



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO DA
ESPÉCIE *Capraria biflora* L. (SCROPHULARIACEAE)**

Luciana Gregório da Silva Souza

Fortaleza

2011

LUCIANA GREGÓRIO DA SILVA SOUZA

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO DA
ESPÉCIE *Capraria biflora* L. (SCROPHULARIACEAE)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Química

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Profa. Dra. Telma Leda G. de Lemos

Fortaleza

2011

S716c Souza, Luciana Gregório da Silva

Contribuição ao estudo fitoquímico da espécie *Capraria biflora* L.
(Scrophulariaceae) / Luciana Gregório da Silva Souza. – 2011.
126 f. : il. color., enc.

Orientadora: Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos

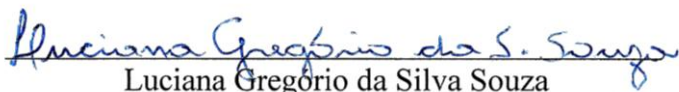
Área de concentração: Química Orgânica

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de
Ciências. Depto. de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza, 2011.

1. Química vegetal 2. **Capraria biflora** 3. Scrophulariaceae I. Lemos,
Telma Leda Gomes de (Orient.) II. Universidade Federal do Ceará –
Programa de Pós-Graduação em Química III. Título


CDD 547

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

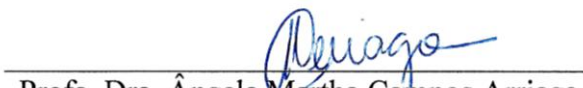

Luciana Gregório da Silva Souza

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 22/07/2011


EXAMINADORES:



Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará – UFC



Profa. Dra. Ângela Martha Campos Arriaga
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Hécio Silva dos Santos
Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente e ter me dado saúde e força para superar os obstáculos.

Aos meus pais que sempre acreditaram em mim, me apoiaram em todas as decisões sem medir esforços, para que eu chegasse até aqui.

À toda minha família pelo apoio e incentivo.

À professora Telma Leda Gomes de Lemos pela dedicação e empenho na orientação e elaboração deste trabalho.

Ao professor Raimundo Braz-Filho por sua amizade e empenho na determinação estrutural das substâncias

Ao meu noivo Paulo, que além de colega e amigo ocupa um lugar muito importante na minha vida, por todo amor, incentivo e companheirismo que a mim dedica.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Química.

Aos meus colegas e amigos de laboratório pelo auxílio nos momentos de necessidade, pela amizade e por tornarem os momentos de trabalho no laboratório, bem mais divertidos: Leo Alcântara, Leo Carvalho, Ayla, Luciana Bertini, Leila, Cleane, Anderson, Patrícia, Karina, André, Juliana, Felipe.

Aos operadores dos aparelho de ressonância: Luciana Lucas e Ayla.

Aos operadores do massa de alta resolução: Isabel, Ceíça e Elton.

À CAPES, pela bolsa concedida e ao CNPq e FUNCAP, pelo suporte financeiro ao curso de Pós-Graduação.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
RESUMO.....	XIV
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS.....	3
2.1- Considerações Botânicas sobre a família Scrophulariaceae.....	3
2.2- Considerações Botânicas sobre o gênero <i>Capraria</i>	3
2.3- Considerações Botânicas sobre a espécie <i>Capraria biflora</i>	4
3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO.....	6
3.1- Iridóides de Scrophulariaceae registrados na literatura.....	6
4- CONSTITUINTES VOLÁTEIS.....	17
4.1- Identificação dos componentes voláteis das folhas de <i>C. biflora</i>	17
5- DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL.....	21
5.1- Determinação estrutural de CBR-1.....	21
5.2- Determinação estrutural de CBR-2.....	27
5.3- Determinação estrutural de CBC-1.....	36
5.4- Determinação estrutural de CBC-2.....	40
5.5- Determinação estrutural dos derivados acetilados CBC-2Ac1 e CBC-2Ac2.....	56
6- DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA CONTRA O <i>Aedes aegypti</i>...	73
7- PARTE EXPERIMENTAL.....	75
7.1- Material.....	75
7.2- Métodos de análise.....	75

7.2- Métodos de análise.....	
7.2.1- Métodos cromatográficos.....	75
7.2.2- Métodos espectroscópicos.....	75
7.3- Métodos físicos.....	76
7.3.1- Determinação de ponto de fusão (PF).....	76
7.3.2- Rotação ótica.....	77
7.4- Estudo dos constituintes voláteis de <i>C. biflora</i>	77
7.4.1- Obtenção do óleo essencial das folhas <i>C. biflora</i>	77
7.5- Estudo dos constituintes fixos de <i>C. biflora</i>	79
7.5.1- Obtenção do Extrato Éter de Petróleo das Raízes (EEPR).....	79
7.5.2- Fracionamento cromatográfico de EEPR - Isolamento de CBR-1.....	79
7.5.3- Fracionamento cromatográfico de F 2-5.....	80
7.5.4- Fracionamento cromatográfico de F 2-5 (10-33) - Isolamento de CBR-2.....	80
7.5.5- Fracionamento do extrato etanólico do caule (EEC) - Isolamento de CBC-1.....	83
7.5.6- Fracionamento cromatográfico de FAC.....	83
7.5.7- Fracionamento cromatográfico de FAC-A.....	83
7.5.8- Fracionamento cromatográfico de FAC-A 17-20 – Isolamento de CBC-2.....	84
7.5.9- Reação de acetilação de CBC-2.....	85
7.6- Avaliação da atividade larvicida (contra o <i>Aedes aegypti</i>) do óleo essencial e hidrolato de <i>C. biflora</i>	85

8- CONCLUSÃO.....	87
9- CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROMÉTRICOS.....	88
10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CCD- Cromatografia em Camada Delgada

DEPT- Distortionless Enhancement by polarization Transfer

EM- Espectrometria de Massa

HMBC- Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HSQC- Heteronuclear Single Quantun Coherence

RMN ¹³C- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN ¹H- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

IV- Infravermelho

IDH- Índice de Deficiência de Hidrogênio

EEPR- Extrato Éter de Petróleo das Raízes

EEC- Extrato Etanólico do Caule

FHC- Fração Hexânica do Caule

FAC- Fração Acetato de etila do Caule

FMC- Fração Metanólica do Caule

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estruturas dos iridóides isolados de espécies da família Scrophulariaceae.....	8
Tabela 2- Iridóides isolados listados por espécie vegetal.....	13
Tabela 3- Constituintes voláteis das folhas de <i>C. biflora</i>	17
Tabela 4- Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C-BB de CBR-1 com padrão de hidrogenação (RMN ¹³ C-BB e DEPT 135°).....	22
Tabela 5- Análise comparativa dos dados de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) e ¹³ C-BB (125 MHz, CDCl ₃) de CBR-1 com dados da literatura, RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) e ¹³ C-BB (75 MHz, CDCl ₃), para a biflorina.....	23
Tabela 6- Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C-BB de CBR-2 com padrão de hidrogenação (RMN ¹³ C-BB e DEPT 135°).....	28
Tabela 7- Correlação Heteronuclear ¹ H, ¹³ C – HSQC (500 X 125 MHz, CDCl ₃) de CBR-2.....	29
Tabela 8- Análise comparativa dos dados de RMN ¹³ C-BB (125 MHz, CDCl ₃) de CBR-2 com dados da literatura para os caprariólídeos A-D (125 MHz, CDCl ₃).....	31
Tabela 9- Análise comparativa dos dados de RMN ¹³ C-BB (125 MHz, D ₂ O) de CBC-1 com dados da literatura, RMN ¹³ C-BB (75 MHz, D ₂ O), para o D-manitol.....	37
Tabela 10- Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C-BB de CBC-2 com padrão de hidrogenação (RMN ¹³ C-BB e RMN ¹³ DEPT).....	41
Tabela 11- Correlação Heteronuclear ¹ H, ¹³ C – HSQC e HMBC (500 X 125 MHz, (CD ₃) ₂ CO) de CBC-2.....	43
Tabela 12- Análise comparativa dos dados de RMN ¹ H (500 MHz, (CD ₃) ₂ CO) e	

^{13}C -BB (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) de CBC-2 com dados da literatura Mo-1.....	45
Tabela 13- Dados obtidos através de NOE por diferença de espectro de RMN ^1H	59
Tabela 14- Correlação Heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC e HMBC (500 X 125 MHz, CDCl_3) dos derivados acetilados.....	61
Tabela 15- Dados referentes ao fracionamento de EEPR.....	79
Tabela 16- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de F 2-5(10-33).....	81
Tabela 17- Dados referentes ao fracionamento de FAC.....	83
Tabela 18- Dados referentes ao fracionamento de FAC-A 17-20.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fotografias da espécie <i>C. biflora</i> , com detalhes para folhas e flor. Horto de plantas medicinais, Campus do Pici, UFC.....	5
Figura 2- Sistema de numeração dos iridóides.....	6
Figura 3- Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. biflora</i>	18
Figura 4- Espectro de massa do β -Elemeno.....	18
Figura 5- Espectro de massa do β -Cariofileno.....	19
Figura 6- Espectro de massa do α -Humuleno.....	19
Figura 7- Espectro de massa do Germacreno-D.....	19
Figura 8- Espectro de massa do γ -Cadineno.....	20
Figura 9- Espectro de massa do Óxido de Cariofileno.....	20
Figura 10- Espectro de massa do Fitol.....	20
Figura 11- Estrutura de CBR-1.....	22
Figura 12- Espectro na região do infravermelho de CBR-1 (KBr).....	24
Figura 13- Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de CBR-1.....	24
Figura 14- Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, CDCl_3] de CBR-1.....	25
Figura 15- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] de CBR-1.....	25
Figura 16- Espectro de massa de CBR-1.....	26
Figura 17- Estrutura de CBR-2.....	30
Figura 18- Estruturas dos Caprariolídeos A-D.....	32
Figura 19- Espectro na região do infravermelho de CBR-2.....	33
Figura 20- Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de CBR-2.....	33
Figura 21- Expansão do espectro de RMN ^1H [0,7 a 3 ppm, 500 MHz, CDCl_3] de CBR-1...	34

Figura 22- Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, CDCl_3] de CBR-2.....	34
Figura 23- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] (acima) e espectro de massa (abaixo) de CBR-2.....	35
Figura 24- Estrutura de CBC-1.....	36
Figura 25- Espectro na região do infravermelho de CBC-1 (KBr).....	37
Figura 26- Espectro de RMN ^1H [500 MHz, D_2O] de CBC-1.....	38
Figura 27- Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, D_2O] de CBC-1.....	38
Figura 28- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, D_2O] de CBC-1.....	39
Figura 29- Correlações à longa distância evidenciando a formação de um acetal.....	42
Figura 30- Correlações à longa distância evidenciando a localização das hidroxilas e do cloro nos carbonos C-5, C-6, C-8 e C-7, respectivamente.....	42
Figura 31- Estruturas dos iridóides CBC-2, Mo-1 e Mo-2.....	46
Figura 32- Espectro na região do infravermelho de CBC-2 (KBr).....	47
Figura 33- Espectro de RMN ^1H [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de CBC-2.....	47
Figura 34- Expansão do espectro de RMN ^1H [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de CBC-2.....	48
Figura 35- Expansão do espectro de RMN ^1H [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de CBC-2.....	48
Figura 36- Expansão do espectro de RMN ^1H [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de CBC-2.....	49
Figura 37- Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de CBC-2.....	49
Figura 38- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de CBC-2.....	50
Figura 39- Espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HSQC [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de CBC-2.....	50
Figura 40- Expansão do espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HSQC [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de CBC-2.....	51
Figura 41- Espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de CBC-2.....	51

Figura 42- Expansão (0,5 a 6 ppm para ^1H e 15 a 120 ppm para ^{13}C) do espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de CBC-2.....	52
Figura 43- Expansão (3,2 a 4,8 ppm para ^1H e 50 a 105 ppm para ^{13}C) do espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de CBC-2.....	53
Figura 44- Expansão (03,2 a 6 ppm para ^1H e 30 a 110 ppm para ^{13}C) do espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de CBC-2.....	54
Figura 45- Espectro de massa de alta resolução EM-IES (modo negativo) de CBC-2.....	55
Figura 46- Proposta mecanística para os principais picos observados no espectro de massa de CBC-2.....	55
Figura 47- Correlações à longa distância confirmando a localização dos grupos funcionais ésteres e CBC-2Ac1.....	57
Figura 48- Interações espaciais justificando a posição da hidroxila e do grupo acetila.....	58
Figura 49- Interações espaciais entre os hidrogênios determinando a configuração relativa.....	58
Figura 50- Estruturas de CBC-2, CBC-2Ac1 e CBC-2Ac2.....	60
Figura 51- Espectro na região do infravermelho de CBC-2Ac1 (KBr).....	63
Figura 52- Espectro na região do infravermelho de CBC-2Ac2 (KBr).....	63
Figura 53- Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de CBC-2Ac1.....	64
Figura 54- Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de CBC-2Ac2.....	64
Figura 55- Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, CDCl_3] de CBC-2Ac1.....	65
Figura 56- Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, CDCl_3] de CBC-2Ac2.....	65
Figura 57- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] de CBC-2Ac1.....	66
Figura 58- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] de CBC-2Ac2.....	66

Figura 59- Expansão (1,3 a 2,9 para ^1H e 15 a 90 para ^{13}C) do espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC [500 MHz, CDCl_3] de CBC-2Ac1.....	67
Figura 60- Expansão (2,0 a 5,5 para ^1H e 156 a 182 para ^{13}C) do espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC [500 MHz, CDCl_3] de CBC-2Ac1.....	67
Figura 61- Espectro de massa de alta resolução (modo negativo) de CBC-2Ac1.....	68
Figura 62- Proposição mecanística para a fragmentação de CBC-2Ac1.....	68
Figura 63- Espectro de massa de alta resolução (modo positivo) de CBC-2Ac2.....	69
Figura 64- Proposição mecanística para a fragmentação de CBC-2Ac2.....	69
Figura 65- Espectro de massa de alta resolução (modo negativo) de CBC-2Ac2.....	70
Figura 66- Proposição mecanística para a fragmentação de CBC-2Ac2.....	70
Figura 67- Espectro NOE [5,68 ppm, CDCl_3] de CBC-2Ac2.....	71
Figura 68- Espectro NOE [5,36 ppm, CDCl_3] de CBC-2Ac2.....	71
Figura 69- Espectro de NOE [5,12 ppm, CDCl_3] de CBC-2Ac2.....	72
Figura 70- Fotografias das larvas do <i>Aedes aegypti</i> e mosquito na fase adulta.....	73

RESUMO

Este trabalho descreve a reinvestigação fitoquímica dos constituintes fixos presentes nas raízes e no caule da espécie *Capraria biflora*, pertencente à família Scrophulariaceae, bem como a investigação da composição química do óleo essencial extraído das folhas e avaliação da atividade larvicida contra larvas do *Aedes aegypti*. O estudo do óleo essencial resultou na identificação de sete constituintes dentre os quais, seis são compostos sesquiterpênicos. O óleo essencial foi submetido ao teste de atividade larvicida e apresentou uma atividade moderada, com $CL_{50}=73,390$. Estudos cromatográficos em gel de sílica, do extrato éter de petróleo das raízes e etanólico do caule, permitiram o isolamento e caracterização de quatro compostos: a naftoquinona biflorina, o sesquiterpeno caprariólídeo B, o açúcar manitol e o iridóide miopoclorin, inédito na espécie. A elucidação estrutural das substâncias foi realizada através de técnicas espectrométricas: infravermelho (IV), espectrometria de massa (EM) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN 1H) e de carbono-13 (RMN ^{13}C), incluindo as técnicas bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC) e comparação com dados registrados na literatura.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO



1- INTRODUÇÃO

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do mundo e até mesmo nas grandes cidades, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e cultivadas em pequenos hortos residenciais [MACIEL *et al.*, 2002].

O conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais contribui de forma relevante para a divulgação de suas propriedades terapêuticas. Este tipo de cultura medicinal chamada de conhecimento ETNOFARMACOLÓGICO desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial, contribuindo para o conhecimento de nossa biodiversidade [MACIEL *et al.*, 2002].

O Brasil é o principal dentre aqueles de megabiodiversidade, detendo em seu território entre 15 e 20% do número total de espécies do planeta. Apresenta a mais diversa flora do mundo, número superior a 55 mil espécies descritas (22% do total mundial), bem como alguns dos ecossistemas mais ricos em número de espécies vegetais - a Amazônia, a Mata Atlântica e o Cerrado. A Floresta Amazônica brasileira, com mais de 30 mil espécies vegetais, compreende cerca de 26% das florestas tropicais remanescentes no planeta.

Cerca de 40% dos medicamentos produzidos no Brasil possuem princípios ativos retirados das plantas. Ainda assim, somente em 8% do número de espécies encontradas na flora brasileira foram estudadas sob o ponto de vista químico e biológico que comprovam a ação terapêutica dessas plantas. Esses fatores demonstram a importância da pesquisa científica envolvendo produtos naturais na descoberta de novas moléculas com propriedades farmacológicas como também na comprovação da ação terapêutica das substâncias já existentes e conhecidas no mercado farmacêutico. Além disto há um grande interesse na busca de substâncias que apresentem menos toxicidade e efeitos colaterais que as atuais [AQUINO, 2003].

A espécie *Capraria biflora* é utilizada popularmente como auxiliar no tratamento de dor, febre, gripe, vômitos, hemorróidas, reumatismo e tumores. Estudos farmacológicos realizados também demonstraram potencial citotóxico, analgésico, antiinflamatório e antibiótico desta planta [VASCONCELOS *et al.*, 2007].

Diversas classes de substâncias já foram isoladas e identificadas nesta espécie, destacando-se: naftoquinonas, sesquitepenos e iridoides [FONSECA, 2003].

Dentre os nomes populares, é conhecida no Brasil como “chá-da-terra”, “chá-do-méxico”, “chá-da-martinica”, “chá-de-goteira”, “chá-de-pé-da-calçada”, “chá-do-rio”, “chá-da-américa”, “chá-das-antilhas”, “chá-de-lima”, “chá-de-marajó”, “chá-da-balsaminha”, “chá-do-maranhão”, “chá-bravo” e “chá-de-preto” [AQUINO *et al.*, 2006].

Por se tratar de uma planta invasora, é encontrada em terrenos baldios, preferindo locais úmidos, próximos ao litoral, riachos ou lagoas [MATOS, 1988]. No Brasil, *C. biflora* é encontrada principalmente em Goiás, Minas Gerais e na faixa litorânea que se estende desde o Piauí ate o Espírito Santo [AQUINO *et al.*, 2006].

Capítulo 2

CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS



2- CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2.1- Considerações Botânicas sobre a família Scrophulariaceae

A família Scrophulariaceae apresenta distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 270 gêneros e aproximadamente 5100 espécies [MABBERLEY, 1997].

São caracterizadas por possuírem ervas na forma de subarbustos ou arbustos. Suas folhas podem ser: simples, opostas, alternas ou vesiculadas, glabras, pilosas ou glandulosas, suas flores são andróginas, diclamídeas e frequentemente zigomorfas. O cálice persistente, gamo ou diassépalo, geralmente pentâmero, com sépalas iguais ou desiguais entre si. A corola pode ser tubo longo ou curto, além de ser curvo e o limbo tem bordo truncado. O androceu está constituído, geralmente de quatro a dois estames, só raramente são cinco estames. As anteras podem ser bitecas, com teças paralelas ou divergentes, ou monotecas, com deicência rimosa vertical ou horizontal. Gineceu formado de dois carpelos, constituindo um ovário súpero, bilocular, com lóculos multiovulados; o estilete é terminal, bilobado ou bífido. O fruto é cápsula bivalvular. As sementes pequenas e numerosas apresentam a testa com estrutura diversa [FONSECA, 2003].

2.2- Considerações Botânicas sobre o gênero *Capraria*

Ervas a arbustos, glabros a pubescentes. Folhas alternas, sésseis a subsésseis, geralmente lineares ou lanceoladas a oblanceoladas, margem geralmente serrada. Flores axilares, solitárias a fasciculadas; cálice pentâmero, dialisépalo, com sépalas iguais entre si; corola alva, pentâmera, rotácea a campanulada; estames 4 ou 5, inclusos ou exsertos, inseridos no tubo da corola, anteras com tecas paralelas; ovário pluriovulado. Fruto cápsula septicida. Sementes trigonais, com testa reticulada [SOUZA; GIULIETTI, 2009].

O gênero *Capraria* apresenta cinco espécies endêmicas, com distribuição neotropical e centro de diversidade na América Central, sendo *C.biflora* L. a espécie de mais ampla distribuição geográfica e a única do gênero que ocorre no Brasil. A separação das espécies de *Capraria* baseia-se principalmente no comprimento relativo da corola e do cálice, formato do tubo e dos lacínios da corola e indumento do pedicelo e cálice [SPRAGUE, 1921].

2.3- Considerações Botânicas sobre a espécie *Capraria biflora*

É uma planta que atinge até 150 cm de altura. Possui caule ramoso, ereto, com ramos alternos, cilíndricos, pubescentes e hirsutos. Suas folhas são alternas, chegando até 8 cm de comprimento, oblongo-lanceoladas-agudas, serradas irregularmente, inteiras na base, cuneadas e estreitando-se para o pecíolo. As folhas são peninervadas, com nervura média saliente na página inferior. Suas flores são pequenas, brancas, pediceladas, geminadas, axilares e campanuladas. Possui segmentos linear-lanceolados, agudos e ligeiramente ciliado-cerrados. Os frutos possuem formato de uma cápsula ovado-oblonga, glabra, contendo sementes rugosas, escuras e oblongo-cuneadas. Suas raízes são numerosas e longas, tortuosas, apresentando cor parda escura [FONSECA, 2003]. Fotografias da espécie e detalhes são apresentados na figura 1 (pág. 5).

FOTO: Luciana Gregório



FOTO: Luciana Gregório



FOTO: <http://www.flickr.com/photos>



Figura 1- Fotografias da espécie *C. biflora*, com detalhes para folhas e flor. Horto de plantas medicinais, Campus do Pici, UFC.

Capítulo 3

LEVANTAMIENTO BIBLIOGRÁFICO



3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

3.1 Iridóides de Scrophulariaceae registrados na literatura

Iridóides são substâncias monoterpênicas formadas nas plantas através de uma ciclização alternativa do pirofosfato de geranila. A estrutura química dessas substâncias é baseada no esqueleto ciclopentano-[c]-pirano. São formados por dez, nove, ou oito átomos de carbono (Fig. 2-a). A clivagem oxidativa da ligação 7,8 do anel ciclopentano dos iridóides fornece os compostos chamados de secoiridóides (Fig. 2-b), enquanto que clivagem do anel pirano produz os derivados de iridóides (Fig. 2-c) [SANTOS, 2001].

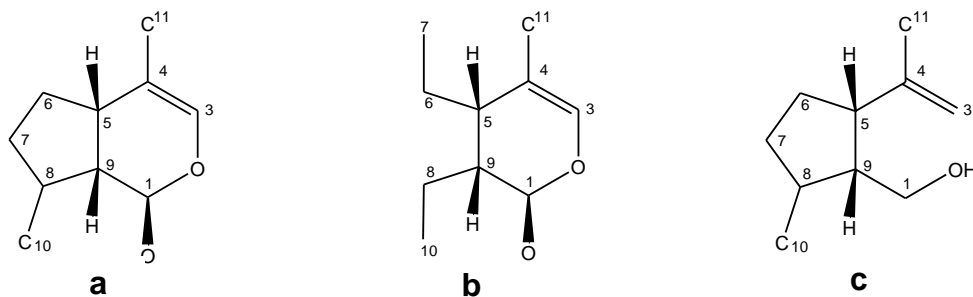


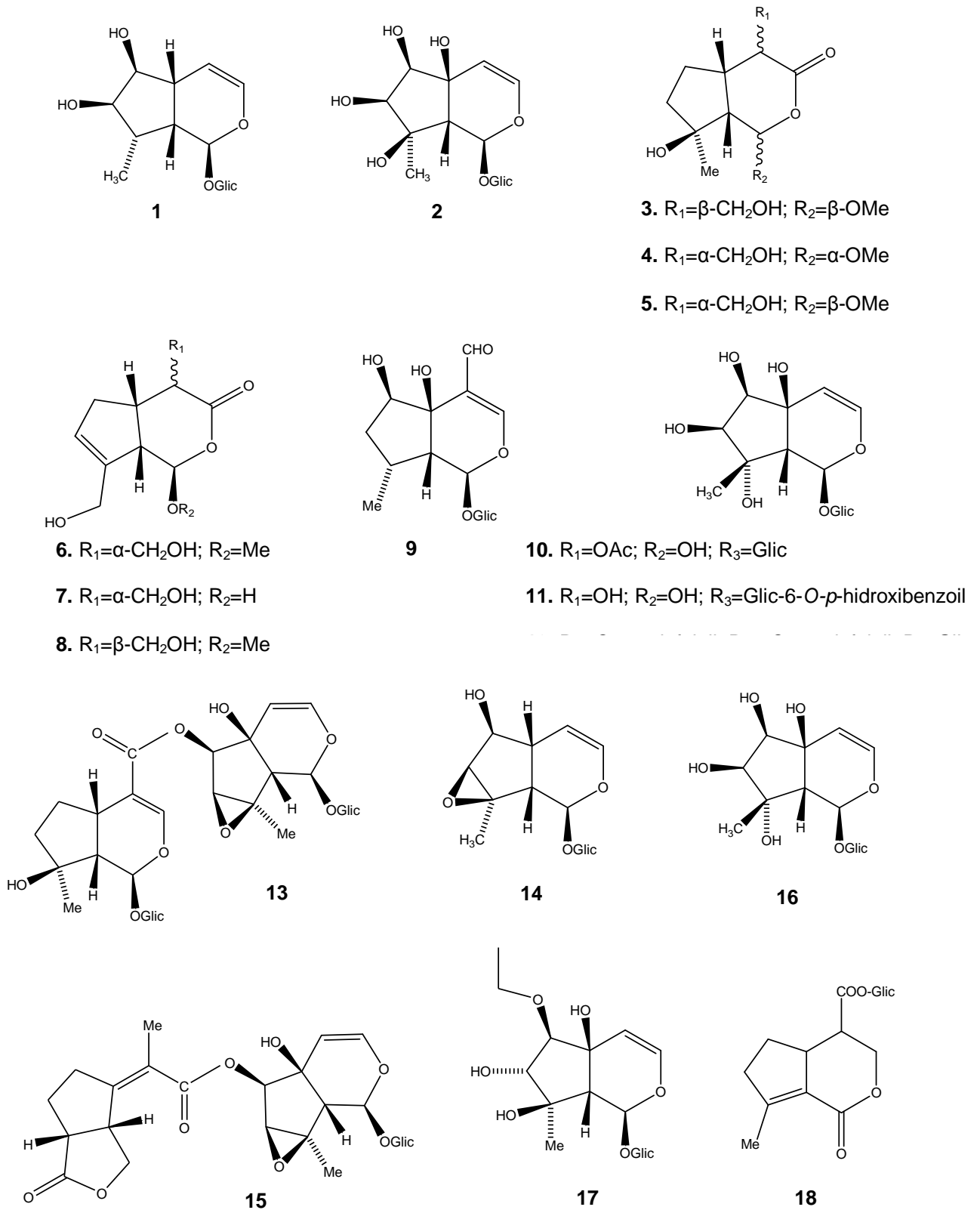
Figura 2- Estrutura química e sistema de numeração dos iridóides

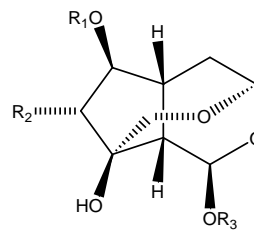
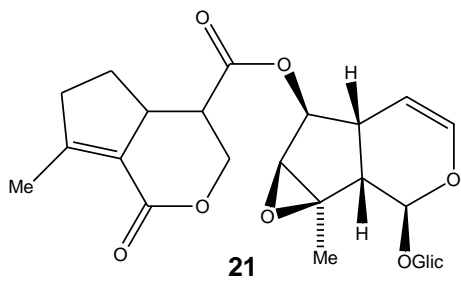
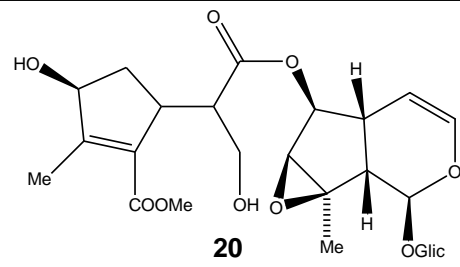
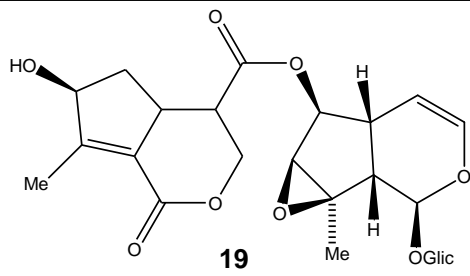
Em Quimiosistemática, os iridóides representam um marcador importante em classificação vegetal, filogenia e evolução. São usados como marcadores de gênero em diversas famílias de plantas diferentes, tais como, as substâncias, “aucubina” que está presente em espécies do gênero *Plantago* (Plantaginaceae), “Asperulosídeo” presente em espécies do gênero *Galium* (Rubiaceae) e a “harpagida” que é encontrada em espécies do gênero *Scrophularia* (Scrophulariaceae).

Estão presentes em um grande número de plantas medicinais, sendo usados popularmente como tônicos amargos, sedativos, antitérmicos, medicamentos para tosse, remédios para ferimentos, doenças de pele e como hipotensivos. Estudo intensivo das atividades dos iridóides revelaram que eles apresentam uma ampla gama de atividades farmacológicas, dentre elas estão: atividade cardiovascular, anti-hepatotóxica, antiinflamatória, hipoglicemiante, antiespasmódica, antitumoral, imunomoduladora, antiviral e atividades purgativas [DINDA *et al.*, 2007].

A pesquisa do caráter inédito de um iridóide isolado da espécie *C. biflora* motivou a realização de levantamento bibliográfico (no período de 1994 a 2009) de iridóides isolados de espécies da família Scrophulariaceae, na qual pode-se notar que foram isolados noventa e cinco iridóides em quarenta e seis espécies vegetais. As estruturas químicas e referências encontram-se dispostas nas tabelas 1 e 2 (pág. 8, 13).

Tabela 1- Estruturas dos iridóides isolados de espécies da família Scrophulariaceae



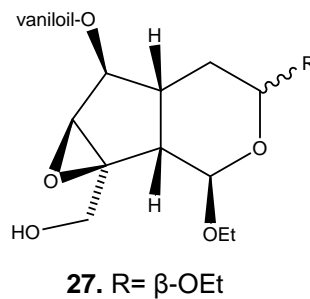
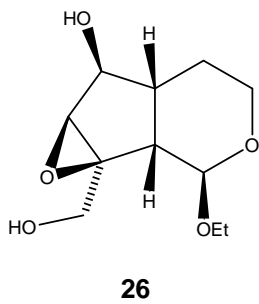


22. R₁=vaniloil; R₂=Cl; R₃=Glic

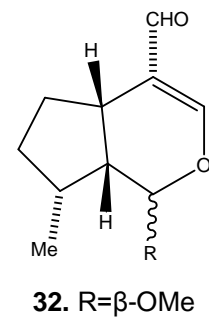
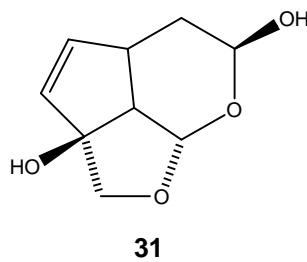
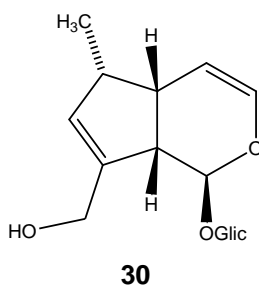
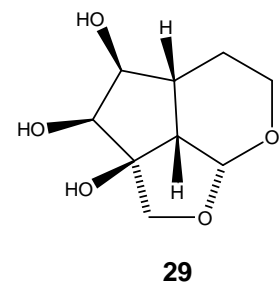
23. R₁=H; R₂=O-vaniloil; R₃=Glic-6-O-cinamoil

24. R₁=H; R₂=OH; R₃=Glic-6-O-cinamoil

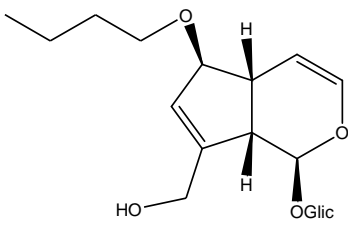
25. R₁=H; R₂=O-cinamoil; R₃=Glic-6-O-cinamoil



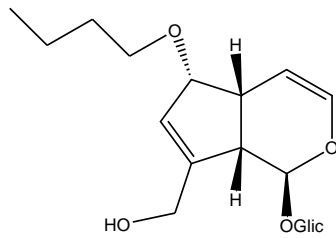
28. R= α-OEt



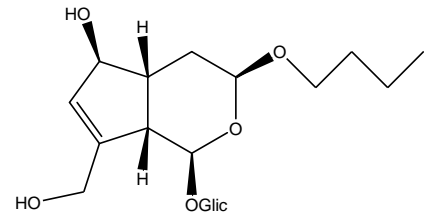
33. R=α-OMe



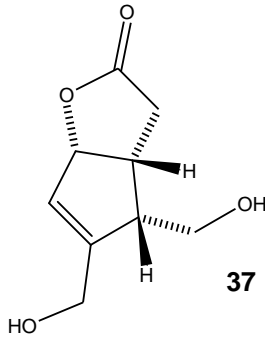
34



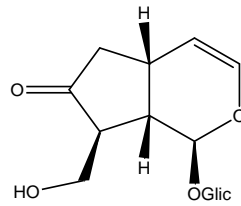
35



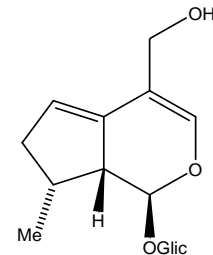
36



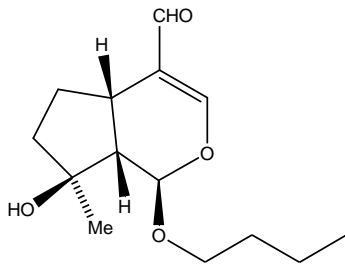
37



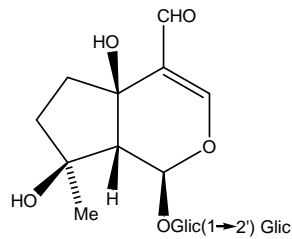
38



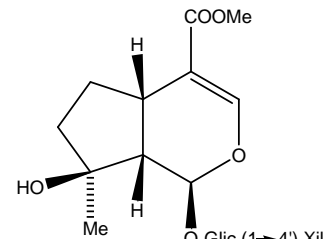
39



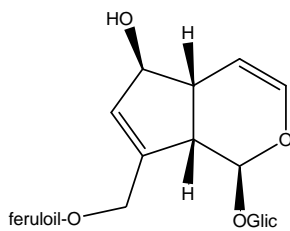
40



41

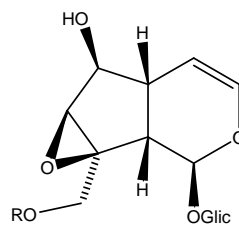


42

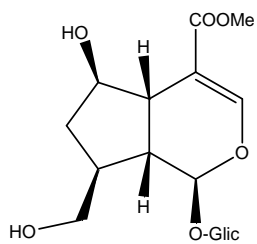
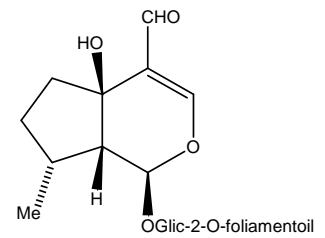


43

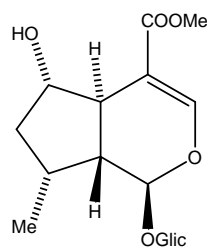
44. R=foliamentoil-8-O-foliamentoil



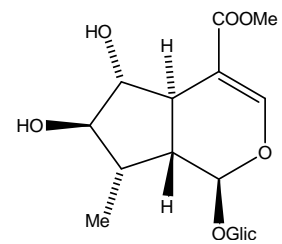
45



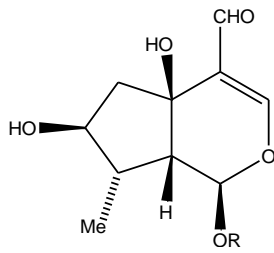
46



47

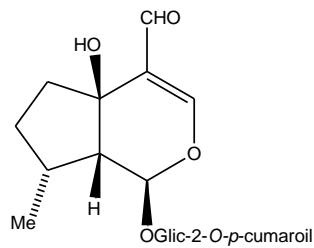


48

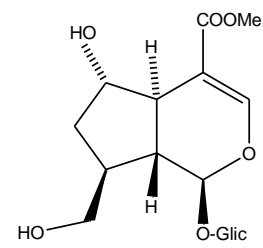


49. R=Glic

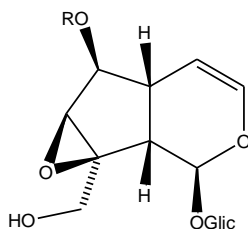
50. R=Glic-2-*O-p*-cumaroil



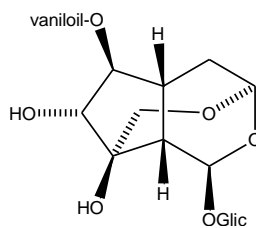
51



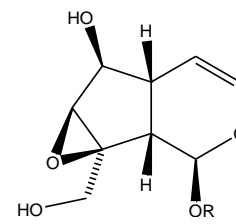
52



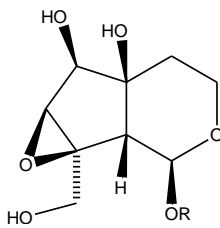
53. R=*m*-MeOH-benzoil



54

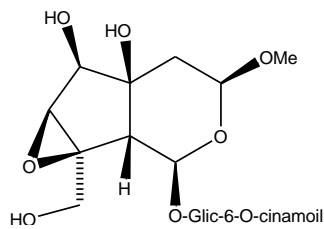


55. R= Glic-6-*O-(E)-p*-OH-cinamoil

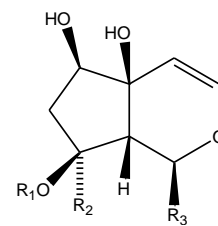


56. R=Glic-6-*O*-vaniloil

57. R=Glic-6-*O-p*-cumaroil



58

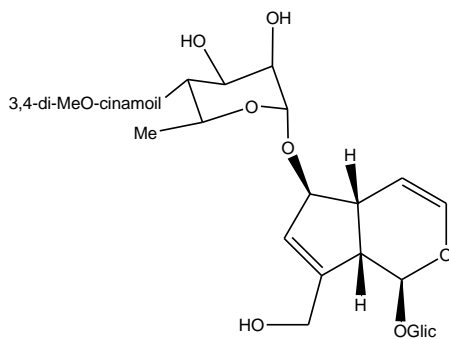


59. R₁=H; R₂=Me; R₃=Glic-6-*O-(E)-p*-OMe-cinamoil

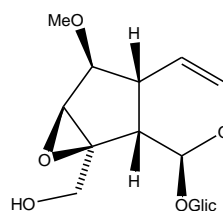
60. R₁=H; R₂=Me; R₃=Glic-6-*O-(Z)-p*-OMe-cinamoil

61. R₁=(*E*)-*p*-OMe-cinamoil; R₂=Me; R₃=OGlic

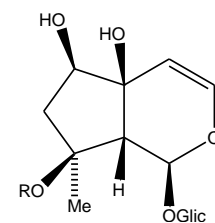
62. R₁=(*Z*)-*p*-OMe-cinamoil; R₂=Me; R₃=OGlic



63

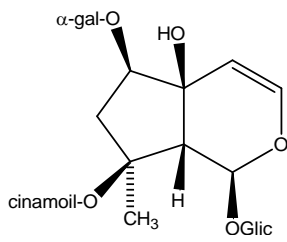


64

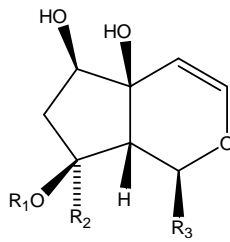


65. R₁=(*E*)-feruloil

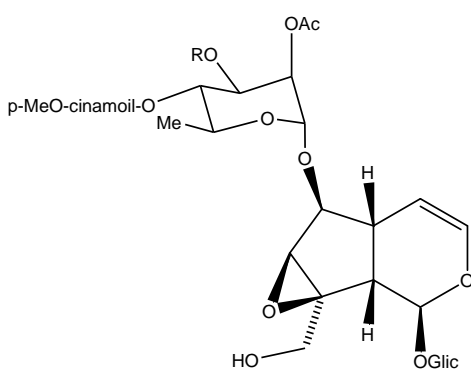
66. R₁=*o*-OH-cinamoil



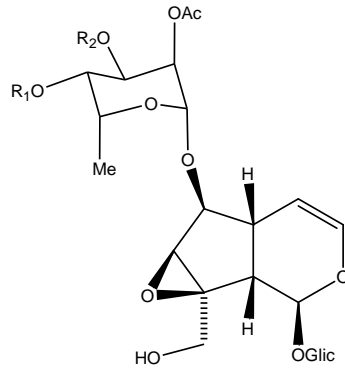
67



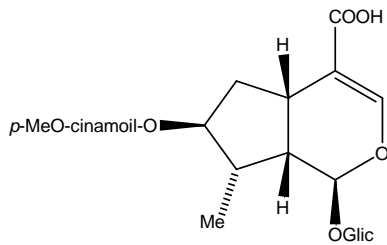
- 68.** R₁=H; R₂=Me; R₃=OGlic-6-*O*-cafeoil
69. R₁=H; R₂=Me; R₃=OGlic-6-*O*-feruloil
70. R₁=*O*-cinamoil; R₂=Me; R₃=OGlic-6-*O*-Glic



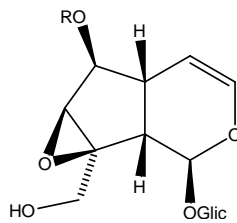
- 71.** R=cinamoil
72. R=Ac



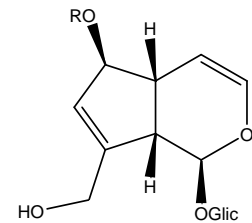
- 73.** R₁=*p*-cumaroil; R₂=H
74. R₁=*p*-cumaroil; R₂=H
75. R₁=*p*-MeO-cinamoil; R₂=*p*-MeO-cinamoil
76. R₁=H; R₂=(*Z*)-*p*-MeO-cinamoil
77. R₁=Ac; R₂=(*Z*)-*p*-MeO-cinamoil
78. R₁=(*Z*)-*p*-MeO-cinamoil; R₂=Ac
79. R₁=isoferuloil; R₂=Ac



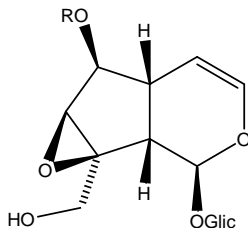
80



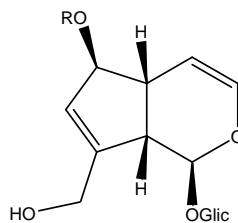
81. R=Ram-3-*O*-Ac-2-*O*-cinamoil



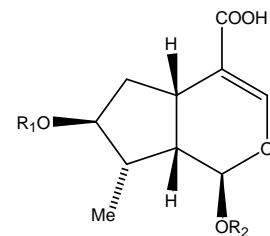
82. R=Xil-4-*O*-*p*-cumaroil



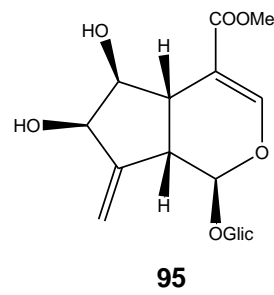
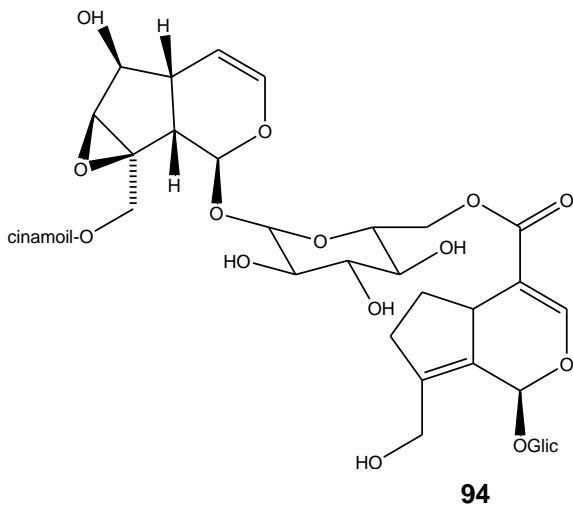
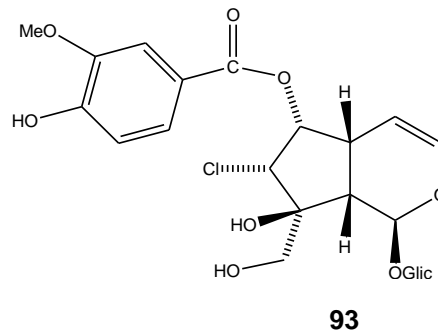
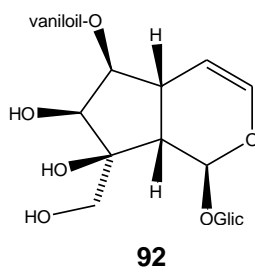
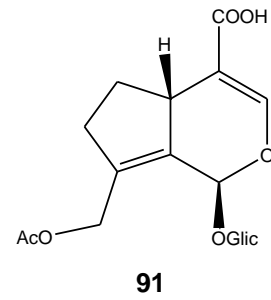
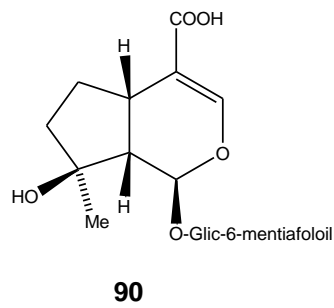
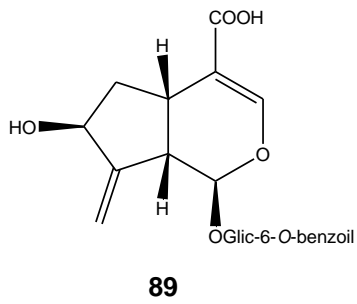
83. R=Ram-2-*O*-cinamoil



- 84.** R=Ram-2-*O*-feruloil
85. R=Ram-3-*O*-(*E*)-3,4-di-OMe-cinamoil
86. R=Ram-3-*O*-(*E*)-*p*-OMe-cinamoil



- 87.** R₁=H, R₂=Glic-6-*O*-benzoil
88. R₁=H, R₂=Glic-6-*O*-*p*-OH-benzoil



*** Substituintes**

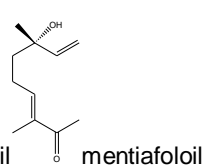
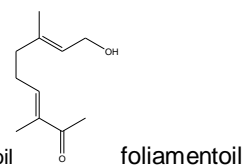
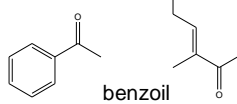
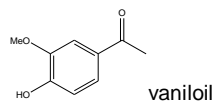
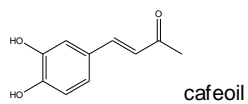
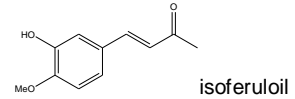
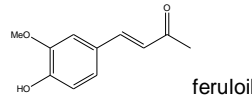
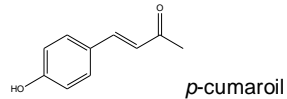
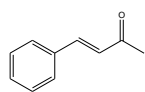


Tabela 2- Iridóides isolados listados por espécie vegetal.

ESPÉCIES	ESTRUTURAS	REFERÊNCIAS
<i>Angelonia integerrima</i>	1	[POSER <i>et al.</i> , 1997]
<i>Cymbalaria muralis ssp. pilosa</i>	2	[BIANCO <i>et al.</i> , 1997a]
<i>Cymbaria mongolica</i>	3-8	[DAI <i>et al.</i> , 2002]
<i>Euphrasia pectinata</i>	9	[ERSÖZ <i>et al.</i> , 2000]
<i>Kickxia abhaica</i>	10-11	[AL-REHAILY <i>et al.</i> , 2006]
<i>Kickxia elatine</i> <i>Kickxia commutata</i> <i>Kickxia spuria</i>	12-13	[HANDJIEVA <i>et al.</i> , 1995]
<i>Linaria arcusangeli</i>	14-16	[BIANCO <i>et al.</i> , 1996] [BIANCO <i>et al.</i> , 1997b]
<i>Linaria flava</i>	15	[BIANCO <i>et al.</i> , 1996]
<i>Linaria flava ssp. sardoa</i>	14	[BIANCO <i>et al.</i> , 1996]
<i>Linaria genestifolia</i>	17	[AHMAD <i>et al.</i> , 2006]
<i>Linaria japonica</i>	18-21	[OTSUKA, 1995] [OTSUKA, 1994]
<i>Neopicrorhiza scrophulariiflora</i>	22-25 26-29	[KIM <i>et al.</i> , 2006] [WANG <i>et al.</i> , 2006]
<i>Pedicularis artselaeri</i>	30-33	[SU <i>et al.</i> , 1998]
<i>Pedicularis chinensis</i>	34-37	[LI <i>et al.</i> , 1995]
<i>Pedicularis grayi</i> <i>Pedicularis procera syn</i>	38	[SCHNEIDER <i>et al.</i> , 1997]
<i>Pedicularis kansuensis f. albiflora</i>	39-40	[YUAN <i>et al.</i> , 2003]

<i>Pedicularis plicata</i>	41-42	[JIA <i>et al.</i> , 1994]
<i>Penstemon acuminatus</i>	43	[VESPER, 1994]
<i>Penstemon newberryi</i>	44	[STERMITZ <i>et al.</i> , 1994a]
<i>Penstemon barrettiae</i>	45	[STERMITZ <i>et al.</i> , 1994b]
<i>Penstemon grandiflorus</i>	46	[FRANZYK <i>et al.</i> , 1998]
<i>Penstemon mucronatus</i>	47-48	[KRULL <i>et al.</i> , 1998a]
<i>Penstemon parryi</i>	49-51	[STERMITZ <i>et al.</i> , 1994b]
<i>Penstemon secundiflorus</i>	46	[KRULL <i>et al.</i> , 1998b]
<i>Penstemon secundiflorus ssp.</i> <i>Lavendulus</i>	46	[FRANZYK <i>et al.</i> , 1998]
<i>Picrorhiza kurroa</i>	53-54	[MANDAL; MUKHOPADHYAY 2004] [JIA <i>et al.</i> , 1999]
<i>Picrorhiza scrophulariiflora</i>	55-58	[LI <i>et al.</i> , 1998] [HUANG <i>et al.</i> , 2006] [WANG <i>et al.</i> , 2006]
<i>Scrophularia buergeriana</i>	59-62	[KIM <i>et al.</i> , 2002]
<i>Scrophularia lepidota</i>	63-64	[TASDEMIR <i>et al.</i> , 2005]
<i>Scrophularia ningpoensis</i>	65-71	[LI <i>et al.</i> , 1999] [CHEN <i>et al.</i> , 2008] [NGUYEN <i>et al.</i> , 2005]
<i>Scrophularia auriculata ssp.</i> <i>pseudoauriculata</i>	72	[GINER <i>et al.</i> , 1998]
<i>Scrophularia nodosa</i>	72-80	[MIYASE; MIMATSU, 1999] [STEVENSON <i>et al.</i> , 2002]

<i>Scrophularia scorodonia</i>	81	[FERNANDEZ <i>et al.</i> , 1995]
<i>Verbascum phlomoides</i>	82	[KLIMEK, 1996]
<i>Verbascum spinosum</i>	83	[KALPOUTZAKIS <i>et al.</i> , 1999]
<i>Verbascum undulatum</i>	84-86	[SKALTSOUNIS <i>et al.</i> , 1996]
<i>Veronica anagallis-aquatica</i>	87-89	[HARPUT <i>et al.</i> , 2004]
<i>Veronica bellidioides</i>	90	[TASKOVA <i>et al.</i> , 1998]
<i>Veronica cymbalaria</i>	91	[TASKOVA <i>et al.</i> , 1999]
<i>Veronica hederifolia</i>	92	[HARPUT <i>et al.</i> , 2002]
<i>Veronica pectinata var. glandulosa</i>	93	[HARPUT <i>et al.</i> , 2003]
<i>Wulfenia carinthiaca</i>	94	[ARNOLD <i>et al.</i> , 2002]
<i>Zaluzianskya capensis</i>	95	[DAMTOFT, 1994]

Capítulo 4

CONSTITUENTES VOLÁTEIS



4- CONSTITUINTES VOLÁTEIS

4.1- Identificação dos componentes voláteis das folhas de *C. biflora*

A identificação dos constituintes químicos voláteis de *C. biflora* foi realizado à partir do óleo essencial obtido das folhas da espécie, coletada no município de Itapiúna-CE em março de 2011.

O óleo essencial foi extraído pelo processo de hidrodestilação em aparelho doseador tipo Cleavenger. Foram utilizados 654 g de material, levando a obtenção de 387 mg (0,059% de rendimento) de um óleo de coloração amarelada e forte odor. A composição química do óleo foi determinada através de análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM). A identificação dos componentes do óleo foi realizada através dos índices de Kovats e comparação com espectros de massa de substâncias presentes na literatura [ADAMS, 2007].

A análise por CG-EM revelou a presença de sete constituintes químicos (Fig 3 , pág. 18), dos quais todos eles foram identificados. Os constituintes apresentaram-se predominantemente como compostos sesquiterpênicos, com exceção do fitol, que apresenta vinte átomos de carbono, um composto diterpênico (Fig. 10, pág. 20).

Os constituintes majoritários do óleo de *C. biflora* foram identificados como o β -Cariofileno (30,6 %) e o Germacreno-D (46,83 %), correspondendo a 77,43 % da composição total do óleo (Tab. 3).

Tabela 3- Constituintes voláteis das folhas de *C. biflora*

COMPONENTES	T.R.	I.K.	%
β -Elemeno	23,07	1390	7,6
β -Cariofileno	23,91	1419	30,6
α -Humuleno	24,90	1455	5,8
Germacreno-D	25,73	1485	46,8
γ -Cadineno	26,96	1513	2,8
Óxido de Cariofileno	28,41	1583	5,3
Fitol	38,54	1943	1,0
TOTAL			100

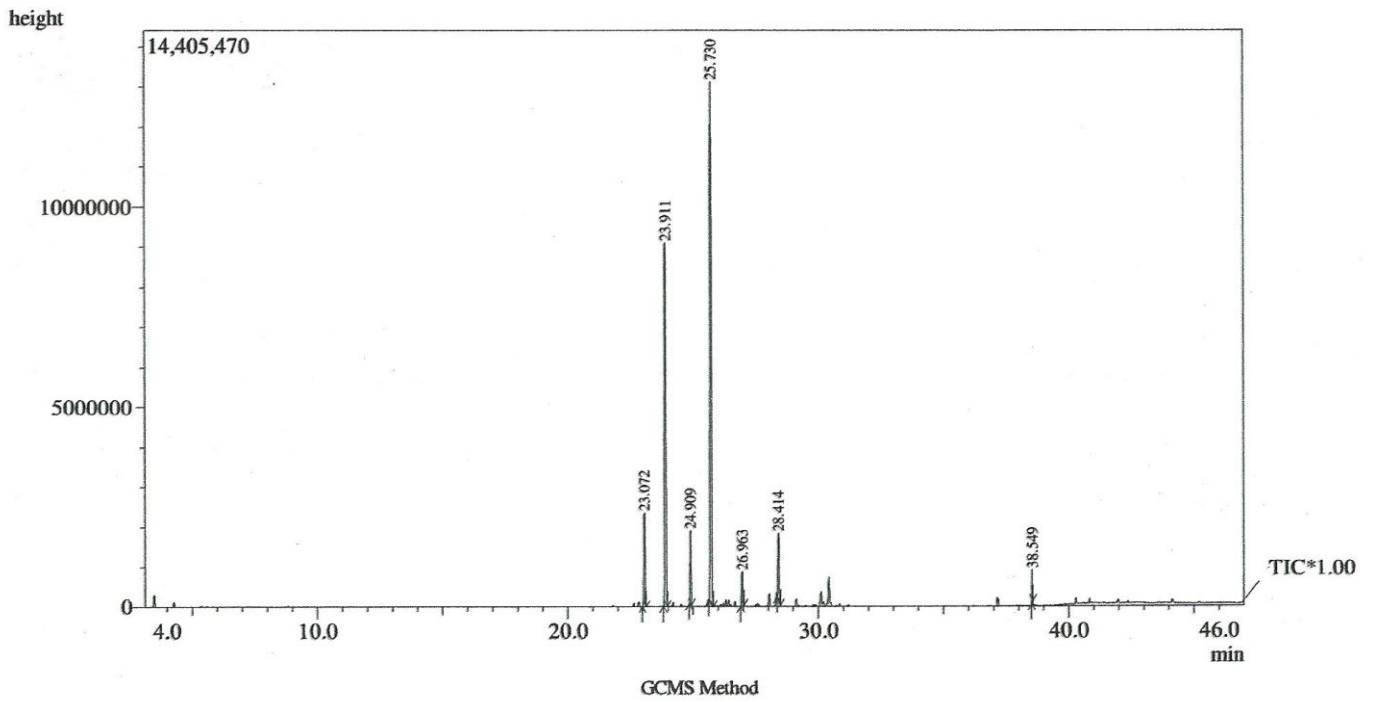


Figura 3- Cromatograma do óleo essencial das folhas de *C. biflora*

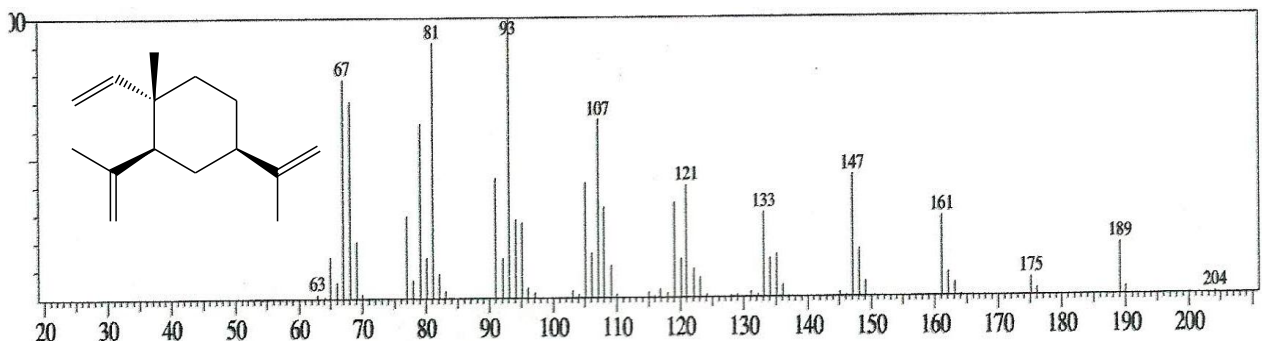


Figura 4- Espectro de massa do β -Elemeno

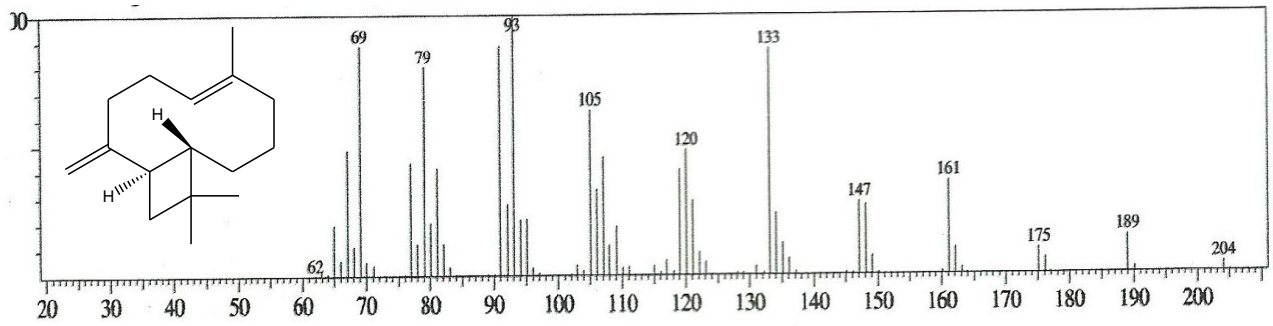


Figura 5- Espectro de massa do β -Cariofileno

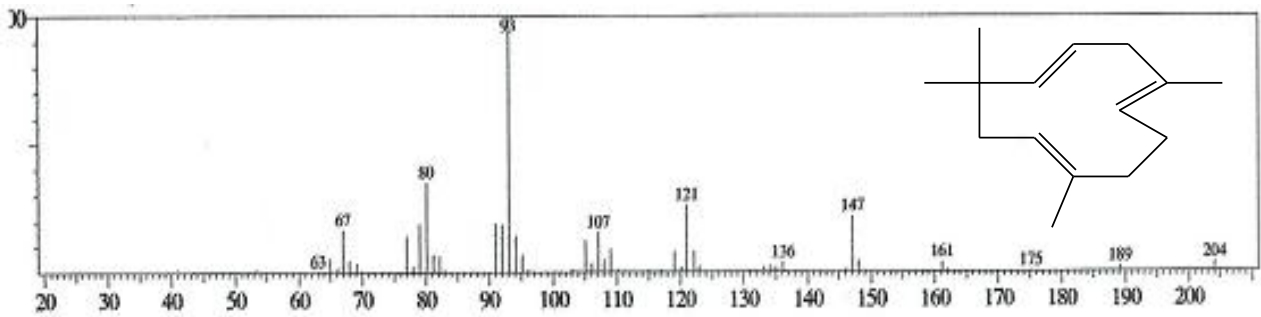


Figura 6- Espectro de massa do α -Humuleno

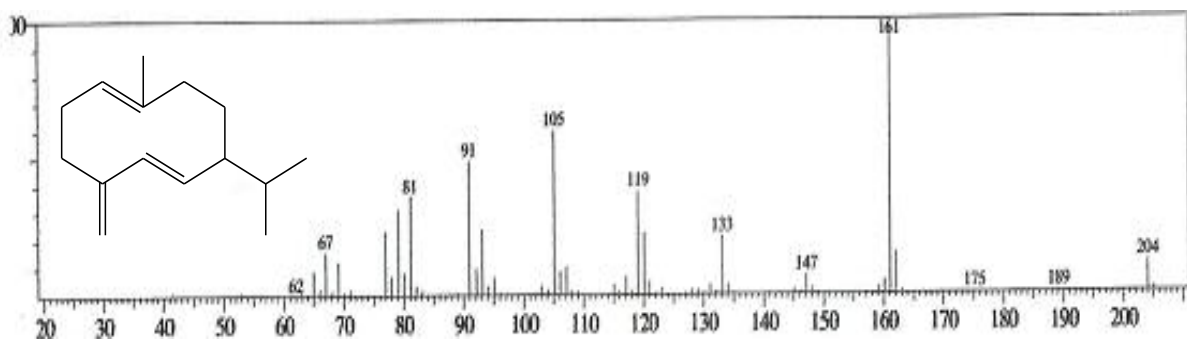


Figura 7- Espectro de massa do Germacreno-D

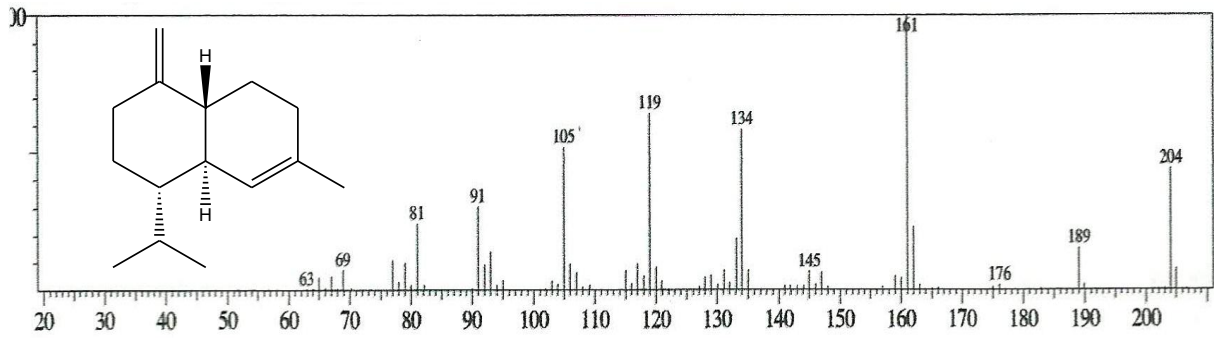


Figura 8- Espectro de massa do γ -Cadineno

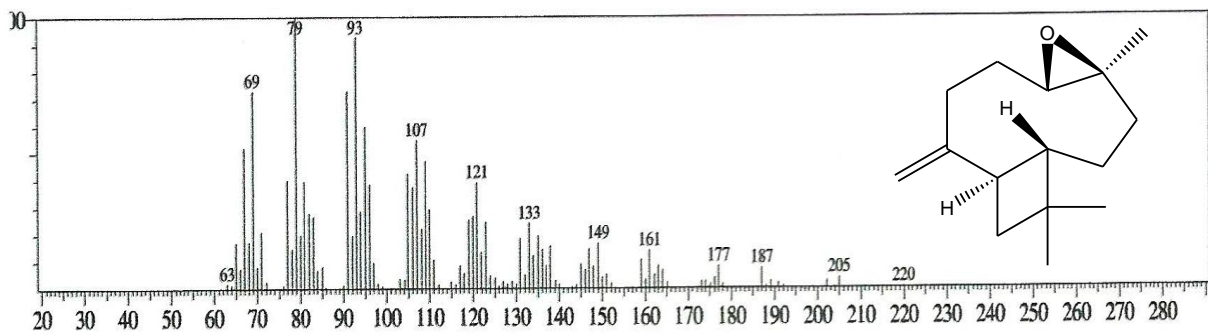


Figura 9- Espectro de massa do Óxido de Cariofileno

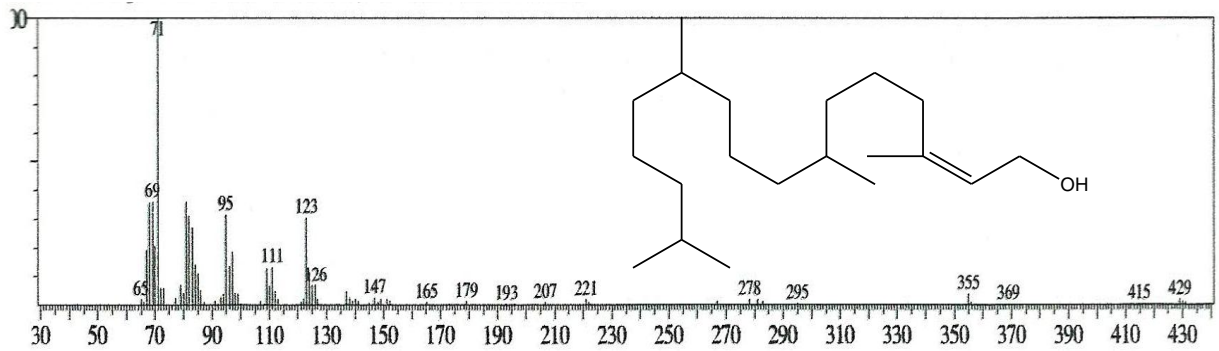


Figura 10- Espectro de massa do Fitol.

Capítulo 5

DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL



5- DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

5.1- Determinação estrutural de CBR-1

Obtido a partir do extrato éter de petróleo das raízes, CBR-1 apresentou-se na forma de cristais em forma de agulha com coloração vermelho-escuro com ponto de fusão 154-158 °C, solúvel em clorofórmio.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 12, pág. 24) em 2921 cm^{-1} referente à deformação axial de grupos C-H de alcanos, absorção em 1684 cm^{-1} referente à deformação axial de carbonila de cetona, em 1592 e 1438 cm^{-1} referente à deformação axial das ligações C=C de grupos aromáticos, em torno de 1236 a 1023 cm^{-1} , referente a deformações angulares no plano de grupos aromáticos.

O espectro RMN ^1H (Fig. 13, pág. 24) apresentou quatro sinais característicos de hidrogênios metílicos, todos singletos, em δ_{H} 2,70; 1,98; 1,72 e 1,59, dois sinais de grupos metilênicos em δ_{H} 2,53 (2H, t, $J=7,3$ Hz, H-10) e em 2,29 (2H, q, $J=7,3$ Hz, H-11), e grupos metínicos em δ_{H} 7,52 (1H, d, $J=8,1$ Hz, H-4) e 7.39 (1H, d, $J=8,1$ Hz, H-5) referente a hidrogênios aromáticos com relação orto, e δ_{H} 5,16 (1H, s, H-12) característico de hidrogênio olefínico (Tab. 5, pág. 23).

O espectro RMN ^{13}C -BB (Fig. 14, pág. 25) de CBR-1 revelou sinais correspondentes a vinte átomos de carbono. A análise comparativa entre os espectros RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° (Fig. 15, pág 25), permitiu reconhecer o padrão de hidrogenação correspondente a cada átomo de carbono. Foram observados quatro sinais para carbonos metínicos, dois metilênicos e quatro metílicos δ_{C} 22,6 (C-16), 18,0 (C-14), 25,1 (C-15) e 7,8 (C-17), bem como a existência de dez sinais de carbono não hidrogenados, sendo 2 carbonílicos δ_{C} 178,0 (C-8) e 182,0 (C-7) e dois carbonos sp^2 oxigenados δ_{C} 140,2 (C-2) e 161,8 (C-9a) (Tab. 5, pág. 23).

Tabela 4- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C -BB de CBR-1 com padrão de hidrogenação (RMN ^{13}C -BB e DEPT 135°).

δ	C	CH	CH ₂	CH ₃	Total
182,0		127,8	26,7	18,0	
178,0		135,9	26,6	25,1	
113,5		140,2		22,6	
161,8		121,9		7,8	
129,0					
146,7					
126,6					
124,2					
116,1					
133,6					
C ₇		C ₄ H ₄	C ₂ H ₄	C ₄ H ₁₂	
C-O					
2(C=O)					C₂₀H₂₀O₃

A análise do espectro de massa de CBR-1 (Fig. 16, pág. 26) revelou o pico do íon molecular em m/z 308 daltons, confirmando a fórmula molecular **C₂₀H₂₀O₃**, com IDH igual a 11.

A partir dos dados obtidos, RMN ^1H , ^{13}C -BB e DEPT 135° foi possível propor para este composto a estrutura da biflorina, 6,9-dimetil-3-(4-metil-pent-3-enil)nafto[1,8-*bc*]-piran-7,8-diona (Fig. 11), uma *orto*-naftoquinona já isolada anteriormente da espécie *C. biflora*. A comprovação da estrutura foi possível através de comparação dos dados espectroscópicos com os da literatura (Tab. 5, pág. 23) [FONSECA *et al*, 2002].

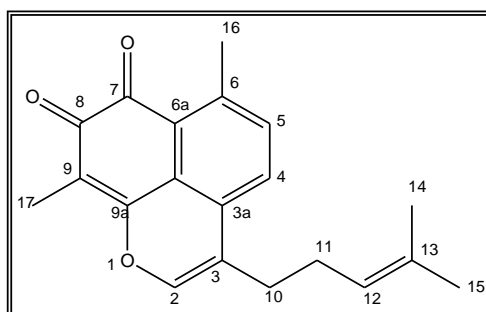


Figura 11- Estrutura de CBR-1.

Tabela 5- Análise comparativa dos dados de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) e ¹³C-BB (125 MHz, CDCl₃) de CBR-1 com dados da literatura, RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) e ¹³C-BB (125 MHz, CDCl₃), para a biflorina [FONSECA *et al*, 2002].

C	CBR-1		Literatura [FONSECA <i>et al</i> , 2002]	
	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H
2	140,2	7,07 (s)	141,2	7,07(s)
3	116,1		116,3	
3 ^a	129,0		129,3	
4	127,8	7,52 (d; 8,1)	128,7	7,55 (d; 8,3)
5	135,9	7,39 (d, 8,1)	136,8	7.43 (d; 8,3)
6	146,7		147,0	
6a	126,6		127,0	
7	182,0		182,4	
8	178,0		178,4	
9	113,5		113,9	
9a	161,8		162,1	
9b	124,2		124,5	
10	26,7	2,53 (t; 7,3)	27,7	2,56 (t; 7;4)
11	26,6	2,29 (q; 7,3)	27,6	2,31 (t)
12	121,9	5,16 (s)	122,9	5,18 (t)
13	133,6		133,9	
14	18,0	1,59 (s)	18,3	1,62 (s)
15	25,1	1,72 (s)	26,1	1,74 (s)
16	22,6	2,70 (s)	23,6	2,74 (s)
17	7,8	1,98 (s)	8,1	2,01 (s)

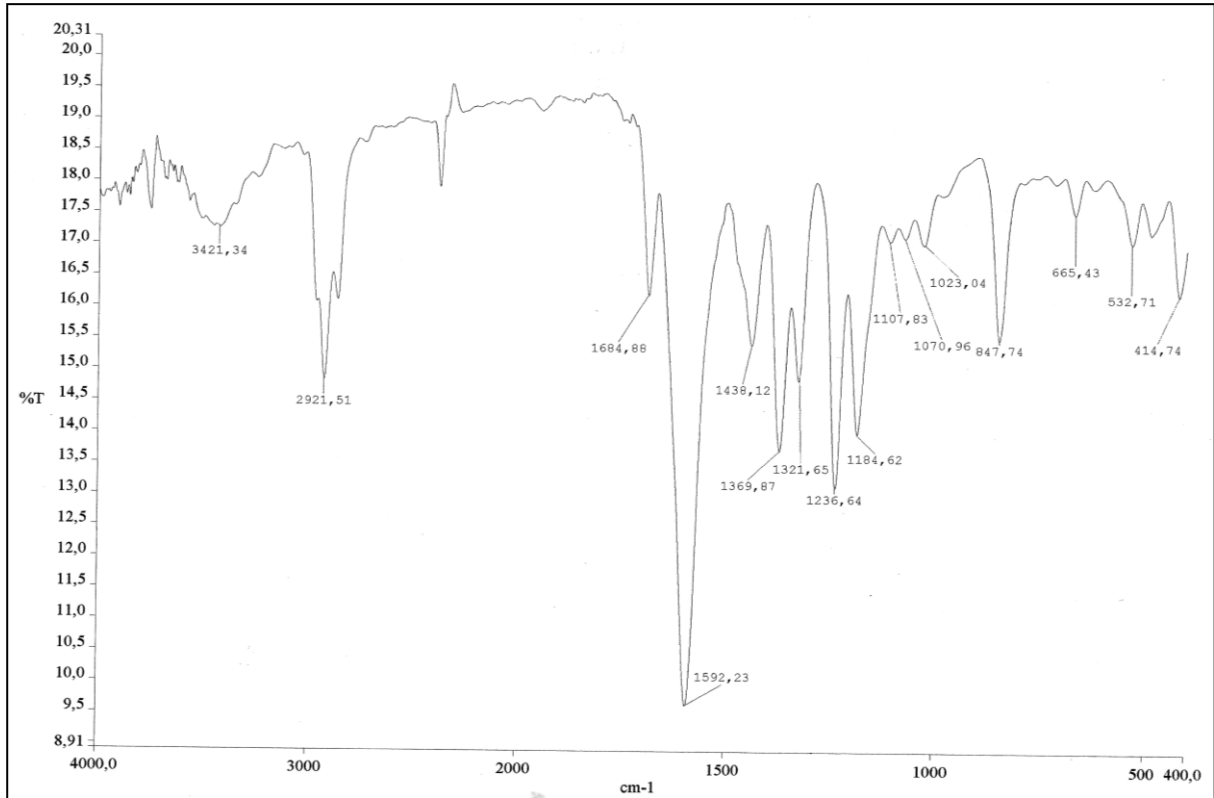


Figura 12- Espectro na região do infravermelho de CBR-1 (KBr).

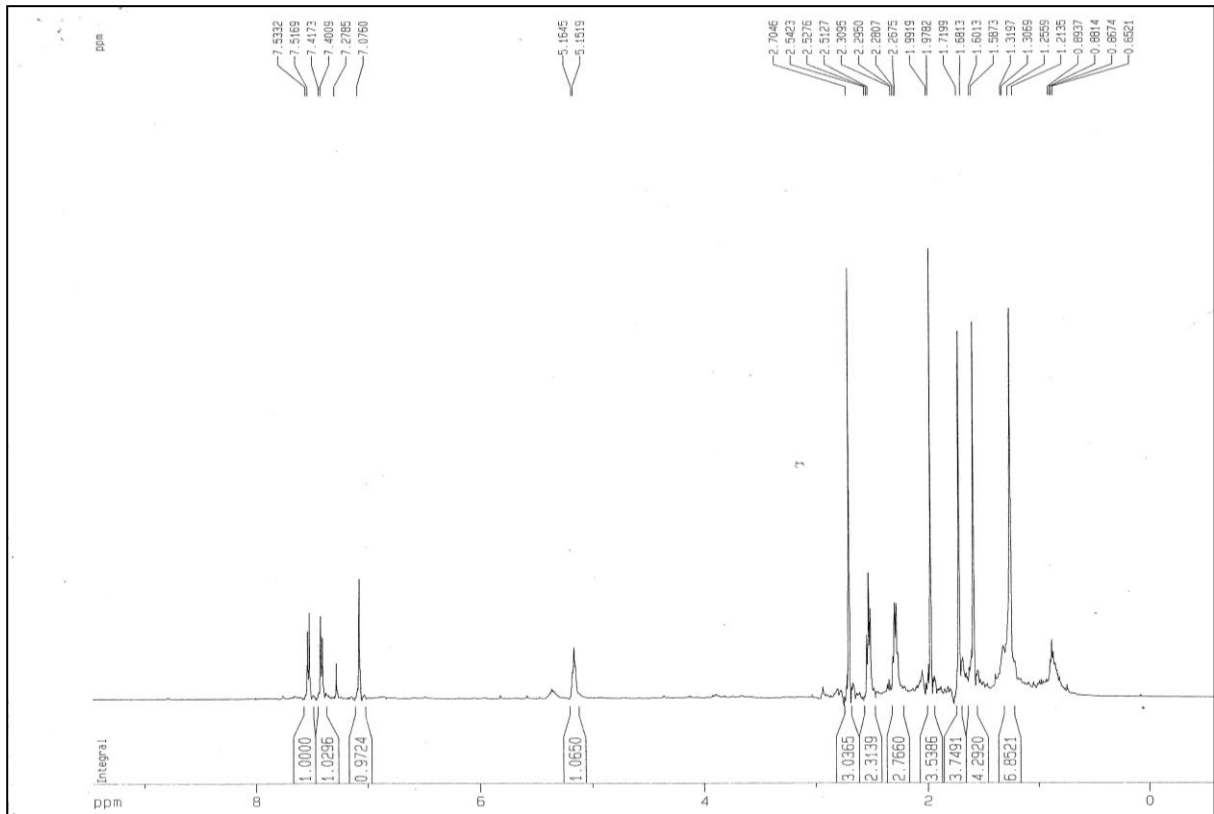


Figura 13- Espectro de RMN ¹H [500 MHz, CDCl₃] de CBR-1.

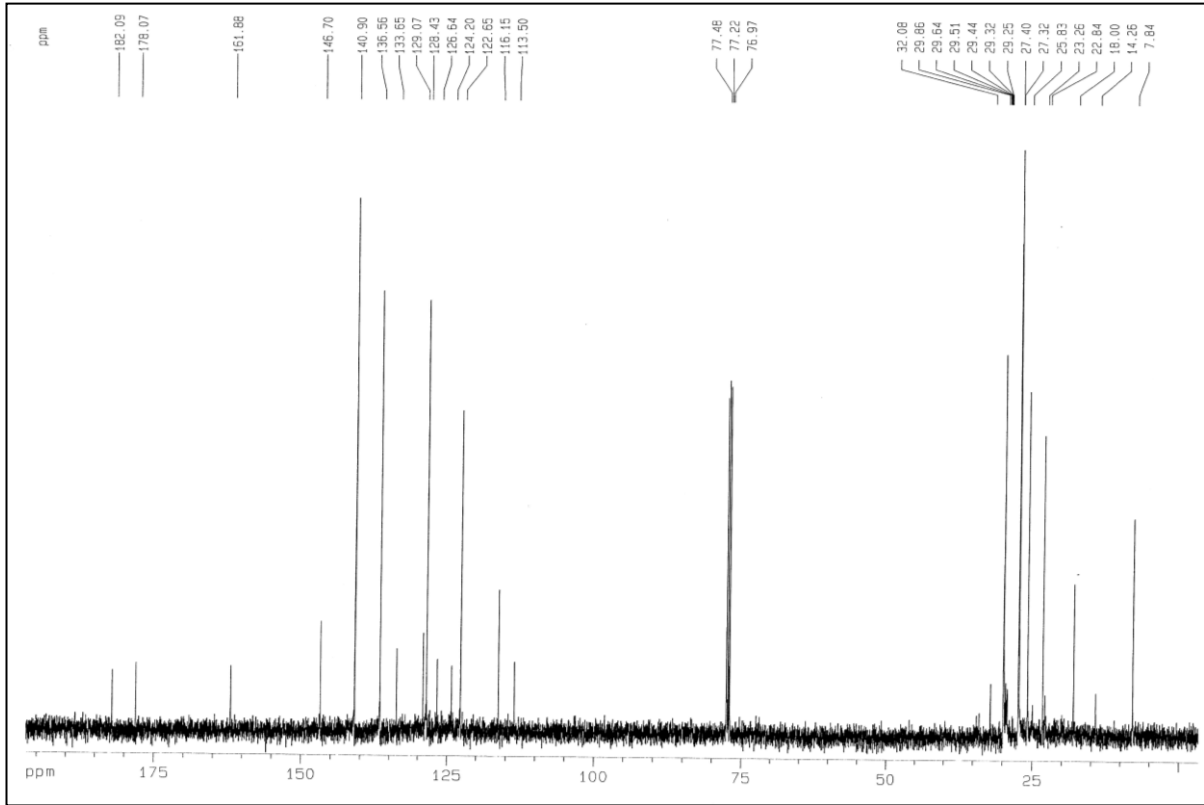


Figura 14- Espectro de RMN ¹³C-BB [125 MHz, CDCl₃] de CBR-1.

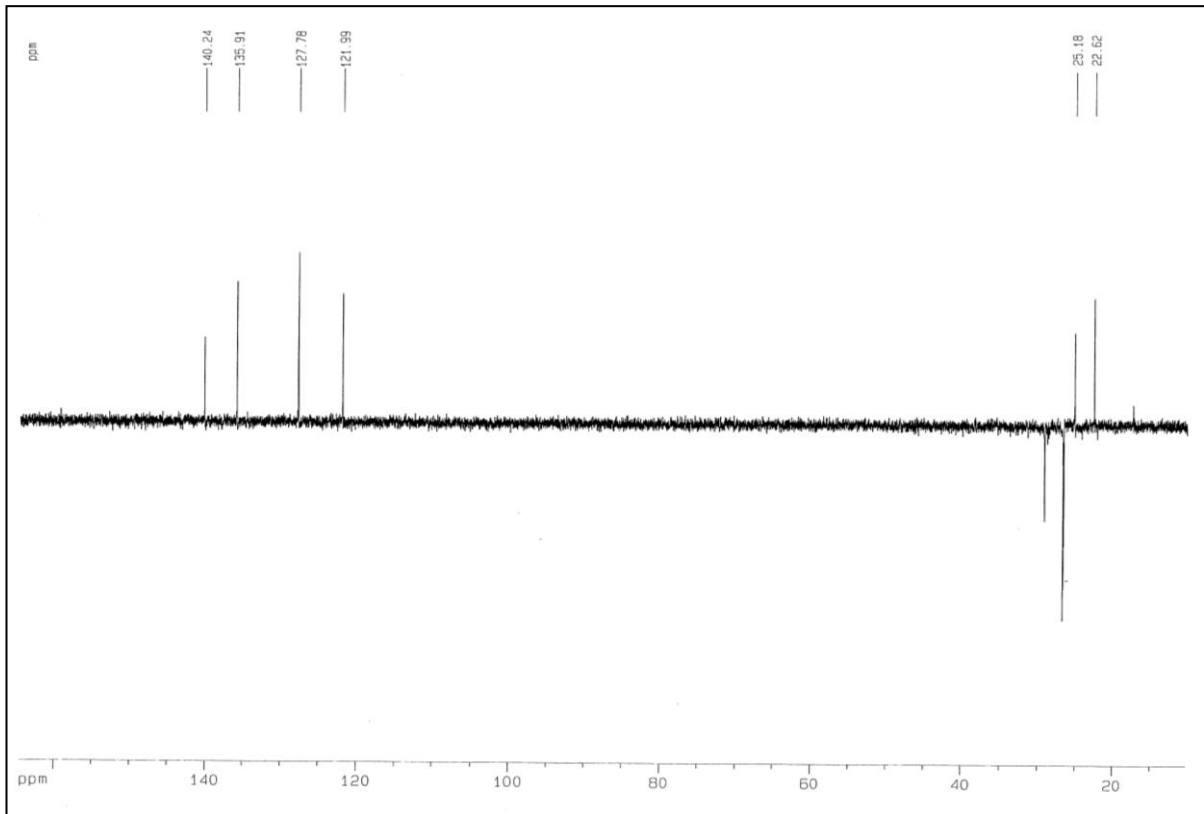


Figura 15- Espectro de RMN ¹³C-DEPT 135° [125 MHz, CDCl₃] de CBR-1.

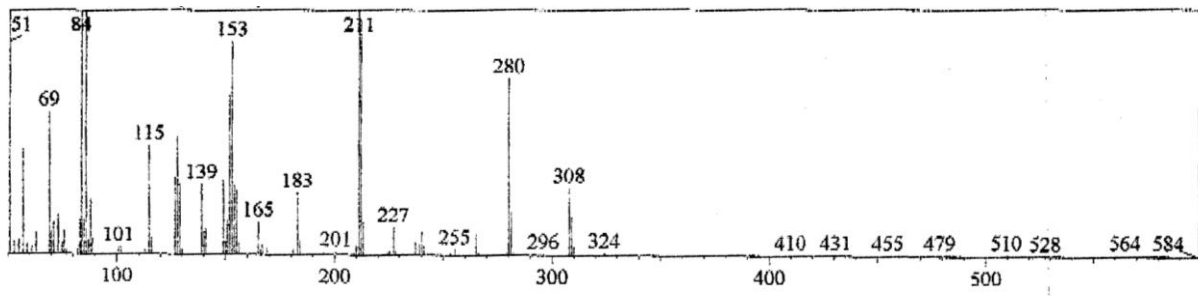


Figura 16- Espectro de massa de CBR-1.

5.2- Determinação estrutural de CBR-2

A substância CBR-2 foi obtida a partir do extrato éter de petróleo, das raízes e apresentou-se com um aspecto viscoso de cor amarelo escuro, solúvel em clorofórmio com rotação óptica $[\alpha]_D^{20} -31^\circ$ (c 0,001; CHCl_3). Literatura: $[\alpha]_D^{20} -38^\circ$ (c 1,08; CHCl_3).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 19, pág. 33) revelou absorção em 2922 cm^{-1} referente a deformação axial de ligações C-H de carbono sp^3 , absorção em 1760 cm^{-1} característicos de deformação axial de carbonila (C=O), em 1454 cm^{-1} correspondente a deformação angular no plano, da ligação C-H de alcenos, além de absorção em 1214 cm^{-1} referente a deformação axial de ligação C-O de ésteres e em 763 cm^{-1} de deformação angular fora do plano da ligação C-H.

O espectro de RMN¹H (Fig. 20, pág. 33) mostrou quatro sinais de hidrogênios ligados a carbonos olefínicos sendo dois desses carbonos oxigenados, revelando sinais de hidrogênio em δ_{H} 7,40 (1H, s, H-12) e 7,43 (1H, s, H-13), sugerindo a estrutura de um anel furânico na molécula, e revelou também a presença de dois sinais de hidrogênios ligados a carbonos metílicos em δ_{H} 1,16 (3H, d, $J=6,0$; H-14) e 1,32 (3H, d, $J=7,1$; H-15), dois sinais de hidrogênios de carbono metínico em δ_{H} 2,21 (1H, m, H-5) e 2,94 (1H, m, H-8) e seis sinais de hidrogênios heterotópicos de carbono metilênico em δ_{H} 2,74 (1H, m, H-4a) e 2,21 (1H, m, H-4b), 1,98 (1H, dd, $J=12,0$; 5,6; H-6a) e 1,88 (1H, m, H-6b), 2,56 (dd, $J=12,5$; 9,2; H-7a) e 1,89 (1H, m, H-7b) (Tab. 7, pág. 29).

Análise do espectro de RMN ¹³C-BB (Fig. 22, pág. 34) permitiu identificar a presença de sinais referentes a quinze átomos de carbono, sugerindo uma estrutura sesquiterpênica. Comparação entre os espectros de RMN ¹³C-BB e DEPT 135° (Fig. 23, pág. 35) possibilitou o reconhecimento do padrão de hidrogenação correspondente a cada átomo de carbono. Foram observados quatro sinais para carbonos quaternários, sendo um deles oxigenado, em δ_{C} 89,9 (C-1), um carbonílico em δ_{C} 179,7 (C-9) e dois olefínicos em δ_{C} 144,6 (C-3) e 122,7 (C-10), seis carbonos metínicos, sendo dois olefínicos em δ_{C} 111,9 (C-2) e 110,2 (C-11), dois olefínicos oxigenados em δ_{C} 143,5 (C-12) e δ_{C} 141,1 (C-13) e dois sp^3 em δ_{C} 29,0 (C-5) e 34,3 (C-8), três carbonos metilênicos em δ_{C}

37,5 (C-4), 47,5 (C-6) e 42,9 (C-7), e dois metílicos em δ_c 20,5 (C-14) e 15,7 (C-15) (Tab. 7, pág. 29).

Tabela 6- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C -BB de CBR-2 com padrão de hidrogenação (RMN ^{13}C -BB e DEPT 135°).

δ	C	CH	CH ₂	CH ₃	Total
89,9		29,0	37,5	15,7	
122,7		34,3	42,9	20,5	
144,6		110,2	47,5		
179,7		111,9			-
		141,1			
		143,5			
	2 C	C ₅ H ₅	C ₃ H ₆	C ₂ H ₆	
	C-O	HC-O			
	C=O				C ₁₅ H ₁₈ O ₃

A análise do espectro de massas de CBR-2 revelou o pico do íon molecular em m/z 246 daltons, confirmando a fórmula molecular C₁₅H₁₈O₃, com IDH igual a 7, referente a presença de ciclos e ligações duplas em sua estrutura.

Tabela 7- Correlação Heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (500 X 125 MHz, CDCl_3) de CBR-2.

HSQC		
C	δ_{H}	δ_{C}
1	-	89,9
2	6,11 (s)	111,9
3	-	144,6
4	2,74 (m) 2,21 (m)	37,5
5	2,21 (m)	29,0
6	1,98 (dd; 12,0; 5,6) 1,88 (m)	47,5
7	2,56 (dd; 12,5; 9,2) 1,89 (m)	42,9
8	2,94 (m)	34,3
9	-	179,7
10	-	122,7
11	6,45 (s)	110,2
12	7,40 (s)	143,5
13	7,43 (s)	141,1
14	1,16 (d; 6,0)	20,5
15	1,32 (d; 7,1)	15,7

A literatura registra a presença de quatro sesquiterpenos isolados de *C. biflora*, caprariolídeos A, B, C e D (Fig. 18, pág. 32). Análise detalhada dos espectros de RMN ^{13}C dos quatro está exposta na tabela 8. Comparação dos dados de CBR-2 e os caprariolídeos permitiu identificar CBR-2 como sendo o

(1R, 5S, 8R) 3-(furan-3'-il)-5,8-dimetil-1-oxaspiro[4.5]non-2-en-9-ona (caprariolídeo B) (Fig. 17), já isolado anteriormente das partes aéreas da espécie *C. biflora* [COLLINS *et al*, 2000], e que está sendo reportado pela primeira vez das raízes da planta.

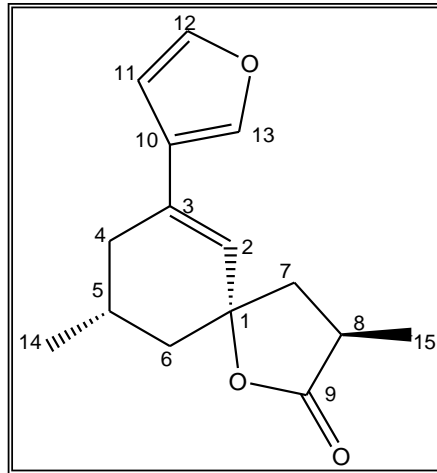


Figura 17- Estrutura de CBR-2

Tabela 8- Análise comparativa dos dados de RMN ^{13}C -BB (125 MHz, CDCl_3) de CBR-2 com dados da literatura para os caprariolídeos A-D (125 MHz, CDCl_3) [COLLINS *et al*, 2000].

	CBR-2	A	B	C	D
C	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
1	89,9	90,3	89,8	92,3	92,1
2	111,9	114,3	111,9	116,4	114,3
3	144,6	143,9	143,5	143,1	14,5
4	37,5	38,4	37,5	39,3	39,3
5	29,0	30,5	29,0	31,2	31,0
6	47,5	45,2	47,3	47,9	49,1
7	42,9	44,5	42,9	40,7	39,5
8	34,3	35,6	34,3	36,2	36,3
9	179,7	179,2	179,8	178,9	179,2
10	122,7	122,9	122,6	123,1	122,7
11	110,2	110,2	110,2	110,4	110,4
12	143,5	143,0	143,0	143,1	143,1
13	141,1	141,1	141,9	141,5	141,4
14	20,5	19,9	20,6	19,7	20,2
15	15,7	15,1	15,7	15,3	15,5

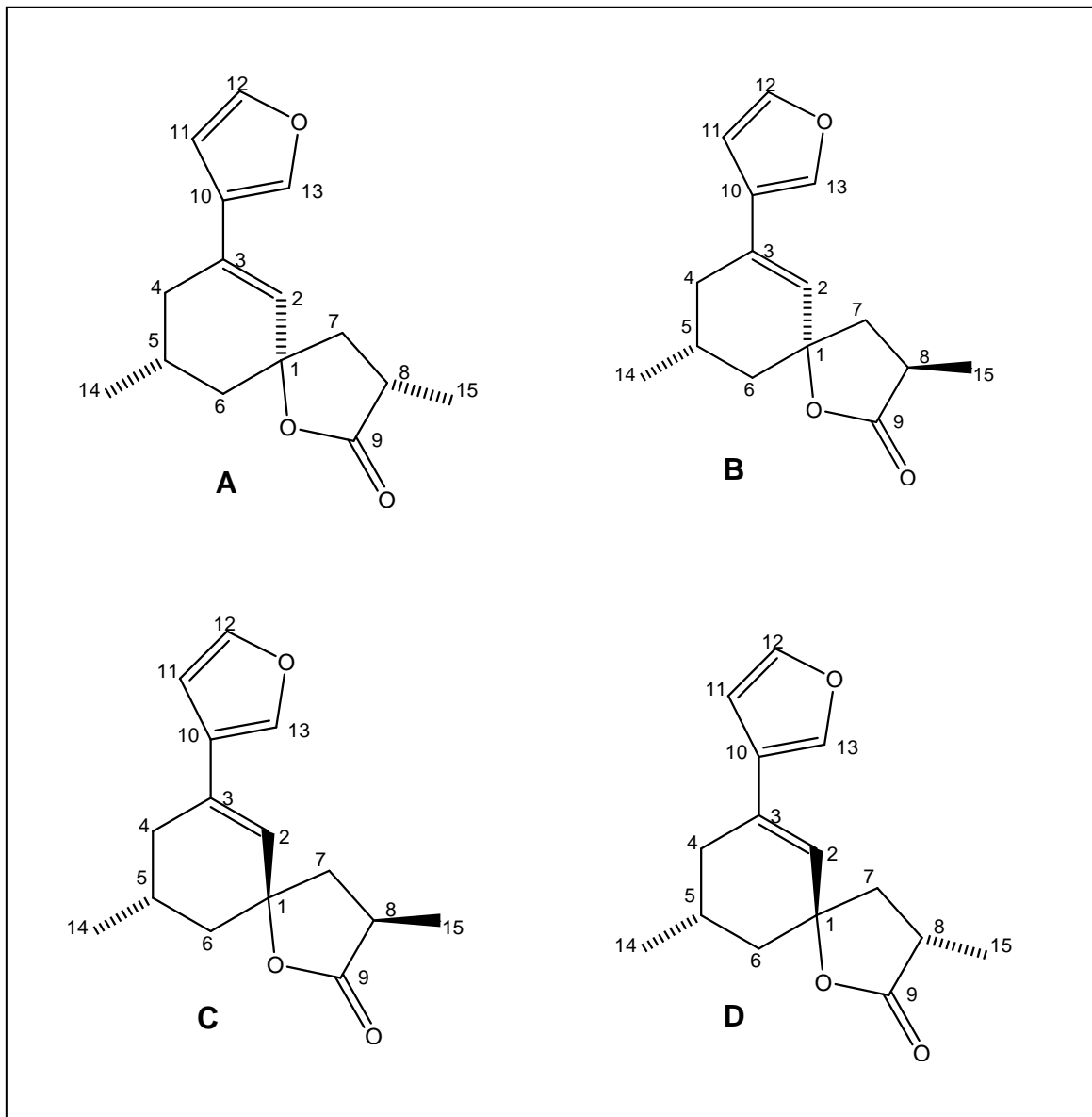


Figura 18- Estruturas dos Caprariolídeos A-D [COLLINS *et al*, 2000]

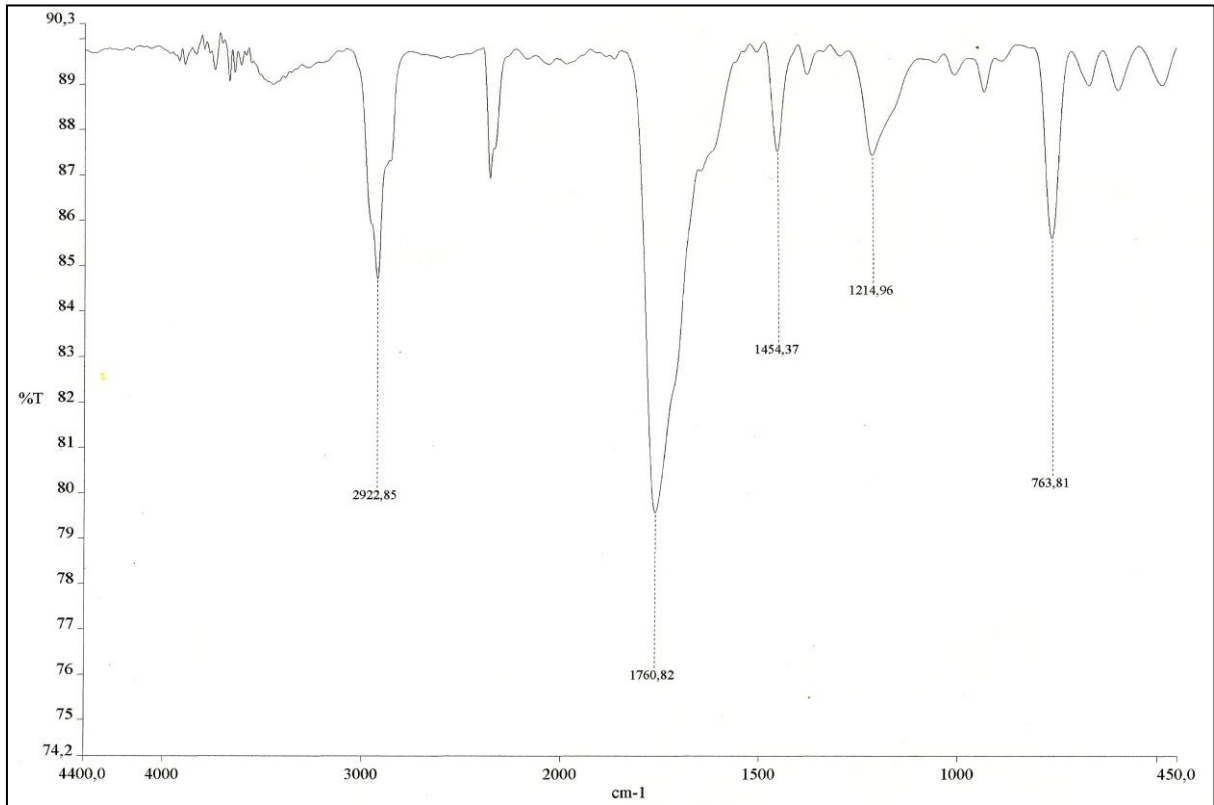


Figura 19- Espectro na região do infravermelho de CBR-2.

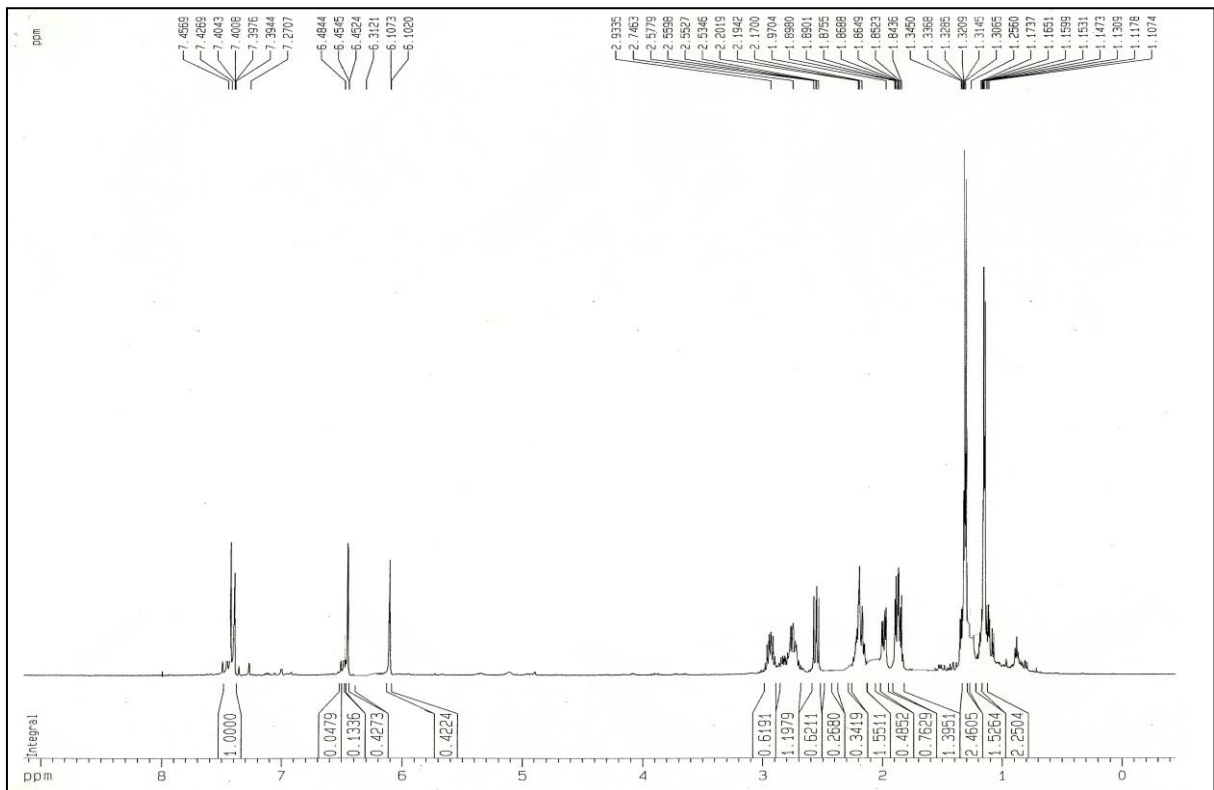


Figura 20- Espectro de RMN ¹H [500 MHz, CDCl₃] de CBR-2.

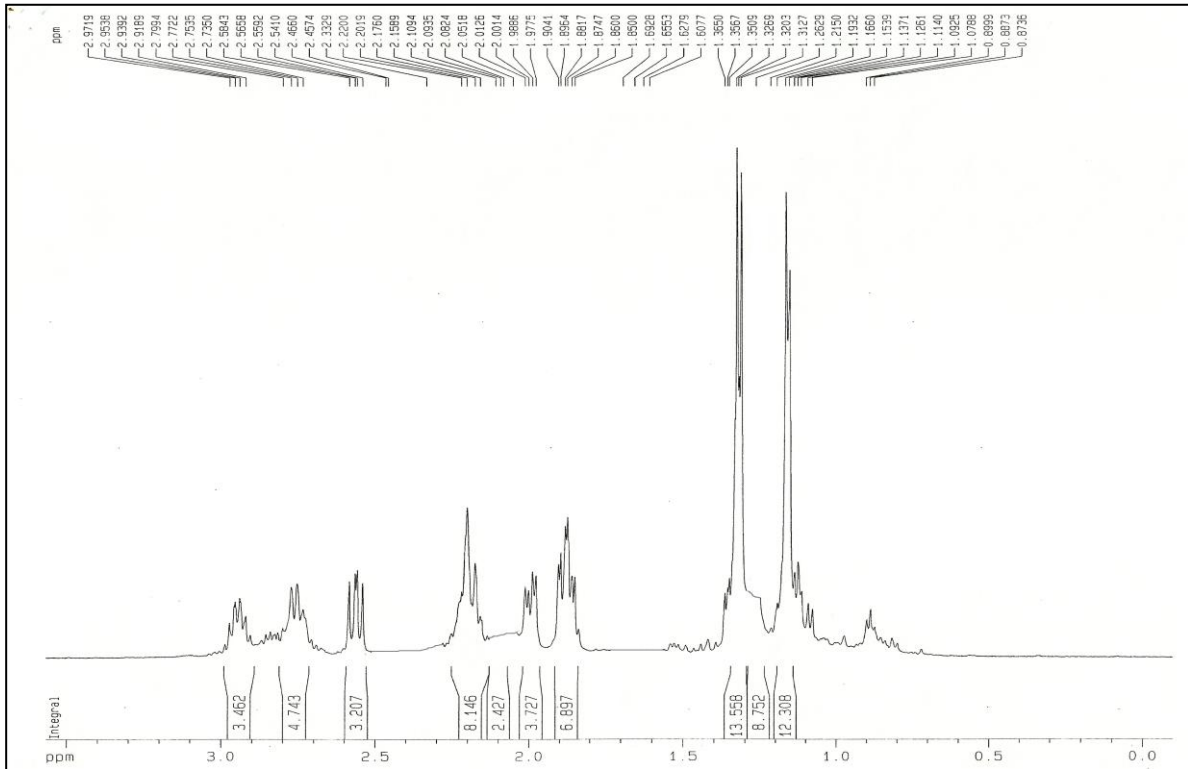


Figura 21- Expansão do espectro de RMN ^1H [0,7 a 3 ppm, 500 MHz, CDCl_3] de CBR-2.

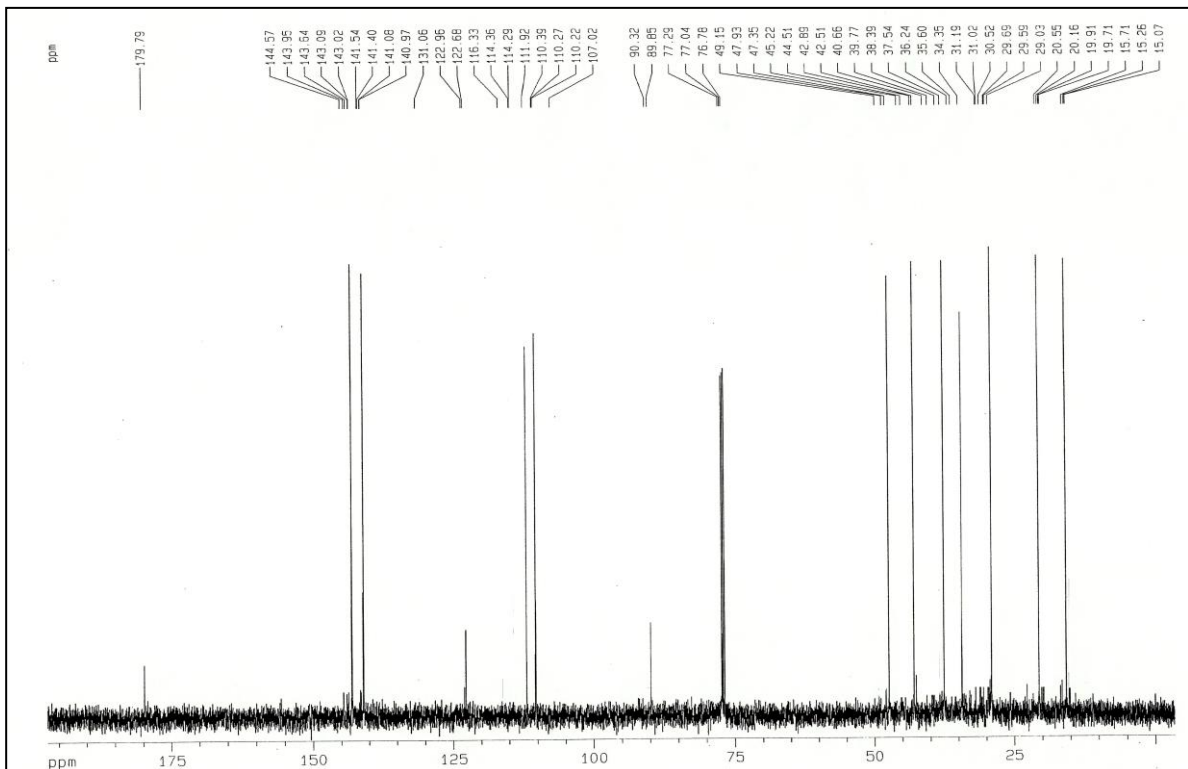


Figura 22- Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, CDCl_3] de CBR-2.

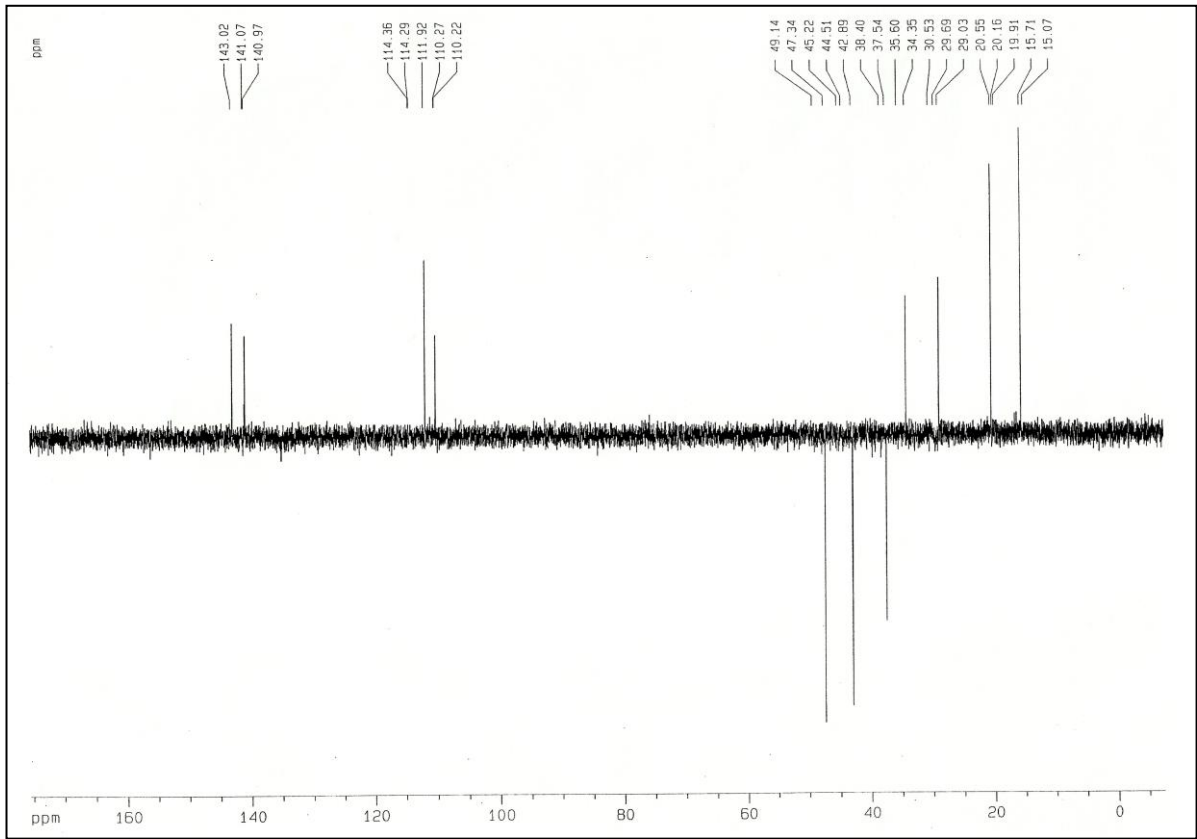
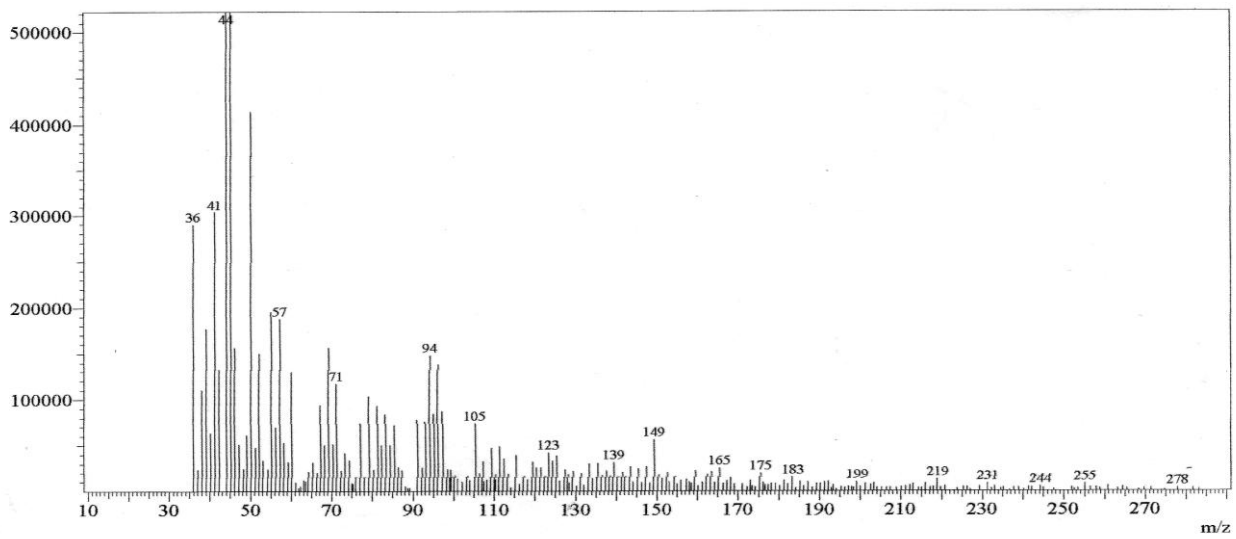


Figura 23- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] (acima) e espectro de massa (abaixo) de CBR-2.



5.3- Determinação estrutural de CBC-1

O composto denominado CBC-1, foi obtido do extrato metanólico do caule, apresentando-se como um sólido amorfo, com ponto de fusão 160-162 °C, solúvel em água e piridina.

O espectro de absorção de IV (Fig. 25, pág. 37) apresentou uma banda larga em 3293 cm^{-1} característica de deformação axial de grupos hidroxila (O-H), absorção em 2939 cm^{-1} de deformação axial de ligações C-H de carbono sp^3 e absorções em 1083 e 1020 cm^{-1} característicos de deformação axial correspondente a ligações C-O (alcoóis primários e secundários).

O composto apresentou dados de RMN ^1H : δ_{H} 3,74; 3,84 e 3,92 todos em região de hidrogênios alifáticos, e RMN ^{13}C : δ_{C} 63,9; 70,0 e 71,6 mostrando apenas um sinal de carbono metilênico (Tab. 9, pág. 37). A análise destes dados permitiu identificá-los como um composto poli-hidroxiado. Análise dos dados obtidos em comparação com os dados da literatura permitiu identificá-lo como D-manitol (Fig. 24), já identificado anteriormente nesta espécie [FONSECA, 2003].

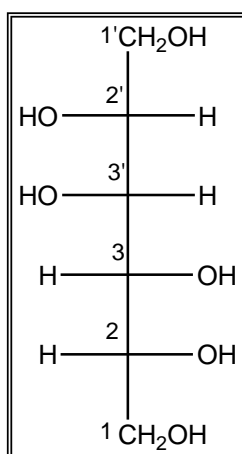


Figura 24- Estrutura de CBC-1.

Tabela 9- Análise comparativa dos dados de RMN ¹³C-BB (125 MHz, D₂O) de CBC-1 com dados da literatura, RMN ¹³C-BB (75 MHz, D₂O), para o D-manitol [FONSECA, 2003].

	CBC-1	D-manitol [FONSECA, 2003]
C	δ_c	
1, 1'	63,9	65,9
2, 2'	70,0	72,0
3, 3'	71,6	73,6

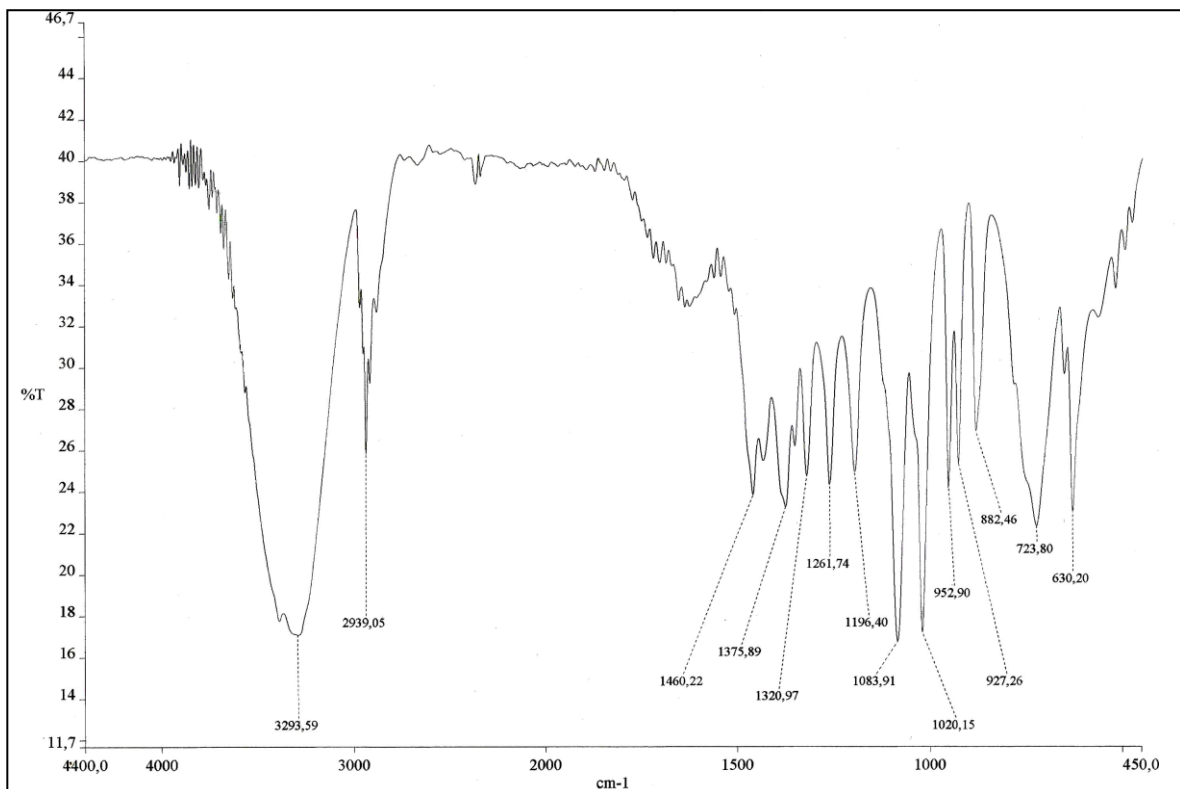


Figura 25- Espectro na região do infravermelho de CBC-1 (KBr).

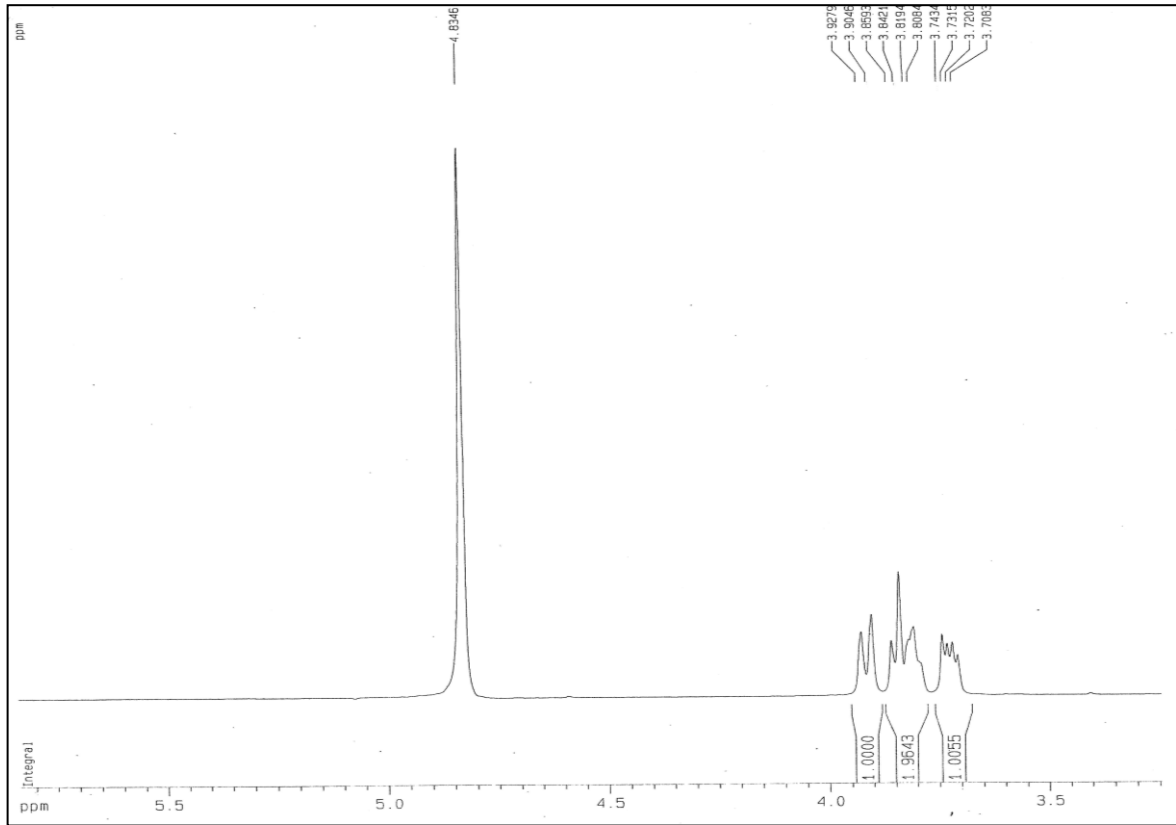


Figura 26- Espectro de RMN ^1H [500 MHz, D_2O] de CBC-1.

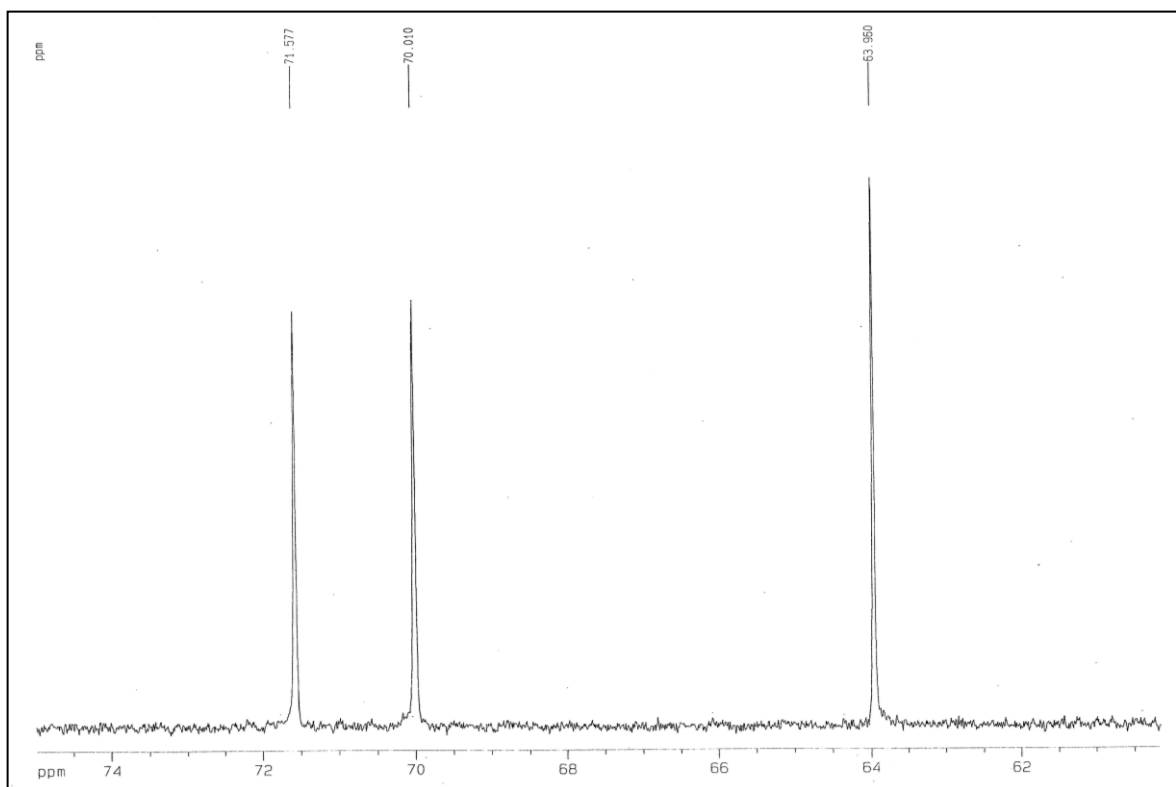


Figura 27- Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, D_2O] de CBC-1

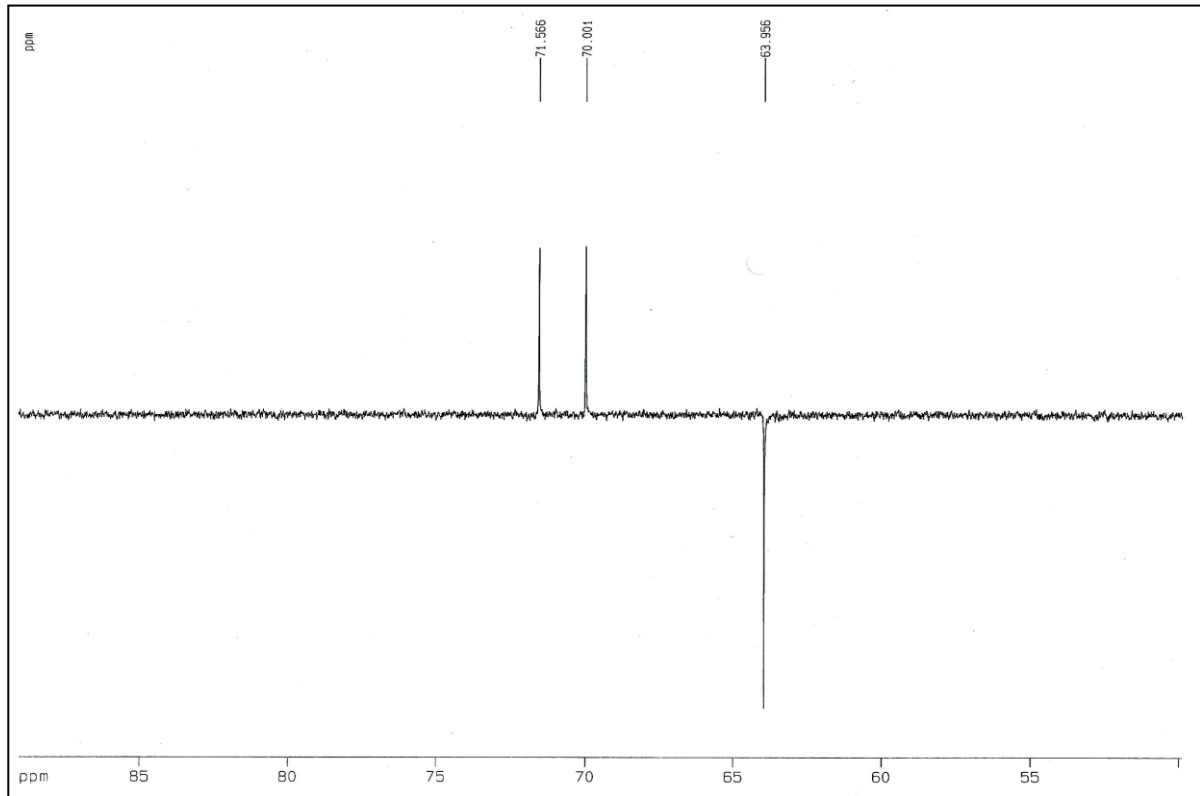


Figura 28- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, D_2O] de CBC-1.

5.4- Determinação estrutural de CBC-2

A substância denominada CBC-2, foi obtida através do fracionamento cromatográfico do extrato metanólico do caule, apresentando um aspecto viscoso de coloração marrom, solúvel em acetona com rotação específica, $[\alpha]_D^{20} +38^\circ$ (c 0,0006; $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$).

A análise do espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 32, pág. 47) permitiu observar uma banda larga em 3411 cm^{-1} , característica de deformação axial da ligação O-H, bandas em torno de 2929 cm^{-1} relativas a deformação axial de grupos C-H de alcanos, banda em torno 1242 cm^{-1} característica de deformação angular de grupos CH_2 , além de bandas entre 1149 e 1033 cm^{-1} atribuídas a deformações axiais da ligação C-O.

O espectro RMN ^1H (Fig. 33, pág. 47) apresentou sinal de hidrogênio metínico ligado a carbono carbinólico em $\delta_{\text{H}} 3,76$ (1H, d, $J=11,0$; H-6), quatro sinais de hidrogênios metilênicos ligados a carbonos oxigenados em $\delta_{\text{H}} 3,70$ (1H, dt, $J=13,7$; $3,7$; H-3a), $3,61$ (1H, ddd, $J=13,7$; $5,0$; $3,7$; H-3b), $4,39$ (1H, d, $J=9,0$; H-10a) e $3,40$ (1H, dd, $J=9,0$; $1,5$; H-10b) e um sinal de hidrogênio ligado a carbono acetálico em $\delta_{\text{H}} 5,39$ (1H, d, $J=5,0$) (Tab. 11, pág. 43).

Análise do espectro de RMN ^{13}C -BB (Fig. 37, pág. 49) permitiu identificar a presença de sinais referentes a nove átomos de carbono. Comparação entre os espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° (Fig. 38, pág. 50) possibilitou o reconhecimento do padrão de hidrogenação correspondente a cada átomo de carbono. Foram observados quatro sinais para carbonos metínicos, sendo um deles oxigenado em $\delta_{\text{C}} 76,4$ (C-6) e o outro clorado, em $\delta_{\text{C}} 73,0$ (C-7), além de um duplamente oxigenado (carbono acetálico) em $\delta_{\text{C}} 110,7$ (C-1), três sinais para carbonos metilênicos, sendo dois oxigenados em $\delta_{\text{C}} 57,9$ (C-3) e $71,8$ (C-10) e dois sinais para carbonos quaternários oxigenados em $\delta_{\text{C}} 72,8$ (C-5) e $84,0$ (C-8) (Tab. 11, pág. 43).

O espectro de massa de alta resolução com ionização por *electrospray* (EM-IES) (Fig. 46, pág 55), no modo negativo, foram obtidos picos do íon molecular $[\text{M}+\text{Cl}]^-$, em m/z 271,0231, m/z 273,0110 (calculado) e m/z 275,0081

(calculado), em uma intensidade relativa de 9:6:1 correspondendo aos picos [M], [M+2] e [M+4], possibilitando assim a confirmação da presença de um cloro na molécula e a determinação da massa molar exata de CBC-2, bem como a confirmação da fórmula molecular $C_9H_{13}O_5Cl$ com IDH igual a 3.

A localização do cloro na substância CBC-2 foi verificada através de uma reação de acetilação, na qual foram obtidos dois produtos acetilados. Através dos dados espectroscópicos destes produtos foi possível determinar a localização do cloro no carbono C-7. A determinação estrutural e os dados espectroscópicos dos derivados acetilados encontram-se nas páginas 56-71.

Os fragmentos que justificam os principais picos observados no espectro de massa de CBC-2 encontram-se ilustrados na figura 47 (pág 55).

Tabela 10- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C -BB de CBC-2 com padrão de hidrogenação (RMN ^{13}C -BB e RMN $^{13}DEPT$).

δ	C	CH	CH ₂	CH ₃	Total
72,8		101,7	57,9		
84,0		76,5	31,9		
		73,0	71,8		
		55,2		-	-
2(C-OH)		CH HC-Cl O-HC-O HC-OH	C ₃ H ₆	-	C ₉ H ₁₃ O ₅ Cl

O espectro bidimensional de correlação heteronuclear HSQC (Fig. 39, pág. 50) permitiu correlacionar, a uma ligação, os sinais de cada hidrogênio ao seu respectivo carbono (Tab. 11, pág. 43).

O espectro bidimensional de correlação heteronuclear de carbono e hidrogênio via duas ligações ($^2J_{CH}$) e três ligações ($^3J_{CH}$), HMBC (Fig. 41, pág.

51) foi utilizado para atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos átomos de carbonos não hidrogenados e confirmação da correlação, de sinais de carbonos, com hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos.

A correlação entre os hidrogênios H-10a e H-10b (δ_H 4,39 e 3,40), H-3a e H-3b (δ_H 3,70 e 3,61) e H-9 (δ_H 2,19) com o carbono C-1 (δ_C 101,0) mostrou a presença de um sistema de três ciclos no esqueleto do iridóide, através da formação de um acetal (Fig. 29).

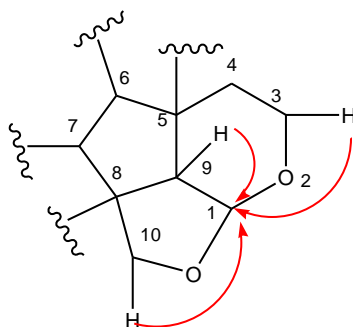


Figura 29- Correlações à longa distância evidenciando a formação de um acetal.

Foram observados também no espectro HMBC (Fig. 41, pág. 51) acoplamentos de hidrogênios e carbonos que possibilitaram justificar a localização das hidroxilas, nos carbonos C-5, C-6, e C-8 e do cloro em C-7 (Fig. 30).

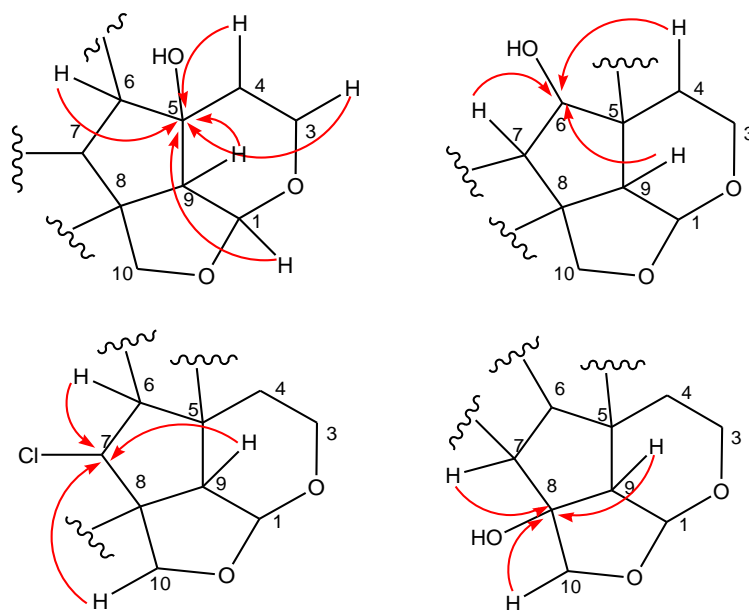


Figura 30- Correlações à longa distância evidenciando a localização das hidroxilas e do cloro nos carbonos C-5, C-6, C-8 e C-7, respectivamente.

Tabela 11- Correlação Heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC e HMBC (500 X 125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) de CBC-2.

HSQC			HMBC	
C	δ_{H}	δ_{C}	$^2\text{J}_{\text{C,H}}$	$^3\text{J}_{\text{C,H}}$
1	5,39 (d; 5,0)	101,7	H-9	2H-3, 2H-10
3	3,70 (dt; 13,7; 3,7) 3,61 (ddd; 13,7; 5,0; 3,7)	57,9	H-4b	H-1
4	1,84 (dl; 15,0) 1,58 (dt; 15,0; 5,0)	31,9	2H-3	H-6
5	-	72,8	2H-4, H-6, H-9	H-1, 2H-3
6	3,76 (d; 11,0)	76,5	H-7	2H-4, H-9
7	4,55 (dd; 11,0; 1,5)	73,0	H-6	2H-10, H-9
8	-	84,0	H-7, H-9, 2H-10	-
9	2,19 (d; 5,0)	55,2	H-1	2H-4, 2H-10
10	4,39 (d; 9,0) 3,40 (dd; 9,0; 1,5) W com 7	71,8	-	H-7

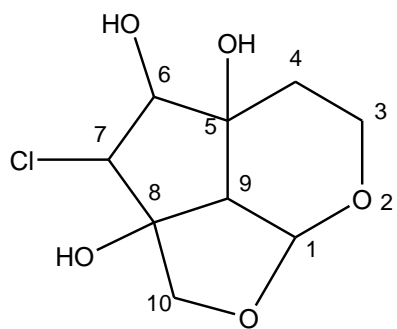
Estudo detalhado dos dados espectrais de CBC-2 possibilitou propor a estrutura de um iridóide. Busca na literatura permitiu encontrar dois iridoides com semelhanças, que foram utilizados para confirmação da estrutura de CBC-2 (Fig. 31, pág. 46). Semelhanças significativas foram observadas no carbono C-5 que trata-se de um carbono tetra-substituído, com deslocamento químico de carbono sp^3 em δ_{C} 72.8 e C-7 com deslocamento em δ_{C} 73.0, semelhantes ao Mo-2 (Fig. 31, pág. 46).

Com os dados da literatura foi possível montar uma tabela comparativa com os dados espectroscópicos destas substâncias (Tab. 12, pág. 45) e sugerir para CBC-2 uma estrutura semelhante ao Mo-2, com um cloro na posição 7.

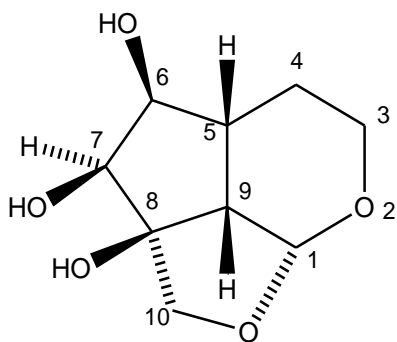
Desta forma CBC-2 foi identificado como um iridoide clorado elucidado como o 7-cloro-8-(hidroxi-metil)octa-hidrociclopenta[c]piran-1,10-oxira-5,6,8-triol, que já possui registro na literatura, mas está sendo reportado pela primeira vez na espécie *C. biflora* [KANEMOTO *et al*, 2008].

Tabela 12- Análise comparativa dos dados de RMN ^1H (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) e ^{13}C -BB (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) de CBC-2 com dados da literatura Mo-1[WANG *et al*, 2006] e Mo-2 [KANEMOTO *et al*, 2008].

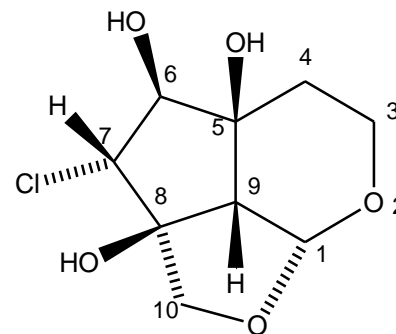
C	CBC-2		Mo-1		Mo-2	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	5,39 (d; 5,0)	101,7	5,29 (d; 5,9)	101,9	5,41 (d; 6,0)	102,3
3	3,70 (dt; 13,7; 3,7) 3,61 (ddd; 13,7; 5,0; 3,7)	57,9	3,92 (dd; 11,8; 2,7) 3,51 (ddd; 11,8; 5,1; 2,1)	56,4	3,74 (ddd; 13,0; 13,0; 2,0) 3,66 (ddd; 13,6; 2,0)	58,5
4	1,84 (dl; 15,0) 1,58 (dt, 15,0; 5,0)	31,9	1,78 (m) 1,62 (br dd; 14,1; 2,0)	22,3	1,87 (ddd; 13,2; 2,0) 1,62 (ddd; 13,0; 13,0; 6,0)	32,0
5	-	72,8	2,45 (m)	37,1	-	73,1
6	3,76 (d; 11,0)	76,5	3,95 (dd; 8,5; 3,7)	74,1	3,71 (d; 11,0)	76,8
7	4,55 (dd; 11,0; 1,5)	73,0	3,70 (d; 3,7)	79,4	4,53 (dd; 11,0; 2,0)	72,4
8	-	84,0	-	85,8	-	84,3
9	2,19 (d; 5,0)	55,1	2,18 (dd; 10,3; 1,9)	46,8	2,15 (d; 6,0)	55,7
10	4,39 (d; 9,0) 3,40 (dd; 9,0; 1,5) W com 7	71,8	3,78 (d; 10,1) 3,62 (d; 10,1)	75,4	4,46 (d; 10,0) 3,40 (dd; 10,0; 2,0)	72,2



CBC-2



Mo-1



Mo-2

Figura 31- Estruturas dos iridóides CBC-2, Mo-1 e Mo-2.

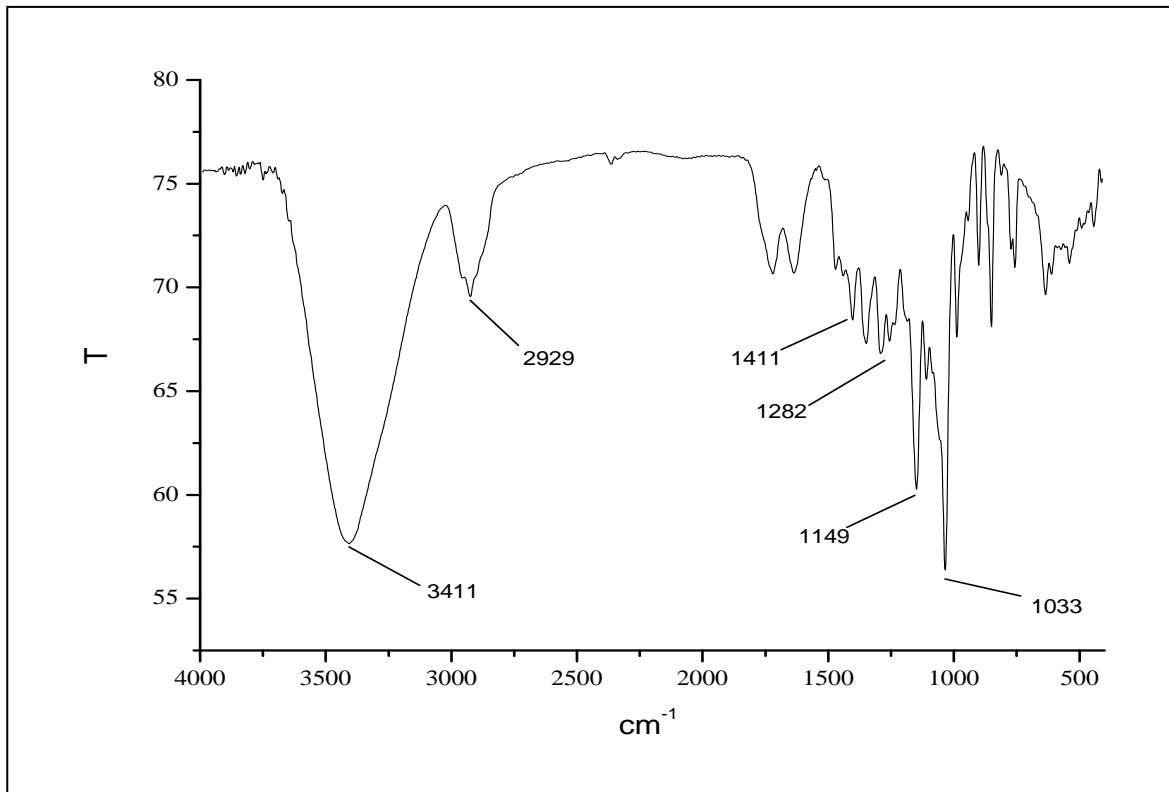


Figura 32- Espectro na região do infravermelho de CBC-2 (KBr).

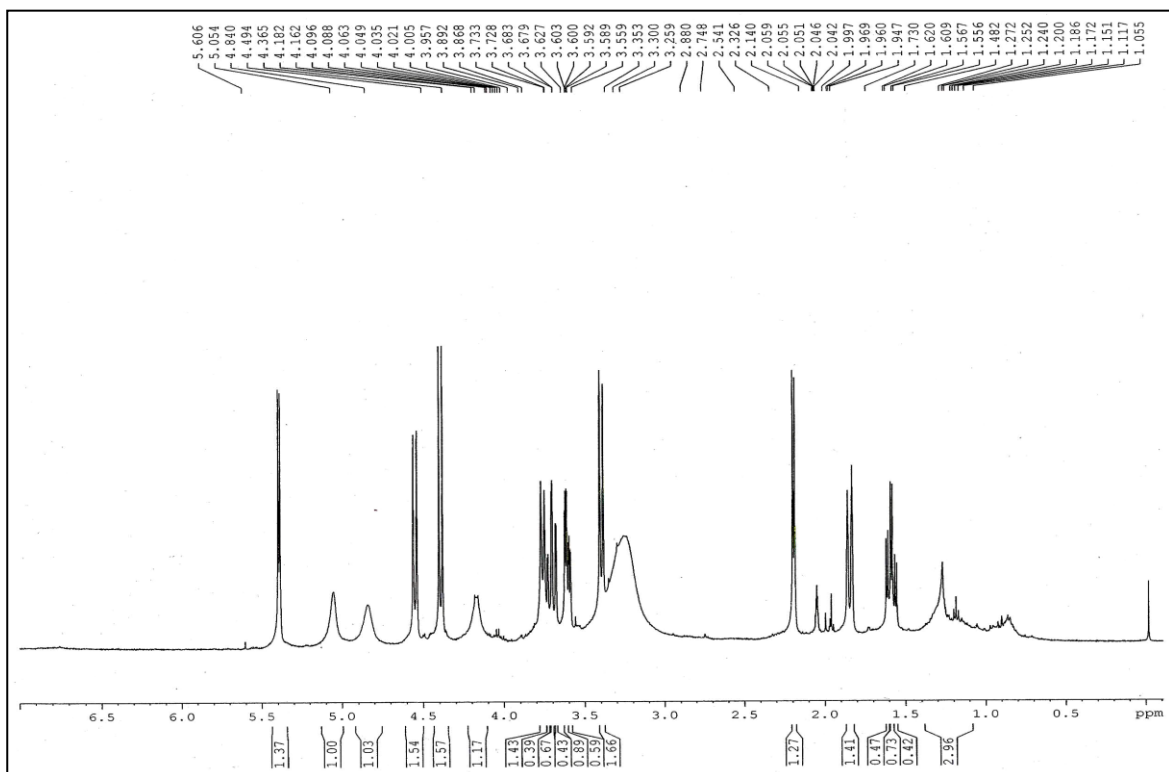


Figura 33- Espectro de RMN ¹H [500 MHz, (CD₃)₂CO] de CBC-2.

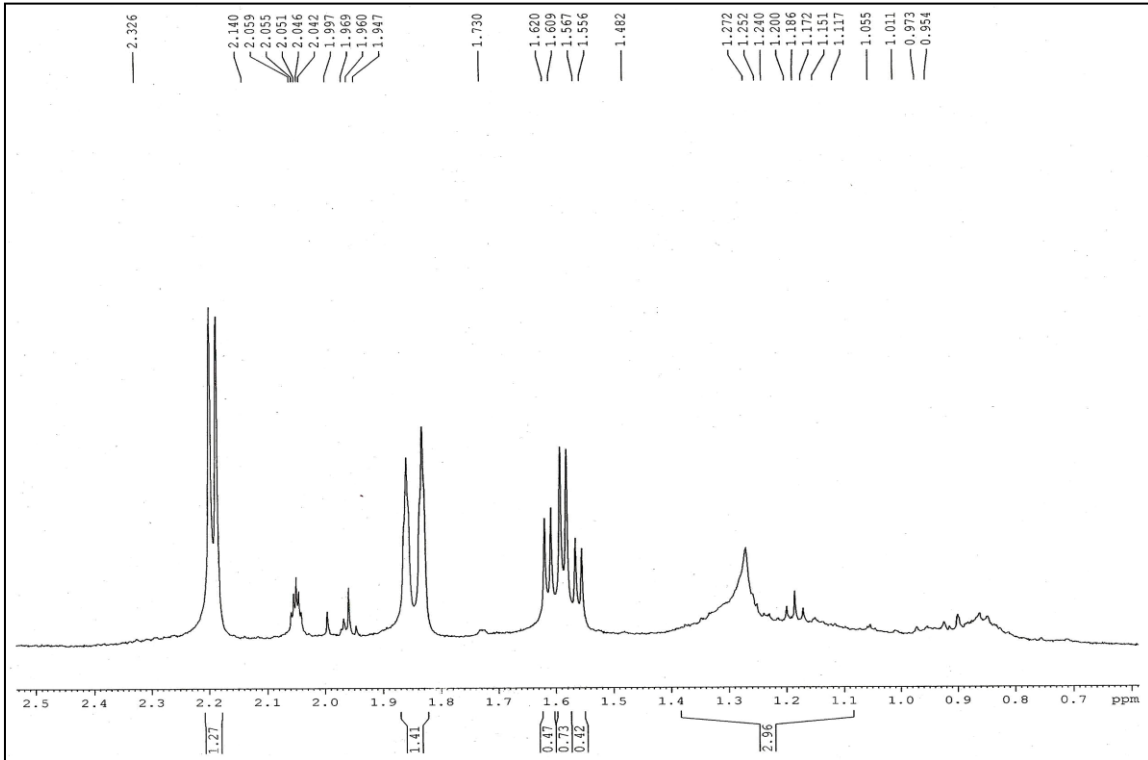


Figura 34- Expansão do espectro de RMN ¹H [500 MHz, (CD₃)₂CO] de CBC-2.

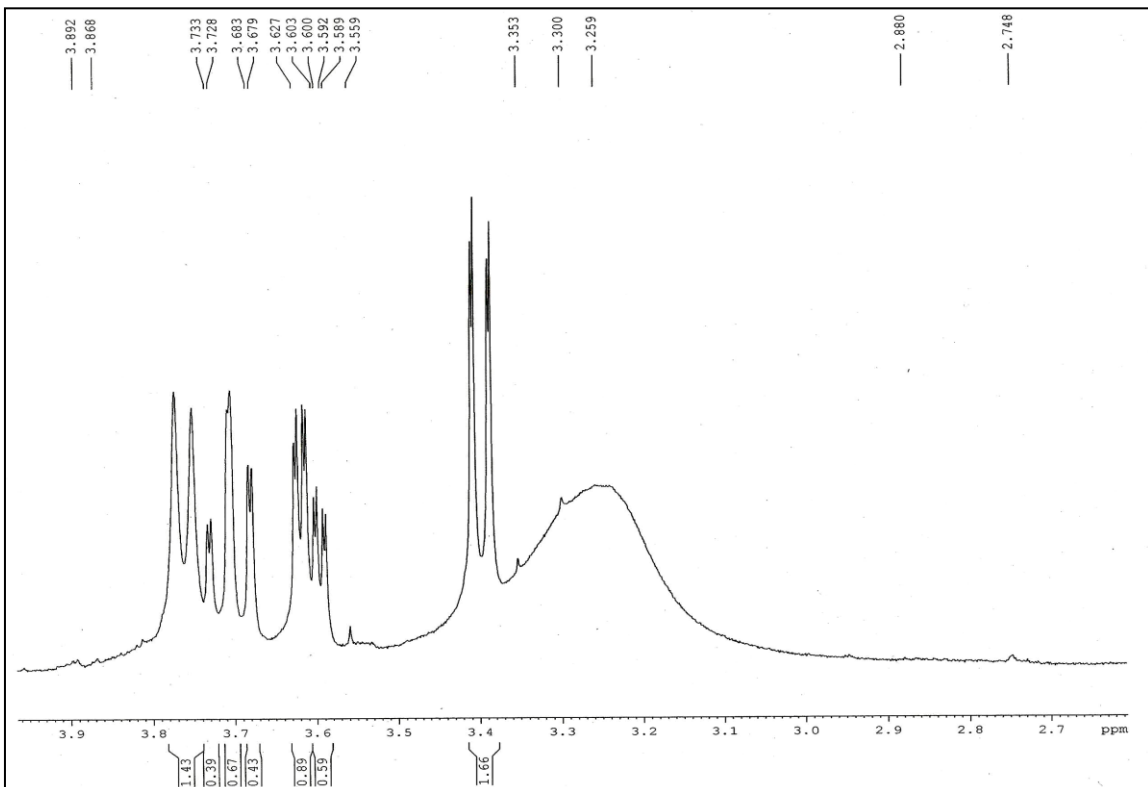


Figura 35- Expansão do espectro de RMN ¹H [500 MHz, (CD₃)₂CO] de CBC-2.

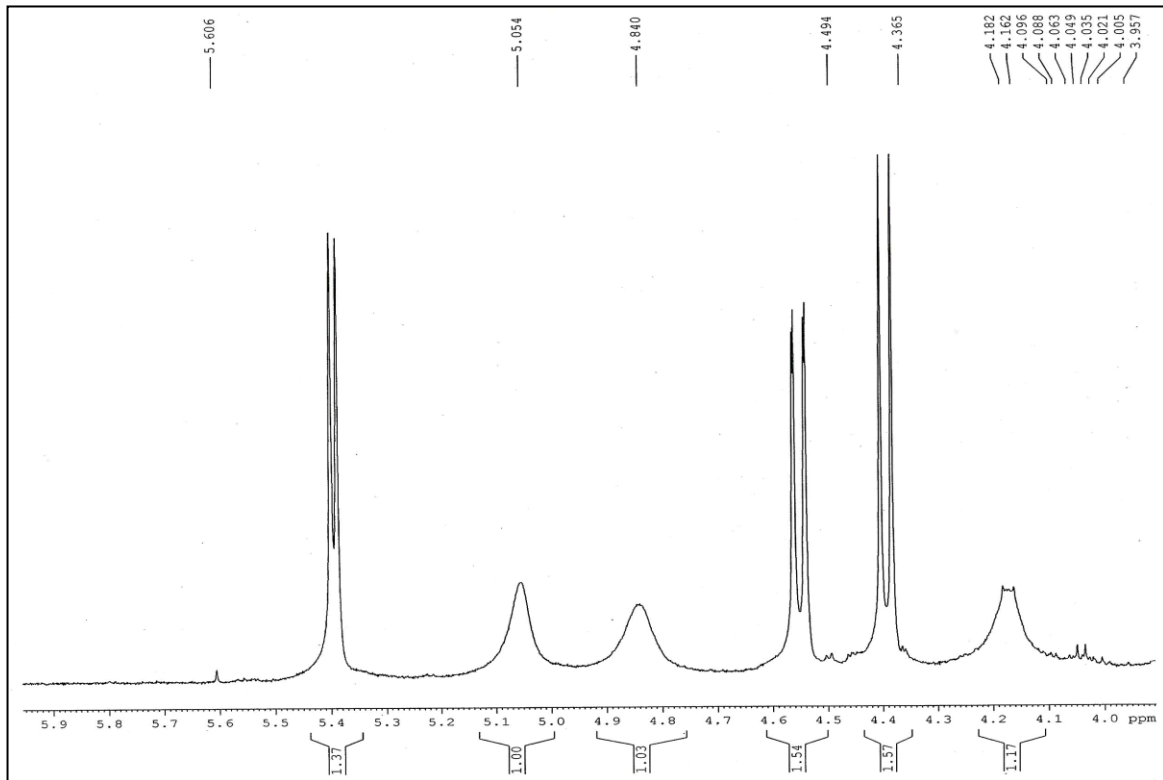


Figura 36- Expansão do espectro de RMN ¹H [500 MHz, (CD₃)₂CO] de CBC-2.

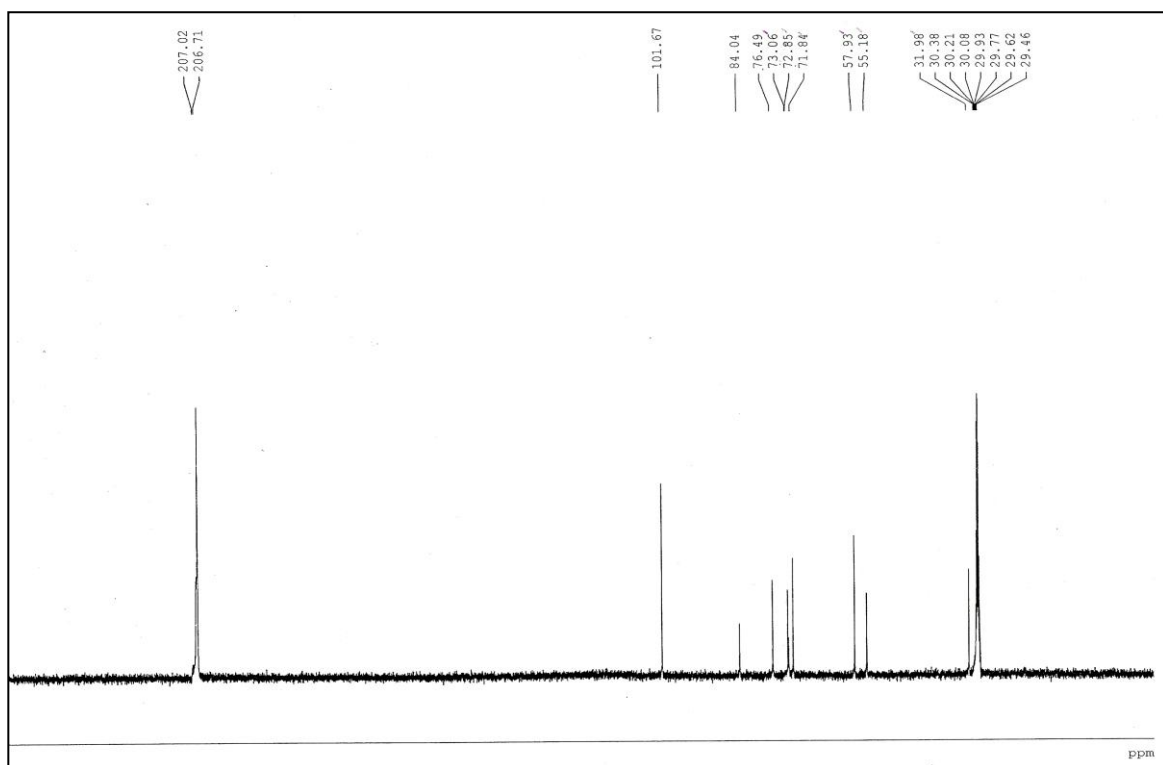


Figura 37- Espectro de RMN ¹³C-BB [125 MHz, (CD₃)₂CO] de CBC-2.

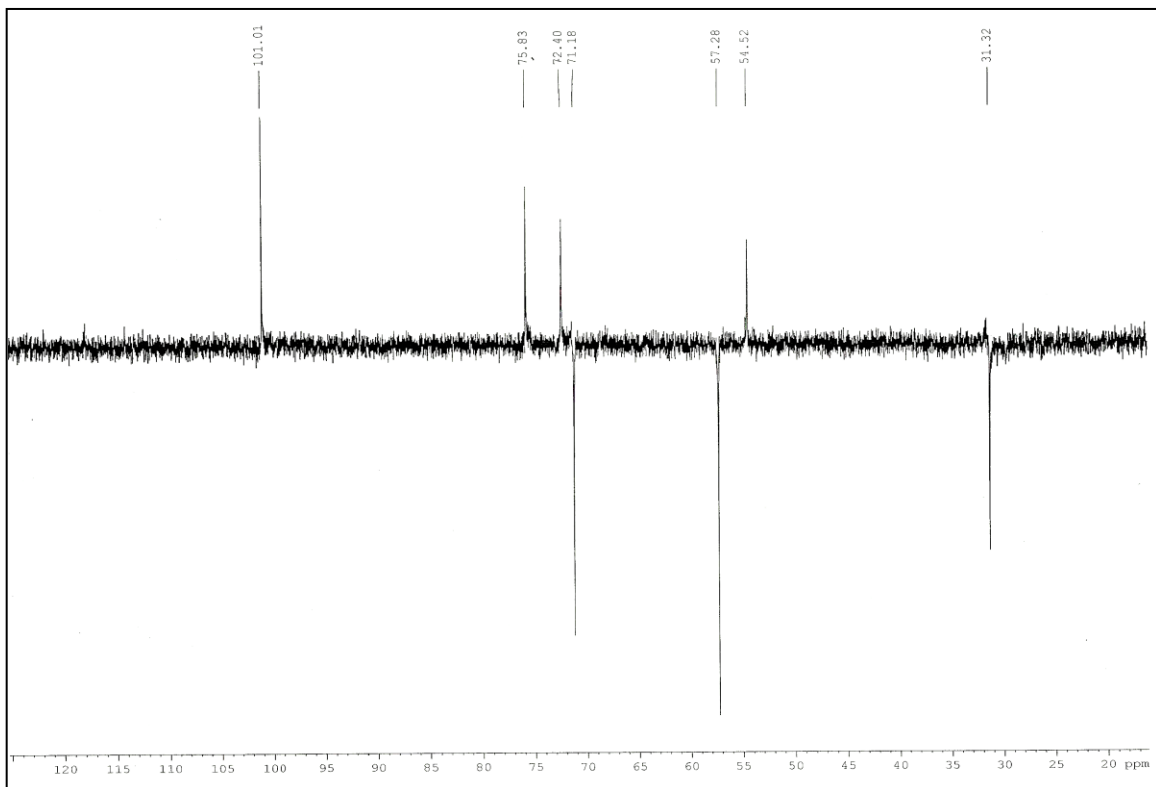


Figura 38- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de CBC-2.

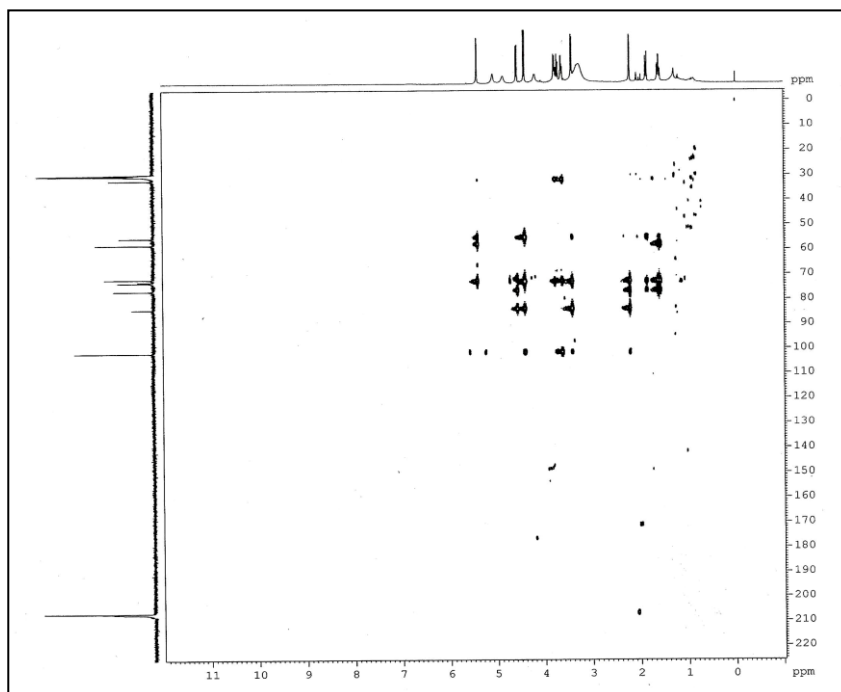


Figura 39- Espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HSQC [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de CBC-2.

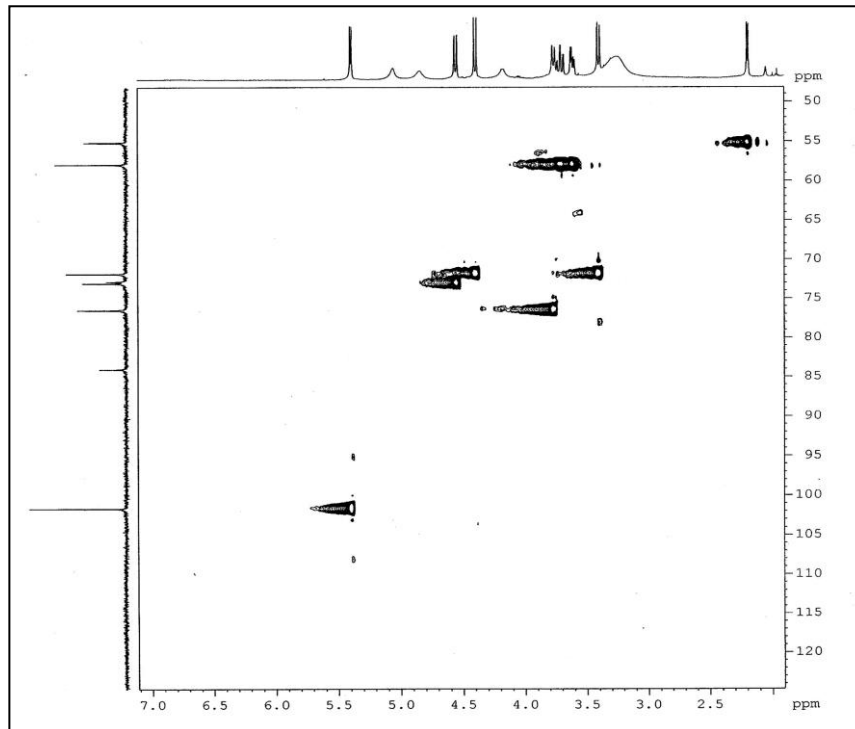


Figura 40- Expansão do espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HSQC [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de CBC-2.

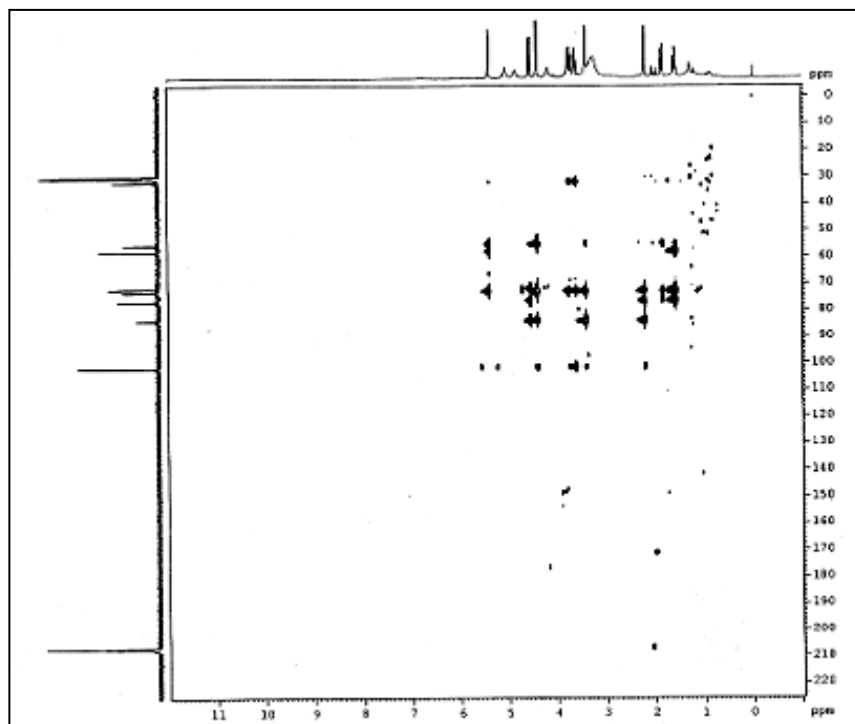


Figura 41- Espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de CBC-2

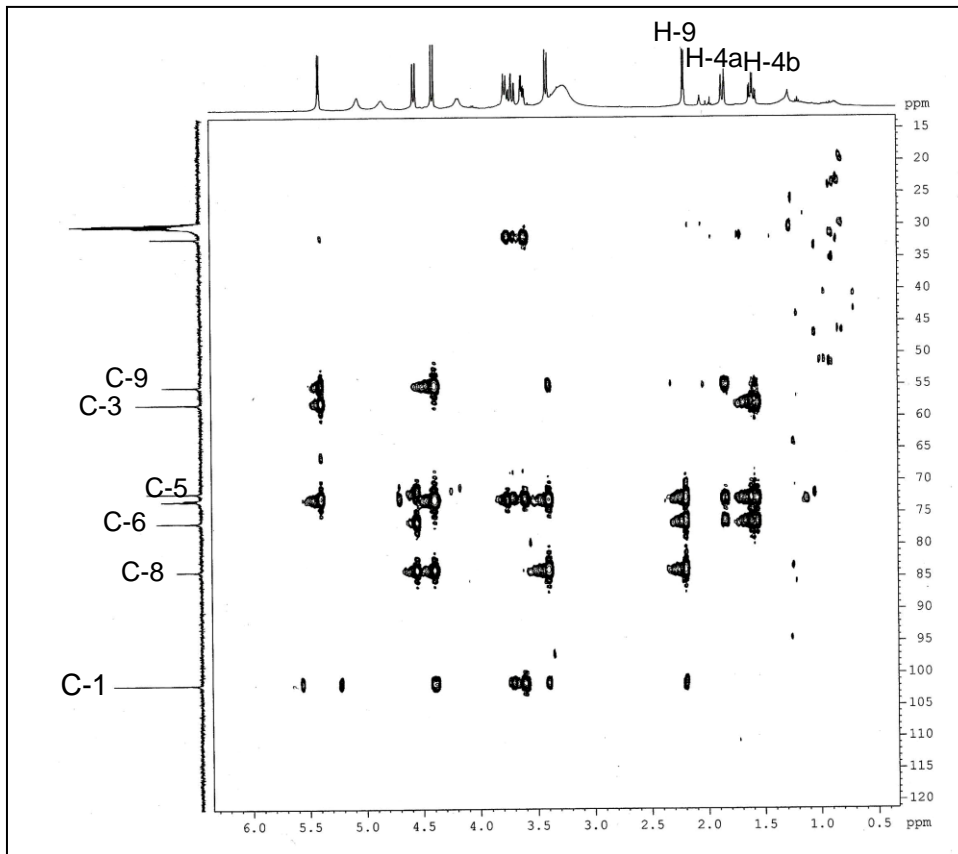
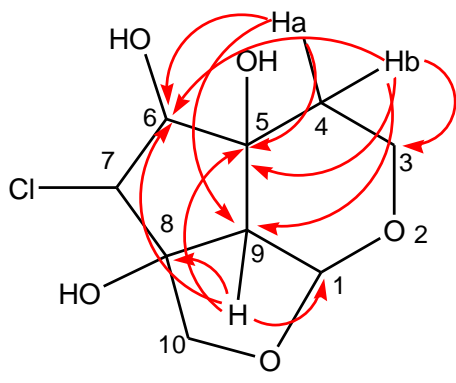


Figura 42- Expansão (0,5 a 6 ppm para ^1H e 15 a 120 ppm para ^{13}C) do espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de CBC-2.



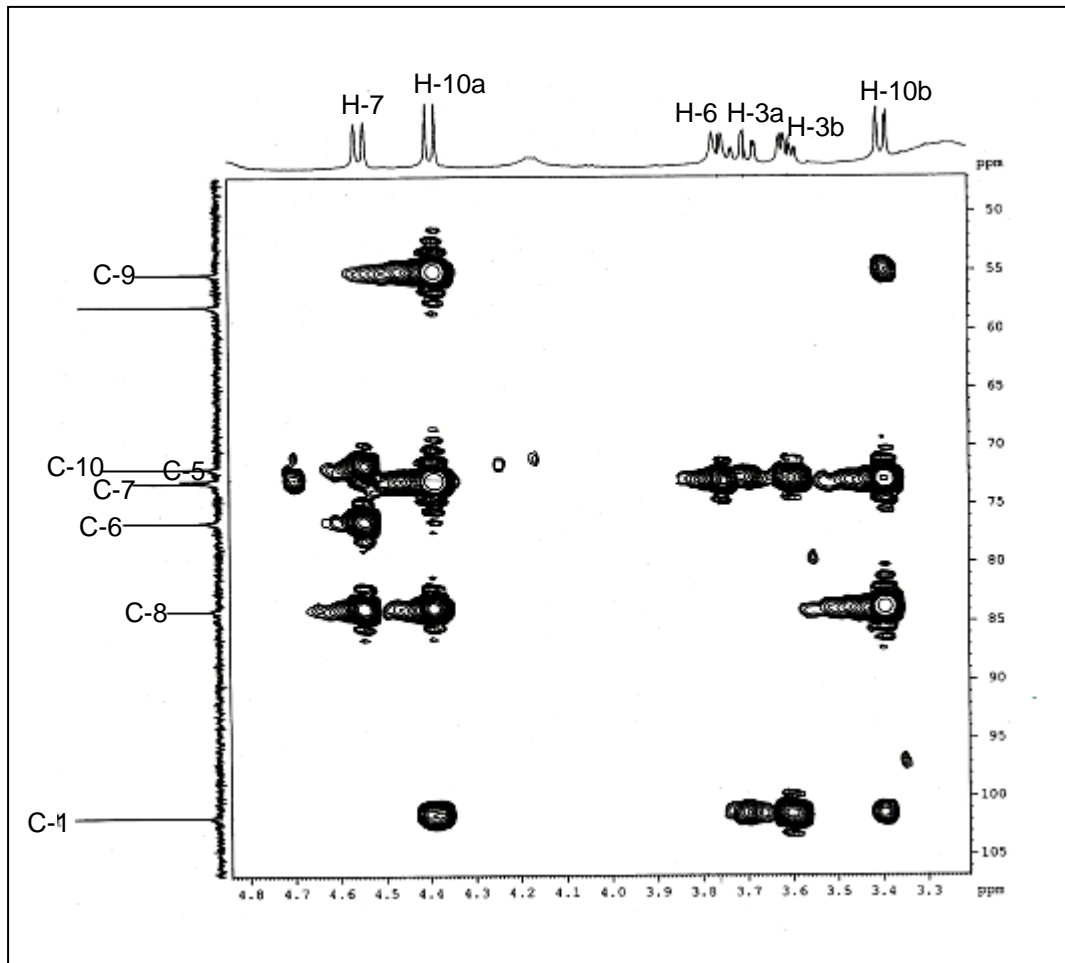
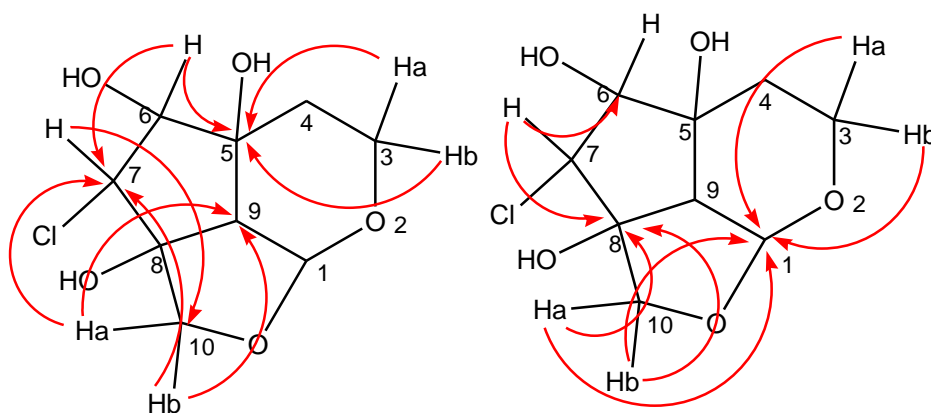


Figura 43- Expansão (3,2 a 4,8 ppm para ^1H e 50 a 105 ppm para ^{13}C) do espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de CBC-2.



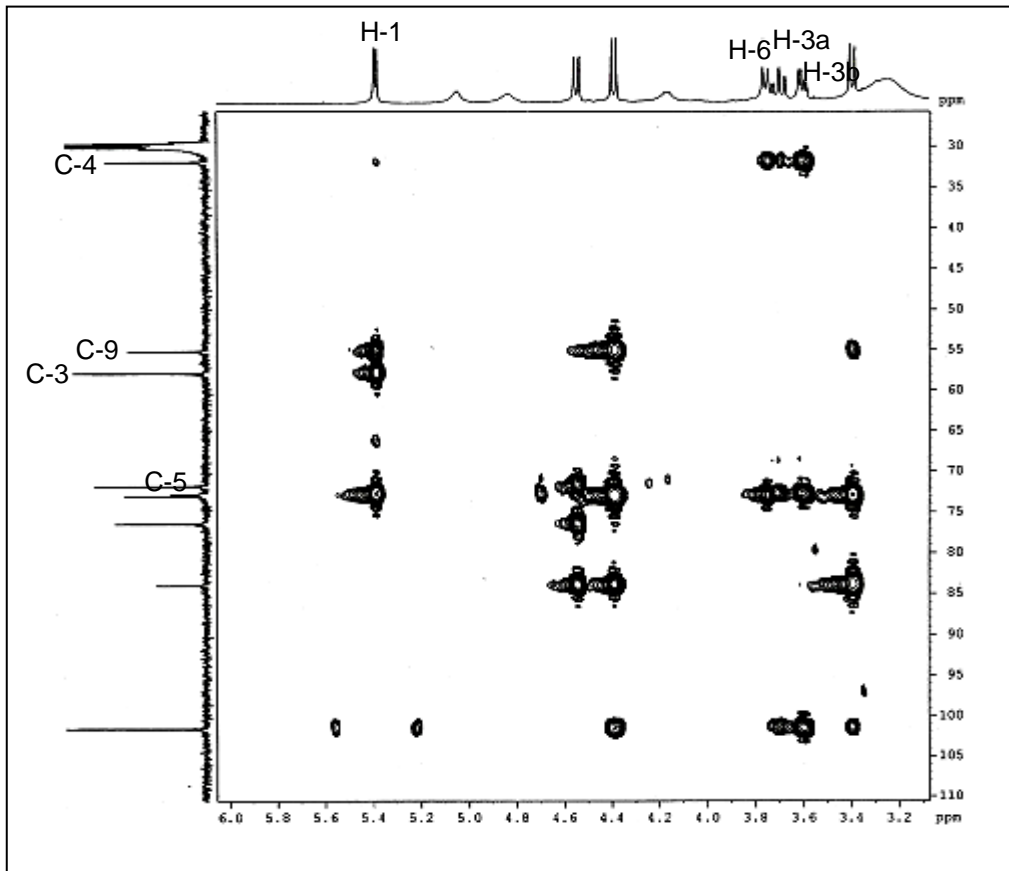
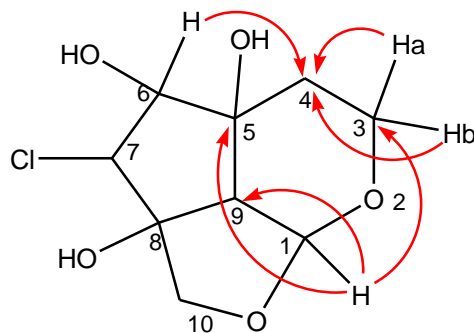


Figura 44- Expansão (03,2 a 6 ppm para ^1H e 30 a 110 ppm para ^{13}C) do espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$] de CBC-2.



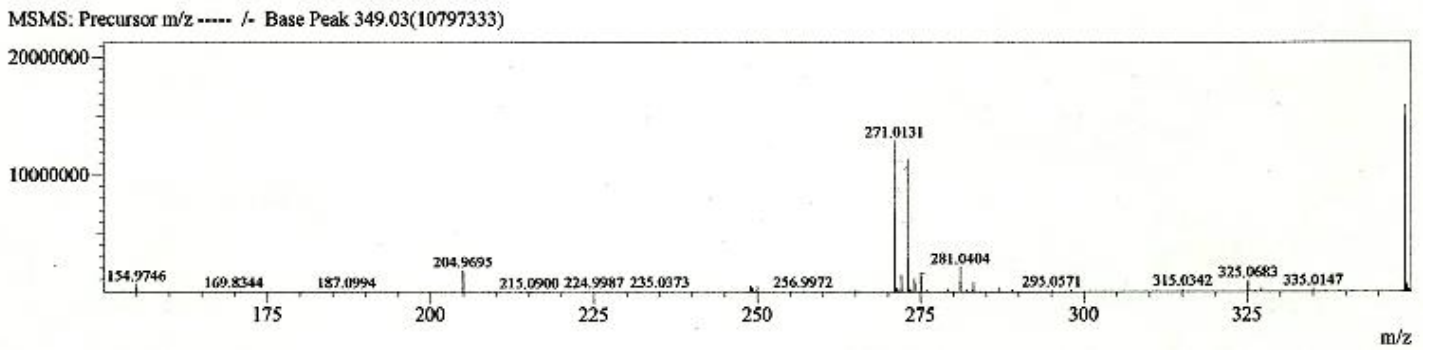


Figura 45- Espectro de massa de alta resolução EM-IES (modo negativo) de CBC-2.

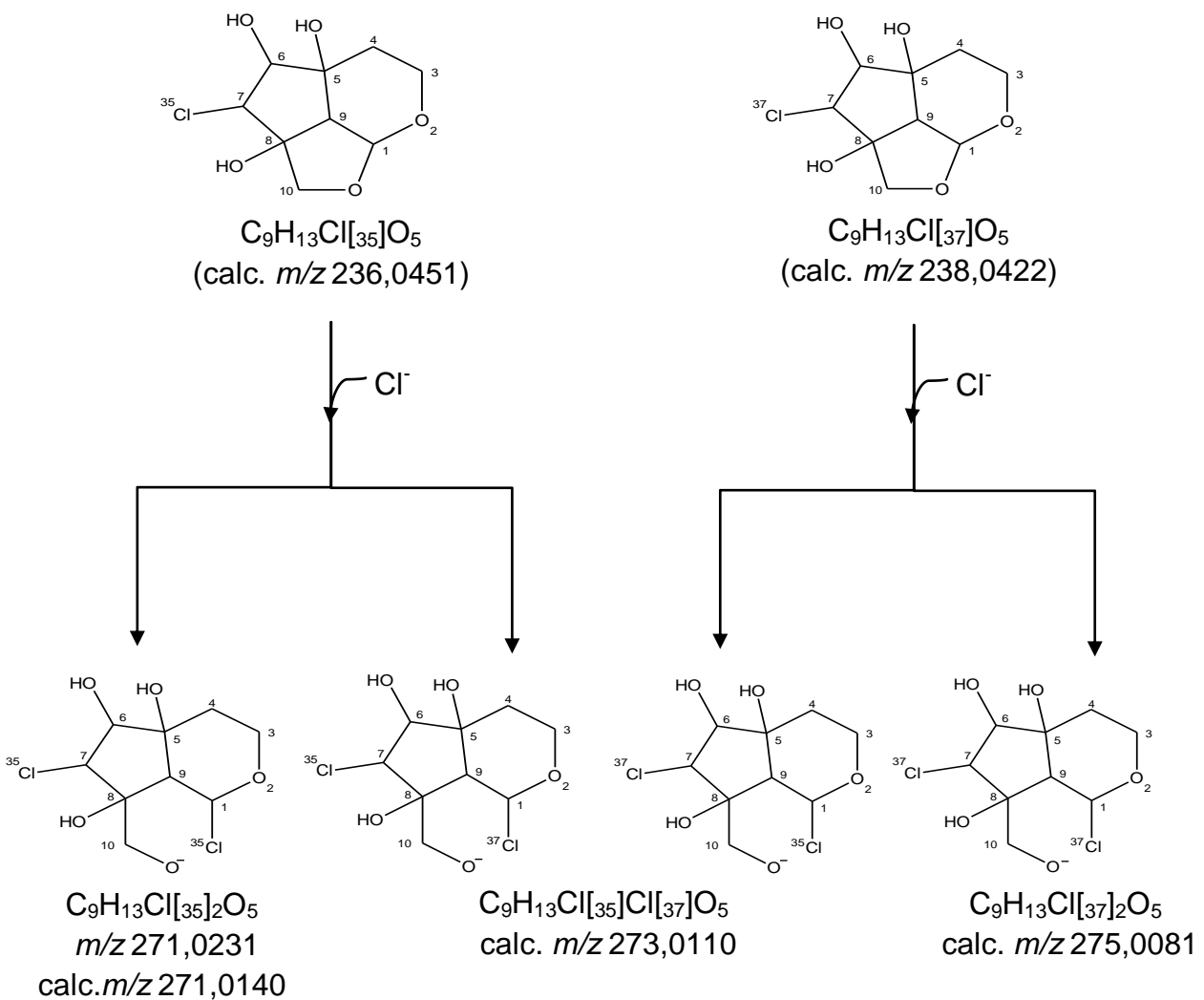


Figura 46- Proposta mecanística para os principais picos observados no espectro de massa de CBC-2.

5.5- Determinação estrutural dos derivados acetilados CBC-2Ac1 e CBC-2Ac2.

Tendo como objetivo a confirmação da estrutura de CBC-2, foi realizada uma reação de acetilação obtendo-se assim os produtos denominados CBC-2Ac1 e CBC-2Ac2, com rendimentos de 35,4 e 24,5% respectivamente. CBC-2Ac1 apresentou-se na forma de cristais de coloração rosada com ponto de fusão 167,3-168,4°C e rotação específica $[\alpha]_D^{20} +90,6^\circ$ (c 0,00075; CHCl_3) solubilidade em clorofórmio e CBC-2Ac2, apresentou um aspecto sólido viscoso de coloração amarelo escuro com rotação específica $[\alpha]_D^{20} +91^\circ$ (c 0,00055; CHCl_3).

A análise dos espectros de absorção na região do infravermelho (Fig. 51-52, pág. 63) dos dois produtos permitiu observar bandas em 1737 cm^{-1} e em 1750 cm^{-1} relativas à deformação axial da ligação C=O de ésteres, compatível com a acetilação de grupos OH.

O espectro RMN ^1H em ambos (Fig. 53-54, pág. 64) apresentou sinais referentes a hidrogênios de grupos metílicos ligados a grupos acetilas (Tab. 14, pág. 61).

Análise dos espectros de RMN ^{13}C -BB dos dois produtos (Fig. 55-56, pág. 65) permitiu identificar a presença de sinais referentes a quinze átomos de carbono em CBC-2AC1 e doze átomos de carbono em CBC-2Ac2. Comparação entre os espectros de RMN ^{13}C -BB e DEPT 135° (Fig. 57, pág. 66) de CBC-2Ac1 mostrou a presença de seis sinais adicionais correspondentes a carbonos metílicos em δ_C 22,5; 21,7 e 20,6; e três carbonilas em δ_C 170,4; 170,1 e 169,7 referentes aos grupos acetilas, evidenciando a acetilação de três hidroxilas, enquanto que em CBC-2Ac2 (Fig 58, pág. 66) observou-se a presença de quatro sinais adicionais em δ_C 170,3; 171,1; 21,9 e 20,8 referentes aos carbonos de dois grupos acetilas (Tab 14, pág. 61).

O espectro bidimensional de correlação heteronuclear de carbono e hidrogênio via duas, três e quatro ligações, ($^2J_{\text{CH}}$), ($^3J_{\text{CH}}$), ($^4J_{\text{CH}}$), HMBC de CBC-2Ac1 (Fig. 59-60, pág. 67), foi utilizado para atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos.

A correlação de H-12 (δ_H 2,06) com C-5 (δ_C 81,6), H-16 (δ_H 2,15) com C-8 (δ_C 88,1) e H-14 (δ_H 2,10) com C-6 (δ_C 74,0), via quatro ligações, além de H-6

com C-13 (δ_C 170.1), via três ligações, permitiu a correta localização dos grupos acetatos nos carbonos C-5, C-6 e C-8 em CBC-2Ac1 (Fig. 47).

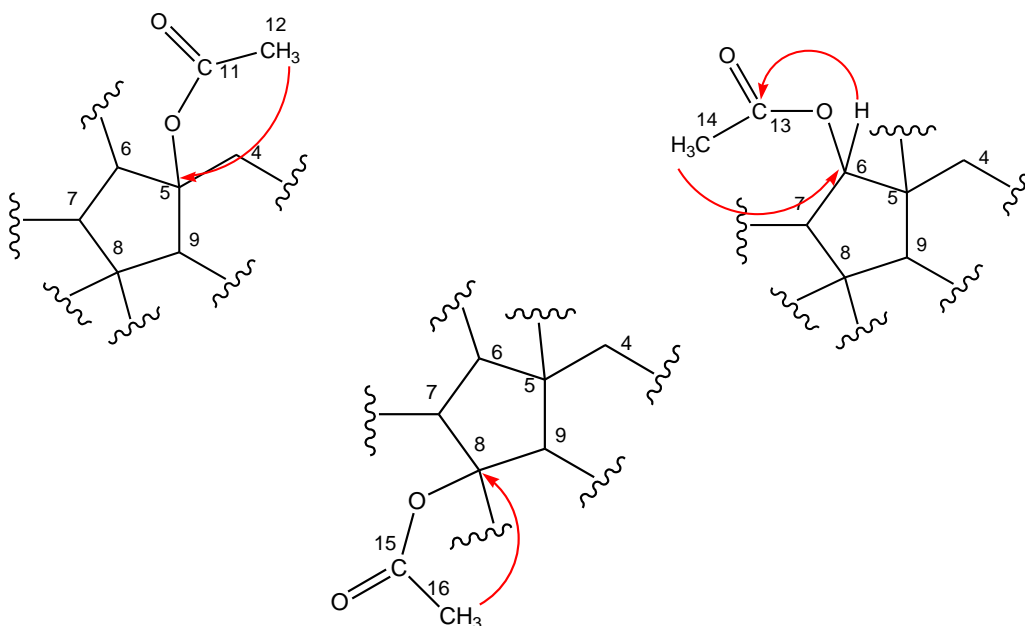


Figura 47- Correlações à longa distância confirmando a localização dos grupos funcionais ésteres e CBC-2Ac1.

O efeito γ , de proteção, observado no sinal de C-4 ($\Delta\delta_{C-4} = \delta_C$ 26,8 – 30,9 = -3,13 ppm) de CBC-2Ac1 (Tab. 14 pág. 60), justifica a acetilação do carbono C-5 neste produto, enquanto que no produto CBC-2Ac2 este efeito não ocorre, sugerindo que a hidroxila do carbono C-5 não sofreu acetilação.

Os espectros de massa de alta resolução dos produtos (Fig. 61-65, pág. 68-70) forneceram a confirmação das fórmulas moleculares dos produtos acetilados. As proposições mecanísticas para os fragmentos dos principais picos que ocorrem no espectro são ilustradas nas figuras 62, 64 e 66 (pág. 68-70).

A configuração relativa inferida para os grupos hidroxilas e acetilas existentes nas moléculas CBC-2, CBC-2Ac1 e CBC-2Ac2 foram deduzidas através do espectro NOE por diferença de espectro de RMN¹H (Fig. 67-69 pág. 71-72) obtido a partir de CBC-2Ac2, o qual revelou interações espaciais entre os hidrogênios H-6 (δ_H 5,35) com os hidrogênios H-10a (δ_H 4,72) e H-3a (δ_H 4,03), do hidrogênio H-7 (δ_H 5,12) com o hidrogênio H-9 (δ_H 2,78) e H-1 (δ_H

5,62) com os hidrogênios H-3b (δ_H 3,82) e H-9 (δ_H 2,78) (Tab. 13, pág. 59). Estas interações sugerem uma configuração β para a hidroxila no carbono C-5 e o grupo acetila no carbono C-8 (Fig. 48).

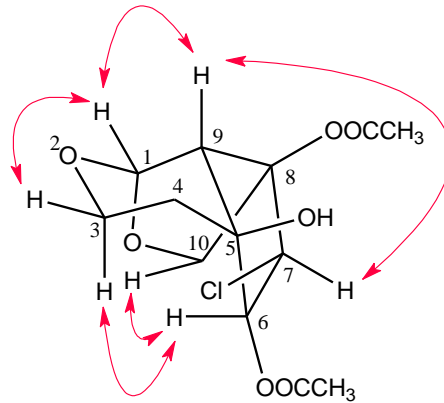


Figura 48- Interações espaciais justificando a posição da hidroxila e do grupo acetila.

A configuração relativa dos centros estereogênicos (Fig. 49) foi determinada com base nas interações entre o hidrogênio H-1 (δ_H 5,62) com os hidrogênios H-3b (δ_H 3,82), H-10b (δ_H 3,80) e H-9 (δ_H 2,78), do hidrogênio H-6 (δ_H 5,35) com os hidrogênios H-10a (δ_H 4,72), e H-3a (δ_H 4,03) e do hidrogênio H-7 (δ_H 5,12) com o hidrogênio H-9 (δ_H 2,78) (Tab. 13, pág. 59).

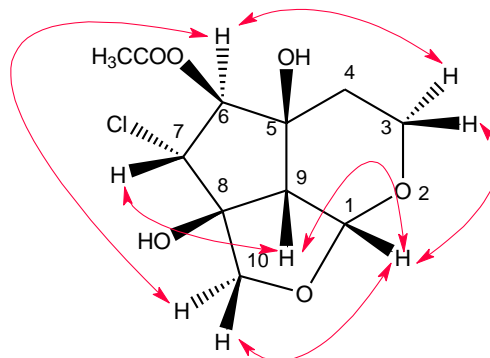


Figura 49- Interações espaciais entre os hidrogênios determinando a configuração relativa.

A reação de acetilação de CBC-2 permitiu a confirmação da proposta estrutural para a referida substância com sua respectiva estereoquímica, que foi denominada como a (1R,5S,6S,7R,8S,9S)-7-cloro-8-(hidroxi-metil)octa-hidrociclopenta[c]piran-1,10-oxira-5,6,8-triol (miopoclorin), inédita na espécie C.

biflora, além de produzir os dois compostos tri e diacetilado, que são relatados pela primeira vez na literatura (Fig. 50, pág 60).

Tabela 13- Dados obtidos através de NOE por diferença de espectro de RMN¹H.

RMN ¹ H		NOE	
H	δ _H	H	δ _H
1	5,62 (d; 5,6)	3b	3,82 (ddd; 12,5; 5,2; 2,0)
		10b	3,80 (dd; 10,5; 1,5)
		9	2,78 (d; 5,6)
6	5,35 (d; 11,2)	10a	4,72 (d, 10,5)
		3a	4,03 (dt; 12,5; 2,5)
7	5,12 (d; 10,5)	9	2,78 (d, 5,6)

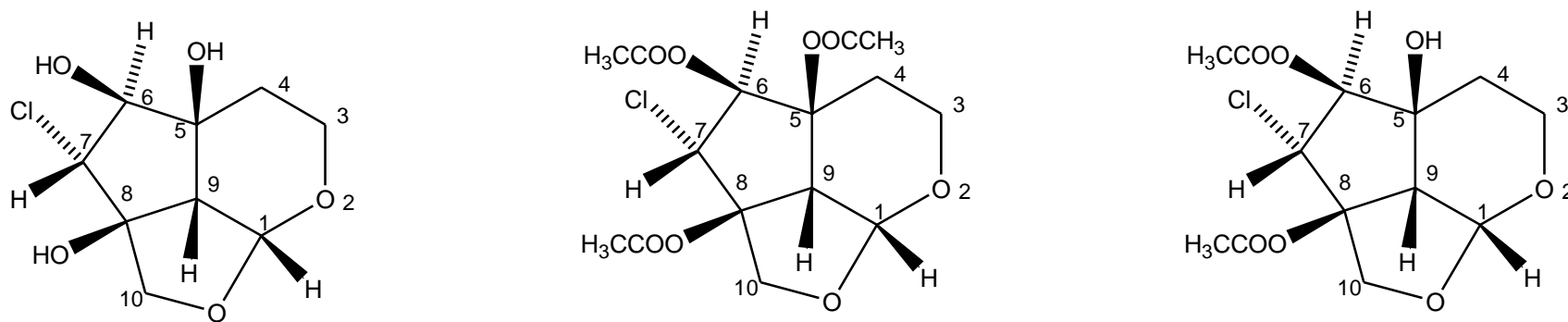


Figura 50- Estruturas de CBC-2, CBC-2Ac1 e CBC-2Ac2.

Tabela 14- Correlação Heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC e HMBC (500 X 125 MHz, CDCl_3) dos derivados acetilados.

HSQC (CBC-2Ac1)			HMBC (CBC-2Ac1)			HSQC (CBC-2Ac2)	
C	δ_{H}	δ_{C}	$^2\text{J}_{\text{C,H}}$	$^3\text{J}_{\text{C,H}}$	$^4\text{J}_{\text{C,H}}$	δ_{H}	δ_{C}
1	5,63 (d; 6,0)	100,9	H-9	2H-3; 2H-10	-	5,62 (d; 5,6)	100,5
3	4,01 (dt; 12,5; 2,0) 3,75 (ddd)	57,6	H-4a	H-1	-	4,03 (dt; 12,5; 2,5) 3,82 (ddd; 12,5; 5,2; 2,0)	57,7
4	2,46 (m) 1,86 (d; 14,0)	26,8	2H-3	H-6	-	1,81 (dt; 13,0; 5,2) 1,72 (dd; 11,7; 2,0)	30,9
5	-	81,6	2H-4; H-6	H-1; 2H-3	H-12	-	75,0
6	5,35 (d; 11,5)	74,0	H-7	2H-4; H-9	H-14	5,35 (d; 11,2)	73,2
7	5,11 (dd; 11,5; 1,0)	63,5	H-6	2H-10	-	5,12 (dd; 11,5; 1,5)	64,5
8	-	88,1	H-9; 2H-10	H-7	H-16	-	88,5
9	3,49 (d; 6,0)	47,4	H-1	H-4b, 2H-10	-	2,78 (d; 5,6)	51,4
10	4,61 (d; 10,5) 3,73 (dd; 10,5; 1,5)	68,7	-	H-7; H-9	-	4,72 (d; 10,5) 3,80 (dd; 10,5; 1,5)	68,0
11 (OCOCH_3)	-	169,7	H-12	-	-	-	

DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

12 (OCOCH ₃)	2,06 (s)	21,7	-	-	-	-	
13 (OCOCH ₃)	-	170,1	H-14	H-6	-	-	170,3
14 (OCOCH ₃)	2,10 (s)	22,5	-	-	-	2,18 (s)	21,9
15 (OCOCH ₃)	-	170,4	H-16	-	-	-	171,1
16 (OCOCH ₃)	2,15 (s)	20,6	-	-	-	2,25 (s)	20,8

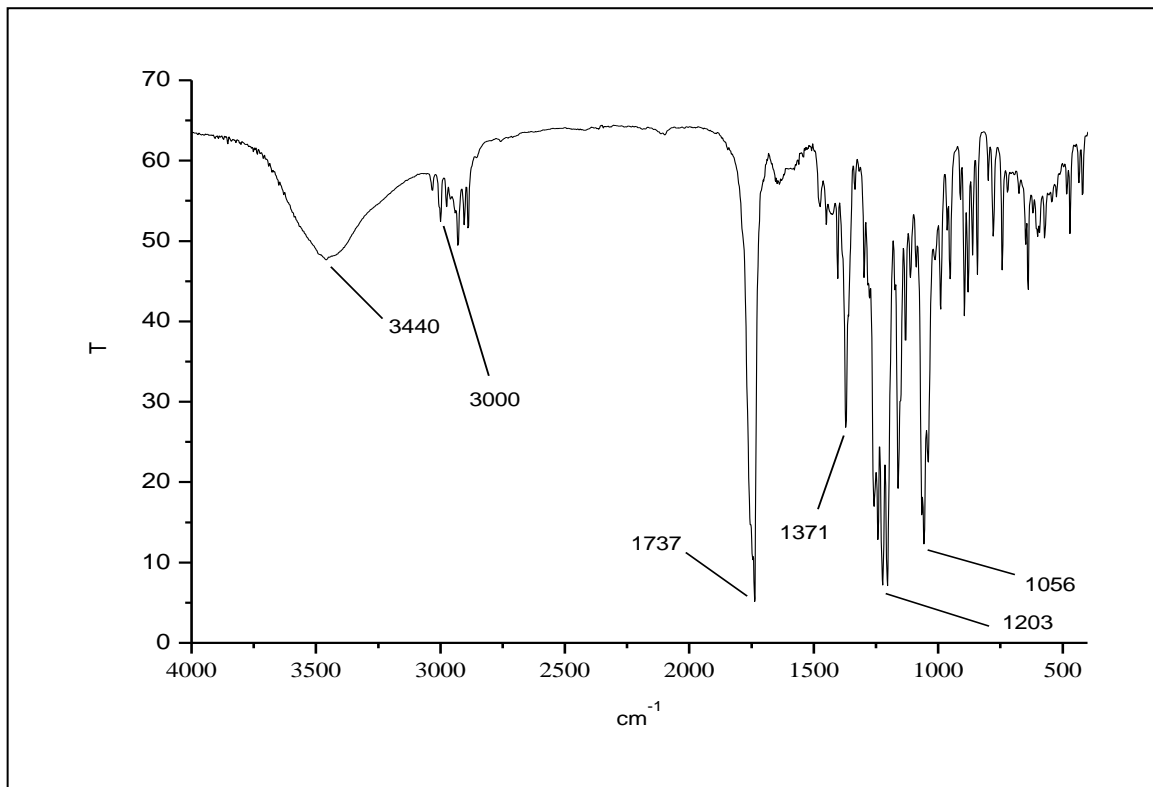


Figura 51- Espectro na região do infravermelho de CBC-2Ac1 (KBr).

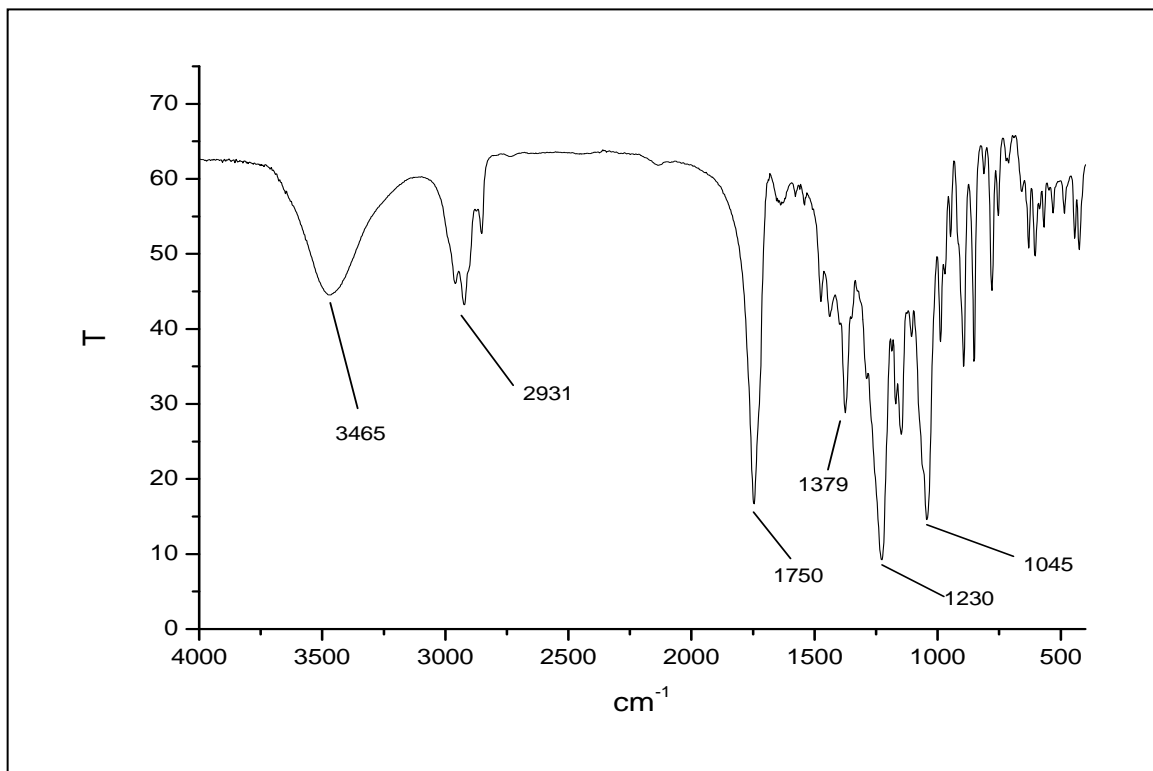


Figura 52- Espectro na região do infravermelho de CBC-2Ac2 (KBr).

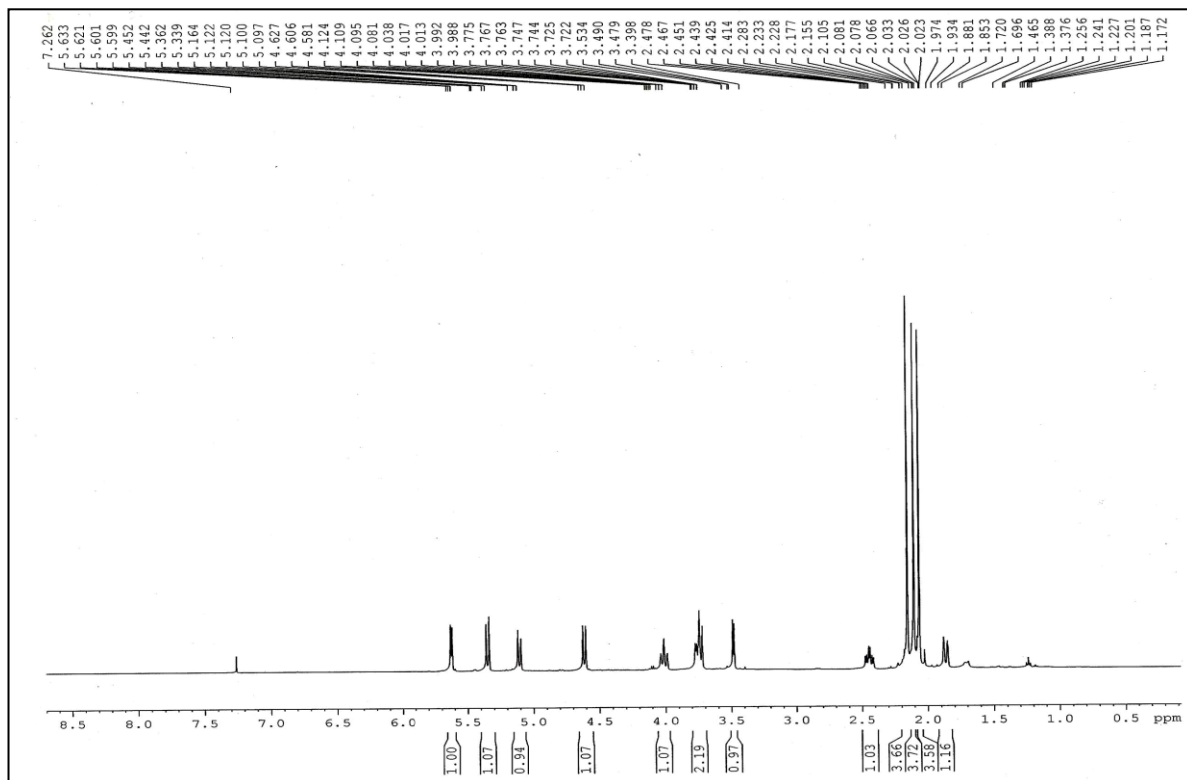


Figura 53- Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de CBC-2Ac1.

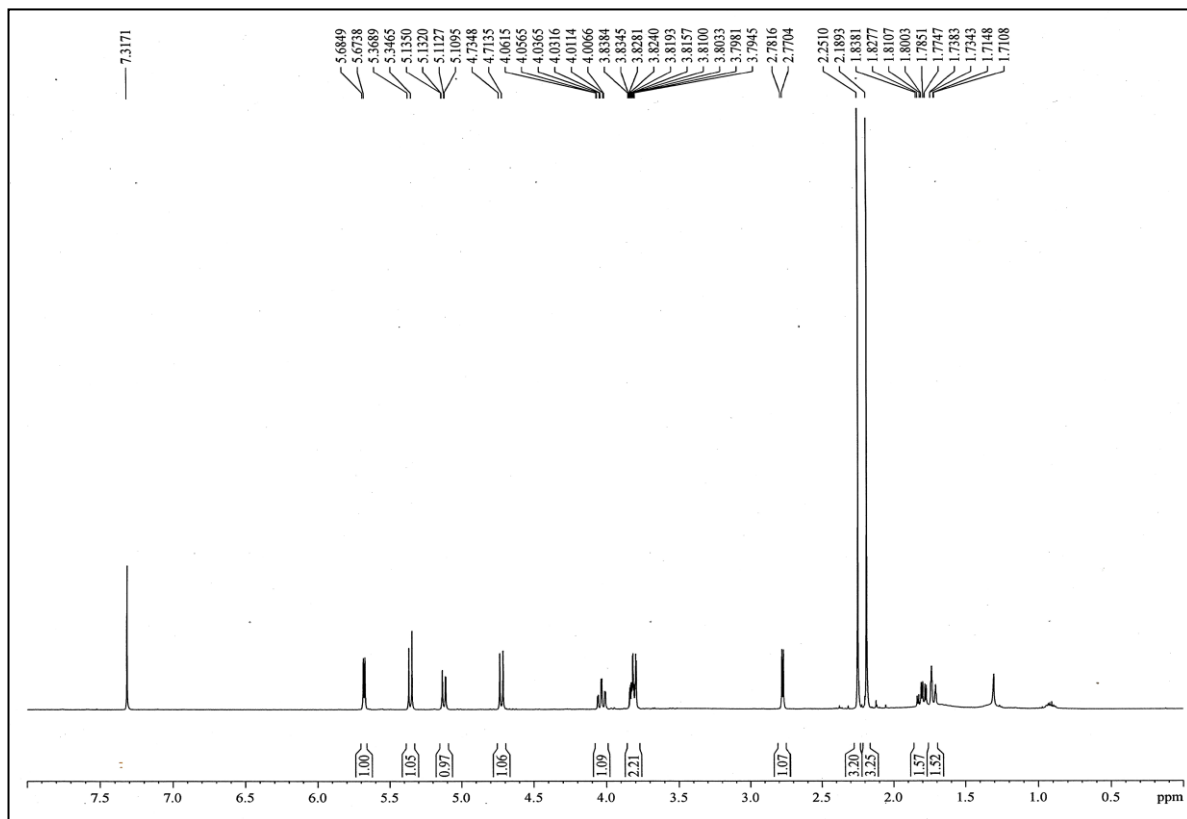


Figura 54- Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de CBC-2Ac2.

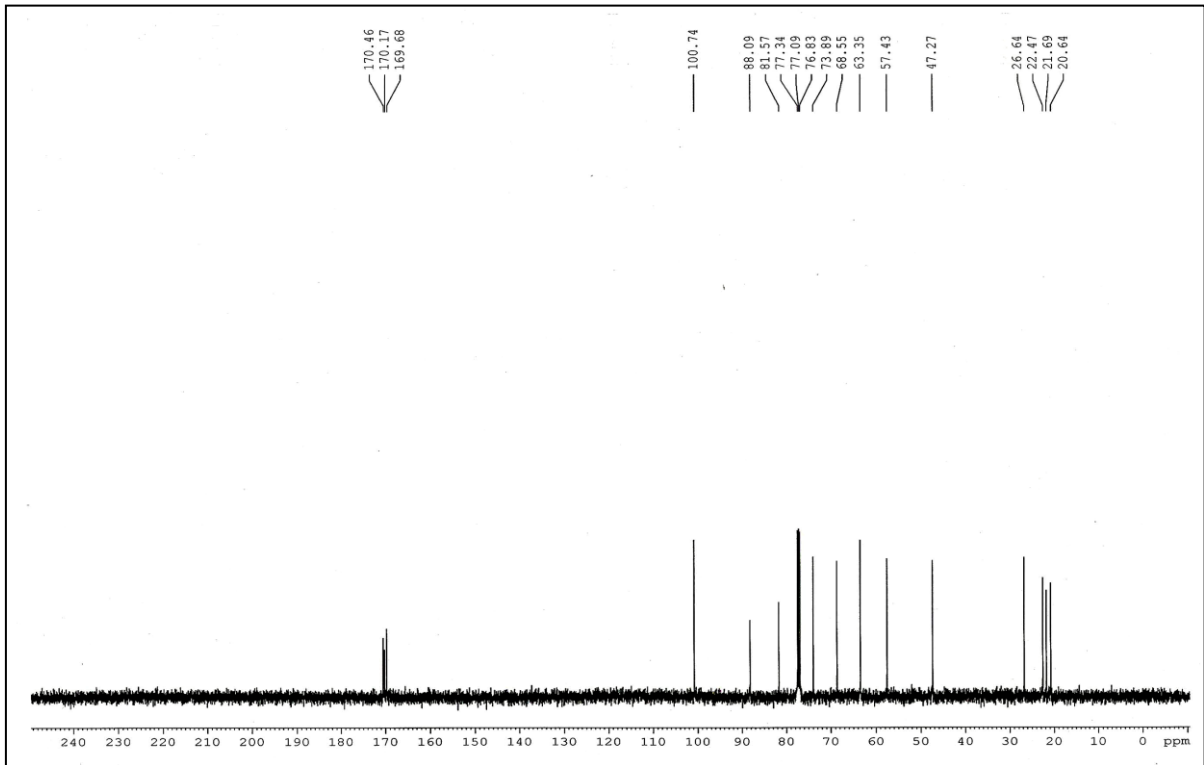


Figura 55- Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, CDCl_3] de CBC-2Ac1.

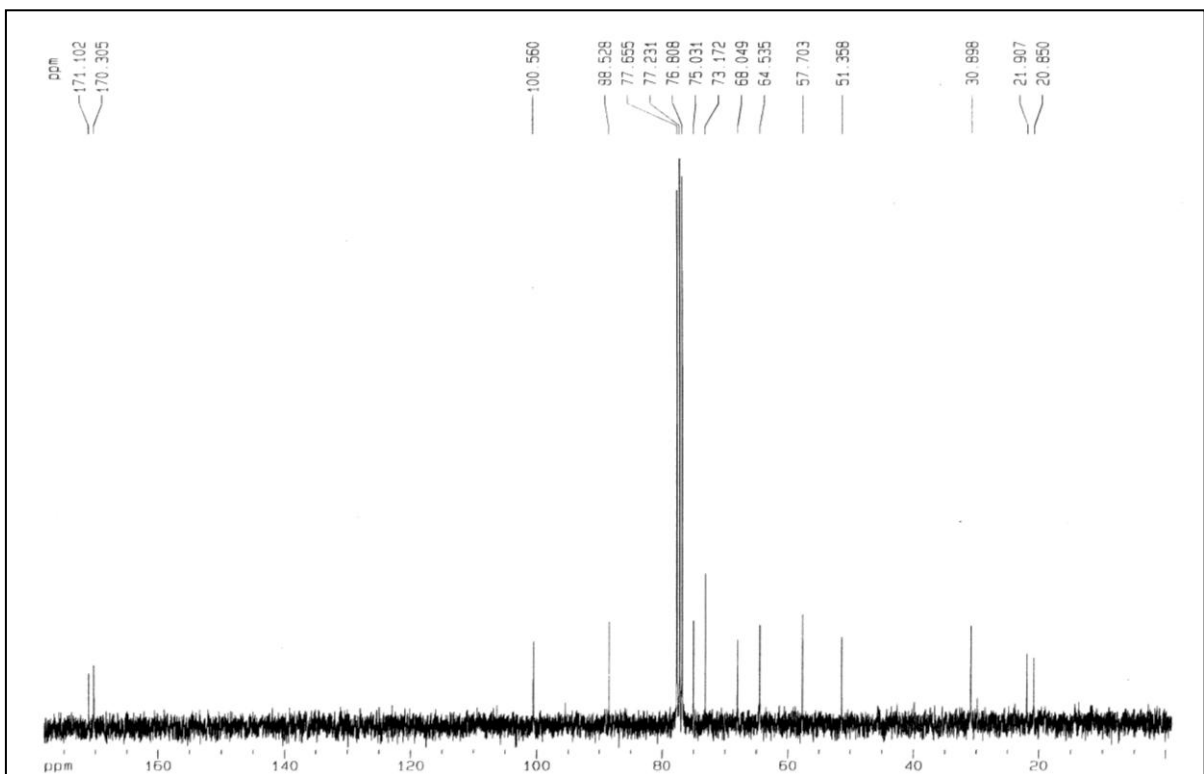


Figura 56- Espectro de RMN ^{13}C -BB [125 MHz, CDCl_3] de CBC-2Ac2

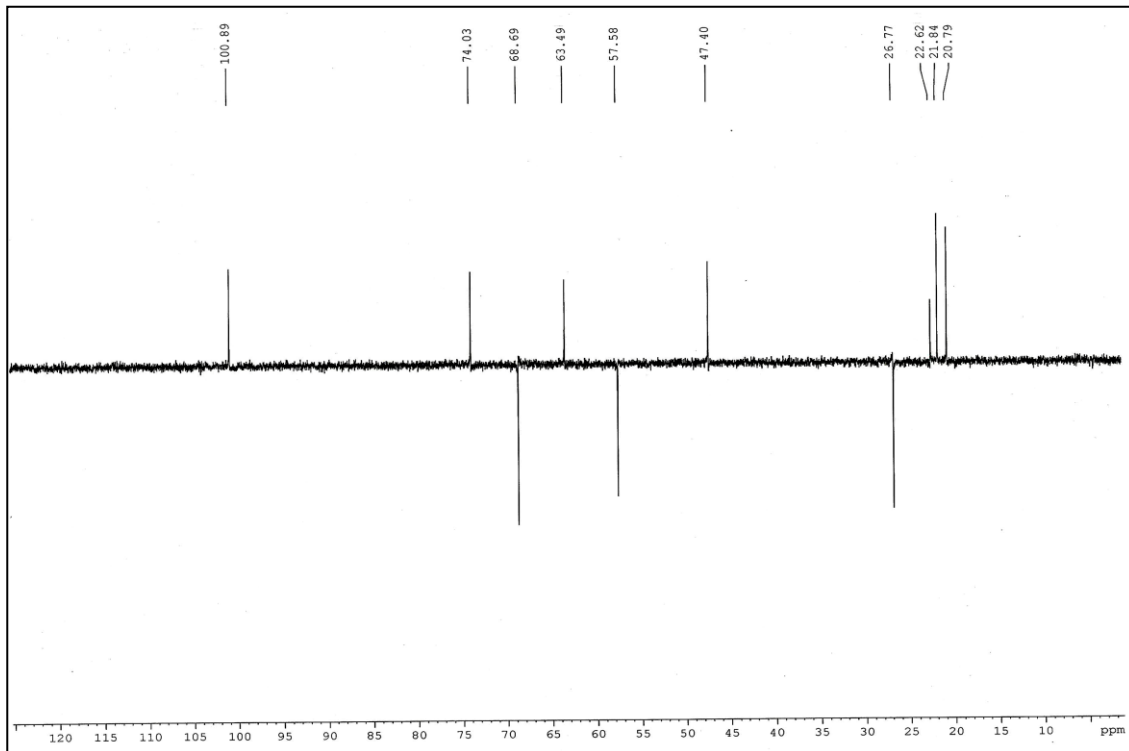


Figura 57- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] de CBC-2Ac1.

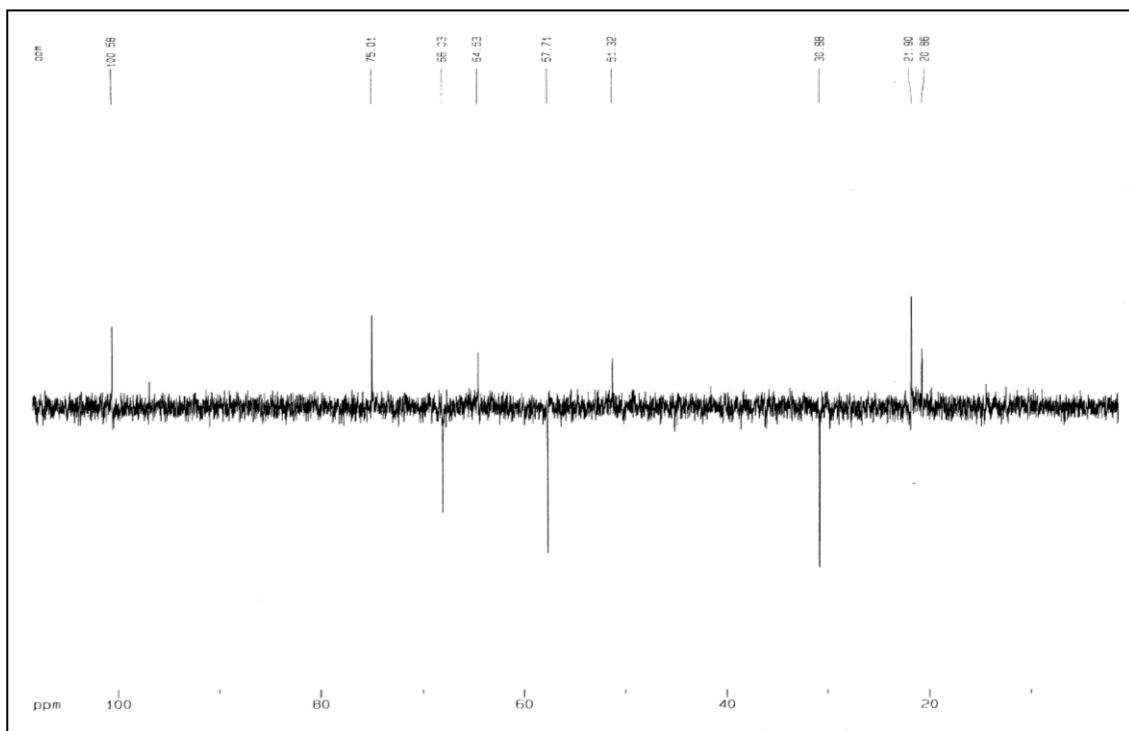


Figura 58- Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] de CBC-2Ac2.

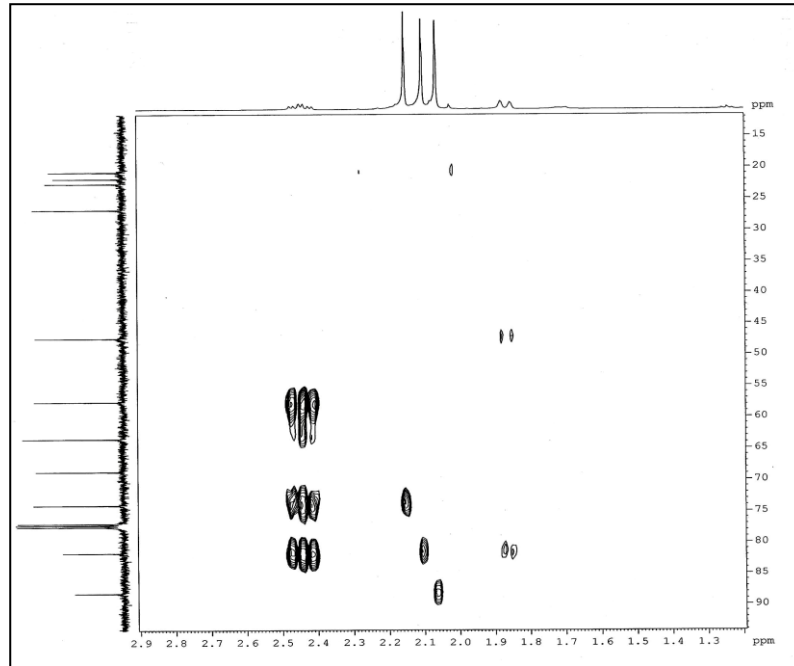


Figura 59- Expansão (1,3 a 2,9 para ^1H e 15 a 90 para ^{13}C) do espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC [500 MHz, CDCl_3] de CBC-2Ac1.

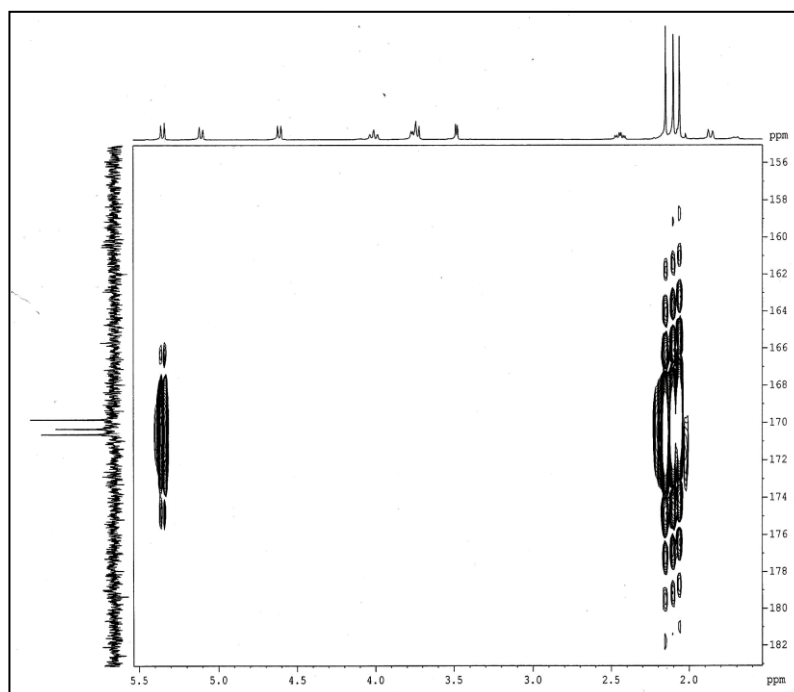


Figura 60- Expansão (2,0 a 5,5 para ^1H e 156 a 182 para ^{13}C) do espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC [500 MHz, CDCl_3] de CBC-2Ac1.

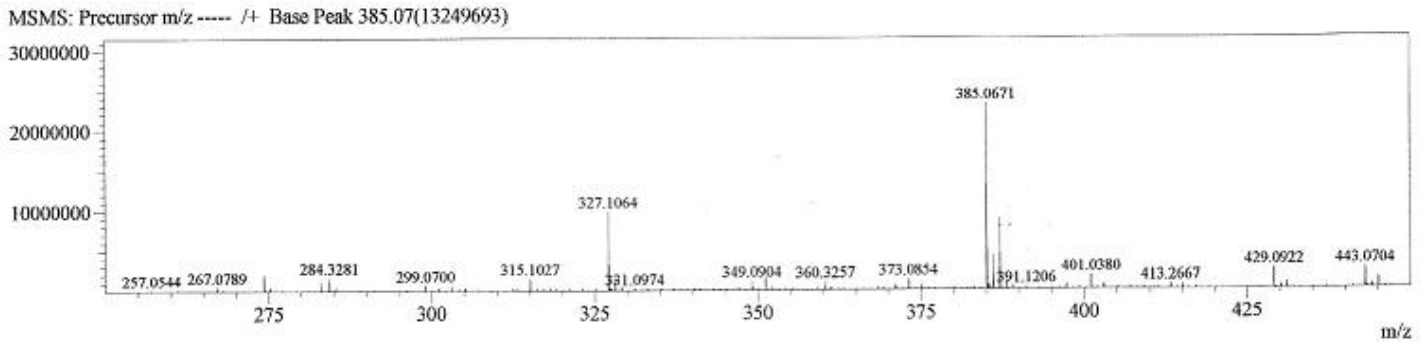


Figura 61- Espectro de massa de alta resolução (modo negativo) de CBC-2Ac1.

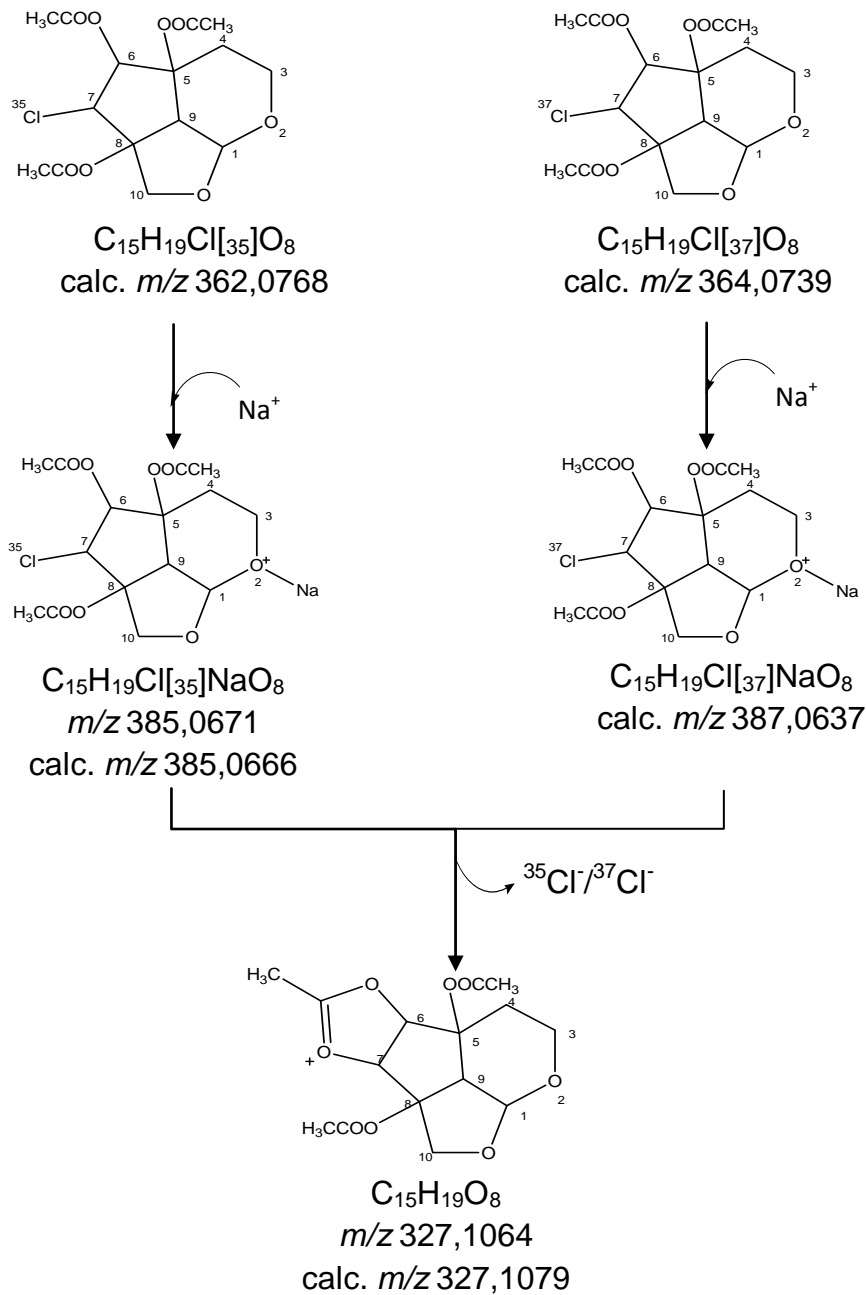


Figura 62- Proposição mecânica para a fragmentação de CBC-2Ac1.

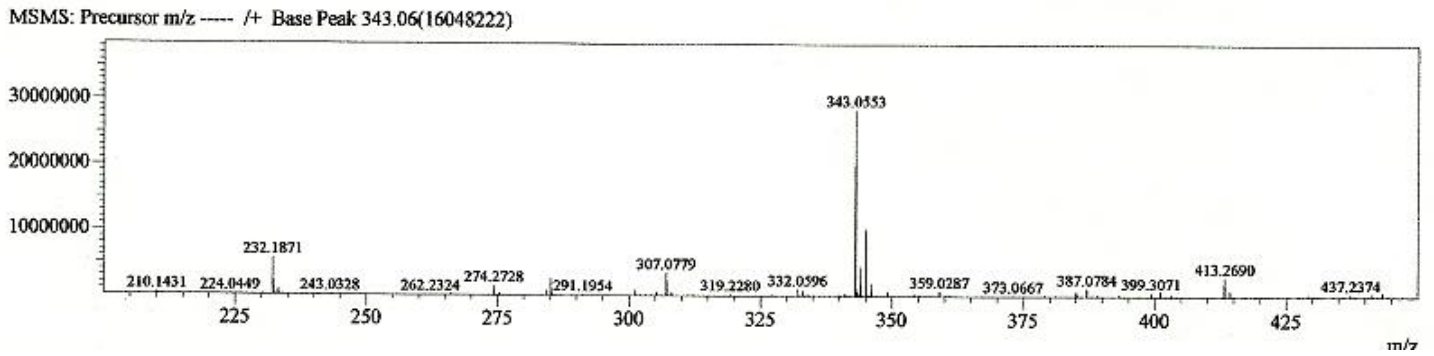


Figura 63- Espectro de massa de alta resolução (modo positivo) de CBC-2Ac2.

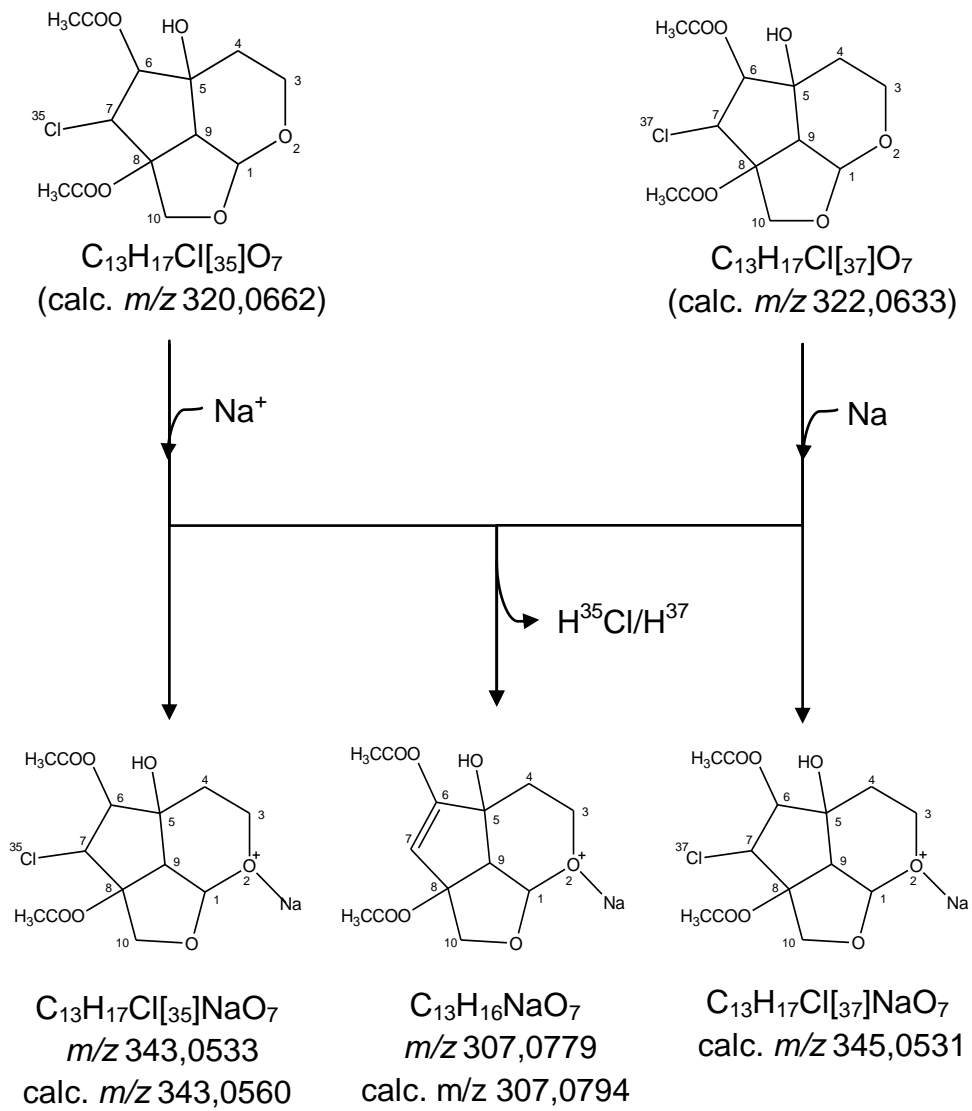


Figura 64- Proposição mecânica para a fragmentação de CBC-2Ac2.

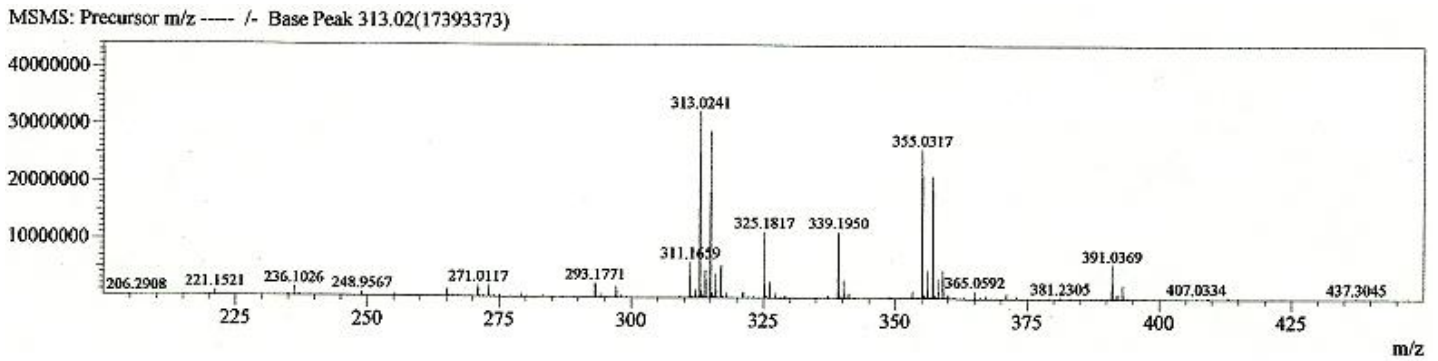


Figura 65- Espectro de massa de alta resolução (modo negativo) de CBC-2Ac2.

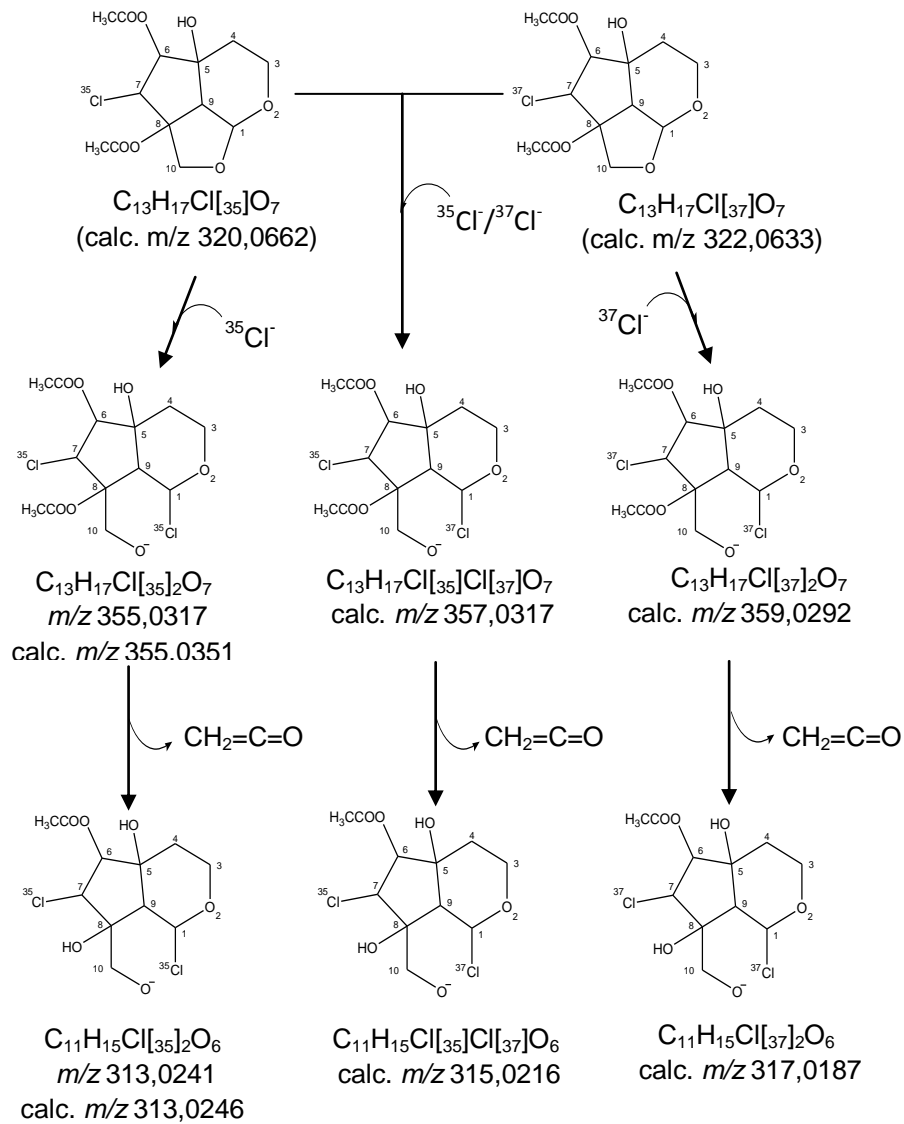


Figura 66- Proposição mecanística para a fragmentação de CBC-2Ac2.

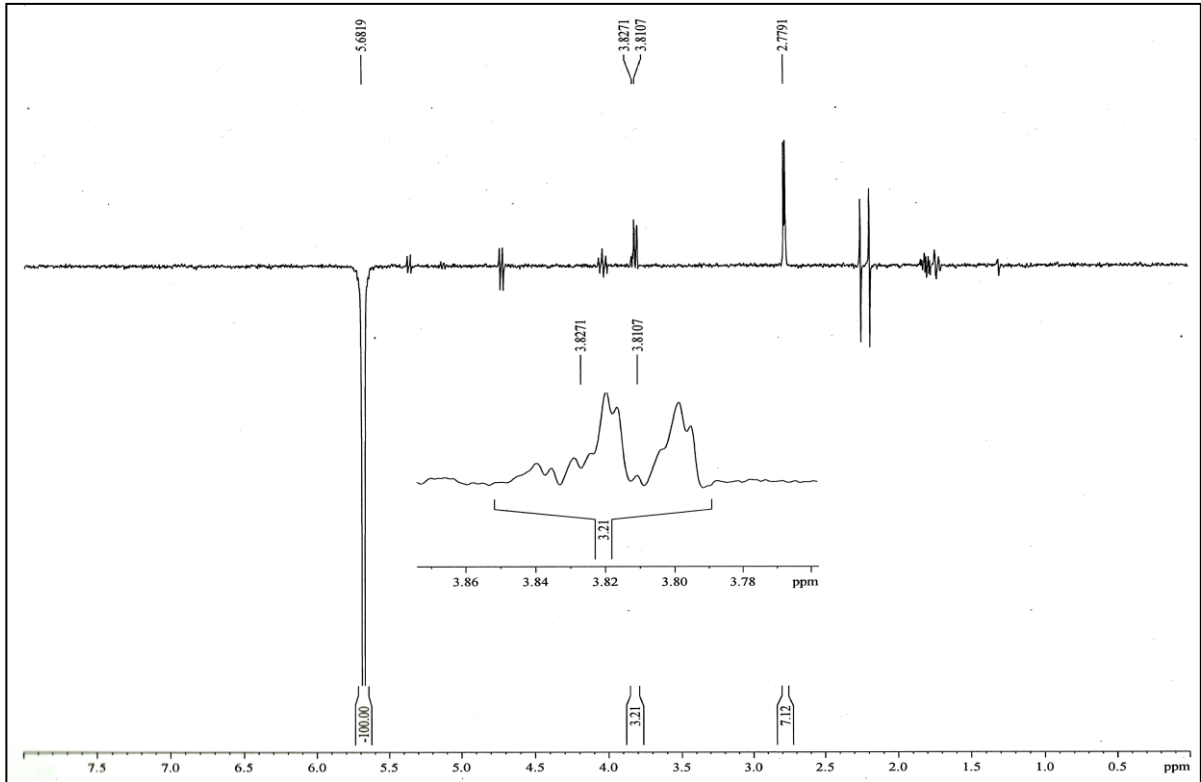


Figura 67- Espectro NOE [5,68 ppm, CDCl_3] de CBC-2Ac2.

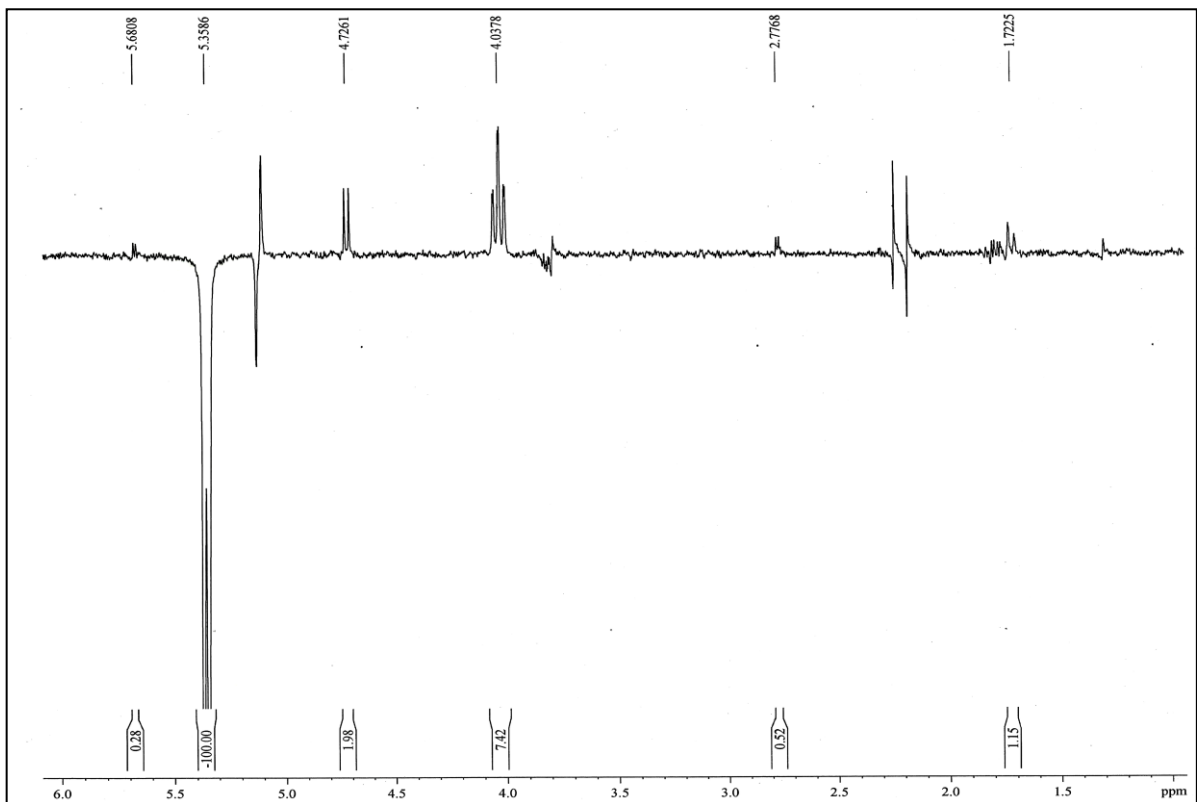


Figura 68- Espectro NOE [5,36 ppm, CDCl_3] de CBC-2Ac2.

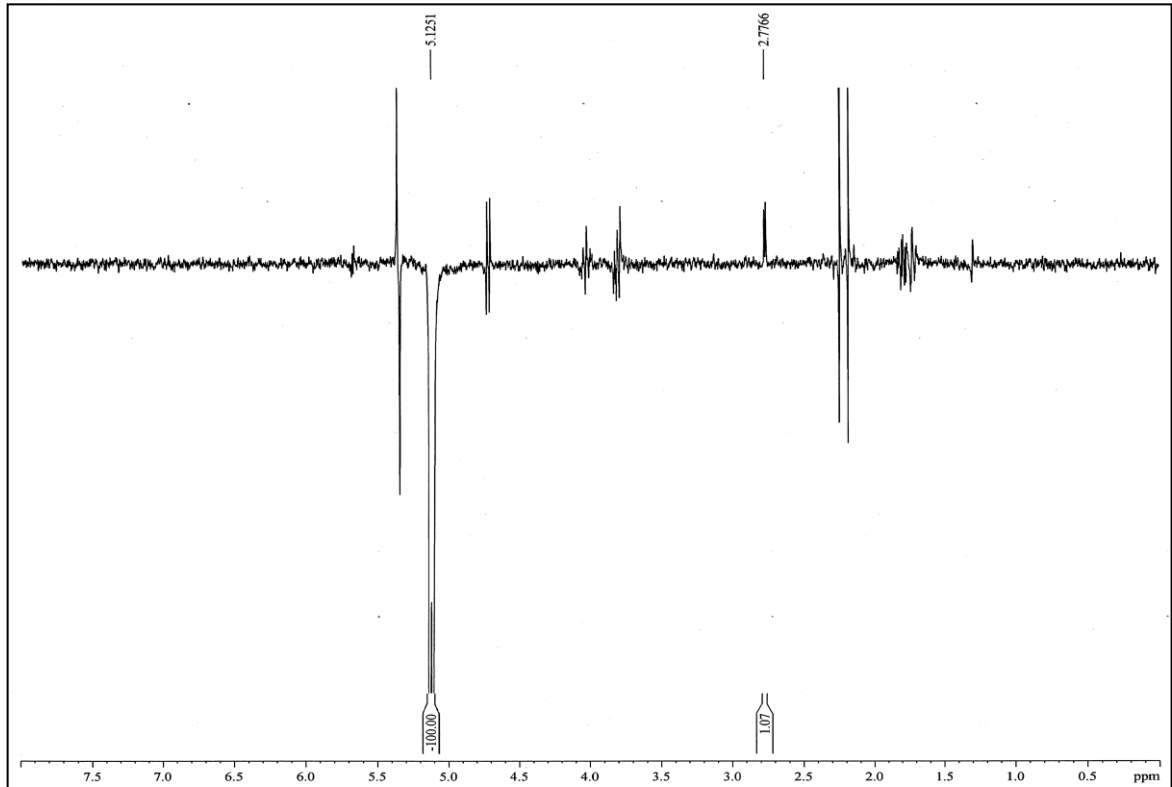


Figura 69- Espectro de NOE [5,12 ppm, CDCl_3] de CBC-2Ac2.

Capítulo 6

*DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA CONTRA O *Aedes aegypti**



6- DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA CONTRA O *Aedes aegypti*

O dengue é uma infecção reemergente que vem preocupando as autoridades sanitárias de todo o mundo em virtude de sua circulação nos cinco continentes e grande potencial para assumir formas graves e letais.

Com o surgimento de formas resistentes do mosquito aos inseticidas convencionais utilizados, tem crescido a procura por extratos vegetais e substâncias naturais que sejam efetivas no combate ao mosquito adulto e/ou à larva do *Aedes aegypti* e que sejam isentas de toxicidade para o meio ambiente. Resistência a inseticidas convencionais é um dos principais obstáculos ao controle de insetos, pestes de importância na agricultura e na medicina. A resistência resulta no aumento da frequência de aplicação de inseticida, dosagens crescentes, rendimentos diminuídos, danos ambientais e surgimento de doenças, quando os vetores não podem ser controlados [SIMAS *et al.*,2004].



FOTO:<http://edsonmelosintonia.blogspot.com>

FOTO:www.conasems.org.br

Figura 70- Fotografias das larvas do *Aedes aegypti* e mosquito na fase adulta.

Plantas, como organismos que co-evoluem com insetos e outros microorganismos, são fontes naturais de substâncias inseticidas e antimicrobianas, já que as mesmas são produzidas pelo vegetal em resposta a um ataque patogênico. Inúmeras substâncias acumulam-se no vegetal para sua defesa contra microorganismos, algumas delas sendo denominadas de fitoalexinas. As plantas sintetizam e emitem inúmeros compostos voláteis (ácidos, aldeídos e terpenos) para atrair polinizadores e se defender de herbívoros [SIMAS *et al.*,2004].

Terpenos e fenilpropanóides voláteis sintetizados por espécies vegetais podem ter, dependendo do inseto em análise, propriedades atrativas (alimentação, polinização) e/ou inseticidas. Nos últimos anos, óleos essenciais obtidos de plantas têm sido considerados fontes em potencial de substâncias biologicamente ativas. Ênfase tem sido dada às propriedades antimicrobiana, antitumoral e inseticida de compostos voláteis, além de sua ação sobre o sistema nervoso central [SIMAS *et al.*,2004].

Foram realizados testes com o óleo essencial e com o hidrolato obtido das folhas de *C. biflora*. Amostras com valores de $CL_{50} < 100$ ppm são consideradas ativas e constituem-se em fortes candidatas ao combate do mosquito [NUNES, 2010].

O óleo essencial das folhas de *C. biflora* apresentou $CL_{50}=73,39$, demonstrando uma atividade inseticida moderada, podendo desta forma, ser utilizado no combate às larvas do mosquito *Aedes aegypti*. O hidrolato não apresentou atividade larvicida.

Capítulo 7

PARTE EXPERIMENTAL



7- PARTE EXPERIMENTAL

7.1- Material

O material botânico (raízes e folhas) foi coletado no município de Itapiúna-CE. Duas exsicatas encontram-se depositadas no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará com os números 30.848 e 30.849.

7.2- Métodos de análise

7.2.1- Métodos cromatográficos

Nas colunas cromatográficas foi utilizado gel de sílica 60 (\emptyset 63 – 200 μ m) da VETEC como fase estacionária. O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com as massas das amostras, bem como as quantidades de sílica a serem utilizadas. Para cromatografia em camada delgada (CCD), utilizou-s gel de sílica 60 (\emptyset 2 – 25 μ m) sobre placas de vidro da marca VETEC e sobre alumínio da Merck com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm.

A revelação das substâncias nas cromatoplasmas foi realizada pela pulverização com solução (1:1) de vanilina a 1% em etanol com solução de ácido perclórico a 5% em água destilada.

Como eluentes, foram utilizados os solventes: hexano, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade.

7.2.2- Métodos espectroscópicos

Espectrometria na Região do Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do Infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro Perkin Elmer FT-IR Spectrum 1000, com transformada de Fourier, instalado na central analítica do DQOI da UFC.

Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e carbono-13 (RMN¹³C) foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo DRX- 500 do Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREM), operando na frequência do hidrogênio a 500,13 MHz e a frequência do carbono a 125,75 MHz.

Os solventes utilizados nas dissoluções das amostras para obtenção dos espectros foram a acetona [(CD₃)₂CO], clorofórmio [CDCl₃] e água (D₂O) deuterados, comercializadas pela Merck e Aldrich.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados, no caso dos espectros de hidrogênio, pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais do solventes deuterados utilizados: acetona (δ_H 2,04 ppm) clorofórmio (δ_H 7,26 ppm) e água (δ_H 4,83) ppm. Nos espectros de carbono os deslocamentos químicos foram referenciados pelos picos centrais dos carbonos dos solventes deuterados: acetona (δ_C 30,0 e 206,7 ppm) e clorofórmio (δ_C 77,2 ppm).

Espectrometria de massa

Os espectros de massa de baixa resolução foram registrados num espectrômetro Shimadzu, modelo QP 5000/DI-50, através de impacto eletrônico a 70 eV, pertencente à Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos em espectrômetro Shimadzu, modelo LCMS-IT-TOF, equipado com fonte de ionização por *eletronspray*.

7.3- Métodos físicos

7.3.1- Determinação de ponto de fusão (PF)

Os pontos de fusão foram determinados em equipamentos de micro determinação METTLER provido de placa aquecedora FP-52 e unidade de controle FP-5.

7.3.2- Rotação Específica

A determinação da rotação ótica foi realizada em espectrômetro digital 341 da Perkin Elmer instalado na central analítica do DQOI da UFC.

7.4- Estudo dos constituintes voláteis de *C. biflora*

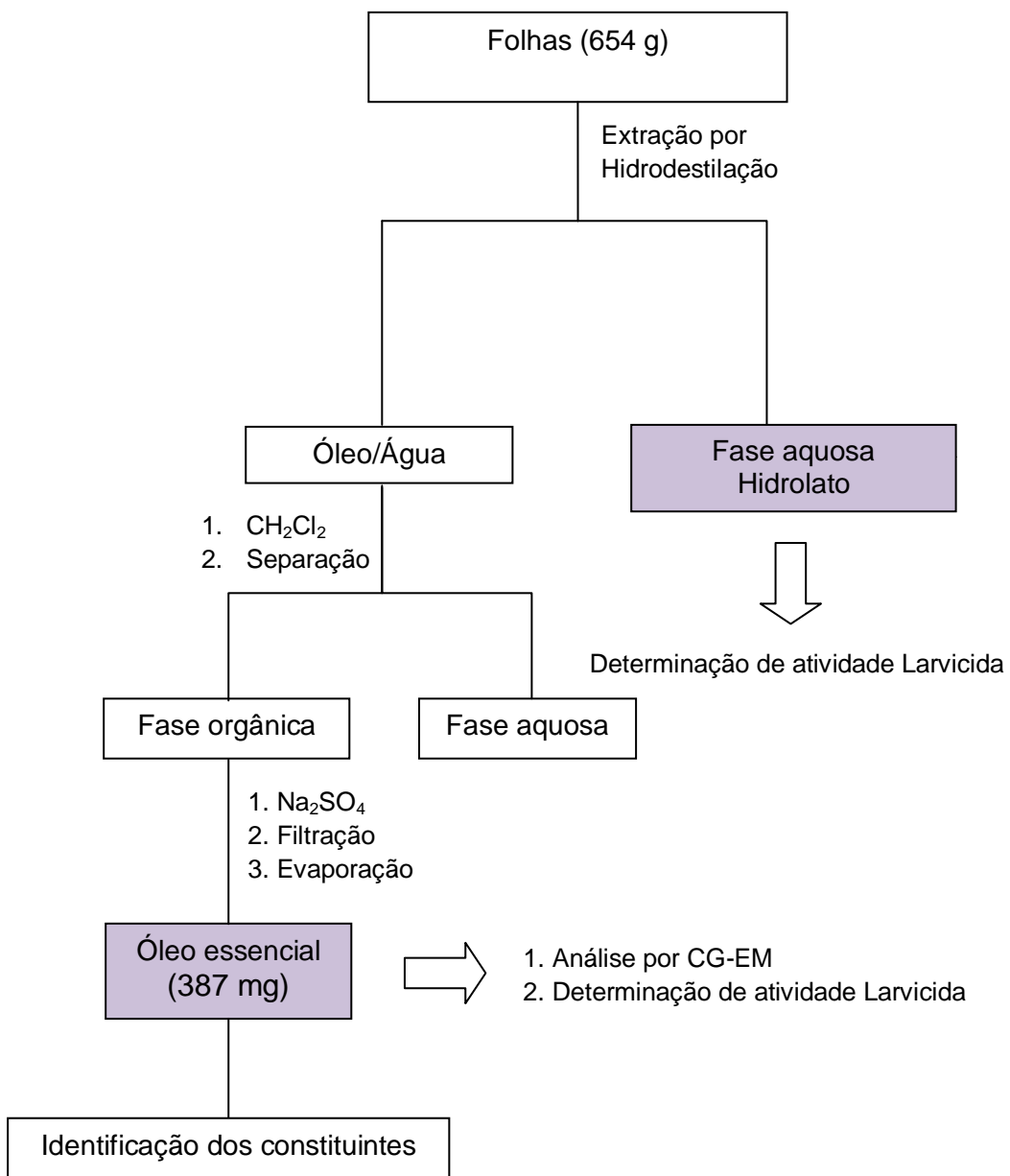
7.4.1- Obtenção do óleo essencial das folhas *C. biflora*

A extração de óleo essencial das folhas de *C. biflora* foi realizada pelo método de hidrodestilação, utilizando doseador tipo Cleavenger.

654,0 g das folhas frescas de *C. biflora* foram acondicionadas em balão de 5,0 L, juntamente com 1,5 L de água destilada. O material foi mantido em ebulição por 2 h. Decorrido este período, a mistura água/óleo presente no doseador foi particionada com diclorometano em funil de separação. A fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida, obtendo-se 387,0 mg (0,059 % de rendimento) de um óleo de coloração amarelada. A fase aquosa (hidrolato) foi reservada para posterior análise de atividade larvicida.

O óleo essencial obtido das folhas de *C. biflora* foi analisado por CG-EM. A identificação dos constituintes voláteis do óleo essencial foi efetuada através de pesquisa em espectroteca e comparação com os dados da literatura [ADAMS, 2007]. Os resultados da identificação destes constituintes encontram-se na tabela 3 (pág. 17). O fluxograma 1 (pág. 78) mostra as etapas de extração do óleo essencial.

Fluxograma 1- Método de extração do óleo essencial das folhas de *C. biflora*



7.5- Estudo dos constituintes fixos de *C. biflora*

7.5.1- Obtenção do Extrato Éter de Petróleo das Raízes (EEPR)

As raízes secas e moídas (700 g) foram extraídas com éter de petróleo à temperatura ambiente e com ausência de luminosidade, durante três dias. Concentração do solvente à pressão reduzida forneceu 1,67 g de um material de cor vermelho intenso com um rendimento de 0,24%, que foi denominado EEPR.

7.5.2- Fracionamento cromatográfico de EEPR - Isolamento de CBR-1

1 g de EEPR foi cromatografado (Tab. 15) em uma coluna (CC) de gel de sílica, cujo diâmetro variou com a quantidade de material usado. A coluna após empacotada com 20 g de gel de sílica foi eluída com solventes: hexano, AcOEt e MeOH. Foram coletadas 14 frações com volume médio de 200 mL, que foram analisadas em CCD e reunidas de acordo com suas similaridades. As frações 8-10 apresentaram-se homogêneas em CCD e foram reunidas, obtendo-se assim a substância denominada CBR-1 (58 mg). As frações 2 a 5 mostraram-se idênticas em CCD, e foram reunidas para posterior fracionamento cromatográfico.

Tabela 15- Dados referentes ao fracionamento de EEPR.

ELUENTE	FRAÇÕES
Hex	F 1
Hex /AcOEt 2%	F 1
Hex /AcOEt 5%	F 2-3
Hex /AcOEt 10%	F 4-5
Hex /AcOEt 20%	F 5-10
Hex /AcOEt 40%	F 11
Hex /AcOEt 50%	F 12
AcOEt	F 13
MeOH	F 14

7.5.3- Fracionamento cromatográfico de F 2-5

A fração 2-5 (600 mg) foi adsorvida em gel de sílica e acondicionada em uma coluna, cujo diâmetro variou com a quantidade de material usado, previamente empacotada com gel de sílica. Utilizou-se para a eluição os solventes hexano, AcOEt e MeOH. Foram coletadas 72 frações, de aproximadamente 10 mL que foram analisadas em CCD e reunidas de acordo com suas similaridades. As frações 10 a 33 mostraram-se idênticas em CCD, e foram reunidas para posterior fracionamento cromatográfico.

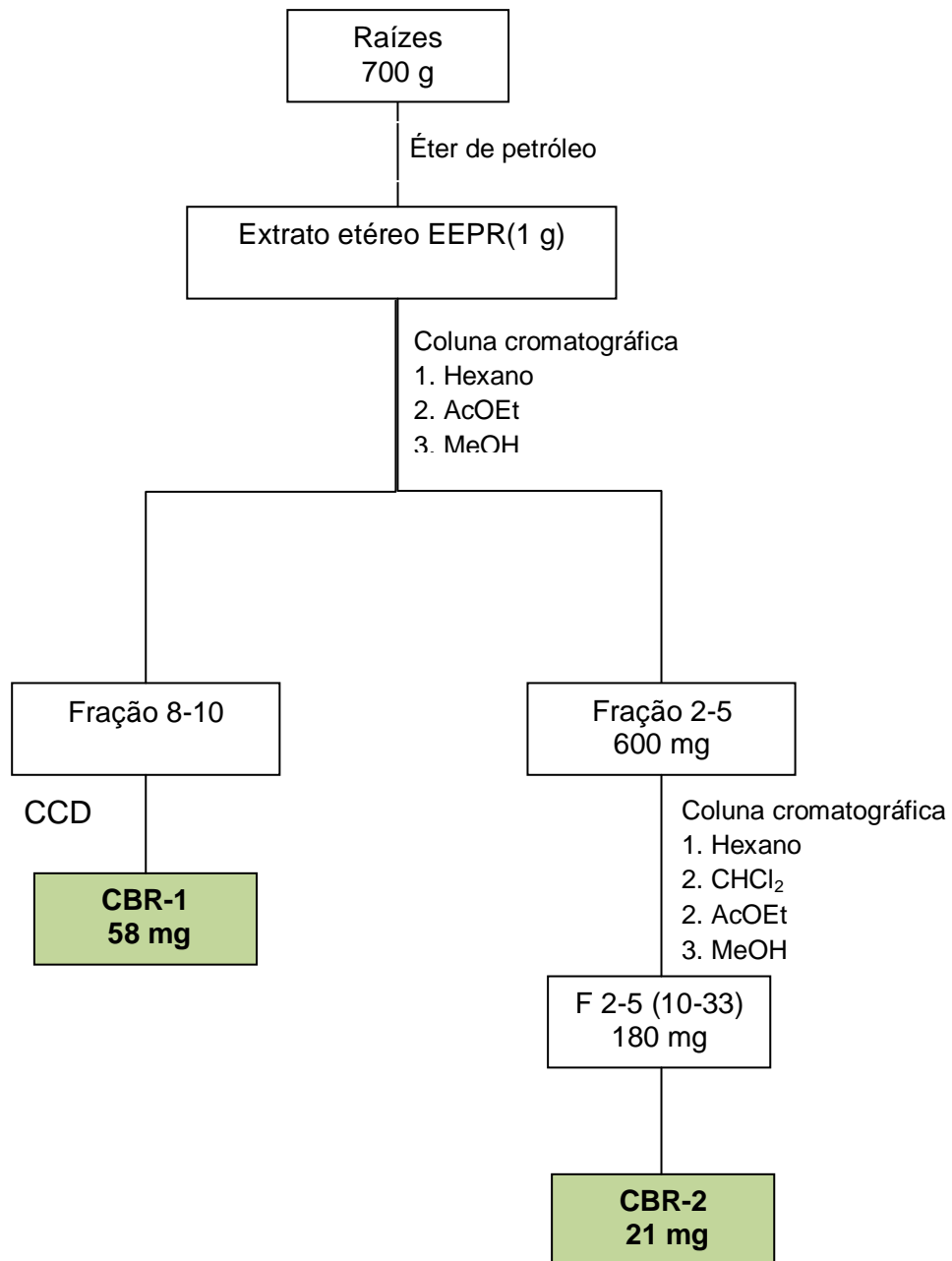
7.5.4- Fracionamento cromatográfico de F 2-5 (10-33) - Isolamento de CBR-2

180 mg da fração 2-5 (10-33) foi adsorvida em gel de sílica e acondicionada em uma coluna, cujo diâmetro variou com a quantidade de material usado, previamente empacotada com gel de sílica. Utilizou-se para a eluição os solventes hexano, CHCl_2 , AcOEt e MeOH. Foram coletadas 50 frações, de aproximadamente 10 mL que foram analisadas por CCD e reunidas de acordo com suas, similaridades (Tab. 16, pág. 81). As frações 7 a 9 mostraram-se idênticas em CCD, e foram reunidas levando ao isolamento de CBR-2 (21 mg).

Tabela 16- Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de F 2-5(10-33).

ELUENTE	FRAÇÕES
Hex /CH ₂ Cl ₂ 20%	1
Hex /CH ₂ Cl ₂ 30%	2-4
Hex /CH ₂ Cl ₂ 35%	5-6
Hex /CH ₂ Cl ₂ 40%	7-10
Hex /CH ₂ Cl ₂ 50%	11-15
Hex /CH ₂ Cl ₂ 70%	16-21
CH ₂ Cl ₂	22-24
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 20%	25-31
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 40%	32-35
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 60%	35-37
AcOEt	38-40
MeOH	41-50

Fluxograma 2- Rota esquemática do isolamento das substâncias CBR-1 e CBR-2, obtida a partir de EEPR.



7.5.5- Fracionamento do extrato etanólico do caule (EEC) - Isolamento de CBC-1

60 g de EEC, foi cromatografado em uma coluna (CC) filtrante à vácuo de gel de sílica, usando-se como eluentes os solventes: hexano, AcOEt e MeOH, obtendo-se assim as frações denominados, FHC (3,5 g), FAC (8,0 g) e FMC (46,7 g). Na fração FMC observou-se a presença de um precipitado que foi filtrado à vácuo e lavado com metanol, fornecendo o composto CBC-1, (410 mg).

7.5.6- Fracionamento cromatográfico de FAC

5,0 g da fração FAC, obtida do fracionamento de EEC, foi cromatografado em uma coluna (CC) filtrante à vácuo de gel de sílica, usando-se como eluentes os solventes: hexano, AcOEt e MeOH, obtendo-se cinco frações (Tabela 17).

Tabela 17- Dados referentes ao fracionamento de FAC.

ELUENTE	FRAÇÕES	MASSA
Hex	FAC-H	734,3 mg
Hex /AcOEt 50%	FAC-HA	2,57 g
AcOEt	FAC-A	810 mg
AcOEt /MeOH 50%	FAC-AM	512 mg
MeOH	FAC-M	208 mg

7.5.7- Fracionamento cromatográfico de FAC-A

A fração FAC-A (810 mg) foi solubilizada em MeOH e submetida a uma coluna cromatográfica, utilizando Sephadex LH 20 como fase estacionária e MeOH como eluente. Foram obtidas 25 frações de aproximadamente 1 mL, que foram analisadas em CCD e reunidas de acordo com o grau de similaridade. As frações 17 a 20 mostraram-se idênticas em CCD, e foram reunidas para posterior fracionamento cromatográfico.

7.5.8- Fracionamento cromatográfico de FAC-A 17-20 – Isolamento de CBC-2

A fração FAC-A 17-20 (360 mg) foi adsorvida em gel de sílica e acondicionada em uma coluna cujo diâmetro variou com a quantidade de material usado, previamente empacotada 14 g de gel de sílica. Utilizou-se para a eluição os solventes CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH. Foram coletadas 125 frações, de aproximadamente 10 mL que foram analisadas em CCD e reunidas de acordo com suas similaridades. As frações 36-43 mostraram-se idênticas em CCD e resultaram no isolamento de CBC-2 (Tabela 18).

Tabela 18- Dados referentes ao fracionamento de FAC-A 17-20.

ELUENTE	FRAÇÕES
AcOEt /CH ₂ Cl ₂ 80%	F 1-3
AcOEt /CH ₂ Cl ₂ 70%	F 4-17
AcOEt /CH ₂ Cl ₂ 60%	F 13-25
AcOEt /CH ₂ Cl ₂ 50%	F 26-36
AcOEt /CH ₂ Cl ₂ 30%	F 37-47
AcOEt /CH ₂ Cl ₂ 20%	F 48-63
AcOEt	F 64-69
AcOEt /MeOH 10%	F 70-91
AcOEt /MeOH 20%	F 92-103
AcOEt /MeOH 30%	F 104-115
AcOEt /MeOH 50%	F 116-121
MeOH	F 122-125

7.5.9- Reação de acetilação de CBC-2

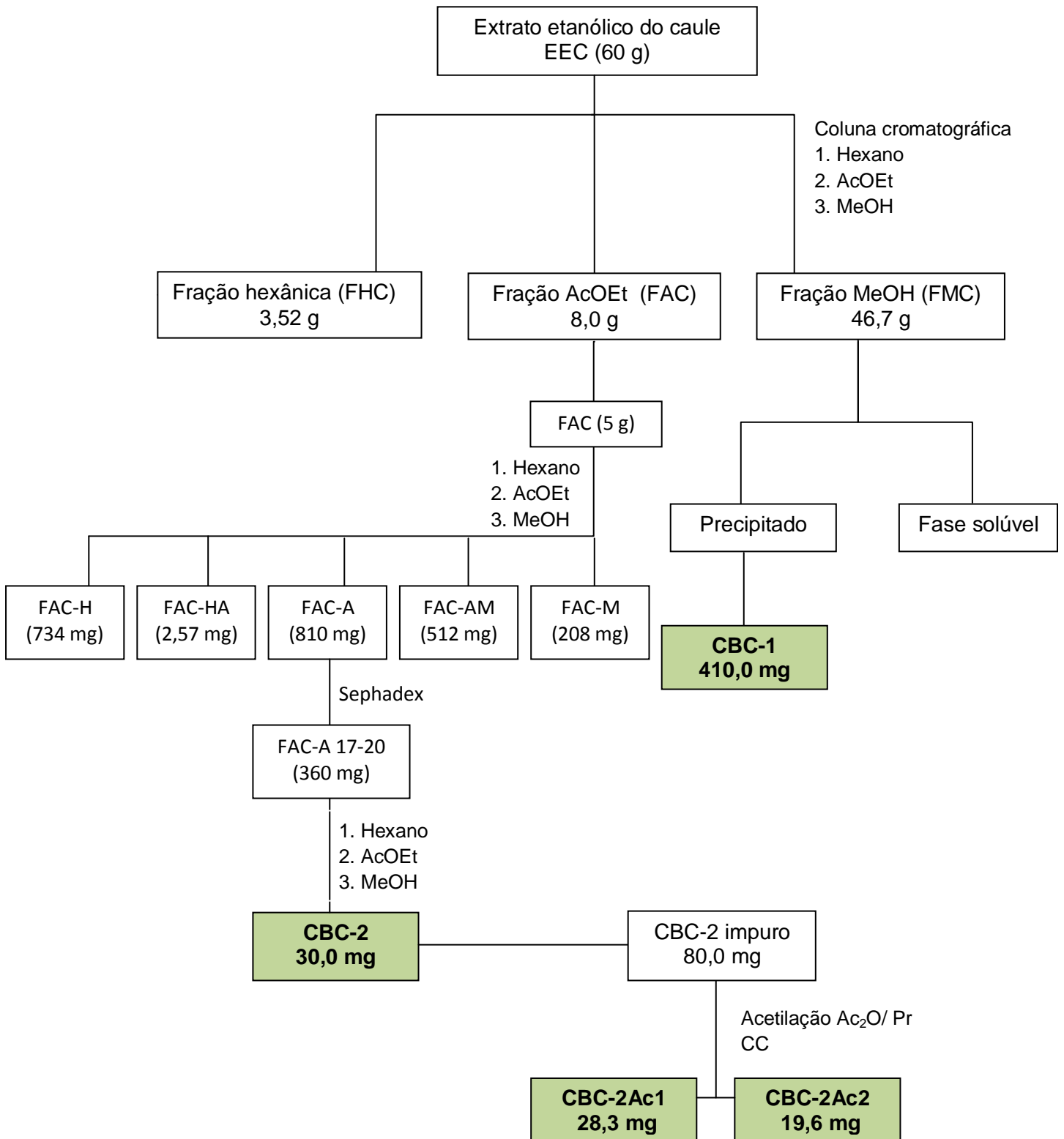
Uma fração contendo CBC-2 impuro (80 mg) foi dissolvida em 1 mL de piridina e 2 mL de anidrido acético e adicionado uma pequena quantidade de

DMAP. A mistura reacional foi mantida sob agitação por 24 horas. Decorrido o tempo, foi adicionada à mistura reacional solução saturada de sulfato de cobre (10 mL) e separada, a fase orgânica da fase aquosa, em funil de separação. A fase orgânica foi lavada várias vezes com água e em seguida tratada com Na₂SO₄ anidro e evaporado sob pressão reduzida. O derivado reacional (61 mg) foi submetido a coluna cromatográfica, fornecendo dois produtos acetilados CBC-2Ac1 (28 mg) e CBC-2Ac2 (19,6 mg).

7.6- Avaliação da atividade larvicida (contra o *Aedes aegypti*) do óleo essencial e hidrolato de *C. biflora*

As amostras, em diferentes quantidades, foram dissolvidas em 0,3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e transferidas para um béquer de 50 mL. Posteriormente, foram adicionadas 50 larvas, no terceiro estágio de vida, juntamente com 19,7 mL de água [GADELHA; TODA, 1985] Paralelamente, foram feitos testes em branco, utilizando-se água e DMSO a 1,5 %. Após 24 horas, foi realizada a contagem das larvas exterminadas e calculada a CL₅₀ [OLIVEIRA *et al.*, 2002].

Fluxograma 3- Rota esquemática do isolamento das substâncias CBC-1 e CBC-2, e obtenção dos derivados reacionais.



Capítulo 8

CONCLUSÃO



8- CONCLUSÃO

O Estudo do óleo essencial das folhas de *C. biflora* (0,059% de rendimento) possibilitou a identificação de 7 constituintes, no qual foi possível observar a presença majoritária de sesquiterpenos, dentre os quais o β -Cariofileno (30,6%) e o Germacreno-D (46,83%), que apresentaram-se em maior proporção, correspondendo a 77,43% da composição total do óleo.

O estudo fitoquímico do extrato éter de petróleo das raízes de *C. biflora* resultou no isolamento e caracterização da naftoquinona, 6,9-dimetil-3-(4-metil-pent-3-enil)nafto[1,8-*bc*]-piran-7,8-diona (biflorina) e do sesquiterpeno, (1R, 5S, 8R) 3-(furan-3'-il)-5,8-dimetil-1-oxaspiro[4.5]non-2-en-9-ona (caprariolideo B). O estudo do extrato etanólico do caule possibilitou o isolamento e identificação do açúcar D-manitol e do iridóide, (1R,5S,6S,7R,8S,9S)-7-cloro-8-(hidroximetil)octa-hidrociclopenta[c]piran-1,10-oxira-5,6,8-triol (miopoclorin), inédito na espécie *C. biflora*.

Para confirmação da estrutura do iridóide foi realizada uma reação de acetilação, obtendo-se um composto triacetilado e um diacetilado, que apresentaram rendimento de 35,4% e 24,5%, respectivamente.

Os testes de atividade larvicida contra o *Aedes Aegypti*, para o óleo essencial apresentou atividade moderada com $CL_{50}=73,39$, sendo considerado apto para tal finalidade.

Os resultados apresentados neste trabalho permitiram mostrar a importância do estudo fitoquímico na busca de novas substâncias que possam constituir novos fármacos, e motivam a continuação do estudo fitoquímico desta espécie na busca de novos compostos com atividade farmacológica, visto que os compostos isolados apresentam grande variedade de atividades biológicas.

Capítulo 9

CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROMÉTRICOS



9- CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROMÉTRICOS

CBR-1

Aspecto: cristais agulha vermelho-escuro

P.F.: 154-158 °C

Solubilidade: clorofórmio.

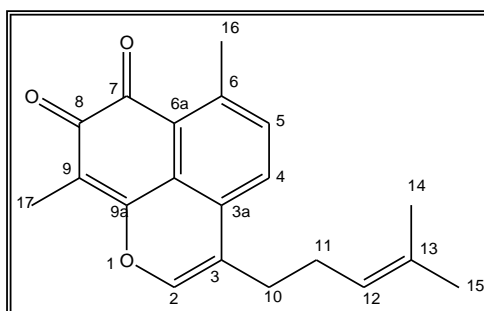
F. M.: C₂₀H₂₀O₃

M.M. (g/mol): 308

Espectrometria na região do IV (KBr, cm⁻¹): 1684; 2921; 1592 e 1438; 1236; 1023.

Espectrometria de RMN ¹H (Tab. 5, pág. 23).

Espectrometria de RMN ¹³C (Tab. 5, pág. 23).



6,9-dimetil-3-(4-metil-pent-3-enil)nafto[1,8-*bc*]-piran-7,8-diona (biflorina)

CBR-2

Aspecto: viscoso amarelo escuro

Rotação específica: $[\alpha]_D^{20} -31^\circ$ (c 0,001; CHCl₃)

Solubilidade: clorofórmio.

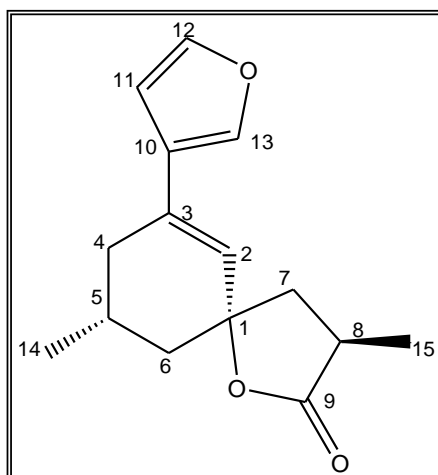
F. M.: C₁₅H₁₈O₃

M.M. (g/mol): 246

Espectrometria na região do IV (KBr, cm⁻¹): 2922; 1760; 1454; 1214; 763.

Espectrometria de RMN ¹H (Tab. 7, pág. 29).

Espectrometria de RMN ¹³C (Tab. 7, pág. 29).



(1R, 5S, 8R) 3-(furan-3'-il)-5,8-dimetil-1-oxaspiro[4.5]non-2-en-9-ona
 (caprariolídeo B)

CBC-1

Aspecto: sólido amorfo

P.F.: 160-162 °C

Solubilidade: água e piridina

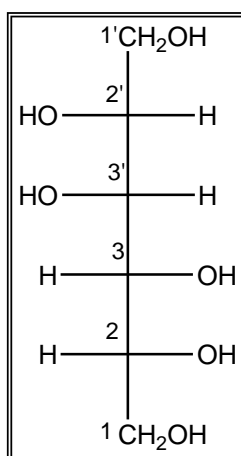
F. M.: C₆H₁₄O₆

M.M. (g/mol): 182

Espectrometria na região do IV (KBr, cm⁻¹): 3293; 2939; 1083; 1020.

Espectrometria de RMN ¹H (Tab. 9, pág. 37).

Espectrometria de RMN ¹³C (Tab. 9, pág. 37).



D-manitol

CBC-2

Aspecto: viscoso marrom

Rotação específica: $[\alpha]_D^{20} +38^\circ$ (c 0,0006; $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$).

Solubilidade: acetona

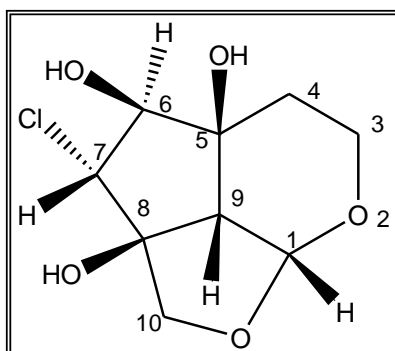
F. M.: $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{O}_5\text{Cl}$

M.M. (g/mol): 271

Espectrometria na região do IV (KBr, cm^{-1}): 3411; 2929; 1242; 1149; 1033.

Espectrometria de RMN ^1H (Tab. 11, pág. 43).

Espectrometria de RMN ^{13}C (Tab. 11, pág. 43).



(1R,5S,6S,7R,8S,9S)-7-cloro-8-(hidroxi-metil)octa-hidrociclopenta[c]piran-1,10-oxira-5,6,8-triol (miopoclorin)

CBC-2Ac1

Aspecto: cristais de cor rósea

Rotação específica: $[\alpha]_D^{20} +90,6^\circ$ (c 0,00075; CHCl_3)

P.F.: 167,3-168,4°C

Solubilidade: clorofórmio

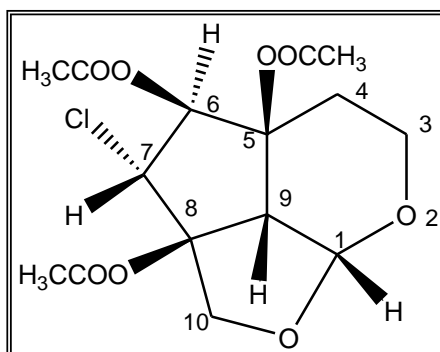
F. M.: $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{ClO}_8$

M.M. (g/mol): 362

Espectrometria na região do IV (KBr , cm^{-1}): 3440; 3000; 1737; 1371; 1203; 1056.

Espectrometria de RMN ^1H (Tab 14, pág. 61).

Espectrometria de RMN ^{13}C (Tab 14, pág. 61).



Derivado triacetilado

CBC-2Ac2

Aspecto: viscoso amarelo

Rotação específica: $[\alpha]_D^{20} +91^\circ$ (c 0,00055; CHCl_3).

Solubilidade: clorofórmio

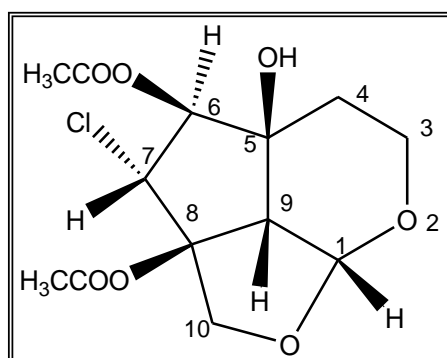
F. M.: $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{ClO}_7$

M.M. (g/mol): 320

Espectrometria na região do IV (KBr, cm^{-1}): 3465; 2931; 1750; 1379; 1230; 1046.

Espectrometria de RMN ^1H (Tab 14, pág. 61).

Espectrometria de RMN ^{13}C (Tab 14, pág. 61).



Derivado diacetilado

Capítulo 10

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry**. Carol Stream: Allured Publ. Corp., 2007.

AL-REHAILY, A. J.; ABDEL-KADER, M. S.; AHMAD, M. S.; MOSSA, J. S. Iridoid glucosides from *Kickxia abhaica* D.A. Sutton from Scrophulariaceae. **Phytochemistry**, v. 67, n. 5, p. 429-432, 2006.

AHMAD, V. U.; KOUSAR, F.; ZUBAIR, M.; KHAN, A.; SHAIQ ALI M., IQBAL CHOUDHARY, M.; SENER, B. A new iridoid glycoside from *Linaria genestifolia*. **Fitoterapia**, v. 77, n. 1, p. 12-14, 2006.

AQUINO, T. M. Caracterização Farmacognóstica de *Capraria biflora* L. e estudo biológico e físico-químico de seus metabólitos secundários. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2003.

AQUINO, T. M.; LIMA, C. S. A.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae): uma Revisão. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 25, n. 3, p. 460-467, 2006.

ARNOLD, U. W.; ZIDORN, C.; ELLMERER, E. P.; STUPPNER, H. Iridoid and phenolic glycosides from *Wulfenia carinthiaca*. **Z. Naturforsch.**, v. 57c, p. 969-975, 2002.

BIANCO, A.; GUISO, M.; PELLEGRINI, G.; NICOLETTI, M.; SERAFINI, M. Muralioside, an iridoid from *Cymbalaria muralis*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 8, p. 1515-1517, 1997a.

BIANCO, A.; GUISO, M.; MARTINO, M.; NICOLETTI, M.; SERAFINI, M.;

TOMASSINI, L.; MOSSA, L.; POLI, F. Iridoids from endemic Sardinian *Linaria* species. **Phytochemistry**, v. 42, n. 1, p. 89-91, 1996.

BIANCO, A.; GUISO, M.; MARTINO, M.; NICOLETTI, M.; SERAFINI, M.; TOMASSINI, L. 8-epi-Muralioside, an Iridoid Glucoside from *Linaria arcusangeli*. **J. Nat. Prod.**, v. 60, n. 4, p. 366-367, 1997b.

CHEN, B.; LIU, Y.; LIU, H. W.; WANG, N. L.; YANG, B. F.; YAO, X. S. Iridoid and aromatic glycosides from *Scrophularia ningpoensis* HEMSL and their inhibition of $[Ca^{2+}]$ increase induced by KCl. **Chem. Biodiv.**, v. 5, n. 9, p. 1723-1735, 2008.

COLLINS D. O.; GALLIMORE, W. A.; REYNOLDS, W. F.; WILLIAMS, L. A. D.; REESE, P. B. New Skeletal Sesquiterpenoids, Caprariolides A-D, from *Capraria biflora* and Their Insecticidal Activity. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n.11, p. 1515-1518, 2000.

DAI J, Q.; LIU, Z. L.; YANG, L. Non-glycosidic iridoids from *Cymbaria mongolica* **Phytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 537-542, 2002.

DAMTOFT, S. Iridoid glucosides in *Zaluzianskya capensis*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 2, p. 373-375, 1994.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally Occurring Iridoids. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 55, n. 2, p. 159-222, 2007a.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally Occurring Secoiridoids and Bioactivity of Naturally Occurring Iridoids and Secoiridoids. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 55, n. 5, p. 689-728, 2007b.

DINDA, B.; ROY CHOWDHURY, D.; MOHANTA, B. C. Naturally Occurring Iridoids, Secoiridoids and Their Bioactivity. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 57, n. 8, p. 765-796, 2009.

ERSÖZ, T.; ZIVER BERKMAN, M.; TASDEMIR, D.; IRELAND, C. M.; CALIS, I.; An iridoid glucoside from *Euphrasia pectinata*. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 10, p. 1449-1450, 2000.

FERNANDEZ, L.; DIAZ, A. M.; OLLIVIER, E.; FAURE, R.; BALANSARD, G. An iridoid diglycoside isolated from *Scrophularia scorodonia*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 5, p.1569-1571, 1995.

FONSECA, A. M. Estudo Fitoquímico dos constituintes fixos e voláteis de *Capraria biflora*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2003.

FONSECA, A. M.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; LEMOS, T. L. G. Total assignments of ¹H and ¹³C spectra of biflorin and bis-biflorin from *Capraria biflora*. **Mag. Res. Chem.**, v. 41, p. 1038-1040, 2002.

FRANZYK, H.; JENSEN, S. R.; STERMITZ, F. R. Iridoid glucosides from *Penstemon secundiflorus* and *P. grandiflorus*: revised structure of 10-hydroxy-8-epihastatoside. **Phytochemistry**, v. 49, n. 7, p. 2025-2030, 1998.

GADELHA, D.P.; TODA, A.T. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. **Rev. Bras. Malariol. D. Trop.**, v. 37, p. 29-36, 1985.

GINER, R. M.; VILLALBA, M. L.; RECIO, M. D. C.; MANEZ, S.; GRAY, A. I.; RIOS, J. L. A New Iridoid from *Scrophularia auriculata* ssp. *pseudoauriculata*. **J. Nat. Prod.**, v. 61, n. 9, p. 1162-1163, 1998.

HANDJIEVA, N.; TERSIEVA, L.; POPOV, S.; EVSTATIEVA, L. Two iridoid glucosides, 5-O-menthiafoloylkickxioside and kickxin, from *Kickxia* Dum. species. **Phytochemistry**, v. 39, n. 4, p. 925-927, 1995.

HARPUT, U. S.; VAREL, M.; NAGATSU, A.; SARACOGLU, I. Acylated iridoid glucosides from *Veronica anagallis-aquatica*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 14, p. 2135-2139, 2004.

HARPUT, U. S.; SARACOGLU, I.; NAGATSU, A.; OGIHARA, Y. Iridoid glucosides from *Veronica hederifolia*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 50, n. 8, p. 1106-1108, 2002.

HARPUT, U. S.; NAGATSU, A.; OGIHARA, Y.; SARACOGLU, I. Iridoid glucosides from *Veronica pectinata* var. *glandulosa*. **Z. Naturforsch.**, v. 58c, p. 481-484, 2003.

HUANG, S. X.; ZHOU, Y.; NIE, Q. J.; DING, L. S.; PENG, S. L. Two new iridoid glucosides from *Picrorhiza scrophulariiflora*. **J. Asian Nat. Prod. Res.**, v. 8, p. 259-263, 2006.

JIA, Q.; HONG, M. F.; MINTER, D. Pikuroside: a novel iridoid from *Picrorhiza kurroa*. **J. Nat. Prod.**, v. 62, n. 6, p. 901-903, 1999.

JIA, Z. J.; GAO, J. J.; LIU, Z. M. Iridoid and phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis plicata* Maxim **Indian J. Chem.**, v. 33B, p. 460-464, 1994.

KANEMOTO, M.; MATSUNAMIA, K.; OTSUKA, H.; SHINZATO, T; ISHIGAKI, C.; TAKEDA, Y. Chlorine-containing iridoid and iridoid glucoside, and other glucosides from leaves of *Myoporum bontioides*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 13, p. 2517-2522, 2008.

KALPOUTZAKIS, E.; ALIGIANNIS, N.; MITAKOU, S.; SKALTSOUNIS, A. L. Verbaspinoside, a New Iridoid Glycoside from *Verbascum spinosum*. **J. Nat. Prod.**, v. 62, n. 2, p. 342-344, 1999.

KIM, I. H.; UCHIYAMA, N.; KAWAHARA, N.; GODA, Y. Iridoid glycosides and cucurbitacin glycoside from *Neopicrorhiza scrophulariiflora*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 24, p. 2691-2696, 2006.

KIM, S. R.; LEE, K. Y.; KOO, K. A.; SUNG, S. H.; LEE, N. G.; KIM, J.; KIM, Y. C. Four new neuroprotective iridoid glycosides from *Scrophularia buergeriana* roots. **J. Nat. Prod.**, v. 65, n. 11, p. 1696-1699, 2002.

KLIMEK, B. Hydroxycinnamoyl ester glycosides and saponins from flowers of *Verbascum phlomoides*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1281-1284, 1996.

KRULL, R. E.; STERMITZ, F. R. Trans-fused iridoid glycosides from *Penstemon mucronatus*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 8, p. 2413-2415, 1998a.

KRULL, R. E.; STERMITZ, F. R.; FRANZYK, H.; JENSEN, S. R. Iridoid glycoside biosynthesis in *Penstemon secundiflorus*. Another H-5, H-9 trans-iridoid glycoside. **Phytochemistry**, v.49, n. 6, p. 1605-1608, 1998b.

LI, Y.; CHANGZENG, W.; ZHONGJIAN, J. Iridoids in roots of *Pedicularis chinensis*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 2, p. 491-494, 1995.

LI, J. X.; LI, P.; TEZUKA, Y.; NAMBA, T.; KADOTA, S. Three phenylethanoid glycosides and an iridoid glycoside from *Picrorhiza scrophulariiflora*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 3, p. 537-542, 1998.

LI, Y. M.; JIANG, S. H.; GAO, W. Y.; ZHU, D. Y. Iridoid glycosides from *Scrophularia ningpoensis*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 1, p. 101-104, 1999.

MABBERLEY, D. J. **The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants**. 2ª ed. 1997.

MACIEL, M. A. M. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quím. Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MANDAL, S.; MUKHOPADHYAY, S. New iridoid glucoside from *Picrorhiza kurroa* Royle ex Benth. **Indian J. Chem.**, v. 43B, n. 5, p. 1023-1025, 2004.

MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais**, Universidade Aberta, Fortaleza, 1988.

MIYASE, T.; MIMATSU, A. Acylated iridoid and phenylethanoid glycosides from the aerial parts of *Scrophularia nodosa*. **J. Nat. Prod.**, v. 62, n. 8, p. 1079-1084, 1999.

NGUYEN, A. T.; FONTAINE, J.; MALONNE, H.; CLAEYS, M.; LUHMER, M.; DUEZ, P. A sugar ester and an iridoid glycoside from *Scrophularia ningpoensis*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 10, p. 1186-1191, 2005.

OLIVEIRA, M. F.; LEMOS, T. L. G.; MATTOS, M. C.; SEGUNDO, T. A.; SANTIAGO, G. M. P.; BRAZ-FILHO, R. New enamines derivatives of lapachol and biological activity. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 74, n. 2, p. 211-221, 2002.

OTSUKA, H. Iridoid mono- and diesters of D-glucopyranose from *Linaria japonica*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1111-1114, 1995.

OTSUKA, H. Iridolinarins A, B, and C: Iridoid Esters of an Iridoid Glucoside from *Linaria japonica*. **J. Nat. Prod.**, v. 57, p. 357-362, 1994.

POSER, G. L. V.; DAMTOFT, S.; SCHRIPSEMA, J.; HENRIQUES, A. T.; JENSEN, S. R. Iridoid glucosides from *Angelonia integerrima*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 2, p. 371-373, 1997.

SANTOS, M. I. S. Biosynthesis Significance of Iridoids in Chemosystematic **Braz. Chem. Soc.**, v. 12, n. 2, p. 144-153, 2001

SCHNEIDER, M. J.; GREEN, J. C.; MCPEAK, D. Proceroside, an iridoid glucoside from *Pedicularis procera*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1097-1098, 1997.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7ª ed. Rio de Janeiro, LTC, 2006.

SIMAS, N. K.; LIMA, E. C.; CONCEIÇÃO, S. R.; KUSTER, R. M.; OLIVEIRA FILHO, A. M. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (Óleo Vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Quim. Nova**, v. 27, n. 1, p. 46-49, 2004.

SKALTSOUNIS, A. L.; TSITSA-TZARDIS, E.; DEMETZOS, C.; HARVALA, C. Unduloside, a New Iridoid Glycoside from *Verbascum undulatum*. **J. Nat. Prod.**, v. 59, n. 7, p. 673-675, 1996.

SOUZA, V. C.; GIULIETTI, A. M. Levantamento das espécies de Scrophulariaceae *sensu lato* nativas do Brasil. **Pesquisas, Botânica, São Leopoldo: Instituto Anchieta de Pesquisas**. n. 60, p. 287-288, 2009.

SPRAGUE, T. A. A revision of the genus *Capraria*. **Bull. Misc. Inform.**, v. 5, p. 205-212, 1921.

STERMITZ, F. R.; ABDEL-KADER, M. S.; FODERARO, T. A.; POMEROY, M. Iridoid glycosides from some butterflies and their larval food plants. **Phytochemistry**, v. 37, n. 4, p. 997-999, 1994a.

STERMITZ, F. R.; BLOKHIN, A.; POLEY, C. S.; KRULL, R. E. Iridoid glycosides of additional Penstemon species. **Phytochemistry**, v. 37, n. 5, p. 1283-1286, 1994b.

STEVENSON, P. C.; SIMMONDS, M. S. J.; SAMPSON, J.; HOUGHTON, P. J.;

GRICE, P. Wound healing activity of acylated iridoid glycosides from *Scrophularia nodosa*. **Phytother. Res.**, v. 16, p. 32-35, 2002.

SU, B. N.; MA, L. P.; JIA, Z. J. Iridoid and phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis artselaeri*. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 720-723, 1998.

TASDEMIR, D.; GÜNER, N. D.; PEROZZO, R.; BRUN, R.; DONMEZ, A. A.; CALIS, I.; RUEDI, P. Anti-protozoal and plasmodial FabI enzyme inhibiting metabolites of *Scrophularia lepidota* roots. **Phytochemistry**, v. 66, n. 3, p. 355-362, 2005.

TASKOVA, R.; HANDJIEVA, N.; PEEV, D.; POPOV, S. Iridoid glucosides from three *Veronica* species. **Phytochemistry**, v. 49, n. 5, p. 1323-1327, 1998.

TASKOVA, R.; HANDJIEVA, N.; EVSTATIEVA, L.; POPOV, S. Iridoid glucosides from *Plantago cornuti*, *Plantago major* and *Veronica cymbalaria*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 8, p. 1443-1445, 1999.

VASCONCELOS, J. N. Avaliação do potencial químico e biológico de *Tephrosia toxicaria* Pers. (Fabaceae). **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2010.

VASCONCELOS, M. C.; BEZERRA, D. P.; FONSECA, A. M.; PEREIRA, M.R.P.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ALVES, A. P. N. N.; LOTUFO, L. V. C. Antitumor Activity of Biflorin, *o*-Naphthoquinone Isolated from *Capraria biflora*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, n. 8, p. 1416-1421, 2007.

VESPER, T.; SEIFERT K. Iridoids and other glucosides from *Penstemon acuminatus*. **Phytochemistry**, v. 37, n. 4, p. 1087-1089, 1994.

WANG, H.; WU, F. H.; XIONG, F; WU, J. J.; ZHANG, L. Y. ; YE, W. C.; LI, P.; ZHAO, S. X. Iridoids from *Neopicrorhiza scrophulariiflora* and Their

Hepatoprotective Activities in Vitro. **Chem. Pharm. Bull.** v. 54, n. 8, p. 1144-1149, 2006.

YUAN, C. S.; XIE, W. D.; YANG, X. P.; JIA, Z. J. A new iridoid glycoside and a new iridoid from *Pedicularis kansuensis* f. albiflora. **Chinese Chemical Lett.**, v. 14, n. 9, p. 932-933, 2003a.

YUAN, C. S.; ZHANG, Q.; XIE, W. D.; YANG, X. P.; JIA, Z. J. Iridoids from *Pedicularis kansuensis* forma albiflora. **Pharmazie**, v. 58, n. 6, p. 428-430, 2003b.