

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JOÃO HENRIQUE SILVA LUCIANO

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE PLANTAS DO  
NORDESTE: *ALBERTIA MYRCIIFOLIA* SPRUCE EX K. SCHUM. E *ALBERTIA*  
*RIGIDA* K. SCHUM.

FORTALEZA  
2009

**JOÃO HENRIQUE SILVA LUCIANO**

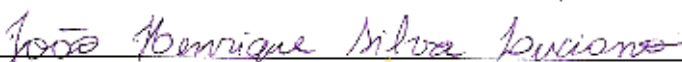
**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DE PLANTAS DO  
NORDESTE: *ALIBERTIA MYCIIFOLIA* SPRUCE EX K. SCHUM. E *ALIBERTIA  
RIGIDA* K. SCHUM.**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química.

Área de concentração: Química Orgânica.

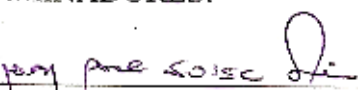
Orientadora: Profa. Dra. Mary Anne Sousa Lima.

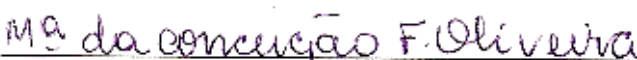
Esta Tese foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

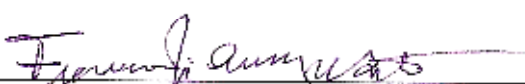
  
João Henrique Silva Luciano

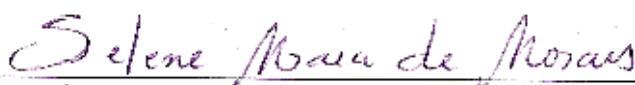
TESE APROVADA EM: 26/03/2009

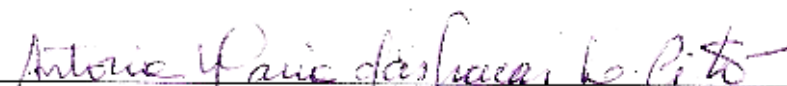
EXAMINADORES:

  
Profa. Dra. Mary Anne Sousa Lima (orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

  
Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira  
Universidade Federal do Ceará - UFC

  
Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte  
Universidade Federal do Ceará - UFC

  
Profa. Dra. Selenic Maia de Moraes  
Universidade Estadual do Ceará - UECE

  
Profa. Dra. Antonia Maria das Graças Lopes Cito  
Universidade Federal do Piauí - UFPI

## AGRADECIMENTOS

À minha família, a quem também dedico esta tese, pelo apoio e compreensão incondicionais.

À professora Mary Anne Sousa Lima, pela orientação sempre firme e coerente, indispensável na realização deste trabalho.

Ao professor Edilberto Rocha Silveira, pela colaboração em incontáveis ocasiões e por me permitir conhecer um pouco mais da Ressonância Magnética Nuclear no CENAUREMN.

Ao professor Elnatan Bezerra de Souza, da Universidade do Vale do Acaraú, pela identificação botânica dos espécimes de *Alibertia myrciifolia*.

Ao professor Edson Paula Nunes, do Departamento de Biologia desta Universidade, pela identificação botânica dos espécimes de *Alibertia rigida*.

Às professoras Laila Salmen Espindola e Ilka Maria Vasconcelos pela realização dos testes de atividades farmacológicas.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Química (UFC), pela contribuição indispensável à minha formação acadêmica.

Aos funcionários da Universidade Federal do Ceará, especialmente à Lana, Mundinha, Sr. Paulo e Célia, pela forma dedicada com a qual realizam seu trabalho.

Aos grandes amigos do laboratório (LAFIPLAM) e dos demais laboratórios do Curso Pós-Graduação em Química (UFC). Também dedico este trabalho a todos eles.

Ao CNPq, CAPES, FINEP, PADCT, PRONEX e FUNCAP, pelo apoio financeiro.

“E você ainda acredita  
Que é um doutor  
Padre ou policial  
Que está contribuindo  
Com sua parte  
Para o nosso belo  
Quadro social...”  
*Raul Seixas*

## RESUMO

Este trabalho relata a investigação química de duas espécies de plantas da família Rubiaceae, pertencentes ao gênero *Alibertia*: *A. myrciifolia* Spruce ex K. Schumman e *A. rigida* K. Schumman, ambas provenientes do município do Crato-CE (região da Chapada do Araripe). O estudo de *A. myrciifolia* resultou no isolamento e identificação de 9 substâncias. Do extrato hexânico dos talos obteve-se a mistura dos fitoesteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, além dos triterpenos hidroxi-hopanona e  $3\alpha,22$ -diidroxi-hopano. Em acréscimo, foi preparado o triterpeno  $3\beta,22$ -diidroxi-hopano por redução da hidroxi-hopanona. A partir do extrato etanólico foram obtidos o flavonóide 3,4-dimetoxi-luteolina, o triterpeno ácido ursólico, o fenil-propanóide ácido cafeico e os iridóides ácido geniposídico, ácido 10-*O*-vaniloil-geniposídico e o ácido 10-*O*-siringoil-geniposídico. Os triterpenos de esqueleto hopano são inéditos no gênero *Alibertia*, bem como o flavonóide e os derivados do ácido geniposídico, sendo que o ácido 10-*O*-vaniloil-geniposídico possui caráter inédito na literatura. Com relação à prospecção química relativa às folhas de *A. rigida*, foram isolados a partir do extrato etanólico os flavonóides rutina, quercetina, canferol e 7-metóxi-apigenina (genkwanina), um dímero do catecol (denominado de 3,4,3',4'-tetra-hidroxibifenila), o éster etílico do ácido cafeico e a procianidina A-2. Todas as substâncias são inéditas em *Alibertia*, com exceção da rutina. Em adição ao estudo fitoquímico das duas espécies, foram realizados testes de atividade fungitóxica e anti-leishmaniose com algumas das substâncias isoladas. No teste contra fungos patogênicos, o ácido geniposídico, o éster etílico do ácido cafeico e a procianidina A-2 inibiram significativamente o crescimento das cepas testadas, enquanto os triterpenos de esqueleto hopano e o ácido 10-*O*-vaniloil-geniposídico foram inativos. Já no teste contra *Leishmania amazonensis*, apenas o éster etílico do ácido cafeico foi ativo. Os metabólitos secundários isolados foram caracterizados através do uso de métodos espectroscópicos na região do I.V., espectros de massa e de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , incluindo técnicas uni e bidimensionais (HMBC e HMQC), além de comparação com dados descritos na literatura.

## ABSTRACT

This work reports the chemical investigation of two plants of the Rubiaceae family, belonging to the *Alibertia* genus: *A. myrciifolia* Spruce ex K. Schumman and *A. rigida* K. Schumman, both collected in Crato County – CE (Araripe's Plateau). The chemical study of *A. myrciifolia* resulted on the isolation and characterization of nine compounds. From the hexane extract of the aerial parts was obtained  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol as mixture, besides the triterpenes hydroxyhopanone and  $3\alpha,22$ -dihydroxyhopane. In addition, the triterpene  $3\beta,22$ -dihydroxyhopane was prepared by reduction of hydroxyhopanone. From the ethanolic extract it was obtained the flavonoid 3,4-dimethoxyluteolin, the triterpene ursolic acid, the phenylpropanoid caffeic acid and the iridoids geniposidic acid, 10-*O*-vanilloyl-geniposidic acid and 10-*O*-syringoyl-geniposidic acid. The hopane triterpenes are new on *Alibertia* genus, as well as the flavonoid and the geniposidic acid derivatives. The 10-*O*-vanilloyl-geniposidic acid is a new compound. Regarding the chemical analysis of the leaves from *A. rigida*, the flavonoids rutin, quercetin, kaempferol and the 7-methoxyapigenin (genkwanin), a catechol dimer (3,4,3',4'-tetrahydroxybiphenyl), the caffeic acid ethyl ester and the procyanidin A-2 were obtained. All compounds are new on *Alibertia* genus, with exception of rutin. In addition to the phytochemical study of both species, some isolated compounds were submitted to fungitoxic and antileishmanial assays. The test against pathogenic fungi showed significant inhibition on the growth of tested strains by geniposidic acid, caffeic acid ethyl ester and procyanidin A-2, while the hopane triterpenes and the 10-*O*-vanilloyl-geniposidic acid were inactive. In the test against *Leishmania amazonensis*, only caffeic acid ethyl ester showed activity. Secondary metabolites of *A. myrciifolia* were characterized by spectroscopic methods including IR, NMR  $^1\text{H}$  and NMR  $^{13}\text{C}$ , uni and bidimensional, and comparison with literature data.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Substâncias isoladas do extrato hexânico dos talos de <i>A. myrciifolia</i> .....	23
Figura 2 – Substâncias isoladas do extrato etanólico dos talos de <i>A. myrciifolia</i> .....	24
Figura 3 – Substâncias isoladas de <i>A. rigida</i> .....	25
Figura 4 – Fotografia das flores de um espécime masculino de <i>A. myrciifolia</i> .....	28
Figura 5 – Fotografia da flor de um espécime feminino de <i>A. myrciifolia</i> .....	28
Figura 6 – Fotografia das flores de <i>A. rigida</i> .....	30
Figura 7 – Fotografia do fruto de <i>A. rigida</i> .....	30
Figura 8 – Rota biossintética para a formação de proantocianidinas.....	32
Figura 9 – Estruturas das unidades flavan-3-ol que compõem as proantocianidinas.....	32
Figura 10 – Exemplos de proantocianidinas tipo-B apresentando as ligações 4 $\beta$ -8 e 4 $\alpha$ -8 entre as unidades monoméricas.....	33
Figura 11 – Exemplos de proantocianidinas tipo-A apresentando as ligações (4 $\beta$ →8, 2 $\beta$ →O→7) e (4 $\beta$ →6, 2 $\beta$ →O→7) entre as unidades monoméricas.....	34
Figura 12 – Procianidinas diméricas descritas na literatura (1-6) com dados de RMN <sup>13</sup> C.....	37
Figura 13 – Procianidinas diméricas e uma trimérica descritas na literatura (7-10) com dados de RMN <sup>13</sup> C.....	38
Figura 14 – Procianidinas triméricas descritas na literatura (11-14) com dados de RMN <sup>13</sup> C.....	39
Figura 15 – Procianidinas triméricas descritas na literatura (15-18) com dados de RMN <sup>13</sup> C.....	40
Figura 16 – Procianidinas triméricas descritas na literatura (19-22) com dados de RMN <sup>13</sup> C.....	41
Figura 17 – Procianidinas triméricas e uma tetramérica descritas na literatura (23-25) com dados de RMN <sup>13</sup> C.....	42
Figura 18 – Procianidinas tetraméricas descritas na literatura (26-27) com dados de RMN <sup>13</sup> C.....	43
Figura 19 – Procianidinas tetraméricas descritas na literatura (28-29) com dados de RMN <sup>13</sup> C.....	44
Figura 20 – Procianidinas tetraméricas e uma pentamérica descritas na literatura (30-32) com dados de RMN <sup>13</sup> C.....	45
Figura 21 – Procianidinas/Propelargonidinas tetraméricas descritas na literatura (33-35) com dados de RMN <sup>13</sup> C.....	46
Figura 22 – Propelargonidinas diméricas descritas na literatura (36-41) com dados de RMN <sup>13</sup> C.....	47
Figura 23 – Propelargonidinas diméricas descritas na literatura (42-47) com dados de RMN <sup>13</sup> C.....	48



Figura 24 – Uma propelargonidinas diméricas, uma trimérica e uma prodelfinidina dimérica descritas na literatura (48-50) com dados de RMN $^{13}\text{C}$ .....	49
Figura 25 – Estrutura do $\beta$ -sitosterol e do estigmasterol.....	51
Figura 26 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AM-1.....	52
Figura 27 – Espectro de absorção na região do I.V. de AM-1 com pastilhas de KBr.....	52
Figura 28 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB de AM-1.....	53
Figura 29 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de AM-1.....	53
Figura 30 – Sub-estruturas para AM-2.....	56
Figura 31 – Estrutura da 22-hidroxi-hopanona.....	56
Figura 32 – Espectro de absorção na região do I.V. de AM-2 com pastilhas de KBr.....	59
Figura 33 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AM-2.....	59
Figura 34 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB de AM-2.....	60
Figura 35 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de AM-2.....	60
Figura 36 – Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ a uma ligação de AM-2 (HSQC) .....	61
Figura 37 – Expansões do espectro HSQC de AM-2.....	61
Figura 38 – Espectro de RMN bidimensional (e expansões) de correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ a mais de uma ligação (HMBC) de AM-2.....	62
Figura 39 – Espectro de massa de AM-2 (impacto eletrônico a 70 eV).....	63
Figura 40 - Proposta mecanística para as fragmentações que justificam os picos principais registrados no espectro de massa de AM-2.....	63
Figura 41 – Estrutura do $3\beta,22$ -di-hidroxi-hopano.....	66
Figura 42 – Espectro de absorção na região do I.V. de AM-2' com pastilhas de KBr....	68
Figura 43 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AM-2'.....	68
Figura 44 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB de AM-2'.....	69
Figura 45 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de AM-2'.....	69
Figura 46 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de AM-2'.....	70
Figura 47 – Expansões do espectro HSQC de AM-2'.....	70
Figura 48 – Espectro de RMN bidimensional HMBC (e expansão) de AM-2'.....	71
Figura 49 – Espectro de massa de AM-2' (impacto eletrônico a 70 eV).....	72
Figura 50 – Sub-estruturas para AM-3.....	75
Figura 51 – Estrutura do $3\alpha,22$ -di-hidroxi-hopano.....	75
Figura 52 – Espectro de absorção na região do I.V. de AM-3 com pastilhas de KBr.....	78
Figura 53 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AM-3.....	78
Figura 54 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB de AM-3.....	79

Figura 55 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de AM-3.....	79
Figura 56 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de AM-3.....	80
Figura 57 – Expansões do espectro HSQC de AM-3.....	80
Figura 58 – Espectro de RMN bidimensional HMBC (e expansões) de AM-3.....	81
Figura 59 – Espectro de massa de AM-3 (impacto eletrônico a 70 eV).....	82
Figura 60 - Proposta mecanística para as fragmentações que justificam os picos principais registrados no espectro de massa de AM-3.....	82
Figura 61 – Sub-estrutura I para AM-4.....	84
Figura 62 – Sub-estruturas II e III para AM-4.....	84
Figura 63 – estrutura da 3,4-dimetoxi-luteolina.....	85
Figura 64 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AM-4.....	87
Figura 65 – Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ de AM-4.....	87
Figura 66 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de AM-4.....	88
Figura 67 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de AM-4.....	89
Figura 68 – Espectro de massa de AM-4 (impacto eletrônico a 70 eV).....	90
Figura 69 – Proposta mecanística para as fragmentações que justificam os principais picos registrados no espectro de massa de AM-4.....	90
Figura 70 – Estrutura do ácido ursólico.....	92
Figura 71 – Espectro de absorção na região do I.V. de AM-5 com pastilhas de KBr.....	94
Figura 72 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AM-5.....	94
Figura 73 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB de AM-5.....	95
Figura 74 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de AM-5.....	95
Figura 75 – Espectro de massa de AM-5 (impacto eletrônico a 70 eV).....	96
Figura 76 – Sub-estrutura para AM-6.....	98
Figura 77 – Estrutura do ácido cafeico.....	99
Figura 78 – Espectro de absorção na região do I.V. de AM-6 com pastilhas de KBr.....	101
Figura 79 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AM-6.....	101
Figura 80 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB de AM-6.....	102
Figura 81 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de AM-6.....	102
Figura 82 – Espectro de RMN bidimensional HMQC de AM-6.....	103
Figura 83 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de AM-6.....	104
Figura 84 – Espectro de massa de AM-6 (impacto eletrônico a 70 eV).....	105
Figura 85 – Sub-estrutura para AM-7.....	108
Figura 86 – Estrutura do ácido geniposídico.....	108
Figura 87 – Espectro de absorção na região do I.V. de AM-7 com pastilhas de KBr.....	111
Figura 88 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AM-7.....	111

Figura 89 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB de AM-7.....	112
Figura 90 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de AM-7.....	112
Figura 91 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de AM-7.....	113
Figura 92 – Expansão do espectro de RMN bidimensional HSQC de AM-7.....	113
Figura 93 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de AM-7.....	114
Figura 94 – Espectro de massa de AM-7 (impacto eletrônico a 70 eV).....	115
Figura 95 – Estrutura de AM-8.....	117
Figura 96 – Sub-estrutura de AM-8.....	118
Figura 97 – Estrutura do ácido 10- <i>O</i> -vaniloil-geniposídico.....	118
Figura 98 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AM-8.....	120
Figura 99 – Expansões do espectro de RMN $^1\text{H}$ de AM-8.....	120
Figura 100 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB de AM-8.....	121
Figura 101 – Espectro de RMN bidimensional HMQC de AM-8.....	121
Figura 102 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de AM-8.....	122
Figura 103 – Expansão do espectro de RMN bidimensional NOESY de AM-8.....	123
Figura 104 – Espectro de absorção na região do I.V. de AM-8 com pastilhas de KBr...	123
Figura 105 – Espectro de massa de AM-8 (impacto eletrônico a 70 eV).....	124
Figura 106 – Sub-estrutura para AM-9.....	126
Figura 107 – Estrutura do ácido 10- <i>O</i> -vaniloil-geniposídico (A) e o ácido 10- <i>O</i> -siringoil-geniposídico (B) .....	127
Figura 108 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AM-9.....	130
Figura 109 – Expansões do espectro de RMN $^1\text{H}$ de AM-9.....	130
Figura 110 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB de AM-9.....	131
Figura 111 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de AM-9.....	131
Figura 112 – Expansão do espectro de RMN bidimensional COSY de AM-9.....	132
Figura 113 – Espectro de RMN bidimensional HMQC de AM-9.....	132
Figura 114 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de AM-9.....	133
Figura 115 – Sub-estrutura para AR-1.....	136
Figura 116 – Estrutura da rutina.....	136
Figura 117 – Espectro de absorção na região do I.V. de AR-1 com pastilhas de KBr....	139
Figura 118 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AR-1.....	139
Figura 119 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB de AR-1.....	140
Figura 120 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de AR-1.....	140
Figura 121 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de AR-1.....	141
Figura 122 – Expansão do espectro de RMN bidimensional HSQC de AR-1.....	141

Figura 123 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de AR-1.....	142
Figura 124 – Expansão do espectro de RMN bidimensional HMBC de AR-1.....	142
Figura 125 – Estrutura da acetina.....	144
Figura 126 – Sub-estrutura para AR-2.....	145
Figura 127 – Estrutura da genkwanina.....	145
Figura 128 – Espectro de absorção na região do I.V. de AR-2 com pastilhas de KBr....	148
Figura 129 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AR-2.....	148
Figura 130 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB de AR-2.....	149
Figura 131 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de AR-2.....	149
Figura 132 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de AR-2.....	150
Figura 133 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de AR-2.....	151
Figura 134 – Sub-estrutura para AR-3.....	153
Figura 135 – Estrutura do éster etílico do ácido cafeico.....	153
Figura 136 – Espectro de absorção na região do I.V. de AR-3 com pastilhas de KBr....	156
Figura 137 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AR-3.....	156
Figura 138 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB de AR-3.....	157
Figura 139 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de AR-3.....	157
Figura 140 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de AR-3.....	158
Figura 141 – Espectro de massa de AR-3 (impacto eletrônico a 70 eV).....	159
Figura 142 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AR-4.....	162
Figura 143 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB de AR-4.....	162
Figura 144 – Espectro de massa de AR-4 (impacto eletrônico a 70 eV).....	163
Figura 145 – Sub-estrutura para AR-5.....	164
Figura 146 – Estrutura da 3,4,3',4'-tetra-hidroxibifenila.....	165
Figura 147 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AR-5.....	167
Figura 148 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB de AR-5.....	167
Figura 149 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de AR-5.....	168
Figura 150 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de AR-5.....	168
Figura 151 – Espectro de absorção na região do I.V. de AR-5 com pastilhas de KBr....	169
Figura 152 – Espectro de massa de AR-5 (impacto eletrônico a 70 eV).....	169
Figura 153 – Sub-estrutura para AR-6.....	171
Figura 154 – Estrutura de quercetina.....	171
Figura 155 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AR-6.....	174
Figura 156 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de AR-6.....	174
Figura 157 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de AR-6.....	175

Figura 158 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de AR-6.....	175
Figura 159 – Espectro de absorção na região do I.V. de AR-6 com pastilhas de KBr.....	176
Figura 160 – Espectro de massa de AR-6 (impacto eletrônico a 70 eV).....	176
Figura 161 – Sub-estruturas para AR-7.....	179
Figura 162 – Estruturas da (+)-catequina e da (+)- e (-)-epicatequina. Conformações de meia cadeira para o anel C da (+)-catequina e da (-)-epicatequina.....	179
Figura 163 – Estrutura da procianidina A-2 e do seu enantiômero.....	180
Figura 164 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AR-7.....	183
Figura 165 – Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ de AR-7.....	183
Figura 166 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB de AR-7.....	184
Figura 167 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de AR-7.....	184
Figura 168 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de AR-7.....	185
Figura 169 – Expansão do espectro de RMN bidimensional HSQC de AR-7.....	185
Figura 170 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de AR-7.....	186
Figura 171 – Expansões do espectro de RMN bidimensional HMBC de AR-7.....	186
Figura 172 – Estruturas das substâncias utilizadas nos testes farmacológicos.....	219
Figura 173 – Teste de inibição do crescimento fúngico.....	224

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proantocianidinas tipo-A descritas na literatura entre os anos de 1989-2008 que apresentam dados de RMN $^1\text{H}$ .....	35
Tabela 2 – Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ de AM-1 com os descritos na literatura para os esteróides $\beta$ -sitosterol e estigmasterol.....	51
Tabela 3 – Deslocamentos químicos de RMN $^{13}\text{C}$ de AM-2 por padrão de hidrogenação.....	55
Tabela 4 – Correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ (HSQC e HMBC) de AM-2.....	57
Tabela 5 – Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ de AM-2 com os descritos na literatura para 22-hidroxi-hopanona.....	58
Tabela 6 – Deslocamentos químicos de RMN $^{13}\text{C}$ de AM-2' por padrão de hidrogenação.....	65
Tabela 7 – Correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ (HSQC e HMBC) de AM-2'.....	66
Tabela 8 – Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ de AM-2' com os de AM-2 e os descritos na literatura para o 3 $\beta$ -hidroxi-hopeno.....	67
Tabela 9 – Deslocamentos químicos de RMN $^{13}\text{C}$ de AM-3 por padrão de hidrogenação.....	74
Tabela 10 – Correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ (HSQC e HMBC) de AM-3.....	76
Tabela 11 – Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ de AM-3 com os de AM-2' e os descritos na literatura para o 3 $\beta$ ,22-di-hidroxi-hopano.....	77
Tabela 12 – Correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ (HMQC e HMBC) de AM-4.....	85
Tabela 13 – Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ de AM-4 com os descritos na literatura para a 3,4-dimetoxi-luteolina.....	86
Tabela 14 – Deslocamentos químicos de RMN $^{13}\text{C}$ de AM-5 por padrão de hidrogenação.....	92
Tabela 15 – Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ de AM-5 com os descritos na literatura para o ácido ursólico.....	93
Tabela 16 – Deslocamentos químicos de RMN $^{13}\text{C}$ de AM-6 por padrão de hidrogenação.....	98
Tabela 17 – Correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ (HMQC e HMBC) de AM-6.....	99
Tabela 18 – Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ de AM-6 com os descritos na literatura para o ácido cafeico.....	100
Tabela 19 – Deslocamentos químicos de RMN $^{13}\text{C}$ de AM-7 por padrão de hidrogenação.....	107
Tabela 20 – Correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ (HMQC e HMBC) de AM-7.....	109
Tabela 21 – Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ de AM-7 com os descritos na literatura para o ácido geniposídico.....	110
Tabela 22 – Correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ (HMQC e HMBC) de AM-8.....	119

Tabela 23 – Correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ (HMQC e HMBC) de AM-9.....	128
Tabela 24 – Comparação entre os dados de RMN $^{13}\text{C}$ obtidos para AM-9 e os descritos na literatura para o ácido geniposídico e os grupamentos vaniloil e siringoil.....	129
Tabela 25 – Deslocamentos químicos de RMN $^{13}\text{C}$ de AR-1 por padrão de hidrogenação.....	135
Tabela 26 – Correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ (HSQC e HMBC) de AR-1.....	137
Tabela 27 – Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ de AR-1 com os descritos na literatura para a rutina.....	138
Tabela 28 – Deslocamentos químicos de RMN $^{13}\text{C}$ de AR-2 por padrão de hidrogenação.....	144
Tabela 29 – Correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ (HSQC e HMBC) de AR-2.....	146
Tabela 30 – Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ de AR-2 com os descritos na literatura para a genkwanina e a acacetina.....	147
Tabela 31 – Correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ (HSQC e HMBC) de AR-3.....	154
Tabela 32 – Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ de AR-3 com os descritos na literatura para o ácido cafeico.....	155
Tabela 33 – Dados de RMN $^1\text{H}$ obtidos para AR-4 e comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ de AR-4 com os descritos na literatura para o canferol.....	161
Tabela 34 – Correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ (HSQC e HMBC) DE AR-5.....	166
Tabela 35 – Comparação dos dados de RMN $^1\text{H}$ e RMN $^{13}\text{C}$ de AR-5 com os descritos na literatura para a 3,4,3',4'-tetra-hidroxibifenila.....	166
Tabela 36 – Correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ (HSQC e HMBC) DE AR-6.....	172
Tabela 37 – Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ de AR-6 com os descritos na literatura para a quercetina.....	173
Tabela 38 – Deslocamentos químicos de RMN $^{13}\text{C}$ e AR-7 por padrão de hidrogenação.....	178
Tabela 39 – Correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ (HSQC e HMBC) de AR-7.....	181
Tabela 40 – Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ de AR-7 com os descritos na literatura para a proantocianidina A-2.....	182
Tabela 41 – Rendimentos obtidos no fracionamento cromatográfico de AMTH.....	191
Tabela 42 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de AMTH-A.....	191
Tabela 43 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTH-A.....	192
Tabela 44 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTH-A(F-2ppt).....	193
Tabela 45 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de AMTH-A4-5.....	195
Tabela 46 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTH-A4-5.....	195
Tabela 47 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTE-C-A.....	198
Tabela 48 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de AMTE-C-A8-9..	198

Tabela 49 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTE-C-A8-9....	199
Tabela 50 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTE-A.....	200
Tabela 51 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de AMTE-A7-11(5-9) .....	201
Tabela 52 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTE-A7-11(5-9) .....	201
Tabela 53 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de AMTE-A12-13.....	202
Tabela 54 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTE-A12-13....	202
Tabela 55 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTE-A12-13(4-9) .....	203
Tabela 56 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTE-B.....	203
Tabela 57 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTE-B9-11.....	204
Tabela 58 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTE-B9-11(4-6)3-4.....	205
Tabela 59 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de AMTE-B9-11(4-6)3-4(6-9) .....	205
Tabela 60 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTE-B9-11(4-6)3-4(6-9) .....	206
Tabela 61 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de AMTE-B9-11(4-6)3-4(3-4) .....	206
Tabela 62 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTE-B9-11(4-6)3-4(3-4) .....	207
Tabela 63 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de ARFE-C.....	211
Tabela 64 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de ARFE-C2ppt.....	212
Tabela 65 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de ARFE-C2.....	213
Tabela 66 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de ARFE-C2(10-13) .....	213
Tabela 67 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de ARFE-C2(10-13).	214
Tabela 68 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de ARFE-C2(23-28).	215
Tabela 69 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de ARFE-A.....	215
Tabela 70 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de ARFE-A9-11.....	216
Tabela 71 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de ARFE-A12-16.....	217
Tabela 72 – Atividade antifúngica de AM-2, AM-3, AR-3 e AR-7.....	222



**LISTA DE FLUXOGRAMAS**

Fluxograma 1 – Isolamento de AM-1, AM-2 e AM-3 a partir do extrato hexânico dos talos de <i>A. myrciifolia</i> .....	196
Fluxograma 2 – Isolamento de AM-4, AM-5, AM-6, AM-7, AM-8 e AM-9 a partir do extrato etanólico dos talos de <i>A. myrciifolia</i> .....	209
Fluxograma 3. Isolamento de AR-1, AR-2, AR-3, AR-4, AR-5, AR-6 e AR-7 a partir do extrato etanólico dos talos de <i>A. rigida</i> .....	218

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

**AMTH** – Extrato Hexânico dos Talos de *Alibertia myrciifolia*

**AMTE** – Extrato Etanólico dos Talos de *Alibertia myrciifolia*

**ARFE** – Extrato Etanólico das Folhas de *Alibertia rigida*

**CCD** – Cromatografia em Camada Delgada

**P.f.** – ponto de fusão

**$\delta$**  – Deslocamento Químico

***J*** – Constante de Acoplamento

**RMN <sup>1</sup>H** – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

**RMN <sup>13</sup>C** – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

**BB** – Broad-Band

**DEPT** – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

**HMQC** – Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

**HSQC** – Heteronuclear Single Quantum Coherence

**HMBC** – Heteronuclear Multiple Band Correlation

**NOESY** – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

**IV** – Infravermelho

**EM** – Espectrometria de Massa

**FM** – Fórmula Molecular

**MM** – Massa Molar

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS</b> .....	26
<b>2.1. Considerações Botânicas Sobre a Família Rubiaceae</b> .....	26
<b>2.2. Considerações Botânicas Sobre a Espécie <i>Alibertia myrciifolia</i> Spruce ex K. Schum.</b> .....	27
<b>2.3. Considerações Botânicas Sobre a Espécie <i>Alibertia rigida</i> K. Schum.</b> .....	29
<b>3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO</b> .....	31
<b>3.1. Levantamento dos Dados de RMN <sup>13</sup>C Para Proantocianidinas Tipo-A Publicados Entre os Anos de 1989 e 2008</b> .....	31
<b>4. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL</b> .....	50
<b>4.1. Determinação Estrutural dos Constituintes Químicos Não-Voláteis do Extrato Hexânico dos Talos de <i>Alibertia myrciifolia</i></b> .....	50
4.1.1. Determinação estrutural de AM-1.....	50
4.1.2. Determinação estrutural de AM-2.....	54
4.1.3. Determinação estrutural de AM-2'.....	64
4.1.4. Determinação estrutural de AM-3.....	73
<b>4.2. Determinação Estrutural dos Constituintes Químicos Não-Voláteis do Extrato Etanólico dos Talos de <i>Alibertia myrciifolia</i></b> .....	83
4.2.1. Determinação estrutural de AM-4.....	83
4.2.2. Determinação estrutural de AM-5.....	91
4.2.3. Determinação estrutural de AM-6.....	97
4.2.4. Determinação estrutural de AM-7.....	106
4.2.5. Determinação Estrutural de AM-8.....	116
4.2.6. Determinação Estrutural de AM-9.....	125
<b>4.3. Determinação Estrutural dos Constituintes Químicos Não-Voláteis do Extrato Etanólico das Folhas de <i>Alibertia rigida</i></b> .....	134
4.3.1. Determinação estrutural de AR-1.....	134
4.3.2. Determinação estrutural de AR-2.....	143
4.3.3. Determinação estrutural de AR-3.....	152
4.3.4. Determinação estrutural de AR-4.....	160
4.3.5. Determinação estrutural de AR-5.....	164
4.3.6. Determinação estrutural de AR-6.....	170
4.3.7. Determinação Estrutural de AR-7.....	177
<b>5. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	187

<b>5.1. Material botânico</b> .....	187
<b>5.2. Métodos de Análise</b> .....	187
5.2.1. Métodos Cromatográficos.....	187
5.2.2. Métodos Espectrométricos.....	188
5.2.2.1. Espectroscopia na região do infravermelho (IV).....	188
5.2.2.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup> H) e de carbono-13 (RMN <sup>13</sup> C) .....	189
5.2.2.3. Espectrometria de massa.....	190
5.2.3. Pontos de fusão.....	190
<b>5.3. Isolamento dos Metabólitos Secundários de <i>A. myrciifolia</i></b> .....	190
5.3.1. Obtenção dos extratos hexânico (AMTH) e etanólico (AMTE).....	190
5.3.2. Tratamento cromatográfico de AMTH.....	191
5.3.3. Tratamento cromatográfico de AMTH-A.....	191
5.3.4. Tratamento cromatográfico de AMTH-A(F-2ppt) .....	192
5.3.5. Purificação de AMTH-A(F-2ppt)3-5: isolamento de AM-1 ( $\beta$ -sitosterol/estigmasterol) .....	193
5.3.6. Purificação de AMTH-A(F-2ppt)(6-25): isolamento de AM-2 (hidroxihopano) .....	193
5.3.7. Reação de redução de AM-2: obtenção do derivado AM-2' ( $3\beta,22$ -diidroxihopano) .....	194
5.3.8. Purificação de AMTH-A4-5: isolamento de AM-3 ( $3\alpha,22$ -di-hidroxihopano) .....	194
5.3.9. Partição de AMTE.....	197
5.3.10. Tratamento cromatográfico de AMTE-C.....	197
5.3.11. Tratamento cromatográfico de AMTE-C-A.....	197
5.3.12. Tratamento cromatográfico de AMTE-C-A8-9.....	198
5.3.13. Purificação de AMTE-C-A8-9(19-92): isolamento de AM-4 (3,4-dimetoxi-luteolina) .....	199
5.3.14. Tratamento cromatográfico de AMTE-A.....	199
5.3.15. Tratamento cromatográfico de AMTE-A7-11.....	200
5.3.16. Tratamento cromatográfico de AMTE-A7-11(5-9): isolamento de AM-5 (ácido ursólico) .....	201
5.3.17. Tratamento cromatográfico de AMTE-A12-13.....	202
5.3.18. Purificação de AMTE-A12-13(4-9): isolamento de AM-6 (ácido cafeico)..	202
5.3.19. Tratamento cromatográfico de AMTE-B.....	203
5.3.20. Tratamento cromatográfico de AMTE-B9-11.....	204
5.3.21. Tratamento cromatográfico de AMTE-B9-11(4-6)3-4.....	205

5.3.22. Purificação de AMTE-B9-11(4-6)3-4(6-9): isolamento de AM-7 (ácido geniposídico) .....	205
5.3.23. Purificação de AMTE-B9-11(4-6)3-4(3-4): isolamento de AM-8.....	206
5.3.24. Purificação de AMTE-B9-11(4-6)3-4(6-9): isolamento de AM-9.....	208
5.4. Isolamento dos Metabólitos Secundários de <i>A. rigida</i> .....	210
5.4.1. Obtenção dos extratos hexânico (ARFH) e etanólico (ARFE).....	210
5.4.2. Partição de ARFE e isolamento de AR-1 (rutina) .....	210
5.4.3. Tratamento cromatográfico de ARFE-C.....	211
5.4.4. Purificação de ARFE-C2ppt: isolamento de AR-2 (genkwanina).....	212
5.4.5. Tratamento cromatográfico de ARFE-C2.....	212
5.4.6. Purificação de ARFE-C2(10-13): isolamento de AR-3 (cafeoato de etila)....	213
5.4.7. Purificação de ARFE-C2(23-28): isolamento de AR-4 (canferol) .....	214
5.4.8. Tratamento cromatográfico de ARFE-A.....	215
5.4.9. Purificação de ARFE-A9-11: isolamento de AR-5 (3,4,3',4'-tetra-hidroxi-bifenila) .....	216
5.4.10. Purificação de ARFE-A12-16: isolamento de AR-6 (quercetina) e AR-7 (procianidina A-2) .....	217
<b>6. TESTES DE ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS</b> .....	219
<b>6.1. Atividade Antifúngica</b> .....	219
6.1.1. Testes de atividade fungitóxica com as amostras AM-2, AM-3, AR-3 e AR-7.....	220
6.1.1.1. Procedimento.....	220
6.1.1.2. Resultados e discussões.....	221
6.1.2. Testes de atividade fungitóxica com as amostras AM-7 e AM-8.....	222
6.1.2.1. Procedimento.....	222
6.1.2.2. Resultados e discussões.....	223
<b>6.2. Atividade Leishmanicida: Ensaio <i>in vitro</i></b> .....	224
6.2.1. Procedimento.....	224
6.2.3. Resultados e discussões.....	225
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	226
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	227

## 1. INTRODUÇÃO

A pesquisa fitoquímica tem por objetivos conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar sua presença. Entre estes constituintes, podem ser destacados os metabólitos secundários (conhecidos também por “micromoléculas”), que, por serem fatores de interação entre organismos, freqüentemente apresentam atividades biológicas interessantes. Muitos são de importância comercial, tanto na área farmacêutica quanto nas áreas alimentar, agrônômica e da perfumaria, entre outras. O uso de produtos naturais como matéria-prima para a síntese de substâncias bioativas, especialmente fármacos, tem sido amplamente relatado ao longo do tempo (SIMÕES *et al*, 2004).

A família Rubiaceae apresenta cerca de 650 gêneros (DELPRETE, 1999), de onde se tem obtido, por meio da investigação fitoquímica/farmacológica, uma vasta gama de substâncias das mais diversas classes de produtos naturais e com grande potencial bioativo. Pode-se destacar, dentre estes, o gênero *Psychotria* e seus alcalóides com atividade analgésica, anti-inflamatória (NINO *et al*, 2006), citotóxica, antifúngica, bactericida (ELISABETSKI *et al*, 1995), entre outras.

O gênero *Alibertia*, composto por cerca de 60 espécies com ocorrência relatada desde as Antilhas, México, América Central e América do Sul. Este gênero também tem se revelado, especialmente nas duas últimas décadas, bastante promissor no que diz respeito à sua avaliação fitoquímica, mesmo que a literatura ainda apresente poucos relatos a seu respeito. Apenas 4 espécies tiveram sua composição micromolecular estudada e divulgada até o momento: *Alibertia macrophylla* (BOLZANI; TREVISAN; YOUNG, 1991; da SILVA *et al*, 2007a; YOUNG *et al*, 1992), *A. edulis* (BROCHINI *et al*, 1994; da SILVA *et al*, 2008), *A. sessilis* (da SILVA *et al*, 2006, 2007b; OLEA; ROQUE; BOLZANI, 1997) e *A. myrciifolia* (LUCIANO *et al*, 2004; MILITÃO *et al*, 2005). Estas espécies têm revelado, dentre outros compostos, um grande número de triterpenos, ésteres do ácido cafeico, esteróides, lignanas, iridóides com atividade fungitóxica e flavonóides com atividade citotóxica contra células cancerígenas.

As espécies *A. myrciifolia* e *A. rigida* são arbustos que podem ter até 5 metros de altura, possuindo flores brancas dióicas (como característica do gênero). Foram isolados, anteriormente, cumarina, flavonas e triterpenos de *A. myrciifolia* (LUCIANO *et al*, 2004), porém, nenhum relato na literatura acerca de trabalhos fitoquímicos que abordem os constituintes fixos de *A. rigida* foi descrito até o momento. Tal constatação foi a motivação

para a realização deste trabalho. Aqui se encontra descrito o estudo fitoquímico dos extratos hexânico e etanólico dos talos de *A. myrciifolia* e do extrato etanólico das folhas *A. rigida*.

Este trabalho contém um texto dedicado às considerações botânicas relacionadas à família Rubiaceae e às espécies estudadas, destacando suas respectivas descrições morfológicas, distribuição geográfica e características gerais. Uma segunda parte na qual se encontra um levantamento bibliográfico dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de proantocianidinas tipo-A, compreendendo os anos de 1989 a 2008. A parte seguinte descreve a determinação estrutural das substâncias provenientes dos extratos hexânico (Fig. 1, abaixo) e etanólico (Fig. 2, Pág. 24) dos talos de *A. myrciifolia* e do extrato etanólico das folhas *A. rigida* (Fig. 3, Pág. 25). Os procedimentos experimentais realizados encontram-se descritos em seguida, sucedidos pela descrição dos testes farmacológicos realizados com algumas das substâncias isoladas das duas espécies. Por fim, encontram-se as conclusões sobre o trabalho realizado e as referências bibliográficas utilizadas, citadas conforme as normas da UFC (MELO *et al*, 2007).

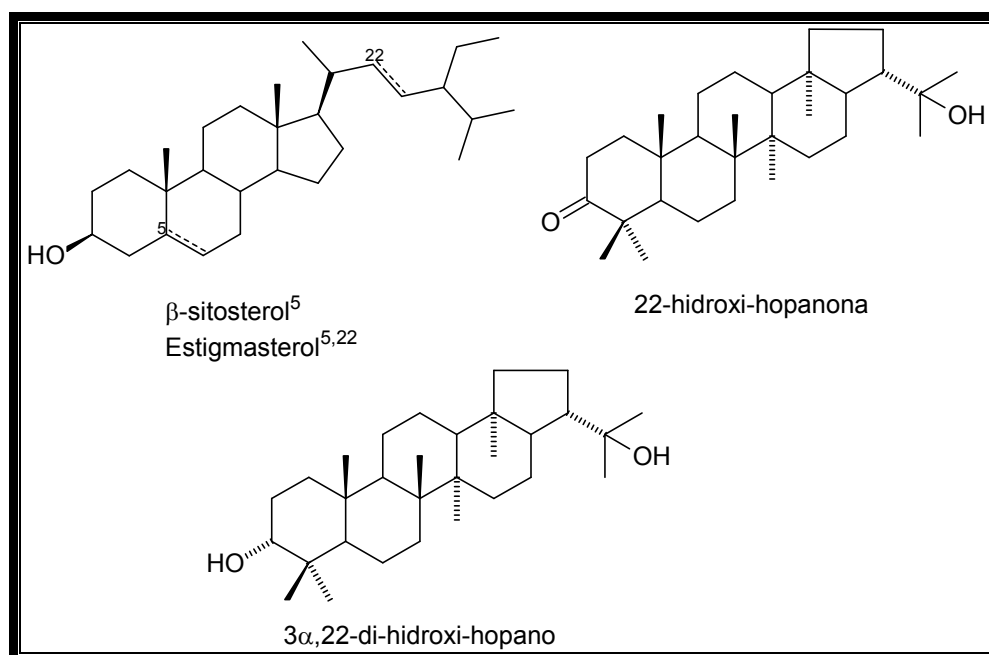


Figura 1: Substâncias isoladas do extrato hexânico dos talos de *A. myrciifolia*

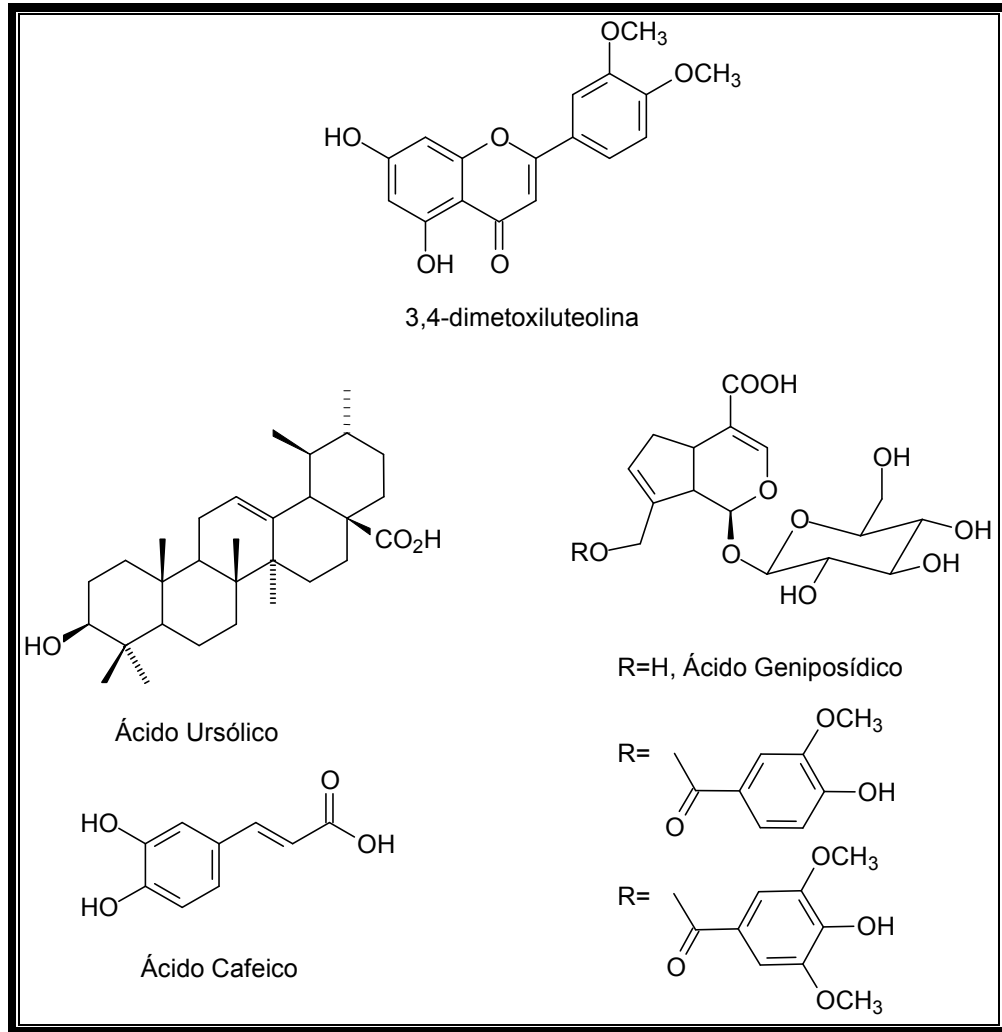


Figura 2: Substâncias isoladas do extrato etanólico dos talos de *A. myrciifolia*



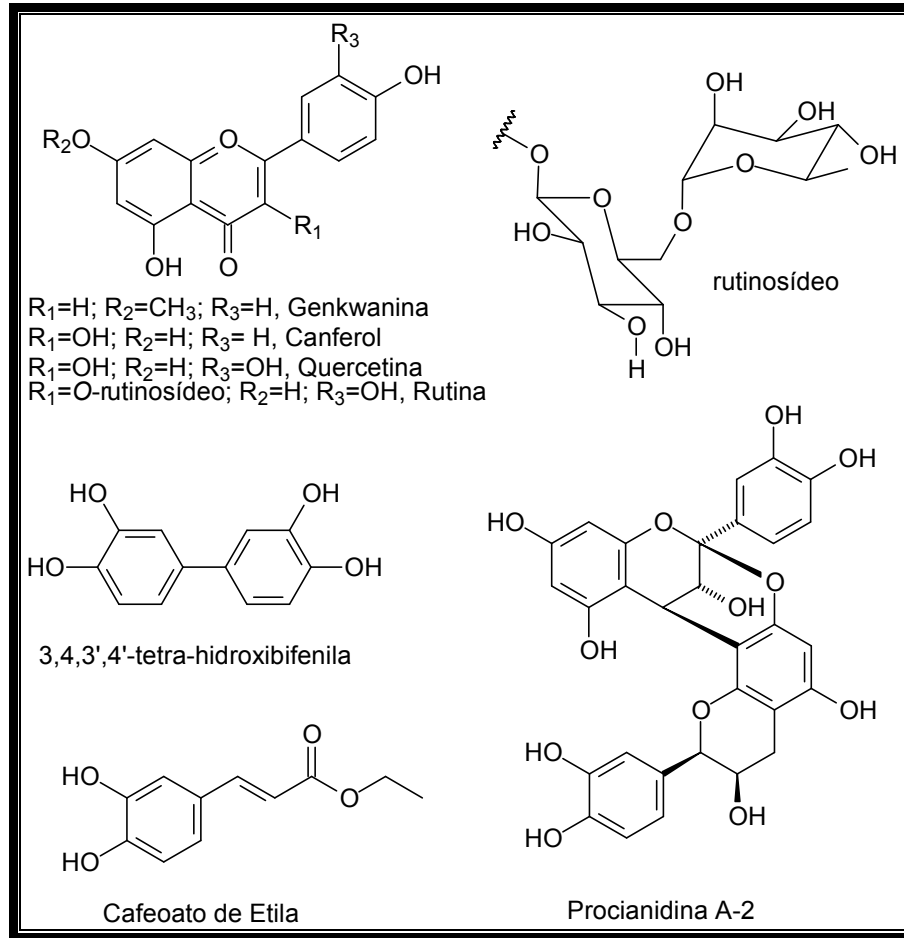


Figura 3: Substâncias isoladas de *A.rigida*

## 2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

### 2.1. Considerações Botânicas Sobre a Família Rubiaceae

A família Rubiaceae é uma das maiores famílias de dicotiledôneas, e possui distribuição cosmopolita, abrangendo cerca de 12000 espécies e 650 gêneros [DELPRETE, 1999]. Ocupa o quarto lugar em diversidade entre as Angiospermas, perdendo apenas para as Asteraceae, Orchidaceae e Fabaceae. *Psychotria* L. é o maior gênero da família, representado mundialmente por cerca de 1650 espécies. Para o Brasil são estimados 96 gêneros; para região Nordeste foram compilados 66 gêneros e 277 espécies [PEREIRA; BARBOSA, 2004].

Rubiaceae é uma das famílias mais facilmente reconhecíveis em estado vegetativo pelas folhas opostas, raramente verticiliadas, e principalmente pela presença de estípulas interpeciolares (intrapeciolares em *Isertia* e *Capirona*). Pode ser confundida no campo com espécies da família Apocynaceae, Sapotaceae e Violaceae, pelas folhas opostas e padrões de nervação semelhantes. Diferencia-se de Sapotaceae e Apocynaceae pela ausência de látex e de Violaceae apenas pelas estípulas interpeciolares. As inflorescências são basicamente cimosas, variam muito quanto ao tipo, forma e tamanho. As flores, actinomorfas, normalmente são brancas, amarelas ou azuis, possuem odor agradável e são geralmente hermafroditas; unissexuais nos gêneros *Alibertia*, *Amaioua*, *Duroia* e *Kotchubaea*. O cálice comumente é pequeno e em alguns gêneros, como *Capirona* e *Warszewiczia*, um dos lobos é expandido e colorido, constituindo uma estrutura de atração para polinizadores. Os frutos podem ser secos ou carnosos. Os frutos secos são capsulares e as sementes frequentemente aladas, dispersadas pelo vento. Os frutos carnosos podem ser bagas ou drupas de colorações variadas: amarelo, alaranjado, vermelho, azul, roxo ou preto [RIBEIRO, 1999].

Algumas espécies de Rubiaceae têm importância econômica, como o café (*Coffea arabica*) e, nas regiões neotropicais, o jenipapo (*Genipa americana*). Com relação à aplicação medicinal, *Cinchona officinale* é produtora de quinino. Existem espécies de *Palicourea* e *Psychotria* tóxicas para o gado; diversos gêneros, entre eles *Gardenia*, *Ixora* e *Mussaenda*, possuem espécies utilizadas como plantas ornamentais [RIBEIRO, 1999].

## 2.2. Considerações Botânicas Sobre a Espécie *Alibertia myrciifolia* Spruce ex K. Schum.

*Alibertia myrciifolia* (Figs. 4 e 5, Pág. 28) é uma espécie característica da família Rubiaceae, pertencente ao “grupo informal” *Alibertia*. Este grupo inclui aproximadamente 11 gêneros com 120 espécies distribuídas entre as famílias Rubiaceae e Gardenieae, de ocorrência estritamente neotropical. Indivíduos deste grupo são observados desde o sudoeste do México até o Nordeste da Argentina. Todos os membros do “grupo *Alibertia*” apresentam-se sem espinhos, como arbustos ou árvores dióicos e com flores brancas ou esbranquiçadas [PERSSON, 2000].

A espécie, que possui sinonímia *Cordia myrciifolia* Spr., é descrita por Pio Corrêa como:

“Arbusto com 2m de altura; pecíolo geralmente com 4-5 cm de comprimento, subcilíndrico com a base subengrossada, na face superior convexo, glabro; folha oblonga, raro oblongo-lanceolada ou oboval-lanceolada, curto-obtuso-acuminada, base aguda, coriácea, em ambas as faces, glabra, na face central nigrescente brilhante, na face dorsal prateada brilhante com 4-8 cm de comprimento, 2-4 cm de largura; flor masculina, disposta em inflorescências terminais de 6-8 flores; cálice com 1 mm de comprimento, cupular, truncado e denso glanduloso na face interior; corola com 10 mm de comprimento, hipocrateriforme, branca, dividida a 1/5 em 4 lacínios, tubo levemente estreitado na base, quadrangular; flor feminina solitária, estipitada; ovário grosso, cilíndrico, glabro, 3-locular; cálice igual ao da flor masculina; corola com 10 mm de comprimento, subtubulosa-quadrangular a 1/3 dividida em lacínios triangulares; estigma, trigono com os ramos curtos e grossos”.

*A. myrciifolia* tem ocorrência na Venezuela, Suriname, Guiana inglesa e no Brasil, especialmente no estado do Pará, Amazonas, Ceará e Goiás. Popularmente é conhecida por “marmelada-de-cachorro”, “fruta-de-cachorro” e “café bravo” [CORRÊA, 1984].



Figura 4 – Fotografia das flores de um espécime masculino de *A. myrciifolia* Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).



Figura 5 – Fotografia da flor de um espécime feminino de *A. myrciifolia*. Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).

### 2.3. Considerações Botânicas Sobre a Espécie *Alibertia rigida* K. Schum.

*Alibertia rigida* (Figs. 6 e 7, Pág. 30) tem como sinonímia *Cordia rigida* Kuntze. e, no território brasileiro, é encontrada nos estados da Bahia, Pernambuco, Maranhão, Ceará, Minas Gerais, Tocantins e Goiás. Ocorre em capoeiras e matas ciliares, nos cerrados e também nos campos rupestres entre pedras. Floresce de abril a junho e frutifica em setembro e outubro (CAMPOS *et al*, 2006).

CAMPOS *et al* (2006) descrevem *Alibertia rigida*, citando a Flora Brasiliensis, da seguinte forma:

Arvoretas ou arbustos 0,4-5 m alt. Caule e ramos pouco escamosos, cilíndricos, glabros. Estípulas triangulares, levemente costadas, ápice aristado, 3-7 cm compr., 3,5 cm larg. Folhas de duas dimensões diferentes, as menores subtendendo as inflorescências, obovadas a espatuladas, raramente elípticas, ápice obtuso, arredondado ou curtamente apiculado, margem revoluta, base atenuada, (3-)4,5-7,5(-10) cm compr., 2,5-3,5(-5,5) cm larg., firmemente cartáceas até coriáceas, discolores, face adaxial geralmente lustrosa, secando verde-oliváceas a atro-castanhas adaxialmente, abaxialmente oliváceas a castanhas, com retículo pouco visível, glabras, desprovidas de domácias nas axilas das nervuras. Flores 4-meras, cálice truncado, ca. 0,5-1 mm compr., corola alvo-amarelada, lobos externamente rosados, secando castanho-escuro e vernicosa, interna e externamente glabra; flores estaminadas em glomérulos multifloros, geralmente 4-8, corola ca. 6 mm compr., ca. 2 mm larg., estigma inteiro; flores pistiladas solitárias, corola 8-11 mm compr., ca. 2 mm larg., ovário (2)3-locular, estigma geralmente tripartido. Baga sub-globosa, verde-amarelada, 0,8-1 cm compr., 1-1,2 cm larg.



Figura 6 – Fotografia das flores de *A. rigida*. Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).



Figura 7 – Fotografia do fruto de *A. rigida*. Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).

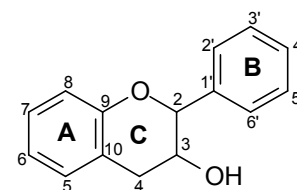
### 3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

#### 3.1. Levantamento dos Dados de RMN $^{13}\text{C}$ Para Proantocianidinas Tipo-A Publicados Entre os Anos de 1989 e 2008

As proantocianidinas estão difundidas por todo o reino vegetal. Acumulam-se nos frutos, nas folhas, no caule e nas sementes das plantas, onde fornecem proteção contra microorganismos patogênicos, insetos nocivos e grandes herbívoros. Ao mesmo tempo, conferem adstringência e sabor a bebidas tais como o vinho, sucos de frutas e chás [DIXON; SHARMA, XIE, 2005; XIE; DIXON, 2005]. Têm sido progressivamente reconhecidas como responsáveis por inúmeros benefícios à saúde humana, tais como [DIXON; SHARMA, XIE, 2005]:

- Previne a aterosclerose;
- Causa apoptose em células cancerígenas;
- Promove a recuperação cardíaca após isquemia;
- Possui efeito analgésico e anti-inflamatório.

Do ponto de vista químico, as proantocianidinas, conhecidas como taninos condensados, são os produtos finais, oligoméricos e poliméricos, da rota biossintética dos flavonóides (Fig. 8, Pág. 32) [DIXON; SHARMA, 2005]. Sua estrutura depende da natureza (estereoquímica e padrão de hidroxilação) do flavan-3-ol iniciador do polímero e das unidades seguintes, da posição e estereoquímica da ligação entre as unidades, do grau de polimerização e da presença ou ausência de grupamentos substituintes [XIE; DIXON, 2005].



Flavan-3-ol

A maioria das proantocianidinas tem como “monômeros” os flavan-3-óis (+)-catequina e (-)-epicatequina (Fig. 9, Pág. 32) [XIE; DIXON, 2005]. Porém, outras unidades de flavan-3-óis (epi)afzelequina e (epi)galocatequina, que também contém o padrão 2,3-*trans* (como na catequina) ou 2,3-*cis* (como na epicatequina) também são encontradas na composição destes compostos (Fig. 9, Pág. 32).

As proantocianidinas homo-oligoméricas com dois grupos hidroxila no anel B (3',4') [como as unidades (epi)catequina] são denominadas procianidinas, enquanto aquelas

com, pelo menos, uma unidade contendo somente um grupo 4'-hidroxil [(*epi*)afzelequina], ou um padrão 3',4',5'-tri-hidroxi [(*epi*)galocatequina], são chamadas propelargonidas ou prodelfinidas (Fig. 24, Pág. 49), respectivamente [XIE; DIXON, 2005].

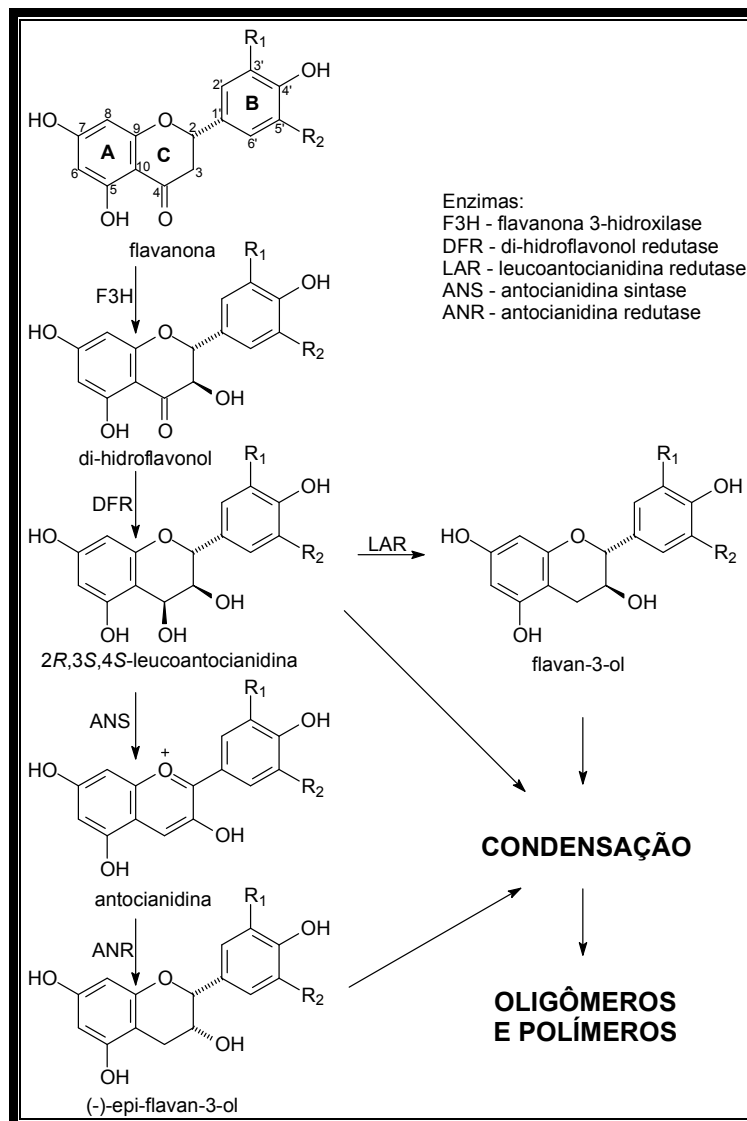


Figura 8 – Rota biossintética para a formação de proantocianidinas.

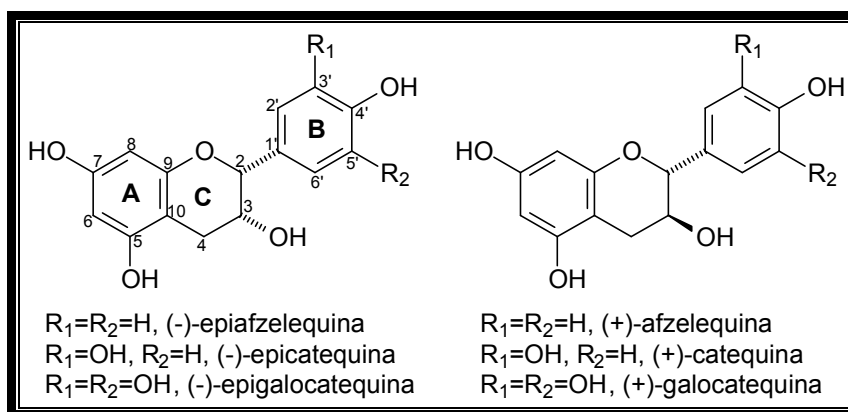


Figura 9 – Estruturas das unidades flavan-3-ol que compõem as proantocianidinas.



As ligações entre as unidades monoméricas nas proantocianidinas envolvem normalmente o carbono 4 da unidade “superior” e o 8 da “inferior” e podem ser  $\alpha$  ou  $\beta$  (Fig. 10, Pág. 33). Também podem ocorrer entre C-4 (superior) e C-6 (inferior) (proantocianidinas tipo-B). Nas proantocianidinas tipo-A, as ligações ocorrem entre ambos C-2 e C-4 da unidade superior e o oxigênio ligado ao C-7 e as posições 6 ou 8, respectivamente, da unidade inferior (Fig. 11, Pág. 34) [XIE; DIXON, 2005].

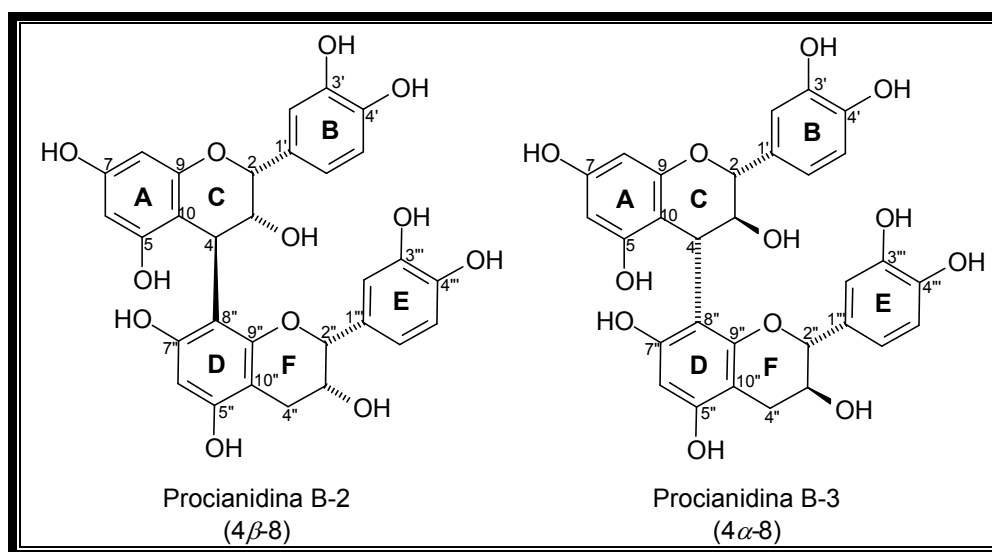


Figura 10 – Exemplos de proantocianidinas tipo-B apresentando as ligações  $4\beta-8$  e  $4\alpha-8$  entre as unidades monoméricas.

As proantocianidinas tipo-A são menos frequentemente isoladas de plantas do que as do tipo-B [XIE; DIXON, 2005]. Pode-se ter uma idéia da pequena quantidade de proantocianidinas tipo-A descritas na literatura química observando-se os dados descritos neste levantamento bibliográfico. O mesmo foi realizado através da base de dados do “SciFinder” analisando o período de publicação de 1989 a 2008. Este período foi escolhido porque, como o levantamento traz os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  descritos para proantocianidinas tipo-A, já existe na literatura uma compilação que apresenta dados publicados até o ano de 1989 [AGRAWAL, 1989]. Encontram-se aqui catalogadas 50 substâncias diferentes, entre procianidinas, propelargonidinas e prodelfinidinas (sejam dímeros, trímeros, tetrâmeros ou pentâmeros). A motivação para realização deste levantamento bibliográfico se deu pelo isolamento de uma proantocianidina em *Alibertia rigida*.

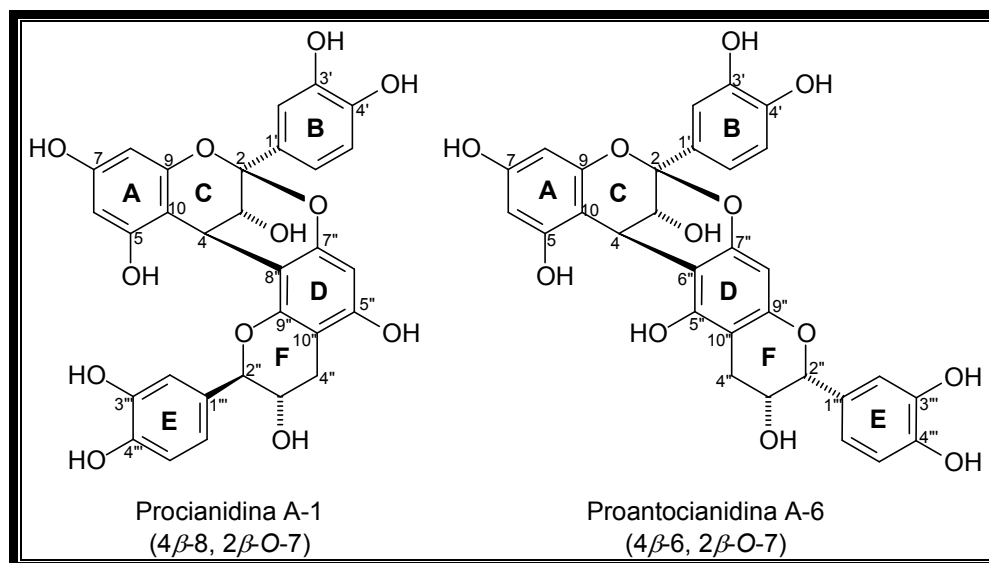


Figura 11 – Exemplos de proantocianidinas tipo-A apresentando as ligações (4 $\beta$ -8, 2 $\beta$ -O-7) e (4 $\beta$ -6, 2 $\beta$ -O-7) entre as unidades monoméricas.

A tabela 1 (Pág. 35) apresenta a relação das proantocianidinas tipo-A descritas na literatura entre os anos de 1989 e 2008, contendo as fontes botânicas (espécie) de onde foram isoladas, os solventes empregados para obtenção dos espectros de RMN, a potência do aparelho no qual os espectros foram obtidos e as referências bibliográficas correspondentes.

As figuras 12 a 24 (Págs. 37 a 49) contêm as estruturas químicas das proantocianidinas tipo-A e os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  relativos a estes compostos. Em algumas destas estruturas faltam dados de RMN relativos a alguns carbonos. Isso se deve ao fato de que estes dados não se encontram nos artigos em que tais substâncias são relatadas. Observa-se ainda que os deslocamentos químicos dos carbonos presentes nas unidades monoméricas que mais se apresentam diferentes, entre as diversas substâncias relatadas, são os deslocamentos dos carbonos 2, 3, 4, 6'', 7'' e 8'', ou seja, os átomos de carbono em que ocorrem as conexões entre estas unidades monoméricas.

Tabela 1 – Proantocianidinas tipo-A descritas na literatura entre os anos de 1989-2008 que apresentam dados de RMN <sup>1</sup>H.

COMPOSTO	ESPÉCIE	SOLVENTE	POT.	REFERÊNCIA
<b>Procianidinas</b>				
<b>I – Dímeros</b>				
1	<i>Parameria laevigata</i>	CD <sub>3</sub> OD	100	KAMIYA <i>et al</i> , 2001
2-5	<i>Arachis hypogaea</i>	CD <sub>3</sub> OD	67,5	LOU <i>et al</i> , 1999
6	<i>Pavetta owariensis</i>	CD <sub>3</sub> OD	50,1	BALDÉ <i>et al</i> , 1991a
7	<i>Pavetta owariensis</i>	(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO	50,1	BALDÉ <i>et al</i> , 1991b
8	<i>Theobroma cacao</i>	(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO + D <sub>2</sub> O	125	HATANO <i>et al</i> , 2002
9	<i>Theobroma cacao</i>	CD <sub>3</sub> OD	75	PORTER <i>et al</i> , 1991
<b>II – Trímeros</b>				
10	<i>Parameria laevigata</i>	CD <sub>3</sub> OD	100	KAMIYA <i>et al</i> , 2001
11	<i>Pavetta owariensis</i>	CD <sub>3</sub> OD	50,1	BALDÉ <i>et al</i> , 1991b
12	<i>Parameria laevigata</i>	CD <sub>3</sub> OD	100	KAMIYA <i>et al</i> , 2001
13	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	CD <sub>3</sub> OD	75	FOO <i>et al</i> , 2000
14	<i>Aescullus hippocastanum</i>	(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO	25	MORIMOTO <i>et al</i> , 1987
15	<i>Pavetta owariensis</i>	CD <sub>3</sub> OD	50,1	BALDÉ <i>et al</i> , 1991b
16	<i>Pavetta owariensis</i>	CD <sub>3</sub> OD	150	BALDÉ <i>et al</i> , 1991b
17	<i>Pavetta owariensis</i>	CDCl <sub>3</sub>	50,1	BALDÉ <i>et al</i> , 1993
18	<i>Pavetta owariensis</i>	CD <sub>3</sub> OD	150	BALDÉ <i>et al</i> , 1991b
19	<i>Parameria laevigata</i>	CD <sub>3</sub> OD	100	KAMIYA <i>et al</i> , 2003
20-21	<i>Pavetta owariensis</i>	CD <sub>3</sub> OD	150	BALDÉ <i>et al</i> , 1995a
22	<i>Parameria laevigata</i>	CD <sub>3</sub> OD	100	KAMIYA <i>et al</i> , 2001
23-24	<i>Theobroma cacao</i>	(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO+D <sub>2</sub> O	125	HATANO <i>et al</i> , 2002
<b>III – Tetrâmeros</b>				
25	<i>Parameria laevigata</i>	CD <sub>3</sub> OD	100	KAMIYA <i>et al</i> , 2001
26-27	<i>Pavetta owariensis</i>	CD <sub>3</sub> OD	150	BALDÉ <i>et al</i> , 1995b
28	<i>Parameria laevigata</i>	CD <sub>3</sub> OD	100	KAMIYA <i>et al</i> , 2003
29	<i>Parameria laevigata</i>	CD <sub>3</sub> OD	100	KAMIYA <i>et al</i> , 2003
30	<i>Parameria laevigata</i>	CD <sub>3</sub> OD	100	KAMIYA <i>et al</i> , 2001
31	<i>Parameria laevigata</i>	CD <sub>3</sub> OD	100	KAMIYA <i>et al</i> , 2003
<b>IV – Pentâmero</b>				

32	<i>Pavetta owariensis</i>	CD <sub>3</sub> OD	50	BALDÉ <i>et al</i> , 1995a
<b>Procianidinas/Propelargonidinas</b>				
33-35	<i>Pavetta owariensis</i>	CD <sub>3</sub> OD	150	BALDÉ <i>et al</i> , 1995b
<b>Propelargonidinas</b>				
<b>I – Dímeros</b>				
36-37	<i>Geranium niveum</i>	CD <sub>3</sub> OD	125	CALZADA <i>et al</i> , 1999
38	<i>Geranium niveum</i>	CD <sub>3</sub> OD	125	CALZADA <i>et al</i> , 2001
39-40	<i>Prunus armeniaca</i>	(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO	125	PRASAD, 2000
41	<i>Prunus armeniaca</i>	(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO	125	RAWAT <i>et al</i> , 1998
42-43	<i>Prunus armeniaca</i>	(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO	125	RAWAT <i>et al</i> , 1999
44	<i>Prunus prostata</i>	CD <sub>3</sub> OD	50	BILIA <i>et al</i> , 1996
45	<i>Prunus armeniaca</i>	(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO	125	RAWAT <i>et al</i> , 1998
46	<i>Prunus armeniaca</i>	(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO+CD <sub>3</sub> OD	125	PRASAD <i>et al</i> , 1998
47-48	<i>Cassipourea gummiflua</i>	CDCl <sub>3</sub>	50	DREWES; TAYLOR, 1994
<b>II – Trímero</b>				
49	<i>Geranium niveum</i>	CD <sub>3</sub> OD	125	CALZADA <i>et al</i> , 2001
<b>Prodelfinidinas</b>				
<b>I – Dímero</b>				
50	<i>Dioclea lasiophylla</i>	CD <sub>3</sub> OD	75	BARREIROS <i>et al</i> , 2000

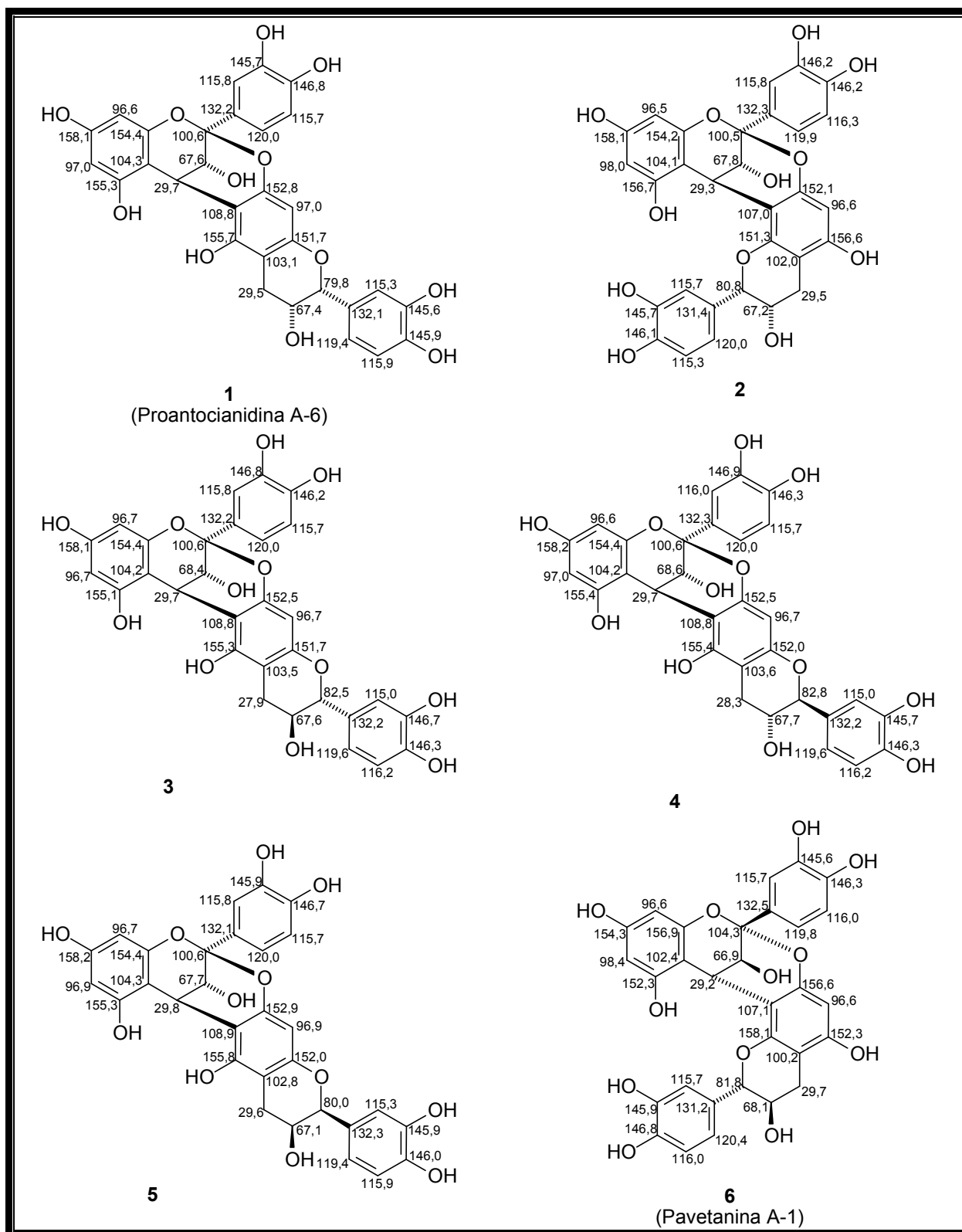


Figura 12 – Procianidinas diméricas descritas na literatura (1-6) com dados de RMN  $^{13}\text{C}$ .

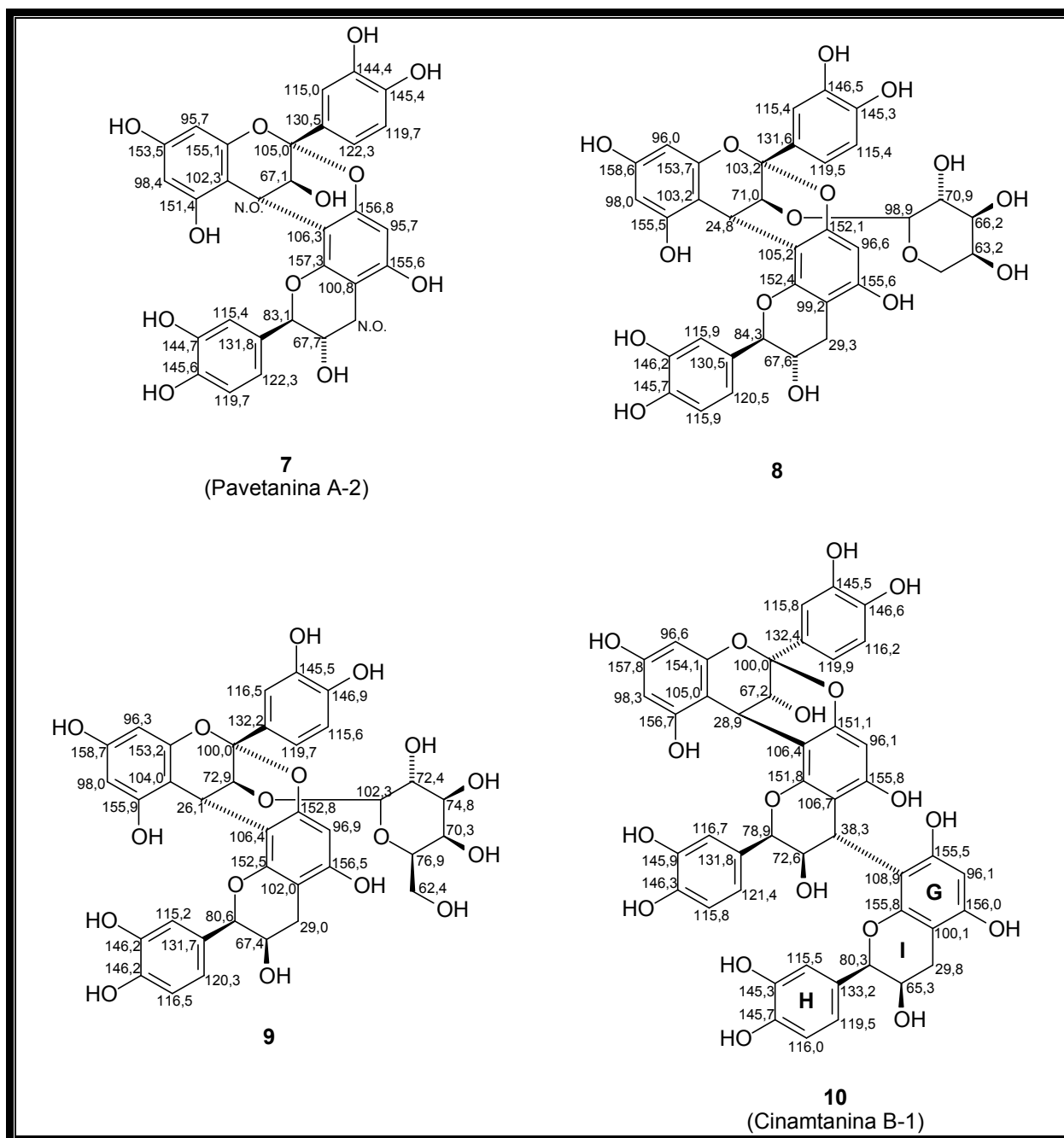


Figura 13 – Procianidinas diméricas e uma trimérica descritas na literatura (7-10) com dados de RMN  $^{13}\text{C}$ .

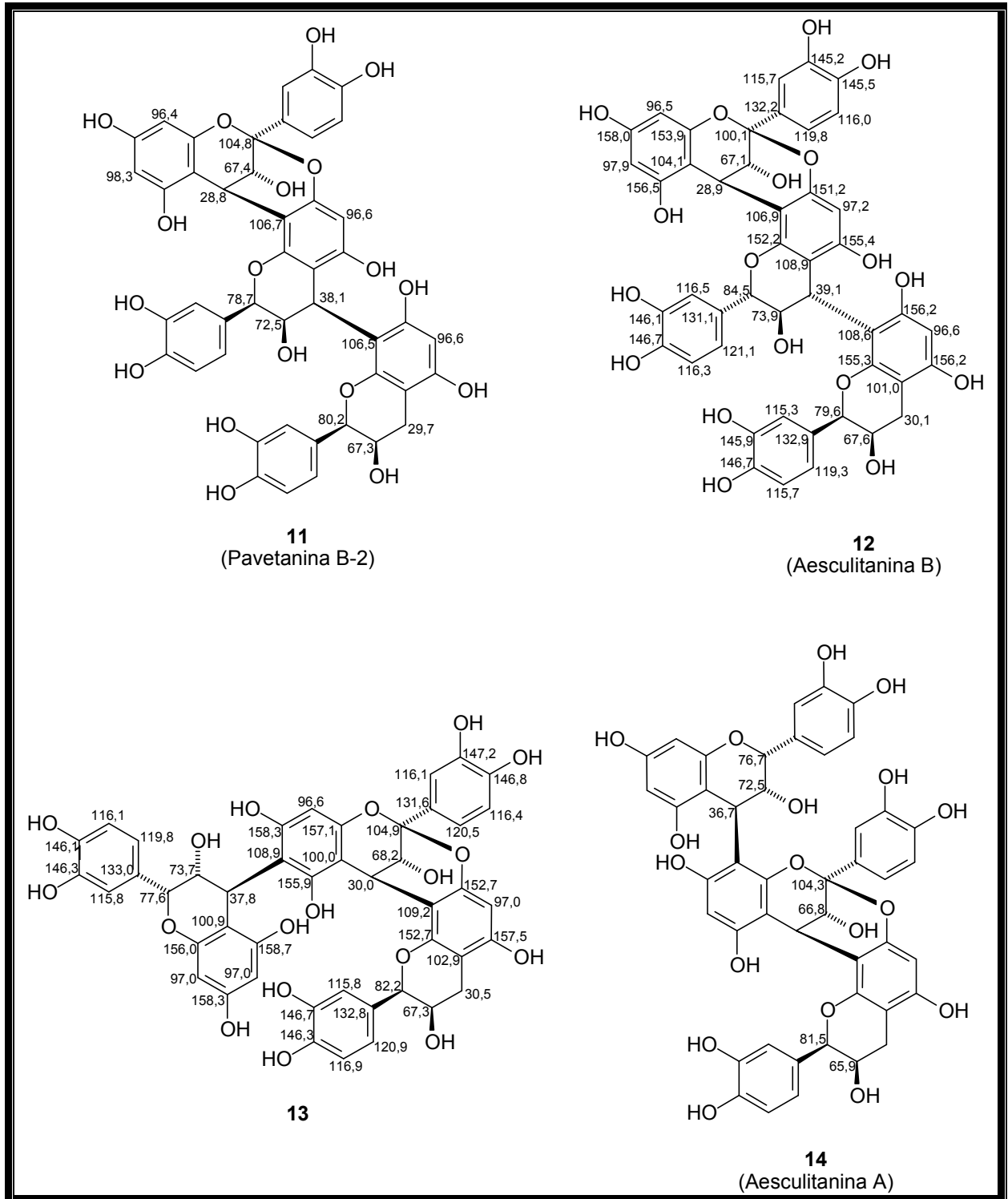


Figura 14 – Procianidinas triméricas descritas na literatura (11-14) com dados de RMN  $^{13}\text{C}$ .

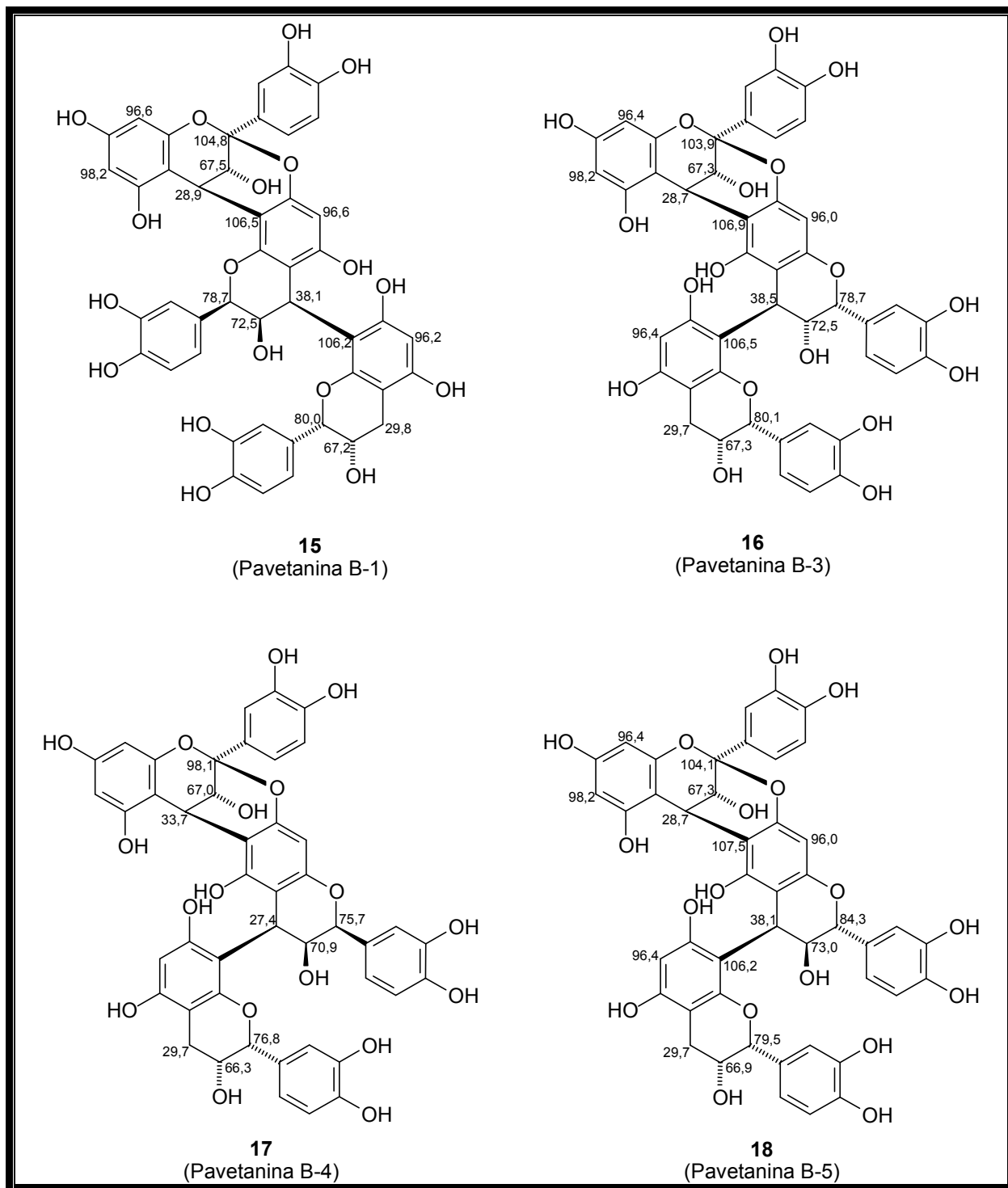


Figura 15 – Procianidinas triméricas descritas na literatura (15-18) com dados de RMN  $^{13}\text{C}$ .



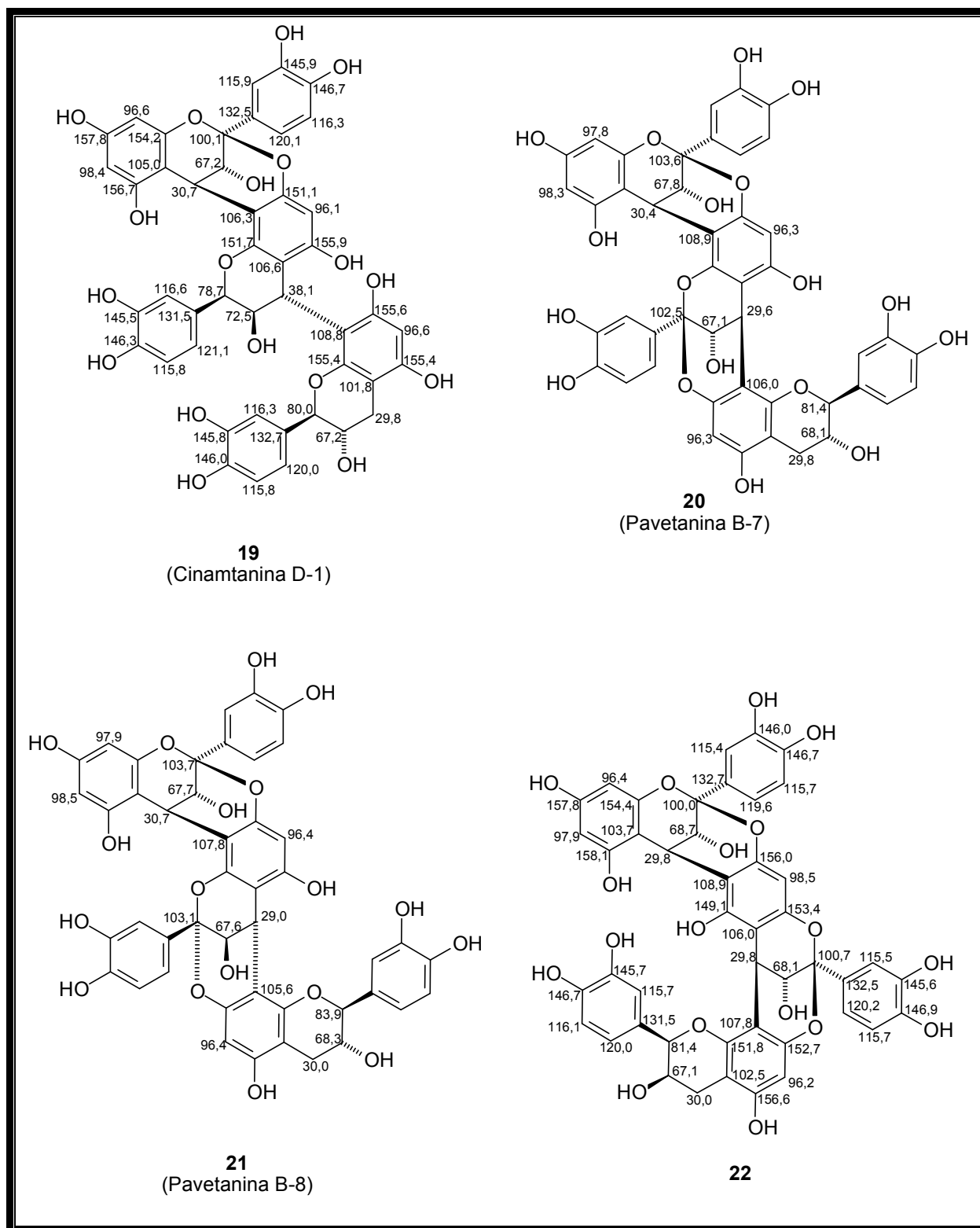


Figura 16 – Procianidinas triméricas descritas na literatura (19-22) com dados de RMN <sup>13</sup>C.

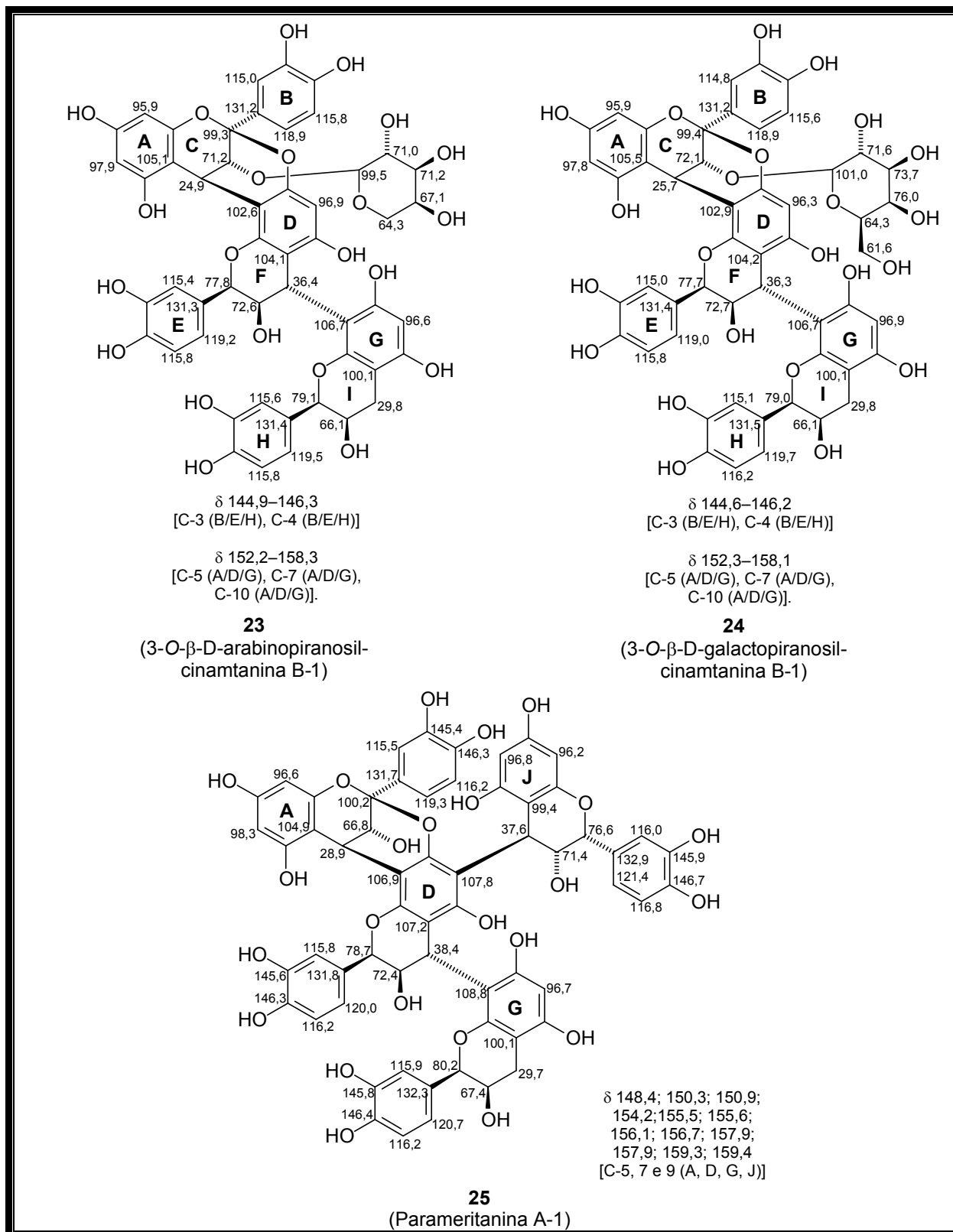


Figura 17 – Procianidinas triméricas e uma tetramérica descritas na literatura (23-25) com dados de RMN  $^{13}\text{C}$ .

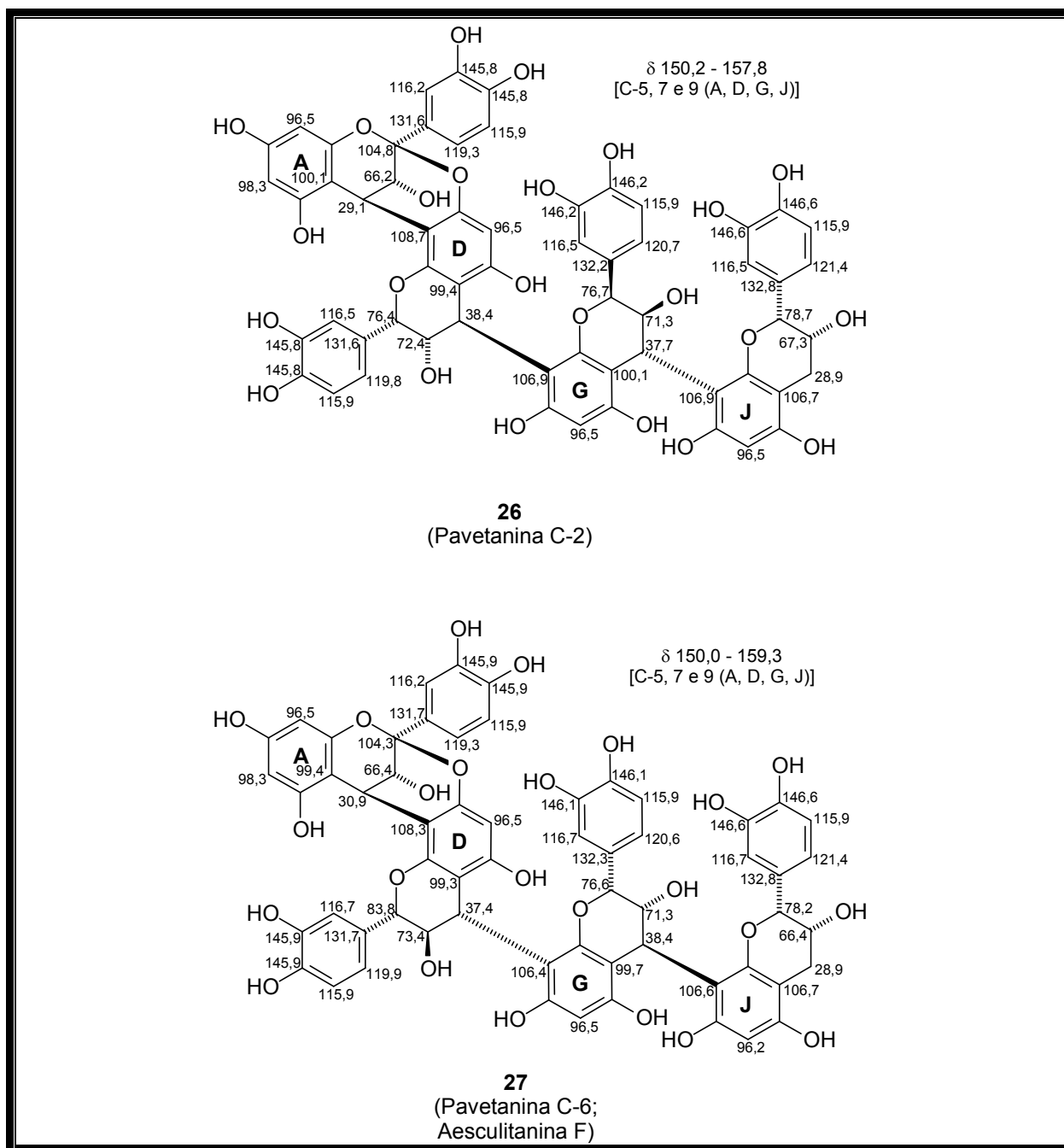


Figura 18 – Procianidinas tetraméricas descritas na literatura (26-27) com dados de RMN  $^{13}\text{C}$ .

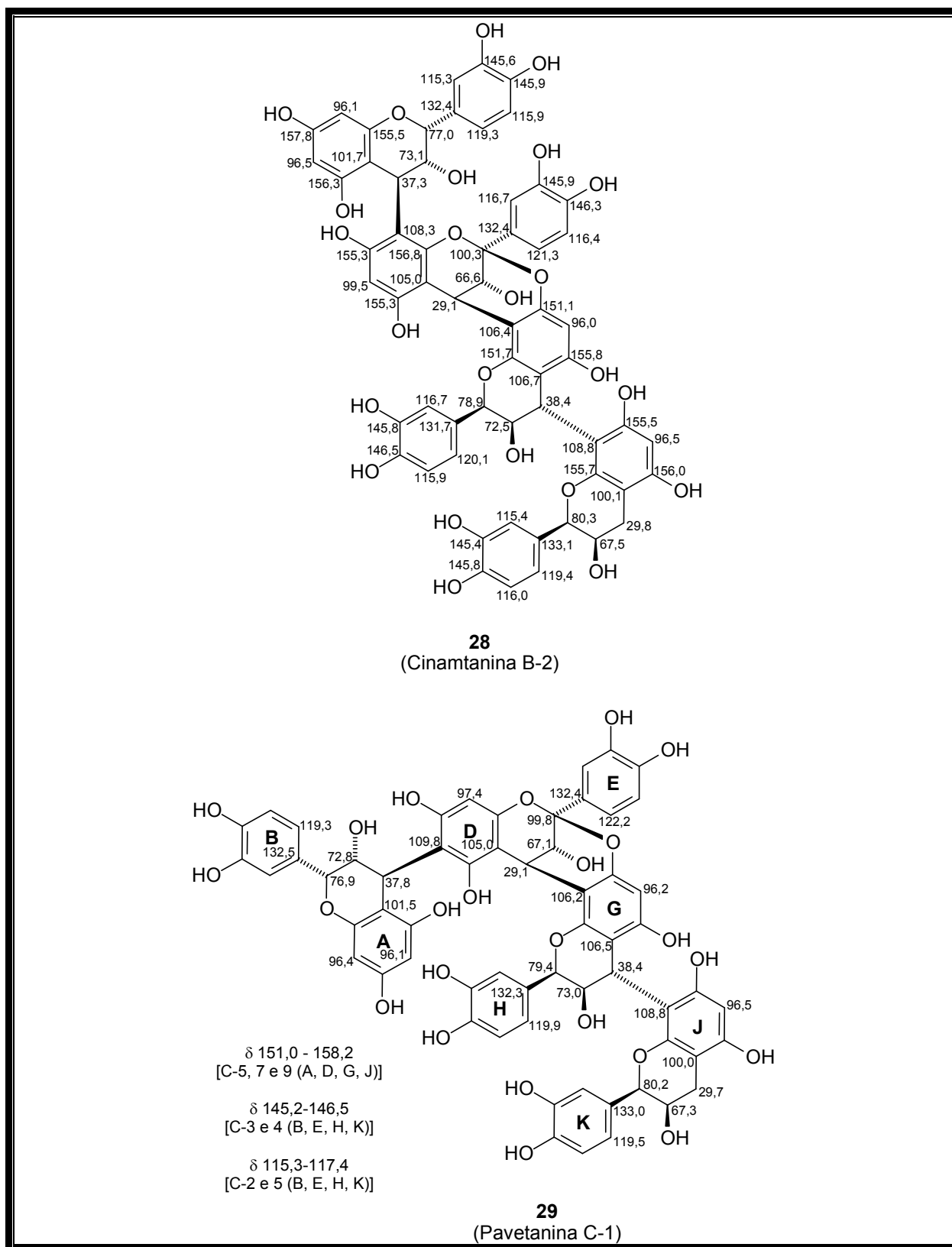


Figura 19 – Procianidinas tetraméricas descritas na literatura (28-29) com dados de RMN  $^{13}\text{C}$ .

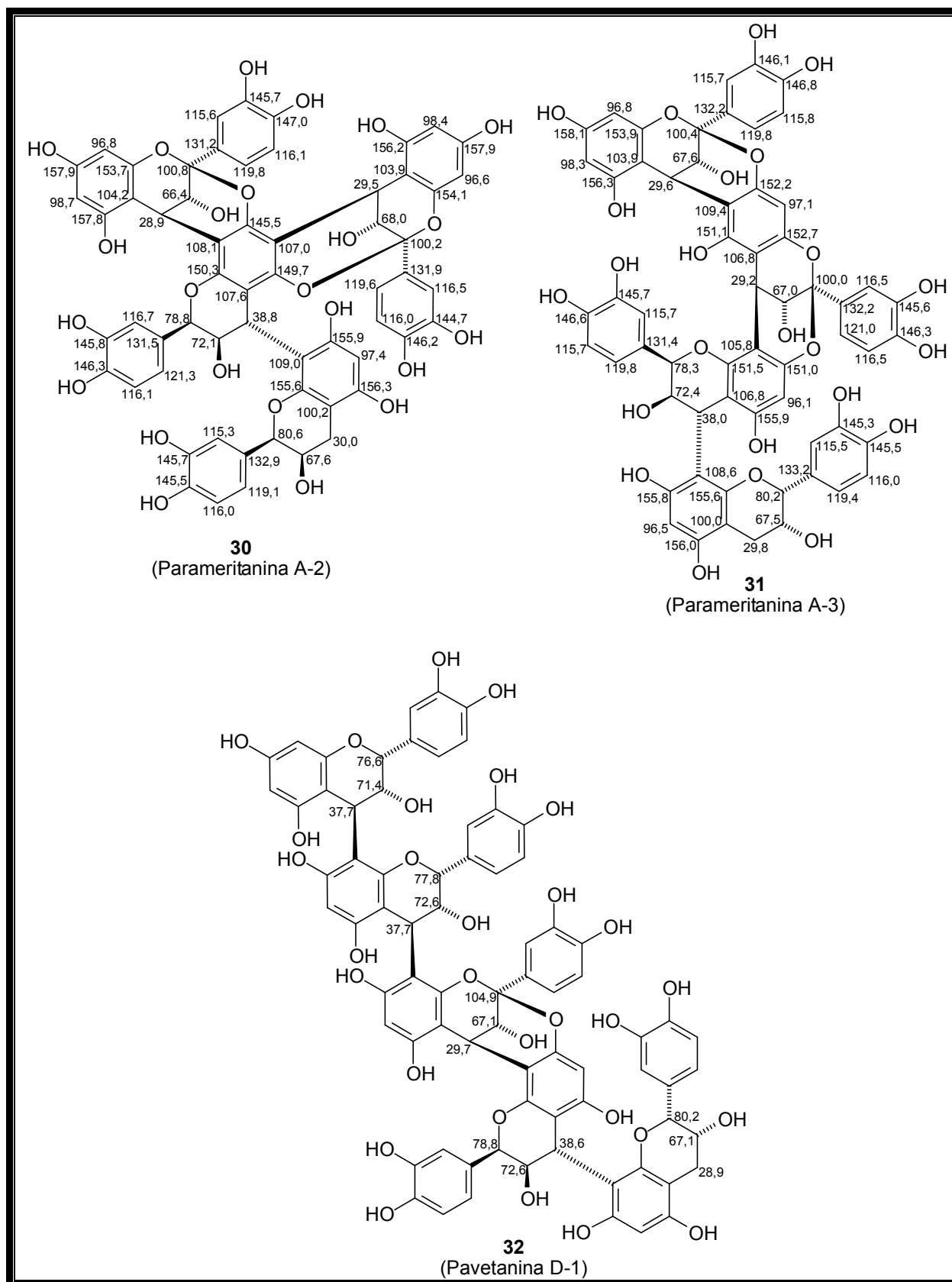


Figura 20 – Procianidinas tetraméricas e uma pentamérica descritas na literatura (30-32) com dados de RMN  $^{13}\text{C}$ .

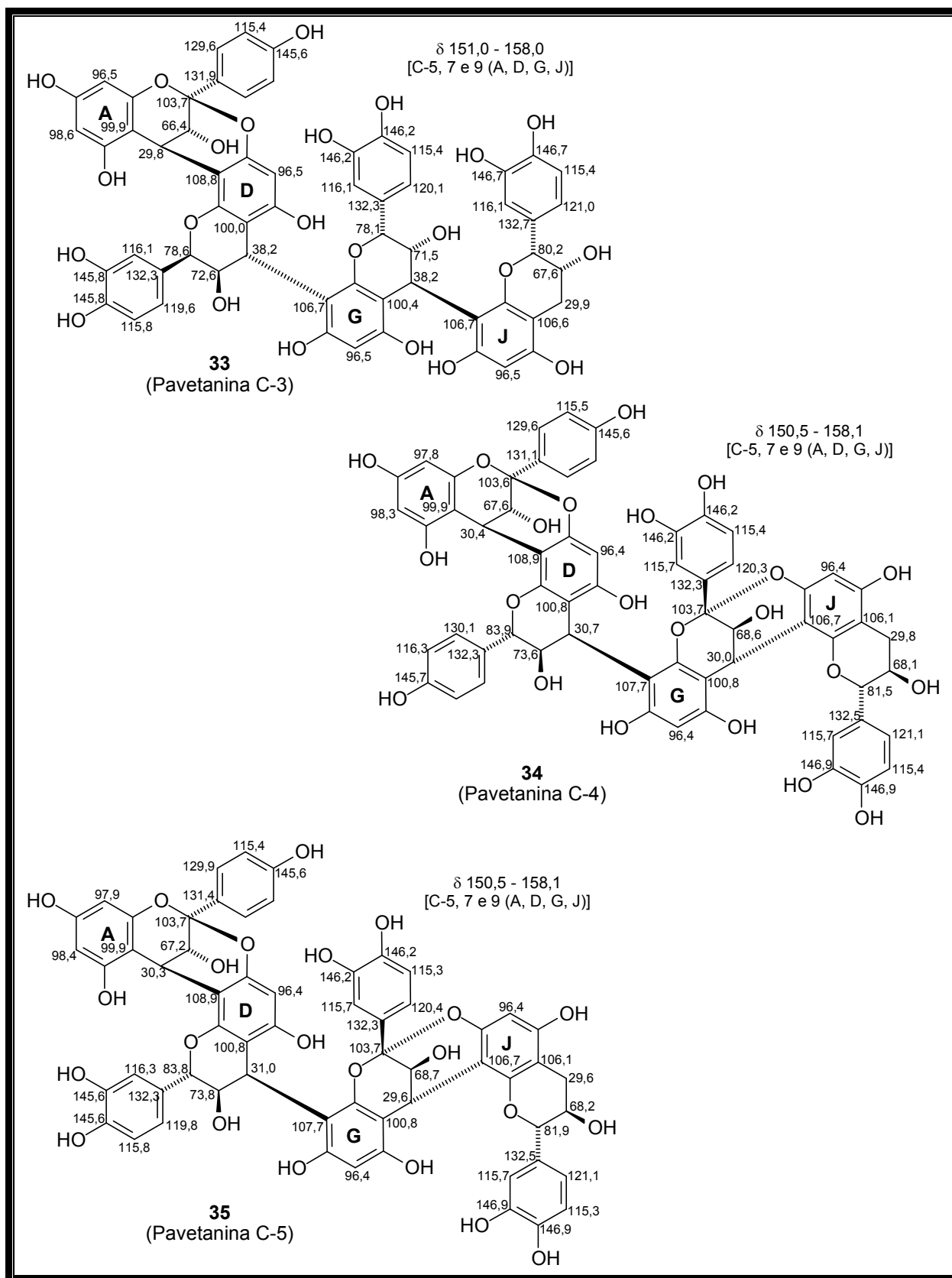


Figura 21 – Procianidinas/Propelargonidinas tetraméricas descritas na literatura (33-35) com dados de RMN  $^{13}\text{C}$ .

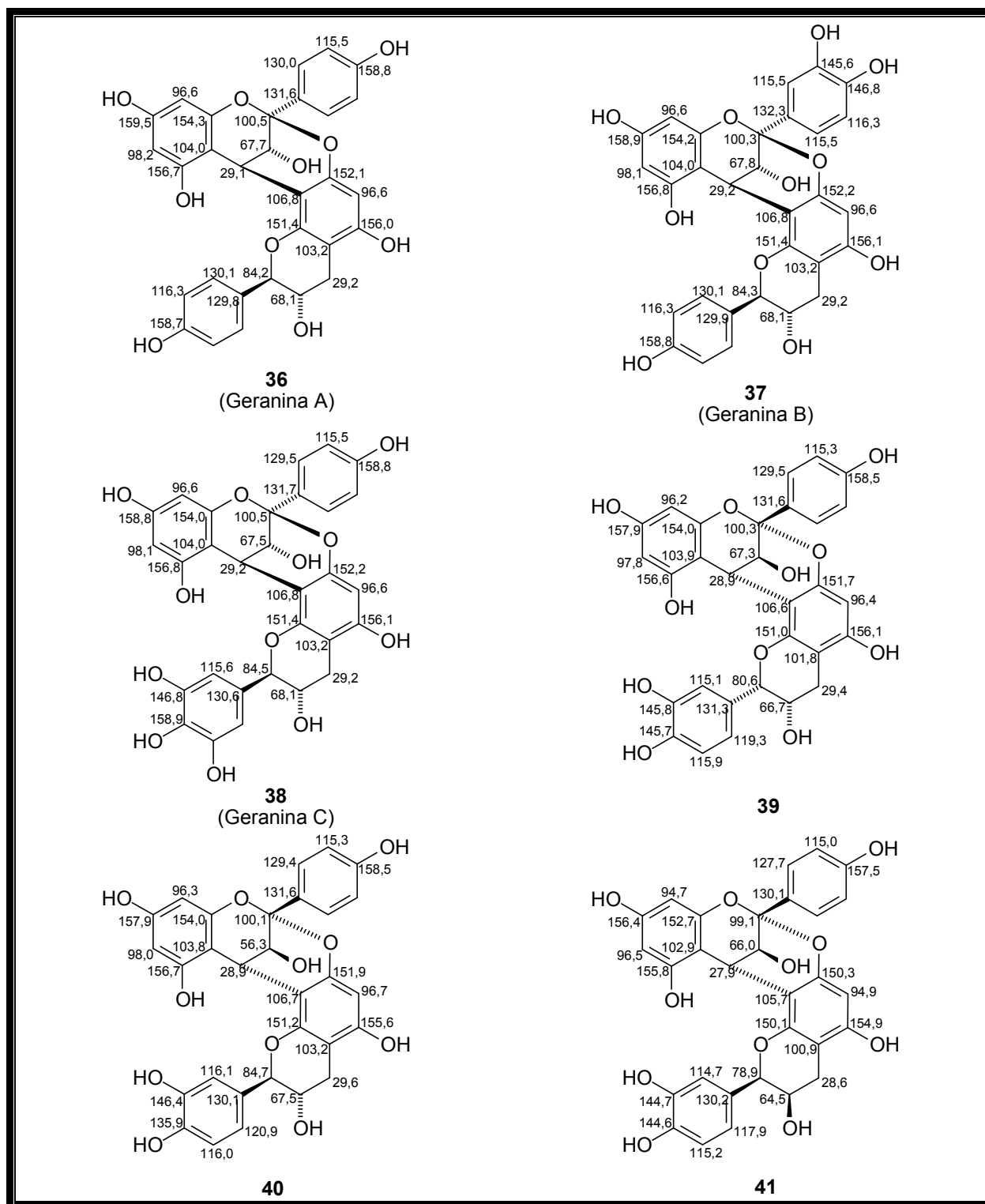


Figura 22 – Propelargoninidas diméricas descritas na literatura (36-41) com dados de RMN  $^{13}\text{C}$ .

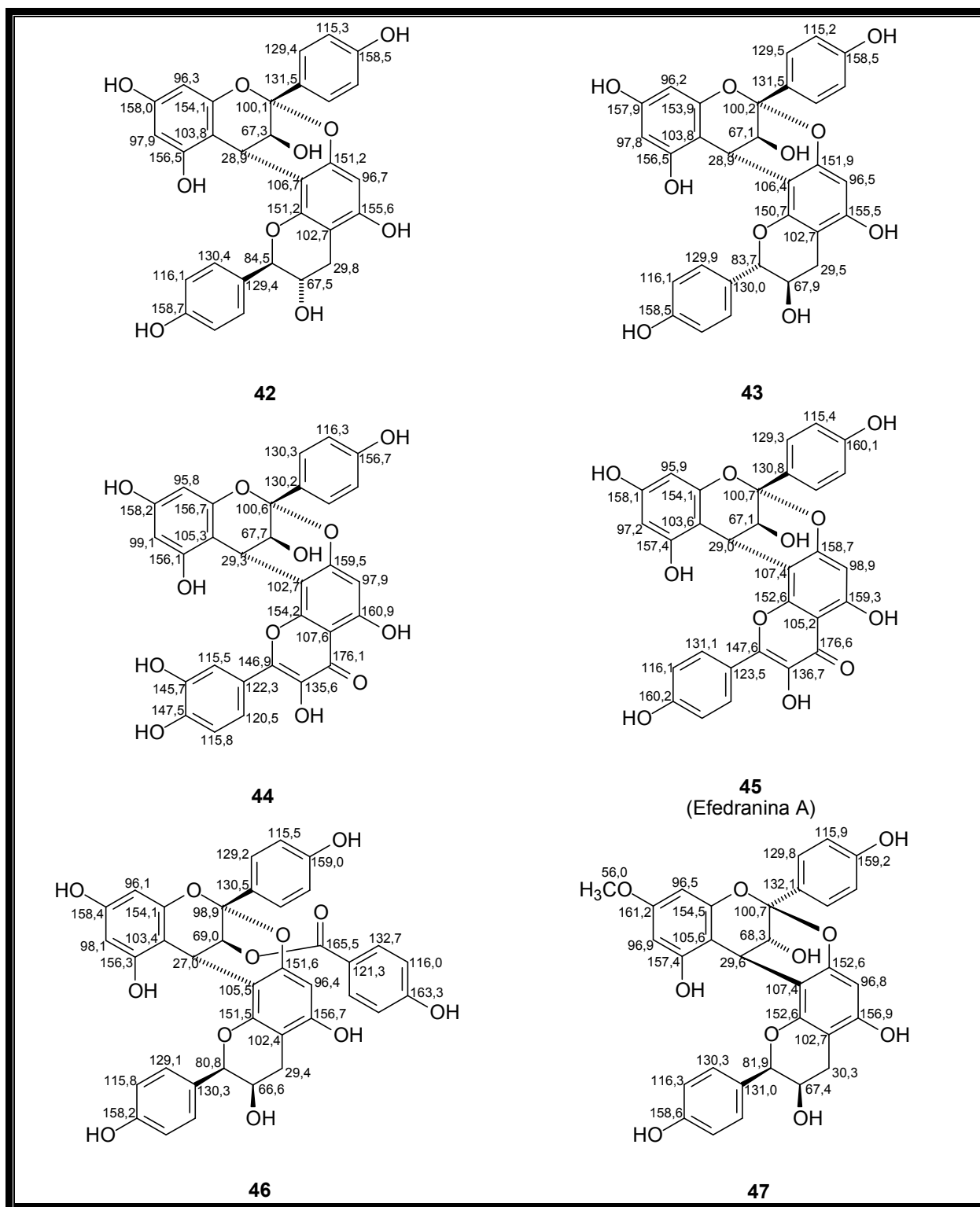


Figura 23 – Propelargonidinas diméricas descritas na literatura (42-47) com dados de RMN  $^{13}\text{C}$ .





## 4. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

### 4.1. Determinação Estrutural dos Constituintes Químicos Não-Voláteis do Extrato Hexânico dos Talos de *Alibertia myrciifolia*

#### 4.1.1. Determinação estrutural de AM-1

AM-1, um sólido amorfo branco (faixa de fusão: 156-159 °C), foi obtido através do tratamento cromatográfico em coluna de sílica “flash” da fração AcOEt, proveniente do tratamento cromatográfico em gel de sílica do extrato hexânico dos talos de *A. myrciifolia* (Fluxograma 1, Pág. 196).

A análise espectroscópica de AM-1 foi efetuada através de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  e infravermelho. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Fig. 26, Pág. 52) indicou sinais característicos de hidrogênios olefínicos em  $\delta_{\text{H}}$  5,35 (d,  $J = 8,4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  5,15 (dd,  $J = 15,1$  e  $8,4$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  5,01 (dd,  $J = 15,1$  e  $8,4$  Hz), de hidrogênio carbinólico  $\delta_{\text{H}}$  3,52 (1H, m), e os situados na região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,69 e  $\delta_{\text{H}}$  2,29 foram relacionados aos vários grupos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Fig. 28, Pág. 53) apresentou vinte e nove linhas espectrais majoritárias, das quais quatro destas encontram-se na região de desblindagem. De acordo com o espectro DEPT 135° (Fig. 29, Pág. 53), os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  140,9 (C) e 121,9 (CH) caracterizam uma dupla ligação trissubstituída, enquanto que os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  138,5 (CH) e 129,5 (CH), foram associados a uma dupla ligação dissubstituída. Em adição, o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  72,0 indicou a presença de um carbono carbinólico na molécula. A análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  revelou que AM-1 tratava-se de uma mistura esteroideal binária.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 27, Pág. 52) apresentou uma banda em  $3434\text{ cm}^{-1}$  compatível com deformação axial de ligação O-H; absorções em  $2943$  e  $2862\text{ cm}^{-1}$  características de deformações axiais de ligação  $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ , uma banda em  $1649\text{ cm}^{-1}$  que pôde ser associada a vibrações de deformação axial C=C de alcenos, além das bandas em  $1241$  a  $1056\text{ cm}^{-1}$ , associadas às vibrações de deformação axial da ligação C-O.

Esses dados, quando confrontados com dados espectroscópicos presentes na literatura [ALMEIDA *et al*, 2005], permitiram propor que AM-1 tratava-se da mistura de esteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, de larga ocorrência no reino vegetal.

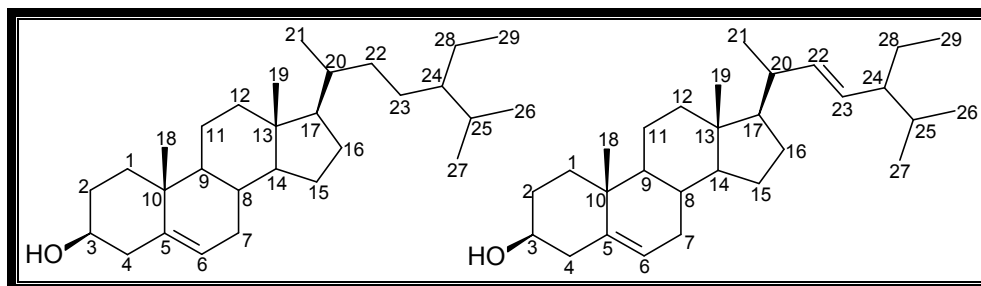


Figura 25 – Estrutura do  $\beta$ -sitosterol e do estigmasterol, respectivamente.

Tabela 2 – Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de AM-1 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) com os descritos na literatura para os esteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol (25 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

C	AM-1	$\beta$ -sitosterol	AM-1	estigmasterol
	$\delta_c$	$\delta_c$	$\delta_c$	$\delta_c$
1	37,5	37,2	37,5	37,4
2	29,1	31,6	29,1	31,7
3	72,0	71,8	72,0	74,1
4	42,5	42,3	42,5	38,3
5	140,9	140,7	140,9	139,8
6	121,9	121,7	121,9	122,8
7	31,9	31,9	31,9	32,0
8	32,1	31,9	32,1	32,0
9	50,4	50,1	50,4	50,3
10	36,7	36,5	36,7	36,7
11	21,3	21,1	21,3	21,1
12	39,9	39,8	39,9	39,8
13	42,5	42,3	42,5	42,3
14	57,1	56,7	57,1	56,9
15	24,6	24,3	24,6	24,5
16	29,1	28,2	29,1	28,9
17	56,2	56,0	56,2	56,1
18	12,0	11,8	12,3	12,1
19	19,6	19,4	19,6	19,3
20	36,7	36,1	40,7	40,6
21	19,3	19,0	19,3	21,1
22	32,1	33,9	138,5	138,5
23	25,6	26,1	129,5	129,5
24	46,1	45,8	51,5	51,4
25	29,1	29,1	29,1	32,0
26	19,2	18,7	19,2	19,0
27	21,3	19,8	21,4	21,1
28	23,3	22,0	25,6	25,5
29	12,2	11,9	12,4	12,2

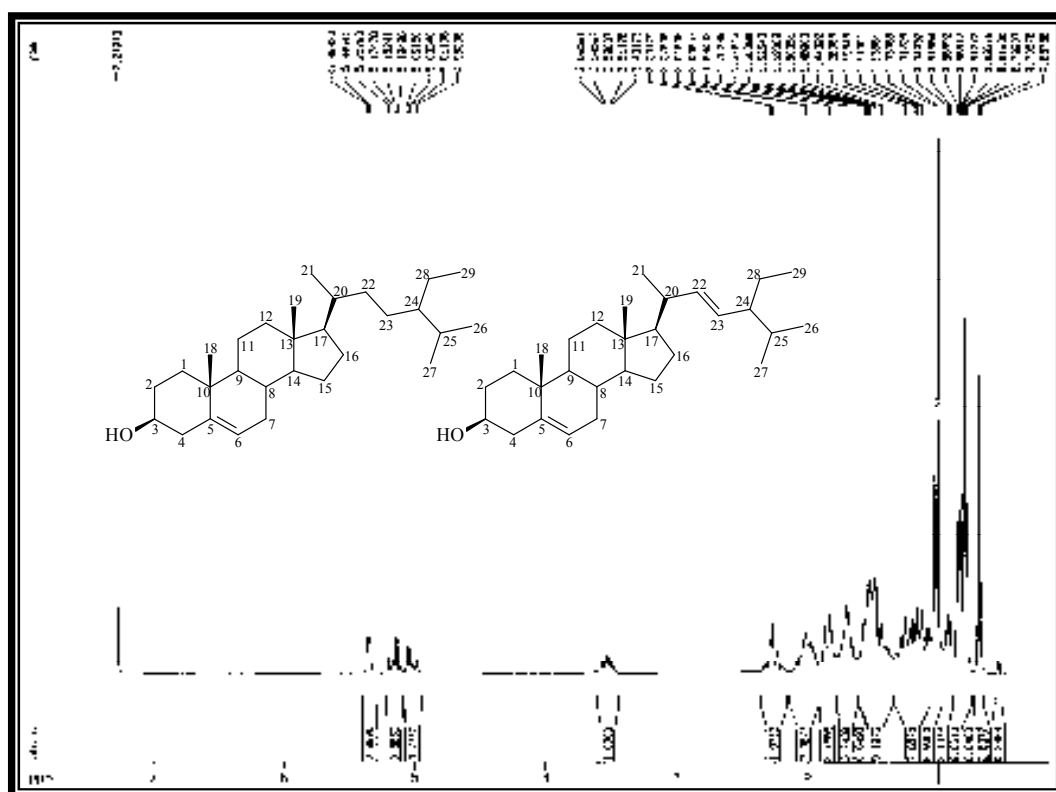


Figura 26 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de AM-1

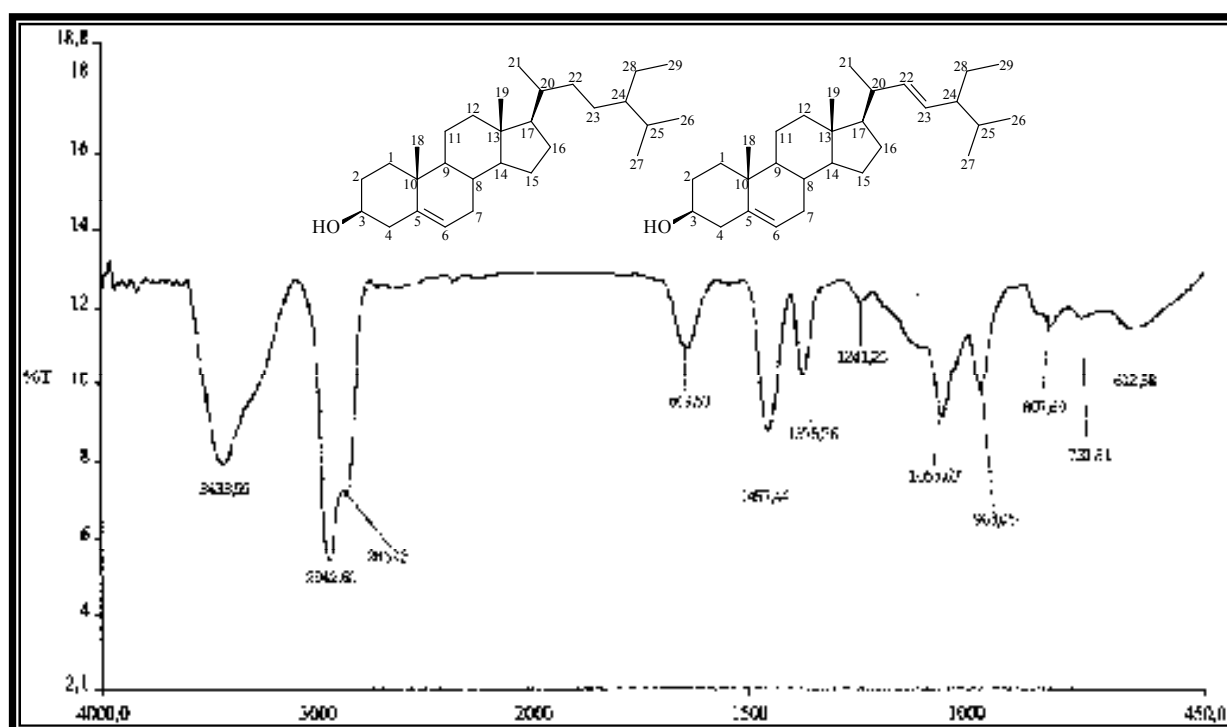


Figura 27 – Espectro de absorção na região do I.V. de AM-1 com pastilhas de KBr.

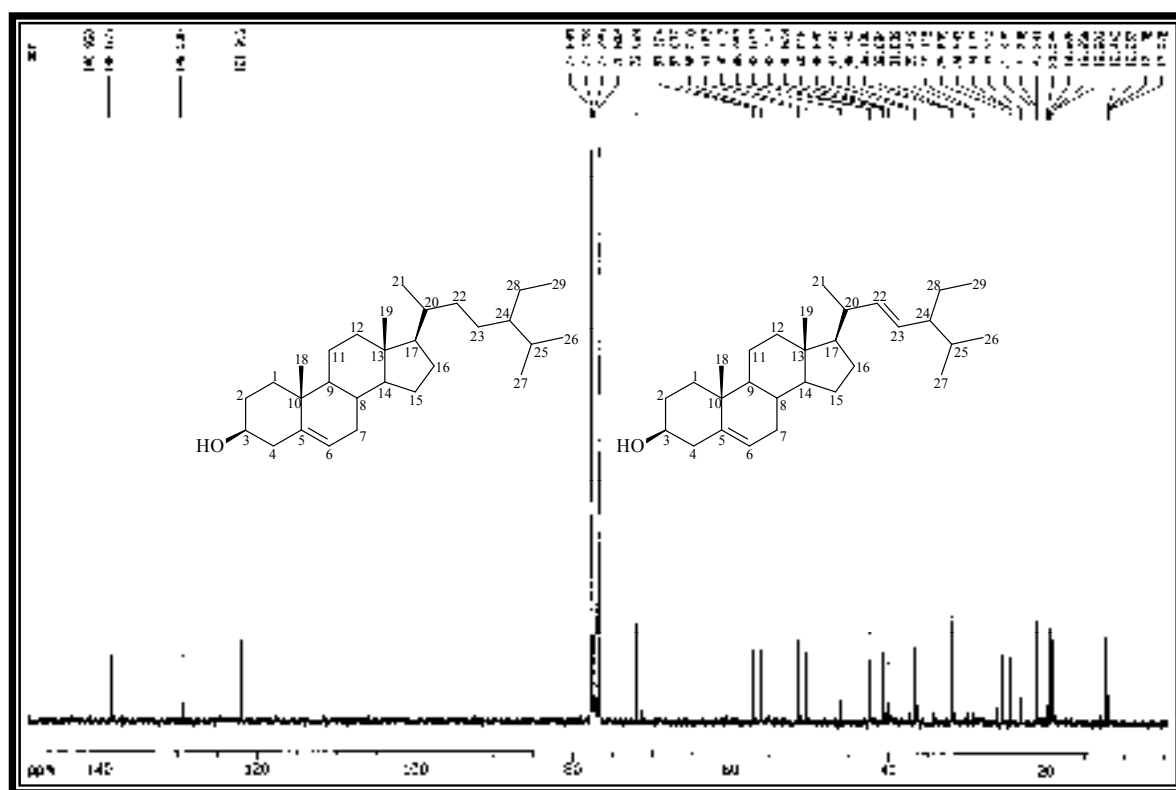


Figura 28 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) de AM-1

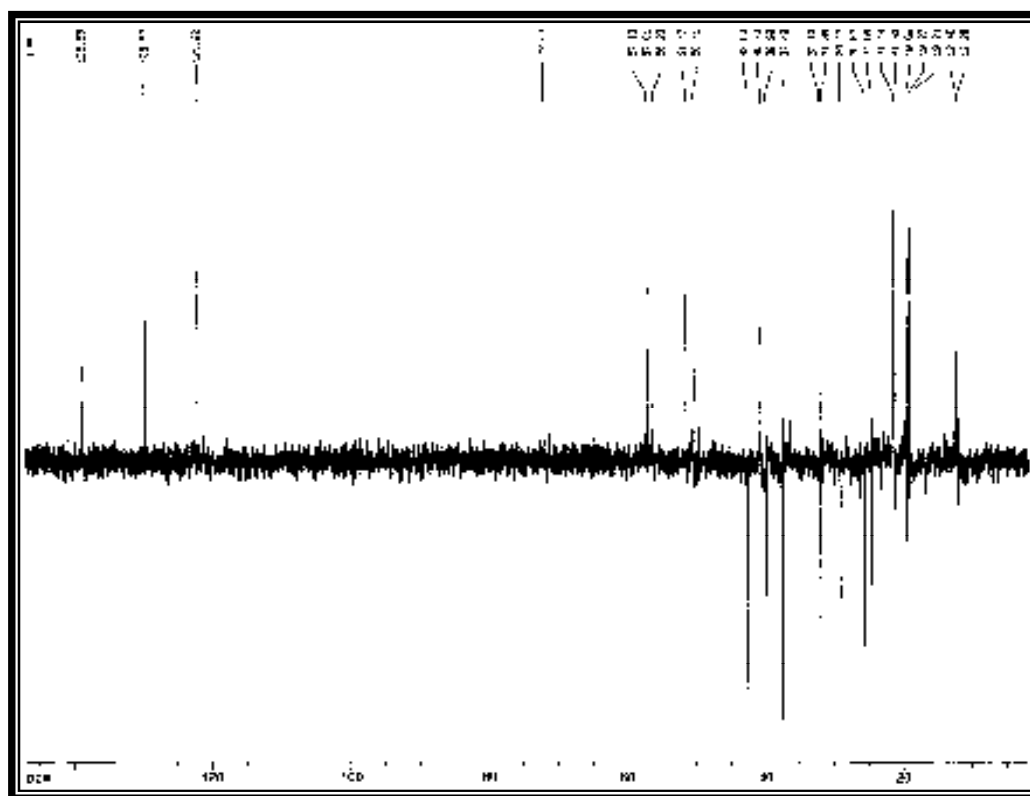


Figura 29 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) de AM-1

#### 4.1.2. Determinação estrutural de AM-2

Sucessivos tratamentos cromatográficos, em coluna de sílica “flash”, da fração AcOEt do extrato hexânico dos talos de *A. myrciifolia* forneceram um sólido cristalino de cor branca com ponto de fusão entre 249,1 e 251,7 °C, o qual foi denominado AM-2 (Fluxograma 1, Pág. 196).

A análise do espectro de absorção na região do infravermelho de AM-2 (Fig. 32, Pág. 59) mostrou uma banda em 3467 cm<sup>-1</sup>, correspondente à deformação axial de ligação O-H, caracterizando a presença de hidroxila na molécula. As absorções em 2946, 2883 e 2860 cm<sup>-1</sup> foram correlacionadas aos estiramentos das ligações C<sub>sp3</sub>-H e a absorção intensa em 1708 cm<sup>-1</sup> relativa à deformação axial da ligação C=O de carbonila. O sinal em 1446 cm<sup>-1</sup> foi relacionado às deformações angulares da ligação C-H dos carbonos metilênicos e ainda uma absorção em 1147 cm<sup>-1</sup> foi atribuída à deformação axial da ligação C-O.

Observando-se o espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de AM-2 (Fig. 33, Pág. 59), foi possível visualizar a presença de sinais apenas entre δ 2,48 e δ 0,77. Destes, os multipletos localizados na faixa de δ 2,48-1,29 foram associados às absorções de hidrogênios ligados a carbonos metilênicos e metílicos de um esqueleto terpenoídico. Os sinais em δ 2,49 (1H), δ 2,40 (1H) e δ 2,24 (1H) foram atribuídos a hidrogênios ligados a carbonos vizinhos ao carbono carbonílico e ao carbinólico, corroborando os dados observados no espectro de IV. O espectro exibiu ainda oito sinais simples e intensos em δ 1,21, 1,18, 1,08, 1,03, 1,01, 0,96, 0,93, e 0,77, relativos a grupos metila ligados a carbonos não-hidrogenados.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C-BB (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de AM-2 (Fig. 34, Pág. 60) apresentou vinte e nove linhas espectrais, dentre as quais, as observadas em δ 218,3 e 74,1 foram atribuídas, respectivamente, a uma carbonila cetônica e a um carbono saturado oxigenado. As demais absorções exibidas no espectro foram relacionadas a carbonos saturados não funcionalizados.

Comparando-se os espectros de RMN <sup>13</sup>C-BB e RMN <sup>13</sup>C-DEPT 135 (Fig. 35, Pág. 60), pôde-se definir o padrão de hidrogenação dos carbonos da molécula, através da presença de sete carbonos não-hidrogenados (δ 218,3, 74,1, 47,5, 44,2, 42,1, 42,8 e 37,0), cinco carbonos metínicos (δ 55,0, 54,1, 51,2, 50,2 e 49,8), dez metilênicos (δ 41,7, 39,7, 34,6, 34,4, 32,8, 26,8, 24,3, 22,1, 21,8 e 19,9) e oito metílicos (δ 31,1, 28,9, 26,8, 21,3, 17,1, 16,6, 16,4 e 15,9). A tabela 3 (Pág. 55) contém os dados de RMN <sup>13</sup>C obtidos para AM-2.

Tabela 3 – Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de AM-2 por padrão de hidrogenação:

C	CH	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	Total
218,3	55,0	41,7	31,1	
74,1	54,1	39,7	28,9	
47,5	51,2	34,6	26,8	
44,2	50,2	34,4	21,3	
42,1	49,8	32,8	17,1	
42,8		26,8	16,6	
37,0		24,3	16,4	
		22,1	15,9	
		21,8		
		19,9		
C <sub>7</sub>	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>24</sub>	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>
<b>1 x =O (carbonila de cetona); 1 x OH</b>				

A reunião dos dados espectroscópicos de AM-2 permitiu sugerir a fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$ , com índice de deficiência de hidrogênio igual a seis. Desta forma, foi proposta a estrutura triterpênica pentacíclica de esqueleto do tipo lupano ou hopano, uma vez que um dos ciclos presentes na estrutura deve ser um ciclopentano substituído com um grupamento 2(2-hidroxipropil). Este fato foi observado pelo deslocamento químico das metilas ligadas ao carbono carbinólico ( $\delta$  31,1, 28,9).

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a uma ligação, com detecção no canal de hidrogênio (HSQC) (Fig. 36, Pág. 61; Fig. 37, Pág. 61) permitiu associar inequivocamente alguns sinais de hidrogênios a seus respectivos carbonos, como se observa na tabela 4 (Pág. 57).

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , com detecção no canal de hidrogênio (HMBC) (Fig. 38, Pág. 62), mostrou os acoplamentos a mais de uma ligação entre hidrogênios e carbonos ( $^2J_{\text{CH}}$  e  $^3J_{\text{CH}}$ ). A análise deste espectro permitiu confirmar que AM-2 possuía esqueleto do tipo hopano. Para tal determinação foram observadas as correlações dos sinais dos hidrogênios em  $\delta$  1,21 e 1,18 com os carbonos em  $\delta$  51,2 e 74,1, além do acoplamento do hidrogênio em  $\delta$  1,50 com o carbono em  $\delta$  74,1. A localização da carbonila foi determinada pelos acoplamentos dos hidrogênios em  $\delta$  2,49, 1,85,

1,08 e 1,03 com o carbono carbonílico em  $\delta$  218,3. Tais correlações podem ser visualizadas nas sub-estruturas para AM-2 (Fig. 30, Pág. 56).

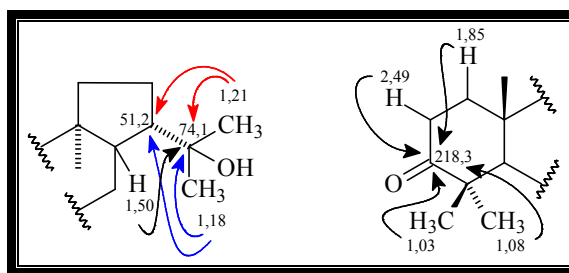


Figura 30 – Sub-estruturas para AM-2

O espectro de massa, obtido por impacto eletrônico a 70 eV (Fig. 39, Pág. 63), confirmou a fórmula molecular  $C_{30}H_{50}O_2$  ao apresentar o pico do íon molecular  $[M]^{\dagger}$  em  $m/z$  442 daltons. A figura 40 (Pág. 63) apresenta uma proposta mecanística para as fragmentações que justificam os picos principais registrados no espectro de massa de AM-2.

A reunião de todos os dados espectroscópicos obtidos para AM-2 através da detalhada análise de seus espectros, bem como a comparação destes com aqueles registrados na literatura para triterpenos de esqueleto hopano, permitiram determinar que AM-2 se tratava do 22-hidroxi-3-oxo-A'-neogamacerano (22-hidroxi-hopanona) (Fig. 31, Pág. 56), anteriormente isolado de espécies dos gêneros *Lithocarpus* e *Castanopsis* [AHMAD; RAHMAN, 1994].

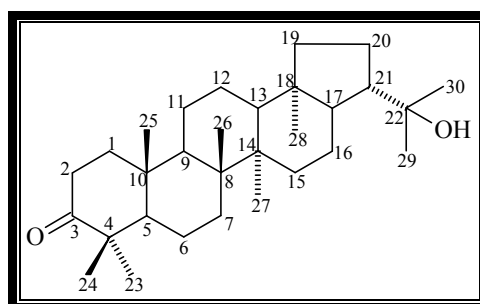


Figura 31 – Estrutura da 22-hidroxi-hopanona



Tabela 4 – Correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (HSQC e HMBC) de AM-2:

<i>C</i>	$^{13}\text{C-BB}$	<i>HSQC</i>	<i>HMBC</i>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	39,7	1,85; 1,40		0,93
2	34,4	2,49 (m); 2,40 (m)		
3	218,3	-	2,49; 2,40	1,85; 1,08; 1,03
4	47,6	-	1,03; 1,08	
5	55,0	1,30		1,85; 1,08; 1,03; 0,93
6	19,9	1,48-1,42 (m)		
7	32,8	1,52; 1,30		1,01
8	41,8	-	1,01	0,96
9	49,8	1,40		1,01; 0,93
10	37,0	-	0,93	
11	21,8	1,65-1,50		
12	24,3	1,55-1,40		
13	50,2	1,32		0,96; 0,77
14	42,1	-	0,96	1,01
15	34,6	1,60; 1,26		0,96
16	22,1	1,94; 1,37		
17	54,1	1,50 (m)		0,77
18	44,2	-	0,77	
19	41,7	1,55; 0,95		0,77
20	26,8	1,80; 1,53		
21	51,2	2,24 (ddl, $J=11,9$ e 10,8 Hz)		1,21; 1,18
22	74,1	-	1,21; 1,18	1,50
23	26,8	1,08 (s)		1,03
24	21,3	1,03 (s)		1,08
25	16,4	0,93 (s)		1,85
26	16,6	1,01 (s)		
27	17,1	0,96 (s)		
28	15,9	0,77 (s)		
29	28,9	1,18 (s)		1,21
30	31,1	1,21 (s)		1,18

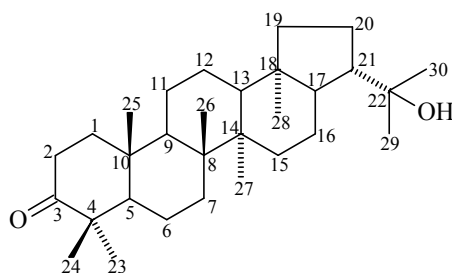
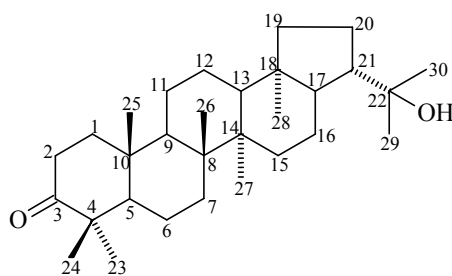


Tabela 5 – Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de AM-2 (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) com os descritos na literatura para 22-hidroxi-hopanona (50,1 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) [AHMAD; RAHMAN, 1994]:

<i>C</i>	<i>AM-2</i>	<i>22-hidroxi-hopanona</i>
	$\delta_c$	$\delta_c$
1	39,7	39,6
2	34,4	34,2
3	218,3	218,1
4	47,6	47,3
5	55,0	54,9
6	19,9	19,9
7	32,8	32,7
8	41,8	41,7
9	49,8	49,6
10	37,0	36,8
11	21,8	21,6
12	24,3	24,1
13	50,2	50,0
14	42,1	41,9
15	34,6	34,4
16	22,1	21,9
17	54,1	54,0
18	44,2	44,1
19	41,7	41,3
20	26,8	26,6
21	51,2	51,0
22	74,1	73,9
23	26,8	26,6
24	21,3	21,1
25	16,4	15,7
26	16,6	16,5
27	17,1	16,9
28	15,9	16,2
29	28,9	28,7
30	31,1	30,9





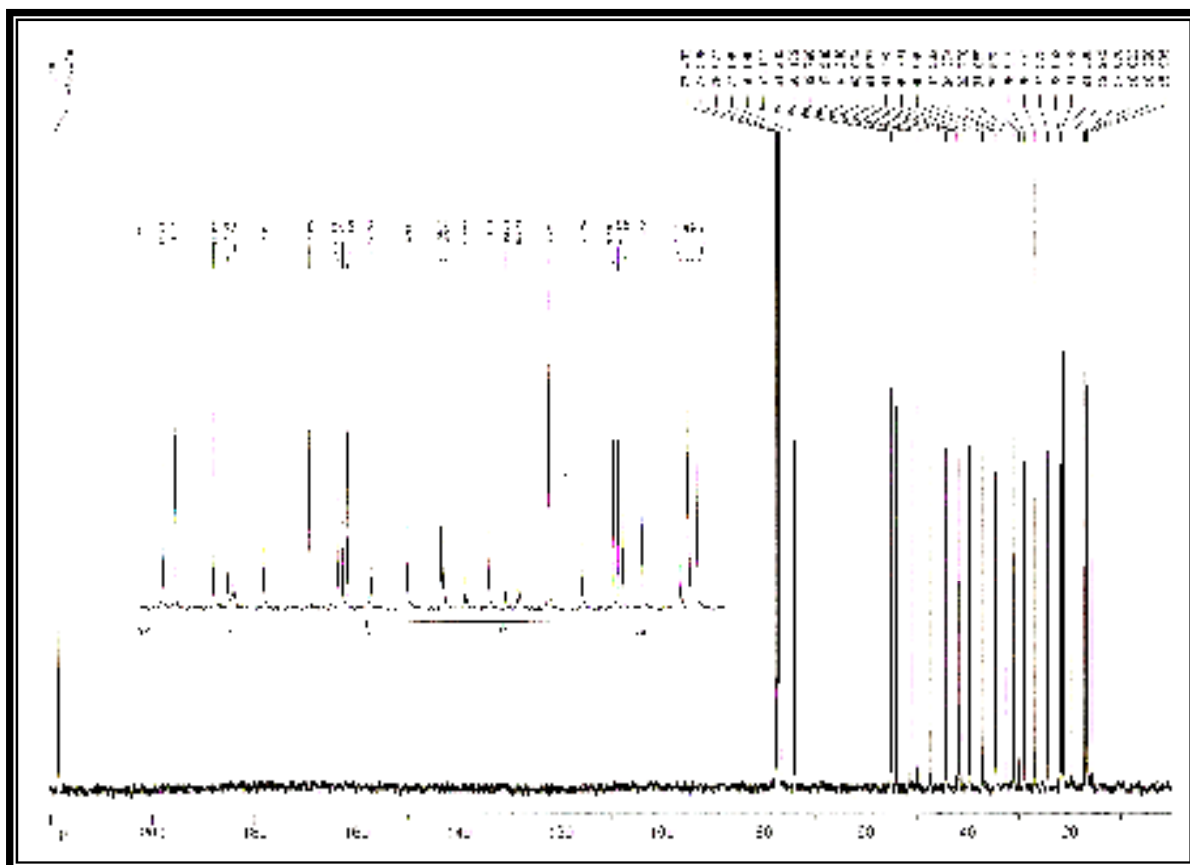


Figura 34 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de AM-2

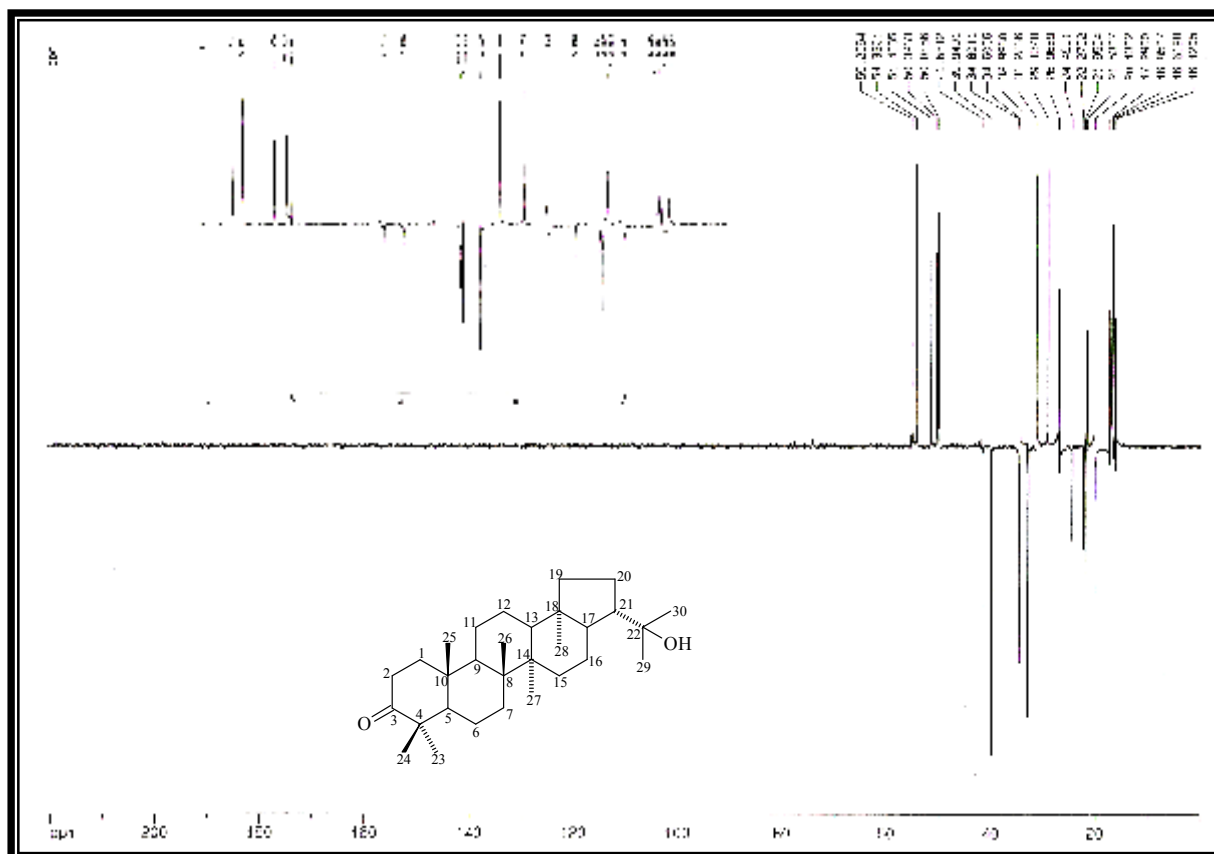


Figura 35 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de AM-2

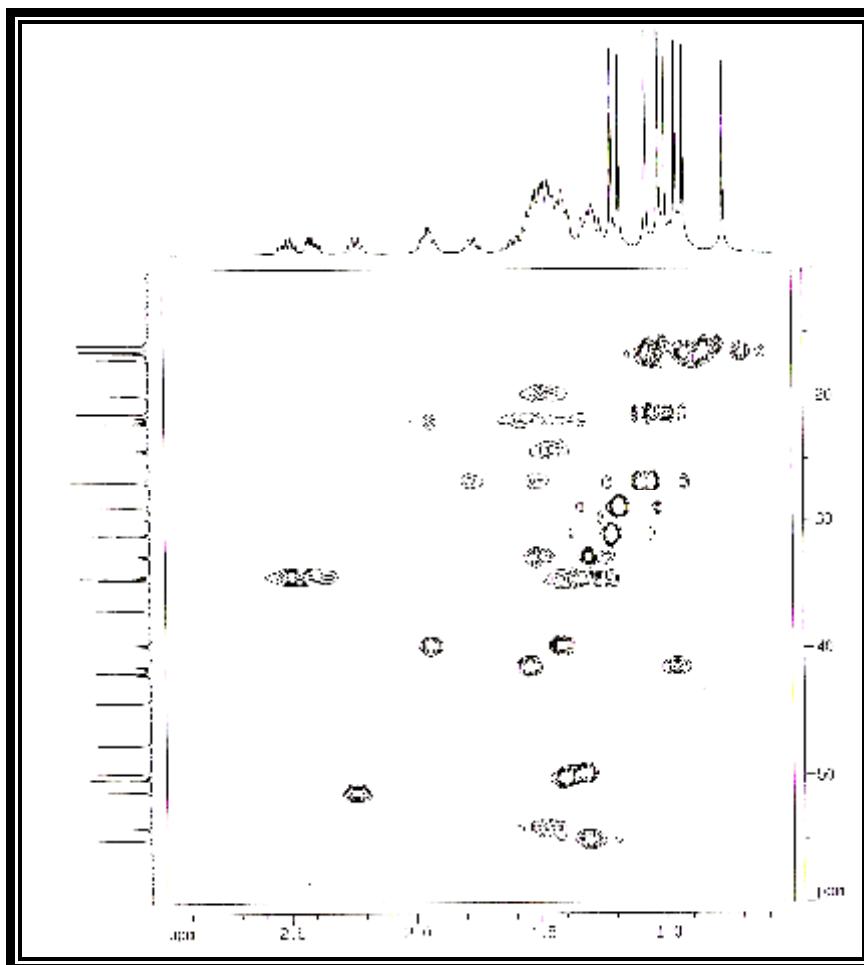


Figura 36 – Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a uma ligação de AM-2 (HSQC)

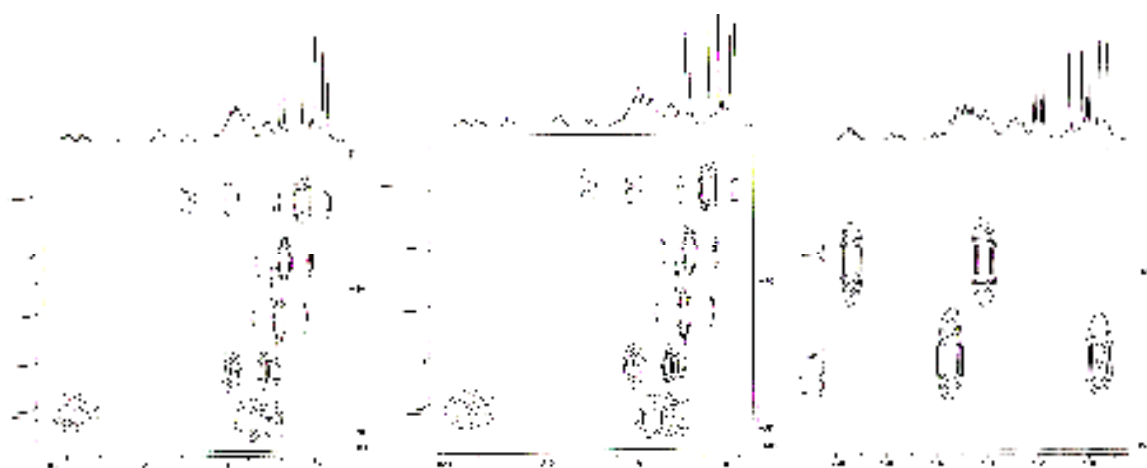
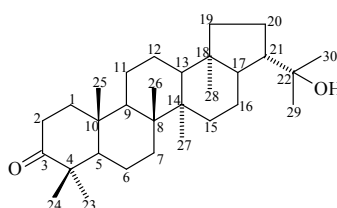


Figura 37 – Expansões do espectro HSQC de AM-2



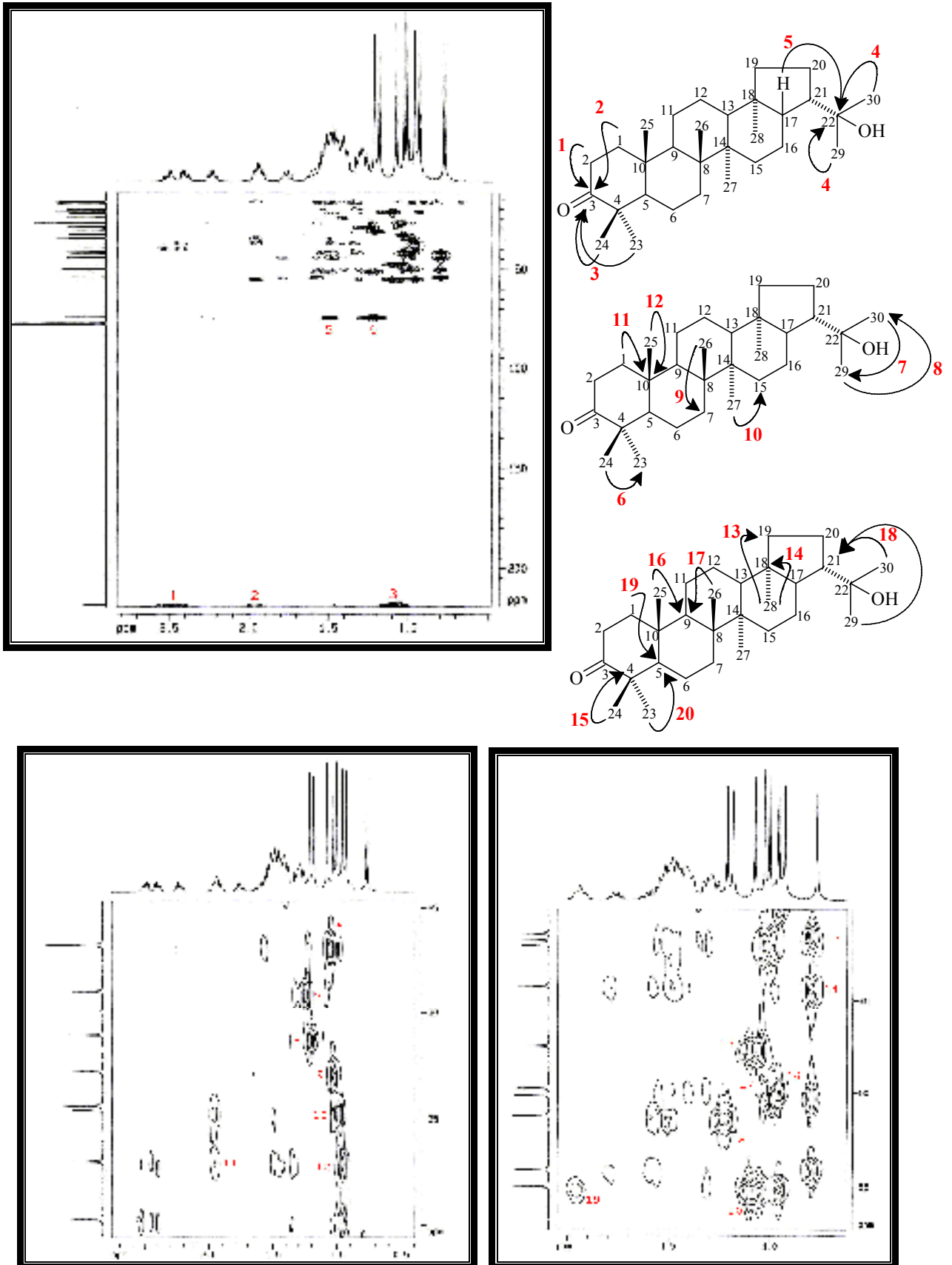


Figura 38 – Espectro de RMN bidimensional (e expansões) de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a mais de uma ligação (HMBC) de AM-2

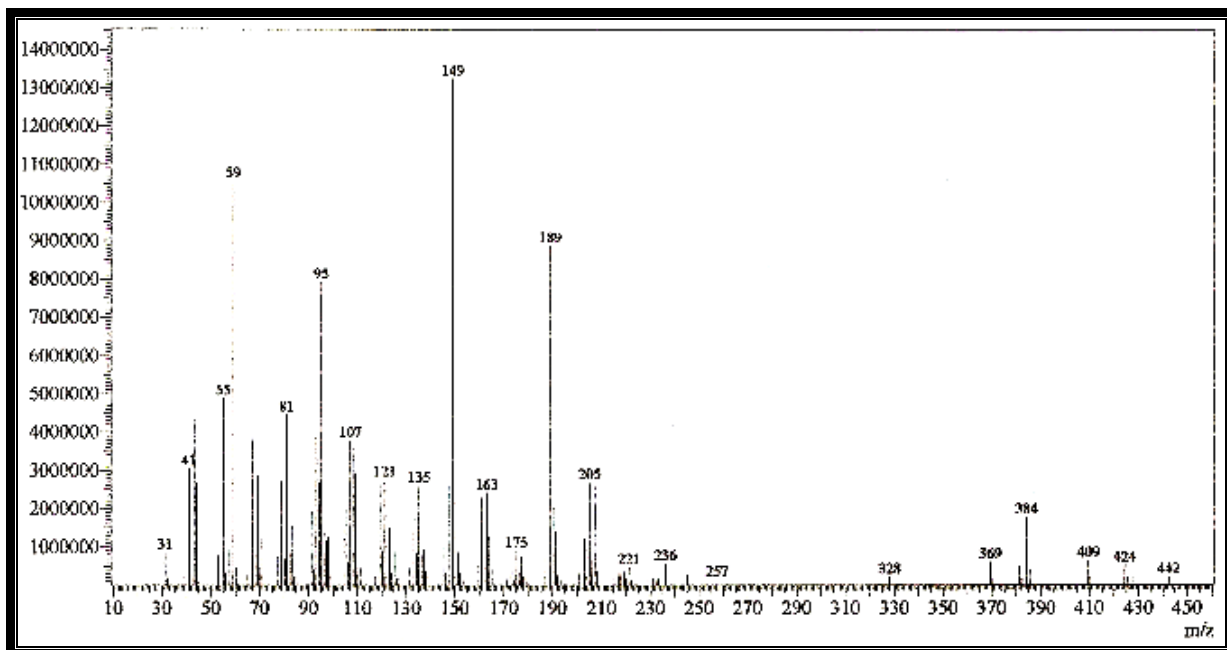


Figura 39 – Espectro de massa de AM-2 (impacto eletrônico a 70 eV)

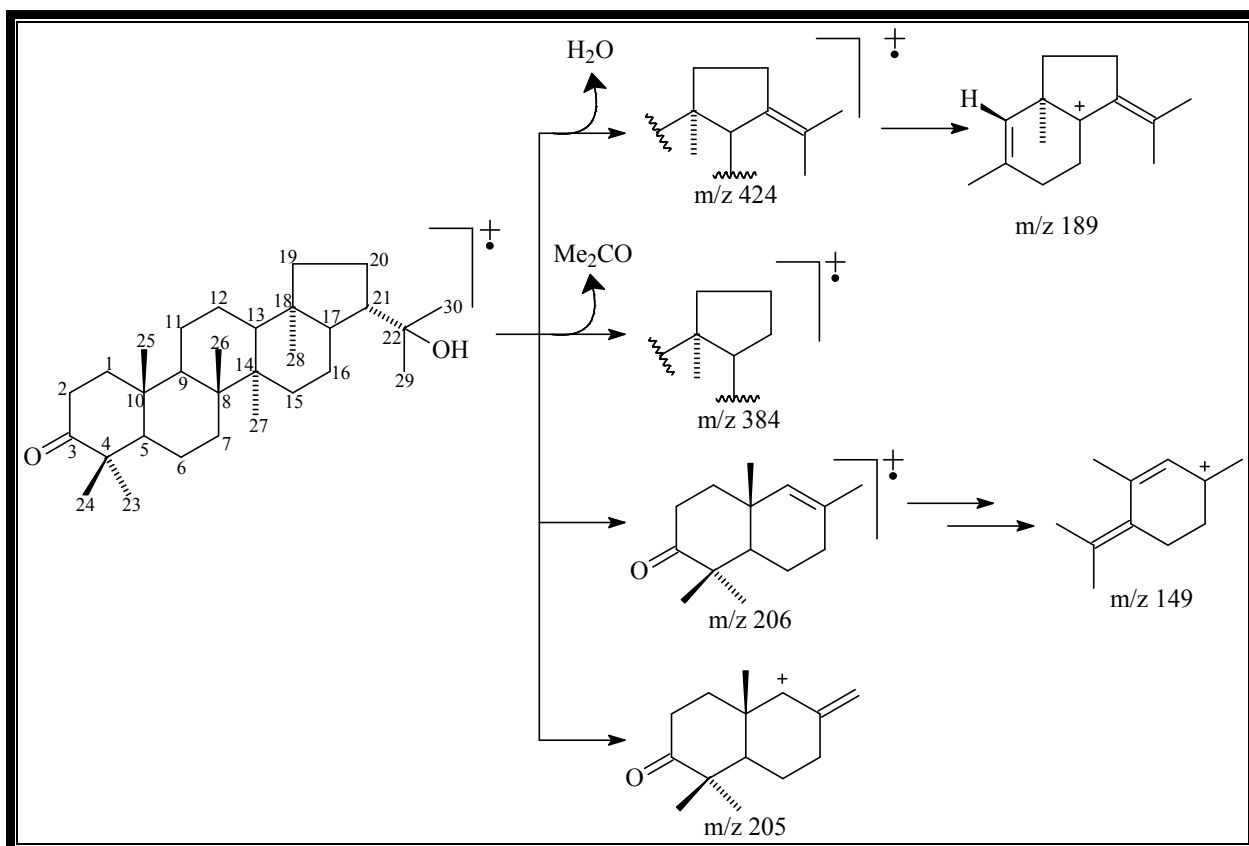


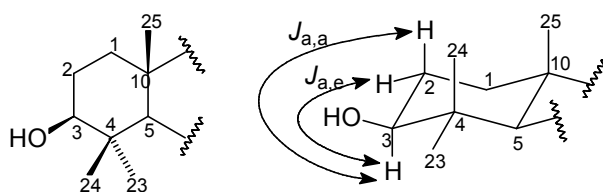
Figura 40 - Proposta mecânica para as fragmentações que justificam os picos principais registrados no espectro de massa de AM-2.

#### 4.1.3. Determinação estrutural de AM-2'

AM-2' foi obtido na forma de um sólido branco e amorfo, com ponto de fusão 269,3-271,5 °C, a partir da reação de redução do grupamento carbonila de AM-2 (22-hidroxi-hopanona), utilizando NaBH<sub>4</sub> como agente redutor (Fluxograma 1, Pág. 196). A obtenção deste derivado foi realizada no intuito de confirmar a proposta estrutural de AM-2.

O espectro de absorção na região do infravermelho de AM-2' (Fig. 42, Pág. 68) mostrou uma banda intensa em 3394 cm<sup>-1</sup>, correspondente à deformação axial O-H, ratificando a presença de hidroxilas na molécula; absorções em 2944 e 2868 cm<sup>-1</sup> correlacionadas aos estiramentos das ligações C-H de alcano; sinais em 1458 e 1375 cm<sup>-1</sup> relativo às deformações angulares da ligação C-H dos carbonos metilênicos e metílicos, e ainda uma absorção em 1034 cm<sup>-1</sup> atribuída à deformação axial da ligação C-O. A ausência da absorção em 1708 cm<sup>-1</sup> confirma a redução da carbonila em AM-2.

Observando-se o espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de AM-2' (Fig. 43, Pág. 68), foi possível visualizar a presença de um sinal em δ 3,48 (1H, dd, *J*=10,0; 5,7 Hz), correspondente a um hidrogênio ligado a carbono alifático oxigenado. A multiplicidade deste sinal (dd) permitiu propor que o grupo hidroxila formado assumiu uma estereoquímica β, como esperado nas reações de redução, para este tipo de composto, empregando NaBH<sub>4</sub>. A figura abaixo confirma esta proposta de configuração para o carbono C-3 ao apresentar os acoplamentos entre os hidrogênios dos carbonos C-2 e C-3. Foram observados sinais em δ 2,41 (1H, ddl, *J*=10,7 e 8,9 Hz), δ 2,23 (dl, *J*=12,9 Hz), na faixa de δ 1,91-



1,46 e em δ 0,82 (1H, d, *J*=11,5Hz) associados às absorções dos hidrogênios ligados a carbonos metilênicos e metílicos do esqueleto terpenoídico. O espectro exibiu ainda oito sinais simples e intensos em δ 1,48, 1,40, 1,28, 1,08, 1,02, 1,01, 0,97, e 0,90, relativos aos grupos metila presentes no estrutura do composto.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C-BB (125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de AM-2' (Fig. 44, Pág. 69) apresentou trinta linhas espectrais, dentre as quais, as observadas em δ 78,5 e 72,8 foram atribuídas aos carbonos saturados ligados aos grupamentos hidroxila. As demais absorções exibidas no espectro foram relacionadas a carbonos saturados não-funcionalizados. A



comparação deste com o espectro RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 (Fig. 45, Pág. 69) permitiu definir o padrão de hidrogenação de todos os carbonos da estrutura como descrito na tabela 6 (Pág. 65).

Tabela 6 – Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz) de AM-2' por padrão de hidrogenação:

<b>C</b>	<b>CH</b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	<b>CH<sub>3</sub></b>	<i>Total</i>
72,8	78,5	42,1	31,9	
44,8	56,0	39,6	30,2	
42,5	55,0	35,1	29,1	
42,3	52,0	34,0	17,6	
39,9	51,0	28,7	17,3	
37,8	50,6	27,4	16,9	
		24,8	16,8	
		22,7	16,6	
		21,7		
		19,2		
$\text{C}_6$	$\text{C}_6\text{H}_6$	$\text{C}_{10}\text{H}_{20}$	$\text{C}_8\text{H}_{24}$	$\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_2$
<b>2 x OH</b>				

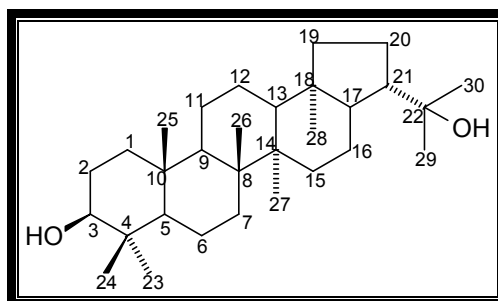
Após observar todos os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  para AM-2' confirmou a fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_2$ , com índice de deficiência de hidrogênio igual a cinco. O espectro de massa, obtido por impacto eletrônico a 70 eV (Fig. 49, Pág. 72), confirmou a fórmula molecular por apresentar o pico do íon molecular em  $m/z$   $[\text{M}]^{\dagger}$  444 daltons.

O espectro de RMN bidimensional HSQC (Figs. 46 e 47, Pág. 70) permitiu associar inequivocamente alguns sinais de hidrogênios a seus respectivos carbonos, como se observa na tabela 7 (Pág. 66). O espectro de RMN bidimensional HMBC (Fig. 48, Pág. 71), mostrou os acoplamentos a mais de uma ligação entre hidrogênios e carbonos ( $^2J_{\text{CH}}$  e  $^3J_{\text{CH}}$ ).

A reunião de todos os dados espectroscópicos obtidos para AM-2' através da detalhada análise de seus espectros, bem como a comparação destes com aqueles registrados para a substância AM-2 e para o  $3\beta$ -hidroxi-hopeno [HOSHINO *et al*, 2004] confirmou que AM-2' tratava-se do  $3\beta,22$ -di-hidroxi-A'-neogamacerano ( $3\beta,22$ -di-hidroxi-hopano) (Fig. 41, Pág. 66), anteriormente isolado em espécies de *Lithocarpus* e *Castanopsis* [AHMAD; RAHMAN, 1994].

Tabela 7 – Correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (HSQC e HMBC) de AM-2':

<i>C</i>	$^{13}\text{C-BB}$	<i>HSQC</i>	<i>HMBC</i>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	39,6	1,70; 0,95		0,90
2	28,7	1,90		
3	78,5	3,48 (dd, $J=10,0$ ; 5,7 Hz)		1,28; 1,08
4	39,9	-	1,28; 1,08	
5	56,0	0,82 (d, $J=11,5\text{Hz}$ )		1,28; 1,08; 0,90
6	19,2	1,60; 1,40		
7	34,0	1,52; 1,24		1,01
8	42,3	-	1,01	1,02
9	51,0	1,28		1,01; 0,90
10	37,8	-	0,90	
11	21,7	1,65-1,50		
12	24,8	1,48		
13	50,6	1,45		1,02; 0,97
14	42,5	-	1,02	1,01
15	35,1	1,40; 1,28		1,02
16	22,7	2,23 (dl, $J=12,9\text{ Hz}$ ); 1,83		
17	55,0	1,52		0,97
18	44,8	-	0,97	
19	42,1	1,60; 1,02		0,97
20	27,4	1,90; 1,75		
21	52,0	2,41 (ddl, $J=10,7$ e 8,9 Hz)		1,48; 1,40
22	72,8	-	1,48; 1,40	
23	29,1	1,28 (s)		1,08
24	16,8	1,08 (s)		3,48; 1,28; 0,82
25	16,6	0,90 (s)		
26	17,3	1,01 (s)		
27	17,6	1,02 (s)		
28	16,9	0,97 (s)		
29	30,2	1,40 (s)		1,48
30	31,9	1,48 (s)		1,40

Figura 41 – Estrutura do 3 $\beta$ ,22-di-hidroxi-hopano



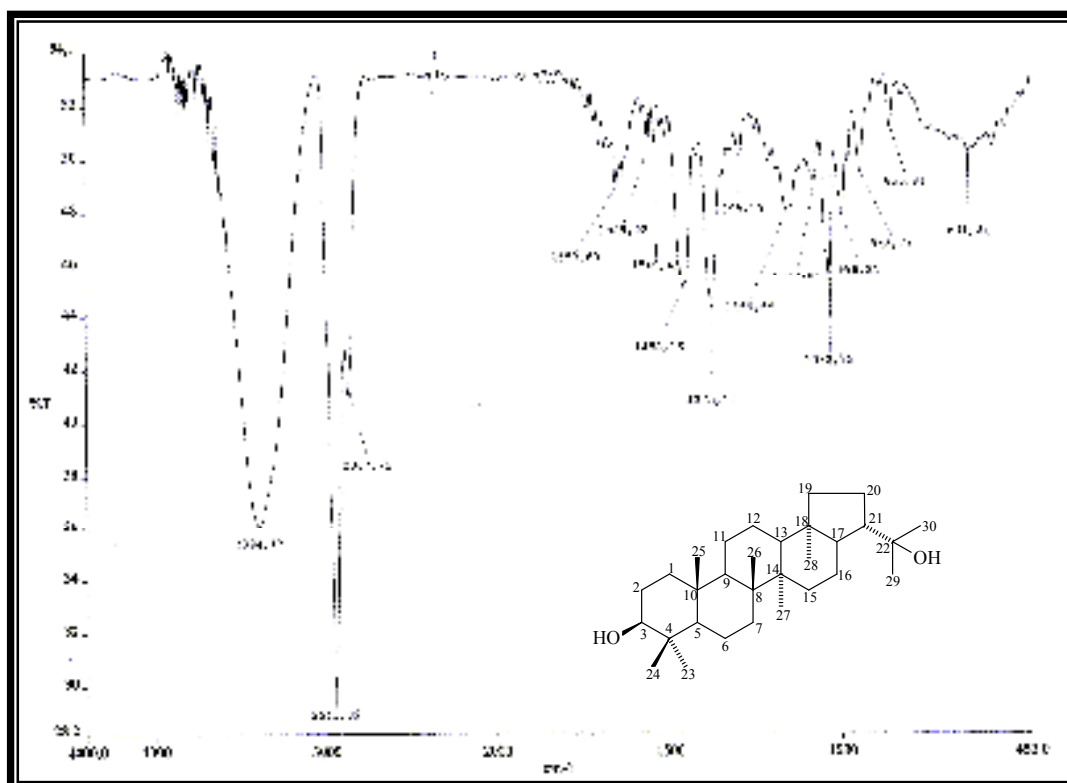


Figura 42 – Espectro de absorção na região do I.V. de AM-2' com pastilhas de KBr.

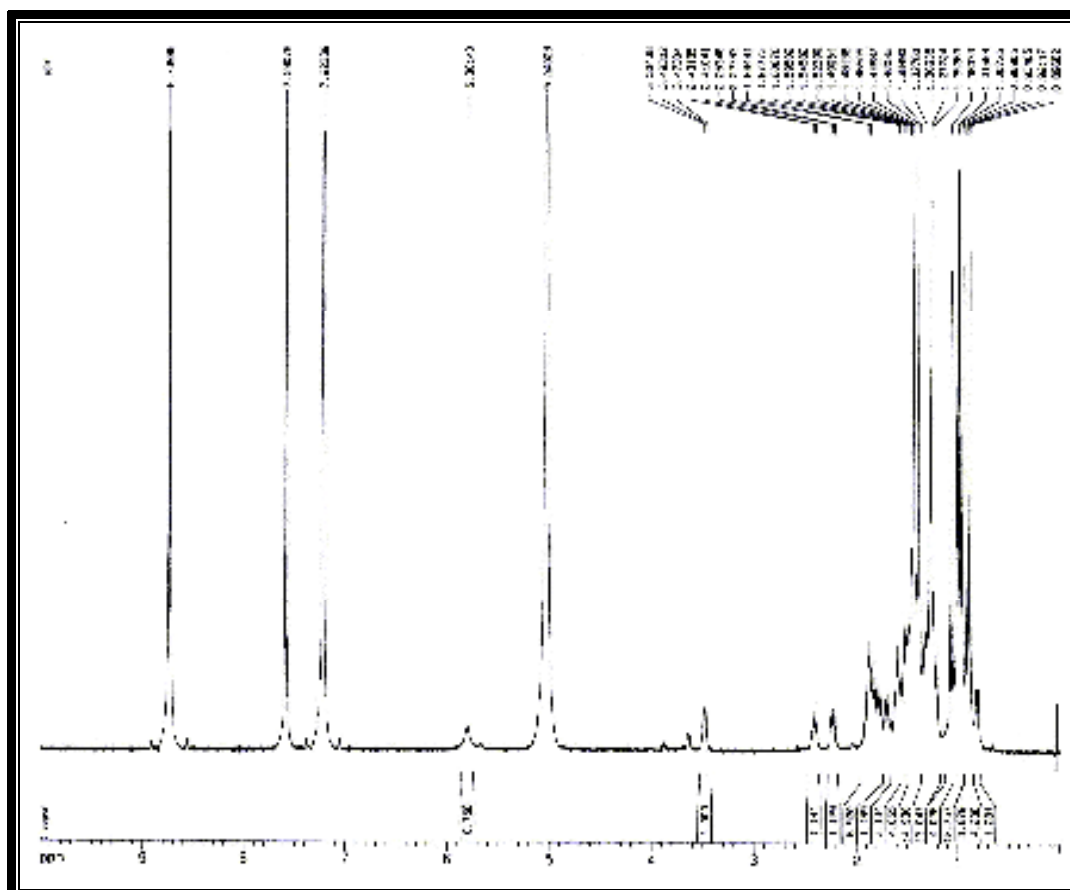


Figura 43 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 500 MHz) de AM-2'

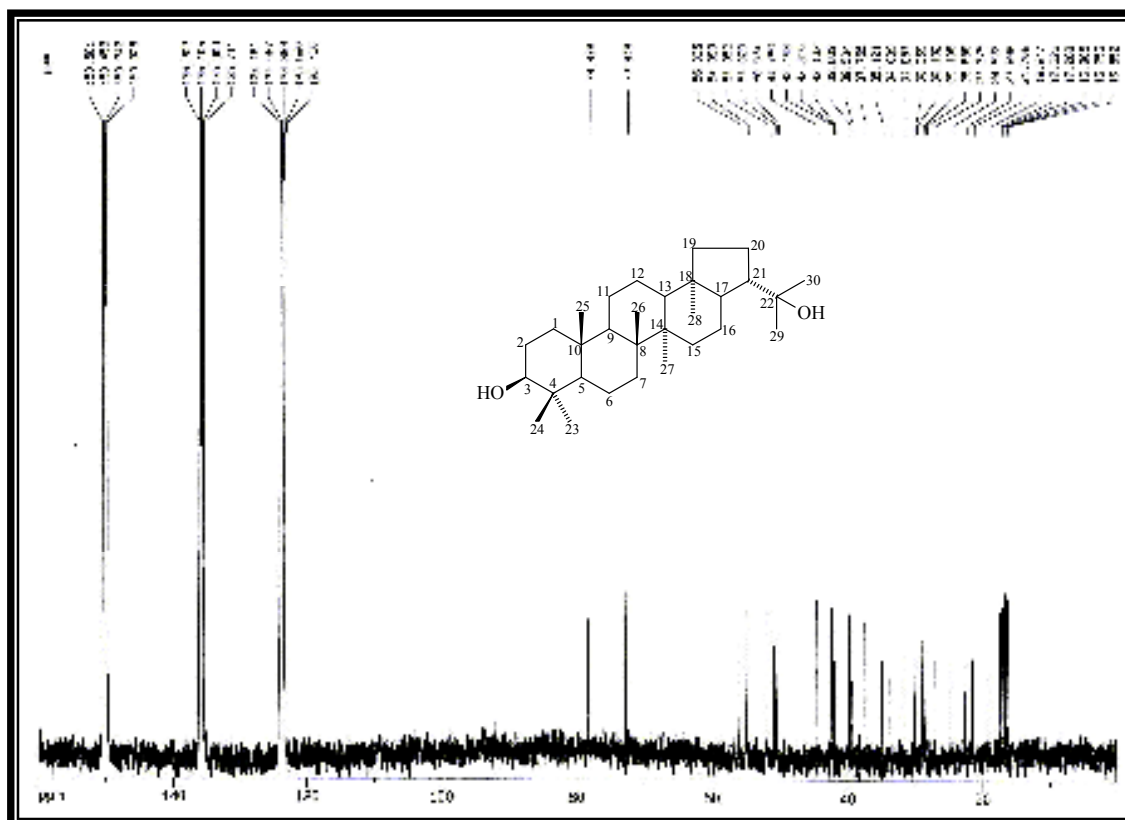


Figura 44 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz) de AM-2'

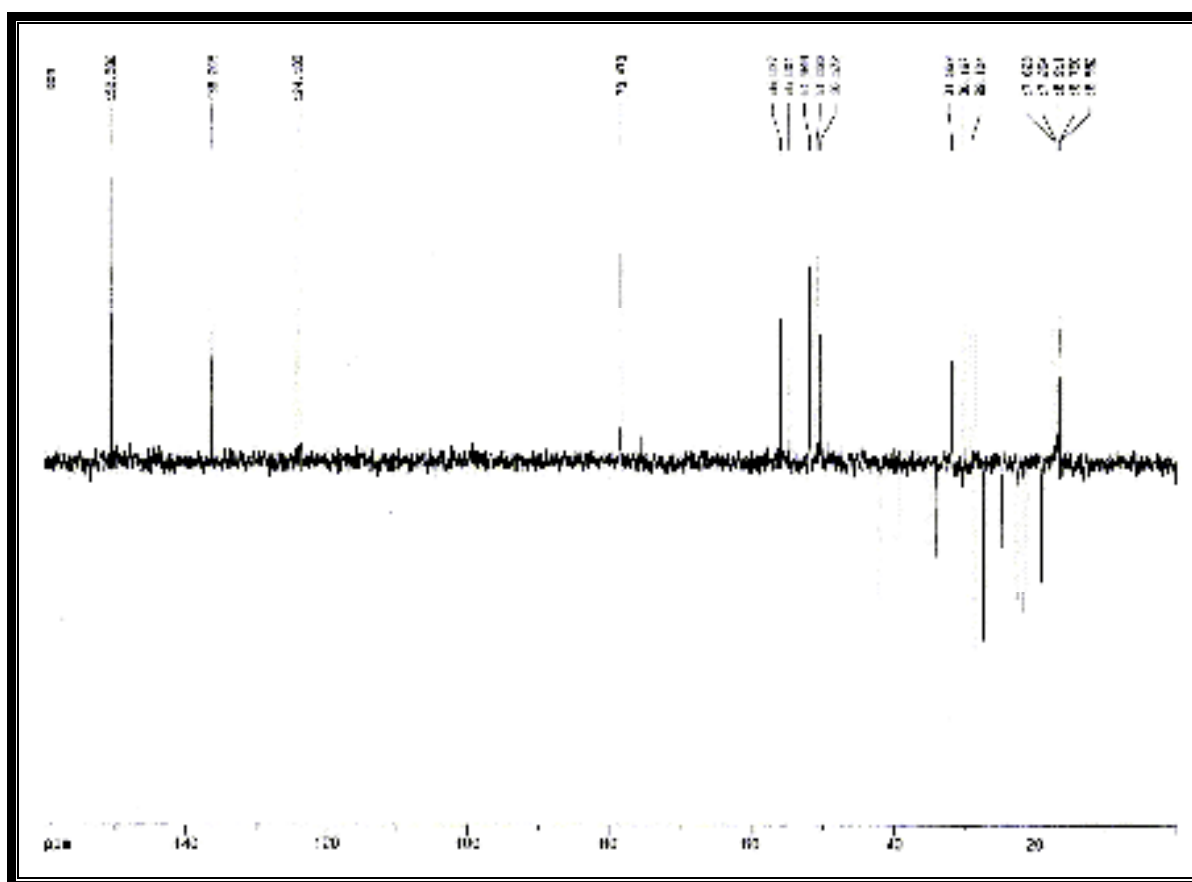


Figura 45 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz) de AM-2'

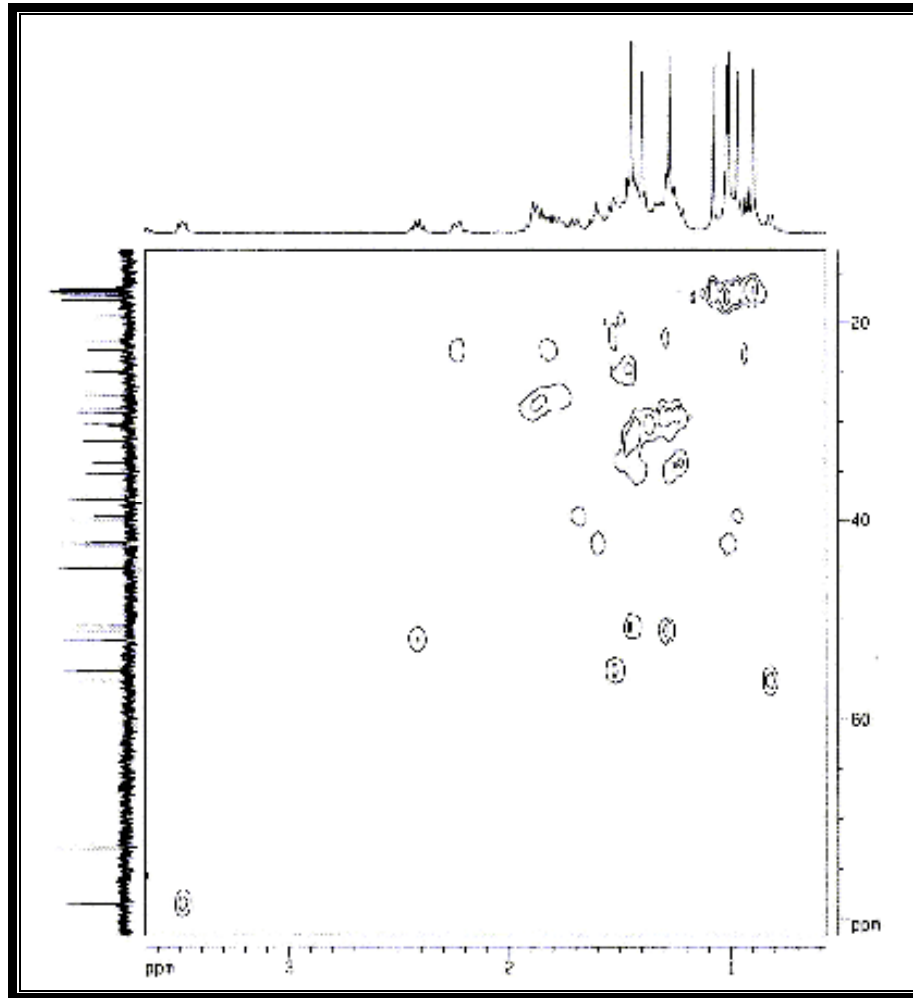


Figura 46 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de AM-2'

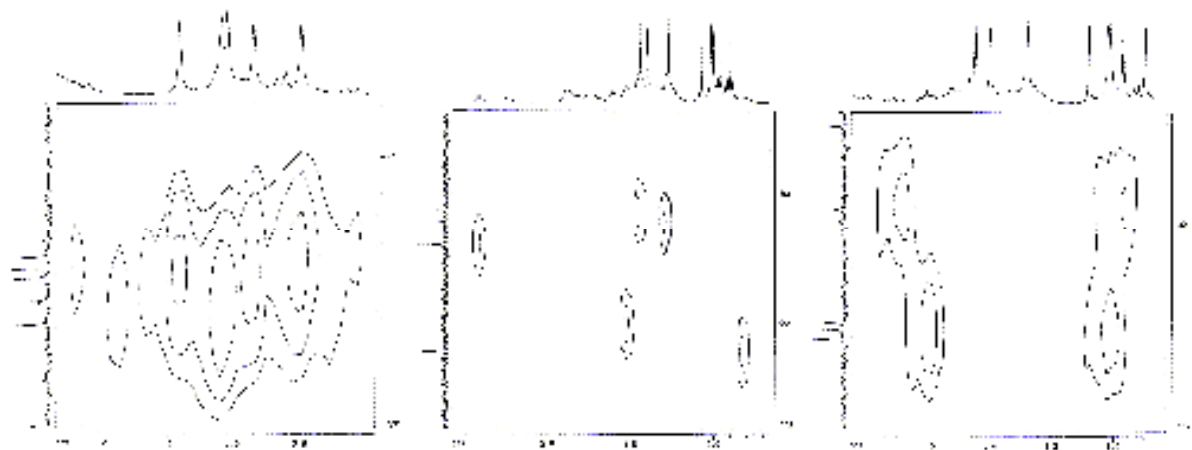
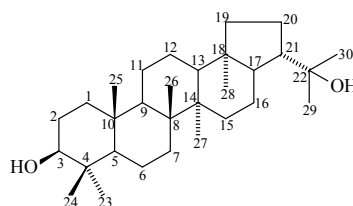


Figura 47 – Expansões do espectro HSQC de AM-2'



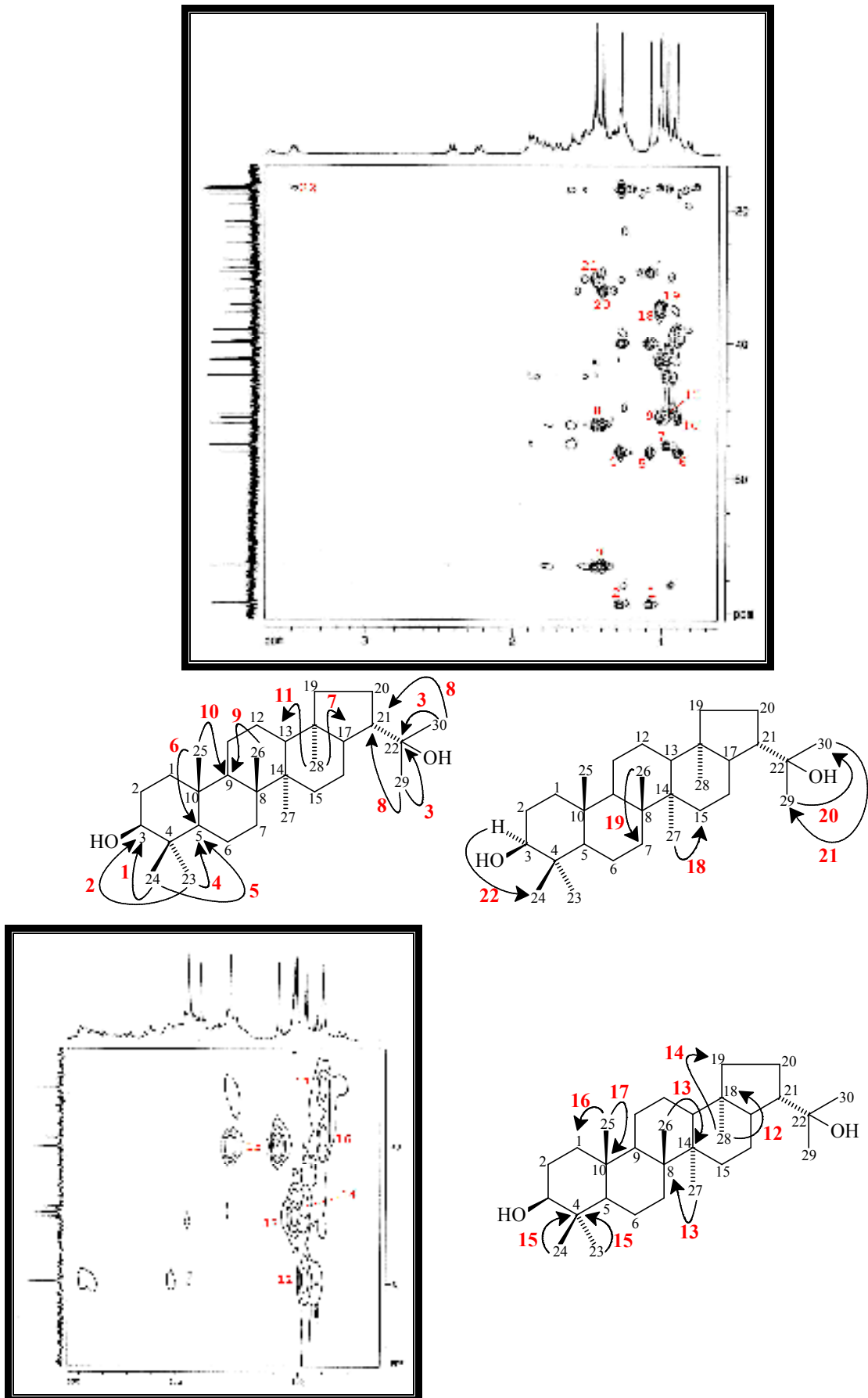


Figura 48 – Espectro de RMN bidimensional HMBC (e expansão) de AM-2'

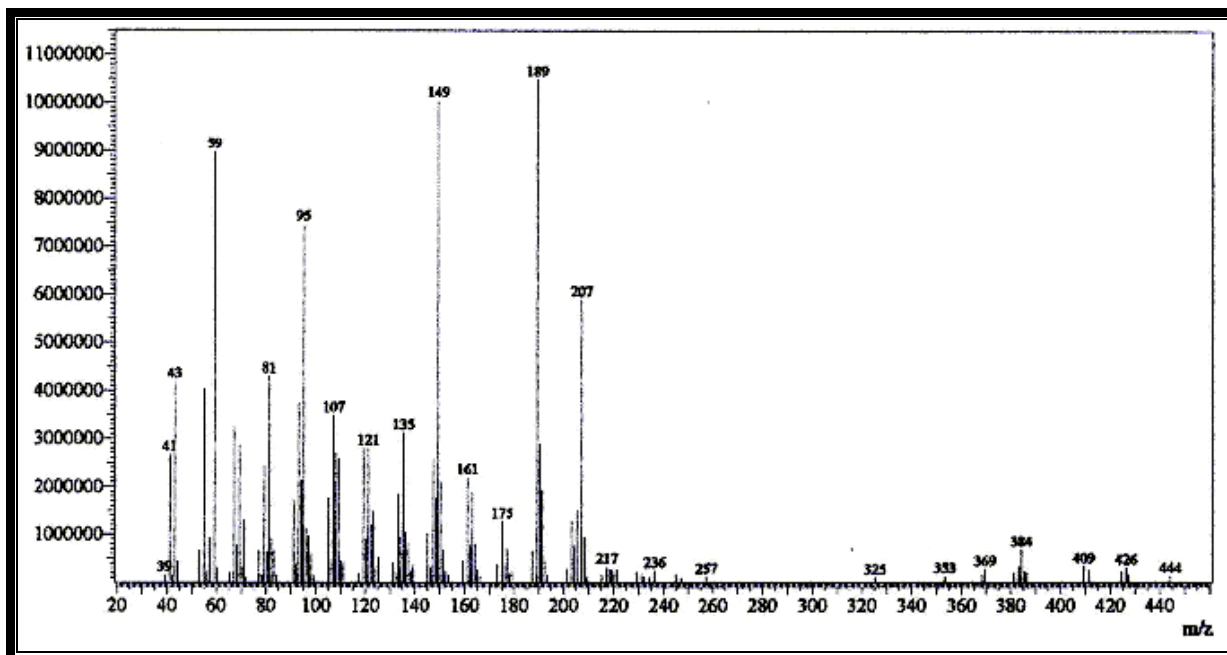
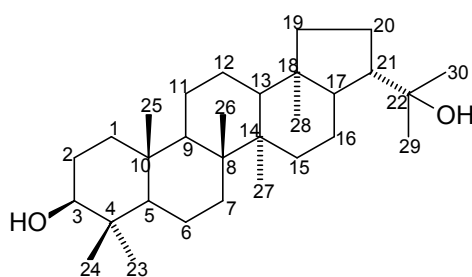


Figura 49 – Espectro de massa de AM-2' (impacto eletrônico a 70 eV)



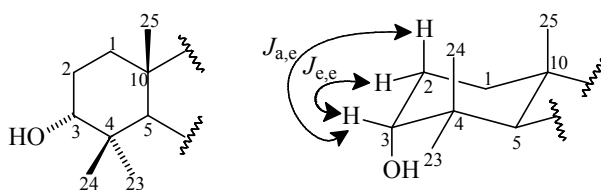
F.M. =  $C_{30}H_{52}O_2$   
M.M. = 444.74



#### 4.1.4. Determinação estrutural de AM-3

Através do tratamento cromatográfico em coluna de sílica “flash” da fração AcOEt, proveniente do extrato hexânico dos talos de *A. myrciifolia*, foi obtido um sólido amorfo de cor branca com ponto de fusão 263,4-265,1 °C, o qual foi denominado AM-3 (Fluxograma 1, Pág. 196).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de AM-3 (Fig. 53, Pág. 78) mostrou-se, de forma geral, semelhante ao de AM-2' (Fig. 43, Pág. 68). O espectro apresentou um simpleto largo em  $\delta$  3,65 (1H), correspondente a um hidrogênio ligado a carbono alifático oxigenado. Comparando-se este sinal com aquele em  $\delta$  3,48 (1H, dd,  $J=10,0$  e  $5,7\text{Hz}$ ) visualizado no espectro RMN  $^1\text{H}$  de AM-2', é possível propor que ambos estavam relacionados a hidrogênios localizados num mesmo ambiente químico, porém com estereoquímicas diferentes. Em AM-2', os valores das constantes de acoplamento indicavam a



estereoquímica  $\alpha$  para este hidrogênio ( $J_{\text{axial/axial}}$  e  $J_{\text{axial/equatorial}}$ ). Já em AM-3, os valores inferiores de  $J$  ( $J_{\text{axial/equatorial}}$  e  $J_{\text{equatorial/equatorial}}$ ) indicaram que este

hidrogênio apresentava estereoquímica  $\beta$  (figura acima). Foram observados ainda sinais em  $\delta$  2,40 (1H, ddl,  $J=10,8$  e  $9,1$  Hz),  $\delta$  2,21 (dl,  $J=12,9$  Hz) e multipletos localizados na faixa de  $\delta$  2,06-1,45, associados às absorções dos hidrogênios ligados a carbonos metilênicos e metílicos de esqueleto terpenoídico. O espectro exibiu ainda sete sinais simples e intensos em  $\delta$  1,44, 1,38, 1,25, 1,03, 0,94, 0,93 e 0,91, relativos a metilas ligadas a carbonos não-hidrogenados.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de AM-3 (Fig. 54, Pág. 79) apresentou trinta linhas espectrais, sendo que, as observadas em  $\delta$  75,8 e 73,0 foram atribuídas a carbonos saturados ligados a grupamentos hidroxila. As demais absorções foram relacionadas a carbonos saturados não-funcionalizados. Ao comparar este espectro com o espectro RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 (Fig. 55, Pág. 79) foi possível definir o padrão de hidrogenação dos carbonos da molécula, o que se encontra descrito na tabela 9 (Pág. 74).

Tabela 9 – Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz) de AM-3 por padrão de hidrogenação:

<b>C</b>	<b>CH</b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	<b>CH<sub>3</sub></b>	<i>Total</i>
73,0	75,8	42,3	31,9	
44,9	55,1	35,2	30,3	
2 x 42,6	52,1	34,4	29,8	
38,6	51,0	34,2	23,1	
38,1	50,7	27,5	17,7	
	49,6	27,0	17,4	
		25,0	17,0	
		22,8	16,6	
		21,8		
		19,2		
<b>C<sub>6</sub></b>	<b>C<sub>6</sub>H<sub>6</sub></b>	<b>C<sub>10</sub>H<sub>20</sub></b>	<b>C<sub>8</sub>H<sub>24</sub></b>	<b>C<sub>30</sub>H<sub>52</sub>O<sub>2</sub></b>
<b>2 x OH</b>				

O espectro de absorção na região do infravermelho de AM-3 (Fig. 52, Pág. 78) mostrou bandas semelhantes às aquelas observadas no espectro de I.V. para AM-2' (Fig. 42, Pág. 68). Pôde-se destacar a absorção visualizada em  $3407\text{ cm}^{-1}$ , correspondente à deformação axial O-H, confirmando a presença de hidroxilas. Dessa forma, após observar todos os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  para AM-3, acrescidos das informações obtidas no espectro de I.V, foi possível sugerir a fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_2$ , com índice de deficiência de hidrogênio igual a cinco. O espectro de massa, obtido por impacto eletrônico a 70 eV (Fig. 59, Pág. 82), confirmou a fórmula molecular por apresentar o pico do íon molecular  $[\text{M}]^{\dagger}$  em  $m/z$  444 daltons. A figura 60 (Pág. 82) apresenta uma proposta mecanística para as fragmentações que justificam os picos principais registrados no espectro de massa de AM-3.

O espectro de RMN bidimensional HSQC (Fig. 56, Pág. 80) permitiu associar inequivocamente alguns sinais de hidrogênios a seus respectivos carbonos, como observado na tabela 10 (Pág. 76).

No espectro de RMN bidimensional HMBC (Fig. 58, Pág. 81) foram observadas as correlações dos sinais dos hidrogênios em  $\delta$  0,94 e 1,25 com o carbono em  $\delta$  75,8 e dos sinais dos hidrogênios em  $\delta$  1,38 e 1,44 com os carbonos em  $\delta$  52,1 e 73,0, como mostrado nas sub-estruturas para AM-3 (Fig. 50, Pág. 75).

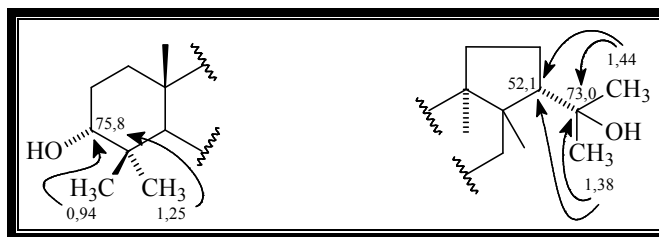


Figura 50 – Sub-estruturas para AM-3

A reunião de todos os dados espectroscópicos obtidos para AM-3 através da detalhada análise de seus espectros, bem como a comparação destes dados com AM-2' e os registrados na literatura para triterpenos de esqueleto hopano, permitiu sugerir que AM-3 tratava-se do  $3\alpha,22$ -di-hidroxi-A'-neogamacerano ( $3\alpha,22$ -di-hidroxi-hopano) [RUIZ *et al*, 2006] (Fig. 51, Pág. 75), anteriormente isolado de *Eleocharis sellowiana* [RUIZ *et al*, 2006].

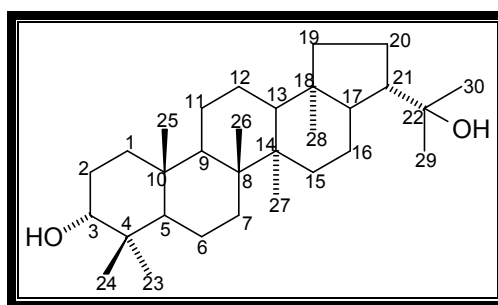


Figura 51 – Estrutura do  $3\alpha,22$ -di-hidroxi-hopano

Tabela 10 – Correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (HSQC e HMBC) de AM-3:

<i>C</i>	$^{13}\text{C-BB}$	<i>HSQC</i>	<i>HMBC</i>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	34,4	1,80; 1,49		3,65; 0,93
2	27,0	2,06 (m); 1,84		
3	75,8	3,65 (sl)		1,25; 0,94
4	38,6	-	3,65; 1,65; 1,25; 0,94	
5	49,6	1,65 (d, $J=12,0$ Hz)		3,65; 1,25
6	19,2	1,53; 1,45	1,65	
7	34,2	1,52; 1,22		0,91
8	42,6	-		0,91
9	51,0	1,46		1,03
10	38,1	-	1,80	0,93
11	21,8	1,62; 1,08		
12	25,0	1,47		
13	50,7	1,45		0,93; 0,91
14	42,6	-		1,03
15	35,2	1,40; 1,22		0,91
16	22,8	2,21 (dl, $J=12,9$ Hz); 1,75		
17	55,1	1,50	2,40	1,77; 1,54; 0,98
18	44,9	-		2,40; 1,77; 0,93
19	42,3	1,54; 0,98		
20	27,5	1,77; 1,15	2,40	
21	52,1	2,40 (ddl, $J=10,8$ e $9,1$ Hz)		1,54; 1,44; 1,38
22	73,0	-	2,40; 1,44; 1,38	1,77
23	29,8	1,25 (s)		3,65; 1,65; 0,94
24	23,1	0,94 (s)		3,65; 1,65; 1,25
25	16,6	0,93 (s)		1,65
26	17,4	1,03 (s)		
27	17,7	0,91 (s)		
28	17,0	0,93 (s)		
29	30,3	1,38 (s)		2,40; 1,44
30	31,9	1,44 (s)		2,40; 1,38

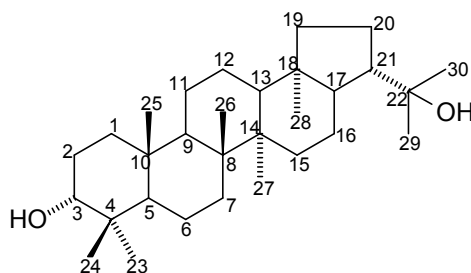
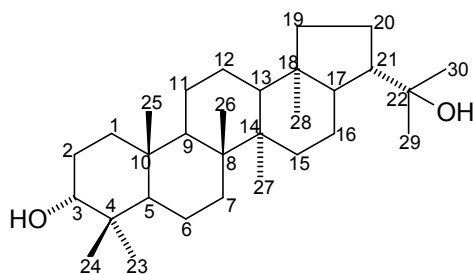
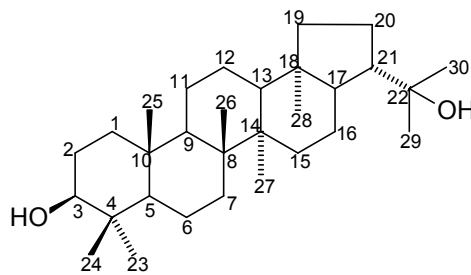


Tabela 11 – Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de AM-3 ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz) com os de AM-2' ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz) e os descritos na literatura para o  $3\beta,22$ -di-hidroxi-hopano ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) [RUIZ *et al.*, 2006]:

C	AM-3	AM-2'	$3\alpha,22$ -di-hidroxi-hopano
	$\delta_c$	$\delta_c$	$\delta_c$
1	34,4	39,6	33,2
2	27,0	28,7	25,3
3	75,8	78,5	76,2
4	38,6	39,9	37,5
5	49,6	56,0	48,8
6	19,2	19,2	18,3
7	34,2	34,0	33,2
8	42,6	42,3	41,8
9	51,0	51,0	50,0
10	38,1	37,8	37,2
11	21,8	21,7	20,9
12	25,0	24,8	24,1
13	50,7	50,6	49,9
14	42,6	42,5	41,9
15	35,2	35,1	34,7
16	22,8	22,7	21,9
17	55,1	55,0	53,9
18	44,9	44,8	44,1
19	42,3	42,1	41,3
20	27,5	27,4	26,6
21	52,1	52,0	51,1
22	73,0	72,8	73,9
23	29,8	29,1	28,3
24	23,1	16,8	22,1
25	16,6	16,6	15,7
26	17,4	17,3	17,0
27	17,7	17,6	17,1
28	17,0	16,9	16,2
29	30,3	30,2	28,7
30	31,9	31,9	30,9



$3\alpha,22$ -di-hidroxi-hopano



$3\beta,22$ -di-hidroxi-hopano

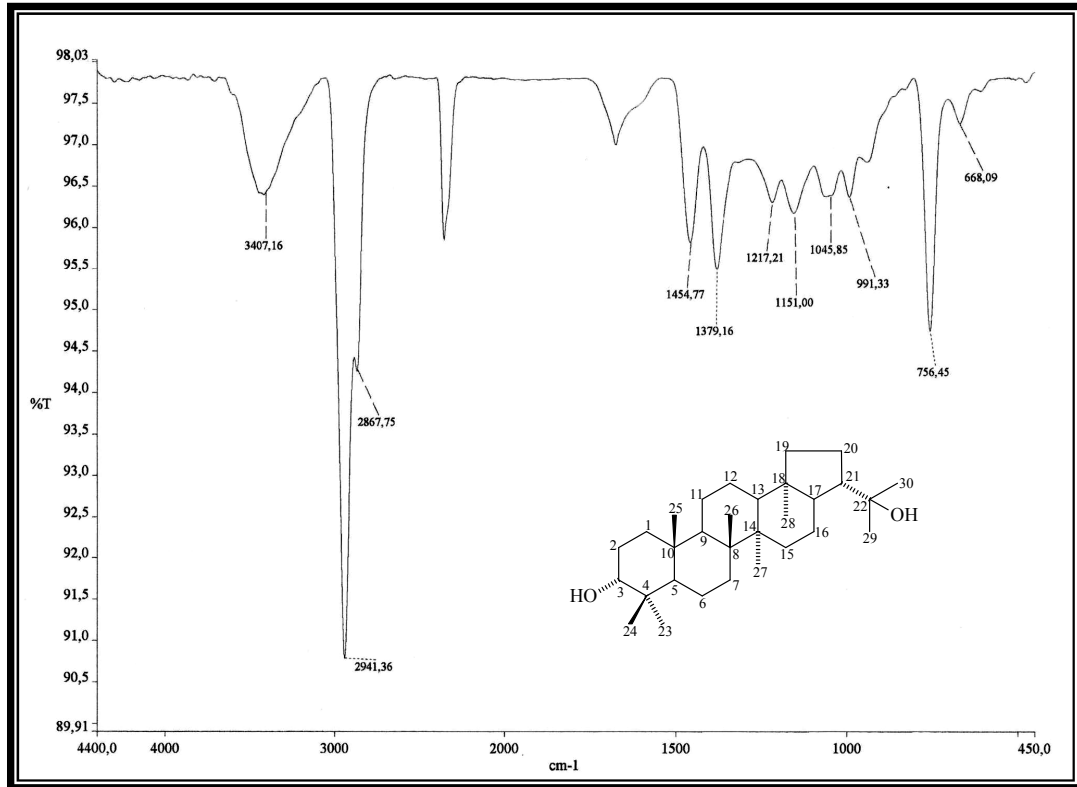


Figura 52 – Espectro de absorção na região do I.V. de AM-3 com pastilhas de KBr.

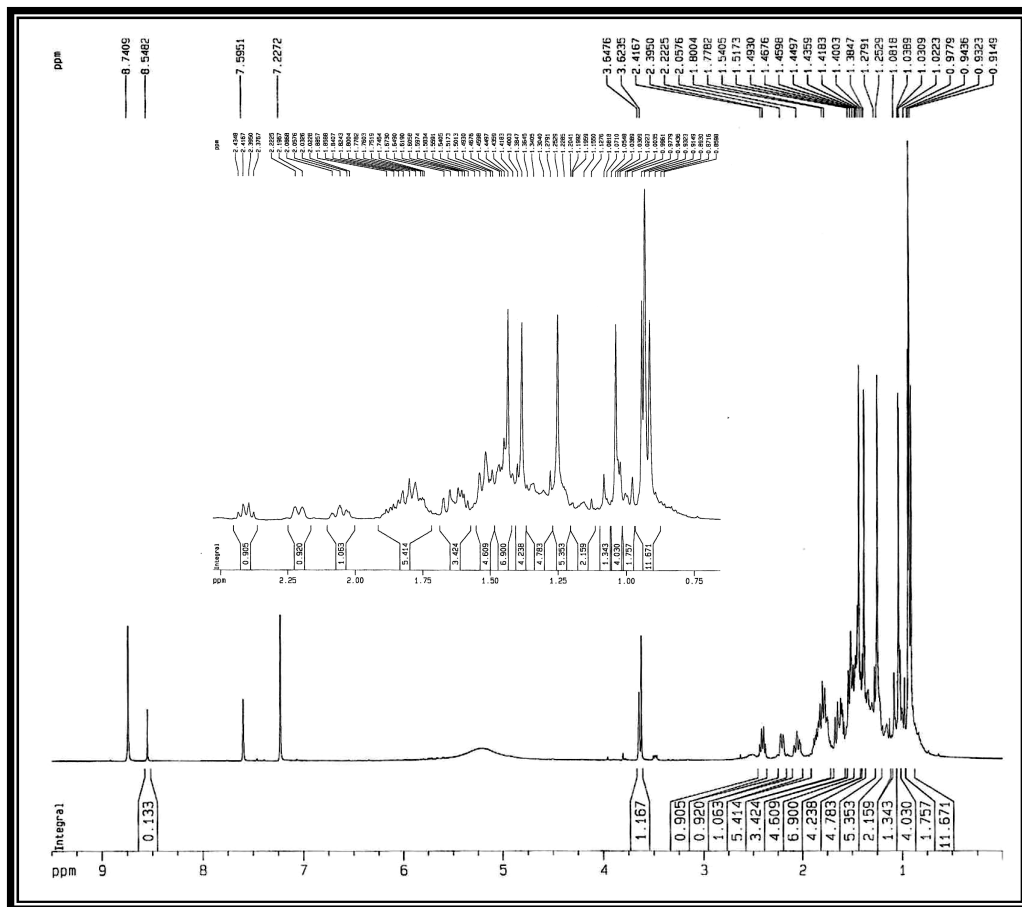


Figura 53 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 500 MHz) de AM-3

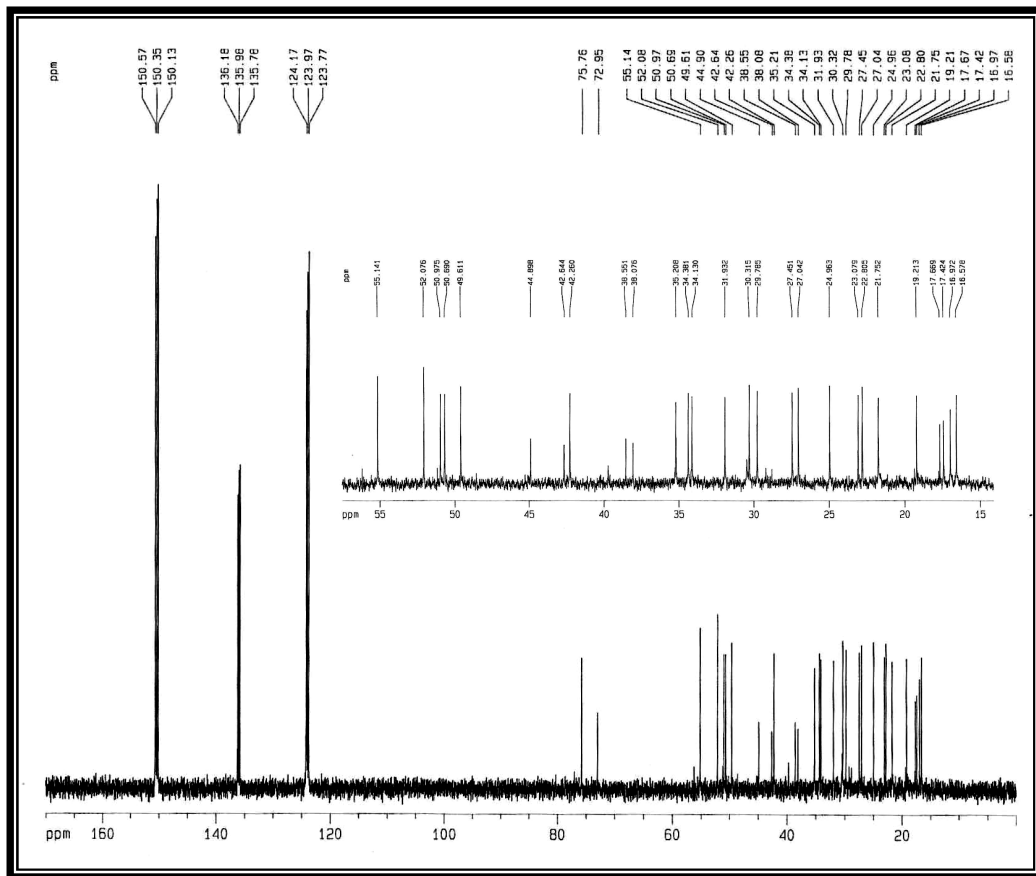


Figura 54 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz) de AM-3

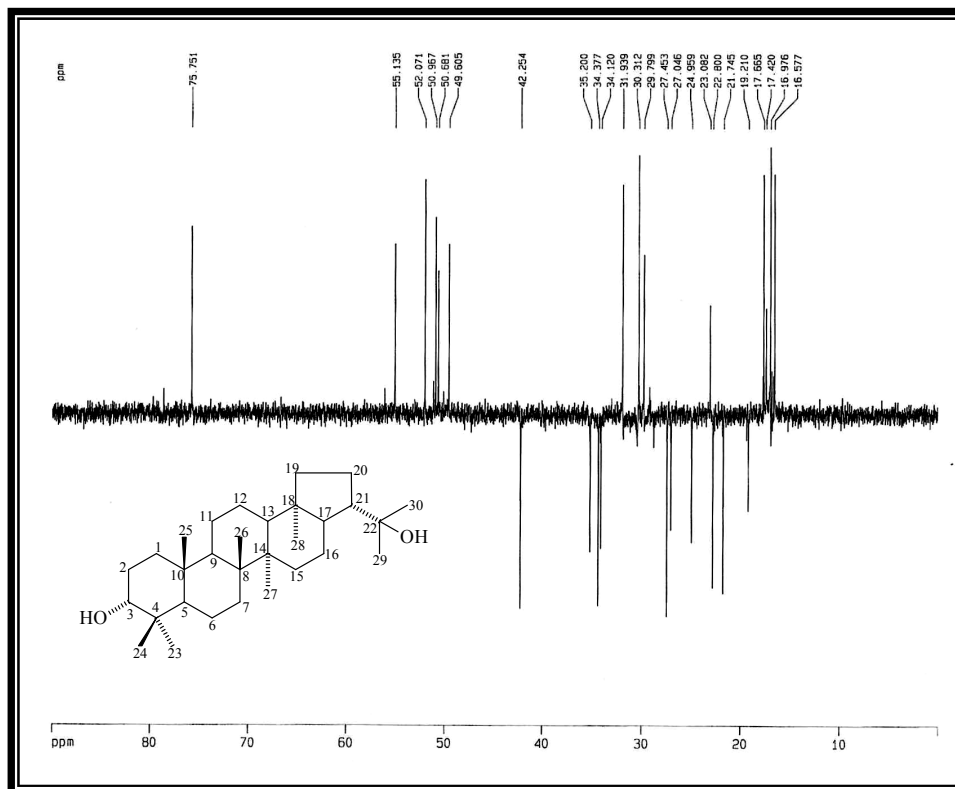


Figura 55 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz) de AM-3

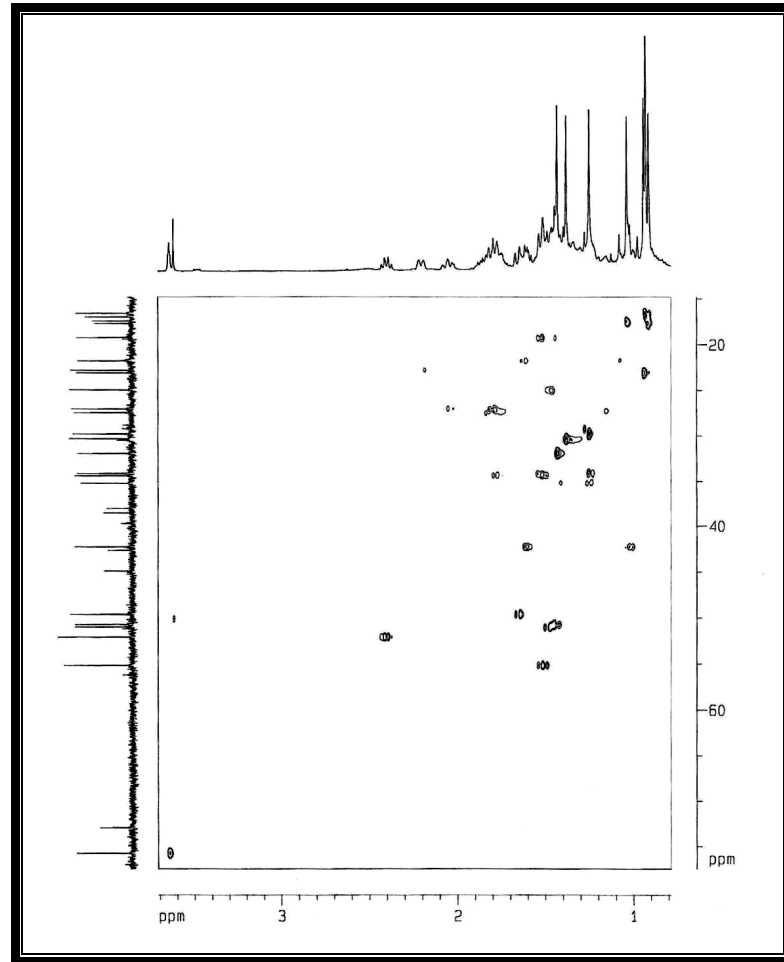


Figura 56 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de AM-3

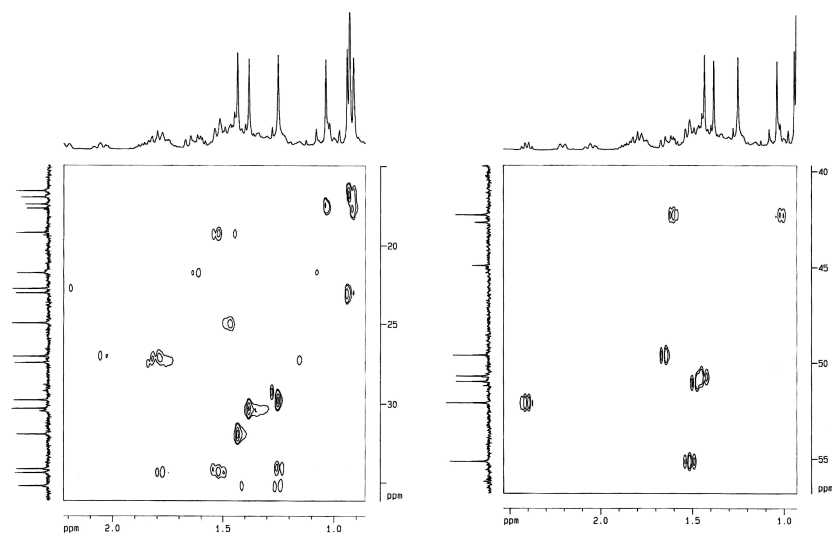
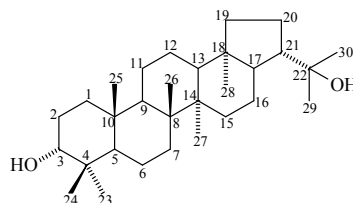


Figura 57 – Expansões do espectro HSQC de AM-3





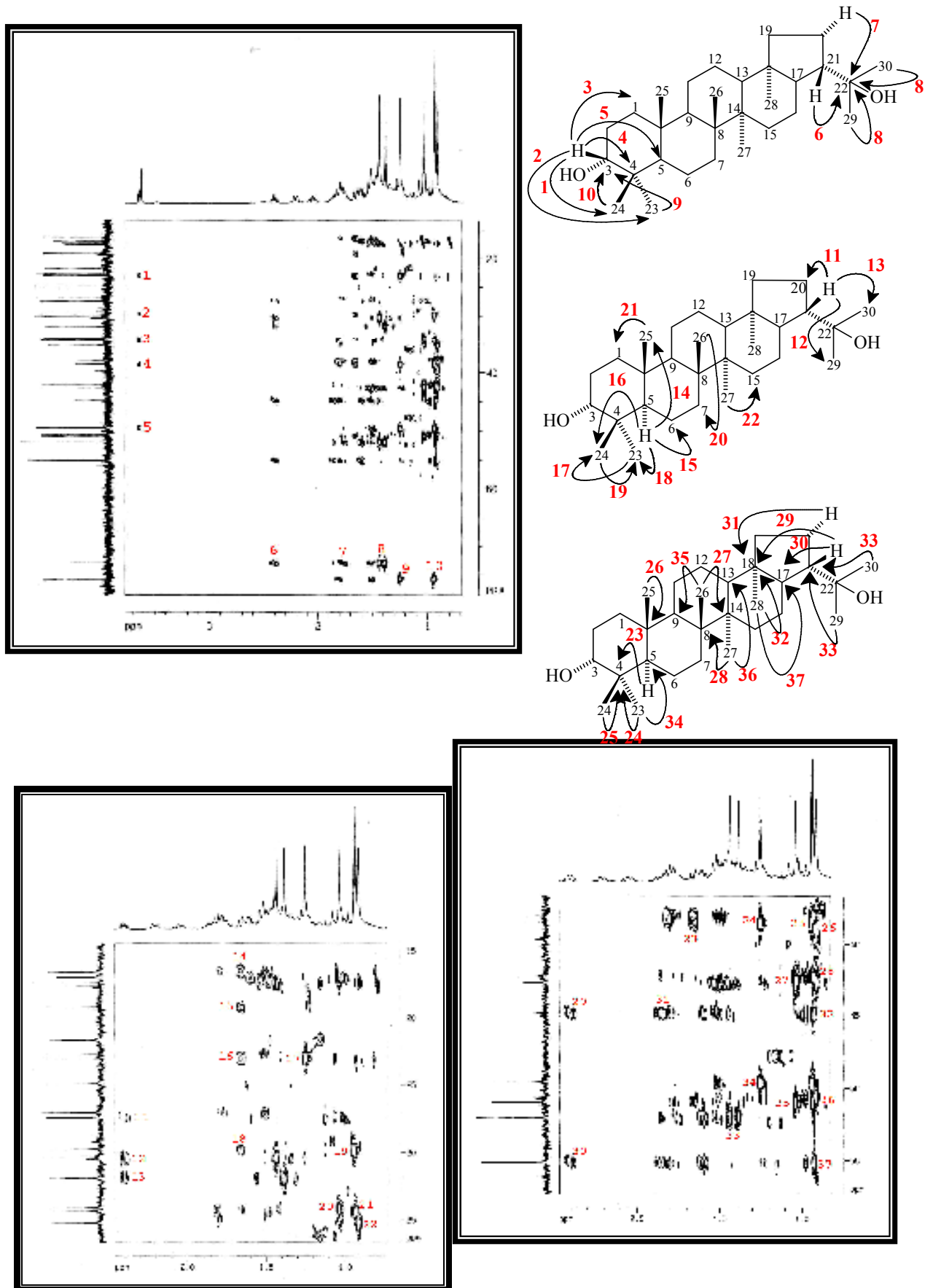


Figura 58 – Espectro de RMN bidimensional HMBC (e expansões) de AM-3

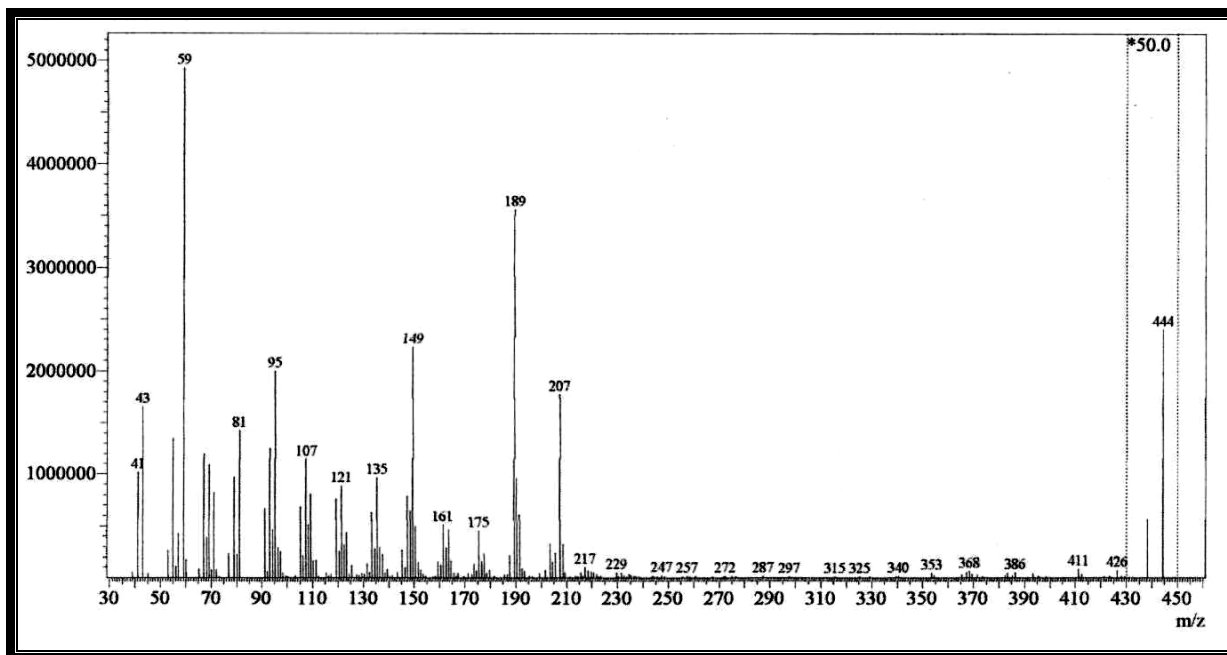


Figura 59 – Espectro de massa de AM-3 (impacto eletrônico a 70 eV).

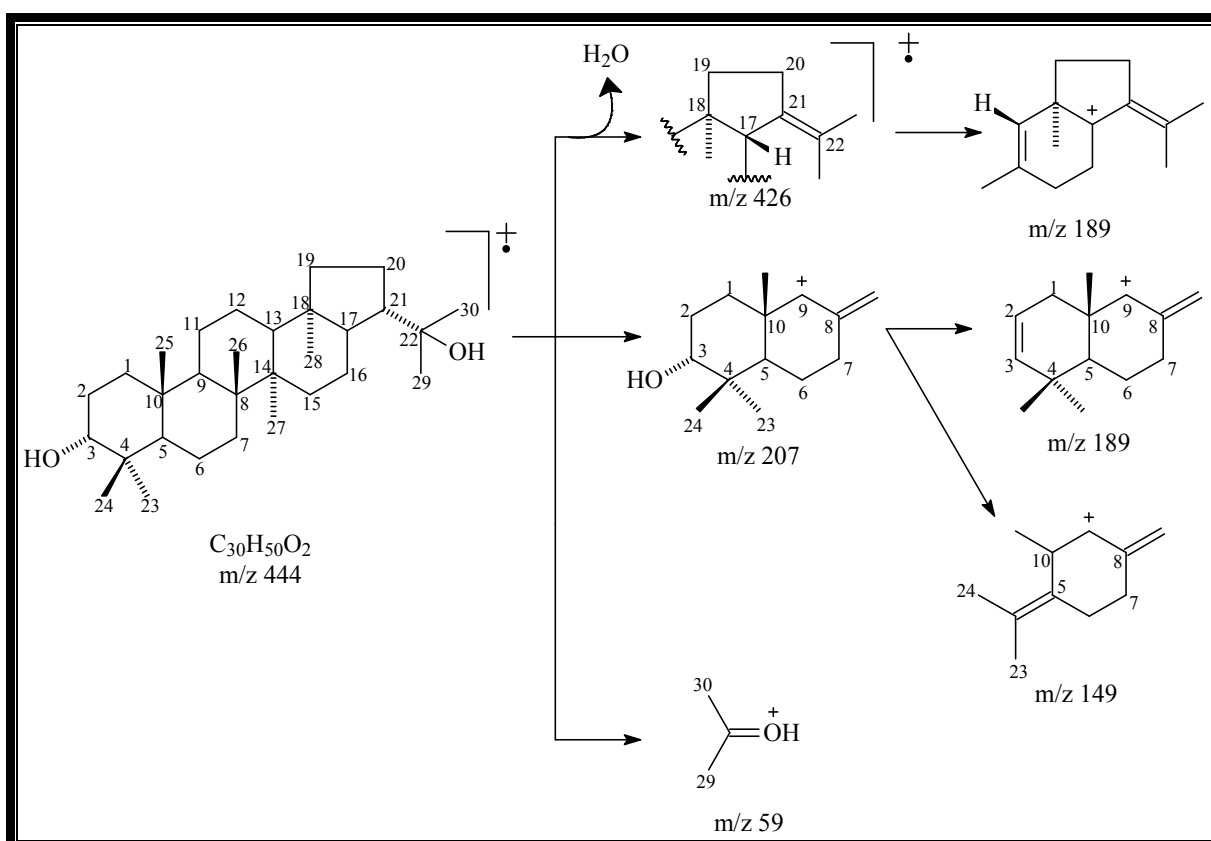


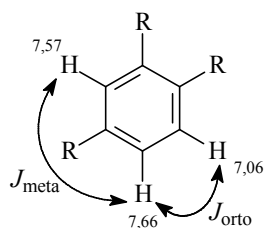
Figura 60 - Proposta mecânica para as fragmentações que justificam os picos principais registrados no espectro de massa de AM-3.

## 4.2. Determinação Estrutural dos Constituintes Químicos Não-Voláteis do Extrato Etanólico dos Talos de *Alibertia myrciifolia*

### 4.2.1. Determinação estrutural de AM-4

Sucessivos tratamentos cromatográficos da fração clorofórmica, proveniente da partição do extrato etanólico dos talos de *A. myrciifolia*, por exclusão em gel de Sephadex LH-20 e cromatografia “flash”, levaram à obtenção de um sólido amorfo de cor amarelo claro e p.f. 281,6-282,1 °C, o qual foi denominado AM-4 (Fluxograma 2, Pág. 209).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de AM-4 (Fig. 64, Pág. 87) mostrou dois sinais em  $\delta$  6,87 (1H, d,  $J=2,0$  Hz) e em  $\delta$  6,79 (1H, d,  $J=2,0$  Hz). Os mesmos foram associados a hidrogênios aromáticos que apresentavam acoplamento *meta* entre si. Os demais sinais observados nesta faixa do espectro:  $\delta$  7,66 (1H, dd,  $J=9,0$  e 2,0 Hz), 7,57 (1H, d,  $J=2,0$  Hz) e 7,06 (1H, d,  $J=9,0$  Hz), foram atribuídos a hidrogênios que mostravam acoplamentos *orto* e/ou *meta* entre si, permitindo sugerir que o composto possuía um anel aromático tri-substituído (abaixo). Foram identificados ainda um sinal simples em  $\delta$  7,00 (s),



correspondente a um hidrogênio olefínico, além de dois sinais simples e intensos em  $\delta$  3,84 (3H, s) e 3,81 (3H, s) atribuídos a hidrogênios de grupamentos metoxilas. Um sinal simples em  $\delta$  13,7 (1H, s), foi associado a um hidrogênio de hidroxila fortemente desblindados, provavelmente em posição “peri” a uma carbonila. Tais dados foram sugestivos de um esqueleto flavonoídico.

Não foi possível realizar a análise espectroscópica de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB e RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 da fração AM-4, devido à pequena quantidade da amostra disponível para a análise. Entretanto, os valores de deslocamentos químicos dos carbonos da amostra puderam ser obtidos a partir dos espectros de RMN bidimensionais (HSQC e HMBC) e se encontram dispostos na tabela 12 (Pág. 85). O espectro de RMN bidimensional HSQC (Fig. 66, Pág. 88) permitiu associar inequivocamente os sinais de todos os hidrogênios a seus respectivos carbonos. O espectro de RMN bidimensional HMBC (Fig. 67, Pág. 89) revelou a correlação do sinal do hidrogênio olefínico em  $\delta$  7,00 com o sinal do carbono em  $\delta$  182,7 (carbonila cetônica conjugada), bem como outras correlações deste hidrogênio com outros carbonos

localizados na sua vizinhança confirmam a proposição estrutural apresentada (Fig. 61, abaixo).

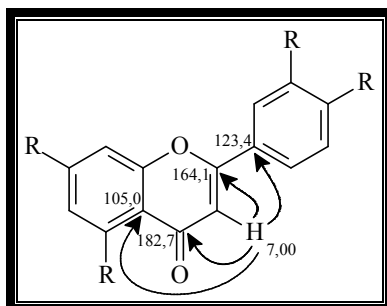


Figura 61 – Sub-estrutura I para AM-4

O padrão de substituição nos anéis A e B do esqueleto flavonoídico foi confirmado através das correlações, no anel A, dos sinais dos hidrogênios em  $\delta$  6,87 e 6,79 com os carbonos em  $\delta$  100,2 e 95,1, respectivamente. No anel B foram verificados os acoplamentos do hidrogênio em  $\delta$  7,66 com carbonos em  $\delta$  164,1 e 152,2 e dos hidrogênios metoxílicos em  $\delta$  3,84 e 3,81 com os carbonos em  $\delta$  150,1 e 152,2, como mostrado na figura 62 (abaixo).

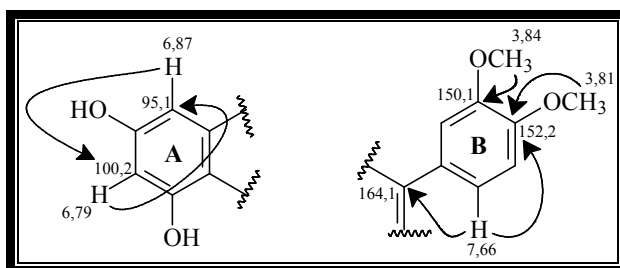


Figura 62 – Sub-estruturas II e III para AM-4

De acordo com estes dados, AM-4 deveria possuir fórmula molecular  $C_{17}H_{14}O_6$ . Esta sugestão foi confirmada pelo espectro de massa da amostra, obtido por impacto eletrônico a 70 eV (Fig. 68, Pág. 90), que apresentou o pico do íon molecular  $[M]^+$  em  $m/z$  314 daltons. A figura 69 (Pág. 90) apresenta uma proposta mecanística para as fragmentações, que justificam os principais picos registrados no espectro de massa de AM-4.

A comparação dos dados de RMN  $^1H$  e RMN  $^{13}C$  de AM-4 com dados relatados na literatura [AGRAWAL, 1989] para flavonas permitiu constatar que este composto tratava-se da 5,7-di-hidroxi-3',4'-dimetoxiflavona, também descrita como 3,4-dimetoxi-luteolina (Fig. 63, Pág. 85). Este composto já foi isolado de *Chrysothamnus nauseosus* (Asteraceae) e *Baccharis trinervi* [STEVENS *et al*, 1999 e GINER *et al*, 1982].

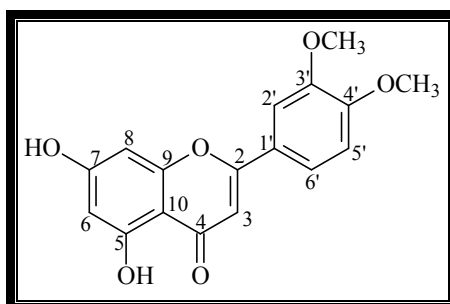


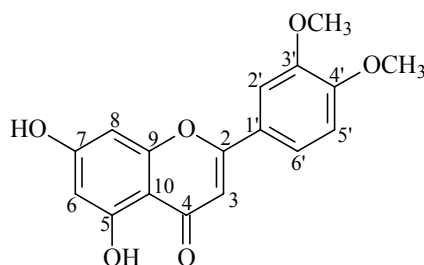
Figura 63 – Estrutura da 3,4-dimetoxi-luteolina

Tabela 12 – Correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (HMQC e HMBC) de AM-4:

<i>C</i>	$^{13}\text{C-BB}$	<i>HSQC</i>	<i>HMBC</i>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
2	164,1	-		7,66; 7,57; 7,00
3	105,0	7,00 (s)		
4	182,7	-	7,00	
5	163,2	-	13,70; 6,79	
6	100,2	6,79 (d, $J=2$ Hz)		13,70; 6,87
7	166,1	-	6,87; 6,79	
8	95,1	6,87 (d, $J=2$ Hz)		6,79
9	158,7	-	6,87	
10	105,0	-		13,70; 7,00; 6,87; 6,79
1'	123,4	-		7,06; 7,00
2'	110,2	7,57 (d, $J=2$ Hz)		7,66
3'	150,1	-		7,06; 3,84
4'	152,2	-	7,06	7,66; 7,57; 3,81
5'	112,2	7,06 (d, $J=9$ Hz)		
6'	120,7	7,66 (d, $J=9$ e 2 Hz)		7,57
OMe-3'	56,1	3,84 (3H, s)		
OMe-4'	56,1	3,81 (3H, s)		

Tabela 13 – Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de AM-4 ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz) com os descritos na literatura para a 3,4-dimetoxi-luteolina (DMSO- $d_6$ , 25 MHz) [AGRAWAL, 1989]:

<i>C</i>	<i>AM-4</i>	<i>3,4-dimetoxi-luteolina</i>
	$\delta_c$	$\delta_c$
2	164,1	163,4
3	105,0	103,9
4	182,7	181,9
5	163,2	161,5
6	100,2	98,8
7	166,1	164,3
8	95,1	94,1
9	158,7	157,4
10	105,0	103,8
1'	123,4	122,9
2'	110,2	109,5
3'	150,1	149,0
4'	152,2	152,0
5'	112,2	111,8
6'	120,7	120,1
OMe-3'	56,1	55,7
OMe-4'	56,1	55,9



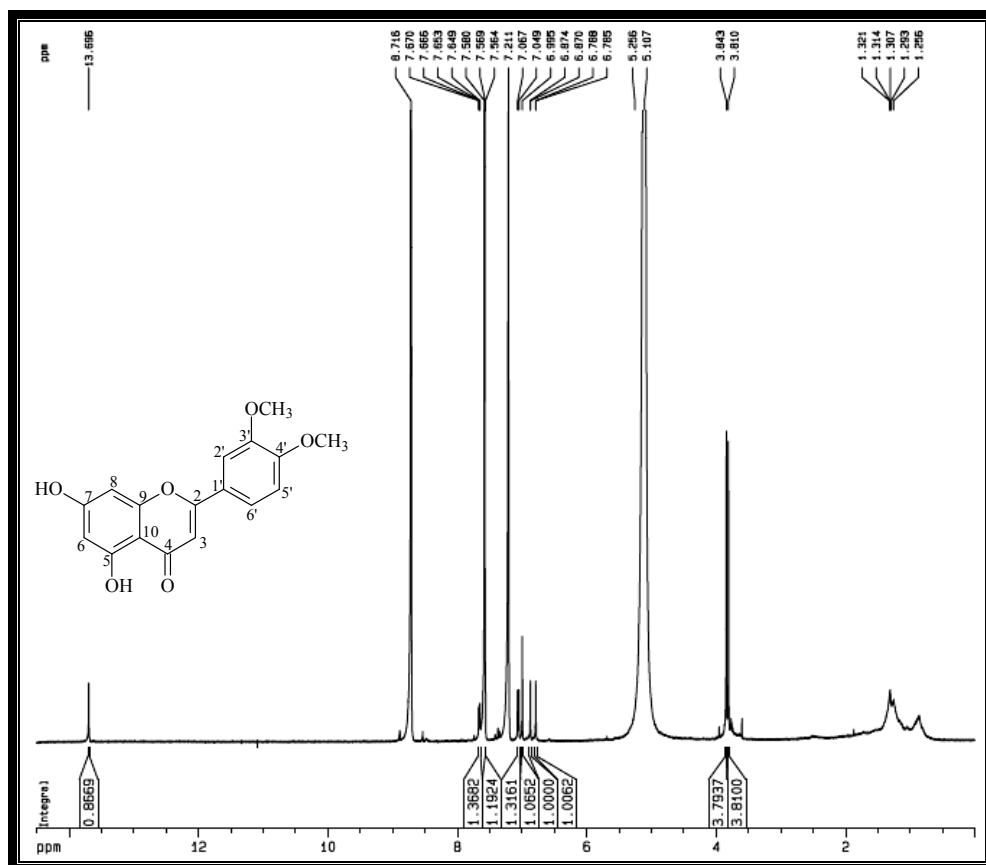


Figura 64 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz) de AM-4

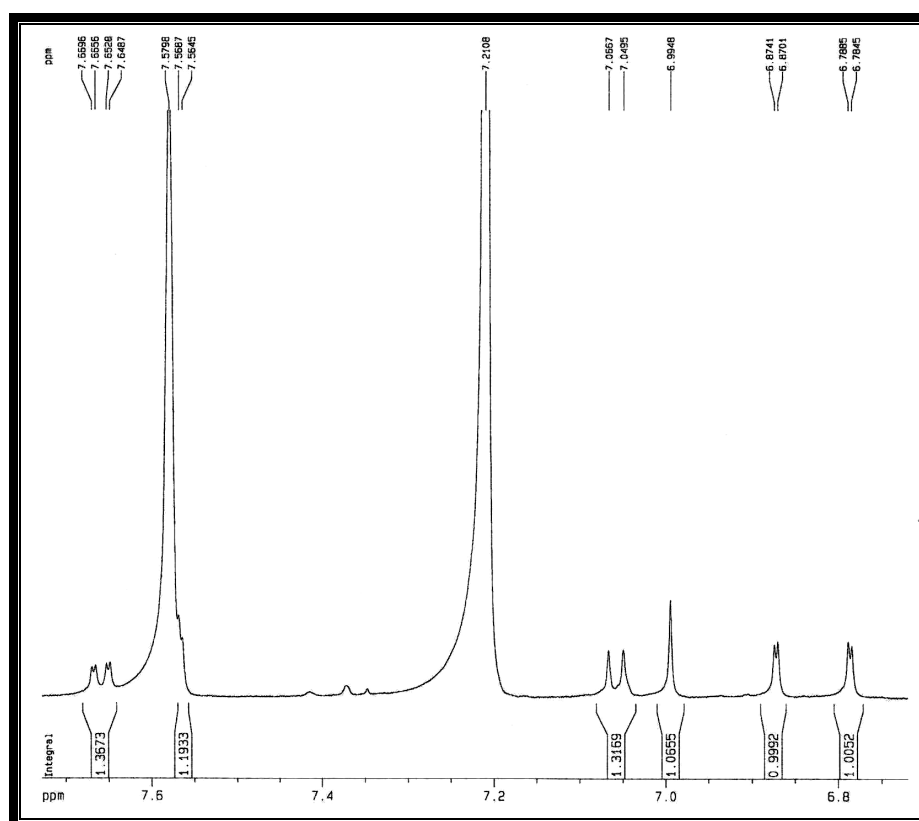


Figura 65 – Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz) de AM-4

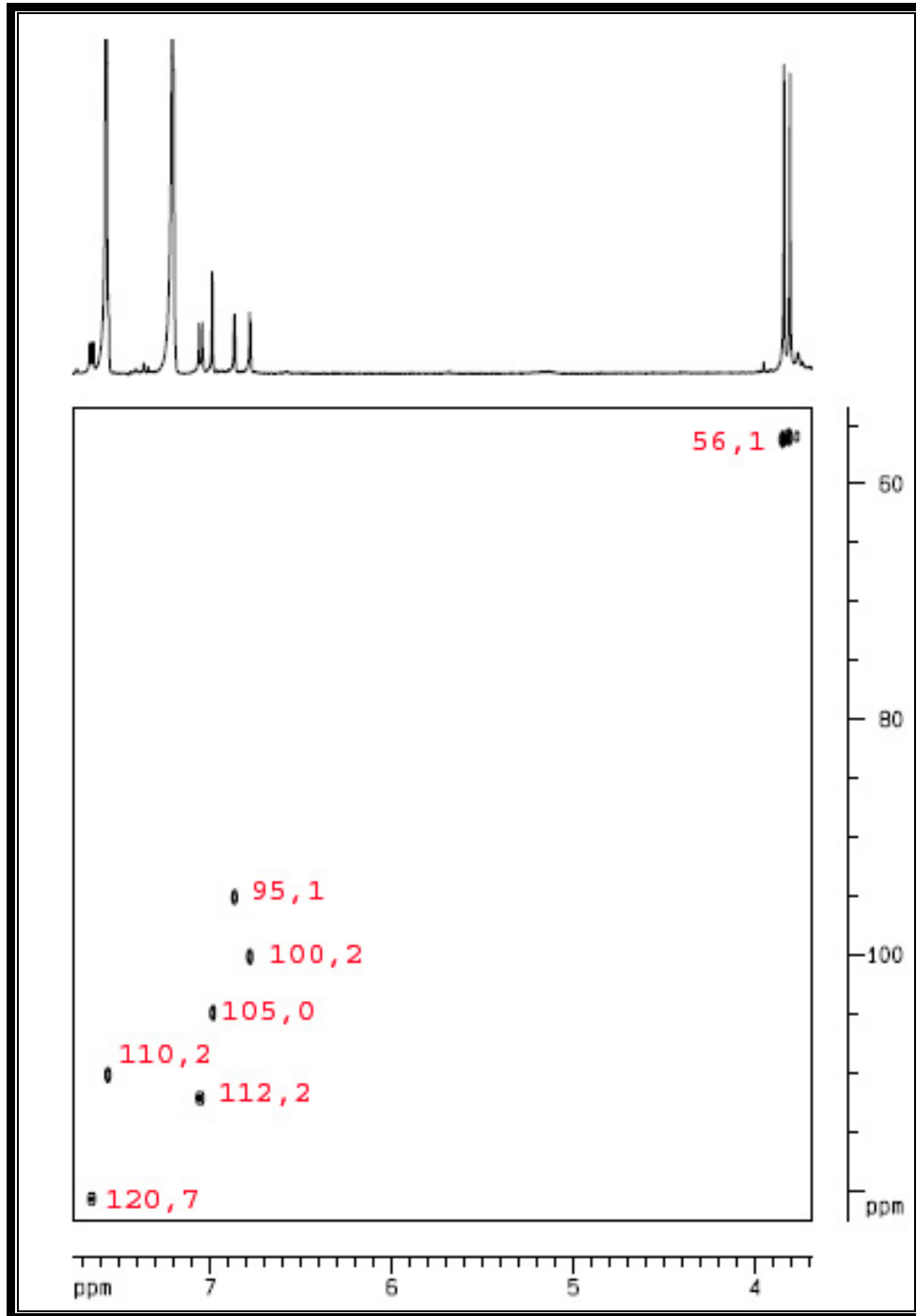
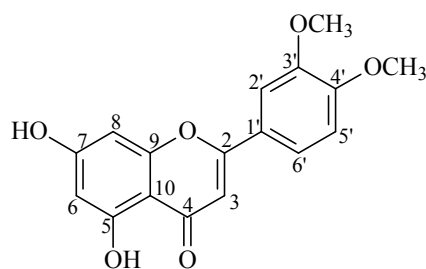


Figura 66 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de AM-4





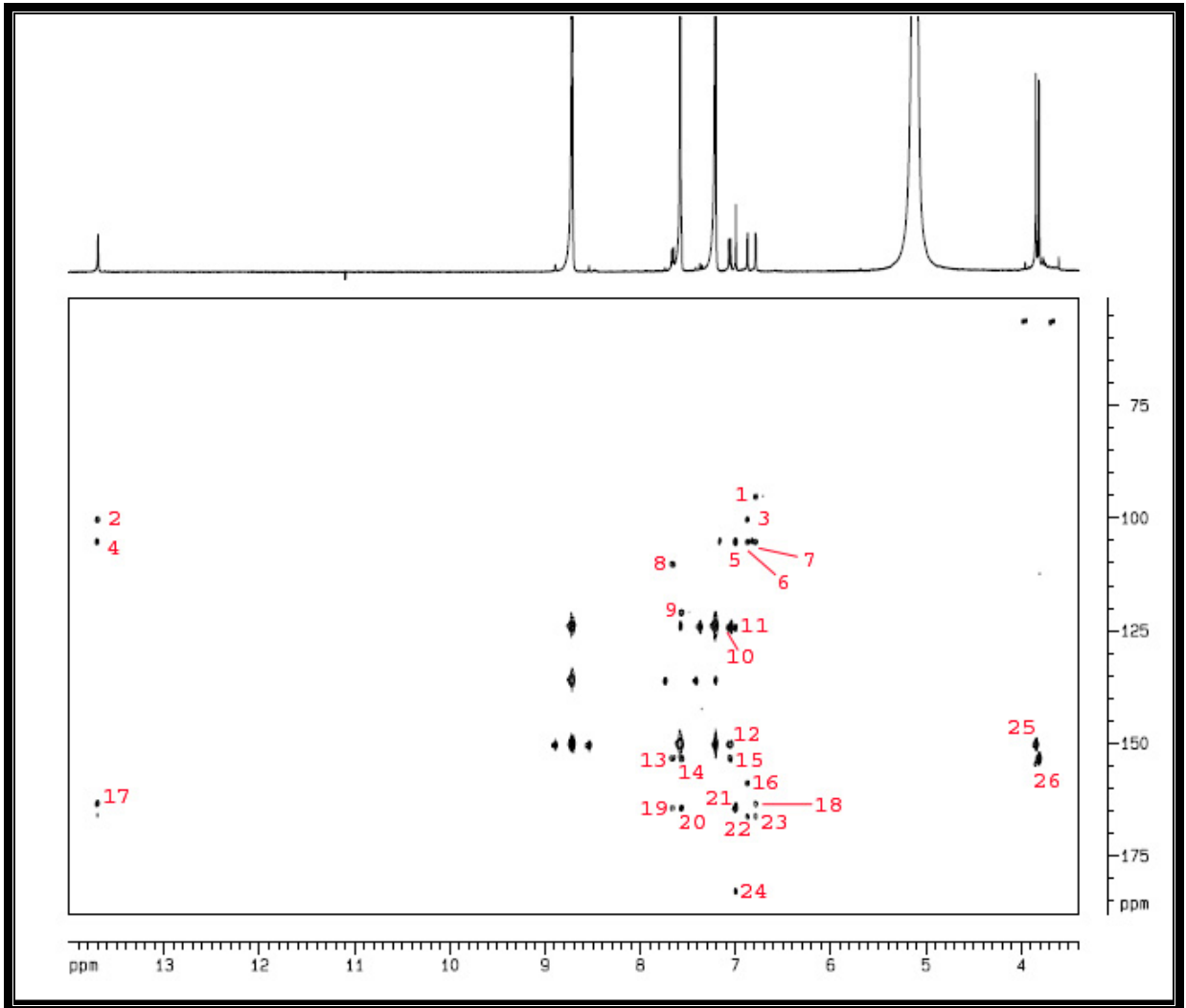
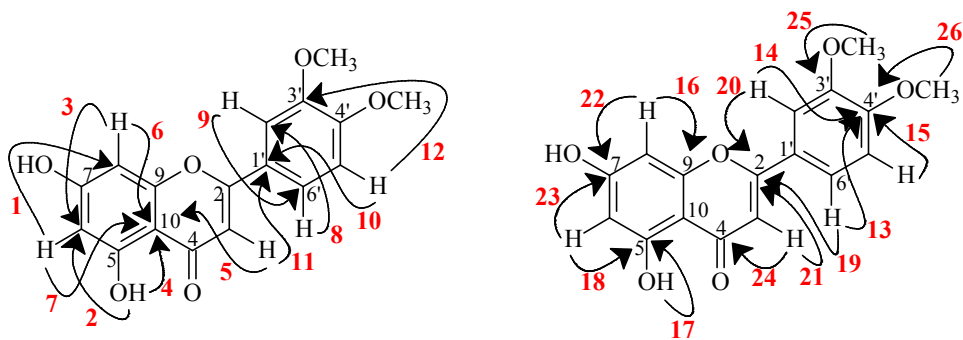


Figura 67 –Espectro de RMN bidimensional HMBC de AM-4



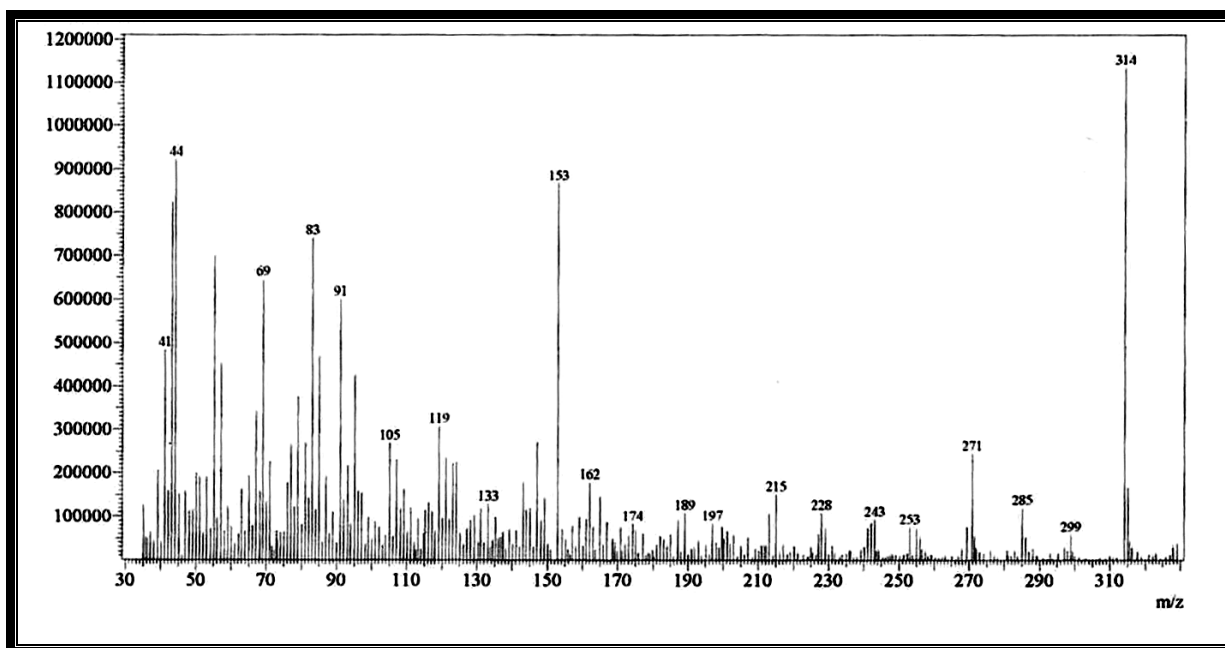


Figura 68 – Espectro de massa de AM-4 (impacto eletrônico a 70 eV).

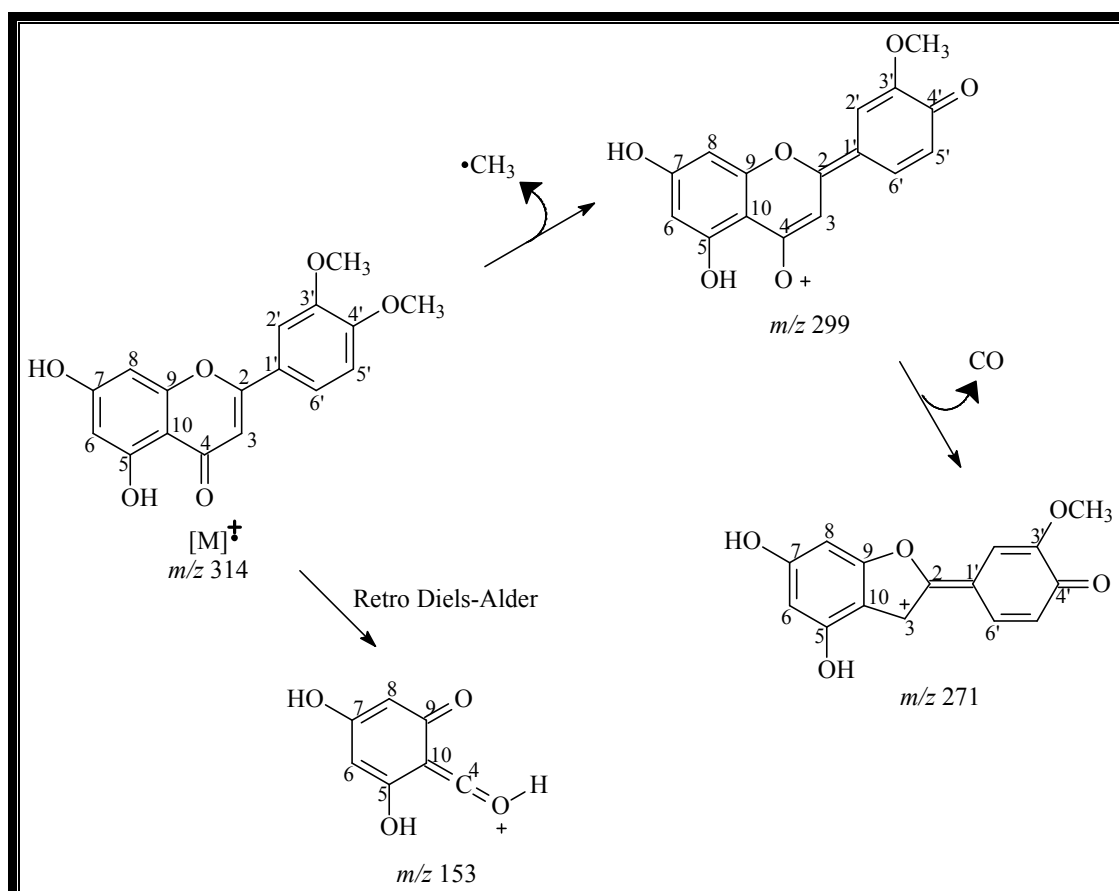


Figura 69 - Proposta mecânica para as fragmentações que justificam os principais picos registrados no espectro de massa de AM-4.

#### 4.2.2. Determinação estrutural de AM-5

Do tratamento cromatográfico em Sephadex LH-20 e coluna de sílica “flash” da fração AcOEt, proveniente do extrato etanólico dos talos de *A. myrciifolia*, foi obtido um sólido amorfo de cor branca com ponto de fusão 285,8-286,9 °C, o qual foi denominado AM-5 (Fluxograma 2, Pág. 209).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 71, Pág. 94) apresentou uma banda em 3416 cm<sup>-1</sup> compatível com deformação axial de ligação O-H; absorção em 2927 cm<sup>-1</sup> característica de deformação axial de ligação C<sub>sp3</sub>-H, uma banda em 1715 cm<sup>-1</sup> associada ao estiramento da ligação C=O da carbonila de um ácido carboxílico. Uma banda em 1690 cm<sup>-1</sup> foi associada a vibrações de deformação axial C=C de alcenos e as bandas em 1277 a 1042 cm<sup>-1</sup> foram relacionadas às vibrações de deformação axial da ligação C-O.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H de AM-5 (300 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) (Fig. 72, Pág. 94) revelou a presença de uma ligação dupla trissubstituída, devido ao sinal de hidrogênio olefínico em δ<sub>H</sub> 5,51 (sl). O sinal em δ<sub>H</sub> 3,46 (ddl, *J*=8,9 Hz) foi atribuído a um hidrogênio ligado a carbono alifático oxigenado. Foi observado ainda um duplete em δ 2,65 (*J*=11,3 Hz), um triplete de duplete em δ 2,35 (*J*=13,3 e 4,5 Hz), além de multipletos entre δ 2,19 e 1,30 referentes aos vários grupos de hidrogênios metilênicos e metínicos. Sete simpletos intensos, atribuídos a hidrogênios de grupamentos metila, foram observados em: δ 1,26; 1,25; 1,07; 1,04; 1,01; 0,98; 0,91. Os dados obtidos neste espectro, acrescidos daqueles observados no espectro de I.V., permitiram sugerir o ocorrência de um esqueleto terpenoídico para AM-5.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C-BB (75 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) (Fig. 73, Pág. 95) apresentou vinte e nove linhas espectrais majoritárias, confirmando a proposição de um esqueleto triterpênico. O sinal em δ<sub>C</sub> 180,3 confirmou a presença de um grupo funcional ácido carboxílico. Os dois sinais observados em δ<sub>C</sub> 139,7 e 126,1 foram atribuídos a carbonos olefínicos, sendo que este último foi relacionado a um carbono metínico após a comparação do espectro RMN <sup>13</sup>C-BB com o espectro DEPT 135° (Fig. 74, Pág. 95). Outros sinais foram observados entre δ 56,3 e 16,1, os quais foram relacionados a carbonos metínicos, metilênicos e metílicos, como se observa na tabela 14 (Pág. 92).

Tabela 14 – Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 75 MHz) de AM-5 por padrão de hidrogenação:

<b>C</b>	<b>CH</b>	<b>CH<sub>2</sub></b>	<b>CH<sub>3</sub></b>	<i>Total</i>
180,3	126,3	39,6	29,3	
139,7	78,6	37,9	24,4	
48,5	56,3	34,1	21,8	
43,0	54,1	31,5	18,0	
40,5	48,5	29,2	17,9	
39,8	40,0	28,6	17,0	
37,8	39,9	25,4	16,1	
		24,1		
		19,3		
<b>C<sub>7</sub></b>	<b>C<sub>7</sub>H<sub>7</sub></b>	<b>C<sub>9</sub>H<sub>18</sub></b>	<b>C<sub>7</sub>H<sub>21</sub></b>	<b>C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub></b>
<b>1 x =O (carbonila de ácido carboxílico); 2 x OH</b>				

O espectro de massa de AM-5 (Fig. 75, Pág. 96), obtido por impacto eletrônico a 70 eV, apresentou pico do íon molecular  $[\text{M}]^{\dagger}$  em  $m/z$  456 daltons, confirmou a fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ . O índice de deficiência de hidrogênio igual a sete indicou duas ligações duplas  $\text{C}=\text{C}$  e  $\text{C}=\text{O}$ , e um esqueleto triterpênico com cinco anéis fundidos. Estes dados, quando confrontados com dados espectroscópicos presentes na literatura para triterpenos, permitiram propor que AM-5 se tratava do triterpeno pentacíclico ácido ursólico [TUNDIS *et al*, 2002], o qual já possui ocorrência relatada em *Alibertia edulis* e *A. macrophylla* [BROCHINI *et al*, 1994; da SILVA *et al*, 2007a].

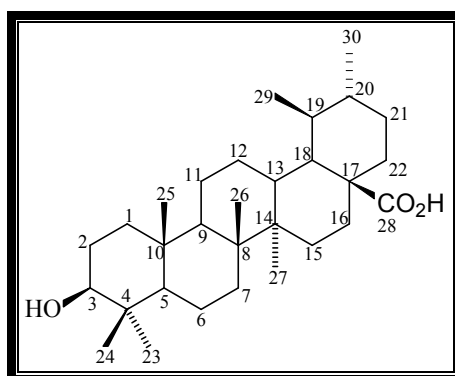
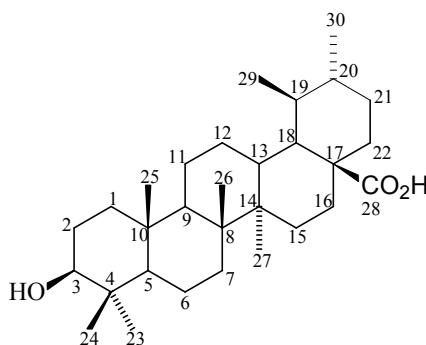


Figura 70 – Estrutura do ácido ursólico.

Tabela 15 – Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de AM-5 (75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) com os descritos na literatura para o ácido ursólico (75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) [TUNDIS *et al*, 2002]:

<i>C</i>	<i>AM-5</i>	<i>Ácido Ursólico</i>
	$\delta_c$	$\delta_c$
1	37,9	37,4
2	28,6	28,0
3	78,6	77,9
4	39,8	39,4
5	56,3	55,8
6	19,3	19,0
7	34,1	33,7
8	40,5	40,1
9	48,5	48,1
10	37,8	37,6
11	24,1	23,9
12	126,1	125,6
13	139,7	139,2
14	43,0	42,7
15	29,2	28,6
16	25,4	24,8
17	48,5	47,9
18	54,1	53,4
19	40,0	39,6
20	39,9	39,5
21	31,5	31,2
22	39,6	39,3
23	29,3	29,3
24	16,1	16,2
25	17,9	17,9
26	18,0	18,0
27	24,4	24,3
28	180,3	179,3
29	17,0	17,1
30	21,8	22,1



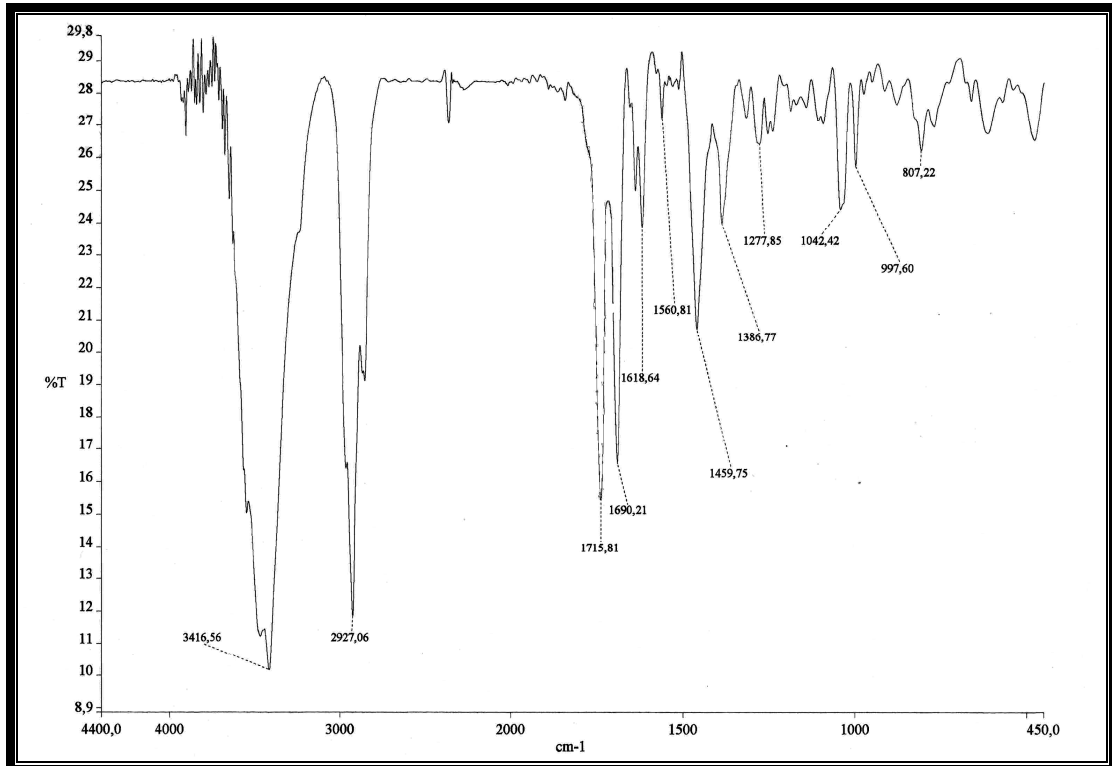


Figura 71 – Espectro de absorção na região do I.V. de AM-5 com pastilhas de KBr.

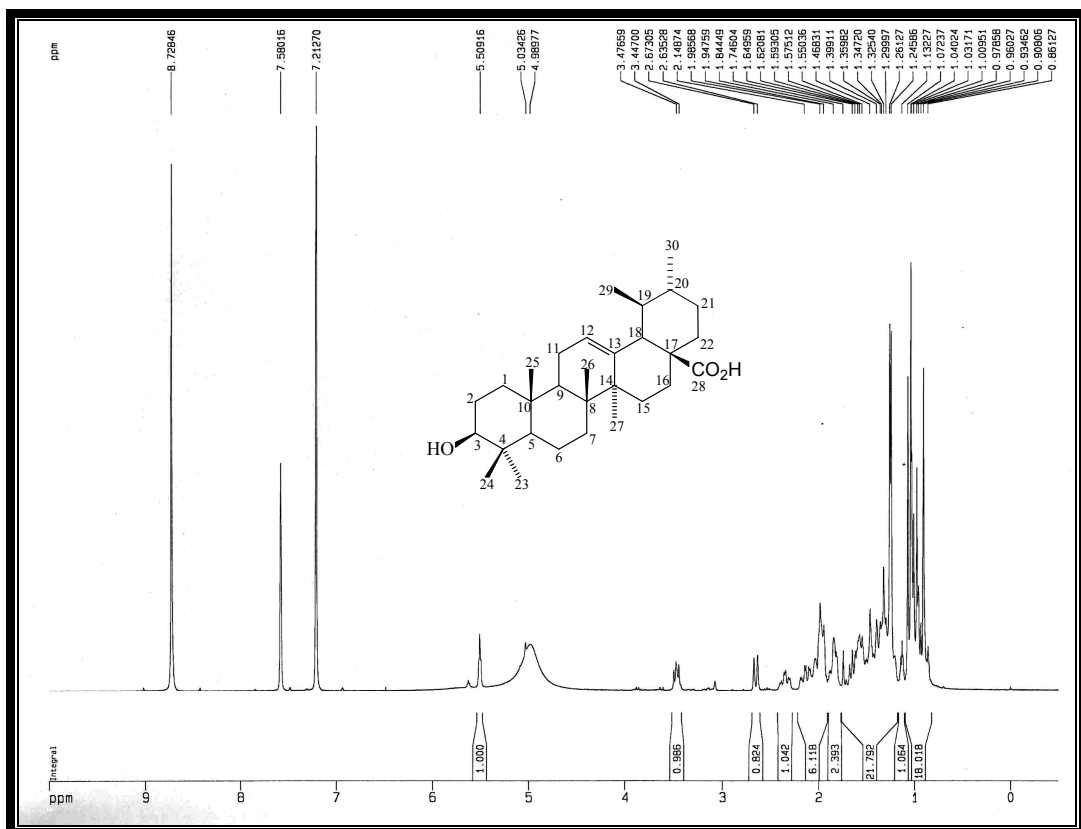


Figura 72 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de AM-5.

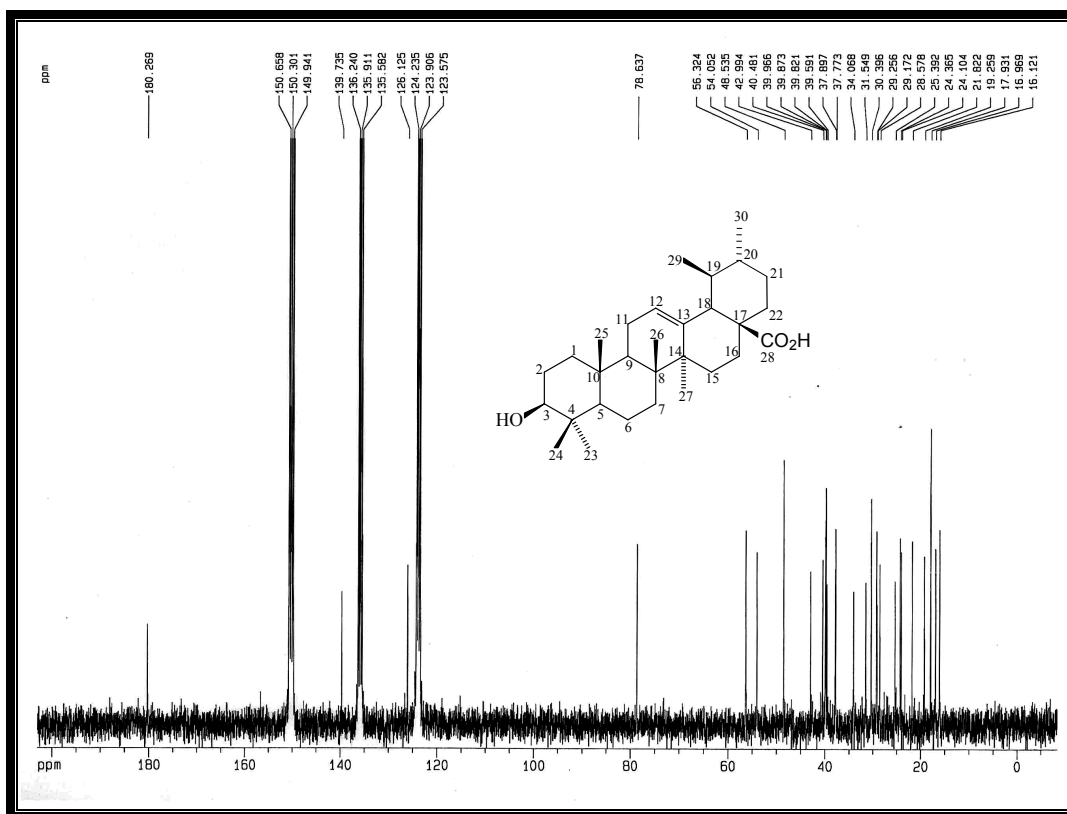


Figura 73 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de AM-5.

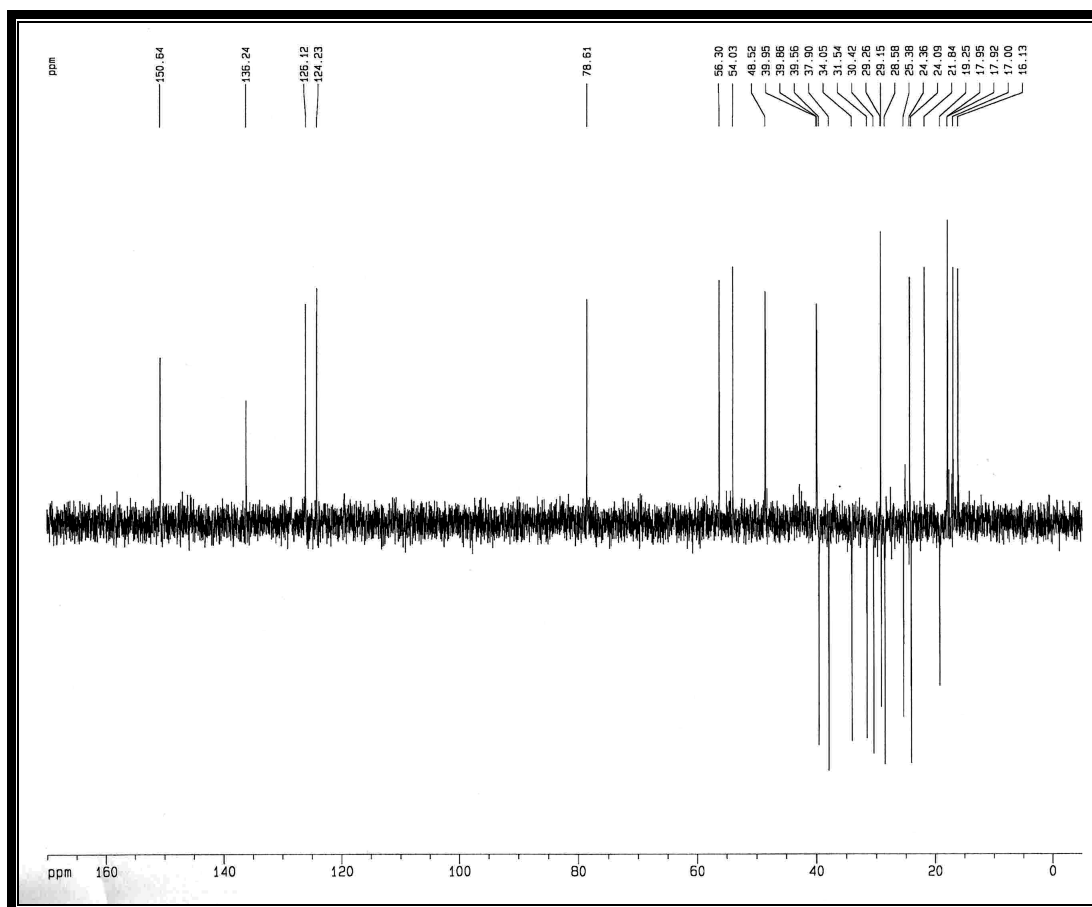


Figura 74 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 (75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de AM-5

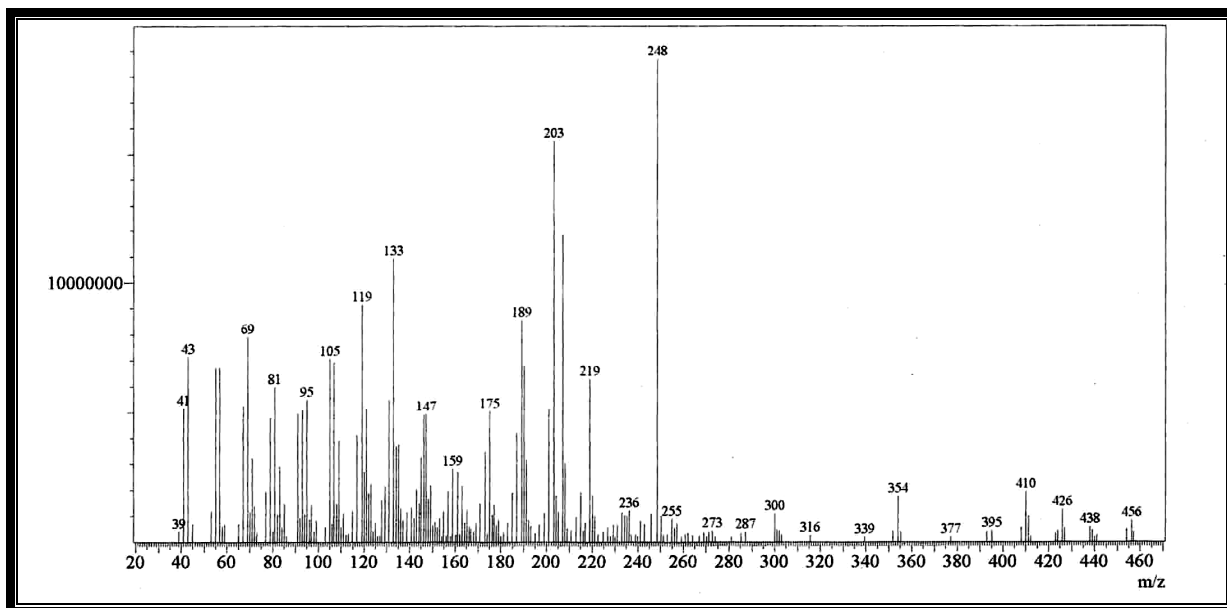
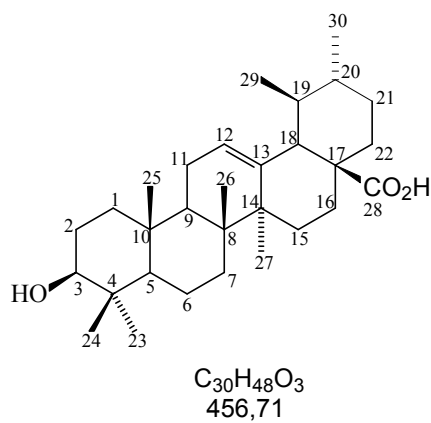


Figura 75 – Espectro de massa de AM-5 (impacto eletrônico a 70 eV).





#### 4.2.3. Determinação estrutural de AM-6

AM-6, um sólido amorfo de cor marrom com ponto de fusão 191,6-193,2 °C, foi obtido do tratamento cromatográfico por exclusão em gel de Sephadex LH-20 e cromatografia “flash” da fração AcOEt, proveniente de partição extrato etanólico dos talos de *A. myrciifolia* (Fluxograma 2, Pág. 209).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 78, Pág. 101) apresentou uma banda em 3435  $\text{cm}^{-1}$  compatível com deformação axial de ligação O-H. A absorção intensa em 1647  $\text{cm}^{-1}$  foi atribuída ao estiramento da ligação C=O de uma carbonila conjugada, uma vez que também foram observadas absorções em 1620, 1520 e 1449  $\text{cm}^{-1}$  que correspondem às deformações axiais das ligações C=C de alcenos e anéis aromáticos. Foram observadas ainda bandas em 1280 e 1120  $\text{cm}^{-1}$ , e em 975 e 780  $\text{cm}^{-1}$  associadas às vibrações de deformação axial da ligação C-O e às deformações angulares das ligações C-H de alcenos e anéis aromáticos, respectivamente.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AM-6 (Fig. 79, Pág. 101) apresentou dois dupletos em  $\delta$  7,52 (1H,  $J=15,9$  Hz) e  $\delta$  6,22 (1H,  $J=15,9$  Hz) atribuídos a hidrogênios olefínicos com acoplamento *trans*. Os demais sinais observados no espectro em  $\delta$  7,03 (1H, d,  $J=1,6$  Hz), 6,93 (1H, dd,  $J=8,1$  e 1,6 Hz) e 6,77 (1H, d,  $J=8,1$  Hz), foram atribuídos a hidrogênios de um anel aromático trissubstituído.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AM-6 (Fig. 80, Pág. 102) apresentou nove linhas espectrais. Destas, a observada em  $\delta$  171,5 foi atribuída a um carbono carbonílico de ácido carboxílico. A presença de dois carbonos aromáticos oxigenados foi proposta pela observação dos sinais em  $\delta$  149,5 e 146,8. Um outro sinal, com deslocamento químico  $\delta$  146,9, foi relacionado ao carbono da dupla ligação localizado na posição  $\beta$  em relação à carbonila, enquanto que o carbono olefínico  $\alpha$  à carbonila foi identificado pelo sinal em  $\delta$  116,3. As demais linhas espectrais em  $\delta$  128,1; 115,3; 116,7; 122,9 foram atribuídas aos carbonos do anel aromático. Ao comparar este espectro com o espectro RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 (Fig. 81, Pág. 102) foi possível definir o padrão de hidrogenação dos carbonos da molécula, o que se encontra descrito na tabela 16 (Pág. 98).

Tabela 16 – Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz) de AM-6 por padrão de hidrogenação:

<i>C</i>	<i>CH</i>	<i>Total</i>
171,5 (COOH)	146,9	
149,5	122,9	
146,8	116,7	
128,1	116,3	
	115,3	
$\text{C}_4\text{HO}_2$	$\text{C}_5\text{H}_5$	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$
2 x OH		

A análise dos dados espectroscópicos obtidos para AM-6 permitiu sugerir a fórmula molecular  $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$ , com índice de deficiência de hidrogênio igual a seis: um anel benzênico, uma ligação dupla e uma carbonila, correspondendo à estrutura de um fenilpropanóide. O espectro de massa, obtido por impacto eletrônico a 70 eV (Fig. 84, Pág. 105), confirmou a fórmula molecular  $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$  ao apresentar o pico do íon molecular  $[\text{M}]^{\dagger}$  em  $m/z$  180 daltons.

O espectro de RMN bidimensional HMQC (Fig. 82, Pág. 103) permitiu associar inequivocamente todos os sinais de hidrogênios a seus respectivos carbonos, como se observa na tabela 17 (Pág. 99).

O espectro de RMN bidimensional HMBC (Fig. 83, Pág. 104), mostrou os acoplamentos a mais de uma ligação entre hidrogênios e carbonos ( $^2J_{\text{CH}}$  e  $^3J_{\text{CH}}$ ). Dentre estes acoplamentos, merecem destaque os que correlacionam o hidrogênio em  $\delta$  7,52 com o carbono carbonílico ( $\delta$  171,5) e os dois carbonos aromáticos em  $\delta$  115,3 e 122,9 (Fig. 76, abaixo).

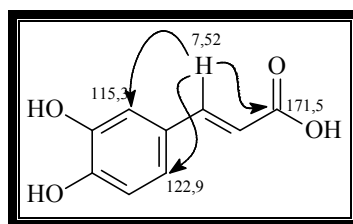


Figura 76 – Sub-estrutura para AM-6

A reunião de todos os dados espectroscópicos obtidos para AM-6 através da detalhada análise de seus espectros, bem como a comparação destes com aqueles registrados na literatura para os fenil-propanóides, permitiram determinar que a amostra se tratava do ácido cafeico [BOLZANI; TREVISAN; YOUNG, 1991] (Fig. 77, Pág. 99), anteriormente isolado de *Alibertia macrophylla* [BOLZANI; TREVISAN; YOUNG, 1991].

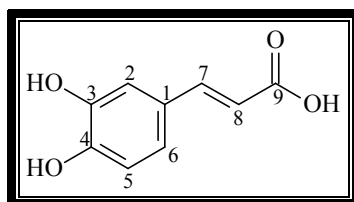


Figura 77 – Estrutura do ácido cafeico

Tabela 17 – Correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (HMQC e HMBC) de AM-6:

<i>C</i>	$^{13}\text{C-BB}$	<i>HMQC</i>	<i>HMBC</i>	
	$\delta_c$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
1	128,1	-	7,52	6,77; 6,22
2	115,3	7,03 (1H, d, $J=1,6$ Hz)		7,52; 6,93
3	149,5	-	7,03	6,77
4	146,8	-	6,77	7,03; 6,93
5	116,7	6,77 (1H, d, $J=8,1$ Hz)		
6	122,9	6,93 (1H, dd, $J=1,6$ e $8,1$ Hz)		7,52; 7,03
7	146,9	7,52 (1H, d, $J=15,9$ Hz)		
8	116,3	6,22 (1H, d, $J=15,9$ Hz)	7,52	
9	171,5	-	6,22	7,52

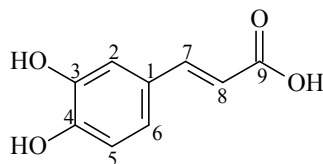
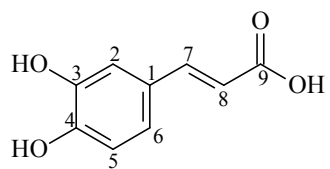


Tabela 18 – Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de AM-6 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz) com os descritos na literatura para o ácido cafeico (acetona- $d_6$ , 50 MHz) [BOLZANI; TREVISAN; YOUNG, 1991]:

<i>C</i>	<i>AM-6</i>	<i>Ácido cafeico</i>
	$\delta_c$	$\delta_c$
1	128,1	127,0
2	115,3	114,9
3	149,5	149,6
4	146,8	146,7
5	116,7	115,2
6	122,9	122,3
7	146,9	146,7
8	116,3	116,4
9	171,5	167,4



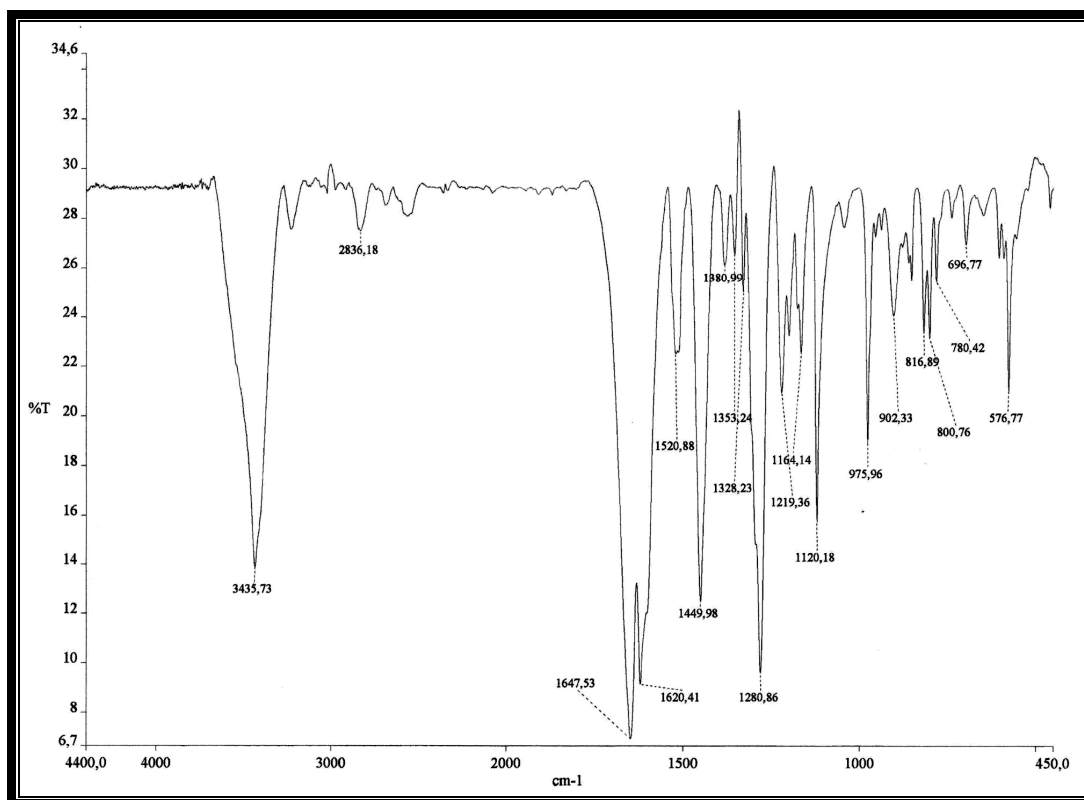


Figura 78 – Espectro de absorção na região do I.V. de AM-6 com pastilhas de KBr.

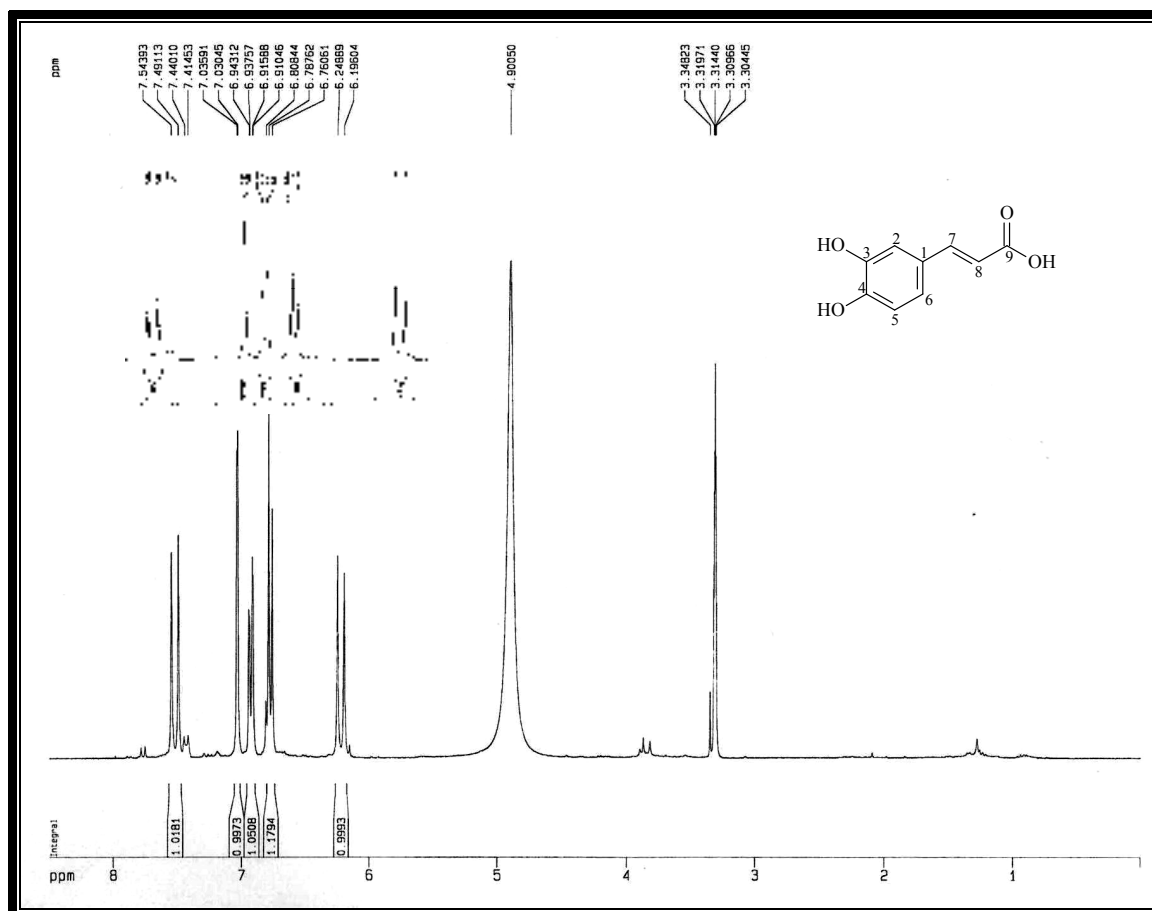


Figura 79 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AM-6.

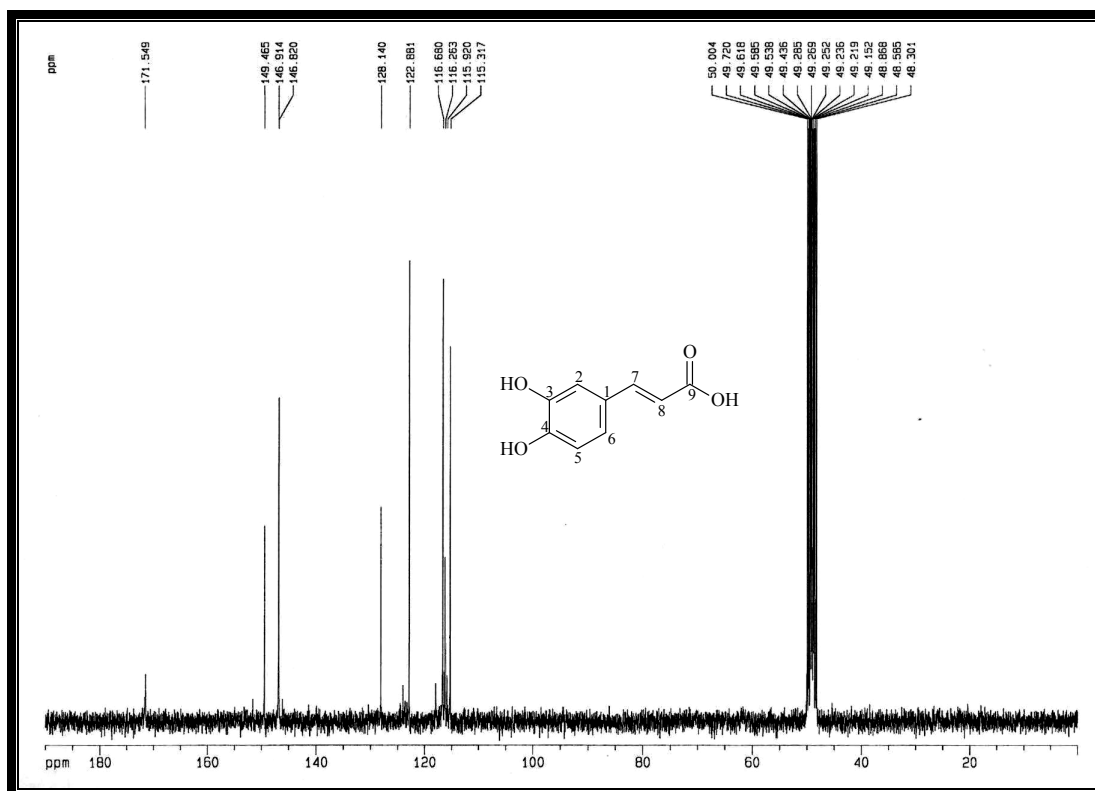


Figura 80 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AM-6.

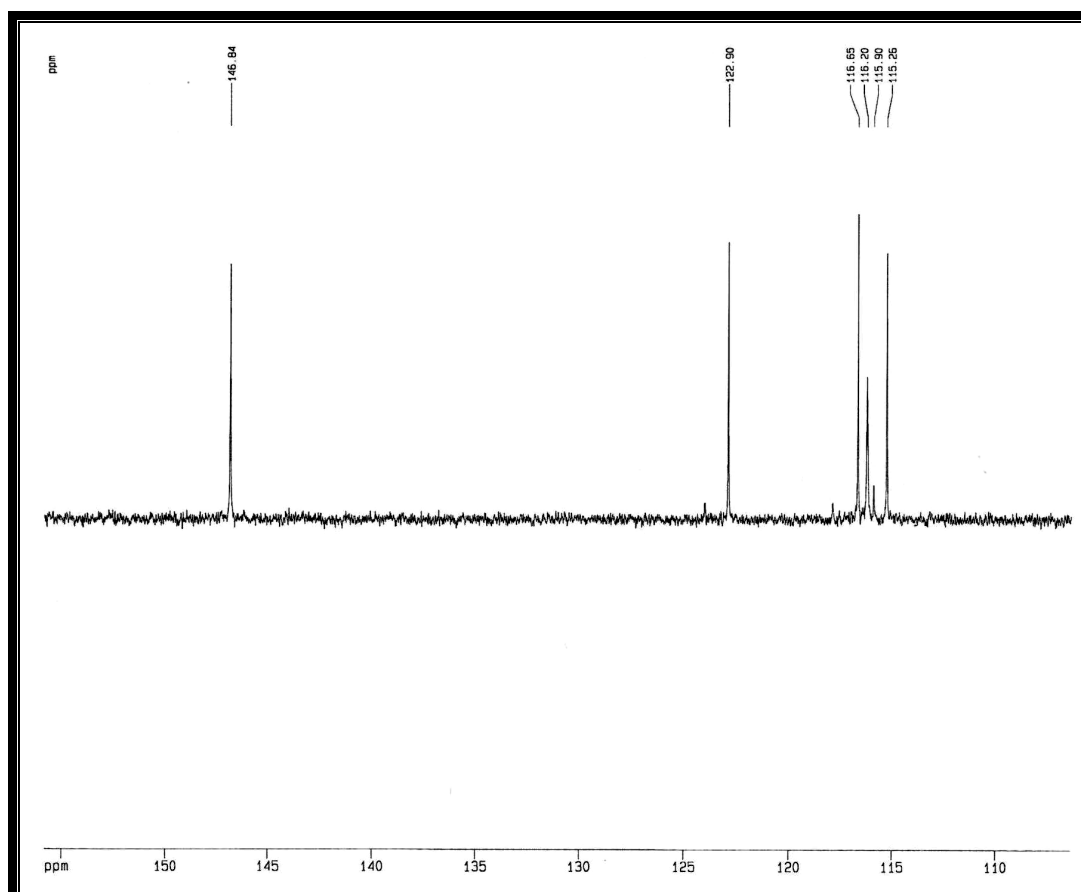


Figura 81 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AM-6.

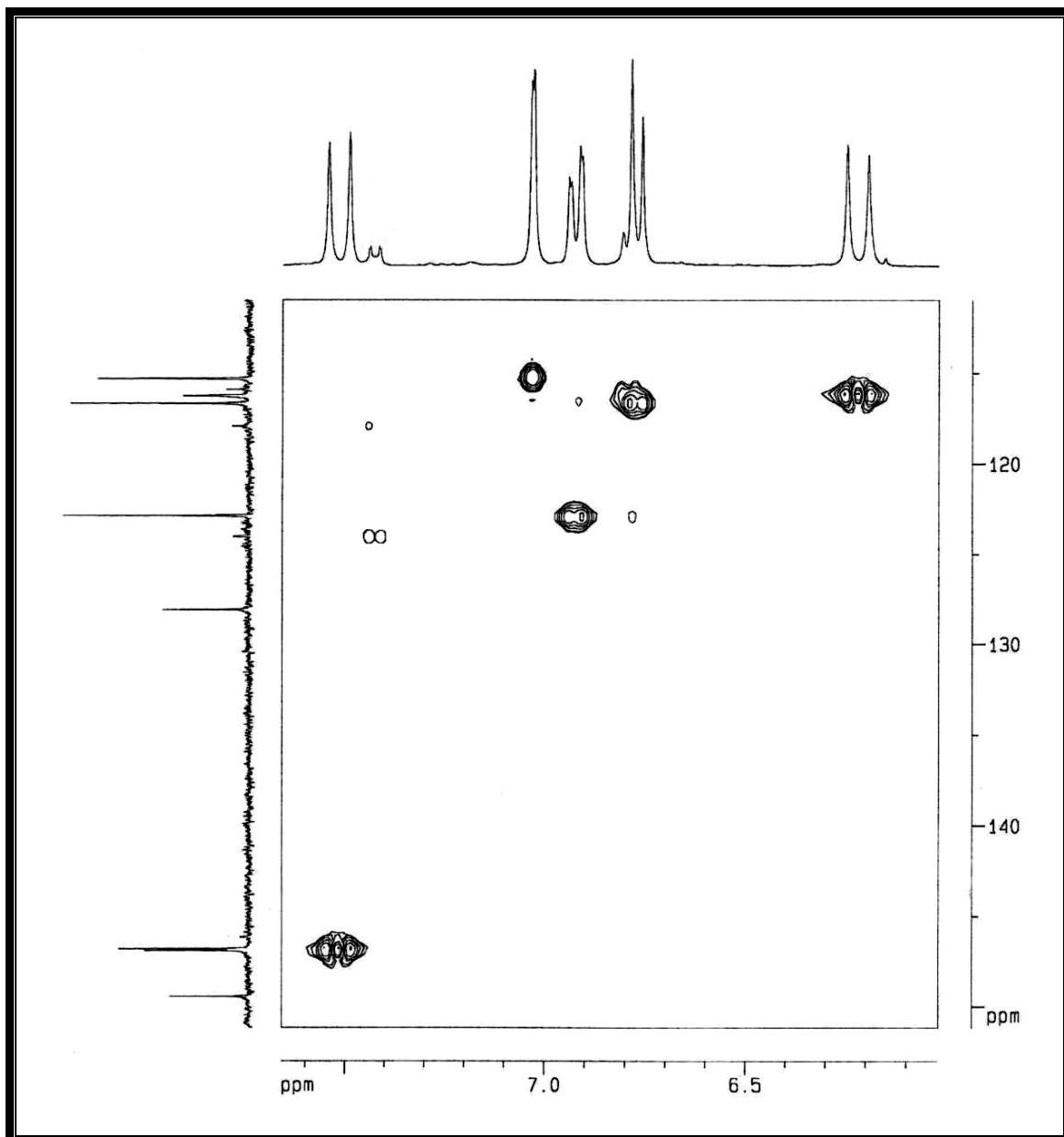
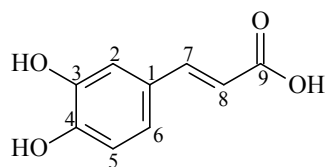


Figura 82 – Espectro de RMN bidimensional HMQC de AM-6



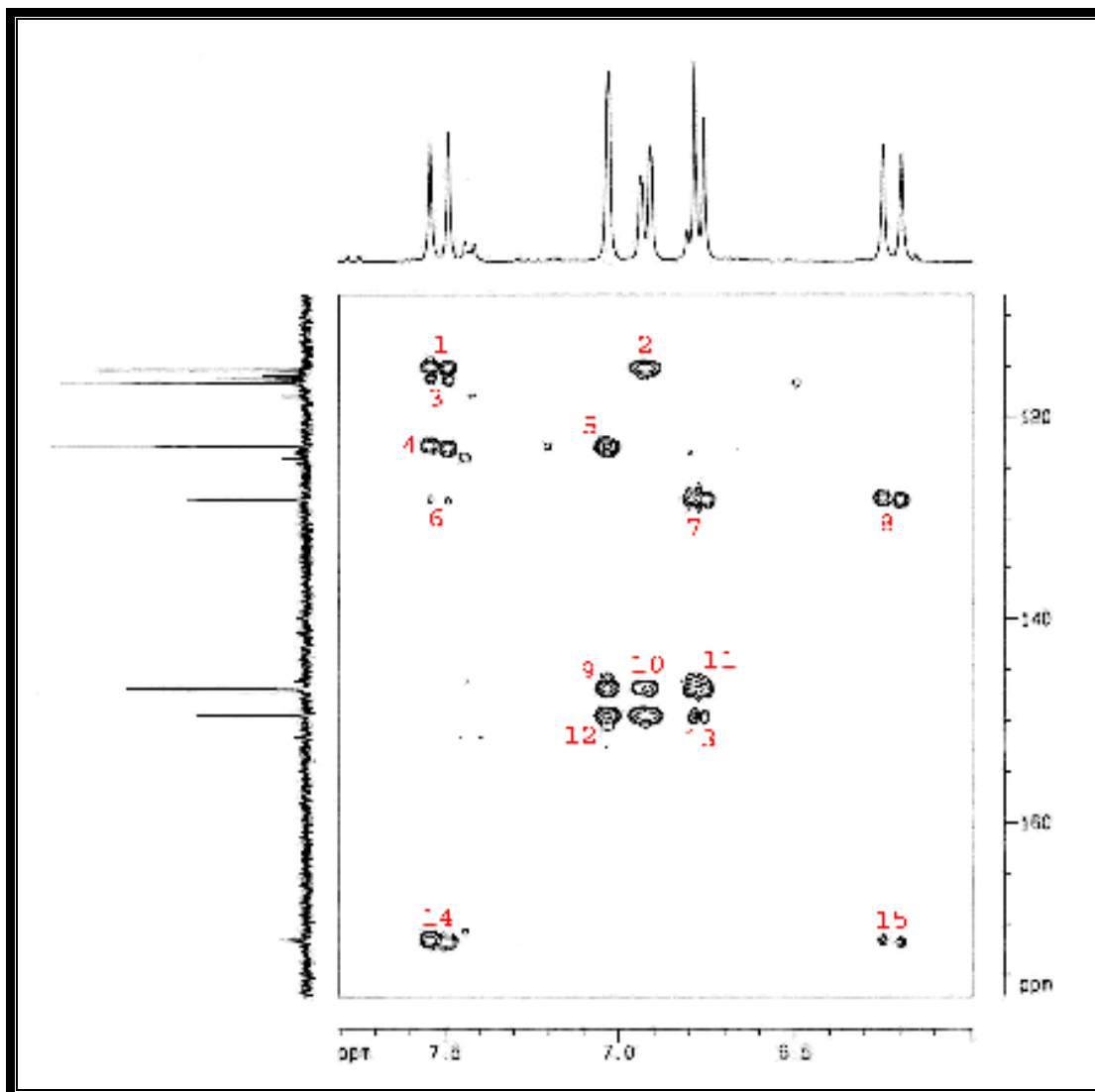
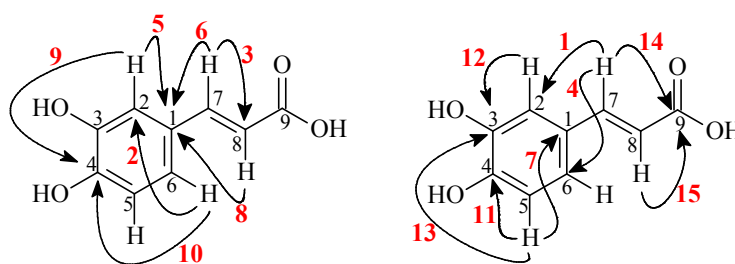


Figura 83 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de AM-6





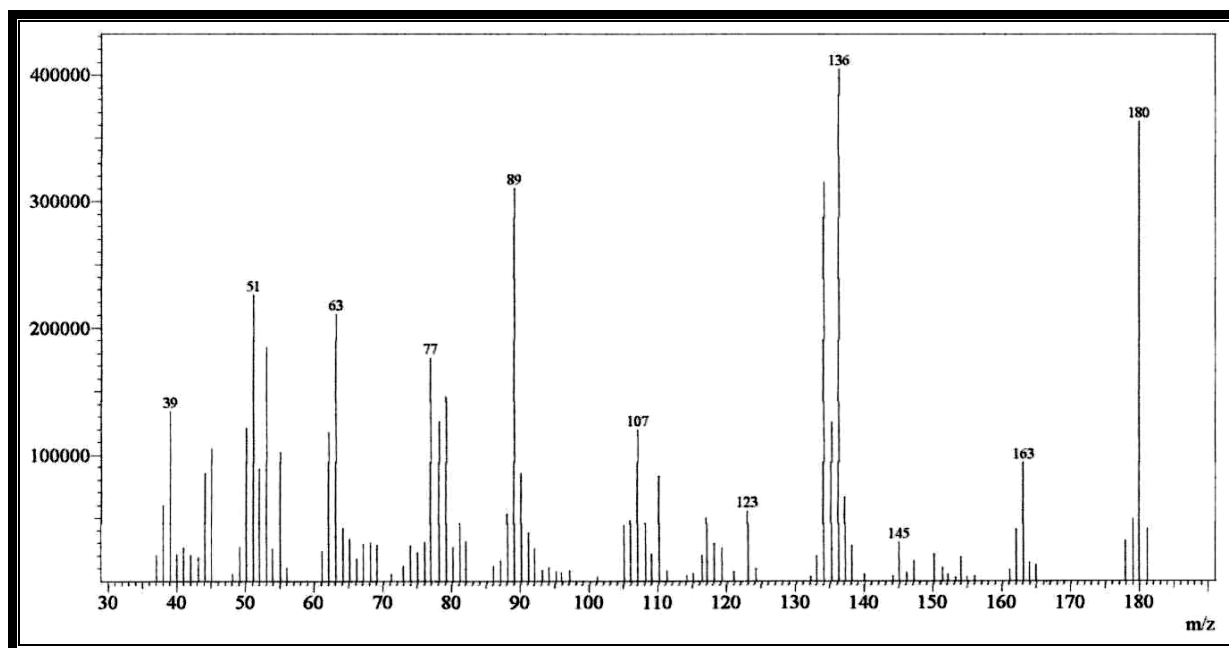
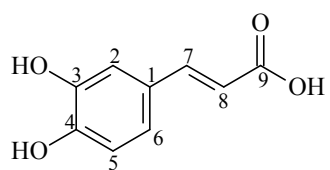


Figura 84 – Espectro de massa de AM-6 (impacto eletrônico a 70 eV).



F.M.:  $C_9H_8O_4$   
M.M. = 180.16

#### 4.2.4. Determinação estrutural de AM-7

A amostra AM-7, uma resina marrom escura, foi obtida do tratamento cromatográfico, por exclusão, em gel de Sephadex LH-20, seguido de cromatografia “flash” e cromatografia em fase reversa (C-18) da fração n-butanol, proveniente de partição extrato etanólico dos talos de *A. myrciifolia* (Fluxograma 2, Pág. 209).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 87, Pág. 111) apresentou uma banda em  $3412\text{ cm}^{-1}$  compatível com o estiramento de ligações O-H. As bandas em  $2921$  e  $2852\text{ cm}^{-1}$  foram relacionadas às deformações axiais de ligações C-H em carbonos alifáticos. A absorção em  $1684\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída ao estiramento da ligação C=O de uma carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada, uma vez que também foi observada uma absorção em  $1637\text{ cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento da ligação C=C de alceno. Foi observada ainda uma banda em  $1076\text{ cm}^{-1}$ , associada às vibrações de deformação axial da ligação C-O.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AM-7 (Fig. 88, Pág. 111) apresentou dois simpletos, em  $\delta$  7,51 (1H) e 5,80 (1H), relacionados a hidrogênios olefínicos. Os dois dupletos em  $\delta$  5,16 (1H,  $J=7,6$  Hz) e 4,71 (1H,  $J=7,9$  Hz) foram atribuídos a hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, sendo este último ( $\delta$  4,71) referente ao hidrogênio anomérico de uma glicose. Outros dois dupletos em  $\delta$  4,32 (1H,  $J=14,2$  Hz) e  $\delta$  4,19 (1H,  $J=14,2$  Hz) foram relacionados a hidrogênios geminais de um carbono carbinólico. O conjunto de sinais observados entre  $\delta$  3,86 e 3,22 são compatíveis com hidrogênios de oses, neste caso, da glicose. Os demais sinais observados no espectro,  $\delta$  2,81 (1H, m), 2,72 (1H, tl,  $J=7,5$  Hz) e 2,11 (1H, m), foram atribuídos a hidrogênios ligados a carbonos não funcionalizados.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AM-7 (Fig. 89, Pág. 112) apresentou dezesseis linhas espectrais. Destas, a observada em  $\delta$  171,1 foi atribuída a um carbono carbonílico de ácido carboxílico. Quatro carbonos olefínicos foram identificados  $\delta$  153,5, 145,0, 128,6 e 113,0. Destes, dois são carbonos hidrogenados [ $\delta$  153,5 e 128,6 - comparação com o espectro RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 (Fig. 90, Pág. 112)], sendo que o mais desblindado também é oxigenado. A presença de carbonos acetais foi confirmada pelo deslocamento químico dos sinais em  $\delta$  100,5 e 98,4. Os sinais visualizados na faixa de  $\delta$  78,6 a 62,8 confirmam que a AM-7 se trata de um heterosídeo, tendo, provavelmente, como açúcar a glicose. Mais uma vez, a comparação com o espectro RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 permitiu propor

que o sinal em  $\delta$  61,6 corresponde a um carbono metilênico oxigenado e os sinais em  $\delta$  47,2 (CH), 39,9 (CH<sub>2</sub>) e 36,8 (CH), foram relacionados a carbonos alifáticos.

Tabela 19 – Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz) de AM-7 por padrão de hidrogenação:

<i>C</i>	<i>CH</i>	<i>CH<sub>2</sub></i>	<i>Total</i>
171,5 (COOH)	153,5 (O)	62,8 (-OH)	
145,0	128,6	61,6 (-OH)	
113,0	100,5 (O)	39,9	
	98,4 (O)		
	78,6		
	78,0 (-OH)		
	75,0 (-OH)		
	71,7 (-OH)		
	47,2		
	36,8		
C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>

A análise dos dados espectroscópicos obtidos para AM-7 permitiu sugerir a fórmula molecular C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>, com índice de deficiência de hidrogênio igual a seis (2 x C=C, C=O, dois anéis). O espectro de massa, obtido por impacto eletrônico a 70 eV (Fig. 94, Pág. 115), confirmou a fórmula molecular proposta ao apresentar o pico do íon molecular [M]<sup>†</sup> em *m/z* 374 daltons. Dessa forma, foi proposto que a estrutura de AM-7 seria compatível com um monoterpeno (iridóide) glicosilado.

O espectro de RMN bidimensional HSQC (Fig. 91, Pág. 113) permitiu associar inequivocamente todos os sinais de hidrogênios a seus respectivos carbonos, como observado na tabela 20 (Pág. 109).

O espectro de RMN bidimensional HMBC (Fig. 93, Pág. 114), mostrou os acoplamentos a mais de uma ligação entre hidrogênios e carbonos (<sup>2</sup>J<sub>CH</sub> e <sup>3</sup>J<sub>CH</sub>). Dentre estes acoplamentos, pôde-se destacar o do hidrogênio em  $\delta$  5,16 com o carbono em  $\delta$  100,5 e o do hidrogênio em  $\delta$  4,71 com o carbono em  $\delta$  98,4, indicando a posição da ligação da unidade glicose no esqueleto do iridóide (Fig. 85, Pág. 108). A posição relativa do grupo carboxila foi

identificada pela correlação entre o hidrogênio em  $\delta$  7,51 e o carbono carbonílico em  $\delta$  171,1 (Fig. 85, abaixo).

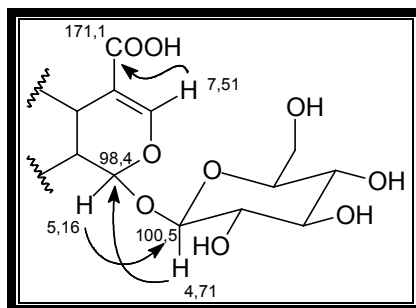


Figura 85 – Sub-estrutura para AM-7

A reunião de todos os dados espectroscópicos obtidos para AM-7 através da detalhada análise de seus espectros, bem como a comparação destes com aqueles registrados na literatura para os iridóides, permitiram determinar que a amostra se tratava do ácido geniposídico [JENSEN *et al*, 1996] (Fig. 86, abaixo), anteriormente isolado de *Alibertia sessilis* [da SILVA *et al*, 2007b].

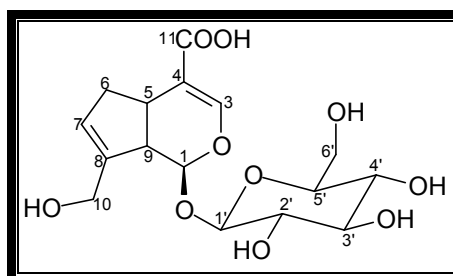


Figura 86 – Estrutura do ácido geniposídico

Tabela 20 – Correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (HMQC e HMBC) de AM-7:

<i>C</i>	$^{13}\text{C-BB}$	<i>HSQC</i>	<i>HMBC</i>	
	$\delta_c$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
1	98,4	5,16 (1H, d, $J=7,6$ Hz)	2,72	7,51; 4,71; 3,17
3	153,5	7,51 (1H, s)	-	5,16; 3,17
4	113,0	-	-	7,51; 3,17
5	36,8	3,17 (1H, dd, $J=8,0$ Hz)	-	7,51; 5,16
6	39,9	2,81 (1H, m); 2,11 (1H, m)	3,17	-
7	128,6	5,80 (1H, s)	-	4,32; 2,72
8	145,0	-	4,32; 2,72	5,16
9	47,2	2,72 (1H, tl, $J=7,5$ Hz)	5,16; 3,17	-
10	61,6	4,32(1H, d, $J=14,2$ Hz); 4,19 (1H, d, $J=14,2$ Hz)	-	-
11	171,1	-	-	7,51; 3,17
1'	100,5	4,71 (1H, d, $J=7,9$ Hz)	3,22	5,16
2'	75,0	3,22 (1H, m)	4,71	-
3'	78,0	3,38 (1H, m)	3,22	4,71
4'	71,7	3,29 (m)	3,38; 3,28	3,86; 3,64
5'	78,6	3,28 (m)	3,86; 3,64; 3,29	-
6'	62,8	3,86 (1H, d, $J=11,7$ Hz); 3,64 (1H, dd, $J=11,7$ e $5,2$ Hz)	3,28	-

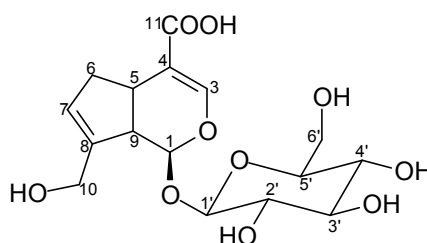
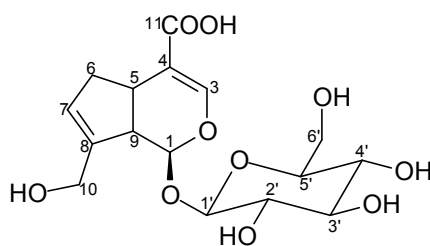


Tabela 21 – Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de AM-7 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) com os descritos na literatura para o ácido geniposídico ( $\text{D}_2\text{O}$ , 50 MHz) [JENSEN *et al*, 1996]:

<i>C</i>	<i>AM-7</i>	<i>Ácido geniposídico</i>
	$\delta_c$	$\delta_c$
1	98,4	97,8
3	153,5	153,0
4	113,0	112,8
5	36,8	35,2
6	39,9	38,9
7	128,6	129,6
8	145,0	142,4
9	47,2	46,6
10	61,6	60,5
11	171,1	171,8
1'	100,5	99,7
2'	75,0	73,6
3'	78,0	76,5
4'	71,7	70,3
5'	78,6	76,9
6'	62,8	61,6



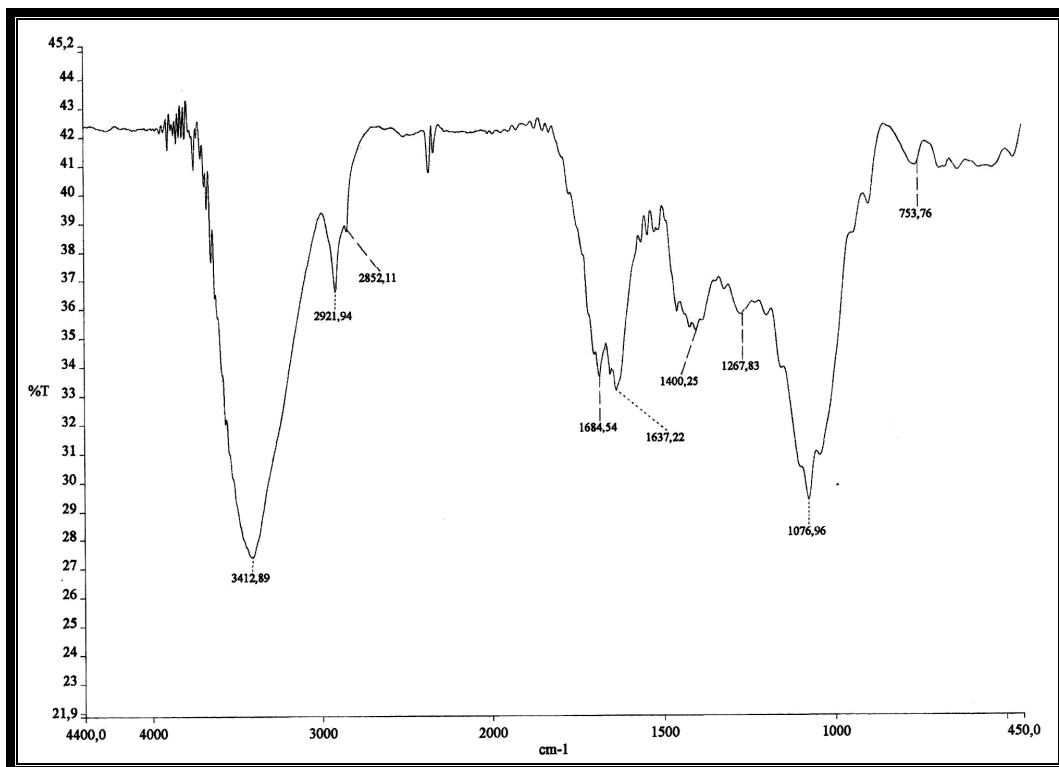


Figura 87 – Espectro de absorção na região do I.V. de AM-7 com pastilhas de KBr.

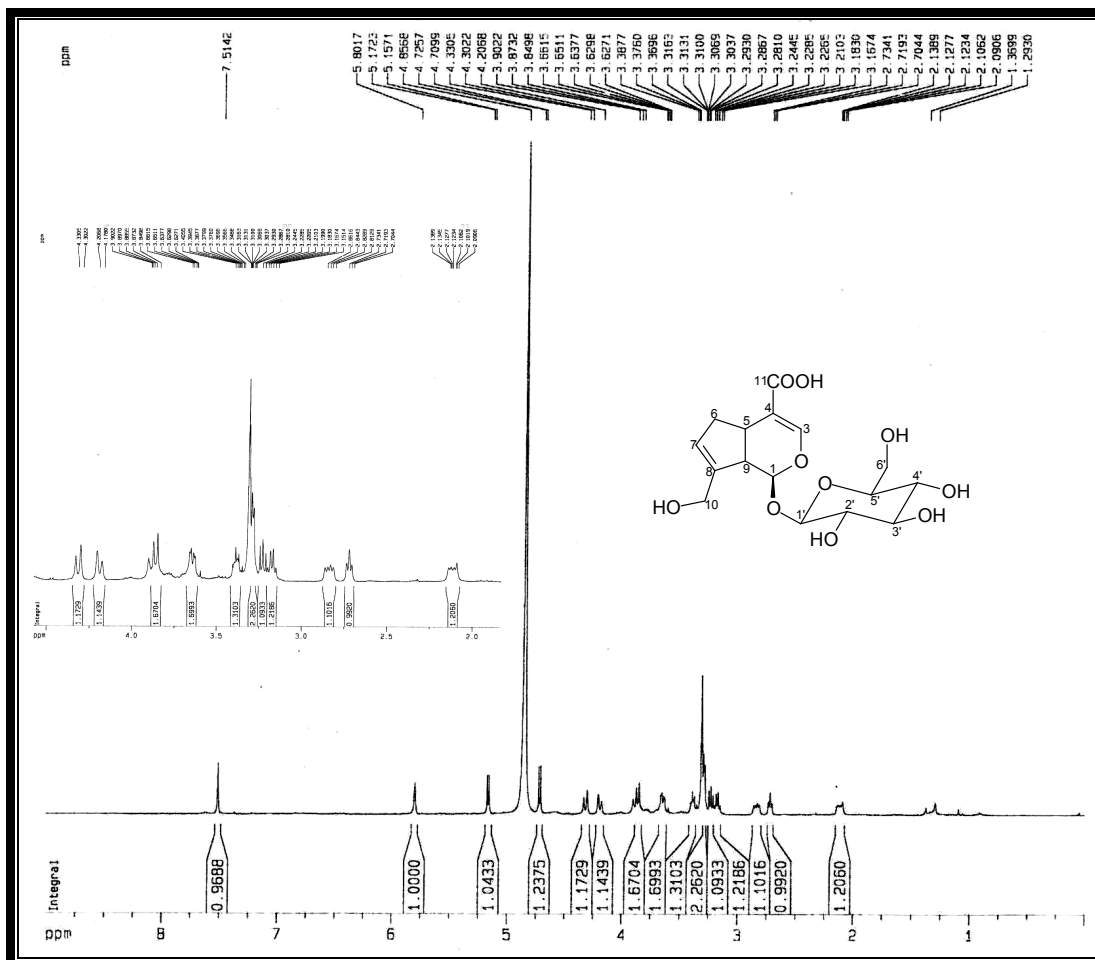


Figura 88 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AM-7.

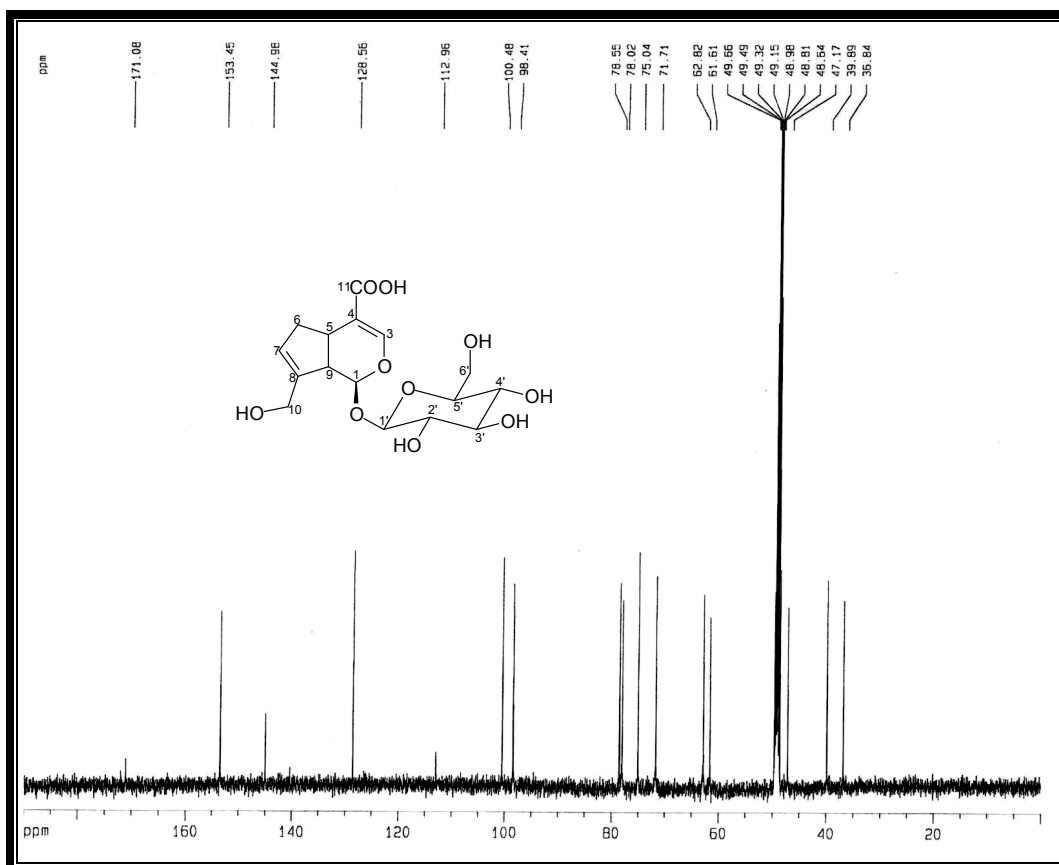


Figura 89 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AM-7.

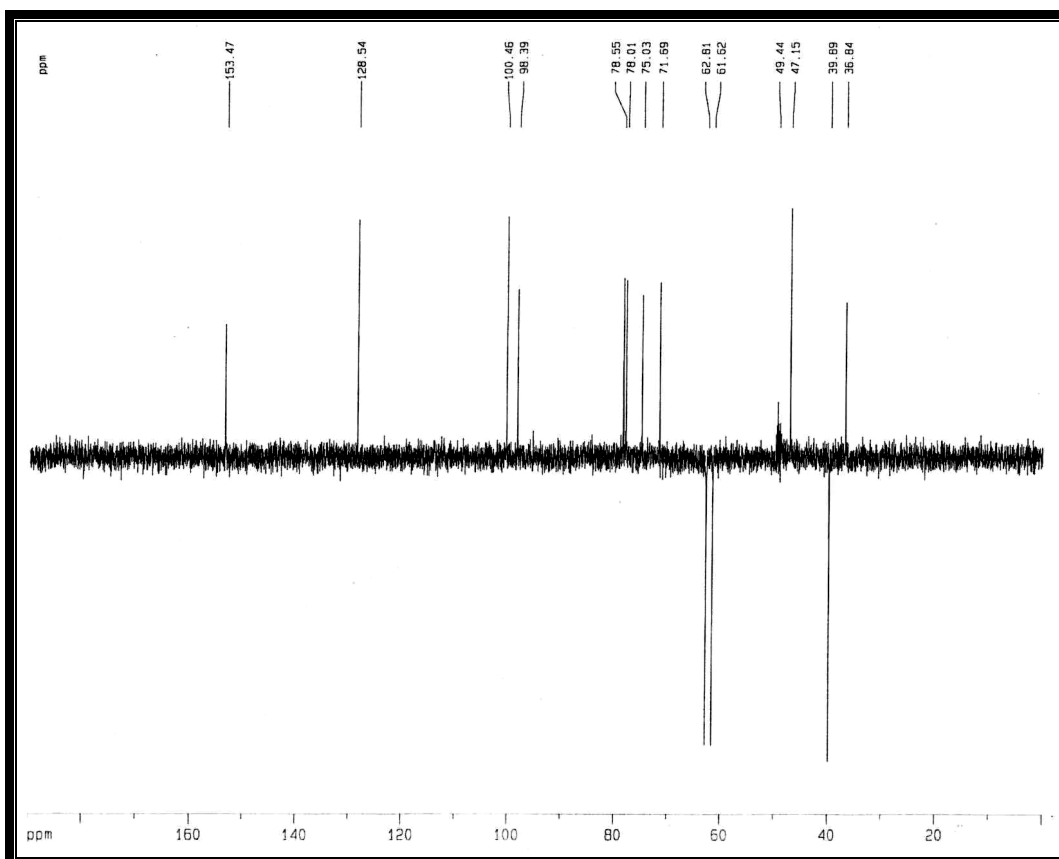


Figura 90 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AM-7.



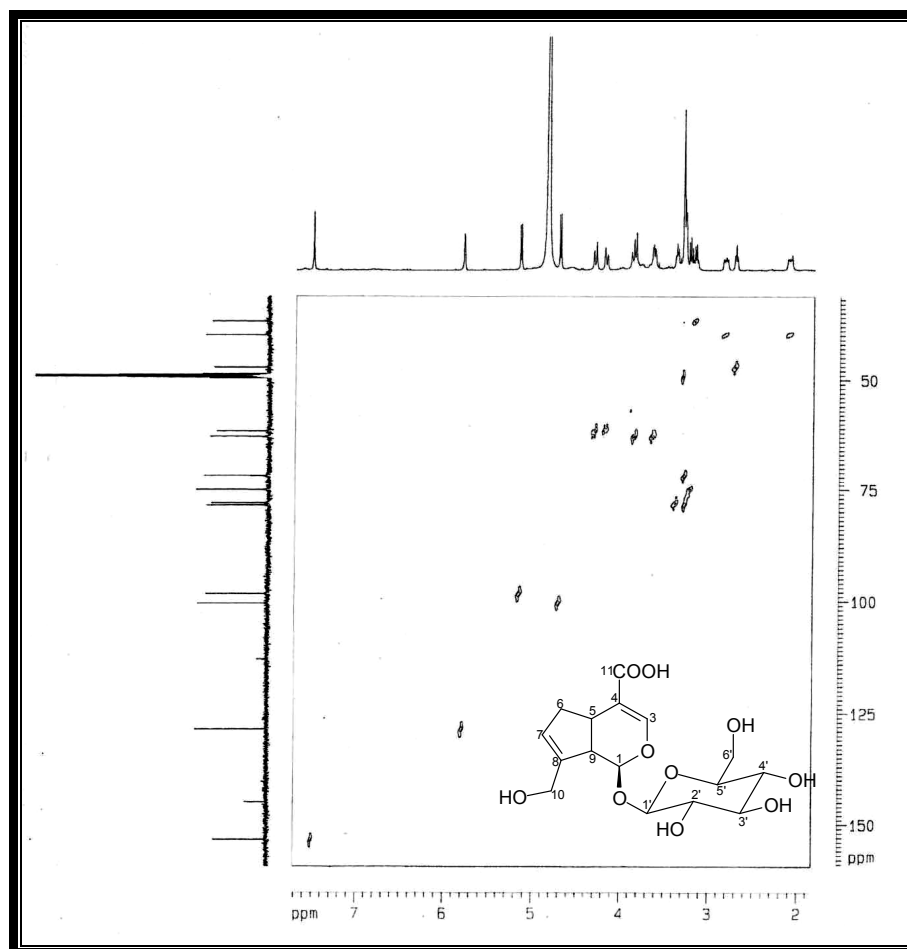


Figura 91 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de AM-7

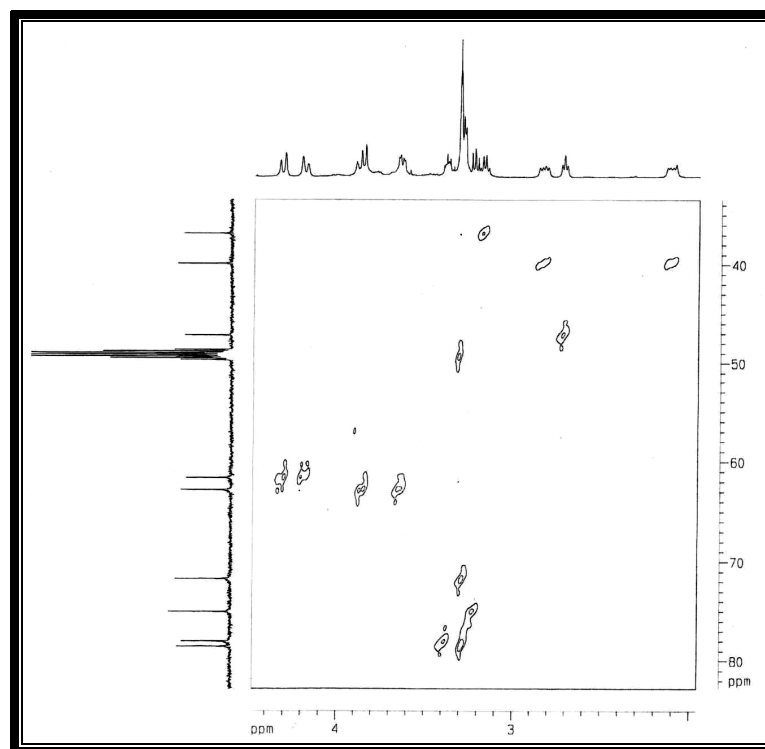


Figura 92 – Expansão do espectro de RMN bidimensional HSQC de AM-7

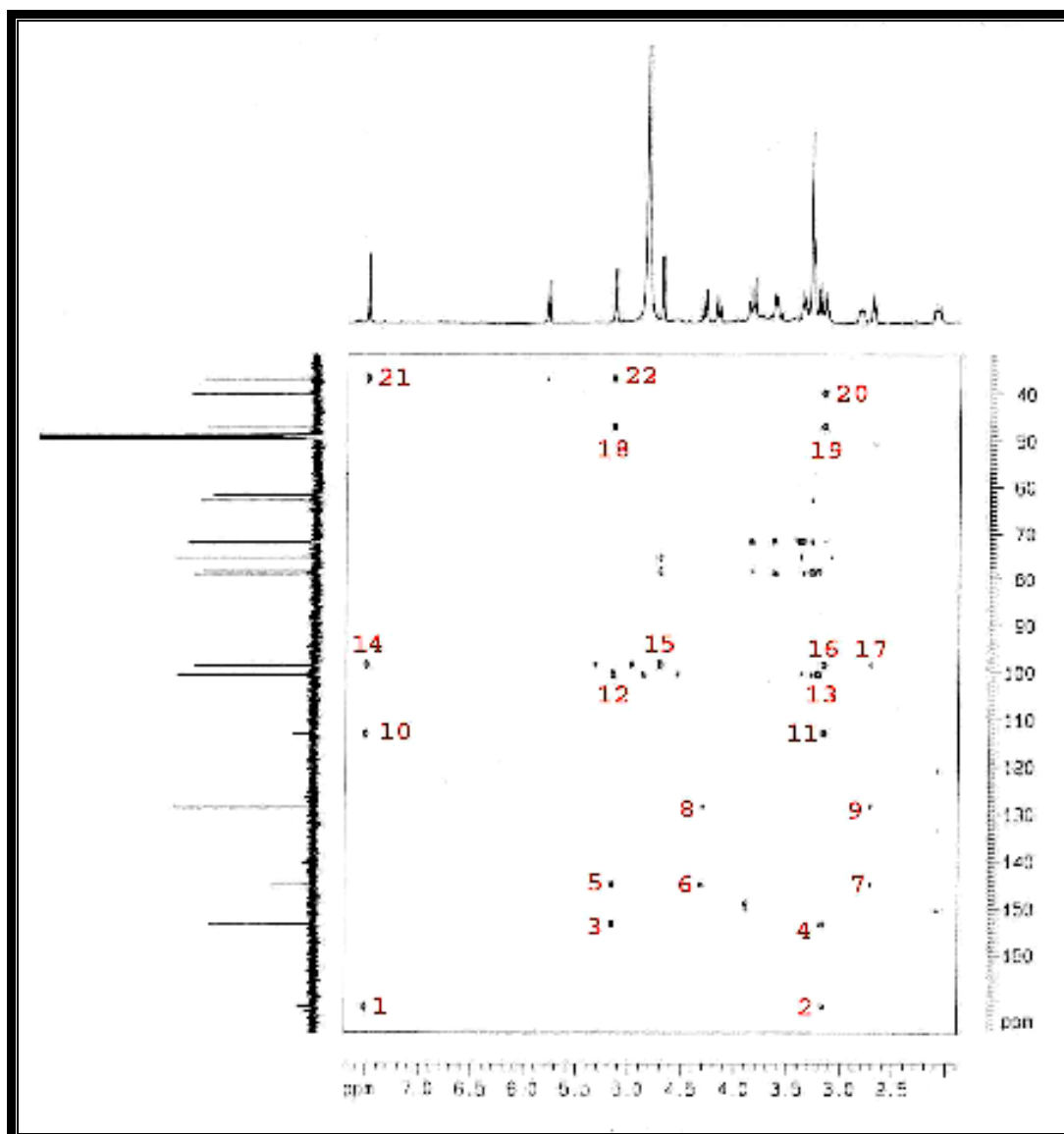
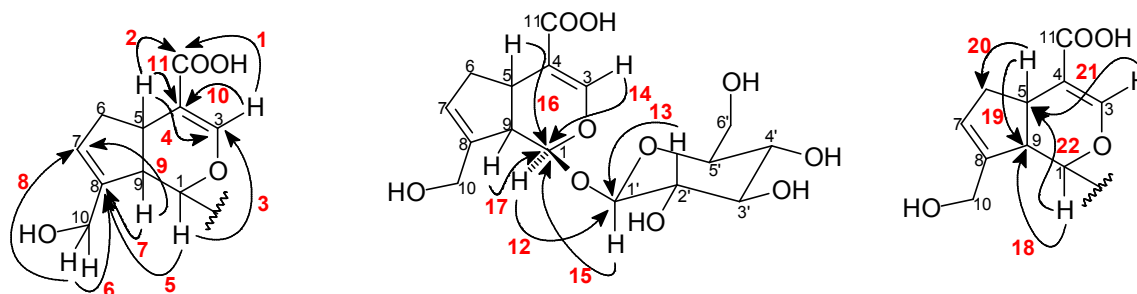


Figura 93 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de AM-7



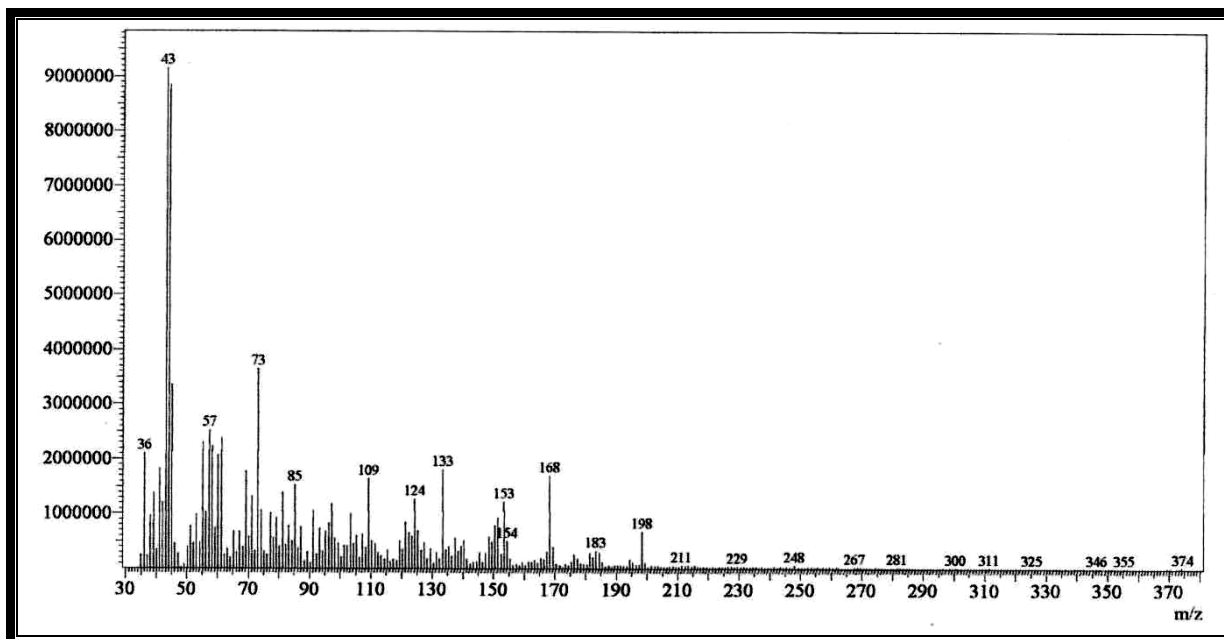
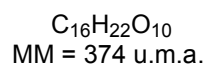
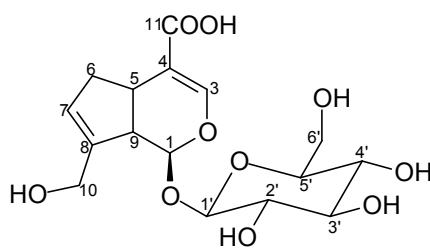


Figura 94 – Espectro de massa de AM-7 (impacto eletrônico a 70 eV).



#### 4.2.5. Determinação Estrutural de AM-8

AM-8 apresentou-se como uma resina marrom escura, proveniente do tratamento cromatográfico, por exclusão, em gel de Sephadex LH-20, seguido de cromatografia “flash” e cromatografia em fase reversa (C-18) da fração n-butanol, resultante da partição do extrato etanólico dos talos de *A. myrciifolia* (Fluxograma 2, Pág. 209).

A análise do espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 104, Pág. 123) revelou uma banda larga e intensa em  $3382\text{ cm}^{-1}$  compatível com o estiramento de ligações O-H; bandas em  $2920$  e  $2855\text{ cm}^{-1}$  relacionadas às deformações axiais de ligações C-H em carbonos alifáticos; absorções em  $1692$  e  $1645\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas aos estiramentos das ligações C=O de carbonilas conjugadas, além de absorções correspondentes às deformações axiais das ligações C=C de alcenos e anéis aromáticos em  $1589$ ,  $1537$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$  e bandas entre  $1107$  e  $1042\text{ cm}^{-1}$  associadas às vibrações de deformação axial da ligação C-O.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AM-8 (Fig. 98, Pág. 120) mostrou uma estreita semelhança com o espectro de RMN  $^1\text{H}$  de AM-7 (Fig. 88, Pág. 111) Foram identificados nele três sinais em  $\delta$  7,48 (1H, dd,  $J=8,4; 2,1\text{Hz}$ ), 7,40 (1H, d,  $J=2,1\text{Hz}$ ) e 6,59 (1H, d,  $J=8,4\text{Hz}$ ) que podem ser atribuídos a hidrogênios aromáticos pertencentes a um sistema de spin AMX, além de dois sinais referentes a hidrogênios olefínicos em  $\delta$  7,23 (1H, d,  $J=0,9\text{Hz}$ ) e 5,86 (1H, sl), dois pares de sinais em  $\delta$  4,87 (1H, d,  $J=14,0\text{Hz}$ ) e 4,99 (1H, d,  $J=14,0\text{Hz}$ ),  $\delta$  2,12 (1H, m) e 2,89 (1H, m) característicos de hidrogênios diastereotópicos de metilenos. Os deslocamentos químicos dos hidrogênios pertencentes à glicose foram identificados em  $\delta$  4,71 (1H, d,  $J=7,7\text{Hz}$ ), 3,39 (1H, m), 3,33 (1H, m), 3,28 (1H, m), 3,25 (1H, m), 3,66 (1H, dd,  $J=12,1; 5,3\text{Hz}$ ) e 3,85 (1H, d,  $J=2,2\text{Hz}$ ). Outro sinal, em  $\delta$  3,81 (3H, s) foi correlacionado a um grupamento metoxila. A comparação entre os espectros RMN  $^1\text{H}$  de AM-8 e AM-7 demonstrou que apenas os sinais referentes ao sistema de spin AMX e o sinal da metoxila não haviam sido visualizados em AM-7, o que sugere uma estrutura para AM-8 de um derivado do ácido geniposídico (Fig. 86, Pág. 108).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AM-8 (Fig. 100, Pág. 121) apresentou vinte e uma linhas espectrais. Destas, duas foram atribuídas a carbonos carbonílicos em  $\delta$  176,0 e 169,4. Sete carbonos  $sp^2$  foram identificados nos sinais localizados entre  $\delta$  148,4 e 113,4. Os demais sinais observados no espectro têm deslocamentos químicos muito próximos àqueles observados no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de AM-7 (Fig. 89, Pág.

112), com exceção do sinal em  $\delta$  56,3, que confirmou a presença de um grupamento metoxila na molécula.

O espectro de massa de AM-8, obtido por impacto eletrônico a 70 eV (Fig. 105, Pág. 124), apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  524 daltons. Este valor é compatível com o que pôde ser proposto com relação à estrutura de AM-8, composta do ácido geniposídico e de um ou mais fragmentos nos quais se encontram um anel aromático tetra-substituído, uma carbonila conjugada e um grupo metoxila. Vale ressaltar que alguns sinais de RMN  $^{13}\text{C}$  que corroboram esta proposição não foram visualizados no dado espectro, uma vez que a quantidade da amostra empregada na análise era pequena. Assim, para solucionar esta dificuldade, bem como determinar a conectividade dos fragmentos identificados em AM-8, foram realizados experimentos de RMN bidimensional.

O espectro de RMN bidimensional HMQC (Fig. 101, Pág. 121) permitiu associar inequivocamente todos os sinais de hidrogênios a seus respectivos carbonos, como se observa na tabela 22 (Pág. 115).

O espectro de RMN bidimensional HMBC (Fig. 102, Pág. 118), mostrou os acoplamentos a mais de uma ligação entre hidrogênios e carbonos ( $^2J_{\text{CH}}$  e  $^3J_{\text{CH}}$ ). O espectro permitiu, através destes acoplamentos, identificar os deslocamentos químicos de três sinais de carbonos aromáticos não observados no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ :  $\delta$  163,4, 151,5 e 115,5. A figura 95 (Pág. 113) apresenta a estrutura química que contém estes três átomos de carbono, a distribuição dos grupamentos no anel aromático e a conexão deste anel com o grupo carbonila. Todos os outros acoplamentos identificados neste espectro encontram-se enumerados na tabela 22 (Pág. 119).

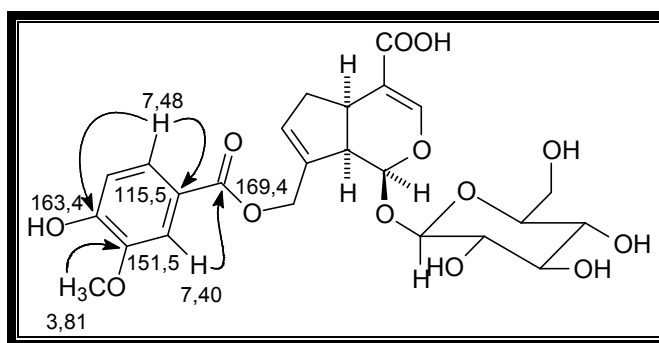


Figura 95 – Estrutura de AM-8

O espectro de RMN bidimensional NOESY (Fig. 103, Pág. 123) confirmou a estereoquímica dos centro estereogênicos na aglicona do ácido geniposídico. A figura 96

(Pág. 118) apresenta os acoplamentos que corroboram a determinação da disposição espacial destes centros.

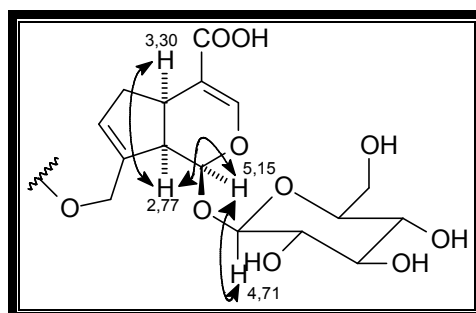


Figura 96 – Sub-estrutura de AM-8

Após a realização de todas as análises, anteriormente descritas, com a amostra AM-8 e posterior comparação dos dados obtidos com os descritos na literatura para a classe dos iridóides, é possível propor para a molécula a estrutura do ácido geniposídico ligado ao grupo vaniloil através do oxigênio do carbono 10 pertencente ao esqueleto do iridóide. Apesar de ser, o ácido geniposídico, um composto muito comum no reino vegetal, a proposta estrutural aqui apresentada para o **ácido 10-*O*-vaniloil-geniposídico** (Fig. 97, Pág. 118) possui caráter inédito na literatura.

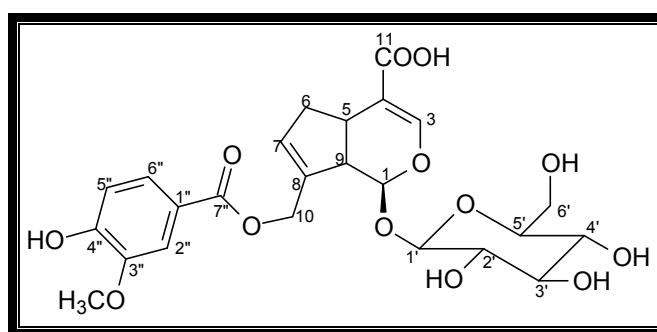
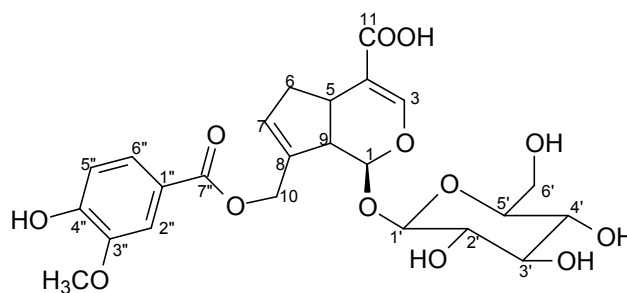


Figura 97 – Estrutura do ácido 10-*O*-vaniloil-geniposídico.

Tabela 22 – Correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (HMQC e HMBC) de AM-8

C	$^{13}\text{C-BB}$	HMQC		HMBC	
	$\delta_c$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	
1	98,0	5,15 (1H, d, $J=7,3\text{Hz}$ )	2,77	7,23; 4,71	
3	148,4	7,23 (1H, d, $J=0,9\text{Hz}$ )	-	3,30	
4	119,1	-	7,23; 3,30	-	
5	37,7	3,30 (m)	-	7,23; 5,86	
6	40,4	2,12 (1H, m); 2,89 (1H, m)	5,86; 3,30	-	
7	131,0	5,86 (1H, sl)	-	2,77	
8	140,5	-	4,99; 4,87; 2,77	-	
9	48,4	2,77 (1H, tl, $J=7,5\text{Hz}$ )	-	5,86	
10	63,8	4,87 (1H, d, $J=14,0\text{Hz}$ ); 4,99 (1H, d, $J=14,0\text{Hz}$ )	-	-	
11	176,0	-	-	7,23	
1'	100,7	4,71 (1H, d, $J=7,7\text{Hz}$ )	3,25	5,15	
2'	75,1	3,25 (1H, m)	-	-	
3'	78,1	3,28 (1H, m)	3,33; 3,25	-	
4'	71,7	3,33 (1H, m)	3,28	-	
5'	78,4	3,39 (1H, m)	3,66	-	
6'	63,0	3,66 (1H, dd, $J=12,1; 5,3\text{Hz}$ ); 3,85 (1H, d, $J=2,2\text{Hz}$ )	-	-	
1''	115,5*	-	-	6,59	
2''	113,4	7,40 (1H, d, $J=2,1\text{Hz}$ )	-	7,48	
3''	151,5*	-	7,40	6,59; 3,81	
4''	163,4*	-	-	7,48; 7,40	
5''	118,4	6,59 (1H, d, $J=8,4\text{Hz}$ )	-	-	
6''	126,5	7,48 (1H, dd, $J=8,4; 2,1\text{Hz}$ )	-	7,40	
7''	169,4	-	-	7,48; 7,40	
-OCH <sub>3</sub>	56,3	3,81 (3H, s)	-	-	

\*sinais identificados a partir do espectro bidimensional HMBC.



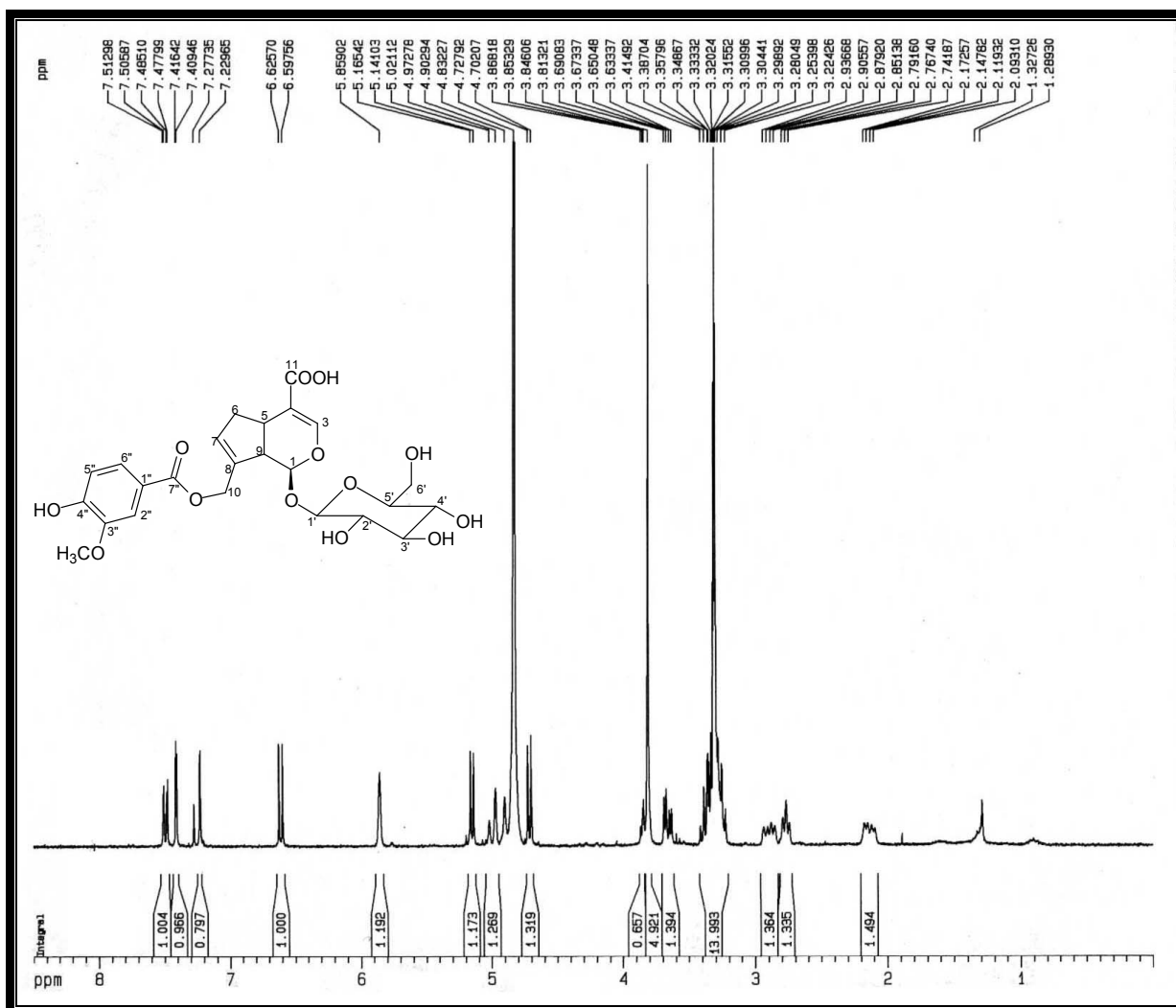


Figura 98 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AM-8.

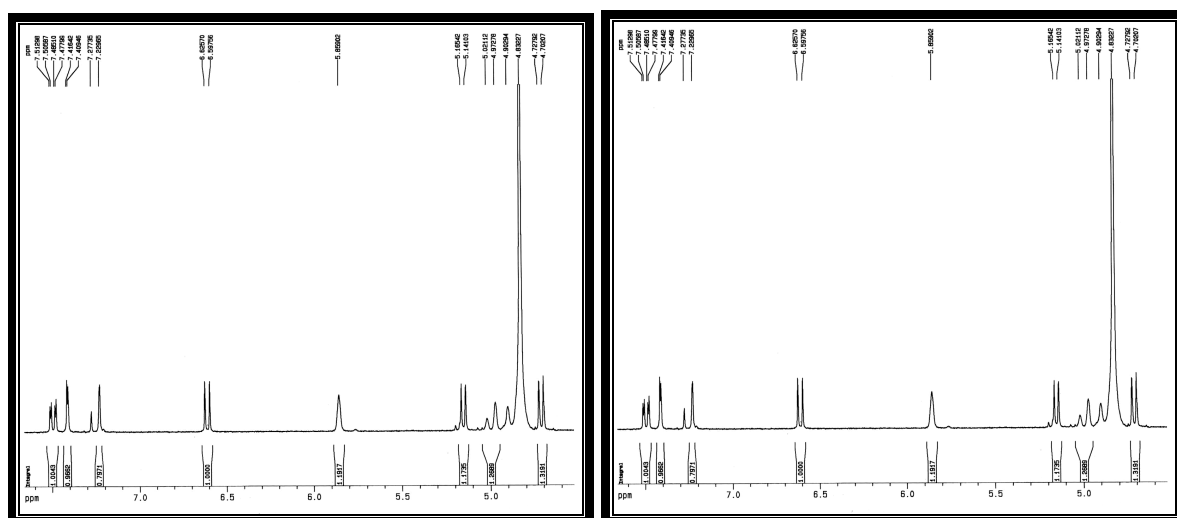


Figura 99 – Expansões do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AM-8.



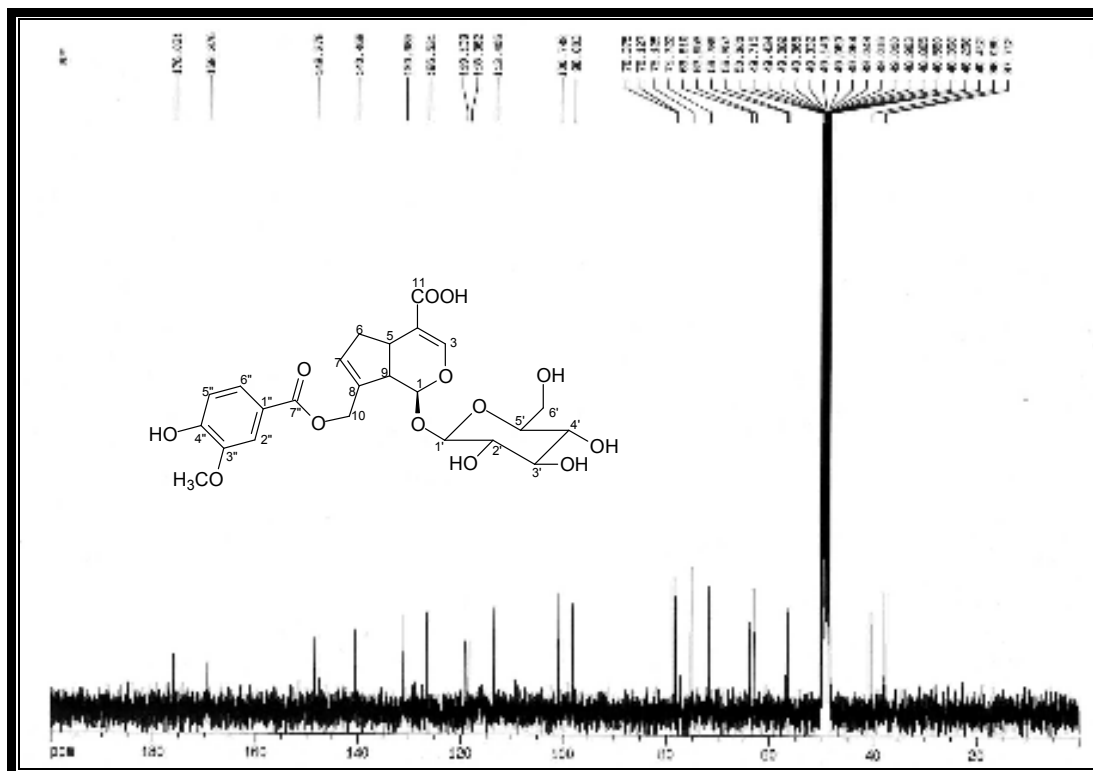


Figura 100 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AM-8.

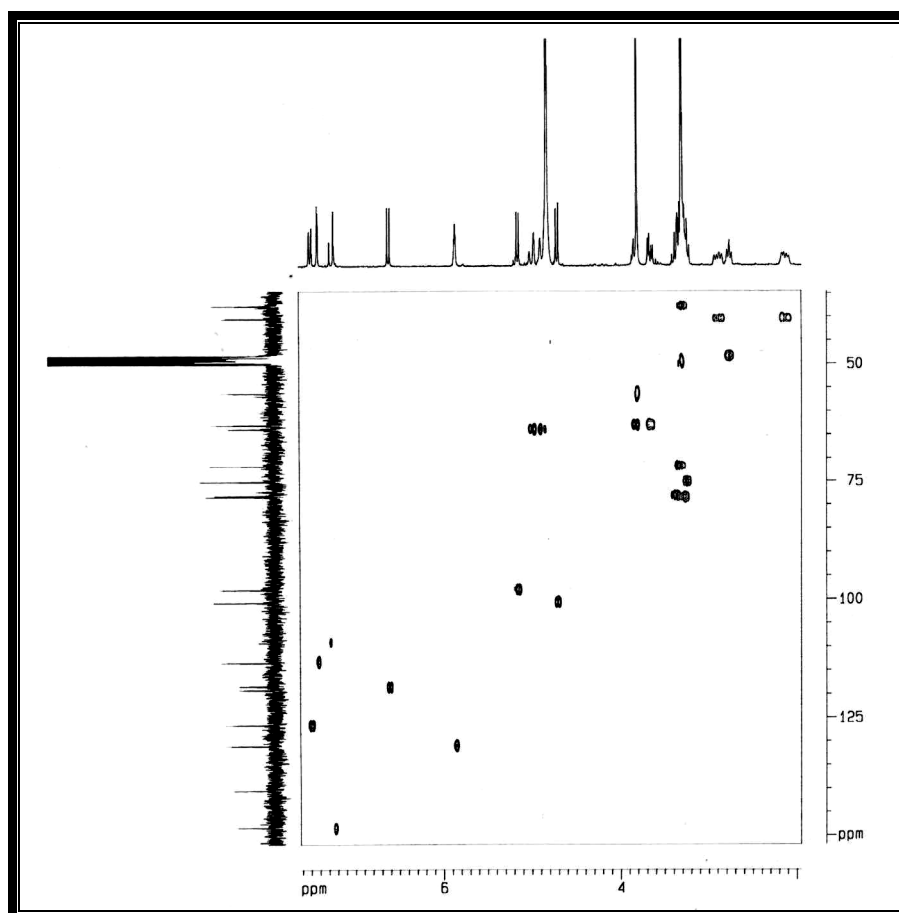


Figura 101 – Espectro de RMN bidimensional HMQC de AM-8.

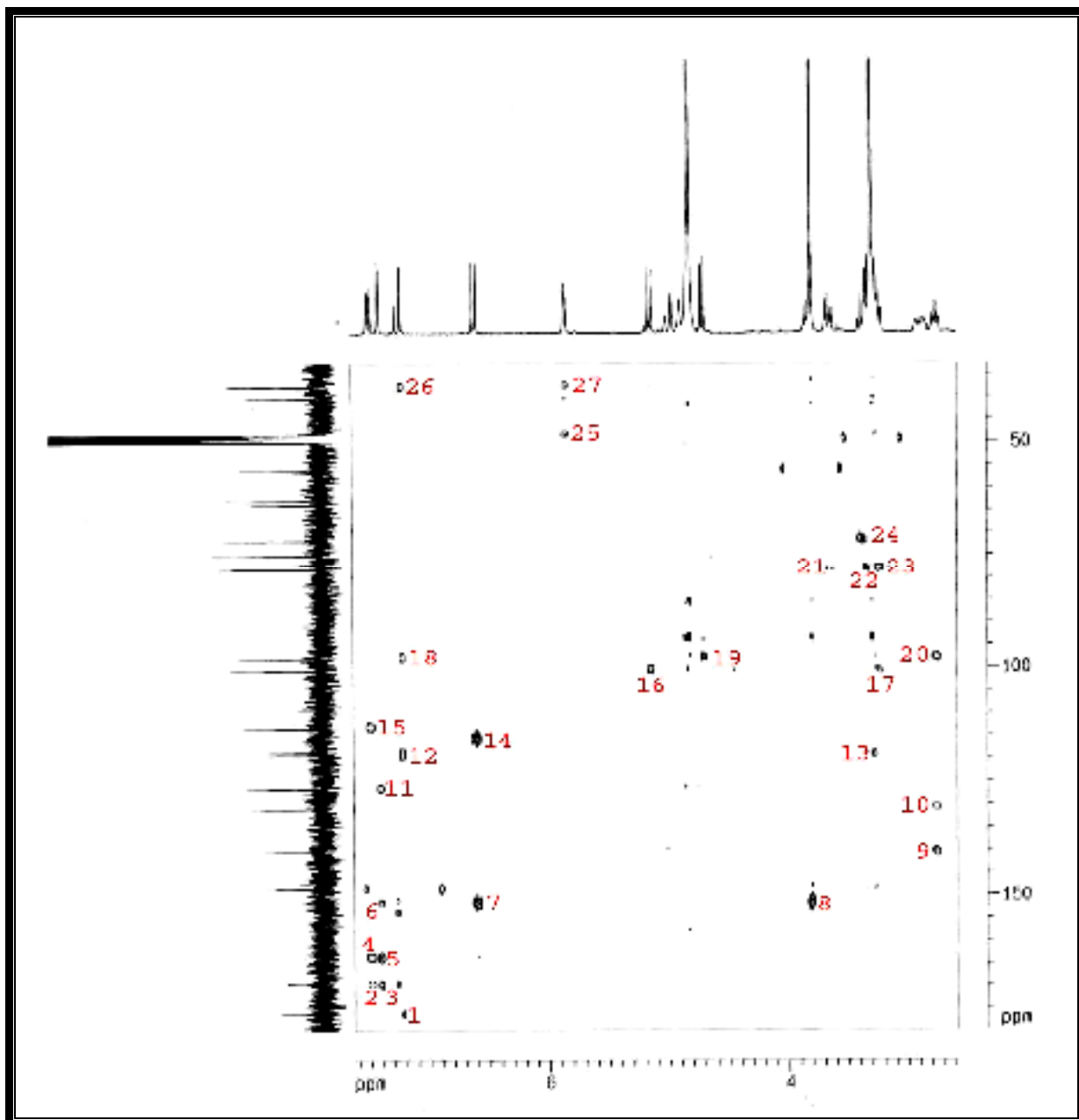
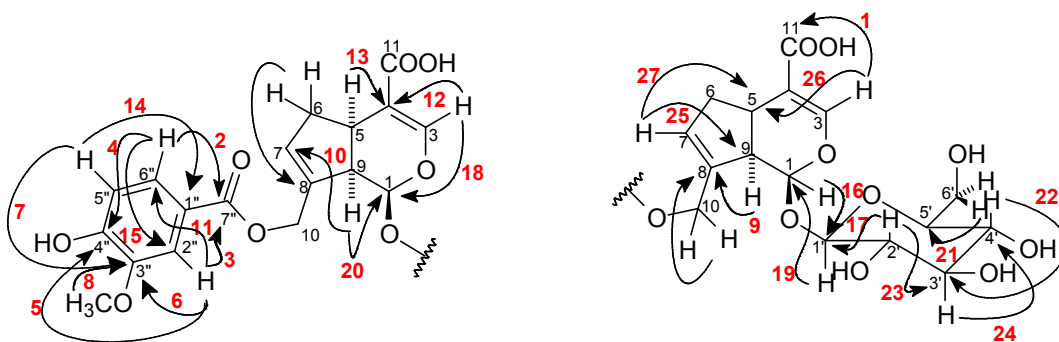


Figura 102 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de AM-8.



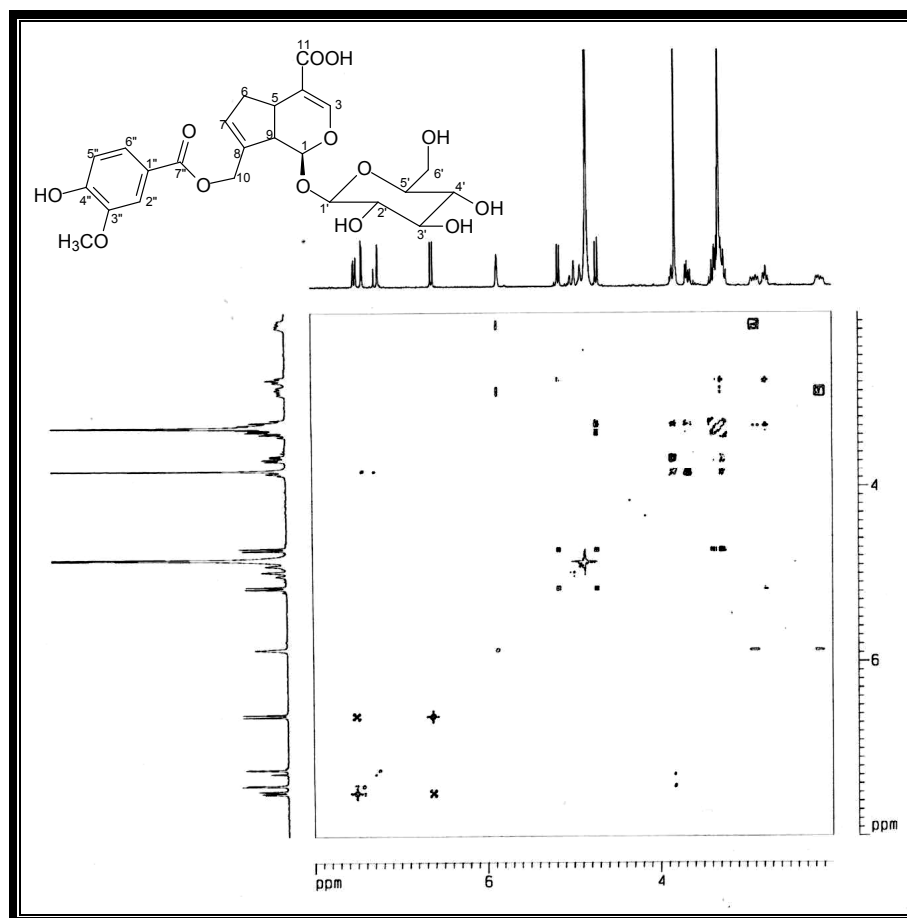


Figura 103 – Expansão do espectro de RMN bidimensional NOESY de AM-8.

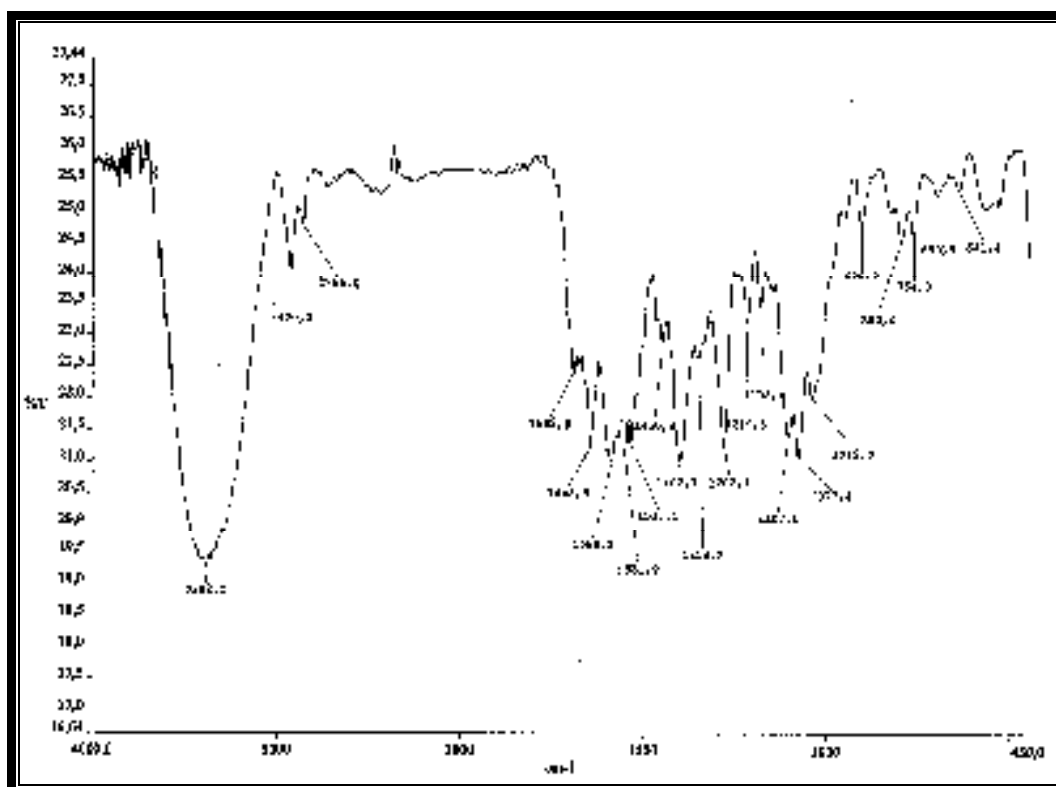


Figura 104 – Espectro de absorção na região do I.V. de AM-8 com pastilhas de KBr.

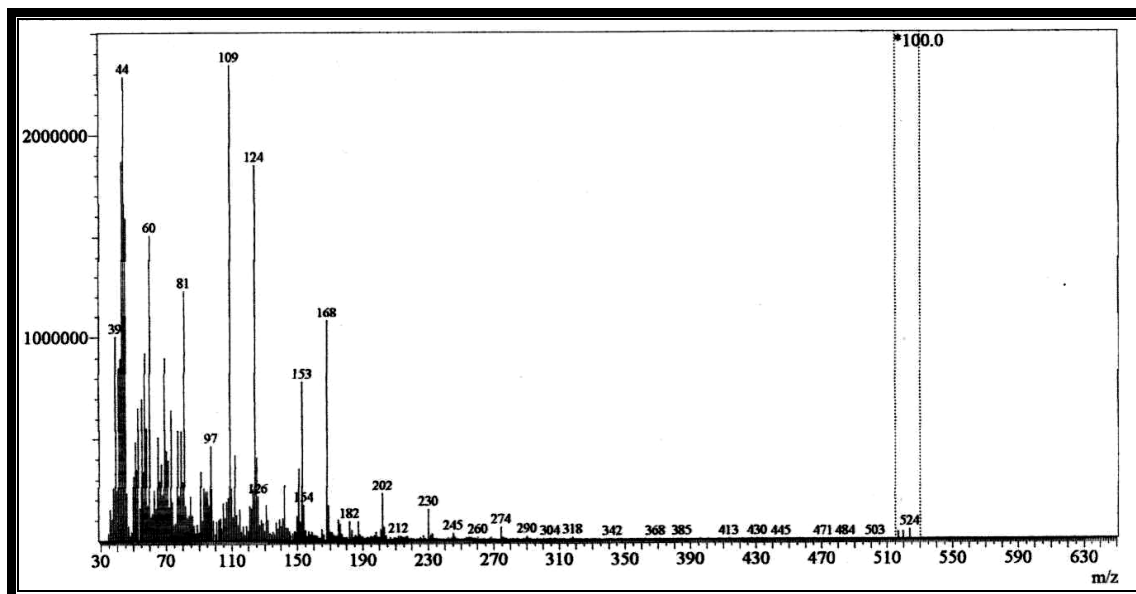
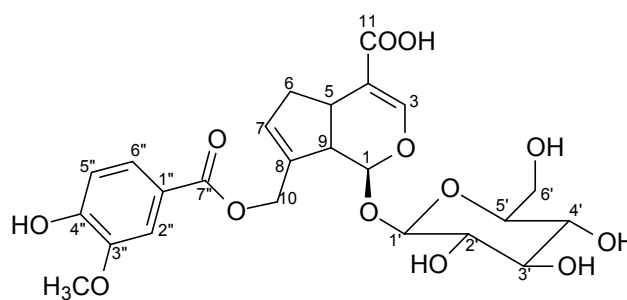


Figura 105 – Espectro de massa de AM-8 (impacto eletrônico a 70 eV).

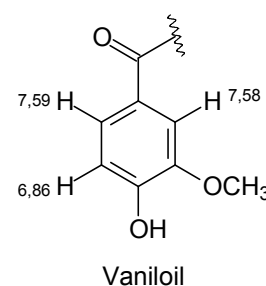


FM = C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>O<sub>13</sub>  
MM = 524 u.m.a.

#### 4.2.6. Determinação Estrutural de AM-9

A fração AM-9, uma resina marrom escura, foi obtida a partir do tratamento cromatográfico, por exclusão, em gel de Sephadex LH-20, seguido de cromatografia “flash” e cromatografia em fase reversa (C-18) da fração n-butanol, resultante da partição do extrato etanólico dos talos de *A. myrciifolia* (Fluxograma 2, Pág. 209).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AM-9 (Fig. 108, Pág. 130) demonstrou certa semelhança com o espectro de RMN  $^1\text{H}$  obtido para AM-7 (Fig. 88, Pág. 111), o que permitiu nortear as proposições estruturais para a amostra baseando-se no esqueleto de um iridóide. Para isso, observou-se, inicialmente que todos os sinais visualizados no espectro de AM-7 foram identificados no de AM-9. Em  $\delta$  7,59, 7,58 e 6,86 foram observados os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos do sistema de spin AMX pertencente ao grupo vaniloil. Os hidrogênios olefínicos foram identificados pelos sinais em  $\delta$  7,51 e 5,91. Os dupletos localizados entre  $\delta$  5,23 e 4,73 indicaram a presença dos hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, bem como os sinais entre  $\delta$  3,84 e 3,25 confirmaram a ocorrência da unidade heterosídica. O grupo metoxila



foi distinguido pelo sinal em  $\delta$  3,90; a observação dos multipletos em  $\delta$  2,85, 2,83 e 2,18 completaram a comparação entre os espectro de RMN  $^1\text{H}$  de AM-9 e AM-7 e são relativos aos hidrogênios ligados a carbonos não funcionalizados. Além destes sinais, alguns outros foram considerados no espectro em questão: o simpleto em  $\delta$  7,35 (característico de hidrogênios aromáticos), o duplete em  $\delta$  5,26 (para um hidrogênio ligado a carbono de acetal) e o simpleto intenso em  $\delta$  3,89 (grupamento metoxila). Estes dados, acrescidos da observação das integrações dos sinais mostrados no espectro, conduziram a proposição estrutural para a amostra AM-9 à possível mistura de iridóides com esqueletos semelhantes, sendo um dos componentes da mistura a substância correspondente à fração AM-8 (ácido 10-*O*-vaniloil-geniposídico – Pág. 118).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AM-9 (Fig. 110, Pág. 131) corroborou a proposição de uma mistura de iridóides na composição da amostra em questão. Esta observação se deu pela significativa presença de sinais “dobrados” no espectro, quando este foi comparado ao de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de AM-7 (Fig. 89, Pág. 112). Entre estes sinais, merecem destaque:  $\delta$  139,9/139,8 e  $\delta$  131,6/131,5 (relativos a carbonos olefínicos);  $\delta$

98,5/98,4 e  $\delta$  64,3/64,1 (de carbonos  $sp^3$  oxigenados);  $\delta$  57,1/56,7 (relativos aos grupos metoxila);  $\delta$  48,0/47,9 e  $\delta$  36,5/36,4 (carbonos não-funcionalizados). Foi possível destacar, ainda, os sinais em  $\delta$  149,1, 142,3 e 108,6, os quais não apresentam correspondentes no espectro de AM-7, representando carbonos aromáticos pertencentes à estrutura do outro membro da mistura em AM-9. O padrão de hidrogenação dos carbonos foi definido através da comparação deste espectro com o de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AM-9 (Fig. 111, Pág. 131), o que revelou que tal padrão se encontrava em acordo com o observado para AM-7, com exceção dos três sinais anteriormente mencionados:  $\delta$  149,1 (C), 142,3 (C) e 108,6 (CH).

Ao se analisar o espectro de RMN bidimensional HMQC de AM-9 (Fig. 113, Pág. 132), foi possível associar os sinais de todos os hidrogênios a seus respectivos carbonos. Dessa forma, determinou-se, pelo acoplamento entre  $\delta_{\text{H}}$  7,35/ $\delta_{\text{C}}$  108,6, a única ligação CH observada para a amostra, mas que não pertence ao componente da mistura já identificado.

O espectro de RMN bidimensional HMBC de AM-9 (Fig. 114, Pág. 133) foi fundamental para a determinação estrutural do segundo componente da mistura. Além de apresentar os acoplamentos observados no espectro HMBC de AM-7 (Fig. 93, Pág. 114), foram visualizados, neste espectro, os acoplamentos entre o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  7,35 e os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  168,1, 149,1, 142,3 e 108,6; e entre os hidrogênios do grupamento metila em  $\delta_{\text{H}}$  3,89 e o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  149,1. Assim, propôs-se que estes sinais pertenceriam a um substituinte aromático simétrico e tetra-substituído por dois grupamentos metoxila, uma hidroxila e uma carbonila. Este grupo se encontra descrito na literatura com o nome de siringoil [YANG, 2006] (Fig. 106, Pág. 126). A tabela 23 (Pág. 128) contém todos os dados resultantes da análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais de AM-9.

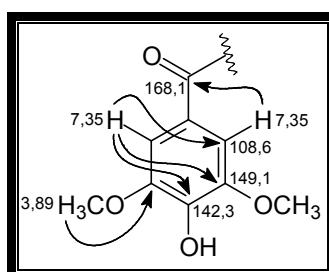


Figura 106 – Sub-estrutura de AM-9

A reunião de todos os dados obtidos com os espectros de RMN de AM-9, bem como a comparação entre estes dados e os referentes às amostras AM-7 e AM-8, e comparação com

dados da literatura para iridóides [YANG *et al*, 2006; MARTIN *et al*, 2007], permitiram propor que a amostra se tratava de uma mistura de derivados do ácido geniposídico: o ácido 10-*O*-vaniloil-geniposídico [descrito anteriormente como a amostra AM-7], inédito na literatura, e o ácido 10-*O*-siringoil-geniposídico (Fig. 107, Pág. 127), cujo único relato de sua ocorrência é em *Avicennia marina* [SUN *et al*, 2008].

A tabela 24 (Pág. 129) apresenta uma comparação entre os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos para AM-9 e os descritos na literatura para o ácido geniposídico e os grupamentos vaniloil e siringoil.

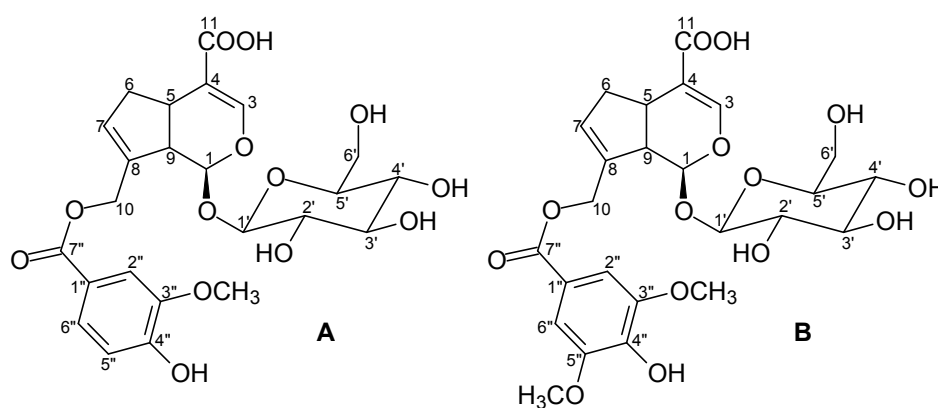


Figura 107 – Estruturas do ácido 10-*O*-vaniloil-geniposídico (A) e do ácido 10-*O*-siringoil-geniposídico (B)

Tabela 23 – Correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (HMQC e HMBC) de AM-9

C	A				B			
	$^{13}\text{C}$ - BB	HMQC	HMBC		$^{13}\text{C}$ - BB	HMQC	HMBC	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}/J(\text{Hz})$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}/J(\text{Hz})$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	98,5*	5,23(d;7,4)	2,83	7,51;4,73	98,4*	5,26(d;7,2)	2,83	7,51;4,73
3	153,5	7,51(d;0,9)	-	-	153,5	7,51(d;0,9)	-	-
4	112,8	-	7,51;3,26	-	112,8	-	7,51;3,26	-
5	36,5*	3,26(m)	-	7,51;5,91	36,4*	3,26(m)	-	7,51;5,91
6	40,1	2,85(m); 2,18(m)	5,91;3,26	-	40,1	2,85(m); 2,18(m)	5,91;3,26	-
7	131,5*	5,91(sl)	-	2,83	131,6*	5,91(sl)	-	2,83
8	139,8*	-	2,83	-	139,9*	-	2,83	-
9	47,9*	2,83(m)	-	5,91	48,0*	2,83(m)	-	5,91
10	64,1*	5,03(dl;13,9) 4,98(m)	-	-	64,3*	5,03(dl;13,9) 4,98(m)	-	-
11	170,9	-	-	7,51	170,9	-	-	7,51
1'	100,8	4,73(d;7,7)	3,27	5,23	100,8	4,73(d;7,7)	3,27	5,26
2'	75,0	3,27(dd;8,6; 8,3)	-	-	75,0	3,27(dd;8,6; 8,3)	-	-
3'	78,1	3,40(t;8,6)	3,27	-	78,1	3,40(t;8,6)	3,27	-
4'	71,7	3,34(m)	3,40	-	71,7	3,34(m)	3,40	-
5'	78,5	3,32(m)	3,66	-	78,5	3,32(m)	3,66	-
6'	63,0	3,84(dt;12;2,3) 3,66(ddd;12; 5,3;1,7)	-	-	63,0	3,84(dt;12;2,3) 3,66(ddd;12; 5,3;1,7)	-	-
1''	122,8	-	-	6,86	121,6	-	7,35	-
2''	114,0	7,58(s)	-	7,59	108,6	7,35(s)	-	7,35
3''	149,0	-	7,58	6,86;3,90	149,1	-	7,35	3,89
4''	153,1	-	6,86	7,59;7,58	142,3	-	-	7,35
5''	116,2	6,86(d;8,5)	7,59	-	149,1	-	7,35	3,89
6''	125,3	7,59(dd;8,5;1,9)	-	7,58	108,6	7,35(s)	-	7,35
7''	168,1	-	-	7,58	168,1	-	-	7,35
OMe-3'	56,7	3,90(s)	-	-	57,1	3,89(s)	-	-
OMe-5'	-	-	-	-	57,1	3,89(s)	-	-

\*os valores podem estar trocados entre os compostos.

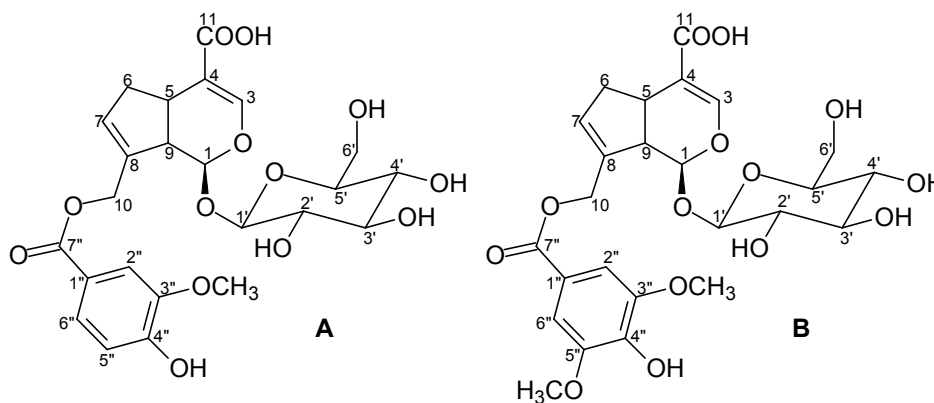
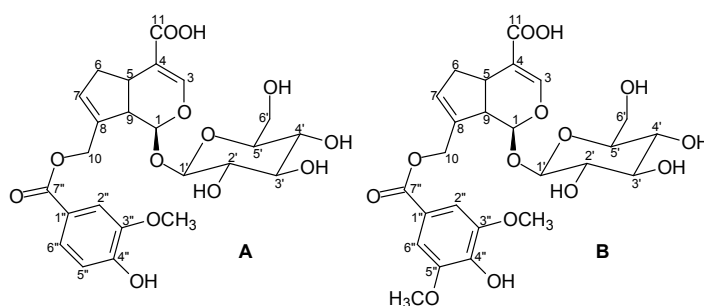




Tabela 24 – Comparação entre os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos para AM-9 (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e os descritos na literatura para o ácido geniposídico (50 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) e os grupamentos vaniloil (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) e siringoil (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

<i>C</i>	<i>AM-9</i>	<i>Ác.geniposídico</i> [Jensen, 1996]	<i>Vaniloil</i> [Yang, 2006]	<i>Siringoil</i> [Yang, 2006]
	$\delta_c$	$\delta_c$	$\delta_c$	$\delta_c$
1	98,4/98,5	97,8		
3	153,5	153,0		
4	112,8	112,8		
5	36,4/36,5	35,2		
6	40,1	38,9		
7	131,5/131,6	129,6		
8	139,8/139,9	142,4		
9	47,9/48,0	46,6		
10	64,1/64,3	60,5		
11	170,9	171,8		
1'	100,8	99,7		
2'	75,0	73,6		
3'	78,1	76,5		
4'	71,7	70,3		
5'	78,5	76,9		
6'	63,0	61,6		
vaniloil				
1''	122,8		122,4	
2''	114,0		113,7	
3''	149,0		148,7	
4''	153,1		153,0	
5''	116,2		116,1	
6''	125,3		125,5	
7''	168,1		167,9	
OMe-3'	56,7		56,5	
siringoil				
1''	121,6			121,2
2'' e 6''	108,6			108,2
3'' e 5''	149,1			148,8
4''	142,3			141,9
7''	168,1			167,9
OMe-3' e 5'	57,1			56,4



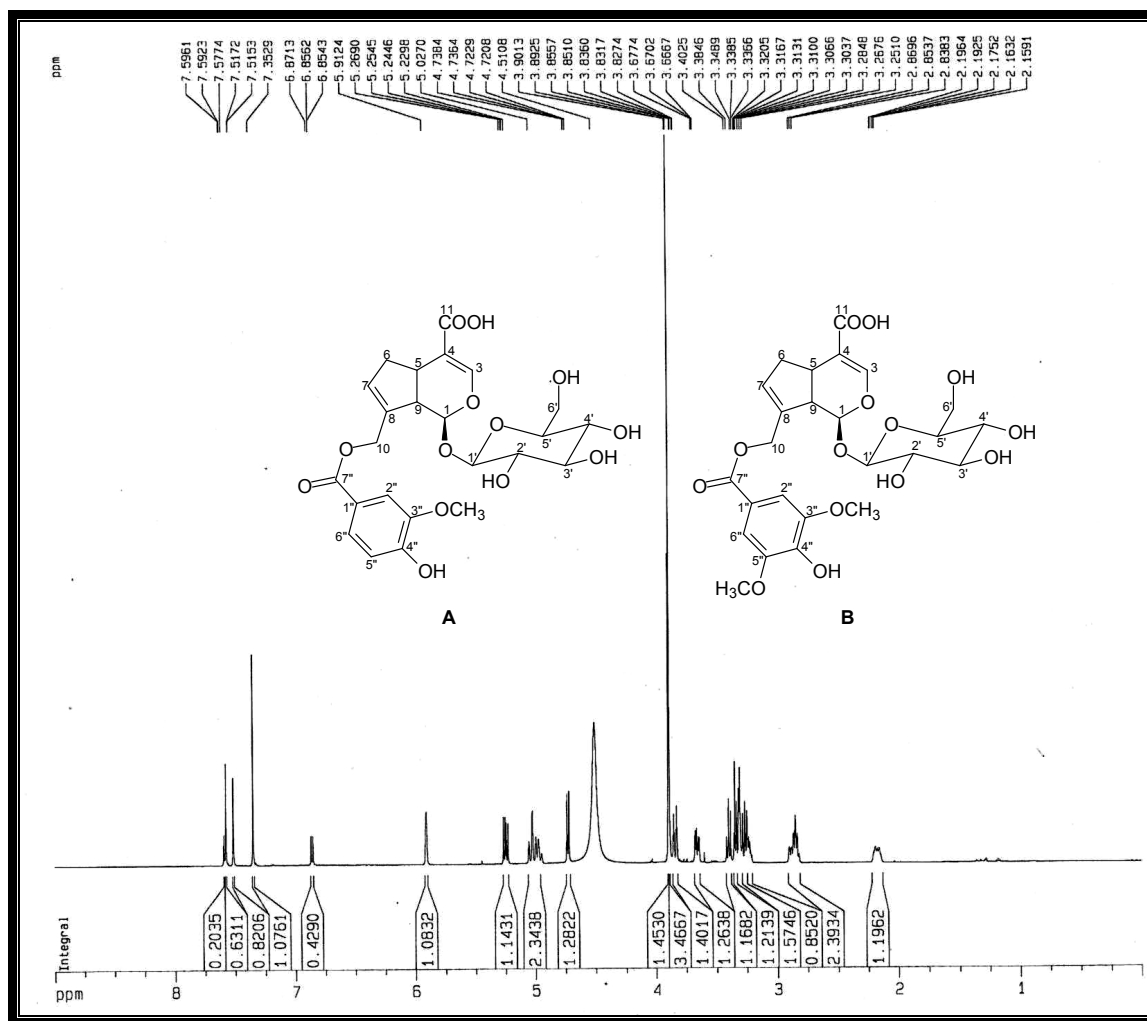


Figura 108 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AM-9.

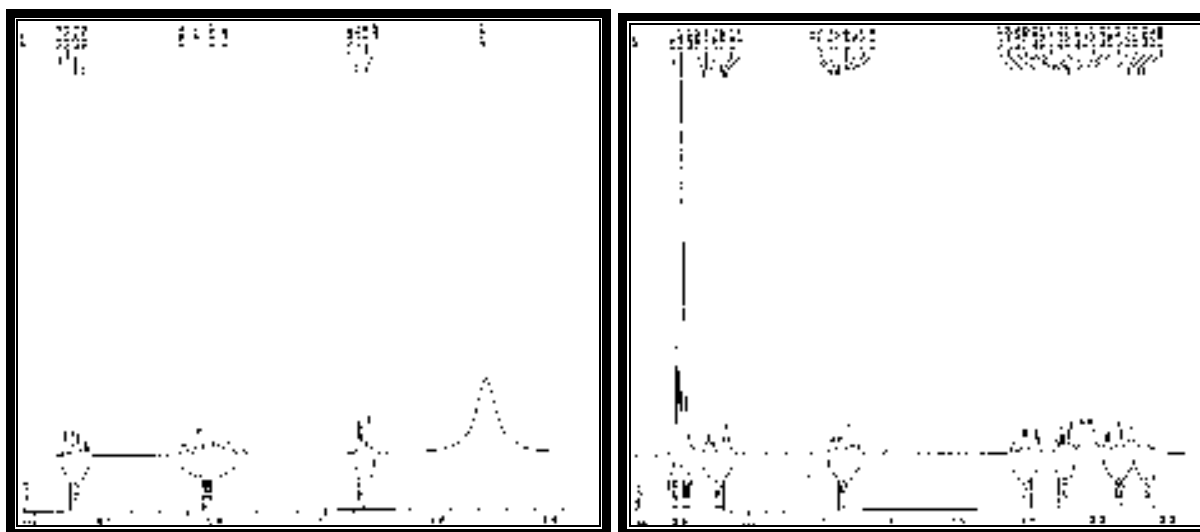


Figura 109 – Expansões do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AM-9.

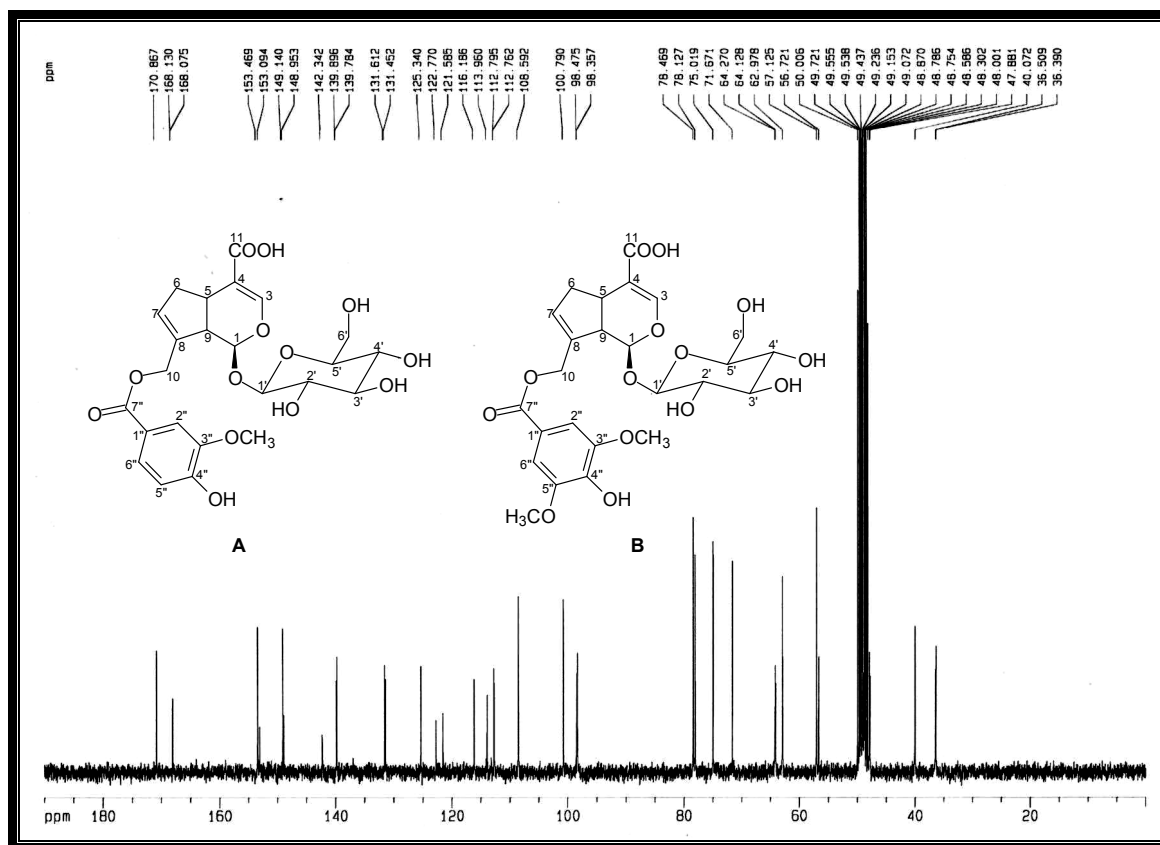


Figura 110 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AM-9.

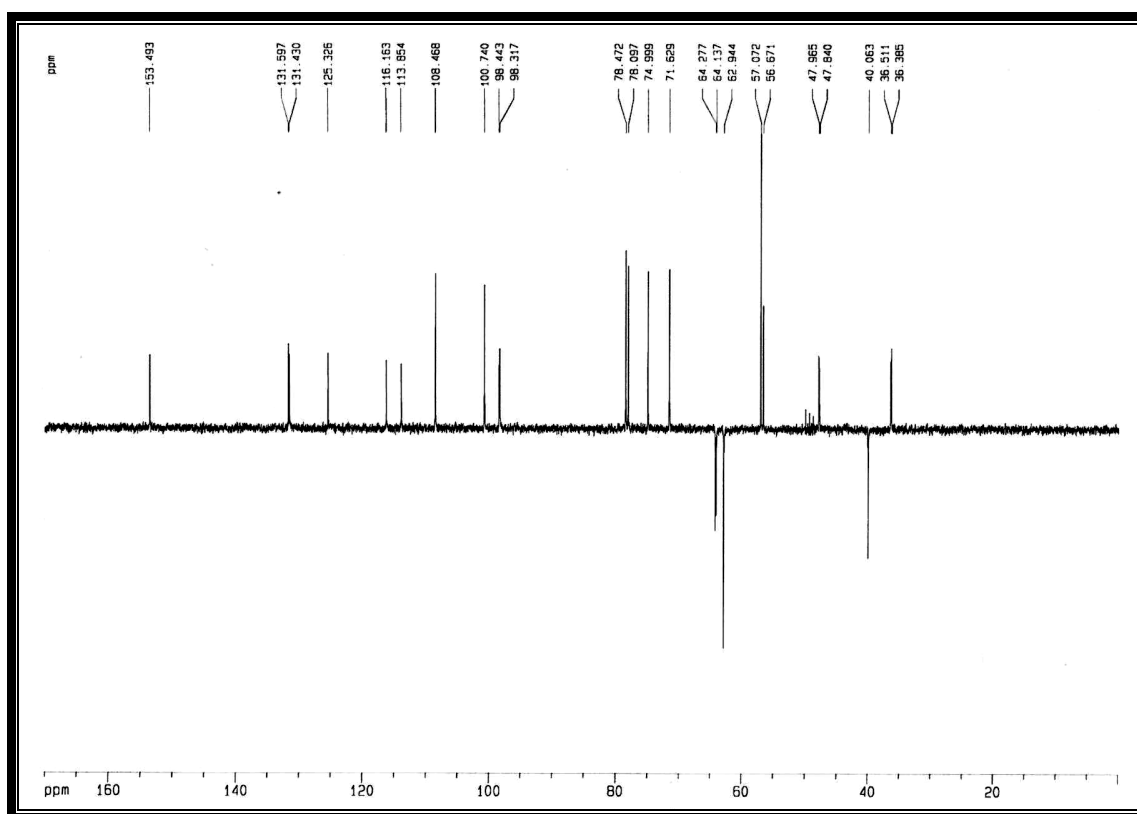


Figura 111 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AM-9.

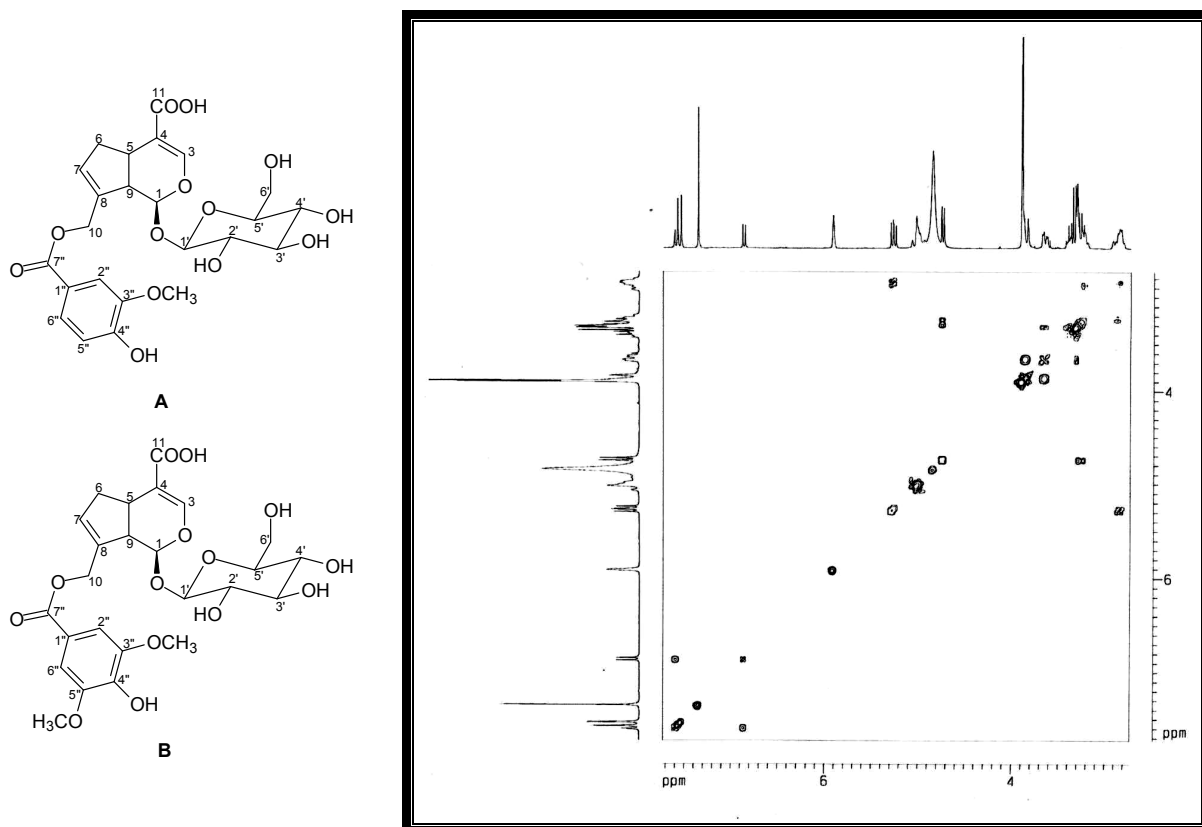


Figura 112 – Expansão do espectro de RMN bidimensional COSY de AM-9.

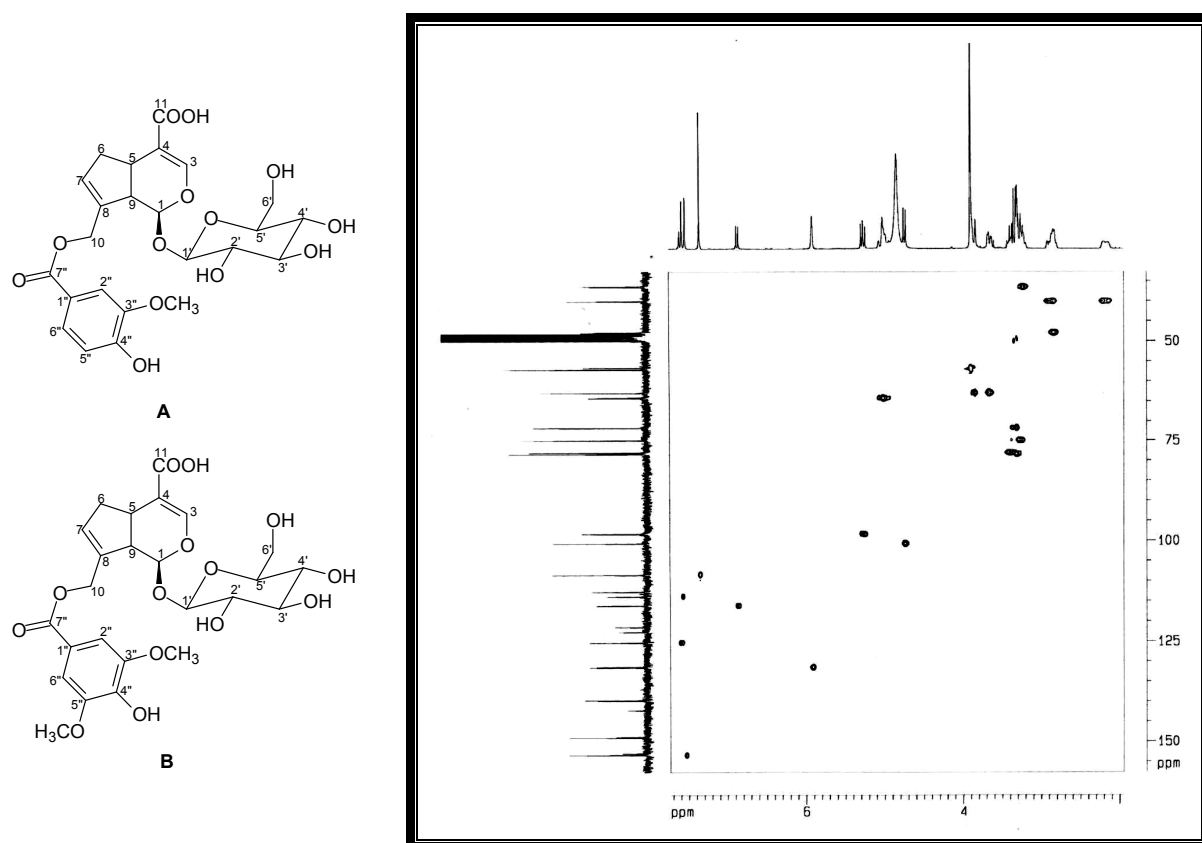


Figura 113 – Espectro de RMN bidimensional HMQC de AM-9.

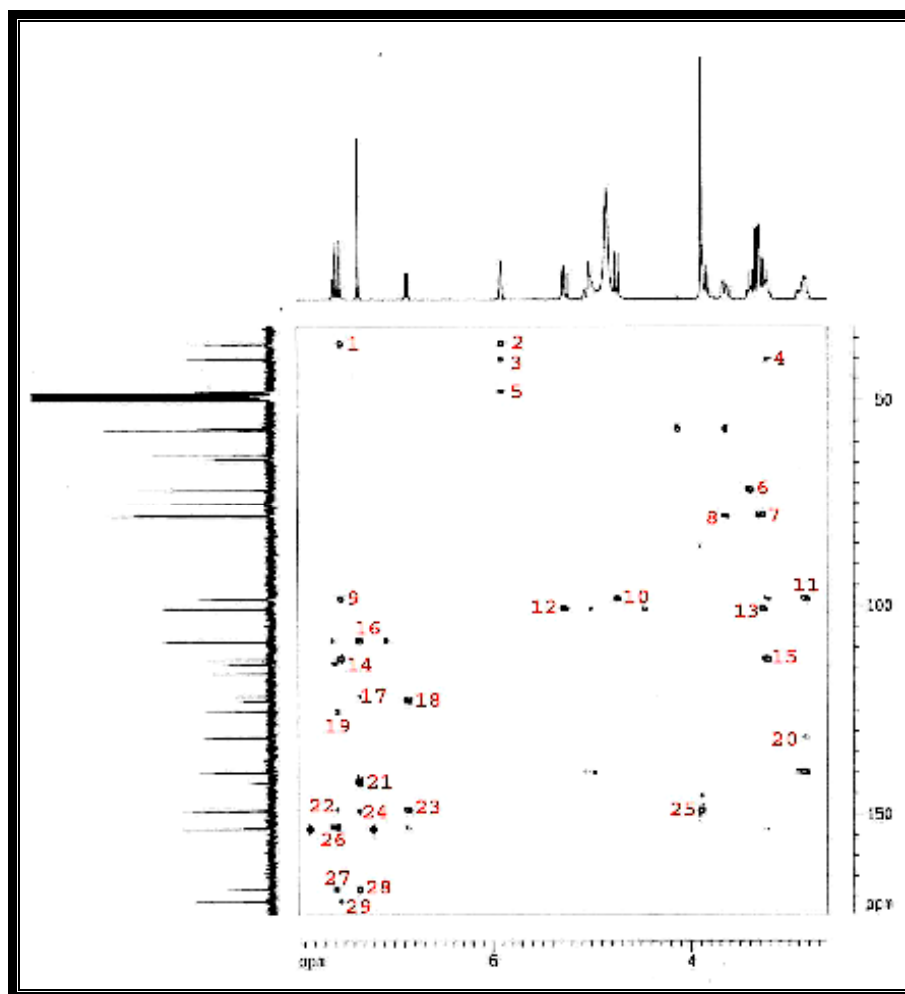
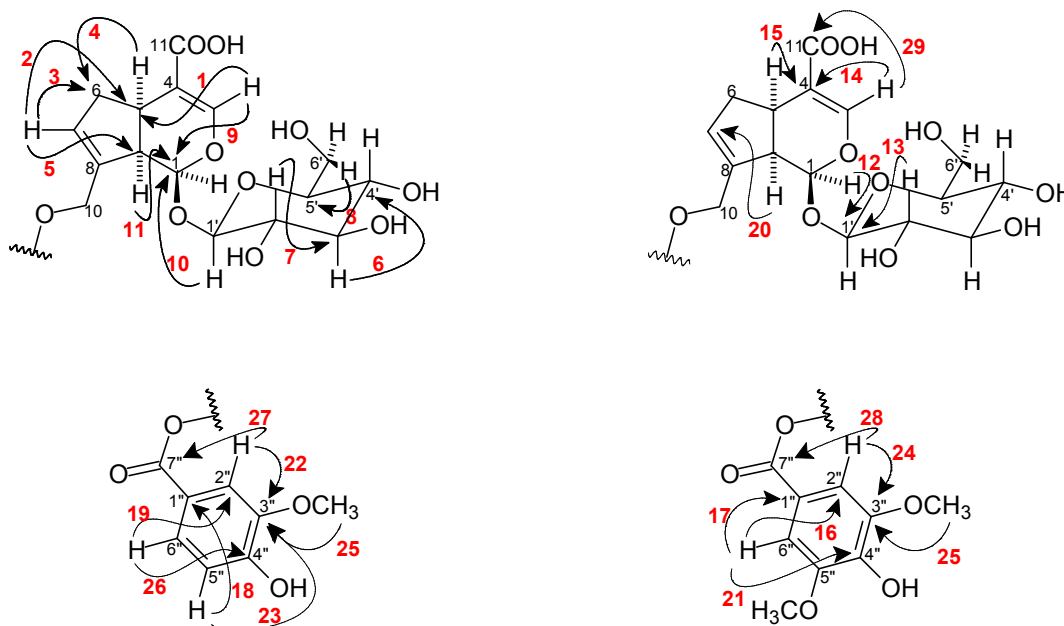


Figura 114 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de AM-9.



### 4.3. Determinação Estrutural dos Constituintes Químicos Não-Voláteis do Extrato Etanólico das Folhas de *Alibertia rigida*

#### 4.3.1. Determinação estrutural de AR-1

AR-1, sólido amorfo de cor amarela com ponto de fusão 210,2-212,5 °C, foi obtido a partir de filtração da fração n-butanol, proveniente de partição do extrato etanólico das folhas de *A. rigida* (Fluxograma 3, Pág. 218).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AR-1 (Fig. 118, Pág. 139) mostrou cinco sinais na faixa de  $\delta$  7,53-6,05, que foram atribuídos a hidrogênios aromáticos. Dentre estes sinais, os dupletos centrados em  $\delta$  6,24 (1H,  $J=2$  Hz) e em  $\delta$  6,05 (1H,  $J=2$  Hz) foram associados a hidrogênios que apresentavam acoplamento *meta* entre si. Os demais sinais observados nesta faixa do espectro em  $\delta$  7,52 (1H, d,  $J=2,1$  Hz), 7,48 (1H, dd,  $J=8,4$  e 2,1 Hz) e 6,73 (1H, d,  $J=8,4$  Hz), foram atribuídos a hidrogênios que mostravam acoplamentos *orto* e/ou *meta* entre si. Destacam-se ainda neste espectro sinais referentes a unidades de açúcar na faixa de  $\delta$  4,96-3,11, onde o duplete em  $\delta$  4,96 (1H, d,  $J=7,4$  Hz) e o singlete em 4,38 (1H, s) foram relacionados a hidrogênios anoméricos. Por fim, identificou-se um dubleto em  $\delta$  0,81 (3H,  $J=6,2$  Hz) que foi relacionado a um grupo metila. Os dados de RMN  $^1\text{H}$  para AR-1 foram compatíveis com um esqueleto flavonoídico, na forma de heterosídeo, contendo duas unidades de açúcar.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Fig. 119, Pág. 140) apresentou vinte e sete linhas espectrais, confirmando a proposição de um esqueleto flavonoídico bisdesmosídico. O sinal em  $\delta$  179,5 foi atribuído a uma carbonila conjugada de cetona, enquanto que os sinais entre  $\delta$  166,1 e 95,0 foram relacionados a carbonos  $sp^2$ , sendo que os seis mais desblindados ( $\delta$  166,1-135,8) se encontravam oxigenados. A comparação deste espectro com o de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° (125MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Fig. 120, Pág. 140) mostrou que todos os carbonos  $sp^2$  eram não hidrogenados, com exceção dos metínicos em  $\delta$  123,7, 117,9, 116,2, 100,1 e 95,0. Os sinais visualizados em  $\delta$  104,9 e 102,6, bem como aqueles entre  $\delta$  78,3 e 68,7 e a metila em  $\delta$  18,0 foram relacionados a carbonos pertencentes às duas unidades de açúcar, respectivamente. A tabela 25 (Pág. 135) contém todos os deslocamentos químicos dos átomos de carbono, obtidos para AR-1, por padrão de hidrogenação.

Tabela 25 – Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) de AR-1 por padrão de hidrogenação:

C	CH	$\text{CH}_2$	$\text{CH}_3$	Total
179,5 (=O)	123,7	68,7 (-O-)	18,0	
166,1 (-OH)	117,9			
163,1 (-OH)	116,2			
159,5	104,9 (-O-)			
158,6 (-O-)	102,6 (-O-)			
149,9 (-OH)	100,1			
146,0 (-OH)	95,0			
135,8 (-O-)	78,3 (-OH)			
123,3	77,4			
105,8	75,9 (-OH)			
	74,1 (-OH)			
	72,4 (-OH)			
	72,2 (-OH)			
	71,5 (-OH)			
	69,9			
$\text{C}_{10}\text{H}_4\text{O}_7$	$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_8$	$\text{CH}_2\text{O}$	$\text{CH}_3$	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$

Para a confirmação da estrutura de AR-1 foram realizados experimentos de RMN bidimensionais. O espectro HSQC (Fig. 121, Pág. 141) permitiu associar inequivocamente todos os sinais de hidrogênios a seus respectivos carbonos, como observado na tabela 26 (Pág. 137). O espectro de RMN bidimensional HMBC (Fig. 123, Pág. 142), mostrou os acoplamentos a mais de uma ligação entre hidrogênios e carbonos ( $^2J_{\text{CH}}$  e  $^3J_{\text{CH}}$ ). A posição relativa da porção heterosídica no esqueleto flavonoídico foi determinada através da correlação entre o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  4,96 e o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  135,8, enquanto a conexão entre as unidades dos açúcares foi visualizada com os acoplamentos dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  4,38 e  $\delta_{\text{H}}$  3,67 com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  68,7 e  $\delta_{\text{C}}$  102,6, respectivamente, como visto na sub-estrutura para AR-1 (Fig. 115, Pág. 136).

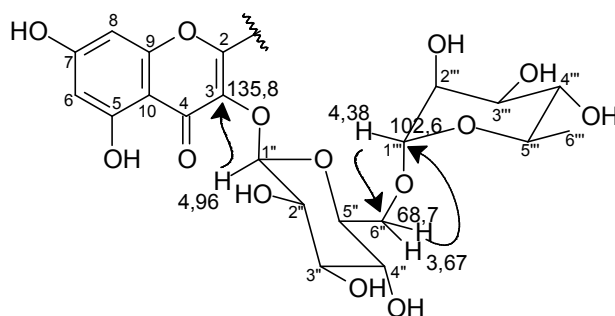


Figura 115 – Sub-estrutura para AR-1

A análise de AR-1 por absorção na região do infravermelho (Fig. 117, Pág. 139) revelou uma banda em  $3419\text{ cm}^{-1}$  compatível com deformação axial de ligação O-H; absorções em  $2922$  e  $2859\text{ cm}^{-1}$  características de deformação axial de ligação  $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ ; uma banda em  $1655\text{ cm}^{-1}$  que foi associada ao estiramento da ligação  $\text{C}=\text{O}$  da carbonila cetônica conjugada, além de bandas em  $1602$ ,  $1507$  e  $1458\text{ cm}^{-1}$  relativas às vibrações de deformação axial  $\text{C}=\text{C}$  de aromáticos e em  $1294$  a  $1064\text{ cm}^{-1}$  associadas às vibrações de deformação axial da ligação C-O.

A reunião de todos os dados espectroscópicos obtidos através da detalhada análise de seus espectros, bem como a comparação destes com aqueles registrados na literatura para os flavonóides, permitiram determinar que AR-1 se tratava da quercetina-3-O- $\beta$ -D-rutinosídeo (rutina) [BECK; HÄBERLEIN, 1999] (Fig. 116, Pág. 136), com larga ocorrência no reino vegetal.

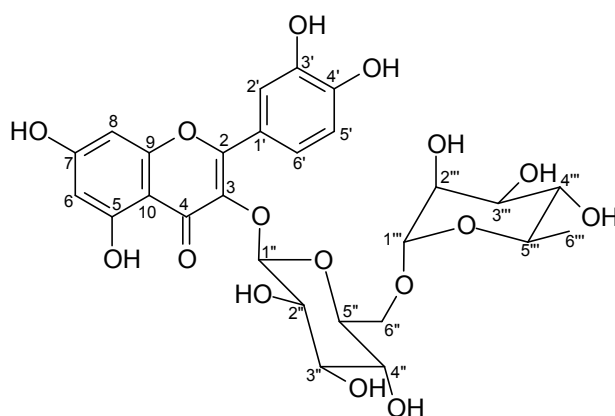


Figura 116 – Estrutura da rutina



Tabela 26 – Correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (HSQC e HMBC) de AR-1:

<i>C</i>	$^{13}\text{C-BB}$	<i>HSQC</i>		<i>HMBC</i>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	$^4J_{\text{CH}}$
2	159,5	-		7,56; 7,48	6,73
3	135,8	-		4,96	
4	179,5	-			6,24
5	163,1	-	6,05		
6	100,1	6,05 (1H, d, $J=2,0$ Hz)		6,24	
7	166,1	-	6,24; 6,05		
8	95,0	6,24 (1H, d, $J=2,0$ Hz)			
9	158,6	-			
10	105,8	-		6,24; 6,05	
1'	123,3	-			
2'	117,9	7,52 (1H, d, $J=2,1$ Hz)		7,48	
3'	146,0	-	7,52	6,73	
4'	149,9	-	6,73	7,52; 7,48	
5'	116,2	6,73 (1H, d, $J=8,4$ Hz)			
6'	123,7	7,48 (1H, dd, $J=8,4$ e $2,1$ Hz)	6,73	7,52	
1''	104,9	4,96 (1H, d, $J=7,4$ Hz)		3,28; 3,19	
2''	75,9	3,34 (m)	3,28		
3''	78,3	3,28 (m)	3,34		
4''	71,5	3,14 (m)	3,19	3,67; 3,34	
5''	77,4	3,19 (1H, m)	3,67; 3,14	4,96	
6''	68,7	3,67 (1H, d, $J=10,1$ Hz) 3,26 (m)	3,19	4,96; 3,14	
1'''	102,6	4,38 (1H, sl)		3,67; 3,26	
2'''	72,2	3,50 (1H, dd, $J=3,2$ e $1,5$ Hz)	4,38	3,17	
3'''	72,4	3,40 (1H, dd, $J=9,4$ e $3,4$ Hz)	3,50; 3,17	4,38	
4'''	74,1	3,17 (m)	3,40	3,50; 0,81	
5'''	69,9	3,31 (m)	0,81	4,38; 3,40	
6'''	18,0	0,81 (3H, d, $J=6,2$ Hz)	3,31	3,17	

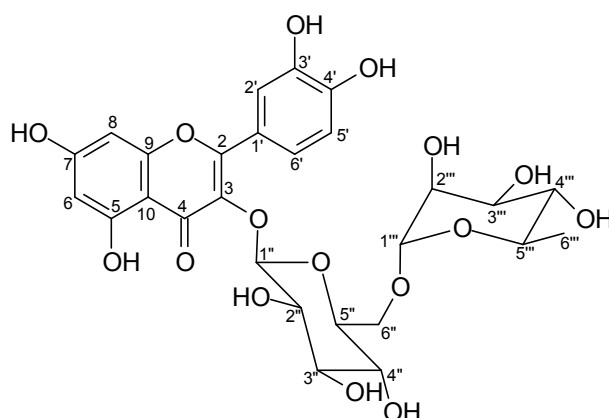
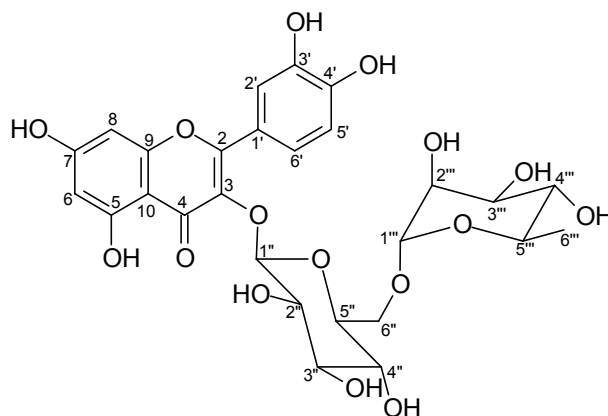


Tabela 27 – Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de AR-1 (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) com os descritos na literatura para a rutina (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) [BECK; HÄBERLEIN, 1999]:

<i>C</i>	<i>AR-1</i>	<i>Rutina</i>
	$\delta_c$	$\delta_c$
2	159,5	158,5
3	135,8	135,6
4	179,5	179,4
5	163,1	162,9
6	100,1	99,9
7	166,1	166,0
8	95,0	94,9
9	158,6	159,3
10	105,8	105,6
1'	123,3	123,1*
2'	117,9	116,0
3'	146,0	145,8
4'	149,9	149,8
5'	116,2	117,7
6'	123,7	123,5*
1''	104,9	104,7
2''	75,9	75,7
3''	78,3	78,2
4''	71,5	71,3 <sup>#</sup>
5''	77,4	77,1
6''	68,7	68,5
1'''	102,6	102,4
2'''	72,2	72,0 <sup>#</sup>
3'''	72,4	72,2 <sup>#</sup>
4'''	74,1	73,9
5'''	69,9	69,7
6'''	18,0	17,9

\*<sup>#</sup> - os valores podem estar trocados.



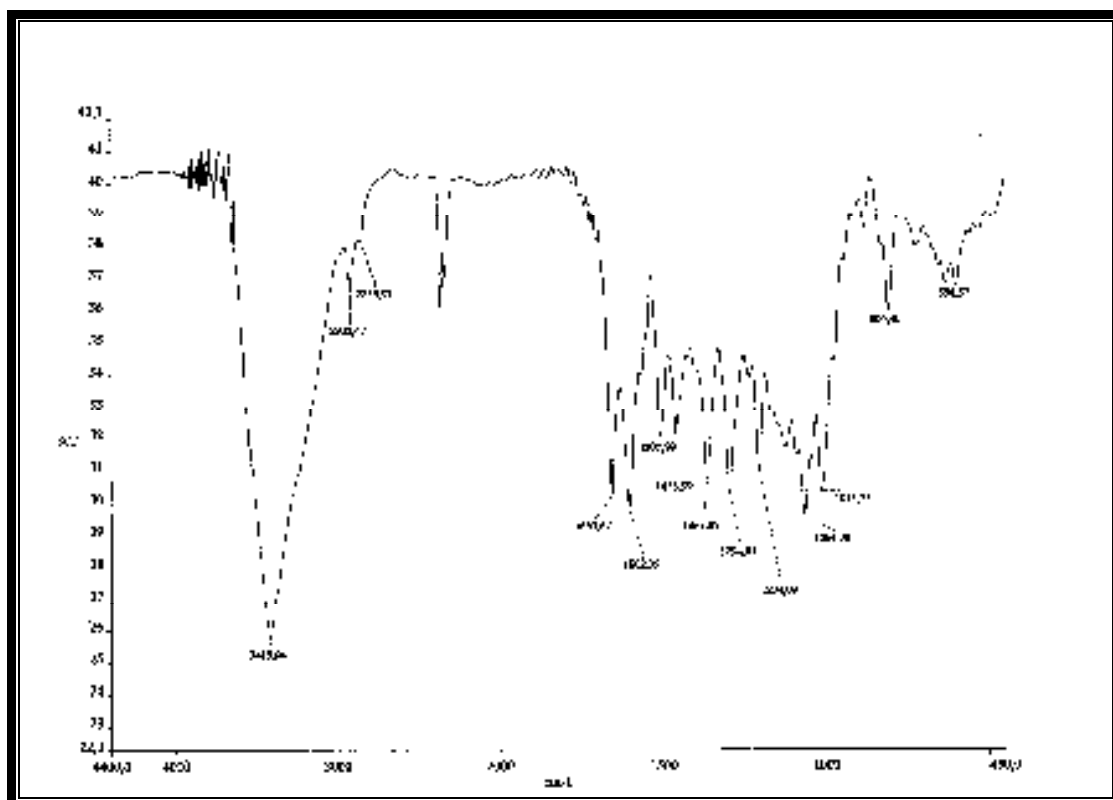


Figura 117 – Espectro de absorção na região do I.V. de AR-1 com pastilhas de KBr.

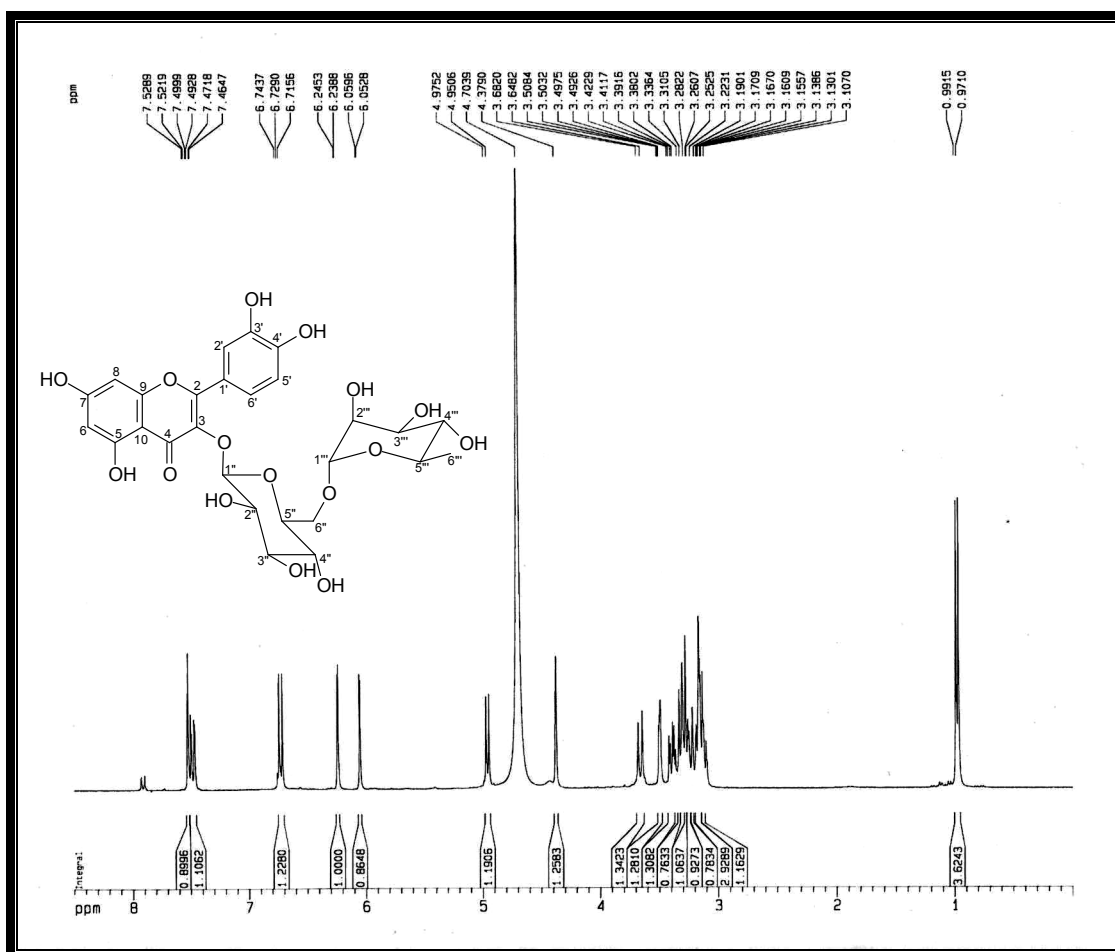


Figura 118 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AR-1.

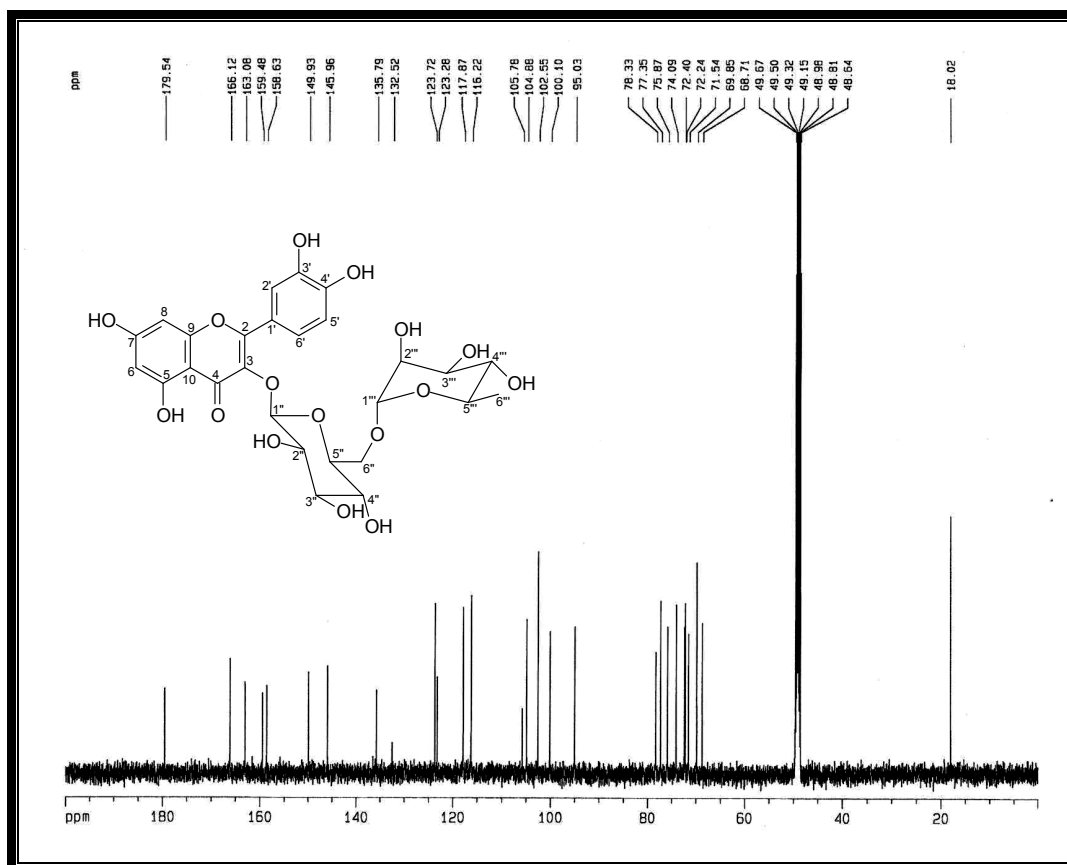


Figura 119 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C-BB}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AR-1.

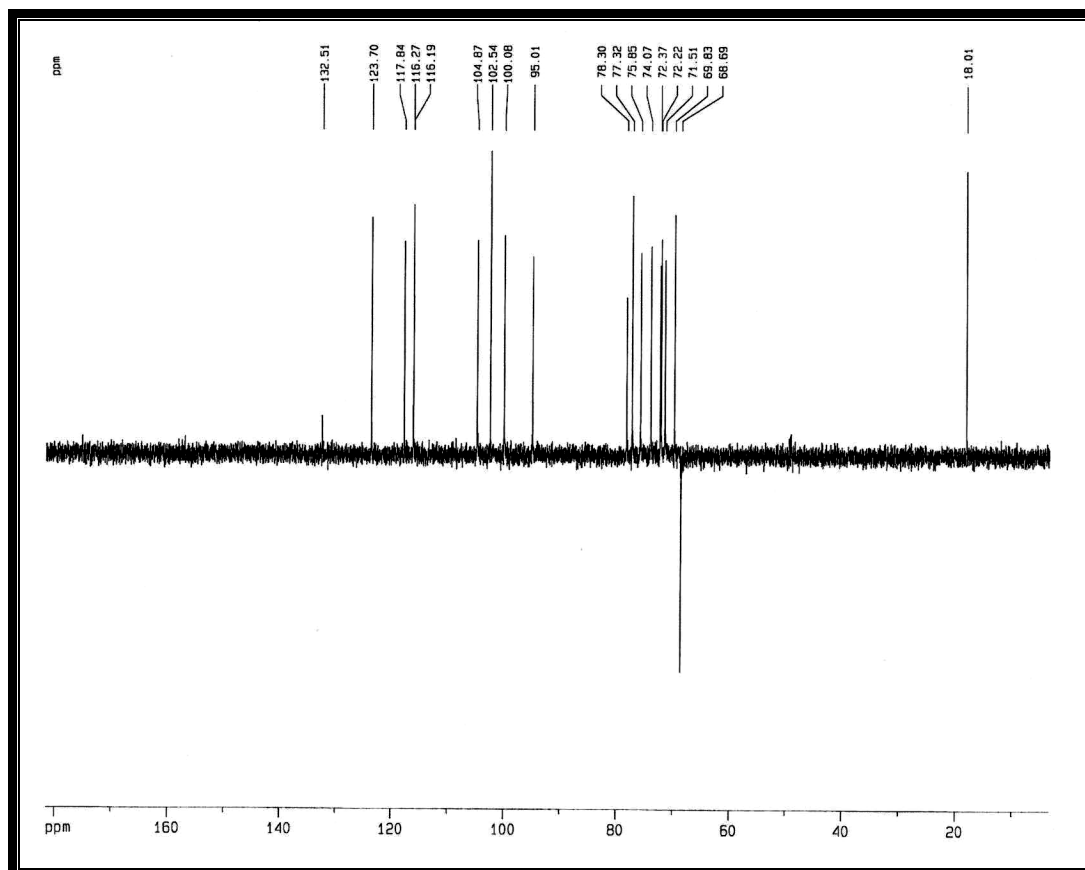


Figura 120 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C-DEPT 135}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AR-1.

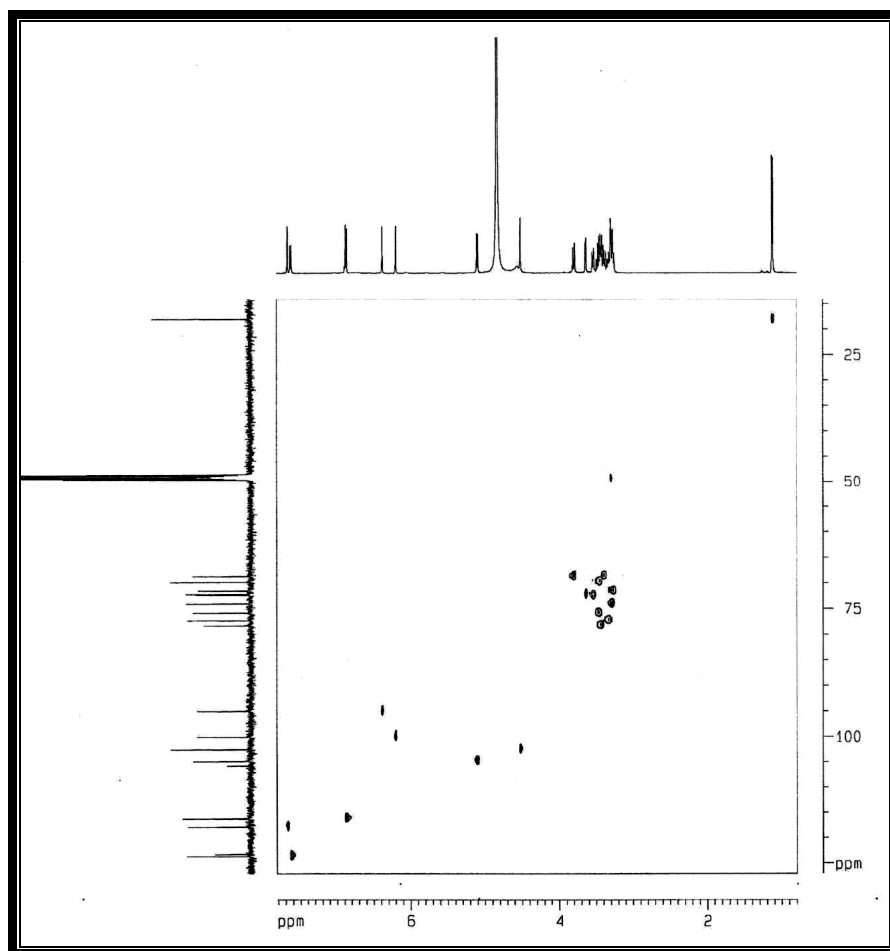


Figura 121 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de AR-1.

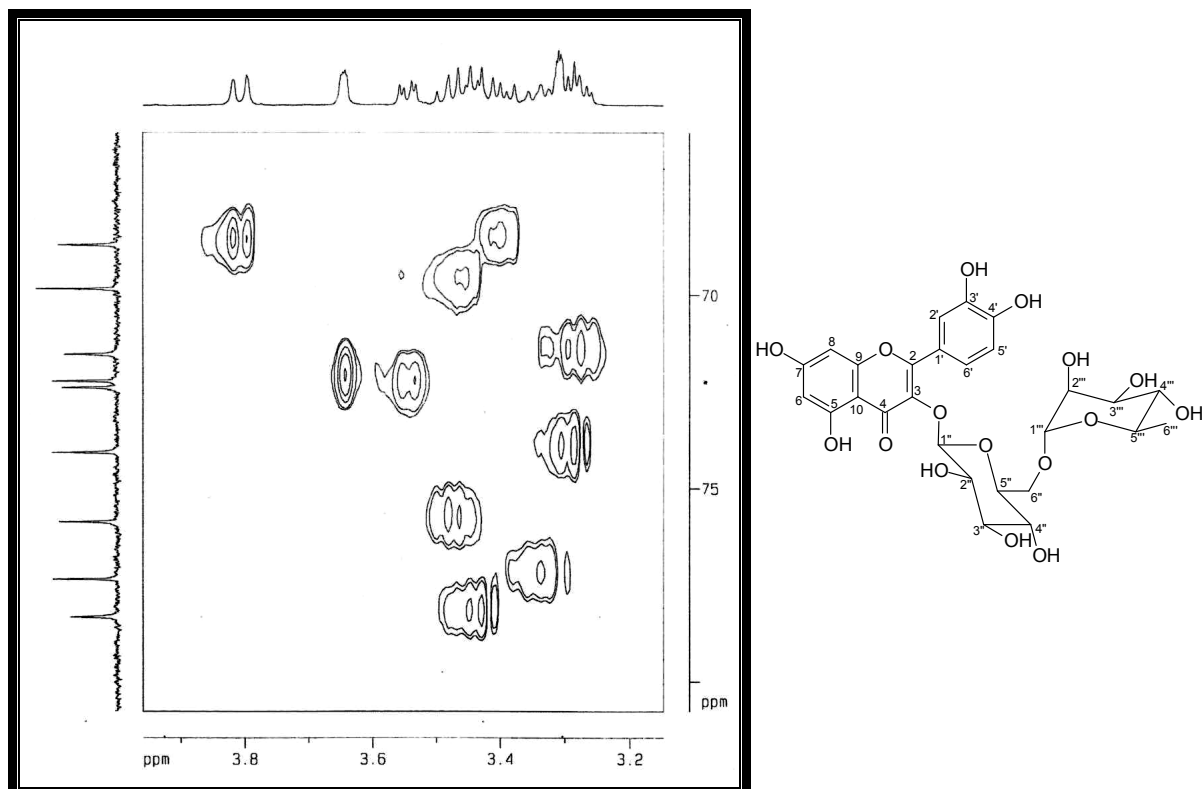


Figura 122 – Expansão do espectro de RMN bidimensional HSQC de AR-1.

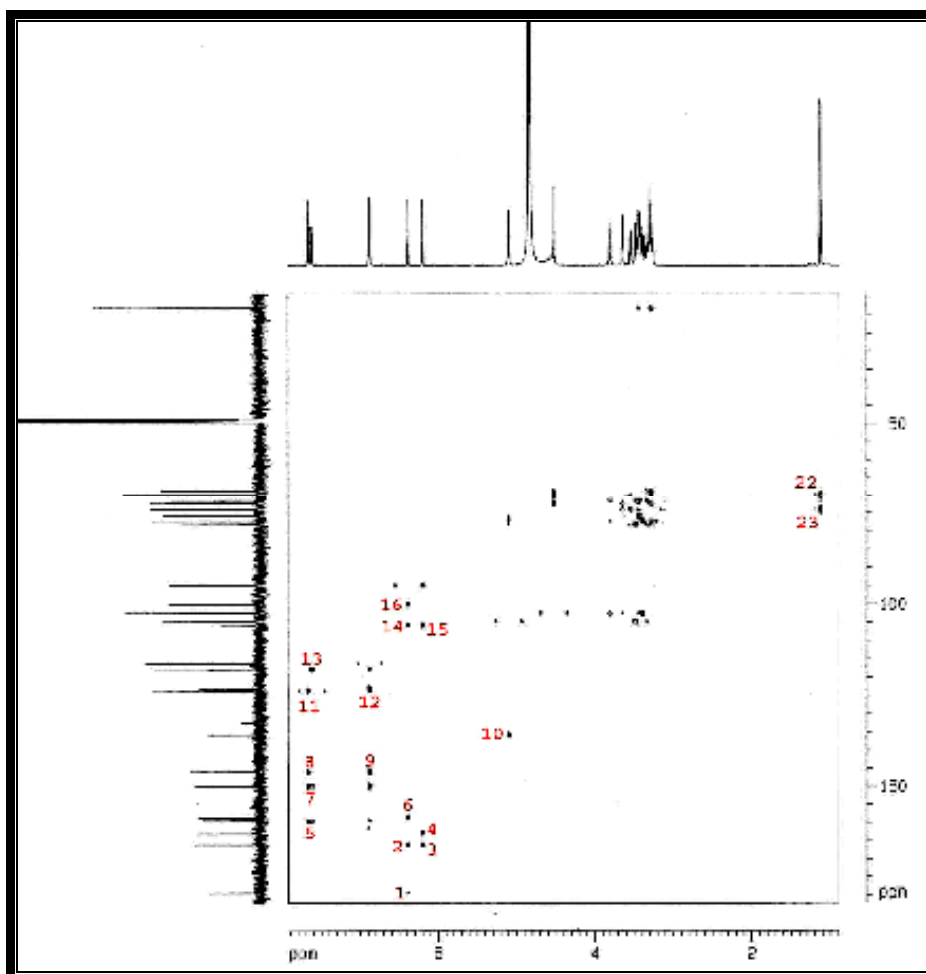


Figura 123 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de AR-1.

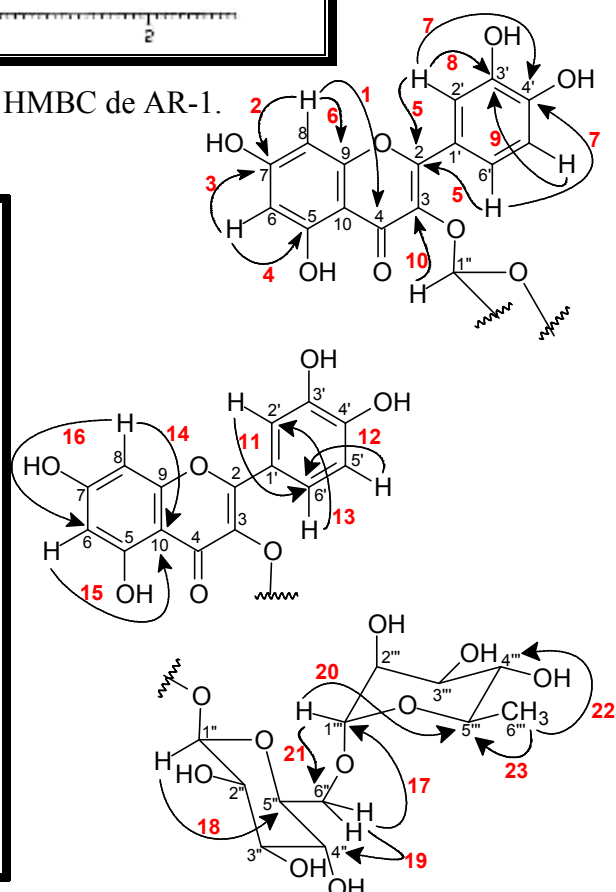
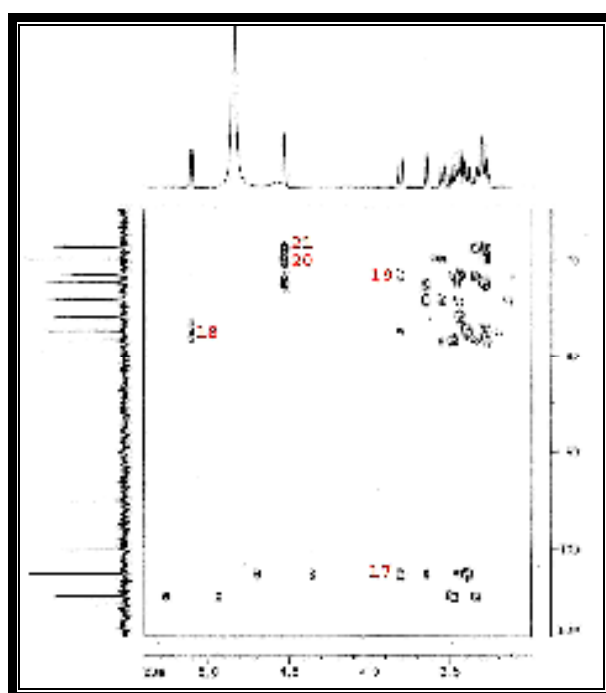


Figura 124 – Expansão do espectro de RMN bidimensional HMBC de AR-1.

#### 4.3.2. Determinação estrutural de AR-2

O tratamento cromatográfico da fração clorofórmica, obtida de partição do extrato etanólico das folhas de *A. rigida*, por meio de cromatografia em gel de sílica, Sephadex LH-20 e cromatografia “flash”, resultou no isolamento de AR-2, um sólido amorfo amarelo claro com ponto de fusão entre 289,1 e 291,5 °C (Fluxograma 3, Pág. 218).

A análise do espectro de absorção na região do infravermelho de AR-2 (Fig. 128, Pág. 148) mostrou uma banda larga em 3496 cm<sup>-1</sup>, correspondente à deformação axial da ligação O-H, caracterizando a presença de hidroxila. A absorção em 1649 cm<sup>-1</sup> foi relacionada à deformação axial C=O de uma carbonila possivelmente conjugada, enquanto que as bandas em 1608, 1563 e 1509 cm<sup>-1</sup> foram compatíveis com bandas esqueléticas de deformações axiais das ligações C=C de anel aromático. As absorções entre 1295 e 1030 cm<sup>-1</sup> foram atribuídas a deformações axiais C-O; e as absorções em 893 e 737 cm<sup>-1</sup> foram relacionadas a deformações angulares fora do plano das ligações C-H de anel aromático.

Observando-se o espectro de RMN <sup>1</sup>H (500MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) de AR-2 (Fig. 129, Pág. 148), foi possível visualizar cinco sinais na faixa δ 7,96-6,61, os quais foram associados a hidrogênios ligados a carbonos *sp*<sup>2</sup>. Destes, foram assinalados os dupletos centrados em δ 7,95 (2H, d, *J*=8,0 Hz) e 7,29 (2H, d, *J*=8,0 Hz), relativos a hidrogênios vizinhos em posição *orto*, enquanto que o simpleto localizado em δ 6,93 (1H, s) foi relacionado a um hidrogênio olefínico isolado. Os outros dois sinais, referentes a hidrogênios aromáticos, assinalados em δ 6,71 (1H, d, *J*=2,1 Hz) e 6,61 (1H, d, *J*=2,1 Hz) e foram compatíveis com hidrogênios que apresentam acoplamento *meta* entre si nas posições 6 e 8, seguindo o padrão de substituição observado em AM-4 (Pág. 83) e AR-1 (Pág. 134). Foram observados ainda um sinal em δ 13,63 (1H, s), correspondente a um hidrogênio de hidroxila fortemente desblindado, além de um sinal simples e intenso em δ 3,79 (3H), associado aos hidrogênios de um grupo metoxila. Os dados de RMN <sup>1</sup>H para AR-2 permitiram sugerir a estrutura de um flavonóide, dada a semelhança destes com os observados para as substâncias AM-4 e AR-1.

A proposição de um esqueleto flavonoídico para AR-2 foi confirmada pela observação do espectro de RMN <sup>13</sup>C-BB (125 MHz) (Fig. 130, Pág. 149), através da visualização de catorze linhas espectrais, dentre as quais a absorção em δ 183,2 foi claramente atribuída a uma carbonila conjugada e quelada, enquanto que outra, em δ 56,3, referiu-se ao carbono do grupo metoxila. Dentre os sinais atribuídos a carbonos *sp*<sup>2</sup>, pôde-se propor, pela

observação do deslocamento químico, que cinco estariam oxigenados ( $\delta$  166,2, 165,2, 163,0, 163,2 e 158,4). Análise comparativa dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB e RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 (Fig. 131, Pág. 149) contribuiu para avaliação do padrão de hidrogenação dos átomos de carbono de AR-2, como observado na tabela 28 (Pág. 144).

Tabela 28 – Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz) de AR-2 por padrão de hidrogenação:

C	CH	CH <sub>3</sub>	Total
183,2 (=O)	129,3 (2x)	56,3 (-O-)	
166,2	117,2 (2x)		
165,2	104,3		
163,0 (-OH)	98,9		
163,2 (-OH)	93,2		
158,4 (-O-)			
122,4			
104,3			
$\text{C}_8\text{H}_2\text{O}_4$	$\text{C}_7\text{H}_7$	$\text{CH}_3\text{O}$	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$

A análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  para AR-2, bem como a fórmula molecular sugerida para sua estrutura ( $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$ ) permitiram propor para o composto o esqueleto de uma flavona semelhante à acacetina [AGRAWALL, 1989] (Fig. 125, Pág. 144).

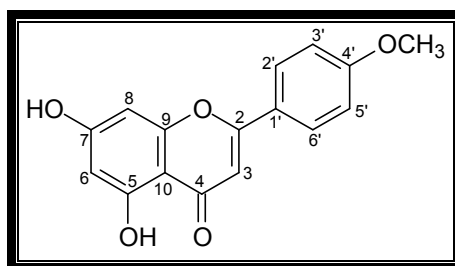


Figura 125 – Estrutura da acacetina

O espectro de RMN bidimensional HMBC (Fig. 133, Pág. 147) de AR-2 mostrou acoplamentos dos hidrogênios em  $\delta$  6,71, 6,61 e 3,79 com o carbono em  $\delta$  166,2 e permitiu concluir que o grupo metoxila se encontrava ligado ao carbono 7 do esqueleto flavônico (Fig. 126, Pág. 145) e não ao carbono 4', como observado na estrutura da acacetina.



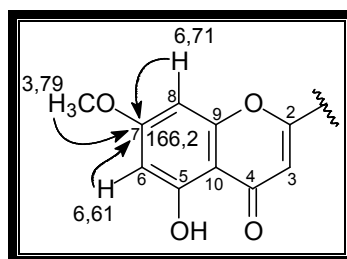


Figura 126 – Sub-estrutura para AR-2

A reunião de todos os dados espectroscópicos obtidos para AR-2 através da detalhada análise de seus espectros, bem como a comparação destes com aqueles registrados na literatura para os flavonóides, permitiram determinar que a substância se tratava da genkwanina (7-metóxiapigenina) [ZAHIR; JOSSANG; BODO, 1996] (Fig. 127, abaixo), anteriormente isolada em *Rhus retinorrhoea* [AHMED, 2001].

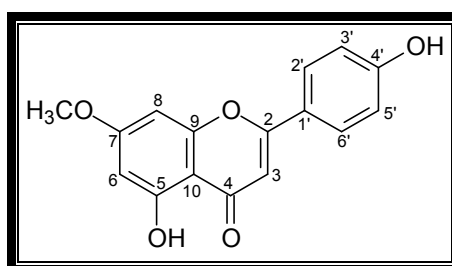


Figura 127 – estrutura da genkwanina

Tabela 29 – Correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (HSQC e HMBC) de AR-2:

<i>C</i>	$^{13}\text{C-BB}$	<i>HSQC</i>	<i>HMBC</i>		
	$\delta_c$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$^4J_{CH}$
2	165,2	-	6,93	7,95	
3	104,3	6,93 (1H, s)			
4	183,2	-		6,93	6,71
5	163,0	-	13,63; 6,61		
6	98,9	6,61 (1H, d, $J=2,1$ Hz)		13,63; 671	
7	166,2	-	6,71; 6,61	3,79	
8	93,2	6,71 (1H, d, $J=2,1$ Hz)		6,61	
9	158,4	-	6,71		
10	106,2	-		13,63; 6,93; 6,71; 6,61	
1'	122,4	-		7,29; 6,93	
2' e 6'	129,3	7,95 (2H, d, $J=8,0$ Hz)		7,95	
3' e 5'	117,2	7,29 (2H, d, $J=8,0$ Hz)	7,95	7,29	
4'	163,2	-	7,29	7,95	
OCH <sub>3</sub>	56,3	3,79 (3H, s)			

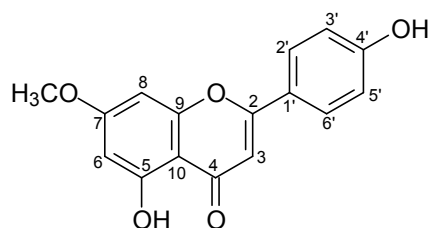
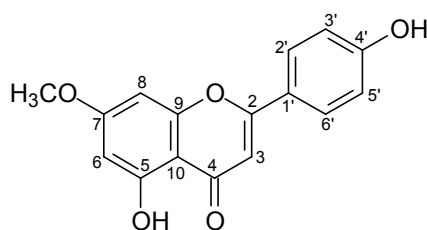


Tabela 30 – Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de AR-2 (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) com os descritos na literatura para a genkwanina (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) [ZAHIR, A.; JOSSANG, A.; BODO, 1996] e a acacetina (25,2 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) [AGRAWALL, 1989]:

<i>C</i>	<i>AR-2</i>	<i>Genkwanina</i>	<i>Acacetina</i>
	$\delta_c$	$\delta_c$	$\delta_c$
2	165,2	166,0	163,9
3	104,3	104,2	103,9
4	183,2	181,4	182,3
5	163,0	161,4	162,2
6	98,9	99,2	99,4
7	166,2	167,1	164,8
8	93,2	93,7	94,3
9	158,4	157,4	157,9
10	106,2	106,5	104,4
1'	122,4	122,9	123,5
2' e 6'	129,3	129,6	128,4
3' e 5'	117,2	117,2	114,8
4'	163,2	162,8	162,8
$\text{OCH}_3$	56,3	56,7	56,1



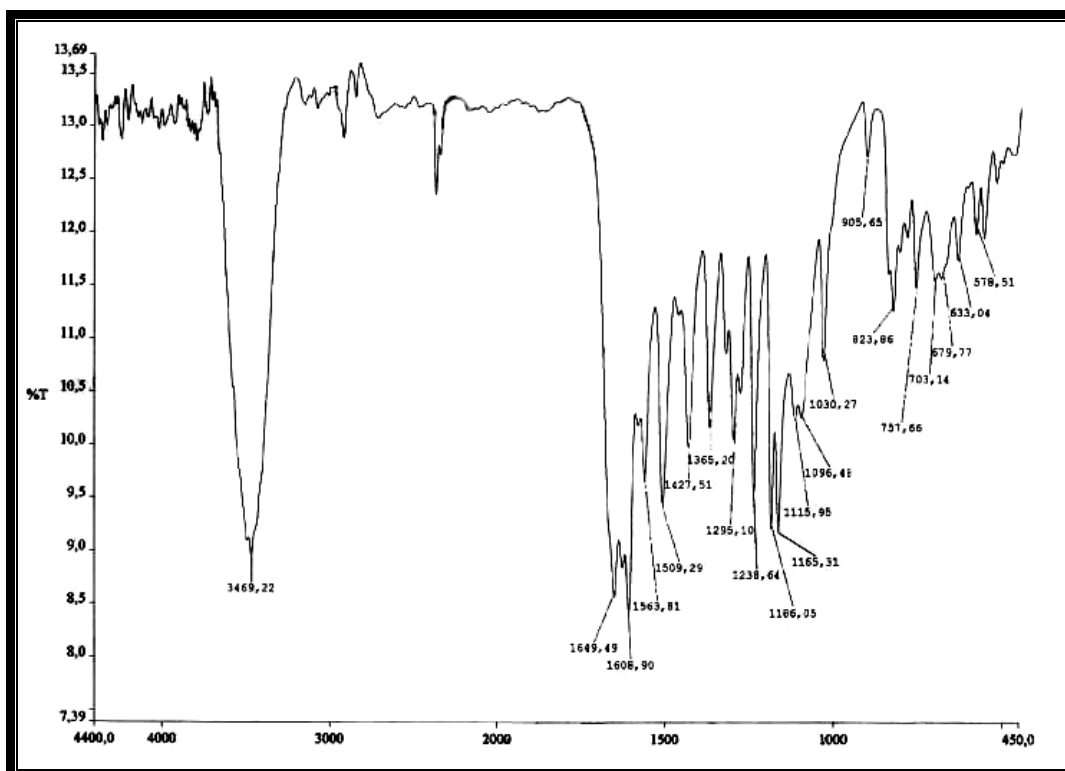


Figura 128 – Espectro de absorção na região do I.V. de AR-2 com pastilhas de KBr.

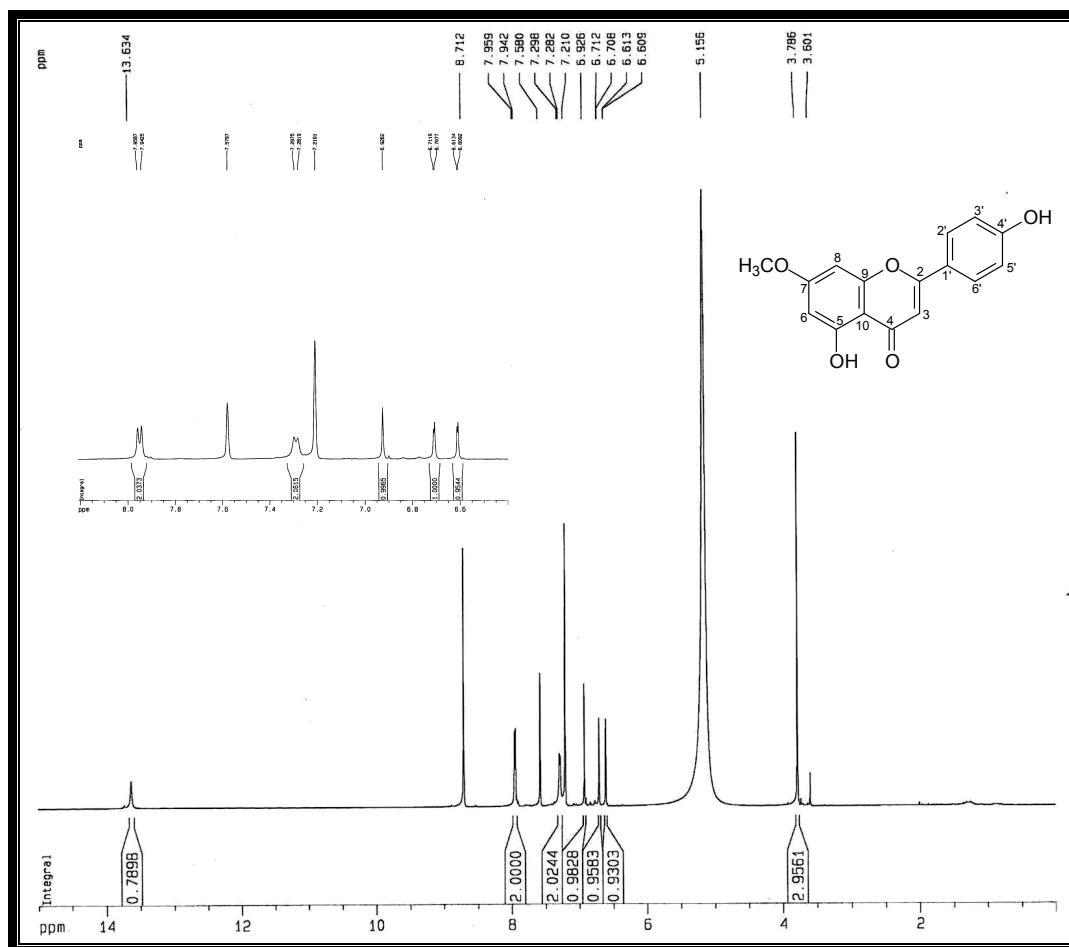


Figura 129 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de AR-2.

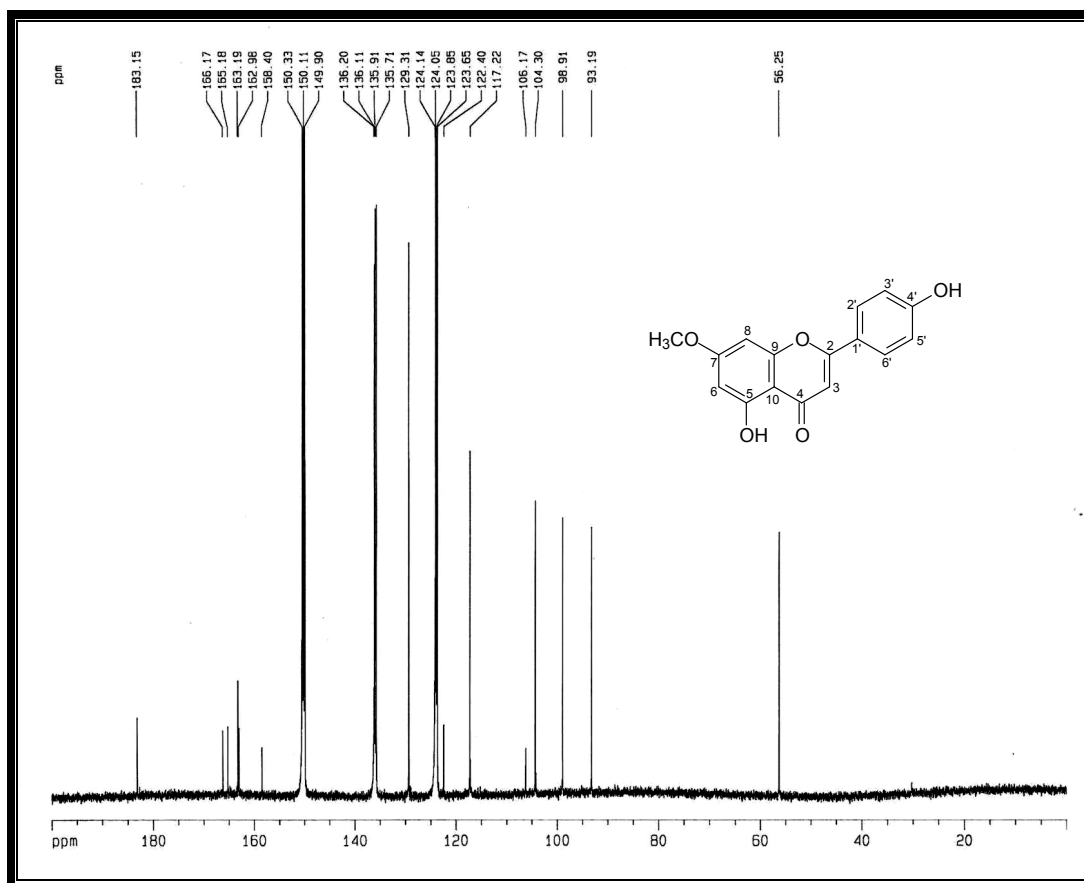


Figura 130 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de AR-2.

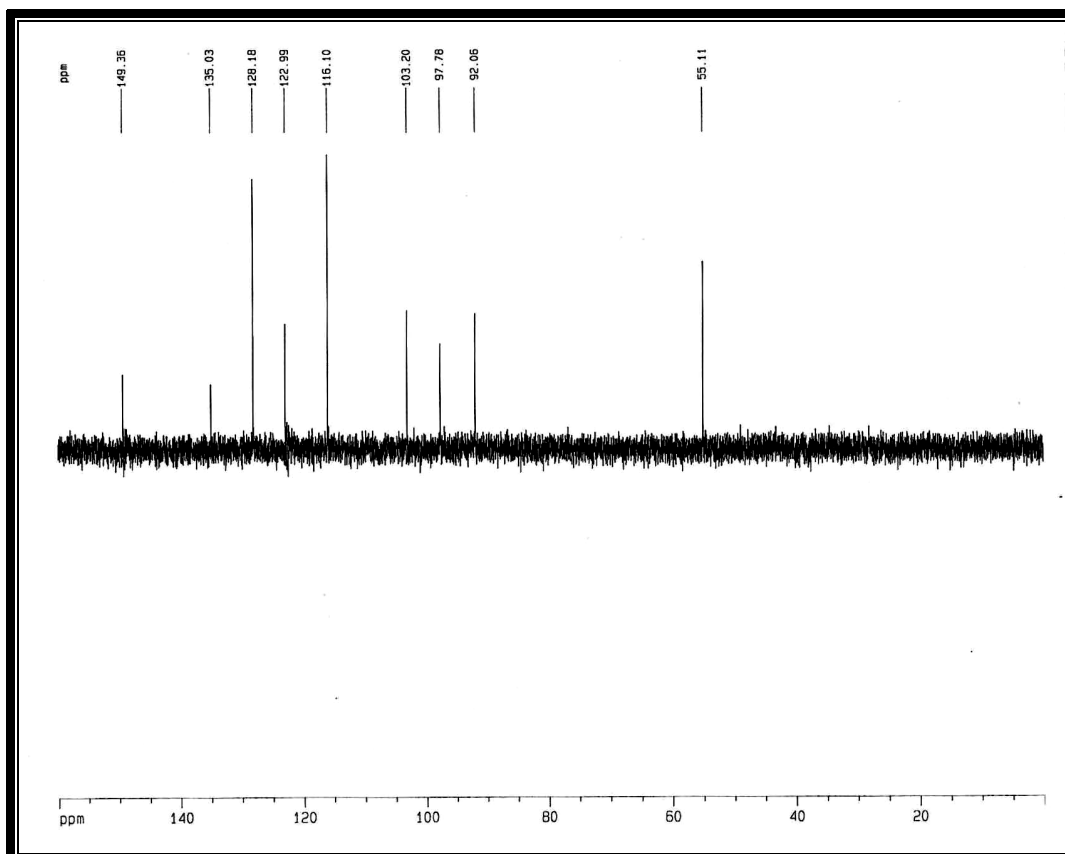


Figura 131 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de AR-2.

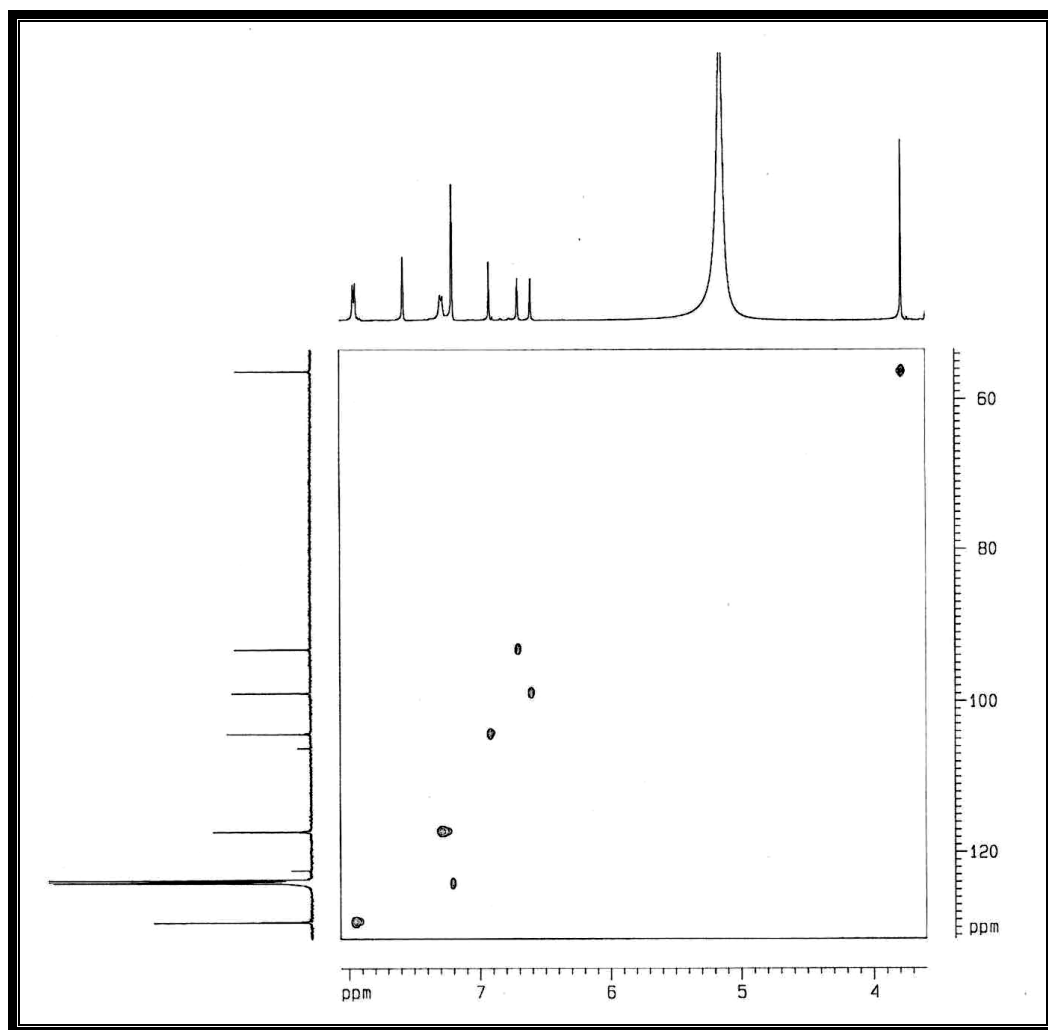
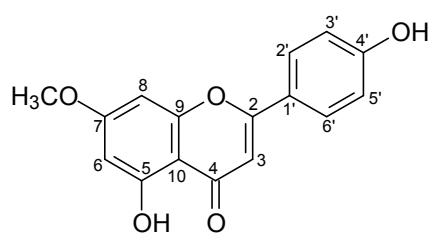


Figura 132 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de AR-2.



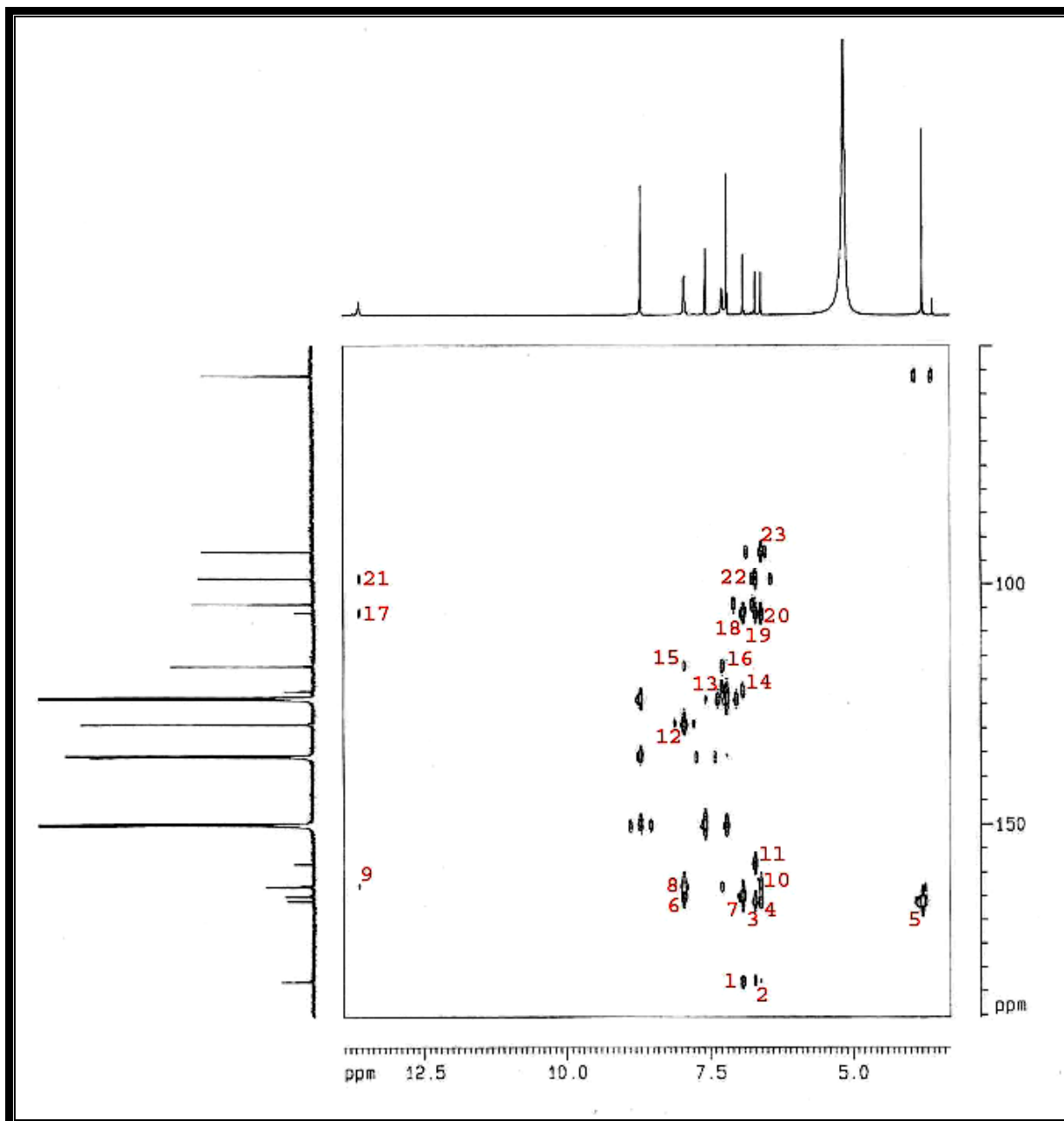
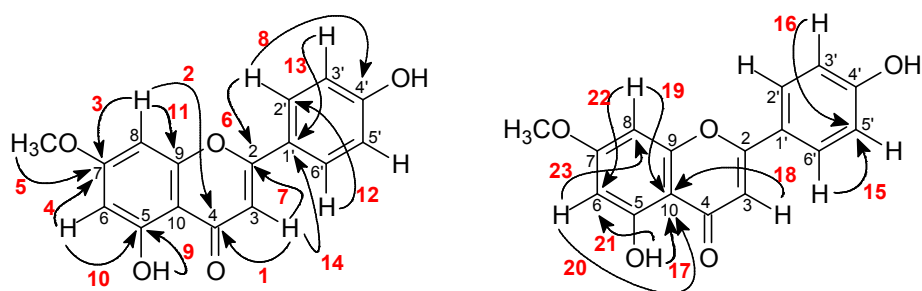


Figura 133 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de AR-2.



#### 4.3.3. Determinação estrutural de AR-3

AR-3, um sólido amorfo marrom escuro (p.f.: 150,1-151,5 °C), foi obtido do tratamento cromatográfico da fração clorofórmica, proveniente da partição do extrato etanólico das folhas de *A. rigida*, através de cromatografia em gel de sílica, em sephadex LH-20 e posterior cromatografia “flash” (Fluxograma 3, Pág. 218).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AR-3 (Fig. 137, Pág. 156) mostrou-se semelhante ao de AM-6 (Fig. 79, Pág. 101). Foram observados dois dupletos ( $J=15,9$  Hz) em  $\delta$  7,53 (1H) e  $\delta$  6,24 (1H) atribuídos a hidrogênios olefínicos com acoplamento *trans*, bem como sinais relacionados a hidrogênios de um anel aromático com o mesmo padrão de substituição observado para AM-6 em  $\delta$  7,03 (1H, d,  $J=1,5$  Hz), 6,93 (1H, dd,  $J=8,2$  e  $1,5$  Hz) e 6,78 (1H, d,  $J=8,2$  Hz). A diferença entre estes dois espectros está, no entanto, nos sinais visualizados em  $\delta$  4,20 (2H, q,  $J=7,1$  Hz) e  $\delta$  1,30 (3H, t,  $J=7,1$  Hz), os quais foram relacionados aos hidrogênios de um grupamento etil ligado a um átomo de oxigênio. Pela análise do espectro, é coerente propor para AR-3 a estrutura de um derivado do ácido cafeico.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AR-3 (Fig. 138, Pág. 157) também se mostrou semelhante ao de AM-6 (Fig. 80, Pág. 102), confirmando a proposição estrutural sugerida. A tabela 32 (Pág. 155) apresenta uma comparação entre os dados obtidos neste espectro de AR-3 e os descritos na literatura para o ácido cafeico [Bolzani, 1991]. Os deslocamentos químicos dos carbonos pertencentes ao grupo etil foram assinalados em  $\delta$  61,6 e  $\delta$  14,8.

Para a confirmação da estrutura proposta para AR-3, foram realizados os experimentos de RMN bidimensional HSQC e HMBC. A tabela 31 (Pág. 154) apresenta os dados obtidos a partir da observação dos espectros resultantes destas duas análises (Fig. 139, Pág. 157 e Fig. 140, Pág. 158, respectivamente). Deve-se, porém destacar, no espectro HMBC, o acoplamento entre os hidrogênios metilênicos do grupo etil ( $\delta$  4,20) com o carbono carbonílico ( $\delta$  169,5), o que confirma a proposição de um éster etílico para AR-3 (Fig. 134, Pág. 153).



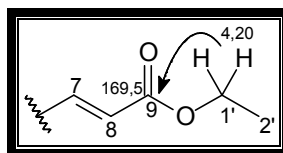


Figura 134 – Sub-estrutura para AR-3

O espectro de massa de AR-3 (Fig. 141, Pág. 159), obtido por impacto eletrônico a 70 eV, forneceu a massa molecular do composto ao apresentar o pico do íon molecular em  $m/z$  208 daltons.

A reunião dos dados espectroscópicos obtidos para AR-3 através da análise de seus espectros, bem como a comparação destes dados com aqueles registrados na literatura para os derivados do ácido cafeico, permitiram determinar que a amostra se tratava do éster etílico deste ácido (Fig. 135, Pág. 153), já anteriormente isolado de *Cichorium endivia* [KISIEL; MICHALSKA, 2006] e *Dysoxylum densiflorum* [XIE; YANG; YUE, 2008].

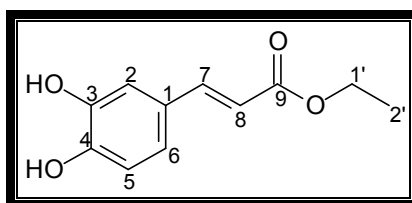


Figura 135 – Estrutura do éster etílico do ácido cafeico

Tabela 31 – Correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (HSQC e HMBC) de AR-3:

<i>C</i>	$^{13}\text{C-BB}$	<i>HSQC</i>	<i>HMBC</i>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	127,9	-	7,53	6,78; 6,24
2	115,3	7,03 (1H, d, $J=1,6$ Hz)		7,53; 6,93
3	149,6	-	7,03	6,78
4	146,9	-	6,78	7,03; 6,93
5	116,7	6,78 (1H, d, $J=8,1$ Hz)		
6	123,7	6,93 (1H, dd, $J=8,2$ e $1,5$ Hz)	6,78	7,53; 7,03
7	146,8	7,53 (1H, d, $J=15,9$ Hz)	6,24	
8	115,5	6,24 (d, $J=15,9$ Hz)		
9	169,5	-	6,24	7,53; 4,20
1'	61,6	4,20 (2H, q, $J=7,1$ Hz)	1,30	
2'	14,8	1,30 (3H, t, $J=7,1$ Hz)	4,20	

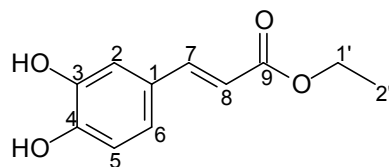
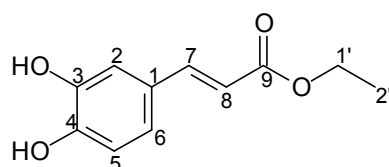


Tabela 32 – Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de AR-3 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) com os descritos na literatura para o ácido cafeico (acetona- $\text{d}_6$ , 50 MHz) [BOLZANI; TREVISAN; YOUNG, 1991]:

<i>C</i>	<i>AR-3</i>	<i>Ácido cafeico</i>
	$\delta_c$	$\delta_c$
1	127,9	127,0
2	115,3	114,9
3	149,6	149,6
4	146,9	146,7
5	116,7	115,2
6	123,7	122,3
7	146,8	146,7
8	115,5	116,4
9	169,5	167,4
1'	61,6	-
2'	14,8	-



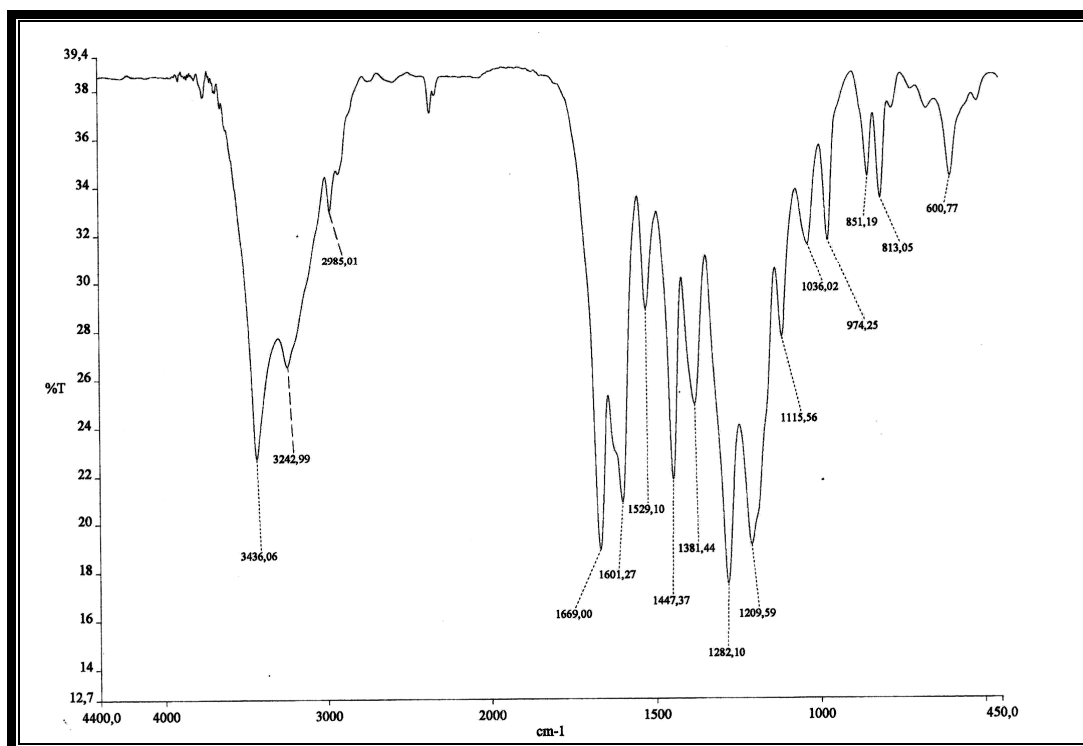


Figura 136 – Espectro de absorção na região do I.V. de AR-3 com pastilhas de KBr.

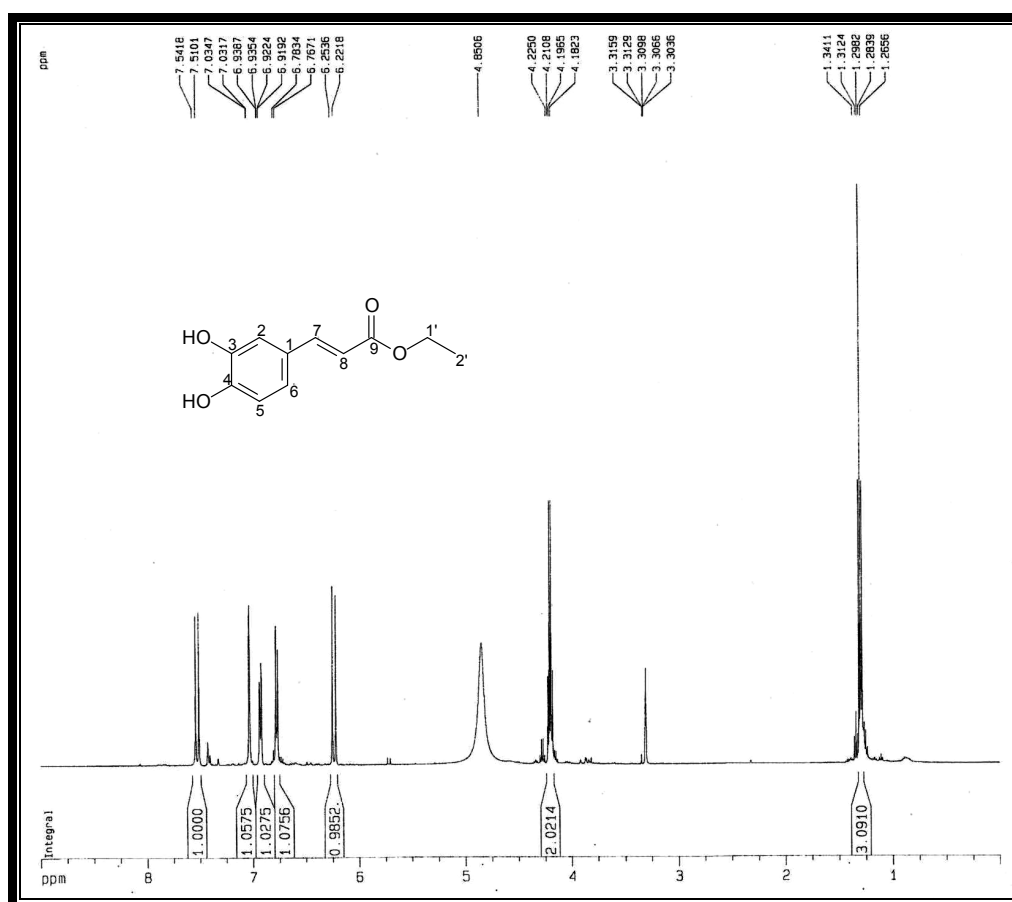


Figura 137 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AR-3.

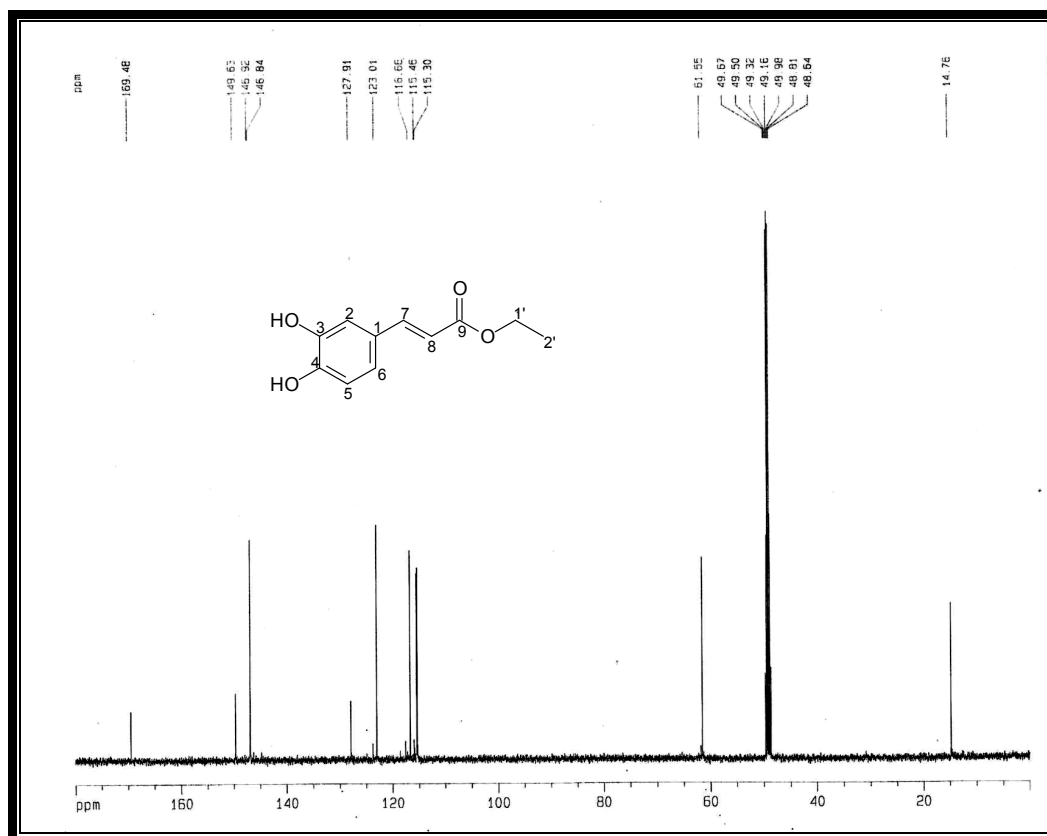


Figura 138 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AR-3.

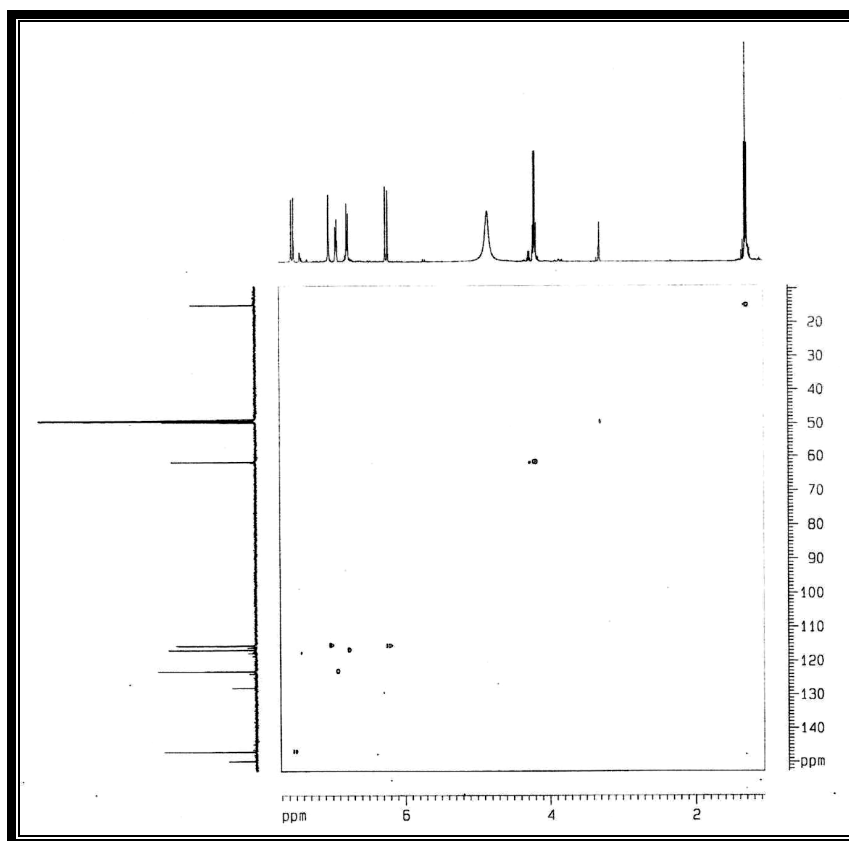


Figura 139 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de AR-3

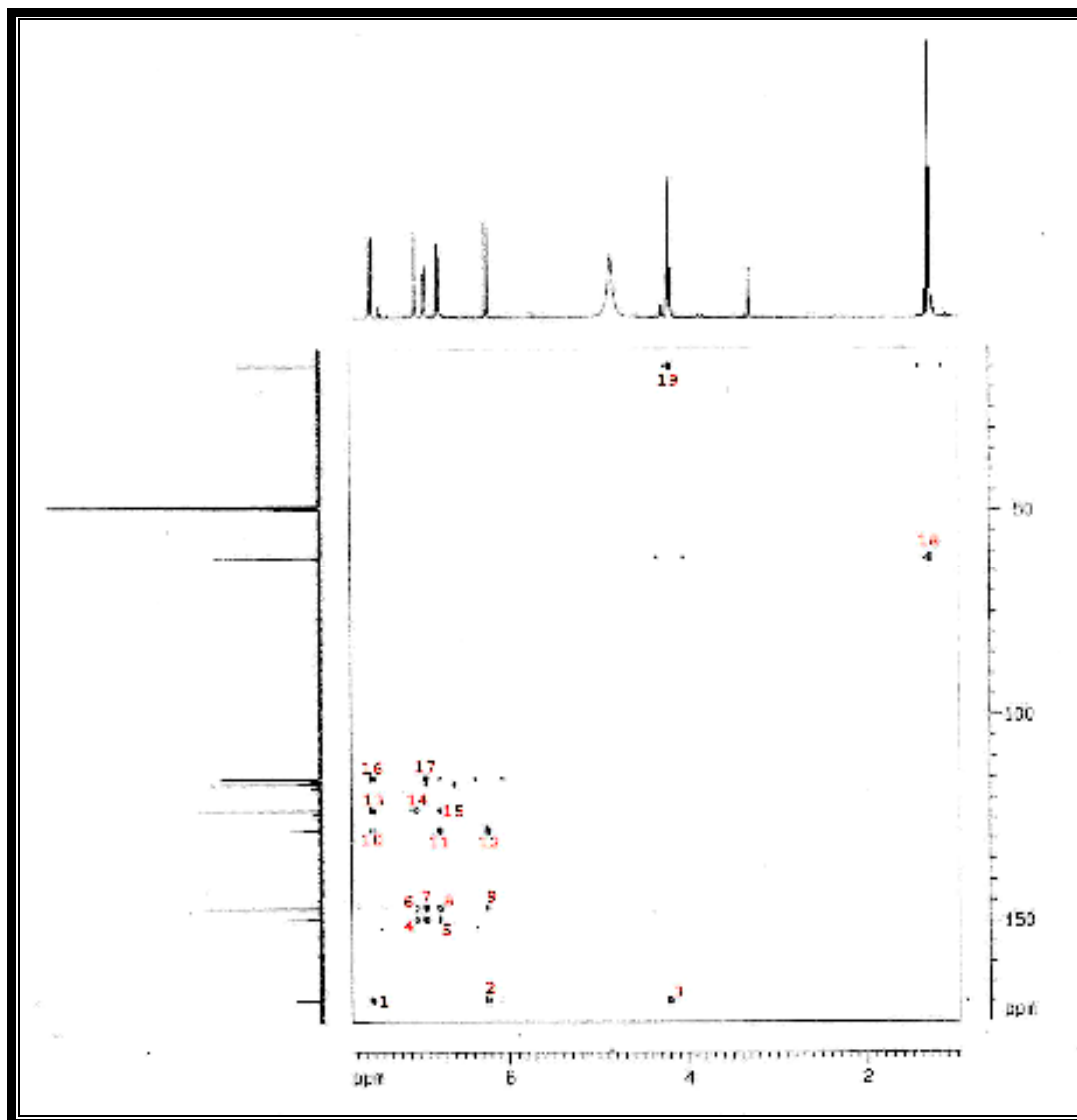
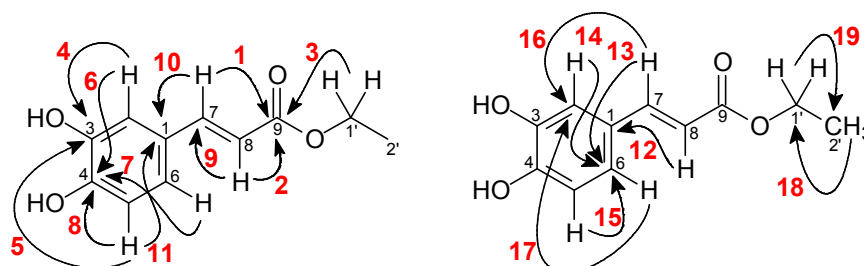


Figura 140 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de AR-3



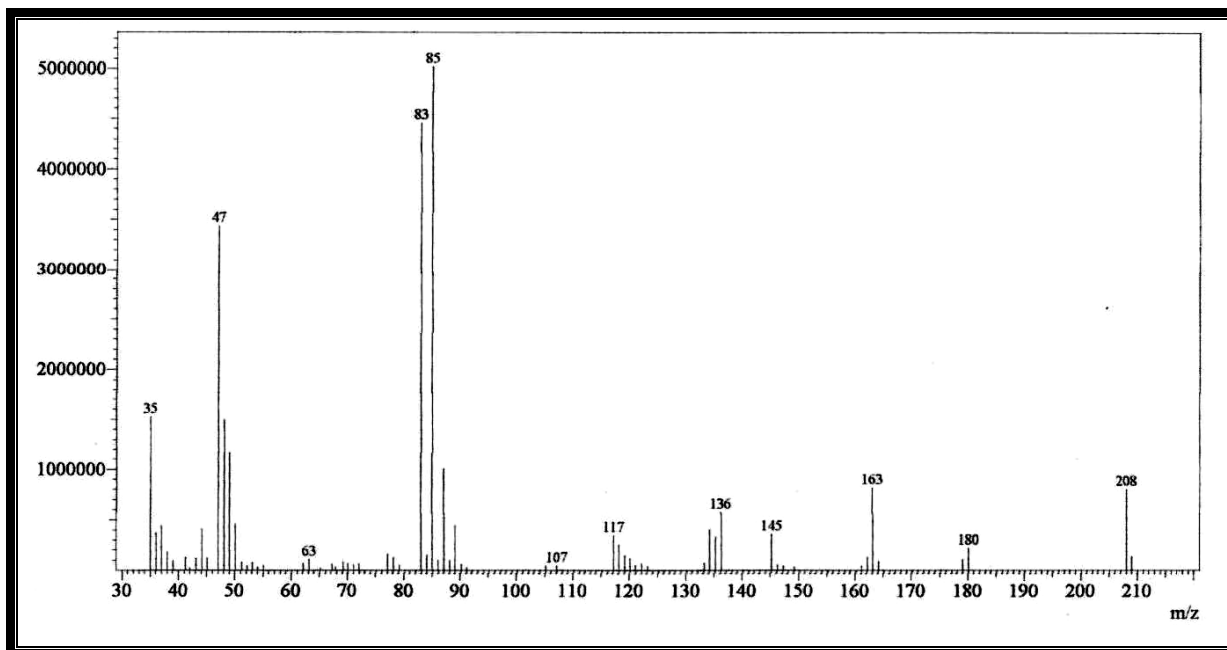
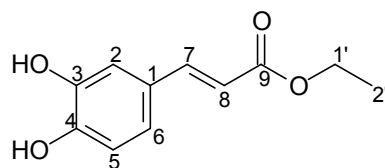


Figura 141 – Espectro de massa de AR-3 (impacto eletrônico a 70 eV).



F.M. =  $C_{11}H_{12}O_4$   
M.M. = 208.21 u.m.a.

#### 4.3.4. Determinação estrutural de AR-4

O tratamento cromatográfico da fração  $\text{CHCl}_3$ , obtida a partir do extrato etanólico das folhas de *A. rigida*, empregando-se cromatografia em gel de sílica, Sephadex LH-20 e cromatografia “flash”, resultou num sólido amorfo amarelo claro com ponto de fusão superior  $300\text{ }^\circ\text{C}$  que foi denominado AR-4 (Fluxograma 3, Pág. 218).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de AR-4 (Fig. 142, Pág. 162) apresentou algumas semelhanças com aquele obtido para AR-2 (genkwanina - Fig. 129, Pág. 148). Neste espectro foram identificados quatro sinais em  $\delta$  6,76, 6,85, 7,32 e 8,54, atribuídos a hidrogênios aromáticos. Os dupletos centrados em  $\delta$  7,32 (2H; d;  $J=8,8$  Hz) e 8,54 (2H; d;  $J=8,8$  Hz) foram relacionados a hidrogênios vicinais em posição *orto* no anel aromático, tal como observado para AR-2 (Pág. 143). Os outros dois dupletos visualizados no espectro em  $\delta$  6,76 (1H; d;  $J=1,9$  Hz) e 6,85 (1H; d;  $J=1,9$  Hz) são compatíveis com hidrogênios que apresentam acoplamento *meta* entre si. A análise do espectro RMN  $^1\text{H}$  de AR-4 e sua comparação com os espectros de AM-4 (Pág. 87), AR-1 (Pág. 139) e AR-2 (Pág. 148) permitiram propor a estrutura de um flavonóide.

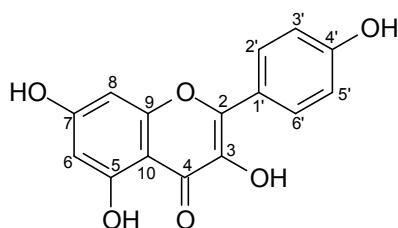
O espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) de AR-4 (Fig. 143, Pág. 162) apresenta 13 sinais em faixa de desblindagem, o que confirma a proposta de um esqueleto flavonoídico para a amostra. O sinal em  $\delta$  177,7 foi atribuído a um carbono carbonílico de uma cetona conjugada. Esta informação, adicionada à observação do sinal em  $\delta$  138,2, referente a um carbono olefínico oxigenado, permitiu sugerir que AR-4 se tratava de um flavonol.

Após a análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  de AR-4 e comparação com os dados obtidos com os descritos na literatura para flavonóis, pôde-se propor que a substância em questão se tratava do canferol (Pág. 161), um flavonol com larga ocorrência no reino vegetal. A tabela 33 (Pág. 161) contém os dados dos espectros obtidos para AR-4 e uma comparação destes com dados da literatura para o canferol [VEGA *et al*, 2007]. O espectro de massa de AR-4, obtido por impacto eletrônico a 70 eV, confirmou a proposição estrutural ao apresentar o pico do íon molecular em  $m/z$  em 286 daltons.



Tabela 33 – Dados de RMN  $^1\text{H}$  obtidos para AR-4 e comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de AR-4 ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 75MHz) com os descritos na literatura para o canferol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100MHz) [VEGA *et al.*, 2007].

C	AR-4		Canferol
	RMN $^1\text{H}$	RMN $^{13}\text{C}$	RMN $^{13}\text{C}$
2	-	148,0	148,1
3	-	138,2	137,1
4	-	177,7	178,0
5	-	161,1	160,6
6	6,76 (1H; d; $J=1,9$ Hz)	99,7	99,3
7	-	166,0	165,7
8	6,85 (1H; d; $J=1,9$ Hz)	94,8	94,5
9	-	157,9	158,3
10	-	104,9	104,5
1'	-	123,2	123,8
2' e 6'	8,54 (2H; d; $J=8,8$ Hz)	130,9	130,7
3' e 5'	7,32 (2H; d; $J=8,8$ Hz)	116,8	116,3
4'	-	162,9	162,5



Estrutura do Canferol

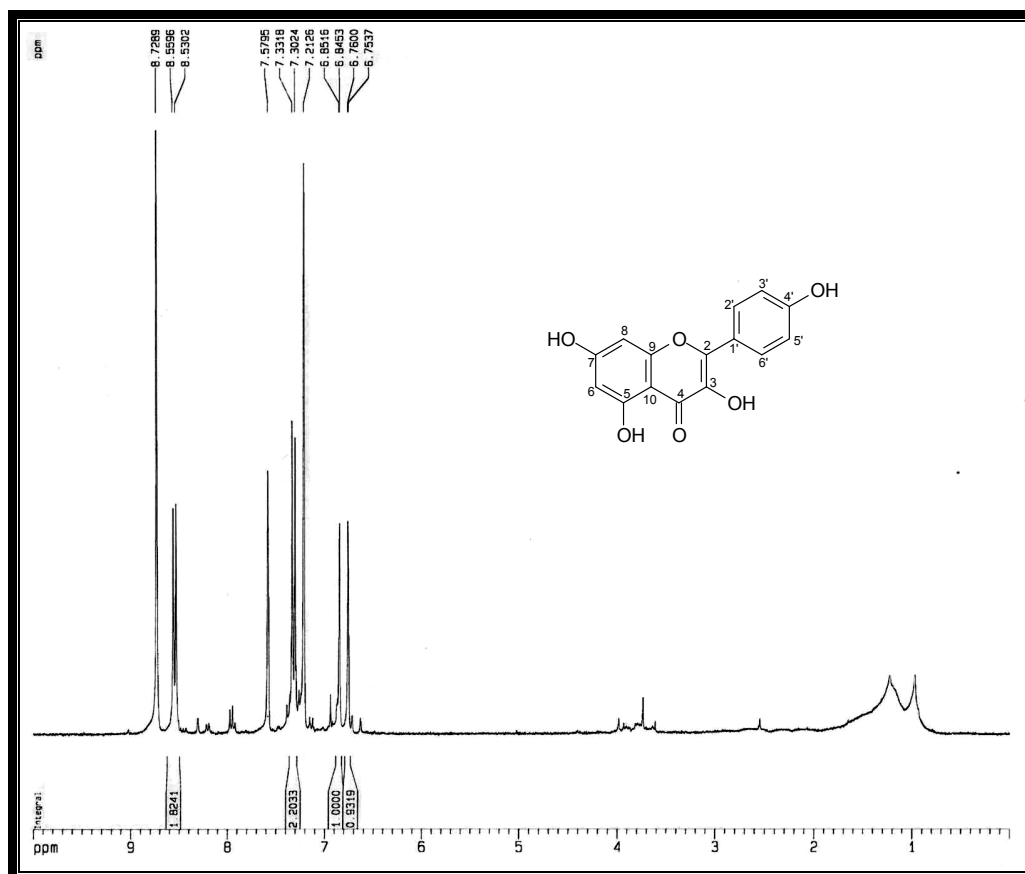


Figura 142 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 300 MHz) de AR-4.

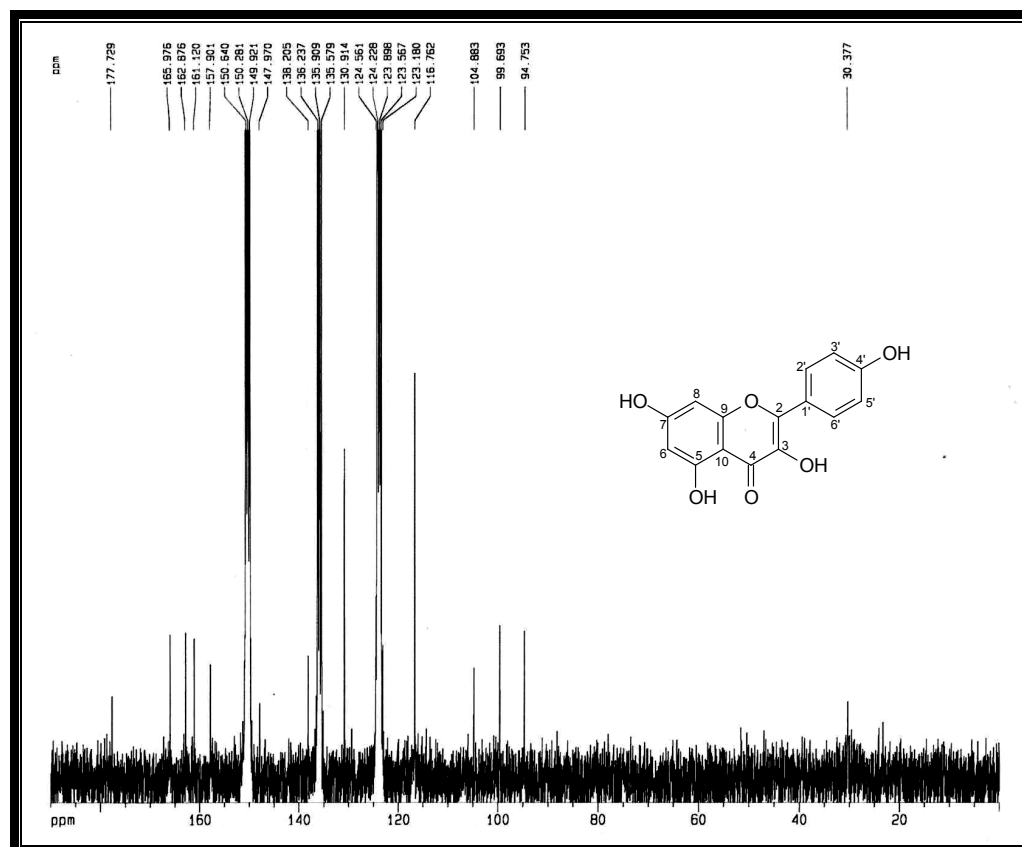


Figura 143 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 75 MHz) de AR-4.

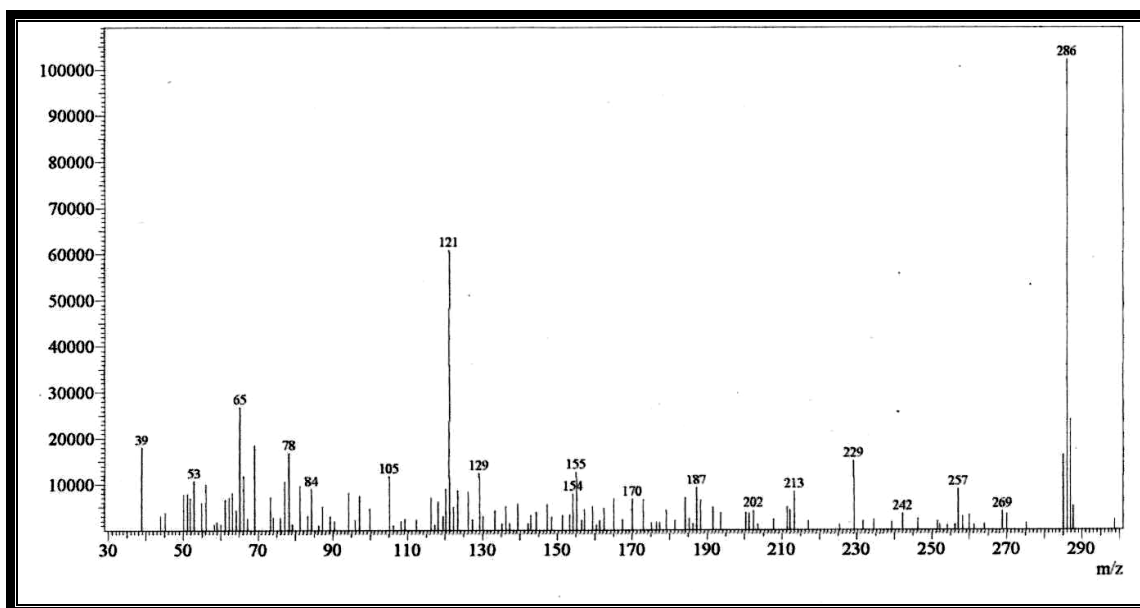
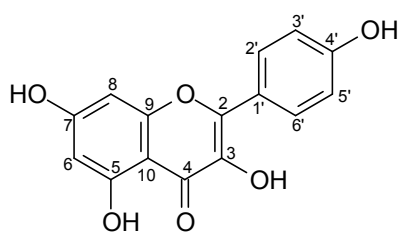


Figura 144 – Espectro de massa de AR-4 (impacto eletrônico a 70 eV).



F.M.:  $C_{15}H_{10}O_6$   
M.M.: 286.24

#### 4.3.5. Determinação estrutural de AR-5

A fração AR-5, um sólido amorfo verde escuro (p.f.=225,8-227,1 °C), foi obtido a partir da submissão da fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *A. rígida* ao tratamento cromatográfico, por exclusão em Sephadex LH-20, seguido de cromatografia “flash” (Fluxograma 3, Pág. 218).

O espectro por absorção na região do I.V. de AR-5 (Fig. 151, Pág. 169) apresentou uma banda larga e intensa em  $3409\text{ cm}^{-1}$  compatível com deformação axial de ligação O-H; absorções em  $1607$ ,  $1510$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$  relativas às vibrações de deformação axial C=C de aromáticos, além das bandas em  $1266$  e  $1117\text{ cm}^{-1}$ , associadas às vibrações de deformação axial da ligação C-O.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AR-5 (Fig. 147, Pág. 167) apresentou apenas três sinais em  $\delta$  6,95 (1H; d;  $J=2,1$  Hz), 6,84 (1H; dd;  $J=8,2$  e  $2,1$  Hz) e 6,77 (1H; d;  $J=8,2$  Hz), característicos de hidrogênios aromáticos pertencentes a um anel 1,3,4-trissubstituído (sistema ABX), como observado para AR-1 e AR-3.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AR-5 (Fig. 148, Pág. 167) foram visualizadas seis linhas espectrais, todas correspondentes a carbonos aromáticos. Destes, dois foram atribuídos a carbonos oxigenados em  $\delta$  146,5 e 145,4, e três a carbonos hidrogenados em  $\delta$  119,1, 116,7 e 114,8. A identificação dos carbonos hidrogenados foi realizada com o auxílio do espectro de RMN bidimensional HSQC (Fig. 149, Pág. 168), através do qual foi possível visualizar os acoplamentos entre hidrogênios e carbonos.

A tabela 34 (Pág. 166) apresenta os dados obtidos dos espectros de RMN uni e bidimensionais de AR-5. A reunião destes dados possibilita propor a sub-estrutura abaixo (Fig. 145, Pág. 164).

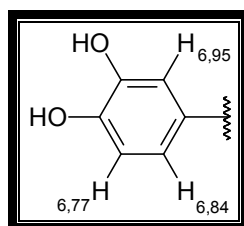


Figura 145 – Sub-estrutura para AR-5.

O espectro de massa de AR-5 (Fig. 152, Pág. 169), obtido por impacto eletrônico a 70 eV, apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  218 daltons, indicando que a massa molar da substância correspondia ao dobro da massa da sub-estrutura proposta. Dessa forma, pôde-se propor, para AR-5 a estrutura de um dímero do catecol, denominado de 3,4,3',4'-tetra-hidroxibifenila [SMEJKALOVA; CONTE; PICCOLO, 2007; JOULIÉ *et al*, 1994], cuja ocorrência foi relatada anteriormente em *Cissus quadrangularis* [MEHTA; KAUR; BHUTANI, 2001].

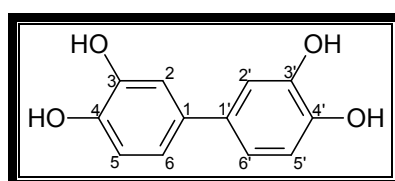


Figura 146 – Estrutura da 3,4,3',4'-tetra-hidroxibifenila

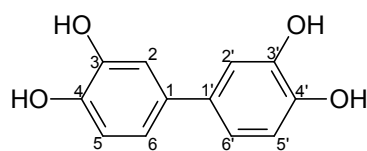
Tabela 34 – Correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (HSQC e HMBC) DE AR-5:

<i>C</i>	$^{13}\text{C-BB}$	<i>HSQC</i>	<i>HMBC</i>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1 e 1'	135,0	-	6,95; 6,84	6,77
2 e 2'	114,8	6,95 (1H; d; $J=2,1$ Hz)		6,84
3 e 3'	146,5	-	6,95	6,77
4 e 4'	145,4	-	6,77	6,95; 6,84
5 e 5'	116,7	6,77 (1H; d; $J=8,2$ Hz)		
6 e 6'	119,1	6,84 (1H; dd; $J=8,2$ e $2,1$ Hz)		6,95

Tabela 35 – Comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) e RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) de AR-5 com os descritos na literatura para a 3,4,3',4'-tetra-hidroxibifenila (DMSO- $d_6$ , 400 MHz – RMN  $^1\text{H}$  e 100 MHz – RMN  $^{13}\text{C}$ ) [SMEJKALOVA; CONTE; PICCOLO, 2007].

<i>C</i>	<i>AR-5</i>		<i>3,4,3',4'-tetra-hidroxibifenila</i>	
	<i>RMN</i> $^1\text{H}$	<i>RMN</i> $^{13}\text{C}$	<i>RMN</i> $^1\text{H}$	<i>RMN</i> $^{13}\text{C}$
1 e 1'	135,0	-	-	*
2 e 2'	114,8	6,95	6,88	114,0
3 e 3'	146,5	-	-	*
4 e 4'	145,4	-	-	*
5 e 5'	116,7	6,77	6,73	116,6
6 e 6'	119,1	6,84	6,77	117,5

\*dados não fornecidos.



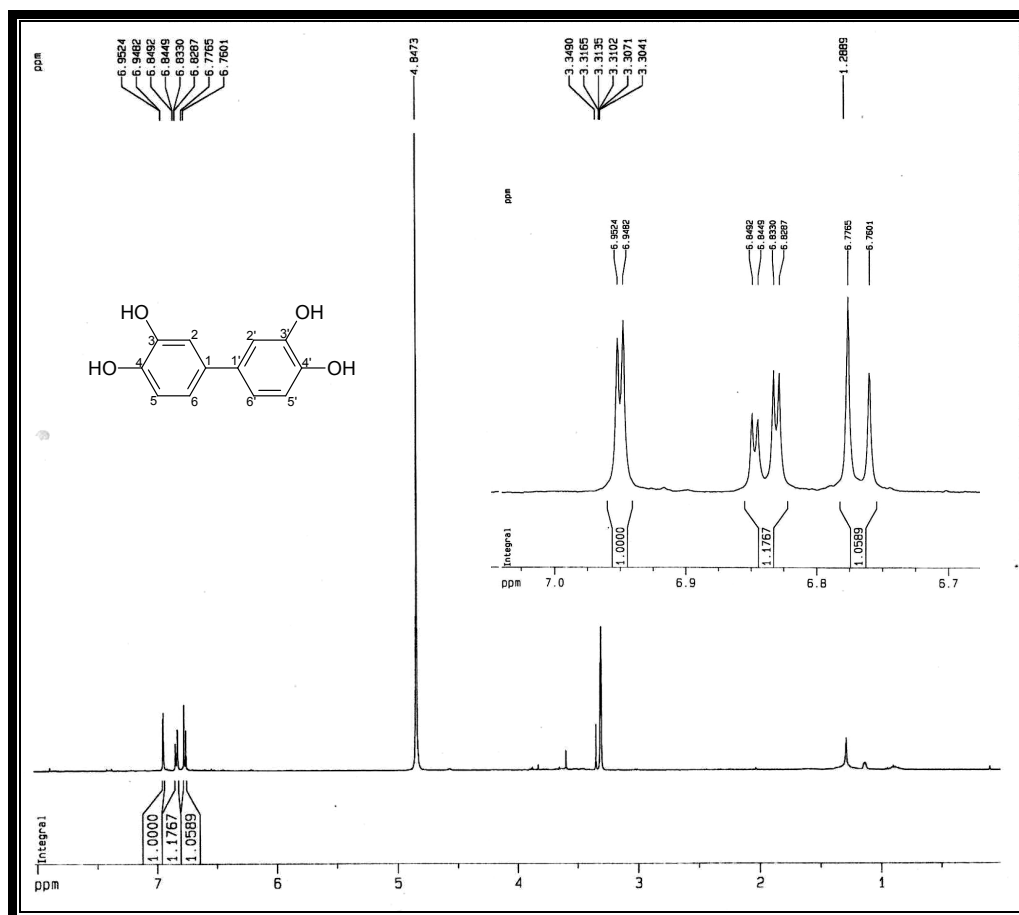


Figura 147 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) de AR-5.

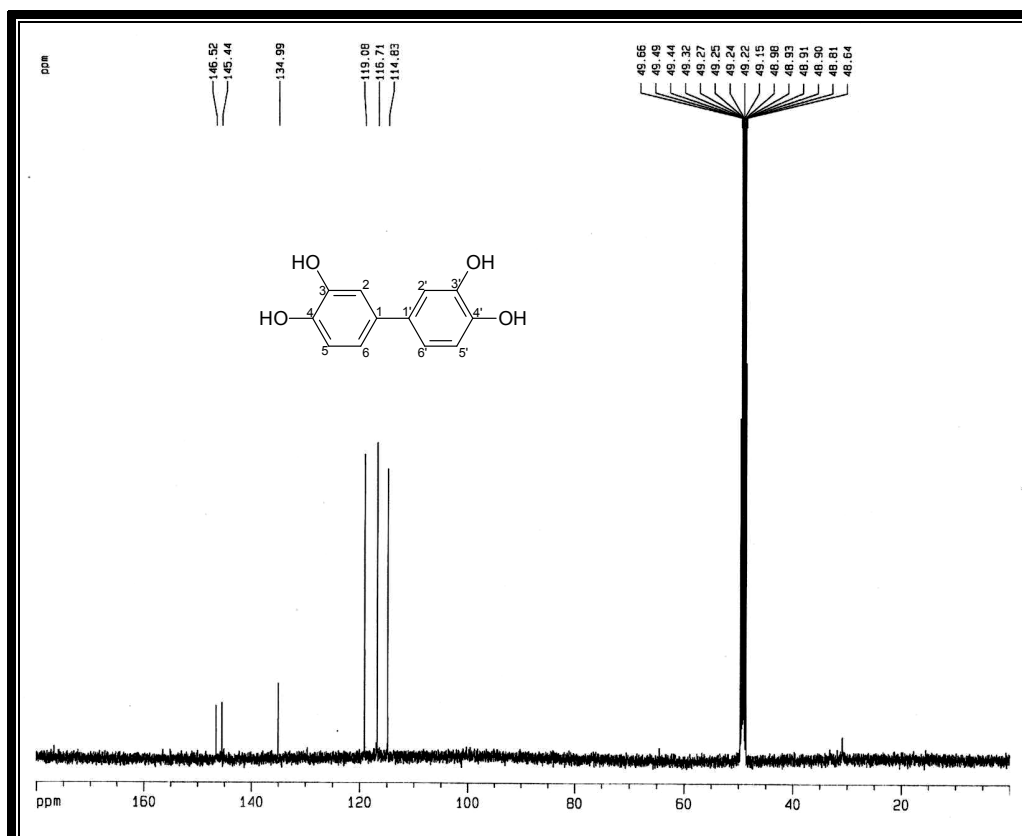


Figura 148 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) de AR-5.

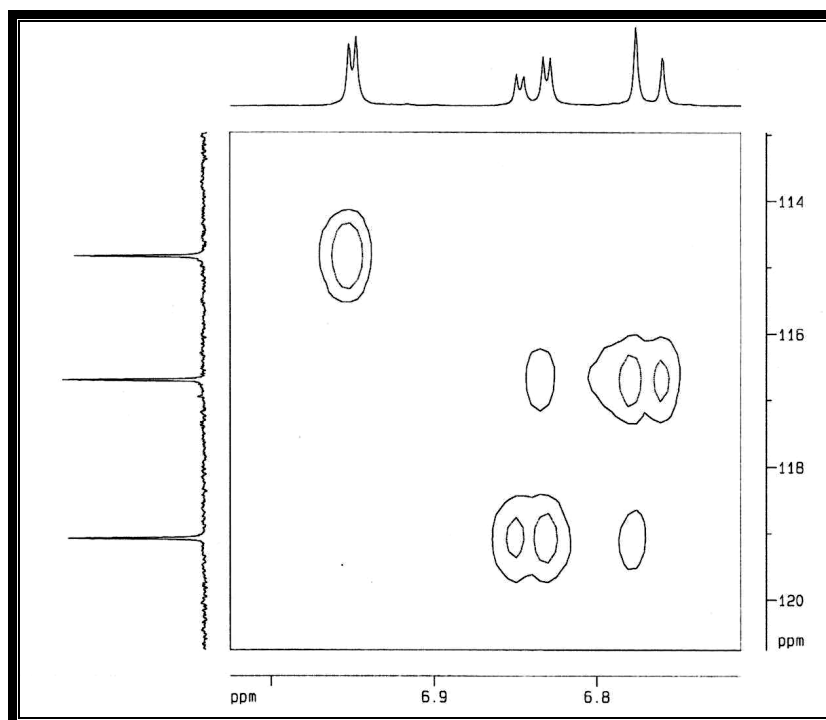


Figura 149 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de AR-5.

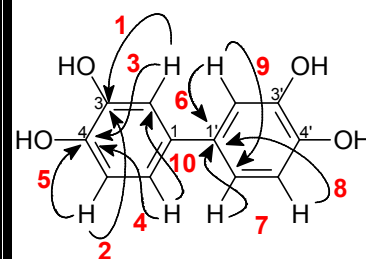
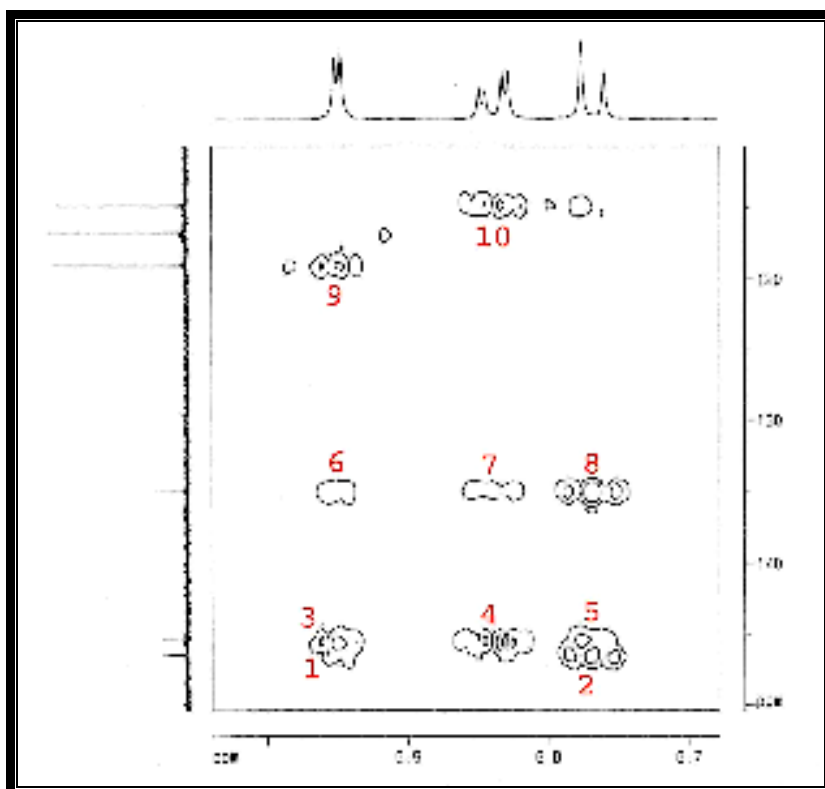
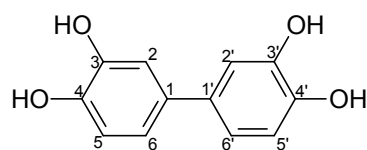


Figura 150 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de AR-5.



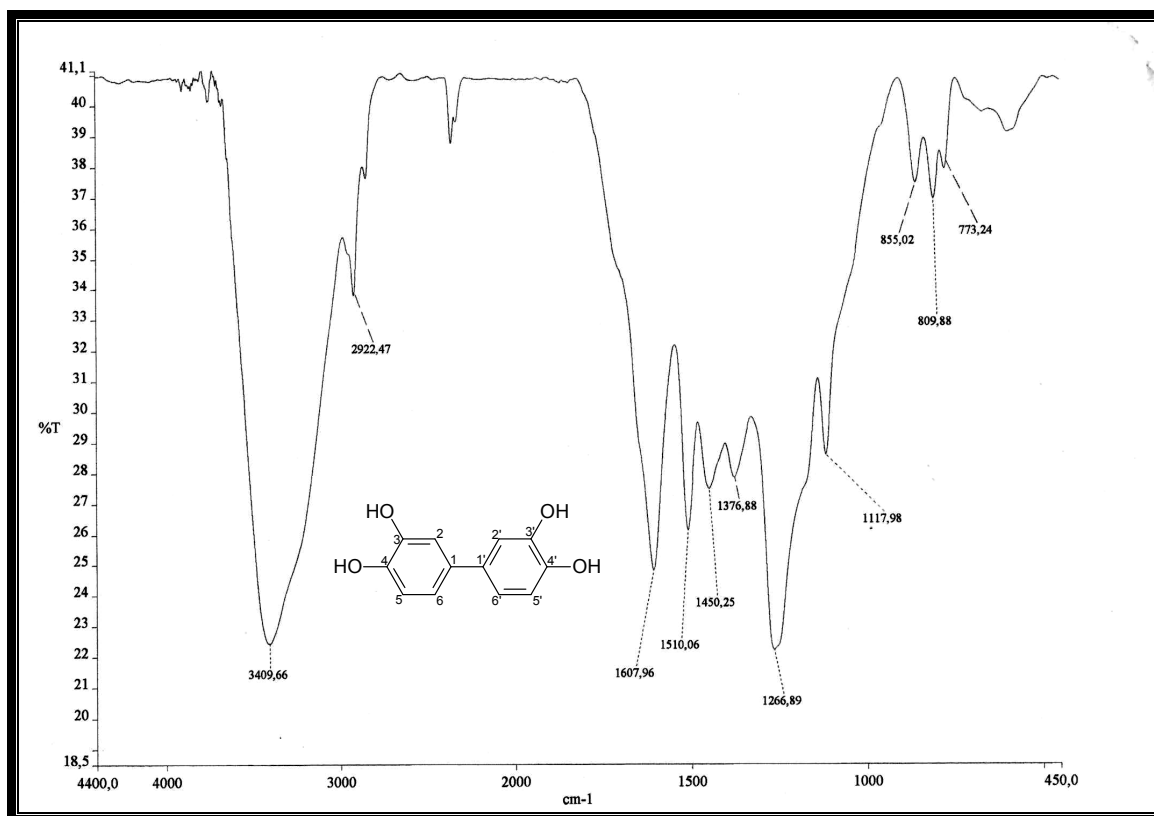


Figura 151 – Espectro de absorção na região do I.V. de AR-5 com pastilhas de KBr.

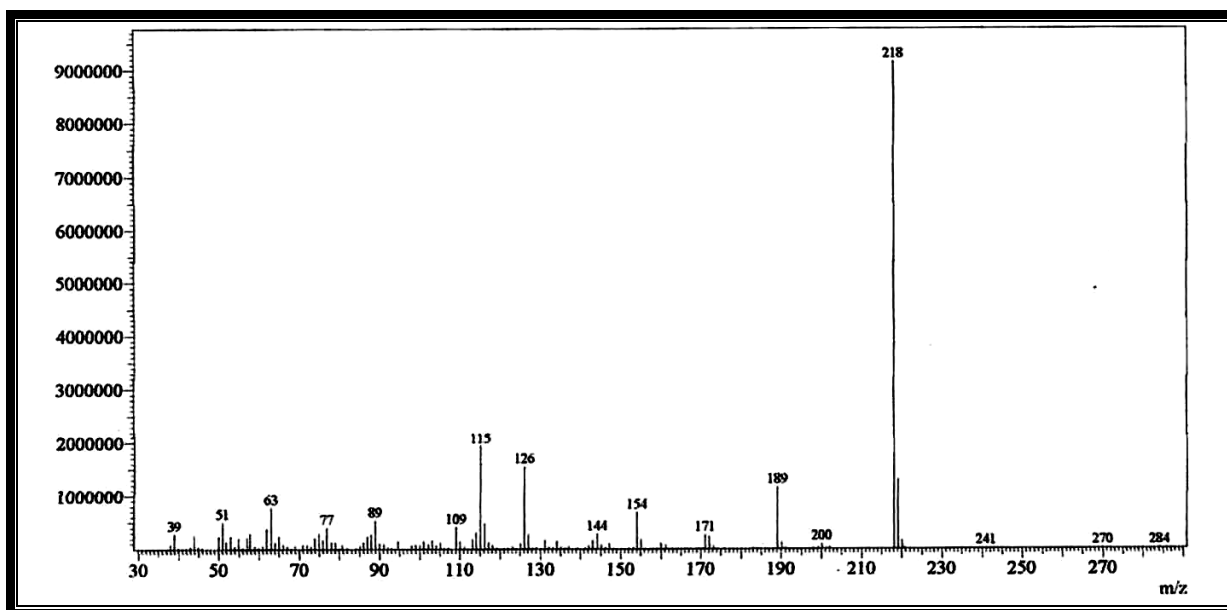
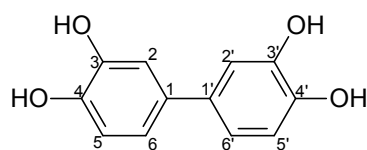


Figura 152 – Espectro de massa de AR-5 (impacto eletrônico a 70 eV).



F.M. = C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>  
M.M. = 218.21

#### 4.3.6. Determinação estrutural de AR-6

O tratamento cromatográfico por exclusão em gel de Sephadex LH-20, seguido de cromatografia “flash”, da fração AcOEt resultante de partição do extrato etanólico das folhas de *A. rígida* (ARFE), forneceu um sólido amorfo amarelo claro, com ponto de fusão 290,8-292,1 °C, que foi denominado AR-6 (Fluxograma 3, Pág. 218).

A análise de AR-6 por absorção na região do infravermelho (Fig. 159, Pág. 176) revelou uma banda em 3415  $\text{cm}^{-1}$  compatível com deformação axial de ligação O-H; absorções em 2930 e 2852  $\text{cm}^{-1}$  características de deformação axial de ligação  $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ ; uma banda em 1618  $\text{cm}^{-1}$  que foi associada ao estiramento da ligação C=O da carbonila cetônica conjugada, além de bandas em 1509 e 1454  $\text{cm}^{-1}$  relativas às vibrações de deformação axial C=C de aromáticos e em 1268 a 1162  $\text{cm}^{-1}$  associadas às vibrações de deformação axial da ligação C-O.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AR-6 (Fig. 155, Pág. 174) apresentou cinco sinais relativos a hidrogênios aromáticos em  $\delta$  7,73 (1H; d;  $J=2,0$  Hz), 7,63 (1H; dd;  $J=8,5$  e 2,0 Hz), 6,88 (1H; d;  $J=8,5$  Hz), 6,39 (1H; d;  $J=1,9$  Hz) e 6,18 (1H; d;  $J=1,9$  Hz). Este espectro demonstrou forte semelhança com o espectro obtido para AR-1 (Fig. 118, Pág. 139), excetuando-se deste último os sinais correspondentes aos hidrogênios osídicos. Assim, pôde-se identificar um sistema ABX com os sinais localizados em  $\delta$  7,73 (1H; d;  $J=2,0$  Hz), 7,63 (1H; dd;  $J=8,5$  e 2,0 Hz) e 6,88 (1H; d;  $J=8,5$  Hz), referentes aos hidrogênios pertencentes a um anel 1,3,4-trissubstituído. Em acréscimo, os sinais em  $\delta$  6,39 (1H; d;  $J=1,9$  Hz) e 6,18 (1H; d;  $J=1,9$  Hz) foram, tal como realizado para AR-1, atribuídos a hidrogênios que apresentavam acoplamento *meta* entre si. Portanto, com base nestas informações, foi possível vislumbrar AR-6 como um flavonóide relacionado à aglicona de AR-1.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AR-6 (Fig. 156, Pág. 174) corroborou com esta proposição ao revelar quinze linhas espectrais. Os sinais em  $\delta$  177,5 e 137,4, referentes ao carbono do grupamento carbonila (C-4) e ao carbono olefínico (C-3), confirmam que AR-6 pertence à sub-classe dos flavonóis. Os carbonos  $\text{sp}^2$  hidrogenados foram identificados como aqueles representados pelos sinais em  $\delta$  121,9, 116,4, 116,2, 99,4 e 94,6. Para esta conclusão foi observado o espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear HSQC (Fig. 157, Pág. 175).

A realização de experimentos de RMN bidimensional HMBC (Fig. 158, Pág. 175) forneceu, de forma inequívoca, a disposição das hidroxilas na estrutura de AR-6 através das correlações dos hidrogênios em  $\delta$  6,18 (H-6) e 7,73 (H-2') com os carbonos  $\delta$  162,6 (H-5) e 165,7 (H-7), 146,4 (H-4') e 148,9 (H-3'), respectivamente (Fig. 153, Pág. 171).

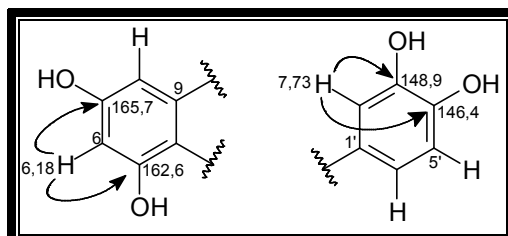


Figura 153 – Sub-estruturas para AR-6

Após a análise dos dados obtidos, acrescidos da massa molar da substância, revelada pelo pico íon-molecular em  $m/z$  302 daltons no espectro de massa (impacto eletrônico a 70 eV), foi proposto que AR-6 se tratava do flavonol quercetina [FOSSSEN; PEDERSEN; ANDERSEN, 1998], que é largamente distribuído reino vegetal e corresponde à aglicona do heterosídeo rutina (AR-1).

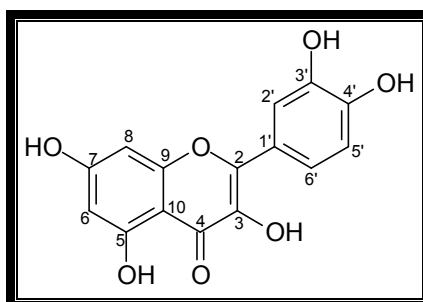


Figura 154 – Estrutura de quercetina

Tabela 36 – Correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (HSQC e HMBC) DE AR-6:

<i>C</i>	$^{13}\text{C-BB}$	<i>HSQC</i>	<i>HMBC</i>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
2	148,2	-		
3	137,4	-		
4	177,5	-		
5	162,6	-	6,18	
6	99,4	6,18 (1H; d; $J=1,9$ Hz)		6,39
7	165,7	-	6,39; 6,18	
8	94,6	6,39 (1H; d; $J=1,9$ Hz)		6,18
9	158,4	-	6,39	
10	104,8	-		6,39; 6,18
1'	124,3	-		6,88
2'	116,2	7,73 (1H; d; $J=2,0$ Hz)		
3'	148,9	-	6,88	7,73; 7,63
4'	146,4	-	7,73	6,88
5'	116,4	6,88 (1H; d; $J=8,5$ Hz)	7,63	
6'	121,9	7,63 (1H; dd; $J=8,5$ e $2,0$ Hz)		7,73

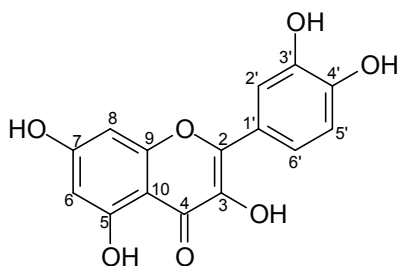
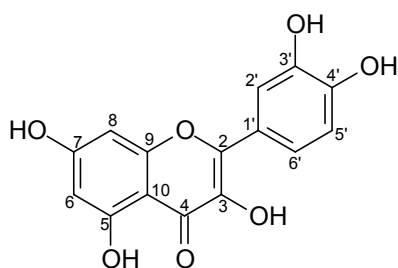


Tabela 37 – Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de AR-6 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) com os descritos na literatura para a quercetina ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100MHz) [FOSSSEN; PEDERSEN; ANDERSEN, 1998].

<i>C</i>	<i>AR-6</i>	<i>Quercetina</i>
	$\delta_c$	$\delta_c$
2	148,2	148,0
3	137,4	137,2
4	177,5	177,3
5	162,6	162,5
6	99,4	99,3
7	165,7	165,3
8	94,6	94,4
9	158,4	158,2
10	104,8	104,5
1'	124,3	124,2
2'	116,2	116,0
3'	148,9	148,8
4'	146,4	146,2
5'	116,4	116,2
6'	121,9	121,7



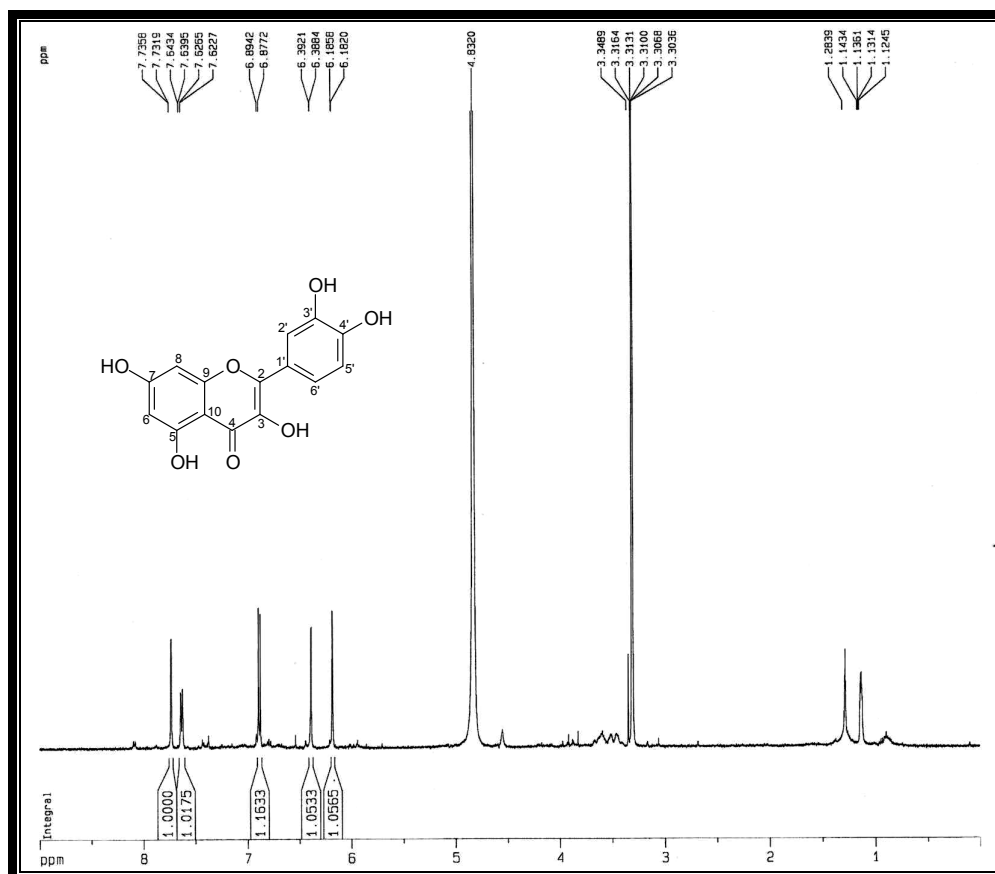


Figura 155 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) de AR-6.

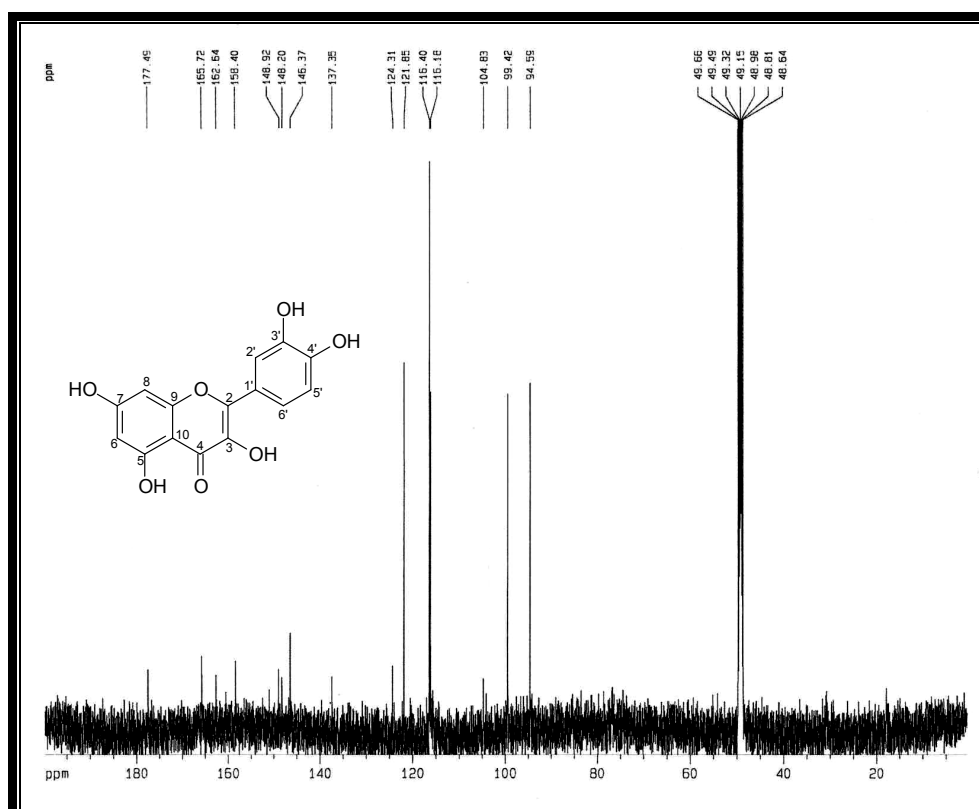


Figura 156 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) de AR-6.

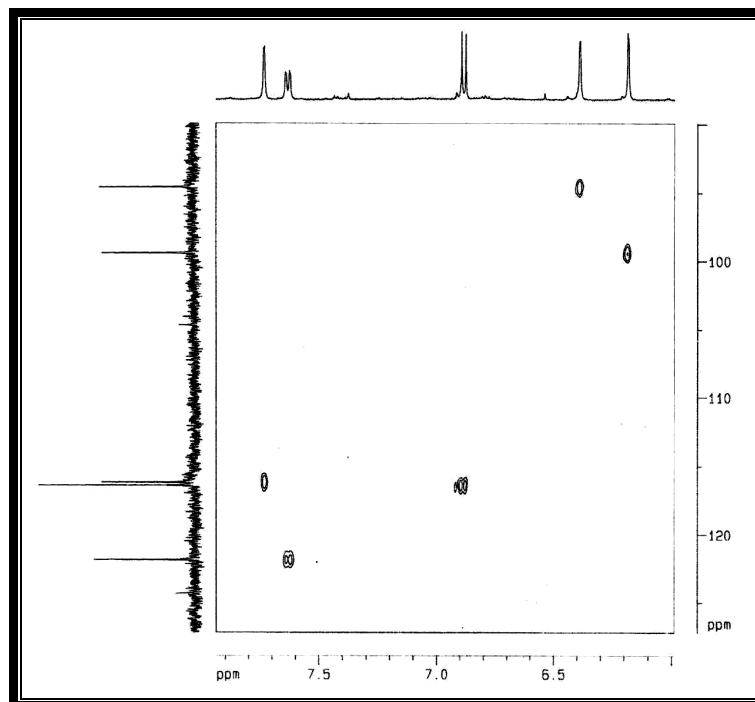


Figura 157 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de AR-6.

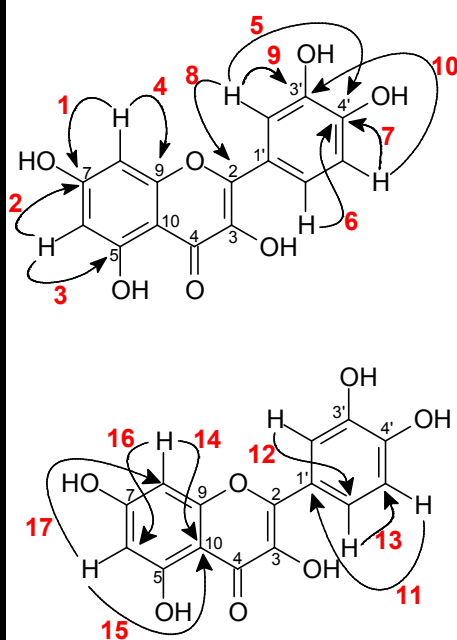
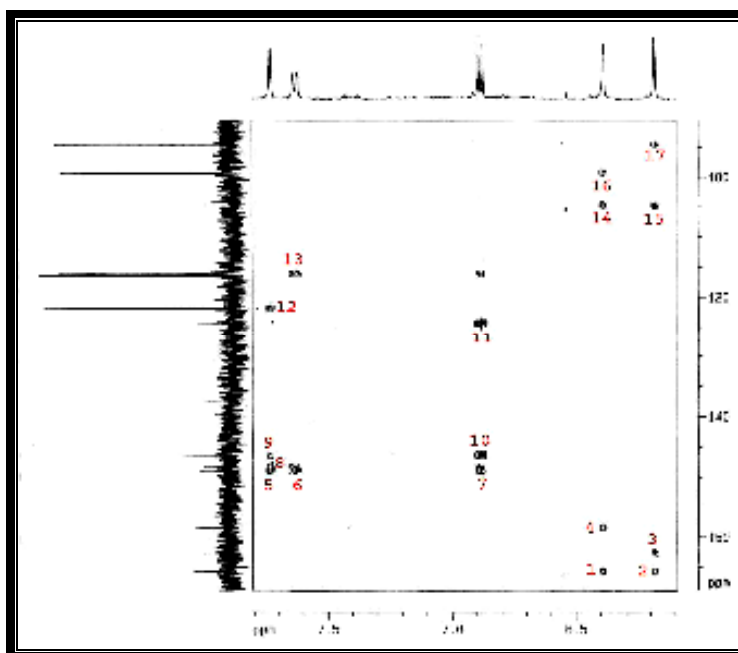
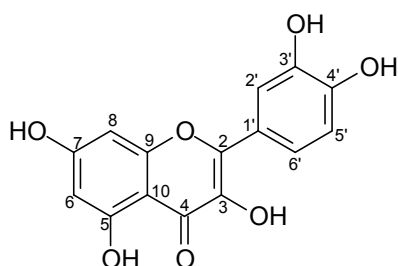


Figura 158 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de AR-6.

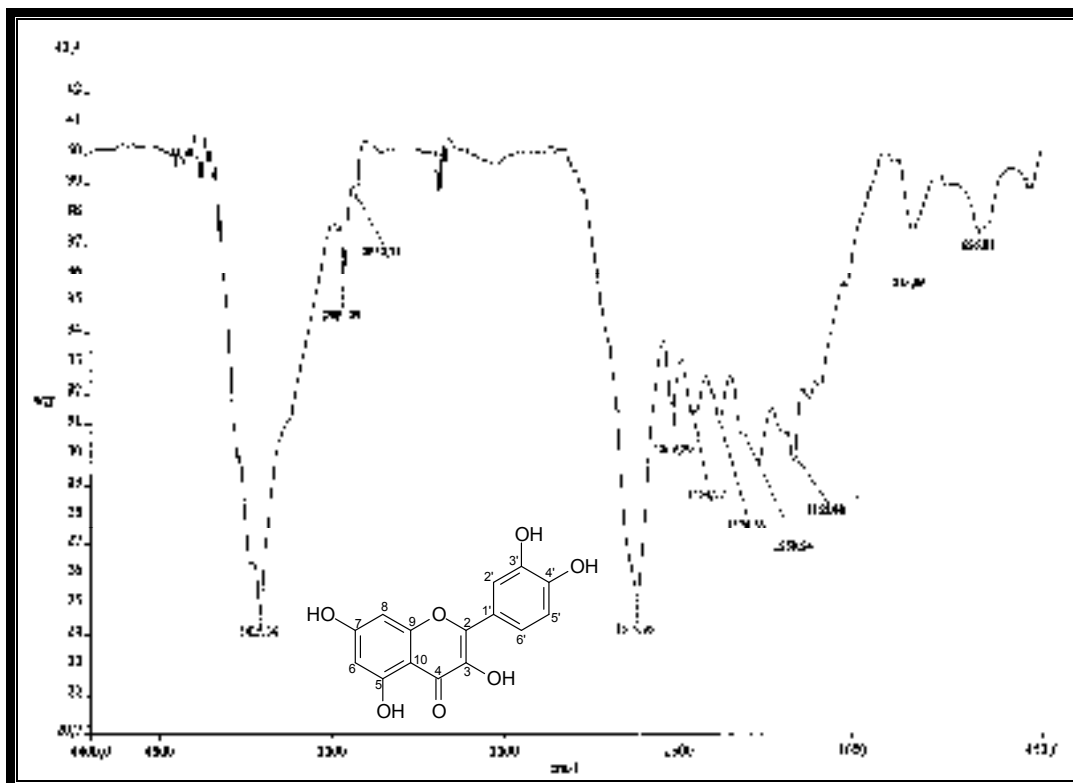


Figura 159 – Espectro de absorção na região do I.V. de AR-6 com pastilhas de KBr.

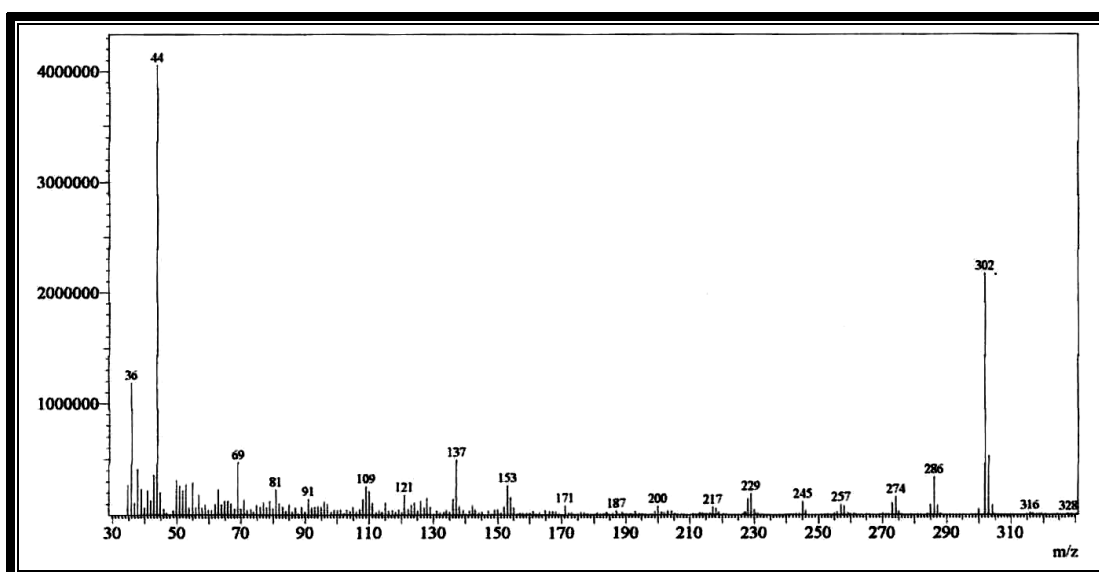
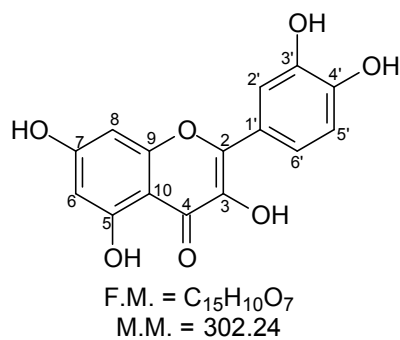


Figura 160 – Espectro de massa de AR-6 (impacto eletrônico a 70 eV).





#### 4.3.7. Determinação Estrutural de AR-7

A fração AcOEt, proveniente da partição do extrato etanólico das folhas de *A. rigida* (ARFE), foi submetida ao tratamento cromatográfico em Sephadex LH-20 e, em seguida, por cromatografia “flash”. Das frações resultantes deste procedimento, uma se apresentou como um sólido amorfo vermelho escuro com ponto de fusão superior a 300 °C, uniforme em CCD. Esta fração foi denominada AR-7.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AR-7 (Fig. 164, Pág. 183) apresentou um conjunto de sinais entre  $\delta$  7,17 e 6,82 compatíveis com os hidrogênios aromáticos de dois sistemas de acoplamento ABX:  $\delta$  7,17 (1H; d;  $J=1,7\text{Hz}$ ),  $\delta$  7,15 (1H; d;  $J=2,0\text{Hz}$ ),  $\delta$  7,03 (1H; dd;  $J=8,2$  e  $2,0\text{Hz}$ ),  $\delta$  6,98 (1H; dd;  $J=8,2$  e  $1,7\text{Hz}$ ),  $\delta$  6,83 (2H; d;  $J=8,2\text{Hz}$ ). Outros três sinais foram atribuídos a hidrogênios aromáticos, são eles: o simpleto em  $\delta$  6,12 (1H) e os dupletos de hidrogênios *meta*-acoplados em  $\delta$  6,09 (1H;  $J=2,0\text{Hz}$ ) e  $\delta$  6,02 (1H;  $J=2,0\text{Hz}$ ). Os demais sinais observados no espectro correspondem a hidrogênios alifáticos. Foram visualizados dois simpletos largos em  $\delta$  4,93 (1H) e  $\delta$  4,24 (1H), além de dois dupletos em  $\delta$  4,42 (1H; d;  $J=3,2\text{Hz}$ ) e  $\delta$  4,08 (1H; d;  $J=3,2\text{Hz}$ ) compatíveis com hidrogênios de um sistema de acoplamento AB; por fim, dois sinais referentes a hidrogênios geminais foram observados em  $\delta$  2,94 (1H; dd;  $J=17,1$  e  $4,7\text{Hz}$ ) e  $\delta$  2,76 (1H; dd;  $J=17,1$  e  $1,9\text{Hz}$ ). Os dados obtidos com este espectro conduziram à proposição, para AR-7, de um esqueleto de flavanol, sendo que a presença de sinais “dobrados” sugeriram a possível ocorrência de um dímero.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AR-7 (Fig. 166, Pág.184) confirmou a proposição de uma estrutura dimérica para o composto ao apresentar trinta linhas espectrais. Dentre estes sinais, vinte e quatro foram atribuídos a carbonos aromáticos ( $\delta$  158,1-96,7) e seis a carbonos alifáticos ( $\delta$  81,8-29,3). Convém destacar que entre os sinais relativos a carbonos aromáticos, dez se encontram na região dos oxigenados ( $\delta$  158,1-145,7) e que entre os alifáticos, um, observado em  $\delta$  100,3, foi atribuído a um carbono de acetal e três relacionados a carbonos oxigenados ( $\delta$  81,8, 68,1 e 67,0). A comparação deste espectro com o de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de AR-7 (Fig. 167, Pág. 184), permitiu identificar treze carbonos metínicos e um metilênico, sendo os demais não-hidrogenados. A tabela 38, (Pág. 178) contém o resultado desta comparação, apresentando os deslocamentos

químicos de cada carbono por padrão de hidrogenação e uma proposta de fórmula molecular para AR-7.

Tabela 38 – Deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) de AR-7 por padrão de hidrogenação:

<i>C</i>	<i>CH</i>	<i>CH<sub>2</sub></i>	<i>Total</i>
158,1 (O)	120,6	30,0	
157,0 (O)	120,0		
156,6 (O)	116,2		
154,3 (O)	116,1		
152,3 (O)	115,8		
152,2 (O)	115,8		
146,8 (O)	98,5		
146,3 (O)	96,8		
146,0 (O)	96,7		
145,7 (O)	81,8		
132,5	68,1 (O)		
131,3	67,0 (O)		
107,3	29,3		
104,4			
102,6			
100,3			
$\text{C}_{16}\text{O}_{10}$	$\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_2$	$\text{CH}_2$	$\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$

A reunião dos dados obtidos com os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  levaram à proposição da fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$  para AR-7, o que corrobora a proposta de um dímero de flavan-3-ol tetra-hidroxilado nas posições 5,7,3',4' para a amostra. Tal proposta é compatível com o esqueleto de uma proantocianidina e, como descrito na literatura para esta sub-classe de flavonóides, as conexões entre as unidades monoméricas nas proantocianidinas envolvem normalmente o carbono 4 da unidade “superior” e o 6 ou 8 da “inferior” (proantocianidinas tipo-B) e/ou, além desta ligação ( $\text{C}_4 \rightarrow \text{C}_6$  ou  $\text{C}_4 \rightarrow \text{C}_8$ ), uma segunda ligação entre o C-2 da unidade superior e o oxigênio ligado ao C-7 da unidade inferior (proantocianidinas tipo-A) [XIE; DIXON, 2005]. A figura 161 (Pág. 179) apresenta sub-estruturas para AR-7, indicando que as possíveis conexões entre as unidades dos flavanóis devem fornecer à amostra a estrutura de uma proantocianidina tipo-A.

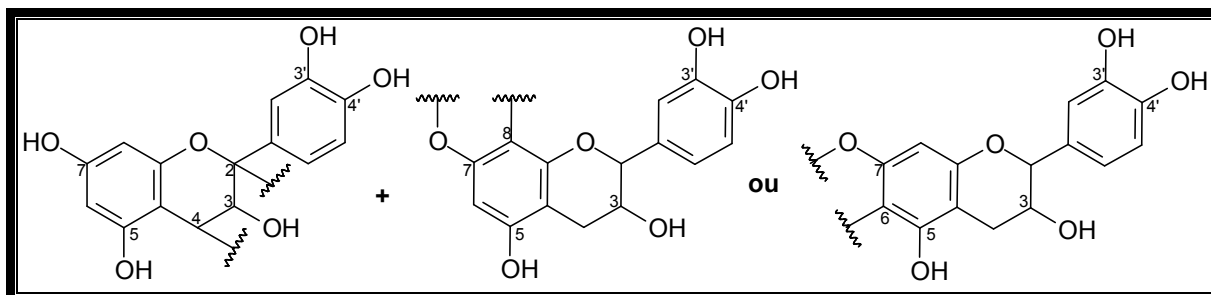


Figura 161 – Sub-estruturas para AR-7.

Ainda de acordo com a literatura, as unidades de flavan-3-óis (com o padrão de hidroxilação observado em AR-7) que constituem as proantocianidinas correspondem à (+)-catequina ou à (-)-epicatequina [XIE; DIXON, 2005] (Fig. 162, Pág. 175). Dessa forma, ao observar as constantes de acoplamento dos hidrogênios alifáticos em  $\delta$  4,42 (d;  $J=3,2\text{Hz}$ ) e  $\delta$  4,08 (d;  $J=3,2\text{Hz}$ ), e em  $\delta$  2,94 (dd;  $J=17,1$  e  $4,7\text{Hz}$ ) e  $\delta$  2,76 (dd;  $J=17,1$  e  $1,9\text{Hz}$ ), que correspondem aos hidrogênios H-3 e H-4 das duas unidades flavan-3-ol de AR-7, vê-se que estas são compatíveis com a estrutura da epicatequina, uma vez que nenhum acoplamento pseudo-axial/pseudo-axial é visualizado entre os hidrogênios em questão nesta molécula.

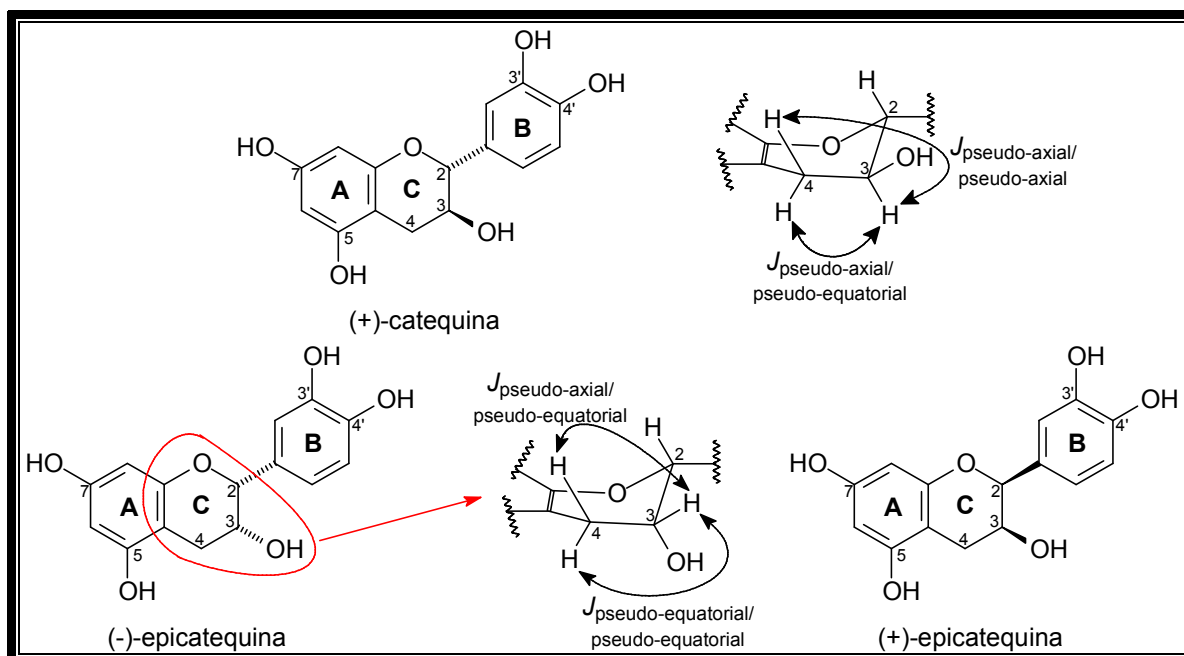


Figura 162 – Estruturas da (+)-catequina e da (+)- e (-)-epicatequina. Conformações de meia cadeira para o anel C da (+)-catequina e da (-)-epicatequina.

Para a determinação da conexão entre as unidades (-)-epicatequina identificadas em AR-7 e confirmação da proposta estrutural da amostra, foram realizados os experimentos

de RMN bidimensional de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a uma ligação (HSQC) e a duas e três ligações (HMBC). As figuras 168 (Pág. 185) e 170 (Pág. 186) apresentam, respectivamente, os espectros HSQC e HMBC de AR-7. A tabela 39 (Pág. 181) contém todos os dados referentes aos acoplamentos visualizados nestes espectros. Porém, convém ressaltar algumas das correlações destacadas do espectro HMBC, entre elas a do hidrogênio em  $\delta$  4,08 com o carbono em  $\delta$  107,3 e as do hidrogênio  $\delta$  4,42 com os carbonos  $\delta$  107,3 e  $\delta$  152,3. Tais correlações permitem propor que as unidades do dímero em questão se encontram ligadas segundo o padrão carbono2 $\rightarrow$ O $\rightarrow$ carbono7 e carbono4 $\rightarrow$ carbono8.

Enfim, a reunião de todos os dados de RMN uni e bidimensionais obtidos para AR-7 e, a posterior comparação destes com dados descritos na literatura para as proantocianidinas, conduziram à proposição da estrutura da epicatequina-(4 $\beta$  $\rightarrow$ 8, 2 $\beta$  $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7)-epicatequina, procianidina A-2 [KAMIYA *et al*, 2001] [ou o seu enantiômero: epicatequina-(4 $\alpha$  $\rightarrow$ 8, 2 $\alpha$  $\rightarrow$ O $\rightarrow$ 7)-epicatequina], uma proantocianidina tipo-A isolada anteriormente de *Parameria laevigata* [KAMIYA *et al*, 2001] e *Arachis hypogaea* [LOU *et al*, 1999], tendo sido o primeiro composto desta classe relatado na literatura [XIE; DIXON, 2005].

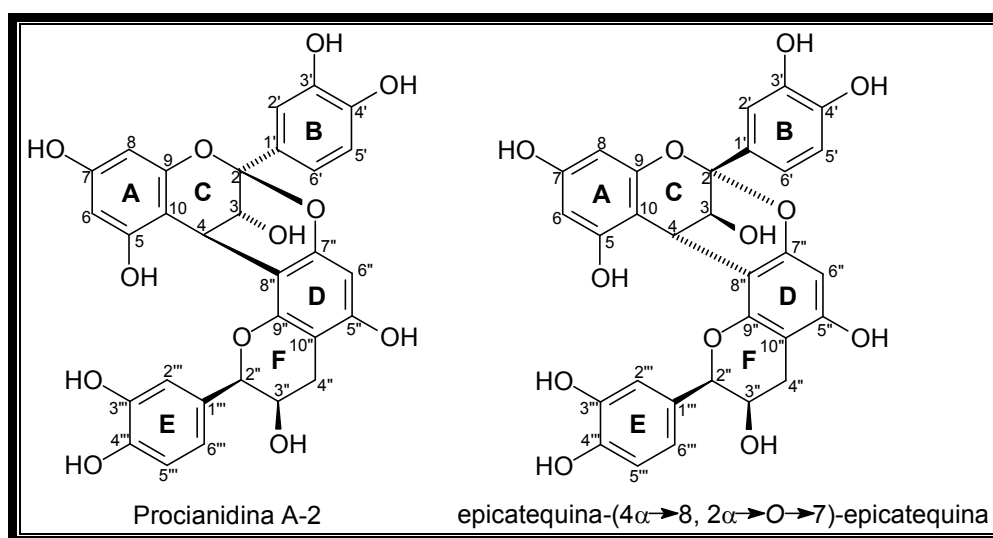


Figura 163 – Estrutura da procianidina A-2 e do seu enantiômero.

Tabela 39 – Correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (HSQC e HMBC) de AR-7:

C	$^{13}\text{C-BB}$	$HSQC$		$HMBC$	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	
2	100,3	-	4,08	7,15; 7,08; 4,42	
3	68,1	4,08 (1H; d; $J=3,2\text{Hz}$ )	4,42	-	
4	29,3	4,42 (1H; d; $J=3,2\text{Hz}$ )	4,08	-	
5	157,0	-	6,02	4,42	
6	98,5	6,02 (1H; d; $J=2,0\text{Hz}$ )	-	6,09	
7	158,1	-	6,09; 6,02	-	
8	96,8	6,09 (1H; d; $J=2,0\text{Hz}$ )	-	6,02	
9	154,3	-	6,09	4,42	
10	104,4	-	4,42	6,09; 6,02; 4,08	
1'	132,5	-	7,15; 7,03	6,83; 4,08	
2'	115,8	7,15 (1H; d; $J=2,0\text{Hz}$ )	-	7,03	
3'	145,7	-	7,15	6,83	
4'	146,8	-	-	7,15; 7,03	
5'	116,2	6,83 (1H; d; $J=8,2\text{Hz}$ )	7,03	-	
6'	120,0	7,03 (1H; dd; $J=8,2$ e $2,0\text{Hz}$ )	-	-	
2''	81,8	4,93 (1H, sl)	-	7,17; 6,98; 2,94; 2,76	
3''	67,0	4,24 (1H, sl)	4,93; 2,94; 2,76	-	
4''	30,0	2,94 (1H; dd; $J=17,1$ e $4,7\text{Hz}$ ) 2,76 (1H; dd; $J=17,1$ e $1,9\text{Hz}$ )	-	4,93	
5''	156,6	-	6,12	2,94; 2,76	
6''	96,7	6,12 (1H, sl)	-	-	
7''	152,3	-	6,12	4,42	
8''	107,3	-	4,42	6,12; 4,08	
9''	152,3	-	-	4,93; 2,94; 2,76	
10''	102,6	-	2,94; 2,76	6,12	
1'''	131,3	-	7,17	6,83	
2'''	115,8	7,17 (1H; d; $J=1,7\text{Hz}$ )	-	4,93	
3'''	146,0	-	-	6,83	
4'''	146,3	-	6,83	7,17; 6,98	
5'''	116,1	6,83 (1H; d; $J=8,2\text{Hz}$ )	-	-	
6'''	120,6	6,98 (1H; dd; $J=8,2$ e $1,7\text{Hz}$ )	6,83	7,17; 4,93	

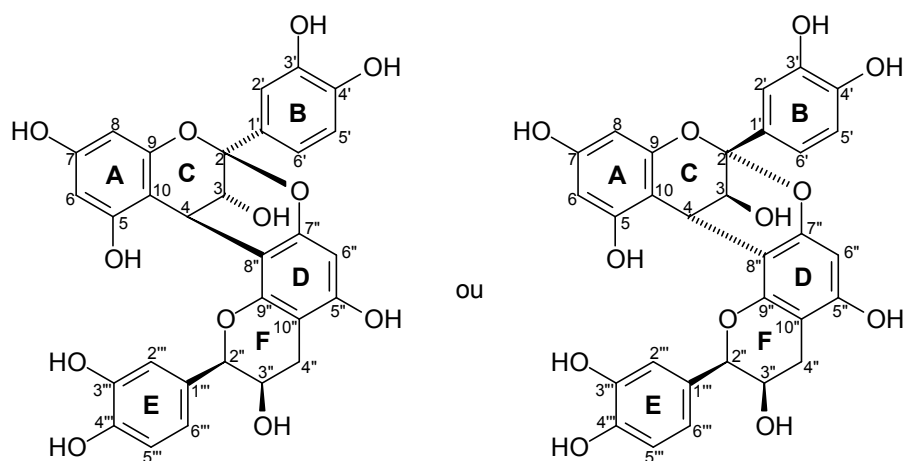
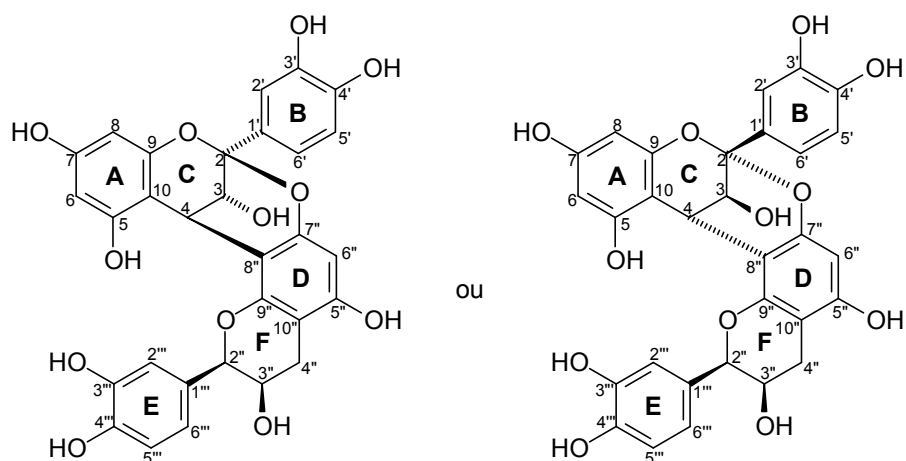


Tabela 40 – Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) de AR-7 com os descritos na literatura para a proantocianidina A-2 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz) [KAMIYA *et al.*, 2001]:

<i>C</i>	<i>AR-7</i>	<i>Proantocianidina A-2</i>
	$\delta_C$	$\delta_C$
2	100,3	100,2
3	68,1	68,1
4	29,3	29,3
5	157,0	157,0
6	98,5	98,3
7	158,1	158,1
8	96,8	96,7
9	154,3	154,2
10	104,4	104,3
1'	132,5	132,5
2'	115,8	115,7
3'	145,7	145,7
4'	146,8	146,7
5'	116,2	116,1
6'	120,0	119,8
2''	81,8	81,8
3''	67,0	67,0
4''	30,0	29,9
5''	156,6	156,6
6''	96,7	96,5
7''	152,3	152,3
8	107,3	107,2
9''	152,2	152,1
10''	102,6	102,5
1'''	131,3	131,2
2'''	115,8	116,0
3'''	146,0	146,0
4'''	146,3	146,3
5'''	116,1	115,6
6'''	120,6	120,4



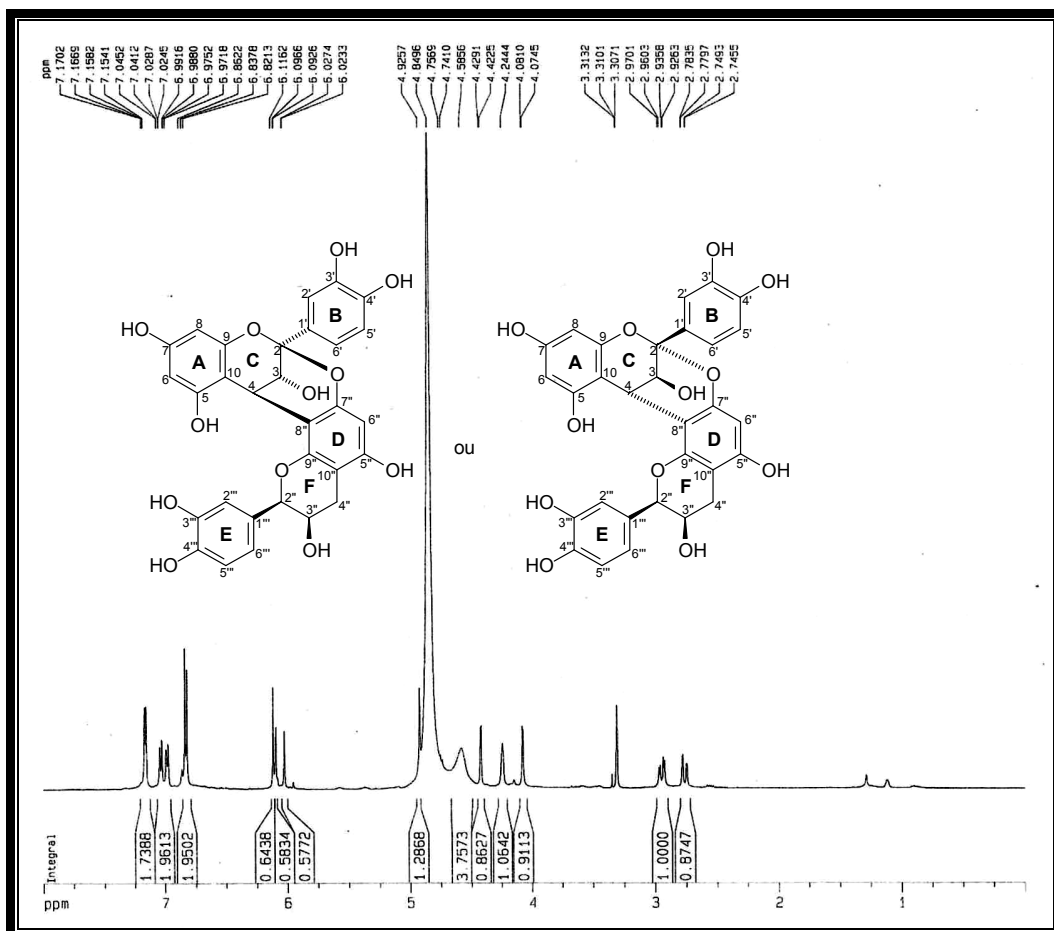


Figura 164 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) de AR-7.

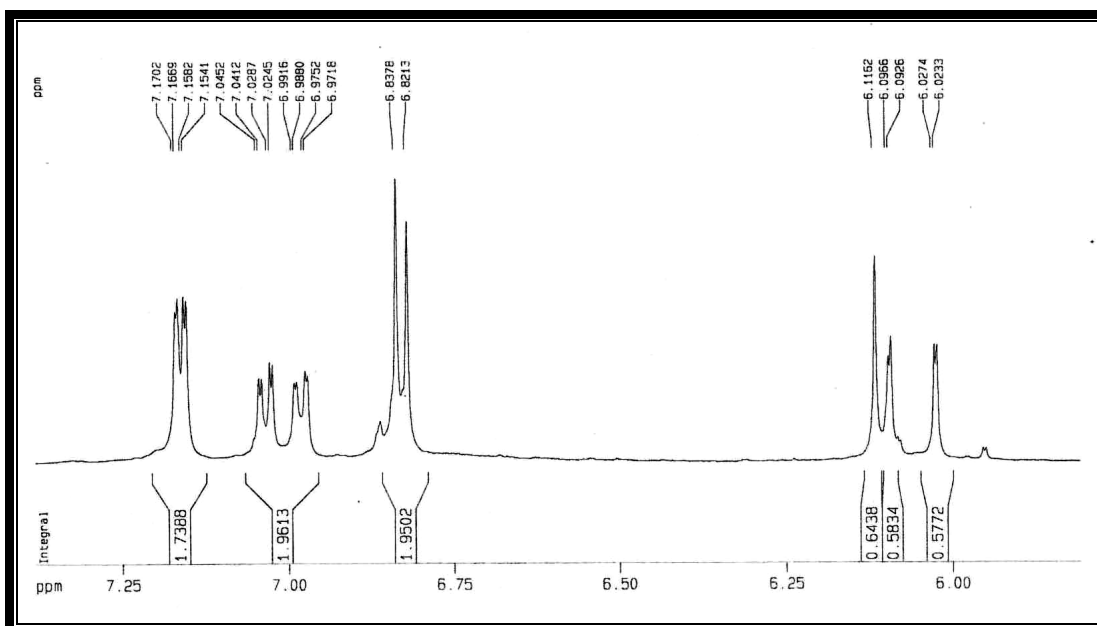


Figura 165 – Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) de AR-7.

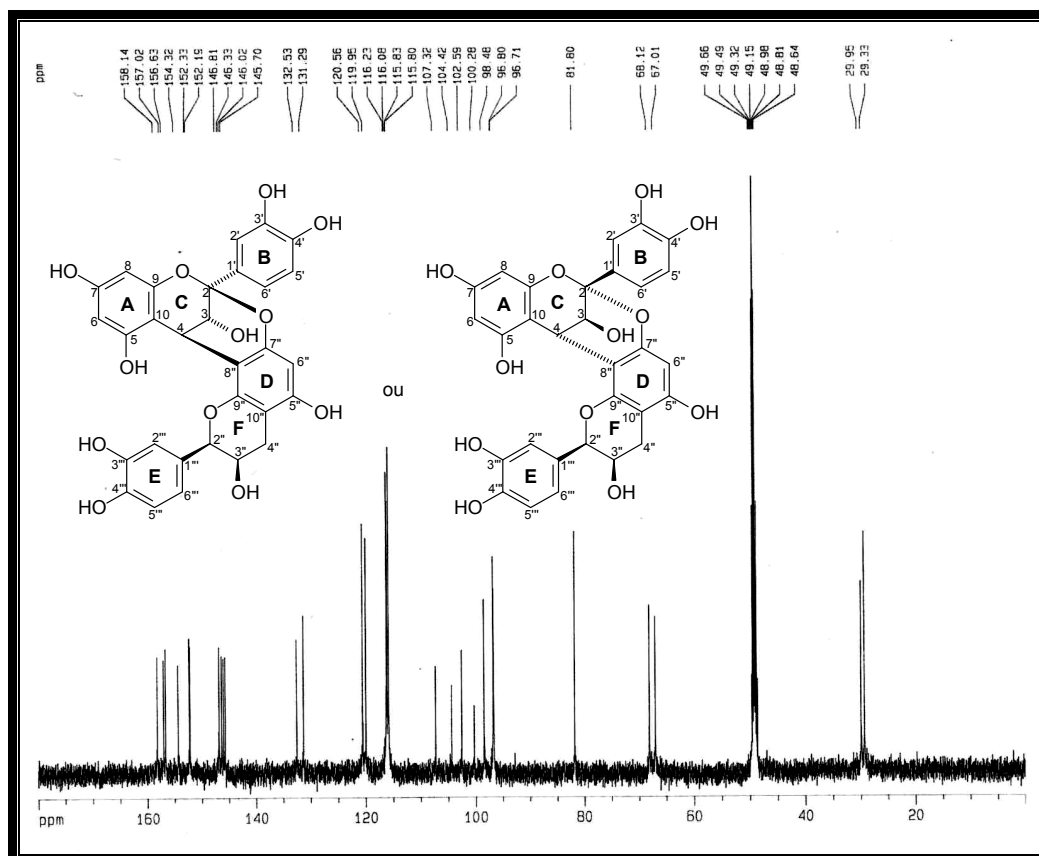


Figura 166 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) de AR-7.

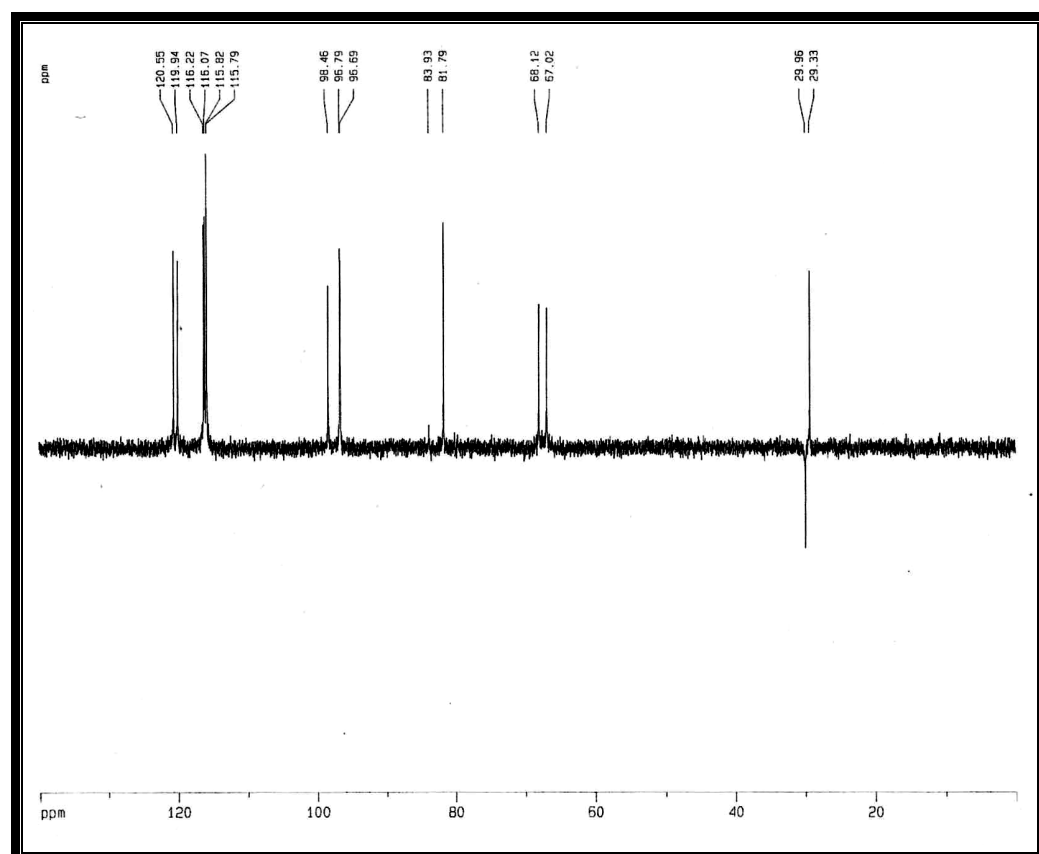


Figura 167 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) de AR-7.



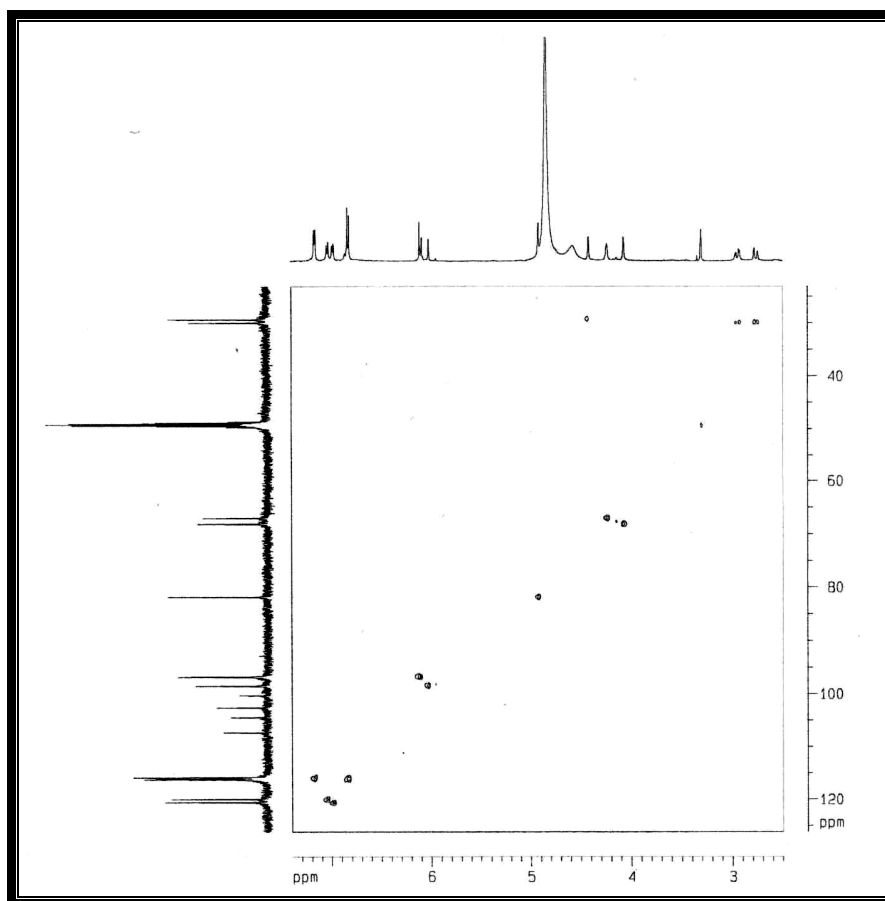


Figura 168 – Espectro de RMN bidimensional HSQC de AR-7.

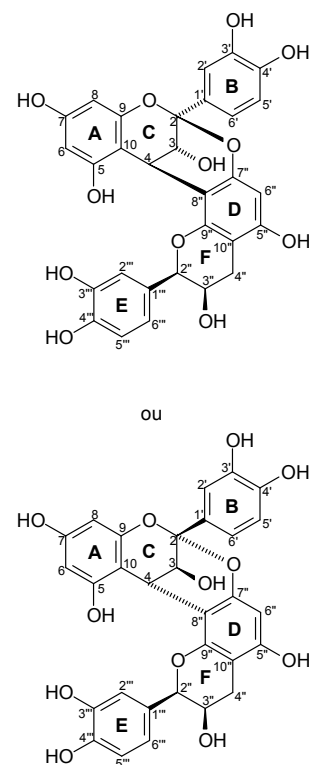
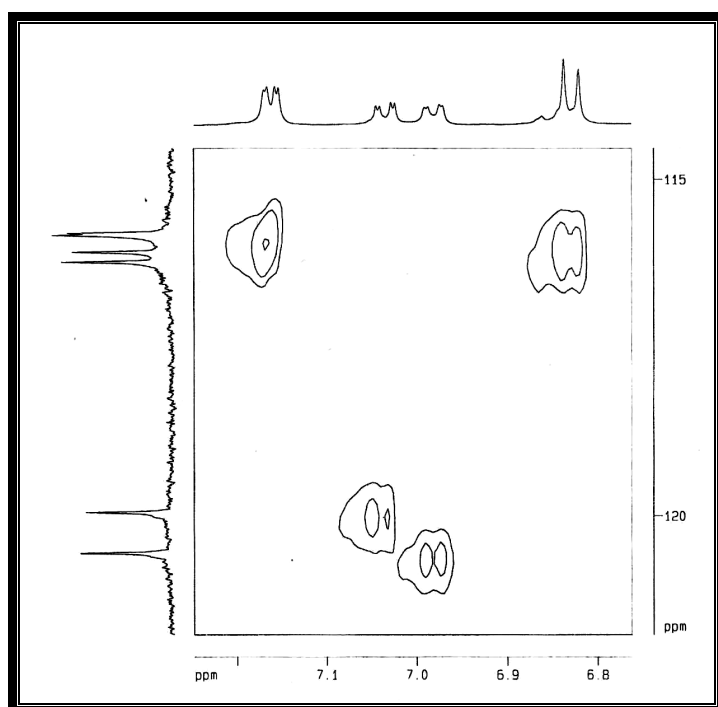


Figura 169 – Expansão do espectro de RMN bidimensional HSQC de AR-7.

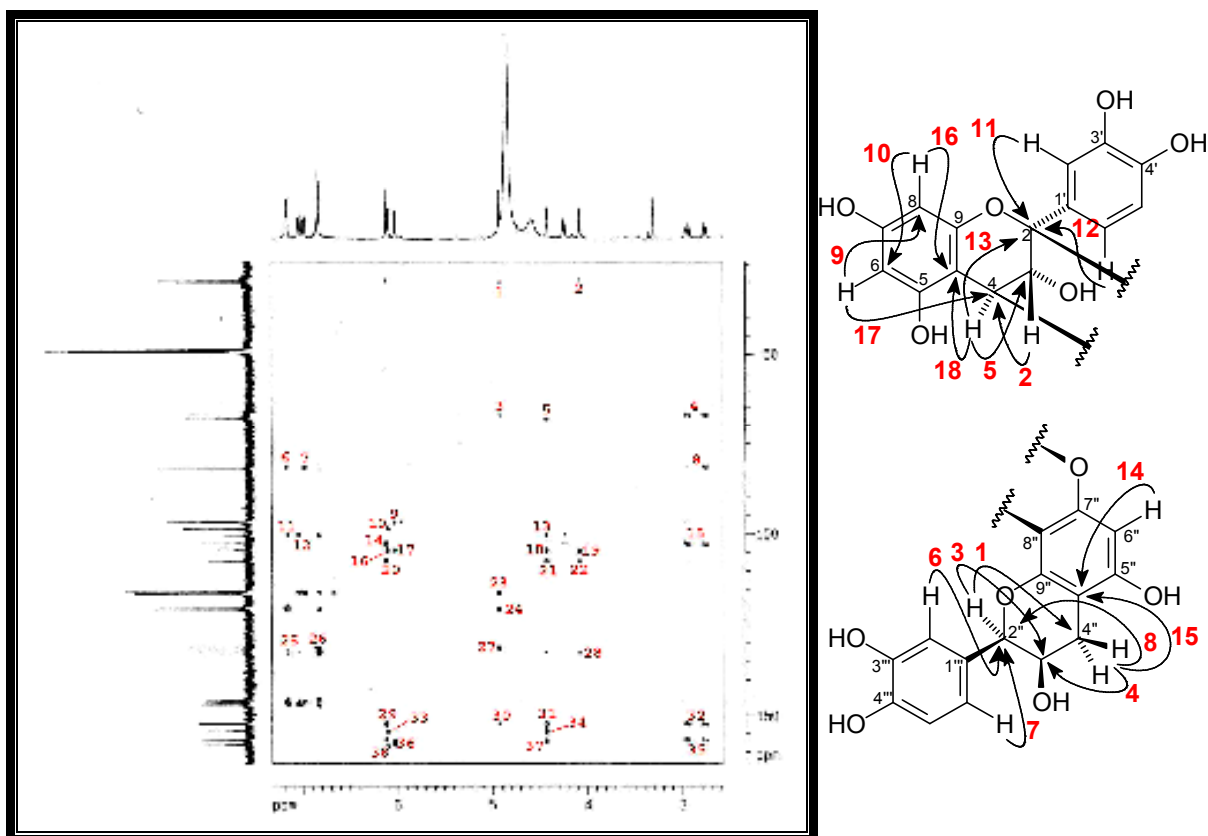


Figura 170 – Espectro de RMN bidimensional HMBC de AR-7.

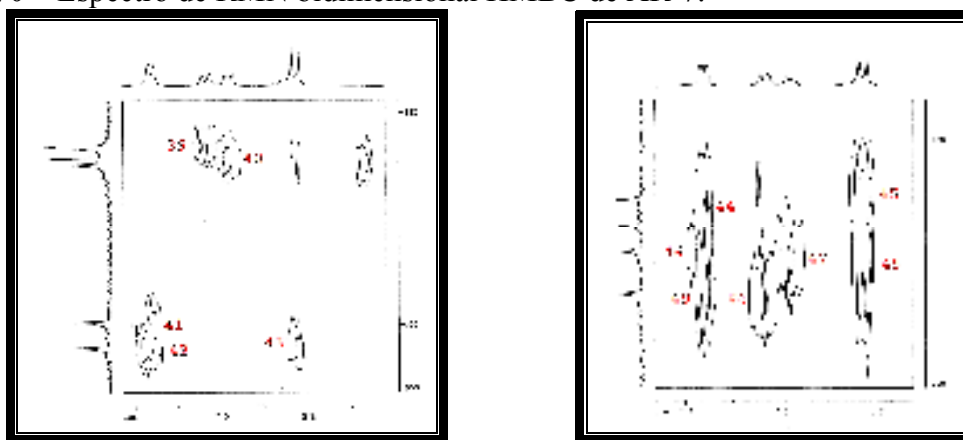
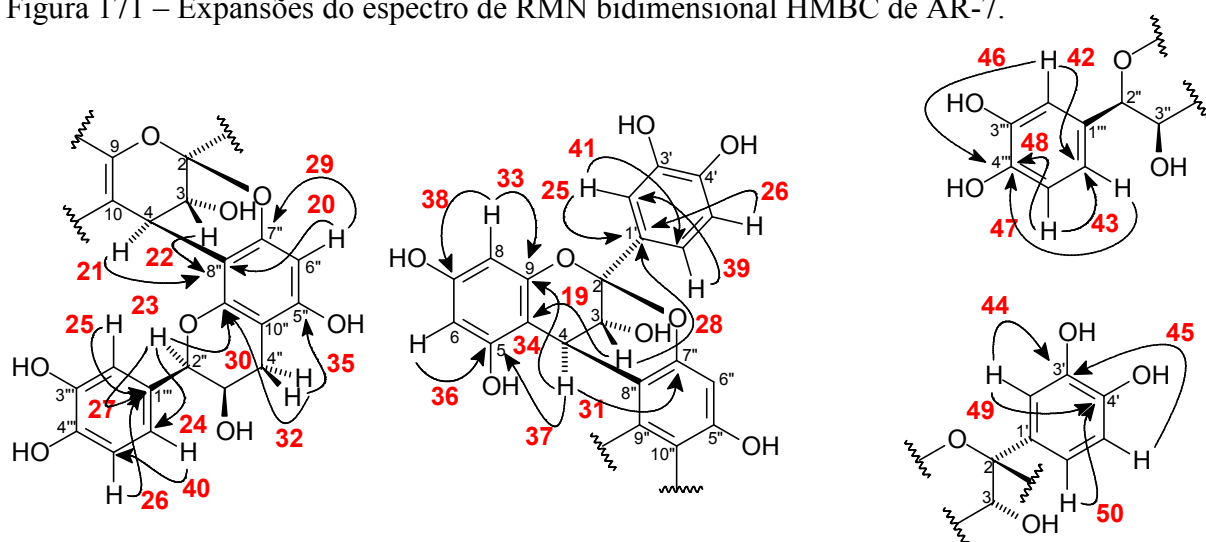


Figura 171 – Expansões do espectro de RMN bidimensional HMBC de AR-7.



## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1. Material botânico

Os talos de espécimes de *Alibertia myrciifolia* e as folhas de *Alibertia rigida*, selecionados para este estudo, foram coletados no município do Crato (Chapada do Araripe – CE), em setembro de 2001 e janeiro de 2005, respectivamente, pelo Professor Edilberto Rocha Silveira, pertencente ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

A identificação botânica dos espécimes de *A. myrciifolia* foi realizada pelo Professor Elnatan Bezerra de Souza (Coordenação de Biologia da Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA). Para os espécimes de *A. rigida*, a autenticação botânica foi feita pelo professor Edson Paula Nunes (Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará - UFC). As exsiccatas relativas a estes espécimes encontram-se depositadas no Herbário Prisco Bezerra/UFC, sob os números de inscrição: 31016 e 34722, respectivamente.

### 5.2. Métodos de Análise

#### 5.2.1. Métodos Cromatográficos

Os processos cromatográficos de adsorção foram executados utilizando gel de sílica com granulometria de 63-200  $\mu\text{m}$  (cromatografia gravitacional) e de 40-63  $\mu\text{m}$  (cromatografia sob pressão – “flash”) das marcas Merck<sup>®</sup> e Vetec<sup>®</sup>. O comprimento e diâmetro das colunas cromatográficas empregadas variaram de acordo com as alíquotas das amostras e as quantidades de gel de sílica utilizadas. As colunas utilizadas na cromatografia “flash” foram de vidro resistente à pressão e continham bulbos no ápice, para armazenamento do solvente. Foi empregada, nesta técnica, bomba de ar comprimido modelo Inalar Compact N<sup>o</sup> 4724059 de Ind. de Aparelhos Médicos Ltda. Para cromatografia de adsorção em fase

reversa foram empregadas colunas SEP-PAK VAC C<sub>18</sub> 500 mg da Waters<sup>®</sup> e BOND ELUT LRC C<sub>18</sub> 500 mg da Varian<sup>®</sup>.

Para cromatografia de camada delgada (CCD) utilizou-se cromatofolhas de gel de sílica 60 ( $\varnothing$   $\mu$ m 2-25) sobre alumínio da marca Merck<sup>®</sup> (com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm). Nas análises em fase reversa foram empregadas cromatofolhas de gel de sílica modificada (RP-18) sobre alumínio da Merck<sup>®</sup>.

Os eluentes utilizados nos procedimentos cromatográficos foram: éter de petróleo, hexano, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila, metanol, n-butanol e ácido acético glacial, puros ou combinados em proporções crescentes de polaridade. Todos de qualidade P.A. das marcas Synth<sup>®</sup> ou Vetec<sup>®</sup>. Os eluentes utilizados nos tratamentos cromatográficos de adsorção sob pressão média foram escolhidos após análise prévia das frações (a serem estudadas) por CCD, a fim de permitir ao constituinte desejado (ou àquele de menor R<sub>f</sub>) apresentar R<sub>f</sub> próximo de 0,3. Nas análises em fase reversa utilizou-se ainda, como eluente, água destilada.

A revelação das substâncias nas cromatoplasmas analíticas foi obtida por exposição à luz ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm), realizada em aparelho Spectroline modelo ENF 240 C/F; por contato com vapores de iodo (I<sub>2</sub>), e por aspersão com solução de vanilina (C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) e ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) em etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), seguida de aquecimento em estufa a 100°C por aproximadamente 5 minutos.

Os fracionamentos por cromatografia de exclusão foram efetuados em gel de dextrana Sephadex LH-20 da Pharmacia Fine Chemicals<sup>®</sup>, utilizando-se metanol puro como fase móvel.

A destilação dos solventes dos extratos e das frações resultantes dos procedimentos cromatográficos foi realizada sob pressão reduzida em evaporador rotatório Büchi<sup>®</sup>.

## 5.2.2. Métodos Espectrométricos

### 5.2.2.1. Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em Espectrômetro Perkin Elmer<sup>®</sup>, modelo FT-IR Spectrum 1000 da Central Analítica do Departamento de Química

Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, utilizando pastilhas de KBr para análises das amostras.

#### 5.2.2.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ ) e de carbono-13 (RMN $^{13}\text{C}$ )

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetros Bruker<sup>®</sup>, modelo Advance DPX-300 e/ou modelo Advance DRX-500, pertencentes ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC), operando na frequência do hidrogênio a 300,13 MHz e a 500,13 MHz, e a frequência do carbono a 75,47 MHz e a 125,75 MHz.

Os solventes utilizados nas dissoluções das amostras para obtenção dos espectros foram: clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e piridina deuterada ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ), comercializados pela Merck<sup>®</sup> e Aldrich<sup>®</sup>.

Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados, no caso dos espectros de hidrogênio, pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não-deuteradas dos solventes deuterados utilizados: clorofórmio (7,27 ppm), metanol (3,31) e piridina (7,22; 7,58; 8,74). Nos espectros de carbono-13, os deslocamentos químicos foram referenciados pelos picos dos carbonos-13 dos solventes: clorofórmio (77,23), metanol (49,15) e piridina (123,87; 135,91; 150,35).

As multiplicidades dos sinais de hidrogênio nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (duplete), dd (duplo duplete), q (quarteto), t (tripleto), m (multiplete).

A técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), foi utilizada na determinação do padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN  $^{13}\text{C}$ , aplicando ângulo de nutação de  $135^\circ$  ( $\text{CH}$  e  $\text{CH}_3$  com amplitude em oposição aos  $\text{CH}_2$ ). Os carbonos não-hidrogenados foram caracterizados pela subtração dos sinais do espectro BB (Broad Band) e DEPT  $135^\circ$ . A descrição dos carbonos pelo padrão de hidrogenação seguiu a convenção: C (carbono não-hidrogenado), CH (carbono metínico),  $\text{CH}_2$  (carbono metilênico) e  $\text{CH}_3$  (carbono metílico).

### 5.2.2.3. Espectrometria de massa

Os espectros de massa dos constituintes não-voláteis foram obtidos em espectrômetro de massa Shimadzu<sup>®</sup>, modelo QP 5000, DI-50, por impacto eletrônico a 70 eV. Tal obtenção foi realizada na Central Analítica do Curso de Pós-Graduação em Química, do Depto. de Química Orgânica e Inorgânica da UFC.

### 5.2.3. Medição dos Pontos de fusão

Os pontos de fusão das substâncias isoladas foram obtidos em equipamento de Microdeterminação digital da Mettler Toledo com placa aquecedora FP82HT e uma central de processamento FP90. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 2°C/min e não foram corrigidas.

## 5.3. Isolamento dos Metabólitos Secundários de *A. myrciifolia*

### 5.3.1. Obtenção dos extratos hexânico (AMTH) e etanólico (AMTE)

Os talos de espécimes de *Alibertia myrciifolia* (790,0 g) foram triturados mecanicamente e extraídos com hexano, de modo exaustivo e à temperatura ambiente. Após evaporação do solvente por destilação sob pressão reduzida, obteve-se 6,62 g de uma graxa marrom-esverdeada, a qual foi denominada AMTH.

A partir da “torta” remanescente, após a obtenção do extrato hexânico, efetuou-se uma extração exaustiva com etanol, também à temperatura ambiente. Este solvente foi evaporado por destilação sob pressão reduzida, fornecendo 67,0 g de um extrato sólido de coloração marrom escura, denominado AMTE. Durante a obtenção deste extrato, foram obtidos 15,0 g do poliálcool manitol através de filtragem e recristalização com etanol. Os fluxogramas 1 e 2 (Págs. 196 e 209, respectivamente) contêm uma síntese do fracionamento dos extratos de *A. myrciifolia* e conseqüente isolamento dos componentes desses extratos.

### 5.3.2. Tratamento cromatográfico de AMTH

Uma alíquota de 5,55 g do extrato hexânico de *A. myrciifolia* foi adsorvida em 9,5 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 55,3 g de gel de sílica em coluna cromatográfica de 5,0 cm de diâmetro. Para seu fracionamento, utilizou-se como eluentes: hexano (3 x 100 mL), hexano/clorofórmio (1:1) (3 x 100 mL), clorofórmio (3 x 100 mL), acetato de etila (2 x 100 mL) e metanol (2 x 100 mL). As cinco frações resultantes deste procedimento encontram-se descritas na tabela 41 (Pág. 191).

Tabela 41 – Rendimentos obtidos no fracionamento cromatográfico de AMTH

<b>ELUENTE</b>	<b>FRAÇÃO</b>	<b>ASPECTO</b>	<b>MASSA</b>
Hexano	AMTH-H	Graxa branca	0,12 g
Hexano/CHCl <sub>3</sub>	AMTH-H/C	Graxa amarela	0,12 g
CHCl <sub>3</sub>	AMTH-C	Graxa amarela	1,42 g
AcOEt	AMTH-A	Sólido verde escuro	3,16 g
<b>MeOH</b>	AMTH-M	Sólido marrom escuro	0,64 g

### 5.3.3. Tratamento cromatográfico de AMTH-A

Após a análise em CCD, a fração AMTH-A (3,16 g) foi submetida ao fracionamento cromatográfico por adsorção em 6,5 g de gel de sílica, pulverização em gral de porcelana e acondicionamento da mistura sobre 25,0 g de gel de sílica em coluna cromatográfica de 3,5 cm de diâmetro. Os solventes utilizados na eluição em um gradiente de concentração em ordem crescente de polaridade foram: hexano, acetato de etila e metanol. Ao todo, foram obtidas 14 frações (de 100 mL cada uma), como descrito na tabela 42 (Pág. 191).

Tabela 42 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de AMTH-A

<b>FRAÇÃO</b>	<b>ELUENTE</b>
1-3	Hexano/acetato de etila 5%
4-5	Hexano/acetato de etila 10%

6-9	Hexano/acetato de etila 25%
10-11	Hexano/acetato de etila 50%
12	Hexano/acetato de etila 75%
13	Acetato de etila 100%
14	Metanol 100%

Observou-se a precipitação de um sólido branco na fração 2 que foi separado da solução-mãe por filtração dando origem a uma nova fração denominada F-2ppt.

A posterior análise comparativa por CCD das frações obtidas neste procedimento permitiu a reunião das idênticas, de acordo com a tabela 43 (abaixo).

Tabela 43 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTH-A

<b>FRAÇÃO</b>	<b>ASPECTO</b>	<b>MASSA (mg)</b>
1	Graxa amarela	189,2
2	Graxa amarela	223,6
2ppt	Sólido amorfo branco	119,5
3	Sólido marrom claro	184,3
4-5	Sólido verde escuro	331,4
6	Sólido verde escuro	770,2
7	Sólido marrom escuro	358,5
8-11	Sólido marrom escuro	510,9
12-13	Sólido marrom escuro	280,4
<b>14</b>	Sólido marrom claro	38,7

#### 5.3.4. Tratamento cromatográfico de AMTH-A(F-2ppt)

O precipitado AMTH-A(F-2ppt) foi cromatografado utilizando gel de sílica para cromatografia “flash” (na proporção de 1:1), pulverizada em gral de porcelana e disposta sobre 9,0 g do mesmo gel de sílica em coluna de 1,5 cm de diâmetro. O processo de eluição foi realizado com os solventes hexano, acetato de etila e metanol em três diferentes concentrações: hexano/acetato de etila 15% (frações 1 a 23), hexano/acetato de etila 20%



(frações 24 a 35) e metanol 100% (frações 36 a 40). As frações obtidas (10 mL) foram submetidas à análise comparativa por CCD, o que permitiu a reunião das frações semelhantes em 6 frações resultantes, como apresentado na tabela abaixo.

Tabela 44 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTH-A(F-2ppt)

<b>FRAÇÃO</b>	<b>ASPECTO</b>	<i>MASSA (mg)</i>
1	Sólido amorfo branco	6,5
2	Sólido amorfo branco	10,4
3-5	Cristais aciculares brancos	32,5
6-25	Cristais aciculares brancos	53,3
28-29	Sólido amorfo branco	1,6
<b>30-40</b>	Sólido amorfo branco	2,2

#### 5.3.5. Purificação de AMTH-A(F-2ppt)3-5: isolamento de **AM-1** ( *$\beta$ -sitosterol/estigmasterol*)

A fração AMTH-A(F-2ppt)(3-5) (32,5 mg) foi adsorvida em aproximadamente 50 mg de gel de sílica para cromatografia “flash”, pulverizada em gral de porcelana e depositada sobre 11,0 g do mesmo gel de sílica numa coluna de 1,5 cm de diâmetro. Após eluição isocrática com uma mistura ternária de éter de petróleo, clorofórmio e metanol (75/20/5), foram coletadas 30 frações. A posterior reunião das frações semelhantes, após a análise por CCD, resultou em apenas três frações: 1-8 (10,1 mg), 9-19 (16,0 mg) e 20-30 (2,7 mg). A fração 9-19 (sólido branco e amorfo) foi denominada **AM-1** e identificada como sendo a mistura dos fitoesteróides  ***$\beta$ -sitosterol e stigmasterol*** após análise do seu espectro de RMN <sup>1</sup>H (Pág. 52).

#### 5.3.6. Purificação de AMTH-A(F-2ppt)(6-25): isolamento de **AM-2** (*hidroxi-hopanona*)

A fração AMTH-A(F-2ppt)(6-25) (53,3 mg) foi submetida à cromatografia “flash” utilizando, como eluente, a mistura éter de petróleo/clorofórmio/metanol (75/20/5). A

amostra foi misturada a gel de sílica para cromatografia “flash” (na proporção de 1:1), pulverizada em gral de porcelana e disposta sobre 11,5 g do mesmo gel de sílica em coluna de 1,5 cm de diâmetro. Após eluição isocrática, foram coletadas 39 frações de 10 mL cada. Estas frações foram, posteriormente, reunidas de acordo com a análise por CCD, na seguinte forma: 1-19 (2,0 mg), 20-26 (41,0 mg) e 27-39 (11,4 mg). Destas, a fração 20-26 se apresentou com o aspecto de cristais brancos e foi denominada **AM-2**. Após a análise espectroscópica (descrita no item 4.1.2, Pág. 54) e comparação dos dados obtidos com os registrados na literatura, este composto foi caracterizado como sendo o triterpeno **hidroxi-hopanona**.

#### 5.3.7. Reação de redução de AM-2: obtenção do derivado **AM-2'** (**3 $\beta$ ,22**-diidroxihopano).

O composto **AM-2** foi submetido à reação de redução do grupamento carbonila (cetônica) para gerar um grupo hidroxila. 15,3 mg de AM-2 foram transferidos para um balão de capacidade 25 mL, no qual foram adicionados 6 mL de etanol e 3 mL de metanol. Em seguida, adicionou-se NaBH<sub>4</sub> em excesso (6,5 mg = 5 x 0,0346 mmol), pouco a pouco, sob a agitação da mistura. Manteve-se a agitação por uma hora. Ao final deste período e após comparação, por CCD, com o material de partida, foi efetuada uma extração do produto da reação com acetato de etila (2 x 5 mL). Após a evaporação do solvente, obteve-se um sólido branco, amorfo e de massa 12,0 mg, o qual foi denominado **AM-2'**. O rendimento da reação foi de 78,1 %. A análise espectroscópica do produto (descrita na Pág. 64) e a posterior comparação dos dados obtidos com os registrados na literatura permitiram caracterizá-lo como o triterpeno **3 $\beta$ ,22**-di-hidroxihopano.

#### 5.3.8. Purificação de AMTH-A4-5: isolamento de **AM-3** (**3 $\alpha$ ,22**-di-hidroxihopano).

A fração AMTH-A4-5 (Pág. 192), de massa 331,4 mg, foi depositada sobre 17,0 g de gel de sílica para cromatografia “flash”, numa coluna de 2,0 cm de diâmetro. Esta foi cromatografada utilizando-se como solventes: hexano e acetato de etila (em misturas binárias), fornecendo 98 frações (10 mL cada), como descrito na tabela 45 (Pág. 195).

Tabela 45 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de AMTH-A4-5

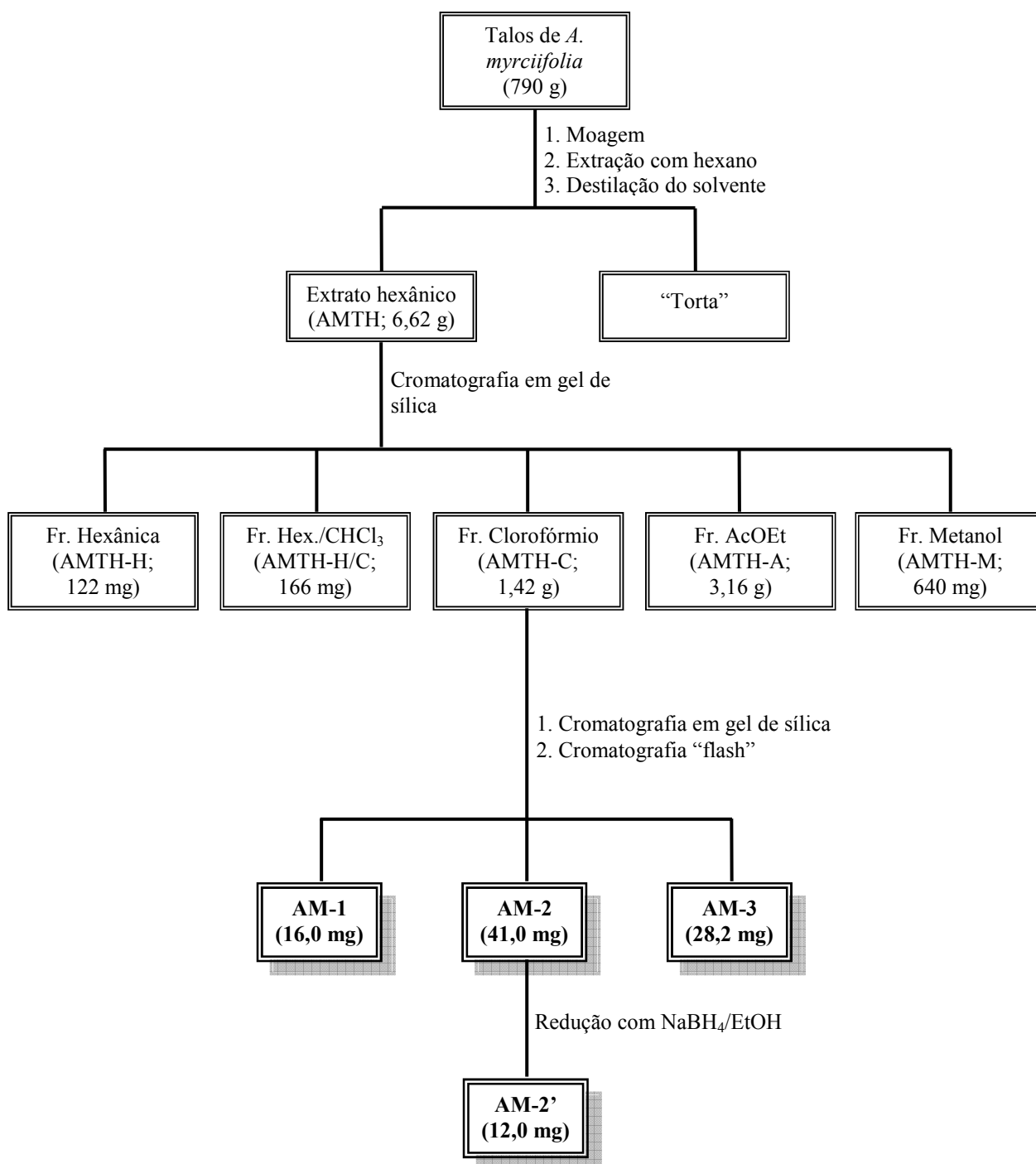
<i>FRAÇÃO</i>	<i>ELUENTE</i>
1-47	Hexano/acetato de etila 10%
48-67	Hexano/acetato de etila 30%
68-87	Hexano/acetato de etila 50%
88-98	Acetato de etila 100%

A análise posterior, por CCD, permitiu a reunião das frações idênticas da forma descrita na tabela 46 (abaixo). A fração 32-37 (28,2 mg), com o aspecto de um sólido amorfo branco mostrou-se uniforme em CCD e foi denominada **AM-3**. Após sua análise espectrométrica (descrita na Pág. 73) e comparação dos dados obtidos com os registrados na literatura, este composto foi caracterizado como sendo o triterpeno **3 $\alpha$ ,22-di-hidroxi-hopano**.

Tabela 46 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTH-A4-5

<i>FRAÇÃO</i>	<i>ASPECTO</i>	<i>MASSA (mg)</i>
1-20	Óleo verde claro	14,2
21-31	Óleo verde claro	31,0
32-37	Sólido amorfo branco	28,2
38-49	Sólido amorfo branco	32,6
50-66	Graxa amarela	98,6
<b>67-98</b>	Graxa amarela	51,1

Fluxograma 1 – Isolamento de AM-1, AM-2 e AM-3 a partir do extrato hexânico dos talos de *A. myrciifolia*.



### 5.3.9. Partição de AMTE

O extrato etanólico de *A. myrciifolia*, AMTE (67,0 g) (Pág. 190), foi solubilizado em uma mistura de metanol (100 mL) e água (100 mL), e extraído com cinco porções sucessivas de 100 mL de cada um dos solventes a seguir, em ordem crescente de polaridade: hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol, fornecendo as seguintes frações: AMTE-H (3,7 g), AMTE-C (15,4 g), AMTE-A (7,6 g) e AMTE-B (9,4 g). A fase aquosa remanescente, 25,5g, foi denominada AMTE-Aq.

### 5.3.10. Tratamento cromatográfico de AMTE-C

A fração AMTE-C (15,4 g) foi adsorvida em aproximadamente 18,0 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 54,0 g de gel de sílica em coluna cromatográfica de 3,5 cm de diâmetro. Utilizou-se como eluentes: clorofórmio, acetato de etila e metanol, fornecendo as frações denominadas: AMTE-C-C (1,52 g), AMTE-C-A (3,64 g), AMTE-C-M (7,77 g).

### 5.3.11. Tratamento cromatográfico de AMTE-C-A

A fração AMTE-C-A (3,64 g), com o aspecto de uma resina marrom escura, foi submetida à cromatografia de exclusão em gel de Sephadex LH-20: dissolvida em metanol, acondicionada sobre uma coluna (3,5 cm de diâmetro) de 40,0 g de Sephadex LH-20 e eluída com metanol, numa vazão de aproximadamente 0,5 mL/min. Foram coletadas 11 frações de 10 mL que foram posteriormente analisadas por CCD e reunidas em 8 frações resultantes (Tab. 47, Pág. 198).

Tabela 47 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTE-C-A

<b>FRAÇÃO</b>	<b>ASPECTO</b>	<b>MASSA</b>
1-2	Sólido marrom claro	185,2 mg
3	Sólido marrom escuro	1,66 g
4	Sólido marrom escuro	712,8 mg
5	Sólido marrom esverdeado	230,0 mg
6	Sólido marrom esverdeado	140,5 mg
7	Sólido marrom escuro	189,9 mg
8-9	Sólido amarelo claro	101,4 mg
<b>10-11</b>	Sólido marrom claro	150,6 mg

## 5.3.12. Tratamento cromatográfico de AMTE-C-A8-9

A fração AMTE-C-A8-9 (101,4 mg) foi acondicionada sobre 13,0 g de gel de sílica para cromatografia “flash”, numa coluna de 2,0 cm de diâmetro. Para a eluição foram utilizados os solventes hexano, acetato de etila e metanol, em misturas binárias, seguindo uma ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 150 frações (de 10 mL cada uma), como se observa na tabela 48 (abaixo).

Tabela 48 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de AMTE-C-A8-9

<b>FRAÇÃO</b>	<b>ELUENTE</b>
1-35	Hexano/acetato de etila 25%
36-82	Hexano/acetato de etila 50%
83-103	Hexano/acetato de etila 75%
104-136	Acetato de etila 100%
137-150	Metanol 100%

Estas frações foram, posteriormente, reunidas de acordo com a análise por CCD, como descrito na tabela 49 (Pág. 199).

Tabela 49 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTE-C-A8-9

<b>FRAÇÃO</b>	<b>ASPECTO</b>	<i>MASSA (mg)</i>
1-5	Sólido marrom claro	5,3
6-18	Sólido amarelo claro	24,5
19-92	Sólido amarelo claro	45,7
<b>93-150</b>	Sólido marrom escuro	14,2

### 5.3.13. Purificação de AMTE-C-A8-9(19-92): isolamento de **AM-4 (3,4-dimetoxi-luteolina)**

A fração AMTE-C-A8-9(19-92) (45,7 mg), foi acondicionada sobre 10,5 g de gel de sílica para cromatografia “flash”, numa coluna de 1,5 cm de diâmetro. Foi utilizada para eluição uma mistura de hexano/acetato de etila 35%, de forma isocrática, para a obtenção de 113 frações (de 5 mL cada uma). A análise posterior, por CCD, permitiu a reunião das frações idênticas, da seguinte forma: 1-5 (1,5 mg), 6-60 (9,3 mg), 61-69 (6,3 mg), 70-108 (7,0 mg) e 109-113 (0,5 mg). A fração 70-108 (um sólido amorfo amarelo claro) foi recromatografada em gel de sílica para cromatografia “flash” (na proporção de 1:1), pulverizada em gral de porcelana e disposta sobre 2,1 g do mesmo gel de sílica em coluna de 1,0 cm de diâmetro. Após eluição isocrática com éter de petróleo/acetato de etila 40%, foram coletadas 95 frações de 5 mL cada. As frações idênticas, quando comparadas por CCD, foram reunidas da seguinte forma: 1-11 (0,8 mg), 12-17 (1,1 mg), 18-91 (1,5 mg) e 92-95 (1,3 mg). A fração 18-91 (um sólido amorfo amarelo claro) foi denominada **AM-4** e identificada como sendo a flavona **3,4-dimetoxi-luteolina**, após sua análise espectroscópica (descrita na Pág. 83) e comparação dos dados obtidos com os registrados na literatura.

### 5.3.14. Tratamento cromatográfico de AMTE-A

A fração AMTE-A (7,6 g) (Pág. 197), proveniente da partição líquido-líquido do extrato etanólico de *A. myrciifolia*, foi dividida em quatro alíquotas de aproximadamente 1,9 g cada uma. Em seguida, estas alíquotas foram submetidas, separadamente, à cromatografia de

exclusão em gel de Sephadex LH-20: acondicionadas sobre uma coluna (3,5 cm de diâmetro) de 40,0 g de Sephadex LH-20 e eluídas com metanol, numa vazão de aproximadamente 0,5 mL/min. Em cada procedimento foram coletadas 20 frações de 10 mL cada. Estas foram comparadas por CCD e as frações semelhantes foram reunidas como se encontra descrito na tabela 50 (abaixo).

Tabela 50 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTE-A

<b>FRAÇÃO</b>	<b>ASPECTO</b>	<i>MASSA</i>
1-4	Sólido amorfo preto	314,9 mg
5	Sólido amorfo marrom	354,1 mg
6	Resina marrom escura	942,8 mg
7-11	Resina marrom escura	4,76 g
12-13	Resina marrom escura	179,1 mg
14-16	Sólido amorfo marrom	154,9 mg
17-19	Sólido amorfo marrom	33,2 mg
<b>20</b>	Sólido amorfo marrom	29,6 mg

#### 5.3.15. Tratamento cromatográfico de AMTE-A7-11

A fração AMTE-A7-11 (4,76 g) foi submetida à cromatografia de exclusão em gel de Sephadex LH-20. Divida em duas partes, as quais foram dissolvidas em metanol, acondicionadas sobre uma coluna (3,5 cm de diâmetro) de 40,0 g de Sephadex LH-20 e eluídas com metanol, numa vazão de aproximadamente 0,5 mL/min. Coletou-se 14 frações de 10 mL que foram, posteriormente, analisadas por CCD permitindo a junção das frações idênticas, o que resultou ao final em 4 frações: 1-4 (23,3 mg), 5-9 (4,12 g), 10-11 (375,8 mg) e 12-14 (119,3 mg).

#### 5.3.16. Tratamento cromatográfico de AMTE-A7-11(5-9): isolamento de **AM-5 (ácido ursólico)**



A fração AMTE-A7-11(5-9) (4,12 g), um sólido amorfo marrom escuro, foi adsorvida em 5,5 g de gel de sílica para cromatografia “flash”, pulverizada em gral de porcelana e disposta sobre 61,0 g do mesmo gel de sílica em coluna de 6,0 cm de diâmetro. O fracionamento foi realizado utilizando os solventes diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias (Tab. 51, abaixo).

Tabela 51 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de AMTE-A7-11(5-9)

<i>FRAÇÃO</i>	<i>ELUENTE</i>
1-3	Diclorometano/acetato de etila 25%
4-6	Diclorometano/acetato de etila 50%
7-9	Diclorometano/acetato de etila 75%
10-11	Acetato de etila 100%
12-15	Acetato de etila/metanol 50%
16-18	Metanol 100%

Foram coletadas 18 frações, de 125 mL, que depois de concentradas e analisadas em CCD foram reunidas de acordo com suas semelhanças (Tab. 52, abaixo). A fração 2-3 apresentou um precipitado sólido branco e amorfo (9,1 mg), que foi separado por filtração e denominado **AM-5**. Este precipitado foi identificado com o triterpeno **ácido ursólico**, cujos dados físicos e espectroscópicos encontram-se descritos na página 91.

Tabela 52 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTE-A7-11(5-9)

<i>FRAÇÃO</i>	<i>ASPECTO</i>	<i>MASSA</i>
1	Resina verde clara	19,8 mg
2-3	Sólido amorfo verde	66,9 mg
4-7	Resina marrom clara	143,7 mg
8-11	Sólido amorfo marrom	145,6 mg
12-14	Resina marrom escura	3,09 g
<b>15-18</b>	Resina marrom escura	121,9 mg

#### 5.3.17. Tratamento cromatográfico de AMTE-A12-13

A fração AMTE-A12-13 (179,1 mg) (Pág. 200) foi submetida à cromatografia “flash”, sendo acondicionada sobre 17,5 g de gel de sílica em coluna de 2,0 cm de diâmetro. A eluição foi realizada utilizando diclorometano e metanol na forma descrita na tabela 53 (abaixo).

Tabela 53 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de AMTE-A12-13

<i>FRAÇÃO</i>	<i>ELUENTE</i>
1-7	Diclorometano/metanol 15%
8-19	Diclorometano/metanol 30%
20-30	Diclorometano/metanol 50%
31-41	Metanol 100%

As 41 frações (10 mL cada) foram analisadas em CCD, sendo as idênticas reunidas da forma como descreve a tabela 54 (abaixo).

Tabela 54 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTE-A12-13

<i>FRAÇÃO</i>	<i>ASPECTO</i>	<i>MASSA (mg)</i>
1-3	Sólido amorfo marrom	12,5
4-9	Sólido amorfo marrom	33,2
10-25	Sólido amorfo marrom	67,2
<b>26-41</b>	Sólido amorfo marrom	93,2

### 5.3.18. Purificação de AMTE-A12-13(4-9): isolamento de **AM-6 (ácido cafeico)**

A fração AMTE-A12-13(4-9) (33,2 mg) (Pág. 202) foi submetida à cromatografia “flash”, sendo adsorvida em gel de sílica (na proporção de 1:1), pulverizada em gral de porcelana e disposta sobre 11g do mesmo gel de sílica em coluna de 1,5 cm de diâmetro. Após eluição isocrática com diclorometano/metanol/ácido acético (88/9,5/2,5), foram coletadas 33 frações de 10 mL cada. As frações idênticas, quando comparadas por CCD, foram reunidas como mostrado na tabela 55 (abaixo).

Tabela 55 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTE-A12-13(4-9)

<b>FRAÇÃO</b>	<b>ASPECTO</b>	<i>MASSA (mg)</i>
1-4	Graxa marrom clara	2,0
5	Resina marrom clara	3,0
6-9	Sólido amorfo marrom	16,4
10-12	Sólido amorfo marrom	3,0
13-17	Sólido amorfo marrom	5,0
18-22	Sólido amorfo marrom	2,1
<b>23-33</b>	Sólido amorfo marrom	1,0

A fração 6-9 mostrou um “spot” uniforme em CCD e foi denominada **AM-6**. A análise espectroscópica (Pág. 97) e comparação com dados descritos na literatura permitiram identificar o composto como o fenil-propanóide **ácido cafeico**.

#### 5.3.19. Tratamento cromatográfico de AMTE-B

A fração AMTE-B (Pág. 197), de massa 9,4 g, resultante da partição do extrato etanólico dos talos de *A. myrciifolia* com o solvente n-butanol, foi submetida à cromatografia de exclusão em gel de Sephadex LH-20: solubilizada em metanol, acondicionada sobre uma coluna (3,5 cm de diâmetro) de 40,0 g de Sephadex LH-20 e eluída com metanol, numa vazão de aproximadamente 0,5 mL/min. Foram coletadas 11 frações de 10 mL que foram comparadas por CCD e reunidas de acordo com suas semelhanças como descrito na tabela 56 (abaixo).

Tabela 56 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTE-B

<b>FRAÇÃO</b>	<b>ASPECTO</b>	<i>MASSA</i>
1-4	Sólido amorfo marrom	277,9 mg
5-6	Resina marrom escura	1,15 g
7-8	Resina marrom escura	5,77 g
<b>9-11</b>	Resina marrom escura	544,5 mg

A fração 9-11 apresentou um precipitado amorfo de coloração branca que, após análise por RMN  $^1\text{H}$  revelou ser o poliálcool D-manitol (240 mg).

### 5.3.20. Tratamento cromatográfico de AMTE-B9-11

A fração AMTE-B9-11 (544,5 mg) foi submetida à cromatografia de exclusão em gel de Sephadex LH-20. A amostra foi solubilizada em 2 mL de metanol, acondicionada sobre uma coluna (3,0 cm de diâmetro) de 30,0 g de Sephadex LH-20 e eluída com metanol, numa vazão de aproximadamente 0,5 mL/min. No procedimento foram coletadas 16 frações de 10 mL cada. Estas foram comparadas por CCD e as frações semelhantes foram reunidas na forma como se encontra descrito na tabela 57 (abaixo).

Tabela 57 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTE-B9-11

<b>FRAÇÃO</b>	<b>ASPECTO</b>	<i>MASSA (mg)</i>
1-3	Sólido amorfo marrom	12,1
4-6	Resina marrom escura	218,3
7	Resina marrom escura	59,4
8-11	Sólido amorfo marrom	124,2
<b>12-16</b>	Sólido amorfo marrom	26,3

A fração 4-6 foi recromatografada em Sephadex LH-20 seguindo o mesmo procedimento anterior. A amostra foi solubilizada em 2 mL de metanol, acondicionada sobre uma coluna (2,0 cm de diâmetro) de 25,0 g de Sephadex LH-20 e eluída com metanol, numa vazão de aproximadamente 0,5 mL/min. No procedimento foram coletadas 6 frações de 10 mL cada. Estas foram comparadas por CCD e as semelhantes foram reunidas, resultando em 3 frações: 1-2 (8,2 mg), 3-4 (180,9 mg) e 5-6 (9,1 mg). A fração 3-4 (um sólido amorfo marrom claro) foi selecionada para análise. Atribuiu-se a ela o código AMTE-B9-11(4-6)3-4.

### 5.3.21. Tratamento cromatográfico de AMTE-B9-11(4-6)3-4

A fração AMTE-B9-11(4-6)3-4 (180,9 mg) foi submetida à cromatografia “flash”. A amostra foi depositada sobre 25,0 g de gel de sílica numa coluna de 2,5 cm de diâmetro. Após eluição isocrática com diclorometano/metanol/ácido acético (78/19,5/2,5), foram coletadas 27 frações de 10 mL cada. As frações idênticas, quando comparadas por CCD, foram reunidas como mostrado na tabela 58 (abaixo).

Tabela 58 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTE-B9-11(4-6)3-4

<b>FRAÇÃO</b>	<b>ASPECTO</b>	<i>MASSA (mg)</i>
1-2	Sólido amorfo marrom	10,5
3-4	Resina marrom escura	41,0
5	Resina marrom escura	50,8
6-9	Sólido amorfo marrom	47,9
<b>10-27</b>	Sólido amorfo marrom	11,7

### 5.3.22. Purificação de AMTE-B9-11(4-6)3-4(6-9): isolamento de **AM-7** (ácido geniposídico)

A fração AMTE-B9-11(4-6)3-4(6-9) (47,9 mg) (Pág. 205) foi cromatografada numa coluna de fase reversa (C-18) de forma semelhante à empregada na análise da fração AMTE-B9-11(4-6)3-4(3-4). O material foi dissolvido em 3 mL de uma mistura de água destilada e metanol (95/5) e a solução transferida para a coluna. A eluição seguiu um gradiente de concentração em ordem decrescente de polaridade, como está descrito na tabela 59 (abaixo).

Tabela 59 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de AMTE-B9-11(4-6)3-4(6-9)

<b>FRAÇÃO</b>	<b>ELUENTE</b>
1-5	Água/metanol 5%
6-9	Água /metanol 15%
10-14	Água /metanol 30%
15-19	Água /metanol 50%
20-22	Água /metanol 75%
23-25	Metanol 100%

As 25 frações (5 mL cada) foram analisadas em CCD (fase normal e reversa), sendo as idênticas reunidas da forma como descreve a tabela 60 (abaixo).

Tabela 60 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTE-B9-11(4-6)3-4(6-9)

<b>FRAÇÃO</b>	<b>ASPECTO</b>	<i>MASSA (mg)</i>
1-2	Resina marrom escura	10,2
3-6	Resina marrom escura	5,1
7	Resina marrom escura	3,6
8-13	Resina marrom escura	4,5
14-16	Sólido amorfo marrom	8,7
<b>17-25</b>	Sólido amorfo marrom	12,7

A fração 1-2, que recebeu o código **AM-7**, foi analisada por métodos espectroscópicos (Pág. 106) e os dados obtidos comparados com dados da literatura, o que demonstrou que a mesma tratava-se do iridóide **ácido geniposídico**.

### 5.3.23. Purificação de AMTE-B9-11(4-6)3-4(3-4): isolamento de **AM-8** (ácido 10-O-vaniloil-geniposídico)

A fração AMTE-B9-11(4-6)3-4(3-4) (41,0 mg) foi cromatografada numa coluna de fase reversa (C-18). A fração foi solubilizada em 4 mL de uma mistura de água destilada e metanol (95/5) e eluída empregando-se um gradiente de concentração em ordem decrescente de polaridade como está descrito na tabela 61 (abaixo).

Tabela 61 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de AMTE-B9-11(4-6)3-4(3-4)

<b>FRAÇÃO</b>	<b>ELUENTE</b>
1-5	Água/metanol 5%
6-10	Água /metanol 15%
11-15	Água /metanol 30%
16-19	Água /metanol 50%

20-22

Metanol 100%

As 22 frações (5 mL cada) foram analisadas em CCD (fase normal e reversa), sendo as idênticas reunidas da forma como descreve a tabela 62 (abaixo).

Tabela 62 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de AMTE-B9-11(4-6)3-4(3-4)

<b>FRAÇÃO</b>	<b>ASPECTO</b>	<i>MASSA (mg)</i>
1-4	Resina marrom clara	4,6
5-6	Resina marrom clara	2,2
7-10	Sólido amorfo marrom	3,6
11-15	Sólido amorfo marrom	14,0
16-19	Sólido amorfo marrom	7,7
<b>20-22</b>	Sólido amorfo marrom	2,7

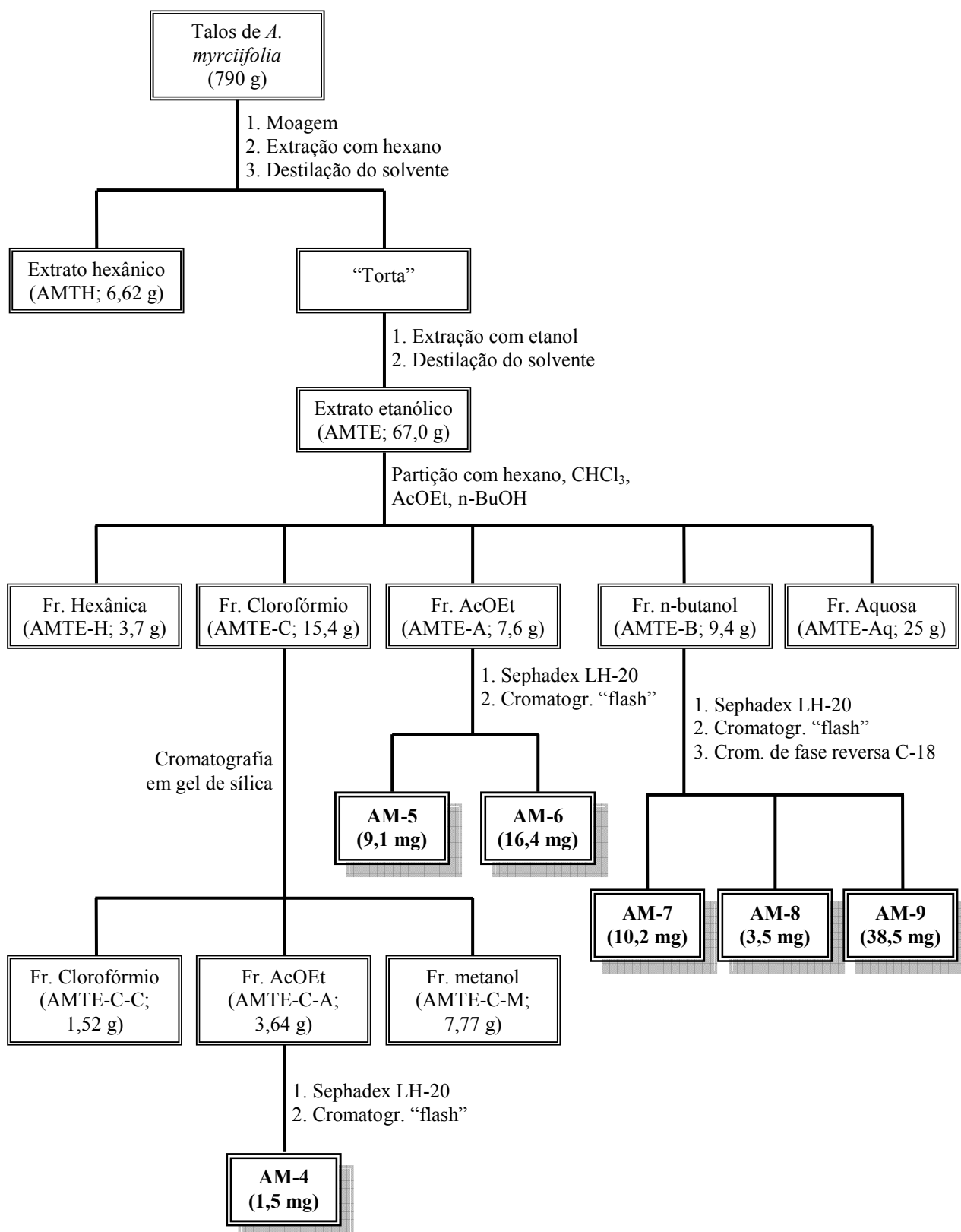
A fração 11-15 (14,0 mg) foi recromatografada em gel de sílica de fase reversa (C-18) sob condições semelhantes às utilizadas na análise da fração que a originou. A amostra foi solubilizada em 2 mL de uma mistura de água destilada e metanol (95/5) e a solução transferida para a coluna. Em seguida fez-se a eluição empregando um gradiente de concentração em ordem decrescente de polaridade: água/metanol 10% (frações 1-3), água/metanol 20% (frações 4-5), água/metanol 30% (frações 6-8), metanol 100 % (fração 9-10). As frações obtidas foram novamente analisadas em CCD (fase normal e reversa), permitindo reunir as que eram idênticas. Desta reunião resultaram 3 frações: 1-2 (3,5 mg), 3-6 (6,2 mg), 7-10 (3,1 mg). A fração 1-2, com o aspecto de um óleo marrom claro, foi analisada por métodos espectroscópicos (Pág. 116) e demonstrou tratar-se de uma substância pura, que foi denominada **AM-8**.

5.3.24. Purificação de AMTE-B9-11(4-6)3-4(6-9): isolamento de **AM-9** (**mistura do ácido 10-O-vaniloil-geniposídico e do ácido 10-O-siringoil-geniposídico**)

Submeteu-se a fração AMTE-B9-11(4-6)3-4(5) (50,8 mg) (Pág. 205) à cromatografia de adsorção em coluna de fase reversa (C-18) de forma semelhante à empregada na análise da fração AMTE-B9-11(4-6)3-4(6-9). Para este procedimento, o material foi dissolvido em 3 mL de uma mistura de água destilada e metanol (95/5) e a solução transferida para a coluna. Em seguida, fez-se a eluição seguindo um gradiente de concentração em ordem decrescente de polaridade: água/metanol 10% (frações 1-4), água/metanol 20% (frações 5-8), água/metanol 30% (frações 9-12), metanol 100 % (fração 12-15). As 15 frações obtidas (5 mL cada) foram analisadas em CCD (fase normal e reversa), permitindo reunir as que eram idênticas. Desta reunião resultaram 3 frações: 1-2 (2,8 mg), 3-10 (38,5 mg), 11-15 (5,1 mg). A fração 3-10, uma resina marrom escura, foi então denominada **AM-9**. Esta foi analisada por métodos espectroscópicos (Pág. 125) e os dados obtidos comparados com dados da literatura, o que demonstrou que a amostra se tratava de uma mistura de iridóides.



Fluxograma 2 – Isolamento de AM-4, AM-5, AM-6, AM-7, AM-8 e AM-9 a partir do extrato etanólico dos talos de *A. myrciifolia*.



#### 5.4. Isolamento dos Metabólitos Secundários de *A. rigida*

##### 5.4.1. Obtenção dos extratos hexânico (ARFH) e etanólico (ARFE)

As folhas de espécimes de *Alibertia rigida* (1,07 Kg) foram trituradas mecanicamente e extraídas com hexano, de modo exaustivo e à temperatura ambiente. Após evaporação do solvente por destilação sob pressão reduzida, obteve-se 19,6 g de uma graxa verde escura, a qual foi denominada ARFH.

A “torta” remanescente, após a obtenção do extrato hexânico, foi extraída de forma exaustiva com etanol à temperatura ambiente. Este solvente foi evaporado por destilação sob pressão reduzida, fornecendo 130,7 g de um extrato sólido de coloração marrom escura, denominado ARFE. O fluxograma 3 (Pág. 218) contém uma síntese do fracionamento deste último extrato de *A. rigida* e conseqüente isolamento dos componentes desse extrato.

##### 5.4.2. Partição de ARFE e isolamento de **AR-1 (rutina)**

Uma alíquota de 30 g do extrato etanólico de *A. rigida* (ARFE) foi solubilizada em 50 mL de metanol. Em seguida foram adicionados à mistura 100 mL de água, o que provocou a precipitação de um sólido viscoso de coloração escura, sendo o mesmo então separado da porção líquida. Ao precipitado foram adicionados 40 mL de MeOH e, mesmo não tendo sido observada completa dissolução, provocou-se novamente a precipitação pela adição de 80 mL de água. Separou-se o precipitado que, depois de seco, resultou num sólido amorfo verde claro de massa 8,5 g. A análise deste sólido por CCD, empregando irradiado por luz UV (254 e 365 nm) na revelação das substâncias presentes nas cromatoplas analíticas, revelou um componente majoritário que emitia coloração vermelha intensa, típica da clorofila presente nas folhas. As porções solúveis do extrato etanólico foram reunidas, e o volume resultante foi transferido para um funil de separação de capacidade 1 L e foi extraído com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol, fornecendo as seguintes frações:

ARFE-H (510,7 mg), ARFE-C (2,3 g), ARFE-A (5,4 g) e ARFE-B (5,9 g). A fase aquosa remanescente (6,5 g) foi denominada ARFE-Aq.

Durante a concentração do solvente n-butanol, na obtenção da fração ARFE-B, observou-se a formação de um precipitado amorfo de cor amarela, que foi separado da água mãe por filtração e denominado **AR-1** (25,2 mg). A análise espectroscópica descrita na Pág. 134 e a posterior comparação dos dados obtidos com dados descritos na literatura permitiram identificá-la como sendo o flavonóide **rutina**.

#### 5.4.3. Tratamento cromatográfico de ARFE-C

A fração ARFE-C (2,3 g) foi adsorvida em aproximadamente 4,0 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 19,0 g de gel de sílica em coluna cromatográfica de 4,5 cm de diâmetro. Utilizou-se como eluentes diclorometano, acetato de etila e metanol nas seguintes proporções: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100%, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 25% , CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 75%, AcOEt 100%, AcOEt/MeOH 50%, MeOH 100%. O procedimento forneceu 6 frações (200 mL cada), uma para cada eluente empregado. A tabela 63 (abaixo) contém a descrição destas frações.

Tabela 63 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de ARFE-C

<b>FRAÇÃO</b>	<b>ASPECTO</b>	<i>MASSA (mg)</i>
1	Sólido amorfo marrom	127,0
2	Resina verde escura	861,3
3	Resina marrom escura	320,0
4	Resina marrom escura	135,0
5	Resina marrom escura	403,0
<b>6</b>	Resina marrom escura	220,0

A fração 2 apresentou-se como um precipitado amarelo claro que foi separado por filtração e denominado de ARFE-C2ppt (24,1 mg).

#### 5.4.4. Purificação de ARFE-C2ppt: isolamento de **AR-2 (genkwanina)**

Uma alíquota de 12,0 mg da fração ARFE-C2ppt foi submetida à cromatografia de exclusão em gel de Sephadex LH-20. A amostra foi solubilizada numa mistura de clorofórmio (1 mL) e metanol (2 mL), acondicionada sobre uma coluna (2,0 cm de diâmetro) de 15,0 g de Sephadex LH-20 e eluída com metanol, numa vazão de aproximadamente 0,5 mL/min. No procedimento foram coletadas 13 frações de 5 mL cada. Estas foram comparadas por CCD e as semelhantes foram reunidas na forma como se encontra descrito na tabela 64 (abaixo).

Tabela 64 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de ARFE-C2ppt

<b>FRAÇÃO</b>	<b>ASPECTO</b>	<i>MASSA (mg)</i>
1-2	Sólido amorfo branco	0,9
2-4	Sólido amorfo amarelo	0,7
5-6	Sólido amorfo amarelo	0,5
7-10	Sólido amorfo amarelo	7,8
<b>11-13</b>	Sólido amorfo amarelo	1,4

A fração 7-10 apresentou-se uniforme em CCD e foi denominada **AR-2**. Após análise de suas constantes espectroscópica e físicas (Pág. 143), seguida de comparação dos dados obtidos com dados da literatura, a substância foi caracterizada como a flavona **genkwanina**.

#### 5.4.5. Tratamento cromatográfico de ARFE-C2

A fração ARFE-C2 (861,3 mg) (Pág. 211), com o aspecto de uma resina verde escura, foi submetida à cromatografia de exclusão em gel de Sephadex LH-20. Para realização do procedimento, a amostra foi dissolvida numa mistura de metanol (2 mL) e clorofórmio (1 mL), acondicionada sobre uma coluna (2,5 cm de diâmetro) de 20,0 g de Sephadex LH-20 e eluída com metanol, numa vazão de aproximadamente 0,5 mL/min. Foram coletadas 30 frações de 5 mL cada. Todas foram, posteriormente, analisadas por CCD permitindo a junção

das frações idênticas, o que resultou ao final em 9 frações, como se observa na tabela 65 (abaixo).

Tabela 65 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de ARFE-C2

<b>FRAÇÃO</b>	<b>ASPECTO</b>	<b>MASSA (mg)</b>
1-2	Resina verde clara	7,1
3-4	Resina verde clara	74,0
5-7	Resina verde escura	443,6
8-9	Resina marrom escura	162,7
10-13	Resina marrom escura	80,3
14-15	Resina marrom escura	11,2
16-22	Sólido amorfo amarelo claro	27,3
23-28	Sólido amorfo amarelo claro	34,1
<b>29-30</b>	Sólido amorfo amarelo claro	5,3

#### 5.4.6. Purificação de ARFE-C2(10-13): isolamento de **AR-3** (cafeato de etila)

A fração ARFE-C2(10-13) (80,3 mg) foi acondicionada numa coluna de vidro (diâmetro: 2 cm) contendo 17,0 g do gel de sílica “flash”. O processo de eluição, empregando como solventes hexano, AcOEt e MeOH, numa ordem crescente de polaridade, da forma como está descrito na tabela 66 (abaixo).

Tabela 66 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de ARFE-C2(10-13)

<b>FRAÇÃO</b>	<b>ELUENTE</b>
1-2	Hexano/acetato de etila 20%
3-23	Hexano/acetato de etila 40%
24-32	Hexano/acetato de etila 60%
33-42	Acetato de etila 100%
43-50	Metanol 100%

As 50 frações (10 mL cada) coletadas no procedimento de eluição foram analisadas em CCD. As frações semelhantes foram reunidas, resultando em 7 frações, como descrito na tabela 67 (abaixo).

Tabela 67 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de ARFE-C2(10-13)

<b>FRAÇÃO</b>	<b>ASPECTO</b>	<b>MASSA (mg)</b>
1-4	Sólido amorfo marrom claro	6,3
5-14	Sólido amorfo marrom escuro	28,0
15-16	Sólido amorfo marrom claro	1,2
17-25	Sólido amorfo marrom claro	3,7
26-37	Sólido amorfo marrom escuro	11,0
38-46	Sólido amorfo marrom claro	3,2
<b>47-50</b>	Sólido amorfo marrom escuro	19,3

A fração 5-14, que recebeu o código **AR-3**, foi analisada por métodos espectroscópicos (Pág. 152) e os dados obtidos foram comparados com dados da literatura, o que demonstrou que a mesma tratava-se do **éster etílico do ácido cafeico**.

#### 5.4.7. Purificação de ARFE-C2(23-28): isolamento de **AR-4 (canferol)**

À fração ARFE-C2(23-28) (34,1 mg) (Pág. 213) foi adicionado gel de sílica para cromatografia “flash” na proporção de 1:1 em massa (aproximadamente). A mistura foi pulverizada em gral de porcelana e depositada sobre uma coluna de 13 g (2 cm de diâmetro) do mesmo tipo de gel de sílica. Para o processo de eluição foram empregados os seguintes solventes nas proporções apresentadas: hexano/AcOEt 35% (frs.: 1 à 24), hexano/AcOEt 50% (frs.: 25 à 44) e MeOH 100% (frs.: 45 à 50). Todas as frações coletadas (10 mL cada) foram comparadas por CCD e as que se apresentaram semelhantes foram reunidas. A tabela 68 (Pág. 215) apresenta aspectos e massas das 7 frações resultantes da reunião.

Tabela 68 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de ARFE-C2(23-28)

FRAÇÃO	ASPECTO	MASSA (mg)
1-3	Sólido amorfo amarelo claro	1,1
4-5	Sólido amorfo amarelo claro	2,5
6-12	Sólido amorfo amarelo claro	11,6
13-26	Sólido amorfo marrom claro	8,6
27-30	Sólido amorfo amarelo claro	2,9
31-46	Sólido amorfo amarelo claro	4,2
47-50	Sólido amorfo marrom escuro	1,3

A fração 6-12 (11,6 mg), denominada **AR-4**, apresentou um “spot” uniforme em CCD e foi, então, submetida à análise espectroscópica. Os dados obtidos nesta análise foram comparados com dados presentes na literatura e revelaram que a substância se tratava do flavonol **canferol**.

#### 5.4.8. Tratamento cromatográfico de ARFE-A

A fração ARFE-A (Pág. 210), obtida de partição do extrato etanólico das folhas de *A. rigida* (com o aspecto de uma resina marrom escura), foi submetida à cromatografia de exclusão em gel de Sephadex LH-20. Para realização do procedimento, uma alíquota de 3,05 g foi dissolvida em 8 mL de metanol, depositada sobre uma coluna (5,0 cm de diâmetro) de 50,0 g de Sephadex LH-20 e eluída com metanol, numa vazão de aproximadamente 0,5 mL/min. Foram coletadas 34 frações de 10 mL cada. Todas foram, posteriormente, analisadas por CCD permitindo a junção das frações idênticas, o que resultou ao final em 8 frações, como se observa na tabela 69 (abaixo).

Tabela 69 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de ARFE-A

FRAÇÃO	ASPECTO	MASSA (mg)
1-3	Sólido amorfo marrom escuro	301,5
4-6	Resina marrom escura	624,0
7-8	Sólido amorfo marrom claro	451,7
9-11	Sólido amorfo marrom escuro	280,2

12-16	Sólido amorfo marrom escuro	388,1
17-20	Sólido amorfo vermelho escuro	114,7
21-33	Sólido amorfo marrom escuro	335,2
<b>34</b>	Sólido amorfo marrom claro	314,9

#### 5.4.9. Purificação de ARFE-A9-11: isolamento de **AR-5 (3,4,3',4'-tetra-hidroxibifenila)**

A fração ARFE-A9-11 (280,2 mg) foi misturada a, aproximadamente, 0,3 g de gel de sílica para cromatografia “flash”. A mistura foi pulverizada em gral de porcelana e acondicionada numa coluna de vidro (diâmetro: 2 cm) recheada com 18,5 g do mesmo tipo de gel de sílica. O processo de eluição foi realizado com os solventes clorofórmio e metanol nas seguintes proporções: CHCl<sub>3</sub>/MeOH 15% (frs.: 1 a 15); CHCl<sub>3</sub>/MeOH 25% (frs.: 16 a 37); CHCl<sub>3</sub>/MeOH 50% (frs.: 38 a 50). As 50 frações (10 mL cada) coletadas foram analisadas em CCD e reunidas de acordo com as suas semelhanças como se observa na tabela 70 (abaixo).

Tabela 70 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de ARFE-A9-11

<b>FRAÇÃO</b>	<b>ASPECTO</b>	<i>MASSA (mg)</i>
1-5	Sólido amorfo amarelo claro	1,8
6-9	Sólido amorfo verde escuro	4,7
10-18	Sólido amorfo vermelho escuro	19,0
19-32	Sólido amorfo vermelho escuro	38,5
33-41	Sólido amorfo vermelho escuro	15,5
<b>42-50</b>	Sólido amorfo vermelho escuro	136,2

A fração 6-9 (4,7 mg), que recebeu o código **AR-5**, foi analisada por métodos espectroscópicos (Pág. 164) e os dados obtidos comparados com dados da literatura, o que demonstrou que a mesma tratava-se do **3,4,3',4'-tetra-hidroxibifenila**.

#### 5.4.10. Purificação de ARFE-A12-16: isolamento de **AR-6 (quercetina)** e **AR-7 (procionidina A-2)**



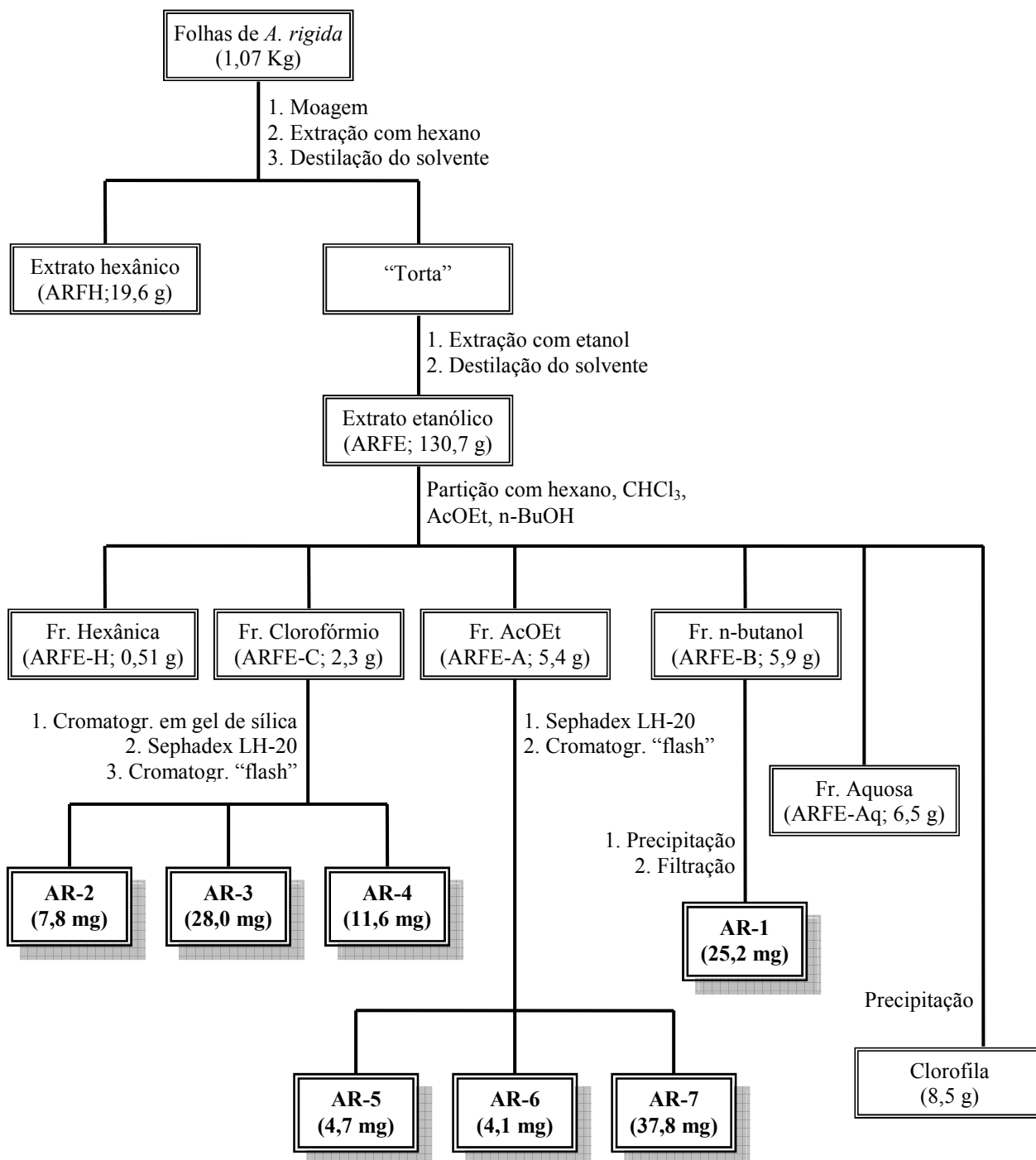
A fração ARFE-A12-16 (388,1 mg) foi submetida à cromatografia do tipo “flash”. À fração foi adicionado gel de sílica para o tipo de cromatografia em questão, na proporção de 1:1 (massa/massa), aproximadamente. A mistura foi pulverizada em gral de porcelana e depositada sobre uma coluna de 18,5 g do mesmo tipo de gel de sílica (diâmetro: 2 cm). Fez-se a eluição empregando clorofórmio e metanol como solventes, nas seguintes proporções: CHCl<sub>3</sub>/MeOH 20% (frs.: 1 a 13); CHCl<sub>3</sub>/MeOH 30% (frs.: 14 a 40); CHCl<sub>3</sub>/MeOH 50% (frs.: 41 a 57). As 57 frações (10 mL cada) coletadas foram analisadas em CCD e reunidas em 9 frações resultantes (Tab. 71, abaixo).

Tabela 71 – Frações resultantes do tratamento cromatográfico de ARFE-A12-16

<b>FRAÇÃO</b>	<b>ASPECTO</b>	<b>MASSA (mg)</b>
1-2	Sólido amorfo amarelo claro	1,2
3	Sólido amorfo amarelo claro	1,9
4-7	Sólido amorfo amarelo claro	4,1
8-10	Sólido amorfo vermelho escuro	17,3
11-18	Sólido amorfo vermelho escuro	37,8
19-23	Sólido amorfo vermelho escuro	43,3
24-28	Sólido amorfo vermelho escuro	25,5
29-40	Sólido amorfo vermelho escuro	36,8
<b>41-57</b>	Sólido amorfo vermelho escuro	184,1

A fração 1-2 (1,2 mg) foi comparada em CCD com a fração AR-4 (Pág. 215) e demonstrou ter o mesmo R.f. Após sua análise em RMN <sup>1</sup>H, concluiu-se que ambas são idênticas. As frações 4-7 (4,1 mg) e 11-18 (37,8 mg), que receberam os códigos **AR-6** e **AR-7**, respectivamente, foram analisadas por métodos espectroscópicos (Pág. 170 e Pág. 177) e os dados obtidos comparados com dados da literatura, o que demonstrou que a primeira tratava-se do flavonol **quercetina** e a segunda da **procianidina A-2**.

Fluxograma 3. Isolamento de **AR-1**, **AR-2**, **AR-3**, **AR-4**, **AR-5**, **AR-6** e **AR-7** a partir do extrato etanólico dos talos de *A. rigida*.



## 6. TESTES DE ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

### 6.1. Atividade Antifúngica

Os ensaios com as amostras **AM-2**, **AM-3**, **AR-3** e **AR-7** foram realizados no Laboratório de Farmacognosia da UNB, coordenado pela professora Laila Salmen Espindola; enquanto os testes com as amostras **AM-7** e **AM-8** foram realizados no Laboratório de Toxinas Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC), sob a supervisão da professora Ilka Maria Vasconcelos.

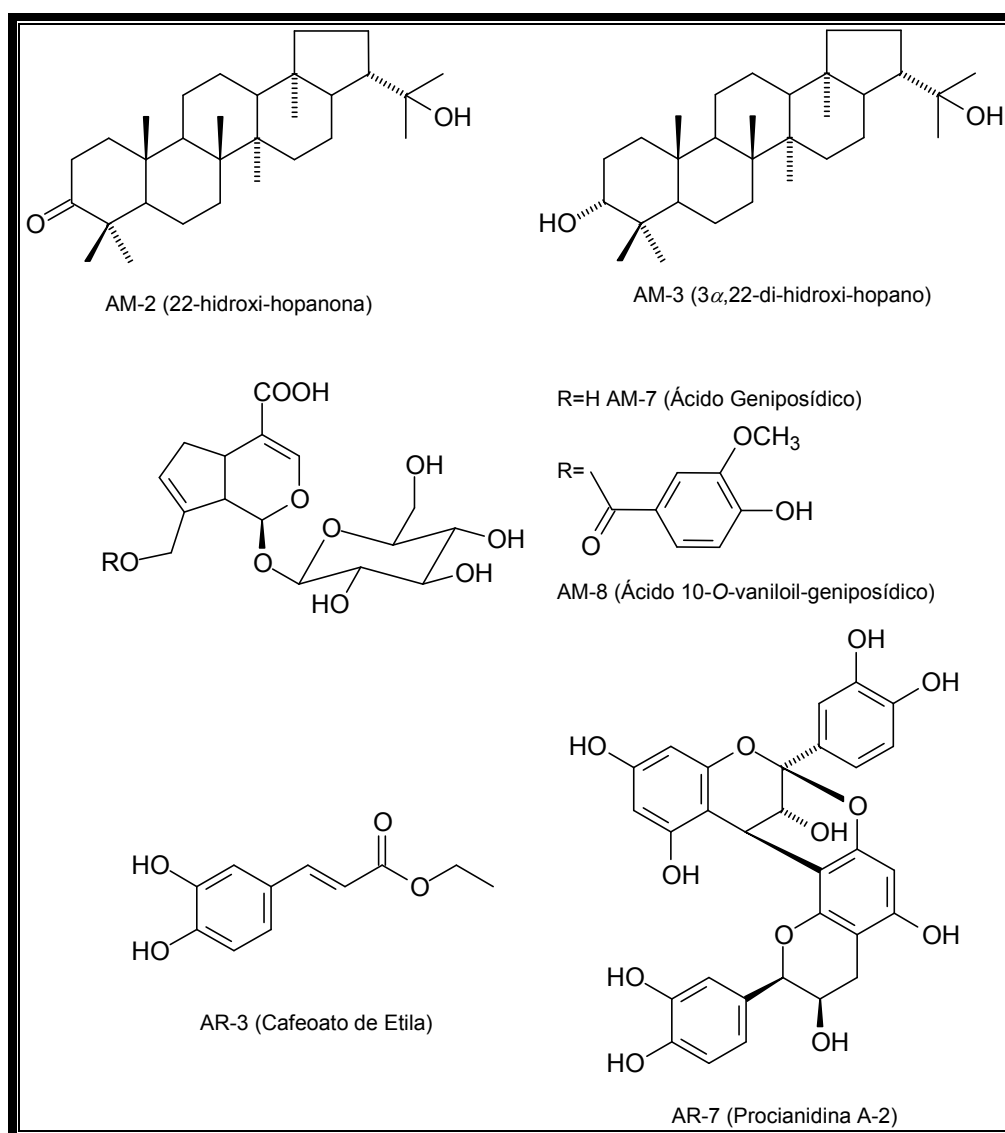


Figura 172 – Estruturas das substâncias utilizadas nos Testes Farmacológicos

### 6.1.1. Testes de atividade fungitóxica com as amostras AM-2, AM-3, AR-3 e AR-7.

#### 6.1.1.1. Procedimento

Adotou-se a metodologia utilizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para teste de diluição em caldo para fungos filamentosos (CLSI, M38-A) e para leveduras (CLSI, M27-A2).

Foram utilizadas duas espécies de leveduras: *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida albicans* (ATCC 10231), ambas da American Type Culture Collection e quatro isolados clínicos de dermatófitos: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum*. Todas as cepas foram fornecidas pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal do Goiás. Os microrganismos foram mantidos em Agar Batata Dextrose inclinado à temperatura ambiente.

Com relação à preparação dos controles, o controle positivo empregado no teste foi o antifúngico Itraconazol utilizando uma solução estoque preparada a partir de Itraconazol diluído em DMSO, filtrado com filtro Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$  e mantida em freezer  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (concentração de 1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A solução estoque foi, então, diluída em meio RPMI para alcançar uma concentração de 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

O meio de cultura utilizado no teste foi o meio RPMI 1640, preparado a partir da base desidratada disponível comercialmente (4,16 g para 400 mL de água desionizada). Com auxílio de um potenciômetro previamente calibrado, o meio foi tamponado com ácido 3-[N-morfolino]-propoanossulfônico (MOPS) 0,165 M (6,9 g em 200 mL de água deionizada) até alcançar pH 7,0. O meio de cultura ajustado foi esterilizado em cabine de fluxo laminar com auxílio de um sistema de filtração a vácuo com membrana em éster de celulose e 0,22  $\mu\text{m}$  de poro. O meio foi mantido a  $4^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

Para controle de esterilidade do meio RPMI, foram retiradas duas alíquotas de aproximadamente 100  $\mu\text{L}$  do meio recém-preparado, transferidas para tubo de ensaio contendo caldo BHI. Os tubos foram colocados em estufa a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 48h. Após esse período, caso não se verificasse crescimento de microrganismo, o meio era liberado para uso.

As amostras foram diluídas em DMSO e, em seguida, foram novamente diluídas em meio RPMI até alcançarem uma concentração de 4  $\text{mg}/\text{mL}$  e DMSO  $< 5\%$ .

Para preparar os inóculos, uma solução salina (0,9%) esterilizada em autoclave foi utilizada. No caso do fungo leveduriforme, uma porção da massa celular foi transferida para tubo com solução salina até a turbidez coincidir com a da solução padrão de McFarland 0,5. Em seguida esse inóculo foi diluído em meio RPMI em uma diluição 1:100, seguida de outra diluição de 1:20, resultando em uma concentração de  $5,0 \times 10^2$  a  $2,5 \times 10^3$  células/mL. No caso dos fungos filamentosos, a solução salina foi vertida para o tubo contendo o meio inoculado, a superfície fúngica foi raspada até a turbidez coincidir com a solução padrão de McFarland 0,5 e o inóculo foi transferido para o tubo original. Esse inóculo é diluído em meio RPMI em uma diluição de 1:5, resultando em uma concentração de  $1,0 \times 10^6$  a  $5,0 \times 10^6$  células/mL.

O teste propriamente dito foi realizado da seguinte forma: em cabine de fluxo laminar, foram distribuídos 100  $\mu$ L do meio RPMI em todos os poços de uma microplaca de 96 poços e fundo redondo. Em seguida, foram distribuídos 100  $\mu$ L das amostras e controle positivo apenas nos primeiros poços da placa. Foram feitas diluições seriadas com auxílio de uma pipeta multicanal em escala 1:2 até o antepenúltimo poço de cada coluna. Os 100  $\mu$ L residuais foram descartados. Por fim, 100  $\mu$ L da suspensão fúngica foram distribuídos em todos os poços, com exceção do último poço que continha apenas meio de cultura e foi destinado para o controle de esterilidade do meio RPMI. O antepenúltimo poço apenas com meio e microrganismo foi destinado para controle de crescimento fúngico. As placas foram tampadas, seladas com filme PVC e incubadas em estufa a 37 °C.

A leitura das placas foi feita verificando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) visualmente, ou seja, verificar a olho nu a menor concentração das amostras capaz de inibir 100% do crescimento do microrganismo.

#### 6.1.1.2. Resultados e discussões

A tabela 72 (Pág. 222) apresenta os resultados das CIMs ( $\mu$ g/mL) de AM-2, AM-3, AR-3 e AR-7 frente às espécies de fungos utilizados no teste. Destas substâncias, AM-2 e AM-3 se mostraram inativas contra todos os fungos. AR-3 foi a que apresentou maior potencial antifúngico, tendo sido extremamente ativa contra todas as espécies testadas, com exceção de *M. gypseum*. AR-7 foi fortemente ativa contra as leveduras, porém fracamente ativa contra *M. canis* e inativa contra as demais cepas.

Observando-se as estruturas das substâncias envolvidas neste teste, vê-se que os compostos aromáticos (AR-3: cafeoato de etila; AR-7: procianidina A-2) foram ativos, enquanto os alifáticos (AM-2 e AM-3: triterpenos de esqueleto hopano) inativos contra os fungos. A literatura descreve o potencial antifúngico do ácido cafeico e de alguns dos seus derivados esterificados (MING *et al*, 2002; HNATYSZYN *et al*, 2007), bem como de proantocianidinas. Entretanto, esse é o primeiro relato da atividade antifúngica do cafeoato de etila e da procianidina A-2. Também não há nenhuma indicação na literatura da atividade antifúngica de triterpenos com esqueleto do tipo hopano.

Tabela 72 – Atividade antifúngica de AM-2, AM-3, AR-3 e AR-7.

FUNGOS	CIM (µg/mL)*			
	AM-2	AM-3	AR-3	AR-7
<b>Leveduras</b>				
<i>Candida albicans</i>	> 125	> 125	15,63	7,81
<i>Candida parapsilosis</i>	> 125	> 125	7,81	0,98
<b>Isolados clínicos de dermatófitos</b>				
<i>Microsporum canis</i>	> 125	> 125	3,91	62,50
<i>Microsporum gypseum</i>	> 125	> 125	125	125
<i>Trichophyton rubrum</i>	> 125	> 125	15,63	125
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	> 125	> 125	15,63	125

\*Os experimentos foram realizados em duplicata; Controle Positivo: Itraconazol.

## 6.1.2. Testes de atividade fungitóxica com as amostras AM-7 e AM-8

### 6.1.2.1. Procedimento

O fungo filamentoso *Colletotrichum gloeosporioides* foi obtido do Departamento de Biologia (UFC), enquanto *Fusarium solani* (URM 3708) and *Aspergillus niger* (URM 3292) foram fornecidos pelo Departamento de Micologia (UFRPE).

O teste de atividade antifúngica contra os fungos citados acima foi realizado em placas de Petri (100 mm x 15 mm) contendo 25 mL de Agar Batata Dextrose. Após o desenvolvimento da colônia de micélios, discos de papel de filtro estéreis (0,6 cm de

diâmetro; Whatman) foram dispostos à distância de 0,5 cm das bordas da colônia. Alíquotas de 75 µL das amostras A-7 e AM-8 (em solução de DMSO 0,1 %) foram adicionadas aos discos. Nistatina e DMSO foram usados como controle positivo e negativo, respectivamente. As placas foram incubadas a 27 °C por 72 horas até que o crescimento micelial tivesse envolvido os discos que continham o controle negativo e se formassem halos de inibição ao redor dos discos que continha as amostras com atividade antifúngica.

#### 6.1.2.2. Resultados e discussões

AM-7 mostrou atividade inibitória no desenvolvimento da massa micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* à concentração de 150 µg/mL (Fig. 173, Pág. 224). O mesmo não foi observado para AM-8, que foi inativa. Além disso, as duas amostras se mostraram inativas contra os demais fungos: *Aspergillus niger* e *Fusarium solani*. Estes resultados demonstram que o tipo de inibição promovida por AM-7 (o iridóide ácido geniposídico) com relação ao desenvolvimento vegetativo dos fungos estudados foi espécie-específica para *Colletotrichum gloeosporioides*. A concentração ativa de AM-7 foi similar ou menor que as relatadas na literatura para outros compostos antifúngicos que são ativos em concentrações que variam de 100 a 300 µg/mL (MELO *et al*, 2005). A atividade antifúngica de iridóides é descrita freqüentemente na literatura (YOUNG *et al*, 1992; GANAPATY *et al*, 2008).

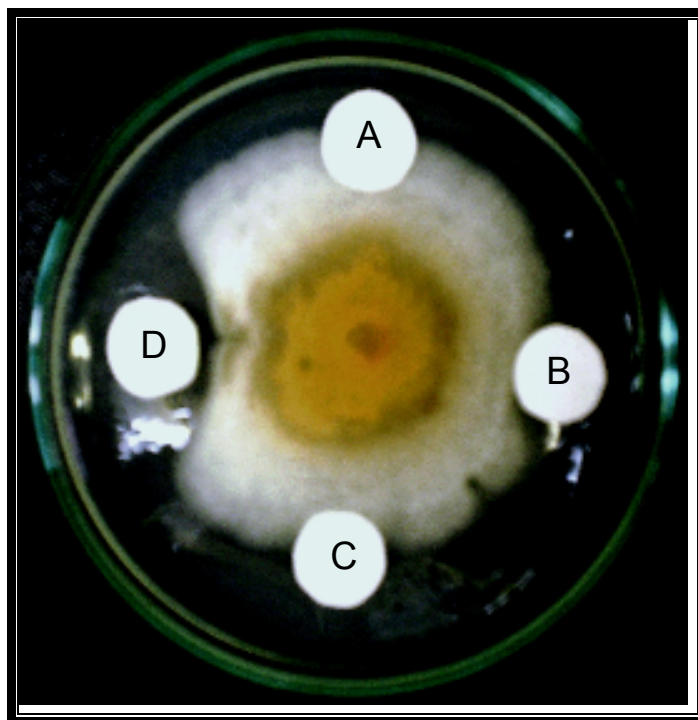


Figura 173 – Teste de inibição do crescimento fúngico. (A) 0,1% DMSO como controle negativo; (B) 150  $\mu\text{g}$  de AM-7; (C) 112,5  $\mu\text{g}$  de AM-8; (D) 2  $\mu\text{g}$  de nistatina como controle positivo.

## 6.2. Atividade Leishmanicida: Ensaios *in vitro*

Os ensaios de atividade leishmanicida foram realizados no laboratório de Farmacognosia da UNB, coordenado pela professora Laila Salmen Espindola.

### 6.2.1. Procedimento

Para a cultura de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, foi utilizada cepa MHOM/BR/87/BA125 isolada de um paciente com leishmaniose cutânea do estado da Bahia, fornecida pelo Instituto Gonçalo Muniz/Fiocruz/Salvador. Os promastigotas foram mantidos em meio Schneider (Sigma) suplementado com 100 U/ml de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina, 10% de soro fetal bovino inativado (Life Technologies, Rockville, MD) e 2% urina humana estéril.



O teste foi realizado da seguinte forma: inicialmente, em uma placa de cultura celular de 96 escavações foi colocado, em cada poço, meio de cultura estéril seguido de uma suspensão de  $10^6$  formas promastigotas dos parasitos. Em seguida, foram adicionados 100 µg/mL das amostras nos primeiros poços. Foi realizada uma diluição seriada e a placa foi incubada por 48 h. Após este período, 10 µL de uma solução de MTT de 5 mg/mL foram adicionados a todos os poços e a placa foi novamente incubada por 4h a 22 °C, protegida da luz. Depois deste período, foram adicionados 100 µL de DMSO para liberação dos cristais de formazan. A placa foi lida em leitor de placa de Elisa no comprimento de 570 nm. Estes experimentos foram realizados em quintuplicata. O  $IC_{50}$  foi determinado pelo programa Prisma GraphPad.

### 6.2.3. Resultados e discussões

O ensaio de atividade leishmancida foi realizado com AM-2, AM-3, AR-3 e AR-7, porém apenas AR-3 mostrou-se ativa contra *Leishmania amazonensis* e seu  $IC_{50}$  ainda não foi calculado. Os resultados obtidos para os triterpenos hopano (AM-2 e AM-3) estão de acordo com a literatura, uma vez que não há relatos desse tipo de atividade biológica para tal sub-classe de compostos. Com relação à atividade apresentada pelo cafeoato de etila (AR-3), apesar de não ser encontrada na literatura nenhuma indicação de atividade leishmanicida para essa substância, alguns outros derivados do ácido cafeico, bem como o próprio ácido são ativos (RADTKE *et al*, 2003; JAYAKUMAR *et al*, 2008). A literatura relata ainda a atividade de proantocianidinas, incluindo a procianidina A-2, contra *Leishmania donovani* (KIDERLEN *et al*, 2001).

## 7. CONCLUSÃO

O estudo químico dos extratos hexânico e etanólico dos talos de *Alibertia myrciifolia* e do extrato etanólico das flores de *A. rigida* resultou na obtenção e caracterização de dezessete constituintes químicos diferentes, pertencentes a várias classes de metabólitos secundários comuns ao gênero *Alibertia*. Para a espécie *A. myrciifolia* foram obtidos dois fitoesteróides, dois triterpenos de esqueleto hopano e um de esqueleto ursano, uma flavona, um fenil-propanóide e três iridóides. De *A. rigida* foram isoladas sete substâncias, sendo cinco flavonóides (três flavonóis, uma flavona e uma proantocianidina), um fenil-propanóide e uma bifênica. A presença de iridóides e triterpenos em *A. myrciifolia* está de acordo com a composição química das espécies de *Alibertia*, uma vez que a literatura descreve um grande número de substâncias destas classes em *A. macrophylla*, *A. edulis* e *A. sessilis* (BROCHINI *et al*, 1994; da SILVA *et al*, 2006, 2007, 2008; YOUNG *et al*, 1992). Porém, este é o primeiro relato do iridóide ácido 10-*O*-vaniloil-geniposídico na literatura, bem como dos dois triterpenos de esqueleto hopano na família Rubiaceae. Além disso, todos os flavonóides isolados das duas espécies são inéditos no gênero *Alibertia*, com exceção da rutina, previamente isolada de *A. sessilis* (OLEA; ROQUE; BOLZANI, 1997).

Testes de atividades fungitóxica e anti-leishmaniose foram realizados com os iridóides ácido geniposídico e ácido 10-*O*-vaniloil-geniposídico, os triterpenos de esqueleto hopano, o éster etílico do ácido cafeico e a procianidina A-2. No teste contra fungos patogênicos (*Candida parapsilosis*, *C. Albicans*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *M. gypseum*.), o ácido geniposídico, o éster etílico do ácido cafeico e a procianidina A-2 indicaram atividade fungitóxica moderada, enquanto os demais compostos foram inativos. Já no teste contra *Leishmania amazonensis*, apenas o éster etílico do ácido cafeico foi ativo.

Os resultados obtidos com os extratos dos talos de *Alibertia myrciifolia* e das folhas de *A. rigida* confirmam o grande potencial químico-botânico-farmacológico de espécies deste gênero e justificam a continuidade dos estudos fitoquímicos para estas espécies.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, P.K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. New York: Elsevier, 1989, 564p.

AHMAD, V.U., RAHMAN, A. **Handbook of Natural Products Data. Pentacyclic triterpenoids**. New York: Elsevier, 1994, v.2.

AHMED, M.S.; GALAL, A.M.; ROSS, S.A.; FERREIRA, D.; ELSOHLY, M.A.; IBRAHIM, A.R.S.; MOSSA, J.S.; EL-FERALY, F.S. A weakly antimalarial biflavanone from *Rhus retinorrhoea*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 4, p. 599-602, 2001.

ALMEIDA, V. L. DE; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quím. Nova.**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

BALDÉ, A.M.; BRUYNE, T.; PIETERS, L.A.; CLAEYS, M.; VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINK, A.J.; WRAY, V.; KOLODZIEJ, H. Proanthocyanidins from Stem Bark of *Pavetta owariensis*, 3. NMR Study of Acetylated Trimeric Proanthocyanidins Possessing a Doubly-Linked Structure. **J. Nat. Prod.**, v. 56, n. 7, p. 1078-1088, 1993.

BALDÉ, A.M.; BRUYNE, T.; PIETERS, L.A.; KOLODZIEJ, H.; VANDEN BERGHE, D.A.; CLAEYS, M.; VLIETINK, A.J. Oligomeric Proanthocyanidins Possessing a Doubly Linked Structure from *Pavetta owariensis*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 3, p. 719-723, 1995a.

BALDÉ, A.M.; BRUYNE, T.; PIETERS, L.A.; KOLODZIEJ, H.; VANDEN BERGHE, D.A.; CLAEYS, M.; VLIETINK, A.J. Tetrameric Proanthocyanidins Containing a Double Interflavonoid (A-type) Linkage from *Pavetta owariensis*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 3, p. 933-938, 1995b.

BALDÉ, A.M.; PIETERS, L.A.; GERGELY, A.; KOLODZIEJ, H.; CLAEYS, M.; VLIETINK, A.J. A-Type Proanthocyanidins from Stem-bark of *Pavetta owariensis*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 1, p. 337-342, 1991a.

BALDÉ, A.M.; PIETERS, L.A.; WRAY, V.; KOLODZIEJ, H.; VANDEN BERGHE, D.A.; CLAEYS, M.; VLIETINK, A.J. Dimeric and Trimeric Proanthocyanidins Possesing a Doubly Linked Structure from *Pavetta owariensis*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 4129-35, 1991b.

- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.P.; DE QUEIROZ, L.P.; DAVID, J.M. A-type proanthocyanidin antioxidant from *Dioclea lasiophylla*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 805-808, 2000.
- BECK, M.A.; HÄBERLEIN, H. Flavonol glycosides from *Eschscholtzia californica*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 2, p. 329-332, 1999.
- BILIA, A.R.; MORELLI, I.; HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Flavans and A-type Proanthocyanidins from *Prunus prostrata*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 4, p. 887-892, 1996.
- BOLZANI, V.S.; TREVISAN, L.M.; YOUNG, M.C.M. Caffeic Acid Esters and Triterpenes of *Alibertia macrophylla*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 6, p. 2089-2091, 1991.
- BROCHINI, C.B.; MARTINS, D.; ROQUE, N.F.; BOLZANI, V.S. An oleanane acid from *Alibertia edulis*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 5, p. 1293-5, 1994.
- CALZADA, F.; CEDILLO-RIVERA, R.; BYE, R.; MATA, R. Geranins C e D, Additional New Antiprotozoal A-type Proanthocyanidins from *Geranium niveum*. **Planta Med.**, v. 67, n. 7, p. 677-680, 2001.
- CALZADA, F.; CERDA-GARCÍA-ROJAS, C.M.; MECKES, M.; CEDILLO-RIVERA, R.; BYE, R.; MATA, R. Geranins A and B, New Antiprotozoal A-Type from *Geranium niveum*. **J. Nat. Prod.**, v. 62, n. 5, p. 705-709, 1999.
- CAMPOS, M.T.V.A.; ZAPPI, D.C., CALIÓ, M.F.; PIRANI, J.R. Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais: Rubiaceae. **Bol. Bot. Univ. São Paulo**, v. 24, p. 41-67, 2006.
- CORRÊA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1984, v. 4 e v. 5.
- da SILVA, V.C.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M.; LOPES, M.N. A New Antifungal Phenolic Glycoside Derivative, Iridoids and Lignans from *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. (Rubiaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, n. 7, p. 1405-1409, 2007b.
- da SILVA, V.C.; FARIA, A.O.; BOLZANI, V.S.; LOPES, M.N. A new ent-kaurane diterpene from stems of *Alibertia macrophylla* K. Schum. (Rubiaceae). **Helv. Chim. Acta**, v. 90, n. 9, p. 1781-1785, 2007a.

da SILVA, V.C.; GIANNINI, M.J.S.M.; CARBONE, V.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; BOLZANI, V.S.; LOPES, M.N. New antifungal terpenoid glycosides from *Alibertia edulis* (Rubiaceae). **Helv. Chim. Acta**, v. 91, n. 7, p.1355-1362, 2008.

da SILVA, V.C.; SILVA, G.H.; BOLZANI, V.S.; LOPES, M.N. Isolation of lignans glycosides from *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. (Rubiaceae) by preparative high-performance liquid chromatography. **Eclética Quím.**, v. 31, n. 4, p. 55-58, 2006.

DELPRETE, P.G. **Flora Neotropica. Monograph 77. Rondeletieae (Rubiaceae) – Part I.** New York Botanical Garden, New York. 1999

DIXON, R.A., SHARMA, S.B., XIE, D. Proanthocyanidins- a final frontier in flavonoid research? **New Phytol.**, v.165, p. 9-28, 2005.

DREWES, S.E.; TAYLOR, C.W. Methylated A-type Proanthocyanidins and Related Metabolites from *Cassipourea gummiflua*. **Phytochemistry**, v.37, n. 2, p. 551-555, 1994.

ELISABETSKY, E.; AMADOR, T.A.; ALBUQUERQUE, R.R.; NUNES, D.S.; CARVALHO, A.C.T. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd. ex R. & S.) Muell. Arg. alkaloids. **J. Ethnopharmacol.**, v. 48, n. 2, p. 77-83, 1995.

FOO, L.Y.; LU, Y.; HOWELL, A.B.; VORSA, N. A-Type Proanthocyanidin Trimers from Cranberry that Inhibit Adherence of Uropathogenic P-Fimbriated *Escherichia coli*. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 9, p. 1225-1228, 2000.

FOSSEN, T.; PEDERSEN, A.T.; ANDERSEN, O.M. Flavonoids from Red Onion (*Allium cepa*). **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p. 281-285, 1998

GANAPATY, S.; NYAMATHULLA, S.; SRILAKSHMI, G.V.K.; KUMAR, P.V.R. Iridoid compounds and antimicrobial activity of the roots of *Tecoma stans* (L) Juss. **Asian J. Chem.**, v. 20, n. 6, 4493-4497, 2008.

GINER, F.J.A.; CASTILLO, J.B.; FERRERO, M.T.M.; RECINOS, S.P. Compounds from Salvadoran Plants. III. Components of *Baccharis trinervi* Persoon. **Rev. Latinoamer. Quím.**, v.13, n. 2, p. 47-49, 1982.

HATANO, T.; MIYATAKE, H.; NATSUME, M.; OSAKABE, N.; TAKIZAWA, T.; ITO, H.; YOSHIDA, T. Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects. **Phytochemistry**, v. 59, n. 7, p. 749-758, 2002.

HNATYSZYN, O.; JUAREZ, S.; OUVINA, A.; MARTINO, V.; ZACCHINO, S.; FERRARO, G. Phytochemical analysis and antifungal evaluation of *Sebastiania commersoniana* extracts. **Pharm. Biol.**, v. 45, n. 5, 404-406, 2007.

HOSHINO, T.; NAKANO, S.; KONDO, T.; SATO, T.; MIYOSHI, A. Squalene-hopene cyclase: final deprotonation reaction, conformational analysis for the cyclization of (3*R,S*)-2,3-oxidosqualene and further evidence for the requirement of an isopropylidene moiety both for initiation of the polycyclization cascade and for the formation of the 5-membered E-ring. **Org. Biomol. Chem.**, v. 2, p. 1456-1470, 2004.

JAYAKUMAR, A.; DONOVAN, M.J.; TRIPATHI, V.; RAMALHO-ORTIGAO, M.; MCDOWELL, M.A. Leishmania major infection activates NF- $\kappa$  B and interferon regulatory factors 1 and 8 in human dendritic cells. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 5, 2138-2148, 2008.

JENSEN, S.R.; OLSEN, C.; RAHN, K.; RASMUSSEN, J.H. Iridoid Glucosides in *Plantago alpina* e *P. altissima*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 6, p. 1633-1636, 1996.

JOULIE, L.F.; SCHATZ, E.; WARD, M.D.; WEBERA, F.; YELLOWLEESB, L.J. Electrochemical Control of Bridging Ligand Conformation in a Binuclear Complex-A Possible Basis for a Molecular Switch. **J. Chem. Soc. Dalton Trans.**, n. 6, p. 799-804, 1994

KAMIYA, K.; OHNO, A.; HORII, Y.; ENDANG, H.; UMAR, M.; SATAKE, T. A-type proanthocyanidins from the bark of *Parameria laevigata*. **Heterocycles**, v. 60, n. 7, p. 1697-1708, 2003.

KAMIYA, K.; WATANABE, C.; ENDANG, H.; UMAR, M.; SATAKE, T. Studies on the Constituents of Bark of *Parameria laevigata* MOLDENKE. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 49, n. 5, p. 551-557, 2001.

KIDERLEN, A.F.; KAYSER, O.; FERREIRA, D.; KOLODZIEJ, H. Tannins and related compounds: killing of amastigotes of *Leishmania donovani* and release of nitric oxide and tumor necrosis factor  $\alpha$  in macrophages in vitro. **Z. Naturforsch. C**, v. 56, n.5/6, 444-454, 2001.

KISIEL, W.; MICHALSKA, K. Sesquiterpenoids and phenolics from roots of *Cichorium endivia* var. *crispum*. **Fitoterapia**, v. 77, p. 354-357, 2006.

LOU, H.; YAMAZAKI, Y.; SASAKI, T.; UCHIDA, M.; TANAKA, H.; OKA, S. A-type proanthocyanidins from peanut skins. **Phytochemistry**, v. 51, n. 2, p. 297-308, 1999.

LUCIANO, J.H.S.; LIMA, M.A.S.; SOUZA, E.B.; SILVEIRA, E.R. Chemical constituents of *Alibertia myrciifolia* Spruce ex K. Schum. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 32, n. 12, p. 1227-1229, 2004.

MARTIN, F.; HAY, A.E.; CORNO, L.; GUPTA, M.P.; HOSTETTMANN, K. Iridoid glycosides from the stems of *Pithecoctenium crucigerum* (Bignoniaceae). **Phytochemistry**, v. 68, n. 9, p. 1307-1311, 2007.

MEHTA, M.; KAUR, N.; BHUTANI, K.K. Determination of marker constituents from *Cissus quadrangularis* Linn. and their quantitation by HPTLC and HPLC. **Phytochem. Analysis**, v. 12, n. 2, p. 91-95, 2001.

MELO, A.C.; MOURA, E.; ANSELMO, G.; MESQUITA, M.; AQUINO, M.; COSTA, R.M. **NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

MELO, V.M.M.; VASCONCELOS, I.M.; GOMES, V.M.; DA CUNHA, M.; SOARES, A.A.; OLIVEIRA, J.T.A. A cotyledonary agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus niger* and impairs glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Plant. Sci.**, v. 169, n. 3, p. 629-639, 2005.

MILITÃO, G.C.G., PESSOA, C. do Ó, COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.E.A., MORAES, M.O.; LUCIANO, J.H.S., LIMA, M.A.S., SILVEIRA, E.R. Cytotoxicity of Flavonoids Isolated from *Alibertia myrciifolia*. **Pharm. Biol.**, v. 43, n. 5, p. 480-484, 2005.

MING, D.S.; LOPEZ, A.; HILLHOUSE, B.J.; FRENCH, C.J.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G. H.N. Bioactive constituents from *Iryanthera megistophylla*. **J. Nat. Prod.**, v. 65, n. 10, 1412-1416, 2002.

MORIMOTO, S.; NONAKA, G.I.; NISHIOKA, I. Tannins and Related Compounds. LIX.<sup>1)</sup> Aesculitannins, Novel Proanthocyanidins with Doubly-Bonded Structures from *Aescullus hippocastanum* L. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 35, n. 12, p. 4717-4729, 1987.

NINO, J.; NARVAEZ, D.M.; MOSQUERA, O.M.; CORREA, Y.M. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from colombian biodiversity. **Braz. J. Microbiol.**, v. 37, n. 4, p. 566-570, 2006 .

OLEA, R.S.G.; ROQUE, N.F.; BOLZANI, V.S. Acylated Flavonols Glycosides and Terpenoids from the Leaves of *Alibertia sessilis*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 8, n. 3, p. 257-259, 1997.

PEREIRA, M.S.; BARBOSA, M.R.V. A família Rubiaceae na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. Subfamílias Antirheoideae, Cinchonoideae e Ixoroideae. **Acta Bot. Bras.**, v. 18, n. 2, p. 305-318, 2004.

PERSSON, C. Phylogeny of the Neotropical *Alibertia* Group (Rubiaceae), with Emphasis on the Genus *Alibertia*, Inferred from ITS and 5S Ribosomal DNA Sequences. **Am. J. Bot.**, v. 87, p. 7, p. 1018-1028, 2000.

PORTER, L.J.; MA, Z.; CHAN, B.G. Cacao Procyanidins: Major Flavonoids and Identification of Some Minor Metabolites. **Phytochemistry**, v. 30, n. 5, p. 1657-1663, 1991.

PRASAD, D. Two A-type proanthocyanidins from *Prunus armeniaca* roots. **Fitoterapia**, v. 71, n. 3, p. 245-253, 2000.

PRASAD, D.; JOSHI, R.K.; PANT, G.; RAWAT, M.S.M.; INOUE, K.; SHINGU, T.; HE, Z.D. An A-Type Proanthocyanidin from *Prunus armeniaca*. **J. Nat. Prod.**, v. 61, n. 3, p. 1123-1125, 1998.

RADTKE, O.A.; FOO, L.Y.; LU, Y.; KIDERLEN, A.F.; KOLODZIEJ, H. Evaluation of sage phenolics for their antileishmanial activity and modulatory effects on interleukin-6, interferon and tumour necrosis factor- $\alpha$ -release in RAW 264.7 cells. **Z. Naturforsch. C**, v. 58, n. 5/6, 395-400, 2003.

RAWAT, M.S.M.; PANT, G.; PRASAD, D.; JOSHI, R.K.; PANDE, C.B. Plant Growth Inhibitors (Proanthocyanidins) from *Prunus armeniaca*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 26, n. 1, p. 13-23, 1998.

RAWAT, M.S.M.; PRASAD, D.; JOSHI, R.K.; PANT, G. Proanthocyanidins from *Prunus armeniaca* roots. **Phytochemistry**, v.50, n. 2, p. 321-324, 1999.

RIBEIRO, J.E.L.S. et al. Flora da Reserva Ducke: **Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra Firme na Amazônia Central**. Manaus: Inpa, 1999, 816p.



RUIZ, A.L.T.G.; MAGALHÃES, A.F.; FARIA, A.D.; MAGALHÃES, E.G.; AMARAL, M.C.E. New Hopane Triterpene from *Eleocharis sellowiana* (Cyperaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 17, n. 4, p. 803-806, 2006.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, .P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5.ed. rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.

SMEJKALOVA, D.; CONTE, P.; PICCOLO, A. Structural Characterization of Isomeric Dimers from the Oxidative Oligomerization of Catechol with a Biomimetic Catalyst. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 737-743, 2007.

STEVENS, J.F.; WOLLENWEBER, E.; IVANCIC, M.; HSU, V.L.; SUNDBERG, S.; DEINZER, M.L. Leaf surface Flavonoids of *Chrysothamnus*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 771-780, 1999.

SUN, Y.; OUYANG, J.; DENG, Z.; LI, Q.; LIN, W. Structure elucidation of five new iridoid glucosides from the leaves of *Avicennia marina*. **Magn. Res. Chem.**, v. 46, n. 7, p. 638-642, 2008.

TUNDIS, R., DEGUIN, B., MENICHINI, F., TILLEQUIN, F. Iridoids from *Putoria calabrica*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 30, n. 7, p. 689-691, 2002.

VEGA, M.R.G.; ESTEVES-SOUZA, A.; VIEIRA, I.J.C.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. Flavonoids from *Annona dioica* Leaves and their Effects in Ehrlich Carcinoma Cells, DNA-topoisomerase I and II. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, n. 8, p. 1554-1559, 2007

XIE, B.J.; YANG, S.P.; YUE, J.M. Terpenoids from *Dysoxylum densiflorum*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2993-2997, 2008.

XIE, D.Y.; DIXON, R.A. Proanthocyanidin Biosynthesis – Still More Questions Than Answers? **Phytochemistry**, v. 66, p. 2127-2144, 2005.

YANG, X.W.; MA, Y.L.; HE, H.P.; WANG, Y.H.; DI, Y.T.; ZHOU, H.; LI, L.; HAO, X.J. Iridoid Constituents of *Tarenna attenuate*. **J. Nat. Prod.**, v. 69, n. 9, p. 971-974, 2006.

YOUNG, M.C.M.; BRAGA, M.R.; DIETRICH, S.M.C.; GOTTLIEB, H.E.; TREVISAN, L.M.V.; BOLZANI, V.S. Fungitoxic Non-glycosidic Iridoids from *Alibertia macrophylla*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3433-3435, 1992.

ZAHIR, A.; JOSSANG, A; BODO, B. DNA Topoisomerase I Inhibitors: Cytotoxic Flavones from *Lethedon tannaensis*. **J. Nat. Prod.**, v. 59 (7), 701-703, 1996.