

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre plantas medicinais constitui-se muitas vezes como único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e mesmo até nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL *et al.*, 2002). Por um longo período de tempo, plantas têm sido uma das fontes de produtos naturais para a manutenção da saúde humana (GOTTLIEB & BORIN, 2002).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das suas virtudes terapêuticas, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantêm em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos (MACIEL *et al.*, 2002).

Apesar dos avanços da Química Medicinal e da Farmacologia, as substâncias de origem vegetal ainda desempenham papéis importantes na medicina moderna, constituindo-se numa importante fonte de medicamentos ou de substâncias protótipos, cujas estruturas moleculares complexas dificilmente seriam obtidas por síntese ou pela química combinatória (NEWMAN *et al.*, 2003; YUNES & CALIXTO, 2001; CORDELL, 2000; SIMÕES *et al.*, 2001).

Brasil, sendo o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo – mais de 55.000 espécies catalogadas (SIMÕES *et al.*, 2001), tem apenas 8% de suas espécies vegetais estudadas, visando compostos bioativos, e apenas 1.100 espécies avaliadas em suas propriedades medicinais (GARCIA *et al.*, 1996). Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade (CALIXTO, 2003).

Apesar de todo esse potencial, apenas uma pequena fração das espécies conhecidas de plantas foi investigada pela ciência. Assim, as plantas medicinais ainda são pouco conhecidas e constituem um fascinante assunto de pesquisa acadêmica e de desenvolvimento (CRAGG & NEWMAN, 2005). Myers (2000) relata em seu artigo um levantamento que identificou 25 áreas do globo terrestre caracterizadas por excepcional concentração de espécies endêmicas e elevada degradação de *habitat*, e que aponta o Cerrado, o Pantanal e a Mata Atlântica como áreas de maior risco de extinção. O Cerrado tem se mostrado muito mais rico do que se previa e muitas das suas tipologias são endêmicas da América do Sul, e do Brasil. Com isso, a importância intrínseca do seu patrimônio genético merece maior reconhecimento (MENDONÇA *et al.*, 2010).

Considerando a abundância e as riquezas que as plantas tem a nos oferecer bem como a preocupante degradação dos ecossistemas citados acima, o Laboratório de Pesquisas 1 (LP1) do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (DQI – UFMS), realiza o estudo químico de plantas do Cerrado e Pantanal de Mato Grosso do Sul. Além do isolamento e caracterização das substâncias presentes nestas plantas, alguns ensaios visando à caracterização de atividades biológicas também são realizados, ou as substâncias são testadas por outros grupos de pesquisa conveniados. Dentre as espécies selecionadas para estudo, estão àquelas pertencentes à família Lauraceae.

Tendo em vista que as espécies da família Lauraceae não estão entre as mais representativas do Cerrado, e que o mesmo se encontra em crescente degradação, algumas espécies podem estar em risco de extinção antes mesmo de serem conhecidas pela ciência. (MENDONÇA *et al.*, 2010). Além disso, esta família possui um gênero especial – *Mezilaurus* – que compreende poucas espécies e escasso estudo químico. Neste trabalho especificamente, efetuou-se o estudo químico de uma espécie descrita recentemente como *Mezilaurus vanderwerffii*, visando o isolamento e caracterização dos metabólitos secundários acumulados pela planta.

2. OBJETIVOS

2.1 - Objetivos Gerais

Realizar o estudo químico de *M. vanderwerffii* (Lauraceae), visando o isolamento e a caracterização estrutural dos metabólitos secundários acumulados.

2.2 - Objetivos Específicos

- Isolar e identificar os metabólitos secundários acumulados por *M. vanderwerffii* (Lauraceae).
- Elucidar as estruturas das substâncias novas isoladas de *M. vanderwerffii* (Lauraceae), utilizando métodos espectroscópicos.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE LAURACEAE

3.1 - A Família Lauraceae

A família Lauraceae composta por 54 gêneros e aproximadamente 2500 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais e áreas de clima temperado, é representada por 22 gêneros e cerca de 400 espécies no Brasil, distribuídas em sua maior parte nas Florestas Pluviais, Restingas e os Cerrados (GOTTLIEB, 1972; JOLY, 1991; CHRISTOPHEL & ROWETT, 1996; QUINET, 2005). A grande maioria são árvores e arbustos, exceto as trepadeiras parasitas do gênero *Cassytha*, e em geral aromáticas e de casca lisa (QUINET & ANDREATA, 2002; QUINET, 2005).

O potencial econômico das espécies da família Lauraceae é conhecido desde os tempos remotos, através de documentos da China de 2800 a.C., onde já era empregado o óleo da cânfora (*Cinnamomum camphora*) na medicina, sendo que a mesma até hoje é utilizada como cardiotônico, anestésico e cicatrizante. As folhas de louro (*Laurus nobilis*), condimento empregado na culinária em todo o mundo, é frequentemente utilizado como estimulante nas afecções gástricas e reumáticas, além de apresentar atividade antiespasmódica (MARQUES, 2001; QUINET & ANDREATA, 2002). O produto alimentício mais comercializado em quase toda a América é o fruto de *Persea americana*, o abacateiro, do qual também se extrai, do mesocarpo e da semente, o óleo para a fabricação de cosméticos. No Brasil destacam-se as espécies de *Ocotea*, *Nectandra* e *Mezilaurus*, conhecidas popularmente como canelas, loureiros, embuias e itauba, que remontam ao início da colonização, quando foram empregadas na construção naval e movelaria de luxo por possuírem uma madeira de excelente qualidade (QUINET & ANDREATA, 2002).

É uma família rica em metabólitos secundários pertencentes às seguintes classes: lignanas, alcaloides aporfínicos e benziltetraidroisoquinolínicos, flavonoides, sesquiterpenos e pironas. (GOTTLIEB, 1972; GARCEZ *et al.*, 1995; GARCEZ *et al.*, 1999; GARCEZ *et al.*, 2005a; GARCEZ *et al.*, 2005b).

Muitos compostos isolados de Lauraceae apresentam atividades biológicas, como por exemplo, os flavonoides monoglicosilados que são ativos contra o vírus do herpes simples do tipo I (HIV-I) em culturas de células, as pironas, dienos, trienos com atividade

antifúngica, os mono e sesquiterpenos com atividades tripanocidas, as neolignanas com atividade antimalárica e antituberculósica bem como alcalóides com atividade antitumoral, antibacteriana e antifúngica (ALMEIDA *et al.*, 1998; BARRERA & SUÁREZ, 2007).

As plantas da família Lauraceae coletadas em Mato Grosso do Sul que já foram estudadas são: *Ocotea corymbosa* (CHAVEZ, 1995), *Ocotea vellosiana* (GARCEZ, W., 1991), *Ocotea suaveolens* (BEIRITH, 1999), *Nectandra gardneri* (GARCEZ, F., *et al.*, 1999), *Nectandra cuspidata* (BATISTA, 2001), *Aiouea trinervis* (MARTINS), 2004; GARCEZ, F., *et al.*, 2005a), *Nectandra cissiflora* (MIRANDA, 2008), *Nectandra Megapotamea* e *Ocotea lanciflora*.

Logo abaixo na tabela 1 estão listadas espécies da família Lauraceae que ocorrem no bioma Cerrado.

Tabela 1: Espécies da família Lauraceae no bioma Cerrado (MENDONÇA *et al.*, 2010)*.

<i>Aiouea macedoana</i>	<i>Nectandra lanceolata</i>	<i>Ocotea oppositifolia</i>
<i>Aiouea piauihyensis</i>	<i>Nectandra megapotamica</i>	<i>Ocotea percoriacea</i>
<i>Aiouea trinervea</i>	<i>Nectandra membranacea</i>	<i>Ocotea pomaderroides</i>
<i>Aniba desertorum</i>	<i>Nectandra nitidula</i>	<i>Ocotea pretiosa</i>
<i>Aniba heringerii</i>	<i>Nectandra reticulata</i>	<i>Ocotea puchella</i>
<i>Aniba pulcherrima</i>	<i>Nectandra rigida</i>	<i>Ocotea spixiana</i>
<i>Cassytha americana</i>	<i>Nectandra warmingii</i>	<i>Ocotea suaveolens</i>
<i>Cassytha filiformis</i>	<i>Ocotea aciphylla</i>	<i>Ocotea tristis</i>
<i>Cinnamomum hanaknechtii</i>	<i>Ocotea acutifolia</i>	<i>Ocotea variabilis</i>
<i>Cinnamomum tomentosum</i>	<i>Ocotea aegiphylla</i>	<i>Ocotea velloziana</i>
<i>Cryptocaria aschersoniana</i>	<i>Ocotea brasiliense</i>	<i>Ocotea xanthoxalyx</i>
<i>Cryptocaria guianensis</i>	<i>Ocotea bracteosa</i>	<i>Persea aurata</i>
<i>Cryptocaria moschata</i>	<i>Ocotea catharinensis</i>	<i>Persea caerulea</i>
<i>Endlicheria paniculata</i>	<i>Ocotea corymbosa</i>	<i>Persea fusca</i>
<i>Licaria armeniaca</i>	<i>Ocotea diospyrifolia</i>	<i>Persea major</i>
<i>Mezilaurus crassiramea</i>	<i>Ocotea glaziovii</i>	<i>Persea pyrifolia</i>
<i>Mezilaurus lindaviana</i>	<i>Ocotea lanceolata</i>	<i>Persea rufotomentosa</i>
<i>Nectandra cissiflora</i>	<i>Ocotea lancifolia</i>	<i>Persea splendens</i>
<i>Nectandra cuspidata</i>	<i>Ocotea langsdorffii</i>	<i>Persea venosa</i>
<i>Nectandra gardneri</i>	<i>Ocotea minarum</i>	<i>Phoebe erythropus</i>
<i>Nectandra hihua</i>	<i>Ocotea odorifera</i>	

*Disponível em <ftp://geofp.ibge.gov.br/documentos/recursosnaturais/levantamento/floravascular.pdf>

3.2 - O Gênero *Mezilaurus*

Segundo um artigo de revisão de van der Werff que data de 1987, o gênero *Mezilaurus* Taubert compreendia 18 espécies, ocorrendo da Costa Rica ao sudeste do Brasil, sendo que 14 delas estavam distribuídas em áreas de boa drenagem do rio Amazonas e poucas espécies ocorriam em outros ecossistemas. Hoje existem, contudo, um total de 26 espécies catalogadas, segundo a base de dados do site “tropicos.org” ligado ao Missouri Botanical Garden (2008) [Tabela 2].

Pesquisa realizada demonstrou que *Mezilaurus* é um dos gêneros de Lauraceae que possui as menores flores, cerca de 2 mm de diâmetro na antese, caracterizam-se por folhas, em geral, congestas no ápice dos ramos, flores trímeras, bissexuadas, apenas 3 estames férteis, representando a série III, e cúpula pouco desenvolvida, quase sempre estreita e em forma de um disco plano (QUINET, 2005; ALVES & BAITELLO, 2008).

O gênero é pouco coletado e, por esta razão, a maioria das coleções botânicas possui poucos espécimes, o que demonstra a necessidade de maior número de coletas para melhorar o entendimento taxonômico do gênero (ALVES & BAITELLO, 2008).

A literatura revela que apenas duas espécies pertencentes ao gênero *Mezilaurus* já foram estudadas quanto a seus constituintes químicos. De *M. itauba*, coletada na Colômbia, foram obtidos sete neolignanais tipo benzofuranoide e três do tipo biciclooctânica (Figura 1) [YANEZ *et al.*, 1985; YANEZ *et al.*, 1986], enquanto em *M. synandra*, coletada no Brasil, foram caracterizadas uma γ -lactona (butanolídio) e alcaloides aporfínicos e benziltetraidroisoquinolínicos (Figura 2) [SILVA *et al.*, 1983].

Tabela 2: *Espécies do gênero *Mezilaurus*.

Nome científico	Autor	Data
<i>Mezilaurus anacardioides</i>	(Meisn.) Taub. ex Mez	1892
<i>Mezilaurus caatingae</i>	van der Werff	1987
<i>Mezilaurus campaucola</i>	van der Werff	2003
<i>Mezilaurus crassiramea</i>	(Meisn.) Taub. ex Mez	1892
<i>Mezilaurus decurrens</i>	(Ducke) Kosterm.	1936
<i>Mezilaurus duckei</i>	van der Werff	1987
<i>Mezilaurus glaucophylla</i>	van der Werff	1987
<i>Mezilaurus itauba</i>	(Meisn.) Taub. ex Mez	1892
<i>Mezilaurus lindaviana</i>	Schwacke & Mez	1892
<i>Mezilaurus maguireana</i>	C.K. Allen	1964
<i>Mezilaurus mahuba</i>	(A. Samp.) van der Werff	1987
<i>Mezilaurus manausensis</i>	van der Werff	2003
<i>Mezilaurus micrantha</i>	van der Werff	1987
<i>Mezilaurus navalium</i>	(Allemão) Taub. ex Mez	1892
<i>Mezilaurus opaca</i>	Kubitzki & van der Werff	1987
<i>Mezilaurus oppositifolia</i>	(Nees) Taubert ex Mez.	1892
<i>Mezilaurus palcazuensis</i>	van der Werff	1987
<i>Mezilaurus pyriflora</i>	van der Werff	1987
<i>Mezilaurus quadrilocellata</i>	van der Werff	1987
<i>Mezilaurus sprucei</i>	(Meisn.) Taub. ex Mez	1892
<i>Mezilaurus subcordata</i>	(Ducke) Kosterm.	1936
<i>Mezilaurus synandra</i>	(Mez) Kosterm.	1936
<i>Mezilaurus thoroflora</i>	van der Werff	1987
<i>Mezilaurus triunca</i>	van der Werff	1994
<i>Mezilaurus vanderwerffii</i>	Alves, F.M. & Baitello	2008
<i>Mezilaurus wurdackiana</i>	C.K. Allen	1964

*Disponível em: <http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Mezilaurus&commonname>

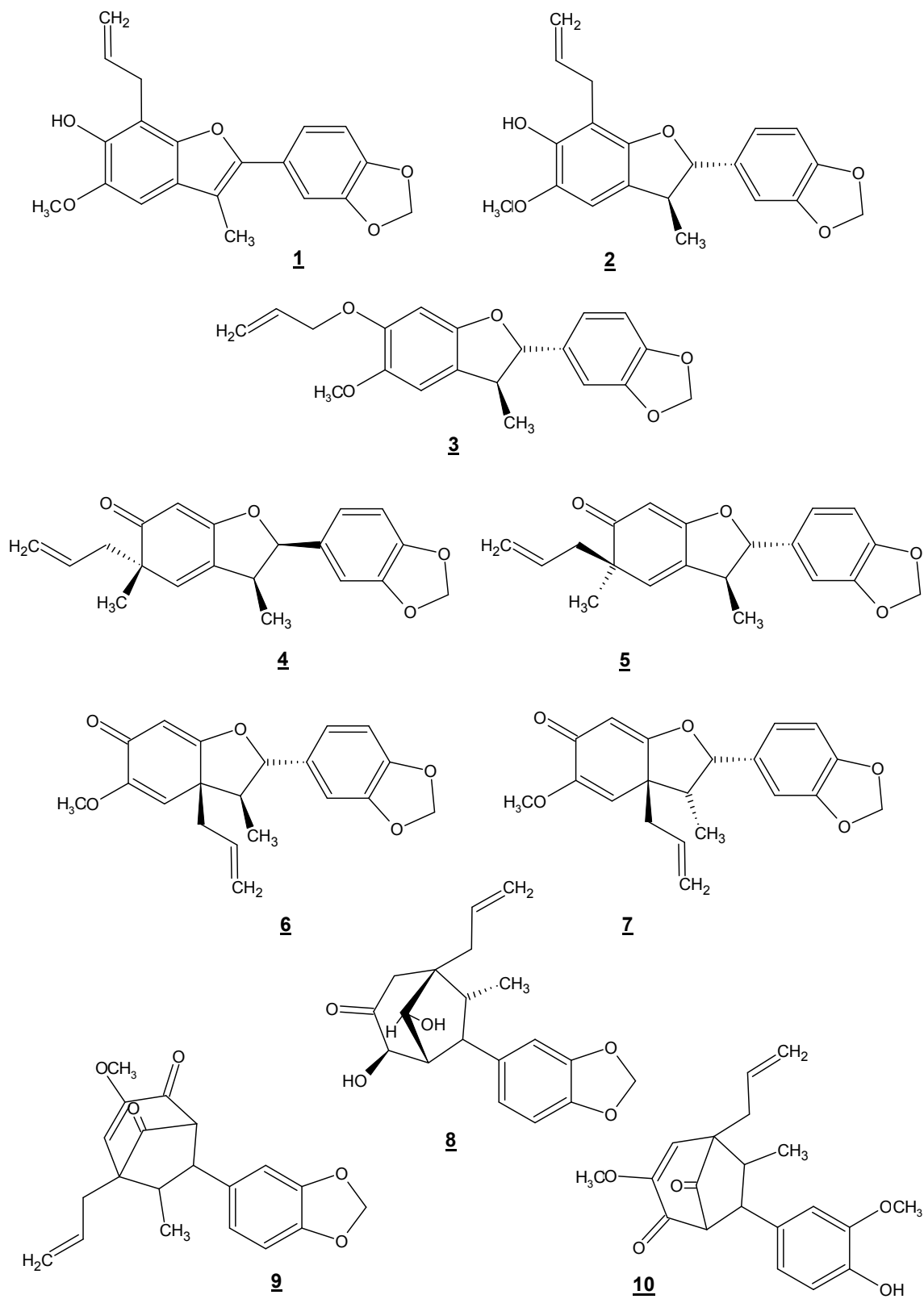
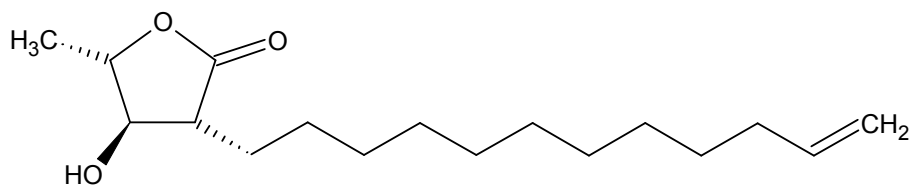
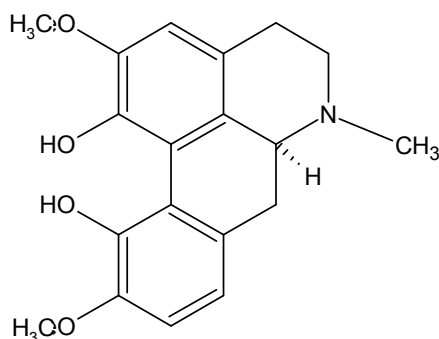


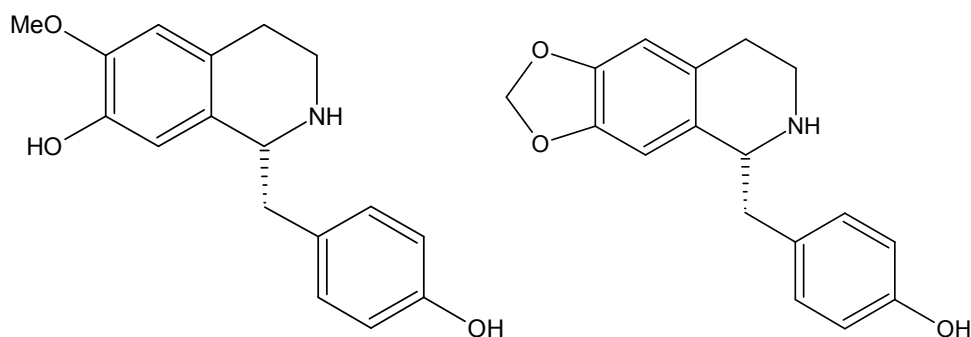
Figura 1: Neolignanas tipo benzofuranoide (1-7) e tipo biciclooctânica (8-10) isoladas de *M. itauba* [Adaptado de YANEZ *et al.*, 1985; YANEZ *et al.*, 1986].



γ -lactona (butanolídio)



Alcaloide aporfínico



Alcaloides benziltetraidroisoquinolínicos

Figura 2: Estruturas e estereoquímica absoluta das substâncias isoladas de *M. synandra* (SILVA *et al.*, 1983).

Garcia e colaboradores (2000) demonstraram que duas neolignanas isoladas de *M. itauba*, a trans-burchelina (6) e a cis-burchelina (7) [Figura 1], apresentaram atividade biológica contra um dos mais importantes vetores do *Trypanossoma cruzi*, que é a larva do inseto hematófago *Rhodnius prolixus*, responsável pela doença de Chagas na América Latina. Estudos de atividade antimicrobiana realizados por Granato e colaboradores (2005) revelaram que o extrato metanólico de *M. itauba* foi ativo contra os micro-organismos

Klebsiella pneumoniae, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Proteus mirabilis*.

Mato Grosso do Sul é um dos estados brasileiros com a flora mais diversificada, nele ocorrendo diversos tipos de bioma, entre eles o Cerrado e o Pantanal. A região de Aquidauana, por exemplo, se caracteriza por uma morfologia bem particular, com montanhas de pedras avermelhadas e um solo misto de Cerrado e áreas em que predominam pedras. Recentemente foi descrita uma planta de porte arbórea popularmente conhecida como “tapinhoã”, classificada como *Mezilaurus vanderwerffii* (Lauraceae), que só ocorre nesta região. Com esta descoberta, o gênero passa a contar com mais uma espécie oficialmente reconhecida.

3.3 - *Mezilaurus vanderwerffii* Alves & Baitello

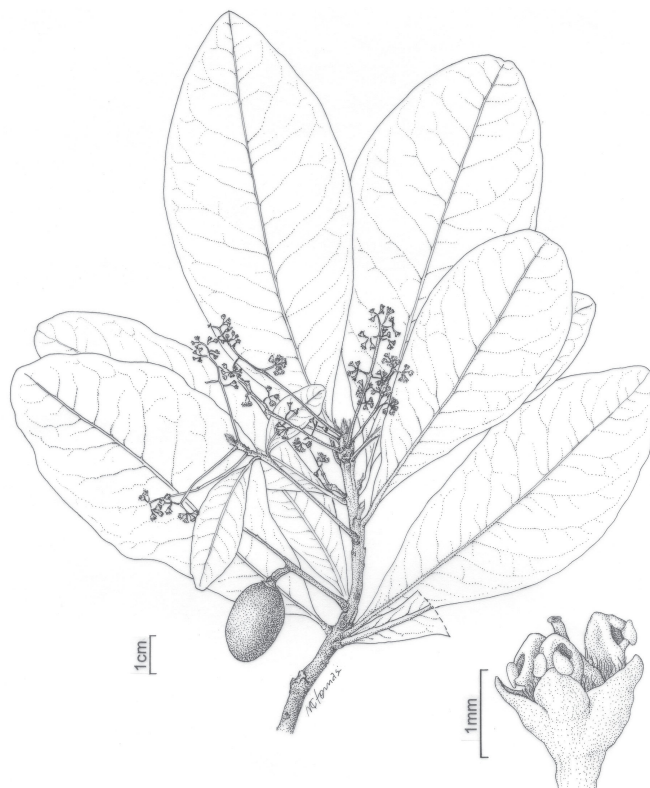


Figura 3: *Mezilaurus vanderwerffii* F.M. Alves & J.B. Baitello (H. Lorenzi 1467) **a:** Ramo com frutos; **b:** Flôr com três únicos estames (série III).

Estudo florístico da família Lauraceae no Mato Grosso do Sul revelou uma nova espécie de *Mezilaurus*, representando a segunda espécie do gênero para o Bioma Cerrado (*lato sensu*) da região Centro-Oeste, embora as coletas disponíveis revelem que esta espécie não é exclusiva desse Bioma (ALVES & BAITELLO, 2008).

Mezilaurus vanderwerffii (Figura 3), tem folhas com a face adaxial densamente pontoado-glandulosa, face abaxial glabrescente, flores externamente glabras e ramos com poucos tricomas esparsos (ALVES & BAITELLO, 2008).

A espécie é frequentemente encontrada no Cerradão de Piraputanga e no Morro do Paxixi, município de Aquidauana, no Cerrado típico e na Floresta Estacional Semidecidual do entorno do Pantanal Matogrossense. A espécie apresenta frequência elevada, porém dispersão muito descontínua ao longo da sua área de distribuição (ALVES & BAITELLO, 2008).

A madeira de *M. vanderwerffii*, por ser dura e pesada, é utilizada localmente para moirões, postes, cruzetas, dormentes, carpintaria em geral, armações de pontes, obras hidráulicas e outras obras externas que requeiram resistência mecânica e grande durabilidade. Seus frutos são apreciados pela avifauna, especialmente por tucanos. Devido à semelhança com outra espécie do gênero, *Mezilaurus navalium* (Allemão) Taubert ex Mez, que ocorre na mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro, *M. vanderwerffii* ficou conhecida em sua região de ocorrência pelo nome popular desta outra: tapinhoã. (ALVES & BAITELLO, 2008).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 - Materiais e Equipamentos Utilizados

4.1.1 - Solventes

Foram utilizados nos processos de extração, partição e como eluentes nas técnicas cromatográficas, solventes de grau P.A. (Merck, Vetec, Synth, QM). Em CLAE, foram empregados solventes de grau cromatográfico (Merck).

4.1.2 - Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)

Foram utilizadas placas ativadas (120°C por 30 minutos) de sílica gel 60 G e GF₂₅₄ e (45 µm) sílica gel 60 F₂₅₄ em cromatofolhas de alumínio 20 x 20 cm da Merck.

4.1.3 - Métodos de detecção em CCDA

- Luz Ultravioleta: incidência de luz ultravioleta (Monitor UV de mão, modelo UVGL-25, UVP inc. com lâmpadas Blackray de 254 e 366 nm) em câmara escura, quando utilizado sílica com indicador fluorescente.

- Vanilina ou Sulfato Cério: após borrifar as placas com a solução reveladora (Vanilina - 10% m/v em H₂O/CH₃OH/H₂SO₄ 45:45:10 v/v/v ; Sulfato Cério [Ce(SO₄)₂] – solução a 2% em H₂SO₄), as placas foram aquecidas à 100 °C em chapa aquecedora até que as manchas fossem visualizadas.

4.1.4 - Cromatografia em coluna – fases estacionárias

a) Sephadex LH-20

Diâmetro da partícula: 25-100 µm (Pharmacia)

b) Sílica gel 60

Diâmetro da partícula: 63-200 µm (Merck); 35-70 µm (Merck).

Especificação: 70-230 mesh ASTM; 200-400 mesh ASTM.

4.1.5 - Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

O equipamento de CLAE utilizado foi da marca Shimadzu modelo LC - 6 AD, bomba ternária, detector UV-visível variável Shimadzu SPD 6 AV e injetor manual com alça de amostragem de 0,5 mL (analítico) e 5 mL (semi-preparativo). As colunas cromatográficas (analítica e semi-preparativa) foram as da marca Phenomenex C-18, partículas de 100 Å de poro, diâmetro médio de 5 µm e dimensões de 5,0 Φ x 250 mm (analítica) e 21,20 Φ x 250 mm (semi-preparativa). Para as separações cromatográficas foram empregados sistemas isocráticos de misturas binárias de CH₃CN/H₂O. A acetonitrila usada foi de grau cromatográfico e a água do sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Condições de trabalho

Analítica

Eluente: CH₃CN/H₂O (22:78 v/v) para FR1C3.2.41-24 e FR2.3Aa20.28.20; CH₃CN/H₂O (18:82 v/v) para FR2.3Aa20.28.35.

Fluxo: 0,7 mL/min.

Comprimento de onda do detector: 254 nm para as duas primeiras amostras, e 210 nm para a terceira.

Injeção: 10 µL.

Semi-Preparativa

Eluente: CH₃CN/H₂O (22:78 v/v) para FR1C3.2.41-24 e FR2.3Aa20.28.20; CH₃CN/H₂O (18:82 v/v) para FR2.3Aa20.28.35.

Fluxo: 14 mL/min.

Comprimento de onda do detector: 254 nm para as duas primeiras amostras, e 210 nm para a terceira.

Injeção: 0,5-1,0 mL.

4.1.6 - Espectros de RMN

Os espectros de RMN uni- e bidimensionais foram registrados em aparelho Bruker, modelo DPX-300 a 300 MHz para RMN ^1H e a 75,0 MHz para RMN de ^{13}C . As amostras foram solubilizadas em CD_3OD , CDCl_3 , CCl_4 e $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ da marca CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.). Como referência interna foi utilizada os sinais relativos aos hidrogênios residuais do solvente para RMN ^1H e aos carbonos do solvente e/ou do tetrametilsilano (TMS) para RMN de ^{13}C .

4.1.7 – Rotação óptica

A rotação óptica foi determinada em polarímetro Perkin Elmer 341.

4.2 - Coleta e Identificação do Material Vegetal

A planta foi classificada da seguinte forma:

Família - Lauraceae

Gênero - *Mezilaurus*

Espécie - *vanderwerffii* Alves & Baitello

Características da Planta: possui porte arbóreo. Conhecida popularmente como “tapinhoã”, que em tupi significa madeira dura e resistente, é muito utilizada na região em obras civis e hidráulicas, que requerem alta resistência e durabilidade. (Figura 4).

Coleta da Planta: as folhas e o caule foram coletados na região de Palmeiras, no município de Aquidauana, Mato Grosso do Sul, em Março de 2007.

Identificação da espécie: foi realizado pelo Msc. Flávio Macedo Alves da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e pelo pesquisador científico e diretor geral do Instituto Florestal, Dr. João Batista Baitello (ALVES & BAITELLO, 2008).

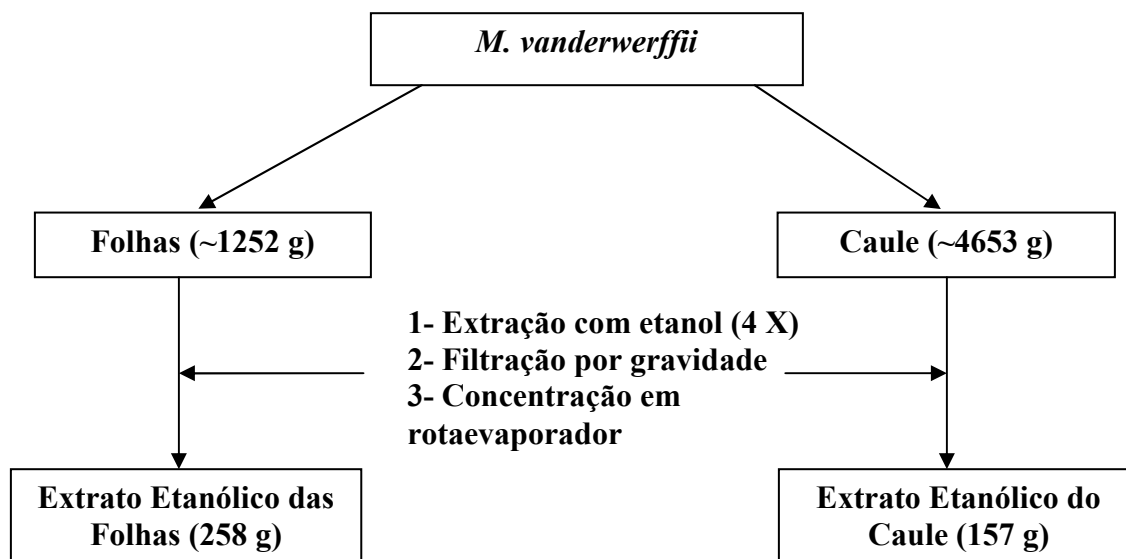
Identificação do gênero: foi realizada pelo Prof^o Msc. Flávio Macedo Alves e as exsicatas foram depositadas no Herbário CGMS da UFMS.



Figura 4: Caule, folhas e frutos de *M. vanderwerffii* coletada em Aquidauana, Mato Grosso do Sul.

4.3 - Obtenção dos Extratos Etanólicos de *M. vanderwerffii*

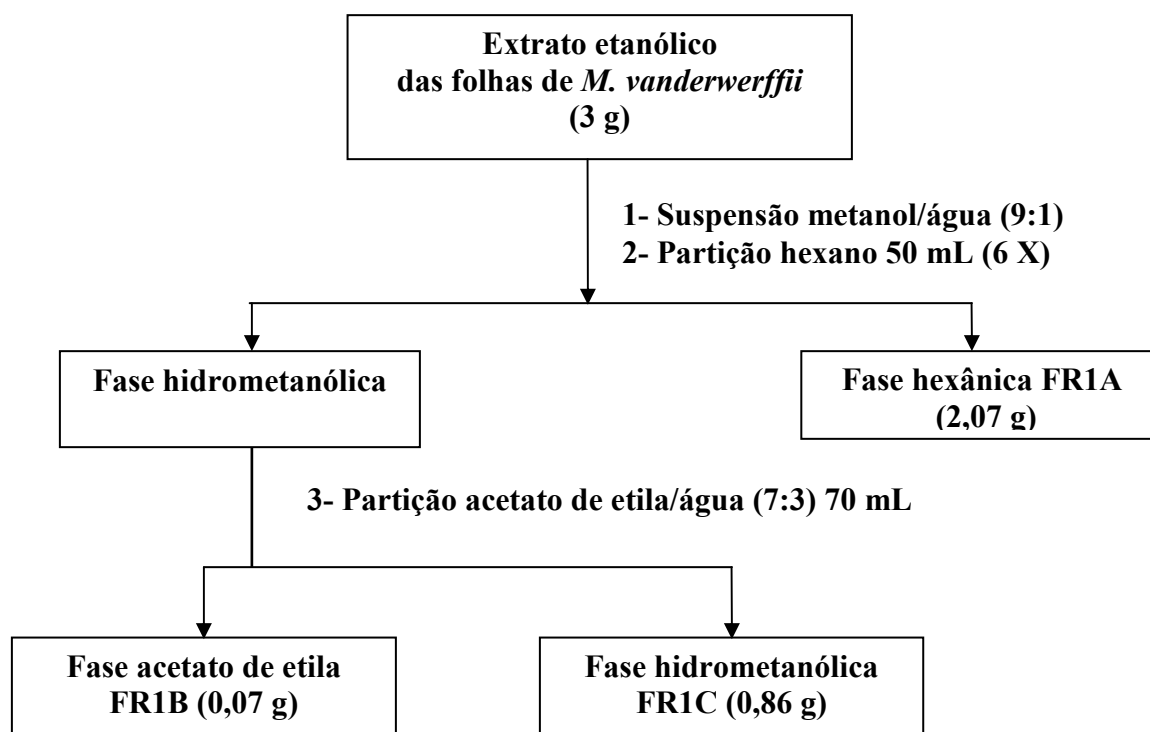
As folhas e o caule de *M. vanderwerffii*, foram secos e triturados, obtendo-se 1252,79 g e 4653,88 g respectivamente. Ambos foram submetidos à extração com etanol durante cinco dias com eventual agitação, à temperatura ambiente (procedimento repetido quatro vezes). Os extratos etanólicos foram concentrados sob pressão reduzida até consistência xaroposa, e seus rendimentos aproximados foram registrados (258 g e 157 g respectivamente) (Esquema 1).



Esquema 1: Obtenção dos extratos etanólicos das folhas e caule de *M. vanderwerffii*.

4.4 - Partição e Fracionamento do Extrato Etanólico das Folhas de *M. vanderwerffii*

Foram separadas aproximadamente 3 g do extrato etanólico das folhas de *M. vanderwerffii*, dissolvidas em metanol/água (9:1) e submetidas à partição com hexano, restando a fração hidrometanólica que em seguida foi particionada com acetato de etila/água (7:3). Tais procedimentos resultaram nas frações **hexânica** (2,1683g), **acetato de etila** (0,0657g) e **hidrometanólica** (0,8618g) (Esquema 2).

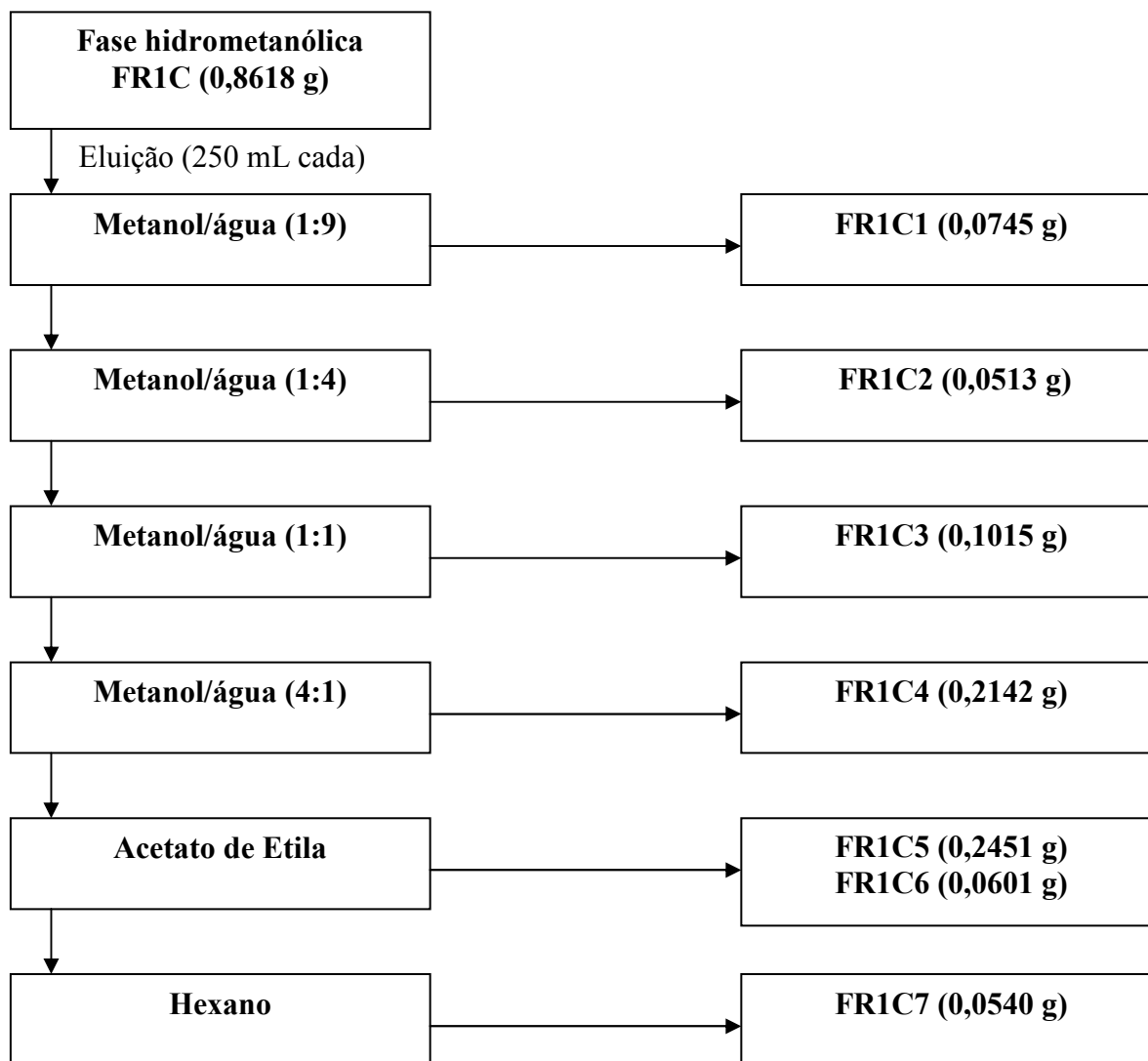


Esquema 2: Partição-teste do extrato etanólico das folhas de *M. vanderwerffii*.

4.4.1 – Estudos com a fase hidrometanólica (FR1C)

A fase hidrometanólica (aproximadamente 0,86 g), foi submetida a uma filtração em sílica, utilizando-se para isso sílica de fase reversa C-18 (4,5 cm de altura), funil de vidro sinterizado (6,0 cm de diâmetro) e bomba de sucção. A coluna foi eluída em metanol/água (1:9), (1:4), (1:1), (4:1), acetato de etila e hexano em gradiente de polaridade decrescente,

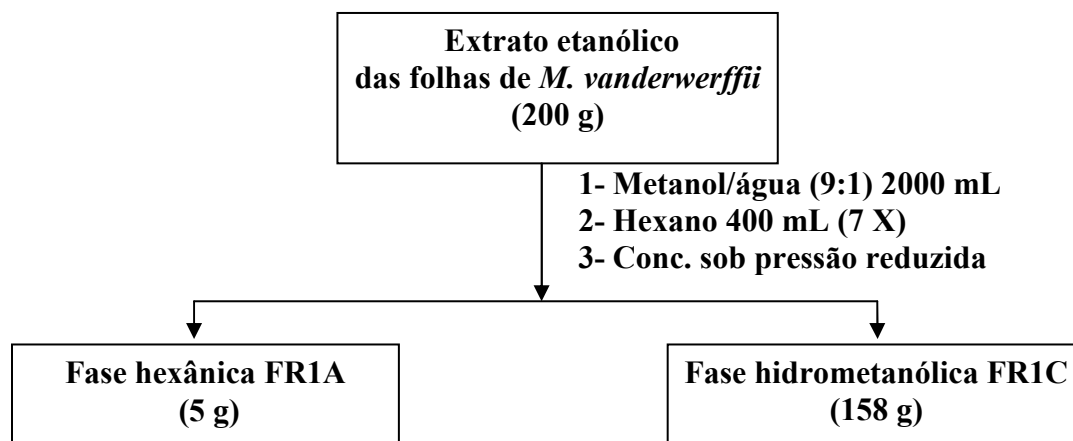
obtendo-se sete frações de 250 mL cada, exceto no caso do eluente acetato de etila do qual coletou-se 2 das 7 frações, com 125 mL cada. As mesmas receberam as denominações de FR1C1 à FR1C7 (Esquema 3). Todas foram concentradas sob pressão reduzida, e submetidas à CCDA, para teste de melhor eluente. Os sistemas de eluentes foram: hexano/acetato de etila (9:1), (1:1), (3:7), (1:4), (1:9), acetato de etila/metanol (9:1), clorofórmio/etanol/água (40:9:1), e as revelações feitas com vanilina e chapa aquecedora.



Esquema 3: Fracionamento cromatográfico da fase hidrometanólica obtida da partição-teste do extrato etanólico das folhas de *M. vanderwerffii*.

Depois destes procedimentos preliminares relatados nos itens 3.4 e 3.4.1, separou-se aproximadamente 200 g do extrato etanólico xaroposo das folhas de *M. vanderwerffii*, e

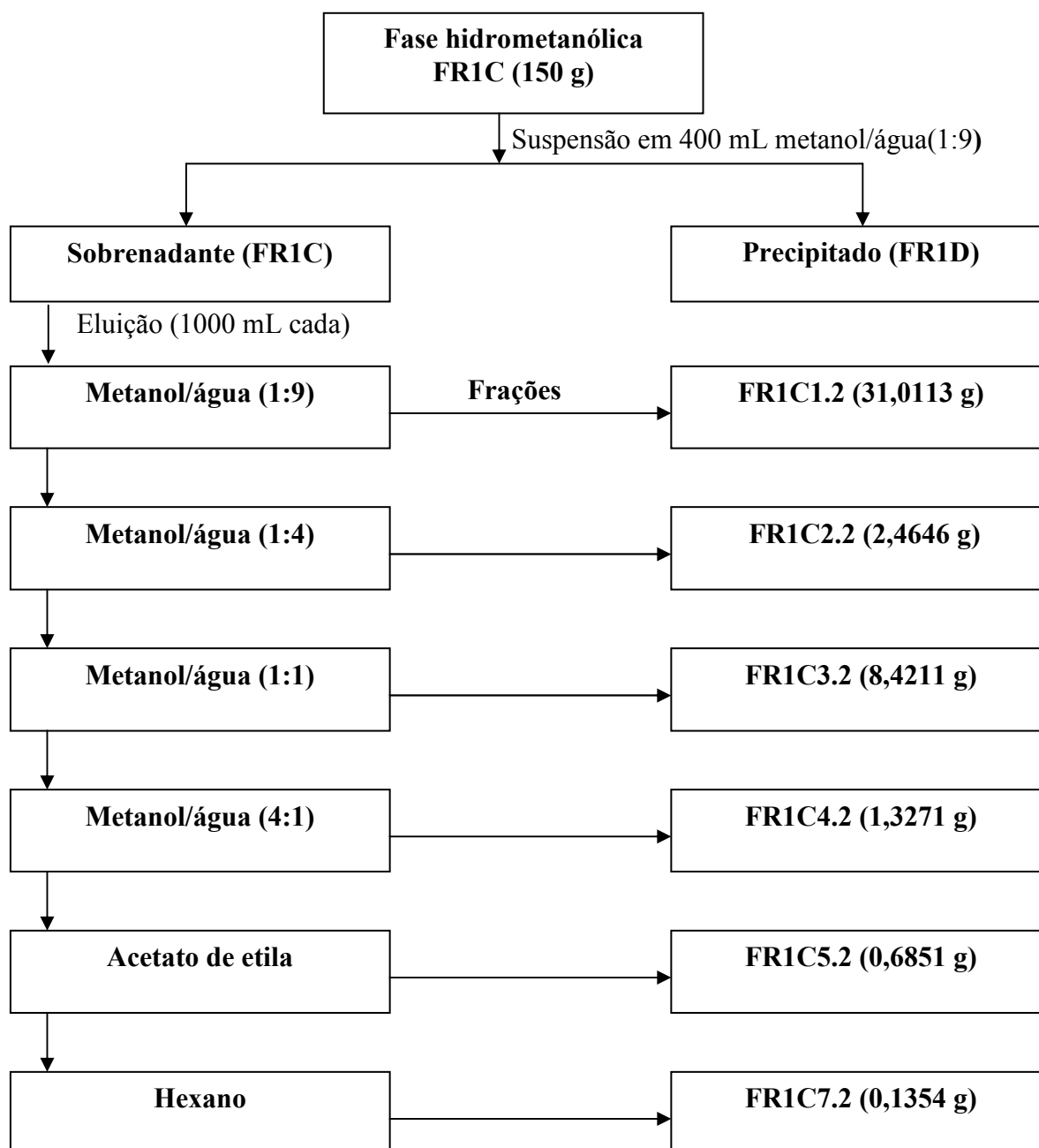
dividiu-os em duas porções de 100 g para cada funil de separação de 2,0 L. Ambos foram dissolvidos em metanol/água (9:1), e submetidos à partição com hexano, resultando em duas fases que foram concentradas sob pressão reduzida: **hexânica** (5,45 g) e **hidrometanólica** (158,14 g) (Esquema 4).



Esquema 4: Segunda partição do extrato etanólico das folhas de *M. vanderwerffii*.

Destes 158 g da fase hidrometanólica, aproximadamente 150,0 g foram suspensos em metanol/água (1:9) com a ajuda de um aparelho de ultrassom. Obtiveram-se duas fases: precipitado e sobrenadante.

O sobrenadante foi separado e submetido à filtração em sílica, utilizando-se novamente de sílica de fase reversa C-18 (4,0 cm de altura), funil de vidro sinterizado (13,5 cm de diâmetro) e bomba de sucção. O sistema de eluição é o mesmo aplicado anteriormente, fornecendo seis frações de 1,0 L cada, que receberam as seguintes denominações: FR1C1.2, FR1C2.2, FR1C3.2, FR1C4.2, FR1C5.2 e FR1C7.2 (Esquema 5).



Esquema 5: Segundo fracionamento cromatográfico da fase hidrometanólica obtida da segunda partição do extrato etanólico das folhas de *M. vanderwerffii*.

As frações tiveram seu perfil cromatográfico traçado em CCDA e as que despertaram maior interesse (manchas bem definidas e de polaridade intermediária), foram submetidas ao fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 e sílica gel 60 (70-230 mesh). As frações selecionadas foram FR1C3.2 e FR1C4.2.

4.4.1.1 - Fracionamento cromatográfico de FR1C3.2

Foi pesada 1,0 g da fração FR1C3.2, solubilizada em metanol, aplicada à coluna de sephadex LH-20 e eluída isocraticamente com 1,0 L de metanol, procedimento do qual se obteve 130 frações. As mesmas foram analisadas por CCDA, sendo agrupadas as frações que apresentaram perfil cromatográfico semelhante (Tabela 3).

Tabela 3: Frações agrupadas obtidas do fracionamento cromatográfico de FR1C3.2 (Coluna 1).

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
FR1C3.2.3	269,6	FR1C3.2.56	34,2
FR1C3.2.15	15,5	FR1C3.2.63	15
FR1C3.2.20	53,7	FR1C3.2.68	17,7
FR1C3.2.22	20,2	FR1C3.2.74	3033,3
FR1C3.2.23	93,2	FR1C3.2.85	6,1
FR1C3.2.32	37,5	FR1C3.2.87	20,4
FR1C3.2.39	19,1	FR1C3.2.95	20,8
FR1C3.2.41	desconhecida	FR1C3.2.104	10,6
FR1C3.2.52	desconhecida	FR1C3.2.113	43,2

A fração FR1C3.2.41 apresentou formação de um precipitado amarelo codificado como FR1C3.2.41ppt (63,9 mg), que foi separado do sobrenadante e submetido a análise espectroscópica de RMN uni e bidimensionais.

Todas as frações agrupadas foram analisadas novamente por CCDA e, dentre elas, selecionaram-se as frações FR1C3.2.41-sobrenadante e FR1C3.2.52 para a purificação de seus constituintes.

4.4.1.1a - Purificação da fração FR1C3.2.41-sobrenadante

O sobrenadante da fração FR1C3.2.41 foi cromatografado em Sephadex LH-20 utilizando-se 500 mL de metanol como eluente. Deste processo obteve-se 35 subfrações,

que foram analisadas por CCDA e agrupadas aquelas cujo perfil cromatográfico fosse semelhante (Tabela 4).

Tabela 4: Subfrações agrupadas obtidas da purificação cromatográfica da fração FR1C3.2.41-sobrenadante (Coluna 2).

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
FR1C3.2.41-1	11,9	FR1C3.2.41-26ppt	8,5
FR1C3.2.41-12	16,2	FR1C3.2.41-30	4,7
FR1C3.2.41-21	6,5	FR1C3.2.41-31	5,0
FR1C3.2.41-23	3,3	FR1C3.2.41-33	2,3
FR1C3.2.41-24	121,5		

Dentre as subfrações analisadas por CCDA, FR1C3.2.41-26ppt para ser submetida a análise espectroscópica de RMN de ^1H e ^{13}C e FR1C3.2.41-24 foi selecionada para isolamento de seus compostos através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.4.1.1b - Isolamento de quatro flavonoides de FR1C3.2.41-24 por CLAE

A fração FR1C3.2.41-24 (121,5 mg) foi submetida a uma separação por CLAE semi-preparativa, utilizando-se coluna de fase reversa C-18 ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (22:78 v/v), $\lambda = 254$ nm e fluxo 14 mL/min). Nesse processo de separação foram coletadas quatro frações, conforme mostra o cromatograma (Figura 5), denominadas FR1C3.2.41-24a, FR1C3.2.41-24b, FR1C3.2.41-24c e FR1C3.2.41-24d. A análise espectroscópica (1D e 2D) destas frações resultou na elucidação estrutural dos flavonóides **a**, **b**, **c** e **d** respectivamente (Tabela 5).

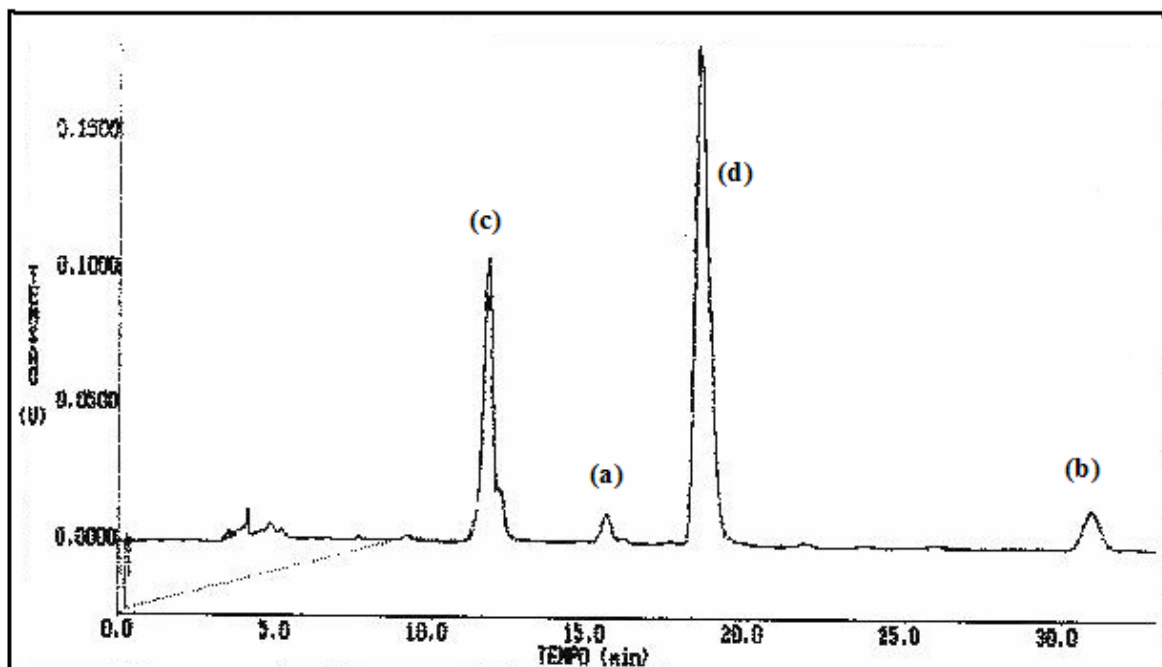


Figura 5: Cromatograma semi-preparativo da fração FR1C3.2.41-24. Coluna de fase reversa C-18, eluente CH₃CN/H₂O (22:78 v/v), detector UV (λ = 254 nm) e fluxo 14 mL/min.

Tabela 5: Substâncias químicas separadas por CLAE da fração FR1C3.2.41-24

Fração	Massa (mg)	Flavonoides
FR1C3.2.41-24a	3,9	kaempferol-3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosídeo
FR1C3.2.41-24b	6,8	kaempferol-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopiranosídeo
FR1C3.2.41-24c	16,6	quercetina-3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosídeo
FR1C3.2.41-24d	79,5	quercetina-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopiranosídeo

4.4.1.1.2 - Purificação da fração FR1C3.2.52

A fração FR1C3.2.52 foi purificado em Sephadex LH-20 com 800 mL de metanol como sistema eluente obtendo-se 50 subfrações, que foram analisadas por CCDA e agrupadas aquelas cujo perfil cromatográfico fosse semelhante (Tabela 6).

Tabela 6: Subfrações agrupadas obtidas da purificação cromatográfica da fração FR1C3.2.52 (Coluna 3).

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
FR1C3.2.52-1	53,4	FR1C3.2.52-27	1,0
FR1C3.2.52-15	2,3	FR1C3.2.52-28	21,2
FR1C3.2.52-24	2,9	FR1C3.2.52-40	7,9
FR1C3.2.52-26	3,0	FR1C3.2.52-47	1,6

As subfrações agrupadas foram avaliadas novamente por CCDA. As quatro últimas foram comparadas com a fração FR1C3.2.41-24 e apresentaram perfil cromatográfico idêntico.

4.4.1.2 - Fracionamento cromatográfico de FR1C4.2

A fração FR1C4.2 (0,7048 g) foi submetida a um fracionamento cromatográfico, utilizando-se sílica gel 60 (70-230 mesh). Para a montagem da coluna cromatográfica foram utilizados 80 g de sílica gel 60 e mais 1,0 g para a confecção da pastilha. A coluna foi eluída com misturas de hexano, acetato de etila e metanol, em gradiente de polaridade crescente, obtendo-se 125 frações. Todas as frações foram submetidas à análise por CCDA, e agrupadas aquelas cujo perfil cromatográfico fosse semelhante sendo descartadas aquelas de menor interesse (as mais polares) [Tabela 7].

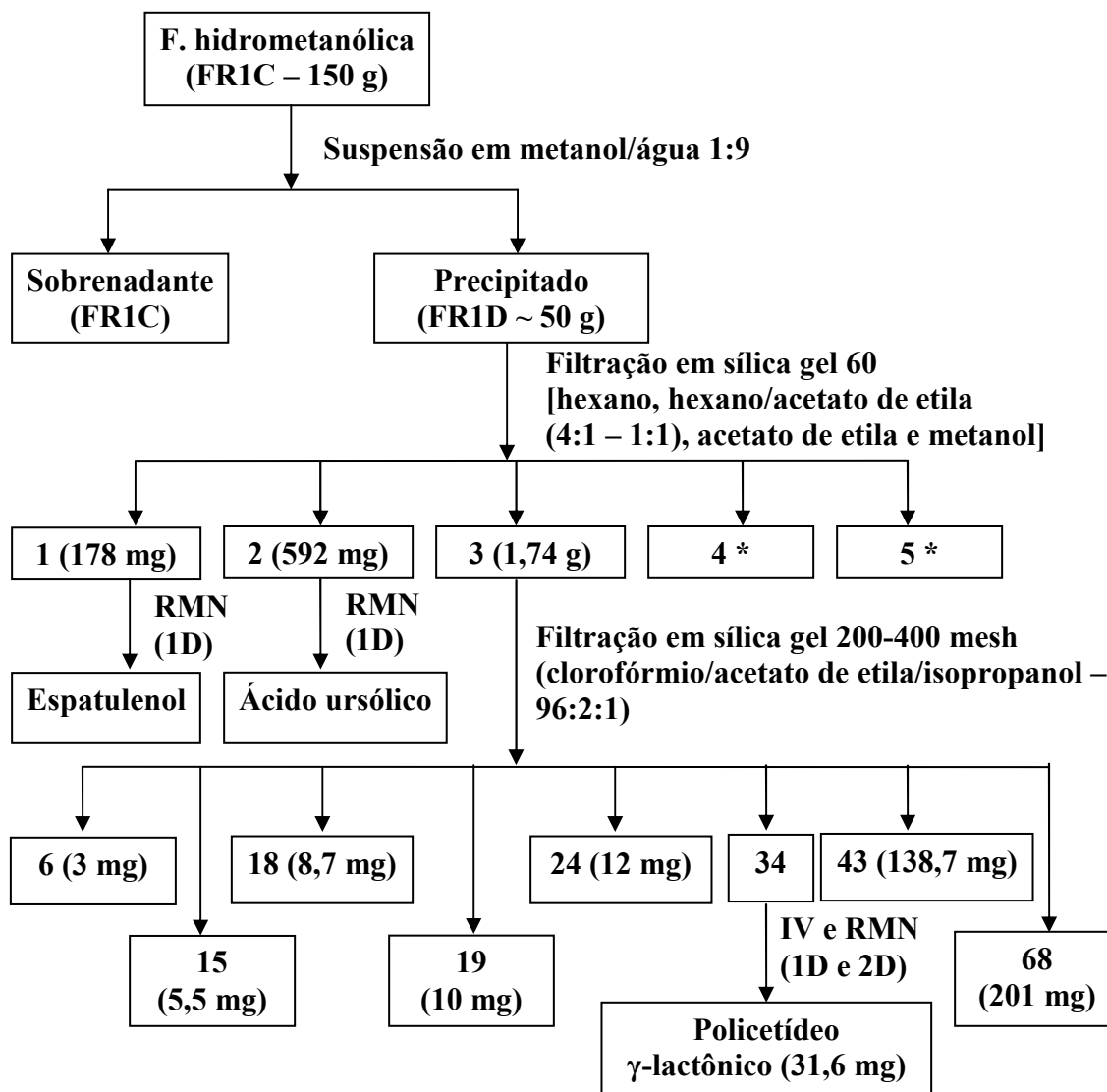
Tabela 7: Frações agrupadas obtidas do fracionamento cromatográfico de FR1C4.2 (Coluna 4)

Eluentes	Frações	Massa (mg)
Hexano/acetato de etila (9:1 v/v)	FR1C4.2.21	2,5
Hexano/acetato de etila (9:1 v/v)	FR1C4.2.47	2,1
Hexano/acetato de etila (4:1 v/v)	FR1C4.2.63	2,1
Hexano/acetato de etila (4:1 v/v)	FR1C4.2.73	3,4
Hexano/acetato de etila (4:1 v/v)	FR1C4.2.74	62,5
Hexano/acetato de etila (4:1 v/v)	FR1C4.2.78	65,0
Hexano/acetato de etila (7:3 v/v)	FR1C4.2.81	22,3
Hexano/acetato de etila (7:3 v/v)	FR1C4.2.89	24,9
Hexano/acetato de etila/metanol (7:3:1 v/v)	FR1C4.2.97	8,6
Hexano/acetato de etila/metanol (7:3:2 v/v)	FR1C4.2.100	9,6

As frações FR1C4.2.21, FR1C4.2.47 e FR1C4.2.63 apresentaram apenas uma mancha na CCDA, mas a análise por RMN de ^1H revelou se tratarem de substâncias apolares de pouco interesse.

4.4.1.3 – Fracionamento cromatográfico e purificações de FR1D

A fração FR1D se trata daquele precipitado que surgiu quando a fase hidrometanólica proveniente da partição do extrato etanólico das folhas de *M. vanderwerffii*, foi suspensa em $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 1:9. A mesma foi purificada em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh), eluída com hexano, hexano/acetato de etila (4:1 – 1:1), acetato de etila e metanol em gradiente de polaridade crescente, resultando em 5 frações. Todas as frações foram submetidas à análise em CCDA (Esquema 6).



Esquema 6: Fracionamento cromatográfico e purificação de FR1D, levando ao isolamento do sesquiterpeno espatulenol, do triterpeno ácido ursólico e de um policetídeo γ -lactônico.

* massa desconhecida.

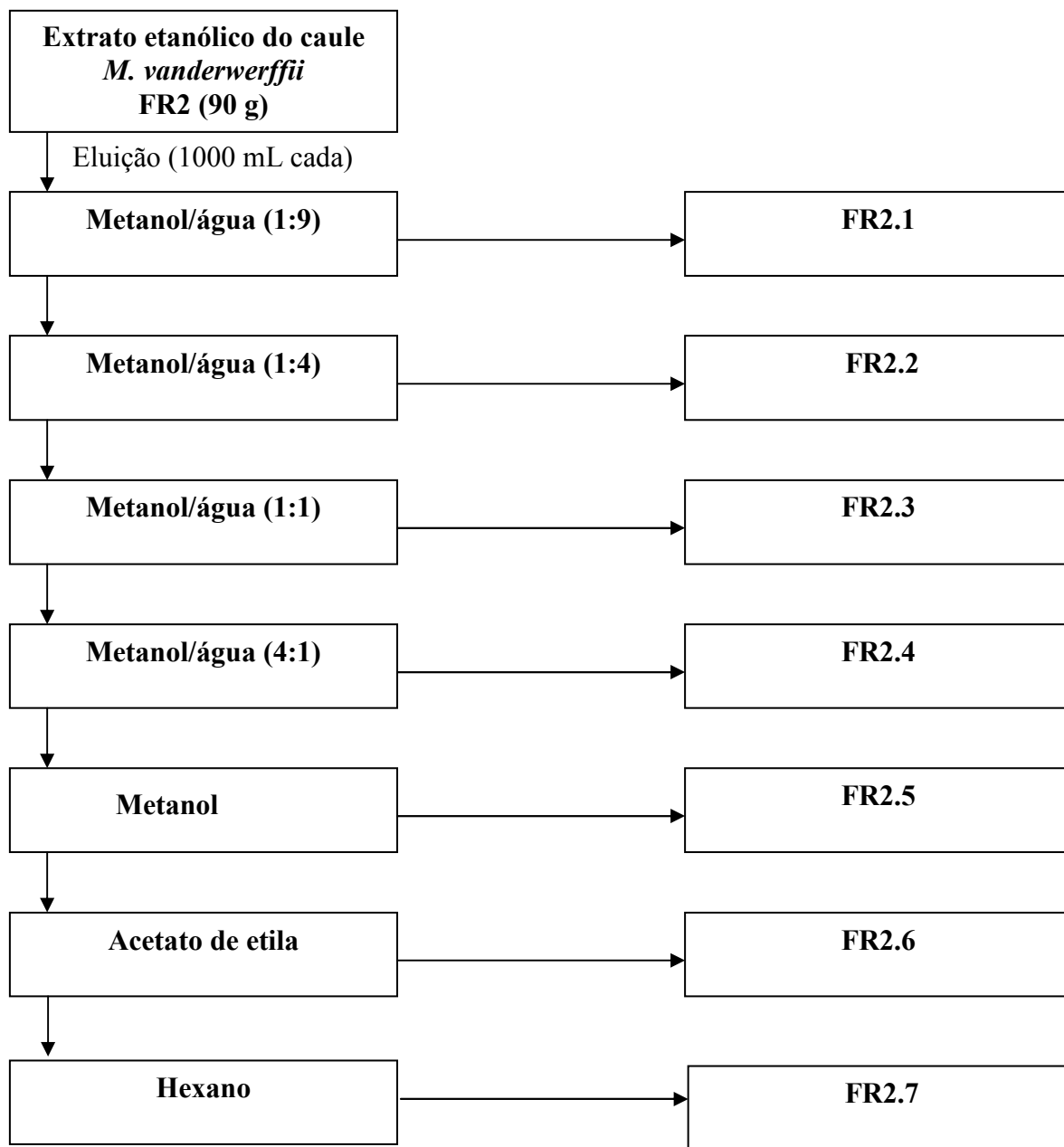
As frações FR1D1 e FR1D2, foram submetidas à análise espectroscópica (1D), o que possibilitou a identificação do sesquiterpeno espatulenol, e do triterpeno ácido ursólico respectivamente.

A fração FR1D3 (cerca de 1 g), foi purificada em coluna de vidro (diâmetro = 3,5 cm) preenchida com 130,0 g de sílica gel 200-400 mesh (flash), com sistema de eluição isocrático constituído por clorofórmio/acetato de etila/isopropanol (96:2:1 – 600 mL), levando a obtenção de 76 frações. As mesmas foram avaliadas por CCDA e agrupadas,

sendo que a fração FR1D3.34, avaliada por RMN (1D e 2D) bem como por IV, levou a elucidação estrutural de um policetídeo γ -lactônico (Esquema 6).

4.5 - Fracionamento e Partição do Extrato Etanólico do Caule de *M. vanderwerffii*

O extrato etanólico do caule de *M. vanderwerffii* – **FR2** - (cerca de 90,0 g) foi submetido a uma filtração em sílica, utilizando-se para isso sílica de fase reversa C-18 (4,0 cm de altura), funil de vidro sinterizado (13,5 cm de diâmetro) e bomba de sucção. A coluna foi eluída em metanol/água (1:9), (1:4), (1:1), (4:1), metanol, acetato de etila e hexano em gradiente de polaridade decrescente, obtendo-se sete frações de 1000 mL cada. As mesmas receberam as denominações de FR2.1, FR2.2, FR2.3, FR2.4, FR2.5, FR2.6 e FR2.7 (Esquema 7).



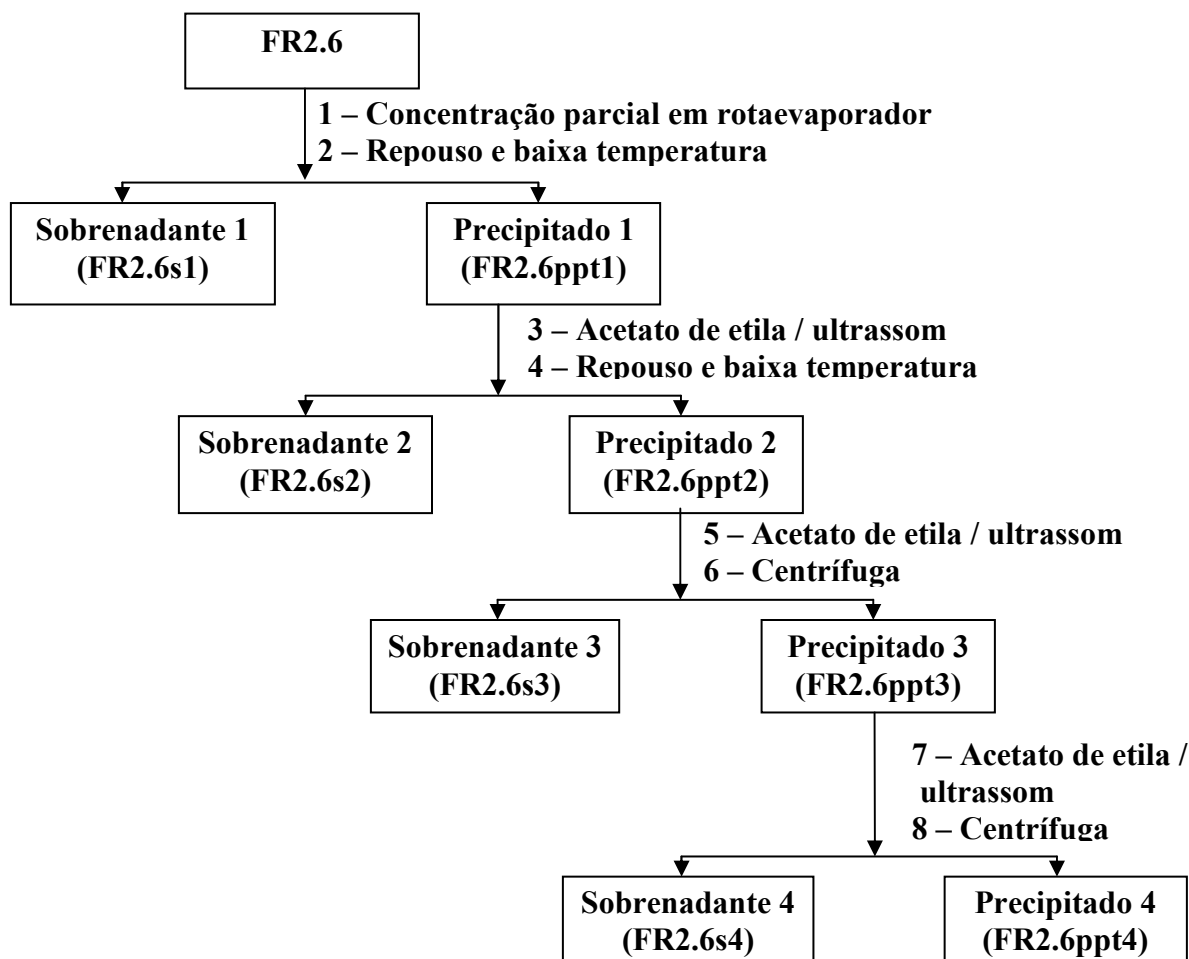
Esquema 7: Fracionamento cromatográfico em coluna de fase reversa do extrato etanólico do caule de *M. vanderwerffii*.

4.5.1 - Fração FR2.7

A fração FR2.7 foi concentrada totalmente, sob pressão reduzida e posteriormente avaliada por RMN de ^1H .

4.5.2 - Fração FR2.6

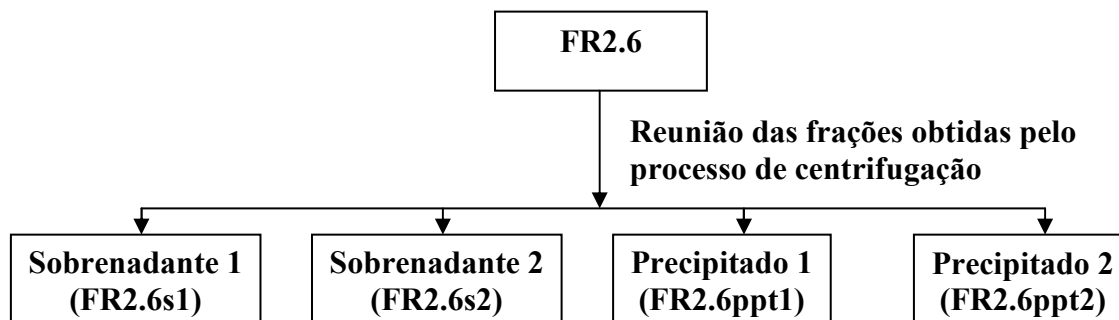
A fração FR2.6 foi parcialmente concentrada e guardada sob refrigeração por aproximadamente três dias. Sob as condições de repouso e baixa temperatura, ocorreu a formação de um precipitado (FR2.6ppt1), que foi separado de seu sobrenadante (FR2.6s1) e purificado com o solvente acetato de etila (Esquema 8).



Esquema 8: Purificação da fração FR2.6 obtida do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico do caule de *M. vanderwerffii*.

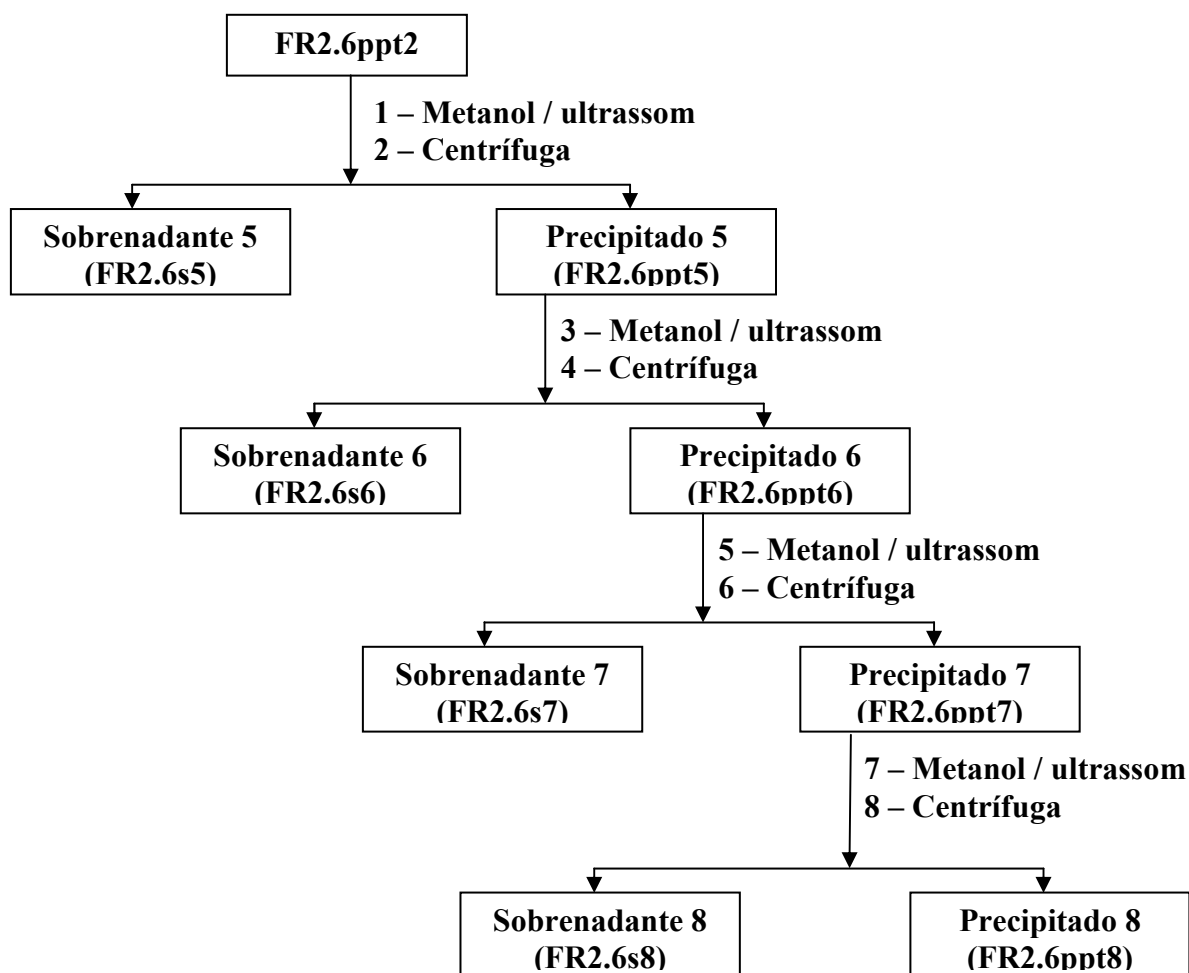
Do processo de purificação acima citado, resultou as frações FR2.6s1 à FR2.6s4 referentes aos sobrenadantes formados, e as frações FR2.6ppt1 à FR2.6ppt4 referentes aos precipitados (Esquema 8).

As frações FR2.6s2, FR2.6s3 e FR2.6s4 foram reunidas e denominada como “**FR2.6s2**”. As frações FR2.6ppt2, FR2.6ppt3 e FR2.6ppt4 também foram reunidas e chamada de “**FR2.6ppt2**” (Esquema 9).

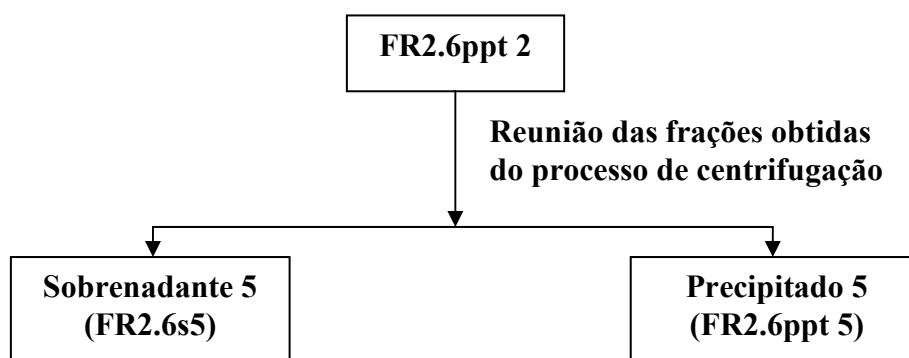


Esquema 9: Frações reunidas após processo de purificação por centrifugação de FR2.6

A fração FR2.6ppt2 foi submetida a processos de purificação com o solvente metanol seguida de centrifugação (Esquema 10). Desse processo, obtiveram-se as frações FR2.6s5, FR2.6s6, FR2.6s7 e FR2.6s8 referentes aos sobrenadantes, que foram reunidas e denominadas como sendo “**FR2.6s5**”. As frações referentes aos precipitados, FR2.6ppt5, FR2.6ppt6, FR2.6ppt7 e FR2.6ppt8, também foram reunidas e denominadas como sendo “**FR2.6ppt5**” (Esquema 11).



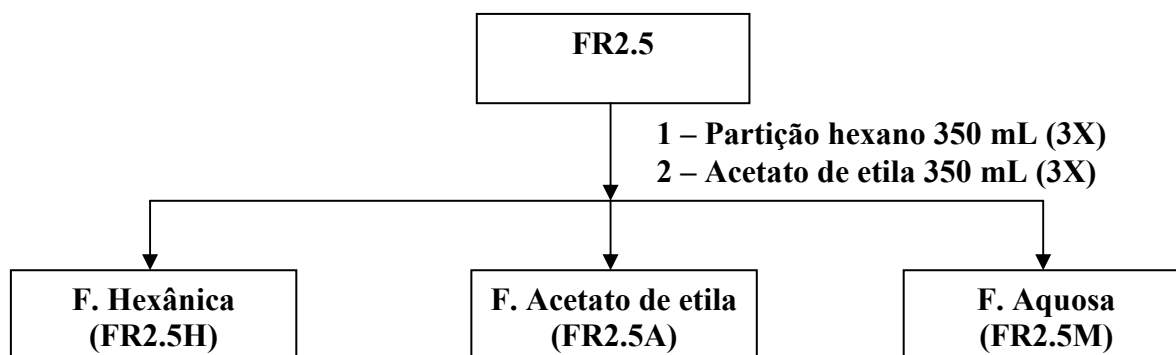
Esquema 10: Purificação por centrifugação da fração FR2.6ppt2 .



Esquema 11: Frações reunidas após processo de purificação por centrifugação de FR2.6ppt2

4.5.3 - Fração FR2.5

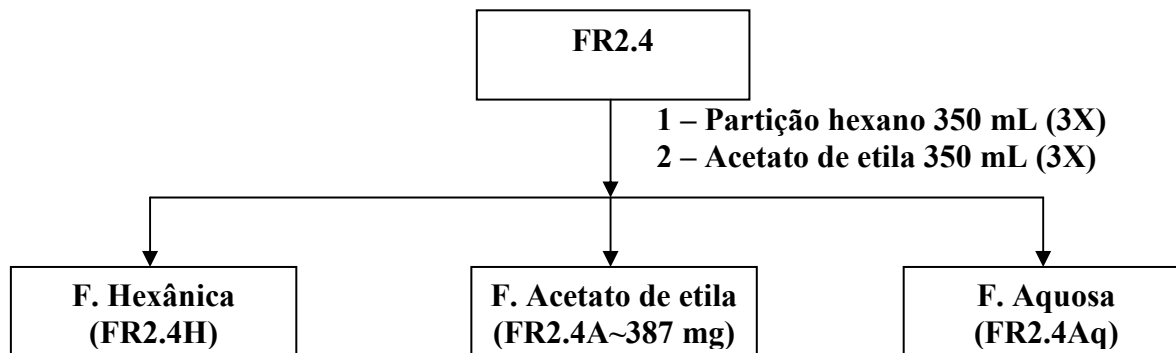
A fração FR2.5 foi submetida a partições em funil de separação, com hexano e acetato de etila (Esquema 12). De FR2.5 obteve-se as fases hexânica (FR2.5H), acetato de etila (FR2.5A) e a metanólica (FR2.5M). Todas as fases foram avaliadas em CCDA e RMN de ^1H .



Esquema 12: Partições das frações FR2.5, FR2.4, FR2.3 e FR2.2 obtidas do fracionamento cromatográfico em coluna de fase reversa do extrato etanólico do caule de *M. vanderwerffii*.

4.5.4 - Fração FR2.4

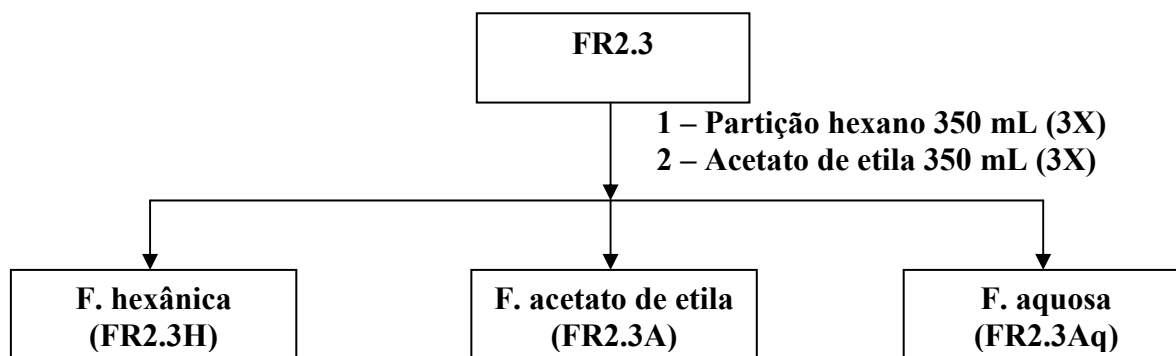
A fração FR2.4 foi submetida a partições em funil de separação, com hexano e acetato de etila (Esquema 13). De FR2.4 obteve-se as fases hexânica (FR2.4H), acetato de etila (FR2.4A), e a aquosa (FR2.4Aq). Todas as fases foram avaliadas em CCDA e RMN de ^1H .



Esquema 13: Partições das frações FR2.5, FR2.4, FR2.3 e FR2.2 obtidas do fracionamento cromatográfico em coluna de fase reversa do extrato etanólico do caule de *M. vanderwerffii*.

4.5.5 - Fração FR2.3

A fração FR2.3 foi submetida a partições em funil de separação, com hexano e acetato de etila (Esquema 14). De FR2.3 obteve-se as fases hexânica (FR2.3H), acetato de etila (FR2.3A) e aquosa (FR2.3Aq).



Esquema 14: Partições das frações FR2.5, FR2.4, FR2.3 e FR2.2 obtidas do fracionamento cromatográfico em coluna de fase reversa do extrato etanólico do caule de *M. vanderwerffii*.

4.5.5.1 – Fracionamento cromatográfico de FR2.3H

Foi aplicada a coluna de sephadex LH-20, 270,4 mg da fração FR2.3H, após esta última ter sido solubilizada numa mistura binária de solventes ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1). A coluna foi eluída com aproximadamente 800 mL da mesma mistura de solventes que solubilizou a amostra, da qual foram coletadas 64 frações. Todas as frações foram analisadas por CCDA, sendo agrupadas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante (Tabela 8).

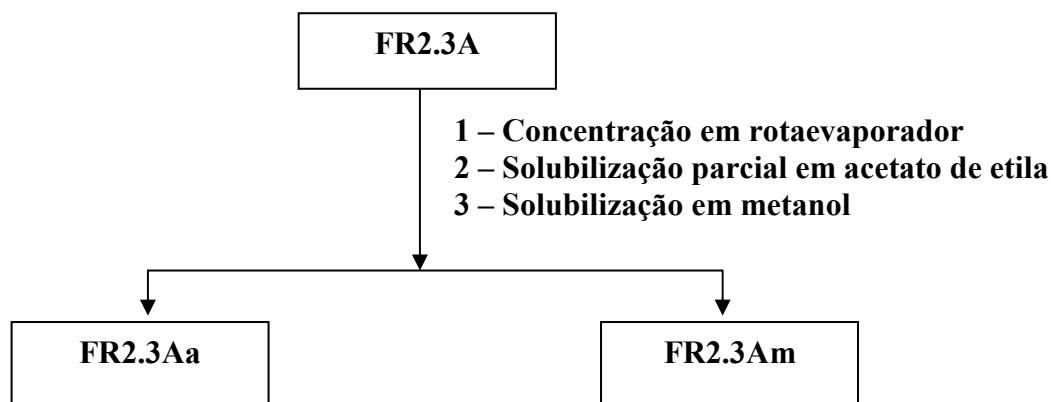
Tabela 8: Frações agrupadas obtidas do fracionamento cromatográfico de FR2.3H

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
FR2.3.3	59,9	FR2.3.18	6,0
FR2.3.7	84,5	FR2.3.22	desconhecida
FR2.3.11	61,3	FR2.3.24	desconhecida

Todas as frações citadas na tabela acima foram analisadas por RMN de ^1H .

4.5.5.2 - Fracionamento cromatográfico de FR2.3A

A fração FR2.3A após concentração, gerou duas novas subfrações: FR2.3Aa (sendo esta uma parte de FR2.3A que se solubilizou em acetato de etila), e FR2.3Am (proveniente do que sobrou e que se solubilizou em metanol) (Esquema 15). Foram ambas analisadas por CCDA ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 4:1), e com base no perfil cromatográfico, FR2.3Aa foi escolhida para uma investigação mais detalhada (item 4.5.5.2.1 da parte experimental).



Esquema 15: Concentração e partição de FR2.3A

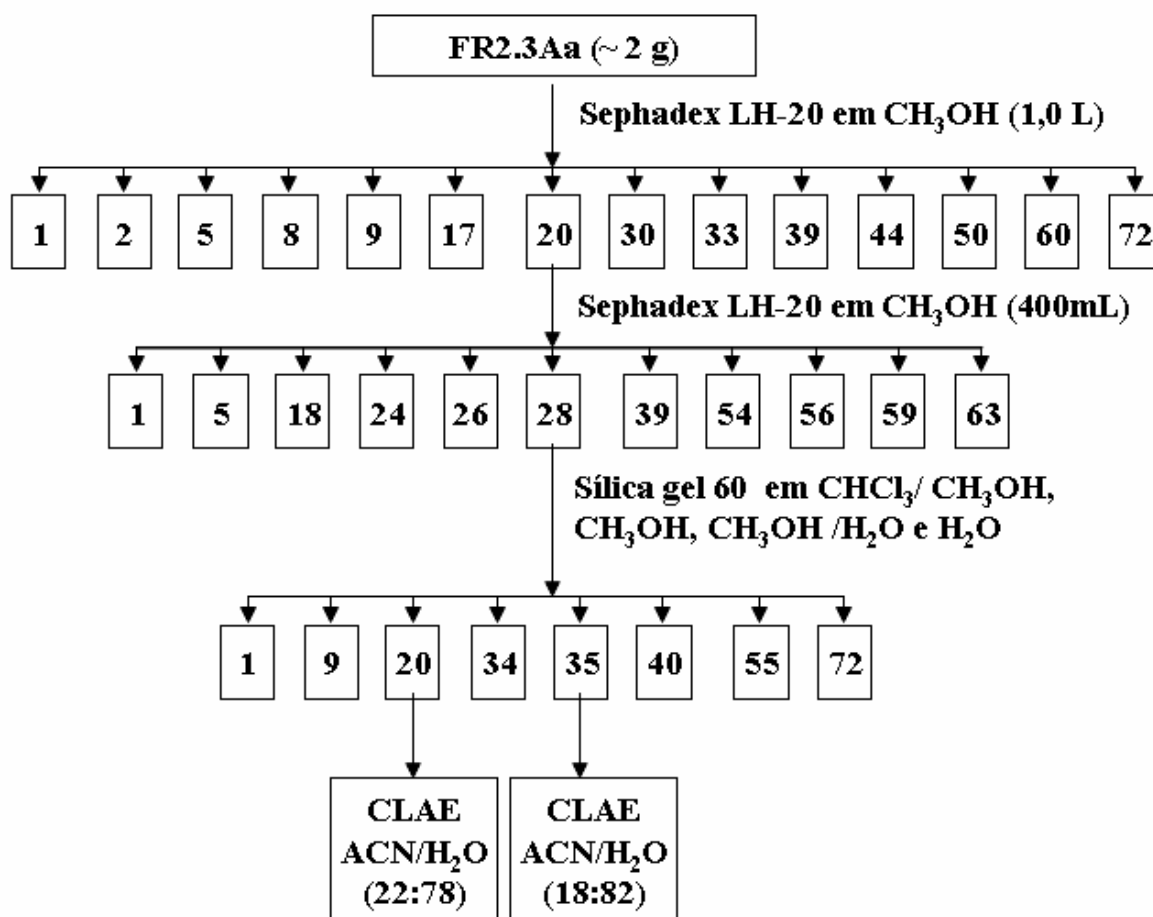
4.5.5.2.1 – Fracionamento cromatográfico e purificação de FR2.3Aa

Cerca de 2 g da fração FR2.3Aa foi filtrada em coluna de Sephadex LH-20 (5,0 cm de diâmetro e 34 cm de altura) utilizando-se 1,0 L de metanol como sistema eluente. Deste processo obteve-se 81 frações, que foram analisadas em CCDA e devidamente agrupadas (Esquema 16). Graças ao seu perfil cromatográfico, a fração FR2.3Aa20 (528,8 mg) foi escolhida para uma filtração na mesma coluna de Sephadex citada acima, tendo como sistema de eluição 400 mL de metanol, resultando em 75 frações. Após analisadas em CCDA e reunidas aquelas com perfil cromatográfico semelhante, selecionou-se FR2.3Aa20.28 (258 mg) para uma filtração em coluna (3,0 cm de diâmetro) preenchida com sílica gel 60 (70-230 mesh e 17,0 cm de altura) (Esquema 16).

Preparou-se uma pastilha com a amostra, utilizando-se de 1,0 g da mesma sílica que preenche a coluna, porém pré-umedecida com 20% de água. Após a aplicação da mesma,

eluiu-se a coluna com os solventes $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, CH_3OH , $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ e H_2O em gradiente de polaridade crescente, obtendo-se mais 72 frações. As mesmas também foram avaliadas por CCDA e agrupadas (Esquema 16) [Tabela 9].

As frações FR2.3Aa20.28.20 e FR2.3Aa20.28.35 foram submetidas a separação em CLAE utilizando-se misturas de acetonitrila e água.



Esquema 16: Filtração cromatográfica de FR2.3Aa, FR2.3Aa20 e FR2.3Aa20.28.

Tabela 9: Massa de algumas frações agrupadas provenientes do fracionamento cromatográfico de FR2.3Aa, FR2.3Aa20 e FR2.3Aa20.28

FR2.3Aa	FR2.3Aa20.	FR2.3Aa20.28.
Fração / massa (mg)		
8 (9,3)	1 (4,6)	1 (3,1)
9 (485,5)	18 (14,4)	9 (4,9)
<u>20</u> (528,8)	24 (11,1)	20 (38,5)
	26 (14,7)	34 (70,5)
	<u>28</u> (258)	35 (97,5)
	54 (4,0)	40 (33,6)
	56 (4,0)	
	59 (1,8)	

Obs: Massa desconhecida para as demais frações não relatadas na tabela.

4.5.5.2.1a - Isolamento de flavonoides de FR2.3Aa por CLAE

As frações FR2.3Aa20.28.**20** (38,5 mg) e FR2.3Aa20.28.**35** (97,5 mg) foram submetidas a uma separação por CLAE semi-preparativa, utilizando-se coluna de fase reversa C-18 (CH₃CN/H₂O (22:78 v/v), λ = 254 nm e CH₃CN/H₂O (18:82 v/v), λ = 210 nm, respectivamente e de fluxo 14 mL/min). Neste processo de separação foram coletadas de FR2.3Aa20.28.**20**, cinco frações: FR2.3Aa20.28.**20a**, FR2.3Aa20.28.**20b**, FR2.3Aa20.28.**20c**, FR2.3Aa20.28.**20d** e FR2.3Aa20.28.**20e**. De FR2.3Aa20.28.**35** foram coletadas seis frações: FR2.3Aa20.28.**35a**, FR2.3Aa20.28.**35b**, FR2.3Aa20.28.**35c**, FR2.3Aa20.28.**35d**, FR2.3Aa20.28.**35e** e FR2.3Aa20.28.**35f**. A análise espectroscópica (1D) destas frações resultou na identificação espectroscópica do flavonoide epicatequina nas frações FR2.3Aa20.28.**20a** e FR2.3Aa20.28.**35d**, bem como do biflavonoide procianidina B2 na fração FR2.3Aa20.28.**35c** (Tabela 10).

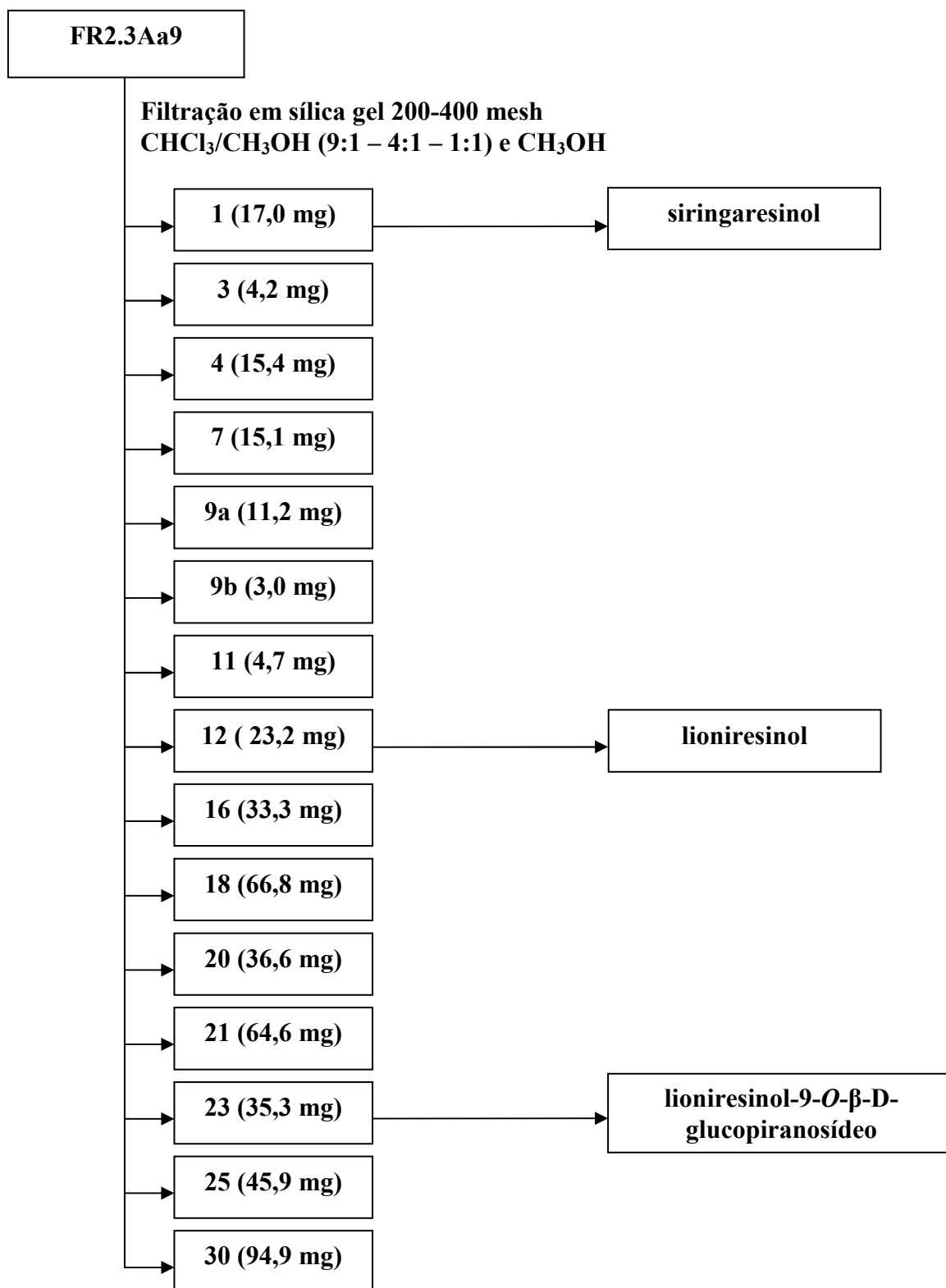
Tabela 10: Flavonoides isolados por CLAE de FR2.3Aa20.28.20 e FR2.3Aa20.20.35

Fração	Flavonoides
FR2.3Aa20.28.20a (10 mg) e	
FR2.3Aa20.20.35d (53,5 mg)	epicatequina
FR2.3Aa20.28.35c (21,7 mg)	procianidina B2

4.5.5.2.1b – Isolamento de lignanas de FR2.3Aa

A fração FR2.3Aa9, proveniente da filtração em Sephadex LH-20 de FR2.3Aa descritas no item 3.5.5.2.1 da parte experimental, cujo o perfil cromatográfico chamou a atenção, foi submetida a filtração em sílica gel 200-400 mesh (flash). A eluição foi realizada com CHCl₃/CH₃OH (9:1 – 4:1 – 1:1) e CH₃OH em gradiente de polaridade crescente (200 mL para cada proporção), obtendo-se 58 frações. As mesmas também foram avaliadas por CCDA e agrupadas (Esquema 17).

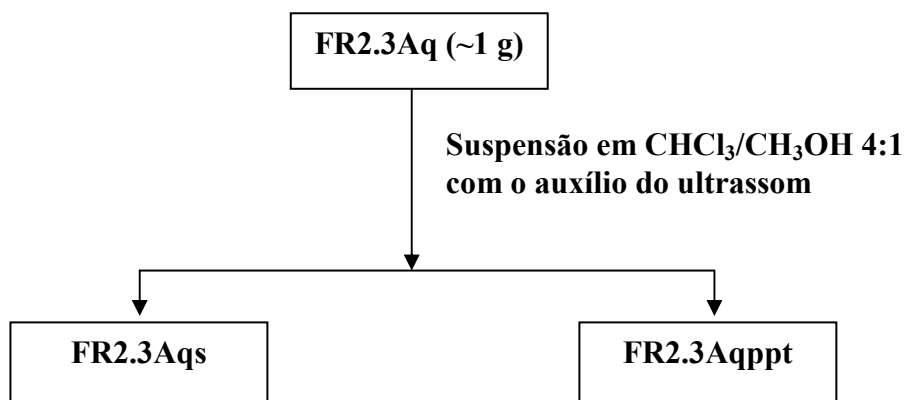
As frações FR2.3Aa9.1, FR2.3Aa9.4, FR2.3Aa9.7, FR2.3Aa9.12 e FR2.3Aa9.23 apresentaram perfil cromatográfico interessante, e as mesmas foram avaliadas por análise espectroscópica (1D e 2D). A primeira, a penúltima e a última fração foram identificadas como sendo substâncias pertencentes à classe das lignanas (Esquema 17).



Esquema 17: Filtração cromatográfica de FR2.3Aa9, e isolamento de três lignanas.

4.5.5.3 – Fracionamento cromatográfico de FR2.3Aq

Separou-se aproximadamente 1 g da fração FR2.3Aq e suspendeu-a em $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 4:1 com o auxílio de um aparelho de ultrassom. Este processo resultou na formação de duas fases (sobrenadante – FR2.3Aqs - e precipitado – FR2.3Aqppt), que foram separadas por centrifugação após descansar sob baixa temperatura, por um período de vinte e quatro horas (Esquema 18).

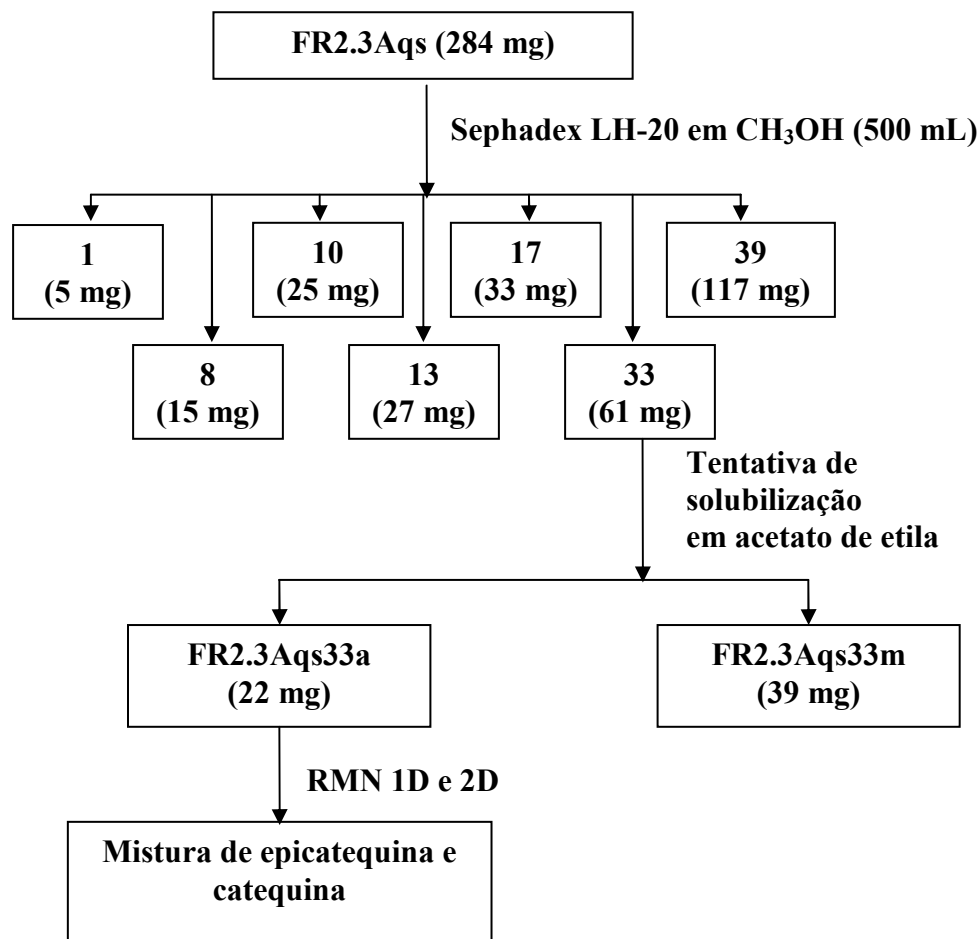


Esquema 18: Suspensão em $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 4:1 de FR2.3Aq.

As duas frações acima foram avaliadas em CCDA e levadas a fracionamentos cromatográficos.

Separou-se então 284 mg de FR2.3Aqs e submeteu-o a uma filtração em Sephadex LH-20 eluída em metanol (500 mL), resultando em 52 frações. Todas foram avaliadas em CCDA e reunidas aquelas cujo perfil cromatográfico era semelhante (Esquema 19).

A fração FR2.3Aqs33, cujo o perfil cromatográfico despertou interesse para uma análise em RMN, formou duas fases quando foi adicionada a ela o solvente acetona. O sobrenadante foi então separado e denominado “FR2.3Aqs33a”, enquanto que o precipitado, por ter se solubilizado em metanol, ficou denominado como FR2.3Aqs33m (Esquema 19).



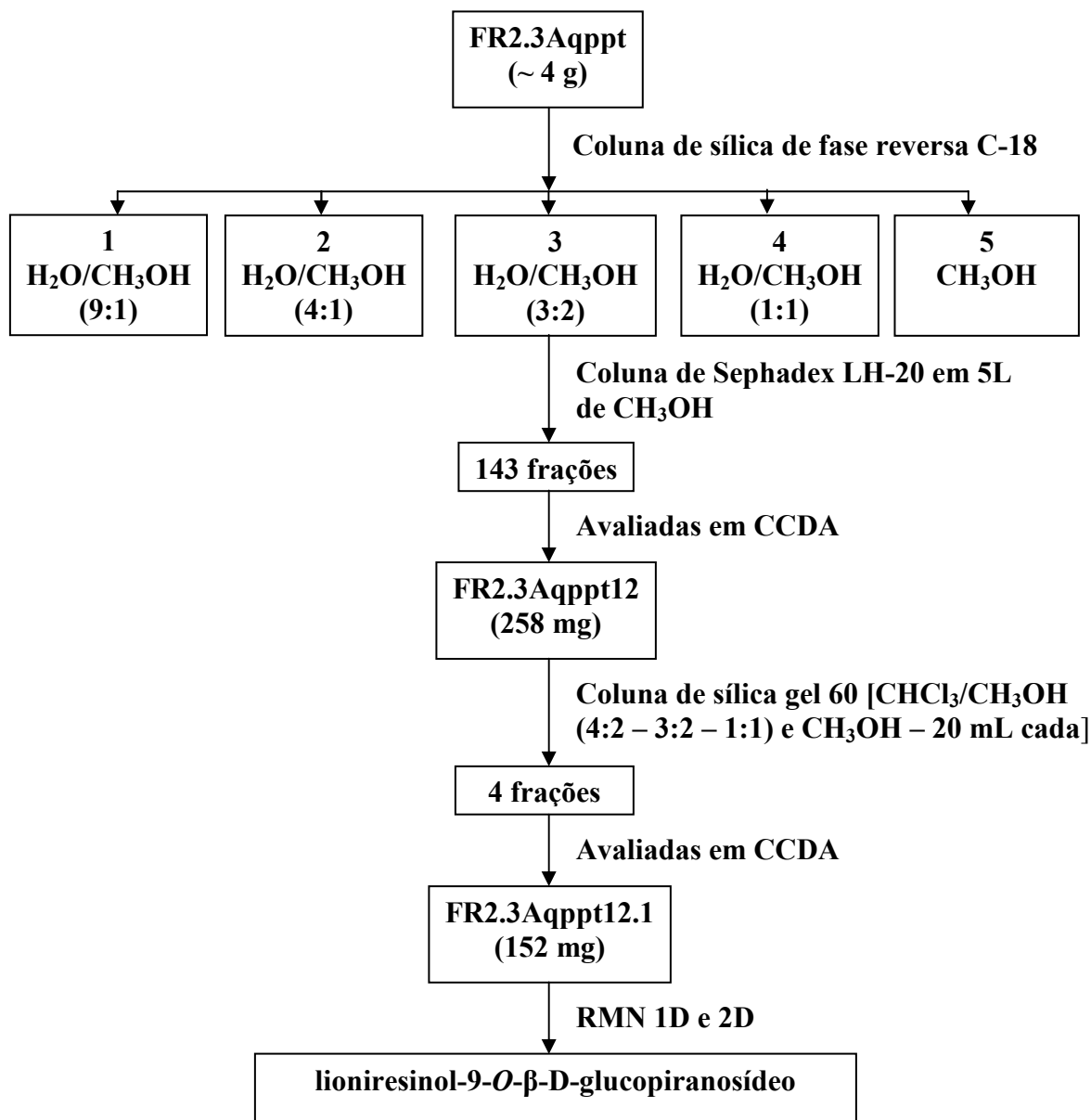
Esquema 19: Fracionamento cromatográfico de FR2.3Aqs e isolamento de uma mistura de flavonoides.

A fração FR2.3Aqppt (aproximadamente 4 g) foi filtrada em coluna preenchida com sílica de fase reversa C-18 (4 cm de altura), eluída em H₂O/CH₃OH (9:1 – 4:1 – 3:2 – 1:1) e CH₃OH (1L para cada), com sistema de eluição em gradiente de polaridade decrescente. Deste processo resultaram-se as cinco frações mostradas no esquema 20. Todas foram avaliadas em CDDA, mas apenas FR2.3Aqppt3 apresentou condições para uma maior investigação cromatográfica.

A mesma foi então purificada em coluna preenchida com Sephadex LH-20 (diâmetro = 5,0 cm; altura da Sephadex = 34 cm), e eluída em cinco litros de metanol, produzindo 143 frações (Esquema 20). Todas elas tiveram seu perfil cromatográfico traçado, onde pode-se verificar que a substância de interesse de coloração azul ao ser revelada com Ce(SO₄)₂, se concentrava entre as frações 12 e 28, sendo estas agrupadas e

denominada FR2.3Aqppt3.12 (aproximadamente 258 mg) [Esquema 21]. As demais frações foram descartadas.

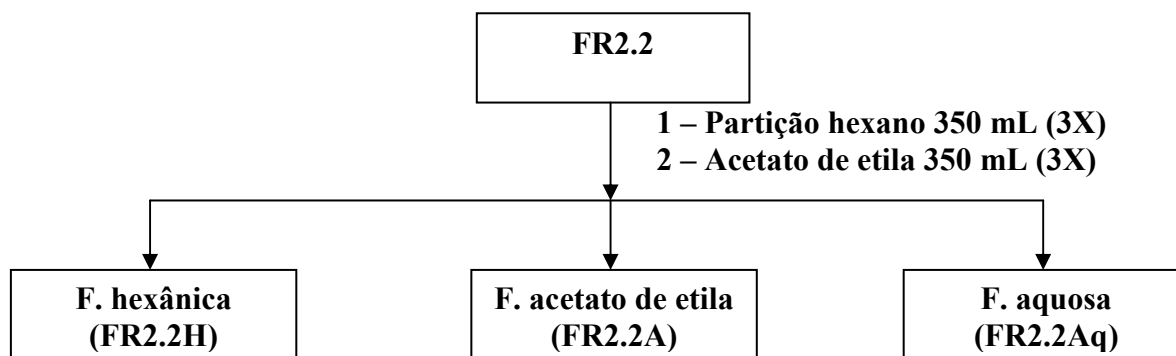
A fração FR2.3Aqppt3.12 foi novamente avaliada em CCDA, onde foi possível constatar a necessidade de uma nova purificação, desta vez em coluna preenchida com sílica gel 60 (6,0 x 0,7 cm), eluída em $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (4:1 – 3:2 – 1:1) e CH_3OH (20 mL de cada), levando a obtenção de quatro frações. Todas foram avaliadas em CCDA, sendo que apenas a primeira tinha condições de ser analisada em RMN, enquanto que as demais foram descartadas (Esquema 20).



Esquema 20: Fracionamentos de FR2.3Aqppt levando ao isolamento de um lioniresinol-9-O-β-D-glucopiranosídeo.

4.5.6 - Fração FR2.2

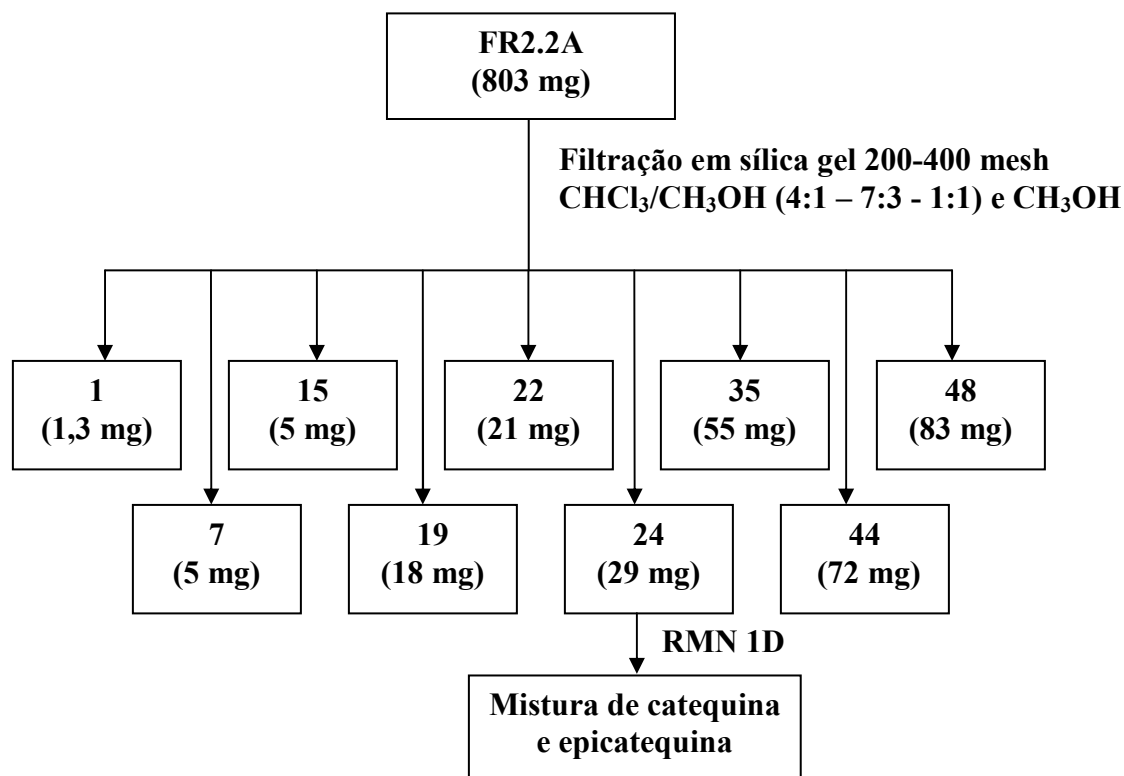
A fração FR2.2 foi submetida a partições em funil de separação, com hexano e acetato de etila (Esquema 22) e também obteve-se fases hexânica (FR2.2H), acetato de etila (FR2.2A) e aquosa (FR2.2Aq) (Esquema 21).



Esquema 21: Partições das frações FR2.5, FR2.4, FR2.3 e FR2.2 obtidas do fracionamento cromatográfico em coluna de fase reversa do extrato etanólico do caule de *M. vanderwerffii*.

4.5.6.1 – Isolamento de uma mistura de flavonoides de FR2.2A

A fração FR2.2A proveniente das partições de FR2.2 descritas no item anterior da parte experimental, foi submetida a uma filtração em sílica gel 200-400 mesh (flash). A eluição foi realizada com $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (4:1 – 7:3 - 1:1) e CH_3OH em gradiente de polaridade crescente (500 mL para cada), obtendo-se 120 frações. As mesmas também foram avaliadas em CCDA e agrupadas (Esquema 22). As frações 51 a 120 foram descartadas.



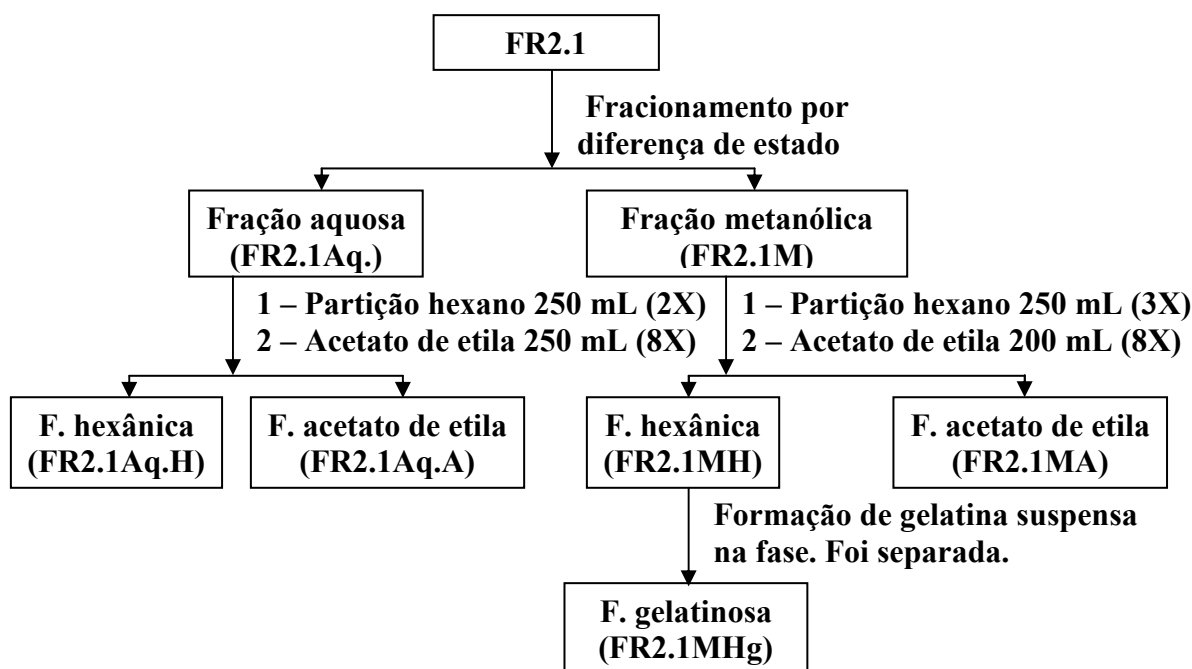
Esquema 22: Filtração cromatográfica de FR2.2A resultando no isolamento de uma mistura de catequina e epicatequina.

A fração FR2.2A²⁴ apresentou perfil cromatográfico interessante, e foi avaliada por análise espectroscópica (1D), levando a identificação de duas substâncias em mistura pertencentes a classe dos flavonoides, a catequina e a epicatequina (Esquema 22).

4.5.7 - Fração FR2.1

A fração FR2.1 foi acondicionada em refrigerador. O congelamento da água na mistura possibilitou sua separação do metanol, obtendo-se assim as frações FR2.1Aq e FR2.1M respectivamente. Ambas foram submetidas a processos de partição com hexano e acetato de etila (Esquema 23). De FR2.1Aq obteve-se as fases hexânica (FR2.1AqH) e de acetato de etila (FR2.1AqA), enquanto que de FR2.1M obteve-se as fases hexânica (FR2.1MH) e de acetato de etila (FR2.1MA). Em FR2.1MH ocorreu a formação de uma gelatina suspensa na fase, que foi separada e denominada como FR2.1MHg (Esquema 23).

Todas as fases obtidas das partições foram concentradas sob pressão reduzida. Todas as frações provenientes das partições com hexano foram avaliadas em RMN de ¹H.



Esquema 23: Fracionamento de FR2.1 e partições das duas frações resultantes, FR2.1Aq e FR2.1M.

Todas as fases hexânicas, provenientes das partições das frações obtidas do extrato etanólico do caule de *M. vanderwerffii*, foram avaliadas em CCDA e posteriormente em RMN de ^1H .

4.6 - Estudo da Atividade Biológica

4.6.1 - Avaliação da atividade antibacteriana do extrato etanólico das folhas e caule de *M. vanderwerffii*

O teste antibacteriano foi realizado em colaboração com a doutoranda do curso de pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste, Ana Lúcia Batista no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Farmácia, UFMS. O teste foi realizado com as bactérias gram-positivas *Enterococcus faecalis* (ATCC 29218), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e a gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

O inóculo é realizado em placas de petri com agar Müller-Hinton, incubadas por 20 horas em estufa a 35° C. Após este período é realizado o teste de susceptibilidade

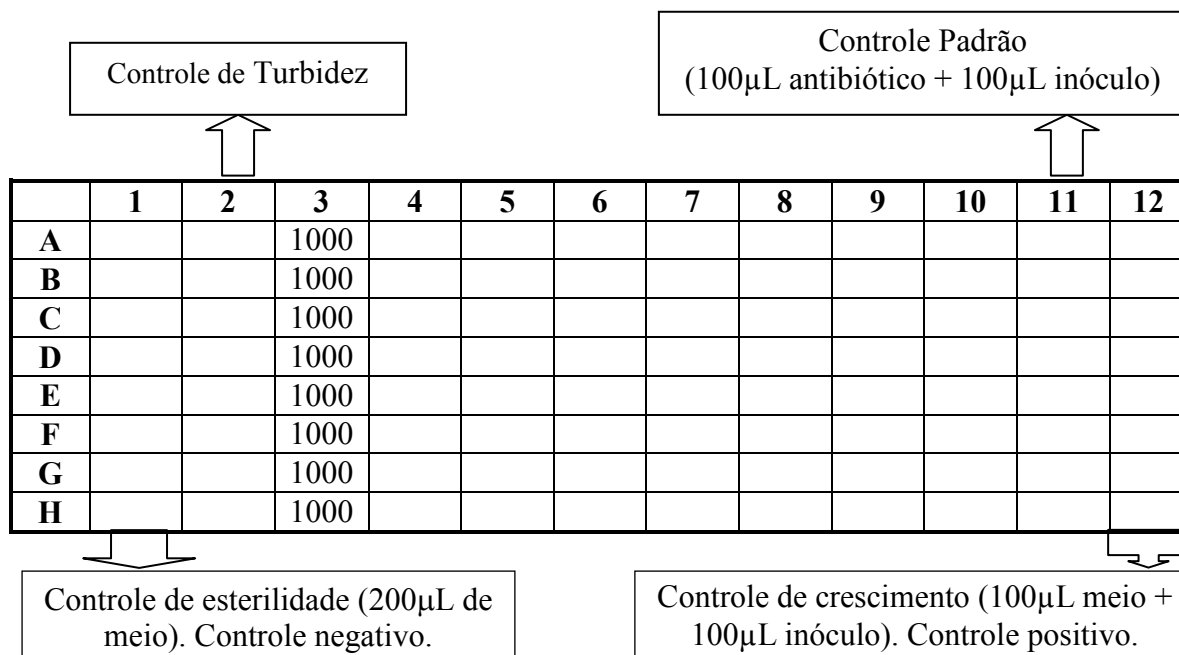
antibacteriana pelo método de microdiluição de acordo com o protocolo CLSI /NCCLS M-7-A6 (2005). Este método utiliza placas contendo 96 compartimentos, sendo cada compartimento denominado de poço como representado no esquema 24.

Como controle positivo para os testes antibacterianos foi utilizado o antibiótico cloranfenicol [(D(-)-treo-1-(p-nitrofenil)-2,2-dicloroacetamido-1,3-propanodiol)], na concentração de 0,25-32µg/mg. Este antibiótico é de amplo espectro, sendo eficaz contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa. Quanto aos extratos foram utilizados 20 mg diluídos em 1000 µL de DMSO 99,9% (Dimetilsulfóxido), obtendo, portanto concentração inicial de 2000 µg/mL. As amostras foram preparadas em tubo de ensaio, para obtenção das concentrações finais nos poços de: 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 e 7,81 µg/mL. As placas após a inoculação foram incubadas em estufa a 35° C por 20 horas e a leitura foi feita considerando o menor CMI (concentração mínima capaz de inibir o crescimento visível do subcultivo bacteriano).

Foram utilizadas três placas para verificar a atividade antibacteriana do extrato etanólico das folhas de *M. vanderwerffii*, uma para cada espécie de bactéria juntamente com o respectivo antibacteriano padrão cloranfenicol, e duas placas para o teste com o extrato do caule, no qual apenas as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) foram utilizadas.

Passos do teste:

- 1º) 100 µL de extrato - 2, 3, 4;
- 2º) 100 µL de meio - 1 (200 µL), 2, 4 ao 10 e 12;
- 3º) Diluições - 4 a 10 (desprezou-se 100 µL no final);
- 4º) Poços 11 - 100 µL de antibiótico nos poços A e B; 100 µL de meio nos poços B ao H;
- 5º) Diluições - B ao H (desprezou-se 100 µL no final);
- 6º) 100 µL de suspensão - 3 a 11 (Esquema 24).



Esquema 24: Representação das placas contendo 96 compartimentos (poços).

4.6.2 - Avaliação da atividade antifúngica de alguns flavonoides de *M. vanderwerffii*

O teste antifúngico foi realizado em colaboração com a aluna de graduação em Farmácia, Caroline Tieppo, no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Farmácia, UFMS. As cepas utilizadas foram *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans*.

A avaliação utilizou o teste de susceptibilidade antifúngica pelo método de microdiluição de acordo com o protocolo CLSI/NCCLS M27-A2 (2002). Este método utiliza placas contendo 96 poços, cujos procedimentos são bastante semelhantes aos descritos para o teste antibacteriano do item 4.6.1. O controle positivo empregado no teste foi a anfotericina B. As diluições variaram de 400,00 a 6,25 µM para os flavonoides kaempferol-3-*O*-β-D-glucopiranosídeo (a), kaempferol-3-*O*-α-L-rhamnopiranosídeo (b) e quercetina-3-*O*-α-L-rhamnopiranosídeo (d), e de 10,00 a 0,25 µM para o controle positivo. Após inoculação as placas de microdiluição foram incubadas em estufa a 35° C por 20 horas. A leitura foi feita considerando o menor CMI (concentração mínima capaz de inibir o crescimento visível do subcultivo fúngico).

Foram utilizadas três placas para verificar a atividade antifúngica dos flavonoides, uma para cada espécie de fungo, juntamente com o respectivo antifúngico padrão anfotericina B.

4.6.3 - Avaliação da atividade antioxidante de alguns flavonoides de *M. vanderwerffii*

Para a verificação da capacidade antioxidante dos flavonoides kaempferol-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo (a), kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (b) e quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (d), utilizou-se o método de seqüestro do radical DPPH, de acordo com a literatura (ZHANG *et al.*, 2007). As soluções dos flavonoides e do controle positivo (ácido caféico) foram adicionadas numa microplaca de 96 poços, em concentrações que variaram de 400,00 a 6,25 μ M para cada um. A adição da solução de DPPH se deu logo em seguida.

A microplaca, contendo as substâncias e o controle positivo, foi levada ao leitor de Elisa Thermoplate a 517 nm, após 30 minutos de repouso no escuro à temperatura ambiente. Os testes foram realizados em triplicata, e o etanol foi usado como branco.

As absorbâncias das amostras foram convertidas em porcentagem de atividade antioxidante (IC%). A expressão dos resultados foi dada pelo IC₅₀, calculado com base na análise de regressão linear.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Estudo Químico das Folhas de *M. vanderwerffii*

Após estabelecer as condições experimentais, através de um experimento piloto, o extrato etanólico das folhas de *M. vanderwerffii*, foi submetido a um processo de partição, dando origem às fases hexânica e hidrometanólica (parte experimental, item 4.4). As fases obtidas foram submetidas a uma avaliação por cromatografia em camada delgada analítica, e em função do comportamento cromatográfico, selecionou-se a fase hidrometanólica para o estudo químico, uma vez que o perfil cromatográfico da fase hexânica indicou que a mesma é constituída por substâncias bem apolares (sendo estas de menor interesse no presente trabalho).

A fase hidrometanólica foi então submetida a técnicas cromatográficas de separação, incluindo cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, sílica gel 60 (70-200 mesh), sílica gel 200-400 mesh (flash) e cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (item 4.4 da parte experimental).

Destes processos de separação foram obtidos:

- Um novo policetídeo γ -lactônico, o sesquiterpeno espatulenol, e o triterpeno ácido ursólico, provenientes do fracionamento e purificação do precipitado formado durante processo de suspensão da fase hidrometanólica em metanol/água (1:9) [ítems 4.4.1 e 4.4.1.3 da parte experimental];

- Quatro flavonoides: kaempferol-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo, kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo, quercetina-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo e quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo, provenientes do fracionamento e purificação do sobrenadante, formado durante processo de suspensão da fase hidrometanólica em metanol/água (1:9) [ítems 4.4.1, 4.4.1.1, 3.4.1.1a e 4.4.1.1b da parte experimental].

O flavonoide quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo foi identificado também na fração FR1C3.2.41 (precipitado codificado como FR1C3.2.41ppt), e na fração FR1C3.2.41-26 (precipitado codificado como FR1C3.2.41-26ppt).

A determinação estrutural dos compostos obtidos foi efetuada com base nos dados espectroscópicos de RMN de ^1H e de ^{13}C uni e bidimensionais e também por comparação com dados espectrais de modelos existentes na literatura.

As demais frações obtidas dos procedimentos cromatográficos com o extrato das folhas de *M. vanderwerffii*, ou foram avaliadas por RMN de ^1H demonstrando se tratar de substâncias de pouco interesse, ou possuíam pouca massa, impedindo qualquer avaliação por RMN, ou ainda foram ignoradas por apresentarem ausência de mancha definidas em CCDA.

5.1.1 – Policetídeos

Os policetídeos são compostos produzidos em geral por microorganismos, principalmente fungos, sendo pouco encontrado em plantas, são cadeias de ácidos graxos que apresentam atividades farmacológicas – antibióticos, antitumorais e etc.

A biossíntese dos ácidos graxos encontra-se associada a um conjunto de enzimas designadas por sintases de ácido graxo, ou policetídeos sintases (PKS), sendo que as PKS específicas em plantas são a chalcona sintase (CHS) e a 2-pirona sintase (2-PS). Cada enzima interatua com uma proteína transportadora da cadeia acilo (PTA), que atua como cofator. O bloco constituinte fundamental é o ácido acético, sob a forma de acetil coenzima-A (acetil-SCoA). Com efeito, é este o iniciador de todo o processo, mas a alongação subsequente da cadeia realiza-se através de um derivado, o malonil-SCoA. O malonil-SCoA forma-se através de uma reação de carboxilação do acetil-SCoA, envolvendo a biotina carboxilada que é transportada por uma proteína (Figura 6) [DEWICK, 2002; LOBO & LOURENÇO, 2007].

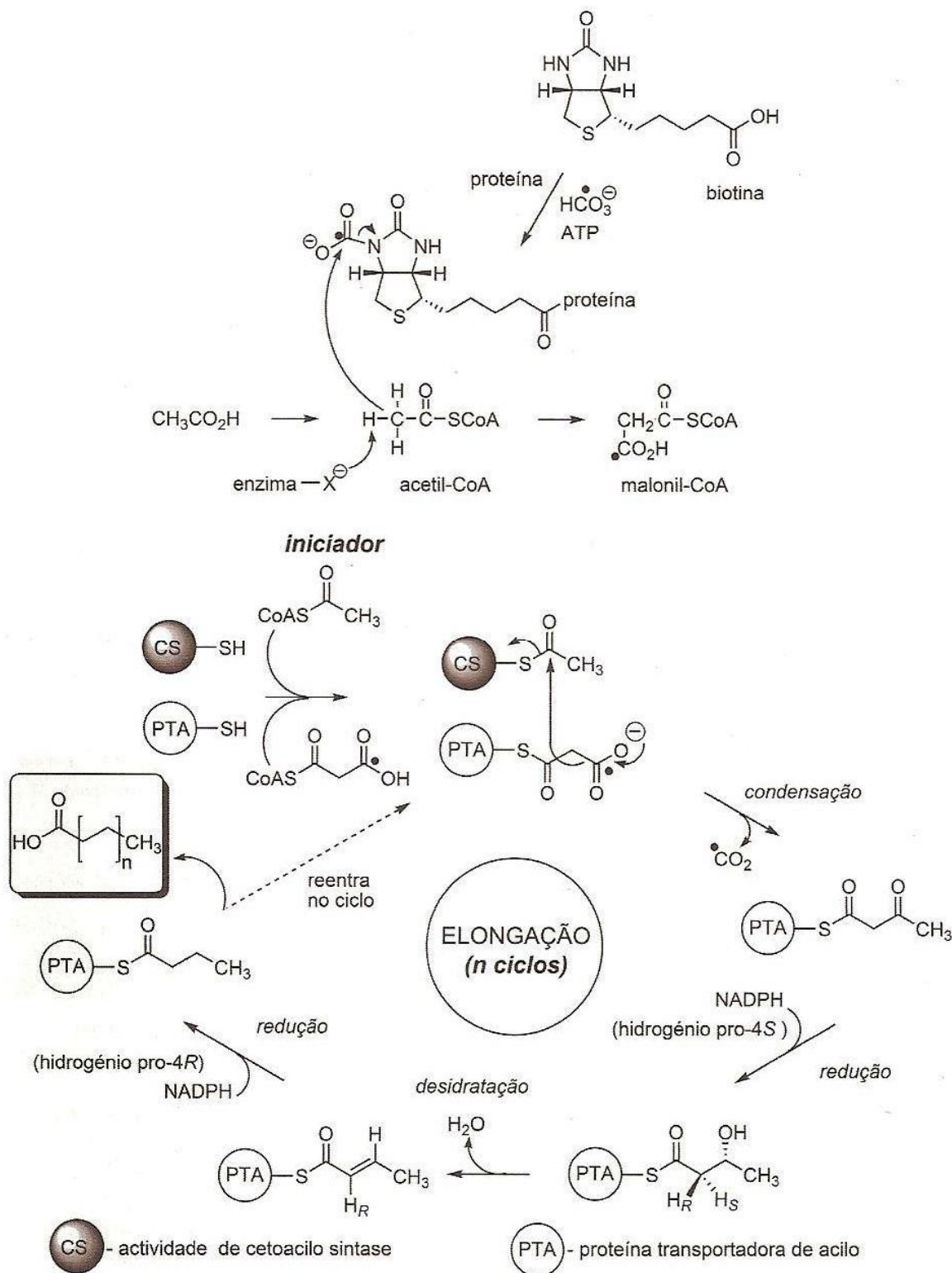


Figura 6: Biossíntese de ácido graxo (extraído de LOBO & LOURENÇO, 2007)

As seguidas reduções e repetidas condensações conduzem a formação de uma cadeia totalmente saturada de quatro átomos de carbono. Em geral o ciclo de alongação se repete várias vezes originando no final o ácido graxo $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{2n}\text{COOH}$. Existem algumas reações comuns em cadeia policetônica, entre elas, tem-se a formação de ligações duplas através de via aeróbica (em plantas e mamíferos) e anaeróbica (em bactérias anaeróbicas), de ciclizações envolvendo formação de anéis furano e tiofeno, entre outras (LOBO & LOURENÇO, 2007).

5.1.1a – Elucidação estrutural de um novo policetídeo γ -lactônico das folhas de *M. vanderwerffii*

A substância “**FR1D3.34**” (31,6 mg) de aspecto oleoso, foi obtida da fração FR1D3 de acordo com os fracionamentos cromatográficos apresentados na parte experimental (item 4.4.1.3).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 10) mostrou sinais bem distribuídos na faixa de 5,76 e 1,23 δ . Este último sinal mostrou características de uma cadeia carbonica linear, enquanto os sinais em 5,76 e 4,93 - 4,88 δ foram compatíveis com uma vinila. O espectro mostrou também sinais relativos a átomos de hidrogênio carbinólico [4,37; 4,08-3,98 (CH_2); 3,39 δ], e a uma metila ligada a carbonila em 2,05 δ (Tabela 11).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 11 e 12) apresentou dezenove sinais destacando-se: dois sinais relativos a duas carbonilas em 179,72 e 171,07 δ ; dois sinais de átomos de carbono de uma vinila em 139,06 e 114,07 δ ; três sinais de átomos de carbono carboxílico, sendo dois metínico (79,67 e 68,15 δ) e um metilênico (68,36 δ); um conjunto de onze sinais na região de átomos de carbono mais protegidos, incluindo um metínico (38,86 δ), nove metilênico e um metílico (20,77 δ) [Tabela 11].

O espectro de infravermelho de FR1D3.34 (Figura 13) confirmou a presença dos grupos funcionais mencionados, destacando-se as bandas relativas ao grupo OH em 3444 cm^{-1} , bandas de carbonila em 1743 e 1732 cm^{-1} e também banda de ligação dupla carbono-carbono em 1639 cm^{-1} . O deslocamento químico referente ao átomo de carbono de uma das carbonilas a 179,72 δ e a localização de uma banda de estiramento de carbonila a 1743 cm^{-1} indicaram a presença de um grupo γ -lactônico na estrutura de FR1D3.34.

O experimento HMBC (Figura 16) mostrou inúmeras correlações (Tabela 11), levando aos fragmentos propostos na figura 7 abaixo.

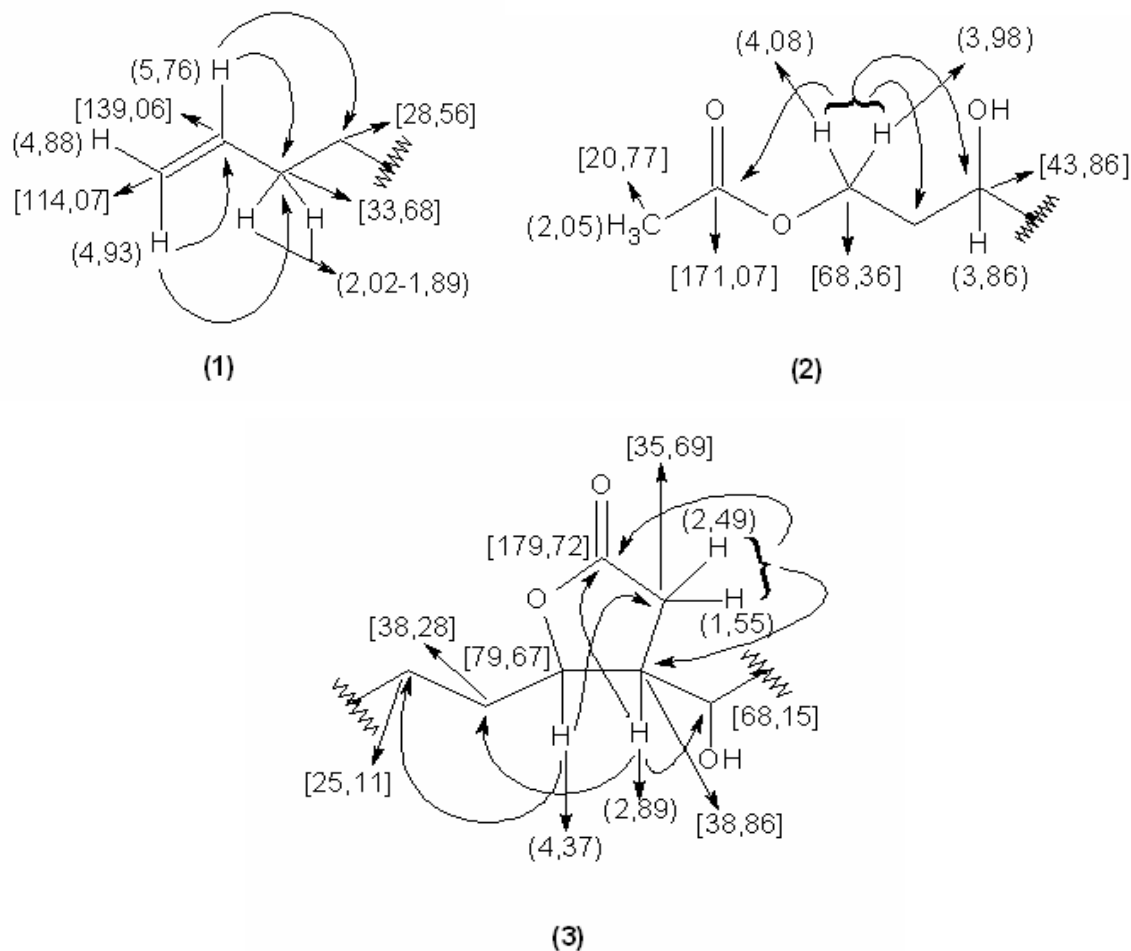


Figura 7: Fragmentos propostos através de análise das correlações observadas no experimento HMBC para o novo policetídeo γ -lactônico (FR1D3.34) [Os deslocamentos dos átomos de hidrogênio estão representados entre parênteses, enquanto que os de carbono estão entre colchetes].

A união desses fragmentos permitiu formular o que seria então a estrutura do composto FR1D3.34, cujo nome é ácido-4-hidroxi-12-tridecenoico-3-[1-(1-hidroxi-3-acetil)-propil-]-oico-lactona e sua respectiva numeração. Outros experimentos serão realizados para a confirmação da estrutura apresentada (Figura 8).

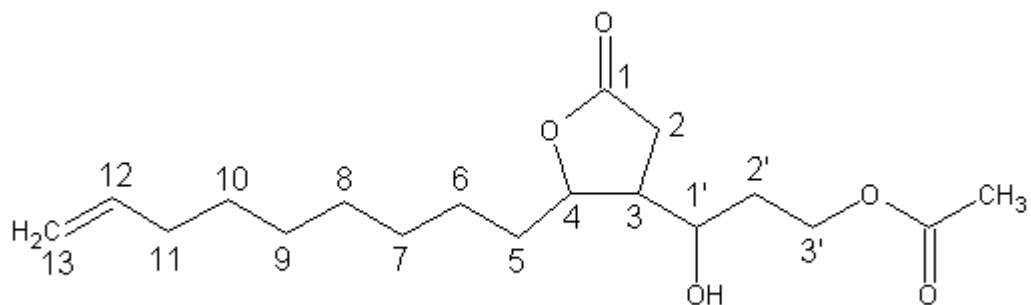


Figura 8: Estrutura proposta para o policetídeo γ -lactônico (FR1D3.34), com base nos experimentos espectroscópicos de RMN 1D e 2D.

No experimento COSY ^1H - ^1H (Figura 17) as correlações entre os átomos de hidrogênio forneceram informações compatíveis com a estrutura proposta para FR1D3.34.

O experimento NOESY (Figura 18) mostrou, entre outras, correlações entre o H-4 (4,37 δ) e H-3 (2,89 δ), e um dos H-2 (2,49 δ). A correlação entre H-1' (3,86 δ) e os átomos de H-5 (1,69; 1,55 δ) sugerem uma relação *cis* entre as cadeias ligadas ao ciclo. Esta conclusão é corroborada pela não observação de correlação entre H-4 e H-1'. A correlação entre o H-4 e um dos átomos de H-2, indica que estes se encontram na mesma face da molécula (Figura 9).

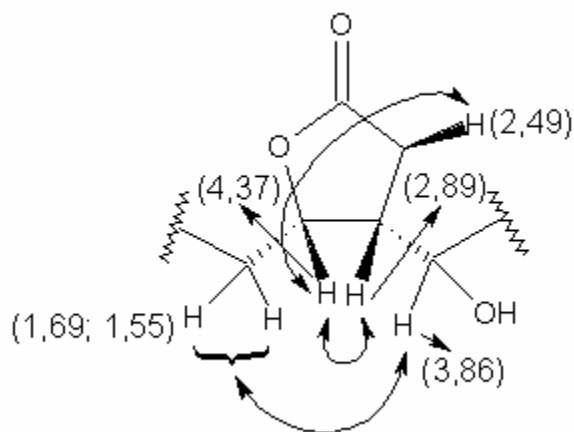


Figura 9: Correlações observadas no experimento NOESY que estabelecem a estereoquímica da estrutura do composto FR1D3.34.

Tabela 11: Dados espectrais de RMN de ^{13}C (75 MHz TMS $\delta = 0$), de ^1H (300 MHz TMS $\delta = 0$) e correlações a longa distância (HMBC) em CDCl_3 do policetídeo γ -lactônico (FR1D3.34).

Policetídeo γ -lactônico (FR1D3.34)			
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, Hz)	HMBC
1	179,72	-	H-2 e 3
2	35,69	2,49 (m) 1,55 (m)	H-3 e 4
3	38,86	2,89 (m)	H-2
4	79,67	4,37 (m)	H-2
5	35,28	-	H-3
6	25,11	1,35 (m) 1,47-1,73 (m)	H-4
7	29,23*	1,23	-
8	28,97*	1,23	-
9	29,29*	1,23	-
10	28,56	1,23	H-13
11	33,68	1,98 (m)	H-12 e 13
12	114,07	4,93 (dl - 17,6) 4,88 (dl - 10,7)	H-13
13	139,06	5,76 (m)	H-12
1'	68,15	3,86 OH - 3,39 (sl)	H-3 e OH
2'	33,98	2,02-1,89 (m)	H-1' e OH
3'	68,36	4,08 (dl - 11,2: 3,7) 3,98 (dl - 11,2: 6,1)	-
CH_3CO_2	171,07	-	H (CH_3CO_2)
CH_3CO_2	20,77	2,05 (s)	-

*Valores intertrocáveis

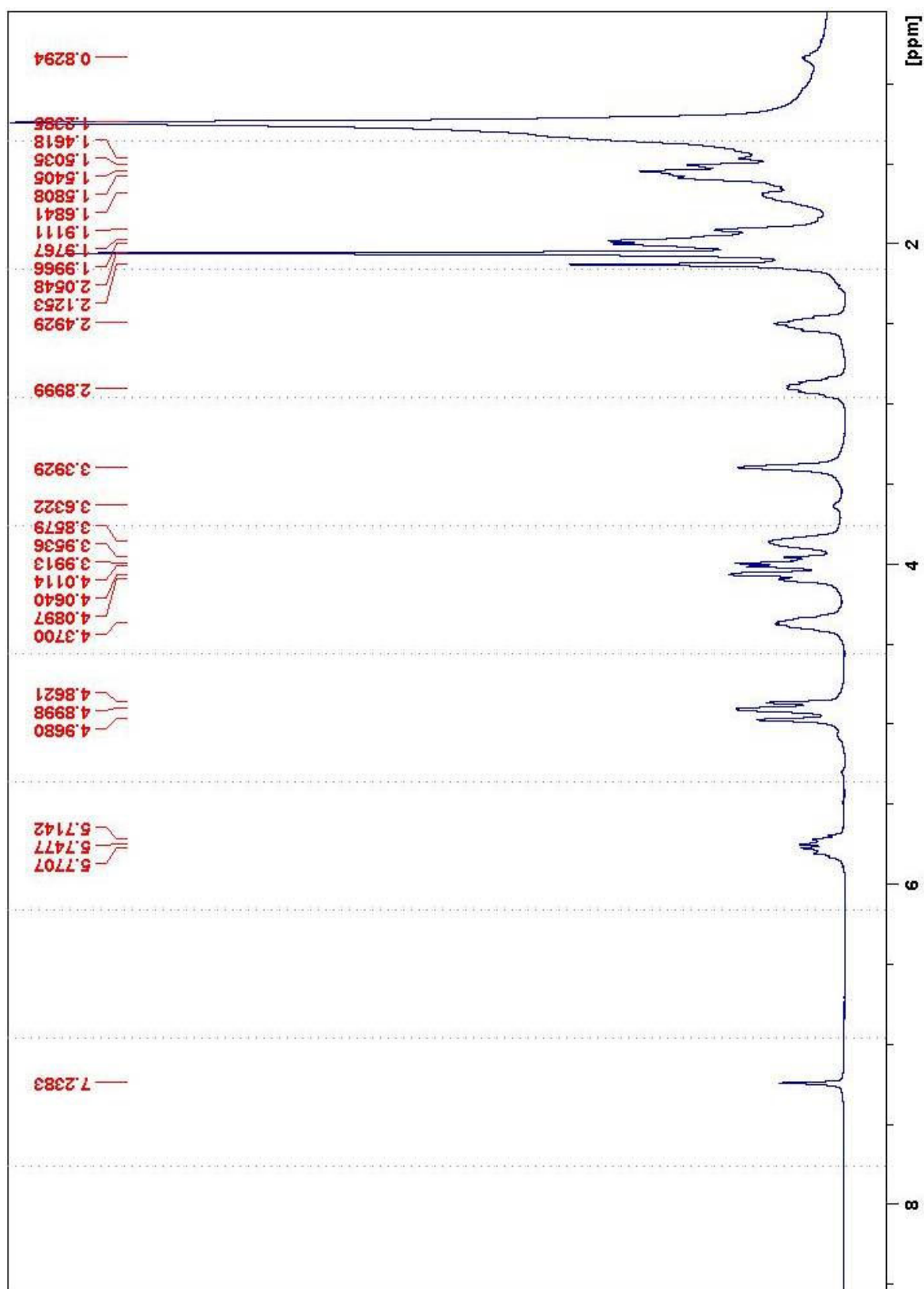


Figura 10: Espectro de RMN de ¹H do policetídeo (FR1D3.34) [300 MHz, CDCl₃].

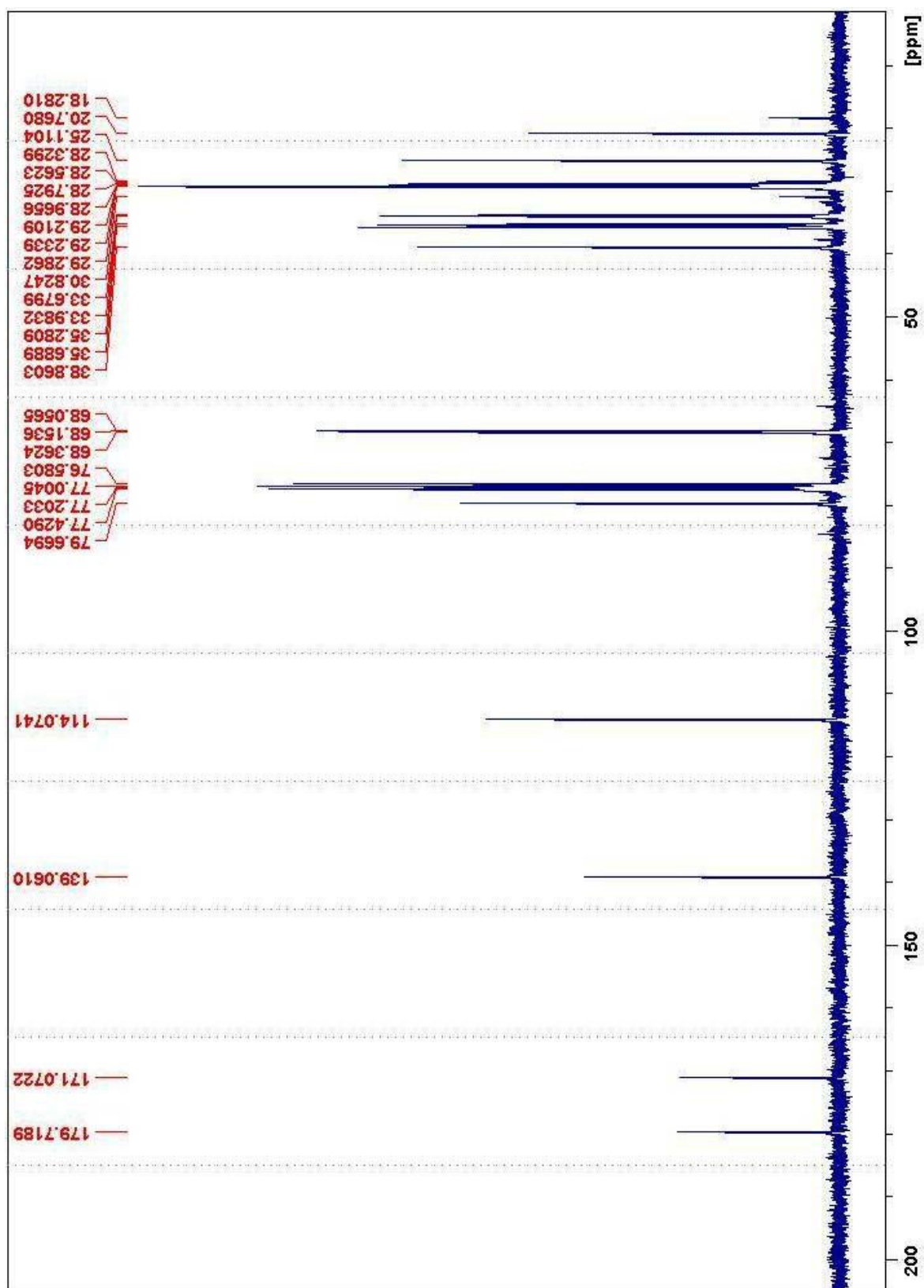


Figura 11: Espectro de RMN de ^{13}C do policetídeo (FR1D3.34) [75 MHz, CDCl_3].

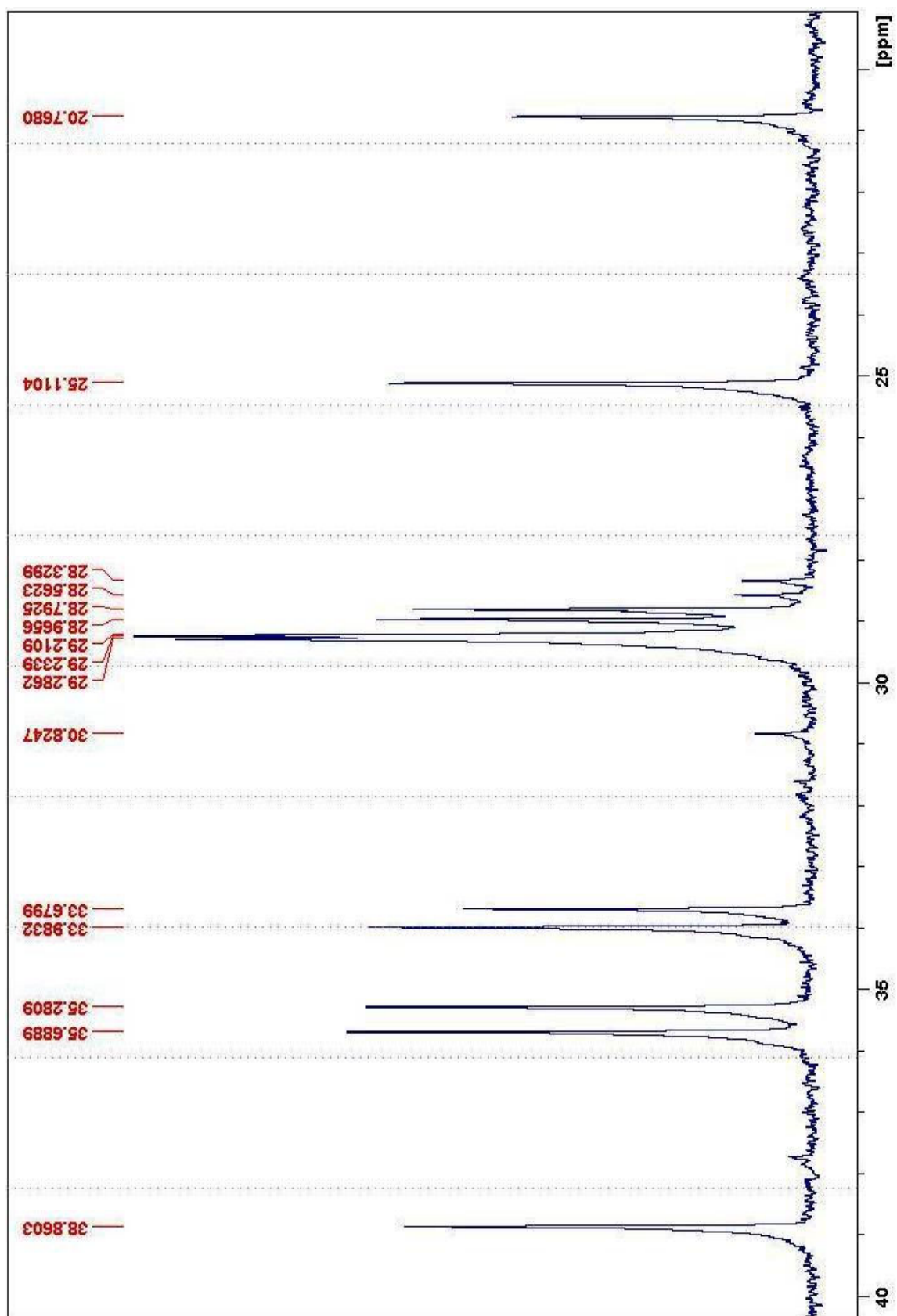


Figura 12: Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do policetídeo (FR1D3.34) [75 MHz, CDCl_3].

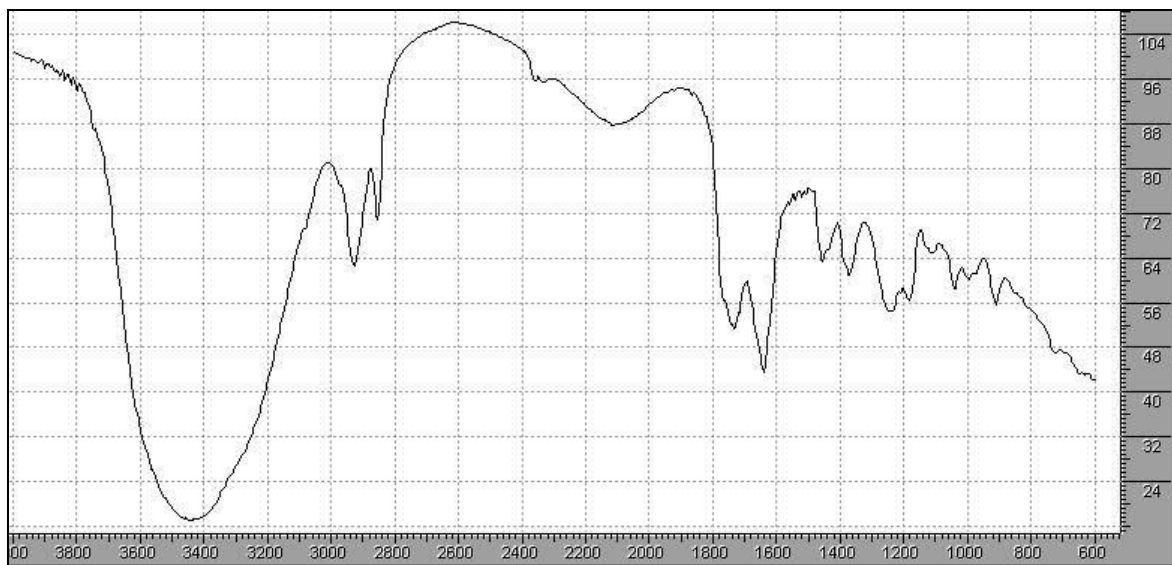


Figura 13: Espectro de Infravermelho do policetídeo (FR1D3.34) [KBr].

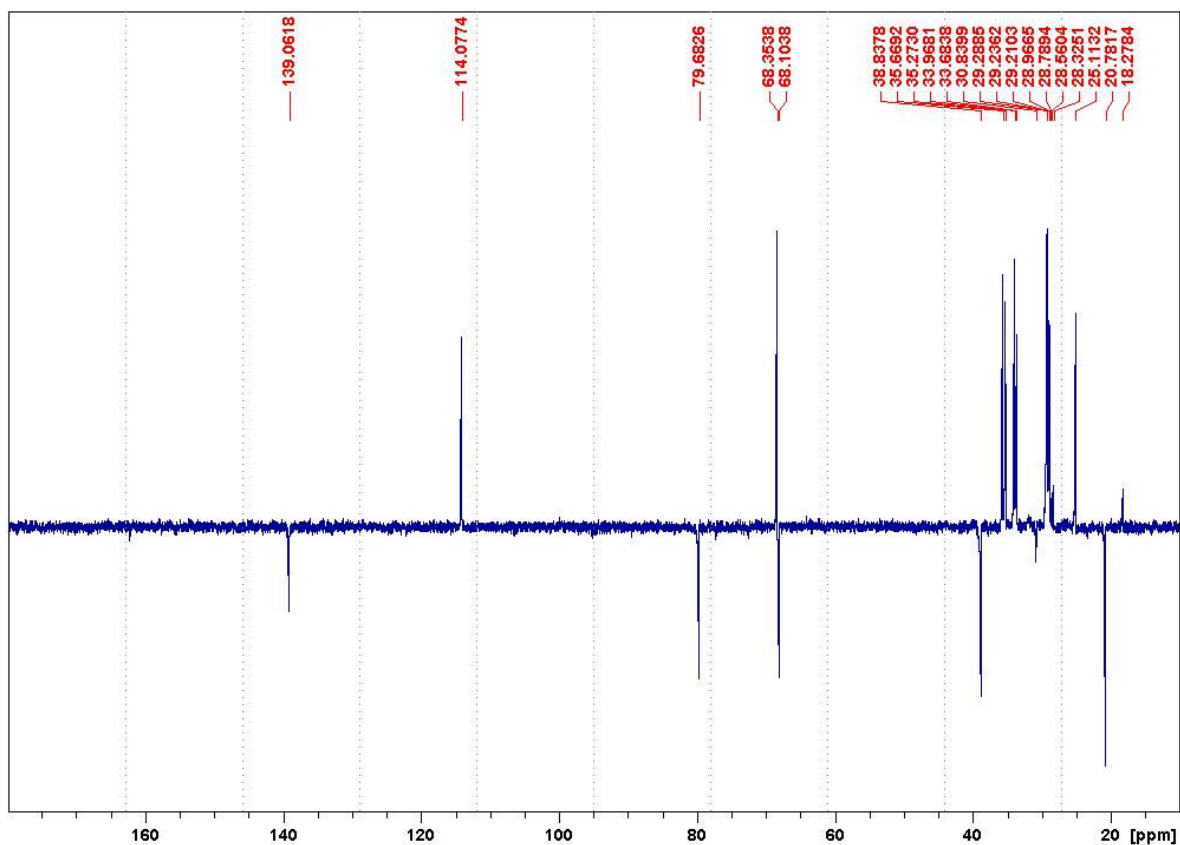


Figura 14: Espectro DEPT 135° do policetídeo (FR1D3.34) [75 MHz, CDCl_3]. DCI_3].

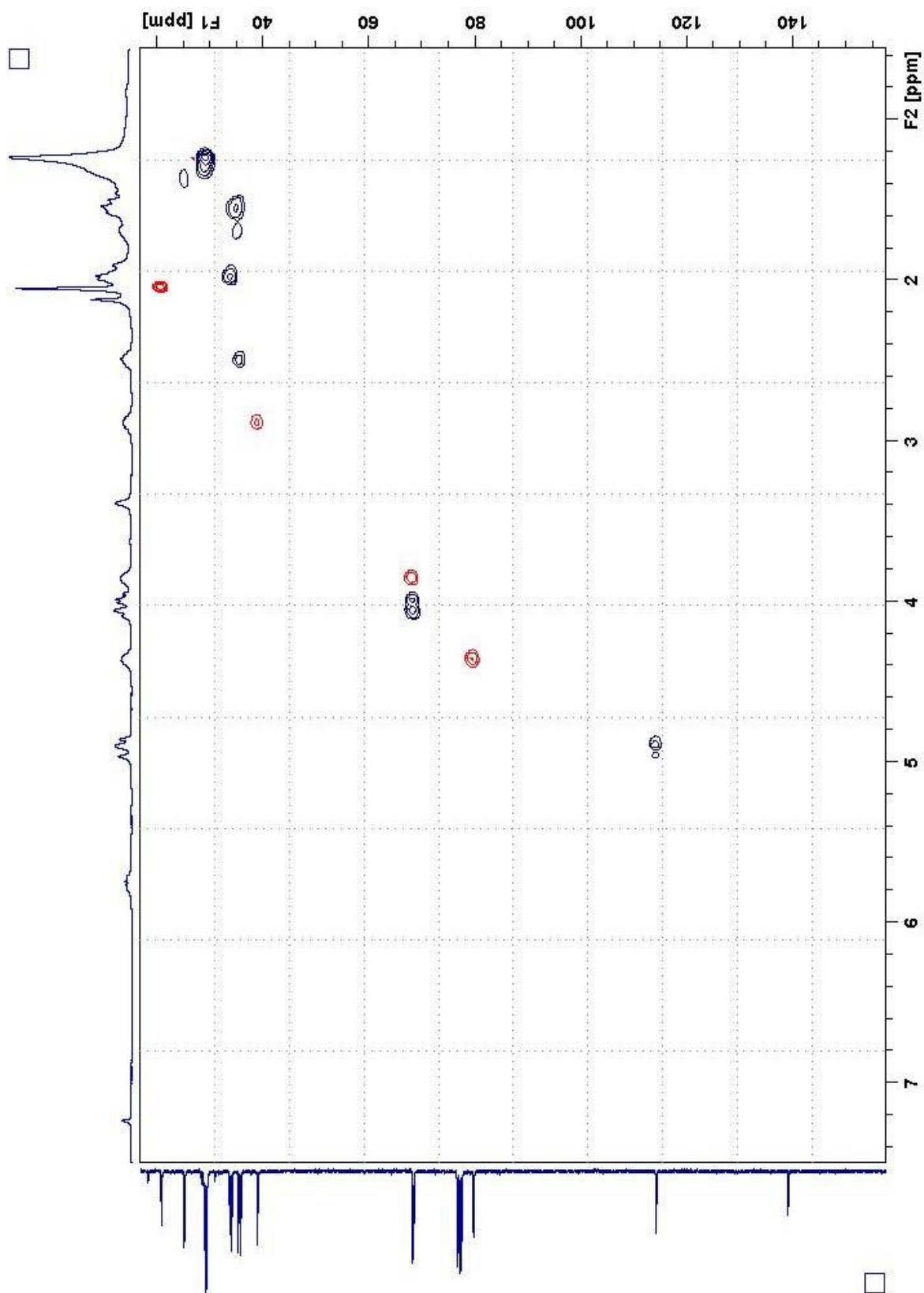


Figura 15: Espectro HSQC do policetídeo (FR1D3.34) [300 MHz/75 MHz, CDCl_3].

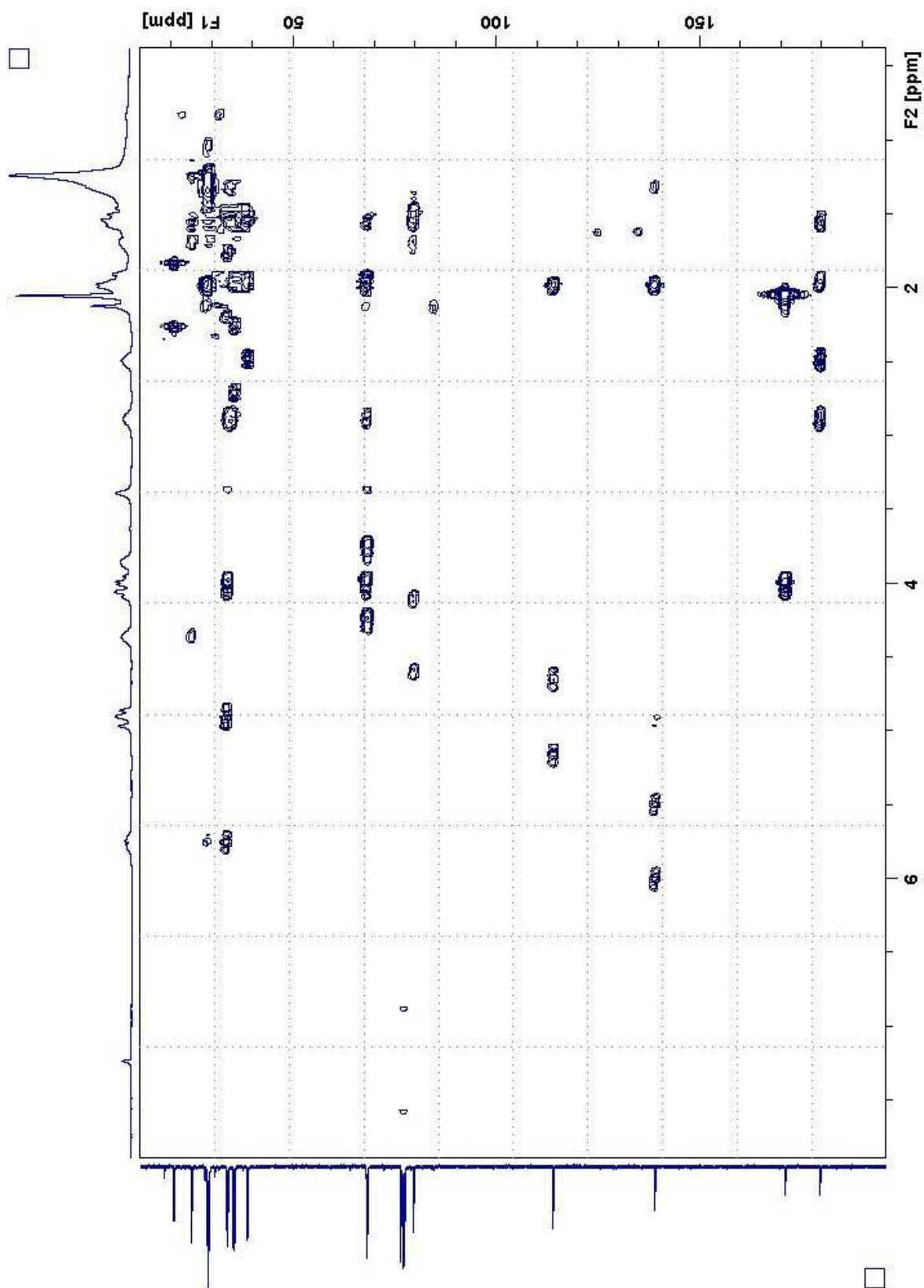


Figura 16: Espectro HMBC do policetídeo (FR1D3.34) [300 MHz/75 MHz, CDCl_3].

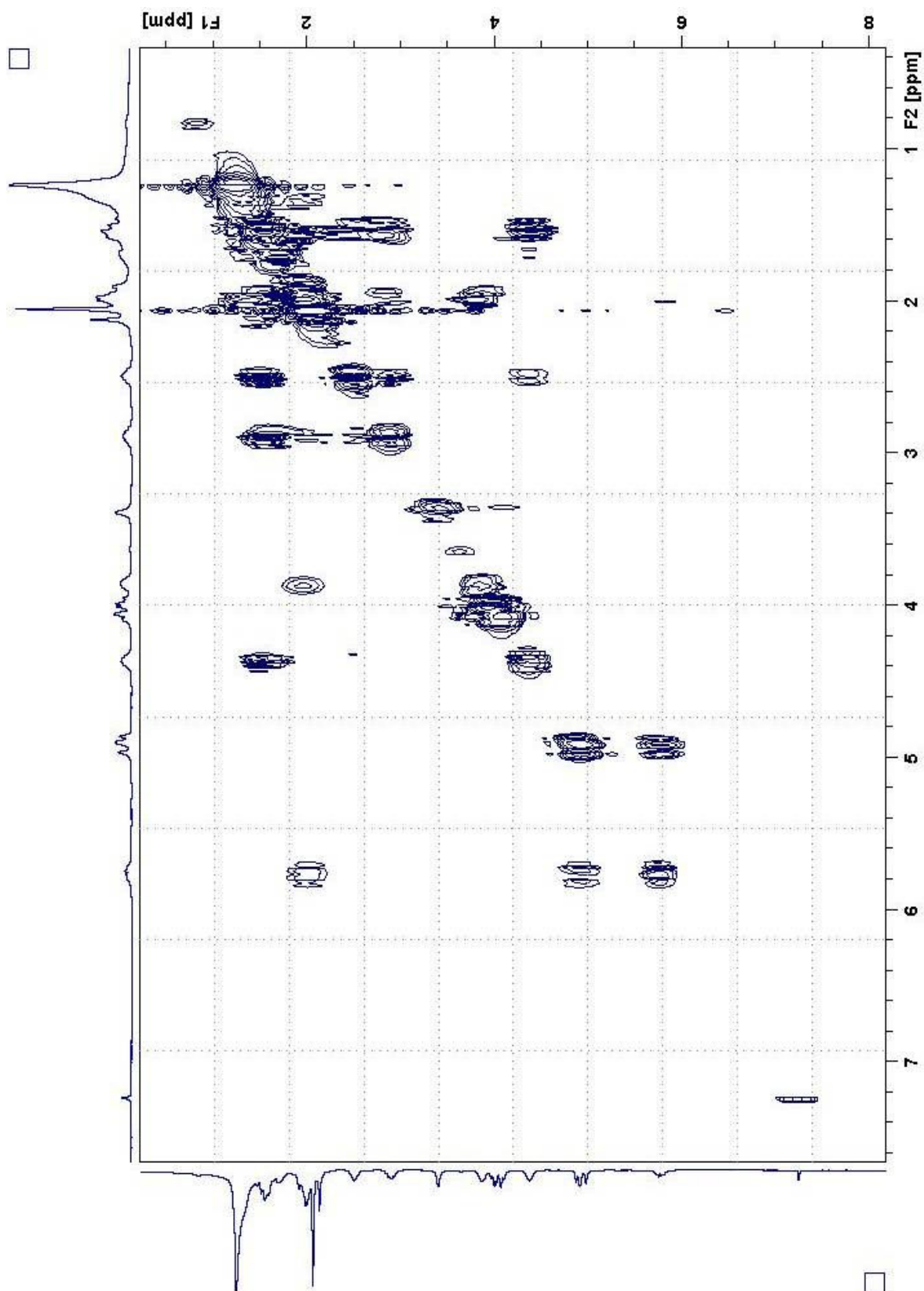


Figura 17: Espectro COSY do policetídeo (FR1D3.34) [300 MHz, CDCl₃].

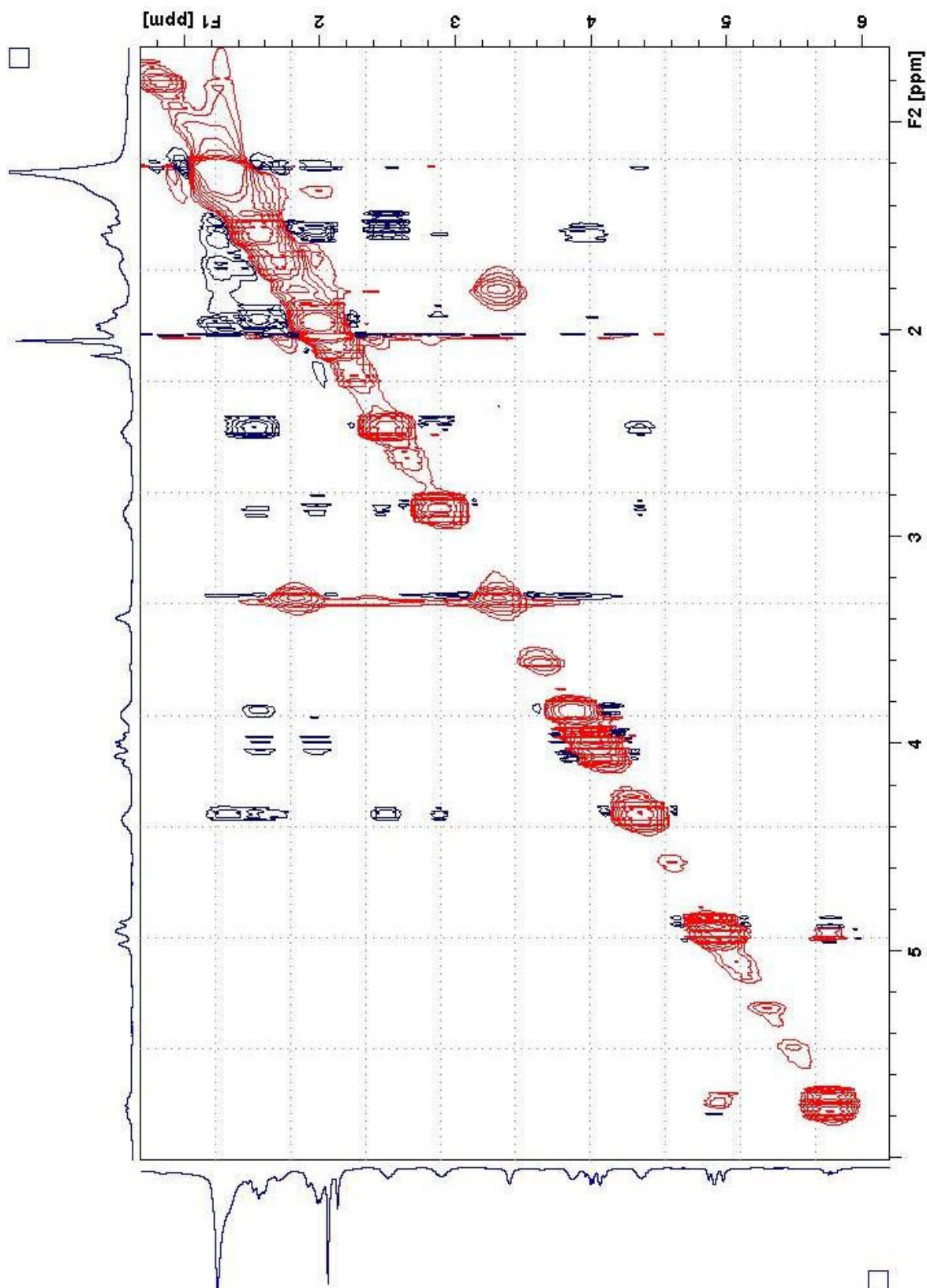


Figura 18: Espectro NOESY^o do policetídeo (FR1D3.34) [300 MHz, CDCl₃].

5.1.2 – Terpenos

Os terpenoides constituem uma vasta família de produtos naturais, cujas estruturas contêm tipicamente um esqueleto carbônico composto de várias unidades isoprenoides. Estas unidades por sua vez são formadas a partir de duas unidades de C₅, o 3,3'-dimetilalil pirofosfato (DMAP) e o 3-isopentenil pirofosfato (IPP). Existem duas vias biossintéticas que descrevem a formação dos terpenoides: a via do mevalonato, cujo intermediário é o ácido (3*R*) mevalônico, e uma via não mevalônica recentemente descoberta, chamada via do ácido pirúvico ou do metil eritritol ou ainda do fosfato de desoxixilulose, que parece ser mais generalizada na natureza do que a primeira (DEWICK, 2002; LOBO & LOURENÇO, 2007).

A condensação “cauda-cabeça” entre as unidades DMAP e IPP, catalisada pela enzima prenil-transferase, leva à formação do geranil pirofosfato (GPP), precursora dos monoterpenos. A condensação daquela cadeia a novas unidades de IPP dá origem sucessivamente às cadeias de farnesil pirofosfato (C₁₅), geranilgeranil pirofosfato (C₂₀) e geranilfarnesil pirofosfato (C₂₅), precursoras dos sesquiterpenos, diterpenos e sesterterpenos, respectivamente. Já a condensação “cauda-cauda” de duas cadeias de farnesil pirofosfato, e a de duas de geranilgeranil pirofosfato, formam cadeias de 30 e 40 carbonos, precursoras dos triterpenos e tetraterpenos respectivamente (Figura 19) [LOBO & LOURENÇO, 2007].

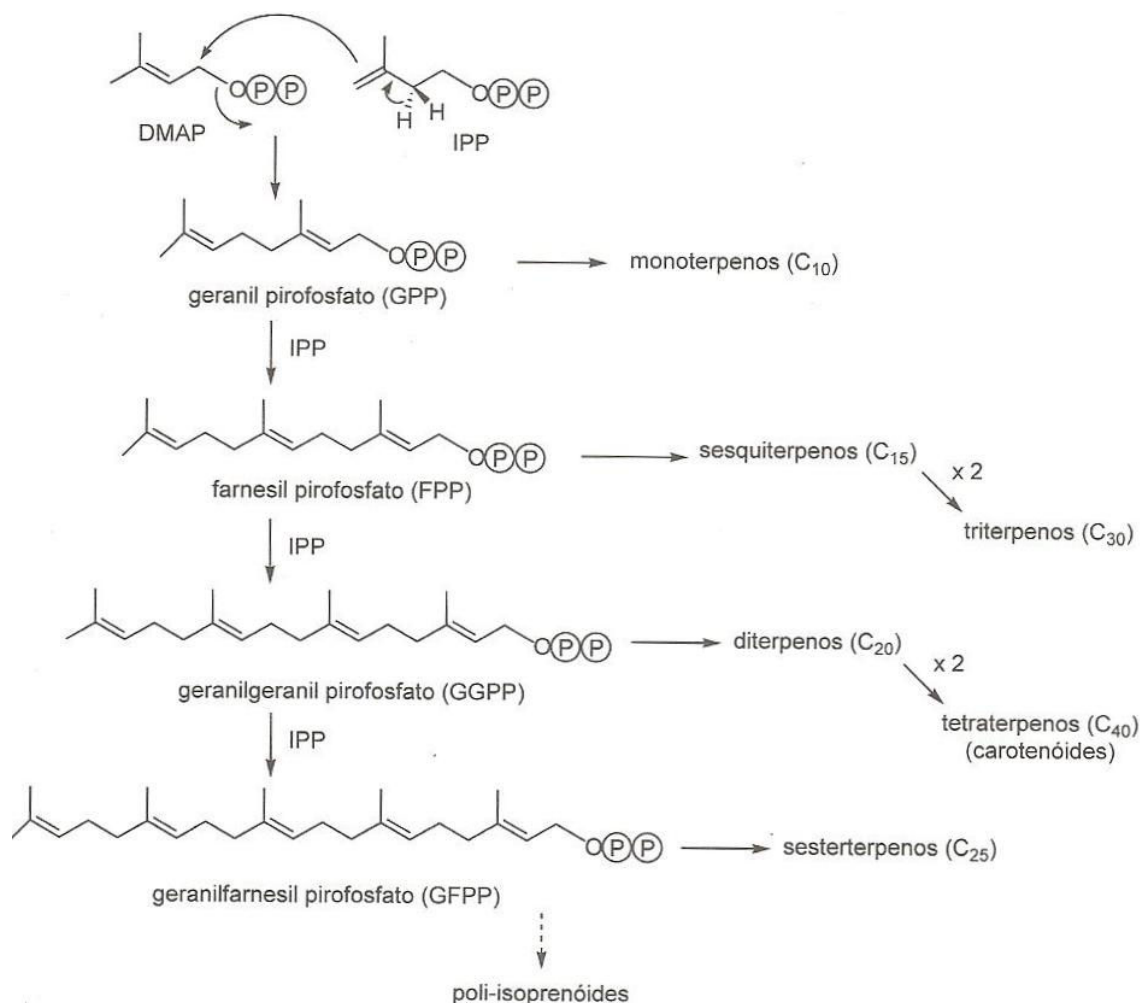
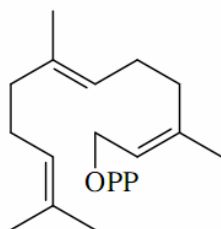


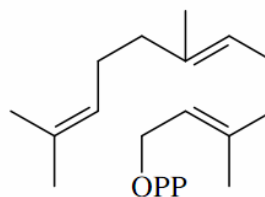
Figura 19: Esquema de formação dos terpenos (extraído de LOBO & LOURENÇO, 2007)

O estudo das folhas de *M. vanderwerffii* possibilitou o isolamento de um sesquiterpeno e um triterpeno (discussão no item 5.1.2.1).

Os sesquiterpenos são uma grande classe de substâncias derivadas da ciclização do pirofosfato de 2-*Z*-6-*E*-farnesila, (**A**) ou pirofosfato de 2-*E*-6-*E*-farnesila (**B**), o que os leva a ter uma diversidade muito grande de esqueletos (LOBO & LOURENÇO, 2007).



A



B

O sesquiterpeno isolado neste trabalho é derivado do isômero 2-*E*-6-*E*-farnesila e apresenta esqueleto carbônico do tipo aromadendrano (Figura 20).

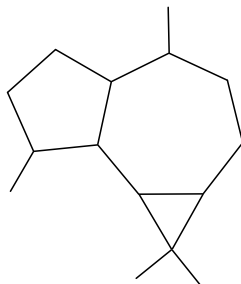


Figura 20: Esqueleto carbônico de um sesquiterpeno do tipo aromadendrano.

Os sesquiterpenos em geral são responsáveis por muitas atividades biológicas, dentre elas antifúngica, antibiótica, anti-inflamatória, anestésica, espasmolítica, sedativa, etc. (HARBORNE & BAXTER, 1995; RAGGI, 2008).

Dentre a ampla variedade de triterpenos, existem alguns que ocorrem com maior frequência nos vegetais. Estes apresentam apenas um grupo funcional no C-3 e são pentacíclicos ou tetracíclicos que contém uma ligação dupla (OLEA & ROQUE, 1990).

O triterpeno isolado neste trabalho é pentacíclico com esqueleto carbônico pertencente ao grupo do ursanos (Figura 21).

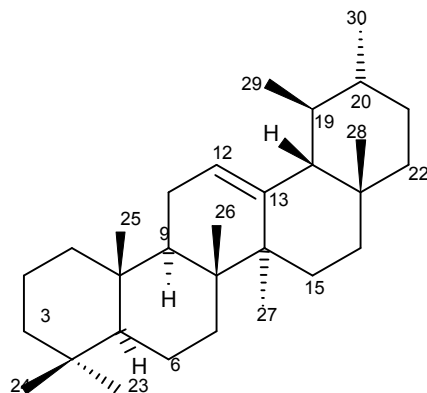


Figura 21: Esqueleto carbônico de um triterpeno do tipo ursano.

Os triterpenoides e seus derivados abrangem uma grande variedade de substâncias de origem vegetal, e apresentam uma gama de funções, dentre eles proteção contra herbívoros, alguns são antimitóticos, e outros ainda atuam na germinação de sementes e na

inibição do crescimento da raiz. Sua importância ecológica como defensivos de plantas está bem estabelecida (HARBORNE, 1993; HARBORNE & BAXTER, 1995).

A família Lauraceae é rica em componentes da classe dos terpenoides, porém não há relatos na literatura que indique o isolamento dos mesmos, no gênero da espécie estudada neste trabalho.

5.1.2.1 – Identificação de terpenos das folhas de *M. vanderwerffii*

5.1.2.1a – Espatuleno (sesquiterpeno)

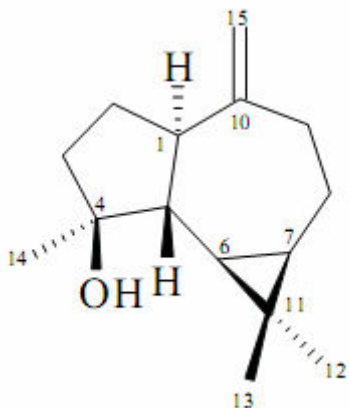


Figura 22: Espatuleno isolado das folhas de *M. vanderwerffii*

A substância “**FR1D1**” (178 mg) de aspecto oleoso, foi obtida da fração FR1D de acordo com os fracionamentos cromatográficos apresentados na parte experimental (item 4.4.1.3).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 23) foram observados sinais em 0,46 e 0,75 δ que foram atribuídos a H-6 e H-7 de sesquiterpenos de esqueleto aromadendrano. Adicionalmente, foi percebida também a presença de dois singletos em 4,68 e 4,72 δ , característicos de átomos de hidrogênio de dupla exocíclica, além de dois singletos em 1,13 (6H) e 1,30 (3H) δ , referentes a três grupos metílicos, sendo o último ligado a carbono oxigenado justificando a maior desproteção (Tabela 12).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 24), juntamente com os sinais evidenciados no DEPT 135° (Figura 25), revelou a presença de quinze átomos de carbono, sendo estes correspondentes a três átomos de carbono metílico, cinco metilênico, quatro metínico e três átomos de carbono quaternário. O sinal em 20,29 δ (C-11), correspondente ao átomo de carbono quaternário do anel ciclopropânico, é evidência para o esqueleto aromadendrano, enquanto o sinal em 80,33 δ (C-4) é sugestivo de um átomo de carbono carbinólico em sistema anelar de cinco membros. Os átomos de carbono que constituem a dupla ligação originam os sinais em 152,63 δ (C-10) e 106,73 δ (C-14), sendo este último sinal de um átomo de carbono metilênico, indicando assim tratar-se de uma dupla ligação exocíclica (Tabela 12).

Através da comparação dos dados de “**FR1D1**” com os dados encontrados na literatura (MOREIRA *et al.*, 2007), confirmou-se que a substância em questão tratava-se do sesquiterpeno espatulenol (Figura 22).

Para o espatulenol são relatadas atividades, antitumoral e também como repelente contra insetos da espécie *Atta cephalopodes*, formiga cortadeira de folhas. Seu mecanismo de ação se dá pelo impedimento do crescimento dos fungos utilizados na alimentação dessas formigas (YOSHIDA, 2007; RAGGI, 2008).

Tabela 12: Dados espectrais de RMN de ^{13}C (75 MHz TMS $\delta = 0$) e de ^1H (300 MHz TMS $\delta = 0$) em $\text{CCl}_4/\text{D}_2\text{O}$ do espatulenol (FR1D1).

Espatulenol (FR1D1)			MOREIRA <i>et al.</i> , 2007	
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, Hz)	$\delta^1\text{H}$ (m)	$\delta^{13}\text{C}$
1	53,6	2,32 (dd - 6,0: 13,0)	2,39 (dd)	54,3
2	26,8	-	-	26,7
3	41,9	-	-	41,7
4	80,3	-	-	80,9
5	53,8	-	-	53,3
6	30,3	0,46 (dd - 9,5: 10,6)	0,46 (dd)	29,9
7	27,6	0,75 (m)	0,72 (ddd)	27,4
8	24,8	-	-	24,8
9	38,9	-	-	38,8
10	152,6	-	-	153,4
11	20,3	-	-	20,2
12	28,9	1,13 (s)	1,05 (s)	28,6
13	16,5	1,13 (s)	1,06 (s)	16,2
14	26,3	Ha – 4,72 (s)	4,69 (s)	26,0
		Hb – 4,68 (s)	4,66 (s)	
15	106,7	1,30 (s)	1,28 (s)	106,2

**ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E CAULE DE UMA NOVA ESPÉCIE CLASSIFICADA COMO *MEZILAUROS*
VANDERWERFFII (LAURACEAE)**

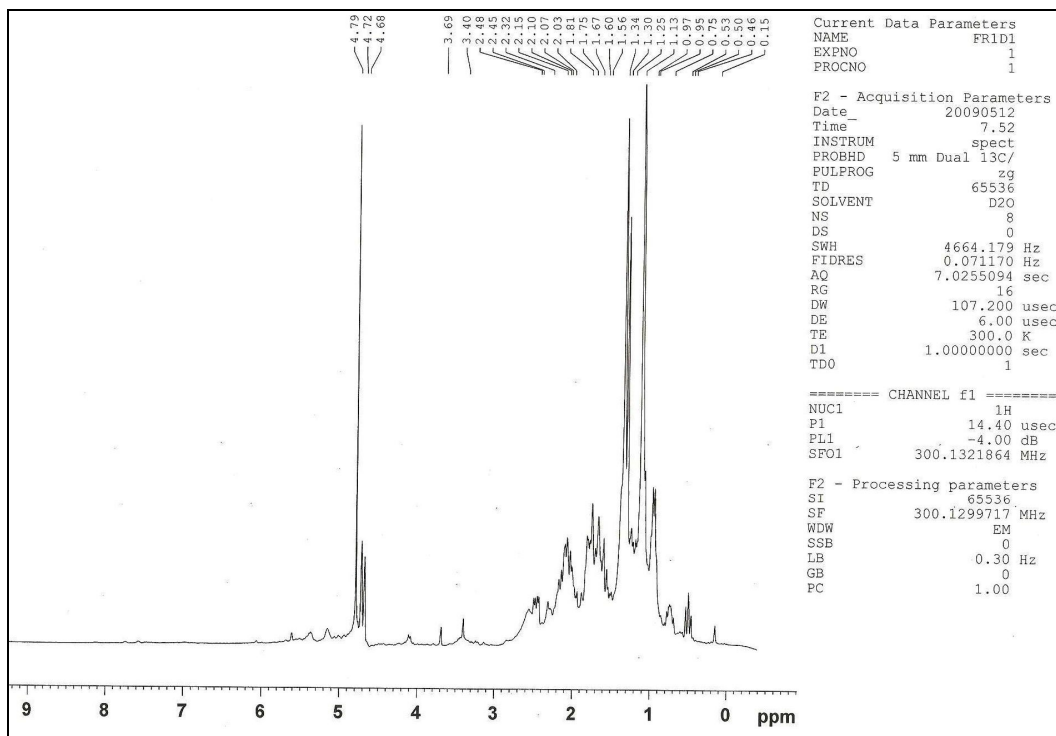


Figura 23: Espectro de RMN de ^1H do spatulenol (FR1D1) [300 MHz, $\text{CCl}_4/\text{D}_2\text{O}$].

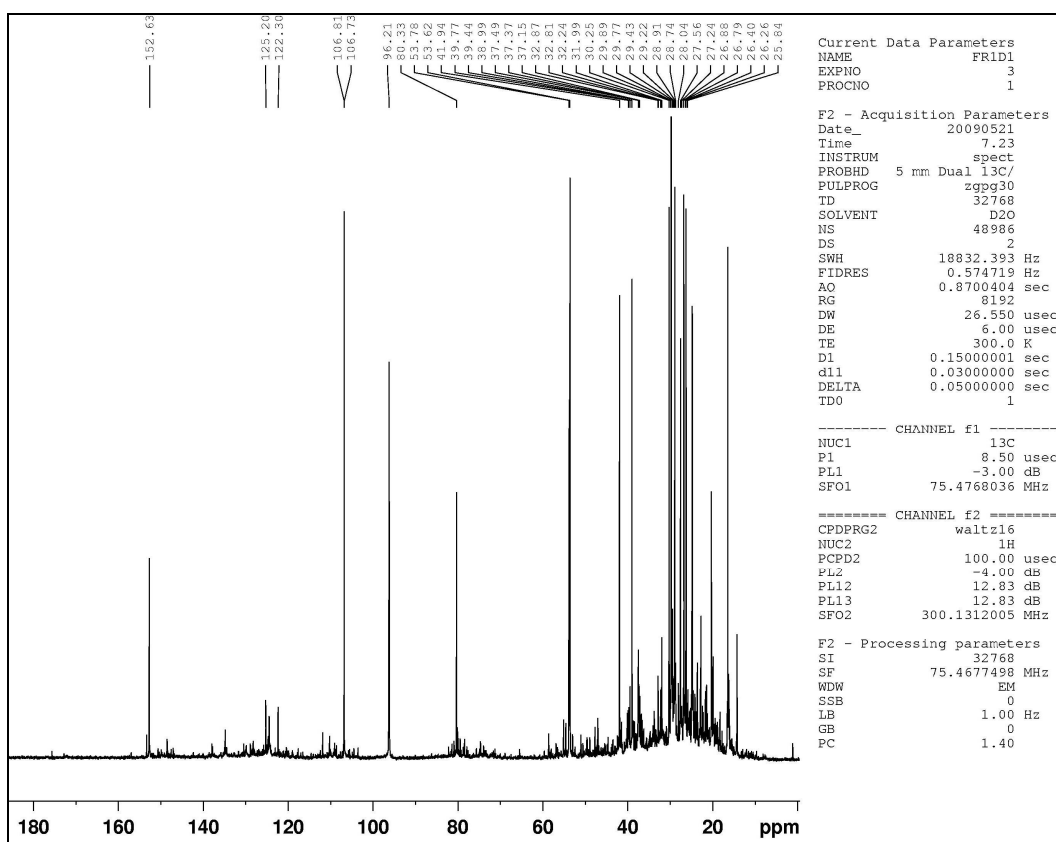


Figura 24: Espectro de RMN de ^{13}C do spatulenol (FR1D1) [75 MHz, $\text{CCl}_4/\text{D}_2\text{O}$].

**ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E CAULE DE UMA NOVA ESPÉCIE CLASSIFICADA COMO *MEZILAUROS*
VANDERWERFFII (LAURACEAE)**

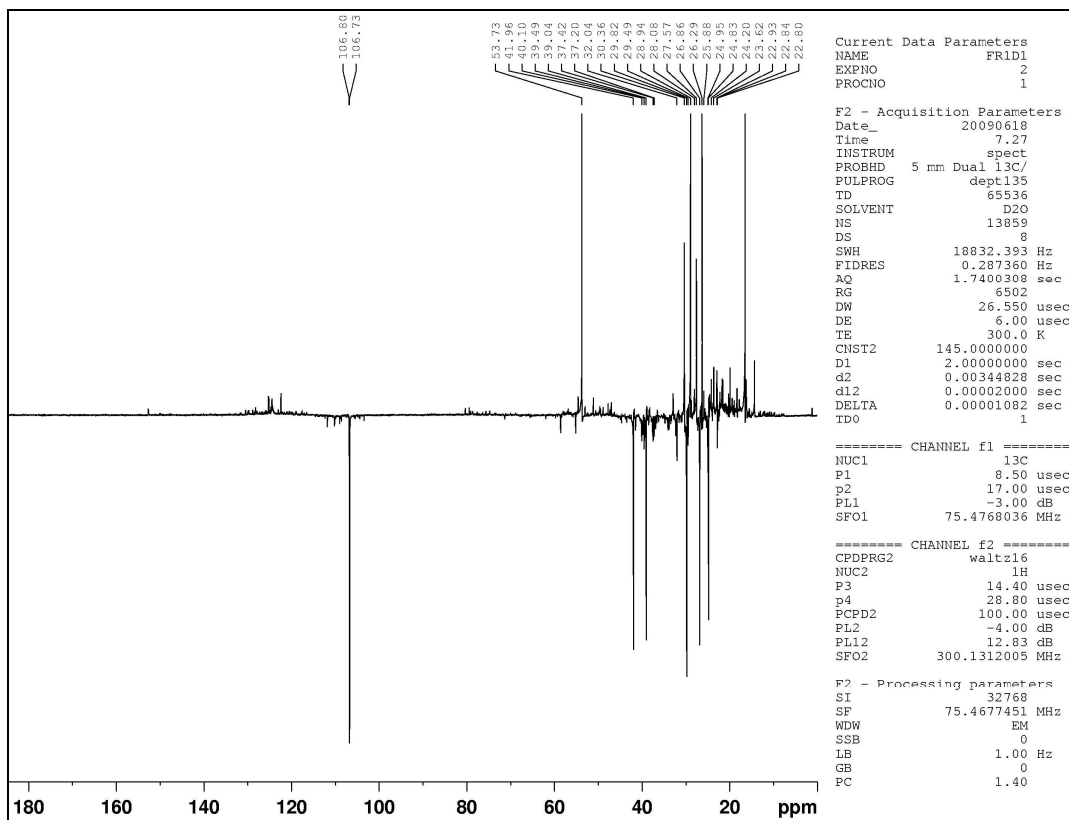


Figura 25: Espectro DEPT 135° do espatulenol (FR1D1) [75 MHz, CCl₄/D₂O].

5.1.2.1b – Ácido ursólico (triterpeno)

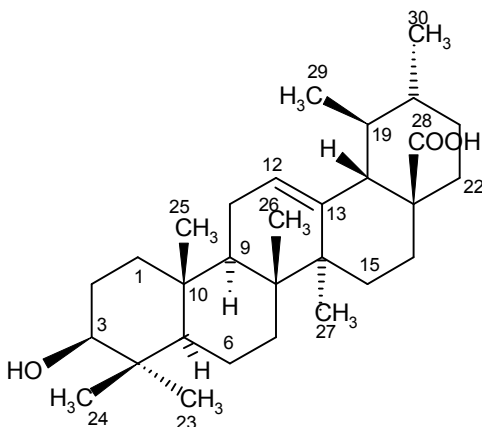


Figura 26: Ácido ursólico isolado das folhas de *M. vanderwerffii*

A substância “**FR1D2**” (592,5 mg xarope) foi obtida da fração FR1D de acordo com os fracionamentos cromatográficos apresentados na parte experimental (item 4.4.1.3).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 27) apesar de bastante confuso, apresentou um perfil típico de substâncias triterpênicas, ou seja, sinais entre 0,82 e 2,05 δ , e também sinais em 5,32 δ e 3,21 δ referentes a átomos de hidrogênio olefínico e carbinólico respectivamente (Tabela 13).

Os dados obtidos dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135° (Figuras 28 e 29) permitiram identificar sinais para um total de trinta átomos de carbono. Dentre esses átomos de carbono foram reconhecidos sinais, cuja natureza e valores de deslocamentos químicos estão coerentes com a presença de átomos de C-sp^2 trissubstituídos, típicos de triterpenos de esqueleto urs-12-eno [125,0 δ (C-12, C) e 139,1 δ (C-13, CH)] [OLEA & ROQUE, 1990]; observou-se também um sinal em 178,0 δ , que foi atribuído ao grupo carboxílico em C-28, e cinco sinais referentes aos grupos de átomos metílicos, sendo eles: 15,9; 16,3; 20,9; 23,4 e 27,9 δ (Tabela 13).

Levando-se em consideração todas as informações fornecidas pelos espectros de RMN (1D) e literatura (RODRIGUES, 1999; OLEA & ROQUE, 1990), a substância que se mostrou compatível com os dados foi um triterpeno pentacíclico da série ursano, o ácido ursólico (ácido 3 β -hidróxi-ursan-12-en-28-oico) [Figura 26].

Tabela 13: Dados espectrais de RMN de ^{13}C (75 MHz TMS $\delta = 0$) em CDCl_3 do ácido ursólico (FR1D2).

Ácido ursólico [#] (FR1D2)		(RODRIGUES, 1999)*		#	*
C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	38,8	38,8	16	24,8	24,3
2	28,4	27,3	17	50,1	48,1
3	79,1	78,8	18	53,4	52,8
4	37,8	38,8	19	37,8	39,1
5	54,3	55,4	20	37,8	38,8
6	18,3	18,4	21	30,3	30,7
7	33,7	33,0	22	37,4	36,7
8	39,0	39,6	23	27,9	28,2
9	48,1	47,5	24	15,9	15,5
10	37,3	37,0	25	15,9	15,7
11	22,7	23,3	26	16,3	16,9
12	125,0	125,5	27	23,4	23,6
13	139,1	138,0	28	178,0	177,7
14	41,7	42,0	29	16,3	16,9
15	29,0	28,2	30	20,7	21,2

**ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E CAULE DE UMA NOVA ESPÉCIE CLASSIFICADA COMO *MEZILAURUS*
VANDERWERFFII (LAURACEAE)**

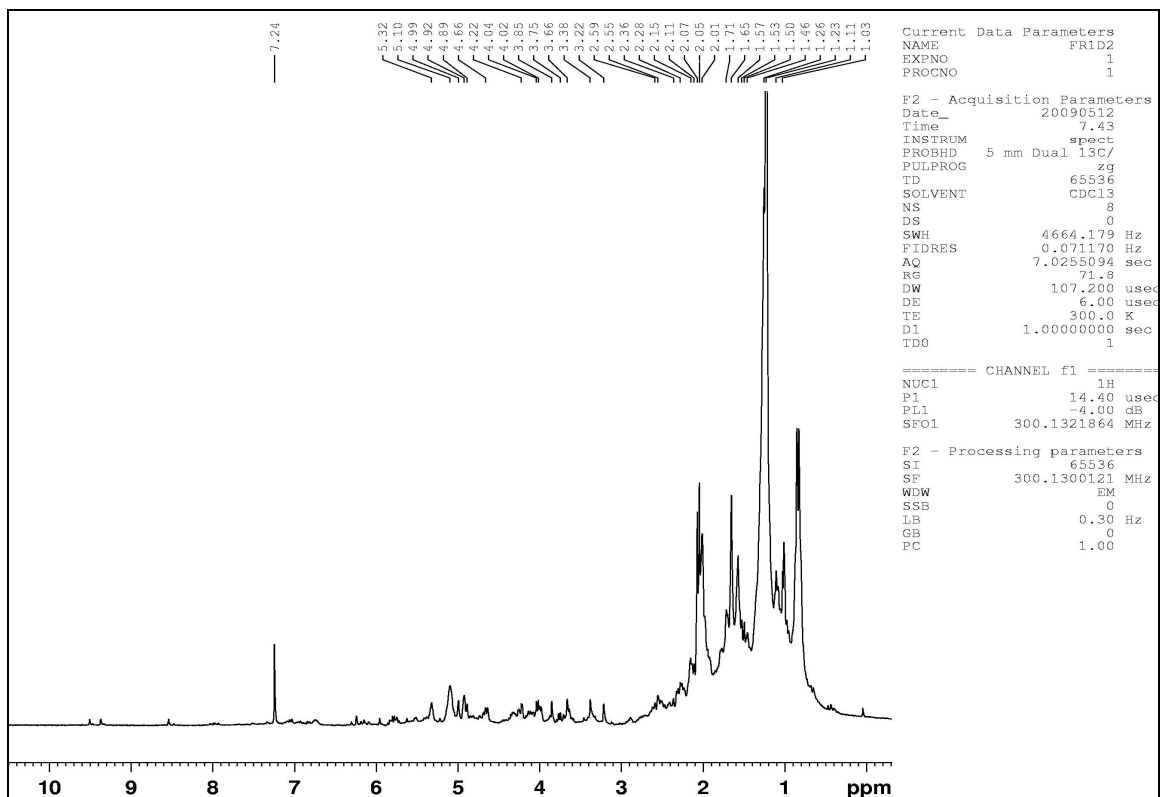


Figura 27: Espectro de RMN de ^1H do ácido ursólico (FR1D2) [300 MHz, CDCl_3].

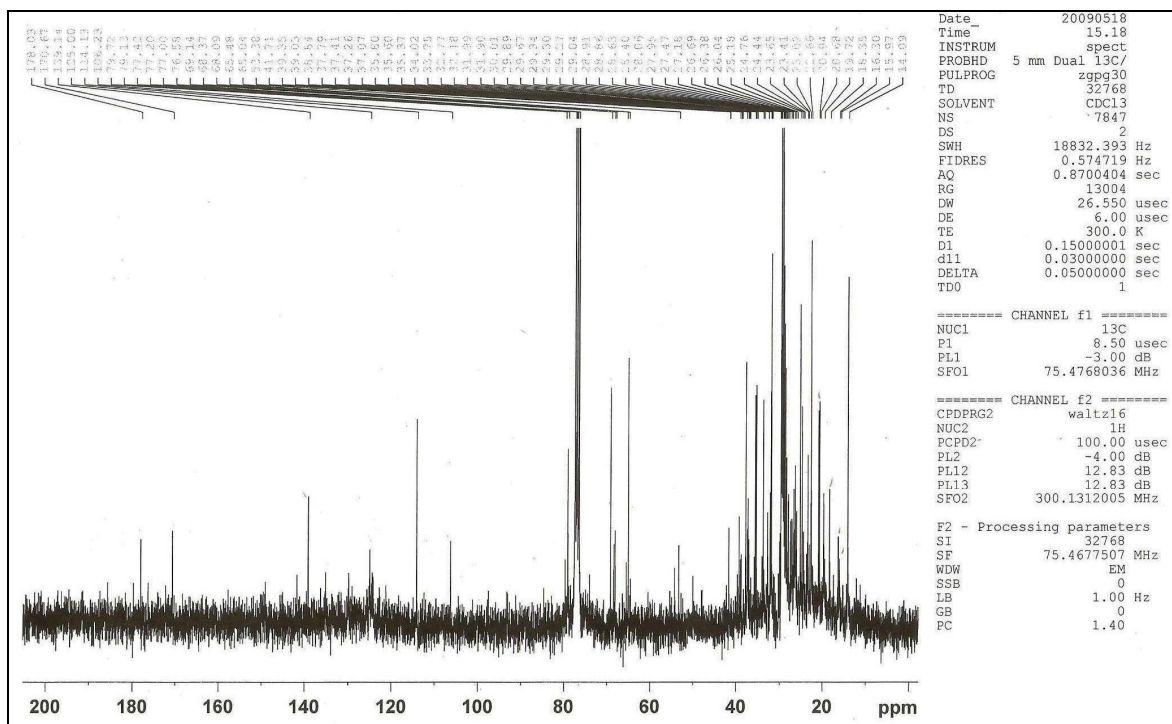


Figura 28: Espectro de RMN de ^{13}C do ácido ursólico (FR1D2) [75 MHz, CDCl_3].

**ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E CAULE DE UMA NOVA ESPÉCIE CLASSIFICADA COMO *MEZILAURUS*
VANDERWERFFII (LAURACEAE)**

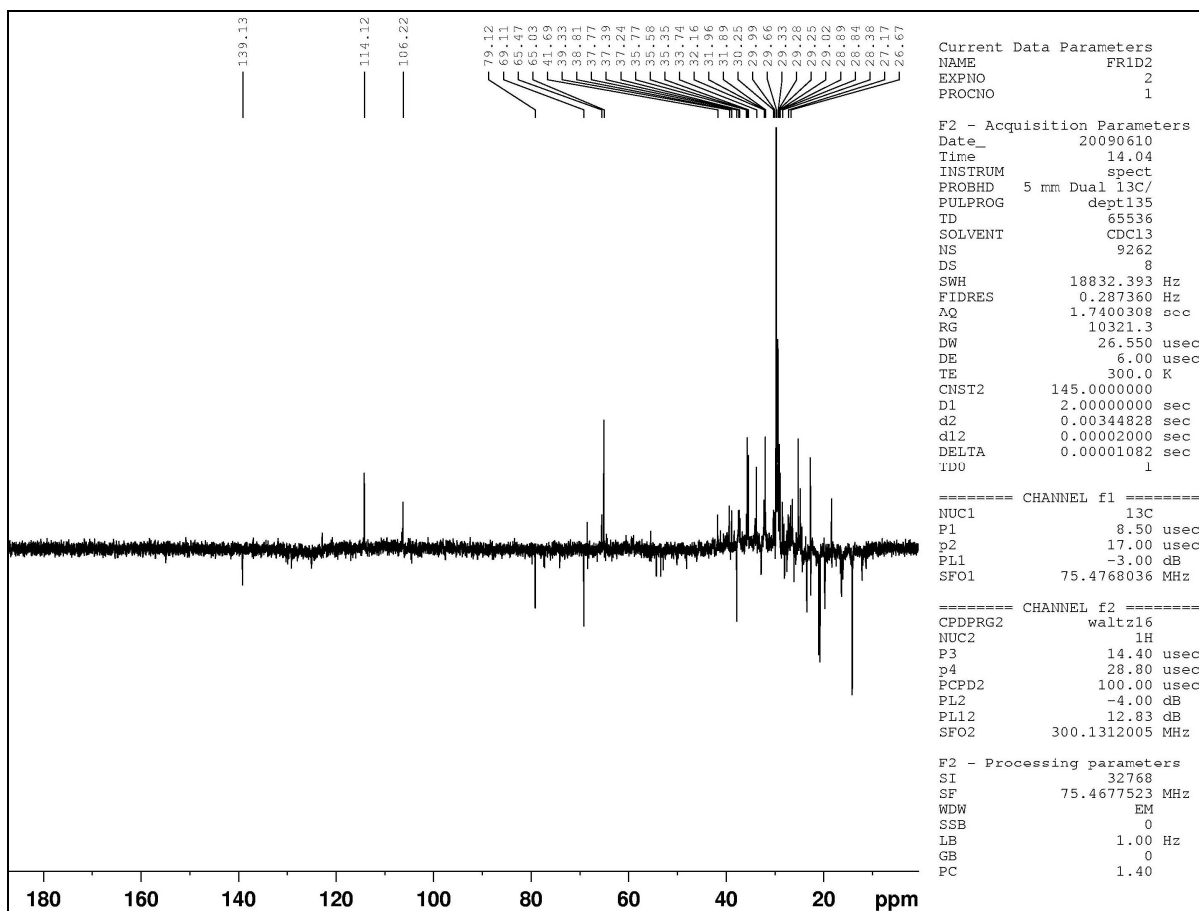


Figura 29: Espectro DEPT 135° do ácido ursólico (FR1D2) [75 MHz, CDCl₃].

5.1.3 – Flavonoides

Os flavonoides constituem uma ampla classe de metabólitos secundários, acumulados por diversas espécies do reino vegetal, com mais de 8.000 compostos diferentes descritos na literatura (PASSAMONTI *et al.*, 2009; SCHIJLEN *et al.*, 2004). Em 1999 havia mais de 6.500 flavonoides naturais identificados (TEILLET *et al.*, 2008). É uma classe quase ausente em algas, ocorrendo alguns representantes em briófitas e existindo somente um relato de ocorrência em fungos. Em pteridófitas também foram encontrados, porém com uma variedade estrutural pequena. Todavia, estão presentes em relativa abundância em angiospermas, com uma diversidade estrutural enorme (SIMÕES *et al.*, 2004).

Estes compostos desempenham papel fundamental na proteção contra agentes oxidantes, e atuam como agentes terapêuticos num elevado número de patologias no ser humano, tais como problemas cardiovasculares, neurodegenerativos, inflamatórios, distúrbios metabólicos e também contra o câncer (PASSAMONTI *et al.*, 2009; PINENT *et al.*, 2008). São compostos fenólicos que apresentam uma estrutura básica conhecida como núcleo flavânico (Figura 30), caracterizada por 15 átomos de carbono (C₆-C₃-C₆), constituída por dois anéis fenil - **A** e **B** - ligados através de uma cadeia de três carbonos (acíclica ou heterocíclica - anel pirano condensado ao anel A, sendo este representado pela letra **C**) [PASSAMONTI *et al.*, 2009; PINENT *et al.*, 2008; LOBO & LOURENÇO, 2007; DEWICK, 2002; SCHIJLEN *et al.*, 2004; HARBORNE, 1982; GEISSMAN & CROUT, 1969].

São divididos em dois grupos principais: flavonoides e isoflavonoides. O esqueleto de quinze carbonos dos isoflavonoides possui arranjo 1,2 difenilpropano, enquanto que os demais flavonoides são arranjos de modo 1,3 difenilpropano. Fazem parte deste último grupo as chalconas, auronas, flavonas, flavonois, antocianinas e antocianidinas (PINENT *et al.*, 2008; TEILLET *et al.*, 2008; SCHIJLEN *et al.*, 2004).

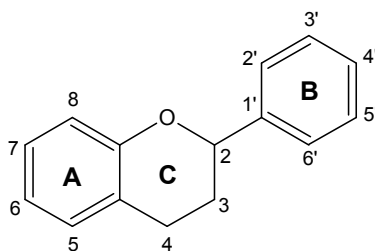


Figura 30: Estrutura e sistema de numeração do núcleo flavânico de arranjo 1,3 difenilpropano

As estruturas básicas dos flavonoides podem ser modificadas e tem vários tipos de substituições. Os núcleos dos inúmeros flavonoides existentes diferem de acordo com o grau e posição de grupos cetona e hidroxila, e com a natureza e extensão da alquilação e glicosilação dos grupos hidroxila. O anel **A** sofre caracteristicamente hidroxilação do tipo resorcinol e o anel **B** é usualmente hidroxilado nas posições C-4', C-3',4', ou C-3',4',5'. As formas conjugadas com açúcares, muito encontradas inclusive, são denominadas de *O*-heterosídeos quando a ligação ocorre por intermédio de uma hidroxila, e de *C*-heterosídeos quando ocorre com um átomo de carbono, porém quando encontradas sem o açúcar são chamadas de aglicona. A glicosilação dos grupos hidroxila acontece preferencialmente nos átomos de carbono cinco e sete, porém mais comumente no três (PASSAMONTI *et al.*, 2009; SCHIJLEN *et al.*, 2004; SIMÕES *et al.*, 2004; PORTO, 2002; GEISSMAN & CROUT, 1969). Além disso, o grau de polimerização acrescenta maior variabilidade para os flavonoides permitindo inúmeras propriedades químicas, físicas e biológicas para estes compostos (PINENT *et al.*, 2008).

Essa grande variabilidade estrutural se deve ao fato de os flavonoides serem construídos através de rotas biossintéticas mista envolvendo blocos provenientes da via do poliacetato e da via do xiquimato. Biossinteticamente, os esqueletos dos vários grupos de flavonoides formam-se sequencialmente como mostrado no esquema da figura 31 de maneira simplificada. (LOBO & LOURENÇO, 2007; SCHIJLEN *et al.*, 2004; DEWICK, 2002).

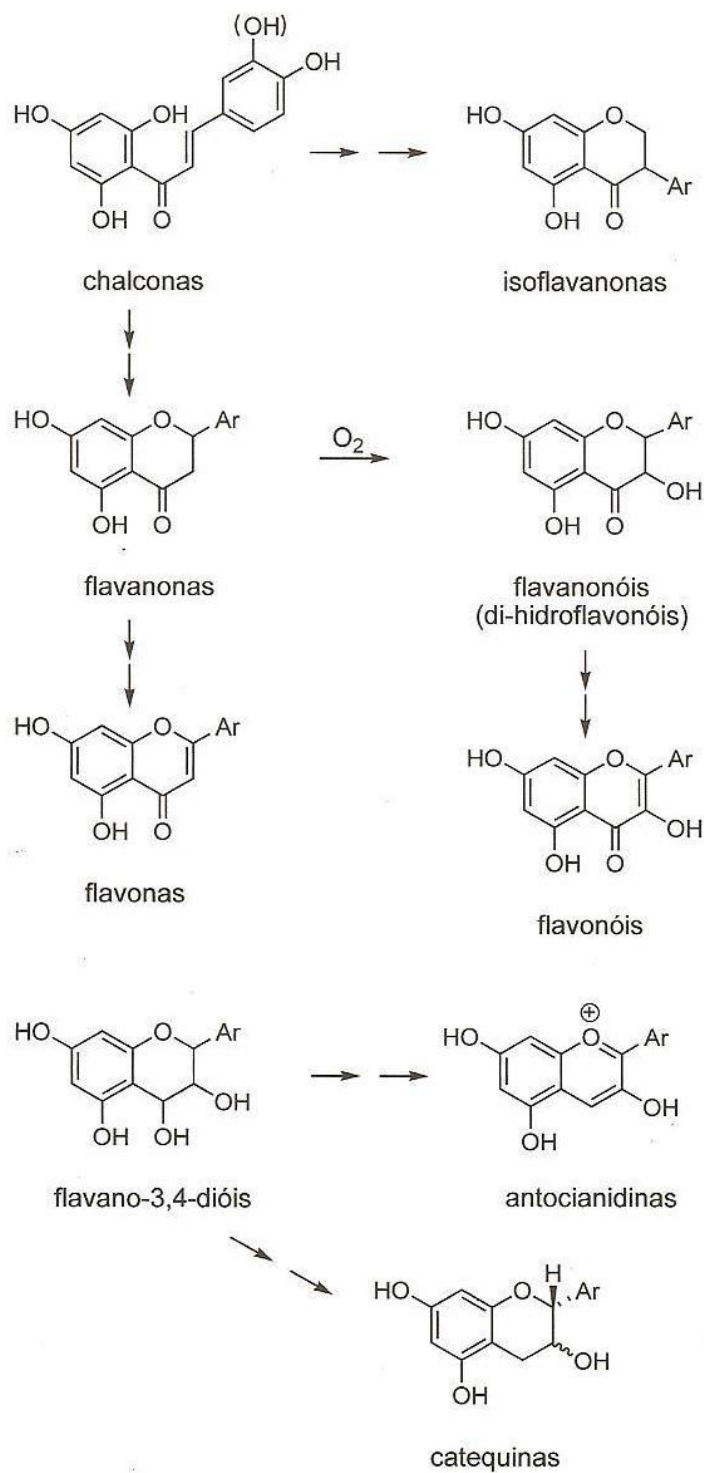


Figura 31: Sequencia de biossíntese simplificada dos vários esqueletos de flavonoides (extraído de LOBO & LOURENÇO, 2007)

Como visto na figura 31, o esqueleto mais simples é o da chalcona, a partir do qual se formam as outras estruturas por reações sucessivas catalisadas por enzimas específicas (LOBO & LOURENÇO, 2007).

Os flavonoides isolados neste trabalho pertencem ao grupo dos flavonois, do tipo quercetina e kaempferol, e dos flavanois, do tipo catequina e epicatequina.

Os **flavonois** são flavonas substituídas na posição C-3 por uma hidroxila, possuem um grupo carboxila na posição C-4, e uma ligação dupla entre as posições C-2 e C-3 do anel C, enquanto que os **flavanois** possuem apenas um grupo hidroxila na posição C-3. A maioria dos flavonois e flavanois, além dos diversos tipos de substituições comuns em flavonoides, é encontrada sob a forma conjugada, ou seja, com um ou mais açúcares ligados aos grupos hidroxilas por uma ligação hemiacetal (SCHIJLEN *et al.*, 2004; SIMÕES *et al.*, 2004).

Neste trabalho também foi isolado um biflavonoide, a procianidina B2 (Figura 32).

Os biflavonoides são formados biossinteticamente através do acoplamento oxidativo de duas unidades de flavonoides com ligação C-C ou C-O-C (DEWICK, 2002). As procianidinas são uma classe de compostos polifenólicos encontradas em várias espécies de plantas e podem estar presentes como monômeros individuais ou, em alguns casos, como unidades oligoméricas. As procianidinas são formadas pela associação de várias unidades monoméricas de catequinas e epicatequinas, e diferem na posição e configuração de suas ligações monoméricas (AGRAWAL, 1989; HARBORNE & MABRY, 1982).

As procianidinas diméricas podem ser classificadas em duas categorias: as do tipo B – dímeros da condensação de unidades de flavanois unidas por ligação C-4→C-8 (B1 a B4) e C-4→C-6 (B5 a B8); e as do tipo A – dímeros que, além da ligação entre flavanos, apresentam ligação éster entre os carbonos C-5 ou C-7 da unidade terminal e o C-2 da unidade superior (AGRAWAL, 1989; HARBORNE & MABRY, 1982; AGRAWAL, 1989).

Estudos de eficiência antioxidante de catequinas e procianidinas, realizados por Porto (2002), sugerem que estas últimas exercem sobretudo, um efeito significativo na capacidade de neutralizar radicais livres, e que o grau de polimerização das mesmas induz um aumento na capacidade antioxidante, porém apenas nos compostos constituídos pela mesma unidade monomérica.

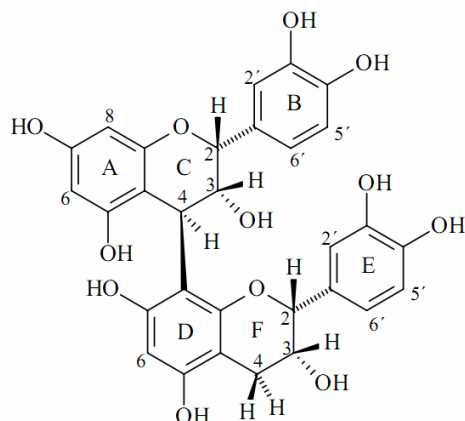
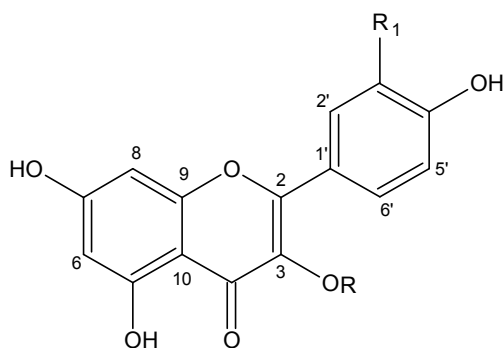


Figura 32: Representação estrutural da procianidina B2 [epicatequina-(4β→8)-epicatequina].

5.1.3.1 – Identificação de flavonoides das folhas de *M. vanderwerffii*



	R	R ₁
a		H
b		H
c		OH
d		OH

Figura 33: Flavonoides isolados das folhas de *M. vanderwerffii*

5.1.3.1a - Kaempferol-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo (a)

A substância “a” (3,9 mg), foi obtida da fração FR1C3.2.41 de acordo com os fracionamentos cromatográficos apresentados na parte experimental (itens 4.4.1.1a e 4.4.1.1b).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 34) do composto “a” apresentou sinais relativos a átomos de hidrogênio aromático de um anel tetrassubstituído em 6,16 e 6,35 (d) δ , e de um anel aromático *para*-substituído em 6,85 e 8,06 (d) δ (Tabela 14).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 35) foram observados dezesseis sinais, os quais com auxílio das informações fornecidas pelo espectro DEPT 135° (Figura 36), foram atribuídos a doze átomos de carbono aromático de anéis tetra e *para*-substituídos, a três átomos de carbono quaternário (sendo dois deles olefínico oxigenado – 158,82 e 135,54 δ – e um carbonílico), a cinco átomos de carbono metínico oxigenado e a um carbono metilênico também oxigenado (Tabela 14).

Os valores de deslocamento químico em 158,82, 135,54 e 179,44 (C-quaternário) δ em conjunto com as correlações observadas no HSQC e HMBC (Figuras 37 e 38), foram consistentes com a presença de uma carbonila cetônica α - β insaturada. Os valores de deslocamento químico relativos aos átomos de carbono do açúcar a 105,09, 73,03, 77,10, 69,99, 75,07 e 61,95 δ foram compatíveis com os da β -D-glucose (HARBORNE & MABRY, 1982) [Tabela 14].

Esses dados juntamente com o aspecto geral do espectro de RMN de ^{13}C , e as informações coletadas na literatura (ANDRADE *et al.*, 1999; HARBORNE & MABRY, 1982; AROT *et al.*, 1996; MULINACCI *et al.*, 1995; VILEGAS *et al.*, 1999) permitiram identificar a substância “a” como sendo um flavonoide glicosilado tipo kaempferol e propor a sua fórmula molecular como sendo $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$. A posição do açúcar no anel foi confirmada através da correlação a longa distância entre o C-3 (δ 135,54) e o átomo de hidrogênio anomérico do açúcar (δ 5,08 - d) no espectro de RMN bidimensional HMBC (Figura 38).

Levando-se em consideração todas as informações fornecidas pelos espectros de RMN (1D e 2D) e literatura, a substância que se mostrou compatível com os dados foi o kaempferol-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo.

Tabela 14: Dados espectrais de RMN de ^{13}C (75 MHz TMS $\delta = 0$), de ^1H (300 MHz TMS $\delta = 0$), e correlações a longa distância (HMBC) em CD_3OD do kaempferol-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo (a).

kaempferol-3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosídeo (a)				HARBORNE & MABRY, 1982
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, Hz)	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$
2	158,82	-	H-2', 3', 5' e 6'	156,3
3	135,54	-	H-1''	133,0
4	179,44	-	H-8	177,4
5	162,94	-	H-6	161,1
6	100,58	6,16 (d - 1,7)	H-8	98,7
7	168,06	-	H-6 e 8	164,1
8	95,23	6,35 (d - 1,7)	H-6	93,6
9	158,67	-	H-8	156,3
10	105,21	-	H-6 e 8	104,1
1'	122,74	-	H-3' e 5'	121,0
2'	132,32	8,06 (d - 7,9)	H-3', 5' e 6'	130,7
3'	116,12	6,85 (d - 7,9)	H-2', 5' e 6'	115,0
4'	161,60	-	H-2', 3', 5' e 6'	159,8
5'	116,12	6,85 (d - 8,0)	H-2', 3' e 6'	115,0
6'	132,32	8,06 (d - 8,0)	H-2', 3' e 5'	130,7
1''	105,09	5,08 (d - 7,5)	-	101,4
2''	73,03	-	-	74,2
3''	77,10	-	-	77,2
4''	69,99	-	-	70,1
5''	75,07	-	-	76,5
6''	61,95	-	-	61,0

**ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E CAULE DE UMA NOVA ESPÉCIE CLASSIFICADA COMO *MEZILAUROS*
VANDERWERFFII (LAURACEAE)**

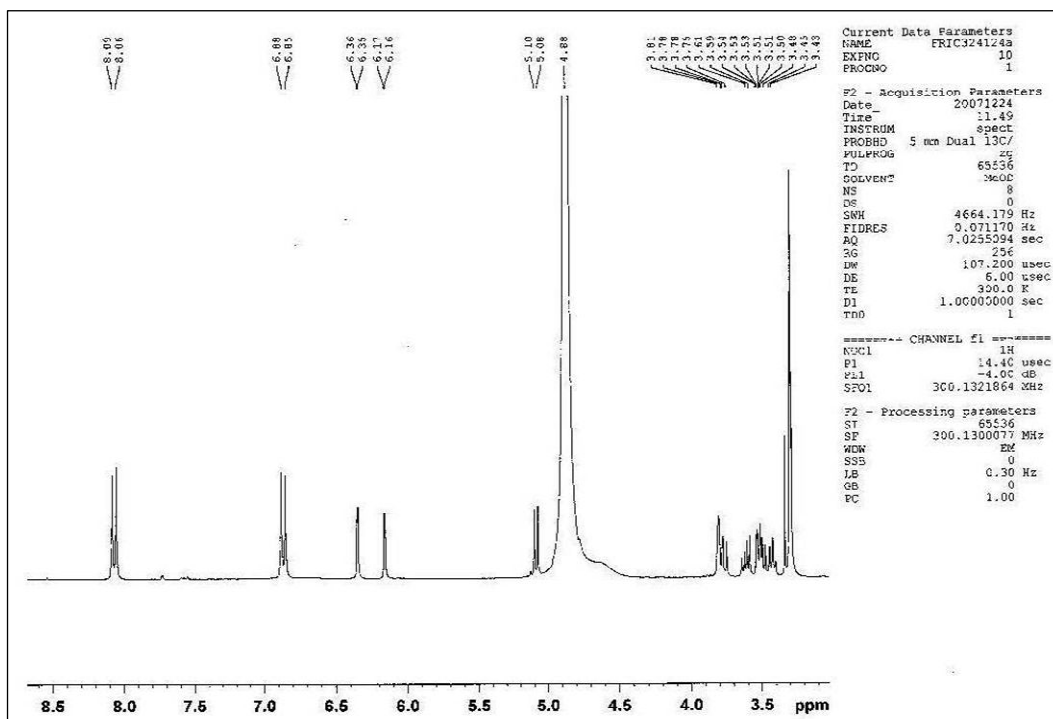


Figura 34: Espectro de RMN de ^1H de kaempferol-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo (a) [300 MHz, CD_3OD].

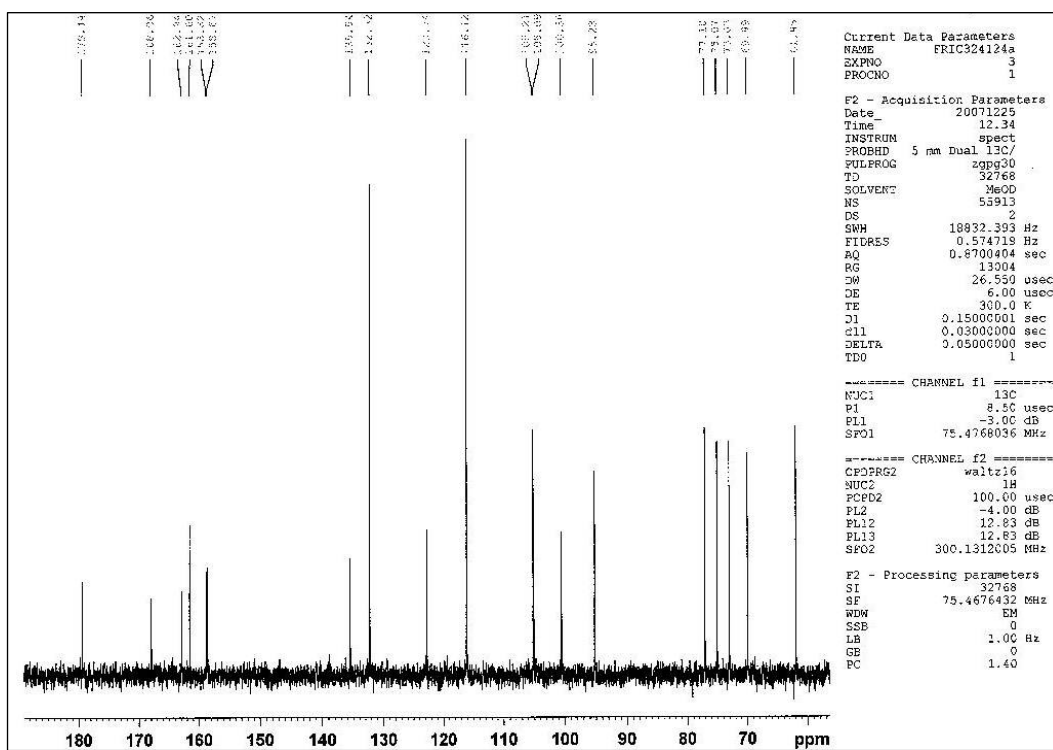


Figura 35: Espectro de RMN de ^{13}C de kaempferol-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo (a) [75 MHz, CD_3OD].

**ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E CAULE DE UMA NOVA ESPÉCIE CLASSIFICADA COMO *MEZILAUROS*
VANDERWERFFII (LAURACEAE)**

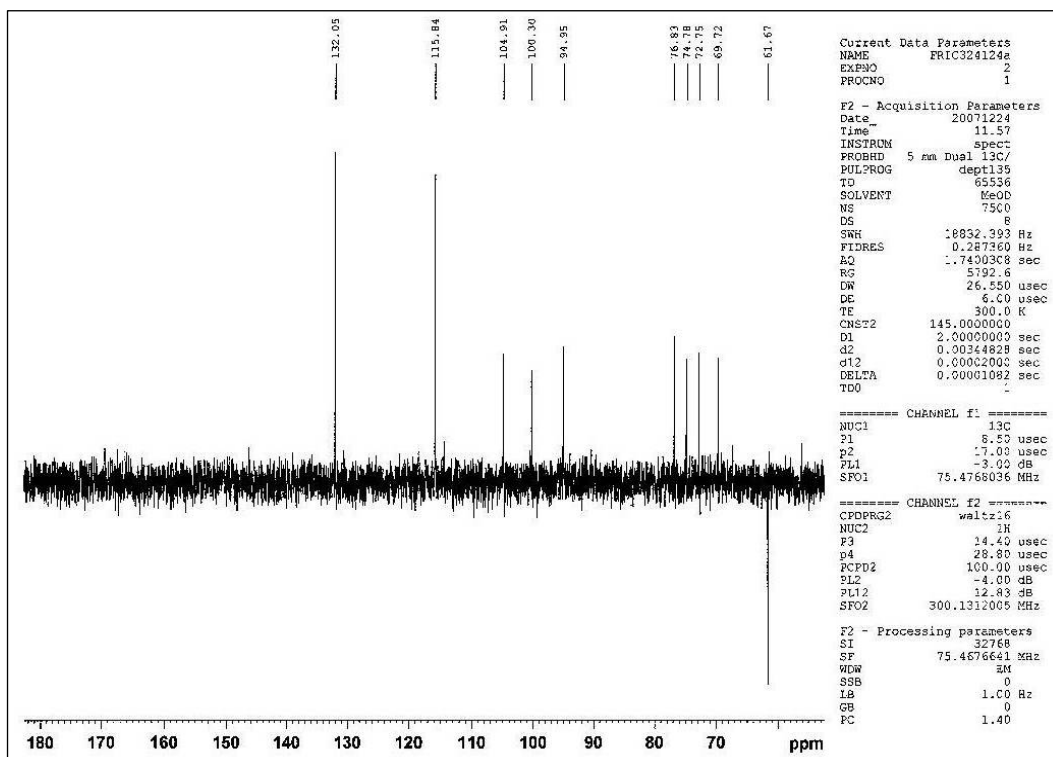


Figura 36: Espectro DEPT 135° de kaempferol-3-*O*-β-D-glucopiranosídeo (a) [75 MHz, CD₃OD].

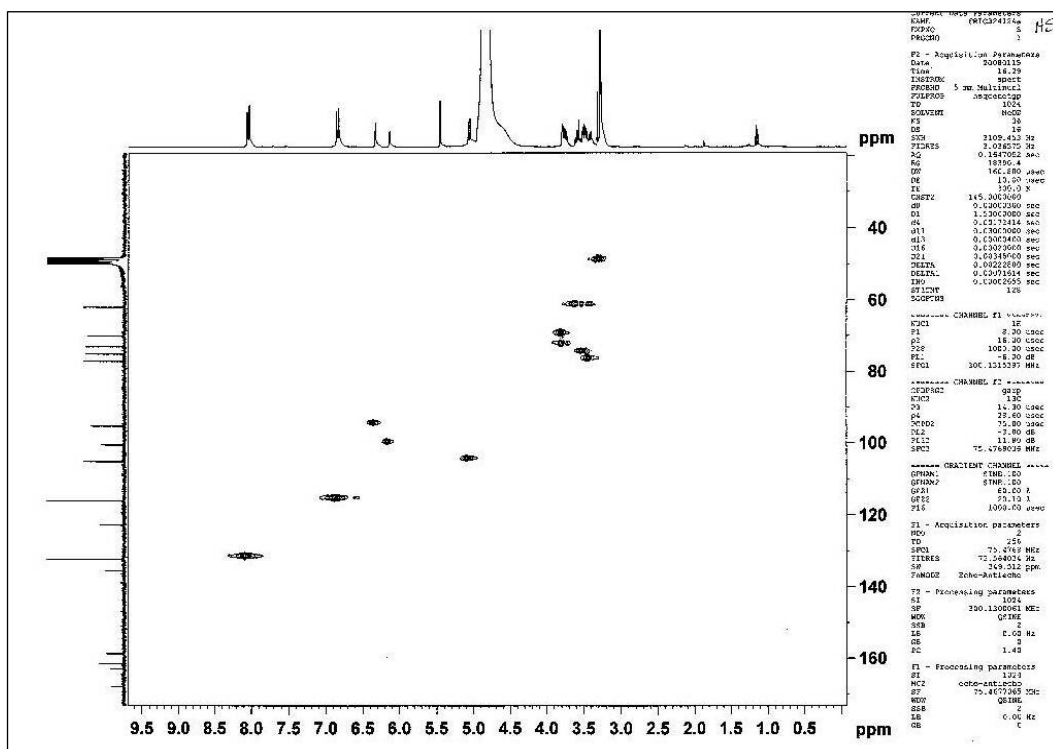


Figura 37: Espectro HSQC de kaempferol-3-*O*-β-D-glucopiranosídeo (a) [300 MHz/75 MHz, CD₃OD].

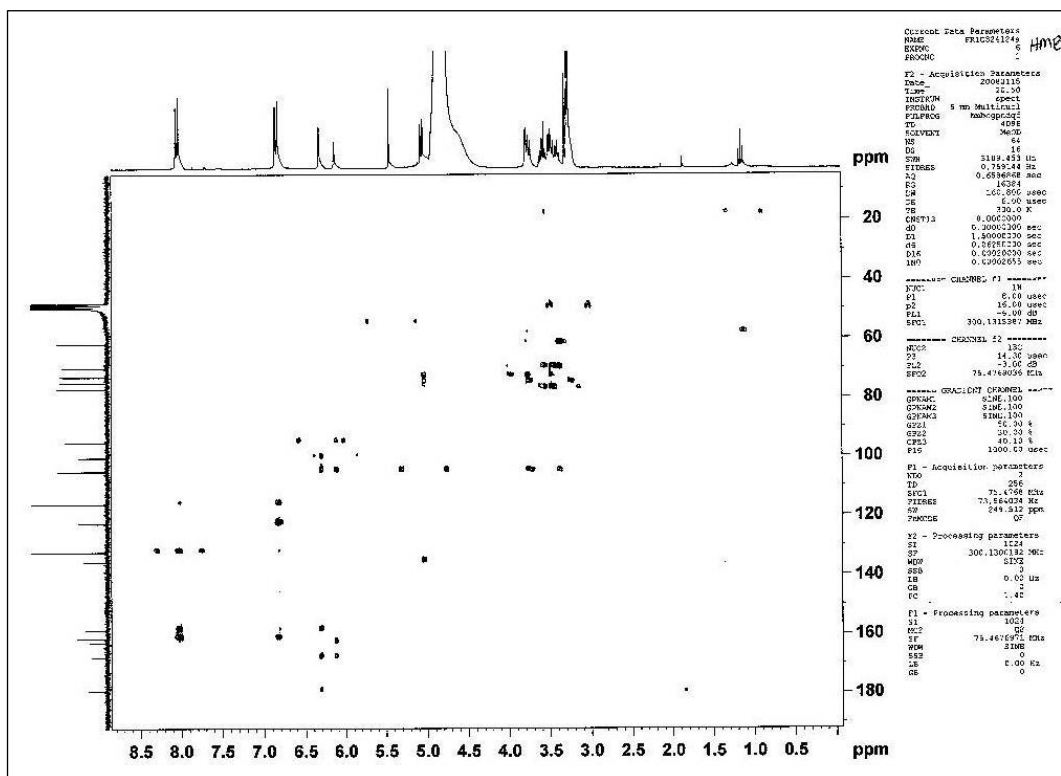


Figura 38: Espectro HMBC de kaempferol-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo (a) [300 MHz/75 MHz, CD₃OD].

5.1.3.1b - kaempferol-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (b)

A substância “b” (6,8 mg) foi obtida da fração FR1C3.2.41 de acordo com os fracionamentos cromatográficos apresentados na parte experimental (itens 4.4.1.1a e 4.4.1.1b).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 39) do composto “b” apresentou sinais relativos a átomos de hidrogênio aromático de um anel tetrassubstituído em 6,16 e 6,32 (d) δ , e de um anel aromático *para*-substituído em 6,89 e 7,72 (d) δ (Tabela 15).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 40) foram observados dezessete sinais, os quais com auxílio das informações fornecidas pelo espectro DEPT 135° (Figura 41), foram atribuídos a doze átomos de carbono aromático de anéis tetra e *para*-substituídos, a três átomos de carbono quaternário (sendo dois deles olefínico oxigenado – 159,14 e 136,14 - e um carbonílico), a cinco átomos de carbono metínico oxigenado e a um carbono metílico (Tabela 15).

Os valores de deslocamento químico em 159,14, 136,14 e 179,50 δ (C-quaternário) em conjunto com as correlações observadas no HSQC e HMBC (Figura 42 e 43), foram consistentes com a presença de uma carbonila cetônica α - β insaturada. Os valores de deslocamento químico relativos aos átomos de carbono do açúcar a 103,51, 72,14, 71,93, 73,21, 72,02 e 17,37 δ foram compatíveis com os da α -L-rhamnose (HARBORNE & MABRY, 1982) [Tabela 15].

Esses dados juntamente com o aspecto geral do espectro de RMN de ^{13}C , e as informações coletadas na literatura (ANDRADE *et al.*, 1999; HARBORNE & MABRY, 1982; AROT *et al.*, 1996; MULINACCI *et al.*, 1995; VILEGAS *et al.*, 1999) permitiram identificar a substância “b” como sendo um flavonoide glicosilado tipo kaempferol e propor a sua fórmula molecular como sendo $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$. A posição do açúcar no anel foi confirmada através da correlação a longa distância entre o C-3 (δ 136,14) e o átomo de hidrogênio anomérico do açúcar (δ 5,35 -d) no espectro de RMN bidimensional HMBC (Figura 43).

Levando-se em consideração todas as informações fornecidas pelos espectros de RMN (1D e 2D) e literatura, a substância que se mostrou compatível com os dados foi o kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo.

Tabela 15: Dados espectrais de RMN de ^{13}C (75 MHz TMS $\delta = 0$), de ^1H (300 MHz TMS $\delta = 0$) e correlações a longa distância (HMBC) em CD_3OD do kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (b).

kaempferol-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopiranosídeo (b)				HARBORNE & MABRY, 1982
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, Hz)	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$
2	159,14	-	H-2', 3', 5' e 6'	156,3
3	136,14	-	H-1''	133,0
4	179,50	-	H-8	177,4
5	163,17	-	H-6	161,1
6	100,23	6,16 (d - 1,5)	H-8	98,7
7	167,03	-	H-6 e 8	164,1
8	95,03	6,32 (d - 1,5)	H-6	93,6
9	158,64	-	H-8	156,3
10	105,61	-	H-6 e 8	104,1
1'	122,68	-	H-3' e 5'	121,0
2'	131,87	7,72 (d - 7,5)	H-3', 5' e 6'	130,7
3'	116,54	6,89 (d - 7,5)	H-2', 5' e 6'	115,0
4'	161,60	-	H-2', 3', 5' e 6'	159,8
5'	116,54	6,89 (d - 7,7)	H-2', 3' e 6'	115,0
6'	131,87	7,72 (d - 7,7)	H-2', 3' e 5'	130,7
1''	103,51	5,35 (d - 1,7)	-	95,0
2''	72,14	4,20 (dd - 1,7: 3,6)	H-1'', 4'' e 5''	71,9
3''	71,93	3,68 (dd - 3,6: 9,2)	H-2'', 4'' e 5''	71,1
4''	73,21	3,32 (dd - 9,2: 9,2)	H-2'', 3'', 5'' e 6''	73,3
5''	72,02	4,20 (dd - 6,0: 9,2)	H-1'', 2'', 4'' e 6''	69,4
6''	17,37	0,89 (d - 6,0)	H-4''	18,0

**ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E CAULE DE UMA NOVA ESPÉCIE CLASSIFICADA COMO *MEZILAUROS*
VANDERWERFFII (LAURACEAE)**

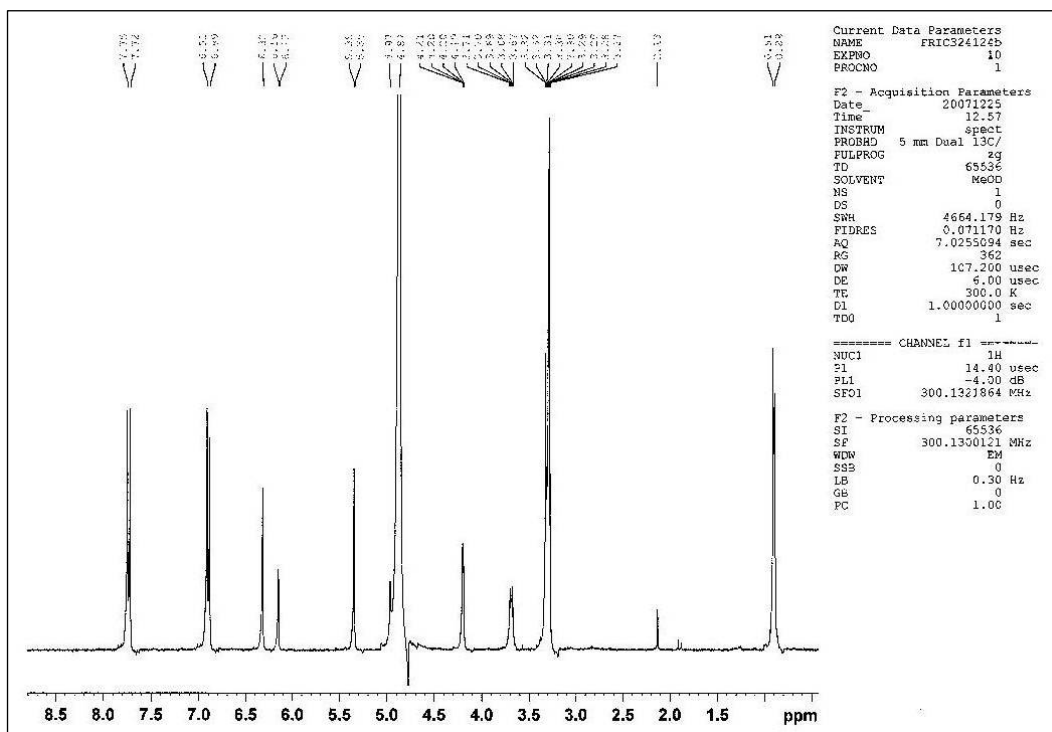


Figura 39: Espectro de RMN de ^1H de kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (b) [300 MHz, CD_3OD].

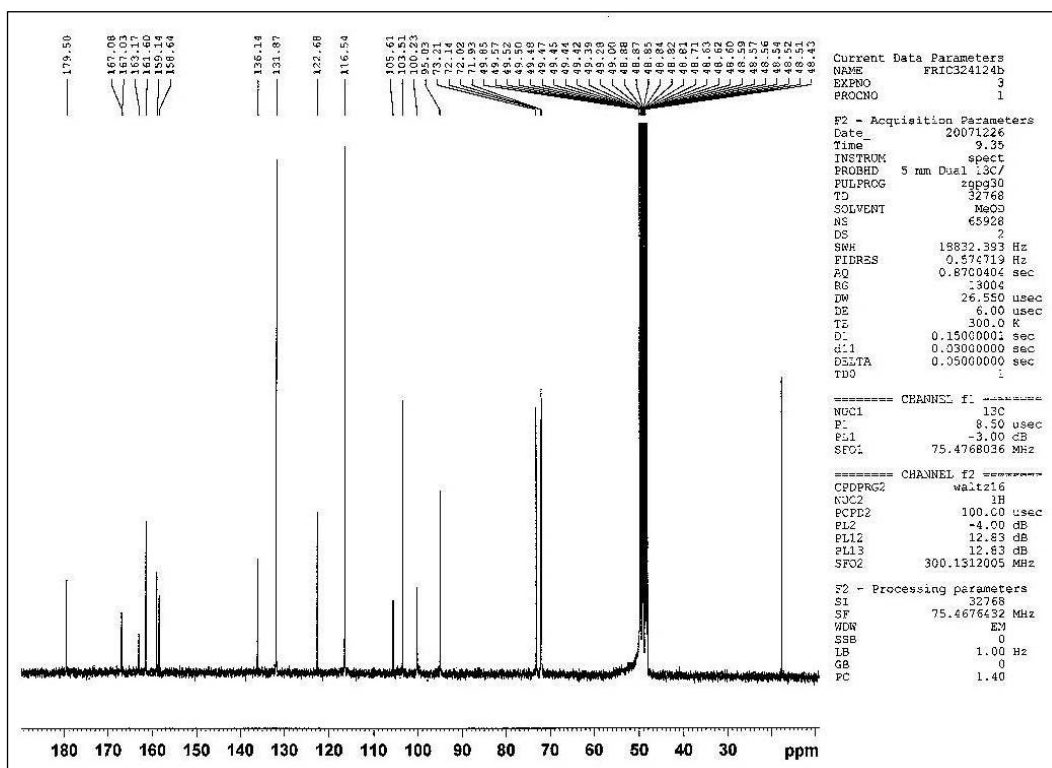


Figura 40: Espectro de RMN de ^{13}C de kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (b) [75 MHz, CD_3OD].

**ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E CAULE DE UMA NOVA ESPÉCIE CLASSIFICADA COMO *MEZILAUROS*
VANDERWERFFII (LAURACEAE)**

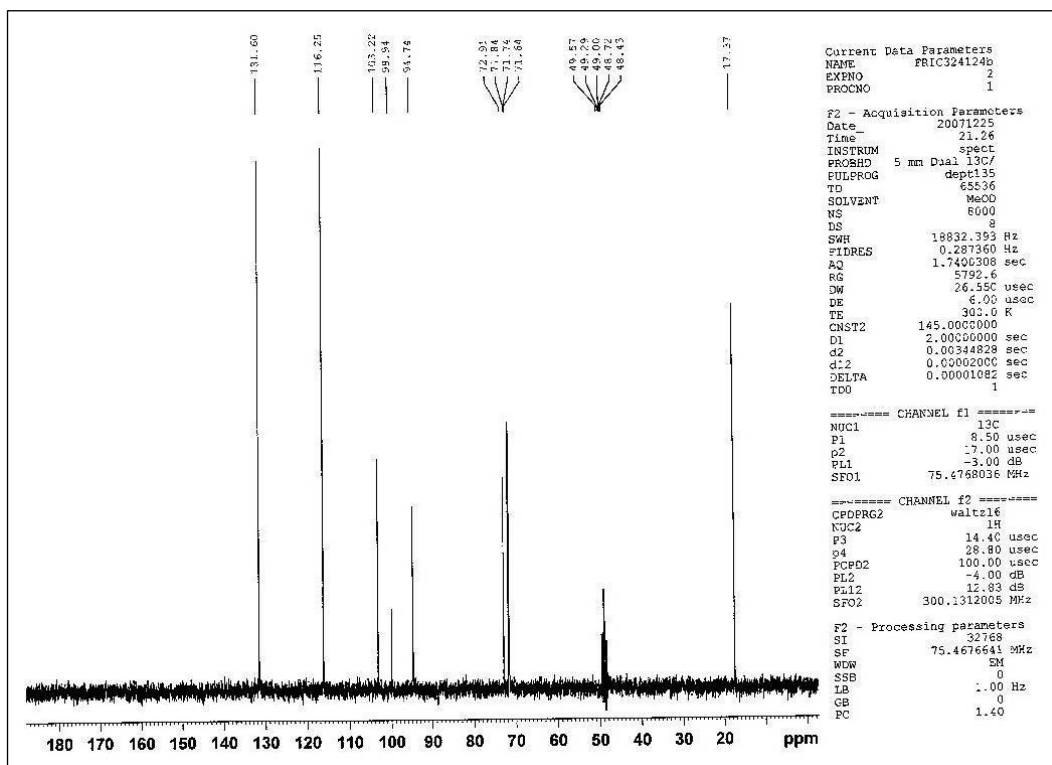


Figura 41: Espectro DEPT 135° de kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (b) [75 MHz, CD₃OD].

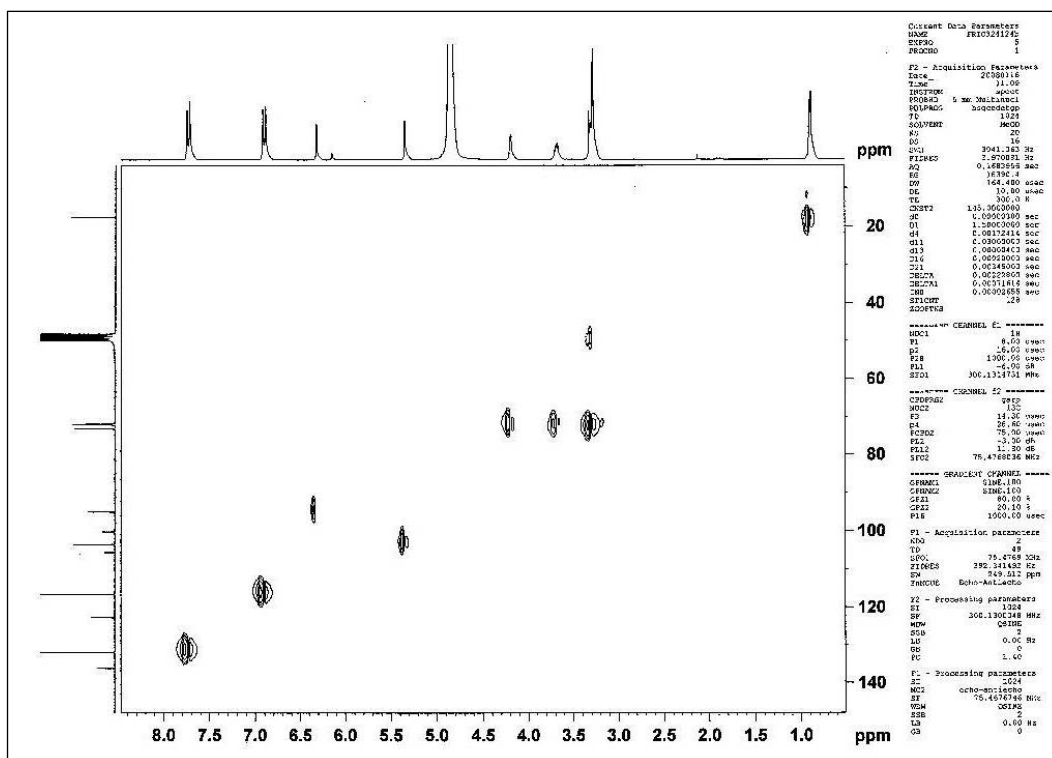


Figura 42: Espectro HSQC de kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (b) [300 MHz/75 MHz, CD₃OD].

**ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E CAULE DE UMA NOVA ESPÉCIE CLASSIFICADA COMO *MEZILAUROS*
VANDERWERFFII (LAURACEAE)**

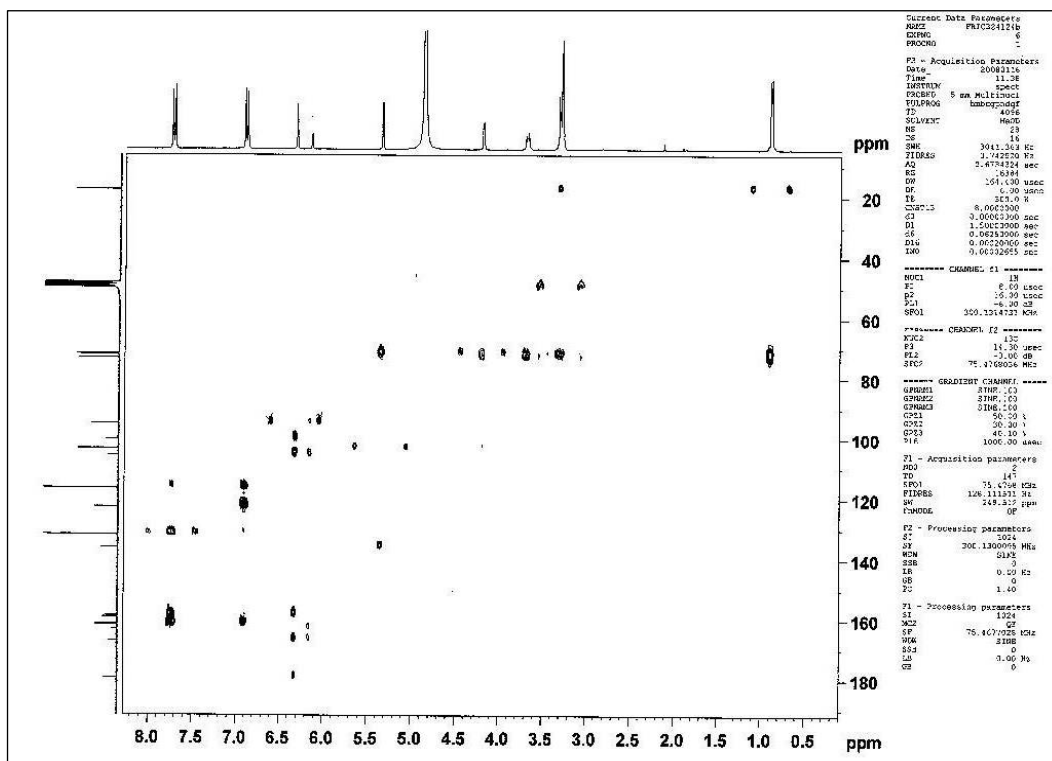


Figura 43: Espectro HMBC de kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (b) [300 MHz/75 MHz, CD₃OD].

5.1.3.1c - Quercetina-3-O-β-D-glucopiranosídeo (c)

A substância “c” (16,6 mg) foi obtida da fração FR1C3.2.41 de acordo com os fracionamentos cromatográficos apresentados na parte experimental (4.4.1.1a e 4.4.1.1b).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 44) do composto “c” apresentou sinais relativos a átomos de hidrogênio aromático de um anel tetrassubstituído em 6,19 e 6,39 (d) δ , e de um anel aromático trissubstituído em 6,85, 7,84 (d) e 7,57 (dd) δ (Tabela 16).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 45) foram observados sinais relativos a duas substâncias que estão em mistura, mas devido a uma grande diferença na intensidade dos sinais, pode-se listar os dois conjuntos de sinais. A substância majoritária (c) apresentou dezoito sinais no espectro, que com auxílio das informações fornecidas pelo espectro DEPT 135° (Figura 46), foram atribuídos a doze átomos de carbono aromático de anéis tetra e trissubstituídos, a três átomos de carbono quaternário (sendo dois deles olefínico oxigenado – δ 158,49 e 135,76 - e um carbonílico), a cinco átomos de carbono metínico oxigenado e a um carbono metilênico também oxigenado (Tabela 16). Os átomos de carbono 1” e 10 apresentaram o mesmo sinal no espectro de RMN de ^{13}C (δ 105,50), bem como o C-1’ e o C-6’ (δ 122,90), porém os valores de deslocamentos no DEPT 135° referente a estes sinais, podem ser atribuídos apenas a C-1” e C-6’ que são terciário, pois os outros dois átomos são quaternário.

Não diferente das duas substâncias anteriores, as informações de deslocamento químico e as correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC (Figuras 47 e 48), indicaram também nesse caso a presença de uma carbonila cetônica α - β insaturada. Os valores de deslocamento químico relativos aos átomos de carbono do açúcar foram compatíveis também com os da β -D-glucose (HARBORNE & MABRY, 1982) [Tabela 16].

De posse das informações espectroscópicas de RMN (1d e 2D) e daquelas reunidas da literatura (ANDRADE *et al.*, 1999; HARBORNE & MABRY, 1982; AROT *et al.*, 1996; MULINACCI *et al.*, 1995; VILEGAS *et al.*, 1999) pode-se identificar a substância “c” como sendo um flavonoide glicosilado, porém do tipo quercetina, e propor a sua fórmula molecular como sendo $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$. A posição do açúcar no anel foi confirmada através da

correlação a longa distância entre o C-3 (δ 135,76) e o átomo de hidrogênio anomérico do açúcar (δ 5,15 -d) no espectro bidimensional de HMBC (Figura 48).

As informações fornecidas pelos espectros de RMN (1D e 2D) e pela literatura, indicam a substância “c” como sendo, quercetina-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo.

Tabela 16: Dados espectrais de RMN de ^{13}C (75 MHz TMS $\delta = 0$), de ^1H (300 MHz TMS $\delta = 0$) e correlações a longa distância (HMBC) em CD_3OD da quercetina-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo (c).

Quercetina-3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosídeo (c)				HARBORNE & MABRY,1982
C/H	δ ^{13}C	δ ^1H (m, Hz)	HMBC	δ ^{13}C
2	158,49	-	H-2', 5' e 6'	156,5
3	135,76	-	H-1''	133,7
4	179,49	-	H-8	177,6
5	162,99	-	H-6	161,3
6	100,08	6,19 (d - 1,6)	H-8	98,8
7	166,57	-	H-6 e 8	164,2
8	94,84	6,39 (d - 1,6)	H-6	93,6
9	158,49	-	H-8	156,5
10	105,50	-	H-6 e 8	104,2
1'	122,90	-	H-2' e 5'	121,6
2'	116,10	6,85 (d - 1,8)	-	115,3
3'	145,83	-	H-2' e 5'	144,8
4'	149,96	-	H-2', 5' e 6'	148,5
5'	117,78	7,84 (d - 7,5)	H-2' e 6'	116,5
6'	122,90	7,57 (dd - 1,8: 7,5)	H-2' e 5'	121,4
1''	105,50	-	-	101,4
2''	73,19	-	-	74,3
3''	77,19	-	-	77,5
4''	70,03	-	-	70,3
5''	75,11	-	-	76,8
6''	61,94	-	-	61,3

**ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E CAULE DE UMA NOVA ESPÉCIE CLASSIFICADA COMO *MEZILAUROS*
VANDERWERFFII (LAURACEAE)**

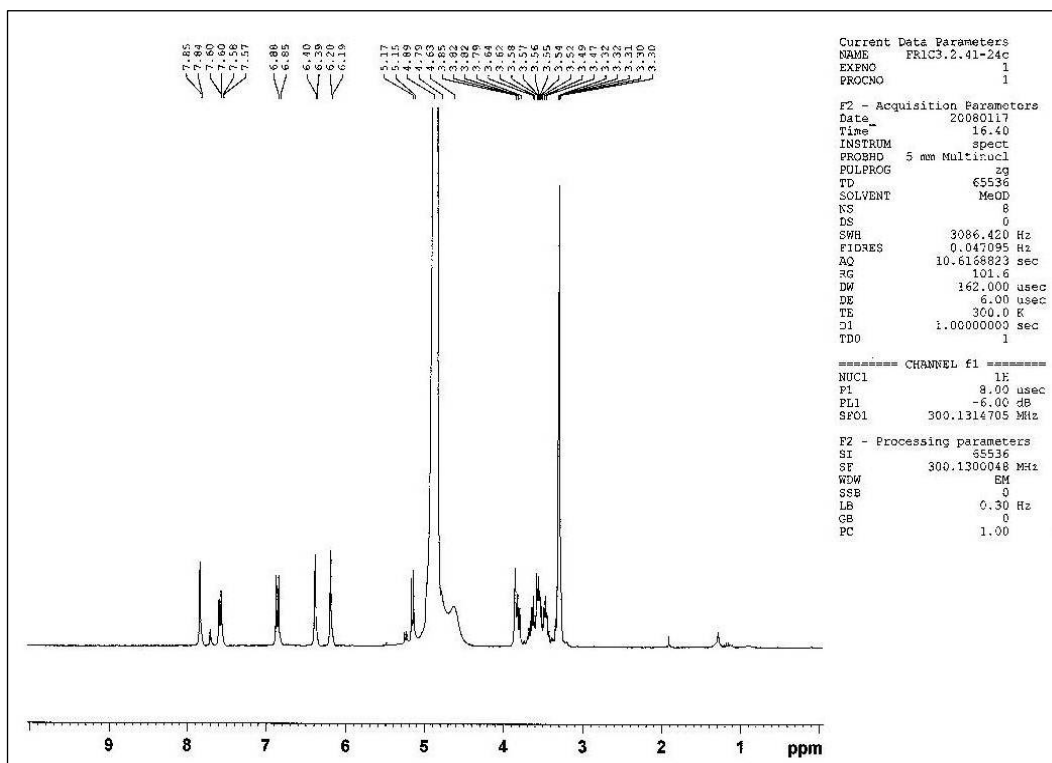


Figura 44: Espectro de RMN de ^1H de quercetina-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo (c) [300 MHz, CD_3OD].

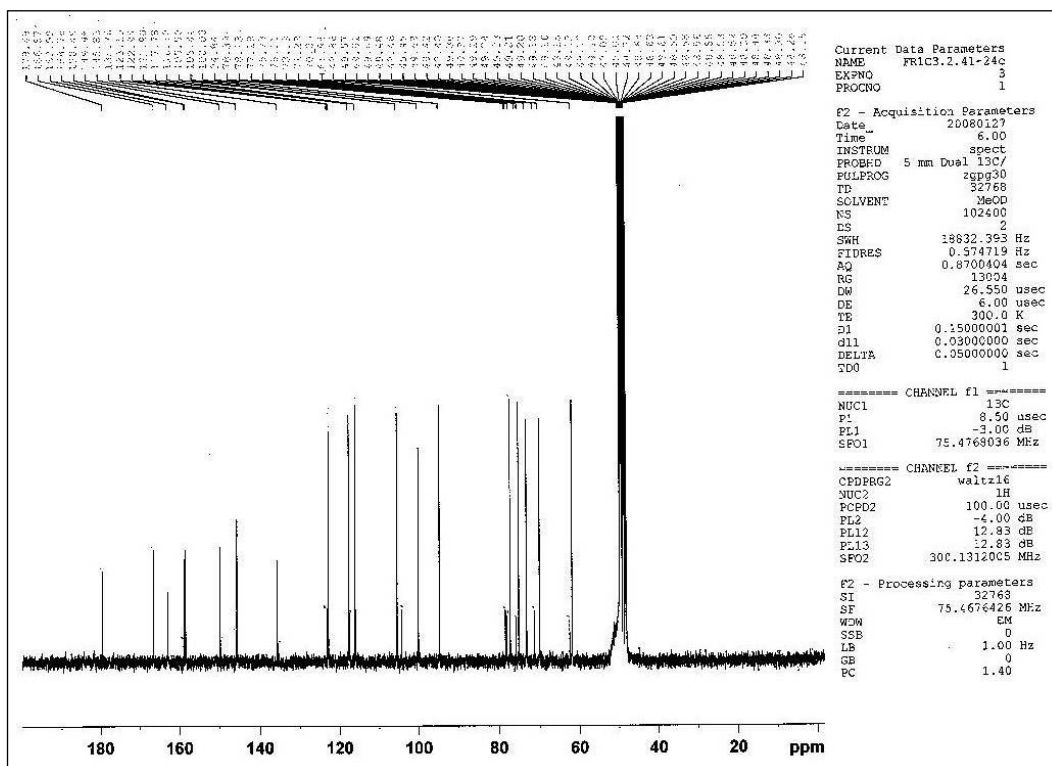


Figura 45: Espectro de RMN de ^{13}C de quercetina-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo (c) [75 MHz, CD_3OD].

**ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E CAULE DE UMA NOVA ESPÉCIE CLASSIFICADA COMO *MEZILAUROS*
VANDERWERFFII (LAURACEAE)**

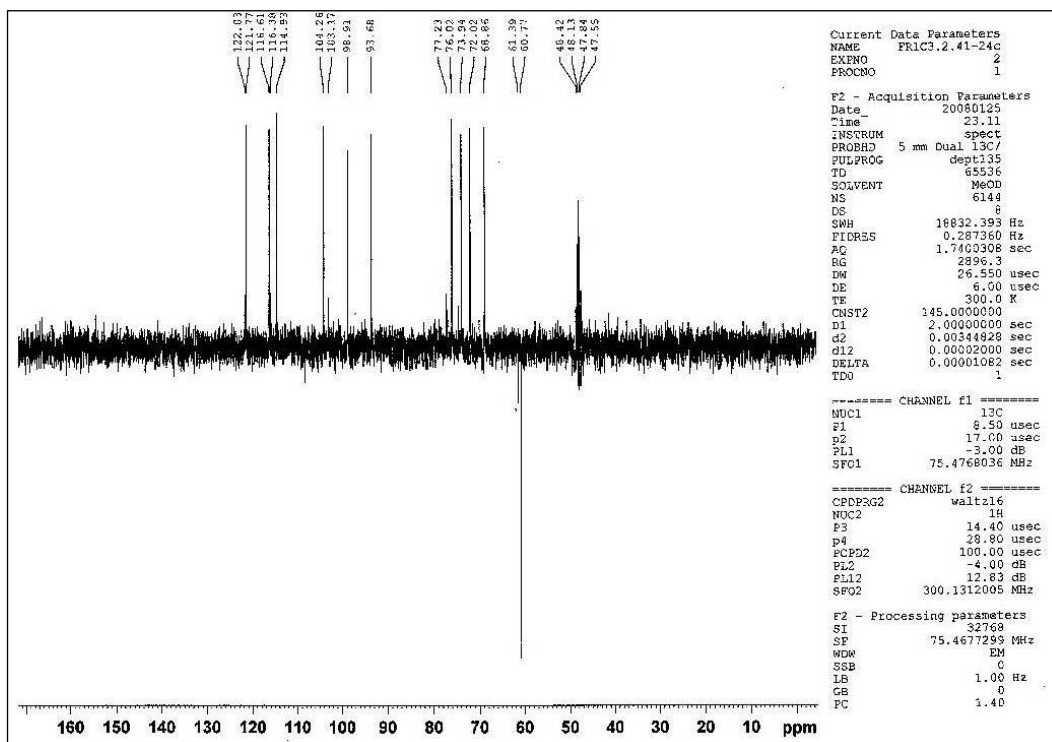


Figura 46: Espectro DEPT 135° de quercetina-3-*O*-β-D-glucopiranosídeo (c) [75 MHz, CD₃OD].

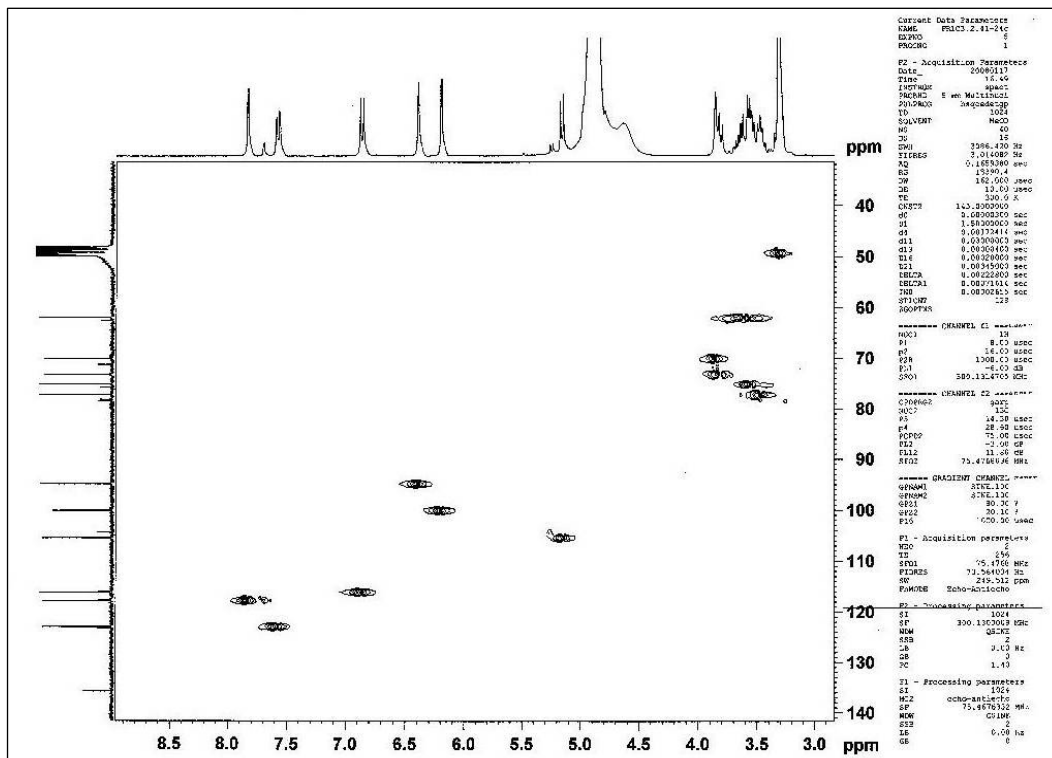


Figura 47: Espectro HSQC de quercetina-3-*O*-β-D-glucopiranosídeo (c) [300 MHz/75 MHz, CD₃OD].

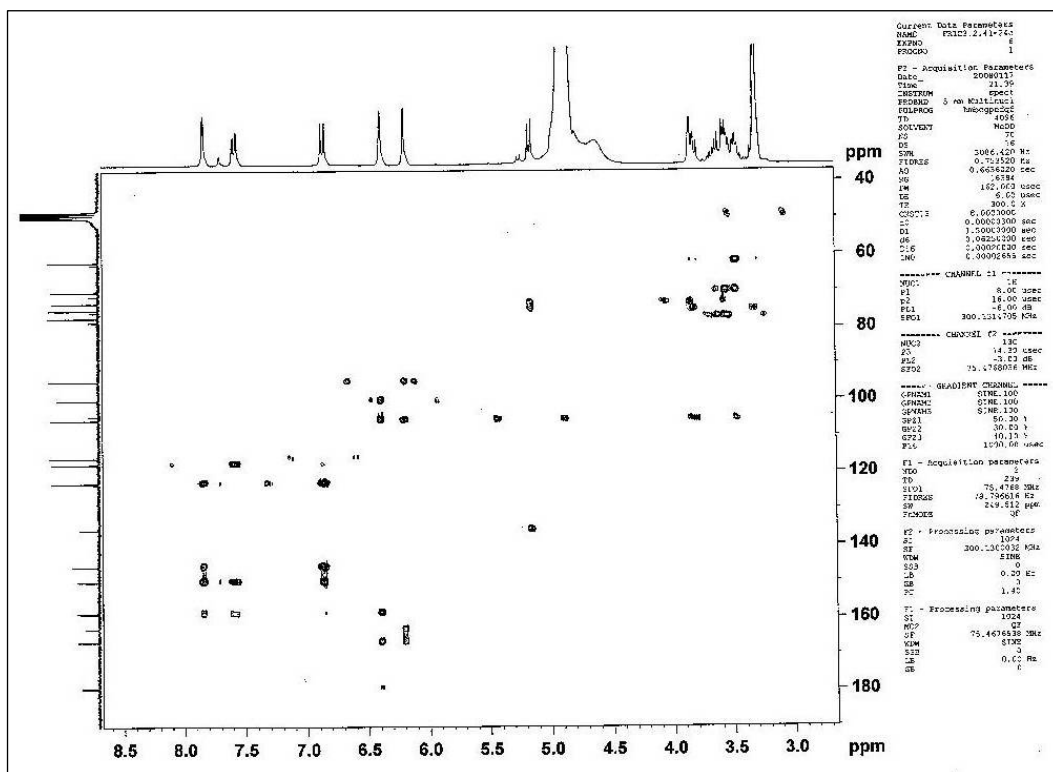


Figura 48: Espectro HMBC de quercetina-3-*O*-β-D-glucopiranosídeo (c) [300 MHz/75 MHz, CD₃OD].

5.1.3.1d - Quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (d e 41ppt)

A substância “d” (79,5 mg) foi obtida da fração FR1C3.2.41 de acordo com os fracionamentos cromatográficos apresentados na parte experimental (itens 4.4.1.1a e 4.4.1.1b).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 49) do composto “d” apresentou sinais relativos a átomos de hidrogênio aromático de um anel tetrassubstituído em 6,14 e 6,30 (d) δ , e de um anel aromático trissubstituído em 6,86, 7,30 (d) e 7,25 (dd) δ (Tabela 17).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 50) foram observados dezoito sinais relativos ao composto “d”, que com auxílio das informações fornecidas pelo espectro DEPT 135° (Figura 51), foram atribuídos a doze átomos de carbono aromático de anéis tetra e trissubstituídos, a três átomos de carbono quaternário (sendo dois deles olefínico oxigenado – 159,18 e 136,14 - e um carbonílico), a cinco átomos de carbono metínico oxigenado e a um carbono metílico (Tabela 17).

Esta substância também possui uma carbonila cetônica α - β insaturada, segundo as informações de deslocamento químico e correlações nos espectros de HSQC e HMBC (Figuras 52 e 53). Com base nos dados de deslocamento químico de carbono, constatou-se que o açúcar presente no composto é o α -L-rhamnose (HARBORNE & MABRY,1982) [Tabela 17].

De acordo com as informações espectroscópicas de RMN (1d e 2D) e aquelas obtidas da literatura (ANDRADE *et al.*, 1999; HARBORNE & MABRY,1982; AROT *et al.*, 1996; MULINACCI *et al.*, 1995; VILEGAS *et al.*,1999) pode-se identificar a substância “d” como sendo um flavonoide glicosilado do tipo quercetina, cuja proposta de fórmula molecular é $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$. A posição do açúcar no anel também foi confirmada através do espectro bidimensional HMBC (Figura 53).

As informações fornecidas pelos espectros de RMN (1D e 2D) e pela literatura, nos levam a propor que a substância “d” se trata do flavonoide, quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo.

Tabela 17: Dados espectrais de RMN de ^{13}C (75 MHz TMS $\delta = 0$), de ^1H (300 MHz TMS $\delta = 0$) e correlações a longa distância (HMBC) em CD_3OD da quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (d e 41ppt).

Quercetina-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopiranosídeo (d e 41ppt)				HARBORNE & MABRY, 1982
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, Hz)	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$
2	159,18	-	H-2', 5' e 6'	157,5
3	136,14	-	H-1''	134,6
4	179,48	-	H-8	178,0
5	162,99	-	H-6	161,6
6	99,75	6,14 (d - 1,5)	H-8	99,0
7	165,68	-	H-6 e 8	164,4
8	94,68	6,30 (d - 1,5)	H-6	93,9
9	158,35	-	H-8	156,7
10	105,81	-	H-6 e 8	104,5
1'	122,89	-	H-2', 5' e 6'	121,4
2'	116,28	6,86 (d - 1,7)	H-5' e 6'	116,1
3'	146,22	-	H-2', 5' e 6'	145,4
4'	149,62	-	H-2', 5' e 6'	148,7
5'	116,90	7,30 (d - 7,6)	H-2' e 6'	115,9
6'	122,89	7,25 (dd - 1,7: 7,6)	H-2' e 5'	121,2
1''	103,41	5,32 (d - 1,5)	-	102,2
2''	71,93	4,22 (dd - 1,5: 3,0)	H-1'', 4'' e 5''	70,8
3''	72,02	3,74 (dd - 3,0: 9,0)	H-2'', 4'' e 5''	70,4
4''	73,19	3,38 (dd - 9,0: 9,0)	H-2'', 3'', 5'' e 6''	71,7
5''	71,82	4,22 (dd - 6,0: 9,0)	H-1'', 2'', 4'' e 6''	70,4
6''	17,59	0,91 (d - 6,0)	H-4''	17,8

**ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E CAULE DE UMA NOVA ESPÉCIE CLASSIFICADA COMO *MEZILAUROS*
VANDERWERFFII (LAURACEAE)**

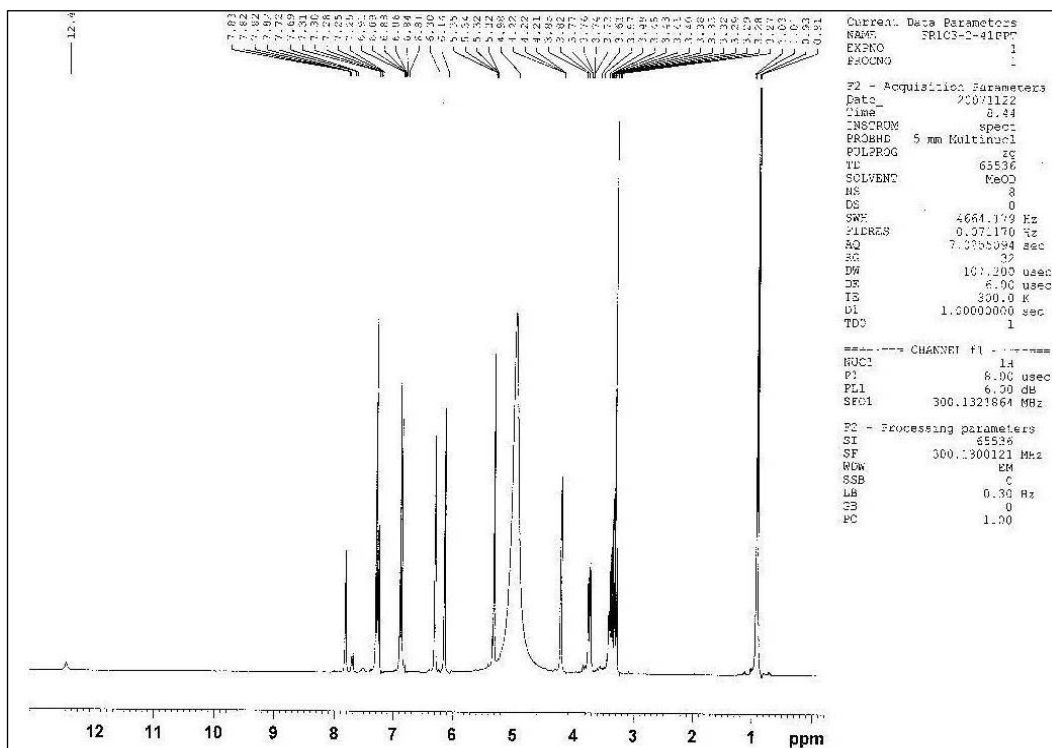


Figura 49: Espectro de RMN de ^1H de quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (d e 41ppt) [300 MHz, CD_3OD].

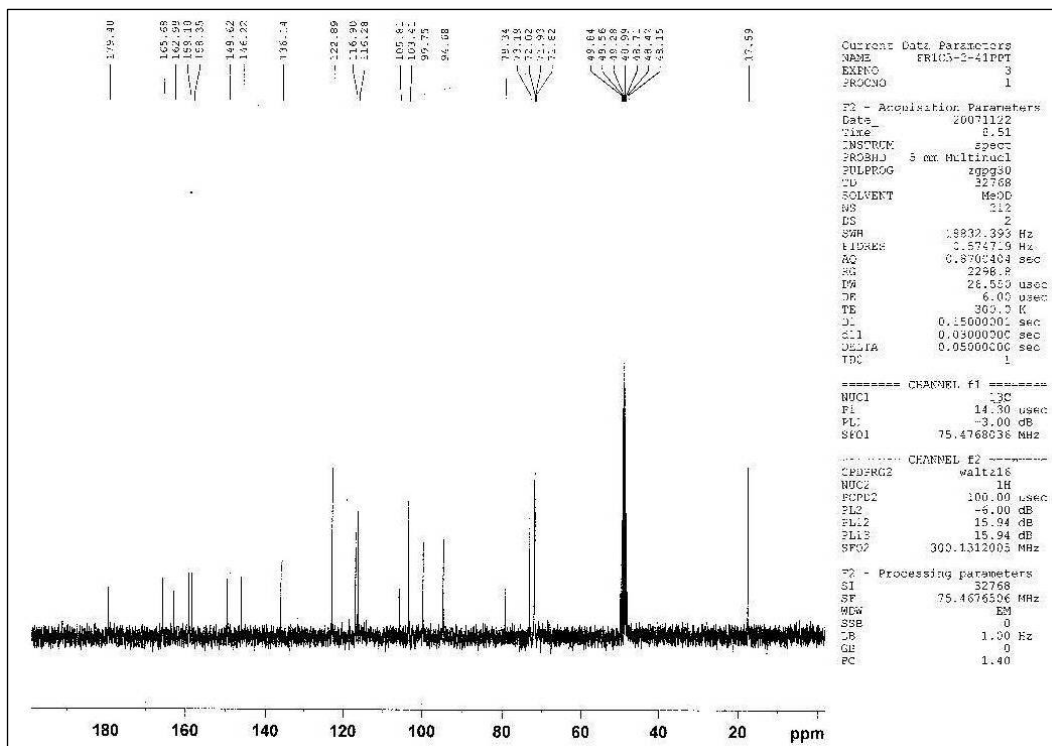


Figura 50: Espectro de RMN de ^{13}C de quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (d e 41ppt) [75 MHz, CD_3OD].

**ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E CAULE DE UMA NOVA ESPÉCIE CLASSIFICADA COMO *MEZILAUROS*
VANDERWERFFII (LAURACEAE)**

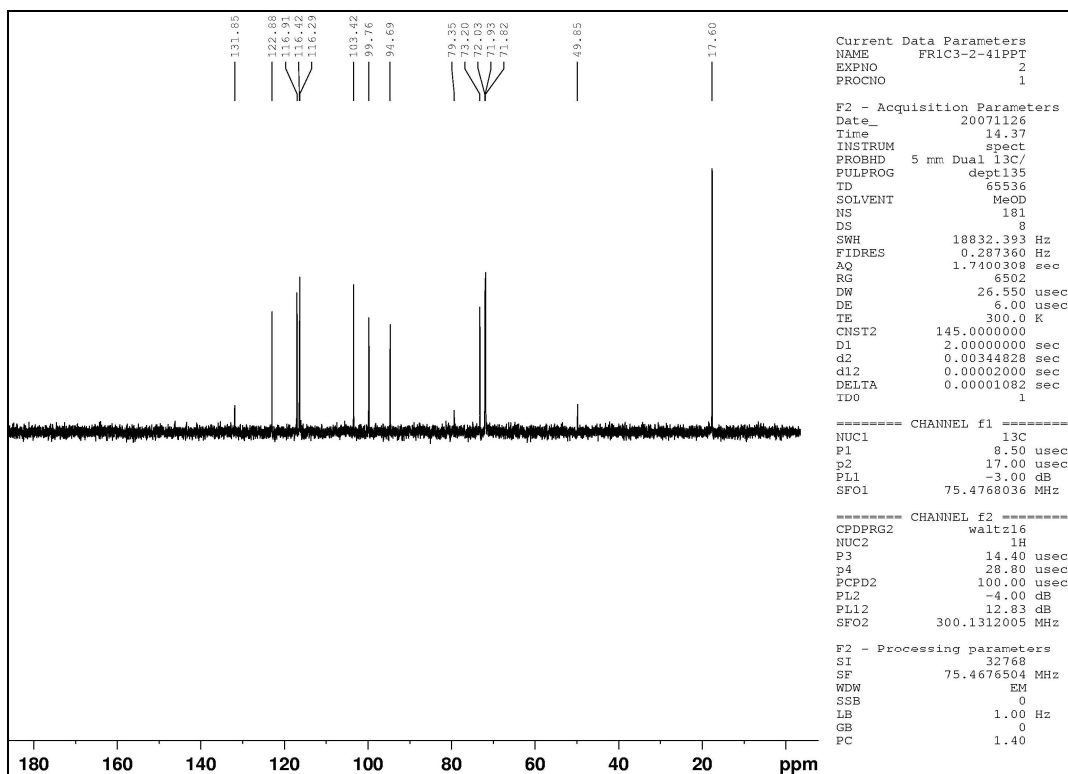


Figura 51: Espectro DEPT 135° de quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (d e 41ppt) [75 MHz, CD₃OD].

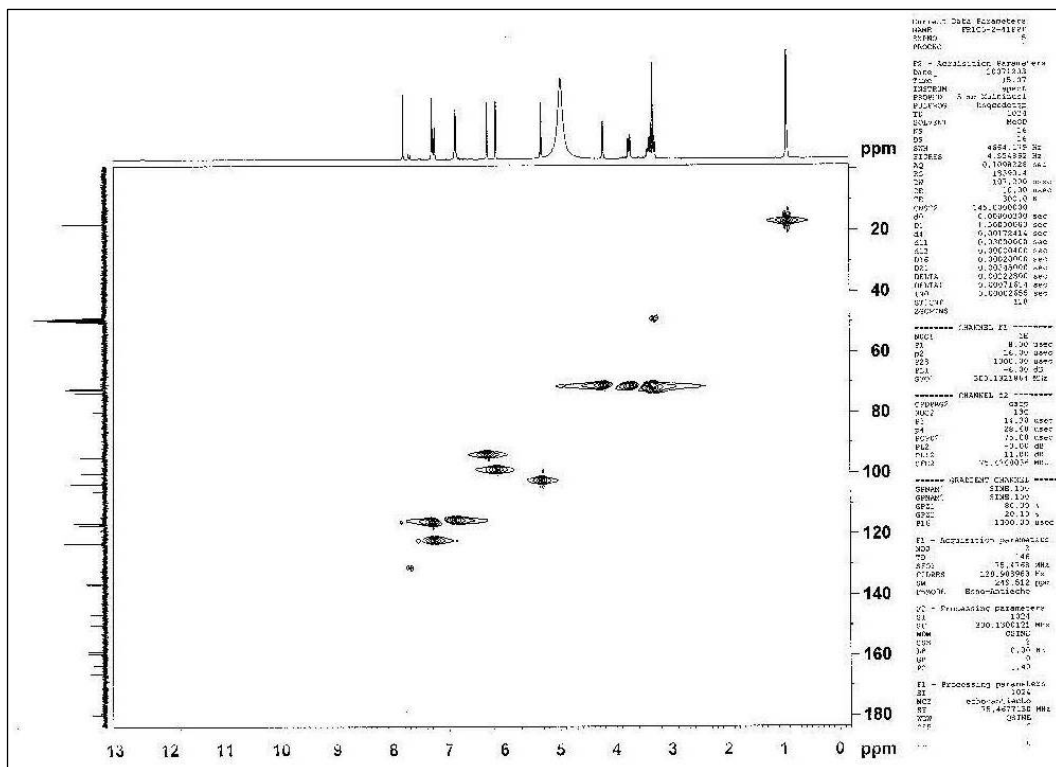


Figura 52: Espectro HSQC de quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (d e 41ppt) [300 MHz/75 MHz, CD₃OD].



Figura 53: Espectro HMBC de quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (d e 41ppt) [300 MHz/75 MHz, CD₃OD].

5.2 – Estudo Químico do Caule de *M. vanderwerffii*

O extrato etanólico do caule de *M. vanderwerffii* (cerca de 90 g) foi submetido a uma filtração em sílica de fase reversa C-18, originando sete frações (item 4.5 da parte experimental). À medida que se tentou concentrar as frações sob pressão reduzida, observou-se a degradação das amostras, sendo então necessária a realização de partições com as mesmas em hexano e acetato de etila, a fim de recuperar aquelas que estavam degradando e evitar que o mesmo acontecesse com as demais.

As frações FR2.7 e FR2.6 não foram particionadas. A primeira foi avaliada por RMN de ^1H , onde através de seu espectro foi possível constatar que seus componentes majoritários se tratavam de material graxo, sendo este de menor interesse no presente trabalho. Em relação a FR2.6, a mesma foi purificada em metanol com a ajuda do processo de centrifugação, sendo suas frações resultantes avaliadas por RMN de ^1H . Seus espectros também indicaram a presença majoritária de material graxo, ou de natureza extremamente polar (este último também não contempla os interesses deste estudo).

O mesmo ocorreu com as frações provenientes das fases hexânicas de FR2.5, FR2.4, FR2.3, FR2.2 e FR2.1 quando submetidas as partições. Das frações provenientes das fases de acetato de etila que foram analisadas em CCDA, apenas a fração FR2.3Aa foi a que chamou a atenção para um trabalho mais detalhado. Realizaram-se com esta fração filtrações em coluna de sephadex LH-20, sílica gel 60 (70-200 mesh), sílica gel 200-400 mesh (flash) bem como separação de seus componentes majoritários em CLAE, sendo que tais procedimentos levaram ao isolamento dos flavonoides epicatequina, da mistura de catequina e epicatequina, de um biflavonoide a procianidina B2, e das lignanas siringaresinol, lioniresinol e lioniresinol-9-*O*- β -D-glucopiranosídeo.

A determinação estrutural das substâncias obtidas foi efetuada com base nos dados espectroscópicos de RMN de ^1H e de ^{13}C uni e bidimensionais e também por comparação com dados espectrais de modelos existentes na literatura.

A fração FR2.3H foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna sephadex LH-20 (item 3.5.5.1 da parte experimental). As frações resultantes dos

agrupamentos daquelas cujos perfis cromatográficos eram semelhantes foram avaliadas por RMN de ^1H , e seus espectros não demonstraram substâncias de interesse para este trabalho.

5.2.1 – Lignanas

Entre os mais importantes grupos de metabólitos secundários vegetais citam-se tradicionalmente os alcaloides, os terpenoides e os flavonoides, mas recentemente ficou claro que os lignoides também ocupam um lugar de destaque. Isto porque estão amplamente distribuídos no reino vegetal, apresentando importância não só para as plantas que as produzem, servindo como marcadores do processo evolutivo, como para o homem que as extrai ou sintetiza, fato que já levou a aplicações terapêuticas importantes (GOTTLIEB & YOSHIDA, 1984).

A biossíntese de lignanas tem despertado grande interesse, devido às inúmeras atividades biológicas atribuídas a elas. Algumas lignanas são usadas na medicina e como suplemento nutricional, tais como os derivados semissintéticos da podofilotoxina empregado na terapia contra o câncer, e a sesamina em saúde e nutrição, e estão entre os principais grupos de compostos de plantas classificadas como fitoestrógenos, além de apresentarem atividade antioxidante, antileucêmica, anti-HIV, anti-inflamatória, antiespasmódica, antialérgica, inseticida entre outros (SUZUKI & UMEZAWA, 2007; LOBO & LOURENÇO, 2007; SIMÕES *et al.*, 2004).

As lignanas são biossintetizadas e depositadas em quantidades significativas no cerne das árvores, provavelmente para prevenir o ataque de fungos no interior da mesma. (SUZUKI & UMEZAWA, 2007).

As lignanas são dímeros de fenilpropanoides formados através do acoplamento oxidativo de alcoois cinâmicos entre si ou destes com ácidos cinâmicos (SIMÕES *et al.*, 2004), cujos monômeros são ligados por um átomo de carbono central (C-8), e que por sua vez estão amplamente distribuídos no reino vegetal. Lignanas são classificadas em oito subgrupos de acordo com o padrão de ciclização e a maneira que o oxigênio é incorporado ao esqueleto: furofurano, furano, dibenzilbutano, dibenzilbutirolactona, ariltetralina, arilnaftaleno, dibenzociclooctadieno e dibenzilbutirolactol (Figura 54) [SUZUKI & UMEZAWA, 2007; UMEZAWA, 2003].

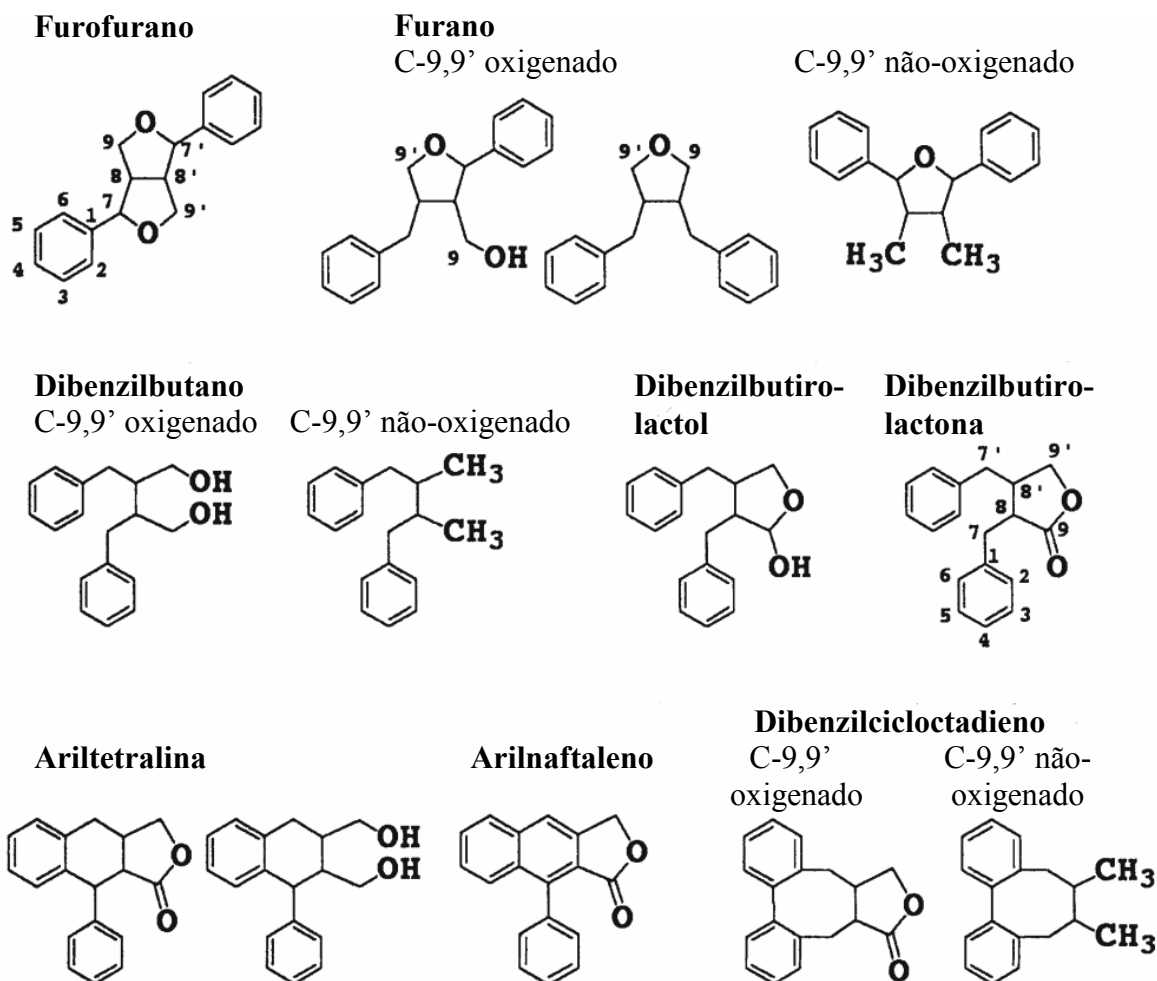
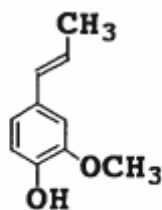
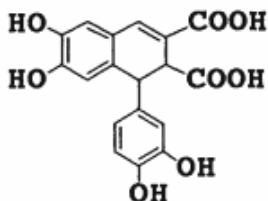


Figura 54: Esqueletos básicos de lignanas (Adaptado de SUZUKI & UMEZAWA, 2007)

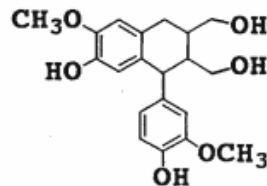
Cada subgrupo varia substancialmente em relação às cadeias laterais de propila e aos níveis de oxidação de ambos os anéis aromáticos. Além disso, estas lignanas podem ser classificadas em três categorias, dependendo do estado de oxidação das posições C-9 e C-9', que estão no terminal da cadeia lateral propila: lignanas oxigenadas (**1**), não oxigenadas (**2**) e ácidos dicarboxílicos (**3**) como mostrado na figura 55 (SUZUKI & UMEZAWA, 2007; UMEZAWA, 2003).



(1) Ioeugenol



(2) Ácido epifílico



(3) Isolariciresinol

Figura 55: Categorias de lignanas de acordo com o estado de oxidação das posições C-9 e 9' terminal da cadeia propila (Adaptado de SUZUKI & UMEZAWA, 2007)

As lignanas isoladas neste trabalho pertencem aos subgrupos furofurano e ariltetralina como visto na figura 54.

5.2.1.1 – Identificação de lignanas do caule de *M. vanderwerffii*

5.2.1.1a – (+)-Siringaresinol

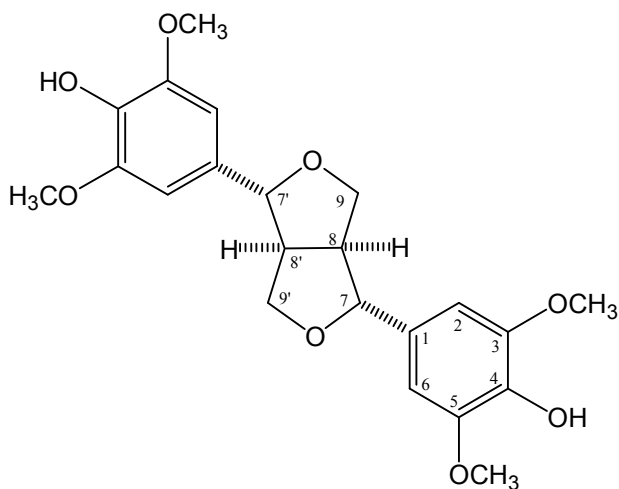


Figura 56: Lignana (+)-siringaresinol isolada do caule de *M. vanderwerffii*

A substância “FR2.3Aa9.1” (17,0 mg) foi obtida da fração FR2.3Aa de acordo com os fracionamentos cromatográficos apresentados na parte experimental (item 4.5.5.2.1b).

Observou-se no espectro de RMN de ^1H (Figura 59) um singleto em 6,55 δ , bastante intenso, com integração para dois átomos de hidrogênio indicativo de hidrogênio

aromático. O valor do deslocamento químico associado ao desdobramento do sinal sugere um anel aromático tetrassubstituído com disposição dos átomos de hidrogênio em meta, possuindo substituintes oxigenados dispostos de modo que o anel apresenta um plano de simetria (Figura 57). O espectro também aponta um singlete intenso em 3,87 δ , proporcional a seis átomos de hidrogênio, em região característica de metoxila. Adicionalmente foram observados sinais de intensidade baixa, com integração para um átomo de hidrogênio cada um, tratando-se de um singlete largo em 3,07 δ , dois multipletos - um em 3,63-3,71 δ e outro em 4,15-4,28 δ - e também um dubleto pouco desdobrado em 4,71 δ . Estes sinais sugeriram um sistema alifático na molécula (Tabela 18).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 60) mostrou oito sinais relativos ao composto “FR2.3Aa9.1”, que com auxílio das informações fornecidas pelo espectro DEPT 135° (Figura 61), foram atribuídos a oito átomos de carbono metínico, sendo quatro deles aromático de anéis 1,3,4,5 tetrassubstituídos; a dois átomos de carbono metilênico, a seis átomos de carbono quaternário aromático oxigenado, sendo dois deles hidroxílico (C-4 e 4' 134,33 δ), e os demais metoxílico (C-3, 5, 3' e 5' 147,17 δ). Além destes, o sinal em 56,64 δ foi atribuído a quatro metoxilas ligadas a anéis aromáticos simétricos, enquanto que os sinais em 54,33 δ , 71,79 δ e 86,29 δ foram reconhecidos como valores de átomos de carbono característicos de anéis tetraidrofurânicos de lignanas, bem como o sinal em 132,09 δ foi alocado ao átomo de carbono aromático ligado ao núcleo tetraidrofurânico (Tabela 18).

Estes dados estão coerentes com uma lignana do tipo bistetraidrofurânica com substituição simétrica dos grupos arila, descrita na literatura como siringaresinol (NAWWAR, 1982), cuja fórmula molecular é $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_8$ (Figura 56).

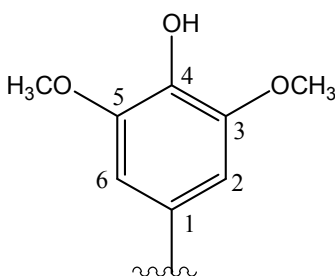


Figura 57: Estrutura parcial de FR2.3Aa9.1

A definição da estereoquímica dos anéis aromáticos ligados ao sistema tetraidrofurânico de lignanas do tipo 3,7-dioxabicyclo-[3.3.0]-octano, é feita com base nos valores de deslocamento químico dos átomos de carbono C-7, 7', C-8, 8' e C-9, 9'. De acordo com a literatura, estes carbonos são observados respectivamente na região de 85,3-85,9; 53,7-54,4 e 71,3-72,0, quando a orientação dos grupos arila é pseudoequatorial, e tornam-se mais protegidos quando a orientação é pseudoaxial (AGRAWAL, 1985). Uma vez que os sinais observados no espectro de FR2.3Aa9.1 foram 86,29, 54,33 e 71,79 δ , a orientação dos anéis aromáticos foi definida como pseudoequatorial.

Existem duas formas isoméricas para a substância isolada, e estão representadas na figura 58. A diferenciação entre as duas formas isoméricas **A** e **B** pode ser feita com base no valor de deslocamento químico de C-7, 7'. No caso de lignanas pertencente à série **B**, estes carbonos são mais desprotegidos, possuindo valores de deslocamento químico da ordem de 87,0 δ $\pm$ 0,2 (BISOLI, 2009). O valor positivo da rotação óptica apresentado por FR2.3Aa9.1, em CH₃OH e a uma concentração de $2,0 \times 10^{-3}$ mg/100mL, $[\alpha]_{20}^{20} = +12,3$, definiu a estereoquímica de FR2.3Aa9.1 como sendo aquela descrita na estrutura **A**. A literatura relata valores de $[\alpha]_D$ em CHCl₃ para (+)-siringaresinol que variam de +2,4° a +44°.

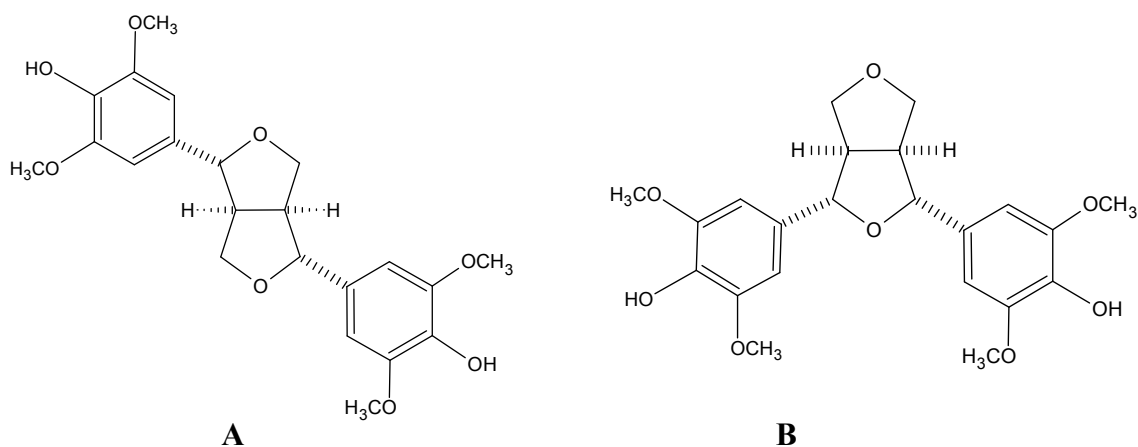


Figura 58: Formas isoméricas A e B de uma lignana do tipo bistetraidrofurânica.

Tabela 18: Dados espectrais de RMN de ^{13}C (75 MHz TMS $\delta = 0$) e de ^1H (300 MHz TMS $\delta = 0$) em CDCl_3 do siringaresinol (FR2.3Aa9.1).

Siringaresinol (FR2.3Aa9.1)			(NAWWAR, 1982)	
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m)
1, 1'	132,09	-	132,2	-
2, 2'	102,73	6,55 (s)	103,7	6,67 (s)
3, 3'	147,17	-	148,4	-
4, 4'	134,33	-	135,4	-
5, 5'	147,17	-	148,4	-
6, 6'	102,73	6,55 (s)	103,7	6,67 (s)
7, 7'	86,29	4,71 (d - 3,5)	86,6	4,80 (d)
8, 8'	54,33	3,07 (sl)	54,5	3,14 (m)
9, 9'	71,79	H-9a, 9'a: 3,63-3,71 (m) H-9b, 9'b: 4,15-4,28 (m)	71,7	3,64 (dd) 4,34 (dd)
OMe-3, 3', 5, 5'	56,37	3,87 (s)	55,9	3,86 (s)

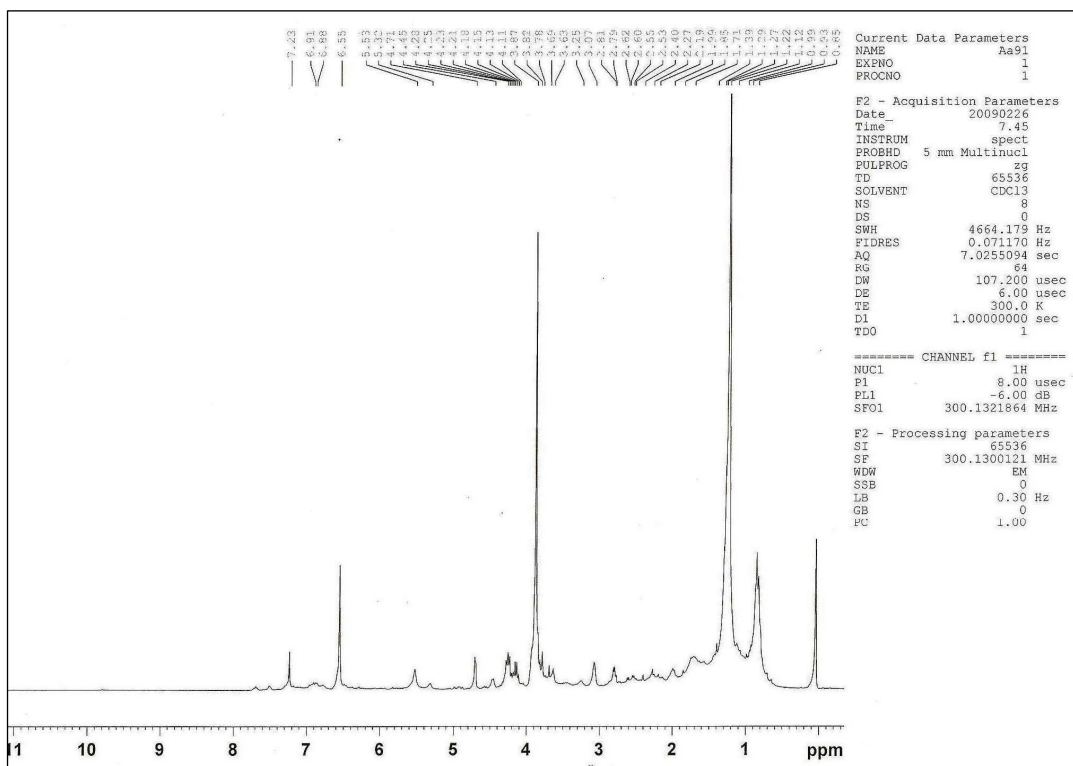


Figura 59: Espectro de RMN de ^1H de siringaresinol (FR2.3Aa9.1) [300 MHz, CD_3OD].

**ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E CAULE DE UMA NOVA ESPÉCIE CLASSIFICADA COMO *MEZILAUROS*
VANDERWERFFII (LAURACEAE)**

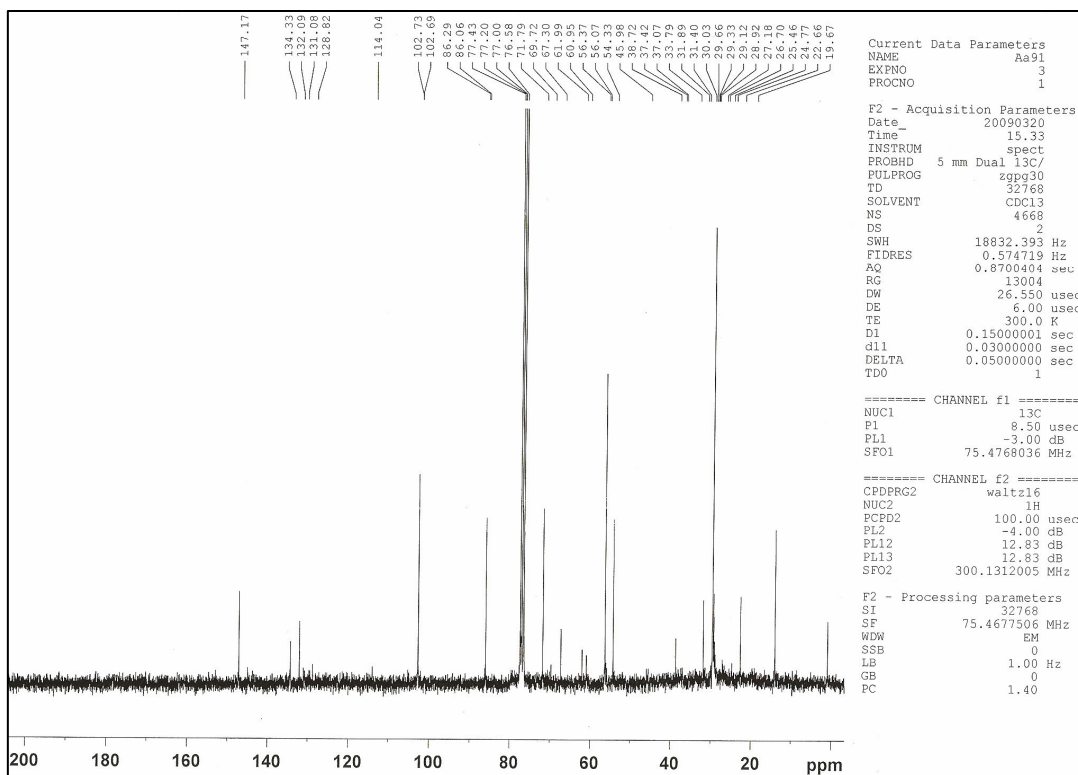


Figura 60: Espectro de RMN de ^{13}C de siringaresinol (FR2.3Aa9.1)[75 MHz, CDCl_3].

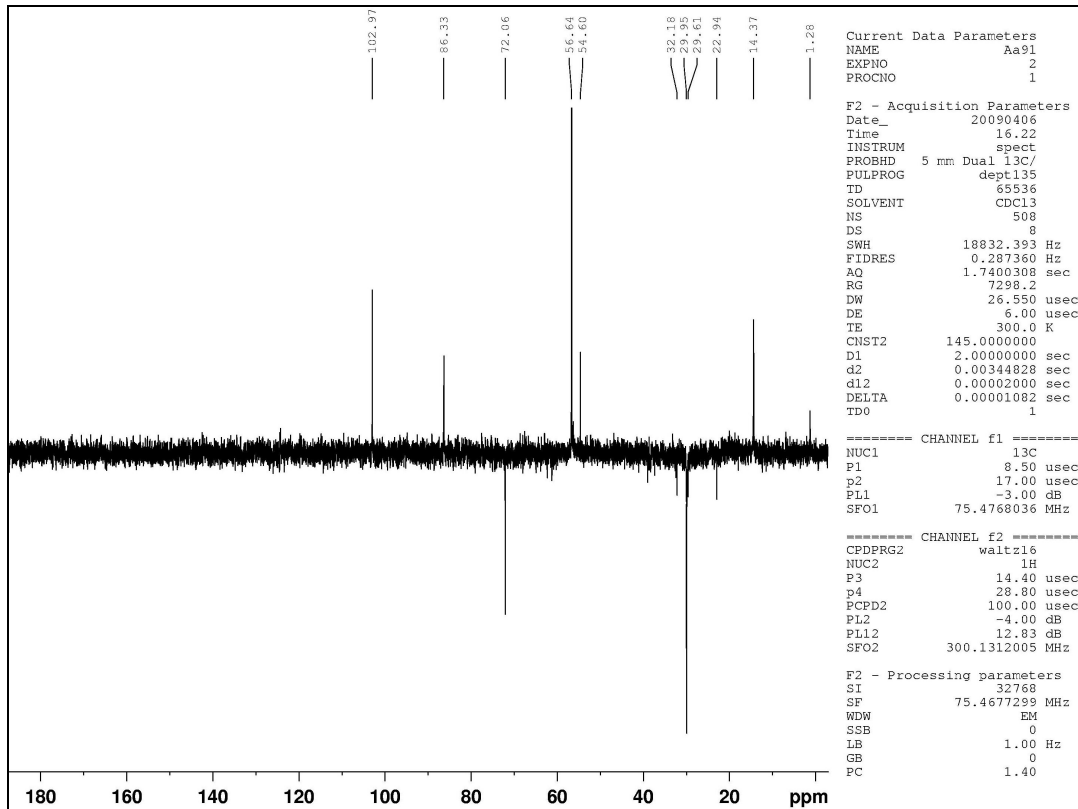


Figura 61: Espectro DEPT 135° de siringaresinol (FR2.3Aa9.1)[75 MHz, CDCl_3].

5.2.1.1b – Lioniresinol

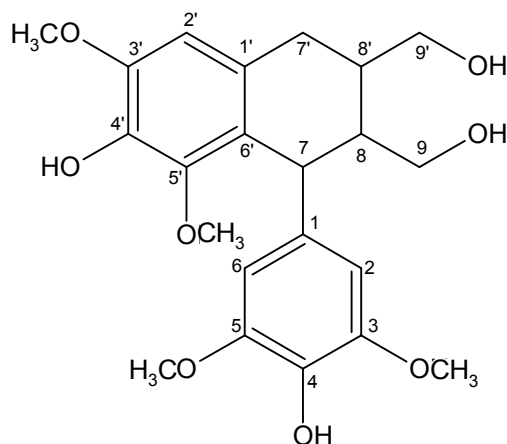


Figura 62: Estrutura da lignana lioniresinol isolada do caule *M. vanderwerffii*.

A substância “**FR2.3Aa9.12**” (23,2 mg) foi obtida da fração FR2.3Aa de acordo com os fracionamentos cromatográficos apresentados na parte experimental (itens 4.5.5.2.1 e 4.5.5.2.1b).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 65) do composto “**FR2.3Aa9.12**” mostrou dois singletos na região de átomos de hidrogênio aromático (6,41 e 6,55 δ) com intensidade proporcionais a 2:1 respectivamente; um dubleto em 4,27 δ , sinais de átomos de hidrogênio carbinólico (3,54-3,61 δ); três singletos na região de metoxila (4,26, 3,61 e 3,34 δ) com intensidade proporcionais a 1:2:1 respectivamente, e também mais três sinais – um em 1,60-1,64 δ (m, 1H), outro em 1,93-1,97 δ (m, 1H) e outro em 2,57-2,68 δ (m, 2H) [Tabela 19].

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 66) mostrou 18 sinais que com o auxílio do DEPT 135° (Figura 67) sugeriram um total de vinte e dois átomos de carbono para o composto “**FR2.3Aa9.12**”, dos quais doze são aromáticos e dez são alifáticos (quatro metoxilas, três átomos de carbono metilênico – dois destes ligados a hidroxila – e um átomo de carbono metínico) [Tabela 19].

Os espectros bidimensionais HSQC e HMBC (Figura 68 e 69) corroboraram para estabelecer os fragmentos da estrutura do composto em análise (Figura 63). Os doze átomos de carbono aromático constituem dois anéis benzênicos, sendo um tetrassubstituído e outro pentassubstituído. O anel tetrassubstituído apresenta uma estrutura simétrica, como

pode ser visto na figura 63, com duas metoxilas ligadas em *meta* e uma hidroxila em *para*, ou seja, com padrão de substituição 1,3,4,5. O outro anel aromático contém apenas um átomo de hidrogênio, sendo substituído por dois radicais alquil e três oxigênios – duas metoxilas e uma hidroxila (Figura 63).

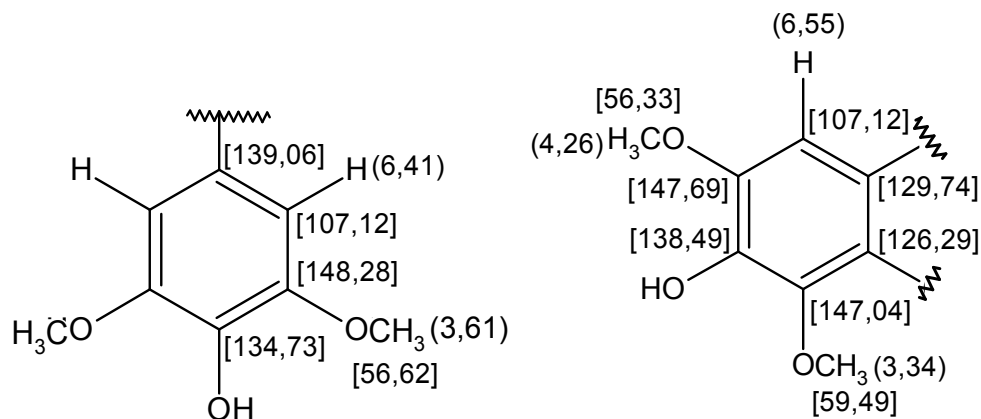


Figura 63: Fragmentos da estrutura do composto "FR2.3Aa9.12" propostos através da análise de dados de RMN 1 e 2D (Os valores de deslocamento para os átomos de hidrogênio estão representados entre parenteses e os de carbono entre colchetes).

O experimento HMBC (Figura 69) mostrou correlação 3J do hidrogênio aromático com sinal em 6,55 δ com os átomos de carbono em 138,39 (3J), 147,07 (4J), 126,29 (3J) e 33,61 δ (3J) como mostrado na Figura 64, permitindo estabelecer a conexão do anel aromático correspondente com a parte alifática da molécula.

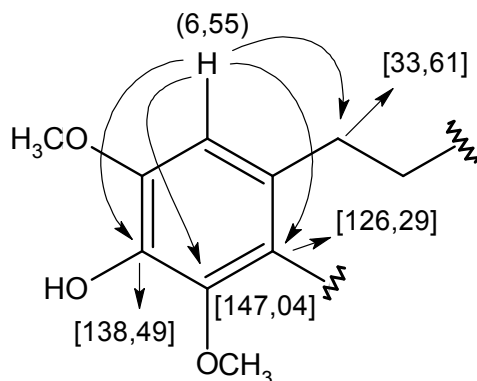


Figura 64: Correlações observadas no experimento HMBC do hidrogênio do anel benzênico pentassubstituído com sinais de átomos de carbono aromático e alifático.

As correlações do hidrogênio correspondente ao sinal em 4,27 δ com os sinais dos átomos de carbono em 107,12 e 126,29 δ , atribuídos a carbono de anéis aromáticos diferentes, indicam que o carbono ao qual se encontra ligado (42,29 δ) suporta os dois anéis. As correlações do hidrogênio em 4,27 δ com os átomos de carbono em 49,04 e 63,81 δ e também com aqueles em 40,98 e 66,46 δ definem a posição destes grupos na cadeia alifática (Tabela 19).

Com base nos dados espectroscópicos obtidos através de experimentos de RMN uni e bidimensionais, e literatura (ZHANG *et al.*, 1999) foi possível identificar o composto FR2.3Aa9.12 como sendo uma lignana ariltetralínica, denominada lioniresinol (Figura 62).

Tabela 19: Dados espectrais de RMN de ^{13}C (75 MHz TMS $\delta = 0$), de ^1H (300 MHz TMS $\delta = 0$) e HSQC em CDCl_3 do lioniresinol (FR2.3Aa9.12).

Lioniresinol (FR2.3Aa9.1)				(ZHANG <i>et al.</i> , 1999)
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, Hz) e HSQC	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$
1	139,06	-	H-7, 2 e 6	137,8
2	107,12	6,41 (s)	H-7	106,5
3	148,28	-	OMe-3	147,7
4	134,73	-	H-2 e 6	134,8
5	148,28	-	OMe-5	147,7
6	107,12	6,41 (s)	H-7	106,5
7	42,29	4,27 (d - 9,5)	H-2, 6 e 9	40,4
8	49,04	1,93-1,97 (m)	H-7 e 7'	46,8
9	63,81	3,54-3,57 (m)	H-7	62,7
1'	129,74	-	-	128,8
2'	107,12	6,55 (s)	H- 7'	107,0
3'	147,69	-	OMe-3'	147,0
4'	138,39	-	H-2'	137,3
5'	147,07	-	H-2' e OMe-5'	146,6
6'	126,29	-	H-7, 7' e 2'	125,1
7'	33,61	2,57-2,68 (m)	H-2'	32,3
8'	40,98	1,60-1,64 (m)	H-7	39,3
9'	66,46	3,58-3,61 (m)	-	64,9
OMe-3	56,62	3,61 (s)	-	56,4
OMe-5	56,62	3,61 (s)	-	56,4
OMe-3'	56,33	4,26 (s)	-	55,9
OMe-5'	59,49	3,34 (s)	-	59,2

**ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E CAULE DE UMA NOVA ESPÉCIE CLASSIFICADA COMO *MEZILAUROS*
VANDERWERFFII (LAURACEAE)**

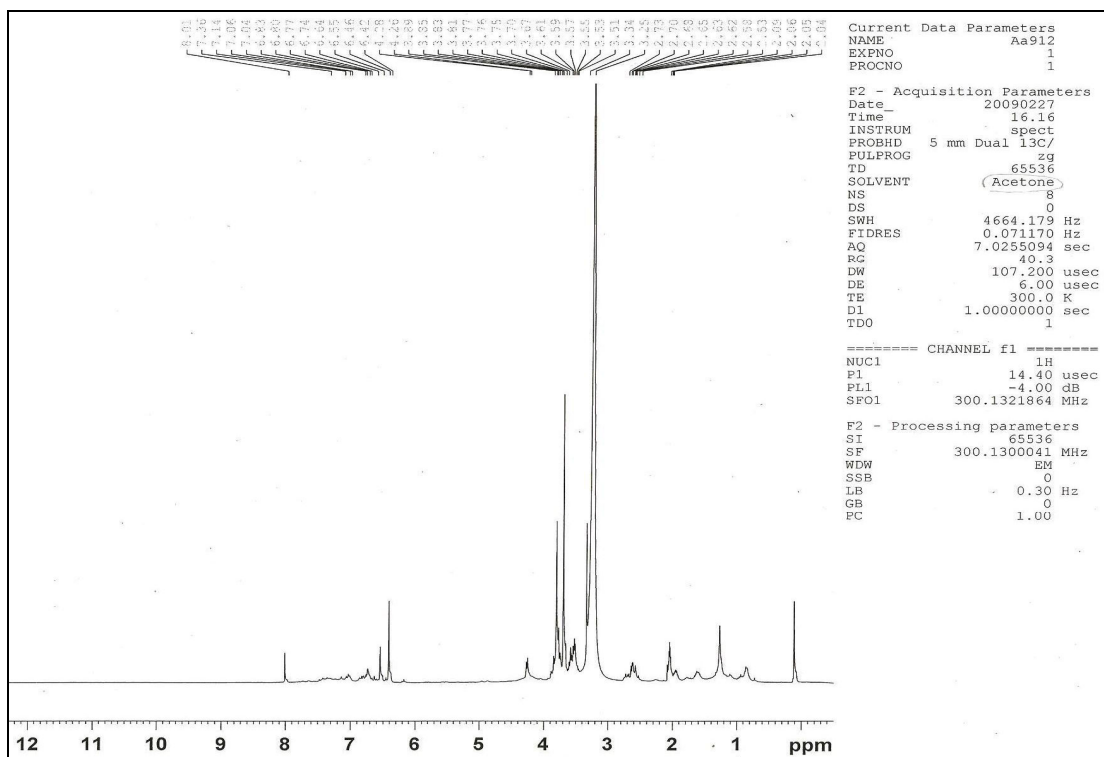


Figura 65: Espectro de RMN de ^1H de lioniresinol (FR2.3Aa9.12) [300 MHz, Acetona- D_6].

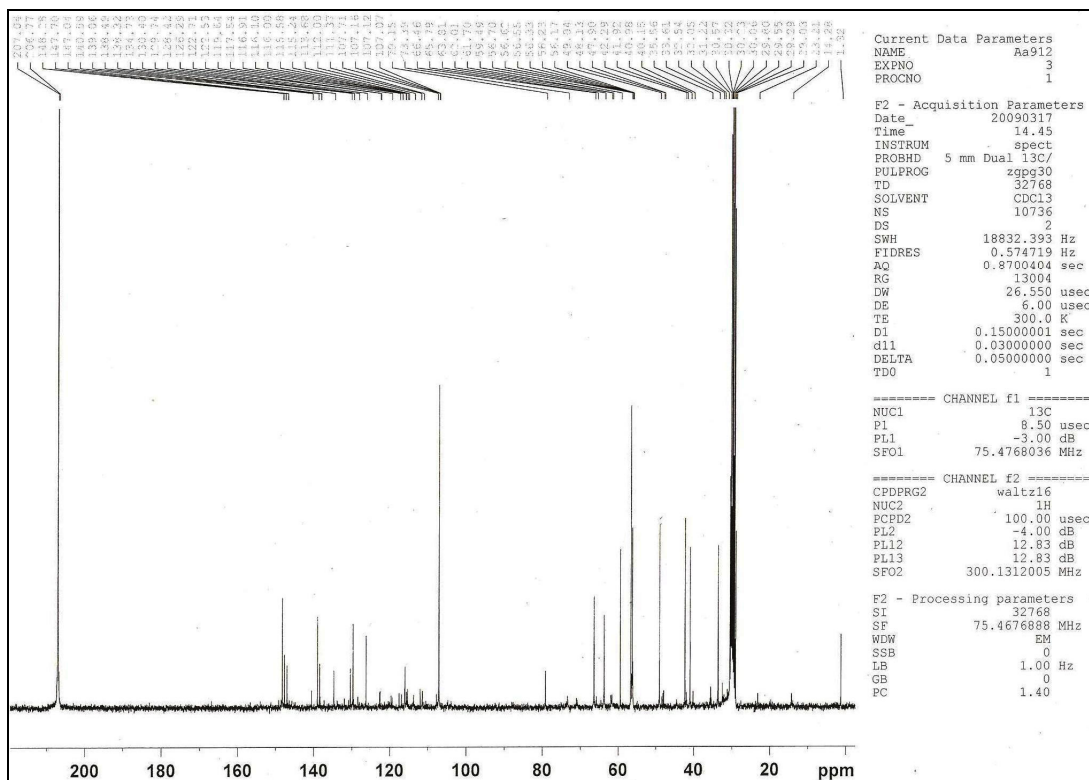


Figura 66: Espectro de RMN de ^{13}C de lioniresinol (FR2.3Aa9.12)[75 MHz, Acetona- D_6].

**ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E CAULE DE UMA NOVA ESPÉCIE CLASSIFICADA COMO *MEZILAUROS*
VANDERWERFFII (LAURACEAE)**

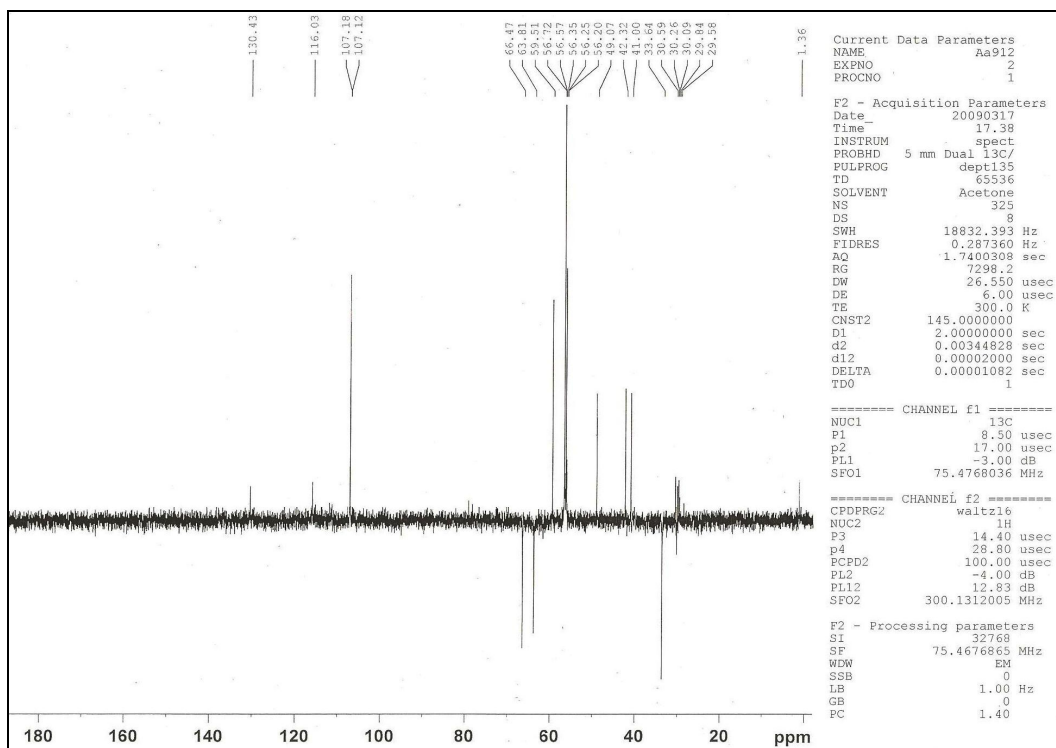


Figura 67: Espectro DEPT 135° de lioniresinol (FR2.3Aa9.12)[75 MHz, Acetona-D₆].

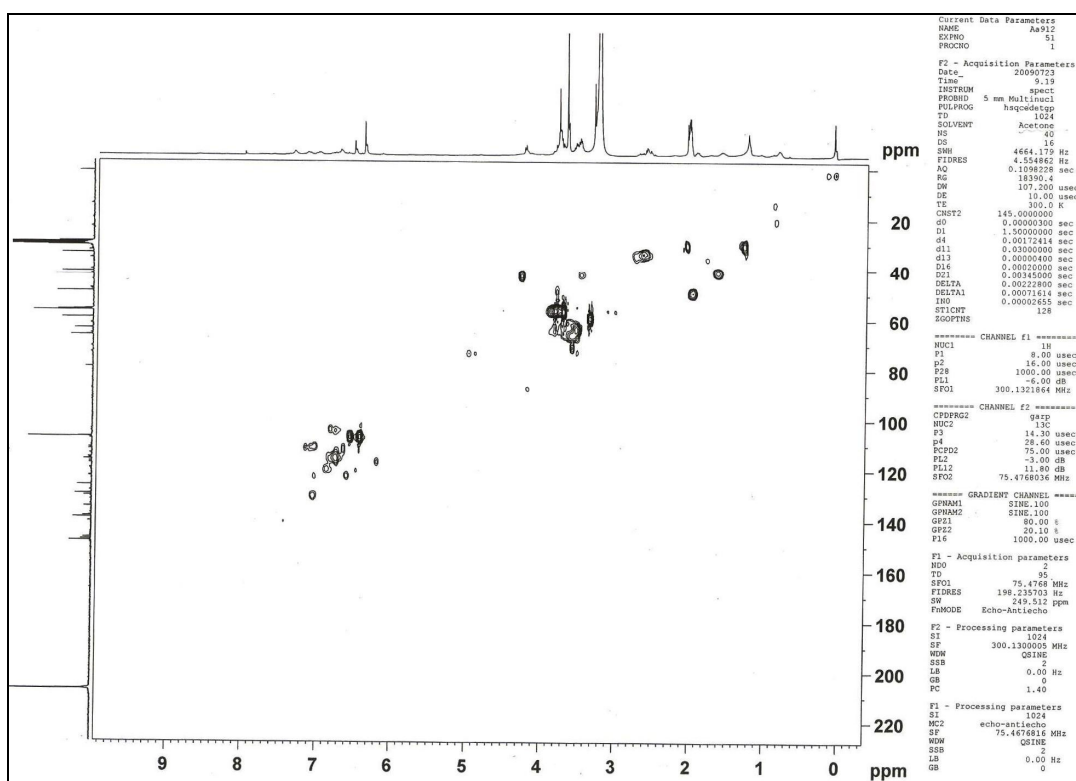


Figura 68: Espectro HSQC de lioniresinol (FR2.3Aa9.12)[300 MHz/75 MHz, Acetona-D₆].

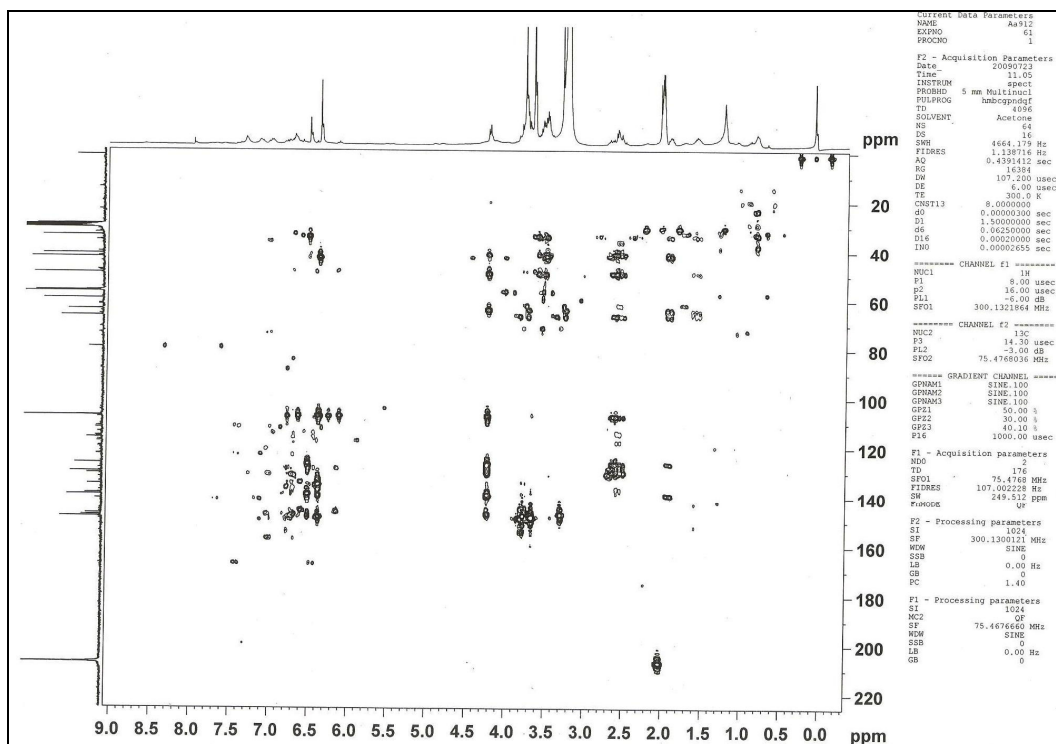


Figura 69: Espectro HMBC de lioniresinol (FR2.3Aa9.12)[300 MHz/75 MHz, Acetona-D₆].

5.2.1.1c – Lioniresinol-9-*O*- β -D-glucopiranosídeo

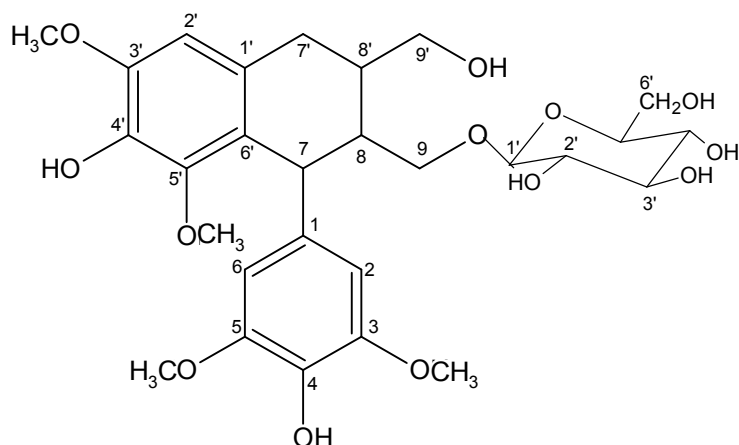


Figura 70: Estrutura da lignana lioniresinol-9-*O*- β -D-glucopiranosídeo isolada do caule *M. vanderwerffii*.

A substância “FR2.3Aa9.23” (35,3 mg) foi obtida da fração FR2.3Aa de acordo com os fracionamentos cromatográficos apresentados na parte experimental (itens 4.5.5.2.1 e 4.5.5.2.1b).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 71) do composto “FR2.3Aa9.23” mostrou dois singletos na região de átomos de hidrogênio aromático (6,43 e 6,58 δ) com intensidade proporcionais a 2:1 respectivamente; um dubleto em 4,41 δ , sinais de átomos de hidrogênio carbinólico (3,61-3,88 δ); três singletos na região de metoxila (3,34, 3,74 e 3,85 δ), mais três sinais na região de hidrogênio alifático [2,62-2,70 δ (m, 2H); 2,09-2,15 δ (m, 1H) e 1,69-1,71 δ (m, 1H)] e um dubleto em 4,28 δ [Tabela 20].

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 72) mostrou vinte e cinco sinais que com o auxílio do HSQC (Figura 73) sugeriram um total de vinte e oito átomos de carbono para o composto “FR2.3Aa9.23”, dos quais doze são aromáticos e dezesseis são alifáticos (quatro metoxilas, quatro átomos de carbono metilênico – três destes ligados a oxigênio – e seis átomos de carbono metínico) [Tabela 20]. Observou-se também no espectro de RMN de ^{13}C , valores de deslocamentos químicos (104,67, 75,07, 78,07, 71,54, 77,78 e 62,70 δ) que foram compatíveis com o açúcar β -D-glucose (HARBORNE & MABRY, 1982) [Tabela 20].

Os espectros bidimensionais HSQC e HMBC (Figura 73 e 74) de FR2.3Aa9.23 corroboraram para estabelecer praticamente as mesmas correlações observadas no item anterior (4.2.1.1b) do Resultados e Discussão para o lioniresinol, levando a concluir que o composto em questão trata-se de uma lignana ariltetralínica, porém com um açúcar na sua estrutura (Tabela 20). A posição do açúcar na molécula foi estabelecida através da correlação a longa distância entre o C-9 (71,54 δ) e o átomo de hidrogênio anomérico do açúcar (71,54 δ , d) observada no espectro de HMBC.

Com base nos dados espectroscópicos obtidos através de experimentos de RMN uni e bidimensionais e literatura (ZHANG *et al.*, 1999; HARBORNE & MABRY, 1982), foi possível identificar o composto FR2.3Aa9.23 como sendo uma lignana ariltetralínica glicosilada, denominada lioniresinol-9-*O*- β -D-glucopiranosídeo (Figura 70). Essa mesma substância também foi identificada em FR2.3Aqppt12.1 (parte experimental 3.5.5.3).

Tabela 20: Dados espectrais de RMN de ^{13}C (75 MHz TMS $\delta = 0$), de ^1H (300 MHz TMS $\delta = 0$) e correlações a longa distância (HMBC) em CDCl_3 do lioniresinol-9-*O*- β -D-glucopiranosídeo (FR2.3Aa9.23).

Lioniresinol-9- <i>O</i> - β -D-glucopiranosídeo (FR2.3Aa9.23)				(ZHANG <i>et al.</i> , 1999)
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, Hz) e HSQC	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$
1	139,26	-	H-7, 2 e 6	137,8
2	106,84	6,43 (s)	H-7	106,5
3	148,95	-	OMe-3	147,7
4	134,5	-	H-2 e 6	134,8
5	148,95	-	OMe-5	147,7
6	106,84	6,43 (s)	H-7	106,5
7	42,67	4,41 (d - 6,8)	H-2, 6 e 9	40,4
8	46,58	2,09-2,15 (m)	H-7 e 7'	46,8
9	71,54	3,86-3,88 (m)	H-7 e 1''	62,7
1'	130,23	-	H-7'	128,8
2'	107,91	6,58(s)	-	107,0
3'	148,61	-	OMe-3'	147,0

Continuação da Tabela 20

Lioniresinol-9- <i>O</i> - β -D-glucopiranosídeo (FR2.3Aa9.23)				(ZHANG <i>et al.</i> , 1999)
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, Hz) e HSQC	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$
4'	138,75	-	H-2'	137,3
5'	147,50	-	OMe-5'	146,6
6'	126,29	-	H-7 e 2'	125,1
7'	33,70	2,62-2,70 (m)	H-2'	32,3
8'	40,49	1,69-1,71 (m)	H-7	39,3
9'	66,18	3,61-3,65 (m)	-	64,9
OMe-3	56,92	3,74 (s)	-	56,4
OMe-5	56,92	3,74 (s)	-	56,4
OMe-3'	56,64	3,85 (s)	-	55,9
OMe-5'	60,25	3,34 (s)	-	59,2
				(HARBONE & MABRY, 1982)
1''	104,67	4,28 (d - 7,5)	H-2''	101,4
2''	75,07	3,20-3,24(m)	-	74,3
3''	78,07	3,25-3,28 (m)	H-6'', 2'' e/ou 4''	77,5
4''	71,54	3,30-3,32 (m)	H-5''	70,3
5''	77,78	3,35-3,39 (m)	H-2'' e/ou 4''	76,8
6''	62,70	3,60-3,70 (m)	-	61,3

**ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E CAULE DE UMA NOVA ESPÉCIE CLASSIFICADA COMO *MEZILAUROS*
VANDERWERFFII (LAURACEAE)**

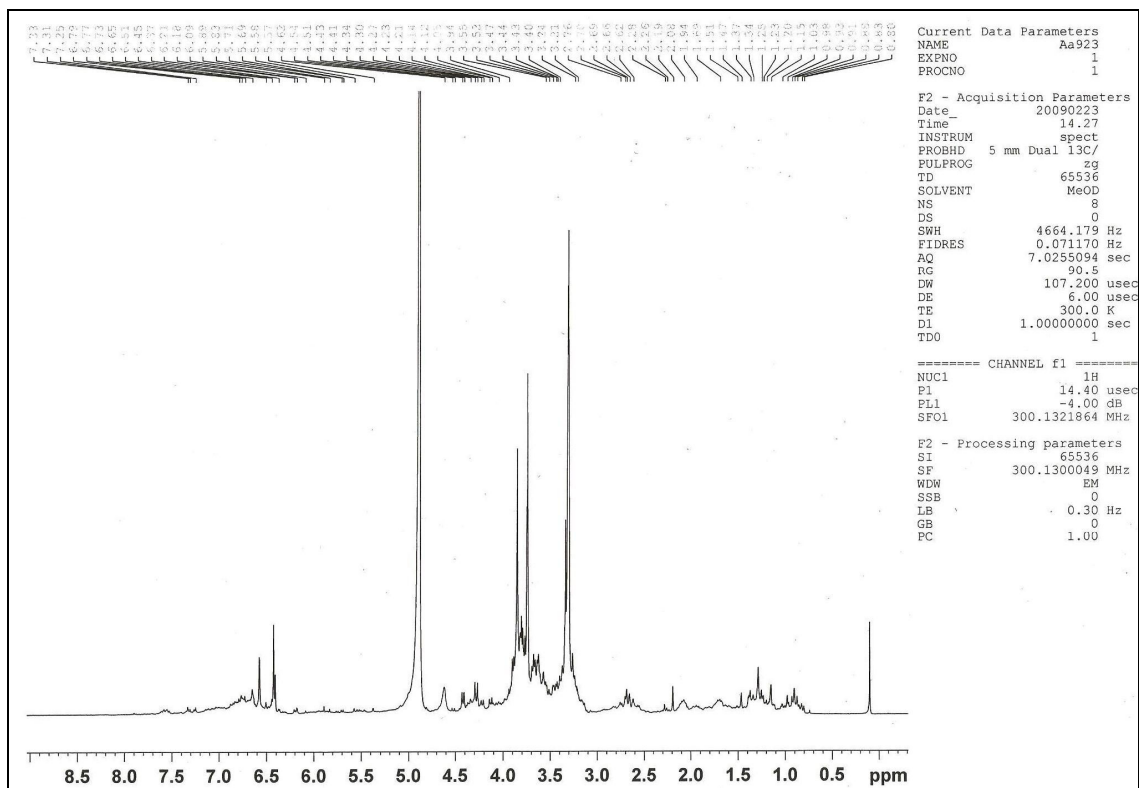


Figura 71: Espectro de RMN de ^1H de lioniresinol-9-*O*- β -D-glucopiranosídeo (FR2.3Aa9.23) [300 MHz, CD_3OD].

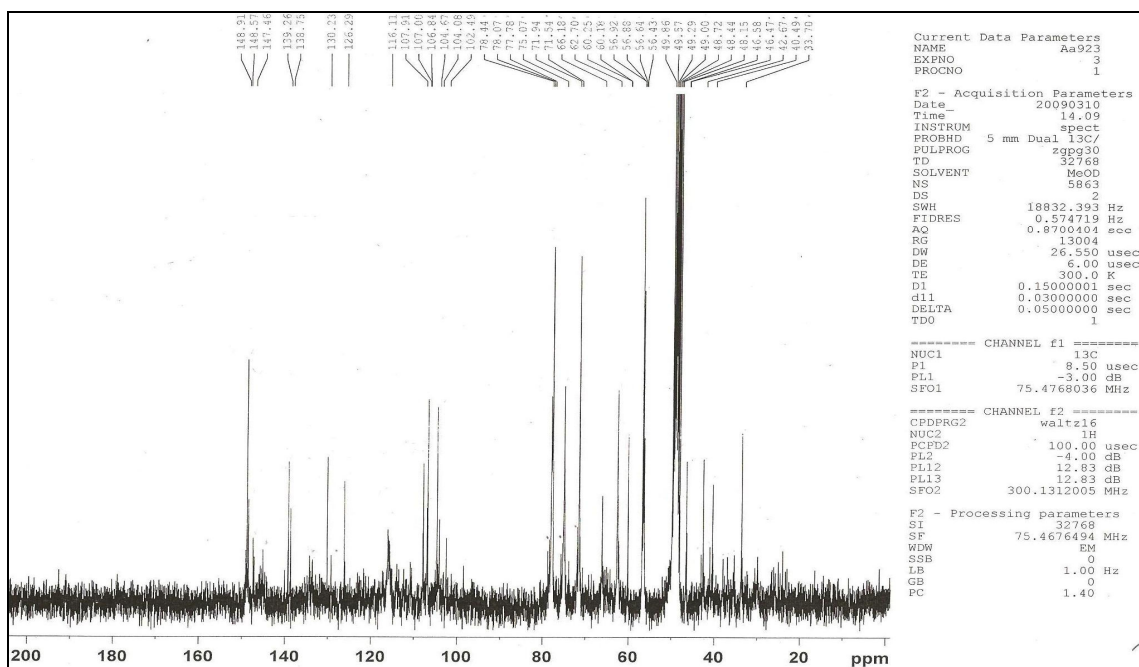


Figura 72: Espectro de RMN de ^{13}C de lioniresinol-9-*O*- β -D-glucopiranosídeo (FR2.3Aa9.23) [75 MHz, CD_3OD].

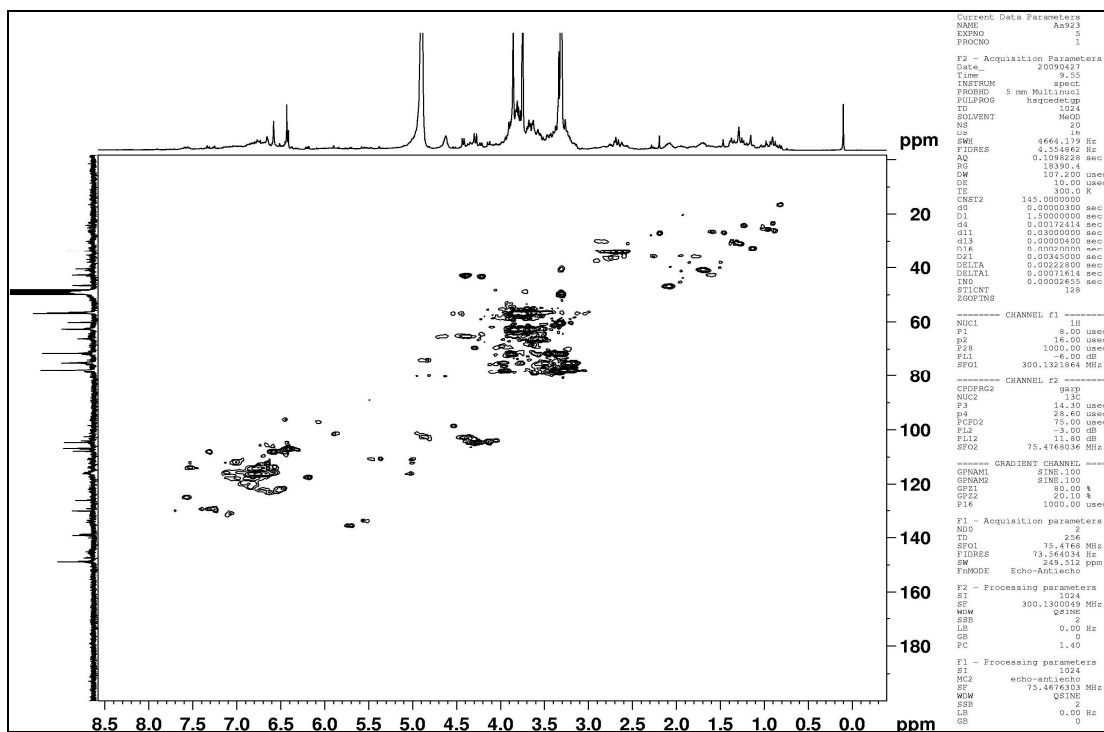


Figura 73: Espectro HSQC de lioniresinol-9-*O*- β -D-glucopiranosídeo (FR2.3Aa9.23)[300 MHz/75 MHz, CD₃OD].

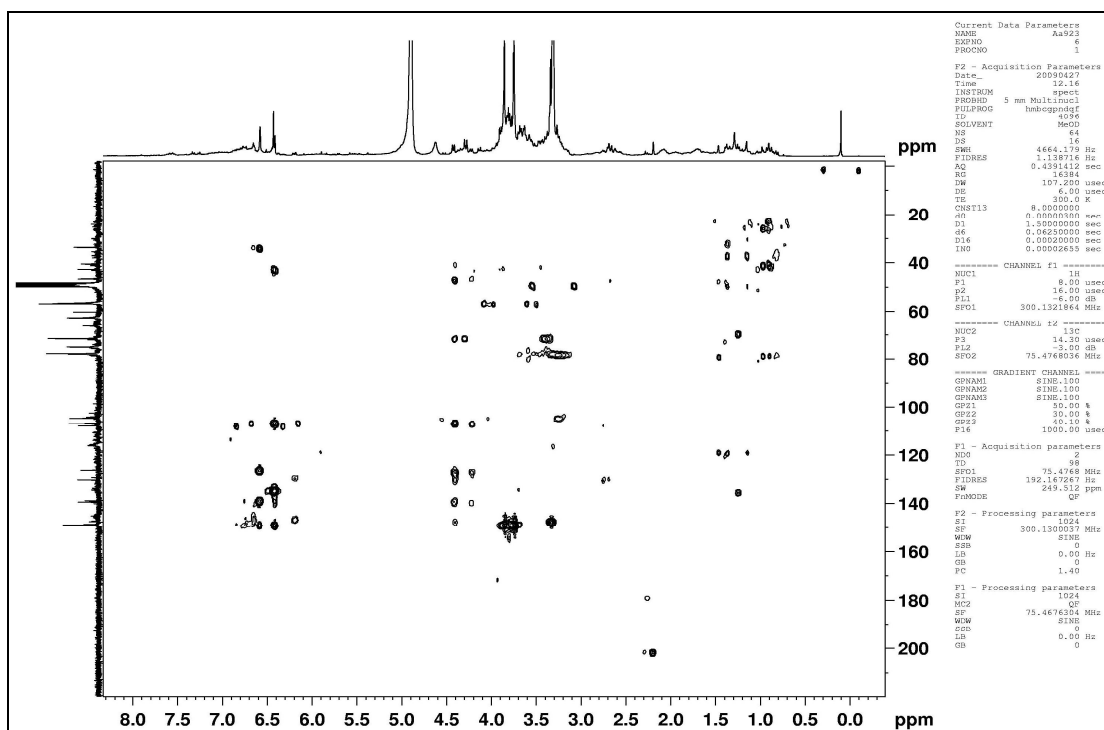


Figura 74: Espectro HMBC de lioniresinol-9-*O*- β -D-glucopiranosídeo (FR2.3Aa9.23)[300 MHz/75 MHz, CD₃OD].

5.2.2 – Identificação de flavonoides e biflavonoide do caule de *M. vanderwerffii*

5.2.2a – Epicatequina

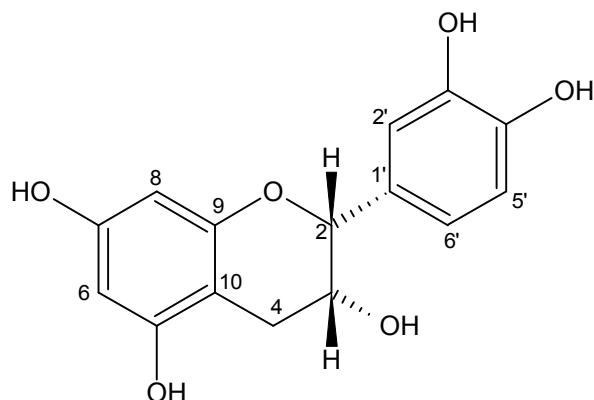


Figura 75: Epicatequina isolada do caule de *M. vanderwerffii*

As substâncias “**20a e 35d**” (10 mg e 53,5 mg respectivamente) foram obtidas da fração FR2.3Aa de acordo com os fracionamentos cromatográficos apresentados na parte experimental (item 4.5.5.2.1a).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 76) foram observados sinais relativos a átomos de hidrogênio aromático de um anel tetrassubstituído em 5,96 (s) e 5,94 (s) δ , de um anel aromático trissubstituído em 6,98 (d) e 6,75-6,82 δ , bem como de átomos de hidrogênio alifático em 4,81 (s), 4,17 (sl), 2,85 (dd) e 2,71 (dd) [Tabela 21].

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 77) foram observados quinze sinais relativos aos compostos “**20a e 35d**”, que com o auxílio do DEPT 135° (Figura 78) foram atribuídos a doze átomos de carbono aromático de anéis tetra e trissubstituídos, a um átomo de carbono quaternário, a um carbono metínico oxigenado e a um carbono metílico (Tabela 21).

Com base nos dados espectroscópicos de RMN unidimensionais, seu aspecto geral e as informações coletadas da literatura (LÔBO *et al.*, 2008), pode-se identificar as

substâncias “20a e 35d” como sendo um flavonoide do tipo Catequina, denominada Epicatequina, cuja fórmula molecular é C₁₅H₁₄O₆.

Tabela 21: Dados espectrais de RMN de ¹³C (75 MHz TMS δ = 0) e de ¹H (300 MHz TMS δ = 0) em CD₃OD da epicatequina (FR2.3Aa20.28.20a e FR2.3Aa20.28.35d).

Epicatequina (20a e 35d)			(LÔBO <i>et al.</i> , 2008)
C/H	δ ¹³ C	δ ¹ H (m, Hz)	δ ¹³ C
2	79,1	4,81 (s)	79,1
3	66,8	4,17 (sl)	66,6
4	28,6	H-4α 2,85 (dd - 4,0: 16,2) H-4β 2,71 (dd - 2,3: 16,2)	28,5
5	157,29	-	157,3
6	95,88	5,96 (s)	96,0
7	157,53	-	156,7
8	94,68	5,94 (s)	95,3
9	157,90	-	157,1
10	100,07	-	99,5
1'	132,21	-	131,7
2'	115,27	6,98 (d -1,5)	115,0
3'	145,67	-	145,0
4'	145,83	-	145,1
5'	115,90	6,75-6,82*	115,4
6'	119,40	6,75-6,82*	119,0

*Sinais sobrepostos

**ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E CAULE DE UMA NOVA ESPÉCIE CLASSIFICADA COMO *MEZILAUROS*
VANDERWERFFII (LAURACEAE)**

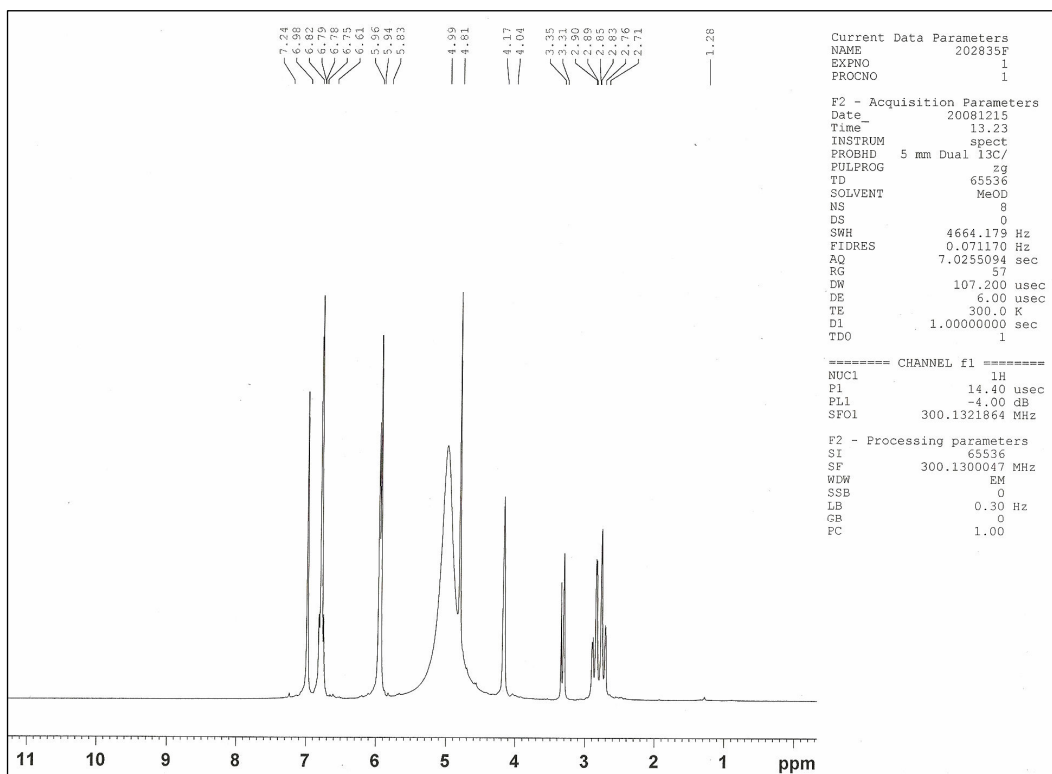


Figura 76: Espectro de RMN de ^1H de epicatequina (**20a** e **35d**) [300 MHz, CD_3OD].

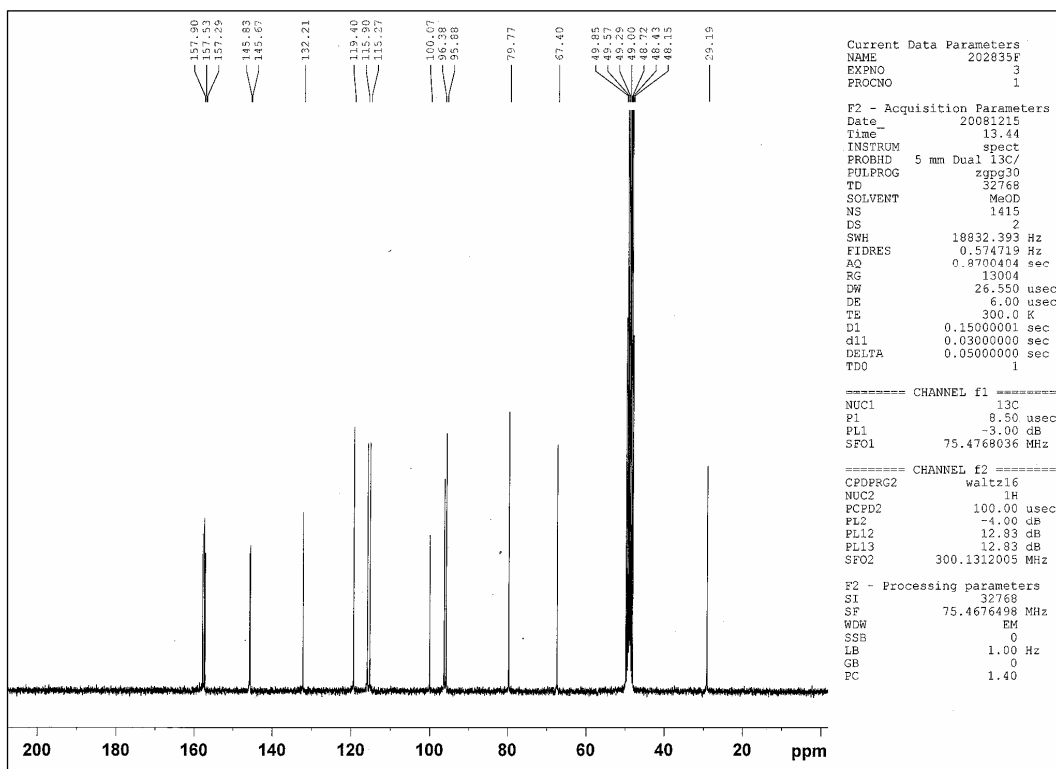


Figura 77: Espectro de RMN de ^{13}C de epicatequina (**20a** e **35d**) [75 MHz, CD_3OD].

**ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E CAULE DE UMA NOVA ESPÉCIE CLASSIFICADA COMO *MEZILAUROS*
VANDERWERFFII (LAURACEAE)**

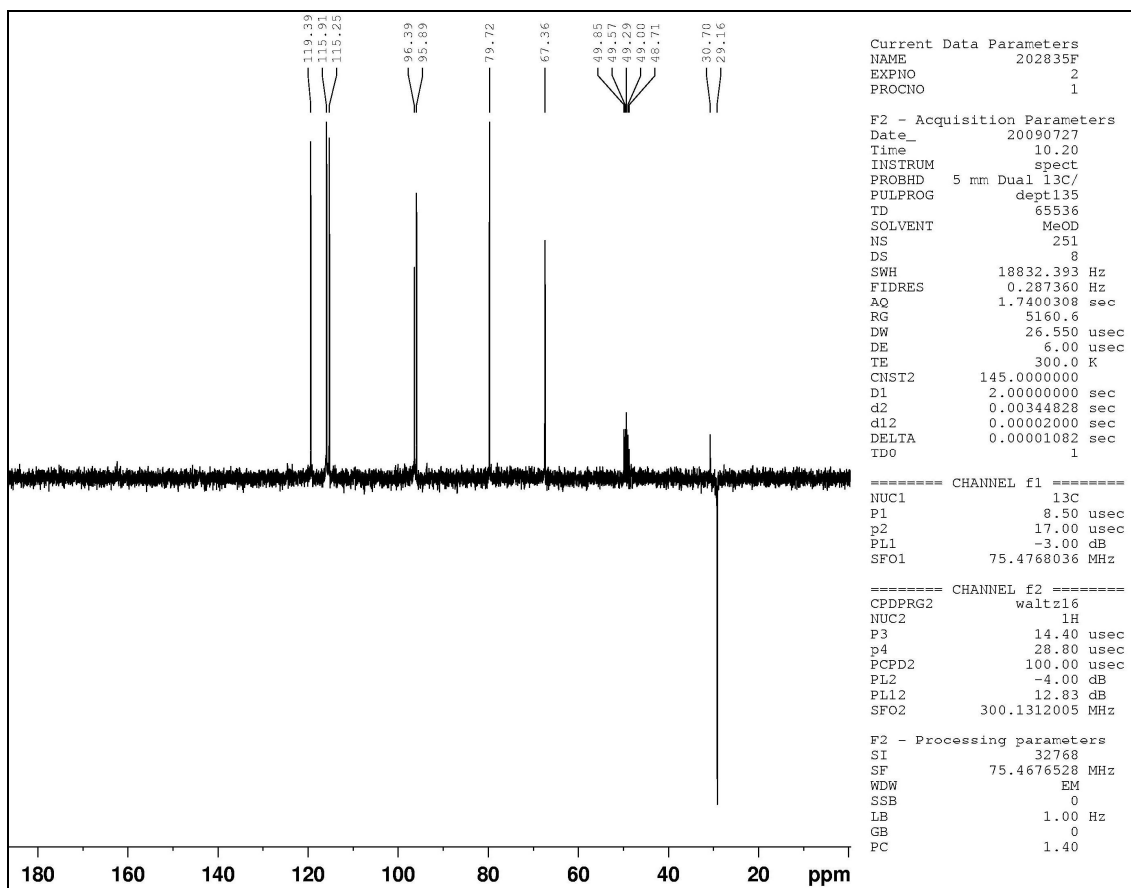


Figura 78: Espectro DEPT 135° de epicatequina (**20a** e **35d**)[75 MHz, CD₃OD].

5.2.2.b – Catequina e epicatequina

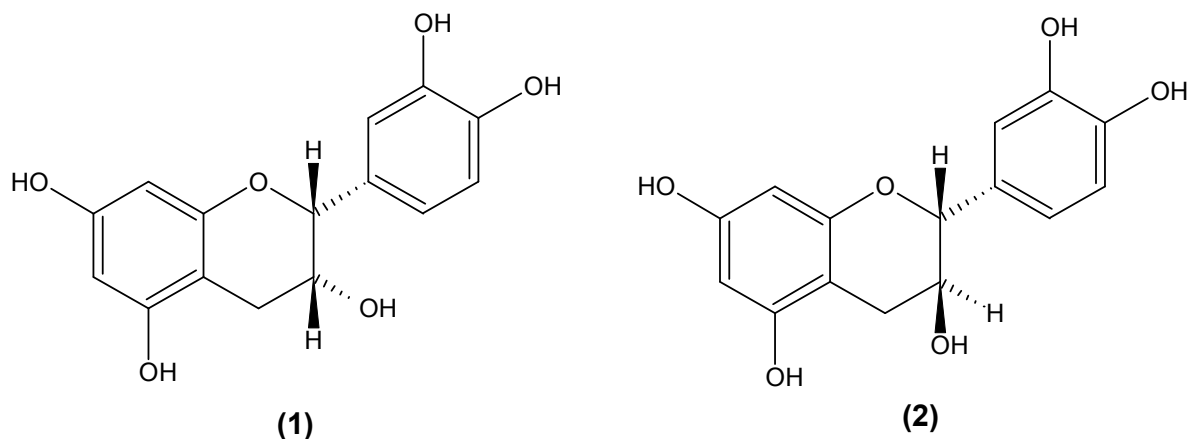


Figura 79: Mistura de catequina (1) e epicatequina (2) obtida do caule de *M. vanderwerffii*

A mistura de substâncias em “FR2.2A24” foram obtidas da fração FR2.2A de acordo com os fracionamentos cromatográficos apresentados na parte experimental (item 4.5.6.1).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 80) foi observado um conjunto de sinais relativos a átomos de hidrogênio na região de aromático em 5,86, 5,87, 5,93 e 5,95 δ , e outro conjunto também na região de aromáticos entre 6,71 e 6,98 δ , bem como de átomos de hidrogênio alifático em 4,81 (sl), 4,56 (d), 3,98 (sl), 4,18 (m), 2,85, 2,71 (d) e 2,50 (sl) [Tabela 22].

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 81) foram observados vinte e três sinais que com o auxílio do DEPT 135° (Figura 82) foram atribuídos a vinte e quatro átomos de carbono aromático de anéis tetra e trissubstituídos, a dois átomos de carbono metílico, e a quatro átomos de carbono metínico oxigenado (Tabela 22).

Com base nos dados espectroscópicos de RMN unidimensionais, seu aspecto geral e as informações coletadas da literatura (LÔBO *et al.*, 2008), pode-se identificar o composto FR2.2A24 como sendo uma mistura de dois flavonoides, catequina e epicatequina, cuja a fórmula molecular de cada um é $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$. Isso pode ser confirmado pela observação dos sinais em 3,98 (sl) e 4,18 (m) no espectro de RMN de ^1H , que são característicos de átomos

de hidrogênio na posição três de epicatequina e catequina respectivamente. A mesma mistura também foi identificada no composto **FR2.3Aqs33a**, segundo dados de RMN unidimensional (parte experimental 3.5.5.3).

Tabela 22: Dados espectrais de RMN de ^{13}C (75 MHz TMS $\delta = 0$) e de ^1H (300 MHz TMS $\delta = 0$) em CD_3OD da mistura de catequina e epicatequina (FR2.2A24).

Epicatequina (A24 majoritário)			Catequina (A24 minoritário)		(LÔBO <i>et al.</i> , 2008)
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, Hz)	δ_{C}	$\delta^1\text{H}$ (m, Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
2	79,81	4,81 (sl)	82,77	4,56 (d)	82,4
3	67,43	3,98 (sl)	68,75	4,18 (m)	68,0
4	29,20	H-4 α 2,85*	28,44	H-4 α 2,85*	28,6
		H-4 β 2,71 (d - 15)		H-4 β 2,50 (sl)	
5	157,31	-	156,86	-	156,6
6	95,91	5,95* [#]	95,52	5,93* [#]	96,0
7	157,57	-	157,50	-	157,5
8	96,42	5,87 [#] (d - 1,6)	96,32	5,86 [#] (d - 1,6)	95,1
9	157,92	-	157,74	-	157,0
10	100,09	-	100,84	-	100,3
1'	132,24	-	132,17	-	131,7
2'	115,31	6,98 (sl)	115,25	6,84 (sl)	115,2
3'	145,71	-	146,15	-	145,6
4'	145,87	-	146,18	-	145,5
5'	115,92	6,75*	116,11	6,76*	115,6
6'	119,41	6,79* [#]	120,05	6,71 [#] (d - 7,5)	119,8

*Sinais sobrepostos; [#]Valores que podem estar trocados.

**ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E CAULE DE UMA NOVA ESPÉCIE CLASSIFICADA COMO *MEZILAUROS*
VANDERWERFFII (LAURACEAE)**

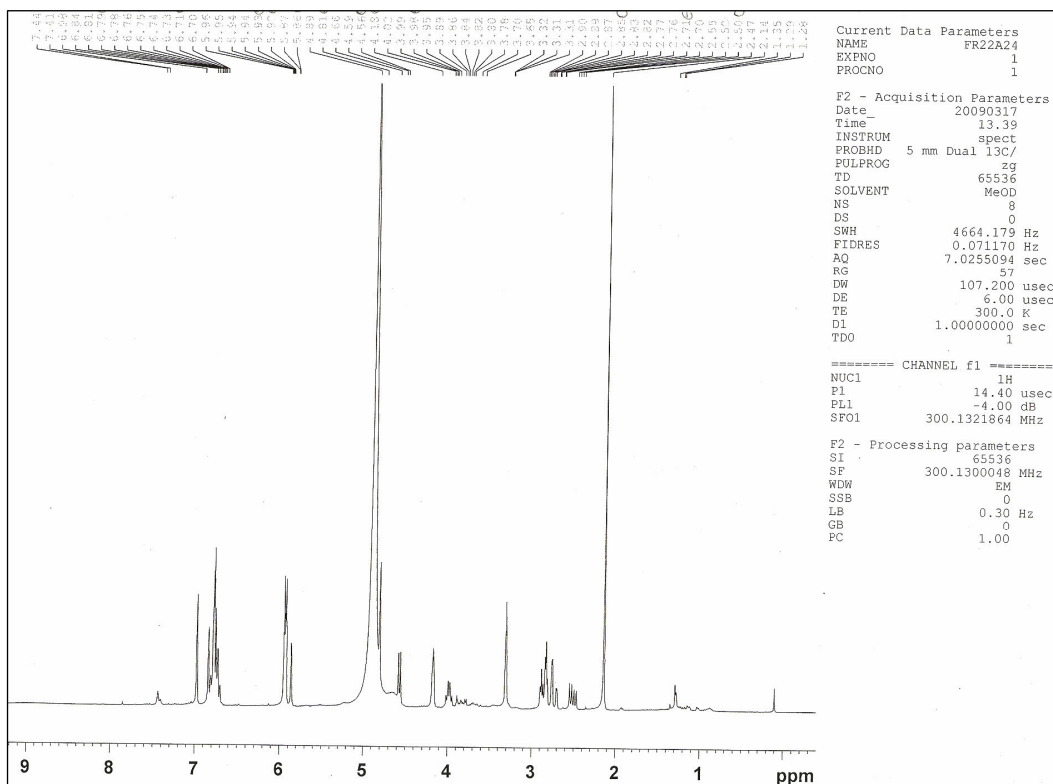


Figura 80: Espectro de RMN de ^1H da mistura de catequina e epicatequina (FR2.2A24) [300 MHz, CD_3OD].

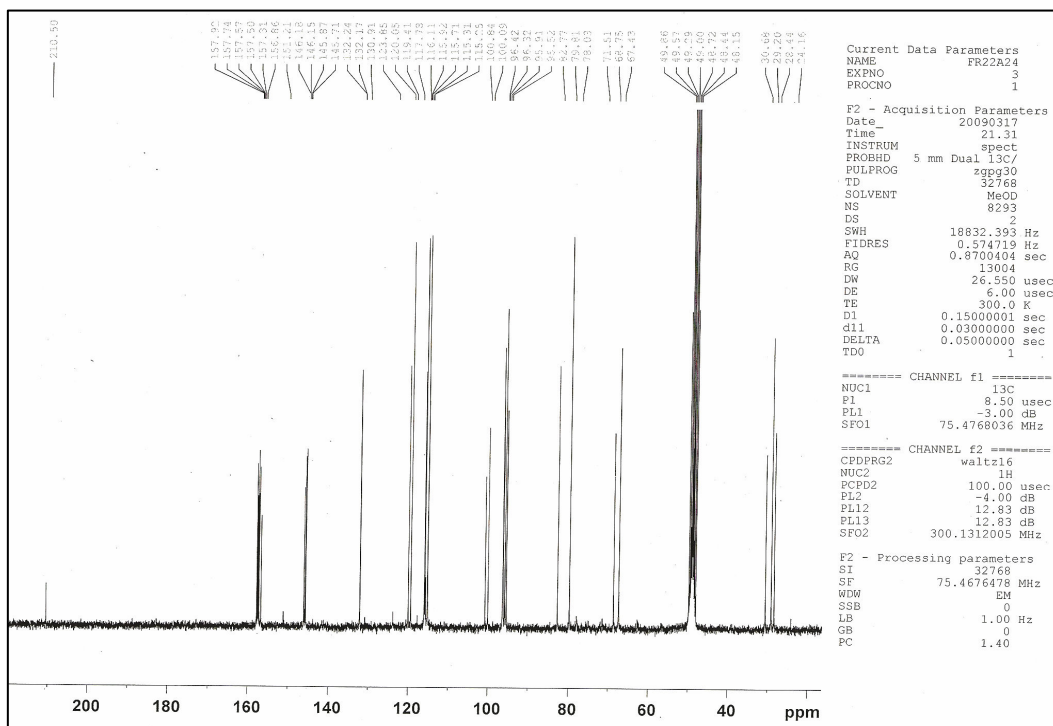


Figura 81: Espectro de RMN de ^{13}C da mistura de catequina e epicatequina (FR2.2A24) [75 MHz, CD_3OD].

**ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E CAULE DE UMA NOVA ESPÉCIE CLASSIFICADA COMO *MEZILAUROS*
VANDERWERFFII (LAURACEAE)**

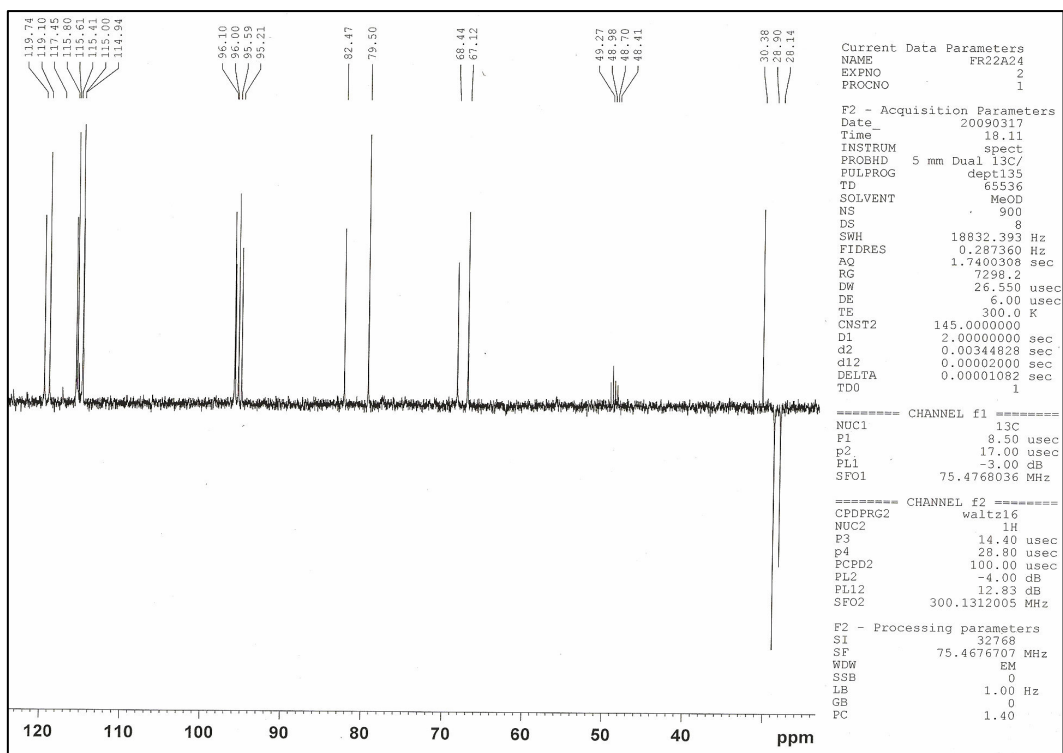


Figura 82: Espectro DEPT 135° da mistura de catequina e epicatequina (FR2.2A24) [75 MHz, CD₃OD].

5.2.2.c – Procianidina B2

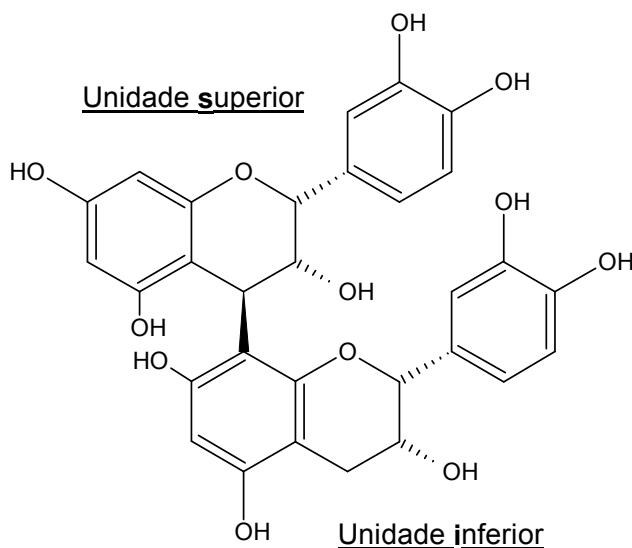


Figura 83: Biflavonoide procianidina B2 obtida do caule de *M. vanderwerffii*

A substância “**35c**” (21,7 mg) foi obtida da fração FR2.3Aa de acordo com os fracionamentos cromatográficos apresentados na parte experimental (item 4.5.5.2.1a).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 84) foi observado um conjunto de sinais relativos a átomos de hidrogênio na região de anel aromático entre 6,71 e 7,12 δ , e outro conjunto em 5,86 e 5,93 δ característico de anel aromático tetrassubstituído (Tabela 23).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 85) foram observados vinte e dois sinais que com o auxílio do DEPT 135° (Figura 86) foram atribuídos a trinta átomos de carbono, dos quais vinte e quatro são aromáticos de anéis tetra e trissubstituídos, um é metilênico e cinco são átomos de carbono metínico, sendo quatro destes oxigenados (Tabela 23).

Com base nos dados de RMN de ^{13}C e comparação com a literatura (HARBORNE & MABRY *et al.*, 1982), e dados de RMN de ^1H juntamente aqueles obtidos da literatura (SHOJI *et al.*, 2003) foi possível identificar a substância **35c** como sendo o biflavonoide Procianidina B2 [epicatequina-(C-4 β →C-8)-epicatequina].

Tabela 23: Dados espectrais de RMN de ^{13}C (75 MHz TMS $\delta = 0$) e de ^1H (300 MHz TMS $\delta = 0$) em CD_3OD da procianidina B2 (FR2.3Aa20.28.35c).

Procianidina B ₂ (FR2.3Aa20.28.35c)			(HARBORNE & MABRY <i>et al.</i> , 1982)
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
2 s [#]	77,06	4,88-5,10*	76,5
2 i [#]	79,74	4,88-5,10*	79,1
3 s	73,49	3,90 (s)	72,8
3 i	68,78	4,27 (sl)	66,2
4 s	37,13	4,63*	36,7
4 i	28,47	2,81*	29,1
		2,88*	
5	156,87	-	155,4
6 s	96,29	5,86 (s)*	97,3
6 i	96,11	5,86 (s)*	96,3
7	157,53	-	155,4
8 s	95,50	5,93*	95,9
8 i	107,30	-	107,6
9 s	157,78	-	157,1
9 i	100,81		
10 s	100,81	-	102,2
10 i	100,50	-	100,6
1' s	132,18	-	132,2
1' i	132,06	-	131,7
2'	115,24	[H-2' s] 6,89 (d - 1,8)	115,4
		[H-2' i] 7,12 (sl)	
3'	145,58	-	145,0
4'	145,83	-	145,2
5'	115,93	6,75*	116,3
6'	120,03	6,71*	119,6

*Sinais sobrepostos; [#]Unidade superior e inferior respectivamente.

**ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E CAULE DE UMA NOVA ESPÉCIE CLASSIFICADA COMO *MEZILAUROS*
VANDERWERFFII (LAURACEAE)**

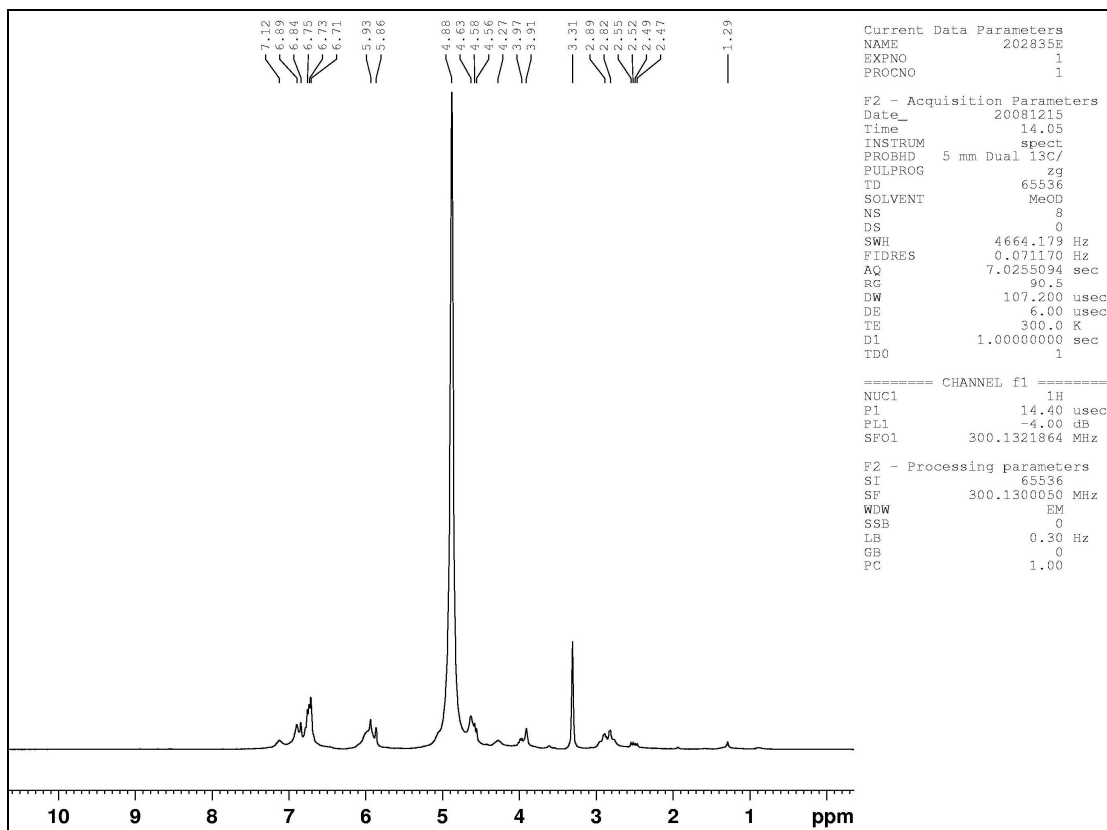


Figura 84: Espectro de RMN de ^1H da procianidina B2 (FR2.3Aa20.28.35c) [300 MHz, CD_3OD].

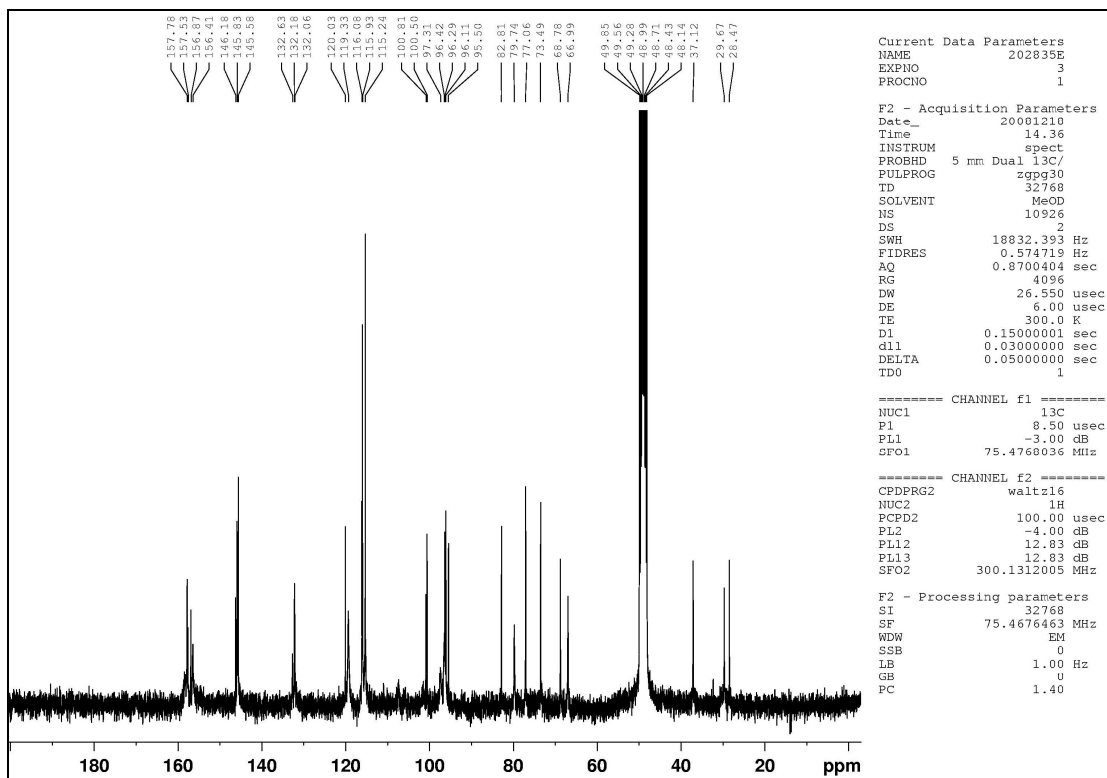


Figura 85: Espectro de RMN de ^{13}C da procianidina B2 (FR2.3Aa20.28.35c) [75 MHz, CD_3OD].

**ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS E CAULE DE UMA NOVA ESPÉCIE CLASSIFICADA COMO *MEZILAUROS*
VANDERWERFFII (LAURACEAE)**

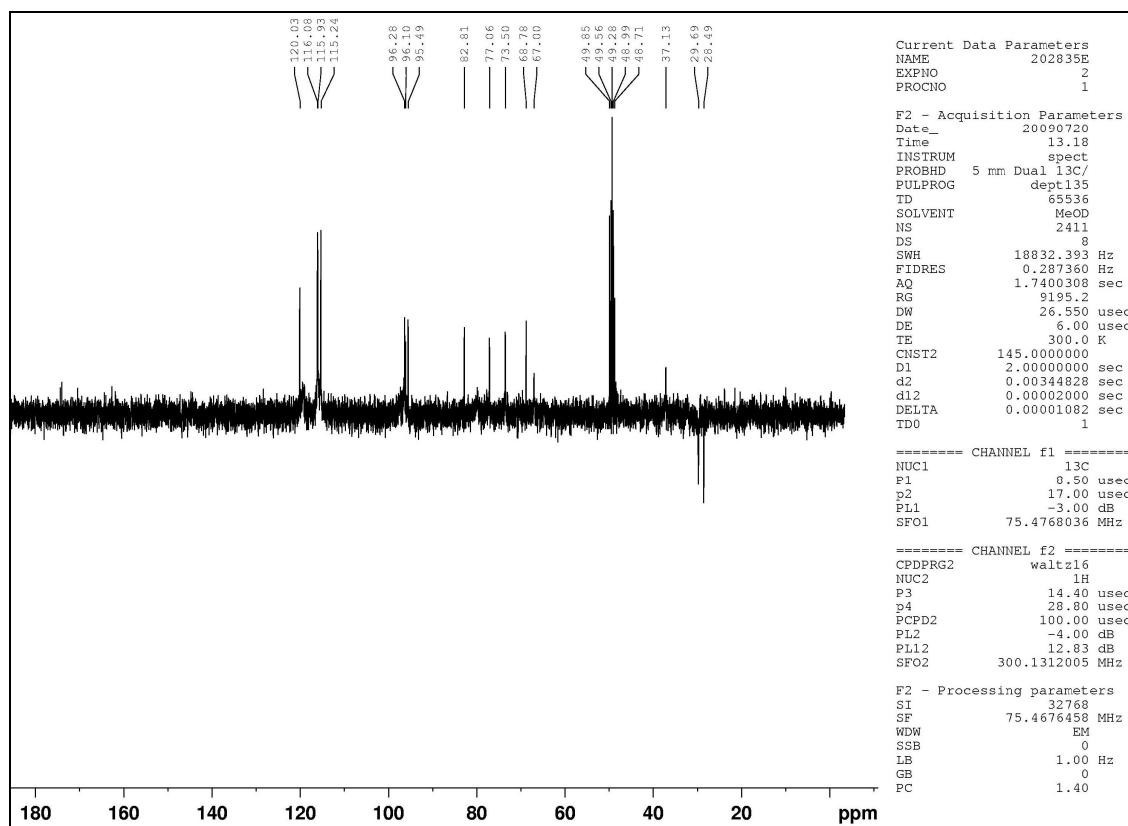


Figura 86: Espectro DEPT 135° da procianidina B2 (FR2.3Aa20.28.35c) [75 MHz, CD₃OD].

5.3 - Estudo da Atividade Biológica

5.3.1 - Avaliação da atividade antibacteriana do extrato etanólico das folhas e caule de *M. vanderwerffii*

O extrato etanólico das folhas foi testado frente aos micro-organismos *E. faecalis*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, e o extrato etanólico do caule frente aos dois últimos, ambos os testes utilizando como padrão o cloranfenicol (Figura 87).

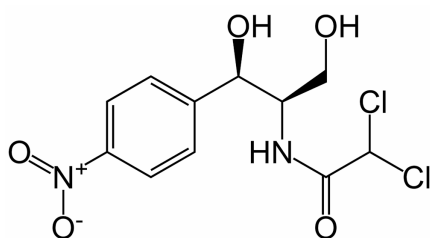


Figura 87: Estrutura do cloranfenicol

O uso das cepas citadas neste teste se justifica, tendo em vista que, atualmente algumas classes de micro-organismos aos quais estas cepas também pertencem, representam extrema preocupação para a saúde pública. Dentre os que mais provocam mortes no mundo estão o *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA), *Staphylococcus aureus* vancomicina-resistente (VRSA), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, que são bactérias resistentes a múltiplas drogas, sem esquecer também da *Enterococcus faecalis*. Os processos infecciosos causados por estas classes de micro-organismos geralmente estão associados à alta letalidade e altos custos de tratamento (ROCHA *et al.*, 2011; VON EIFF *et al.*, 2002).

O critério utilizado para a classificação da atividade antibacteriana foi: Concentração Mínima Inibitória (CMI) menor que 100 µg/mL - boa atividade; CMI de 100 a 500 µg/mL - atividade moderada; CMI entre 500 a 1000 µg/mL - pouco ativo e CMI acima de 1000 µg/mL - inativo (PRETTO *et al.*, 2004; HOLETZ *et al.*, 2002).

O extrato das folhas não apresentou atividade em relação aos micro-organismos testados, enquanto que o extrato do caule apresentou atividade moderada frente a bactéria

S. aureus com CMI de 250 µg/mL, e foi pouco ativo frente a *P. aeruginosa* com CMI de 1000 µg/mL (Tabela 24).

Tabela 24: Dados da atividade antibacteriana do extrato etanólico do caule e das folhas de *M. vanderwerffii*

Concentração Mínima Inibitória (CMI em µg/mL)			
Microorganismos	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>E. faecalis</i> (ATCC 29218)
Frações			
Ex. et. do caule	250	1000	*N.T.
Ex. et. das folhas	*In.	In.	In.
Cloranfenicol	1,0	8,0	0,5

*N.T. – não testado; In. – inativo.

5.3.2 - Avaliação da atividade antifúngica de alguns flavonoides de *M. vanderwerffii*

Os flavonoides kaempferol-3-*O*-β-D-glucopiranosídeo (a), kaempferol-3-*O*-α-L-rhamnopiranosídeo (b) e quercetina 3-*O*-α-L-rhamnopiranosídeo (d) foram testados frente aos microorganismos (leveduras patogênicas) *C. albicans*, *C. krusei* e *C. neoformans*.

O uso dessas cepas justifica-se devido ao fato da maioria das infecções fúngicas serem decorrente de leveduras do gênero *Candida* sp. e *Cryptococcus* sp. As infecções fúngicas invasivas permanecem como importante causa de morbidade e mortalidade, em especial na população de pacientes gravemente enfermos e os imunocomprometidos (MORETTI, 2007).

A avaliação utilizou o teste de susceptibilidade antifúngica pelo método de microdiluição, usando a anfotericina B como antifúngico padrão (Figura 88). Todas as substâncias testadas apresentaram atividade moderada contra as três cepas utilizadas. O menor valor de CMI (concentração mínima inibitória) para todos os casos foi igual a 100 µM. Em relação à cepa *C. albicans*, observou um crescimento menos acentuado de fungos

na concentração de 50 μM em relação às concentrações inferiores para as três substâncias testadas (Tabela 25).

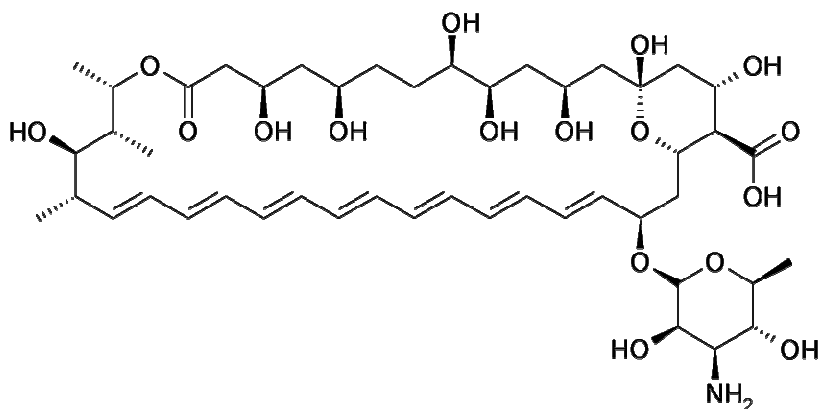


Figura 88: Estrutura da anfotericina B.

Tabela 25: Dados da atividade antifúngica dos flavonoides de *M. vanderwerffii*

Concentração Mínima Inibitória (CMI em μM)				
Microorganismos	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>	<i>C. neoformans</i>
Substâncias				
“a”	100	50	100	100
“b”	100	50	100	100
“d”	100	50	100	100
anfotericina B	0,5		0,5	0,25

5.3.3 - Avaliação da atividade antioxidante de alguns flavonoides de *M. vanderwerffii*

Os flavonoides kaempferol-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo (a), kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (b) e quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (d) tiveram suas atividades antioxidantes testadas utilizando o método do sequestro de radical livre com DPPH, e o ácido caféico como controle (Figura 89).

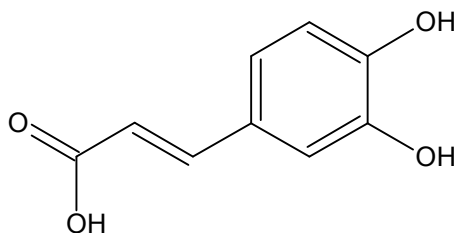


Figura 89: Estrutura do ácido caféico

As propriedades antioxidantes de misturas complexas ou substâncias isoladas podem ser detectadas através de teste qualitativo com solução de beta-caroteno, e medidas por métodos que utilizem o radical livre estável DPPH (1,1-dimetil-2-picril-hidrazina) em ensaios de captação de radical pelas substâncias em análise (REBELLO, 2005). O DPPH como radical livre apresenta coloração violeta e quando reduzido por alguma substância com capacidade antioxidante torna-se amarelo (Figura 90).

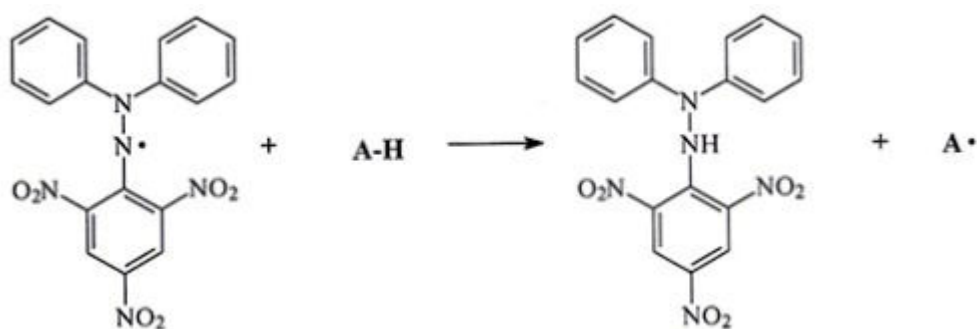


Figura 90: Estrutura do DPPH antes e depois da reação com o antioxidante (AH).

Os testes de atividade antioxidante permitem avaliar a capacidade de um composto em inibir a degradação oxidativa. A atividade é expressa através do valor de IC_{50} (corresponde a concentração da amostra teste que captura 50% do radical DPPH, e é dado em μM), quanto menor esse valor mais antioxidante é a substância.

O menor valor de IC_{50} nos testes realizados neste trabalho como esperado, foi o do controle positivo o ácido caféico ($IC_{50} = 11,53 \pm 0,13 \mu M$), seguido pela quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (d) [$IC_{50} = 14,02 \pm 0,11 \mu M$] e pelo kaempferol-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo (a) [$IC_{50} = 50,08 \pm 0,13 \mu M$]. Isto significa que as substâncias “d” e “a” demonstraram atividade antioxidante positiva, enquanto que o kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (b) apresentou-se inativo frente ao teste (Tabela 26).

A capacidade antioxidante dos flavonoides está relacionada a três características estruturais: 1- presença do sistema *orto*-dihidroxi no anel B com capacidade de doação de elétrons; 2 - a presença do grupo carbonila α - β insaturada em C-4; 3 - a presença de um grupo hidroxílico em C-3 e/ou a ocorrência simultânea de tal grupo em C-3 e C-5. Já a ocorrência de glicosilação em C-3 ou em outros grupos hidroxilas, além de aumentar o peso molecular também contribui para a diminuição da atividade antioxidante (CHLUDIL *et al.*, 2008; CERQUEIRA *et al.*, 2007; DORNAS *et al.*, 2007).

A literatura revela que, em testes antioxidantes usando o radical livre estável DPPH com a quercetina, o potencial antioxidante é sempre maior do que o de seus derivados glicosilados (LEU *et al.*, 2006; OH *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2006). Isto pode ser explicado pela presença das hidroxilas *orto* no anel B, insaturação e hidroxila na posição 3 do anel C, que auxiliam na estabilização do radical flavonoil, enquanto que em seus derivados, a presença de grupos glicosídeos interferem na planaridade do radical e deslocalização do elétron, o que diminui a possibilidade de transferência de elétrons para o radical DPPH, levando a um decréscimo na sua ação antioxidante (BARREIROS *et al.*, 2006). Com relação ao kaempferol e seus derivados, a literatura consultada mostra resultados ambíguos. Em alguns artigos os testes com o kaempferol e seus derivados demonstraram suas capacidades antioxidantes (na maioria das vezes menor do que os da quercetina e seus derivados), enquanto que em outros, eles se apresentaram inativos (LEU *et al.*, 2006; OH *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2006).

Tabela 26: Dados da atividade antioxidante dos flavonoides de *M. vanderwerffii*

Substâncias	*IC ₅₀ (μM)
kaempferol-3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosídeo	50,08 $\pm$ 0,13
kaempferol-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopiranosídeo	*In.
quercetina-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopiranosídeo	14,02 $\pm$ 0,11
Ácido caféico (controle)	11,53 $\pm$ 0,13

* IC₅₀ - concentração que inibi 50% dos radicais livres, calculada com base na análise de regressão linear; In. – inativo.

6 - CONCLUSÃO

A investigação química das folhas de *M. vanderwerffii* levou a identificação de quatro flavonoides, sendo dois derivados glicosilados do kaempferol: kaempferol-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo, kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo; e dois derivados glicosilados da quercetina: quercetina-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo, quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo. Dois terpenos também foram identificados: o sesquiterpeno de esqueleto aromadendrano espatulenol, e o triterpeno de esqueleto ursano, ácido ursólico, bem como um novo policetídeo γ -lactônico cuja estrutura ainda não foi confirmada.

O estudo químico do caule possibilitou a identificação de mais compostos pertencentes à classe dos flavonoides, desta vez uma epicatequina, uma mistura de catequina e epicatequina e uma procianidina B2 (biflavonoide). Compostos da classe das lignanas também foram identificados em *M. vanderwerffii*, sendo eles: siringaresinol, lioniresinol e lioniresinol-9-*O*- β -D-glucopiranosídeo.

As classes aos quais os compostos isolados neste trabalho pertencem (flavonoides, terpenos e lignanas) seguem bem presentes nas espécies da família Lauraceae, porém são inéditas no gênero *Mezilaurus*.

Ensaio biológicos de capacidade antioxidante e antifúngica foram realizados com três dos quatro flavonoides identificados. No ensaio antioxidante pelo método do DPPH, os flavonoides kaempferol-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo e quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo demonstraram atividade moderada ($IC_{50} = 50,08 \pm 0,13 \mu M$) e boa ($IC_{50} = 14,02 \pm 0,11 \mu M$) respectivamente, se comparado ao controle positivo, o ácido caféico ($IC_{50} = 11,53 \pm 0,13 \mu M$), por outro lado o kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo mostrou-se inativo. No teste frente aos fungos patogênicos *C. albicans*, *C. krusei* e *C. neoformans*, pelo método de microdiluição em placa com 96 poços, os três flavonoides apresentaram atividade antifúngica moderada (CMI = 100 μM) se comparado ao padrão anfotericina B com valores de CMI = 0,5 μM para os dois primeiros micro-organismos e CMI = 0,25 μM para o último. Quanto ao flavonoide quercetina-3-*O*- β -D-glucopiranosídeo, nenhum teste biológico foi realizado, pois o mesmo se encontra em mistura.

Ensaio de atividade antibacteriana foram realizados com os extratos etanólicos das folhas e caule de *M. vanderwerffii*, pelo método de microdiluição em placas de 96 poços. O extrato das folhas foi testado contra as bactérias patogênicas *S. aureus*, *P. aeruginosa*, e *E. faecalis*, e apresentou-se inativo frente a esses micro-organismos. O extrato do caule, testado apenas contra a *S. aureus* e a *P. aeruginosa*, apresentou atividade moderada para a primeira (CMI = 250 µg/mL), e fraca para a segunda (CMI = 1000 µg/mL). As concentrações mínimas inibitórias do padrão cloranfenicol foram 1,0 µg/mL para a primeira bactéria, 8,0 µg/mL para a segunda e 0,5 µg/mL para a terceira.

Os resultados deste estudo, não são apenas relevantes por fornecerem dados que poderão facilitar futuramente, a consulta e a execução de novos trabalhos relativos ao isolamento e elucidação estrutural de substâncias aqui descritas, mas também por contribuir para o conhecimento da composição química de espécies da família Lauraceae, principalmente quando estas pertencem a um gênero tão restrito, por isso especial, como é o caso do gênero *Mezilaurus*.

7. REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P. K.; THAKUR, R. S. ^{13}C NMR Spectroscopy of Lignan and Neolignan Derivatives. *Magn. Reson. Chem.* 1985, **23**, 389-418.
- AGRAWAL, P. K. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1989.
- ANDRADE, F. D. P.; SANTOS, L. C.; DOKKEDAL, A. L.; VILEGAS, W. Acyl glucosylated flavonols from *Paepalanthus* species. *Phytochemistry*. 1999, **51**, 411-415.
- ALMEIDA, A. P.; MIRANDA, M. M. F. S.; SIMONI, I. C.; WIGG, M. D.; LAGROTA, M. H. C.; COSTA, S. S. Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of *Persea americana* (Lauraceae) leaf infusion. *Phytother. Res.* 1998, **12**, 562-567.
- ALVES, F. M.; BAITELLO, J. B. Uma nova espécie de *Mezilaurus* Taubert (Lauraceae) para a flora brasileira. *Acta Bot. Bras.* 2008, **22**, 355-358.
- AROT, L. O. M.; MIDIWO, J. O.; KRAUS, W. A flavonol glycoside from *Myrsine africana* leaves. *Phytochemistry*. 1996, **43**, 1107-1109.
- BATISTA, A.L.; Estudo Fitoquímico das Folhas e Casca de *Nectandra cuspidata* (Meissn.) Mez. Lauraceae. [Dissertação.] Campo Grande: Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2001.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova*. 2006, **29**, 113-123.

BARRERA, E. D. C.; SUÁREZ, L. E. C. Metabólitos con actividad biológica aislados de especies pertenecientes a la familia Lauraceae. *Scientia et Technica*. 2007, **33**, 363-364.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B.; HESS, S. C.; MESSANA, I.; FERRARI, F.; YUNES, R. A. Study of the antinociceptive action of the ethanolic extract and the triterpene 24-hydroxytormentic acid isolated from the stem bark of *Ocotea suaveolens*. *Planta Med.* 1999, **65**, 50-55.

BISOLI, E. Derivados Fenantrênicos, Outros Compostos Aromáticos e Triterpenóides Bioativos de Raízes e Galhos de *Combretum laxum* Jacq. (Combretaceae). [Dissertação.] Campo Grande: Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2009.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Cienc. Cult.* 2003, **55**, 37-38.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quim. Nova*. 2007, **30**, 441-449.

CHLUDIL, H. D.; CORBINO, G. B. e LEICACH, S. R. Soil Quality Effects on *Chenopodium album* Flavonoid Content and Antioxidant Potential. *J. Agric. Food Chem.* 2008, **56**, 5050-5056.

CHAVEZ, J. P.; GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M.; 10-desmethyl-1-methyleudesmanes from *Ocotea corymbosa*. *Phytochemistry*. 1995, **39**, 849.

CHRISTOPHEL, D. C.; ROWETT, A. I. "The use of cuticular feature in the taxonomy of the Lauraceae". *Ann. Mo. Bot. Gard.* 1996, **83**, 419-432.

CORDELL, G. A. Biodiversity and drug discovery: a symbiotic relationship. *Phytochemistry*. 2000, **55**, 463-480.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: a continuing source of novel drug leads. *Pure Appl. Chem.* 2005, **77**, 7-24.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach, 2nd ed. New York: Wiley, 2002.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; SANTOS, A. F.; NAGEM, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 2007, **28**, 241-249.

Disponível em:

<http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Mezilaurus&commonname>. Acesso em 30 de agosto de 2008.

GARCEZ, W. S.; Constituintes Químicos de *Ocotea vellosiana* (Meissn.) Mez. Lauraceae. [Tese.] São Paulo: Instituto de Química, USP, 1991.

GARCEZ, W. S.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Benzylisoquinoline alkaloids and flavonols from *Ocotea vellosiana*. *Phytochemistry*. 1995, **39**, 815-816.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MARTINS, M.; CRUZ, A. C. A bioactive lactone from *Nectandra gardneri*. *Planta Med.* 1999, **65**, 775.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MARTINS, M.; MATOS, M. F. C.; GUTERRES, Z. R.; MANTOVANI, M. S.; MISU, C. K.; NAKASHITA, S. T. Cytotoxic and Genotoxic butanolides and lignans from *Aiouea trinervis*. *Planta Med.* 2005a, **71**, 923-927.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M. G. E.; SHIMABUKURO, A. A. *J. Indole alkaloid and other constituents from *Ocotea minarum*. J. Brazil. Chem. Soc.* 2005b, **16B**, 1382-1386.

GARCIA, E. S.; SILVA, A. C. P.; GILBERT, B.; CORRÊA, C. B. V.; CAVALHEIRO, M. V. S.; SANTOS, R. R.; TOMASINI, T. *Fitoterápicos*. Campinas: André Tosello, 1996.

GARCIA, E. S.; CABRAL, M. M. O.; SHAUB, G. A.; GOTTLIEB, O. R.; AZAMBUJA, P. Effects of lignoids on a hematophagous bug, *Rhodnius prolixus*: feeding, ecdysis and diuresis. *Phytochemistry*. 2000, **55**, 611-616.

GEISSMAN, T. A.; CROUT, D. H. G. *Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism*. USA: Freeman, 1969.

GOTTLIEB, O. R. Plant chemosystematics and phylogeny. III. Chemosystematics of the Lauraceae. *Phytochemistry*, 1972, **11**, 1537-1570.

GOTTLIEB, O. R. e YOSHIDA, M. Lignóides – Com Atenção Especial à Química das Neolignanas. *Quim. Nova*. 1984, **7**, 250-272.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. DE M. B. Quantitative Chemobiology: A Guide into the Understanding of Plant Bioactivity. *J. Brazil. Chem. Soc.* 2002, **13**, 772-776.

GRANATO, D.; NUNES, D. S.; MATTOS, P. P.; RIOS, E. M.; GLINSKI, A.; RODRIGUES, L. C.; ZANUSSO JÚNIOR, G. Chemical and Biological Evaluation of Rejects from the Wood Industry. *Braz. Arch. Biol. Techn.* 2005, **48**, 237-241.

HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. *The Flavonoids: Advances in Research*. New York: Chapman and Hall, 1982.

HARBORNE, J. B. Advances in chemical ecology. *Nat. Prod. Rep.* 1993, **10**, 327-348.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H.; *Phytochemical Dictionary: a Handbook of Bioactive Compounds from Plants.* London: Taylor & Francis, 1995.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R. ; CORTEZ, D. A. G. ; NAKAMURA, C. V. ; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2002, **97**, 1027-1031.

JOLY, A.B. *Introdução à taxonomia vegetal.* São Paulo: Nacional, 1991.

LEU, C. H.; LI, C. Y.; YAO, X.; WU, T. S. Constituents from the Leaves of *Phellodendron amurense* and Their Antioxidant Activity. *Chem. Pharm. Bull.* 2006, **54**, 1308-1311.

LÔBO, L. T.; CASTRO, K. C. F.; ARRUDA, M. S. P.; SILVA, M. N.; ARRUDA, A. C.; MULLER, A. H.; ARRUDA, G. M. S. P.; SANTOS, A. S. Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (Leguminosae). *Quim. Nova.* 2008, **31**, 493-497.

LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. *Biossíntese de Produtos Naturais.* 1ª ed. Lisboa: IST Press, 2007.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA Jr, V.F; GRYNBERG, N.F.; ECHEVERRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quím. Nova.* 2002, **25**, 429-438.

MARQUES, C. A. “Importância Econômica da Família Lauraceae Lindl”. *Floresta e Ambiente.* 2001, **8**, 195.

MARTINS, M.; Estudo Químico da Raiz, Caule Subterrâneo e Folhas de *Aiouea trinervis*. [Dissertação.] Campo Grande: Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2004.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JR., M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E. Flora vascular do bioma Cerrado. Disponível em:

<<ftp://geofp.ibge.gov.br/documentos/recursosnaturais/levantamento/floravascular.pdf>>.

Acesso em 15 de janeiro de 2010.

MIRANDA, A. C. M. Sesquiterpenos da casca do caule de *Nectandra cissiflora* Nees (Lauraceae). [Dissertação.] Campo Grande: Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2008.

MOREIRA, I. S.; ROQUE, N. F.; CONTINI, K.; LAGO, J. H. G. Sesquiterpenos e hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopia emarginata* (Annonaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 2007, **17**, 55-58.

MORETTI, M. L. A importância crescente das infecções fúngicas. *Rev. Panam. Infect.* 2007, **9**, 8-9.

MULINACCI, N.; VINCIERI, F. F.; BALDI, A.; BAMBAGIOTTI-ALBERTI, M.; SENDL, A.; WAGNER, H. Flavonol glycosides from *Sedum telephium* subspecies maximum leaves. *Phytochemistry*. 1995, **38**, 531-533.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J.; Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 2000, **403**, 853.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI /NCCLS M27-A2). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. 2002.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI /NCCLS M-7-A6). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-sixth edition. Approved document M7-A6. Wayne (PA)7. 2005.

NAWWAR, M. A. M.; BUDDRUS, J.; BAUER, H. Dimeric phenolic constituents from the roots of *Tamarix nilotica*. *Phytochemistry*. 1982, **21**, 1755-1758.

NEWMAN, D. J. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 2003, **66**, 1022-1037.

OH, H.; KIM, D. H.; CHO, J. H.; KIM, Y. C. Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004, **95**, 421-424.

OLEA, R. S. C.; ROQUE, N. F. Análise de estruturas de triterpenos por RMN de ^{13}C . *Quím. Nova*. 1990, **13**, 278-281.

PASSAMONTI, S.; TERDOSLAVICH, M; FRANCA, R.; VANZO, A.; TRAMER, F.; BRAIDOT, E.; PETRUSSA, E.; VIANELLO, A. Bioavailability of Flavonoids: A Review of Their Membrane Transport and the Function of Bilirubin Translocase in Animal and Plant Organisms. *Curr. Drug Metab.* 2009, **10**, 369-394.

PINENT, M.; CASTELL, A.; BAIGES, I.; MONTAGUT, G.; AROLA, L.; ARDÉVOL, A. Bioactivity of Flavonoids on Insulin-Secreting Cells. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 2008, **7**, 299-308.

PORTO, P. A. L. S. Estudo da Atividade Antioxidante de Catequinas e Procianidinas Oligoméricas. [Dissertação.] Departamento de Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2002.

PRETTO, J. B.; CECHINEL FILHO, V.; NULDIN, V. F.; SARTORI, M. R. K.; ISAISAS, E. B.; BELLA CRUZ, A. Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense*. *Z. Naturforsch.* 2004, **59**, 657-662.

QUINET, A. & ANDREATA, R. H. P. Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. *Rodriguésia*. 2002, **53**, 59-121.

QUINET, A. Sinopse taxonômica da família Lauraceae no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Act. Bot. Bras.* 2005, **19**, 563-572.

RAGGI, L. Estudo da composição química e das atividades biológicas de óleos voláteis de espécies de Lauraceae, em diferentes épocas do ano. [Dissertação.] São Paulo: Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2008.

REBELLO, J. M. Avaliação da atividade antioxidante e antifúngica de análogos sintéticos da acetofenona e pró-oxidante e antitumoral de chalconas sintéticas. [Dissertação.] Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

RODRIGUES, E. D. Estudo químico das folhas e flores de *Lafoensia densiflora* Pohl (Lytraceae). [Dissertação.] Campo Grande: Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 1999.

SCHIJLEN, E. G. W. M.; VOS, C. H. R. ; TUNEN, A. J. V. ; BOVY, A. G. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*. 2004, **65**, 2631–2648.

SHOJI, T.; MUTSUGA, M.; NAKAMURA, T.; KANDA, T; AKIYAMA, H; GODA, Y. Isolation and structural elucidation of some procyanidins from apple by low-temperature Nuclear Magnetic Resonance. *J. Agric. Food Chem.* 2003, **51**, 3806-3813.

SILVA, R.; NAGEM, T. J.; MESQUITA, A. O. A. L.; GOTTLIEB, O. R. γ -Lactones from *Mezilaurus synandra*. *Phytochemistry*. 1983, **22**, 772-773.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia, da planta ao medicamento. 3º ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia, da planta ao medicamento. 5º ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2004.

SUZUKI, S.; UMEZAWA, T. Biosynthesis of lignans and norlignans. *J. Wood Sci.* 2007, **53**, 273–284.

TIELLET, F.; BOUMENDJEL, A.; BOUTONNAT, J.; RONOT, X. Flavonoids as RTK Inhibitors and Potential Anticancer Agents. *Med. Res. Rev.* 2008, **28**, 715-745.

UMEZAWA, T. Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochem. Rev.* 2003, **2**, 371–390.

VAN DER WERFF, H. A revision of *Mezilaurus* (Lauraceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 1987, **74**, 153-182.

VILEGAS, W.; NEHME, C. J.; DOKKEDDAL, A. L.; PIACENTE, S.; RASTRELLI, L.; PIZZA, C. Quercetagenin 7-methyl ether glycosides from *Paepalanthus vellozioides* and *Paepalanthus latipes*. *Phytochemistry*. 1999, **51**, 403-409.

WANG, K.; CHEN, L.; LI, N.; YU, X. Antioxidant and radical-scavenging activity of flavonoids from *Solidago Canadensis*. *Zhongguo Yaoxue Zazhishe*. 2006, **41**, 493-497.

YANEZ, R. X.; DE DIAZ, A. M. P. Consideraciones biogenéticas sobre los neolignanos aislados de la corteza de *Mezilaurus itauba*. *Revista Colombiana de Química*. 1985, **14**, 65-69.

YANEZ, R. X.; DE DIAZ, A. M. P.; DIAZ, P. P. Neolignans from *Mezilaurus itauba*. *Phytochemistry*. 1986, **25**, 1953-1956.

YOSHIDA, N. C. Estudo fitoquímico das partes aéreas (folhas e cerne do caule) de *Unonopsis lindmanii* R. E. Fries (R. E. Fries) Annonaceae, e avaliação da atividade biológica por bioensaios simples. [Dissertação.] Campo Grande: Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2007.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Ed.) Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó: Argos, 2001.

ZHANG, X.; GUO, D.; LI, C.; ZHENG, J.; KOIKE, K.; JIA, Z. e NIKAIDO, Z. Gaultherins A and B, two lignans from *Gaultheria yunnanensis*. *Phytochemistry*. 1999, **51**, 569-472.

ZHANG, X.; XU, J.; WANG, J.; WANG, N.; KURIHARA, H.; KITANAKA, S. e YAO, X. Bioactive bibenzyl derivatives and fluorenones from *Dendrobium nobile*. *J. Nat. Prod.* 2007, **70**, 24-28.