UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Araucaria angustifolia*
(Bert.) O. Ktze

Fabiana Novaes Fonseca

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADOR

Prof. Dr. Massuo Jorge Kato

São Paulo

1997

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Fonseca, Fabiana Novaes
F676m Metabólitos secundários de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O.
Ktze / Fabiana Novaes Fonseca. -- São Paulo, 1997.
149p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química. Departamento
de Química Fundamental.
Orientador: Kato, Massuo Jorge

1. Produtos naturais : Química orgânica I. T. II. Kato,
Massuo Jorge, orientador.

547.7 CDD

“Metabólitos Secundários de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze”

FABIANA NOVAES FONSECA

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Área: Química Orgânica

Aprovado por:

Prof. Dr. MASSUO JORGE KATO
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. NÍDIA FRANCA ROQUE
IQ - USP

Profa. Dra. MAYSA FURLAN
IQ - UNESP - Araraquara

SÃO PAULO
21 DE NOVEMBRO DE 1997

***“Caminante, son tus huellas
el camino, y nadie mas;
Caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.
Al andar se hace camino,
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.
Caminante, no hay camino,
sino estelas en la mar.”***

Cantar 29.

Antonio Machado

***Aos meus pais, Eliana Novaes Fonseca
e José Elias da Fonseca,
e à minha irmã Maria Hemíla Fonseca,
pelo carinho, confiança, força, estímulo e compreensão.
Por estarem sempre do meu lado,
e por serem a maior preciosidade
que Deus me deu.***

***À Profª. Drª. Eny Ioshvet Segal Floh,
pela orientação nos experimentos
de cultura de células,
pela sua força,
pelo seu carinho.
Pelo seu exemplo.***

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Massuo Jorge Kato, pela orientação, apoio e pela oportunidade de fazer parte de seu grupo.

Ao Prof. Dr. Walter Handro do Instituto de Biociências, pelo apoio e pelas valiosas sugestões.

À Prof^a. Dr^a. Maysa Furlan do Instituto de Química da UNESP-Araraquara, pela obtenção do extrato de caule adulto.

Ao Norberto P. Lopes, pelo auxílio, interesse e por ter acompanhado de perto todas as etapas deste trabalho.

À Patrícia Sartorelli, pelo grande auxílio na fitoquímica dos calos.

Ao Ernani Pinto Júnior pelas sementes.

Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais Ana Luísa, Ana Paula, Ari, Cecília, Clara, Claudia, Dulce, Eduardo, Eva, Guilherme, João, Júlio, Leandro, Luciana, Lucianinha, Mara, Maria de Lurdes, Mônica, Dona Marina, Paulo Benevides, Paulo Brandão, Sérgio, Wagner, Seu Zé e em especial à Isabel, pela ajuda e discussões sobre espectroscopia de massas e à Ana Cristina, pelo seu companheirismo e amizade.

Ao “pessoal da bio”, Ana Paula (s), Armando, Catarina, Consuelo, Lázaro, Liane, Maria Anastácia, Nídia, Gilmar, Patrícia, pela companhia agradável, e especialmente à grande amiga Carmen Silva (Carminha), pela paciência, ajuda e preciosos conselhos.

Aos “amigos da araucaria”, Leandro Astarita e Jorge Solsrzano, pelas sugestões, discussões e fotos.

Ao Chico e Jailson, pela perfeição no xerox.

Aos funcionários da Central Analítica, pela obtenção dos espectros de RMN, massas, IV, especialmente ao Luiz Carlos Roque.

Aos funcionários da Biblioteca do Conjunto das Químicas, especialmente à Adriana, Moema e Ângelo.

A todos aqueles que de alguma forma auxiliaram na execução deste trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

	PÁGINA
Resumo	VII
Abstract	VII
Sumário de Figuras	VIII
Sumário de Tabelas	X
Sumário de Espectros	XI
Abreviaturas e Símbolos	XIII
INTRODUÇÃO	001
I - A família Araucariaceae e a espécie <i>Araucaria angustifolia</i> .(Bert.) O. Ktze	001
II - Metabólitos secundários da família Araucariaceae	006
III - A cultura de células e tecidos vegetais no estudo do metabolismo secundário	019
IV - Objetivos do trabalho	022
MATERIAIS E MÉTODOS	023
I - Materiais, reagentes e equipamentos utilizados	023
II - Cultura de tecidos	025
II.1 - Material vegetal	025
II.2 - Obtenção dos explantes para cultura de tecidos	025
II. 2. A - Embriões	025
II. 2. B - Plântulas	026
II.3 - Indução e manutenção dos calos	027
II. 3. A - Embriões	027
II. 3. B - Plântulas	028

III - Fitoquímica	031
III. 1 - Material vegetal	031
III. 2 - Obtenção dos extratos de <i>A. angustifolia</i>	031
III. 3 - Fracionamento do extrato de caule adulto	033
III.4 - Fracionamento do extrato de calos	038
III.5 - Dados físicos e espectroscópicos das substâncias isoladas	040
III.6 - Espectros obtidos	044
RESULTADOS E DISCUSSÃO	081
I - Cultura de Tecidos	081
I. 1 - Indução e manutenção de calos	081
I. 2 - Discussão	091
II - Fitoquímica	092
II.1 - Substâncias isoladas de <i>Araucaria angustifolia</i>	092
II.2 - Determinação estrutural	094
II.2 - A - Derivados do benzaldeído	094
II.2 - B - Fenilpropanóides	097
II.2 - C - Isoflavonas	110
II.2 - D - Lignanas furofurânicas	115
II.2 - E - Lignanas tetraidrofurânicas	120
CONSIDERAÇÕES GERAIS	125
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

RESUMO

O estudo fitoquímico do extrato etanólico de caules adultos de *Araucaria angustifolia* resultou no isolamento e identificação da vanilina, *p*-hidroxibenzaldeído, coniferaldeído, dois isoflavonóides (cabreuvina e irisolidona), quatro lignanas (pinoresinol, eudesmina, lariciresinol e 9'-*O*-acetato de lariciresinol) e β -sitosterol. Foi desenvolvido um protocolo para a obtenção de calos, a partir de caules de plântulas estioladas, dos quais foram isolados e caracterizados mistura de isômeros *E* e *Z* do *p*-cumarato de octadecila e do ferulato de octadecila.

ABSTRACT

Phytochemical investigations carried out on ethanolic extract from woods of *Araucaria angustifolia* resulted on the isolation and identification of vanillin, *p*-hydroxybenzaldehyde, coniferaldehyde; two isoflavones (cabreuvin and irisolidone); four lignans (pinoresinol, eudesmine, lariciresinol and 9'-*O*-lariciresinol-acetate), and β -sitosterol. Its callus culture was showed to accumulate mixtures of isomers *E* and *Z* of octadecyl *p*-cumarate and of octadecyl ferulate.

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplar adulto de <i>Araucaria angustifolia</i>	003
Figura 2 - Aspectos de uma pinha feminina madura e pinhões	004
Figura 3 - Plântulas de <i>A. angustifolia</i> cultivadas na casa de vegetação do LQPN do Instituto de Química – USP	005
Figura 4 - Terpenos da família Araucariaceae	011
Figura 5 - Flavonóides da família Araucariaceae	015
Figura 6 - Lignóides da família Araucariaceae	017
Figura 7 - Algumas aplicações da cultura de células e tecidos vegetais	020
Figura 8 - Relações biossintéticas entre lignanas de <i>Forsythia intermedia</i> e podofilotoxina	022
Figura 9 - Obtenção das frações de polaridade média do extrato de caule adulto e de calos	032
Figura 10 - Fracionamento cromatográfico da fração diclorometânica do extrato etanólico do caule adulto	034
Figura 11 - Fracionamento cromatográfico das subfrações de F3/C8	035
Figura 12 - Fracionamento cromatográfico das frações F3/C9 e F3/C10	037
Figura 13 - Fracionamento cromatográfico da fração diclorometânica dos calos ARA-4	039
Figura 14 - Porcentagem de formação de calos e oxidação dos explantes obtidos a partir de embriões inteiros, mantidos na luz	083
Figura 15 - Porcentagem de formação de calos e oxidação dos explantes obtidos a partir de embriões inteiros mantidos no escuro	083
Figura 16 - Porcentagem de formação de calos e oxidação dos explantes obtidos a partir de eixos embrionários mantidos na luz	084
Figura 17 - Porcentagem de formação de calos e oxidação dos explantes obtidos a partir de eixos embrionários mantidos no escuro	084

Figura 18 - Porcentagem de formação de calos e oxidação dos explantes obtidos a partir de plântulas crescidas na luz	085
Figura 19 - Porcentagem de formação de calos e oxidação dos explantes obtidos a partir de plântulas estioladas	085
Figura 20 - Tempo de cultura para formação de calos em embriões inteiros	086
Figura 21 - Tempo de cultura para formação de calos em eixos embrionários	086
Figura 22 - Tempo de cultura para formação de calos em plântulas crescidas na luz e estioladas	087
Figura 23 - Calos de segmentos de caule de plântulas 23 dias após a inoculação	088
Figura 24 - Desenho esquemático de uma placa de Petri múltipla	089
Figura 25 - Placa de Petri múltipla, com calos obtidos no meio ARA4, montada segundo a Figura 24	089
Figura 26 - Calo de segmentos de caule de plântulas estioladas em ARA4, 20 dias após o primeiro repique	090
Figura 27 - Interpretação do espectro de massas obtido para 11 , 12 , 13 e 14	109
Figura 28 - Interpretação do espectro de massas obtido para a cabreuvinina (4)	113
Figura 29 - Interpretação do espectro de massas obtido para a irisolidona (5)	114
Figura 30 - Esqueleto carbônico das lignanas furofurânicas	115
Figura 31 – Possibilidades isoméricas para lignanas furofurânicas	115
Figura 32 – Interpretação do espectro de massas obtido para o pinoresinol (6)	118
Figura 33 – Interpretação do espectro de massas obtido para a eudesmina (7)	119
Figura 34 – Proposta de fragmentação para o 9'-O-acetil-lariciresinol (9)	124

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1 - Metabólitos secundários da família Araucariaceae	007
Tabela 2 - Reguladores de crescimento utilizados para a indução e manutenção de calos em embriões	028
Tabela 3 - Reguladores de crescimento utilizados para a indução e manutenção de calos em plântulas	029
Tabela 4 - Fracionamento do extrato etanólico do caule adulto	033
Tabela 5 - Fracionamento do extrato de calos	038
Tabela 6 - Dados de RMN- ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) do <i>p</i> -hidroxibenzaldeído (1)	096
Tabela 7 - Dados de RMN- ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da vanilina (2)	096
Tabela 8 - Dados de RMN- ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) da vanilina (2)	096
Tabela 9 - Dados de RMN- ¹ H (200MHz, CDCl ₃) do coniferaldeído (3)	099
Tabela 10 - Dados de RMN- ¹³ C (50MHz, CDCl ₃) do coniferaldeído (3)	100
Tabela 11 - Dados de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do (<i>E</i>)- e (<i>Z</i>)- <i>p</i> -cumarato de octadecila (11 e 12)	103
Tabela 12 - Dados de RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) do (<i>E</i>)- e (<i>Z</i>)- <i>p</i> -cumarato de octadecila (11 e 12)	104
Tabela 13 - Dados de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do (<i>E</i>)- e (<i>Z</i>)-ferulato de octadecila (13 e 14)	107
Tabela 14 - Dados de RMN- ¹³ C (50MHz, CDCl ₃) de (<i>E</i>)- e (<i>Z</i>)-ferulato de octadecila (13 e 14)	108
Tabela 15 - Dados de RMN- ¹ H (200MHz, CDCl ₃) da cabreuvina (4)	112
Tabela 16 - Dados de RMN- ¹ H (300MHz, CDCl ₃) da irisolidona (5)	112
Tabela 17 - Dados de RMN- ¹ H (200MHz, CDCl ₃) do pinoresinol (6) e eudesmina (7)	117
Tabela 18 - Dados de RMN- ¹ H do lariciresinol (8) (300MHz, CDCl ₃) e 9'- <i>O</i> -acetil-lariciresinol (9) (200MHz, CDCl ₃)	122
Tabela 19 - Dados de RMN- ¹³ C lariciresinol (8) (75MHz, CDCl ₃) e 9'- <i>O</i> -acetil-lariciresinol (9) (50MHz, CDCl ₃)	123

SUMÁRIO DE ESPECTROS

Espectro 1 - RMN- ¹ H da fração diclorometânica (A3) do extrato de calos	045
Espectro 2 - RMN- ¹ H de <u>1</u>	046
Espectro 3 - RMN- ¹ H de <u>2</u>	047
Espectro 4 -RMN- ¹³ C de <u>2</u>	048
Espectro 5 - Espectro de massas de <u>1</u>	049
Espectro 6 - Espectro de massas de <u>2</u>	049
Espectro 7 - RMN- ¹ H de <u>3</u>	050
Espectro 8 - RMN HOMO - COSY ¹ H- ¹ H de <u>3</u>	051
Espectro 9 - RMN- ¹³ C de <u>3</u>	052
Espectro 10 - Espectro de massas de <u>3</u>	053
Espectro 11 - RMN- ¹ H de <u>11</u> e <u>12</u>	054
Espectro 12 - RMN- ¹ H de <u>11</u> e <u>12</u> – expansão	055
Espectro 13 - RMN- ¹³ C de <u>11</u> e <u>12</u>	056
Espectro 14 - Espectro no infravermelho de <u>11</u> e <u>12</u>	057
Espectro 15 - Espectro de massas de <u>11</u> e <u>12</u>	057
Espectro 16 - RMN- ¹ H de <u>13</u> e <u>14</u>	058
Espectro 17 - RMN- ¹ H de <u>13</u> e <u>14</u> – expansão	059
Espectro 18 - RMN- ¹³ C de <u>13</u> e <u>14</u>	060
Espectro 19 - RMN- ¹³ C – DEPT 135° de <u>13</u> e <u>14</u>	061
Espectro 20 - Espectro no infravermelho de <u>13</u> e <u>14</u>	062
Espectro 21 - Espectro de massas de <u>13</u> e <u>14</u>	062
Espectro 22 - RMN- ¹ H de <u>4</u>	063
Espectro 23 - RMN- ¹ H de <u>4</u> – expansão	064
Espectro 24 - RMN HOMO - COSY ¹ H - ¹ H de <u>4</u>	065
Espectro 25 - RMN- ¹ H de <u>5</u>	066
Espectro 26 - Espectro de NOE diff. de <u>5</u>	067
Espectro 27 - Espectro de massas de <u>4</u>	068
Espectro 28 - Espectro de massas de <u>5</u>	068

Espectro 29 - RMN- ¹ H de <u>6</u>	069
Espectro 30 - RMN- ¹ H de <u>7</u>	070
Espectro 31 - Espectro de massas de <u>6</u>	071
Espectro 32 - Espectro de massas de <u>7</u>	071
Espectro 33 - RMN- ¹ H de <u>8</u>	072
Espectro 34 - RMN- ¹³ C de <u>8</u>	073
Espectro 35 - RMN- ¹ H de <u>9</u>	074
Espectro 36 - RMN HOMO - COSY ¹ H - ¹ H de <u>9</u>	075
Espectro 37 - RMN- ¹³ C de <u>9</u>	076
Espectro 38 - Espectro de massas de <u>8</u>	077
Espectro 39 - Espectro de massas de <u>9</u>	077
Espectro 40 – Espectro no infravermelho de <u>9</u>	078
Espectro 41 - RMN- ¹ H de <u>10</u>	079
Espectro 42 - Espectro de massas de <u>10</u>	080

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2,4-D	ácido 2,4 – diclorofenoxiacético
AcOEt	acetato de etila
ANA	ácido α -naftalenoacético
AIA	ácido indolacético
AIB	ácido indol - 3 - butírico
Ar	arila
CC	cromatografia em coluna
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
CPC	cromatografia planar comparativa
CPP	cromatografia planar preparativa
CPRP	cromatografia planar radial preparativa
CG	cromatografia gasosa
DCM	diclorometano
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
<i>d</i>	dubleto
<i>dd</i>	duplo-dubleto
EM	espectrometria de massas
Gu	guaiacila (4 - hidroxí -3- metoxifenila)
Hex	hexano
HOMO - COSY	homonuclear correlated spectroscopy
Hz	hertz
int. rel.	intensidade relativa
IV	infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento
K	cinetina (6 - benzilamino-purina)
<i>m</i>	multiplete
[M ⁺]	pico do íon molecular
MS	meio básico segundo Murashige e Skoog [72]

<i>max</i>	máximo
Me	metila
MeOH	metanol
Me ₂ CO	acetona
<i>m/z</i>	relação massa carga
NOE	nuclear overhauser effect
NOE diff.	nuclear overhauser effect differential
OAc	acetila
pH	potencial hidrogenioiônico
RMN- ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN- ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze
<i>s</i>	singleto
<i>s/</i>	singleto largo
<i>t</i>	triplete
TMS	tetrametilsilano
v/v	volume por volume
Ve	veratril (3,4 – dimetoxifenila)
δ	deslocamento químico

INTRODUÇÃO

I - A família Araucariaceae e a espécie Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktze

A família Araucariaceae, pertence à ordem das *Coniferae*, à classe *Coniferopsida* e ao grupo das *Gymnospermae* [1].

A ordem das coníferas inclui várias espécies usadas na medicina tradicional e, segundo Dallimore e Jackson [2], pode ser dividida em seis famílias: *Cephalotaxaceae*, *Podocarpaceae*, *Araucariaceae*, *Cupressaceae*, *Taxodiaceae* e *Pinaceae*. No Brasil, só ocorrem representantes nativos das famílias *Podocarpaceae* (*Podocarpus lamberti* e *P. sellowii*) e *Araucariaceae* (*Araucaria angustifolia*) [1, 2, 3].

A família Araucariaceae possui apenas dois gêneros - *Araucaria* e *Agathis* [4] e apesar da distribuição desta família ser restrita ao Hemisfério Sul (com exceção de algumas espécies de *Agathis*, as quais são endêmicas do Arquipélago Malaio e Ilhas Filipinas), ela já foi muito mais ampla no passado. Foram descobertos vários fósseis do gênero *Araucaria* em ambos os hemisférios datando do Jurássico, enquanto que exemplares de *Agathis* só foram encontrados no Hemisfério Sul no começo do Cretáceo [5].

O gênero *Agathis* possui cerca de treze espécies [6] e o *Araucaria*, vinte [4]. Destas, apenas duas são nativas da América do Sul: *Araucaria araucana* ($\equiv$ *imbricata*), a qual ocorre no sul do Chile e Argentina, e *Araucaria angustifolia* ($\equiv$ *brasiliensis*), cuja ocorrência se restringe ao Brasil e Território de Misiones na Argentina. Quanto ao gênero *Agathis*, com exceção das espécies encontradas no Arquipélago Malaio e Ilhas Filipinas, todas são endêmicas da Austrália. Aqui no Brasil é comum o cultivo de *Araucaria excelsa*, *Araucaria biddiwillii* e, mais raramente, algumas espécies de *Agathis* com finalidades ornamentais [3].

A espécie *Araucaria angustifolia* ($\equiv$ *brasiliensis*) é conhecida popularmente como araucária, pinheiro do Paraná, e entre os povos indígenas como “cariúva” ou “curi”. No exterior é conhecida como “brazilian pine” (**Figuras 1 a 3**, p. 3 a 5).

Segundo Reitz e Klein [7] são árvores altas, chegando a alcançar 50 m de altura, com 1-2 m ou mais de diâmetro; o tronco em geral é cilíndrico, reto e raras vezes ramificado em dois ou mais, sua casca é grossa (até 5 cm) e resinosa. As árvores adultas possuem formato de umbela, enquanto as jovens possuem a copa cônica.

Quanto a sua utilidade, os pinhões fornecem alimento nutritivo e muito apreciado por homens e animais. Mas sem dúvida, o uso mais importante é o da madeira, geralmente chamada de pinho, que é usada para a fabricação de taboados, vigamento, compensados, celulose, papel, lã e seda artificiais; a resina serve de base para a fabricação de vernizes, terebentina, e outros produtos químicos [7, 8, 9].

A araucária é encontrada formando agrupamentos densos, principalmente na parte leste e central do planalto sul-brasileiro, abrangendo o Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, ocorrendo em focos esparsos ao sul de São Paulo e na Serra da Mantiqueira, e ainda ao sul de Minas Gerais e Rio de Janeiro [7, 10].

No início deste século, aproximadamente 20 milhões de hectares no sul do país eram cobertos pelas “Florestas de Araucária”, as quais dominavam a paisagem destas regiões, entretanto, devido à intensa exploração madeireira ocorrida principalmente na década de 60-70, e a expansão das fronteiras agrícolas, chegou-se perto de sua completa extinção. Apesar desta situação o reflorestamento ainda é muito pouco aplicado [11].

Figura 1: Exemplar adulto de *Araucaria angustifolia*.
Ilustração retida do livro ÁRVORES DO BRASIL [9]

Figura 2: Aspectos da pinha feminina madura e de pinhões.
Ilustração retida do livro ÁRVORES DO BRASIL [9]

Figura 3: Plântulas de *A. angustifolia* cultivadas na casa de vegetação do LQPN do Instituto de Química – USP.

II – Metabólitos secundários da família Araucariaceae

Os estudos fitoquímicos realizados em espécies de *Araucariaceae* (**Tabela 1**, p. 7 a 10), revelaram até o presente, a ocorrência de terpenos (**Figura 4**, p. 11 a 14) na resina [12 a 28], biflavonóides (**Figura 5**, p. 15 a 16) nas folhas [6, 30 a 33] e lignóides (**Figura 6**, p. 17, 18) na madeira [8, 34 a 39].

Os estudos realizados com *A. angustifolia* revelaram o acúmulo específico de determinadas classes de metabólitos secundários nas partes estudadas. Foi observado o acúmulo de lignanas no caule e nas raízes (L2, L4 - L13) e terpenos na resina (T1a, T1b, T1d, T41, T42) e nos óleos essenciais das folhas e brotos (T43 a T52).

As funções ecofisiológicas das substâncias presentes nos diversos tecidos vegetais citados ainda necessitam de investigações sistemáticas, visto que, para as três classes descritas, diversos efeitos farmacológicos e biológicos já foram atribuídos [40 a 45]. Tal fato, torna certos tecidos da araucária fonte fértil de substâncias a serem testadas com finalidades medicinais.

Tabela 1a: Metabólitos secundários do gênero *Agathis*

Espécie	Parte estudada	Terpenos	Flavonóides	Lignóides	Referências Bibliográficas
<i>Agathis alba</i>	Folhas	-	F2a, F2c; F2e F3a; F3c; F3b; F4a; F4b; F4c; F4d	-	[29]
<i>Agathis atropurpurea</i>	Folhas	-	F2b; F2c; F2g F3b; F3c; F3e	-	[6]
<i>Agathis australis</i>	Folhas	-	F2b; F2c; F2d; F2g; F3b; F3c; F3d; F3e	-	[6]
Resina		T1a; T1c; T2a; T2b; T3a; T3b; T20; T26a; T26b; T28a; T28b; T30; T31; T32			[12 - 14]
Madeira		-	-	L1 - L3	[34]
Óleo essencial*		T53	-	-	[20]

<i>Agathis lanceolata</i>	Resina	T1a; T1d; T1e; T3c; T4; T28c	-	[18, 19]
<i>Agathis microstachya</i>	Resina	T1a; T1c	-	[16]
<i>Agathis ovata</i>	Folhas	-	F2a; F2c; F2d; F2g; F3b; F3c; F3d; F3e	[6]
<i>Agathis robusta</i>	Resina	T1a; T3a; T12; T13; T26	-	[12, 15, 17]
	Folhas		F1; F2a - F2e	[6, 31, 32]
		-	-	
<i>Agathis vitiensis</i>	Resina	T1a; T1d; T1e; T10c; T28c	-	[18]
	Caule adulto	T23; T24; T33; T34	-	[21]

* Os autores não citam qual a parte usada para a extração do óleo essencial.

Tabela 1b: Metabólitos secundários do gênero *Araucaria*

<i>Araucaria angustifolia</i>	Raiz	-	-	L2a; L2b	[35]
	Caule adulto	T1a; T1b; T11d; T41; T28	F6	L2; L4b - L4c; L5a; L5b; L6a; L6b L7a - L7b L8 - L13	[8, 36 - 39]
	Óleo essencial das folhas e brotos	T43 - T45	-	-	[22]
	Resina comercial	-	F6	L2c; L4a; L5a; L6; L9	[39]
<i>Araucaria araucana</i>	Óleo essencial*	T35 - T41	-	-	[23]
	Madeira	T11a - T11e	-	-	[24]
	Resina	T10a - T10c	-	-	[17]

<i>Araucaria bidwillii</i>	Folhas	F2a; F2c; F2e; F2f; F3a; F3b; F3c; F4a; F4c; F4d; F4e	[29]
	Resina	T1d; T1e; T1f; T1g; T1h; T5; T6; T7; T8a; T8b; T17a; T17b; T18	[25, 26]
<i>Araucaria cookii</i>	Resina	T1i; T1j; T1m; T14a - T14d; T15a - T15c T25a - T25c; T29	[28]
	Folhas	-	[30, 33]
<i>Araucaria cunninghami</i>	Resina	T1i; T1j; T2c; T8c-T8i; T19	[27]
	Folhas	-	[30, 33]
		F2d; F2h; F4f; F4g; F5	

* Os autores não citam qual a parte usada para a extração do óleo essencial.

T1a R₁ = R₂ = CO₂H
 T1b R₁ = CH₂OH R₂ = CO₂H
 T1c R₁ = CO₂Me R₂ = CO₂H
 T1d R₁ = CO₂H R₂ = CO₂Me
 T1e R₁ = CO₂Me R₂ = CO₂Me
 T1f R₁ = CH₂OAc R₂ = CO₂Me

T1g R₁ = CH₂OH R₂ = CO₂Me
 T1h R₁ = CHO R₂ = CO₂Me
 T1i R₁ = CO₂Me R₂ = CH₂OH
 T1j R₁ = CO₂Me R₂ = CH₂OAc
 T1l R₁ = CO₂H R₂ = CH₂COMe
 T1m R₁ = CH₂OH R₂ = CH₂OH

T2a R = CO₂H
 T2b R = CH₂OH
 T2c R = CO₂Me

T3a R = COOH
 T3b R = CH₂OH
 T3c R = CO₂Me

T4

T5

T6

T7

T8a R₁ = Me R₂ = Ac
 T8b R₁ = Me R₂ = H
 T8c R₁ = CO₂H R₂ = H
 T8d R₁ = CO₂Me R₂ = Ac
 T8e R₁ = CH₂OH R₂ = H

T8f R₁ = CHO R₂ = H
 T8g R₁ = CH₂OH R₂ = Ac
 T8h R₁ = CHO R₂ = Ac
 T8i R₁ = CH₂OAc R₂ = Ac

T9a R₁ = CHO R₂ = CH₂OH
 T9b R₁ = CH₂OH R₂ = CO₂Me

T10a R = CH₂OH
 T10b R = CO₂H
 T10c R = CHO

Figura 4a: Terpenos da família Araucariaceae

- T11a** $R_1 = R_2 = \text{CH}_2\text{OH}$
T11b $R_1 = \text{CHO}$ $R_2 = \text{CH}_2\text{OH}$
T11c $R_1 = \text{CHO}$ $R_2 = \text{CH}_2\text{OAc}$
T11d $R_1 = \text{CO}_2\text{H}$ $R_2 = \text{CH}_2\text{OH}$
T11e $R_1 = \text{CO}_2\text{H}$ $R_2 = \text{CH}_2\text{OAc}$

T12 **T13**

- T14a** $R_1 = \text{CO}_2\text{Me}$ $R_2 = \text{H}$
T14b $R_1 = \text{CO}_2\text{H}$ $R_2 = \text{CO}_2\text{Me}$
T14c $R_1 = \text{CHO}$ $R_2 = \text{H}$
T14d $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$ $R_2 = \text{H}$

- T15a** $R = \text{CH}_2\text{Me}$
T15b $R = \text{CHO}$
T15c $R = \text{CH}_2\text{OH}$

T16

- T17a** $R = \text{CO}_2\text{Me}$
T17b $R = \text{CH}_2\text{OH}$

T18 **T19** **T20** **T21****Figura 4b:** Terpenos da família Araucariaceae

Figura 4c: Terpenos da família Araucariaceae

Figura 4d: Terpenos da família Araucariaceae

F1 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = H$

- F2a** $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = Me$
F2b $R_1 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = H; R_2 = Me$
F2c $R_1 = R_3 = R_4 = R_6 = H; R_2 = R_5 = Me$
F2d $R_1 = R_4 = H; R_2 = R_3 = R_5 = R_6 = Me$
F2e $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = H$
F2f $R_1 = R_3 = R_4 = H; R_2 = R_5 = R_6 = Me$
F2g $R_1 = R_4 = R_6 = H; R_2 = R_5 = R_3 = Me$
F2h $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = H; R_3 = R_6 = Me$

- F3a** $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$
F3b $R_1 = R_2 = R_4 = H; R_3 = Me$
F3c $R_2 = R_4 = H; R_1 = R_3 = Me$
F3d $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = Me$
F3e $R_4 = H; R_1 = R_2 = R_3 = Me$

Figura 5a: Flavonóides da família Araucariaceae

F5 **F6****Figura 5b:** Flavonóides da família Araucariaceae

Figura 6a: Lignóides da família Araucariaceae

Figura 6b: Lignóides da família Araucariaceae

III- A Cultura de Células e Tecidos Vegetais no Estudo do Metabolismo Secundário

O conhecimento da habilidade de uma célula vegetal crescer e dividir continuamente de uma maneira autônoma, podendo regenerar um organismo inteiro (totipotência), possibilitou o surgimento e o desenvolvimento das técnicas de cultura de células e tecidos [46]. Os termos “cultura de células e tecidos vegetais”, são geralmente usados para descrever o cultivo “*in vitro*” e asséptico de células, ou qualquer parte de um vegetal em um meio nutritivo sob condições controladas [47].

Nas últimas duas décadas, a cultura de células e tecidos vegetais emergiu como uma nova metodologia, capaz de complementar os métodos convencionais na pesquisa básica de várias áreas científicas e da indústria biotecnológica vegetal (**Figura 7**, p. 20).

Um campo que vem sendo explorado e apresenta grande potencial, é a aplicação destas técnicas no estudo do metabolismo secundário, através do estudo de rotas biossintéticas e da produção “*in vitro*” de metabólitos com interesses farmacêuticos e/ou químicos [48]. A possibilidade de produzir compostos sobre condições ambientais controladas, independente das variações climáticas, mudanças na composição do solo, e livre de ataque de patógenos e predadores, fez com que as pesquisas nesta área aumentassem de maneira exponencial [47, 49, 50].

Figura 7: Algumas aplicações da cultura de células e tecidos vegetais

Hoje existem inúmeros exemplos de sistemas de cultivo “*in vitro*”, que acumulam metabólitos secundários em quantidade análoga ou igual às plantas correspondentes [51]. Zenk e colaboradores [52] demonstraram que células desdiferenciadas de *Morinda citrifolia* mantidas em suspensão, são capazes de produzir antraquinonas em concentrações da ordem de 1g por litro de meio em duas semanas, superando em dez vezes a produção de um vegetal normal. Em 1983, foi iniciada a comercialização da shikonina, um corante extraído do *Lithospermum erythrorhizon* [53] pela Mitsui Petrochemicals. A partir de segmentos de raízes de *Panax ginseng*, Furuya e Ushiyama [54] obtiveram linhagens de células cultivadas em biorreator de 20 toneladas, sendo que a composição química e o potencial farmacológico do extrato aquoso obtido, mostraram-se muito semelhantes aquele extraído das plantas intactas.

Apesar dos resultados estimulantes, a maioria dos metabólitos secundários de interesse são produzidos em baixas concentrações ou não são produzidos em suspensões celulares. Outro fator importante, é a instabilidade genética das linhagens de células selecionadas, as quais podem sofrer mutações perdendo características metabólicas importantes [51, 50].

A biossíntese de produtos naturais foi outra área que muito se beneficiou com o desenvolvimento de tais técnicas. Embora culturas de muitas espécies vegetais não expressem ou acumulem produtos do metabolismo secundário, a informação genética pode estar presente. Tal fato, juntamente com a ausência de produtos fenólicos, acabou por favorecer a purificação de enzimas, o que levou a cultura de células, a ser explorada como fonte de tais, principalmente a partir dos anos 70. Assim muitos detalhes enzimológicos envolvidos em etapas de transformações de diversos produtos naturais, vieram a ser conhecidos [55]. A partir de células de *Forsythia intermedia*, Dinkova Kostova e colaboradores [56] isolaram duas formas funcionais da enzima (+)-pinoresinol / (+)-lariciresinol redutase, as quais catalisam a sequência de redução do (+)-pinoresinol $\rightarrow$ (+)-lariciresinol $\rightarrow$ (-)-secoisolariciresinol (**Figura 8**, p. 22). Kutney [57] e colaboradores [58] desenvolveram uma linhagem de células de *Nicotiana sylvestris*, as quais secretavam altas concentrações de peroxidases no meio de cultura, capazes de biotransformar precursores exógenos de dibenzilbutanolídeos, análogos ao (-)-matairesinol, em derivados da podofilotoxina.

A capacidade de determinadas culturas expressarem rotas metabólicas incomuns, levando a formação de produtos diferentes daqueles encontrados nos tecidos das plantas intactas, torna a cultura de células uma fonte potencial de novos produtos com atividade biológica e farmacológica [59, 60]. Do extrato de calos de *Tripterygiun wilfordii*, espécie conhecida na medicina chinesa por suas propriedades anti-leucêmicas, foram isolados triterpenos pentacíclicos, enquanto que no tecido indutor dos calos foram encontrados basicamente diterpenos derivados do ácido abiético [61].

IV - Objetivos do Trabalho

O presente trabalho teve como objetivos o desenvolvimento de estudos de indução e manutenção de calos, sob condições nutritivas e ambientais totalmente controladas, visando a obtenção de um sistema desdiferenciado como modelo para a investigação da expressão de rotas do metabolismo secundário em *A. angustifolia*. Os metabólitos secundários do caule de planta adulta foram caracterizados, visando a obtenção de padrões de lignanas previamente descritos na literatura [8, 37, 38].

Este estudo tem como base, a possível semelhança entre o sistema enzimático da rota biossintética (**Figura 8**), descrita para *Forsythia intermedia* [62] e o da *Araucaria angustifolia*, uma vez que ambas acumulam as lignanas (+)-pinoresinol, (+)-lariciresinol e (-)-secoisolariciresinol. Acredita-se que a formação de (+)-pinoresinol, e as subsequentes etapas de reduções, constituem-se etapas chave, possivelmente universais em vegetais, e que poderiam ter como um dos produtos finais a lignana antitumoral podofilotoxina [62 – 70]

Figura 8: Relações biogênicas entre lignanas de *Forsythia intermedia* e podofilotoxina

MATERIAIS E MÉTODOS

I – Materiais, reagentes e instrumentos utilizados

O grau de pureza dos solventes variou de acordo com a finalidade. Para extração, CC, CPP, CPC e CPRP, utilizou-se solventes de grau P.A. da Merck, Grupo Química e Vetec submetidos a destilação fracionada.

A fase estacionária utilizada para cromatografia em coluna filtrante foi Si-60 da Merck, partículas de 63-210 μm .

Para CPC utilizou-se camadas de 0,50 mm, Si-60 GF₂₅₄ Merck, partículas de 4-45 μm . Para CPP utilizou-se camadas de 1,0 mm, Si-60₂₅₄ Merck, partículas de 4-45 μm . Para CPRP, foi utilizado Cromatotron - *Harrison Research* (mod. 7924T), placa de sílica-gel 60 PF₂₅₄ (partículas de 5-45 μm) com gesso e 2mm de espessura.

A revelação dos cromatogramas obtidos em placas foi realizada com solução de sulfato cérico, cloreto férrico, vapores de iodo e/ou irradiação no UV (254 e 356 nm).

Os experimento de cromatografia à gás, foram feitos em aparelho Hewlett Packard mod. 5890 series II, com injetor automático HP7673, integrador HP 3396A e detetor FID. A coluna capilar utilizada foi HP-5, 30 m x 0,32 mm x 0,25 μm , com split de 1:20. O gás de arraste foi H₂.

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C foram registrados em espectrômetro Bruker AC-200 e 300, operando para ¹H a 200 e 300 MHz, e para ¹³C a 50 e 75 MHz, respectivamente, utilizando como solvente CDCl₃ da Aldrich ou Merck. Os dados estão expressos em deslocamento químico δ (ppm), utilizando como referência interna o deslocamento químico do CDCl₃ ou TMS.

Os espectros no infravermelho foram registrados em aparelhos FT-IR 1750 Perkin Elmer e FT-IR 510 Nicolet, na forma de filmes utilizando janelas de KBr. Os dados são expressos em números de onda ν (cm^{-1}).

Os espectros de UV foram obtidos em espectrômetro UV/VIS Hitachi U-3000, cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm, em MeOH grau espectroscópico.

Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetros HP5988A Hewlett Packard (quadrupolo), Mat 90 Finnigan (duplo foco geometria reversa) e INCOS 50 Finnigan-Mat (quadrupolo), injeção direta e impacto eletrônico (EI) a 30 e 70 eV conforme especificado no espectro. Este último foi usado nas análises por CG-EM acoplado a cromatógrafo 3400 Varian coluna DB-5, 30 m e 0,25 mm. Os dados estão expressos como relação massa/carga (m/z) dos íons fragmentários correspondentes.

As medidas de rotação específica $[\alpha]_D$ foram realizadas em polarímetro digital JASCO DIP-370, filtro Na, com caminho óptico de 1 cm.

Nos experimentos de cultura de tecidos, os reagentes usados foram de grau P. A., especiais para cultura de células, das marcas Sigma e Merck.

II – Cultura de Tecidos

II. 1 - Material Vegetal

Foram utilizados embriões e plântulas de *A. angustifolia*, obtidos a partir de sementes adquiridas no comércio da cidade de Santo Antônio dos Pinhais - SP- no mês de maio, local onde se concentra um foco de “mata de araucária”.

II.2- Obtenção Dos Explantes Para Cultura de Tecidos

Na tentativa de obter-se calos friáveis, foram testados seis tipos diferentes de explantes de *Araucaria angustifolia*:

- II.2 – A - Embriões inteiros e seccionados em cotilédones, eixo embrionário, e polo radicular;
- II.2 – B - Segmentos de caule de plântulas crescidas na luz e estioladas, contendo pelo menos uma gema lateral;

II.2- A- Embriões

As sementes foram lavadas com Tween 10% v/v durante 10 minutos sob agitação. Os megagametófitos foram isolados, mergulhados em álcool 70% v/v por mais 5 minutos e desinfetados com solução aquosa de hipoclorito de sódio comercial 80% v/v durante 20 minutos sob agitação. Os embriões foram excisados do megagametófito, imersos em solução aquosa da hipoclorito de sódio 5% v/v e lavados três vezes com água destilada autoclavada. Uma vez desinfetados, estes foram seccionados ou não, dependendo do experimento.

II.2- B.- Plântulas

Com o intuito de diminuir o índice de contaminação dos explantes, as sementes antes de serem germinadas, foram previamente lavadas com Tween 10% v/v, agitadas em solução aquosa de hipoclorito de sódio comercial 80% v/v durante 5 minutos, e desinfetadas com solução aquosa do fungicida Bayfidan 250 PM da Bayer (triadimenol) 3g/L durante 10 minutos. Uma vez limpas, estas foram germinadas em vermiculita, na presença de luz e em câmara escura, ambos os casos com temperatura a $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Ao atingirem cerca de 16 cm de altura, estas foram colhidas e submetidas ao processo de esterilização.

Devido ao alto nível de contaminação destes explantes, foram testados vários métodos diferentes de assepsia, sendo o mais efetivo descrito abaixo:

- retirar as gemas apicais e o sistema radicular das plântulas;
- retirar 5 cm da base do caule e descartar;
- escovar os caules com detergente, lavar e secar;
- cortar os caules em pedaços de cerca de 4 cm de comprimento;
- agitar 5 minutos em solução aquosa de Tween 0,1% v/v;
- lavar com água destilada;
- agitar 1 minuto em álcool etílico 70% v/v;
- agitar 20 minutos em solução aquosa de NaOCl comercial 50% v/v;
- lavar com água destilada autoclavada três vezes;
- agitar os caules em meio líquido com a seguinte composição [71]:
 - meio básico Murashige & Skoog [72];
 - sacarose 20 g/L;
 - mioinositol 100 mg/L;
 - complexo vitamínico de Nitsch & Nitsch [73];
 - Bayfidan 3 g/L;

rifampicina 25 mg/L;

ácido ascórbico 25 mg/L

-deixar em agitação sob pouca luminosidade ($10 \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), durante doze horas;

Após a assepsia os explantes foram cortados em solução aquosa de ácido ascórbico 1g/100mL, na qual permaneceram durante 5 minutos antes da inoculação.

II.3 - Indução e Manutenção dos Calos

II.3- A- Embriões

Para as etapas de indução e manutenção dos calos, embriões inteiros e seccionados foram submetidos a diferentes tratamentos conforme descrito na **Tabela 2** (p. 28). O meio básico continha os sais minerais do meio MS [72]. Nos meios F1A a F4A foram acrescentados 200 mg/L de complexo vitamínico M.S. marca Sigma (Nº de catálogo M-7150), 400 mg/L de hidrolisado de caseína bovina e 25 mg/L de ácido ascórbico. A concentração de sacarose foi alterada para 30 g/L.

Como agente geleificante, foi usado Phytigel da Sigma (Nº de catálogo P-8169) na concentração de 1,6 g/L. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. O ácido ascórbico, foi esterilizado por membrana filtrante de $0,22\mu\text{m}$, antes de ser adicionado ao meio esterilizado.

Código do meio	Reguladores de Crescimento			
	Auxina (mg/L)		Citocinina (mg/L)	
M1A	2,4-D	1,0	-	
M3A	2,4-D	3,0	-	
M5A	2,4-D	5,0	-	
F1A	2,4-D	2,0	K	0,1
F2A	AIA	2,0	K	0,1
F3A	AIB	2,0	K	0,1
F4A	ANA	2,0	K	0,1

Tabela 2: Reguladores de crescimento utilizados para indução e manutenção de calos em embriões

Foram inoculados três explantes por placa de Petri, perfazendo um mínimo de vinte e quatro unidades para cada tipo de explante, para cada tipo de tratamento. Parte do material (50%), foi mantido em sala de crescimento com temperatura a $26^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, e fotoperíodo de 18 horas de luz, sob intensidade luminosa de $45\mu\text{m. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$; o restante foi mantido em câmara escura com temperatura a $26^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Para a manutenção os calos obtidos foram repicados para o mesmo meio de indução, com intervalos de cerca de 30 dias.

II.3- B- Plântulas

Devido a pequena intensidade na indução e a impossibilidade de subcultivo dos calos obtidos a partir de embriões, optou-se por testar outras fontes de explantes.

Handro & Ferreira [75] e Penchel [76] relataram a formação de calos em explantes de caule de plântulas estioladas ou crescidas na luz. Dessa forma segmentos de caule de plântulas crescidas na luz e crescidas no escuro foram submetidos aos tratamentos com reguladores descritos na **Tabela 3**. Utilizou-se meio básico MS. Aos meios ARA1 a ARA4 foram acrescentados 100 mg/L de mioinositol, 30 g/L de sacarose, 50 mg/L de arginina, 20 mg/L de glutamina, 20 mg/L de uréia, 150 mg/L de ácido cítrico e complexo vitamínico de Nitsch & Nitsch; o meio MBF-13 foi suplementado com 400 mg/L de hidrolisado de caseína bovina, 200 mg/L de complexo vitamínico MS da Sigma e 30 g/L de sacarose. Mais uma vez, foi utilizado Phytigel como agente geleificante. O pH foi ajustado para 5,8 antes do processo de esterilização. O complexo vitamínico, e as soluções de aminoácidos, antioxidante e uréia foram esterilizados por membrana filtrante de 0,22µm da Millipore.

Código do meio	Reguladores de Crescimento			
	Auxina (mg/L)		Citocinina (mg/L)	
ARA1	2,4-D	2,0	K	0,1
ARA2	AIA	2,0	K	0,1
ARA3	AIB	2,0	K	0,1
ARA4	ANA	2,0	K	0,1
MBF13	2,4-D	2,0	-	

Tabela 3: Reguladores de crescimento utilizados para indução e manutenção de calos em plântulas

Foi inoculado um explante por tubo de ensaio, de modo a obter-se um mínimo de vinte e quatro unidades para cada tratamento. O material inoculado foi mantido em sala de crescimento com temperatura a $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 18 horas de luz sob intensidade luminosa de $10\mu\text{m. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$.

Os calos obtidos foram repicados para meios de mesma composição com intervalos de cerca de 50 dias.

Considerando que quinze dias após o repique, 70% dos calos estavam oxidados, foram realizados os seguintes ensaios, no material proveniente dos meios ARA1, ARA3, ARA4 e MBF-13:

- a) transferir os calos, de modo a deixá-los intactos, sem retirar as células mortas e/ou oxidadas e restos de explantes;
- b) retirar dos calos, restos de explantes e células oxidadas e/ou mortas.
- c) variar a concentração de auxina, para 2,0 mg/L, 1,0 mg/L e 0,0 mg/L.

III – Fitoquímica

III. 1 - Material Vegetal

Para o estudo fitoquímicos foram utilizados:

- caule de planta adulta (**Figura 1**, p. 3);
- calos induzidos em ARA 4 (**Figura 26**, p. 90).

Pedaços de caule adulto foram coletados no Sítio Jaqueira, bairro Dos Ferreiras, estrada de Salesópolis - SP - Km1.

As linhagens de calos foram obtidas no meio de cultura ARA 4, conforme descrito no item II de Materiais e Métodos.

III.2- Obtenção dos Extratos de A. angustifolia

Pedaços de caule adulto de *A. angustifolia* foram secos, moídos e submetidos a extração com etanol com auxílio de ultrassom durante 20 minutos, sendo o processo repetido por três vezes. O extrato obtido (10g) foi suspenso em uma mistura de MeOH/H₂O 4:1 e submetido a partição com hexano a fim de retirar o excesso de ácidos graxos. A fração resultante foi novamente particionada com DCM e solução aquosa saturada de NaCl. A fração diclorometânica resultante foi tratada com água destilada, com o intuito de retirar o excesso de sal, obtendo-se assim uma terceira fração (F3) com 4g (**Figura 9**, p. 32), a qual foi submetida ao fracionamento cromatográfico.

Células frescas (182 g), provenientes do meio ARA-4, recém tiradas do meio de cultura, foram congeladas em nitrogênio líquido e trituradas. A extração foi feita com EtOH (500 ml 4X) em ultrassom. O extrato bruto obtido (3,678 g) foi suspenso em 100ml de uma mistura de MeOH/H₂O 4:1 e submetido ao mesmo processo de extração (**Figura 9**, p. 32) descrito para o extrato bruto de caule.

Figura 9: Obtenção das frações de polaridade média do extrato de caule adulto e de calos.

III.3- Fracionamento do Extrato do Caule Adulto

A fração diclorometânica F3 (4,0 g) do caule adulto foi submetida a cromatografia em coluna de sílica gel (60H -10,0 x 30,0 cm) sob pressão, eluída com sistema DCM/MeOH em ordem crescente de polaridade, resultando em 150 frações de aproximadamente 25 ml, as quais depois de analisadas por CPC foram agrupadas conforme a **Tabela 4**:

Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)
F3/1	8,3	F3/12	50,4
F3/2	9,1	F3/13	58,5
F3/3	9,8	F3/14	34,3
F3/4	10,1	F3/15	98,4
F3/5	9,4	F3/16	117,5
F3/6	9,5	F3/17	66,1
F3/7	2,5	F3/18	78,3
F3/8	515,8	F3/19	99,2
F3/9	168,3	F3/20	549,0
F3/10	357,2	F3/21	576,0
F3/11	93,4	F3/22	540,5

Tabela 4: Fracionamento do extrato etanólico do caule adulto.

A fração F3/8, foi dividida em duas porções de cerca de 250 mg e submetida CPRP fornecendo dois lotes de subfrações, as quais foram purificadas conforme resumido nas **Figuras 11a** (p. 35) e **11b** (p.36).

O fracionamento das demais frações estão descritos nas **Figuras 10** (p. 34) e **12** (p. 37).

Figura 10: Fracionamento cromatográfico da fração diclorometânica do extrato etanólico do caule adulto

Figura 11a: Fracionamento cromatográfico das subfrações de F3/C8

Figura 11b: Fracionamento das subfrações de F3/C8

Figura 12: Fracionamento cromatográfico das frações F3/C9 e F3/C10

III.4- Fracionamento do Extrato de Calos

O espectro de RMN-¹H (**Espectro 1**, p. 45) da fração diclorometânica (A3), apresentou sinais referentes a hidrogênios aromáticos (6,8δ - 7,0), propenílicos (6,2δ - 7,6δ) e metoxilícos (3,6δ), indicando a presença de fenilpropanóides.

A fração diclorometânica A3 (238,5 mg) foi submetida a cromatografia em coluna de sílica gel 60-H (7,0 x 25 cm), eluída com sistema de DCM/MeOH em ordem crescente de polaridade, fornecendo 201 frações de aproximadamente 10 ml, as quais depois de analisadas por CPC foram agrupadas conforme a **Tabela 5**:

Fração	Massa (mg)	Fração	Massa (mg)
A3/1	2,5	A3/10	3,7
A3/2	22,4	A3/11	4,9
A3/3	2,3	A3/12	2,1
A3/4	4,2	A3/13	1,7
A3/5	6,4	A3/14	9,8
A3/6	26,7	A3/15	2,1
A3/7	13,6	A3/16	4,6
A3/8	4,1	A3/17	10,0
A3/9	4,9	A3/18	5,1

Tabela 5: Fracionamento do extrato de calos.

A fração A3/2 foi purificada conforme descrito na **Figura 13** (p. 39).

Figura 13: Fracionamento cromatográfico da fração diclorometânica dos calos ARA-4

III. 5. Dados Espectroscópicos das Substâncias Isoladas

4-Hidroxibenzaldeído (1)

EM (70 eV) m/z (int. rel.): 122 [M⁺] (86), 123 [M+1] (7),

121 (100), 93 (34), 65 (24). **Espectro 5**, p. 49.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): **Espectro 2**, p. 46; **Tabela 6**, p. 96.

4-Hidroxi-3-metoxibenzaldeído (2)

Vanilina

EM (70 eV) m/z (int. rel.): 152 [M⁺] (96), 151 (100),

137 (5), 123 (20), 109 (18), 95 (2), 81 (23), 65 (8). **Espectro 6**, p. 49.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): **Espectro 3**, p. 47; **Tabela 7**, p. 96.

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): **Espectro 4**, p. 48; **Tabela 8**, p. 96.

(E)-4-Hidroxi-3-metoxicinamalaldeído (3)

Coniferaldeído

EM (70 eV) m/z (int. rel.): 178 (100),

161 (21), 151 (7), 147 (39), 135 (48), 77 (42). **Espectro 10**, p. 53.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃): **Espectro 7**, p. 50; **Tabela 9**, p. 99.

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): **Espectro 9**, p. 52; **Tabela 10**, p. 100.

(E)-4-Hidroxicinamato de octadecila (11)

(E)-*p*-Cumarato de octadecila

IV $\nu_{\text{max}}^{\text{filme}}$ cm⁻¹: 3390, 1716, 1640, 1608, 1588, 980. **Espectro 14**, p. 57.

EM (70 eV) m/z (int. rel.): 416 [M+1] (3), 417 [M+2] (1), 177 (2),

164 (100), 147 (56), 119 (12), 107 (17). **Espectro 15**, p. 57; **Figura 27**, p. 109.

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): **Espectro 11**, p. 54; **Tabela 11**, p. 103.

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃): **Espectro 13**, p. 56; **Tabela 12**, p. 104.

(Z)-4-Hidroxicinamato de octadecila (12)

(Z)-*p*-Cumarato de octadecila

IV $\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$ cm^{-1} : 3390, 1716, 1640, 1608, 1588, 720. **Espectro 14**, p. 57.

EM (70 eV) m/z (int. rel.): 416 [M+1] (3), 417 [M+2] (1), 177 (2), 164 (100), 147 (56), 119 (12), 107 (17). **Espectro 15**, p. 57; **Figura 27**, p. 109.

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3): **Espectro 11**, p. 54; **Tabela 11**, p. 103.

RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): **Espectro 13**, p. 56; **Tabela 12**, p. 104.

(E)-4-Hidroxi-3-metoxicinamato de octadecila (13)

(E)-Ferulato de octadecila

IV $\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$ cm^{-1} : 3422, 2851, 1711, 1634, 1161, 982. **Espectro 20**, p. 62.

EM (70 eV) m/z (int. rel.): 446 [M+1] (14), 447 [M+2] (1), 207 (1), 194 (100), 177 (55), 149 (16), 17 (23). **Espectro 21**, p. 62; **Figura 27**, p. 109.

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3): **Espectro 16**, p. 58; **Tabela 13**, p. 107.

RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): **Espectro 18**, p. 60; **Tabela 14**, p. 108.

(Z)-4-Hidroxi-3-metoxicinamato de octadecila (14)

(Z)-Ferulato de octadecila

IV $\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$ cm^{-1} : 3422, 2851, 1711, 1634, 1161, 721. **Espectro 20**, p. 62;

EM (70 eV) m/z (int. rel.): 446 [M+1] (14), 447 [M+2] (1), 207 (1), 194 (100), 177 (55), 149 (16), 17 (23). **Espectro 21**, p. 62; **Figura 27**, p. 109.

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3): **Espectro 16**, p. 58; **Tabela 13**, p. 107.

RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): **Espectro 18**, p. 60; **Tabela 14**, p. 108.

7,3',4'-Trimetoxi-isoflavona (4)

Cabreuvina

EM (70 eV) m/z (int. rel.): 312 [M+] (2), 156 (3), 297 (3), 150 (6), 122 (11), 119 (15), 162 (5). **Espectro 27**, p. 68, **Figura 28**, p. 113.

RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3): **Espectro 22**, p. 63; **Tabela 15**, p. 112.

5,7-Diidroxi- 4',7'-dimetoxi-isoflavona (5)

Irisolidona

 $C_{17}H_{14}O_6$

EM (35 eV) m/z (int. rel.): 314 [M⁺] (66), 315 [M+1] (13), 316 [M+2] (12), 299 (100), 271 (40), 182 (1), 167 (4), 139 (33), 132 (4). **Espectro 28**, p. 68, **Figura 29**, p. 114.

RMN-¹H (2000 MHz, CDCl₃): **Espectro 25**, p. 66; **Tabela 16**, p. 112.

(7S, 8R, 7'S, 8'R)-4,4'-Diidroxi-3,3'-dimetoxi-7,9':7',9-diepoxi-lignana (6)

(+) -Pinoresinol

 $C_{20}H_{22}O_6$
 $[\alpha]_D^{25} + 84.4^\circ$ (c 1.0 MeOH)

EM (70 eV) m/z (int. rel.): 356 [M⁺] (18), 205 (12), 163 (22), 151 (100), 137 (46), 123 (8), 77 (15). **Espectro 31**, p. 71, **Figura 32**, p. 118.

RMN-¹H (200MHz, CDCl₃): **Espectro 29**, p. 69; **Tabela 17**, p. 117.

(7S, 8R, 7'S, 8'R)- 3, 3'- 4,4'- Tetrametoxi- 7, 9':7',9 – diepoxi-lignana (7)

(+) –Eudesmina

 $C_{22}H_{26}O_6$
 $[\alpha]_D^{25} + 60,5^\circ$ (c 1.0; MeOH)

EM (70 eV) m/z (int. rel.): 386 [M⁺] (29), 220 (4), 219 (1), 194 (9), 193 (4), 180 (3), 177 (67), 165 (100), 151 (65), 137 (7) **Espectro 32**, p. 71, **Figura 33**, p. 119.

RMN-¹H (200MHz, CDCl₃): **Espectro 30**, p. 70, **Tabela 17**, p. 117.

rel - (7R, 8S, 8'S) - 4, 4', 9 - Triidroxi-3,3'- dimetoxi- 7,9' - epoxilignana (8)

(+) -Lariciresinol

 $C_{20}H_{24}O_6$
 $[\alpha]_D^{25} + 23^\circ$ (c 1.0; Me₂O)

EM (70 eV) m/z (int. rel.): 360 [M⁺] (27), 342 (2), 219 (10), 194 (30), 152 (16), 151 (51), 137 (100), 123 (13), 122 (27). **Espectro 38**, p. 77.

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): **Espectro 33**, p. 72, **Tabela 18**, p. 122.

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃): **Espectro 35**, p. 73, **Tabela 19**, p. 123.

rel - (7*R*, 8*S*, 8'*S*)-4,4'-Diidroxi-9-acetiloxi-3,3'-dimetoxi-7,9'-epoxilignana (9)

(+)-9'-O-Acetil-lariciresinol

$C_{22}H_{26}O_7$

$[\alpha]_D^{25} + 3,5^\circ$ (c 1,0; Me_2O)

IV $\nu_{max}^{film} cm^{-1}$: 3415, 1734, 1460, 1270, 1123, 1035,

819,800. **Espectro 40**, p. 78.

EM (70 eV) m/z (int. rel): 402 [M⁺] (19), 342 (5), 219 (18),

205 (22), 151 (54), 137 (100), 123 (8), 122 (16).

Espectro 39, p. 77, **Figura 34**, p. 124.

RMN-¹H (200 MHz, $CDCl_3$): **Espectro 35**, p. 74, **Tabela 18**, p. 122.

RMN-¹³C (50 MHz, $CDCl_3$): **Espectro 37**, p. 76, **Tabela 19**, p. 123.

β - sitosterol (11) [74]

$C_{29}H_{50}O$

EM (70 eV) m/z (int. rel): 414 [M⁺] (78),

396 (43), 329 (56), 303 (51), 273 (32), 255 (42),

213 (51), 55 (100). **Espectro 42**, p. 80.

RMN-¹H (200 MHz, $CDCl_3$): **Espectro 41**, p. 79.

III.6 – ESPECTROS

61.05

7.61948	7.53993	7.23942	7.01215	6.90057	6.56133	6.21938	5.35374	5.31513	4.31191	4.29927	4.25251	4.23108	4.19067	4.15233	4.12553	4.09304	4.06328	3.99739	3.70719	3.69259		
2.72799	2.74995	2.31937	2.29529	2.24752	2.00778	1.78917	1.65080	1.57210	1.44364	1.22680	0.97941	0.94774	0.90935	0.87804	0.85225	0.82414	0.81351	0.80377	0.79142	0.76939		
1.65196	1.57210	1.52210	1.44364	1.22680	0.97941	0.94774	0.90935	0.87804	0.85225	0.82414	0.81351	0.80377	0.79142	0.76939	0.65196

Espectro 1: Espectro de RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) da fração diclorometânica (A3) do extrato de calos

Espectro 3: Espectro de RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) de (2)

Scan 33 (1.036 min) of DATA:298.D
C8-2A1

Espectro 5: Espectro de massas (70 eV) de 1.

Scan 40 (1.193 min) of DATA:297.D
C5-2A

Espectro 6: Espectro de massas (70 eV) de 2

F4B1 C8 - C

Espectro 7: Espectro de RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) de (3)

Espectro 8: Espectro de RMN HOMO-COSY ^1H - ^1H (200 MHz, CDCl_3) de **3**.

Espectro 9: Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de **3**.

Espectro 10: Espectro de massas (70 eV) de 3.

C2-1 (10min)

Espectro 11: Espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) de **11** e **12**.

Espectro 12: Expansão da região 2,08 a 7,58 do Espectro 11.

Fbiana C2-1 (48h 27min)

Espectro 13: Espectro de RMN-¹³C (300 MHz, CDCl₃) de 11 e 12.

Espectro 14: Espectro no IV de 11 e 12.

Espectro 15: Espectro de massas (70 ev) de 11 e 12.

C2-2

Espectro 16: Espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) de **13** e **14**.

FIGURE 12-2

Espectro 19: Espectro de RMN-¹³C - DEPT 135° (50 MHz, CDCl₃) de **13** e **14**.

Espectro 20: Espectro no IV de 13 e 14.

Espectro 21: Espectro de massas (70 eV) de 13 e 14.

FAB1 AMOSTRA 5B1

Espectro 22: Espectro de RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) de **4**

Espectro 23: Expansão da região 6,0δ a 7,0δ do Espectro 22.

Espectro 24: Espectro de RMN HOMO-COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (200MHz, CDCl_3) de **4**.

Fabiana 481-B

Espectro 25: Espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) de **5**

Espectro 26: Espectro NOE - diff (300 MHz, CDCl₃) de **5**

Espectro 27: Espectro de massas (70 eV) de 4.

Espectro 28: Espectro de massas (70 eV) de 5.

FABIANA: 3B1.A

Espectro 30 : Espectro de RMN-¹H (200MHz, CDCl₃) de 1

Espectro 31: Espectro de massas (70 eV) de 6.

Espectro 32: Espectro de massas (70 eV) de 7.

Espectro 33: Espectro de RMN-¹H (300 MHz; CDCl₃) de **8**.

Espectro 35: Espectro de RMN-¹H (200 MHz; CDCl₃) de **9**.

Espectro 36: Espectro de RMN HOMO - COSY ^1H - ^1H (200 MHz, CDCl_3) de **9**.

FABIANA 5B3

Espectro 37: Espectro de RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃) de **9**.

Scan 43 (1.380 min) of DATA:290.D
C9-6*

Espectro 38: Espectro de massas (70 eV) de 8.

Scan 741 (25.720 min) of DATA:344B.D
ACOET+DIACOET

Espectro 39 : Espectro de massas (70 eV) de 9.

Espectro 40: Espectro no IV de 9.

Espectro 41: Espectro de RMN-¹H (200 MHz; CDCl₃) de 10.

Espectro 42: Espectro de massas (70 eV) de 10.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

I – Cultura de Tecidos

I.1 – Indução e Manutenção de Calos

Dos diferentes explantes de *A. angustifolia* testados, apenas embriões inteiros e eixos embrionários, obtidos nos meios M1A e F1A foram efetivos na indução de calos (**Figuras 14**, p. 83 a **26**, p. 90). Os meios F2A e F3A não induziram de calos.

As principais dificuldades na manutenção das culturas de calos, foram os processos de necrose e oxidação apresentado por cerca de 90% do material, após 15 dias de transferência.

I.1-A. Plântulas

As tentativas de estabelecimento de culturas tendo-se como explantes, segmentos de caules de plântulas crescidas sob condições normais de luminosidade não foram satisfatórias, pois apresentaram altos índices de contaminação e oxidação (**Figura 18**, p. 85 e **22**, p. 87).

O material proveniente das plântulas estioladas (**Figuras 19**, p. 85; **22**, p. 87 e **23**, p. 88), mostrou resultados satisfatórios, com exceção de ARA2 (**Figura 23**, p. 88) o qual não foi efetivo na indução da dediferenciação. O subcultivo em massa porém não foi possível, pois cerca de 30 dias após a transferência, 70% dos calos estavam oxidados. Foi verificado que o ferimento demasiado dos calos durante a transferência favorecia o processo de oxidação, não sendo porém o fator determinante para tal processo, pois em cerca de 25 dias, 33% do material não injuriado permaneceu com a mesma coloração esverdeada, enquanto que 27% do material injuriado também mostrou o mesmo quadro. A variação da concentração de auxinas também não afetou visualmente o comportamento das colônias celulares (**Figuras 24**, p. 89 e **25**, p. 89). Entretanto

como cerca de 13% dos calos de ARA4 resistiram à primeira transferência (**Figura 26**, p. 90), optou-se pela inoculação em massa de explantes neste meio a fim de obter material suficiente para as análises fitoquímicas. Os calos obtidos foram repicados mais duas vezes a cada 50 dias, depois do que foram submetidos ao processo de extração (**Materiais e Métodos**).

Figura 14: Porcentagem de formação de calos e oxidação dos explantes obtidos a partir de embriões inteiros mantidos na luz

Figura 15: Porcentagem de formação de calos e oxidação dos explantes obtidos a partir de embriões inteiros mantidos no escuro

Figura 16: Porcentagem de formação de calos e oxidação dos explantes obtidos a partir de eixos embrionários mantidos na luz

Figura 17: Porcentagem de formação de calos e oxidação dos explantes obtidos a partir de eixos embrionários mantidos no escuro

Figura 18: Porcentagem de formação de calos e oxidação dos explantes obtidos a partir de plântulas crescidas na luz

Figura 19: Porcentagem de formação de calos e oxidação dos explantes obtidos a partir de plântulas estioladas

Figura 20: Tempo de cultura para formação de calos em embriões inteiros

Figura 21: Tempo de cultura para formação de calos em eixos embrionários

Figura 22: Tempo de cultura para formação de calos em plântulas crescidas na luz e estioladas

Figura 23: Calos de segmentos de caule de plântulas 23 dias após a inoculação.

Figura 24: Desenho esquemático de uma placa de Petri multipla, onde os círculos vermelhos e azuis representam respectivamente os calos transferidos intactos e injuriados. Nas linhas houveram variação quanto a concentração de auxina.

Figura 25: Placa de Petri múltipla, com calos obtidos no meio ARA4, montada segundo a Figura 24.

Figura 26: Calo de segmentos de caule de plântulas estioladas em ARA4, 20 dias após o primeiro repique

II.2 - Discussão

Dos explantes testados, os provenientes do caule de plântulas estioladas, apresentaram melhores resultados. Embriões inteiros e eixos embrionários também foram efetivos na formação de calos friáveis com bom crescimento, entretanto não foi possível subcultivá-los.

Quanto a composição dos meios de cultura, as auxinas 2,4-D e ANA foram efetivas na indução da proliferação celular, o que também foi constatado para outras espécies de coníferas [77]. Entre os meios testados, ARA4 foi o único efetivo na promoção da desdiferenciação e na manutenção dos calos obtidos; o meio MBF-13 induziu calos num período de tempo bem mais curto que ARA4, entretanto não foi efetivo no subcultivo das massas celulares obtidas.

O maior problema encontrado no cultivo de calos desta espécie, foi a manutenção das colônias celulares obtidas, o que também foi relatado para várias espécies do gênero *Araucaria* [75, 78-83]. A redução do crescimento ou a morte das colônias celulares após a fase de indução, parece ocorrer em muitas culturas de coníferas. Em *Picea abies*, somente 10 a 15% das massas celulares induzidas continuaram a proliferação. Respostas similares foram observadas também para *Picea glauca* e *P. engelmannii* [84 - 86]. Em seu trabalho sobre morfogênese celular e poliembriogênese somática de *A. angustifolia*, Astarita [87] observou que durante a fase de estabilização e multiplicação das culturas induzidas, ocorria grande diminuição no número de colônias celulares e que mesmo reduzindo as concentrações dos reguladores de crescimento, apenas 11,2% das massa celulares permanecem vivas.

Como 13% dos calos resistiram às duas transferências realizadas, optou-se por inocular grande quantidade de explantes a fim de obter massa celular suficiente para as análises fitoquímicas.

II – Fitoquímica

II.1 – Substâncias Isoladas de *Araucaria angustifolia*

Caule Adulto

Calos

II.2 – Determinação Estrutural

II.2 - A - Derivados do Benzaldeído

Nos espectros de massas (**Espectros 5 e 6**, p. 49) das substâncias **1** e **2**, é possível observar picos relativos aos íons moleculares em m/z 152 e 122. Estes valores associados a integração de hidrogênios no espectro de RMN de ^1H , foram compatíveis com as respectivas fórmulas moleculares $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ e $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$, o que possibilitou identificá-las respectivamente, como sendo o *p*-hidroxibenzaldeído [88, 89] e o 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (vanilina) [88, 90]. Os espectros de RMN - ^1H (**Espectros 2**, p. 46 e **3**, p. 47) apresentaram como característica comum, um singlete na região de 9,7 δ referente ao hidrogênio aldeídico, além de diversos sinais na região dos hidrogênios aromáticos.

No espectro de RMN de ^1H (**Espectro 2**, p. 46; **Tabela 6**, p. 96) do *p*-hidroxibenzaldeído **1**, pode-se observar dois dubletos em 6,94 δ e 7,79 δ com $J=8,1$ Hz, atribuídos aos H-3/H-5 e H-2/H-6 respectivamente, os quais acoplam num sistema AxB_x [90], indicando portanto, um anel aromático *para* substituído. Considerando que os hidrogênios desprotegidos estão em posição *orto* à carbonila aldeídica, e que os outros hidrogênios estão acoplados a estes, a estrutura do *p*-hidroxibenzaldeído tornou-se evidente.

No espectro de RMN-¹H (**Espectro 3**, p. 47 e **Tabela 7** p. 96) da substância **2**, foi possível observar, além de um singlete de hidrogênios metoxílicos em 3,91δ (3H), um dubleto em 6,98δ, atribuído à H-5, o qual acopla com H-6 (J=8,08 Hz) e um multiplete em 7,36δ atribuído a H-6/H-2. Tal padrão de substituição, associado a presença de uma hidroxila e uma metoxila como substituintes, possibilitaram identificá-la como a vanilina. A confirmação definitiva foi obtida através dos dados de RMN – ¹³C (**Espectro 4**, p. 48 e **Tabela 8**, p. 96) e por comparação cromatográfica com uma amostra autêntica da mesma.

Os íons fragmentários apresentados foram compatíveis com benzaldeídos substituídos, confirmando as estruturas apresentadas.

O *p*-hidroxibenzaldeído é frequentemente encontrado na sua forma glicosilada [91], no estado livre entretanto havia sido isolado somente nas espécies *Papaver somniferum* (Papaveraceae) e *Iryanthera lancifolia* (Myristicaceae) [92]. A vanilina foi primeiramente isolada dos frutos da *Vanilla planifolia*, uma espécie de orquídea vivaz e espontânea nas florestas úmidas do México, atualmente cultivada em várias partes do mundo [93]. Hoje ela pode ser produzida industrialmente por oxidação do isoeugenol e do piperonal (3,4-metilenodioxibenzaldeído) [94, 95].

Hidrogênios	δ (ppm)
	<i>p</i> -hidroxibenzaldeído (1)
H-3/H-5	6,94 (d, J= 8,1 Hz, 2H)
H-2/H-6	7,79 (d, J=8,1 Hz, 2H)
CHO	9,76 (s, 1H)

Tabela 6: Dados de RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) do *p*-hidroxibenzaldeído (**1**).

Hidrogênios	δ (ppm)
	vanilina (2)
H-5	6,98 (d, J= 8,08 Hz, 1H)
H-2/H-6	7,36 (m, 2H)
Ar-OCH ₃	3,91 (s, 3H)
Ar-OH	3,59 (s/, 1H)
CHO	9,76 (s, 1H)

Tabela 7: Dados de RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) da vanilina (**2**)

Carbonos	δ (ppm)
	Vanilina (2)
C-1	129,99
C-2	108,89
C-3	147,10
C-4	151,83
C-5	114,34
C-6	127,55
CHO	190,88
Ar-OCH ₃	56,12

Tabela 8: Dados de RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) da vanilina (**2**)

II.2 - B. Fenilpropanóides

A) Coniferaldeído

A substância **3** foi identificada como sendo o fenilpropanóide, coniferaldeído, com base nas técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H , ^{13}C e HOMO-COSY ^1H - ^1H , e ainda na espectrometria de massas.

No espectro de RMN- ^1H (**Espectro 7**, p. 50; **Tabela 9**, p. 99), um singleto largo em 5,91 δ , integrando para um hidrogênio, e outro singleto em 3,88 δ , integrando para três hidrogênios, indicaram a presença de uma hidroxila e de uma metoxila aromática, respectivamente. O duplo dubleto em 7,06 δ ($J = 1,8$ e 8,1 Hz) acoplando com os dubletos em 7,00 δ (1,8 Hz) e em 6,69 (8,1 Hz), característicos para prótons com relação *meta* e *orto*, foram atribuídos aos hidrogênios H-6, H-2 e H-5, respectivamente. A definição do padrão de substituição como sendo 4-hidroxi-3-metoxifenila foi confirmada através dos dados obtidos no espectro de RMN- ^{13}C (**Espectro 9**, p. 52; **Tabela 10**, p. 100).

O espectro de RMN- ^1H , apresenta ainda um dubleto em 7,33 δ (H-7) e um duplo-dubleto em 6,52 δ (H-8) que acoplam entre si com $J=15,8$ Hz, característico de hidrogênios em ligação dupla *trans*. Através do espectro de HOMO-COSY ^1H - ^1H (**Espectro 8**, p. 51) e das constantes de acoplamento, pode-se observar que H-8, também acopla com um outro hidrogênio em 9,58 δ como um dubleto, o que sugere a presença de um grupamento cinamaldeídico. Tal fato foi confirmado pelo espectro de RMN- ^{13}C , o qual mostrou sinais em 193,50 δ , típico para carbonila de aldeídos conjugados e em 153,0 δ (C-7) e 124,04 δ (C-8) (**Espectro 9**, p. 52; **Tabela 10**, p. 100). Os sinais referentes aos carbonos aromáticos foram concordantes com aqueles correspondentes ao coniferaldeído [96].

A configuração definitiva foi obtida pela espectrometria de massas (**Espectro 10**, p. 53), que apresentou pico em m/z 178 correspondente ao íon molecular, e o íon fragmentário em m/z 137, indicando um íon tropílio substituído por uma hidroxila e uma metoxila.

Os dados encontrados foram coerentes com os registrados para o coniferaldeído [96, 97]. Este possui ampla distribuição no reino vegetal, tendo sido relatado juntamente com siringaldeído, como os principais componentes do extrato aquoso de *Senra incana* (Malvaceae). Estudos farmacológicos sobre este extrato, e seus principais constituintes isolados, revelaram que o coniferaldeído é capaz de inibir a prostaglandina-sintetase numa potência cinco vezes maior que o ácido acetilsalicílico [97].

Hidrogênios	δ (ppm)
	coniferaldeído (3)
H-2	7,00 (d, J= 1,8 Hz, 1H)
H-5	6,69 (d, J= 8,1 Hz, 1H)
H-6	7,06 (dd, J=8,1 e 1,8 Hz, 1H)
H-7	7,33 (d, J= 15,8 Hz, 1H)
H-8	6,52 (dd, J=15,8 e 7,7 Hz, 1H)
H-9	9,58 (d, J= 7,7 Hz, 1H)
Ar-OMe	3,88 (s, 3H)
Ar-OH	5,91 (s, 1H)

Tabela 9: Dados de RMN-¹H (200MHz, CDCl₃) do coniferaldeído (**3**).

Carbonos	δ (ppm)
	coniferaldeído (<u>3</u>)
C-1	128,82
C-2	109,41
C-3	146,91
C-4	148,89
C-5	114,90
C-6	126,45
C-7	153,00
C-8	124,04
C-9	193,56
Ar-OCH ₃	55,99

Tabela 10: Dados de RMN-¹³C (50MHz, CDCl₃) do coniferaldeído (3)

B) (E)- e (Z)-p-Cumarato de octadecila

O espectro na região do IV (**Espectro 14**, p. 57) da mistura de **11** e **12** (fração A3/2-1) apresentou bandas de absorções em, 1716 cm^{-1} , correspondente a uma carbonila de éster α,β -insaturada, e em 1675, 1608, 1588, 1465 cm^{-1} , correspondentes à ligação dupla conjugada e anéis aromáticos.

No espectro de RMN- ^1H (**Espectros 11**, p. 54 e **12**, p. 55) da fração C2-1 observa-se na região dos hidrogênios aromáticos, dois dubletos em $6,79\delta$ e $7,36\delta$, cujos acoplamentos de 8,6 Hz (**Tabela 11**, p. 103) indicam claramente a presença de um sistema aromático *para* dissustituído A_xB_x . Um singlete largo em $5,45\delta$ indicou que uma hidroxila seria um dos substituintes deste anel, enquanto as cadeias cinamílicas foram determinadas através da observação de dois dubletos em $7,55\delta$ e $6,23\delta$ ($J=15,9\text{ Hz}$) e $6,74\delta$ e $5,76\delta$ ($J=12,9\text{ Hz}$), caracterizam hidrogênios olefínicos *E* e *Z*, respectivamente. Bandas de deformação $\text{C}=\text{C}$ em 980 cm^{-1} e 720 cm^{-1} no espectro de IV, confirmaram respectivamente a presença dos sistemas *E* e *Z*.

A definição da estrutura como sendo um éster graxo do ácido *p*-cumárico foi propiciada pela RMN de ^1H , onde pode-se observar a intensidade relativa do singlete largo em 1,19 δ , referente à uma longa cadeia metilênica e do tripleto em 0,81 δ (6,9 Hz) referente à uma metila terminal. Dados conclusivos que afastaram a possibilidade da cadeia alifática estar presente devido à impurezas, foram as absorções de dois tripletos em 4,11 δ e 4,05 δ , referentes aos hidrogênios metilênicos H-1'(*trans* e *cis*) desprotegidos pelo oxigênio carbinólico. Esta possibilidade estrutural foi confirmada pelo espectro de RMN de ^{13}C (**Espectro 13**, p. 56; **Tabela 12**, p. 104), que mostrou absorções em 167,53 δ e em 64,63 δ , características de carbonila de éster e de carbono carbinólico, respectivamente. Os dados de RMN de ^{13}C confirmaram ainda o padrão de substituição do anel aromático (**Tabela 12**, p. 104).

A proposta do tamanho desta cadeia alifática como sendo $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$, foi feita com base na espectroscopia de massas (**Espectro 15**, p. 57, **Figura 27**, p. 109) que indicou m/z 416 ($\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_3$) como íon molecular, e ainda o pico base em m/z 164 ($\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_3$), atribuído ao íon acílio correspondente.

Os dados obtidos confrontados com os publicados [98 – 100], possibilitaram confirmar as estruturas das substâncias **11** e **12** como sendo o (*E*)-*p*-cumarato de octadecila e o (*Z*)-*p*-cumarato de octadecila, respectivamente. A integração dos hidrogênios do espectro de RMN - ^1H apontou para uma proporção aproximada de 4:1 entre os isômeros *cis* e *trans* na mistura.

Tais produtos, tem sido descrito em várias espécies [101 – 103]. Um dos motivos de ampla distribuição talvez seja o seu possível envolvimento, juntamente com ésteres análogos do ácido ferúlico no processo de formação da suberina [103].

Hidrogênios	δ (ppm)	
	(E)- p-cumarato de octadecila (11)	(Z)- p-cumarato de octadecila (11)
H-2/H-6	6,79 (d, J= 8,6 Hz, 2H)	6,79 (d, J= 8,6 Hz, 2H)
H-3/H-5	7,36 (d, J= 8,6 Hz, 2H)	7,36 (d, J= 8,6 Hz, 2H)
H-7	7,55 (d, J= 15,9 Hz, 1H)	6,74 (d, J= 12,7 Hz, 1H)
H-8	6,23 (d, J= 15,9 Hz, 1H)	5,76 (d, J= 12,7 Hz, 1H)
H-1'	4,11 (t, J= 6,7 Hz, 2H)	4,05 (t, J= 6,7 Hz, 2H)
H-2'	1,61 (m, 2H)	1,61 (m, 2H)
-(CH ₂) ₁₇ -	1,18 (sl, 30H)	1,18 (sl, 30H)
H-20'	0,81 (t, J= 6,9 Hz, 3H)	0,81 (t, J= 6,9 Hz, 3H)
Ar-OH	5,46 (sl, 1H)	5,46 (sl, 1H)

Tabela 11: Dados de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) do (E)- e (Z)-p-cumarato de octadecila **11** e **12**.

Carbonos	δ (ppm)
	<i>(E)</i>-<i>p</i>-cumarato de octadecila (11)
C-1	129,90
C-2/C-6	132,30
C-3/C-5	115,85
C-4	157,78
C-7	144,24
C-8	115,75
C-9	167,53
C-1'	64,63
C-2'	31,92
C-3'	25,98
C-4'-C-19'	29,68
C-20'	14,07

Tabela 12: Dados de RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) do (*E*)- e (*Z*)-*p*-cumarato de octadecila **11** e **12**.

C) Ferulato de octadecila

O espectro na região do IV (**Espectro 20**, p. 62) da fração A3/2-2, mostrou bandas de absorções em 3422 cm^{-1} e 1711 cm^{-1} , indicando um grupamento hidroxila e uma carbonila de éster α,β -insaturada, respectivamente e em 1634 , 1519 e 874 cm^{-1} , referentes ao estiramento de um anel aromático. Bandas em 983 cm^{-1} e 721 cm^{-1} sugeriram uma mistura de isômeros *trans* e *cis*.

Os espectros de RMN de ^1H (**Espectros 16**, p. 58 e **17**, p. 59; **Tabela 13**, p. 107) e de ^{13}C (**Espectros 18**, p. 60 e **19**, p. 61; **Tabela 14**, p. 108), mostraram sinais característicos para o ferulato, e confirmaram a presença de uma mistura de isômeros; a configuração da ligação dupla foi deduzida a partir das constantes de acoplamento dos dubletos relativos aos hidrogênios olefínicos em $7,54\delta$ e $6,22\delta$, ($J=15,9\text{ Hz}$), típicos de sistemas *E* e $6,72\delta$ e $5,74\delta$ ($J=12,9\text{ Hz}$) típicos de sistemas *Z*, de forma análoga aos ésteres alifáticos do ácido *p*-cumárico.

A cadeia alifática, constatada através de um singlete largo em $1,84\delta$, foi novamente considerada como ligada à molécula devido as absorções dos tripletos em $4,12\delta$ e $4,05\delta$, referentes aos hidrogênios H-1' dos isômeros *E* e *Z*, respectivamente, e pelo tripleto em $0,77\delta$, referente à metila terminal. O tamanho da cadeia metilênica foi deduzido a partir do espectro de massas (**Espectro 21**, p. 62, **Figura 27**, p. 109), que mostrou o íon fragmentário em m/z 474 ($\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_4$) como $M+1$ e m/z 475 como $M+2$; o pico base em m/z 194 ($\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4$) corresponde à estrutura do ferulato.

A proporção entre os dois isômeros foi estimada também como 4:1, com base na integração dos diversos sinais no espectro de RMN-¹H.

Com base nos dados espectroscópicos obtidos e na literatura [104–106] as substâncias **13** e **14** foram identificadas como sendo o (*E*)- ferulato de octadecila e (*Z*)- ferulato de octadecila, respectivamente.

Tais produtos foram previamente isolados em cultura de células de *Kalanchoes daigremotiana* [107] e em vários tecidos de outras espécies [104 – 108].

Hidrogênios	δ (ppm)	
	(E)-ferulato de octadecila (13)	(Z)-ferulato de octadecila (13)
H-2	6,97 (d, J= 1,8 Hz, 1H)	6,97 (d, J= 1,8 Hz, 1H)
H-5	6,84 (d, J= 8,1 Hz, 1H)	6,84 (d, J= 8,1 Hz, 1H)
H-6	7,00 (dd, J= 8,1 e 1,8 Hz, 1H)	7,00 (dd, J= 8,1 e 1,8 Hz, 1H)
H-7	7,54 (d, J= 15,9 Hz, 1H)	6,72 (d, J= 12,9 Hz, 1H)
H-8	6,22 (d, J= 15,9 Hz, 1H)	5,74 (d, J= 12,9 Hz, 1H)
H-1'	4,12 (t, J= 6,8 Hz, 1H)	4,05 (t, J= 6,8 Hz, 1H)
H-2'	1,61 (m, 2H)	1,61 (m, 2H)
-(CH ₂) ₁₇ -	1,18 (sl, 30H)	1,18 (sl, 30H)
H-20'	0,77 (t, J= 6,8 Hz, 3H)	0,77 (t, J= 6,8 Hz, 3H)

Tabela 13: Dados de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) do (E)- e (Z)-ferulato de octadecila (**13** e **14**).

Carbonos	δ (ppm)
	<i>(E)</i> -ferulato de octadecila (13)
C-1	128,83
C-2	109,26
C-3	146,72
C-4	147,86
C-5	114,67
C-6	123,03
C-7	144,60
C-8	115,68
C-9	167,38
C-1'	64,44
C-2'	31,91
C-3'	25,98
C-4'-C-19'	29,30
C-20'	14,11
Ar-OCH ₃	55,92

Tabela 14: Dados de RMN-¹³C (50MHz, CDCl₃) do (*E*)- e (*Z*)-ferulato de octadecila (**13** e **14**).

Figura 27: Interpretação do espectro de massas obtido para 11, 12, 13 e 14

II.2 - C. Isoflavonas

As isoflavonas **4** e **5**, foram identificadas através da análise dos seus espectros de RMN de ^1H e de massas, além de comparação com dados descritos na literatura [109 – 110].

Um pico em m/z 312 M^+ , no espectro de massas de **4**, (**Espectro 27**, p. 68 e **Figura 28**, p. 113), associado às absorções de hidrogênio aromático (6H), olefínico (1H) e metoxílicos (9H), no espectro de RMN- ^1H (**Espectros 22**, p. 63 e **23**, p. 64; **Tabela 15**, p. 112), é compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_5$.

A presença do singlete em 7,90 δ , referente a um hidrogênio desprotegido diagnosticou o esqueleto carbônico da substância como sendo de isoflavonóide. Um dubleto em 8,84 δ ($J = 8,9$ Hz), referente a um hidrogênio desprotegido por ligação de hidrogênio, foi atribuído ao H-5. Através das constantes de acoplamento do espectro de RMN de ^1H e de correlações observadas no espectro de HOMO-COSY ^1H - ^1H (**Espectro 24**, p. 65), foi possível verificar o acoplamento de H-5 com um duplo-dubleto em 6,94 δ ($J = 8,9$ e 2,4 Hz) atribuído a H-6, e este por sua vez, acoplando numa relação *meta* com um dubleto em 6,80 δ ($J=2,4$ Hz) foi atribuído a H-8. A presença de um duplo-dubleto em 7,00 δ ($J=8,3$ Hz e 1,9 Hz), acoplando com um dubleto em 6,86 δ (8,3 Hz), e com um dubleto em 7,15 δ ($J=1,9$ Hz), com relações *orto* e *meta* entre esses hidrogênios, definiram o padrão de substituições do anel B.

A presença de três metoxilas aromáticas juntamente com sinais dos hidrogênios aromáticos dos anéis A e B no espectro de RMN de ^1H e HOMO-COSY ^1H - ^1H , possibilitaram a atribuição destes grupamentos nas posições 7, 3',4'. O íon fragmentário em m/z 162 (**Espectro 27**, p. 68; **Figura 28**, p. 113) confirmou o padrão de substituição do anel B. A substância foi então caracterizada como sendo a cabreuvinina, a qual havia sido isolada das sementes de *Calopogonium mucunoides* [109].

No espectro de RMN de ^1H (**Espectro 25**, p. 66; **Tabela 16**, p. 112) da substância **5** observou-se um singleto em 7,86 δ , atribuído à H-2; a presença de um singleto em 6,38 δ , característico de H-8, e dois dubletos em 7,40 δ e 6,68 δ com ($J=8,8$ Hz, 2H), indicaram, respectivamente, o padrão penta-substituído para o anel A e *p*-substituído para o anel B. Observou-se a absorção de prótons referentes à duas metoxilas aromáticas (3,78 δ e 3,91 δ) e um hidrogênio hidroxílico em 6,20 δ . O íon fragmentário em m/z 132 (**Espectro 28**, p. 68; **Figura 29**, p. 114) definiu a presença de uma metoxila na posição *para* do anel B. A definição das posições de substituição da metoxila e da hidroxila, foi feita com base no espectro de NOE diff. (**Espectro 26**, p. 67), onde foi possível observar um efeito NOE nos sinais de H-3'/H-5' quando os hidrogênios metoxílicos em 3,78 δ foram irradiados. A irradiação na metoxila em 3,91 δ não exerceu nenhum efeito no sinal de H-8, indicando que a mesma deve estar localizada entre as hidroxilas. Tais inferências confirmam as posições das metoxilas nas posições 6 e 4', que são relativa a isoflavona irisolidona [110] previamente isolada do caule de *Pericopsi mooniana* [111] e *Podocarpus amarus* [110].

Hidrogênios	δ (ppm)
	<i>cabreuvina</i> (4)
H-2	7,90 (1H, s)
H-5	8,84 (1H, <i>d</i> , J=8,9 Hz)
H-6	6,94 (1H, <i>dd</i> , J=8,9 e 2,4 Hz)
H-8	6,80 (1H, <i>d</i> , J= 2,4 Hz)
H-2'	7,15 (1H, <i>d</i> , J=1,9 Hz)
H-5'	6,86 (1H; <i>d</i> ; J=8,3 Hz)
H-6'	7,00 (1H, <i>dd</i> , J=8,3 e 1,9 Hz)
ArOCH ₃	3,86 (3H, s)
ArOCH ₃	3,85 (1H, s)
ArOCH ₃	3,84 (1H, s)

Tabela 15: Dados de RMN-¹H (200MHz, CDCl₃) da cabreuvina (**4**).

Hidrogênios	δ (ppm)
	<i>irisolidona</i> (5)
H-2	7,86 (1H, s)
H-8	6,38 (1H, s)
H-2'/H-6'	7,40 (2H, <i>d</i> , J=8.8 Hz)
H-5'/H-3'	6,86 (2H, <i>d</i> , J=8.8 Hz)
C5-OH	12,55 (1H, s)
C7-OH	6,2 (1H, <i>sf</i>)
C-6-OCH ₃	3,91 (3H, s)
C-4'-OCH ₃	3,78 (3H, s)

Tabela 16: Dados de RMN-¹H (300MHz, CDCl₃) da irisolidona (**5**)

Figura 28: Interpretação do espectro de massas obtido para a cabreuvin (4).

Figura 29: Interpretação do espectro de massas obtido para a irisolidona (**5**).

II.2 - D. Lignanas Furofurânicas

Uma das maiores subclasses de lignanas são as do tipo furofurânicas. Elas estão amplamente distribuídas na natureza, e tem como característica básica a presença do sistema 3,7-dioxabicyclo [3.3.0] octano [109 – 110]. Em *A. angustifolia* haviam sido isolados o pinoresinol, a eudesmina e o filigenol [37 – 38].

O anel furofurânico deste tipo de lignana (**Figura 30**) apresenta sempre junção do tipo cis, devido a menor tensão envolvida quando comparado a possibilidade trans. Dessa forma, a configuração nos carbonos da posição 8 e 8', pode ser (S) (S) ou (R) (R), sendo a última a mais comum para a maioria das lignanas furofurânicas naturais [112].

Figura 30: Esqueleto carbônico das lignanas furofurânicas

Os substituintes dos anéis alifáticos ocupam geralmente as posições *pseudo* equatoriais e/ou *pseudo* axiais. Na ausência de outros grupos funcionais nos anéis heterocíclicos, as possibilidades de isomeria podem resultar em três possibilidades configuracionais (**Figura 31**): *pseudo* diequatoriais (a), *pseudo* equatorial/*pseudo* axial (forma epimérica) (b) e *pseudo* diaxial (c) [113].

Figura 31: Possibilidades isoméricas para lignanas furofurânicas

A espectroscopia de RMN- ^1H , tem sido a principal técnica para a diagnose da estereoquímica relativa deste tipo de lignanas. As estruturas simétricas **a** e **c** (**Figura 31**), podem ser definidas a partir dos deslocamentos químicos dos hidrogênios 7 e 7'. No caso de epímeros, a quebra da simetria, provoca o desdobramento dos sinais dos hidrogênios presentes no anel furofurânico, aumentando a complexidade do espectro [114]. Segundo Becker e Beroza [115], representantes da série *pseudo* diequatoriais podem ser identificados pela absorção dos prótons oxibenzílicos em aproximadamente 4,75 δ (*d*, 4Hz), o que foi observado para as lignanas **6** (**Espectro 29**, p. 69; **Tabela 17**, p. 117) e **7** (**Espectro 30**, p. 70; **Tabela 17**, p. 117). No caso de representantes *pseudo* diaxiais, os mesmos hidrogênios absorvem em 4,90 δ [116 – 117].

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios aromáticos, indicam a presença de anéis do tipo guaiacílico (4-hidroxi-3-metoxibenzílico) para a substância **6**, e veratrílico (3,4-dimetoxibenzílico) para a substância **7**. Estes padrões de substituição foram confirmado pela espectroscopia de massas (**Espectros 31** e **32**, p. 71; **Figuras 32**, p. 118 e **33**, p. 119), através da análise dos íons moleculares e, mais especificamente, dos íons tropílios.

Baseando-se nos dados descritos acima e na literatura pesquisada, as substâncias **6** e **7** foram identificadas respectivamente como sendo pinosresinol [118] e eudesmina [113].

Hidrogênios	δ (ppm)	
	pinoresinol 6	eudesmina 7
H-7, H-7'	4,73 (d, J= 4,2 Hz, 1H)	4,69 (d, J=4,2 Hz, 1H)
H-8, H-8'	3,09 (m, 2H)	3,05 (m, 2H)
H-9 ax, H-9'ax	#	#
H-9 eq, H-9' eq	4,24 (dd, J=9,1 e 6,8 Hz, 2H)	4,20 (dd, J=9,0 e 6,9 Hz, 2H)
Ar-OMe	3,87 (s, 3H); 3,89 (s, 3H)	3,81 (s, 3H); 3,82 (s, 3H) 3,83 (s, 3H); 3,86 (s, 3H)
H-Ar	6,78 – 6,90 (m, 6H)	6,74 – 6,84 (m, 6H)

Os sinais de tais hidrogênios encontram-se encobertos pelos sinais das metoxilas aromáticas.

Tabela 17: Dados de RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) do pinoresinol (**6**) e eudesmina (**7**).

Figura 32: Interpretação do espectro de massas obtido para o pinoresinol (6).

II.2 - D. Lignanas Tetraidrofurânicas

Com base nos espectros de RMN- ^1H (**Espectro 33**, p. 72), RMN- ^{13}C (**Espectro 34**, p. 73), massas (**Espectro 38**, p. 77) e dados descritos na literatura [37, 38, 119], a lignana **8** foi identificada como (+)-lariciresinol, anteriormente descrita em *A. angustifolia* [37]. A lignana **9** foi identificada com base nos seus espectros de RMN- ^1H (**Espectro 35**, p. 74), HOMO-COSY ^1H - ^1H (**Espectro 36**, p. 75), RMN- ^{13}C (**Espectro 37**, p. 76), IV (**Espectro 40**, p. 78) e massas, como sendo o 9'-O-acetil-lariciresinol.

Os espectros de RMN- ^1H (**Espectros 33**, p. 72 e **35**, p. 74; **Tabela 18**, p. 122) de ambas as substâncias apresentaram deslocamentos químicos característicos para este tipo de lignana tetraidrofurânica de ocorrência natural e também resultantes da hidrogenólise parcial de lignanas furofurânicas [113, 121-122].

Nestas duas lignanas tetraidrofurânicas, pode-se observar nitidamente os duplo-dubletos referentes aos dois hidrogênios do carbono 9 (H-9 α e H-9 β). Os hidrogênios H-9' não puderam ser observados no espectro da substância **8**, por estar absorvendo na mesma região das metoxilas aromáticas (3,83 δ), entretanto, no caso do produto monoacetilado **9**, estes apareceram sob a forma de duplo-dubletos (4,10 δ e 4,28 δ), devido ao efeito de desproteção exercido pelo grupamento acetila. Os hidrogênios H-7 também mostraram diferenças, pois em **8** foi possível observá-los como duplo-dubletos (2,47 e 2,88 δ), enquanto na lignana **9**, estes absorveram na região de 2,44 - 2,79 δ , junto com os H-8 e 8', sob a forma de multipeto. Estas atribuições foram confirmadas pela análise do espectro de RMN HOMO - COSY ^1H - ^1H (**Espectro 36**, p. 75).

A RMN de ^{13}C também forneceu informações precisas quanto a estereoquímica relativa das lignanas isoladas [122]. Foi possível definir a orientação *pseudo*-axial do anel aromático ligado ao C-7' das duas lignanas tetraidrofuranas isoladas, através do sinal em 82,6 +/- 0,3 ppm neste carbono, (**Espectros 34**, p. 73 e **37**, p. 76; **Tabela 19**, p. 123). Na lignana **9**, o posicionamento do grupamento acetila em C-9' foi feito com base na análise do espectro de RMN- ^{13}C (**Espectro 37**, p. 76, **Tabela 19**, p. 123). Fonseca e colaboradores [37, 38] estudaram extensivamente a aplicação deste tipo de espectrometria em lignana tetraidrofurânicas, e verificaram que a presença de uma acetila no C-9' provoca uma desproteção de aproximadamente 2-3 ppm, enquanto que o C-8' é protegido de aproximadamente 3,5 δ pelo efeito γ exercido pela carbonila, quando comparado a lignana não acetilada.

O grau e o padrão de substituição nos anéis aromáticos foram deduzidos através dos dados observados nos espectros de massas (**Espectros 39**, p. 77 e **40**, p. 78; **Figura 34**, p. 124) e por RMN de ^1H e de ^{13}C , respectivamente.

Considerando que o acetato de etila foi utilizado nas etapas de purificação, é possível que tal substância seja produto da acetilação do lariciresinol.

Hidrogênios	δ (ppm)	
	lariciresinol (8)	9'-O-acetil-lariciresinol (9)
7-H	2,47 (1H, dd, J= 13,3, 10,9 Hz)	2,44 – 2,79 (3H, m)
7-H	2,88 (1H, dd, J= 13,2, 4,8 Hz)	2,44 – 2,79 (3H, m)
7'-H	4,73 (1H, d, J= 6,6 Hz)	4,69 (1H, d, J= 6,4 Hz)
8-H	2,34 (1H, m)	2,44 – 2,79 (3H, m)
8'-H	2,66 (1H, m)	2,44 – 2,79 (3H, m)
9-H α	3,97 (1H, dd, J= 8,5, 6,5 Hz)	3,99 (1H, dd, J= 8,6 e 6,2 Hz)
9-H β	3,68 (1H, dd, J= 8,5, 6,1 Hz)	3,66 (1H, dd, J= 8,6 e 6,2 Hz)
9'-H α	3,83 (1H, m)	4,10 (1H, dd, J= 11,3 e 7,3 Hz)
9'-H β	#	4,28 (1H, dd, J= 11,3 e 6,9 Hz)
Ar-H	6,60-6,81 (6H, m)	6,58 – 6,83 (6H, m)
Ar-OMe	3,81 (3H, s)	3,81 (3H, s)
Ar-OMe	3,83 (3H, s)	3,83 (3H, s)
Ar-OH	6,26 (1H, s/)	5,51 (1H, s/)
Ar-OH	6,17 (1H, s/)	5,43 (1H, s/)
COCH ₃	-	1,94 (3H, s)

- Os sinais referentes a estes hidrogênios estão encobertos pelos sinais das metóxilas aromáticas.

Tabela 18: Dados de RMN-¹H do lariciresinol (300MHz, CDCl₃) (**8**) e do 9'-O-acetil-lariciresinol (200MHz, CDCl₃) (**9**).

Carbonos	δ (ppm)	
	<i>lariciresinol</i> (8)	<i>9'-O-acetil-lariciresinol</i> (9)
C-1	134,8	134,2
C-2	111,4	111,2
C-3	146,7 ^a	146,5 ^b
C-4	144,0	143,9
C-5	114,4	114,4
C-6	121,0	121,0
C-7	33,1	33,2
C-8	42,4	42,4
C-9	72,7	72,7
C-1'	132,2	131,8
C-2'	108,4	108,3
C-3'	146,6 ^a	146,5 ^b
C-4'	145,0	145,1
C-5'	114,2	114,1
C-6'	118,6	118,9
C-7'	82,6	83,0
C-8'	52,5	48,9
C-9'	60,4	62,6
Ar-OMe	55,8	55,7 ^c
Ar-OMe	55,8	55,6 ^c
<u>CO</u> CH ₃	-	170,9
CO <u>C</u> H ₃	-	20,8

Valores na mesma coluna, marcados com a mesma letra podem ser permutados

Tabela 19: Dados de RMN-¹³C do lariciresinol (75MHz, CDCl₃) (**8**) e do 9'-O-acetil-lariciresinol (50MHz, CDCl₃) (**9**).

Figura 34: Proposta de fragmentação para o 9'-O-acetil-lariciresinol (**9**).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo fitoquímico realizado com o caule adulto de *Araucaria angustifolia* confirmou o acúmulo das lignanas pinoresinol, eudesmina e lariciresinol, anteriormente descrito na literatura [36 – 38], enquanto a lignana secoisolariciresinol e outras análogas não foram detectadas neste estudo. No entanto, foram isolados dois derivados do benzaldeído (*p*-hidroxibenzaldeído e vanilina), um fenilpropanóide (coniferaldeído) e dois isoflavonóides, sendo inéditas tais ocorrências em espécies da família *Araucariaceae*. O acúmulo de benzaldeídos não é muito comum. Admite-se que estes podem ser produtos da β -oxidação dos respectivos ácidos cinâmicos substituídos [123]; a formação de derivados do ácido benzóico, através da degradação da cadeia lateral de fenilpropanóides, foi constatada em culturas de células de *Vanilla planifolia* [124, 125], onde a adição dos ácidos cinâmicos e ferúlicos aumentavam a produção dos ácidos *p*-hidroxibenzóico e vanílico respectivamente [123].

Foram obtidos calos a partir de caules de plântulas estioladas no meio básico MS, suplementado com complexo vitamínico de Nitsch e Nitsch, uréia, glutamina, arginina, ácido cítrico e mioinositol, contendo ANA e K como reguladores de crescimento. Os calos obtidos foram analisados após duas transferências, revelando o acúmulo dos isômeros *E* e *Z* do *p*-cumarato de octadecila e dos isômeros *E* e *Z* do ferulato de octadecila. Dentre os metabólitos secundários de *A. angustifolia*, tanto os flavonóides quanto as lignanas compartilham das mesmas etapas biossintéticas preliminares, tendo como precursores os ácidos *p*-cumárico e ferúlico. Na via biossintética que conduz aos flavonóides, os ácidos cinâmicos são inicialmente convertidos à ésteres de coenzima-A, os quais sofrem seguidas reações de condensação de Claisen com o malonil Co-A para, após diversas etapas, formar a respectiva chalcona.

Na biossíntese de lignanas, os ésteres de coenzima-A são reduzidos aos respectivos aldeídos e álcoois cinamílicos que sofrem as reações de acoplamento oxidativo produzindo diversos tipos de estruturas.

No caso de sistemas desdiferenciados o metabolismo primário está bastante ativo, pois as células encontram-se em constante processo de crescimento e divisão celular, levando ao detrimento do metabolismo secundário [126].

A análise dos metabólitos presentes no caule adulto e nos calos mostrou que ambos os tecidos são capazes de expressar as etapas biossintéticas resultando no acúmulo de fenilpropanóides. Entretanto, as células cultivadas nas condições descritas, não foram efetivas na dimerização de tais precursores levando a formação de lignanas. Através da administração de precursores marcados, como o ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e álcool coniferílico nos calos obtidos ou através de reações imunológicas, seria possível avaliar a semelhança entre o metabolismo de *A. angustifolia* e *Forsythia intermedia*.

É possível que os ácidos *p*-cumárico e ferúlico estejam sendo consumidos na síntese dos ésteres graxos, os quais podem fazer parte da constituição tanto suberina quanto paredes celulares, deixando de estar disponível para a biossíntese de lignóides. Considerando que tais ácidos inibem a germinação em diversas espécies [107], eles também poderiam estar inibindo o próprio crescimento celular na condição de cultura "*in vitro*" testada explicando o lento crescimento das culturas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – Castro M. A, Gordaliza M., Del Corral J. M. M. and San Feliciano A. (1996) *Phytochemistry* **41**: 995.
- 2 – Dallimore W. and Jackson B. (1966) In: Arnold E. (ed.) *A Handbook of Coniferae and Ginkgoaceae*. London.
- 3 – Joly A. B. (1979) *Botânica – Introdução à Taxonomia Vegetal*. 5^o ed. Editora Nacional, São Paulo, p: 187-213.
- 4 – Stockey R. A. and Ko H. (1986) *Botanical Gazette* **147**: 508.
- 5 – Stockey R. A. (1994) *Journal of Plant Research* **107**: 493.
- 6 – Ofman D. J., Markhan K. R., Vilain C. and Molloy P. J. (1995) *Phytochemistry* **38**:1223.
- 7 – Reitz E. R. and Klein R. M. (1966) *Araucariáceas*. In: *Flora Ilustrada Catarinense*, Fascículo 3, Itajaí, Santa Catarina.
- 8 – Campello J. P. and Fonseca S. F. (1975) *Phytochemistry* **14**: 2299.
- 9 – Lorenzi H. (1992) *Árvores do Brasil – Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Plantarum LTDA, Nova Odessa. p:35.
- 10 – Inoue M. T., Roderjan C. V. and Kuniyoshi Y. S. (1984) *Projeto Madeira do Paraná*. Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná. Curitiba. p: 260
- 11 – Seitz R. (1986) *Crown development of Araucaria angustifolia in its natural enviromment during six years*. In: Fujimori R. I. and Whitehead D. (eds.) *Crown and canopy structure in relation to productivity*. Forestry and Forest Products Research Institute, Ibaraki, p: 129-145.
- 12 – Enzell C. R. and Thomas B. R. (1965) *Acta Chemica Scandinava* **19**: 913.
- 13 – Enzell C. R. and Thomas B. R. (1965) *Acta Chemica Scandinava* **19**: 1875.
- 14 – Thomas B. R. (1966) *Acta Chemica Scandinava* **20**:1074.
- 15 – Carman R. M. and Dennis N. (1964) *Australian Journal of Chemical* **17**:390.
- 16 – Carman R. (1973) *Australian Journal of Chemistry* **26**:209.
- 17 – Chandra G. (1964) *Journal of. Chemical Society* 3648.

- 18 – Smith R. M., Marty R. A and Peters C. (1981) *Phytochemistry* **20**:2205.
- 19 – Khac D. D., Bastard J. and Fetizon M. (1979) *Phytochemistry* **18**:1839.
- 20 – Briggs L. and White G. W. (1973) *Australian Journal of Chemistry* **26**:2229.
- 21 – Cambie J. C., Coddington J. M, Stone M. J., Tanala N., Hua L. Y. and Arigayo S. (1989) *Phytochemistry* **28**:1675.
- 22 – Fernandes R. R., Moreira E. A. and Miguel O. G. (1991) *Acta Biologica Paranaense* **20**:125.
- 23 – Briggs L. H. and White G. W. (1975) *Tetrahedron* **31**: 1311.
- 24 – Bruns K. (1968) *Tetrahedron* **24**:3417.
- 25 – Caputo R. and Mangoni L. (1974) *Phytochemistry* **13**: 467.
- 26 – Caputo R., Mangoni L., Monaco P., Pelosi L. and Previtera L. (1976) *Phytochemistry* **15**: 1401.
- 27 – Caputo R., Mangoni L., Monaco P., Pelosi L. and Previtera L. (1974) *Phytochemistry* **13**: 471.
- 28 – Caputo R., Davinola V. and Mangoni L. (1974) *Phytochemistry* **13**: 475.
- 29 – Khan N. V., Ilyas M., Rahman W., Mashima T., Okigawa M. and Kawano N. (1972) *Tetrahedron* **28**: 5689.
- 30 – Markhan K. R. (1984) *Phytochemistry* **23**: 2053.
- 31 – Markhan K. R., Sheppard C. and Geiger H. (1987) *Phytochemistry* **26**:3335.
- 32 – Lin Y. and Chen F. (1974) *Phytochemistry* **13**:1617.
- 33 – Ilyas M., Usmani J. N., Bhatnagar S. P., Ilyas M., Rahman W. and Pelter A. (1968) *Tetrahedron Letters* **53**: 5515.
- 34 – Enzell C. R., Hirose Y. and Thomas B. R. (1967) *Tetrahedron Letters* **9**: 793.
- 35 – Dryselius E. and Lindberg B. (1956) *Acta Chemica Scandinava* **10**:445.
- 36 – Anderegg R. J. and Rowe J. W. (1974) *Holzforschung* **28**, 171.
- 37 – Fonseca S. F., Campello J. P., Barata L. E. S. and Rúveda E. A. (1978) *Phytochemistry* **17**:499.
- 38 – Fonseca S. F., Nielsen L. and Rúveda E. A. (1978) *Phytochemistry* **18**:1073.
- 39 – Ohashi H., Kawai S., Sakurai Y. and Yasue M. (1992) *Phytochemistry* **31**: 1371.
- 40 – Rao C. B. S. (1987) Chemistry of lignans. Andhra University Press, Adhra Pradesh, India. p:377.
- 41 – Whitting D. A. (1985) *Natural Products Reports*: 191.

- 42 – Pelter A. (1986) *Adv. Phytochemistry* **20**:201.
- 43 – Gottlieb O. R. (1977) *Chemistry of Neolignans with potential biological activity*. In Wagner H. and Wolff P. (eds.) **New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutic Activity**. Springer-Verlag, Heidelberg, p:227.
- 44 – Gottlieb O. R. (1979) *Journal of Ethnopharmacology* **1**:309.
- 45 – McRae W. D. and Towers G. H. N. (1985) *Phytochemistry* **24**:561.
- 46 – Allan E. (1991) *Plant Cell Culture*. In: Stafford A. and Warren G. (Eds.) **Plant Cell and Tissue Culture**. Open University Press, Great Britain, p: 1.
- 47 – Vasil I. and Constabel F. (1987) *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, **vol. 1 e 4**, Academic Press, INC, London.
- 48 – Zenk M. H., Rüffer M., Kutchan T. M., Galneder E. (1988) *Biotechnological Approaches to the Production of Isoquinoline Alkaloids*. In: Ciba Foundation Symposium; 137. **Application of Plant Cell and Tissue Culture**. John Wiley and Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, Sussex PO191UD, UK, p: 213.
- 49 – Tabata M. (1977) *Recent Advances in the Production of Medicinal Substances by Plant Cell Cultures*. In: Barz W., Reinhard E., Zenk M. H., (eds.) **Plant Tissue Culture and It's Bio - Technological Application**. Springer – Verlag, Berlin, Heidelberg, p: 3.
- 50 – Barz W., Reinhard E. and Zenk M. H., (1977) **Plant Tissue Culture and It's Bio-Technological Application**. Springer – Verlag, Berlin, Heidelberg.
- 51 – Zafar R., Aeri V. and Datta A. (1992) *Fitoterapia* **LXIII**: 33.
- 52 – Zenk M. H., el-Shagi H. and Schulte U. (1975) *Planta Medica Supply* p:79.
- 53 – Fujita Y., Takahashi S. and Yama S. (1985) *Agricultural and Biological Chemistry* **49**:1755.
- 54 – Furuya T. and Ushiyama M. (1994) *Ginseng Production in Cultures of Panax ginseng Cells*. In: Shargool P. D. and Ngo T. T. (eds.) **Biotechnological Applications of Plant Cultures**, CRC Press, N. Y., p: 1.
- 55 – Zenk M. (1991) *Phytochemistry* **30**:3861.
- 56 – Dinkova Kostova A., Gang D. R., Davin L. Bedgar D. L., Chu A. and Lewis N. G. (1996) *The Journal of Biological Chemistry* **271**:29473.
- 57 – Kutney J. P. (1997) *Pure & Applied Chemistry* **69**: 431.

- 58 – Kutney J. P., Du X., Naidu R., Stoykov N. M. and Takemoto M. (1996)
Heterocycles **42**: 479.
- 59 – Farnsworth N. R. (1984) The Role of Medicinal Plants in Drug Development.
Munksgaard, Copenhagen, p: 1.
- 60 – Verdine G. L. (1996) *Nature* **384** (Supply. 7): 11.
- 61 – Nakano K., Oose Y., Masuda Y., Kamada H. and Takaishi Y. (1997)
Phytochemistry **45**: 293.
- 62 – Katayama T., Davin L., Chu A. and Lewis N.G. (1993) *Phytochemistry*
33:581.
- 63 – Dewick P. M. and Jackson D. E. (1984) *Phytochemistry* **23**:1029.
- 64 – Dewick P. M. and Jackson D. E. (1984) *Phytochemistry* **23**:1037.
- 65 – Dewick P. M. and Kamil W. M. (1986) *Phytochemistry* **25**:2093.
- 66 – Umezawa T., Davin L. and Lewis N.G. (1990) *Biochemical and Biophysical
Research Communications* **171**:1008.
- 67 – Umezawa T., Davin L., Yamamoto E., Kingston D. and Lewis N.G. (1990)
Journal of Biological Chemical society. Chemical Communications
20:1405.
- 68 – Umezawa T., Davin L. and Lewis N.G. (1991) *Journal of Biological
Chemistry* **266**:10210.
- 69 – Davin L., Bedgar D. L., Katayama T. and Lewis N.G. (1992) *Phytochemistry*
31:3869.
- 70 – Katayama T., Davin L. and Lewis N.G. (1992) *Phytochemistry* **31**:3875.
- 71 – Haldeman J. H. (1987) *Hortscience* **22**(2):306 - 307.
- 72 – Murashige T. and Skoog F. (1962) *Physiology Plantarum* **15**:473 - 497.
- 73 – Nitsch J. P. and Nitsch C. (1969) *Science* **163**:85.
- 74 – Rubinstein I., Goad L. J., Clague A. D. H. and Mulheirn L. J. (1976)
Phytochemistry **15**:195.
- 75 – Handro W. and Ferreira C. M. (1980) *Boletim Botanico da Universidade de S.
Paulo* **8**:71.
- 76 – Penchel R. M. (1986) *In vitro* studies of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze
and *Araucaria heterophylla* (Sallib.). Master thesis, Institute of Botany
and Plant Physiology, The State Univ. of New Jersey

- 77 – Bekkaoui F., Saxena P. K., Attree S. M., Fowke L. C. and Dustan, D. I. (1987) *Plant Cell Reports* **6**: 476.
- 78 – Haines R. J. and Fossard R. A. (1977) *Acta Horticulture* **78**:297.
- 79 – Beniest J. and Debergh P. (1976) *Med. Fac. Landbouww Rijksuniv. Gent.* **41**: 1599.
- 80 – Maene L. J. and Debergh P. C. (1981) *Preliminary results on organ culture of Araucaria excelsa (Lamb.) R. Br.* In Proc IUFRO sect S2 01 5. Int. Workshop "In vitro" Cultivation For Tree Species, Fontainebleu, France, p. 155.
- 81 – Burrows G. (1981) *Queensl. Dep. For. Res. Rep.* **3**: 36.
- 82 – Burrows G. (1983) Organ culture of some species of the Araucariaceae. Anatomical aspects of bud development. *Proc. 2nd Aust Plant Tissue Culture Conf.*, Sydney, p. 18.
- 83 – Cardemil L. and Jordan M. (1982) *Z. Pflanzenphysiol.* **107**: 329.
- 84 – Krogstrup P. (1986) *Canadian Journal Forest Research* **16**: 664.
- 85 – Web D. T. Webster F. Flinn B. S., Roberts D. R. and Ellis D. D. (1989) *Canadian Journal Forest Research* **20**: 1759.
- 86 – Mo L. H., von Arnold S. and Lagercrantz U. (1991) *Journal of Plant Physiology* **138**: 223.
- 87 – Astarita L. V. (1996) Cultura *in vitro* de Massas Celulares Suspensor-Embrionárias de *Araucaria angustifolia*: Morfogênese Celular e Poliembriogênese Somática. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. RS.
- 88 – Beistel D. W. and Edwards D. (1976) *The Journal of Physical Chemistry* **80**:2023.
- 89 – *Aldrich Library of NMR Spectra* (1974) 2:65B.
- 90 – Gannett P. M., Nagel D. L., Reilly P. J., Lawson T., Sharpe J. and Toth B. (1988) *Journal of Organic Chemistry* **53**:1064.
- 91 – Jindra A., Sipal Z. and Hudecova H. (1964) *Experientia* **20**: 371.
- 92 – Silva D, H. S. (1997) *Constituintes Químicos de Iryanthera sagotiana e Iryanthera lancifolia.* Tese de doutoramento. Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

- 93 – Costa A. F. (1986) *Farmacognosia* 4^a ed., **vol. 2**. Fundação Calouste Gulbenkian, p: 718.
- 94 – Dewick P. M. (1992) *Natural Products Reports* **9**: 153.
- 95 – Costa A. F. (1986) *Farmacognosia* 4^a ed., **vol. 1**. Fundação Calouste Gulbenkian, p: 722.
- 96 – Etse J. T., Gray A. I., Waterman P. G., Bates C. D., Watson D. G and Thomas D. W. (1988) *Journal of Natural Products* **51**: 314.
- 97 – Farah M. H. and Samuelsson G. (1992) *Planta Medica* **58**:14.
- 98 – Gunatilake A. A. L. and Sultanbawa M. U. S. (1973) *J. C. S. Perkin I*: 1155.
- 99 – Bohlmann F., Zdero C., King R. M. and Robinson H. (1979) *Phytochemistry* **18**: 1177.
- 100 – Martínez V., Barberá O., Sanchez-Parareda J. and Marco A. (1987) *Phytochemistry* **26**: 2619.
- 101 – Wandji J., Nkengfack E., Fomum Z. T., Ubillas R., Killday B. and Tempesta (1990) *Journal of Natural Products* **53**: 1425.
- 102 – Snook M. E. and Data E. S. (1994) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**: 2589.
- 103 – Norton R. A. and Dowd P. F. (1996) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**: 2412.
- 104 – Baldé A. L., Clayes L. A., Pieters V. W., Wray V. and Vlietinck A. J. (1991) *Phytochemistry* **30**: 1024.
- 105 – Bernards M. A. and Lewis N. G. (1992) *Phytochemistry* **31**:3409.
- 106 – Kawanishi K., Yasufuku J., Ishikawa A. and Hashimoto Y. (1990) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **31**: 105.
- 107 –Nair M. G., Epp M. D. and Burke B. A. (1988) *Journal of Chemical Ecology* **14**: 589.
- 108 – Laver M. and Fang H. L. (1989) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **37**: 114.
- 109 – Vilain C. and Jadot J. (1976) *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* **45**: 468.
- 110 – Carman R. R., Russell-Maynard J. K. L. and Schumann R. C. (1985) *Australian Journal of Chemistry* **38**: 485.

- 111 – Fitzgerald M. A., Gunning P. J. M. and Donnelly D. M. X. (1976) *Journal of Chemistry Society Perkin Transactions I*: 187.
- 112 – Pelter A. and Ward R. S. (1978) *Substituted Furofurans (2,6-Diaryl-3,7-dioxabicyclo [3.3.0] octanes)*. In: Rao C.B.S. (ed.) *Chemistry of Lignans*, University Press, Andhra Pradesh, India, p: 227.
- 113 – Kato M. J. (1989) *A Distribuição de Lignóides e Policetídeos Nos Frutos de Virola elongata (Benth.) Warb. (Myristicaceae)*. Tese de doutoramento. Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
- 114 – Greger H. and Hofer O. (1980) *Tetrahedron* **36**: 3551.
- 115 – Becker E. D. and Beroza N. (1962) *Tetrahedron Letters* **4**:157.
- 116 – Atal C. K., Dhar K. L. and Pelter A. (1967) *Journal of Chemical Society (C)* 2228.
- 117 – Lindsay H., Briggs R., Cambie C. and Couch R. A. F. (1968) *Journal of Chemical Society (C)* 3042.
- 118 – Ludwig C. H., Nist B. J. and McCarthy (1964) *Journal of American Chemical Society* **86**: 1186.
- 119 – Duh C. Y., Phoebe J. C. H., Pezzuto J. M., Kinghorn A D. and Farnsworth N. R. (1986) *Journal of Natural Production* **49**:706.
- 120 – Klemm H.L. (1978) *Substituted Furans*. In: Rao C. B. S. (ed.) *Chemistry of Lignans*, University Press, Adhra Pradesh, India, p: 175.
- 121 – Ayoub S.M.H. and Kingston D. G. I. (1984) *Journal of Natural Products* **47**: 875.
- 122 – Agrawal P. K. and Thakur P. S. (1985) *Magnetic Resonance in Chemistry* **23**: 389.
- 123 – Luckner M. (1984) *Secondary Metabolism in Microorganism, Plants and Animals*, 2th, Springer-Verlag, N. Y., p: 444.
- 124 – Funk C. and Brodelius P. E. (1990) *Plant Physiology* **94**: 95.
- 125 – Funk C. and Brodelius P. E. (1990) *Plant Physiology* **94**: 101.
- 126 – Guern J., Renaudin J. P. and Brown S. C. (1987) *The Compartmentation of Secondary Metabolites in Plant Cell Cultures*. In: Vasil I. and Constabel F (eds.) *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, **vol. 4**, Academic Press, INC, London, p: 43.