

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DAS
ESPÉCIES *Tabebuia serratifolia* Nichols e *Tabebuia rosea* Bertol

MAÍLCAR FERNANDES DE OLIVEIRA

TESE DE DOUTORADO

2000

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DAS
ESPÉCIES *Tabebuia serratifolia* Nichols e *Tabebuia rosea* Bertol**

Tese submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica
como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor.

Universidade Federal do Ceará – Centro de Ciências
Departamento de Química Orgânica e Inorgânica

Fortaleza - Ceará

2000

1

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e em cuja Biblioteca Central encontra-se à disposição dos interessados.

Mailcar Fernandes de Oliveira

Tese aprovada em : 22/08/2000

Banca Examinadora:

Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Depto. de Química Orgânica e Inorgânica-UFC
Orientadora

Dr. Francisco José Queiroz Monte
Depto. de Química Orgânica e Inorgânica-UFC

Dr. Marcos Carlos de Mattos
Depto. de Química Orgânica e Inorgânica-UFC

Dra. Vanderlan da Silva Bolzani
UNESP - Araraquara, SP

Dra. Eva Gonçalves Magalhães
UNICAMP - São Paulo

Este trabalho foi realizado sob a orientação da Professora Telma Leda Gomes de Lemos do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

Para Vincenzo, meu amado filho, a quem devo as maiores alegrias da minha vida.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xviii
LISTA DE QUADROS.....	xx
LISTA DE FLUXOGRAMAS.....	xx
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxi
FOTOGRAFIA DE <i>Tabebuia serratifolia</i>	xxii
FOTOGRAFIA DE <i>Tabebuia rosea</i>	xxiii

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO.....	01
-----------------	----

CAPÍTULO 2

CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE AS ESPÉCIES ESTUDADAS E LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO DO GÊNERO <i>Tabebuia</i>	06
---	----

CAPÍTULO 3

DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES FIXOS ISOLADOS DO EXTRATO ETANÓLICO DO CERNE DE <i>Tabebuia serratifolia</i>	17
3.1. Determinação Estrutural de IAE-1 (28).....	17
3.2. Determinação Estrutural de IAEC-1(30).....	28
3.3. Determinação Estrutural de IAEA-K1(90).....	39
3.4. Determinação Estrutural de IAEA-K3(89).....	47
3.5. Determinação Estrutural de IAEA-K4(88).....	63
3.6. Determinação Estrutural de IAEE-K1-Ac(91a).....	79
3.7. Determinação Estrutural de IAEC-2 (77) e IAEA-K2(78).....	92
3.8. Determinação Estrutural de lapiper(96), lapirrol(97) e lapimor(98).....	94
3.9. Determinação Estrutural de lapidroxi-2-1(99) e lapidroxi-2-2(100).....	102

CAPÍTULO 4

DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES FIXOS ISOLADOS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DO LENHO E CASCAS DO LENHO DE <i>Tabebuia rosea</i>	117
4.1. Determinação Estrutural de ILEC-1 (92).....	117
4.2. Determinação Estrutural de ILEA-1(93).....	124
4.3. Determinação Estrutural de ILEA-4(94).....	129

CAPÍTULO 5

PARTE EXPERIMENTAL.....	140
5.1. Coleta e Identificação do Material Botânico.....	140
5.2. Métodos Cromatográficos.....	140
5.3. Métodos Espectrométricos e Espectroscópicos.....	140
5.4. ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO ETANÓLICO DO CERNE DE <i>Tabebuia serratifolia</i>	143
5.5. Obtenção do Extrato Etanólico do Cerne de <i>Tabebuia serratifolia</i>	143
5.6. Obtenção de IAE-1(28).....	143
5.7. Fracionamento do Extrato Etanólico IAE.....	143
5.8. Elaboração do Eluato IAEC.....	144
5.9. Elaboração de IAEC(sol. hexano).....	144
5.10. Elaboração da Fração IAEC(sol.hexano)(42-47) e Obtenção de IAEC-1(30)....	145
5.11. Elaboração da Fração IAEC(sol.hexano)(56-58) e Obtenção de IAEC-2(77)....	145
5.12. Elaboração do Eluato IAEA.....	146
5.13. Elaboração da Fração IAEA(35) e Obtenção de IAEA-K1(90).....	146
5.14. Elaboração da Fração IAEA(36).....	147
5.15. Elaboração da Fração IAEA(36)(36-39).....	147
5.16. Elaboração da Fração IAEA(36)(36-39)(10-16) e Obtenção de IAEA-K4(88)..	148
5.17. Elaboração da Fração IAEA(37-41) e Obtenção de IAEA-K2(78).....	148
5.18. Elaboração da Fração IAEA(37-41)(sol.acetona) e Obtenção de IAEA-K3(89).149	
5.19. Elaboração do Eluato IAEE.....	149
5.20. Elaboração da Fração IAEE(43-55).....	150
5.21. Elaboração da Fração IAEE(43-55)(74-75).....	151
5.22. Acetilação da Fração IAEE(43-55)(74-75)(12-14).....	152

5.23. Elaboração da Fração IAEE(43-55)(74-75)(12-14)(Ac).....	152
5.24. Elaboração da Fração IAEE(43-55)(74-75)(12-14)(Ac)(04) e Obtenção de IAEE-K1-Ac(91a).....	153
5.25. ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO ETANÓLICO DO CERNE DE <i>Tabebuia rosea</i>	155
5.26. Obtenção do Extrato Etanólico do Cerne de <i>Tabebuia rosea</i>	155
5.27. Fracionamento do Extrato Etanólico ILE.....	155
5.28. Elaboração do Eluato ILEC.....	155
5.29. Elaboração da Fração ILEC(128-133) e Obtenção de ILEC-1(92).....	156
5.30. Elaboração do Eluato ILEA e Obtenção de ILEA-1(93) e ILEA-2(78).....	157
5.31. Elaboração da Fração ILEA(24-28)(sol.clorofórmio).....	158
5.32. Elaboração da Fração ILEA(24-28)(sol.clorofórmio)(08-19).....	159
5.33. Elaboração da Fração ILEA(24-28)(sol.clorofórmio)(08-19)(35-40).....	160
5.34. Elaboração da Fração ILEA(24-28)(sol.clorofórmio)(08-19)(35-40)(01) e Obtenção de ILEA-4(94).....	160
5.35. ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DO CERNE DE <i>Tabebuia rosea</i>	162
5.36. Obtenção do Extrato Etanólico das Cascas do Cerne de <i>Tabebuia rosea</i>	162
5.37. Fracionamento do Extrato Etanólico ICE.....	162
5.38. Elaboração do Eluato ICEH.....	163
5.39. Elaboração da Fração ICEH(28-30) e Obtenção de ICEH-K1(77).....	163
5.40. PREPARAÇÃO DE DERIVADOS.....	165
5.41. Obtenção de IAEA-K3-Ac (89a).....	165
5.42. Obtenção de IAEA-K4-Ac (88a).....	166
5.43. Obtenção de Lapiper (96), Lapirol(97) e Lapimor(98).....	166
5.44. Obtenção de Lapidroxi-2-1(99) e Lapidroxi-2-2 (100).....	167
5.45. Bioensaios Realizados com Lapachol e seus Derivados Nitrogenados.....	169
5.46. Citotoxicidade Frente às Larvas de <i>Artemia salina</i>	169
5.47. Citotoxicidade Frente às Larvas de <i>Aedes aegypti</i>	170
5.48. Citotoxicidade em Células Tumerais Humanas (Tumor de Mama A549).....	171
CAPÍTULO 6	
CONCLUSÃO	174

CAPÍTULO 7

CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROMÉTRICOS.....	176
7.1. IAE-1: Lapachol (28).....	176
7.2. IAEC-1: Dehidro- α -lapachona (30).....	176
7.3. IAEA-K1: Ácido 3-hidroxi-4-metoxi-benzóico (92).....	177
7.4. IAEA-K3: 8- <i>epi</i> -cicoolivil (89).....	177
7.5. IAEA-K3-Ac: 4, 4', 9, 9'-acetoxi-8- <i>epi</i> -cicoolivil (89a).....	178
7.6. IAEA-K4: Olivil (88).....	178
7.7. IAEA-K4-Ac: 4, 4', 9-triacetoxi-olivil (88a).....	179
7.8. IAEE-K1-Ac: 8, 2',3',4',6', 4''-hexaacetoxi-3''-metoxi-bezoil-ajugol(91a).....	179
7.9. IAEC-2 ou ICEH-K1: β -sitosterol (77) e IAEA-K2 ou ILEA-2: glicosídeo do β -sitosterol (78).....	180
7.10. ILEC-1: Éster metílico do ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico (92).....	180
7.11. ILEA-1: Ácido- <i>p</i> -hidroxi-cinâmico (93).....	181
7.12. ILEA-4: Ácido 3 β ,6 β ,19 α -trihidroxi-urs-12-en-28-óico (94).....	181
7.13. Lapiper (96).....	182
7.14. Lapirol (97).....	182
7.15. Lapimor (98).....	183
7.16. Lapidroxi-2-1 (99).....	183
7.17. Lapidroxi-2-2 (100).....	184

CAPÍTULO 8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	185
---------------------------------	-----

AGRADECIMENTOS

Tenho uma imensa gratidão pela professora Telma Leda Gomes de Lemos, e todas as palavras que consiga escrever não conseguirão expressar o quanto a Telma é importante na minha vida. Sou-lhe grata por ter me aceito como aluna de iniciação científica em 1987, ensinando-me pacientemente fazer placas, colunas, isolar substâncias, e responder as muitas indagações que pairavam na minha cabeça. O tempo passou, e continuamos juntas no meu mestrado, seguido do doutorado que agora chega ao fim. Agradeço-lhe por tudo, a paciente orientação, dedicação, amizade, respeito e até mesmo os puxões de orelha vez ou outra, quando eu divagava muito pela vida e a poesia, ou estava literalmente com a cabeça nas nuvens. Gostaria de dizer, que a poesia da vida continua a me deslumbrar, mas é esse sentir poético que dota de tanto encanto também o estudo das plantas.

Agradeço ao Dr. Raimundo Braz Filho, pela imensa ajuda na elucidação das estruturas das substâncias, pelo exemplo de dedicação à química de produtos naturais e lição de humildade, que somente aqueles que são grandes possuem.

Ao professor Marcos Carlos de Mattos, pela inigualável ajuda na preparação dos derivados do lapachol.

Ao professor Edilberto Rocha Silveira pelo apoio, amizade, exemplo de profissionalismo e por assinar as requisições dos tantos espectros com solventes deuterados caros.

Ao professor Francisco José Queiroz Monte, que durante grande parte do tempo de curso foi coordenador, e sempre procurou ajudar-me em tudo que fosse possível, e até mesmo nas coisas que pareciam impossíveis. Muito obrigada, Chico!

Ao professor Manoel Andrade Neto, pela coleta de material botânico, por ser esse apaixonado pelas plantas, que jamais se nega a mergulhar mata adentro e coletar para os amigos o que a flora nos oferece. Muitos lhe são gratos, tenho certeza.

Ao amigo Daniel Esdras Andrade, por ter me agüentado durante todos esses anos com a pergunta: Daniel, os espectros estão prontos? A sua paciência só não conseguiu ser maior que o seu empenho em conseguir sempre os melhores espectros de ressonância.

À professora Mary Anne Souza Lima, pela atenção e cuidado com que recebia aqueles pacotinhos minúsculos com microgramas de material para fazer espectros de massas, e por seu empenho em obtê-los.

Ao professor Mohamed Jaffar da Universidade de Manchester-School of Pharmacy-Londres, pelos testes de atividade anticancerígena dos derivados do lapachol.

À professora Gilvandete Santiago, pelos testes realizados com as larvas do *Aedes aegypti*.

À aluna Taciana Alves Segundo, pela dedicação e imensa ajuda em laboratório.

À funcionária Tereza (Tetê) pelos espectros de infravermelho, e por fazer milagres para conseguir obtê-los, pois sempre fui pão-dura com amostras enviadas para fazer I.V.

Às funcionárias Laurilane, Margarida e Raimunda (Mundinha), que sempre se empenharam para nos oferecer no laboratório o material necessário para que fizéssemos nosso trabalho, e por terem muitas vezes ouvido desaforos de uma aluna cheia de pedidos de última hora.

Aos professores que durante todo esse tempo contribuíram com minha formação acadêmica, dedicando-se a passar o máximo dos seus conhecimentos. Se mais não aprendi, foi tão somente por falta de esforço da minha parte.

Aos meus colegas de laboratório, verdadeiros heróis em me agüentar ali do lado, cheia de exaltações, humores alternados - ora alegria com um sólido lindo, ora irritação com uma coluna onde tudo descia torto. Agradeço-lhes demais por terem sempre torcido por mim, vibrado com cada substância isolada, por serem tão generosos e amigos, e pacientes ao ouvir minhas estórias de vôos.

A CAPES, PADCT e BNB pela concessão de bolsas e recursos financeiros.

RESUMO

O presente trabalho de pesquisa relata o estudo fitoquímico dos constituintes fixos presentes nas espécies *Tabebuia serratifolia* Nichols e *Tabebuia rosea* Bertol, popularmente conhecidas como ipê amarelo e ipê roxo, respectivamente. O interesse pelo gênero deveu-se principalmente ao fato de serem descritas na literatura a presença de quinonas, substâncias cujas grande atividade biológica, tais como: anticancerígena, tripanossomicida, antibiótica, antiinflamatória, moluscicida, antiviral, entre outras.

O extrato etanólico do lenho de *T. serratifolia* forneceu as seguintes substâncias: lapachol (28), dehidro- α -lapachona (30), olivil (88), 8-*epi*-cicoolivil (89), ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico (90), β -sitosterol(77), glicosídeo do β -sitosterol (78) e 4''-hidroxi-3''-metoxibenzoil-ajugol (91), identificado através do seu derivado hexaacetilado (91a). Através do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico do lenho e cascas do lenho de *T. rosea* obteve-se o éter metílico do ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico(92), ácido *p*-hidroxi-cinâmico (93), β -sitosterol (77), glicosídeo do β -sitosterol (78) e o ácido 3 β -6 β -19 α -trihidroxi-*urs*-12-en-28-óico (94).

Levantamento bibliográfico mostrou que as substâncias (89) e (91) são inéditas, enquanto que (88), (90), (92), (93) e (94) não haviam ainda sido isoladas no gênero.

Novos derivados aminados do lapachol(28) com as aminas piperidina, pirrolidina, morfolina e hidroxilamina foram obtidos, com substituição no carbono-2, e denominados de lapiper (96), lapirrol(97), lapimor(98). Todavia, reação com hidroxilamina produziu compostos com esqueleto semelhante a α - e β -lapachona com formação de oxima no carbono-1. As oximas foram chamadas de lapidroxi-2-1 (99) e lapidroxi-2-2 (100). Os compostos obtidos foram avaliados contra larvas de *Artemia salina*, *Aedes aegypti* e testes de atividade citotóxica em células tumorais A-549.

A determinação estrutural das substâncias foi feita com base nos dados espectroscópicos tais como I.V, RMN¹H e RMN¹³C, incluindo técnicas bidimensionais, ¹H-¹H-COSY, NOESY, ¹H-¹³C-HETCOR, COLOC, HMQC e HMBC, e espectrometria de massas.

ABSTRACT

The present research reports the isolation and chemical identification of fixed constituents of *Tabebuia serratifolia* Nichols and *Tabebuia rosea* Bertol, popularly known as ipê amarelo and ipê roxo, respectively. The interesting for the gender was due to the fact of they be described in the literature as a source of quinones, substances whose are attributed potent biological activity, such as: anticancer, tripanossomicidal, antibiotic, antiinflammatory, moluscicidal, antiviral, among others.

The ethanolic extract of the heartwood of *T. serratifolia* yield the following substances: lapachol, dehydro- α -lapachone, olivil, 8-*epi*-cicoolivil, 4-hydroxy-3-methoxy-benzoic acid, β -sitosterol, β -sitosterol glucoside and 4''-hydroxy-3''-methoxybenzoyl-ajugol, identified by its hexaacetylated derivative.

Chromatographic analysis of the bark's and heartwood's ethanolic extract of *T. rosea* yield 4-hydroxy-3-methoxy-benzoic methyl ester, *p*-hydroxy-cinnamic acid, β -sitosterol, β -sitosterol glucoside and 3 β -6 β -19 α -trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid.

Reactions of lapachol with amines morpholine, piperidine and pyrrolidine yielded new lapachol derivatives substituted at carbon-2. The reaction with hydroxylamine yielded compounds similar to α - e β -lapachone with formation of oxime at carbon-1. Biological activities of these products were evaluated against *Artemia salina* (BST) and *Aedes aegypti*, and also cytotoxicity against human tumor cell A-549.

The structural determination of all substances was based on spectrometric analysis such as I.V, RMN¹H and RMN¹³C, including bidimensional techniques, ¹H-¹H-COSY, NOESY, ¹H-¹³C-HETCOR, COLOC, HMQC and HMBC.

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
01. Espectro na região do I.V. (fase KBr)de IAE-1(28)	21
02. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500MHz) de IAE-1(28)	22
03. Espectro de RMN ¹³ C-PND (CDCl ₃ , 125 MHz) de IAE-1(28)	23
04. Espectro de RMN ¹³ C- DEPT (CDCl ₃ , 125 MHz) de IAE-1(28)	24
05. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HETCOR(¹ H- ¹³ C- ⁿ J _{CH} , n=1) (CDCl ₃ , 125 MHz) de IAE-1(28)	25
06. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-COLOC (¹ H- ¹³ C- ⁿ J _{CH} , n=2 e 3) (CDCl ₃ , 125 MHz) de IAE-1(28)	26
07. Espectro de massas de IAE-1(28)	27
08. Espectro na região do I.V. (fase KBr)de IAEC-1(30)	32
09. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de IAEC-1(30)	33
10. Espectro de RMN ¹³ C-PND (CDCl ₃ , 125 MHz) de IAEC-1(30)	34
11. Espectro de RMN ¹³ C- DEPT (CDCl ₃ , 125 MHz) de IAEC-1(30)	35
12. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HETCOR(¹ H- ¹³ C- ⁿ J _{CH} , n=1) (CDCl ₃ , 125 MHz) de IAEC-1(30)	36
13. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-COLOC (¹ H- ¹³ C- ⁿ J _{CH} , n=2 e 3) (CDCl ₃ , 125 MHz) de IAEC-1(30)	37
14. Espectro de massas de IAEC-1(30)	38
15. Espectro na região do I.V. (fase KBr)de IAEA-K1(90)	41
16. Espectro de RMN ¹ H (acetona-d ₆ , 500 MHz) de IAEA-K1(90)	42
17. Espectro de RMN ¹³ C-PND (acetona-d ₆ , 125 MHz) de IAEA-K1(90)	43
18. Espectro de RMN ¹³ C-DEPT (acetona-d ₆ , 125Mz) de IAEA-K1(90)	44
19. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-COLOC (¹ H- ¹³ C- ⁿ J _{CH} , n=2 e 3) (acetona-d ₆ , 125 MHz) de IAEA-K1(90)	45
20. Espectro de massas de IAEA-K1(90)	38
21. Espectro na região do I.V. (fase KBr)de IAEA-K3(89)	54
22. Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) de IAEA-K3(89)	55

23. Espectro de RMN ¹³ C-PND (CD ₃ OD, 125Mz) de IAEA-K3(89).....	56
24. Espectro de RMN ¹³ C-DEPT (CD ₃ OD, 125 MHz) de IAEA-K3(89).....	57
25. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HMQC(¹ H- ¹³ C- ⁿ J _{CH} , n=1) (CD ₃ OD, 125 MHz) de IAEA-K3(89).....	58
26. Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear (¹ H- ¹ H-COSY) (CD ₃ OD, 300 MHz) de IAEA-K3(89).....	59
27. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HMBC (¹ H- ¹³ C- ⁿ J _{CH} , n=2 e 3) (CD ₃ OD, 75 MHz) de IAEA-K3(89).....	60
28. Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear com acoplamento dipolar (¹ H- ¹ H-NOESY) (CD ₃ OD, 500 MHz) de IAEA-K3(89).....	61
29. Espectro de massas de IAEA-K3(89).....	62
30. Espectro de RMN ¹ H (acetona-d ₆ , 500 MHz) de IAEA-K4(88).....	68
31. Espectro de RMN ¹³ C-PND (acetona-d ₆ , 125 MHz) de IAEA-K4(88).....	69
32. Espectro de RMN ¹³ C-DEPT (acetona-d ₆ , 125 MHz) de IAEA-K4(88).....	70
33. Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear (¹ H- ¹ H-COSY) (acetona-d ₆ , 500 MHz) de IAEA-K4(88).....	71
34. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HMQC (¹ H- ¹³ C- ⁿ J _{CH} , n=1) (acetona-d ₆ , 75 MHz) de IAEA-K4(88).....	72
35. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HMBC (¹ H- ¹³ C- ⁿ J _{CH} , n=2 e 3) (acetona-d ₆ , 125 MHz) de IAEA-K4(88).....	73
36. Espectro de massas de IAEA-K4(88).....	74
37. Espectro na região do I.V. (filme) de IAEA-K4-Ac(88a).....	75
38. Espectro de RMN ¹³ C-PND (CDCl ₃ , 125 MHz) de IAEA-K4-Ac(88a).....	76
39. Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear com acoplamento dipolar (¹ H- ¹ H-NOESY) (CDCl ₃ , 300 MHz) de IAEA-K4-Ac(88a).....	77
40. Espectro de massas de IAEA-K4-Ac(88a).....	78
41. Espectro na região do I.V. (filme) de IAEE-K1-Ac(91a).....	84
42. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de IAEE-K1-Ac(91a).....	85
43. Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear (¹ H- ¹ H-COSY) (CDCl ₃ , 500 MHz) de IAEE-K1-Ac(91a).....	86
44. Espectro de RMN ¹³ C-PND (CDCl ₃ , 125 MHz) de IAEE-K1-Ac(91a).....	87
45. Espectro de RMN ¹³ C-DEPT (CDCl ₃ , 125Mz) de IAEE-K1-Ac(91a).....	88

46. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HMQC (^1H - ^{13}C - $^nJ_{\text{CH}}$, $n=1$) (CDCl_3 , 125 MHz) de IAEE-K1-Ac(91a)	89
47. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HMBC (^1H - ^{13}C - $^nJ_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3) (CDCl_3 , 125 MHz) de IAEE-K1-Ac(91a)	90
48. Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear com acoplamento dipolar (^1H - ^1H -ROESY) (CDCl_3 , 500 MHz) de IAEE-K1-Ac(91a)	91
49. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Lapiper(96)	96
50. Espectro de RMN ^{13}C -PND (CDCl_3 , 125 MHz) de Lapiper(96)	97
51. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Lapirrol(97)	98
52. Espectro de RMN ^{13}C -PND (CDCl_3 , 125 MHz) de Lapirrol(97)	99
53. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Lapimor(98)	100
54. Espectro de RMN ^{13}C -PND (CDCl_3 , 125 MHz) de Lapimor(98)	101
55. Espectro de RMN ^1H (acetona- d_6 , 500 MHz) de Lapidroxi-2-1(99)	106
56. Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear (^1H - ^1H -COSY) (acetona- d_6 , 500 MHz) de Lapidroxi-2-1(99)	107
57. Espectro de RMN ^{13}C -PND (acetona- d_6 , 125 MHz) de Lapidroxi-2-1(99)	108
58. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT (acetona- d_6 , 125 MHz) de Lapidroxi-2-1(99)	109
59. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HMQC (^1H - ^{13}C - $^nJ_{\text{CH}}$, $n=1$) (acetona- d_6 , 125 MHz) de Lapidroxi-2-1(99)	110
60. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HMBC (^1H - ^{13}C - $^nJ_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3) (acetona- d_6 , 125 MHz) de Lapidroxi-2-1(99)	111
61. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Lapidroxi-2-2(100)	112
62. Espectro de RMN ^{13}C -PND (CDCl_3 , 125 MHz) de Lapidroxi-2-2(100)	113
63. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT (CDCl_3 , 125 MHz) de Lapidroxi-2-2(100)	114
64. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HMQC (^1H - ^{13}C - $^nJ_{\text{CH}}$, $n=1$) (CDCl_3 , 125 MHz) de Lapidroxi-2-2(100)	115
65. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HMBC (^1H - ^{13}C - $^nJ_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3) (CDCl_3 , 125 MHz) de Lapidroxi-2-2(100)	116
66. Espectro na região do I.V. (fase KBr) de ILEC-1(92)	119
67. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de ILEC-1(92)	120
68. Espectro de RMN ^{13}C -PND (CDCl_3 , 50 MHz) de ILEC-1(92)	121
69. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT (CDCl_3 , 50 MHz) de ILEC-1(92)	122

70. Espectro de massas de ILEC-1(92)	123
71. Espectro na região do I.V. (fase KBr) de ILEA-1(93)	126
72. Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 200 MHz) de ILEA-1(93)	127
73. Espectro de RMN ¹³ C-PND (CD ₃ OD, 50 MHz) de ILEA-1(93)	128
74. Espectro na região do I.V. (fase KBr) de ILEA-4(94)	133
75. Espectro de RMN ¹³ C-PND (CD ₃ OD, 125 MHz) de ILEA-4(94)	134
76. Espectro de RMN ¹³ C-DEPT (CD ₃ OD, 125 MHz) de ILEA-4(94)	135
77. Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) de ILEA-4(94)	136
78. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-COLOC (¹ H- ¹³ C- ⁿ J _{CH} , n=2 e 3) (CD ₃ OD, 125 MHz) de ILEA-4(94)	137
79. Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear (¹ H- ¹ H-COSY) (CD ₃ OD, 500 MHz) de ILEA-4(94)	138
80. Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HETCOR(¹ H- ¹³ C- ⁿ J _{CH} , n=1) (CD ₃ OD, 125 MHz) de ILEA-4(94)	139

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
01. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de IAE-1 (28) em CDCl ₃	19
02. Dados de RMN ¹³ C de IAE-1(28) e comparação com os citados na literatura para o lapachol(28) em CDCl ₃	20
03. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de IAEC-1(30) em CDCl ₃	30
04. Dados de RMN ¹³ C de IAEC-1(30) e comparação com os citados na literatura para dehidro- α -lapachona e β -lapachona(21) em CDCl ₃	31
05. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de IAEA-K1 e comparação com dados da literatura para o ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico(90)em CDCl ₃	40
06. Dados de RMN ¹³ C e ¹ H de IAEA-K3(89) emCD ₃ OD.....	51
07.Dados de RMN ¹³ c e ¹ H de IAEA-K3-Ac(89a) em C ₆ D ₆	52
08.Comparação entre os dados de RMN ¹³ C de IAEA-K3 (89) e cicoolivil(57) registrados na literatura , em CD ₃ OD.....	53
09. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de IAEA-K4 (88) em acetona-d ₆	66
10. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de IAEA-K4(88) em (CD ₃) ₂ CO e CD ₃ OD ⁵ , lariciresinol (101) e 88a em CDCl ₃	67
11. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de IAEE-K1-Ac (91a) em CDCl ₃	82
12. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de IAEE-K1-Ac(91a) em CDCl ₃ e (102) em d ₅ - piridina.83	83
13. Dados de RMN ¹³ C de IAEC-2 (77)e IAEA-K2(78) comparados com valores da literatura citados para o β -sitosterol e seu glicosídeo acetilado(78a).....	93
14. Correlação dos dados de RMN ¹³ C do Lapachol(28), Lapiper(96), Lapidroxi(97) e Lapimor(98).....	95
15. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de Lapidroxi-2-1(99) e Lapidroxi-2-2(100) em CDCl ₃ ... 105	105
16. Correlação dos dados de RMN ¹³ C de Lapachol(28), Lapidroxi-2-1(99) e Lapidroxi-2-2(100).....	104
17. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de ILEC-1(92) em CDCl ₃	118
18. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de ILEA-1(93)	125

19. Correlação dos dados espectroscópicos de ILEA-4(94) e comparação com valores da literatura para o ácido 3 β ,6 β ,19 α -trihidroxi-urs-12-en-28-óico(94) e o ácido 3 β -6 α -19 α -trihidroxi-urs-12-eno-28-óico (106).....	132
20. Valores de DL ₅₀ (ppm) apresentados pelos compostos 28, 96, 97 e 98 frente às larvas de <i>Artemia salina</i>	169
21. Valores de DL ₅₀ (ppm) apresentados pelos compostos 28, 96, 97 e 98 frente às larvas de <i>Aedes aegypti</i>	170
22. Dados de Citotoxicidade Aeróbica e Hipóxica dos compostos 28, 96, 97 e 98 em Células Tumorais Humanas (Tumor de mama A549).....	171

LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
01. Substâncias isoladas de <i>Tabebuia serratifolia</i>	03
02. Substâncias isoladas de <i>Tabebuia rosea</i>	04
03. Derivados preparados a partir do lapachol (28).....	05
04. Lista das substâncias presentes no gênero <i>Tabebuia</i> registradas na literatura.....	07
05. Estruturas das substâncias presentes no gênero <i>Tabebuia</i> registradas na literatura..	11
06. Interações dipolares entre ^1H , ^1H para IAEA-K3(89), observadas no espectro NOESY.....	50

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma	Página
01. Isolamento dos constituintes químicos de <i>Tabebuia serratifolia</i>	172
02. Isolamento dos constituintes químicos de <i>Tabebuia rosea</i>	173

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia em camada delgada de sílica gel
I.V.	Infravermelho
E.M.	Espectrometria de massas
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio-1
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
PND	Proton Noise Decoupled
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
COSY	Correlated Spectroscopy
HETCOR	Heteronuclear Correlation Spectroscopy
NOESY	Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Band Correlation

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A família Bignoniaceae é constituída por aproximadamente 110 gêneros e 800 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, e incluem árvores madeiras e ornamentais dos gêneros *Jacaranda*, *Spathodea*, *Tabebuia*, *Catalpa* e *Crescentia*¹.

O gênero *Tabebuia* é formado por cerca de 100 espécies, a maioria arbustos e grandes árvores, que se destacam pela beleza das flores e produção de madeira de boa qualidade^{1,2}. Várias espécies desse gênero foram estudadas fitoquimicamente, mostrando como constituintes principais naftoquinonas, lignanas, iridóides, triterpenos e ácidos aromáticos (quadro 4, pag.7-10).

O interesse pelo estudo do gênero foi desencadeado pelo fato de muitas dessas substâncias apresentarem atividades farmacológicas, particularmente as quinonas, uma classe de substâncias que apresenta uma grande variedade de atividades biológicas, tais como: anticancerígena, tripanossomicida, antibiótica, antiinflamatória, moluscicida, e ainda algumas mostraram-se ativas contra o vírus HIV, entre outras^{3,4,5,6,7,8,9,10,11}. No presente trabalho são relatados o estudo fitoquímico de duas espécies de *Tabebuia* encontradas no Nordeste do Brasil: *Tabebuia serratifolia* Nichols e *Tabebuia rosea* Bertol, visando a identificação dos seus constituintes químicos e possíveis aplicações farmacológicas.

Do extrato etanólico do lenho de *T. serratifolia* foram isoladas as seguintes substâncias: lapachol (28), dehidro- α -lapachona (30), olivil (88), 8-*epi*-cicoolivil (89), ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico (90), β -sitosterol(77), glicosídeo do β -sitosterol (78) e 4''-hidroxi-3''-metoxibenzoil-ajugol (91), identificado através do seu derivado hexaacetilado (91a). As substâncias (89) e (91) são inéditas na literatura, e as substâncias (88) e (90) não haviam ainda sido isoladas no gênero (ver quadro 01, pág.03).

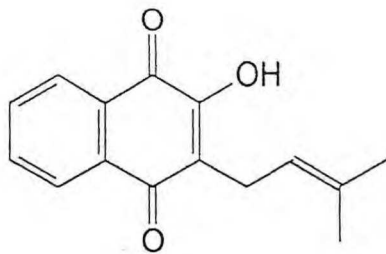
O estudo do extrato etanólico do lenho e cascas do lenho de *T. rosea* levou ao isolamento e identificação do éster metílico do ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico (92), ácido *p*-hidroxi-cinâmico (93), β -sitosterol (77), glicosídeo do β -sitosterol (78) e ácido 3 β -6 β -19 α -trihidroxi-*urs*-12-eno-28-óico (94). As substâncias (92), (93) e (94) são inéditas no gênero (ver quadro 02, pág.04).

Devido ao largo espectro de atividade apresentada pelo lapachol (28), foram preparados derivados para comparação dos dados de atividade biológica. Optou-se por reações onde fossem introduzidas aminas no C-2 do lapachol em reações baseadas em trabalho da literatura¹² com algumas quinonas, que mostraram a potencialidade de derivados aminados como agentes anticancerígenos. Os derivados obtidos usando as aminas piperidina, pirrolidina, morfolina e hidroxilamina foram denominados de lapiper (96), lapirrol(97), lapimor(98), lapidroxi-2-1 (99) e lapidroxi-2-2 (100), cujas estruturas podem ser observadas no quadro 03, pág. 05. Foram realizados com as substâncias (28), (96), (97) e (98) testes de atividade contra larvas de *Artemia salina*, *Aedes aegypti* e testes de atividade antitumoral em células A549(tumor de mama), que revelaram a potencialidade de ação dos derivados preparados.

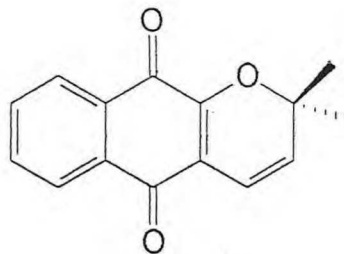
Nesse trabalho encontram-se as técnicas de isolamento, preparação dos derivados e determinação estrutural das substâncias presentes nas espécies *Tabebuia serratifolia* e *Tabebuia rosea*, sendo que o capítulo 1 trata a presente introdução.

O capítulo 2 trata das considerações botânicas das espécies estudadas e levantamento bibliográfico das substâncias isoladas no gênero *Tabebuia*. No capítulo 3 é relatada a elucidação estrutural dos constituintes químicos isolados de *Tabebuia serratifolia* e dos derivados preparados. O capítulo 4 refere-se à a elucidação estrutural dos constituintes químicos de *Tabebuia rosea*. No capítulo 5 são descritos os procedimentos experimentais para isolamento das substâncias e preparação de derivados, as técnicas utilizadas e especificações dos materiais e instrumentos. O capítulo 6 é dedicado às conclusões. O capítulo 7 refere-se às constantes físicas e dados espectrométricos das substâncias, e finalmente o capítulo 8, onde se encontram as referências bibliográficas citadas no presente trabalho.

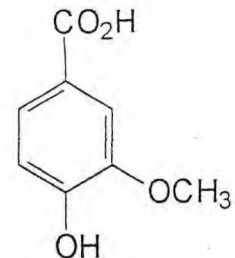
Quadro 1: Substâncias isoladas de *Tabebuia serratifolia*



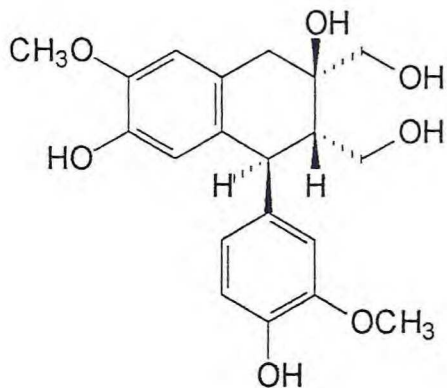
(28)



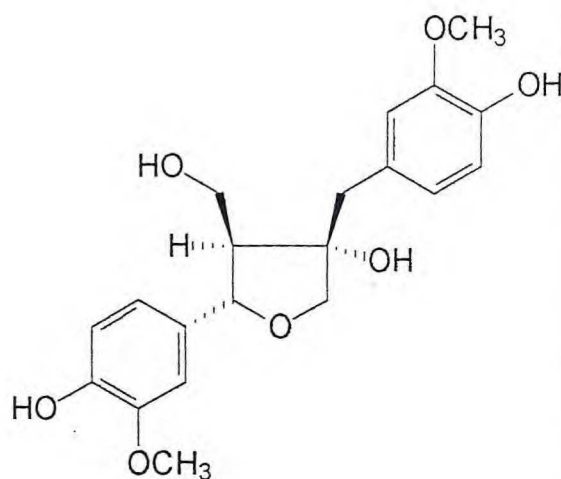
(30)



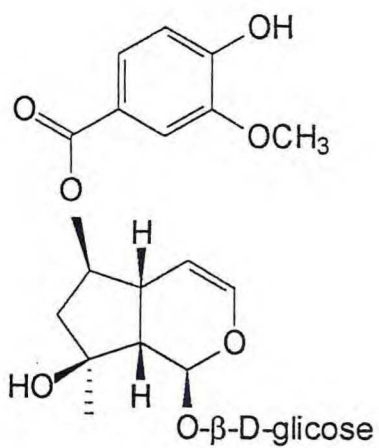
(90)



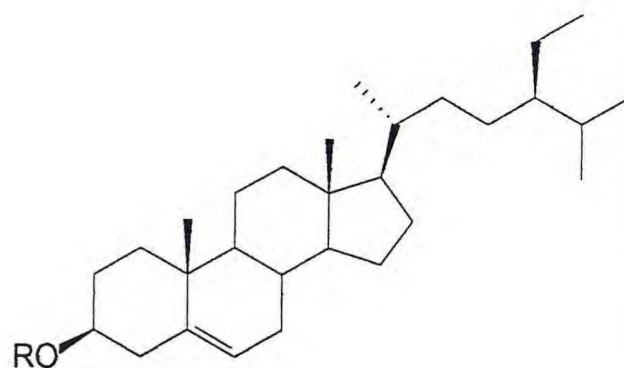
(89)



(88)



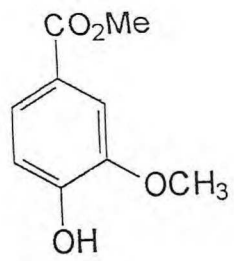
(91)



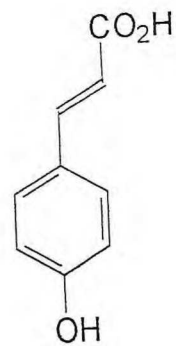
(77): R=H

(78): R=β-D-glicose

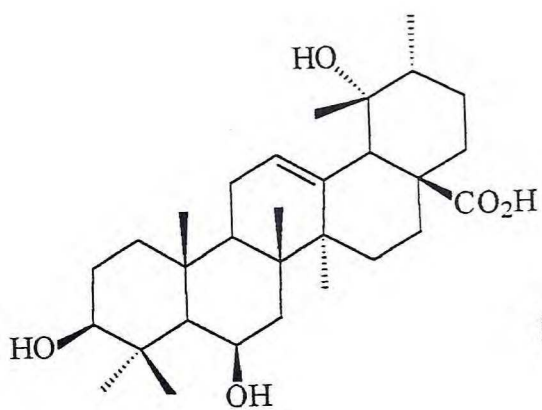
Quadro 2: Substâncias isoladas de *Tabebuia rosea*



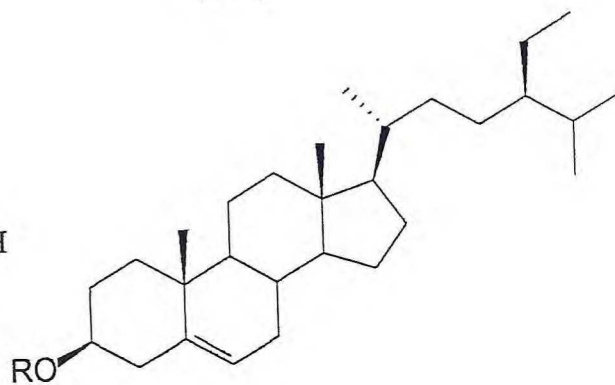
(92)



(93)



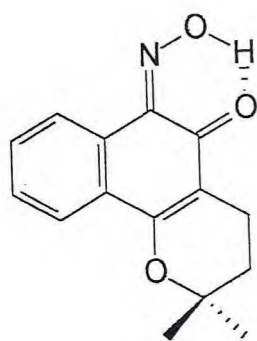
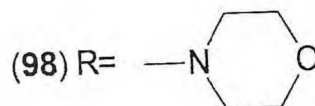
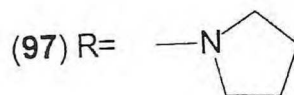
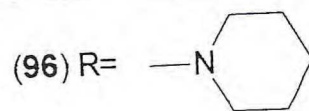
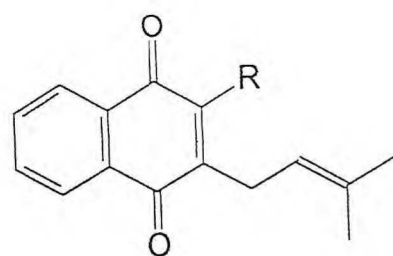
(94)



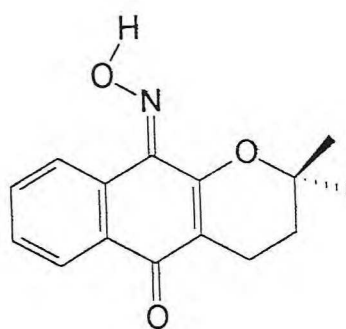
(77): R=H

(78): R= β -D-glicose

Quadro 3: Derivados preparados a partir do lapachol



(99)



(100)

CAPÍTULO 2

*CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE
AS ESPÉCIES ESTUDADAS E
LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO DO
GÊNERO *Tabebuia**

CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE AS ESPÉCIES ESTUDADAS E LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO DO GÊNERO *Tabebuia*

Tabebuia serratifolia Nichols , conhecida popularmente como ipê amarelo, é uma árvore de 8-20 m de altura, casca pardacenta; folhas opostas digitadas, glabras ou pubescentes; folíolos cinco, peciolados, oblongo-acuminados ou oboval-acuminados, 4-17 cm de comprimento, 3-7 cm de largura, serrados, peninervados; flores afunilado-campanuladas de 5-6 cm, amarelas, em panículas terminais; estames inseridos no tubo da corola, cerca de 9-10 mm da base; disco aneliforme inteiro; cápsula deiscente com até 20 cm de comprimento¹.

Tabebuia rosea Bertol, conhecida popularmente como ipê roxo, é uma árvore de 25-30 m de altura, casca escura; folhas espalmadas, folíolos cinco, anisófilos, elípticos ou oblongo-elípticos, 8-35 cm de comprimento, 3-18 cm de largura, agudos até afunilados; flores com cálice cupular, bilabiadas, de cor rosa, púrpuro-rosa, em panículas terminais; cápsula linear-cilíndrica com 22-38 cm¹.

Através de pesquisa bibliográfica realizada no Chemical Abstracts observou-se que a maioria das espécies do gênero *Tabebuia* estudadas apresentaram como constituintes predominantes as quinonas. Encontram-se também descritos na literatura outros metabólitos secundários, entre os quais lignanas, iridóides e seus glicosídeos, flavonóides, esteróides, ácidos aromáticos e triterpenos. As substâncias identificadas no gênero *Tabebuia* e as espécies de onde foram isoladas encontram-se descritas nos quadros 4, págs. 7-10, cujas estruturas podem ser observadas no quadro 5, págs. 11-16.

Quadro 04: Lista das substâncias presentes no gênero *Tabebuia* registradas na literatura

Substâncias	Estruturas	Espécies do gênero <i>Tabebuia</i>	Ref.
2-etilnafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona	01	<i>serratifolia, avellanadae</i>	4,13
2-(1'-hidroxietil)nafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona	02	<i>cassinoides, rosea, chrysantha, ochracea, avellanadae</i>	4, 14,13, 15
2-acetilnafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona	03	<i>cassinoides, caraiba, rosea, avellanadae, chrysantha</i>	4,14, 13,15
8-hidroxi-2-(1'-hidroxietil)nafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona	04	<i>avellanadae</i>	4,13, 16
5-hidroxi-2-(1'-hidroxietil)nafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona	05	<i>caraiba, incana, avellanadae</i>	4, 16, 17
2-acetil-5-hidroxinafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona	06	<i>avellanadae</i>	4
2-acetil-8-hidroxinafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona	07	<i>avellanadae</i>	4, 13
2-etil-5-hidroxinafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona	08	<i>incana</i>	4, 17
2-(1'-hidroxietil)-6-metoxinafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona	09	<i>ochracea</i>	4, 14
2-acetil-6-metoxinafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona	10	<i>ochracea</i>	4, 14
2-(1'-hidroxietil)-8-metoxinafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona	11	<i>ochracea</i>	4, 14
2-acetil-8-metoxinafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona	12	<i>ochracea</i>	4, 14
7,8-dimetoxi-2-(1'-hidroxietil)nafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona	13	<i>ochracea</i>	4, 14
5-hidroxi-2-isopropilnafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona	14	<i>caraiba</i>	4
2-isopropilnafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona	15	<i>avellanadae</i>	13
5,8-dihidroxi-2-(1'-hidroxietil)nafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona	16	<i>ochracea</i>	18
2-acetil-8-hidroxi-7-metoxinafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona	17	<i>ochracea</i>	18
2-(1'-hidroxietil)-8-hidroxi-7-metoxinafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona	18	<i>incana</i>	17
2,3-dihidro-2(1'-metiletetil)nafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona	19	<i>avellanadae, incana, rosea, serratifolia</i>	4, 19,20, 21
2,3-dihidro-5-hidroxi-2(1'-metiletetil)nafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona	20	<i>avellanadae, incana, rosea, serratifolia</i>	4, 19,20, 21
β -lapachona	21	<i>avellanadae, chrysantha, donnell-smittii, guayacan</i>	22,20, 23
Lapachenol	22	<i>avellanadae, chrysantha, donnell-smittii, incana, serratifolia</i>	22, 24, 17
Dihidrolapachenol	23	<i>chrysantha, donnell-smittii</i>	22

Continuação do Quadro 04.

Substâncias	Estruturas	Espécies	Ref.
Nor-dihidrolapachenol	24	<i>chrysantha</i>	22
Deoxi-lapachol	25	<i>avellanedae</i>	20
Menaquinona	26	<i>avellanedae</i>	20
Lapachol-metil-éter	27	<i>avellanedae</i>	20
→ Lapachol	28	<i>serratifolia, avellanedae</i>	4,13
→ α-lapachona	29	<i>avellanedae</i>	20
→ 2,3-di(3,3-dimetil-alil)-1,4-naftoquinona	30	<i>guayacan</i>	25
1-hidroxi-2-metil-antraquinona	31	<i>chrysantha</i>	22
2-hidroxi-3-metil-antraquinona	32	<i>chrysantha, avellanedae</i>	20
2-metil-antraquinona	33	<i>avellanedae</i>	20
2-hidroximetil-antraquinona	34	<i>avellanedae</i>	20
Antraquinona-2-aldeído	35	<i>avellanedae</i>	20
Antraquinona-2-ácido carboxílico	36	<i>avellanedae</i>	20
1-hidroxi-antraquinona	37	<i>avellanedae</i>	20
1-metoxi-antraquinona	38	<i>avellanedae</i>	20
Dehidrotectol	39	<i>chrysantha, rosea</i>	22,21,26,27
Tetrahidrotectol	40	<i>chrysantha, guayacan</i>	22, 23
Tetrahidrotectol-dimetil-éter	41	<i>crysantha</i>	22
Tectol	42	<i>guayacan</i>	28, 23
Tabebuina	43	<i>avellanedae</i>	20
Tecomaquinona III	44	<i>rosea</i>	29
Tecomaquinona I	45	<i>rosea</i>	29
Tecomaquinona II	46	<i>rosea</i>	29
Guaiacatina	47	<i>guayacan</i>	28
Guaiina	48	<i>guayacan</i>	30, 31
p-metoxi-benzoil-ajugol	49	<i>avellanedae</i>	32
→ 3,4-dimetoxi-benzoil-ajugol	50	<i>avellanedae</i>	32

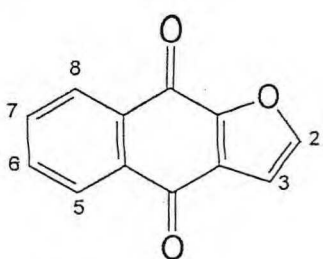
Continuação do Quadro 04.

Substâncias	Estruturas	Espécies	Ref.
<i>p</i> -hidroxi-benzoil-ajugol	51	<i>avellaneda</i>	32
Ajugol	52	<i>avellaneda</i>	32
Catalpol	53	<i>rosea</i>	33
6-O-(<i>p</i> -cumaroil)-catalpol	54	<i>rosea</i>	33, 34
Aucubina	55	<i>rosea</i>	33
6-epimonelitosídeo	56	<i>heptaphylla</i>	35
Ciclo-olivil	57	<i>ochracea, avellaneda</i>	14, 24
4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído	58	<i>avellaneda</i>	19
Ciclo-olivil-acetonídeo	59	<i>incana</i>	17
Ácido-4-hidroxi-benzóico	60	<i>avellaneda</i>	19
Ácido-4-metoxi-benzóico	61	<i>avellaneda</i>	19
Ácido-3,4,5-trimetoxi-benzóico	62	<i>avellaneda</i>	19
1-metoxi-naftaleno	63	<i>chrysantha</i>	22
Ácido-3,4-dihidroxi-cinâmico	64	<i>rosea</i>	36
Ácido-4-hidroxi-3-metoxi-cinâmico	65	<i>rosea</i>	36
Luteolina	66	<i>caraiba</i>	37, 38
6-hidroxi-luteolina-7-O-glicosídeo	67	<i>caraiba</i>	37, 39
Escuteralareina	68	<i>caraiba</i>	37
Campferol	69	<i>rosea</i>	34
Campferol-3-O-diglicosídeo	70	<i>caraiba, rosea</i>	34, 38
Quercetina	71	<i>caraiba, rosea</i>	37, 34, 38
Quercetina-3- β -D-rutinosídeo	72	<i>caraiba</i>	37, 38, 39
Lupenona	73	<i>Rosea</i>	40, 41, 34
α -amirina	74	<i>caraiba, rosea</i>	37, 34
Betulina	75	<i>rosea</i>	34
Ácido betulínico	76	<i>rosea</i>	34

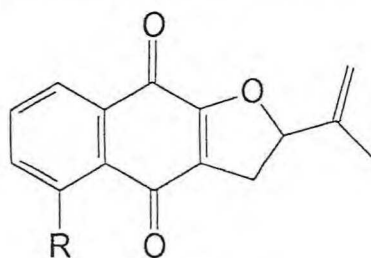
Continuação do Quadro 04.

Substâncias	Estruturas	Espécies	Ref.
β-sitosterol	77	<i>pentaphylla</i>	42
Glicosídeo do β-sitosterol	78	<i>pentaphylla</i>	42
Capsantina	79	<i>caraiba</i>	38
β-caroteno	80	<i>caraiba</i>	38
β,β-caroteno-3,3'-diol	81	<i>caraiba</i>	38
Licopeno	82	<i>caraiba</i>	38
Hexacosano	83	<i>rosea</i>	41
Heptacosano	84	<i>rosea</i>	27
Nonacosano	85	<i>rosea</i>	27, 42
Hentriacontano	86	<i>rosea</i>	42
Hentriacontanol	87	<i>rosea</i>	42

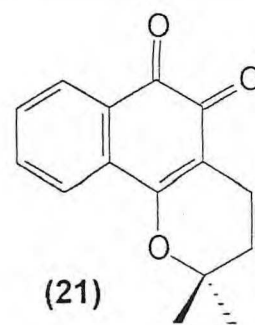
Quadro 5: Substâncias isoladas no gênero *Tabebuia* registradas na literatura



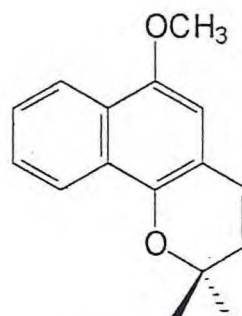
- (01) 2-CH₂CH₃
 (02) 2-CH(OH)CH₃
 (03) 2-COCH₃
 (04) 2-CH(OH)CH₃-8-OH
 (05) 2-CH(OH)CH₃-5-OH
 (06) 2-COCH₃-5-OH
 (07) 2-COCH₃-8-OH
 (08) 2-CH₂CH₃-5-OH
 (09) 2-CH(OH)CH₃-6-OCH₃
 (10) 2-COCH₃-6-OCH₃
 (11) 2-CH(OH)CH₃-8-OCH₃
 (12) 2-COCH₃-8-OCH₃
 (13) 2-CH(OH)CH₃-7,8-di-OCH₃
 (14) 2-C(CH₂)CH₃-5-OH
 (15) 2-CH(CH₃)₂
 (16) 2-CH(OH)CH₃-5,8-di-OH
 (17) 2-COCH₃-8-OH-7-OCH₃
 (18) 2-CH(OH)CH₃-7-OCH₃-8-OH



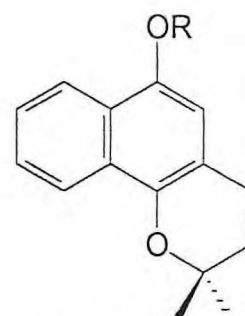
- (19) R=H
 (20) R=OH



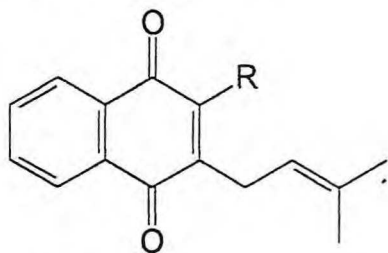
(21)



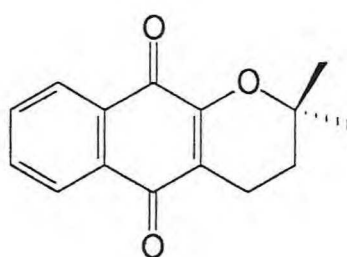
(22)



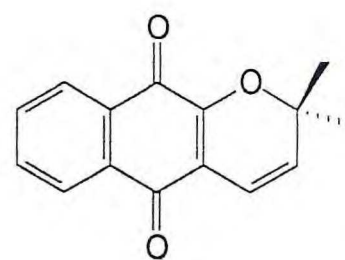
- (23) R=CH₃
 (24) R=H



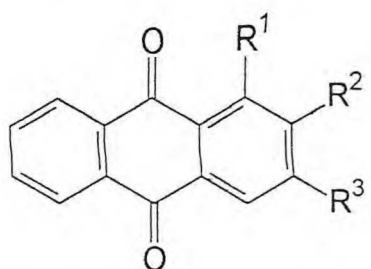
- (25) R=H
 (26) R=CH₃
 (27) R=OCH₃
 (28) R=OH



(29)



(30)



(31) R¹=OH; R²=CH₃; R³=H

(32) R¹=H; R²=OH; R³=CH₃

(33) R¹=R³=H; R²=CH₃

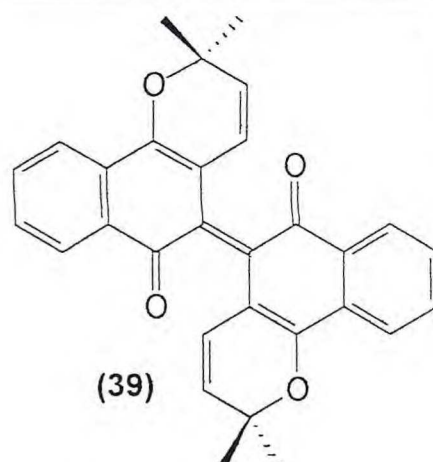
(34) R¹=R³=H; R²=CH₂OH

(35) R¹=R³=H; R²=CHO

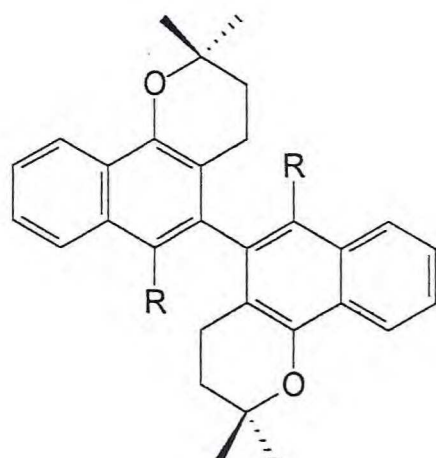
(36) R¹=R³=H; R²=CO₂H

(37) R¹=OH; R²=R³=H

(38) R¹=OCH₃; R²=R³=H

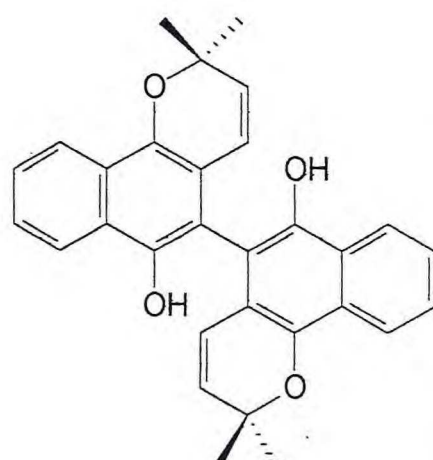


(39)

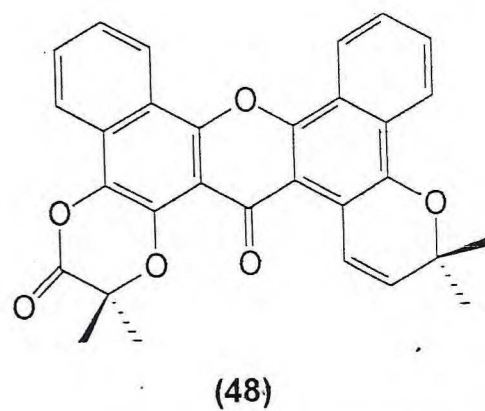
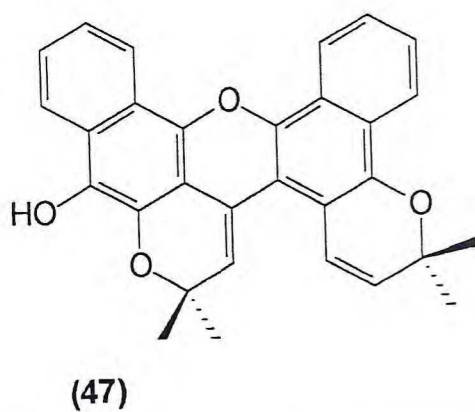
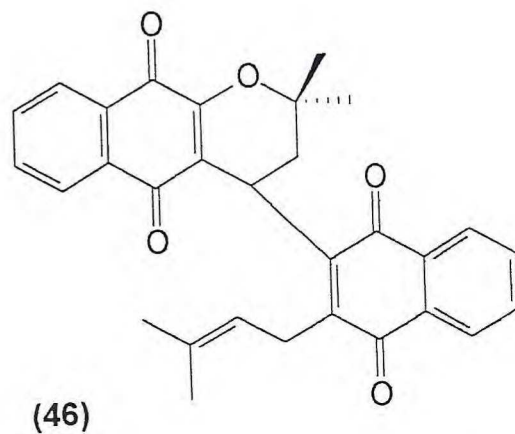
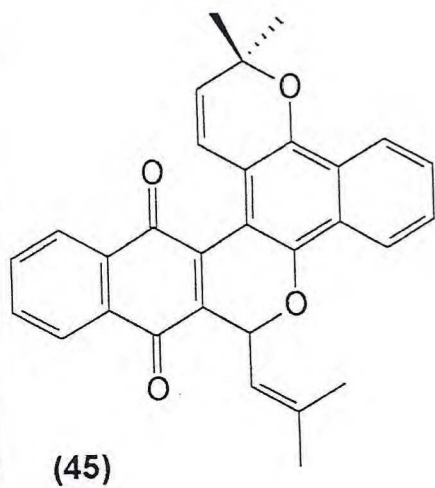
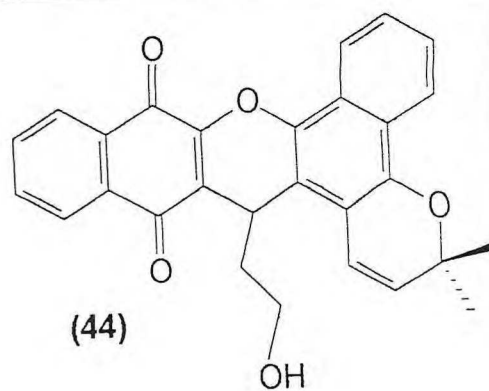
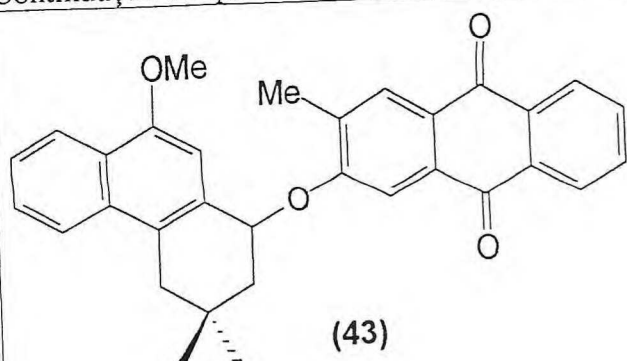


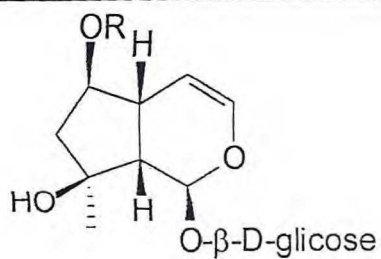
(40) R=OH

(41) R=OCH₃



(42)



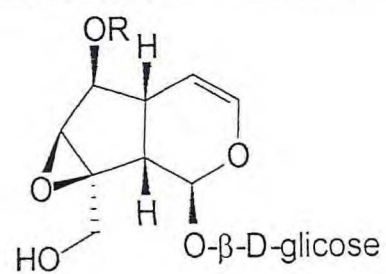


(49) R=*p*-metoxi-benzoil

(50) R=3,4-dimetoxi-benzoil

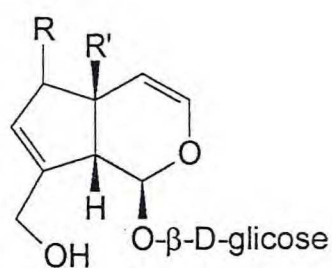
(51) R=*p*-hidroxibenzoil

(52) R=H



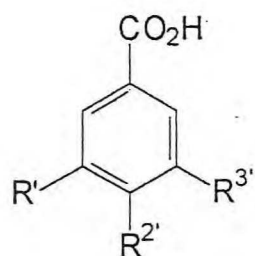
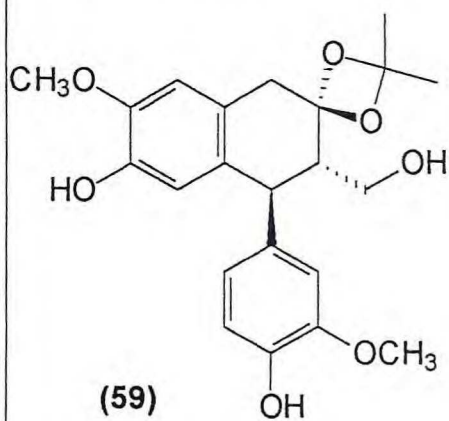
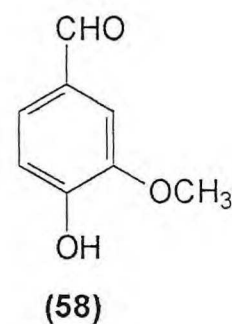
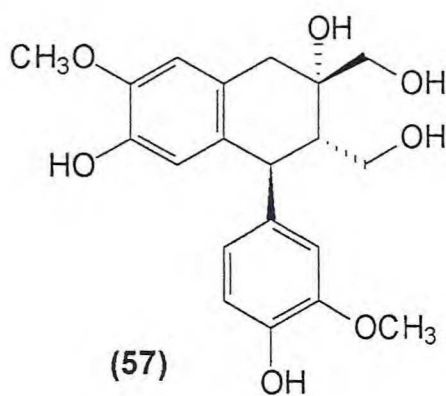
(53) R=H

(54) R=*p*-hidroxicumaroil



(55) R= β -OH; R'=H

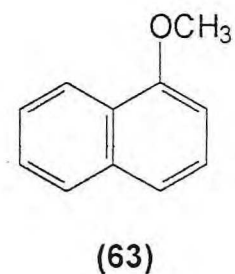
(56) R= α -OH; R'=OH

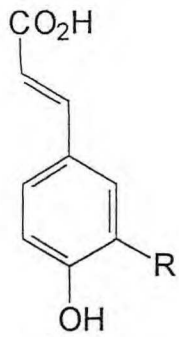


(60) R'=R^{3'}=H; R^{2'}=OH

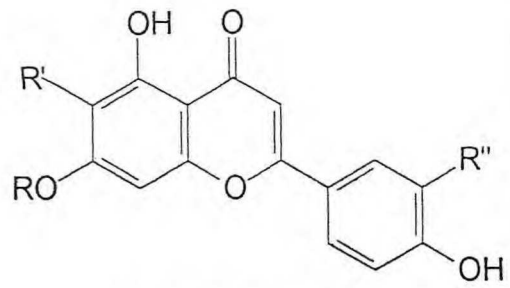
(61) R'=R^{3'}=H; R^{2'}=OCH₃

(62) R'=R^{2'}=R^{3'}=OCH₃

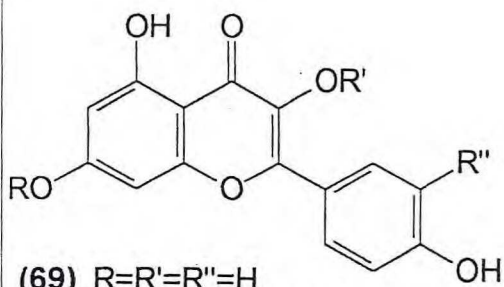




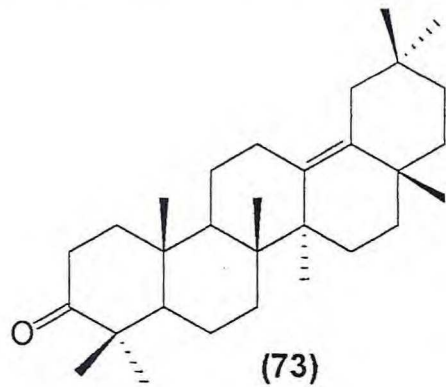
- (64) R=OH
(65) R=OCH₃



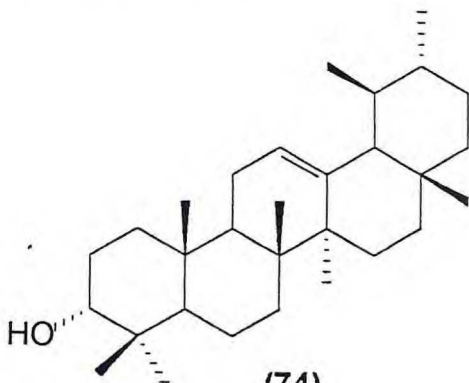
- (66) R=R'=H; R''=OH
(67) R=β-D-Glucose; R'=R''=OH
(68) R=R''=H; R'=OH



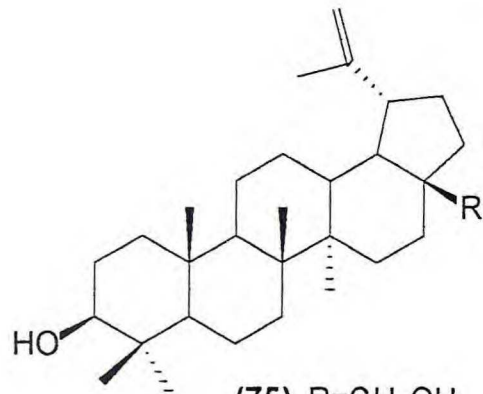
- (69) R=R'=R''=H
(70) R'=β-D-diglicosídeo
(71) R=R'=H; R''=OH
(72) R=R''=H; R'=β-D-Rutinose



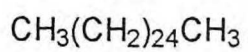
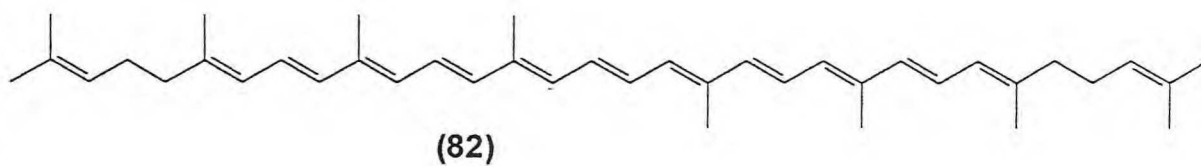
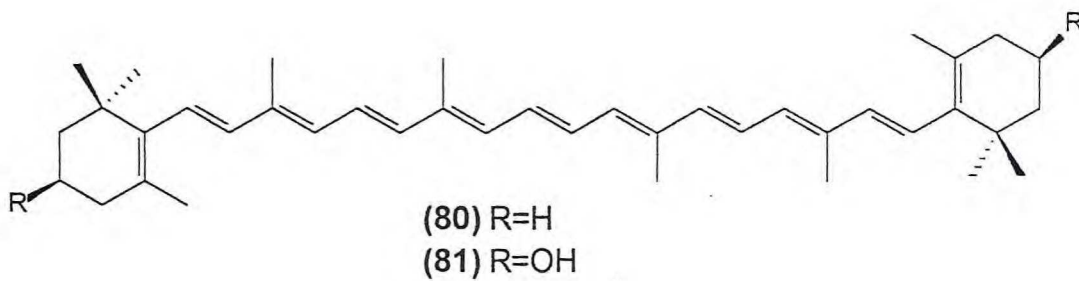
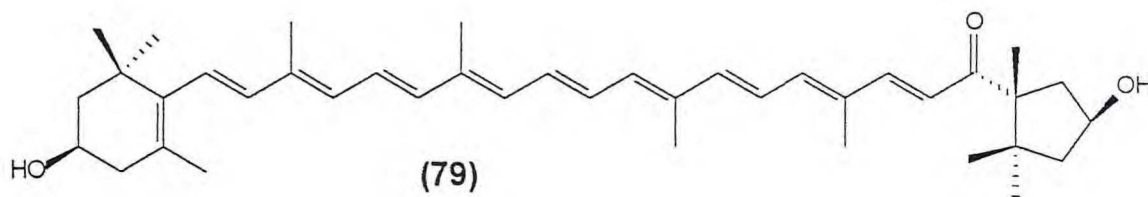
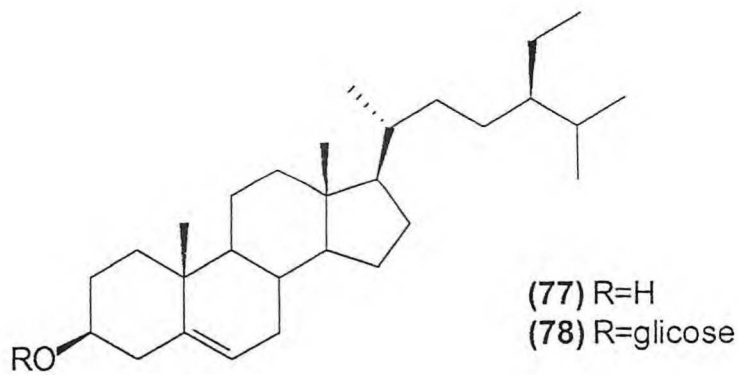
(73)



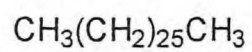
(74)



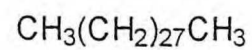
- (75) R=CH₂OH
(76) R=CO₂H



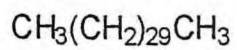
(83)



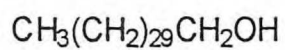
(84)



(85)



(86)



(87)

CAPÍTULO 3

*DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS
CONSTITUENTES FIXOS ISOLADOS DO
EXTRATO ETANÓLICO DO LENHO DE
Tabebuia serratifolia*

DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES FIXOS ISOLADOS DO EXTRATO ETANÓLICO DO CERNE DE *Tabebuia serratifolia*.

Através do estudo fitoquímico do extrato etanólico do cerne de *Tabebuia serratifolia* foram isoladas as seguintes substâncias: IAE-1[lapachol], IAH-1[dehidro- α -lapachona], IAEC-2 [β -sitosterol], IAEA-K1[ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico], IAEA-K2[glicosídeo do β -sitosterol], IAEA-K3[8-*epi*-cicoolivil], IAEA-K4[olivil] e IAEE-K1[4-hidroxi-3-metoxi-benzoil-ajugol] cuja estrutura foi determinada através de seu derivado hexa-acetilado IAEE-K1-Ac. Foram ainda preparados os derivados acetilados IAEA-K3-Ac(tetra-acetilado) e IAEA-K4-Ac(triacetilado). O lapachol foi utilizado numa série de reações com aminas, resultando na obtenção dos seguintes derivados: lapiper, lapirrol, lapimor, lapidroxi-2-1 e lapidroxi-2-2. A caracterização das substâncias foi feita com base nos dados espectroscópicos.

3.1. Determinação Estrutural de IAE-1 (28)

A substância denominada IAE-1 apresentou-se como um sólido amarelo, solúvel em clorofórmio de ponto de fusão 139-140°C. Observou-se no espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 1, pág.21) bandas em 3353 cm^{-1} ($\nu_{\text{O-H}}$), 1657 e 1641 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$ de 1,4-naftoquinonas) e 1592 ($\nu_{\text{C=C}}$).

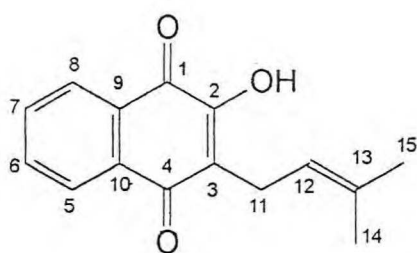
O espectro de RMN¹H (Fig.2, pág.22) apresentou sinais para quatro hidrogênios aromáticos com valores de deslocamento químico compatíveis com um sistema 1,4-naftoquinônico em δ 8.07, 8.02, 7.70 e 7.62. Foram ainda observados sinais para hidrogênio olefínico em δ 5.17, metilênico em δ 3.28, duas metilas em δ 1.75 e 1.64, e uma hidroxila com o sinal de hidrogênio em δ 7.36.

Através dos espectros de RMN¹³C-PND(Fig.3, pág.23) e DEPT-135 (Fig.4,pág.24) foram identificados os carbonos metínicos, metilênicos, metílicos e não-hidrogenados, sendo os sinais em δ 184.54 e 181.71 característicos de carbonila conjugadas em 1,4-naftoquinonas. A correlação dos átomos de hidrogênio aos carbonos foi feita através do espectro bidimensional de correlação heteronuclear (¹H x ¹³C-COSY-¹J_{CH} ; Fig. 5, pág.25) e para atribuir inequivocamente os deslocamentos químicos,

principalmente dos carbonos não-hidrogenados, fez-se o espectro bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY- $^nJ_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3 ; Fig. 6, pág.26).

O espectro de massas (Fig. 7, pág.27) apresentou o pico correspondente ao íon molecular (M^+) em m/z 242 daltons, referente à fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$ do lapachol(28).

A análise dos dados espectroscópicos (Tab.1, pág.19) e comparação com valores da literatura^{43,44} (Tabela 2, pág.20) possibilitou confirmar que IAE-1 é a substância conhecida como lapachol(28), uma naftoquinona largamente distribuída no gênero *Tabebuia*, e cuja vasta atividade biológica incentivou a síntese de derivados.



(28)

Tabela 1: Dados de RMN¹H e ¹³C de IAE-1 (28) em CDCl₃

	¹ H x ¹³ C-COSY- ¹ J		¹ H x ¹³ C-COSY- ⁿ J	
	δ _C	δ _H , J(Hz)	² J _{CH}	³ J _{CH}
<u>C</u>				
1	179.85	-		H-5
2	152.75	-		H-11
3	123.53	-	H-11	
4	184.54	-		H-5, H-11
9	129.48	-		H-5, H-7
10	132.94	-		H-6
13	133.80	-	H-14, H-15	H-11
<u>CH</u>				
5	126.78	8.07(dd, J=7.5 e 1.1)		H-7
6	134.83	7.70(dt, J=7.5 e 1.4)		H-8
7	132.85	7.62(dt, J=7.5 e 1.4)		
8	126.05	8.02(dd, J=7.5 e 1.1)		H-6
12	119.71	5.17(m)	H-11	H-14, H-15
<u>CH₂</u>				
11	22.64	3.27(d, J=4.4)		
<u>CH₃</u>				
14	17.90	1.75(s)		H-12, H-15
15	25.76	1.64(s)		H-12, H-14

Tabela 2: Dados de RMN¹³C de IAE-1(28) e comparação com os citados na literatura^{43,44} para o lapachol(28) em CDCl₃.

<u>C</u>	$\delta_C(28)$	$\delta_C(28)^{43}$	$\delta_C(28)^{44}$
1	179.85	181.61	181.5
2	152.75	152.67	152.7
3	123.53	123.41	123.5
4	184.54	184.50	184.4
9	129.48	129.37	129.3
10	132.94	132.80	133.8
13	133.80	133.73	138.7
<u>CH</u>			
5	126.78	126.68	126.1
6	134.83	134.75	134.8
7	132.85	132.77	132.7
8	126.05	125.97	126.7
12	119.71	119.61	114.6
<u>CH₂</u>			
11	22.64	22.55	25.0
<u>CH₃</u>			
14	17.90	17.83	17.9
15	25.76	25.69	22.6

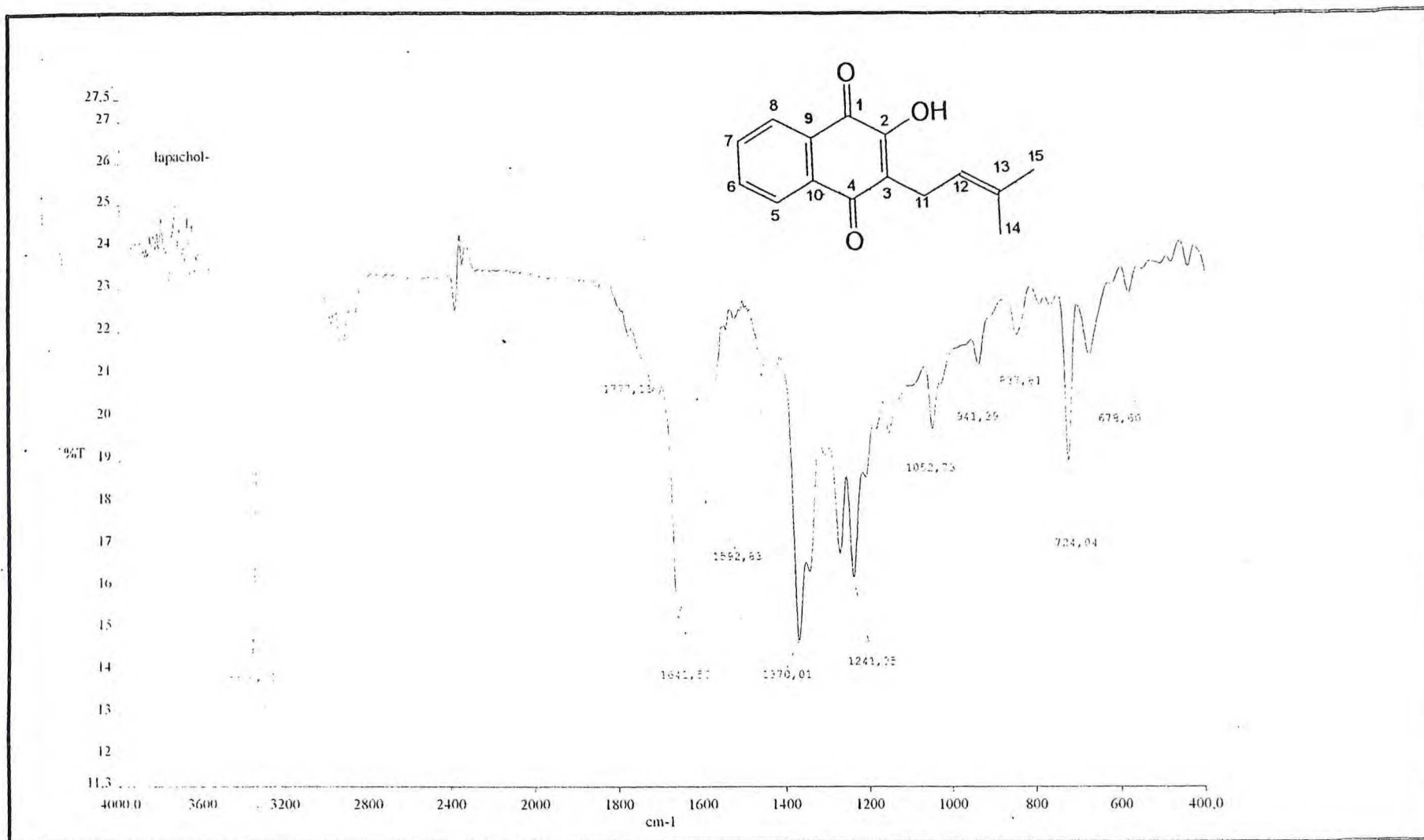


Figura 1. Espectro na região do I.V. (fase KBr) de IAE-1(28)

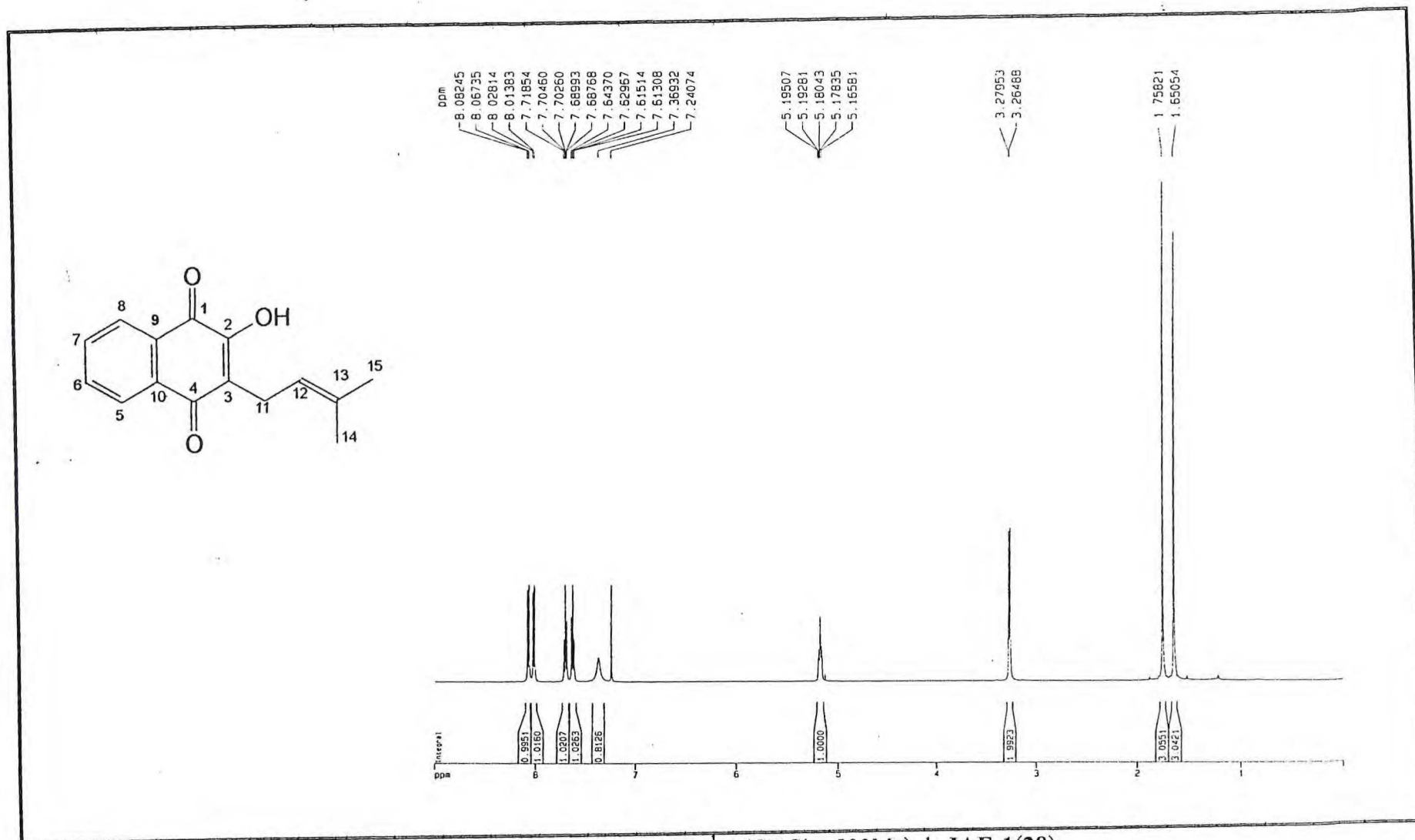


Figura 2: Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 500Mz) de IAE-1(28)

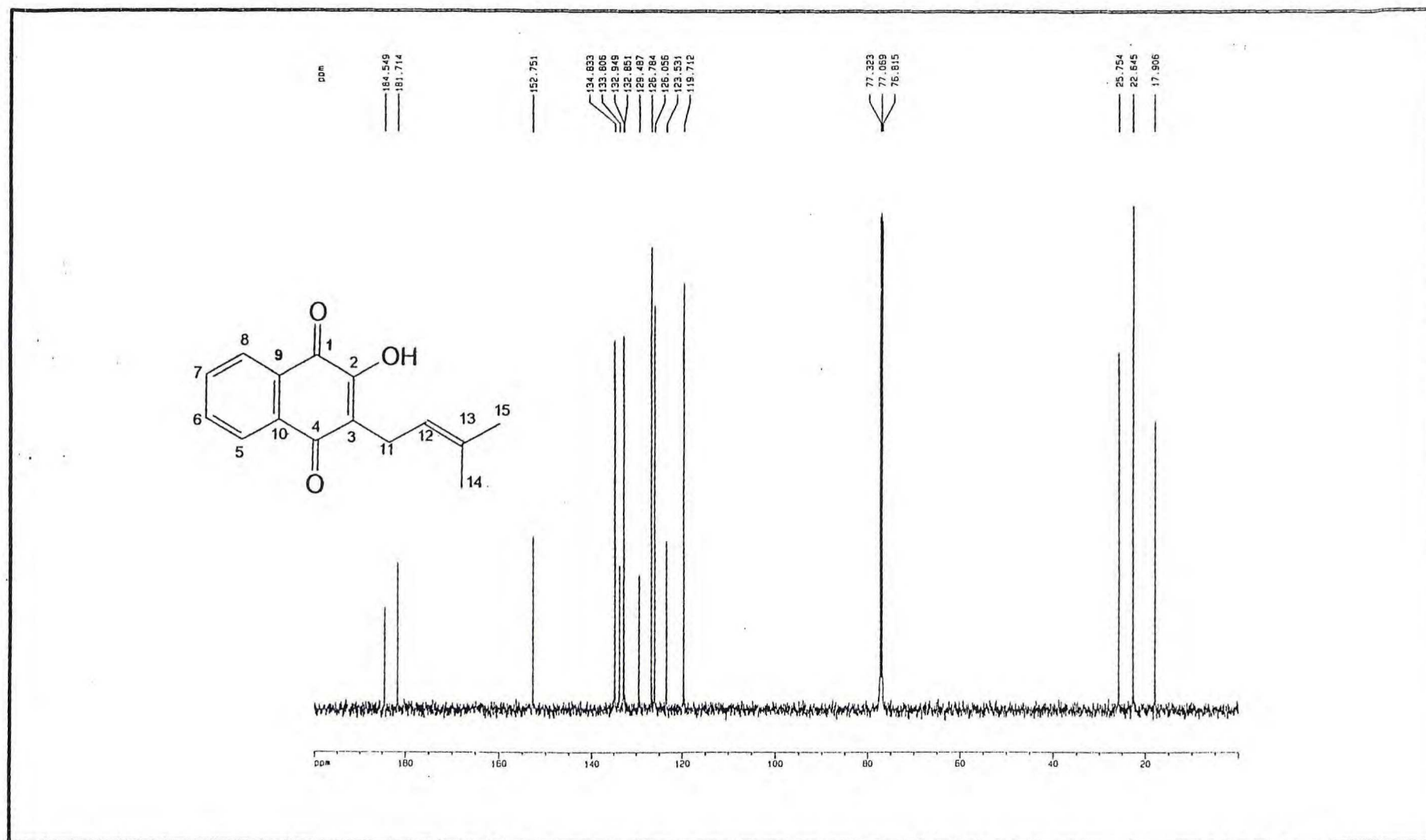


Figura 3: Espectro de RMN ^{13}C -PND (CDCl_3 , 125Mz) de IAE-1(28)

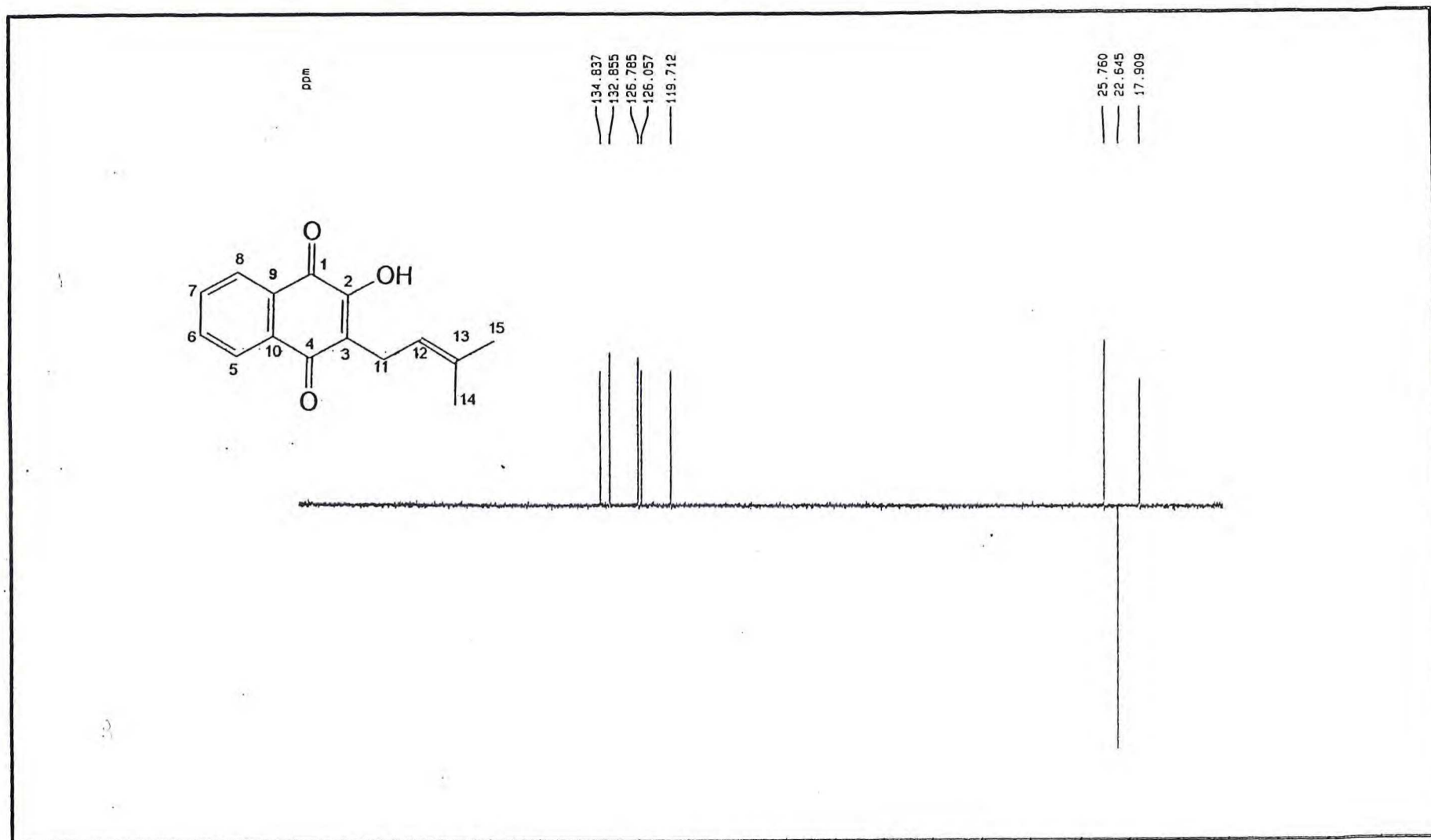


Figura 4: Espectro de RMN ^{13}C - DEPT (CDCl_3 , 125Mz) de IAE-1(28)

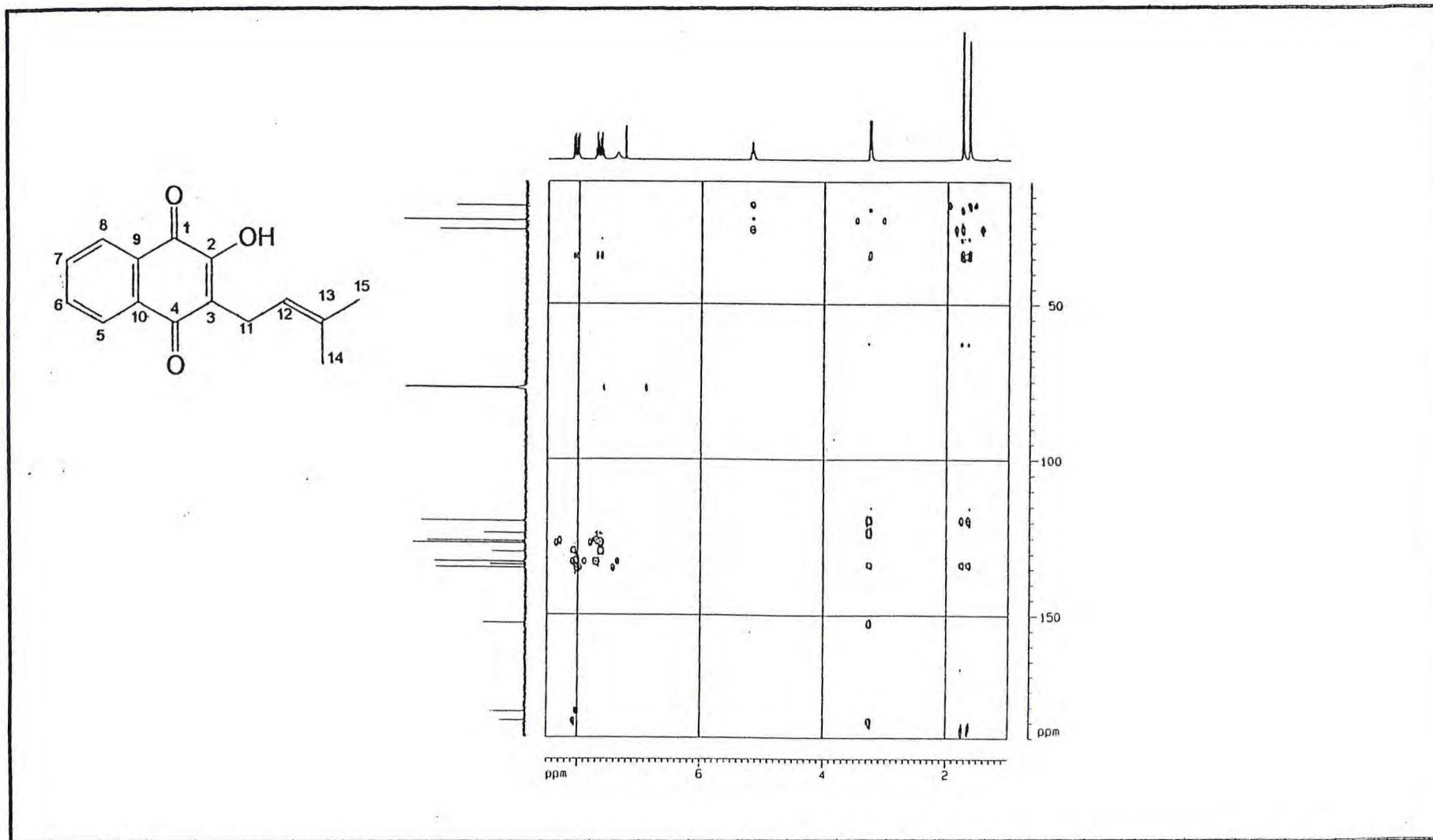


Figura 6: Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-COLOC (^1H - ^{13}C - $^{n}\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3) (CDCl_3 , 125Mz) de IAE-1(28)

File:OUT023 Ident:616 Acq:22-OCT-1998 08:52:46 +1:04:24 Cal:OUT023
AutoSpec EI+ Magnet BpI:8164234 TIC:29178412 Flags:HALL

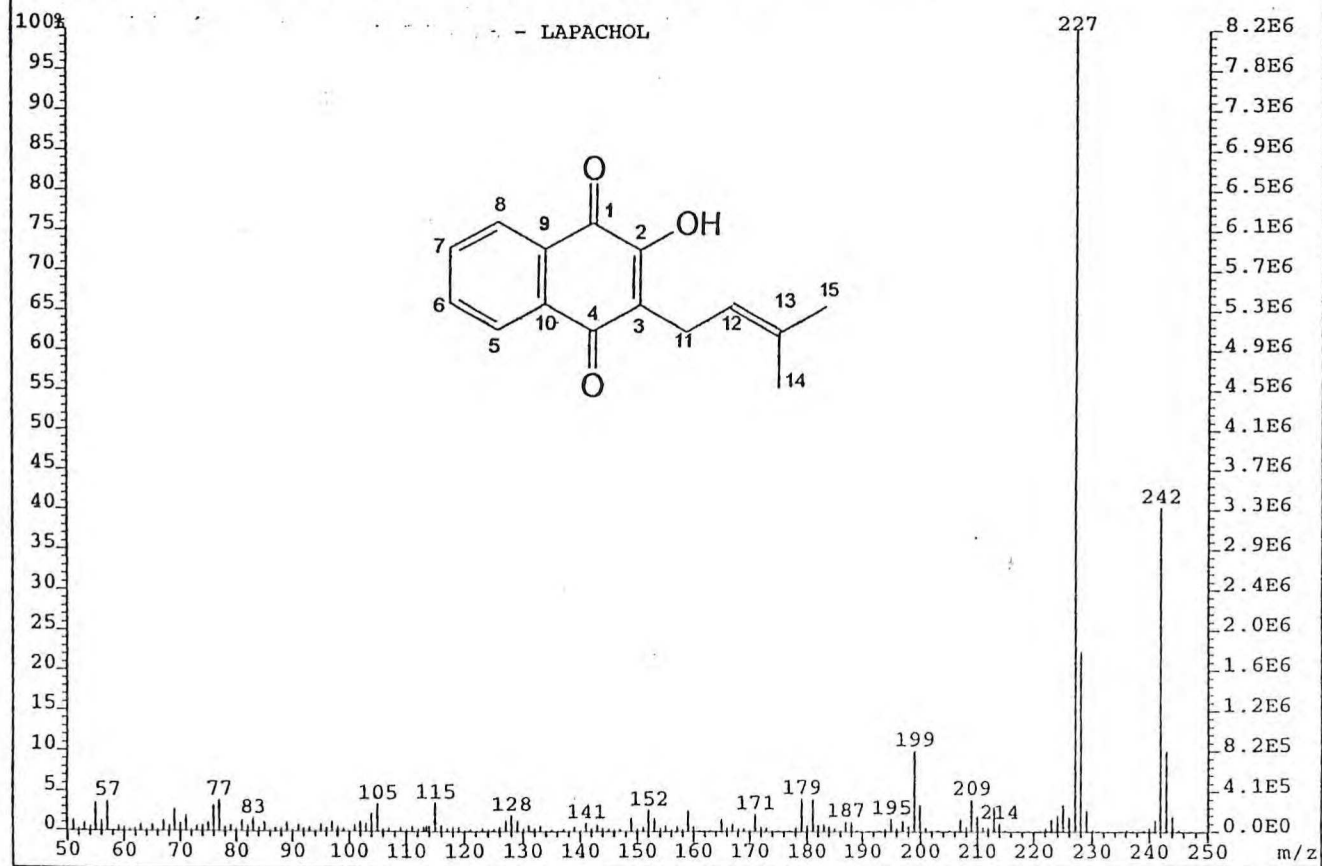


Figura 7: Espectro de massas de IAE-1(28)

3.2. Determinação Estrutural de IAEC-1(30)

A substância denominada IAEC-1 apresentou-se como um sólido cristalino laranja, solúvel em clorofórmio e com ponto de fusão 141-143 °C. O espectro na região de infravermelho (Fig. 8, pág.32) mostrou bandas em 1645 cm⁻¹ (ν_{C=O}), 1579 (ν_{C=C}), 1334 e 1134 cm⁻¹.

O espectro de RMN¹H (Fig. 9, pág.33) apresentou sinais relativos a hidrogênios aromáticos 1,2-dissubstituídos em δ 8.06 (dd, *J*=7.4 e 2.0), 8.04 (dd, *J*=7.4 e 2.0), 7.68 (dt, *J*=7.4 e 2.0) e 7.64 (dt, *J*=7.4 e 2.0). Sinais correspondentes a dois hidrogênios olefinicos *cis* foram observados em δ 6.62 (d, *J*=10.2) e 5.69 (d, *J*=10.2); um singlete (δ 1.52) com área de integração mostrando seis hidrogênios foi correlacionado a duas metilas ligadas a carbono quaternário.

Os espectros de RMN¹³C-PND (Fig. 10, pág.34) e DEPT-135 (Fig.11, pág.35) indicaram a presença de duas carbonilas em δ 179.85 e 181.86, posteriormente correlacionadas a carbonilas de naftoquinonas da série-1,4, um carbono não-hidrogenado oxigenado (δ 80.45), dois carbonos olefinicos (δ 130.89 e 115.51), além dos sinais referentes aos carbonos aromáticos e metílicos (Tab. 3, pág.30). A correlação entre os sinais de hidrogênio e carbono foi feita através do espectro de correlação heteronuclear-HETCOR (Fig.12, pág.36). A análise desses dados, incluindo os observados no espectro de correlação heteronuclear a longa distância-COLOC (Fig.13, pág.37), e comparação com valores da literatura^{43,44} levou à dedução de que IAEC-1 tratava-se da substância dehidro-α-lapachona (30), uma naftoquinona largamente distribuída no gênero *Tabebuia*. O espectro de massas (Fig.14, pág.38) apresentou o pico correspondente ao íon molecular (M⁺) em *m/z* 240 daltons, compatível com a fórmula molecular C₁₅H₁₂O₃ da dehidro-α-lapachona (30).

Na Tabela 4, pág.31, encontram-se os deslocamentos químicos dos carbonos de IAEC-1, os valores descritos na literatura para a dehidro-α-lapachona(30)^{43,44}, e ainda os valores descritos para a β-lapachona (21)⁴⁴, que mostram a diferença de deslocamento químico do carbono-sp² oxigenado do anel pirânico entre as naftoquinonas da série-1,2 (C-4) e série-1,4(C-2). Foi observado que esse carbono sofre um efeito de desproteção maior na série-1,2. Alguns autores especulam que esse fato

poderia ser explicado pela maior contribuição da forma IV na série-1,2 do que a contribuição da forma II na série-1,4 para o híbrido de ressonância⁴⁴.

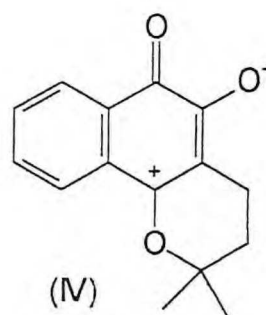
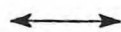
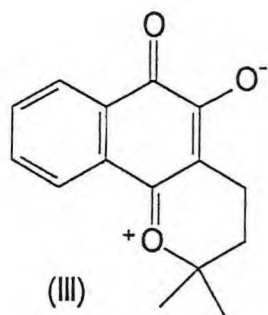
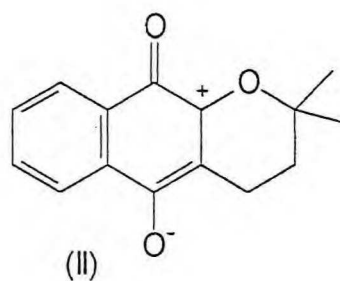
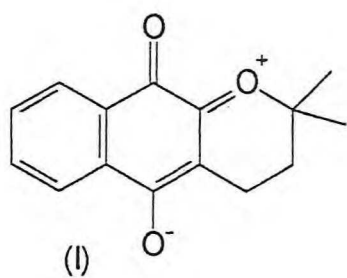
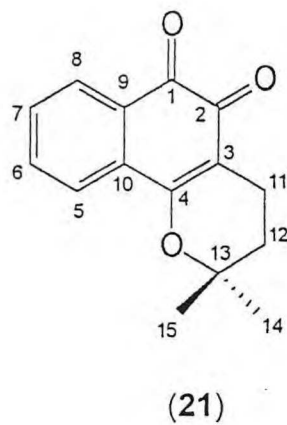
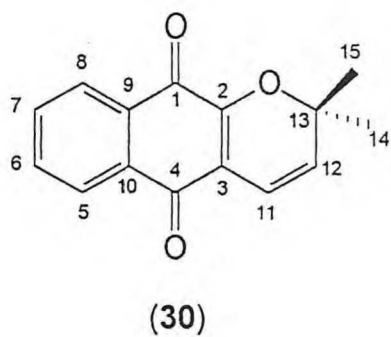


Tabela 3: Dados de RMN¹H e ¹³C de IAEC-1(30) em CDCl₃.

	¹ H x ¹³ C-COSY- ¹ J		¹ H x ¹³ C-COSY- ⁿ J	
	δ _C	δ _H , J(Hz)	² J _{CH}	³ J _{CH}
<u>C</u>				
1	179.85	-		H-8
2	152.49	-		
3	117.89	-		
4	181.86	-		H-5
9	131.58	-		H-5, H-7
10	131.66	-		H-6, H-8
13	80.45	-	H-14, H-15	
<u>CH</u>				
5	126.25	8.04(dd, J=7.4 2.0)		
6	133.96	7.68(dt, J=7.4 e 2.0)		H-8
7	132.85	7.64(dt, J=7.4 e 2.0)		
8	126.05	8.06(dd, J=7.4 2.0)		
11	115.51	6.62(d, J=10.2)		
12	130.89	5.69(d, J=10.2)		H-14, H-15
<u>CH₃</u>				
14	28.40	1.52(s)		
15	28.40	1.52(s)		

Tabela 4: Dados de RMN¹³C de IAEC-1 (30) e comparação com os citados na literatura^{43,44} para dehidro- α -lapachona e β -lapachona (21) em CDCl₃.

<u>C</u>	δ_C (30)	$\delta_C(30)^{43}$	$\delta_C(30)^{44}$	$\delta_C(21)^{44}$
1	179.85	179.16	179.3	179.3
2	152.49	151.88	152.1	178.8
3	117.89	117.33	117.6	112.4
4	181.86	181.11	181.3	161.7
9	131.58	130.97	130.8	132.3
10	131.66	131.02	131.2	129.7
13	80.45	79.79	80.2	79.2
CH				
5	126.25	125.66	125.9	123.9
6	133.96	133.52	133.7	127.9
7	132.85	132.77	132.9	130.4
8	126.05	125.70	125.9	134.6
11	115.51	115.00	115.2	16.0
12	130.89	130.48	130.6	31.4
CH₃				
14	28.40	27.98	28.3	26.6
15	28.40	27.98	28.3	26.6

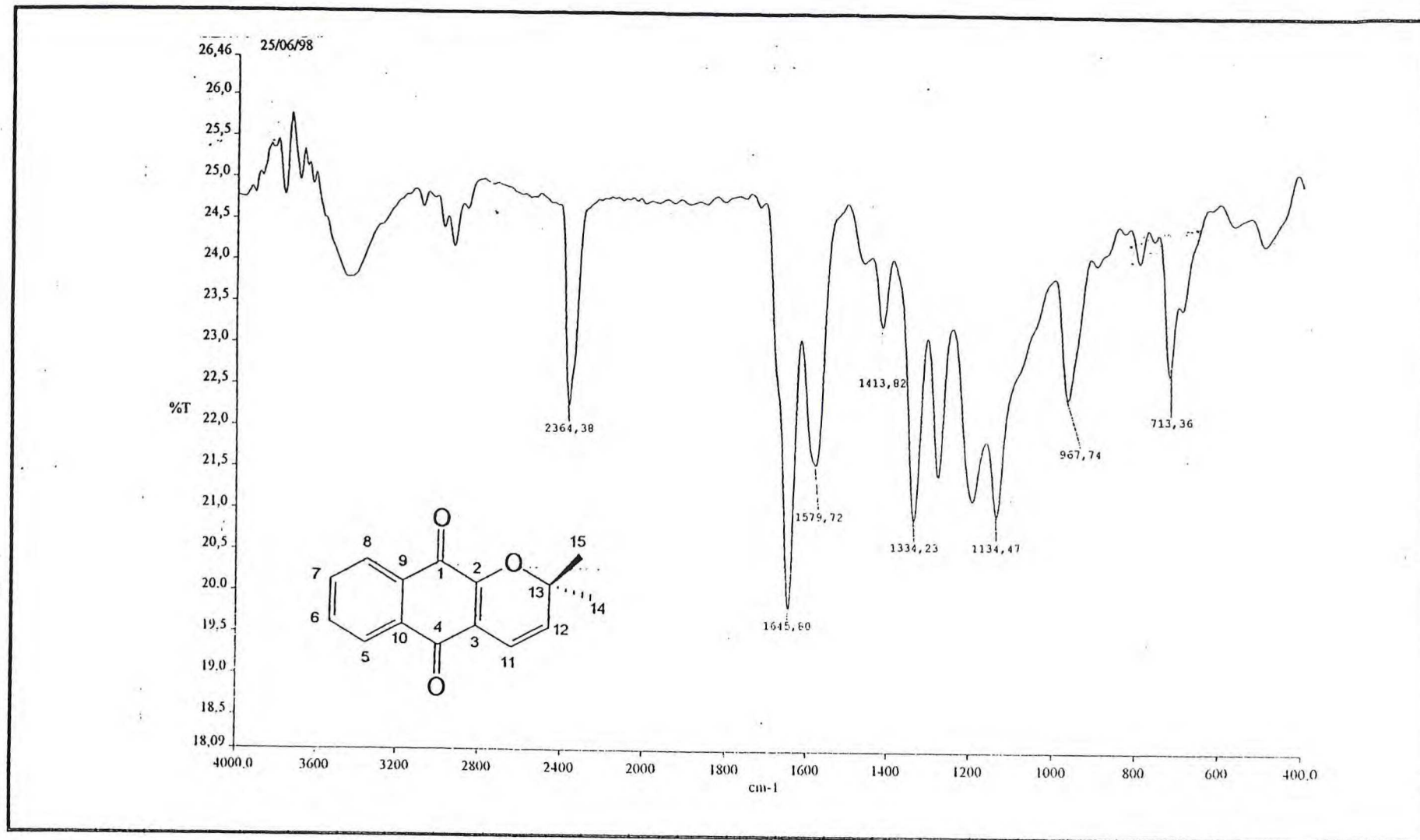


Figura 8: Espectro na região do I.V. (fase KBr) de IAEC-1(30)

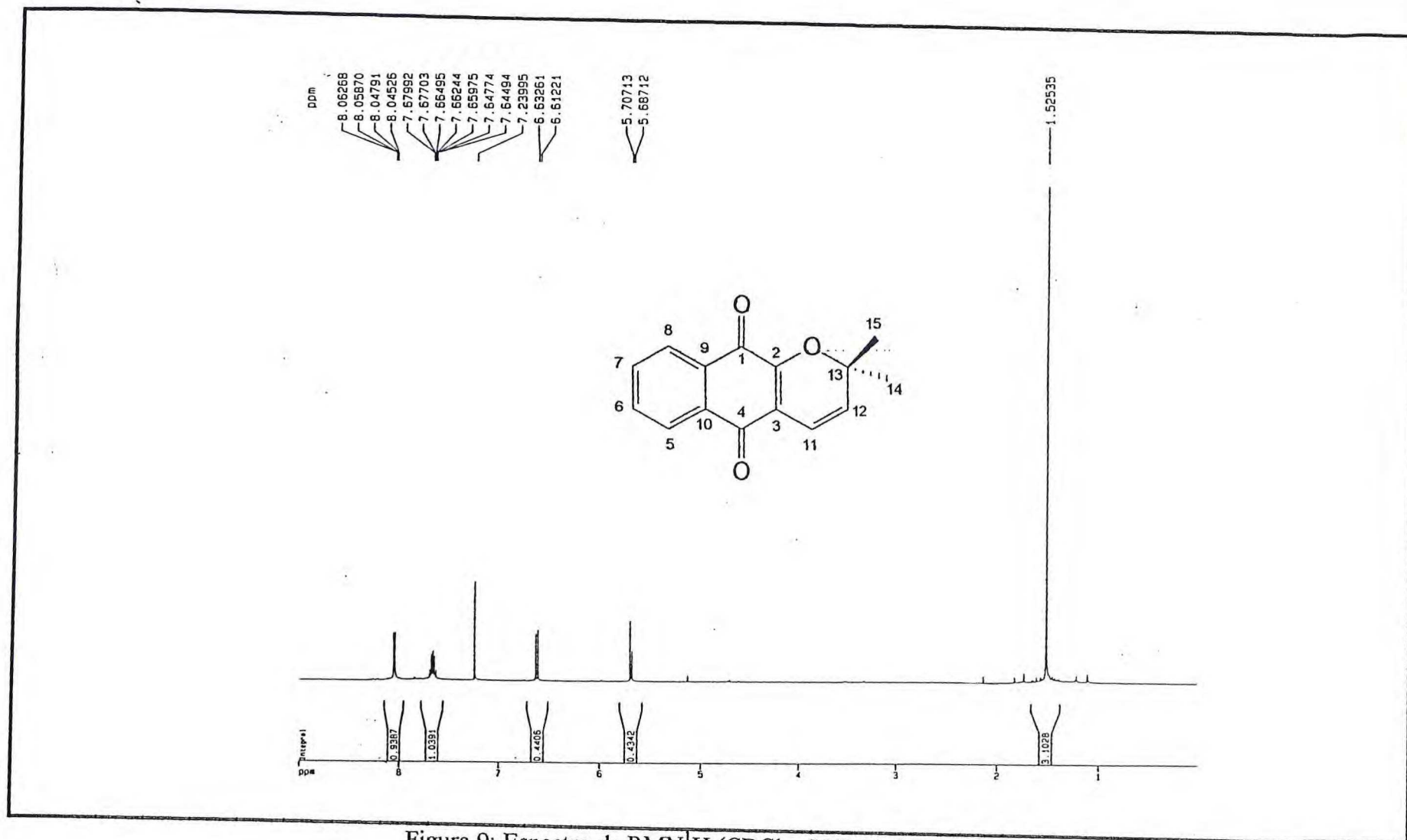


Figura 9: Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 500Mz) de IAEC-1(30)

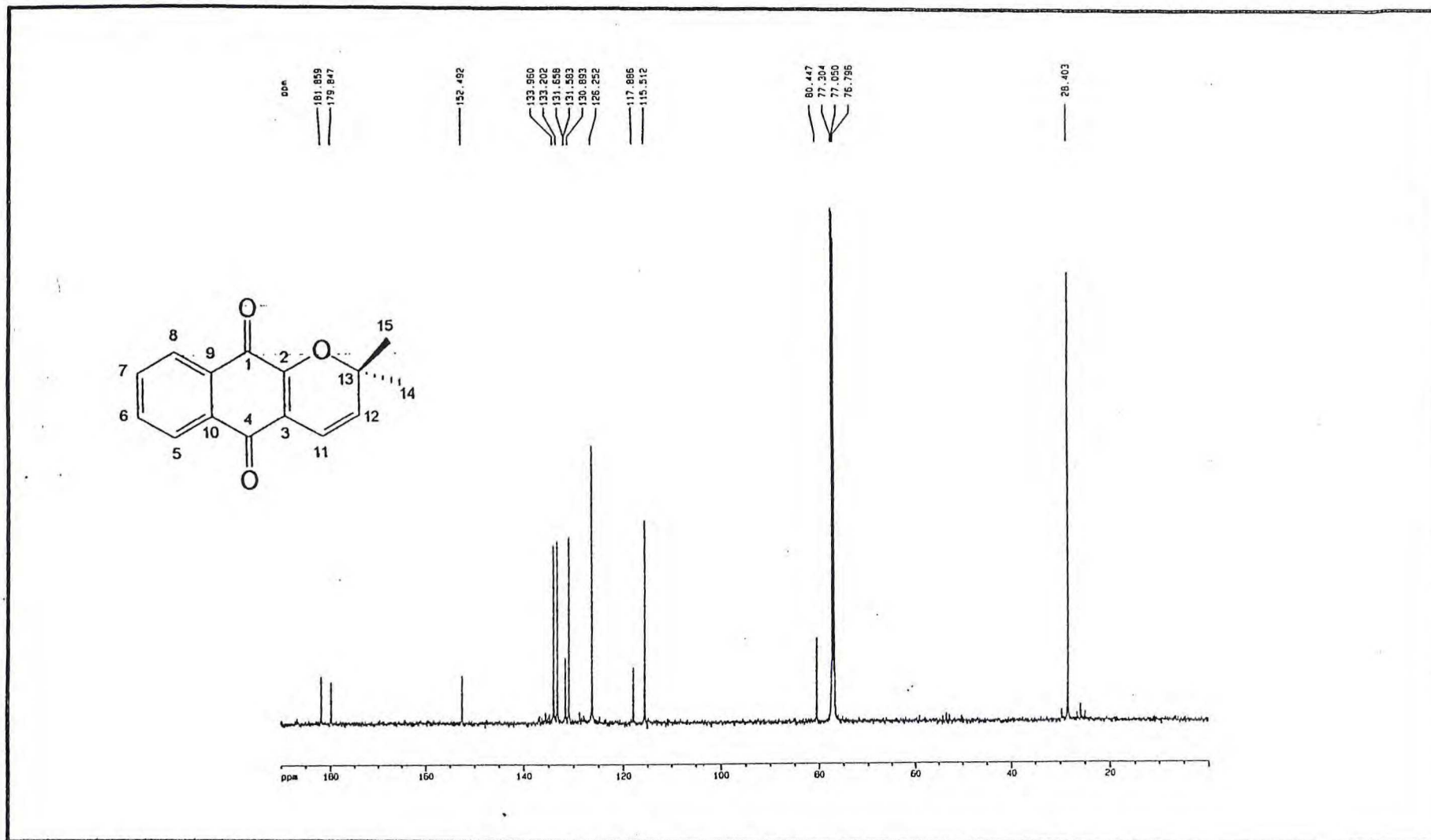


Figura 10: Espectro de RMN^{13}C -PND (CDCl_3 , 125Mz) de IAEC-1(30)

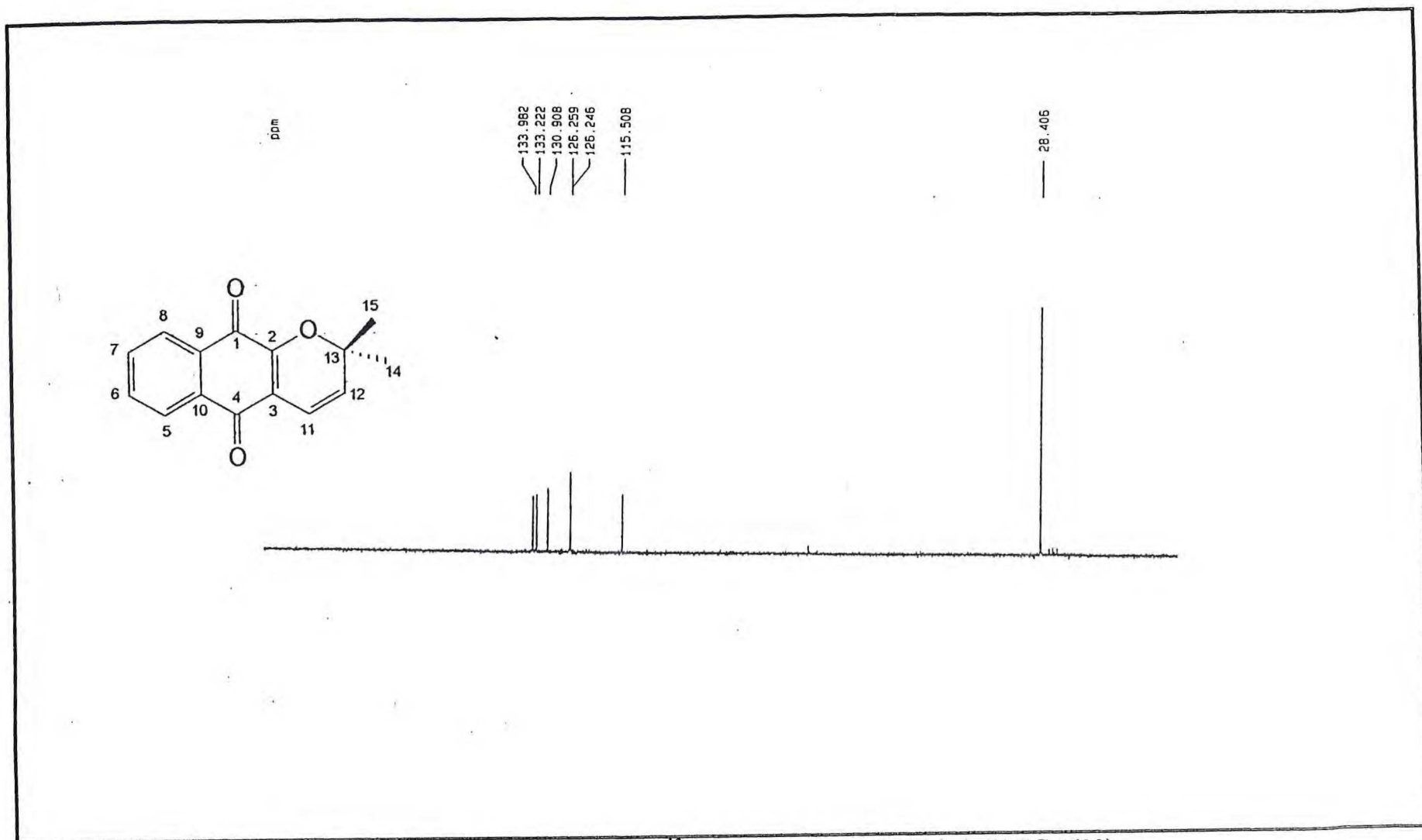


Figura 11: Espectro de RMN ^{13}C - DEPT (CDCl_3 , 125Mz) de IAEC-1(30)

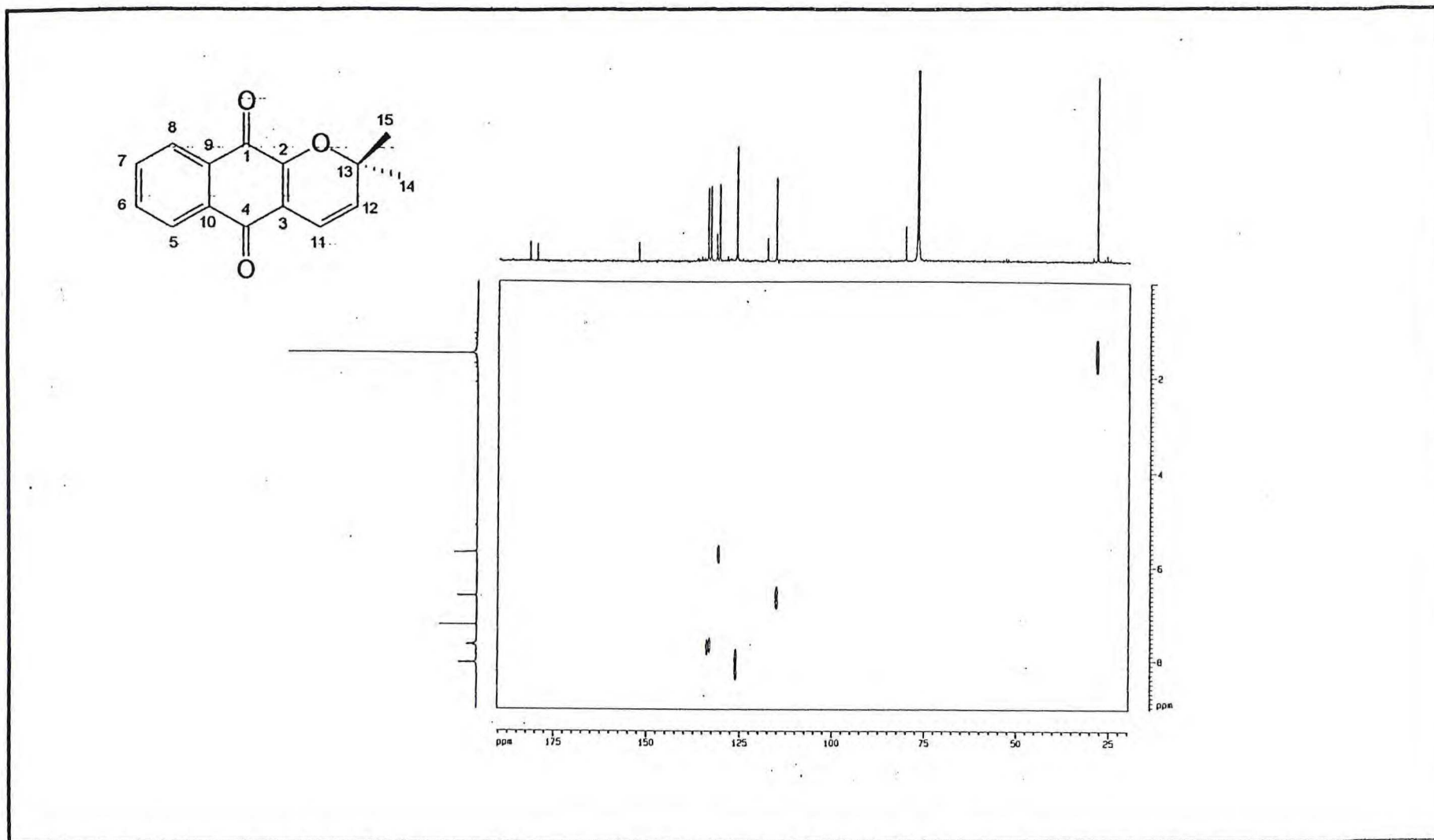


Figura 12: Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HETCOR(^1H - ^{13}C - $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=1$) (CDCl_3 , 125Mz) de IAEC-1(30)

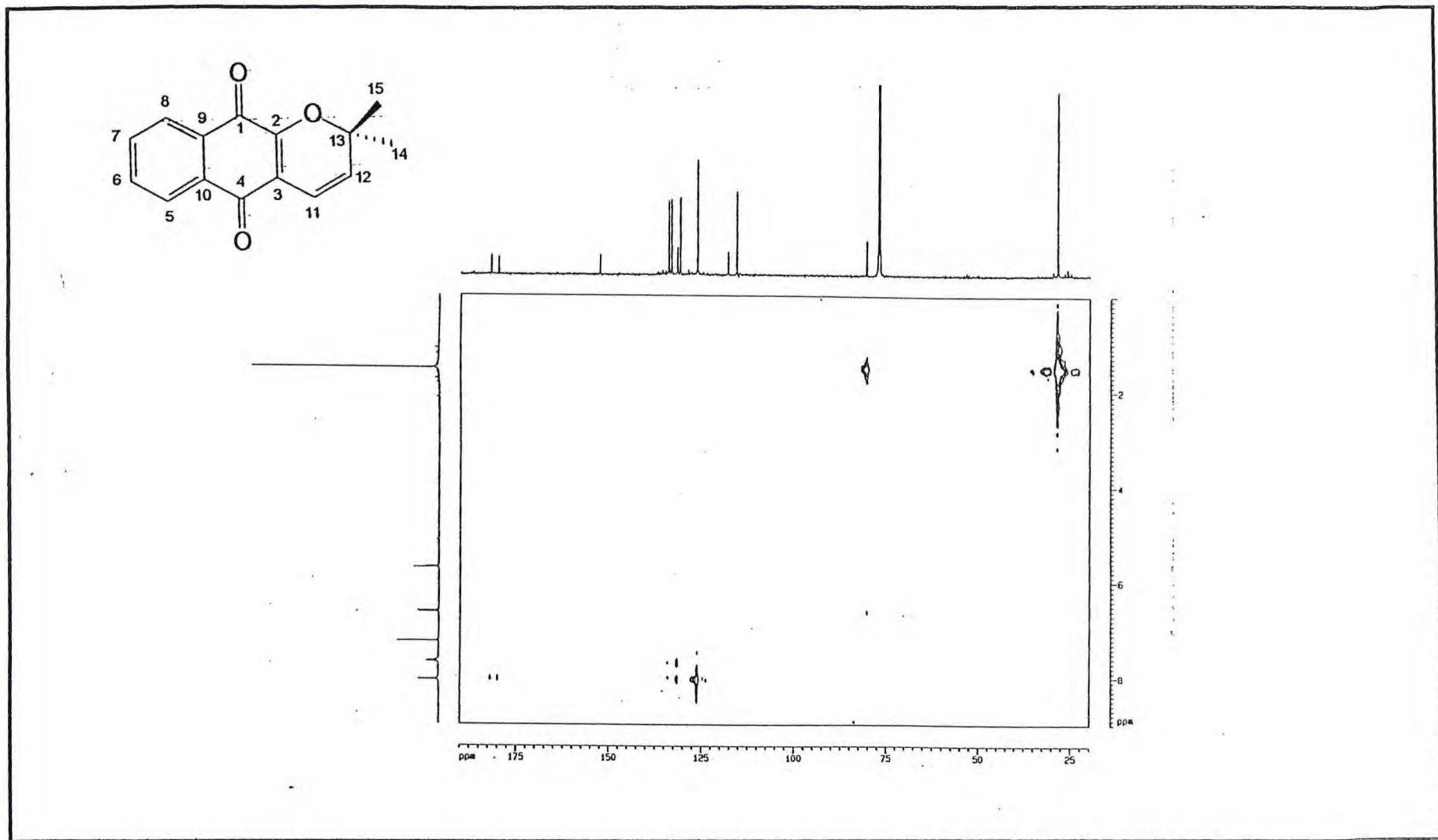


Figura13: Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-COLOC (^1H - ^{13}C - $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3) (CDCl_3 , 125Mz) de IAEC-1(30)

File:MAR11 Ident:444 Acq:11-MAR-1999 14:21:50 +43:56 Cal:MAR11
AutoSpec EI+ Magnet BpI:9596767 TIC:75699728 Flags:HALL

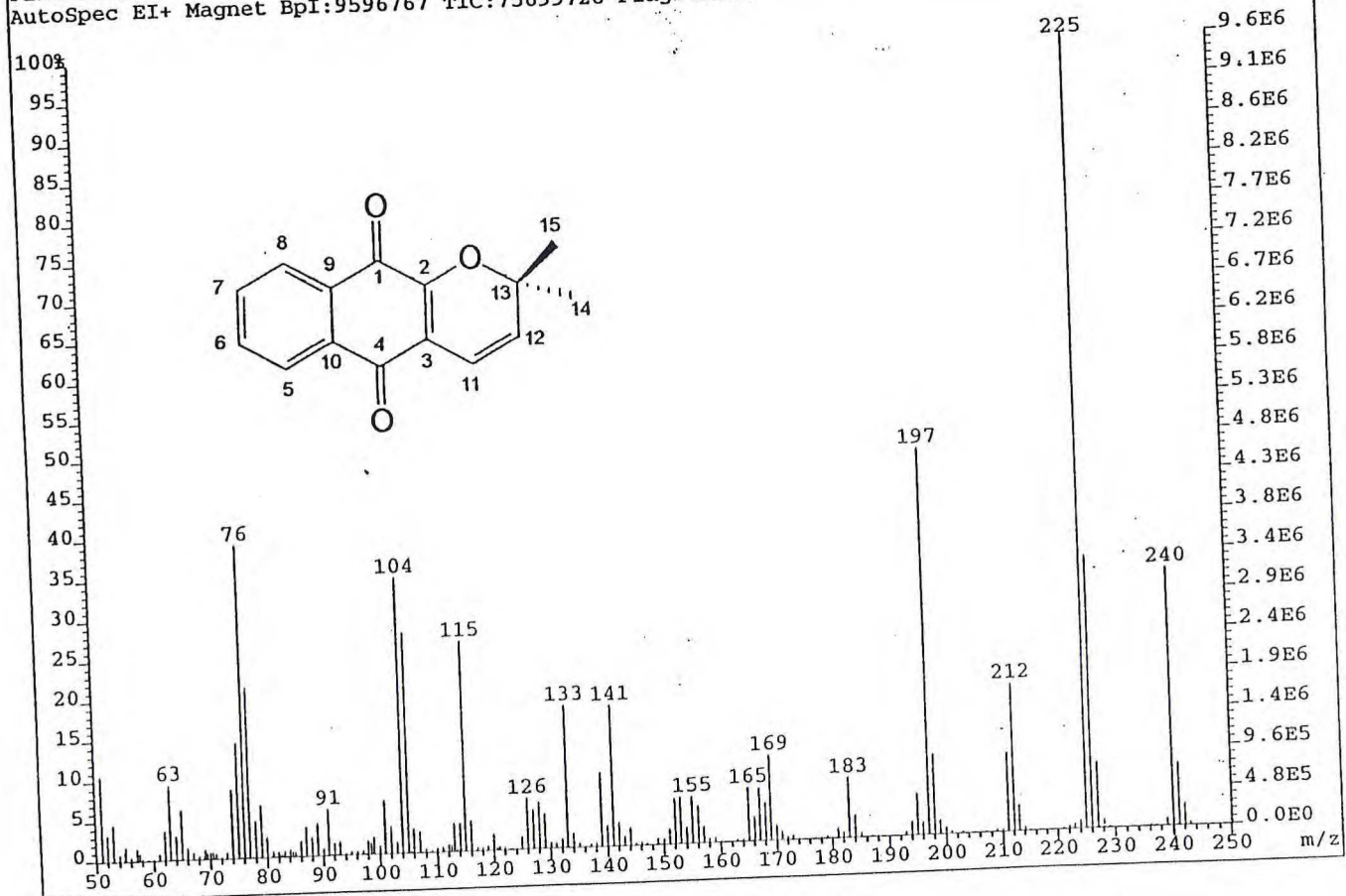


Figura14: Espectro de massas de IAEC-1(30)

3.3. Determinação Estrutural de IAEA-K1(90)

A substância denominada IAEA-K1 apresentou-se como um sólido branco, solúvel em clorofórmio, e com ponto de fusão 209-210⁰C. O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig.15, pág.41) mostrou bandas em 3485 cm⁻¹ (ν_{O-H}), 1681 cm⁻¹ ($\nu_{C=O}$ de carbonila conjugada) e em 1598, 1523 e 1512 cm⁻¹ ($\nu_{C=C}$).

O espectro de RMN¹H (Fig.16, pág.42) apresentou sinais em δ 7.56 (dd, $J=8.1$ e 2.0, acoplamento *orto* e *meta*), 7.54(d, $J=2.0$ acoplamento *meta*) e 6.88(d, $J=8.1$ acoplamento *orto*), correspondentes a três hidrogênios aromáticos. A multiplicidade dos sinais e valores das constantes de acoplamento (J) mostraram um padrão de anel aromático 1,3,4-trissubstituído. A presença de uma metoxila ficou configurada pelo singleto em δ 3.87(3H).

Nos espectros de RMN¹³C-PND (Fig.17, pág.43) e DEPT-135 (Fig.18, pág.44) foram detectados três carbonos aromáticos hidrogenados em δ 124.88, 115.52 e 113.53, dois carbonos aromáticos oxigenados em δ 152.08 e 148.07, um carbono aromático não-hidrogenado em δ 121.67, um carbono carboxílico conjugado em δ 167.66, e o sinal do carbono da metoxila em δ 56.33. Esses dados indicaram que a substância isolada tratava-se de um derivado do ácido benzóico contendo uma metoxila e uma hidroxila no anel.

No espectro bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância-COLOC (Fig.19, pág.45) observou-se que o sinal em δ 148.07 estava acoplando com os hidrogênios da metoxila, sendo portanto o sinal em δ 152.08 pertencente ao outro carbono oxigenado. Esses valores de deslocamento químico só poderiam ser justificados se a hidroxila estivesse em posição *para* ao grupamento carboxílico, e portanto situada a metoxila em posição *meta*.

O espectro de massas (Fig.20, pág.46) apresentou o pico correspondente ao íon molecular (M^+) em m/z 168 daltons, referente à fórmula molecular C₈H₈O₄ do composto. De acordo com esses dados concluiu-se que IAEA-K1 tratava-se do ácido 4-hidroxi-3-metoxi benzóico (90), cujas atribuições de deslocamento químico de ¹H e ¹³C e comparação com dados da literatura⁴⁵ podem ser observados na Tabela 5, pág.40.

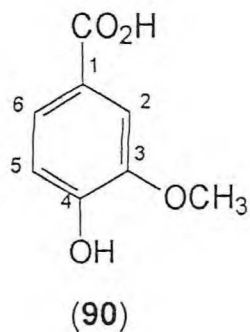


Tabela 5: Dados de RMN¹H e ¹³C de IAEA-K1 e comparação com dados da literatura⁴⁵ para o ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico (90) em CDCl₃.

<u>C</u>	¹ H x ¹³ C-COSY- ¹ J		¹ H x ¹³ C-COSY- ⁿ J		δ _C (90) ⁴⁵
	δ _C	δ _H , J(Hz)	² J _{CH}	³ J _{CH}	
C=O	167.66	-	-	-	167.46
1	122.86	-	H-2	H-5	121.74
3	148.07	-	H-2	H-5, OCH ₃	147.02
4	152.08	-		H-2	150.95
CH					
2	113.53	7.54(d, J=2.0)	-	H-6	112.62
5	115.52	6.88(d, J=8.1)	-	-	114.84
6	124.88	7.56(dd, J=8.1 e 2.0)	-	H-2	123.56
CH₃					
OCH₃	56.33	3.87(s)			55.55

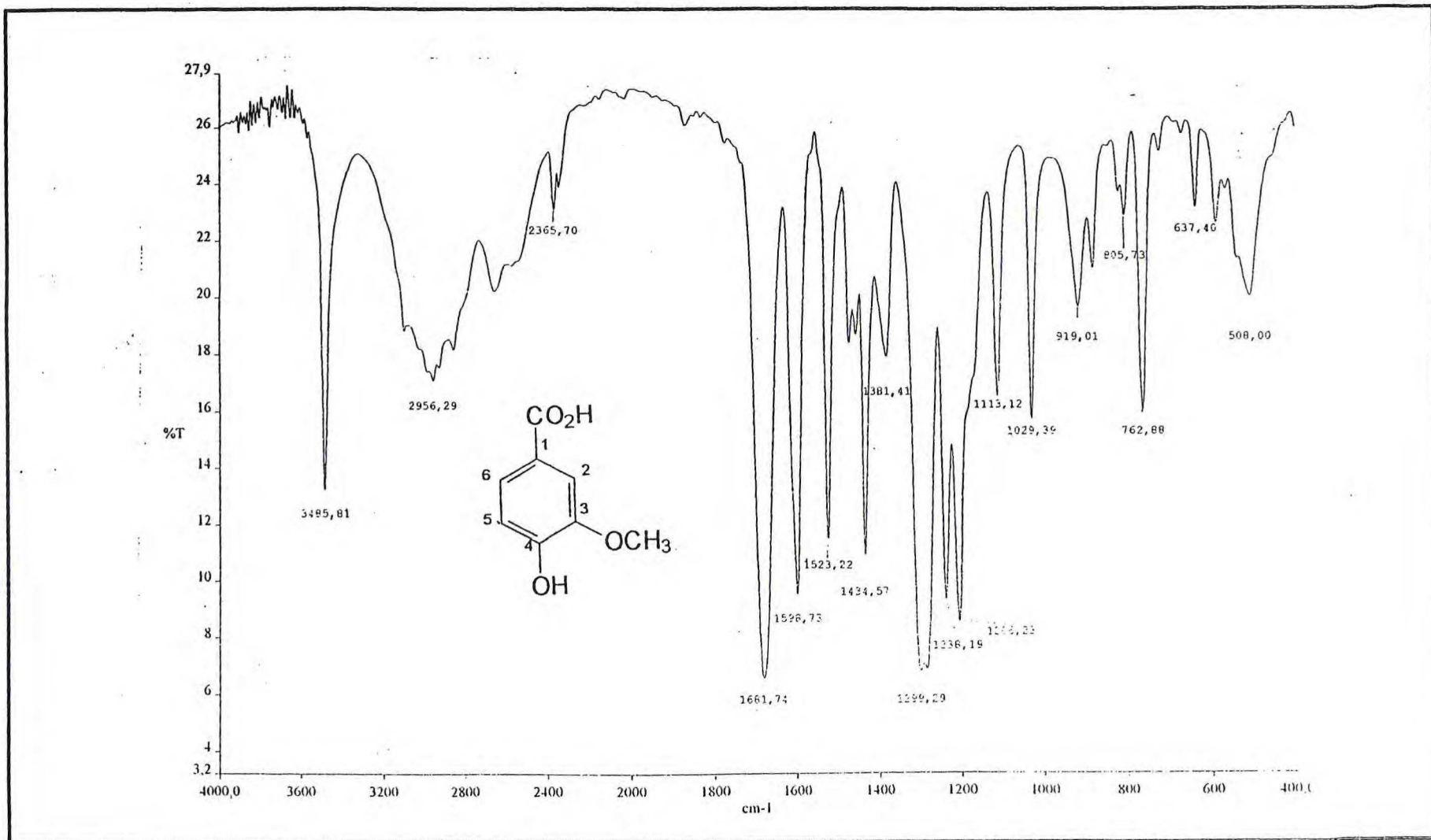
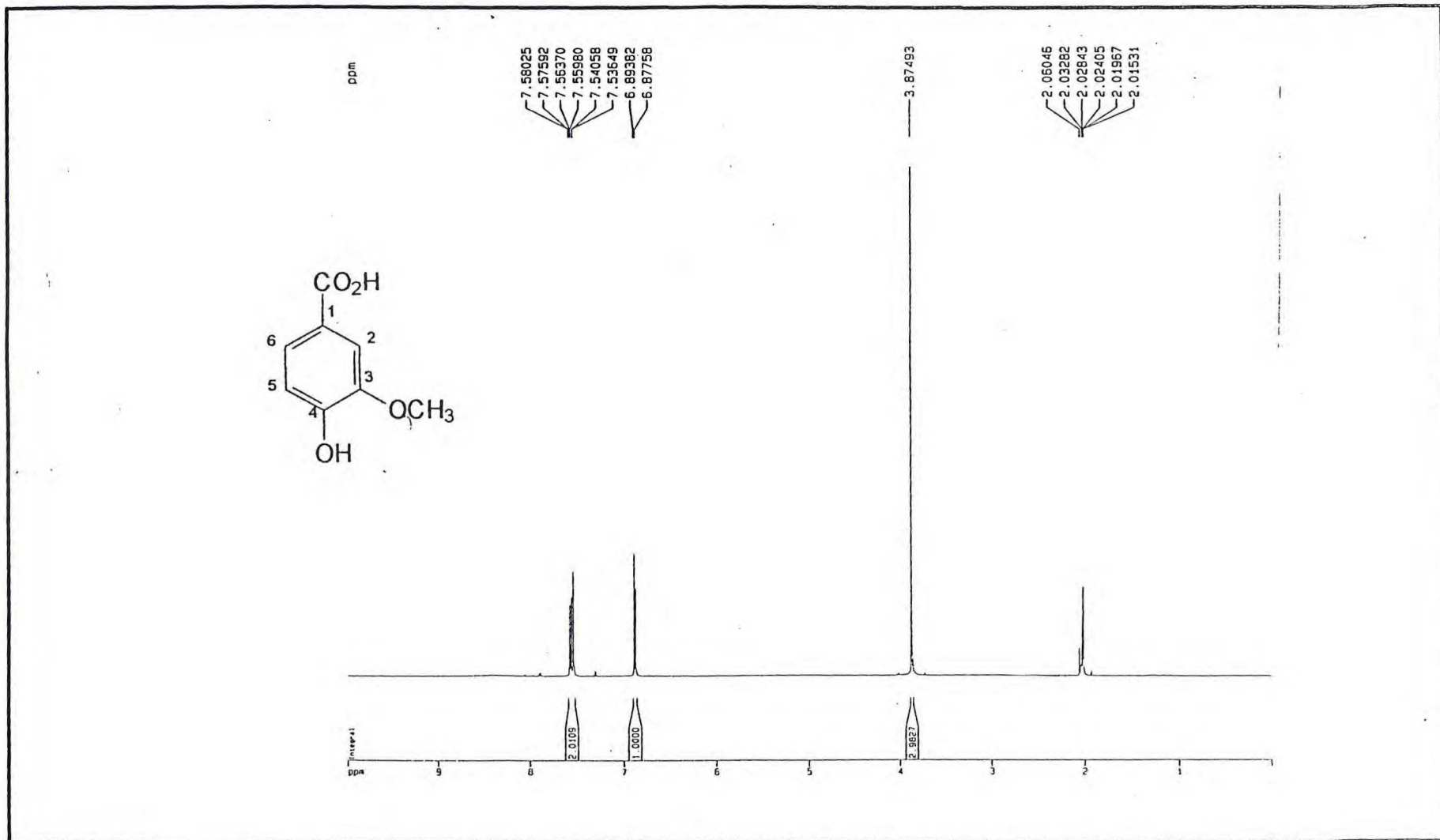


Figura15: Espectro na região do I.V. (fase KBr)de IAEA-K1(90)



Figural6 : Espectro de RMN¹H (acetona-d₆, 500Mz) de IAEA-K1(90)

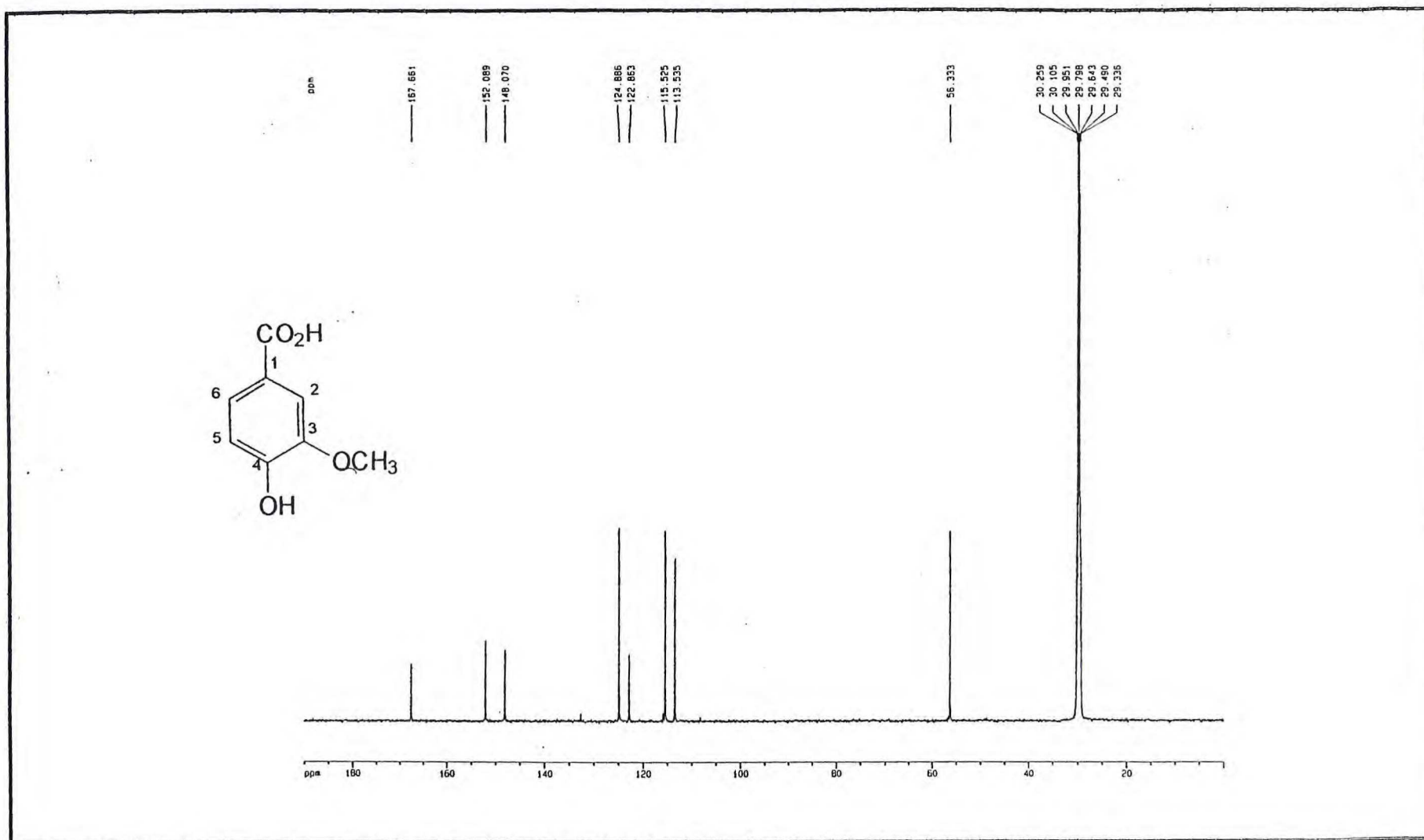


Figura17: Espectro de RMN ^{13}C -PND (acetona- d_6 , 125Mz) de IAEA-K1(90)

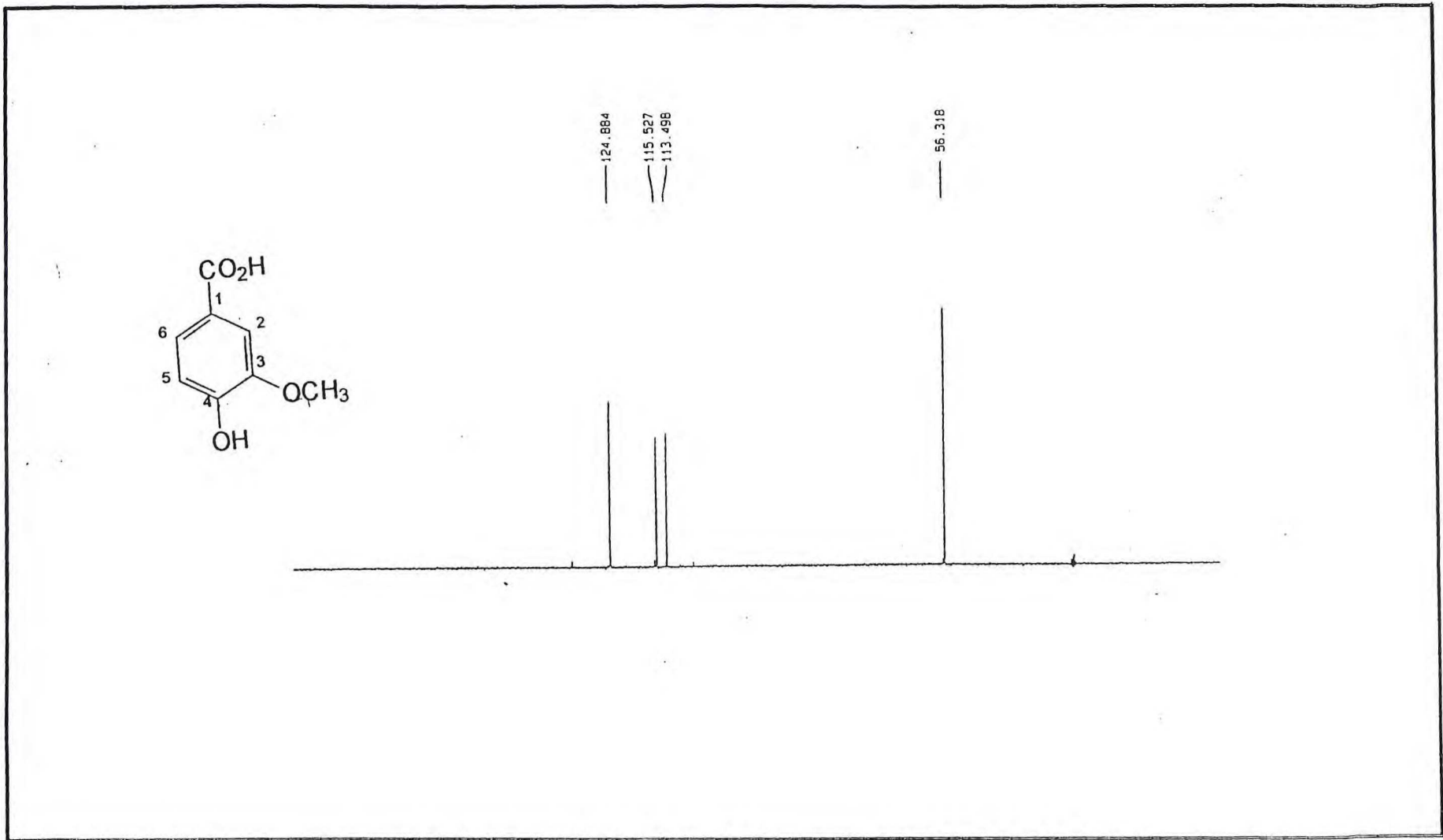


Figura18: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT (acetona- d_6 , 125Mz) de IAEA-K1(90)

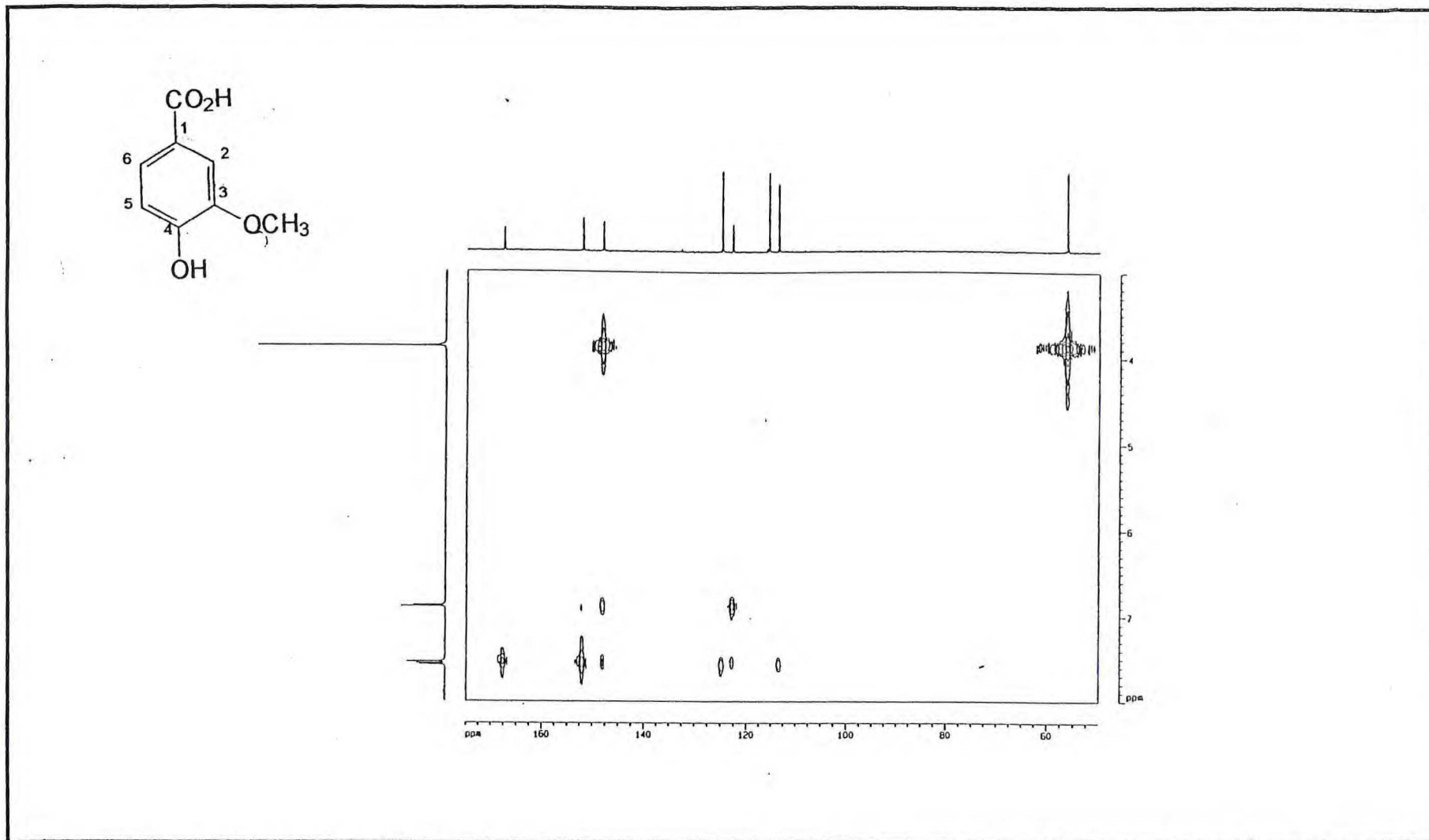


Figura19: Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-COLOC (¹H-¹³C- ⁿJ_{CH}, n=2 e 3) (acetona-d₆, 125Mz) de IAEA-K1(90)

File:OUT08 Ident:81_86 Win 1047PPM Acq: 8-OCT-1998 09:34:08 +8:19 Cal:OUT08
AutoSpec EI+ Magnet BpM:168 BpI:238443 TIC:905845 Flags:HALL

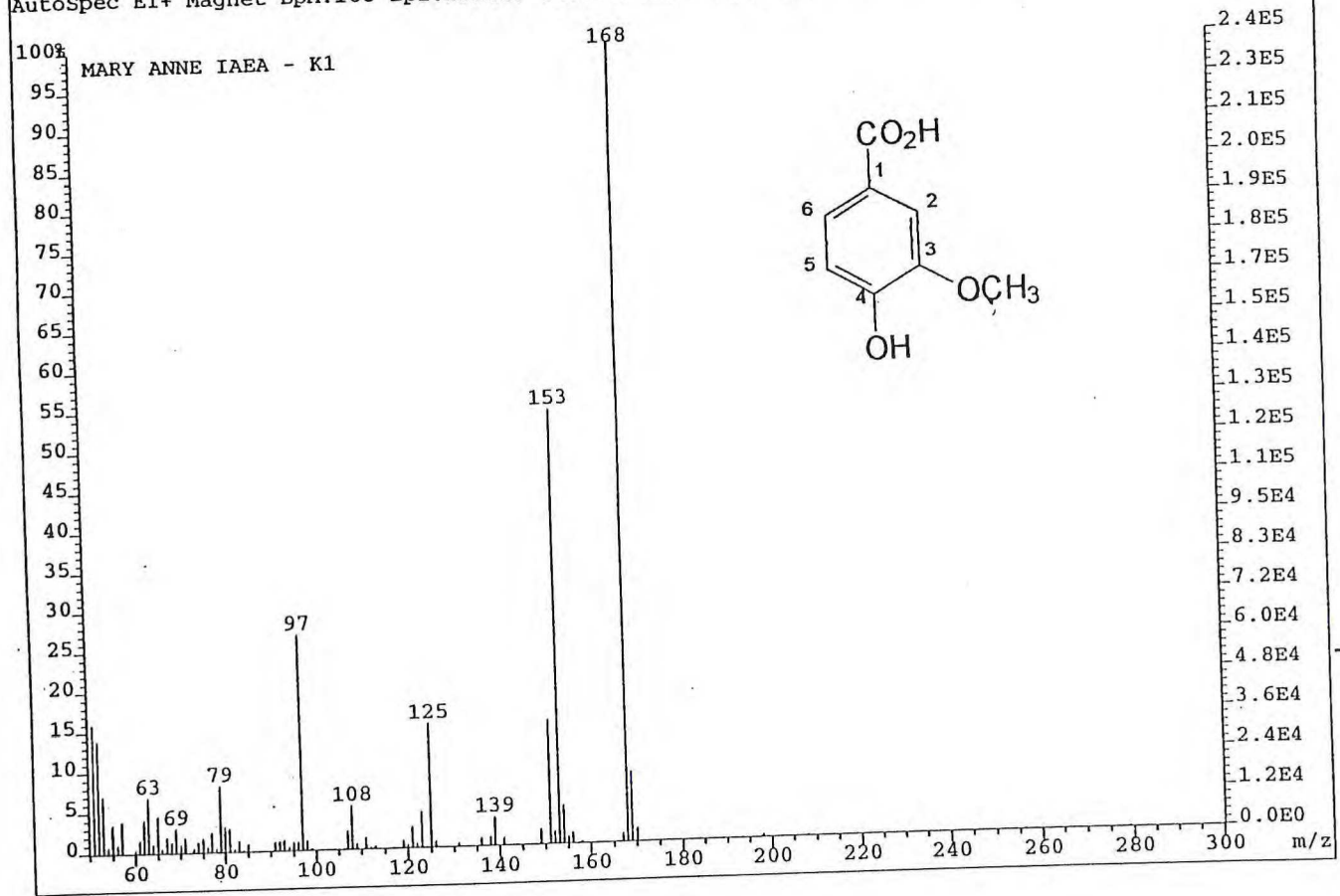


Figura20: Espectro de massas de IAEA-K1(90)

3.4. Determinação Estrutural de IAEA-K3 (89)

A substância denominada IAEA-K3 apresentou-se como um sólido amorfo, levemente amarelado, solúvel em metanol, e de ponto de fusão 159-162°C.

Observou-se no espectro de absorção na região do infravermelho (Fig.21, pág.54) bandas em 3488 cm⁻¹(ν_{O-H}), 1610 e 1515 cm⁻¹ (ν_{C=C}), 1430, 1270 e 1031 cm⁻¹.

O espectro de RMN¹H (Fig.22, pág.55) indicou a presença de cinco hidrogênios aromáticos em δ 6.63 (d, *J*=8.0, 1H), 6.67(d, *J*=1.9, 1H), 6.64(dd, *J*=8.0 e 1.9), 6.61(s, 1H) e 6.16(s, 1H); hidrogênios metilênicos em δ 3.19(d, *J*=16.5, 1H) e 2.59(d, *J*=16.5, 1H), hidrogênios metínicos em δ 3.99(d, *J*=11.6, 1H) e 2.01(ddd, *J*=2.5, 3.6 e 11.6) e dois grupos metoxila em δ 3.78(s, 3H) e 3.75(s, 3H). Outros sinais em δ 3.30-3.70(2H), 3.56(1H) e 3.54(1H) foram posteriormente atribuídos a dois grupos metilênicos.

A análise dos espectros de RMN¹³C-PND (Fig.23, pág.56) e DEPT-135 (Fig.24, pág.57) mostrou a seguinte composição de carbonos: sete carbonos aromáticos não-hidrogenados (δ 147.78, 146.16, 144.77, 143.98, 137.15, 132.25 e 125.11), cinco carbonos aromáticos hidrogenados (δ 122.23, 116.01, 114.70, 112.71 e 111.72), um carbono não-hidrogenado oxigenado (δ 73.60), três carbonos metilênicos, sendo dois oxigenados (δ 68.09, 59.52 e 38.68), dois carbonos metínicos (δ 46.31 e 43.57) e dois carbonos metílicos com sinal único e de maior intensidade em δ 55.08. A correlação entre os sinais de ¹H e ¹³C foi feita através do espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMQC (¹H-¹³C, ¹J_{CH}, Fig.25, pág.58).

O espectro bidimensional de correlação homonuclear ¹H-¹H-COSY (Fig.26, pág.59) mostrou além dos acoplamentos entre os hidrogênios aromáticos, os acoplamentos geminais entre os hidrogênios com sinais em δ 3.80-3.70 e 3.56, δ 3.80-3.70 e 3.54, δ 3.19 e 2.59; e acoplamento entre os hidrogênios metínicos com δ 3.99 e 2.01, com valor de constante de acoplamento *J*=11.6, compatível com interação axial-axial de um sistema cíclico.

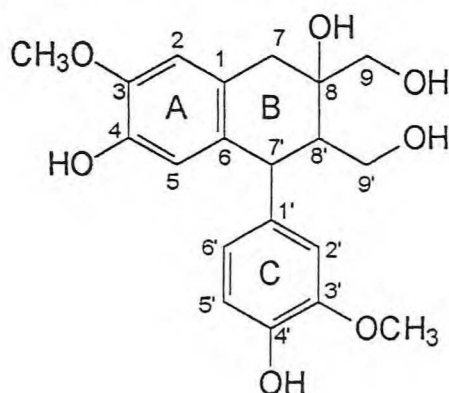
Os sinais referentes aos dois sistemas aromáticos mostraram que os carbonos oxigenados possuíam deslocamentos químicos condizentes com um posicionamento *orto* um em relação ao outro, apresentando-se portanto em cada anel um grupo hidroxila e metoxila vizinhos.

Em um dos anéis constatou-se a presença de três hidrogênios: um apresentando *acoplamento orto*, outro *orto* e *meta* e por fim um com apenas *meta*, compatível com um anel aromático 1,3,4-trissubstituído. Chamou-se a esse sistema de anel C. O outro anel aromático, apresentando apenas dois hidrogênios como singletos, indicou um padrão de anel aromático 1,3,4,6-tetrassubstituído, e foi chamado de anel A.

Através da análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância HMBC (^1H - ^{13}C , $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3 , Fig.27, pág.60) observou-se que os carbonos do anel C [δ 137.15(C), 122.23(CH) e 112.71(CH)] apresentavam acoplamento fora do anel-C apenas com o hidrogênio metínico em δ 3.99, levando à conclusão da conectividade do anel C com esse hidrogênio.

Prosseguindo a análise do espectro HMBC constatou-se que também o anel A estava próximo ao hidrogênio com δ 3.99, através do acoplamento deste com os carbonos aromáticos em δ 132.25(C), 125.11(C) e 116.01(CH). Verificou-se ainda que o anel A encontrava-se acoplado aos dois hidrogênios metilênicos em δ 3.19(1H) e 2.59(1H), que por sua vez acoplava com os carbonos oxigenados em δ 73.60 e 68.09.

Após detalhada análise dos dados espectroscópicos, encontrados na Tabela 6, pág.51, foi proposta a estrutura abaixo para IAEA-K3, correspondente a uma lignana.



A análise do espectro de RMN ^1H mostrou o acoplamento axial-axial entre o H-7' e H-8' ($J=11.6$), indicando o posicionamento *trans* dos mesmos. Essa proposição foi confirmada pelo espectro ^1H - ^1H -NOESY (Fig.28, pág.61), onde se verificou a interação entre H-7' e H-9', e de H-8' com H-7a, H-2' e H-6'.

A determinação da estereoquímica do C-8 foi possível pela observação do acoplamento de H-7b (equatorial) com 2H-9. Se o grupo CH_2OH (C-9) estivesse em posição equatorial (portanto *trans* ao outro) deveria ser também observada a interação de

2H-9 com H-7a, o que não se verificou no espectro. A ausência das interações entre H-8'e H-9, de H-7a com 2H-9' confirmaram ainda que os dois grupos CH_2OH tem uma configuração *cis*. No quadro 6, pág.50 são mostradas as interações observadas entre os hidrogênios no espectro NOESY(Fig.28, pág.61).

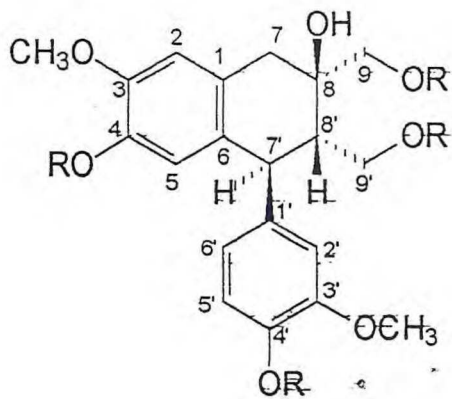
O espectro de massas de IAEA-K3 (Fig.29, pág.62)apresentou pico de ion molecular com m/z 376 $[M]^+$, correspondente à fórmula molecular $C_{20}H_{24}O_7$. De acordo com os dados analisados pode-se assegurar para IAEA-K3 a estrutura (89).

A análise dos espectros do derivado tetra-acetilado de IAEA-K3, denominado IAEA-K3-Ac (89a), cujos dados espectroscópicos encontram-se na Tabela 7, pág.52, corroboram com a proposição da estrutura.

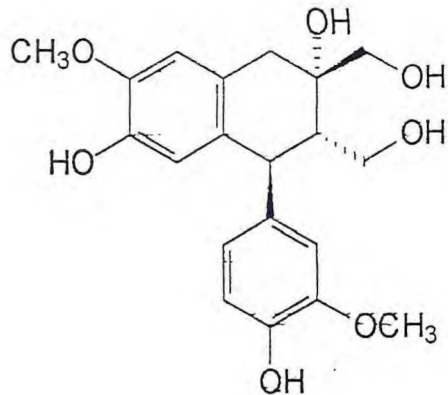
Feito levantamento bibliográfico, foram encontradas na literatura referências do isolamento e dados espectroscópicos do diastereoisômero *trans* de IAEA-K3, conhecido como (+)-cicoolivil (57)^{46,47}, isolado dentre outros gêneros na espécie *Tabebuia palmeri* Wood²⁴.

No entanto, o isômero *cis* IAEA-K3 é inédito na literatura, e foi denominado de 8-*epi*-cicoolivil (89). A comparação dos dados espectroscópicos de RMN¹³C de IAEA-K3 com os relatados na literatura para o (+)-cicoolivil(57)^{46,47} encontram-se na Tabela 8, pág.53. Em uma das referências⁴⁷ os valores de deslocamento químicos dos carbonos 1, 1',5', 6, 9 e 9' estão atribuídos erroneamente, e deverão ser corrigidos.

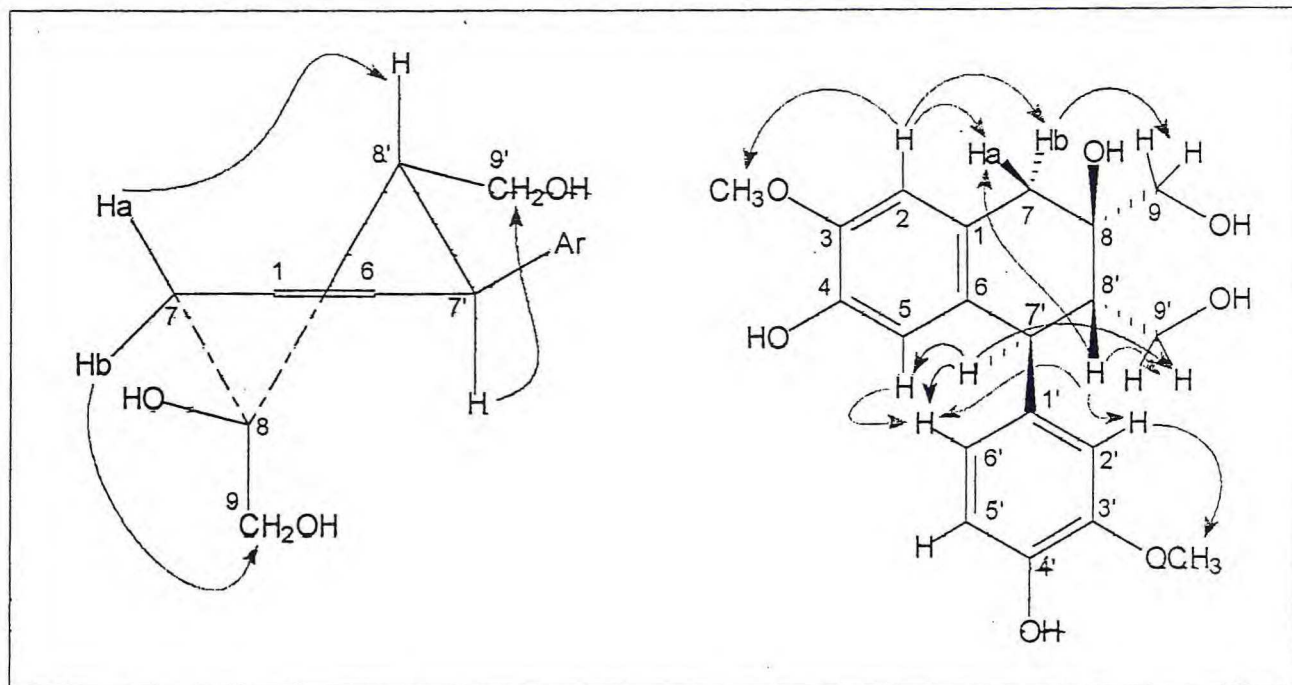
Dados da literatura mostraram que algumas lignanas são compostos biologicamente ativos, que incluem atividade anticancerígena^{48,49,50, 51}.



(89): R=H
 (89a): R=Ac



(57)



Quadro 6: Interações dipolares entre ^1H , ^1H para IAEA-K3(89), observadas no espectro NOESY(Fig.28, pág.61). Detalhe à esquerda.

Tabela 6: Dados de RMN¹³C e ¹H de IAEA-K3 (89) em CD₃OD.

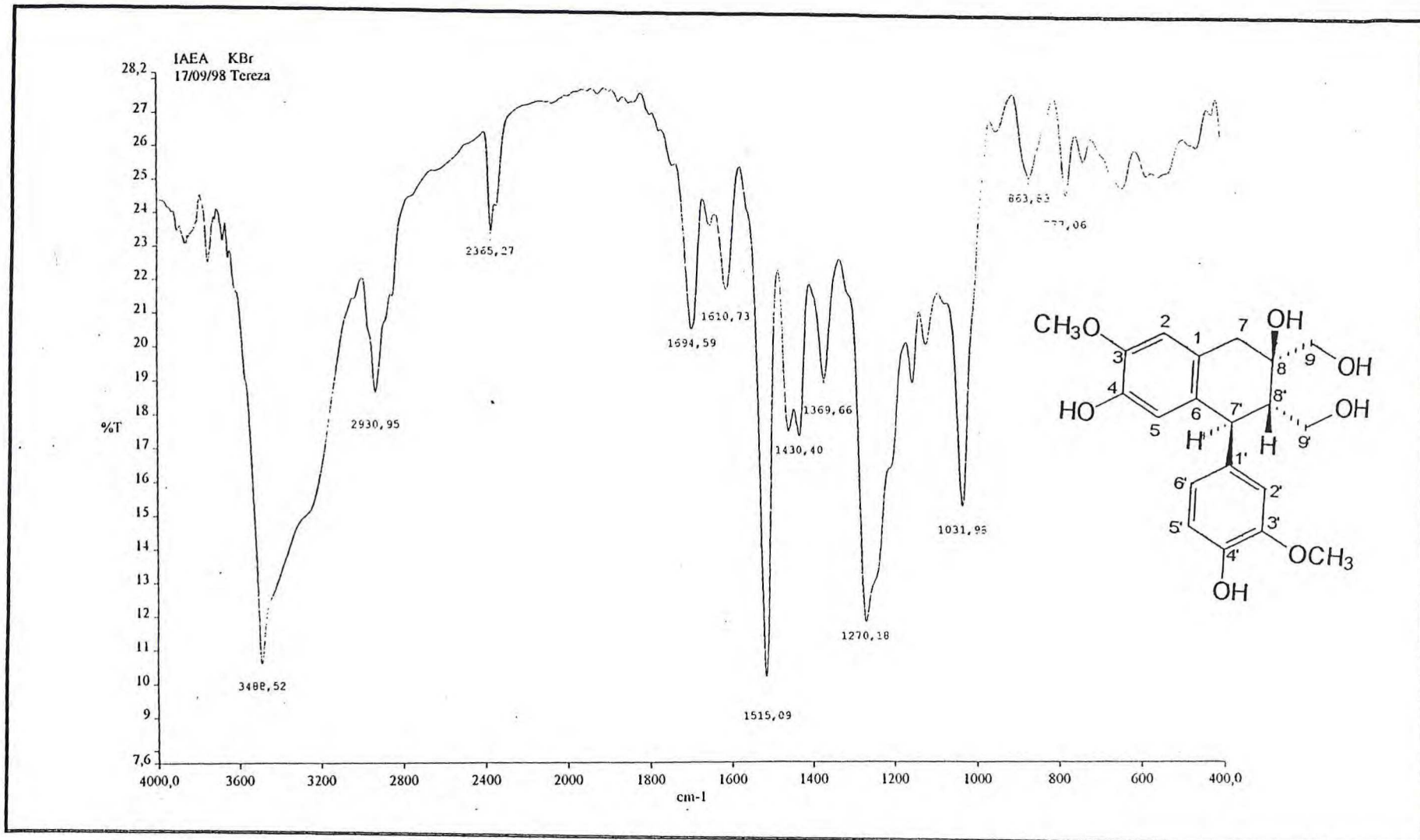
C	¹³ C x ¹ H-COSY- ¹ J _{CH}		¹³ C x ¹ H-COSY- ⁿ J _{CH}		¹ H x ¹ H-NOESY
	δ _C	δ _H	² J _{CH}	³ J _{CH}	
1	125.11	-	2H-7	H-5, H-7'	
3	146.16	-	H-2	H-5, MeO-3	
4	143.98	-	H-5	H-2	
6	132.25	-	H-7'	H-2, 2H-7	
8	73.60	-	2H-7, H-9b	H-9'b	
1'	137.15	-	H-7'	H-5'	
3'	147.78	-		H-5', MeO-3'	
4'	144.77	-	H-5'	H-2', H-6'	
CH					
2	111.72	6.61(s)		2H-7	MeO-3, H-7b , H-7a
5	116.01	6.16(s)			H-2', H-6', H-7'
2'	112.71	6.67(d, J=1.9)		H-7', H-6'	MeO-3', H-7'
5'	114.70	6.73(d, J=8.0)			
6'	122.23	6.64(dd, J=8.0 e 1.9)		H-7', H-2'	H-7'
7'	43.57	3.99(d, J=11.6)		H-5, H-2', H-6'	H-2', H-6', H-5, H-9'b
8'	46.31	2.01(ddd, J=11.6, 2.5 e 3.6)	H-7', 2H-9'		H-7a, H-2', H-6', 2H-9'
CH₂					
7	38.68	3.19(d, J=16.5), H-7a 2.59(d, J=16.5), H-7b		H-2, H-9b	H-9b
9	68.09	3.80-3.70, H-9a 3.56(d, J=11.1), H-9b		H-7b	H-7b
9'	59.52	3.80-3.70, H-9'a 3.54(dd, J=11.2, 4.2), H-9'b			H-8'
CH₃					
MeO-3	55.08				H-2
MeO-3'	55.08				H-2'

Tabela 7: Dados de RMN¹³C e ¹H de IAEA-K3-Ac (89a) em C₆D₆.

<u>C</u>	¹³ C x ¹ H-COSY- ¹ J _{CH}		¹³ C x ¹ H-COSY- ⁿ J _{CH}		¹ H x ¹ H-NOESY
	δ _C	δ _H , J(Hz)	² J _{CH}	³ J _{CH}	
1	132.19		2H-7	H-5	
3	150.83			H-5, MeO-3	
4	139.56			H-2	
6	131.41		H-7'	H-2	
8	72.16				
1'	143.55		H-7'	H-5'	
3'	152.37			H-5', MeO-3'	
4'	139.87			H-2', H-6'	
CH					
2	113.15	6.51(s)		H-7b	H-7b, MeO-3
5	124.81	6.84(s)			
2'	114.16	6.77(d, J=1.7)		H-6', H-7'	MeO-3'
5'	123.84	6.99(d, J=8.0)			
6'	122.24	6.66(dd, J=8.0 e 1.7)		H-2'	
7'	45.45	4.26(d, J=10.9)		H-2', H-6', H-5	H-2', H-6', H-5
8'	46.50	2.32(ddd, J=10.9, 4.8, 3.3)		H-7b, H-9b	2H-9', H-7a, H-2', H-6'
CH₂					
7	40.52	3.10(d, J=16.7), H-7a 2.85(d, J=16.7), H-7b			
9	70.14	4.38(d, J=11.2), H-9a 4.28(d, J=11.2), H-9b			
9'	63.27	4.39(dd, J=12.0, 4.8), H-9'a 4.22(dd, J=12.0, 3.3) H-9'b			
CH₃					
MeO-3	55.80	3.35(s)			
MeO-3'	55.80	3.30(s)			
AcO	170.73	1.83(s)			
AcO	170.13	1.67(s)			
AcO	168.87	1.80(s)			
AcO	168.47	1.92(s)			

Tabela 8: Comparação entre os dados de RMN¹³C de IAEA-K3 (89) e cicloolivil (57) registrados na literatura^{46,47}, em CD₃OD

C	δ_C(89)	δ_C(57)⁴⁶	δ_C(57)⁴⁷
1	125.11	126.5	138.4
3	146.16	147.5	147.6
4	143.98	145.3	145.5
6	132.25	133.6 ^d	126.6
8	73.60	75.0	74.9
1'	137.15	138.5	133.7
3'	147.78	149.2	149.2
4'	144.77	146.2	146.2
CH			
2	111.72	113.0	113.3
5	116.01	117.4	116.2
2'	112.71	114.0	114.3
5'	114.70	116.1	117.3
6'	122.23	122.2	123.7
7'	43.57	44.9	45.0
8'	46.31	47.6	47.9
CH₂			
7	38.68	40.0	40.1
9	68.09	69.5	61.0
9'	59.52	60.9	69.5
CH₃			
MeO-3	55.08	56.4	56.6
MeO-3'	55.08	56.4	56.6



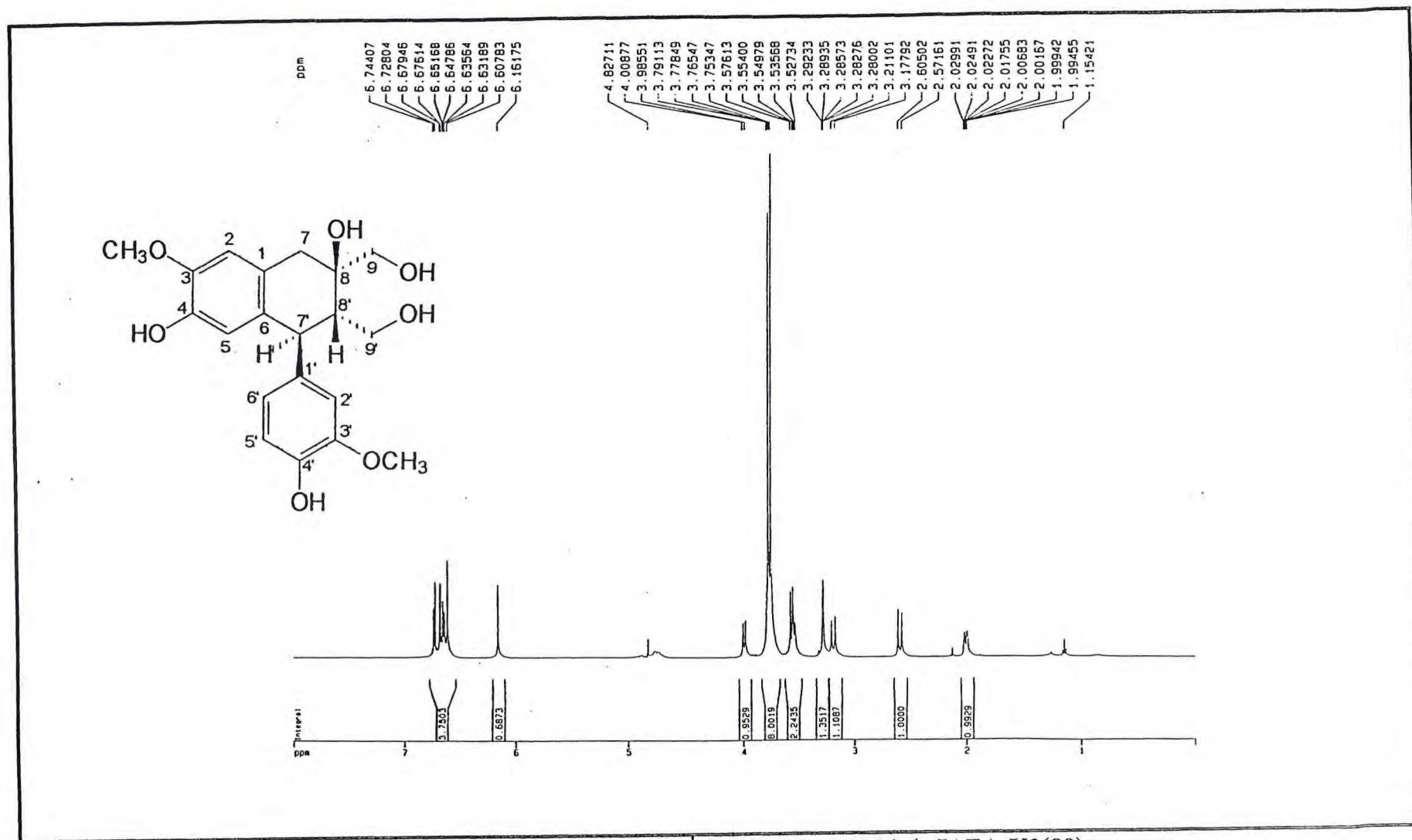


Figura22: Espectro de RMN¹H (CD₃OD, 500Mz) de IAEA-K3(89)

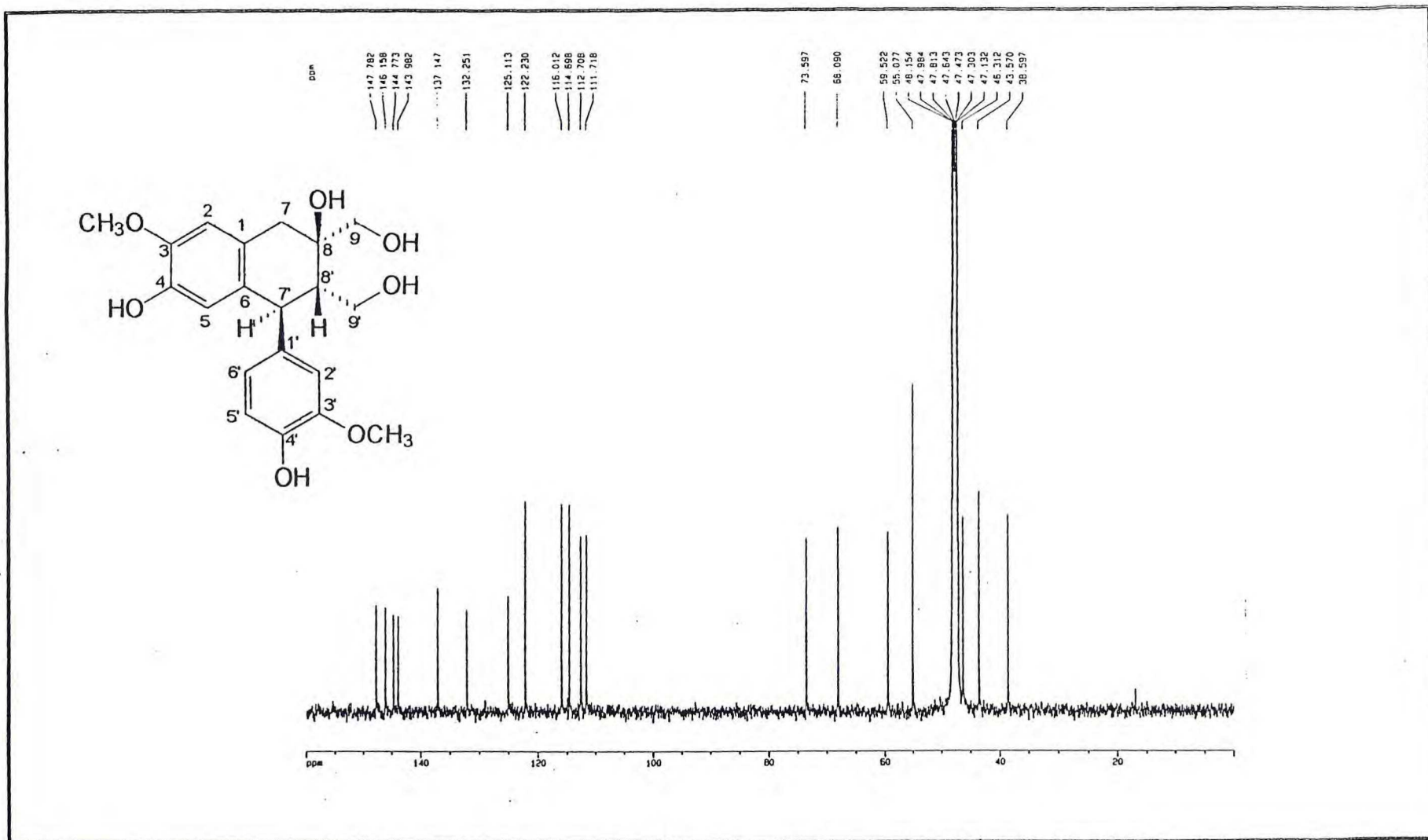


Figura23: Espectro de RMN^{13}C -PND (CD_3OD , 125Mz) de IAEA-K3(89)

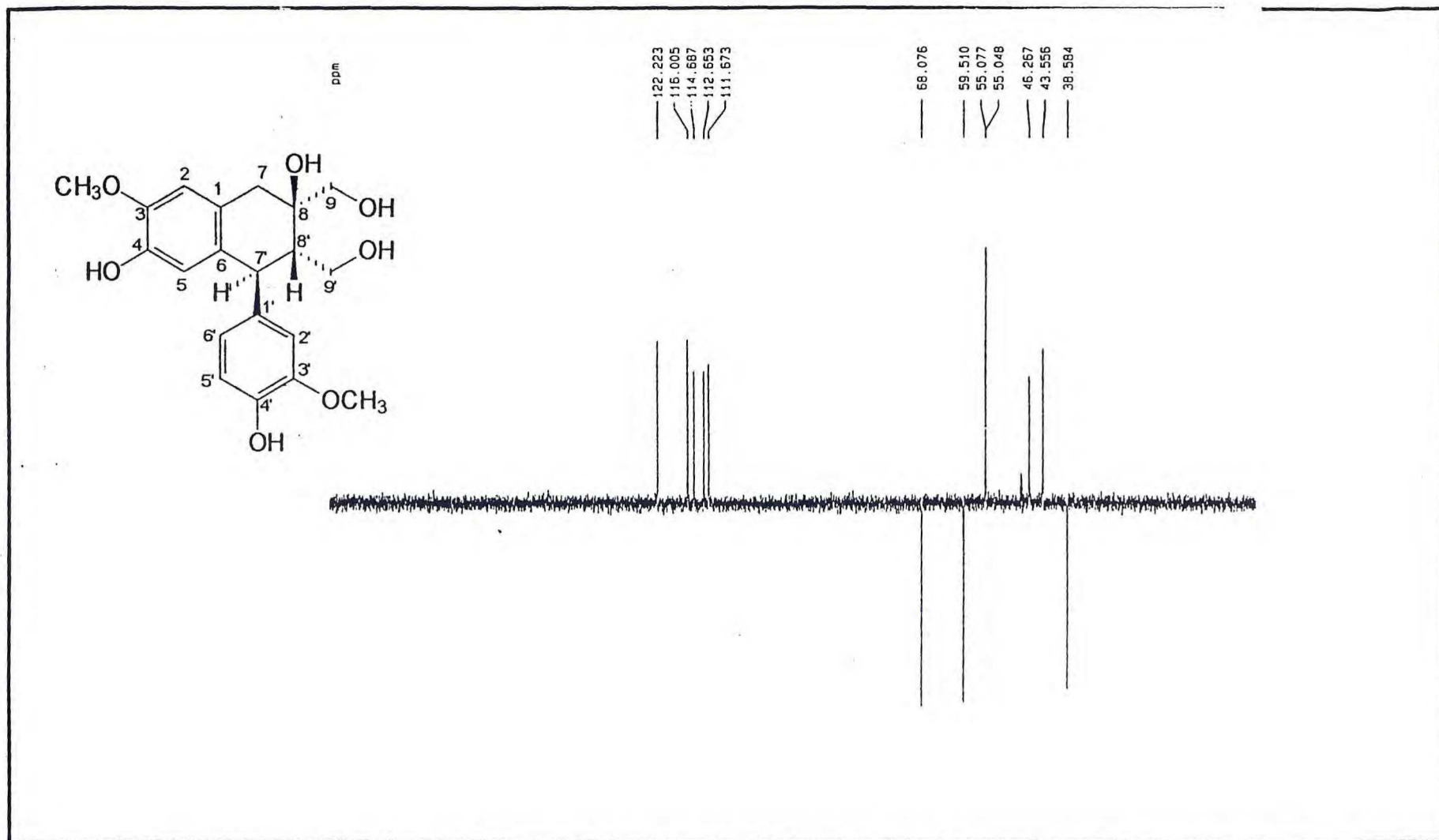


Figura24: Espectro de RMN¹³C-DEPT (CD₃OD, 125Mz) de IAEA-K3(89)

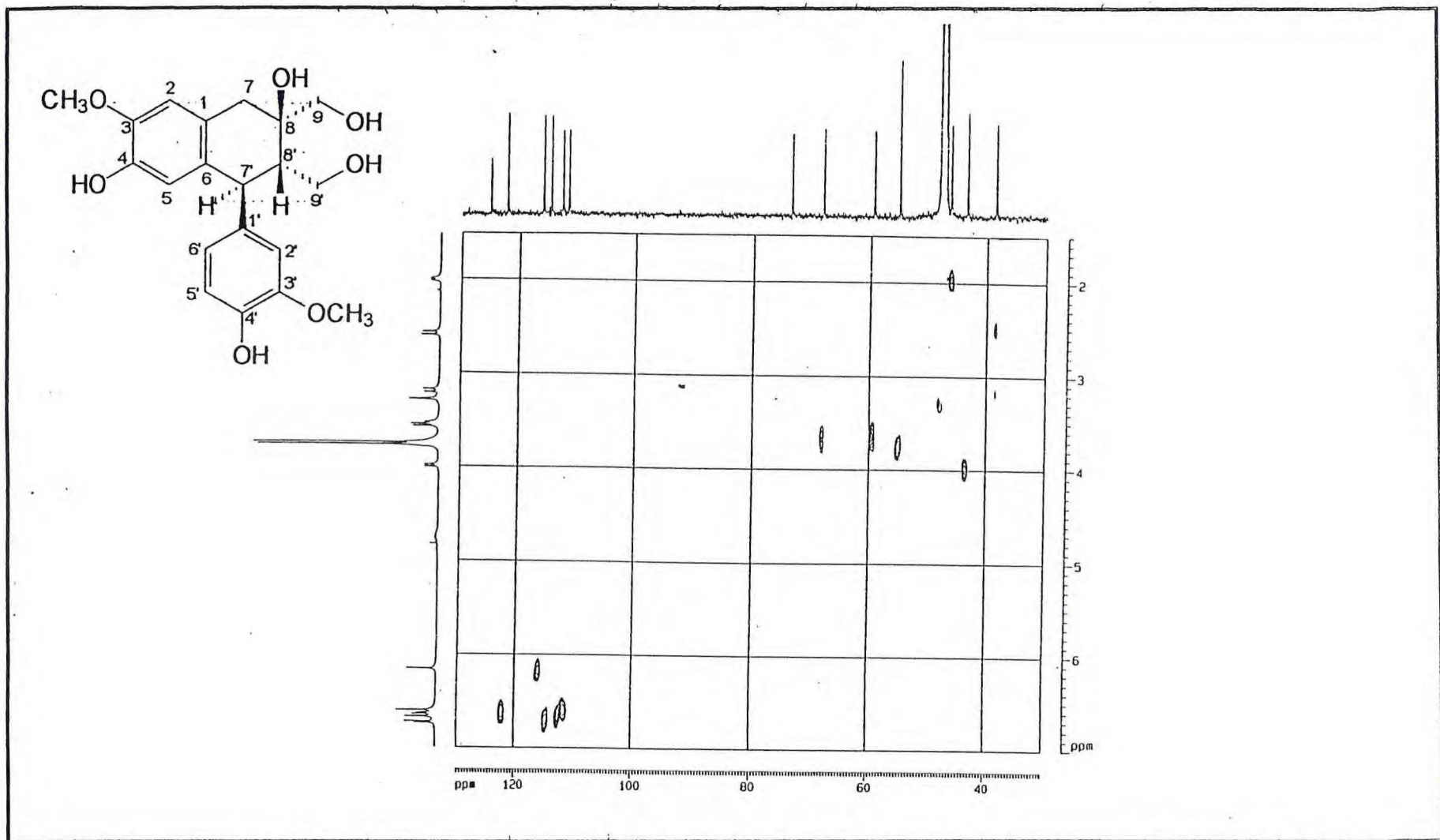


Figura25: Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HMQC($^1\text{H}-^{13}\text{C}-^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=1$) (CD_3OD , 125Mz) de IAEA-K3(89)

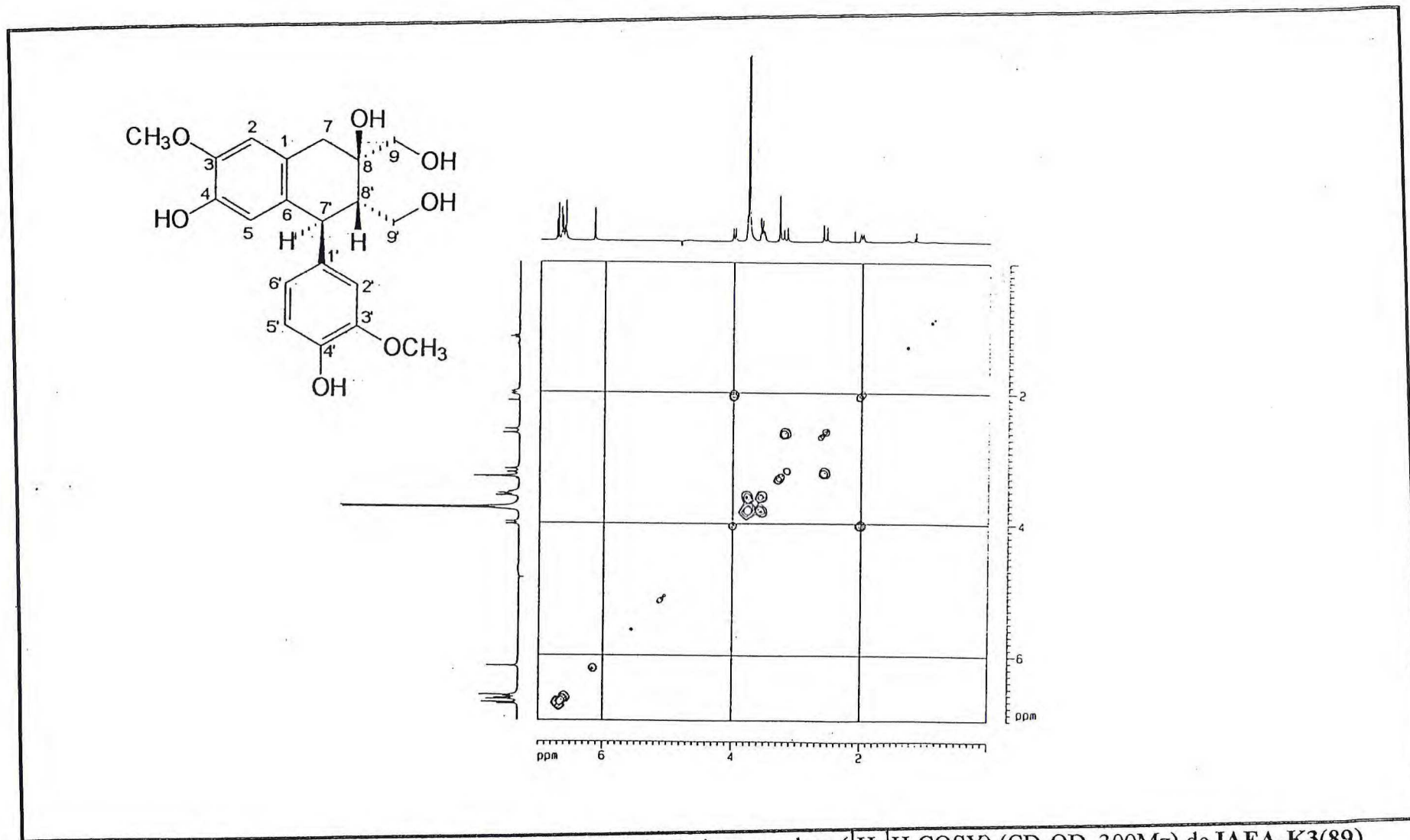


Figura26: Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear (^1H - ^1H -COSY) (CD_3OD , 300Mz) de IAEA-K3(89)

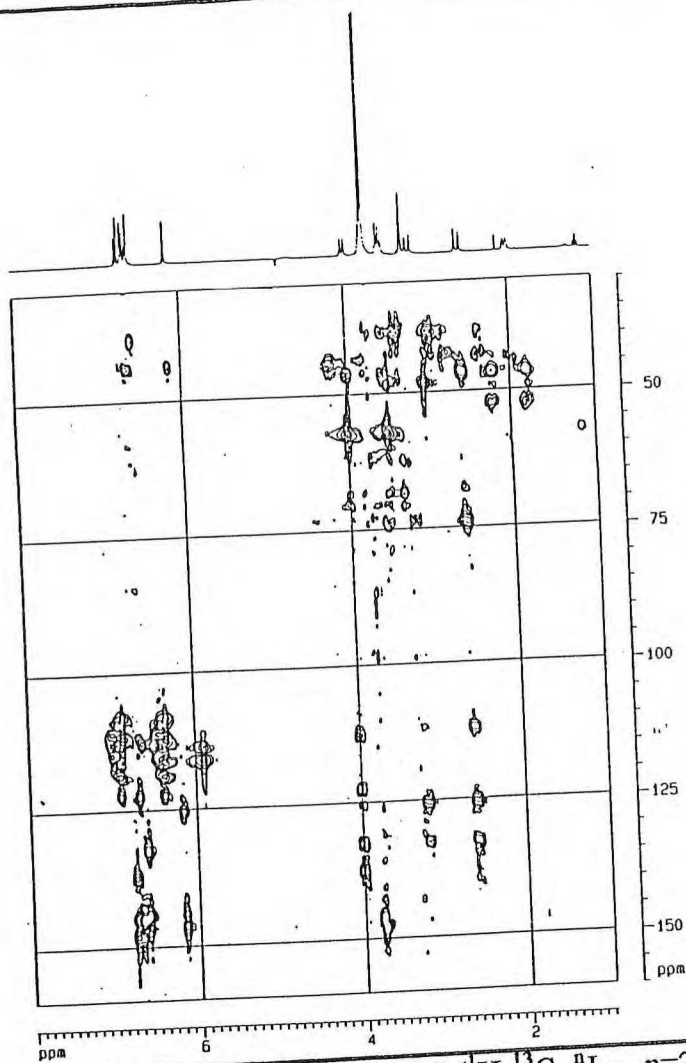
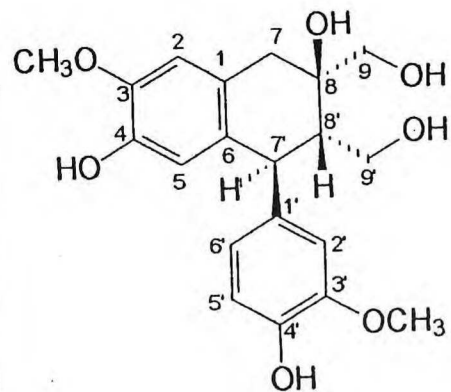


Figura27: Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HMBC (^1H - ^{13}C - $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3) (CD_3OD , 75Mz) de IAEA-K3(89)

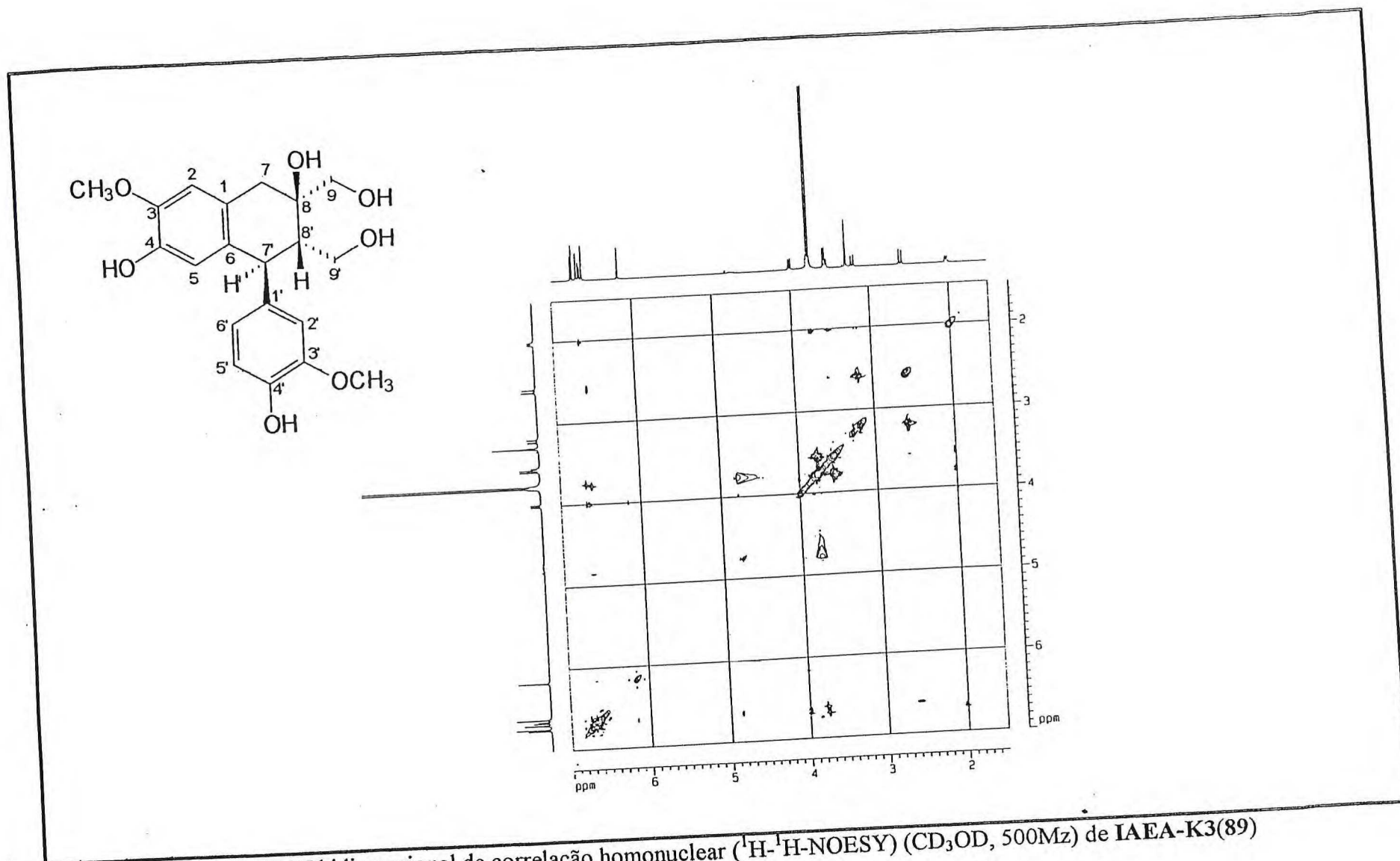


Figura28: Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear (^1H - ^1H -NOESY) (CD_3OD , 500Mz) de IAEA-K3(89)

File:MAR11 Ident:361_365 Win 1000PPM Acq:11-MAR-1999 14:21:50 +35:56 Cal:MAR11
AutoSpec EI+ Magnet BpM:57 BpI:201536 TIC:3169524 Flags:HALL

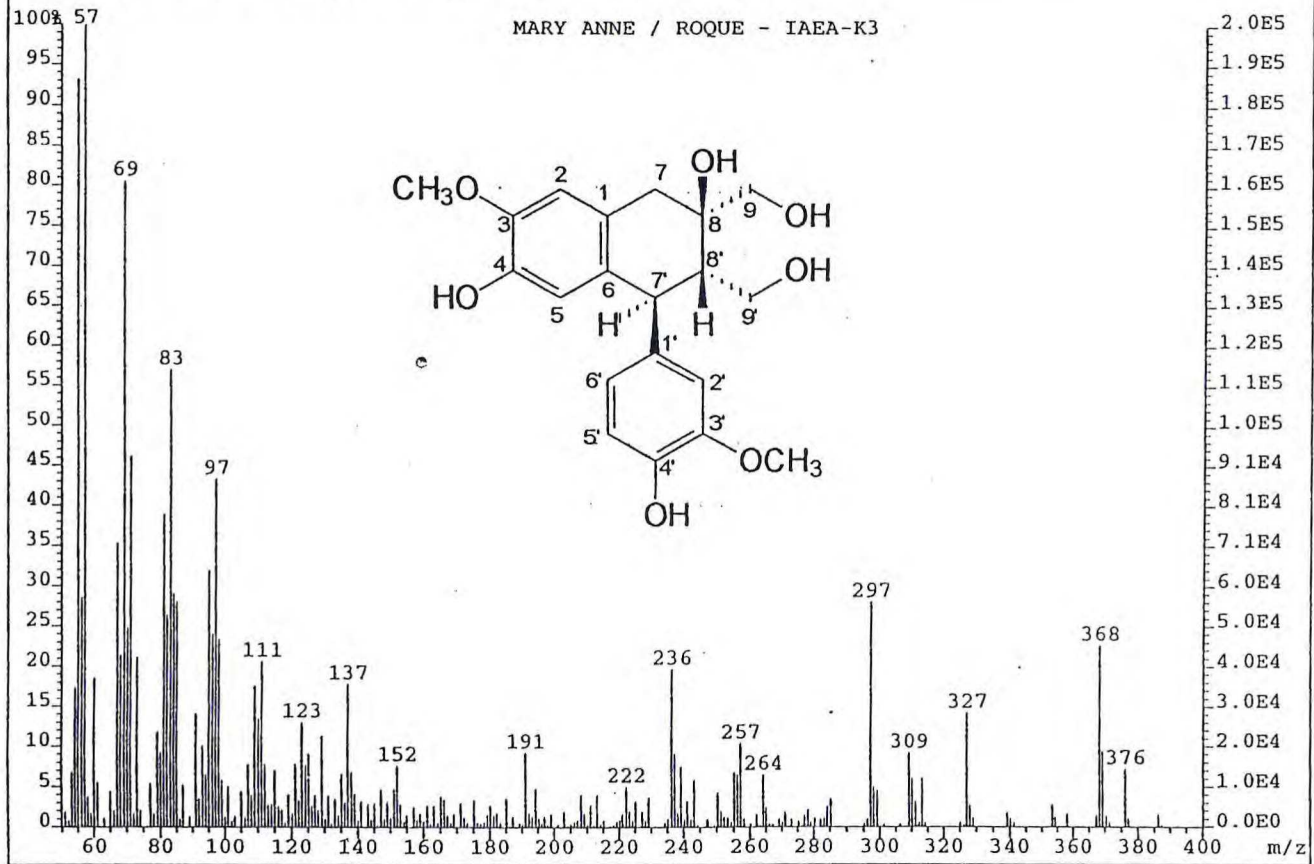


Figura29: Espectro de massas de IAEA-K3(89)

3.5. Determinação Estrutural de IAEA-K4(88)

A substância denominada IAEA-K4 foi isolada sob a forma de um sólido amarelado amorfo, solúvel em acetona, e com ponto de fusão 125-127^oC.

O espectro de RMN¹H (Fig.30, pág.68) apresentou sinais correspondentes a seis hidrogênios aromáticos em δ 7.15 (d, $J=1.5$, 1H), 6.93(d, $J=1.6$, 1H), 6.86(dd, $J=1.5$ e 8.0, 1H), 6.74(dd, $J=1.6$ e 8.0, 1H), 6.73(d, $J=8.0$, 1H) e 6.71(d, $J=8.0$, 1H). A multiplicidade dos sinais e os valores das constantes de acoplamento indicaram que os sinais pertenciam a dois anéis aromáticos 1,3,4-trissubstituído. Observou-se sinais relativos a dois hidrogênios metínicos em δ 2.31(dt, $J=7.5$ e 6.5, 1H) e 4.70(d, $J=7.5$, 1H); seis hidrogênios metilênicos em δ 3.02(d, $J=13.8$, 1H) e 2.92(d, $J=13.8$, 1H), δ 3.79(d, $J=8.9$, 1H) e 3.59(d, $J=8.9$, 1H), δ 3.84(m, 1H) e 3.75(m, 1H); dois grupamentos metoxila em δ 3.77(s, 3H) e 3.76(s, 3H) e ainda sinais em δ 7.48(sl, 1H), 7.38(sl, 1H), 3.96(t, $J=4.4$, 1H) e 3.67(s, 1H) posteriormente atribuídos a hidrogênios de hidroxilas.

O espectro de RMN¹³C-PND (Fig.31, pág.69) apresentou vinte linhas espectrais, que juntamente à análise do espectro RMN¹³C-DEPT (Fig.32, pág.70) permitiram a identificação dos carbonos e seus graus de hidrogenação. Foram observados sinais referentes a carbonos aromáticos em δ 148.07(C), 147.71(C), 146.54(C), 145.78(C), 135.73(C), 130.15(C), 122.80(CH), 119.22(CH), 114.39(CH), 114.30(CH), 114.00(CH) e 110.15(CH). Sinais correspondentes a carbonos-sp³ oxigenados foram verificados em δ 83.44(HC-O), 82.02(C-O), 76.68(H₂C-O), 59.60(H₂C-O) e o sinal superposto em 55.29(H₃C-O) relativos a duas metoxilas. Além desses, um sinal em δ 60.70 referente a carbono metínico desprotegido e outro em δ 39.34 correspondente a carbono metilênico.

Através dos espectros bidimensional de correlação homonuclear (¹H x ¹H-COSY, Fig.33, pág.71), heteronuclear- HMQC(¹H x ¹³C-COSY - ¹J_{CH}, Fig.34, pág.72) e heteronuclear a longa distância-HMBC(¹H x ¹³C-COSY- ⁿJ_{CH}, n=2 e 3, Fig.35, pág.73) foi possível estabelecer inequivocamente a correlação entre os hidrogênios e carbonos (Tabela 9, pág.66).

O espectro de massas(Fig.36, pág.74) apresentou o pico correspondente ao íon molecular (M⁺) em m/z 376 daltons, referente à fórmula molecular C₂₀H₂₄O₇. A análise desses dados e comparação com modelos da literatura, incluindo o lariciresinol(101)⁵²,

uma lignana não-hidroxilada no C-8', levou à proposição da estrutura (88) para IAEA-K4, uma lignana denominada olivil, inédita no gênero *Tabebuia*. Na tabela 10, pág.67, podem ser observados os dados espectroscópicos de IAEA-K4(88) em comparação com valores da literatura^{47,52}. Contudo, as absorções referentes aos carbonos aromáticos encontram-se invertidas na referência de número 47, visto que na análise do espectro de correlação heteronuclear a longa distância ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY - $^n\text{J}_{\text{CH}}$, n=2 e 3, Fig.35, pág.73) fica evidenciado o acoplamento entre o C-1' e os dois hidrogênios em C-7'(^2J), o H-2'(^2J), H-6'(^2J) e H-5'(^3J), o que não ocorreria se o referido anel aromático estivesse ligado ao C-7.

Para confirmar a estrutura proposta foi preparado o derivado acetilado de IAEA-K4(88), denominado IAEA-K4-Ac (88a). O espectro de absorção na região de infravermelho (Fig.37, pág.75) apresentou bandas em 3402 cm^{-1} ($\nu_{\text{O-H}}$), 1716 cm^{-1} correlacionada a $\nu_{\text{C=O}}$ de éster, e 1607 e 1517 cm^{-1} correspondentes a $\nu_{\text{C=C}}$.

O espectro de RMN¹³C-PND(Fig.38, pág.76) apresentou sinais de grupamentos acetato em δ 170.76, 169.04 e 168.98 correspondentes a três carbonilas e δ 20.82 e 20.65(sinais superpostos) relativos às três metilas. Quando comparados os deslocamentos químicos de ¹³C entre IAEA-K4(88) e IAEA-K4-Ac(88a) observou-se que a substituição da hidroxilas por grupamentos acetato provocaram um efeito de proteção em C-4, C-4' e C-8, e uma desproteção em C-1', C-3', C-5', C-1, C-3 e C-5. Esses efeitos são justificáveis, visto que C-3', C-5' C-3 e C-5(em posição *orto*) e C-1' e C-1(em posição *para*) encontram-se protegidos pela hidroxila em IAEA-K4, enquanto que a substituição no anel de um grupo hidroxila por um grupo acetato protege os carbonos aos quais está ligado, no caso C-4' e C-4.

O espectro bidimensional NOESY (Fig.39, pág.77) de IAEA-K4-Ac(88a) mostrou uma interação espacial entre H-7 e H-9a, H-9b, H-9'a; e também a proximidade espacial entre H-8 e H-2, H-6, H-9'b. Essas interações são consistentes com uma orientação *trans* entre H-7 e H-8, e uma orientação *cis* entre H-8 e HO-8', que estabelecem confirmam a estereoquímica da molécula. Os dados de RMN ¹H de IAEA-K4-Ac(88a) encontraram-se na Tabela 10, pág.67, e mostram-se similares ao citado pela literatura⁵³. O espectro de massas(Fig.40, pág.78) apresentou o pico correspondente ao íon molecular (M^+) em m/z 502 daltons, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_{10}$ do derivado triacetilado IAEA-K4-Ac(88a).

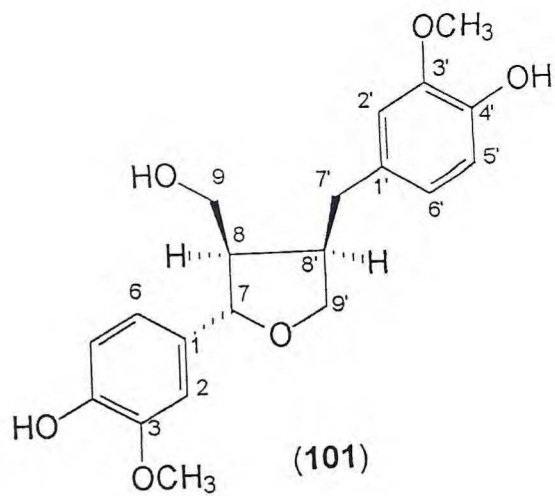
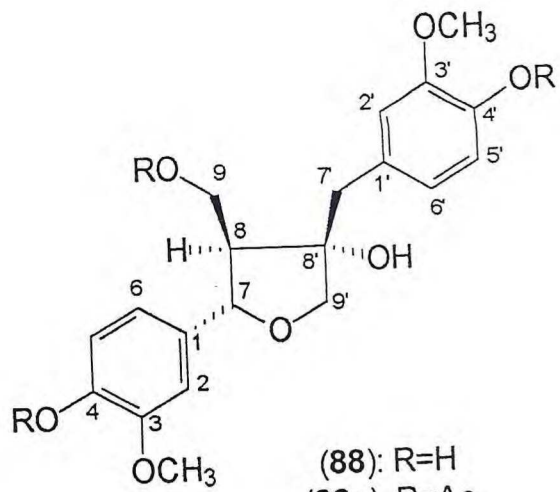


Tabela 9: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de IAEA-K4 (88) em acetona- d_6 .

<u>C</u>	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY- 1J		$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY- nJ		$^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY
	δ_C	$\delta_H, J(\text{Hz})$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	
1'	130.15	-	2H-7', H-6', H-2	H-5'	-
3'	147.71	-	H-2'	HO-4', MeO-3'	-
4'	145.78	-	HO-4'	H-2', H-6'	-
8'	82.02	-	2H-7', 2H-9', HO-8'	-	-
1	135.73	-	H-2, H-6	H-5	-
3	148.07	-	H-2	HO-4, MeO-3	-
4	146.54	-	HO-4		-
CH					
2'	114.00	6.93(d, $J=1.6$)	-	2H-7'	H-6'
5'	114.39	6.71(d, $J=8.0$)	-	-	H-6'
6'	122.80	6.74(dd, $J=1.6$ e 8.0)	-	2H-7', H-2'	H-2'e H-5'
2	110.15	7.15(d, $J=1.5$)	-	-	H-6
5	114.30	6.73(d, $J=8.0$)	-	-	H-6
6	119.22	6.86(dd, $J=1.5$ e 8.0)	-	H-2	H-2 e H-5
7	83.44	4.70 (d, $J=7.5$)	H-8	-	H-8
8	60.70	2.31(dt, $J=7.5$ e 6.5)	H-7, 2H-9	H-9'b	H-7 e 2H-9
CH₂					
7'	39.34	Ha: 3.02(d, $J=13.8$) Hb: 2.92(d, $J=13.8$)	-	-	H-7'b H-7'a
9'	76.68	Ha: 3.79(d, $J=8.9$) Hb: 3.59(d, $J=8.9$)	-	-	H-9'b H-9'a
9	59.60	Ha: 3.84(m) Hb: 3.75(m)	-	-	H-9b, H-8 H-9a, H-8
CH₃					
MeO-3'	55.29	3.77(s)	-	-	-
MeO-3	55.29	3.76(s)	-	-	-
HO-4'	-	7.38(sl)	-	-	-
HO-4	-	7.48(sl)	-	-	-
HO-8'	-	3.67(s)	-	-	-
HO-9	-	3.96(t, 4.4)	-	-	2H-9

Tabela 10: Dados de RMN¹H e ¹³C de IAEA-K4(88) em (CD₃)₂CO e CD₃OD⁴⁷, lariciresinol (101)⁵² e 88a⁵³ em CDCl₃.

C	δ _C (88)	δ _C (88) ⁴⁷	δ _C (101) ⁵²	δ _C (88a)	δ _H (88a)	δ _H (88a) ⁵³
C=O	-	-	-	170.7	-	-
C=O	-	-	-	169.0	-	-
C=O	-	-	-	168.9	-	-
1'	130.1	135.3	131.6	135.1	-	-
3'	147.7	148.5	146.9	151.1	-	-
4'	145.7	146.1	143.9	139.0	-	-
8'	82.0	82.5	42.1(CH)	81.2	-	-
1	135.7	130.4	133.7	140.5	-	-
3	148.0	149.0	146.9	151.3	-	-
4	146.5	147.1	145.1	139.4	-	-
CH						
2'	114.0	111.5	111.6	114.4	6.87(d, J=1.5)	6.90(d)
5'	114.3	115.6	114.6	122.6	6.95(d, J=8.0)	7.00(d)
6'	122.8	120.7	120.6	122.1	6.80(dd, J=1.5, 8.0)	6.83(dd)
2	110.1	115.2	108.7	110.3	7.09(d, J=1.7)	7.12(d)
5	114.3	115.7	114.4	122.8	6.96(d, J=8.1)	6.99(d)
6	119.2	123.8	118.1	118.4	6.91(dd, J=1.7, 8.0)	6.95(dd)
7	83.4	85.8	82.3	83.7	4.73(d, J=6.8)	4.76(dl, J=7.0)
8	60.7	61.9	52.2	56.6	2.57(dt, J=6.2, 6.8)	2.60(ddd, J=7.0)
CH₂						
7'	39.3	40.6	32.3	39.6	2.97(d, J=13.7), H-7'a 2.86(d, J=13.7), H-7'b	3.01(d, J=13.0) 2.89(d, J=13.0)
9'	76.6	77.9	72.1	77.5	3.87(d, J=9.5), H-9'a 3.72(d, J=9.5), H-9'b	3.91(d, J=11.5) 3.76(d, J=11.5)
9	59.6	60.7	59.1	62.4	4.37(dd, J=11.5, 6.2) 4.20(dd, J=11.5, 6.8)	4.39(dd, J=12.0) 4.23(dd, J=12.0)
CH₃						
MeO-3'	55.2	56.3	55.1	55.9	3.81(s)	3.83(s)
MeO-3	55.2	56.3	55.1	55.9	3.80(s)	3.83(s)
CH ₃ CO	-	-	-	20.6	2.29(s)	2.06(s)
CH ₃ CO	-	-	-	20.6	2.28(s)	2.06(s)
CH ₃ CO	-	-	-	20.8	2.03(s)	2.06(s)

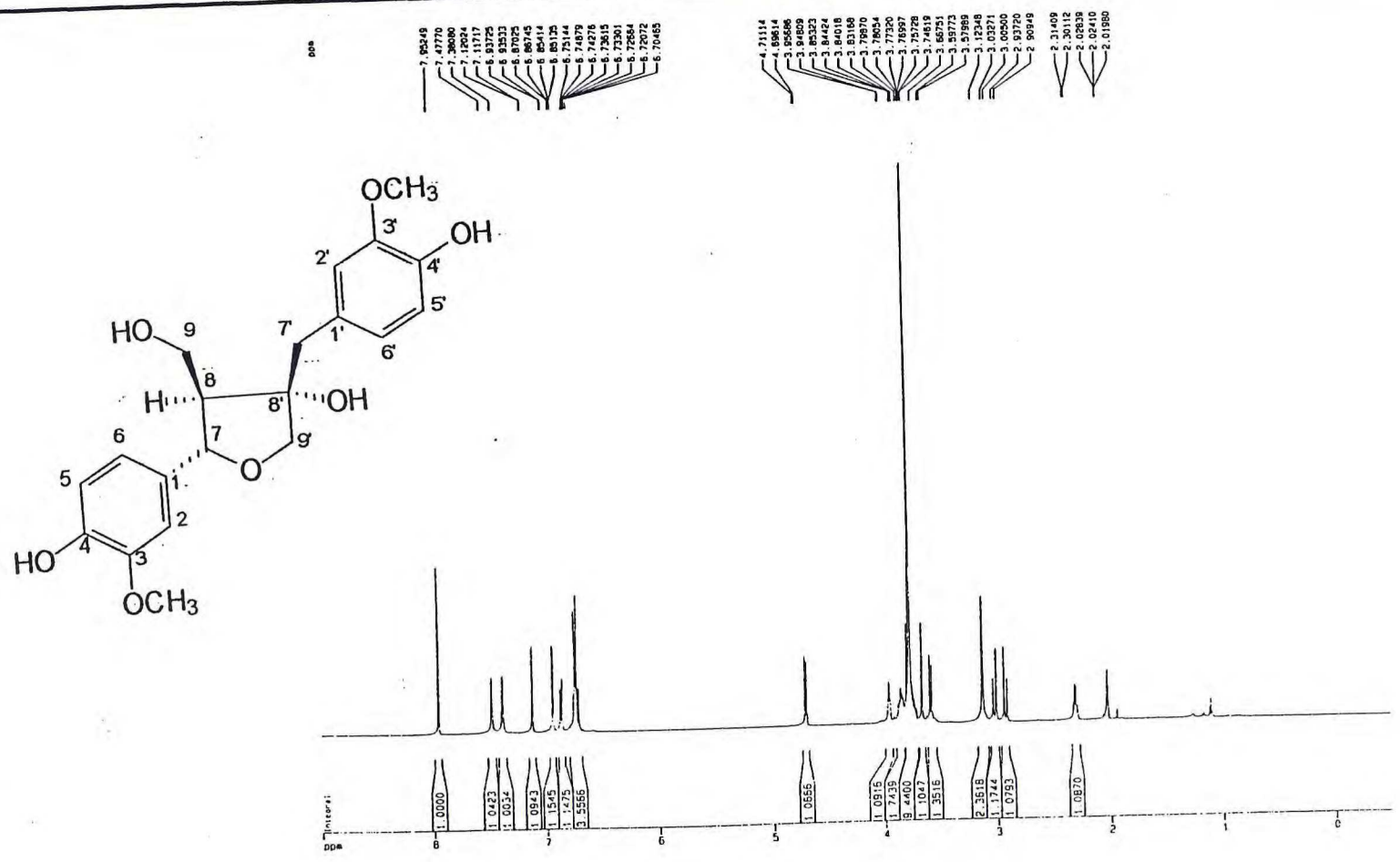


Figura 30: Espectro de RMN¹H (acetona-d₆, 500Mz) de IAEA-K4(88)

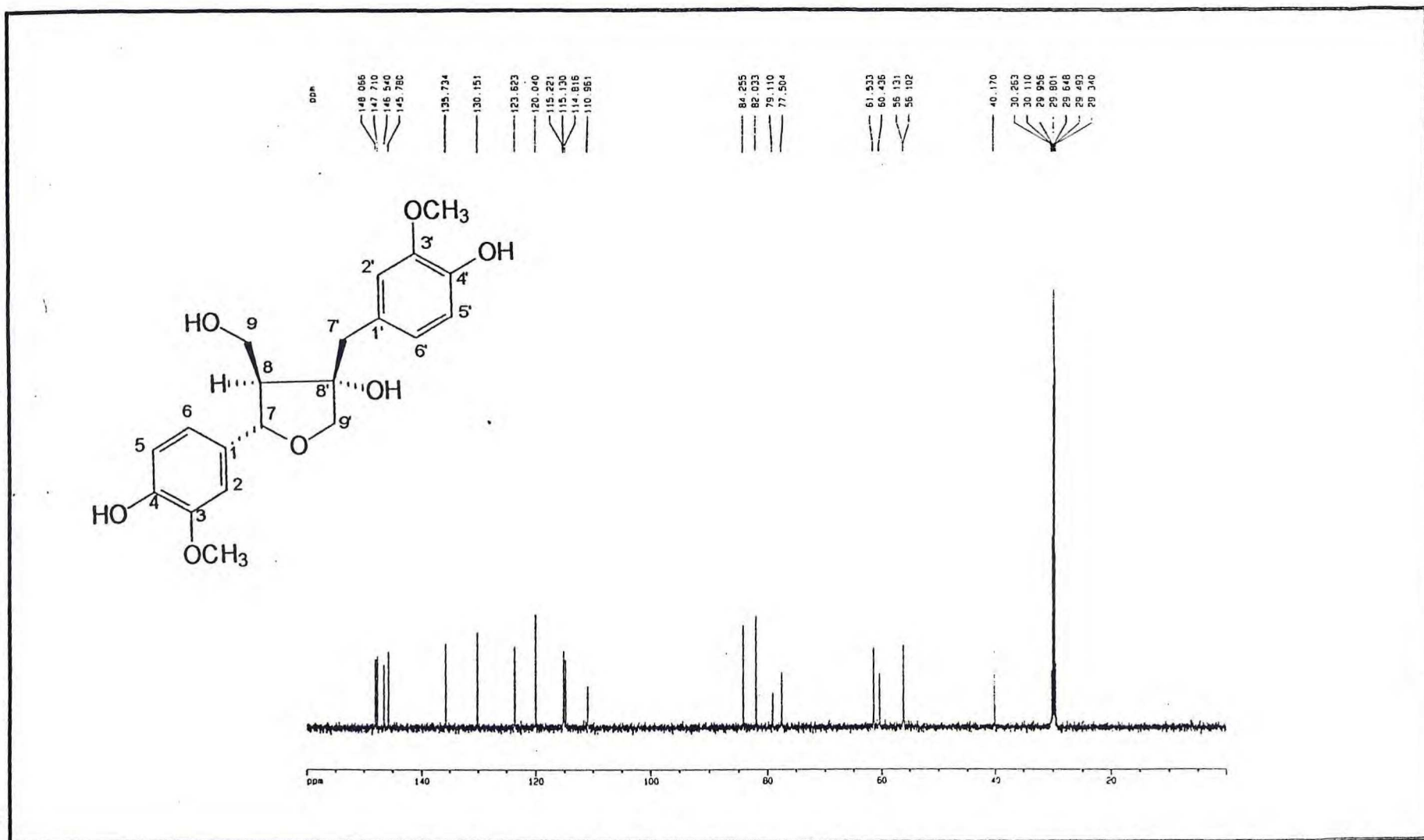


Figura 31: Espectro de RMN ^{13}C -PND (acetona-d₆, 125Mz) de IAEA-K4(88)

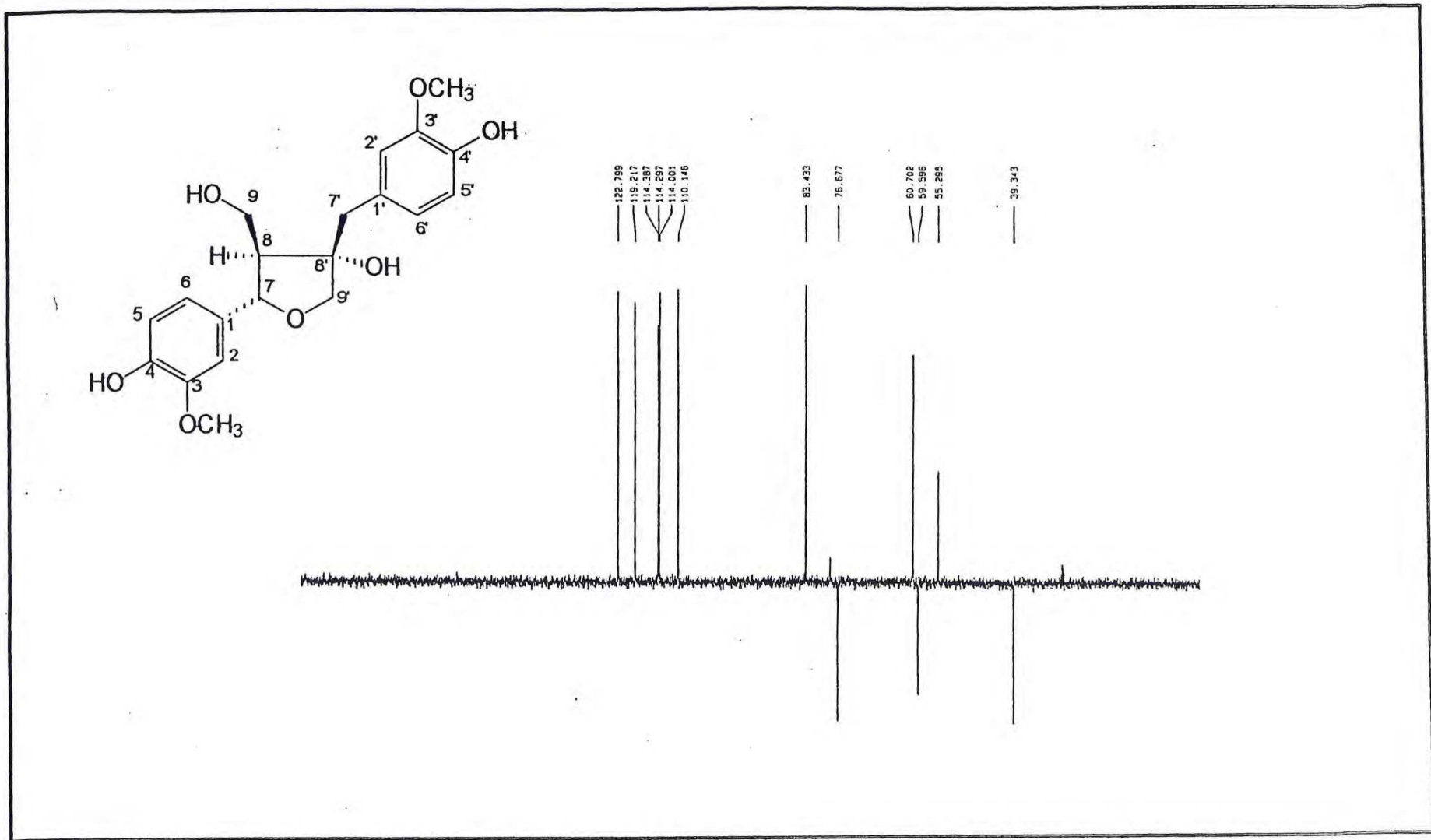


Figura 32: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT (acetona- d_6 , 125Mz) de IAEA-K4(88)

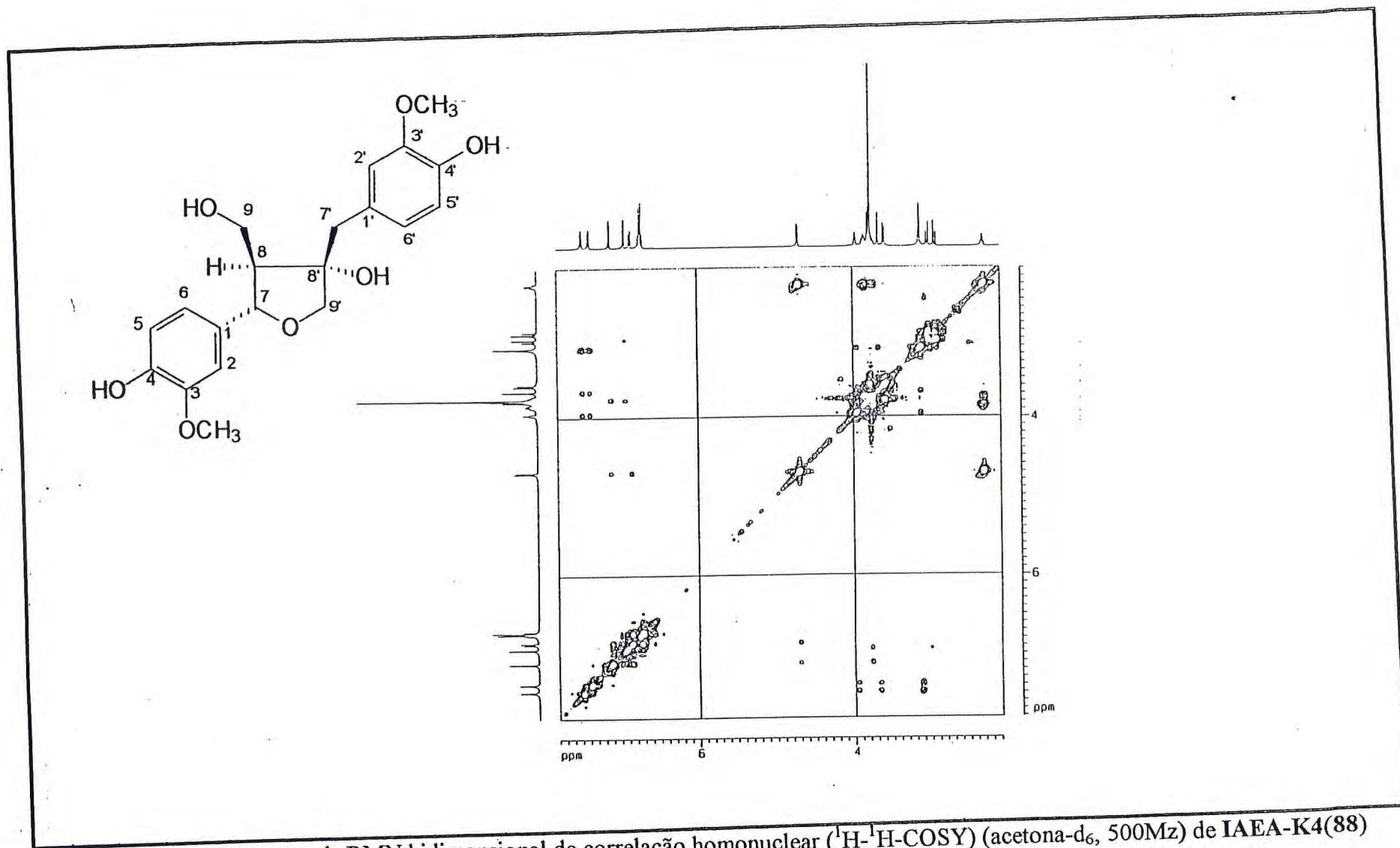


Figura 33: Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear (^1H - ^1H -COSY) (acetona- d_6 , 500Mz) de IAEA-K4(88)

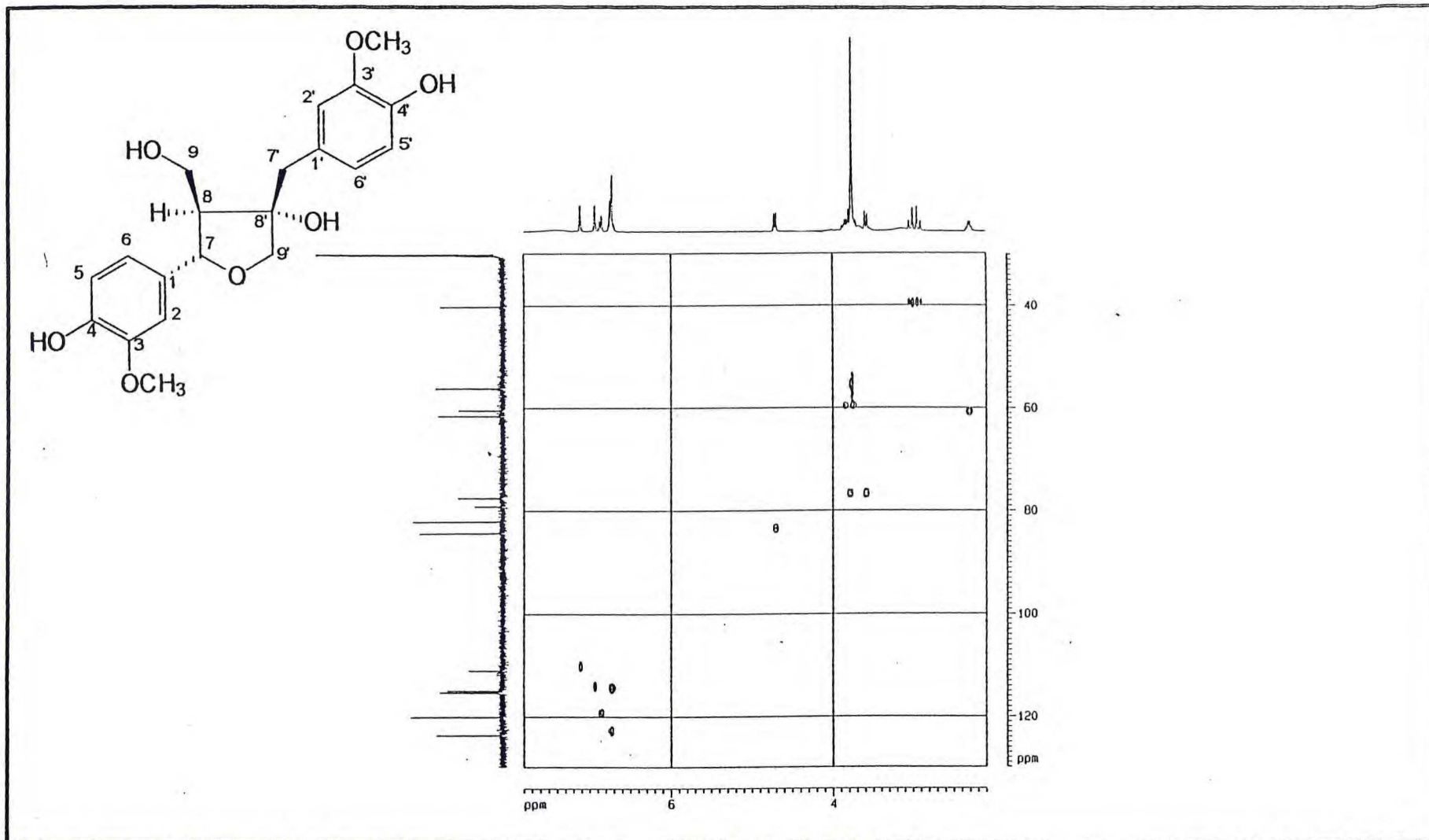


Figura 34: Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HMQC (^1H - ^{13}C - $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=1$) (acetona- d_6 , 75Mz) de IAEA-K4(88)

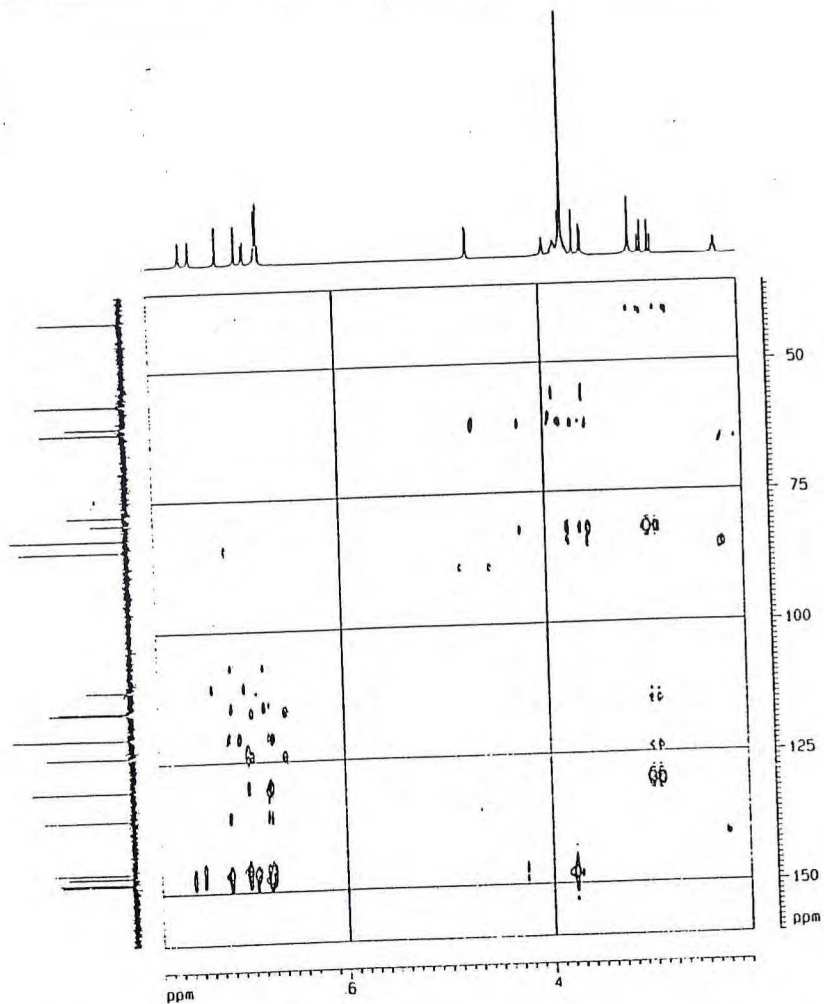
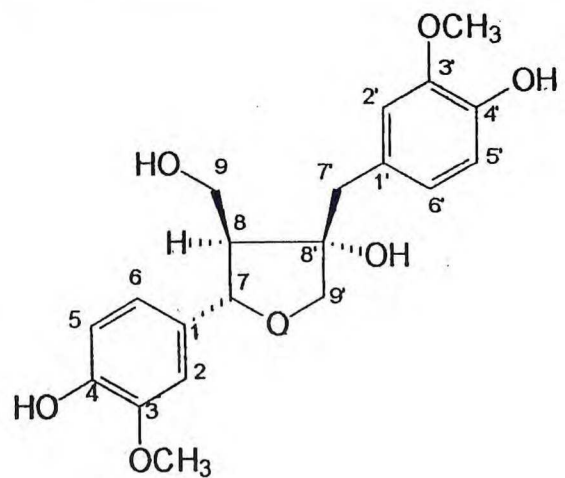


Figura 35: Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HMBC (¹H-¹³C-ⁿJ_{CH}, n=2 e 3) (acetona-d₆, 125Mz) de IAEA-K4(88)

File:MAR11 Ident:541_543 Win 1000PPM Acq:11-MAR-1999 14:21:50 +53:36 Cal:MAR11
AutoSpec EI+ Magnet BpM:138 BpI:4117846 TIC:27917444 Flags:HALL

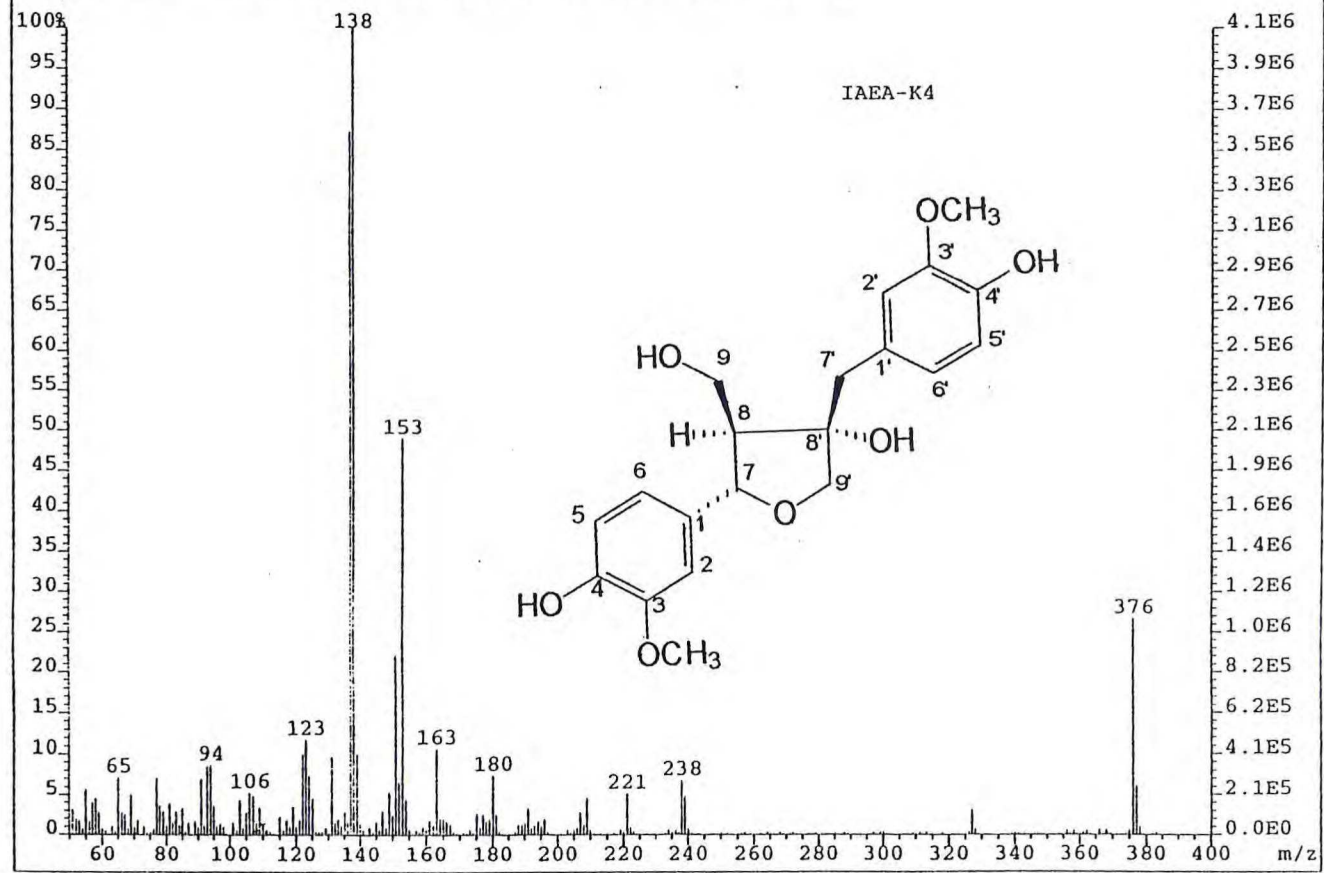


Figura 36: Espectro de massas de IAEA-K4(88)

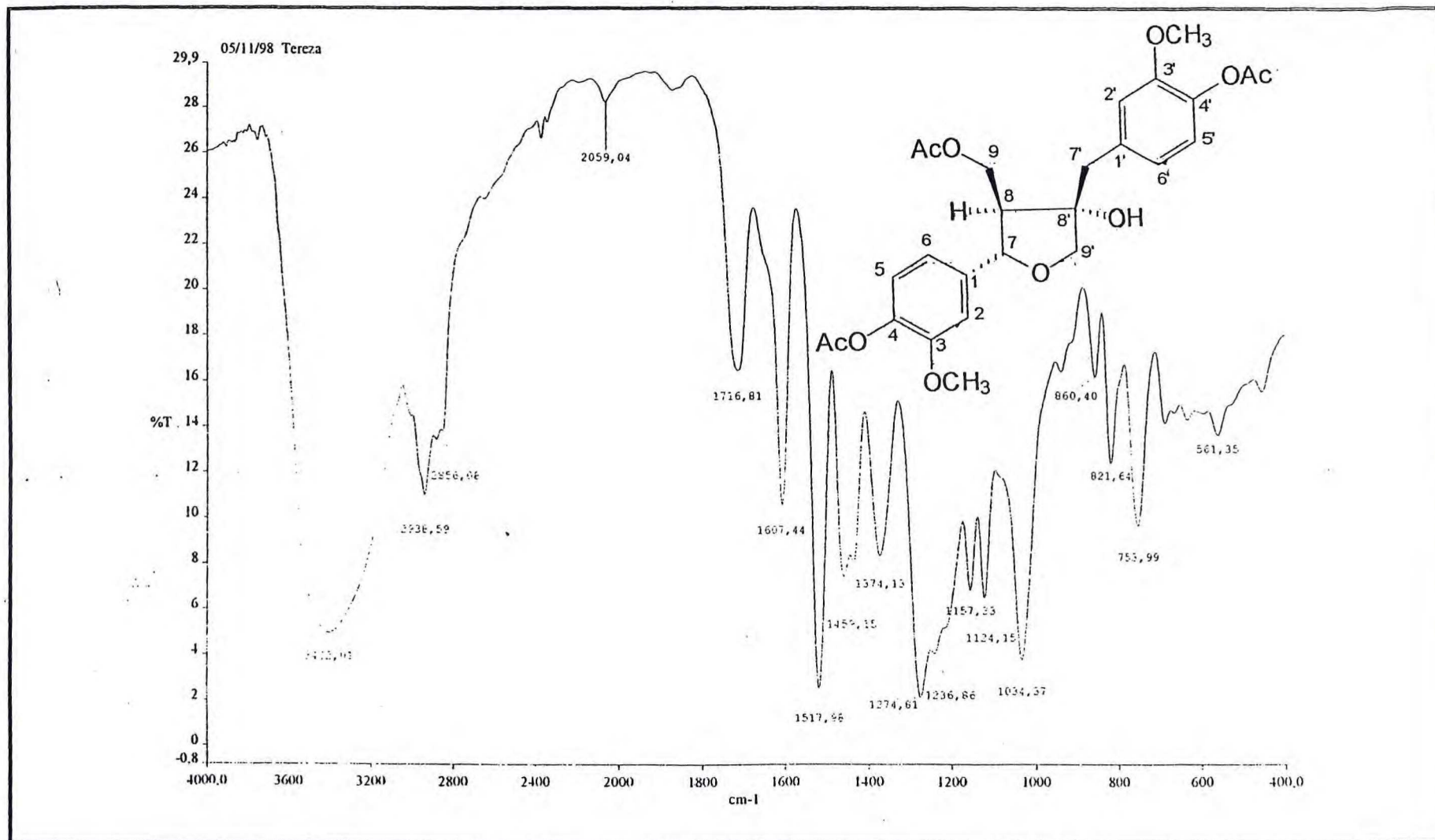


Figura 37: . Espectro na região do I.V. (filme) de IAEA-K4-Ac(88a)

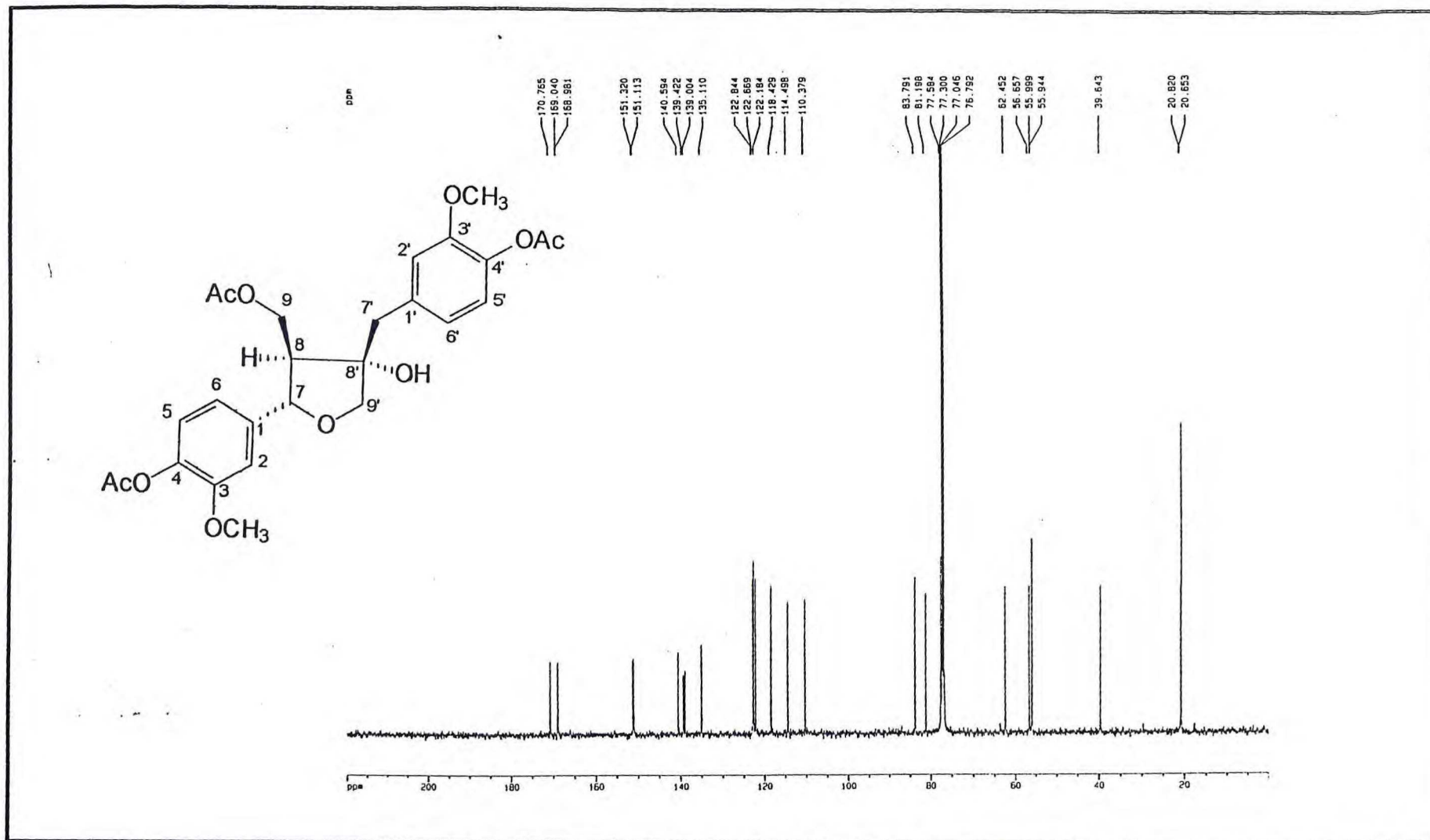


Figura 38: Espectro de RMN¹³C-PND (CDCl₃, 125Mz) de IAEA-K4-Ac(88a)

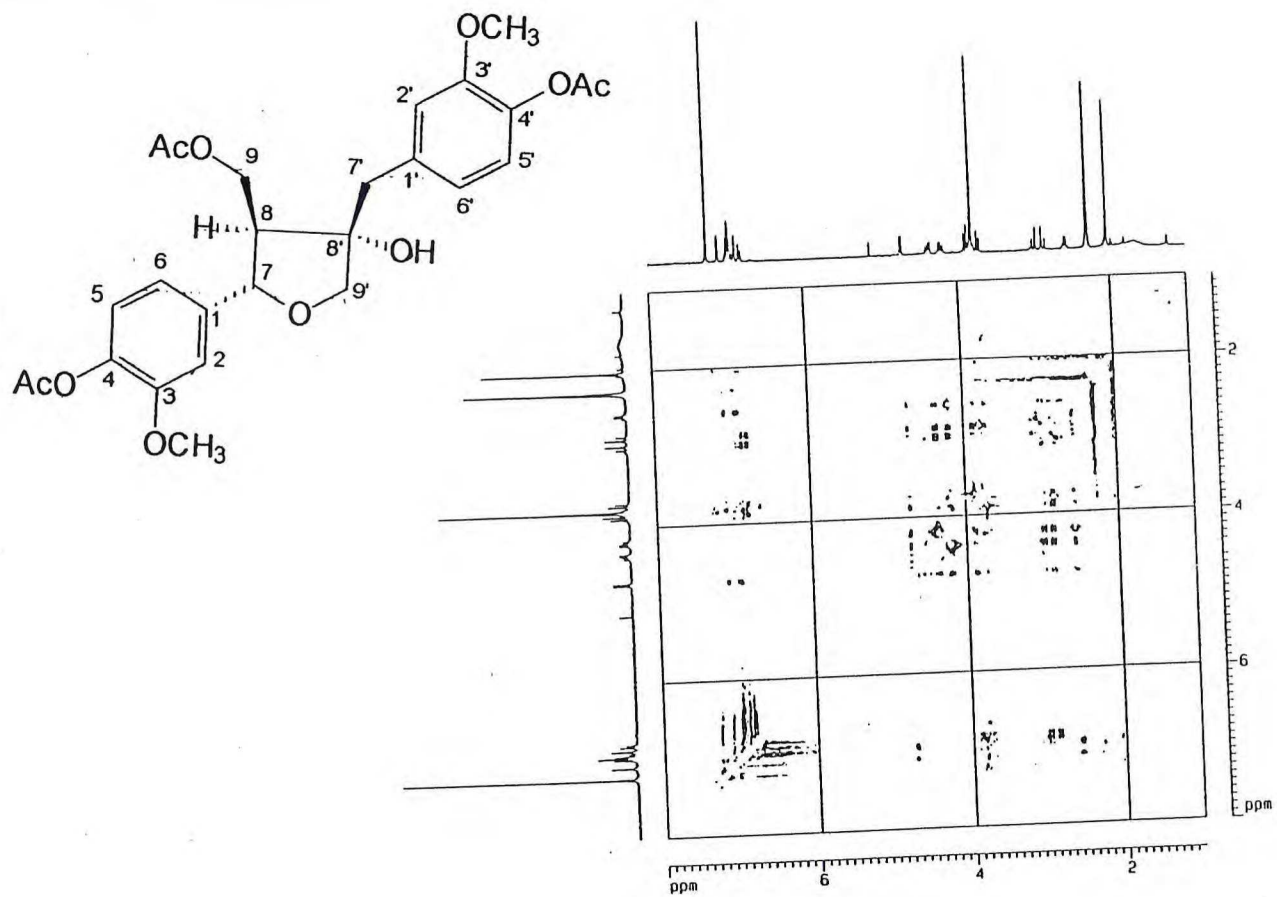


Figura 39: Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear (¹H-¹H-NOESY) (CDCl₃, 300Mz) de IAEA-K4-Ac(88a)

File:MAR11 Ident:230 Acq:11-MAR-1999 14:21:50 +22:48 Cal:MAR11
AutoSpec EI+ Magnet BpI:383111 TIC:3490083 Flags:HALL

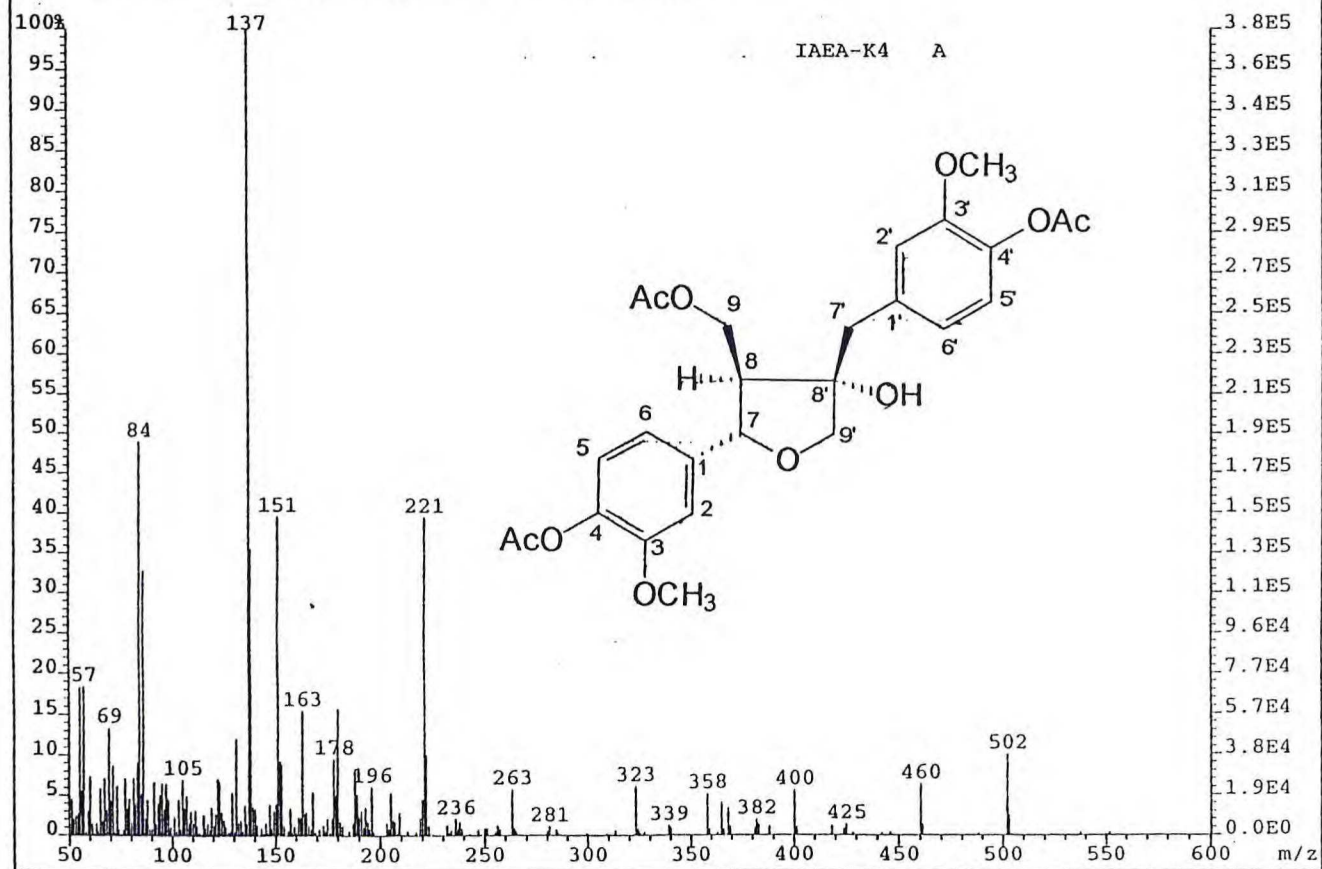


Figura 40: Espectro de massas de IAEA-K4-Ac(88a)

3.6. Determinação Estrutural de IAEE-K1-Ac(91a)

A substância denominada IAEE-K1-Ac foi obtida a partir da acetilação da fração IAEE(43-55)(74-75)(12-14) e purificação por cromatografia. Apresentou-se como um óleo amarelo escuro, solúvel em clorofórmio.

O espectro de absorção na região de infravermelho (Fig.41, pág.84) apresentou bandas em 3486, 1737, 1689, 1640, 1516, 1144 e 1027 cm^{-1} .

O espectro de RMN¹H (Fig.42, pág.85) apresentou sinais em δ 7.59 (d, $J=1.5$, 1H), 7.56 (dd, $J=8.2$ e 1.5 , 1H) e 7.05(d, $J=8.2$, 1H) atribuídos a um sistema aromático 1,3,4-trissubstituído. Sinais correlacionados a uma porção glicosídica foram observados em δ 3.75(m, 1H), 4.10(dd, $J=10.2$ e 2.1 , 1H), 4.38(dd, $J=7.6$ e 4.7 , 1H), 4.90(t, $J=8.3$, 1H), 4.90(d, $J=8.3$, 1H) e 5.08(t, $J=9.5$). Na região entre δ 1.86-1.97 verificou-se a presença de seis singletos, relativos a grupamentos metilas de acetato e um singlete em δ 1.55 de metila ligada a carbono tetrassubstituído. Foram ainda observados os sinais para uma metoxila em δ 3.87(s, 3H), dois hidrogênios metilênicos em δ 2.20(dl, $J=15.5$, 1H) e 2.42(dd, $J=15.5$ e 4.6), quatro hidrogênios metínicos em δ 2.96(dl, $J=8.3$, 1H), 2.92(dl, $J=8.3$, 1H), 5.14(d, $J=5.1$, 1H) e 5.83(sl), sendo os dois últimos sinais relativos a hidrogênios ligados a carbonos oxigenados. Sinais correlacionados a hidrogênios olefínicos foram observados em δ 6.19(dd, $J=6.5$ e 2.0 , 1H) e 4.74(d, $J=6.5$, 1H). A análise do espectro bidimensional de correlação homonuclear (¹H x ¹H-COSY, Fig.43, pág.86) confirmou o acoplamento *cis* ($J=6.5$) entre os hidrogênios olefínicos além de um acoplamento alílico ($J=2.0$) entre os hidrogênio em δ 6.19 e δ 2.92; acoplamento entre o hidrogênio metínico em δ 5.83 com o hidrogênio em δ 2.96. Os demais acoplamentos podem ser observados na tabela 11, pág.82.

Os espectros de RMN¹³C-PND (Fig.44, pág.87) e DEPT-135(Fig.45, pag.88) apresentaram sinais típicos de um grupo glicopiranosídico com deslocamentos químicos em δ 61.90(CH₂), 68.45(CH), 70.68(CH), 72.09(CH), 72.68(CH) e 95.77(CH) correspondente ao carbono anomérico. Foram observados sete sinais de carbonos carbonílicos entre δ 165.25-170.83, sendo seis correlacionados a grupos acetato e um atribuído a carbonila de éster aromático (δ 165.25). Os sinais de carbonos aromáticos apresentaram-se em δ 151.19(=C-O), 143.83(=C-O), 128.90(C), 122.73(CH),

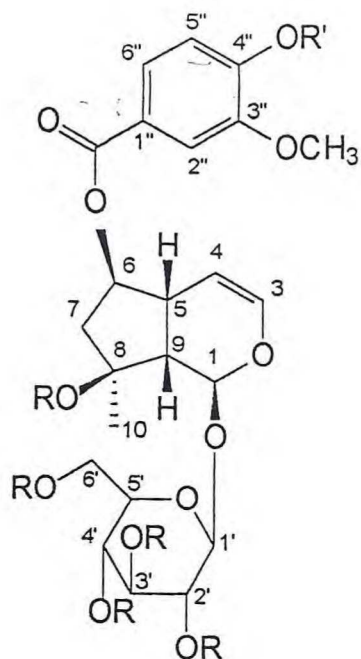
122.61(CH) e 113.50(CH). A análise desses dados juntamente aos deslocamentos químicos e multiplicidade dos hidrogênios aromáticos levou à conclusão de que o anel aromático encontrava-se acilado na posição 4 e substituído por uma metoxila na posição 3, o que justifica a proteção do carbono em δ 113.50, situado em posição *orto* ao carbono metoxilado. Os demais sinais observados foram correlacionados a um carbono quaternário oxigenado (δ 87.39), um carbono metínico mono-oxigenado (δ 78.83), um carbono hemiacetálico (δ 92.93), dois carbonos metínicos não-oxigenados (δ 48.44 e 38.11), dois carbonos olefínicos, sendo um deles oxigenado (δ 140.68 e 102.70), um carbono metilênico (δ 45.44) e um carbono metílico (δ 22.18).

Através do espectro bidimensional de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C -HMQC, Fig.46, pág.89) foram estabelecidos corretamente os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono (Tabela 11, pág.82). A análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância (^1H - ^{13}C -HMBC, $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3 , Fig.47, pág.90), juntamente com os demais dados observados e comparação com valores da literatura (Tabela 12, pág.83) citados para o 3,4-dimetoxi-benzoil-ajugol (102)³², levou à proposição da estrutura (91a) para IAEE-K1-Ac, denominado 8,2',3',4',6', 4''-hexaacetoxi-3''-metoxi-bezoil-ajugol.

O composto trata-se, portanto, de um iridóide oxigenado nas posições C-8 e C-6 do anel ciclopentano, sendo em C-6 o sítio de acilação onde se encontra o éster aromático. A localização da porção glicosídica no C-1 ficou caracterizada pelo deslocamento químico de C-1 (δ 92.93), H-1 (δ 5.83, 1H) e ainda pelo acoplamento a longa distância ($^3\text{J}_{\text{CH}}$) entre o C-1 do iridóide e o H-1' da glicose.

Para assegurar as configurações relativas dos carbonos foram feitos experimentos de ROESY (Fig.48, pág.91), onde foram observadas interação entre os hidrogênios da metila H-10 com H-1 e H-7a. O H-7a interage com o H-6, mostrando uma relação *cis* entre eles. Essas observações mostram que H-10, H-1, H-7a e H-6 estão localizados numa mesma face da molécula, a face alfa, assumindo a usual estereoquímica C-1, C-6, C-5. A ausência de interação entre H-10 e H-9 confirmam a esperada relação *cis* entre H-9 e H-5, na junção do anel, enquanto que a interação entre H-1 e H-1' comprovam a substituição em posição β no C-1 e C-1'. Com esses dados tornou-se possível assegurar a configuração relativa proposta para a estrutura (91a). A

substância não-acetilada original na planta corresponderia ao 4''-hidroxi-3''-metoxibenzoil-ajugol(91).



- (91): R=R'=H
(91a): R=R'=Ac
(102): R=H; R'=Me

Tabela 11: Dados de RMN¹H e ¹³C de IAEE-K1-Ac (91a) em CDCl₃.

C	δ_C	¹ H x ¹³ C-COSY- ¹ J		¹ H x ¹³ C-COSY- ⁿ J	
		$\delta_H, J(\text{Hz})$	² J _{CH}	³ J _{CH}	
6(Ac)	168-170	-			
C=O	165.25	-		H-2'', H-6	
3''	151.19	-		H-5'', CH ₃ O	
4''	143.83	-		H-2'', H-5''	
1''	128.90	-	H-2''	H-5''	
8	87.39	-	H-9, H-7a, H-10	H-1, H-6	
CH					
3	140.68	6.19 (dd, J=6.5 e 2.0)		H-1, H-5	
5''	122.73	7.05 (d, J=8.2)			
6''	122.61	7.56 (dd, J=8.2 e 1.5)		H-2''	
2''	113.50	7.59 (d, J=1.5)		H-6''	
4	102.70	4.76 (dl, J=6.5)	H-3	H-9, H-6	
1'	95.77	4.90 (d, J=8.2)	H-2'	H-1	
1	92.93	5.83 (sl)	H-3, H-9	H-1'	
6	78.83	5.14 (d, J=5.1)	H-5, H-7a	H-4	
2'-5'	62-72	5.0-5.2			
9	48.44	2.96 (dl, J=8.3)		H-7a	
5	38.11	2.92 (dl, J=8.3)	H-9	H-7a	
CH₂					
6'	61.90	H _a : 4.10 (dd, J=10.2 e 2.1) H _b : 4.38 (dd, J=7.6 e 4.7)			
7	45.44	H _a : 2.20 (dl, J=15.5) H _b : 2.42 (dd, J=15.5 e 4.6)		H-5, H-10	
CH₃					
10	22.18	1.55(s)			
6(CH₃CO)	20-22	1.8-2.0(s)			
CH₃CO	21.20	2.31(s)			
CH₃CO	20.80	2.08(s)			
CH₃CO	20.80	2.02(s)			
CH₃CO	20.80	1.98(s)			
CH₃CO	20.68	1.97(s)			
OMe	56.22	3.87(s)			

Tabela 12: Dados de RMN¹H e ¹³C de IAEE-K1-Ac(91a) em CDCl₃ e comparação com dados da literatura para o composto (102)³² em d₅-piridina.

¹ H x ¹³ C-COSY- ¹ J				
C	δ _C (91a)	δ _H (91a), J(Hz)	δ _C (102) ³²	δ _H (102) ³² , J(Hz)
C=O(Ac)	170.8	-	-	-
C=O(Ac)	170.5	-	-	-
C=O(Ac)	170.3	-	-	-
C=O(Ac)	169.4	-	-	-
C=O(Ac)	169.1	-	-	-
C=O(Ac)	168.4	-	-	-
C=O	165.2	-	166.3	-
3''	151.1	-	154.0	-
4''	143.8	-	*	-
1''	128.9	-	*	-
8	87.3	-	77.8	-
CH				
3	140.6	6.19 (dd, J=6.5 e 2.0)	140.6	6.46(dd, J=6.3 e 1.9)
5''	122.7	7.05 (d, J=8.2)	111.4	6.99(d, J=8.7)
6''	122.6	7.56 (dd, J=8.2 e 1.5)	124.2	7.93(dd, J=8.7 e 1.9)
2''	113.5	7.59 (d, J=1.5)	113.2	7.86(d, J=1.9)
4	102.7	4.76 (dl, J=6.5)	104.2	5.20(dd, J=6.3 e 2.5)
1'	95.7	4.90 (d, J=8.2)	99.9	5.43(d, J=7.8)
1	92.9	5.83 (sl)	93.1	6.18(d, J=1.9)
6	78.8	5.14 (d, J=5.1)	79.8	5.34(td, J=5.3 e 2.4)
3'	72.6	5.22 (t, J=9.5)	78.5	4.41(t, J=8.7)
5'	72.0	3.75 (m)	78.7	3.96(m)
2'	70.6	4.99 (t, J=8.3)	74.9	4.08(t, J=8.7)
4'	68.4	5.08 (t, J=9.5)	71.5	4.35(t, J=9.2)
9	48.4	2.96 (dl, J=8.3)	51.4	3.19(dd, J=9.2 e 2.4)
5	38.1	2.92 (dl, J=8.3)	38.8	3.25(m)
CH₂				
6'	61.9	Ha: 4.10 (dd, J=10.2 e 2.1) Hb: 4.38 (dd, J=7.6 e 4.7)	62.5	Ha: 4.41(dd, J=11.7 e 4.8) Hb: 4.48(dd, J=11.7 e 1.9)
7	45.4	Ha: 2.20 (dl, J=15.5) Hb: 2.42 (dd, J=15.5 e 4.6)	48.0	2.49(d, J=5.8)
CH₃				
10	22.1	1.55(s)	26.3	1.70(s)
CH ₃ CO	22.0	1.86(s)	-	-
CH ₃ CO	21.2	2.31(s)	-	-
CH ₃ CO	20.8	2.08(s)	-	-
CH ₃ CO	20.8	2.02(s)	-	-
CH ₃ CO	20.8	1.98(s)	-	-
CH ₃ CO	20.6	1.97(s)	-	-
OMe	56.2	3.87(s)	55.9	3.79(s)
OMe	-	-	55.9	3.75(s)

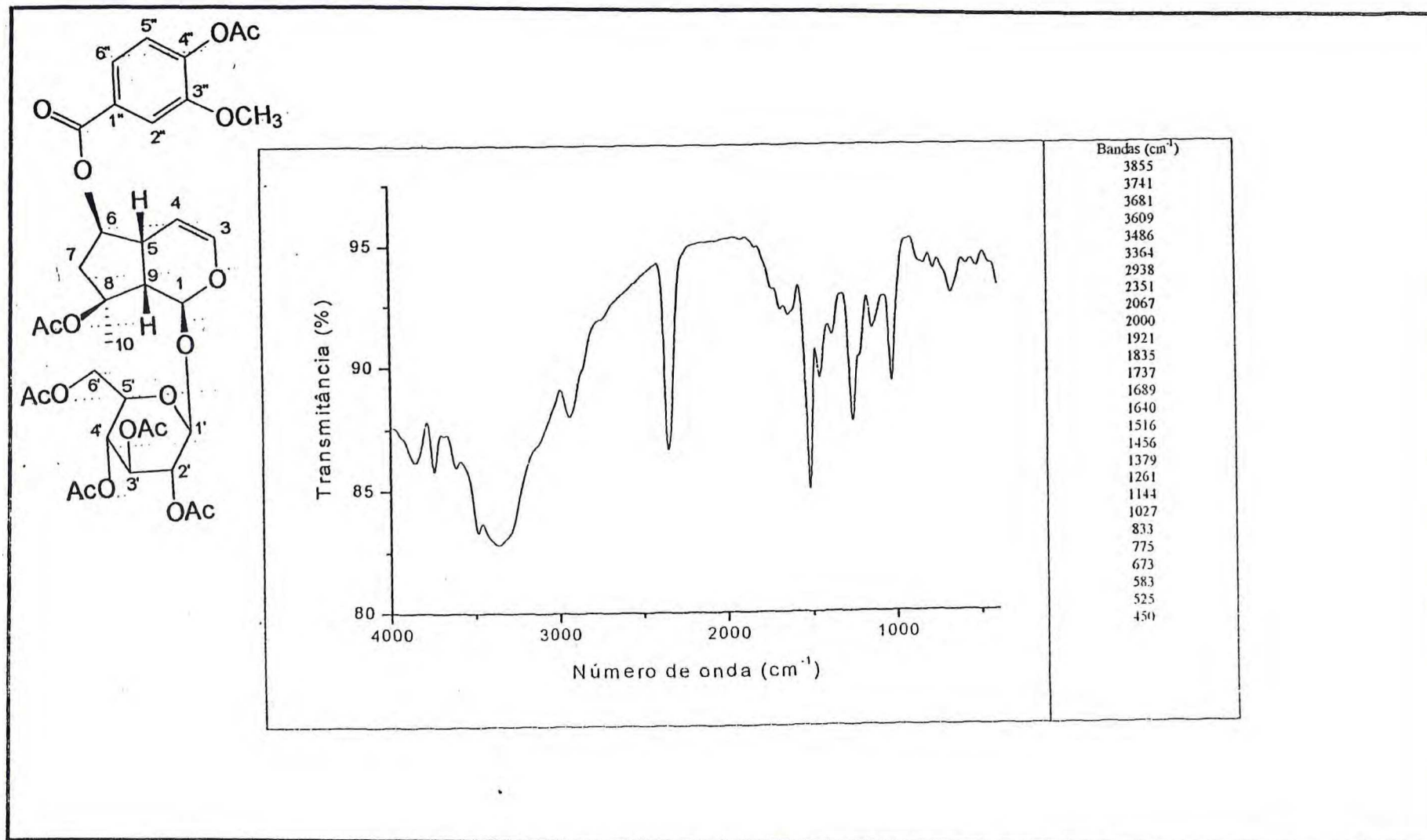


Figura 41: Espectro na região do I.V. (filme) de IAEE-K1-Ac(91a)

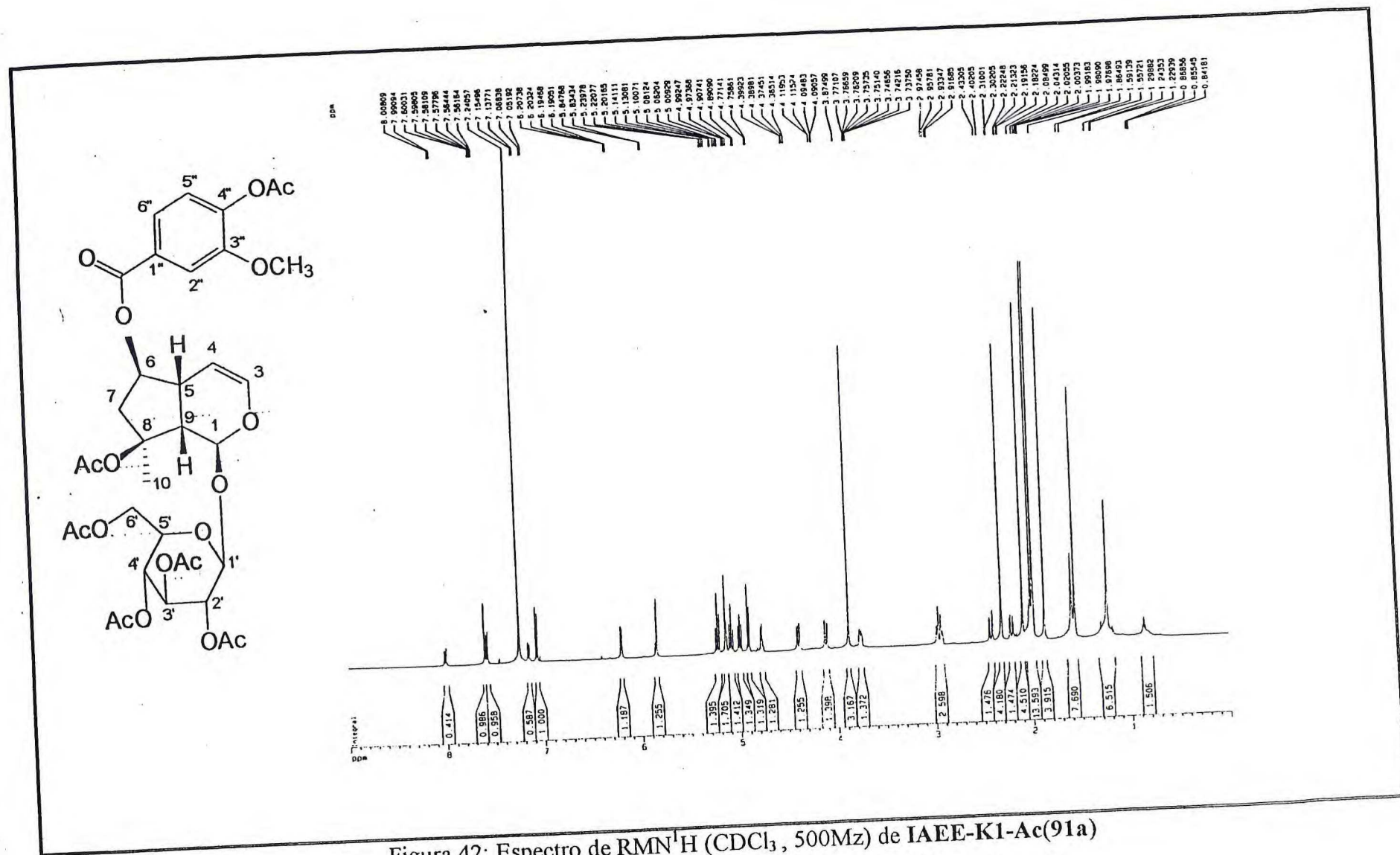


Figura 42: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500Mz) de IAEE-K1-Ac(91a)

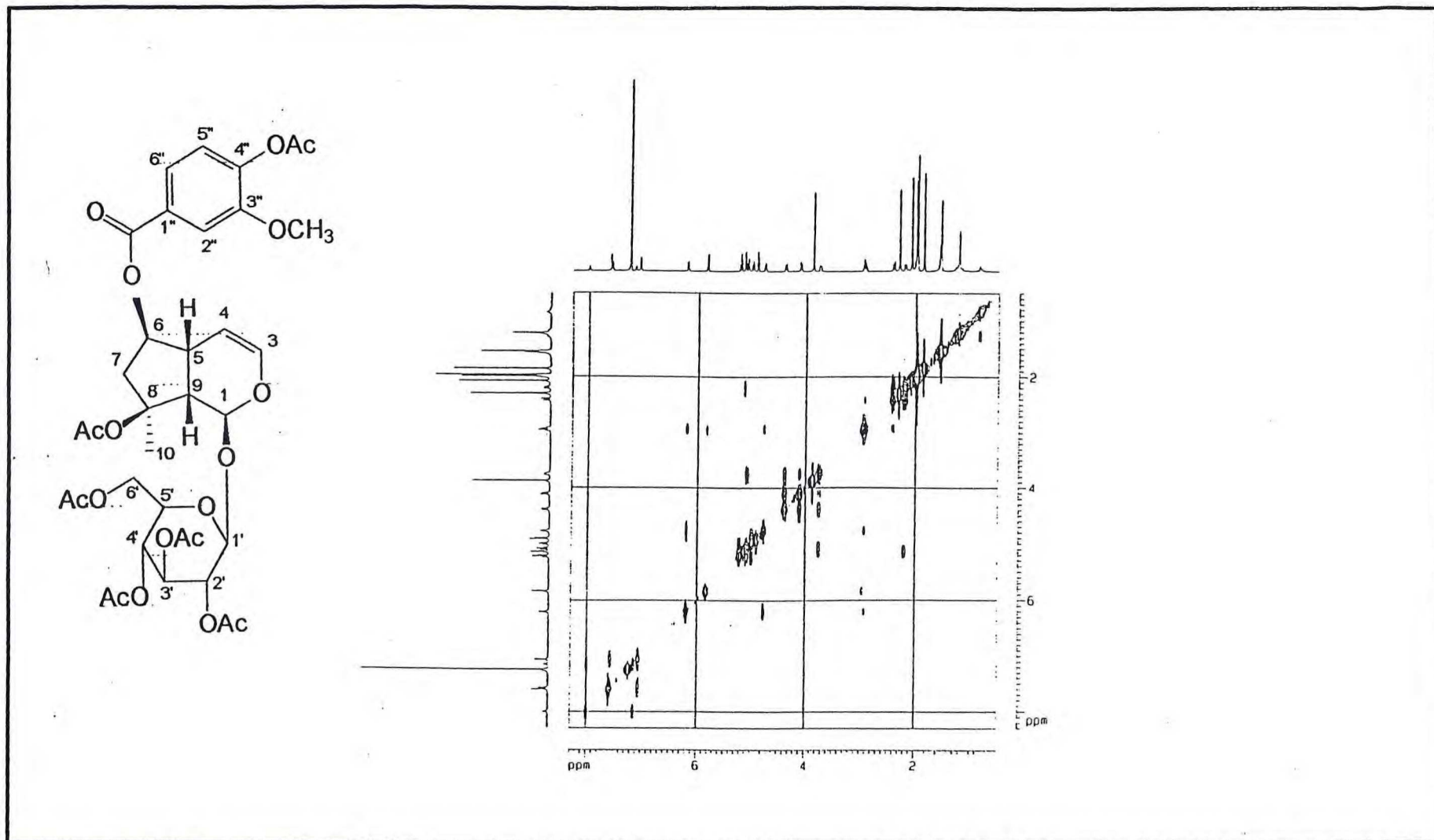


Figura 43: Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear (^1H - ^1H -COSY) (CDCl_3 , 500Mz) de IAEE-K1-Ac(91a)

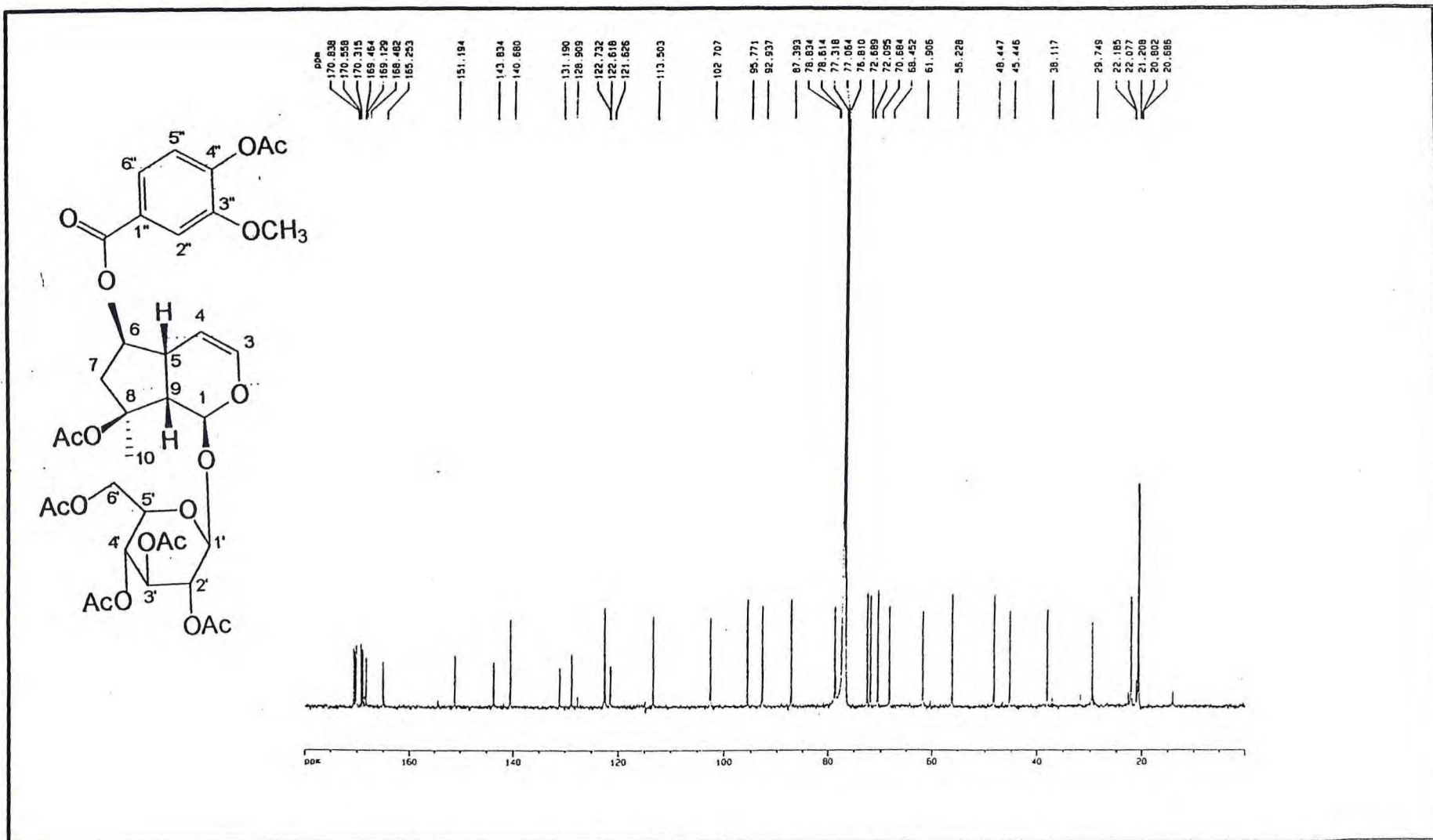


Figura 44: Espectro de RMN¹³C-PND (CDCl₃, 125Mz) de IAEE-K1-Ac(91a)

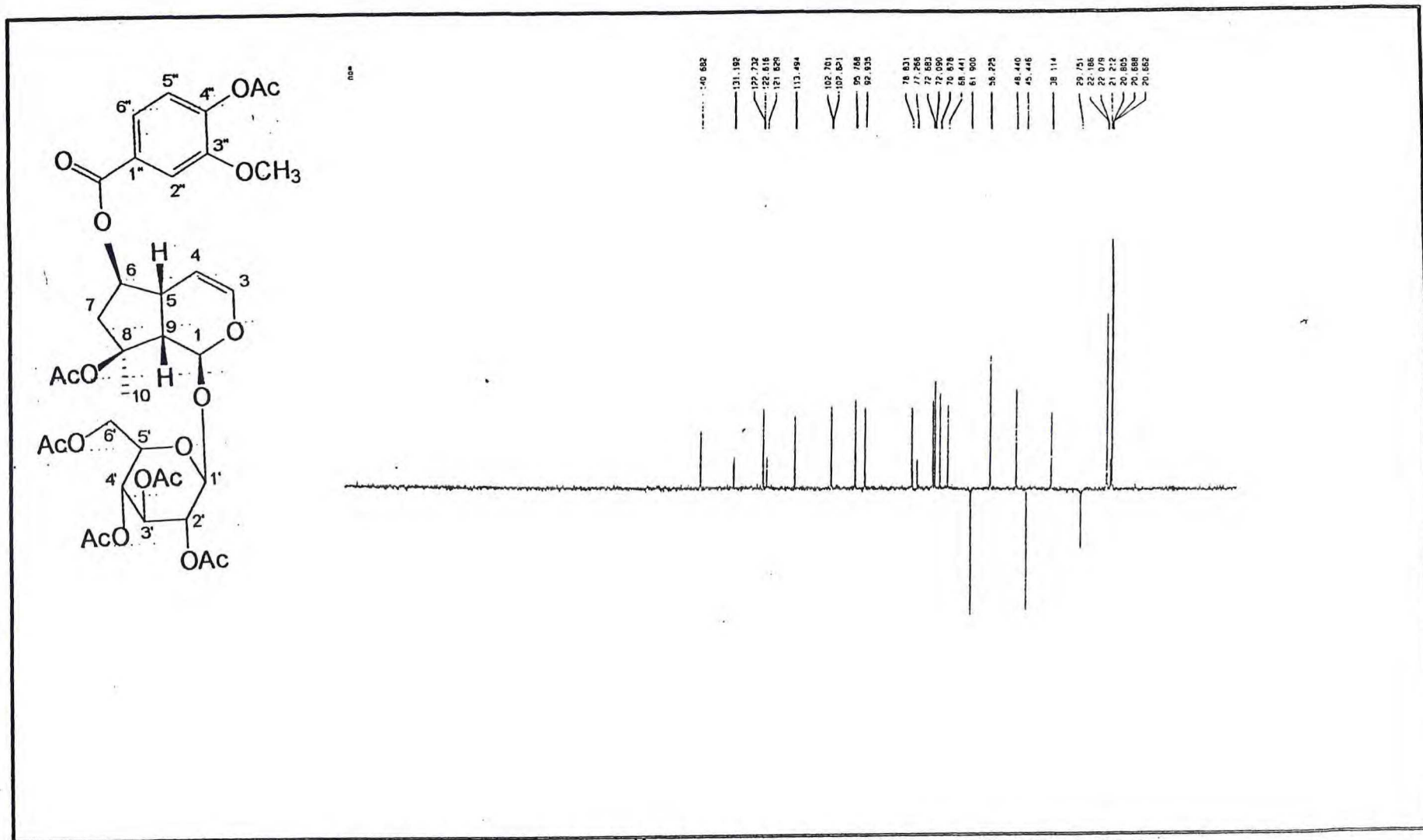


Figura 45: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT (CDCl_3 , 125Mz) de IAEE-K1-Ac(91a)

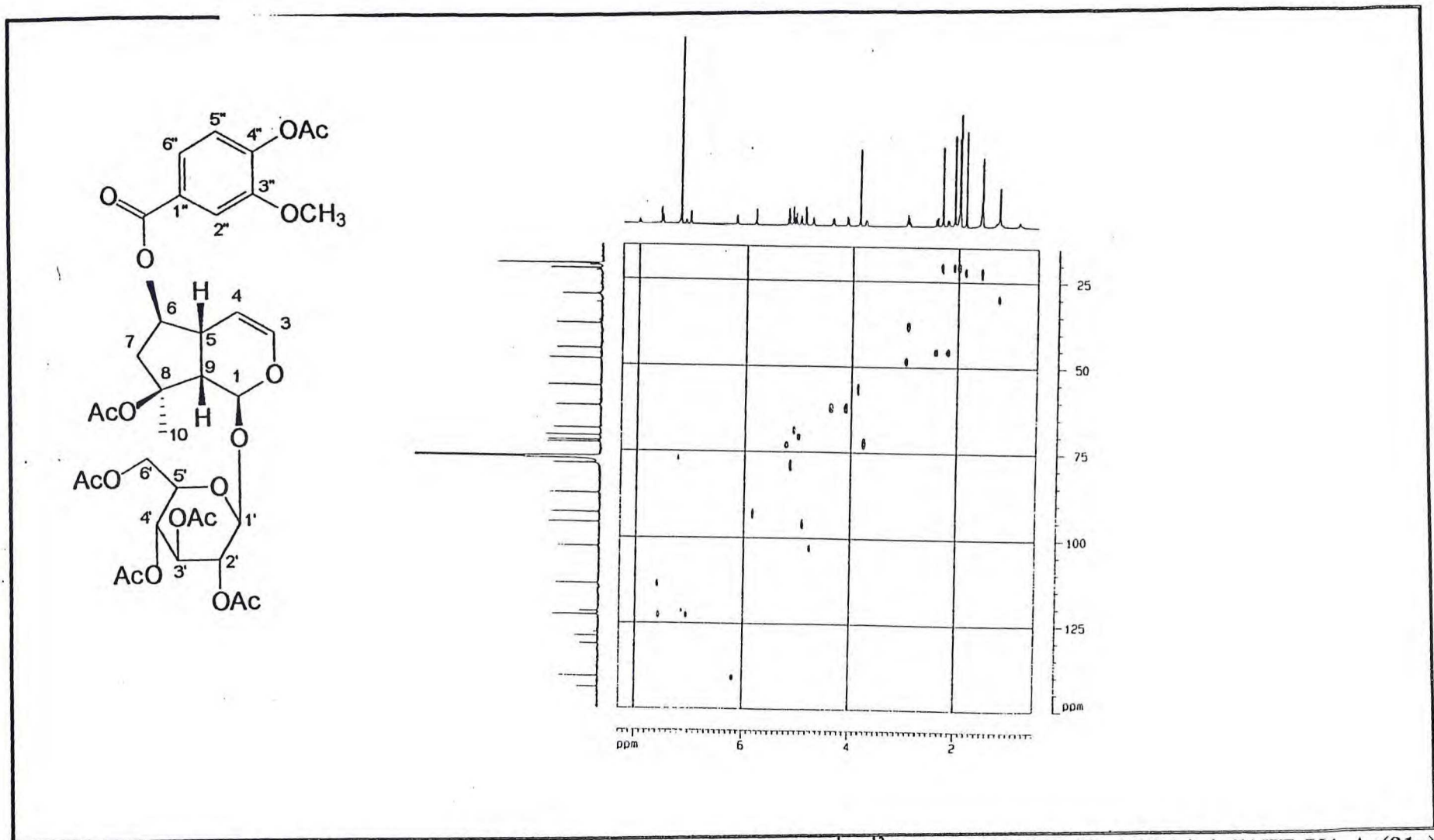


Figura 46: Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HMQC (^1H - ^{13}C - $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=1$) (CDCl_3 , 125Mz) de IAEE-K1-Ac(91a)

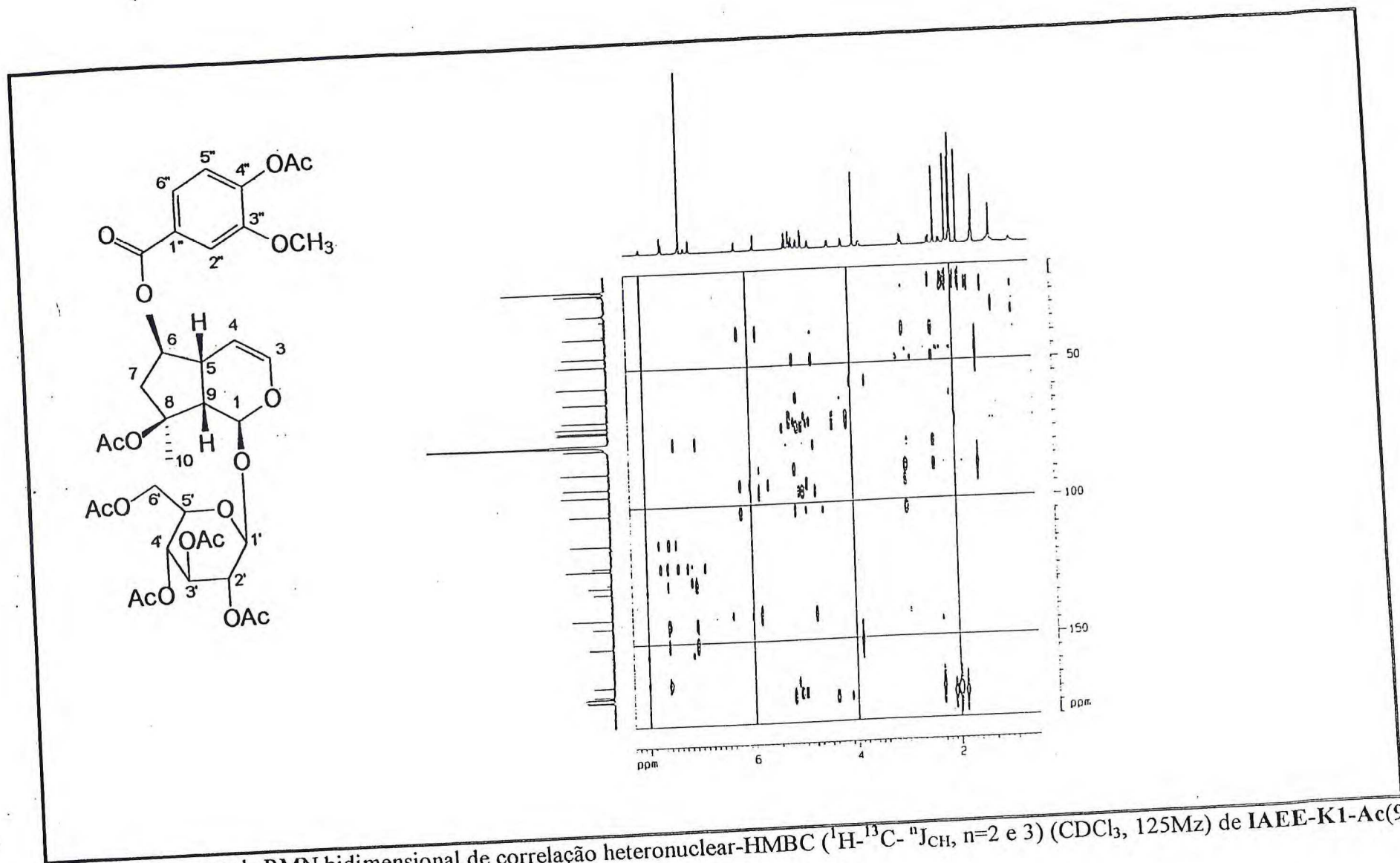


Figura 47: Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HMBC (^1H - ^{13}C - $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3) (CDCl_3 , 125Mz) de IAEE-K1-Ac(91a)

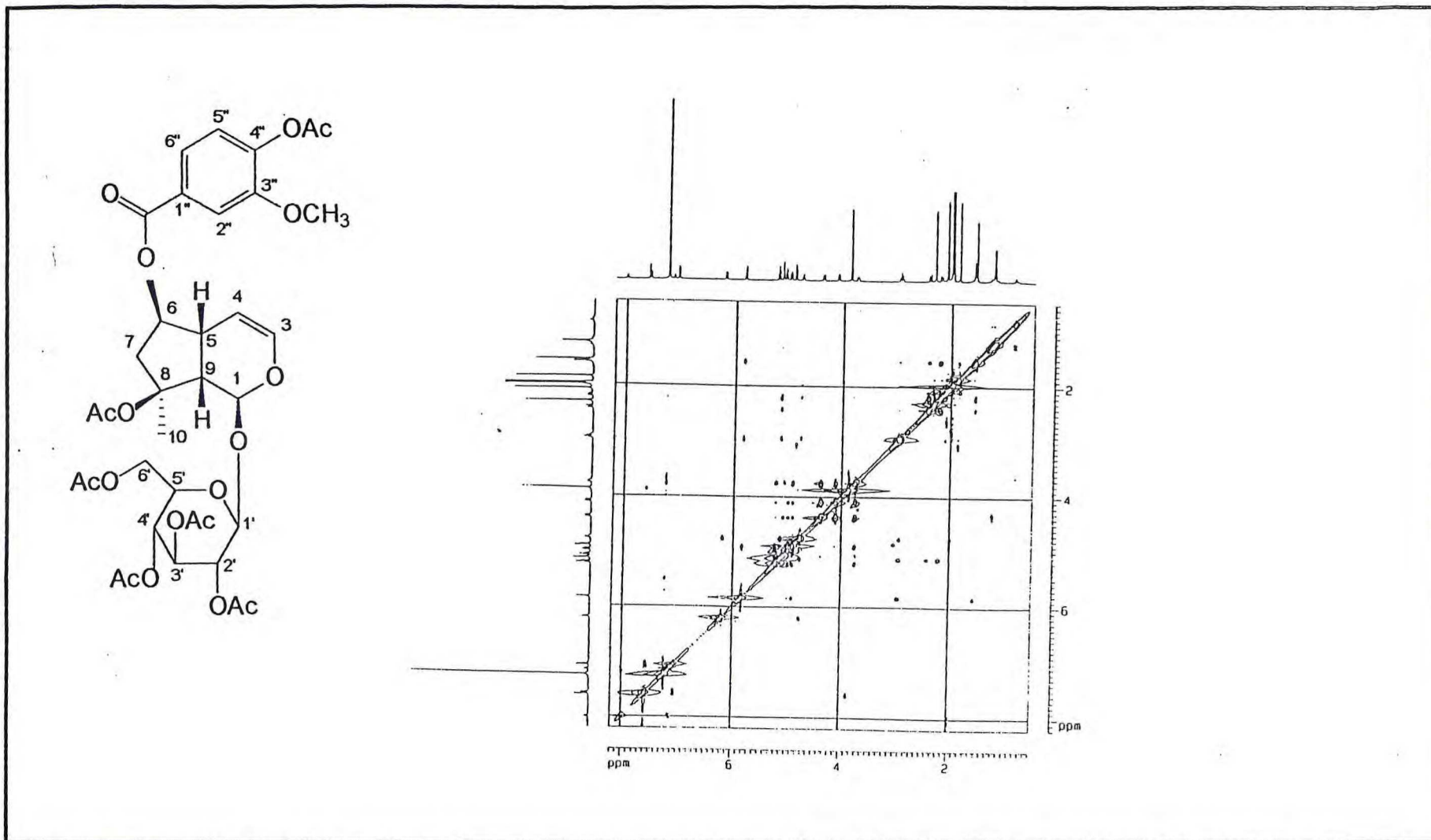
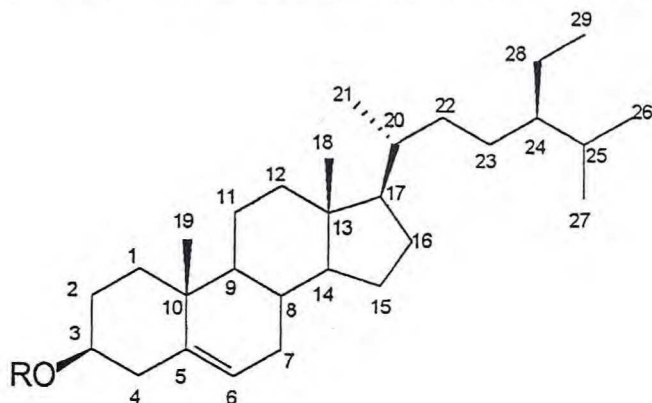


Figura 48: Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear (^1H - ^1H -ROESY) (CDCl_3 , 500Mz) de IAEE-K1-Ac(91a)

3.7. Determinação Estrutural de IAEC-2 (77) e IAEA-K2(78)

Os compostos IAEC-2 (77) e IAEA-K2(78) apresentaram pontos de fusão 136-137°C e 283-286°C, respectivamente. Os compostos foram comparados com amostras padrão em CCD e mostraram-se similares ao β -sitosterol (77) e ao glicosídeo do β -sitosterol (78). A confirmação estrutural foi feita por comparação dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono observados nos espectros RMN¹³C-PND com valores descritos na literatura⁵⁴ (Tab.13, pág.93). Essas duas substâncias são largamente distribuídas no reino vegetal e haviam sido anteriormente isoladas no gênero *Tabebuia*.



(77): R=H
(78): R= β -D-glicose

Tabela 13: Dados de RMN¹³C de IAEC-2 (77)e IAEA-K2(78) comparados com valores da literatura citados para o β-sitosterol e seu glicosídeo acetilado(78a)⁵⁴

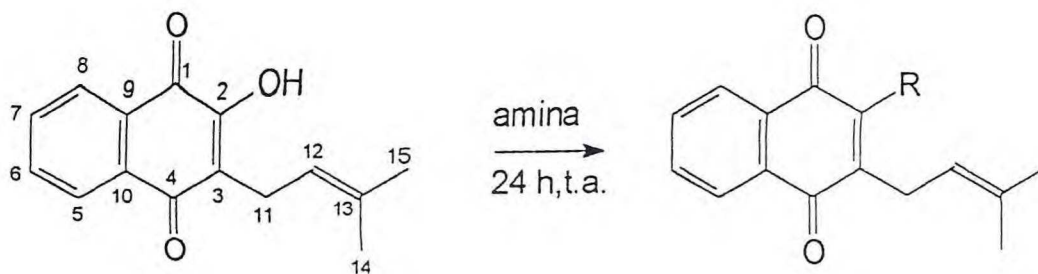
C	$\delta_c(77)^{54}$	$\delta_c(77)$	$\delta_c(78a)^{54}$	$\delta_c(78)$
1	37.2	37.3	37.2	37.4
2	31.6	31.7	29.5	30.2
3	71.8	71.8	80.0	78.4
4	42.3	42.3	38.9	39.3
5	140.7	140.8	140.3	140.8
6	121.7	121.7	122.0	121.9
7	31.9	31.9	31.8	32.1
8	31.9	31.9	31.8	32.0
9	50.1	50.2	50.2	50.3
10	36.5	36.5	36.5	36.8
11	21.1	21.1	20.9	21.2
12	39.8	39.8	39.7	39.9
13	42.3	42.3	42.3	42.4
14	56.7	56.8	56.7	56.8
15	24.3	24.3	24.2	24.5
16	28.2	28.2	28.1	28.5
17	56.0	56.1	56.1	56.2
18	11.8	11.8	11.9	12.1
19	19.4	19.4	19.2	19.1
20	36.1	36.1	36.0	36.3
21	19.0	19.0	18.7	19.0
22	33.9	34.0	34.0	34.1
23	26.1	26.2	26.1	26.3
24	45.8	45.9	45.8	46.0
25	29.1	29.2	29.1	29.4
26	18.7	18.8	19.7	19.9
27	19.8	19.8	18.9	19.4
28	22.0	23.1	23.0	23.3
29	11.9	12.0	11.0	11.9
1'	-	-	99.6	102.5
2'	-	-	71.7	78.0
3'	-	-	73.0	78.5
4'	-	-	68.7	71.6
5'	-	-	71.5	75.3
6'	-	-	61.9	62.7

3.8. Determinação Estrutural de Lapiper(96), Lapirrol(97) e Lapimor(98)

Visando obter derivados do lapachol e os respectivos dados de atividade biológica optou-se por reações onde fossem introduzidas aminas no C-2 do lapachol. A escolha por derivados aminados foi feita baseada em trabalho da literatura¹² com algumas quinonas, que revelaram a potencialidade destes derivados como agentes anticancerígenos. Os derivados aminados do lapachol(28), denominados lapiper(96), lapirrol(97), e lapimor(98), foram obtidos conforme esperados, com rendimentos de 79, 77e 94% , respectivamente. Lapiper(96) e Lapimor(98) apresentaram-se como sólidos vermelhos cristalinos, com pontos de fusão 88-90⁰C e 81-83⁰C, respectivamente, enquanto Lapirrol(97) foi obtido como um óleo viscoso vermelho. O resultado dos testes anticancerígenos mostrou a potencialidade dos derivados (ver parte experimental) e estão sendo submetidos a publicação na revista Planta Médica.

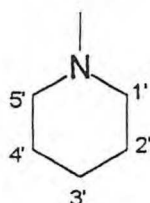
As suas estruturas foram determinadas com base na análise dos espectros de RMN¹H que podem ser observados nas figuras 49(96), 51(97) e 53(98), págs. 96, 98 e 100 e RMN¹³C-PND nas figuras 50(96), 52(97) e 54(98), págs. 97, 99 e 101, respectivamente

No espectro de RMN¹H dos derivados são verificados os hidrogênios relacionados às respectivas aminas. Os dados espectroscópicos mostraram que a substituição da hidroxila em C-2 pelas referidas aminas influenciaram pouco o anel aromático e a cadeia lateral no C-3. Observou-se, contudo, um efeito de desproteção no C-2 quando comparados com o lapachol(28) com δ 152.75, principalmente em lapiper(96) e lapimor (98), com valores de δ 164.47 e 165.47, respectivamente. Os sinais de ¹³C correlacionados às aminas foram observados em δ 66.80, 45.45 e 25.77 para (96); δ 44.85, 22.94 e 22.56 para (97); δ 45.54 e 24.69 para (98). Na tabela 14, pág.95, podem ser observados os deslocamentos químicos de ¹³C dos compostos (96), (97) e (98) comparados com os apresentados pelo lapachol (28).

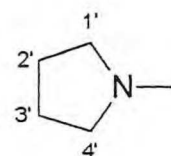


(28)

(96) R=



(97) R=



(98) R=

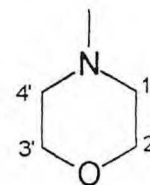


Tabela 14: Correlação dos dados de RMN¹³C do Lapachol(28), Lapiper(96), Lapirrol(97) e Lapimor(98)

<u>C</u>	δ_C (28)	δ_C (96)	δ_C (97)	δ_C (98)
1	181.71	186.88	187.17	182.60
2	152.75	164.47	165.85	154.74
3	123.53	122.26	121.43	123.58
4	184.54	183.97	183.79	184.58
9	129.48	131.12	131.25	129.85
10	132.94	134.55	134.63	133.11
13	133.80	131.42	131.67	133.40
CH				
5	126.78	126.01	125.92	126.62
6	134.83	133.86	133.60	134.61
7	132.85	131.12	130.92	132.55
8	126.05	125.32	125.24	125.90
12	119.71	123.18	123.24	120.35
CH₂				
11	22.64	22.94	22.93	22.70
CH₃				
14	17.90	18.04	18.09	17.94
15	25.76	25.74	25.76	25.77
Amina				
	-	44.85 (1',5')	45.54 (1',4')	45.45 (1',4')
	-	22.94 (2',4')	24.69 (2',3')	66.80 (2',3')
	-	22.56 (3')	-	-

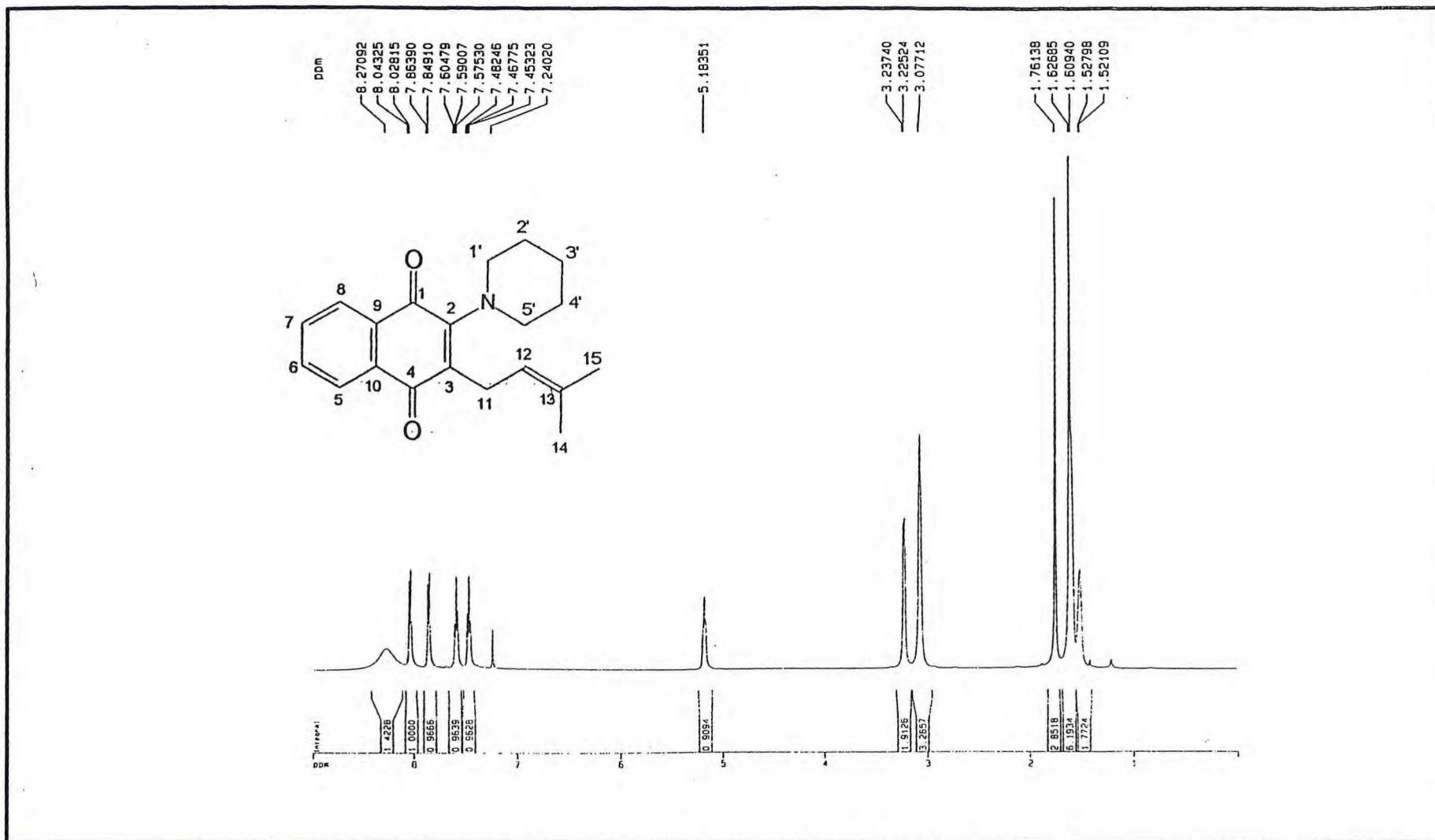


Figura 49: Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 500Mz) de Lapiper(96)

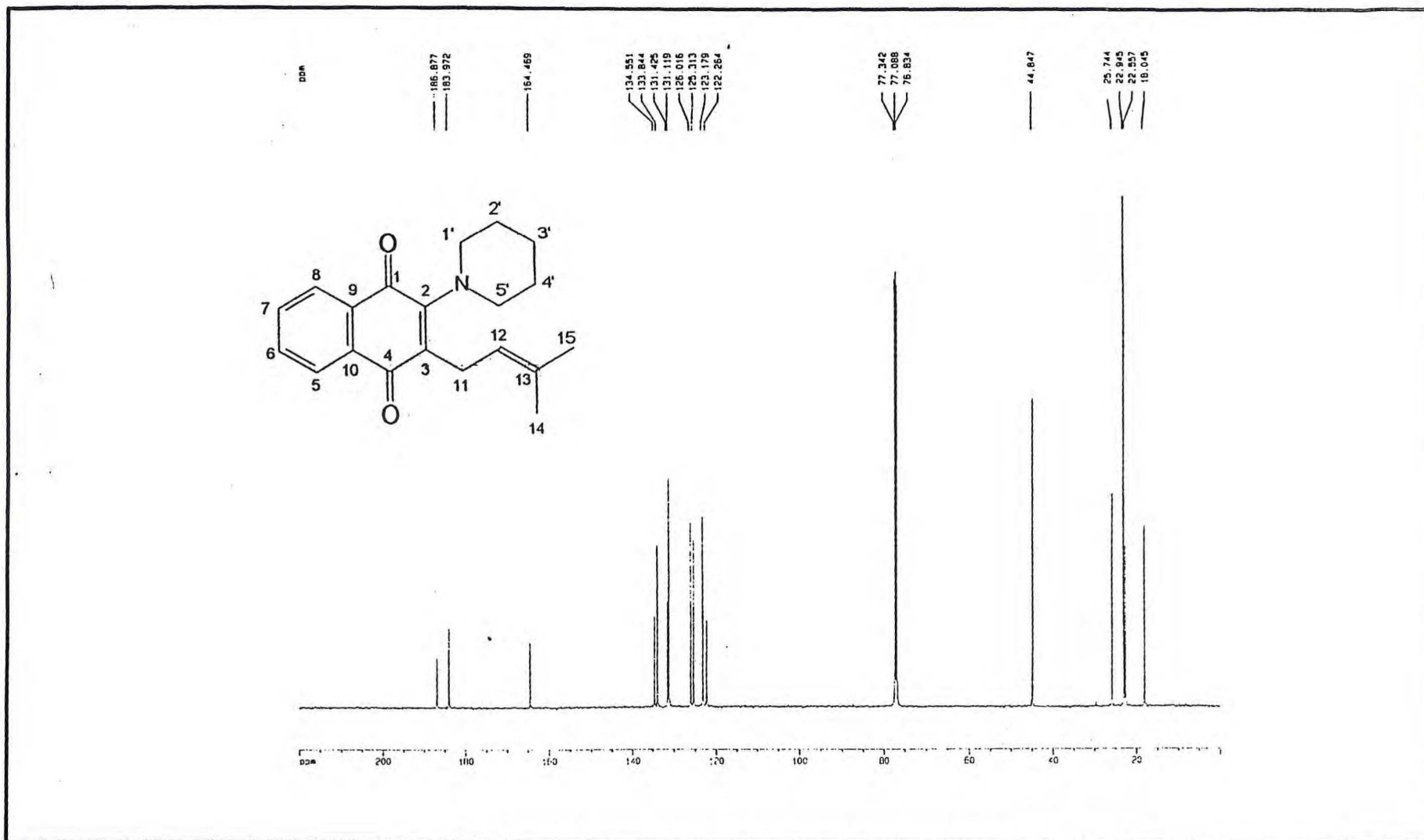


Figura 50: Espectro de RMN¹³C-PND (CDCl₃, 125Mz) de Lapiper(96)

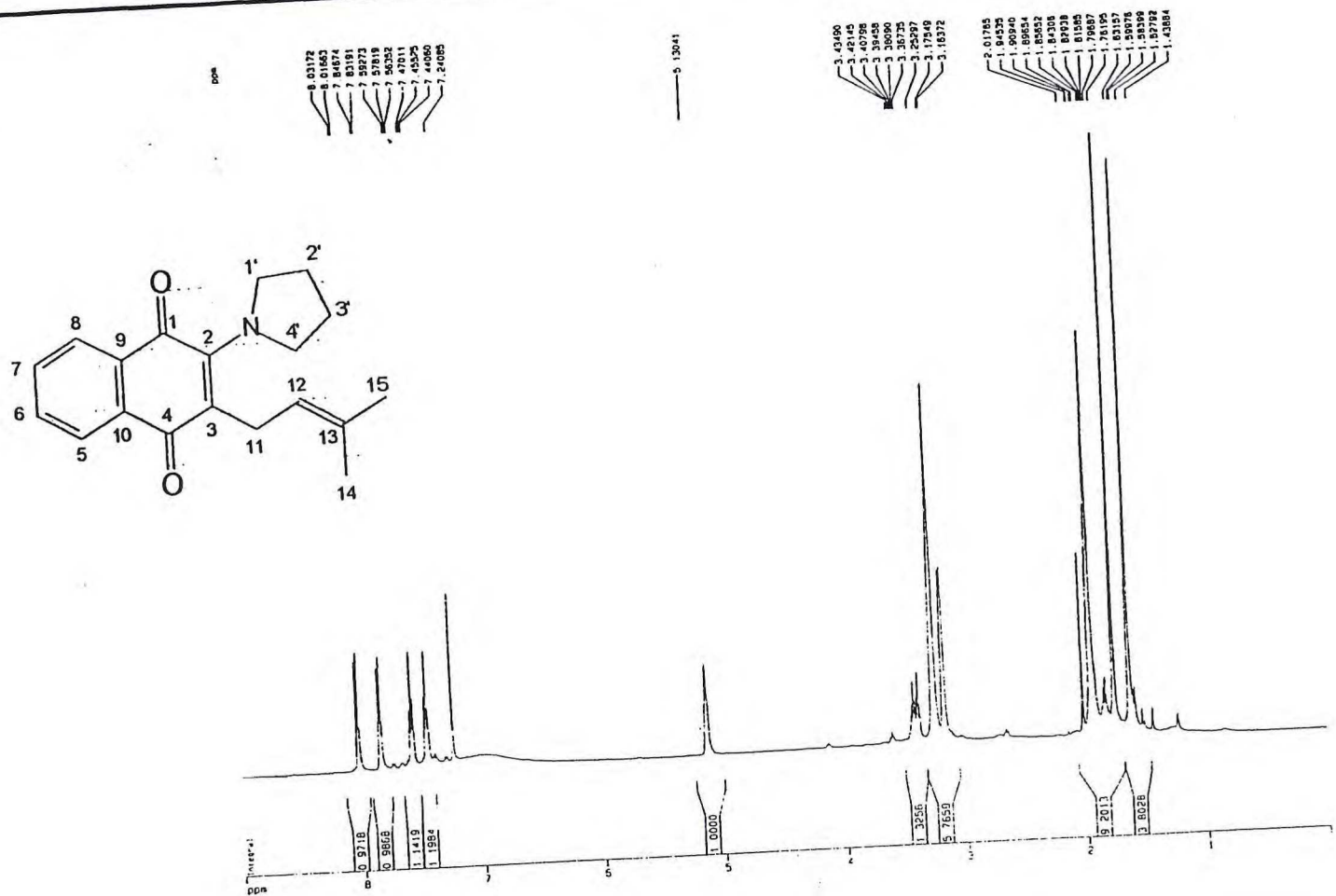


Figura 51: Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 500Mz) de Lapirrol(97)

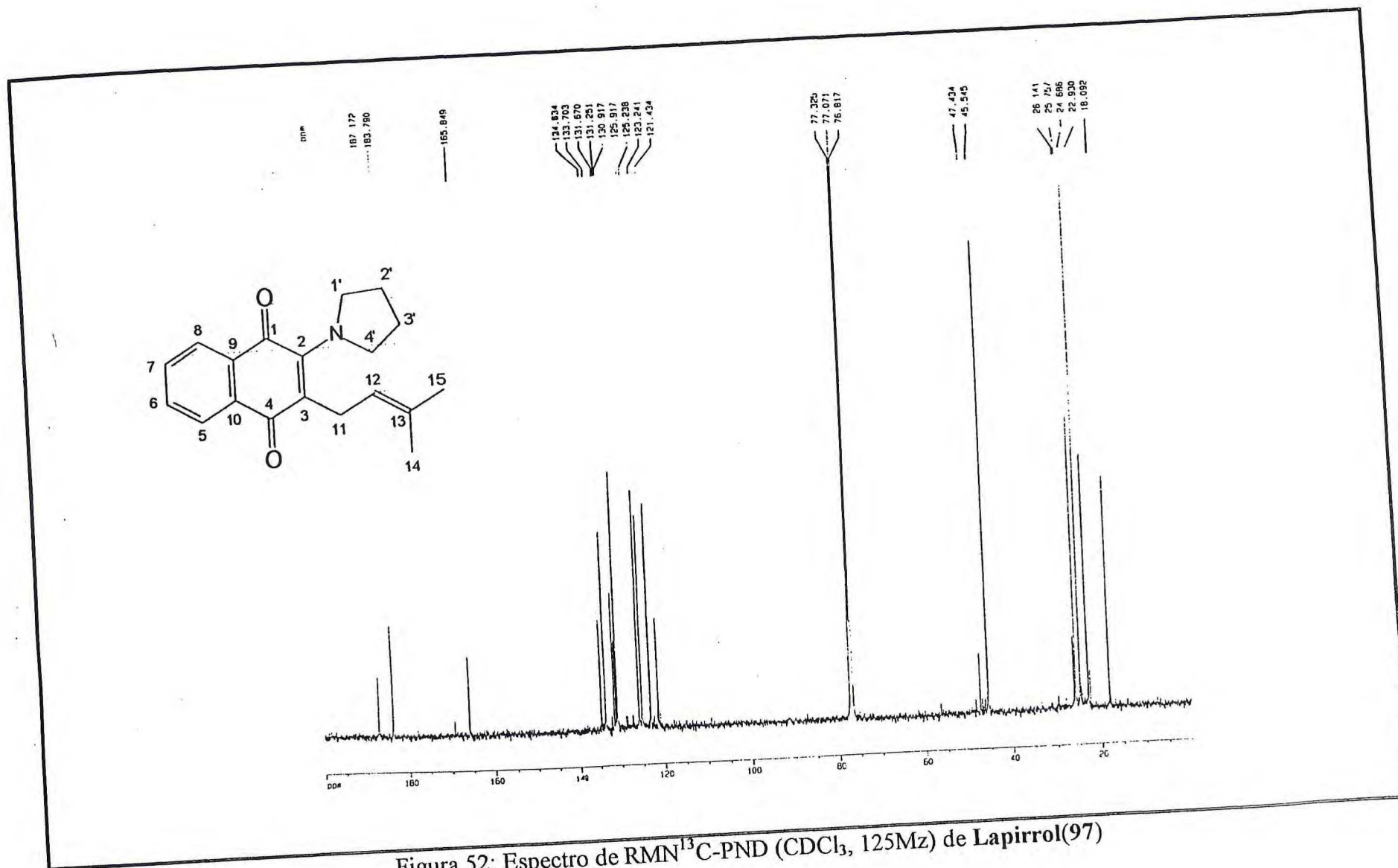


Figura 52: Espectro de RMN¹³C-PND (CDCl₃, 125Mz) de Lapirrol(97)

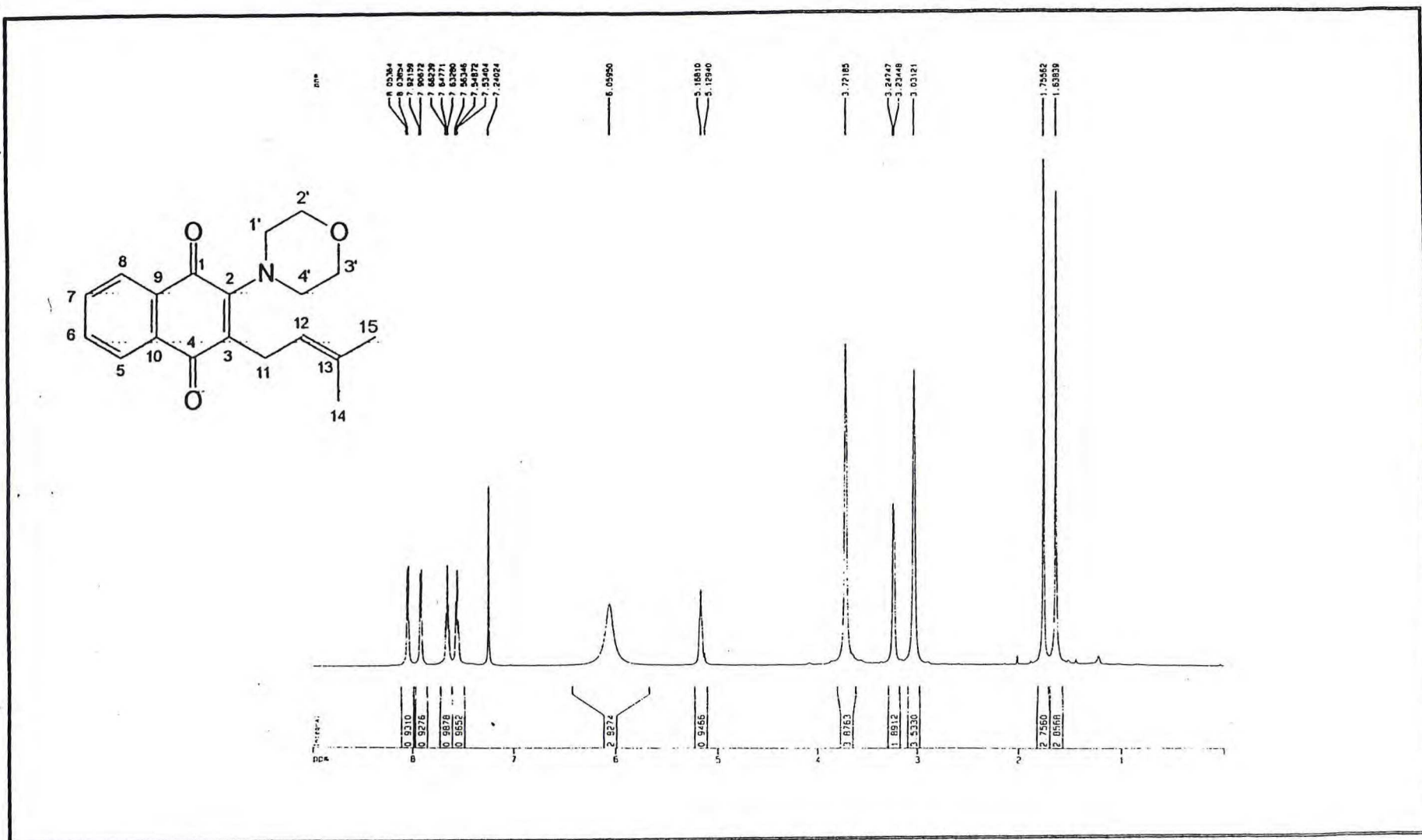


Figura 53: Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 500Mz) de Lapimor(98)

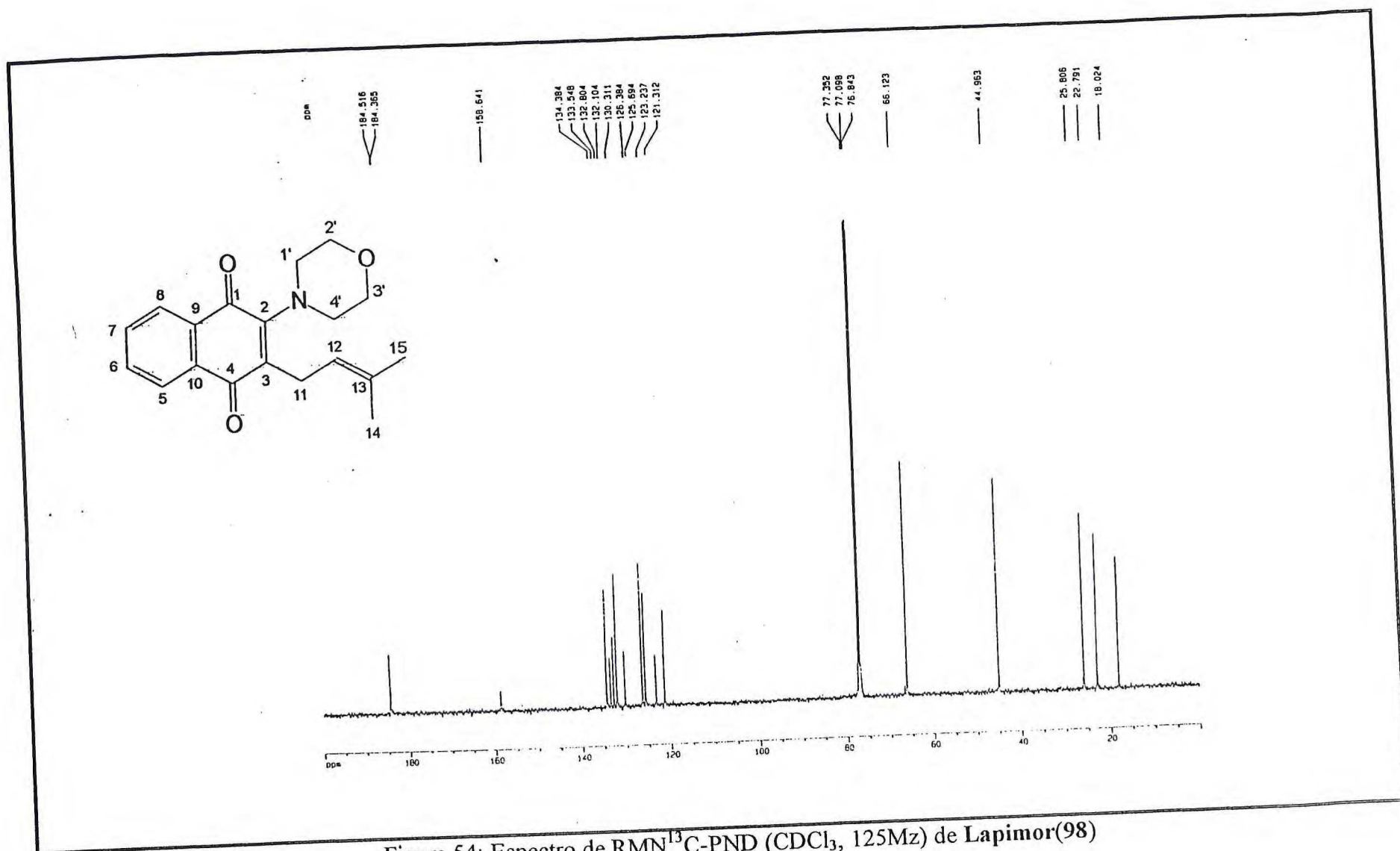
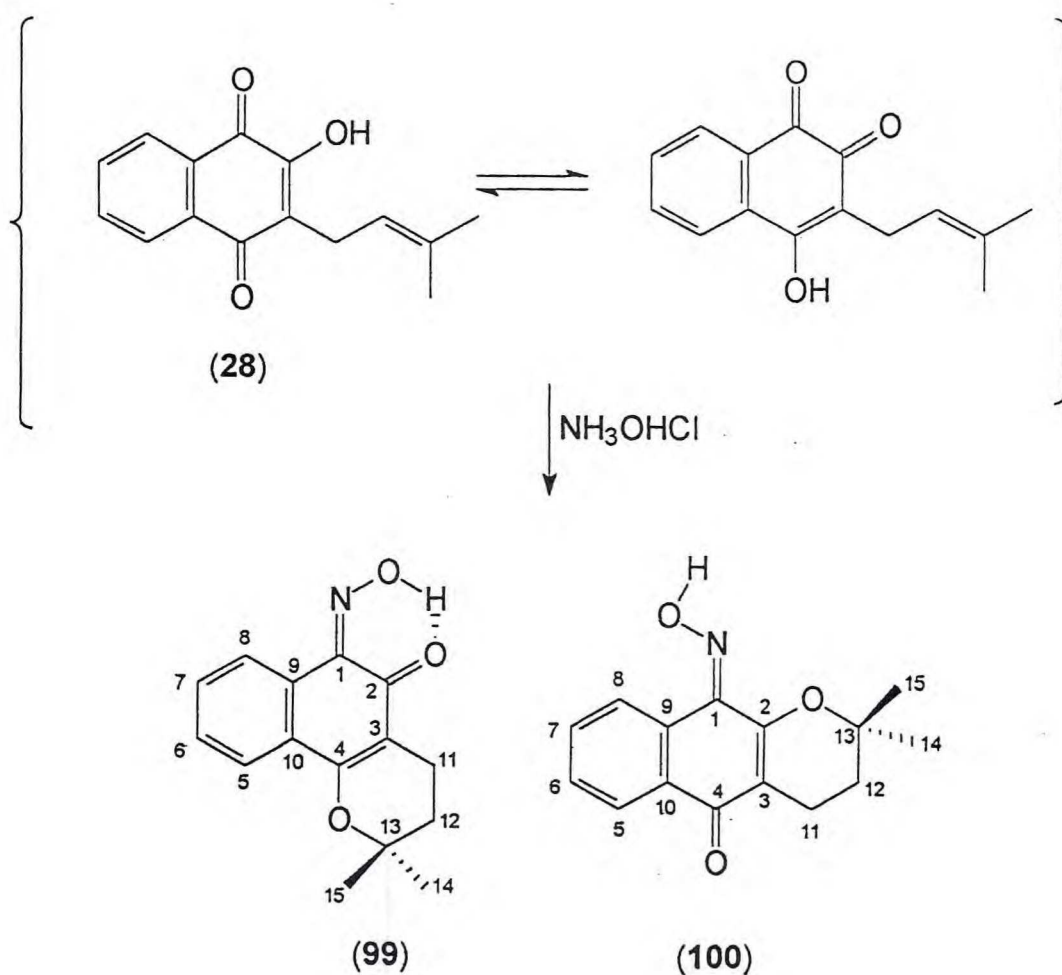


Figura 54: Espectro de RMN¹³C-PND (CDCl₃, 125Mz) de Lapimor(98)

3.9. Determinação Estrutural de Lapidroxi-2-1(99) e Lapidroxi-2-2(100)

Dando continuidade à obtenção dos derivados aminados do lapachol foi feita reação com hidroxilamina tentando introduzir esse grupo no C-2 conforme resultados obtidos com as aminas anteriores. Contudo, obteve-se na reação do lapachol com cloridrato de hidroxilamina duas oximas, denominadas Lapidroxi-2-1(99) e Lapidroxi-2-2(100), resultantes do ataque do nitrogênio a um dos carbonos carbonílicos, seguido de ciclização. Os produtos obtidos mostraram que no meio reacional houve predominância de um dos tautômeros do lapachol, conforme mostrado no equilíbrio abaixo.



Lapidroxi-2-1(99) foi obtido como o produto principal da citada reação, apresentando-se como um sólido laranja, solúvel em clorofórmio e com ponto de fusão $152-153^\circ\text{C}$. O espectro de RMN^1H de lapidroxi-2-1(Fig.55, pág.106) apresentou

sinais referentes a quatro hidrogênios aromáticos em δ 8.18, 7.94, 7.58 e 7.54; dois grupos metilênicos em δ 1.94 e 2.57 e duas metilas em δ 1.50(6H). Foi ainda observado um singlete em δ 18.00 atribuído ao hidrogênio da hidroxilamina inserida. Esse valor de deslocamento químico tão elevado sugeriu que o hidrogênio encontrava-se formando ligação de hidrogênio com a carbonila-2. As diferenças básicas dos valores observados nos espectros de RMN¹H de lapidroxi-2-1(99) e lapachol(28) foi o aparecimento do grupo metilênico em δ 1.94 e a ausência do hidrogênio olefínico em (99), observado no lapachol em δ 5.17. No espectro ¹H-¹H-COSY(Fig.56, pág.107) observou-se além do acoplamento entre os hidrogênios aromáticos, a interação vicinal entre os dois grupos metilênicos.

Os espectros de RMN¹³C-PND(Fig.57, pág.108) e DEPT-135(Fig.58, pág.109) mostraram a presença de uma carbonila em δ 180.94, dois carbonos olefínicos não-hidrogenados, sendo um deles oxigenado(δ 163.74 e 110.35), um carbono correlacionado à ligação C=NOH em δ 143.06, dois carbonos metilênicos em δ 30.96 e 15.26, duas metoxilas em δ 25.97(sinais superpostos), um carbono quaternário oxigenado em δ 79.75, e carbonos aromáticos em δ 130.66(CH), 130.16(C), 129.21(CH), 125.84(C), 123.46(CH) e 121.98(CH).

A correlação entre os átomos de hidrogênio e carbono foi feita com base nos espectros bidimensionais de correlação heteronuclear HMQC(¹H-¹³C-COSY, ¹J_{CH}, Fig.59, pág.1110) e HMBC(¹H-¹³C-COSY, ⁿJ_{CH}, n=2 e 3, Fig.60, pág.111) e pode ser observada na Tabela 15, pág.105.

A análise do espectro bidimensional de correlação a longa distância(HMBC) possibilitou localizar a ligação C=NOH em posição α (alfa) ao anel aromático, através do acoplamento em ³J do H-8 com o C-1, e do C-1 com o hidrogênio do grupo -NOH. A carbonila foi posicionada no C-2, acoplado em ³J com 2H-11. O posicionamento do anel dihidro-pirano no C-3 e C-4 ficou evidenciado pelo acoplamento do C-3 com 2H-11(²J) e 2H-12(³J), e do C-4 com H-5 e 2H-11. Os demais acoplamentos longa distância podem ser vistos na Tabela 15, pág.105. Diante dos dados espectroscópicos observados foi proposta a estrutura (99) para lapidroxi-2-1.

O produto minoritário, denominado lapidroxi-2-2(100), apresentou-se como um sólido laranja, solúvel em clorofórmio e com ponto de fusão 217-218^oC. O espectro de

RMN¹H(Fig.61, pág.112) apresentou sinais correspondentes a quatro hidrogênios aromáticos, dois grupos metilênicos, duas metilas e um singlete largo em δ 12.10 atribuído ao hidrogênio do grupo -NOH. A multiplicidade dos sinais e deslocamentos químicos mostraram-se bastante parecidas com os observados para lapidroxi-2-1(99).

Contudo, a análise dos espectros de RMN¹³C-PND (Fig.62, pág.113), DEPT-135(Fig.63, pág.114), HMQC(¹H-¹³C-COSY, ¹J_{CH}, Fig.64, pág.115) e HMBC(¹H-¹³C-COSY, ⁿJ_{CH}, n=2 e 3, Fig.65, pág.116) mostrou que o sítio da substituição-eliminação fora o mesmo que em lapidroxi-2-1(99), ou seja, no C-1. Porém o posicionamento do anel dihidro-pirano diferia. No espectro HMBC ficou evidenciado o acoplamento da carbonila em C-4 com H-5 e 2H-11(³J), localizando-a portanto em posição α ao anel aromático. A localização de C-1(C=NOH) em posição α ao anel aromático pode ser comprovada pelo seu acoplamento com H-8(³J). O C-3 acopla com 2H-11(²J) e 2H-12(³J). O C-13 acopla com 2H-12(²J) e 2H-11, 3H-14 e 3H-15(³J). A análise cuidadosa de todos os dados espectroscópicos(Tabela 15, pág.105) permitiu-nos assegurar a estrutura de Lapidroxi-2-2 (100).

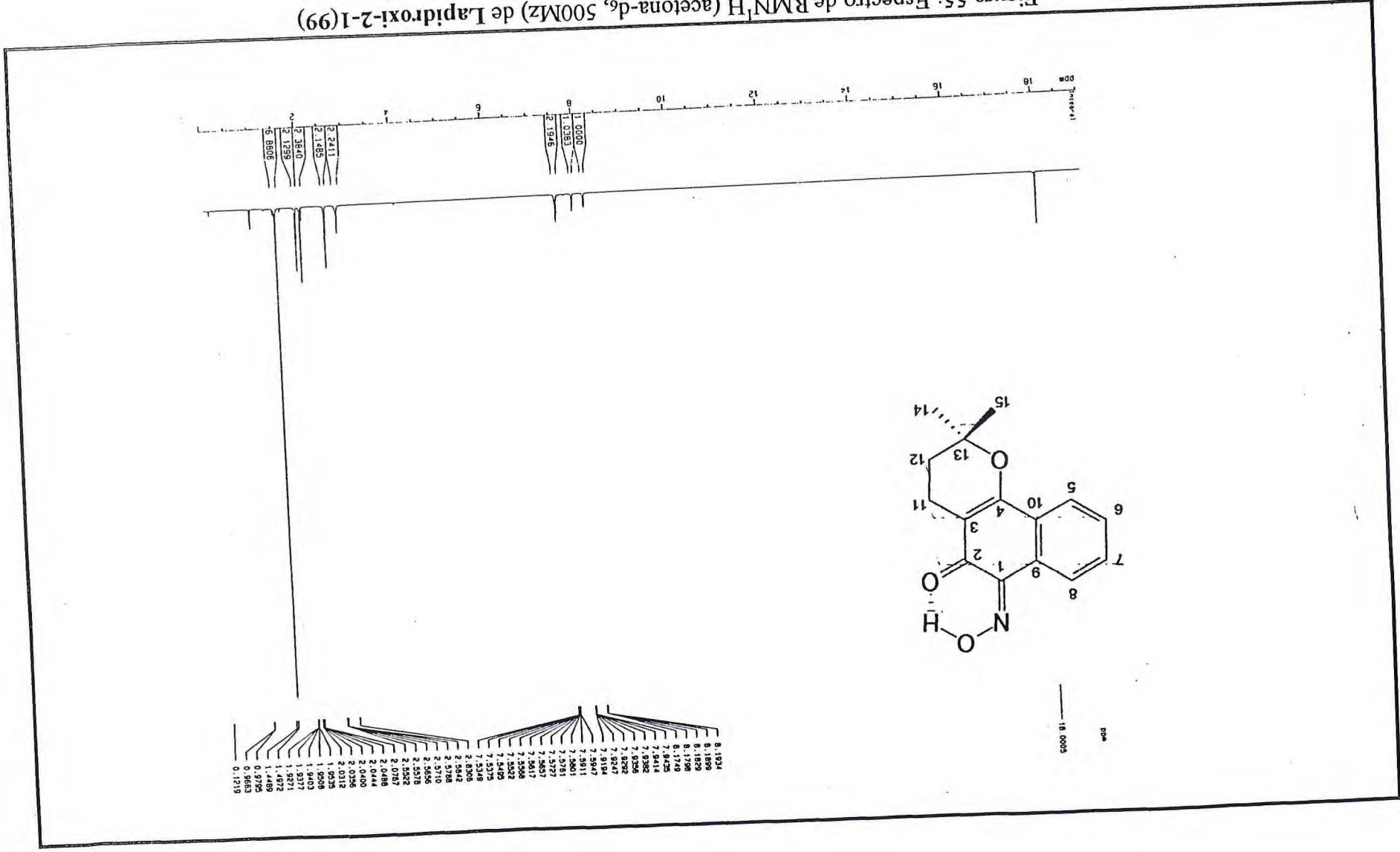
Tabela 16: Correlação dos dados de RMN¹³C de Lapachol(28), Lapidroxi-2-1(99) e Lapidroxi-2-2(100)

<u>C</u>	δ_c (28)	δ_c (99)	δ_c (100)
1	181.71	143.06	139.40
2	152.75	180.94	156.38
3	123.53	110.35	113.48
4	184.54	163.74	183.83
9	129.48	130.16	126.69
10	132.94	125.84	130.52
13	133.80	79.75	78.34
<u>CH</u>			
5	126.78	123.46	126.69
6	134.83	129.21	130.61
7	132.85	130.66	132.52
8	126.05	121.98	129.61
12	119.71	30.96(CH ₂)	31.65(CH ₂)
<u>CH₂</u>			
11	22.64	15.26	16.80
<u>CH₃</u>			
14	17.90	25.97	26.64
15	25.76	25.97	26.64
N-OH	-	-	-

Tabela 15: Dados de RMN¹H e ¹³C de Lapidroxi-2-1(99) e Lapidroxi-2-2(100) em CDCl₃

C	¹ H x ¹³ C-COSY- ¹ J (99)		¹ H x ¹³ C-COSY- ⁿ J _{CH} (99)		¹ H x ¹³ C-COSY- ¹ J _{CH} (100)		¹ H x ¹³ C-COSY- ⁿ J _{CH} (100)	
	δ _C	δ _H , J(Hz)	² J _{CH}	³ J _{CH}	δ _C	δ _H , J(Hz)	² J _{CH}	³ J _{CH}
1	143.06	-	-	N-OH, H-8	139.40	-	-	H-8
2	180.94	-	-	2H-11	156.38	-	-	2H-11
3	110.35	-	2H-11	2H-12	113.48	-	2H-11	2H-12
4	163.74	-	-	H-5, 2H-11	183.83	-	-	H-5, 2H-11
9	130.16	-	-	H-7	126.69	-	-	H-5, H-7
10	125.84	-	-	H-6, H-8	130.52	-	-	H-6, H-8
13	79.75	-	2H-12, 3H-14, 3H-15	2H-11	78.34	-	2H-12	2H-11, 3H-14, 3H-15
CH								
5	123.46	7.94(dd, J=7.1 e 1.7)	-	H-7	126.69	8.26(dd, J= 7.1 e 1.0)	-	H-7
6	129.21	7.54(m)	-	H-8	130.61	7.56(m)	-	-
7	130.66	7.58(m)	-	H-5	132.52	7.63(m)	-	H-5
8	121.98	8.18(dd, J=7.1 e 1.7)	-	H-6	129.61	9.06(d, J=8.0)	-	-
CH ₂								
11	15.26	2.57(t, J=6.6)	2H-12	-	16.80	2.62(t, J= 6.6)	2H-12	-
12	30.96	1.94(t, J=6.6)	2H-11	3H-14, 3H-15	31.65	1.86(t, J= 6.6)	2H-11	-
CH ₃								
14	25.97	1.50(s)	-	2H-12	26.64	1.46(s)	-	2H-12
15	25.97	1.50(s)	-	2H-12	26.64	1.46(s)	-	2H-12
N-OH	-	18.00(s)	-	-	-	12.10(sl)	-	-

Figura 55: Espectro de RMN¹H (acetona-d₆, 500Mz) de Lapidroxi-2-1(99)



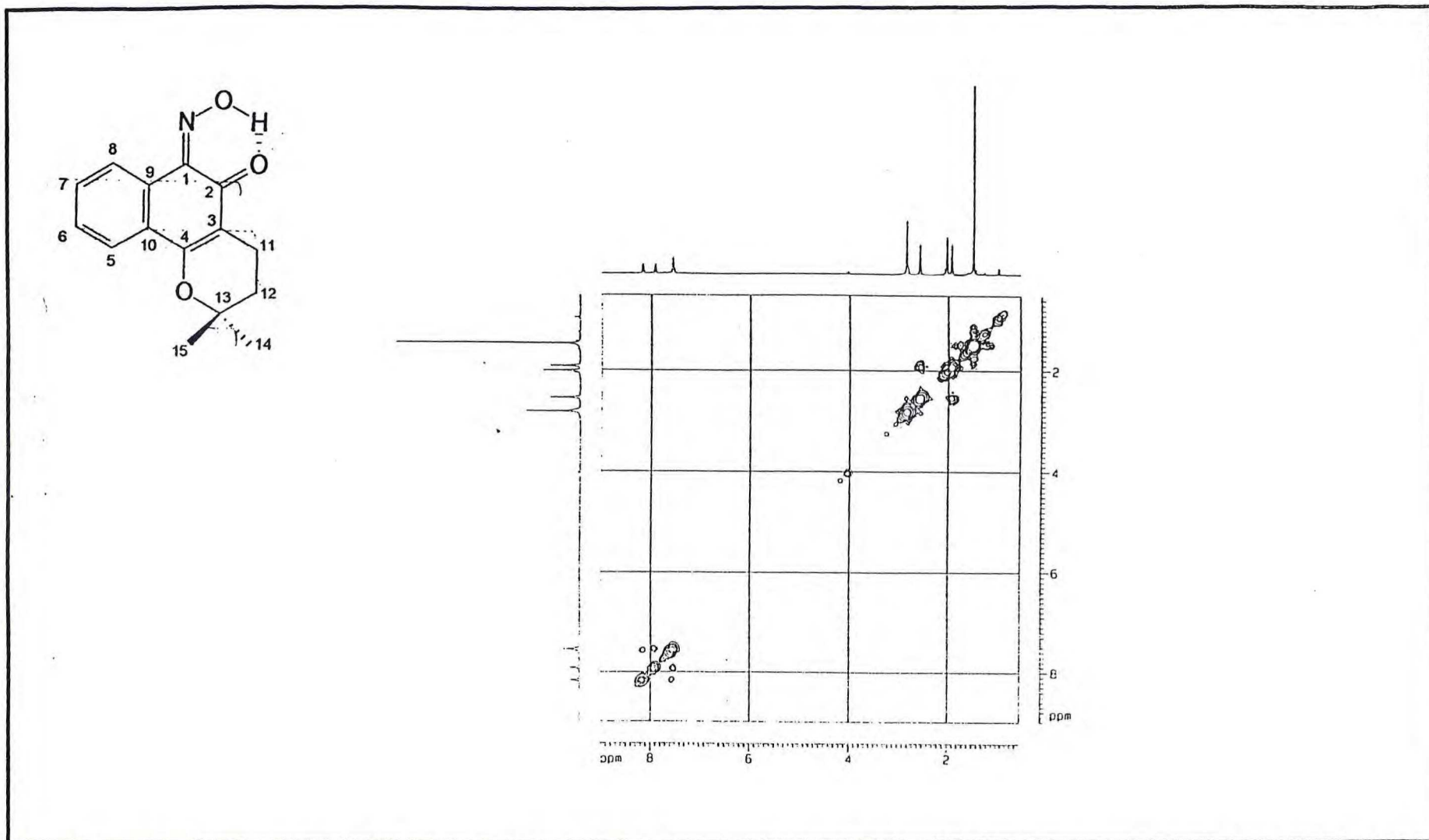


Figura 56: Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear (¹H-¹H-COSY) (acetona-d₆, 500Mz) de Lapidroxi-2-1(99)

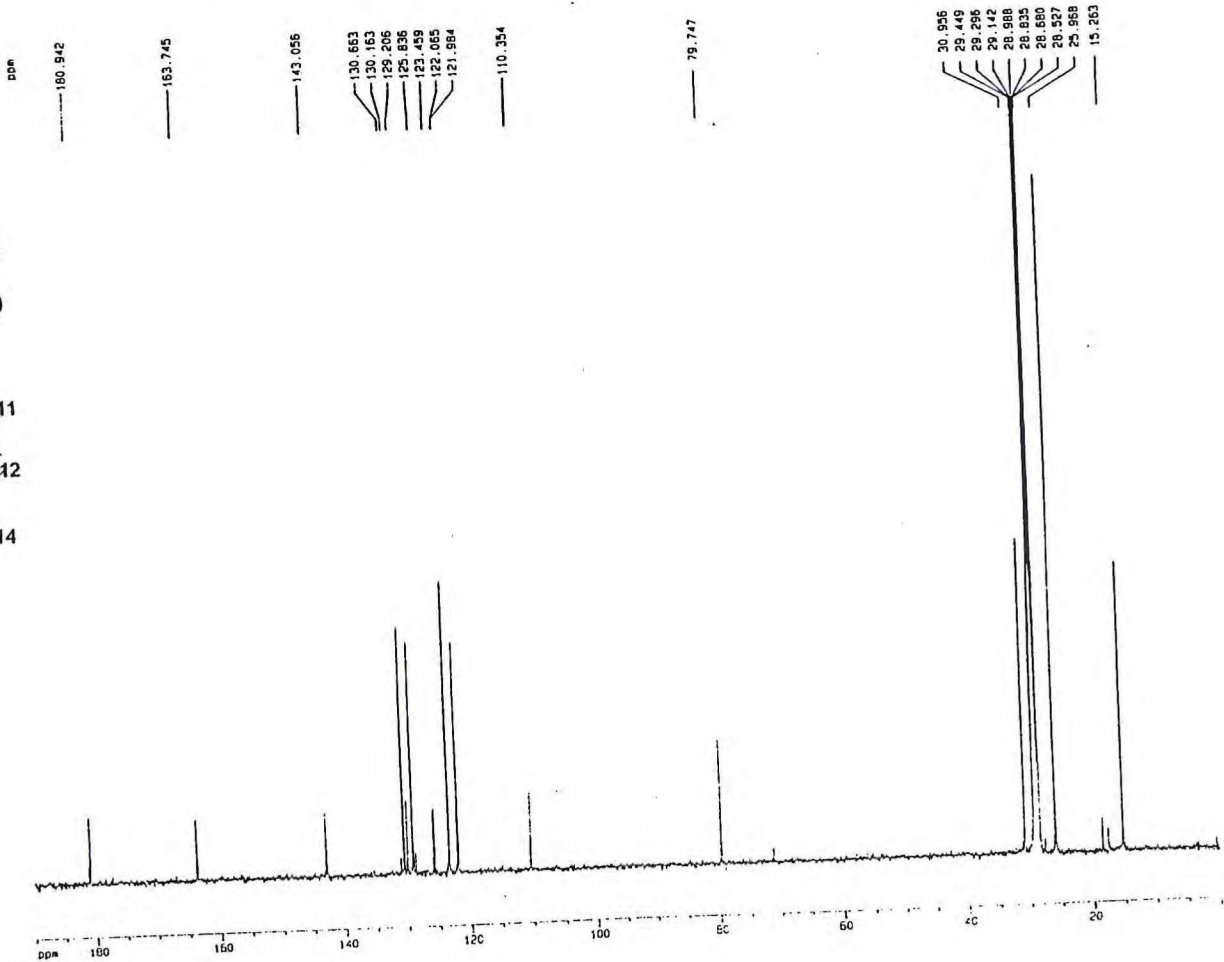
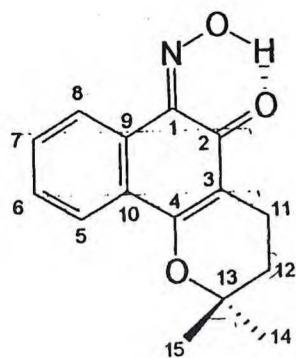


Figura 57: Espectro de RMN¹³C-PND (acetona-d₆, 125Mz) de Lapidroxi-2-1(99)

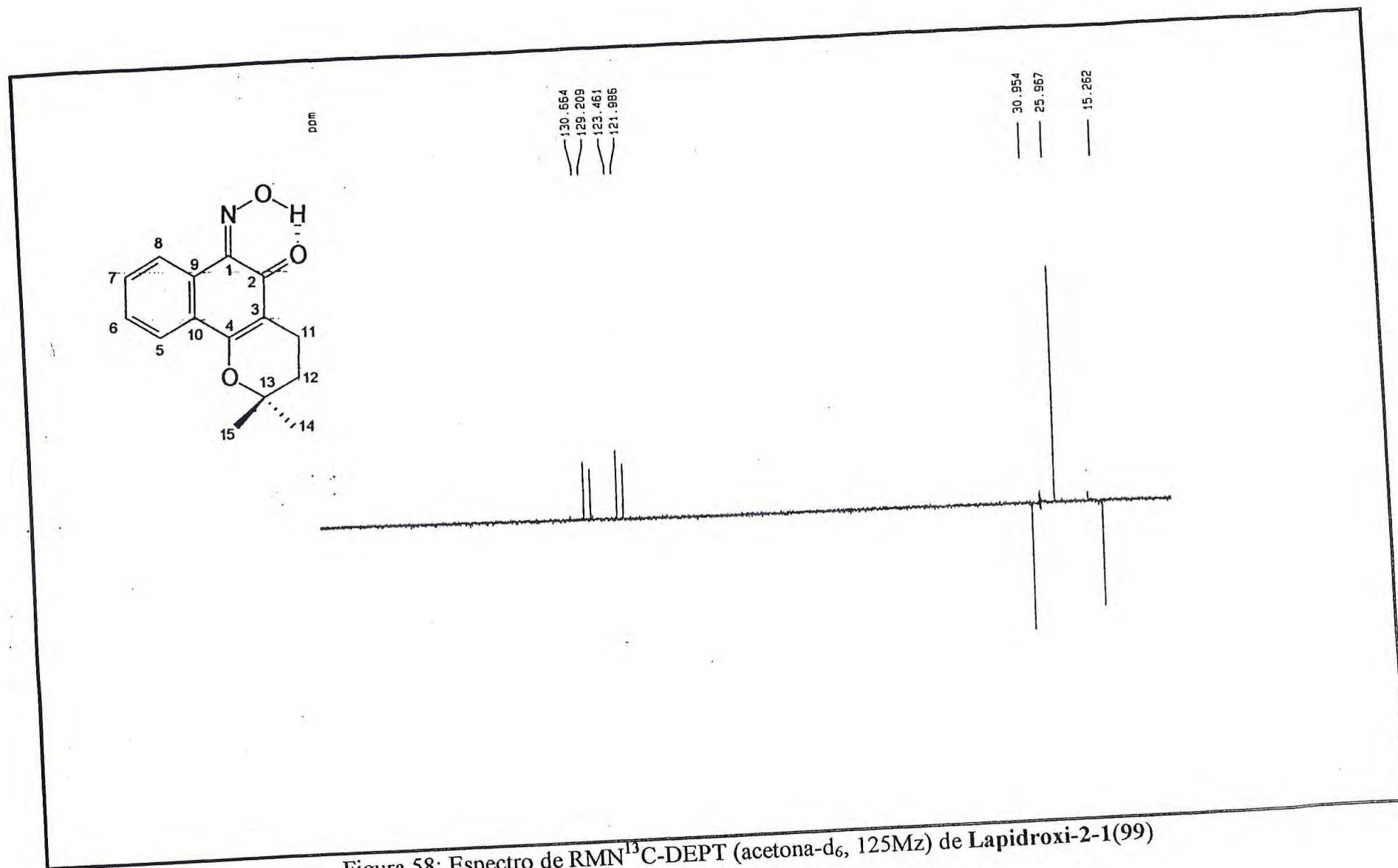


Figura 58: Espectro de RMN¹³C-DEPT (acetona-d₆, 125Mz) de Lapidroxi-2-1(99)

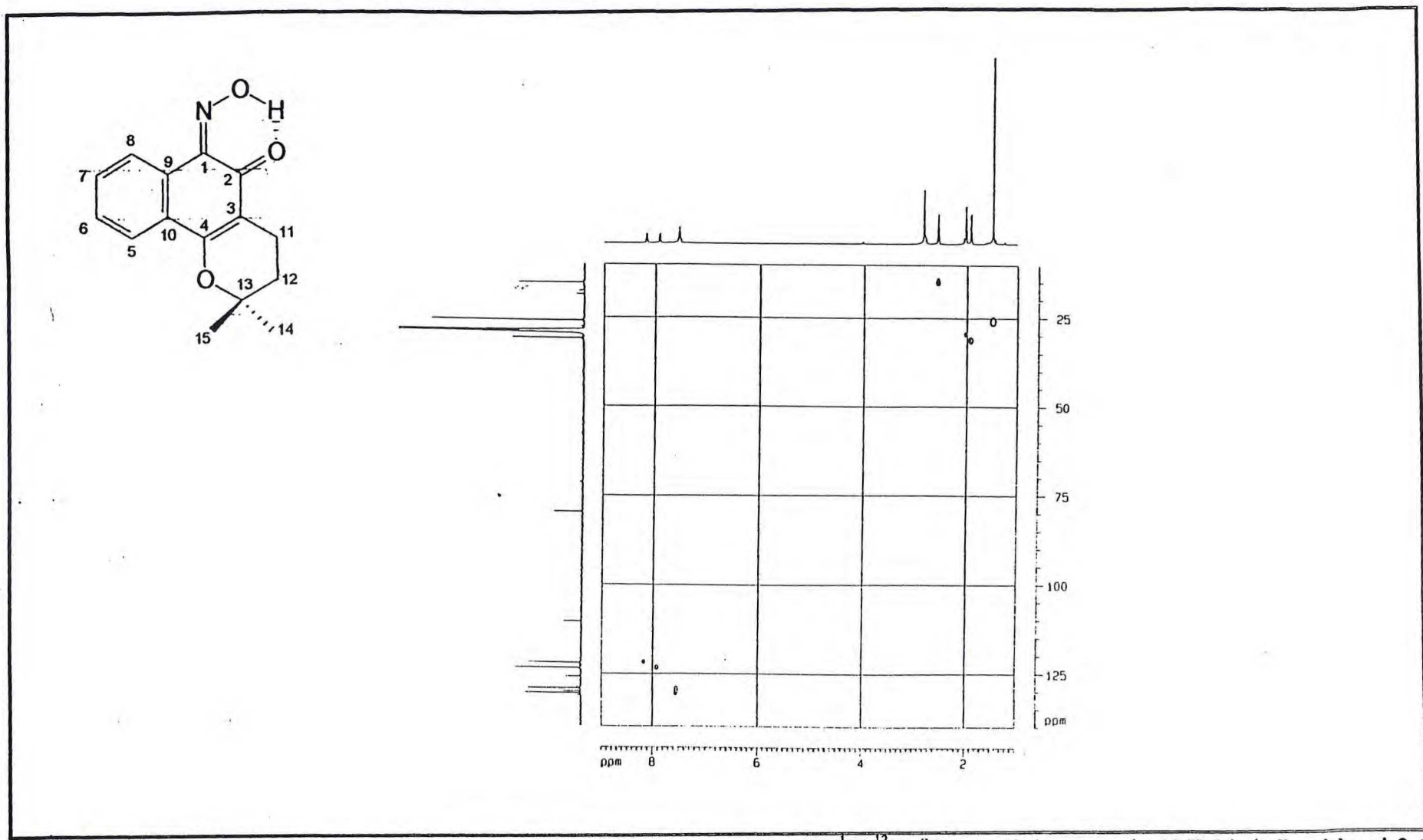


Figura 59: Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HMQC (^1H - ^{13}C - $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=1$) (acetona- d_6 , 125Mz) de Lapidroxi-2-1(99)

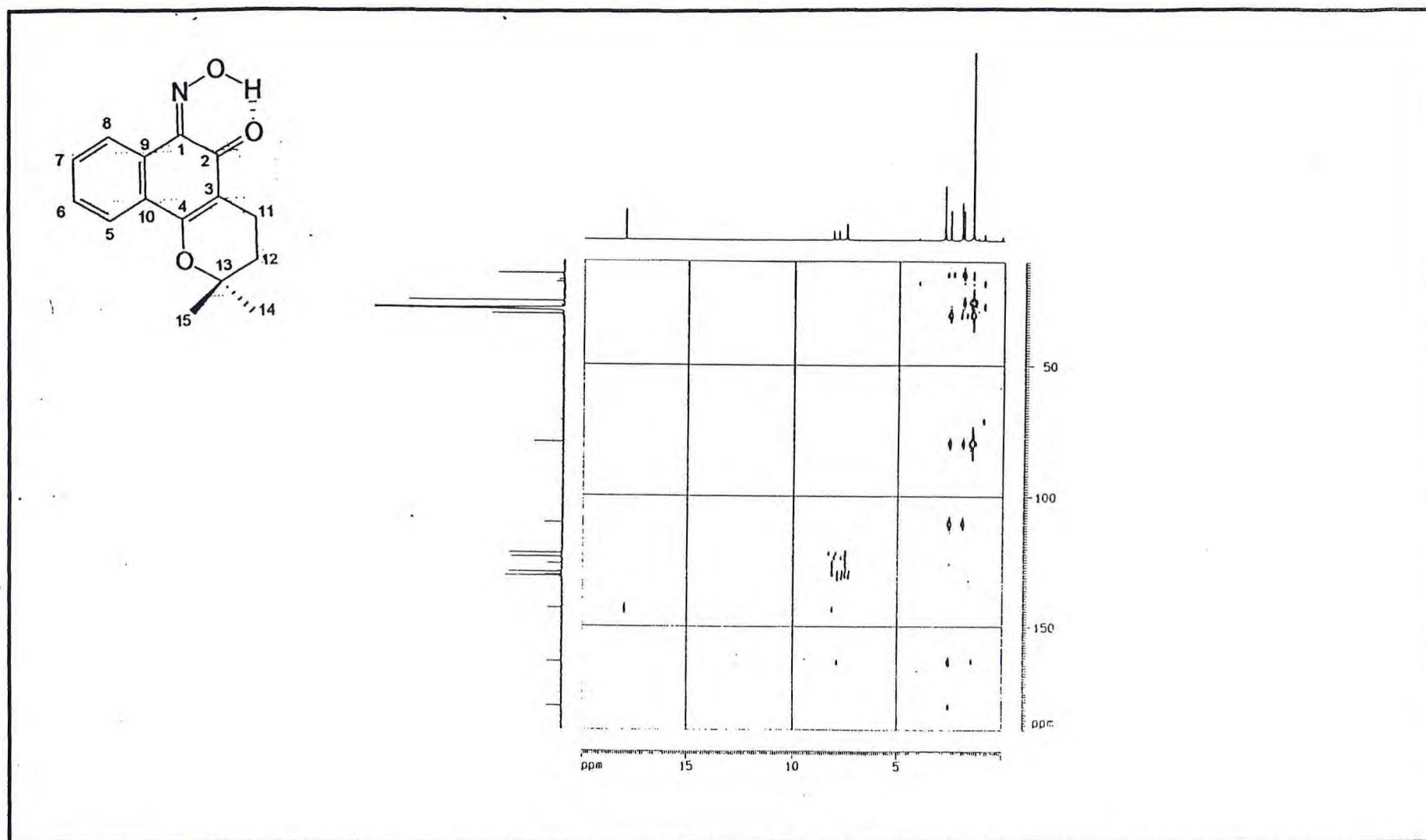


Figura60: Espectro de RMN bidimens. de correlação heteronuclear-HMBC (^1H - ^{13}C - $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3) (acetona- d_6 , 125Mz) de Lapidroxi-2-1(99)

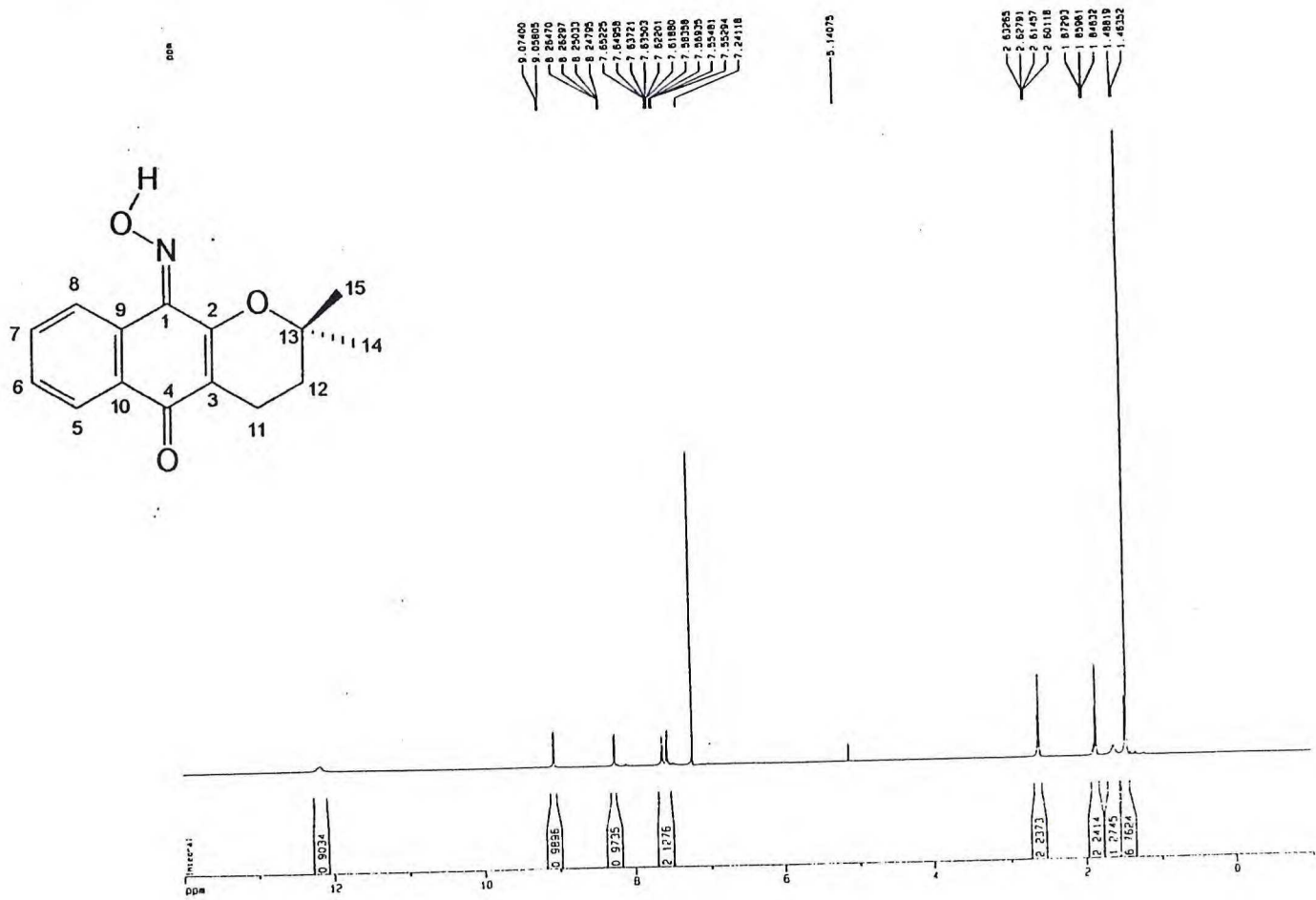


Figura 61: . Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 500Mz) de Lapidroxi-2-2(100)

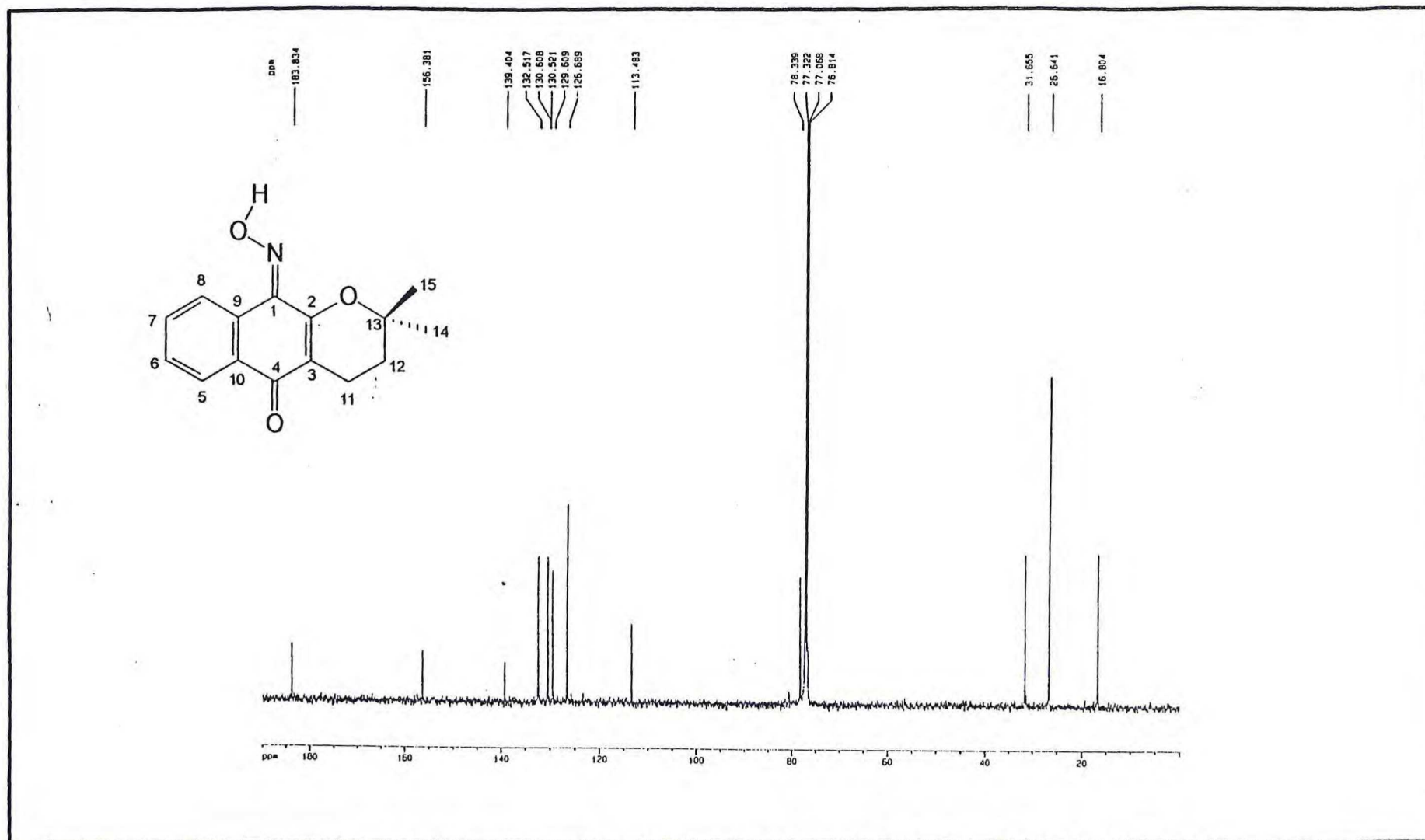


Figura 62: . Espectro de RMN¹³C-PND (CDCl₃, 125Mz) de Lapidroxi-2-2(100)

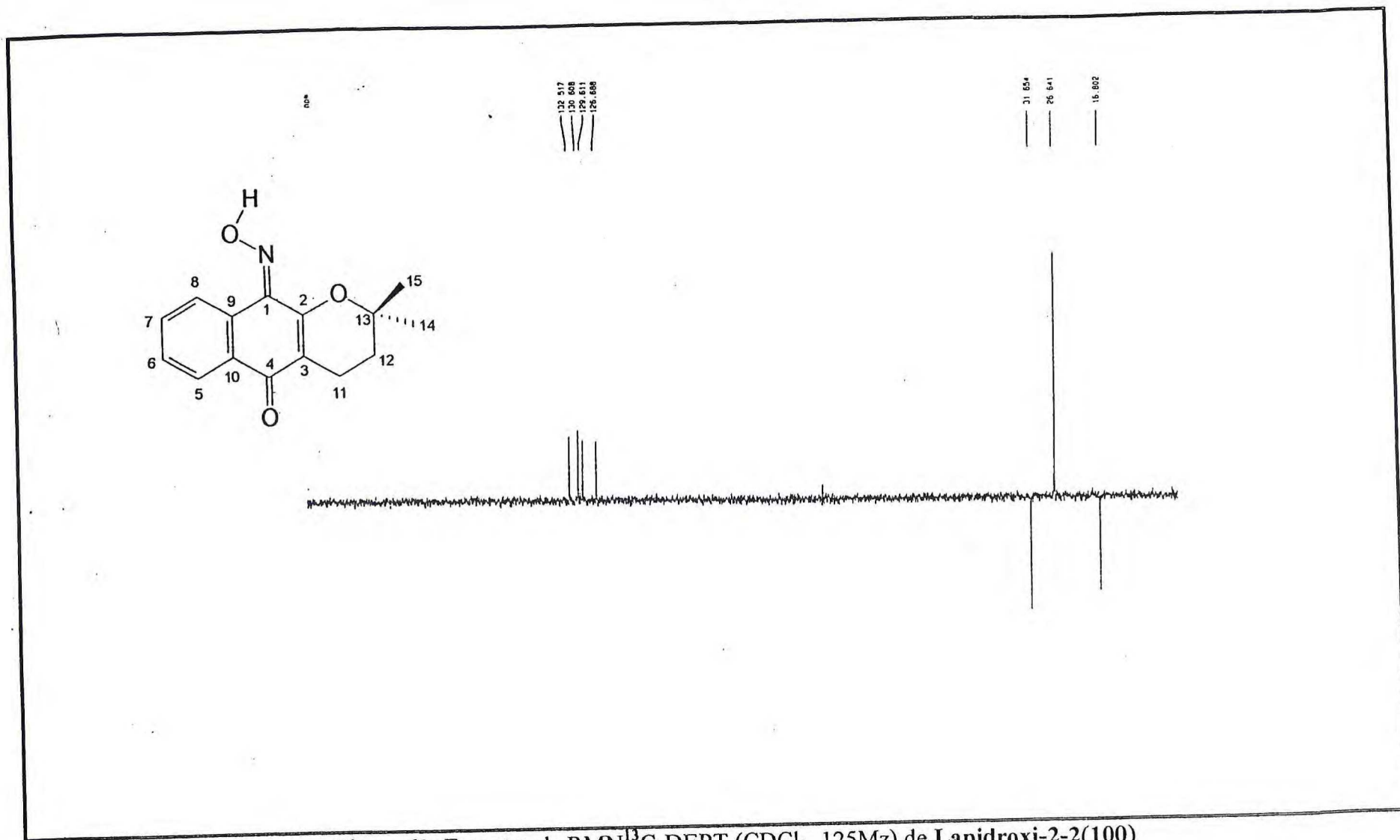


Figura 63: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT (CDCl_3 , 125Mz) de Lapidroxi-2-2(100)

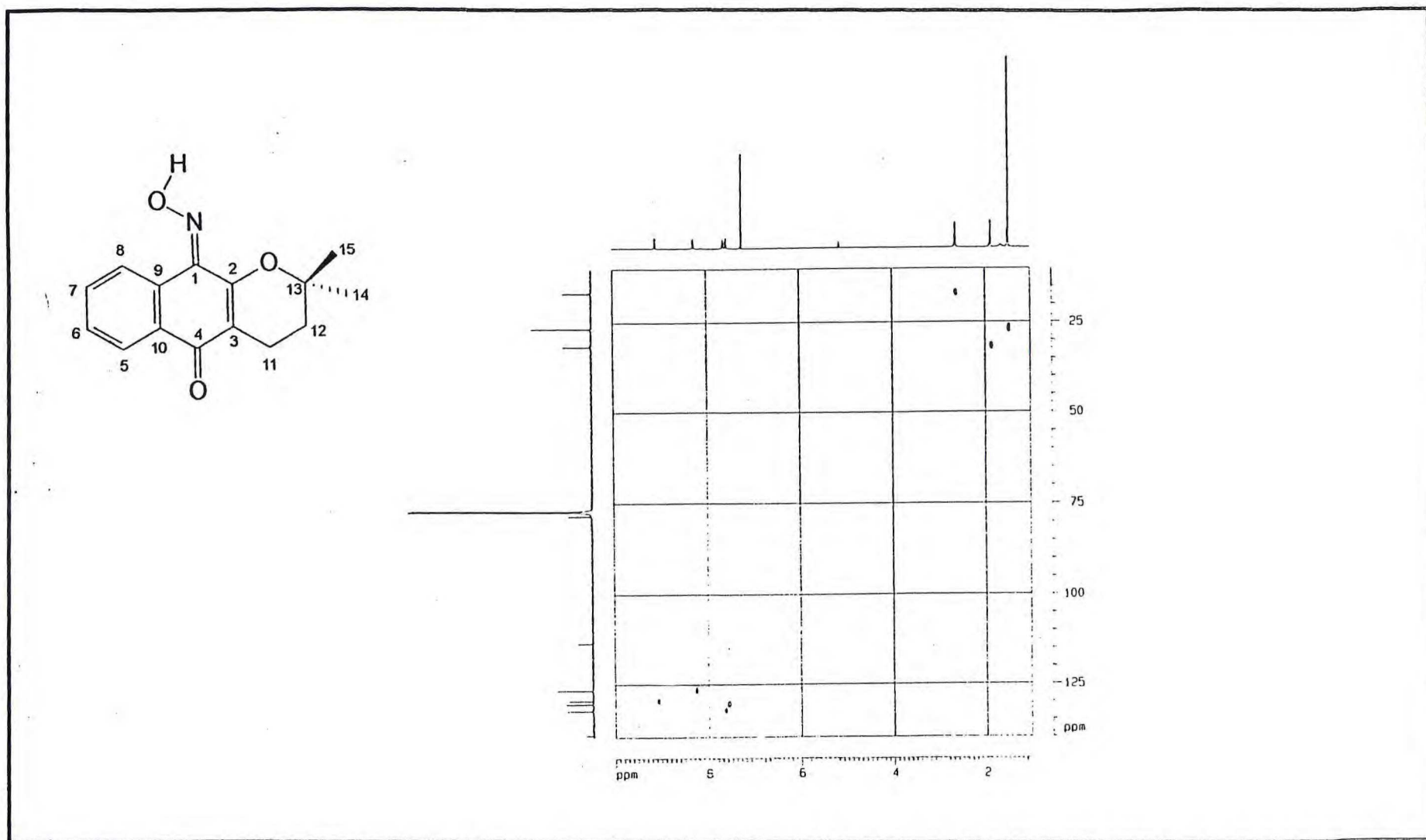


Figura 64: Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HMQC (^1H - ^{13}C - $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=1$) (CDCl_3 , 125Mz) de Lapidroxi-2-2(100)

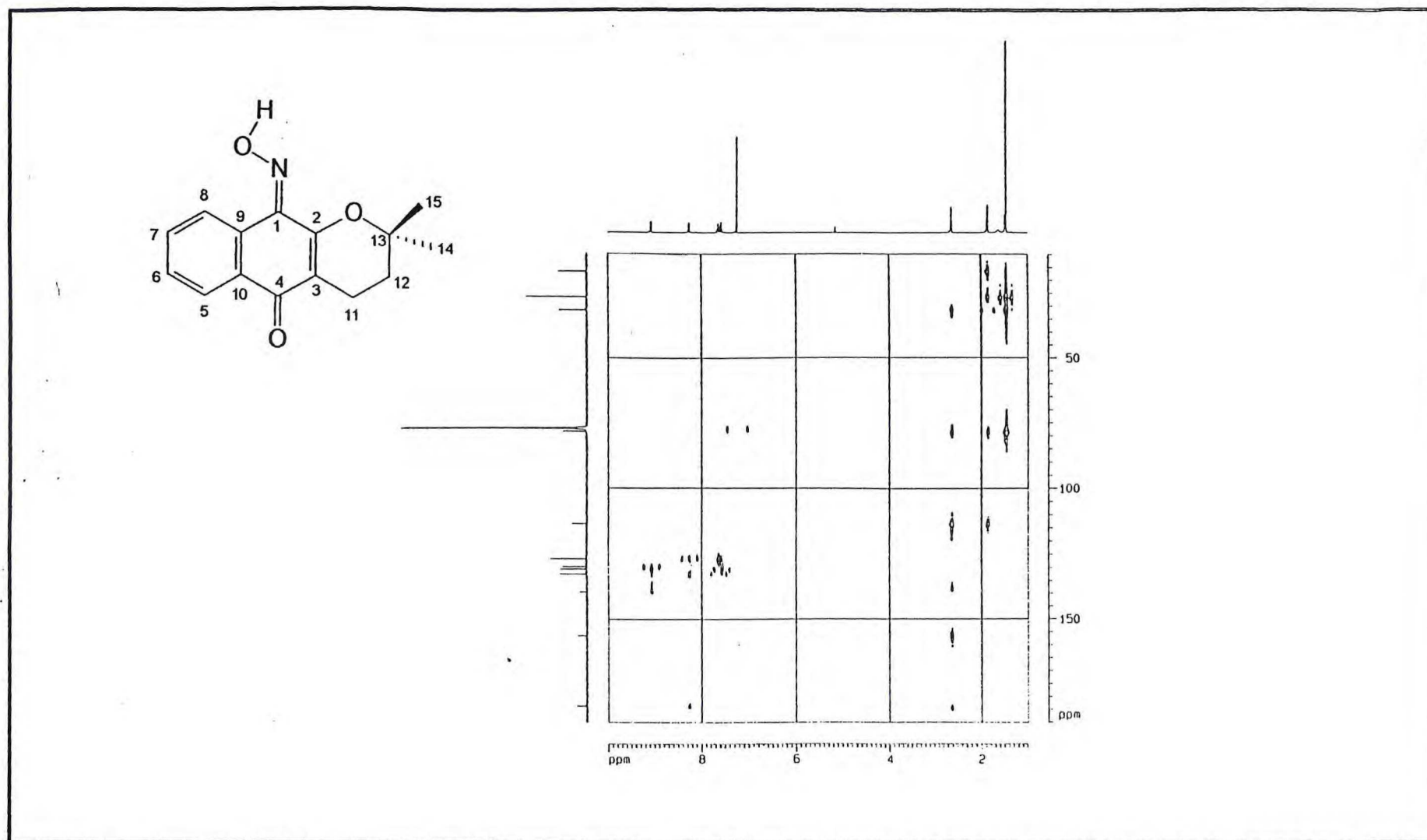


Figura 65: Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HMBC (^1H - ^{13}C - $^n\text{J}_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3) (CDCl_3 , 125Mz) de Lapidroxi-2-2(100)

CAPÍTULO 4

*DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS
CONSTITUINTES FIXOS ISOLADOS DO
EXTRATO ETANÓLICO DO LENHO E
CASCAS DO LENHO DE Tabebuia rosea*

4. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES FIXOS ISOLADOS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DO LENHO E CASCAS DO LENHO DE *Tabebuia rosea*.

Foram isoladas seis substâncias do lenho e cascas do lenho de *Tabebuia rosea*, que foram denominadas da seguinte maneira: ILEC-1 [éster metílico do ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico], ILEA-1 [ácido *p*-hidroxi-cinâmico], ILEA-2 [glicosídeo do β -sitosterol], ILEA-4 [ácido 3 β ,6 β ,19 α -trihidroxí-urs-12-eno-28-óico] e ICEH-K1 [β -sitosterol]. As análises dos dados espectroscópicos e espectrométricos que possibilitaram a identificação das substâncias encontram-se descritas a seguir. A determinação do β -sitosterol(77) e glicosídeo do β -sitosterol(78) foi feita anteriormente no capítulo 3.

4.1. Determinação Estrutural de ILEC-1 (92)

A substância denominada ILEC-1 apresentou-se como um sólido levemente amarelado e ponto de fusão 180-182°C.

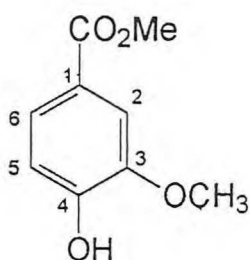
O espectro na região do infravermelho (Fig.66, pág.119) exibiu uma larga absorção absorções em 1678 cm⁻¹ correlacionada a $\nu_{C=O}$ de carbonila de éster conjugada e bandas em 1593 e 1517 cm⁻¹ atribuídas a $\nu_{C=C}$ de anel aromático.

O espectro de RMN¹H (Fig.67, pág.120) confirmou a natureza aromática de ILEC-1 através dos sinais em δ 7.75(dd, $J=8.4$ e 1.7 Hz, 1H), 7.57(sl, 1H) e 6.89(d, $J=8.4$ Hz), além de mostrar a presença de dois grupamentos metoxílicos em δ 3.92(s, 6H). A análise dos espectros de RMN¹³C-PND (Fig.68, pág.121) e DEPT-135 (Fig.69, pág.122) possibilitou a identificação de três carbonos aromáticos hidrogenados em δ 124.57, 112.20 e 110.25, dois carbonos aromáticos oxigenados em δ 153.67 e 148.59, além de um carbono aromático quaternário em δ 121.67, um carbono carboxílico conjugado em δ 172.08, e dois carbonos alifáticos oxigenados em δ 56.03 e 55.96 correspondentes aos grupamentos metoxila. De acordo com esses dados chegou-se à conclusão de que a estrutura tratava-se do éster metílico do ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico (92).

O padrão de substituição no anel foi caracterizado pela multiplicidade dos hidrogênios aromáticos, pois observou-se um hidrogênio com acoplamento *orto* e *meta* (δ 7.75, dd, $J=8.4$ e 1.7 Hz), um hidrogênio apresentando somente acoplamento *orto* (δ 6.89, d, $J=8.4$ Hz) e um outro sob a forma de singlete largo em δ 7.57 sugerindo apenas acoplamento em *meta*. Os deslocamentos químicos apresentados no espectro de RMN¹³C

para os carbonos aromáticos oxigenados também são compatíveis com esse padrão de substituição, pois observou-se um efeito de proteção ao carbono oxigenado em δ 148.59 devido à presença em *orto* de outro carbono oxigenado (δ 153.67), menos protegido que o anterior por situar-se em posição *para* ao carbono ligado à carbonila. As atribuições de deslocamento químico de ^1H e ^{13}C podem ser observadas na Tabela 17, pág. 118.

De acordo com esses dados foi proposta a estrutura (92) para ILEC-1, corroborada pelo espectro de massas (Fig.70, pág.123), que apresentou íon molecular (M^+) com razão m/z 182 daltons. ILEC-1 foi identificado o éster metílico do ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico (92).



(92)

Tabela 17: Dados de RMN ^1H e ^{13}C de ILEC-1(92) em CDCl_3 .

<u>C</u>	$^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY- ^1J	
	δ_c	$\delta_H, J(\text{Hz})$
C=O	172.08	-
1	121.67	-
3	148.59	-
4	153.67	-
CH		
2	110.25	7.57(sl)
5	112.20	6.89(d, $J=8.4$)
6	124.57	7.75(dd, $J=8.4$ e 1.7)
CH₃		
OCH₃	56.00	3.92(s)
OCH₃	56.00	3.92(s)

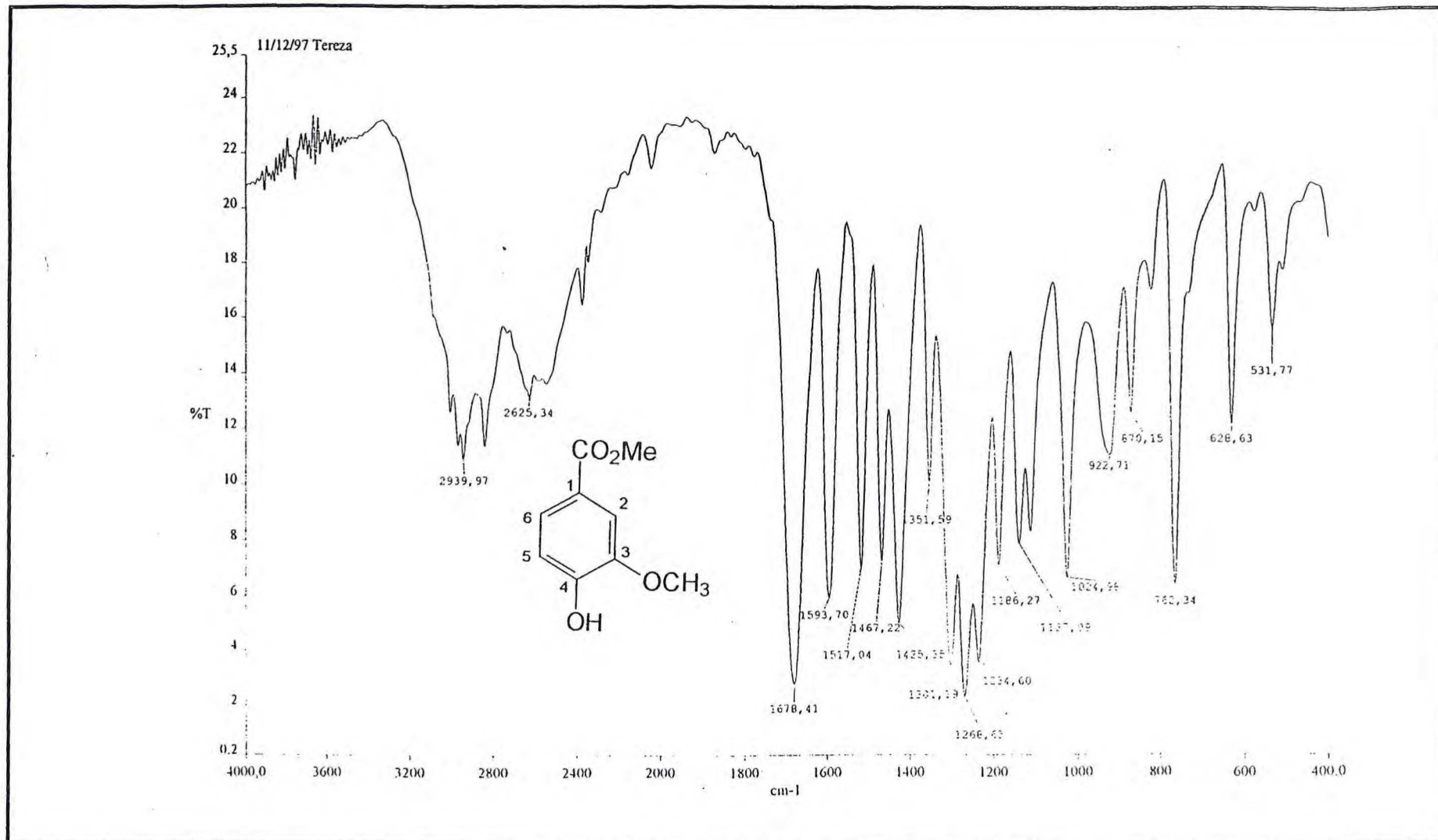


Figura 66: Espectro na região do I.V. (fase KBr) de ILEC-1(92)

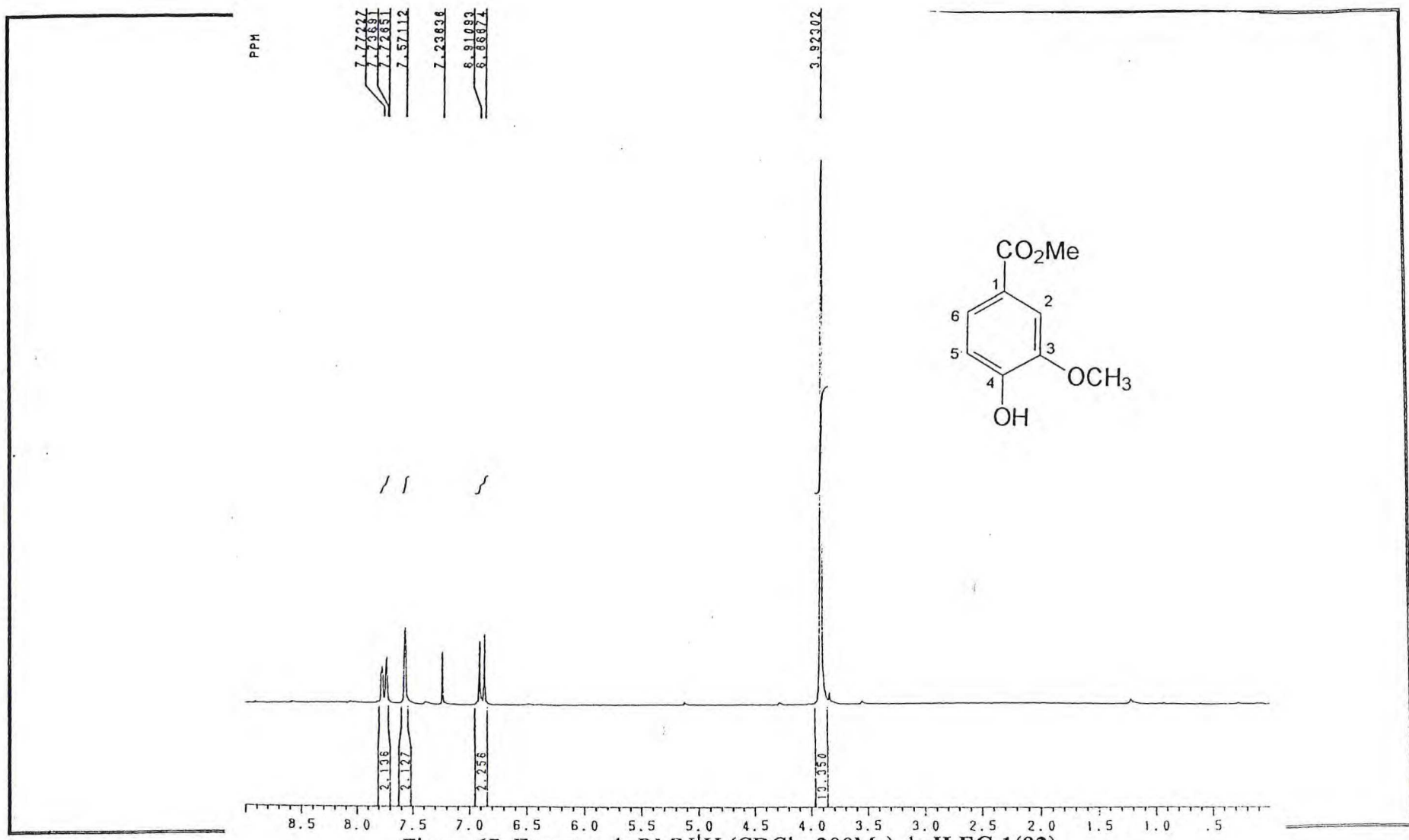


Figura 67: Espectro de RMN^1H (CDCl_3 , 200Mz) de ILEC-1(92)

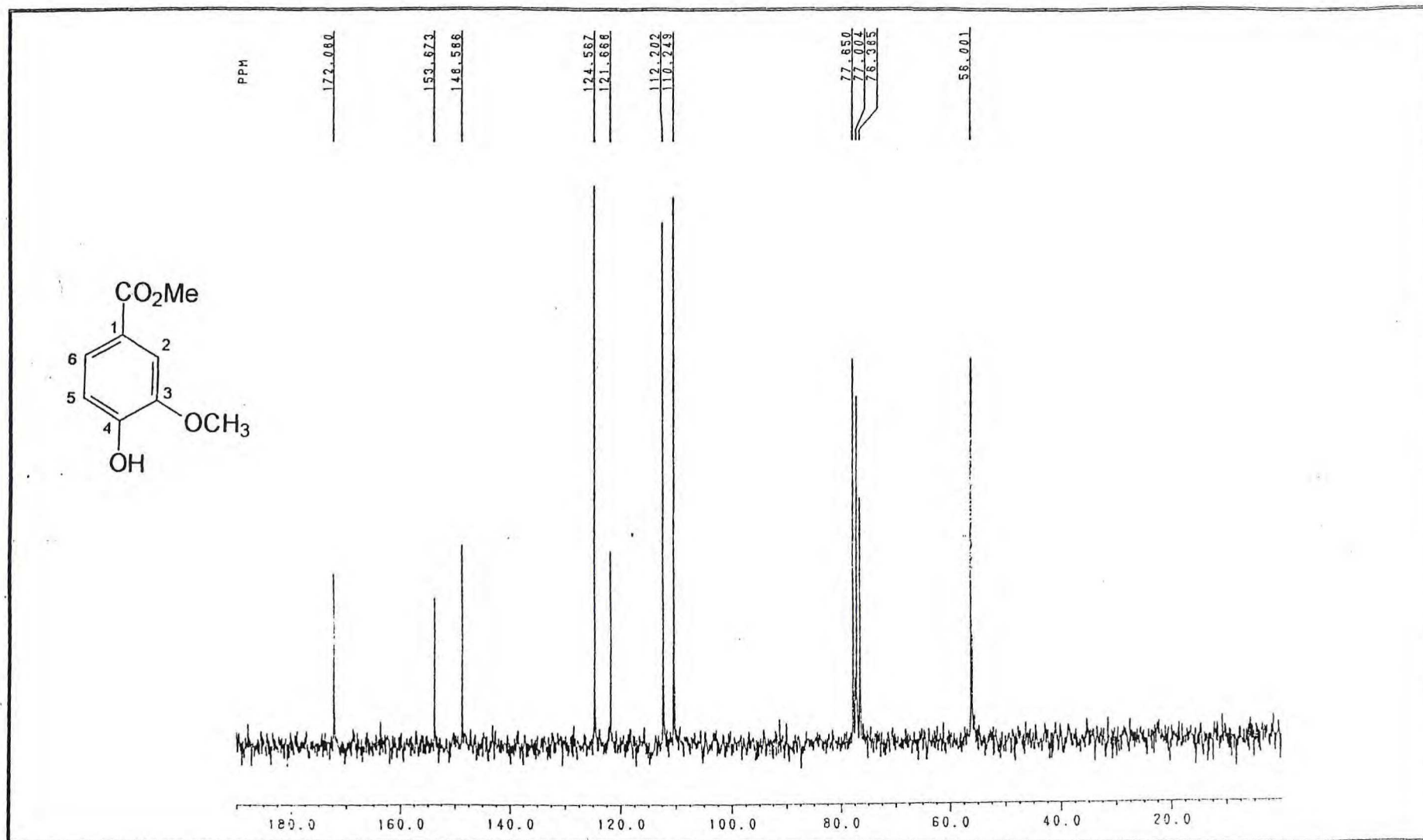


Figura 68: Espectro de RMN ^{13}C -PND (CDCl_3 , 50Mz) de ILEC-1(92)

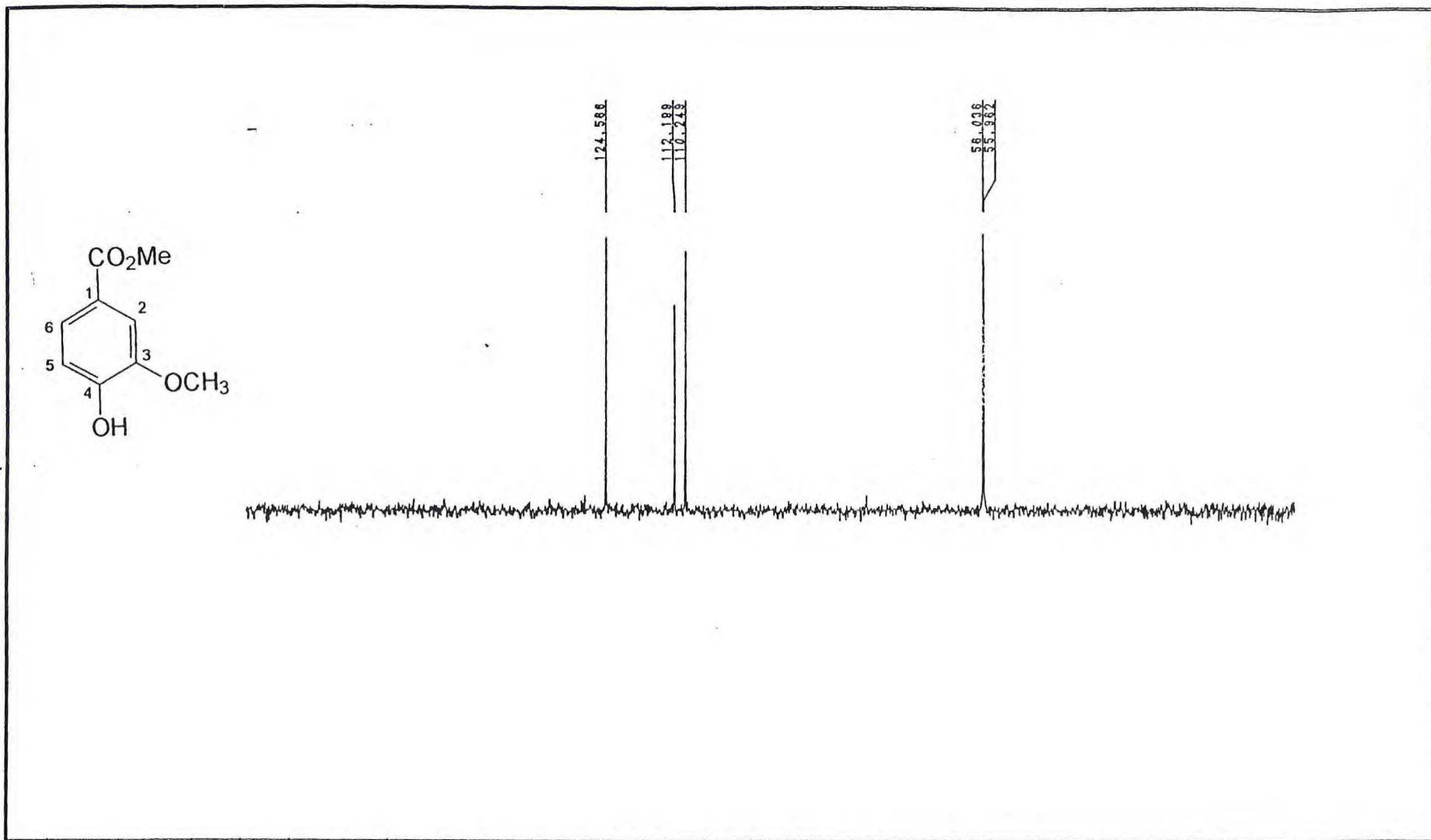


Figura 69: Espectro de RMN¹³C-DEPT (CDCl₃, 50Mz) de ILEC-1(92)

File:OUT023 Ident:539_541 Win 1000PPM Acq:22-OCT-1998 08:52:46 +56:28 Cal:OUT023
AutoSpec EI+ Magnet BpM:182 BpI:6111915 TIC:20225246 Flags:HALL

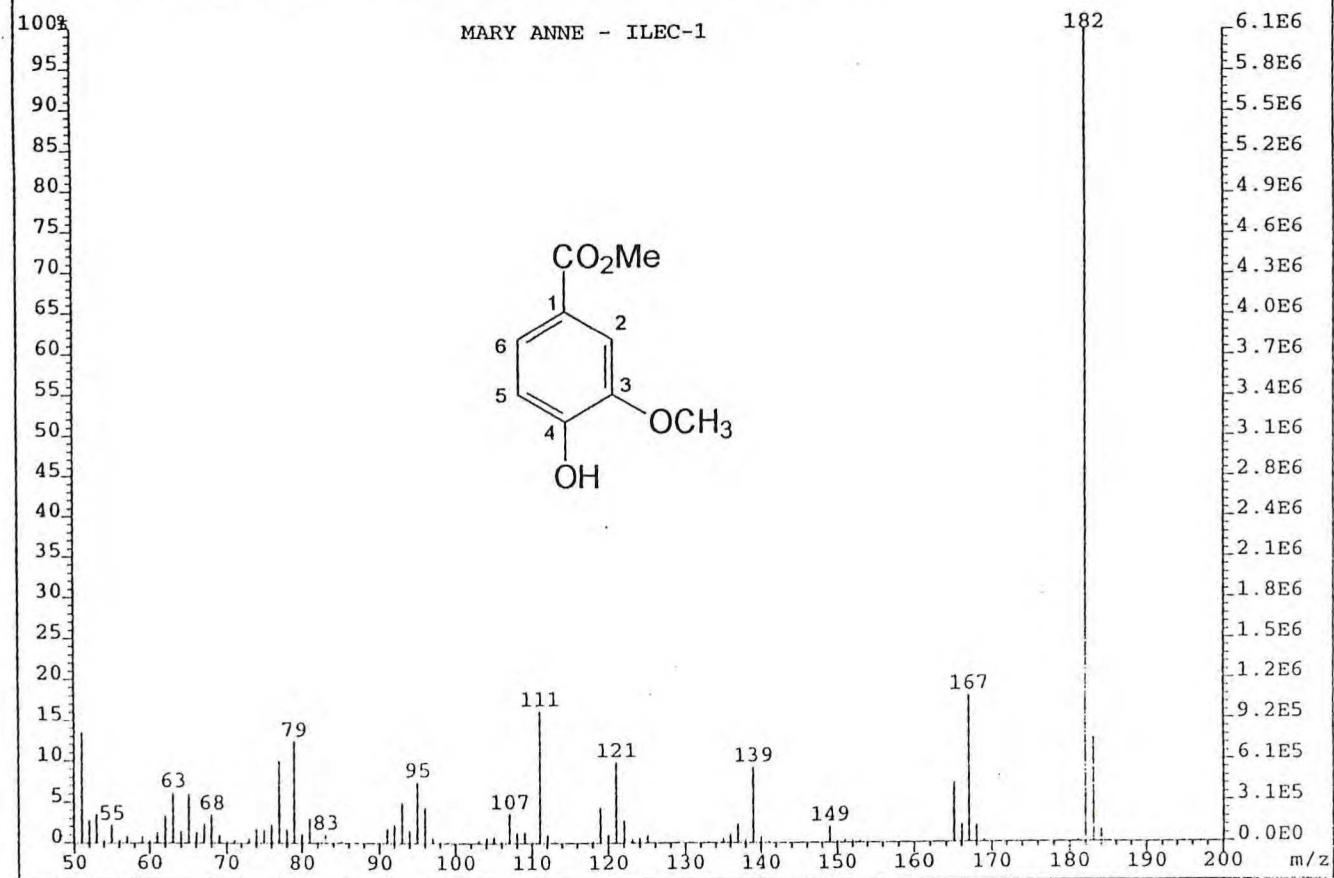


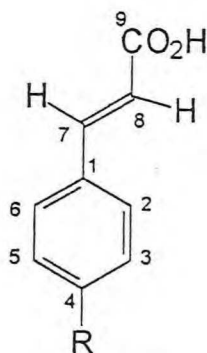
Figura 70: Espectro de massas de ILEC-1(92)

4.2. Determinação Estrutural de ILEA-1(93)

ILEA-1 apresentou-se como um sólido amarelado, solúvel em metanol, com ponto de fusão 210-213°C. O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig.71, pág.126) mostrou bandas em 3382 cm⁻¹ (ν_{O-H}), 1673 cm⁻¹ (ν_{C=O} de carbonila conjugada) e em 1628, 1601 e 1512 cm⁻¹ (ν_{C=C}).

O espectro de RMN¹H (Fig.72, pág.127) apresentou sinais de hidrogênios com deslocamentos químicos em δ 6.79(d, J=8.6 Hz, 2H) e δ 7.41(d, J=8.6 Hz, 2H) correlacionados a um sistema aromático *para*-substituído, além da presença de sinais em δ 6.26(d, J=16.3 Hz, 1H) e δ 7.59(d, J=16.3 Hz, 1H) atribuídos a hidrogênios vinílicos característicos do ácido *trans*-cinâmico(108)⁵⁵.

A análise dos espectros de RMN¹³C-PND (Fig.73, pág.128) mostrou a presença de uma carboxila α,β-insaturada (C-9) em δ 171.10, e dois carbonos sp² mono-hidrogenados conjugados a carbonila em δ 146.68 (C-7) e 115.44 (C-8), correspondentes ao grupo cinâmico. Para os carbonos aromáticos foram observados quatro sinais: em δ 127.10 (C-1), 131.06 (C-2 e C-6), 161.00 (carbono oxigenado, C-4) e 116.74 (C-3 e C-5) protegidos por estarem em posição *orto* ao carbono oxigenado. Os dados de ¹H e ¹³C de ILEA-1 encontram-se na Tabela 18, pág.125. Assim, a estrutura proposta para ILEA-1 foi à correspondente ao ácido *p*-hidroxi-cinâmico (93).



(93): R=OH

(108): R=H

Tabela 18: Dados de RMN¹H e ¹³C de ILEA-1(93)

¹ H x ¹³ C-COSY- ¹ J		
<u>C</u>	$\delta_C(93)$	$\delta_H(93), J(\text{Hz})$
1	127.10	-
4	161.00	-
9	171.10	-
CH		
2,6	131.06	7.41(d, $J=8.6$)
3,5	116.74	6.79(d, $J=8.6$)
7	146.68	7.59(d, $J=16.3$)
8	115.44	6.29(d, $J=16.3$)

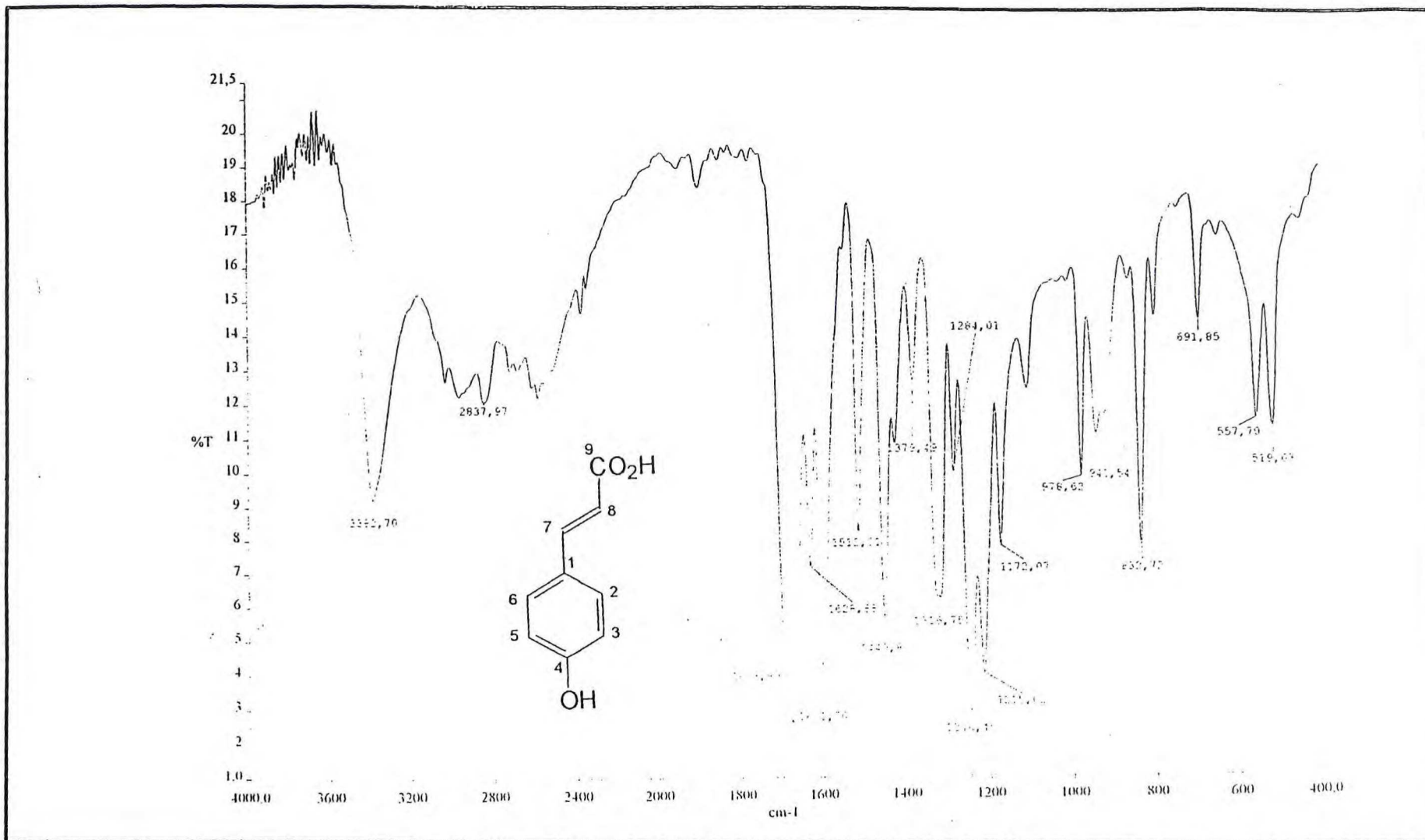


Figura 71: Espectro na região do I.V. (fase KBr) de ILEA-1(93)

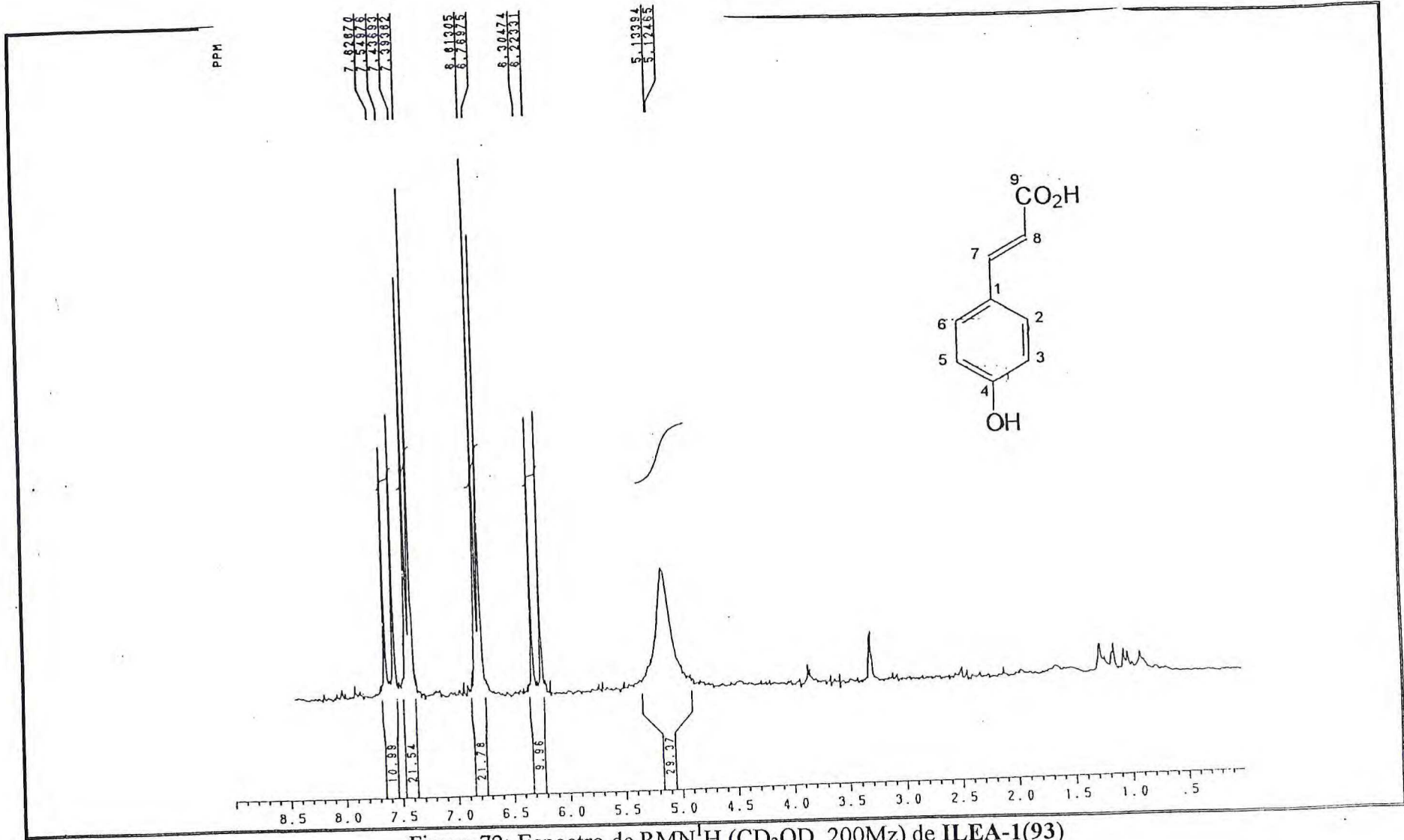


Figura 72: Espectro de RMN¹H (CD₃OD, 200Mz) de ILEA-1(93)

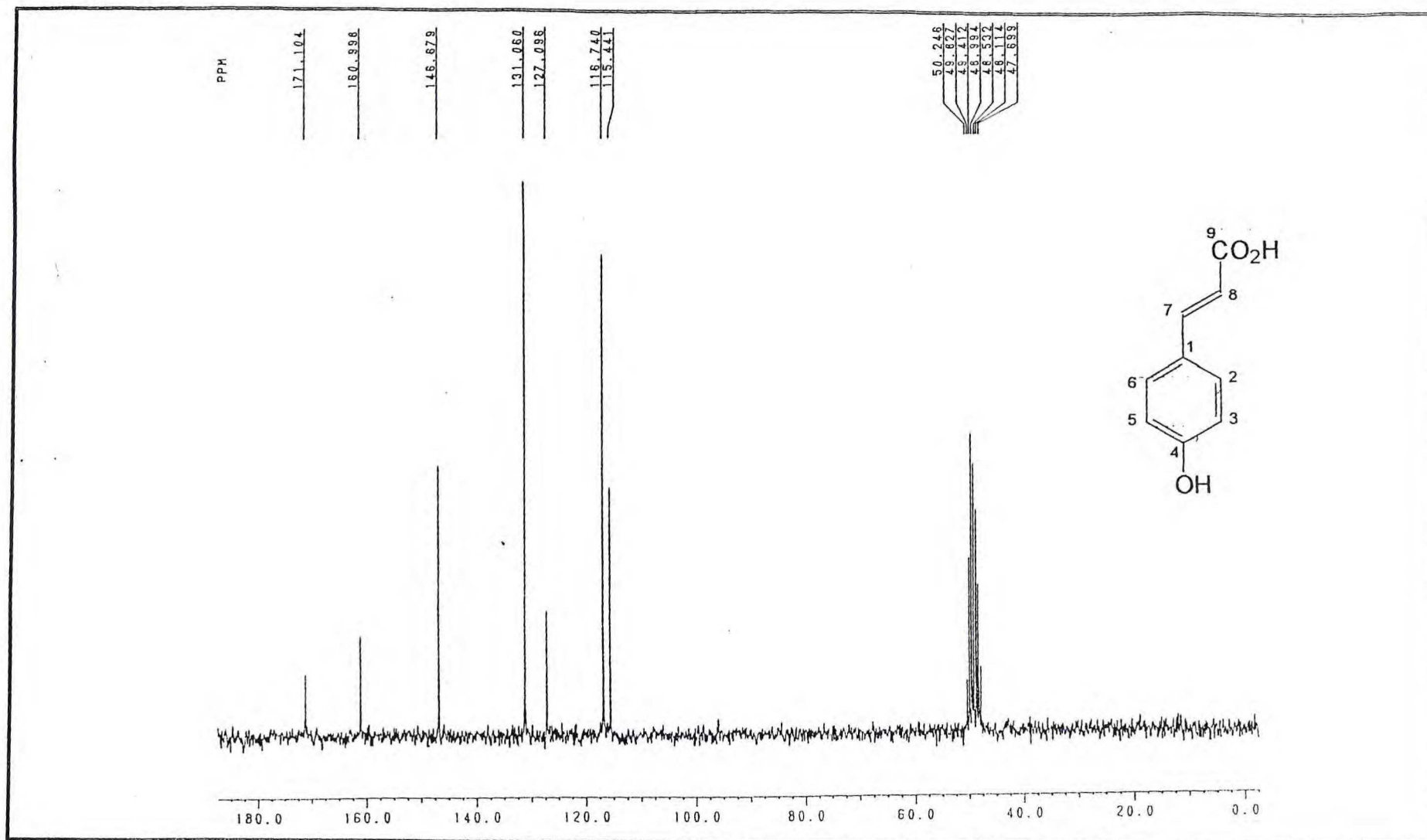


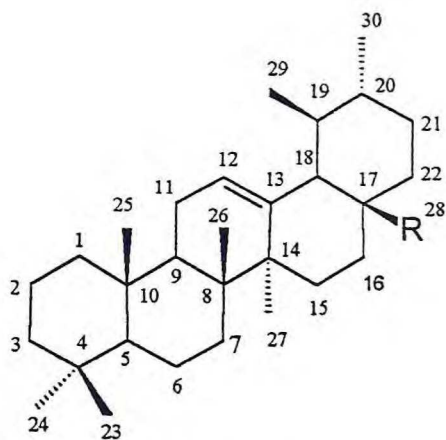
Figura 73: Espectro de RMN¹³C-PND (CD₃OD, 50Mz) de ILEA-1(93)

4.4. Determinação Estrutural de ILEA-4(94)

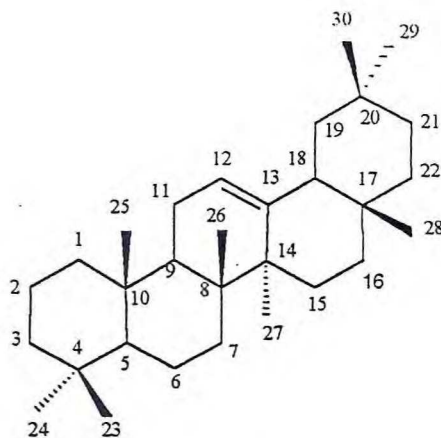
A substância denominada ILEA-4 mostrou-se como um sólido branco, solúvel em metanol, de ponto de fusão 251-253°C.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig.74, pág.133) apresentou absorção intensa em 3449 cm⁻¹ referente a ν_{O-H} , e 1696 cm⁻¹ correspondente a $\nu_{C=O}$ de ácido carboxílico.

Os espectros de RMN¹³C-PND (Fig.75, pág.134) e DEPT-135 (Fig.76, pág.135) mostraram sete grupos metílicos, oito metilênicos, sete carbonos quaternários, além de um grupo carboxila, um carbono oxigenado quaternário e dois carbonos oxigenados terciários. Os deslocamentos químicos dos carbonos olefinicos em δ 129.81 (CH) e 139.25 (C) foram úteis para distinguir entre um triterpeno da série URS-12-eno(103) e seu análogo OLEAN-12-eno(104).



(103): R=CH₃
(105): R=CO₂H



(104)

Na série URS-12-eno (103) o C-12 é mais desprotegido em torno de 2 ppm e o C-13 mais protegido em torno de 5 ppm em comparação com os correspondentes carbonos em análogos OLEAN-12-enos(104)⁵⁶. Essa diferença pode ser explicada pela presença de um grupo 29 β -metil(equatorial) nas proximidades da dupla ligação, o qual se encontra em posição γ ao C-13 e em posição δ ao C-12. Uma diferença ainda maior no deslocamentos

químicos entre as duas séries é observada no C-18, o qual é deslocado para região diamagnética em torno de 11 ppm na série OLEAN-12-enos, devido ao efeito de proteção do grupo 3 β -metil(axial) que está disposto em posição γ -gauche ao C-18 em OLEA-12-enos⁵⁶.

O sinal em δ 182.26 foi atribuído à presença de uma carboxila no C-28 do esqueleto URS-12-eno, que acrescido aos sinais de três carbonos oxigenados sugeriram que a estrutura tratava-se de um derivado tri-hidroxilado do ácido ursólico (105).

O espectro de RMN¹H (Fig.77, pág.136) mostrou um sinal para próton olefínico em δ 5.31 (sl, 1H) e para dois hidrogênios ligados a carbonos oxigenados mono-hidrogenados em δ 3.08 (dd, $J=11.9$ e 4.1 Hz, 1H) e δ 4.81 (sl, 1H). Foram observados seis singletos em δ 1.04, 1.07, 1.15, 1.19, 1.29 e 1.30 atribuídos a grupamentos metílicos ligados a carbono quaternário, e um dubleto em δ 0.96 referente a um grupo metílico ligado a carbono terciário.

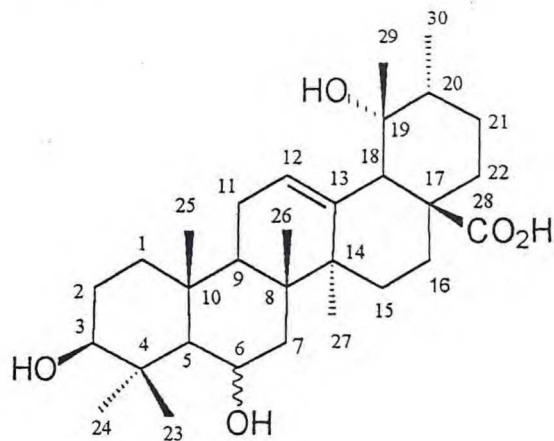
No espectro de correlação heteronuclear a longa distância (¹H x ¹³C-COSY- $^nJ_{CH}$, $n=2$ e 3 , Fig.78, pág.137) observou-se que o sinal em δ 2.51 (s, 1H) apresentava acoplamento com C-17, C-28 e C-13, levando à dedução de que tratava-se do hidrogênio ligado ao C-18, vizinho do carbono quaternário oxigenado C-19. A presença de uma hidroxila em posição β (equatorial) no C-3 ficou evidenciada pelo deslocamento químico, multiplicidade e valores da constante de acoplamento (J) apresentado pelo hidrogênio em C-3, cujo sinal em δ 3.08 mostrou-se como um duplo dubleto com valores de $J=11.9$ Hz e $J=4.1$ Hz, referentes respectivamente aos acoplamentos axial-axial e axial-equatorial com os hidrogênios axial e equatorial do C-2.

A localização do outro grupo hidroxila no C-6 foi deduzida pela correlação entre os sinais no espectro de correlação homonuclear bidimensional (¹H-¹H-COSY, Fig.79, pág.138) onde observa-se um acoplamento entre o H-6 (δ 4.81) com os 2H-7 (δ 1.75-1.50) e com H-5 (δ 0.73). A posição β (axial) da hidroxila em C-6 ficou evidenciada pelos fracos acoplamentos apresentados pelo H-6, por estar em posição equatorial.

A comparação dos dados espectroscópicos de ILEA-4 com valores da literatura^{57,58,59} confirmaram a estrutura proposta como sendo o ácido 3 β -6 β -19 α -trihidroxil-urs-12-eno-28-óico (94), substância inédita no gênero *Tabebuia*, isolada anteriormente no gênero *Uncaria*.

Na tabela 19, pág.132, podem ser observados os valores de deslocamentos químicos atribuídos aos átomos de carbono e hidrogênio, feitas com base nos espectros de correlação heteronuclear (¹H x ¹³C-COSY- $^nJ_{CH}$, $n=1$, Fig.80, pág.139) e de correlação

heteronuclear a longa distância ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY- $^nJ_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3 , Fig.78, pág.137) e ainda a comparação com os dados espectroscópicos de ^{13}C RMN fornecidos na literatura para o ácido 3β - 6β - 19α -trihidroxi-*urs*-12-eno-28-óico (**94**)⁵⁷ e o ácido 3β - 6α - 19α -trihidroxi-*urs*-12-eno-28-óico (**106**)⁵⁸.



(**94**): β -OH
(**106**): α -OH

Tabela 19: Correlação dos dados espectroscópicos de ILEA-4(94) e comparação com valores da literatura para o ácido 3 β ,6 β ,19 α -trihidroxi-urs-12-en-28-óico(94)⁵⁷ e o ácido 3 β -6 α -19 α -trihidroxi-urs-12-eno-28-óico (106)⁵⁸.

<u>C</u>	¹ H x ¹³ C-COSY- ¹ J		¹³ C x ¹ H-COSY- ⁿ J _{CH}		$\delta_C(94)^{57}$	$\delta_C(106)^{58}$
	$\delta_C(94)$	$\delta_H, J(\text{Hz})(94)$	² J _{CH}	³ J _{CH}		
4	40.70	-	H-5,H-23, H-24	-	39.7	41.4
8	40.23	-	H-26	H-27	40.5	42.9
10	37.63	-	H-5	H-6, H-25	37.1	38.3
13	139.25	-	H-18	H-27	139.3	140.2
14	43.07	-	H-27	H-12, H-26	42.6	42.9
17	*	-	H-18	-	48.5	47.8
19	73.67	-	-	-	72.9	73.9
28	182.26	-	-	H-18	180.7	179.2
CH						
3	80.18	3.08(dd, J=11.9 e 4.1)	-	-	78.8	80.2
5	57.25	0.73(sl)	-	-	56.4	55.3
6	68.97	4.81(sl)	-	-	67.9	67.3
9	49.00	1.73	-	H-12,H-25, H-26	48.3	47.8
12	129.81	5.31(sl)	H-11	-	128.4	129.5
18	55.14	2.51(s)	-	H-12	54.7	55.3
20	43.07	1.33	-	H-30	42.4	43.1
CH₂						
1	42.07	1.75-1.5 e 0.9 (dd)	-	-	41.77	39.3
2	28.05	1.75-1.50 e 1.20	-	-	28.4	27.4
7	41.92	1.75-1.50	-	-	41.3	42.7
11	24.62	2.03	H-12	-	24.1	24.4
15	29.59	1.88(dt) e 1.00	-	H-27	29.3	28.0
16	26.68	2.55(dt) e 1.60	-	-	26.5	26.6
21	27.30	1.73	-	-	27.0	26.8
22	39.01	1.75 e 1.60	-	-	38.5	39.0
CH₃						
23	17.61	1.15(s)	-	H-5	17.1	17.6
24	28.44	1.04(s)	-	-	28.6	29.1
25	17.28	1.29(s)	-	-	16.9	16.8
26	18.49	1.07(s)	-	-	18.0	22.4
27	24.80	1.30(s)	-	-	24.7	24.7
29	27.12	1.19(s)	-	-	27.2	27.3
30	16.56	0.92(d, J=6.8)	-	-	16.8	16.5

*Superposto com o sinal do MeOH (solvente)

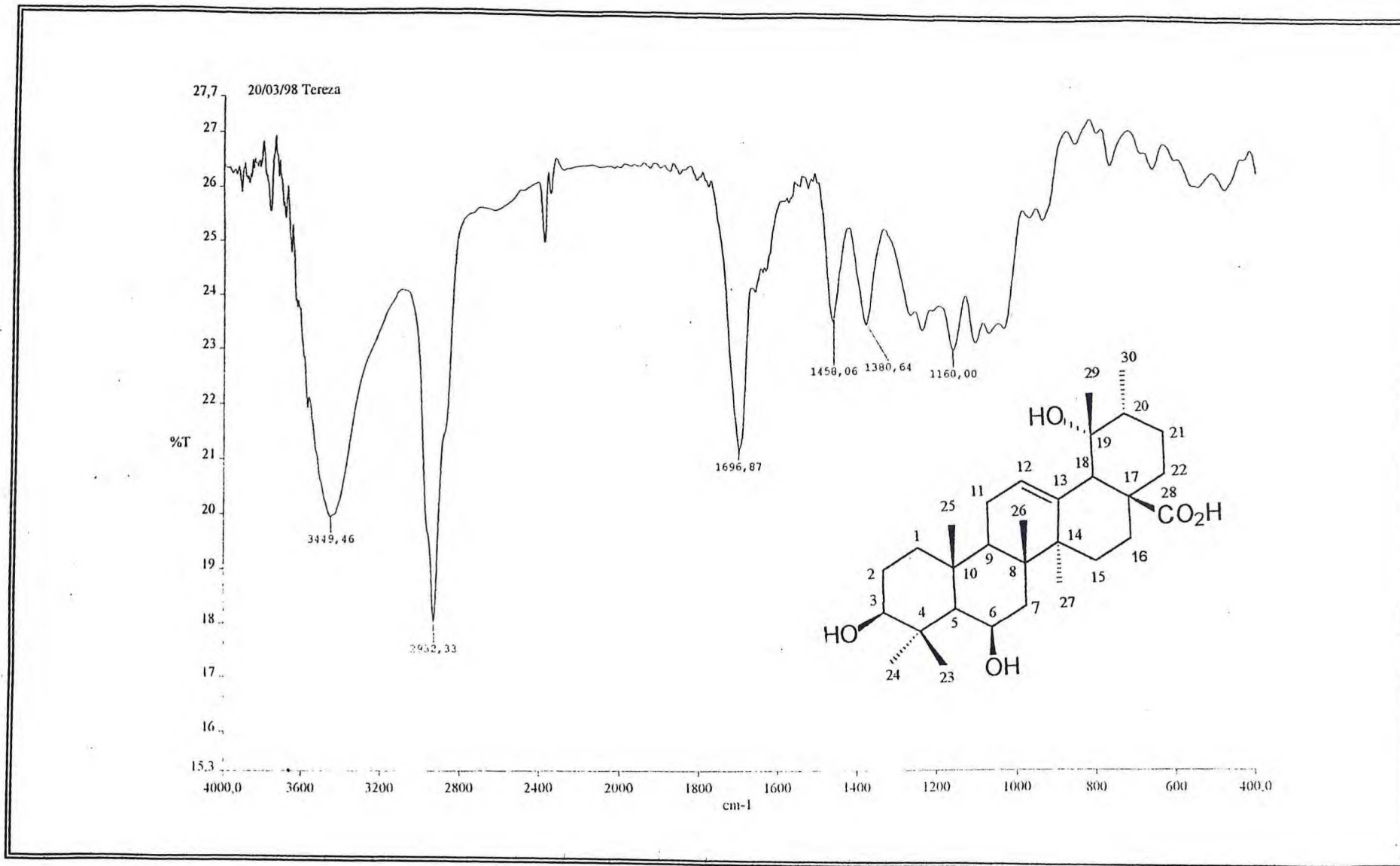


Figura 74: Espectro na região do I.V. (fase KBr) de ILEA-4(94)

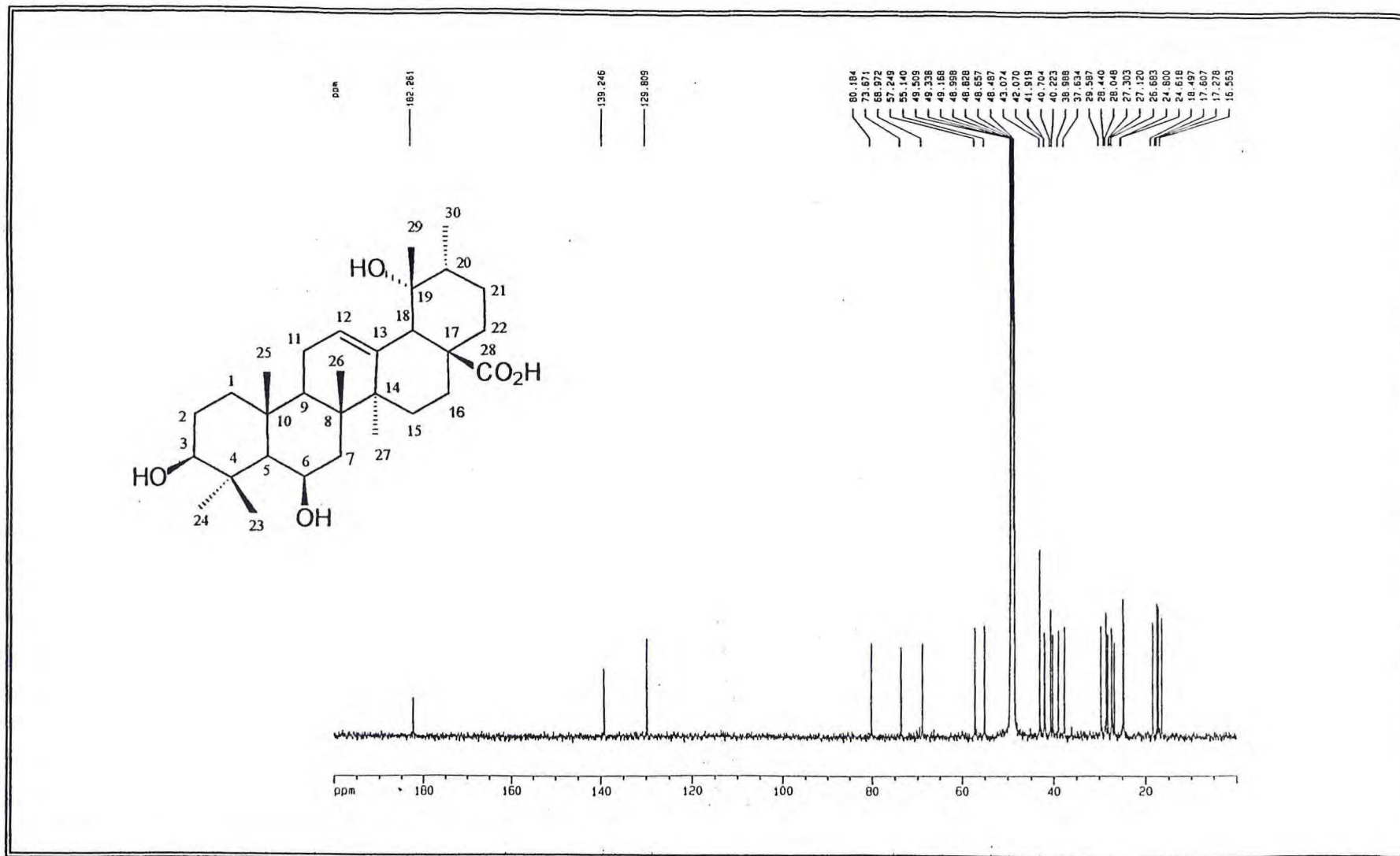


Figura 75: Espectro de RMN^{13}C -PND (CD_3OD , 125 MHz) de ILEA-4(94)

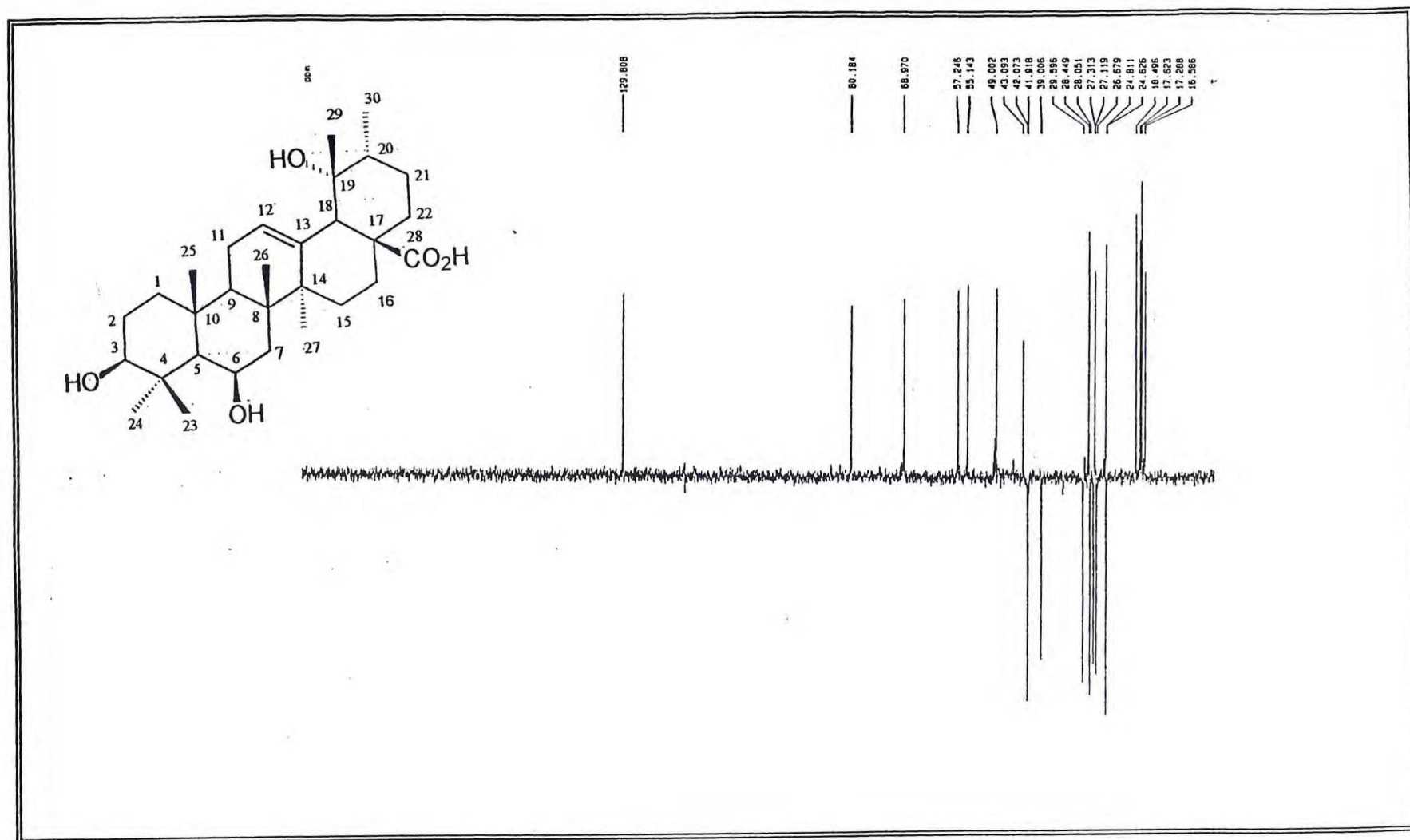


Figura 76: Espectro de RMN¹³C-DEPT (CD₃OD, 125 MHz) de ILEA-4(94)

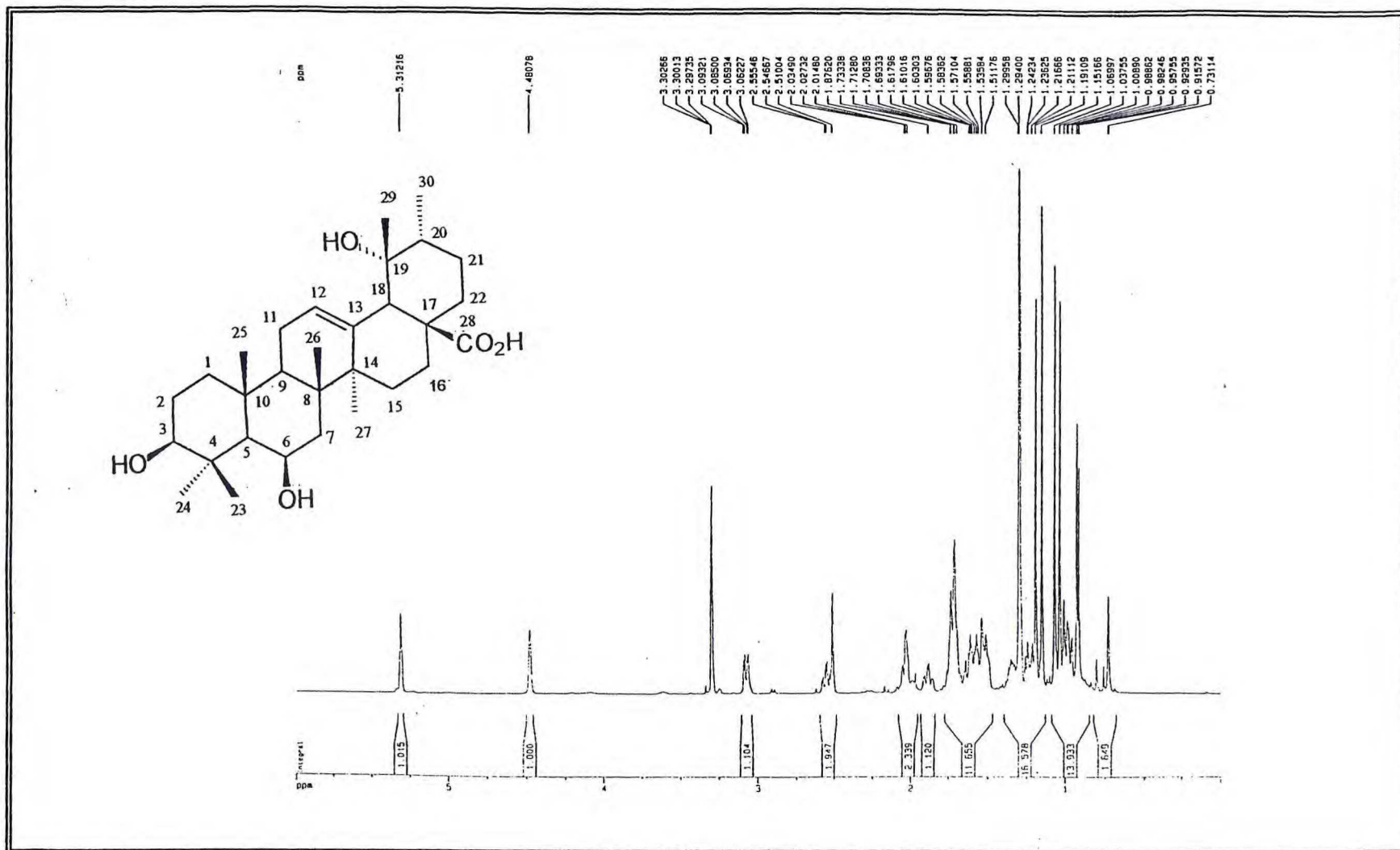


Figura 77: Espectro de RMN¹H (CD₃OD, 500 MHz) de ILEA-4(94)

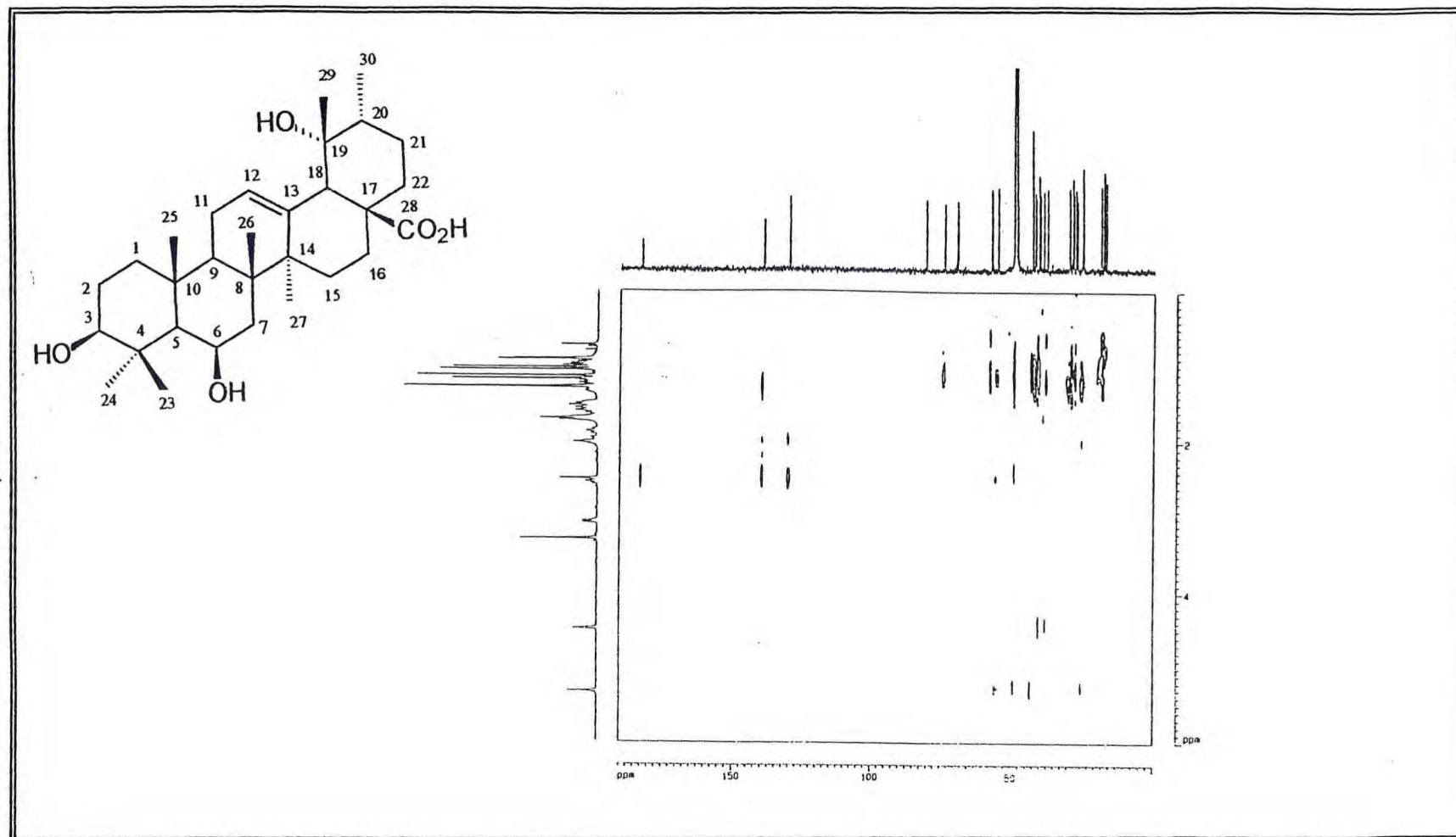


Figura 78: Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-COLOC (^1H - ^{13}C - $^nJ_{\text{CH}}$, $n=2$ e 3)
(CD_3OD , 125 MHz) de ILEA-4(94)

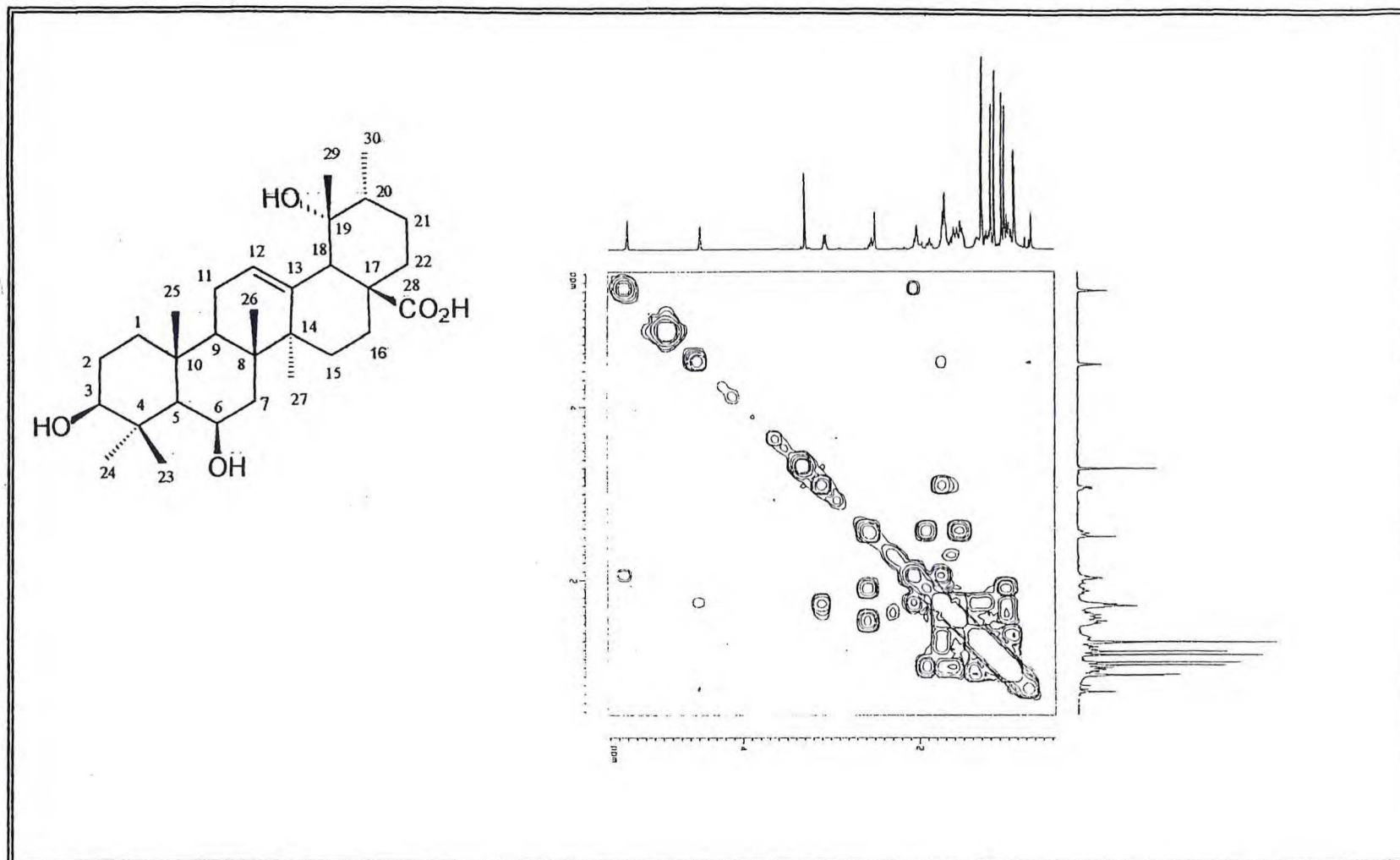


Figura 79: Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear (¹H-¹H-COSY) (CD₃OD, 500 MHz) de ILEA-4(94)

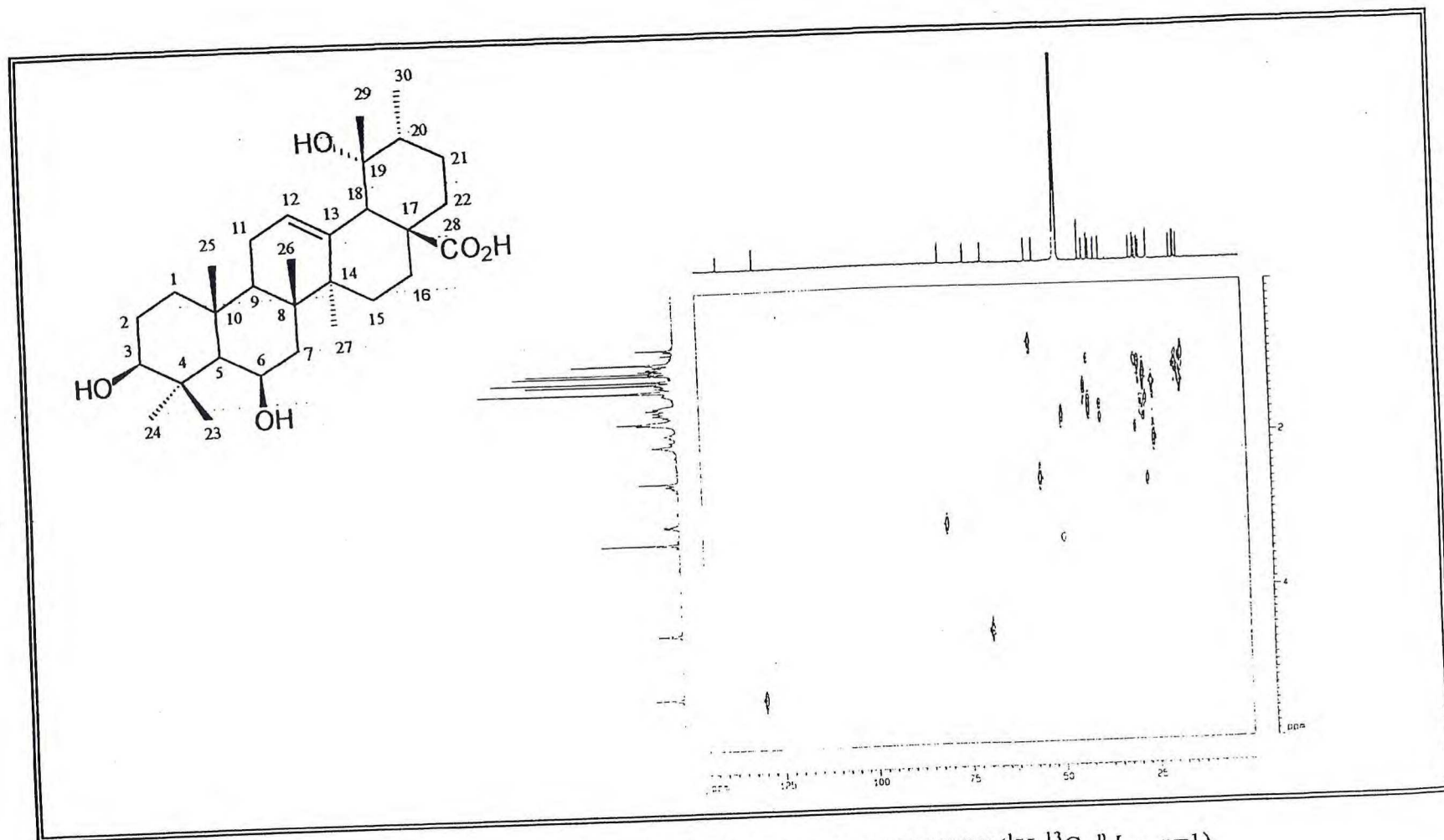


Figura 80: Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear-HETCOR(^1H - ^{13}C - $^nJ_{\text{CH}}$, $n=1$)
(CD_3OD , 125 MHz) de ILEA-4(94)

CAPÍTULO 5

PARTE EXPERIMENTAL

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Coleta e Identificação do Material Botânico

Foram estudados os constituintes fixos de duas espécies do gênero *Tabebuia*: *Tabebuia serratifolia* Nicholson e *Tabebuia rosea* Bertol. O caule de *Tabebuia rosea* foi coletado na Reserva Florestal da Companhia Vale do Rio Doce no município de Santa Luzia – Maranhão, enquanto que o caule de *Tabebuia serratifolia* foi coletado no município de Mulungú-Ceará. As excisas de *T. serratifolia* e *T. rosea* encontram-se arquivadas no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, sob os números 21645 e 25949, respectivamente e foram identificadas pela professora Ivanilza M. Andrade.

5.2. Métodos Cromatográficos

As cromatografias de adsorção em coluna foram feitas utilizando-se sílica-gel ($\approx 0,05\text{mm}$) código 453337 e as de camada delgada sílica-gel 60 código 45335, ambas da marca Carlo Erba. O comprimento e diâmetro das colunas variaram conforme as quantidades e grau de pureza das amostras a serem cromatografadas.

A revelação das substâncias em análise em cromatografia em camada delgada foram realizadas por exposição à lâmpada de irradiação modelo UVSL – 25 da Mineral Light ($\lambda = 254$ e 366 nm) seguidas pela pulverização com solução de vanilina/ácido perclórico/etanol e aquecimento em estufa. Utilizou-se quando necessário revelação em câmara de iodo.

5.3. Métodos Espectrométricos e Espectroscópicos

Os espectros apresentados nesse trabalho foram obtidos em aparelhos pertencentes ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, ao Departamento de Química da Universidade de Campinas. A descrição dos modelos e condições dos aparelhos utilizados para a caracterização das substâncias encontra-se a seguir.

Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em espectrômetro Perkin-Elmer modelo 720. Para as substâncias sólidas foram utilizadas pastilhas de KBr e para as demais foram preparados filmes.

Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN¹H) e de Carbono-13 (RMN¹³C)

Os espectros de RMN unidimensionais e bidimensionais foram obtidos em espectrômetros Bruker AC-200, AC-300 e AC-500, operando em 200, 300 e 500 MHz para hidrogênio (RMN¹H) e 50, 75 e 125 MHz para carbono-13 (RMN¹³C), respectivamente. Os espectros unidimensionais de RMN¹³C foram obtidos totalmente desacoplados e utilizando-se a técnica DEPT-135 (ângulo de mutação 135°). Foram utilizadas algumas técnicas de RMN bidimensionais: espectroscopia de correlação homonuclear (¹H-¹H-COSY), espectroscopia de correlação heteronuclear (¹³C-¹H-COSY ou HETCOR), experimentos de correlação homonuclear a longa distância(COLOC), espectroscopia de efeito nuclear Overhauser bidimensional (NOESY). Os métodos de detecção inversa utilizados foram coerência quântica múltipla heteronuclear (HMQC) e correlação de ligações múltiplas heteronuclear. (HMBC). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e a multiplicidade dos sinais conforme a convenção: s(singleto), sl(singleto largo), d(dubleto), dd(duplo dubleto), t(tripleto), q(quarteto) e m(multipeto). Os solventes utilizados na dissolução das substâncias submetidas às análises foram clorofórmio-D(CDCl₃), metanol-D(CD₃OD), acetona-D(C₃D₆O), benzeno-D(C₆D₆) e piridina-D(C₅D₅N).

Espectrometria de Massas (E.M.)

Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro de massas de alta resolução, aparelho VG AUTOSPEC FYSONE INSTRUMENT.

Determinação do Ponto de Fusão

Os valores dos pontos de fusão das substâncias foram determinados no aparelho METTLER com placa aquecedora modelo FP 52 e unidade de controle FP 5.

5.4. ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO ETANÓLICO DO CERNE DE *Tabebuia serratifolia* (Fluxograma 1, pág.172)

5.5. Obtenção do Extrato Etanólico do Cerne de *Tabebuia serratifolia*

O caule de *Tabebuia serratifolia* foi separado em lenho e cascas. O lenho(1,8Kg), seco a temperatura ambiente e triturado, foi submetido a extração a frio com etanol. A solução obtida foi destilada sob pressão reduzida a temperatura média de 60^o C. Observou-se a formação de um material sólido amarelo, o qual foi separado e posteriormente purificado. O extrato etanólico obtido (145g) foi denominado IAE.

5.6. Obtenção de IAE-1(28)

O sólido amarelo precipitado no extrato etanólico (4,9g) foi lavado com etanol gelado, dissolvido a quente em hexano, e deixado a temperatura ambiente para recrystalizar. O sólido foi filtrado e seco, resultando em 4,2g de um sólido amarelo denominado IAE-1, com ponto de fusão 139-140 °C . CCD de IAE-1 e amostra autêntica de lapachol revelou que eram similares. Os espectros de RMN¹H e RMN¹³C confirmaram que IAE-1 tratava-se da naftoquinona lapachol (28), obtida com um rendimento de 2,9% do total do extrato etanólico.

5.7. Fracionamento do Extrato Etanólico IAE

O fracionamento inicial de IAE (145g) foi feito adsorvendo-o em 100g de sílica-gel por meio de atrito mecânico em gral de porcelana, acondicionamento sobre 196g de sílica-gel em funil de separação e eluição com hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol, resultando nos seguintes eluatos:

ELUENTES	ELUATO	PESO(g)
Hexano	IAEH	1,65g
Clorofórmio	IAEC	4,60g
Acetato de etila	IAEA	15,66g
Etanol	IAEE	70,07g

Os procedimentos cromatográficos no fracionamento dos eluatos e frações irão seguir um padrão de exposição. Em todos os procedimentos utilizou-se para a adsorção dos extratos e no empacotamento das colunas cromatográficas sílica-gel, estando

especificadas como “sílica-gel adsorção” e “sílica-gel coluna”, respectivamente. As quantidades de sílica-gel utilizadas são variáveis para cada fracionamento, conforme a quantidade e grau de pureza da amostra. Nos procedimentos encontram-se também descritos o peso da amostra (eluato ou fração), o seu aspecto físico, o número de frações obtidas e os eluentes utilizados em cada etapa. As frações que se encontram combinadas foram reunidas conforme semelhança dos constituintes químicos revelada através de cromatografia em camada delgada, referida como CCD. Quando necessárias serão feitas observações, além da apresentação dos resultados. Esperamos com tal exposição tornar mais concisos e objetivos os procedimentos, facilitando a leitura e a reprodutibilidade dos experimentos.

5.8. Elaboração do Eluato IAEC

O eluato IAEC (4,60g) apresentou-se quase completamente sólido e de cor amarelo-escuro. Ao adicionar-se hexano à amostra observou-se a formação de precipitado amarelo que foi separado da parte solúvel por meio de filtração. CCD revelou tratar-se de lapachol. A parte solúvel foi denominada de IAEC (sol. hexano).

5.9. Elaboração de IAEC(sol. hexano)

Essa amostra, obtida por tratamento do eluato clorofórmico IAEC com hexano foi submetida a cromatografia em coluna, conforme os seguintes itens ora descritos:

Peso da amostra: 1,75g / Aspecto da amostra: óleo marron-claro pastoso

Sílica-gel adsorção: 3g / Sílica-gel coluna: 15g

Foram obtidas 64 frações, eluídas da seguinte maneira:

Eluente	Proporção	Frações
Hexano	1	01 a 19
Hexano/clorofórmio	10:1	20 a 48
Hexano/clorofórmio	4:1	49 a 56
Clorofórmio	1	57 a 60
Acetato de etila	1	61 a 63
Etanol	1	64

Observações:

- a) As frações 42 a 47 foram reunidas por apresentarem um sólido laranja impuro e denominada IAEC(sol.hexano)(42-47).
- b) As frações 56 a 58 apresentaram material sólido branco; foram reunidas e denominadas de IAEC(sol.hexano)(56-58).

5.10. Elaboração da Fração IAEC(sol.hexano)(42-47) e Obtenção de IAEC-1(30)

Fez-se coluna cromatográfica dessa fração visando a purificação do material sólido laranja obtido no tratamento cromatográfico de IAEC(sol.hexano), com as seguintes especificações:

Peso da amostra: 181 mg / Aspecto da amostra: sólido laranja

Sílica-gel adsorção: 2g / Sílica-gel coluna: 8g

Foram obtidas 29 frações, eluídas na seguinte ordem:

Eluente	Proporção	Frações
Hexano	1	01
Hexano/clorofórmio	10:1	02 a 22
Clorofórmio	1	23 a 27
Acetato de Etila	1	28
Etanol	1	29

Resultados:

As frações 10 a 15 foram reunidas, e apresentaram cristais de cor laranja, com ponto de fusão 141-143 °C. Obteve-se 38 mg da substância, que foi denominada de IAEC-1, e posteriormente identificada através dos métodos espectroscópicos como sendo a dehidro- α -lapachona (30).

5.11. Elaboração da Fração IAEC(sol.hexano)(56-58) e Obtenção de IAEC-2(77)

Essa fração, constituída principalmente de material sólido, foi para recristalizado com hexano, resultando na purificação de um sólido branco amorfo, de ponto de fusão 136-137°C, denominado IAEC-2 e posteriormente identificado através dos dados espectroscópicos e comparação com amostra autêntica como o β -sitosterol (77).

5.12. Elaboração do Eluato IAEA

O eluato IAEA, obtido na eluição do extrato etanólico IAE com acetato de etila, foi submetido ao fracionamento cromatográfico, conforme especificações abaixo:

Peso da amostra: 15,65g / Aspecto da amostra: óleo viscoso marrom

Sílica-gel adsorção: 50g / Sílica-gel coluna: 180g

Foram obtidas 45 frações, eluídas do seguinte modo:

Eluente	Proporção	Frações
Clorofórmio	1	01 a 33
Acetato de etila	1	34 a 41
Etanol	1	42 a 45

Fez-se algumas importantes observações, algumas baseadas em dados de CCD comparando-se com padrões já isolados.

- a) A presença de dehidro- α -lapachona nas frações 02 a 08
- b) A presença de β -sitosterol nas frações 19 a 25.
- c) A fração 35 era constituída em sua maioria por material sólido.
- d) A fração 36 estava constituída predominantemente por uma substância, mas impurificada com outras de Rf próximos.
- e) Nas frações 37 a 41 observou-se a presença de material sólido e apresentavam dois constituintes principais, além de outras substâncias.

Feitas as observações, realizou-se procedimentos para tentar purificar as substâncias contidas nas frações 35, 36, e na fração reunida 37-41, e que encontram-se descritos a seguir.

5.13. Elaboração da Fração IAEA(35) e Obtenção de IAEA-K1(90)

A fração IAEA(35) mostrou-se como um sólido impregnado de material de cor marrom. Fez-se a dissolução do material em éter etílico e foi-se adicionando hexano à solução até ser observada a formação de precipitado. Separou-se este da parte solúvel, e repetiu-se o procedimento. O material precipitado foi então filtrado em funil de Buchner e lavado sucessivamente com hexano e clorofórmio até ser observada a completa dissociação do material escuro. Obteve-se assim um sólido amorfo, levemente amarelado, com ponto de fusão 209-210 °C, denominado IAEA-K1, o qual foi

identificado através dos dados espectroscópicos como sendo o ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico (90).

5.14. Elaboração da Fração IAEA(36)

Fez-se o fracionamento cromatográfico da fração IAEC(36), descrito a seguir:

Peso da amostra: 4,74g / Aspecto da amostra: óleo viscoso marrom

Sílica-gel adsorção: 10g / Sílica-gel coluna: 40g

Foram obtidas 58 frações, eluídas na seguinte ordem:

Eluente	Proporção	Frações
Clorofórmio/hexano	3:2	01
Clorofórmio	1	02 a 11
Clorofórmio/acetato de etila	10:1	12 a 29
Clorofórmio/acetato de etila	5:1	30 a 36
Clorofórmio/acetato de etila	2:1	37 a 46
Acetato de etila	1	47 a 50
Acetato de etila/metanol	3:1	51 a 54
Metanol	1	55 a 58

As frações 36 a 39 foram reunidas e denominada a fração resultante de IAEA(36)(36-39), que foi submetida a posteriores cromatografias para purificação do constituinte majoritário.

5.15. Elaboração da Fração IAEA(36)(36-39)

Fez-se coluna cromatográfica da fração IAEA(36)(36-39) conforme especificações abaixo:

Peso da amostra: 1,34g / Aspecto da amostra: resina marrom

Sílica-gel adsorção: 2g / Sílica-gel coluna: 15g

Foram obtidas 21 frações, eluídas na ordem abaixo:

Eluente	Proporção	Frações
Clorofórmio/acetato de etila	4:1	01 a 11
Clorofórmio/acetato de etila	1:1	12 a 17
Clorofórmio/acetato de etila	3:7	18
Clorofórmio/acetato de etila	1:4	19 a 20
Metanol	1	21

As frações 10 a 16 apresentaram a substância predominante com menor grau de impureza e foram reunidas. A fração resultante foi denominada IAEA(36)(36-39)(10-16), cujo tratamento cromatográfico está descrito a seguir.

5.16. Elaboração da Fração IAEA(36)(36-39)(10-16) e Obtenção de IAEA-K4(88)

Submeteu-se a fração IAEA(36)(36-39)(10-16) a coluna cromatográfica para purificação final da substância majoritária, conforme descrição abaixo:

Peso da amostra: 245mg / Aspecto da amostra: óleo viscoso marrom

Sílica-gel adsorção: 2g / Sílica-gel coluna: 20g

Foram obtidas 30 frações, eluídas na seguinte ordem:

Eluente	Proporção	Frações
Clorofórmio/acetato de etila	3:1	01 a 21
Clorofórmio/acetato de etila	1:1	22 a 26
Acetato de etila	1	27 a 29
Metanol	1	30

Nas frações 17 a 20 observou-se em CCD uma mancha única e foram então reunidas. A substância presente nessas frações apresentou um aspecto de óleo viscoso marrom, ficando aderida ao vidro como um filme rígido. A substância foi denominada IAEA-K4, cuja estrutura foi determinada com base nos dados espectroscópicos e caracterizada como a lignana chamada olivil (88).

5.17. Elaboração da Fração IAEA(37-41) e Obtenção de IAEA-K2(78)

A fração IAEA(37-41), onde observou-se a presença de material sólido, foi tratada com acetona, resultando na obtenção de um sólido branco amorfo insolúvel em acetona; a parte solúvel foi denominada IAEA(37-41)(sol.acetona) e posteriormente estudada. O sólido insolúvel foi lavado diversas vezes com acetona, filtrado, seco e denominado IAEA-K2. Análise comparativa em CCD com amostra autêntica e análise dos dados espectroscópicos mostraram que a substância isolada tratava-se do glicosídeo do β -sitosterol (78).

5.18. Elaboração da Fração IAEA(37-41)(sol. acetona) e Obtenção de IAEA-K3(89)

Fez-se coluna cromatográfica dessa fração, onde observou-se a predominância de uma substância, impurificada com outras de Rf próximos, além de material mais polar retido na origem da placa em CCD quando usado o eluente acetato de etila/etanol(9:1).

Foram seguidas as seguintes especificações:

Peso da amostra: 2,13g / Aspecto da amostra: óleo viscoso marrom

Sílica-gel adsorção: 6g / Sílica-gel coluna: 25g

Foram obtidas 56 frações, eluídas na seguinte ordem:

Eluentes	Proporção	Frações
Hexano/clorofórmio	1:1	01 a 41
Clorofórmio	1	42
Clorofórmio/acetato de etila	1:1	43
Acetato de etila	1	44 a 51
Acetato de etila/etanol	5:1	52 a 53
Acetato de etila/etanol	3:1	54 a 55
Etanol	1	56

As frações 46 a 49 apresentaram um componente majoritário e foram reunidas. Dissolveu-se então essa fração reunida IAEA(37-41)(sol. acetona)(46-49) em acetona e adicionou-se hexano. A solução tomou um aspecto turvo até ocorrer a completa precipitação de um material sólido. Separou-se este da parte solúvel e repetiu-se o procedimento de dissolução e precipitação. O material sólido obtido(315mg), de cor levemente amarelada, e ponto de fusão 159-162 °C, foi então analisado em CCD, onde apresentou uma única mancha. A substância foi chamada de IAEA-K3, posteriormente identificada como um epímero da lignana cicloolivil, e denominada de 8-*epi*-cicloolivil (89), uma substância inédita na literatura.

5.19. Elaboração do Eluato IAEE

O eluato IAEE, constituído das substâncias mais polares do extrato etanólico IAE, foi cromatografado em coluna, possuindo as seguintes especificações:

Peso da amostra: 70,07g / Aspecto da amostra: resina marrom-escuro

Sílica-gel adsorção: 95g / Sílica-gel coluna: 150g

Foram obtidas 85 frações, eluídas na seguinte ordem:

Eluente	Proporção	Frações
Clorofórmio	1	01 a 05
Clorofórmio/acetato de etila	9:1	06 a 14
Clorofórmio/acetato de etila	3:1	15 a 20
Clorofórmio/acetato de etila	1:1	21 a 22
Acetato de etila	1	23 a 38
Acetato de etila/metanol	9:1	39 a 75
Acetato de etila/metanol	3:2	76 a 81
Metanol	1	82 a 85

Observações:

- a) As frações 01 a 22, obtidas com eluentes menos polares, apresentaram-se em pequena quantidade e em mistura e foram desprezadas.
- b) As frações 43 a 55 continham uma mistura de substâncias, entre as quais duas se encontravam em maior quantidade. O tratamento cromatográfico dessa fração encontra-se relatado a seguir.
- c) As frações 56 a 58 também apresentavam as duas substâncias citadas acima, porém com menor quantidade de substâncias menos polares. Essa fração foi trabalhada inicialmente através de reação de acetilação, e encontra-se descrita na seqüência.
- d) As frações 59 a 85 mostraram-se insolúveis em acetato de etila, pouco solúveis em metanol e não foram estudadas.

5.20. Elaboração da Fração IAEE(43-55)

Fez coluna cromatográfica da fração IAEE(43-55) visando o isolamento dos componentes majoritários, conforme as seguintes especificações:

Peso da amostra: 4,30g / Aspecto da amostra: óleo viscoso marrom-escuro

Sílica adsorção: 10g / Sílica coluna: 60g

Foram eluídas 84 frações, na seguinte ordem:

Eluente	Proporção	Frações
Clorofórmio/hexano	2:1	01 a 06
Clorofórmio/hexano	3:1	07 a 09
Clorofórmio	1	10 a 13
Clorofórmio/acetato de etila	10:1	14 a 20
Clorofórmio/acetato de etila	4:1	21 a 25
Clorofórmio/acetato de etila	7:3	26 a 52
Clorofórmio/acetato de etila	1:1	53 a 60
Clorofórmio/acetato de etila	3:7	61 a 63
Acetato de etila	1	64 a 66
Acetato de etila/etanol	4:1	67 a 79
Acetato de etila/etanol	1:1	80 a 83
Etanol	1	84

As frações 74 e 75 foram reunidas por apresentarem apenas as duas substâncias, que apesar de Rf pouco próximos, foram eluídas juntas. A fração foi denominada de IAEE(43-55)(74-75), e o seu tratamento cromatográfico encontra-se descrito a seguir.

5.21. Elaboração da Fração IAEE(43-55)(74-75)

O fracionamento cromatográfico dessa fração foi feito com as especificações abaixo:

Peso da amostra: 1,37g / Aspecto da amostra: óleo marrom-escuro

Sílica-gel adsorção: 5g / Sílica-gel coluna: 30g

Foram obtidas 27 frações na seguinte seqüência de eluição:

Eluente	Proporção	Frações
Clorofórmio/acetato de etila	1:1	01 a 02
Acetato de etila	1	03 a 16
Acetato de etila/metanol	10:1	17 a 18
Acetato de etila/metanol	5:1	19 a 21
Acetato de etila/metanol	2:1	22 a 24
Acetato de etila/metanol	1:1	25 a 26
Metanol	1	27

Em nenhuma das frações obtidas observou-se a separação das substâncias. Porém as frações 12 a 14 mostraram uma menor concentração do constituinte mais polar. Essas frações foram reunidas, denominadas de IAEE(43-55)(74-75)(12-14), e submetidas a reação de acetilação, descrita a seguir.

5.22. Acetilação da Fração IAEE(43-55)(74-75)(12-14)

Fez-se acetilação dessa fração visando obter uma melhor separação entre as substâncias majoritárias, visto que os procedimentos cromatográficos não se mostraram eficientes para separá-las em sua forma original. O procedimento nessa reação foi o seguinte:

a) Dissolveu-se 78mg da amostra em 2mL de piridina e adicionou-se 4mL de anidrido acético. A mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente por 24 horas e acompanhada por CCD. À mistura reacional adicionou-se 30mL de água destilada e 30mL de clorofórmio. Em um funil de separação dividimos as fases. A fase aquosa foi desprezada e a fase orgânica submetida ao procedimento seguinte.

d) A fase orgânica foi lavada quatro vezes com 30ml de solução de sulfato de cobre (CuSO_4) a 10%. Tratou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e após filtração e evaporação obteve-se 103mg do material acetilado, denominado IAEE(43-55)(74-75)(12-14)(Ac). A fração acetilada mostrou em CCD a presença majoritária de um constituinte, porém impurificado por outra substância mais polar. Na tentativa de purificá-lo fez-se coluna cromatográfica, descrita no item seguinte.

5.23. Elaboração da Fração IAEE(43-55)(74-75)(12-14)(Ac)

A cromatografia em coluna do material acetilado seguiu as especificações abaixo:

Peso da amostra: 103mg / Aspecto da amostra: óleo marrom-claro

Sílica-gel adsorção: 1g / Sílica-gel coluna: 10g

Foram obtidas 11 frações, eluídas do seguinte modo:

Eluente	Proporção	Frações
Hexano	1	01
Hexano/clorofórmio	9:1	02
Hexano/clorofórmio	4:1	03
Hexano/clorofórmio	1:1	04
Clorofórmio	1	05
Clorofórmio/acetato de etila	9:1	06
Clorofórmio/acetato de etila	7:3	07
Clorofórmio/acetato de etila	1:1	08 a 10
Acetato de etila	1	11

As frações foram analisadas em CCD e nenhuma apresentou-se pura. A fração 04, denominada de IAEE(43-55)(74-75)(12-14)(Ac)(04) mostrou menor grau de impureza e foi recromatografada em coluna, descrita a seguir.

5.24. Elaboração da Fração IAEE(43-55)(74-75)(12-14)(Ac)(04) e Obtenção de IAEE-K1-Ac(91a)

Essa fração foi cromatografada em coluna visando purificar o constituinte principal do material acetilado, através das seguintes especificações:

Peso da amostra: 48mg / Aspecto da amostra: óleo marrom-claro

Sílica-gel adsorção: 0,5g / Sílica-gel coluna: 6g

Foram obtidas 17 frações, conforme a seguinte eluição:

Eluente	Proporção	Frações
Hexano/clorofórmio	9:1	01 a 05
Hexano/clorofórmio	8:1	06
Hexano/clorofórmio	4:1	07
Hexano/clorofórmio	1:1	08 a 10
Clorofórmio	1	11 a 15
Acetato de etila	1	16 a 17

Observou-se na análise feita em CCD que as frações 08 a 11 apresentavam uma única mancha. A substância finalmente isolada, sob a forma de um óleo marrom-claro, foi denominada de IAEE-K1-Ac, e posteriormente identificada através de análise dos dados espectroscópicos como sendo o glicosídeo hexaacetilado do iridóide 3-hidroxi-4-metoxi-benzoil)-ajugol (91a).

5.25. ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO ETANÓLICO DO LENHO DE *Tabebuia rosea* (Fluxograma 2, pág.173)

5.26. Obtenção do Extrato Etanólico do Lenho de *Tabebuia rosea*

O cerne ou lenho de *Tabebuia rosea* foi separado das cascas. O material (1.800g) foi seco a temperatura ambiente, triturado mecanicamente, e submetido a extração a frio com etanol. A solução obtida foi destilada sob pressão reduzida a temperatura média de 60^o C. Esse procedimento resultou na obtenção de 112g de extrato etanólico, sob a forma de um xarope marrom-escuro com material sólido, que foi denominado ILE

5.27. Fracionamento do Extrato Etanólico ILE

O tratamento cromatográfico inicial de ILE (112g) foi feito por adsorção em 140g de sílica-gel por meio de atrito mecânico em gral de porcelana, acondicionamento sobre 240g de sílica-gel em funil de separação e eluição com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, resultando nos seguintes eluatos:

ELUENTES	ELUATO	PESO(g)
Hexano	ILEH	1,16
Clorofórmio	ILEC	3,98
Acetato de etila	ILEA	9,13
Metanol	ILEM	65,86

Foram submetidos a tratamento cromatográfico para isolamento dos constituintes químicos os eluatos ILEC e ILEA, descritos a seguir.

5.28. Elaboração do Eluato ILEC

Fez-se cromatografia em coluna do eluato ILEC conforme as especificações abaixo:

Peso da amostra: 3,98g / Aspecto da amostra: pasta marrom

Sílica-gel adsorção: 6g / Sílica-gel coluna: 40g

Foram eluídas 143 frações na seguinte ordem:

Eluente	Proporção	Frações
Hexano	1	01 a 06
Hexano/clorofórmio	9:1	07 a 66
Hexano/clorofórmio	4:1	67 a 77
Hexano/clorofórmio	3:1	78 a 100
Hexano/clorofórmio	1:1	101 a 118
Clorofórmio	1	119 a 132
Clorofórmio/acetato de etila	3:1	133 a 136
Clorofórmio/acetato de etila	1:1	137
Acetato de etila	1	138
Acetato de etila/etanol	1:1	139 a 141
Etanol	1	142
Metanol	1	143

Observações:

- a) As frações menos polares apresentaram-se como uma mistura complexa de substâncias, de difícil isolamento, e não foram trabalhadas.
- b) As frações 113 a 127 eram formadas predominantemente de material sólido branco, que foi submetido a CCD e mostrou tratar-se de β -sitosterol por comparação com amostra autêntica.
- c) As frações 128 a 133 apresentaram-se sob o aspecto físico constituídas de material sólido disperso em um óleo marrom. Feita CCD as frações foram reunidas e o material resultante chamado de ILEC(128-133), cujo tratamento cromatográfico encontra-se relatado a seguir.

5.29. Elaboração da Fração ILEC(128-133) e Obtenção de ILEC-1(92)

Foi realizado o fracionamento cromatográfico em coluna da fração ILEC(128-133) visando purificação dos constituintes, conforme descrição abaixo:

Peso da amostra: 313mg / Aspecto: óleo marrom com material sólido disperso

Sílica-gel adsorção: 1g / Sílica gel coluna: 8g

Foram obtidas 17 frações eluídas na seguinte ordem:

Eluente	Proporção	Frações
Clorofórmio	1	01 a 02
Clorofórmio/acetato de etila	1:1	03 a 14
Acetato de etila	1	15
Metanol	1	16 a 17

As frações 07 e 08 apresentaram-se como um material sólido levemente amarelado. Feita CCD observou-se que o material não era revelado por uso de vanilina ou iodo e podia ser detectado apenas pela observação sob luz UV. Assim, as frações foram reunidas e tratadas com uma mistura de hexano/acetona (4:1) visando eliminar resquício de impureza de natureza polar. Obteve-se dessa maneira um precipitado sólido, de cor levemente amarelada, de ponto de fusão 180-182 °C. A substância foi denominada ILEC-1 e identificada como o éster metílico do ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico (92).

5.30. Elaboração do Eluato ILEA e Obtenção de ILEA-1(93) e ILEA-2(78)

O tratamento cromatográfico do eluato ILEA foi feito de acordo com as seguintes especificações:

Peso da amostra: 9,13g /Aspecto da amostra: óleo marrom com material sólido

Sílica-gel adsorção: 19g / Sílica-gel coluna: 80g

Foram obtidas 76 frações conforme a ordem de eluição abaixo:

Eluente	Proporção	Frações
Clorofórmio	1	01 a 11
Clorofórmio/acetato de etila	9:1	12 a 14
Clorofórmio/acetato de etila	3:1	15 a 42
Clorofórmio/acetato de etila	1:1	43 a 44
Acetato de etila	1	45 a 60
Acetato de etila/etanol	9:1	61 a 69
Acetato de etila/etanol	3:1	70 a 72
Acetato de etila/etanol	1:1	73 a 75
Etanol	1	76

Observações:

- a) As frações 24 a 28 apresentaram-se constituídas por material sólido disperso em uma pasta amarela. Após análise em CCD as frações foram reunidas e tratadas com clorofórmio. A maior parte do material foi dissolvida, permanecendo insolúvel um sólido levemente amarelado, chamado de ILEA(24-28)(ins.clorofórmio). O material solúvel em clorofórmio foi denominado ILEA(24-28)(sol.clorofórmio), e foi submetido a tratamento cromatográfico descrito na seqüência.
- b) ILEA(24-28)(ins.clorofórmio) foi tratado com acetona, resultando na obtenção de um precipitado sólido levemente amarelado, de ponto de fusão 210-213 °C, denominado ILEA-1 e identificado por dados espectroscópicos como sendo o ácido para-hidroxi-cinâmico (93).
- c) A fração 52 mostrou-se constituída predominantemente por material sólido e foi lavado várias vezes com acetato de etila sob aquecimento, resultando na obtenção de um sólido branco, de ponto de fusão 283-286 °C, denominado ILEA-2 e caracterizado como o glicosídeo do β -sitosterol (78), isolado anteriormente de *Tabebuia serratifolia*.

5.31. Elaboração da Fração ILEA(24-28)(sol.clorofórmio)

Fez-se coluna cromatográfica dessa fração visando o isolamento de uma substância revelada em cor azul em vanilina e de Rf menor que a substância denominada ILEA-1. O fracionamento ocorreu através das seguintes especificações:

Peso da amostra: 500mg/ Aspecto da amostra: resina amarela com sólido disperso

Sílica-gel adsorção: 4g / Sílica-gel coluna: 30g

Foram eluídas 36 frações conforme a seguinte ordem:

Eluente	Proporção	Frações
Clorofórmio	1	01 a 20
Clorofórmio/acetato de etila	7:1	21 a 24
Clorofórmio/acetato de etila	3:1	25 a 27
Clorofórmio/acetato de etila	1:1	28 a 29
Acetato de etila	1	30 a 32
Acetato de etila/etanol	1:1	33 a 35
Etanol	1	36

Observou-se a presença da substância revelada em azul nas frações 04 a 22. Contudo, foram reunidas para tratamento cromatográfico as frações 08 a 19, por apresentarem menor quantidade de impurezas. A fração foi denominada ILEA(24-28)(sol.clorofórmio)(08-19) e submetida a cromatografia descrita no item seguinte.

5.32. Elaboração da Fração ILEA(24-28)(sol.clorofórmio)(08-19)

Essa fração foi cromatografada em coluna conforme as especificações abaixo:

Peso da amostra: 290mg / Aspecto da amostra: óleo amarelo com sólido disperso

Sílica-gel adsorção: 2g / Sílica-gel coluna: 20g

Foram obtidas 49 frações de acordo com a ordem de eluição abaixo:

Eluente	Proporção	Frações
Hexano/clorofórmio	4:1	01
Hexano/clorofórmio	3:2	02
Hexano/clorofórmio	1:1	03
Hexano/clorofórmio	1:2	04
Clorofórmio	1	05
Clorofórmio/acetato de etila	9:1	06 a 10
Clorofórmio/acetato de etila	4:1	11 a 13
Clorofórmio/acetato de etila	3:1	14 a 36
Acetato de etila	1	37 a 44
Etanol	1	45 a 49

Observações:

- a) As frações iniciais não apresentaram substâncias.
- b) Observou-se em CCD a presença da substância revelada em azul nas frações 29 a 40, onde foi também detectada a presença de ILEA-1. As frações 35 a 40, de aspecto sólido, foram reunidas e a fração resultante chamada de ILEA(24-28)(sol.clorofórmio)(08-19) (35-40), cujo fracionamento cromatográfico encontra-se descrito a seguir.

5.33. Elaboração da Fração ILEA(24-28)(sol.clorofórmio)(08-19)(35-40)

Foi feita cromatografia em coluna dessa fração com o objetivo de purificar a substância revelada azul e de aspecto sólido, de acordo com as descrições abaixo:

Peso da amostra: 227mg / Aspecto da amostra: sólido levemente amarelado

Sílica-gel adsorção: 1g / Sílica-gel coluna: 10g

Obteve-se 04 frações eluídas na seguinte ordem:

Eluente	Proporção	Frações
Clorofórmio/acetato de etila	4:1	01
Clorofórmio/acetato de etila	1:1	02
Acetato de etila	1	03
Etanol	1	04

Observações:

- A fração 01 mostrou-se desprovida de ILEA-1, contudo ainda levemente impurificada com material de Rf muito próximo ao da substância desejada. A fração foi chamada de ILEA(24-28)(sol.clorofórmio)(08-19)(35-40)(01) e seu fracionamento cromatográfico encontra-se descrito no item seguinte.
- A fração 02 apresentou em CCD quantidades parecidas da substância revelada em azul e ILEA-1 e por isso não foi reunida à fração 01.
- As frações 03 e 04 estavam constituídas apenas de ILEA-1.

5.34. Elaboração da Fração ILEA(24-28)(sol.clorofórmio)(08-19)(35-40)(01) e Obtenção de ILEA-4(94)

O fracionamento cromatográfico dessa fração, visando purificar a substância sólida revelada em azul, obedeceu às seguintes especificações:

Peso da amostra: 37mg / Aspecto da amostra: sólido levemente amarelado

Sílica-gel adsorção: 0,5g / Sílica-gel coluna: 5g

Foram obtidas 22 frações seguindo a ordem de eluição abaixo:

Eluente	Proporção	Frações
Clorofórmio	1	01 a 05
Clorofórmio/acetato de etila	4:1	06 a 21
Acetato de etila	1	22

Resultados:

Obteve-se nas frações 10 a 12 uma substância de mancha única em CCD, revelada em azul com vanilina. As frações foram reunidas, produzindo 12mg da substância denominada ILEA-4, que apresentou-se como um sólido branco, de ponto de fusão 251-253 °C, e caracterizada como o triterpeno denominado ácido 3 β ,6 β -19 α -trihidroxi-urs-12-eno-28-óico (**94**), inédito no gênero *Tabebuia*.

5.35. ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO ETANÓLICO DAS CASCAS DO LENHO DE *Tabebuia rosea* (Fluxograma 2, pág.173)

5.36. Obtenção do Extrato Etanólico das Cascas do Lenho de *Tabebuia rosea*

As cascas do lenho de *Tabebuia rosea* (700g) foram secas a temperatura ambiente, trituradas, e submetidas a extração a frio com etanol. A solução obtida foi destilada sob pressão reduzida a temperatura média de 60^o C. Obteve-se 128g de extrato etanólico, sob a forma de um xarope marrom-escuro, que foi denominado ICE

5.37. Fracionamento do Extrato Etanólico ICE

O fracionamento inicial de ICE (128g) foi feito adsorvendo-o em 150g de sílica-gel por meio de atrito mecânico em gral de porcelana, acondicionamento sobre 260g de sílica-gel em funil de separação e eluição com hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e metanol, resultando nos seguintes eluatos:

ELUENTES	ELUATO	PESO(g)
Hexano	ICEH	0,91
Clorofórmio	ICEC	5,75
Acetato de etila	ICEA	6,72
Etanol	ICEE	73,67
Metanol	ICEM	16,38

Observações:

- O eluato ICEH mostrou-se como um óleo amarelo, onde observava-se pequena quantidade material sólido branco. ICEH foi submetido a tratamento cromatográfico.
- O eluato ICEC tinha o aspecto de pasta, de coloração verde. CCD mostrou a presença de clorofila na amostra, impurificando largamente os demais constituintes. O extrato foi submetido a análise cromatográfica.
- Os eluatos ICEE e ICEM apresentaram-se como xaropes marrom-escuro. CCD revelou a presença de constituintes muito polares e de R_f muito próximos. Esses eluatos não foram estudados.

5.38. Elaboração do Eluato ICEH

O eluato ICEH foi cromatografado em coluna, conforme as especificações abaixo:

Peso da amostra: 910mg / Aspecto da amostra: óleo amarelo

Sílica-gel adsorção: 1g / Sílica-gel coluna: 10g

Foram eluídas 33 frações, na seguinte ordem:

Eluente	Proporção	Frações
Hexano	1	01 a 11
Hexano/acetato de etila	5:1	12 a 32
Acetato de etila	1	33

As frações 28 a 30 apresentaram-se como um sólido amarelo, e constituídas de uma substância majoritária. Foram reunidas e a fração resultante denominada ICEH(20-30). O tratamento cromatográfico encontra-se descrito a seguir.

5.39. Elaboração da Fração ICEH(28-30) e Obtenção de ICEH-K1(77)

ICEH(28-30) foi cromatografada em coluna conforme as seguintes especificações:

Peso da amostra: 15mg / Aspecto da amostra: sólido amarelo

Sílica-gel adsorção: 0,5g / Sílica-gel coluna: 3g

Foram obtidas 23 frações, eluídas da seguinte maneira:

Eluente	Proporção	Frações
Hexano/acetato de etila	10:1	01 a 19
Acetato de etila	1	20 a 23

As frações 06 a 14 mostraram em CCD a presença de duas substâncias, sendo a menos polar o componente majoritário. As frações foram reunidas e tratadas com etanol. Observou-se então a formação de um precipitado branco, enquanto que a solução ficou com coloração amarela.

Feita CCD das partes solúvel e insolúvel em etanol verificou-se que a solução continha mistura de duas substâncias, enquanto que o material insolúvel apresentava-se puro. O sólido branco obtido (6mg) foi denominado ICEH-K1 e posteriormente identificado como β -sitosterol (77), isolado anteriormente em *Tabebuia serratifolia*.

5.40. PREPARAÇÃO DE DERIVADOS

5.41. Obtenção de IAEA-K3-Ac (89a)

A substância denominada IAEA-K3(89), isolada na fração IAEA(37-41)(46-49), foi submetida a reação de acetilação, seguindo os procedimentos abaixo:

Dissolveu-se 43mg de IAEA-K3 em 1mL de piridina e 2mL de anidrido acético. A mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente, sob agitação magnética, durante 24 horas, após ser constatada a ocorrência da reação por CCD. Adicionou-se então à mistura 15 mL de água e 15mL de clorofórmio e em um funil de separação fez-se o isolamento das fases. A fase aquosa foi tratada por mais duas vezes com 15mL de clorofórmio e as fases orgânicas foram reunidas em uma só. Desprezou-se a fase aquosa. A fase orgânica foi colocada em um funil de separação e lavada por quatro vezes com 30 mL de solução 10% de sulfato de cobre (CuSO_4). Devidamente separada, a fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrada e o solvente destilado sob pressão reduzida. O material resultante constituiu-se de 43 mg de um óleo marrom denominado IAEA-K3 (Acetilação). CCD do material acetilado mostrou que era constituído por uma substância majoritária, a qual foi purificada em cromatografia em coluna, especificada abaixo.

Peso da amostra: 43mg/ Aspecto da amostra: óleo marron

Sílica-gel adsorção: 0,5g/ Sílica-gel coluna: 5g

Foram eluídas 06 frações, na seguinte ordem:

Eluente	Proporção	Frações
Clorofórmio	1	01
Clorofórmio/acetato de etila	10:1	02
Clorofórmio/acetato de etila	1:1	03
Acetato de etila	1	04
Acetato de etila/etanol	10:1	05
Etanol	1	06

Obteve-se nas frações (02-04) 31mg do derivado acetilado puro, denominado IAEA-K3-Ac(89a), resultante da acetilação de quatro dos cinco grupos hidroxila presentes em IAEA-K3(89).

5.42. Obtenção de IAEA-K4-Ac (88a)

A substância IAEA-K4 (88), contida na fração IAEA(36)(36-39)(10-16)(17-20) foi submetida à reação de acetilação, seguindo procedimentos similares aos descritos no item 5. Para a purificação do derivado acetilado, foi feito fracionamento cromatográfico em coluna, conforme as seguintes especificações:

Peso da amostra: 40 mg/Aspecto da amostra: óleo amarelo

Sílica-gel adsorção: 0,5 g/Sílica-gel coluna: 4g

Foram obtidas 17 frações, eluídas de acordo com a ordem abaixo:

Eluente	Proporção	Frações
Hexano/clorofórmio	1	01
Hexano/clorofórmio	1:1	02 a 07
Clorofórmio	1	08 a 10
Clorofórmio/acetato de etila	9:1	11 a 12
Clorofórmio/acetato de etila	3:2	13 a 14
Acetato de etila	1	15 a 16
Metanol	1	17

Foram obtidos 24mg do derivado acetilado puro, denominado IAEA-K4-Ac (88a), nas frações (12-14), produto da acetilação de três dos quatro grupos hidroxila presentes em IAEA-K4(88).

5.43. Obtenção de Lapiper (96), Lapirrol (97) e Lapimor (98)

Esses três derivados aminados do lapachol foram preparados através do seguinte procedimento padrão: em um balão monotubulado foram adicionados 100mg de lapachol (41 mmol) e 2mL da amina e o sistema reacional foi mantido sob agitação magnética, a temperatura ambiente, durante 6 horas. Em seguida o excesso de amina foi retirado sob vácuo. O produto bruto foi dissolvido em acetato de etila e precipitado pela adição de hexano à solução e posteriormente filtrado a vácuo, lavado com hexano sob

aquecimento (para retirar traços de lapachol) e submetido a análises espectroscópicas de I.V., E.M., $RMN^{13}C$ e RMN^1H que permitiram a determinação estrutural. Os rendimentos e os dados físicos dos produtos encontram-se abaixo:

Lapiper (96): 100mg (79%). Sólido cristalino vermelho, p.f. 88-90°C ; **Lapirrol (97):** 99mg(77%), óleo viscoso vermelho; **Lapimor (98):** 119mg (94%), Sólido cristalino vermelho, p.f. 81-83°C .

5.44. Obtenção de Lapidroxi-2-1(99) e Lapidroxi-2-2 (100)

Dissolveu-se em um balão monotubulado 1,71 g de cloridrato de hidroxilamina em 15mL de metanol e logo em seguida foram adicionados 200mg de lapachol. A mistura reacional foi mantida sob refluxo e agitação magnética durante 6 horas. Ao produto bruto foram adicionados 15 mL de água e 15 mL de acetato de etila e em um funil de separação as fases foram divididas. A fase orgânica foi lavada com água e novamente separada, repetindo-se esse procedimento por cinco vezes. A fase orgânica resultante foi então tratada com sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro, filtrada e evaporada sob pressão reduzida até a completa destilação do solvente.

Ao produto bruto obtido (216 mg) foi adicionado hexano e levado para aquecimento em banho-maria, resultando em dissolução de parte do material. A parte insolúvel (158mg) foi chamada de Lapidroxi (ins.hexano) e a solúvel de Lapidroxi (sol.hexano).

CCD das amostras mostrou que Lapidroxi (ins.hexano) era constituída por algumas substâncias, sendo uma delas predominante, enquanto que Lapidroxi (sol.hexano), 58mg, tratava-se de lapachol (28).

Visando a purificação das substâncias encerradas em Lapidroxi (ins.hexano) fez-se fracionamento cromatográfico em coluna, conforme as seguintes especificações:

Peso da amostra: 158mg/Aspecto da amostra: pasta marrom

Sílica-gel adsorção: 1g /Sílica-gel coluna: 10g

Foram obtidas 32 frações, eluídas de acordo com a ordem abaixo:

Eluente	Proporção	Frações
Hexano	1	01 a 08
Hexano/clorofórmio	9:1	09 a 19
Hexano/clorofórmio	4:1	20 a 27
Hexano/clorofórmio	1:1	28 a 29
Clorofórmio	1	30 a 31
Acetato de etila	1	32

Resultados:

a) Obteve-se nas frações 13 a 25 49mg de uma substância pura, sob a forma de um sólido amarelo, denominada lapidoxi-2-1(99), que apresentou ponto de fusão 152-153 °C. A análise dos espectros mostrou que o derivado obtido tratava-se de uma oxima.

b) As frações 31 a 33, constituídas de material sólido, foram reunidas e tratadas com dietil-éter. As partes solúvel e insolúvel em éter foram submetidas a CCD, onde verificou-se que a solução etérea era constituída de 7mg de uma única substância, um sólido de coloração laranja que apresentou ponto de fusão 217-218 °C. A substância foi denominada de lapidoxi-2-2 (100), identificada como um isômero da oxima lapidoxi-2-1(99).

Foram obtidas 32 frações, eluídas de acordo com a ordem abaixo:

Eluente	Proporção	Frações
Hexano	1	01 a 08
Hexano/clorofórmio	9:1	09 a 19
Hexano/clorofórmio	4:1	20 a 27
Hexano/clorofórmio	1:1	28 a 29
Clorofórmio	1	30 a 31
Acetato de etila	1	32

Resultados:

a) Obteve-se nas frações 13 a 25 49mg de uma substância pura, sob a forma de um sólido amarelo, denominada lapidoxi-2-1(99), que apresentou ponto de fusão 152-153 °C. A análise dos espectros mostrou que o derivado obtido tratava-se de uma oxima.

b) As frações 31 a 33, constituídas de material sólido, foram reunidas e tratadas com dietil-éter. As partes solúvel e insolúvel em éter foram submetidas a CCD, onde verificou-se que a solução etérea era constituída de 7mg de uma única substância, um sólido de coloração laranja que apresentou ponto de fusão 217-218 °C. A substância foi denominada de lapidoxi-2-2 (100), identificada como um isômero da oxima lapidroxí-2-1(99).

5.45. Bioensaios Realizados com Lapachol e seus Derivados Nitrogenados

5.46. Citotoxicidade Frente às Larvas de *Artemia salina*

Para a realização do teste de citotoxicidade do lapachol e seus derivados foram utilizadas larvas de *Artemia salina*. Os ovos de *A. salina* foram eclodidos em água de salinidade a 12 ppm e após 24 horas, as larvas foram coletadas para os bioensaios. Foram preparadas soluções em triplicata das substâncias **28**, **96**, **97** e **98** em cinco diferentes concentrações: 500 ppm, 100 ppm, 10 ppm, 5 ppm e 1 ppm, dissolvendo-se a massa relativa a cada concentração desejada em 0,3 mL de dimetilsulfóxido, e completado o volume para 10 mL com água de salinidade a 12 ppm.

Às soluções preparadas foram adicionadas 10 larvas e após 24 horas foi feita a contagem dos animais vivos e mortos. Paralelamente aos bioensaios feitos com o lapachol(**28**) e seus derivados **96**, **97** e **98** foram feitos testes em branco, utilizando o mesmo volume de dimetilsulfóxido e este não apresentou atividade larvicida.

Os resultados obtidos foram aplicados ao Programa Probit para o cálculo da concentração capaz de matar 50% das larvas (DL_{50}). Os resultados dos testes frente às larvas de *Artemia salina* utilizando os compostos (**28**), (**96**), (**97**) e (**98**) encontram-se apresentados na tabela 20.

Tabela 20 : Valores de DL_{50} (ppm) apresentados pelos compostos **28**, **96**, **97** e **98** frente às larvas de *Artemia salina*.

Composto	DL_{50} para <i>Artemia salina</i>
Lapachol(28)	12,75
Lapiper(96)	10,00
Lapirrol(97)	55,26
Lapimor(98)	31,62

Nos testes com larvas de *Artemia salina* foram observados para o lapachol (**28**) e os derivados (**96**), (**97**) e (**98**) valores de DL_{50} menores que 1000 ppm, que confirmam também para os derivados do lapachol uma potencial atividade biológica¹⁵

5.47. Citotoxicidade Frente às Larvas de *Aedes aegypti*

Nos bioensaios frente às larvas de *Aedes aegypti*, os ovos desta espécie foram eclodidos em água isenta de cloro. Em condições normais, os ovos maduros eclodem após alguns minutos quando submersos em meio líquido e apresentam quatro estágios larvários¹⁴, sendo, portanto, selecionadas larvas de estágio 3 para serem utilizadas em nosso estudo.

O lapachol (28) e seus derivados nitrogenados (96), (97) e (98) foram utilizados em cinco diferentes concentrações 500 ppm, 100 ppm, 10 ppm, 5 ppm e 1 ppm, em duplicata. As quantidades referentes a cada concentração foram dissolvidas em 0,3 mL de dimetilsulfóxido e completado o volume para 20 mL com água. Foram adicionadas então a cada tubo 50 larvas, e após 24 horas fez-se a contagem das larvas vivas (quando havia). Foram feitos testes em branco, utilizando o mesmo volume de dimetilsulfóxido e este não apresentou atividade larvicida. Os resultados obtidos foram aplicados ao Programa Probit para o cálculo da concentração capaz de matar 50% das larvas (DL₅₀). Os resultados dos testes frente às larvas de *Aedes aegypti* utilizando os compostos (28), (96), (97) e (98) encontram-se apresentados na tabela 21.

Tabela 21 : Valores de DL₅₀ (ppm) apresentados pelos compostos 28, 96, 97 e 98 frente às larvas de *Aedes aegypti*.

Compostos	DL ₅₀ p/ <i>Aedes aegypti</i>
Lapachol(28)	20,79
Lapiper(96)	242,61
Lapirrol(97)	899,38
Lapimor(98)	397,05

Os resultados mostraram que o lapachol(28) é a substância mais ativa, indicando que a presença da hidroxila na posição 2 parece ser de fundamental importância para a atividade larvicida contra *Aedes aegypti*.

5.48. Citotoxicidade em Células Tumorais Humanas (Tumor de Mama A549)

Os ensaios de citotoxicidade contra células tumorais foram realizados na Universidade de Manchester-School of Pharmacy-Londres, sob a supervisão do pesquisador Mohamed Jaffar, conforme procedimento a seguir.

A toxicidade seletiva para células tumorais da mama da espécie humana tipo A549 foi determinada para os compostos lapachol (28), lapiper (96), lapirrol (97) e lapimor (98) utilizando-se o ensaio MTT[brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio]. As células foram tratadas com as drogas por três horas a temperatura de 37°C sobre condições aeróbicas(ar) e hipóxicas(N₂). As drogas foram então removidas e as células mantidas em proliferação por três dias antes até realização do ensaio MTT.

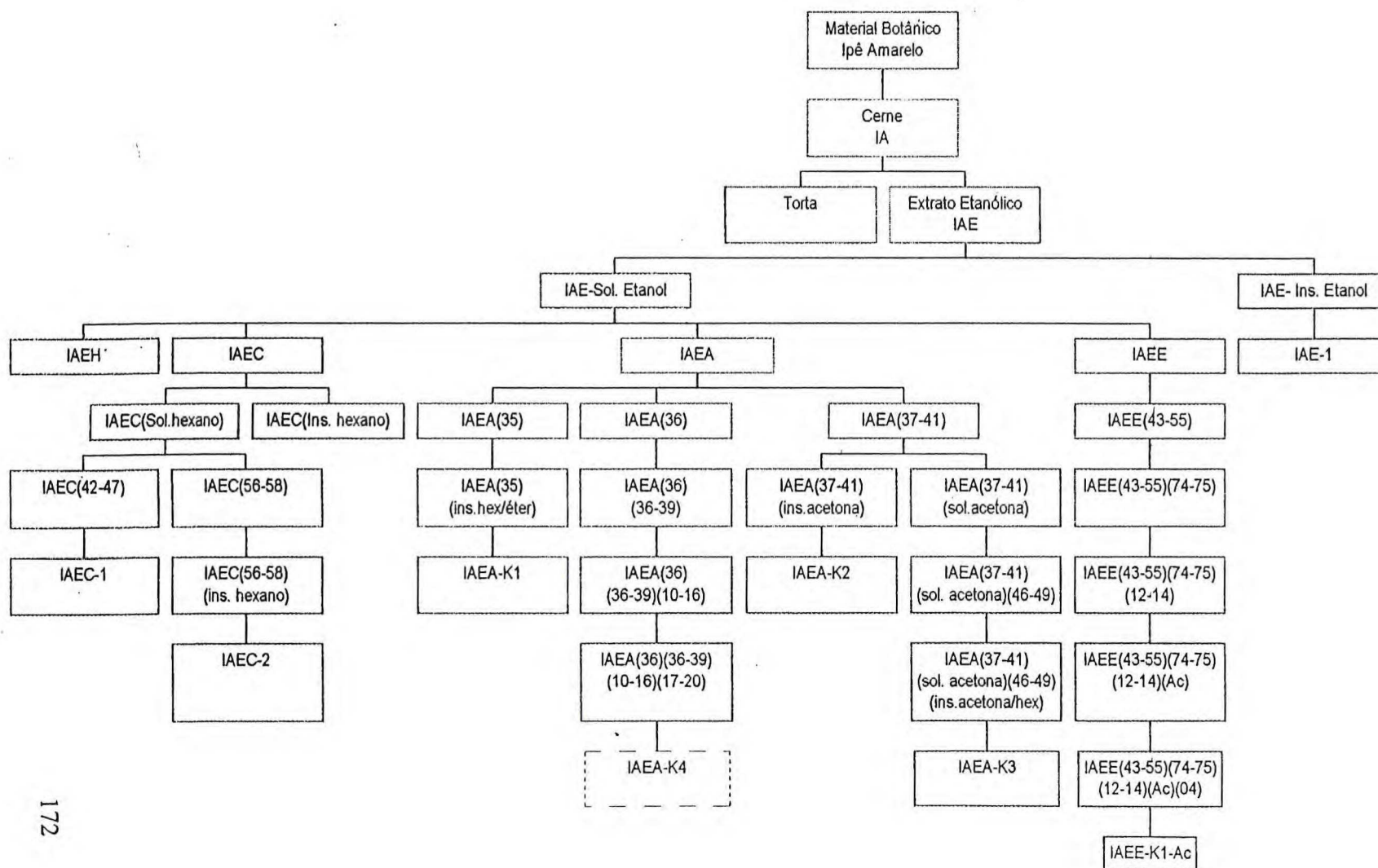
Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 22, onde os valores de IC₅₀(ar) são as concentrações requeridas para matar 50% das células sobre condições aeróbicas e os valores de IC₅₀(N₂) são as concentrações requeridas para matar 50% das células sob condições hipóxicas. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

Tabela 22: Dados de Citotoxicidade Aeróbica e Hipóxica dos compostos 28, 96, 97 e 98 em Células Tumorais Humanas (Tumor de mama A549)

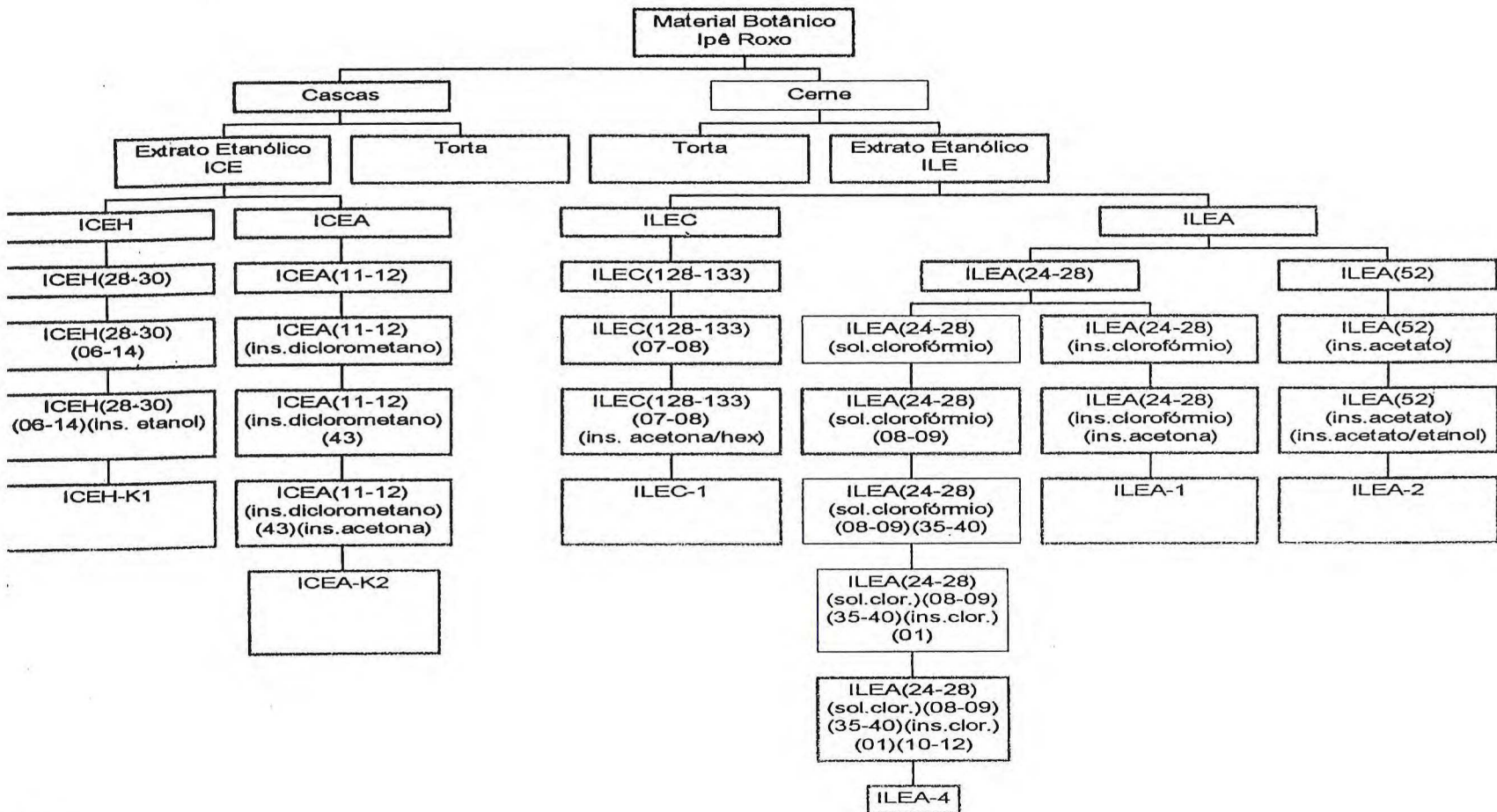
Composto	IC ₅₀ (ar) em μ M	IC ₅₀ (N ₂) em μ M
Lapachol(28)	0.783 +/- 0.058	1.0 +/- 0.3
Lapiper(96)	0.68 +/- 0.0059	0.99 +/- 0.08
Lapirrol(97)	1.05 +/- 0.21	0.84 +/- 0.11
Lapimor(98)	0.054 +/- 0.001	0.091 +/- 0.032

As observações iniciais mostram que tanto o lapachol(28) quanto os seus derivados possuem atividade contra as células tumorais em baixas concentrações sobre condições aeróbicas e hipóxicas. Contudo, o lapimor(98) apresentou um fator dez vezes mais potente que seus análogos, indicando a importância da porção morfolina na toxicidade desse tipo de composto.

Fluxograma 1: Obtenção dos extratos e isolamento de IAE-1, IAEC-1, IAEC-2, IAEA-K1, IAEA-K4, IAEA-K2, IAEA-K3, IAEE-K1 e IAEE-K3



FLUXOGRAMA: Obtenção dos extratos e Isolamento de ICEH-1, ICEA-K1 E ICEA-K2



CAPÍTULO 6

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico dos constituintes fixos das espécies *Tabebuia serratifolia* Nichols e *Tabebuia rosea* Bertol resultou no isolamento de substâncias pertencentes a várias classes de compostos orgânicos: quinonas, lignanas, triterpenos, ácidos, ésteres, esteróides e iridóides.

O extrato etanólico do lenho de *T. serratifolia* forneceu quantidade apreciável de lapachol (28), além de uma outra quinona, a dehidro- α -lapachona (30); as lignanas olivil (88) e 8-*epi*-cicoolivil (89); o ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico(90); o esteróide β -sitosterol (77) e seu glicosídeo (78); e o heterosídeo de iridóide 4''-hidroxi-3''-metoxibenzoil-ajugol (91), identificado através do seu derivado hexaacetilado (91a).

O fracionamento cromatográfico do extrato etanólico do lenho e cascas do lenho de *T. rosea* resultou no isolamento do éster metílico do ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico (92), ácido *p*-hidroxi-cinâmico (93); β -sitosterol (77) e seu glicosídeo(78); e o triterpeno ácido 3 β -6 β -19 α -trihidroxi-*urs*-12-eno-28-óico (94).

O levantamento bibliográfico demonstrou que 8-*epi*-cicoolivil (89) e o 4''-hidroxi-3''-metoxibenzoil-ajugol (91) são substâncias inéditas. Os compostos olivil (88), ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico (90), éster metílico do ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico (92), ácido *p*-hidroxi-cinâmico (93) e ácido 3 β -6 β -19 α -trihidroxi-*urs*-12-eno-28-óico (94) jamais haviam sido identificados no gênero *Tabebuia*.

A preparação de derivados do lapachol (28) utilizando aminas foi feita visando obter comparação de dados de atividade biológica. As aminas piperidina, pirrolidina e morfolina produziram lapiper (96), lapirrol (97), lapimor (98), pela substituição da hidroxila no C-2 do lapachol pela respectiva amina. Na reação do lapachol com cloridrato de hidroxilamina foram obtidas duas oximas, lapidroxi-2-1 (99) e lapidroxi-2-2(100), que mostraram que nas condições reacionais utilizadas ocorreu ciclização e que houve predominância de um dos tautômeros do lapachol.

Os testes realizados com larvas de *Artemia salina* com o lapachol (28) e os derivados (96), (97) e (98) apresentaram valores de DL₅₀ menores que 1000 ppm, que indicam também para os derivados do lapachol uma potencial atividade biológica.

Os testes com as larvas de *Aedes aegypti* utilizando os compostos (28), (96), (97) e (98) mostraram que o lapachol (28) é a substância mais ativa, indicando que a presença da hidroxila no C-2 parece ser de fundamental importância para a atividade larvicida contra *Aedes aegypti*.

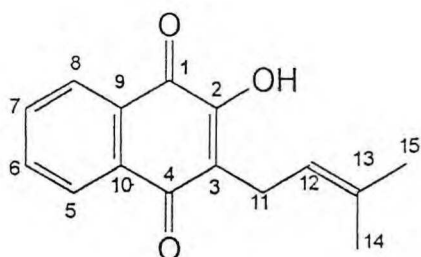
Os dados de citotoxicidade aeróbica e hipóxica dos compostos 28, 96, 97 e 98 em células tumorais humanas (Tumor de mama A549) mostraram que o lapachol(28) e seus derivados possuem atividade contra as células tumorais em baixas concentrações sob as duas condições. Contudo, o lapimor(98) apresentou um fator dez vezes mais potente que seus análogos, indicando a importância que a presença da porção morfolina nesse tipo de composto aumentou bastante a citotoxicidade nas células testadas.

CAPÍTULO 7

*CONSTANTES FÍSICAS E DADOS
ESPECTROMÉTRICOS*

7. CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROMÉTRICOS

7.1. IAE-1: Lapachol (28)



FM=C₁₅H₁₄O₃

PM=242 u.m.a

Ponto de fusão: 139-140⁰C

Aspecto: sólido cristalino amarelo

Solubilidade: clorofórmio

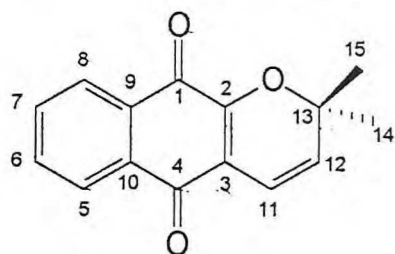
Dados de RMN¹H (500 MHz, CDCl₃): ver tab.1, pág.19.

Dados de RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃): ver tab.1, pág.19.

Dados de I.V. (KBr, ν_{\max} cm⁻¹): ver fig.1, pág.21.

Dados de E.M.: ver fig.7, pág.27.

7.2. IAEC-1: Dehidro- α -lapachona (30)



FM=C₁₅H₁₂O₃

PM=240 u.m.a

Ponto de fusão: 141-143⁰C

Aspecto: sólido cristalino laranja

Solubilidade: clorofórmio

Dados de RMN¹H (500 MHz, CDCl₃): ver tab.3, pág.30.

Dados de RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃): ver tab.3, pág.30.

Dados de I.V. (KBr, ν_{\max} cm⁻¹): ver fig.8, pág.32.

Dados de E.M.: ver fig.14, pág.38.

7.3. IAEA-K1: Ácido 3-hidroxi-4-metoxi-benzóico (92)



FM=C₈H₈O₄

PM=168 u.m.a

Ponto de fusão: 209-210 °C

Aspecto: sólido amorfo branco

Solubilidade: clorofórmio

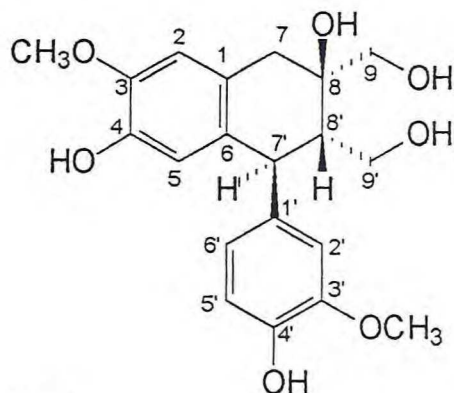
Dados de RMN¹H (500 MHz, CDCl₃): ver tab.5, pág.40.

Dados de RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃): ver tab.5, pág.40.

Dados de I.V. (KBr, ν_{\max} cm⁻¹): ver fig.15, pág.41.

Dados de E.M.: ver fig.20, pág.46.

7.4. IAEA-K3: 8-*epi*-cicoolivil (89)



FM=C₂₀H₂₄O₇

PM=376 u.m.a

Ponto de fusão: 159-162 °C

Aspecto: sólido amarelado

Solubilidade: metanol

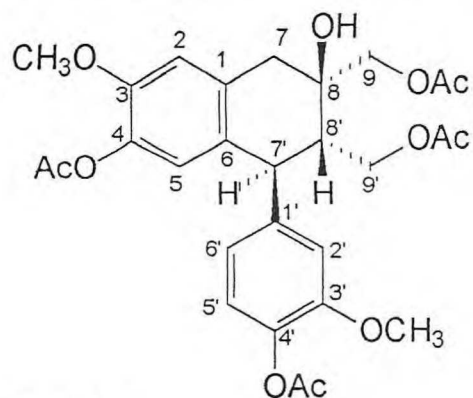
Dados de RMN¹H (500 MHz, CD₃OD): ver tab.6, pág.51.

Dados de RMN¹³C (125 MHz, CD₃OD): ver tab.6, pág.51.

Dados de I.V. (KBr, ν_{\max} cm⁻¹): ver fig.21, pág.54.

Dados de E.M.: ver fig.29, pág.62.

7.5. IAEA-K3-Ac: 4, 4', 9, 9'-acetoxi-8-*epi*-ciclooilivil (89a)



FM=C₂₈H₃₂O₁₁

PM=544 u.m.a

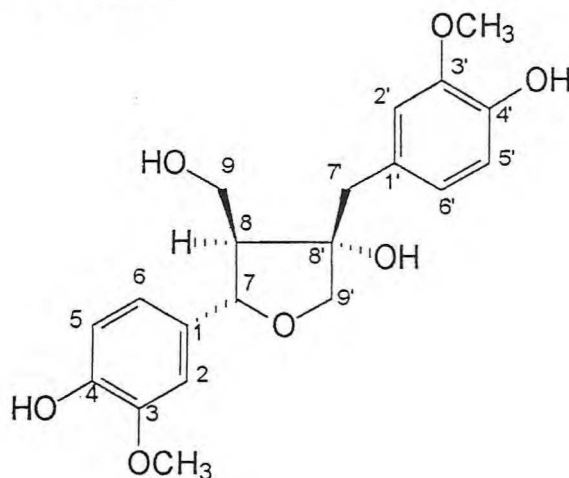
Aspecto: óleo amarelo

Solubilidade: clorofórmio

Dados de RMN¹H (500 MHz, C₆D₆): ver tab.7, pág.52.

Dados de RMN¹³C (125 MHz, C₆D₆): ver tab.7, pág.52.

7.6. IAEA-K4: Olivil (88)



FM=C₂₀H₂₄O₇

PM=376 u.m.a

Ponto de fusão: 125-127 °C

Aspecto: sólido amarelado

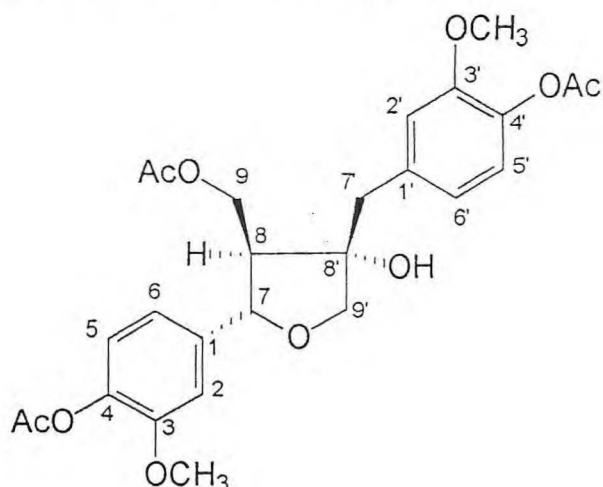
Solubilidade: acetona

Dados de RMN¹H [500 MHz, (CD₃)₂CO] : ver tab.9, pág.66.

Dados de RMN¹³C [125 MHz, (CD₃)₂CO]: ver tab.9, pág.66.

Dados de E.M.:ver fig.36, pág.74.

7.7. IAEA-K4-Ac: 4, 4', 9-triacetoxi-olivil (88a)



FM=C₂₆H₃₀O₁₀

PM=502 u.m.a

Aspecto: óleo amarelo-escuro

Solubilidade: clorofórmio

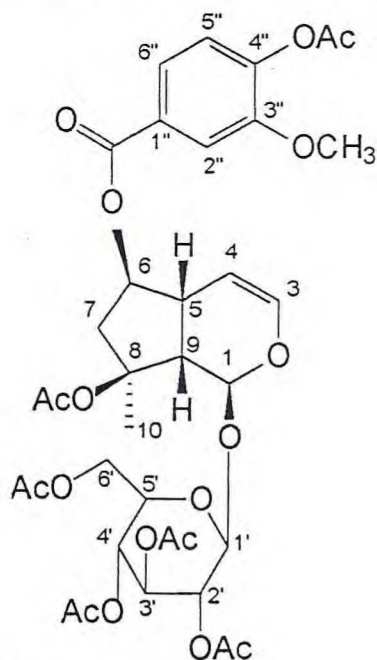
Dados de RMN¹H (500 MHz, CDCl₃): ver tab.10, pág.67.

Dados de RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃): ver tab.10, pág.67.

Dados de I.V. (KBr, ν_{\max} cm⁻¹): ver fig.37, pág.75.

Dados de E.M.:ver fig.40, pág.78.

7.8. IAEE-K1-Ac: 8, 2',3',4',6', 4''-hexaacetoxi-3''-metoxi-bezoil-ajugol(91a)



FM=C₃₅H₄₂O₁₈

PM=750 u.m.a

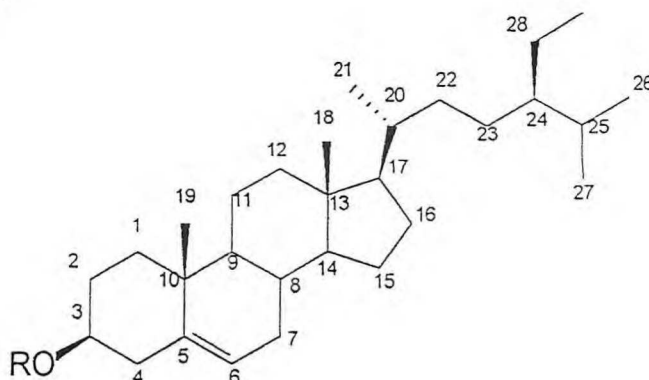
Aspecto: óleo amarelo-escuro

Solubilidade: clorofórmio

Dados de RMN¹H (500 MHz, CDCl₃): ver tab.11, pág.82.

Dados de RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃): ver tab.11, pág.82.

7.9. IAEC-2 ou ICEH-K1: β -sitosterol (77) e IAEA-K2 ou ILEA-2: glicosídeo do β -sitosterol (78)



R=OH (77)

FM=C₂₉H₅₀O

PM=414 u.m.a

Ponto de fusão: 136-137 °C

Aspecto: sólido branco amorfo

Solubilidade: clorofórmio

Dados de RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃): ver tab.13, pág.93.

R=Glicose(78)

FM=C₃₅H₆₀O₆

PM=576 u.m.a

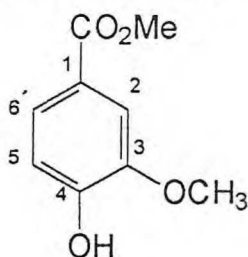
Ponto de fusão: 283-286 °C

Aspecto: sólido branco amorfo

Solubilidade: piridina

Dados de RMN¹³C (50 MHz, C₅H₅N): ver tab.13, pág.93.

7.10. ILEC-1: Éster metílico do ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico (92)



FM=C₉H₁₀O₄

PM=182 u.m.a

Ponto de fusão: 180-182 °C

Aspecto: sólido amarelado

Solubilidade: clorofórmio

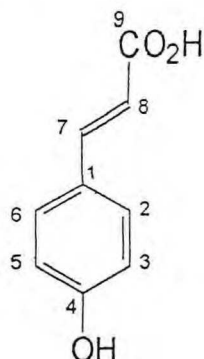
Dados de RMN¹H (200 MHz, CDCl₃): ver tab.17, pág.118.

Dados de RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃): ver tab.17, pág.118.

Dados de I.V. (KBr, ν_{\max} cm⁻¹): ver fig.67, pág.120.

Dados de E.M.: ver fig.70, pág.123.

7.11. ILEA-1: Ácido-*p*-hidroxi-cinâmico (93)



FM=C₉H₈O₃

PM=164 u.m.a

Ponto de fusão: 210-213 °C

Aspecto: sólido amarelado

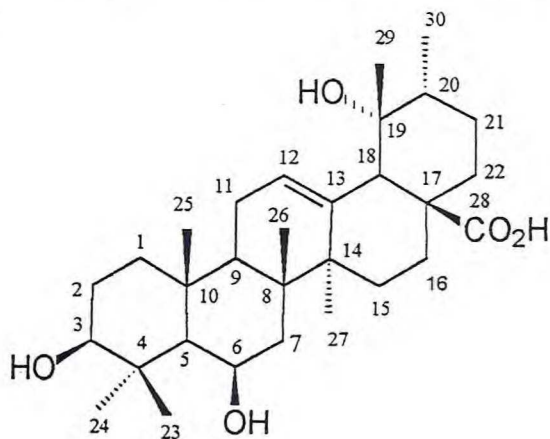
Solubilidade: metanol

Dados de RMN¹H (200 MHz, CD₃OD): ver tab.18, pág.125.

Dados de RMN¹³C (50 MHz, CD₃OD): ver tab.18, pág.125.

Dados de I.V. (KBr, ν_{\max} cm⁻¹): ver fig.66, pág.119.

7.12. ILEA-4: Ácido 3 β ,6 β ,19 α -trihidroxi-urs-12-en-28-óico (94)



FM=C₃₈H₄₈O₅

PM=488 u.m.a

Ponto de fusão: 251-253 °C

Aspecto: sólido branco amorfo

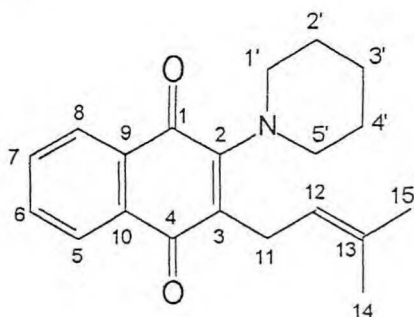
Solubilidade: metanol

Dados de RMN¹H (500 MHz, CD₃OD): ver tab.19, pág.132.

Dados de RMN¹³C (125 MHz, CD₃OD): ver tab.19, pág.132.

Dados de I.V. (KBr, ν_{\max} cm⁻¹): ver fig.74, pág.133.

7.13. Lapiper (96)



FM=C₂₀H₂₃O₂N

PM=309 u.m.a

Ponto de fusão: 88-90 °C

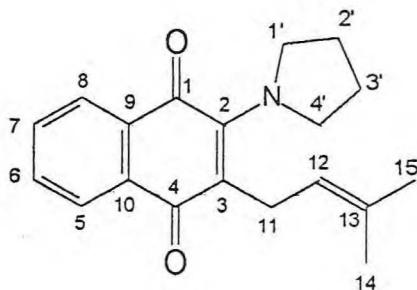
Aspecto: sólido cristalino vermelho

Solubilidade: clorofórmio

Dados de RMN¹H (500 MHz, CDCl₃): ver fig.49, pág.96.

Dados de RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃): ver tab.14, pág.95.

7.14. Lapirrol (97)



FM=C₁₉H₂₁O₂N

PM=295 u.m.a

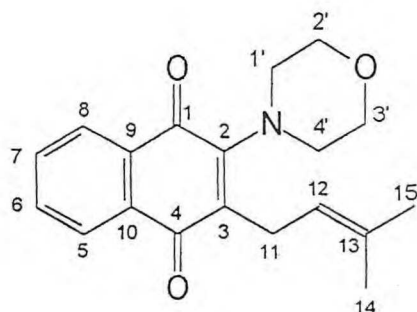
Aspecto: óleo viscoso vermelho

Solubilidade: clorofórmio

Dados de RMN¹H (500 MHz, CDCl₃): ver fig.51, pág.98.

Dados de RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃): ver tab.14, pág.95.

7.15. Lapimor (98)



FM=C₁₉H₂₁O₃N

PM=311 u.m.a

Ponto de fusão: 81-83 °C

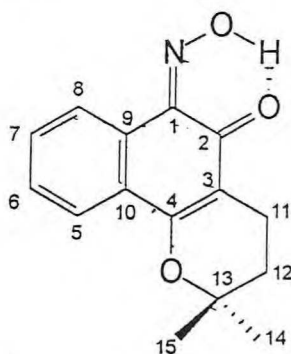
Aspecto: sólido cristalino vermelho

Solubilidade: clorofórmio

Dados de RMN¹H (500 MHz, CDCl₃): ver fig.53, pág.100.

Dados de RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃): ver tab.14, pág.95.

7.16. Lapidroxi-2-1 (99)



FM=C₁₅H₁₅O₃N

PM=257 u.m.a

Ponto de fusão: 152-153 °C

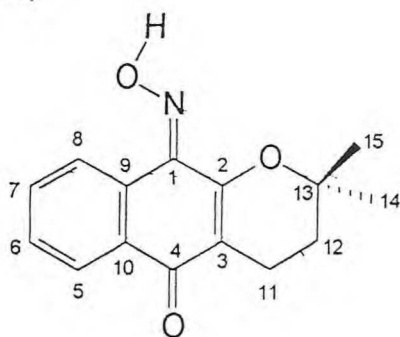
Aspecto: sólido cristalino amarelo

Solubilidade: acetona

Dados de RMN¹H [500 MHz, (CD₃)₂CO]: ver tab.15, pág.105.

Dados de RMN¹³C [125 MHz, (CD₃)₂CO]: ver tab.15, pág.105.

7.17. Lapidroxi-2-2 (100)



FM=C₁₅H₁₅O₃N

PM=257 u.m.a

Ponto de fusão: 217-218 °C

Aspecto: sólido cristalino laranja

Solubilidade: clorofórmio

Dados de RMN¹H (500 MHz, CDCl₃): ver tab.15, pág.105.

Dados de RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃): ver tab.15, pág.105.

CAPÍTULO 8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

001. Gentry, A.H., *Flora Neotrópica*, Bignoniaceae(1992). Organization for Flora Neotrópica, The New York Botanical Garden.
002. De Febres, Z. L., Steyermark, J. A., *Flora da Venezuela*(1982), Vol.VIII, Ed Fundación Educación Ambiental.
003. Fávaro, O.C.N., Oliveira, M.M., Rossini, M.A.A., Kamakura, C.R., Pinto, A.V.e Pinto, M.C.F.R. Seleção Por Meio de Células KB de Substâncias e Extratos Potencialmente Ativos em Quimioterapia do Câncer. **An.Ac.bras.Ci.** (1990), 62(3), 217-224.
- 004.Oliveira, A.B., Raslan, D.S., Miraglia, M.C.M., Mesquita, A.A.L., Zani, C. L., Ferreira, D.T. e Maia, J.G.S. Estrutura Química e Atividade Biológica de Naftoquinonas de Bignoniaceas Brasileiras. **Química Nova** (1990), 13(4), 302-307.
005. Ueda, S., Umemura, T., Dohguchi, K. Matsuzaki, Tokuda, H., Nishino, H. and Akio, I. Production of Anti-tumor-promoting Furano-naphtoquinones in *Tabebuia avellanadae* Cell Cultures. **Phytochemistry** (1994), 36(2), 323-325.
006. Lima, O.G., Coelho, J.S.B., d'Albuquerque, I.L., Mello, J.F., Martins, D.G., Lacerda, A.L. e Sousa, M.A.M. Substâncias Antimicrobianas de Plantas Superiores. **Rev. Inst. Antib. Recife** (1971), 11(1), 21-26.
007. Santana, C.F.,Lima, O.G., d'Albuquerque, I.L., Lacerda, A.L. e Martins, D.G. Observações Sobre as Propriedades Anti-tumorais e Toxicológicas do Extrato do Líber e de Alguns Componentes do Cerne do Pau d'Arco(*Tabebuia avellanadae*) **Rev. Inst. Antib. Recife** (1968), 8(1/2), 89-95.
008. Santana, C.F.,Lima, Lins, L.J.P., Asfora, J.J. Melo, A.M.,O.G. e d'Albuquerque, I.L. Primeiras Observações com Emprego do Lapachol em Pacientes Humanos Portadores de Neoplasias Malignas. **Rev. Inst. Antib. Recife** (1980), 20(1/2), 61-69.
009. Ioset, J.R., Marston, A., Gupta, M.P. and Hostettmann, K. Antifungal and Larvicidal Meroterpenoid Naphtoquinones and a Naphtoxirene the Roots of *Cordia linnaei*. **Phytochemistry** (1998), 47(5), 729-724.
010. Decosterd, L.A., Parsons, I.C., Gustafson, K.R., Cardelina II, J.H., McMahon, J.B., Cragg, G.M., Murata, Y., Pannell, L.K., Steiner J.R., Clardy, J. and Boyd, M.R. Structure, Absolute Stereochemistry, and Synthesis of Conocurvone, a Potent,

- Novel HIV-Inhibitory Naphthoquinone Trimer from a *Conospermum* sp.
J. Am. Chem. Soc. (1993), 115, 6673-6679.
011. Perez, H., Diaz, F. and Medina, J.D. Chemical Investigation and *in vitro* Antimalarial Activity of *Tabebuia ochracea* ssp. *neochrysantha*. **Int. J. Pharm.** (1997), 35(4), 227-231.
012. Naylor, M. A., Jaffar, M., Nolan, J., Steohens, M.A., Butler, S., Patel, K.B., Everett, S.A., Adams, G.E. and Stratford, I.J. 2-Cyclopropylindoloquinones and Their Analogues as Bioreductively Activated Antitumor Agents: Structure-Activity *in vitro* and Efficacy *in vivo*. **J. Med. Chem.** (1997), 40, 2335-2346.
013. Steinert, J., Khalaf, H. and Rimpler, M. HPLC Separation and Determination of Naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones and Related Compounds in Extracts of *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae). **J. Chrom. A** (1995), 281-287.
014. Zani, C.L., Oliveira, A.B. and Oliveira, G.G. Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea*. **Phytochemistry** (1991), 30(7), 2379-2381.
015. Girard, M., Kindack, D., Dawson, J.-C.E. and Awang, D.V.C. Naphthoquinone Constituents of *Tabebuia* sp. **J. Nat. Prod.** (1988), 51(5), 1023-1024.
016. Fujimoto, Y., Eguchi, T., Murasaki, C., Ohashi, Y., Katsumi, K., Takagaki, H., Abe, M., Inazawa, K., Yamazaki, K., Ikekawa, N., Yoshikawa, ° and Ikekawa, T. Studies on the Structure and Stereochemistry of Cytotoxic Furanonaphthoquinones from *Tabebuia impetiginosa*: 5- and 8-Hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones. **J. Chem. Soc. Perkins Trans. 1** (1991), 2323-2327.
017. Oliveira, A.B., Raslan, D.S., Oliveira, G.G. and Maia J.G. Lignans and Naphthoquinones from *Tabebuia incana*. **Phytochemistry** (1993), 34(5), 1409-1412.
018. Diaz, F. and Medina, J.D. Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea* ssp. *neochrysantha*. **J. Nat. Prod.** (1996), 59(4), 423-424.
019. Wagner, H., Kreher, B., Lotter, H., Hamburger, M.O. and Cordell, G.A. Structure Determination of New Isomeric Naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones from *Tabebuia avellanedae* by Selective-INEPT technique. **Helv. Chim. Acta** (1989), 72, 659-667.
020. Burnett, A.R. and Thomson, R.H. Naturally Occurring Quinones. Part X. The Quinonoid Constituents of *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae). **J. Chem. Soc (C)** (1967), 2100-2104.

021. Joshi, K.C., Prakash, L. and Singh, P. Quinones and Other Constituents from *Tabebuia rosea*. **Phytochemistry** (1973), 12, 942-943.
022. Burnett, A.R. and Thomson, R.H. Naturally Occuring Quinones. Part XII. Extractives from *Tabebuia chrysantha* Nichols and Other Bignoniaceae. **J. Chem. Soc (C)**(1968), 850-853.
023. Manners, G., Jurd, L. and Stevens, K. Guayacanicin- A Novel Phenolic Xanthen Derivative from *Tabebuia guayacan*. **J.Chem.Soc. Chem. Comm.**(1974), 388-389.
024. Villegas, J.R., Amato, S., Castro, I., Castro, O. and Jacobson, U. 4-Aryltetralin Lignan and Furanonaphthoquinones from *Tabebuia palmeri* Wood. **Fitoterapia** (1995), LXVI(3), 281-282.
025. Manners, G.D. and Jurd, L. A New Naphtoquinone from *Tabebuia Guayacan*. **Phytochemistry** (1976), 12, 942-943.
026. Joshi, K.C., Prakash, L. and Shah, R.K. Chemical Examination of the roots of *Tabebuia rosea* and Heartwood of *Oroxylum indicum*. **Planta Medica** (1977), 31(3), 257-258.
027. Prakash, L. and Singh, R. Chemical Constituents of Stem Bark and Root Heartwood of *Tabebuia pentaphylla* Hemsl (Bignoniaceae). **Pharmazie** (1980), 35(12), 813.
028. Manners, G.D., Jurd, L., Wong, R. and Palmer, K. Constituents of *Tabebuia guayacan*, The Structure of Guayacanicin. **Tetrahedron** (1975), 31, 3019-3024.
029. Sharma, P.K., Khanna, R.N., Rohatgi, B.K. and Thomson, R.H. Tecomaquinone-III: A New Quinone from *Tabebuia pentaphylla*. **Phytochemistry** (1988), 27(2), 632-633.
030. Manners, G.D., Jurd, L., Wong, R. and Palmer, K. Constituents of *Tabebuia guayacan* II, The Structure of Guayin. **Tetrahedron** (1976), 32, 543-547.
031. Manners, G.D., Jurd, L., Wong, R. and Palmer, K. Guayin: Na Unusual Oxalactone Dibenzxanthone from *Tabebuia guayacan*. **J.Chem.Soc.Chem.Comm.**(1975), 711.
032. Nakano, K., Maruyama, K., Murakami, K., Takaishi, Y. and Tomimatsu, T. Iridoids from *Tabebuia avellaneda*. **Phytochemistry** (1993), 32(2), 371-373.
033. Compadre, C.M., Jauregui, J.F., Nathan, P.J. and Enriquez, R.G. Isolation of 6-O-(*p*-Coumaroyl)-Catalpol from *Tabebuia rosea*. **Planta Medica** (1982), 46, 42-44.

034. Bishay, D.W., Abdel-Baky, A.M., Ross, S.A. and Ibrahim, Z.Z. Phytochemical Study of *Tabebuia pentaphylla* Hemsl Cultived in Egypt. **Bull. Pharm. Sci.** (1987), 10(2), 01-20.
035. Bianco, A., Passacantilli, P., Nicoletti, M. and Lima, R.A. Iridoids in Equatorial and Tropical Flora. Part.6. **Phytochemistry** (1983), 22(5), 1189-1191.
036. Nair, A.G.R., Gunasegaran, R. and Joshi, B.S. Chemical Investigation of Certain South Idian Plants. **Ind. J. Chem.** (1982), 21(B), 979-980.
037. Abdel-Baky, A.M. and Bishay, D.W. Pharmacognostic Study of *Tecoma argentea* Ber & Schum Cultivated in Egypt. . **Bull. Pharm.Sci.** (1984), 7(1), 190-206.
038. Dixit, B.S. and Srivastava, S.N. Flavonoids and Carotenoids of *Tecoma argentea* flowers. **Fitoterapia** (1992), 63(3), 272.
039. Blatt, C., Salatino, A. and Salatino, M.L.F. Flavonoids of *Tabebuia caraiba*(Bignoniaceae). **Biochem.Syst.Ecol.** (1996), 24(1), 89.
040. Joshi, K.C., Singh, P. and Singh, G. Crystalline Components of Roots of *Phyllarthron comorense* DC and of Stem Brak of *Tabebuia rosea* DC. **Ind. J. Chem, Sect B** (1976), 14B(8), 637-638.
041. Prakash, L.and Garg, G. Chemical Constituents of the Root Barks of *Jacaranda mimosaeifolia* D.Don and *Tabebuia pentaphylla* (Linn) Hemsl. **Pharmazie** (1980), 35(10), 649.
042. Prakash, L. and Singh, R. Chemical Examination of the Leaves and Stem Heartwood of *Tabebuia pentaphylla* (Linn) Hemsl(Bignoniaceae). **J. Ind. Chem.Soc.** (1981), 58(11), 1122-1123.
043. Dawson, B.A., Girard, M., Kindack, D., Fillion, J. and Awang, D.V.C. ¹³NMR of Lapachol and Some Related Naphthoquinones. **Mag. Res. Chem.** (1989), 27, 1176-1183.
044. Ferreira, C.A.C., Ferreira, V.F., Pinto, A.V., Lopes, R.S.C., Pinto, M.C.R. and Silva, A.J.R. **An. Ac. Bras. Ci.** (1987), 59(1/2), 5-8.
045. Pouchert, C.J.& Behnke, J., **The Aldrich Library of ¹³C and ¹HNMR spectra** (1993), Ed.I, Aldrich Chemical Company.
046. Sugiyama, M., Nagayama, E. and Kikuchi, M. Lignan and Phenylpropanoid Glycosides from *Osmanthus asiaticus*. **Phytochemistry** (1993), 33(5), 1215-1219.

047. Wang, H-B., De-Guan, Y., Liang, X-T., Watanabe, N., Tamai, M. and Omura, S. The Structures of Two Lignan Glycosides From *Stauntonia chinensis*. **J. Nat. Prod.** (1989), 52(2), 342-345.
048. ElGamal, A.A., Takeda, K., Itokawa, I.I., Halim, A.F., Amer, M.M. and Saad, H.E.A. Lignan Bis-Glucosides From *Galium sinaicum*. **Phytochemistry** (1997), 45(3), 597-600.
049. Cho, J.Y., Yoo, E.S., Yoshikawa, K., Baik, K.U., Lee, J. and Park, M.H. Inhibitory Effect of Lignans From the Rhizomes of *Coptis japonica* var. *Dissecta* on Tumor Necrosis Factor-alpha Production in Lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 Cells. **Arq. Pharm. Res.** (1998), 21(1), 12-16.
050. Suh, N., Luyengi, L., Fong, H.H.S., Kinghorn, A.D. and Pezzuto, J.M. Discovery of Natural Product Chemopreventive Agents Utilizing HL-60 Cell-Differentiation as a Model. **Anticancer Res.**(1995), 15(2), 233-239.
051. Smolny, T., Wichers, H., Kalenberg, S., Vari, A.S., Petersen, M. and Alfermann, A.W. Accumulation of Podophyllotoxin and Related Lignans in Cell Suspension Cultures of *Lunum album*. **Phytochemistry** (1998), 48(6), 975-979.
052. Fonseca, S.F., Nielsen, L.T. and Ruveda, E.A. Lignans of *Araucaria angustifolia* and ¹³NMR Analysis of Some Phenyltetralin Lignans. **Phytochemistry** (1979), 18, 1703-1708.
053. Tan, R.X., Jakupovic, J. and Jia, Z.J. Aromatic Constituents From *Vladimiria souliei*. **Planta Medica** (1990), 56, 475-477.
054. Macari, P.A.T., Emerenciano, V.P. e Ferreira, Z.M.G.S. Identificação dos Triterpenos de *Miconia albicans* Triana Através de Análise por Microcomputador. **Química Nova** (1990), 13(4), 260-262.
055. Pavia, D.L., Lampman, G.M. and Kriz, G.S. **Introduction to Spectroscopy** (1996), 2nd edition, Ed. Saunders College Publishing.
056. Mahato, S.B. and Kundu, A.P. ¹³CNMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids-A Compilation and Some Salient Features. **Phytochemistry** (1994), 37(6), 1517-1575.
057. Aquino, R., Simone, F., Vinciere, F.F., Pizza, C. and Gacs-Baitz, E. New Polyhydroxylated Triterpenes From *Uncaria tomentosa*. **J. Nat. Prod.** (1990), 53(3), 559-564.

058. Liang, Z.Z., Aquino, R., Feo, V, Simone, F. and Pizza, C. Polyhydroxylated Triterpenes From *Eriobotrya japonica*. *Planta Medica* (1990), 56, 330-332.
059. Aimi, N., Likhitwitayawuid, K., Goto, J., Ponglux, D., Haginiwa, J. and Sakai, S. Triterpenoidal Constituents of *Uncaria florida* Vidal. *Tetrahedron* (1989), 45(13), 4125-4132.