetro Elisa a 570 nm, onde foram obtidos os valores de absorbância. A determinação do EC₅₀ foi realizada a partir de no mínimo 3 ensaios independentes.

A porcentagem de atividade antioxidante (AA) foi calculada segundo a expressão:

$$\% AA = 100 - \left\{ \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}} \right\}$$

Para o branco foi utilizado 0,29 µL de metanol e 71 µL da solução da amostra. A solução de DPPH (0,29 µL; 0,3 µM) em metanol (71 µL) foi utilizada como controle negativo. As soluções de quercetina e rutina foram utilizadas como controle positivo.

3.4.4 Análise estatística

Os valores de CE₅₀ (concentração efetiva que inibe 50% da atividade do radical livre formado) foram calculados por regressão linear dos dados experimentais onde o eixo da abscissa representa as concentrações da amostra e o eixo da ordenada mede a porcentagem de atividade antioxidante. Esses valores de CE₅₀ obtidos por regressão linear mostraram um bom

coeficiente de correlação ($r^2 \geq 0,95$). Os tratamentos estatísticos dos dados de no mínimo três experimentos independentes; sendo o CE_{50} o valor médio obtido dessas experiências, foram expressos em $CE_{50} \pm$ desvio padrão (DP). Nos experimentos foi assumida margem de erro $\leq 10\%$.

3.5 Avaliação da Atividade Anti-helmíntica

Esse experimento procurou investigar o efeito nematicida das frações geradas pelo fracionamento do extrato metanólico e das substâncias isoladas, através de um biomonitoramento utilizando como modelo experimental camundongos naturalmente infectados pelo nematóide *Aspiculuris tetraptera*. Diversos autores têm ressaltado a facilidade de disseminação de *A. tetraptera* em grandes criações de roedores, sendo freqüentemente encontrados parasitando o intestino de camundongos mantidos em biotério (ZENNER & REGNAULT, 2000).

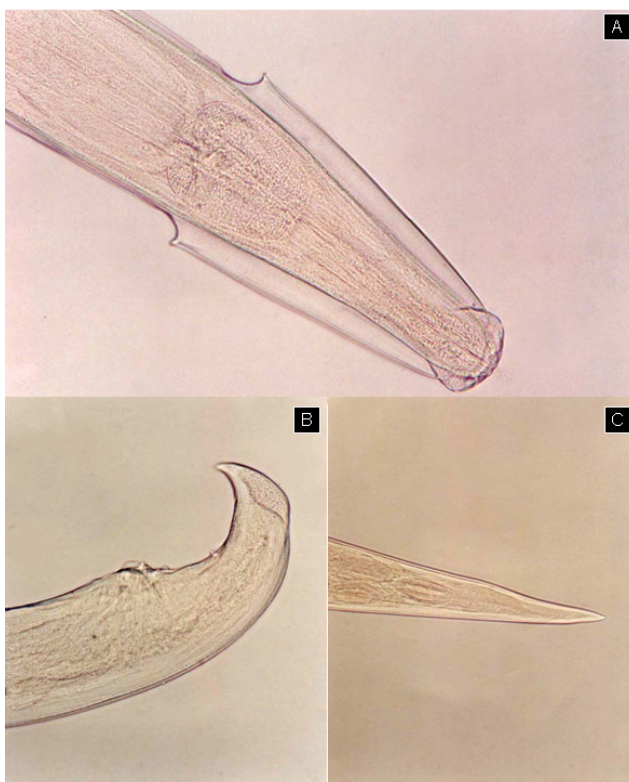


Figura 8. Exemplares da espécie *Aspiculuris tetraptera*, onde na extremidade anterior (A) observa-se o bulbo esofágico e as asas cervicais desenvolvidas; extremidade posterior do sexo masculino (B); e extremidade posterior do sexo feminino (C) (40X).

3.5.1 Animais

Foram utilizados lotes de camundongos albinos, de ambos os sexos, pesando em torno de 25 g, oriundos da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ e mantidos no biotério do Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, até a execução do experimento.

3.5.1 Execução do teste

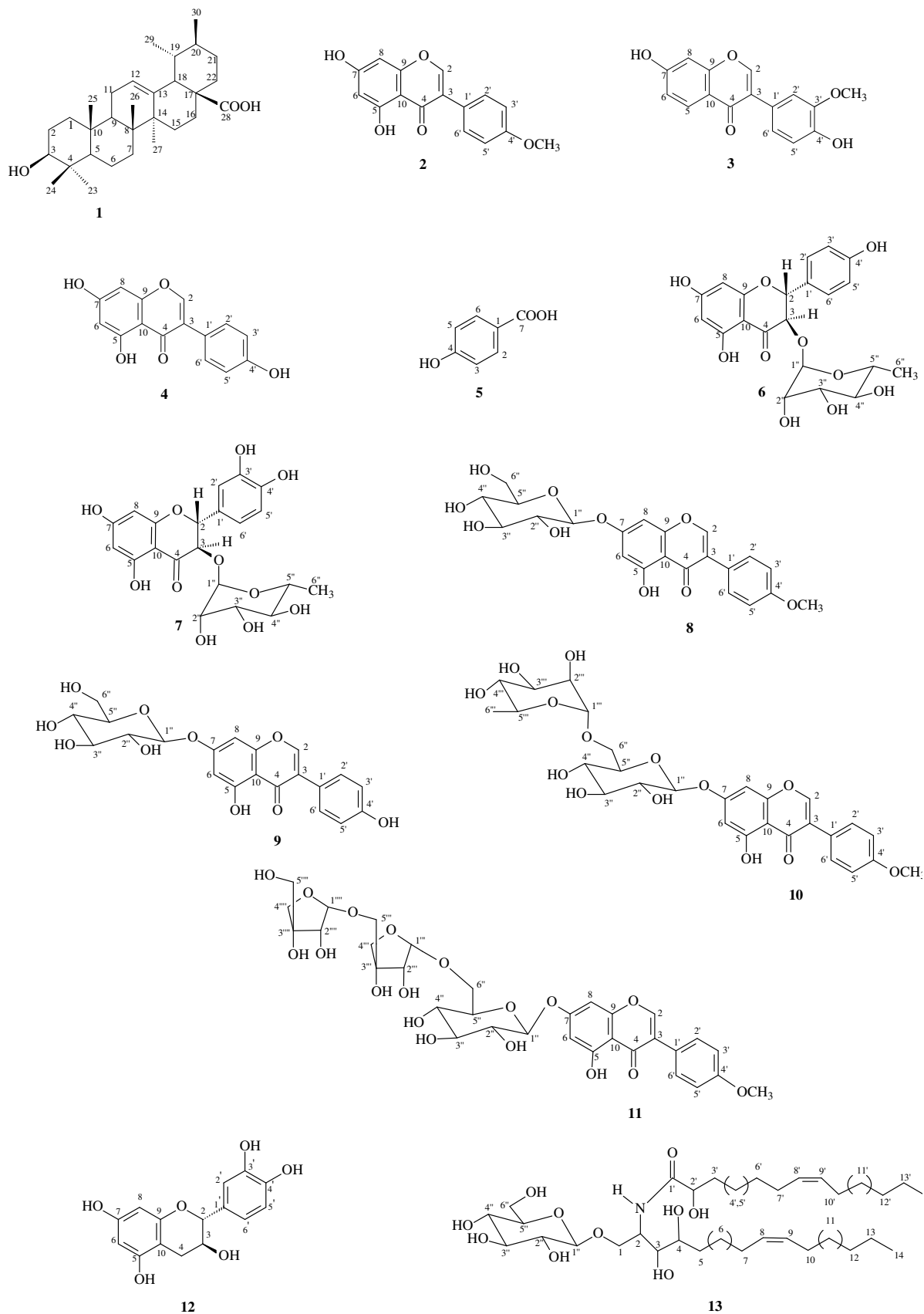
Os ensaios foram realizados no Laboratório de Atividade Anti-helmíntica de Plantas sob supervisão do Prof. Dr. Hélcio Resende Borba (Instituto de Biologia – UFRRJ). Um total de 100 camundongos albinos SW foram mantidos em gaiolas coletivas de polipropileno, nas quais, a limitação das medidas de higiene possibilitou o nível desejado da infecção natural pelo nematóide *A. tetraptera*. Para os testes foram utilizados grupos de 10 camundongos, machos e fêmeas, com peso compreendido entre 20 e 22 g. As gaiolas eram dotadas de piso telado, com o objetivo de facilitar a coleta diária de fezes. Foram utilizadas doses de 12,0 e 24,0 mg.kg⁻¹ para as frações de acetato de etila, butanol e metanol (obtidas do fracionamento das raízes de *A. anthelmia*) e doses de 2,0 mg.kg⁻¹ para as substâncias **2**, **8**, **10**, **11** e **12** (ver p. 39 e 147). As frações e substâncias isoladas foram solubilizadas em água destilada com auxílio de ultrassom e aplicadas por via intragástrica, no volume de 0,04 ml.g⁻¹, com emprego de sonda de polietileno, durante três dias consecutivos a cada camundongo dos lotes experimentais (AMORIM & BORBA, 1990). As fezes de cada gaiola foram coletadas diariamente, processadas em tamis de malha 125 µm e examinadas sob microscópio do tipo estereomicroscópio Wild M-5, visando à contagem de *A. tetraptera* eliminados do 2^o ao 5^o dia, perfazendo um total de quatro exames fecais. Dois lotes de 10 camundongos serviram como controle, sendo que um deles recebeu doses de mebendazol (Pantelmin[®], Janssen-Cilag) em três dias consecutivos (20 mg.kg⁻¹) e o outro recebeu apenas o veículo (0,04 ml.g⁻¹), objetivando avaliar a eliminação espontânea do helminto. No quinto e último dia dos testes, os animais foram eutanasiados por inalação de vapores de éter etílico e necropsiados, examinando-se o conteúdo do intestino grosso (exame coproparasitológico), de modo a avaliar-se o número de *A. tetraptera* remanescentes (AMORIM *et al.*, 1987). O resultado foi expresso em termos percentuais de eliminação de *A. tetraptera*, considerando-se para o cálculo o número de helmintos apurados na contagem fecal em relação ao número total de helmintos eliminados nas fezes e à necropsia.

3.5.2 Análise estatística

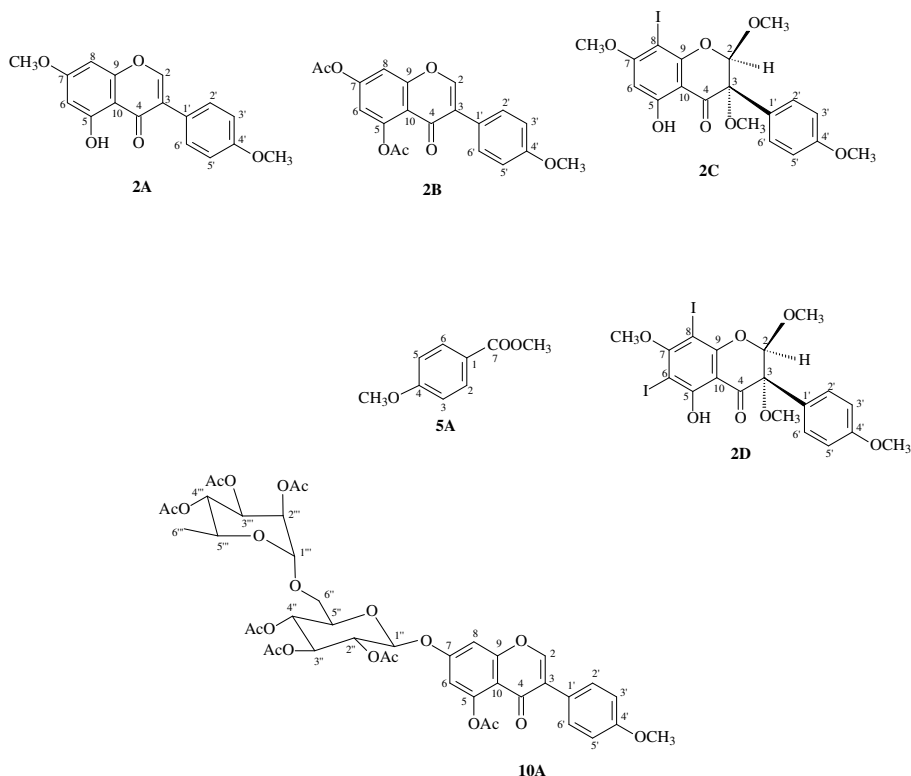
No teste de atividade anti-helmíntica, os resultados sofreram transformação angular e foram comparados com valores encontrados no lote controle empregando-se o teste *t* de “Student”. O nível de significância adotado foi ***p*<0,05 e **p*<0,01.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Substâncias Isoladas das Raízes de *Andira anthelmia*



4.1.1 Derivados obtidos a partir das substâncias isoladas das raízes de *A. anthelmia*



4.1.1.1 Determinação estrutural das substâncias isoladas e derivados

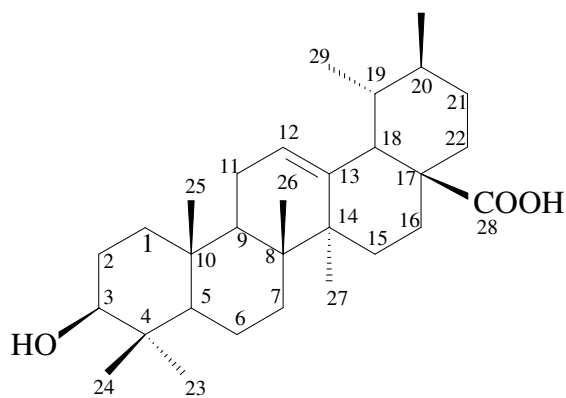
4.1.1.1.1 Identificação da substância 1

A análise do espectro registrado na região de IV da substância **1** (Figura 9; p. 42) revelou bandas de absorção em 3424 cm^{-1} (estiramento O-H), 2928 cm^{-1} e 2866 cm^{-1} (grupos CH_2 e CH_3), 1693 cm^{-1} (estiramento C=O) e 1036 cm^{-1} (estiramento C-O).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 10; p. 42) mostrou sinais que podem ser atribuídos as sete metilas alifáticas com deslocamentos químicos em δ_{H} 0,88; 0,96 (x2); 1,02 (x2) e 1,04 (x2). O sinal em δ_{H} 3,45 correspondente ao hidrogênio H-3, apareceu como um tripleto com $J=8,0\text{ Hz}$, sugerindo sua posição axial em relação ao grupo hidroxílico. Também foi observado nesse espectro, um singleto largo em δ_{H} 5,48, referente ao hidrogênio olefínico H-12 e um dubleto em δ_{H} 2,63 com $J = 12,0\text{ Hz}$ resultado do acoplamento entre os hidrogênios H-18 e H-19, característico de triterpenóides pentacíclicos com esqueleto do tipo urs-12-eno.

Outra característica importante de triterpenos pertencentes à classe dos ursanos é o sinal do carbono sp^2 quaternário em δ_{C} 139,24 (C-13). Este carbono recebe uma maior proteção devido ao efeito γ exercido pela metila ligada ao C-19. Nos espectros de RMN de ^{13}C -BBD (Figura 11 e 12; p. 43), incluindo experimento de DEPT 135° (Figura 13, p. 44), também foi detectada a presença dos carbonos metínico sp^2 em δ_{CH} 125,62, carbinólico em δ_{CH} 78,10 (C-3) e carboxílico em $\delta_{\text{C=O}}$ 179,94 (C-28). Os demais sinais são de carbonos sp^3 quaternários, metínicos, metilênicos e metílicos. Estes dados foram comparados com os descritos na literatura (KRIWACKI & PITNER, 1989) (Tabela 3; p. 41) e estão de acordo com a estrutura proposta para o ácido ursólico (ácido-3- β -hidroxi-urs-12-en-28-óico, **1**). Este

triterpeno, muito comum em plantas, está sendo registrado pela primeira vez no gênero *Andira*.



ácido ursólico (1)

Tabela 3. Dados de RMN de ^{13}C (50 MHz) da substância 1

C	(KRIWACKI & PITNER, 1989)*	1*	C	(KRIWACKI & PITNER, 1989)*	1*
	δ_{C}	δ_{C}		δ_{C}	δ_{C}
1	38,99	39,04	16	24,83	24,88
2	27,98	28,07	17	47,96	48,02
3	78,04	78,10	18	53,45	53,51
4	38,90	39,38	19	39,87	39,47
5	55,73	55,78	20	39,30	39,04
6	18,71	18,76	21	30,98	31,04
7	33,47	33,55	22	37,35	37,25
8	39,92	39,02	23	28,74	29,98
9	47,96	48,02	24	16,49	16,54
10	37,35	37,41	25	15,58	15,66
11	23,56	23,61	26	17,43	17,42
12	125,57	125,62	27	23,83	23,88
13	139,17	139,24	28	179,86	179,94
14	42,40	42,47	29	17,50	17,51
15	28,73	28,73	30	21,40	21,39

*: $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

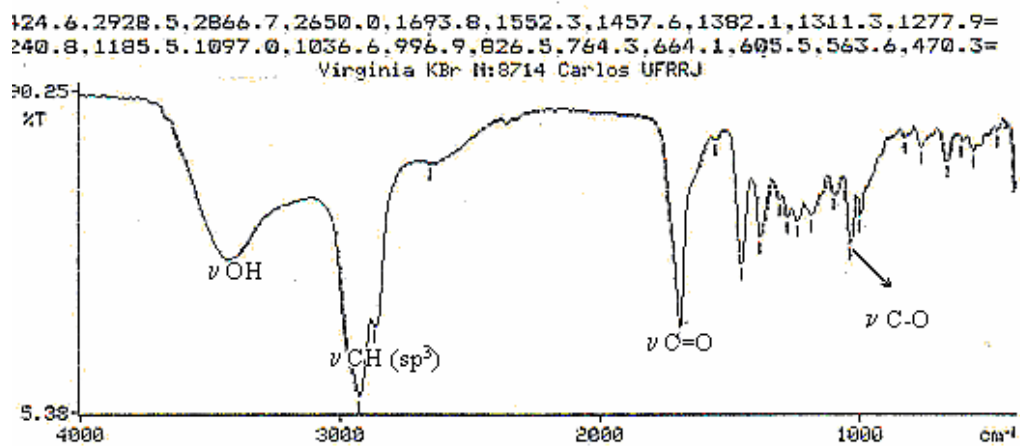


Figura 9. Espectro de I.V. (KBr) de 1.

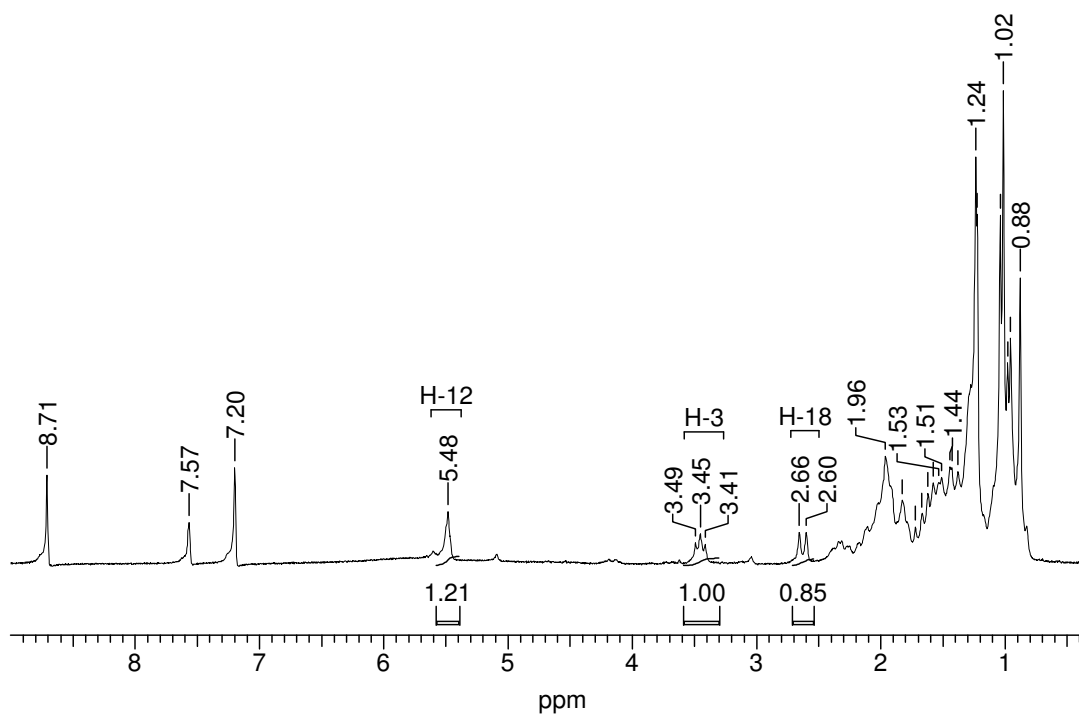


Figura 10. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de 1.

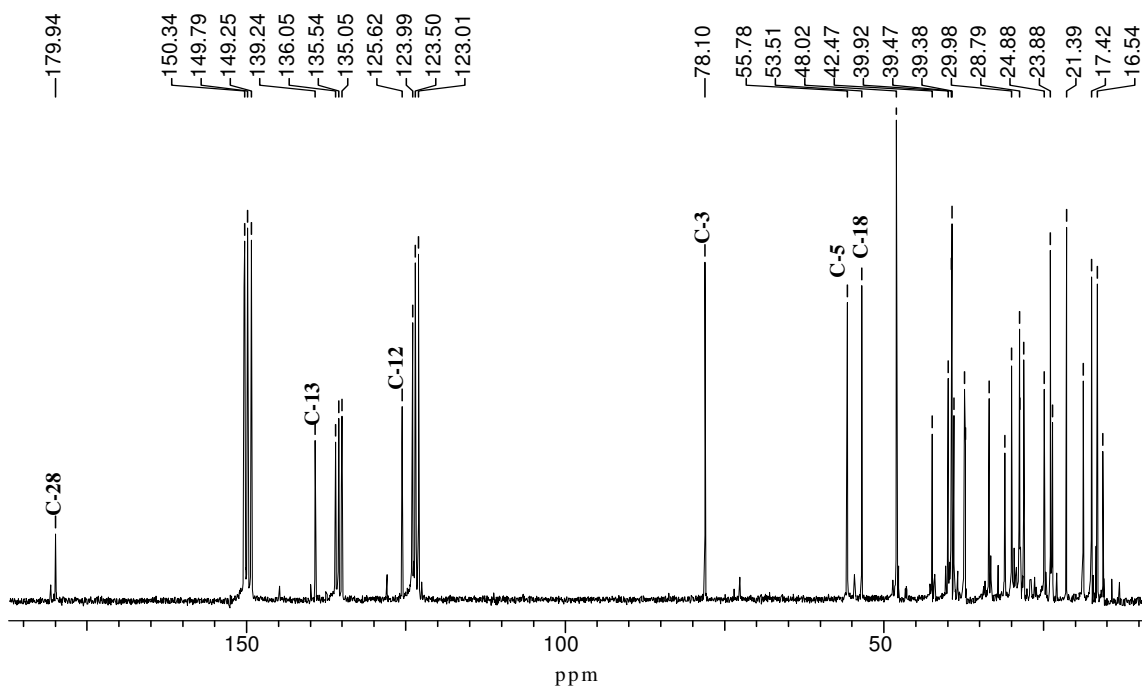


Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de 1.

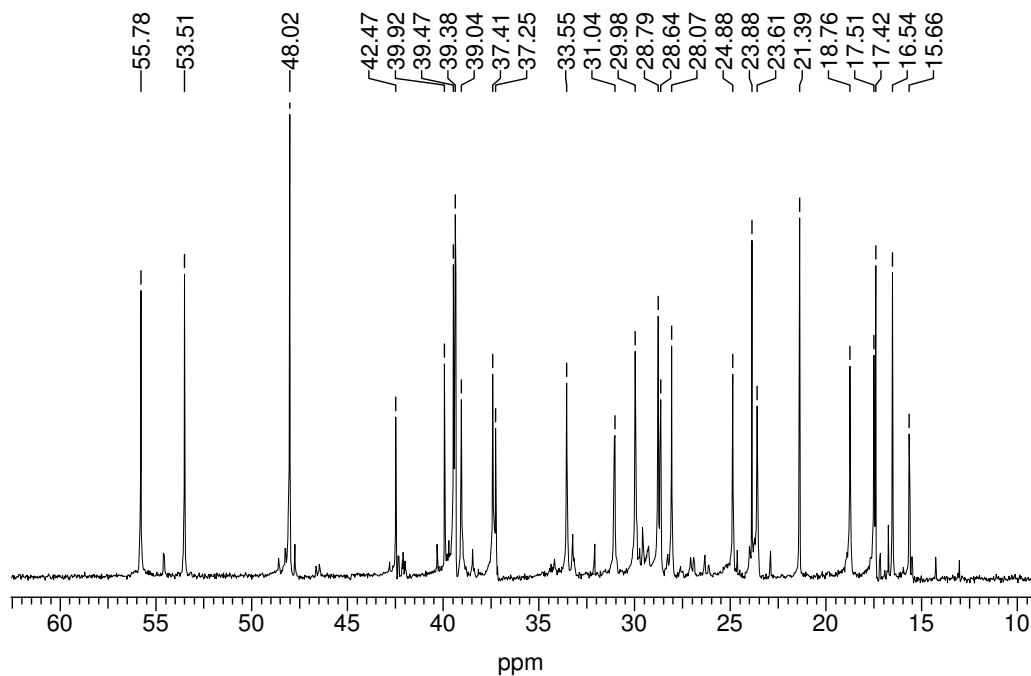


Figura 12. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, BBD, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de 1 na região entre δ_{C} 10,0-62,55 ppm.

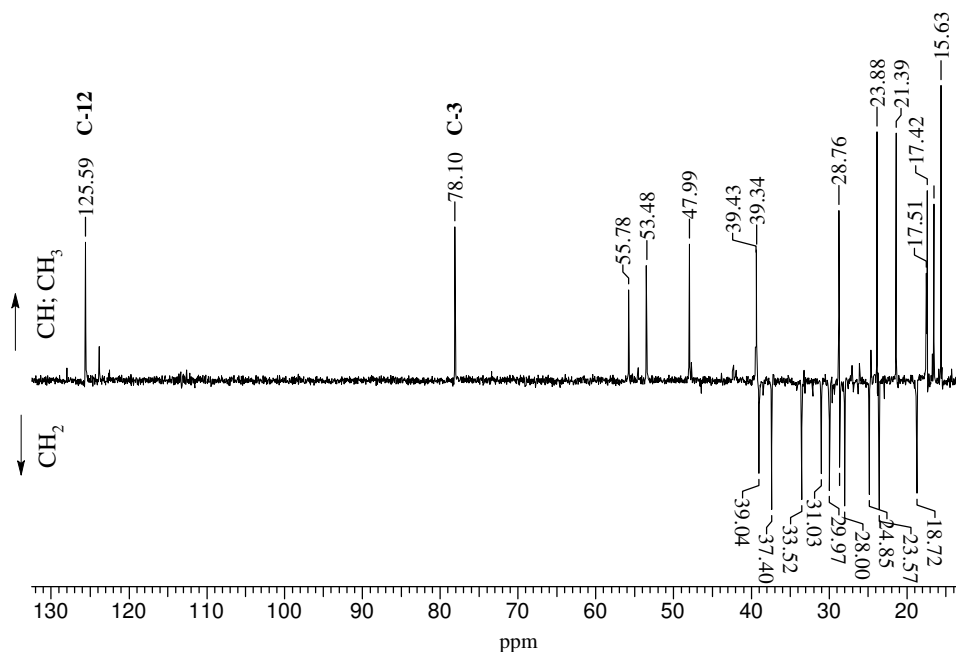


Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DEPT 135° , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de **1**.

4.1.1.1.2 Identificação da substância **2**

No espectro de IV de **2** (Figura 14; p. 46) foram observadas bandas de absorção em 1653 cm^{-1} (estiramento $\text{C}=\text{O}$ de carbonila conjugada), 1618 cm^{-1} (estiramento $\text{C}=\text{C}$ de ligação dupla conjugada à carbonila), 1565 , 1514 e 1439 cm^{-1} (estiramento $\text{C}=\text{C}$ de anel aromático) e 1248 cm^{-1} (estiramento $\text{C}-\text{O}$).

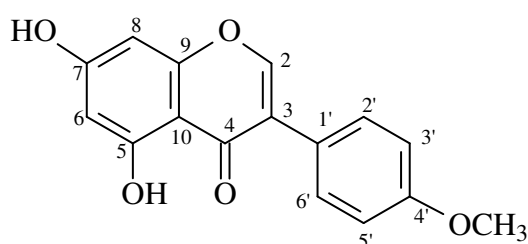
O espectro de RMN de ^1H da substância **2** (Figura 15; p. 46) mostrou cinco sinais na região de deslocamento de hidrogênios de sistema aromático, além de uma absorção em $\delta_{\text{H}} 12,91$ indicando hidroxila quelada e outra em $\delta_{\text{H}} 3,77$ com integração para 3 hidrogênios, indicando a presença de grupamento metoxílico. O par de dubletos em $\delta_{\text{H}} 6,21$ (H-6) e $\delta_{\text{H}} 6,36$ (H-8) com $J=2,0\text{ Hz}$ atribuídos aos hidrogênios do anel A juntamente com o par de dubletos $\delta_{\text{H}} 6,97$ (H-3',5') e $\delta_{\text{H}} 7,47$ (H-2',6') com $J=10,0\text{ Hz}$, compatíveis ao de um sistema $\text{AA}'\text{BB}'$, e o singlete em $\delta_{\text{H}} 8,33$ correspondente ao H-2 permitiram sugerir o esqueleto de uma isoflavona. O valor do deslocamento químico dos hidrogênios H-3' e H-5' para campo mais alto do que os hidrogênios H-2' e H-6' sugeriram o grupo oxigenado sustentado por C-4'. A localização do grupo metoxílico foi definida através da análise dos sinais de NOE no espectro obtido com o experimento de NOEDIFF (Figura 16; p. 47). O espectro resultante deste experimento através da irradiação na frequência da metoxila, apresentou sinal de NOE em $\delta_{\text{H}} 6,97$ (H-3',5') justificando sua localização em C-4' e, portanto do grupo hidroxílico em C-7.

O espectro de RMN de ^{13}C -BBD deste flavonóide (Figura 17; p. 47) revelou sinal correspondente ao carbono carbonílico $\delta_{\text{C}=\text{O}} 180,12$ (C-4), os carbonos oxigenados $\delta_{\text{C}} 162,01$

(C-5) e δ_C 164,44 (C-7) e distinguiu os sinais dos carbonos metínicos em δ_{CH} 99,06 (C-6) e δ_{CH} 93,75 (C-8). Os dados desse espectro também permitiram confirmar a proposta pelo deslocamento característico em δ_{CH} 154,64 atribuído ao C-2.

A fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_5$ foi confirmada pelo pico em m/z 284 observado no espectro de massas (Figura 18; p. 48). A fragmentação mais característica de todos os flavonóides foi atribuída à clivagem no anel C pelo rearranjo retro Diels-Alder fornecendo o fragmento m/z 132 (20%), sendo compatível com fragmento envolvendo o anel B metoxilado (Esquema 9; p. 48).

Todos os dados discutidos e comparados com a literatura (SILVA *et al.*, 2000) (Tabela 4; p. 45) permitiram caracterizar este flavonóide como a biochanina A ou 5,7-diidroxi-4'-metoxiisoflavona (**2**), isolada com bastante frequência no gênero *Andira*, como descrito na revisão deste trabalho (item 2.1.2).



biochanina A (**2**)

Tabela 4. Dados de RMN de ^{13}C (50 MHz) da substância 2

C	(SILVA <i>et al.</i> , 2000)*	2*	
	δ_C	δ_C	δ_H (mult.; J Hz)
2	154,93	154,64	8,33 (s)
3	122,80	122,95	-
4	180,49	180,54	-
5	161,70	162,01	-
6	99,86	99,06	6,21 (d; 2,0)
7	163,0	164,44	-
8	94,69	93,75	6,36 (d; 2,0)
9	157,32	157,62	-
10	106,24	106,06	-
1'	122,31	121,95	-
2'	130,25	130,17	7,48 (d; 10,0)
3'	113,84	113,71	6,97 (d; 10,0)
4'	159,30	159,19	-
5'	113,84	113,71	6,97 (d; 10,0)
6'	130,25	130,17	7,48 (d; 10,0)
4'-OCH ₃	55,25	55,18	3,77 (s)
5-OH	-	-	12,91 (s)

*: DMSO-d₆

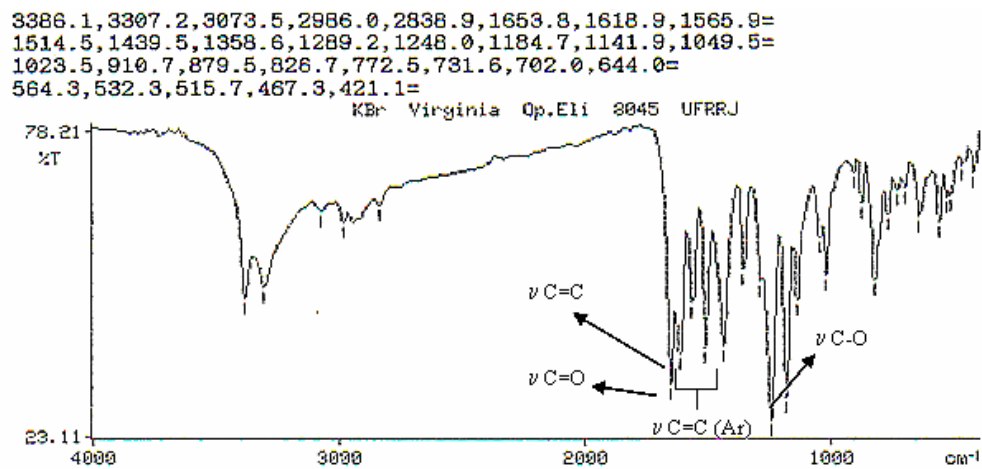


Figura 14. Espectro de I.V. (KBr) de 2.

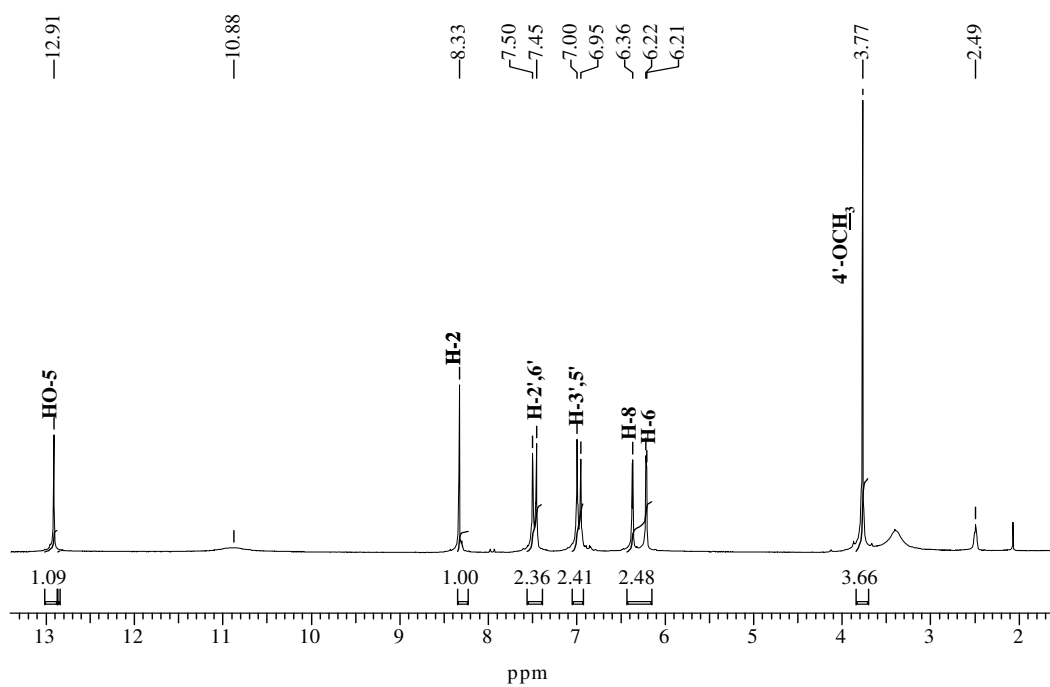


Figura 15. Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆) de 2.

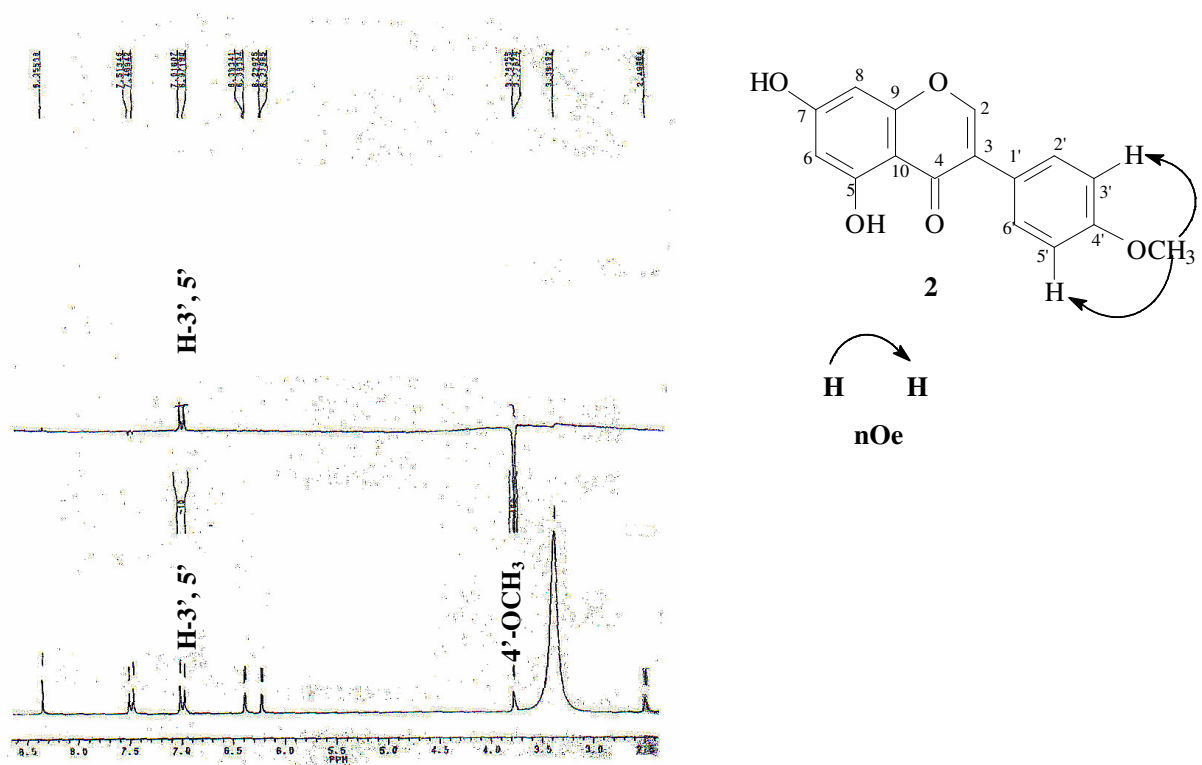


Figura 16. Espectro de NOEDIFF (200 MHz, DMSO-d₆) obtido por irradiação na frequência da metoxila de 2.

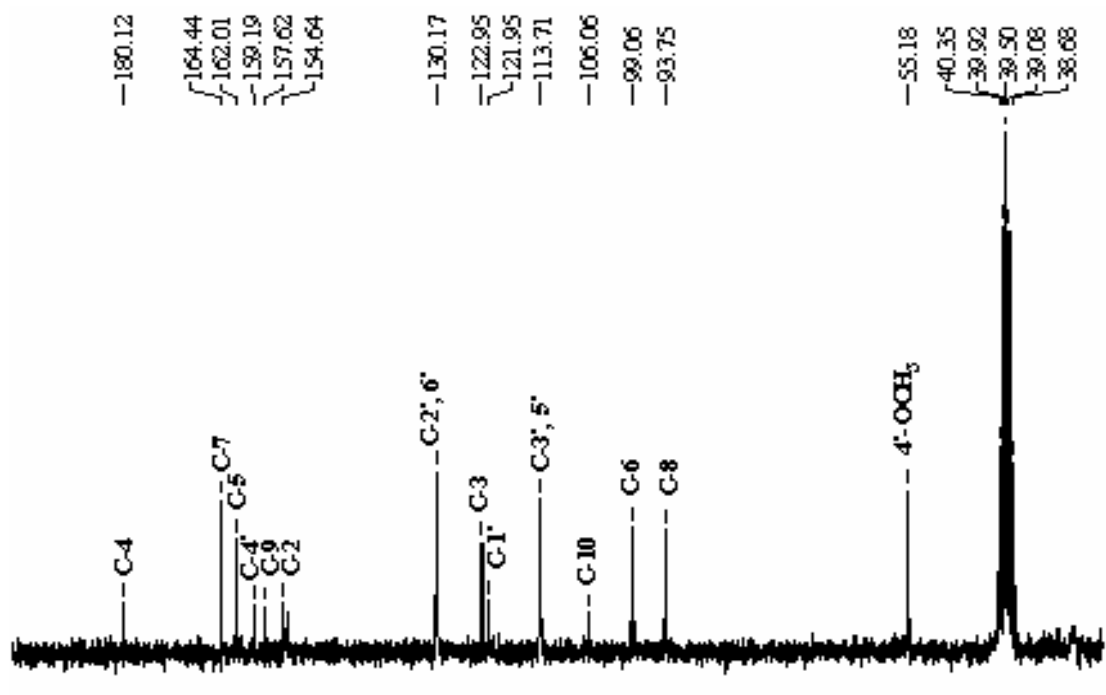


Figura 17. Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, BBD, DMSO-d₆) de 2.

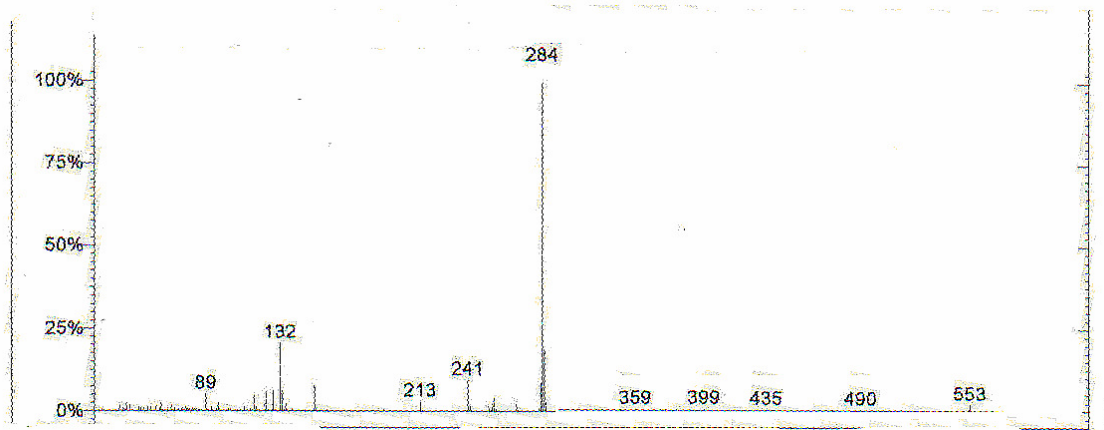
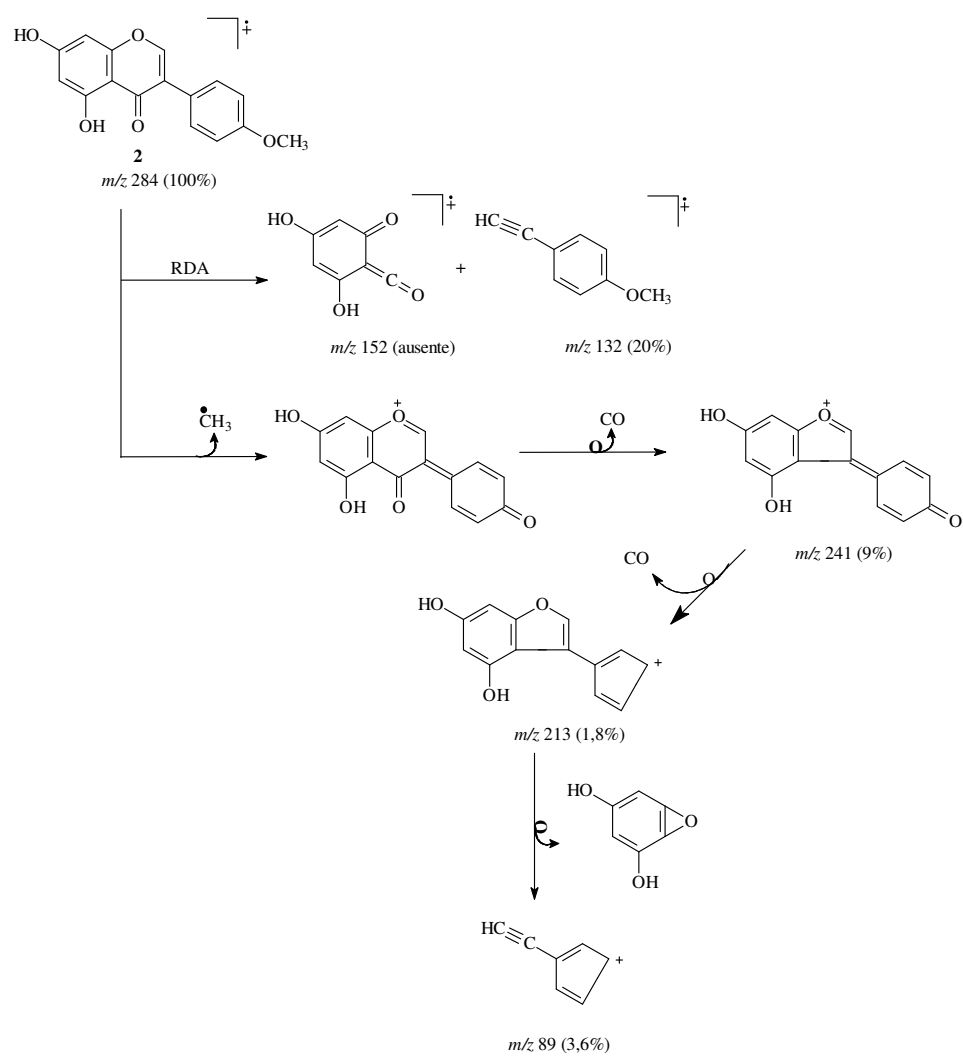


Figura 18. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de 2.



Esquema 9. Proposta de fragmentação para a substância 2.

4.1.1.1.3 Transformações químicas na substância 2

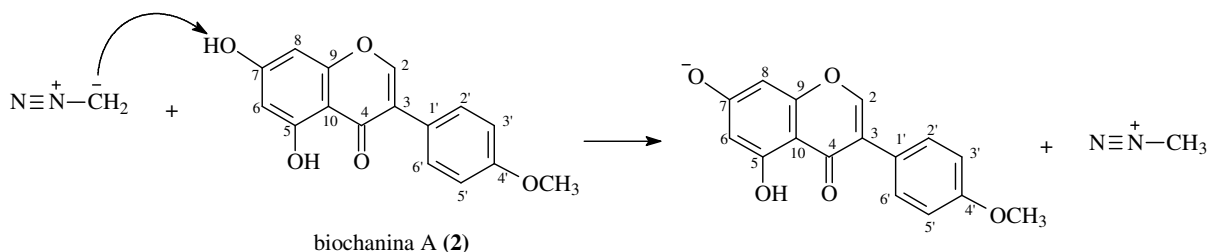
▪ Derivado 2A

O espectro de RMN de ^1H (Figura 19; p. 50) indicou a formação do derivado **2A** (Esquema 10; p. 49) pela presença de um sinal adicional de grupo metoxílico na molécula. Os sinais apareceram como dois singletos em δ_{H} 3,83 e δ_{H} 3,86 sendo um deles ligado no C-4' (presente na molécula original) e o outro substituindo no C-7, confirmando a incorporação do diazometano no fenol livre (HO-7) (Tabela 5; p. 50).

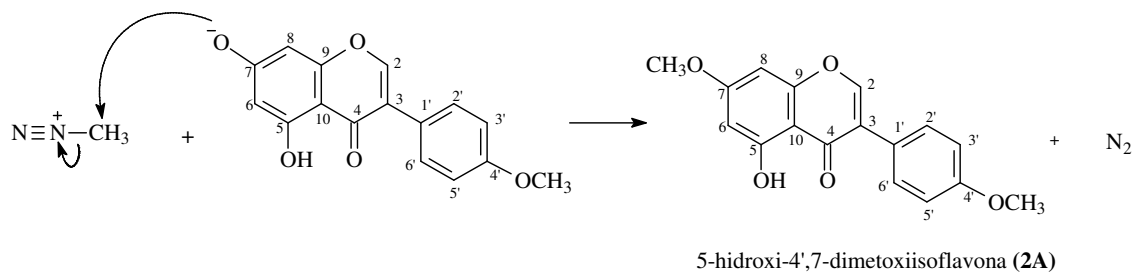
No espectro de RMN de ^{13}C -BBD (Figura 20; p. 51) observou-se que a troca da hidroxila no carbono C-7 por uma metoxila, não gerou modificação significativa nos deslocamentos químicos nos carbonos *ipso* e *orto*, resultado que pode ser justificado pela variação no uso de solventes na obtenção desses espectros (MARKHAM *et al.*, 1982). O efeito do solvente revelado pela comparação de espectros obtidos em CDCl_3 e DMSO-d_6 permitiu observar desproteção ($\Delta\delta_{\text{C}} \approx +0,9$ ppm) no carbono que sustenta o grupo metoxílico (carbono *ipso*) e proteção de $\Delta\delta_{\text{C}} \approx -1,75$ ppm e $\Delta\delta_{\text{C}} \approx -2,41$ ppm nos carbonos *orto* C-6 e C-8, respectivamente.

No espectro de massas (Figura 21; p. 51) os picos representantes de íons formados a partir do íon molecular [m/z 298 (100%)] podem ser justificados pela eliminação de unidade estrutural representada pela perda de 30 (H_2CO) [m/z 269 (19%)] e a típica fragmentação do anel C pelo rearranjo retro Diels-Alder [m/z 166 (11%)], semelhante à fragmentação observada para **2**.

ETAPA 1



ETAPA 2



Esquema 10. Mecanismo de reação com diazometano para formação de **2A**.

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) da substância 2A

C	2A	
	δ_{C}	δ_{H} (<i>mult.</i> , J Hz)
2	152,60	7,82 (<i>s</i>)
3	123,49	-
4	180,74	-
5	162,58	-
6	98,11	6,34 (<i>sl</i>)
7	165,43	-
8	92,28	6,25 (<i>sl</i>)
9	157,85	-
10	109,18	-
1'	122,82	-
2', 6'	130,01	7,43 (<i>d</i> ; 8,0)
3', 5'	114,0	6,95 (<i>d</i> ; 8,0)
4'	159,70	-
4'-OCH ₃	55,26	3,82 (<i>s</i>)
7-OCH ₃	55,71	3,82 (<i>s</i>)
HO-5	-	12,85 (<i>s</i>)

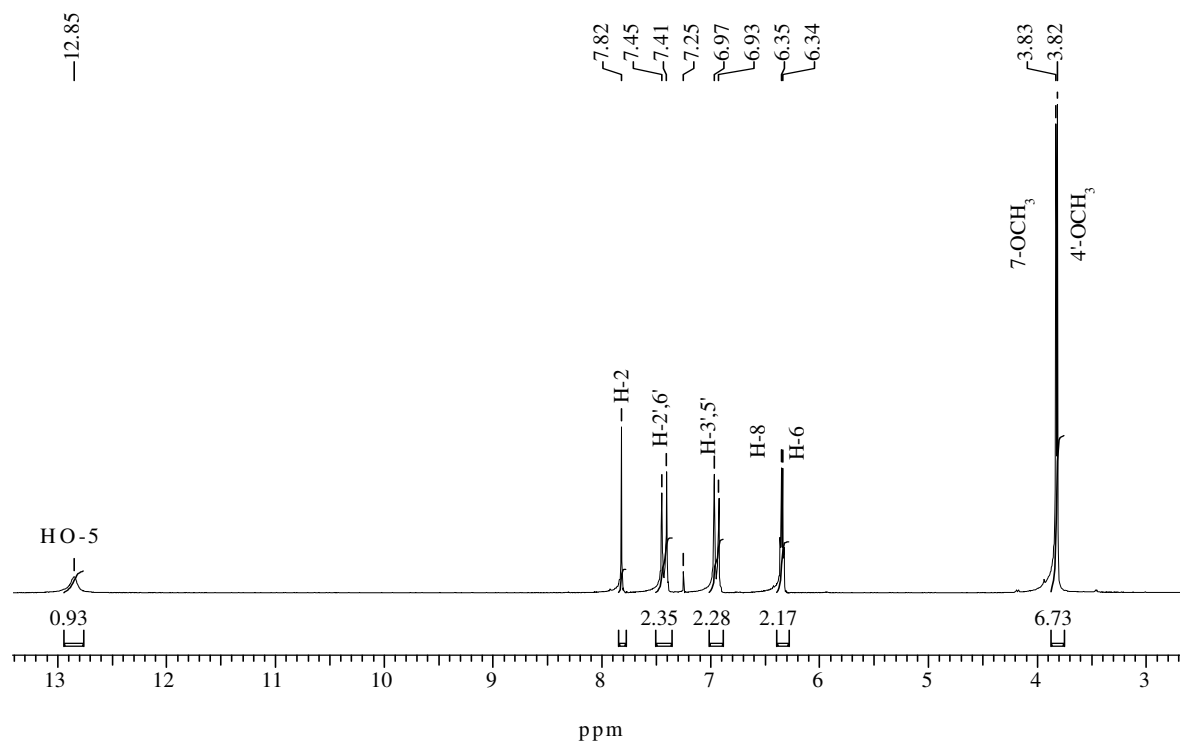


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3) de 2A.

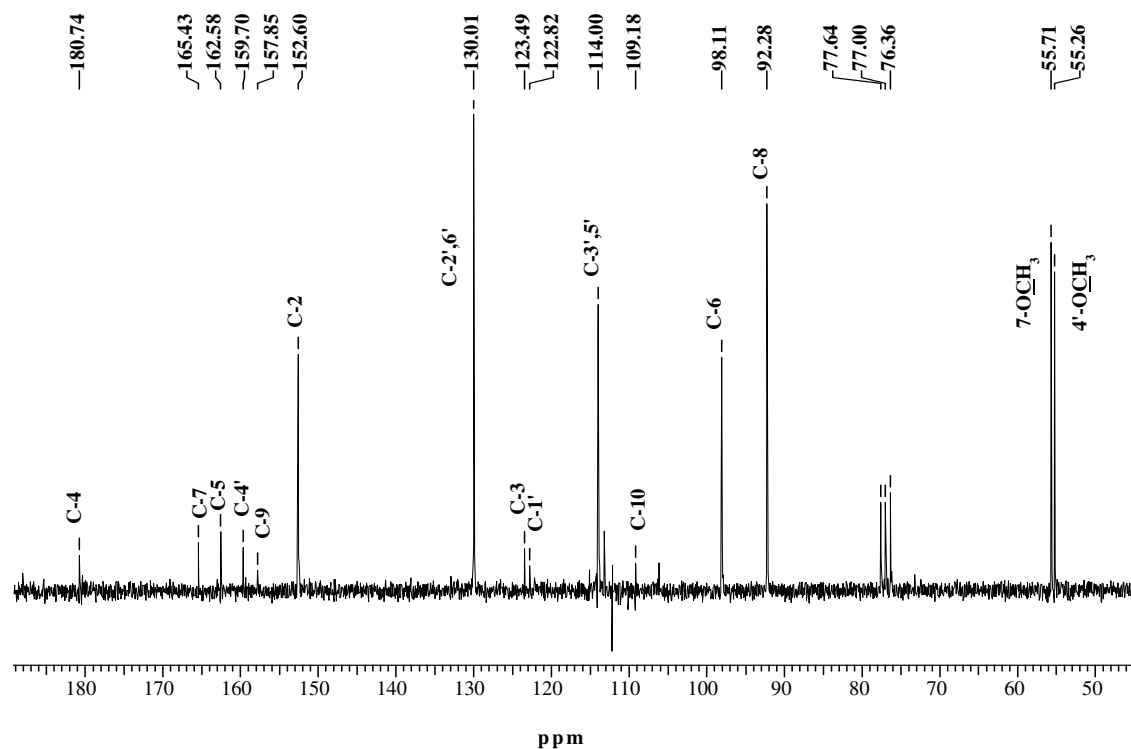


Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, BBD, CDCl_3) de 2A.

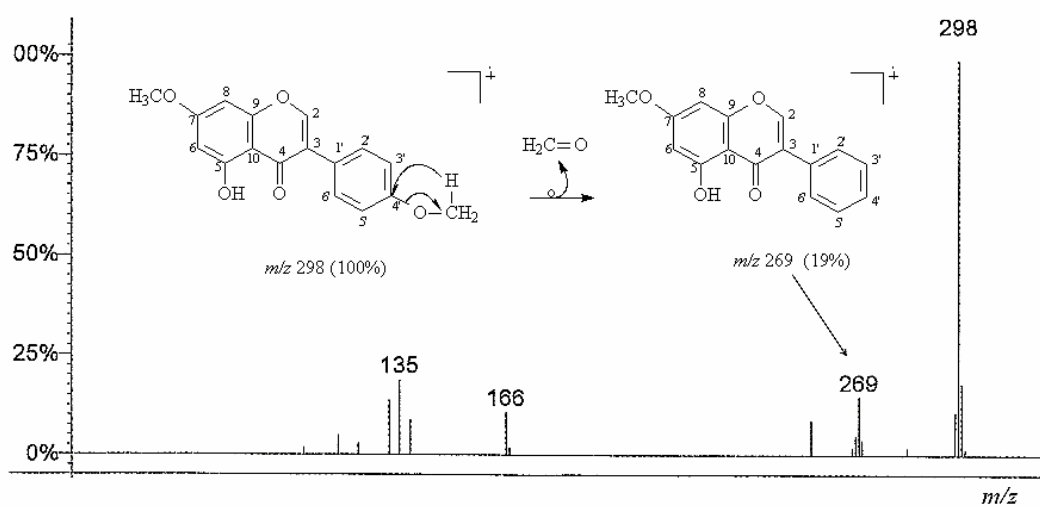


Figura 21. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de 2A.

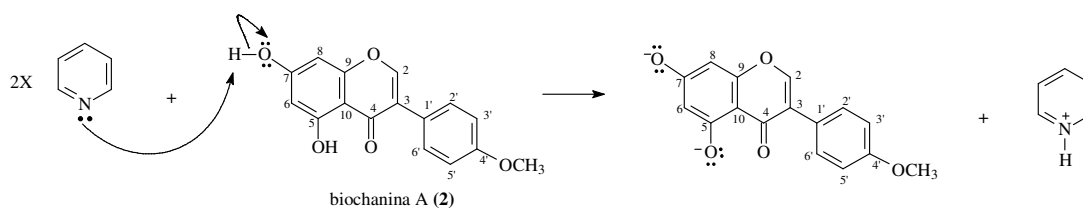
▪ Derivado 2B

A acetilação da hidroxila quelada HO-5 e da hidroxila HO-7 gera maior desproteção nos hidrogênios H-6 e H-8 localizados em posição *orto* no anel A (MABRY *et al.*, 1970), como conseqüência da atenuação do efeito mesomérico promovido pela deslocalização dos elétrons não compartilhados do átomo de oxigênio devido à presença da carbonila do grupo acetoxila. O espectro de RMN de ^1H (Figura 22; p. 53) mostrou que a formação do produto foi completa, pela presença de dois sinais relativos aos grupos acetoxilas em $\delta_{\text{H}} 2,32$ e $\delta_{\text{H}} 2,40$ e a ausência da hidroxila quelada HO-5.

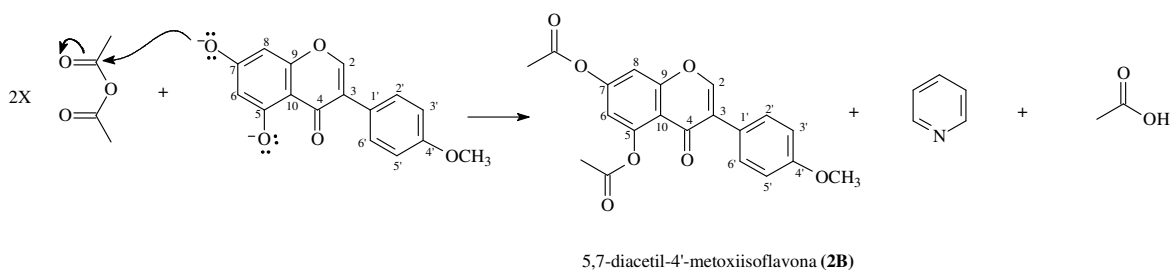
Após a acetilação das hidroxilas em C-5 e C-7, o espectro de RMN de ^{13}C -BBD (Figura 23; p. 54) do derivado **2B** apresentou mudanças nos deslocamentos químicos correspondentes aos carbonos *ipso* (proteção $\Delta\delta_{\text{C}} \approx -5,0$ ppm), *orto* (desproteção, $\Delta\delta_{\text{C}} \approx +9,0$ ppm) e *para* (desproteção $\Delta\delta_{\text{C}} \approx +8,0$ ppm) como esperado (MARKHAM, 1989). Nestes valores inclui-se o efeito de solvente, já que, segundo (MARKHAM *et al.*, 1982), nos espectros dos flavonóides o valor do deslocamento químico dos carbonos individualmente aumenta 0,5 ppm quando o solvente é trocado de CDCl_3 para DMSO-d_6 (Tabela 6, p. 53).

O espectro de massas (Figura 24; p. 54) revelou picos significativos em m/z 326 (100%) devido à fragmentação do grupo acetoxila com perda ceteno ($\text{O}=\text{C}=\text{CH}_2$) e fragmentações atribuídas à clivagem no anel C pela reação retro Diels-Alder; m/z 152 (3,5%) e m/z 132 (12%), além do pico referente ao íon molecular m/z 368 [M^+].

ETAPA 1



ETAPA 2



Esquema 11. Mecanismo proposto para acetilação de hidroxilas fenólicas.

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) da substância 2B

C	2B	
	δ_{C}	δ_{H} (mult.; J Hz)
2	150,60	7,85 (s)
3	126,07	-
4	174,59	-
5	157,64	-
6	108,99	6,83 (d; 2,0)
7	159,70	-
8	108,99	7,22 (d; 2,0)
9	151,48	-
10	113,72	-
1'	123,52	-
2',6'	130,28	7,38 (d; 8,0)
3',5'	114,0	6,94 (d; 8,0)
4'	153,66	-
4'-OCH ₃	55,29	3,81 (s)
AcO-5	21,11	2,46 (s)
AcO-7	21,11	2,34 (s)

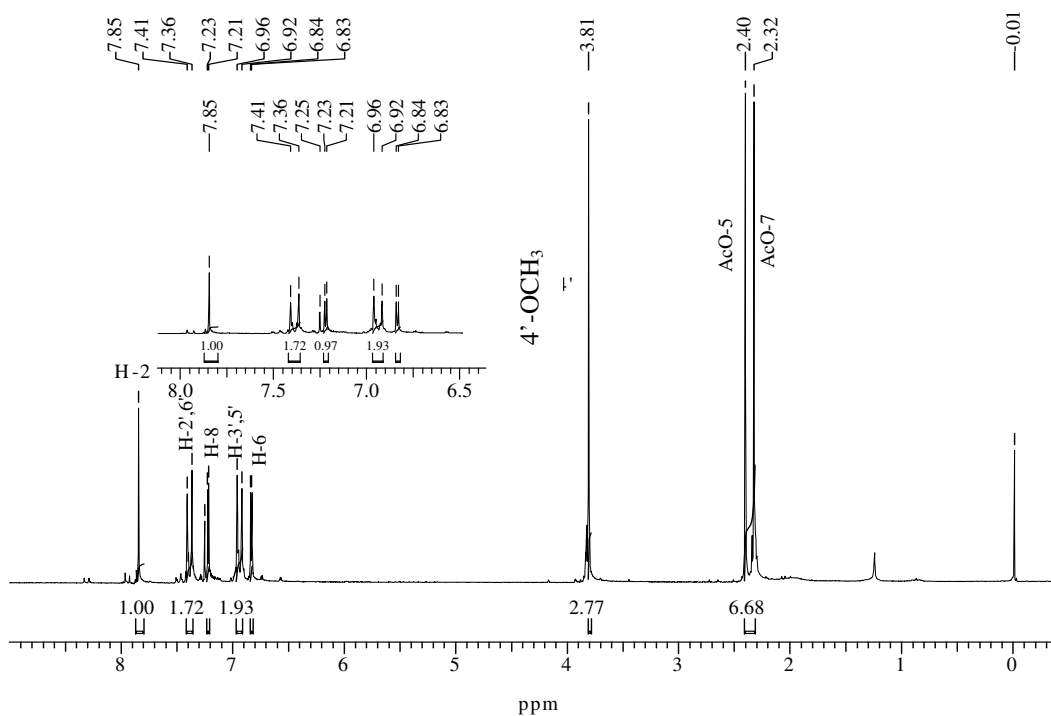


Figura 22. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 2B.

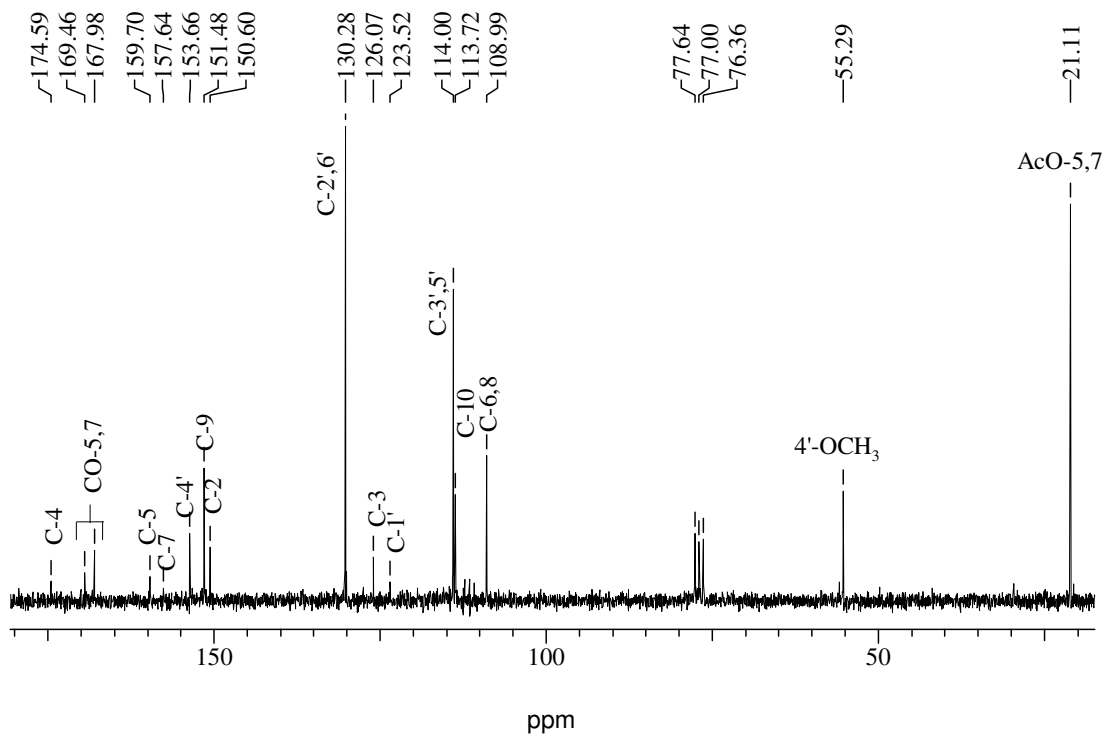


Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, BBD, CDCl_3) de 2B.

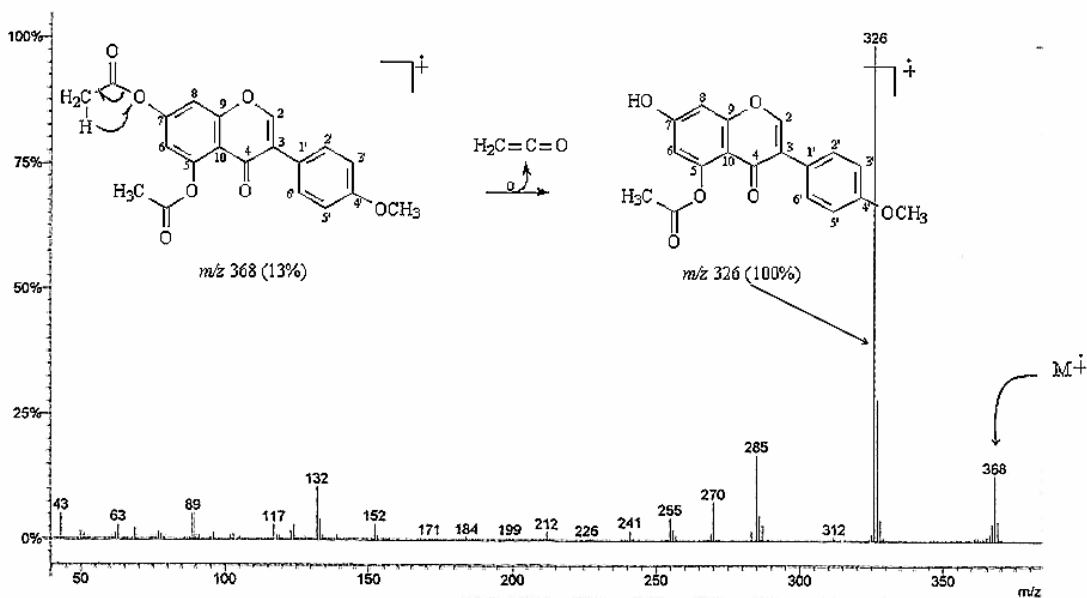


Figura 24. Espectro de massas por I.E. (70 eV) de 2B.

▪ Derivados **2C** e **2D**

No espectro de IV dos produtos **2C+2D** (Figura 27; p. 60) foram observadas bandas de absorção em 3433 cm^{-1} (estiramento O-H), 1635 cm^{-1} (estiramento C=O para carbonila não conjugada), 1620 , 1561 , 1538 , 1513 e 1494 cm^{-1} (estiramento C=C de sistema aromático), 1179 cm^{-1} (estiramento C-O) e 660 cm^{-1} (estiramento C-I).

A formação dos produtos **2C+2D** foi proposta com base nos picos observados no CG (Figura 39; p. 71) (T_R 19 min. e T_R 25 min.), que facilitou a análise dos sinais observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

A análise comparativa entre os dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos produtos **2C+2D** com dados da substância original (**2A**) permitiu confirmar a reação (Esquema 12; p. 58) pelas modificações significativas nos respectivos espectros.

O espectro de RMN de ^1H dessa mistura (Figuras 28 e 29; p. 60 e 61) mostrou sinais de absorção na região aromática, sendo dois pares de dubletos referentes a dois sistemas aromáticos semelhantes, cujas multiplicidades revelaram acoplamento compatível ao de um sistema AA'BB': δ_H 6,96 (*d*, $J=8,9$, H-3',5') e δ_H 7,40 (*d*, $J=8,9$ H-2',6') [**2C**] e δ_H 6,89 (*d*, $J=8,9$, H-3',5') e δ_H 7,42 (*d*, $J=8,9$, H-2',6') [**2D**]. O mapa de contornos do $^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY (Figura 30; p. 62) foi usado para confirmação das interações spin-spin destes átomos de hidrogênio. Ainda na região de absorção de hidrogênios em anel aromático, nota-se a presença de um singlete em δ_H 6,23, atribuído a um hidrogênio do anel A de um dos produtos (**2C**). Os sinais em δ_H 12,18 e 12,81 (*s*) referentes a duas hidroxilas queladas e os sinais de dois singletos na região de frequência média referentes a dois hidrogênios metínicos não aromáticos e substituídos por função oxigenada em δ_H 5,18 (*s*, H-2) [**2C**] e δ_H 5,21 (*s*, H-2) [**2D**], com integrações diferentes, também indicaram a presença dos produtos **2C+2D**. Esses sinais representando hidrogênios ligados a dois respectivos carbonos em $\approx \delta_C$ 106,0 ppm também garantem a mistura dos produtos **2C+2D**. Os sinais adicionais na região de frequência baixa foram atribuídos as metoxilas, substituindo respectivamente nos carbonos dos anéis A em δ_H 3,96 (C-7) [**2C**] e δ_H 3,97 (C-7) [**2D**]; B em δ_H 3,86 (C-4') [**2C** e **2D**]; δ_H 3,63 (C-2) [**2C** e **2D**] e C em δ_H 3,21 (C-3) [**2C**] e δ_H 3,19 (C-3) [**2D**].

O experimento de NOEDIFF (Figura 31; p. 63) serviu para identificar a configuração relativa (*R,S*) dos hidrogênios em C-2 e C-3 (Figura 25; p. 56). A irradiação em δ_H 3,63 (H₃CO-2, **2C** e **2D**) gerou NOE em H-2 (δ_H 5,22 e 5,18); em δ_H 3,19 (H₃CO-3, **2D**) gerou NOE em H-2',6' (δ_H 7,42) e em HO-5 (δ_H 12,18); irradiação em δ_H 3,86 (H₃CO-4', **2C** e **2D**) e δ_H 3,96 (H₃CO-7, **2C**) gerou NOE em H-3',5' (δ_H 6,98) e H-6 (δ_H 6,23), respectivamente. Irradiação em δ_H 3,21 (H₃CO-3) de **2C** gerou NOE em δ_H 5,18 (H-2), δ_H 7,40 (H-2',6') e em HO-5 (δ_H 12,81). O NOE observado no H-2 com irradiação em H₃CO-3 justifica a configuração relativa *trans* H₃CO-2/ H₃CO-3, ou seja, *rel-2R, 3S*. Nenhum sinal foi observado no espectro obtido pela irradiação em δ_H 3,97 (H₃CO-7 de **2D**); por outro lado o dubleto em δ_H 6,96 (H-3',5') foi observado no espectro obtido pela irradiação em δ_H 3,86 (H₃CO-4' de **2C**).

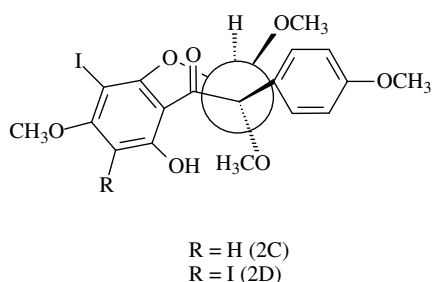


Figura 25. Projeção de Newman mostrando a configuração relativa para as substâncias 2C e 2D.

Os espectros de RMN¹³C-BBD e DEPT 135° (Figuras 32, 33 e 34; p. 64, 65 e 66) juntamente com o espectro de HMQC (Figura 35; p. 67) permitiram distinguir a mistura pelo aparecimento de 34 sinais carbono. A localização das funções oxigenadas nos carbonos quaternários aromáticos é visível pelos valores dos deslocamentos químicos em torno de δ_C 156,0-166,0. Os produtos possuem o mesmo padrão de oxigenação no anel B, com sinais em δ_{CH} 113,50 (C-3',5') e δ_{CH} 130,19 (C-2',6') [2C] e δ_{CH} 113,63 (C-3',5') e δ_{CH} 130,22 (C-2',6') [2D]. A comparação entre os valores dos deslocamentos químicos dos espectros de RMN de ¹³C aliado ao mapa de contornos do HMBC (Figuras 36, 37 e 38; p. 68, 69 e 70) permitiu atribuir inequivocamente esses dados e observar mudanças significativas nos deslocamentos químicos entre carbonos quaternários aromáticos oxigenados: δ_C 159,84 [2C]/159,67 [2D] (C- 4'), δ_C 166,03 [2C]/163,61 [2D] (C-5) e δ_C 165,76 [2C]/167,02 [2D] (C-7); quaternários oxigenados saturados: δ_C 80,47 [2C]/80,16 [2D] (C-3) e quaternários ligados ao iodo: δ_C 64,85 [2C]/70,61 [2D] (C-8) e δ_C 73,39 [2D] (C-6). Estas modificações tornam-se compreendidas quando se observa os efeitos do átomo de iodo nos carbonos *ipso*, *orto*, *meta* e *para* através da comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos do benzeno e do iodobenzeno (Figura 26; p. 56). Essas modificações podem ser analisadas, considerando-se a incorporação do iodo em C-8, observando-se o efeito de proteção de $\Delta\delta_C \approx -33,2$ ppm no carbono *ipso* devido ao aumento de densidade eletrônica sobre esse carbono. Os mesmos efeitos são também verificados na substância 2D, que contém o átomo de iodo localizado em C-6 e C-8 (Tabela 7; p. 59).

As posições corretas ocupadas pelos átomos de iodo nos componentes da mistura dos derivados iodados 2C e 2D foram confirmadas pelo mapa de contornos do HMBC (Figuras 36, 37 e 38; p. 68, 69 e 70). Em 2C o H-6 (δ_H 6,23) apresenta correlações (³J_{CH}) com C-8 (δ_C 64,85) e (²J_{CH}) C-5 (δ_C 166,03) respectivamente. Do mesmo modo, em 2D observou-se as correlações (³J_{CH}) entre HO-5 (δ_H 12,81) e carbono que sustenta o iodo C-6 (δ_C 73,39).

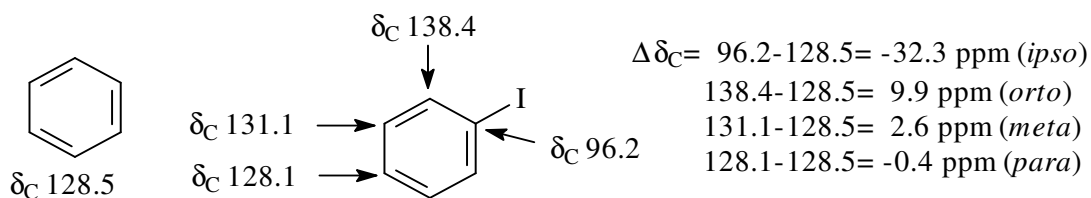


Figura 26. Efeito nos deslocamentos químicos nos ¹³C do anel benzeno quando um hidrogênio é substituído por um átomo de iodo.

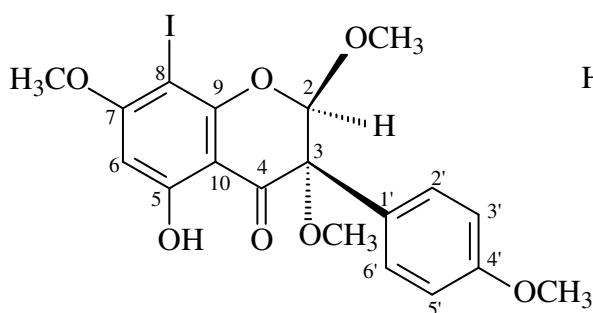
A presença do sinal do carbono C-2 em torno δ_{CH} 106,31 [2C] e δ_{CH} 106,36 [2D] permitiu deduzir a incorporação de grupo oxigenado também nessa posição gerando CH de acetal. Pelo do mapa de contornos do HMQC (Figura 35; p. 67) foi possível estabelecer as correlação diretas dos carbonos metínicos C-2 de 2C e 2D com os respectivos hidrogênios: δ_C/δ_H 106,31/5,18 [2C] e δ_C/δ_H 106,36/5,21 [2D] e C-6 de 2C: δ_C/δ_H 93,96/6,23.

A posição correta das metoxilas foi definida pelas interações heteronucleares a longa distância ($^3J_{CH}$) entre H₃CO-2 (δ_H 3,36) e C-2 (δ_{CH} 106,31); H₃CO-3 (δ_H 3,21) e C-3 (δ_C 80,47) valor típico de metoxila ligada a carbono sp³; H₃CO-4' (δ_H 3,86) e C-4' (δ_C 159,84); H₃CO-7 (δ_H 3,96) e C-7 (δ_C 165,76) para a substância 2C, e, H₃CO-2 (δ_H 3,36) e C-2 (δ_{CH} 106,36); H₃CO-3 (δ_H 3,19) e C-3 (δ_C 80,16); H₃CO-4' (δ_H 3,86) e C-4' (δ_C 159,67); H₃CO-7 (δ_H 3,97) e C-7 (δ_C 167,02) para a substância 2D.

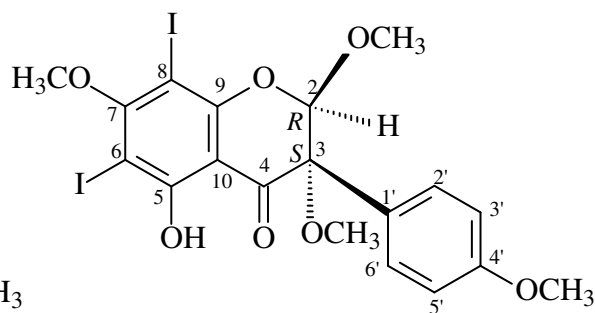
Evidência dos produtos 2C+2D foi à presença de dois picos [T_R 19,0 min (58.14%) e T_R 25, 3 (41.86%)] cujos respectivos espectros de massas (Figuras 40 e 41; p. 71 e 73) apresentam os seus M⁺ e os demais fragmentos informados nos Esquemas 13 (p. 72) e 14 (p. 74).

As citações sobre propriedades físico-químicas e biológicas de flavonóides têm sido freqüentes na literatura. São sempre utilizadas como exemplo na aplicação das novas metodologias de investigações científicas quanto às propriedades de substâncias naturais. O uso de reações para modificação estrutural ou incorporação de grupos funcionais em estruturas de produtos naturais é um meio de avaliar a possibilidade de melhorar as atividades desses constituintes, além de fornecer informações para elucidação estrutural, conduzir à obtenção de novas substâncias e, inclusive, permitir a avaliação de novos dados espectrométricos. A incorporação de iodo em flavonóides tem sido usada para a obtenção de precursores sintéticos de biflavonóides via reação radicalar (ALI & ILYAS, 1986).

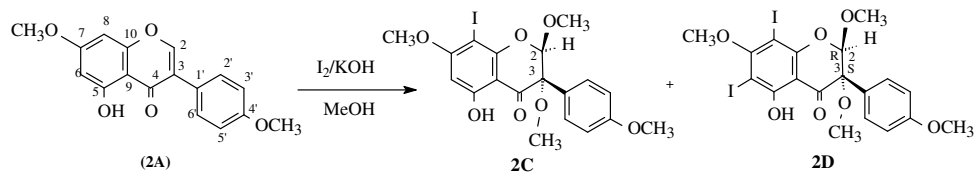
Os produtos dessa reação com isoflavonas são diferentes dos de flavonas (SILVA, 2002), porque ocorre a adição de metoxilas na enona. Esta é a primeira vez que se descreve a incorporação de átomos de iodo em isoflavonas. Todos os dados espectrométricos discutidos acima, permitiram confirmar a estrutura proposta dos derivados inéditos *rel*-2*R*,3*S*-5-2,3,7,4'-tetrametoxi-8-iodoisoflavona (2C) e *rel*-2*R*,3*S*-5-2,3,7,4'-tetrametoxi-6,8-diiodoisoflavona (2D) obtidos a partir da reação realizada com um derivado da isoflavona natural conhecida como biochanina A, isolada de várias espécies de *Andira*.



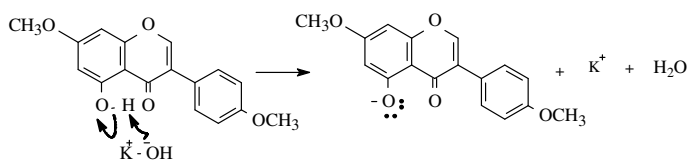
rel-2*R*,3*S*-5-hidroxi-2,3,7,4'-tetrametoxi-8-iodoisoflavona (2C)



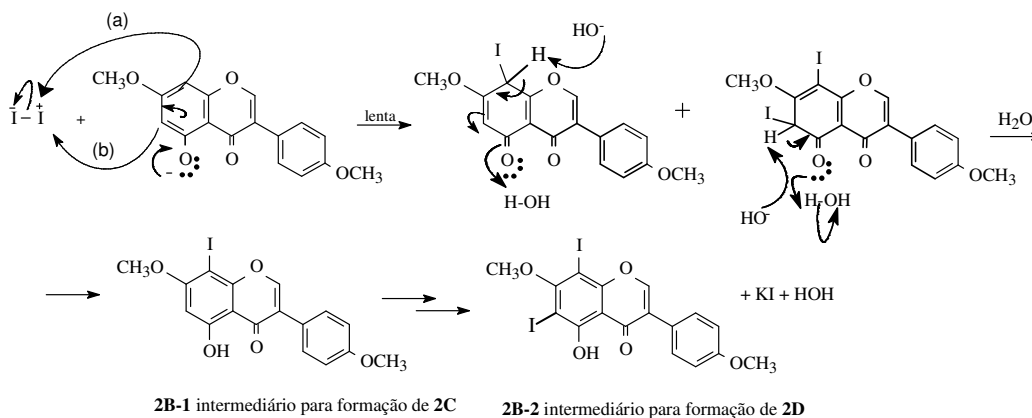
rel-2*R*,3*S*-5-hidroxi-2,3,7,4'-tetrametoxi-6,8-diiodoisoflavona (2D)



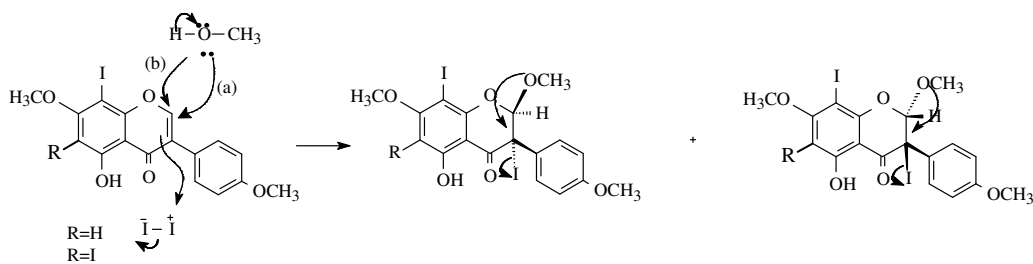
ETAPA 1 - Formação do substituinte fenoxi - Forte orientador *orto-para*



ETAPA 2 - Substituição aromática eletrofílica (Halogenação)

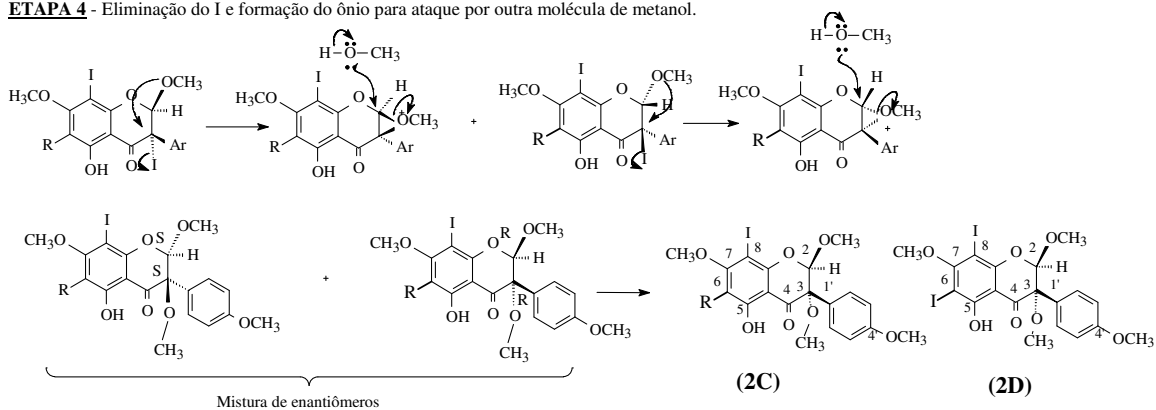


ETAPA 3 - Adição de OCH_3 e I na dupla da enona.



Esquema 12. Mecanismo proposto para a formação de 2C e 2D.

ETAPA 4 - Eliminação do I e formação do ônio para ataque por outra molécula de metanol.



2C: *Rel-2R,3R-5-hidroxi-2,3,4',7-tetrametoxi-8-iodoiso*flavona

2D: *Rel-2R,3R-5-hidroxi-2,3,4',7-tetrametoxi-6,8-diiodoiso*flavona

Continuação do Esquema 12. Mecanismo proposto para formação de 2C e 2D.

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (125 MHz) dos derivados 2C e 2D

C	2C			2D		
	HMQC (1J)		HMBC ($^{2,3}J$)	HMQC (1J)		HMBC ($^{2,3}J$)
	δ_{C}	δ_{H}		δ_{C}	δ_{H}	
2	106,31	5,18 (s)	<u>H</u> ₃ CO-2	106,36	5,21 (s)	<u>H</u> ₃ CO-2
3	80,47	-	<u>H</u> ₃ CO-3	80,16	-	<u>H</u> ₃ CO-3
4	192,92	-	H-2	193,61	-	H-2
5	166,03	-	5-O <u>H</u> , H-6	163,61	-	5-O <u>H</u>
6	93,96	6,23 (s)	5-O <u>H</u>	73,39	-	5-O <u>H</u>
7	165,76	-	H-6	167,02	-	<u>H</u> ₃ CO-7
8	64,85	-	H-6	70,61	-	5-O <u>H</u>
9	157,47	-	H-2	156,86	-	H-2
10	102,89	-	5-O <u>H</u> , H-6	104,74	-	5-O <u>H</u>
1'	123,73	-	H-3', H-5'	124,50	-	H-3', H-5'
2',6'*	130,19	7,40 (d; 8,9)	-	130,22	7,42 (d; 8,9)	-
3',5'*	113,50	6,96 (d; 8,9)	-	113,63	6,98 (d; 8,9)	-
4'	159,84	-	H-2', H-6', <u>H</u> ₃ CO-4'	159,67	-	H-2', H-6', <u>H</u> ₃ CO-4'
H ₃ CO-2	57,43	3,36 (s)	-	57,25	3,36 (s)	-
H ₃ CO-3	52,98	3,21 (s)	-	52,91	3,19 (s)	-
H ₃ CO-4'	55,28	3,86 (s)	-	55,26	3,86 (s)	-
H ₃ CO-7	56,89	3,96 (s)	-	60,92	3,97 (s)	-
OH	-	12,18 (s)	-	-	12,81 (s)	-

* os valores dos deslocamentos químicos podem estar trocados.

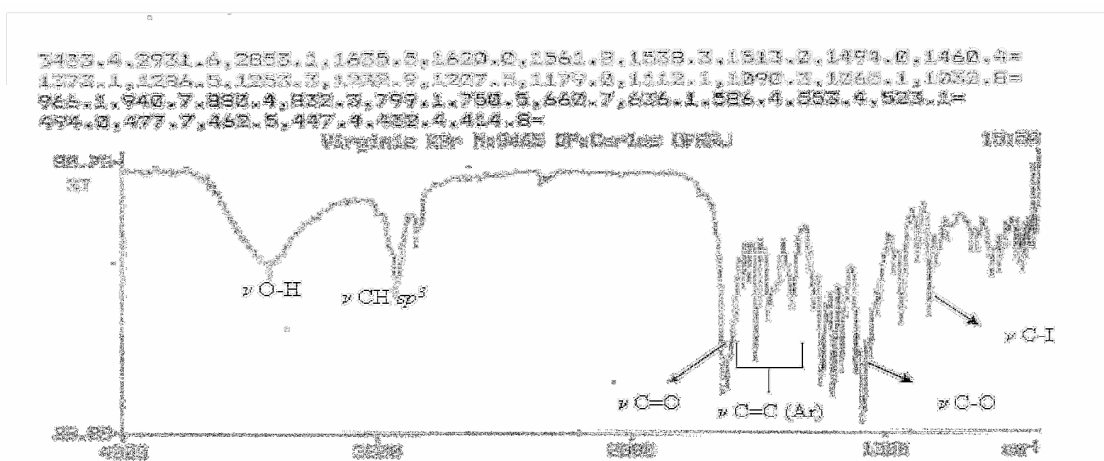
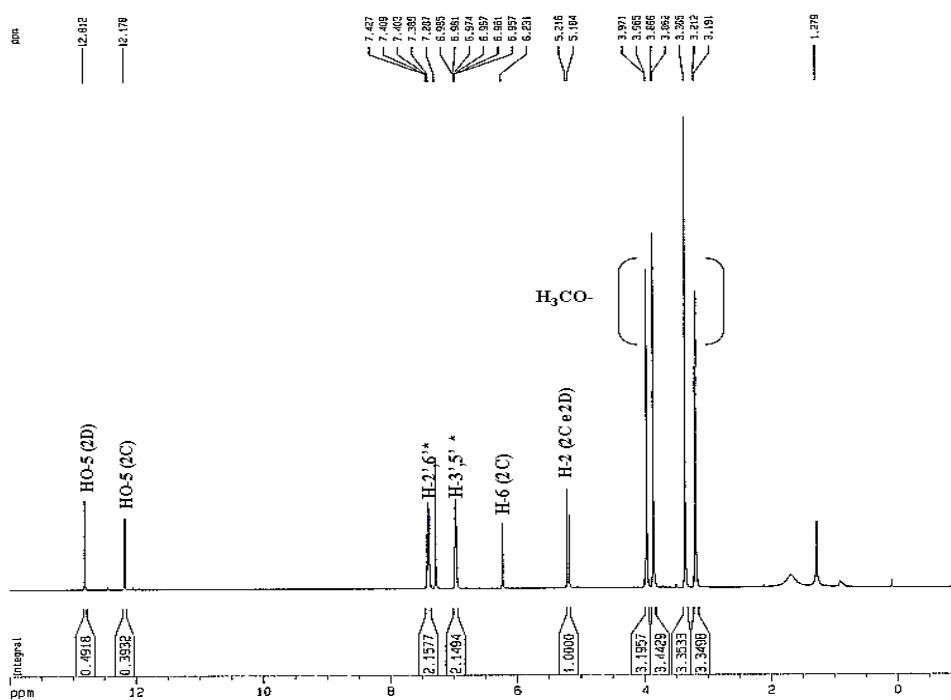


Figura 27. Espectro de I.V. (KBr) de 2C+2D.



* os valores dos deslocamentos químicos podem estar trocados

Figura 28. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) de 2C+2D.

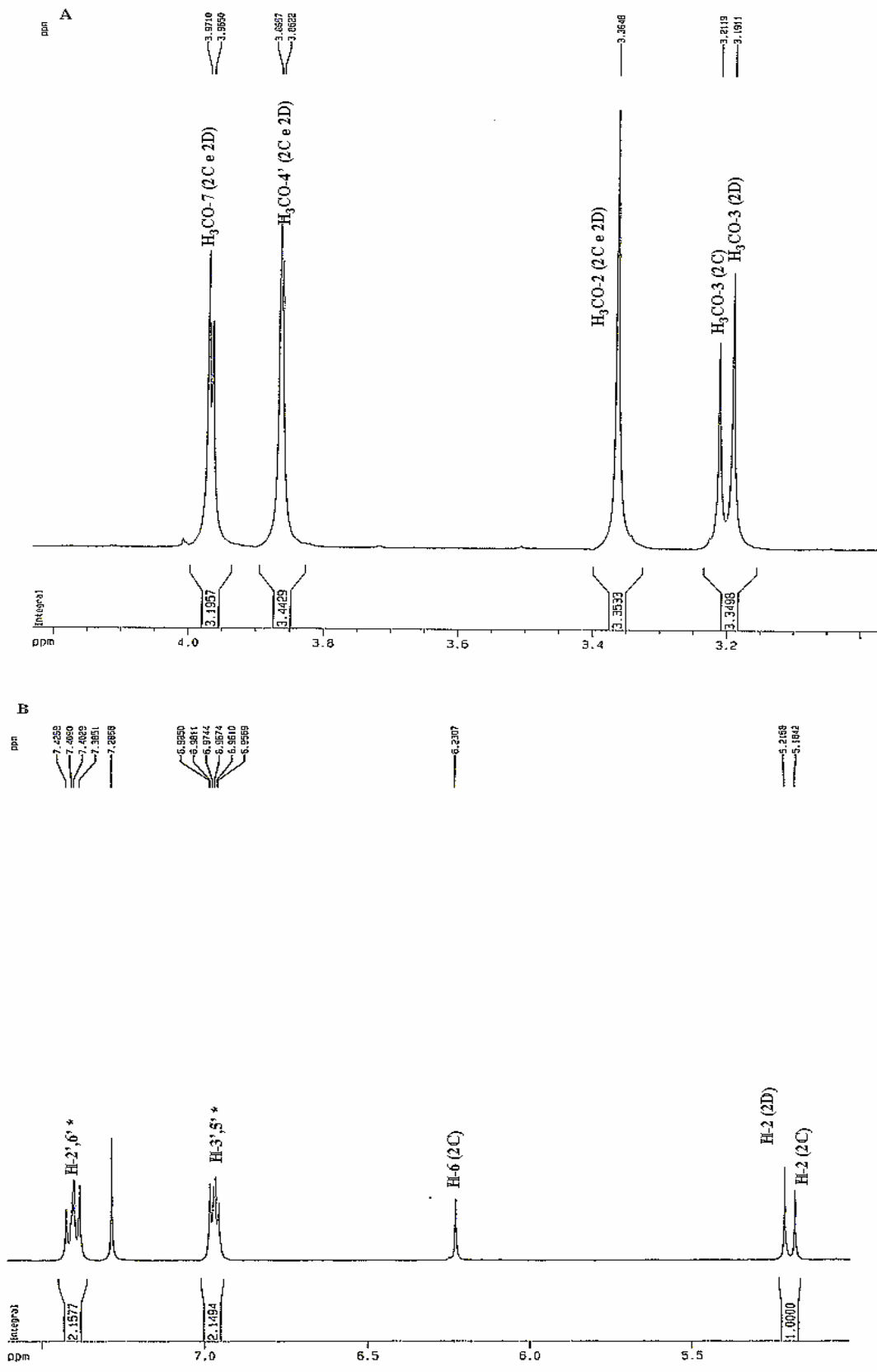


Figura 29. Expansões no espectro de RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$) de 2C+2D nas regiões entre: [A] δ_H 3,0-4,4 ppm e [B] δ_H 5,0-7,5 ppm.

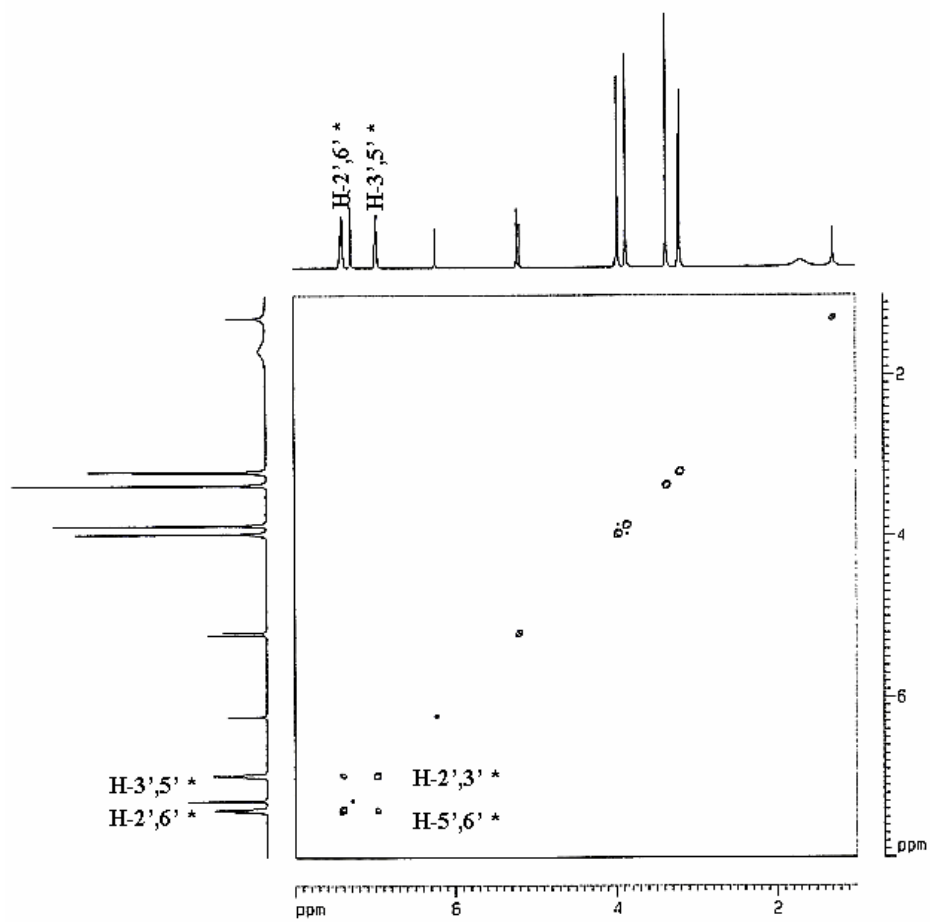


Figura 30. Mapa de contornos $^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY (500MHz, CDCl_3) de 2C+2D.

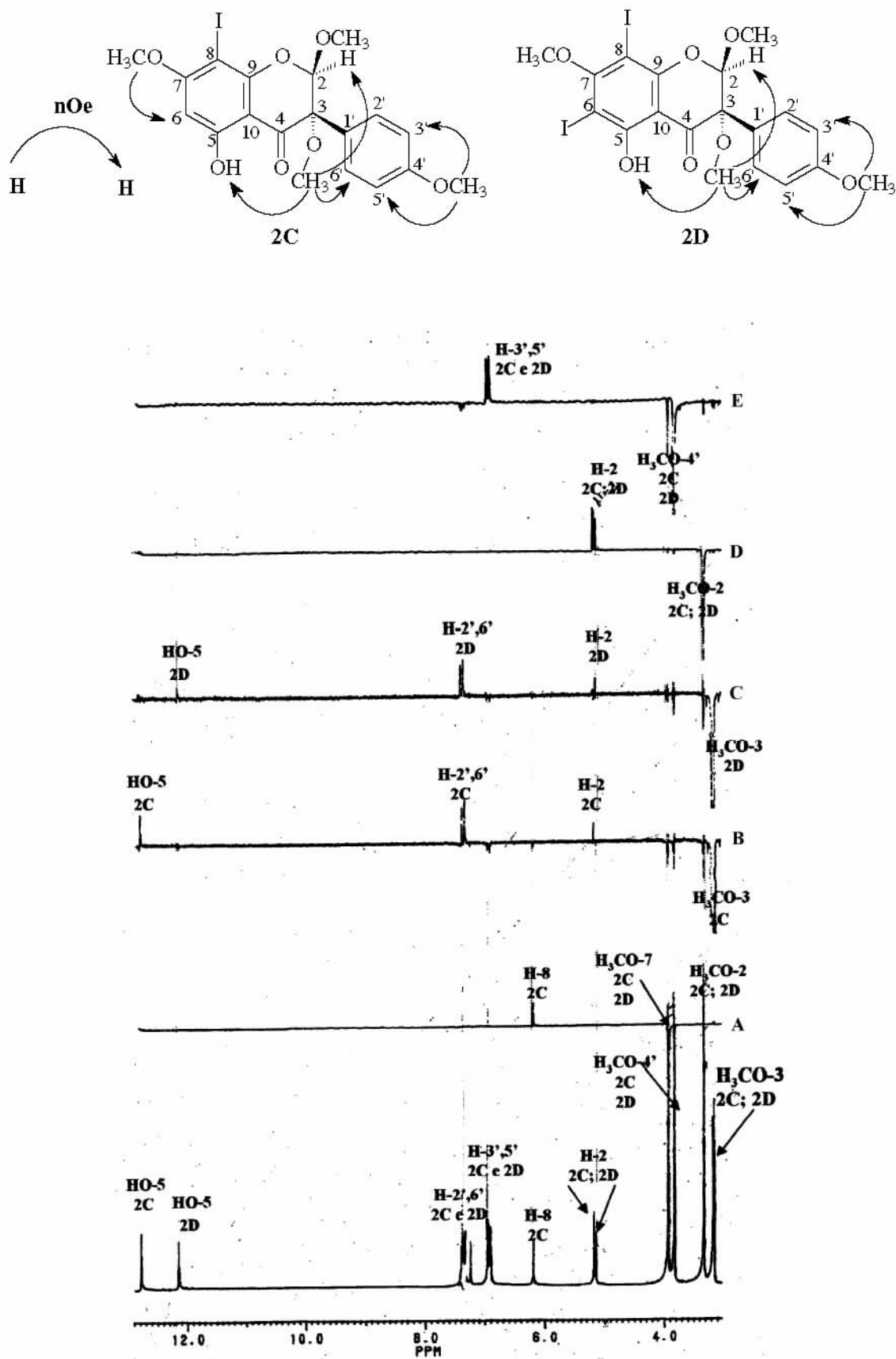


Figura 31. Experimentos de NOEDIFF (200 MHz, CDCl₃) para 2C+2D.

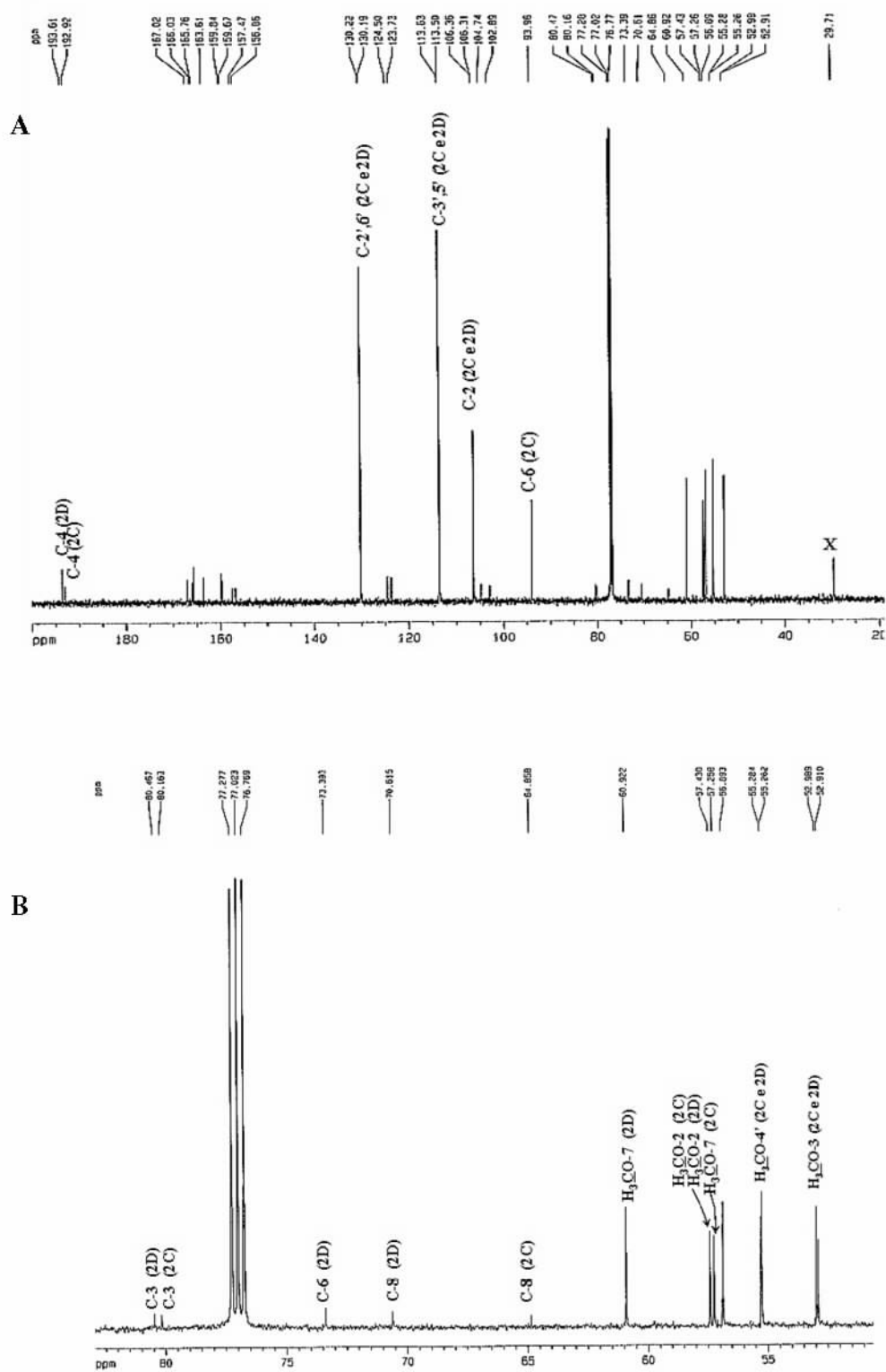


Figura 32. [A] Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, BBD, CDCl_3) de 2C+2D; [B] Expansão na região entre δ_{C} 52,0-81,0 ppm.

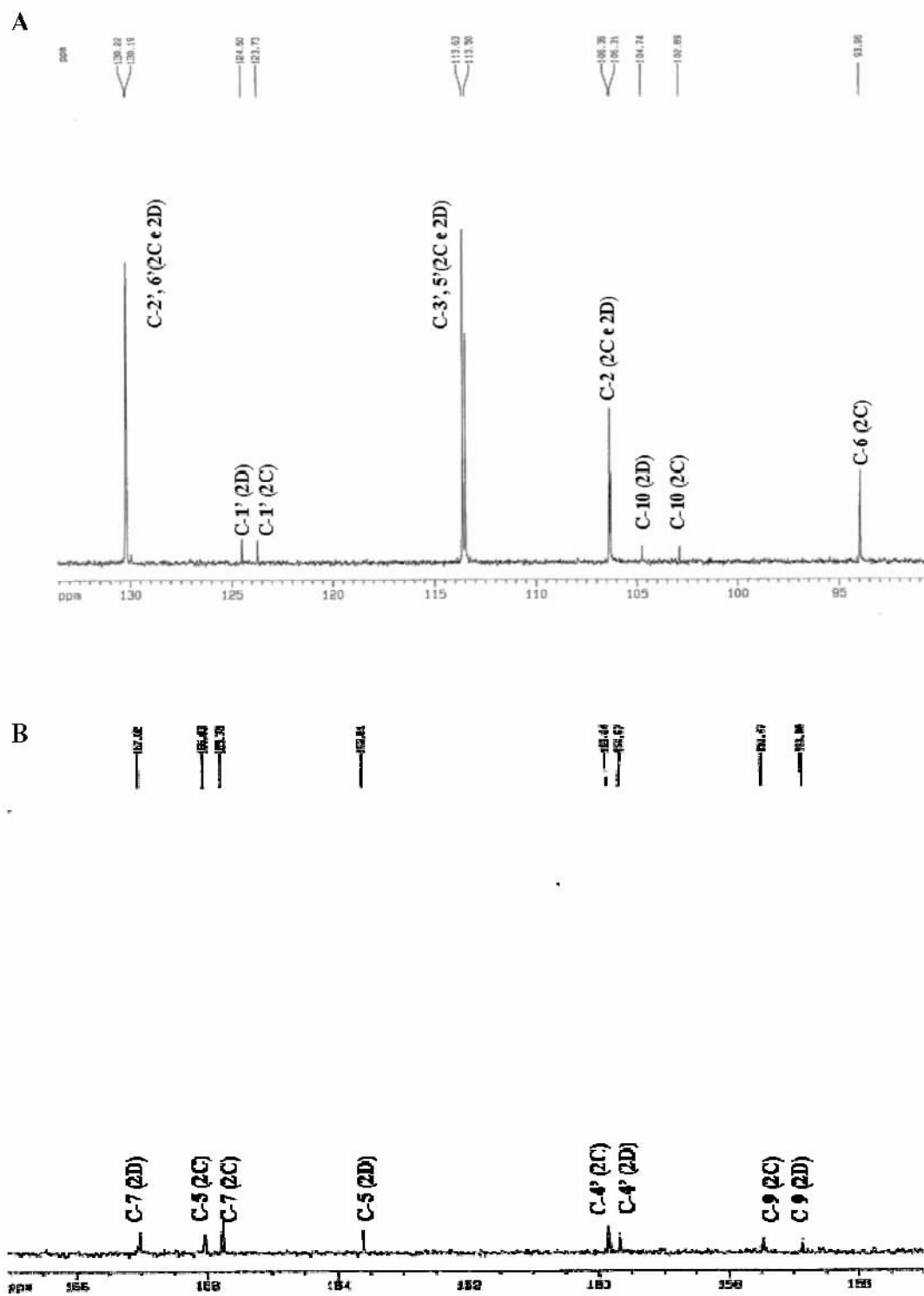


Figura 33. Expansões do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, BBD, CDCl_3) de 2C+2D nas regiões entre: [A] 93,0-131,0 ppm e [B] δ_{C} 155,0-168,0 ppm.

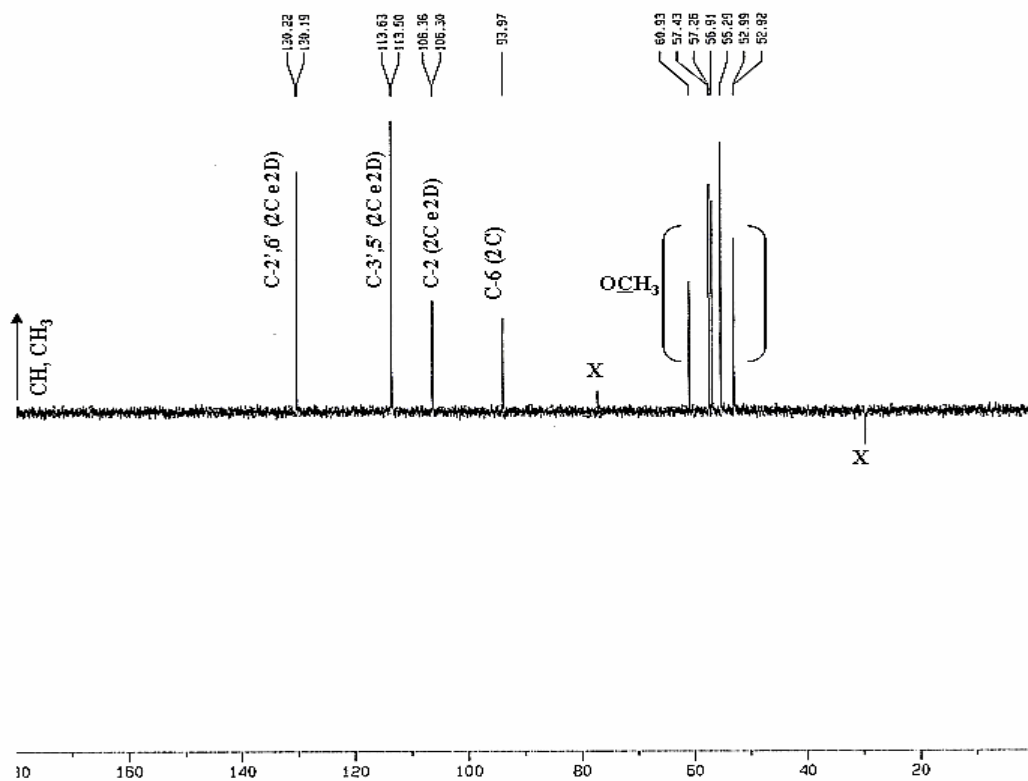


Figura 34. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPT 135°, CDCl_3) de 2C+2D.

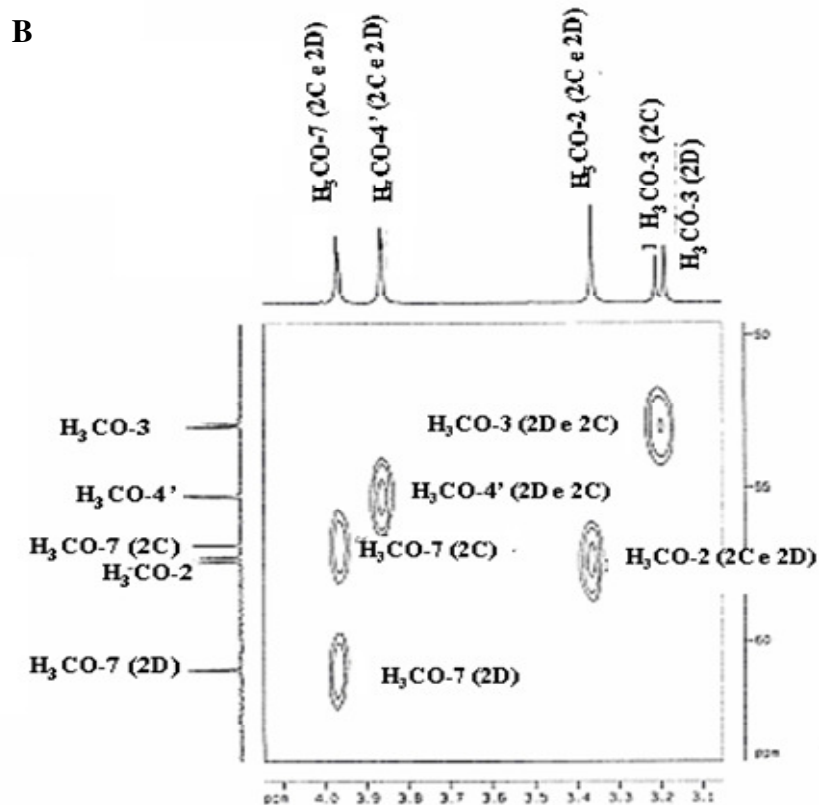
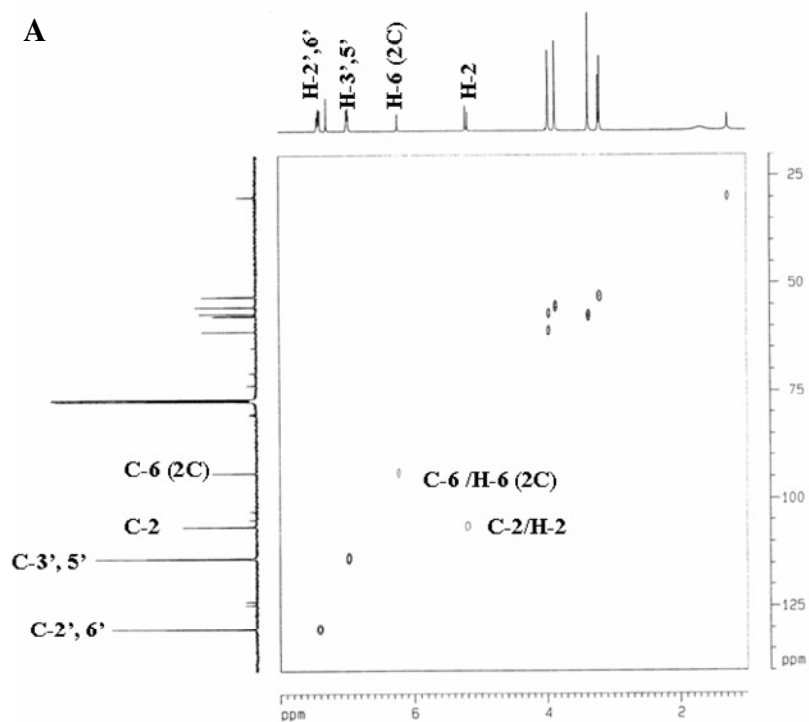


Figura 35. [A] Mapa de contornos HMQC (125 MHz, CDCl₃) de 2C+2D e [B] Expansão na região entre δ_C 50,0-65,0 ppm e δ_H 3,10-4,0 ppm .

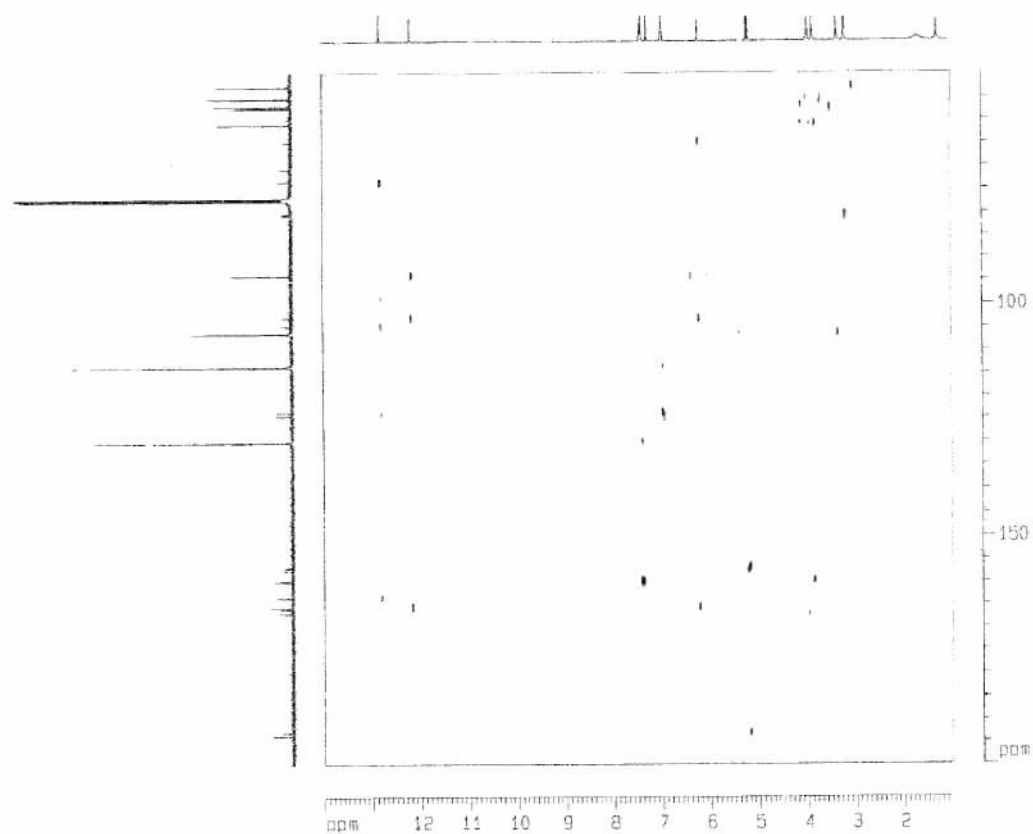
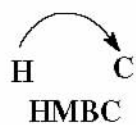
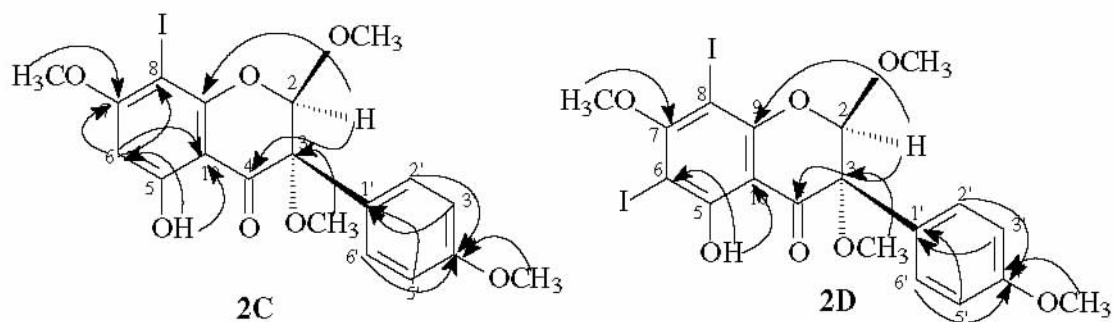


Figura 36. Mapa de contornos HMBC (125 MHz, CDCl_3) e correlações observadas para 2C+2D.

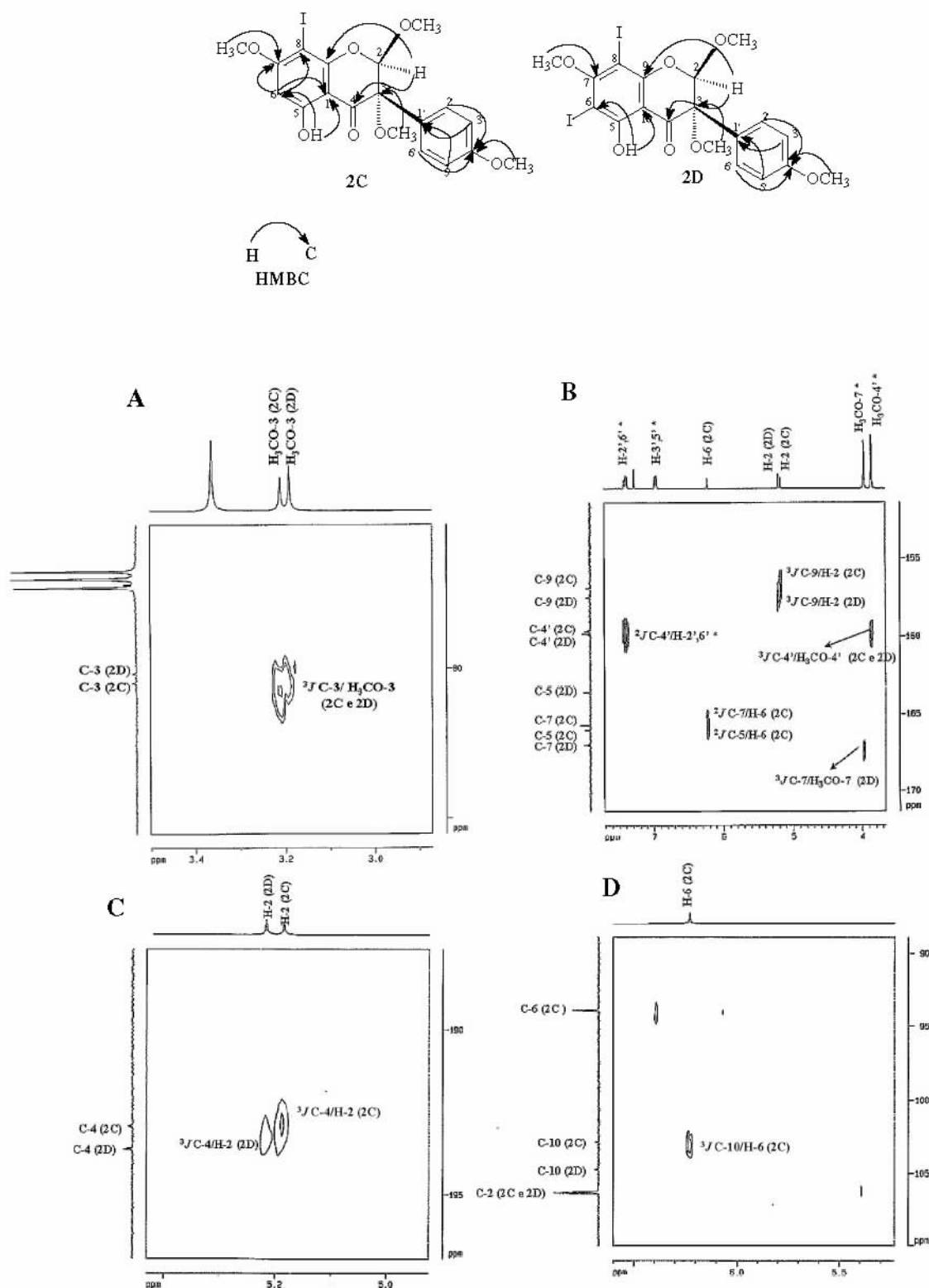


Figura 37. Expansões do mapa de contornos HMBC (125 MHz, CDCl_3) de 2C+2D nas regiões entre: [A] δ_{C} 75,0-85,0 ppm e δ_{H} 2,9-3,5 ppm, [B] δ_{C} 150,0-170,0 ppm e δ_{H} 3,70-7,70 ppm, [C] δ_{C} 190,0-195,0 ppm e δ_{H} 5,0-5,4 ppm, [D] δ_{C} 150,0-170,0 ppm e δ_{H} 3,70-7,70 ppm.

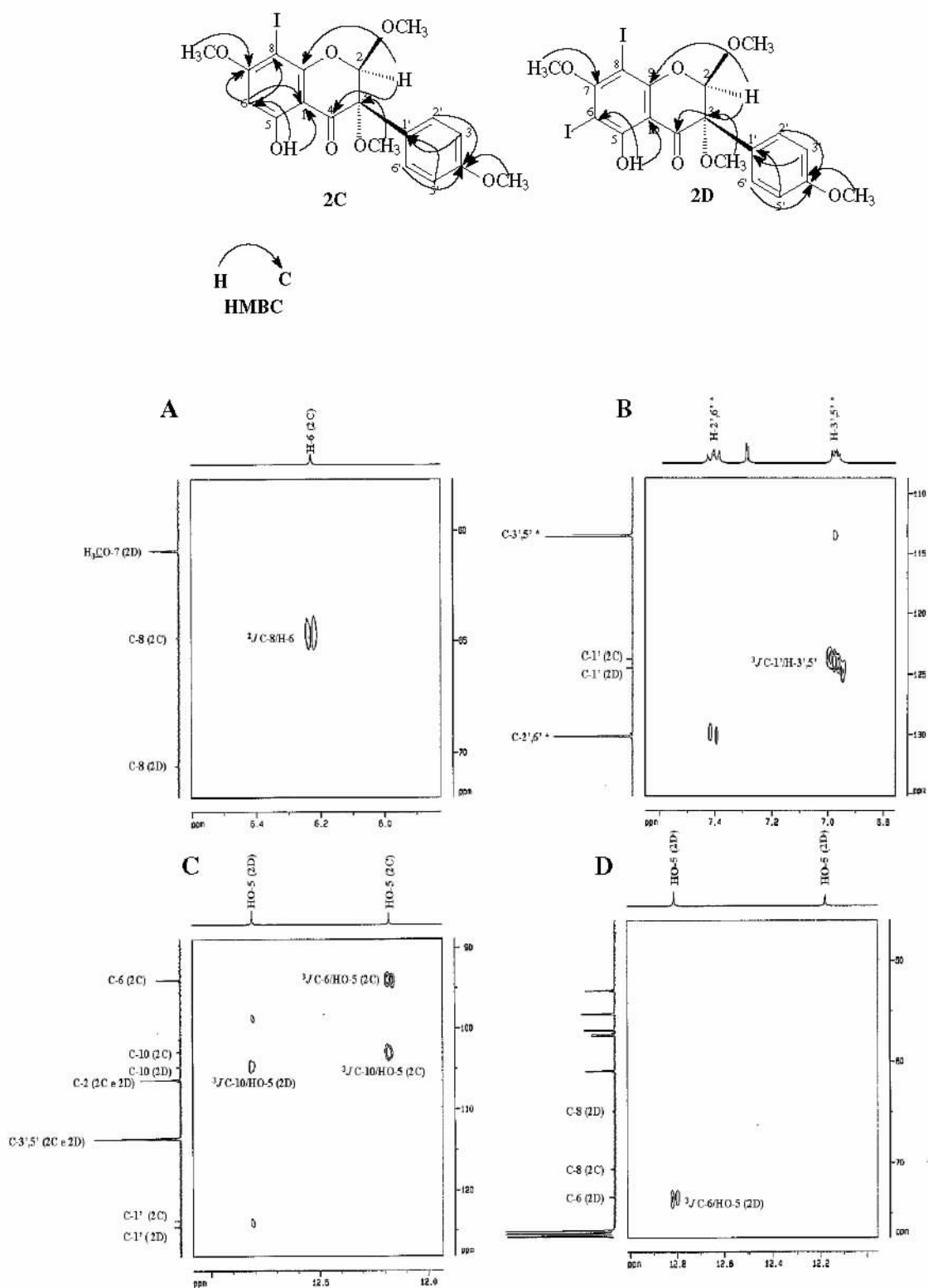


Figura 38. Expansões do mapa de contornos HMBC (125 MHz, CDCl₃) de 2C+2D nas regiões entre: [A] δ_C 60,0-70,0 ppm e δ_H 5,9-6,5 ppm, [B] δ_C 110,0-130,0 ppm e δ_H 6,80-7,50 ppm, [C] δ_C 90,0-130,0 ppm e δ_H 12,0-12,90 ppm, [D] δ_C 50,0-75,0 ppm e δ_H 12,1-12,9 ppm.

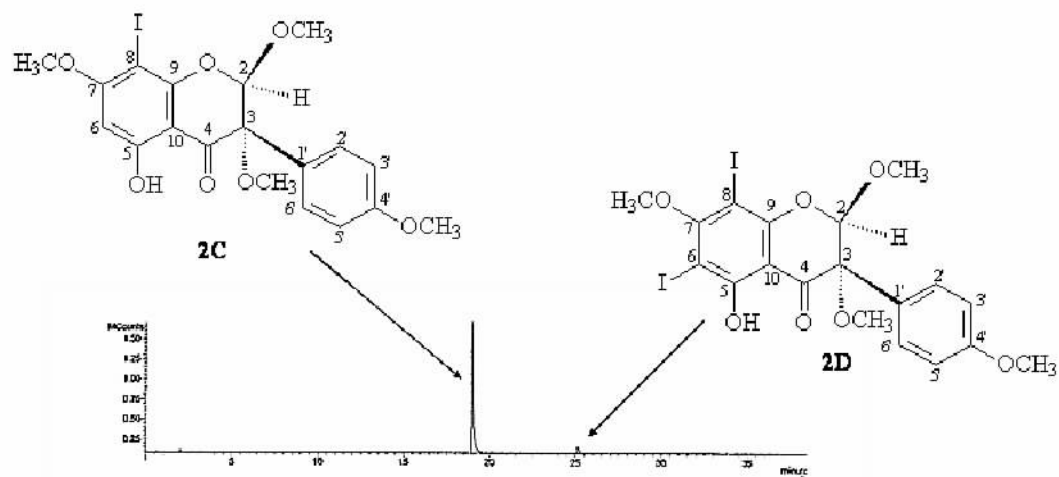


Figura 39. Cromatograma a gás (CG) dos produtos 2C+2D.

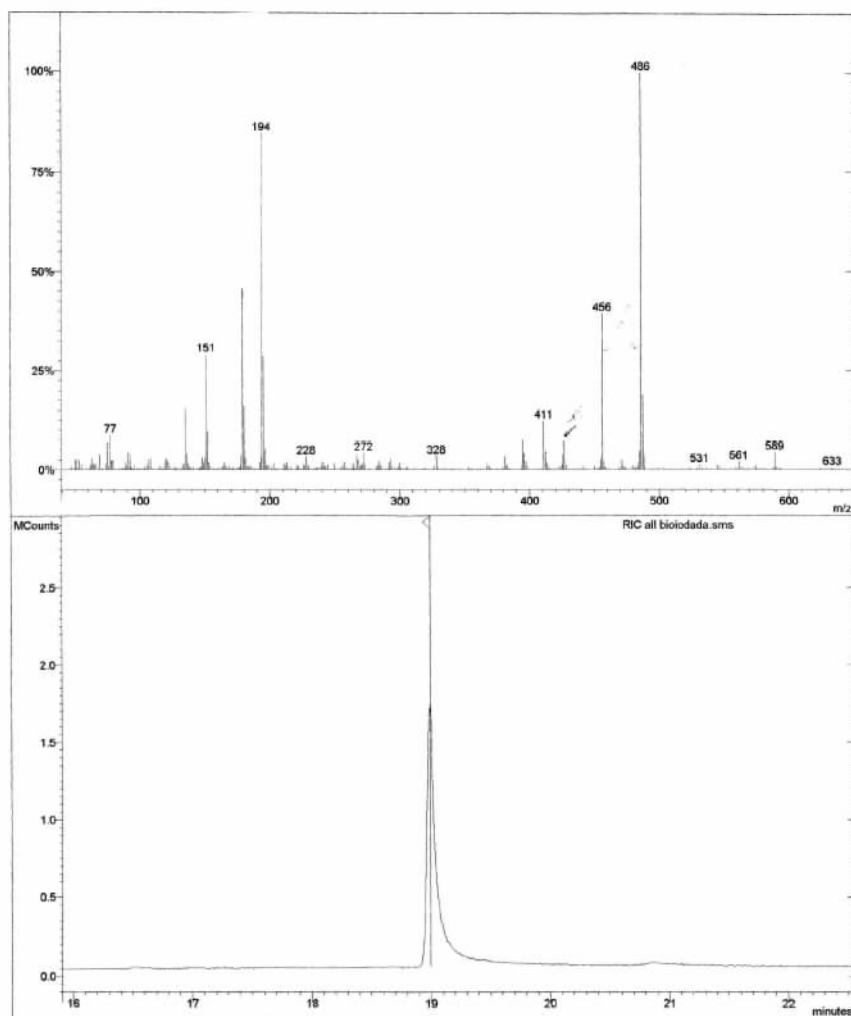
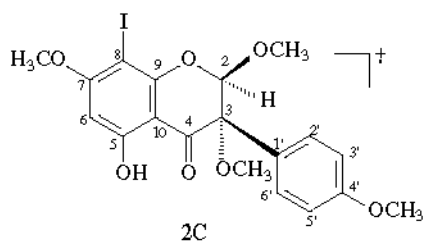
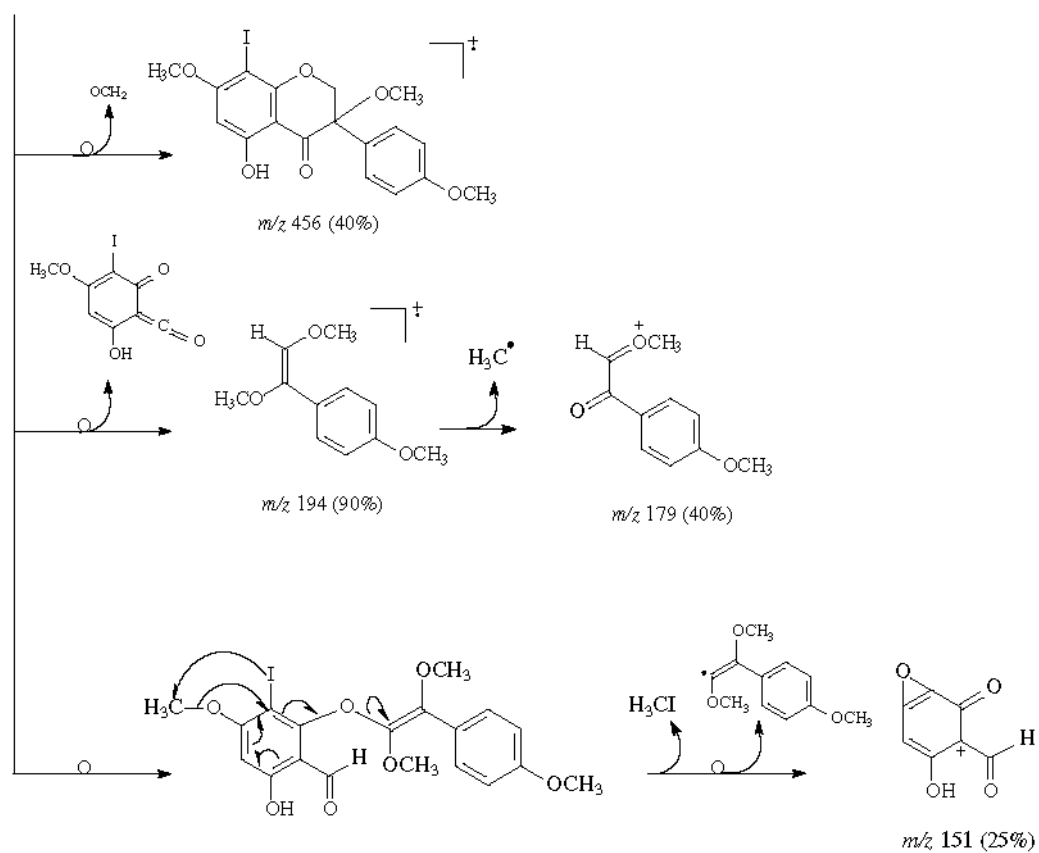


Figura 40. Espectro de massas por I.E. (70 eV) e CG de 2C.



$t_R = 19 \text{ min.}$
 $C_{19}H_{19}I_2O_7$
 $M^+ 486 (100)$



Esquema 13. Proposta de fragmentação para a substância 2C.

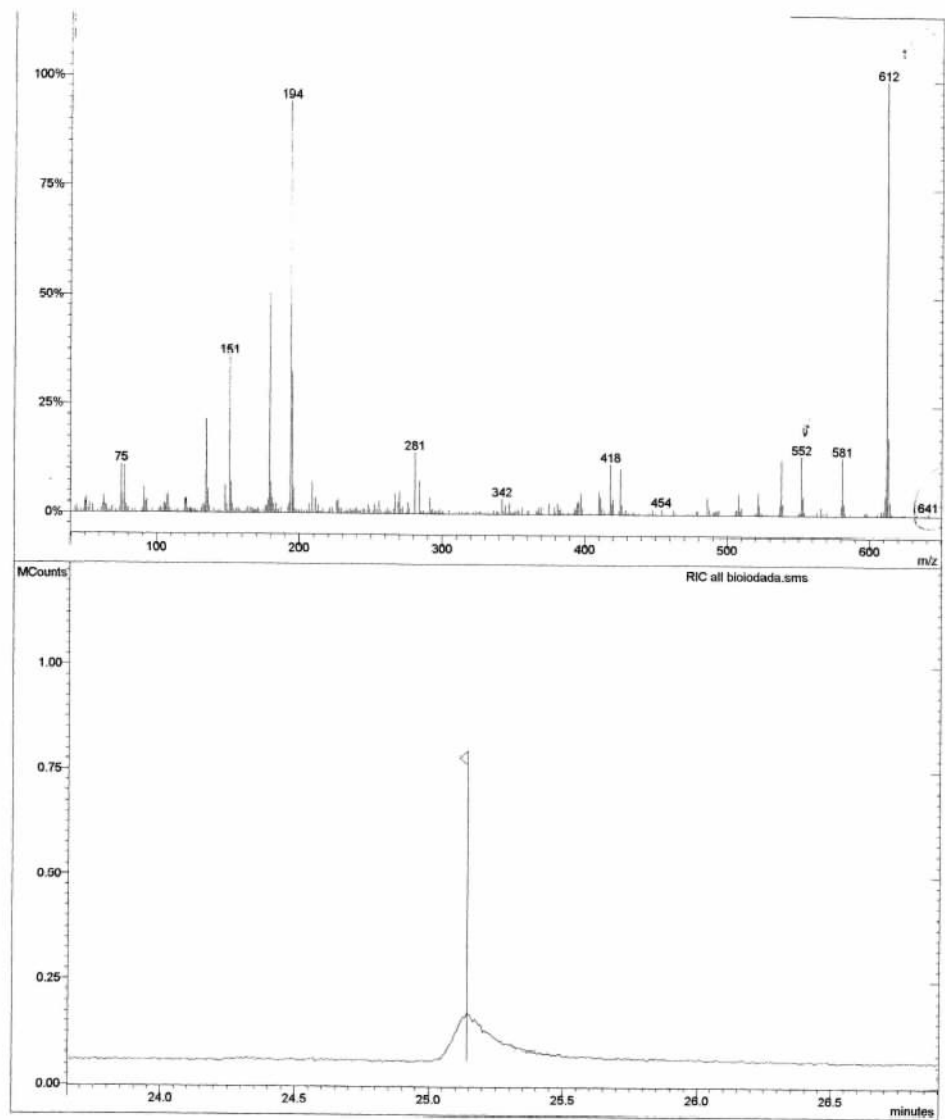
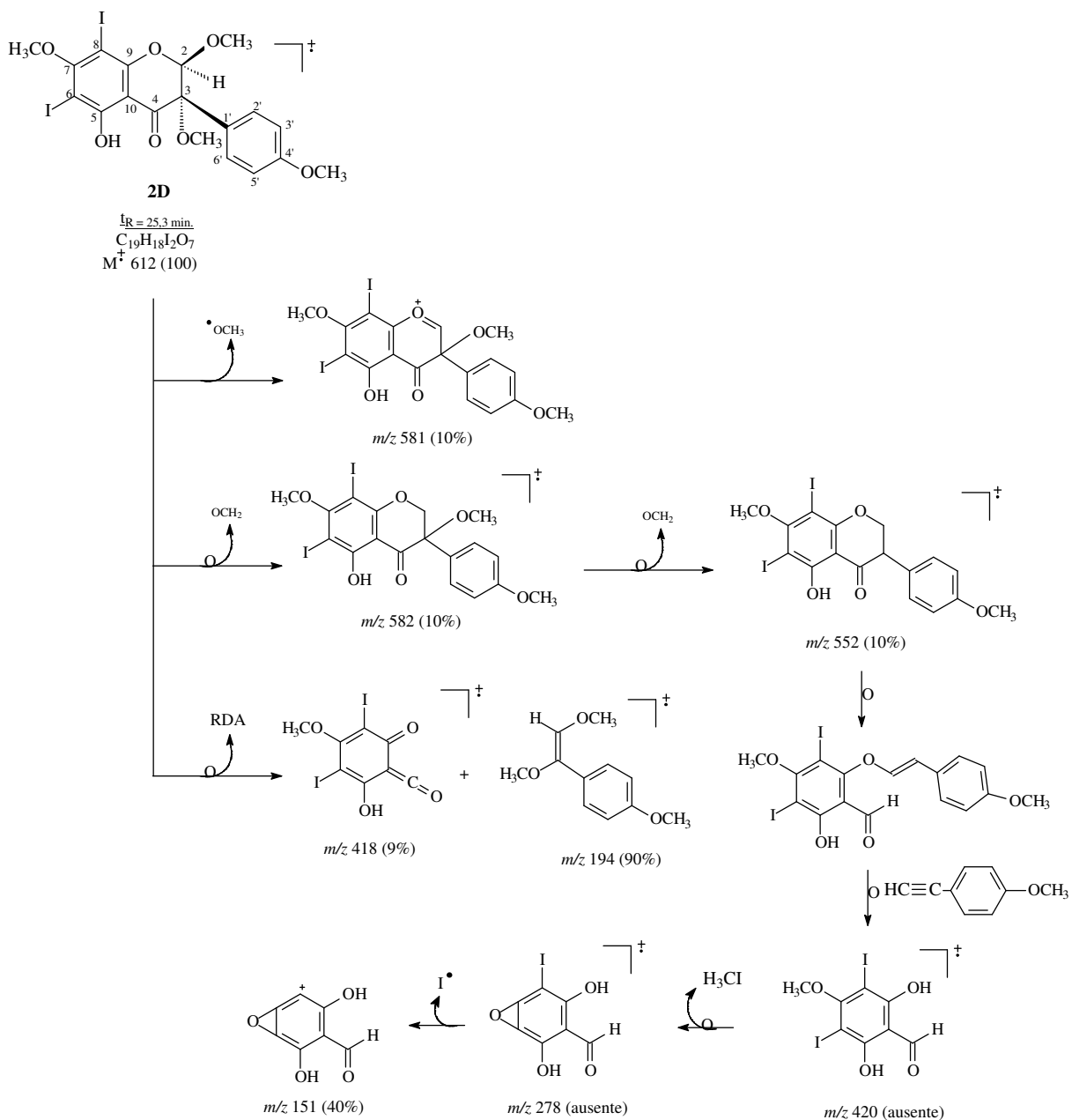


Figura 41. Espectro de massas por I.E. (70 eV) e CG de 2D.



Esquema 14. Proposta de fragmentação para a substância 2D.

4.1.1.1.4 Identificação da substância 3

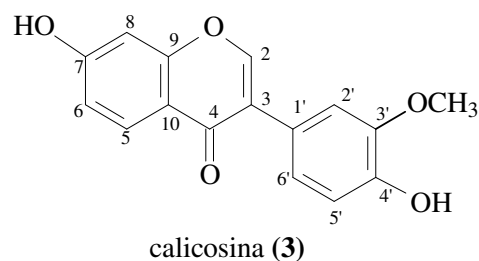
O espectro de RMN de ^1H de **3** (Figura 42; p. 76) exibiu singlete em δ_{H} 8,22 característico do H-2 do anel C de isoflavonas. O anel A esta representado pelos sinais em δ_{H} 6,84 (*dd*, $J=2,2$ e 8,60, H-6), δ_{H} 6,74 (2,2 Hz, H-8) e δ_{H} 7,89 (*d*, $J=8,6$, Hz, H-5), que acoplam entre si formando um sistema ABC.

O mapa de contornos do [$^1\text{Hx}^1\text{H}$]-COSY (Figura 43; p. 76) assinalou o acoplamento entre os hidrogênios aromáticos. O acoplamento entre os hidrogênios em δ_{H} 6,84 (*dd*, $J=2,2$ e 8,60, H-6) e δ_{H} 7,89 (*d*, $J=8,6$, Hz, H-5) confirmou a ausência da hidroxila quelada 5-OH. Os sinais que apareceram como dois dubletos largos em δ_{H} 6,93 (2H) e δ_{H} 7,03 (1H) foram atribuídos aos hidrogênios H-2',5' e H-6', respectivamente e permitiram propor substituições nas posições 3' e 4'. A função oxigenada foi reconhecida como sendo uma metoxila pelo valor em δ_{H} 3,77 com integração para três hidrogênios, e seu posicionamento foi definido através da análise dos sinais de NOE no espectro obtido com o experimento de NOEDIFF (Figura 44; p. 77). O espectro resultante deste experimento com a substância **3**, através de irradiação na frequência da metoxila, apresenta sinal de NOE em δ_{H} 6,93 (H-2') e justificou a metoxila como o substituinte em C-3'. A substância **3** foi identificada como sendo a 3'-metoxidaidzeína ou calicosina de acordo com a análise dos espectros e comparação com os dados da literatura (HIRAKURA *et al.*, 1997) (Tabela 8; p. 75). Esta substância relatada pela primeira vez na espécie *A. anthelmia*, foi também identificada nas folhas de *A. inermis* (LOCK de UGAZ *et al.*, 1991).

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) da substância 3

C	(HIRAKURA <i>et al.</i> , 1997)*	3*	
	δ_{H}	δ_{H} (<i>mult.</i> ; J Hz)	[$^1\text{Hx}^1\text{H}$]-COSY
2	8,42 (<i>s</i>)	8,22 (<i>s</i>)	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	8,06 (<i>d</i> ; 8,8)	7,89 (<i>d</i> ; 10,0)	H-6
6	7,15 (<i>dd</i> ; 1,9 e 8,8)	6,84 (<i>dd</i> ; 2,2 e 8,60)	H-5
7	-	-	-
8	7,23 (<i>d</i> ; 1,9)	6,74 (<i>sl</i>)	-
9	-	-	-
10	-	-	-
1'	-	-	-
2'	7,19 (<i>d</i> ; 1,9)	6,93 (<i>sl</i>)	-
3'	-	-	-
4'	-	-	-
5'	6,83 (<i>d</i> ; 8,3)	6,93 (<i>sl</i>)	H-6'
6'	7,02 (<i>dd</i> ; 1,9 e 8,3)	7,03 (<i>sl</i>)	H-5'
3'-OCH ₃	3,80 (<i>s</i>)	3,77 (<i>s</i>)	-

*: DMSO-d₆ (500 MHz)



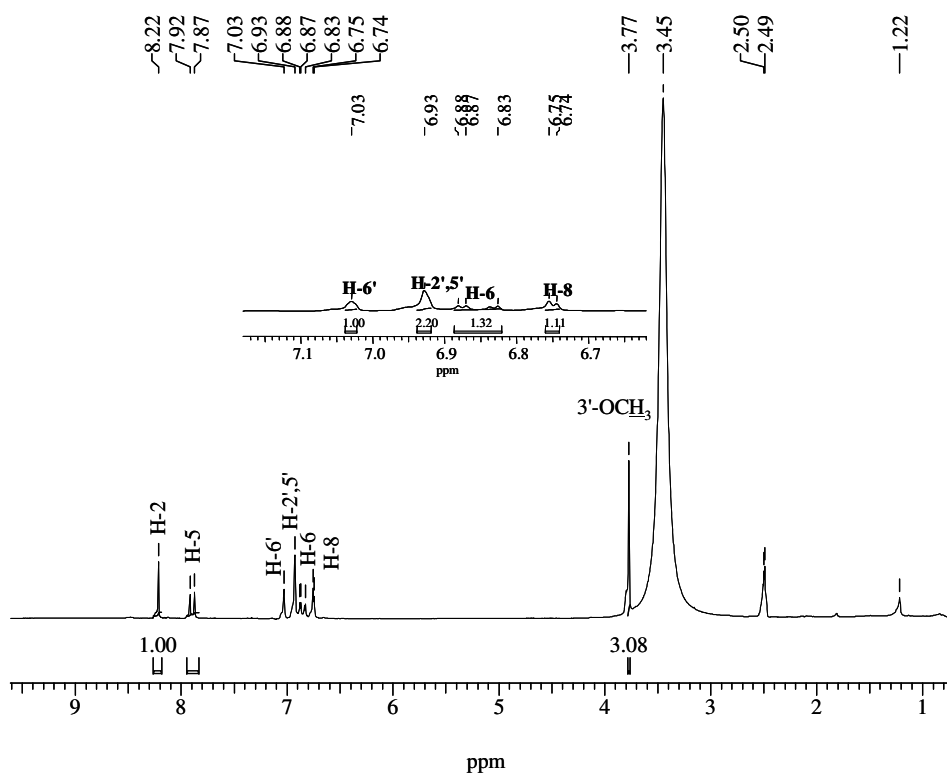


Figura 42. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d_6) de 3.

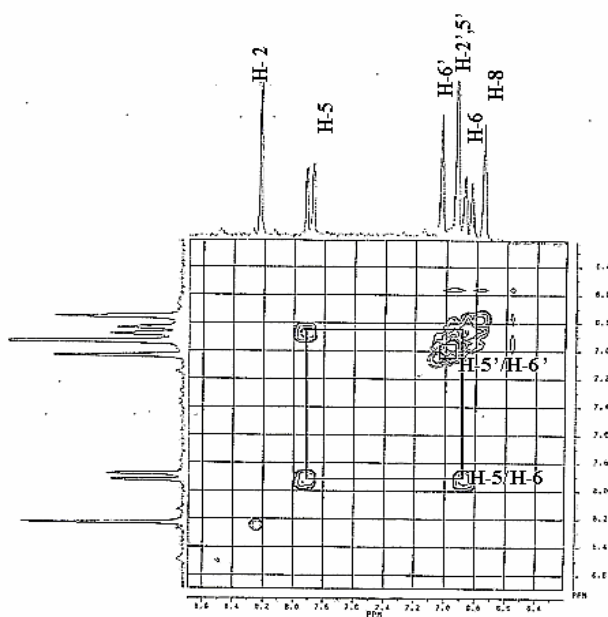


Figura 43. Expansão do mapa de contornos $^1\text{H}_x^1\text{H-COSY}$ (200MHz, DMSO-d_6) de 3 na região entre δ_{H} 6,3-8,6 ppm.

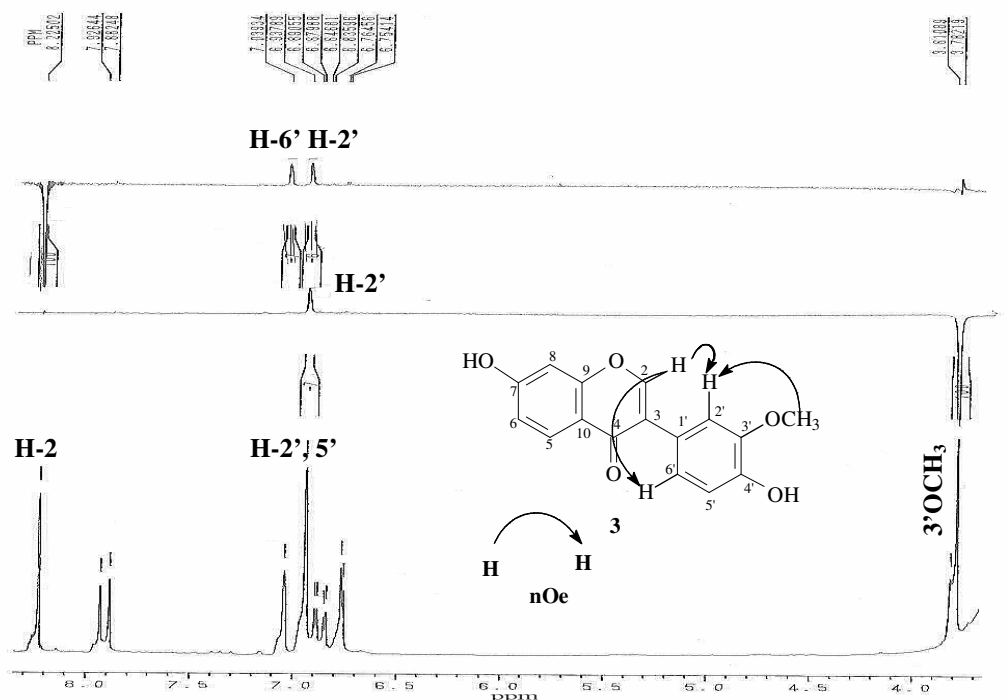


Figura 44. Experimento de NOEDIFF (200 MHz, DMSO-d₆) de **3**; [A] Irradiação na frequência da metoxila, [B] Irradiação na frequência do H-2.

4.1.1.1.5 Identificação da substância **4**

A atribuição dos valores dos deslocamentos químicos dos sinais dos hidrogênios da substância **4** foi baseada na comparação desses mesmos valores com os dados da substância **2**. A diferença mais evidente foi à ausência do sinal de singlete em $\delta_{\text{H}} 3,77$ (referente ao grupo metoxílico) e a semelhança entre os demais sinais. Os outros dados fornecidos pelo RMN de ^1H (Figura 45; p. 79) serviram para confirmar esta suposição pela presença de dois singletos largos em $\delta_{\text{H}} 6,59$ (H-6) e $\delta_{\text{H}} 6,69$ (H-8); um singlete em $\delta_{\text{H}} 8,52$ atribuído ao H-2 e sinais do sistema AA'BB' indicados pelos dubletos em $\delta_{\text{H}} 7,29$ (H-3',5') e $\delta_{\text{H}} 7,84$ (H-2',6') com $J=8,0$ Hz.

O espectro de RMN de ^{13}C -BBD (Figura 46; p. 79) confirmou a presença de um grupo hidroxílico substituindo em C-4', concordando com as informações fornecidas pelo espectro de hidrogênio. Contudo, é interessante notar que a conversão de uma hidroxila por uma metoxila promove uma variação de $\Delta\delta \approx 2,0$ ppm maior entre os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos C-3',5' ($\delta_{\text{CH}} = 115,04$) de **4** (4'-OH) em comparação ao deslocamento químico dos mesmos carbonos C-3',5' ($\delta_{\text{CH}} = 113,0$) para **2** (4'-OCH₃). A comparação dos dados de RMN de ^{13}C da substância **4** com os dados da literatura (DEMUNER *et al.*, 2003) confirma a estrutura da isoflavona genisteína ou 4',5,7-triidroxisoflavona (Tabela 9; p. 78). Esta substância isolada anteriormente em *A. inermis* (KRAFT *et al.*, 2000) está sendo registrada pela primeira vez na espécie *A. anthelmia*.

A fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_5$ foi confirmada pelo pico em m/z 270 observado no espectro de massas (Figura 47; p. 80). A fragmentação fornecida pela reação retro Diels-Alder m/z 152 (20%) (Esquema 15; p. 80) foi compatível com a estrutura proposta para **4**.

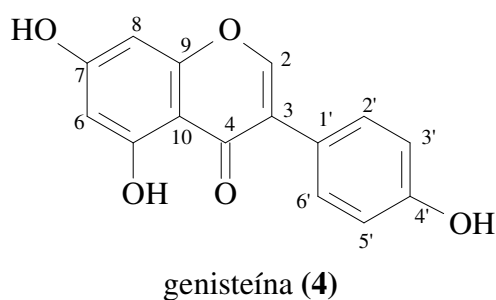


Tabela 9. Dados de RMN de 1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) da substância **4**

C	(DEMUNER <i>et al.</i> , 2003)*	4*	
	δ_C	δ_C	δ_H (mult.; J Hz)
2	154,2	152,80	8,52 (s)
3	122,3	121,86	-
4	180,2	179,48	-
5	162,0	161,86	-
6	99,0	100,12	6,59 (sl)
7	165,3	168,87	-
8	94,0	94,33	6,69 (sl)
9	157,6	157,95	-
10	104,4	102,61	-
1'	121,2	121,62	-
2'	130,1	130,17	7,84 (d; 8,0)
3'	115,0	115,04	7,29 (d; 8,0)
4'	157,4	157,41	-
5'	115,0	115,04	7,29 (d; 8,0)
6'	130,1	130,17	7,84 (d; 8,0)

*: DMSO- d_6

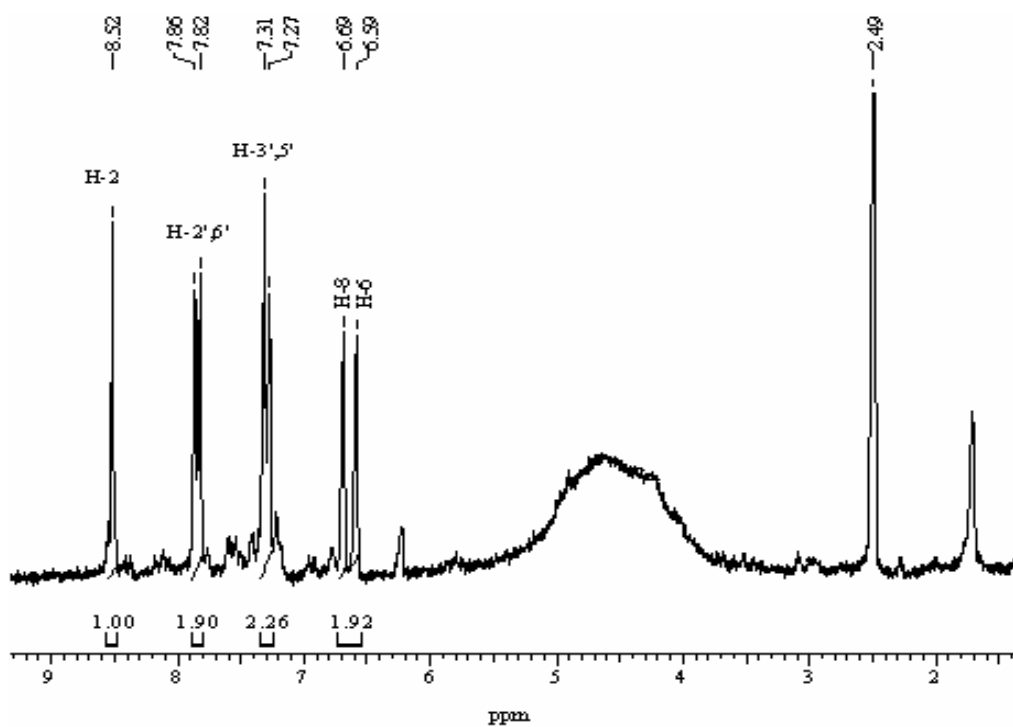


Figura 45. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d_6) de 4.

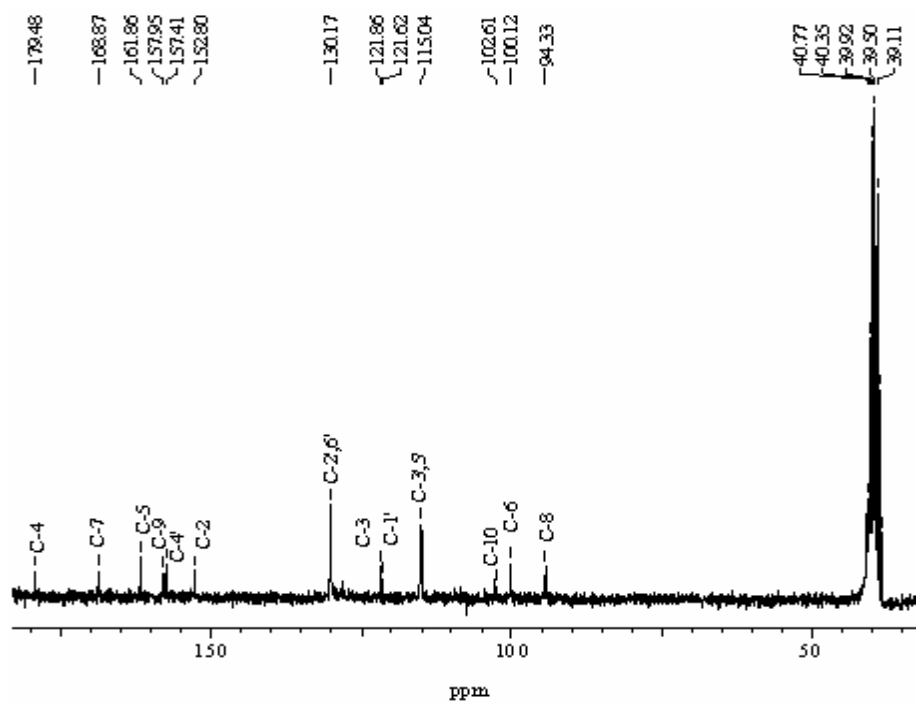


Figura 46. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, BBD, DMSO-d_6) de 4.

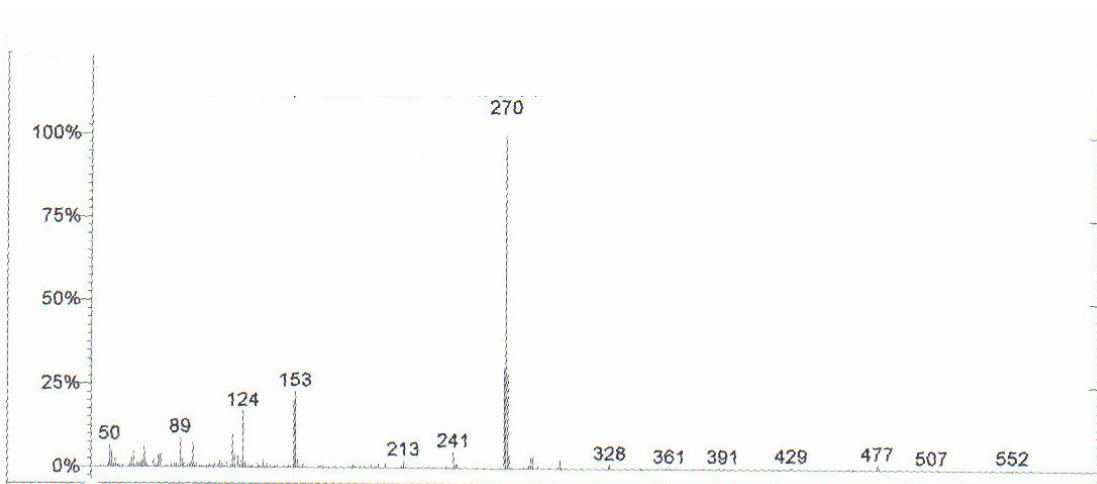
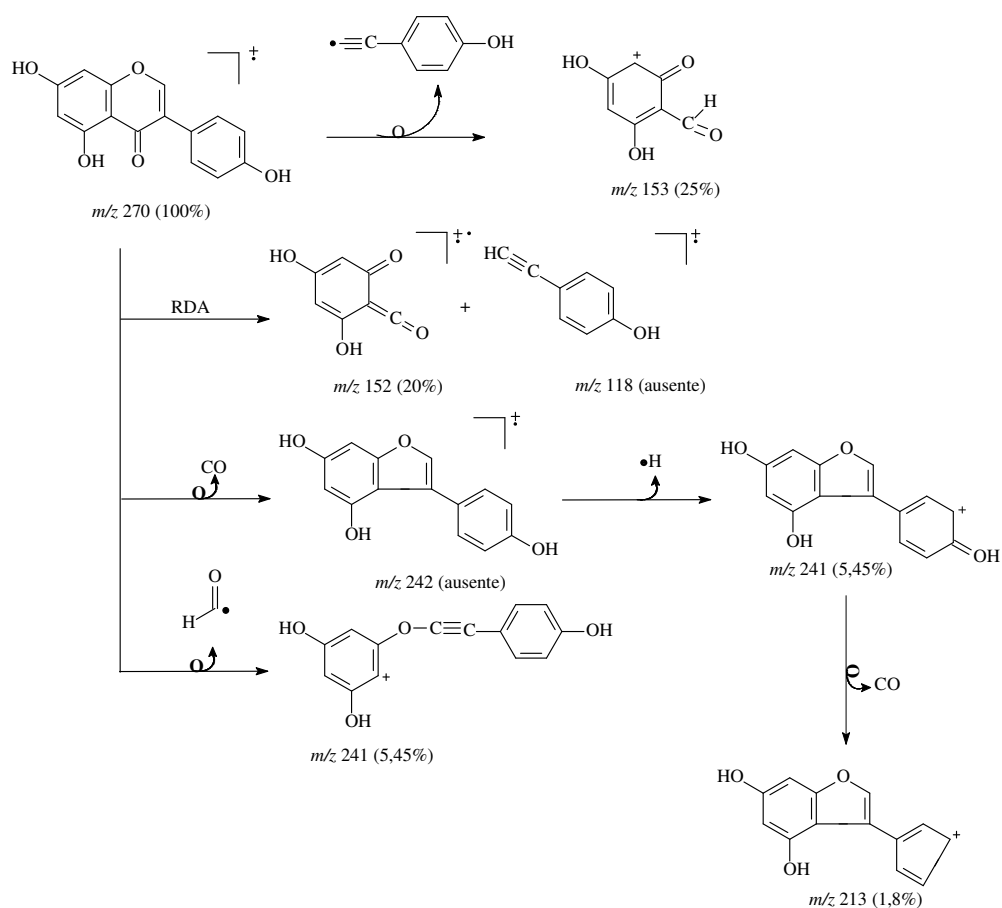


Figura 47. Espectro de massas por IE (70 eV) de 4.



Esquema 15. Proposta de fragmentação para substância 4.

4.1.1.1.6 Identificação da substância 5

Para confirmar a estrutura da substância **5** foram realizadas análises de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e EM. O espectro de RMN de ^1H (Figura 48; p. 82) permitiu identificar dois dubletos em δ_{H} 5,96 (2H, $J = 8,0$ Hz, H-3, 5) e em δ_{H} 6,95 (2H, $J = 8,0$ Hz; H-2,6). A integração dos sinais e o valor de $J = 8,0\text{Hz}$, justifica a proposta sistema AA'BB, confirmando a proposta do ácido *p*-hidroxibenzoico.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C -BBD (Figura 49; p. 82) mostrou valores de deslocamentos químicos compatíveis com carbono quaternário C-7 em δ_{C} 167,22 (carbonila conjugada) e ao carbono carbinólico C-4 em δ_{C} 161,58. O valor do δ_{CH} 115,13 para os carbonos C-3', 5' é compatível com o grupo hidroxílico em C-4' (Tabela 10; p. 81).

A substância **5** foi metilada com diazometano formando o *p*-metoxi benzoato de metila (**5A**) e analisada por CG-EM. Os picos detectados no espectro de massas (Figura 50; p. 83) m/z 166 (M^+), 135 (100%), 107 (18%), 77 (25%) (Esquema 16; p. 83) auxiliaram na determinação estrutural de **5**.

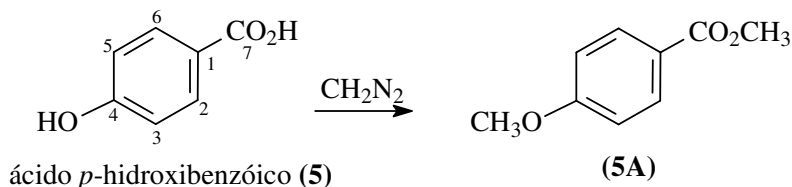


Tabela 10. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e de ^{13}C (50 MHz) da substância 5

C	(SCOTT, 1972)	5	
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H} (mult.; J Hz)
1	121,9	121,40	-
2	132,7	131,44	6,95 (d; 8,0)
3	115,8	115,13	5,96 (d; 8,0)
4	162,5	161,59	-
5	115,8	115,13	5,96 (d; 8,0)
6	132,7	131,44	6,95 (d; 8,0)
7	169,0	167,23	-

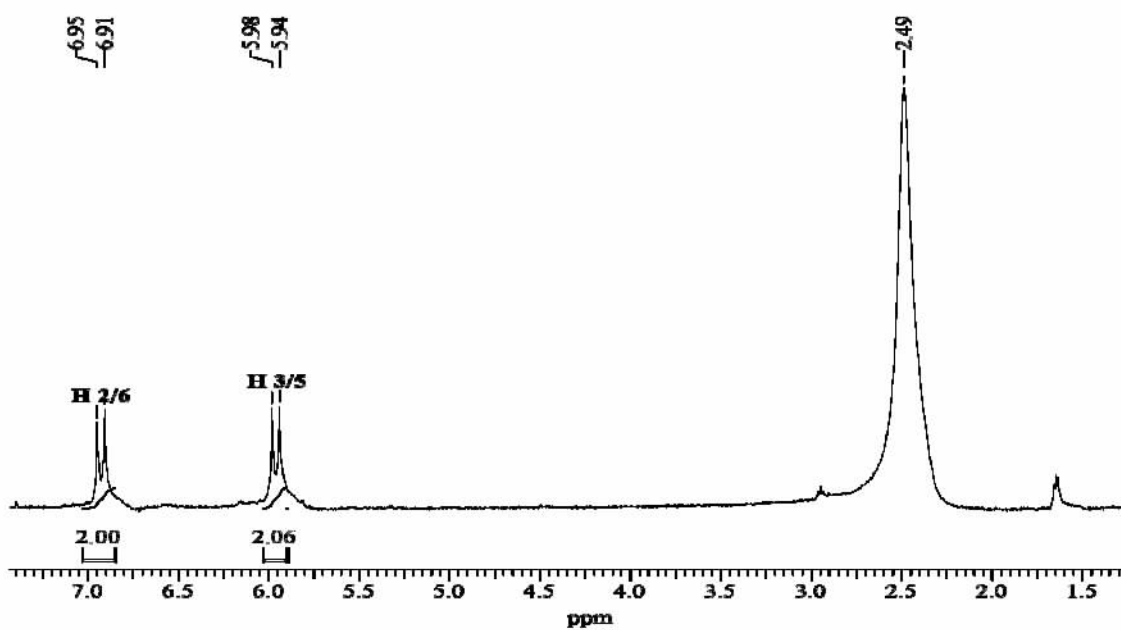


Figura 48. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d_6) de 5.

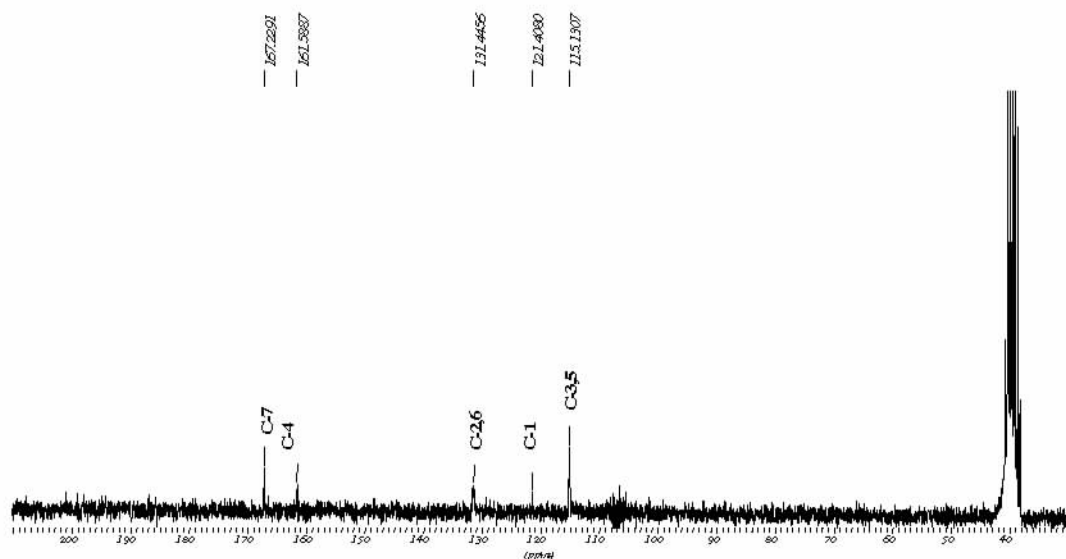


Figura 49. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, BBD, DMSO-d_6) de 5.

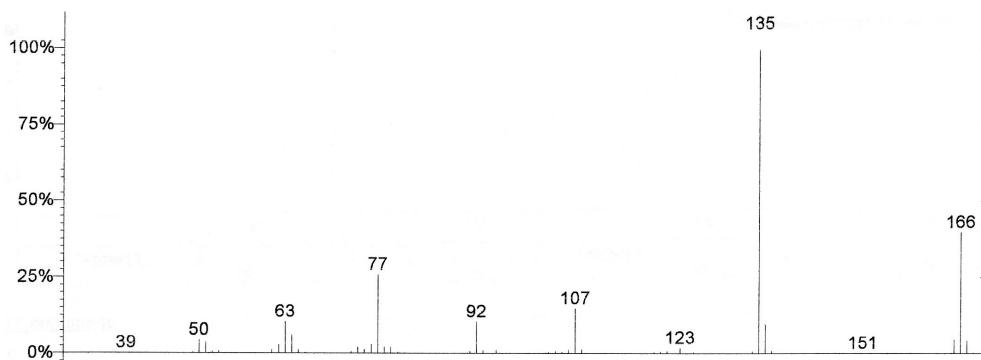
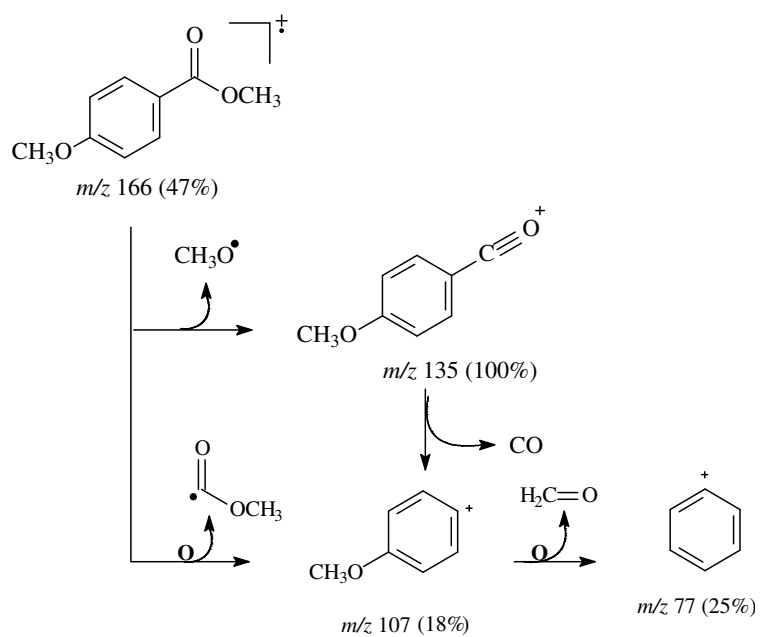


Figura 50. Espectro de massas por IE (70 eV) de 5A.



Esquema 16. Proposta de fragmentação para substância 5A.

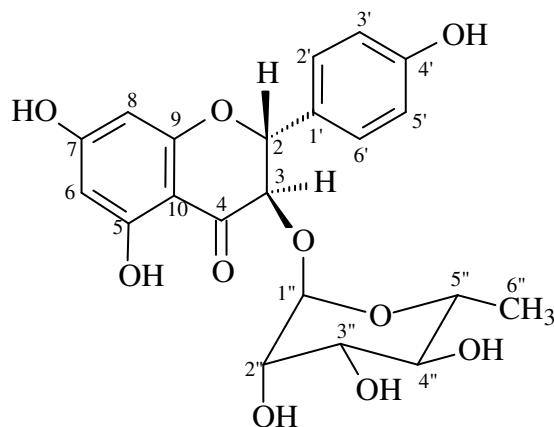
4.1.1.1.7 Identificação da substância 6

O espectro de RMN de ^1H de **6** (Figura 51; p. 86) possui 4 sinais que absorvem na região de hidrogênios em sistema aromático. Esses sinais correspondem a dois singletos largos em δ_{H} 5,84 (H-6) e δ_{H} 5,86 (H-8) formando um sistema AB no anel A e dois dubletos registrados em δ_{H} 6,79 (*dd*, $J=8,0$, H-3',5') e δ_{H} 7,33 (*dd*, $J=8,0$ Hz, H-2',6') representando um sistema do tipo AA'BB' no anel B. Os dubletos na região de frequência média, em δ_{H} 5,27 (*d*, $J=10,5$ Hz, 1H) e δ_{H} 4,72 (*d*, $J=10,5$ Hz, 1H) são relativos aos hidrogênios H-2/H-3. Especificamente, estes adotam configuração relativa *trans*, e determinam a principal característica do esqueleto do flavonol (GAFFIELD & WAISS, 1975). O mapa de contornos [$^1\text{Hx}^1\text{H}$]-COSY (Figura 52; p. 87) mostra a vizinhança entre esses hidrogênios e confirmam a proposta do flavonol. A presença de sinais na região de açúcar δ_{H} 3,09-3,97, o singlete em δ_{H} 3,97 atribuído a um hidrogênio de carbono anomérico (acetal), os acoplamentos mostrados no mapa de contornos do [$^1\text{Hx}^1\text{H}$]-COSY entre os hidrogênios H-2'' e H-3'', H-3'' e H-4'' e H-4'' e H-5'', e principalmente o sinal de dubleto em δ_{H} 1,05 (*d*, $J=6,0$ Hz, H-6'') confirmam a presença de uma unidade ramnose na molécula.

Os espectros de RMN de ^{13}C -BBD e DEPT 135° (Figuras 53 e 54; p. 88 e 89) mostraram 7 sinais de carbonos quaternários δ_{C} 194,34 (C=O), δ_{C} 163,42 (C-5), δ_{C} 167,4 (C-7), δ_{C} 162,16 (C-9), δ_{C} 100,71 (C-10), δ_{C} 126,57 (C-1') e δ_{C} 157,82 (C-4'); 2 sinais de carbonos metínicos saturados δ_{CH} 81,44 (C-2) e δ_{CH} 75,92 (C-3); 4 sinais de carbonos metínicos pertencentes a sistema aromático δ_{CH} 96,22 (C-6), δ_{CH} 95,25 (C-8), δ_{CH} 129,02 (C-2',6') e δ_{CH} 115,15 (C-3',5'); 5 sinais remanescentes de carbonos atribuídos à unidade de açúcar δ_{CH} 100,29 (C-1''), δ_{CH} 72,10 (C-2''), δ_{CH} 70,30 (C-3''), δ_{CH} 71,60 (C-4'') e δ_{CH} 68,90 (C-5'') e 1 sinal referente ao carbono metílico δ_{CH_3} 17,67 atribuído ao C-6''.

Pelo mapa de contornos HMQC (Figura 55; p. 90) puderam ser estabelecidas as correlações diretas dos carbonos metínicos da porção aglicona: C-6 [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 5,84/96,22], C-8 [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 5,86/95,25]; 2C-3',5 [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 6,79/115,15]; 2CH-2',6' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 7,33/129,02] e dos carbonos metínicos e metílico (C-6'') da porção açúcar: C-1'' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3,98/100,29], C-2'' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3,92/70,17]; C-3'' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3,40/70,30], C-4'' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3,39/71,62], C-5'' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3,93/68,9] e C-6'' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 1,05/17,67].

Pelo mapa de contornos HMBC (Figuras 56 e 57; p. 91 e 92) pode-se confirmar a conexão da unidade açúcar através do acoplamento a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) entre o hidrogênio H-1'' (δ_{H} 3,98) e o carbono C-3 (δ_{C} 75,92). Também nesse mesmo experimento, o acoplamento a duas ligações ($^2J_{\text{CH}}$) entre o hidrogênio H-2 (δ_{H} 5,27) e o carbono C-3 define a estrutura do flavonol. A Tabela 11 (p. 85) apresenta todas as atribuições dos dados de RMN de ^{13}C (SILVA *et al.*, 1997). Estes se assemelham aos dados do flavonol engeletina ou *rel-2R,3R-5,7,4'*-triidroxi-3-*O*- α -L-ramnopiranosilflavanonol (**6**). Este 3-*O*-glicosil-flavonol, isolado anteriormente das folhas de *A. inermis* (KRAFT *et al.*, 2001), está sendo relatado pela primeira vez nas raízes de *A. anthelmia*.



engeletina (6)

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) 1D e 2D da substância 6

C	(SILVA <i>et al.</i> , 1997)*	6*			
		HMQC (1J)		[$^1\text{Hx}^1\text{H}$]-COSY	HMBC ($^{2,3}J$)
		δ_{C}	δ_{H} (mult.; J Hz)		
2	81,28	81,44	5,27 (d; 10,5)	H-3	H-3, H-6', H-2'
3	75,75	75,92	4,72 (d; 10,5)	H-2	H-2, H-2'', H-6', H-1''
4	194,32	194,34	-	-	H-2, H-3
5	163,21	163,42	-	-	H-6, 5-OH
6	95,97	96,22	5,84 (s)	-	H-8
7	167,28	167,75	-	-	H-6, H-8, 7-OH
8	94,97	95,25	5,86 (s)	-	H-6, 7-OH
9	161,99	162,16	-	-	H-3, H-8
10	100,61	100,71	-	-	H-3, H-6
1'	126,32	126,57	-	-	H-2, H-3, H-2', H-5'
2'	128,82	129,02	7,33 (d; 8,0)	H-3'	H-2, H-3'
3'	114,96	115,15	6,79 (d; 8,0)	H-2'	H-2', H-5'
4'	157,63	157,82	-	-	H-2', 4'-OH
5'	114,96	115,15	6,79 (d; 8,0)	H-6'	H-6', 4'-OH
6'	128,82	129,02	7,33 (d; 8,0)	H-5'	H-2, H-2'
1''	100,10	100,29	3,97 (s)	-	H-3
2''	70,20	70,17	3,28 (sl)	H-3''	H-3''
3''	69,95	70,30	3,39 (d; 10,0 e 3,0)	H-4''	H-2''
4''	73,4	71,62	3,39 (t; 9,45)	H-3'', H-5''	6''-CH ₃
5''	68,77	68,96	3,91 (m)	H-6''	H-4''
6''	17,52	17,67	1,05 (d; 6,0)	H-5''	H-4''
5-OH	-	-	11,77	-	-

*: DMSO-d₆

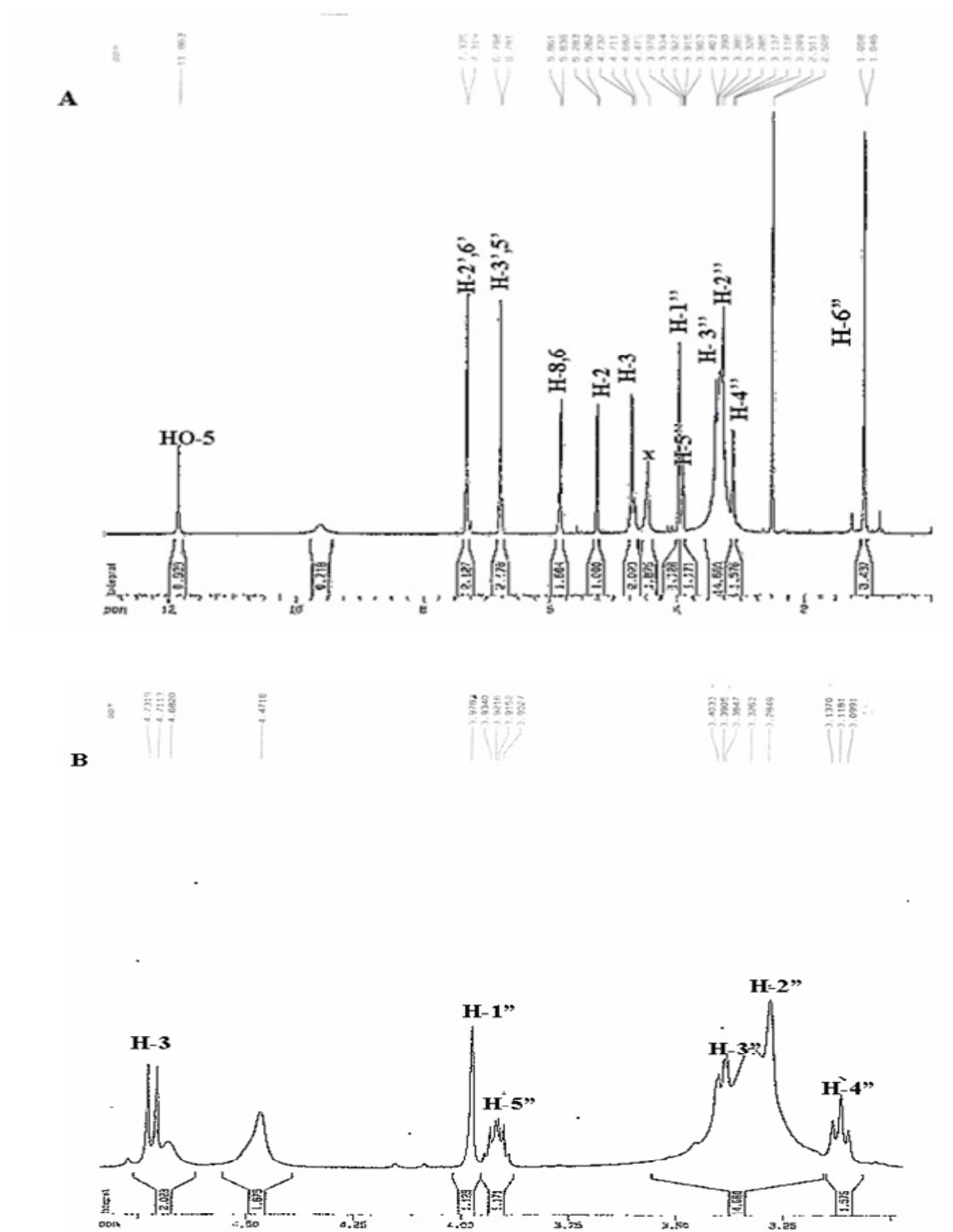


Figura 51. [A] Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) de 6; [B] Expansão na região entre δ_{H} 3,09-4,73 ppm.

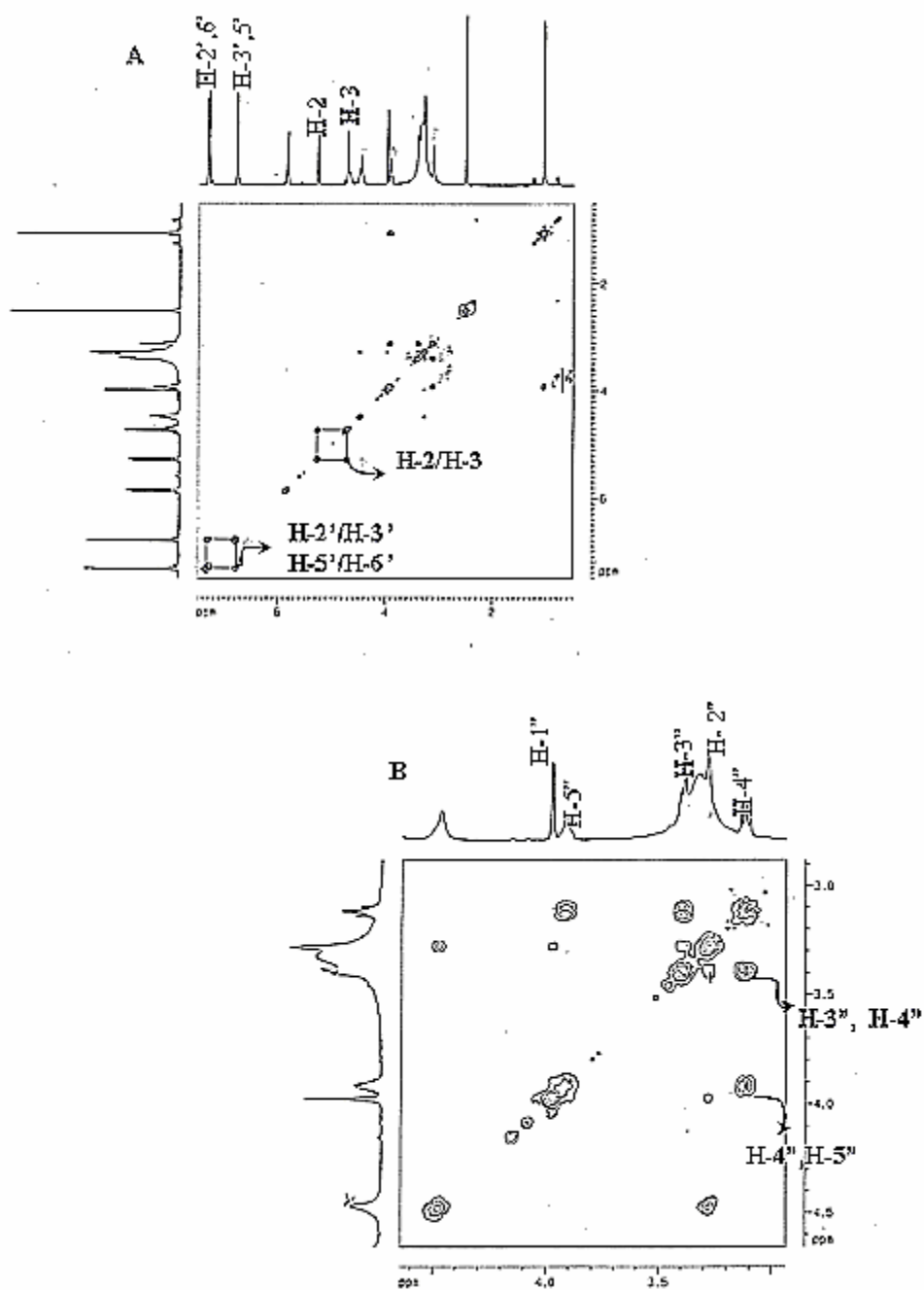
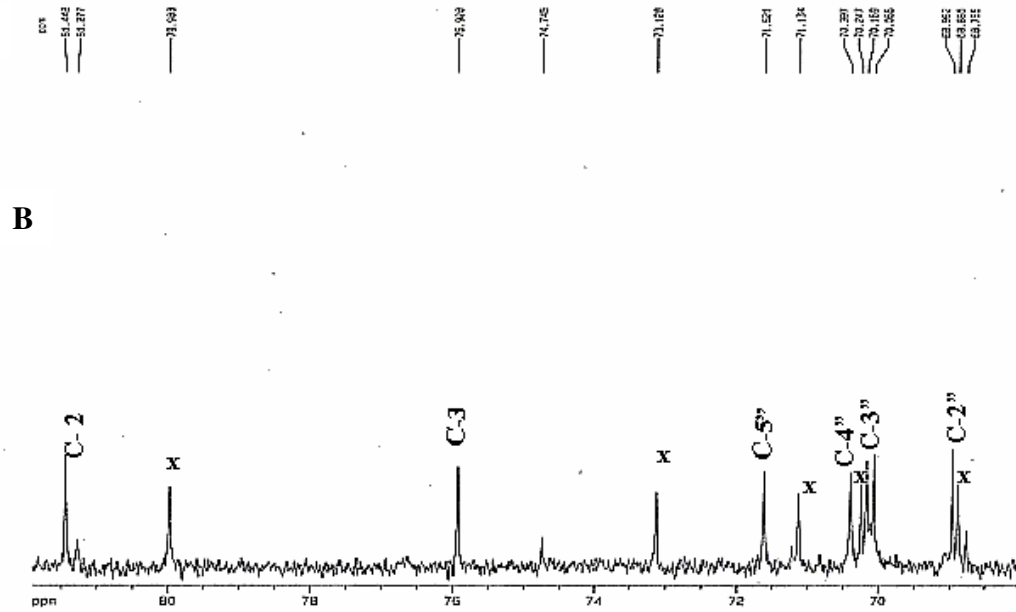
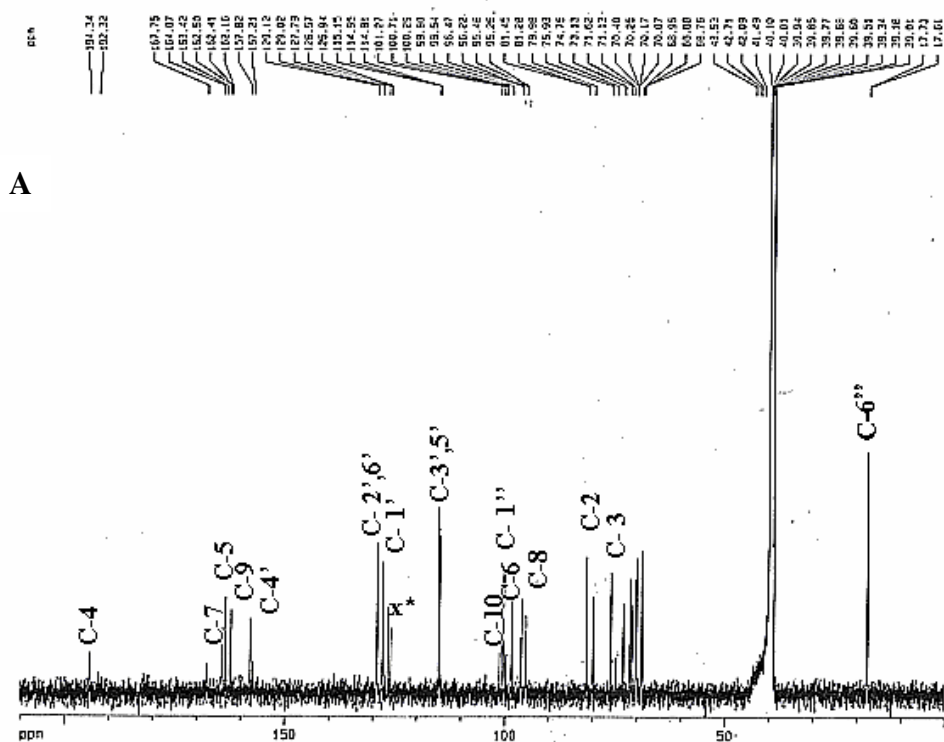


Figura 52. [A] Mapa de contornos $^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY (500MHz, DMSO- d_6) de 6; [B] Expansão na região entre δ_{H} 3,0- 5,1 ppm.



* vestígios de outro flavanonol não identificado

Figura 53. [A] Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, BBD, DMSO-d_6) de 6; [B] Expansão na região entre δ_{C} 68,76-81,44 ppm.

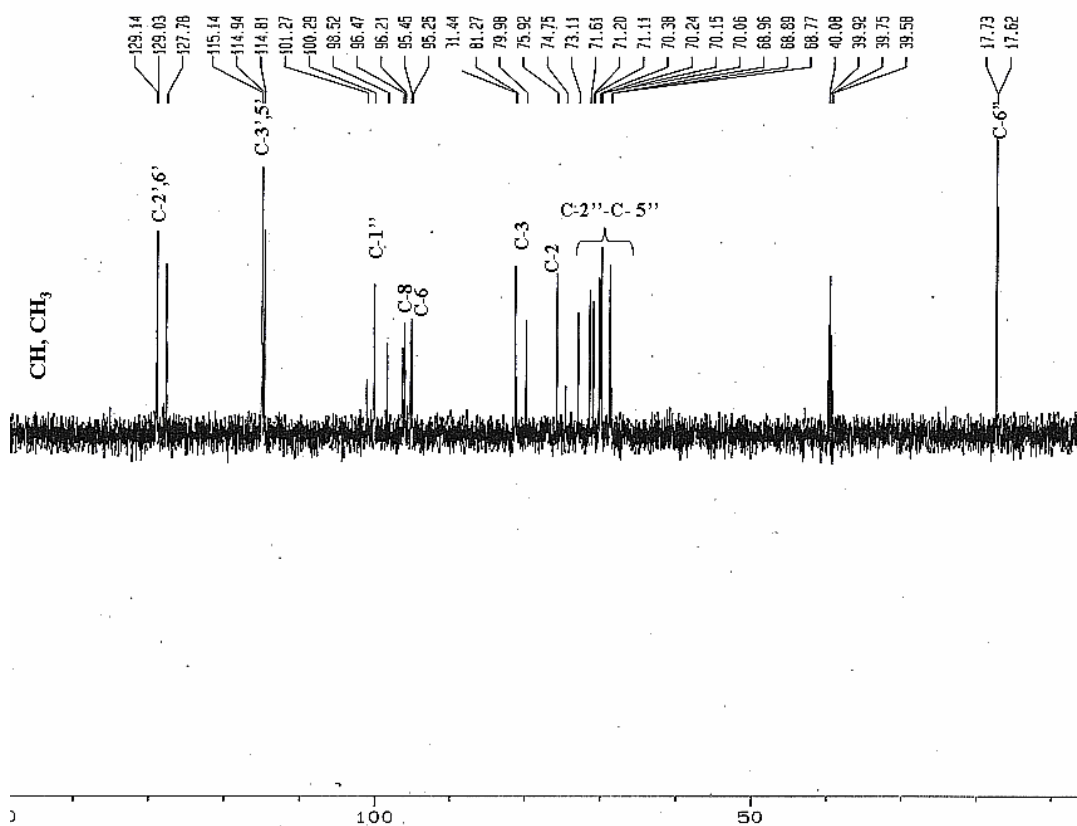


Figura 54. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPT 135°, DMSO- d_6) de 6.

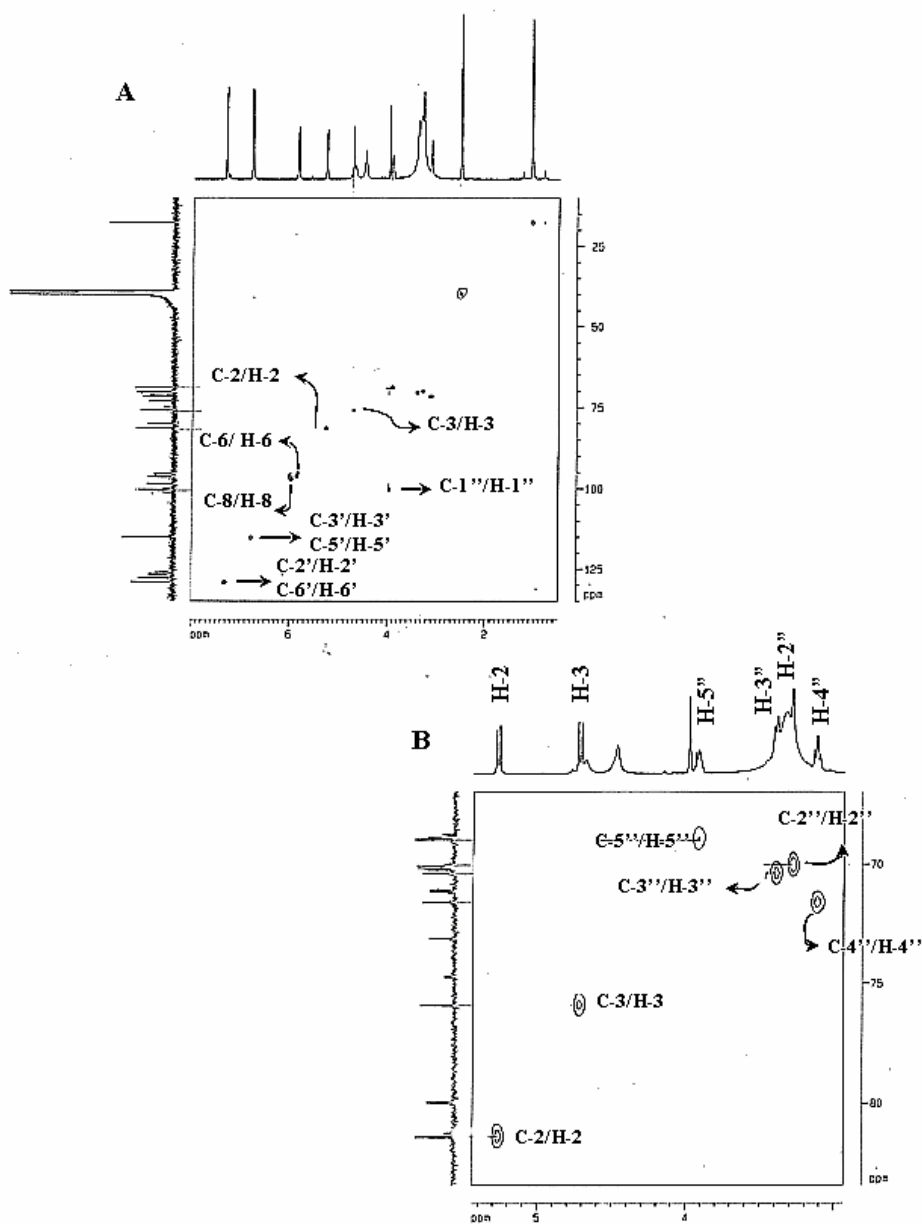


Figura 55. Mapa de contornos HMQC (125 MHz, DMSO-d₆) de **6**; [B] Expansão na região entre δ_C 68,0-84,0 ppm e δ_H 3,10-5,4 ppm .

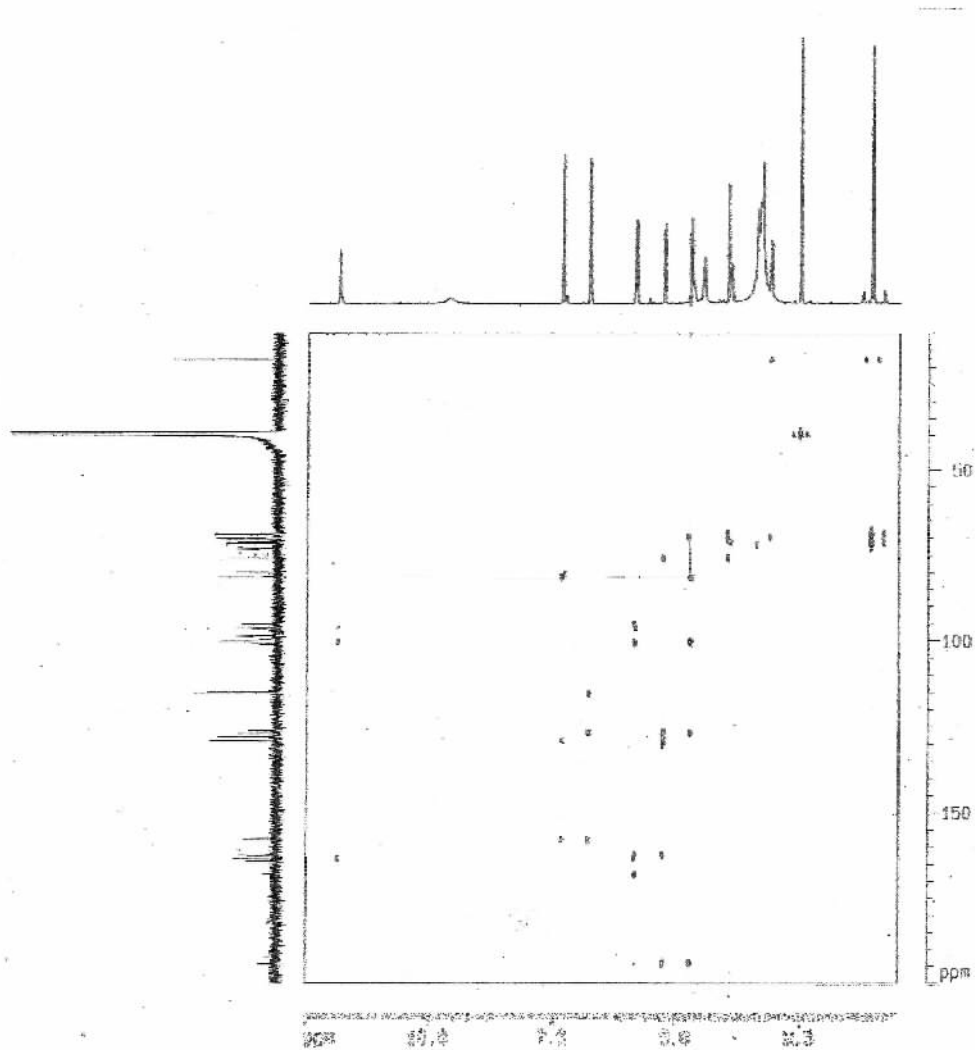
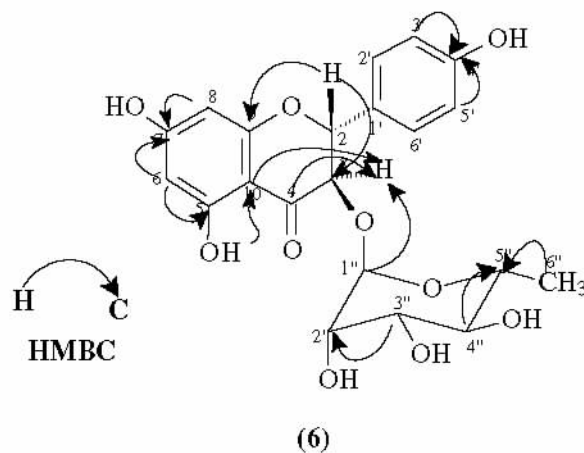


Figura 56. Mapa de contornos HMBC (125 MHz, DMSO- d_6) e correlações observadas para a substância 6.

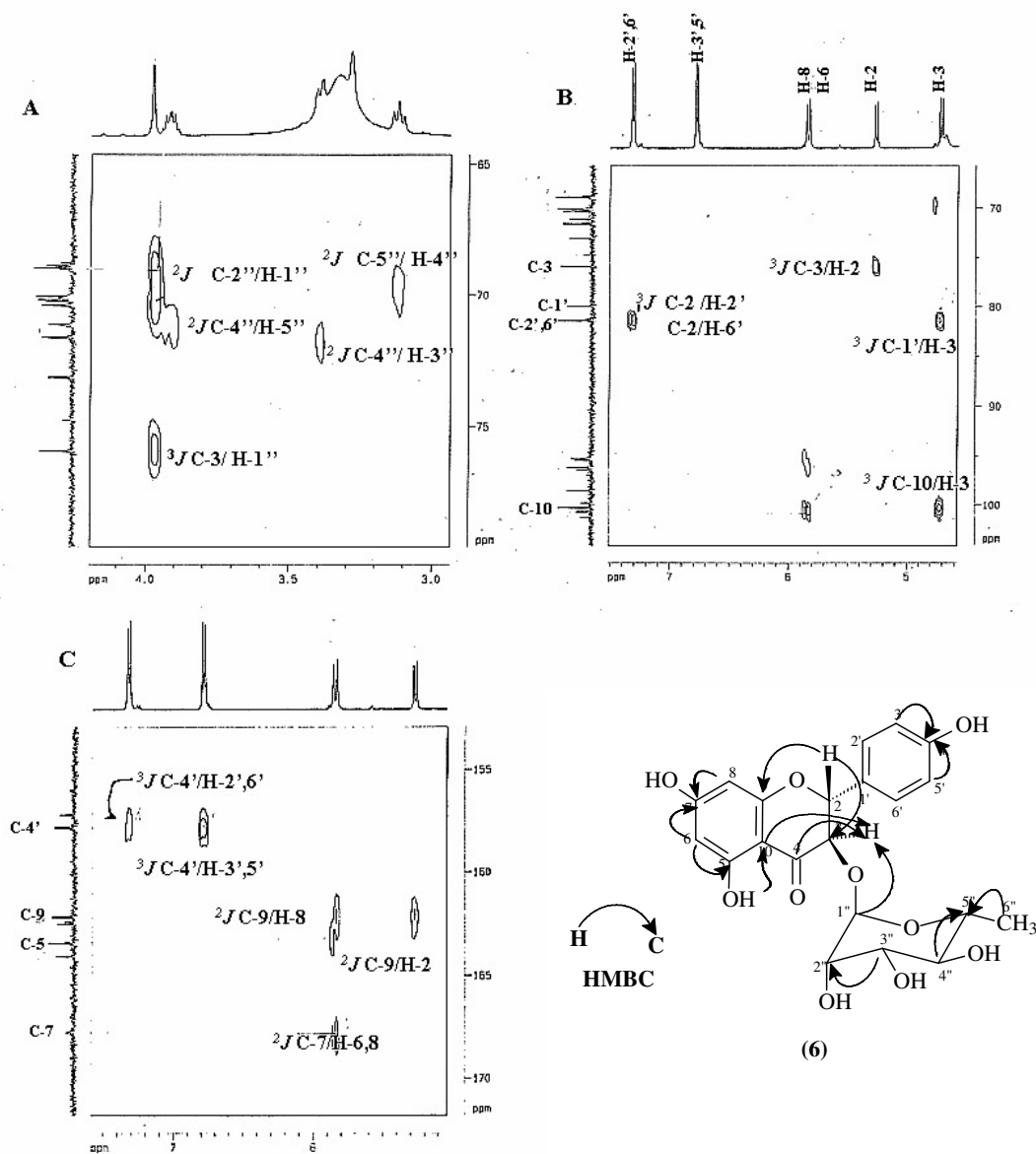
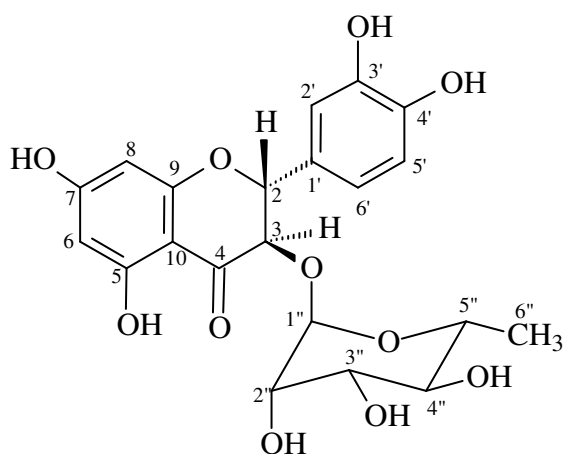


Figura 57. Expansões do mapa de contornos HMBC (125 MHz, DMSO- d_6) de 6 nas regiões entre: [A] δ_{C} 65,0-80,0 ppm e δ_{H} 3,0-4,1 ppm [B] δ_{C} 65,0-110,0 ppm e δ_{H} 4,8-7,5 ppm e [C] δ_{C} 155,0-170,0 ppm e δ_{H} 5,0-7,5 ppm

4.1.1.1.8 Identificação da substância 7

A atribuição dos valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios da substância **7** (Figura 58; p. 95) foi baseada na comparação desses mesmos valores aos da substância **6** (engeletina). Essa comparação evidenciou na região aromática, a diferença entre os anéis B dessas duas substâncias. Na substância **7**, a presença dos sinais δ_{H} 6,80 (*m*, H-5',6') e δ_{H} 6,96 (*sl*, H-2'), formam um sistema tipo AMX. Os demais sinais de hidrogênios tanto da porção aglicona quanto da unidade açúcar foram semelhantes aos observados para a substância **6**. Portanto, foi observado um acoplamento com $J=10,0$ Hz entre os hidrogênios H-2 em δ_{H} 5,10 e H-3 em δ_{H} 4,60 (*d*), o que auxiliou na definição da configuração relativa *trans*, adotada por estes hidrogênios na molécula de **7**. Também, a presença dos sinais do hidrogênio anomérico em δ_{H} 4,05 e do dubleto em δ_{H} 1,13 (*d*, $J=6,0$ Hz) confirmaram uma unidade de ramnose nesta molécula.

No espectro de RMN de ^{13}C -BBD (Figura 59; p. 95) foi verificada a presença de 5 sinais referentes aos carbonos oxigenados de sistema aromático δ_{C} 168,05 (C-7), δ_{C} 165,11 (C-5), δ_{C} 163,81 (C-9), δ_{C} 146,22 (C-3') e δ_{C} 147,01 (C-4'), além do sinal também nesta região de frequência alta δ_{C} 195,86 atribuído ao carbono carbonílico C-4. Os deslocamentos químicos dos carbonos C-3' (δ_{C} 146,22) e C-4' (δ_{C} 147,01), mais baixos em relação aos demais carbonos oxigenados, se deve ao fato destes sofrerem o efeito de proteção por mesomeria, exercido pelas hidroxilas vizinhas substituídas em *orto*. Os demais sinais são de carbonos metínicos saturados δ_{CH} 83,08 (C-2) e δ_{CH} 77,32 (C-3); em sistema aromático δ_{CH} 97,0 (C-6), δ_{CH} 95,97 (C-8), δ_{CH} 116,02 (C-2'), δ_{CH} 115,32 (C-5') e δ_{CH} 120,26 (C-6'); quaternários δ_{C} 101,61 (C-10/1') e δ_{C} 128,84 (C-1'), metínicos da unidade de açúcar δ_{CH} 101,61 (C-1''), δ_{CH} 71,41 (C-2''), δ_{CH} 71,98 (C-3''), δ_{CH} 73,44 (C-4'') e δ_{CH} 70,07 (C-5'') e metílico δ_{CH_3} 17,82 (C-6''). Todos estes dados atribuídos estão de acordo com os dados de ^{13}C descritos na literatura (CINTRA *et al.*, 2002) e permitiram propor a estrutura da astilbina (diidroquercetina 3- α -L-ramnopiranosil) ou *rel-2R,3R-5,7,4'*-tetrahydroxi-3-*O*- α -L-ramnopiranosilflavanonol (**7**). Esse flavononol encontrado também na espécie *A. inermis* (KRAFT *et al.*, 2001), está sendo relatado pela primeira vez em *A. anthelmia*.



astilbina (**7**)

Tabela 12. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) da substância 7

C	(CINTRA <i>et al.</i> , 2002)*	7^{*1}	
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H} (mult.; <i>J</i> Hz)
2	84,7	83,48	5,10 (<i>d</i> ; 10,0)
3	79,3	77,71	4,60 (<i>d</i> ; 10,0)
4	196,8	195,86	-
5	166,3	165,11	-
6	98,2	97,0	5,86 (<i>d</i> ; 2,0)
7	169,3	168,05	-
8	97,1	95,97	5,88 (<i>d</i> ; 2,0)
9	164,9	163,81	-
10	103,2	101,61	-
1'	130,0	128,84	-
2'	117,1	116,02	6,96 (<i>d</i> ; 2,0)
3'	147,3	146,22	-
4'	148,1	147,01	-
5'	116,2	115,32	6,80 (<i>m</i>)
6'	121,3	120,26	6,80 (<i>m</i>)
1''	103,2	101,61	4,06 (<i>s</i>)
2''	72,6	71,41	3,58 (<i>dd</i> ; 10,0 e 3,0)
3''	73,2	71,98	3,51 (<i>t</i> , 9,45)
4''	74,6	73,44	3,32 (<i>m</i>)
5''	71,3	70,07	3,24 (<i>m</i>)
6''	18,7	17,82	1,13 (<i>d</i> ; 6,0)

*: Metanol- d_4

*1: Acetona- d_6

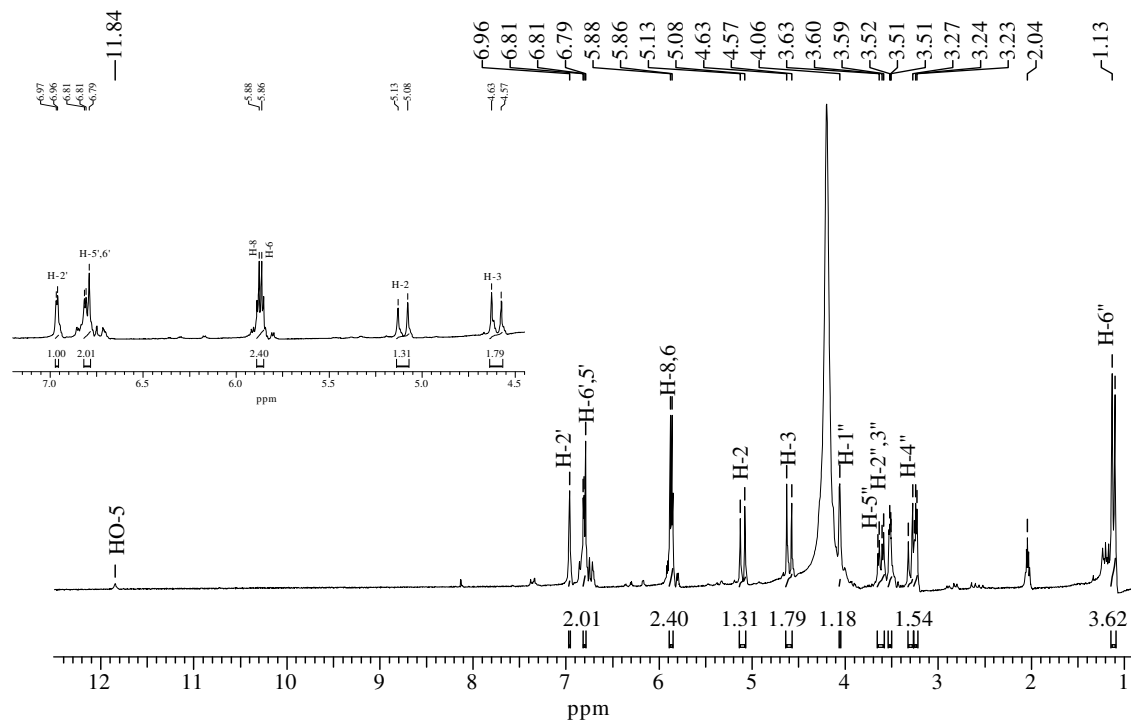


Figura 58. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, Acetona- d_6) de 7.

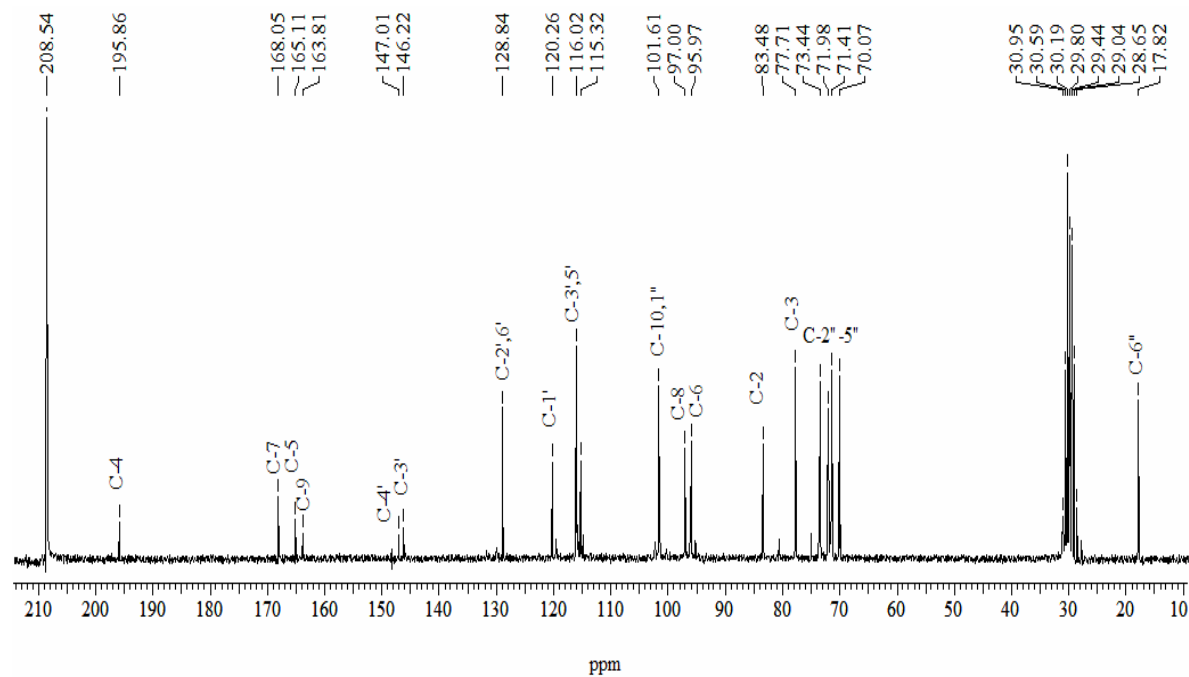


Figura 59. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, BBD, Acetona- d_6) de 7.

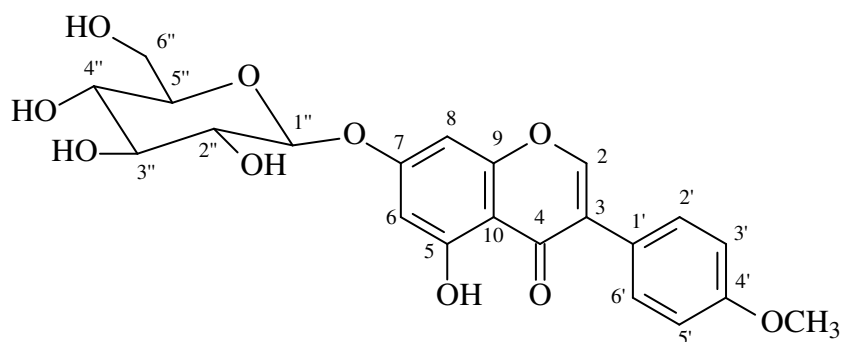
4.1.1.1.9 Identificação da substância 8

O espectro de RMN de ^1H de **8** (Figura 60; p. 98) exibiu um singlete característico na região de frequência alta δ_{H} 8,48 referente a um hidrogênio sp^2 . Esta informação, e a análise dos sinais remanescentes no espectro de hidrogênio, levou a conclusão que a substância tratava-se de uma isoflavona. Os sinais de dois dubletos com acoplamento *meta* ($J=2,0$ Hz) entre os hidrogênios H-6 (δ_{H} 6,48) e H-8 (δ_{H} 6,73), respectivamente, o par de dubletos de um anel benzênico *p*-substituído em δ_{H} 7,02 (H-3',5') e δ_{H} 7,53 (H-2',6') com acoplamento de $J=8,8$ Hz e o sinal em δ_{H} 3,79 (*s*) atribuído ao grupamento metoxílico, revelaram a estrutura de uma isoflavona 5,7,4'-trioxigenada, com esqueleto semelhante ao da biochanina A (**2**). Além desses sinais, foram observados vários sinais na região de açúcar, que puderam ser assinalados por comparação com dados da literatura (RAO *et al.*, 1989): δ_{H} 5,07 (*d*, $J=7,3$ Hz) correspondente ao hidrogênio anomérico H-1'', δ_{H} 3,28 (*m*), 3,29 (*m*), 3,42 (*m*), 3,44 (*d*, $J=11,0$ Hz) e 3,69 (*m*) referente a unidade de açúcar. A localização deste açúcar e também do grupo metoxílico, foi auxiliado pelo espectro de correlação 2D NOESY (Figura 61; p. 98) que mostrou entre outras interações espaciais, a interação entre H-6 e H-8 no anel A com o hidrogênio anomérico H-1'' do açúcar e entre os hidrogênios do grupo metoxi (OCH_3) com os hidrogênios H-3',5' no anel B.

Pela análise do espectro de RMN de ^{13}C APT (Figura 62; p. 99) foi confirmada a suposição da parte aglicona como sendo a biochanina A (**2**). Estes sinais correspondem aos carbonos carbonílico δ_{C} 180,40 (C-4), quaternários δ_{C} 159,22 (C-4'), δ_{C} 161,61 (C-5) e δ_{C} 163,04 (C-7), metínicos δ_{CH} 99,05 (C-6), δ_{CH} 93,74 (C-8), δ_{CH} 154,91 (C-2), δ_{CH} 130,16 (C-2',6') e δ_{CH} 113,73 (C-3',5') e metílico em δ_{CH_3} 55,17 (OCH_3). Os sinais adicionais δ_{CH} 99,84 (C-1'', anomérico), δ_{CH} 73,06 (C-2''), δ_{CH} 77,17 (C-3''), δ_{CH} 69,58 (C-3''), δ_{CH} 76,73 (C-4'') e o sinal do carbono metilênico δ_{CH_2} 60,61 (C-6''), permitiram reconhecer a glicose, como o açúcar presente na molécula (BREITMAIER & VOELTER, 1989; RAO *et al.*, 1989).

Pelo mapa de contornos HMQC (Figura 63; p. 99) foram estabelecidas as correlações diretas de todos os carbonos hidrogenados: C-6 [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 6,48/99,61], C-8 [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 6,73/94,57]; 2C-3',5 [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 7,02/113,73]; 2CH-2',6' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 7,53/130,16], C-1'' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 5,08/99,84], C-2'' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3,28/73,06]; C-3'' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3,29/77,17], C-4'' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3,44/69,58], C-5'' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3,42/76,73] e C-6'' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3,69/60,61].

O mapa de contornos HMBC (Figura 64; p. 100) além de confirmar as conexões C-7-O- β -D-glicopiranosil, pelo acoplamento a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) entre H-1'' (δ_{H} 99,8) e C-7 (δ_{C} 163,04) e entre os hidrogênios da metoxila δ_{H} 3,79 e o C-4' (δ_{C} 159,22), permitiu atribuir inequivocamente o valor dos deslocamentos químicos de todos os carbonos quaternários da estrutura definida como biochanina A 7-O- β -D-glicopiranosídeo (**8**), que está sendo divulgada pela primeira vez no gênero *Andira*.

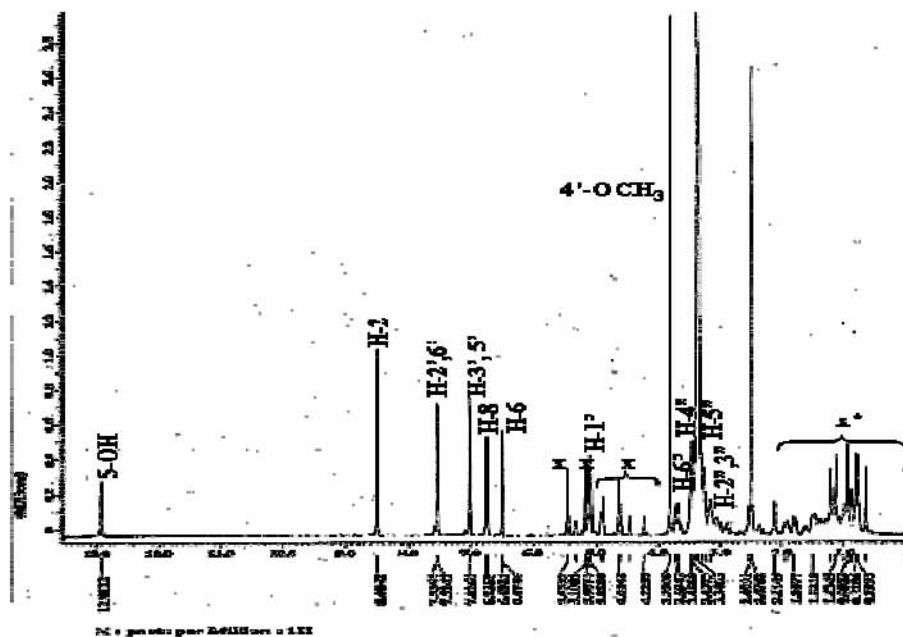


biochanina A 7-O- β -D-glicopiranosídeo (**8**)

Tabela 13. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) 1D e 2D da substância **8**

C	(RAO <i>et al.</i> , 1989)*		8*		
			HMQC (1J)		HMBC ($^{2,3}J$)
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H} (mult.; J Hz)	
2	154,8	8,42 (s)	154,91	8,48 (s)	-
3	122,2	-	122,23	-	H-2, H-2', H-6'
4	180,4	-	180,40	-	H-2
5	161,6	-	161,61	-	H-6, 5-OH
6	99,6	6,48 (s)	99,61	6,48 (d; 2,0)	H-8, 5-OH
7	162,9	-	163,04	-	H-6, H-8, H-1''
8	94,5	6,72 (s)	94,57	6,73 (d; 2,0)	H-6
9	157,2	-	157,21	-	H-2, H-8
10	106,1	-	106,07	-	H-6, H-8, 5-OH
1'	122,7	-	122,70	-	H-2', H-3', H-5', H-6'
2'/6'	130,1	7,52 (d; 8,4)	130,16	7,53 (d; 8,8)	-
3'/5'	113,7	7,01 (d; 8,4)	113,73	7,02 (d; 8,8)	-
4'	159,2	-	159,22	-	H-2', H-3', H-5', H-6', OCH ₃
1''	99,8	5,05 (d; 7,3)	99,84	5,08 (d; 7,3)	H-3''
2''	73,0	3,28 (m)	73,06	3,28 (m)	H-3''
3''	76,2	3,29 (m)	77,17	3,29 (m)	H-2''
4''	69,7	3,13 (t; 8,8)	69,58	3,44 (d; 8,0)	-
5''	75,5	3,61 (m)	76,73	3,42 (m)	-
6''	67,6	3,88 (d; 11)	60,61	3,69 (m)	-
OCH ₃	55,1	3,79 (s)	55,17	3,79 (s)	-

*: DMSO-d₆



* vestígios de outros glicosídeos

Figura 60. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de 8.

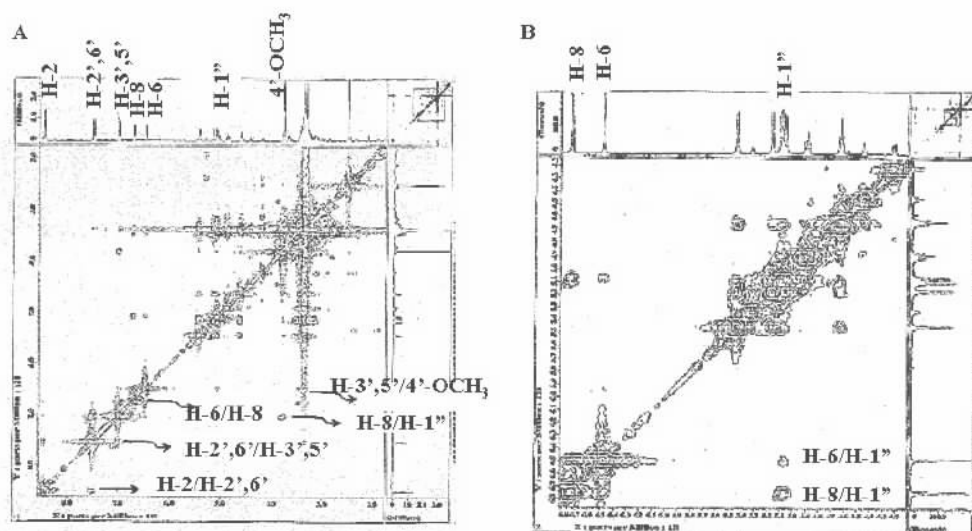
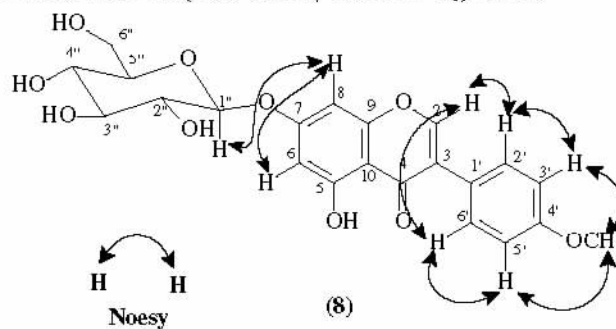


Figura 61. [A] Mapa de contornos NOESY (400 MHz, DMSO-d_6) de 8; [B] Expansão na região entre δ_{H} 4,2- 6,8 ppm.

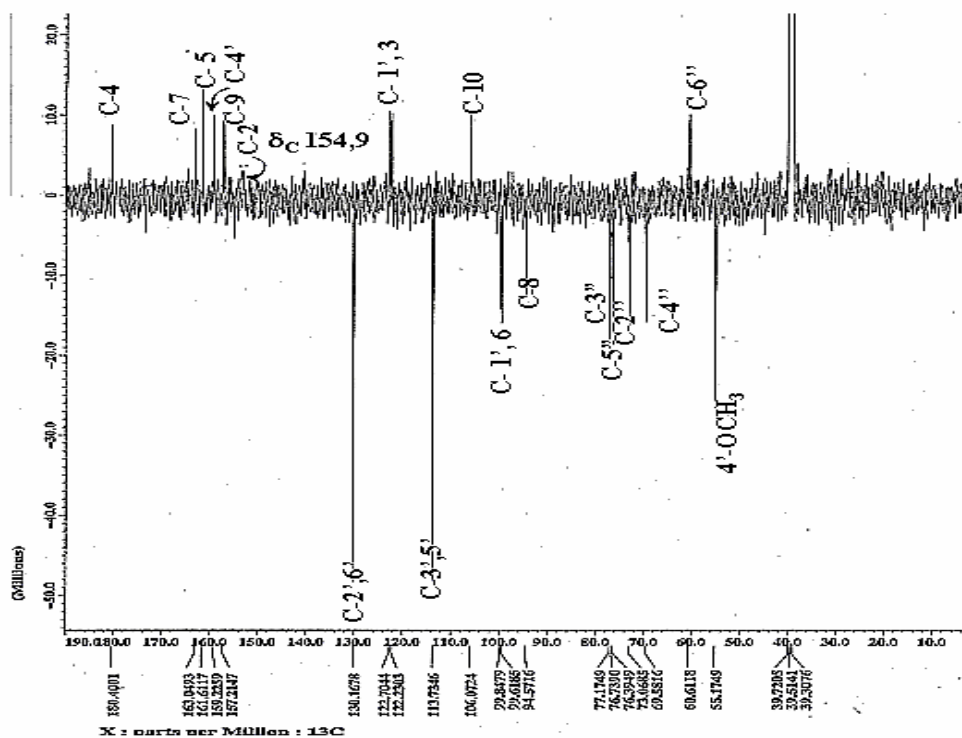


Figura 62. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, 100 MHz, DMSO- d_6) de 8.

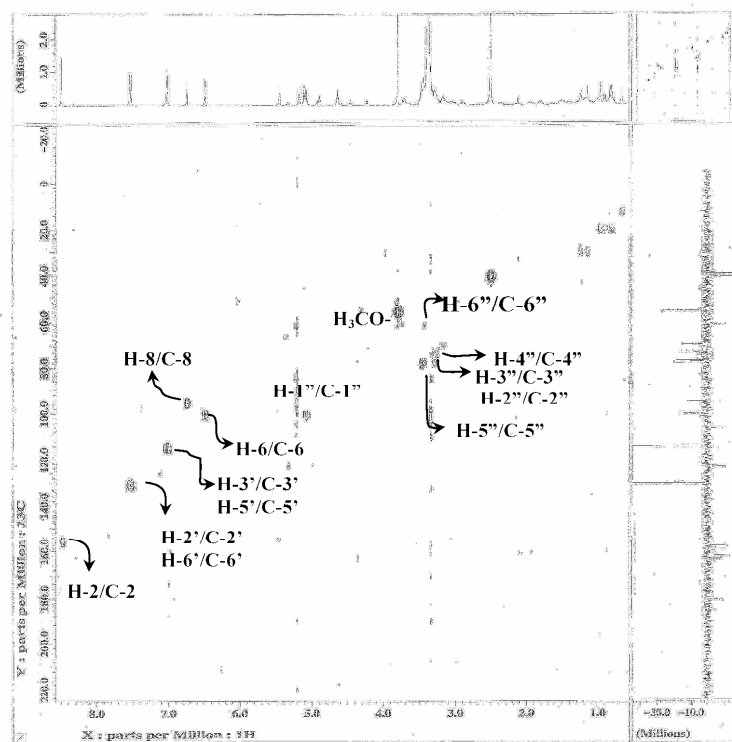


Figura 63. Mapa de contornos HMQC (100 MHz, DMSO- d_6) de 8.

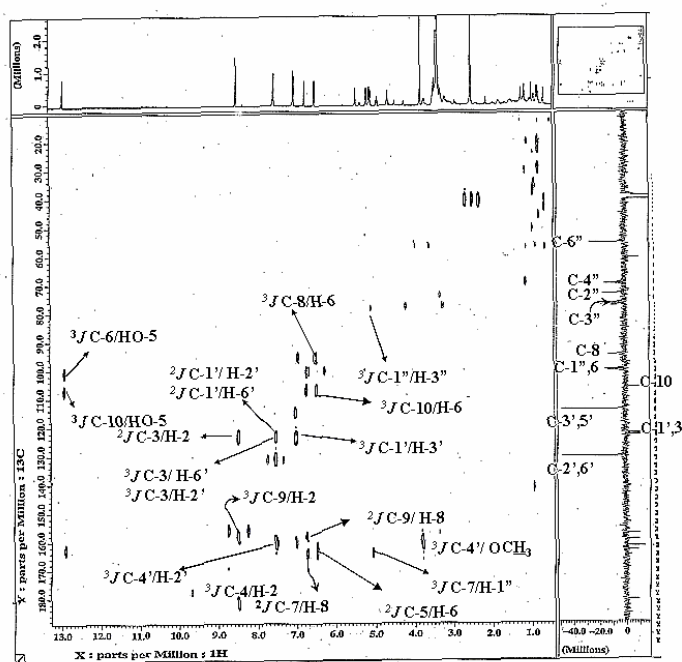
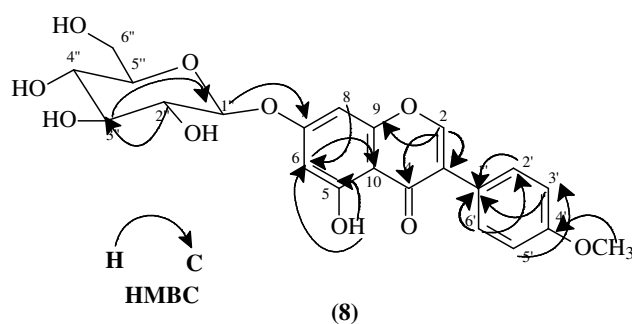


Figura 64. Mapa de contornos HMBC (125 MHz, DMSO- d_6) e correlações observadas para a substância 8.

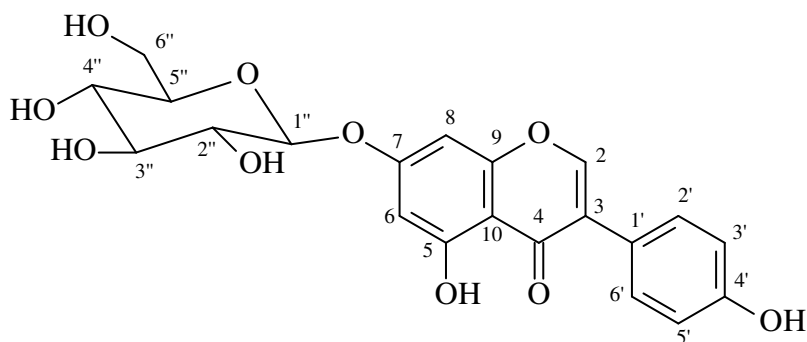
4.1.1.10 Identificação da substância 9

O espectro de RMN de ^1H de **9** (Figuras 65 e 66; p. 103) exibiu sinais de deslocamentos de hidrogênio, idênticos aos observados para o isoflavonóide geinsteína (**4**), diferenciando apenas pelas absorções localizadas na região de açúcar entre δ_{H} 3,14-5,04. A perfeita multiplicidade verificada por esses sinais, permitiu definir os acoplamentos entre os hidrogênios desta unidade açúcar: δ_{H} 5,04 (*d*, $J=7,5$ Hz, H-1''), 3,22 (*t*, $J=9,0$ Hz), 3,30 (*d*, $J=8,5$ Hz), 3,14 (*t*, $J=8,0$ Hz) e 3,68 (*d*, $J=11,0$ Hz). Apesar da ausência da hidroxila quelada, concluiu-se que esta pode ter sido trocada com a água do DMSO- d_6 (solvente de registro do espectro). Pelo mapa de contornos COSY- $[^1\text{H}\times^1\text{H}]$ (Figura 67; p. 104) pode-se determinar a vizinhança entre os hidrogênios do sistema aromático (anel B) δ_{H} 7,38 (*d*, $J=8,6$, H-2',6') e δ_{H} 6,84 (*d*, $J=8,6$, H-3',4') e entre os hidrogênios do açúcar 5,04 (*d*, $J=7,5$ Hz, H-1'') e δ_{H} 3,22 (*t*, $J=9,0$ Hz, H-2'').

No espectro de RMN de ^{13}C -BBD (Figura 68; p. 104), foi possível observar na região de frequência alta os sinais correspondentes aos carbonos carbonílico δ_{C} 180,20 (C-4),

quaternários oxigenados δ_C 159,21 (C-4'), C-5 (δ_C 163,06) e δ_C 166,44 (C-7) e o metínico δ_{CH} 154,65 (C-2). Na região de frequência média, observou-se os sinais dos carbonos metínicos em sistema aromático δ_{CH} 99,87 (C-6) e δ_{CH} 94,0 (C-8) (acoplamento *meta* anel A), δ_{CH} 130,26 (C-2',6') e δ_{CH} 115,57 (C-3',5') (acoplamento *orto* anel B). Os sinais adicionais foram atribuídos à unidade de açúcar. Pelo valor do deslocamento δ_{CH_2} 66,36 (C-6''), e a comparação com valores existentes na literatura (BREITMAIER & VOELTER, 1989), este açúcar foi determinado como sendo a molécula de glicose. Outros sinais de carbono foram assinalados com base nesses dados retirados da literatura, δ_{CH} 99,87 (C-1''), δ_{CH} 73,13 (C-2''), δ_{CH} 77,27 (C-3''), δ_{CH} 69,60 (C-4'') e δ_{CH} 76,46 (C-5'').

O mapa de contornos HMQC (Figura 69; p. 105) foram estabelecidas inequivocamente todas as correlações entre hidrogênios e carbonos: C-2 [δ_H/δ_C 8,47/154,65], C-6 [δ_H/δ_C 6,43/99,87], C-8 [δ_H/δ_C 6,70/94,0]; 2C-3',5 [δ_H/δ_C 7,0/115,57]; 2CH-2',6' [δ_H/δ_C 7,51/130,26], C-1'' [δ_H/δ_C 5,04/99,87], C-2'' [δ_H/δ_C 3,22/73,13]; C-3'' [δ_H/δ_C 3,30/77,27], C-4'' [δ_H/δ_C 3,14/69,60] e C-6'' [δ_H/δ_C 3,68/66,36]. As atribuições descritas na Tabela 14 (p. 102) e a respectiva comparação com os dados da literatura (BREITMAIER & VOELTER, 1989; MA *et al.*, 1998) confirmaram a estrutura da genisteína 7-O- β -D-glicopiranosídeo (**9**). A genisteína, assim como outras isoflavonas de esqueletos comuns e seus 7-O-glicosídeos, são frequentemente relatadas no gênero *Andira* e mesmo na família Leguminosae (Fabaceae), no entanto, esta é a primeira vez que a substância (**9**) é isolada no gênero citado.



genisteína 7-O- β -D-glicopiranosídeo (**9**)

Tabela 14. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (125 MHz) da substância 9

C	(MA <i>et al.</i> , 1998)*		9*	
			HMQC (1J)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H} (<i>mult.</i> ; <i>J</i> Hz)
2	154,2	8,14 (<i>s</i>)	154,65	8,47 (<i>s</i>)
3	122,3	-	122,96	-
4	180,2	-	180,20	-
5	162,0	-	163,06	-
6	99,0	6,51 (<i>d</i> ; 2,1)	99,87	6,43 (<i>sl</i>)
7	165,3	-	166,44	-
8	94,0	6,70 (<i>d</i> ; 2,1)	94,0	6,66 (<i>sl</i>)
9	157,6	-	157,46	-
10	104,4	-	106,0	-
1'	121,2	-	122,96	-
2'/6'	130,1	7,38 (<i>d</i> ; 8,6)	130,26	7,51 (<i>d</i> ; 9,0)
3'/5'	115,0	6,84 (<i>d</i> ; 8,6)	115,57	7,0 (<i>d</i> ; 9,0)
4'	159,2	-	159,21	-
1''	99,8	5,03 (<i>d</i> ; 7,3)	99,87	5,04 (<i>d</i> ; 7,5)
2''	73,0	3,39 (<i>m</i>)	73,13	3,22 (<i>t</i> ; 9,0)
3''	76,2	3,29 (<i>m</i>)	77,27	3,30 (<i>d</i> ; 8,5)
4''	69,7	3,13 (<i>t</i> ; 8,8)	69,60	3,14 (<i>t</i> ; 8,0)
5''	75,5	3,51 (<i>m</i>)	76,46	*1
6''	67,6	3,70 (<i>dd</i> ; 11,8; 5,3; H-6''b) 3,90 (<i>dd</i> ; 11,7; H-6''a)	66,36	3,68 (<i>d</i> ; 11,0)

*: DMSO- d_6

*1: valor do deslocamento químico encontra-se suprimido pelo sinal da água do DMSO- d_6

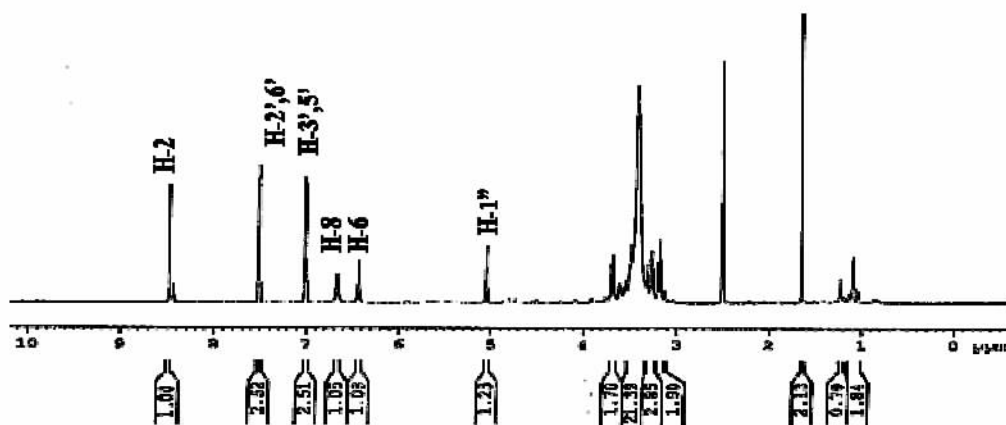


Figura 65. RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de 9.

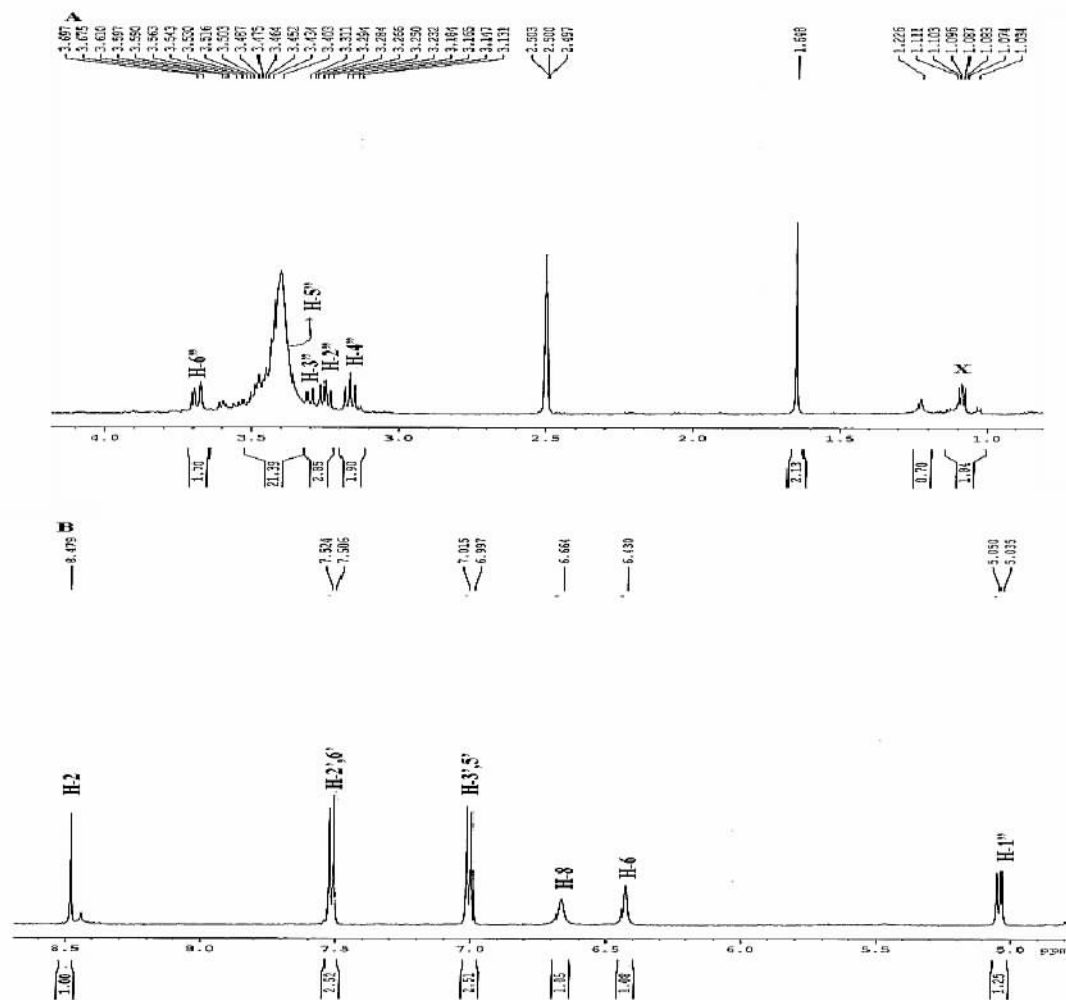


Figura 66. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de 9 nas regiões entre: [A] δ_{H} 1,0-4,0 ppm e [B] δ_{H} 5,0-8,0 ppm.

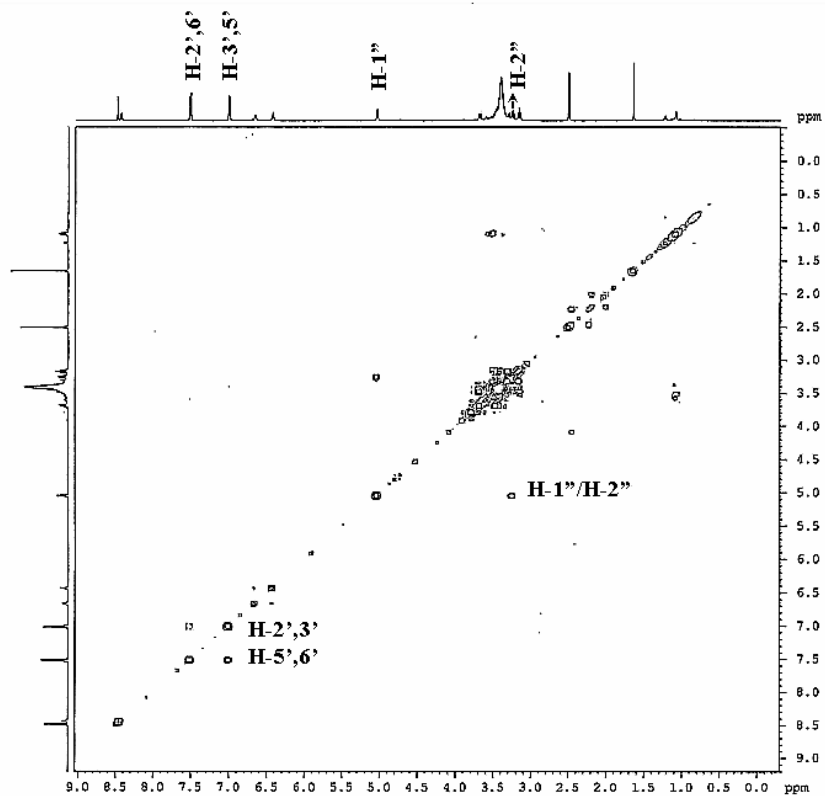


Figura 67. Mapa de contornos $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, DMSO- d_6) de 9.

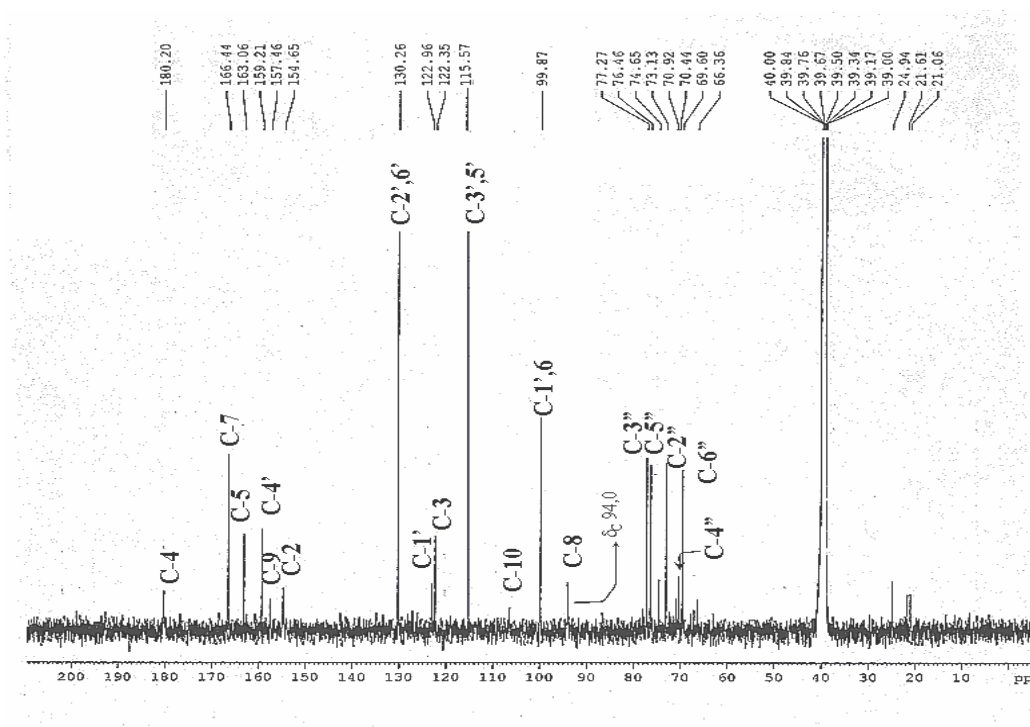


Figura 68. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, BBD, DMSO- d_6) de 9.

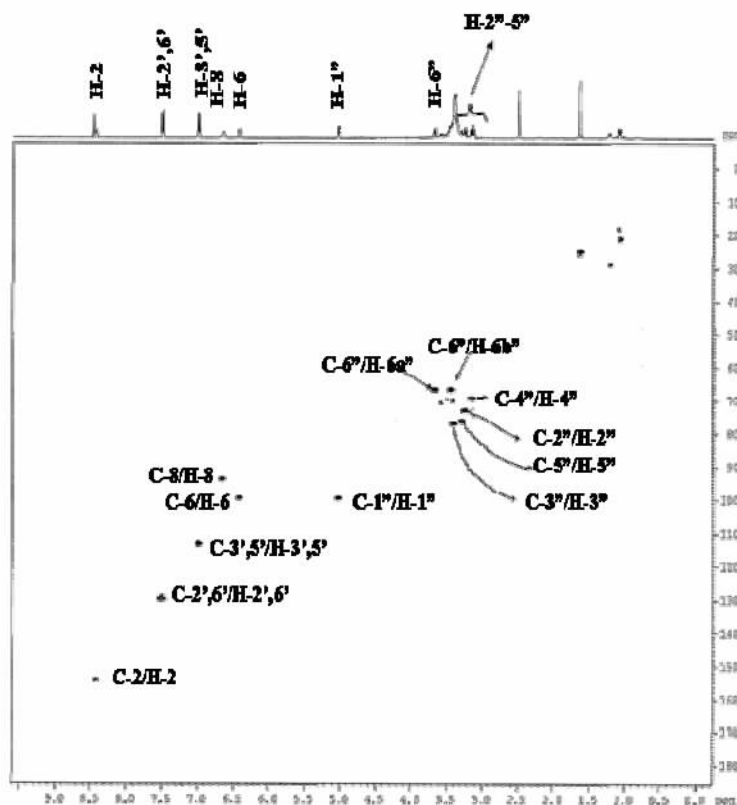


Figura 69. Mapa de contornos HMQC (125 MHz, DMSO- d_6) de 9.

4.1.1.1.11 Identificação da substância 10

A substância 10 apresentou características espectroscópicas semelhantes às observadas na substância 2. Pelo espectro de RMN de ^1H de 10 (Figura 70; p. 109) puderam ser atribuídos os valores de deslocamento químico dos hidrogênios ligados aos carbonos sp^2 δ_{H} 7,53 (*d*, $J=8,8$ Hz, H-2',6'), 7,02 (*d*, $J=8,8$ Hz, H-3',5'), 6,46 (*d*, $J=2,0$ Hz, H-6), 6,74 (*d*, $J=2,0$ Hz, H-8) e 8,44 (*s*, H-2) e da metoxila δ_{H} 3,79 (OCH_3). A grande quantidade de sinais na região entre δ_{H} 3,17-5,0 indicou unidades de açúcar na molécula, principalmente pela presença dos sinais em δ_{H} 5,0 (*d*, 6,3) e δ_{H} 4,54 (*sl*) atribuídos a hidrogênios anoméricos. Ficou constatado que um desses açúcares tratava-se da ramnose devido ao duplete característico de metila terminal em δ_{H} 1,11 com $J=6,0$ Hz presente nesse carboidrato.

Nos espectros de RMN de ^{13}C BBD e DEPT 135° (Figuras 71 e 72; p. 110 e 111) foram observados na região de açúcar, 12 sinais carbonos correspondentes a duas unidades de açúcar. Esses foram assinalados em δ_{C} 99,99 (C-1''), 73,08 (C-2''), 75,67 (C-3''), 70,08 (C-4''), 76,54 (C-5''), 66,43 (C-6''), 100,68 (C-1'''), 70,32 (C-2'''), 70,75 (C-3'''), 72,18 (C-4''') e 68,41 (C-5'''), além do sinal adicional em δ_{CH_3} 17,89 (C-6'''). Pelas informações dadas na análise do espectro de hidrogênio, e a presença do valor de deslocamento em δ_{CH_3} 17,89, ficou comprovada a presença de ramnose nesta molécula. A comparação dos valores de deslocamentos químicos dos carbonos remanescentes com a literatura (HU *et al.*, 1994), mostrou grande semelhança aos da glicose, principalmente em relação ao carbono metilênico C-6'' (δ_{CH_2} 66,43).

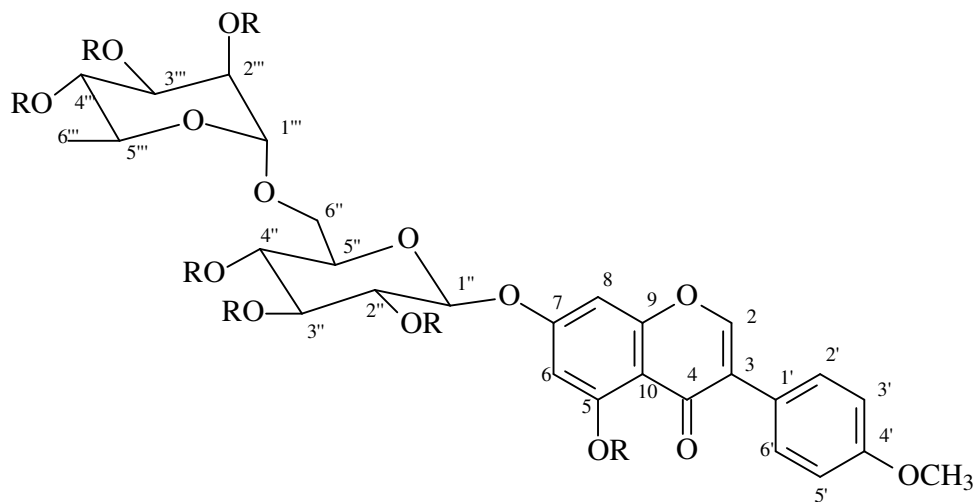
A análise do mapa de contornos HMQC (Figura 73; p.112) foi conclusiva para a atribuição de todos os valores de deslocamento químico de todos os carbonos hidrogenados: C-2 [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 8,44/155,06], C-6 [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 6,46/99,80], C-8 [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 6,74/94,70]; 2C-3',5 [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 7,02/113,79]; 2CH-2',6' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 7,53/130,17], C-1'' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 5,0/99,99], C-2'' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$

3,33/73,36]; C-3'' [δ_H/δ_C 3,31/75,66], C-4'' [δ_H/δ_C 3,17/69,63], C-5'' [δ_H/δ_C 3,32/76,53], C-6'' [δ_H/δ_C 3,94/66,43], C-1''' [δ_H/δ_C 4,54/100,68], C-2''' [δ_H/δ_C 3,65/70,0], C-3''' [δ_H/δ_C 3,55/70,74], C-4''' [δ_H/δ_C 3,19/72,18], C-5''' [δ_H/δ_C 3,45/68,41] e C-6''' [δ_H/δ_C 1,11/17,89].

Como na substância **8**, a análise do mapa de contornos HMBC (Figuras 74 e 75, p. 113 e 114) confirmou os acoplamentos a três ligações ($^3J_{CH}$) entre o H-1'' (δ_H 5,0) e C-7 (δ_C 162,9) e entre H-1''' (δ_H 4,84) e C-6'' (δ_C 17,89). Os valores das constantes de acoplamento de H-1'' (d , $J=6,3$ Hz), H-1''' (sl) e H-6''' (d , $J=6,0$) permitiram definir uma conexão do tipo α -L-ramnopiranosil-(1''' \rightarrow 6'')- β -D-glicopiranosil.

A comparação destes valores com deslocamentos químicos de modelos da literatura (Mod-1) (HU *et al.*, 1994) confirmou a estrutura da biochanina A 7-O- α -L-ramnopiranosil-(1''' \rightarrow 6'')- β -D-glicopiranosídeo (**10**). A substância **10** está sendo divulgada pela primeira vez neste gênero, seu único registro na literatura relata seu isolamento das cascas da espécie *Dalbergia paniculata* (PARTHASARATY *et al.*, 1972).

A presença de hidroxilas serviu de orientação para preparação do derivado heptacetilado **10A** que melhorou a visualização pelo espalhamento dos sinais de hidrogênios na região de açúcar. Este derivado foi identificado através de RMN de 1H (Figura 76; p. 115), ^{13}C -DEPT 135° (Figura 77; p. 116) e HETCOSY (Figura 78; p. 117). A atribuição completa dos dados RMN de 1H e ^{13}C de **10** (Tabela 15; p. 107) e seu derivado acetilado **10A** (Tabela 16; p. 108) estão sendo divulgados pela primeira vez na literatura.



R = H = biochanina A 7-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosídeo (**10**)

R = Ac = heptacetil biochanina A 7-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosídeo (**10A**)

Tabela 15. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) 1D e 2D da substância 10 em comparação com dados do modelo Mod-1

C	(HU <i>et al.</i> , 1994)*	10*		
		HMQC (1J)		HMBC ($^{2,3}J$)
		δ_{C}	δ_{H} (<i>mult.</i> ; <i>J</i> Hz)	
2	164,1	155,06	8,44 (<i>s</i>)	-
3	103,9	122,81	-	H-2
4	182,1	180,45	-	-
5	162,5	161,53	-	H-6, 5-OH
6	99,6	99,80	6,46 (<i>d</i> ; 2,0)	5-OH
7	163,1	162,91	-	H-6, 5-OH, H-1''
8	94,9	94,70	6,74 (<i>d</i> ; 2,0)	H-6
9	161,2	157,27	-	H-8, H-2, 5-OH
10	105,9	106,19	-	H-8
1'	122,8	122,16	-	H-2', H-3', H-5', H-6'
2'	128,6	130,17	7,53 (<i>d</i> ; 8,8)	-
3'	114,7	113,79	7,02 (<i>d</i> ; 8,8)	-
4'	157,1	159,27	-	H-2', H-3', H-5', H-6', OCH ₃
5'	114,7	113,79	7,53 (<i>d</i> ; 8,8)	-
6'	128,6	130,17	7,02 (<i>d</i> ; 8,8)	-
1''	99,8	99,99	5,00 (<i>d</i> ; 6,3)	-
2''	73,2	73,36	3,33 (<i>m</i>)	-
3''	75,8	75,66	3,31 (<i>m</i>)	-
4''	70,5	69,63	3,17 (<i>m</i>)	-
5''	76,4	76,53	3,32 (<i>m</i>)	-
6''	66,2	66,43	3,94 (<i>m</i>)	H-1'''
1'''	100,0	100,68	4,54 (<i>sl</i>)	H-6''
2'''	70,8	70,0	3,65 (<i>m</i>)	-
3'''	69,7	70,74	3,55 (<i>m</i>)	-
4'''	72,2	72,17	3,19 (<i>m</i>)	-
5'''	68,5	68,41	3,45 (<i>m</i>)	H-1'''
6'''	17,9	17,89	1,11 (<i>d</i> ; 6,0)	H-4'''
5-OH	-	-	12,86 (<i>s</i>)	-
OCH ₃	55,7	55,21	3,79 (<i>s</i> , 3H)	-

*: DMSO-d₆

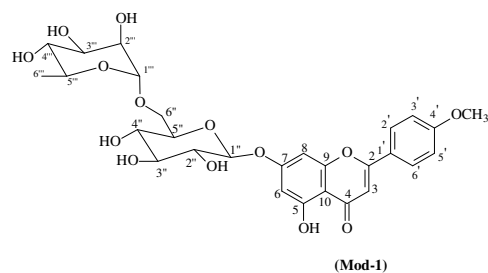
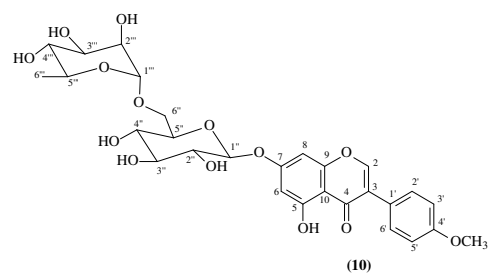
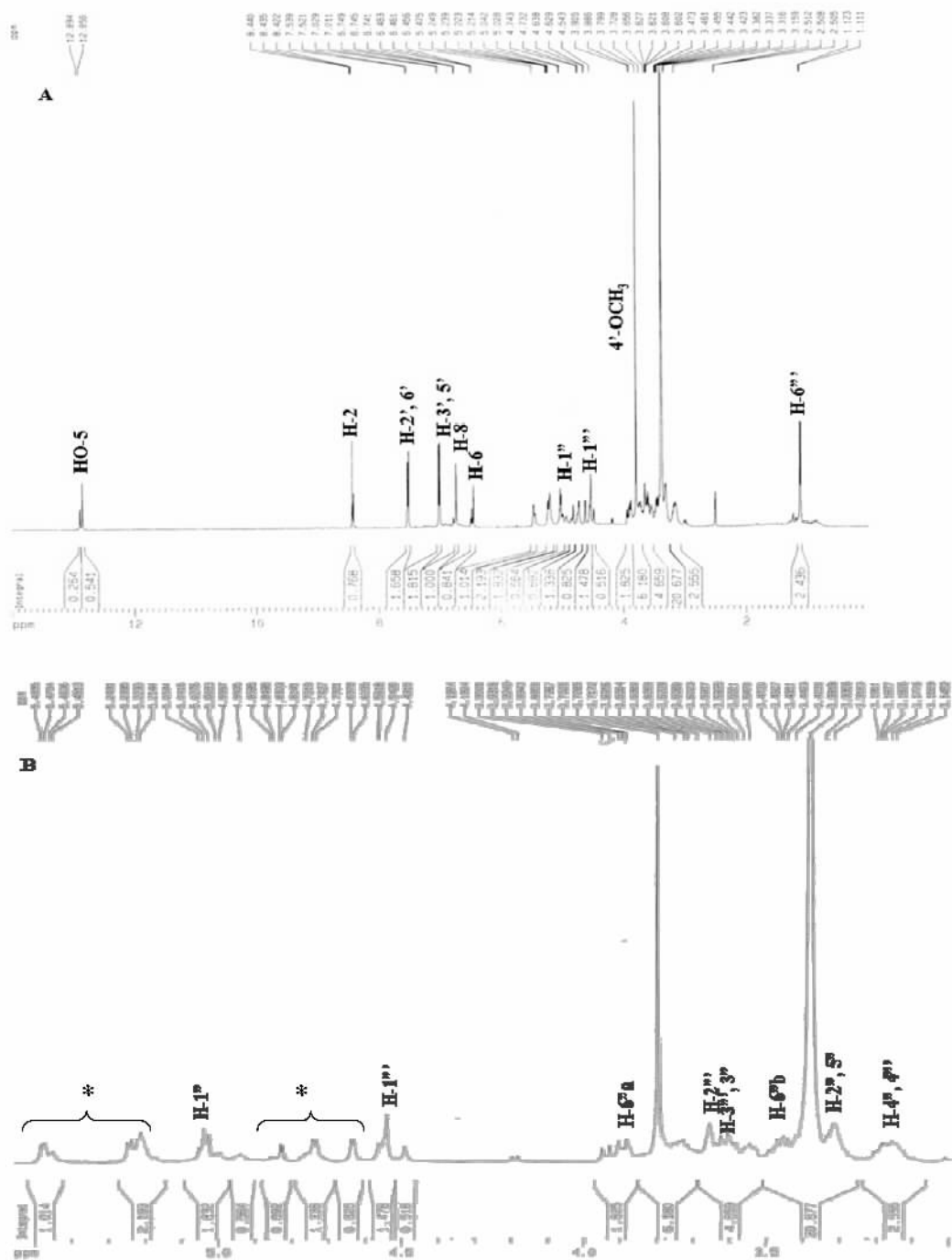


Tabela 16. Dados de RMN ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) do derivado 10A

C	10A	
	δ_{C}	δ_{H} (<i>mult.</i> ; <i>J</i> (Hz))
2	151,62	7,85 (<i>s</i>)
3	125,26	-
4	174,30	-
5	150,77	-
6	101,67	6,86 (<i>d</i> ; 2,0)
7	159,35	-
8	97,98	7,06 (<i>d</i> ; 2,0)
9	158,32	-
10	109,60	-
1'	123,60	-
2'	130,09	7,70 (<i>d</i> ; 8,0)
3'	114,70	7,05 (<i>d</i> ; 8,8)
4'	159,35	-
5'	113,78	7,05 (<i>d</i> ; 8,0)
6'	130,09	7,70 (<i>d</i> ; 8,0)
1''	97,98	4,93 (<i>d</i> ; 6,0)
2''	70,68	5,23 (<i>m</i>)
3''	72,29	5,23 (<i>m</i>)
4''	68,45	5,36 (<i>m</i>)
5''	73,36	3,86 (<i>m</i>)
6''	66,44	3,55 (<i>m</i>)
1'''	97,77	4,93 (<i>sl</i>)
2'''	68,93	4,98 (<i>sl</i>)
3'''	70,56	5,02 (<i>sl</i>)
4'''	68,45	5,17 (<i>m</i>)
5'''	69,70	3,96 (<i>m</i>)
6'''	17,08	1,11 (<i>d</i> ; 6,0)
4'-OCH ₃	55,04	3,75 (<i>s</i> ; 3H)
AcO 5; 2''; 3''; 4''; 2'''; 3'''; 4'''	168,99; 169,20; 169,45; 169,69; 169,90	2,05-2,34



* vestígios de outra substância

Figura 70. [A] Espectro de RMN de ${}^1\text{H}$ (500 MHz, DMSO-d_6) de 10; [B] Expansão na região entre δ_{H} 3,14-5,48 ppm.

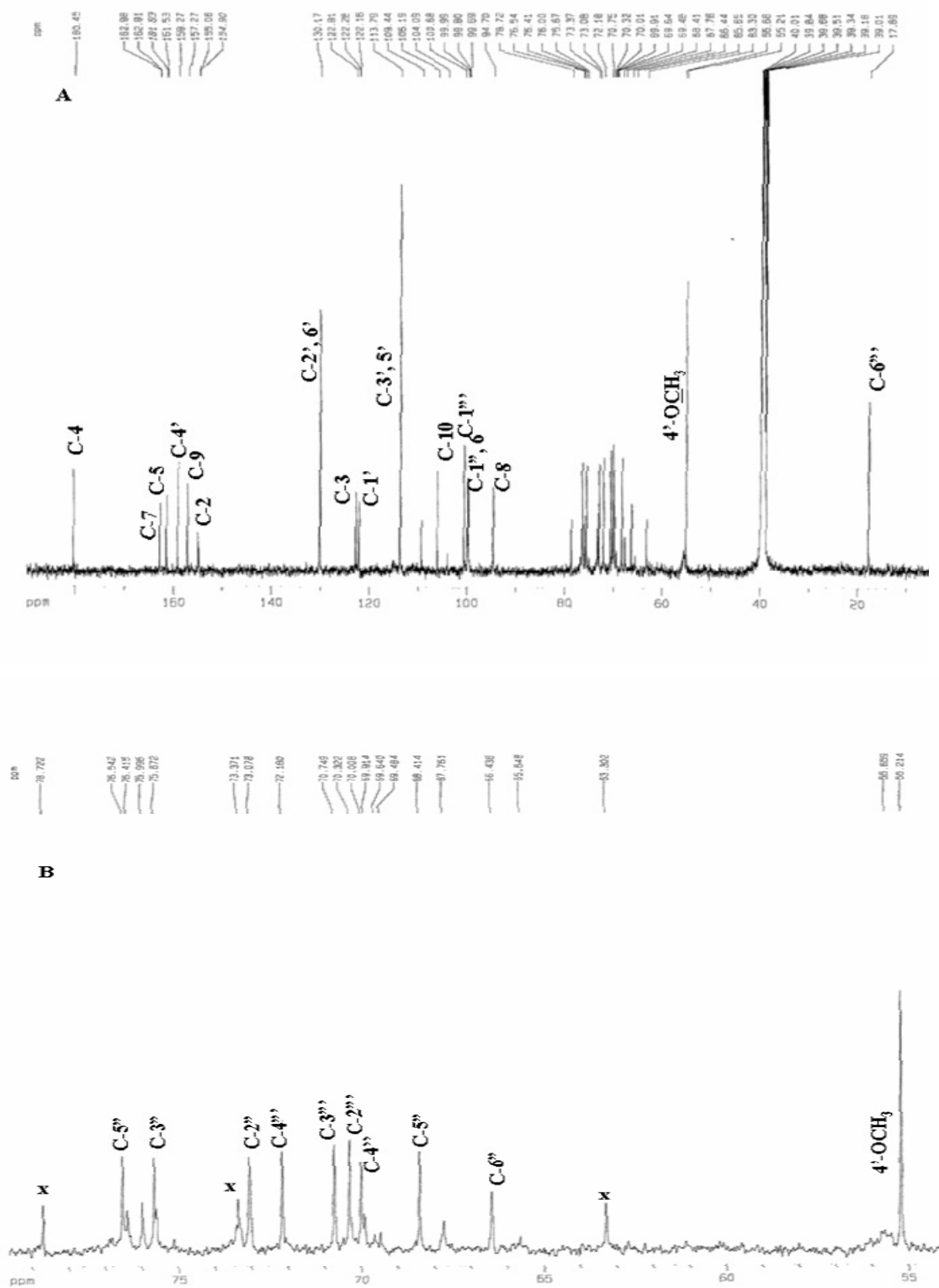


Figura 71. [A] Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, BBD, DMSO- d_6) de 10; [B] expansão na região entre δ_{C} 55,21- 78,72 ppm.

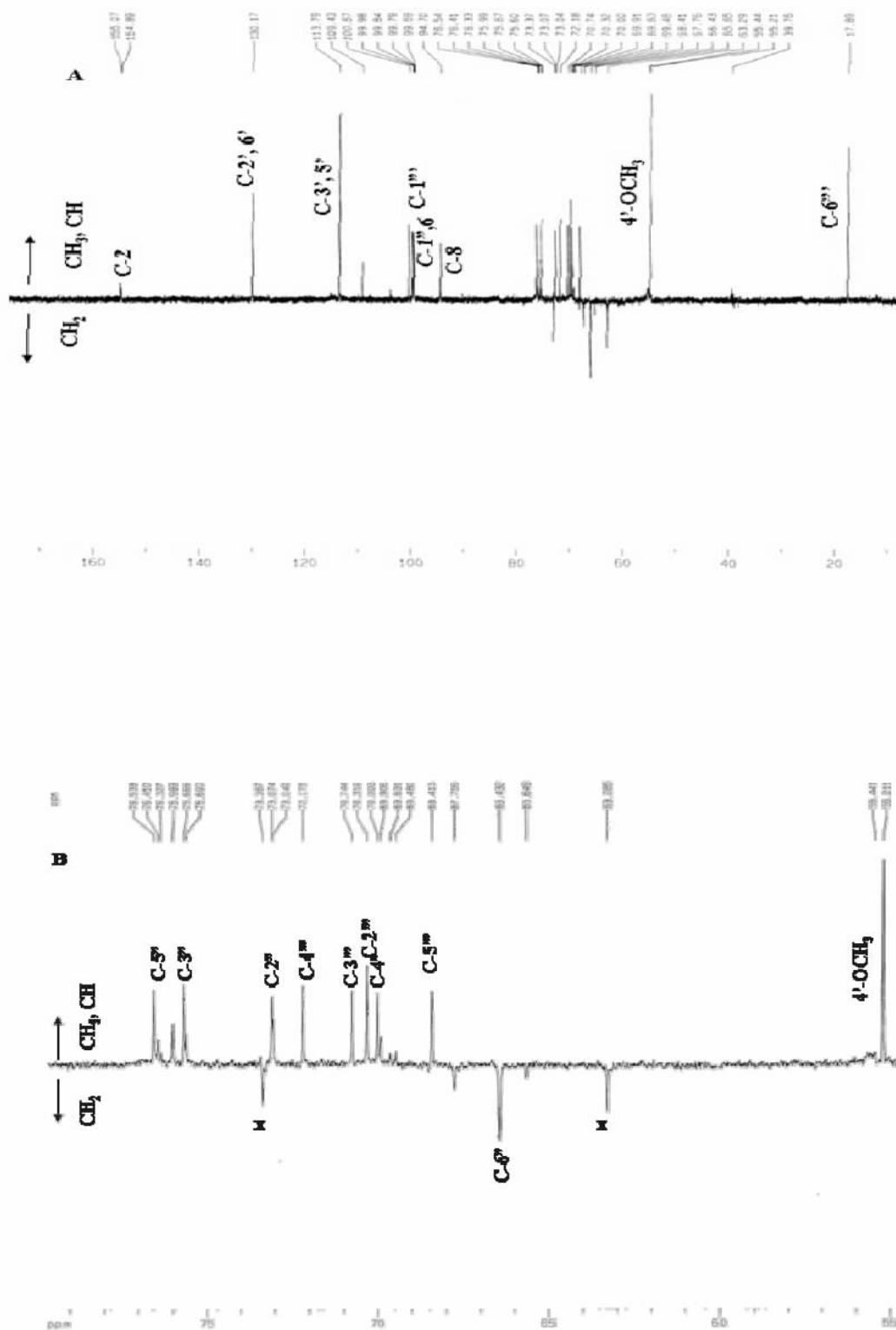


Figura 72. [A] Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, DEPT 135°, DMSO-d₆) de 10 e [B] Expansão na região entre δ_C 76,53-55,21 ppm.

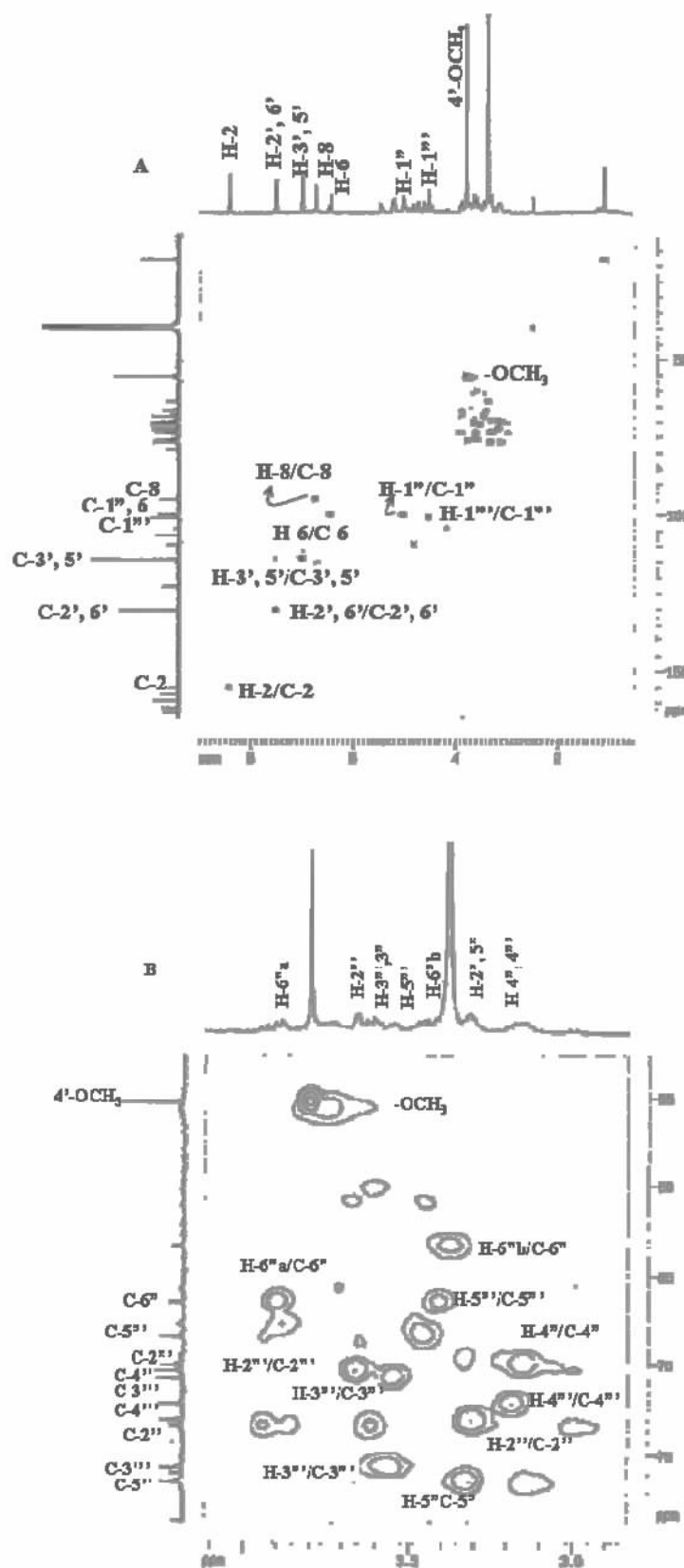


Figura 73. [A] Mapa de contornos HMQC (125 MHz, DMSO- d_6) de 10; [B] Expansão na região entre δ_C 53,0-77,0 ppm e δ_H 2,90-4,10 ppm.

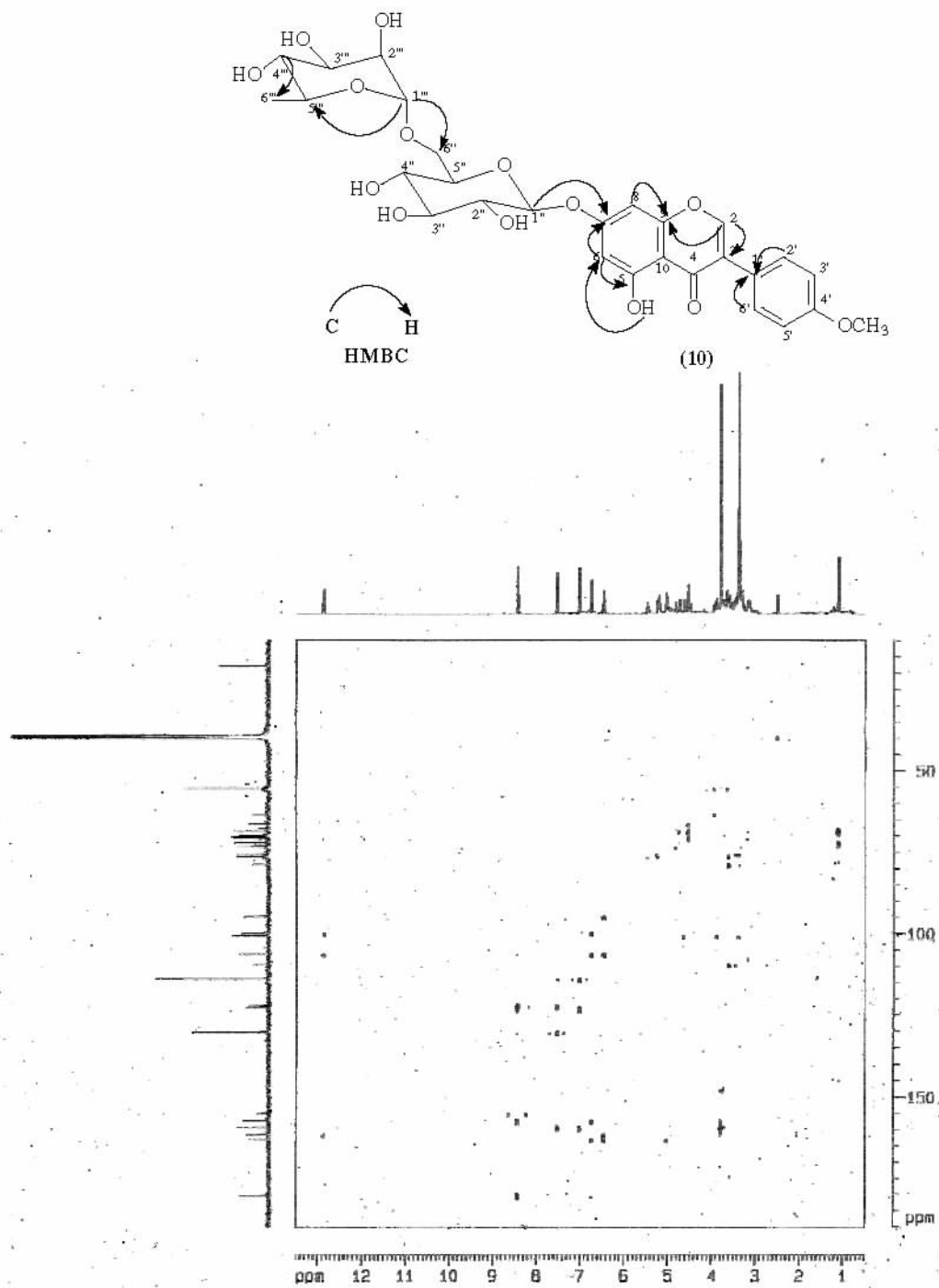


Figura 74. Mapa de contornos HMBC (125 MHz, DMSO- d_6) e algumas correlações observadas para a substância 10.

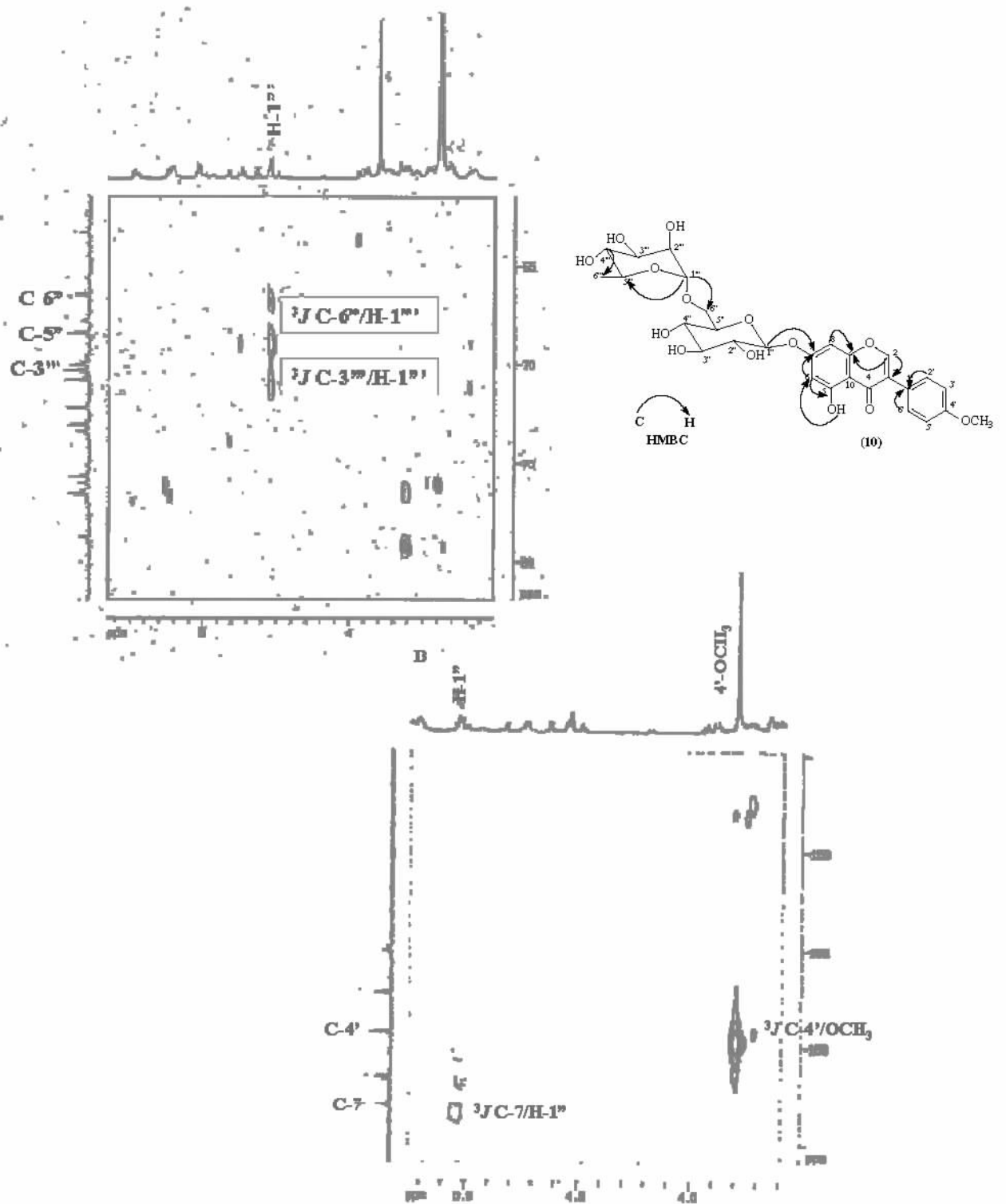


Figura 75. Expansões do mapa de contornos HMBC (125 MHz, DMSO-d₆) de 10 nas regiões entre: [A] δ_C 62,0-81,0 ppm e δ_H 3,10-5,60 ppm e [B] δ_C 62,0-81,0 ppm e δ_H 3,10-5,60 ppm.

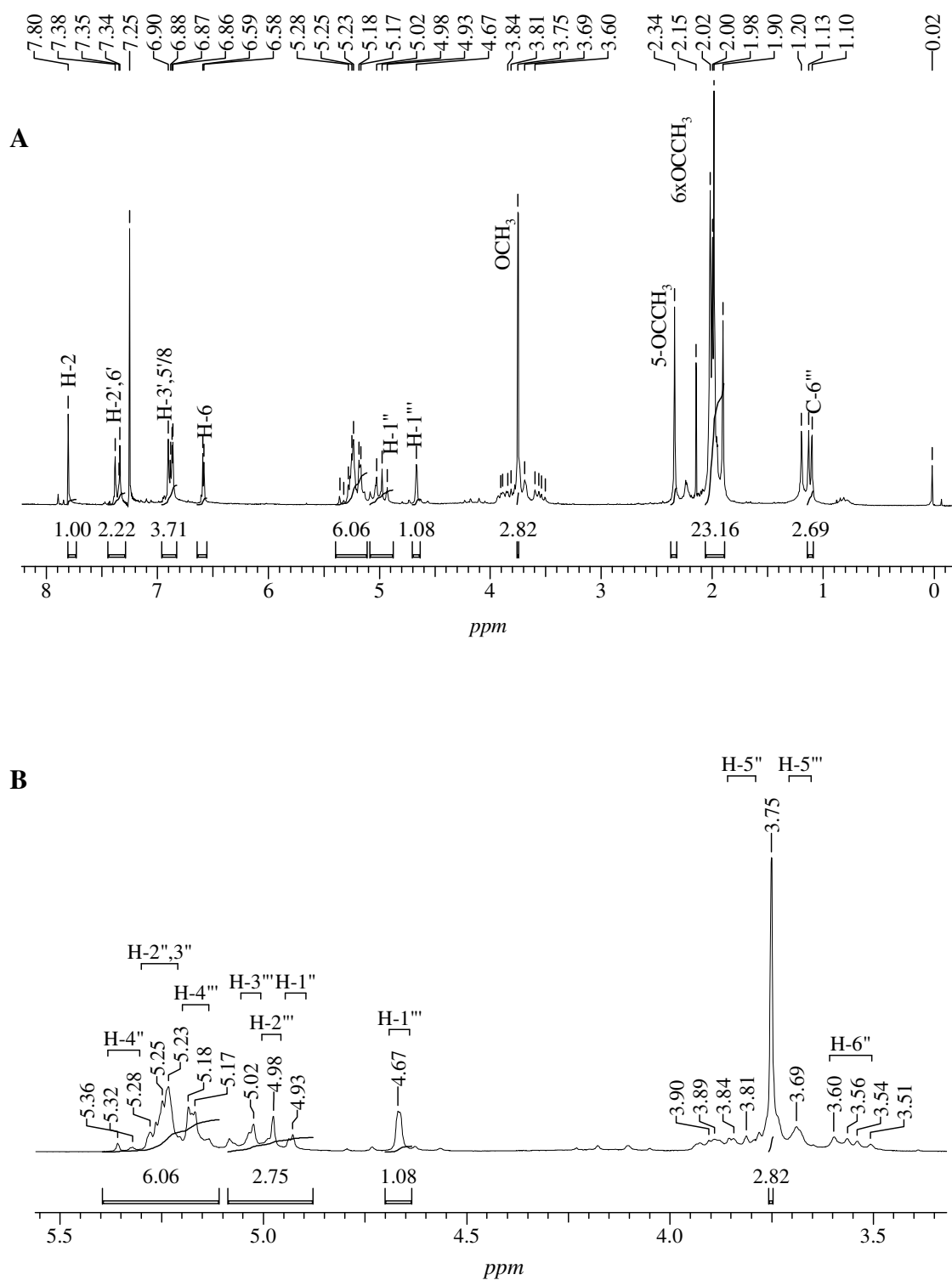


Figura 76. [A] Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) de 10A; [B] Expansão na região entre δ_H 3,50-5,5 ppm.

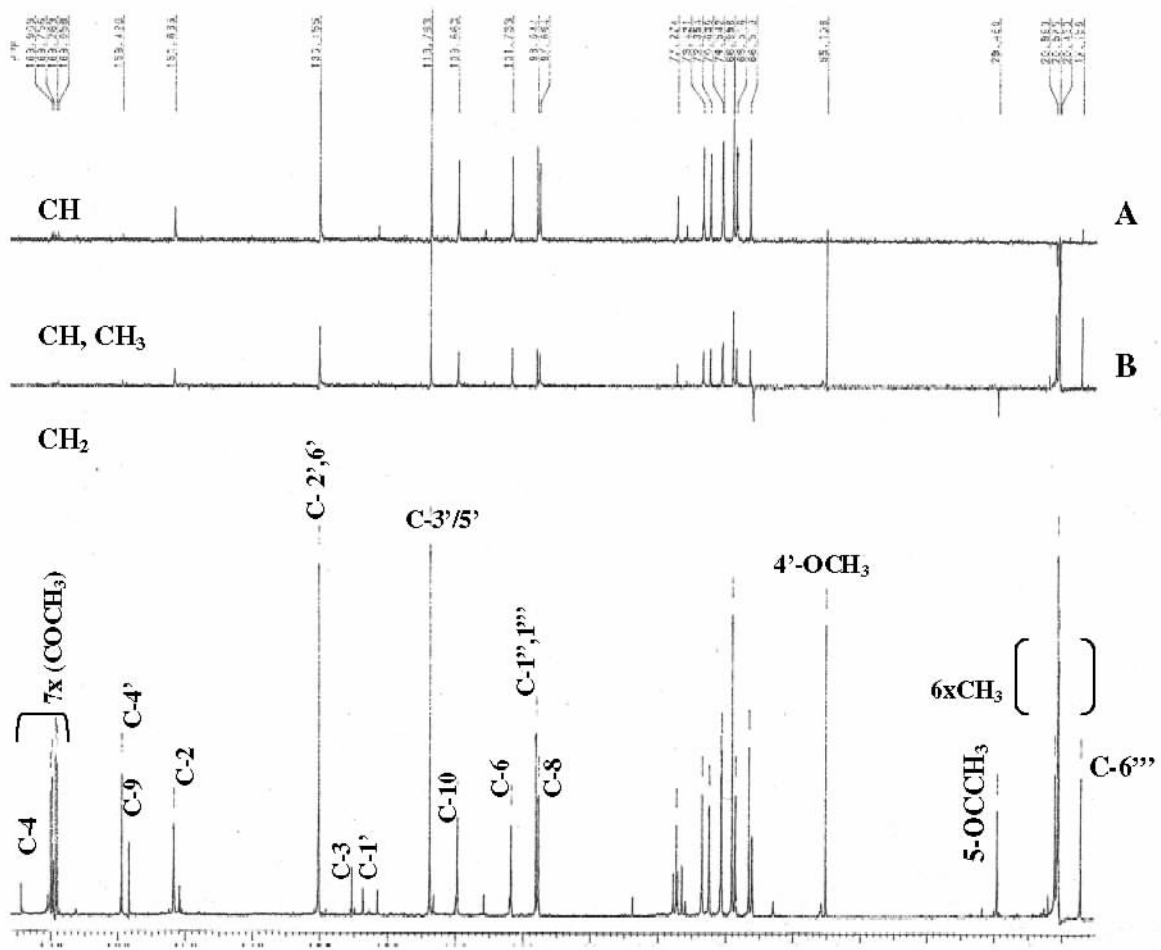


Figura 77. Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 90°[A] e 135°[B], CDCl_3) de 10A.

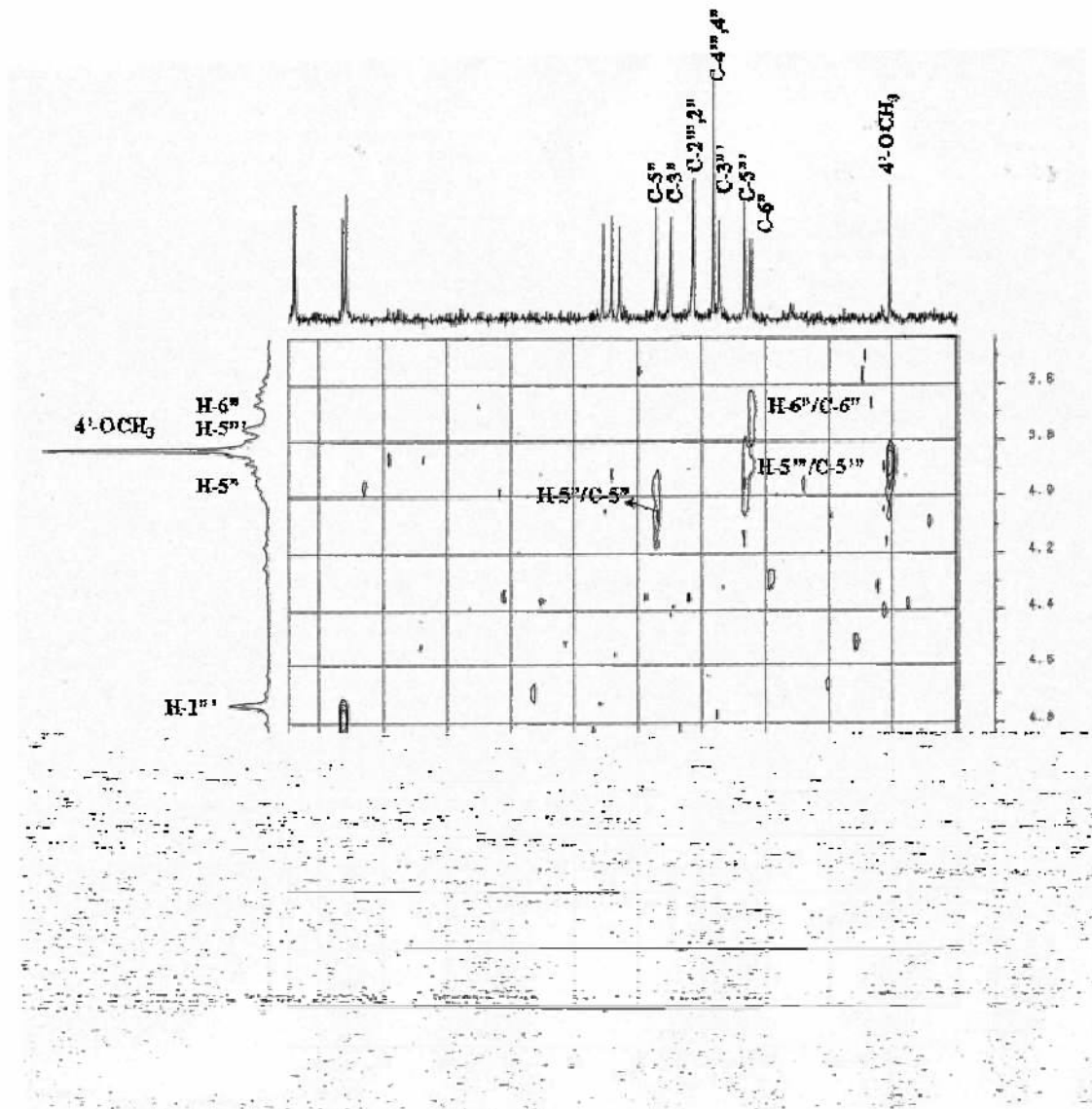


Figura 78. Mapa de contornos $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY (50 MHz, CDCl_3) de 10A.

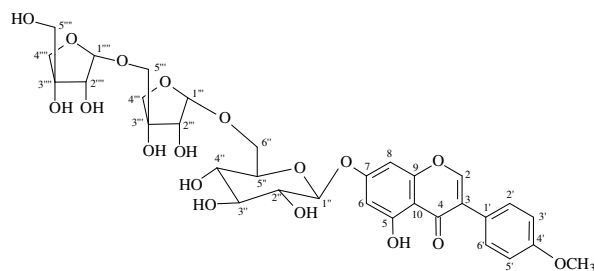
4.1.1.1.12 Identificação da substância 11

Por comparação dos valores de deslocamento químico dos sinais do hidrogênio da metila e dos localizados nas regiões de frequência média e alta, também pelo o cálculo das constantes de acoplamentos, confirmou-se a porção aglicona como derivada da biochanina A (2). Além da confirmação da porção aglicona, era necessário confirmar se os sinais presentes na região de deslocamento químico de açúcares estariam conectados a molécula de biochanina A (2). O espectro de RMN de ^1H (Figura 79; p. 120) revelou a presença de três unidades de açúcar pelos sinais de três hidrogênios anoméricos em δ_{H} 5,05 (d , $J=7,3$ Hz, H-1''), δ_{H} 4,82 (d , $J=1,7$ Hz, H-1''') e δ_{H} 4,81 (d , $J=1,7$ Hz, H-1''''). O mapa de contornos $^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY (Figura 80; p. 121) apenas indicou os acoplamentos entre as unidades de açúcar δ_{H} 5,05 (H-1'') e δ_{H} 3,28 (H-2''); δ_{H} 4,82 (H-1''') e δ_{H} 3,75 (H-2''') e δ_{H} 3,13 (H-4'') e δ_{H} 3,62 (H-5''), e entre os hidrogênios do anel B do isoflavonóide.

O espectro de RMN de ^{13}C BBD (Figuras 81 e 82; p. 122 e 123) mostrou sinais de 14 carbonos na região de açúcares. Destes sinais o sinal em δ_{CH} 109,02, mostrou-se bastante intenso e bem característico do carbono anomérico da apiose (BREITMAIER & VOELTER, 1989). Pela intensidade do sinal, este foi atribuído aos carbonos C-1'' e C-1'''' e confirmou a presença de duas unidades β -apiofuranosil. Pela análise do espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (Figura 83; p. 123) puderam ser observados 4 sinais de CH_2 , sendo que o de maior intensidade δ_{CH_2} 73,40 foi atribuído aos carbonos C-4''' e C-4'''' , δ_{CH_2} 63,08 e 69,35 aos carbonos C-5''' e C-5'''' , todos referentes as duas unidades de apiose. O sinal em δ_{CH_2} 67,67 e do carbono anomérico remanescente δ_{CH} 99,75 (C-1'') foram atribuídos a uma unidade de glicose segundo valores descritos na literatura (BREITMAIER & VOELTER, 1989).

O mapa de contornos HMQC (Figura 84; p. 124) permitiu atribuição de todos os valores de deslocamentos químicos dos carbonos hidrogenados que podem ser conferidos na Tabela 17; p. 119.

Pela análise do mapa de contornos HMBC (Figuras 85, 86 e 87; p. 125, 126 e 127) e pela verificação do alto deslocamento químico dos carbonos C-6'' (δ_{CH_2} 67,67) e C-5''' (δ_{CH_2} 69,35), os pontos de conexão entre as unidades de açúcar foram confirmados sugerindo ligações interglicosídicas do tipo apiofuranosil (1'''' \rightarrow 5''') apiofuranosil (1''' \rightarrow 6'') glicopiranosil (RAMESH & YURAJAN, 1995; SILVA *et al.*, 2000; FARAG *et al.*, 2001). Portanto, o mapa de contornos HMBC (Figuras 85, 86 e 87; p. 125, 126 e 127) confirmou as correlações supostas entre os hidrogênios da metoxila (δ_{H} 3,79) e o carbono C-4' (δ_{C} 159,23) ($^3J_{\text{CH}}$); hidrogênios anoméricos H-1'' (δ_{H} 5,05) e o C-7 (δ_{C} 162,96) ($^3J_{\text{CH}}$); H-1'''' (δ_{H} 4,81) e o carbono C-6'' (δ_{CH_2} 67,67) ($^3J_{\text{CH}}$); H-5''' (δ_{H} 5,53) e C-1'''' (δ_{CH} 109,02) ($^3J_{\text{CH}}$). O carbono C-1''' da unidade apiofuranosil 1-substituída (δ_{CH} 109,02) e C-5''' da unidade apiofuranosil 5-substituída (δ_{CH_2} 69,35), respectivamente, confirmaram a seqüência dos três açúcares, que estão de acordo com os valores registrados literatura para a biochanina A 7-*O*- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 5)- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosídeo (11) isolada anteriormente das raízes de *Andira inermis* (SILVA *et al.*, 2000) e das cascas do tronco de *Dalbergia sissoo* (FARAG *et al.*, 2001).

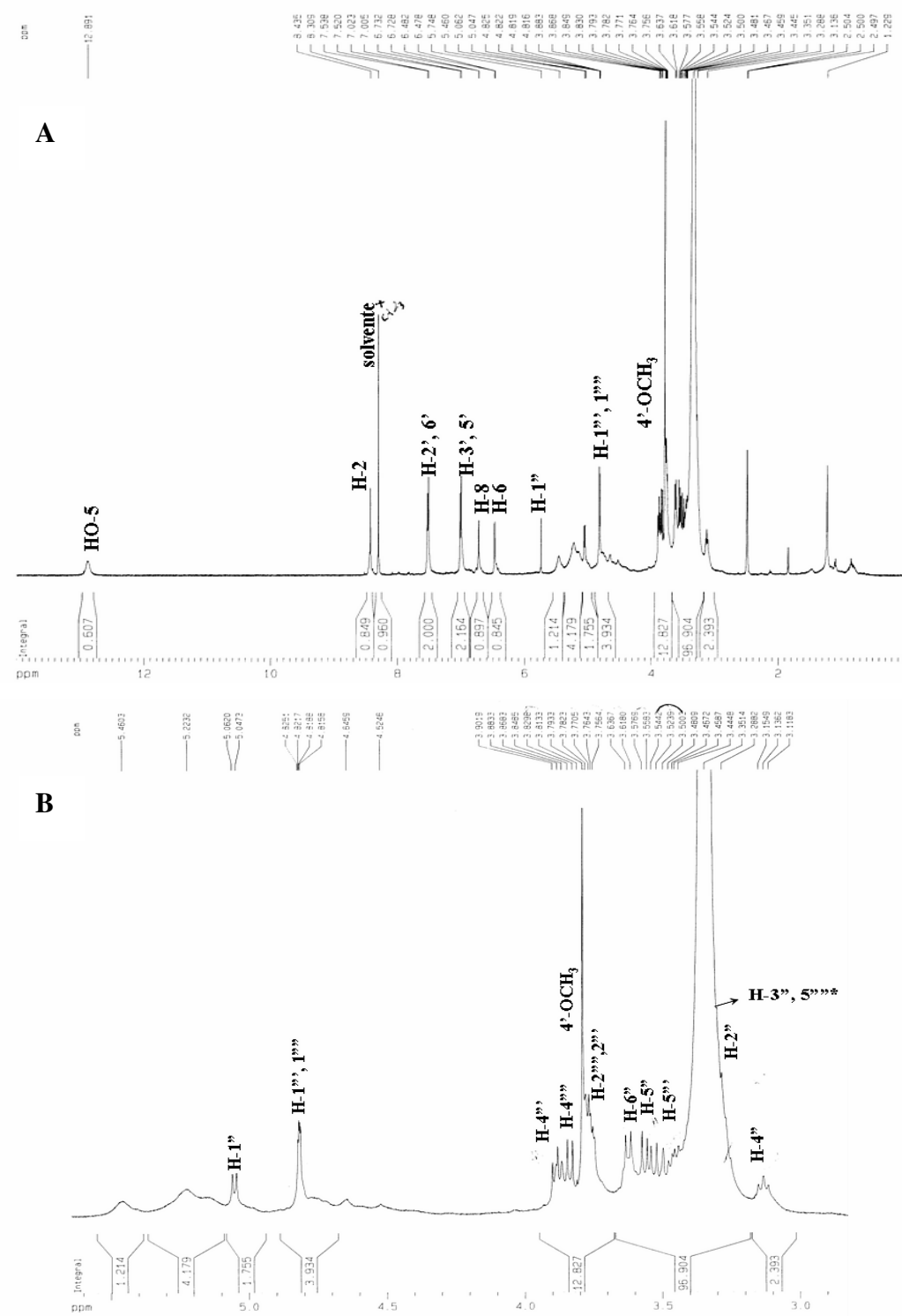


biochanina A 7-O-β-D-apiofuranosil-(1→5)-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosídeo (11)

Tabela 17. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) 1D e 2D da substância 11

C	(SILVA <i>et al.</i> , 2000)*		11*			
	δ_{C}	δ_{H}	HMQC (1J)		HMBC ($^{2,3}J$)	$(^1\text{H} \times ^1\text{H})$ COSY
			δ_{C}	δ_{H} ; (<i>mult.</i> ; <i>J</i> Hz)		
2	154,8	8,42 (<i>s</i>)	154,89	8,44 (<i>s</i>)	-	-
3	122,2	-	122,24	-	H-2, H-2', H-6'	-
4	180,4	-	180,43	-	H-2	-
5	161,6	-	161,65	-	H-6	-
6	99,6	6,48 (<i>s</i>)	99,67	6,48 (<i>d</i> ; 2,0)	H-8	-
7	162,9	-	162,96	-	H-1'', H-6, H-8	-
8	94,5	6,72 (<i>s</i>)	94,58	6,73 (<i>d</i> ; 2,0)	-	-
9	157,2	-	157,28	-	-	-
10	106,1	-	106,17	-	H-8, H-6	-
1'	122,7	-	122,76	-	H-2', H-3', H-5', H-6'	-
2'/6'	130,1	7,52 (<i>d</i> ; 8,4)	130,20	7,53 (<i>d</i> ; 9,0)	-	H-3'/H-5'
3'/5'	113,7	7,01 (<i>d</i> ; 8,8)	113,77	7,01 (<i>d</i> ; 9)	-	H-2'/H-6'
4'	159,2	-	159,23	-	H-2', H-3', H-5', H-6'	-
1''	99,8	5,05 (<i>d</i> ; 7,3)	99,75	5,05 (<i>d</i> ; 7,3)	H-2''	H-2''
2''	73,0	3,28 (<i>m</i>)	73,02	3,28 (<i>m</i>)	-	H-1'', H-3''
3''	76,2	3,29 (<i>m</i>)	76,25	3,28 (<i>m</i>)	-	H-2''
4''	69,7	3,13 (<i>t</i> ; 8,8)	69,77	3,13 (<i>t</i> ; 9,0)	-	H-5''
5''	75,5	3,61 (<i>m</i>)	75,53	3,62 (<i>d</i> ; 9,0)	-	H-4''
6''	67,6	3,88 (<i>d</i> ; 11)	67,67	3,82 (<i>d</i> ; 7,9)	-	-
1'''	109,0	4,82 (<i>d</i> ; 2,9)	109,02	4,82 (<i>d</i> ; 1,5)	H-6'''	-
2'''	76,3	3,74 (<i>d</i> ; 2,9)	76,34	3,75 (<i>m</i>)	-	-
3'''	77,4	-	77,45	-	-	-
4'''	73,4	3,89 (<i>d</i> ; 9,2)	73,40	3,89 (<i>d</i> ; 9,0)	-	-
5'''	69,3	3,53 (<i>d</i> ; 9,9)	69,35	3,53 (<i>m</i>)	-	-
1''''	109,0	4,81 (<i>d</i> ; 2,9)	109,02	4,81 (<i>d</i> ; 1,5)	-	-
2''''	75,6	3,75 (<i>d</i> ; 2,9)	75,64	3,75 (<i>m</i>)	-	-
3''''	78,7	-	78,76	-	-	-
4''''	73,4	3,83 (<i>d</i> ; 9,5)	73,40	3,82 (<i>d</i> ; 8,25)	-	-
5''''	63,1	3,32 (<i>m</i>)	63,08	-	-	-
5-OH	-	-	-	12,89 (<i>s</i>)	-	-
4'-OCH ₃	55,1	3,79 (<i>s</i>)	55,18	3,79 (<i>s</i>)	-	-

*: DMSO- d_6



*os sinais dos hidrogênios H-3''' e H-5'''' encontram-se suprimidos pelo sinal da água do DMSO-d₆
Figura 79. [A] Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) de 11; [B] Expansão na região entre δ_H 3,11 ppm-5,46 ppm.

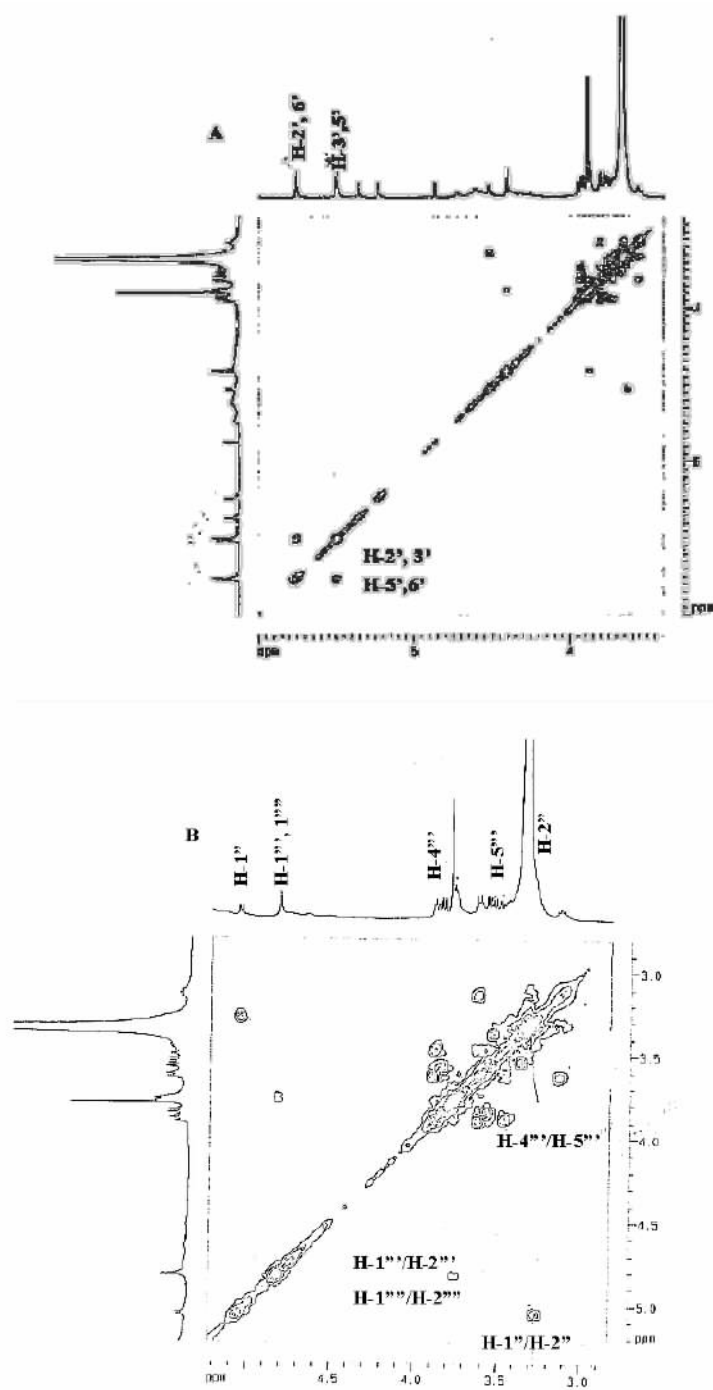


Figura 80. [A] Mapa de contornos $^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY (500MHz, DMSO- d_6) de 11, [B] Expansão na região entre δ_{H} 2,9- 5,2 ppm.

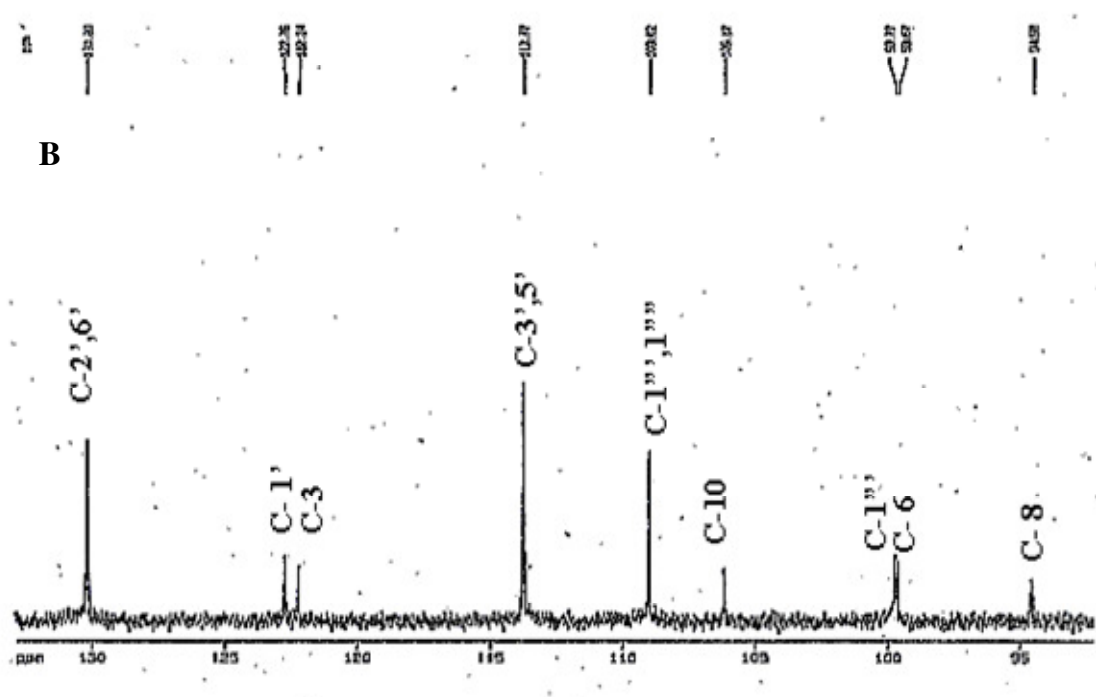
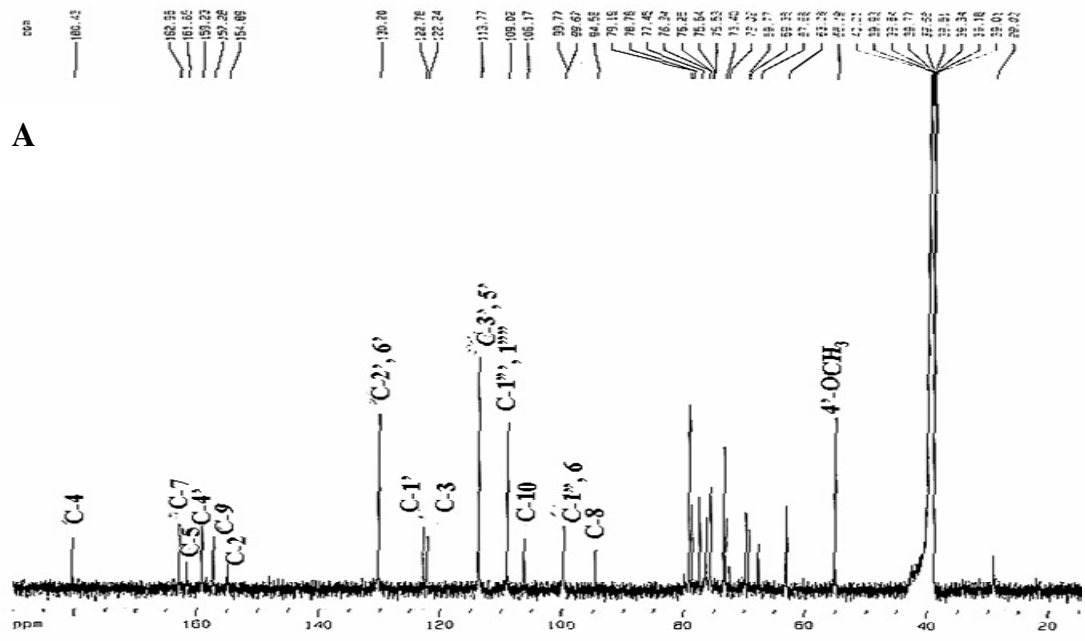


Figura 81. [A] Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, BBD, DMSO-d_6) de 11; [B] Expansão na região entre δ_{C} 130,20 ppm-94,58 ppm.

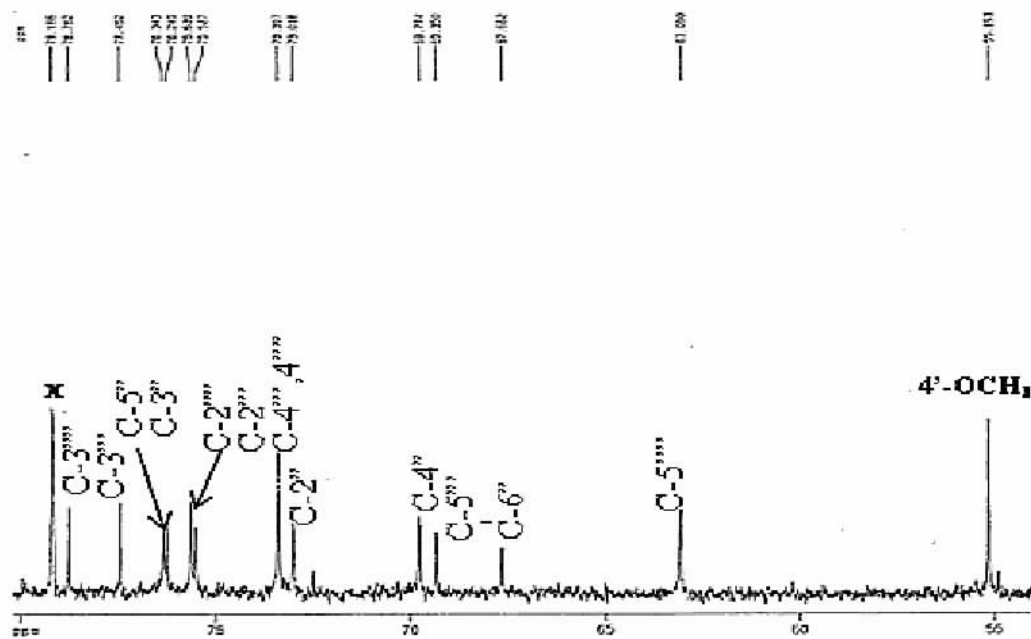


Figura 82. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, BBD, DMSO-d_6) de 11 na região entre δ_{C} 79,18 ppm-55,19 ppm.

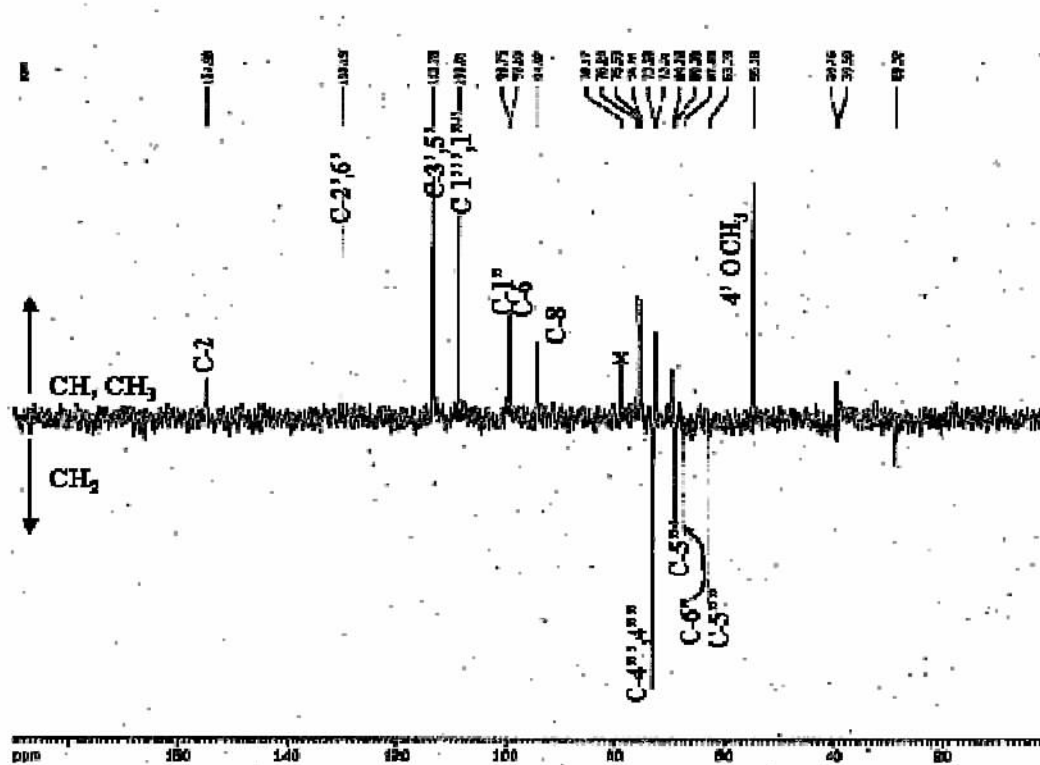


Figura 83. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, DEPT 135°, DMSO-d_6) de 11.

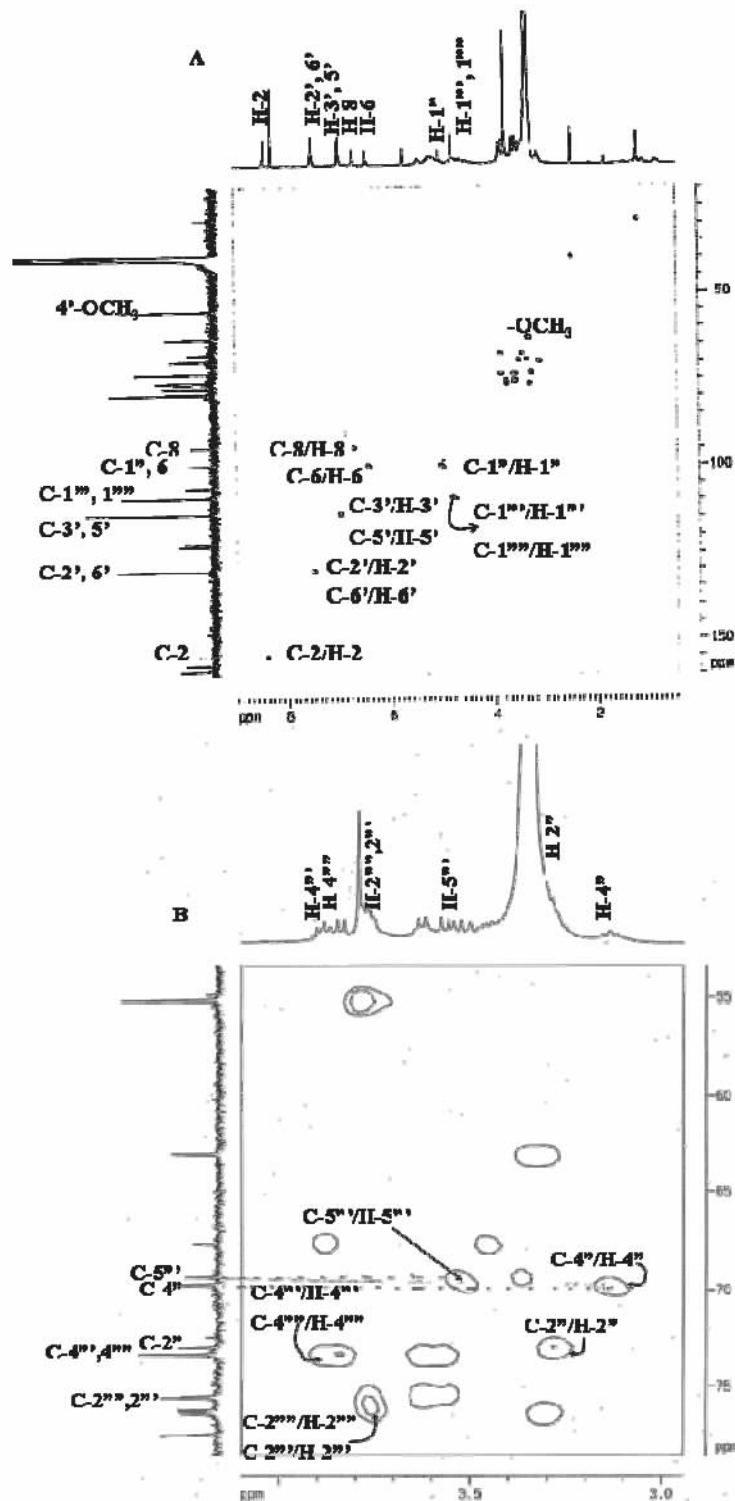


Figura 84. [A] Mapa de contornos HMQC (125 MHz, DMSO- d_6) de 11, [B] Expansão na região entre δ_C 55,0-80,0 ppm e δ_H 3,0-4,0 ppm.

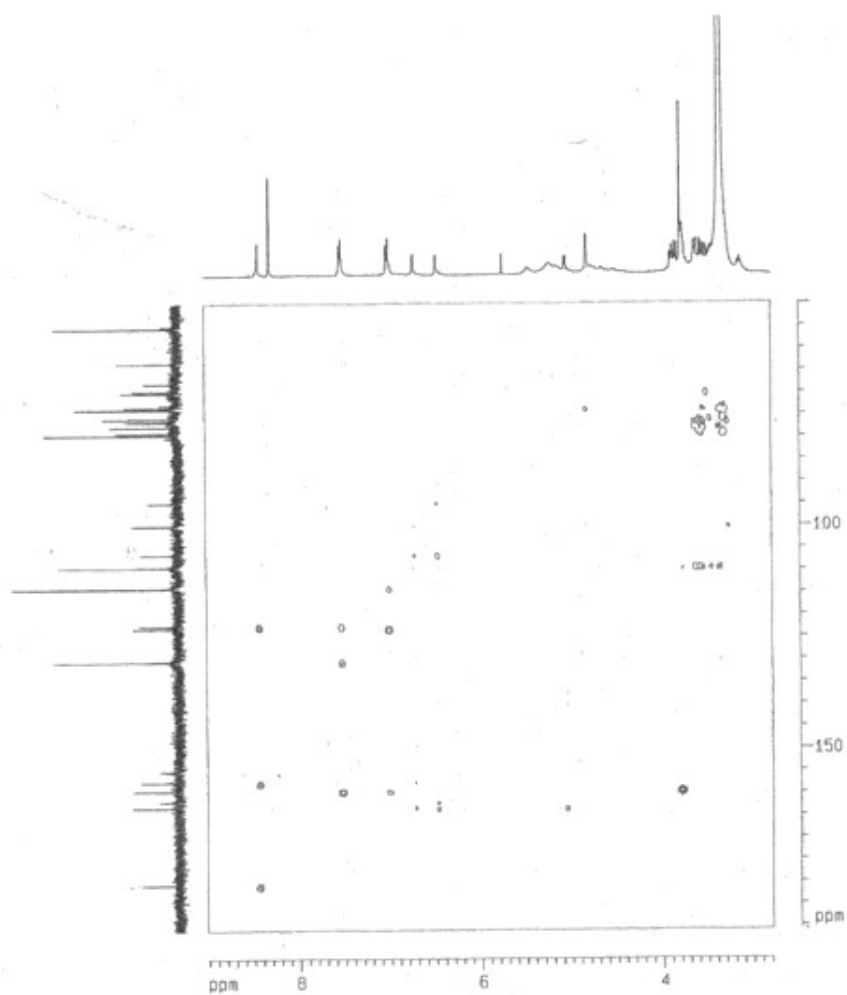
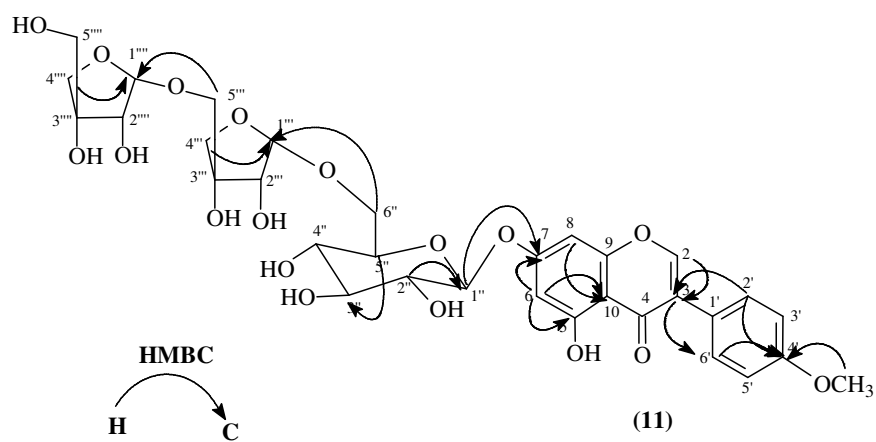


Figura 85. Mapa de contornos HMBC (125 MHz, DMSO- d_6) e correlações observadas para a substância 11.

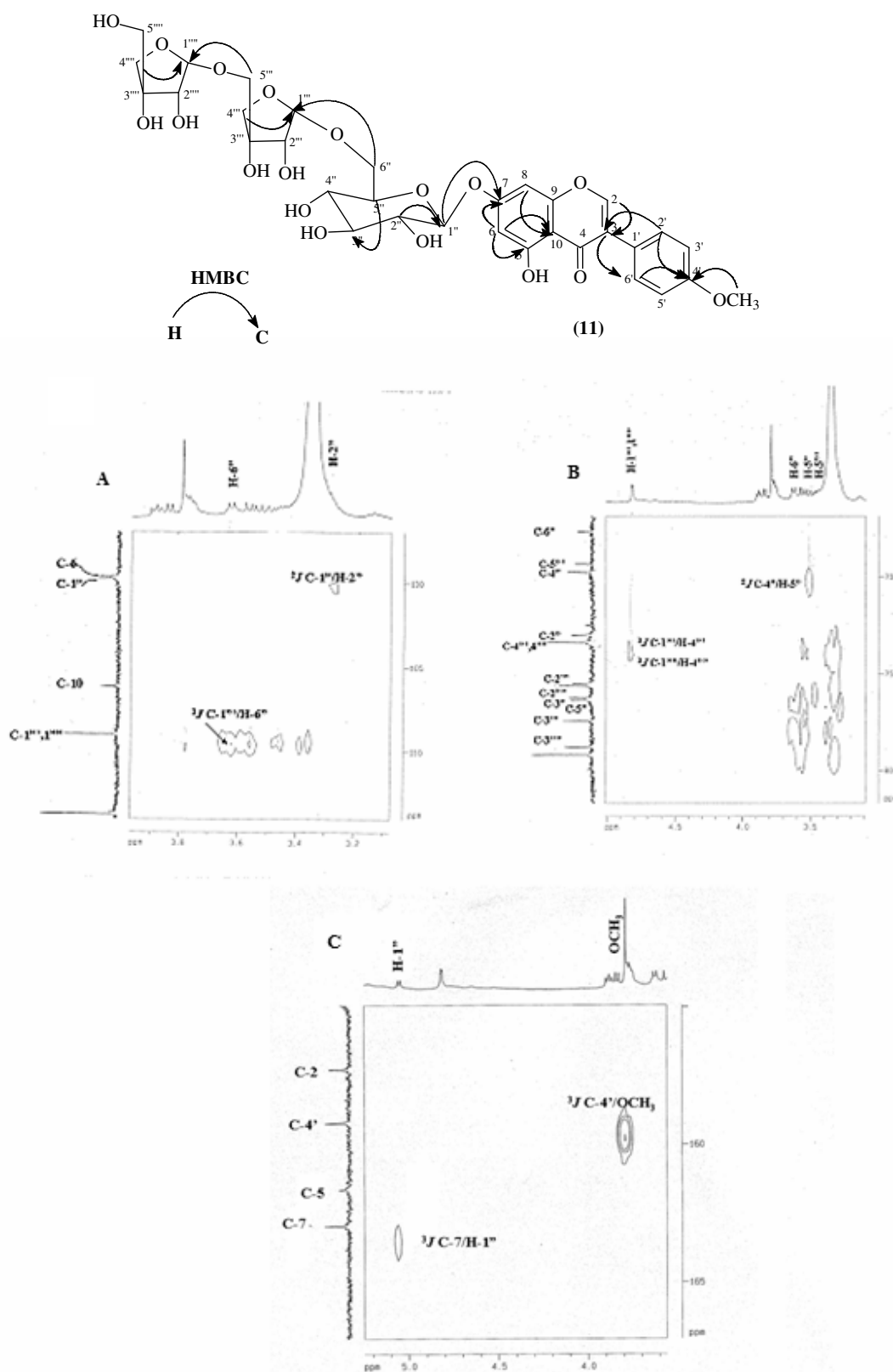


Figura 86. Expansões do mapa de contornos HMBC (125 MHz, DMSO- d_6) de 11 nas regiões entre: [A] δ_C 95,0-113,0 ppm e δ_H 3,1-3,9 ppm, [B] δ_C 65,0-82,0 ppm e δ_H 3,1-4,9 ppm e [C] δ_C 155,0-167,0 ppm e δ_H 3,5-5,1 ppm.

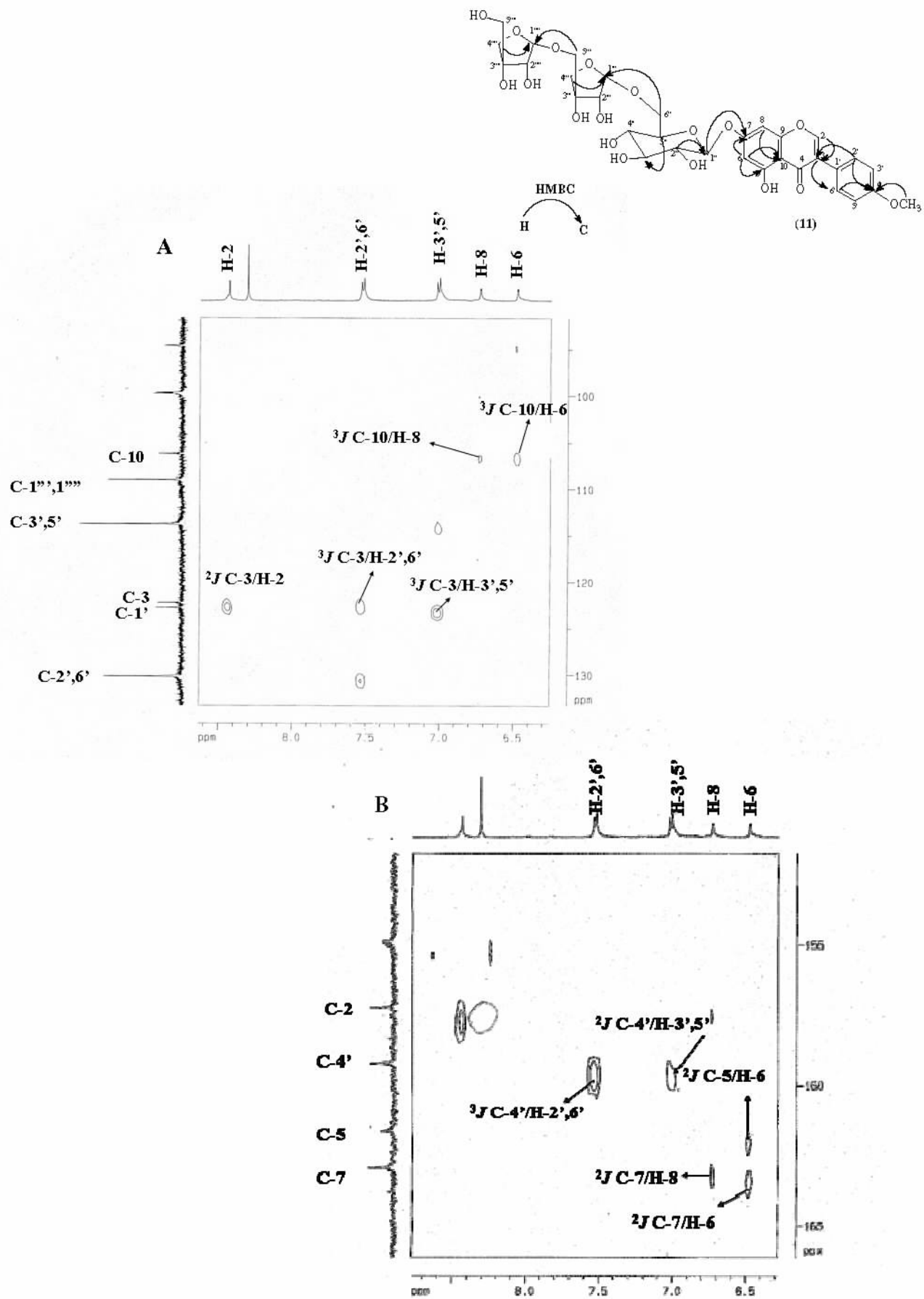


Figura 87. Expansões do mapa de contornos HMBC (125 MHz, DMSO-d₆) de 11 nas regiões entre: [A] δ_C 95,0-130,0 ppm e δ_H 6,3-8,5 ppm e [B] δ_C 150,0-165,0 ppm e δ_H 6,3-8,6 ppm.

4.1.1.1.13 Identificação da substância 12

O espectro de RMN de ^1H de **12** (Figura 89; p. 130) mostrou 5 sinais na região de hidrogênios em sistemas aromáticos em δ_{H} 5,86 (*d*, $J=2,4$ Hz, H-8), δ_{H} 6,01 (*d*, $J=2,4$ Hz, H-6), confirmando a presença de acoplamento em *meta*, certamente no anel A, e os deslocamentos químicos em δ_{H} 6,76 (*m*, H-5',6') e δ_{H} 6,88 (*d*, $J=2,0$ Hz, H-2') relativos um anel trissubstituído, muito comum em anel B de flavonóides. No entanto, os sinais na região de frequência média, a multiplicidade e os valores das constantes de acoplamento verificadas entre o H-2 em δ_{H} 4,54 (*d*, $J=8,0$ Hz) com os hidrogênios H-4 β em δ_{H} 2,52 (*dd*, $J=8,60$ e $16,0$ Hz, H-4 β), H-4 α em δ_{H} 2,90 (*dd*, $J=6,0$ e $16,0$ Hz, H-4 α) e H-3 em δ_{H} 4,0 (*td*, $J=8,0$; $8,8$; $6,0$ Hz); inclusive este último com os hidrogênios H-4 β e H-4 α , sugeriram o esqueleto de um flavan-3-ol (Figura 88; p. 128).

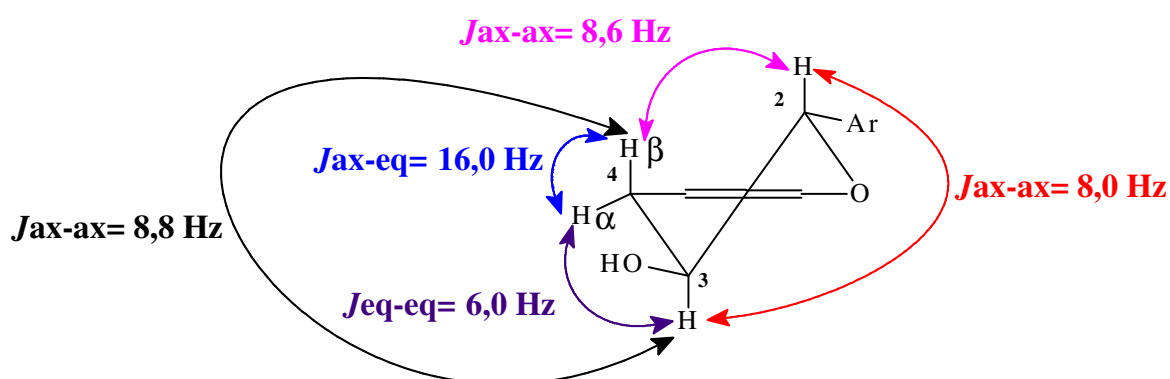
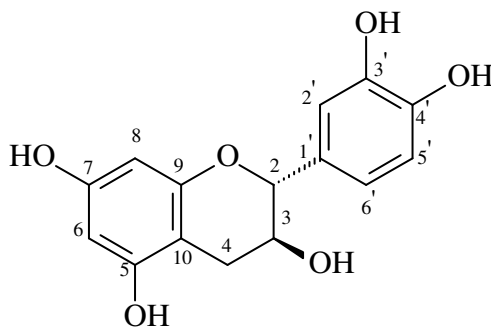


Figura 88. Representação da configuração adotada pelos hidrogênios do anel C de **12**.

O espectro de RMN de ^{13}C BBD (Figura 90; p. 131) apresentou 14 sinais, sendo um dos sinais atribuídos a dois carbonos C-3' e C-4' em δ_{CH} 145,89, ambos protegidos em *orto* pelo efeito mesomérico exercido pelas hidroxilas sustentadas pelos carbonos vicinais. A ausência do sinal correspondente a carbonila, a presença dos sinais atribuídos aos carbonos metínicos δ_{CH} 82,78 (C-2) e δ_{CH} 68,53 (C-3), e metilênico δ_{CH_2} 28,98 (C-4), concordam com as informações fornecidas pelo RMN de ^1H . Todas as atribuições de ^1H e ^{13}C mostradas na Tabela 18 (p. 129) foram, portanto, confirmadas por comparação dos dados espectrais de **12** com valores dos deslocamentos químicos encontrados para a molécula de catequina, descrita na literatura por FOO & KARCHESY (1989).

O espectro de massas (Figura 91; p. 131) confirma a fórmula molecular da catequina $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ pelo pico em m/z 270, e mostra a característica fragmentação fornecida pela reação retro Diels-Alder m/z 152 (41%) (Esquema 17; p. 132). Este flavan-3-ol, muito encontrado na família Leguminosae, foi isolado pela primeira vez no gênero *Andira* das frações mais polares do extrato metanólico das raízes de *Andira anthelmia*.



catequina (12)

Tabela 18. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) da substância 12

C	(FOO & KARCHESY, 1989)*		12*1	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H} (mult.; J Hz)
2	82,56	4,59 (<i>d</i> ; 7,5)	82,78	4,55 (<i>d</i> ; 7,74)
3	68,33	4,04 (<i>m</i>)	68,53	4,0 (<i>td</i> , 8,0; 8,8; 6,0)
4 α 4 β	28,66	2,93 (<i>dd</i> ; 16,1 e 5,3) 2,56 (<i>dd</i> ; 16,1 e 8,2)	28,98	2,90 (<i>dd</i> ; 16,0 e 5,3) 2,52 (<i>dd</i> ; 16,0 e 8,6)
5	157,14	-	157,89	-
6	96,17	5,90 (<i>d</i> ; 2,2)	96,39	5,86 (<i>d</i> ; 2,4)
7	157,63	-	157,44	-
8	95,45	6,04 (<i>d</i> ; 2,2)	95,58	6,01 (<i>d</i> ; 2,4)
9	156,82	-	156,99	-
10	100,60	-	100,76	-
1'	132,09	-	132,15	-
2'	115,20	6,91 (<i>d</i> ; 1,5)	115,95	6,88 (<i>d</i> ; 2,0)
3'	145,58	-	145,89	-
4'	145,64	-	145,89	-
5'	115,33	6,76 (<i>m</i>)	115,47	6,76 (<i>m</i>)
6'	120,04	6,76 (<i>m</i>)	120,26	6,76 (<i>m</i>)

*: MeOD₄

*1: Acetona-d₆

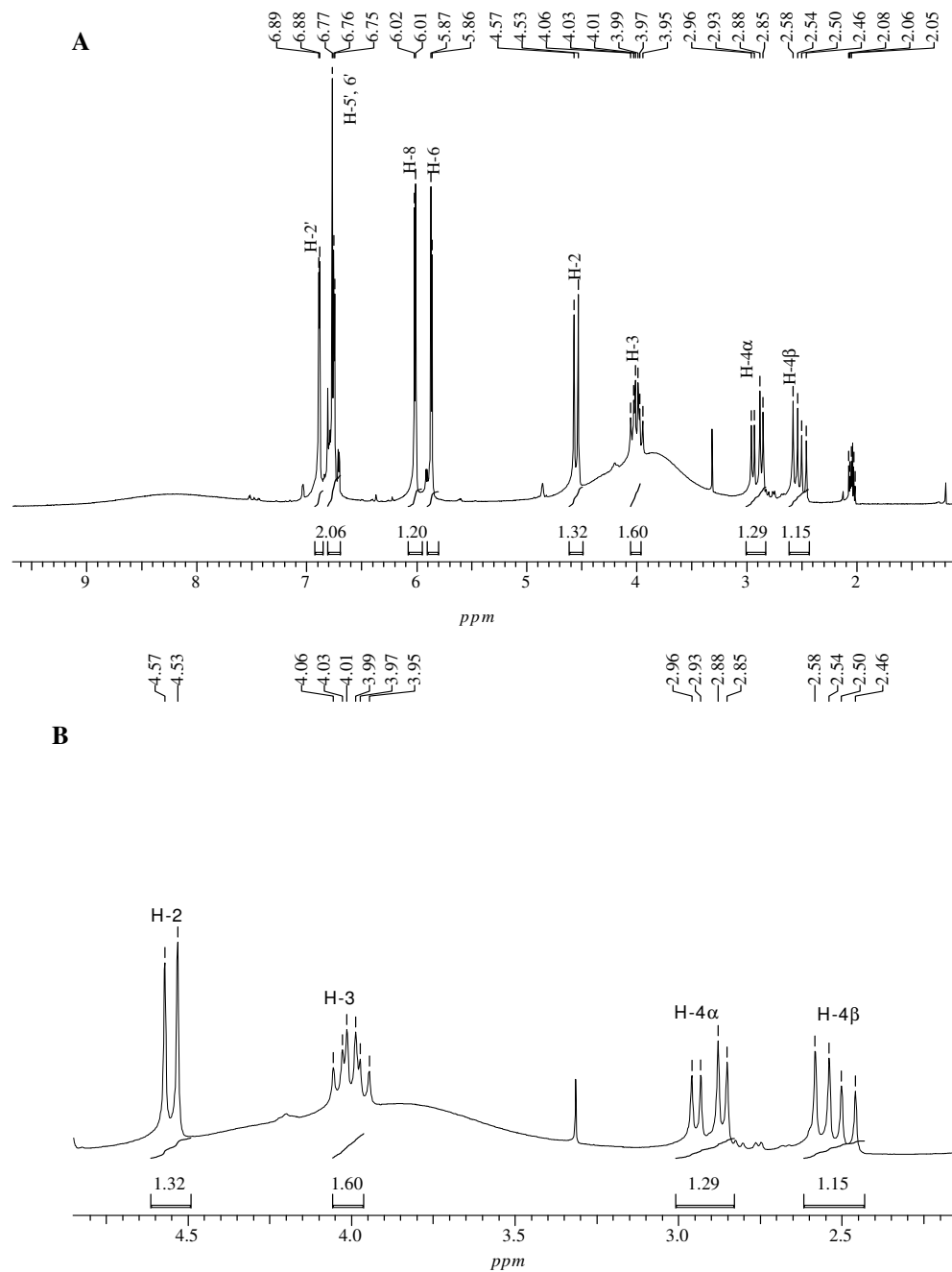


Figura 89. [A] Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, Acetona- d_6) de 12; [B] Expansão na região entre δ_{H} 2,16-4,85 ppm.

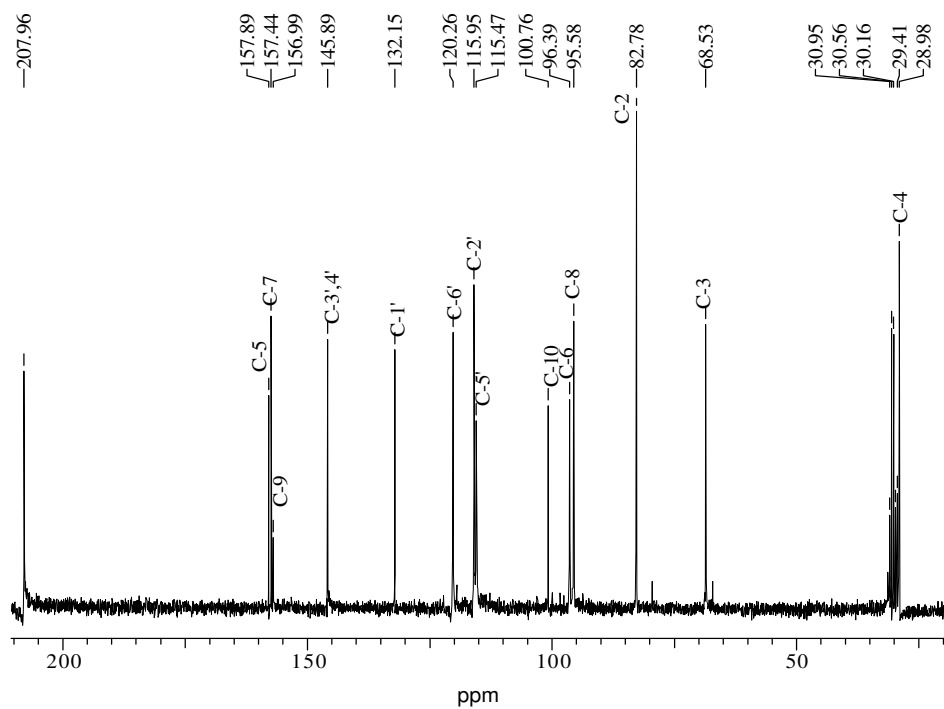


Figura 90. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, BBD, Acetona- d_6) de 12.

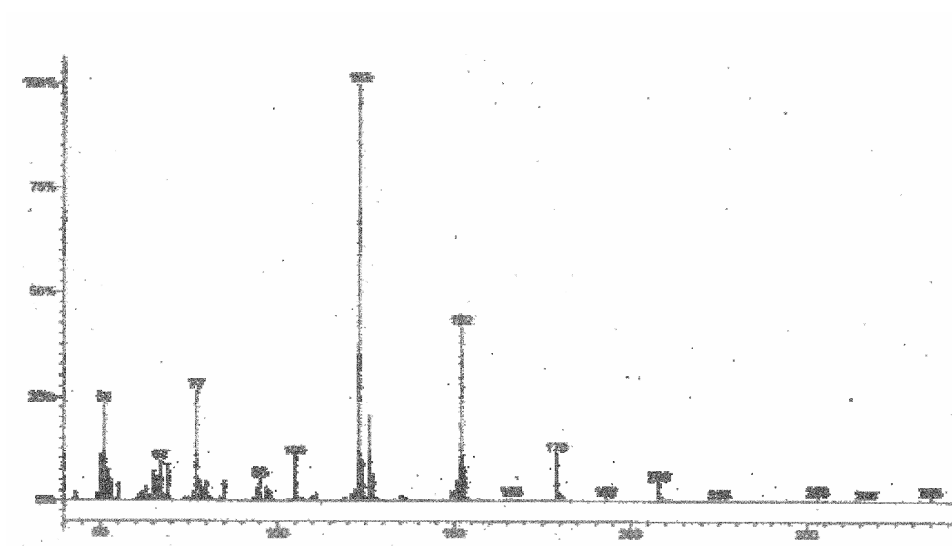
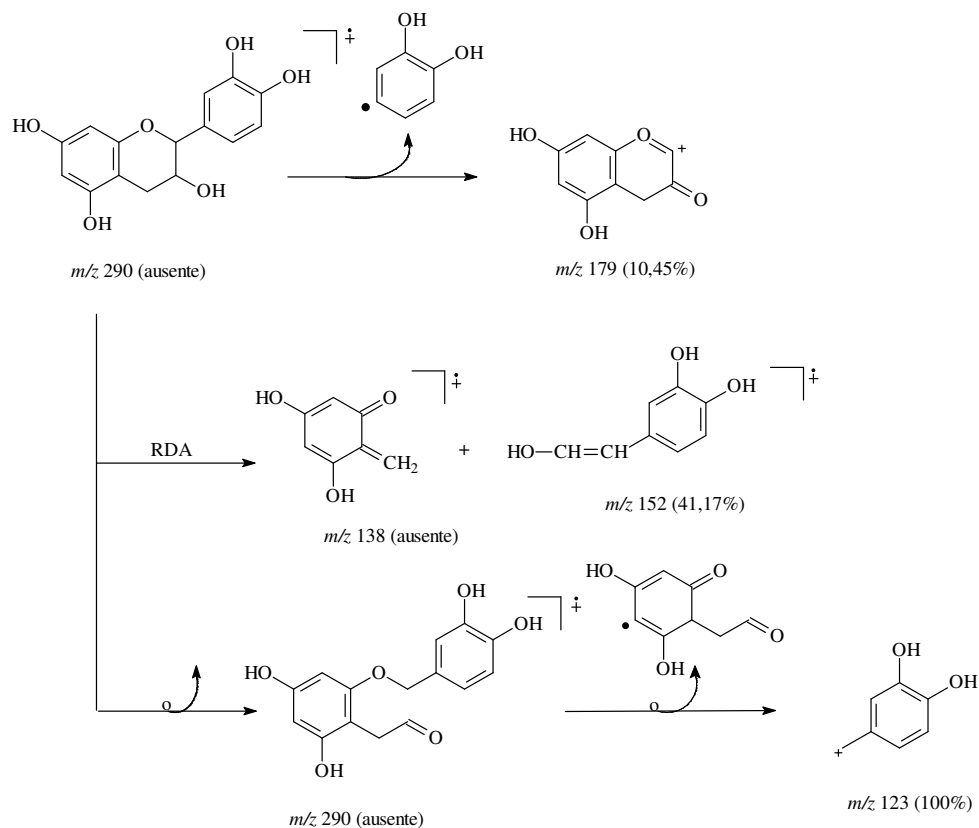


Figura 91. Espectro de massas por IE (70 eV) de 12.



Esquema 17. Proposta de fragmentação para substância 12.

4.1.1.1.14 Identificação da substância 13

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 92 e 93; p. 135 e 136) mostrou uma série de sinais em δ_{H} 2,91-4,14 e 4,34-5,59, além dos sinais adicionais δ_{H} 0,87, 1,24, 1,49-1,55 e 1,94, relativos a presença de cadeia alquílica. Esse espectro, auxiliado pela análise do mapa de contornos do HMQC (Figuras 98, 99 e 100; p. 140, 141 e 142) permitiu verificar que os sinais em δ_{H} 4,34 (*t*, HO-4''), 4,52 (*t*, HO-6''), 4,77 (*t*, HO-3), 4,89 (*t*, HO-4), 4,90 (*d*, HO-3''), 4,94 (*d*, HO-2''), 5,59 (*d*, HO-2'), e sinal em δ_{H} 7,50 (*d*, 7,0 Hz, HN) eram de hidrogênios não ligados a carbonos. Essa informação justifica-se, pela ligação de hidrogênio feita com os heteroátomos do solvente de registro do espectro (DMSO- d_6).

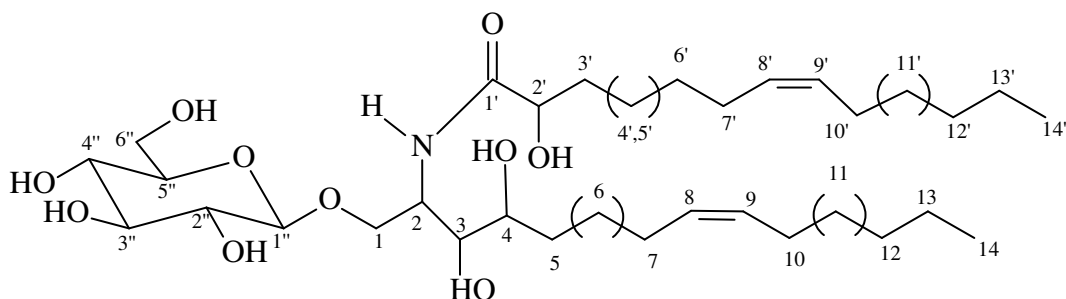
O mapa de contornos do HMQC (Figuras 98, 99 e 100; p. 140, 141 e 142) também permitiu o assinalamento de todos os carbonos hidrogenados: C-8,8' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 5,36 (*m*)/130,2-129,8]; C-9,9' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 5,32 (*m*)/129,7-129,3 4]; C-2 [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 4,13 (*m*)/49,8]; C-2' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3,86 (*m*)/70,9]; C-1 [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3,80 e 3,65 (*m*)/ 68,9]; C-6'' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3,68 e 3,43 (*m*)/61,0]; C-4'' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3,40 (*m*)/74,2]; C-3 [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3,35 (*m*)/70,5]; C-5'' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3,15 (*m*)/76,5]; C-3'' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3,08 (*m*)/76,8]; C-2'' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 2,91 (*m*)/73,4]; C-4 [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3,05 (*m*)/69,9] e C-1'' [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 4,13 (*d*)/103,4.

Na análise do RMN de ^{13}C (Figura 97; p. 139), mereceu destaque os sinais dos carbonos de dupla olefínica; também o sinal em δ_{CH} 49,8 (carbono metínico ligado a nitrogênio) e o sinal em δ_{CH} 103,4 atribuído a um carbono anomérico, os demais sinais podem ser relacionados a uma unidade de açúcar, restando três carbonos oxigenados metínicos e um oxigenado metilênico. Além dos valores de deslocamento de carbono relacionados aos sinais do mapa de contorno do HMQC, observou-se um sinal em δ_{C} 173,7 que pôde ser atribuído a

uma carbonila de amida com um grupo oxigenado em α (HO-2'). Esse grupo em alfa justifica esse valor de deslocamento químico para amidas. Isso justifica, inclusive, o dubleto em δ_H 7,5 do N-H acoplado com o hidrogênio ligado ao carbono metínico δ_{CH} 49,8 (C-4). Pelo mapa de contornos $^1Hx^1H$ -COSY (Figuras 94, 95 e 96; p. 137, 138 e 139) foi possível verificar os acoplamentos entre esse hidrogênio e os hidrogênios do carbono metilênico (2H-1) e metínico (H-3) e o sinal em δ_H 3,05 (ligado ao HC-4, δ_{CH} 69,9) acoplado com os hidrogênios do carbono metilênico em δ_H 1,94, 1,55 (H-5).

Os sinais em δ_{CH} 103,4, 73,4, 76,8, 74,2, 76,5, 61,0 são compatíveis com a unidade de β -D-glicose (BREITMAIER & VOELTER, 1989). Após as deduções acima, fez-se a comparação com os dados com um cerebrosídeo, semelhante a ceramida, isolada de *Euphorbia nicaeensis* (CATENI *et al.*, 2003) e *Desmodium gangeticum* (Leguminosae, Fabaceae) (MISHRA *et al.*, 2005). Essa comparação possibilitou identificar a semelhança entre **13** e as substâncias isoladas dessas espécies. A diferença pertinente entre os dados está principalmente na cadeia lateral, cuja definição ainda depende de análises adicionais. Os deslocamentos químicos da cadeia insaturada e dos demais carbonos e hidrogênios estão relacionados na Tabela 19 (p. 134).

O mapa de contornos do HMBC (Figuras 101, 102, 103 e 104; p. 143, 144, 145 e 146), trouxe informações que definiram os deslocamentos químicos dos hidrogênios dos grupos H-O ligados nos respectivos carbonos, de acordo com acoplamentos a longa distância $^{2,3}J_{CH}$: C-1'' com HO-2'' ($^3J_{CH}$); C-2'' com HO-3'' ($^3J_{CH}$) e com HO-2'' ($^2J_{CH}$); C-3'' com HO-2'' e HO-4'' ($^3J_{CH}$) e com HO-3'' ($^2J_{CH}$). Todos os dados atribuídos permitiram definir a estrutura de **13** como sendo 1-O- β -D-glicopiranosil-2-(2'-hidroxiacil-*cis*-en-amino)-3,4-dihidroxi-*cis*-alquenil.



1-O- β -D-glicopiranosil-2-(2'-hidroxiacil-*cis*-en-amino)-3,4-diidroxi-*cis*-alquenil (**13**)

Tabela 19. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) 1D e 2D da substância 13

C	(CATENI <i>et al.</i> , 2003)*		13*			
	δ_{C}	δ_{H}	HMQC (1J)		HMBC ($^{2,3}J$)	COSY $^1\text{H}\times^1\text{H}$
			δ_{C}	δ_{H} (<i>mult.</i> ; <i>J</i> Hz)		
1	70,5	4,70 (<i>dd</i>) 4,52 (<i>m</i>)	68,9	3,80 3,65	H-1'', H-2, HN	H-1a/H-1b
2	51,8	5,22 (<i>m</i>)	49,8	4,13 (<i>m</i>)	H-1a; H-1b; HO-3, H-3	-
3	76,0	4,28 (<i>m</i>)	70,5	3,35 (<i>m</i>)	HO-3	HO-3
4	72,6	4,22 (<i>m</i>)	69,9	3,05	HO-4, H-3	HO-4
5	34,0	1,87 (<i>m</i>) 2,38 (<i>m</i>)	32,3	1,94 1,55	-	-
6	26,0	1,65 (<i>m</i>) 1,72 (<i>m</i>)	25,5	1,24	-	-
1'	175,8	-	173,7	-	H-2, HN, H-2'	-
2'	72,5	4,57 (<i>dd</i>)	70,9	3,85 (<i>m</i>)	HO-2'	HO-2'
3'	35,7	2,0 (<i>m</i>) 2,20 (<i>m</i>)	34,3	1,55 1,49	HO-2'	-
4'-6'	23,7-32,3	1,25-1,30 (<i>m</i>)	28,9-29,1	1,24	-	-
7, 7'	27,8	2,20 (<i>m</i>)	26,9 26,7	1,99 1,99	-	H-8, 8' H-9, 9' H-10, 10'
8, 8'	130,6	5,45 (<i>m</i>)	130,2/129,8	5,36 (<i>m</i>)	H-7, 7'	H-7, 7'
9, 9'	130,4	5,45 (<i>m</i>)	129,7/129,3	5,32 (<i>m</i>)	H-10, 10'	-
10, 10'	27,7	2,20 (<i>m</i>)	31,9	1,49 1,94	H-1, H-12	H-11, 11'
11, 11'	29,7-30,3	1,30 (<i>m</i>)	28,9-29,1	1,29-1,24	H-10, H-13	-
12, 12'	29,7-30,3	1,30 (<i>m</i>)	31,2	1,24	H-10, H-13	-
13, 13'	29,7-30,3	1,30 (<i>m</i>)	24,4	1,24	H-11	-
14, 14'	14,5	0,85 (<i>m</i>)	13,9	0,87 (<i>t</i> ; 8,5)	H-12	-
1''	105,6	4,95 (<i>d</i> ; 7,6)	103,4	4,14 (<i>d</i> ; 7,0)	H-1a, H-1b, HO-2''	H-2''
2''	75,3	4,0 (<i>t</i>)	73,4	2,91 (<i>td</i>)	HO-2'', HO-3''	HO-2'', H-1'', H-3''
3''	78,5	4,21 (<i>m</i>)	76,8	3,08	HO-3'', H-4'', HO-2''	HO-3''
4''	71,6	4,19 (<i>m</i>)	74,2	3,40 (<i>m</i>)	HO-4'', H-3'', HO-3''	HO-4'', H-5''
5''	78,7	3,87 (<i>m</i>)	76,5	3,15 (<i>m</i>)	H-2'', HO-6''	-
6''	62,7	4,48 (<i>dd</i> ; 11,8; 2,0) 4,36 (<i>dd</i> ; 11,8; 2,0)	61,0	3,68 (<i>m</i>) 3,4 (<i>m</i>)	HO-6'', H-4''	-
HN	-	8,53 (<i>d</i> ; 7,9)	-	7,5 (<i>d</i> ; 7,0)	-	-
HO-3	-	6,82 (<i>sl</i>)	-	4,77 (<i>t</i>)	-	-
HO-4	-	6,0 (<i>sl</i>)	-	4,89 (<i>t</i>)	-	-
HO-2'	-	7,62 (<i>sl</i>)	-	5,59 (<i>d</i>)	-	-
HO-2''	-	-	-	4,94 (<i>d</i>)	-	-
HO-3''	-	-	-	4,90 (<i>d</i>)	-	-
HO-4''	-	-	-	4,34 (<i>t</i>)	-	-
HO-6''	-	6,30 (<i>sl</i>)	-	4,52 (<i>t</i>)	-	-

*:DMSO- d_6

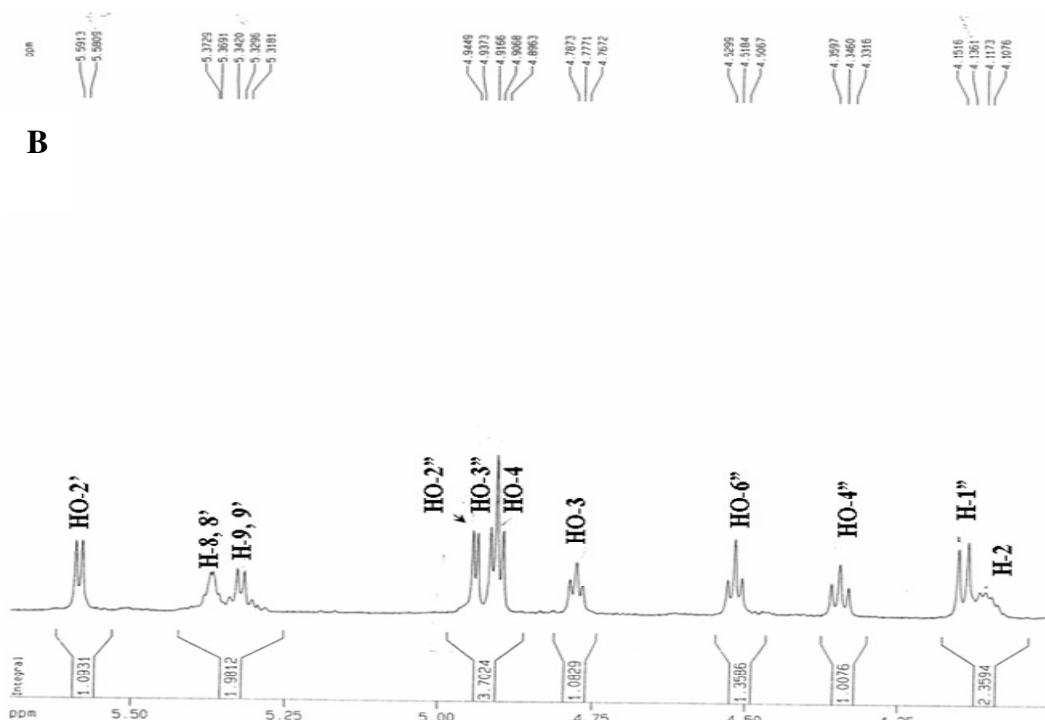
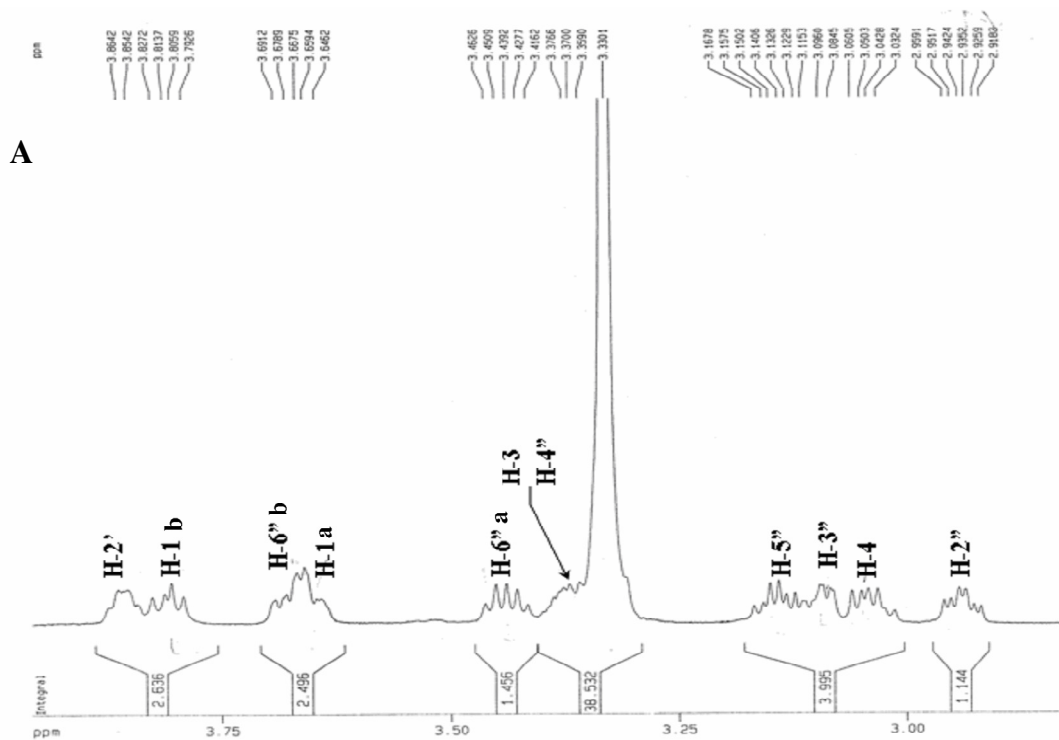


Figura 92. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) de 13 na região entre: [A] δ_{H} 2,90-3,90 ppm e [B] δ_{H} 4,10-5,60 ppm.

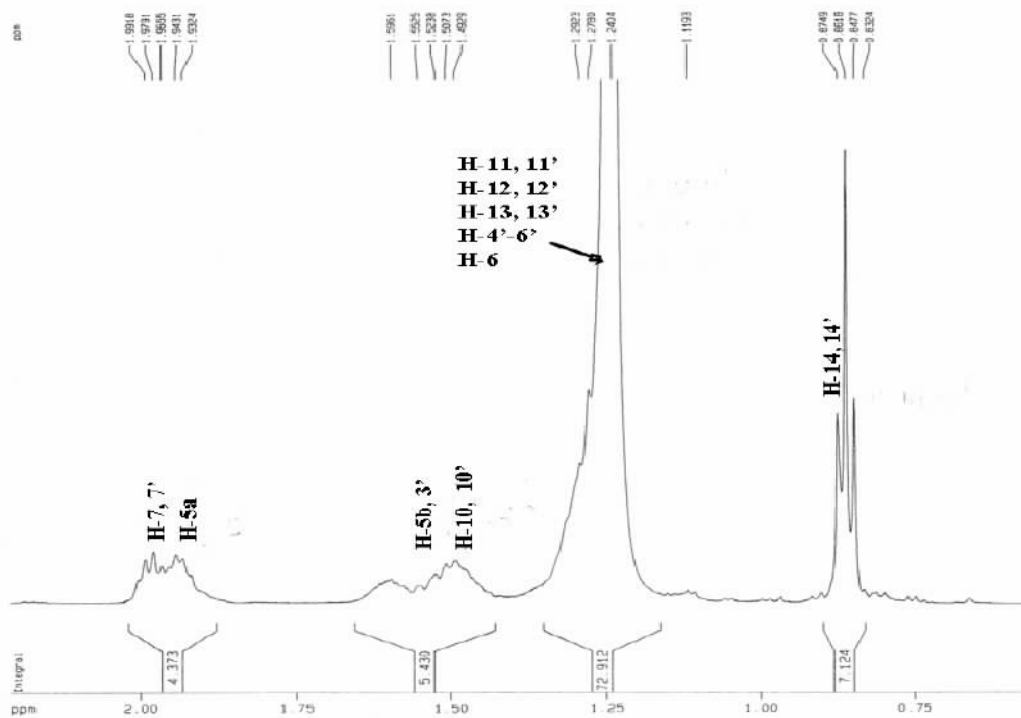


Figura 93. Expansões do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) de 13 nas regiões entre δ_{H} 0,75-2,0 ppm.

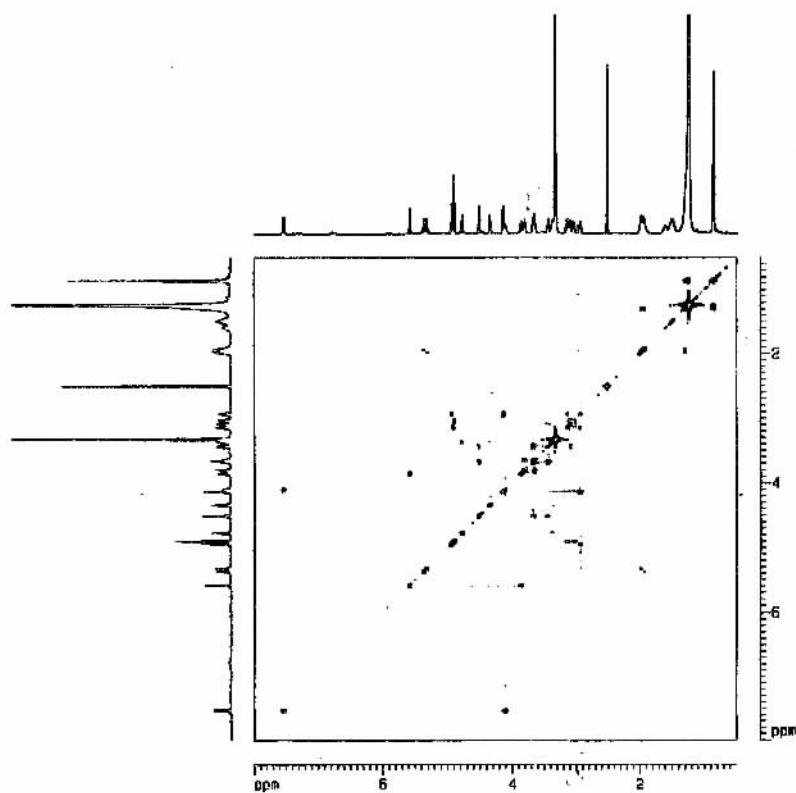


Figura 94. Mapa de contornos $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, DMSO-d_6) de 13.

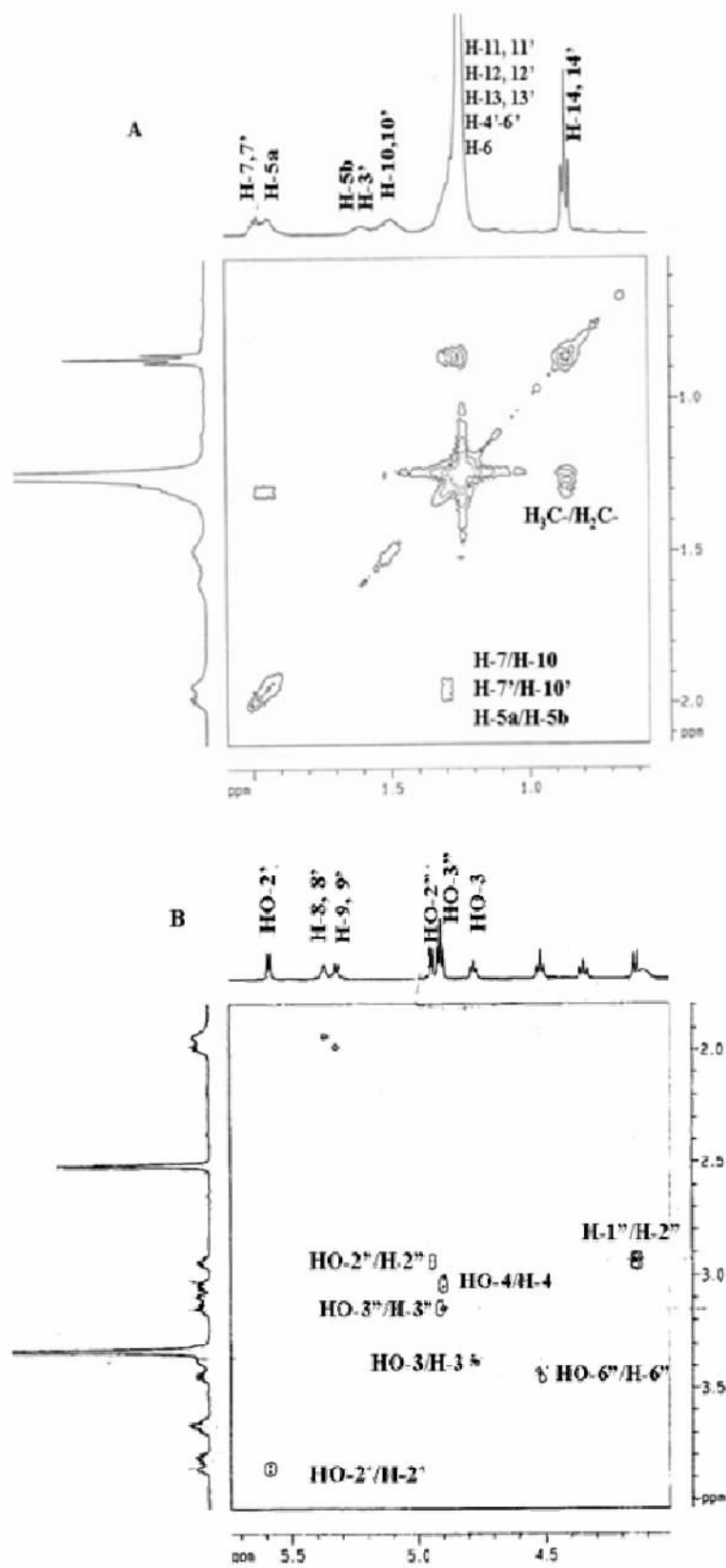


Figura 95. Expansões do mapa de contornos $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, DMSO- d_6) de 13 nas regiões entre: [A] δ_{H} 0,75-2,0 ppm e [B] δ_{H} 1,8-3,9 ppm.

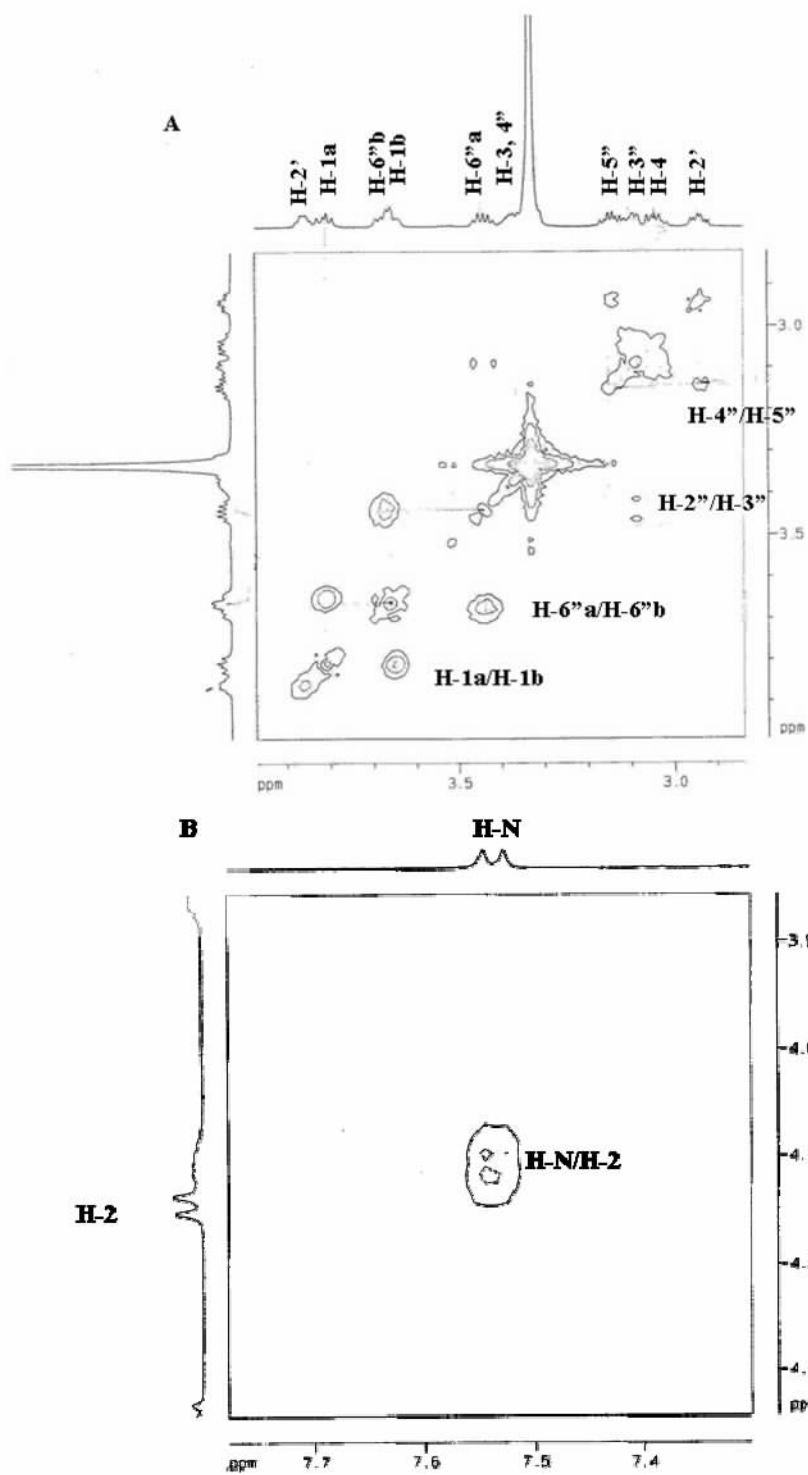


Figura 96. Expansões do mapa de contornos $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, DMSO- d_6) de 13 nas regiões entre: [A] δ_{H} 2,9-3,9 ppm e [B] δ_{H} 1,8-3,9 ppm.

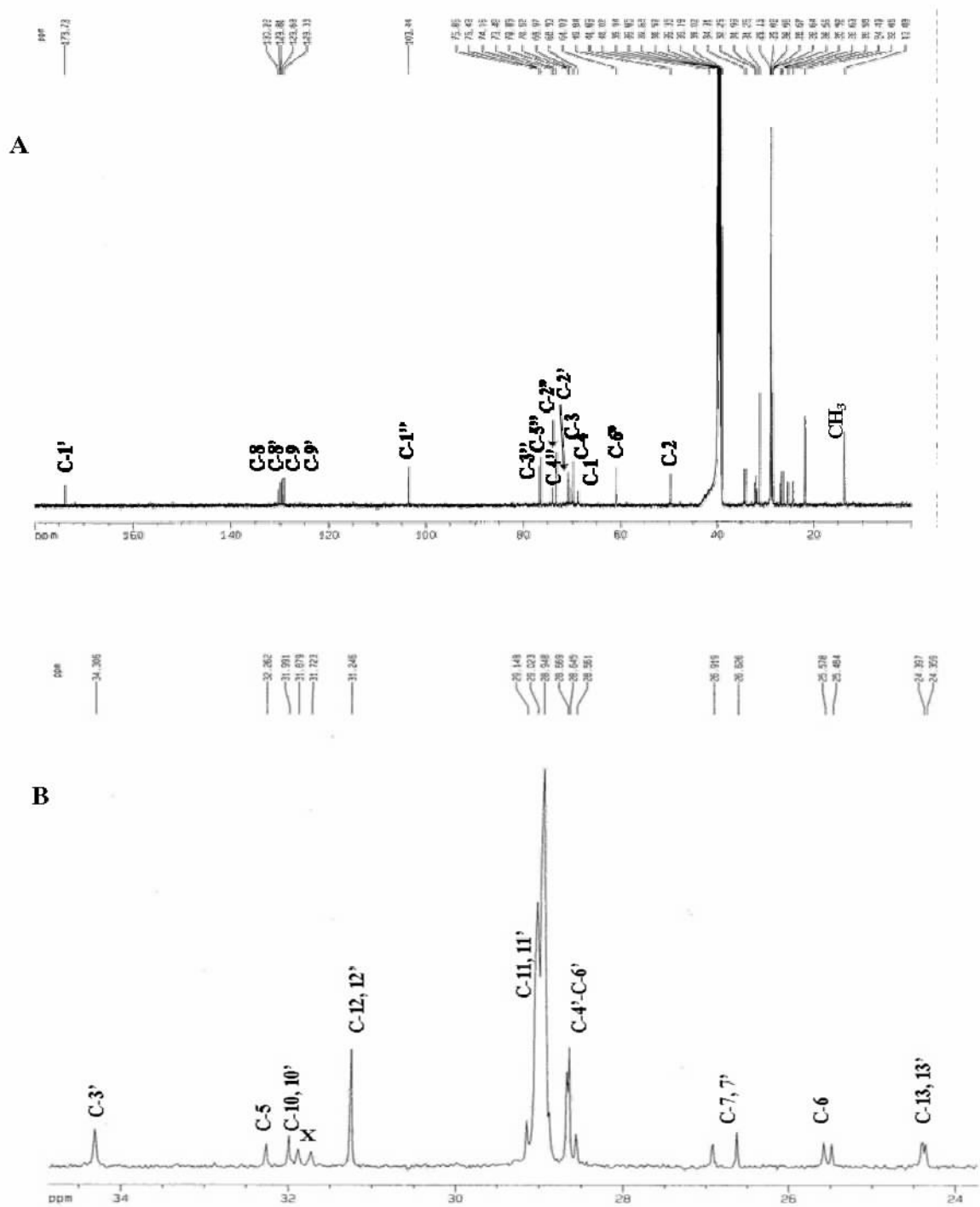


Figura 97. [A] Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, BBD, DMSO-d_6) de 13; [B] Expansão na região entre δ_{C} 24,0-35,0 ppm.

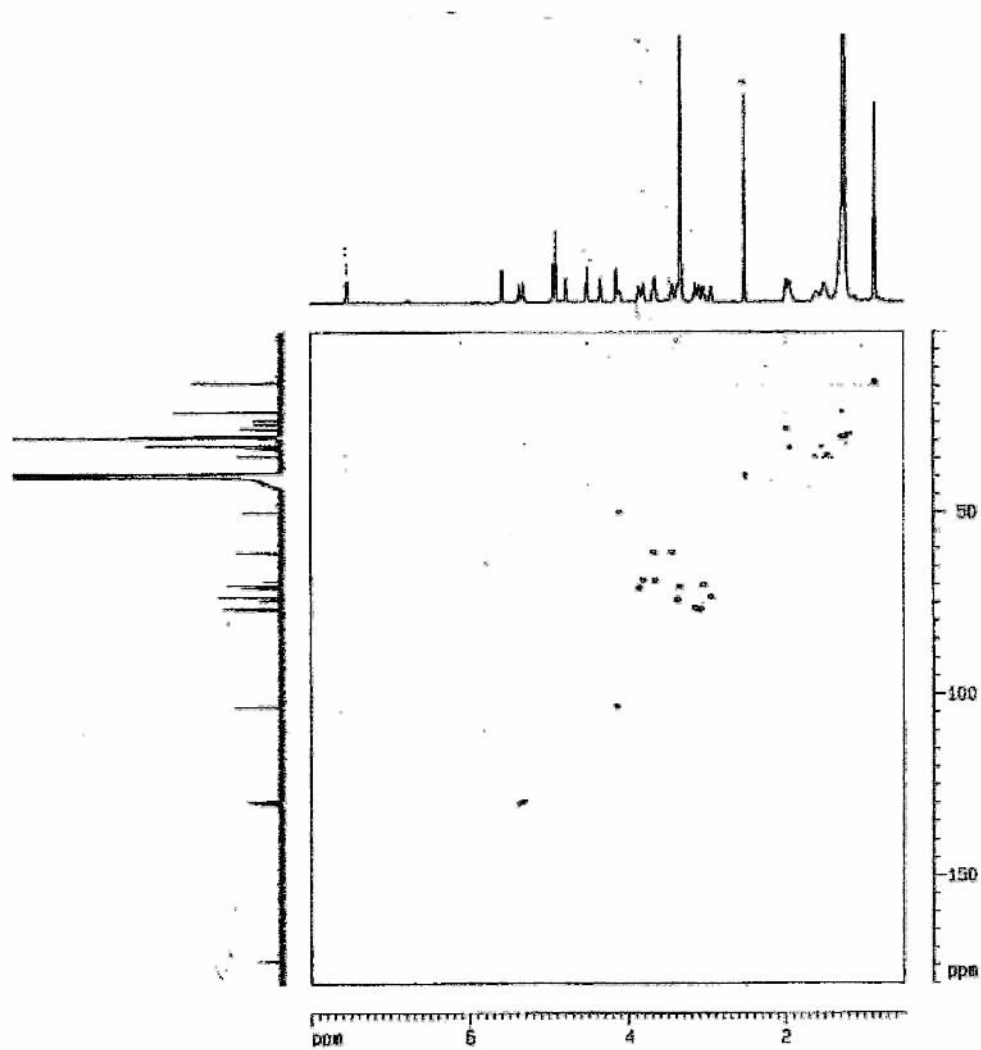


Figura 98. Mapa de contornos HMQC (125 MHz, DMSO- d_6) de 13.

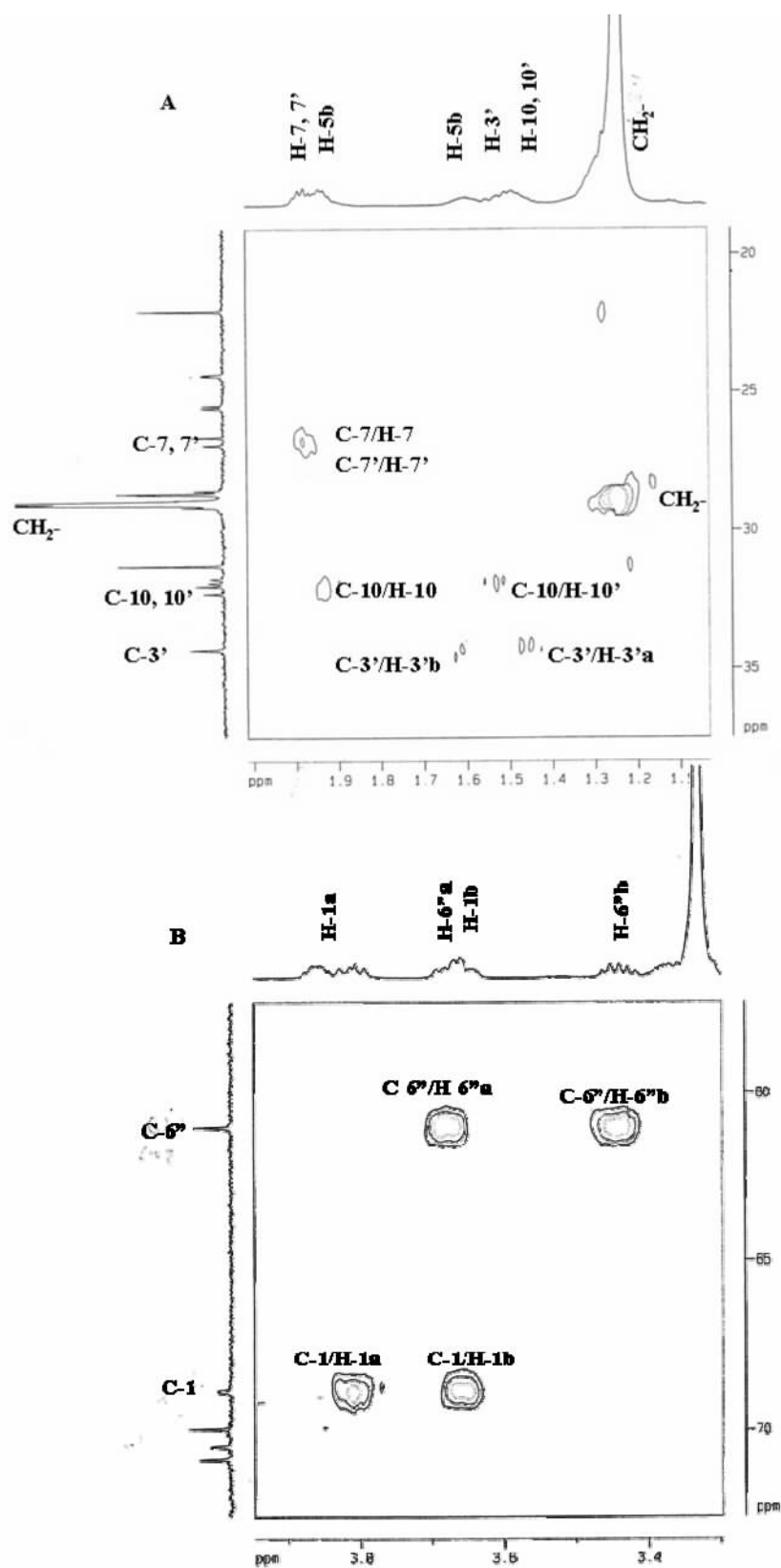


Figura 99. Expansões do mapa de contornos HMQC (125 MHz, DMSO-d₆) de 13 nas regiões entre: [A] δ_H 1,1-2,0 ppm e δ_C 20,0-35,0 ppm [B] δ_H 3,4-3,9 ppm e δ_C 60,0-70,0 ppm.

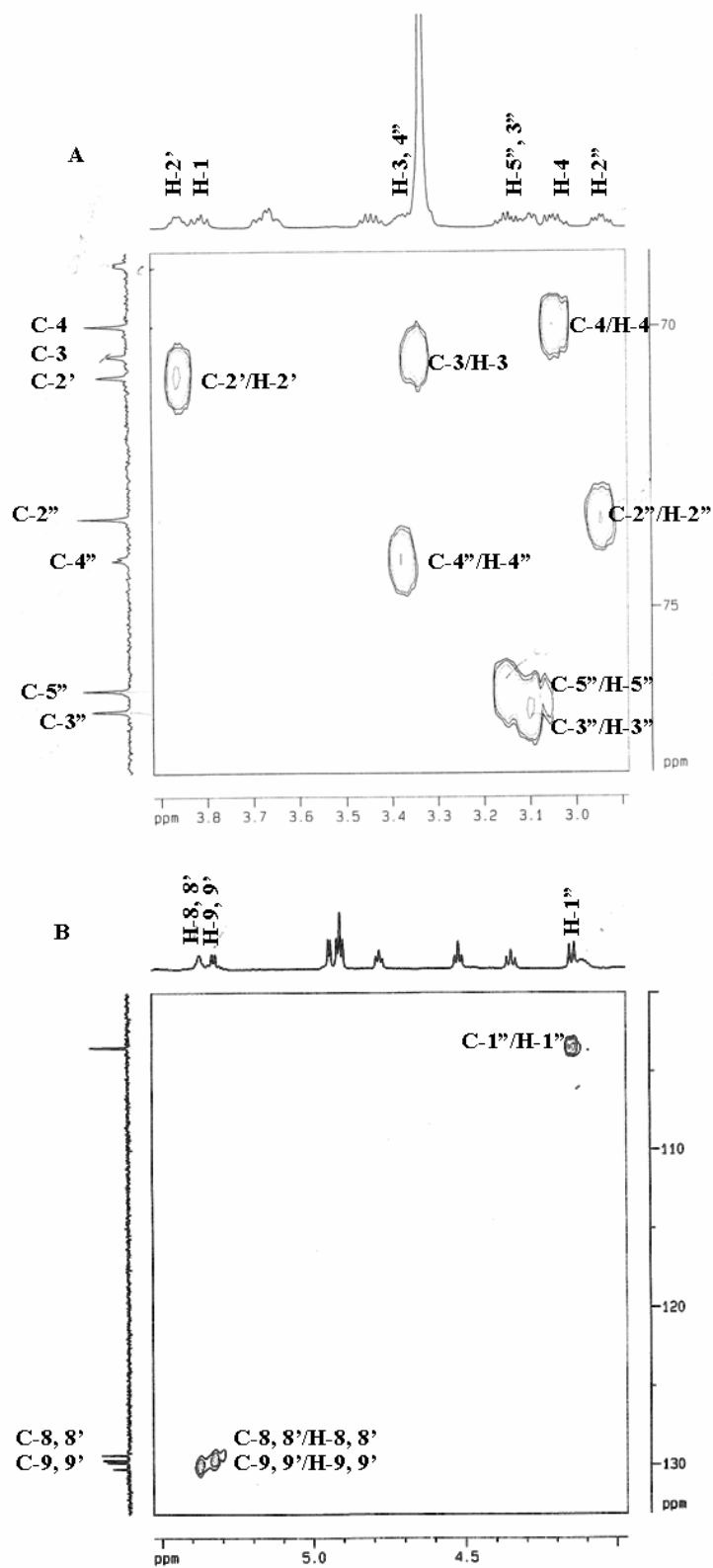


Figura 100. Expansões do mapa de contornos HMQC (125 MHz, DMSO- d_6) de 13 nas regiões entre: [A] δ_{H} 3,0-3,8 ppm e δ_{C} 70,0-77,0 ppm [B] δ_{H} 4,0-5,5 ppm e δ_{C} 109,0-130,0 ppm.

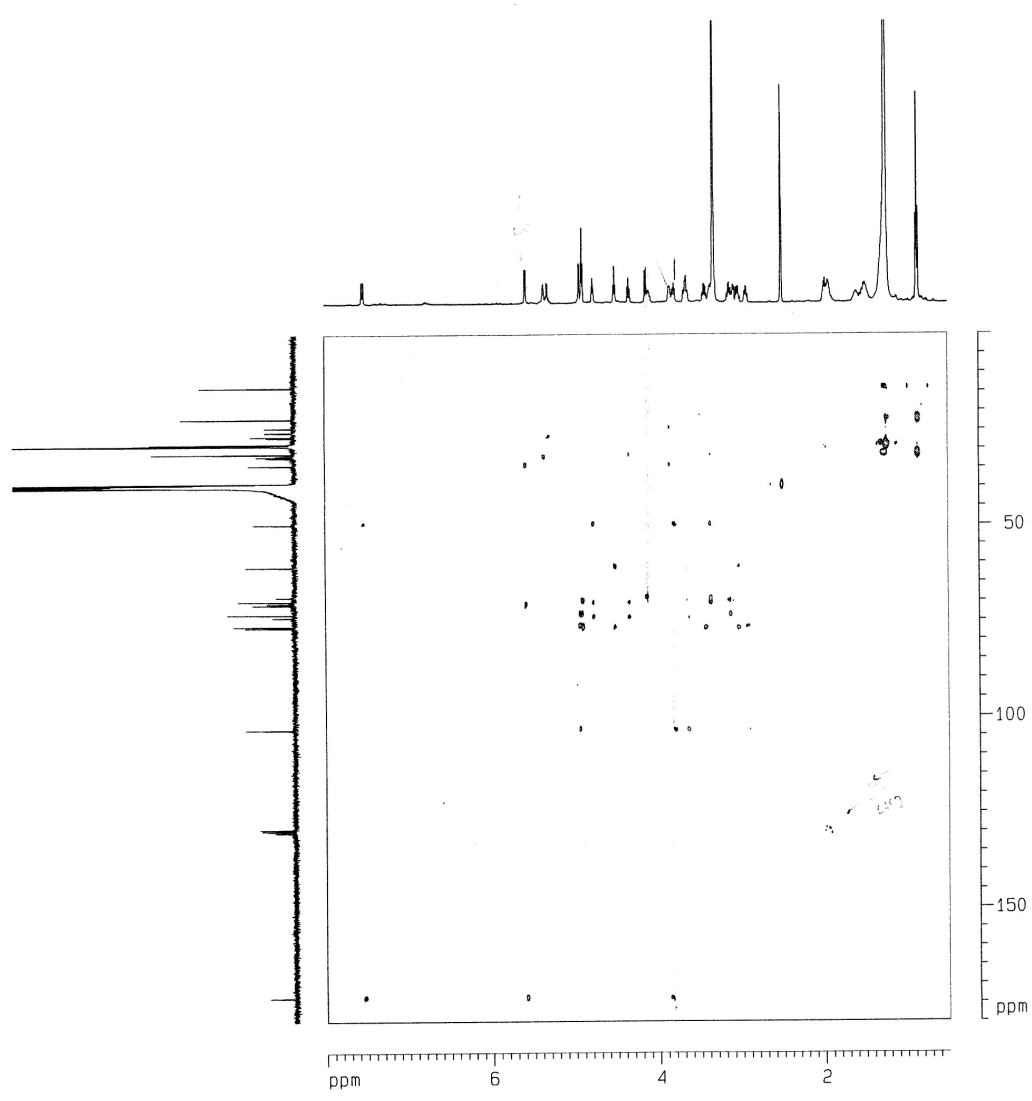
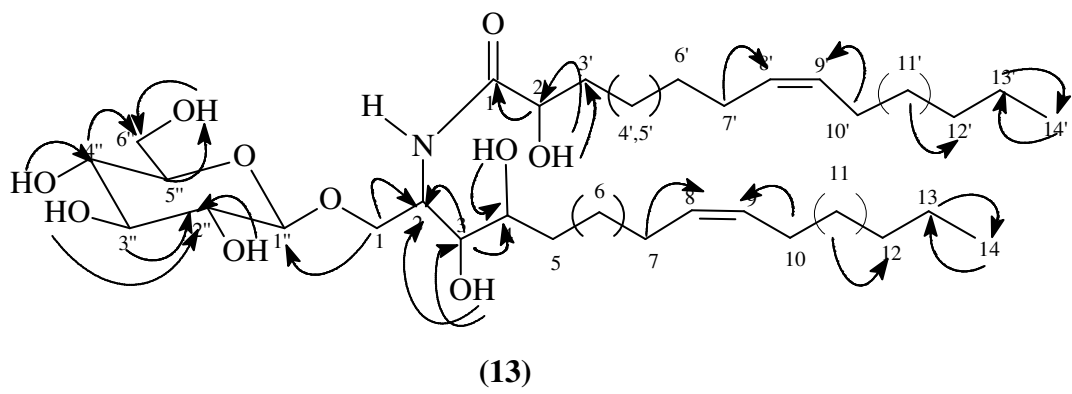


Figura 101. Mapa de contornos HMBC (125 MHz, DMSO-d₆) e algumas correlações observadas para a substância 13.

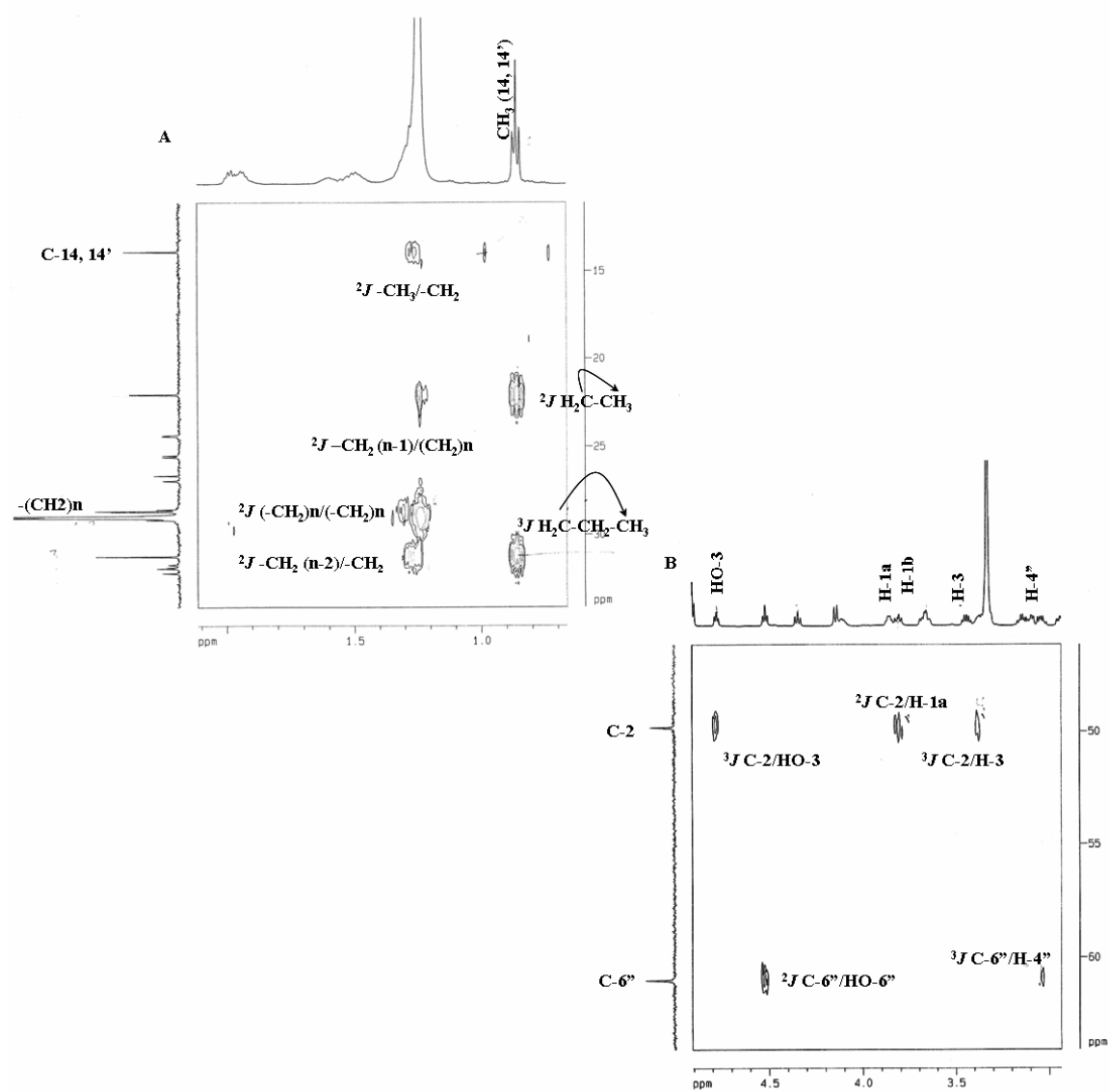
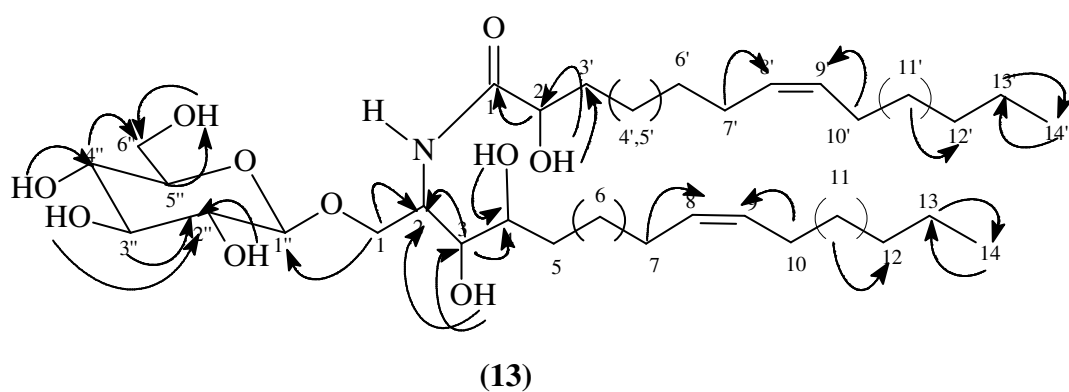


Figura 102. Expansões do mapa de contornos (HMBC, 125 MHz, DMSO- d_6) de 13, nas regiões entre: [A] δ_H 0,7-2,0 ppm e δ_C 14,0-33,0 ppm e [B] δ_H 3,0-4,8 ppm e δ_C 49,0-62,0 ppm.

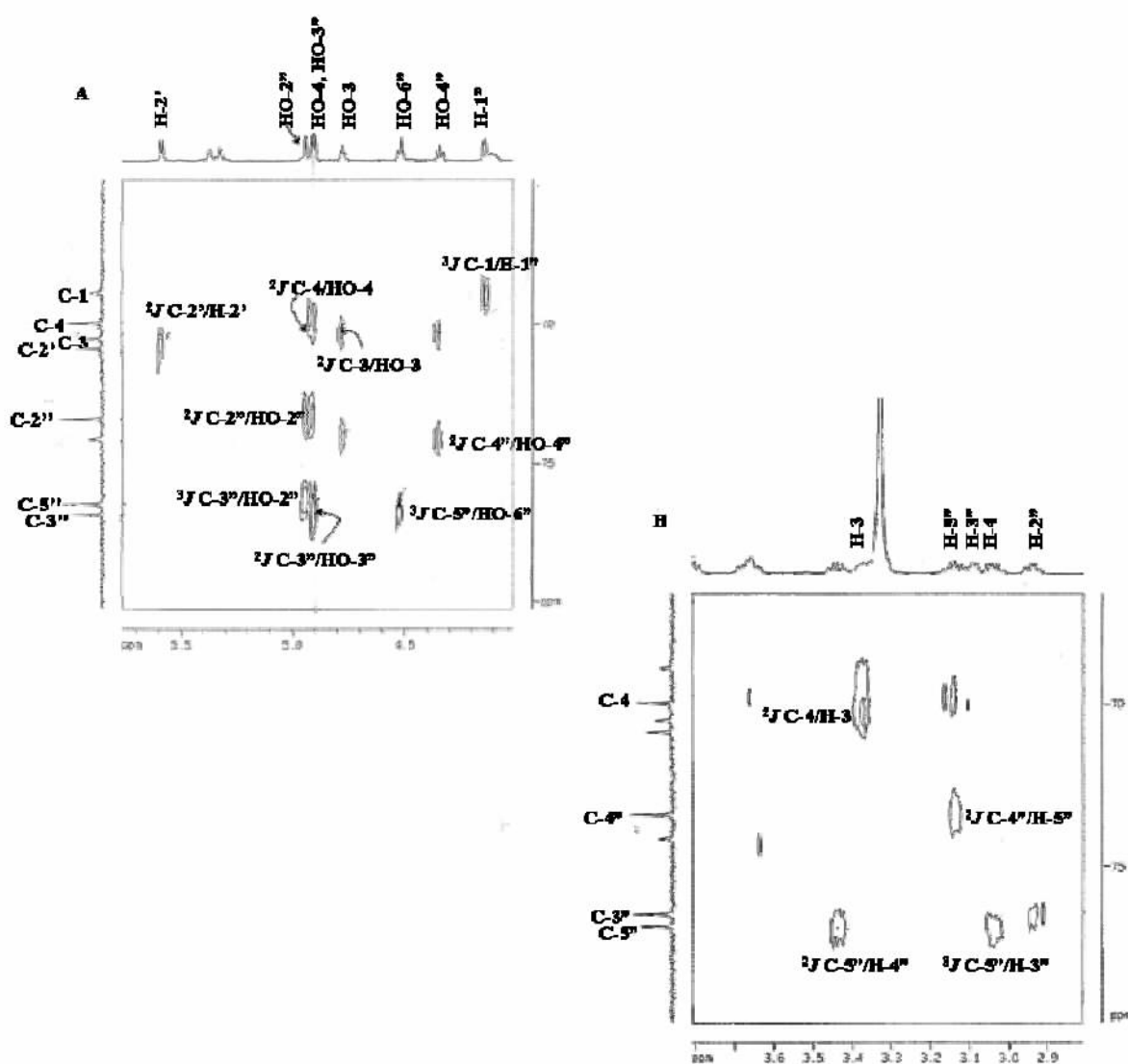
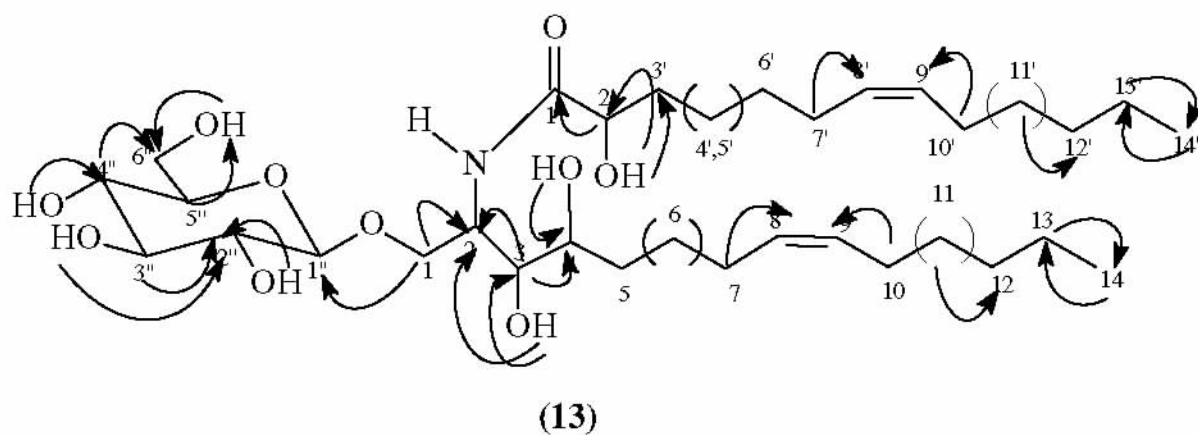


Figura 103. Expansões do mapa de contornos HMBC (125 MHz, DMSO- d_6) de 13, nas regiões entre: [A] δ_{H} 4,0-5,6 ppm e δ_{C} 65,0-80,0 ppm e [B] δ_{H} 2,9-3,7 ppm e δ_{C} 65,0-80,0 ppm.

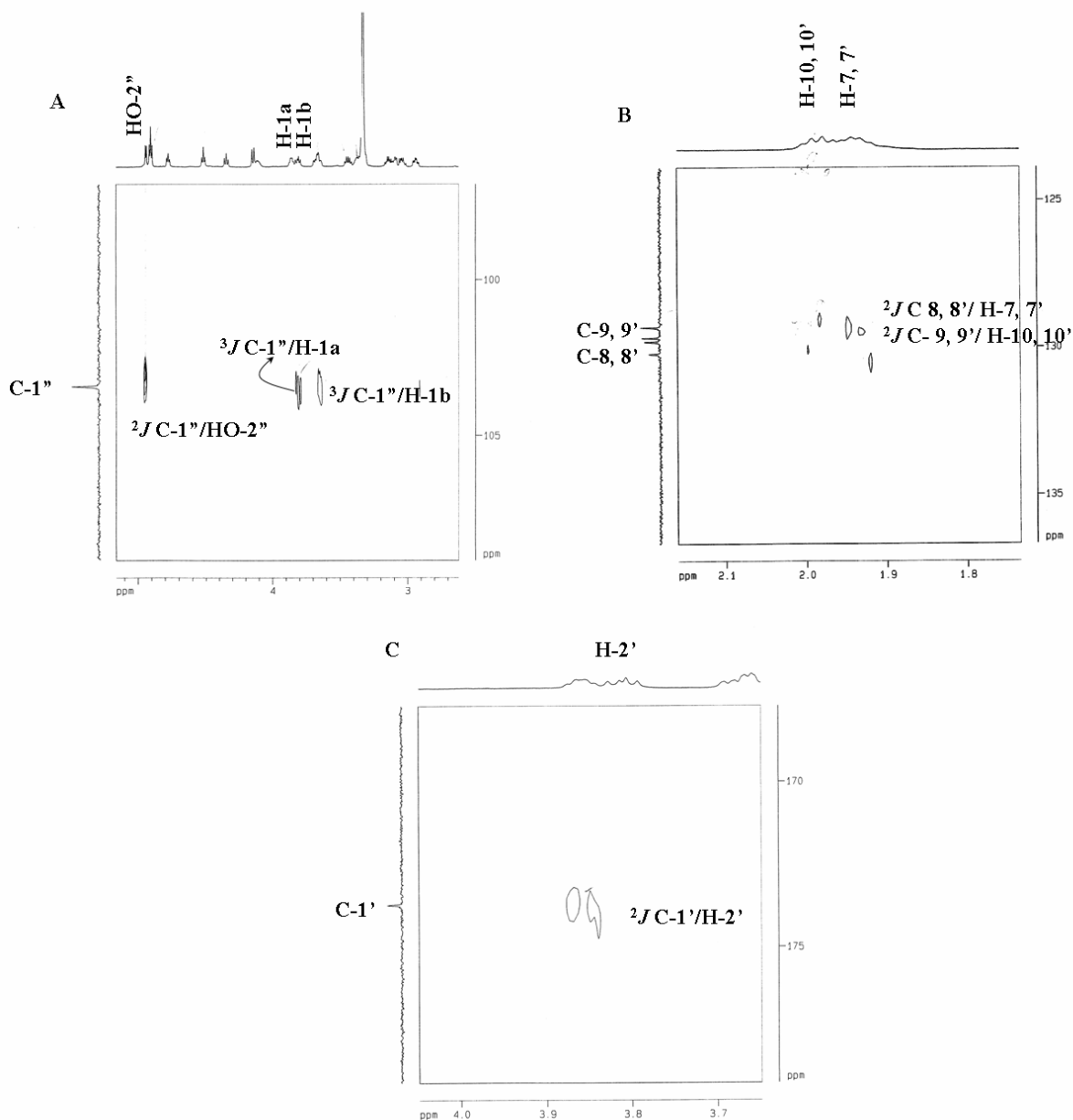
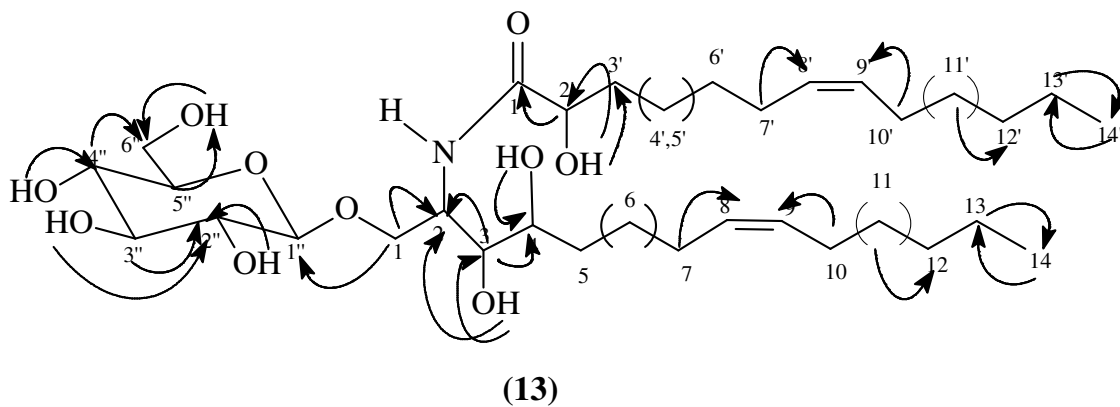
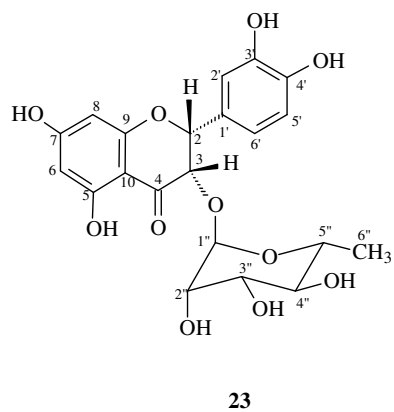
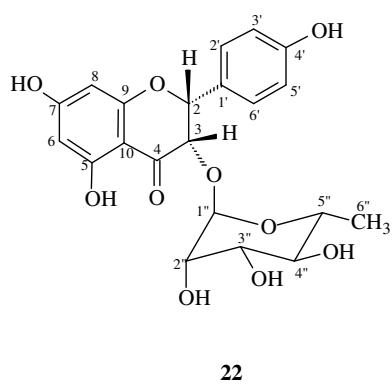
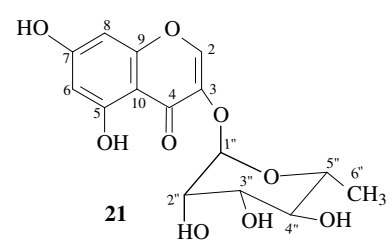
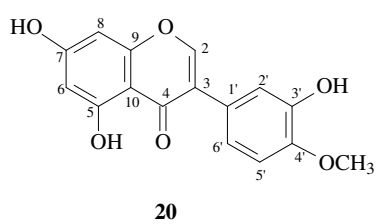
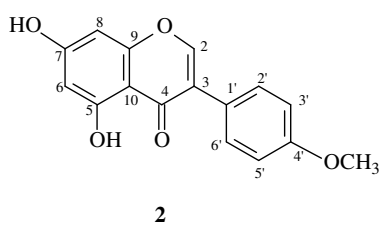
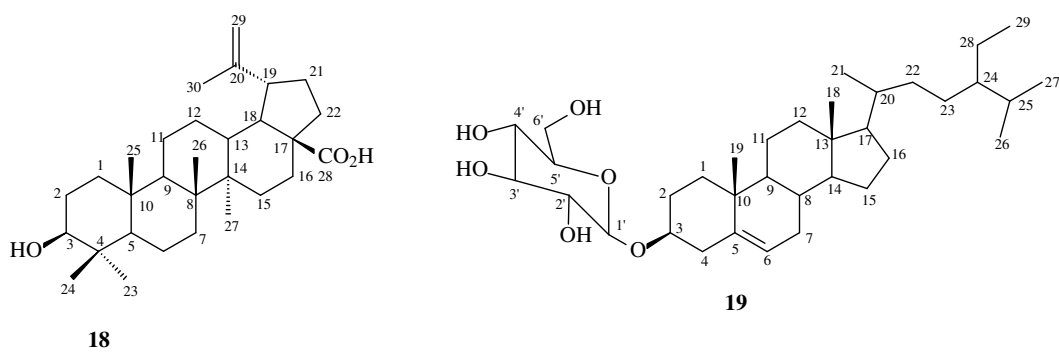
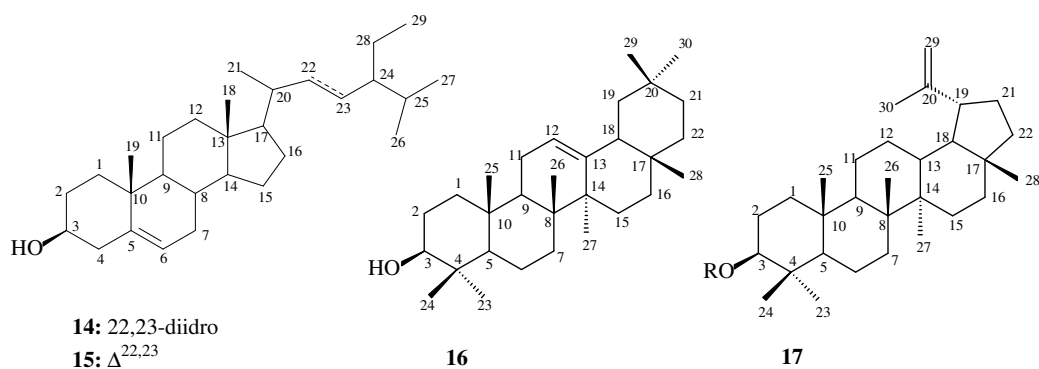


Figura 104. Expansões do mapa de contornos HMBC (125 MHz, DMSO- d_6) de 13, nas regiões entre: [A] δ_H 2,7-5,0 ppm e δ_C 97,0-107,0 ppm e [B] δ_H 1,8-2,1 ppm e δ_C 125,0-135,0 ppm e [C] δ_H 3,7-4,0 ppm e δ_C 170,0-177,0 ppm.

4.2 Substâncias Isoladas das Raízes de *Andira fraxinifolia*



4.2.1 Determinação estrutural das substâncias isoladas das raízes de *A. fraxinifolia*

4.2.1.1 Identificação das substâncias 14 e 15

Com base na comparação com uma amostra autêntica, em análises que envolveram espectros de RMN de ^1H , CG-EM, PF, cromatografia em camada delgada, utilizando vários sistemas de solventes e revelação positiva em Liebermann-Burchard, chegou-se a conclusão que as substâncias **14** e **15** se tratavam de uma mistura de esteróides.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 105; p. 148) da mistura **14** e **15** mostrou sinais entre δ_{H} 0,65 e δ_{H} 1,23 correspondentes as metilas, multipletto em δ_{H} 3,53 atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico H-3, um dubleto em δ_{H} 5,31 atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono olefínico H-6 e o multipletto em δ_{H} 5,07 correspondentes aos hidrogênios H-22 e H-23 para o estigmasterol.

Pelo CG-EM e comparação com padrões da biblioteca do equipamento (Figura 106; p. 149) confirmou-se a mistura dos esteróides sitosterol (**14**) e estigmasterol (**15**).

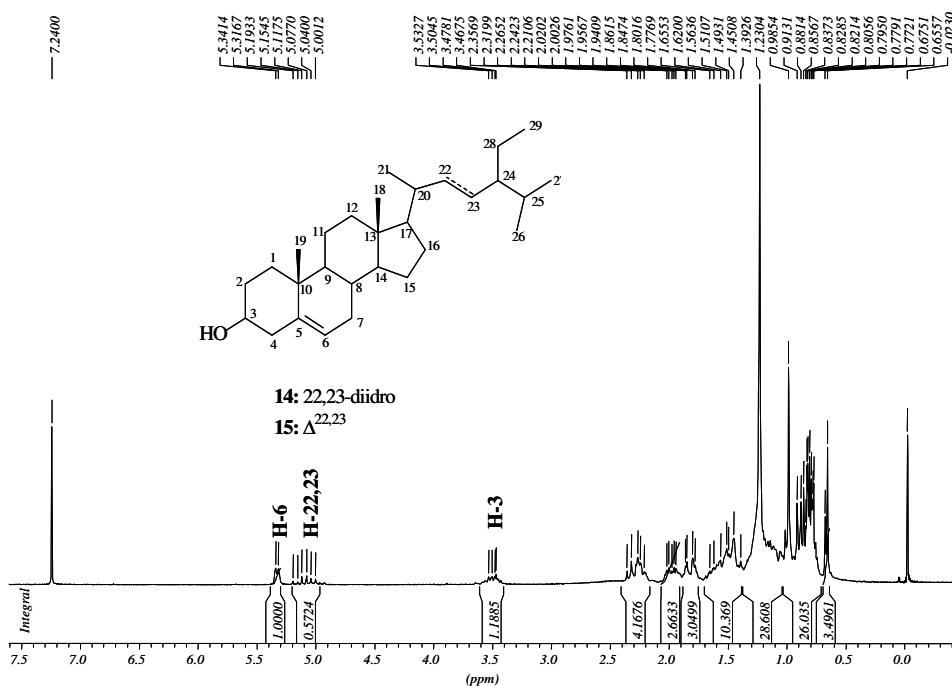


Figura 105. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 14 e 15.

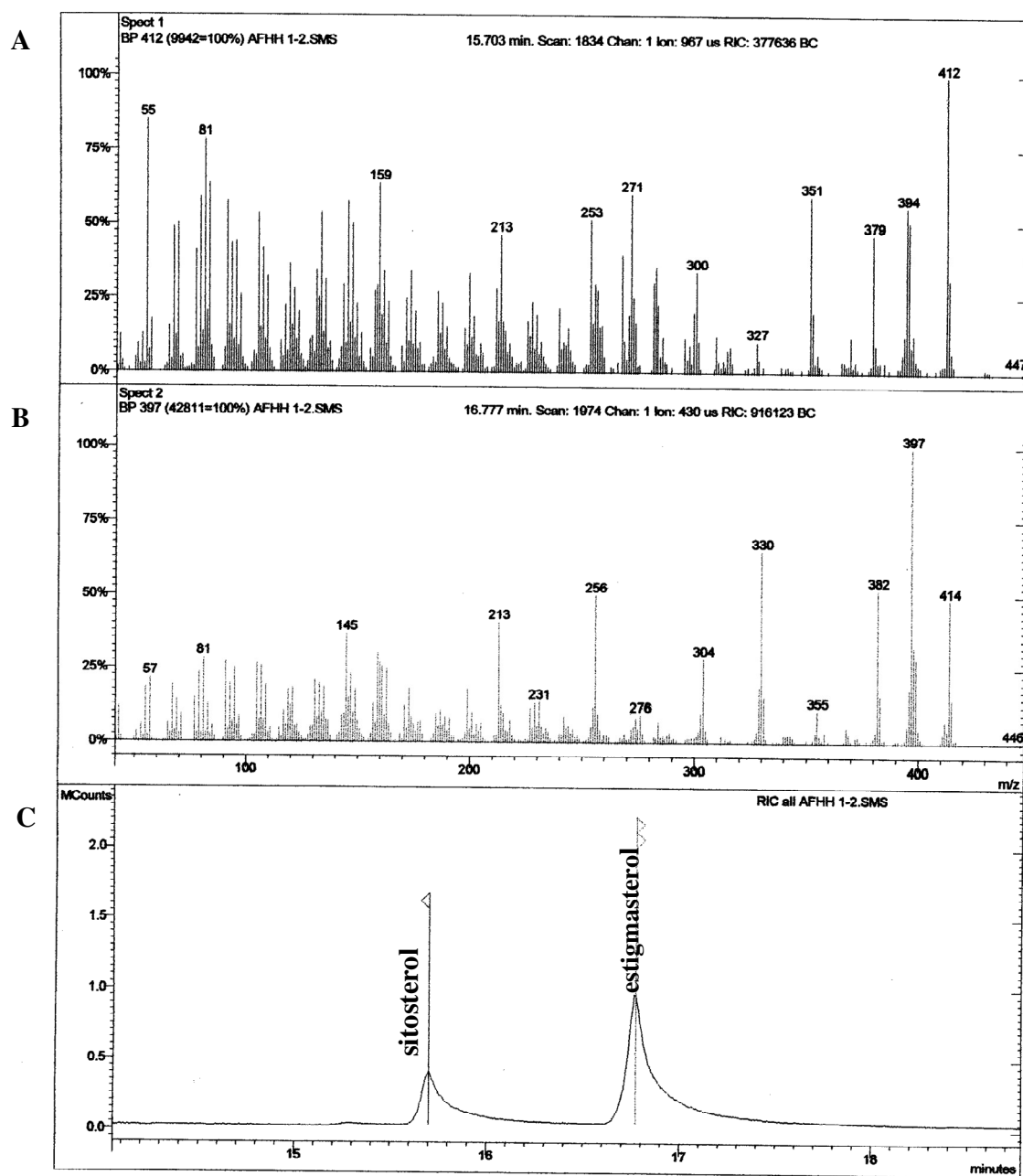


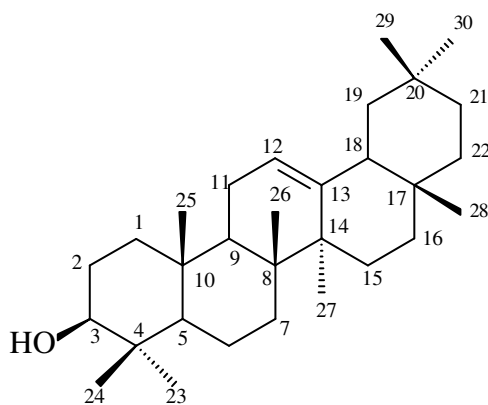
Figura 106. Espectro de massas da mistura do sitosterol [A], estigmasterol [B] e [C] CG da mistura de esteróides.

4.2.1.2 Identificação da substância 16

A substância **16** foi reconhecida pela análise dos dados espectrais de RMN ^1H (Figura 107; p. 151) e ^{13}C -BBD (Figura 108; p. 152).

O espectro de RMN de ^1H mostrou sinais correspondentes às metilas ligadas aos carbonos sp^3 em δ_{H} 0,69 a δ_{H} 1,44; hidrogênio ligado ao carbono carbinólico em δ_{H} 3,21 (*m*, H-3) e sinal do hidrogênio ligado ao carbono olefínico em δ_{H} 5,15 (*m*, H-12).

O espectro de RMN ^{13}C -PND identificou os sinais representantes de átomos de carbonos metílicos, metilênicos, metínicos e quaternários. Os deslocamentos químicos dos carbonos em δ_{CH} 121,69 e δ_{C} 145,16, correspondentes aos carbonos C-12 e C-13, respectivamente, são compatíveis com os sinais encontrados em triterpenos pentacíclicos da série dos oleanenos. O valor do deslocamento químico C-13 (δ_{C} 145,16) é consequência do efeito γ de proteção, exercido pelo CH_3 -19 sobre este carbono, como acontece nos triterpenos da série dos ursenos. A comparação dos valores dos deslocamentos químicos de carbonos da substância **16**, com os valores fornecidos pela literatura (MAHATO & KUNDU, 1994), permitiu propor a estrutura de **16** como sendo a β -amirina, cujos valores atribuídos, estão na Tabela 20 (p. 151).



β - amirina (**16**)

Tabela 20. Dados de RMN ^{13}C (50 MHz) da substância 16

C	(MAHATO & KUNDU, 1994)	16	C	(MAHATO & KUNDU, 1994)	16
	δ_{C}	δ_{C}		δ_{C}	δ_{C}
1	38,70	38,55	16	27,00	26,87
2	27,30	27,18	17	32,50	32,45
3	78,80	79,00	18	47,40	47,19
4	38,80	38,73	19	46,90	46,76
5	55,30	55,13	20	31,10	31,06
6	18,30	18,32	21	34,80	34,70
7	32,80	32,60	22	37,20	37,09
8	38,80	38,73	23	28,20	28,00
9	47,70	46,76	24	15,50	15,47
10	37,60	36,91	25	15,60	15,47
11	23,60	23,48	26	16,90	16,78
12	121,80	121,69	27	26,00	25,96
13	145,10	145,16	28	28,40	28,36
14	41,80	41,67	29	33,50	33,30
15	26,20	26,12	30	23,70	23,66

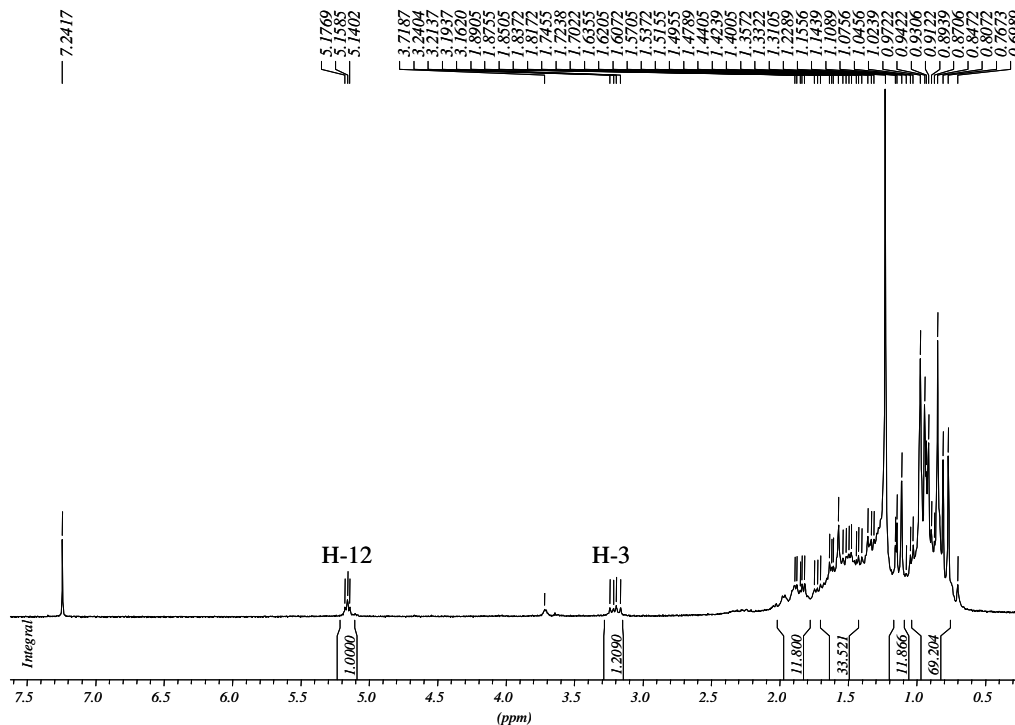


Figura 107. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 16.

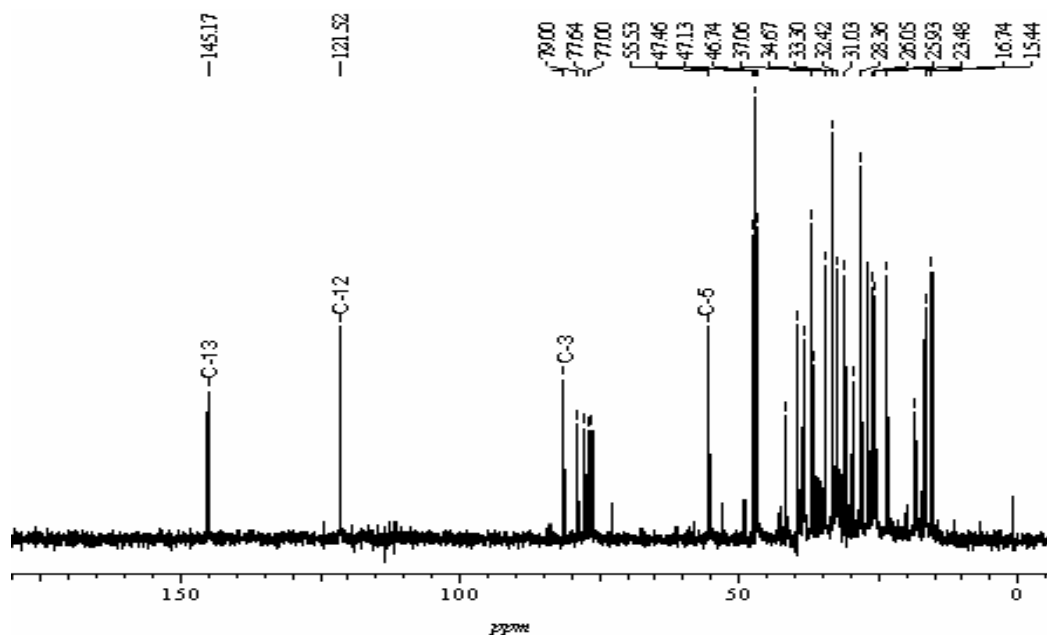


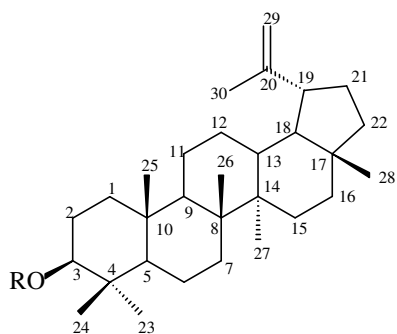
Figura 108. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, BBD, CDCl_3) de 16.

4.2.1.3 Identificação da substância 17

A análise do espectro registrado na região do IV da substância **17** (Figura 109; p. 154) revelou bandas de absorção para hidroxila em 3441 cm^{-1} (estiramento O-H), grupamentos CH_2 e CH_3 em 2922 cm^{-1} e 2851 cm^{-1} e carbonila de éster em 1729 cm^{-1} .

Os sinais presentes no espectro de RMN de ^1H (Figura 110; p. 154) podem ser atribuídos a sinais correspondentes as metilas δ_{H} 0,76-1,31, sendo que uma delas em δ_{H} 1,66 corresponde a metila ligada ao carbono sp^2 (H-30). Neste espectro também foram observados dois singletos largos em δ_{H} 4,54 e δ_{H} 4,66 correspondentes aos hidrogênios ligados a carbonos olefínicos (H-29a e H-29b) e um multipletto em δ_{H} 4,45 atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico (H-3), mais desprotegido devido à presença do grupo acila ligado a este carbono. Estes dados sugeriram um esqueleto do tipo lup-20-(29)-eno. Pela presença do sinal em δ_{H} 4,54 foi proposta a mistura de ésteres acil lupeol.

Os sinais intensos observados no espectro de RMN de ^{13}C -BBD (Figura 111; p. 155), atribuídos a dois carbonos sp^2 , sendo um deles em δ_{C} 150,3 referente ao C-20 e outro δ_{CH_2} 109,3, referente ao C-29, foram compatíveis com os valores dos deslocamentos químicos encontrados para triterpenos pentacíclicos da série lupeno. Alguns sinais remanescentes garantiram, além da molécula de lupeol, a presença ésteres de acil lupeol. Os demais sinais foram assinalados como sendo de carbonos sp^3 quaternários, metínicos, metilênicos e metílicos. A comparação dos valores de deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos para a estrutura proposta da mistura dos ésteres 3- β -O-acil lupeol estão de acordo com a literatura (CARVALHO *et al.*, 2001).



lupeol (17)

Tabela 21. Dados de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da substância 17

C	(CARVALHO <i>et al.</i> , 2001)*	17*	C	(CARVALHO <i>et al.</i> , 2001)*	17*
	δ_{C}	δ_{C}		δ_{C}	δ_{C}
1	37,7	37,78	16	35,5	35,54
2	27,4	27,41	17	43,0	42,97
3	78,9	80,57	18	48,2	48,25
4	38,8	38,33	19	47,9	47,97
5	55,3	55,34	20	150,9	150,93
6	18,3	18,16	21	29,8	31,90
7	34,2	34,18	22	40,0	39,97
8	40,8	40,82	23	28,0	27,93
9	50,4	50,31	24	15,4	14,49
10	37,1	37,06	25	16,1	16,13
11	20,9	20,92	26	15,9	15,95
12	25,1	25,14	27	14,5	14,10
13	38,0	38,0	28	18,0	17,91
14	42,8	42,79	29	109,3	109,35
15	27,4	27,41	30	19,3	19,26

*: CDCl_3

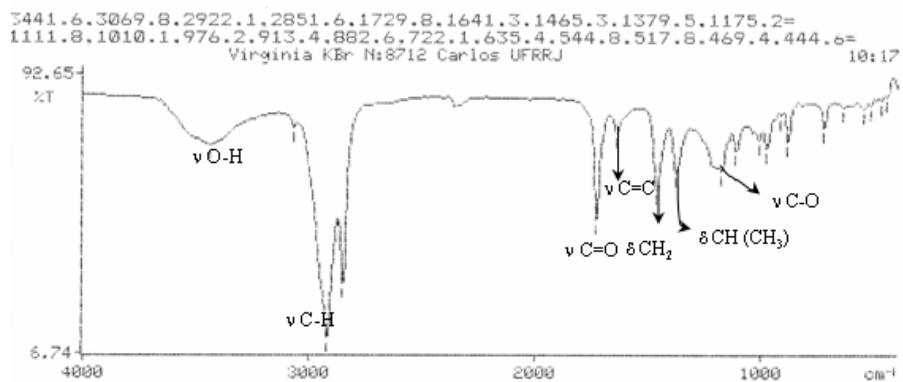


Figura 109. Espectro de I.V. (KBr) de 17.

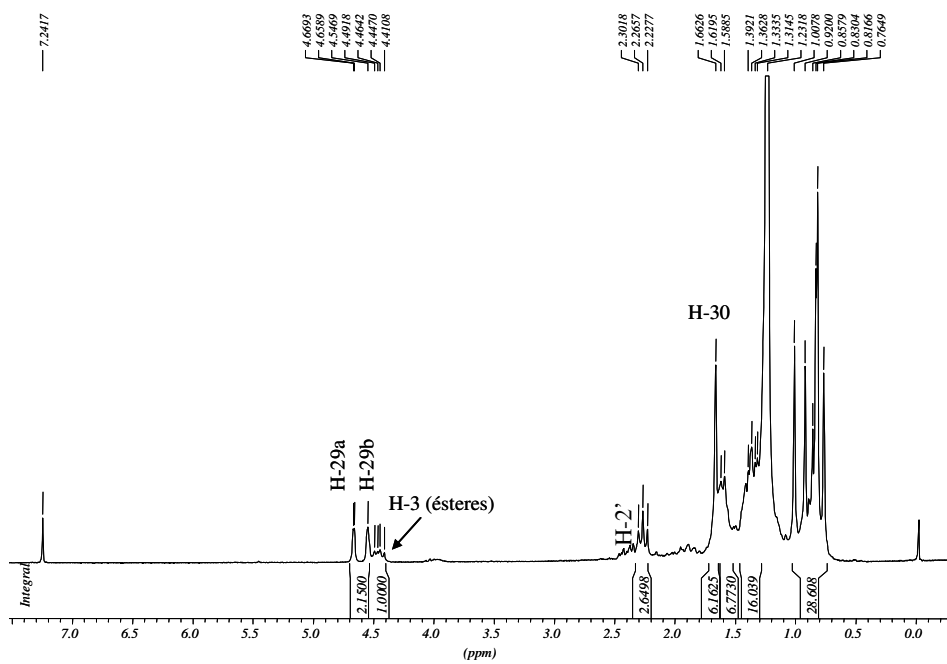


Figura 110. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 17.

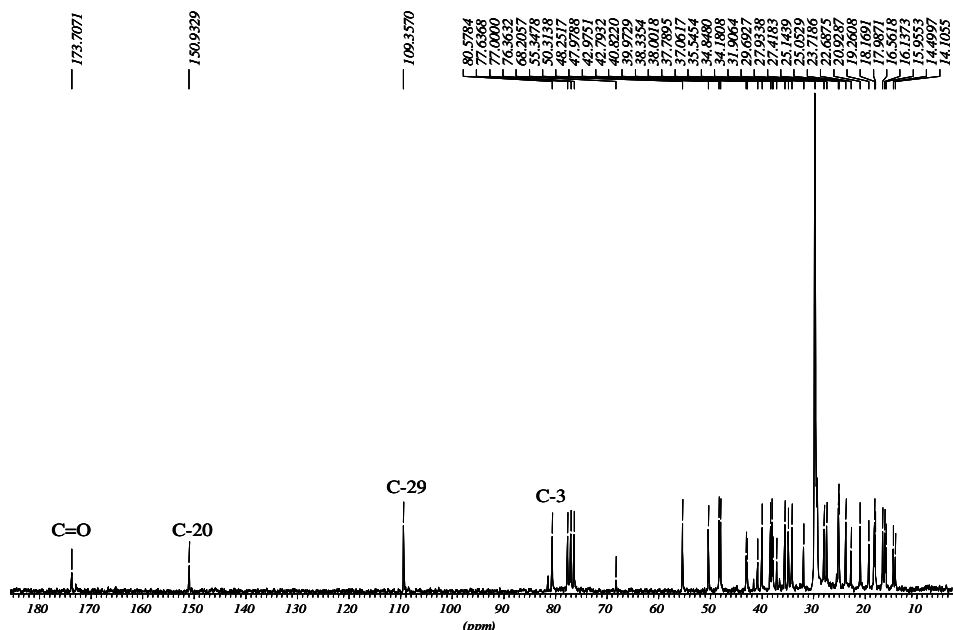


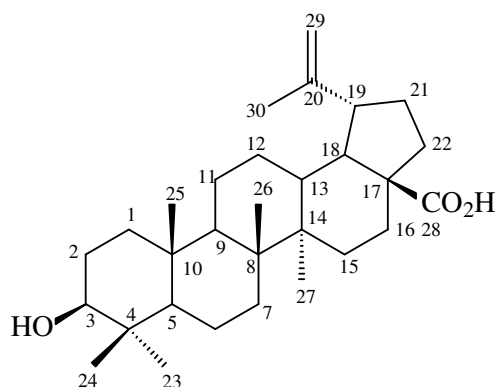
Figura 111. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, BBD, CDCl_3) de 17.

4.2.1.4 Identificação da substância 18

A análise do espectro registrado na região do IV para a substância **18** (Figura 112; p. 156) revelou bandas de absorção para grupo hidroxílico em 3463 cm^{-1} (estiramento O-H de ácido), 2937 cm^{-1} e 2867 cm^{-1} (grupos CH_2 e CH_3), 1691 cm^{-1} (C=O) e 1036 cm^{-1} (C-O).

Os sinais presentes no espectro de RMN de ^1H (Figura 113; p. 157) podem ser atribuídos as metilas, sendo que uma delas em $\delta_{\text{H}} 1,66\text{ ppm}$ (H-30), corresponde a metila ligada ao carbono sp^2 . Também foram observados nesse espectro, dois singletos largos em $\delta_{\text{H}} 4,58$ e $4,79$ (H-29a e H-29-b), correspondentes a hidrogênios ligados ao carbono olefínico e um multiplete em $\delta_{\text{H}} 3,16$ (H-3) atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico. Essas informações fornecidas pelo espectro de hidrogênio sugeriram uma estrutura de triterpeno pentacíclico da série dos lupenos semelhante ao observado para a substância **17**.

As diferenças entre as substâncias **17** e **18**, apareceram no espectro de RMN de ^{13}C -BBD (Figura 114; p. 158). Nesse foram observadas a presença de dois carbonos sp^2 em $\delta_{\text{C}} 150,71$ (C-20) e outro em $\delta_{\text{CH}_2} 109,99$ (C-29) e um carbinólico $\delta_{\text{CH}} 79,33$ (C-3). Apesar da ausência do sinal referente à carbonila de ácido, o sinal do carbono quaternário C-17 em $\delta_{\text{C}} 47,18$ (mais desprotegido do que o mesmo para a substância **17**), evidenciou sua ligação ao grupo carboxílico. Os demais sinais foram atribuídos aos carbonos sp^3 quaternários, metínicos, metilênicos e metílicos. Estes dados foram comparados com os descritos na literatura (BILIA *et al.*, 1996) e estão de acordo para a estrutura do ácido betulínico (**18**).



ácido betulínico (**18**)

Tabela 22. Dados de RMN de ^{13}C (50 MHz) da substância 18

C	(BILIA <i>et al.</i> , 1996)*	18^{*1}	C	(BILIA <i>et al.</i> , 1996)*	18^{*1}
	δ_{C}	δ_{C}		δ_{C}	δ_{C}
1	38,70	38,66	16	29,30	29,99
2	27,30	27,62	17	48,00	47,18
3	78,90	79,33	18	48,00	47,18
4	38,90	39,12	19	48,80	49,52
5	55,40	55,61	20	150,40	150,71
6	18,30	18,56	21	30,00	30,84
7	34,30	34,60	22	34,00	34,60
8	40,70	40,97	23	28,00	28,26
9	50,40	50,76	24	15,20	15,64
10	37,20	37,36	25	15,90	16,40
11	20,90	21,13	26	16,00	18,56
12	25,60	25,77	27	14,70	14,95
13	38,50	38,66	28	181,00	-
14	42,50	42,69	29	109,60	109,99
15	30,60	30,84	30	19,40	19,55

*: $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

*1: CDCl_3

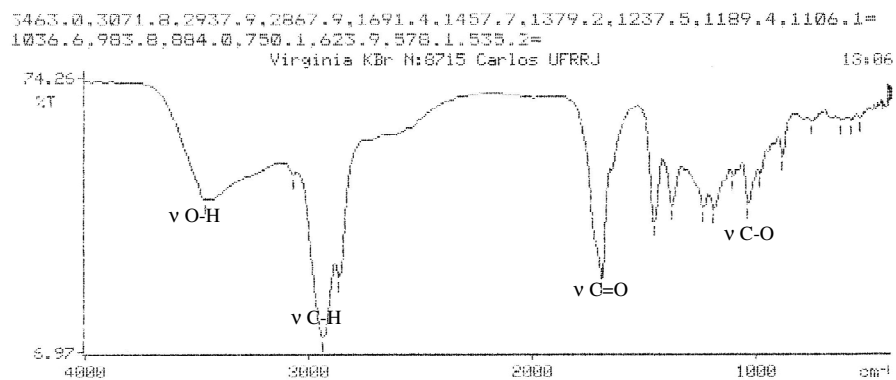


Figura 112. Espectro de I.V. (KBr) de 18.

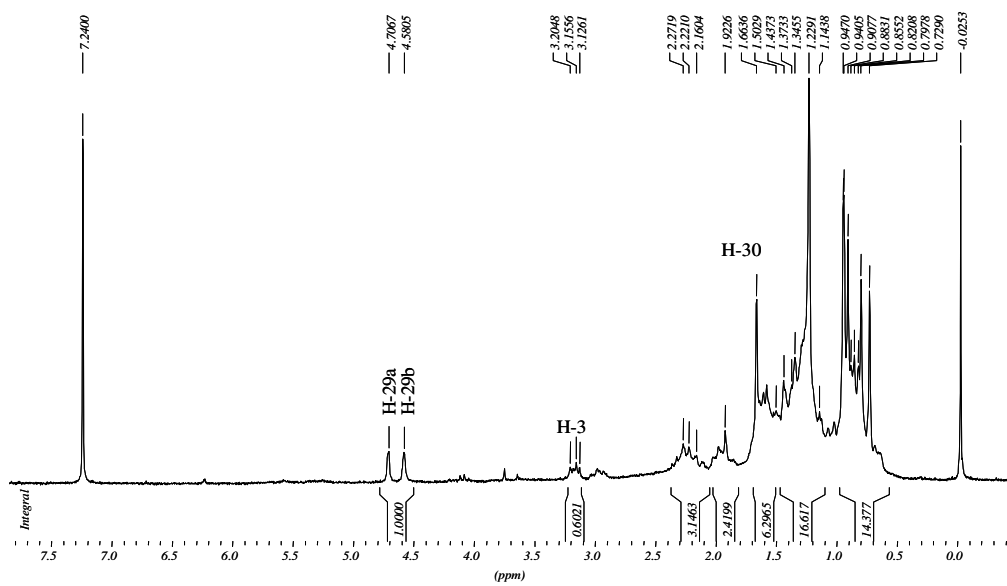


Figura 113. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 18.

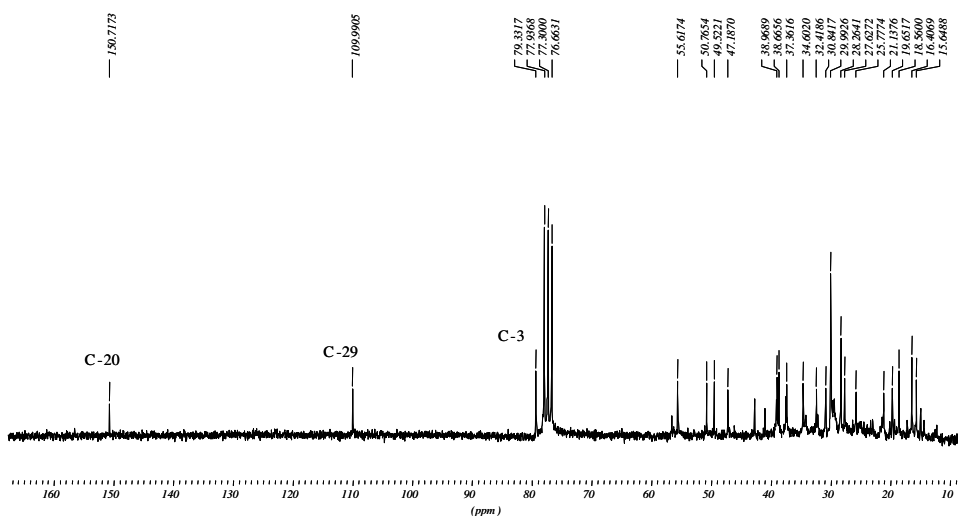
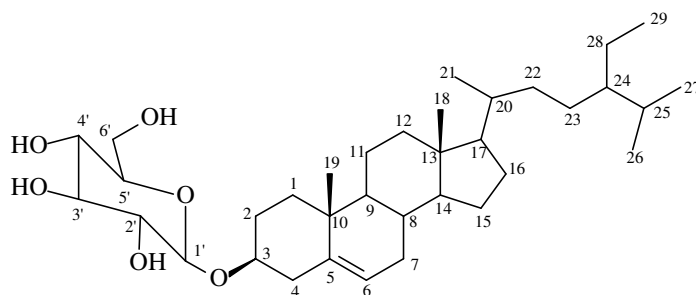


Figura 114. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, PND, CDCl_3) de **18**.

4.2.1.5 Identificação da substância **19**

O espectro de IV de **19** (Figura 115; p. 159) revelou uma banda larga em 3416 cm^{-1} referente ao estiramento de grupos hidroxílicos e outras absorções em 2933 cm^{-1} e 2871 cm^{-1} referentes à presença de CH , CH_2 e CH_3 e em 1163 cm^{-1} devido ao estiramento C-O. Devido a polaridade e a alta solubilidade em piridina, propomos que a amostra tratava-se de saponina esteroidal. A parte da aglicona como sendo esteroidal foi definida pelo espectro de RMN de ^1H (Figura 116; p. 160) que apresentou sinais característicos de esteróides; δ_{H} 0,63 atribuído ao grupo metílico mais protegido e vários sinais entre δ_{H} 0,81 e δ_{H} 0,97 de grupos metílicos agrupados na mesma região de baixa frequência.

No espectro de RMN de ^{13}C DEPT- 90° e 135° (Figura 117; p. 160) foram observados quatro valores atribuídos a carbonos olefínicos sendo os deslocamentos químicos em δ_{CH} 141,05 e δ_{CH} 122,09 referentes aos carbonos C-5 e C-6 da ligação dupla característica da molécula do sitosterol. Em concordância com os dados do RMN de ^1H , os outros sinais sugeriram a presença de uma unidade de açúcar, δ_{CH} 102,67 ppm do carbono anomérico C-1', quatro sinais de carbonos metínicos oxigenados em δ_{CH} 71,79, 75,43, 76,31, 78,58 e 78,69 e um sinal de carbono metilênico em δ_{CH_2} 62,91 referente ao carbono C-6'' da molécula de glicose. A comparação dos valores dos deslocamentos químicos de carbonos e hidrogênios com os da literatura (KOJIMA *et al.*, 1990) confirmou a estrutura de **19** como sendo o 3-O- β -D-glicopiranosilsitosterol.



3-O- β -D-glicopiranosilsterol (**19**)

Tabela 23. Dados de RMN de ^{13}C (50 MHz) da substância 19

C	(KOJIMA <i>et al.</i> , 1990)*	19^{*1}	C	(KOJIMA <i>et al.</i> , 1990)*	19^{*1}
	δ_{C}	δ_{C}		δ_{C}	δ_{C}
1	36,8	37,06	19	19,7	19,57
2	29,3	29,58	20	36,1	36,52
3	76,9	76,58	21	20,6	20,14
4	41,8	40,08	22	33,3	34,33
5	140,4	141,05	23	27,8	26,48
6	121,2	122,08	24	45,1	46,10
7	31,4	32,19	25	29,3	30,37
8	31,4	32,21	26	19,1	19,35
9	49,6	50,47	27	18,9	19,16
10	36,8	37,06	28	25,4	24,66
11	22,5	21,42	29	12,1	12,30
12	39,7	39,45	1'	100,8	102,67
13	42,3	42,61	2'	73,4	75,43
14	56,2	56,96	3'	76,7	76,60
15	23,8	23,52	4'	68,5	71,79
16	28,7	28,69	5'	71,5	71,79
17	55,4	56,37	6'	62,1	62,90
18	11,6	12,12			

*: DMSO- d_6

*1: $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

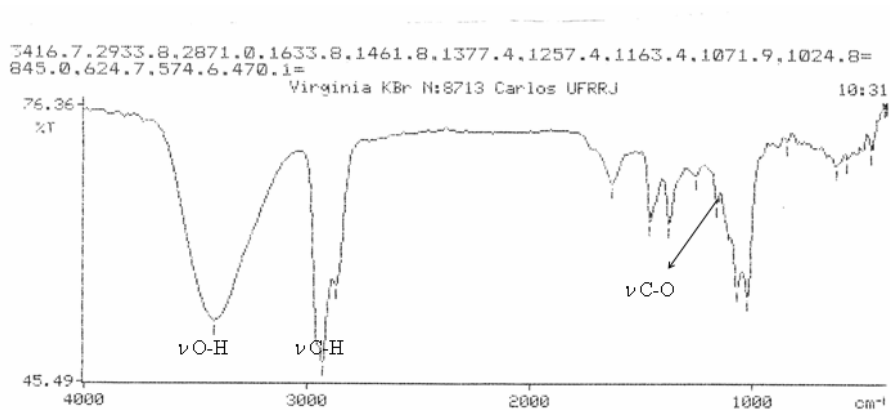


Figura 115. Espectro de I.V. (KBr) de 19.

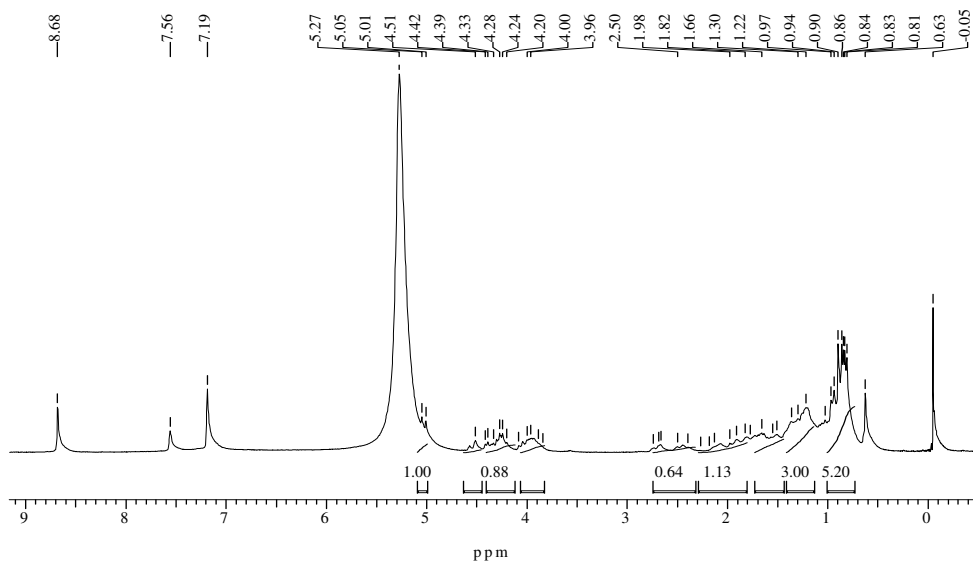


Figura 116. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de 19.

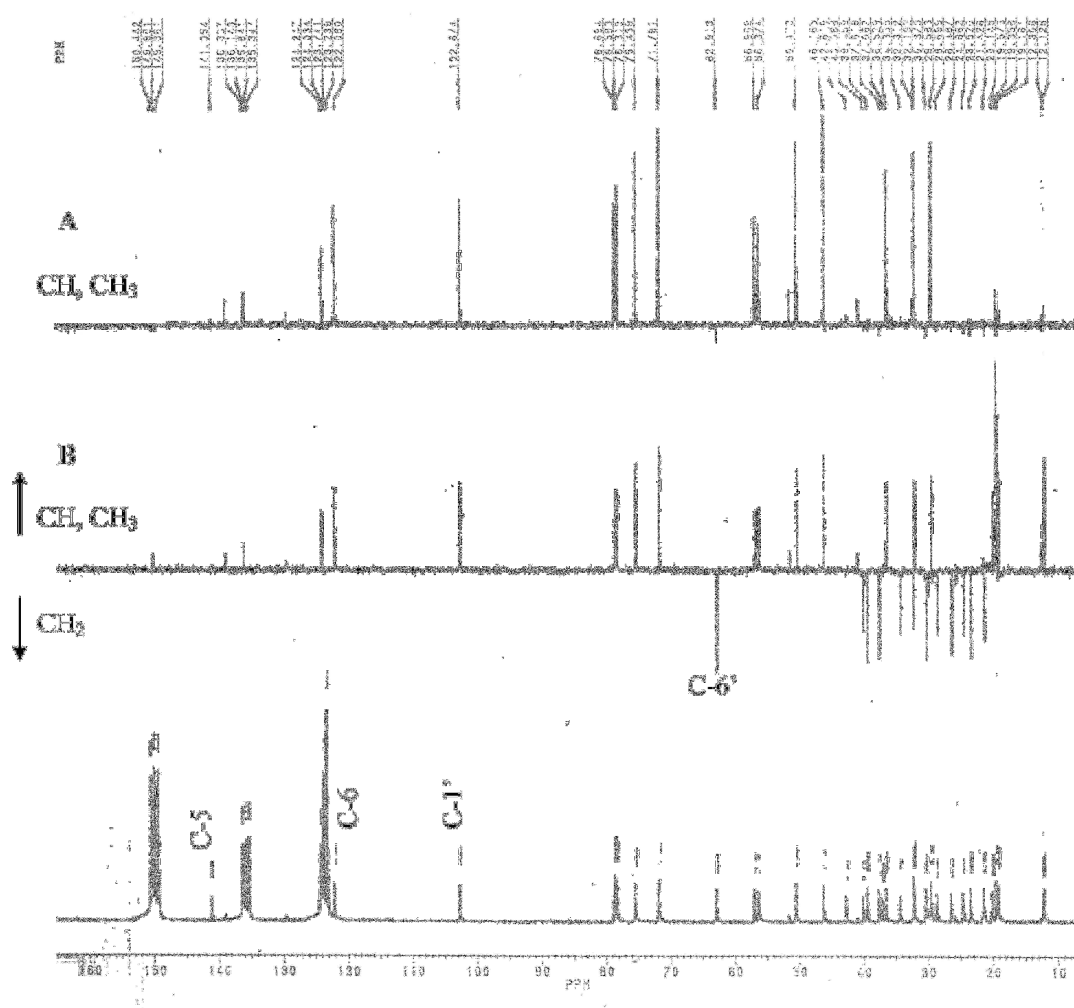


Figura 117. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DEPT 90° [A] e 135° [B], $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de 19.

4.2.1.6 Identificação da substância 20

O espectro de RMN de ^1H de **20** (Figura 118; p. 163) exibiu sinais na região de hidrogênios em anel aromático: dois singletos largos atribuídos ao acoplamento *meta* entre H-6 em δ_{H} 6,17 e H-8 em δ_{H} 6,32, e outros três sinais atribuídos a um dubleto largo em δ_{H} 6,94 ($J=8,5$ Hz, H-6'), um dubleto em δ_{H} 6,97 ($J=8,5$ Hz, H-5') e um singlete largo em δ_{H} 7,03 (H-2') referentes ao sistema ABC do anel B. Além desses sinais, foram observados nesse espectro, absorções relativas a uma hidroxila quelada HO-5 em δ_{H} 12,95 (*s*), um grupo metoxílico em δ_{H} 3,79 (*s*) e ao singlete em δ_{H} 8,28 ppm atribuído ao hidrogênio metínico H-2, típico de esqueletos de isoflavonóides. A localização do grupo metoxílico foi definida através da análise dos sinais de NOE nos espectros obtidos com experimentos NOEDIFF (Figura 119; p. 163). O espectro resultante deste experimento com a substância **20**, através de irradiação na frequência da metoxila, gerou sinal de NOE em δ_{H} 6,97 (*d*, H-5'), justificando a localização em C-4'.

O espectro de RMN de ^{13}C -BBD (Figura 120; p. 164) revelou sinais atribuídos aos carbonos dos sistemas AB do anel A e ABC do anel B. Foram confirmados sinais para 16 carbonos, sendo seis pertencentes aos carbonos metínicos oxigenados δ_{CH} 154,06 (C-2), δ_{CH} 99,15 (C-6), δ_{CH} 93,77 (C-8), δ_{CH} 116,37 (C-2'), δ_{CH} 112,01 (C-5') e δ_{CH} 119,78 (C-6'), nove quaternários δ_{C} 123,39 (C-3), $\delta_{\text{C=O}}$ 179,99 (C-4), δ_{C} 161,97 (C-5), δ_{C} 164,50 (C-7), δ_{C} 157,58 (C-9), δ_{C} 104,20 (C-10), 122,07 (C-1'), δ_{C} 146,10 (C-3') e δ_{C} 147,68 (C-4'), e o metílico δ_{CH_3} 55,66 (4'-OCH₃).

Todos os carbonos metínicos tiveram a interpretação possibilitada pelas correlações heteronucleares no experimento de HMQC (Figura 121; p. 164): δ_{C} 154,06/ δ_{H} 8,28 (H-2), 99,15/6,17 (H-6), 93,77/6,32 (H-8), 116,37/7,03, 112,01/6,97 (H-5') e 119,78/6,94 (H-6') (Tabela 24; p. 162).

Pelo mapa de contornos HMBC (Figuras 122 e 123; p. 165 e 166) mostrou, além do acoplamento a duas ligações ($^2J_{\text{CH}}$) entre os hidrogênios da metoxila e o C-4', que concordou com o experimento de NOEDIFF quanto à localização desse grupo, outras correlações heteronucleares ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$) que permitiram atribuir inequivocamente todos os valores de deslocamento químico de carbono da substância 20.

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a substância **20**, mostraram-se semelhantes àqueles descritos na literatura (AGRAWAL *et al.*, 1989) e permitiram propor a estrutura da 5,7,3'-trihidroxi-4'-metoxiisoflavona ou prateseína, como é conhecida trivialmente. Esta substância isolada anteriormente de *A. inermis* (KRAFT *et al.*, 2000) está sendo divulgada pela primeira vez em *A. fraxinifolia*.

Tabela 24. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) da substância 20

C	δ_{C} (AGRAWAL, 1989)	20		
	δ_{C}	HMQC (1J)		HMBC ($^{2,3}J$)
		δ_{C}	δ_{H} (<i>mult.</i> ; <i>J</i> Hz)	
2	153,4	154,06	8,28 (<i>s</i>)	-
3	123,7	123,39	-	H-2
4	180,4	179,99	-	H-2
5	162,7	161,97	-	H-6; <u>HO-5</u>
6	98,9	99,15	6,17 (<i>sl</i>)	H-8, <u>HO-5</u>
7	164,5	164,50	-	-
8	93,5	93,77	6,32 (<i>sl</i>)	H-6
9	157,9	157,58	-	H-8
10	106,4	104,20	-	H-6; H-8
1'	122,7	122,07	-	H-2'
2'	116,7	116,37	7,03 (<i>sl</i>)	H-6'
3'	146,3	146,10	-	H-2'; H-5'; H-6'
4'	147,6	147,68	-	H-2'; H-5'; H-6'; <u>OCH₃</u>
5'	111,4	112,01	6,97 (<i>d</i> ; 8,5)	
6'	119,9	119,78	6,94 (<i>d</i> ; 8,5)	H-6', H-5'
4'-OCH ₃	55,2	55,66	3,79 (<i>s</i>)	-
HO-5	-	-	12,95 (<i>s</i>)	-

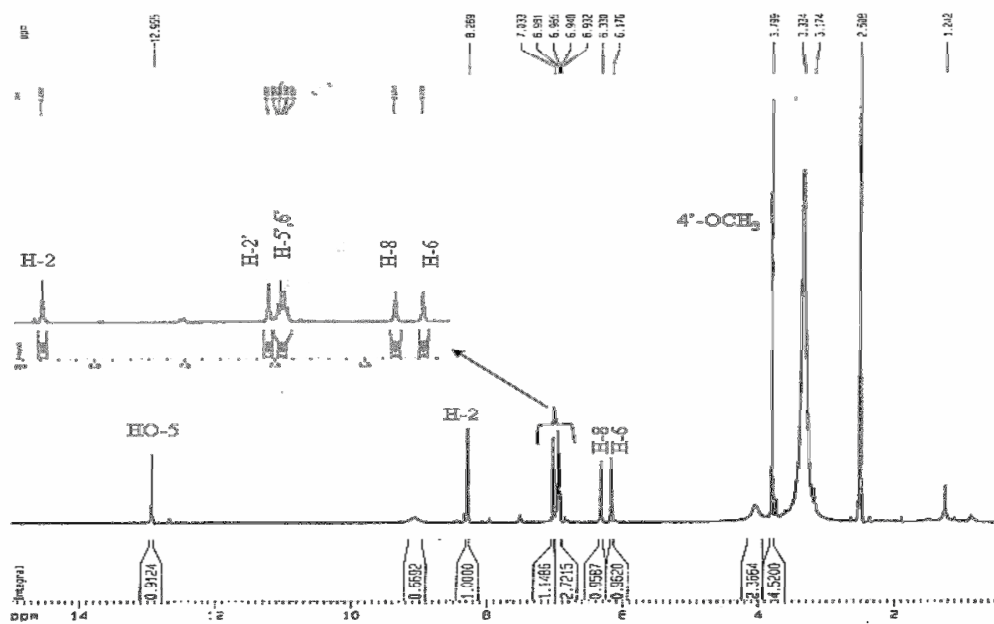


Figura 118. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) de 20.

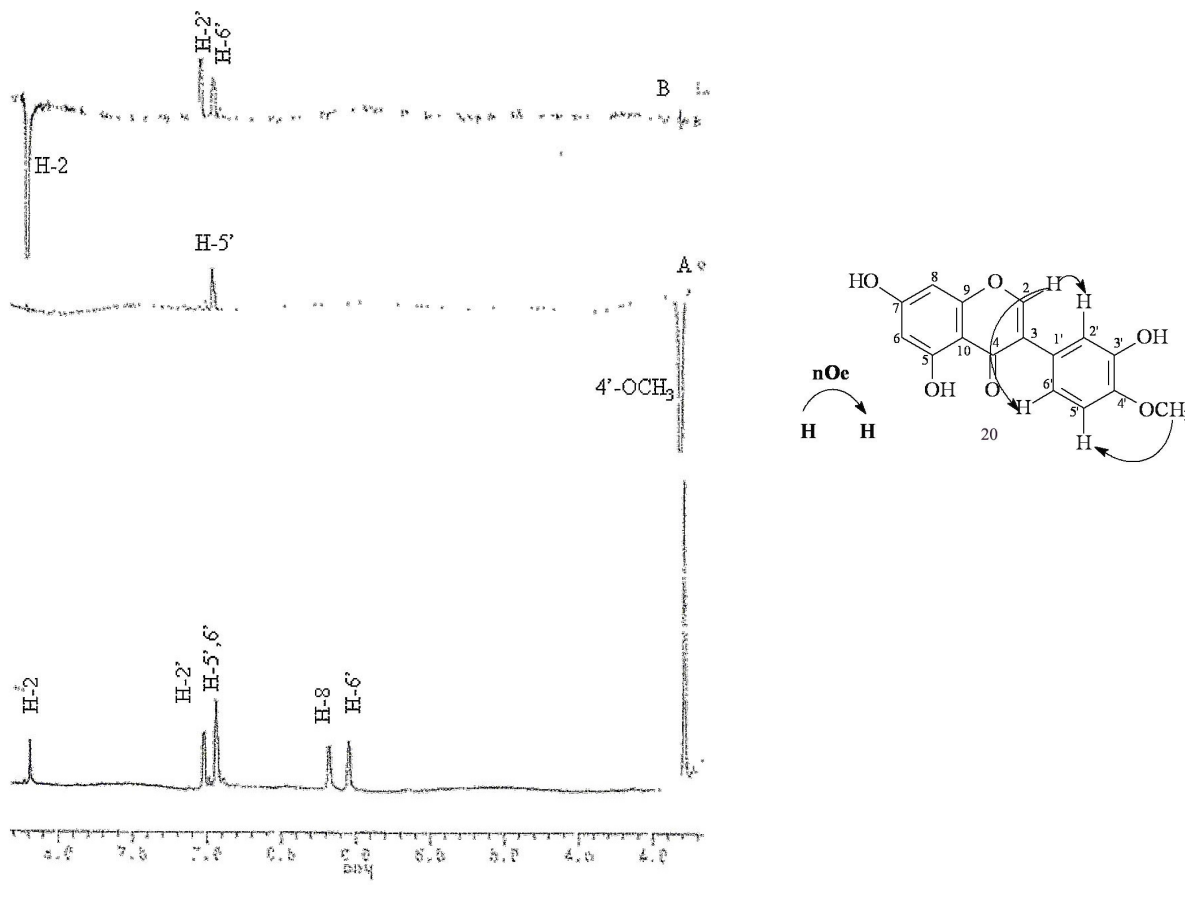


Figura 119. Experimento de NOEDIFF (200 MHz, DMSO-d_6) de 20, [A] Irradiação na frequência da metoxila, [B] Irradiação na frequência do hidrogênio H-2.

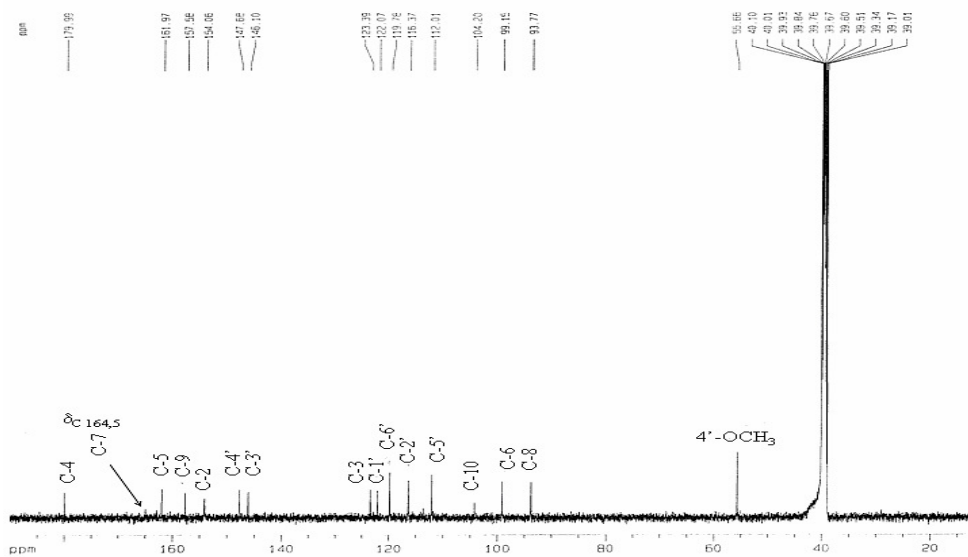


Figura 120. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, BBD, DMSO-d_6) de 20.

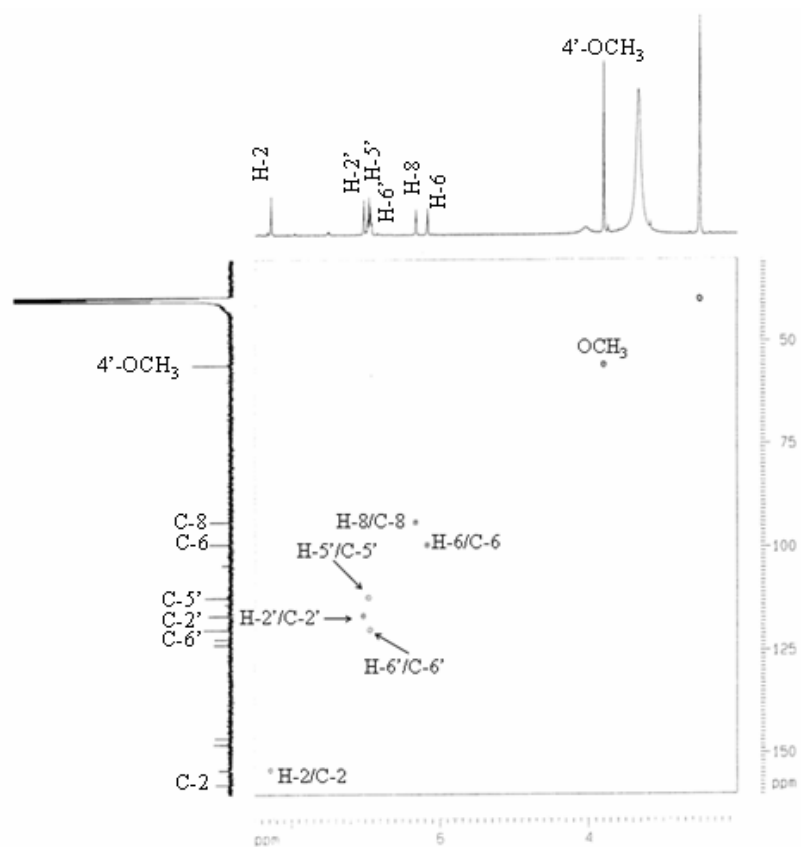


Figura 121. Mapa de contornos HMBC (125 MHz, DMSO-d_6) de 20.

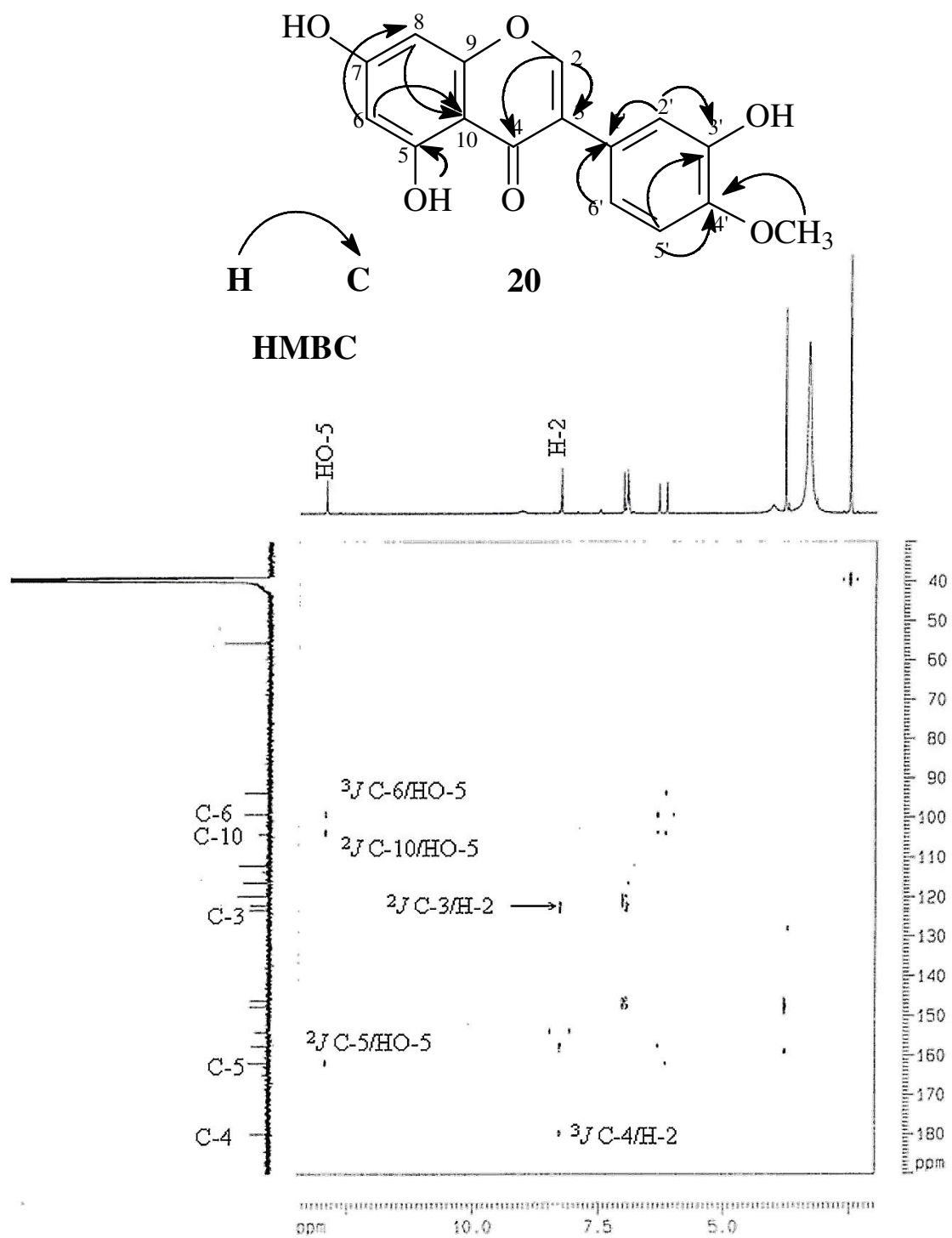


Figura 122. Mapa de contornos (HMBC, 125 MHz, DMSO- d_6) e algumas correlações observadas para a substância 20.

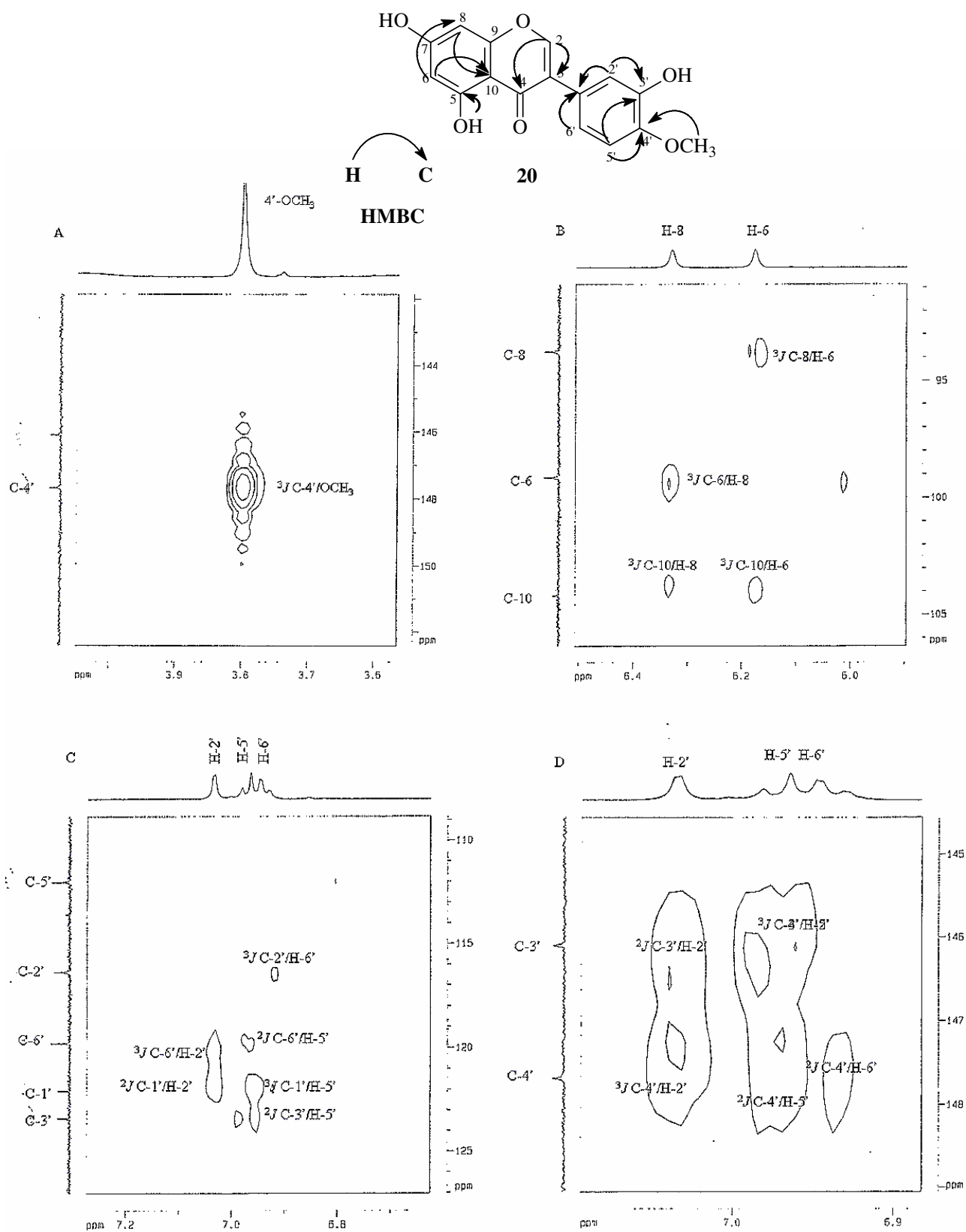


Figura 123. Expansões do mapa de contornos (HMBC, 125 MHz, DMSO-d₆) de 20 nas regiões entre: [A] δ_C 143,0-152,0 ppm e δ_H 3,60-4,0 ppm, [B] δ_C 91,0-106,0 ppm e δ_H 5,90-6,50 ppm, [C] δ_C 109,0-126,0 ppm e δ_H 6,70-7,20 ppm e [D] δ_C 145,0-150,0 ppm e δ_H 6,90-7,10 ppm.

4.2.1.7 Identificação da substância 21

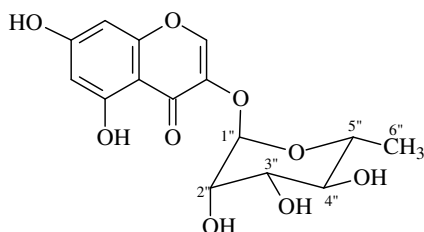
O espectro de RMN de ^1H (Figura 124; p. 169) apresentou na região de frequência alta sinais que evidenciaram a presença de dois anéis aromáticos. Esses sinais corresponderam a dois dubletos em δ_{H} 6,18 e δ_{H} 6,35 atribuídos aos hidrogênios H-6 ($J=2,0$) e H-8 ($J=2,0$), respectivamente e um singlete em δ_{H} 8,20 (s) atribuído ao hidrogênio H-2 do esqueleto de um isoflavonóide. Pela ausência de sinais de hidrogênios para o anel B de flavonóides, foi proposto o esqueleto de uma cromona. As multiplicidades dos sinais adicionais na região de açúcar, sendo um singlete largo em δ_{H} 5,17 (H-1'), os sinais δ_{H} 3,89 (sl , H-2'), 3,64 (sl , H-3'), 3,23 (m , H-4'), 3,58 (m , H-5') e principalmente pelo dubleto em δ_{H} 1,10 (d , H-6'), todos na mesma intensidade dos sinais encontrados na região de frequência alta, indicaram a presença de uma unidade de ramnose na molécula. O posicionamento deste açúcar foi definido pelo experimento de NOEDIFF (Figura 125; p. 169). O espectro resultante deste experimento com esta substância, através de irradiação na frequência do hidrogênio H-1', gerou sinal de NOE em δ_{H} 8,20 (s , H-2), justificando a conexão do açúcar ao C-3, como previsto pela biossíntese mostrada no Esquema 18 (p. 168).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 126; p. 170) permitiu atribuir inequivocamente os valores dos deslocamentos químicos de todos os carbonos de **21** em comparação com os valores da 5,7-diidrox-3-*O*- α -L-ramnopiranosilcromona, descrita na literatura (LU & FOO, 1999). Destes carbonos merecem destaque os carbonos quaternários C-3 (δ_{C} 138,03), mais desprotegido devido à proximidade ao átomo de oxigênio, em comparação com esqueletos de isoflavonóides comuns, e, os sinais dos carbonos da unidade de ramnose δ_{CH} 100,57 (C-1'), 70,21 (C-2'), 69,92 (C-3'), 71,52 (C-4'), 69,83 (C-5') e o carbono metílico δ_{CH_2} 17,85 (C-6') (Tabela 25; p. 168).

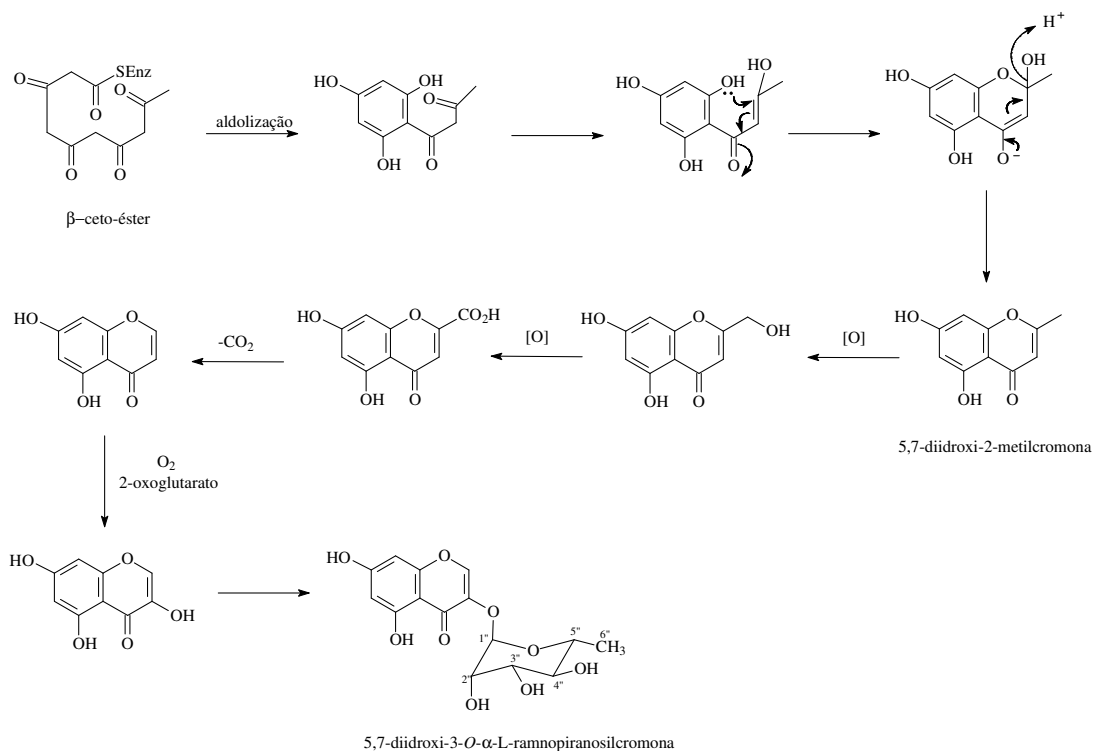
Os picos em m/z 194 (100%), m/z 166 (12,5%), m/z 152 (2,5%) e m/z 137 (87,5%) relativo à perda do açúcar, perda de 28 (CO), fragmentação Retro Diels-Alder e fragmentação de $[(\text{C}_6\text{H}_3)(\text{OH})_3(\text{C}\equiv\text{O})^+]$, respectivamente foram compatíveis com a estrutura proposta para **21** (Figura 127, p. 170 e Esquema 19; p. 171). Apesar da ausência de fragmento correspondente a ramnose, o experimento de NOEDIFF garantiu a ligação desse grupo à porção cromona.

As cromonas são formadas pela via do acetato através de reações de aldolização ou de Claisen em um poli- β -ceto éster. Estas reações envolvem a aldolização de três unidades acetato e condensação de Claisen de outras duas unidades acetato. O intermediário chave é a 5,7-diidrox-2-metilcromona que, através de modificações (oxidação e descarboxilação) na cadeia alifática lateral, e posterior reação de *O*-glicosilação, forma a 5,7-diidrox-3-*O*- α -L-ramnopiranosilcromona (Esquema 18; p. 168).

Esta substância isolada anteriormente de *Eucryphia cordifolia* (Eucryphiaceae) (TSCHESCHE *et al.*, 1979) está sendo registrada pela primeira vez na subfamília Faboideae (Papilionoideae).



5,7-diidrox-3-*O*- α -L-ramnopiranosilcromona (**21**)



Esquema 18. Rota biosintética de formação da 5,7-diidroxi-*O*-α-L-ramnopiranosilcromona encontrada nas raízes de *A. fraxinifolia* (adaptado de DEWICK, 2002).

Tabela 25. Dados de RMN de ¹H (200 MHz) e de ¹³C (50 MHz) de 21

C	(LU & FOO, 1999)*		21*	
	δ _H	δ _C	δ _H (<i>mult.</i> ; <i>J</i> Hz)	δ _C
2	8,33 (<i>s</i>)	148,30	8,20 (<i>s</i>)	148,34
3	-	138,34	-	138,03
4	-	177,53	-	176,97
5	-	161,80	-	161,53
6	6,21 (<i>d</i> ; 2,0)	99,10	6,18 (<i>d</i> ; 2,0)	99,06
7	-	164,58	-	165,10
8	6,37 (<i>d</i> ; 2,0)	94,14	6,35 (<i>d</i> ; 2,0)	94,03
9	-	157,60	-	157,34
10	-	105,08	-	104,58
1'	5,22 (<i>d</i> ; 1,4)	100,85	5,17 (<i>sl</i>)	100,57
2'	3,89 (<i>sl</i>)	70,48	3,89 (<i>sl</i>)	70,21
3'	3,68 (<i>m</i>)	70,11	3,64 (<i>m</i>)	69,92
4'	3,25 (<i>m</i>)	71,79	3,23 (<i>m</i>)	71,52
5'	3,58 (<i>m</i>)	70,07	3,58 (<i>m</i>)	69,83
6'	1,13 (<i>d</i> ; 6,2)	18,09	1,10 (<i>d</i> ; 6,0)	17,85

*: DMSO-d₆

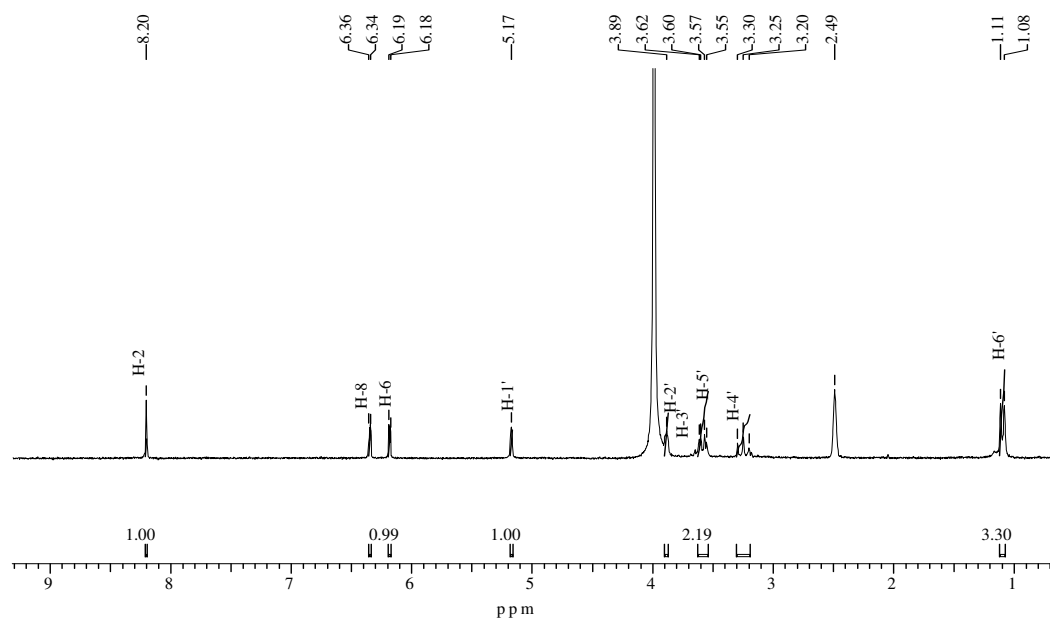


Figura 124. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d_6) de 21.

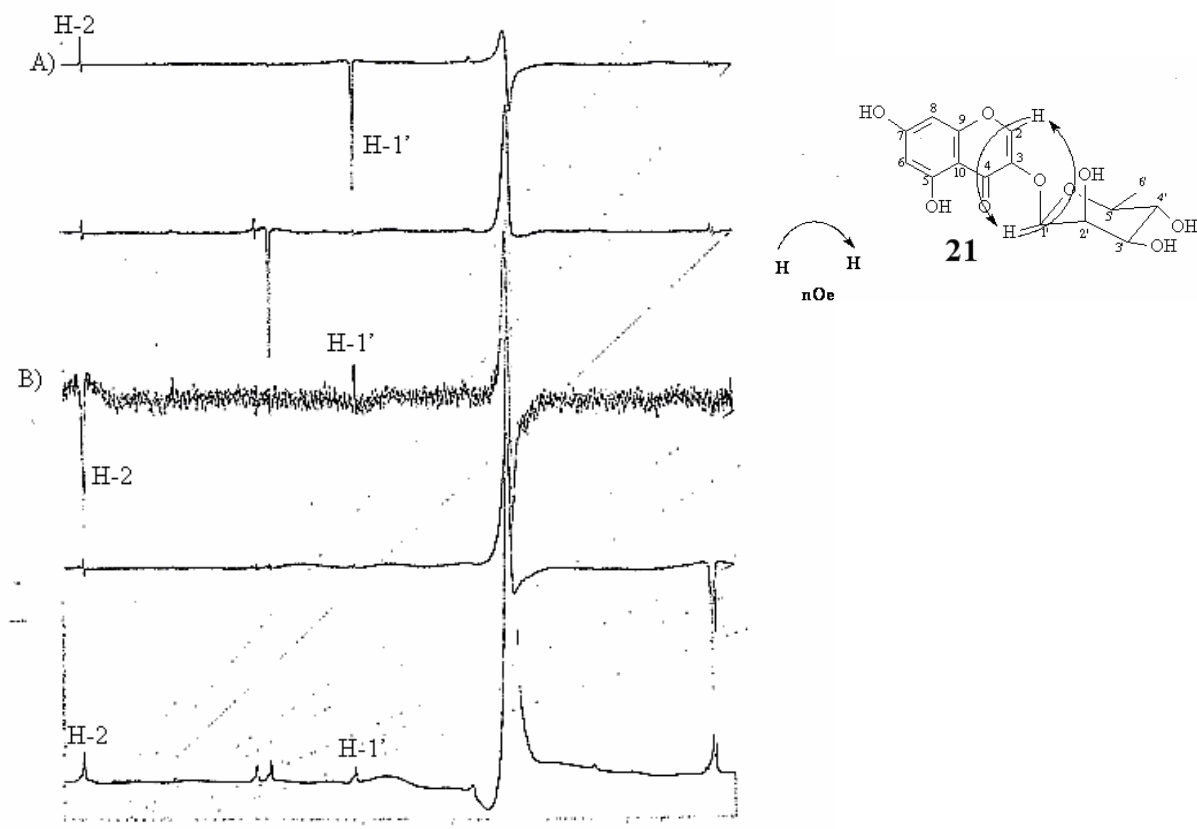


Figura 125. Espectro de NOEDIFF (200 MHz, DMSO-d_6) de 21, [A] Irradiação na frequência do hidrogênio H-1', [B] Irradiação na frequência do hidrogênio H-2.

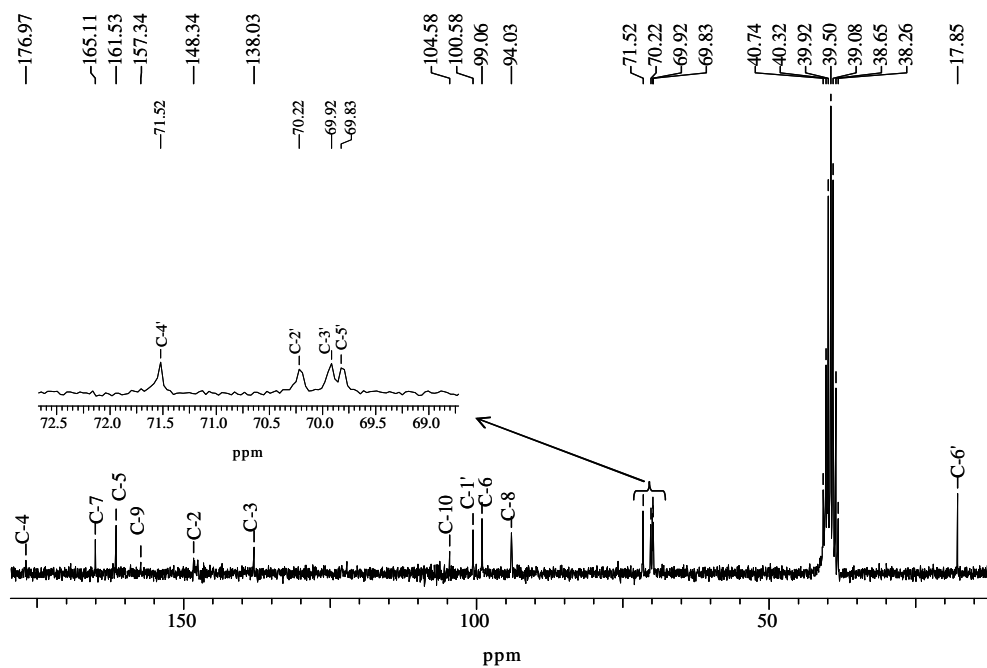


Figura 126. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, BBD, DMSO- d_6) de 21.

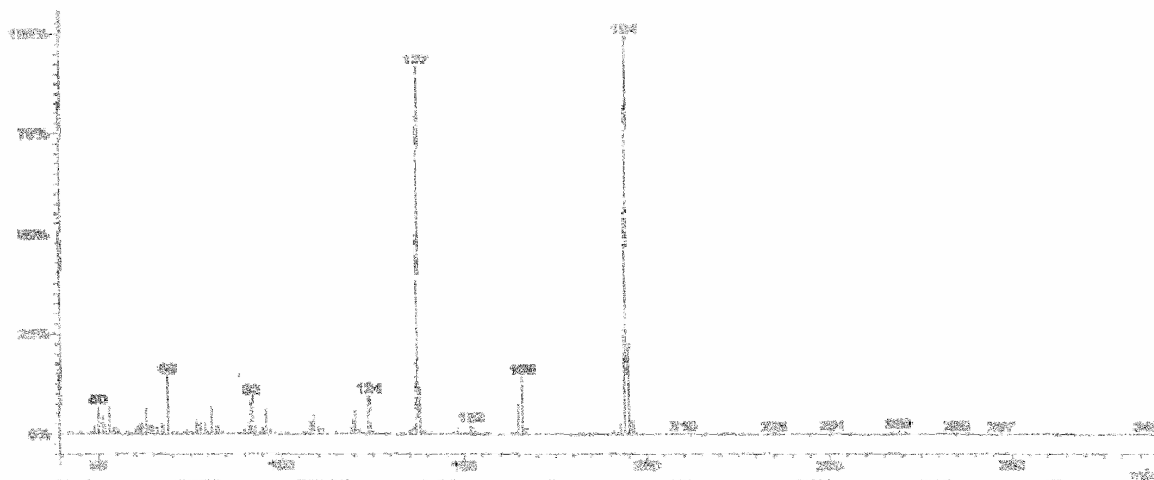
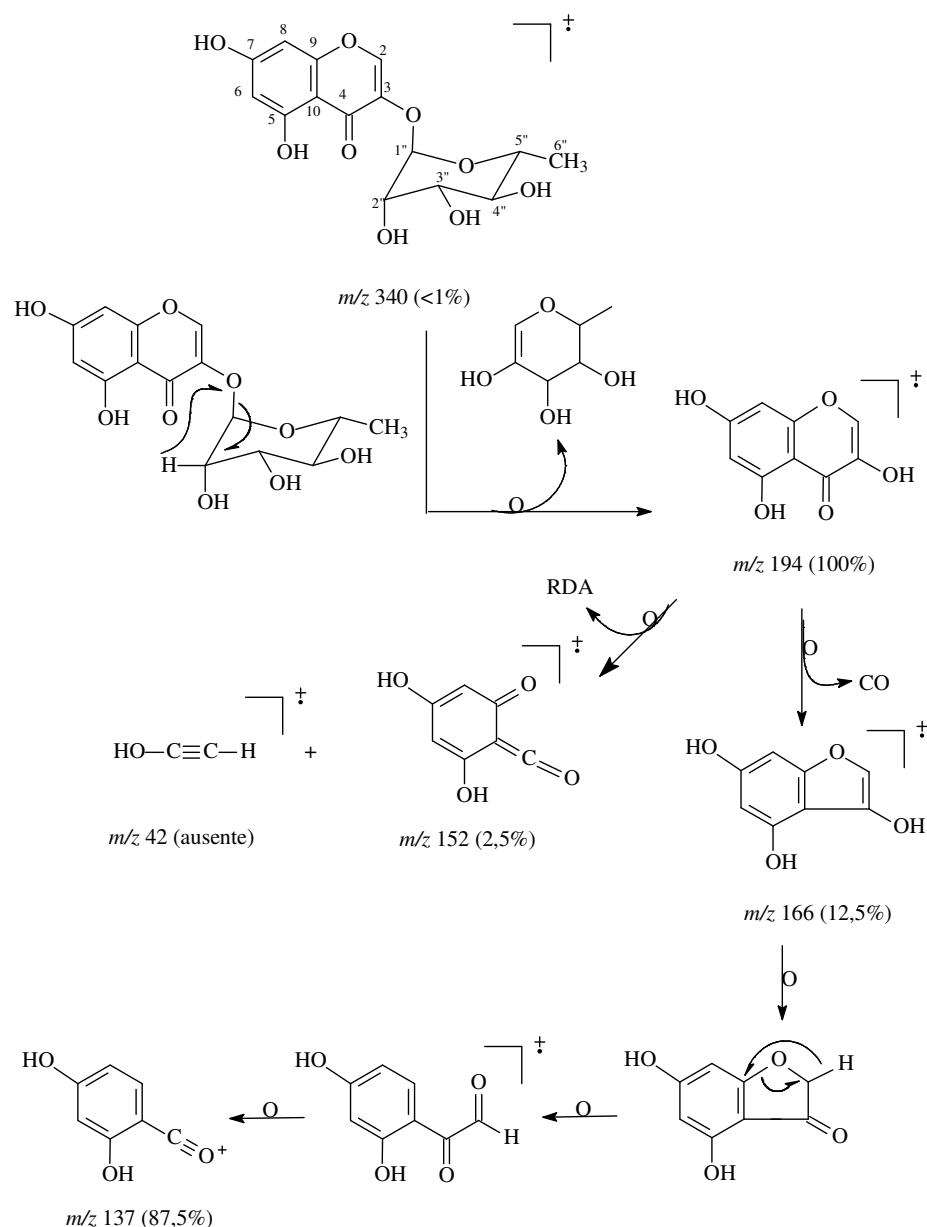


Figura 127. Espectro de Massa por I.E. (70 eV) de 21.



Esquema 19. Proposta de fragmentação para a substância 21.

4.2.1.8 Identificação das substâncias 22 e 23

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 128, 129 e 130; p. 175 e 176) incluindo experimento $^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY (Figura 131; p. 177) desta mistura, apresentou dois pares de dubletos acoplado entre si em δ_{H} 5,62 (H-2) e δ_{H} 4,17 (H-3) ($J=2,0$ Hz) [22]; δ_{H} 5,55 (H-2) e δ_{H} 4,21 (H-3) ($J=2,0$ Hz) [23], representando dois sistemas AB em carbonos oxigenados, cujos valores das constantes de acoplamento foram compatíveis com a relação *cis* entre os hidrogênios ligados aos carbonos metínicos C-2 e C-3 (GAFFIELD & WAISS, 1975). Também foi verificado pelo espectro de RMN de ^1H , o conjunto de sinais em δ_{H} 5,95 e δ_{H} 5,97 [22]; δ_{H} 5,92 e δ_{H} 5,94 [23] (contendo dubletos com $J=2,2$ Hz) compatíveis com sinais de hidrogênios (H-6 e H-8) de flavanonois. A localização da unidade de açúcar foi auxiliada pelo espectro de correlação 2D NOESY (Figura 132; p. 177) que mostrou interações espaciais

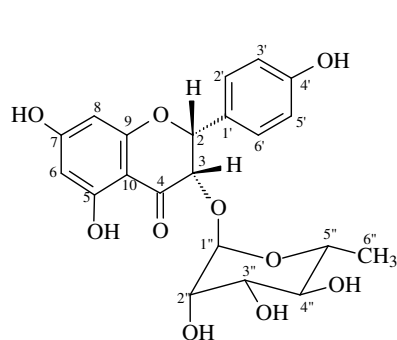
entre o hidrogênio H-3 e o hidrogênio anomérico H-1'' da ramnose entre outras interações que confirmaram os anéis mono e dioxigenados para as substâncias **22** e **23**, respectivamente. A proposta de mistura dos flavanonóis foi confirmada pela integração dos sinais dos respectivos pares de dubletos ($J= 2,0$ Hz), sendo que os sinais atribuídos a **22** [δ_H 5,62 (H-2) e 4,0 (H-3)] apresentaram-se com maior intensidade do que os atribuídos a **23** [δ_H 5,55 (H-2) e 4,21 (H-3)]. A integração desses sinais permitiu calcular a percentagem relativa de 6/4 entre **22** e **23**.

A análise dos espectros de RMN de ^{13}C (BBD e APT) (Figuras 133, 134 e 135; p. 178 e 179) confirmou os deslocamentos dos carbonos metínicos e permitiu identificar os sinais dos carbonos quaternários desta unidade proposta para **22** e **23** [δ_C 192,9, 193,1 (C=O), 164,1, 164,0 (C-5), 167,1, 167,1 (C-7), 162,6, 162,5 (C-9) e 100,2, 100,3 (C-10)]. Esses valores, aliados aos sinais de hidroxilas fenólicas em δ_H 11,7 (*s*, HO-5), 9,47 (*sl*), 8,92 (*s*) e 8,91 (*s*), estão de acordo com os anéis A e C. Os demais sinais na região de núcleos em sistemas aromáticos compatíveis com a presença do sistema AA'BB' [representado pelos sinais em δ_H 7,26 e 6,76 (*d*, 8,4 Hz, 2H, cada) ligados aos carbonos em δ_{CH} 127,8 e 115,1, respectivamente] e de um sistema ABC [representado pelos sinais em δ_H 6,84 (*s*, 1H), 6,76 (*d*, 8,4 Hz) e 6,71 (*d*, 8,4 Hz) ligados nos carbonos δ_{CH} 114,1, 117,6 e 115,1, respectivamente]. Os demais sinais de carbonos aromáticos quaternários [δ_C 125,8 (C-1', **22**), 126,4 (C-1', **23**), 157,3 (4', **22**), 145,0, 145,2 (C-3' e C-4', **23**)] estavam de acordo com os padrões de substituição dos anéis B desses flavonóides.

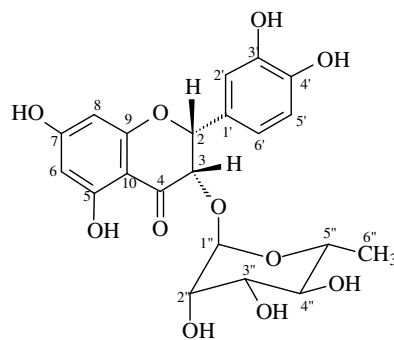
O mapa de contornos HMQC (Figura 136; p. 179) permitiu atribuir os respectivos carbonos metínicos ligados aos hidrogênios representados por esses sinais e confirmar a natureza dos carbonos oxigenados- sp^3 (δ_{CH} 80,1/73,1 e 79,9/73,4) e os carbonos não oxigenados- sp^2 (95,2/96,2 e 95,2/96,2) que foram atribuídos aos respectivos carbonos C-2/C-3 (anel C) e C-6/C-8 (anel A) dos flavanonóis representados como **22** e **23**, respectivamente. A unidade de açúcar foi identificada pelos pares de sinais em δ_{CH} 98,3/98,6, 70,3/70,3, 70,3/70,3, 71,3/71,2, 69,0/68,9 e δ_{CH_3} 17,6/17,6 e pelos sinais de $^1J_{CH}$ presentes no experimento HMQC que detectou os deslocamentos químicos dos hidrogênios [δ_H 4,74 (*s*)/4,74 (*s*), 3,44 (*m*)/3,44 (*m*), 3,17 (*m*)/3,17 (*m*), 3,03 (*m*)/3,03 (*m*), 2,44 (*m*)/2,30 (*m*), 0,83 (*d*, 6,2 Hz)/0,79 (*d*, 6,2 Hz)] ligados aos respectivos carbonos compatíveis com os sinais para a ramnose (Tabelas 26 e 27; p. 175 e 176).

Os sinais de $^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$ no mapa de contornos HMBC (Figuras 137 e 138, p. 180 e 181) da mistura permitiram verificar interações de acoplamento dos hidrogênios H-2',6' e H-3 com o C-2 (80,1), H-1'' com C-3 (73,4) e H-3 com C-1'' (98,8) e do H-2 com C-2',6' (127,8), que foram atribuídos a **22**; e os sinais de acoplamento de H-3, H-6' e H-2' com C-2 (79,9), H-2 e H-1'' com C-3 (73,3) e H-3 com C-1'' (98,6), que foram atribuídos a **23**. Todos esses dados forneceram informações imprescindíveis para propor as estruturas do *rel*-2*R*,3*S*-5,7,4'-trihidroxi-3-*O*- α -L-ramnopiranosilflavanonol (**22**) e *rel*-2*R*,3*S*-5,7,3',4'-tetraidroxi-3-*O*- α -L-ramnopiranosilflavanonol (**23**).

Os dados de RMN de 1H e ^{13}C foram semelhantes aos registrados na literatura os flavanonóis isoengeletina e isoastilbina (GAFFIELD & WAISS, 1975; SILVA *et al.*, 1997; CINTRA *et al.*, 2002).



isoengeletina (**22**)



isoastilbina (**23**)

Tabela 26. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) 1D e 2D de **22**

C	(SILVA <i>et al.</i> , 1997)*	22*			
		HMQC (1J)		$^1\text{H}\times^1\text{H}$ COSY	HMBC ($^{2,3}J$)
		δ_{C}	δ_{H} (<i>mult.</i> ; <i>J</i> Hz)		
2	81,28	80,08	5,62 (<i>d</i> ; 1,8)	H-3	H-3, H-6', H-2'
3	75,75	73,13	4,17 (<i>d</i> ; 2,2)	H-2	-
4	194,32	192,88	-	-	H-2, H-3
5	163,21	164,07	-	-	H-6, 5-OH
6	95,97	95,17	5,95 (<i>d</i> ; 2,2)	-	H-8
7	167,28	167,11	-	-	H-6, H-8, 7-OH
8	94,97	95,17	5,97 (<i>d</i> ; 2,2)	-	H-6, 7-OH
9	161,99	162,62	-	-	H-8
10	100,61	100,19	-	-	H-3, H-6
1'	126,32	125,85	-	-	H-2, H-3, H-2', H-5'
2'	128,82	127,83	7,26 (<i>d</i> ; 8,4)	H-6'	H-2, H-3'
3'	114,96	115,12	6,76 (<i>d</i> ; 8,4)	-	H-2', H-5'
4'	157,63	157,27	-	-	H-2', 4'-OH
5'	114,96	115,12	6,76 (<i>d</i> ; 8,4)	-	H-6', 4'-OH
6'	128,82	127,83	7,26 (<i>d</i> ; 8,4)	H-2'	H-2, H-2'
1''	100,10	98,57	4,74 (<i>s</i>)	H-2''	-
2''	70,20	70,34	3,44 (<i>m</i>)	H-1'', H-5''	H-3''
3''	69,95	70,34	3,17 (<i>m</i>)	H-4''	H-2''
4''	73,4	71,16	3,03 (<i>m</i>)	H-3''/H-5''	6''-CH ₃
5''	68,77	68,96	2,30 (<i>m</i>)	H-4'', H-6''	-
6''	17,52	17,62	0,79 (<i>d</i> ; 6,2)	H-5''	H-4''
5-OH	-	-	11,77	-	-
4'-OH	-	-	8,91	-	-

DMSO- d_6

*:

Tabela 27. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) 1D e 2D de 23

C	(CINTRA <i>et al.</i> , 2002)*		23*			
	δ_{C}	δ_{C}	HMQC (1J)		$^1\text{H}_x^1\text{H}$ COSY	HMBC (2,3J)
			δ_{H} (<i>mult.</i> ; J Hz)			
2	82,0	79,94	5,55 (<i>d</i> ; 2,0)		H-3	H-3, H-6', H-2'
3	76,9	73,35	4,21 (<i>d</i> ; 2,0)		H-2	H-2, H-1''
4	194,1	193,07	-		-	H-2, H-3
5	166,2	163,98	-		-	H-6, 5-OH
6	97,6	96,23	5,92 (<i>d</i> ; 2,0)		-	H-8
7	169,8	167,06	-		-	H-6, H-8, 7-OH
8	96,5	96,23	5,94 (<i>d</i> ; 2,0)		-	H-6, 7-OH
9	164,5	162,49	-		-	H-8
10	101,6	100,29	-		-	H-3, H-6
1'	128,6	126,37	-		-	H-2, H-3, H-2', H-5'
2'	116,3	114,09	6,84 (<i>s</i>)		-	H-2, 3'-OH
3'	146,5	144,97	-		-	H-2', 3'-OH, H-5'
4'	146,6	145,15	-		-	H-2', 4'-OH
5'	115,3	115,12	6,71 (<i>s</i>)		-	H-6', 4'-OH
6'	119,4	117,60	6,76 (<i>d</i> ; 8,4)		H-2', H-5'	H-2, H-2'
1''	102,0	98,83	4,74 (<i>s</i>)		-	H-3
2''	72,0	70,34	3,44 (<i>m</i>)		H-1'', H-5''	H-3''
3''	72,0	70,34	3,17 (<i>m</i>)		H-4''	H-2''
4''	73,4	71,25	3,03 (<i>m</i>)		H-3''/H-5''	6''-CH ₃
5''	7,08	69,01	2,44 (<i>m</i>)		H-4'', H-6''	-
6''	17,8	17,62	0,83 (<i>d</i> ; 6,2)		H-5''	H-4''
5-OH	76,9		11,76			
3'-OH	194,1		9,47			
4'-OH	166,2		8,92			

*:DMSO- d_6

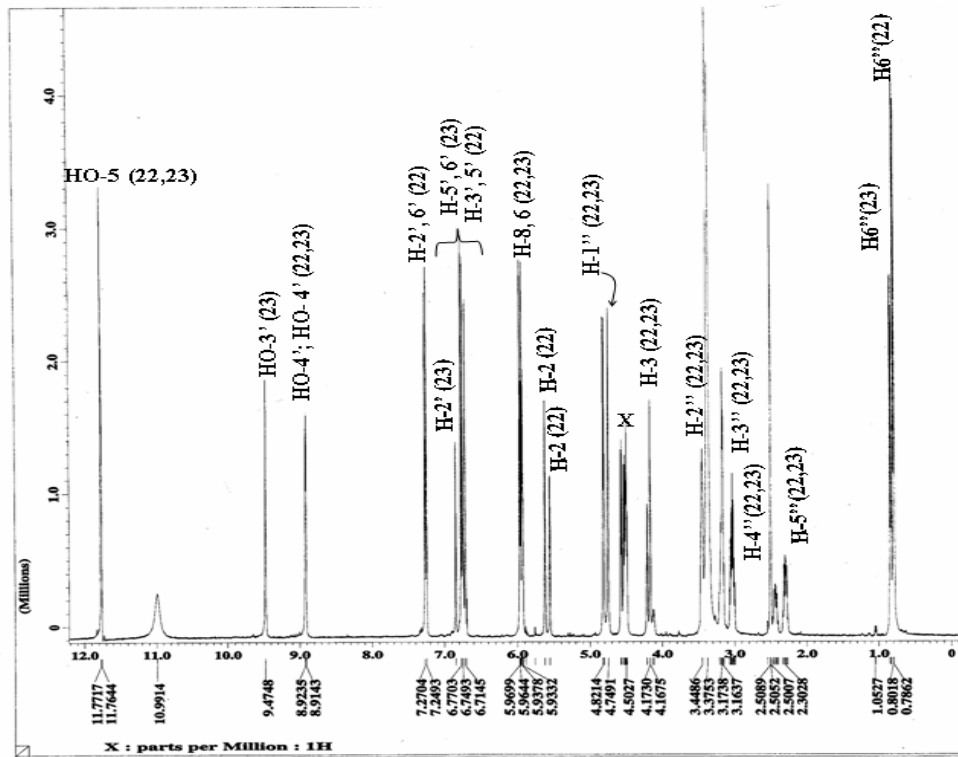


Figura 128. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de 22+23.

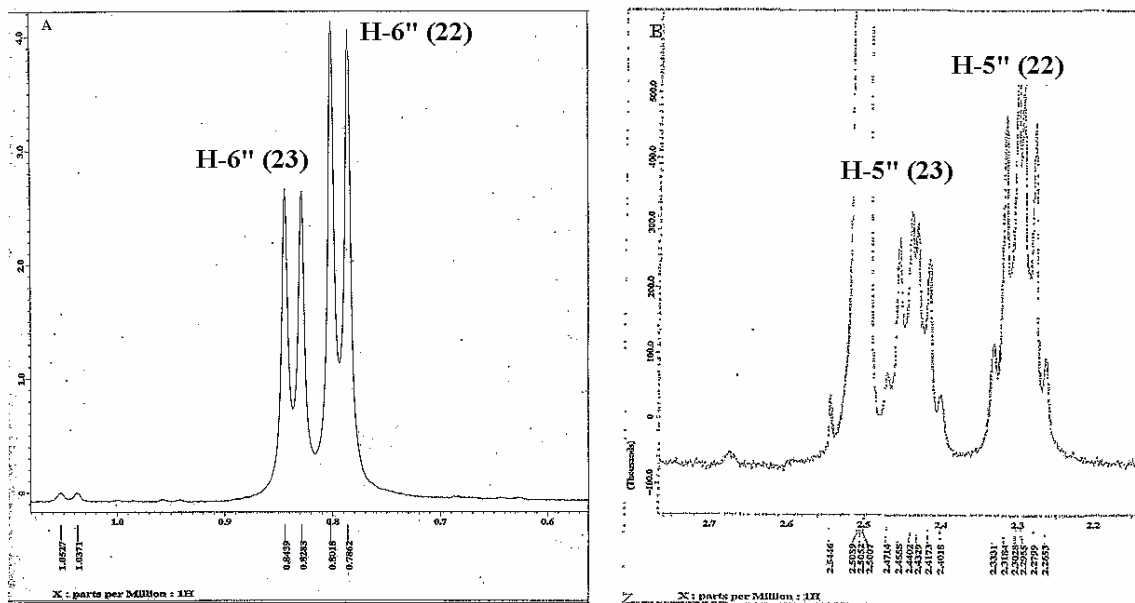


Figura 129. Expansões no espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de 22+23 nas regiões entre: [A] δ_{H} 0,6-1,0, [B] δ_{H} 2,1-2,7 ppm.

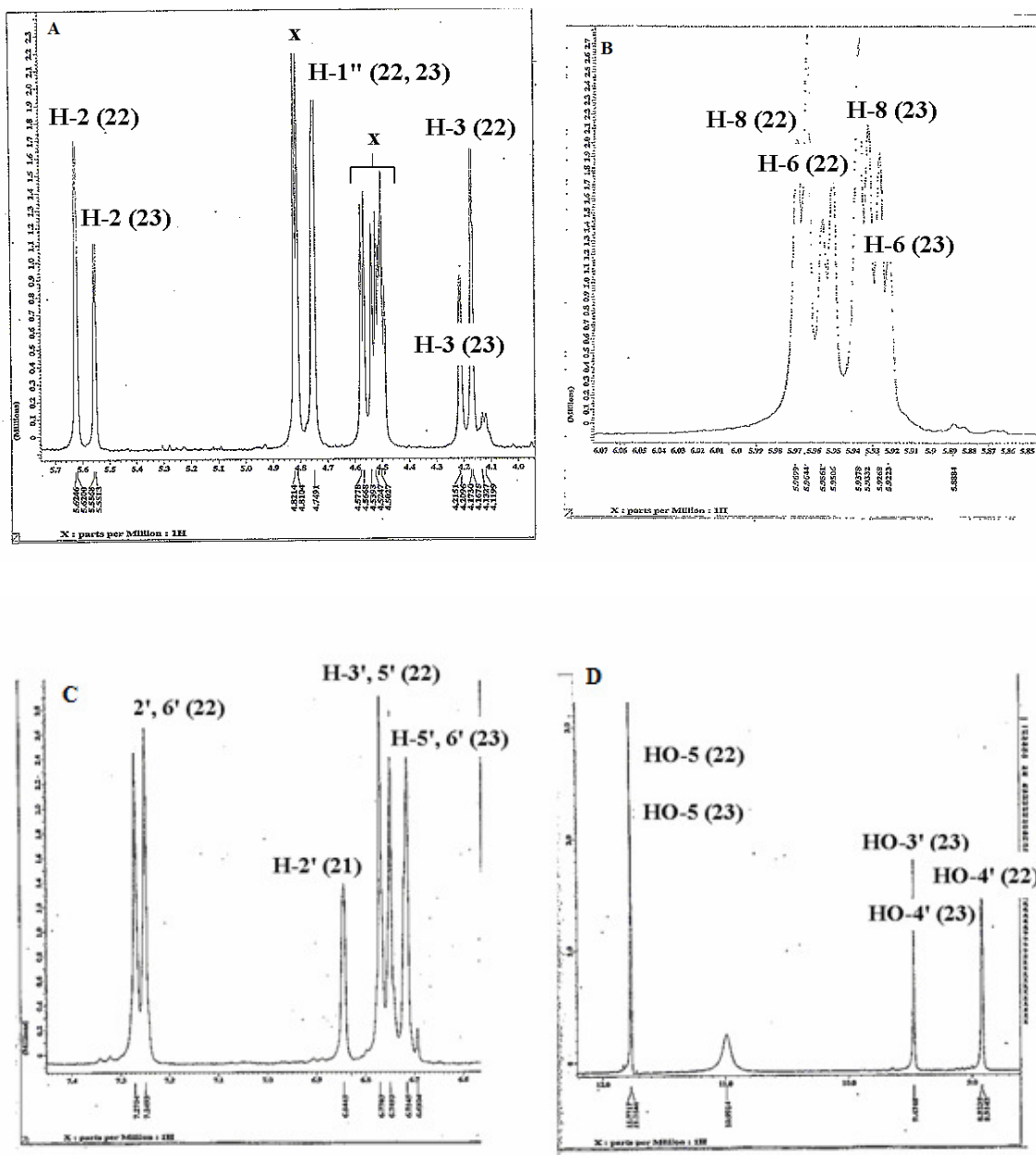


Figura 130. Expansões no espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de 22+23 nas regiões entre: [A] δ_{H} 4,0-5,7, [B] δ_{H} 5,84-6,07, [C] δ_{H} 6,6-7,4 e [D] δ_{H} 8,9-12,0 ppm.

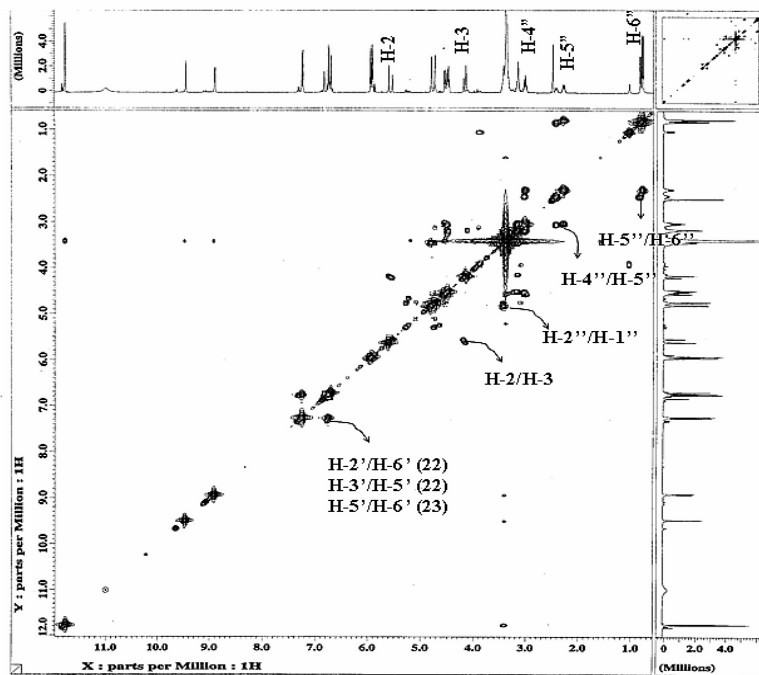


Figura 131. Mapa de contornos $^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY (400 MHz, DMSO- d_6) de 22+23.

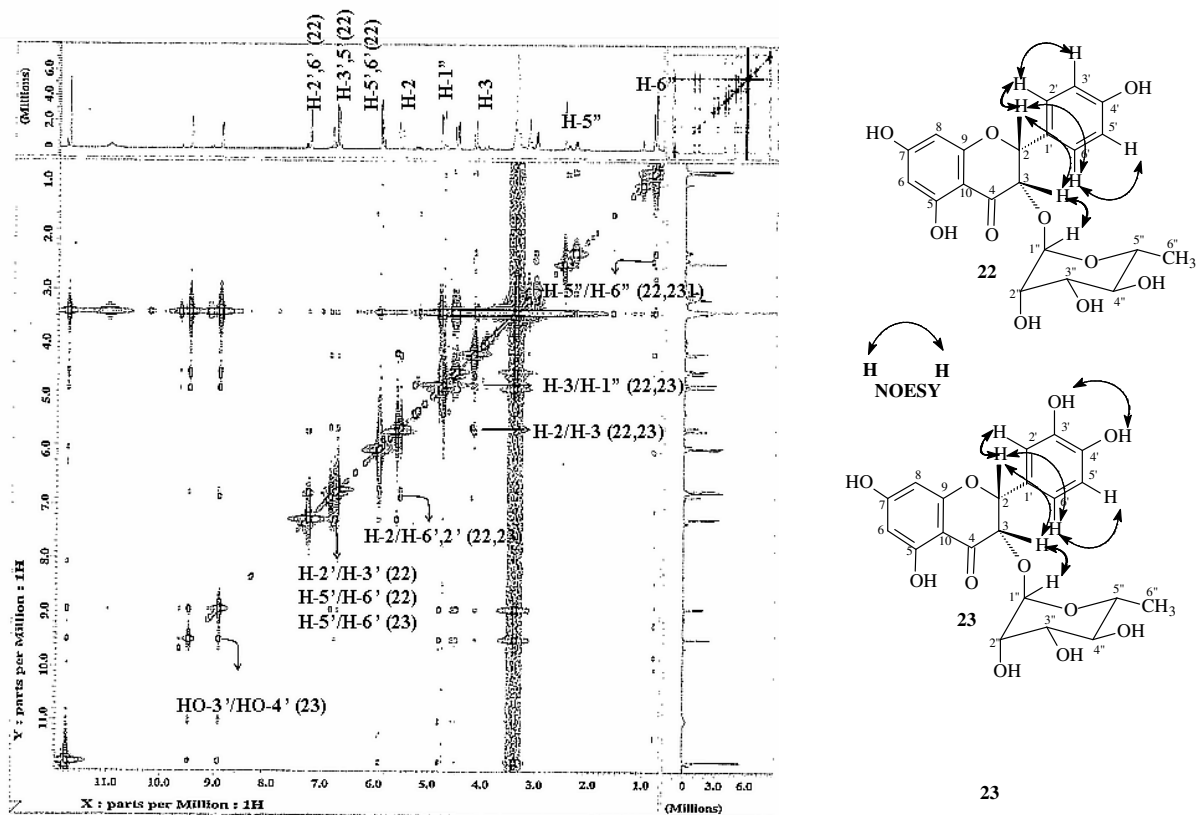


Figura 132. Mapa de contornos NOESY (400MHz, DMSO- d_6) e algumas interações espaciais observadas para as substâncias 22+23.

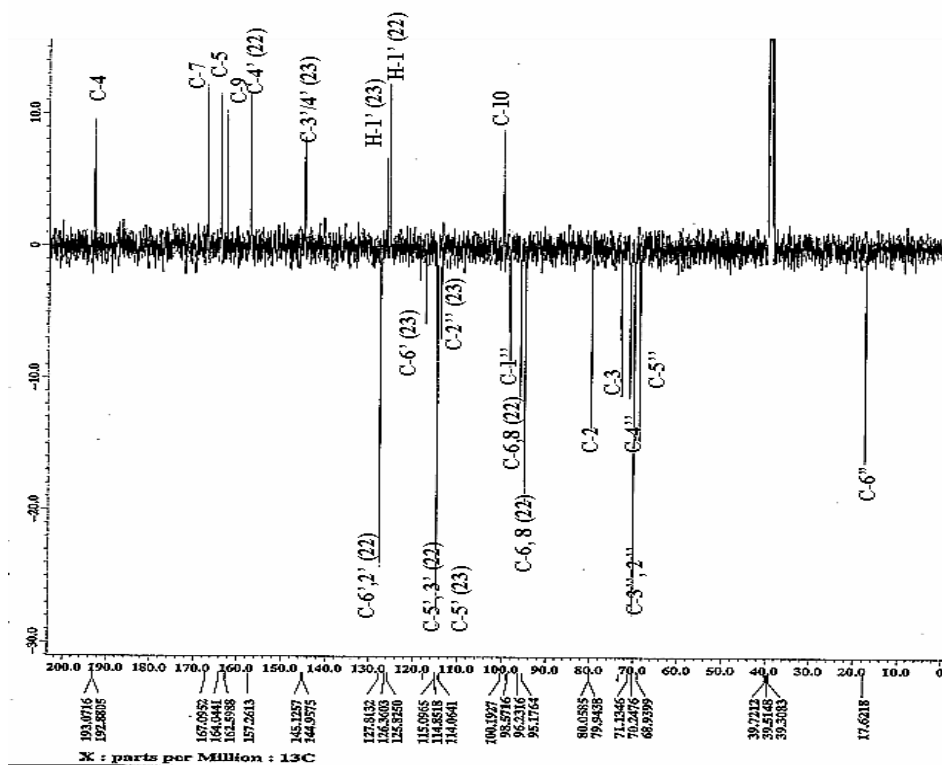


Figura 133. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, APT, DMSO-d_6) de 22+23.

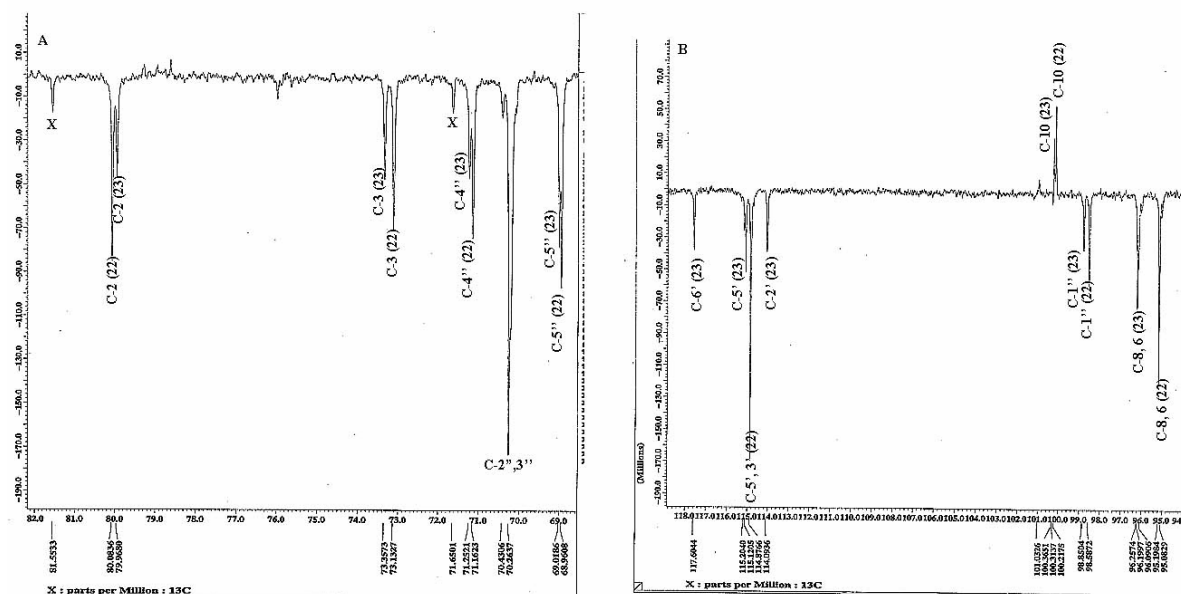


Figura 134. Expansões do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, APT, DMSO-d_6) de 22+23 nas regiões entre [A] δ_{C} 68,96-81,55 e [B] δ_{C} 95,08-117,60.

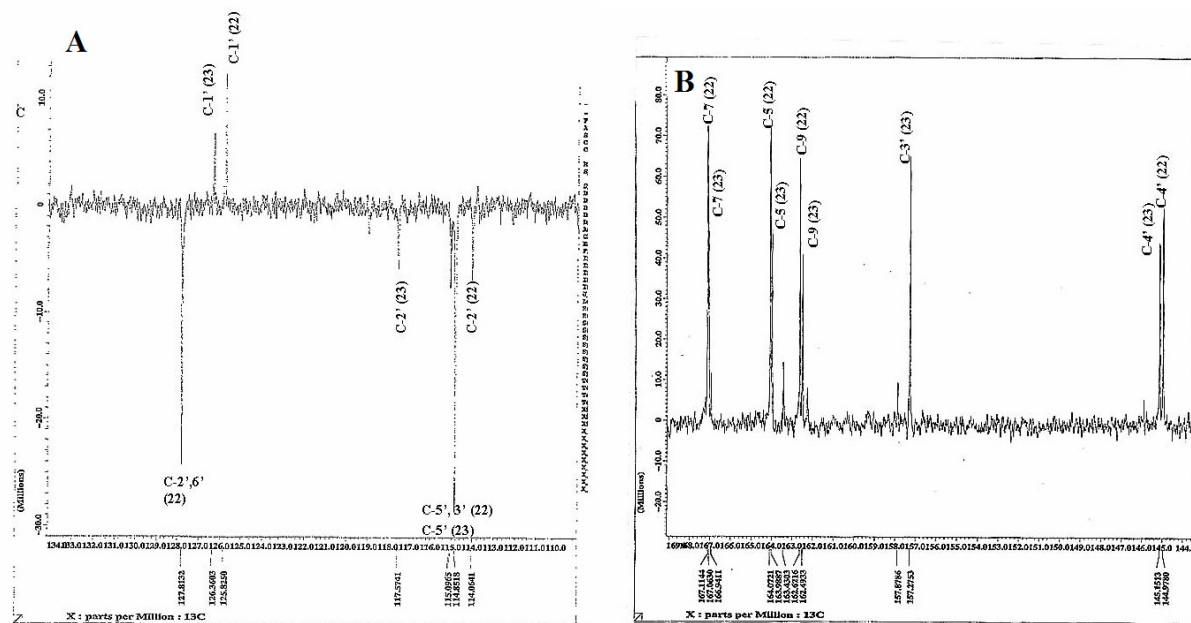


Figura 135. Expansões do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, APT, DMSO-d_6) de 22+23 nas regiões entre [A] δ_{C} 114,06-127,81 e [B] δ_{C} 144,97-167,11.

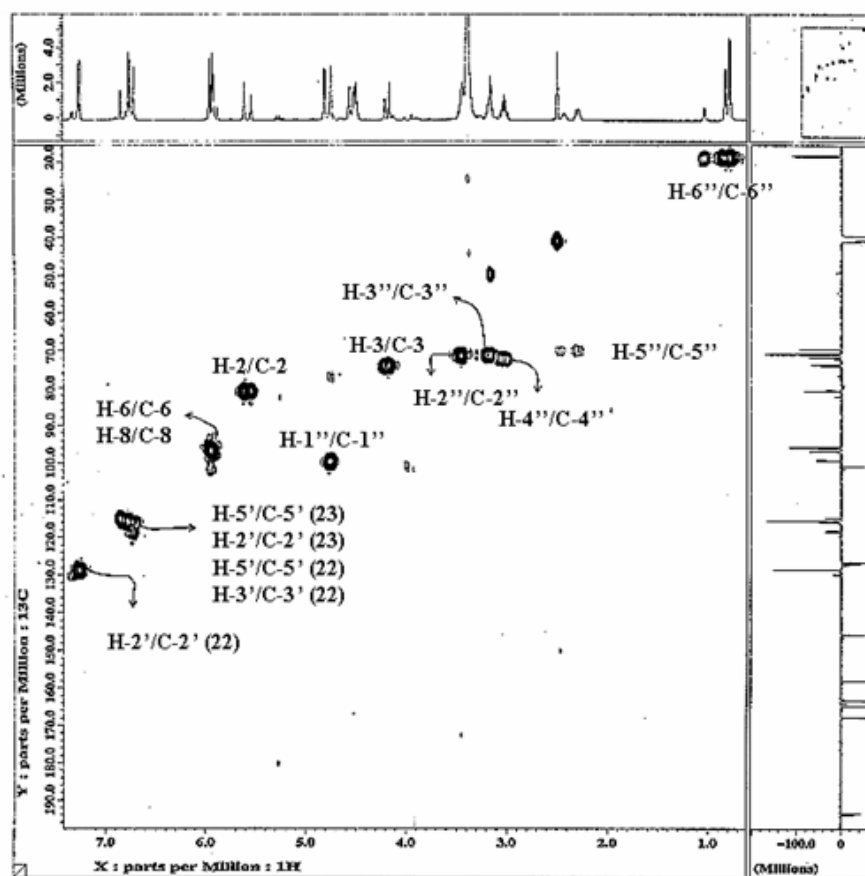


Figura 136. Mapa de contornos HMQC (100 MHz, DMSO-d_6) de 22+23.

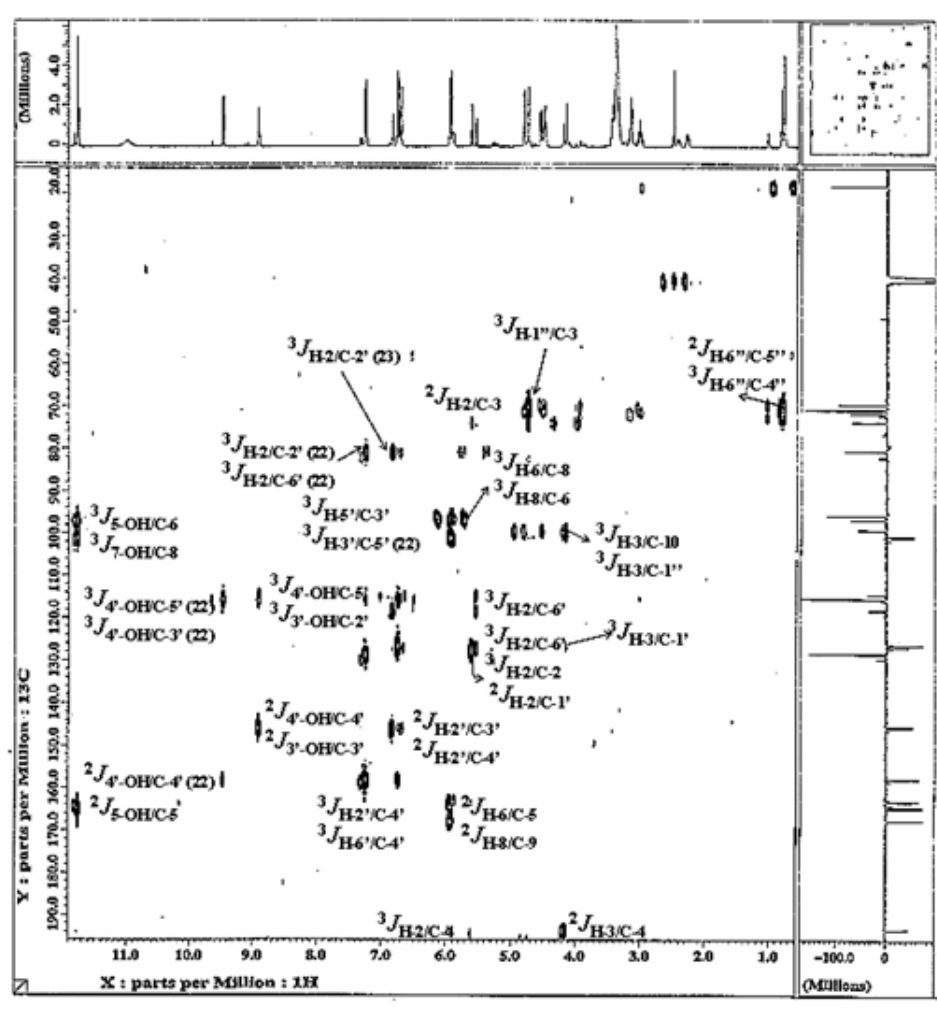
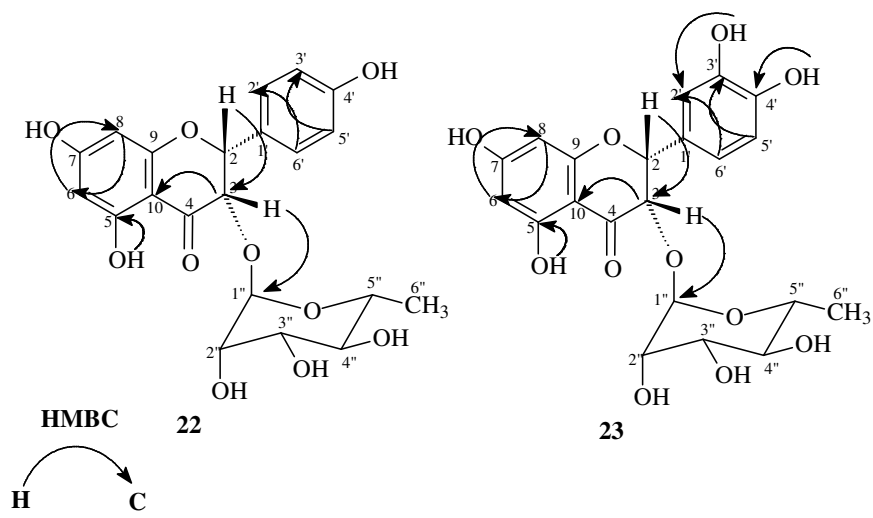


Figura 137. Mapa de contornos HMBC (100 MHz, DMSO-d₆) de 22+23, e correlações observadas para as substâncias 22+23.

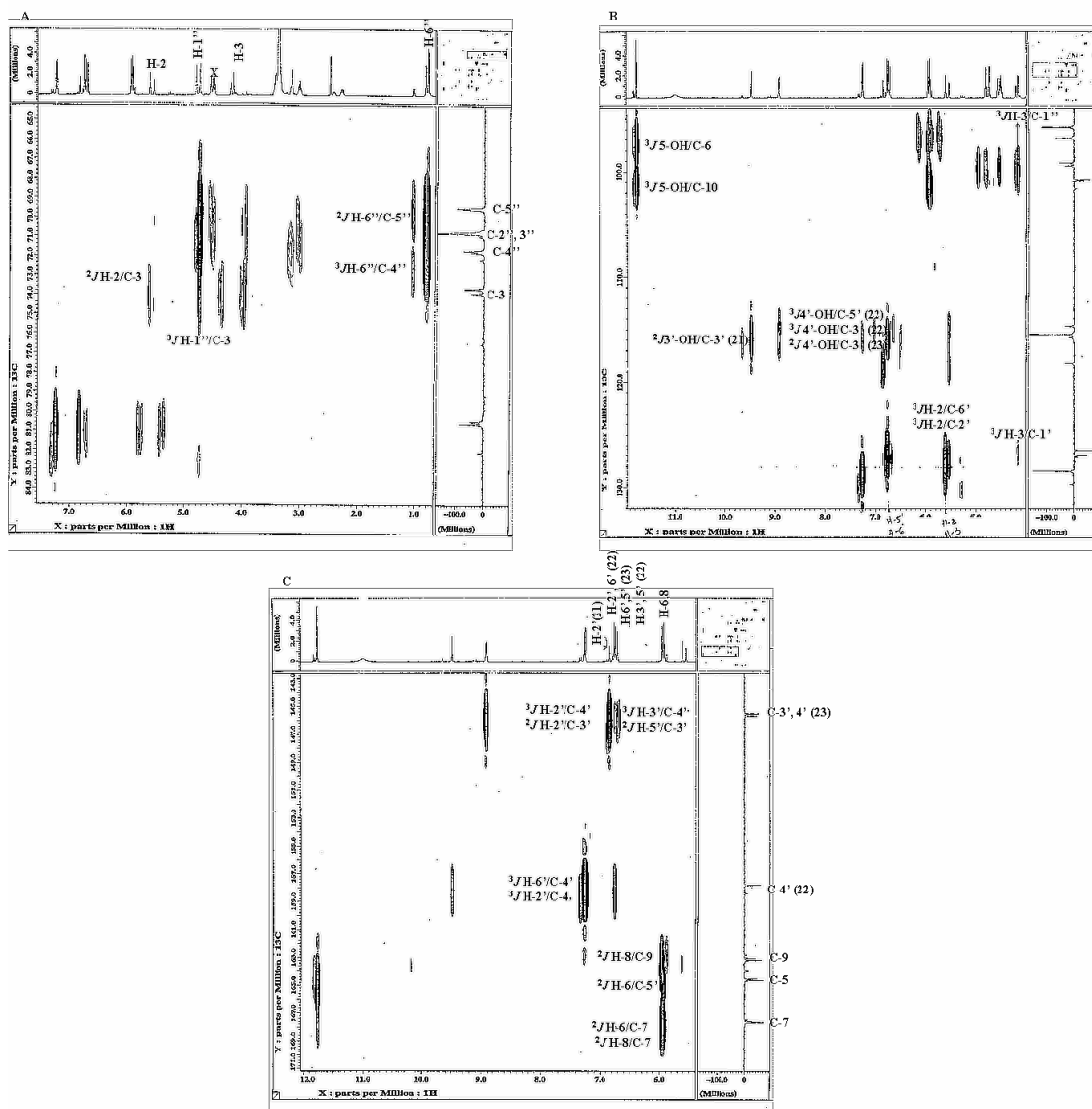
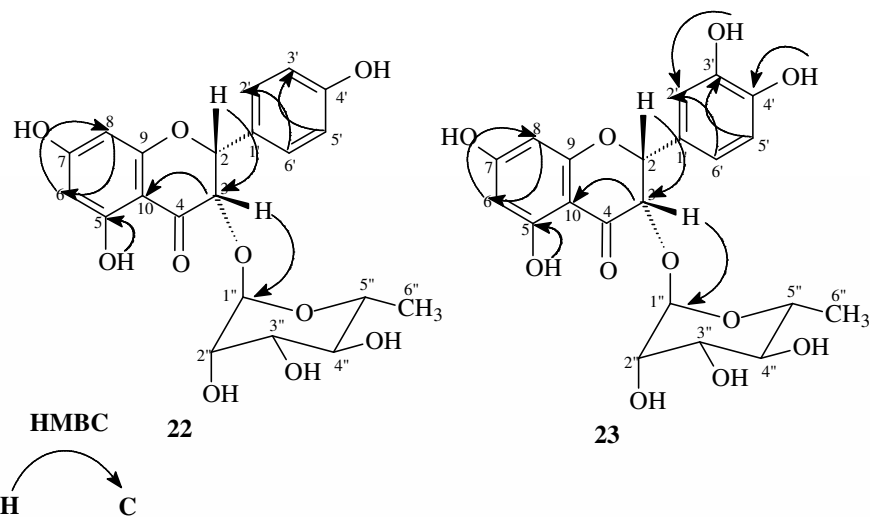
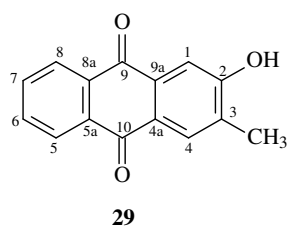
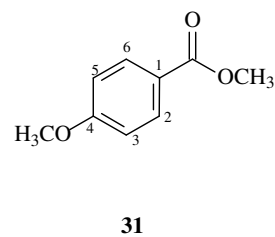
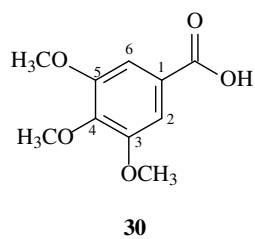
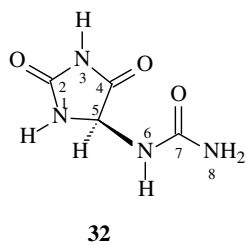
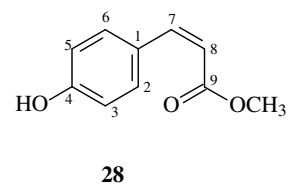
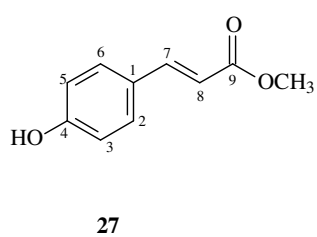
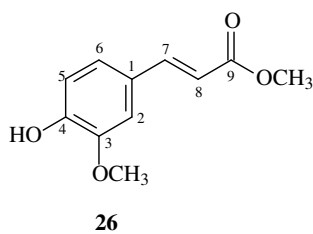
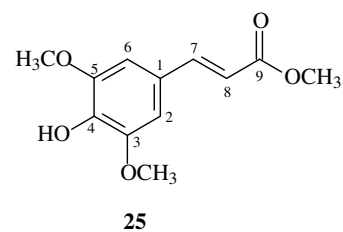
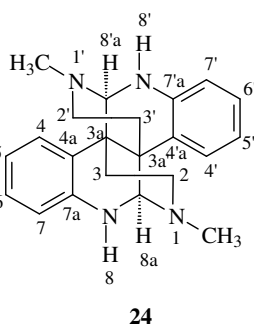
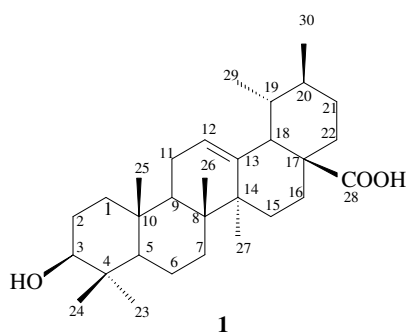


Figura 138. Expansões do mapa de contornos HMBC (100 MHz, DMSO- d_6) de 22+23 nas regiões entre: [A] δ_C 65,0-84,0 e δ_H 1,0-7,0 ppm, [B] δ_C 95,0-132,0 e δ_H 5,0-11,0 ppm e [C] δ_C 143,0-171,0 e δ_H 6,0-12,0 ppm.

4.3 Constituintes Químicos Isolados de *Palicourea coriacea*



4.3.1 Determinação Estrutural dos Constituintes Isolados das Folhas de *P. coriacea*

4.3.1.1 Identificação da substância 24

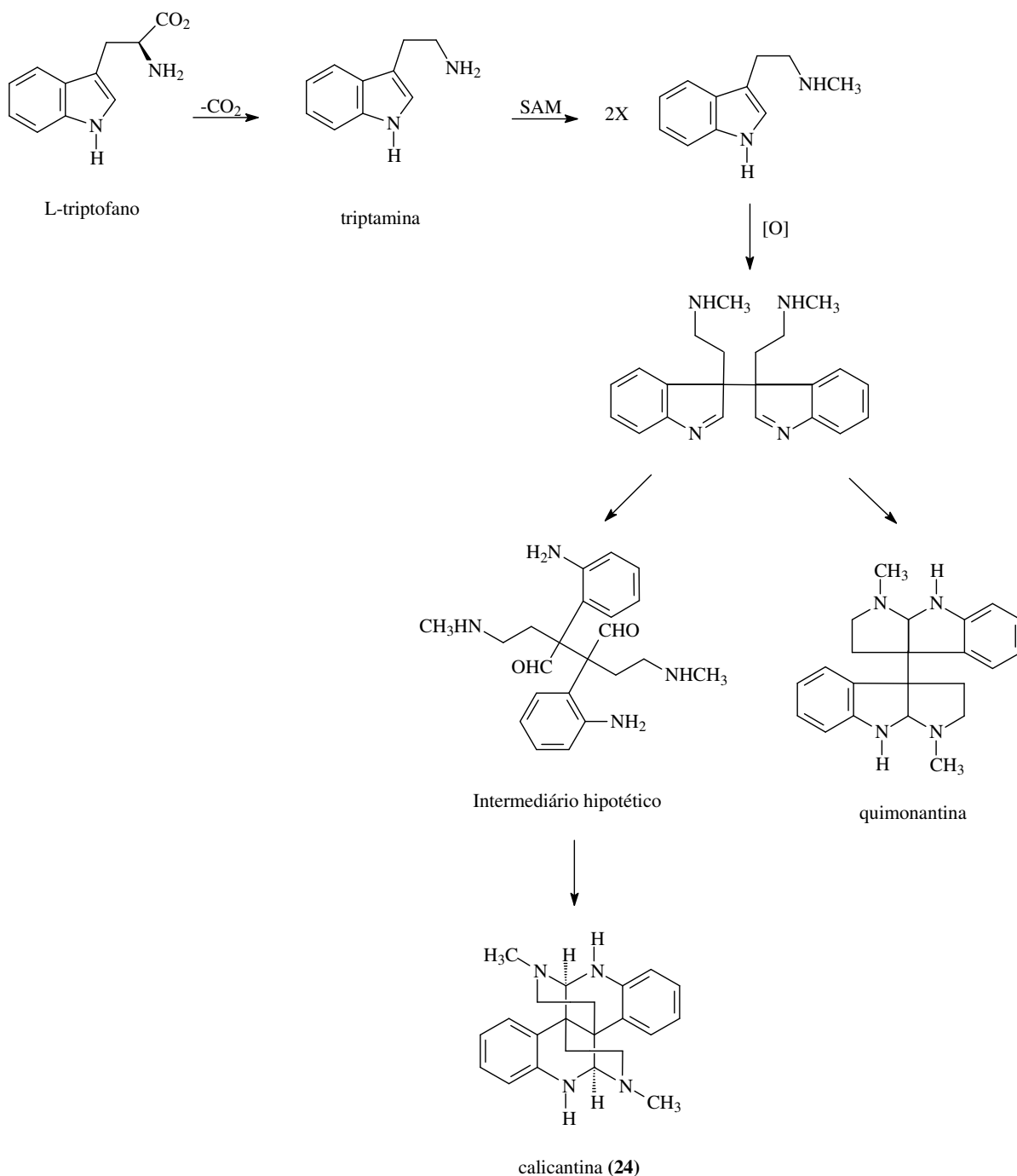
O espectro de IV da substância **24** (Figura 139; p. 186) exibiu bandas de absorção referentes aos estiramentos N-H (3594 cm^{-1}), CH₂ (2970 cm^{-1}), CH₃-N ($2700\text{-}2869\text{ cm}^{-1}$), anel aromático (1440 , 1490 e 1535 cm^{-1}), C-N (1379 cm^{-1}) e deformação C-H de anel aromático 1,2-dissubstituído (742 cm^{-1}).

O perfil do espectro de RMN de ¹H (Figura 140; p. 186) evidenciou a presença de 11 sinais de hidrogênios, cujas multiplicidades indicaram a natureza de um alcalóide dimérico. Foram assinalados sinais para 4 hidrogênios em sistemas aromáticos em δ_{H} 6,26 (*d*, 8,0 Hz, H-4,4'), δ_{H} 6,55 (*dt*, 7,0 e 1,0 Hz, H-5,5'), δ_{H} 6,83 (*dt*, 7,0 e 1,0 Hz, H-6,6') e δ_{H} 7,02 (*d*, 8,0 Hz) característicos de anel aromático 1,2-dissubstituído; e 4 sinais atribuídos a hidrogênios ligados a carbonos metilênicos H-2 [δ_{H} 2,31 (*dt*, 12,0 e 4,0 Hz, H-2 α) e δ_{H} 2,64 (*dt*, 12,0 e 4,0 Hz, H-2 β) e H-3 [δ_{H} 1,32 (*dt*, 14,0 e 4,0 Hz, H-3 α) e δ_{H} 3,11 (*dt*, 14,0 e 4,0 Hz, H-3 β)]. Também no espectro de RMN de ¹H foram observados sinais de um singlete com integração para 3 prótons em δ_{H} 2,42 ppm, atribuídos ao grupo *N*-metílico e um singlete largo em δ_{H} 4,58 ppm que indicou a presença de N-H na molécula como observado no espectro de I.V.. Pelo mapa de contornos COSY [¹Hx¹H] (Figura 141; p. 187) confirmou-se o acoplamento entre os hidrogênios geminais H-2 α e H-2 β , H-3 α e H-3 β , respectivamente, assim como o acoplamento entre hidrogênios do sistema aromático: H-4,4' com H-5,5' e H-6,6'; H-6,6' com H-5,5' e H-7,7'.

Os espectros de RMN ¹³C-BBD e DEPT 135° da substância **24** (Figuras 142 e 143; p. 187 e 188) apresentaram sinais correspondentes a 11 átomos de carbonos, sendo um sinal em δ_{CH_3} 42,30 ppm atribuído ao carbono metílico ligado a um nitrogênio terciário (*N*-metílico). O espectro apresentou ainda sinais em δ_{CH} 126,37 (C-4,4'), δ_{CH} 116,12 (C-5,5'), δ_{CH} 124,28 (C-6,6') e δ_{CH} 111,81 (C-7,7') referentes aos 4 carbonos metínicos; δ_{C} 124,85 (C-4a,4a') e δ_{C} 145,23 (C-7a,7a'), δ_{C} 70,81 (C-8a,8a') e δ_{C} 35,75 (C-3a,3a') atribuídos aos carbonos quaternários. Através do espectro de RMN de ¹³C também foi possível distinguir os carbonos metilênicos diastereotópicos C-2,2' (δ_{CH_2} 46,34) e C-3,3' (δ_{CH_2} 31,54).

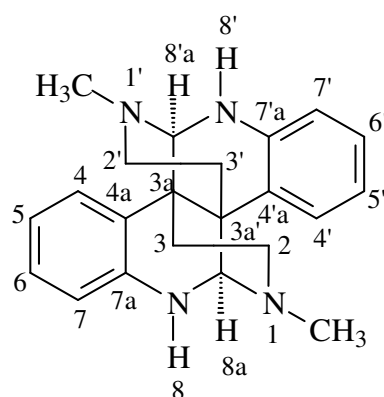
A comparação dos dados de RMN de ¹H e de ¹³C (Tabela 28; p. 185) com os dados fornecidos pela literatura (ADJIBADE *et al.*, 1992) e permitiram identificar a substância **24** como sendo a calicantina.

A calicantina é um alcalóide do tipo pirrolizidínico onde ambos os carbonos C-2 e C-3 do anel indólico podem agir como nucleófilos (Esquema 20; p. 184). Na biossíntese dos alcalóides diméricos o C-3 é o ponto de acoplamento entre os anéis indólicos com a formação que envolve dimerização oxidativa da *N*-metil triptamina a um intermediário hipotético. Esse intermediário pode sofrer hidrólise para formar a quimonantina e conseqüentemente a calicantina (MAY & STOLTZ, 2006).



Esquema 20. Rota biossintética de formação da calicantina encontrada nas folhas de *P. coriacea*.

Esse alcalóide tem sido encontrado com frequência nas plantas da tribo Psychotrieae sendo relatada em *Palicourea alpina* (STUART & WOO-MING, 1975), *Palicourea fenderli* (NAKANO & MARTIN, 1976), *Palicourea ovalis* (GARCIA *et al.*, 1997), *Psychotria forsteriana* (ADJIBADÉ *et al.*, 1992), *Psychotria rostrata* (LAJIS *et al.*, 1993), *Psychotria glomerulata* (SOLÍS *et al.*, 1997) and from *Psychotria colorata* (VEROTTA *et al.*, 1998).



calicantina (**24**)

Tabela 28. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e de ^{13}C (50 MHz) de **24**

C	(ADJIBADE <i>et al.</i> , 1992)*		24*	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H} (<i>mult.</i> ; <i>J</i> Hz)
1,1'	-	2,90 (<i>s</i>)	-	2,42 (<i>s</i>)
2,2'	46,6	2α : 2,26 (<i>ddd</i> ; 12,0; 4,1; 1,4 Hz) 2β : 2,63 (<i>ddd</i> ; 12,0; 5,6; 1,4 Hz)	46,34	2α : 2,31 (<i>dt</i> ; 12,0; 4,0 Hz) 2β : 2,63 (<i>dt</i> ; 12,0; 4,0 Hz)
3,3'	31,7	3α : 1,30 (<i>ddd</i> ; 13,2; 4,1; 1,4 Hz) 3β : 3,15 (<i>dt</i> ; 13,2; 5,5 Hz)	31,54	3α : 1,32 (<i>dd</i> ; 14,0; 4,0 Hz) 3β : 3,11 (<i>dt</i> ; 14,0; 4,0 Hz)
3a,3'a	36,0	-	35,76	-
4,4'	126,5	6,28 (<i>dd</i> ; 8,0; 1,0 Hz)	126,37	6,28 (<i>d</i> ; 8,0 Hz)
4a,4'a	125,0	-	124,85	-
5,5'	116,4	6,55 (<i>td</i> ; 7,5; 1,0 Hz)	116,12	6,55 (<i>dt</i> ; 7,0; 1,0 Hz)
6,6'	124,4	6,83 (<i>dt</i> ; 7,5; 1,0 Hz)	124,28	6,83 (<i>dt</i> ; 7,0; 1,4 Hz)
7,7'	112,0	7,02 (<i>dd</i> ; 8,0; 1,0 Hz)	111,81	7,02 (<i>d</i> ; 8,0 Hz)
8,8'	-	3,86 (<i>sl</i>)	-	4,58 (<i>sl</i>)
7a,7'a	145,3	-	145,23	-
8a/8'a	71,0	4,33 (<i>s</i>)	70,81	4,32 (<i>s</i>)
N-CH ₃	42,6	2,42 (<i>s</i>)	42,30	2,42 (<i>s</i>)

*: CDCl₃

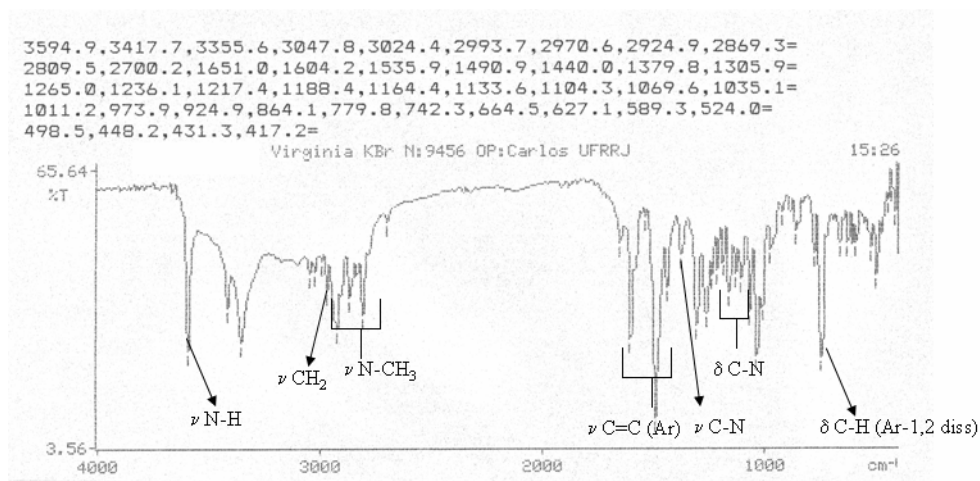


Figura 139. Espectro de I.V. (KBr) de 24.

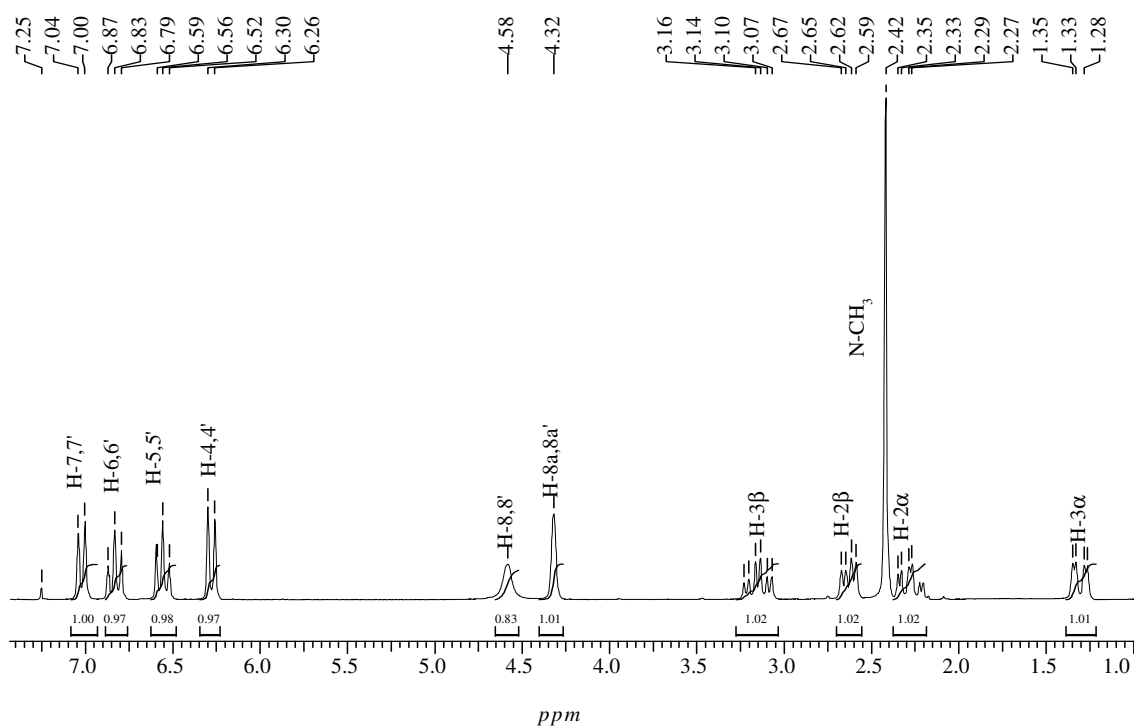


Figura 140. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 24.

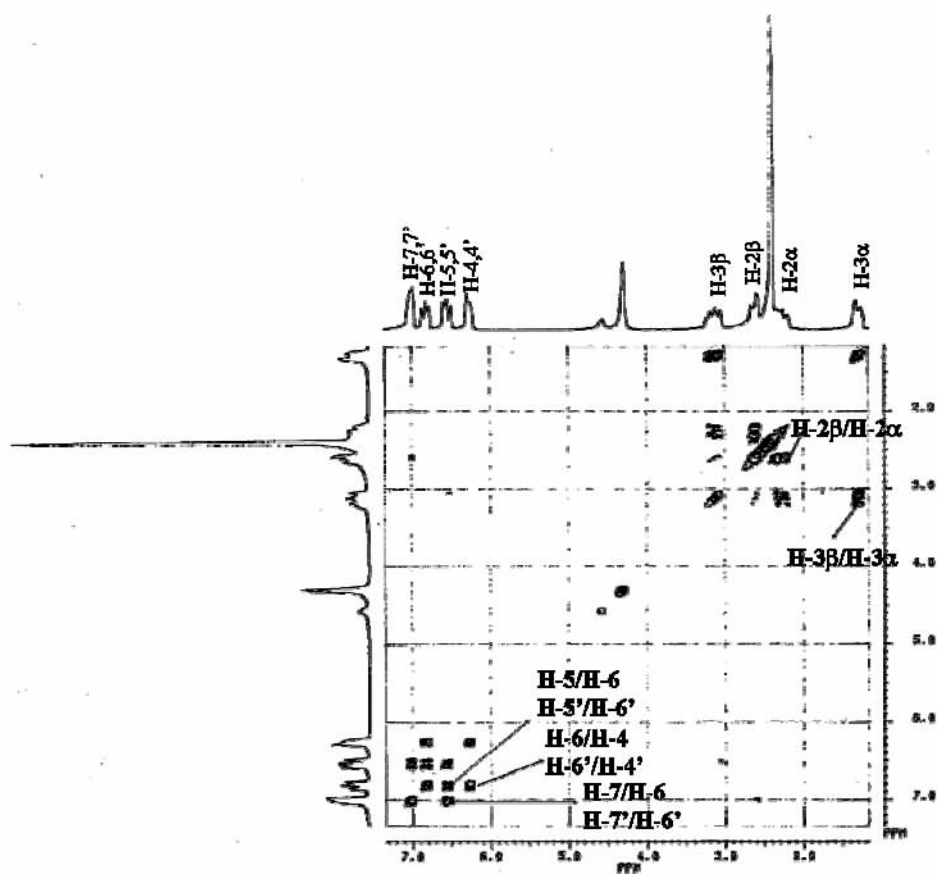


Figura 141. Mapa de contornos $^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY (200 MHz, CDCl_3) de 24.

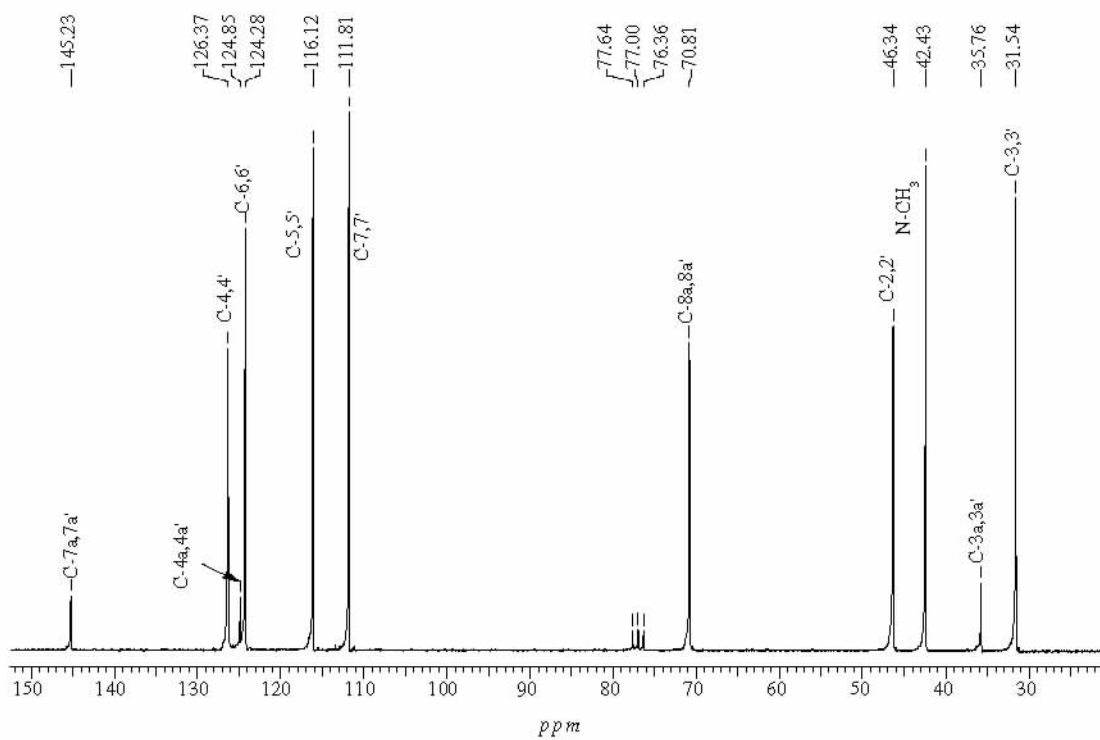


Figura 142. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, BBD, CDCl_3) de 24.

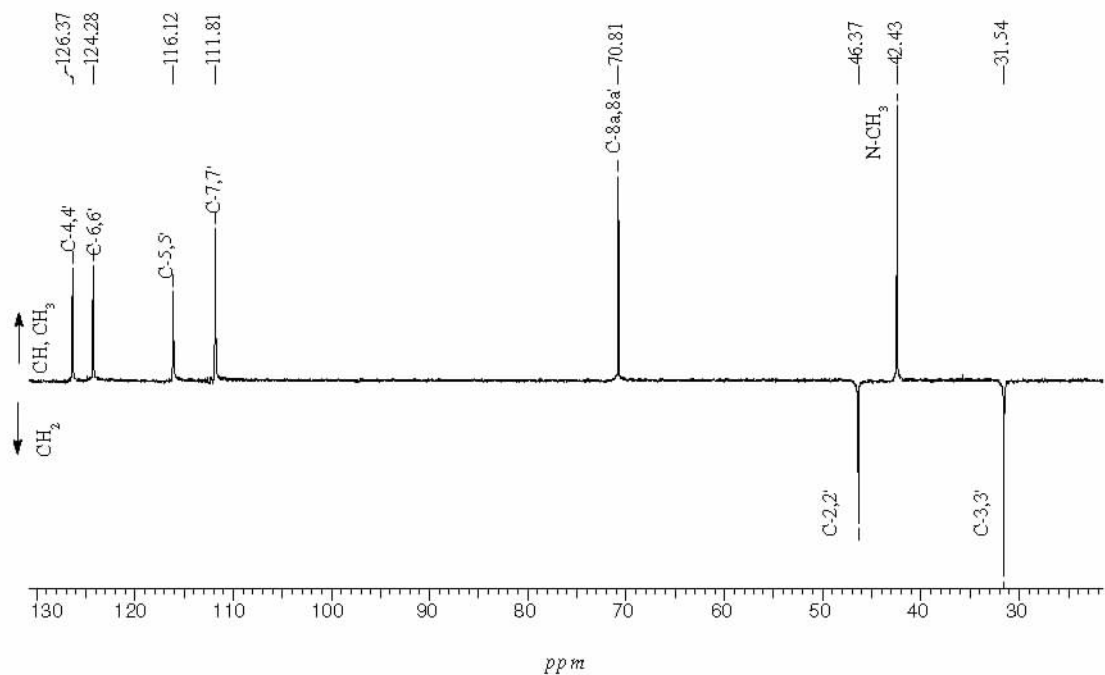


Figura 143. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, DEPT 135° , CDCl_3) de 24.

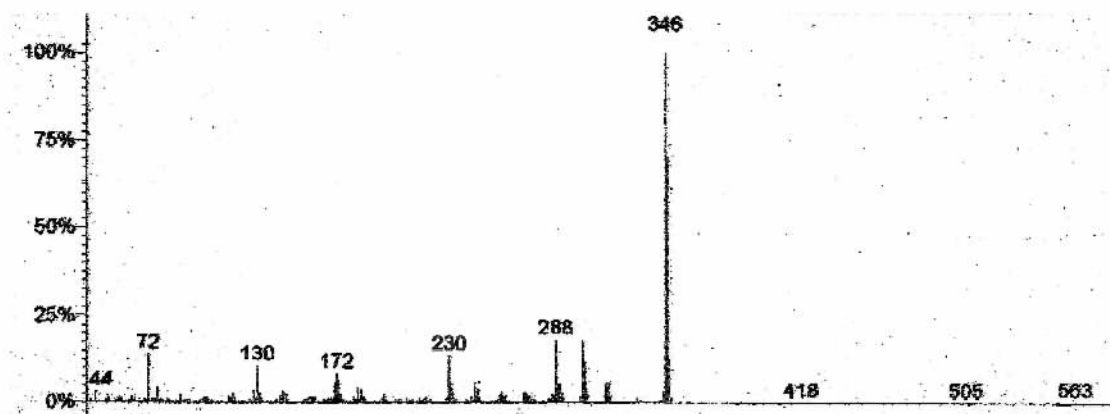
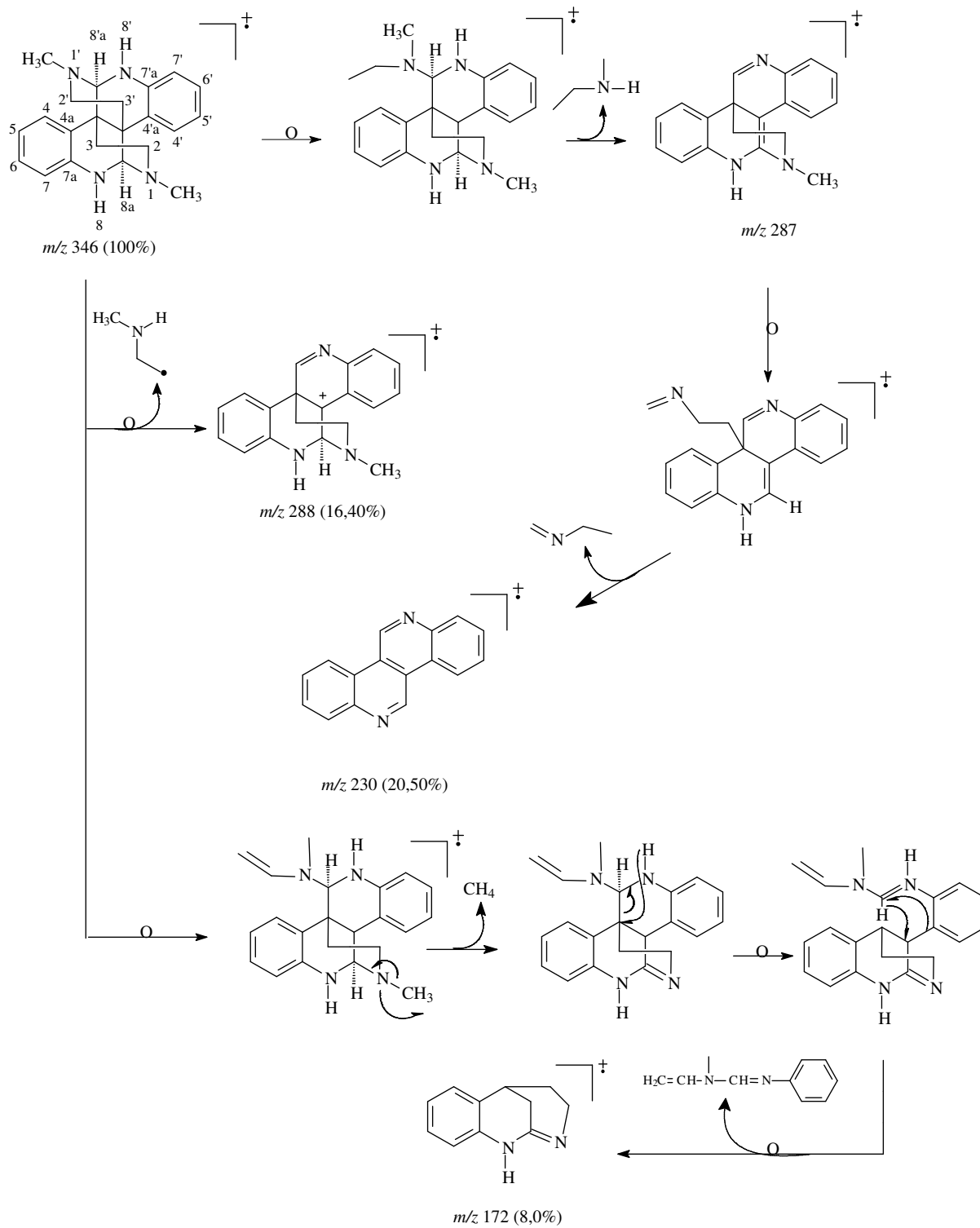


Figura 144. Espectro de Massa por I.E. (70 eV) de 24.



Esquema 21. Proposta de fragmentação para a substância 24.

4.3.1.2 Identificação das substâncias 25, 26 e 27

Os espectros de RMN de ^1H de **25** (Figura 149; p. 192), **26** (Figura 149; p. 194) e **27** (Figura 152; p. 196), exibiram sinais em δ_{H} 6,72 (*s*, H-2,6) [**25**], δ_{H} 6,90 (*d*, 8,0 Hz, H-5), δ_{H} 7,07 (*d*, 2,0 Hz, H-6), δ_{H} 7,02 (*d*, 8,0 Hz, H-2) [**26**], δ_{H} 7,44 (*d*, 8,8 Hz, H-2,6), δ_{H} 6,78 (*d*, 8,8 Hz, H-3,5) [**27**], compatíveis com sistemas aromáticos conjugados tri- [**25**], di- [**26**] e monoxigenados [**27**], sinais na região de frequência baixa com integração para 3 ou 6 hidrogênios confirmaram a presença de três, dois e um grupo metoxílico, respectivamente para as substâncias **25** [δ_{H} 3,76 (*s*, 3H), δ_{H} 3,87 (*s*, 3H)], **26** [δ_{H} 3,79 (*s*, 3H), δ_{H} 3,93 (*s*, 3H)] e **27** [δ_{H} 3,74 (*s*, 3H)]. Pelos sinais correspondentes aos dois hidrogênios ligados a carbonos metínicos com constantes de acoplamento igual a $J=16,0$ Hz e absorções em δ_{H} 6,26 (*d*, H-8) e δ_{H} 7,55 (*d*, H-7) [**25**], δ_{H} 6,30 (*d*, H-8) e δ_{H} 7,62 (*d*, H-7) [**26**] e δ_{H} 6,31 (*d*, H-8) e δ_{H} 7,60 (*d*, H-7) [**27**], foi possível caracterizá-los como hidrogênios vicinais que mantêm configuração *trans* entre si.

Essa última afirmação pôde ser confirmada pela análise dos espectros de RMN de ^{13}C -BBD de **25** (Figura 147; p. 192), **26** (Figura 150; p. 195) e **27** (Figura 153; p. 197) os quais indicaram sinais correspondentes aos carbonos olefínicos para **25** [δ_{CH} 115,27 (C-8) e δ_{CH} 145,08 (C-7)], **26** [δ_{CH} 115,16 (C-8) e δ_{CH} 144,10 (C-7)] e **27** [δ_{CH} 116,93 (C-8) e δ_{CH} 146,61 (C-7)], onde o carbono C-7 encontra-se mais desprotegido, devido ao efeito exercido pela dupla conjugada a carbonila. Os sinais em δ_{CH_3} 51,50 (**25**), 51,35 (**26**) e 52,0 (**27**) indicaram metoxila de éster e os sinais em δ_{CH_3} 56,17 (**25**), 56,03 (**26**) indicaram metoxila ligada a anel aromático. A solubilidade desses compostos ao CDCl_3 e o deslocamento químico do C-4 em δ_{C} 137,04 (**25**) e 148,01 (**26**) foram determinantes para se chegar à estrutura dos ésteres baseados na comparação com os modelos A, B, C e D (Figura 145; p. 190).

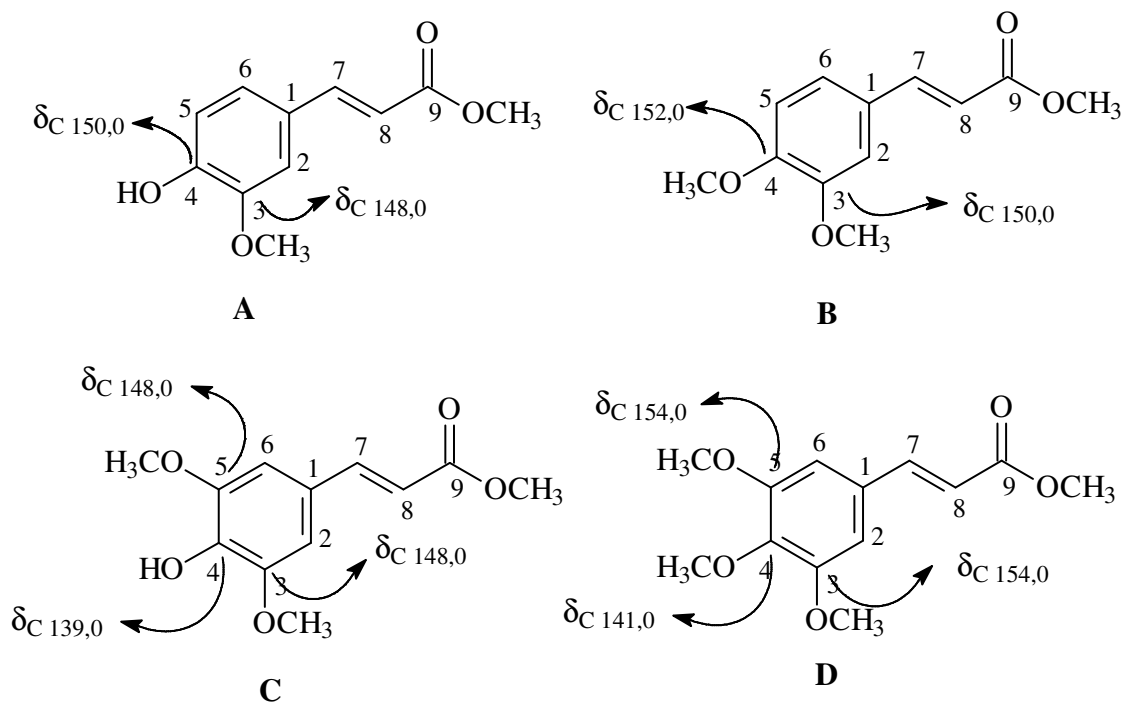
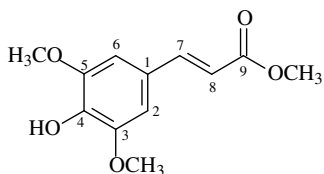


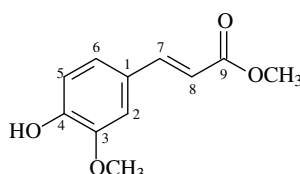
Figura 145. Efeito nos deslocamentos químicos nos ^{13}C do C-4 causado pela troca de substituintes.

Inclusive na substância **25** percebe-se a influência das metoxilas adjacentes que exercem efeito γ de proteção fazendo com que o deslocamento do C-4 em δ_C 137,04, seja ainda menor. Todos esses dados permitiram propor as estruturas dos éteres (*E*) 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamato de metila (**25**), (*E*)-4-hidroxi-3-metoxicinamato de metila (**26**) e (*E*)-hidroxicinamato de metila (**27**).

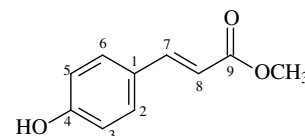
Os espectros de massas para as substâncias **25** (Figura 148; p. 193), **26** (Figura 151; p. 195) e **27** (Figura 154; p. 197) mostraram fragmentações relativas ao pico íon molecular 238 [23], m/z 208 [24] e m/z 178 [25] (100%) [M^+], e outros picos representantes de íons formados a partir do íon molecular podem ser justificados pela eliminação de unidade estrutural representada pela perda de 31 ($H_3CO\cdot$), 28 (CO), 15 ($H_3C\cdot$) entre outras mostradas nos Esquemas 22 (p. 193), 23 (p. 196) e 24 (p. 198).



(*E*)-4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamato de metila
(**25**)



(*E*)-4-hidroxi-5-metoxicinamato de metila
(**26**)



(*E*)-4-hidroxicinamato de metila
(**27**)

Tabela 29. Dados de RMN de 1H (200 MHz) e de ^{13}C (50 MHz) para as substâncias 25 e 27 e de RMN de 1H (400 MHz) e de ^{13}C (1250 MHz) para a substância 26

C	25*		26*		27*	
	δ_C	δ_H (mult.; J Hz)	δ_C	δ_H (mult.; J Hz)	δ_C	δ_H (mult.; J Hz)
1	125,64	-	126,95	-	126,97	-
2	104,89	6,72 (s)	109,4	7,02 (d; 2,0)	131,18	7,44 (d; 8,8 Hz)
3	147,08	-	148,01	-	114,74	6,78 (d; 8,8 Hz)
4	137,04	-	146,80	-	161,60	-
5	147,08	-	114,76	6,90 (d; 8,0)	114,74	6,78 (d; 8,8 Hz)
6	104,90	6,72 (s)	123,04	7,07 (dd; 2,0 e 8,0)	131,18	7,44 (d; 8,8 Hz)
7	145,08	6,26 (d; 16 Hz)	144,10	7,62 (d; 16,0 Hz)	146,61	7,60 (d; 16 Hz)
8	115,27	7,56 (d; 16 Hz)	115,16	6,30 (d; 16 Hz)	116,93	6,31 (d; 16 Hz)
9	167,49	-	167,77	-	169,82	-
3-OCH ₃	56,14	3,76 (s)	56,09	3,93 (s; 3H)	52,0	-
5-OCH ₃	56,14	3,76 (s)	-	-	-	-
9-OCH ₃	51,50	3,87 (s)	51,62	3,79 (s; 3H)	-	3,74 (s)

*: CDCl₃

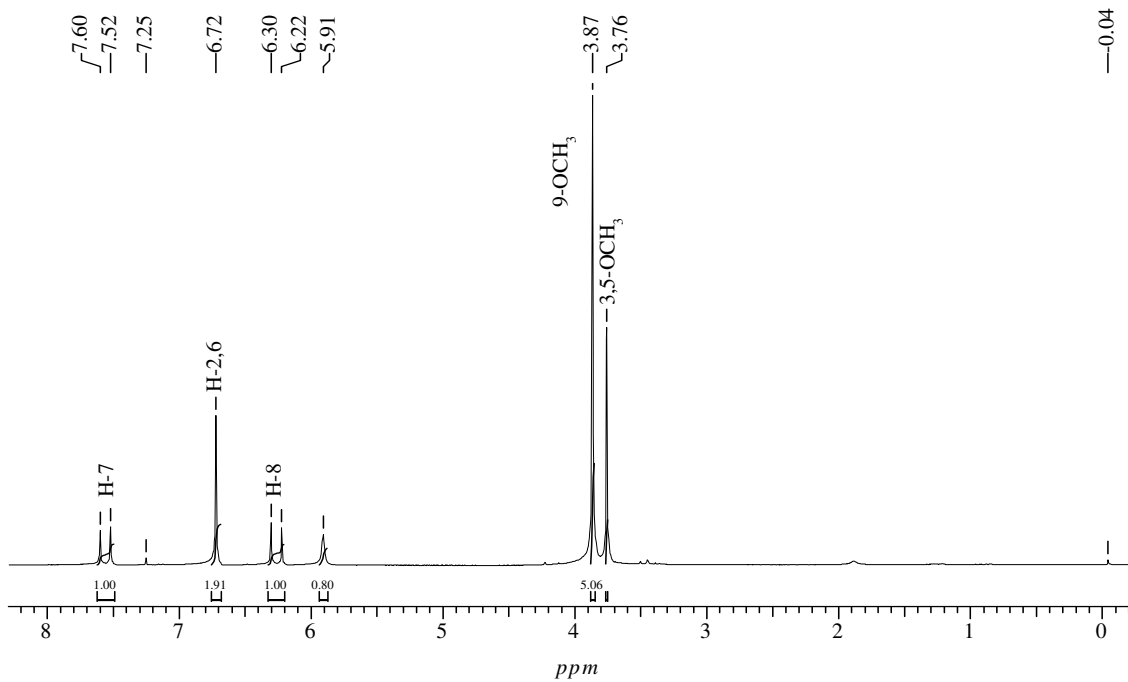


Figura 146. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 25.

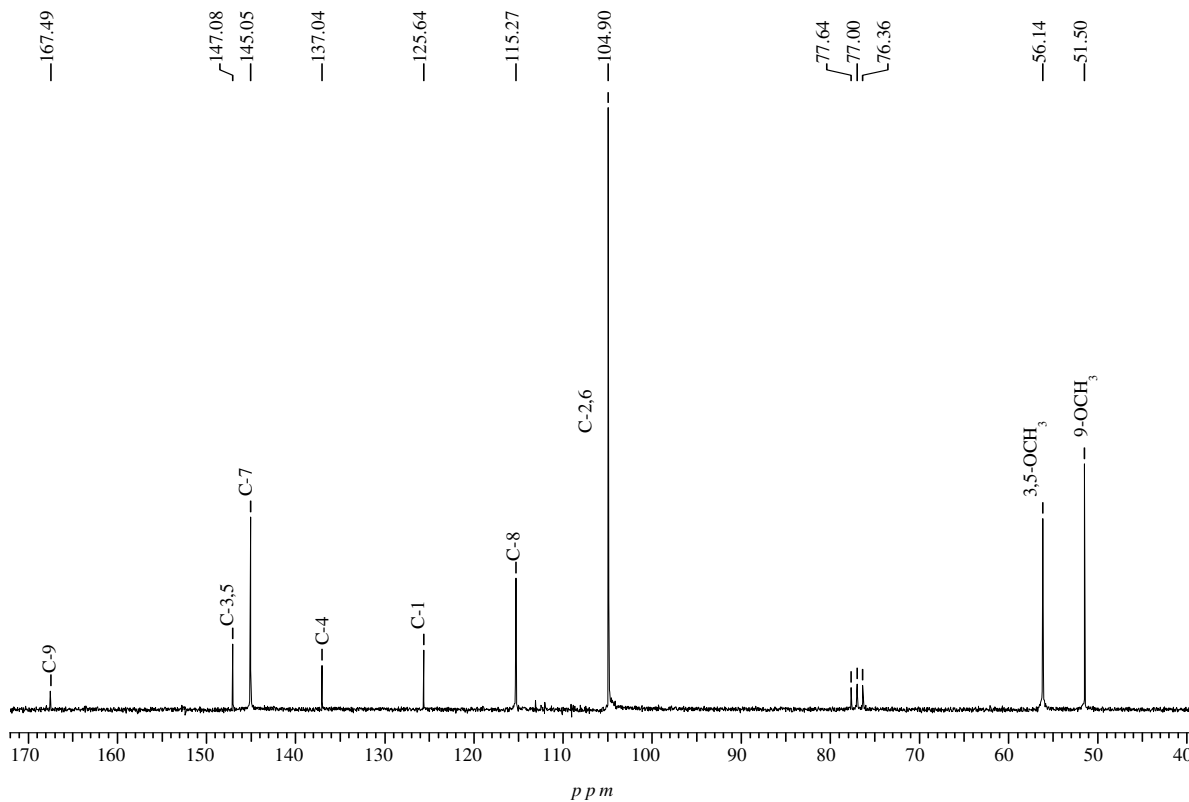


Figura 147. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, BBD, CDCl_3) de 25.

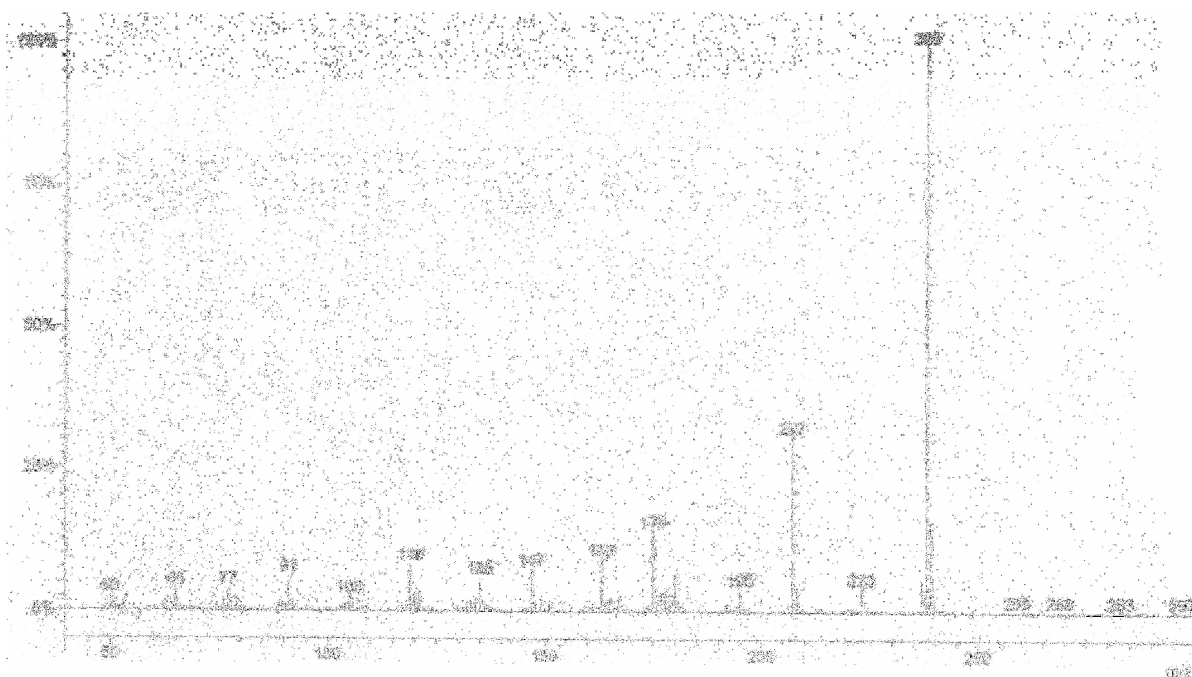
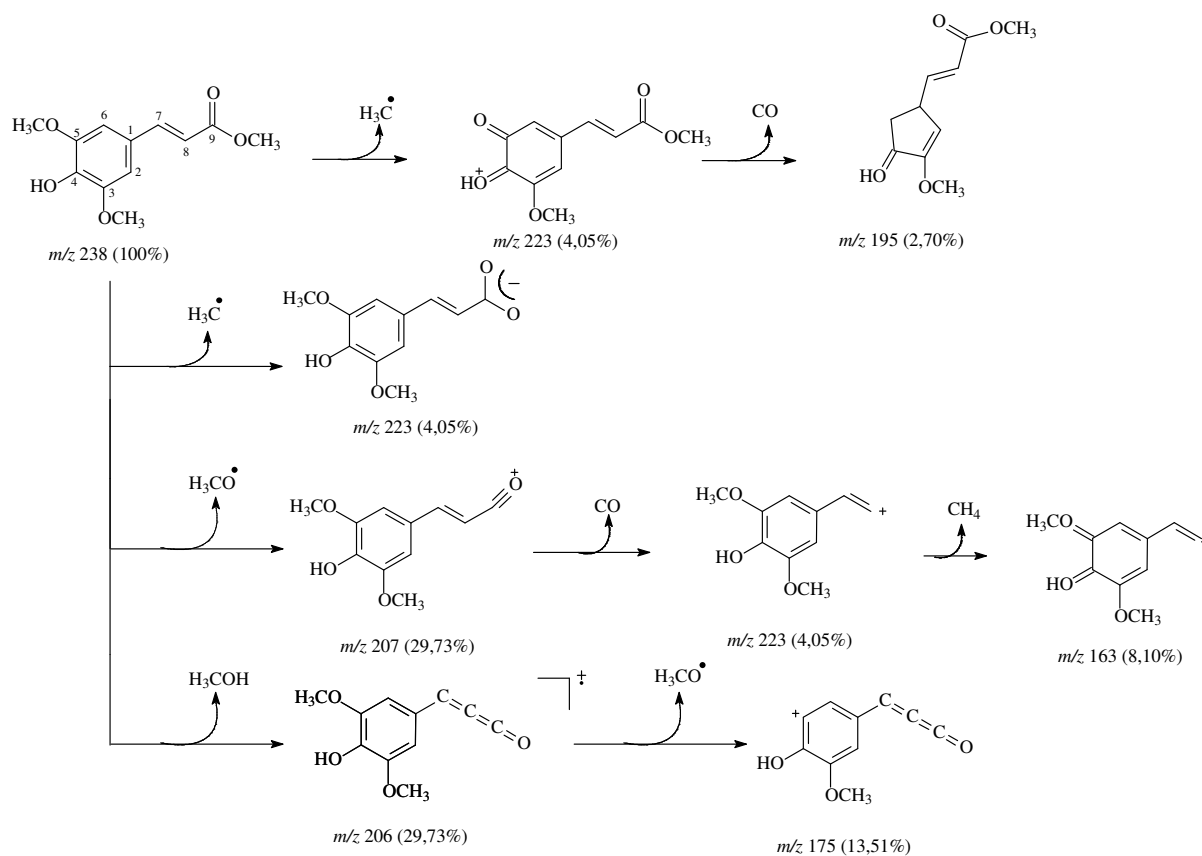


Figura 148. Espectro de Massa por I.E. (70 eV) de 25.



Esquema 22. Proposta de fragmentação para a substância 25.

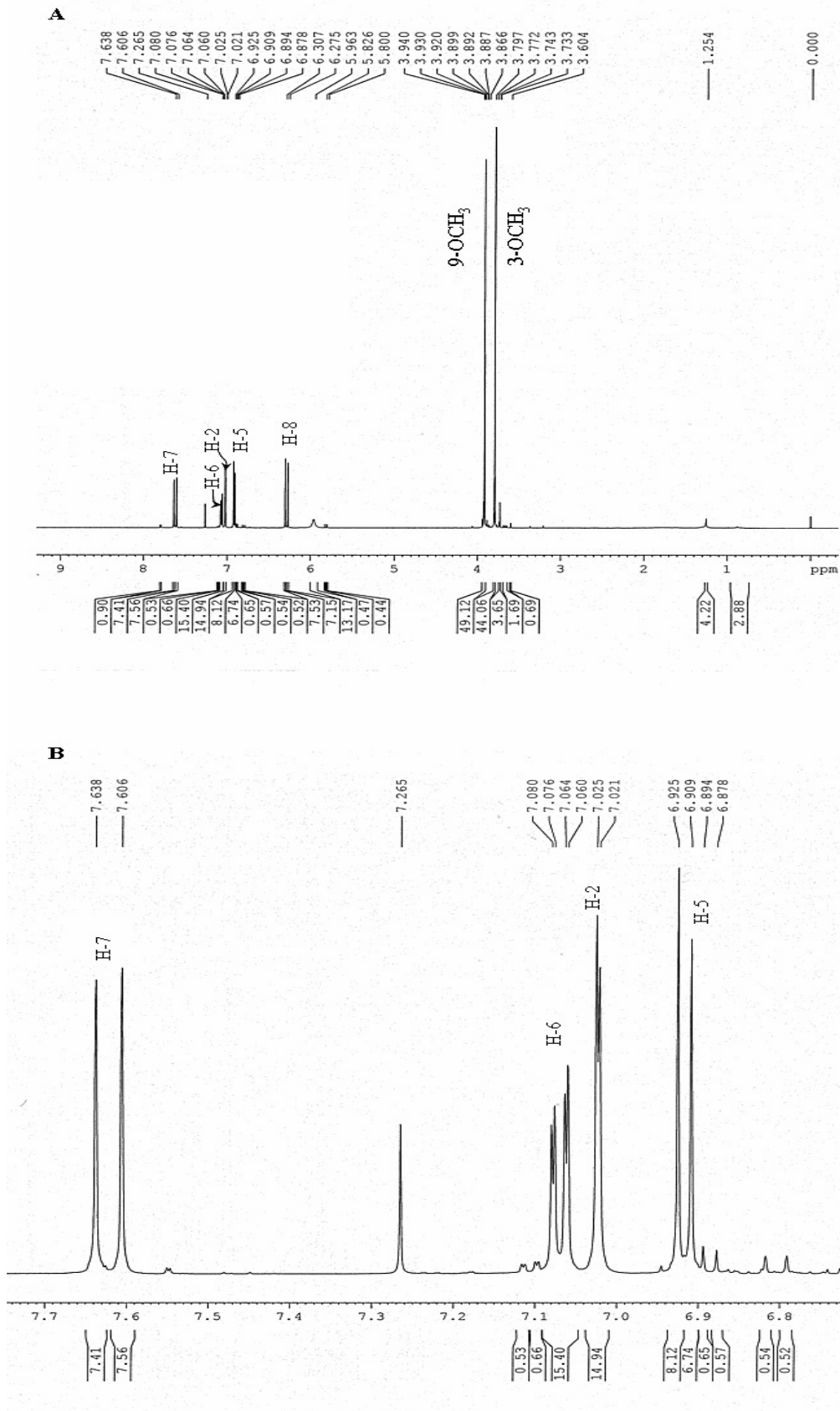


Figura 149. [A] Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 26; [B] Expansão na região entre δ_{H} 6,8 e 7,7 ppm.

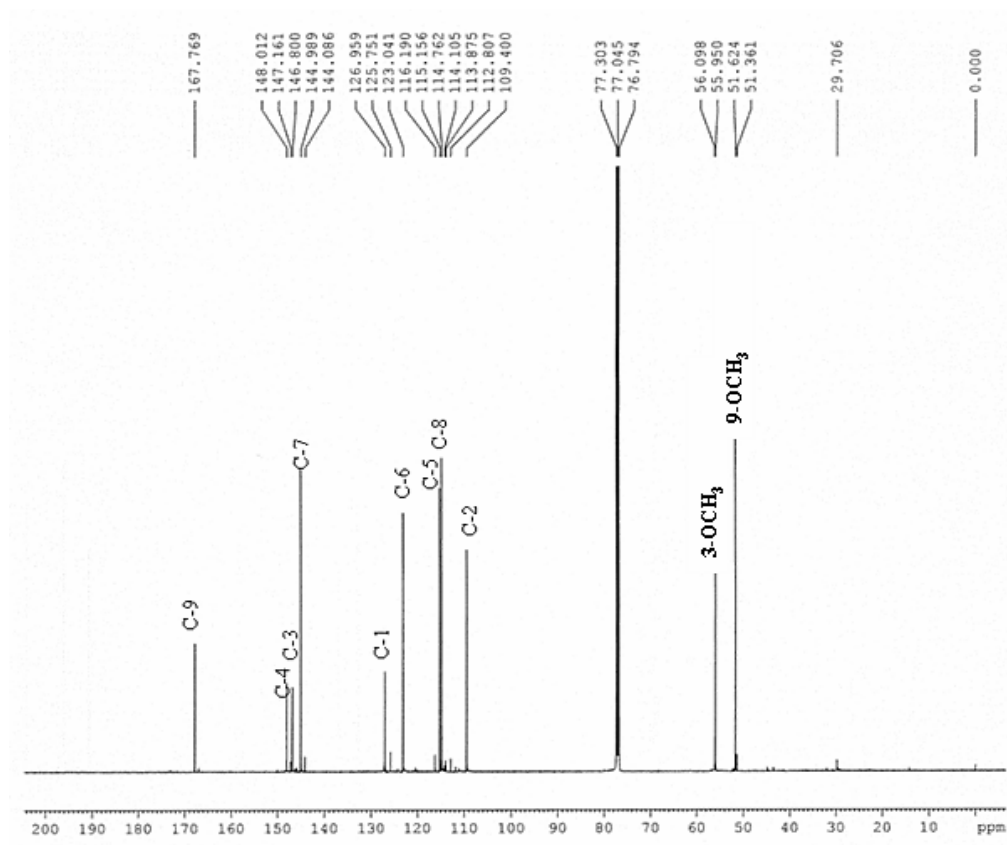


Figura 150. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, BBD, CDCl_3) de 26.

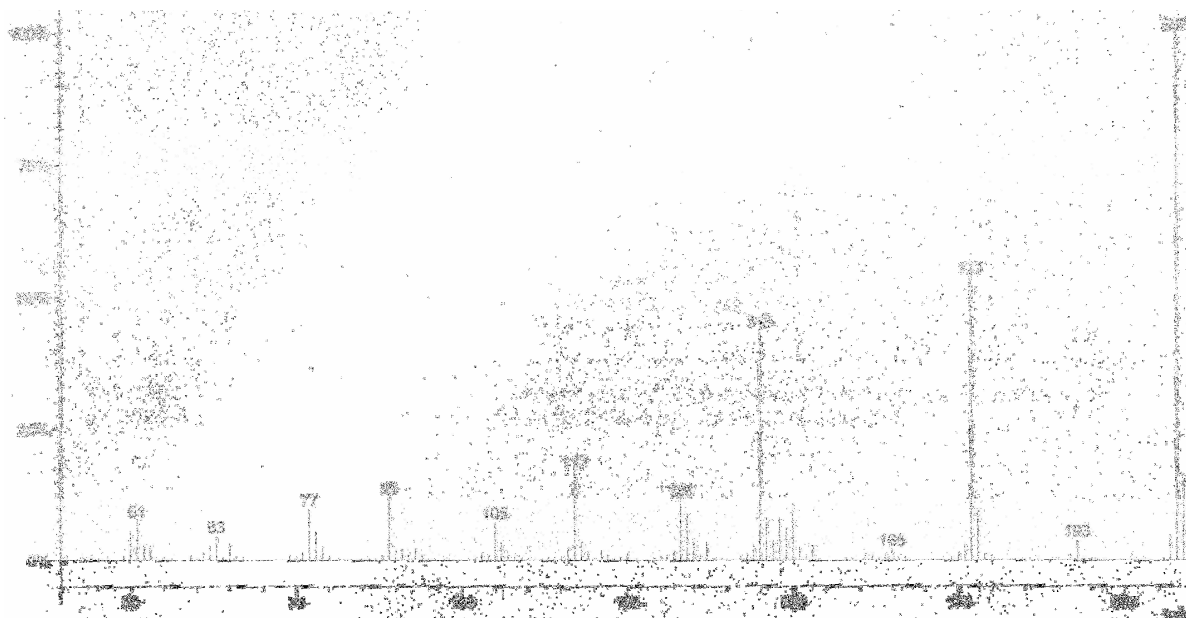
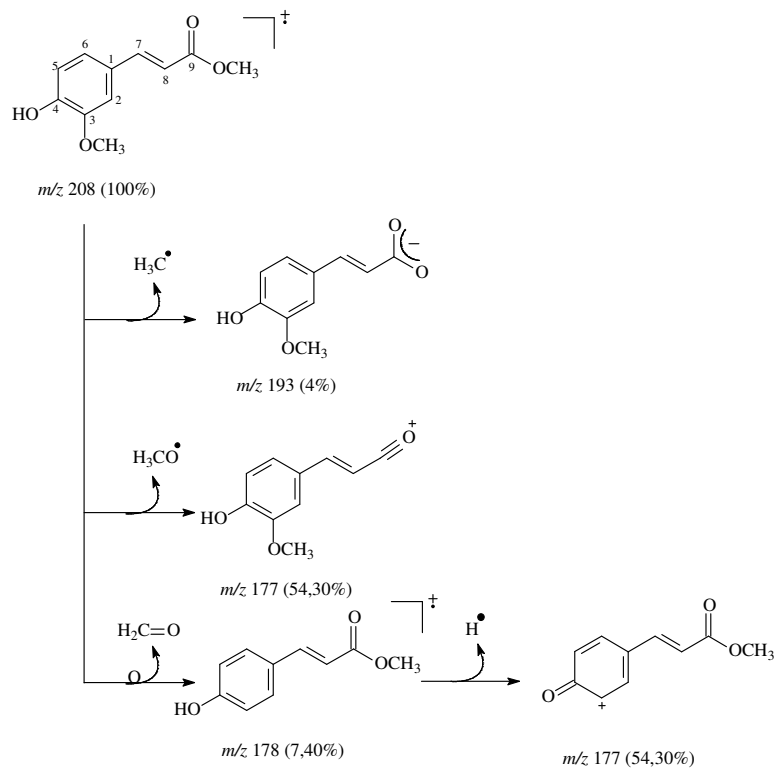


Figura 151. Espectro de Massa por I.E. (70 eV) de 26.



Esquema 23. Proposta de fragmentação para a substância 26.

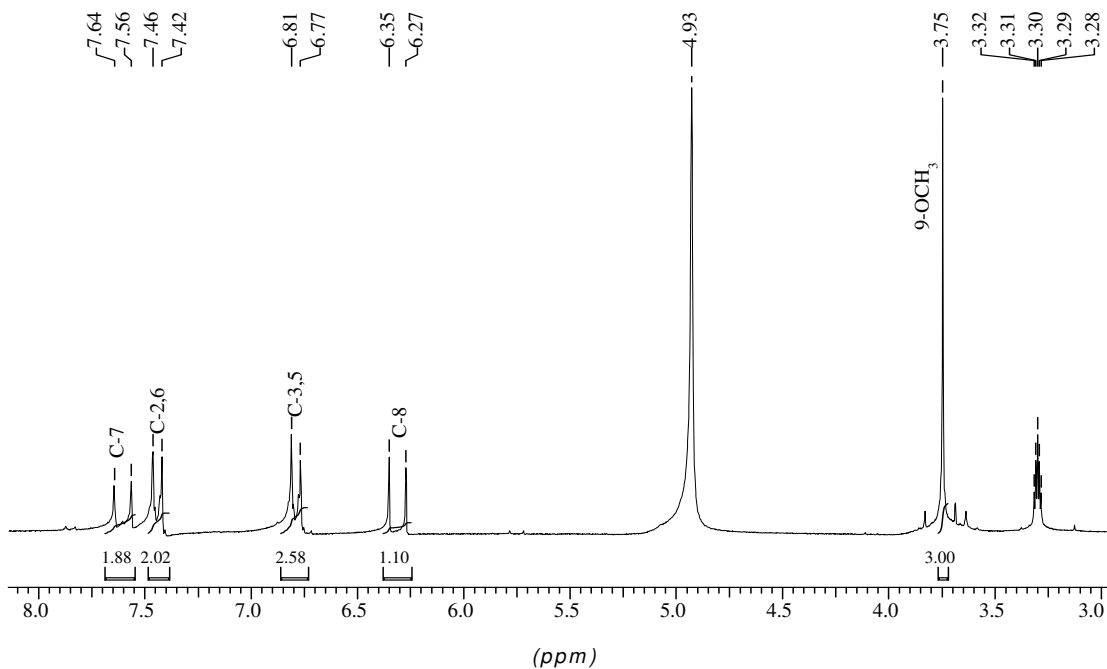


Figura 152. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD) de 27.

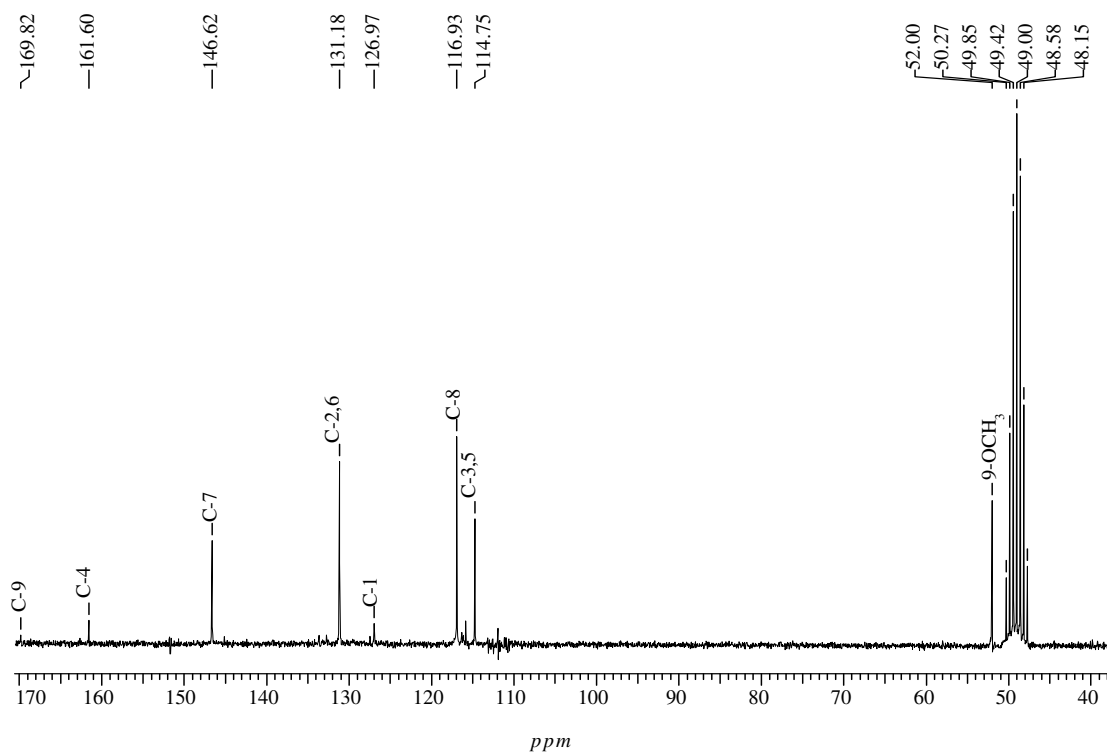


Figura 153. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, BBD, CDCl_3) de 27.

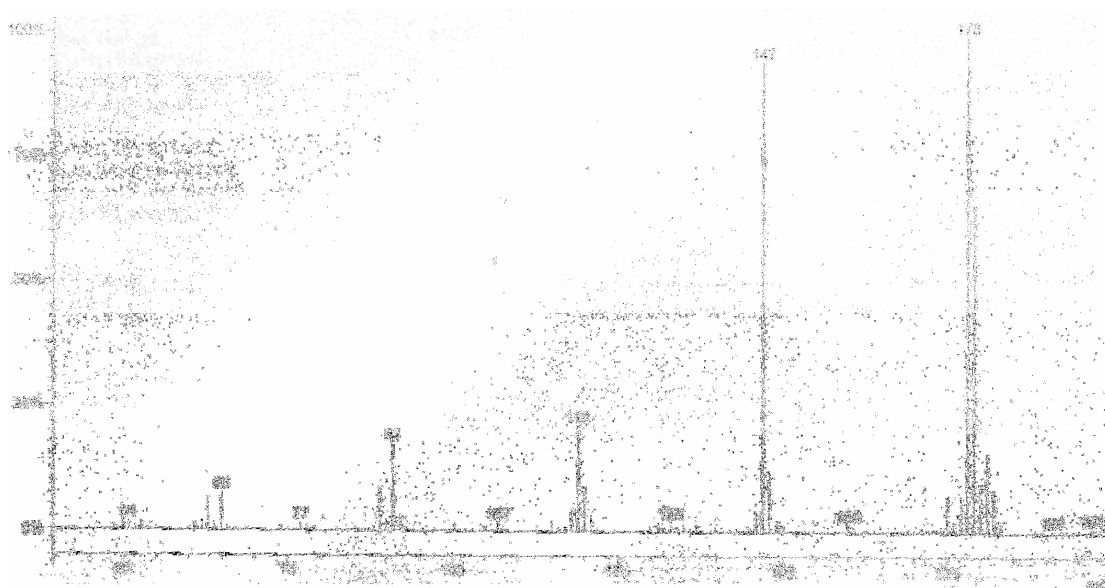
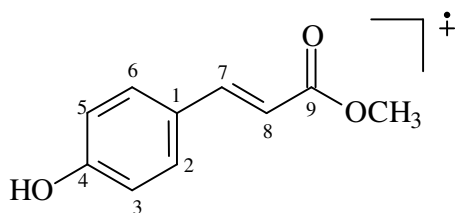
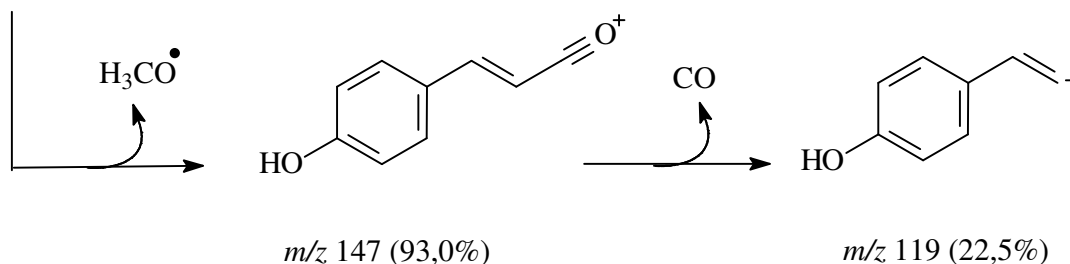


Figura 154. Espectro de Massa por I.E. (70 eV) de 27.



m/z 178 (100%)

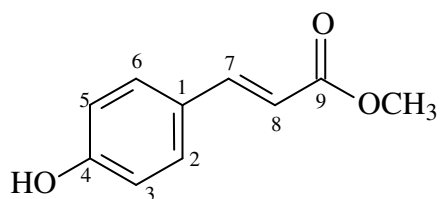


Esquema 24. Proposta de fragmentação para a substância 27.

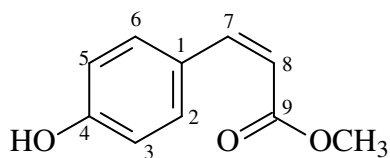
4.3.1.3 Identificação da substância 28

A substância foi isolada em mistura com seu isômero (*E*)-4-hidroxicinamato de metila (**27**). Isso foi confirmado pela análise dos espectros de RMN de ^1H (Figura 155; p. 200) e de ^{13}C (Figura 157; p. 202). Os espectros de RMN de ^1H da mistura de isômeros **27** e **28** exibiram sinais coincidentes em δ_{H} 7,43 (*d*, 8,4, H-2,6) e δ_{H} 6,86 (*d*, 8,4, H-3,5) que se acoplam entre si, como mostrou o mapa de contornos $^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY (Figura 156; p. 201) e foram compatíveis com o de um sistema aromático tipo AA'BB'. Sinais na região de frequência baixa confirmaram a presença de dois grupos carbometoxi em δ_{H} 3,80 (**27**) δ_{H} 3,91 (**28**). Pelos sinais correspondentes aos hidrogênios ligados a carbonos metínicos com constantes de acoplamento igual $J=16,0$ Hz e absorções em δ_{H} 6,31 (*d*) e δ_{H} 7,64 (*d*) que foram atribuídas aos hidrogênios H-8 e H-7 da substância **27**, respectivamente, tornando-se possível definir sua configuração como sendo *trans*. Os sinais remanescentes em δ_{H} 6,86 (*d*) e δ_{H} 7,96 (*d*), foram então atribuídos aos hidrogênios H-8 e H-7 da substância **28**, respectivamente, e pela constante de acoplamento com $J=10,5$ Hz foi definido como o isômero *cis*.

Análise dos espectros de RMN de ^{13}C -BBD de **27+28** (Figura 157; p. 202) indicou sinais correspondentes aos carbonos olefínicos de **27** [δ_{CH} 114,98 (C-8) e δ_{CH} 144,50 (C-7)] e **28** [δ_{CH} 115,90 (C-8) e δ_{CH} 131,93 (C-7)] e outros sinais que com o auxílio do mapa de contornos HMQC (Figura 158; p. 202) permitiu a atribuição de todos os carbonos hidrogenados caracterizando as estruturas dos ésteres (*E*)-4-hidroxicinamato de metila (**27**) e (*Z*)-4-hidroxicinamato de metila (**28**).



(*E*)-4-hidroxicinamato de metila
(27)



(*Z*)-4-hidroxicinamato de metila
(28)

Tabela 30. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (125 MHz) da substância 28

C	(IMASHIRO & SEKI, 2004)*	28*		
		δ_{H}	HMQC (1J)	
			δ_{C}	δ_{H} (<i>mult.</i> ; <i>J</i> Hz)
1	-	122,90	-	-
2	7,70 (<i>d</i> ; 8,8)	132,0	7,43 (<i>d</i> ; 8,4)	H-3
3	6,88 (<i>d</i> ; 8,8)	115,40	6,86 (<i>d</i> ; 8,4)	H-2
4	-	157,58	-	-
5	6,88 (<i>d</i> ; 8,8)	115,40	6,86 (<i>d</i> ; 8,4)	H-6
6	7,70 (<i>d</i> ; 8,8)	132,0	7,43 (<i>d</i> ; 8,4)	H-5
7	6,86 (<i>d</i> ; 12,9)	131,93	7,96 (<i>d</i> ; 10,5)	H-8
8	5,84 (<i>d</i> ; 12,9)	115,90	6,86 (<i>d</i> ; 10,5)	H-7
9	-	166,81	-	-
9-OCH ₃	3,73 (<i>s</i>)	51,91	3,91 (<i>s</i>)	-

*: CDCl₃

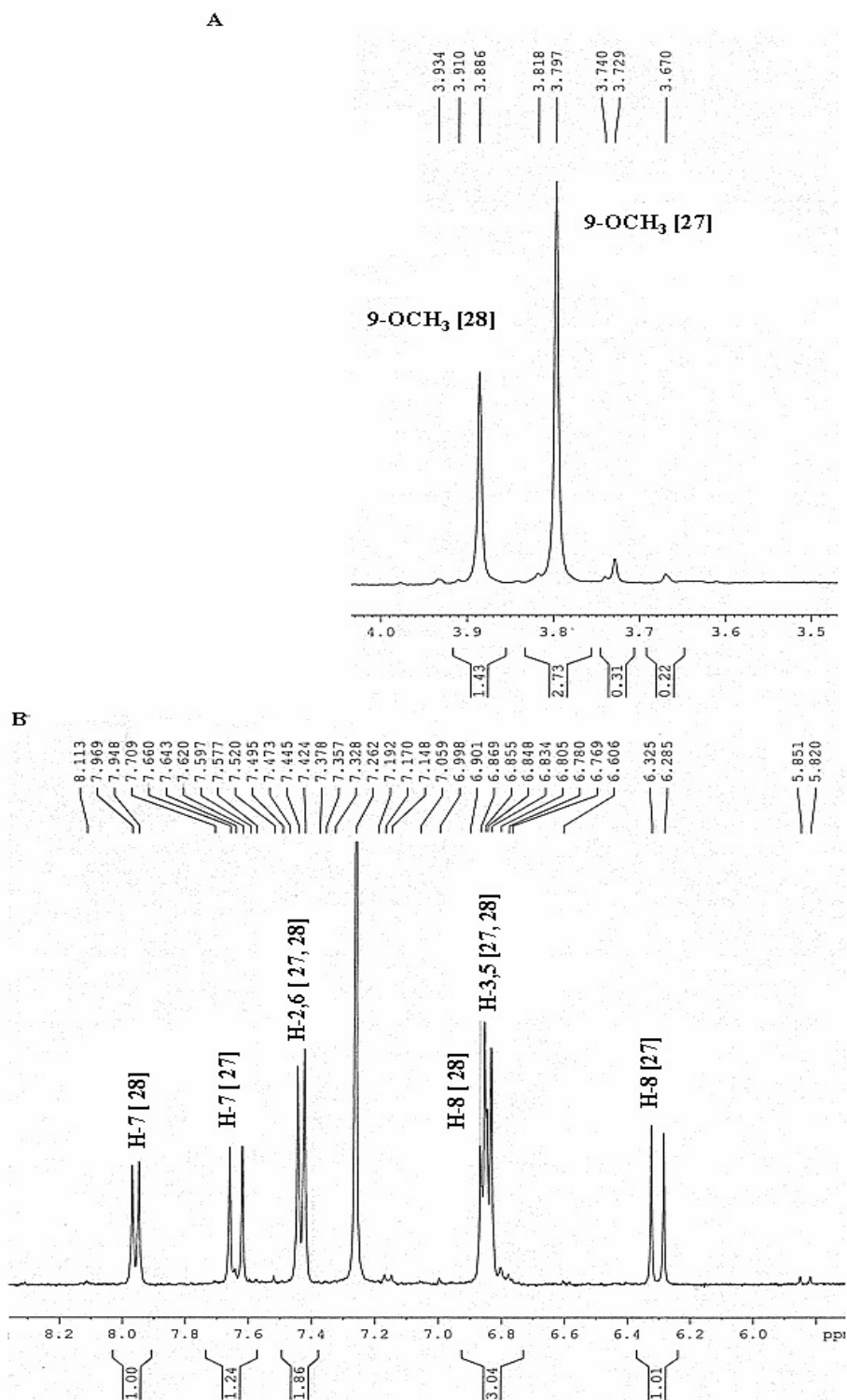


Figura 155. Expansões do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 27+28 entre as regiões: [A] δ_{H} 3,7-4,0 ppm e [B] δ_{H} 6,2-8,2 ppm.

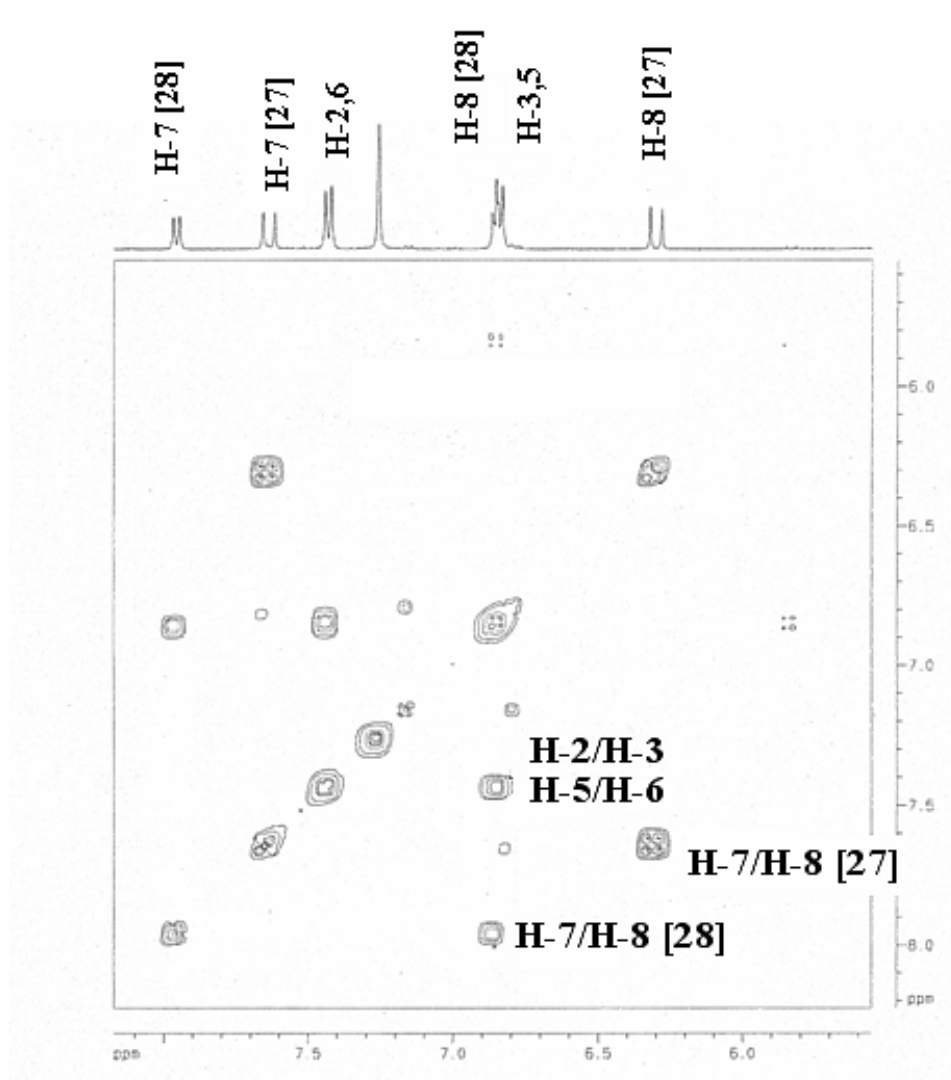


Figura 156. Mapa de contornos $^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY (500 MHz, CDCl_3) de 27+28 na região entre δ_{H} 6,0-8,0 ppm.

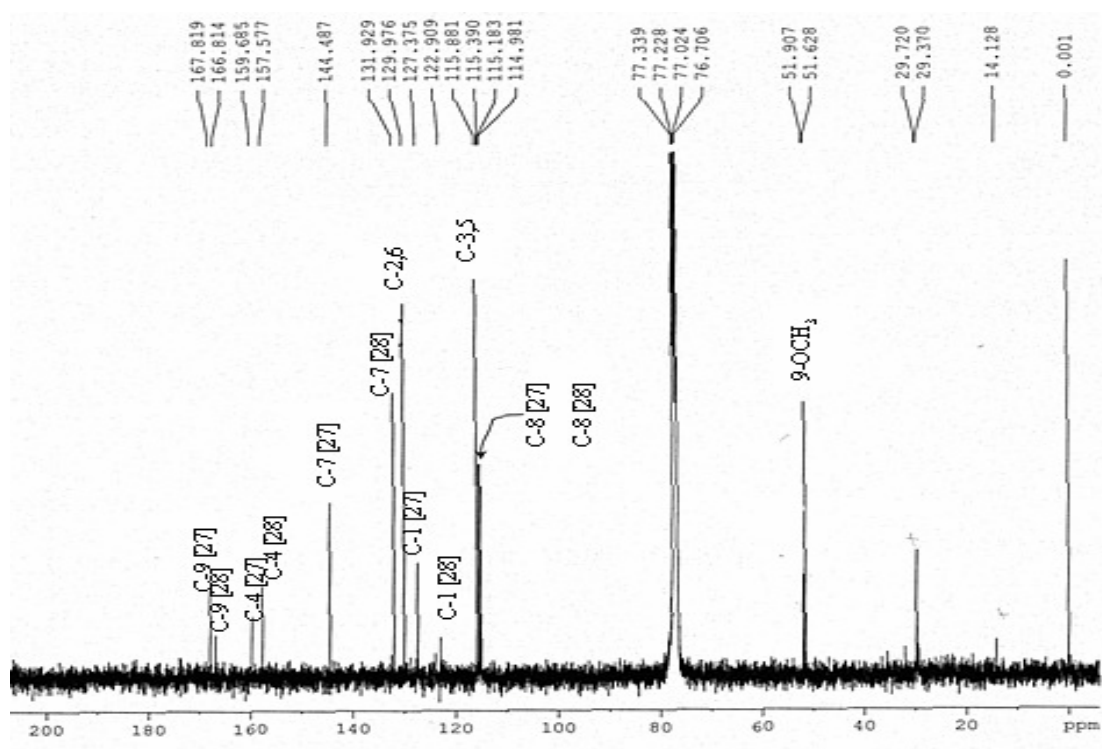


Figura 157. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, BBD, CDCl_3) de 27+28.

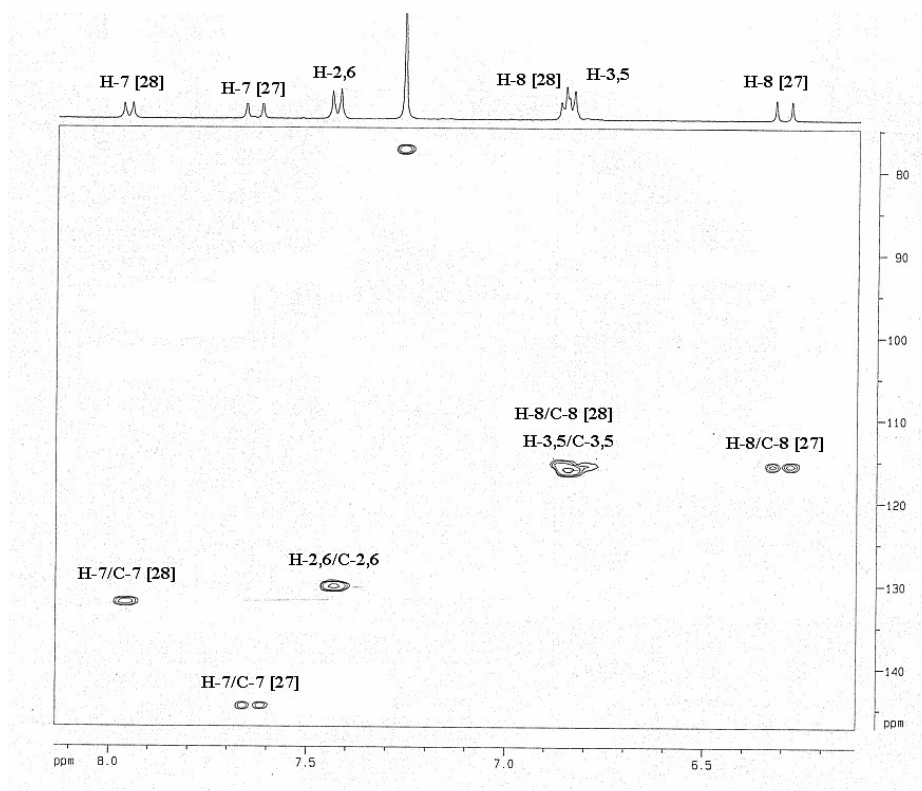


Figura 158. Mapa de contornos HMBC (125 MHz, CDCl_3) de 27+28.

4.3.1.4 Identificação da substância 29

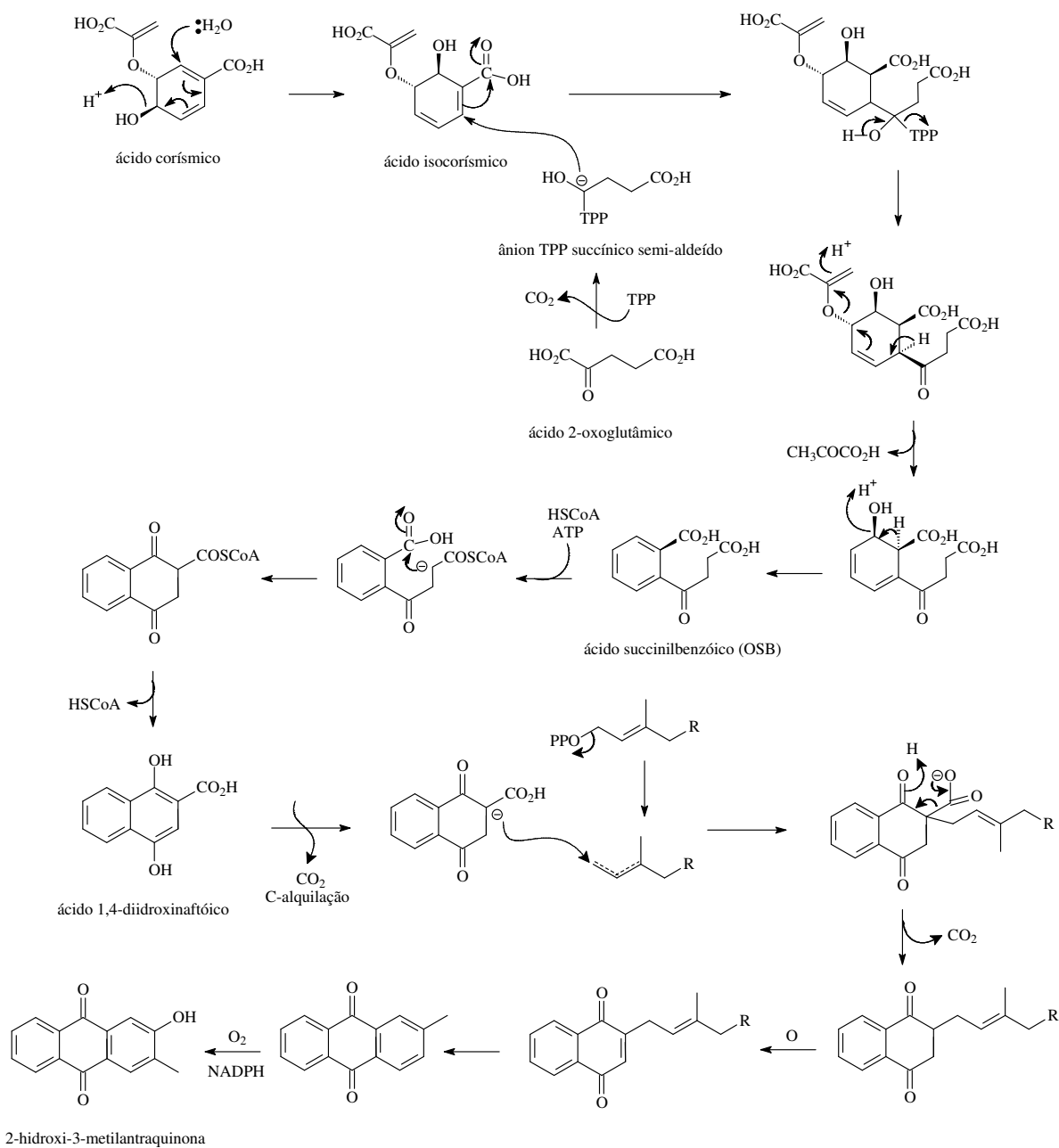
O espectro de RMN de ^1H de **29** (Figuras 159 e 160; p. 206) apresentou um singlete em δ_{H} 2,38, que foi atribuído a metila; quatro sinais na região de hidrogênios em sistemas aromáticos δ_{H} 7,86 (*dd*; 7,3; 1,6 Hz; H-6), δ_{H} 7,88 (*dd*; 7,3; 1,6 Hz; H-7), δ_{H} 8,25 (*dd*; 7,3; 1,9 Hz, H-5) e δ_{H} 8,22 (*dd*; 7,3; 1,9 Hz; H-8), além de dois singletos em δ_{H} 7,67 e δ_{H} 8,03 atribuídos aos hidrogênios H-1 e H-4, respectivamente. O mapa de contornos ($^1\text{Hx}^1\text{H-COSY}$) (Figura 162; p. 207) apresentou sinais de acoplamento entre os hidrogênios em δ_{H} 8,25 (H-5) e δ_{H} 7,86 (H-6) e entre δ_{H} 7,88 (H-7) e δ_{H} 8,22 (H-8). Os deslocamentos químicos, a multiplicidade dos sinais e os valores das constantes de acoplamento confirmaram a presença de dois anéis aromáticos, sendo um deles dissubstituído. O experimento de SEL NOEDIFF (Figura 161; p. 207) auxiliou na definição da posição da hidroxila no C-2 e da metila no C-3. Irradiando na frequência H-1 (δ_{H} 7,67) foi observado NOE no hidrogênio da hidroxila em δ_{H} 9,98 (2-OH) e irradiando na frequência da metila em δ_{H} 2,38 foi observado NOE em δ_{H} 8,03 (H-4). Esse experimento foi imprescindível para a definição da estrutura, uma vez que não foram observados os carbonos quaternários. Com o experimento de SEL-NOEDIFF foi determinado o anel C dissubstituído da antraquinona.

Todos os carbonos hidrogenados tiveram sua interpretação possibilitada pelas correlações heteronucleares observadas no experimento de HMQC (Figura 164; p. 209): δ_{C} 113,75/ δ_{H} 7,67 (C-1); δ_{C} 130,95/ δ_{H} 8,03 (C-4); δ_{C} 127,51/ δ_{H} 8,25 (C-5); δ_{C} 134,96/ δ_{H} 7,86 (C-6); δ_{C} 134,49/ δ_{H} 7,88 (C-7); δ_{C} 127,45/ δ_{H} 8,22 (C-8) e δ_{C} 16,67/ δ_{H} 2,38 (CH_3).

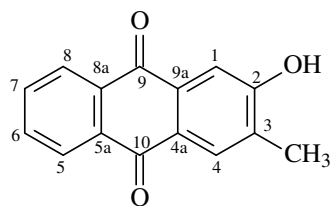
O fragmento m/z 182 observado no espectro de massas (Figura 165; p. 210) foi compatível com o anel B dicarbonilado e o fragmento m/z 152 (2 x CO e 1x OH) (Esquema 26; p. 210) confirmaram a quinona.

Todos esses dados comparados às informações obtidas na literatura (KITAJIMA *et al.*, 1998) permitiram concluir a proposta para a 2-hidroxi-3-metilantraquinona (**29**). Esta substância está sendo relatada pela primeira vez no gênero *Palicourea*.

É bem conhecida a distribuição das antraquinonas entre as Rubiáceas (KITAJIMA *et al.*, 1998). As quinonas são derivadas por oxidação de alguns compostos fenólicos como catecols (1,2-diidroxibenzenos) que formam *orto* e *para* quinonas. As quinonas podem ser formadas por sistemas fenólicos gerados pelas vias do acetato ou do chiquimato. Diversas quinonas que possuem estruturas contendo fragmento terpenóide bem como porção derivada do chiquimato são encontradas na natureza, como exemplo têm-se as ubiquinonas (coenzima Q), tocoferóis, filoquinonas (vitamina K₁), menaquinonas (vitamina K₂). Estas quinonas são derivadas do ácido corísmico via seu isômero, o ácido isocorísmico que se incorpora com unidades adicionais de carbonos providos pelo ácido 2-oxoglutárico, via mecanismo envolvendo a coenzima tiamina difosfato (TPP). O 2-oxoglutarato é descarboxilado na presença de TPP formando o ânion TPP succínico semialdeído que ataca o ácido isocorísmico em uma reação do tipo Michael. Perda do cofator tiamina, eliminação do ácido pirúvico e desidratação geram o intermediário ácido *o*-succinilbenzóico (OSB). Este é ativado pela formação de um éster de coenzima A e uma condensação de Dieckmann formando o ácido diidronaftóico que por ação enzimática é catalisado a uma naftoquinona isoprenilada. As etapas seguintes envolvem alquilação, descarboxilação, oxidação, redução pelos cofatores NADPH/O₂ e ciclização da porção dimetilalil para gerar a 2-hidroxi-3-metilantraquinona (DEWICK, 2002).



Esquema 25. Rota biossintética de 2-hidroxi-3-metilantraquinona encontrada nas folhas de *P. coriacea* (adaptado de DEWICK, 2002).



2-hidroxi-3-metilantraqüinona (**29**)

Tabela 31. Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e de ^{13}C (125 MHz) da substância 29

C	(KITAJIMA <i>et al.</i> , 1998)*		29 ^{*1}		
	δ_{C}	δ_{H}	HMQC (1J)		COSY [$^1\text{H} \times ^1\text{H}$]
			δ_{C}	δ_{H}	
1	114,6	7,63	113,75	7,67 (s)	-
2	159,14	-	*2	-	-
3	128,19	-	*2	-	-
4	128,16	7,11	130,95	8,03 (s)	-
4a	127,34	-	*2	-	-
5	127,91	8,29	127,51	8,25 (dd, 7,3; 1,9 Hz)	H-6
5a	132,19	-	*2	-	-
6	134,2	7,8	134,96	7,86 (td, 7,3; 1,6 Hz)	H-5, H-7
7	134,04	7,78	134,49	7,88(td, 7,3; 1,6 Hz)	H-8
8	127,33	8,53	127,45	8,22 (dd, 7,3; 1,9 Hz)	H-7
8a	133,37	-	*2	-	-
9	182,58	-	*2	-	-
9a	130,78	-	*2	-	-
10	182,85	-	*2	-	-
CH ₃	16,05	2,45	16,67	2,38 (s)	-

*: CDCl₃

*1: Acetona-d₆

*2: devido a pouca quantidade de material não foi possível atribuir os valores de deslocamento dos carbonos quaternários

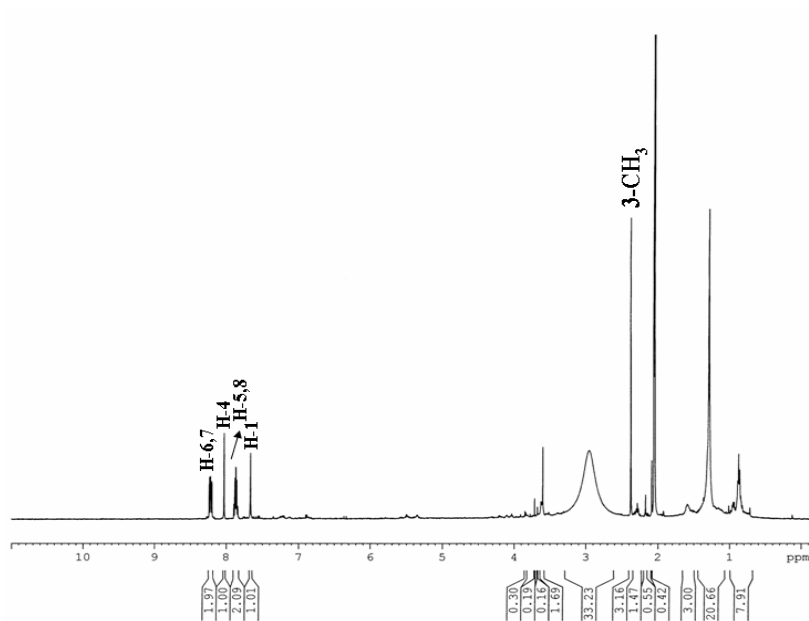


Figura 159. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, Acetona- d_6) de 29.

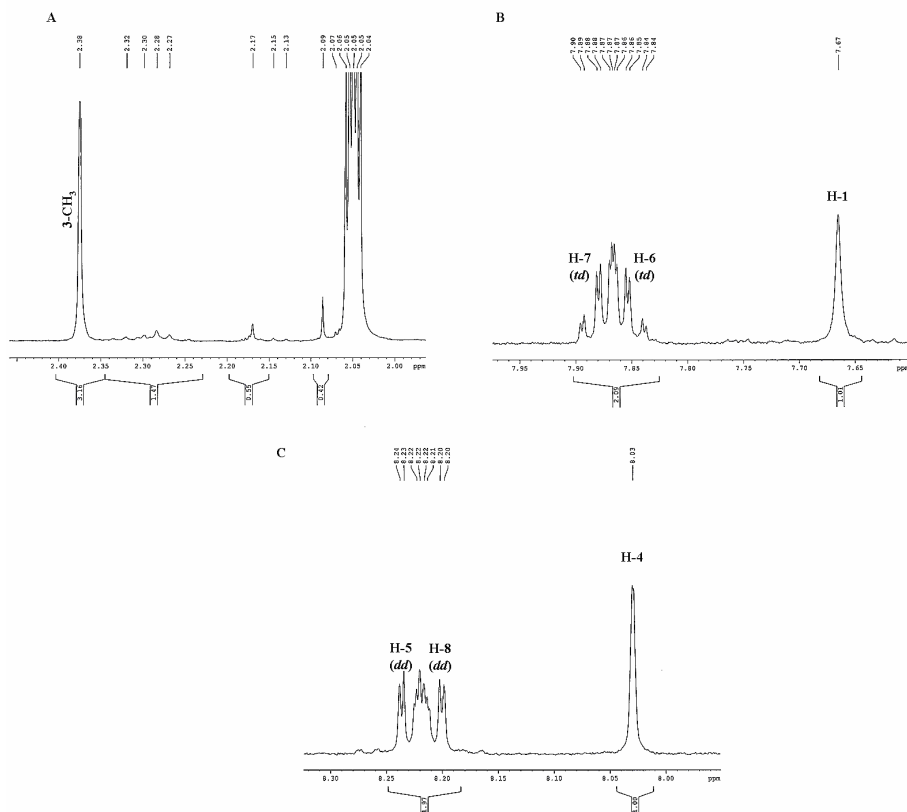


Figura 160. Expansões do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, Acetona- d_6) de 29 nas regiões entre: [A] δ_{H} 2,0-2,40 ppm; [B] δ_{H} 7,65-7,95 ppm e [C] δ_{H} 8,0-8,30 ppm.

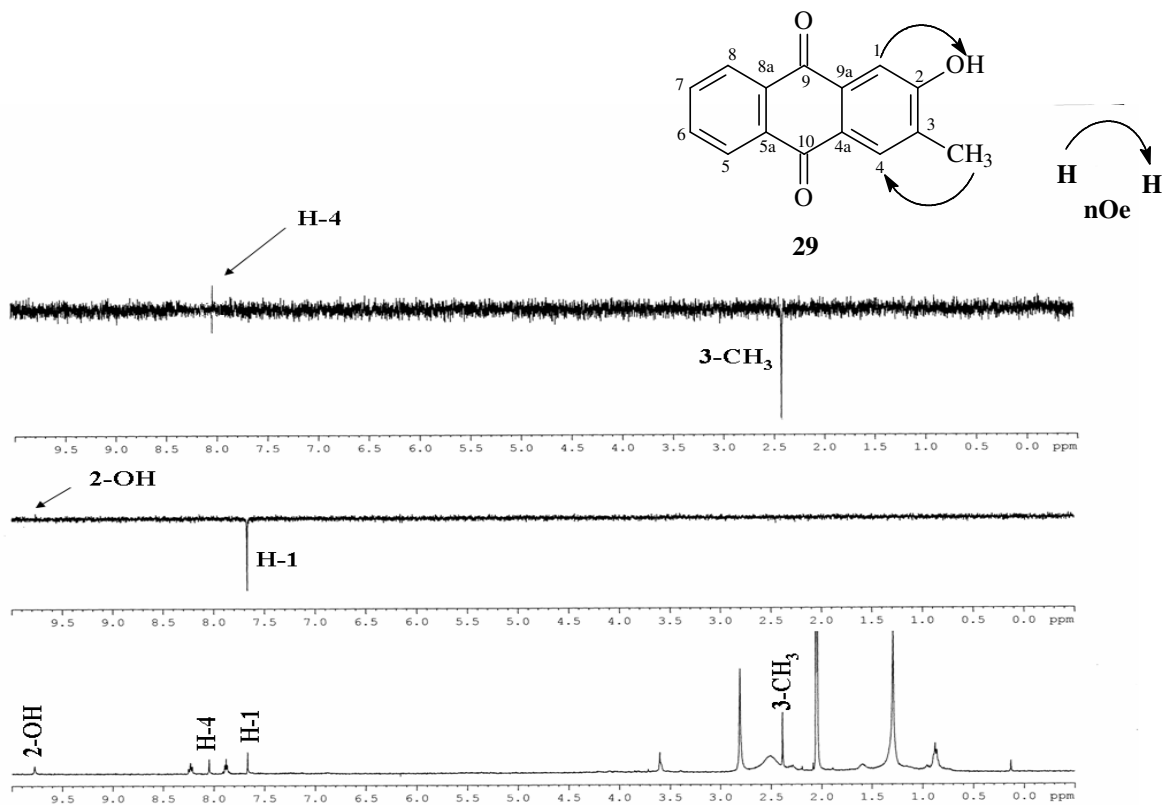


Figura 161. Experimento de SEL-NOEDIFF (500 MHz, Acetona-d₆) de 29.

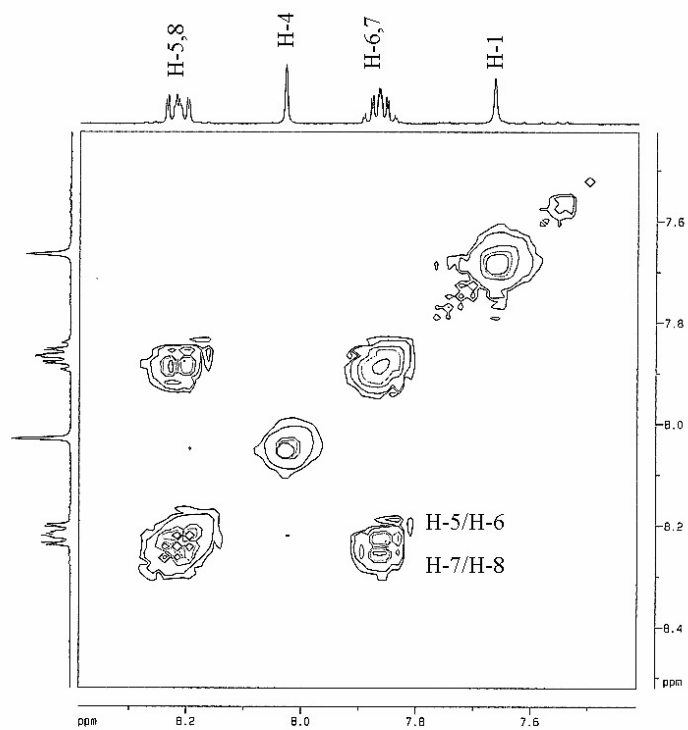
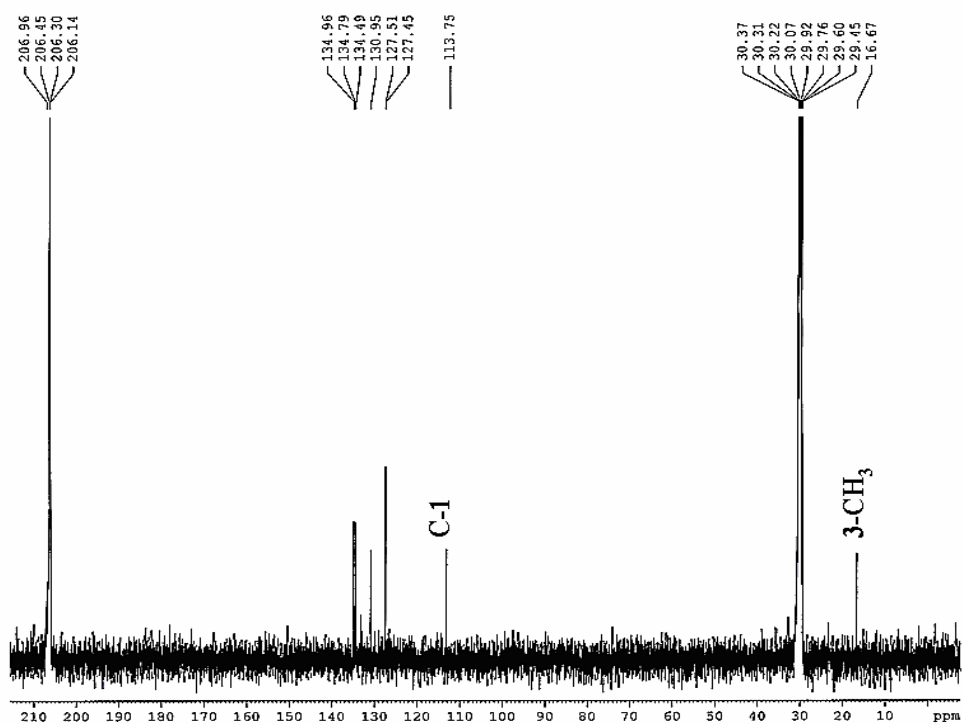


Figura 162. Mapa de contornos ¹Hx¹H-COSY (500 MHz, Acetona-d₆) de 29.

A



B

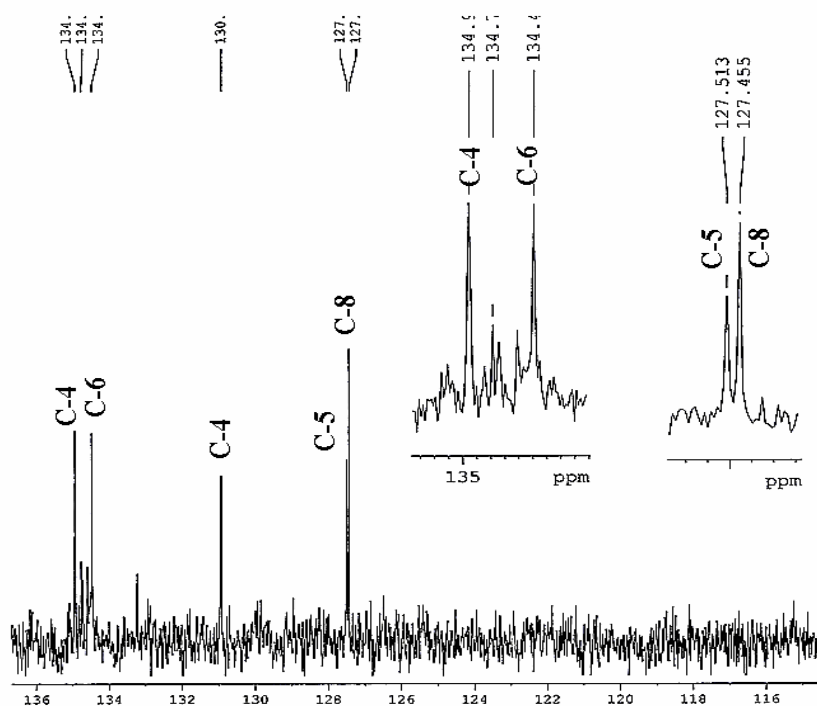


Figura 163. [A] Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, Acetona- d_6) de 29; [B] Expansão na região entre δ_{C} 116,0-136,0 ppm.

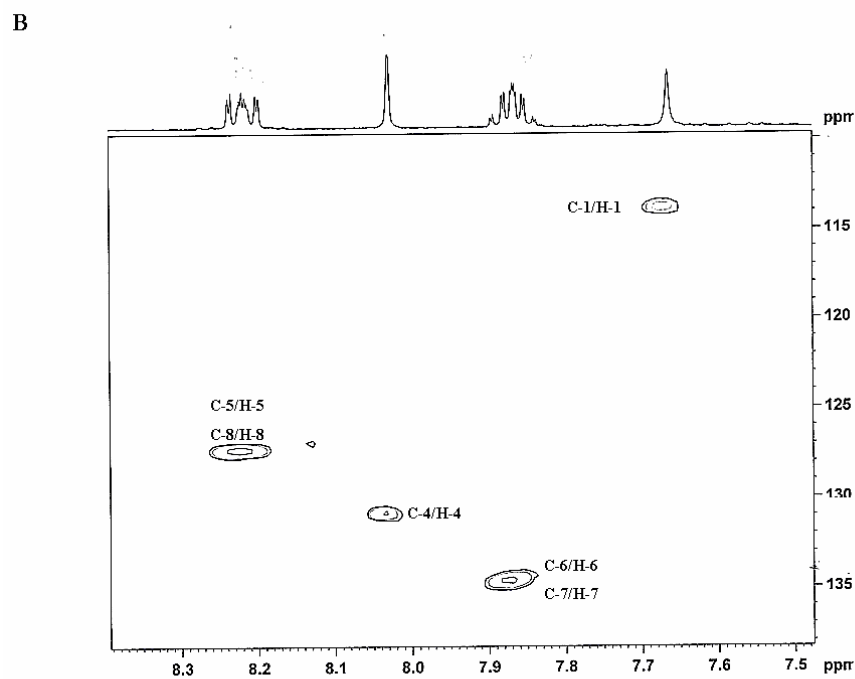
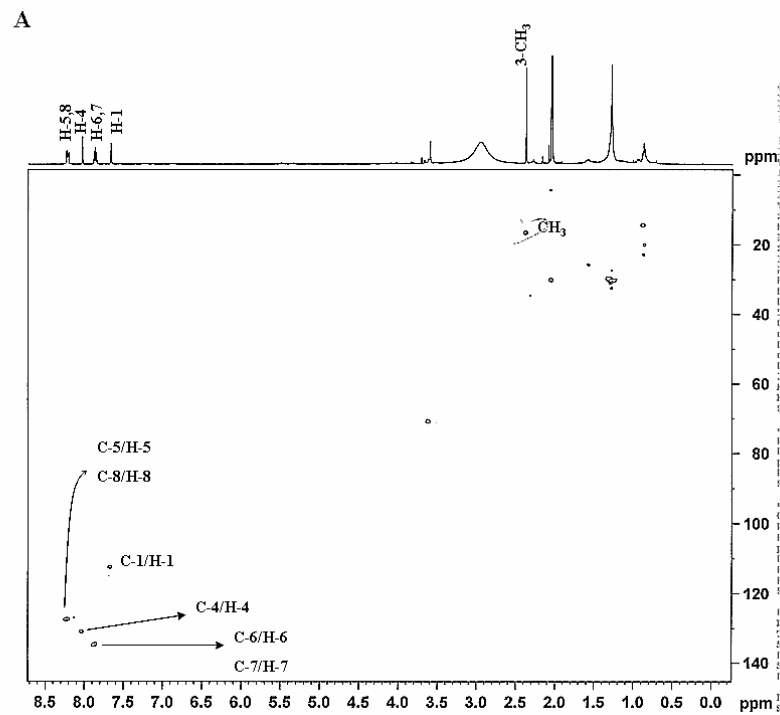


Figura 164. [A] Mapa de contornos HMQC (125 MHz, Acetona- d_6) de 29; [B] Expansão na região entre δ_C 110,0-137,0 ppm e δ_H 7,5-8,3 ppm.

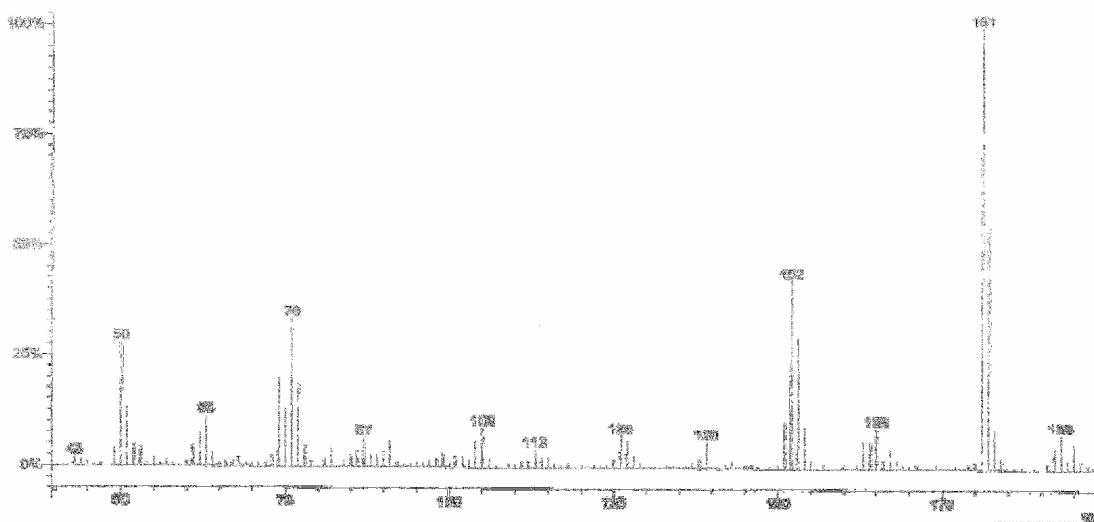
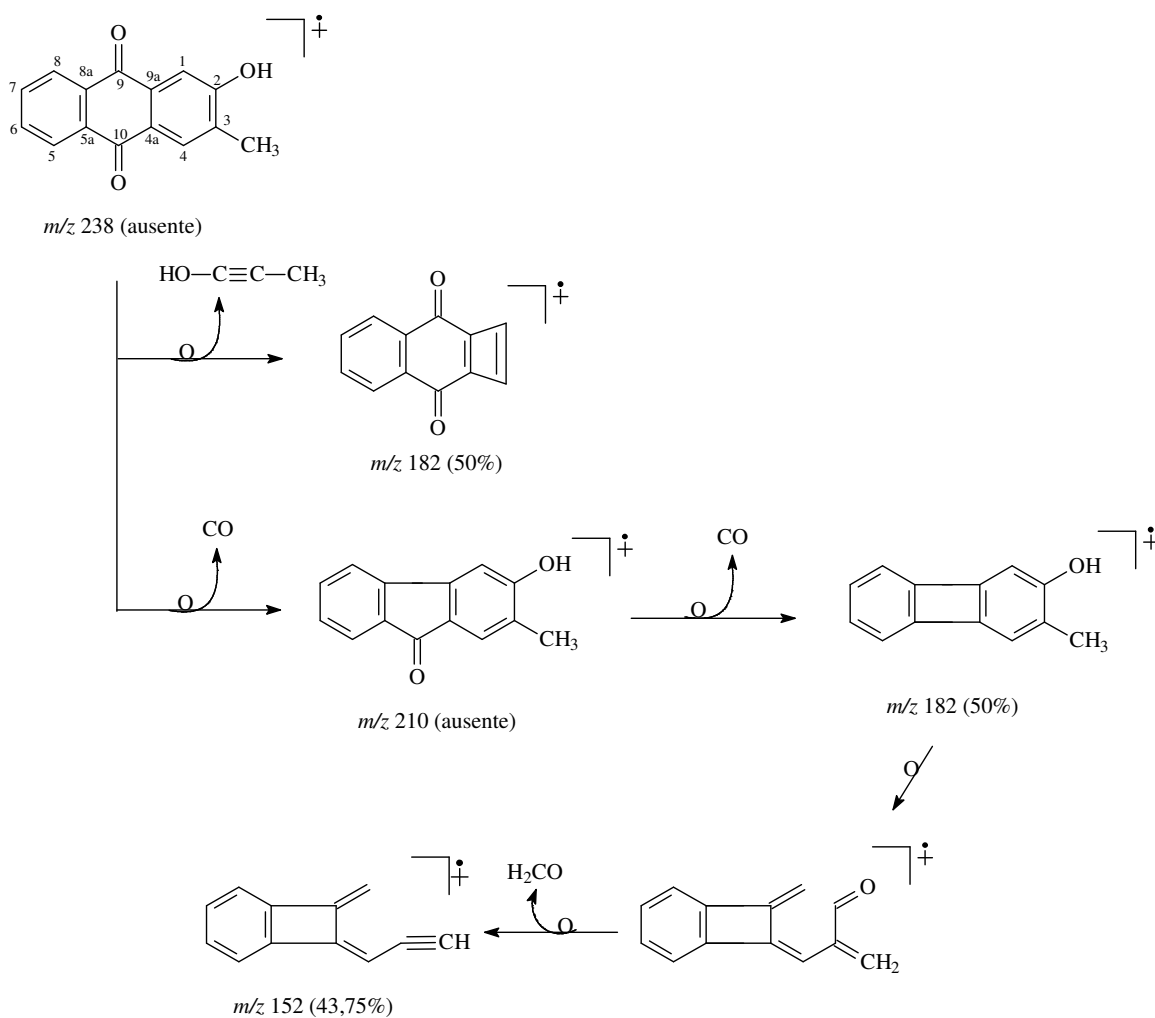


Figura 165. Espectro de massa por I.E. (70 eV) de 29.

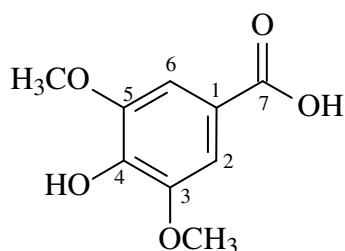


Esquema 26. Proposta de fragmentação para a substância 29.

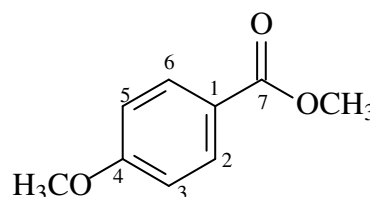
4.3.1.5 Identificação das substâncias **30** e **31**

Para confirmar a estrutura das substâncias **30** e **31** foram realizadas análises de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C . A análise dos espectros de RMN de ^1H de **30** (Figura 166) e **31** (Figura 168), permitiu identificar um singlete em δ_{H} 6,82 (2H, H-2,6) e dois dubletos em δ_{H} 5,96 (2H, $J=8,0$ Hz, H-3, 5) atribuídos aos sistemas aromáticos de **30** e **31**, respectivamente.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 167 e 169) mostrou valores de deslocamentos químicos compatíveis com carbono quaternário C-7 em δ_{C} 167,70 [**30**] e δ_{C} 166,79 [**31**] (carbonila conjugada) e ao carbono carbinólico C-4 em δ_{CH} 142,56 [**30**] e δ_{CH} 159,30 [**31**]. O C-4 encontra-se mais protegido em **30** devido ao efeito γ de proteção exercido pelas duas metoxilas localizadas nos carbonos adjacentes.



ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico (**30**)



4-metoxibenzoato de metila (**31**)

Tabela 32. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e de ^{13}C (50 MHz) das substâncias 30 e 31

C	30		31	
	δ_{C}	δ_{H} (mult.; J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult.; J Hz)
1	124,70	-	122,43	-
2	107,05	6,82 (s)	131,46	7,95 (d; 8,0)
3	146,87	-	113,48	6,86 (d; 8,0)
4	142,56	-	159,30	-
5	146,87	-	113,48	7,95 (d; 8,0)
6	107,05	6,82 (s)	131,46	6,86 (d; 8,0)
7	167,70	-	166,79	-
3-OCH ₃	56,14	3,77 (s)	-	-
4-OCH ₃	-	-	55,29	3,81 (s)
5-OCH ₃	56,14	3,77 (s)	-	-
7-OCH ₃	52,44	3,68 (s)	51,74	3,85 (s)

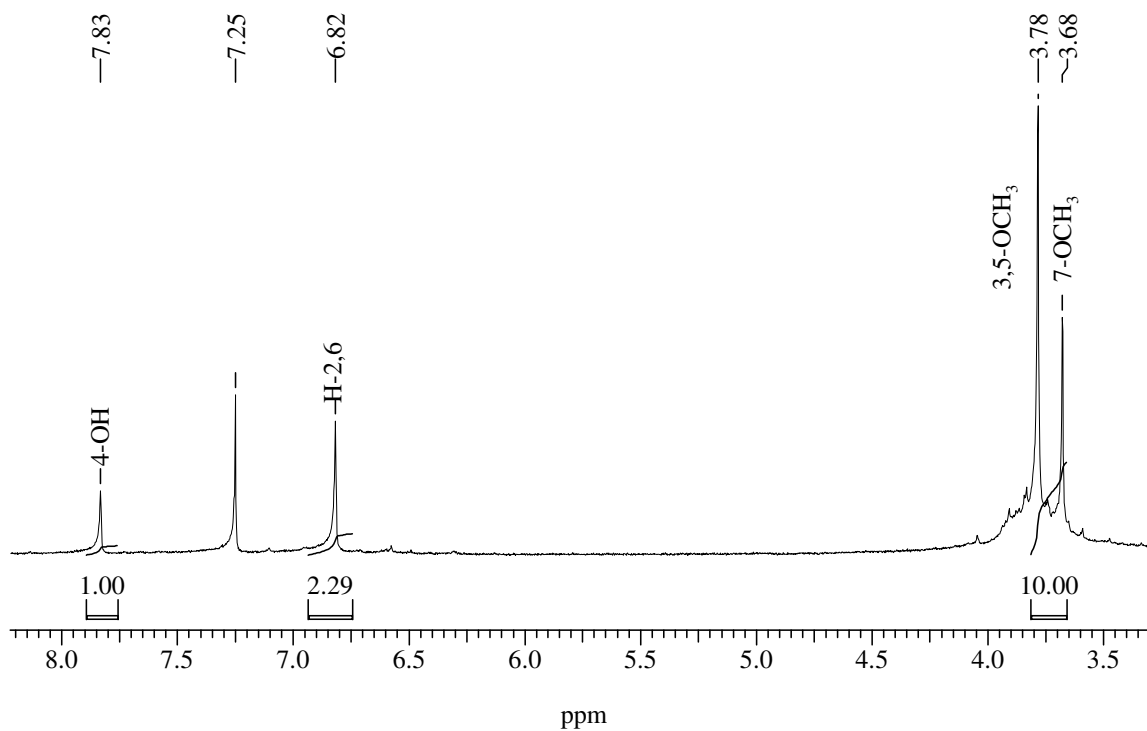


Figura 166. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 30.

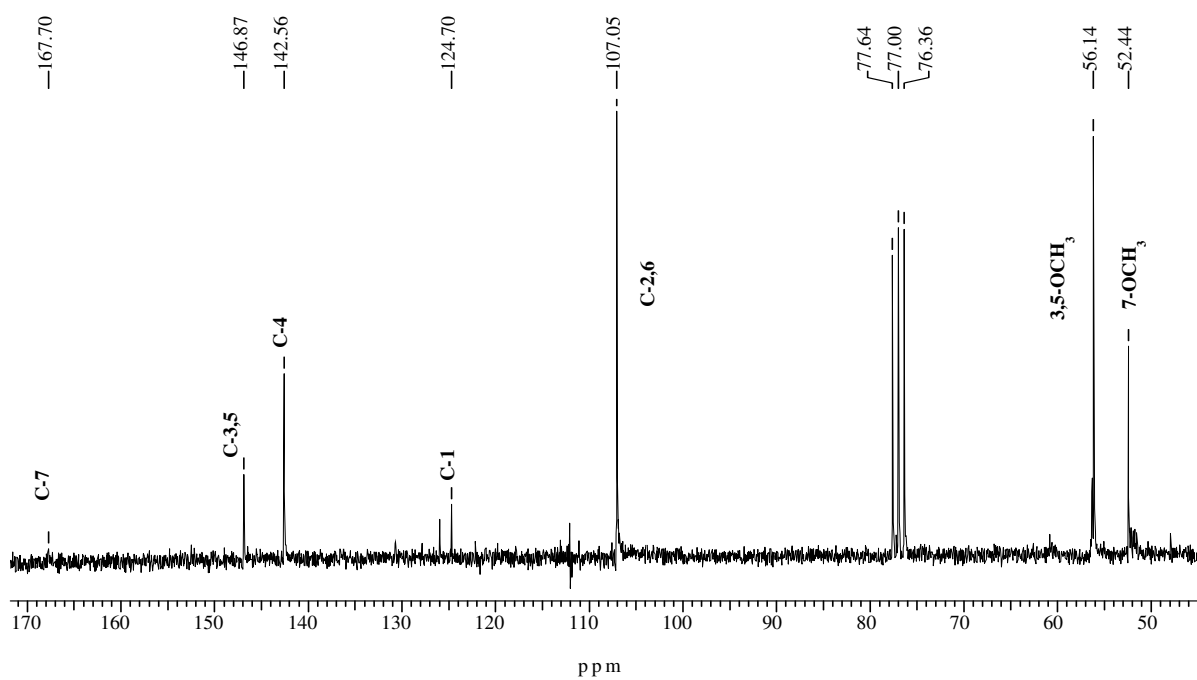


Figura 167. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 30.

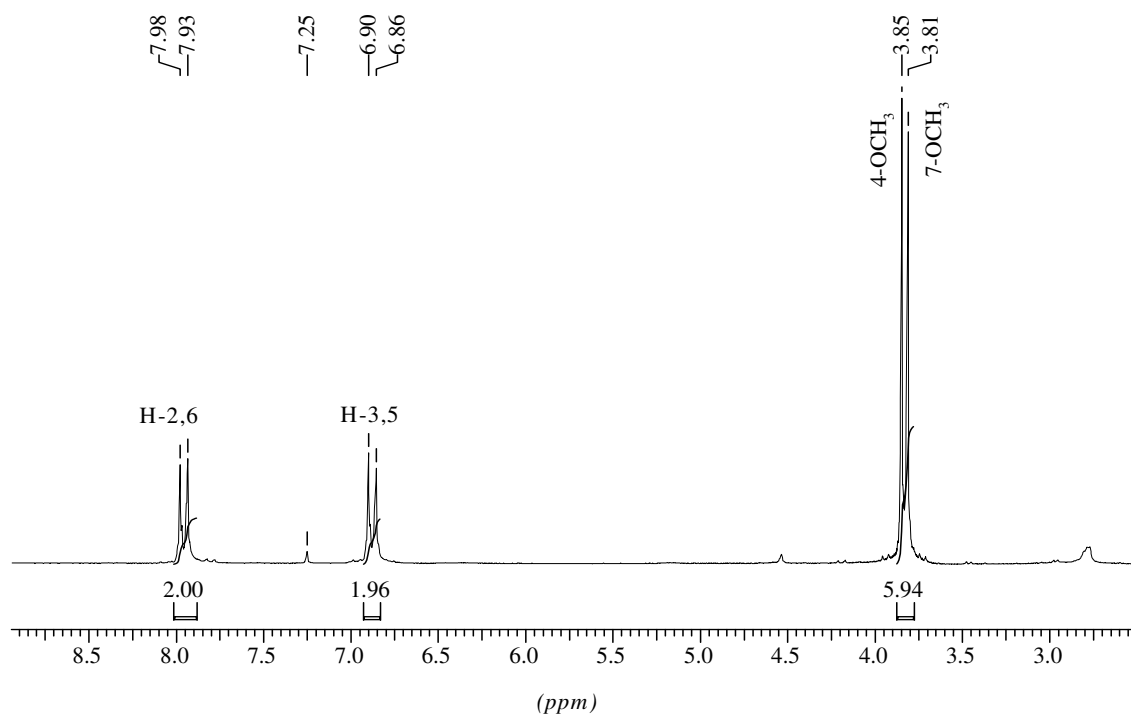


Figura 168. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de 31.

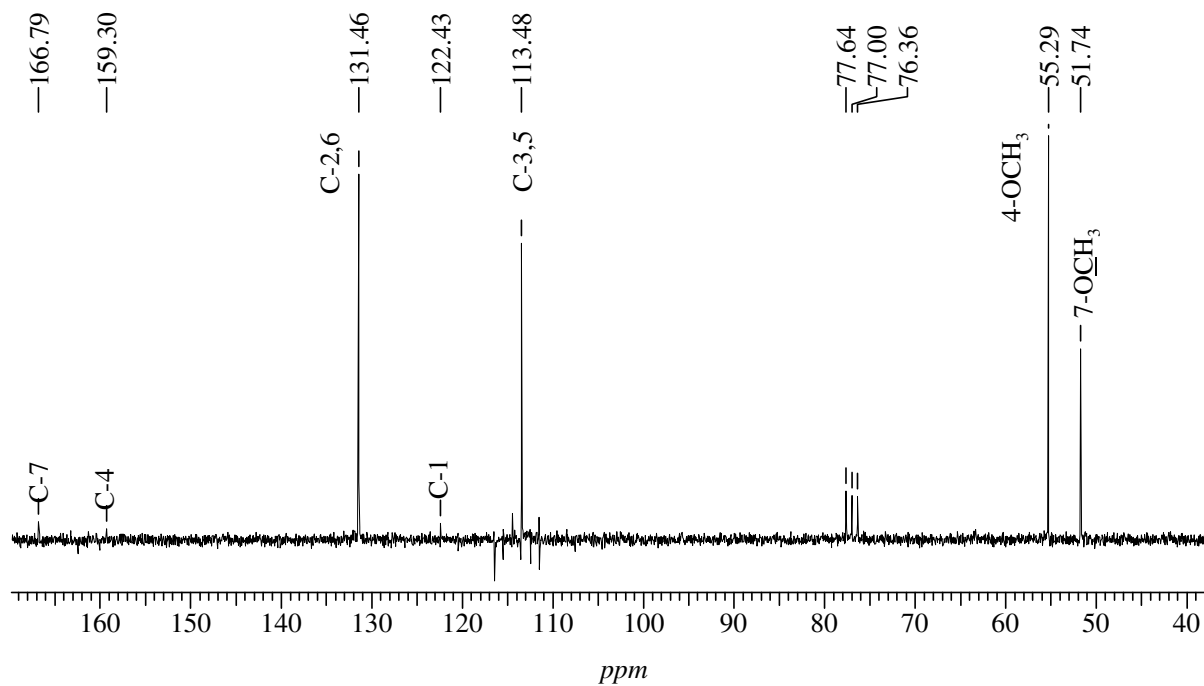


Figura 169. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, PND, CDCl_3) de 31.

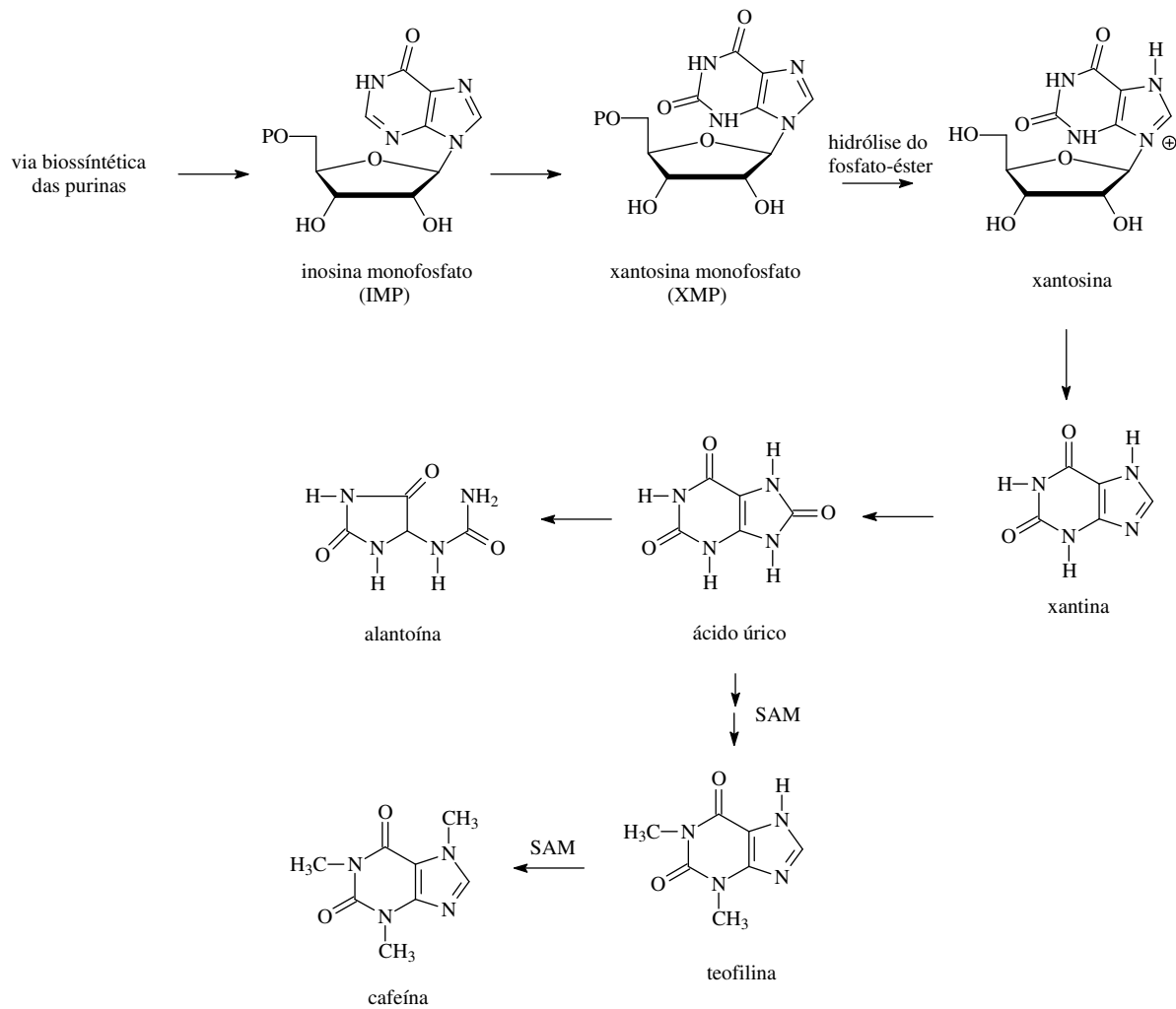
4.3.1.6 Identificação da substância 32

O espectro de RMN de ^1H (Figura 170; p. 217) de **32** apresentou sinais exclusivamente na região de frequência alta, sendo sinais referentes a três singletos em δ_{H} 10,56 (HN-3), δ_{H} 8,05 (HN-1), δ_{H} 5,83 (H_2N -8), um dubleto em δ_{H} 6,93 ($J= 8,0$ Hz, HN-6) atribuídos aos cinco hidrogênios ligados a átomos de nitrogênio, além do dubleto em δ_{H} 5,23 ($J=8,0$ Hz) referente ao hidrogênio metínico H-5.

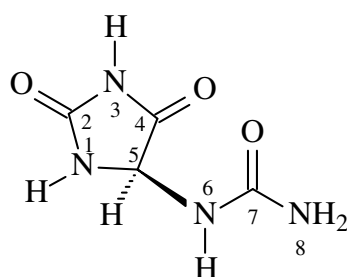
O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 171; p. 217) apresentou sinais correspondentes a quatro átomos de carbono, sendo dois sinais em δ_{C} 173,96 (C-4) e δ_{C} 157,86 (C-2) atribuídos a dois carbonos carboximídicos, e dois sinais em δ_{C} 157,22 (C-7) e δ_{C} 62,76 (C-5) referentes a carbonos do grupamento carbonílico de amida e metínico carbinólico, respectivamente.

A comparação dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância **32** com os dados da literatura (POJE & SOKOLIC-MARAVIC, 1986; FERREIRA *et al.*, 2000) foi determinante para propor a estrutura da alantoína.

Os precursores biogénéticos da alantoína são os mesmos das metilxantinas, as bases púricas livres, como a hipoxantina, adenina, guanina, e também nucleosídeos. A adenina parece ser o precursor mais importante. A purina contém o anel de seis membros da pirimidina fundido com o anel de cinco membros do imidazol e é bastante rara no reino vegetal, sendo comumente encontrados os derivados metilados da 2,6-dioxipurina, as metilxantinas. Nestes vegetais, o anel purina é sintetizado pela quebra de ácidos nucleicos a partir do IMP (inosina monofosfato). A metilxantina não serve como precursor direto para a alantoína, sendo catabolizada pela rota convencional de degradação das purinas, via ácido úrico (Esquema 27; p. 215).



Esquema 27. Rota biossintética da alantoína encontrada nas folhas de *P. coriacea*.



alantoína (32)

Tabela 33. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) da substância 32

Posição	δ_{C} (POJE & SOKOLIC- MARAVIC, 1986)	δ_{H} (FERREIRA <i>et al.</i> , 2000)*	32^{*1}	
			δ_{H} (<i>mult.</i> ; J Hz)	δ_{C}
1	-	8,05 (<i>sl</i>)	8,05 (<i>sl</i>)	-
2	156,9	-	-	157,86
3	-	10,54 (<i>sl</i>)	10,56 (<i>sl</i>)	-
4	173,7			173,96
5	62,5	5,21 (<i>d</i> ; 8,1)	5,23 (<i>d</i> ; 8,0)	62,76
6	-	6,91 (<i>d</i> ; 8,1)	6,93 (<i>d</i> ; 8,0)	-
7	157,5	-	-	157,22
8	-	5,82 (<i>sl</i>)	5,83 (<i>sl</i>)	-

*: D₂O

*1: DMSO-d₆

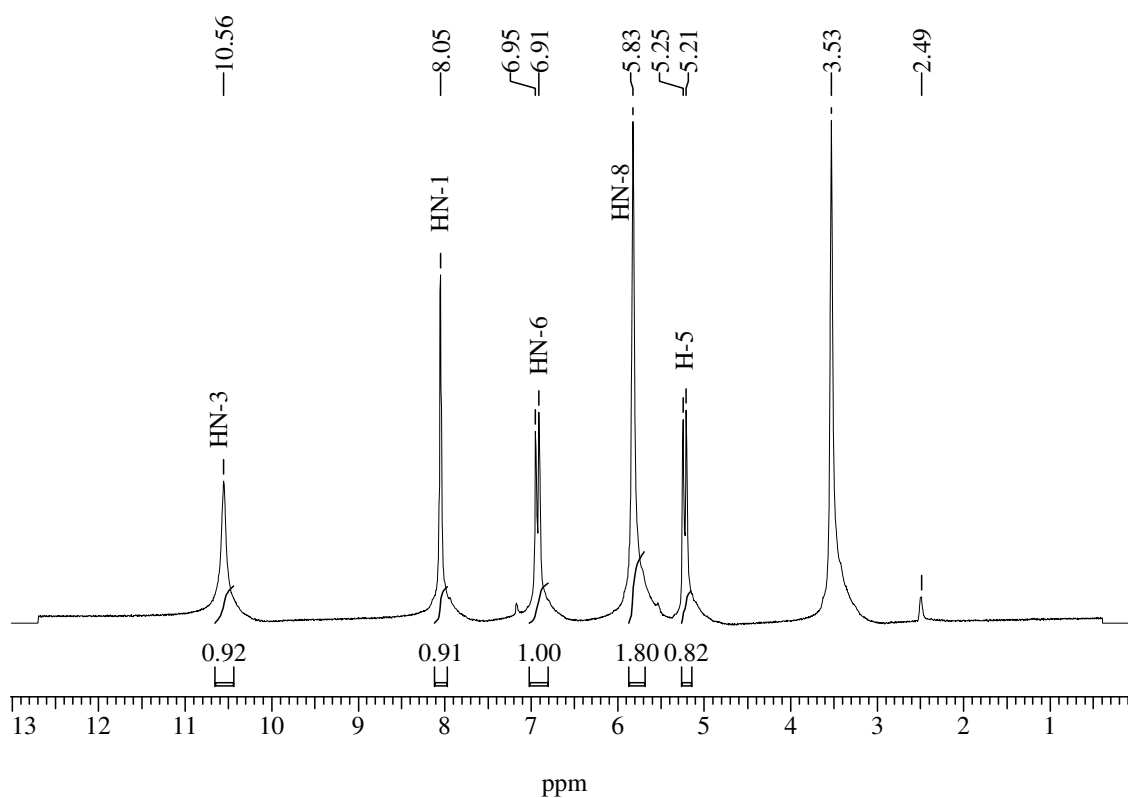


Figura 170. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d_6) de 32.

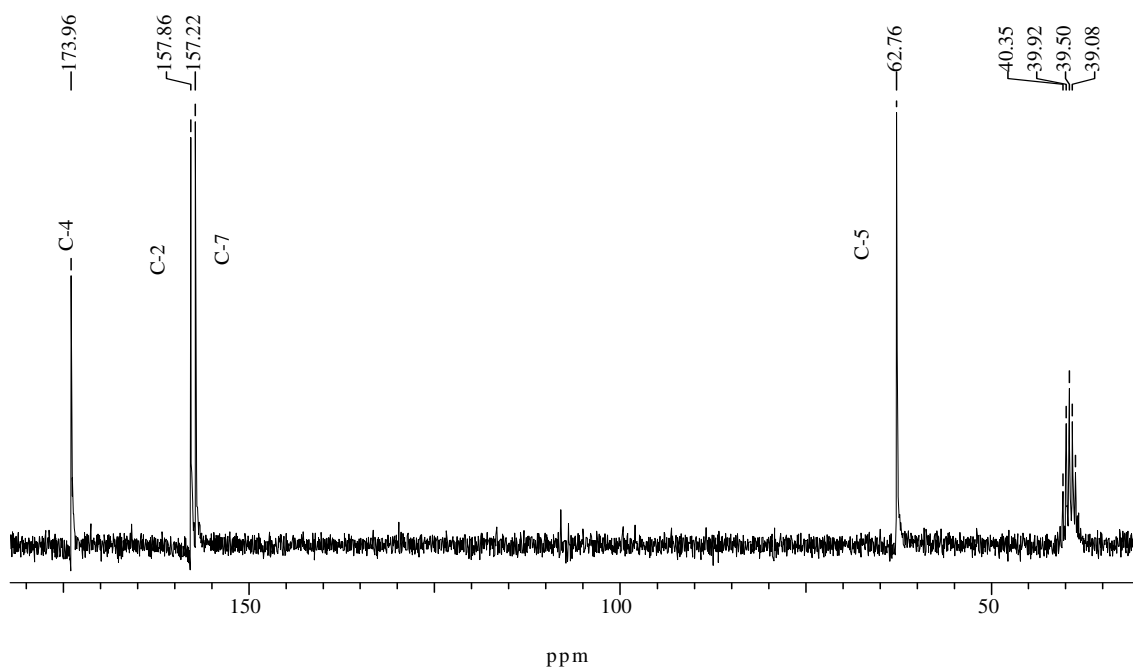


Figura 171. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, BBD, DMSO-d_6) de 32.

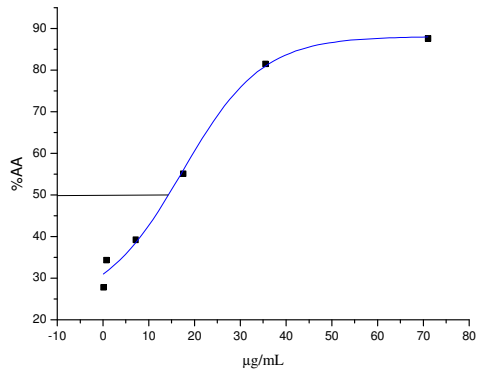
4.4 Atividade Antioxidante

Os valores de CE₅₀ (concentração efetiva que inibe 50% da atividade do radical livre formado) foram calculados por regressão linear dos dados experimentais onde o eixo da abscissa representa a concentração da amostra e o eixo da ordenada a porcentagem de atividade antioxidante. Os valores de CE₅₀ resultados por linhas de regressão linear, mostraram um bom coeficiente de correlação ($r \geq 0,95$). Nas frações **AARMA** e **AARMM** e para a catequina (**11**) os valores de CE₅₀ foram obtidos por leitura direta do valor da concentração, devido a características inerentes a essas amostras. A Figura 172 (p. 219) mostra gráficos e equações obtidos para a fração **AARMA**, exemplificando a determinação da CE₅₀ para curvas sigmoidais, e a Figura 173 (p. 220) ilustra o mesmo para fração **AARMB**, porém, com perfil linear para as reações de captura do radical DPPH. Foram realizados no mínimo três experimentos independentes; sendo o CE₅₀ o valor médio obtido dessas experiências, foram expressos em CE₅₀ \pm desvio padrão (DP). Em todos os experimentos foi assumida margem de erro $\leq 10\%$. A Tabela 34 (p. 218) ilustra os valores determinados de CE₅₀ frente ao DPPH, respectivamente para os extratos, frações, substâncias isoladas.

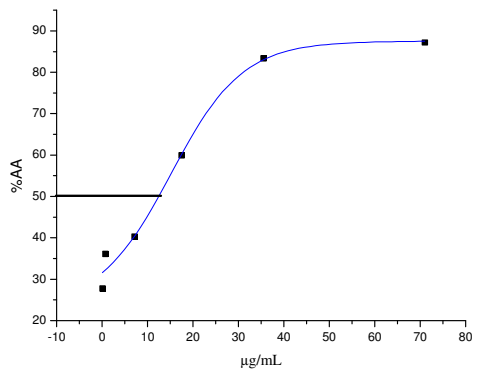
Tabela 34. Valores de CE₅₀ dos extratos ($\mu\text{g/mL}$), frações ($\mu\text{g/mL}$), substâncias isoladas (μM) e padrões (μM)

Amostra	Origem	Valor de CE ₅₀
Extrato metanólico (AARM)	<i>A. anthelmia</i>	10,71 \pm 0,81
Fração Acetato de Etila (AARMA)*	<i>A. anthelmia</i>	13,52 \pm 0,33
Fração Butanólica (AARMB)	<i>A. anthelmia</i>	20,70 \pm 0,82
Fração Metanólica (AARMM)*	<i>A. anthelmia</i>	9,85 \pm 0,13
Biochanina A (2)	<i>A. anthelmia</i>	85,07 \pm 3,33
Calicosina (3)	<i>A. anthelmia</i>	89,48 \pm 1,26
Genisteína (4)	<i>A. anthelmia</i>	54,82 \pm 1,01
Engeletina (6)	<i>A. anthelmia</i>	19,35 \pm 0,53
Astilbina (7)	<i>A. anthelmia</i>	4,42 \pm 0,21
Biochanina A 7-O- β -D-glicopiranosídeo (8)	<i>A. anthelmia</i>	77,74 \pm 3,58
Genisteína 7-O- β -D-glicopiranosídeo (9)	<i>A. anthelmia</i>	78,21 \pm 1,01
Biochanina A 7-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosídeo (10)	<i>A. anthelmia</i>	89,43 \pm 4,56
Biochanina A 7-O- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 5)- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosídeo (11)	<i>A. anthelmia</i>	165,23 \pm 5,03
Catequina (12)*	<i>A. anthelmia</i>	2,37 \pm 0,28
Extrato Metanólico (AFRM)	<i>A. fraxinifolia</i>	7,39 \pm 0,54
Fração Acetato de Etila (AFRMA)	<i>A. fraxinifolia</i>	22,98 \pm 1,26
Fração Metanólica (AFRMM)	<i>A. fraxinifolia</i>	10,06 \pm 1,15
Prateseína (20)	<i>A. fraxinifolia</i>	66,18 \pm 4,31
5,7-diidroxi-3-O- α -L-ramnopiranosilcromona (21)	<i>A. fraxinifolia</i>	83,27 \pm 1,85
Isoengeltina (22)	<i>A. fraxinifolia</i>	42,03 \pm 1,93
Isoastilbina (23)	<i>A. fraxinifolia</i>	31,17 \pm 0,85
Rutina	Mel	8,52 \pm 0,38
Quercetina	Mel	3,18 \pm 0,16

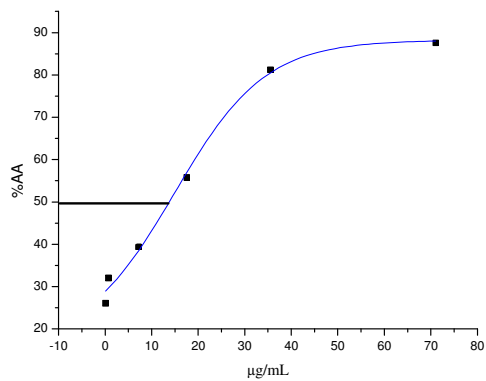
Fração Acetato de Etila (AARMA)



$CE_{50} = 13,81 \mu\text{g/mL}$



$CE_{50} = 13,16 \mu\text{g/mL}$



$CE_{50} = 13,60 \mu\text{g/mL}$

$CE_{50} = 13,52 (\pm 0,33)$

Figura 172. Exemplo de gráficos de CE_{50} obtidos para amostras que assumiram perfil sigmoidal.

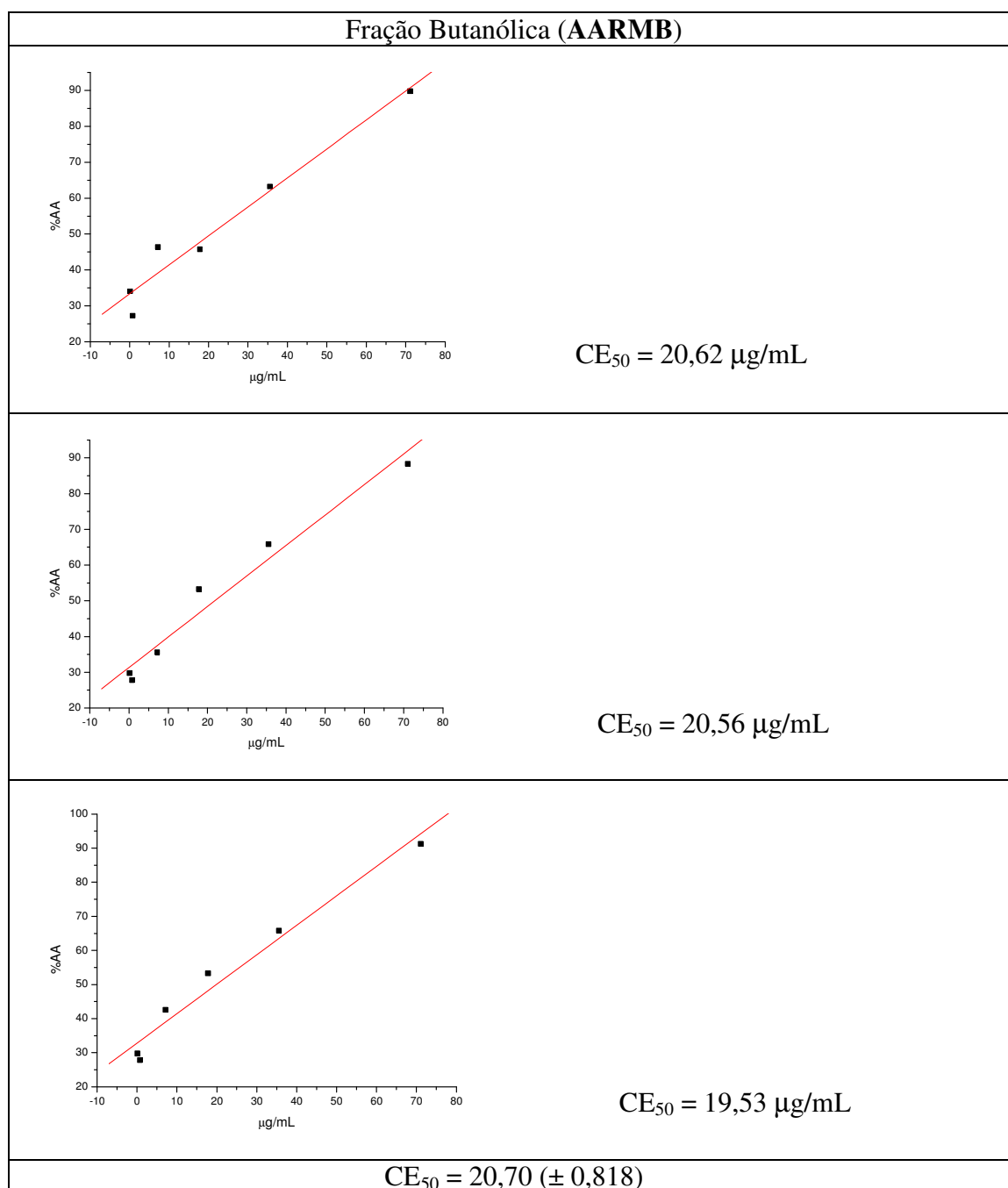
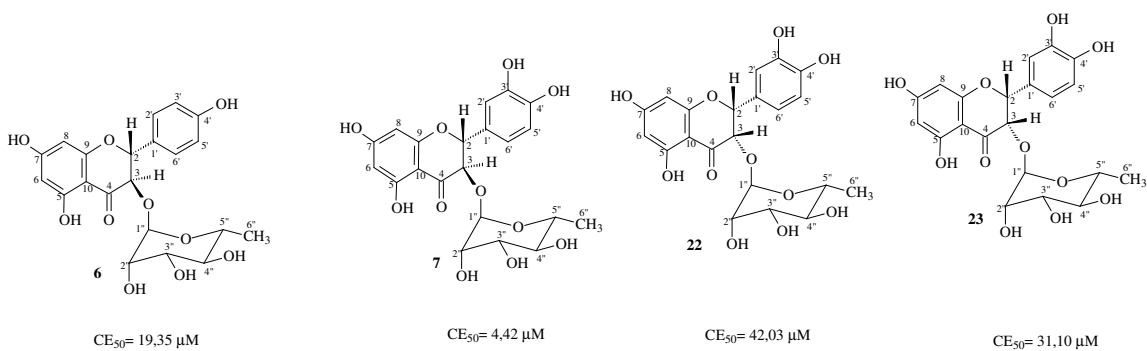
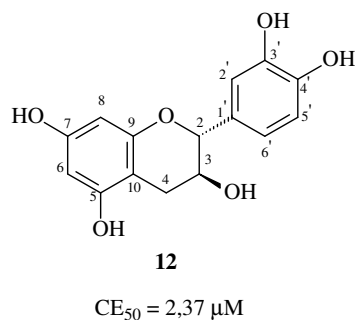


Figura 173. Exemplo de gráficos de CE_{50} obtidos para amostras que assumiram perfil linear.

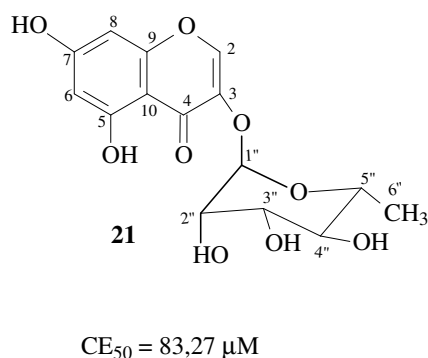
Os resultados da atividade antioxidante mostraram que entre os flavononóis isolados das duas espécies de *Andira*, a astilbina (**7**) foi a mais ativa com valor de $CE_{50} = 4,42 \mu M$. Na astilbina (**7**), a presença do anel B dissustituído permite a estabilização do radical livre por 8 estruturas de ressonância, além das 4 estruturas de ressonância existentes no anel A. No caso da engeletina (**6**) são formadas apenas 4 estruturas de ressonâncias devido ao anel B ser monossustituído. Nos flavononóis isoastilbina (**22**) e isoengeltina (**23**), percebeu-se uma grande diminuição desta atividade. Nesses dois casos a conformação do açúcar, que está na mesma face do anel B, afeta a captura do H^{\bullet} pela molécula de DPPH, provavelmente por impedimento estérico.



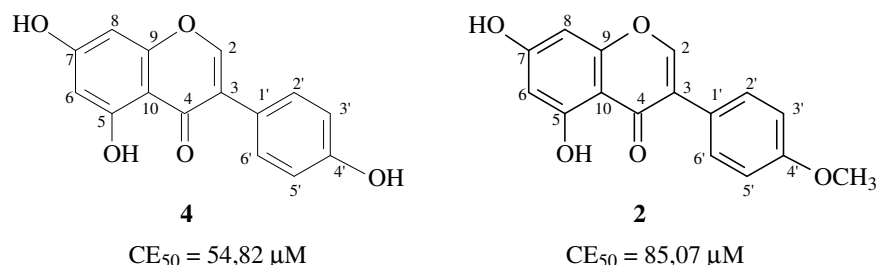
A ausência da carbonila no carbono C-4, permite que a molécula da catequina (**12**) apresente 8 estruturas de ressonância no anel A, além das 8 estruturas de ressonância possíveis no anel B. Essas 16 estruturas de ressonância que estabilizam o radical livre formado conferem maior estabilidade do radical livre proveniente da catequina (**12**). A atividade antioxidante da catequina (**12**) frente ao DPPH é comparável ao do flavanonol astilbina (**7**), porém muito mais ativa e com uma curva de atividade que assume uma característica sigmoideal.



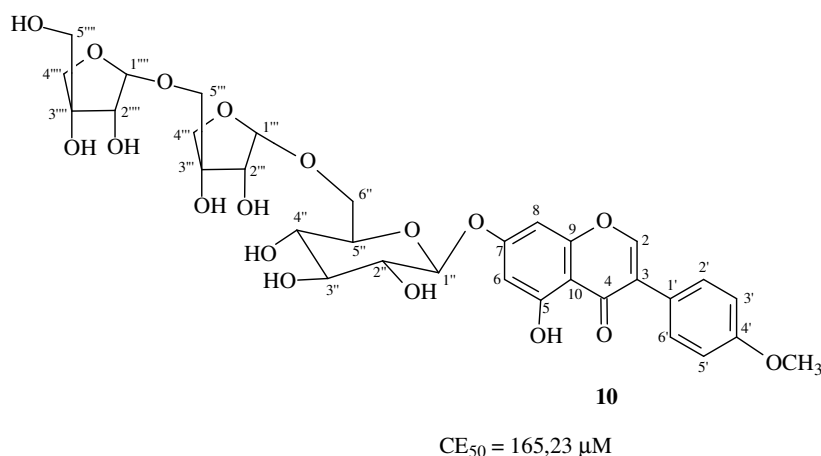
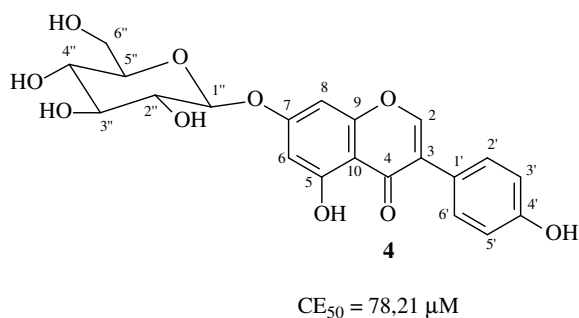
A ausência do anel B na molécula de 5,7-diidroxi-3-*O*- α -L-ranopiranosilcromona (**21**) é um forte indício da forte perda da atividade antioxidante.



Outros dois fatores também podem afetar a captura do H^{\bullet} pela molécula de DPPH. Na molécula de genisteína (**4**), a insaturação 2,3 no anel C permite que o radical livre formado seja estabilizado por apenas 3 estruturas de ressonância no anel B e mais 1 no anel C com perda da aromaticidade. No caso da biochanina A (**2**) a diminuição da atividade antioxidante se deve a presença de uma metoxila no anel B.



A glicosilação afeta negativamente a atividade antioxidante. No caso das moléculas de genisteína 7-*O*- β -D-glicopiranosídeo (**9**) e biochanina A 7-*O*- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 5)- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosídeo (**11**), a substituição de unidades de açúcar na hidroxila do C-7, comprometeu as formas de ressonância do sistema 5,7-diidroxil do anel A. esta informação é confirmada pelos altos valores de CE₅₀ encontrados para estas moléculas.



Os extratos e frações das duas espécies exibiram um alto potencial de atividade antioxidante, provavelmente devido à significativa concentração de compostos fenólicos encontrados. Os extratos brutos metanólicos das duas espécies mostraram valores de CE₅₀ iguais a 10,71 μ g/ml (**AARM**) e 7,39 μ g/ml (**AFRM**). De acordo com estes valores pode-se

sugerir que esses extratos possuem um forte efeito sinérgico entre as substâncias presentes. Os resultados obtidos para as diversas partições dos extratos brutos metanólicos das raízes das duas espécies exibiram valores de CE_{50} significativos. Os valores obtidos para as partições foram: $CE_{50} = 13,52 \mu\text{g/ml}$ (**AARMA**), $CE_{50} = 20,70 \mu\text{g/ml}$ (**AARMB**) e $CE_{50} = 9,85 \mu\text{g/ml}$ (**AARMM**) para a espécie *A. anthelmia* e $CE_{50} = 22,98 \mu\text{g/ml}$ (**AFRMA**) e $CE_{50} = 10,06 \mu\text{g/ml}$ (**AFRMB**) para a espécie *A. fraxinifolia*. Nota-se que estes valores estão correlacionados principalmente com a polaridade dessas frações, sendo a atividade antioxidante mais pronunciada nas frações **AARMM** e **AFRMM**. Os valores de CE_{50} reforçam a idéia de sinergismo entre o conjunto de flavonóides isolados e outros compostos em menor quantidade dentro de cada fração. Pode-se afirmar que alguns dos flavonóides citados possam estar contribuindo com uma maior atividade antioxidante, pois estes em sua forma pura se mostraram bastante promissores, como por exemplo, a catequina (**12**) e a astilbina (**7**).

O *screening* usando o método do radical DDPH mostrou-se efetivo e permitiu verificar que as espécies *A. anthelmia* e *A. fraxinifolia* bem como algumas das substâncias encontradas em suas raízes, podem ser consideradas uma boa fonte natural de antioxidantes.

4.5 Atividade Anti-helmíntica

SILVA (2003) em estudo posterior, com os extratos aquoso e metanólico das raízes de *A. anthelmia* comprovou uma significativa atividade anti-helmíntica com uma porcentagem de eliminação de 63,20% (25,7 Limite Inferior e 96,0 Limite Superior) de *A. tetraptera*. SILVA (2003) também verificou que o percentual diário de eliminação de *A. tetraptera* observado com os extratos da raiz de *A. anthelmia* foi similar ao comportamento do mebendazol, onde a ação foi lenta, por um período de quatro dias. O extrato bruto metanólico foi sucessivamente particionado fornecendo as frações acetato de etila, butanol e metanol que apresentaram 18,45%, 21,26% e 38,0% de eliminação do nematóide respectivamente quando testadas na dose de 12 mg.kg^{-1} . Os animais tratados com a fração **AARMB** na dose de 24 mg.kg^{-1} , se mostraram extremamente irritados. Logo na primeira aplicação foi detectada 60% de mortalidade entre cobaias. Essa informação alertou para a toxidez dos extratos e frações quando empregados em doses elevadas e permitiu um ajuste da dose para uma concentração de 12 mg.kg^{-1} .

A comparação das porcentagens de eliminação entre o extrato bruto metanólico e as frações, mostrou que após o fracionamento ocorreu uma redução no percentual de eliminação de *A. tetraptera*. Essa redução de atividade após o fracionamento é comumente citada na literatura, onde efeitos sinérgicos existentes em extratos brutos, tendem a aumentar a atividade.

Para as substâncias isoladas os resultados mostraram que a biochanina A (**2**) e catequina (**12**) apresentaram baixo percentual de eliminação de *A. tetraptera*, 5,20% e 7,95%, respectivamente, quando comparado com o grupo controle (1,56%), embora não tenham sido estatisticamente significativos. Porém substâncias biochanina A 7-*O*- β -D-glucopiranosídeo (**8**), biochanina A 7-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6 \rightarrow)- β -D-glucopiranosídeo (**10**) e biochanina A 7-*O*- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 5)- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosídeo (**11**) apresentaram significativa atividade anti-helmíntica quando comparado com o grupo controle, apesar de serem menos ativas do que o quimioterápico mebendazol (100%). Os percentuais de eliminação para as substâncias **8**, **10** e **11** foram de 23,0%, 29,0% e 40,21% respectivamente, sendo a substância **11** a mais ativa dentro da fração butanólica. Esses dados sugerem que nesta série de flavonóides, a presença de unidades glicosídicas na posição C-7 em detrimento de flavonóides agliconas como a biochanina A (**2**) podem ser determinantes

para a atividade de anti-helmíntica. A Tabela 35 (p. 224) e a Figura 174 (p. 225) mostram os resultados obtidos com esse experimento.

O local primário de ação do mebendazol é a inibição da glicose ao contrário dos demais benzimidazóis, havendo depleção na reserva de glicogênio do helminto, tornando-o incapaz de produzir o ATP necessário a sua sobrevivência. A atividade observada sobre *A. tetraptera* pode estar relacionada tanto com o mecanismo neuromuscular como com as reações bioquímicas envolvidas no metabolismo de energia, através da complexação de algumas substâncias com proteínas que participam do sistema neuromuscular ou das reações que formam a geração de energia metabólica. Similar, por exemplo, a ação inibidora dos anti-helmínticos benzimidazóis, no transporte de glicose e sobre a enzima fumarato redutase, bloqueando a geração de ligações energéticas, provocando paralisia muscular e morte do parasito, bem como a ação sob o sistema neuromuscular das drogas organofosforadas, através da inibição da acetilcolinesterase (GOODMAN *et al.*, 2003).

Os dados obtidos indicam o extrato bruto da raiz como um anti-helmíntico potencial, contudo, devido à alta toxidez apresentada, tornam-se necessários estudos complementares no sentido de se identificar a fração tóxica e ativa, bem como o mecanismo de ação das substâncias no parasito e no hospedeiro.

Tabela 35. Influência das frações e substâncias isoladas de *A. anthelmia* na eliminação de *A. tetraptera*

Tratamento	Doses mg.kg ⁻¹	Número de helmintos		% de eliminação
		Exame fecal	Necropsia	
AARMA	12	114	521	18,45 ± 7,01
AARMB	12	406	1607	21,26 ± 12,95
AARMM	12	714	1880	38,0 ± 14,04
1	2	103	1978	5,20 ± 8,5
2	2	700	1741	23,0 ± 6,10
3	2	132	633	29,0 ± 8,06
4	2	23	95	40,21 ± 13,58
5	2	166	2088	7,95 ± 5,85
MB	20	324	0	100
Controle	---	45	2836	1,56±3,90

Legenda:

AARMA – Fração acetato de etila das raízes de *A. anthelmia*

AARMB - Fração butanólica das raízes de *A. anthelmia*

AARMM - Fração metanólica das raízes de *A. anthelmia*

1. Biochanina A (2)

2. Biochanina A 7-*O*-β-D-glucopiranosídeo (8)

3. Biochanina A 7-*O*-α-L-ramnopiranosil-(1'''→6'')- β-D-glucopiranosídeo (10)

4. Biochanina A 7-*O*-β-D-apiofuranosil-(1→5)-β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosídeo (11)

5. Catequina (12)

MB - Mebendazol

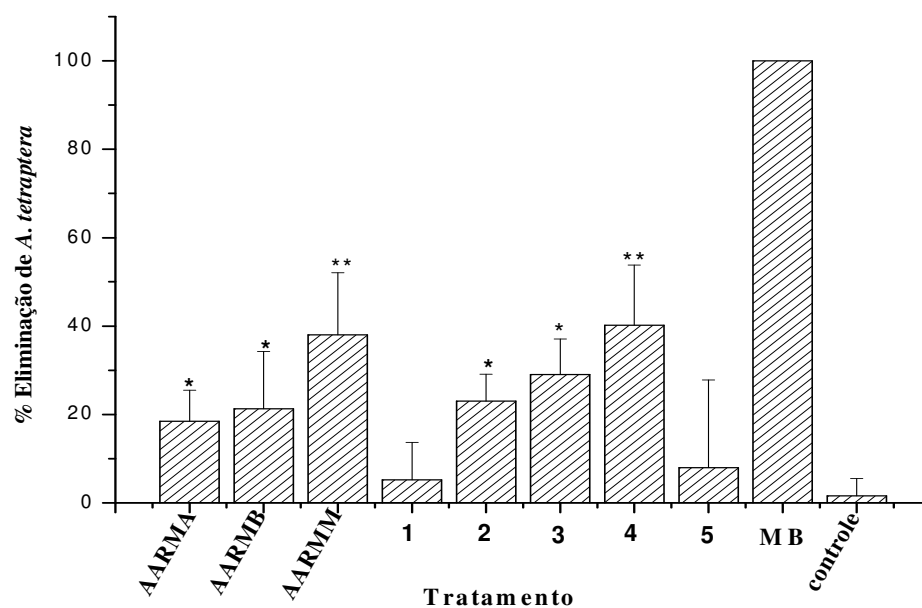


Figura 174. Atividade anti-helmíntica em camundongos tratados com as frações e substâncias isoladas de *A. anthelmia* em comparação com o mebendazol (MB) e com animais não tratados (controle). Valores expressos em média \pm DP de nematóides eliminados nos diferentes grupos de animais testados. $n=10$. Os símbolos* e ** indicam valores de $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente.

5 CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo fitoquímico de duas espécies de *Andira* (*Andira anthelmia* e *Andira fraxinifolia*).

Observou-se que as duas espécies são biprodutoras de isoflavonóides e *O*-glicosil isoflavonas. Tendo a biochanina A como o constituinte mais abundante. Isto está de acordo com as características do gênero, mas, também se encontrou esteróides, terpenos, saponinas, cromonas e o cerebrosídeo, além de flavanas e flavanóis.

A reação de isoflavona com iodo em meio básico e metanol conduz a incorporação de iodo em 6 e/ou 8 com adição de grupo metoxila na enona. Observamos que este resultado é diferente de quando se realiza esta reação com flavonas, não incorporando metoxila em 2,3.

Não é o primeiro estudo fitoquímico de *Palicourea coriacea*, mas, gerou novas informações permitindo identificar o alcalóide calicantina já detectado neste gênero e perceber que esta espécie é capaz de metabolizar outras substâncias como ácidos triterpênicos e derivados dos ácidos benzóico e cinâmico, além de ser fonte significativa quantidade de alantoína.

A potencial atividade antioxidante dos extratos e frações das espécies *A. anthelmia* e *A. fraxinifolia* é, provavelmente, devido à significativa concentração de substâncias fenólicas na raiz destas plantas. Pode-se sugerir que estes extratos possuem um forte efeito sinérgico entre as substâncias presentes e que alguns dos flavonóides isolados contribuem para essa atividade.

O extrato bruto da raiz de *A. anthelmia* é um anti-helmíntico em potencial, contudo, devido à alta toxidez apresentada, tornam-se necessários estudos complementares no sentido de se identificar a fração tóxica e ativa, bem como o mecanismo de ação das substâncias isoladas tanto no parasito quanto no hospedeiro. A biochanina A-7-*O*- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 5)- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosídeo foi a substância natural mais ativa como antihelmíntica. Permitindo sugerir que a presença de unidades glicosídicas na posição C-7, pode ser um diferencial para esta ação.

6 REFERÊNCIAS

- ADJIBADÉ, Y., WENINGER, B., QUIRION, J. C., KUBALLA, B., CABALION, P., ANTON, R. Dimeric alkaloids from de *Psychotria forsteriana*. *Phytochem.*, v. 31, p. 317-319, 1992.
- AGRAWAL, P. K.; BANSAL, M. C.; PORTER, L. J.; FOO, L. Y. *Carbon-13 NMR of Flavonoids - Studies in organic chemistry 39*; AGRAWAL, P.K., ed.; Elsevier Science Publishers B.V.: Amsterdam, 1989, v. 39, 201 p.
- AHMAD, V. U.; RAHMAN, A. *Handbook of Natural Products Data*. Vol., 2, Elsevier: Amsterdam, 1994.
- ALI, S. M., ILYAS, M. Biomimetic approach to biflavonoids: oxidative coupling of 2'-hydroxychalcones with I₂ in alkaline methanol. *J. Org. Chem.*, v. 51, p. 5415-5417, 1986.
- ALMEIDA, M. E. L. *Estudo químico de leguminosas brasileiras*. Tese de Mestrado: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1973. 142 p.
- ALOY, J.; RABAUT, C. Homologs of tyrosine. *J. Pharm. Chim.*, v. 3, p. 481-483, 1911.
- AMORIM, A.; BORBA, H. R. Ação anti-helmíntica III. Efeito de extratos aquosos de *Punica granatum* L. (romã) na eliminação de *Vampirolepis nana* e de oxiurídeos em camundongos. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 71, n. 4, p. 85-87, 1990.
- AMORIM, A.; BORBA, H. R.; SILVA, W. J. Ação anti-helmíntica de plantas. *Revista Brasileira de Farmácia*. v. 68, p. 64-70, 1987.
- ASSIS, J. C. S.R.; SUFFREDINI, I. B.; MORENO, P. R. H.; YOUNG, M. C.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N.; BERNARDI, M. M. Analysis of the toxic potential of *Palicourea corymbifera* (Mull. Arg.) Standl. in laboratory animals. *Research in Veterinary Science*, v. 80, p. 209-217, 2006.
- BARROSO, G. M. *Sistemática de angiospermas do Brasil*. 2 ed. Imprensa Universitária: Viçosa, v. 3, 1991.
- BILIA, R. A.; MENDEZ, J.; MORELLI, I. Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania carii*. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v. 71, p. 191-197, 1996.
- BOKESCH, H. R.; PANNELL, L. K.; COCHRAN, P. K.; SOWDER, R. C.; MCKEE, T. C.; BOYD, M. R. A novel anti-HIV macrocyclic peptide from *Palicourea condensata*. *J. Nat. Prod.*, v. 64, p. 249-250, 2001.
- BOLZANI, V. S.; TREVISAN, L. M. V.; YOUNG, M. C. Triterpenes of *Palicourea rigida* H.B.K. *Rev. Latinoam. de Quim.*, v. 23, n. 1, p-20-21, 1992.
- BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A.J.; ARAÚJO, A.R.; SILVA, D.H.S.; LOPES, M.N. Search for antifungal and anticancer compounds from native plant species of Cerrado and Atlantic forest. *An. Acad. Bras. Ci.*, v. 71, n. 2, p. 181-186, 1999.

BRAZ FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R.; PINHO, S. L. V.; MONTE, F. J. Q.; DA ROCHA, A. I. Flavonoids from amazonian Leguminosae. *Phytochem.*, v. 12, p. 1184-1186, 1973.

BREITMAIER, E.; VOELTER, W. *Carbon-13 NMR spectroscopy – High-resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry*. 3th Ed., VCH: Weinheim 1989, 515 p.

BUCKINGHAM, J. Ed. *Dictionary of Organic Compounds*. 5th, Chapman and Hall: London, 1982 (T-03375).

BURKART, A. *Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas*. Buenos Aires: ACME, 1952. 569 p.

BURKART, A. *Leguminosas*. In: Dimitri, M.J. *Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería*. Buenos Aires: ACME, v. 1, p. 467-538, 1978.

BURKART, A. *Leguminosas*. In: REITZ, R. (ed.). *Flora Ilustrada Catarinense*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1979. 299 p.

BURKART, A. Leguminosae. In: BURKART, A., BURKART, N.S.T. de; BACIGALUPO, N.M. *Flora ilustrada de Entre Rios (Argentina)*. Buenos Aires: Colección Científica del INTA, Tomo VI, III, p. 442-738, 1987.

CARVALHO, M. C.; VELLOSO, C. R. X.; BRAZ-FILHO, R.; COSTA, W. F. Acyl-lupeol esters from *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 2, n. 4, p. 555-559, 2001.

CATENI, F.; ZILIC, J.; FALSONE, G.; HOLLAN, F.; FRAUSIN, F.; SCARCIA, V. Preliminary biological assay on cerebroside mixture from *Euphorbia nicaeensis* All. Isolation and structure determination of five glucocerebrosides. *Il Farmaco*, v. 58, p. 809-817, 2003.

CHEN, C. Y.; HSIEH, S. L.; HSIEH, M. M.; HSIEH, S. F.; HSIEH, T. J. Substituent chemical shift of rhamnosides from the stems of *Cinnamomum osmophleum*. *Chin. Pharm. J.*, v. 56, p. 141-146, 2004.

CINTRA, P.; MALASPINA, O.; PETACCI, F.; FERNANDES, J. B.; BUENO, O. C.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. Toxicity of *Dimorphandra mollis* to workers of *Apis mellifera*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 13, n. 1, p. 115-118, 2002.

COCKER, W.; DAHL, T.; DEMPSEY, C.; MCMURRAY, T. B. H. Extractives from woods. I. Extractives from *Andira inermis*. *J. Chem. Soc.*, p. 4906-4909, 1962.

COCKER, W.; DAHL, T.; DEMPSEY, C.; MCMURRY, T. B. H. Inermin, an extractive of *Andira inermis*. *Chem. & Ind.*, p. 216-217, 1962.

COOKE, R. G.; FLETCHER, R. A. H. Isoflavonoids. III. Constituents of *Cotoneaster* Species. *Aust. J. Chem.*, v. 27, p. 1377-1379, 1974.

- CORRÊA, M.P. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. v. 1, Ministério da Agricultura – IBDF, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1984. 224 p.
- CRONQUIST, A. *The evolution and classification of flowering plants*. Houghton Mifflin: Boston, 1968. 396 p.
- CRONQUIST, A. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University, 1981. 643 p.
- DALHGREN, G. The last Dahlegrenogram, a system of classification of the dicotyledons. In: TAN, K. (Ed.). *Plant taxonomy, phylogeography and related subjects*. Edinburg University: Edinburg, p. 249-260, 1989.
- DELPRETE, P.; CORTÉS, R. *Rubiaceae of the New World: Palicourea Aublet*, <http://www.nybg.org/bsci/res/PALICOUREA.HTML>, acessado em 12/11/2005.
- DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. de A.; NASCIMENTO, J. C.; VIEIRA, J. J.; SANTOS, M. A. Isolamento e avaliação da atividade nematocida de constituintes químicos de *Mucuna cinerea* contra *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*. *Quím. Nova*, v. 26, n. 3, p. 335-339, 2003.
- DEWICK, P. M. *Medicinal natural products – A biosynthetic approach*. 2 ed. John Wiley & Sons LTD: England, 2002. 507 p.
- DÜSMAN, L.T.; JORGE, T.C.M.; SOUZA, M.C.; EBERLIN, M.N.; MEUER, E.C.; BOCCA, C.C.; BASSO, E.A.; SARRAGIOTTO, M.H. Monoterpene indole alkaloids from *Palicourea crocea*. *J. Nat. Prod.*, v. 67, p. 1886-1888, 2004.
- ALVES, H. M.; BRAZ FILHO, R.; CARVALHO, M. G.; DUTRA, N. N. Constituintes químicos de *Simaba obovata*. *Quím. Nova*, v. 15, n. 1, p. 10-14, 1992.
- ECKSCHMIDT, M.; BRIZOLLA, M.; TARRAGA, D.P.; PALERMO-NETO, J. Is monofluoroacetic acid the active neurotoxic principle in *Palicourea marcgravii* St. Hill leaves? *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 22, n. 8, p. 975-977, 1989
- EL-SEEDI, H. R. Coumarins, benzoic acids and triterpenoids from *Palicourea demissa*. *Rev. Latinoam. de Quim.*, v. 27, n. 1, p. 13-16, 1999.
- FARAG, S. F.; AHMED, A. S.; TERASHIMA, K.; TAKAYA, Y.; NIWA, M. Isoflavonoid glycosides from *Dalbergia sissoo*. *Phytochem.*, v. 57, p. 1263-1268, 2001.
- FARIA, S.M.; SUTHERLAND, J.; SPRENT, J. A new type of infected cell in root nodules of *Andira* spp. (Leguminosae). *Plant Sci.*, v. 45, p. 143-147, 1986.
- FERREIRA, D. T.; ALVARES, P. S.; HOUGHTON, P. J.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos das raízes de *Pyrostegia venusta* e considerações sobre a sua importância medicinal. *Quim. Nova*, v. 23, p. 42-46, 2000.
- FOO, L. Y.; KARCHESY, J. J. Procyanidin dimmers and trimers from Douglas fir inner bark. *Phytochem.*, v. 28, p. 1743-1747, 1989.

FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Cardiotônicos: histórico e perspectivas de uma antiga e importante classe de agentes terapêuticos. *Quím. Nova*, v. 19, n. 2, p. 182-190, 1996.

GAFFIELD, W.; WAISS JR.; A. C. Structural relationships and interconversion on isomeric astilbins. *J. Org. Chem.*, v. 40, n. 8, p. 1057-1061, 1975.

GARCIA, L.A. de.; TOBON, C.F.; MORA, C.E. Cytotoxicity of the constituents of *Palicourea ovalis*. *Rev. Col. Cienc. Quim. Farm.*, v. 26, p. 55-57, 1997.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A.; HARDMAN, J. G.; GILMAN, A.G.; LIMBIRD, L.E. *The pharmacological basis of therapeutics*. 10^a ed. McGraw-Hill: New York, 2003.

GOTTLIEB, O.R. *Micromolecular evolution systematic an ecology*. N.Y. Springer Verlag: Berlin, 1982.

HARBORNE, J. B.; BOULTER, D.; TURNER, B. L. *Chemotaxonomy of the Leguminosae*. Academic Press: London, 1971. 612 p.

HEMINGWAY, S.R.; PHILIPSSON, J.D. Alkaloids of the RUBIACEAE in Philipsson, J.D. et Zenk, M.H. - *Indole and Biogenetically related alkaloids*. Academic: London, cap.4, p. 63-90, 1980.

HIRAKURA, K.; MORITA, M.; NAKAJIMA, K.; SUGAMA, K.; TAKAGI, K.; NIITSU, K.; IKEYA, Y.; MARUNO, M.; OKADA, M. Phenolic glucosides from the root of *Pueraria lobata*. *Phytochem.*, v. 46, n. 5, p. 921-928, 1997.

HU, C.; CHEN, K.; SHI, Q.; KILKUSKIE, R.E.; CHENG, Y.; LEE, K.H. Anti-aids agents, 10¹. Acacetin-*O*- β -D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure-activity correlation with some related flavonoids. *J. Nat.Prod.*, v. 57, n. 1, p. 42-51, 1994.

HU, J.M.; LAVIN, M.; WOJCIECHOWSKI, M.F.; SANDERSON, M.J. Phylogenetic systematics of the tribe Millettieae (Leguminosae) based on chloroplast *trnk/matk* sequences and its implications for evolutionary patterns in Papilionoideae. *Am. J. Bot.*, v. 87, p. 418-430, 2000.

HUTCHINSON, J. *The genera of flowering plants. (Angiospermae)*. Clarendon Press: Oxford, v. 1, 1964. 516 p.

IMASHIRO, R.; SEKI, M. A catalytic asymmetric synthesis of chiral glycidic acid derivatives through chiral dioxirane-mediated catalytic asymmetric epoxidation of cinnamic acid derivatives. *J. Org. Chem.*, v. 69, p. 4216-4226, 2004.

JENSEN, S.R.; NIELSEN, B.J.; DAHLGREN, R. Iridoid compounds, their occurrence and systematic importance in the Angiosperms. *Bot. Notiser*, v. 128, p. 148-180, 1975.

KAMNAING, P.; FREE, S. N. Y. F.; NKENGFACK, A. E.; FOLEFOG, G.; FOMUM, Z. T. An isoflavan-quinone and a flavonol from *Millettia laurentii*. *Phytochem.*, v. 51, n^o. 6, p. 829-832, 1999.

KASAI, R.; HIRONO, S.; CHOU, W.; TANAKA, O.; CHEN, F. Sweet dihydroflavonol rhamnoside from leaves of *Engelhardtia chrysolepis*, a Chinese folk medicine, Hung-qi. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 36, n°. 10, p. 4167-4170, 1988.

KITAJIMA, M.; FISCHER, U.; NAKAMURA, M.; OHSAWA, M.; UENO, M.; TAKAYAMA, H.; UNGER, M.; STOCKIGT, J.; AIMI, N. Anthraquinones from *Ophiorrhiza pumila* tissue and cell cultures. *Phytochem.*, v. 48, n. 1, p. 107-111, 1998.

KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Constituents of the *Labiatae* plants. 5. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry*, v. 29, n. 7, p. 2351-2355, 1990.

KRAFT, C.; JENETT-SIEMS, K.; SIEMS, K.; GUPTA, M.P.; BIENZLE, U.; EICH, E. Antiplasmodial activity of isoflavones from *Andira inermis*. *J. Ethnopharmacol.*, v. 73, p. 131-135, 2000.

KRAFT, C.; JENETT-SIEMS, K.; SIEMS, K.; SOLIS, P. N.; GUPTA, M. P.; BIENZLE, U.; EICH, E. Andinermals A-C, antiplasmodial constituents from *Andira inermis*. *Phytochem.*, v. 58, p. 769-774, 2001.

KRAFT, C.; JENETT-SIEMS, K.; KÖHLER, I.; SIEMS, K.; ABBIW, D.; BIENZLE, U.; EICH, E. Andinol A and B, two unique 6-hydroxymethylpterocarpenes from *Andira inermis*. *Z. Naturforsch.*, v. 57c, p. 785-790, 2002.

KRIWACKI, R. W.; PITNER, T. P. Current aspects of practical two-dimensional (2D) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: applications to structure elucidation. *Pharm. Research*, v. 6, n. 7, p. 531-554, 1989.

LAJIS, N.H., MAHMUD, Z., TOIA, R.F. The alkaloids of *Psychotria rostrata*. *Planta Medica*, v. 59, p. 383-384, 1993.

LAPA BAUTISTA, A.R.P.; MORS, W.B. Estudo fitoquímico de *Andira humilis* Mart. Ex Benth. I. Biochanina A, o principal constituinte do órgão subterrâneo. *B.I.B.B.*, v. 14, n. 1, p. 58-63, 1975.

LAPA BAUTISTA, A.R.P.; LACAZ, M.H.A. MORS, W.B. Contribuição ao estudo de plantas tóxicas no Estado da Bahia: atividade de *Andira anthelmia* (Vell.) Macbr., *BIBB*, v. 15, p. 31-36, 1976.

LIBOT, F.; MIET, C.; KUNESCH, N.; POISSON, J.E.; RUSSET, E.; SEVENET, T. Rubiaceae D'Océanie: Alkaloids de *Psychotria oleoides* de Nouvelle-Calédone et de *Calycodendron milnei* du Vanuatu (Nouvelles-Hébrides). *J.Nat.Prod.*, v. 50, n. 3, p. 468-473, 1987.

LOCK de UGAZ, O.; SANCHEZ, J.C.L.; UBILLAS, R.P.S.; TEMPESTA, M.S. Flavonoids from *Andira inermis*. *Fitoterapia*, v. 62, n. 1, p. 89-90, 1991.

LU, Y.; FOO, Y. The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chemistry*, v. 65, p. 1-8, 1999.

- MA, W. G.; FUKUSHI, Y.; HOSTETTMANN, K.; TAHARA, S. Isoflavonoid glycosides from *Eriosma tuberosum*. *Phytochem.*, v. 49, p. 251-254, 1998.
- MABRY, T. J., MARKAM, K. R.; THOMAS, M. B. *The systematic identification of flavonoids*. New York: Springer, 1970.
- MAHATO; S. B.; KUNDU; A. P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features. *Phytochem.*, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.
- MARKHAM, K. R.; CHARI, M.; MABRY, T. J. *Carbon-13 NMR spectroscopy of flavonoids*. In: *The flavonoids: advances in research* (Harborne, J. B. and Mabry, T. J., eds.), Chapman & Hall: London, p. 19-134, 1982.
- MARKHAM, K. R. Flavones, flavonols and their glycosides. In: *Methods in plant biochemistry* (Harborne, J. B. and Mabry, T. J., eds.), Vol. I, Academic Press: London , p. 197-235, 1989.
- MATOS, N.F. O gênero *Andira* Lam. (Leguminosae:Papilionoideae) no Brasil. *Acta Amazon.*, v. 9, p. 241-66, 1979.
- MATOS, F. J. A. *Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras*. Editora UFC: Fortaleza, 1991. p.167.
- MAY, J. A.; STOLTZ, B. The structural and synthetic implications of the biosynthesis of the calycanthaceous alkaloids, the communesins, and nomofungi. *Tetrahedron*, v. 62, p. 5262-5271, 2006.
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.
- MISHRA, P. K.; SINGH, N.; AHMAD, G.; DUBE, A.; MAURYA, R. Glycolipids and other constituents from *Desmodium gangeticum* with antileishmanial and immunomodulatory activities. *Bioorg. & Med. Chem. Let.*, v. 15, p. 4543-4546, 2005.
- MORITA, H.; ICHIHARA, Y.; TAKEYA, K; WATANABE, K.; ITOKAWA, H.; MOTIDOME, M. A New indol alkaloid from the leaves of *Palicourea marcgravii*. *Planta Medica*, v. 55, n. 3, p. 288-289, 1989.
- MWAULUKA, K.; BELL, E.A.; BARRY, V.C.; BRIGS, J.M. N-methyl-L-tyrosine from seeds of *Combretum zeyheri*. *Phytochem.*, v. 14, n. 7, p. 1657-1658, 1975.
- NAKANO, T.; MARTÍN, A. Studies on the alkaloids of *Palicourea fendleri*. *Planta Medica*, v. 30, n. 2, p. 186-188, 1976.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.*, v. 66, p. 7, p. 1022-1037, 2003.
- PARTHASARATHY, M. R.; SESHADRI, T. R.; VARMA, R. S. New isoflavonoid glycosides from *Dalbergia paniculada*. *Phytochem.*, v. 15, p. 1025-1027, 1976.

- PECKOLT, G. O valor dos anti-helmínticos brasileiros. *Rev. Flora Med.*, v. 7, p. 334-388, 1942.
- PENNINGTON, T.; LIMA, H.C. Two new of *Andira* (Leguminosae) from Brazil and the influence of dispersal in determining their distributions. *Kew Bull.*, v. 50, p. 557-566, 1995.
- PENNINGTON, T. Cladistic analysis of chloroplast DNA restriction site characters in *Andira* (Leguminosae: Dalbergieae). *Am. J. Bot.*, v. 82, n. 4, p. 526-534, 1995.
- PENNINGTON, T. Molecular and morphological data provide phylogenetic resolution at different hierarchical levels in *Andira*. *Syst. Biol.*, v. 45, n. 4, p. 496-515, 1996
- PENNINGTON, R.T.; GEMEINHOLZER, B. Cryptic clades, fruit wall morphology and biology of *Andira* (Leguminosae: Papilionoideae). *Bot. J. Linn. Soc.*, v. 134, p. 267-286, 2000.
- PHILLIPSON, J. D. A matter of some sensitivity. *Phytochem.*, v. 38, n. 6, p. 1319-1343, 1995.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade desafios e perspectivas. *Quím. Nova*, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.
- POJE, M.; SOKOLIC-MARAVIC, L. The mechanism for the conversion of uric acid into allantoin and dehydro-allantoin. *Tetrahedron*, v. 42, n. 7, p. 747-751, 1986.
- POLHILL, R.M. Papilionoideae. In POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H. (eds). *Advances in legume systematics*. v. 1, Royal Botanic Garden: New York, p. 1-12, 1981.
- RAMESH, P.; YUVARAJAN, C.R. Coromandelin, a new isoflavone apioglucoside from leaves of *Dalbergia coromandeliana*. *J. Nat. Prod.*, v. 58, p. 1240-1241, 1995.
- RAO, P.S.; ASHEERVADAM, Y.; KHALILULLIAH, M.D.; MURTI, V.V.S. A revised structure for the isoflavone lanceolarin. *Phytochem.*, v. 28, p. 957-958, 1989.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. Diversidade. In: *Biologia vegetal*. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p. 157-407, 1996.
- RIPPERGER, R. Chimonanthine from *Palicourea domingensis*. *Pharmazie*. v. 37, n. 12, p. 867, 1982.
- RIVIER, L.; LINDGREN, J.E. "Ayahuasca", The South American halucinogenic drink: An ethnobotanical and chemical investigation. *Economic Botany*, v. 26, p.101-129, 1972.
- RIZZINI, C. T. Germinação e inibição em cinco espécies de *Andira* (Leguminosae, Lotoideae). *Rev. Bras. Biol.*, v. 31, n. 2, p. 209-218, 1971.
- ROBBRECHT, E. Tropical woody Rubiaceae. *Opera Botanica Belgica*. v.1, 1988.

ROBBRECHT, E. Introduction to advances in Rubiaceae macrosystematics. *Opera Botanica Belgica*, v. 6, p. 7-18, 1993.

SCHULZE – MENZ, G.K. Reihe Rosales. In: MELCHIOR, H.A. *Engler's sylabus der pflanzenfamilien*. Gerbrüder Borntraeger: Berlin, v. 2, p. 193-242, 1964.

SCHUMANN, K. Rubiaceae. In: A. Engler e K. Prantl (editores). *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*, v. 4, n. 4, p. 1-156, 1891.

SCOTT, K.N. Carbon-13 nuclear magnetic resonance of biologically important aromatic acids. I. chemical shifts of benzoic acid and derivatives. *J. of the Am.Chem.Soc.*, v. 94, n. 24, p. 8564-8568, 1972.

SHRINER, R. L. *The systematic identification of organic compounds*. 6th ed., John Wiley & Sons: Singapore, 1979. p. 160.

SANTOS, R.I. *Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários*. In: *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC: Porto Alegre / Florianópolis, 1999.

SILVA, B.P. da; VELOZO, L.S.M.; PARENTE, J.P. Biochanin A triglycoside from *Andira inermis*. *Fitoterapia*, v. 71, p. 663-667, 2000.

SILVA, D.H.S.; YOSHIDA, M.; KATO, M.J.; Flavonoids from *Iryanthera sagostiana*. *Phytochem.*, v. 46, n. 3, p. 579-582, 1997.

SILVA, S.L. da C. Avaliação anti-helmíntica de extratos de duas espécies de *Andira*, em camundongos naturalmente infectados por *Vampirolepis nana* (Sielbold, 1852) Spasskii, 1954 (Eucestoda: Hymenolepididae) e *Aspiculuris tetraptera* (Nitzsch 1821) Schulz, 1924 (Nematoda: Heteroxynematidae), Tese de Doutorado: Instituto Oswaldo Cruz, 2002.

SILVA, T.M.S. Estudo químico de espécies de *Solanum*., Tese de Doutorado: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2002.

SILVA, S.L. da C.; BORBA, H.R.; BONFIM, T.C.B. do; CARVALHO, M.G. de; CAVALCANTI, H.L.; BARBOSA, C.G. Ação anti-helmíntica de extratos brutos de *Andira antihelmia* (Vell.) Macbr. e *Andira fraxinifolia* Benth., em camundongos naturalmente infectados por *Vampirolepis nana* e *Aspiculuris tetraptera*. *Parasitol. Latinoam.*, v. 58, p. 23-29, 2003

SOLÍS, P.N., WRIGHT, C.W., GUPTA, M.P., PHILLIPSON, J.D. Quinoline alkaloids from *Psychotria glomerulata*. *Phytochem.*, v. 44, p. 963-969, 1997.

STANDLEY, P. C. Rubiaceae. In: MACBRIDE, J. F. Flora of Peru. *Field Museum of Natural History*, v. 13, n. 6, p. 3- 261, 1936.

STANDLEY, P. C. Flora of Costa Rica: Rubiaceae. *Field Museum of Natural History*, v. 18, p. 1264-1380, 1938.

- STEYERMARK, J. A. *Palicourea*. In: MAGUIRE, B. M. et al. Flora of the Guayana Highlands. *Memoirs of New York Botanical Garden*, v. 23, p. 717-777, 1972.
- STUART, K.L.; WOO-MING, R.B. *Palicourea* alkaloids. Structure of palinine. *Tetrahedron Letters*, v. 44, p. 3853-3856, 1974.
- STUART, K.L.; WOO-MING, R.B. Calycanthine from *Palicourea alpina*. *Phytochem.*, v. 14, n. 11, p. 2529, 1975.
- STUART, K.L.; WOO-MING, R.B. Vomifoliol in *Croton* and *Palicourea* species. *Phytochem.*, v. 14, n. 2, p. 594-595, 1975.
- TAKHATAJAN, A. *Flowering plants – Origin and dispersal*. Oliver & Boyd: Edinburgh, 1969. 310 p.
- TAYLOR, C. M. Revision of *Palicourea* (Rubiaceae) in Mexico and Central America. *Systematic Botanical Monograph*, v. 26, p. 1-102, 1989.
- TAYLOR, C. M. Revision of *Palicourea* (Rubiaceae: Psychotrieae) in the West Indies. *Moscocosa*, v. 7, p. 201-241, 1993.
- TAYLOR, C. M. Overview of the Psychotrieae (Rubiaceae) in the Neotropics. *Opera Botanica Belgica*, v. 7, p. 261-270, 1996.
- TAYLOR, C. M. Conspectus of the genus *Palicourea* (Rubiaceae: Psychotrieae) with the description of some new species from Ecuador and Colombia. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 84, p. 224-262, 1997.
- TSCHESCHE, R.; DELHVI, S.; SEPULVEDA, S.; BREITMAIER, E. Eucryphin, a new chromone rhamnoside from bark of *Eucryphia cordifolia*. *Phytochem.*, v. 22, p. 867-869, 1979.
- TOKARNIA, C. H., DÖBEREINER, J., PEIXOTO, P. V. *Plantas tóxicas do Brasil*. Hellianthus: Rio de Janeiro, p. 3-17, 2000.
- TUNMANN, O. The formation of araroba (crude chrysarobin) in *Andira araroba* aguiar. *Apoth. Ztg.*, v. 30, p. 517-519, 1915.
- VALVERDE, J.; TAMAYO, G.; HESSE, M. β -carboline monoterpene glucosides from *Palicourea adusta*. *Phytochemistry*, v. 52, p. 1485-1489, 1999.
- VEROTTA, L.; PILATI, T.; TATÒ, M.; ELISABETSKY, E.; AMADOR, T.A.; NUNES, D.S. Pyrrolidinoindoline alkaloids from *Psychotria colorata*. *J. Nat. Prod.*, v. 61, p. 392-396, 1998.
- VOGEL, A. I. *Vogel's textbook of practical organic chemistry*. 5th ed., Longman: England, 1989. p. 433.
- WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *J. Ethnopharmacol.*, v. 51, p. 239-254, 1996.

WALL, M. E.; WANI, M. C. *The alkaloids*. Academic Press: New York, 1998.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J. B. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. ARGOS: Florianópolis, 2001. 523 p.

ZENNER, L.; REGNAULT, J. P. A retrospective study of microbiological and parasitological status of laboratory rodents in France. *J Exp Anim Sci.*, v. 40, n. 4, p. 211-222, 2000.