



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Instituto de Química
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado e Doutorado



**ESTUDO QUÍMICO DA RAIZ DE *ALIBERTIA CONCOLOR* (CHAM.)
K.SCHUM. (RUBIACEAE) ASSOCIADO À ANÁLISE
CONFORMACIONAL DE SEUS IRIDOIDES**

Nathália Mitsuko Oyama

Prof. Dr. Walmir Silva Garcez

Campo Grande – 2015

Unidade XI – Instituto de Química – UFMS

Cidade Universitária, s/n - Caixa Postal 549 - Fone/Fax 067xx 3345-7009 Fone 067xx 3345-7010
79070-900 - Campo Grande (MS)
<http://www.ufms.br> e-mail: pgquimica.propp@ufms.br



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Instituto de Química
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado e Doutorado



**ESTUDO QUÍMICO DA RAIZ DE *ALIBERTIA CONCOLOR* (CHAM.)
K.SCHUM. (RUBIACEAE) ASSOCIADO À ANÁLISE
CONFORMACIONAL DE SEUS IRIDOIDES**

Nathália Mitsuko Oyama

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química – Nível de
Mestrado – da Universidade Federal de
Mato Grosso do Sul para obtenção do
título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Walmir Silva Garcez
Co-orientadora: Dr^a Edilene Delphino Rodrigues

Campo Grande – 2015

Unidade XI – Instituto de Química – UFMS

Cidade Universitária, s/n - Caixa Postal 549 - Fone/Fax 067xx 3345-7009 Fone 067xx 3345-7010
79070-900 - Campo Grande (MS)
<http://www.ufms.br> e-mail: pgquimica.propp@ufms.br

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.”

(Dalai Lama)

Aos meus pais, Massao e Tsuyako Oyama

AGRADECIMENTOS

Várias são as pessoas que colaboraram para a realização deste trabalho e a elas prestarei meus sinceros agradecimentos:

Aos meus pais, Massao e Tsuyako, e meu namorado Alex, pelo apoio constante e por compreenderem a minha ausência.

Ao Prof. Walmir Silva Garcez eu agradeço pela paciência, compreensão, amizade e pelos valiosos ensinamentos que, com certeza, eu levarei para a vida toda.

À Dr^a Edilene D. Rodrigues pela orientação, dedicação e a grande amizade que construímos, e pelos valiosos ensinamentos de RMN e paciência de trabalhar comigo.

Aos professores Dr^a Mária José Camargo, Dr. Joaquim Corsino e Dr. Adilson Beatriz por terem aceitado fazer parte da minha banca e pelas contribuições prestadas.

À Prof^a Fernanda Rodrigues Garcez pela importante contribuição com seus ensinamentos sobre elucidação estrutural.

Aos amigos do laboratório LP1, em especial ao aluno de iniciação científica Rafael, pela parceria e agradável convivência nesses anos.

Ao técnico Vinícius Palaretti pela realização dos experimentos de RMN-1D no espectrômetro de 500Mhz da FFCL-RP/USP.

Ao Prof. Gil Valdo José da Silva da FFCL-RP/USP pela permissão de uso do espectrômetro de 500Mhz BRUKER-DRX-500 para a realização dos experimentos de RMN-1D e 2D.

Aos secretários do programa de pós-graduação do INQUI-UFMS, Celestino e Adermar, pela eficiência e amizade.

Aos professores do INQUI-UFMS, por dividirem comigo os seus conhecimentos.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida, à CAPES e à FUNDECT, pelo apoio financeiro

ÍNDICE

RESUMO.....	I
ABSTRACT	IV
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTAS DE TABELAS.....	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Importância Dos Produtos Naturais	1
1.2 Determinação Estrutural dos Produtos Naturais	3
1.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Análise Conformacional	3
1.4 Família Rubiaceae	8
1.5 Gênero <i>Alibertia</i>	10
1.6 Definição de Iridoides e Aspectos de sua Elucidação Estrutural	11
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	15
3.1 Material Utilizado.....	15
3.2 Estudo Fitoquímico de <i>Alibertia concolor</i> (Rubiaceae)	16
3.2.1 Coleta e Identificação do Material Vegetal	16
3.2.2 Obtenção do Extrato Bruto da Raiz De <i>Alibertia concolor</i> e da Substância 1.16	
3.2.3 Fracionamento do Extrato Bruto da Raiz de <i>A. concolor</i> (Rac)	16
3.2.4 Fracionamento Preliminar da Raiz de <i>A. concolor</i> (Rac) – (Parte 1) – Obtenção das substâncias 2 e 3a.....	16
3.2.5 Fracionamento do Extrato da Raiz de <i>A. concolor</i> (Parte 2) – Obtenção das substâncias 3a, 4a e 4b.....	19
3.2.6 Obtenção das Substâncias 3b, 3c e 3d a Partir da substância 3a – Estudo da Estabilidade do iridoide a.	20
3.2.7 Análise Conformacional das Substâncias 3a, 3b, 3c e 3d.....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Identificação das Substâncias Presentes na Raiz de <i>A. concolor</i> (Cham.) K.Schum. (Rubiaceae).....	22
4.2 Identificação das Substâncias 3a, 3b, 3c e 3d.....	22
4.2.1 Identificação e Análise Conformacional da Substância 3a.....	22



4.2.2	Identificação das Substâncias 3b, 3c e 3d	45
4.2.3	Determinação da Configuração Relativa da Substância 3b	49
4.2.4	Determinação da Configuração da Substância 3c	51
4.2.5	Proposta da Configuração da Substância 3d	53
4.3	Caracterização das Substâncias 4a e 4b	67
4.4	Identificação da Substância 2	75
4.5	Identificação da Substância 1	86
5	CONCLUSÃO.....	91
6	REFERÊNCIAS	92



RESUMO

Os produtos naturais sempre foram importantes para humanidade, principalmente na medicina. Uma área bastante importante no estudo de produtos naturais é a sua determinação estrutural. Entre as técnicas mais usadas com esta finalidade encontra-se a RMN, que, combinada com análise conformacional computacional, tem solucionado vários problemas na identificação de produtos naturais. Neste sentido, o presente trabalho trata da aplicação destas técnicas na identificação de substâncias da classe dos iridoídeos, principalmente não glicosilados, presentes na raiz de *Alibertia concolor* (Rubiaceae). As estruturas destes compostos apresentam um sistema bicíclico e vários centros quirais, conferindo-lhe uma mobilidade conformacional razoavelmente alta, que dificulta a determinação de suas configurações relativas. O material vegetal foi coletado em Campo Grande – MS. Seu extrato em acetona foi submetido a técnicas cromatográficas que resultaram no isolamento/caracterização de cinco substâncias, as quais foram identificadas ou tiveram suas estruturas elucidadas com base nas técnicas espectroscópicas de análise de RMN de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais) e/ou na análise conformacional computacional. As substâncias obtidas foram: o açúcar D-manitol, o iridoídeo glicosilado “shanzisídeo metil éster”, o iridoídeo não glicosilado “scyphiphin C1” e a mistura de dois diastereoisômeros de iridoídeos não glicosilados: a “shanzigenina metil éster” e a “1-*epi*-shanzigenina metil éster”. Além disso, foi realizado um estudo de estabilidade da “scyphiphin C” em metanol e em piridina, a partir do qual foram obtidos três isômeros inéditos deste iridoídeo: a “scyphiphin C”, a “scyphiphin C2” e “scyphiphin C3”.



ABSTRACT

Natural products have always been important to humanity, especially in medicine. A very important area in the study of natural products is their structural determination. Among the techniques most used for this purpose is NMR spectroscopy. The combination of NMR with computational conformational analysis has solved many problems of indentifying natural products. Thus, the aim of this work is the identification of iridoid, especially not glycosylated, from *Alibertia concolor* root (Rubiaceae). The iridoids present several chiral centers and a bicyclic system in their structure, giving them a conformational mobility fairly high. This fact makes it difficult to determine unequivocally the stereochemistry of these compounds. The plant material was collected in Campo Grande – MS and its acetone extract was subjected to chromatographic techniques. This procedure resulted in obtaining five substances (D-mannitol, shanziside methyl ester, scyphiphin C and the mixture of two diastereoisomers, shanzigenin methyl ésterand 1-*epi*-shanzigenin methyl ester). These substances were identified or elucidated on the basis of their ^1H and ^{13}C NMR (1D and 2D) data and/or computational conformational analysis. Besides, a stability study of scyphiphin C1 in methanol and pyridine was performed, from which were obtained three unpublished isomers: scyphiphin C, scyphiphin C2 and scyphiphin C3.



LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	-	acetato de etila
ax	-	axial
CC	-	cromatografia em coluna (à pressão atmosférica)
CCDA	-	cromatografia em camada delgada analítica
CD ₃ OD	-	metanol deuterado
COSY	-	<i>Homonuclear correlated spectroscopy</i>
conf.	-	<i>confôrmero</i>
<i>d</i>	-	dubleto
DCM	-	diclorometano
<i>dd</i>	-	Duplo dubleto
<i>ddl</i>	-	Duplo dubleto largo
DEPT	-	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
<i>dl</i>	-	dupleto largo
DMSO-d ₆	-	Dimetilsulfóxido deuterado
<i>dt</i>	-	duplo tripleto
eq	-	equatorial
Glu	-	glucose
HMBC	-	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HSQC	-	<i>Heteronuclear sigle quantum coherence</i>
Hz	-	<i>Hertz</i>
<i>J</i>	-	constante de acoplamento
<i>m</i>	-	multipleto
MeOH	-	metanol
NOESY	-	<i>Nuclear overhauser and exchange spectroscopy</i>
Ø	-	diâmetro interno
<i>q</i>	-	quarteto
<i>ql</i>	-	quarteto largo
<i>s</i>	-	singleto
<i>sl</i>	-	singleto largo



<i>t</i>	-	triplete
<i>td</i>	-	triplete de dubleto
<i>tl</i>	-	triplete largo
UV	-	ultravioleta
δ	-	deslocamento químico
BBD	-	Broadband decoupling



LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alcaloides do ópio	1
Figura 2 - Produtos Naturais Quimioterápicos.....	2
Figura 3 - Estrutura do colesterol proposta por Wieland e Windaus (9) e estrutura correta (10).....	3
Figura 4 - Proposta da estrutura da Porrinoxina (11) e da estrutura revisada (12).	4
Figura 5 - Estrutura da ochratoxina A (13) e seus confôrmeros (13a e 13b).....	5
Figura 6 – Projeções do ângulo diedro entre Ha e Hb vicinais.....	7
Figura 7 – Equação e Curva de Karplus tomando como base uma molécula de etano.....	7
Figura 8 - Estrutura da quinina.	9
Figura 9 - Iridoides isolados de <i>Randia spinosa</i>	9
Figura 10 - Estrutura do geniposídeo.	9
Figura 11 – Estrutura dos iridoides não glicosilados.....	10
Figura 12 - Triterpenos isolados da espécie <i>Alibertia edulis</i>	10
Figura 13 – Estrutura de iridoides isoladas em <i>A. sessilis</i>	11
Figura 14 - Esqueletos dos iridoides	11
Figura 15 - Iridoides produzidos por <i>Iridomyrmex detectus</i>	12
Figura 16 - Estrutura dos iridoides A, B, C e D obtidos por Fúrio (2006)	13
Figura 17 - Placa cromatográfica revelada com solução vanilina ácida.	17
Figura 18 - Fluxograma do fracionamento cromatográfico - parte 1- do extrato acetônico de <i>A. concolor</i>	17
Figura 19 - Placa cromatografica resultante da coluna realizada com a fração RAC3-S4-19.....	20
Figura 20 - Fluxograma do fracionamento cromatográfico - parte 2- do extrato acetônico de <i>A. concolor</i>	20
Figura 21 – Principais correlações observadas pelo do experimento 2D HMBC (DMSO-d6, 500 MHz) da substância 3a.....	24
Figura 22 - Posições possíveis para a terceira hidroxila.....	25
Figura 23 - Proposta da posição da terceira hidroxila	25
Figura 24 - Correlações observadas pelo experimento de RMN de NOESY.....	26
Figura 25 - Proposta estrutural da substância 3a.....	26
Figura 26 - Proposta da conformação da substância 3a.....	27
Figura 27 - Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD, 300 MHz) da substância 3a	29
Figura 28 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD, 300MHz) da substância 3a	30
Figura 29 - Espectro de RMN de ¹ H (DMSO-d6, 400 MHz) da substância 3a.....	31
Figura 30 - Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (DMSO-d6, 400MHz) da substância 3a	32
Figura 31 - Espectro de RMN de ¹³ C (CD ₃ OD, 75 MHz) da substância 3a	33
Figura 32 - Expansão do espectro de RMN de ¹³ C (CD ₃ OD, 75 MHz) da substância 3a	34
Figura 33 - Espectro de RMN de ¹³ C DEPT 135° (CD ₃ OD, 75 MHz) da substância 3a	35
Figura 34 - Mapa de contorno do experimento de RMN J-resolved(CD ₃ OD,300 MHz) da substância 3a.....	36



Figura 35 - Espectro de RMN bidimensional HSQC (CD ₃ OD, 300MHz e 75 MHz) da substância 3a	37
Figura 36 - Correlações observadas pelo mapa de contorno do experimento 2D HSQC da substância 3a.....	38
Figura 37 - Mapa de contorno do experimento 2D COSY (CD ₃ OD, 300MHz) da substância 3a.....	39
Figura 38 - Mapa de contorno do experimento 2D COSY (DMSO-d ₆ , 300MHz) da substância 3a	40
Figura 39 - Mapa de contorno do experimento HMBC (CD ₃ OD, 300MHz) da substância 3a	41
Figura 40 - Mapa de contorno do experimento HMBC (DMSO-d ₆ , 500MHz) da substância 3a.....	42
Figura 42 - Mapa de contorno do experimento NOESY (DMSO-d ₆ , 500MHz) da substância 3a	43
Figura 43 - Mapa de contorno do experimento NOESY (CD ₃ OD, 300 MHz) da substância 3a.....	44
Figura 44 - Espectros de RMN ¹ H da substância 3a em CD ₃ OD obtidos após 1h em solução (b) e após 10 dias (a).....	45
Figura 45 - Comparação dos espectros de RMN de ¹ H (CD ₃ OD,300MHz) a) após 120h em CD ₃ OD; b) após 72h em Pyr-d ₅	46
Figura 46 - Proposta dos possíveis isômeros da substância 3a	46
Figura 47 - Proposta do mecanismo de isomerização da substância 3a no carbono 4.....	47
Figura 48 - Proposta do mecanismo de isomerização da substância 3a no carbono 1.....	47
Figura 49 - Principais correlações observadas pelo experimento NOESY da substância 3b.....	50
Figura 50 - Estrutura da substância 3b	50
Figura 51 - Conformações de mínima energia da substância 3b.....	51
Figura 52 - Proposta da estrutura da substância 3c	52
Figura 53 - Proposta da conformação da substância 3c.....	52
Figura 54 - Estrutura da substância 3d	53
Figura 55 - Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD, 300MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d	54
Figura 56 - Ampliação do espectro de RMN de ¹ H das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d.....	55
Figura 57 - Espectro de RMN de ¹³ C (CD ₃ OD, 75MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d	56
Figura 58 - Espectro de RMN de ¹³ C DEPT 135° (CD ₃ OD, 75MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d	57
Figura 59 - Mapa de contorno do experimento 2D COSY(CD ₃ OD, 300MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d	58
Figura 60 - Mapa de contorno do experimento 2D HMBC (CD ₃ OD, 300 MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d.....	59
Figura 61 - Mapa de contorno do experimento 2D HSQC (CD ₃ OD, 300 MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d.....	60
Figura 62 - Mapa de contorno do experimento J-resolved (CD ₃ OD, 300 MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d.....	61
Figura 63 - Mapa de contorno do experimento 2D NOESY (CD ₃ OD, 300 MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d.....	62
Figura 64 - Espectro de RMN de ¹ H (Piridina-d ₅ , 300MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d.....	63
Figura 65 - Espectro de RMN de ¹³ C (Piridina-d ₅ , 75,0 MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d.....	64
Figura 66 - Mapa de contorno do experimento 2D COSY (Pir-d ₅ , 300,0 MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d...65	



Figura 67 - Mapa de contorno do experimento 2D HMBC (Piridina-d5, 300,0 MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d.....	66
Figura 68 - Proposta estrutural do esqueleto das substâncias 4a e 4b.....	67
Figura 69 - Estruturas da shanzigenina metil éster e 1-epishanzigenina metil éster.....	68
Figura 70 - Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300MHz) das substâncias 4a e 4b em mistura.....	70
Figura 71 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300MHz) das substâncias 4a e 4b em mistura.....	71
Figura 72 - Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75MHz) das substâncias 4a e 4b em mistura.....	72
Figura 73 - Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75,0 MHz) das substâncias 4a e 4b em mistura.....	73
Figura 74 - Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 (CD_3OD , 75,0 MHz) das substâncias 4a e 4b em mistura.....	74
Figura 75 - Estrutura proposta para a substância 2.....	76
Figura 76 - Estrutura da substância 2.....	76
Figura 77 - Espectro de RMN de ^1H (CH_3OD , 300MHz) da substância 2.....	78
Figura 78 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CH_3OD , 300 MHz) da substância 2.....	79
Figura 79 - Espectro de RMN de ^{13}C (CH_3OD , 75 MHz) da substância 2.....	80
Figura 80 - Mapa de contorno do experimento 2D HSQC (CH_3OD , 300MHz) da substância 2.....	81
Figura 81 - Mapa de contorno do experimento HMBC (CH_3OD , 300MHz) da substância 2.....	82
Figura 82 - Mapa de contorno do experimento 2D COSY (CH_3OD , 300MHz) da substância 2.....	83
Figura 83 - Mapa de contorno do experimento J-resolved (CH_3OD , 300MHz) da substância 2.....	84
Figura 84 - Mapa de contorno do experimento NOESY (CH_3OD , 300MHz) da substância 2.....	85
Figura 85 - Estrutura na substância 1 (D-manitol).....	86
Figura 86 - Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 300MHz) do manitol.....	88
Figura 87 - Espectro de RMN de ^{13}C (D_2O , 300MHz) da substância 1.....	89



LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados de RMN ^1H da substância 3a -----	23
Tabela 2 - Dados de RMN ^{13}C da substância 3a-----	24
Tabela 3 - Comparação dos valores de J experimental e teórico das substâncias 3a com heterociclo na conformação cadeira-----	27
Tabela 4 - Dados de RMN de ^{13}C das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d-----	48
Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H das substâncias 3b, 3c e 3d -----	49
Tabela 6 - Comparação dos valores de J experimental e teórico das substância 3b-----	51
Tabela 7 - Comparação dos valores de J experimental e teórico das substância 3c-----	53
Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H e das substâncias 4a, 4b-----	68
Tabela 9 - Dados de RMN de ^{13}C das substâncias 4a, 4b-----	69
Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 2 e do shanzisídeo metil éster-----	77
Tabela 11 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C do D-manitol -----	87



INTRODUÇÃO

ESTUDO QUÍMICO DA RAIZ DE *Alibertia concolor* (Cham.) K.Schum. (RUBIACEAE) ASSOCIADO
À ANÁLISE CONFORMACIONAL DE IRIDOIDES PRESENTES NA ESPÉCIE



1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância dos produtos naturais

Os produtos naturais sempre foram importantes para a humanidade. Um exemplo relevante de utilização foi no Antigo Egito; os sacerdotes os usavam em técnicas de conservação das múmias e os faraós utilizavam metais como cosméticos e óleos perfumados para suavizar a pele. Além disso, dados da medicina egípcia contido no “Ebers Papyrus” documentam 700 drogas extraídas de planta. (CRAGG, 2013). No Ocidente, no século XVI, o pau-brasil (*Cesalpinia echinata*) era comercializado pelos portugueses para tingir roupas em razão do corante vermelho obtido da planta (PINTO, 2002).

O consumo e o conhecimento sobre os produtos naturais nas diferentes civilizações contribuíram significativamente para o desenvolvimento da pesquisa científica sobre o mesmo. A ânsia originada pelo entendimento das propriedades químicas das substâncias levou a descobertas de vários metabólitos secundários. Uma das descobertas foram as substâncias alucinógenas, como por exemplo, o ópio, um suco leitoso obtido através da *Papaver somniferum*, e utilizado há séculos por suas propriedades soporíferas e analgésicas (BARREIRO, 2006). O estudo dos constituintes químicos do ópio (1803) levou ao isolamento da morfina (1), codeína (2), tebaína (3), narcotina (4) e a papaverina (5), os quais são alcaloides e possuem propriedades analgésicas, antitussígenos e espasmolítico (Figura 1) (HOSTETTMANN, 2003).

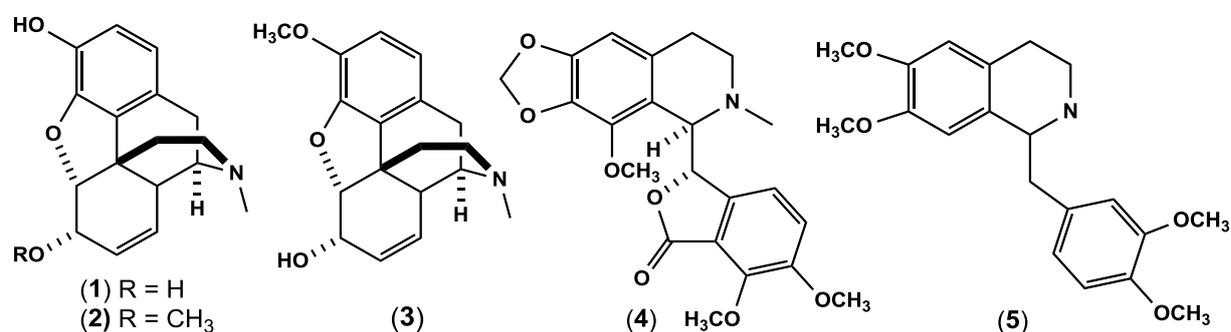


Figura 1 - Alcaloides do ópio

Atualmente, a medicina chinesa é amplamente conhecida devido à fartura e eficiência de espécies vegetais utilizadas no tratamento alternativo de algumas doenças.



Muitas pesquisas têm explorado o potencial de criação de novos fármacos baseados em princípios ativos que podem ser encontrados na natureza. Um clássico, e importante exemplo é a da *Catharanthus roseus*, conhecida simplesmente como vinca. A partir do seu estudo químico foram isolados dois alcaloides (**Figura 2**), vimblastina (**6**) e vincristina (**7**) que são utilizados, principalmente, como quimioterápicos contra o câncer de ovário, testículos e leucemia (HEIJDEN, 2004). Dentre os quimioterápicos, o paclitaxel (**8**) foi isolado em 1971, da casca de *Taxus brevifolia*. Este produto natural mostrou-se eficaz contra alguns tipos de câncer e tumor. Em meados da década de 20, ele foi comercializado com o nome de Taxol[®], sendo o remédio mais vendido para o tratamento do câncer de mama e ovário (SOUZA, 2004).

Assim como a vimblastina, vincristina e o taxol, outros fármacos foram, e ainda são fundamentais para o progresso e interesse nos produtos naturais por parte da pesquisa científica e indústria econômica e farmacêutica.

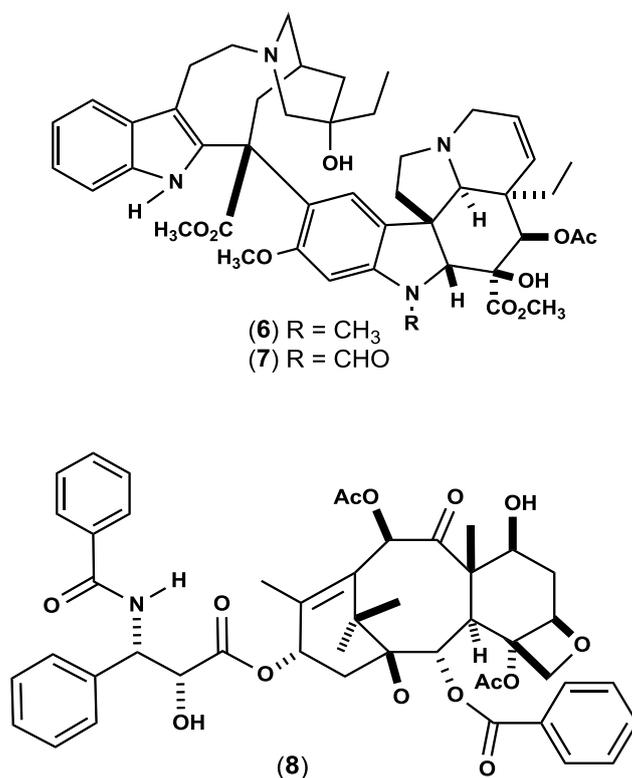


Figura 2 - Produtos Naturais quimioterápicos.



1.2 Determinação Estrutural dos Produtos Naturais

As últimas décadas foram marcadas por grandes avanços na ciência e tecnologia que permitiram a elucidação estrutural de produtos naturais mais satisfatoriamente. Até o início do século XX, a elucidação estrutural era feita por meio de síntese química, ou, mais especificamente, processos de degradação ou modificação estrutural. (NICOLAU, 2005), isto limitava a capacidade da determinação das estruturas e, muitas delas foram consideradas erradas. Um exemplo clássico foi a estrutura do colesterol (9) (Figura 3), proposta por Wieland e Windaus (1928), a qual foi corrigida cinco anos depois, através da análise por raio-X de um cristal do esteroide (BERNAL, 1932).

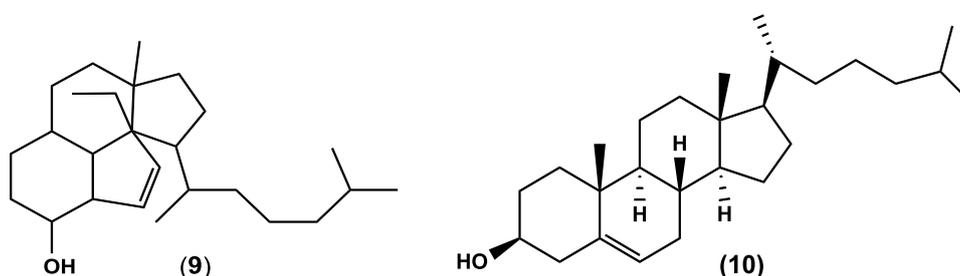


Figura 3 - Estrutura do colesterol proposta por Wieland e Windaus (9) e estrutura correta (10).

1.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Análise Conformacional

Os métodos mais significativos para a determinação estrutural e identificação dos constituintes químicos das plantas são os espectroscópicos. Nesse contexto, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das técnicas mais utilizadas para investigação a nível molecular, permitindo obter informações estruturais e dinâmicas das mais simples as mais complexas substâncias (NASCIMENTO, 2001).

A RMN se destaca pela riqueza dos dados fornecidos, que são fundamentais na elucidação das estruturas de compostos, sendo que as informações obtidas mais importantes são, principalmente, dois parâmetros da RMN, o deslocamento químico e a constante de acoplamento spin-spin, os quais são importantes para indicar a composição molecular e determinar a estereoquímica de compostos orgânicos.

Apesar do seu alto potencial, a espectroscopia de RMN apresenta uma baixa sensibilidade que tem sido superada com os recentes avanços em gradientes de campo



pulsado (PFG), técnicas de supressão de solvente, tecnologia de construção de sondas e magnetos com campo alto. Isto permite a correção de algumas estruturas propostas anteriores a estes avanços. Por exemplo, a estrutura proposta **(11)** (**Figura 4**), para a fitoxina do fungo *Alternaria porri*, denominada porritoxina, antes baseada em dados de RMN 1D (400MHz) aliados a IV, EM, e UV, por Suemitsu (1992), foi recentemente corrigida para a estrutura **12**, por Horiuchi (2002) utilizando dados de RMN 1D e 2D (500MHz), com aplicação de pulsos de gradiente de campo, além de UV, EM, IV.

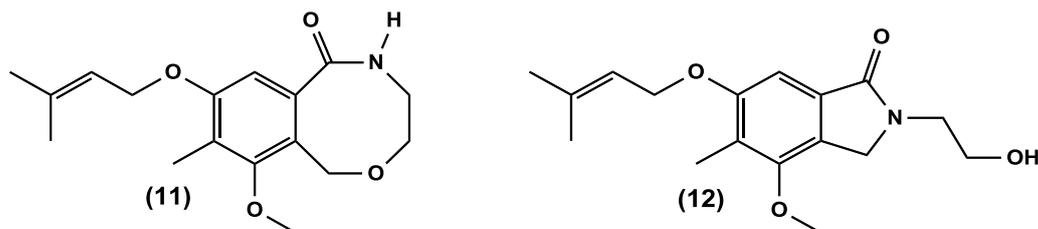


Figura 4 - Proposta da estrutura da Porritoxina (11) e da estrutura revisada (12).

Uma das dificuldades encontradas durante a determinação estrutural de compostos orgânicos está relacionada à determinação da configuração absoluta, ou seja, a estereoquímica. Uma das formas de superar esta dificuldade é realizar o estudo conformacional, baseando-se nos dados de constantes de acoplamento direto fornecidos pelo experimento de RMN 2D NOESY e de acoplamentos spin-spin observados em espectros de RMN 1D e RMN 2D *J-resolved*. Durante a análise destes dados, pode-se realizar a comparação com dados estimados computacionalmente, ou com outros dados experimentais como raios-X e difração de elétrons, espectroscopia na região do infravermelho, na região do Ultravioleta, Raman, de fotoelétrons, entre outros (SMITH, 2007).

O arranjo dos átomos de uma molécula no espaço pode variar através de rotações de ligações simples. Os arranjos espaciais assumidos são chamados de conformações, que representam confôrmeros, os quais são rapidamente interconvertidos, na maioria das vezes não podendo ser isolados, por possuírem uma barreira energética baixa (ELIEL, 1994). A interpretação ou predição de propriedades físico-químicas em relação à energia contida em uma substância, em termos das conformações assumidas por uma dada molécula, chama-se de análise conformacional.

A investigação de propriedades conformacionais é uma área muito importante da química, porque muitas moléculas de interesse para a Química Orgânica, Bioquímica e Química Medicinal podem adotar várias conformações. Esta mobilidade conformacional pode ser útil no estudo de interações moleculares importantes para atividade biológica.



Um dos pontos mais importantes no estudo de moléculas mais complexas, como os produtos naturais, é a elucidação de centros quirais existentes nestas moléculas, uma vez que esses centros estão intimamente relacionados à atividade biológica. Um estudo de análise conformacional interessante é o trabalho de Dais e colaboradores (2005), que utiliza cálculos computacionais de modelagem molecular e experimentos de RMN 2D na análise conformacional da ochratoxina A (**13**) (Figura 5), produzida por fungos encontrados em alimentos como cereais, feijão e café. Para este composto a toxicidade observada é atribuída à hidroxila ligada ao C-8, podendo interagir através de uma ligação de hidrogênio com a carbonila do grupo amida, quando está na conformação **13a**, ou com a carbonila da lactona de seis membros, quando na conformação **13b**.

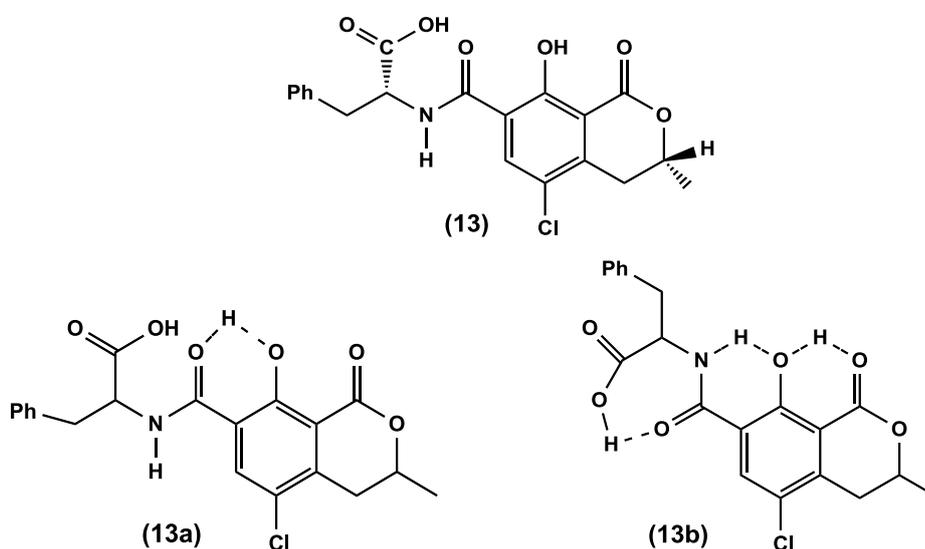


Figura 5 - Estrutura da ochratoxina A (**13**) e seus confôrmeros (**13a** e **13b**)

Devido ao poder da interpretação dos modelos moleculares foram desenvolvidas ferramentas matemáticas para auxiliar o entendimento da estrutura molecular e suas alterações associadas com a reatividade química. Com o avanço tecnológico, programas computacionais que desenham as moléculas são utilizados para este objetivo, permitindo a simulação numérica de estruturas químicas e reações, baseadas nas leis fundamentais da física.

Recentemente foram desenvolvidos métodos de mecânica molecular e semi-empíricos (*ab initio*) para cálculos de parâmetros de RMN como constante de blindagem nuclear e de acoplamento spin-spin.



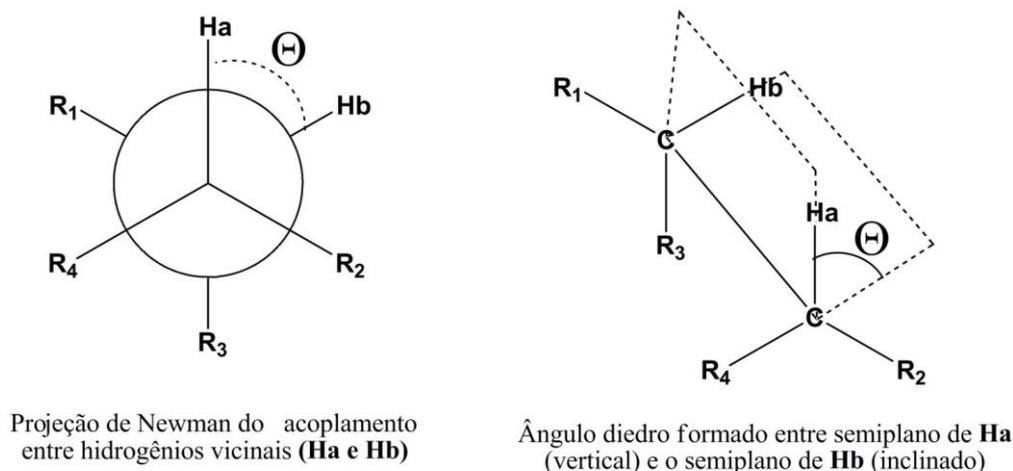
A base dos métodos de mecânica molecular, segundo Barreiro e colaboradores (1997), é a mecânica clássica da estrutura molecular (clássica), pela qual as moléculas são constituídas por esferas (átomos) ligadas por molas com constantes de força características, que formam um campo de força. Este campo é a somatória de energias relacionadas às posições de equilíbrio do sistema derivadas de um ou mais parâmetros, tais como distâncias de ligação, ângulos de ligação, ângulos diedros, distâncias de van der Waals, ligações hidrogênio, interações eletrostáticas, entre outros. A avaliação por mecânica molecular é realizada por programas computacionais, o que permite uma determinada rapidez na análise de sistemas moleculares complexos. As constantes de força são avaliadas experimentalmente por espectroscopia (como dicroísmo circular e RMN) e comparadas com os dados obtidos computacionalmente.

Cada programa computacional analisa um ou mais parâmetros, ou seja, cada programa utiliza um tipo de campo de força. Os campos de força mais comuns são AMBER, MM2, MMP2, MMX e SYBIL. O campo de força MM2, por exemplo, é muito utilizado para moléculas de baixo peso molecular. O campo de força MMX, contido no programa PCMODEL, é derivado do MM2 acrescido de rotinas para cálculos utilizando moléculas com sistemas π .

O programa PCMODEL calcula o ângulo diedro (θ) e constante de acoplamento (J) entre hidrogênios vicinais de sistema sp^3 , distâncias entre átomos, bem como posições de átomos e conformações de mínima energia, baseadas na energia potencial da molécula. Portanto, este programa é bastante útil na análise conformacional por RMN.

O ângulo diedro é formado por dois semiplanos que possuem uma aresta em comum. Considerando um fragmento molecular *Ha-Cx-Cy-Hb*, o ângulo diedro será o ângulo formado entre o semiplano que contem a ligação *Ha-Cx* e o que contem a ligação *Cy-Hb*, como mostrado na **Figura 6**. É importante salientar que o valor do acoplamento vicinal $^3J_{(Ha,Hb)}$ entre os hidrogênios *Ha* e *Hb* está relacionado com o ângulo diedro entre eles de acordo com a equação (curva) de Karplus (**Figura 7**).





$J_{Ha,Hb}$ depende de Θ (ângulo diedro)

Figura 6 – Projeções do ângulo diedro entre Ha e Hb vicinais

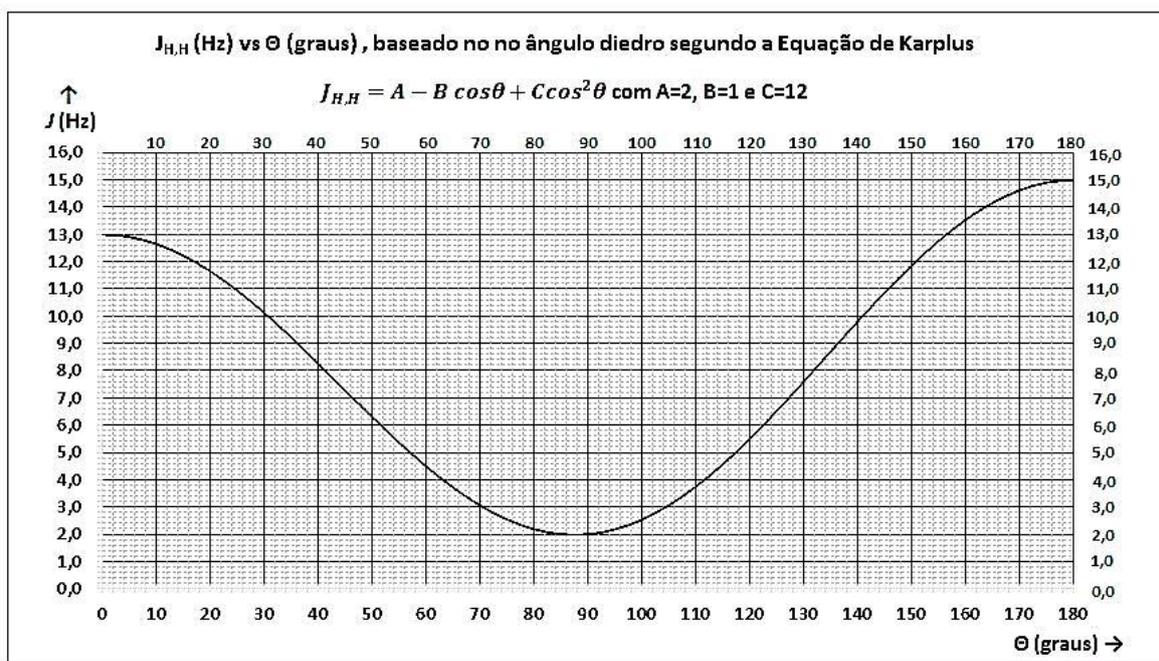


Figura 7 – Equação e Curva de Karplus tomando como base uma molécula de etano

Os métodos de mecânica quântica permitem maior precisão nos resultados e fornecem dados sobre a estrutura eletrônica, implicando em um maior custo computacional, incluindo tempo e capacidade de memória necessária. Os programas de métodos quânticos *ab initio* (CADPAC, GAMESS, GAUSSIAN, HONDO, entre outros) e semi-empíricos (AMPAC, MOPAC, etc.) são baseados no formalismo de orbitais moleculares. Nos métodos *ab initio*, um modelo para uma função de onda particular é selecionado e os cálculos



necessários são realizados sem simplificação. Em tais abordagens o erro está associado ao conjunto de bases selecionado e ao nível de tratamento da correlação eletrônica. Nos métodos semi-empíricos parte de seus parâmetros são ajustados a dados experimentais, o que aumenta a precisão química e a velocidade dos métodos de orbitais moleculares.

Estes cálculos têm sido muito utilizados como ferramentas na química computacional, na elucidação estrutural (TOUSEK, 2005; SASS, 2008; SASS, 2008; SASS, 2011; SOARES, 2012) ou até mesmo na correção de estruturas determinadas anteriormente (LODEWYK, 2012).

1.4 Família Rubiaceae

A família Rubiaceae encontra-se como uma das plantas mais promissoras quanto à diversidade de produtos naturais bioativos. É a quarta maior família em número de espécie entre as Angiospermas, possuindo cerca de 650 gêneros distribuídos em 13.000 espécies. Durante as últimas duas décadas, a divisão da família Rubiaceae sofreu algumas reorganizações sugestionadas principalmente por estudos filogenéticos moleculares, estudos florísticos e revisões taxonômicas (DELPRETE, 2012). A última atualização sugeriu a divisão da família Rubiaceae em três subfamílias: Rubioideae, Cinchonoideae e Ixoroideae, com mais de 44 tribos (BREMNER, 2009).

As espécies da família Rubiaceae são conhecidas por produzirem uma variedade de metabólitos secundários como: flavonoides, iridoides, alcaloides, terpenos, entre outros (SOUZA, 2013). Muitas são conhecidas devido à importância econômica, alimentícia e terapêutica, como a *Chinchona officinalis* que foi utilizada por longa data contra malária, devido à grande produção de quinina (14) (**Figura 8**), um alcaloide com funções antimaláricas, antitérmicas e analgésicas (McCALLEY, 2002). Outra espécie importante é a *Genipa americana*, ocorrente no Nordeste brasileiro e conhecida pelo nome do seu fruto comestível, genipapo. Além dessas espécies, vale destacar as espécies *Ixora coccinea* e *Gardenia jasminoides*, utilizadas como plantas ornamentais. Os frutos da *G. jasminoides* são utilizados na medicina popular oriental no tratamento de febres, dores de cabeça, desordens hepáticas, icterícia e hipertensão (AMURADA, 1976).



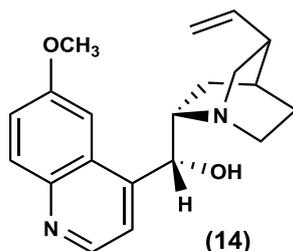


Figura 8 - Estrutura da quinina.

Outra espécie ativa é a *Randia spinosa* (HAMERSKI, 2005), utilizada na medicina popular como anti-inflamatória. Um estudo fitoquímico realizado com seus caules levou ao isolamento dos iridoides glicosilados randinosídeo (15), gardenosídeo (14), galiosídeo (16), ésteres metílicos dos ácidos deacetilasperulosídico (17) e escandosídico (18), **Figura 9**.

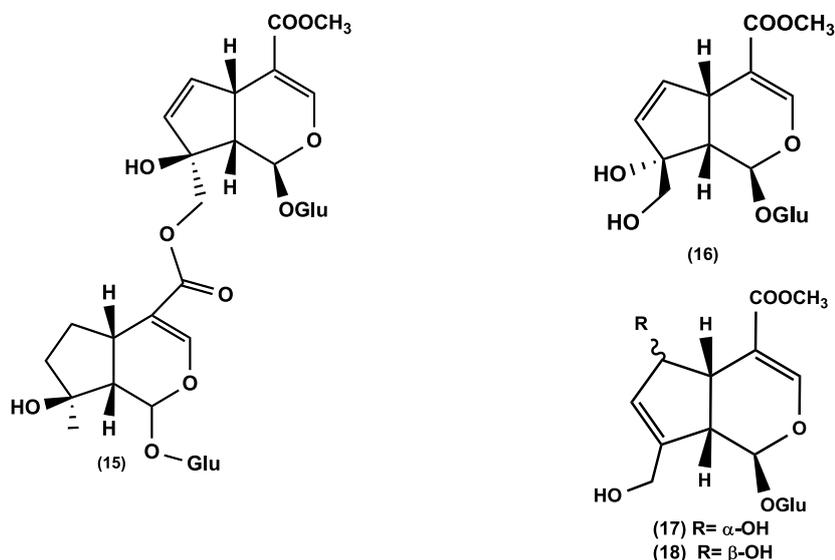


Figura 9 - Iridoides isolados de *Randia spinosa*.

Os iridoides podem ser encontrados em outras espécies de Rubiaceas, por exemplo, o geniposídeo (19), **Figura 10**, um iridoide glicosilado, é majoritário na espécie *G. jasminoides* e apresenta ação de inibição da enzima 5-lipoxigenase (NISHIZAWA, 1988).

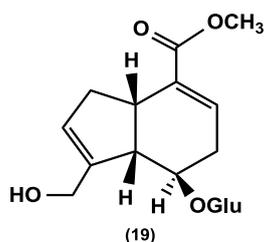


Figura 10 - Estrutura do geniposídeo.



1.5 Gênero *Alibertia*

O gênero *Alibertia* faz parte da subfamília Ixoroideae, inclusa na tribo Gadenieae que possuem 67 gêneros diferentes (ROBBRECH, 2009). Este gênero se destaca pela produção de triterpenos, flavonoides e iridoides.

Das folhas da espécie *Alibertia macrophylla* foram obtidos quatro iridoides não glicosilados (**20-23** – **Figura 11**), sendo que o par de epímeros **20** e **23** apresentou atividade antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Cladosporium sphaerospermum*, *C. cladosporioides*, *Colletotrichum gloesporioides*. (BOLZANI, 1991; YOUNG, 1992).

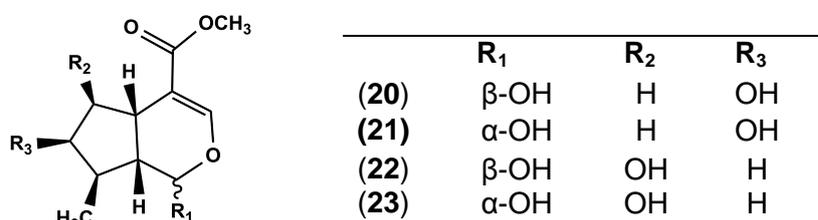


Figura 11 – Estrutura dos iridoides não glicosilados.

Posteriormente, um estudo realizado com as folhas da espécie *Alibertia edulis* resultou na obtenção dos ácidos ursólico (**24**) e oleanólico (**25**) (**Figura 12**), (BROCHINI, 1994).

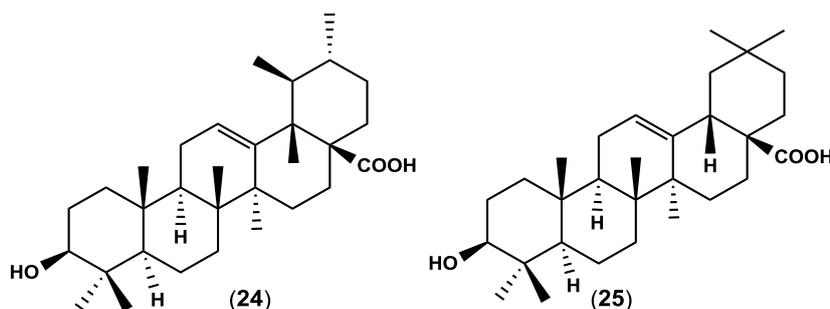


Figura 12 - Triterpenos isolados da espécie *Alibertia edulis*.

Um estudo químico da raiz de *Alibertia sessilis* (Fúrio, 2006) resultou no isolamento de quinze substâncias, dentre elas dois iridoides glicosilados e seis não glicosilados, que são respectivamente: 10-(di-metil-cafeoil)-geniposídeo (**26**), “4”-metil-gaertnerosídeo” (**27**), “shanzigenina metil éster (**28**)”, “1-epishanzigenina metil éster” (**29**) (**Figura 13**).



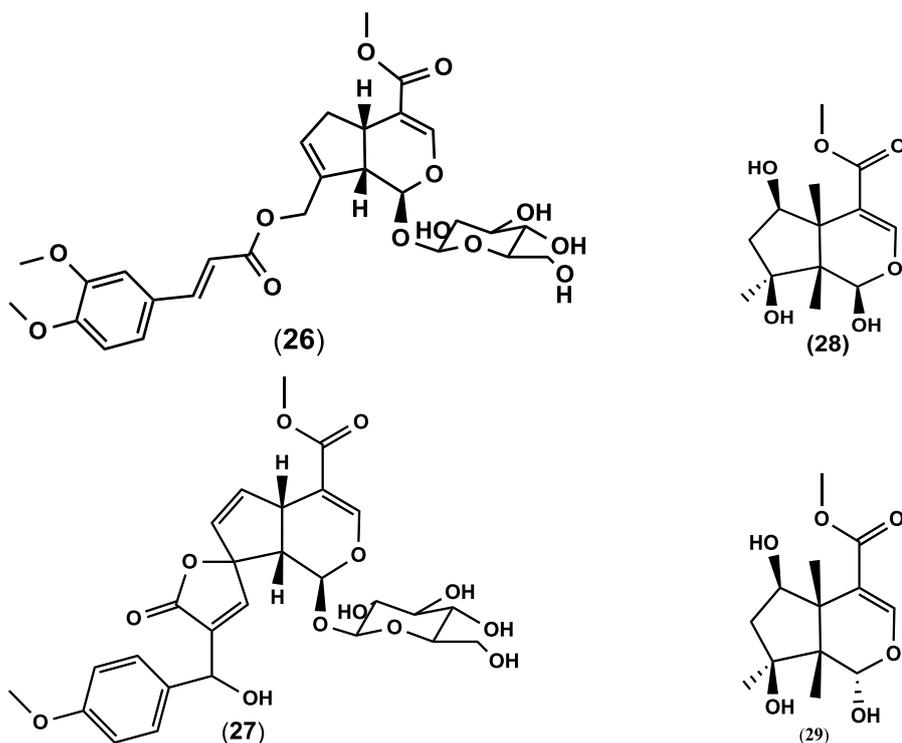


Figura 13 – Estrutura de iridoides isoladas em *A. sessilis*

1.6 Definição de iridoides e aspectos de sua elucidação estrutural

Os iridoides pertencem à classe dos terpenos, sendo, portanto, de natureza isoprenoide. São monoterpenos, ou seja, têm 10 carbonos originados a partir de duas unidades de isoprenos, podendo ter alterações na sequência típica de isoprenoides devido a rearranjos (SAMPAIO-SANTOS, 2001). O esqueleto básico do qual derivam é representado pelo 1-isopropil-2,3-dimetilciclopentano ou iridano (**Figura 14-A**). Em geral, apresenta um heterociclo de seis membros contendo um átomo de oxigênio geminado ao ciclopentano, formando o núcleo denominado iridoide (**Figura 14-B**). A quebra da ligação entre os carbonos 1 e 5 do ciclo pentano dá origem aos chamados secoiridoides (**Figura 14-C**).

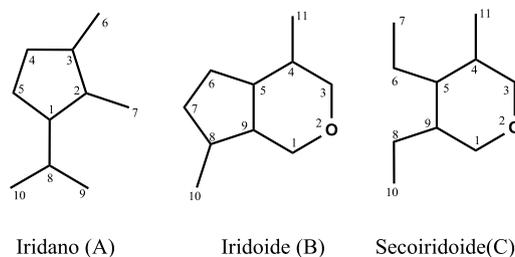


Figura 14 - Esqueletos dos iridoides



O nome do composto modelo, o iridodial (**Figura 15-A**), provem da espécie de formigas *Iridomyrmex detectus*, que secretam iridoides, incluindo também a iridomirmecina (**Figura 15-B**), como produtos defensivos (DYER, 1996). O esqueleto iridodial é produzido após uma série de reações de hidroxilação e oxidação do geraniol, seguido por uma reação de Michael (**Figura 15-C**) (Dewick, 2002). Os iridoides são precursores da biossíntese dos alcaloides indolmonoterpênicos, tais como a ioimbina, a ajmalicina, a strictosidina, a vindolina, a catarantina, a ibogaína, a quinidina e a brucina (BATTERSBY, 1968).

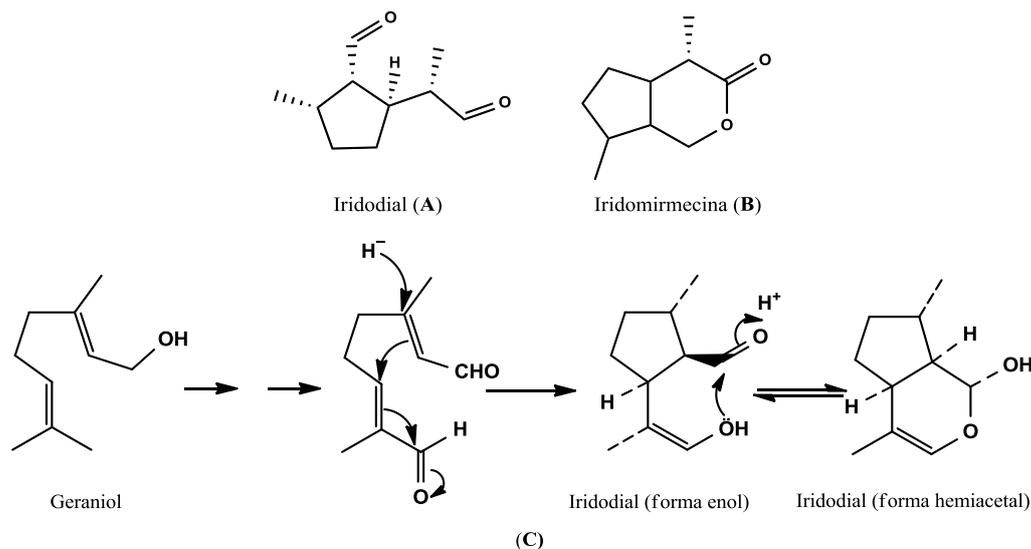


Figura 15 - Iridoides produzidos por *Iridomyrmex detectus*

A presença de vários centros quirais e do sistema bicíclico (sendo um dos ciclos um anel pirano) na estrutura dos iridoides lhe confere uma razoavelmente alta mobilidade conformacional. Isto implica em dificuldades para elucidar suas estruturas com atribuições inequívocas de suas configurações relativas, inclusive recentemente algumas estruturas de iridoides têm sido revisadas. Por exemplo, os três iridoides obtidos por Delazar e colaboradores (2004) da espécie *Eremostachys glabra* Boiss. (Lamiaceae) tiveram suas estruturas revisadas por Jensen e colaboradores (2007).

Outro problema encontrado na elucidação dos iridoides diz respeito ao fato desses compostos serem lábeis tanto em C-1 (hemiacetal) quanto em C-4, podendo sofrer isomerização nestes sítios. Essas modificações podem ocorrer durante a biossíntese, produzindo pares de epímeros naturais ou durante o processo de obtenção, produzindo pares de epímeros como artefatos.

Fúrio (2006), durante seu trabalho experimental, obteve uma mistura dos iridoides A, B, C, e D mostrados na **Figura 16**. Ele observou através dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C que a proporção entre os componentes da mistura variava em função do tempo e solvente, o que



indicou a ocorrência de isomerização desses iridoides. Entretanto, para a confirmação desta hipótese seriam necessários novos experimentos de RMN, atividade óptica e estudos conformacionais.

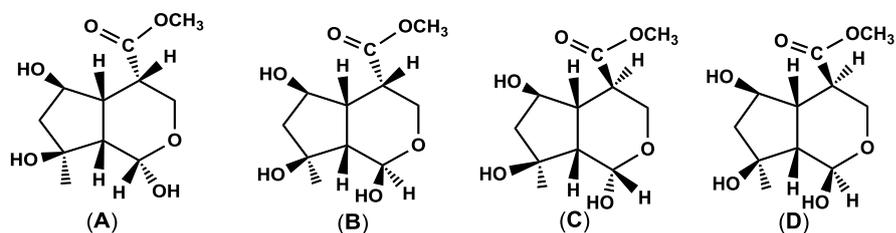


Figura 16 - Estrutura dos iridoides A, B, C e D obtidos por Fúrio (2006)



OBJETIVOS

ESTUDO QUÍMICO DA RAIZ DE *Alibertia concolor* (Cham.) K.Schum. (RUBIACEAE) ASSOCIADO
À ANÁLISE CONFORMACIONAL DE IRIDOIDES PRESENTES NA ESPÉCIE



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar o estudo químico da raiz de um espécime de *Alibertia concolor*.

Realizar a análise conformacional dos iridoides não glicosilados sem a presença da dupla ligação entre C-3 e C-4, presentes na raiz dessa espécie.

2.2 Objetivos específicos

- Coletar, identificar e preparar o extrato acetônico das raízes da planta *Alibertia concolor*;

- Submeter o extrato acetônico a processos cromatográficos visando a purificação dos constituintes químicos presentes, em especial, os iridoides não glicosilados e sem a presença da dupla ligação nos carbonos 3 e 4.

- Identificar ou elucidar as estruturas dos iridoides e outros constituintes químicos isolados;

- Obter as conformações mais estáveis dos iridoides e calcular as suas constantes de acoplamento com o auxílio de softwares de análise conformacional;

- Comparar as constantes de acoplamento calculadas com as obtidas experimentalmente por RMN;

- Atribuir a configuração relativa dos isômeros dos iridoides;

- Verificar as estabilidades dos iridoides em piridina e em metanol frente à isomerização em C-1 e C-4.



PARTE EXPERIMENTAL

ESTUDO QUÍMICO DA RAIZ DE *Alibertia concolor* (Cham.) K.Schum. (RUBIACEAE) ASSOCIADO
À ANÁLISE CONFORMACIONAL DE IRIDOIDES PRESENTES NA ESPÉCIE



3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Material Utilizado

- 🌿 Solventes de grau P. A. (Merck ou Synth): AcOEt, CH₃OH, Acetona, Acetonitrila, Piridina.
- 🌿 Sephadex LH-20[®] (Pharmacia).
- 🌿 Sílica gel 60 G (5-40 μm, Merck) em camadas de 0,25 mm de espessura para cromatografia em camada delgada analítica.
- 🌿 Reveladores: inspeção à luz UV (254 nm), solução vanilina 0,5% H₂SO₄ e chapa de aquecimento.
- 🌿 Eluente: AcOEt:HCOOH:H₂O(90:5:5 v/v/v) (**Eluente I**).
- 🌿 Espectrômetro BRUKER[®] - Modelo DPX300: magneto de 7,05 Tesla, com sonda de dual detecção direta e sonda multinuclear de detecção inversa (¹H: 300,13 MHz, ¹³C: 75,468 MHz) para tubos de amostras de 5 mm, com sistema de “lock” de Deutério (²H), bobina geradora de gradiente em z (campo máximo de 53,5 Gauss.cm⁻¹) usada nos experimentos de RMN 2D.
- 🌿 Espectrômetro BRUKER[®] - Modelo DRX500 – Ultra Shield[®]: magneto de 11,74 Tesla, com sonda multinuclear de detecção inversa (¹H: 500,13 MHz, ¹³C: 125,77 MHz) para tubos de amostras de 5 mm, com sistema de “lock” de Deutério (²H), bobina geradora de gradiente em z (campo máximo de 53,5 Gauss.cm⁻¹) usada nos experimentos de RMN 2D.
- 🌿 Solventes deuterados empregados foram: Pyr-d₅, CD₃OD, D₂O, DMSO-d₆ (Merck, Aldrich ou CIL).



3.2 Estudo Fitoquímico de *Alibertia concolor* (Rubiaceae)

3.2.1 Coleta e identificação do material vegetal

A raiz de *Alibertia concolor* foi coletada em fevereiro de 2014, no município de Campo Grande – MS e identificada pelo Prof. Dr. Arnildo Pott, sendo depositada duas exsicatas no Herbário CGMS-UFMS (Herbário de Campo Grande – MS da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul) sob os números CGMS-37442 e CGMS-37449.

3.2.2 Obtenção do extrato bruto acetônico da raiz de *Alibertia concolor*.

A raiz de *A. concolor* (100,0g) foi submetida a um processo de limpeza consistindo na remoção de resíduos e outros fragmentos. A seguir foi triturada e moída. O pó obtido foi extraído exaustivamente com acetona à temperatura ambiente. O extrato foi concentrado por evaporação do solvente sob pressão reduzida em rotaevaporador. Durante o processo de rotaevaporação, formou-se um precipitado branco, solúvel em água, que foi separado e lavado com acetona, dando origem a substância **1** (13,4mg) que foi submetida à análise de RMN de ^1H e ^{13}C . O extrato bruto foi codificado como RAC tendo massa igual a 15,00g.

3.2.3 Fracionamento do extrato bruto da raiz de *A. concolor* (RAC)

Para garantir um rendimento mais eficiente, o fracionamento da RAC foi realizado em duas etapas. A primeira consistiu em um fracionamento preliminar a fim de encontrar uma metodologia eficaz de separação e isolamento dos iridoides, e a segunda resumiu-se em reproduzir o melhor método testado na primeira etapa do fracionamento.

3.2.4 Fracionamento preliminar da raiz de *A. concolor* (RAC) – (parte 1) – obtenção das substâncias **2** e **3a**.

Inicialmente 4,0 g do extrato foram submetidos ao fracionamento cromatográfico utilizando uma coluna cromatográfica filtrante aberta ($h = 28$ cm; $\Phi = 5,0$ cm), empregando sephadex LH-20[®] e o eluente CH_3OH . Foram recolhidas 78 frações de 10 mL das quais



foram submetidas à cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD) utilizando o eluente I. Após as revelações das placas, com solução de vanilina ácida, foi possível observar, em algumas frações, a presença de uma mancha azulada, característica de iridoide (**Figura 17**). Estas frações foram reunidas em uma só fração, codificada como RAC-S1 (1,9 g).

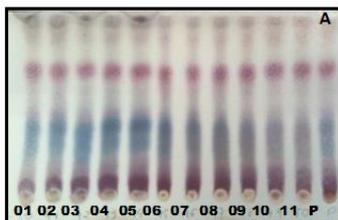


Figura 17 - Placa cromatográfica revelada com solução vanilina ácida.

A fim de estabelecer uma metodologia de separação e isolamento desses iridoídes, a fração RAC-S1 foi dividida em três partes: RAC-S1a, RAC-S1b, RAC-S1c. Cada parte foi submetida a testes em colunas empregando, respectivamente, Sephadex LH-20[®] em CH₃OH/H₂O (gradiente crescente de polaridade), ou sílica de fase reversa C-18 em H₂O/CH₃OH (gradiente decrescente de polaridade) ou (7:3 v/v). A **Figura 18** representa sucintamente o fracionamento cromatográfico dessa parte do extrato.

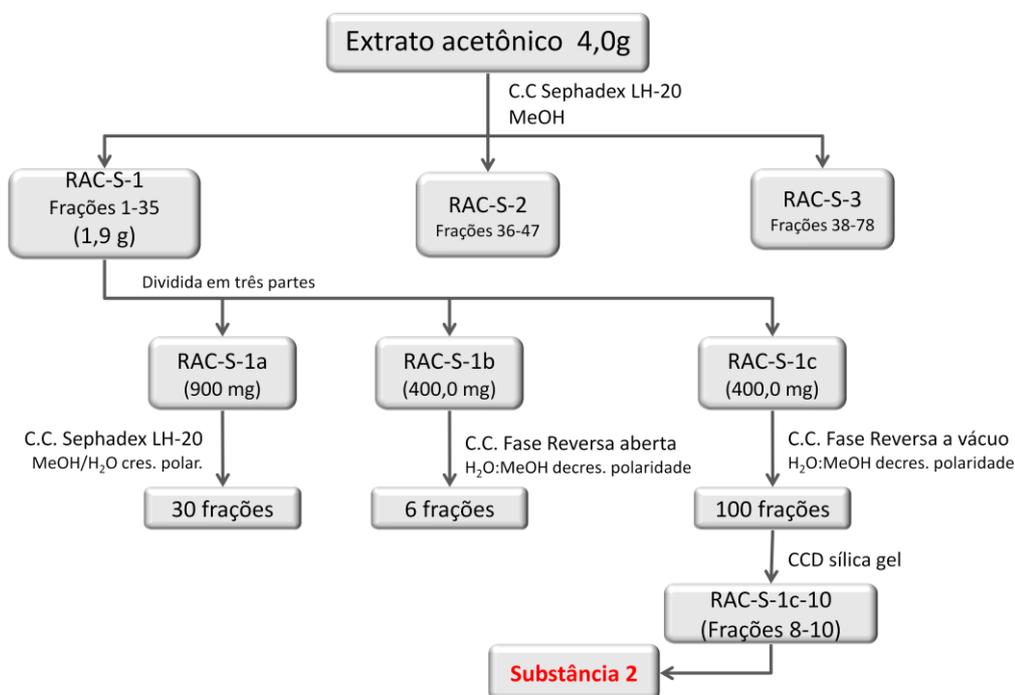


Figura 18 - Fluxograma do fracionamento cromatográfico - parte 1- do extrato acetônico de *A. concolor*.



A primeira parte da fração, a RAC-S1a (900,0 mg) foi submetida a uma cromatografia em coluna aberta ($h = 28\text{cm}$; $\Phi = 5,0\text{ cm}$) utilizando Sephadex LH-20 e o eluente $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas 30 frações de 10 mL, as quais foram cromatografadas em CCDA, eluídas no eluente I e reveladas em solução de vanilina, seguida de aquecimento. A partir da análise dos cromatogramas percebeu-se que o procedimento adotado não apresentou uma boa separação dos iridoides. Deste modo, a segunda parte, RAC-S1b (400 mg), foi submetida a uma coluna aberta ($h = 6\text{cm}$; $\Phi = 6\text{cm}$), usando sílica de fase reversa C-18, como fase estacionária e, como eluente, $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}$ (gradiente decrescente de polaridade), sendo recolhidas 6 frações de aproximadamente 120 mL. Após análise por CCDA, verificou-se que a separação das substâncias nesta condição também não foi muito efetiva.

A terceira parte, RAC-S1c (400mg), foi submetida a uma cromatografia em coluna sob vácuo, utilizando sílica de fase reversa C-18 com a mesma dimensão da coluna anterior, iniciando agora, com a mistura de eluente $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}$ (7:3 v/v) seguindo a ordem gradiente decrescente de polaridade até 100% de CH_3OH . Foram recolhidas 100 frações de 20 mL, as quais foram avaliadas por CCDA e agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico. A fração RAC-S1c-10 (9,0mg) apresentou uma mancha azulada na placa após revelação, indicando a presença de iridoide e foi enviada para análise de RMN 1D e 2D, fornecendo a **substância 2**. O aspecto do espectro de RMN ^1H mostrou-se característico de um iridoide glicosilado.

As frações das colunas RAC-S1a, RAC-S1b e RAC-S1c que apresentaram manchas azuis na placa cromatográfica foram reunidas, gerando a fração denominada RAC-S1abc. Esta fração (~200,0 mg) foi submetida a um novo fracionamento cromatográfico utilizando uma coluna aberta ($h = 10\text{cm}$, $\Phi = 2\text{cm}$) de sílica *flash* (230-400 mesh), e o eluente AcOEt saturado com Água. Deste fracionamento foram obtidas 36 frações que, após análise por CCDA, foram reunidas em 5 sub-frações. A CCDA da sub-fração denominada RAC-S1abc-F-10 apresentou uma mancha azulada majoritária. A fim de purificar esta sub-fração, foi feita uma lavagem com o solvente AcOEt, fornecendo a **substância 3a** (5,0 mg), que foi analisada por RMN de ^1H que indicou a presença de um iridoide não glicosilado sem ligação dupla. Uma outra análise por RMN de ^1H foi realizada após sete dias, a primeira mostrou que a **substância 3a** não é estável em CH_3OH , apresentando sinais de mais três iridoides.



3.2.5 Fracionamento do extrato da raiz de *A. concolor* (parte 2) – Obtenção das substâncias 3a, 4a e 4b

Visando à obtenção da **substância 3a** pura, fez-se um novo fracionamento cromatográfico partindo do extrato bruto da raiz de *A. concolor* (RAC). Para garantir uma separação mais eficiente e prevenir a modificação da **substância 3a** durante o processo, evitou-se o uso de CH₃OH. O extrato bruto foi dividido em três alíquotas: uma com 2,0 g (RAC1), outra com 3,0 g (RAC2) e a terceira com 2,5 g (RAC3). Cada alíquota foi submetida ao mesmo procedimento cromatográfico, sendo solubilizada em AcOEt:CH₃OH 7:3 (v/v) e aplicada em uma coluna aberta (h= 15cm; Φ = 5,0 cm) de sephadex LH-20[®], utilizando o eluente isocrático AcOEt:CH₃OH 7:3 (v/v). As frações obtidas foram cromatografadas em placas de sílica gel de alumínio e eluídas no eluente I. Após análise, as frações foram reunidas de acordo com a semelhança cromatográfica. Nas frações RAC1-S6-22(140,0mg), RAC2-S4-22(193,0mg) e RAC3-S4-19(184,0mg) foi detectado a presença do iridoide **3a**. Tais frações foram submetidas, separadamente, a uma cromatografia em coluna aberta (h= 10,5cm; Φ= 2cm) utilizando sílica *flash* (230-400mesh) e, AcOEt saturado com H₂O, como eluente isocrático. Após análise por CCDA (**Figura 19**), as frações obtidas foram reunidas em sub-frações de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico. As frações denominadas RAC1-S622-F11-25 (7,0mg), RAC2-S422-F17-24 (8,6mg) e RAC3-S419-F12-19 (7,8mg), apresentaram uma forte mancha azul em CCDA, quando revelada com solução de vanilina. As amostras foram lavadas com solvente AcOEt, obtendo a **substância 3a**. Para análise de RMN 1D e 2D da **substância 3a**, as frações RAC2-S422-F17-24 e RAC3-S419-F12-19 foram reunidas e codificadas como **IRIDOIDE A** [substância 3a (16,8mg)]. Esta substância foi analisada por RMN 1D e 2D em DMSO-d₆ e CD₃OD.

As frações RAC1S622-F4-6(1,6mg), RAC2S422-F2-5(2,3mg) e RAC3S419-F5-6(1,9mg) (**Figura 19**) apresentaram uma mancha rosa em CCD quando revelada com solução de vanilina. As três amostras foram lavadas com solvente AcOEt e reunidas em uma só fração, denominada RACSFlash 4-5 (5,8mg). Tal fração foi submetida a experimentos de RMN de ¹H e ¹³C. A análise preliminar dos espectros indicou a presença de dois iridoídes em mistura, denominados **4a** e **4b**. O esquema do isolamento das substâncias **3a**, **4a** e **4b** é mostrado na **Figura 20**.



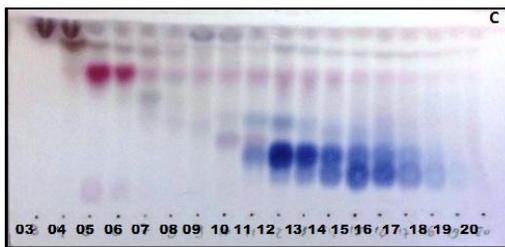


Figura 19 - Placa cromatografica resultante da coluna realizada com a fração RAC3-S4-19

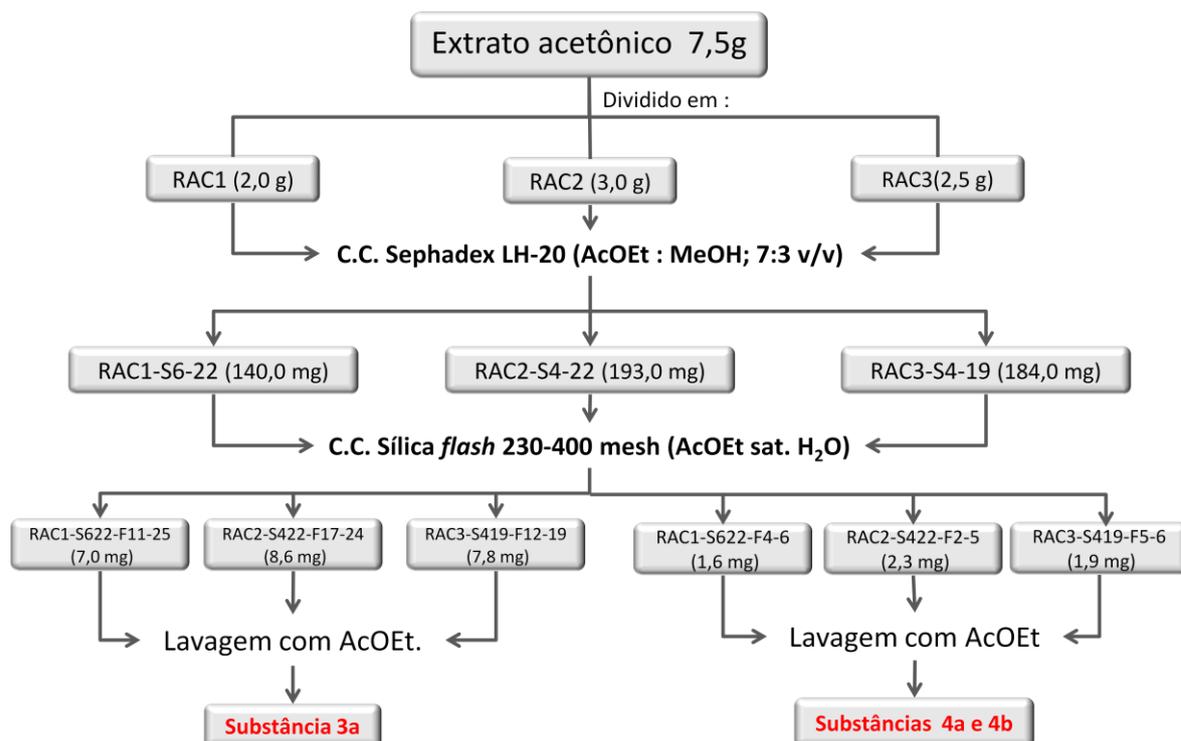


Figura 20 - Fluxograma do fracionamento cromatográfico - parte 2- do extrato acetônico de *A. concolor*

3.2.6 Obtenção das substâncias 3b, 3c e 3d a partir da fração IRIDOIDE A (substância 3a) – Estudo da estabilidade da substância 3a.

Da mesma forma que o espectro de RMN ^1H da fração RAC-S1abc-F-10 (item 3.2.4) em CH_3OH apresentou modificação em função do tempo, o espectro da fração RAC1S622-F11-25 também se modificou. Procedeu-se então um estudo de estabilidade dessa substância. A fração RAC1S622-F11-25 solubilizada em MeOD foi submetida a aquecimentos em banho-maria 40°C por 15, 40, 180 minutos. Após cada aquecimento, foi feito um experimento de RMN ^1H . Não foram observadas mudanças significativas na proporção dos isômeros **3a**, **3b**, **3c** e **3d**. A fim de induzir a formação das substâncias **3b**, **3c** e **3d**, a partir de **3a**, a amostra IRIDOIDE A foi solubilizada em Pyr-d5 e seu espectro



de RMN de ^1H foi analisado em função do tempo até a observação da presença de sinais característicos das **substâncias 3b, 3c e 3d**. A mistura das quatro substâncias foram submetidas à RMN 1D e 2D nos solventes MeOD, DMSO, Pyr-d5.

3.2.7 Análise Conformacional das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d.

A partir das configurações propostas para as **substâncias 3a, 3b, 3c e 3d**, foram calculadas as conformações de mínima energia possíveis e a abundância natural para cada uma das conformações de acordo com a distribuição de Boltzmann, a 27 °C. Para tanto foram utilizados os softwares PCModel[®] (SERENASOFT, 2005) - campo MMX- e Boltz2005[®] (CONSTANTINO, 2014). As constantes de acoplamento spin-spin foram calculadas a partir da média ponderada dessas conformações e comparadas com os dados experimentais de RMN de ^1H obtidos a 27°C.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

ESTUDO QUÍMICO DA RAIZ DE *Alibertia concolor* (Cham.) K.Schum. (RUBIACEAE) ASSOCIADO
À ANÁLISE CONFORMACIONAL DE IRIDOIDES PRESENTES NA ESPÉCIE



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação das substâncias presentes na raiz de *A. concolor* (Cham.) K.Schum. (Rubiaceae)

As estruturas das substâncias isoladas e/ou identificadas foram estabelecidas com base na interpretação dos dados espectrais de RMN 1D e 2D, além de comparações com dados da literatura. As substâncias obtidas foram numeradas de acordo com a ordem cronológica de obtenção, entretanto na discussão sobre a determinação estrutural delas a ordem seguida será de acordo com a semelhança e complexidade estrutural e com a classe a qual pertence cada substância. Assim, primeiramente serão descritos os iridoides saturados não glicosilados (**substâncias 3a, 3b, 3c, 3d**), depois iridoides insaturados não glicosilados (**substâncias 4a e 4b**), seguidos do iridoide insaturado glicosilado (**substância 2**) e, finalmente o açúcar (**substância 1**).

4.2 Identificação das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d

4.2.1 Identificação e análise conformacional da substância 3a

A fração RAC1S622-F11-25, obtida de acordo com o procedimento descrito no item 3.2.5 (p. 19), apresentou uma substância sólida amorfa branca, codificada por **substância 3a**, cuja análise por CCDA mostrou uma mancha azul característica de iridoides. Foram realizados experimentos de RMN ^1H e ^{13}C , 1D e 2D em solventes MeOD (**Figuras 27 e 28**), e DMSO- d_6 (**Figuras 29 e 30**) (p. 29 à 32). No espectro de RMN de ^1H em CH_3OD , foi observado dois simpletos em δ 1,14 e δ 3,67, referentes a três hidrogênios cada e atribuídos aos grupos $-\text{CH}_3$ e $-\text{OCH}_3$, respectivamente. Além desses sinais, o espectro apresentou outros oito sinais, referentes a um hidrogênio cada, sendo: um duplete em δ 4,98 ($J = 9,0\text{Hz}$), que pode ser atribuído a um hidrogênio de carbono de hemiacetal, como por exemplo o C-1 de iridoide; um tripleto em δ 3,21 ($J = 11,7\text{Hz}$); um duplo-duplo-duplete em δ 3,78 ($J = 11,7; 6,2$ e $1,1$ Hz); e três duplo-dupletos em δ 1,67 ($J = 14,9; 3,2$ e $1,2$ Hz), δ 2,22 ($J = 14,9$ e $9,1$ Hz) e δ 2,58 ($J = 9,0$ e $5,8$ Hz). As multiplicidades e valores



das constantes de acoplamento (J) foram determinadas com o auxílio de experimentos de RMN de ^1H (1D e/ou J -resolved) (Figuras 34, Tabela 1).

Tabela 1 - Dados de RMN ^1H da substância 3a

Nº	Subst. 3a ¹ em MeOD	Subst. 3a ² em DMSO-d6
Hid.	$\delta^1\text{H}$ (ppm); mult; J^3 (Hz)	$\delta^1\text{H}$ (ppm); mult; J^3 (Hz)
1	4,98; <i>d</i> ; 9,0	4,75; <i>d</i> ; 8,5
3	3,21; <i>dd</i> ; 11,9 e 11,8 3,78; <i>ddd</i> 11,9; 5,9 e 1,2	2,99; <i>dd</i> ; 11,7 e 11,1 3,54; <i>ddd</i> 11,1; 5,9 e 1,6
4	2,04; <i>tdt</i> ; 11,8; 5,9; 5,8 e 1,5	1,79; <i>dddd</i> ; 11,7; 5,9; 5,4 e 1,7
5	2,88; <i>tdd</i> 8,1; 5,8; 5,7 e 1,2	2,64; <i>tdt</i> 8,2; 5,5; 5,4 e 1,6
6	4,41; <i>td</i> 9,4; 8,1 e 3,5	4,41; <i>dddd</i> ; 9,3; 8,2; 4,3 e 3,4
7	1,67; <i>dd</i> 15,0; 3,5 e 1,5 2,22; <i>dd</i> 15,0 e 9,4	1,46; <i>ddd</i> 14,5; 3,4 e 1,7 1,99; <i>dd</i> 14,5 e 9,3
8	-	-
9	2,58; <i>dd</i> 9,0 e 5,7	2,33; <i>dd</i> 8,5 e 5,5
10	1,14; <i>s</i>	0,94; <i>s</i>
12	3,67; <i>s</i>	
OH (C-1)	-	6,65; <i>s</i>
OH (C-6)	-	4,38; <i>d</i> ; 4,3
OH (C-8)	-	4,43; <i>s</i>

¹ 300 MHz
³ Valores de J (Hz) observados através dos experimentos J -resolved

A análise dos espectros de RMN de ^{13}C (BBD e DEPT135), em MeOD (Figuras 31 à 33 e Tabela 2), indicou a presença de dois carbonos sem hidrogênios ligados, sendo um em δ 174,4, típico de carboxila de éster e um em δ 78,5 característico de carbono carbinólico; cinco carbonos metínicos (δ 94,5; δ 50,5; δ 49,2; δ 72,1 e δ 48,7), dois metilênicos (δ 65,2 e δ 49,2) e dois carbonos metílicos (δ 24,3 e δ 52,1).



Tabela 2 - Dados de RMN ¹³C da substância 3a

N°	Subst. 3a ¹ em CD ₃ OD		Subst. 3a ² em DMSO-d ₆	
	Carb.	δ ¹³ C(ppm)	Carb.	δ ¹³ C(ppm)
1	94,5 CH		92,7 CH	
3	65,2 CH ₂		63,4 CH ₂	
4	50,5 CH		48,8 CH	
5	49,2 CH		47,5 CH	
6	72,1 CH		69,8 CH	
7	49,2 CH ₂		48,7 CH ₂	
8	78,5 C		76,1 C	
9	48,7 CH		47,3 CH	
10	24,3 CH ₃		24,9 CH ₃	
11	174,4 C		172,3 C	
12	52,1 CH ₃		52, CH ₃	

¹ 75 MHz² 200 MHz

A combinação desses dados com as correlações observadas no experimento HSQC, em CD₃OD (**Figura 35 e 36**, páginas 37 e 38), permitiu atribuir os valores de deslocamento químico dos carbonos e dos seus respectivos hidrogênios (**Tabelas 1 e 2**). Os sinais em δ 94,5, δ 78,5 e δ 72,1 indicam a presença de três hidroxilas. Associando essas informações com as correlações observadas no experimento HMBC (**Figura 21, 39 e 40**; p. 41 e 42), foi possível atribuir a posição de duas hidroxilas, um em C-1 (δ 94,5) e outra em C-8 (δ 78,5). A terceira hidroxila estaria ligada a um carbono originalmente metilênico no esqueleto geral do iridoide (**Figura 22**)

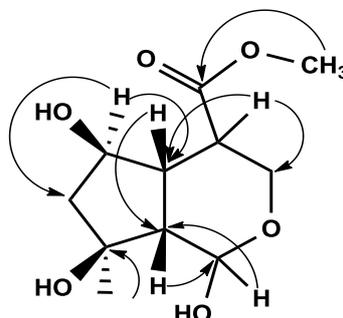


Figura 21 – Principais correlações observadas pelo do experimento 2D HMBC (DMSO-d₆, 500 MHz) da substância 3a



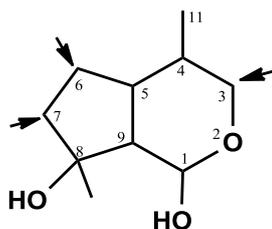


Figura 22 - Posições possíveis para a terceira hidroxila

Para atribuir a posição correta da terceira hidroxila foi estudada as possíveis multiplicidades de cada hidrogênio nas posições possíveis. Se a hidroxila estivesse ligada no C-3 seu deslocamento químico seria em torno de δ 94,0 ppm e H-4 (2,04; *ddd*) seria um duplo-duplo-duplete (*ddd*). Caso a hidroxila estivesse ligada no C-7, a multiplicidade de H-5 seria diferente, pois existiria dois hidrogênios em C-6. Deste modo, a terceira hidroxila esta ligada no C-6, o que é compatível com o deslocamento químico em δ 72,1 para C-6 e em δ 4,41 para H-6, incluindo sua multiplicidade de tripleto de duplete e de H-5 (δ 2,88 *ddd*). Esta proposição foi confirmada através das correlações observadas no mapa de contorno do experimento COSY (Figuras 37 e 38) do H-5 (δ 2,88 *ddd*) com H-6 (δ 4,41 *td*), H-6 com H7' (δ 1,67 *dd*) e H7'' (δ 2,22 *dd*) e H-4 (δ 2,04 *ddd*) com H-3' (δ 3,21 *t*) e H-3'' (δ 3,78 *ddd*), além das correlações observadas no mapa de contorno do experimento HMBC para C-6 e H-6 (Figuras 39 e 40, p. 41 e 42). Além disso, no espectro de RMN de ^1H em DMSO- d_6 , aparecem sinais referente à três hidroxilas em δ 6,65 (*s*), δ 4,43 (*s*) e δ 4,38 (*d*; $J=4,3$ Hz) (Figuras 29 e 30). Como nesse espectro o sinal referente a H-6, δ 4,16 (*ddd*; 9,3; 8,2; 4,3 e 3,4), possui um acoplamento a mais que no espectro em MeOD, H-6 (δ 4,41 *td* 9,4; 8,1 e 3,5), o duplete em δ 4,38 pode ser atribuído a hidroxila geminal a H-6. Além disso, foram observadas no experimento HMBC em DMSO- d_6 as correlações dos sinais das hidroxilas com os carbonos C-1, C-6, C-7, C-8 e C-9 (Figura 40, p.42). Logo, a estrutura mostrada na Figura 23 pôde ser proposta para a substância 3a.

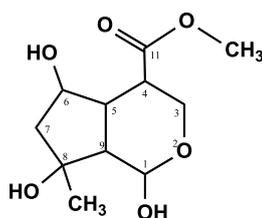


Figura 23 - Proposta da posição da terceira hidroxila



A determinação da configuração relativa da **substância 3a** foi feita através da análise dos espectros de RMN 2D NOESY adquiridos em MeOD (**Figura 42**, p.44) e em DMSO-d6 (**Figura 41**, p. 41). No mapa de contorno do NOESY em CD₃OD foi observada uma interação dipolar entre H-5 (*td*; δ 2,88) e H-9 (*dd*; δ 2,58), indicando que eles estão próximos e no mesmo plano da molécula. Isto é compatível com a configuração *cis* da junção do anel. Também foram observadas as correlações do hidrogênio H-9 com H-4, indicando que H-4 está para o mesmo plano que H-5 e H-9. Além disso, foram observadas correlações do H-10 com H-6 e H-7"; e do H-1 com H-6 e H-3'. (**Figura 24**), o que indica que H-1, H-3', H-6 e H-10 estão no mesmo plano da molécula. Analisando as estruturas dos iridoides que possuem a junção dos anéis em *cis*, observou-se que na maioria H-5 e H-9 geralmente são *beta*. Pela biossíntese, a metila C-10 é *alfa*, portanto a configuração de C-8 é *S* com a hidroxila *beta*. Se H-10 é *alfa*, H-7", H-1, H-3' e H-6 são *alfa*. Esta proposição foi reforçada no experimento NOESY da substância 3a em DMSO-d6 pelas correlações observadas entre as hidroxilas, indicando que elas estão voltadas para o mesmo plano da molécula. Considerando essas informações, a **substância 3a** possui a configuração relativa apresentada na **Figura 25**.

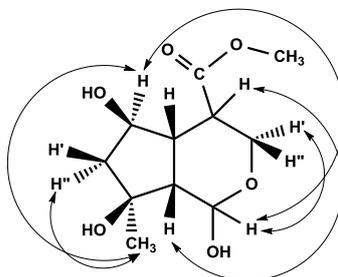


Figura 24 - Correlações observadas pelo experimento de RMN de NOESY (DMSO-d6, 500MHz) da substância 3a

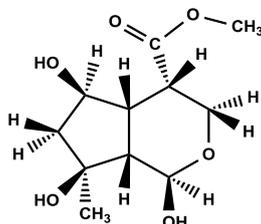


Figura 25 - Proposta estrutural da substância 3a

Após a determinação da configuração da **substância 3a**, os valores de *J* experimentais foram comparados com os valores das médias ponderais de *J* calculados para 3a com o heterociclo nas conformações cadeira e barco. A **Tabela 3** mostra a comparação dos valores experimentais de *J* com os calculados para a heteroconformação



cadeira que apresentou melhor correlação com os dados experimentais para a **substância 3a**. Através da análise desta tabela pode-se observar uma grande semelhança com todos os valores de J . Isto permite confirmar que a conformação mais estável da **substância 3a** encontra-se em cadeira (**Figura 26 a**). A análise das conformações da substância 3a, pelo programa PCModel, mostra que os grupos -OH e -COOCH₃ dos carbonos C-1 e C-4, respectivamente, estão na posição equatorial (**Figura 26 a**). Também foi possível observar a formação da ligação de hidrogênio, formando um ciclo de sete átomos, formado pelos carbonos C-11, C-4, C-5, C-6 e seus respectivos grupos OH (**Figura 26 b**), o que indica uma maior estabilidade para esta conformação. Após levantamento bibliográfico verificou-se que a **substância 3a** é inédita.

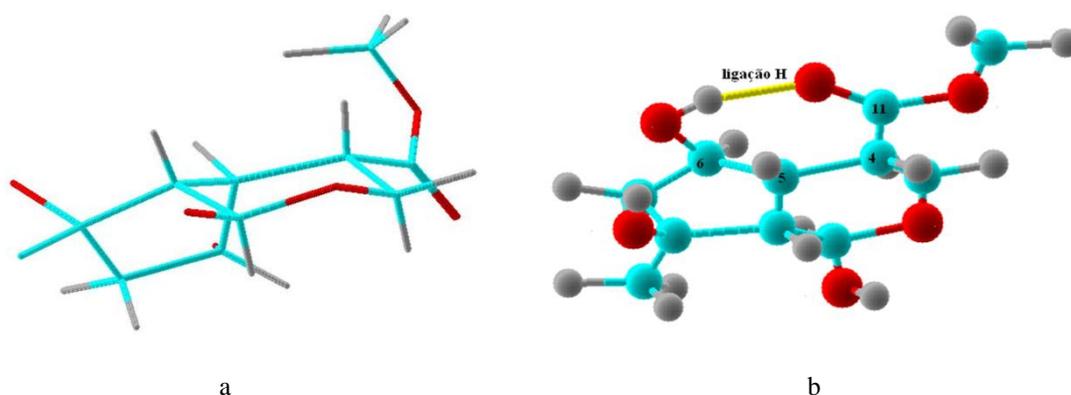


Figura 26 - Proposta da conformação da substância 3a

Tabela 3 - Comparação dos valores de J experimental e teórico das substâncias 3a com heterociclo na conformação cadeira,

	H-1:H-9	H-5:H-9	H-4:H-5	H-3 α :H-4	H-3 β :H-4	H-5:H-6	H-6:H-7 α	H-6:H-7 β	Nº de conf. ⁵
J_{calc}^1 (Hz)	8,0	6,9	4,7	11,4	5,1	6,3	8,5	2,7	55
J_{exp}^2 (Hz)	9,0	5,7	5,8	11,8	5,9	8,1	9,4	3,5	-

¹ Média ponderada de acordo com a distribuição de Boltzman (programa Boltz2005) dos valores de J calculados para cada conformer de mínima energia encontrados com auxílio do programa PCmodel MHz

² Valores de J determinados com base nos experimentos 1H (1D), J-resolved, COSY e HMQC (¹H:300,06 MHz e ¹³C 75,45 MHz)

³ Valores de J com incoerência indicativos que a conformação provável seja a twist (intermediária entre cadeira e bote)

⁵ Números de conformer de mínima energia encontrados pelo PCModel.



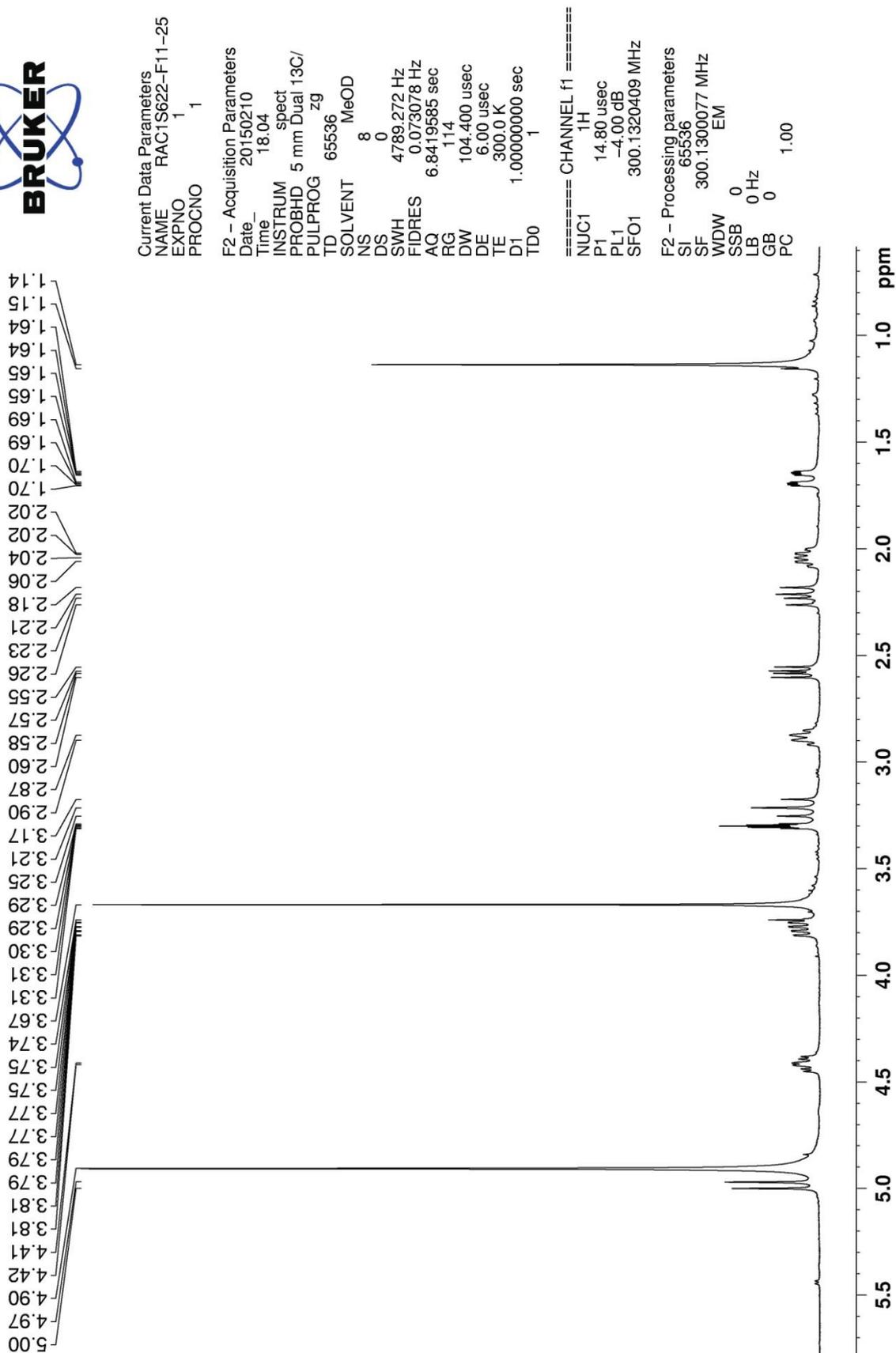


Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) da substância 3a



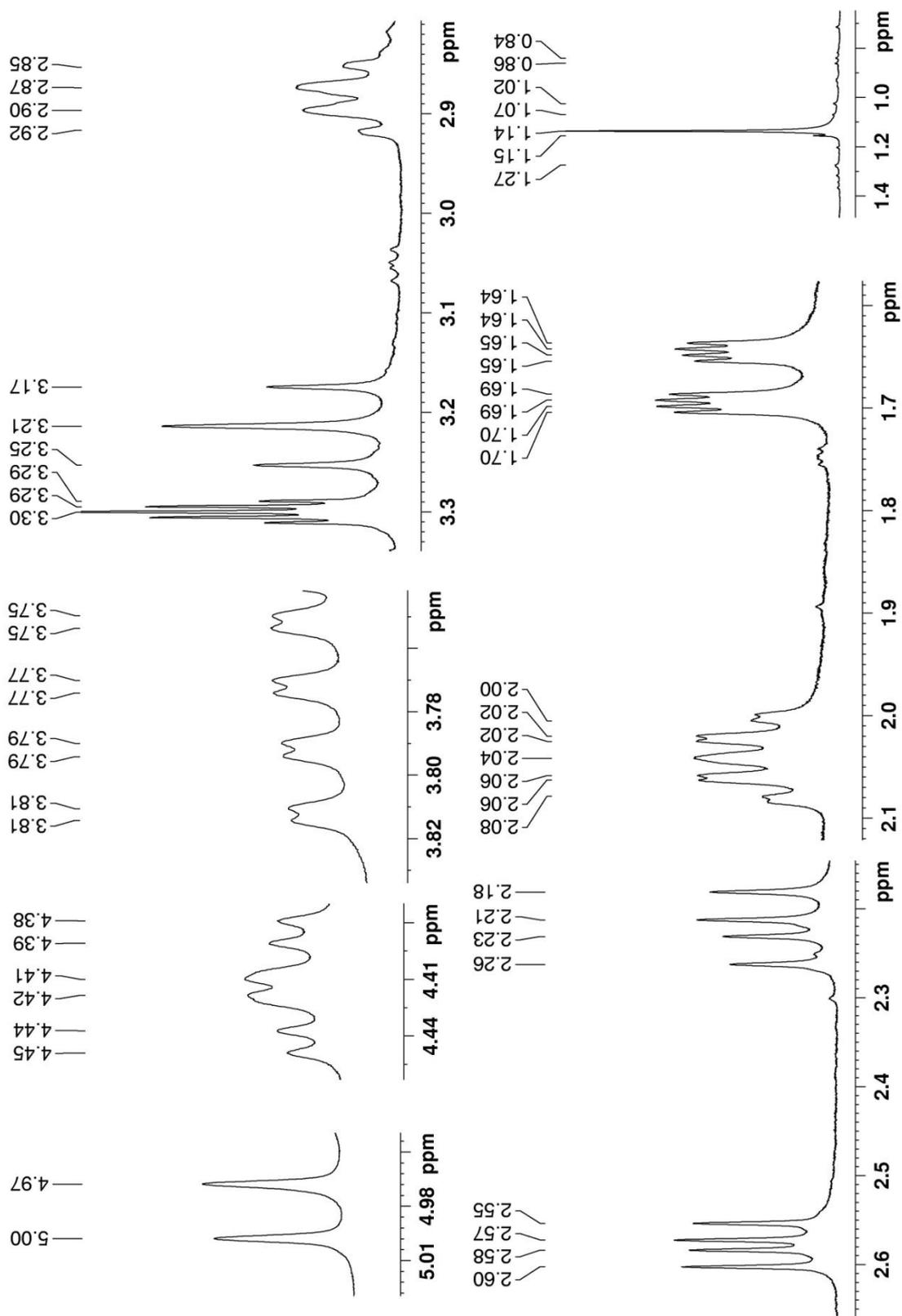


Figura 28 - Expansão do espectro de RMN de ¹H (CD₃OD, 300MHz) da substância 3a





```

Current Data Parameters
NAME      iridoide_c_d
EXPNO    1
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20150518
Time     10.04
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Dual 13C/
PULPROG  zg30
TD        65536
SOLVENT  DMSO
NS        16
DS        2
SWH       8278.146
FIDRES    0.126314
AQ        3.9583745
RG         114
DW        60.400
DE         6.50
TE        293.5
D1         1.00000000
TD0        1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      1H
P1        12.00
PL1       1.10
SFO1      400.1324710

F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        400.1300000
WDW       EM
SSB       0
LB        0 Hz
GB        0
PC        1.00
    
```

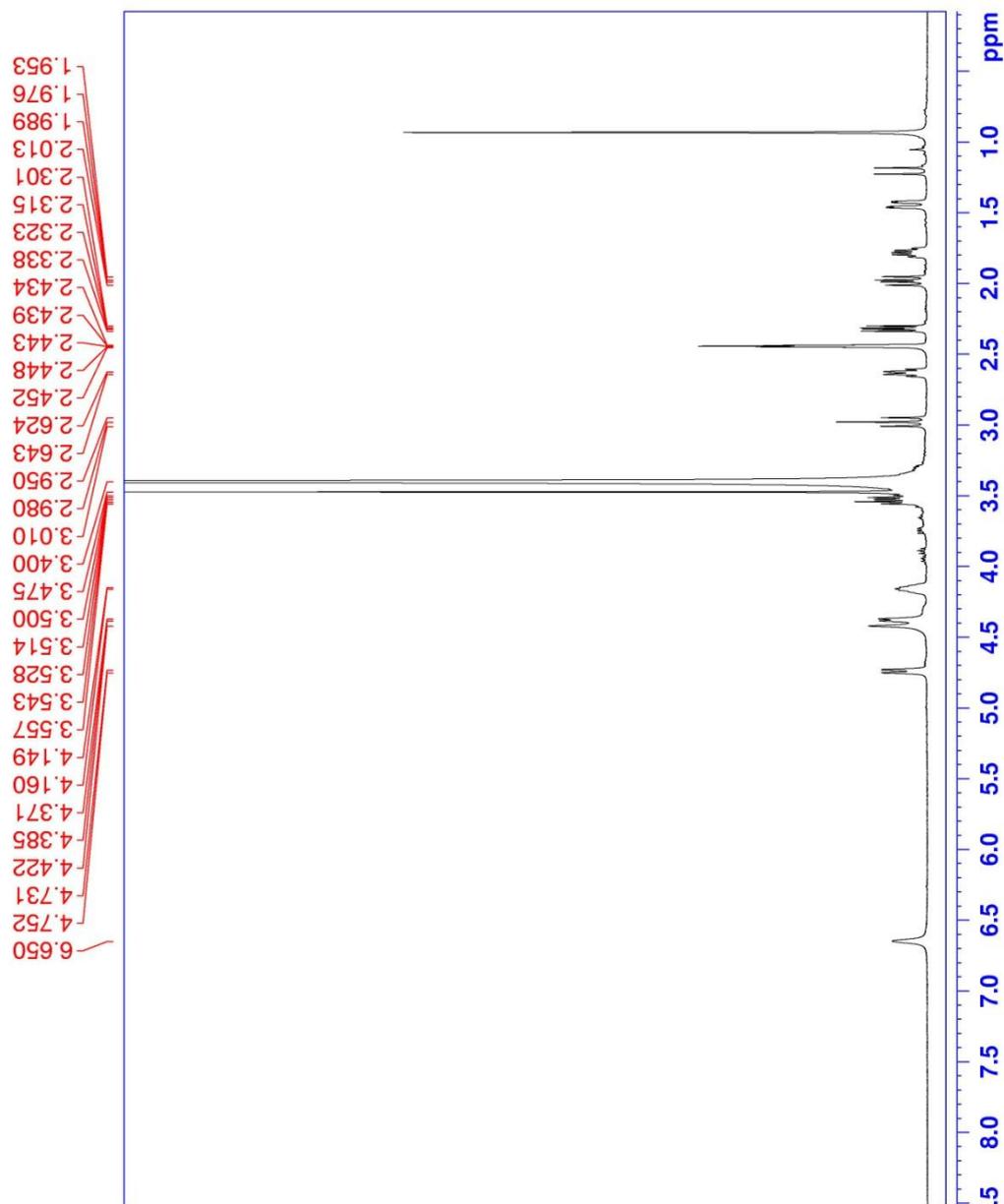


Figura 29 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) da substância 3a



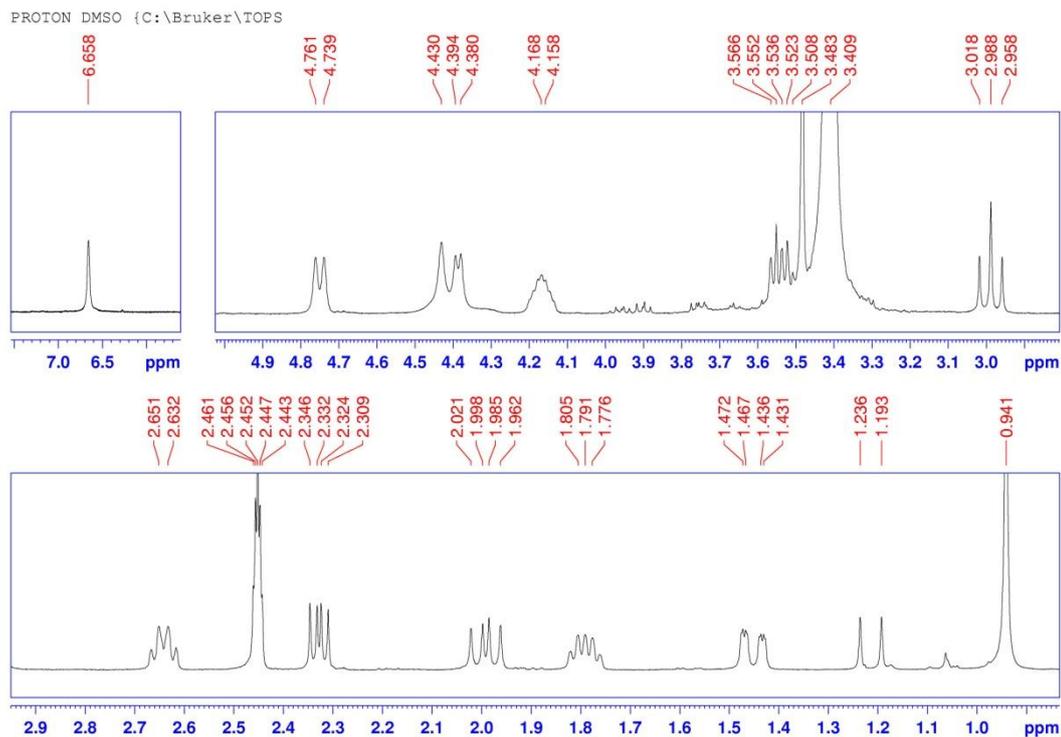


Figura 30 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500MHz) da substância 3a





Current Data Parameters
 NAME 13C-CD3OD-RA
 EXPNO 3
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20150211
 Time 16.41
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Dual 13C/
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT MeOD
 NS 2527
 DS 2
 SWH 18832.393 Hz
 FIDRES 0.574719 Hz
 AQ 0.8699904 sec
 RG 13004
 DW 26.550 usec
 DE 6.00 usec
 TE 300.0 K
 d11 0.15000001 sec
 d1 0.03000000 sec
 DELTA 0.05000000 sec
 TDO 1
 SFO1 75.4768036 MHz
 NUC1 13C
 P1 8.75 usec
 PLW1 -1.00000000 W
 SFO2 300.1312005 MHz
 NUC2 1H
 CPDPRG2 waltz16
 PCPD2 100.00 usec
 PLW2 -1.00000000 W
 PLW12 -1.00000000 W
 PLW13 -1.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 75.4676430 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

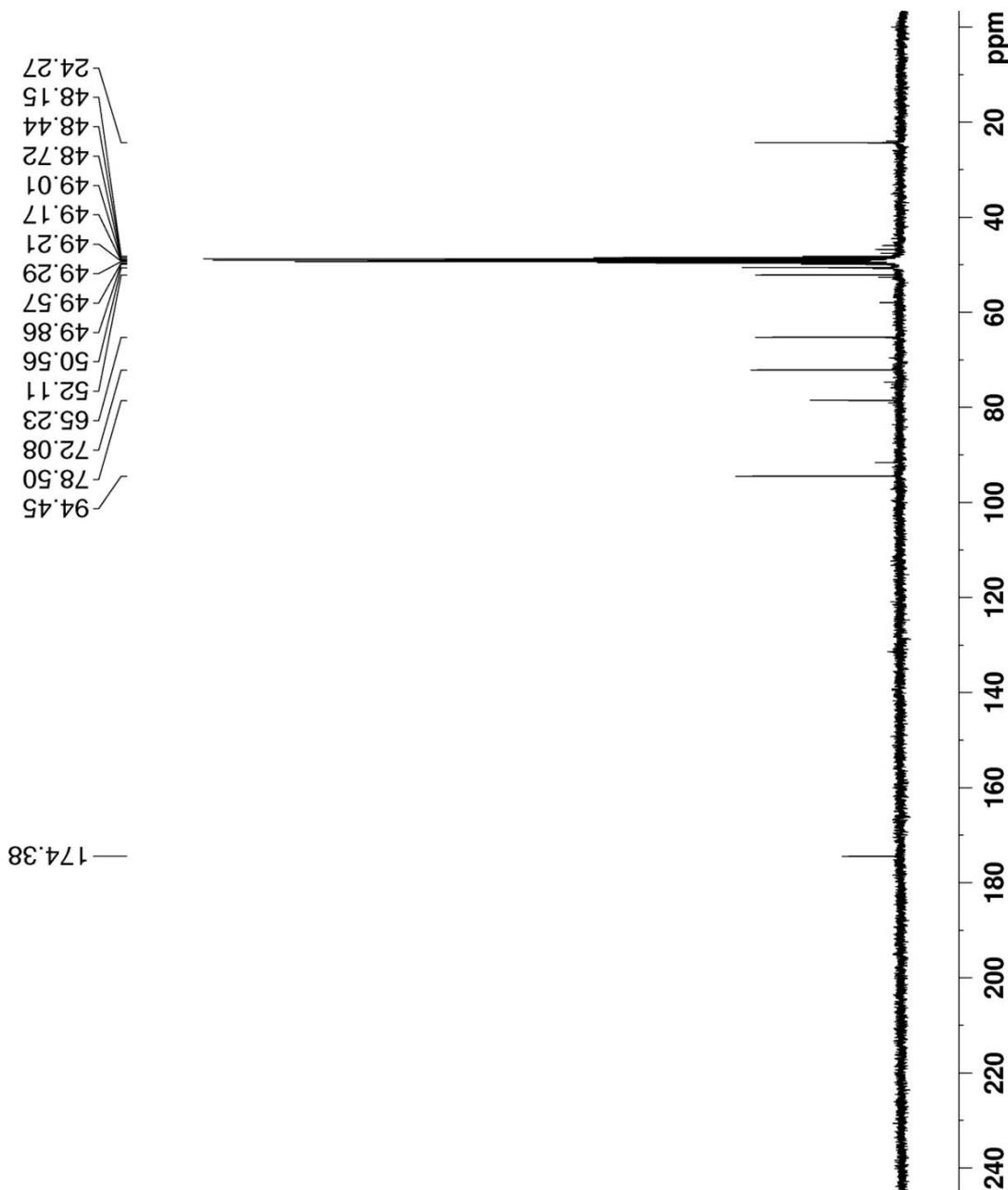


Figura 31 - Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) da substância 3a



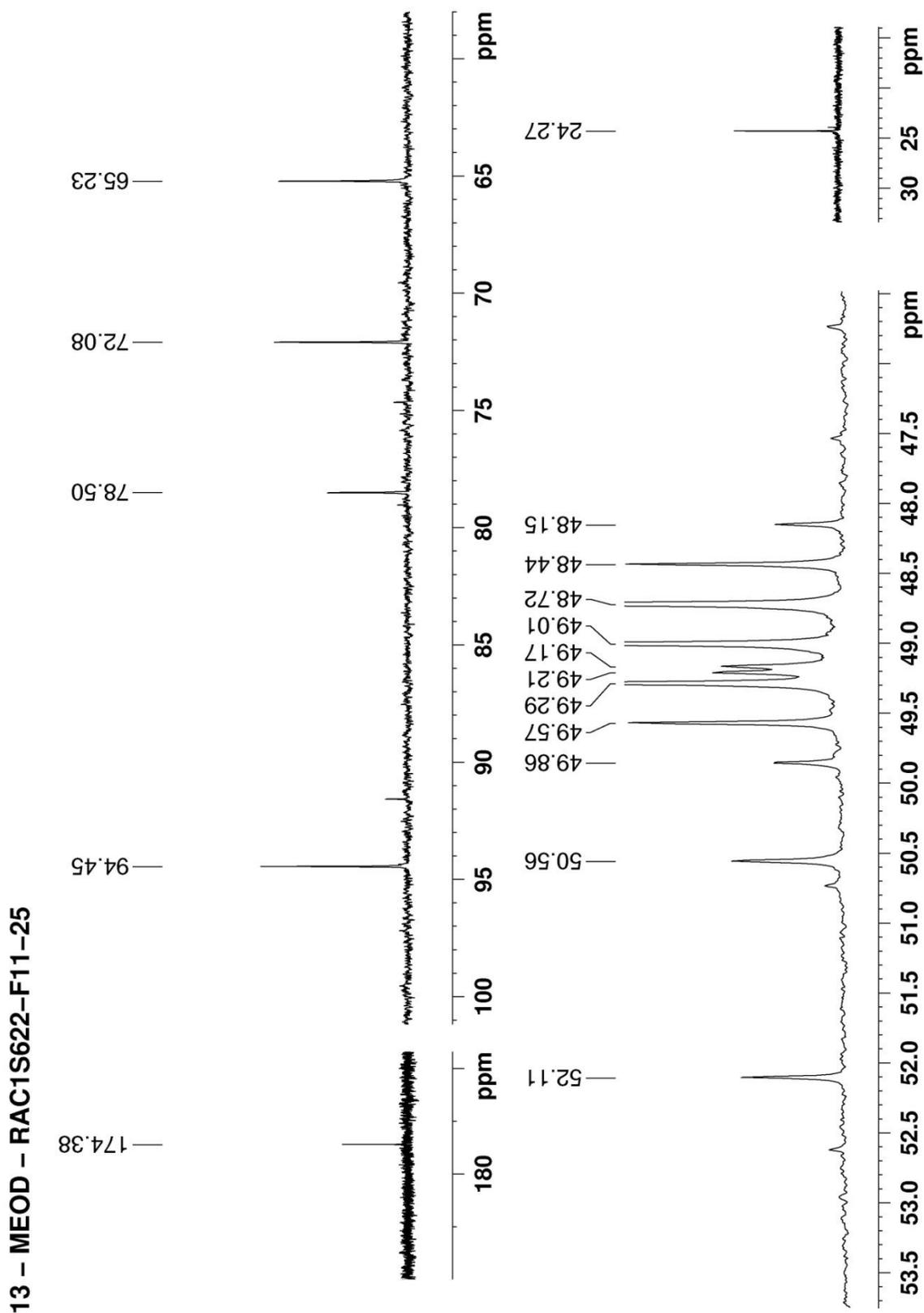


Figura 32 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) da substância 3a





Current Data Parameters
 NAME RAC1S622-F-11-2
 EXPNO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date_ 20150211
 Time 18.40
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Dual 13C/
 PULPROG dept135
 TD 65536
 SOLVENT MeOD
 NS 256
 DS 8
 SWH 18832.393 Hz
 FIDRES 0.287360 Hz
 AQ 1.7400308 sec
 RG 5792.6
 DW 26.550 usec
 DE 6.00 usec
 TE 300.0 K
 CNST2 145.000000
 D1 2.00000000 sec
 d2 0.00344828 sec
 d12 0.00002000 sec
 DELTA 0.00001114 sec
 TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 13C
 P1 8.75 usec
 P2 17.50 usec
 PL1 -3.00 dB
 SFO1 75.4768036 MHz

===== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 P3 14.80 usec
 P4 29.60 usec
 PCPD2 100.00 usec
 PL2 -4.00 dB
 PL12 12.59 dB
 SFO2 300.1312005 MHz

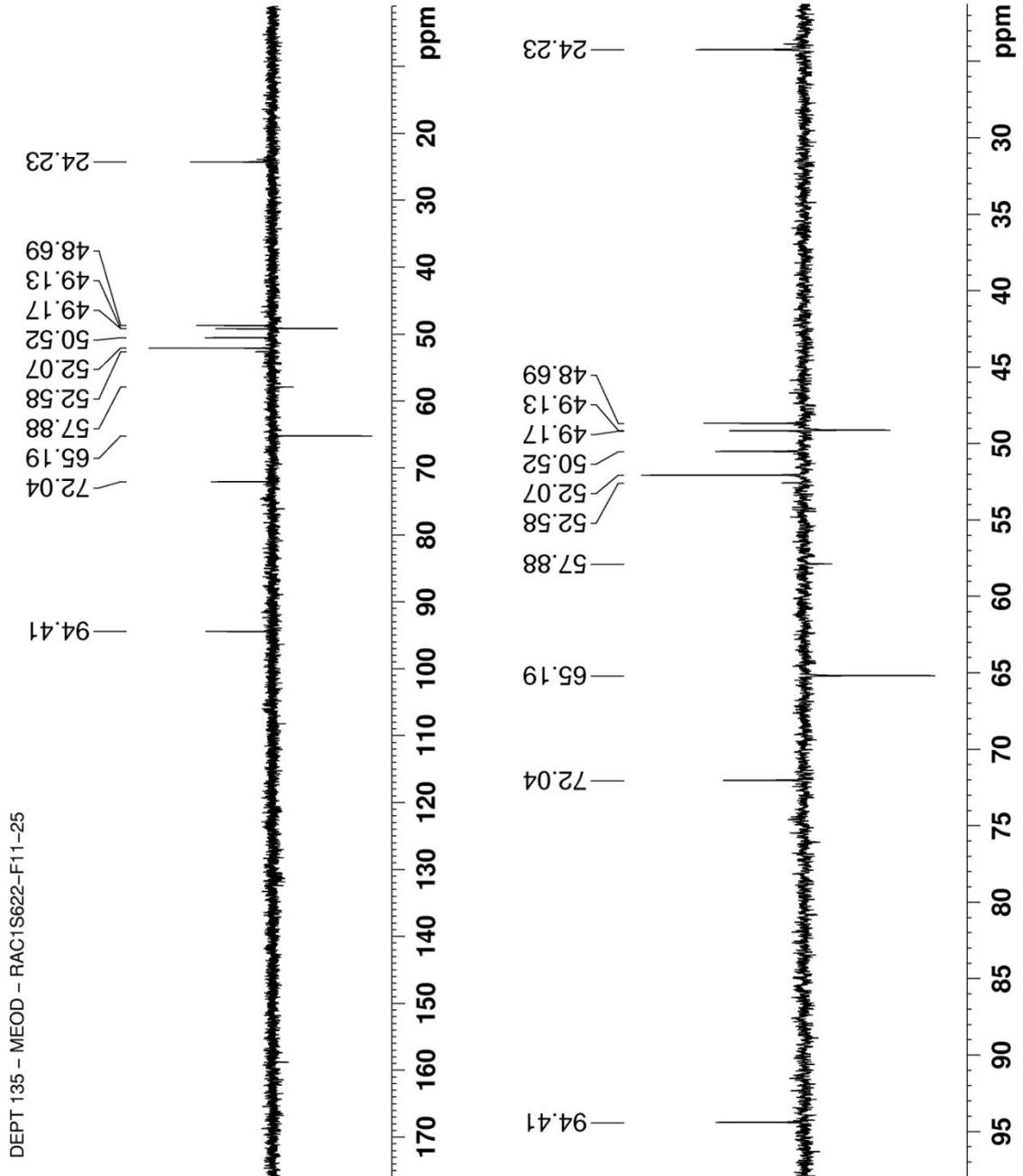


Figura 33 - Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° (CD_3OD , 75 MHz) da substância 3a



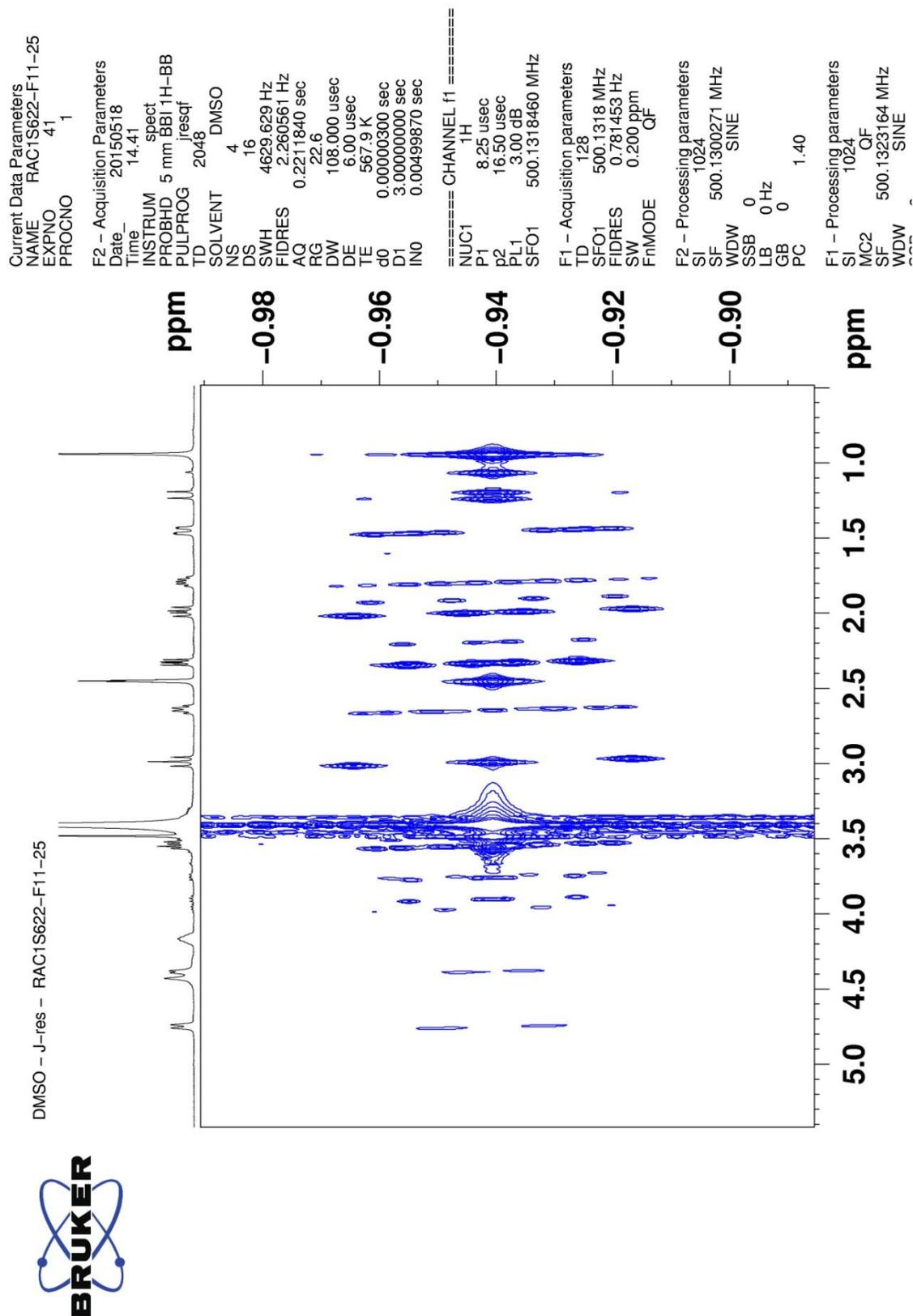


Figura 34 - Mapa de contorno do experimento de RMN *J*-resolved(CD₃OD,300 MHz) da substância 3a



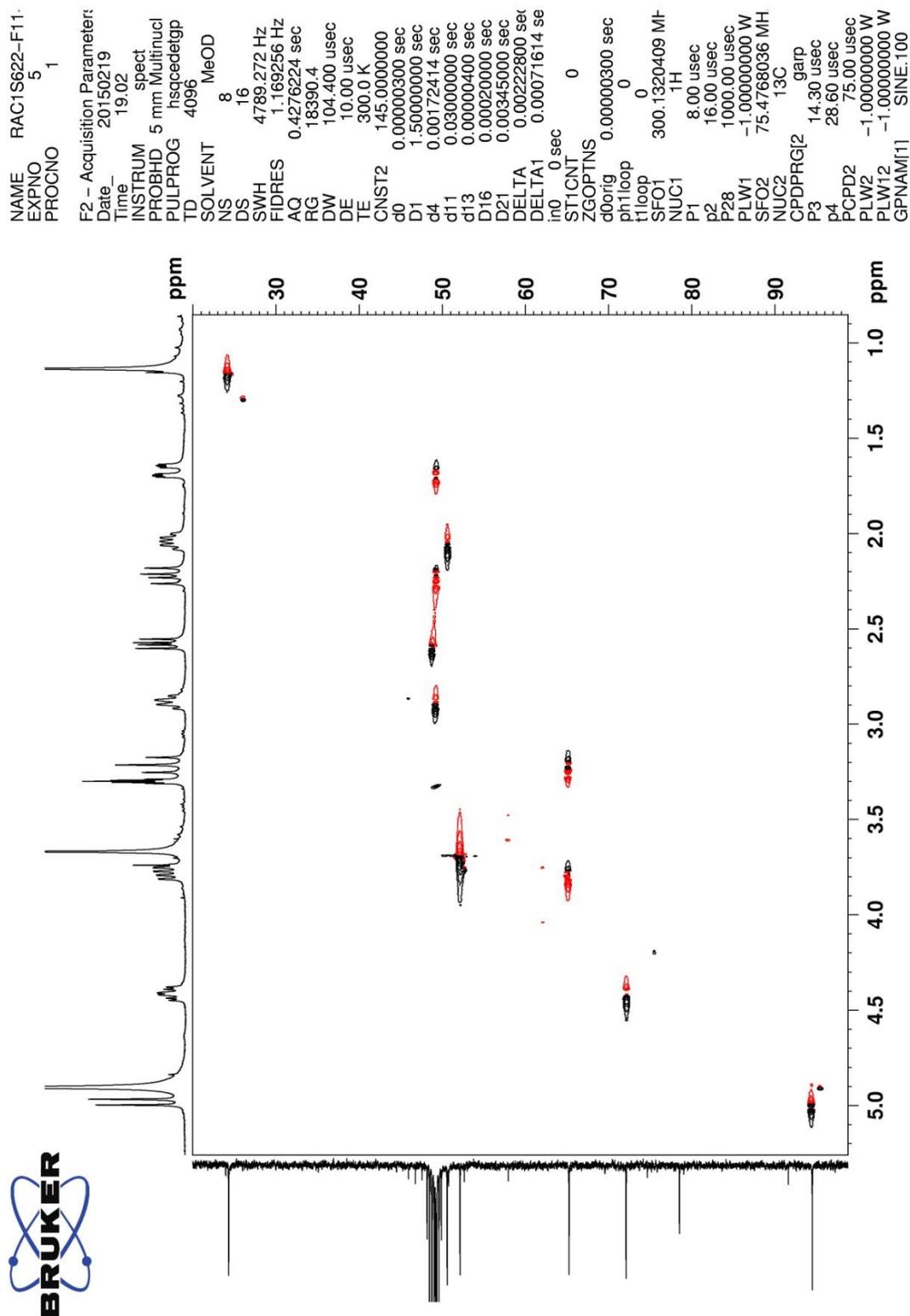


Figura 35 - Espectro de RMN bidimensional HSQC (CD₃OD, 300MHz e 75 MHz) da substância 3a



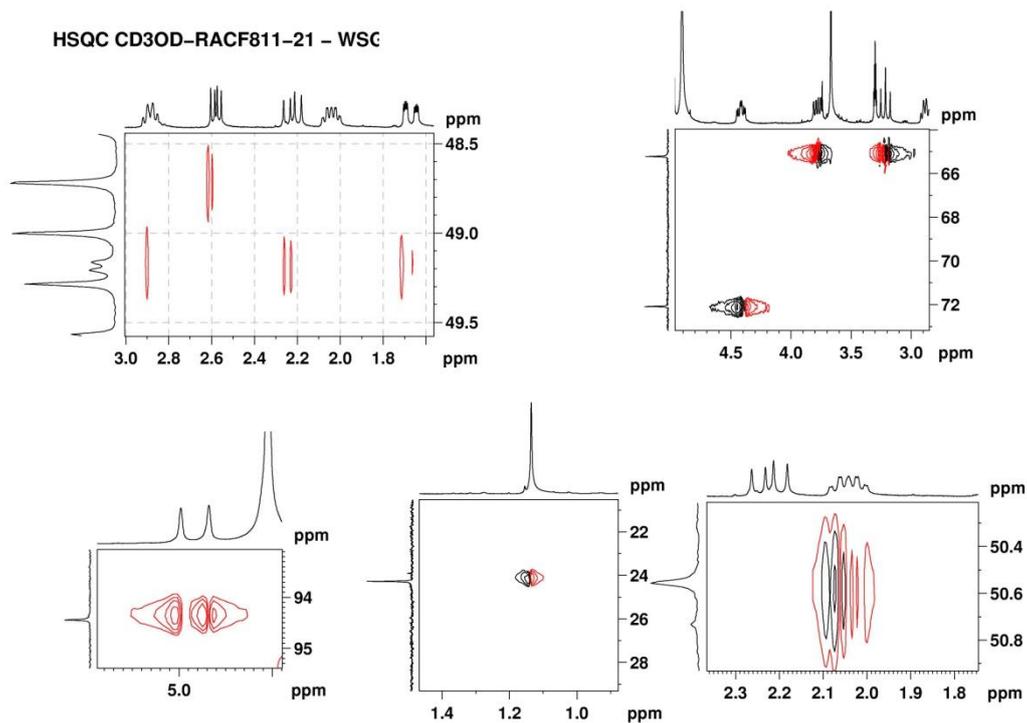


Figura 36 - Correlações observadas pelo mapa de contorno do experimento 2D HSQC da substância 3a



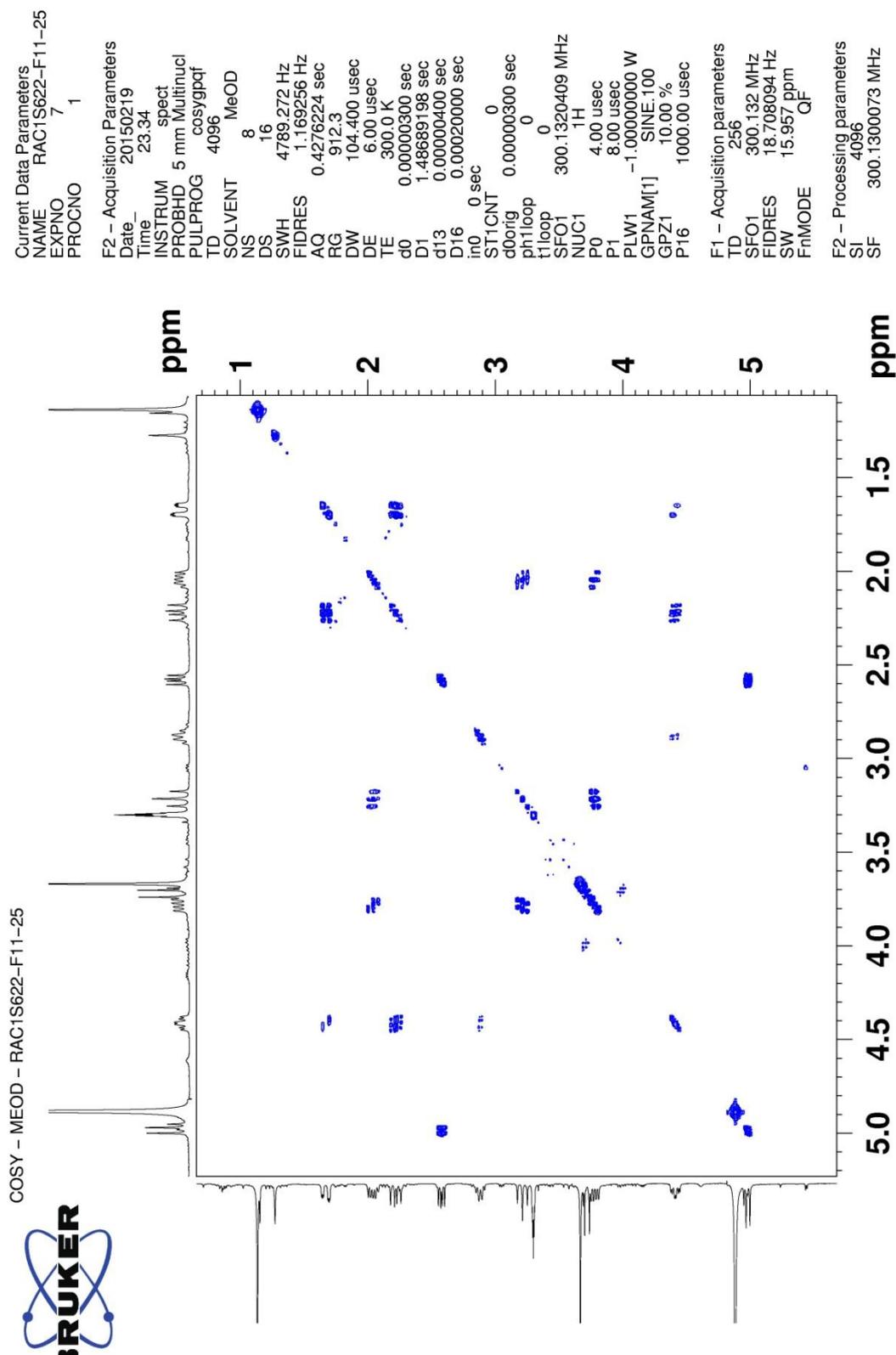


Figura 37 - Mapa de contorno do experimento 2D COSY (CD₃OD, 300MHz) da substância 3a



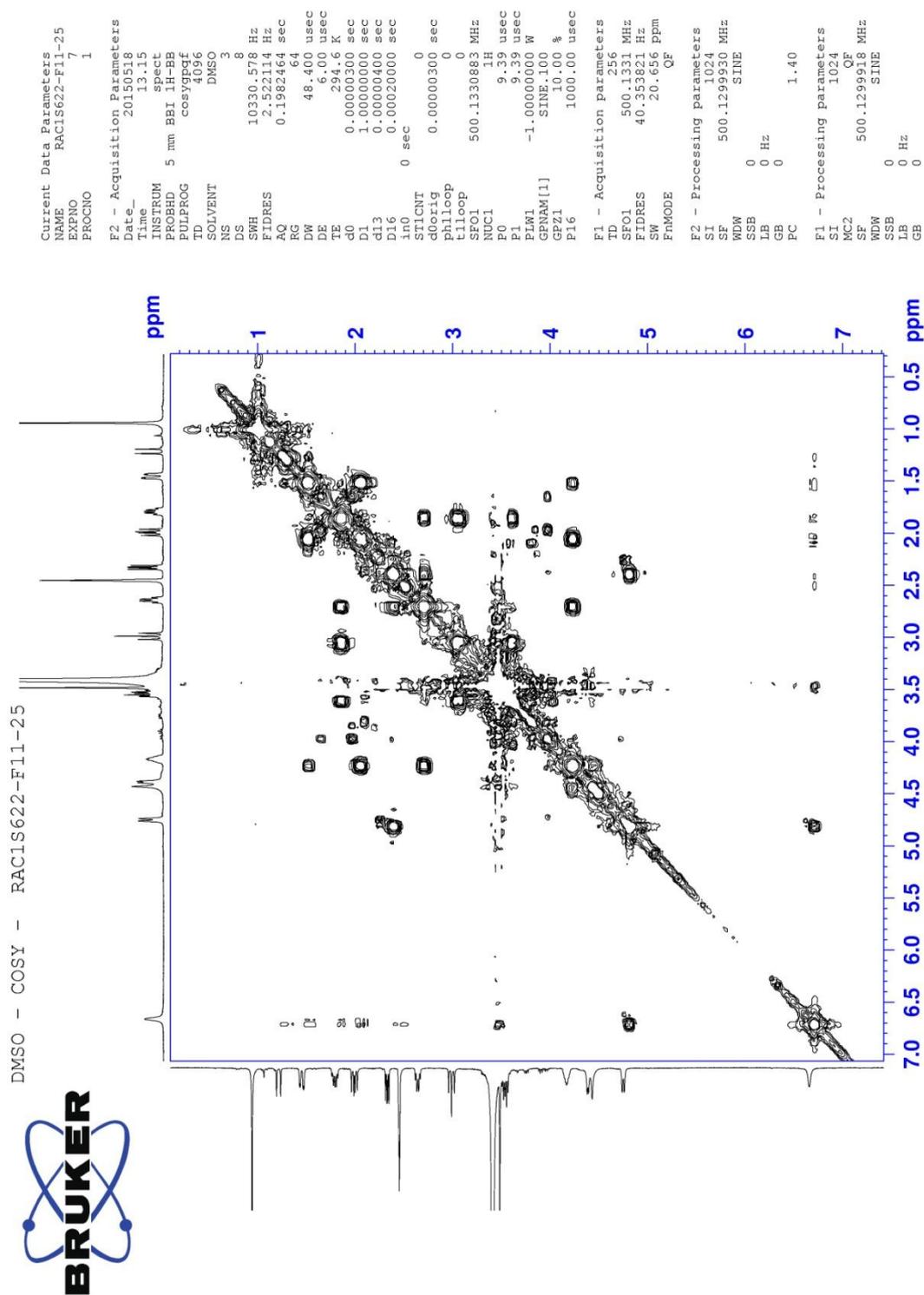


Figura 38 - Mapa de contorno do experimento 2D COSY (DMSO-d6, 500MHz) da substância 3a



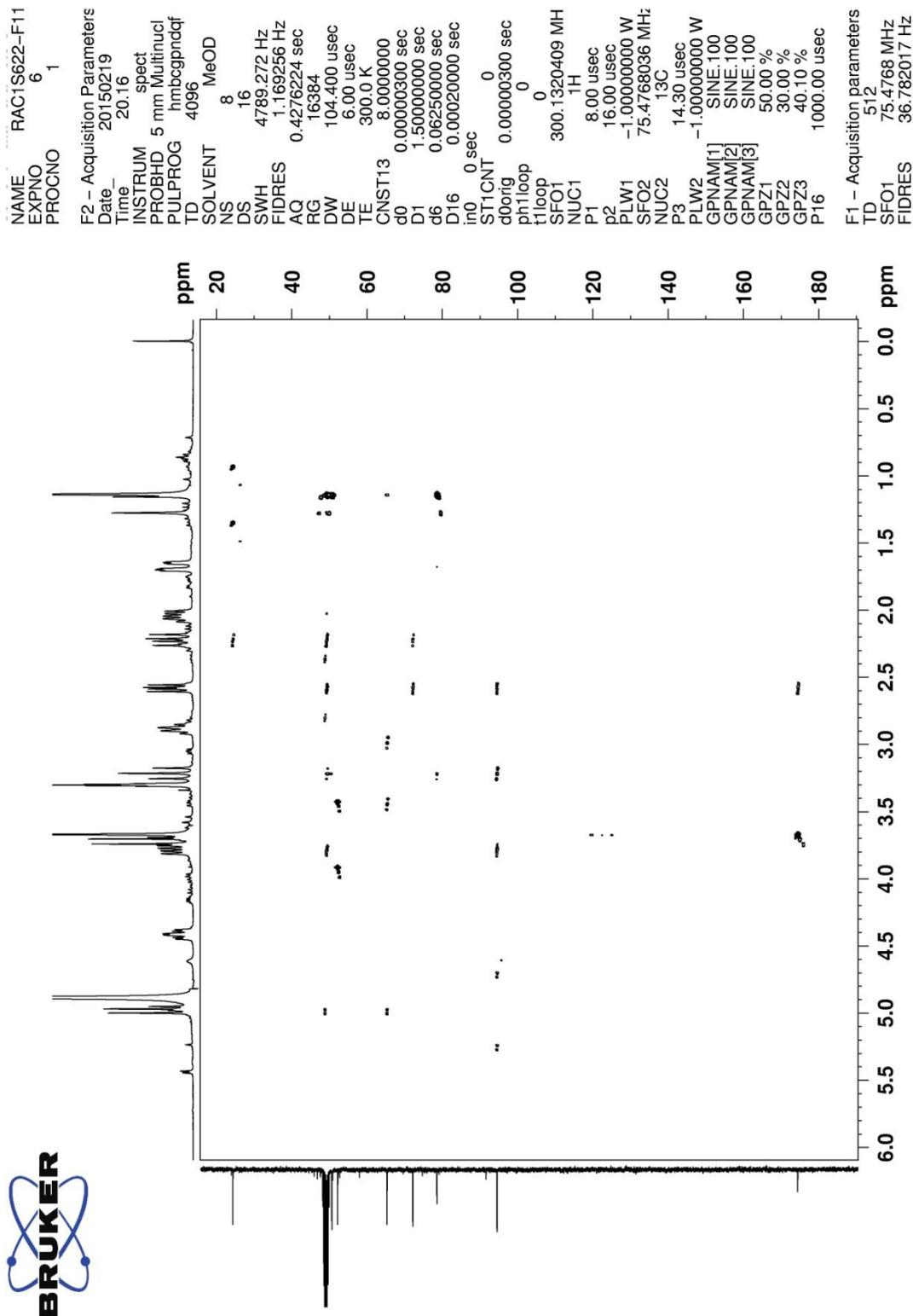


Figura 39 - Mapa de contorno do experimento HMBC (CD₃OD, 300MHz) da substância 3a



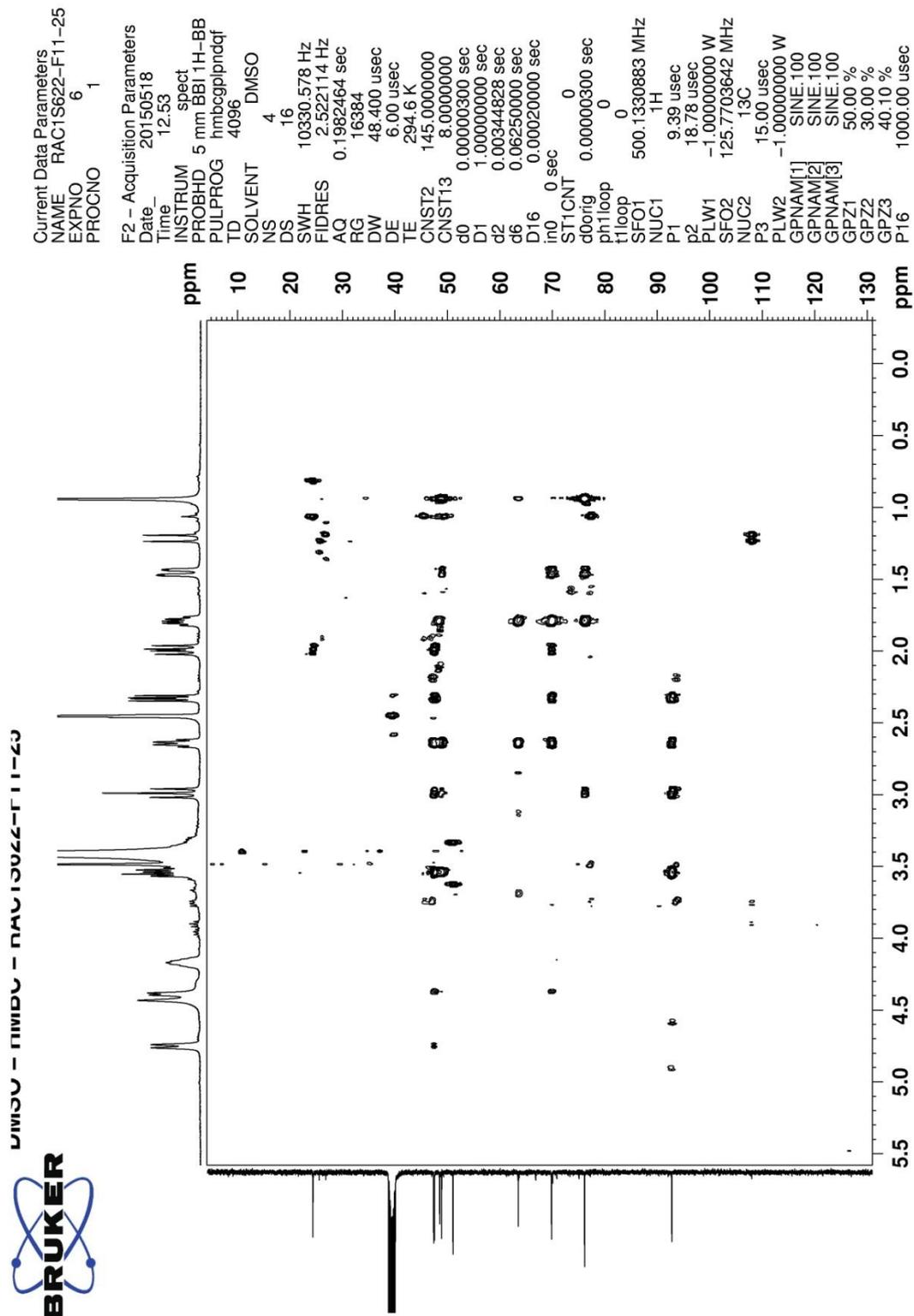


Figura 40 - Mapa de contorno do experimento HMBC (DMSO-d₆, 400MHz) da substância 3a



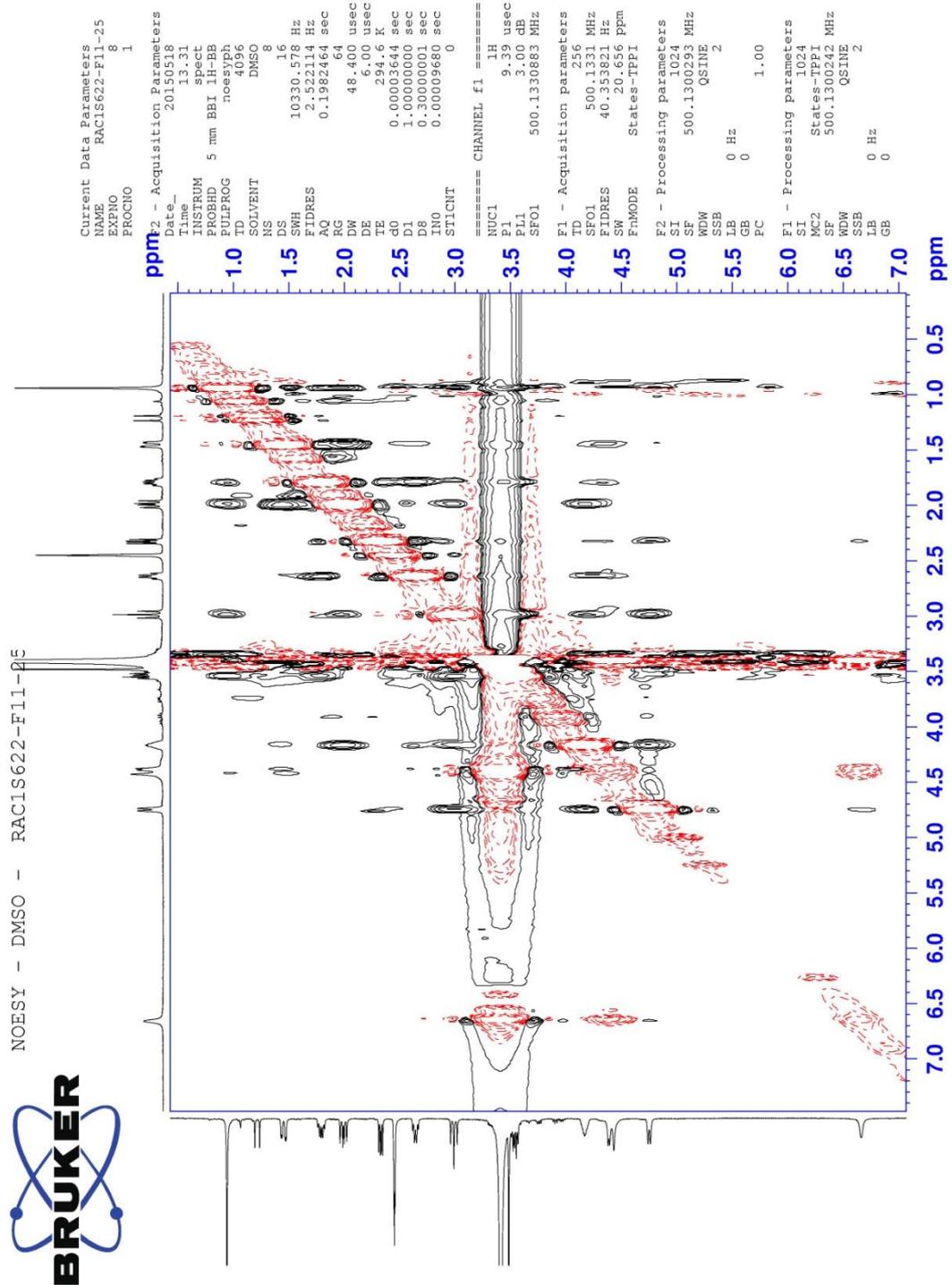


Figura 41 - Mapa de contorno do experimento NOESY (DMSO-d₆, 400MHz) da substância 3a



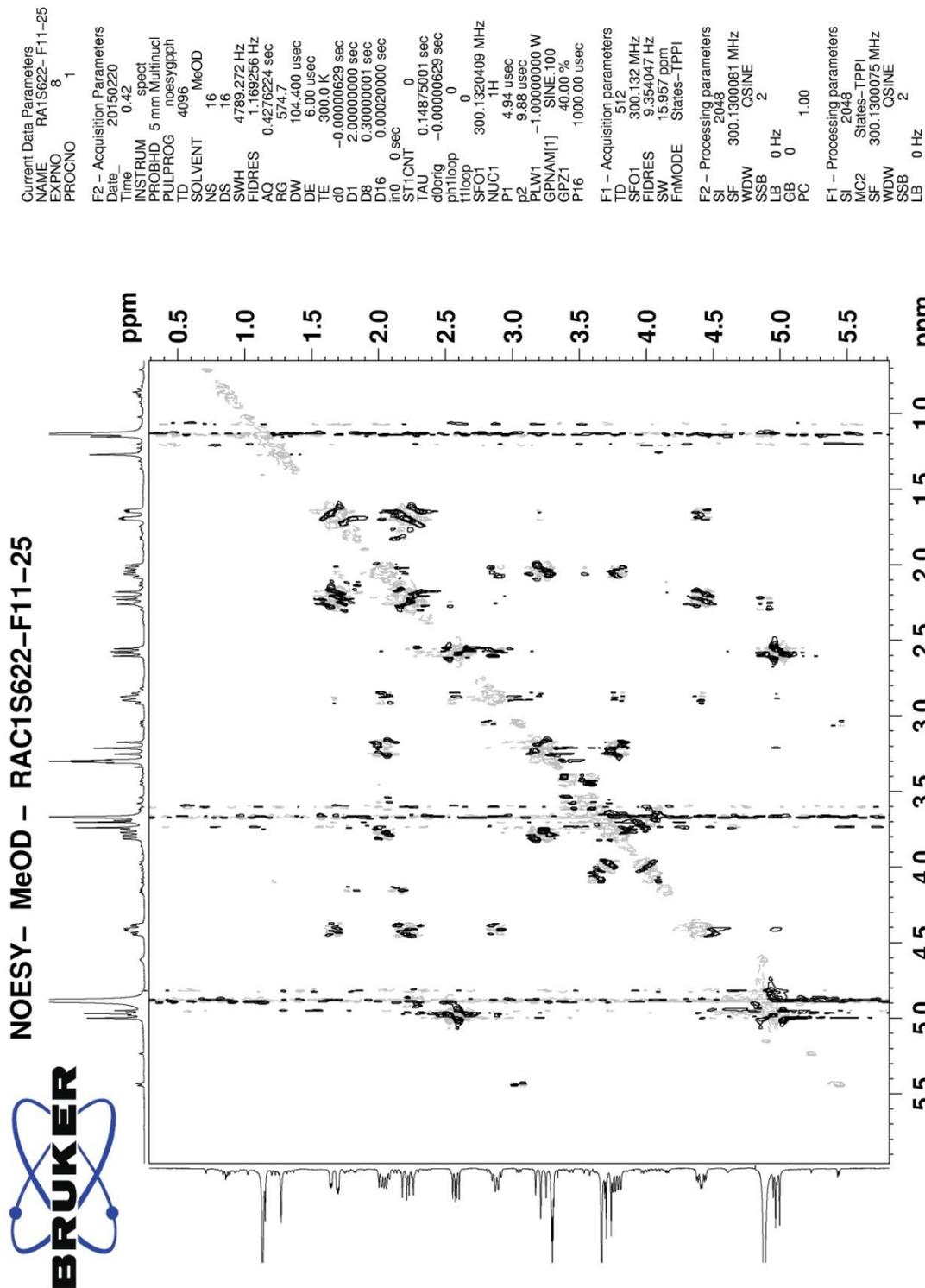


Figura 42 - Mapa de contorno do experimento NOESY (CD₃OD, 300 MHz) da substância 3a



O espectro de RMN da **substância 3a** em CD₃OD apresentou modificações em função do tempo (**Figura 43**), da mesma forma que os espectros obtidos por Fúrio em 2006, que observou, em seu trabalho com a espécie *A. sessilis*, a obtenção de **3a** sempre em mistura com outros três iridoides não glicosilados. Fúrio (2006) acreditava que um dos iridoides obtidos por ele sofria isomerização formando dois pares de epímeros. Como ele não obteve nenhum deles puros, não pôde concluir qual ou quais isômeros eram naturais. No presente trabalho foi possível obter a **substância 3a** pura e observar sua isomerização tanto em CD₃OD quanto em Piridina-d₅, cuja descrição será realizada a seguir. Logo se pode concluir que o iridoide não glicosilado natural produzido por *A. concolor* e possivelmente por *A. sessilis* (Fúrio, 2006) é a **substância 3a**.

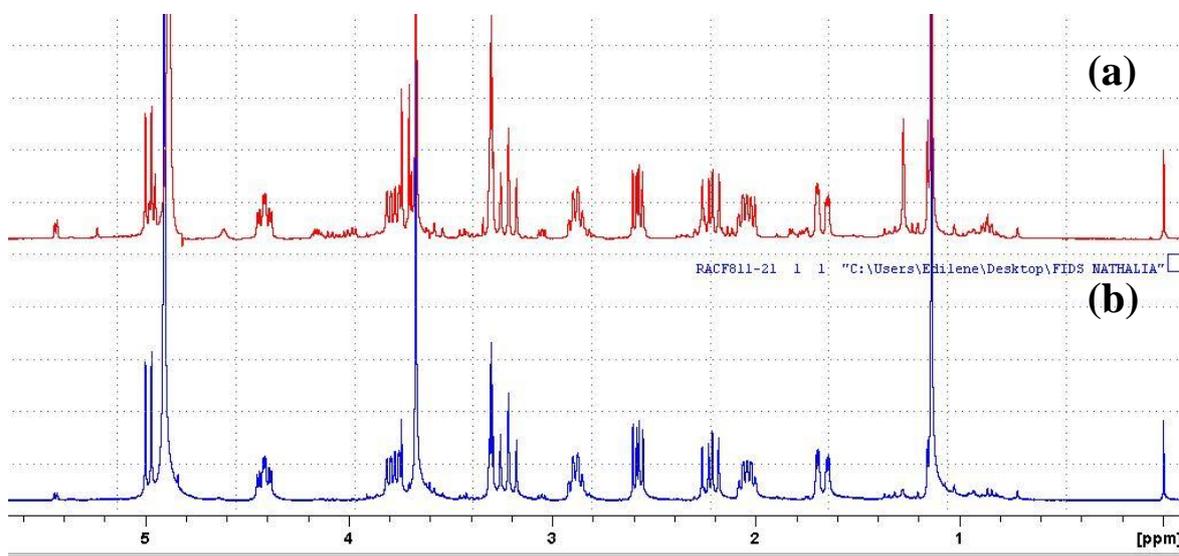


Figura 43 - Espectros de RMN ¹H da substância **3a** em CD₃OD obtidos após 1h em solução (b) e após dez dias (a)

4.2.2 Identificação das substâncias **3b**, **3c** e **3d**

Com a finalidade de indentificar os isômeros derivados da “scyphiphin C”, como os obtidos por Fúrio (2006) foram adquiridos espectros de RMN de ¹H dessa substância, em CD₃OD, a cada 24h, no período de 10 dias (240 h). A partir desses espectros observou-se a formação de apenas um dos isômeros. Como no trabalho realizado por Fúrio (2006) os espectros da mistura foram obtidos em Piridina-d₅ e sendo este solvente mais básico que metanol, poderia facilitar a produção dos demais isômeros. Deste modo, o espectro de RMN de “scyphiphin C”, em Pyr-d₅ foi adquirido no tempo de 1h, 72 h, 96h e 120h. No espectro obtido após 72 h em solução foi observada a formação de dois isômeros, além daqueles observados em CD₃OD, com 10 dias em



solução (**Figura 44**). Após esse período, não foi observada nenhuma alteração na proporção entre os quatros isômeros (**substâncias 3a, 3b, 3c e 3d**)

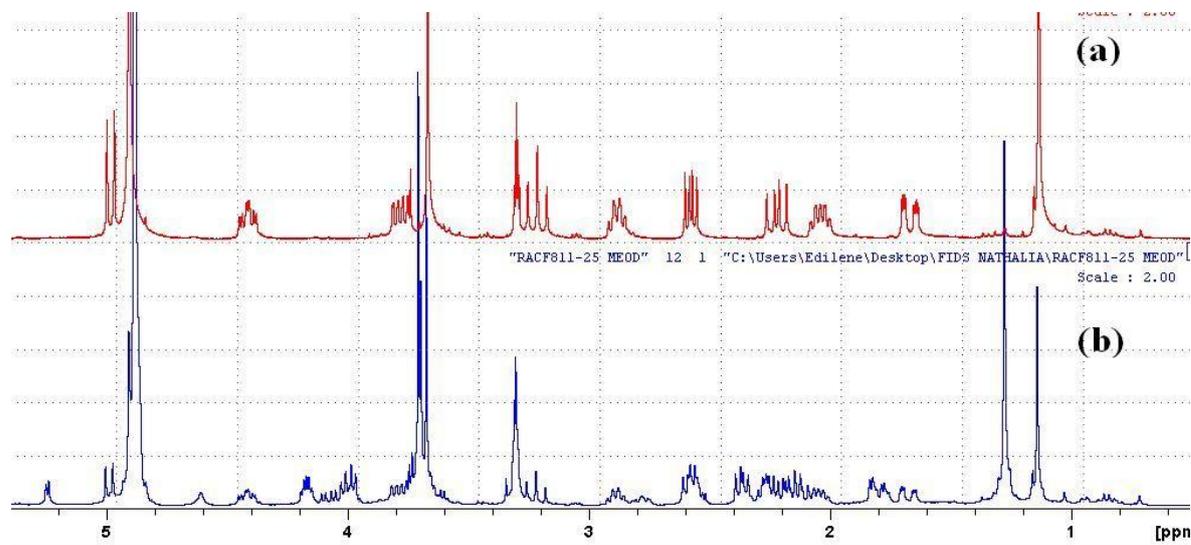


Figura 44 - Comparação dos espectros de RMN de ^1H (CD_3OD , 300MHz) a) após 120h em CD_3OD ; b) após 72h em Pyr-d5

A mistura final dos isômeros obtidos foi analisada por RMN ^1H e ^{13}C (1D e 2D) em Piridina-d5 e em CD_3OD (**Figuras 54 à 66**, p. 54 à 66). Os sinais observados foram semelhantes aos da **substância 3a**, o que indicou que as substâncias formadas realmente poderiam ser seus isômeros. Para identificar os isômeros derivados de 3a é importante observar os sítios mais reativos da molécula em questão em presença de uma base: o hemiacetal (C-1) por estar em equilíbrio com a sua forma aberta e o carbono α -carbonila (C-4), por possuir um hidrogênio ácido. Assim, pode-se supor que a mistura final em piridina é composta pelos isômeros mostrados na **Figura 45**, sendo que **3b, 3c e 3d** podem ser formados através do mecanismo proposto na **Figura 46**, onde a etapa inicial é a captura do próton da hidroxila ligada a C-1, com consequente abertura do hemiacetal, e/ou através do mecanismo proposto na **Figura 47**, onde a etapa inicial se dá pela captura do H-4.

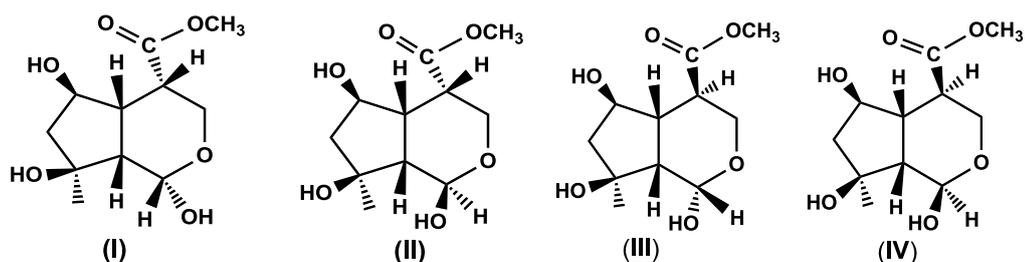


Figura 45 - Proposta dos possíveis isômeros da substância 3a



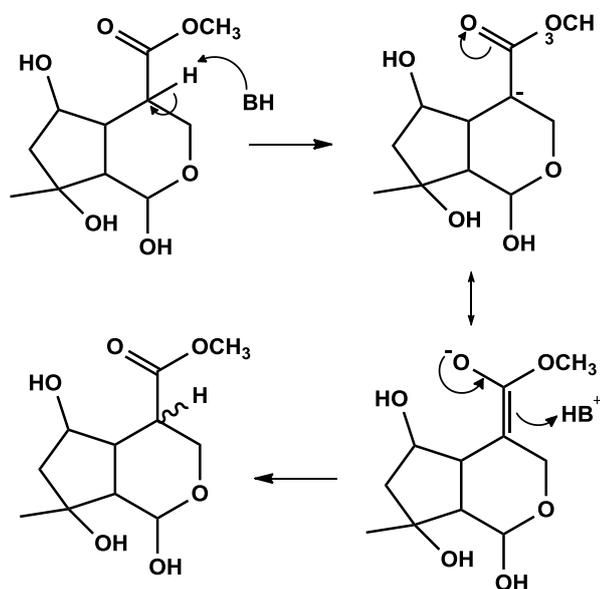


Figura 46 - Proposta do mecanismo de isomerização da substância 3a no carbono 4.

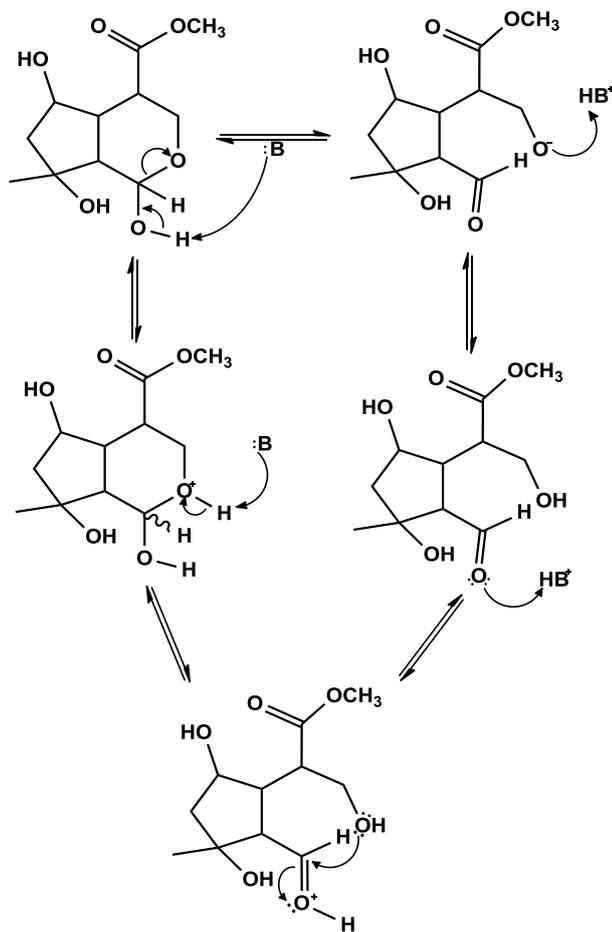


Figura 47 - Proposta do mecanismo de isomerização da substância 3a no carbono 1



A análise minuciosa dos espectros de RMN de ^{13}C (BBD e DEPT135) da mistura final, tanto em Piridina- d_5 quanto em CD_3OD (Tabela 04), permitiu agrupar os sinais de acordo com a proporção de intensidade em quatro grupos com onze sinais cada. Através desta análise pode-se observar que o composto majoritário na mistura final é o isômero codificado como **substância 3b**, e o minoritário é o codificado como **substância 3d**. A proporção da **substância 3a** (isômero natural) na mistura final é maior que a **substância 3c**. Portanto, a ordem decrescente de proporção entre os isômeros na mistura final é: **3b > 3a > 3c > 3d**.

Com o auxílio dos experimentos HSQC, HMBC, COSY em CD_3OD foi possível atribuir aos carbonos os seus respectivos hidrogênios (Tabelas 4 e 5). Além disso, com o experimento *J-resolved* foi possível definir os valores das constantes de acoplamento, bem como as multiplicidades, da maioria dos sinais de hidrogênios referentes aos isômeros em mistura. A semelhança nos valores dos deslocamentos químicos e a diferença entre os valores de acoplamento da mistura com a **substância 3a** pura foi uma indicação de que as substâncias **3b**, **3c** e **3d** possuíam apenas uma pequena diferença estrutural entre eles, como proposto anteriormente.

Tabela 4 - Dados de RMN de ^{13}C das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d

N° Carb.	Subst. 3a ($\delta^{13}\text{C/ppm}$)	Subst. 3b ($\delta^{13}\text{C/ppm}$)	Subst. 3c ($\delta^{13}\text{C/ppm}$)	Subst. 3d ($\delta^{13}\text{C/ppm}$)
1	94,5 CH	95,6 CH	91,9 CH	91,6 CH
3	65,2 CH_2	62,1 CH_2	59,2 CH_2	57,9 CH_2
4	50,5 CH	47,1 CH	47,1 CH	50,7 CH
5	49,2 CH	48,9 CH	44,1 CH	45,8 CH
6	72,1 CH	75,5 CH	76,2 CH	75,5 CH
7	49,2 CH_2	49,7 CH_2	48,5 CH_2	47,6 CH_2
8	78,5 C	79,6 CH	79,8 C	79,0 C
9	48,7 CH	49,8 CH	46,9 CH	46,7 CH
10	24,3 CH_3	26,1 CH_3	26,5 CH_3	23,9 CH_3
11	174,4 C	174,9 C	173,6 C	não observado
12	52,1 CH_3	52,4 CH_3	52,2 CH_3	52,6 CH_3

¹ CD_3OD ; 75,0 MHz



Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H das substâncias 3b, 3c e 3d

Nº Hid.	Subst. 3a ($\delta^1\text{H}/\text{JHz}^2$)	Subst. 3b ($\delta^1\text{H}/\text{JHz}^2$)	Subst. 3c ($\delta^1\text{H}/\text{JHz}^2$)	Subst. 3d ($\delta^1\text{H}/\text{JHz}^2$)
1	4,98; <i>d</i> ; 9,0	4,88 <i>d</i> 6,3	5,24 <i>d</i> 3,4	5,44 <i>d</i> 3,7
3'	3,21; <i>dd</i> ; 11,9; 11,8	3,71 <i>dd</i> 12,1; 5,5;	3,6 <i>dd</i> 12,4; 4,6	3,42 <i>ddd</i> 11,9; 6,6; 1,1
3''	3,78; <i>ddd</i> 11,9; 5,9; 1,2	4,0 <i>ddd</i> 12,1; 5,4; 1,3	4,08 <i>ddd</i> 12,4; 5,23;	3,56 <i>t</i> 11,9
4	2,04; <i>dtd</i> ; 11,8; 5,9; 5,8; 1,5	2,27 <i>dd</i> 8,9; 5,5; 5,4	2,37 <i>m</i>	2,04 <i>m</i>
5	2,88; <i>tdd</i> 8,1; 5,8; 5,7; 1,2	2,57 <i>ddd</i> 9,5; 8,9; 3,3	2,78 <i>ddd</i> 9,6; 8,4; 2,8	2,83 <i>m</i>
6	4,41; <i>td</i> 9,4; 8,1; 3,5	4,17 <i>dtd</i> 3,6; 6,6; 3,3	3,98 <i>ddd</i> 9,6; 6,5; 3,6	4,25 <i>ddd</i> 9,3; 6,7; 5,2
7'	1,67; <i>dd</i> 15,0; 3,5; 1,5	1,81 <i>dd</i> 14,6; 3,6	1,78 <i>ddd</i> 15,0; 3,6; 1,0	1,80 <i>m</i>
7''	2,22; <i>dd</i> 15,0; 9,4	2,16 <i>dd</i> 14,6; 6,6	2,13 <i>dd</i> 15,0; 6,6	2,56 <i>m</i>
8	-	-	-	-
9	2,58; <i>dd</i> 9,0; 5,7	2,37 <i>d</i> 8,9; 6,3	2,54 <i>dd</i> 8,4; 3,4	3,05 <i>dd</i> 5,5; 3,7
10	1,14; <i>s</i>	1,27 <i>s</i>	1,26 <i>s</i>	1,16 <i>s</i>
11	-	-	-	-
12	3,67; <i>s</i>	3,6 <i>s</i>	3,69 <i>s</i>	3,74 <i>s</i>

¹ CD₃OD; 300,0 MHz² Valores obtidos com auxílio do experimento *J-resolved*

4.2.3 Determinação da configuração relativa da substância 3b

O primeiro isômero a ter as configurações relativas dos centros C-1 e C-4 atribuídas foi a **substância majoritária 3b**. Considerando que a junção dos anéis dos quatro iridoides apresenta configuração *cis*, e os hidrogênios em H-5 e H-9 e as hidroxilas de C-6 e C-8 estão com orientação β , enquanto a metila C-10 está com orientação α , a configuração de C-1 e C-4 pode ser determinada através dos valores de *J* dos acoplamentos de H-1 com H-9 e H-4 com H-3', H-3'' e H-5. Os valores dos *J* obtidos experimentalmente foram comparados com os valores de *J* experimentais da **substância 3a** e com os valores de *J* calculados com auxílio do programa PCModel 7.0 que foi considerado as conformações cadeira e barco para o anel de 6 membros, além do auxílio do gráfico de Kaplus, que relaciona valor de *J* com ângulo diedro entre os hidrogênios vicinais.

No mapa de contorno do NOESY em CD₃OD foram observadas correlações entre H-1 e H-3', H-4 com H-6 e H-10; H-10 com H-7'; H-5 com H-3'' e H-9 com H-7'' (**Figura 48**). A



estrutura que melhor correlacionou os dados experimentais com os teóricos é apresentada na **Figura 40**, onde a mudança estrutural em relação a **substância 3a** é a inversão de configuração do C-4. Portanto, na **substância 3b** o grupo carboxila está com orientação β .

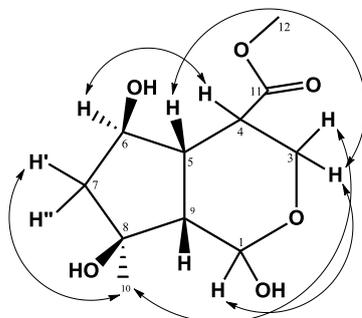


Figura 48 - Principais correlações observadas pelo experimento NOESY da substância **3b**

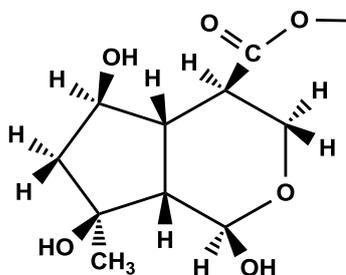


Figura 49 - Estrutura da substância **3b**

Após a determinação da configuração da **substância 3b**, os valores de J experimental foram comparados com os valores de J ponderais calculados nas conformações cadeira e barco. A **Tabela 6** mostra a comparação do J experimental com os J calculado na conformação bote da **substância 3b**. Através da análise da tabela pode-se observar uma diferença de grandeza entre H-3 β e H-4 experimental com o teórico. Esta diferença possivelmente se deve ao fato da conformação da **substância 3b** não ser exatamente bote. A fim de avaliar a conformação mais estável da **substância 3b** foi calculado os valores dos ângulos diedros da **substância 3b**, de acordo com a equação de Karplus, com o auxílio de modelos moleculares. Para os valores de J dos hidrogênios H-3 α com H-4 ($J= 5,5$) e H-3 β com H-4 ($J= 5,4$) serem aproximados, a conformação da **substância 3b** pode ser como mostrado na **Figura 51**. A conformação se apresenta na forma twist. Apesar de ser a menos estável para um ciclo hexano foi observado, com o auxílio do programa PCModel, que nesta conformação há um ligação de hidrogênio sendo formada, gerando mais dois ciclos: um de sete e outro de 8 átomos, o que justifica a estabilidade da **substância 3b**.



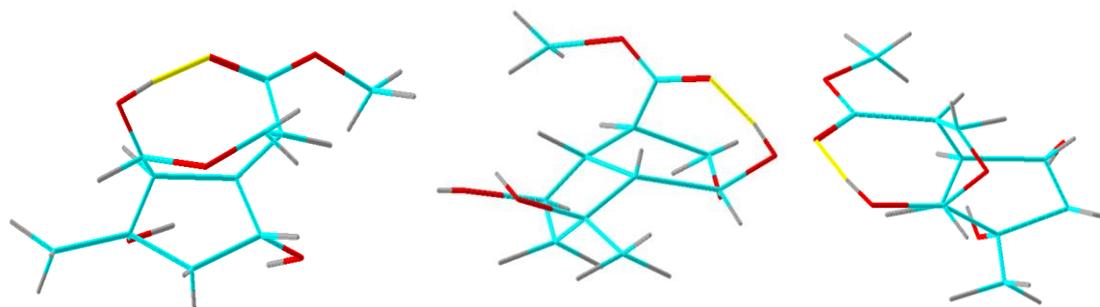


Figura 50 - Conformações de mínima energia da substância 3b

Após levantamento bibliográfico constatou-se que a **substância 3b** é “scyphiphin C”, cujo primeiro relato na literatura ocorreu em 2010, tendo sido obtida de *Scyphiphora hydrophyllacea* Gaertn. F. (Rubiaceae) (FENG, 2010). Diante deste fato optou-se por chamar a substância 3a, inédita, de “scyphiphin C1”.

Tabela 6 - Comparação dos valores de J experimental e teórico das substância 3b

	H-1:H-9	H-5:H-9	H-4:H-5	H-3 α :H-4	H-3 β :H-4	H-5:H-6	H-6:H-7 α	H-6:H-7 β	Conformação	N ^o conf. ⁶
J_{calc}^1 (Hz)	5,3	9,4	12,5	4,5	10,9	1,8	4,6	2,7	Bote ⁴	63
J_{exp}^2 (Hz)	6,3	8,9	8,9	5,5	5,4	3,3	6,6	3,6	Twist ⁵	-

¹ Média ponderada de acordo com a distribuição de Boltzman (programa Boltz2005) dos valores de J calculados para cada conformeromero de mínima energia encontrados com auxílio do programa PCmodel MHz

² Valores de J determinados com base nos experimentos 1H (1D), J-resolved, COSY e HMQC (¹H:300,06 MHz e ¹³C 75,45 MHz)

³ Valores de J com incoerência indicativos que a conformação provável seja a twist (intermediária entre cadeira e bote)

⁴ Conformação do heterociclo com melhor correlação entre os dados calculados e os experimentais

⁵ Conformação do heterociclo mais provável determinada pelo calculo dos valores ângulos diedros a partir dos J experimentais de acordo com a equação Karplus aproximada

⁶ Números de conformeromeros de mínima energia encontrados pelo PCModel .

4.2.4 Determinação da configuração da substância 3c

A **substância 3c** foi o segundo isômero a ser identificado na mistura final.

As correlações observadas no experimento NOESY (H-1 com H-3', H-4 e H-5; e H-10 com H-7'') (Figura 62, p.62) indicaram que a **substância 3c** trata-se do produto resultante da inversão de C-1 da **substância 3a**. Deste modo, a configuração relativa da **substância 3c** é a representada na Figura 51, com os grupos hidroxila (em C-1) e carboxila com orientação α .



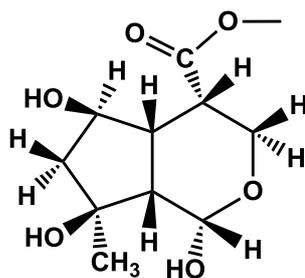


Figura 51 - Proposta da estrutura da substância 3c

Através da comparação dos valores de J experimental com o calculado (**Tabela 7**) foi observada uma diferença de grandeza entre os J do $H-3_\beta$ com $H-4$. Esta diferença se deve, possivelmente, ao fato da conformação não ser exatamente bote. A avaliação da conformação mais estável da substância 3c foi realizada da mesma maneira que a **substância 3b**. A conformação mostrada na **Figura 52** apresenta a conformação mais provável para a **substância 3c**, segundo cálculos realizados no PCModel®.

O levantamento bibliográfico indicou que a substância 3c é inédita e optou-se por chamá-la de “scyphiphin C2”.

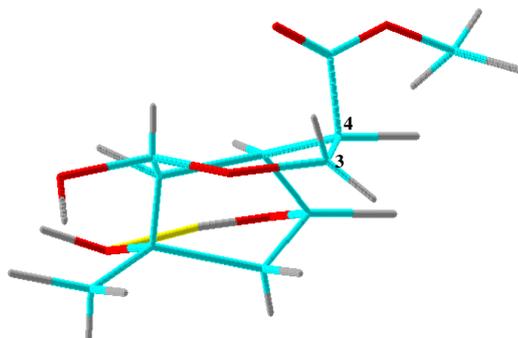


Figura 52 - Proposta da conformação da substância 3c



Tabela 7 - Comparação dos valores de J experimental e teórico das substância 3c

	H-1:H-9	H-5:H-9	H-4:H-5	H-3 α :H-4	H-3 β :H-4	H-5:H-6	H-6:H-7 α	H-6:H-7 β	Conformação	Nº conf. ⁶
J_{calc}^1 (Hz)	3,6	6,1	4,9	11,9	4,7	7,5	3,6	9,5	Cadeira ⁴	19
J_{exp}^2 (Hz)	3,4	8,4	2,8	5,2	4,6	9,6	3,6	6,6	Twist ⁵	-

¹ Média ponderada de acordo com a distribuição de Boltzman (programa Boltz2005) dos valores de J calculados para cada conformêros de mínima energia encontrados com auxílio do programa PCmodel MHz

² Valores de J determinados com base nos experimentos 1H (1D), J-resolved, COSY e HMQC (¹H:300,06 MHz e ¹³C 75,45 MHz)

³ Valores de J com incoerência indicativos que a conformação provável seja a twist (intermediária entre cadeira e bote)

⁴ Conformação do heterociclo com melhor correlação entre os dados calculados e os experimentais

⁵ Conformação do heterociclo mais provável determinada pelo calculo dos valores ângulos diedros a partir dos J experimentais de acordo com a equação Karplus aproximada

⁶ Números de conformêros de mínima energia encontrados pelo PCModel .

4.2.5 Proposta da configuração da substância 3d

A **substância 3d** foi o primeiro isômero formado a partir da **substância 3a**, sendo o único isômero formado em presença de metanol. Fato constatado pela presença do sinal em δ 5,44 no espectro de RMN ¹H em CD₃OD realizado após 120 h de dissolução. Entretanto, apresentou-se como o isômero minoritário na mistura final. Após a identificação dos demais isômeros, por exclusão foram atribuídos os sinais de RMN ¹H e ¹³C (**Tabela 4**) para a **substância 3d**. A partir da análise destes dados e comparação com os demais isômeros pode atribuir à **substância 3d** a estrutura representada abaixo. O levantamento bibliográfico indicou que a **substância 3d** é inédita e optou-se por chamá-la de “scyphiphin C3”.

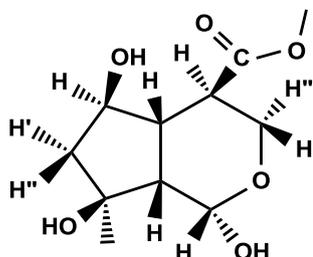


Figura 53 - Estrutura da substância 3d



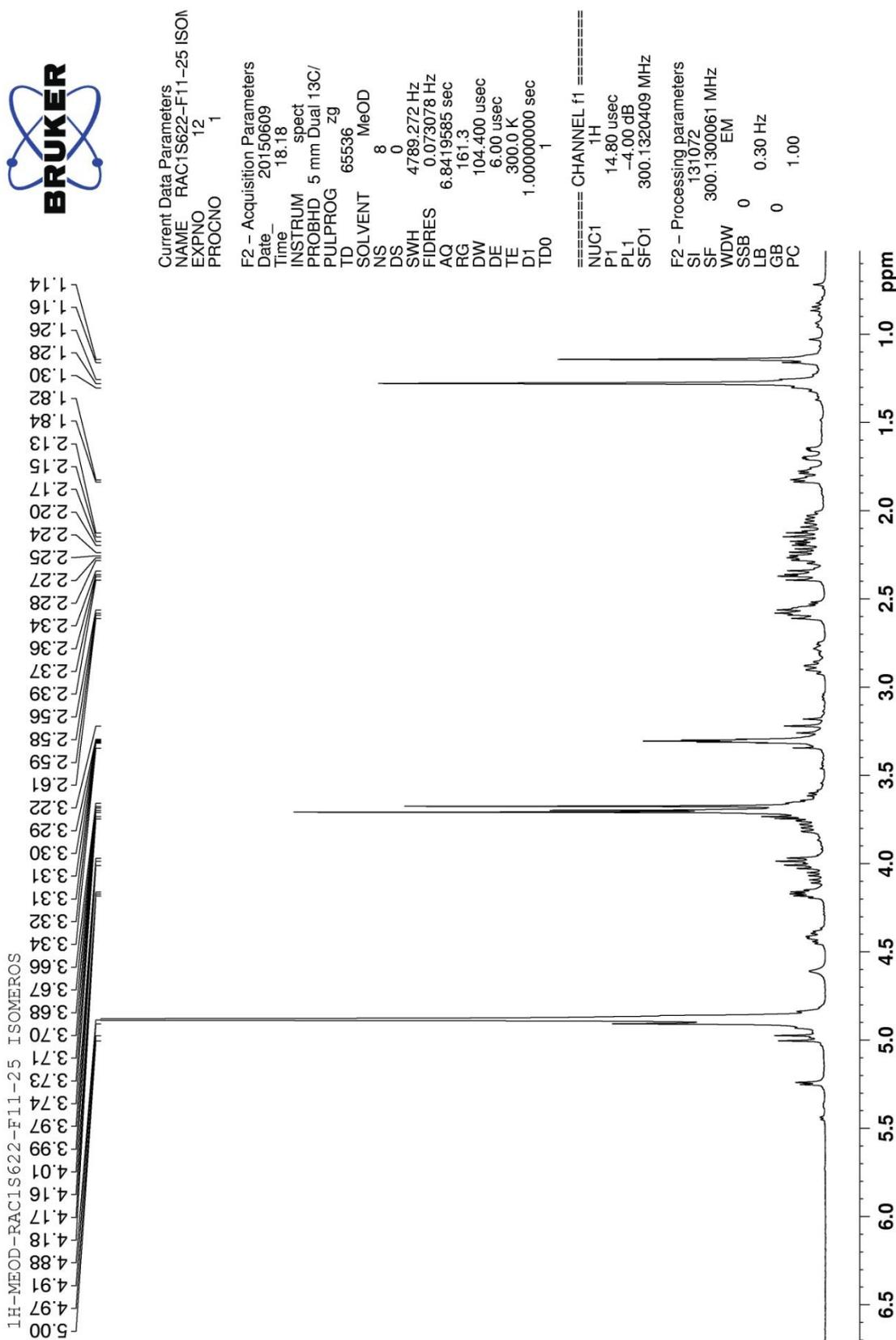


Figura 54 - Espectro de RMN de ¹H (CD₃OD, 300MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d



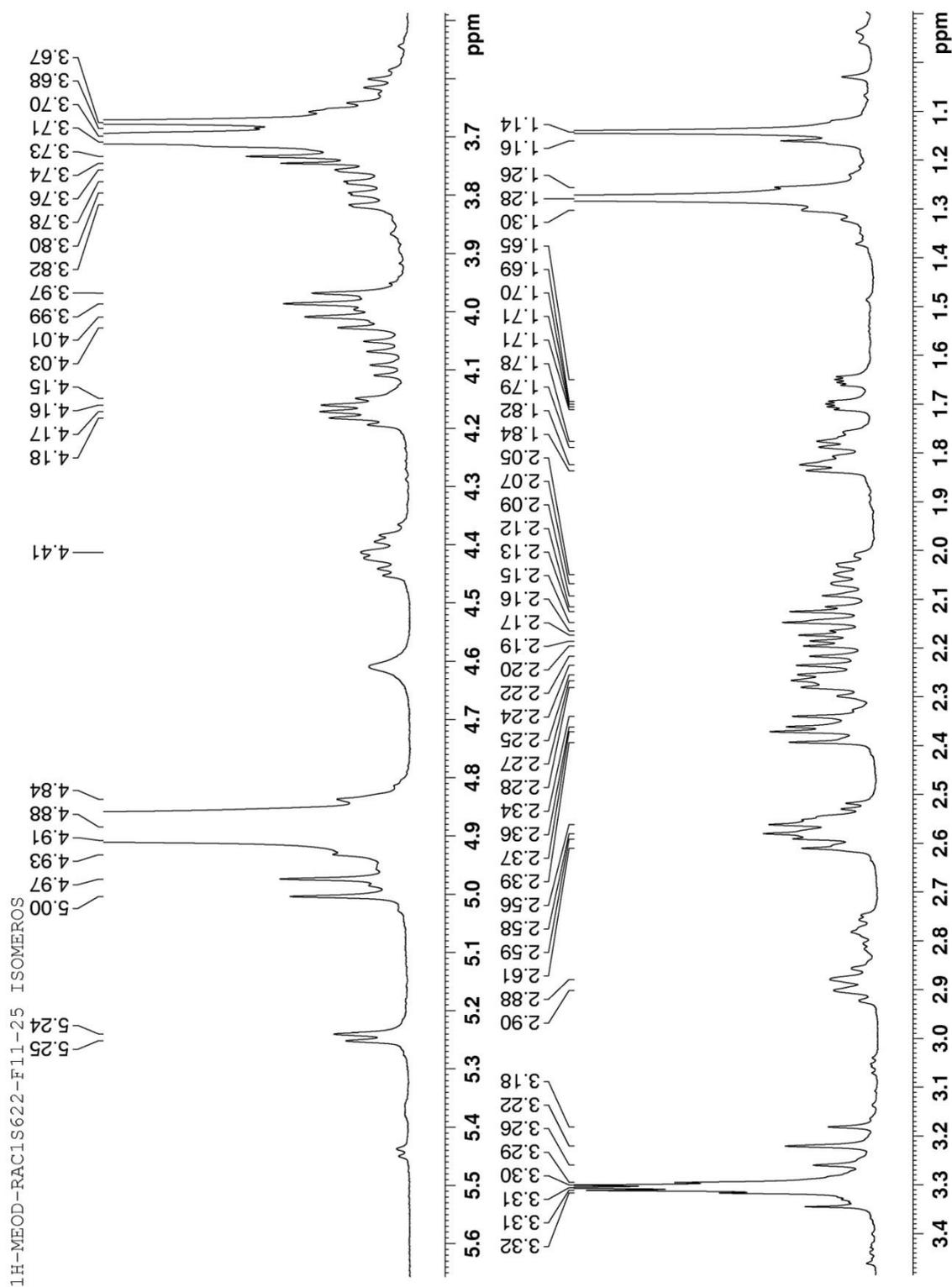


Figura 55 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d





Current Data Parameters
 NAME RAC1S622-F11-25 ISOME
 EXPNO 3
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20150610
 Time 7.01
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Dual 13C/
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT MeOD
 NS 27765
 DS 2
 SWH 18832.393 Hz
 FIDRES 0.574719 Hz
 AQ 0.8699904 sec
 RG 13004
 DW 26.550 usec
 DE 6.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 0.15000001 sec
 d11 0.03000000 sec
 DELTA 0.05000000 sec
 TD0 1
 SFO1 75.4768036 MHz
 NUC1 13C
 P1 8.50 usec
 PLW1 -1.00000000 W
 SFO2 300.1312005 MHz
 NUC2 1H
 CPDPRG2 waltz16
 PCPD2 100.00 usec
 PLW2 -1.00000000 W
 PLW12 -1.00000000 W
 PLW13 -1.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 75.4676424 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 3.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

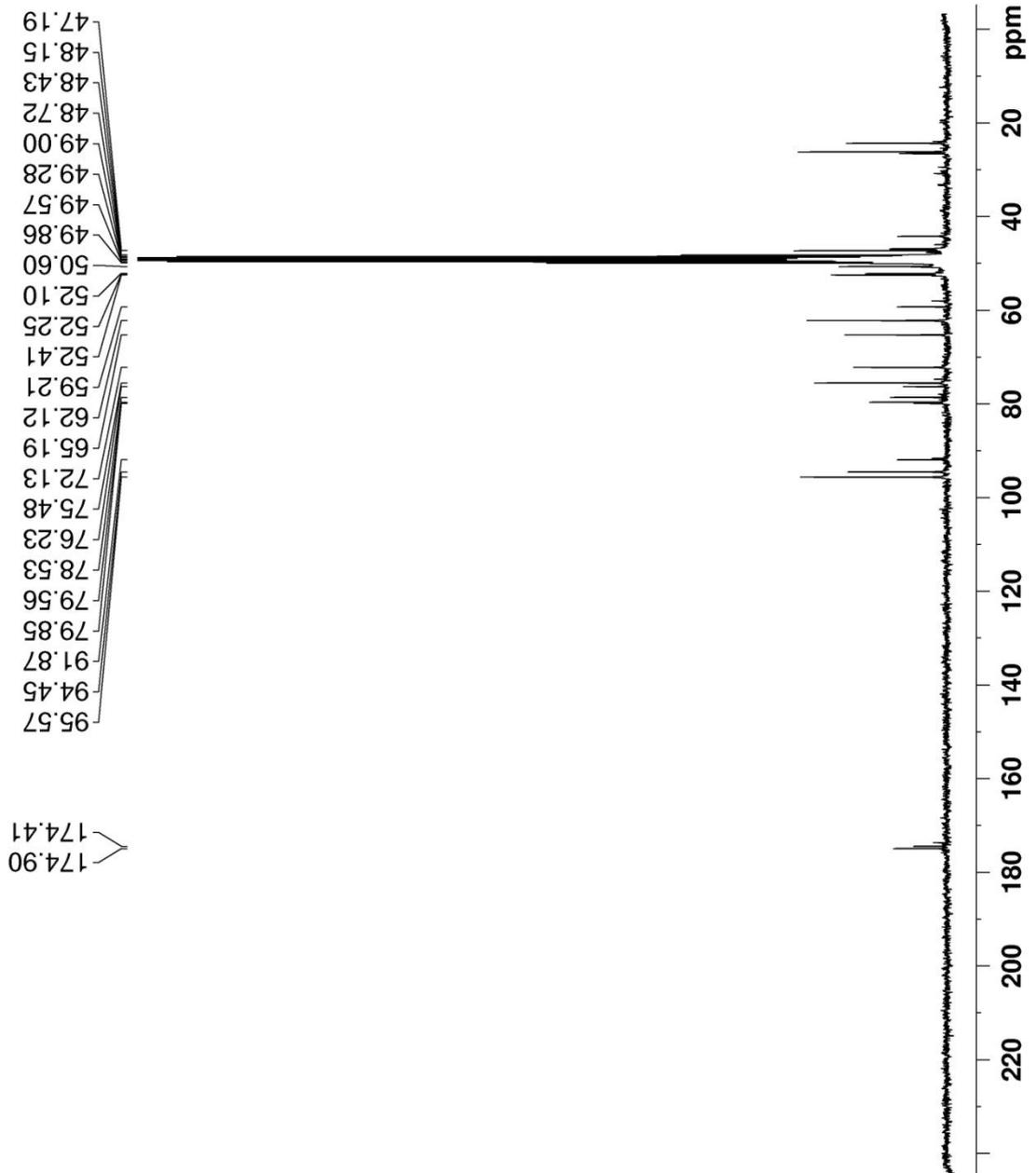


Figura 56 - Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d



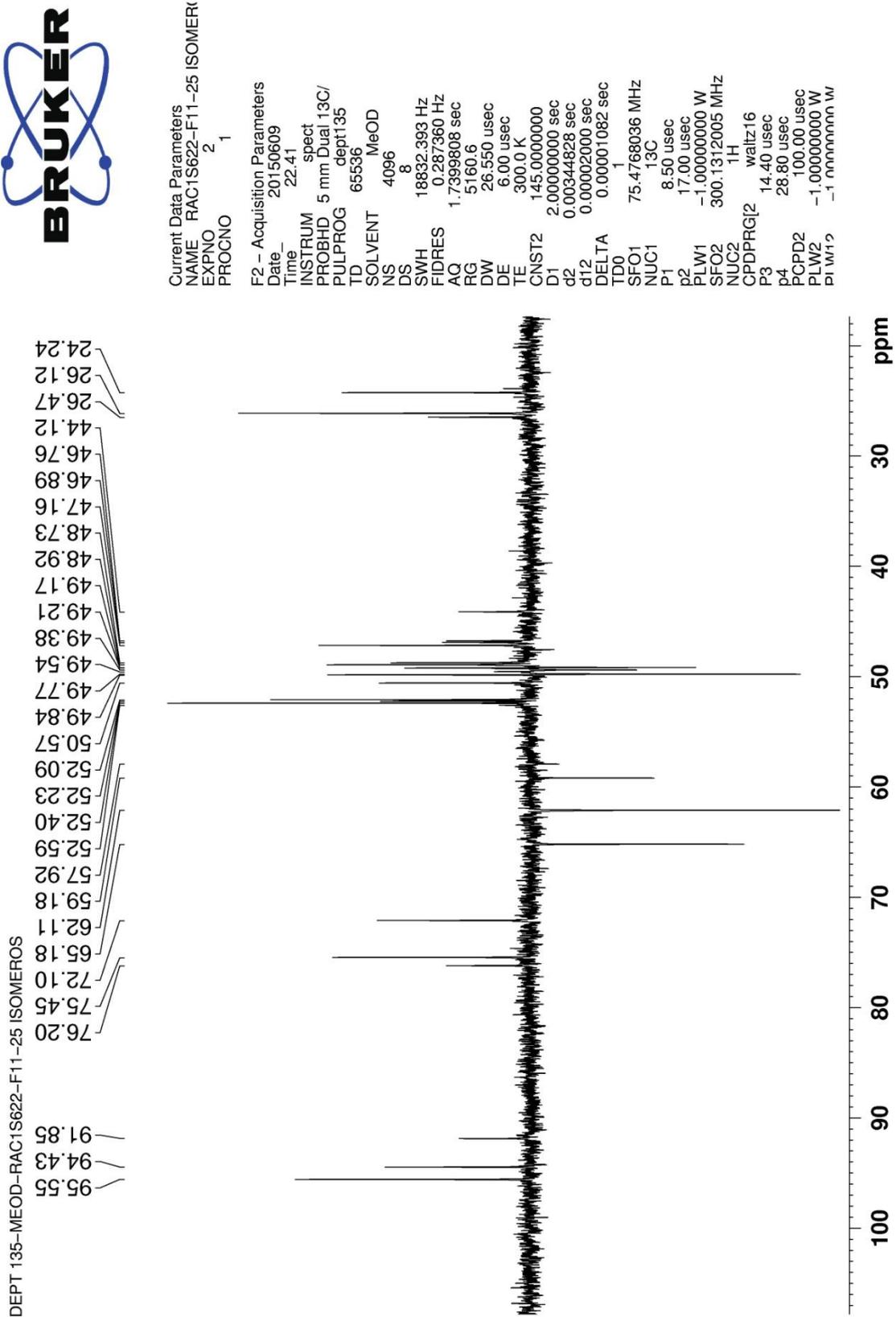


Figura 57 - Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° (CD_3OD , 75MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d



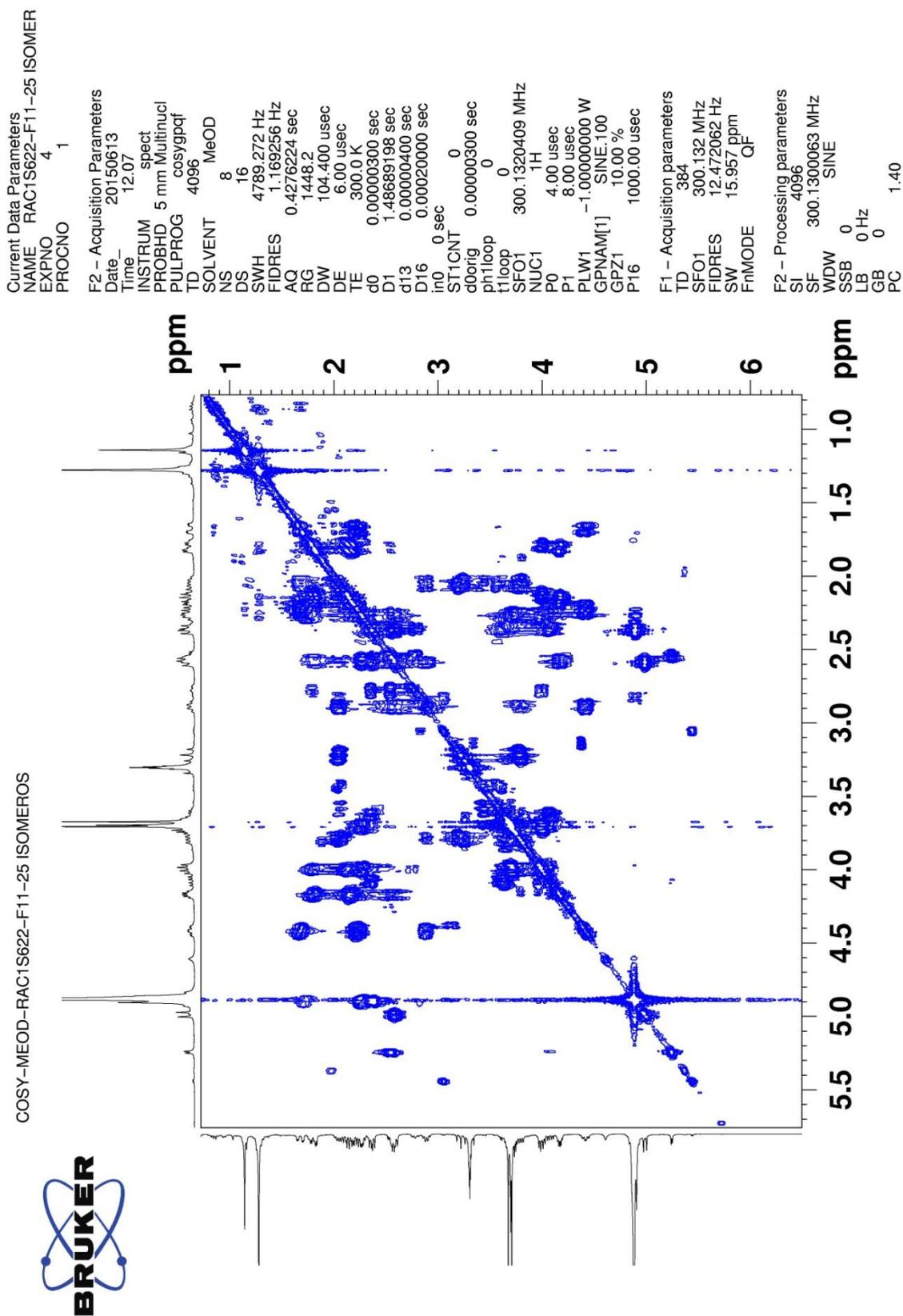


Figura 58 - Mapa de contorno do experimento 2D COSY(CD₃OD, 300MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d



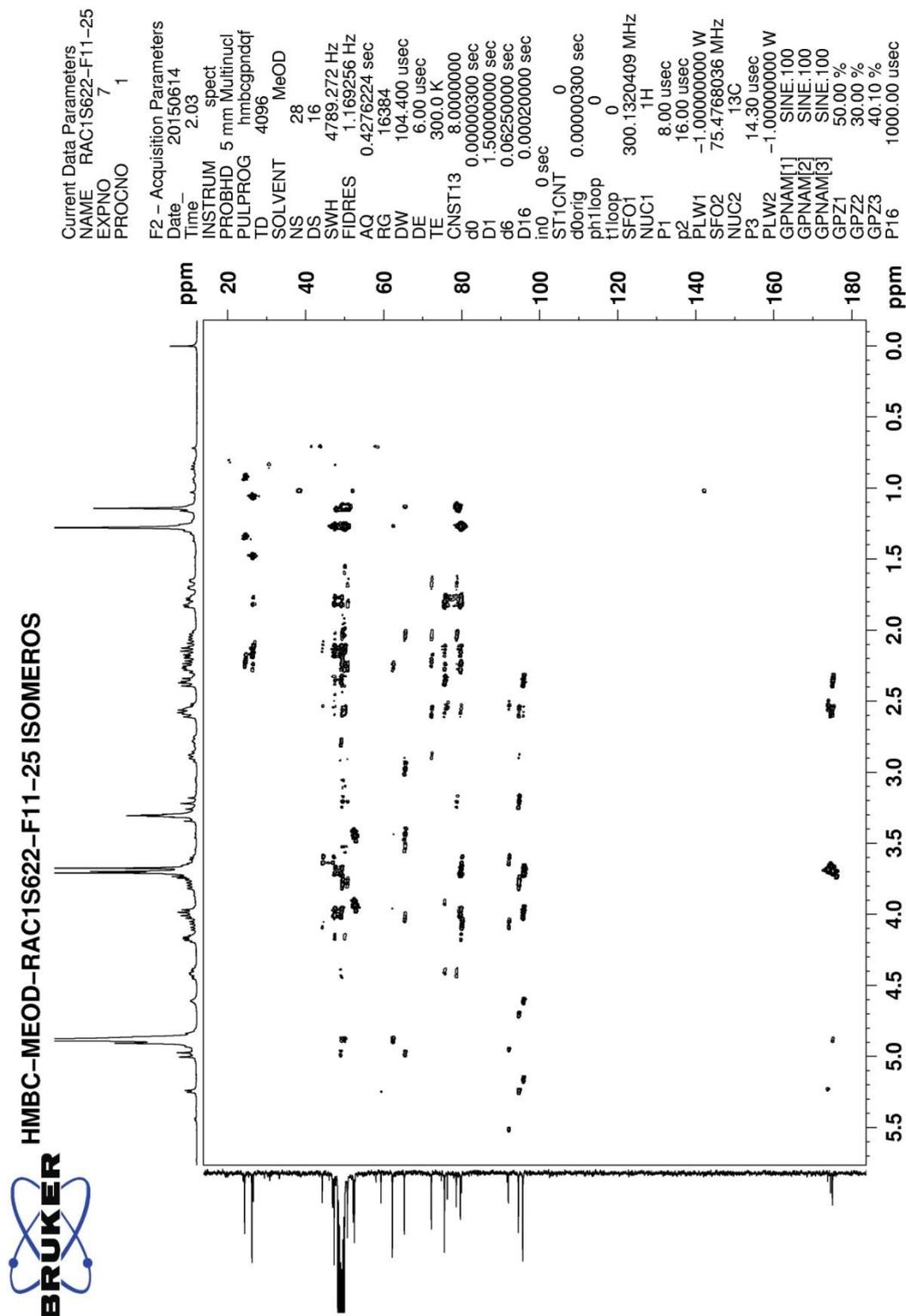


Figura 59 - Mapa de contorno do experimento 2D HMBC (CD₃OD, 300 MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d



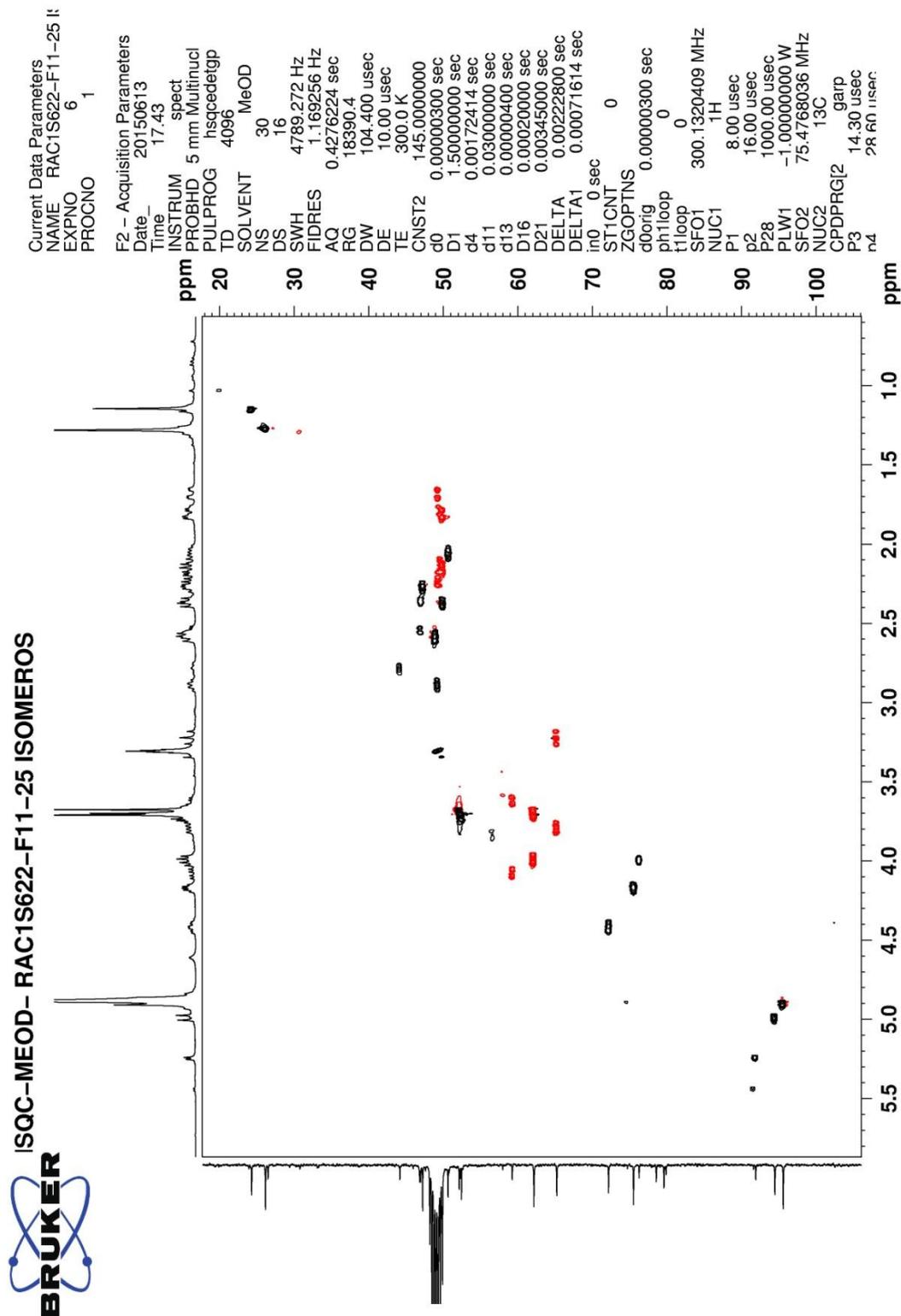


Figura 60 - Mapa de contorno do experimento 2D HSQC (CD₃OD, 300 MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d



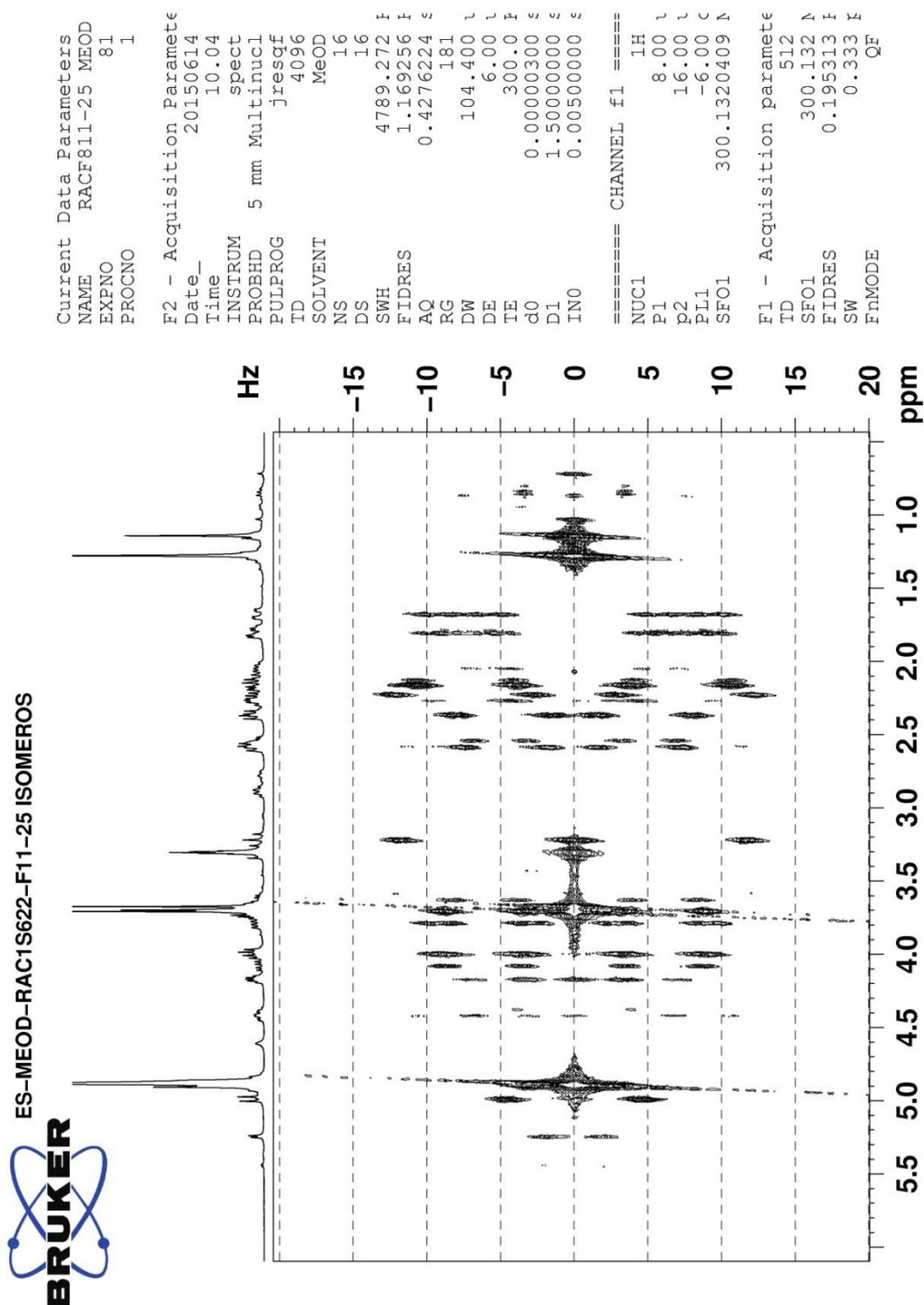


Figura 61 - Mapa de contorno do experimento *J*-resolved (CD₃OD, 300 MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d



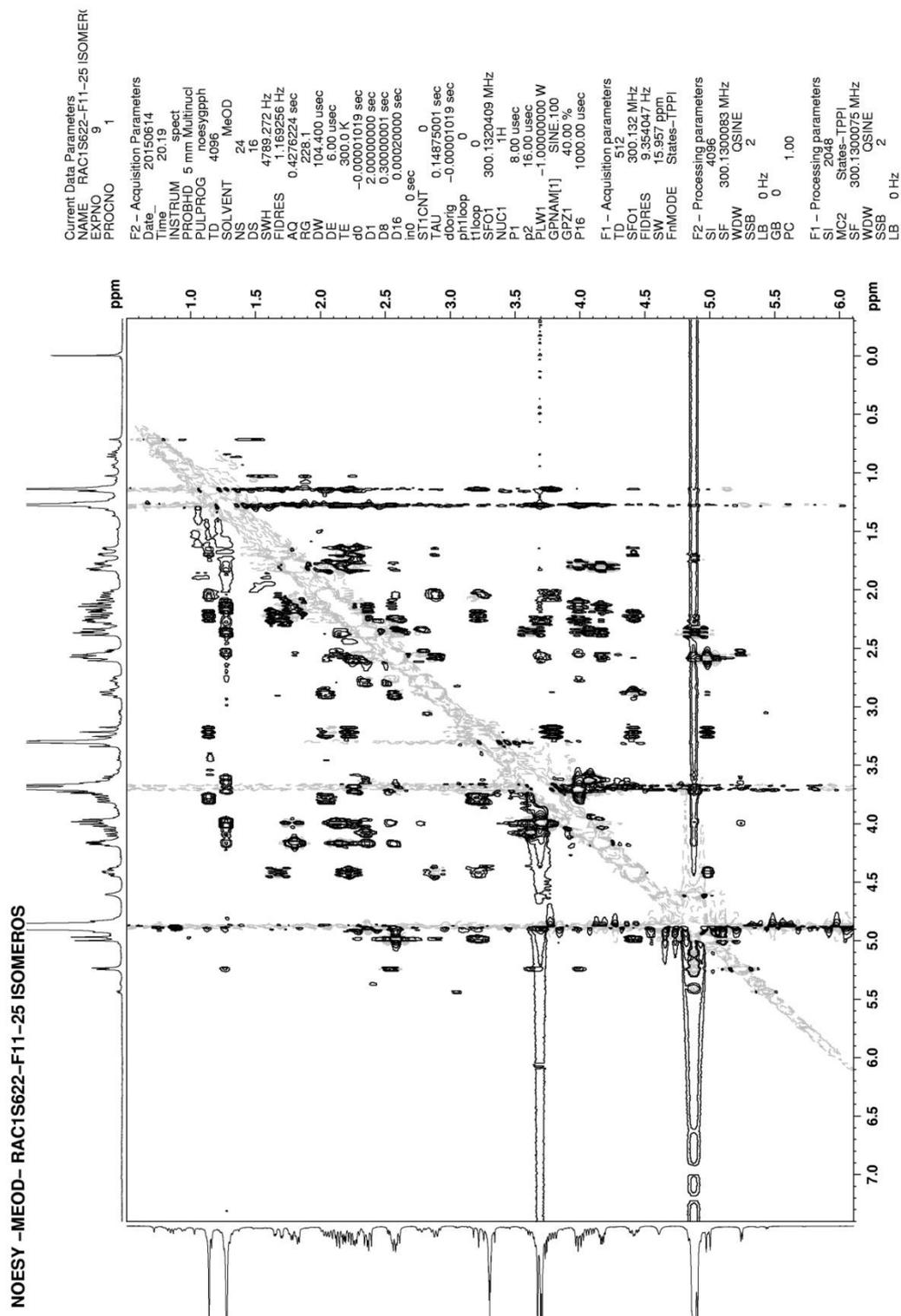


Figura 62 - Mapa de contorno do experimento 2D NOESY (CD₃OD, 300 MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d



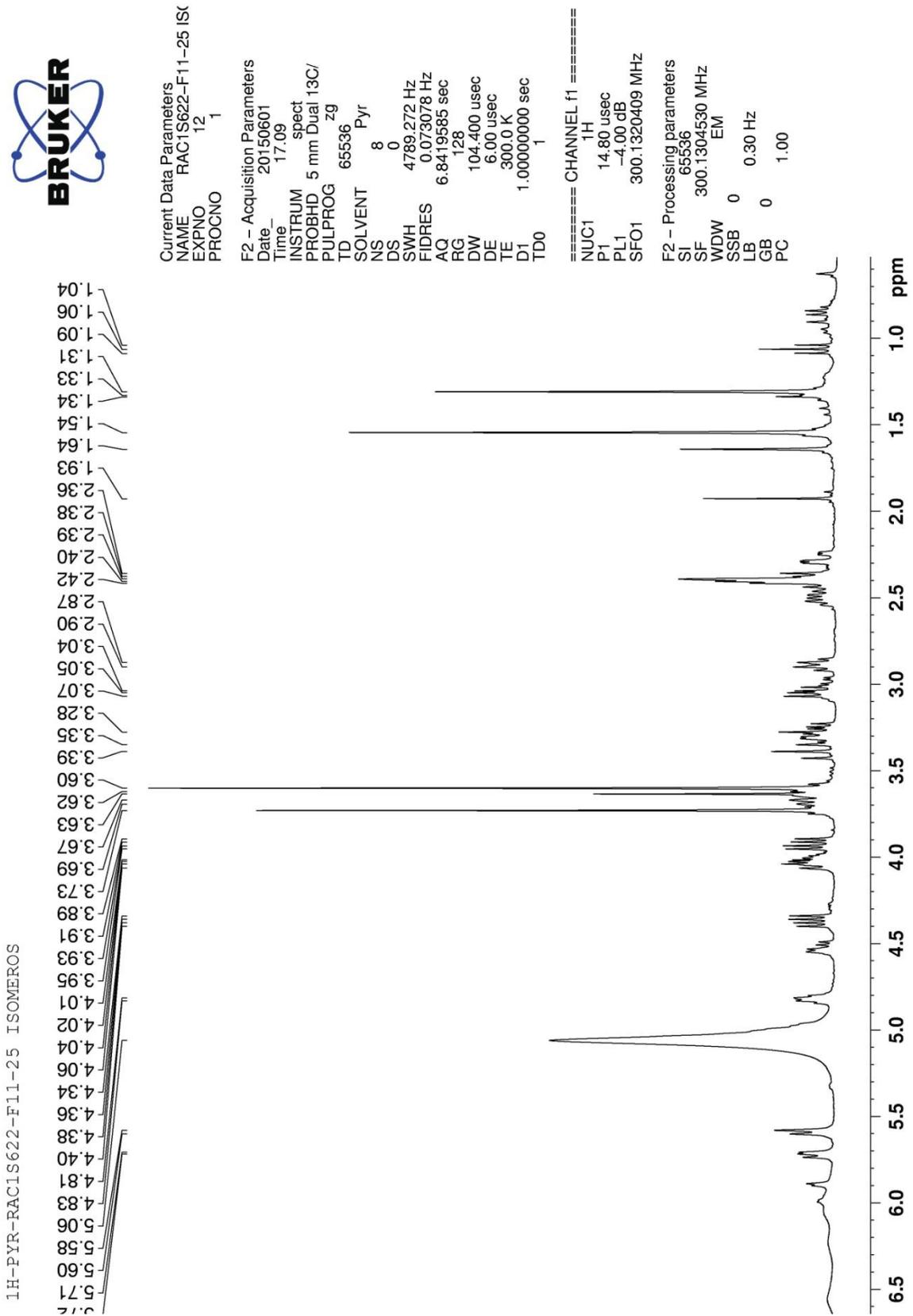


Figura 63 - Espectro de RMN de ¹H (Piridina-d₅, 300MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d





Current Data Parameters
 NAME RAC15622-F
 EXPNO 3
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Paramett
 Date 20150529
 Time 12.45
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Dual 13
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT Pyr
 NS 3648
 DS 2
 SMH 18832.393 Hz
 FIDRES 0.574719 Hz
 AQ 0.8699904 sec
 RG 10321.3
 DW 26.550 usec
 DE 6.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 0.15000001 sec
 d11 0.03000000 sec
 DELTA 0.05000000 s
 TDO 1
 SFO1 75.4768036 M
 NUC1 13C
 P1 8.75 usec
 PLW1 -1.00000000 V
 SFO2 300.1312005 N
 NUC2 1H
 CPDPRG2 waltz16
 PCPD2 100.00 usec
 PLW2 -1.00000000 V
 PLW12 -1.00000000 V
 PLW13 -1.00000000 V

F2 - Processing paramett
 SI 32768
 SF 75.4678202 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

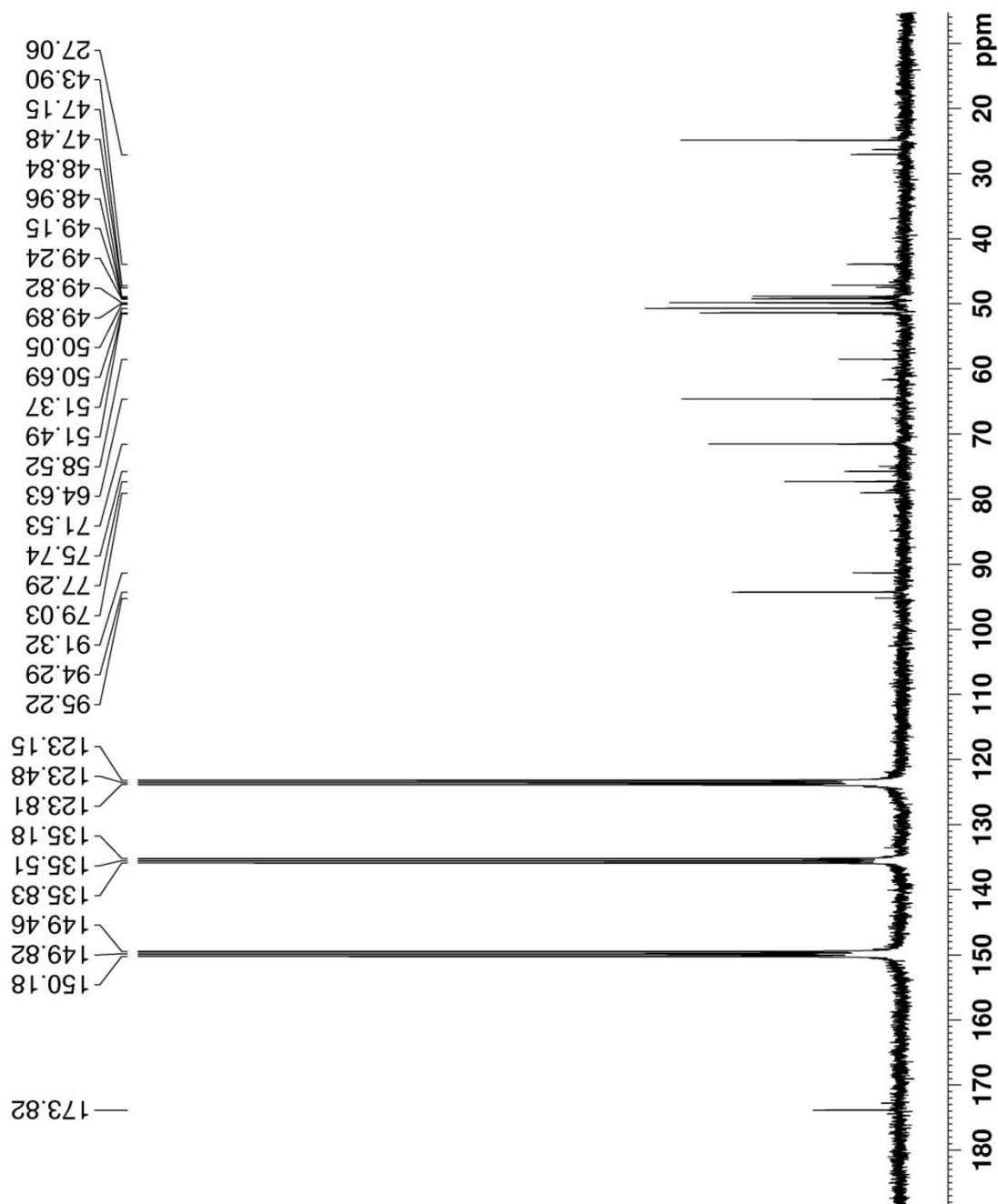


Figura 64 - Espectro de RMN de ¹³C (Piridina-d₅, 75,0 MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d



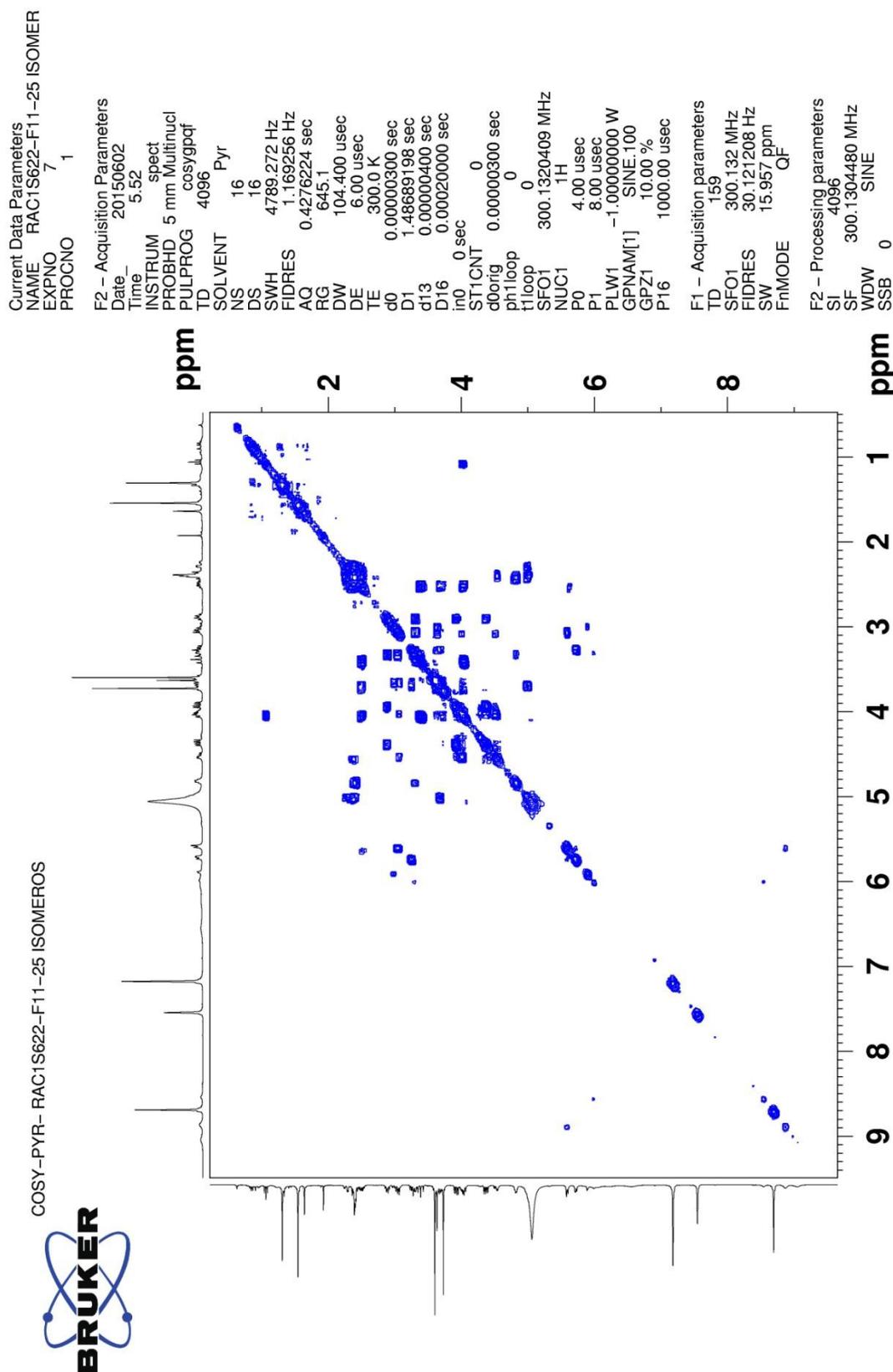


Figura 65 - Mapa de contorno do experimento 2D COSY (Piridina-d₅, 300,0 MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d



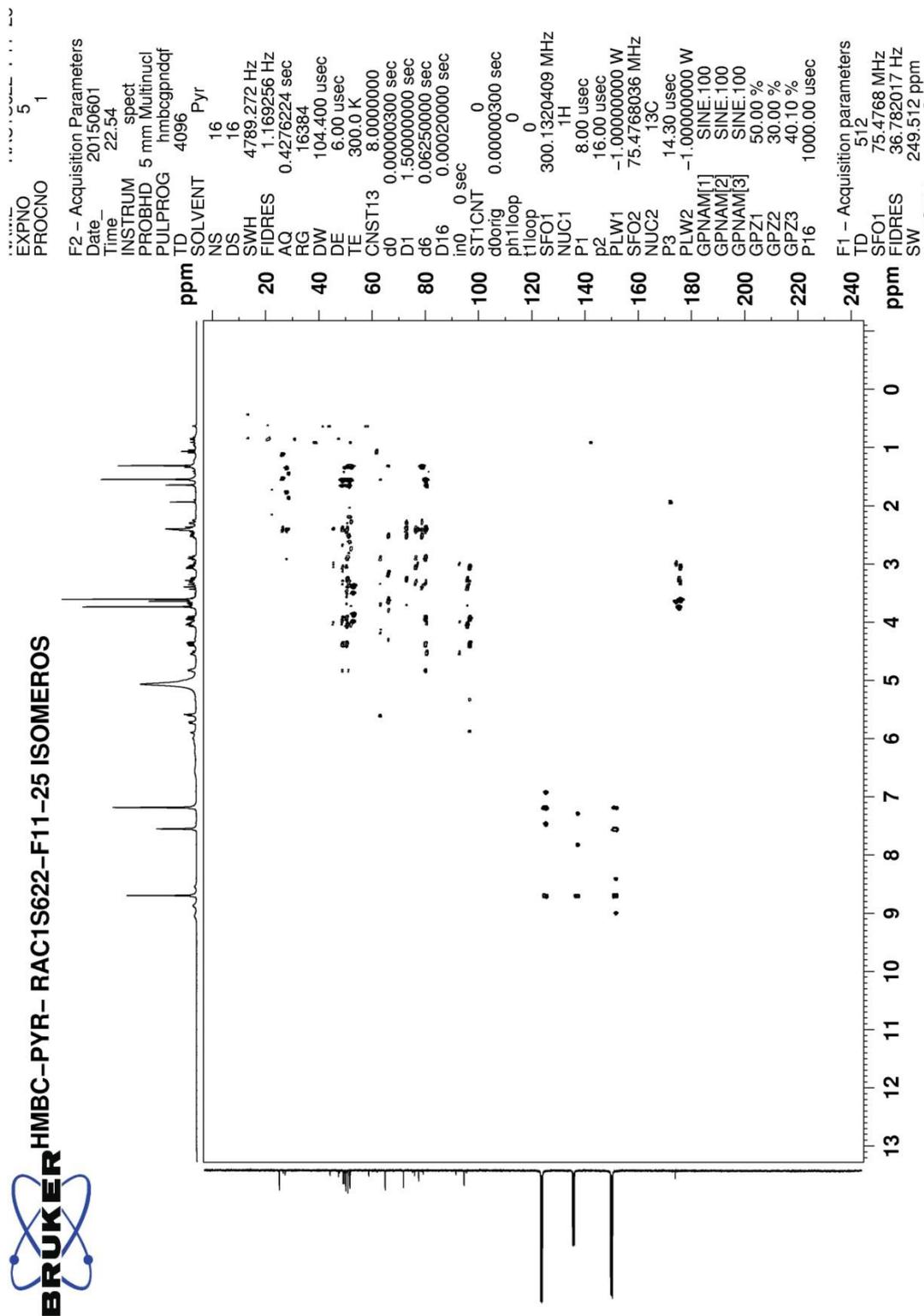


Figura 66 - Mapa de contorno do experimento 2D HMBC (Piridina-d₅, 300,0 MHz) das substâncias 3a, 3b, 3c e 3d



4.3 Caracterização das substâncias 4a e 4b

A amostra RACflash-4-5 apresentou uma única mancha rosa em CCDA quando revelada com solução de vanilina. Pelo espectro de RMN de ^1H foi possível observar dois *simpletos* referentes a grupos metoxilas de éster em δ 3,70 e δ 3,73, um *simpleto* em δ 7,40, referente a dois hidrogênios e dois *dupletos* em δ 5,16 e δ 5,41 referentes a um hidrogênio cada (**Figura 69 e 70**, p.70 e 71) Esses conjuntos de sinais indicaram se tratar de uma mistura de duas substâncias com estruturas semelhantes, numa proporção próxima de 1:1.

O espectro de RMN de ^{13}C (BBD e DEPT 135°) (**Figuras 71 a 73**, p.72-74) apresentou 22 sinais que podem ser agrupados em dois conjuntos de onze sinais de acordo com as diferenças de intensidade: dois sinais referentes a carbonilas α , β insaturadas em δ 170,1 e δ 168,8; quatro sinais de carbonos olefínicos em δ 108,5 ($=\text{C}-$), δ 108,6 ($=\text{C}-$), δ 151,6 ($\begin{smallmatrix} =\text{CH} \\ \text{O}- \end{smallmatrix}$) e δ 152,4 ($\begin{smallmatrix} =\text{CH} \\ \text{O}- \end{smallmatrix}$); dois sinais de carbonos metilênicos em δ 47,4 e δ 48,2; seis sinais de carbonos metínicos em δ 41,2, δ 41,8, δ 50,5, δ 51,5, δ 76,8 e δ 78,9, sendo os dois últimos carbonos carbinólicos; dois sinais de metilas em δ 23,6 e δ 22,6, dois sinais de metoxilas, δ 50,7 e δ 51,5, dois sinais de carbonos quaternários carbinólicos em δ 78,0 e δ 79,6 e, finalmente, dois sinais de carbonos metínicos típicos de hemiacetais em δ 91,0 e δ 92,7.

A análise dos conjuntos de sinais, considerando, principalmente as multiplicidades dos carbonos e as intensidades dos sinais, levou à proposta de tratar de uma mistura de duas substâncias em proporção próxima de 1:1 com fórmula molecular igual a $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_6$. O padrão de oxidação sugerido por estes dados foi comparado com os padrões de oxidação mais comumente encontrados nos iridóides da literatura e nos iridoídes 3a, descrito anteriormente. Estas comparações indicaram que as substâncias 4a e 4b possuem um padrão bastante semelhante ao da substância 3a. (**Figura 67, Tabelas 8 e 9**).

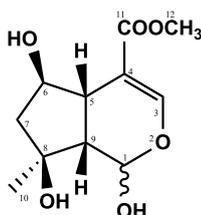


Figura 67 - Proposta estrutural do esqueleto das substâncias 4a e 4b



A partir da revisão da literatura, verificou-se a ocorrência de uma mistura de iridoídeos não glicosilados cujas estruturas são pares de epímeros conhecidas como shanzigenina metil éster e 1-epishanzigenina metil éster (**Figura 68**). Através da comparação dos valores de δ_C e δ_H das substâncias **4a** e **4b** com os pares de epímeros (**Tabelas 8 e 9**), verificou-se uma grande semelhança entre eles, o que permitiu afirmar que as substâncias **4a** e **4b** são as substâncias shanzigenina metil éster e 1-epishanzigenina metil éster.

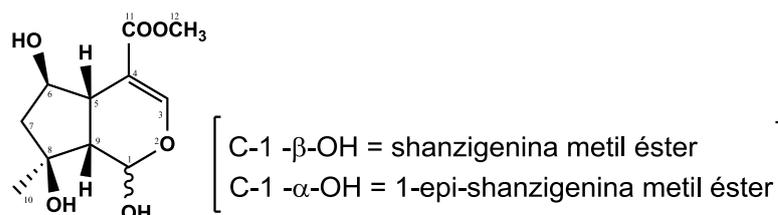


Figura 68 - Estruturas da shanzigenina metil éster e 1-epishanzigenina metil éster

O primeiro relato das substâncias shanzigenina metil éster e a 1-epishanzigenina metil éster foi mencionado por Achenbach (1981) como produtos derivados da hidrólise do shanzisídeo metil éster, encontrado na espécie da família Rubiaceae, *Canthium subcordatum*. Em 2001, Guo *et. al*, isolaram pela primeira vez como produto natural, os pares de epímeros da raiz de *Phlomis umbrosa*, uma espécie da família Lamiaceae.

Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H e das substâncias **4a**, **4b**

N ^o Carb.	Subst. 4a δ ^1H , mult. (J/Hz) ¹	Shanzigenina metil Ester δ ^1H , mult. (J/Hz) ²	Subst. 4b δ ^1H , mult. (J/Hz) ¹	1-epi- shanzigenina metil Ester δ ^1H , mult. (J/Hz) ²
1	5,41 <i>d</i> (3,8)	5,42 <i>d</i> (2,5)	5,16 <i>d</i> (4,5)	5,18 <i>d</i> (6,1)
3	7,40 <i>s</i>	7,42 <i>s</i>	7,40 <i>s</i>	7,42 <i>s</i>
5	3,05	3,07 <i>m</i>	3,0 <i>m</i>	3,03 <i>m</i>
6	3,97 <i>m</i>	4,22 <i>m</i>	4,2 <i>ddd</i> (9,6; 6,8; 3,1)	3,99 <i>ddd</i> (9,2; 6,0; 3,1)
7	1,65 <i>ddd</i> (14,3, 3,0, 1,6) 2,29 <i>dd</i> (14,3; 9,5)	1,67 <i>brd</i> (14,0) 2,29 <i>dd</i> (14,0; 9,0)	1,79 <i>dd</i> (13,6;5,3) 2,00 <i>dd</i> (13,6; 7,0)	1,79 <i>dd</i> (13,2; 5,0) 2,0 <i>dd</i> (13,2; 6,9)
9	2,13 <i>dd</i> (5,8; 2,5)	2,14 <i>dd</i> (5,8; 2,5)	2,37 <i>dd</i> (9,4; 4,5)	2,37 <i>dd</i> (9,1; 6,1)
10	1,25 <i>s</i>	1,31 <i>s</i>	1,34 <i>s</i>	1,36 <i>s</i>
12	3,70 <i>s</i>	3,72 <i>s</i>	3,73 <i>s</i>	3,74 <i>s</i>

¹ Experimentos obtidos em CD₃OD, 300 MHz.

² Experimentos obtidos em CD₃OD, 400 MHz (Guo, 2001).



Tabela 9 - Dados de RMN de ^{13}C das substâncias 4a, 4b

N ^o Carb.	Subst. 4a $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ¹	Shanzigenina metil éster $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ²	Subst. 4b $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ¹	1-epi- shanzigenina metil éster $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ²
1	91,0	92,4	94,2	90,4
3	151,6	153,0	153,8	151,3
4	108,7	110,0	110,0	108,7
5	41,1	43,3	42,6	42,2
6	76,8	80,3	78,2	77,8
7	47,4	49,2	48,7	46,8
8	78,0	81,0	79,5	90,7
9	50,5	51,9	51,9	48,0
10	23,6	25,0	24,0	19,3
11	170,1	170,2	170,2	169,7
12	50,7	53,2	53,0,	51,6

¹ Experimentos obtidos em CD_3OD , 75 MHz. 171,1

² Experimentos obtidos em CD_3OD , 40 MHz (Guo, 2001).



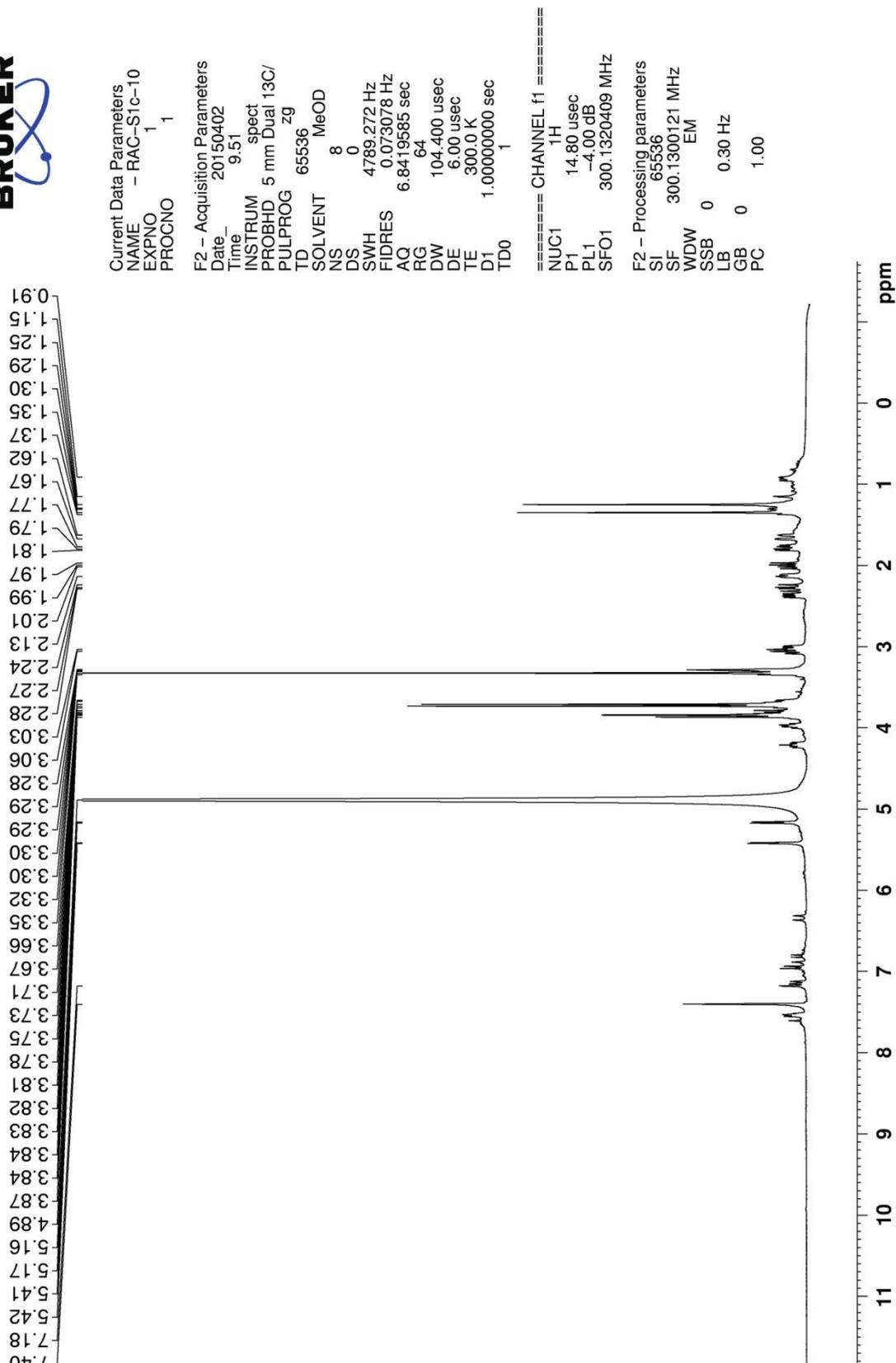


Figura 69 - Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300MHz) das substâncias 4a e 4b em mistura





```

Current Data Parameters
NAME      RACFLASH4-5
EXPNO    1
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20150402
Time     9.51
INSTRUM spect
PROBHD   5 mm Dual 13C/
PULPROG zg
TD       65536
SOLVENT  MeOD
NS       8
DS       0
SWH      4789.272 Hz
FIDRES   0.073078 Hz
AQ       6.8419585 sec
RG       64
DW       104.400 usec
DE       6.00 usec
TE       300.0 K
D1       1.00000000 sec
TD0      1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1     1H
P1       14.80 usec
PL1      -4.00 dB
SFO1     300.1320409 MHz

F2 - Processing parameters
SI       65536
SF       300.1300121 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       0
GB       0
PC       1.00

```

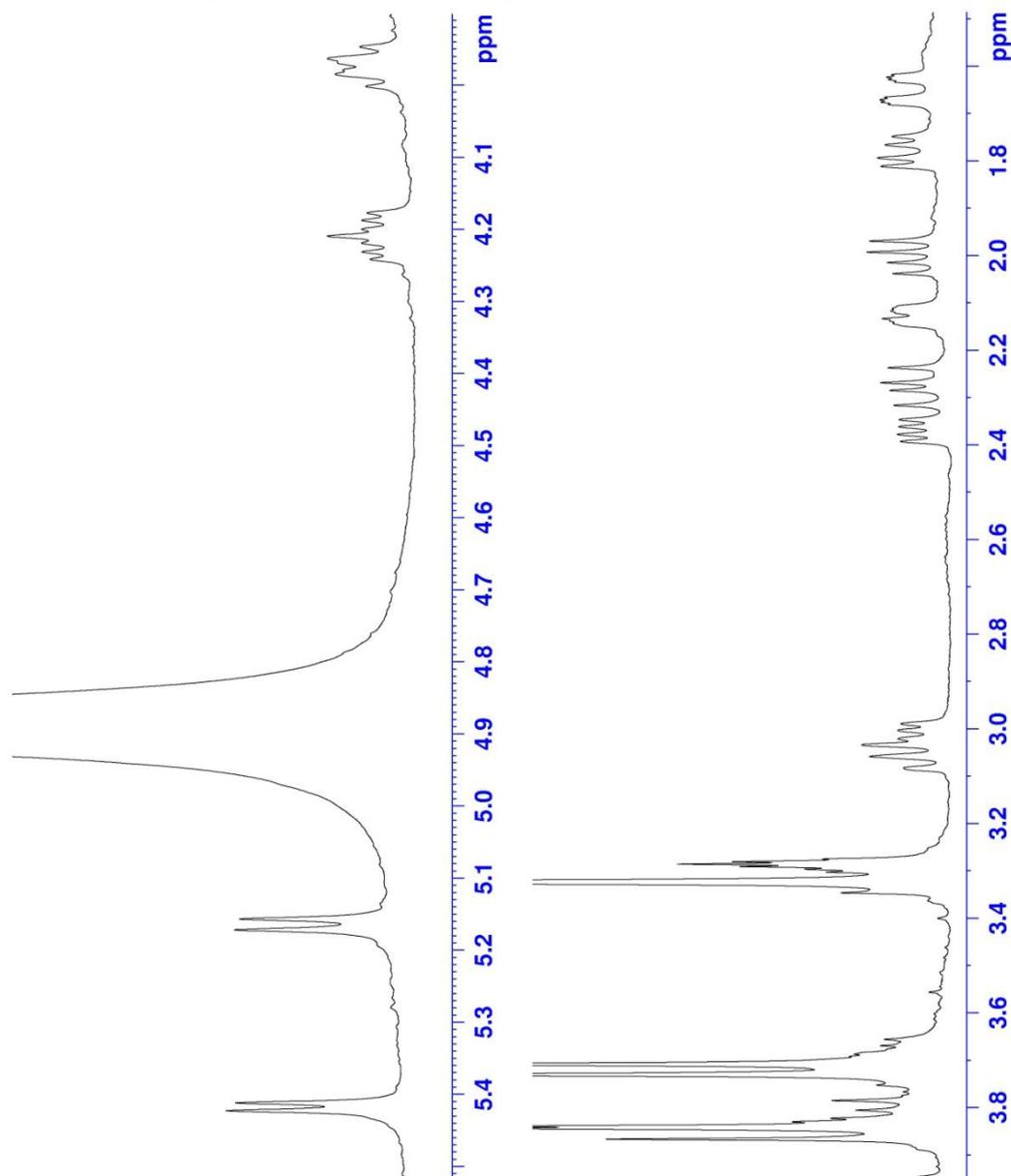


Figura 70 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300MHz) das substâncias 4a e 4b em mistura





Current Data Parameters
 NAME RACFLASH4-5
 EXPNO 3
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20150417
 Time_ 13.13
 INSTRUM spect
 PROBD 5 mm Multinucl
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT MeOD
 NS 5837
 DS 2
 SWH 18832.393 Hz
 FIDRES 0.574719 Hz
 AQ 0.8699904 sec
 RG 6502
 DW 26.550 usec
 DE 6.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 0.15000001 sec
 d11 0.03000000 sec
 DELTA 0.05000000 sec
 TD0 1
 SFO1 75.4768036 MHz
 NUC1 13C
 P1 14.30 usec
 PLW1 -1.00000000 W
 SFO2 300.1312005 MHz
 NUC2 1H
 CPDPRG2 waltz16
 PCPD2 100.00 usec
 PLW2 -1.00000000 W
 PLW12 -1.00000000 W
 PLW13 -1.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 75.4677498 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

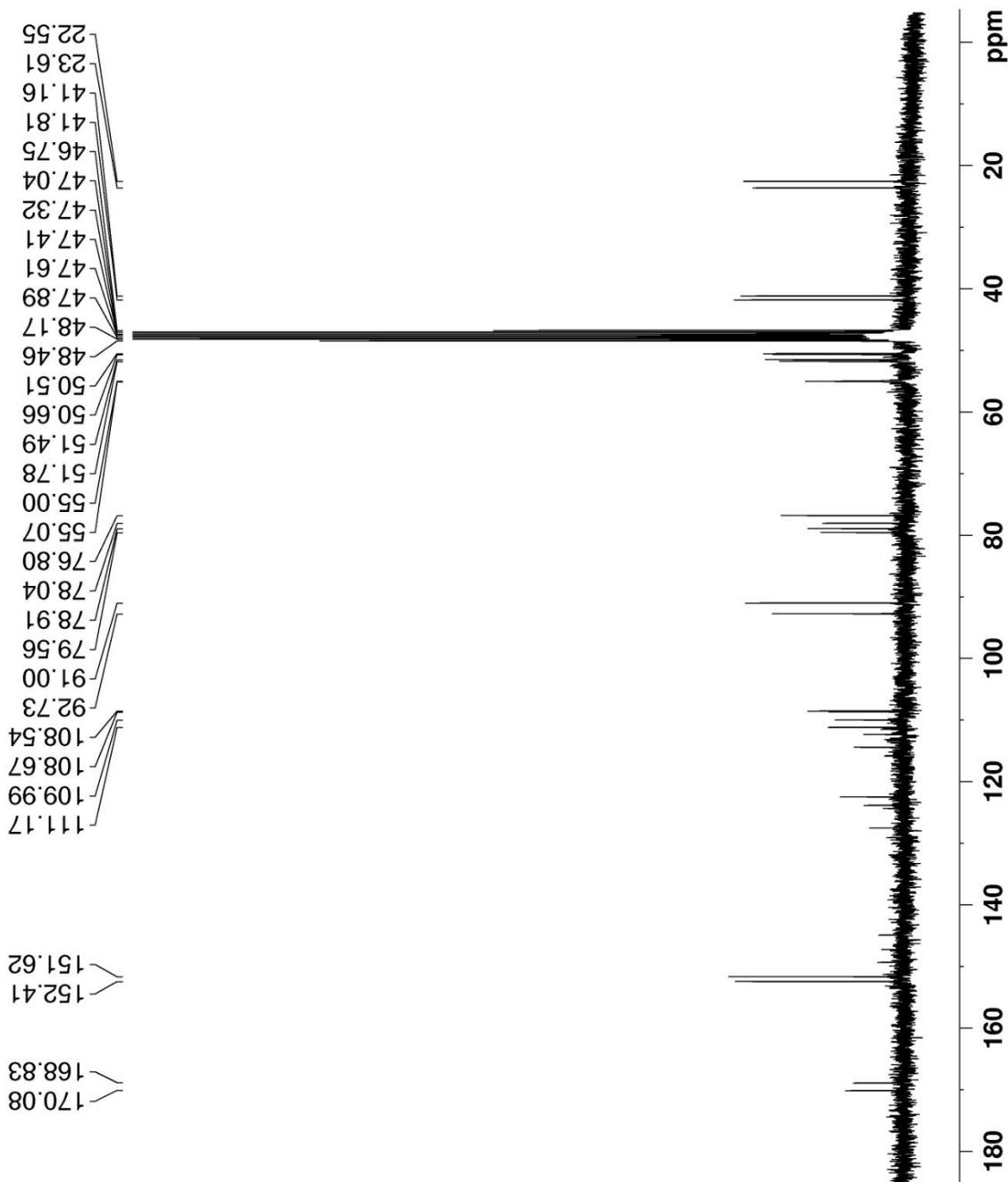


Figura 71 - Espectro de RMN de ¹³C (CD₃OD, 75MHz) das substâncias 4a e 4b em mistura





Current Data Parameters
 NAME RACFLASH4-5
 EXPNO 3
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20150417
 Time_ 13.13
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Multinucl
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT MeOD
 NS 5837
 DS 2
 SWH 18832.393 Hz
 FIDRES 0.574719 Hz
 AQ 0.8699904 sec
 RG 6502
 DW 26.550 usec
 DE 6.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 0.15000001 sec
 d11 0.03000000 sec
 DELTA 0.05000000 sec
 TD0 1
 SFO1 75.4768036 MHz
 NUC1 13C
 P1 14.30 usec
 PLW1 -1.00000000 W
 SFO2 300.1312005 MHz
 NUC2 1H
 CPDPRG[2] waltz16
 PCPD2 100.00 usec
 PLW2 -1.00000000 W
 PLW12 -1.00000000 W
 PLW13 -1.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 75.4677498 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

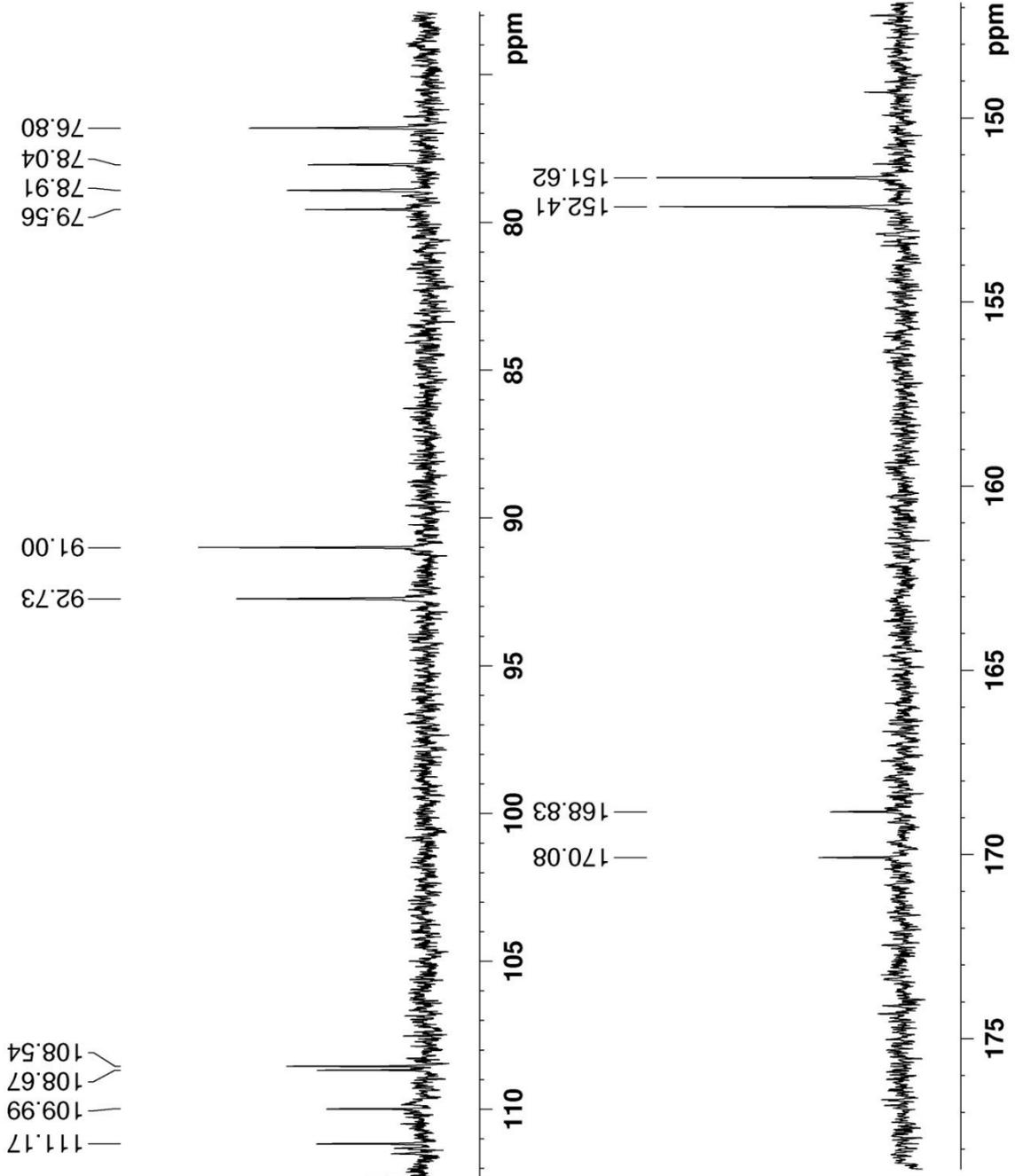


Figura 72 - Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75,0 MHz) das substâncias 4a e 4b em mistura



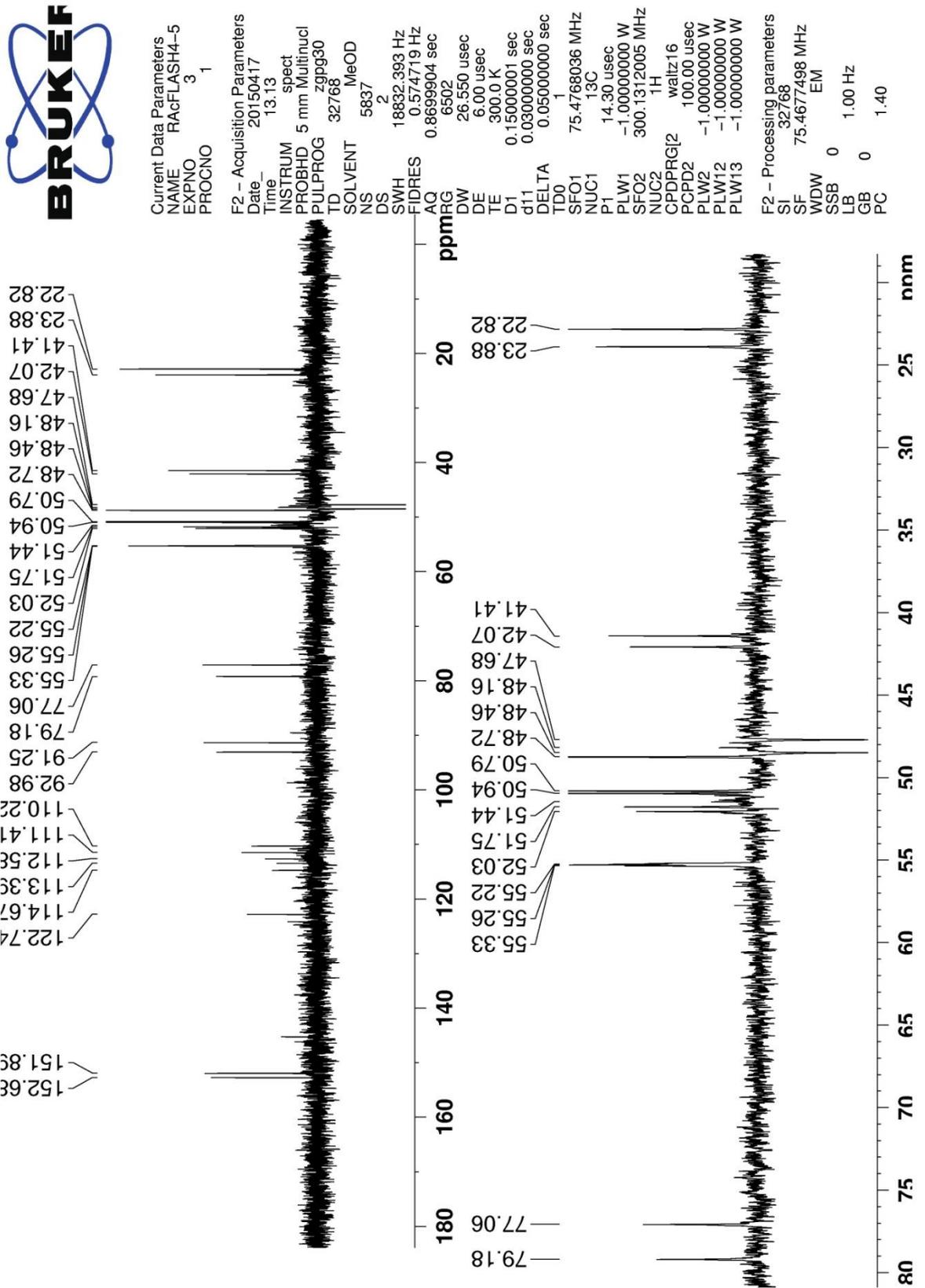


Figura 73 - Espectro de RMN de 13C DEPT 135 (CD₃OD, 75,0 MHz) das substâncias 4a e 4b em mistura



4.4 Identificação da substância 2

A **substância 2** foi obtida da fração RAC-S1c-10 de acordo com o fracionamento cromatográfico descrito no item 3.2.4 (p. 16), apresentando uma mancha azulada na placa após revelação, o que indicou tratar-se de um iridoide. Seu espectro de RMN de ^1H (**Figuras 76 e 77**, p.78 e 79) apresentou um simpleto em δ 7,4 e um duplete em δ 5,56, atribuídos a um hidrogênio olefínico e um de hemiacetal, respectivamente. Além desses, foi observado um sinal de hidrogênio característico de grupo metila em δ 1,23 e um sinal de hidrogênios de metoxila em δ 3,72.

O espectro de RMN ^1H mostrou, ainda, um conjunto de sinais entre δ 3,24 e δ 4,62, característicos de C-H carbinólico, típicos de açúcar. Com o auxílio do experimento *J-resolved* (**Figura 82**, p.84) foi determinada as multiplicidades dos sinais em: δ 4,62 (*d*, $J = 7,9$ Hz); δ 3,15, (*dd*, $J = 8,0; 9,0$ Hz); δ 3,35 (*t*, $J = 8,0$ Hz); δ 3,24 (*dd*, $J = 8,5$ e $J = 9,5$ Hz); δ 3,97 (*m*); 4,43 (*dd*, $J = 11,7; 5,2$ Hz) e 4,58 (*dd*, $J = 11,7; 2,2$ Hz). O duplete em δ 4,62 ($J = 7,9$ Hz) pode ser atribuído ao hidrogênio do carbono anomérico (H-1') que deve ter uma relação axial-axial com o hidrogênio H-2' (δ 3,15, *dd*, $J = 8,0; 9,0$ Hz). Analisando os valores dos deslocamentos químicos e das constantes de acoplamento dos demais sinais do açúcar pôde-se aferir que todos os hidrogênios glicosídicos estão na posição axial. A comparação destes dados com dados da literatura sugeriu que o glicosídeo presente poderia ser a β -D-glucose. Os sinais nos espectros de RMN ^{13}C (**Figura 78**, p.80) em δ 99,8 (CH), δ 74,4 (CH), δ 78,8 (CH), δ 71,6 (CH), δ 77,5 (CH) e δ 63,0 (CH₂) e suas correlações observadas no experimento de RMN bidimensional HSQC (**Figura 79**) corroboraram com esta proposição.

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou, além dos sinais da unidade do açúcar, outros 11 sinais referentes à aglicona com provável esqueleto iridoide, sendo um sinal em δ 169,7, relativo à carbonila de éster; dois sinais de carbonos olefínicos em δ 152,8 (CH) e δ 111,4 (C); dois sinais de carbonos carbinólicos em δ 77,5 (CH) e δ 79,0 (C); um carbono ligado a dois átomos de oxigênio em δ 94,8 (-O-CH-O-); δ 24,7 (-CH₃); δ 51,9 (-OCH₃); δ 49,29 (-CH₂-), δ 41,4 (CH); δ 51,7 (CH). A multiplicidade destes sinais foi determinada com o experimento HSQC (**Figura 79**) que também possibilitou a atribuição dos carbonos aos seus respectivos hidrogênios.

Entre as correlações observadas no mapa de contorno gerado a partir do experimento heteronuclear HMBC (**Figura 80**) três merecem destaque, pois possibilitaram a localização da posição da carboxila de éster, da metila e do açúcar. Estas correlações foram respectivamente: a correlação 3J entre H-3 (*s*; δ 7,4) e C-11 (δ 169,7); a correlação 2J entre H-10 (*s*; δ 1,25) e C-8



(79,0) e a correlação 3J entre H-1'(s, δ 4,62) e C-1 (94,8). Com isto pôde-se propor a estrutura mostrada na **Figura 74**, sem atribuição da configuração relativa dos grupos presentes, como possível estrutura da **substância 2**.

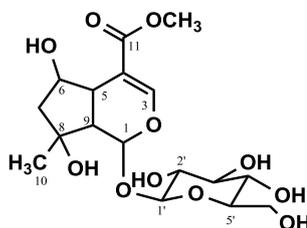


Figura 74 – Estrutura proposta para a substância 2

A junção dos anéis apresenta configuração *cis*, uma vez que no mapa de contorno gerado a partir do experimento NOESY (**Figura 83**, p.85) foi observada interação dipolar entre H-5 (*ddd*; δ 2,99) e H-9 (*dd*; δ 2,61). As correlações observadas entre H-1 (*d*, δ 5,56), H-6 (*td*, δ 4,03) e H-10 (*s*, δ 1,25) indicam que eles estão do mesmo lado da molécula. Não foram observadas as correlações dos hidrogênios H-1, H-6 e H-10 com H-5 e H-9, o que indica que os dois conjuntos de hidrogênios podem estar em lados opostos. Estes dados são indicativos que a estrutura, apresentada na **Figura 75**, pode ser atribuída à substância presente na fração RAC-S1c-10.

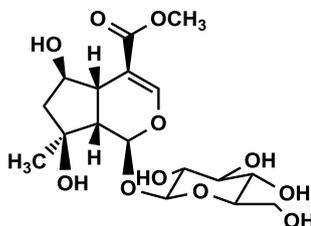


Figura 75 - Estrutura da substância 2

Após levantamento bibliográfico e a comparação desses dados com os da literatura (ACHENBACH, 1981) [**Tabela 10**], foi possível confirmar a estrutura de **2** e identificá-la como sendo o iridoide glicosilado chamado de shanzisídeo metil éster, obtido de *Canthium subcordatum* (ACHENBACH, 1981) e *Pedicularis condensata* (AKDEMIR, 1991). Em 2008 foi publicada uma patente do uso do shanzisídeo metil éster no tratamento de hepatites B e C (FONG, 2008).



Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 2 e do shanzisídeo metil éster

N	Substância 2 ¹		Shanzisídeo metil éster ²	
	δ_H ppm (mult., J em Hz)	δ_C (ppm)	δ_H ppm (mult.; J em Hz)	δ_C (ppm)
1	5,56 (d, 2,7)	94,8	5,57 (d, 3,0)	94,94
3	7,4 (s)	152,8	7,41 (d, 1)	152,9
4	-	111,4	-	111,40
5	2,99 (ddd, 3,3; 10,0)	41,4	2,99 (m)	41,48
6	4,03 (td, 6,1; 6,1; 3,5)	77,5	4,03 (m)	77,96
7	1,81 (d, 5,9; 13,2) 2,01 (d, 6,3; 13,2)	49,2	1,83 (dd, 13,0; 6,0) 2,01 (dd, 10,0; 3,0)	51,9*
8	-	79,0	-	79,09
9	2,61 (dd, 2,7; 10,0)	51,7	2,61 (dd, 10,0; 3,0)	51,74
10	1,23 (s)	24,7	1,26 (s)	24,66
11	-	169,7	-	169,80
12	3,72 (s)	51,9	3,72 (s)	49,12*
1'	4,62 (d, 7,9)	99,8	4,61 (d, 8,0)	99,86
2'	3,15 (dd, 8,0; 9,0)	74,6	encoberto	74,63
3'	3,35 (t, 8,0)	78,0	encoberto	78,28
4'	3,24 (dd, 8,5; 9,5)	71,6	encoberto	71,64
5'	3,97 (m)	78,3	encoberto	77,50
6'	4,43 (dd, 11,7; 5,2) 4,58 (dd, 11,7; 2,2)	62,9	3,64 (dd, 12,0; 6,0) 3,91 (dd, 12,0; 2,0)	62,8

¹ Experimento obtido em MeOD, 300 MHz e 75,00 MHz.² Experimento obtido em MeOD, 250 MHz e 62,50 MHz.

* Os valores devem ser trocados.



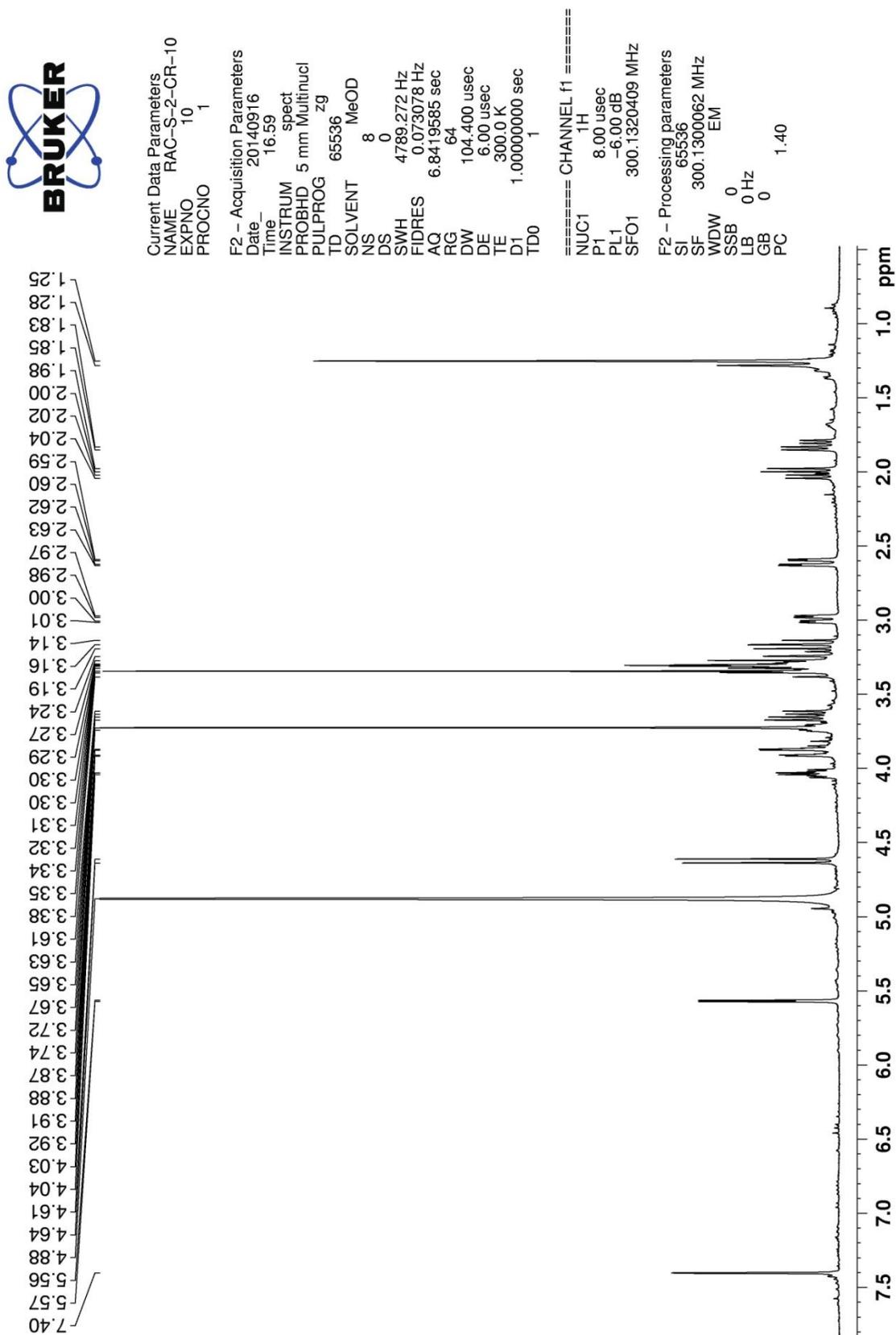


Figura 76 - Espectro de RMN de ^1H (CH_3OD , 300MHz) da substância 2



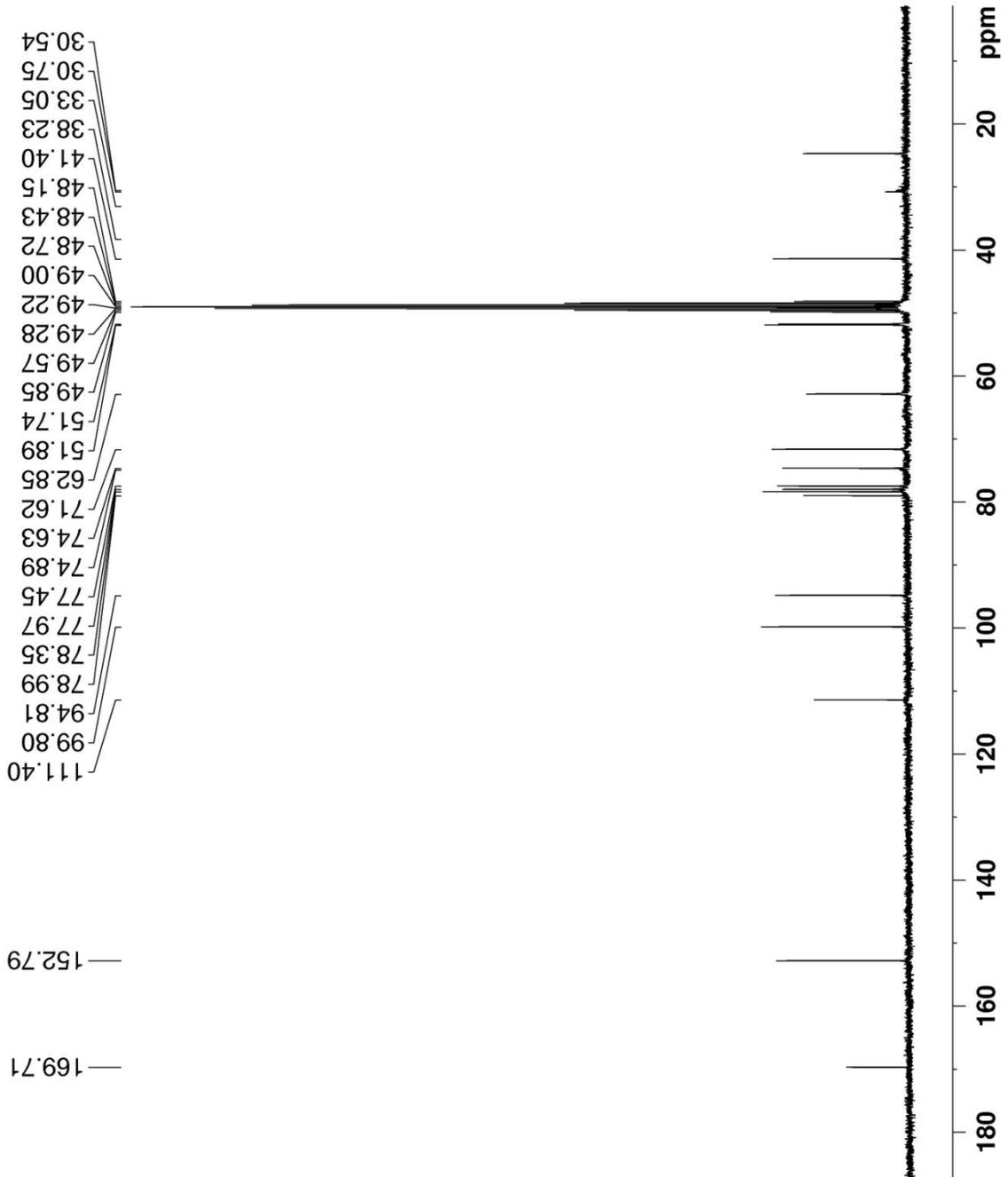


Figura 78 - Espectro de RMN de ¹³C (CH₃OD, 75 MHz) da substância 2



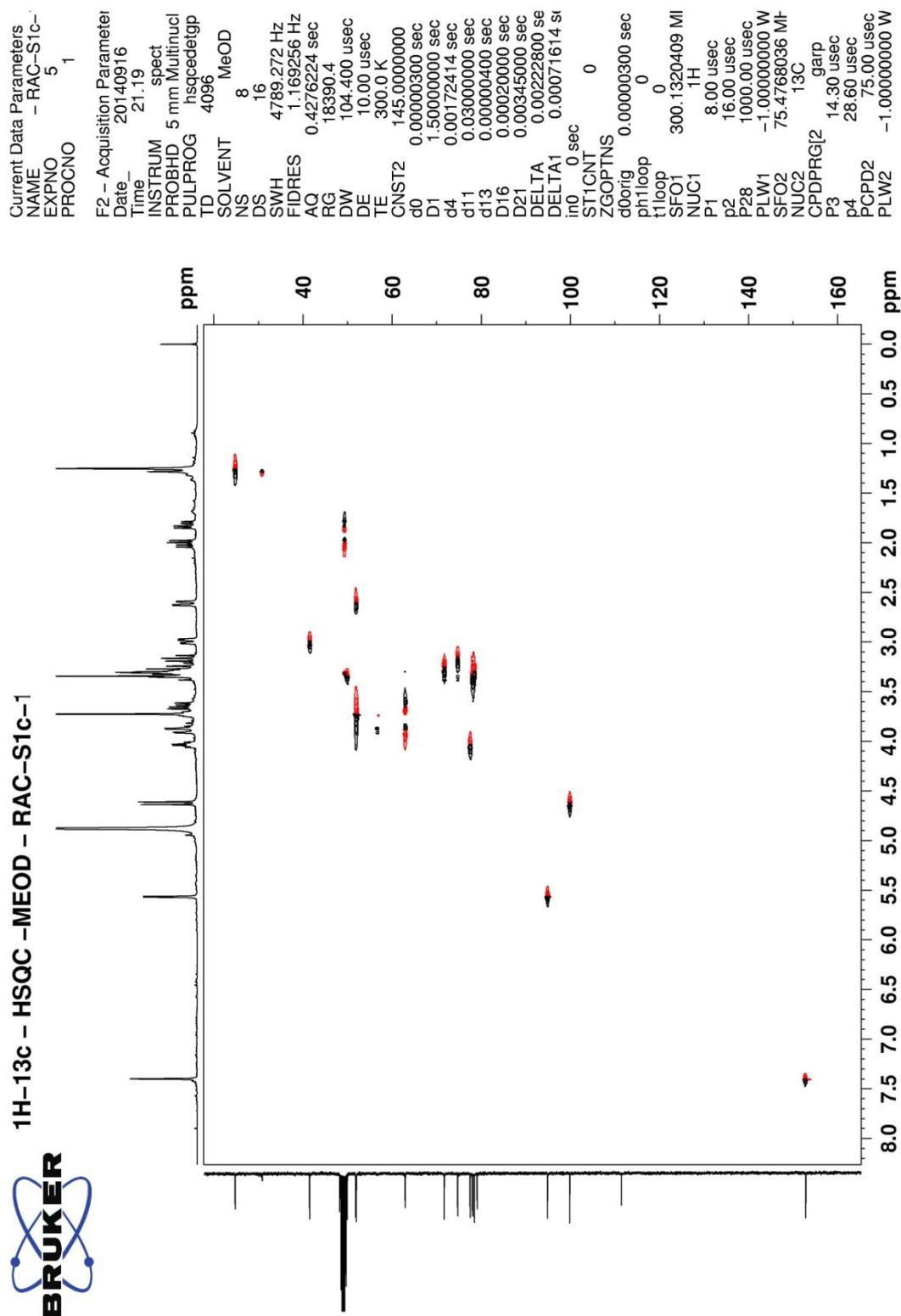


Figura 79 - Mapa de contorno do experimento 2D HSQC (CH₃OD, 300MHz) da substância 2



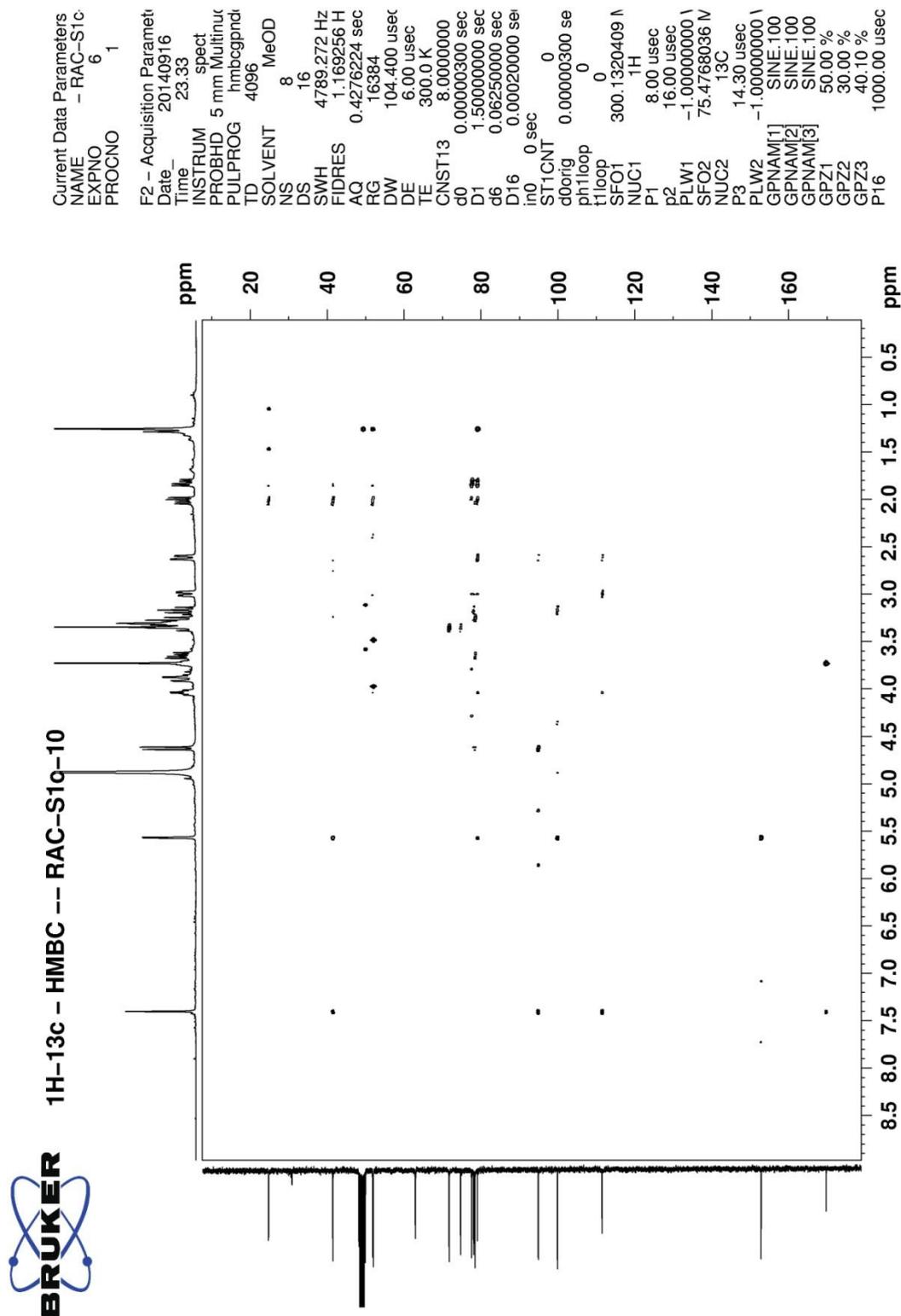


Figura 80 - Mapa de contorno do experimento HMBC (CH₃OD, 300MHz) da substância 2



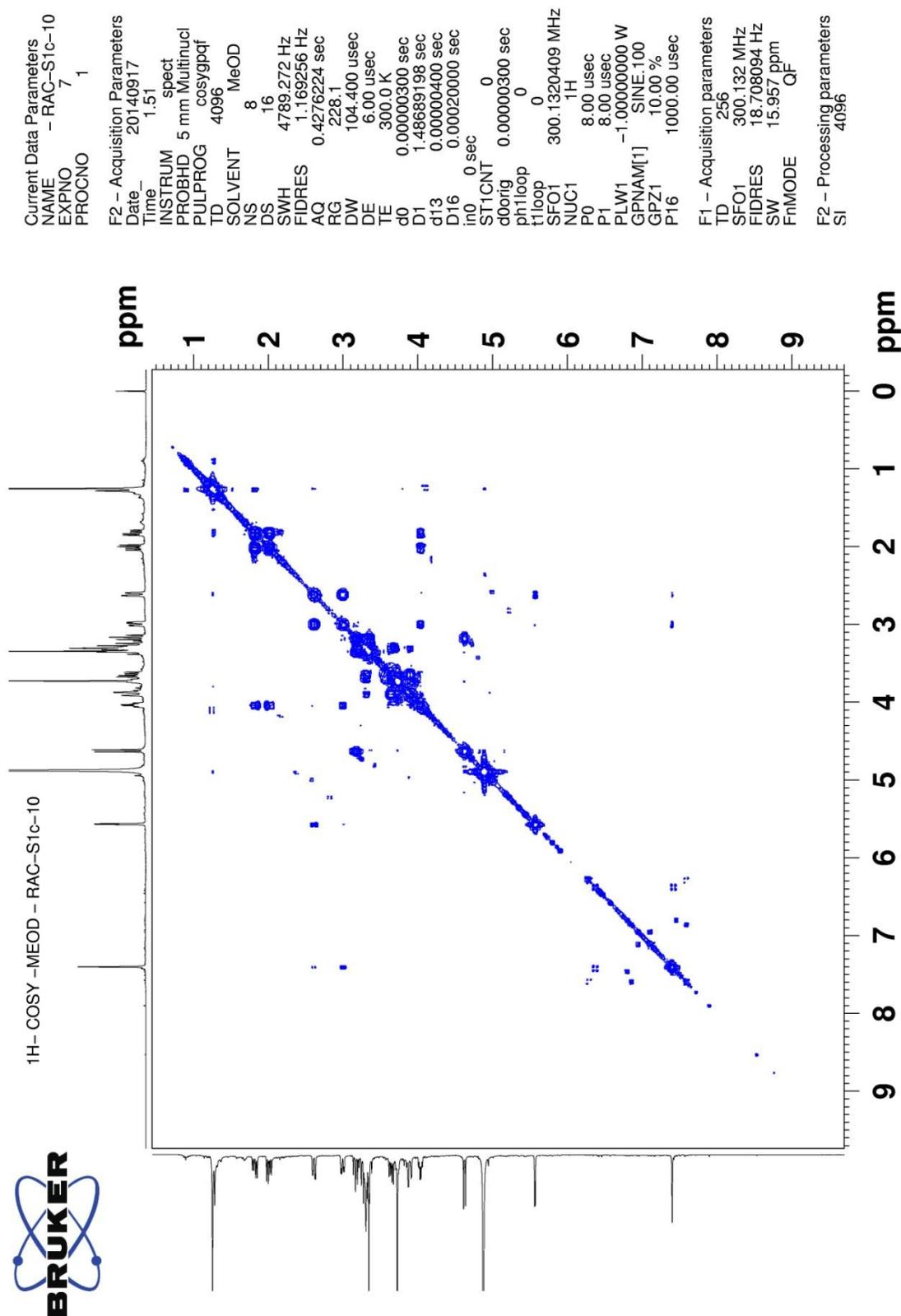


Figura 81 - Mapa de contorno do experimento 2D COSY (CH₃OD, 300MHz) da substância 2





1H- NOESY -MEOD - RAC-S1c-10

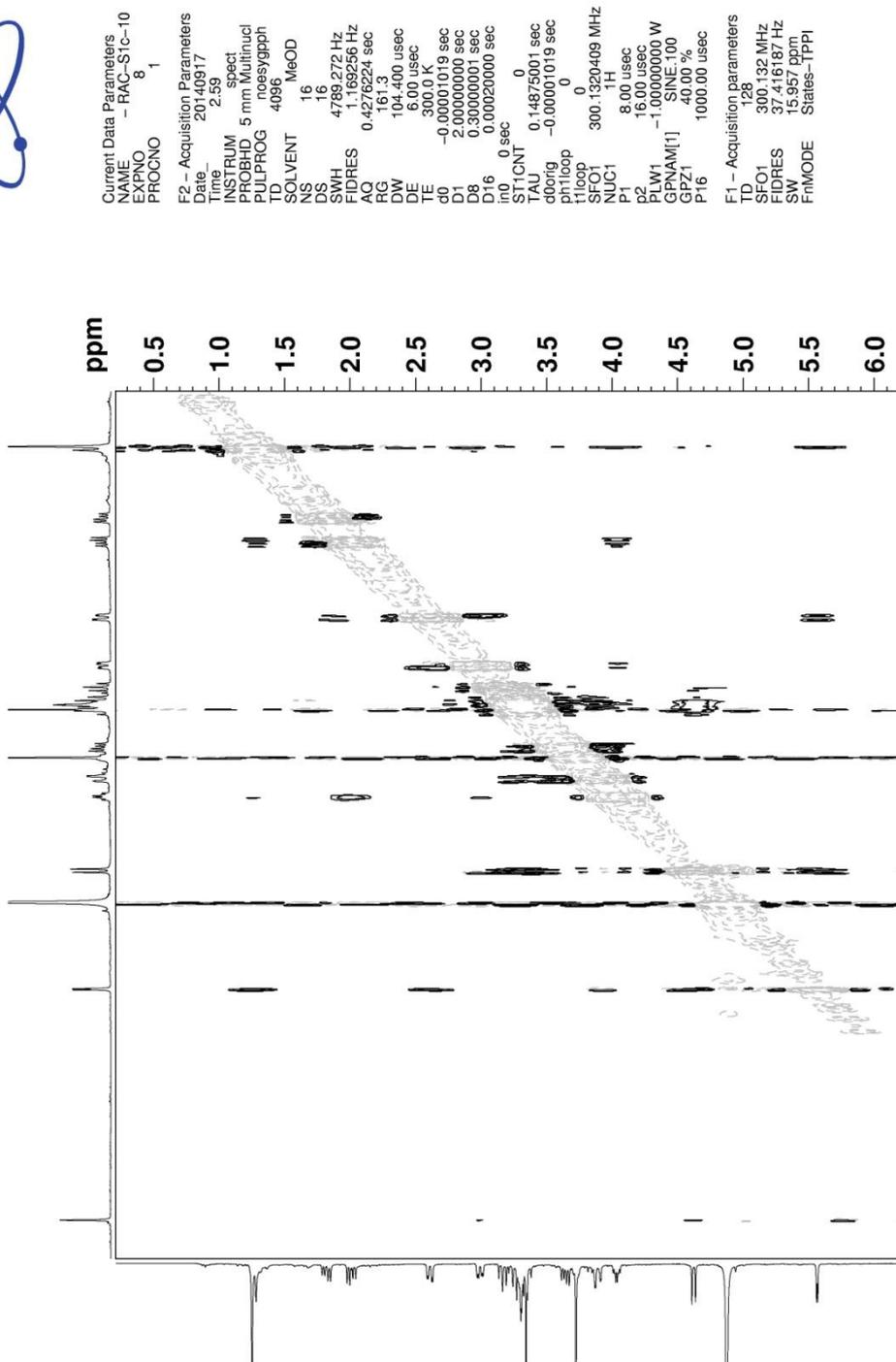


Figura 83 - Mapa de contorno do experimento NOESY (CH₃OD, 300MHz) da substância 2



4.5 Identificação da substância 1 – D-Manitol

A **substância 1** foi isolada durante o processo de evaporação do extrato bruto da raiz de *A. concolor* como um precipitado sólido cristalino branco, solúvel em água.

O espectro de RMN de ^1H da **substância 1** (**Figura 85**) apresentou quatro sinais na região característica de açúcares (δ_{H} 3,40-3,7). Pela ampliação desta região foi possível observar a multiplicidade de cada hidrogênio, bem como as constantes de acoplamento dos mesmos: δ_{H} 3,45(*dd*; $J=11,4; 5,4$); δ_{H} 3,65 (*dd*; $J=11,4; 2,3$); δ_{H} 3,54 (*td*; $J= 8,5; 8,5; 2,3$) e δ_{H} 3,58 (*d*; $J= 8,5$).

O espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135° (**Figura 86**) apresentou apenas três sinais. Estes ocorreram na região característica de sinais de carbonos carbinólicos, sendo em δ_{C} 63,3(CH₂), δ_{C} 69,3(CH) e em δ_{C} 70,9 (CH). A análise dos valores de deslocamento químico e multiplicidade dos sinais observados nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , bem como das estruturas de açúcares presentes na literatura conduzem à proposta de uma estrutura com um número de carbono maior que três que seja simétrica. Recorrendo à literatura, observou-se que Fúrio (2006) havia obtido de *A. sessilis* o manitol (**Figura 84**). Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da **substância 1** foram, então, comparados com os da literatura (RAVEN, 2001;), **Tabela 11**. Assim, esta substância foi identificada como sendo o manitol.

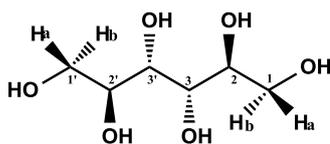


Figura 84 - Estrutura na substância 1 (D-manitol)



Tabela 11 - Dados de RMN 1H e 13C do D-manitol (20)

N°	Substância 1 ^a		Manitol ^b (literatura)
	δ_H (mult.; J em Hz)	δ_C	δ_C
1 e 1'	3,45(dd; 11,4; 5,4) 3,65 (dd; 11,4; 2,3)	63,3	64,6
2 e 2'	3,54 (td; 8,5; 8,5; 2,3)	70,9	72,2
3 e 3'	3,58 (d; 8,5)	69,3	70,7

^a Experimentos obtidos em D₂O, 300,06 MHz e 75,45 MHz

² Experimentos obtidos em D₂O, 299,90 MHz e 75,45 MHz

O manitol foi identificado em 20 espécies da família Rubiaceae (SUBRAMANIAN, 1971). De acordo com a literatura, vários açúcares estão presentes no gênero *Alibertia*, obtido em sua maioria, no começo das extrações ou partições. Esta substância além de possuir ação diurética osmótica (HENGEL, 1997), é bastante utilizada para reduzir a pressão intracraniana em pacientes com traumatismo craniano, tumor cerebral e acidente vascular cerebral (MISRA, 2005).





Current Data Parameters
 NAME RAC - pptd- H2O
 EXPNO 1
 PROCNO 1
 F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20140604
 Time 17.44
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Dual 13C/
 PULPROG zg
 TD 65536
 SOLVENT D2O
 NS 8
 DS 0
 SWH 4789.272 Hz
 FIDRES 0.073078 Hz
 AQ 6.8419585 sec
 RG 57
 DW 104.400 usec
 DE 6.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 sec
 TD0 1
 ===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 8.00 usec
 PL1 -6.00 dB
 SFO1 300.1320409 MHz
 F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 300.1300121 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0 Hz
 GB 0
 PC 1.00

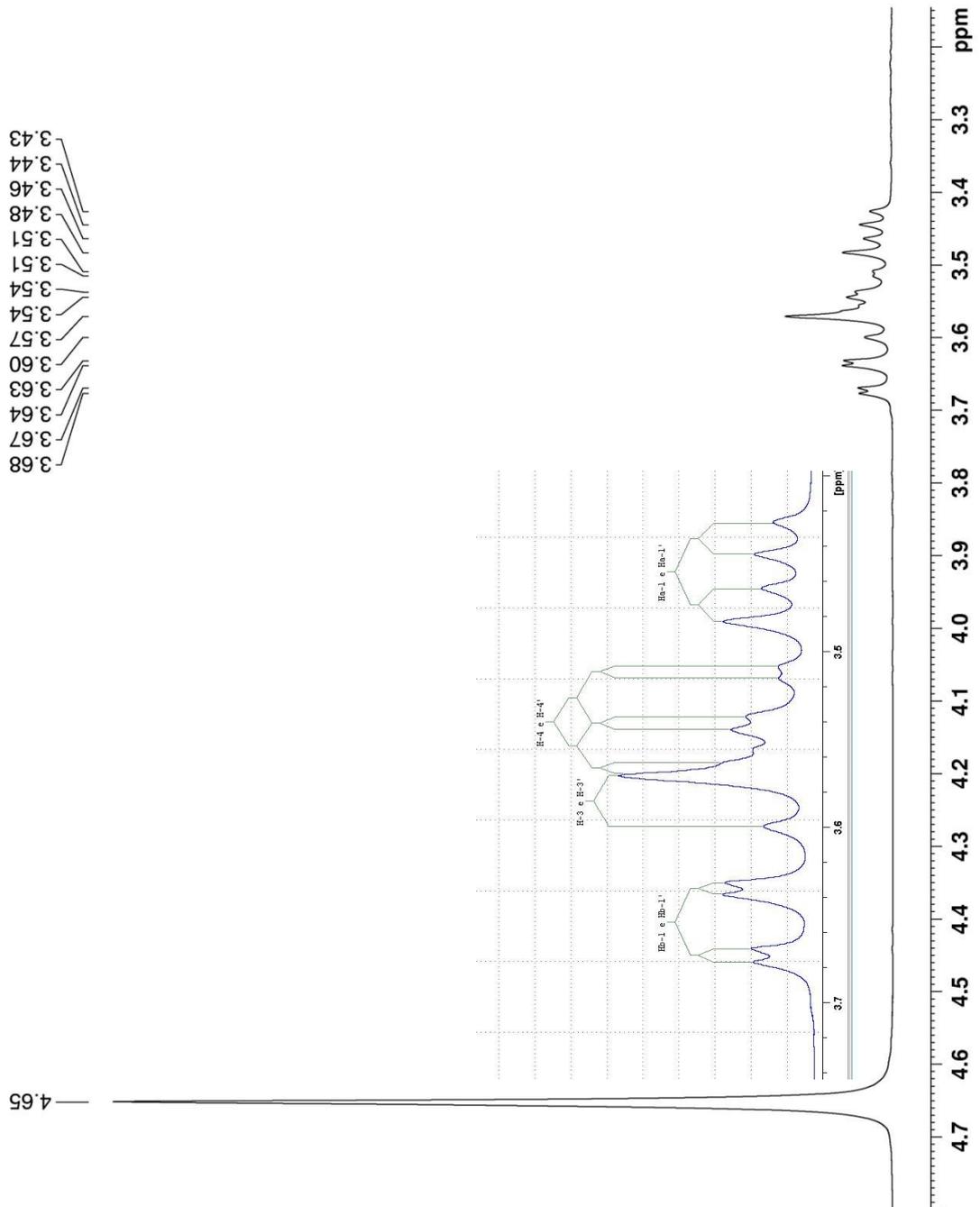
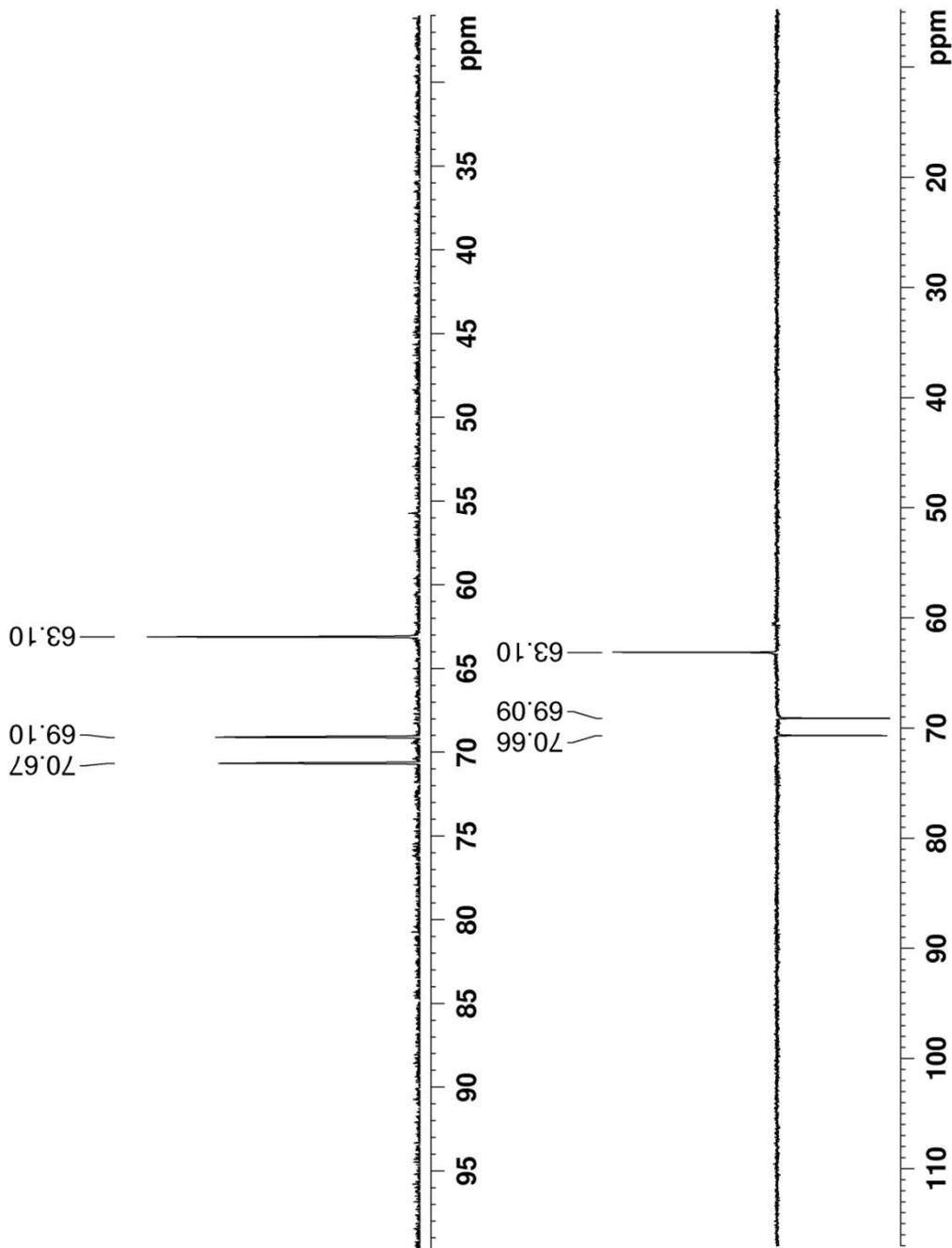


Figura 85 - Espectro de RMN de ¹H (D₂O, 300MHz) substância 1





13C e DEPT135 -D2O - RAC pptd-H2O



Current Data Parameters
 NAME ACR-PPT-AC-H2C
 EXPNO 3
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20140604
 Time_ 17.52
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Dual 13C/
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT D2O
 NS 470
 DS 2
 SWH 18832.393 Hz
 FIDRES 0.574719 Hz
 AQ 0.8699904 sec
 RG 13004
 DW 26.550 usec
 DE 6.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 0.15000001 sec
 d11 0.03000000 sec
 DELTA 0.05000000 sec
 TD0 1
 SFO1 75.4768036 MHz
 NUC1 13C
 P1 8.50 usec
 PLW1 -1.00000000 W
 SFO2 300.1312005 MHz
 NUC2 1H
 CPDPRG2 waltz16
 PCPD2 100.00 usec
 PLW2 -1.00000000 W
 PLW12 -1.00000000 W
 PLW13 -1.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 75.4677498 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

Figura 86 - Espectro de RMN de ¹³C (D₂O, 300MHz) da substância 1



CONCLUSÃO

ESTUDO QUÍMICO DA RAIZ DE *Alibertia concolor* (Cham.) K.Schum. (RUBIACEAE) ASSOCIADO
À ANÁLISE CONFORMACIONAL DE IRIDOIDES PRESENTES NA ESPÉCIE



5 CONCLUSÃO

O presente trabalho descreve o estudo químico associado à análise conformacional de iridoides presentes na raiz *A. concolor* (Cham.) K.Schum. (RUBIACEAE).

O extrato bruto acetônico da raiz do espécime coletado no município de Campo Grande – MS foi submetido a processos cromatográficos pelos quais foram obtidas cinco substâncias, sendo um açúcar, o D-manitol, e quatro iridoides: a inédita “scyphiphin C1”, o shanzisídeo metil éster, a shanzigenina metil éster e a 1-epi-shanzigenina metil éster.

A partir do estudo de estabilidade da “scyphiphin C1” em metanol e em piridina foram obtidos três derivados: os inéditos “scyphiphin C2” e “scyphiphin C3” e a “scyphiphin C”, obtida anteriormente *Scyphiphora hydrophyllacea*.

A associação da análise por RMN com dados calculados pelo programa PCModel permitiu a atribuição inequívoca da estrutura da “scyphiphin C1” e seus derivados, incluindo a configuração relativa, bem como as conformações de mínima energia.



REFERÊNCIAS

ESTUDO QUÍMICO DA RAIZ DE *Alibertia concolor* (Cham.) K.Schum. (RUBIACEAE) ASSOCIADO
À ANÁLISE CONFORMACIONAL DE IRIDOIDES PRESENTES NA ESPÉCIE



6 REFERÊNCIAS

- ABDEL-WAHAB, S. M.; SELIM, M. A. Lipids and flavonoids of *Sapindus saponaria*. **Fitoterapia**, v.3, p. 167-168, 1985.
- ABURADA, M., H. SASAKI., M. HARADA. Pharmacological studies of Gardênia fruits II. Contribution of the constituent crude drugs to choleric activity of Inchinkoto in rats. **Yakugaku Zasshi**, v. 96, p.147-153. 1976.
- AKDEMİR, Z.; ÇALI, H.; JUNIOR, P. Iridoid and phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis condensata*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 7, p. 2401- 2402, 1991.
- AGRAWAL, P. K.; NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**. v. 31, n. 10, p. 3307-3330, 1992.
- AGRAWAL, P. K. Carbon-13 NMR of flavonoids. **Elsevier Science Publishers B. V**, 1989.
- AIST. **Spectral Database for Organic Compounds, SDDBS**. Disponível em: <http://sdds.db.aist.go.jp>. Acesso em agosto de 2014.
- BARREIRO, E. J.; RODRIGUES, C. R.; ALBUQUERQUE, M. G.; SANT'ANNA, C. M. R.; ALENCASTRO, R. B. Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. **Química Nova**, v.20 (3), p. 300-310, p. 1997.
- BARREIRO, E. J.; VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-33, 2006.
- BATTERSBY, A. R.; BURNETT, A. R.; PEARSON, P. G. Preparation of secologanin: its conversion into ipecoside and its role in indole alkaloid biosynthesis. **Chemical Communications**, v. 21, p. 1280-1281, 1968.
- BERNAL, J. D. **Nature**, Chemical & Industry, p. 129, 1932.



- BOLTZ2005. Disponível em: *artemis.ffclrp.usp.br*. Acesso em julho de 2013 – agosto de 2014.
- BOLZANI, V. da S.; TREVISAN, L.M.V; YOUNG, M.C.M. Caffeic acidésterande triterpenes of *Alibertia macropylla*. **Phytochemistry**, v. 30 (6), p. 2089-2091, 1991.
- BREMER, B.; ERIKSSON, T. Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamilies, and tribes. **International Journal of Plant Sciences**, v. 170, n. 6, p. 766-793, 2009.
- BROCHINI, C.B.; MARTINS, D.; ROQUE, N.F. A oleanane acid from *Alibertia edulis*. **Phytochemistry**, v. 36 (5), p.1293-1295, 1994.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drugs leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.
- DAIS, P.; STEFANAKI, I.; FRAGAKI, G.; MIKROS, E. Conformational Analysis of Ochratoxin A by NMR Spectroscopy and Computational Molecular Modeling. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109 (35), p. 16926-16936, 2005.
- DELAZAR, A.; BYRES, M.; GIBBONS, S.; KUMARASAMY, Y.; MODARRESI, M.; NAHAR, L.; SHOEB, M.; SARKER, S., D. Iridoid Glycosides from *Eremostachys glabra*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1584-1587, 2004.
- DELPRETE, P. G. Rubiaceae (coffee or quinine family). In: SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D. Wm.; HEALD, S. V. (Ed.). Flowering plants of the Neotropics. Princeton, *New Jersey*: Princeton University Press/The New York Botanical Garden, p. 328-333, 2004b.
- DELPRETE, P. G.; JARDIM, J. G. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. **Rodriguésia** [online], v. 63, n. 1, p. 101-128, 2012.
- DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products, *England*: John Wiley & Sons, p. 188-189, 2002.



- DYER, L. A.; BOWERS, M. D. The importance of sequestered iridoid glycosides as a defense against an ant predator. **Journal of Chemical Ecology**, v. 22 (8), p. 1527-1539, 1996.
- ELIEL, E. L.; WILEN, S. H.; MANDER, L. N. Stereochemistry of organic compounds. 2ed. **New York**: J. Wiley, p. 560, 1994.
- ERSOZ, T.; KAYA, D.; YALÇIN, F.N.; ÇALIS, I.; JENSEN, S.R; GODFREDSSEN, C.H.; KAZAZ, C.; PALASKA, E. Iridoid glucosides from *Lamium garganicum* subsp. *laevigatum*. **Turkish Journal of Chemistry**, v.31, p. 155–162, 2007.
- FENG, C. L.; GONG, M. F.; ZENG, Y. B.; DAÍ, H. F.; MEI, W. L. Scyphiphin C, a New Iridoid from *Scyphiphora hydrophyllacea*. **Molecules**, v. 15, p. 2473-2477, 2010.
- FONG, H. Compositions and methods using lamiridosin, derivatives of lamiridosin or iridoids for treatment of liver disease, particularly treatments for infection by HCV and/or HBV. **WO 2008100547**, 21 de agosto, 2008.
- FÚRIO, A. C. Estudo químico da porção subterrânea da *Alibertia sessilis*. [Tese.] **Campo Grande**: Instituto de Química – INQUI- Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2006.
- GUO, S.; J, GAO, L. M.; CHENG, D. L. Iridoids from *Phlomis umbrosa*. **Pharmazie**, v. 56, n. 2, pp. 178-180, 2001.
- HAMERSKI, L.; CARBONEZI, C. A.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M. Saponinas triterpênicas de *Tocoyena brasiliensis* Mart. (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 601-604, 2005.
- HANS, A.; WAIBEL, R.; RAPPESBERGERI,; ADDAE-MENSAH, I. Iridoid and other constituents of *Canthium subcordatum*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 7, p. 1591-1595, p. 1981.
- HEIJDEN, R.; JACOBS, D. I.; SNOEIJER, W.; HALLARD, D.; VERPOORTE, R. The *Catharanthus* Alkaloids: Pharmacognosy and Biotechnology. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 607-628, 2004.



- HENGEL, P.; NIKKEN, J. J.; JONG, G. M.; HESP, W. L. E. M.; BOMMEL, E. F. H. Mannitol-induced acute renal failure. **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 50, n. 1, p. 21-24, 1997.
- HORIUCHI, M.; MAOKA, T.; IWASE N.; OHNISHI, K. Reinvestigation of structure of porritoxin, a phytotoxin of *Alternaria porri*. **Journal Natural Products**. v.65, n. 8, p. 1204-1205.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores, EdUFSCar: *São Carlos*, 2003.
- JENSEN, S. R.; ÇALIŞ, İ.; GOTFREDSSEN, C. H.; SØTOFTE, I. Structural Revision of Some Recently Published Iridoid Glucosides. **Journal of Natural Products**, v. 70 (1), p. 29-32, 2007.
- LODEWYK, M. W.; SIEBERT, M. R.; Tantillo, D. J. Computational Prediction of ^1H and ^{13}C Chemical Shifts: A Useful Tool for Natural Product, Mechanistic, and Synthetic Organic Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 3, pp 1839–1862, 2012.
- MISRA, U. K.; KALITA, J.; RANJAN, P.; MANDAL, S. K. Mannitol in intracerebral hemorrhage: a randomized controlled study. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 234, n. 1-2, p. 41-45, 2005.
- MCCALLEY, D. Analysis of the *Cinchona* alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 967, p. 1–19, 2002.
- NASCIMENTO, C. J.; BLOCH Jr, C. Ressonância Magnética Nuclear: Gradus Primus **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 21, p. 52-61, julho/agosto, 2001.
In: http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio21/21_10.pdf.
- NICOLAU, K. C.; SNYDER, S. A. Chasing Molecules That Were Never There: Misassigned Natural Products and the Role of Chemical Synthesis in Modern Structure Elucidation. **Anwesandre Chemie-International Edition**, v. 44, p. 2050, 2005.



- NISHIZAWA, M., IZUHARA, R., KANEKO, K., KOSHIHARA, Y., FUJIMOTO, Y. 5-Lipoxygenase inhibitors isolated from *Gardeniae fructus*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin** (Tokyo), v. 36(1), p. 87-95, 1988.
- OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F.; BOLZANI, V. da S. Acylated flavonol glycosides and terpenoids from the leaves of *Alibertia sessilis*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 8 (3), p. 257-259, 1997.
- OLIVEIRA, P. S. M.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. V. N. Utilização do D-manitol em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 441-452, 2009.
- PINTO, A.C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. Silva.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.
- RAVEN, J. A.; BEARDALL, J.; CHUDEK, J. A.; SCRIMGEOUR, C. M.; CLAYTON, M. N.; McINROY, S. G. Altritol synthesis by *Notheia anomala*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 3, p. 389-394, 2001.
- ROBBRECHT, E. Tropical Woody Rubiaceae, Opera Botanica Belgica 1, Meise. National **Plantintuen van Belgie**, 1988. In: BREMER, B.; ERIKSSON, T. Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamilies, and tribes. **International Journal of Plant Sciences**, v. 170, n. 6, p. 766-793, 2009.
- SAMPAIO-SANTOS, M. I.; KAPLAN, M. A. C. Biosynthesis significance of iridoids in chemosystematics. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 2, p. 144-153, 2001.
- SANTOS, S. M. I.; KAPLAN, M. A. C. Biosynthesis significance of iridoids in chemosystematics. **Journal of Brazilian of Chemical Society**, v. 12, n. 2, p. 144-153, 2001.
- SASS, D. C.; HELENO, V. C. G.; LOPES, J. L. C.; CONSTANTINO, M. G. One-step biomimetic conversion of a furanoheliangolide into an eremantholide using Stryker's reagent. **Tetrahedron Letters**, v. 49, p. 3877-3880, 2008.



- SASS, D. C.; OLIVEIRA, K. T.; CONSTANTINO, M. G. Synthesis of homoallylic oxygenated α -methylene- γ -butyrolactones: a model for preparing biologically active natural lactones. **Tetrahedron Letters**, v. 49, p. 5770-5772, 2008.
- SASS, D. C.; HELENO, V. C. G.; BARBOSA, J. S.; MORAIS, G. O.; COSTA, F. B.; CONSTANTINO, M. G. Reduction of Furanoheliangolides. In: 14th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, **Brasília**, 2011.
- SOARES, A. C. F. ; Sass, D. C. ; SILVA, A. N. ; MATOS, P. M. ; SILVA, E. H. ; Lopes, N. P. ; Lopes, J. L. C. ; Heleno, V. C. G. . Complete ¹H and ¹³C NMR structural assignments for a group of four goyazensolide-type furanoheliangolides. **Química Nova**, v. 35, p. 2205-2209, 2012.
- PCMODEL.version 7.0, *Serena Softwar*, Inc., Bloomington, IN 47402-3076.
- SMITH, M. B.; J. In: March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanismos, and Structure. John Wiley & Sons. (Eds). *New Jersey*, cap. 4, 2007.
- SOARES, A. C. F. S.; SILVA, A. N.; MATOS, P. M.; SILVA, E. H.; HELENO, V. C. G.; PEPORINE, N. L.; LOPES, J. L. C.; SASS, D. C. Complete ¹H and ¹³C NMR structural assignments for a group of four goyazensolide-type furanoheliangolides. **Química Nova**, v. 35, n.11, p. 2205-2209, 2012.
- SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, p. 308-312, 2004.
- SOUZA, R. K. D. S.; MENDONÇA, A. C. A. M.; SILVA, M. A. P. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de espécies de Rubiaceae no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 1, p. 140-156, 2013.
- SUBRAMANIAN, S. S.; NAIR, G. R. Distribution of mannitol and flavonols in some rubiaceous plants. **Phytochemistry**, v. 10, n. 9, p. 2125-2127, 1971.
- SUEMITSU, R.; OHNISHI, K.; HORIUCHI, M.; KITAGUCHI, A.; ODAMURA, K. Porritoxin, a phytotoxin of *Alternarza porri*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 7, pp. 2325.- 2326, 1992.



- TOUŠEK, J.; MALIŇÁKOVÁ, K.; DOSTÁL, J.; MAREK, R. Theoretical and experimental NMR study of protopine hydrochloride isomers. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, p. 578–581, 2005.
- TUNDIS, R.; LOIZZO, M., R.; MENICHINI, F.; STATTI, G., A.; MENICHIN, F. Biological and Pharmacological Activities of Iridoids: Recent Developments. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 399-42, 2008.
- YOUNG, M. C. M.; BRAGA, M. R.; DIETRICH, S. M. C.; GOTTLIEB, H. E.; TREVISAN, L. M. V.; BOLZANI, V. S. Fungitoxic non-glicosidic iridoids from *Alibertia macrophylla*. **Phytochemistry**, v. 31 (10), p. 3433-3435, 1992.
- WIELAND, O. H. The chemistry of the bile acids. **Nobel Lecture**, December 12, 1928.

