UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Iryanthera sagotiana*
e *Iryanthera lancifolia*

Dulce Helena Siqueira Silva
TESE DE DOUTORADO

Orientador: Prof. Dr. Massayoshi Yoshida

São Paulo
-1997-

**“Constituintes Químicos de *Iryanthera Sagotiana* e
Iryanthera Lancifolia”**

DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA

**Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção
do grau de Doutor em Ciências - Área: Química Orgânica**

Aprovado por:

**Prof. Dr. MASSAYOSHI YOSHIDA
IQ - USP
(Orientador e Presidente)**

**Profa. Dra. HELENA MARIA CARVALHO FERRAZ
IQ - USP**

**Profa. Dra. DAISY DE BRITO REZENDE
IQ - USP**

**Profa. Dra. LUCIA MARIA XAVIER LOPES
IQ - UNESP - Araraquara**

**Prof. Dr. JOAO BATISTA FERNANDES
UFSCar**

**SÃO PAULO
27 DE FEVEREIRO DE 1997**

*O presente trabalho foi realizado sob a orientação do
Prof. Dr. MASSAYOSHI YOSHIDA*

Agradecimentos Especiais

Aos meus pais Oscar e Dulce, pelo amor e apoio incondicionais, inclusive na ajuda a cuidar dos meus filhos, permitindo uma dedicação maior à elaboração desta tese.

Às minhas irmãs Elisa e Cecília, queridas amigas.

À vó Didi, pelo exemplo de vida.

Ao Luiz, pelo amor e pela persistência.

Ao Gabriel e Luiza, que conseguem a incrível proeza de, ao consumirem tanto do meu tempo, terem a capacidade de inundar-me de prazer e energia para o trabalho, o riso, a vida.

Agradecimentos

Ao Professor Massayoshi Yoshida, pelos ensinamentos, pela liberdade na condução do trabalho e pela amizade.

Aos Professores Nídia Franca Roque e Massuo Jorge Kato pelas valiosas discussões, colaboração e amizade.

À Professora Sílvia B. M. Barros e à Solange S. Davino pelos ensaios de atividade antioxidante.

Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais, pelas discussões enriquecedoras e convívio super agradável, em especial à Ana Luíza, Bebel, Beto, Cecília, Clara, Cláudia, Luciana Retz e ao Alberto, inclusive pela ajuda no HPLC.

Aos funcionários da Central Analítica, pela obtenção dos espectros de RMN e de Massas, em especial ao Roque, pelos espectros bidimensionais e experimentos de NOE diferencial.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

Índice Geral

Índice de Esquemas	iii
Índice de Figuras	iv
Índice de Tabelas	ix
Abreviaturas e Símbolos	xi
Resumo	xiii
Abstract	xiv
 INTRODUÇÃO	 01
1. O gênero <i>Iryanthera</i>	02
2. Antioxidantes	15
 PARTE EXPERIMENTAL	 19
1. Coleta e Preparação dos Extratos Vegetais	20
2. Fracionamento Cromatográfico	21
2.1. Inflorescências de <i>I. sagotiana</i>	21
2.2. Folhas de <i>I. sagotiana</i>	22
2.3. Pericarpos de <i>I. lancifolia</i>	22
2.4. Inflorescências de <i>I. lancifolia</i>	23
3. Reações de Derivatização	31
3.1. Acetilação	31
3.2. Epoxidação	32
4. Especificação dos Instrumentos, Materiais e Métodos	33
5. Dados Físicos e Espectroscópicos das Substâncias Isoladas	35

6. Ensaio farmacológico para medida de Atividade Antioxidante	40
6.1 Inibição da oxidação de β -caroteno	40
6.2 Medidas de atividade antioxidante por MDA e QL	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
1. Substâncias isoladas de <i>I. sagotiana</i> e <i>I. lancifolia</i>	44
2. Identificação e determinação estrutural das substâncias isoladas	47
2.1. Diidrochalconas	47
2.1.1. Identificação de 1 , 2 , 3 e 4	47
2.1.2. Diidrochalcona glicosilada 5	51
2.1.3. Diidrochalcona dimérica 6	55
2.2. Flavonóis 7 e 8	58
2.3. Diidroflavonóis 9 a 12	60
2.4. Flavonolignóis 13 a 15	65
2.4.1. Estudo Estereoquímico de 13 e 14	72
2.5. Lactonas Policetídicas 16 a 18	78
2.6. <i>p</i> -Hidroxibenzaldeído e Ácido diidro- <i>p</i> -cumárico	85
2.7. Tocotrienol 21	87
2.8. Neolignana 22	89
2.9. Esteróide glicosilado 23	92
3. Atividade Antioxidante	95
CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
ESPECTROS DE RMN	100
BIBLIOGRAFIA	144

ÍNDICE de ESQUEMAS

ESQUEMA 1:	Fracionamento cromatográfico das inflorescências de <i>I. sagotiana</i>	26
ESQUEMA 2:	Fracionamento cromatográfico das folhas de <i>I. sagotiana</i>	28
ESQUEMA 3:	Fracionamento cromatográfico dos pericarpos de <i>I. lancifolia</i> .	29
ESQUEMA 4:	Fracionamento cromatográfico das inflorescências de <i>I. lancifolia</i> .	30
ESQUEMA 5:	Interpretação do EMIE obtido para as substâncias 1, 2, 3 e 4.	50
ESQUEMA 6:	Interpretação do EMIE obtido para a substância 5.	53
ESQUEMA 7:	Interpretação do EMIE obtido para a substância 6.	57
ESQUEMA 8:	Interpretação do EMIE obtido para a substância 13, 14 e 15.	71
ESQUEMA 9:	Interpretação do EMIE obtido para a substância 16.	80
ESQUEMA 10:	Interpretação do EMIE obtido para o derivado epoxidado 16a.	81
ESQUEMA 11:	Interpretação do EMIE obtido para a substância 18.	84
ESQUEMA 12:	Interpretação do EMIE obtido para a substância 21.	88

ÍNDICE de FIGURAS

FIGURA 1:	Espectro de RMN de ^1H de 1 (200 MHz; CDCl_3).	101
FIGURA 2:	Espectro de RMN de ^{13}C de 1 (50 MHz, CDCl_3).	101
FIGURA 3:	Espectro de NOE diferencial de 1 .	102
FIGURA 4:	Espectro de RMN de ^1H de 2 (200 MHz; CDCl_3).	103
FIGURA 5:	Espectro de NOE diferencial de 2 .	104
FIGURA 6:	Espectro de RMN de ^1H de 3 (200 MHz; CDCl_3).	105
FIGURA 7:	Espectro de RMN de ^1H de 4 (200 MHz; DMSO-d_6).	105
FIGURA 8:	Espectro de RMN de ^{13}C (PND) de 3 (50 MHz, DMSO-d_6).	106
FIGURA 9:	Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135°) de 3 (50 MHz, DMSO-d_6).	106
FIGURA 10:	Espectro de RMN de ^1H de 5 (200 MHz; $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$).	107
FIGURA 11:	Espectro de RMN de ^{13}C (PND) de 5 (50 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$).	107
FIGURA 12:	Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135°) de 5 (50 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$).	108
FIGURA 13:	Espectro de RMN de ^1H de 6 (200 MHz; $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$).	108
FIGURA 14:	Espectro de RMN de ^{13}C (PND) de 6 (50 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$).	109
FIGURA 15:	Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135°) de 6 (50 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$).	109
FIGURA 16:	Espectro de RMN de ^1H de 7 (200 MHz; $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$).	110
FIGURA 17:	Espectro de RMN de ^{13}C (PND) de 7 (50 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$).	110

FIGURA 18:	Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135°) de 7 (50 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$).	111
FIGURA 19:	Espectro de RMN de ^1H de 8 (200 MHz; DMSO-d_6).	111
FIGURA 20:	Espectro de RMN de ^{13}C (PND) de 8 (50 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$).	112
FIGURA 21:	Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135°) de 8 (50 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$).	112
FIGURA 22:	Espectro de RMN bidimensional ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) de 8 (200 MHz; DMSO-d_6).	113
FIGURA 23:	Espectro de RMN de ^1H de 9 (200 MHz; $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$).	114
FIGURA 24:	Espectro de RMN de ^{13}C (PND) de 9 (50 MHz, DMSO-d_6).	114
FIGURA 25:	Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135°) de 9 (50 MHz, DMSO-d_6).	115
FIGURA 26:	Espectro de RMN de ^1H de 10 (200 MHz; $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$).	115
FIGURA 27:	Espectro de RMN de ^1H de 9 + 11 (200 MHz; DMSO-d_6).	116
FIGURA 28:	Espectro de RMN de ^{13}C (PND) de 9 + 11 (50 MHz, DMSO-d_6).	116
FIGURA 29:	Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135°) de 9 + 11 (50 MHz, DMSO-d_6).	117
FIGURA 30:	Espectro de RMN bidimensional ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) de 9 + 11 (200 MHz; DMSO-d_6).	118
FIGURA 31:	Espectro de RMN de ^1H de 10 + 12 (200 MHz; DMSO-d_6).	119
FIGURA 32:	Espectro de RMN de ^1H de 13 (200 MHz; acetona- d_6).	120

FIGURA 33:	Expansão do espectro de RMN de ^1H de 13 (200 MHz; metanol- d_4).	120
FIGURA 34:	Espectro de RMN bidimensional ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) de 13 (200 MHz; metanol- d_4).	121
FIGURA 35:	Espectro de RMN de ^{13}C (PND) de 13 (50 MHz, acetona- d_6).	122
FIGURA 36:	Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135°) de 13 (50 MHz, acetona- d_6).	122
FIGURA 37:	Espectro de NOE diferencial de 13 .	123
FIGURA 37	(cont.): Espectro de NOE diferencial de 13 .	124
FIGURA 38:	Espectro de RMN de ^1H de 14 (200 MHz; CDCl_3 + DMSO- d_6).	125
FIGURA 39:	Espectro de RMN bidimensional ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) de 14 (200 MHz; CDCl_3 + DMSO- d_6).	126
FIGURA 40:	Espectro de RMN de ^{13}C (PND) de 14 (50 MHz, CDCl_3 + DMSO- d_6).	127
FIGURA 41:	Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135°) de 14 (50 MHz, CDCl_3 + DMSO- d_6).	127
FIGURA 42:	Espectro de RMN bidimensional ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) de 14 (CDCl_3 + DMSO- d_6).	128
FIGURA 43:	Espectro de NOE diferencial de 14 .	129
FIGURA 44:	Espectro de RMN de ^1H de 15 (200 MHz; CDCl_3 + DMSO- d_6).	130
FIGURA 45:	Expansão do espectro de RMN de ^1H de 15 (200 MHz; CDCl_3 + DMSO- d_6).	130
FIGURA 46:	Espectro de RMN bidimensional ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) de 15 (200 MHz; metanol- d_4).	131
FIGURA 47:	Espectro de RMN de ^1H de 16 (200 MHz; CDCl_3).	132

FIGURA 48:	Espectro de RMN de ^{13}C (PND) de 16 (50 MHz, CDCl_3).	132
FIGURA 49:	Espectro de RMN de ^1H de 16a (200 MHz; CDCl_3).	133
FIGURA 50:	Espectro de RMN de ^{13}C (PND) de 16a (50 MHz, CDCl_3).	133
FIGURA 51:	Espectro de RMN bidimensional ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) de 16a (200 MHz; CDCl_3).	134
FIGURA 52:	Espectro de RMN de ^1H de 16 + 17 (200 MHz; CDCl_3).	135
FIGURA 53:	Expansão do espectro de RMN de ^1H de 16 + 17 (200 MHz; CDCl_3).	135
FIGURA 54:	Espectro de RMN de ^{13}C (PND) de 16 + 17 (50 MHz, CDCl_3).	136
FIGURA 55:	Espectro de RMN de ^1H de 18 (200 MHz; CDCl_3).	136
FIGURA 56:	Espectro de RMN de ^1H de 19 (200 MHz; DMSO-d_6).	137
FIGURA 57:	Espectro de RMN de ^{13}C (PND) de 19 (75 MHz, DMSO-d_6).	137
FIGURA 58:	Espectro de RMN de ^1H de 20 (200 MHz; DMSO-d_6).	138
FIGURA 59:	Espectro de RMN de ^{13}C (PND) de 20 (50 MHz, DMSO-d_6).	138
FIGURA 60:	Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135°) de 20 (50 MHz, DMSO-d_6).	139
FIGURA 61:	Espectro de RMN de ^1H de 21 (200 MHz; CDCl_3).	139
FIGURA 62:	Espectro de RMN de ^1H de 22 (300 MHz; CDCl_3).	140
FIGURA 63:	Expansão do espectro de RMN de ^1H de 22 (300 MHz; CDCl_3).	140
FIGURA 64:	Espectro de RMN de ^1H de 23 (300 MHz; $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$).	141
FIGURA 65:	Expansão do espectro de RMN de ^1H de 23 (300 MHz; $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$).	141

FIGURA 66:	Espectro de RMN de ^{13}C (PND) de 23 (75 MHz, CDCl_3 + DMSO-d_6).	142
FIGURA 67:	Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (PND) de 23 (75 MHz, CDCl_3 + DMSO-d_6).	142
FIGURA 68:	Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135°) de 23 (75 MHz, CDCl_3 + DMSO-d_6).	143

ÍNDICE de TABELAS

TABELA 1:	Distribuição das espécies de miristicáceas na flora neotropical.	2
TABELA 2:	Espécies de <i>Iryanthera</i> presentes na flora brasileira .	5
TABELA 3:	Metabólitos especiais encontrados em espécies de <i>Iryanthera</i> .	6
TABELA 4:	Massas do material vegetal e dos extratos obtidos.	
TABELA 5:	Dados de RMN de ^1H de 1 , 2 , 3 e 4 (CDCl_3 + DMSO-d_6 ; 200 MHz).	48
TABELA 6:	Dados de RMN de ^{13}C de 1 e 3 (CDCl_3 + DMSO-d_6 ; 50,3 MHz).	48
TABELA 7:	Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de 5 (DMSO-d_6 ; 200 MHz e 50,3 MHz,	52
TABELA 8:	Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de 6 (CDCl_3 + DMSO-d_6 ; 200 MHz e 50,3 MHz	56
TABELA 9:	Dados de RMN de ^1H de 7 e 8 (DMSO-d_6 , 200 MHz).	58
TABELA 10:	Dados de RMN de ^{13}C de 7 e 8 (DMSO-d_6 ; 50,3 MHz).	59
TABELA 11:	Dados de RMN de ^1H de 9 , 10 , 11 e 12 (DMSO-d_6 , 200 MHz).	61
TABELA 12	Dados de RMN de ^1H da astilbina, neoastilbina, isoastilbina e neoisoastilbina.	63
TABELA 13:	Dados de RMN de ^{13}C de aromadendrina, 9 e 11 (DMSO-d_6 ;50,3 MHz).	64
TABELA 14:	Dados de RMN de ^1H de 13 , 14 e 15 (CDCl_3 + DMSO-d_6 ; 200 MHz).	67
TABELA 15:	Dados de RMN de ^1H de 13a , 14a e Iu-8a (CDCl_3 ; 200 MHz).	68

TABELA 16:	Dados de RMN de ^{13}C da parte flavonoídica de 13 e 14 (CDCl_3 + DMSO-d_6 ; 50,3 MHz) e Iu-8 (Acetona- d_6 ; 50,3 MHz).	69
TABELA 17:	Dados de RMN de ^{13}C da parte lignoídica de 13 e 14 (CDCl_3 + DMSO-d_6 ; 50,3 MHz) e Iu-8 (Acetona- d_6 ; 50,3 MHz).	70
TABELA 18:	Correlações observadas no espectro de RMN bidimensional $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ de 13 .	75
TABELA 19:	Correlações observadas no espectro de RMN bidimensional $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ de 14 .	75
TABELA 20:	Correlações observadas no espectro de RMN bidimensional $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ de 15 .	76
TABELA 21:	Correlações observadas no espectro de RMN bidimensional $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ de 14 .	76
TABELA 22:	Dados de RMN de ^1H de 16 , 17 , 18 e 16a .	78
TABELA 23:	Dados de RMN de ^{13}C de 16 e 17 .	79
TABELA 24:	Deslocamentos químicos de C-5 e C-1' em 3-OH- γ -lactonas.	82
TABELA 25:	Dados de RMN de ^1H de 19 e 20 (DMSO-d_6 ; 200 MHz)	85
TABELA 26:	Dados de RMN de ^{13}C de 19 e 20 (DMSO-d_6 ; 50,3 MHz).	86
TABELA 27:	Dados de RMN de ^1H de 21 (CDCl_3 , 200 MHz).	87
TABELA 28:	Dados de RMN de ^1H de 22 (CDCl_3 , 300 MHz).	90
TABELA 29:	Dados de RMN de ^1H de 23 (CDCl_3 + DMSO-d_6 , 300 MHz).	93
TABELA 30:	Dados de RMN de ^{13}C de 23 (CDCl_3 + DMSO-d_6 ; 75MHz)	94
TABELA 31	Comparação dos valores de Q1/2 ($\mu\text{g/ml}$) obtidos pelos métodos de medida de MDA e quimioluminescência para os ensaios <i>in vitro</i> .	96

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcO	acetoxila
AcOEt	acetato de etila
AcOH	ácido acético
CAOx	capacidade antioxidante
CC	cromatografia em coluna
CCDC	cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CG	cromatografia gasosa
CG/EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	correlated spectroscopy
d	dubleto
dd	duplo dubleto
ddd	duplo duplo dubleto
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
DCM	diclorometano
DMSO	dimetilsulfóxido
EM	espectrometria de massas
EMIE	espectro de massas com ionização por impacto de elétrons
EtOH	etanol
FAB-MS	espectro de massas obtido por bombardeamento de átomos rápidos
g	gramas
Glc	galactose

Glu	glicose
i-PrOH	iso-propanol
int. rel.	intensidade relativa
J	constante de acoplamento
m	multiplete
mult.	multiplicidade
[M] ⁺	pico do íon molecular
MCPBA	ácido <i>m</i> -cloroperbenzóico
Me	metila
MeOH	metanol
m/z	relação massa carga
nm	nanômetro
NOE	Nuclear Overhauser Effect
p.	página
pir.	piridina
Ram	ramnose
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	singleto
sl	singleto largo
PND	proton noise decoupling
RP	fase reversa
t	triplete
t def.	triplete deformado
UV	espectro na região do ultravioleta
δ	deslocamento químico
λ	comprimento de onda

RESUMO

O presente trabalho descreve o isolamento, identificação e determinação estrutural dos constituintes químicos das inflorescências e folhas de *Iryanthera sagotiana* e das inflorescências e pericarpos de *I. lancifolia*, espécies da família Myristicaceae, que ocorrem na Amazônia.

A investigação fitoquímica das inflorescências de *I. sagotiana* (Benth.) Warb. forneceu, após extração, partição com solventes orgânicos e fracionamentos cromatográficos, quatro diidrochalconas: 2',4'-diidroxi-4,6'-dimetoxidiidrochalcona (I); 2',4',6'-triidróxi-4-metoxidiidrochalcona; 2',4,4'-triidróxi-6'-metoxidiidrochalcona (II) e 2',4'-diidroxi-4-metóxi-6'-glicopiranosil-diidrochalcona, sendo as duas últimas, inéditas. Foram também isolados e identificados o benzaldeído, o ácido diidro-*p*-cumárico, dois flavonóis glicosilados: afzelina e quercitrina e quatro flavanonóis glicosilados: engeletina, isoengeletina, astilbina e isoastilbina. Das folhas de *I. sagotiana* foram isoladas as diidrochalconas I, II e o dímero 3',3''-bis-2',4',6'-triidróxi-4-metoxidiidrochalcona, inédito na literatura, além da afzelina, quercitrina, engeletina e astilbina.

Os pericarpos de *I. lancifolia* Ducke forneceram, após procedimentos cromatográficos, as diidrochalconas I e 2',4'-diidróxi-4',6'-dimetoxidiidrochalcona, inédita, e três flavonolignóides também inéditos: *rel* (1''R,2''R,3''S)-3'-(1'',4''-di-*p*-hidroxifenil-2'',3''-dimetilbutil)-2',4'-diidróxi-4,6'-dimetoxidiidrochalcona (III); *rel* (1''R,2''S,3''R)-3'-(1'',4''-di-*p*-hidroxifenil-2'',3''-dimetilbutil)-2',4'-diidróxi-4,6'-dimetoxidiidrochalcona (IV) e 5'-(1'',4''-di-*p*-hidroxifenil-2'',3''-dimetilbutil)-2',6'-diidróxi-4,4'-dimetoxidiidrochalcona. Foram isoladas também três lactonas policetílicas inéditas: (2S,3S,4S)-2-(7'-dodecenil)-3-hidróxi-4-metil-butanolido, *rel* (2S,3R,4S)-2-(7'-dodecenil)-3-hidróxi-4-metil-butanolido e 2-dodecil-3-hidróxi-4-metil-but-2-enolido, além do tocotrienol 2,8-dimetil-2-(4,8,12-trimetil-3,7,11-tridecatrienil)-6-cromanol e da lignana (8R,7'S,8'S)-4,4'-diidróxi-2,7'-ciclolignana. Das inflorescências de *I. lancifolia* foram isolados a diidrochalcona I, os flavonolignóides III e IV, o tocotrienol e o esteróide 3-β-O-β-D-galactopiranosilsitosterol.

A elucidação estrutural das substâncias isoladas foi baseada em métodos espectrométricos: EM, RMN de ¹H e ¹³C (PND e DEPT 135°), técnicas de RMN bidimensionais (HOMOCOSY e HETERO-COSY) e experimentos para a observação de NOE. Reações de acetilação e epoxidação foram efetuadas para se obterem derivados mais informativos.

As atividades antioxidantes da afzelina, da quercitrina, do flavonolignóide IV e do tocotrienol foram avaliadas em comparação com a atividade antioxidante da vitamina E, empregando-se a inibição da auto-oxidação de homogenato de cérebro como modelo experimental. A capacidade antioxidante foi medida pela produção de malonildialdeído

(MDA) e a concentração necessária para inibir 50% da autoxidação ($Q_{1/2}$) foi calculada. Os valores de $Q_{1/2}$ obtidos para afzelina, quercitrina, flavonolignóide, tocotrienol e vitamina E foram, respectivamente: 62,30; 2,29; 4,83; 1,08 e 11,20 μM . Estes ensaios foram realizados pela pesquisadora Dra. Solange C. Davino e pela professora Dra. Sílvia B. M. Barros, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

ABSTRACT

This work describes the isolation, identification and structural elucidation of chemical constituents from inflorescences and leaves of *Iryanthera sagotiana* (Myristicaceae) and from inflorescences and pericarps of *I. lancifolia*, collected in Amazon region.

After extraction and partition with organic solvents and chromatographic fractionation, phytochemical analysis of inflorescences of *I. sagotiana* (Benth.) Warb. afforded four dihydrochalcones: 2',4'-dihydroxy-4,6'-dimethoxydihydrochalcone (I); 2',4',6'-trihydroxy-4-methoxy-dihydrochalcone; and the new 2',4,4'-trihydroxy-6'-methoxy-dihydrochalcone (II) and 2',4'-dihydroxy-4-methoxy-6'-glucopyranosyl-dihydrochalcone. Benzaldehyde, dihydro-*p*-cumaric acid besides two glycosylated flavonols: afzelin and quercitrin and four glycosylated flavanonols: engeletin, isoengeletin, astilbin and isoastilbin were also isolated and identified. Leaves of *I. sagotiana* yielded dihydrochalcones I, II and the new dimer 3',3''-bis-2',4',6'-trihydroxy-4-methoxydihydrochalcone in addition to afzelin, quercitrin, engeletin and astilbin.

Pericarps of *I. lancifolia* Ducke afforded, after fractionation procedures, dihydrochalcones I e 2',4-dihydroxy-4',6'-dimethoxy-dihydrochalcone, which has not been reported in literature yet, as well as three new flavonolignoids: rel (1''R,2''R,3''S)-3'-(1'',4''-di-*p*-hydroxyphenyl-2'',3''-dimethylbutyl)-2',4'-dihydroxy-4,6'-dimethoxydihydrochalcone (III); rel (1''R,2''S,3''R)-3'-(1'',4''-di-*p*-hydroxyphenyl-2'',3''-dimethylbutyl)-2',4'-dihydroxy-4,6'-dimethoxydihydrochalcone (IV) e 5'-(1'',4''-di-*p*-hydroxyphenyl-2'',3''-dimethylbutyl)-2',6'-dihydroxy-4,4'-dimethoxy-dihydrochalcone. Three new polyketide lactones were also isolated: (2S,3S,4S)-2-(7'-dodecenyl)-3-hydroxy-4-methyl-butanolide, rel (2S,3R,4S)-2-(7'-dodecenyl)-3-hydroxy-4-methyl-butanolide e 2-dodecyl-3-hydroxy-4-methyl-but-2-enolide, besides tocotrienol 2,8-dimethyl-2-(4,8,12-trimethyl-3,7,11-tridecatrienyl)-6-cromanol and lignan (8R,7'S,8'S)-4,4'-dihydroxy-2,7'-cyclolignan. From inflorescences of *I. lancifolia*, dihydrochalcone I, flavonolignoids III e IV, tocotrienol and the steroid 3-β-O-β-D-galactopyranosylsitosterol were isolated.

Structural elucidation of the isolated compounds were based on spectrometric methods: MS, ¹H and ¹³C NMR (PND and DEPT 135°), bidimensional NMR techniques (HOMOCOSY e HETERO-COSY) as well as NOE experiments. Acetylation and epoxidation reactions were carried out in order to get more informative derivatives.

Antioxidant activities of afzelin, quercitrin, flavonolignoid IV and tocotrienol were evaluated in comparison with the antioxidant activity of vitamin E, using the inhibition of autoxidation of brain homogenates as a experimental model. The antioxidant capacity was measured by malondialdehyde (MDA) production and the necessary concentration to inhibit 50% of autoxidation (Q_{1/2}) was calculated. The following values of Q_{1/2} were obtained for afzelin, quercitrin, flavonolignoid, tocotrienol and vitamin E, respectively: 62,30; 2,29; 4,83; 1,08 e 11,20 μM.

Introdução

1. O gênero *Iryanthera*

A família Myristicaceae engloba cerca de 400 espécies agrupadas em 16 gêneros que se distribuem pelas florestas tropicais e equatoriais da Ásia, África e América [1]. No Brasil são encontrados cinco gêneros de Myristicaceae (TABELA 1), em particular na Amazônia, considerada o centro de origem e dispersão desta família na América [2].

TABELA 1: Distribuição das espécies de miristicáceas na flora neotropical.

Gênero	Total de espécies	Amazônia brasileira	Outras regiões do Brasil	Fora do Brasil
<i>Compsonaura</i>	10	5	-	5
<i>Diallynanthera</i>	7	1	-	6
<i>Iryanthera</i>	19	17	-	2
<i>Osteophloeum</i>	2	1	-	1
<i>Virola</i>	46	29	6	11
Total	84	53	6	25

As miristicáceas são todas plantas lenhosas, cuja casca interna costuma exsudar um líquido resinoso avermelhado, insolúvel, utilizado no preparo de rapés alucinogênicos [3, 4]. Suas flores são pequenas, dispostas em inflorescências, cujo pólen permite classificar o gênero *Iryanthera* como o mais evoluído dentre as miristicáceas neotropicais [5, 6]. Os frutos são constituídos pelo pericarpo lenhoso que envolve a semente, sendo esta recoberta parcial ou totalmente pelo arilo. Estas sementes têm alto teor de triglicerídeos e ácidos graxos, principalmente ácido mirístico (C₁₄), que são conhecidos como “sebo de ucuúba” e utilizados na indústria de cosméticos, sendo exportados pelo

Brasil [2]. Ucuúba é o nome genérico dado às espécies de miristicáceas amazônicas, com variações para designar algumas espécies: ucuúba branca para *Virola surinamensis* e ucuúba vermelha para *Virola sebifera*; cumala blanca para *Iryanthera lancifolia* e *I. grandis*, e cumala colorada para *I. paradoxa*, no Peru e ainda ucuúba punã para *I. ulei* [2, 4].

O arilo que recobre as sementes é o responsável pela atração visual dos dispersores (tucanos e outros pássaros da família Ramphastidae) em função do seu colorido intenso, sendo os mais comuns o vermelho (em *Virola*), o escarlate (em *Iryanthera*) e o alaranjado, provocado pela presença de licopeno e seus derivados. O arilo é inodoro, mas extremamente nutritivo e é separado da semente após ter sido engolido, já na moela do pássaro dispersor. A semente nua é então regurgitada, na maioria das vezes, em pleno voo, o que confere eficiência à sua dispersão e por conseguinte, à perpetuação da espécie [7].

Filogeneticamente, as miristicáceas são consideradas como uma das famílias mais primitivas das angiospermas e, ao lado de anonáceas, caneláceas, magnoliáceas e lauráceas integram a ordem das Magnoliales [2].

O interesse etnofarmacológico por miristicáceas partiu da descoberta de que algumas espécies do gênero *Virola* constituem a fonte do rapé yakee, parika ou epena, um narcótico alucinogênico poderoso utilizado por índios da região amazônica [8]. A sua análise fitoquímica evidenciou a presença de compostos indólicos alucinogênicos derivados de N,N-dimetiltriptamina e de β -carbolina [9], que são estruturalmente semelhantes à serotonina, um importante neurotransmissor cerebral.

dimetiltriptamina

6-metoxitetraidro- β -carbolina

As miristicáceas são usadas ainda com diversas finalidades pelos indígenas da Amazônia, por exemplo no preparo de veneno de flecha, como estimulante cerebral, no tratamento de infecções dermatológicas ou estomacais, reumatismo, tumores, etc [3]. Muitas das atividades biológicas sugeridas pelo uso popular foram comprovadas e atribuídas às substâncias presentes nos diversos tecidos das espécies de miristicáceas com base em estudos fitoquímicos e farmacológicos. Assim, o uso de emplastos de folhas de *Virola* e *Iryanthera* em tratamentos dermatológicos pôde ser justificado pela presença de neolignanas com reconhecida atividade fungicida ou fungistática [10] e de isoflavonóides com propriedades antimicrobianas [11]. As folhas de *Virola surinamensis* forneceram as neolignanas do tipo 8.O.4' surinamensina e virolina, que apresentaram atividade contra penetração de cercárias de *Schistosoma mansoni* [12]. Neolignanas com o esqueleto do ácido nordiidroguaiarético (NDGA), um potente agente antitumoral, foram isoladas do extrato clorofórmico de arilos e sementes de *Virola calophylla* [13] e apresentaram atividade larvicida sobre *Schistosoma mansoni* e moluscicida sobre *Biomphalaria glabrata*. O NDGA possui também intensa atividade antioxidante e tem sido usado para evitar o ranço em gorduras animais e vegetais, assim como a oxidação das vitaminas A e E [14]. Esta atividade é decorrente da presença de hidroxilas fenólicas em sua estrutura, capazes de sequestrar radicais livres do meio, já que o radical assim gerado pode ser bem estabilizado através de ressonância pelo anel aromático. Esta propriedade é acentuada pela presença de outro grupo hidroxila em *orto*, caracterizando a subunidade catecol.

R=H virolina

R=OH surinamensina

NDGA

O gênero *Iryanthera*, depois de *Virola*, é o maior em relação ao número de espécies, tendo sido estudadas 11, de um total de 22 espécies de *Iryanthera* conhecidas no Brasil até o momento (TABELA 2) [2]. Nos diversos tecidos estudados, verificou-se a presença de metabólitos especiais pertencentes a várias classes, como lactonas, neolignanas, flavonolignóides e principalmente flavonóides dos tipos virolano, flavana, diidrochalcona e chalcona (TABELA 3).

TABELA 2: Espécies de *Iryanthera* presentes na flora brasileira .

Espécies estudadas quimicamente		
<i>I. coriaceae</i> Ducke	<i>I. juruensis</i> Warb.	<i>I. sagotiana</i> (Benth.) Warb.
<i>I. duckei</i>	<i>I. laevis</i> Markgraf	<i>I. tricornis</i> Ducke
<i>I. elliptica</i> Ducke	<i>I. paraensis</i> Huber	<i>I. ulei</i> Warb.
<i>I. grandis</i> Ducke	<i>I. polyneura</i> Huber	
Espécies não estudadas quimicamente		
<i>I. campinae</i> W. Rodr.		<i>I. crassifolia</i> A.C. Smith
<i>I. hostmanii</i> (Benth.) Warb.		<i>I. inpaie</i> W. Rodr.
<i>I. lancifolia</i> Ducke		<i>I. macrophylla</i> Warb.
<i>I. megistocarpa</i> A. Gentry		<i>I. obovata</i>
<i>I. olacoides</i> (A.C. Smith) A.C. Smith		<i>I. paradoxa</i> (Schw.) Warb.
<i>I. tessmanii</i> Markgraf		

Através do levantamento bibliográfico apresentado na TABELA 3 percebe-se, dentre as espécies de *Iryanthera* estudadas quimicamente, um predomínio de virolanos, flavanas, diidrochalconas e policetídeos na madeira e casca do tronco e de policetídeos, diidrochalconas e flavonolignóides nos frutos.

TABELA 3: Metabólitos especiais encontrados em espécies de *Iryanthera*.

FLAVANAS

R ¹	R ²	R ³	espécie	tecido	ref.
H	H	OMe	<i>I. elliptica</i>	madeira	15
					16
			<i>I. grandis</i>	madeira	17
Me	OMe	H	<i>I. grandis</i>	madeira	17
Me	OMe	OH	<i>I. coriaceae</i>	madeira	16

R ¹	R ²	R ³	R ⁴	espécie	tecido	ref.
H	Me	H	Me	<i>I. laevis</i>	madeira	18
Me	H	H	Me	<i>I. laevis</i>	madeira	18
OH	Me	Me	Me	<i>I. laevis</i>	madeira	18
H	H	Me	H	<i>I. laevis</i>	madeira	18
				<i>I. juruensis</i>	madeira	16

CHALCONAS

R			
H	<i>I. polyneura</i>	madeira	19
Me	<i>I. polyneura</i>	madeira	19

DIIDROCHALCONAS

R ¹	R ²	R ³			
H	H	OMe	<i>I. polyneura</i>	madeira	19
OMe	Me	H	<i>I. grandis</i>	fruto	20
			<i>I. laevis</i>	madeira	18,21,22
			<i>I. paraensis</i>	casca	23
			<i>I. sagotiana</i>	casca	24
			<i>I. ulei</i>	madeira	26
			<i>I. ulei</i>	casca	23
OMe	Me	OMe	<i>I. laevis</i>	casca	25
			<i>I. ulei</i>	casca	26
OMe	-OCH ₂ -		<i>I. laevis</i>	casca	25
			<i>I. sagotiana</i>	casca	24
OH	Me	H	<i>I. laevis</i>	fruto	21

VIROLANOS

R¹ R² R³
Me H H

<i>I. coriaceae</i>	madeira	27
<i>I. paraensis</i>	madeira	28
<i>I. polyneura</i>	madeira	19

H H H

<i>I. coriaceae</i>	madeira	27
<i>I. grandis</i>	madeira	17
<i>I. paraensis</i>	madeira	28
<i>I. polyneura</i>	madeira	19
<i>I. tricornis</i>	madeira	28

H H OMe

<i>I. grandis</i>	madeira	17
-------------------	---------	----

R¹ R²
H H

<i>I. coriaceae</i>	madeira	27
<i>I. elliptica</i>	madeira	15
<i>I. paraensis</i>	madeira	28
<i>I. tricornis</i>	madeira	28

Me OH

<i>I. grandis</i>	madeira	17
-------------------	---------	----

R¹ R² R³
Me H H

<i>I. coriaceae</i>	madeira	27
---------------------	---------	----

H OH Me

<i>I. coriaceae</i>	madeira	27
<i>I. grandis</i>	madeira	17
<i>I. laevis</i>	madeira	18
<i>I. parensis</i>	madeira	28
<i>I. tricornis</i>	madeira	28
<i>I. ulei</i>	madeira	26

*

R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
H	Me	Me	H	H

<i>I. coriaceae</i>	madeira	27
<i>I. laevis</i>	madeira	18
<i>I. ulei</i>	madeira	26

H	H	Me	H	Me
---	---	----	---	----

<i>I. laevis</i>	madeira	18
<i>I. paraensis</i>	madeira	28
<i>I. polyneura</i>	madeira	19
<i>I. ulei</i>	madeira	26

H	Me	H	Me	H
---	----	---	----	---

<i>I. laevis</i>	madeira	18
<i>I. ulei</i>	madeira	26

OMe	Me	Me	H	H
-----	----	----	---	---

<i>I. ulei</i>	madeira	26
----------------	---------	----

VIROLANOL

<i>I. duckei</i>		29
------------------	--	----

ESPIROELIPTINA

<i>I. elliptica</i>	madeira	15
---------------------	---------	----

LACTONAS

n
17

I. juruensis
I. ulei

madeira
madeira

30
3

n
13
15

I. juruensis
I. juruensis

madeira
madeira

31
31

n
15
17
19

I. juruensis
I. juruensis
I. juruensis

madeira
madeira
madeira

31
31
31

I. elliptica

madeira

15

n
7
9
15

I. paraensis
I. paraensis
I. grandis

fruto
fruto
fruto

32
32
30

n
7
9

I. paraensis
I. paraensis

fruto
fruto

32
32

I. juruensis

madeira

30

R

CH₃*I. duckei*

29

OCH₃*I. duckei*

29

TOCOTRIENÓIS

I. grandis

fruto

20

I. grandis

fruto

20

I. grandis

fruto

20

I. grandis

fruto

20

NEOLIGNANAS

I. grandis

fruto

20

I. duckei

arilo

33

I. duckei

arilo

33

I. paraensis

fruto

32

I. paraensis

casca

26

I. ulei

casca

26

FLAVONOLIGNÓIDES

R ¹	R ²	R ³			
OMe	OMe	H	<i>I. laevis</i>	fruto	23
			<i>I. ulei</i>	casca	23
OH	OMe	H	rel (7'R,8'R,8"S)	<i>I. grandis</i>	fruto
OH	OMe	H	rel (7'R,8'S,8"R)	<i>I. grandis</i>	fruto
OH	-OCH ₂ O-		rel (7'R,8'R,8"S)	<i>I. grandis</i>	fruto
OH	-OCH ₂ O-		rel (7'R,8'S,8"R)	<i>I. grandis</i>	fruto

I. laevis

fruto

23

R¹R²

H

H

I. laevis

fruto

23

I. ulei

casca

23

Me

H

I. laevis

fruto

23

I. ulei

casca

23

I. paraensis

casca

23

I. ulei

casca

23

2. Antioxidantes

Os processos oxidativos que ocorrem nas organelas celulares vegetais e o próprio oxigênio molecular com seu forte caráter de diradical geram espécies radicalares de oxigênio que causam danos às células. A oxidação das membranas lipídicas que protegem as organelas celulares leva à formação dos hidroperóxidos lipídicos que contribuem para a disfunção celular e estão estreitamente relacionados com diversas doenças, incluindo o câncer, aterosclerose e também aceleram o envelhecimento [35].

Contudo, a maioria dos organismos desenvolveu sistemas defensivos contra o stress oxidativo através da produção de antioxidantes endógenos que protegem os sistemas biológicos presentes no vegetal, como cloroplastos, membranas celulares, proteínas, DNA.

Os metabólitos secundários com atividade antioxidante incluem uma grande variedade de compostos fenólicos, carotenóides e substâncias contendo nitrogênio ou enxofre [36]. As reações em cadeia formadoras de radicais livres podem, em princípio, ser bloqueadas de duas maneiras: adicionando-se compostos que retardam a formação de radicais livres ou introduzindo-se substâncias que competem pelos radicais livres e os removem da reação. O primeiro mecanismo é exemplificado pela adição de carvão à borracha para evitar a penetração de luz no material. Nas plantas, pode-se exemplificar este mecanismo com algumas ceras foliares, que refletem a radiação ultravioleta evitando a formação de radicais livres [37]. O segundo mecanismo, mais estudado, consiste na adição de

pequenas quantidades de um material que reage rapidamente com os radicais livres de uma cadeia auto-oxidativa e a impede de progredir. Dentro desta visão, podem-se classificar os antioxidantes em:

1-Substâncias facilmente oxidáveis que interceptam e desativam os oxidantes, convertendo-os a produtos reacionais muito menos reativos. Os fenóis, ao reagirem com radicais peroxílicos, dão origem a um hidroperóxido, ROOH, e um radical fenoxílico, $\text{ArO}\cdot$, que é estabilizado por ressonância do elétron desemparelhado para as posições *orto* e *para* do anel. Além disso, grupos volumosos ou doadores de elétrons em *orto* aumentam a eficácia do fenol como antioxidante. Os radicais fenoxílicos também podem ser estabilizados por ligação de hidrogênio com um grupo hidroxila ou amino adjacente, como nos catecóis e catecolaminas, aumentando a sua estabilidade e a potência antioxidante. Estas características estão presentes em diversos antioxidantes naturais:

quercetina

miricetina

α -tocoferol

2-Substâncias coloridas que absorvem em comprimentos de onda potencialmente danosos, evitando que ocorra a oxidação. Os carotenóides, presentes em frutos e raízes comestíveis, são poli-isoprenos de cadeia longa poli-insaturadas que agem como antioxidantes por absorverem substancialmente luz UV e visível, e também porque reagem com muitos tipos de radicais livres formando radicais bastante estabilizados pela extensa conjugação das ligações duplas de suas cadeias carbônicas. Alguns flavonóides, além de agirem como antioxidantes por suas

características fenólicas, agem também como filtros de radiação, devido à extensão da conjugação das suas ligações [38, 39].

β -caroteno

kaempferol

3. Agentes complexantes que desativam íons metálicos catalisadores de diversos processos oxidativos. O sequestro de íons metálicos é uma possibilidade de mecanismo através do qual as plantas poderiam inibir reações radiculares catalisadas por oxi-redução, como a auto-oxidação de lipídios e proteínas. Muitas classes de compostos são potenciais agentes quelatantes de metais, sendo alguns adicionados a alimentos e outros produtos; sua atividade antioxidante provavelmente se deve a esta propriedade. Por exemplo, o ácido cítrico age como um antioxidante eficaz para óleos comestíveis, mesmo quando há excesso de íons metálicos no óleo. Outros ácidos policarboxílicos de origem vegetal, como os ácidos maleico, tartárico e malônico, também podem atuar como antioxidantes.

ácido cítrico

ácido tartárico

ácido malônico

A curcumina, um potente antioxidante extraído dos rizomas de *Curcuma longa*, tem seu mecanismo de ação baseado na quelação de íons metálicos pelo grupo β -dicetona central, além de atuar como sequestrador de radicais livres graças à sua parte fenólica. Esta característica de atuação bimodal também é frequente nos flavonóides [40]. A sua parte fenólica desempenha ação antioxidante através da remoção de radicais

livres do meio e concomitante estabilização do radical através da deslocalização no anel benzênico, por ressonância. Além disso, flavonóides que possuem os grupos (3-OH, 4-ceto) e/ou (5-OH, 4-ceto) podem formar complexos com íons metálicos, agindo como quelatantes de metal.

n-tritriacontan-16,18-diona

curcumina

robinetina

Além destes mecanismos de ação, há estudos *in vitro* que evidenciam a ação sinérgica do ácido ascórbico com α -tocoferol, regenerando-o a partir de radicais tocoferila. A reciclagem da vitamina E permite a ela agir eficientemente, apesar de estar presente em níveis baixos nas membranas celulares [41]. Outros estudos relatam o sinergismo entre α -tocoferol e os flavonolignóides silibina, silicristina e silidianina, isolados de *Sylibum marianum* (Asteraceae) [42].

A ocorrência expressiva de flavonóides e flavonolignóides em espécies de *Iryanthera* induziu a realização de um estudo fitoquímico dirigido à detecção, isolamento e determinação estrutural de substâncias com atividade antioxidante, escolhendo-se para esta finalidade *I. sagotiana* e *I. lancifolia*.

Parte Experimental

1-Coleta e preparação dos extratos vegetais

As inflorescências e folhas de *I. sagotiana* foram coletadas na Reserva Utinga (CPATU, Belém), os frutos de *I. lancifolia* foram coletados em local de mata inundada, na Reserva Gavião (WWF-INPA) e as inflorescências de *I. lancifolia*, na Reserva Cabo Frio (WWF-INPA), em 1989.

As inflorescências e folhas foram secas, moídas e extraídas primeiramente com hexano e depois com etanol em extrator Soxhlet. Os frutos de *I. lancifolia* estavam verdes e encontravam-se atacados por insetos, contendo a semente de tamanho e massa anormalmente reduzidos. Foram separados nas suas quatro partes: pericarpo, arilo, tegumento e semente. Os pericarpos foram secos, moídos e extraídos com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1. Os extratos obtidos foram concentrados em rotaevaporador e submetidos a partições com solventes orgânicos (ESQUEMAS 1, 2, 3 e 4).

TABELA 4: Quantidade do material vegetal e dos extratos obtidos (gramas):

	Material vegetal seco	Extrato Hexânico	Extrato Etanólico	Extrato $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$
<i>I. sagotiana</i>	inflorescências			
	170	1,9	9,0	-
	folhas			
	300	3,0	23,0	-
<i>I. lancifolia</i>	pericarpos			
	7	-	-	1,1
	inflorescências			
	70	1,0	3,8	-

2-Fracionamento Cromatográfico

Os fracionamentos cromatográficos dos extratos de inflorescências e folhas de *I. sagotiana* e de inflorescências e pericarpos de *I. lancifolia* encontram-se detalhados nos ESQUEMAS 1 a 4. Uma pequena discussão introdutória sobre pontos não abordados nestes esquemas, referentes ao fracionamento de cada extrato estudado, é feita a seguir:

2.1- Inflorescências de *I. sagotiana*

Após a partição do extrato etanólico das inflorescências de *I. sagotiana* ocorreu a precipitação de cristais amarelos na fase acetato de etila. Seus espectros de RMN de ^1H e ^{13}C mostraram tratar-se de uma mistura de flavonóides glicosilados. A análise por CCDC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 79:18:3) mostrou 2 manchas com R_f 0,3 e 0,2, cada uma das quais contendo 3 flavonóides glicosilados, conforme se constatou ao final do tratamento cromatográfico.

A análise por CCDC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 79:18:3) da fase clorofórmica deste extrato mostrou a presença das duas manchas referentes aos flavonóides glicosilados, além de outras atribuídas a substâncias menos polares. Esta fase foi, então, submetida a uma coluna de Amberlite XAD-2 eluída com a seqüência de solventes sugerida por Tomás-Barberan [43] a fim de se concentrarem os flavonóides glicosilados em algumas frações. A coluna em sílica foi usada com o intuito de se separarem os flavonóides de R_f 0,3 daqueles com R_f 0,2, após o que, cada uma destas 2 amostras foi aplicada em uma coluna de Sephadex LH-20.

As frações obtidas destas colunas tiveram que ser analisadas por RMN de ^1H , já que, para cada uma destas duas amostras, todas as frações obtidas apresentavam o mesmo Rf em CCDC de sílica.

O ajuste da fase móvel nas etapas envolvendo CLAE foi realizado em coluna analítica (250x4,6 mm) e posterior “scale-up” para coluna preparativa (250x22 mm)

2.2-Folhas de *I. sagotiana*

A análise por CCDC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 79:18:3) da fase clorofórmica do extrato etanólico das folhas de *I. sagotiana* evidenciou a semelhança da sua composição química com a das inflorescências de *I. sagotiana*. Isto possibilitou a realização de essencialmente o mesmo tratamento cromatográfico, dispensando-se, no entanto algumas etapas como a realização da CC em Sephadex, em vista de se terem obtido frações da CC em sílica “flash”, com um grau de pureza maior do que o obtido anteriormente, para as inflorescências, e que foi considerado suficiente para a análise das amostras por CLAE.

2.3-Pericarpos de *I. lancifolia*

Em vista da pequena quantidade de extrato, não se realizou partição com este material. A sua análise por CCDC (Benzeno/Acetona 8:2) evidenciou a grande concentração de substâncias com Rf 0,2, que foram posteriormente identificadas com flavonolignóides. A quantificação destas substâncias mostrou que elas constituíam cerca de 20% do extrato.

2.4-Inflorescências de *I. lancifolia*

A análise por CCDC dos extratos hexânico e etanólico das inflorescências de *I. lancifolia* revelou muitas semelhanças entre estes e o extrato dos pericarpos desta espécie, notadamente a mancha muito intensa com Rf 0,5 (Benzeno/Acetona 6:4) relativa aos flavonolignóides. Não se detectou a presença de substâncias de polaridade comparável à dos flavonóis e flavanonóis glicosilados (manchas amarelo intenso com Rf 0,2 e 0,3 em CCDC eluída com CHCl₃/MeOH/H₂O 79:18:3), o que tornou a CCDC destes extratos muito diferente dos extratos de inflorescências e folhas de *I. sagotiana*.

A análise por CCDC (CHCl₃/MeOH 9:1) das frações mais polares obtidas da CC da fração clorofórmica apresentaram manchas com Rf 0,3 que, ao serem reveladas com Ce(SO₄)₂ e aquecidas (~80 °C), adquiriram inicialmente cor azul celeste, que se tornavam lilás após cerca de 20 segundos. Isto consistiu um forte indício da presença de esteróide glicosilado nestas frações, o que se confirmou através do seu isolamento e identificação.

Árvore adulta de *I. lancifolia*.

Inflorescências em transição à fase de frutificação.

Fotografias gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Massuo J. Kato.

Fruto sadio de *Virola*.

Frutos de *I. lancifolia* atacados por insetos, mostrando
a semente de tamanho anormalmente reduzido.

Fotografias gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Massuo J. Kato.

ESQUEMA 1: Fracionamento cromatográfico das inflorescências de *I. sagotiana*.

- a secagem
- b moagem
- c extração em Soxhlet
- d concentração em rotaevaporador
- e adição de água (10% > 40%)
- f partição com solventes orgânicos (hexano, clorofórmio, acetato de etila)
- g coluna em Amberlite XAD-2 eluída com (H₂O; H₂O/MeOH 8:2; H₂O/MeOH 6:4; H₂O/MeOH 4:6; H₂O/MeOH 2:8; MeOH; hexano; acetona)
- h coluna “flash” em Si-60 (40-63 μ) 15x2,5cm eluída com CHCl₃/MeOH/H₂O 79:18:3
- i coluna “flash” em Si-60 (40-63 μ) 15x2,5cm eluída com hexano/CHCl₃ em gradiente > CHCl₃/MeOH em gradiente
- j coluna em Sephadex LH-20 eluída com MeOH/CHCl₃ 9:1
- k CLAE em coluna RP-8 (7 μ) 250x22 mm, eluída com MeOH (HOAc 3%)/H₂O 53:47; 8 mL/min; detecção a 254 nm
- l CLAE em coluna RP-8 (7 μ) 250x22 mm, eluída com MeOH (HOAc 2%)/H₂O 65:35; 8 mL/min; detecção a 254 nm
- m CLAE em coluna RP-8 (7 μ) 250x22 mm, eluída com MeOH (HOAc 3%)/H₂O 60:40; 8 mL/min; detecção a 254 nm
- n CCDP (Benzeno/Acetona 8:2), 2 desenvolvimentos.
- * números que indicam as frações trabalhadas

As frações não mencionadas não foram trabalhadas por serem constituídas de misturas de alta complexidade, não sendo possível o isolamento de substâncias puras em quantidade suficiente para as análises necessárias à determinação estrutural; ou por serem frações constituídas essencialmente por ácidos graxos e triglicerídeos.

ESQUEMA 2: Fracionamento cromatográfico das folhas de *I. sagotiana*.

- a secagem
 b moagem
 c extração em Soxhlet
 d concentração em rotaevaporador
 e adição de água (10% > 40%)
 f partição com solventes orgânicos (hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol)
 g cromatografia circular (Chromatotron) , eluída com hexano/AcOEt em gradiente
 h coluna "flash" em Si-60 (40-63 μ) 15x2,5cm eluída com CHCl₃/MeOH/H₂O em gradiente, utilizando-se 1 g da fase clorofórmica.
 i CLAE em coluna RP-8 (7 μ) 250x22 mm, eluída com MeOH (HOAc 2%)/H₂O 65:35; 8 mL/min; detecção a 254 nm
 j CCDP (CHCl₃/MeOH/H₂O 86:12:2)

ESQUEMA 3: Fracionamento cromatográfico dos pericarpos de *I. sagotiana*.

- a secagem
- b moagem
- c extração a frio
- d concentração em rotaevaporador
- e coluna "flash" em Si-60 (40-63 μ) 15x2,5cm eluída com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ em gradiente
- f CCDP eluída com Benzeno/Acetona 8:2
- g recristalização em $\text{CHCl}_3/\text{Hexano}$
- h CCDP (Benzeno:Acetona 8:2)
- i CLAE em coluna RP-18 (107 μ) 250x22 mm, eluída com MeOH (HOAc 2 %)/ H_2O 68:32; 8 mL/min; detecção a 254 nm
- j CLAE em coluna RP-18 (107 μ) 250x22 mm, eluída com $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 78:22; 8 mL/min; detecção a 254 nm

ESQUEMA 4: Fracionamento cromatográfico das inflorescências de *I. lancifolia*.

- a secagem
 b moagem
 c extração em Soxhlet
 d concentração em rotaevaporador
 e adição de água (10% > 40%)
 f partição com solventes orgânicos (hexano, clorofórmio, acetato de etila)
 g CCDP em Hexano/AcOEt 7:3, 2 desenvolvimentos.
 h CC filtrante, gradiente: Hexano/ CHCl₃/AcOEt/MeOH
 i coluna "flash" em Si-60 (40-63 μ) 15x2,5cm eluída com CHCl₃/MeOH em gradiente
 j CLAE em coluna RP-8 (7μ) 250x22 mm, eluída com MeOH /H₂O 78:22; 8 mL/min; detecção a 254 nm
 k coluna "flash" em Si-60 (40-63 μ) 15x2.5cm eluída com CHCl₃/MeOH em gradiente
 l CCDP em CHCl₃/MeOH 9:1.

3-Reações de Derivatização

3.1-Acetilação

Em frasco de 10 mL, adicionou-se anidrido acético (0,5 mL) e piridina (0,5 mL) a 5 mg de **13**, deixando-se em repouso por 24 h. A mistura foi, a seguir, vertida sobre água gelada (5 mL) e extraída com clorofórmio (3 x 5 mL). A fase clorofórmica foi lavada com solução de HCl 2% (3 x 5 mL) e em seguida com água (1 x 10 mL) e seca com sulfato de sódio anidro. O solvente foi removido em rotaevaporador a pressão reduzida, fornecendo 4 mg de **13a**.

A substância **14** (15 mg) foi submetida aos mesmos procedimentos, utilizando-se 1 mL de anidrido acético e 1 mL de piridina. Obteve-se 20 mg de uma mistura contendo a substância **14** peracetilada (**14a**) e a substância **14** com os grupos hidroxila em C-4, C-4', C-4'' e C-13 acetilados, enquanto o grupo hidroxila em C-11, quelatado com a carbonila em C-9, permaneceu livre (**14b**). Essa mistura foi submetida à separação por CLAE (MeOH/H₂O 78:22, coluna RP-18, 250 x 4,6 mm, 7 µ, 1 mL/mol, detecção a 280 nm) fornecendo **14a** (5 mg) e **14b** (4 mg).

3.2-Epoxidação

Em balão de fundo redondo de 25 mL, a substância **16** (6,4 mg) foi dissolvida em DCM gelado (2 mL). A seguir, uma solução de MCPBA (10 mg) em DCM (2 mL) também gelada foi gotejada sobre a

mistura reacional, esperando-se 1 h sob agitação. A finalização da reação foi monitorada por CCDC (Benzeno/AcOEt 8:2). Ao seu término, a solução da amostra foi extraída com soluções de NaHSO₃ a 5% e NaHCO₃ a 5% geladas e com água gelada. O solvente foi removido em rotaevaporador a pressão reduzida, obtendo-se a lactona epoxidada **16a** (7 mg).

4-Especificação dos materiais e equipamentos

O material vegetal foi moído em moinho de facas, modelo TE 840 da Marconi.

O grau de pureza dos solventes utilizados variou de acordo com a finalidade:

- para as extrações, partições e sistemas cromatográficos utilizaram-se solventes de grau P.A. das marcas Merck, Grupo Química, Vetec e Synth, e grau técnico (B. Herzog) submetido a destilação fracionada;
- para separações em CLAE utilizaram-se solventes desaerados e ultra-filtrados, grau espectroscópico da Merck e OmniSolv;

O tipo de fase estacionária utilizada variou de acordo com a separação desejada:

- para cromatografia em coluna filtrante sob pressão reduzida utilizou-se sílica Si-60 da Merck, partículas de 63-210 μm (art. 7734)
- para cromatografia em coluna (à pressão atmosférica) utilizou-se Sephadex LH-20 (25-100 μm) da Pharmacia e Amberlite XAD-2 (100-250 μm) da Aldrich previamente tratada com acetona a quente em Soxhlet.
- para cromatografia em coluna de sílica tipo “flash” utilizou-se como adsorvente Si 60 da Merck, partículas de 40-63 μm (art. 9385).
- para CCDC utilizou-se como adsorvente Si 60 G da Merck (art. 7731) com espessura de 0,25 e 0,50 mm e para CCDP utilizou-se como adsorvente Si 60 PF₂₅₄ da Merck (art. 7747) com espessura de 1,0 mm.

Para as revelações dos cromatogramas obtidos em placas comparativas utilizaram-se vapores de iodo, solução de sulfato cérico em ácido sulfúrico e/ou irradiação no UV (254 e 366 nm) e, em placas preparativas, foi utilizado irradiação no UV (254 e 366 nm).

A separação por CLAE foi realizada em coluna de fase reversa (base sílica derivatizada com octadecilsilano), 250 x 4,6 mm (analítica) e 250 X 22 mm (preparativa), partícula de 60 Å de poro, e diâmetro médio de 7mm, utilizando bomba quaternária Perkin Elmer Series 4 com detetor UV/VIS variável HP 1050 e estação de dados Perkin Elmer 3600, para condições analítica e preparativa.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram registrados em espectrômetros Bruker AC-200 operando respectivamente a 200 e 50,3 MHz e Bruker AC-300 operando respectivamente a 300 e 75 MHz utilizando como solventes CDCl_3 , CD_3OD , acetona- d_6 , DMSO-d_6 e piridina- d_5 da Aldrich ou Merck.

Os espectros de UV foram obtidos em espectrofotômetro UV/VIS Lambda 3B da Perkin Elmer, em MeOH grau de pureza espectroscópico.

Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetros HP 5988A Hewlett Packard (quadrupolo), ITD 800 Finnigan MAT (ion trap detector) e INCOS 50 Finnigan-Mat (quadrupolo) operados a baixa resolução, utilizando-se a técnica de impacto eletrônico a 70 ou 20 eV. As amostras foram injetadas via cromatógrafo gasoso (modelo Varian 3400, coluna DB-5, 30 m e 0,25 mm de diâmetro interno) acoplado ao espectrômetro de massas ou através de injeção direta.

As rotações específicas foram medidas em polarímetro digital JASCO DIP-370, filtro de Na.

5-Dados físicos complementares das substâncias isoladas de *I. sagotiana* e *I. lancifolia*

- **1** (2',4'-diidróxi-4,6'-dimetoxidiidrochalcona)

RMN de ^1H : TABELA 5

RMN de ^{13}C : TABELA 6

EMIE (70 eV) m/z (int. rel.): 302 $[\text{M}]^+$ (8), 167 (11), 163 (14), 152 (6), 134 (40), 121 (100).

- **2** (2',4'-diidróxi-4,6'-dimetoxidiidrochalcona)

RMN de ^1H : TABELA 5

EMIE (70 eV) m/z (int. rel.): 302 $[\text{M}]^+$ (9), 181 (14), 149 (5), 120 (46), 107 (100).

- **3** (2',4,4'-triidróxi-6'-metoxidiidrochalcona)

RMN de ^1H : TABELA 5

RMN de ^{13}C : TABELA 6

EMIE (70 eV) m/z (int. rel.): 288 $[\text{M}]^+$ (10), 167 (100), 152 (8), 140 (16), 120 (43), 107 (15), 77 (8).

- **4** (2',4',6'-triidróxi-4-metoxidiidrochalcona)

RMN de ^1H : TABELA 5

EMIE (70 eV) m/z (int. rel.): 288 $[\text{M}]^+$ (12), 153 (47), 134 (42), 121 (100)

- **5** (2',4'-diidroxí-4-metóxi-6'-glicopiranosil-diidrochalcona)

RMN de ^1H : TABELA 7

RMN de ^{13}C : TABELA 7

EMIE (70 eV) m/z (int. rel.): 288 $[\text{M}]^+$ - Glu (100), 287 (13), 286 (33), 271 (13), 270 (19), 256 (21), 239 (16), 167 (2), 163 (3), 153 (5), 134 (20), 121 (93), 77 (52).

- **6** (3',3''-bis-2',4',6'-triidróxi-4-metoxidiidrochalcona)

$[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -8^{\circ}$, $c=0,16$ em MeOH.

RMN de ^1H : TABELA 8

RMN de ^{13}C : TABELA 8

EMIE (70 eV) m/z (int. rel.): 288 $[\text{M}]^+$ - 286 (10), 270 (3), 239 (1), 167 (10), 163 (3), 153 (44), 134 (40), 121 (100).

EM-FAB 593 $[\text{M}]^+ + 18$ (14).

- **7** (afzelina) e **8** (quercitrina)

$[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -8^{\circ}$, $c=0,16$ em MeOH.

RMN de ^1H : TABELA 9

RMN de ^{13}C : TABELA 10

- **9** (engeletina), **10** (astilbina), **11** (isoengeletina), **12** (isoastilbina)

9: $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -21^{\circ}$, $c=0,80$ em MeOH.

10: $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -18^{\circ}$, $c=0,25$ em MeOH.

RMN de ^1H : TABELA 11

RMN de ^{13}C : TABELA 13

- **13** (*rel* (1^oR,2^oS,3^oR)-3'-(1^o,4^o-di-*p*-hidroxifenil-2^o,3^o-dimetilbutil)-2',4'-diidrôxi-4,6'-dimetoxidiidrochalcona)

RMN de ¹H : TABELA 14

RMN de ¹³C : TABELA 16, 17

EMIE (70 eV) m/z (int. rel.): 570 [M]⁺ (1), 407 (100), 302 (14), 287 (1), 268 (6), 245 (3), 167 (56), 163 (4), 162 (20), 161 (18), 147 (18), 134 (57), 121 (92), 107 (50), 91 (14), 77 (16).

- **13a**

RMN de ¹H : TABELA 15

RMN de ¹³C : TABELA 16, 17

- **14** (*rel* (1^oR,2^oR,3^oS)-3'-(1^o,4^o-di-*p*-hidroxifenil-2^o,3^o-dimetilbutil)-2',4'-diidrôxi-4,6'-dimetoxidiidrochalcona)

RMN de ¹H : TABELA 14

RMN de ¹³C : TABELA 16, 17

EMIE (70 eV) m/z (int. rel.): 570 [M]⁺ (1), 407 (100), 302 (12), 287 (1), 268 (4), 245 (4), 167 (25), 163 (2), 162 (10), 161 (10), 147 (10), 134 (22), 121 (58), 107 (23), 91 (5), 77 (7).

- **14a**

RMN de ¹H : TABELA 15

RMN de ¹³C : TABELA 16, 17

- **15** (5'-(1'',4''-di-*p*-hidroxifenil-2'',3''-dimetilbutil)-2',6'-diidrôxi-4,4'-dimetoxidiidrochalcona)

RMN de ^1H : TABELA 14

EMIE (70 eV) m/z (int. rel.): 570 $[\text{M}]^+$ (1), 407 (100), 302 (5), 287 (1), 268 (2), 245 (3), 167 (12). 163 (1), 162 (5), 161 (7), 147 (5), 134 (16), 121 (52), 107 (15), 91 (8), 77 (6).

- **16** ((2S,3S,4S)-2-(7'-dodecenil)-3-hidrôxi-4-metil-butanolido)

$[\alpha]_D^{21} = -9^0$, $c = 0,22$ em CHCl_3 .

RMN de ^1H : TABELA 22

RMN de ^{13}C : TABELA 23

EMIE (20 eV) m/z (int. rel.): 282 $[\text{M}]^+$ (1), 281 (5), 264 (1), 207 (21), 129 (73), 116 (100), 111 (28), 99 (23), 85 (9), 71 (8), 57 (41).

- **16a**

RMN de ^1H : TABELA 22

RMN de ^{13}C : TABELA 23

EMIE (70 eV) m/z (int. rel.): 298 $[\text{M}]^+$ (1), 280 (1), 213 (2), 185 (2), 171 (2), 129 (10), 127 (6), 115 (10), 111 (11), 99 (15), 85 (13), 71 (22), 57 (100).

- **17** (*rel* (2S,3R,4S)-2-(7'-dodecenil)-3-hidrôxi-4-metil-butanolido)

RMN de ^1H : TABELA 22

RMN de ^{13}C : TABELA 23

- **18** (2-dodecil-3-hidróxi-4-metil-but-2-enolido)

$[\alpha]_D^{21} = +14^0$, $c=0,18$ em CHCl_3 .

RMN de ^1H : TABELA 22

EMIE (70 eV) m/z (int. rel.): 282 $[\text{M}]^+$ (1), 225 (1), 183 (1), 127 (21), 114 (35), 99 (20), 85 (17), 71 (22), 57 (100).

- **19** (benzaldeído) e **20** (ácido diidro-*p*-cumárico)

RMN de ^1H : TABELA 25

RMN de ^{13}C : TABELA 26

- **21** (2,8-dimetil-2-(4,8,12-trimetil-3,7,11-tridecatrienil)-6-cromanol)

RMN de ^1H : TABELA 27

EMIE (70 eV) m/z (int. rel.): 396 $[\text{M}]^+$ (10), 217 (2), 205 (6), 177 (31), 149 (16), 137 (67), 121 (22), 109 (22), 107 (23), 93 (23), 91 (22), 79 (22), 77 (14), 69 (100).

- **22** ((8R,7'S,8'S)-4,4'-diidróxi-2,7'-ciclolignana)

$[\alpha]_D^{21} = -19^0$, $c=0,21$ em CHCl_3 .

RMN de ^1H : TABELA 28

- **23** (3- β -O- β -D-galactopiranosilsterol)

$[\alpha]_D^{21} = -48^0$, $c=0,39$ em MeOH.

RMN de ^1H : TABELA 29

RMN de ^{13}C : TABELA 30

6- Ensaio farmacológico para avaliação da atividade antioxidante *

A atividade antioxidante de extratos, frações e substâncias puras foi avaliada pelo “screening” com β -caroteno e por dois ensaios in vitro, descritos a seguir:

6.1- Inibição da oxidação do β -caroteno em presença de luz:

Antes de se iniciar os ensaios in vitro, realiza-se uma primeira triagem destes extratos através da cromatografia em camada delgada com revelação por β -caroteno. Essa metodologia, embora seja apenas qualitativa, é muito simples, prática e de custo baixo. Placas de cromatografia revestidas com sílica-gel G são ativadas a 100 °C por 15 minutos. Após a aplicação dos extratos ou frações, a cromatografia é desenvolvida com o sistema de solventes adequado à polaridade da amostra.

A revelação é efetuada com uma solução de β -caroteno em $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 1:2. As placas, após nebulização, são expostas à luz, permanecendo coradas as manchas que contenham substâncias com atividade antioxidante [44].

* Ensaio foram realizados pela pesquisadora Dra. Solange C. Davino e professora Dra. Sílvia B. M. Barros, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

6.2-Medida da atividade antioxidante in vitro através da inibição da autooxidação de homogenato de cérebro através da medida de malonildialdeído(MDA) e quimioluminescência (QL)*.

Para a obtenção do homogenato de cérebro, utilizam-se ratos adultos Wistar que, após anestesia com éter, são submetidos à laparotomia e o cérebro perfundido, através do coração, com tampão NaCl 140 mM, pH 7,4 a 4 °C.

Os cérebros são homogeneizados em quatro vezes seu peso no tampão acima e centrifugados por 15 minutos a 1000 rpm a 4 °C. O sobrenadante é imediatamente diluído em três vezes o seu volume com o mesmo tampão [45].

Homogenatos de cérebro, quando incubados em condições de oxigenação e temperatura, sofrem peroxidação espontânea que pode ser avaliada quer pela produção de malonildialdeído (MDA), através de medidas de TBARS (thiobarbituric acid reactants), quer pela medida de quimioluminescência.

- Medida de malonildialdeído (MDA)

Três mililitros do homogenato diluído são transferidos para erlenmeyers de 25 mL e incubados a 37 °C durante uma hora em banho de agitação. As medidas de TBARS são determinadas de acordo com o método descrito na literatura [47] e são realizadas na presença de diferentes concentrações dos extratos brutos e frações dissolvidas em solvente adequado. A capacidade antioxidante é calculada em porcentagem relativamente a controles aos quais não se adicionam extratos:

$$\text{CAOx (tbar)} = 100 \left[1 - \frac{(\text{TBAR})_{60} - (\text{TBAR})_0}{(\text{TBAR}_0)_{60} - (\text{TBAR}_0)_0} \right] \text{ onde,}$$

$(\text{TBAR}_0)_{60}$ e $(\text{TBAR})_{60}$ são os TBAR medidos após 60 minutos de incubação sem e com os extratos ou frações, respectivamente, e o $(\text{TBAR}_0)_0$ e $(\text{TBAR})_0$ representam os valores determinados antes da incubação.

Como parâmetro de comparação, são feitas medidas de capacidade antioxidante do α -tocoferol, diluído em EtOH 50 %.

-Medida da Quimioluminescência

A quimioluminescência de homogenatos de cérebro é medida em contador de cintilação líquida PACKARD 1300 R, como descrito na literatura [46].

Três mL do homogenato de cérebro diluído, contendo ou não os extratos ou frações, são contados por 60 minutos em um contador de cintilação no canal fora de coincidência a 25 °C [47, 48], sendo usado também como parâmetro de comparação, o α -tocoferol.

Resultados e Discussão

1. SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *I. sagotiana* e *I. lancifolia*

1 **2** **3** **4** **5** **6** **7**

R=H

8

R=OH

9

R=H

10

R=OH

11

R=H

12

R=OH

Glu=glicose; Ram=ramnose

13 *rel* (7'R,8'R,8"S)**14** *rel* (7'R,8'S,8"R) **15** **16** 2S,3S,4S**17** *rel* (2S,3R,4S) **18** **19** **20** **21** **22** **23**

Glc=galactose

Substâncias isoladas a partir de cada material vegetal estudado:

	1	2*	3*	4	5*	6*	7	8	9	10	11	12	13*	14*	15*
<i>I. sagotiana</i>															
inflorescências	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X			
folhas	X		X			X	X	X	X						
<i>I. lancifolia</i>															
pericarpos	X	X											X	X	X
inflorescências	X												X	X	
<i>I. sagotiana</i>															
inflorescências				X	X										
folhas															
<i>I. lancifolia</i>															
pericarpos	X	X	X			X	X								
inflorescências						X		X							

* Substâncias inéditas

2. Identificação e determinação estrutural das substâncias isoladas

2.1. Diidrochalconas

2.1.1. Diidrochalconas 1, 2, 3 e 4

As substâncias **1**, **2**, **3** e **4** foram identificadas através da análise dos seus dados de RMN de ^1H (TABELA 5, FIGURAS 1, 4, 6 e 7) e de ^{13}C (TABELA 6, FIGURAS 2, 8 e 9) e por comparação com dados da literatura [18, 20, 21]. As substâncias **2** e **3**, apesar de não terem sido ainda relatadas na literatura, possuem a estrutura básica, inclusive o padrão de oxigenação das diidrochalconas **1** e **4**, que serviram de modelo para a elucidação estrutural de **2** e **3**.

A distinção entre **1** e **2** foi conseguida através do espectro de NOE diferencial (FIGURAS 3 e 5) onde foi possível observar, para a substância **1**, incremento dos sinais de H-5' (δ 5,84) e de H-3/H-5 (δ 6,76) ao se irradiarem os grupos metoxílicos em C-6' e C-4, respectivamente. Além disso, observou-se NOE nos sinais de H-3' e H-5' ao se irradiar o grupo hidroxila em C-4' (δ 9,71). No caso da substância **2**, observou-se aumento nos sinais de H-3'(δ 6,01) e H-5' (δ 5,97) ao se irradiar o grupo metoxílico em C-4' e no sinal de H-5' ao se irradiar o grupo metoxílico em C-6'. Os prótons do anel aromático B não sofreram nenhuma influência ao se irradiar qualquer dos grupos metoxílicos, confirmando a estrutura proposta para a diidrochalcona **2**. Os fragmentos observados no EM (ESQUEMA 5) também confirmam as estruturas propostas.

TABELA 5: Dados de RMN de ^1H de **1**, **2**, **3** e **4** ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$; 200 MHz; δ , J em Hz).

H	1	2	3	4
α	3,17;t;	3,27;t;7,5	3,13;t;7,6	3,23;t;7,6
β	2,85;t;	2,91;t;7,5	2,73;t;7,6	2,80;t;7,6
5'	5,84;d;2,0	5,97;sl	5,87;d;2,1	5,81;sl
3'	5,94;d;2,0	6,01;sl	5,95;d;2,1	5,81;sl
3, 5	6,76;dm;8,7	6,82;d;8,6	6,65;d;8,4	6,81;d;8,5
2, 6	7,08;d;8,7	7,15;d;8,6	7,00;d;8,4	7,13;d;8,5
MeO-4	3,72;s	-	-	3,68;s
MeO-4'	-	3,77;s	-	-
MeO-6'	3,75;s	3,84;s	3,78;s	-
HO-4'	9,71;s	9,25;sl	-	-
HO-2'	13,90	13,94	13,95	13,90

TABELA 6: Dados de RMN de ^{13}C de **1** e **3** ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$; 50,3 MHz; δ)

C	1	3
α	45,9	45,9
β	29,0	29,8
1	133,7	131,8
2, 6	129,3	129,5
3, 5	113,8	115,4
4	157,8	155,7
1'	105,6	104,7
2'	163,2	163,4
3'	96,5	96,0
4'	163,4	165,1
5'	90,9	91,7
6'	167,2	166,4
MeO-4	55,2	-
MeO-6'	55,6	56,1
C=O	204,7	204,3

1 **2**

As substâncias **3** e **4** foram diferenciadas devido aos substituintes do anel A. Enquanto a substância **3** apresenta 2 dubletos em δ 5,87 e δ 5,95 para os prótons H-5' e H-3', respectivamente, o espectro de RMN de ^1H da substância **4** mostra apenas um singlete integrando para dois prótons nesta região do espectro, sugerindo que o anel A deve ser simetricamente substituído. Como o espectro de RMN de ^1H de cada uma destas substâncias apresenta sinal para apenas um grupo metoxílico, pôde-se localizá-lo em C-6' para a substância **3**, em função da observação dos fragmentos b, c e d (ESQUEMA 5) no seu EMIE; e em C-4, para a substância **4**, de tal forma que as observações feitas acima em relação aos sinais para H-3' e H-5' fossem respeitadas. Os EM de **3** e **4** confirmam estas proposições através dos fragmentos mostrados no ESQUEMA 5.

3 **4**

ESQUEMA 5: Interpretação do EM obtido para **1**, **2**, **3** e **4**.

	$[M]^+$	R^1	R^2	R^3
1	302 (8)	H	Me	Me
2	302 (9)	Me	Me	H
3	288 (10)	H	Me	H
4	288 (8)	H	H	Me

	a	b	c	d
	m/z	m/z	m/z	m/z
1	167 (11)	121 (100)	134 (40)	163 (14)
2	181 (14)	107 (100)	120 (46)	149 (5)
3	167 (100)	107 (15)	120 (43)	149 (1)
4	153 (47)	121 (100)	134 (42)	163 (2)

2.1.2. Diidrochalcona glicosilada

O espectro de RMN de ^1H de **5** mostra dois tripletos em δ 2,79 e δ 3,24 e dois dubletos em δ 6,78 e δ 7,14 (TABELA 7, FIGURA 10), caracterizando uma diidrochalcona com o anel B *para*-substituído. Os espectros de RMN de ^{13}C PND e DEPT 135 $^\circ$ confirmam esta estrutura parcial através dos sinais em δ 29,7 e δ 44,8 para os carbonos β e α , respectivamente, e dos sinais em δ 114,0 para C-3 e C-5 e em δ 129,7 para C-2 e C-6 (TABELA 7, FIGURAS 11 e 12). Um dubleto em δ 4,87 ($J=7,0$ Hz) no espectro de RMN de ^1H , além de multipletos entre δ 3,0 e 4,0 sugerem a presença de uma unidade β -O-glucosila ligada à diidrochalcona. Esta suposição foi confirmada pelos espectros de RMN de ^{13}C PND e DEPT 135 $^\circ$ que mostraram um sinal para C metilênico em δ 61,0, quatro sinais em torno de δ 70 para carbonos terciários e um sinal em δ 100,9 atribuído ao carbono anomérico (C-1'').

Estas observações aliadas ao fato de que o anel A não apresenta simetria ($\delta_{\text{H}3'}$ 5,89; $\delta_{\text{H}5'}$ 5,66; $\delta_{\text{C}3'}$ 98,0; $\delta_{\text{C}5'}$ 96,2) permitiram restringir a quatro o número de alternativas possíveis para esta diidrochalcona:

I **II** **III** **IV**

TABELA 7: Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e de ^{13}C (50 MHz) de **5** (DMSO- d_6 ; δ ; J em Hz).

H	δ	C	δ
α	3,24;m	α	44,8
β	2,79;t;7,4	β	29,7
3'	5,89;sl	1	134,1
5'	5,66;sl	2, 6	129,7
2, 6	7,14;d;8,5	3, 5	114,0
3, 5	6,78;d;8,5	4	158,0
MeO-	3,68;s	1'	104,0
glicose:		2'	161,2
1"	4,87;d;7,0	3'	98,0
2" a 6"	3,0-3,8;m	4'	166,3
		5'	96,2
		6'	157,0
		MeO-	55,4
		glicose:	
		1"	100,9
		2" a 5"	69,9/73,7/77,2/77,5
		6"	61,0

ESQUEMA 6: Interpretação do EMIE obtido para a substância **5** (70 eV).

A fragmentação observada no EM (ESQUEMA 6) permite posicionar o grupo metoxílico no anel B de **5**.

A presença de diidrochalconas glicosiladas no reino vegetal é bastante restrita, tendo sido encontradas apenas nas famílias Liliaceae, Salicaceae, Rosaceae e Ericaceae [49] e nas folhas de *Viburnum davidii* e *V. lantanoides*, de onde foram isolados o davidiosídeo e 4'-O-metildavidiosídeo [50, 51].

A comparação do valor de $[\alpha]_D$ para **5** ($[\alpha]_D = -42^\circ$) e para o davidiosídeo ($[\alpha]_D = -59^\circ$) permite inferir a configuração da unidade glicosídica como sendo da série D, definindo a estrutura desta diidrochalcona inédita na literatura como 4',6'-diidróxi-4-metóxi-2'-O- β -D-glicopiranosil-diidrochalcona.

2.1.3. Diidrochalcona dimérica

O espectro de RMN de ^1H da bis-diidrochalcona **6** mostra absorções características de diidrochalcona (δ 2,7-2,9;m e δ 3,5-3,6;m), além de dois dubletos em δ 6,70 e δ 7,05 de prótons aromáticos em anel *p*-substituído, atribuídos aos prótons do anel B (TABELA 8, FIGURA 13). A integração dos sinais do espectro de RMN de ^1H e a análise do espectro de RMN de ^{13}C PND e DEPT 135 $^\circ$ (FIGURA 14 e 15) evidenciaram, no entanto, a presença de apenas um próton aromático no anel A (δ 5,79; sl) e também a existência de apenas um C metínico no anel A (δ 94,5), o que levou à suposição de uma segunda unidade flavonoídica unida à primeira através de C-3'. O sinal atribuído a C-3' em δ 115,0 mostrou uma desblindagem de cerca de 20 ppm, quando comparado ao seu monômero (substância **4**) e apareceu como carbono quaternário, evidenciado pelo experimento de DEPT 135 $^\circ$. Os dados de RMN de ^{13}C são coerentes com a estrutura proposta e os picos com m/z 121 (100%) e 134 (40%) confirmaram o posicionamento do grupo metoxílico no anel B desta nova diidrochalcona dimérica (ESQUEMA 7). O espectro de massas por FAB apresentou um fragmento de m/z 593 (14) que foi atribuído ao pico do íon molecular mais 18 u referentes, provavelmente, a uma molécula de água ($[\text{M}]^+ + 18 + 1$).

A medida da rotação específica ($[\alpha]_D^{25} = -8^\circ$) mostrou tratar-se de uma molécula não planar e quiral, devido à restrição na rotação dos anéis aromáticos pentassubstituídos que sustentam a ligação 3',3'' entre as duas unidades de diidrochalcona que formam este dímero.

TABELA 8: Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e de ^{13}C (50,3 MHz) de **6** ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$; δ , J em Hz).

H	δ	C	δ
α	2,7-2,9; m	α	45,0
β	3,5-3,6;m	β	29,2
5	5,79;sl	1	133,4
3, 5	6,70;d;8,4	2, 6	128,8
2, 6	7,05;d;8,4	3, 5	113,1
		4	157,1
		1'	103,7
		2',6'	163,9
		3'	115,0
		4'	164,0
		5'	94,5
		MeO	54,6
		C=O	203,9

O primeiro exemplo de diidrochalcona dimérica foi isolado da casca do caule de *Brackenridgea zanguebarica* (Ochnaceae) [52], cujas raízes são usadas no tratamento de feridas na África do Sul. Este dímero foi denominado brackenina e é formado por duas unidades de diidroliquiritigenina ligadas através de seus C- α . A substância **6** é o segundo exemplo de diidrochalcona dimérica relatado na literatura e o primeiro exemplo de biflavonóide na família Myristicaceae.

brackenina

ESQUEMA 7: Interpretação do EMIE obtido para a substância **6** (70 eV).

2.2. Flavonóis

Os flavonóides glicosilados **7** e **8** foram identificados como afzelina e quercitrina, respectivamente, através dos seus dados de RMN de ^1H e ^{13}C e posterior confirmação com dados da literatura [53, 54, 55].

Os espectros de RMN de ^1H destes flavonóis mostram um dubleto em $\delta \sim 0,8$, integrando para 3 prótons, além de absorções em $\delta \sim 3$ a 4, sugerindo a presença de ramnose nestas substâncias (TABELA 9, FIGURAS 16 e 19). Os espectros de RMN de ^{13}C PND e DEPT 135 $^\circ$ mostram um sinal em δ 17,7 (grupo metílico) e absorções em torno de $\delta \sim 70$ (4 sinais) e $\delta \sim 100$ (carbono anomérico), confirmando a presença de ramnose nestas substâncias (TABELA 10, FIGURAS 17, 18, 20 e 21). A desproteção observada em C-2 (10,5 ppm para **7** e 10,0 ppm para **8**) e C-4 (1,9 ppm para **7** e 1,4 ppm para **8**) nestes flavonóis glicosilados quando comparados às suas agliconas: kaempferol e quercetina, respectivamente, está de acordo com dados da literatura (TABELA 10), [56, 57].

TABELA 9: Dados de RMN de ^1H de **7** e **8** (DMSO- d_6 , 200 MHz; δ , J em Hz).

H	7	8
6	6,36;d;1,9	6,38;d;1,9
8	6,16;d;1,9	6,19;d;1,9
2'	7,73;d;8,7	7,2;sl
3'	6,89;d;8,7	-
5'	6,89;d;8,7	6,85;d;8,2
6'	7,73;d;8,7	7,2;sl
HO-5	12,60;sl	12,64;s
Ramnose:		
1"	5,27;s	5,23;d;1,0
2",3",4",5"	3,0-3,2;m	3,1-4,0;m
6"	0,77;d;5,4	0,79;d;5,2

TABELA 10: Dados de RMN de ^{13}C de **7** e **8** (DMSO- d_6 ; 50,3 MHz; δ)

C	kaempferol	afzelina (7)	quercetina	quercitrina(8)
2	146,8	157,3	146,9	156,9
3	135,6	134,4	135,8	134,6
4	175,9	177,6	175,9	178,1
5	160,7	161,5	160,8	161,7
6	98,2	99,2	98,3	99,2
7	163,9	165,4	164,0	164,7
8	93,5	94,1	93,5	94,1
9	156,2	156,8	156,2	157,8
10	103,1	104,0	103,1	104,5
1'	121,7	120,8	122,1	121,1
2'	129,5	130,8	115,2	115,9
3'	115,4	115,7	145,1	145,6
4'	159,2	160,2	147,7	148,9
5'	115,4	115,7	115,7	116,0
6'	129,5	130,8	120,1	121,6
Ramnose:				
1"		102,0		102,2
2"		70,3		70,5
3"		70,6		70,8
4"		71,4		71,6
5"		70,9		71,0
6"		17,7		17,7

R=H afzelina (**7**)R=OH quercitrina (**8**)

R=H kaempferol

R=OH quercetina

2.3. Diidroflavonóis

Os flavanonóis glicosilados **9** a **12** foram identificados através da análise dos seus espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , além de comparação com dados da literatura [53, 54, 55]. Os espectros de RMN de ^1H de **9** e **11** mostram-se bastante parecidos com o da afzelina (**7**), com exceção da região entre δ 4,0 e δ 6,0 onde observam-se dois dubletos em δ 4,74 ($J=10,0$ Hz) e δ 5,27 ($J=2,1$ Hz) para **9** e dois dubletos em δ 4,15 ($J=2,1$ Hz) e δ 5,59 ($J=2,1$ Hz) para **11** (TABELA 11, FIGURAS 23, 26, 27, 31) característicos dos prótons H-3 e H-2 de diidroflavonóis. Estes dados levam à conclusão de que **9** e **11** constituem um par de diidroflavonóis diastereoisoméricos, resultantes da redução da afzelina. Da mesma forma pôde-se chegar à conclusão de que **10** e **12** formam um par de diastereoisômeros através do exame dos seus espectros de RMN de ^1H . Os dubletos em δ 4,63 ($J=9,9$ Hz) e δ 5,22 ($J=9,9$ Hz) correspondem aos prótons H-3 e H-2 de **10** e os dubletos em δ 4,18 ($J=2,4$ Hz) e δ 5,52 ($J=2,4$ Hz), aos prótons H-3 e H-2 de **12** (TABELA 11). Os compostos **10** e **12** possuem a estrutura de produtos reduzidos da quercitrina em C2-C3.

A distinção entre o par diastereomérico **9/11**, assim como entre **10/12**, foi, assim, realizada apenas com base nos deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos prótons H-2 e H-3 das agliconas [53, 58]. Os diidroflavonóis **9** e **10** apresentam os prótons H-2 e H-3 em *anti* ($\delta_{\text{H}2}\sim 5,2$ e $\delta_{\text{H}3}\sim 4,7$; $J=10$ Hz), enquanto **11** e **12** os apresentam em *syn* ($\delta_{\text{H}2}\sim 5,5$ e $\delta_{\text{H}3}\sim 4,1$; $J=2$ Hz).

TABELA 11: Dados de RMN de ^1H de **9**, **10**, **11** e **12** (DMSO- d_6 , 200 MHz; δ ; J em Hz).

H	9	10	11	12
2	5,27;d;10	5,22;d;9,8	5,59;d;2,1	5,52;d;2,4
3	4,74;d;10	4,63;d;9,9	4,15;d;2,1	4,18;d;2,4
6	5,90;d;2	5,88;d;2	5,95;d;2	5,88;d;2
8	5,87;d;2	5,86;d;2	5,92;d;2	5,86;d;2
2'	7,32;d;8	6,72;sl	7,25;d;8,6	6,70;sl
3'	6,78;d;8	-	6,75;d;8,6	-
5'	6,78;d;8	6,72;sl	6,75;d;8,6	6,70;sl
6'	7,32;d;8	6,87;sl	7,25;d;8,6	6,84;sl
HO-5	11,81;sl	11,80;s		11,70;s
Ramnose:				
1"	4,08;s	4,00;s	4,74;s	4,75;s
2"/3"/4"/5"	2,9-3,9;m	3,1-4,0;m	2,9-3,4;m	3,1-4,0;m
6"	1,03;d;6,2	1,03;d;6,0	0,78;d;6,2	0,82;d;5,8

Os dados espectroscópicos experimentais de **10** e **12** foram comparados com os da literatura [58] (TABELA 12), o que permitiu a determinação das configurações absolutas destes diidroflavonóis glicosilados, unicamente através da análise dos deslocamentos químicos dos prótons H-2 e H-3 da aglicona e dos prótons H-1" (anomérico) e H-6" (grupo metílico) da ramnose e da comparação dos valores de $[\alpha]_D$ destas substâncias com dados da literatura [55, 59].

Comparando-se os valores de deslocamentos químicos dos prótons anoméricos das substâncias **9** a **12** (TABELA 11), percebe-se que os prótons H-1" das substâncias **9** e **10** são bem mais blindados do que os das substâncias **11** e **12**. Em relação aos grupos metílicos da ramnose, observa-se o oposto, sendo mais desblindados os prótons metílicos de **9** e **10** do que os de **11** e **12**.

Estas diferenças nos deslocamentos químicos são devidas à desproteção anisotrópica exercida pelos grupos carbonílicos sobre os prótons metílicos de **9** e **10** e sobre os prótons anoméricos de **11** e **12**; e à

proteção anisotrópica do anel aromático B sobre os prótons anoméricos de **9** e **10** e sobre os grupos metílicos de **11** e **12**. Estes efeitos, por sua vez, são decorrentes da conformação *syn* entre os prótons H-3 e H-1", evidenciada pelo experimento NOESY [59], assim como da estereoquímica *anti* entre os prótons H-2 e H-3 da aglicona para as moléculas em que a configuração de C-2 e C-3 é 2R,3R (substâncias **9** e **10**) ou estereoquímica *syn* entre H-2 e H-3, quando a configuração de C-2 e C-3 é 2R,3S (substâncias **11** e **12**). Esta análise permitiu a identificação de **10** como sendo a astilbina (2R,3R-3-O-ramnosildiidroquercetina) e de **12** como sendo a isoastilbina (2R,3S-3-O-ramnosildiidroquercetina). O mesmo tipo de análise permitiu identificar a substância **9** com a engeletina (2R,3R-3-O-ramnosildiidrokaempferol) e **11** com a isoengeletina (2R,3S-3-O-ramnosildiidrokaempferol).

10 (2R,3R)

12 (2R,3S)

As substâncias **11** e **12** não puderam ser isoladas provavelmente devido a reações de isomerização, que devem ter ocorrido no meio levemente ácido usado nas separações por CLAE, seguido de aquecimento no rotaevaporador [53]. No entanto, isto não se constituiu num entrave para a identificação das substâncias **11** e **12**, já que os seus deslocamentos químicos puderam ser obtidos por subtração de espectros, pois se dispunha tanto dos espectros das misturas **9+11** e **10+12**, como dos espectros das substâncias puras **9** e **10**.

TABELA 12 : Dados de RMN de ^1H da astilbina (**II**), neoastilbina (**I**), isoastilbina (**III**) e neoisoastilbina (**IV**) (δ , J em Hz)

H	I ^a	II ^a	III ^a	I ^b	II ^b	III ^b	IV ^b	10	12
2	5,08;d;11,0	5,21;d;10,1	5,52;d;2,4	5,08;d;11,0	5,20;d;10,0	5,54;d;2,0	5,44;d;2,0	5,22;d;9,8	5,52;d;2,3
3	4,70;d;11,0	4,62;d;10,1	4,20;d;2,4	4,71;d;11,0	4,66;d;10,0	4,30;d;2,0	4,20;d;2,0	4,63;d;9,8	4,18;d;2,3
1"	4,96;d;1,2	4,03;d;1,0	4,78;d;1,2	5,19;d;2,0		5,00;d;2,0		4,00;s	4,75;s
6"	0,80;d;6,4	1,06;d;6,1	0,85;d;6,1	0,91;d;6,0	1,23;d;6,0	0,97;d;6,0	1,16;d;6,0	1,03;d;6,0	0,82;d;5,8

a: DMSO- d_6 , 500 MHz [58]

b: acetona- d_6 , 100 MHz [55]

I: (2S,3S)-3-O-ramnosil-diidroquercetina

II: (2R,3R)-3-O-ramnosil-diidroquercetina

III: (2R,3S)-3-O-ramnosil-diidroquercetina

IV: (2S,3R)-3-O-ramnosil-diidroquercetina

neoastilbina

astilbina

isoastilbina

neoisoastilbina

R=H

9

R=H

11

R=OH

10

R=OH

12

Os dados de RMN de ^{13}C para a engeletina (**9**) e isoengeletina (**11**) não constam da literatura. Os dados obtidos puderam ser atribuídos por comparação com os dados da aglicona aromadendrina. A desproteção observada para C-3 (2,6 ppm) e a proteção para C-2 (3,2 ppm), C-4 (3,4 ppm) e C-1' (2,6 ppm) da engeletina quando comparada à sua aglicona aromadendrina são coerentes com os dados da literatura [56, 57] (TABELA 13, FIGURAS 24, 25, 28, 29).

TABELA 13: Dados de RMN de ^{13}C de aromadendrina, **9** e **11** (DMSO- d_6 ; 50,3 MHz; δ)

C	aromadendrina	9	11
2	85,0	81,8	80,3
3	73,7	76,3	73,4
4	198,4	195,0	193,0
5	165,3	163,7	164,3
6	97,5	96,4	96,6
7	168,8	167,4	167,7
8	96,4	95,4	95,5
9	164,6	162,5	162,9
10	101,9	101,3	100,4
1'	129,4	126,8	126,1
2'	130,4	129,4	128,1
3'	116,3	115,5	115,2
4'	159,2	158,2	157,5
5'	116,3	115,5	115,2
6'	130,4	129,4	128,1
Ramnose:			
1"		100,6	98,8
2"		69,3	70,4
3"		70,4	73,4
4"		70,7	70,5
5"		71,9	71,4
6"		18,0	17,9

2.4 Flavonolignóides

As substâncias **13**, **14** e **15** são flavonolignóides resultantes do acoplamento de uma diidrochalcona (unidade flavonoídica) com uma neolignana diarilbutânica (unidade lignoídica).

A região de prótons aromáticos no espectro de RMN de ^1H mostrou absorções para 3 anéis *p*-substituídos além de um singlete em $\delta \sim 6,0$ referente a um próton aromático sofrendo influência de 3 substituintes oxigenados (2 em *orto* e 1 em *para*). Na região de prótons alifáticos verificou-se a presença de 2 tripletos em $\delta \sim 3,0$ integrando para 2 prótons cada, característicos de diidrochalcona, além de um dubleto em $\delta \sim 4,0$ sugerindo a presença de um próton dibenzílico e de 2 dubletos em $\delta < 1,0$ integrando para 3 prótons cada, referentes a 2 grupos metílicos sobre carbonos terciários. Observou-se também um sinal em $\delta \sim 14$ referente ao próton de hidroxila quelada com carbonila, 2 sinais para grupos metoxílicos aromáticos, além de outros sinais para prótons alifáticos em $\delta \sim 1,5$ a $3,0$ (TABELA 14, FIGURAS 32, 38, 44).

A partir destes dados foi possível propor a estrutura A para as substâncias **13** e **14**, análogas a **Iu-8**, isolada anteriormente dos frutos de *I. laevis* e da casca do tronco de *I. ulei* [23]. Estas substâncias diferem apenas nos sinais de prótons ligados ou próximos aos centros quirais, sugerindo tratar-se de um par diastereoisomérico. O estrutura B foi proposta para a substância **15**, cujos prótons do anel aromático D coalescem num único singlete por influência anisotrópica do anel B [23].

O posicionamento do segundo grupo metoxílico no C-13 da substância **15** se deveu ao fato de ele estar necessariamente vizinho a pelo menos um carbono aromático não substituído, caso contrário a coplanaridade do anel estaria prejudicada e o sinal do grupo metoxílico apareceria mais desprotegido [21, 60].

A comparação dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C das substâncias **13** e **14** acetiladas com os de **Iu-8** acetilada evidenciou diferenças estruturais que sugeriram que estas são substâncias com diferentes estereoquímicas (TABELAS 15, 16, 17 e FIGURAS 35, 40).

Os espectros de massas destas substâncias mostram o fragmento 121 (92% para **13**; 59% para **14**; 74% para **15**) que definem a posição de um grupo metoxílico em C-4; e o fragmento 163 (56% para **13**; 25% para **14**; 12% para **15**) que define a posição do outro grupo metoxílico em C-13 ou C-15, além do íon molecular M^+ 570 (1% para **13**, **14** e **15**) que corrobora as estruturas propostas (ESQUEMA 9). Os dados de RMN de ^{13}C estão mais de acordo com o posicionamento do grupo metoxílico em C-15, para as substâncias **13** e **14**; além disso confirmam as proposições feitas para as substâncias **13** e **14**, inclusive em relação ao fato de **13** e **14** formarem um par diastereomérico, já que as principais diferenças entre seus espectros de RMN de ^{13}C também são em torno dos sinais referentes aos centros quirais e em carbonos vizinhos a eles. A comparação destes dados com os de RMN de ^{13}C de **Iu-8** [23] (TABELA 17) permite concluir que a estereoquímica dos seus centros quirais também é diferente da estereoquímica das substâncias **13** e **14**.

TABELA 14: Dados de RMN de ^1H de **13**, **14** e **15** ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$; 200 MHz; δ ; J em Hz).

H	13	14	15
9'	0,68;d;6,9	0,65;d;6,6	0,74;d;6,6
9"	0,63;d;6,9	0,74;d;5,9	0,76;d;6,6
8"	1,7-1,9;m	1,7-1,9;m	1,5-1,7;m
7"a	2,35;dd;8,2;13,4	2,41;d;6,6	
7"b	2,50;dd;6,6;13,4	2,42;d;6,6	
8'	2,98;ddq;2,8;6,8 e 11,7	2,8-2,9;m	2,7-2,9;m
7	2,86;t;7,5	2,83;t;6,6	2,86;t;8,0
8	3,16;t;7,5	3,15;t;6,6	3,19;t;8,0
MeO-	3,68;s	3,58;s	3,74;s
MeO-	3,73;s	3,73;s	3,74;s
7'	4,15;d;11,6	4,39;d;11,0	4,37;d;11,0
H aromáticos			
14	5,81;s	5,64;s	5,89;s
	6,61;d;8,3	6,59;d;8,1	6,54;s
	6,67;d;8,1	6,71;d;8,8	6,66;d;8,1
	6,77;d;8,5	6,77;d;8,1	6,77;d;8,8
	6,88;d;8,1	6,88;d;8,1	7,11;d;8,1
	7,09;d;8,5	7,08;d;8,1	7,41;d;8,1
	7,30;d;8,3		
HO		7,85;sl	
HO		8,02;sl	
HO		8,73;sl	
HO-11	14,34;s	14,48;s	14,41;s

TABELA 15: Dados de RMN de ^1H das substâncias acetiladas **13a**, **14a** e **Iu-8a** (CDCl_3 ; 200 MHz; δ ; J em Hz).

H	13a	14a	Iu-8a
9'	0,83;d;7,4	0,64;d;6,8	0,65;d;6,8
9"	0,64;d;6,6	0,85;d;6,5	0,84;d;6,6
8"	1,6-1,8;m	1,9-2,1;m	1,6-2,2;m
7"	2,2-2,4;m	2,2-2,6;m	2,2-2,5;m
8'	2,9-3,0;m	2,9-3,0;m	1,6-2,2;m
7	2,86;t;7,6	2,89;t;7,0	2,9-3,1;m
8	3,24;t;7,6	3,09;t;7,0	2,9-3,1;m
MeO-	3,67;s	3,77;s	3,69;s
MeO-	3,71;s	3,86;s	3,76;s
7'	3,96;d;11,4	4,08;d;10,0	4,10;d;11,3
H aromáticos			
14	6,03;s	6,43;s	6,46;s
	6,77;d;8,5	6,83;sl	6,7-7,3;m
	6,83;d;7,5	7,03;d;8,4	
	6,88;d;7,7	7,16;d;8,0	
	7,02;d;7,7		
	7,07;d;7,5		
	7,29;d;8,5		
CH_3CO	2,17;s	2,25;s	
	2,22;s	2,31;s	

TABELA 16: Dados de RMN de ^{13}C da parte flavonoídica de **13** e **14** ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$; 50,3 MHz; δ) e **Iu-8** (Acetona- d_6 ; 50,3 MHz; δ) e dos respectivos derivados acetilados **13a**, **14a** e **Iu-8a** (CDCl_3 ; 50 MHz; δ)

C	13	14	Iu-8	13a	14a	Iu-8a
1	137,4	135,3	134,5	133,5	132,9	133,6
2, 6	129,9	130,1	130,1	129,3	129,3	129,5
3, 5	114,4	113,6	114,5	120,9	120,8	120,9
4	158,4	157,5	158,9	157,9	157,0	157,9
7	31,0	30,1	30,6	29,1	29,4	29,0
8	46,8	45,9	46,8	46,6	45,3	45,4
9	205,3	204,3	205,0	201,0	206,2	201,9
10	105,0	104,6	105,6	121,3	121,4	122,4
11	161,7	160,8	165,8			
12	111,5	111,5	112,1	113,7	113,9	122,4
13	161,7	162,3	163,1			
14	91,2	90,8	91,7	108,8	105,0	105,0
15	161,7	164,8	162,6	159,9	158,0	155,7
MeO-4	55,6	55,0	55,3	55,2	55,2	55,3
MeO-15	55,7	55,1	55,7	55,6	55,2	55,9
<u>CH₃CO</u>				21,0	20,6	20,7
				21,4	21,2	21,1
CH ₃ CO				169,2	169,5	169,3

TABELA 17: Dados de RMN de ^{13}C da parte lignoídica de **13** e **14** ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$; 50,3 MHz; δ) e **Iu-8** (Acetona- d_6 ; 50,3 MHz; δ) e dos respectivos derivados acetilados **13a**, **14a** e **Iu-8a** (CDCl_3 , 50 MHz; δ) [23].

C	13	14	Iu-8	13a	14a	Iu-8a
1'	134,1	133,0	134,5	139,0	138,8	138,7
2',6'	130,5	130,0	130,5	129,5	130,2	129,5
3',5'	115,0	114,4	115,2	121,1	121,1	121,4
4'	154,9	153,9	155,9	148,7	148,8	148,9
7'	45,4	41,8	44,0	42,1	42,0	43,5
8'	37,1	35,0	36,1	36,3	35,3	35,3
9'	12,6	11,0	11,8	12,3	11,0	10,7
1''	134,6	133,8	133,4	140,8	138,8	138,7
2'', 6''	130,6	130,1	130,7	130,1	130,2	130,4
3'', 5''	115,3	114,9	115,5	121,1	121,1	121,4
4''	154,9	154,2	156,1	148,8	148,2	149,2
7''	42,7	41,3	42,4	41,8	41,0	41,1
8''	37,1	32,6	34,8	36,3	35,3	35,3
9''	12,65	13,1	12,9	12,3	14,0	14,0
<u>CH</u> ₃ CO				21,0	20,6	20,7
				21,4	21,2	21,1
CH ₃ <u>C</u> O				169,2	169,5	169,3

ESQUEMA 8: Fragmentação de massas para as substâncias **13**, **14** e **15**.

2.4.1-Estudo estereoquímico de 13 e 14

Os espectros 2D HOMOCOSY de **13**, **14** e **15** permitem a atribuição inequívoca de todos os sinais relativos aos prótons da região alifática, necessária para a realização do experimento de NOE diferencial (TABELAS 18, 19 e 20 e FIGURAS 34, 39, 46).

Os prótons H-7' e H-8' mantêm uma relação *anti*-periplanar, de acordo com a equação de Karplus, como evidencia a constante de acoplamento de H-7' (11,0 Hz).

Os espectros de NOE diferencial de **13** e **14** (FIGURAS 37 e 43) mostram que irradiando-se o próton H-7', observa-se um aumento de intensidade no sinal do grupo metílico Me-9'' , sugerindo uma relação tipo *syn*-periplanar para H-7' e Me-9''. Isto se confirma através da observação do NOE para H-7' quando Me-9'' é irradiado, tanto no caso de **13** como no de **14**. Ao irradiar-se o grupo metílico Me-9' , o sinal referente aos prótons metilênicos H-7'' é aumentado, sugerindo proximidade espacial destes dois grupos, o que é confirmado pela observação do NOE para o grupo metílico Me-9', quando os prótons H-7'' são irradiados.

A existência de 3 centros quirais implica na existência de, no máximo, oito estereoisômeros (2^n , $n=3$) para cada estrutura, resultante das configurações R ou S que cada centro quiral pode ter:

(1) 7'R, 8'R, 8''S	(6) 7'S, 8'S, 8''R
(2) 7'R, 8'S, 8''R	(5) 7'S, 8'R, 8''S
(3) 7'R, 8'R, 8''R	(7) 7'S, 8'R, 8''R
(4) 7'R, 8'S, 8''S	(8) 7'S, 8'S, 8''S

Estabelecida a relação tipo *syn*-periplanar entre H-7' e Me-9', podem ser excluídas as alternativas (3), (4), (7) e (8), já que a proximidade

espacial dos prótons metilênicos H-7'' e do grupo metílico Me-9' estaria impedida nos casos em que as configurações de C-8' e C-8'' são ambas R ou ambas S. Assim restam 4 possibilidades de estereoquímica para representar as substâncias **13** e **14**.

(1) 7'R, 8'R, 8''S

(6) 7'S, 8'S, 8''R

(2) 7'R, 8'S, 8''R

(5) 7'S, 8'R, 8''S

Esta definição de relações espaciais conseguida através da análise do espectro de NOE diferencial mostrou-se essencial para o estudo estereoquímico.

Tentou-se então analisar a estereoquímica dos centros quirais C-7', C-8' e C-8'' com base nas possibilidades de proteção que os anéis A, B e C devem exercer sobre os grupos metílicos Me-9' e Me-9''.

Estruturas		Proteção de Anel
(1) e (6)	Me-9'	A e B
	Me-9''	(C)
(2) e (5)	Me-9'	B e (C)
	Me-9''	A

O anel C não exerce proteção efetiva por ter grupos volumosos como substituintes, o que o impede estericamente de adotar conformações que resultassem em proteção aos grupos metílicos:

Substância		¹ H	¹³ C
13	Me-9'	0,68	12,65
	Me-9''	0,63	12,60
14	Me-9'	0,65	11,0
	Me-9''	0,74	13,1

O grupo metílico Me-9' de **14** é mais blindado magneticamente que Me-9'', conforme observado nos seus dados de RMN de ^1H e ^{13}C , levando à proposição das estruturas (1) ou (6), nas quais ocorre proteção efetiva do grupo Me-9' pelos anéis A e B, para representar a substância **14** e definindo a sua configuração relativa: *rel* (7'R, 8'R, 8''S).

O grupo Me-9'' da substância **14** é o mais desblindado dentre os quatro grupos metílicos analisados, o que é consistente com a observação de que nas estruturas (1) e (6) somente o anel C poderia exercer alguma proteção anisotrópica sobre Me-9'', o que é, no entanto, dificultado em virtude do seu impedimento estérico.

Os deslocamentos químicos dos grupos metílicos da substância **13** têm valores intermediários aos observados para a substância **14**, o que permite propor as estruturas (2) e (5) para representá-la, já que estas têm o grupo Me-9' protegido apenas pelo anel B e Me-9'' sofrendo proteção anisotrópica apenas do anel A. Isto explica ainda a grande proximidade entre os valores dos deslocamentos químicos dos grupos metílicos da substância **13** tanto em RMN de ^1H (δ 0,63 e δ 0,68) como em RMN de ^{13}C (δ 12,60 e δ 12,65) e define a sua estereoquímica relativa: *rel* (7'R, 8'S, 8''R).

O espectro de NOE diferencial de **13** permite ainda a atribuição do sinal em δ 3,73 ao grupo MeO-15, através da observação de aumento neste sinal ao se irradiar H-14, e consequentemente, o sinal em δ 3,68 foi atribuído ao MeO-4. A irradiação em H-7' provocou aumento no duplete em δ 7,30, atribuindo-se este sinal aos prótons H-2' e H-6', e portanto, o sinal em δ 6,61 foi atribuído aos prótons H-3' e H-5', já que a correlação entre estes dois sinais foi observada no espectro bidimensional $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ de **13**. Da mesma forma, ao se irradiar H-7'', verifica-se aumento no sinal em δ 6,88, atribuindo-se este sinal aos prótons H-2'' e H-6'' e o duplete em 6,67, aos prótons H-3'' e H-5'', cujos

acoplamentos foram mostrados no espectro bidimensional. Através do mesmo raciocínio, pôde-se também atribuir o sinal em δ 6,77 a H-3 e H-5 e o sinal em δ 7,09 a H-2 e H-6, o que foi corroborado pela observação de NOE em δ 6,77 ao se irradiar o grupo MeO-4 (δ 3,68).

TABELA 18: Correlações observadas no espectro de RMN bidimensional $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ de **13** (200 MHz, metanol- d_4 , δ).

H	δ	Sinais correlacionados
7'	4,24	2,98 (H-8')
8	3,18	2,86 (H-7)
8'	2,98	0,68 (H-9'); 4,24 (H-7')
7	2,86	3,18 (H-8)
7''a	2,35	1,7-1,9 (H-8'')
8''	1,7-1,9	0,63 (H-9''); 2,35 (H-7''a)
9'	0,68	2,98 (H-8')
9''	0,63	1,7-1,9 (H-8'')

TABELA 19: Correlações observadas no espectro de RMN bidimensional $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ de **14** (200 MHz; CDCl_3 + DMSO- d_6 ; δ).

H	δ	Sinais correlacionados
7'	4,39	2,8-2,9 (H-8')
8	3,15	2,83 (H-7)
8'	2,8-2,9	0,65 (H-9'), 1,7-1,9 (H-8''); 4,39 (H-7')
7	2,83	3,15 (H-8)
7''	2,41	1,7-1,9 (H-8'')
8''	1,7-1,9	0,74 (H-9''); 2,41 (H-7''); 2,8-2,9 (H-8')
9''	0,74	1,7-1,9 (H-8'')
9'	0,65	2,8-2,9 (H-8')

TABELA 20: Correlações observadas no espectro de RMN bidimensional $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ de **15** (200 MHz; metanol- d_4 ; δ)

H	δ	Sinais correlacionados
7'	4,37	2,7-2,9 (H-8')
8	3,19	2,86 (H-7)
7	2,86	3,16 (H-8)
8'	2,7-2,9	0,76 (H-9'); 4,37 (H-7')
8''	1,5-1,7	0,73 (H-9'')
9'	0,76	2,7-2,9 (H-8')
9''	0,73	1,5-1,7 (H-8'')

TABELA 21: Correlações observadas no espectro de RMN bidimensional $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ de **14** (200 MHz; $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-} \text{d}_6$; δ)

H	δ	Sinais de C correlacionados
9'	0,65	11,0
9''	0,74	13,1
8''	1,7-1,9	35,0
7''	2,41	41,3
8'	2,8-2,9	32,6
7	2,83	30,1
8	3,15	45,9
MeO-	3,58	55,0
MeO-	3,73	55,1
7'	4,39	41,8
14	5,64	90,8

13 *rel* (7'R, 8'S, 8''R)

14 *rel* (7'R, 8'R, 8''S)

15

2.5- Lactonas Policetídicas

A análise do espectro de RMN de ^1H da substância **16** evidenciou a presença de uma lactona policetídica. O duplete em δ 1,39 ($J=6,5$ Hz) e os multipletos em δ 4,1-4,2 e δ 4,4-4,6 (TABELA 22, FIGURA 47) aliados aos sinais em δ 13,8, 74,0, 78,2 e 177,7 observados no espectro de RMN de ^{13}C (TABELA 23, FIGURA 48) confirmaram a estrutura parcial de uma γ -lactona.

O espectro de RMN de ^1H mostra ainda um singlete largo em δ 1,20 e um triplete deformado em δ 0,86 sugerindo a presença da cadeia policetídica; e os sinais em δ 5,33 (t, $J=5,0$ Hz) e δ 1,9-2,0 (m) atribuídos aos prótons olefinicos e alílicos, respectivamente, mostraram tratar-se de uma γ -lactona com uma insaturação na cadeia policetídica. O espectro de RMN de ^{13}C mostra sinais em δ 129,8 (carbonos olefinicos), δ 27,1 (carbonos alílicos) que confirmam a referida proposição.

TABELA 22: Dados de RMN de ^1H de **16**, **17**, **18** e **16a** (200 MHz; CDCl_3 ; δ ; J em Hz)

H	16	17	18	16a
w'	0,86;t def.	0,81;t def.	0,70;t def.	0,79;t def.
($-\text{CH}_2-$)n	1,20;sl	1,19;sl	1,18;sl	1,20;sl
Me-5	1,39;d;6,5	1,28;d;6,5	2,00;d;6,2	1,33;d;6,6
H-1'	1,4-1,6;m	1,4-1,6;m	1,9-2,0;m	1,4-1,6;m
H alílicos	1,9-2,0;m	1,9-2,0;m	-	-
H-2	2,5-2,6;m	2,4-2,5;m	-	2,4-2,5;m
H-3	4,1-4,2;m	4,1-4,2;m	-	4,13;t;4,1
H-4	4,56;q;6,6	4,45;q;6,6	5,83;q;6,2	4,56;q;6,6
H-7'/H-8'	5,33;t;5,0	5,33;t;5,0	-	2,2-2,3;m

TABELA 23: Dados de RMN de ^{13}C de **16**, **17** e **16a**.

C	16	17	16a
1	177,5	177,1	177
2	49,2	43,7	49,1
3	74,1	73,9	74,0
4	78,1	82,3	78,1
5	13,8	18,1	13,8
1'	28,4	23,3	28,4
2' a 5'	~29	~29	~29
6'	27,1	27,2	26,1
7'/8'	129,9	129,9	33,0
9'	27,1	27,2	26,1
10'	31,9	31,8	31,9
11'	22,6	22,6	22,6
12'	14,1	14,1	14,1

A análise do EM desta lactona mostrou que ela é derivada do ácido mirístico (C_{14}) através da observação do pico do íon molecular em 282 $[M^+]$ (2) e do íon resultante da respectiva perda de água, com m/z 264 (6). Os outros fragmentos mostrados no ESQUEMA 9 confirmam a estrutura desta lactona.

ESQUEMA 9: Interpretação do EM obtido para a lactona policetílica **16**.

A posição da ligação dupla na cadeia metilênica foi determinada através da observação dos fragmentos mostrados no ESQUEMA 10, para o derivado epoxidado **16a**.

ESQUEMA 10: Interpretação do EM obtido para o derivado epoxidado **16a**.

A estereoquímica desta lactona foi determinada através da análise dos dados de RMN de ^{13}C de C-5 e C-1', $[\alpha]_D$ e por comparação com dados da literatura. Os deslocamentos químicos de C-5 e C-1' em γ -lactonas dependem em primeira instância dos efeitos γ -*cis* ou γ -*trans* do grupo hidroxila em C-3, sobre os carbonos C-5 e C-1' e assumem os valores mostrados na TABELA 24, construída a partir de dados da literatura [61]. Fixando-se o grupo metílico em β , tem-se 4 possibilidades de estereoquímica para estas lactonas:

TABELA 24: Deslocamentos químicos de C-5 e C-1' em 3-OH- γ -lactonas (20 MHz; CDCl_3 ; δ).

	A	B	C	D
C-5	18,0	13,8	18,1	13,7
C-1'	23,3	27,2	*	23,3

Os dados de RMN de ^{13}C da substância **16** para C-5 e C-1' são δ 13,8 e δ 27,2 respectivamente, o que indicou que a sua estereoquímica relativa segue a do modelo B. O valor de $[\alpha]_D^{21} = -9^\circ$ definiu a configuração absoluta desta lactona como sendo análoga à do grandinolídeo, isolado anteriormente dos frutos de *I. grandis* [20]. Pôde-se assim propor a estrutura (2S,3S,4S)-2-(7'-dodecenil)-3-hidróxi-4-metil-butanólido para a substância **16**.

16

A substância **17** foi detectada em mistura com **16** através do exame dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (FIGURAS 52, 53 e 54) de uma fração posterior à que continha somente **16**.

A presença de 2 dubletos em δ 1,28 e δ 1,39 para os grupos metílicos e de multipletos bem mais largos em δ ~2,5 e δ ~4,5 para os prótons H-2 e H-4, respectivamente, indicou a presença de γ -lactonas diastereoméricas em mistura. O espectro de RMN de ^{13}C mostrou os sinais referentes aos carbonos lactônicos C-1 a C-5 e ainda C-1' duplicados, conforme mostra a TABELA 23, confirmando a presença de lactonas diastereoméricas.

Por subtração de espectros pôde-se determinar os deslocamentos químicos dos carbonos da substância **17** e observar que, com base nos sinais para C-5 e C-1' (δ 18,0 e δ 23,3, respectivamente), a sua configuração relativa obedece à indicada pelo modelo A. Desta forma, propõe-se a estrutura *rel* (2S,3R,4S)-2-(5'-dodecenil)-3-hidróxi-4-metilbutanolido para a substância **17**.

17

A análise por CG/EM confirmou a presença deste par diastereomérico através da observação de 2 picos majoritários no cromatograma gasoso, e espectro de massas praticamente idêntico ao da substância **16**.

A substância **18** teve sua estrutura elucidada com base nos seus dados de RMN de ^1H (TABELA 22, FIGURA 55) e EM (ESQUEMA 11), além de comparação com dados obtidos para a substância **16**. O seu espectro de RMN de ^1H mostra um dubleto em δ 2,00 ($J=6,2$ Hz) atribuído ao grupo metílico em C-4. Este sinal aparece mais desprotegido ($\sim 0,7$ ppm) que o grupo metílico da substância **16**, sugerindo a presença de uma ligação dupla entre C-2 e C-3. O próton H-4 (δ 5,83, q, $J=6,2$ Hz) também apareceu mais desprotegido do que H-4 na substância **16**. A inexistência do sinal referente a H-3 ($\delta \sim 4,1$; m para a substância **16**) confirmou a estrutura parcial desta γ -lactona. A cadeia metilênica não apresentou insaturação, como pôde-se perceber pela ausência de sinais em $\delta \sim 5,3$ (H olefínicos, para a substância **16**). O EM mostrou o pico do íon molecular em 282 (2), consistente com uma cadeia carbônica com 12 átomos de C. Conclui-se, portanto que esta lactona, assim como as substâncias **16** e **17**, também é derivada do ácido mirístico. Os fragmentos com m/z 127 (100) e m/z 114 (42) confirmam a estrutura proposta para a lactona 2-dodecil-3-hidróxi-4-metil-buten-2-olido, inédita na literatura.

ESQUEMA 11: Interpretação do EM obtido para a substância **18**.

2.6- Ácido diidro-*p*-cumárico e *p*-hidroxibenzaldeído

O *p*-hidroxibenzaldeído (**19**) e o ácido diidro-*p*-cumárico (**20**) foram identificados com base nos seus dados de RMN de ^1H e ^{13}C (FIGURAS 56 a 60). A substância **19** é frequentemente encontrada na sua forma glicosilada, no reino vegetal. No estado livre, havia sido isolada somente de *Papaver somniferum* (Papaveraceae) [63].

Da mesma forma, o ácido diidro-*p*-cumárico ou ácido floretínico foi anteriormente isolado da madeira de *Haplomorsia monophylla* (Leguminosa) [64]. Este ácido é produto da redução do ácido *p*-cumárico, que por sua vez é precursor de flavonóides. Desta forma, é coerente a sua presença em inflorescências de *Iryanthera sagotiana*, onde a principal classe de metabólitos especiais detectada foi a de flavonóides.

TABELA 25: Dados de RMN de ^1H de **19** e **20** (DMSO- d_6 ; 200 MHz; δ ; J em Hz).

H	19	20
α	-	2,67;t;7,4
β	-	2,40;t;7,4
2, 6	7,69; d;8,8	6,98; d;8,3
3, 5	6,90;d;8,8	6,63;d;8,3
H aldeídico	9,76	-

TABELA 26: Dados de RMN de ^{13}C de **19** e **20** (DMSO- d_6 ; 50,3 MHz; δ)

C	19	20
α	-	36,1
β	-	29,7
1	130,0	131,4
2, 6	131,8	129,3
3, 5	115,6	115,3
4	163,1	155,7
C=O	190,4	174,0

19 **20**

2.7 Tocotrienol

A observação de quatro singletos em δ 1,18, 1,52, 1,60 e 2,06 integrando respectivamente para 1, 3, 1 e 1 grupos metílicos, além do multipletto em δ 5,04 para prótons olefínicos, integrando para 3 prótons e de dois dubletos em δ 6,31 ($J=2,6$ Hz) e δ 6,41 ($J=2,6$ Hz) no espectro de RMN de ^1H (TABELA 27, FIGURA 61) da substância **21** indicam tratar-se de um tocotrienol 6,8-dissubstituído. A comparação com dados da literatura [23] e a análise do seu EM (ESQUEMA 12) possibilitam a identificação da substância **21** com o tocotrienol 2,8-dimetil-2-(4',8',12'-trimetil-3',7',11'-tridecatrienil)-6-cromanol. Esta substância foi anteriormente isolada dos frutos de *I. grandis*, juntamente com outros três tocotrienóis [23].

TABELA 27: Dados de RMN de ^1H de **21** (200 MHz; CDCl_3 ; δ ; J em Hz).

H	21
Me-2	1,18;s
Me-4',Me-8',Me-12'	1,52;s
Me-12'	1,60;s
H-3	1,8-1,6;m
Me-8	2,06;s
H alílicos	1,9-2,2;m
H-4	2,63;t;7,1
H-3',H-7',H-11'	5,04;m
H-5	6,31;s;2,6
H-7	6,41;d;2,6

21

ESQUEMA 12: Fragmentação de massas para **21**.

2.8 Lignana

O espectro de RMN de ^1H da substância **22** (FIGURAS 62 e 63) mostrou dois dubletos em δ 0,78 ($J=6,2$ Hz) e δ 1,00 ($J=6,3$ Hz) integrando para três prótons cada; dois duplos dubletos em δ 2,50 ($J=11,3$ Hz e 16,0 Hz) e δ 2,70 ($J=4,3$ Hz e $J=16,0$ Hz) integrando para um próton cada, além de um dubleto em δ 3,36 ($J=10,3$ Hz) atribuível a um próton dibenzílico. Estes deslocamentos químicos, aliados à presença de absorções na região de prótons aromáticos, sugeriram tratar-se de uma lignana ariltetralínica, cuja atribuição dos sinais mencionados é mostrada na TABELA 28.

A existência de um multiplete em δ 1,4-1,6 sustenta esta proposição, sendo esta absorção atribuída aos prótons H-8 e H-8' e coincidente com a absorção da água presente no deuteroclorofórmio, o que dificulta a definição de sua multiplicidade.

O padrão de substituição dos anéis aromáticos foi definido através da observação dos sinais entre δ 6,0 e 7,0. Um dubleto em δ 6,04 ($J=2,1$ Hz) foi atribuído ao próton H-3, protegido através do efeito anisotrópico exercido pelo anel C. Além disso, sua constante de acoplamento evidencia a existência de apenas acoplamento em *meta*. O duplo dubleto observado em δ 6,50 ($J=2,1$ Hz e 8,2 Hz) foi atribuído a H-5 e a existência de acoplamentos em *orto* (com H-6) e *meta* (com H-3) definiu o padrão de substituição do anel A. O dubleto em δ 6,87 ($J=8,5$ Hz) atribuído a H-6 sustenta estas afirmações. O padrão de substituição do anel C é do tipo AA'BB' e foi definido através da observação de dois dubletos em δ 6,69 ($J=8,5$ Hz), atribuído a H-2' e H-6' e em δ 6,91 ($J=8,5$ Hz), atribuído a H-3' e H-5', protegidos em função do efeito mesomérico positivo exercido pelo grupo hidroxila em C-4'.

O espectro de RMN de ^1H mostrou ainda dois singletos largos em δ 4,28 e δ 4,58 atribuídos aos dois prótons hidroxílicos desta neolignana.

TABELA 28: Dados de RMN de ^1H de **22** (CDCl_3 ; 300 MHz; δ ; J em Hz).

H	22
3	6,04;d;2,1
5	6,50;dd;2,1 e 8,2
6	6,87;d;8,2
7a	2,49;dd;11,3 e 16,0
7b	2,70;dd;4,3 e 16,0
8	1,4-1,6;m
9	1,00;d;6,3
2', 6'	6,91;d;8,5
3', 5'	6,69;d;8,5
7'	3,36;d;10,3
8'	1,4-1,6;m
9'	0,78;d;6,2
OH	4,28;sl
OH	4,58;sl

A constante de acoplamento de 10,3 Hz entre H-7' e H-8', obtida a partir do sinal para H-7' evidenciou uma relação *trans* entre estes prótons. O fato do anel C exercer proteção anisotrópica sobre H-3 define sua posição em equatorial. Estas observações aliadas à comparação dos deslocamentos químicos dos prótons metílicos com dados da literatura [65, 66] definem as relações *trans-trans* e a conformação pseudo-equatorial dos substituintes do anel cicloexânico desta molécula.

No caso em que os substituintes do anel B mantêm relação *cis-cis*, o anel C posiciona-se em axial, protegendo os prótons H-9 e deixando de

proteger H-3 e H-9', o que torna clara a diferença entre estes dois tipos de estereoquímica [66].

O valor de $[\alpha]_D = -19^0$ possibilitou o estabelecimento da configuração absoluta desta lignana e a identificação como (8R,7'S,8'S)-4,4'-diidroxí-2,7'-ciclólignana, anteriormente isolada dos frutos de *Iryanthera grandis* [20].

2.9- Esteróide glicosilado

O espectro de RMN de ^{13}C mostra a presença de 35 carbonos na substância **23** (TABELA 30, FIGURAS 66, 67), sendo que seis destes sinais apareceram na região de carbonos glicosídicos, correspondendo a uma unidade de hexose. O carbono secundário em δ 62,0 presente no espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 $^\circ$ (FIGURA 68) restringe a escolha da unidade glicosídica entre glicose ou galactose. A comparação dos deslocamentos químicos dos outros sinais referentes à unidade de açúcar com dados da literatura [67] confirma a presença de galactose. O espectro de RMN de ^1H mostra o sinal referente ao próton anomérico como um dubleto em δ 4,29 e a sua constante de acoplamento ($J=7,7$ Hz) evidencia a configuração β da galactose. (TABELA 29, FIGURAS 64, 65).

A desproteção observada no C-3 da aglicona (δ 78,2) evidencia a ligação da galactose a este carbono e a ocorrência de sinais para carbonos olefinicos em δ 121,4 e δ 140,1 indica a presença de ligação dupla endocíclica entre C-5 e C-6 [68, 69]. Estas observações foram confirmadas pelo espectro de RMN de ^1H , que mostra o sinal do próton carbinólico H-3 deslocado para 3,68 (ddd, $J= 4,7; 11,8$ e $24,9$) e um tripleto deformado em δ 5,25 característico de esteróides Δ^5 .

O espectro de RMN de ^{13}C mostra ainda absorções para seis grupos metílicos em δ 11,5, até δ 19,5, que podem ser correlacionados com os sinais para prótons metílicos observados entre δ 0,5 e δ 0,9 no espectro de RMN de ^1H . A expansão desta região espectral evidencia a presença de dois singletos em δ 0,57 e δ 0,89 atribuídos aos grupos metílicos em C-18 e C-19, respectivamente, além de um dubleto em δ 0,81 ($J= 6,4$ Hz) atribuído aos prótons metílicos H-27. O espectro de RMN de ^1H mostra ainda dois dubletos em δ 0,71 ($J= 6,6$ Hz) e δ 0,73 ($J= 6,5$ Hz) sobrepostos a um tripleto

TABELA 30: Dados de RMN de ^{13}C de **23** (CDCl_3 + DMSO-d_6 ; 75 MHz; δ)

C	23
1	36,9
2	29,3
3	78,2
4	38,4
5	140,1
6	121,4
7	31,5
8	31,4
9	49,7
10	36,3
11	20,6
12	39,3
13	41,9
14	56,3
15	23,9
16	27,8
17	55,6
18	11,5
19	19,0
20	35,7
21	18,7
22	33,5
23	25,6
24	45,4
25	28,7
26	18,4
27	19,5
28	22,7
29	11,6
1'	100,9
2'	73,4
3'	75,6
4'	70,4
5'	76,5
6'	62,0

3. Atividade Antioxidante*

A medida da capacidade antioxidante (CAOx) é obtida a partir dos valores de produção de malonildialdeído (MDA) e emissão espontânea de quimioluminescência (QL). As curvas traçadas do inverso da concentração da amostra pelo inverso de CAOx permitem a obtenção das retas, a partir das quais se calcula a concentração necessária para se inibir 50 % da autoxidação ($Q_{1/2}$). Os valores de $Q_{1/2}$ obtidos pelos dois métodos utilizados (MDA e QL) para os diversos extratos, frações e substâncias puras testadas encontram-se na TABELA 31.

Os resultados mostrados nesta tabela indicam que as frações provenientes do extrato hexânico e a fração hexânica do extrato etanólico, ou seja, as frações menos polares, apresentam baixa atividade antioxidante, provavelmente devido à baixa concentração dos flavonóides mais ativos nestas frações, já que estes são compostos bastante polares. Com o aumento da polaridade das frações, observou-se um aumento na sua atividade antioxidante, o que também se deve ao aumento da concentração dos flavonóides ativos aí presentes. A sequência crescente de polaridade: EEFH; EEFC; EEFA; EEFM acompanha o aumento da atividade antioxidante, sendo, no entanto, quebrada pelo valor de $Q_{1/2}$ para a fração onde ocorreu a precipitação de cristais amarelos, EEFA (1,50), sendo esta a fração mais ativa ensaiada. É interessante comparar este valor com o valor de $Q_{1/2}$ obtido para a quercitrina (2,29), provavelmente a substância com maior capacidade antioxidante presente nos extratos estudados. EEFA é constituída pela mistura dos flavonóis e diidroflavonóis glicosilados e, ainda assim, apresentou CAOx maior que a quercitrina. Estes resultados preliminares podem sugerir a presença de sinergismo entre os constituintes desta mistura.

* Ensaios realizados pela pesquisadora Dra. Solange C. Davino e professora Dra. Sílvia B. M. Barros, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

TABELA 31: Comparação dos valores de $Q_{1/2}$ ($\mu\text{g/ml}$) obtidos pelos métodos de medida de MDA e quimioluminescência para os ensaios *in vitro*.

Procedência do Extrato	Amostra	MDA	QL
<i>I. sagotiana</i> ; inflorescências	EEFH	305,0	-
	EEFM	2,46	-
<i>I. sagotiana</i> ; folhas	EEFH	443,3	-
	EHFM	4,67	-
	EE	5,33	0,36
	EEFH	33,50	-
	EEFC	6,61	-
	EEFA	1,50	-
	EEFM	5,71	4,10
	quercetrina	2,29	-
	afzelina	62,30	-
<i>I. lancifolia</i> ; pericarpos	tocotrienol	1,08	-
	flavonolignóide	4,83	-
Padrões	α -tocoferol	12,10	-
	quercetina	7,07	-

- ensaios não realizados

Considerações

Finais

Os extratos polares de folhas e inflorescências de *Iryanthera sagotiana* mostraram ser constituídos predominantemente de metabólitos especiais da classe dos flavonóides, substâncias que absorvem radiação fortemente na região de UV/visível do espectro eletromagnético. O predomínio destas substâncias permite inferir um papel químico-ecológico de atração visual de polinizadores às flores e também um papel fisiológico de proteção contra o excesso de radiação que levaria ao stress oxidativo, atuando como antioxidantes. Nas folhas, isto seria justificado pela presença de estruturas diretamente ligadas à absorção de luz em função das reações fotossintéticas [36] e nas inflorescências, por serem tecidos vegetais efêmeros e portanto mais vulneráveis [7].

A composição química dos pericarpos de *I. lancifolia* mostrou-se extremamente parecida com a dos frutos de *I. grandis* [20], de onde foram anteriormente isoladas a diidrochalcona **1**, o tocotrienol **21**, a lignana **22**, também presentes no pericarpo de *I. lancifolia*, conforme mostrado no presente trabalho. Além destas substâncias, a ocorrência de lactonas policetídicas e flavonolignóides nos frutos de *I. grandis* e pericarpos de *I. lancifolia* sugere a proximidade taxonômica destas duas espécies, já que em frutos de *I. paraensis* foram encontradas apenas lactonas policetídicas e

uma neolignana tipo 8.O.4' [32], e nos frutos de *I. laevis*, apenas diidrochalconas e um flavonolignóide [21].

Outro aspecto taxonômico a ser ressaltado é a presença de lactonas policetídicas alifáticas ter sido, pela primeira vez, verificada numa espécie de miristicácea neotropical.

A co-ocorrência de tocotrienol e flavonolignóides nos pericarpos sugere a ação antioxidante sinérgica entre estas substâncias, já que, isoladamente, ambas apresentaram atividade antioxidante e há estudos que comprovam o sinergismo entre α -tocoferol, estruturalmente análogo ao tocotrienol, e os flavonolignóides isolados de *Sylibum marianum* [42].

Espectros de RMN

FIGURA 1: Espectro de RMN de ¹H de **1** (200 MHz; CDCl₃).

FIGURA 2: Espectro de RMN de ¹³C de **1** (50 MHz, CDCl₃).

FIGURA 3: Espectro de NOE diferencial de 1.

FIGURA 5: Espectro de NOE diferencial **de 2**.

FIGURA 6: Espectro de RMN de ¹H de **3** (200 MHz; CDCl₃).

FIGURA 7: Espectro de RMN de ¹H de **4** (200 MHz; DMSO-d₆).

FIGURA 8: Espectro de RMN de ¹³C (PND) de **3** (50 MHz, DMSO-d₆). FIGURA 9: Espectro de RMN de ¹³C (DEPT 135°) de **3** (50 MHz, DMSO-d₆).

FIGURA 16. Espectro de RMN de ^1H de $\text{C}_6\text{H}_5\text{C}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$ (100 MHz, CDCl_3).

FIGURA 11: Espectro de RMN de ^{13}C (PND) de 5 (50 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$).

FIGURA 12: Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135°) de **5** (50 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$).

FIGURA 13: Espectro de RMN de ^1H de **5** (200 MHz; $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$).

FIGURA 14: Espectro de RMN de ^{13}C (PMD) de 6 (50 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$).

FIGURA 15: Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135°) de 6 (50 MHz, CDCl_3 + DMSO-d_6).

FIGURA 16: Espectro de RMN de ¹H de **7** (200 MHz; CDCl₃ + DMSO-d₆).

FIGURA 17: Espectro de RMN de ¹³C (PND) de **7** (50 MHz, CDCl₃ + DMSO-d₆).

FIGURA 18: Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135°) de **7** (50 MHz, CDCl_3 + DMSO-d_6).

FIGURA 19: Espectro de RMN de ^1H de **8** (200 MHz; DMSO-d_6).

FIGURA 20: Espectro de RMN de ^{13}C (PND de **8** (50 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$).

FIGURA 21: Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135°) de **8** (50 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$).

FIGURA 22: Espectro de RMN bidimensional ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) de **8** (200 MHz; DMSO- d_6).

FIGURA 23: Espectro de RMN de ^1H de **9** (200 MHz; CDCl_3 + DMSO-d_6).

FIGURA 24: Espectro de RMN de ^{13}C (PND) de **9** (50 MHz, DMSO-d_6).

FIGURA 25: Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135°) de 9 (50 MHz, DMSO- d_6).

FIGURA 26: Espectro de RMN de ^1H de 10 (200 MHz; $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-}\text{d}_6$).

FIGURA 28: Espectro de RMN de ^{13}C (PND) de 9 + 11 (50 MHz, DMSO- d_6).

FIGURA 30: Espectro de RMN bidimensional ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) de **9** + **11** (200 MHz; DMSO- d_6).

FIGURA 31: Espectro de RMN de ^1H de **10** + **12** (200 MHz; DMSO-d_6).

FIGURA 34: Espectro de RMN bidimensional (^1H x ^1H) de **13** (200 MHz; metanol- d_4).

FIGURA 35: Espectro de RMN de ^{13}C (PND) de **13** (50 MHz, acetona- d_6).

FIGURA 36: Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135°) de **13** (50 MHz, acetona- d_6)

FIGURA 37: Espectro de NOE diferencial de 13.

FIGURA 37 (cont.): Espectro de NOE diferencial de 13.

FIGURA 38: Espectro de RMN de ^1H de **14** (200 MHz; $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$).

FIGURA 39: Espectro de RMN bidimensional (^1H x ^1H) de **14** (200 MHz; CDCl_3 + DMSO-d_6).

FIGURA 40: Espectro de RMN de ^{13}C (PND) de **14** (50 MHz, CDCl_3 + DMSO-d_6).

FIGURA 41: Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135°) de **14** (50 MHz, CDCl_3 + DMSO-d_6).

FIGURA 42: Espectro de RMN bidimensional (^1H x ^{13}C) de **14** (CDCl_3 + DMSO-d_6).

FIGURA 43: Espectro de NOE diferencial de 14.

FIGURA 46: Espectro de RMN bidimensional (^1H x ^1H) de **15** (200 MHz; metanol- d_4).

FIGURA 47: Espectro de RMN de ¹H de **16** (200 MHz; CDCl₃).

FIGURA 48: Espectro de RMN de ¹³C (PND) de **16** (50 MHz, CDCl₃).

FIGURA 51: Espectro de RMN bidimensional $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ de **16a** (200 MHz; CDCl_3).

FIGURA 52: Espectro de RMN de ^1H de **16** + **17** (200 MHz; CDCl_3).

FIGURA 53: Expansão do espectro de RMN de ^1H de **16** + **17** (200 MHz; CDCl_3).

FIGURA 54: Espectro de RMN de ^{13}C (PND) de 16 + 17 (50 MHz, CDCl_3).

FIGURA 55: Espectro de RMN de ^1H de 18 (200 MHz; CDCl_3).

FIGURA 56: Espectro de RMN de ^1H de 19 (200 MHz; $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$).

FIGURA 57: Espectro de RMN de ^{13}C (PND) de 19 (75 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$).

FIGURA 60: Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135°) de **20** (50 MHz, DMSO- d_6).

FIGURA 61: Espectro de RMN de ^1H de **21** (200 MHz; CDCl_3).

FIGURA 62: Espectro de RMN de ¹H de **22** (300 MHz; CDCl₃).

FIGURA 63: Expansão do espectro de RMN de ¹H de **22** (300 MHz; CDCl₃).

FIGURA 64: Espectro de RMN de ^1H de 23 (300 MHz) $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$).

FIGURA 65: Expansão do espectro de RMN de ^1H de 23 (300 MHz; $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$).

FIGURA 66: Espectro de RMN de ^{13}C (PND) de 23 (75 MHz, CDCl_3 + DMSO-d_6).

FIGURA 67: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (PND) de 23 (75 MHz, CDCl_3 + DMSO-d_6).

FIGURA 68: Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135°) de 23 (75 MHz, CDCl_3 + $\text{DMSO}-d_6$).

Bibliografia

1. BARROSO, G. M. (1978) *Sistemática de Angiospermas do Brasil*, vol. 1, p. 34, EDUSP, São Paulo.
2. RODRIGUES, W. A. (1980) *Cien. Cult.* (supl.) **32**, 12.
3. GOTTLIEB, O. R. (1980) *Cien. Cult.* (supl.) **32**, 18.
4. SCHULTES, R. E., HOLMSTEDT, B. (1971) *Lloydia* **34**, 61.
5. LISBOA, P. L. B. (1990) *Cien. Cult.* **42**, 70
6. SMITH, A. C. AND WODEHOUSE, R. P. (1937) *Brittonia* **2**, 393.
7. PAULINO Fo., H. F. (1985) *Ecologia Química da Família Myristicaceae* - Tese de Doutorado - IQ/USP.
8. SCHULTES, R. E. (1954) *Bot. Mus. Leaflet. Harvard Univ.* **16**, 241.
9. AGURELL, S., HOLMSTEDT, B., LINDGREEN, J. E., SCHULTES, R. E. (1969) *Acta Chem. Scand.* **23**, 903.
10. GOTTLIEB, O. R. (1977) *Fortsch. Chem. Org. Naturst.* **35**, 1.
11. HARBORNE, J. B. (1977) *Pure and Appl. Chem.* **49**, 1403.
12. BARATA, L. E. S., BAKER, P. M., GOTTLIEB, O. R. e RÚVEDA, E. A. (1978) *Phytochemistry* **17**, 783.
13. BROCKSON, U. (1980) *Neolignanas de Lauraceae e Myristicaceae* -Tese de Doutorado-, Universidade de São Paulo, S.P.
14. YOSHIDA, M. (1995) *ACS Symposium Series 588*. Ed. P. R. Seidl, O. R. Gottlieb, M. A. C. Kaplan, p. 85-92.

15. BRAZ FILHO, R., DIAZ D., GOTTLIEB, O. R. (1980) *Phytochemistry* **19**, 455.
16. FRANCA, N. C., DIAZ D., P. P., GOTTLIEB, O. R. e PAULA ROSA, B. DE (1974) *Phytochemistry* **13**, 1631.
17. DIAZ D., P. P. AND DIAZ, A. M. P. (1986) *Phytochemistry* **25**, 2395.
18. BRAZ FILHO, R., SILVA, M. S. AND GOTTLIEB, O. R. (1980) *Phytochemistry* **19**, 1195.
19. ALMEIDA, M. E. L, BRAZ Fo., R., VON BÜLLOW, M. V., CORREA, J. J. L., GOTTLIEB, O. R., MAIA, J. G., SILVA, M. S. (1979) *Phytochemistry* **18**, 1015.
20. VIEIRA, P. C., GOTTLIEB, O. R., GOTTLIEB, H. E. (1983) *Phytochemistry* **22**, 2281.
21. GARZON N., L., CUCA S., L. E., MARTINEZ V., J. C., YOSHIDA, M., GOTTLIEB, O. R. (1987) *Phytochemistry* **26**, 2835.
22. VILLAMIL Z., E., CUCA S., L. E., MARTINEZ V., J. C. (1988) *Spectros. Int. J.*, **6**, 157.
23. CONSERVA, L. M., YOSHIDA, M., GOTTLIEB, O. R., MARTINEZ V., J. C., GOTTLIEB, H. E. (1990) *Phytochemistry* **29**, 3911.
24. KAWANISHI, K., TAKAGAKI, T., HASHIMOTO, Y. (1990) *Phytochemistry* **29**, 2735.
25. MARTINEZ V., J. C., CUCA S., L. E. (1989) *Rev. Colomb. Quím.* **18**, 37.
26. CONSERVA, L. M., YOSHIDA, M., GOTTLIEB, O. R. (1990) *Phytochemistry* **29**, 3986.
27. LIMA, R. A., FRANCA, N. F., DIAZ D., P. P., GOTTLIEB, O. R. (1975) *Phytochemistry* **14**, 1831.
28. SILVA, J. J., GIESBRECHT, A. M., ALVARENGA, M. A., GOTTLIEB, O. R. (1984) *Acta Amazônica* **14**, 455.
29. BRAZ Fo., R., ALEGRIO, L. V., GOTTLIEB, O. R. (1982) *Cien. Cult.* **34**, 516.

30. VIEIRA, P. C., YOSHIDA, M., GOTTLIEB, O.R., PAULINO FILHO, H. F., NAGEM, T. J. AND BRAZ FILHO, R. (1983) *Phytochemistry* **22**, 711.
31. NAGEM, T. J., BRAZ Fo., R., GOTTLIEB, O. R. (1981) *Ciên. Cult.* (supl.) **33**, 464.
32. MAGRI, F. M. M., KATO, M. J., YOSHIDA, M. (1996) *Phytochemistry* **43**, 669.
33. ALEGRIO, L. V., BRAZ Fo., R. GOTTLIEB, O. R. (1983) *Ciên. Cult.* (supl.) **35**, 458.
34. SILVA, D. H. S., CAVALHEIRO, A. J., YOSHIDA, M. AND GOTTLIEB, O. R. (1995) *Phytochemistry* **38**, 1013.
35. HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C (1989) *Free Rad. Biol. Med.*, Clarendon Press, Oxford, 2nd edn, p 196.
36. GORDON, M. H. (1996) *Nat. Prod. Reports* **13**, 265.
37. LARSON, R. A. (1995) *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **29**, 175.
38. OSAWA, T. (1994) *Cosmetics & Toiletries* **109**, 77
39. LARSON, R. A. (1988) *Phytochemistry*, **27**, p6p.
40. SHIBAMOTO, T et al. (1992) "Food Phytochemicals for Cancer Prevention II- Teas, spices and herbs" in ACS Symposium Series 547 (C. T. Ho, M. T. Huang, ed.) p 154-163
41. CHOW, C. K. (1991) *Free Rad. Biol. Med.* **11**, 215.
42. KOMP, B., GIGENGACK, C., NIENHAUS, M. H. (1992) *Chem. Abstr.* **117**, 219 737p, PATENTE: Ger. Offen.-DE 4.101.122
43. TOMÁS-BARBERAN, F. A., BLÁZQUEZ, M. A., GARCIA-VIGUERA, C., FERRERES, F., TOMÁS-LORENTE, F. (1992), *Phytochem. Anal.* **3**, 178.
44. MORAES, M. S. (1983) *Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluido de Pothomorphe umbellata (L.)*-Dissertação de mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas- USP- SP.

45. STOCKS, J., GUTTERIDGE, J. M. C., DORMANDY, T. L. (1974) *Clin. Sci. Mol. Mod.*, **47**, 215.
46. LISSI, E. A., CACERES, T., VIDELLA, L. A. (1986) *J. Free Rad. Biol. Med.*, **2**, 63.
47. FEE, J. A., TEITELBAUM, H. D. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **49**, 150.
48. OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K. (1979) *Anal. Biochem.*, **95**, 351.
49. WILLIAMS, A. H. (1986) *Comparative Phytochemistry* (Swain, T. ed) p. 297. Academic Press, London.
50. BOHM, B. A. AND GLENNIE, C. W (1969) *Phytochemistry* **8**, 905.
51. JENSEN, S. R., NIELSEN, B. J. AND NORN, V. (1977) *Phytochemistry* **16**, 2036
52. DREWES, S. E AND HUDSON, N. A. (1983) *Phytochemistry* **22**, 2823
53. GAFFIELD, W. AND WAISS Jr, A. C. (1975) *J. Org. Chem.* **40**, 1057.
54. TSCHESCHE, R., DELHVI, S., SEPULVEDA, S. AND BREITMEIER E. (1979) *Phytochemistry* **18**, 867.
55. KASAI, R., HIRONO, S., CHOU, W. H., TANAKA, O. AND CHEN, F. H. (1988) *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 4167.
56. MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. (1970) *The Systematic Identification of Flavonoids* (Harborne, J. B. ed.) Springer-Verlag, New York.
57. HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. (1982) *The Flavonoids: Advances in Research*, (J. B. Harborne e T. J. Mabry, ed.) Chapman and Hall Ltd., London, p.261-311.
58. AGRAWAL, P. K. E BANSAL, M. C. (1989) *Carbon-13 NMR of Flavonoids* (P. K. Agrawal, ed.) Elsevier, Amsterdan, p. 283-364

59. DE BRITTO, J., MANICKAM, V. S., GOPALAKRISHNAN, S.,
USHIODA, T. and TANAKA, N. (1995) *Chem. Pharm. Bull.* **43**,
338.
60. HUFFORD, C. D. AND ONGUNTIMEIN, B. O. (1980) *Phytochemistry*
19, 2036.
61. CHAVEZ, M. H. e ROQUE, N. F. (1997) *Phytochemistry* **44**, 523.
62. PRETSCH, E., SEIBL, J., SIMON, W. CLERC, T. (1989) *Spectral data
for Structure Determination of Organic Compounds* (W.
Fresenius, ed.), Springer-Verlag, Berlin.
63. JINDRA, A., SIPAL, Z. HUDECOVA, H. (1964) *Experientia* **20**, 371.
64. PEARL, I. A. e BEYER, D. L. (1961) *J. Org. Chem.* **26**, 546.
65. JOSHI, B. S., RAVINDRANATH, K. R., VISWANATHAN, N. (1978)
Experientia **34**, 422.
66. JOSHI, B. S., VISWANATHAN, N., BALAKRISHNAN, V., GAWAD, D.
H. and RAVINDRANATH, K. R. (1979) *Tetrahedron* **35**, 1665.
67. AHMAD, V. U., ALIYA, R., SHAISTA, P. AND SHAMEEL, M. (1992)
Phytochemistry **31**, 1429.
68. OGER, J. M., RICHOMME, P., BRUNETON, J., GUINAUDEAU, H.
(1991) *J. Nat. Prod.* **54**, 273.
69. MATIDA, A. K., ROSSI, M. H., BLUMENTHAL, E. E. A., SCHUQUEL,
I. T. A., MALHEIROS, A. E VIDOTTI, G. J. (1996) *Anais Assoc.
Bras. Quim.* **45**, 147.
70. OSMAN, A. M., EL-GARBY YOUNES, M. e MOKHTAR, A. (1975)
Phytochemistry **14**, 829.
71. OSMAN, A. M., EL-GARBY YOUNES, M. e MOKHTAR, A. (1975)
Aust. J. Chem. **28**, 217.