

Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Departamento de Química Orgânica

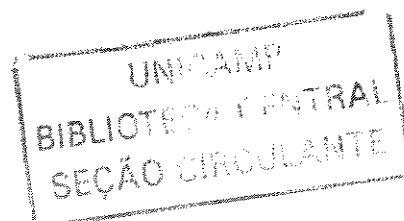
Dissertação de Mestrado

**Contribuições à Química das Recompensas Florais de
*Guttiferae (Clusia) e Orchidaceae (Maxillariinae)***

Mirele Sanches Fernandes Lapis

Orientadora: Profa. Dra. Anita J. Marsaioli

Março de 2005



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	L314c
V	EX
TOMBO BC/	65147
PROC. 16- P-	00086-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11 00
DATA	03/08/05
Nº CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA
UNICAMP

Bib. id. 360820

L315c

Lapis, Mirele Sanches Fernandes.

Contribuições à química das recompensas florais de *Guttiferae (Clusia)* e *Orchidaceae (Maxillariinae)*. / Mirele Sanches Fernandes Lapis. -- Campinas, SP: [s.n], 2005.

Orientador: Anita Jocelyne Marsaioli.

Dissertação – Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Fragrâncias. 2. Antioxidantes. 3. Antineoplástico. 4. Topoisomerase. I. Marsaioli, Anita Jocelyne. II. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: The chemical contribution to floral rewards of *Guttiferae (Clusia)* and *Orchidaceae (Maxillariinae)*.

Palavras-chave em inglês: Fragrance; Antioxidant; Anticancer; Topoisomerase.

Área de concentração: Química Orgânica.

Titulação: Mestre em Química Orgânica.

Banca examinadora: Sônia Corina Hess (UFMS); Ronaldo Aloise Pilli (IQ-UNICAMP).

Data de defesa: 07/03/2005.

*Ao meu marido Alexandre,
pelo seu carinho, compreensão e incentivo...*

Todo meu amor

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli, pela orientação, confiança e oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Instituto de Química da Unicamp e a todos seus professores, pela ótima infraestrutura e contribuição para minha formação.

Aos técnicos deste Instituto pela atenção e serviços prestados, em especial, à Dona Maria Lopes pelo excelente apoio técnico e amizade.

À Renata Lígia A. Furlan do Instituto de Biociências da USP, pela realização dos testes de inibição de topoisomerases.

À Samantha Koehler do Instituto de Biologia da Unicamp, pela disposição e colaboração na identificação das espécies de *Maxillaria* e pelos agradáveis momentos nos dias de coleta.

Ao Dr. Volker Bittrich, pela coleta e identificação das espécies de *Clusia*.

Ao CPQBA, em especial, ao Prof. João Ernesto, pelos ensaios de atividade antiproliferativa.

À CAPES pela concessão da bolsa.

E finalmente, à minha família, por todo apoio, incentivo e apreço.

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome: Mirele Sanches Fernandes Lapis

Naturalidade: Porto Alegre/RS

e-mail: mirelesf@ig.com.br

Formação

Nível Médio

Técnica em Química – Colégio Batista, Porto Alegre/RS, 1994-1996.

Nível Superior

Química Industrial – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997-2002.

Atividades Acadêmicas

Iniciação Científica

Instituto de Química – UFRGS

Síntese de Cristais Líquidos

Orientador: Prof. Dr. Aloir Antonio Merlo

Período: 1998-2001

Cursos

Curso (teórico-prático) de Métodos Cromatográficos em Análise Quiral, 30 h, 09-12 de dezembro de 2002, UFSM, Santa Maria.

Trabalhos em Congressos

VII Encontro de Química da Região Sul – Tubarão/SC – Outubro de 1999.

Oxazolidinonas Quirais: Uso em Síntese de Cristais Líquidos

9th BMOS – Brazilian Meeting on Organic Synthesis – Curitiba/PR – 2001.

*An efficient strategy for synthesis of chiral crystals from
Evan's methodologies*

V Ibero American Workshop on Complex Fluids and their Applications
Maringá/PR – 2001.

*An efficient strategy for synthesis of chiral crystals from
Evan's methodologies*

27^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - Salvador/BA – 2004.

*Estudo da composição química e da atividade antioxidante do látex
do fruto de Clusia grandiflora*

Artigos

Merlo, A. A. and Fernandes, M. S. An efficient strategy for synthesis of chiral liquid crystals from Evan's methodologies *Synthetic Communications* **2003**, 33, 1167-1178.

RESUMO

CONTRIBUIÇÕES À QUÍMICA DAS RECOMPENSAS FLORAIS DE GUTTIFERAE (*CLUSIA*) E ORCHIDACEAE (*MAXILLARIINAE*).

Este trabalho teve como objetivo elucidar algumas interações ecológicas de espécies de Orchidaceae e Guttiferae. No primeiro capítulo, é descrita a determinação da composição química das fragrâncias florais de cinco espécies de orquídeas pertencentes ao complexo *Maxillaria madida* (*M. juergensii*, *M. madida*, *M. vernicosa*, *M. ferdinandiana* e *M. pachyphylla*), através da técnica de *headspace* dinâmico e análise por CG/EM. Monoterpenóides e sesquiterpenóides não oxigenados são os principais compostos voláteis emitidos e provavelmente responsáveis pela atração dos insetos polinizadores. No segundo capítulo, demos continuidade ao estudo da composição química do látex dos frutos de *C. grandiflora* iniciado por Cláudio A. G. da Câmara. Este estudo resultou no isolamento de 3 compostos, sendo 2 inéditos e derivados do ácido *cis*- δ -tocotrienólico. Estes compostos quando submetidos ao teste em CCD com β -caroteno, apresentaram propriedades antioxidantes. No último capítulo deste trabalho, é apresentada a análise da composição química das resinas florais do híbrido interespecífico de *C. weddelliana* X *paralicola*, comparada com a das resinas florais de seus parentais. Observou-se que todos os compostos isolados também estão presentes nas espécies genitoras, variando apenas suas abundâncias. Finalmente, foi avaliada a atividade antineoplásica das resinas florais de *C. grandiflora*, *C. hilariana*, *C. renggerioides*, *C. fluminensis*, *C. spiritu-sanctensis*, *C. lanceolata*, *C. nemorosa hermafrodita* e *C. paralicola*, em 8 diferentes linhagens de células. Os resultados revelaram que os metabólitos secundários (benzofenonas poliiisopreniladas) presentes nestas espécies são eficientes agentes antitumorais e o mecanismo de ação destes compostos envolve a inibição de topoisomerases.

ABSTRACT

THE CHEMICAL CONTRIBUTION TO FLORAL REWARDS OF GUTTIFERAE (*CLUSIA*) AND ORCHIDACEAE (*MAXILLARIINAE*).

The aim of this research was the elucidation of ecological interactions in Orchidaceae and Guttiferae species. The first chapter describes the floral fragrance chemical compositions of five orchid species belonging to the *Maxillaria madida* group (*M. juergensii*, *M. madida*, *M. vernicosa*, *M. ferdinandiana* and *M. pachyphylla*) obtained by applying dynamic headspace sampling technique and GC/MS analysis. Monoterpenoids and sesquiterpenoids without oxygen in its structure are the main emitted volatile compounds and probably responsible for the pollinator attractions. In the second chapter the investigation of *Clusia grandiflora* fruit latex chemical composition initiated some years ago by Dr Cláudio A. G. da Câmara was concluded with the isolation of novel compounds derived from tocotrienolic acid. Two of which (methyl-(2Z,6E,10E)-13-(6-hydroxy-2, 7, 8-trimethyl-3, 4-dihydro-2H-2-chromenyl)-2, 6, 10-trimethyl-2, 6, 10-tridecatrienoate and methyl-(2Z,6E,10E)-13-(6-formyl-5-hydroxy-2,8-dimethyl -3, 4-dihydro-2H-2-chromenyl)- 2, 6, 10-trimethyl-2, 6, 10-tridecatrienoate) are novel secondary metabolites which have antioxidant properties revealed by β -carotene TLC test. Evaluation of the interspecific hybrid of *Clusia weddelliana* x *paralicola* floral resin and revealed that the chemical constituents in the parents and hybrid species were identical with different relative abundances. Finally, we have evaluated the anticancer activity of the floral resins of *C. grandiflora*, *C. hilariana*, *C. renggerioides*, *C. fluminensis*, *C. spiritu-sanctensis*, *C. lanceolata*, *C. nemorosa hermafrodita* and *C. paralicola* in eight cell lines. The results showed that the secondary metabolites (polyisoprenylated benzophenones) were efficient antitumor agents by topoisomerase inhibition.

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Classificação das substâncias mediadoras de interações entre os organismos.....	2
FIGURA 2. Flores de <i>Ophrys ofusca</i> com abelha <i>Andrena</i>	14
FIGURA 3. Equipamento de injeção de sólidos.....	15
FIGURA 4. Equipamento de <i>headspace</i> estático.....	16
FIGURA 5. Equipamento de <i>headspace</i> dinâmico.....	17
FIGURA 6. Flores de: a) <i>M. juergensii</i> ; b) <i>M. madida</i> ; c) <i>M. vernicosa</i> ; d) <i>M. ferdinandiana</i> ; e) <i>M. pachyphylla</i>	18
FIGURA 7. Cromatogramas de íons totais obtidos por CG/EM das cinco espécies de <i>Maxillaria</i>	19
FIGURA 8. Cromatogramas de íons totais obtidos por CG/EM das cinco espécies de <i>Maxillaria</i>	20
FIGURA 9. Biossíntese de Terpenos.....	26
FIGURA 10. Látex exsudado pelos canais laticíferos do fruto de <i>Clusia grandiflora</i>	36
FIGURA 11. Frutos de <i>C. grandiflora</i>	38
FIGURA 12. Compostos isolados do látex de <i>C. grandiflora</i>	39
FIGURA 13. Comparação dos deslocamentos químicos (ppm) de ^{13}C entre o sistema bicíclico do composto (2) e do γ -tocoferol....	44
FIGURA 14. Incrementos observados no experimento de diferença de NOE.....	44

FIGURA 15. Incrementos observados no experimento de diferença de NOE.....	47
FIGURA 16. Correlações heteronucleares H,C-gHMBC observadas no composto 3.....	48
FIGURA 17. Compostos com propriedades antioxidantes.....	52
FIGURA 18. Teste em CCD com β -caroteno.....	53
FIGURA 19. Estrutura do ácido garcinóico.....	53
FIGURA 20. Híbrido de <i>C. weddelliana</i> x <i>paralicola</i>	70
FIGURA 21. Compostos isolados do híbrido de <i>Clusia weddelliana</i> x <i>paralicola</i>	71
FIGURA 22. Incrementos observados no experimento de NOE.....	76
FIGURA 23. Quimioterápicos derivados de plantas.....	79
FIGURA 24. Cromatograma da resina bruta de <i>C. spiritu-sanctensis</i>	84
FIGURA 25. Fases do Ciclo celular.....	86
FIGURA 26. Representação esquemática de um Citômetro de Fluxo.....	87
FIGURA 27. Ensaio de atividade da topoisomerase.....	91
FIGURA 28. Ensaio de atividade da topoisomerase.....	92

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Compostos voláteis detectados nas fragrâncias florais de espécies do complexo <i>Maxillaria madida</i>	21
TABELA 2. Espécies de <i>Maxillaria madida</i> estudadas.....	30
TABELA 3. Deslocamentos de ^1H e ^{13}C (ppm) dos compostos (2) e (3) obtidos por RMN de 1D e 2D.....	49
TABELA 4. Quantificação por CLAE das resinas de <i>C. weddelliana</i> e <i>C. paralicola</i>	72
TABELA 5. Compostos químicos isolados de <i>Clusia</i>	80
TABELA 6. IC_{50} das resinas florais de <i>Clusia</i> em células de câncer humano.....	81
TABELA 7. Concentração inibitória dos compostos puros.....	85
TABELA 8. Concentrações de DNA superespiralado e circular após aplicação do composto A.....	91
TABELA 9. Concentrações de DNA superespiralado e circular após aplicação dos compostos B, C e D.....	93
TABELA 10. Espécies estudadas durante a execução deste trabalho.....	97

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Comunicação Química.....	1
1.2 Polinização.....	3
2. OBJETIVOS.....	9
 CAPÍTULO I – FRAGRÂNCIAS FLORAIS	
I.1 Introdução.....	13
I.2 Métodos de obtenção de aromas florais.....	14
I.3 Resultados e Discussão.....	18
I.4 Conclusão.....	29
I.5 Parte Experimental	
I.5.1 Plantas.....	30
I.5.2 Headspace dinâmico.....	30
I.5.3 CG/EM.....	31
 CAPÍTULO II– LÁTEX	
II.1 Introdução.....	35
II.2 Resultados e Discussão.....	38
II.2.1 Análise do látex.....	38
II.2.2 Determinação Estrutural do Composto (1).....	40
II.2.3 Determinação Estrutural do Composto (2).....	41
II.2.4 Determinação Estrutural do Composto (3).....	45
II.2.5 Atividade Antioxidante.....	50

II.3 Conclusão.....	55
II.4 Parte Experimental	
II.4.1 Considerações Gerais.....	56
II.4.2 Material Vegetal.....	58
II.4.3 Obtenção do Látex dos Frutos.....	58
II.4.4 Análise Química do Látex.....	58
II.4.5 Análise da Fração Polar.....	59
II.4.6 Ensaio de Atividade Antioxidante.....	60
II.4.7 Dados Espectroscópicos do Composto (1).....	60
II.4.8 Dados Espectroscópicos do Composto (2).....	61
II.4.9 Dados Espectroscópicos do Composto (3).....	62

CAPÍTULO III– RESINAS

III.1 Introdução.....	67
III.2 Resultados e Discussão.....	70
III.2.1 Análise Química da Resina do Híbrido de <i>Clusia weddelliana</i> x <i>paralicola</i>	70
III.2.2 Determinação Estrutural do Composto (4).....	72
III.2.3 Determinação Estrutural do Composto (5).....	74
III.2.4 Determinação Estrutural do Composto (6).....	77
III.3 Atividade Anticâncer.....	78
III.3.1 Determinação da Atividade Antiproliferativa de células cancerosas....	80
III.3.2 Isolamento e Avaliação da Atividade Antitumoral dos Constituintes da resina de <i>Clusia spiritu-sanctensis</i>	84
III.3.3 Teste de Inibição de Topoisomerase.....	89
III.4 Conclusão.....	94

III.5 Parte Experimental	
III.5.1 Material Vegetal.....	96
III.5.2 Extração das Resinas.....	97
III.5.3 Análise Química do Híbrido.....	97
III.5.4 Ensaio de Atividade Antiproliferativa.....	98
III.5.5 Avaliação do Ciclo Celular.....	100
III.5.6 Teste de Inibição de Topoisomerase.....	101
III.5.7 Dados Espectroscópicos do Composto (4).....	102
III.5.8 Dados Espectroscópicos do Composto (5).....	103
III.5.9 Dados Espectroscópicos do Composto (6).....	104
ESPECTROS.....	107

1. INTRODUÇÃO

1.1 COMUNICAÇÃO QUÍMICA

Todos os seres vivos mantêm profundas interações com o meio em que vivem assegurando-lhes oportunidades de sobrevivência (através da disponibilidade de alimentos e defesa contra predadores). Ao longo da evolução, os animais, principalmente os insetos, desenvolveram diferentes tipos de comunicação química, que é utilizada para transferência de informações entre indivíduos da mesma espécie ou entre espécies diferentes.

As substâncias químicas usadas na comunicação em geral são denominadas semioquímicos¹ (do grego: *semio* = sinal) o que significa sinais químicos². Os semioquímicos, que são utilizados na comunicação interespecífica são definidos de aleloquímicos e, os intraespecíficos, de feromônios (**Figura 1**).

Os feromônios (do grego *pherein* = transferência e *horman* = excitar) são substâncias químicas que modificam o comportamento ou fisiologia de indivíduos da mesma espécie. São classificados como feromônios sexuais (provocam atração entre macho e fêmea), de defesa e de alarme (produzem estado de defesa ou alerta pela aproximação de algum predador natural), de agregação, de trilha e de oviposição (demarcam, respectivamente, o caminho até uma fonte de alimento e o local onde os ovos foram depositados)^{3,4}. Eles

¹ O termo infoquímicos proposto por Dicke e Sabelis (1988) também é aceito. Ele leva em consideração o caráter benéfico ou prejudicial na interação entre os indivíduos, o que não era considerado na definição de semioquímicos.

² Mori, K. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 8, 1479-1489.

³ Cardé, R.T.; Bell, W.J. *Chemical Ecology of Insects* **1995**, Chapman and Hall, NY.

apresentam estruturas que vão desde álcoois e hidrocarbonetos simples, até compostos polifuncionais mais complexos.

Os aleloquímicos são substâncias químicas que mediam interações entre indivíduos pertencentes a espécies distintas. São subdivididos em alomônios, que são compostos químicos emitidos por uma espécie e que modificam o comportamento de outras espécies, em benefício da espécie emissora; cairomônios, que são compostos químicos emitidos por uma espécie que modificam o comportamento de indivíduos de outras espécies, com o benefício da espécie receptora; e sinomônios, que são compostos químicos emitidos por uma espécie que modificam o comportamento de outras espécies, com o benefício tanto da espécie receptora como da emissora⁴.

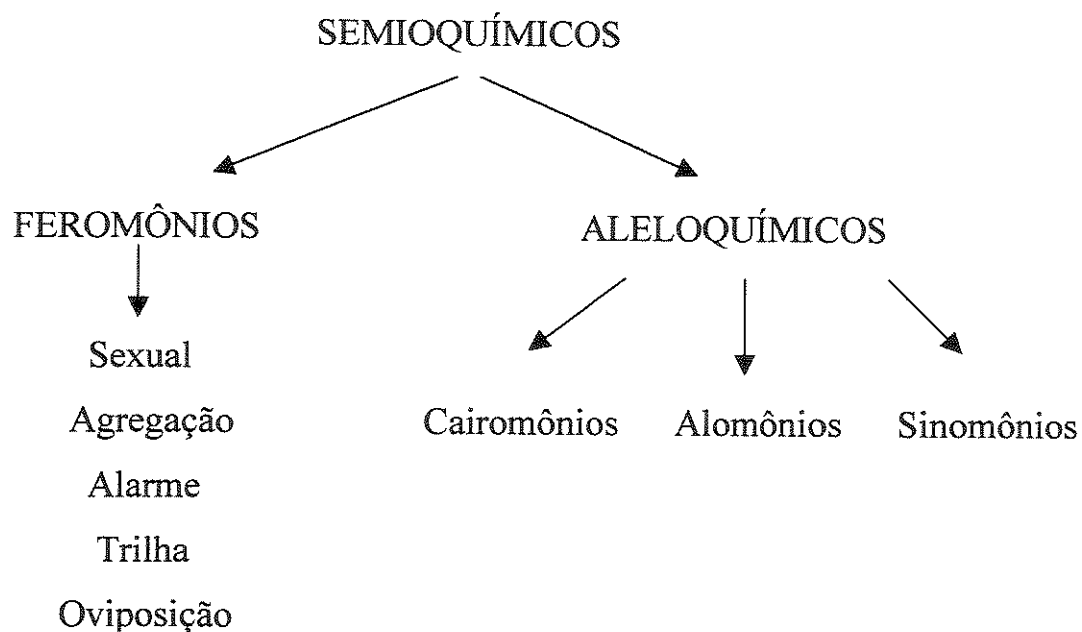


Figura 1: Classificação das substâncias mediadoras de interações entre os organismos.

⁴ Vilela, E.F.; Della Lucia, T.M.C. Feromônios de Insetos **1987**, Imprensa Universitária UFV, MG.

A partir do interesse de se compreender o comportamento e as relações entre os seres vivos surgiu a Ecologia Química, uma área de pesquisa que envolve químicos, biólogos, agrônomos e pesquisadores afins, com o propósito de desvendar os mecanismos de comunicação entre os organismos vivos.

1.2 POLINIZAÇÃO

Dentre as interações ecológicas mediadas por semioquímicos, a polinização é uma das mais importantes nas Angiospermas (plantas floríferas). Nesta interação, os polinizadores, geralmente pássaros, morcegos e insetos (especialmente abelhas, borboletas, vespas e moscas), transferem o pólen de uma flor para outra, possibilitando à planta seu processo de reprodução. Em geral, esta associação baseia-se no mutualismo, ou seja, ambos indivíduos envolvidos são beneficiados.

A comunicação química das Angiospermas com seus polinizadores inicia-se com um visual atrativo e/ou com a liberação de compostos voláteis da flor. A fragrância floral apresenta uma composição química muito variada incluindo diversas classes de compostos como monoterpenos, sesquiterpenos, compostos aromáticos, compostos nitrogenados e derivados de ácidos graxos, cuja distribuição nas fragrâncias⁵ varia quali e quantitativamente. Essa variação na composição das fragrâncias florais tem como objetivo a atração de um polinizador específico.

A fragrância floral também pode ser um sinal de recompensa para o polinizador como fonte alimentar, ou ainda, pode apenas mimetizar sinais de

⁵ Keams, C.A.; Inouye, D.W. *Techniques for pollination biologists* 1995, Colorado: University Press.

recompensa, ou copiar estruturas de feromônio de insetos, de modo que a polinização ocorra por engano dos visitantes.

As recompensas florais oferecidas pelas flores podem ser: néctar, pólen, ceras, resinas e óleos⁶.

O néctar é constituído basicamente de água e açúcares misturados com outros compostos como aminoácidos, lipídeos, agentes antioxidantes, íons minerais e constituintes secundários das plantas⁷.

O pólen é uma fonte de alimento importante para os visitantes florais, principalmente para abelhas e besouros, pois é rico em nutrientes, contendo em geral entre 16 e 30% de proteínas, 1 e 7% de amido, 0 e 15% de açúcares livres, 3 e 10% de gorduras, além de várias vitaminas e sais inorgânicos como componentes minoritários. Essas diferenças na composição química são geralmente espécie-específicas⁷.

Os óleos florais oferecidos aos polinizadores são óleos fragrantes e óleos comestíveis. Óleos fragrantes são coletados exclusivamente por machos de abelhas Euglossini que usam esses óleos no processo de acasalamento. Os óleos comestíveis são excretados por glândulas especializadas da flor e são constituídos, predominantemente, de monoacilgliceróis, diacilgliceróis ou ácidos graxos livres, saturados, β -substituídos, de cadeias longas⁸.

As resinas e as ceras florais são recompensas utilizadas como principal matéria-prima na construção e impermeabilização de ninhos por abelhas. As ceras são constituídas basicamente de triterpenos⁹ e as resinas de

⁶ Raguso, R.A.; Pellmyr, O. *OIKOS*, **1998**, *81*, 238-254.

⁷ Harbone, J.B. *Introduction to Ecological Biochemistry* **1992**, London Academic Press.

⁸ a) Reis, M.G.; Faria, A.D.; Amaral, M.C.E.; Bittrich, V.; Marsaioli, A.J. *J. Braz. Chem. Soc.* **2000**, *11*, 600-608; b) Reis, M.G.; Faria, A.D.; Amaral, M.C.E.; Marsaioli, A.J. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8519-8523.

⁹ Flach, A.; Dondon, R.C.; Singer, R.B.; Koehler, S.; Amaral, M.C.E.; Marsaioli, A.J. *J. Chem. Ecol.* **2004**, *30*, 1039-1050.

benzofenonas poliisopreniladas, xantonas, lactonas, ácidos fenólicos e flavonóides.

Como foi apresentado as recompensas e aromas florais são fundamentais no processo de polinização e, por isso, desempenham um papel importante tanto na especiação (evolução de espécies novas) como na manutenção de espécies próximas, que ocorrem no mesmo *habitat*.

Dentro deste contexto espécies pertencentes a Orchidaceae e Guttiferae, duas famílias de Angiospermas, foram alvo de estudo neste trabalho.

A família Orchidaceae constitui uma das maiores famílias de plantas floríferas e é a maior entre as monocotiledôneas, com cerca de 700 gêneros e 19.500 espécies, sendo a América Tropical a região de maior ocorrência e biodiversidade. A subtribo Maxillariinae, pertencente à tribo Maxillarieae, engloba a maioria das orquídeas neotropicais e compreende, aproximadamente, 472 espécies¹⁰. Esta subtribo está, atualmente, dividida em oito gêneros: *Anthosiphon* Schltr. (1 sp.), *Chrysocynis* Linden e Rchb. (3 spp.), *Cryptocentrum* Benth. (19 spp.), *Cyrtidorchis* Rausch. (4 spp.), *Maxillaria* Ruiz e Pavon (420 spp.), *Mormolyca* Fenzl (7 spp.), *Pityphyllum* Schltr. (4 spp.) e *Trigonidium* Lindl. (14 spp.). O gênero *Maxillaria* constitui o mais diverso da tribo Maxillarieae, sendo o quinto mais numeroso entre as orquídeas neotropicais. Atualmente são reconhecidas 420 espécies mas estima-se que existam pelo menos 650, ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina¹¹. A maioria das espécies são epífitas¹², crescendo em matas úmidas, porém algumas espécies podem ser encontradas até a 2000 m de altitude na cordilheira andina ou em áreas abertas, crescendo como

¹⁰ Dressler, R.L. *Phylogeny and Classification of the Orchid Family* 1993, Portland, Dioscorides Press.

¹¹ Atwood, J.T.; Mora de Retana, D.E., *Fieldiana* 1999, 40, 1-182.

¹² Planta que cresce apoiada em outra planta, sem ser parasita.

rupícolas¹³. Mais de 60% das espécies de *Maxillaria* citadas por Pabst e Dungs (1977) foram indicadas como ocorrendo exclusivamente no território brasileiro. Entretanto, desde o trabalho de Hoehne (1953), a grande maioria das espécies permanece pouco estudada¹⁴.

O complexo *Maxillaria madida* Lindl. está composto por cerca de 10 espécies epífitas, raramente rupícolas, que ocorrem no domínio da Mata Atlântica em localidades da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira¹⁵. As espécies do grupo são caracterizadas por apresentarem inflorescências curtas, uma flor carnosa e brilhante, principalmente o labelo, e de coloração alvo-amarelada, avermelhada ou castanho-escura, e sem recompensa aparente¹⁶.

Guttiferae (Clusiaceae), a segunda família a ser estudada neste trabalho, pertence à ordem Malpighiales, divisão Angiospermae (Magnoliophyta). Possui cerca de 26 gêneros e aproximadamente 400 espécies, distribuídas nos Neotrópicos, desde o sul da Flórida até o sul do Brasil¹⁷.

Clusia é o maior gênero de Guttiferae, com cerca de 250 espécies, sendo 60 espécies brasileiras¹⁸. As espécies de *Clusia* são, em sua grande maioria, dióicas, enquanto poucas são hermafroditas ou incluem raças com plantas hermafroditas. Suas formas de vida incluem hemiepífitas, lianas, arbustos e árvores.

As plantas do gênero *Clusia*, como quase todos os membros da família Guttiferae, caracterizam-se pela presença de látex em seus tecidos. O látex pode ser definido como uma suspensão aquosa ou emulsão de várias partículas

¹³ Plantas que vivem nas rochas.

¹⁴ Hoehne, F.C. *Orchidaceas* 1953, Flora Brasílica, São Paulo - Secretaria da Agricultura.

¹⁵ Pabst, G.F.J.; Dungs, F. *Orchidaceae Brasilienses II* 1977, Hildesheim, Brücke-Verlag Kurt Schmiersow.

¹⁶ Singer, R.B.; Koehler, S. *Ann. Bot.* 2004, 93, 39-51.

¹⁷ Ribeiro, J.E.L. *et al.* Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação de uma floresta de terra firme na Amazônia, 1999, 244, INPA/Manaus.

¹⁸ Bittrich, V. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* 1997, 3, 13-19.

que são acumuladas em células e/ou estruturas especializadas. Estas estruturas responsáveis pela produção do látex são denominadas de laticíferas e a suspensão aquosa denominada de látex pode ser constituída pelas mais diversas substâncias. Entre estas destacam-se os triterpenóides, esteróides, hidrocarbonetos poliisoprenóides, ácidos graxos, compostos aromáticos, alcalóides, proteínas, entre outros. O látex também pode ser proveniente de células não laticíferas, como na planta *Parthenium argentatum*, cujo látex ocorre em células parenquimáticas¹⁹.

As funções exercidas pelo látex na planta ainda não estão bem esclarecidas mas, de forma geral, acredita-se que tenha função de distribuir os nutrientes às diferentes partes da planta e agir como uma barreira contra o ataque de insetos e microrganismos.

O látex de algumas espécies de *Clusia* e de outros gêneros da família é utilizado na medicina popular indígena como cicatrizante de feridas²⁰, analgésico²¹, no tratamento de doenças da pele e reumatismo²².

As flores de espécies de *Clusia* podem oferecer néctar, pólen e resinas como recompensas para os polinizadores, que incluem: abelhas de vários grupos taxonômicos, besouros, beija-flor, esfingídeos e moscas.

Resinas florais são recompensas pouco comuns e somente são encontradas em duas famílias de Angiospermae: Euphorbiaceae²³, espécies do gênero *Dalechampia* L. e Guttiferae²⁴ espécies dos gêneros *Clusia*, *Clusiella*

¹⁹ a) Fahn, A. Plant Anatomy **1997**, Oxford, Butterworth Heinemann; b) Fahn, A. Secretory Tissues in Plants **1990**, Oxford, Academic Press; c) São os componentes normais do floema e podem conter substâncias fenólicas, amido, cristais, etc.

²⁰ Pitter, H. Manual de las Plantas Usales de Venezuela y su Suplemento **1970**, 211, Fundación Menzoza Caracas.

²¹ Uphof, J.C.T. Dictionary of Economic Plants **1968**, Lehre, Germany.

²² Salama, M. Rev. Latino-Am. Química **1986**, 16, 117-118.

²³ Armbruster, W.S. Amer. J. Bot. **1984**, 71, 1149-1160.

²⁴ Porto, A.L.M.; Marsaioli, A.J.; Machado, S.M.F.; Oliveira, C.M.A.; Bittrich, V.; Amaral, M.C.E. Phytochemistry **2000**, 55, 755-768.

Planch. & Triana e *Tovomitopsis*. São constituídas por diversas classes de compostos como flavonóides, xantonas, ácidos fenólicos, lactonas e sesquiterpenóides. Vários destes compostos tem mostrado atividade anti-microbiana, anti-fúngica, anti-HIV²⁵, anti-bacteriana²⁶ e anti-câncer^{27,28}.

Na natureza, as resinas florais são utilizadas como principal matéria-prima na construção e impermeabilização de ninhos por abelhas fêmeas solitárias da tribo Euglossini e sociais das tribos Meliponini e Trigonini.

²⁵ Delle Monache, F.; Delle Monache, G.; Pinheiro, R.M.; Radics, L. *Phytochemistry* **1988**, 27, 2305-2308.

²⁶ Lokvam, J.; Braddock, J.F. *Oecologia* **1999**, 119, 534-540.

²⁷ Cuesta-Rubio, O.; Frontana-Urbe, B.A.; Ramirez-Apan, T. *Z Naturforsch C* **2002**, 57, 372-378.

²⁸ Ito, C.; Masataka, I.; Yoshiaki, M.; Onoda, S.; Rao, K.S.; Mukaianaka, T.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Furukawa, H. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 206-209.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo promover um estudo interdisciplinar envolvendo químicos e biólogos, com o intuito de desvendar e compreender algumas interações ecológicas de espécies de Orchidaceae e Guttiferae, bem como identificar e avaliar a atividade biológica destes mediadores químicos.

Para tanto este trabalho foi dividido nos seguintes tópicos:

- determinar a composição química das fragrâncias florais de espécies pertencentes ao complexo *Maxillaria madida* utilizando a técnica de *headspace* dinâmico e análise por CG/EM e verificar a importância destes compostos voláteis na interação planta-inseto polinizador;
- isolar e identificar os constituintes do látex dos frutos de *C. grandiflora* e, posteriormente, avaliar o potencial antioxidante dos compostos isolados;
- isolar e identificar os constituintes das resinas de espécies do gênero *Clusia* e avaliar a atividade antineoplásica destes compostos através de ensaios antiproliferativo de células cancerosas e inibição de topoisomerasas.

CAPÍTULO I – FRAGRÂNCIAS FLORAIS

I.1 INTRODUÇÃO

Como exposto anteriormente, as plantas utilizam-se de suas cores e aromas para atrair seus polinizadores. Muitas vezes, a fragrância é o fator dominante da atração, especialmente à noite, para animais (morcegos e mariposas) que possuem pouco estímulo visual. Algumas espécies de plantas do gênero *Arum* têm flores de cor púrpura vibrante que abrem à noite. A flor libera aminas voláteis, com odor forte e desagradável, atraindo moscas e besouros de esterco, que penetram na flor e, nos seus movimentos, transferem pólen dos estames²⁹ para os estigmas³⁰, efetuando a polinização⁷.

As plantas podem também associar a estes recursos a sua forma. Como exemplo, podemos citar as flores de orquídeas do gênero *Ophrys* que são polinizadas por abelhas do gênero *Andrena*. Elas apresentam a forma e a cor tão semelhantes à forma e a cor da abelha fêmea, que chegam a confundir o macho da espécie na sua busca de acasalamento, realizando a pseudocopulação. Além do visual que ilude o inseto, as flores utilizam uma atração olfativa, mimetizando o feromônio sexual da abelha fêmea para atrair o macho, levando à polinização por engano³¹ (**Figura 2**).

²⁹ Órgão masculino da flor, onde são produzidos os grãos de pólen.

³⁰ Órgão feminino da flor, geralmente dilatado e pegajoso, que recebe os grãos de pólen que irão fecundar a flor.

³¹ Karin, A.; Karlson, B. *Phytochemistry* **1990**, 29, 1359-1387.



Figura 2. Flores de *Ophrys ofusca* com abelha *Andrena*.

As substâncias responsáveis pelos aromas são bastante voláteis, podendo ser obtidas por várias técnicas. São geralmente formadas por mono e sesquiterpenóides, álcoois alifáticos simples, cetonas, ésteres ou substâncias aromáticas. Algumas vezes, uma só substância é responsável pelo odor, entretanto na maioria das vezes, a mistura é complexa.

I.2 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE AROMAS FLORAIS

O protocolo para análise da composição química das fragrâncias florais segue obrigatoriamente:

- captura dos voláteis;
- separação;
- identificação

Vários métodos de amostragem podem ser utilizados, como: injeção de sólidos, *headspace* estático (SPME) e *headspace* dinâmico.

O método de injeção de sólidos³² consiste na introdução de um pequeno pedaço da flor em um equipamento de injeção de sólidos (Figura 3) o qual é

³² Silva, U.F.; Borba, E.L.; Semir, J.; Marsaioli, A.J. *Phytochemistry* 1990, 50, 31-34.

introduzido no injetor do cromatógrafo. A fragrância é liberada e detectada pelo sistema do cromatógrafo. Esta técnica possui a vantagem de ser rápida, porém, compostos não voláteis podem ser introduzidos na coluna cromatográfica mascarando o resultado.

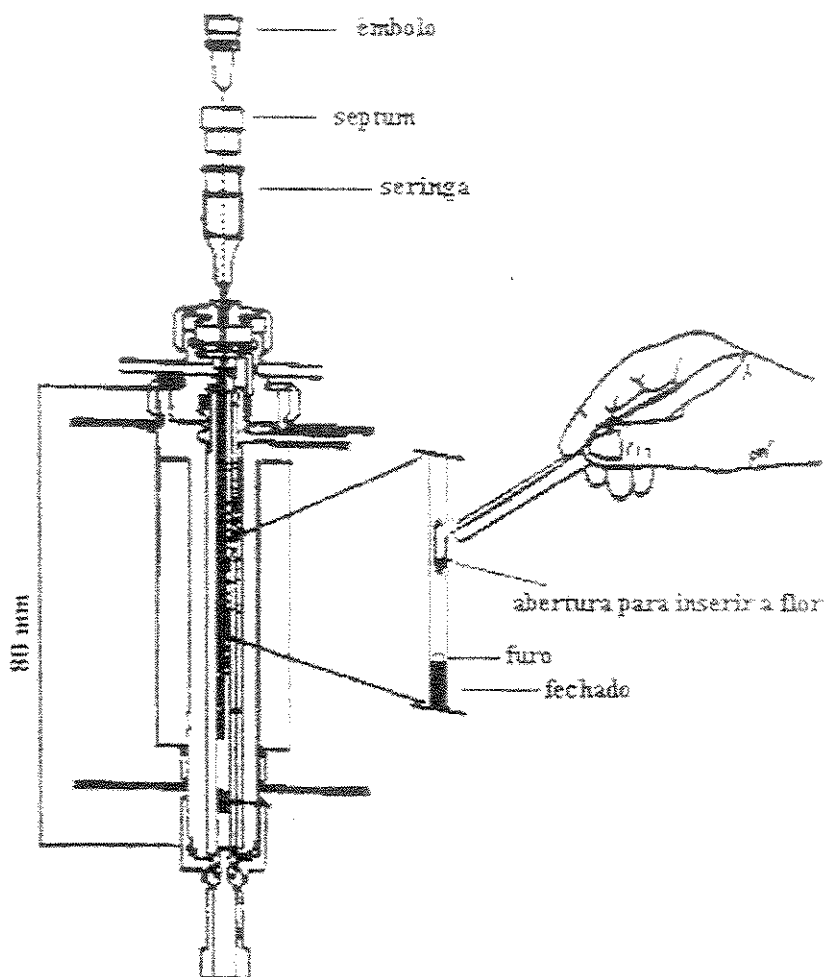


Figura 3. Equipamento de injeção de sólidos³².

O *headspace* estático ou Microextração em Fase Sólida³³ (SPME) é uma técnica de extração e pré-concentração rápida, simples, de baixo custo e que dispensa o uso de solventes e manipulação excessiva da amostra. Esta

³³ Zhang, Z. Y.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* **1993**, 65, 1843-1852.

metodologia utiliza um pequeno pedaço de sílica fundida recoberta com um polímero adsorvente (fibra) que é exposto, num espaço confinante, ao material a ser analisado. Os analitos adsorvidos pela fibra são liberados por dessorção térmica diretamente no injetor do cromatógrafo (**Figura 4**). Esta técnica apresenta como desvantagem a modificação do injetor do cromatógrafo.

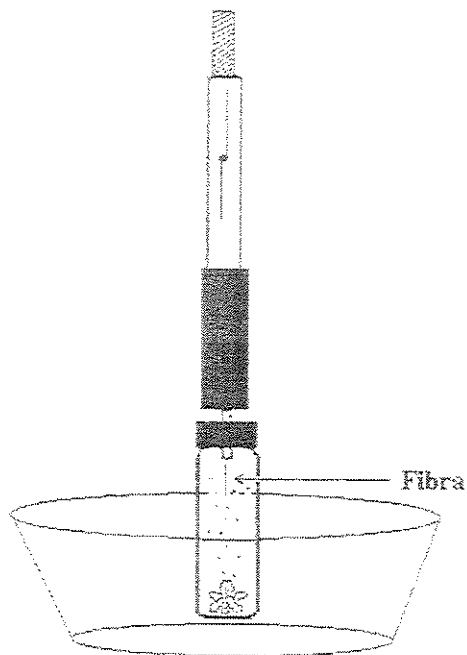


Figura 4. Equipamento de *headspace* estático³⁴.

O método de *headspace* dinâmico⁶ (**Figura 5**) consiste na concentração dos voláteis em um polímero adsorvente (Chromsorb[®] 101, 102 e 105, Porapak Q e Tenax GC[®]). Um frasco contendo a flor é conectado a um tubo de vidro contendo o polímero adsorvente e o ar é arrastado com o auxílio de uma bomba. Os compostos voláteis capturados no adsorvente são dessorvidos

³⁴ Nogueira, P.C.L. Contribuição à Química dos Compostos Voláteis e Interações com Organismos Receptores **2002**, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp.

utilizando-se solvente bidestilado (diclorometano). Após, é feita a redução do volume do solvente com um leve fluxo de N_2 e o extrato é analisado por CG/EM. Esta técnica tem a vantagem de ser reprodutiva e de fácil extração dos compostos voláteis dos polímeros adsorventes.

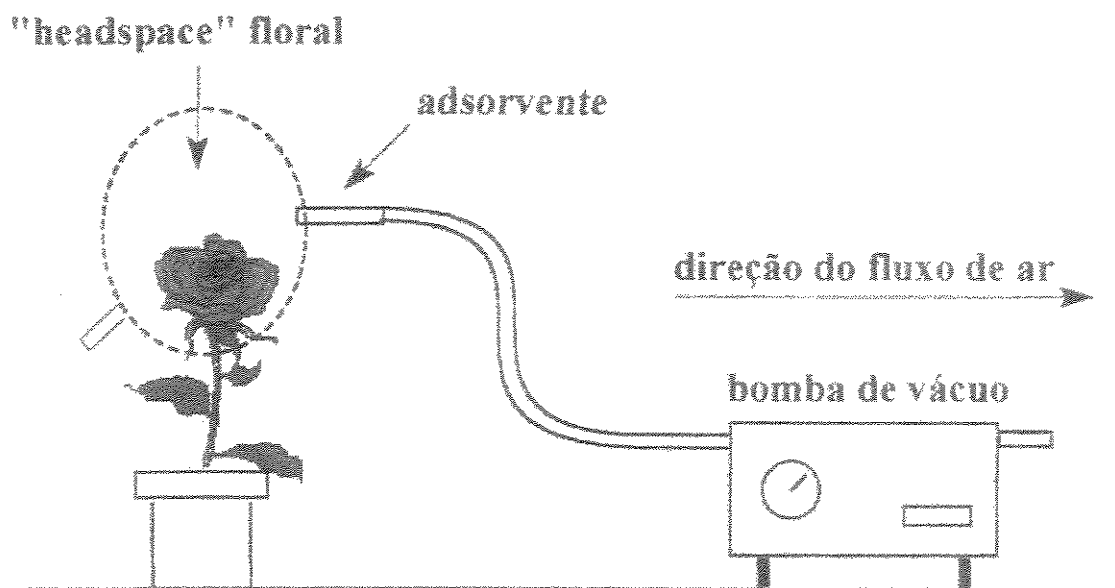


Figura 5. Equipamento de *headspace* dinâmico²⁸.

I.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os voláteis florais aqui estudados pertencem a espécies do complexo *Maxillaria madida*, gênero *Maxillaria* e à família Orchidaceae. As espécies foram identificadas pela aluna de doutorado Samantha Koehler, do Instituto de Biologia da Unicamp, que estuda a filogenia e polinização deste complexo.

Dentre as metodologias de obtenção de voláteis apresentadas, optamos por empregar a técnica de *headspace* dinâmico por ser a técnica mais adequada no estudo das interações ecológicas e por ser reprodutiva.

M. juergensii, *M. madida*, *M. vernicosa*, *M. ferdinandiana* e *M. pachyphylla* (Figura 6) foram as cinco espécies de *Maxillaria* estudadas. Os cromatogramas obtidos por CG/EM são apresentados a seguir (Figura 7 e 8) e os resultados das análises dos compostos voláteis são mostrados na Tabela 1.

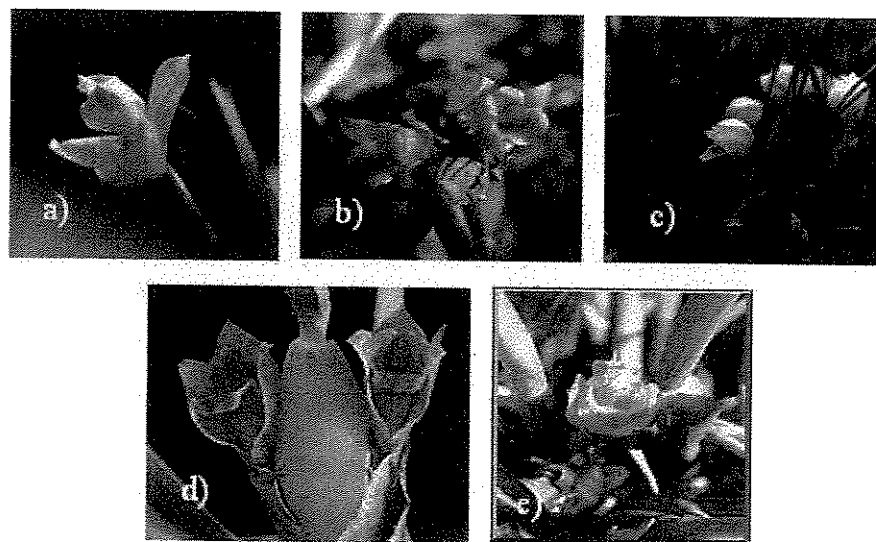


Figura 6. Flores de: a) *M. juergensii*; b) *M. madida*; c) *M. vernicosa*;
d) *M. ferdinandiana*; e) *M. pachyphylla*.

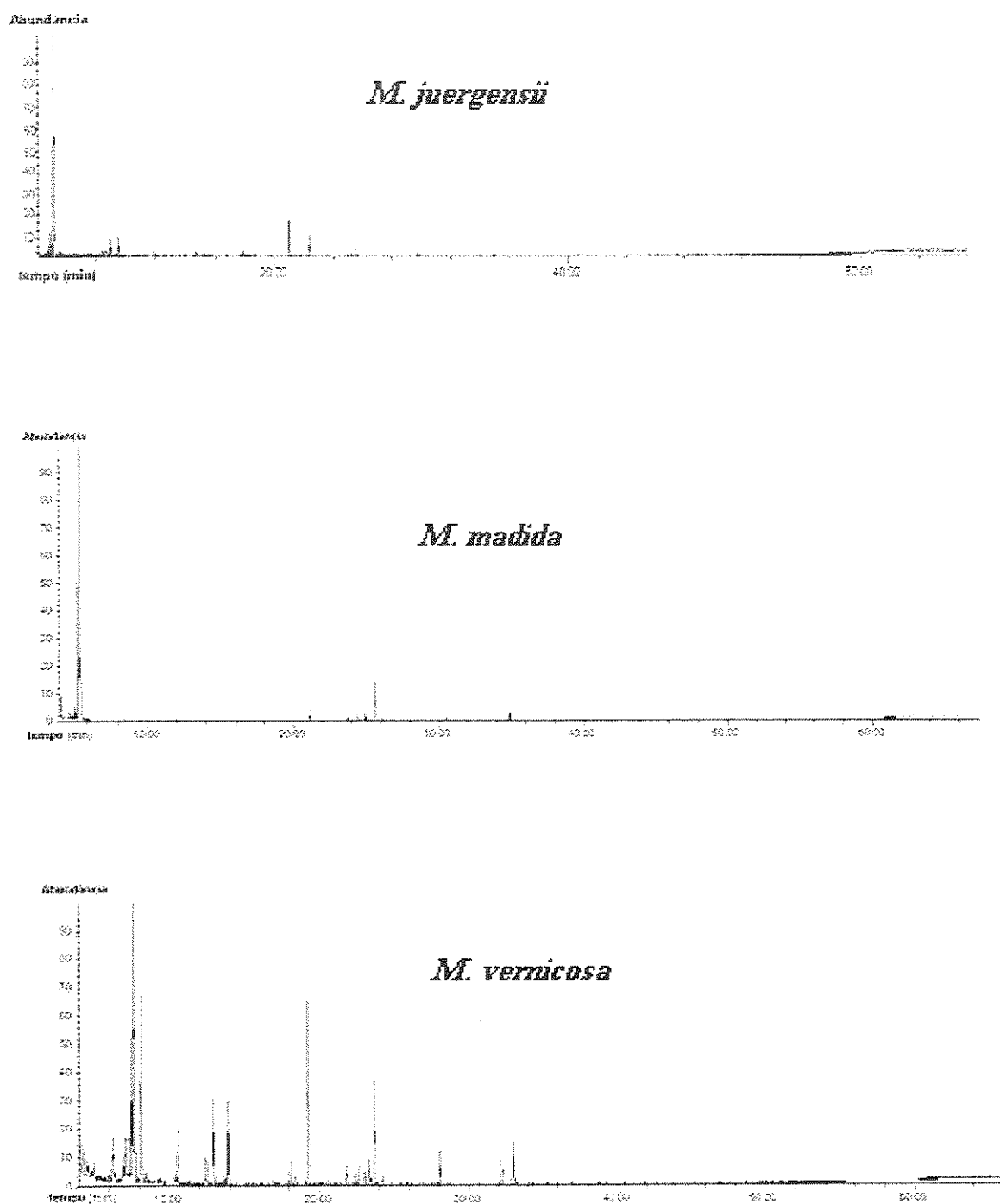


Figura 7. Cromatogramas de íons totais obtidos por CG/EM das espécies de *Maxillaria*.

HP 5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m), 40-290°C (5 min), 4°C/min, inj=240°C, f=1 mL/min.

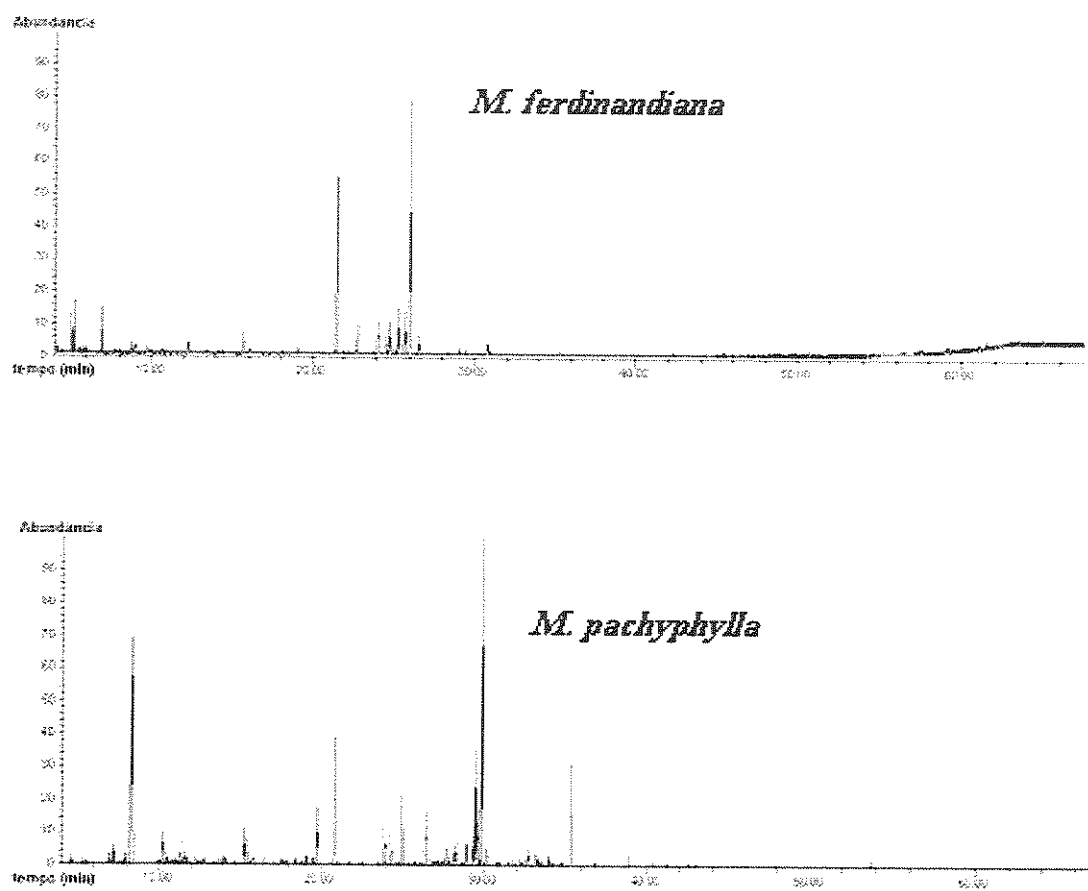
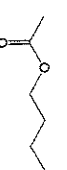
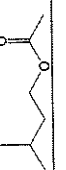
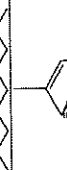
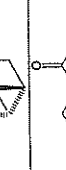
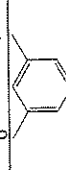
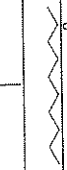
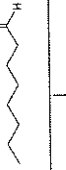
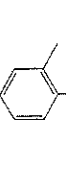
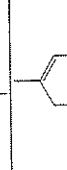
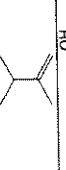
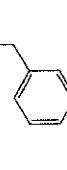
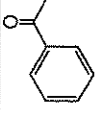
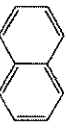
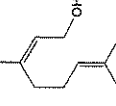
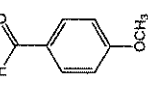


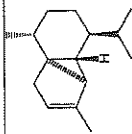
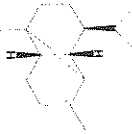
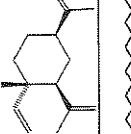
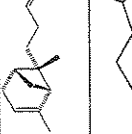
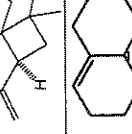
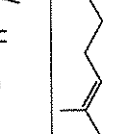
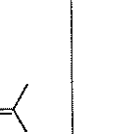
Figura 8. Cromatogramas de íons totais obtidos por CG/EM das espécies de *Maxillaria*.

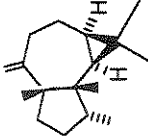
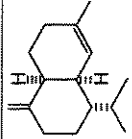
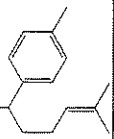
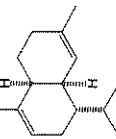
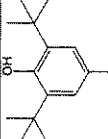
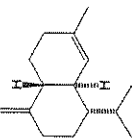
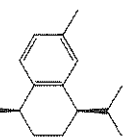
HP 5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m), 40-290°C (5min), 4°C/min, inj=240°C, f=1mL/min.

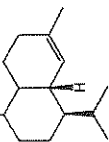
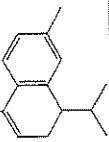
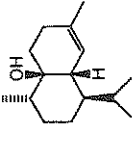
Tabela 1. Compostos voláteis detectados nas fragrâncias florais de espécies do complexo *Maxillaria madida*

Compostos		Ir _c	Ir _i	Maxillaria juergensii %	Maxillaria madida %	Maxillaria vermicosa %	Maxillaria ferdinandiana %	Maxillaria pachyphylla %
acetato de butila (1)		817	812	-	11,9	-	-	-
acetato de isoamila (2)		873	876	-	57	-	-	-
nonano (3)		905	899	3,0	-	-	-	-
α-pineno (4)		938	939	-	-	-	3,7	-
benzaldeído (5)		960	961	-	-	-	-	5,0
6-metil-5-hepten-2-ona (6)		984	985	-	-	3,9	-	0,4
1,3,5-trimetilbenzeno (7)		1000	994	4,2	-	-	-	-
decano (8)		1000	999	5,8	-	-	1,7	1,0
octanal (9)		1003	1001	-	-	-	-	0,7
1,2,4-trimetilbenzeno (10)		1020	1023	-	-	-	-	0,8
limoneno (11)		1030	1031	12,8	-	30,6	-	-
álcool benzílico (12)		1031	1032	-	-	0,9	-	0,8

acetofenona (13)		1064	1065	-	-	-	-	1,3
undecano (14)		1100	1099	4,3	-	-	2,1	2,7
nonanal (15)		1100	1102	-	-	1,2	-	2,5
naftaleno (16)		1180	1179	4,3	-	-	-	0,8
dodecano (17)		1199	1199	-	-	-	2,5	-
n-decanal (18)		1205	1204	-	-	11,7	-	1,6
nerol (19)		1224	1228	-	-	-	-	6,9
p-anisaldeído (20)		1255	1252	-	-	-	-	20,9
n-decanol (21)		1275	1272	5,5	-	-	-	-
tridecano (22)		1300	1299	-	-	0,9	-	-
benzilbutanoato (23)		1345	1345	-	-	-	-	4,5

α -cubebeno (24)		1348	1351	-	-	0,8	-	-	-
α -copaeno (25)		1375	1376	34,1	3,0	22,4	32,4	7,9	-
β -elemeno (26)		1390	1391	-	-	-	-	0,4	-
tetradecano (27)		1399	1399	-	-	-	-	0,4	-
cis- α -bergamoteno (28)		1414	1415	-	-	1,0	-	0,3	-
trans-cariofileno (29)		1419	1418	13,3	-	-	2,8	6,0	-
β -gurjuneno (30)		1428	1432	-	-	0,5	-	-	-
trans-geranilacetona (31)		1447	1453	-	-	-	-	0,3	-

allo-aromadendreno (32)		1456	1461	-	-	-	2,6	3,8	1,7
γ -muuroleno (33)		1475	1477	-	-	-	-	-	2,1
germacreno- D (34)		1478	1480	-	-	0,3	0,8	2,0	-
curcumenno (35)		1484	1483	-	-	1,3	1,8	3,5	2,8
α -muuroleno (36)		1500	1499	-	-	1,3	1,6	4,9	0,5
2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol (37)		1514	1512	2,2	-	-	-	-	-
γ -cadineno (38)		1514	1513	-	-	1,2	0,9	4,5	3,4
cis-calameneno (39)		1523	1521	-	-	7	-	-	5,6

δ -cadineno (40)		1524	1524	5,3	8	12,1	28,7	16,4
α -calacoreno (41)		1543	1542	-	0,7	0,8	2,0	1,2
1- <i>epi</i> -cubenol (42)		1627	1627	-	-	-	0,7	-
Identificados				94,8	91,7	94,5	95,3	98,9
Não identificados				5,2	8,3	5,5	4,7	1,1

IR_c – Índice de Retenção calculado³⁵; IR_l – Índice de Retenção da literatura³⁶

³⁵ Van den Dool, H.; Kratz, P. D. J. *Journal of Chromatography* **1963**, *11*, 463.

³⁶ Adams, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy **1995**, Allured Publishing Co., Illinois.

Analisando os resultados da **Tabela 1**, observou-se que os principais compostos voláteis emitidos por este grupo são os terpenóides.

Os terpenóides são uma família quimicamente diversa de metabólitos secundários encontrados na natureza (plantas, fungos e bactérias), com mais de 29000 compostos caracterizados. São comumente originados pela via do acetato mevalonato (**Figura 9**) e são classificados de acordo com a quantidade de unidades de isopreno em: hemiterpenóides (C_5), monoterpenóides (C_{10}), sesquiterpenóides (C_{15}), diterpenóides (C_{20}), triterpenóides (C_{30}) e carotenóides (C_{40}). Eles apresentam funções variadas nos vegetais, entretanto, os mono e sesquiterpenóides são responsáveis pelos aromas das plantas e, conseqüentemente, pela atração a longa distância dos polinizadores³⁷.

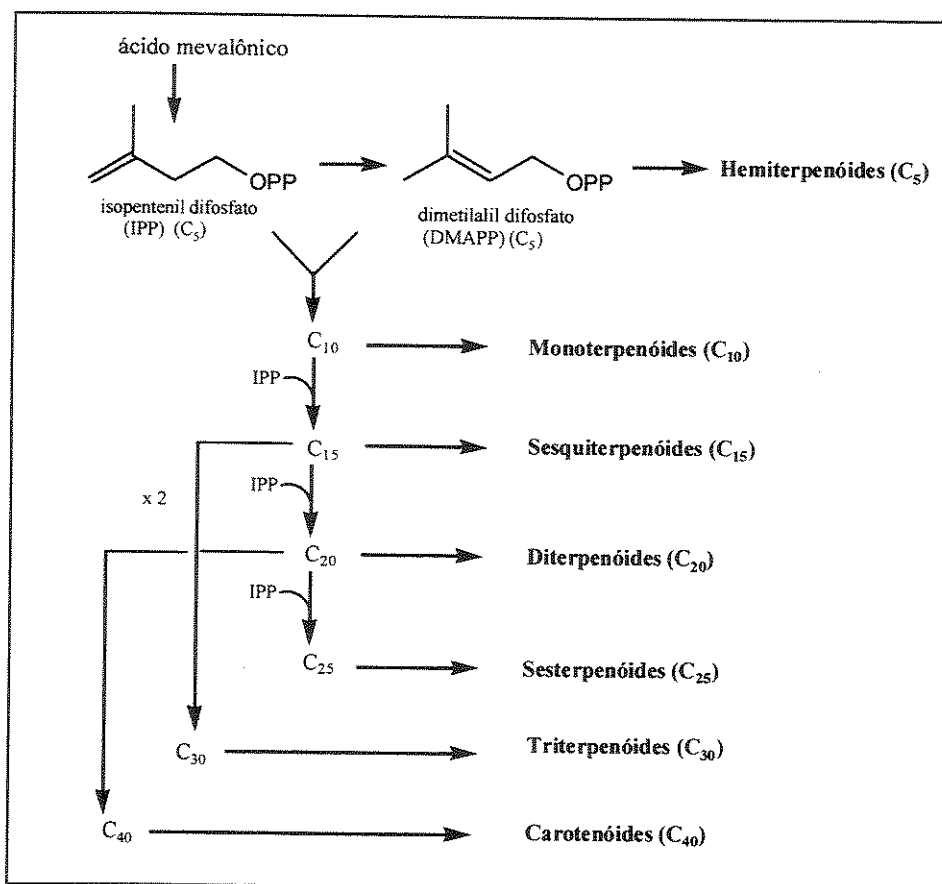


Figura 9. Biossíntese de Terpenos.

³⁷ Seigler, D.S. Plant Secondary Metabolism 1995, Kluwer Academic Publishers, 312-427.

Os sesquiterpenóides não oxigenados (α -copaeno e δ -cadineno) foram encontrados em todas espécies analisadas, porém em abundâncias diferentes.

M. juergensii e *M. ferdinandiana* apresentaram uma fragrância muito similar com a predominância do α -copaeno em suas composições em 34% e 32,4% respectivamente.

M. vernicosa também revelou compostos voláteis semelhantes a *M. juergensii* e *M. ferdinandiana*, entretanto, o limoneno (monoterpeno) apresenta-se como seu constituinte majoritário (30%), seguido do α -copaeno (22,4%).

A fragrância intensa e adocicada de *M. madida* pode ser atribuída a presença de 57% de acetato de isoamila e 11,9% de acetato de butila em sua composição. Estes compostos não foram encontrados na composição das outras espécies analisadas sendo, portanto, característicos desta espécie.

M. pachyphylla apresentou uma mistura bastante complexa de compostos voláteis em sua fragrância. O δ -cadineno é responsável por 16,4% da composição total desta fragrância e o *p*-anisaldeído é o constituinte majoritário, com 20,9%, e característico desta espécie.

Estas diferenças observadas na composição química das fragrâncias florais deste complexo sugerem que diferentes polinizadores podem ser atraídos às plantas.

Comparando nossos resultados com os relatados na literatura por Flach e col.⁹, que investigaram a composição química das recompensas florais e fragrâncias de 10 espécies brasileiras de *Maxillariinae*, observamos uma grande similaridade nos compostos voláteis emitidos. Os terpenóides (mono e sesqui) foram predominantes, com alguns aldeídos, hidrocarbonetos, compostos aromáticos e derivados de ácidos graxos em menor proporção.

A ausência de recompensas neste complexo, observada por Koehler e col.¹⁶, sugere que a polinização nas espécies deste grupo ocorra por engano. Isto é, os polinizadores em busca de alimentos, são atraídos pelas fragrâncias e pela superfície brilhante do labelo e, ao se aproximarem da flor em busca de recursos, removem acidentalmente o polinário, retirando-o da flor e possibilitam à planta seu processo de reprodução. Como o processo de atração do polinizador e remoção do polinário ocorre por engano, a formação de frutos nas populações é relativamente baixa quando comparada a espécies que oferecem recompensa. A ausência de recompensas sugere também que não há a atração de nenhum polinizador em específico, mas sim, de algumas espécies com hábito exploratório, possivelmente abelhas ou vespas, que são os polinizadores mais comuns para subtribo *Maxillariinae*.

I.4 CONCLUSÃO

A investigação da composição química das fragrâncias florais de *Maxillaria juergensii*, *Maxillaria ferdinandiana*, *Maxillaria vernicosa*, *Maxillaria pachyphylla* e *Maxillaria madida*, pertencentes ao complexo *M. madida*, revelou que estas espécies apresentam basicamente os mesmos compostos em suas fragrâncias. Monoterpenóides e sesquiterpenóides não oxigenados são os compostos voláteis predominantes, sendo o α -copaeno e δ -cadineno comum a todas espécies, porém em abundâncias diferentes.

Os principais constituintes detectados nas fragrâncias de cada espécie analisada foram:

- M. juergensii*: α -copaeno (34%)
- M. ferdinandiana*: α -copaeno (32,4%) e δ -cadineno (28,7%)
- M. vernicosa*: limoneno (30%) e α -copaeno (22,4%)
- M. pachyphylla*: *p*-anisalaldeído (20,9%) e δ -cadineno (16,4%)
- M. madida*: acetato de isoamila (57%)

Visto que as espécies deste complexo não apresentam nenhuma recompensa, sugerimos que a polinização ocorra por engano e que não haja atração de um polinizador em específico.

Estes resultados reforçam os dados relatados na literatura e comprovam a importância das recompensas e dos aromas florais nas interações das espécies de *Maxillaria* e seus insetos polinizadores, a fim de garantir a evolução e manutenção das espécies.

I.5 PARTE EXPERIMENTAL

I.5.1 PLANTAS

As espécies de *Maxillaria madida* usadas neste estudo encontram-se em cultivo no Instituto de Botânica de São Paulo^a e na Escola Superior de Agronomia Luis de Queiroz^b (Universidade de São Paulo/Piracicaba). A identificação das espécies foi realizada pela aluna de doutorado Samantha Koehler, do Instituto de Biologia da Unicamp (**Tabela 2**). A coleta dos aromas florais foi realizada na época de floração das espécies (Novembro-Março), entre o período das 10-15 h e, por aproximadamente, 3 horas.

Tabela 2. Espécies estudadas durante a execução deste trabalho.

ESPÉCIES	Nº EXCICATA
<i>Maxillaria juergensii</i>	#1138 ^a
<i>Maxillaria madida</i>	#4814 ^a
<i>Maxillaria vernicosa</i>	#8627 ^a
<i>Maxillaria ferdinandiana</i>	#3258 ^b
<i>Maxillaria pachyphylla</i>	#10298 ^b

I.5.2 HEADSPACE DINÂMICO

Este método, empregado para coleta dos voláteis, utiliza como adsorvente o polímero Porapak-Q, um tubo de vidro com uma abertura para inserir a flor, e outra abertura oposta, para conectar o vidro contendo o polímero. O ar contendo a fragrância foi arrastado a um fluxo de 500mL/min,

durante três horas, com o auxílio de uma bomba. O processo de dessorção dos voláteis foi realizado utilizando 1,5 mL de CH₂Cl₂ bidestilado. A redução do volume de solvente foi realizada empregando um leve fluxo de N₂. A seguir, o extrato foi analisado por CG/EM.

I.5.3 CG/EM

As análises foram realizadas em um cromatógrafo HP 6890 acoplado a um detector seletivo de massas HP 5973. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-5, com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme da fase estacionária. O programa utilizado foi de 40°C até 290°C, com um gradiente de 4°C/min, injetor a 240°C e fluxo de 1 mL/min. Para as análises foi utilizado Hélio como gás de arraste, injetor no modo splitless e 1 µL de volume do extrato em diclorometano.

A identificação dos voláteis foi feita a partir do espectro de massas obtido em comparação com espectros da biblioteca Wiley, índice de retenção e coinjeção de padrões.

Os índices de retenção (IR) foram calculados a partir da coinjeção da fragrância floral com uma mistura padrão de hidrocarbonetos, C₁₁-C₃₀, sob as mesmas condições de equipamento descritas acima e com aplicação da equação de Van den Dool e Kratz³⁵.

$$IR = [(T_S - T_{Cn-1}) / (T_{Cn} - T_{Cn-1})] \times 100 + 100 \times N$$

Onde:

T_s – Tempo de retenção do composto analisado

$T_{C_{n-1}}$ – Tempo de retenção do n-alceno que elui antes da substância analisada

T_{C_n} – Tempo de retenção do n-alceno que elui depois da substância analisada

N – Número de carbonos do n-alceno que elui antes da substância analisada

CAPÍTULO II

CAPÍTULO II – LÁTEX

CAPÍTULO II

II.1 INTRODUÇÃO

As plantas produzem e acumulam centenas de micromoléculas para a sua defesa, regulação e adaptação, sendo, portanto, biologicamente ativas. Muitas substâncias produzidas por plantas possuem atividades contra insetos, fungos, bactérias e patógenos em geral, como uma forma de defesa principalmente, nos ambientes tropicais e equatoriais, onde a biodiversidade de microrganismos, insetos e animais é prolífera. São essas substâncias que o homem aprendeu a utilizar como medicamento na cura de doenças desde os tempos remotos até os dias de hoje, sendo o alvo de muitos estudos e propiciando inúmeros protótipos de medicamentos para a indústria farmacêutica³⁸.

Raízes, folhas e frutos de vários gêneros e espécies da família Guttiferae são usados na medicina popular, na forma de chá ou ingestão do látex, no tratamento de reumatismo, dores de cabeça²², como purgativo, diurético, antipirético²¹, etc. Algumas espécies são também de interesse econômico por fornecerem frutos comestíveis (*Garcinia*, *Platonia*, *Mammea*) e por serem utilizadas como plantas ornamentais. O látex encontrado nos frutos de *C. rósea*²⁰ é usado por nativos da Venezuela para fechar ferimentos da pele. Já o látex do tronco de *Clusia grandiflora*³⁹ apresentou, como agentes bactericidas contra dois patógenos de abelhas (*Paenibacillus larvae* e *Paenibacillus alvei*), as benzofenonas chamona I e nemorosona II. Na Costa Rica, o extrato aquoso das folhas de *C. coclensis*^{40,41,42} é empregado no tratamento de hipertensão

³⁸ O'Neill, M.O.; Lewis, J.A. ACS Symposium Series **1993**, 534, 48-55.

³⁹ Lokvam, J.; Braddock, J.F.; Reichardt, P.B.; Clausen, T.P. *Phytochemistry* **2000**, 55, 29-34.

⁴⁰ Garcia-Gonzalez, M.; Matamoros, O.M. *Rev. Biol. Trop* **1996**, 44, 87-91.

⁴¹ Garcia-Gonzalez, M.; Matamoros, O.M. *Rev. Biol. Trop* **1997**, 45, 999-1003.

⁴² Garcia-Gonzalez, M.; Matamoros, O.M. *Rev. Biol. Trop* **1998**, 46, 575-578.

arterial e, na Amazônia, certas tribos utilizam o látex de *C. insignis*⁴³ nos olhos, para “aumentar a probabilidade de encontrar tartarugas”. Além disso, o látex de espécies de *Moronobea*, *Platonia* e *Symphonia* é usado pelos índios na impermeabilização de canoas, na confecção de máscaras e em tochas para iluminação.

O látex, ainda pouco conhecido, pode ser definido como uma suspensão aquosa de aspecto leitoso produzida por estruturas especializadas denominadas laticíferas (**Figura 10**) e é encontrado em todo tecido vegetal. Isto sugere que o látex, encontrado tanto nas folhas, como nos ramos e frutos, possua a mesma classe de metabólitos, variando apenas na proporção de seus constituintes químicos. Pode mostrar-se incolor, amarelo, alaranjado, vermelho e, mais comumente, branco. Pode ser constituído por uma infinidade de substâncias como triterpenóides, esteróides, hidrocarbonetos poliisoprenóides, ácidos graxos, compostos aromáticos, alcalóides e proteínas¹⁹.

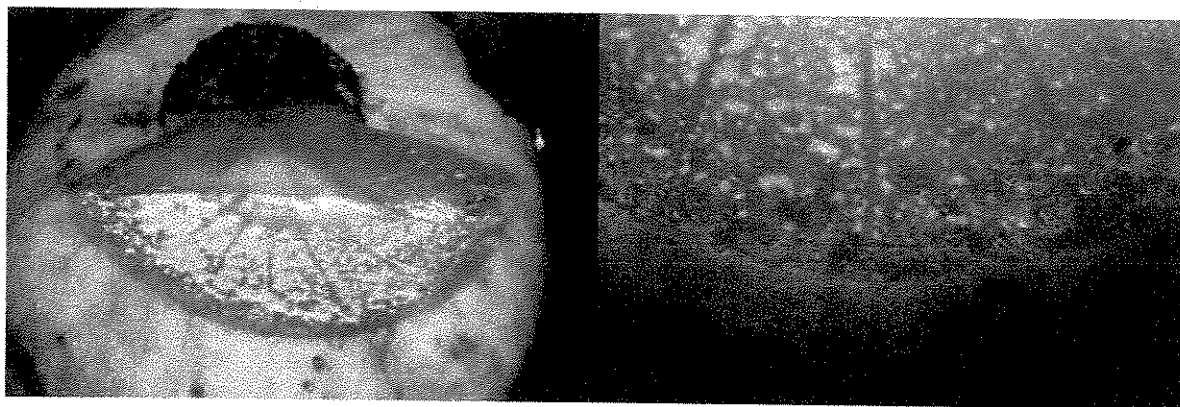


Figura 10. Látex exsudado pelos canais laticíferos do fruto de *C. grandiflora*.

⁴³ Bittrich, V.; Amaral, M.C.E. *Kew Bull.* **1996**, 51, 681.

As plantas laticíferas ocorrem com maior frequência nas Dicotiledôneas⁴⁴ e estima-se que cerca de 40 famílias e mais de 20.000 espécies possuam algum tipo de estrutura laticífera.

As funções exercidas pelo látex na planta ainda não estão bem esclarecidas, mas de acordo com relatos na literatura, acredita-se que tenha função protetora contra o ataque de herbívoros e, também, antimicrobiana ou fungicida e até cicatrizante, fechando ferimentos na superfície da planta.

Baseados nestas observações da literatura buscamos nesta etapa do trabalho fazer um estudo mais detalhado da composição química do látex de *Clusia grandiflora*. Este estudo foi iniciado por Cláudio Augusto Gomes da Câmara⁴⁵ no seu doutorado e agora demos continuidade a este trabalho isolando e identificando novos produtos naturais de interesse biológico.

⁴⁴ Plantas com flor, pertencentes à divisão Magnoliophyta, as quais contém duas ou mais sementes.

⁴⁵ Câmara, C.A.G. *Clusia-Cultura de Tecidos e importância de seu Látex na Sobrevivência das Espécies* 2001, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp.

II.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta etapa do trabalho investigou-se a composição química do látex dos frutos de *Clusia grandiflora* (Figura 11), seção Chlamydoclusia, que foram coletados na Fazenda Santa Elisa – Instituto Agronômico de Campinas, pelo Dr. Volker Bittrich.



Figura 11. Frutos de *C. grandiflora*

II.2.1 ANÁLISE DO LÁTEX

Os frutos foram cortados transversalmente, e o látex exsudado foi recolhido rapidamente em um béquer com metanol, onde observou-se a formação de um precipitado, que foi caracterizado como um polissacarídeo⁴⁵. A fração metanólica foi filtrada, o solvente removido e o látex armazenado a -10°C. Para facilitar a separação de seus constituintes, o látex foi metilado com diazometano. Após a derivação, a mistura foi submetida a vários métodos cromatográficos de adsorção em sílica gel. É importante salientar que os

compostos foram isolados na forma de ésteres metílicos, enquanto que os produtos naturais são encontrados na forma de ácidos carboxílicos, conforme foi verificado em trabalhos anteriores⁴⁵.

A análise do látex permitiu o isolamento de 3 compostos (**Figura 12**), sendo 2 inéditos (**2** e **3**), e todos derivados do ácido *cis*- δ -tocotrienólico⁴⁶.

A determinação estrutural dos compostos isolados foi feita através de técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de 1D e 2D (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, g-HMBC, DEPT 135° e 90°), IV e EM.

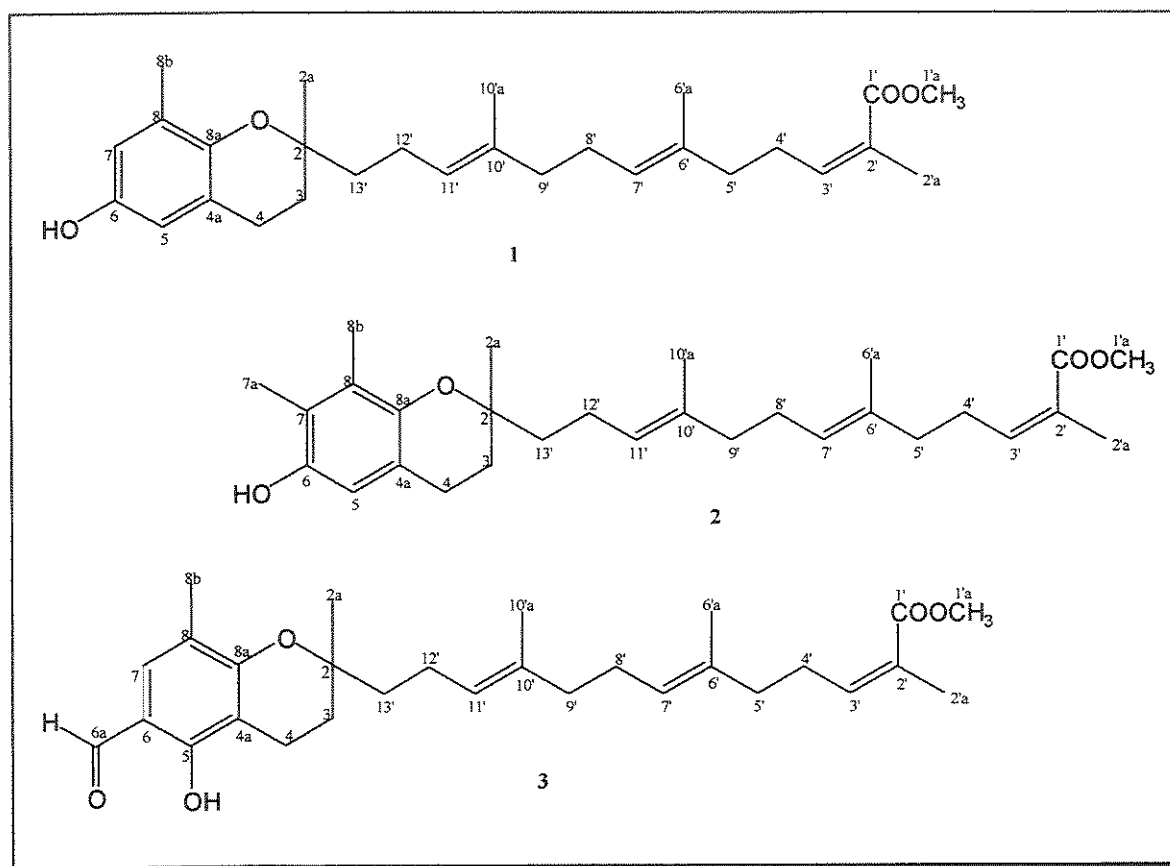
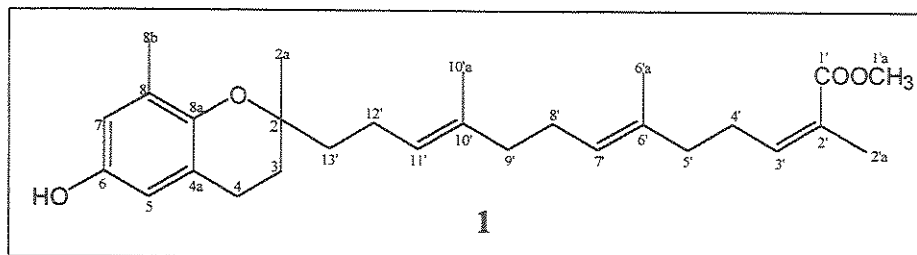


Figura 12. Compostos isolados do látex de *C. grandiflora*.

⁴⁶ Delle Monache, F.; Marta, M.; Mac-Quhae, M.M.; Nicoletti, M. *Gazz. Chim. Ital.* **1984**, *114*, 135-137.

II.2.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO (1)



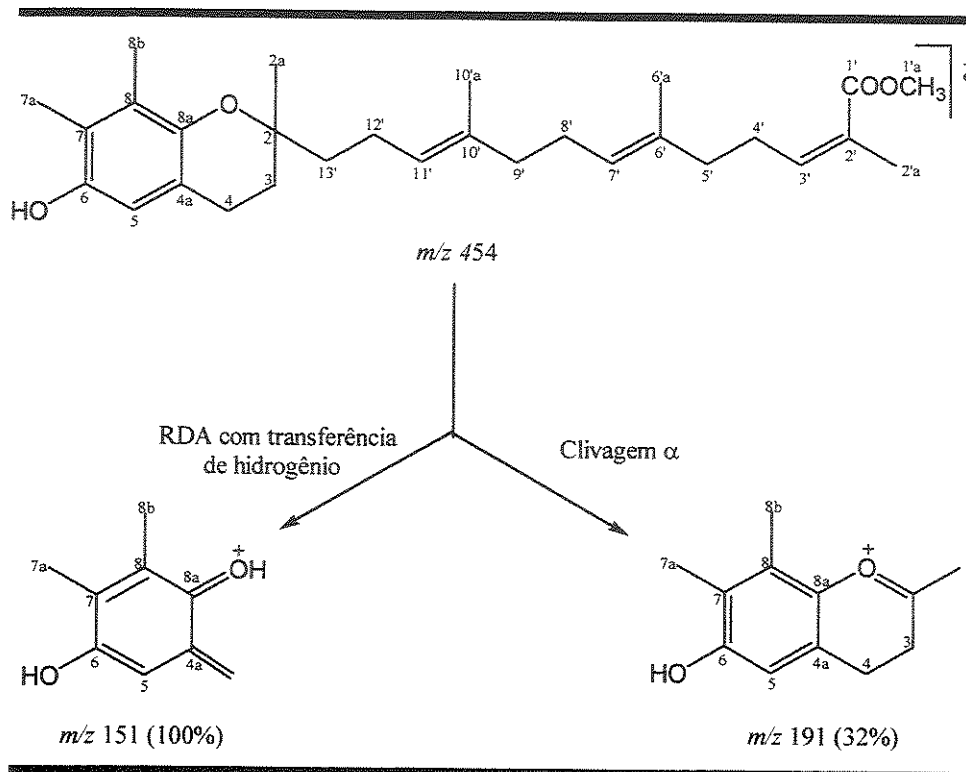
O composto (**1**) foi obtido na forma de um óleo amarelo. O espectro na região do IV (**E-1**) apresentou uma banda de absorção característica de ésteres α,β -insaturados em 1717 cm^{-1} , relacionado ao estiramento de $\text{C}=\text{O}$ e uma banda intensa e larga na região de 3421 cm^{-1} referente ao estiramento de OH.

A análise do espectro de RMN de ^1H (**E-2**) revelou dois sinais duplos em δ 6,38 e δ 6,47 que são característicos de um sistema de spins em anéis aromáticos com acoplamento em *meta* ($^4J=2,4\text{ Hz}$) e um sinal em δ 2,12 correspondente a três hidrogênios de metila aromática. Observou-se ainda três singletos em δ 1,57 (3H), 1,58 (3H) e 1,88 (3H) ppm, correspondentes a três grupos metílicos sobre as duplas ligações, e que foram atribuídos para C-6'a (15,7), C-10'a (15,8) e C-2'a (20,6) ppm.

Em δ 3,73 observou-se apenas um sinal que foi atribuído a uma metoxila, cuja presença foi confirmada no espectro de RMN de ^{13}C pelo sinal em δ 51,2 referente a um carbono metoxílico.

Na região de δ_{H} 5,91 foi observado um sinal atribuído a um hidrogênio olefínico β de um sistema carboxílico α,β -insaturado e em δ_{H} 5,11 um sinal com integração para dois hidrogênios olefínicos.

O espectro de RMN de ^{13}C (**E-3**) revelou 28 sinais com diferentes deslocamentos químicos, cujos padrões de hidrogenação foram estabelecidos pela análise dos espectros obtidos pela técnica DEPT 135° e 90° (**E-4**), como

Esquema 1. Fragmentações características do composto (2).

A análise do espectro de RMN de ^1H (**E-8**) mostrou um sinal em δ 6,37 atribuído para um hidrogênio pertencente ao sistema aromático e dois singletos em δ 2,11 e δ 2,13 de duas metilas aromáticas. Verificou-se ainda três singletos em δ 1,57 (3H), 1,59 (3H) e 1,88 (3H) ppm, correspondentes a três grupos metílicos sobre duplas ligações, e que foram atribuídos para C-6'a (15,7), C-10'a (15,8) e C-2'a (20,6) ppm.

Na região de δ 5,91 foi observado um sinal atribuído a um hidrogênio olefínico β de um sistema carboxílico α,β -insaturado e em δ 5,11 um sinal com integração para dois hidrogênios olefínicos.

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C indicaram a presença de apenas uma metoxila em δ 3,73 com integração para 3 hidrogênios e em δ 51,2 para um carbono metoxílico.

O espectro de RMN de ^{13}C (**E-9**) revelou 29 sinais com diferentes deslocamentos químicos, os quais pela análise dos espectros de DEPT 135° e 90° (**E-10**) foram classificados quanto ao padrão de hidrogenação como sendo 7 carbonos metílicos, 8 metilênicos, 4 metínicos e 10 não hidrogenados.

A comparação dos dados espectrais registrados para o composto **2** com os obtidos para o composto **1**, sugere que estes compostos pertençam à mesma classe química e, que a diferença entre eles esteja na substituição do sistema aromático. O espectro de RMN de ^1H do composto **1** mostrou apenas 1 sinal referente a uma metila aromática em δ 2,12, enquanto que para o composto **2** observou-se dois sinais para duas metilas aromáticas em δ 2,11 e δ 2,13.

Os deslocamentos químicos de ^{13}C atribuídos para o sistema bicíclico do composto **2**, mostraram-se semelhantes com os dados relatados para o sistema bicíclico do γ -tocoferol⁴⁷ (**Figura 13**). Porém, analisando as correlações H, C (HMBC) (**E-11**, **E-12**, **E-13**) a longa distância entre H-5 (δ 6,37) e C-7 (δ 121,6) e entre H-5 (δ 6,37) e C-8a (δ 146,2) do composto **2**, observamos que as atribuições feitas para o C-6 (δ_{C} 146,0) e C-8a (δ_{C} 145,5) do γ -tocoferol não eram compatíveis com nossas observações e, portanto, decidimos inverter as atribuições para C-6 (δ_{C} 145,6) e C-8a (δ_{C} 146,2) de acordo com os resultados observados em nossas análises.

⁴⁷ Matsuo, M.; Urano, S. *Tetrahedron* **1976**, 32, 229-231.

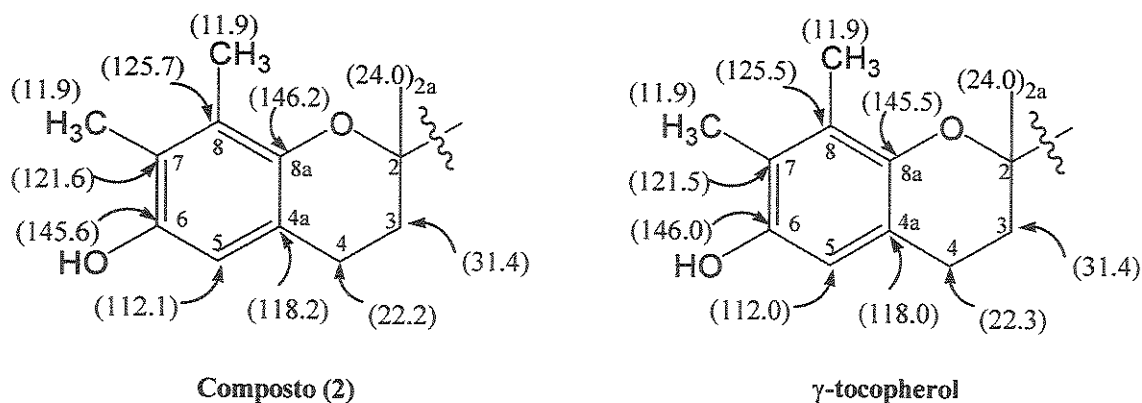


Figura 13. Comparação dos deslocamentos químicos (ppm) de ^{13}C entre o sistema bicíclico do composto (2) e do γ -tocoferol.

A configuração *cis* para olefina em C-2'-C-3' foi estabelecida através do experimento de RMN de ^1H de diferença de NOE (NOESY 1D) (E-14, E-15). A irradiação da metoxila em δ_{H} 3,73 causou um incremento de 0,94% no sinal em δ_{H} 2,54 e um incremento de 0,81% na metila em δ_{H} 1,57. E, ao irradiar a metila em δ_{H} 1,88 observou-se um incremento de 0,97% no hidrogênio vinílico em δ_{H} 5,91 (Figura 14).

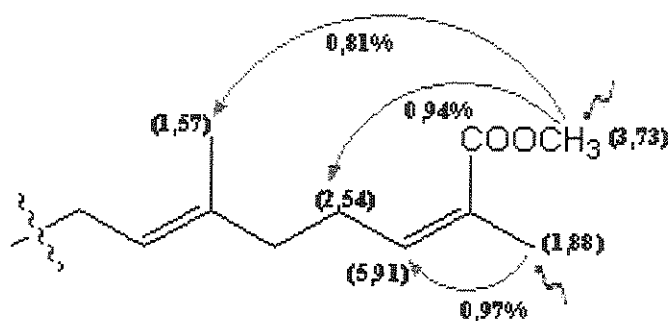
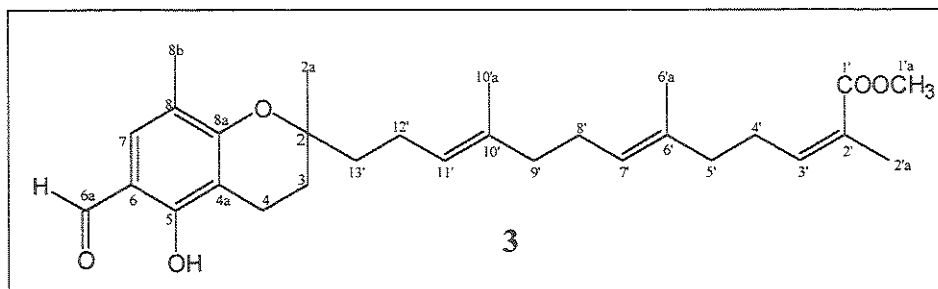


Figura 14. Incrementos observados no experimento de diferença de NOE.

Associando estas informações, concluímos que este composto corresponde à estrutura 2, a qual foi sugerida anteriormente por Cláudio A G. da Câmara. Este composto é inédito e não encontra-se relatado na literatura.

II.2.4 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO (3)

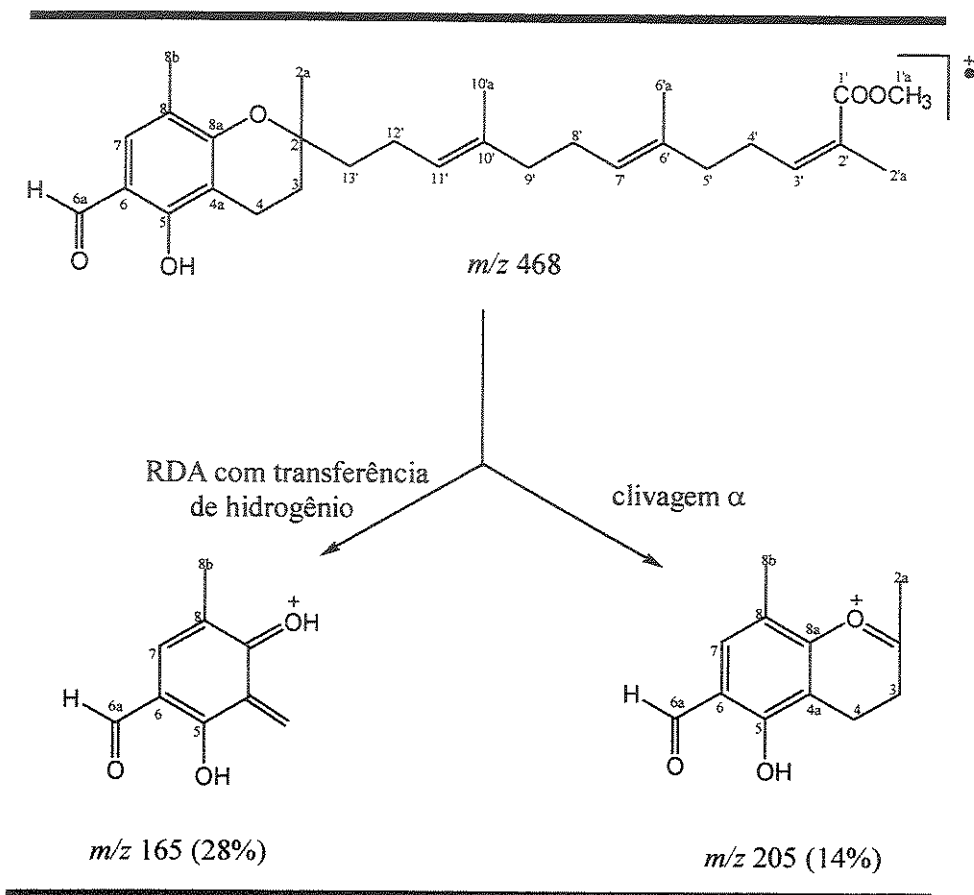


Este composto foi isolado na forma de um óleo amarelo e os espectros de UV, IV e RMN de 1D e 2D (^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC) obtidos apresentaram um perfil bastante semelhante aos dos compostos anteriormente caracterizados.

No espectro de UV (**E-16**) foram observadas absorções em 224 e 298 nm, consistentes com os grupos cromofóricos carboxílico α,β -insaturado e fenol, respectivamente.

No espectro de IV (**E-17**) observou-se uma banda de estiramento de $\text{C}=\text{O}$ de aldeído em 1716 cm^{-1} , uma banda de deformação axial de $\text{C}-\text{H}$ de aldeído aromático em 2853 cm^{-1} e uma banda larga em 3418 cm^{-1} referente ao estiramento de OH .

A análise por espectrometria de massas de alta resolução (**E-18**) forneceu o pico íon molecular m/z 468,2844 que foi coerente com o valor 468,2875 calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}_5$ (**Esquema 2**).

Esquema 2. Fragmentações características do composto **(3)**.

O espectro de RMN de ^{13}C (**E-20**) revelou 29 sinais com diferentes deslocamentos químicos, os quais pela análise dos espectros de DEPT 135° e 90° (**E-21**) foram classificados quanto ao padrão de hidrogenação como sendo 6 carbonos metílicos, 8 metilênicos, 5 metínicos e 10 não hidrogenados.

A principal diferença no espectro de RMN de ^1H (**E-19**) do composto **3**, com relação ao do composto **1**, foi observada em δ 9,61 um sinal referente a hidrogênio de aldeído, que foi confirmado por RMN de ^{13}C com um sinal em

194,2 ppm. Os demais sinais de ^1H e ^{13}C da cadeia lateral C-1'-C13' apresentaram deslocamentos químicos semelhantes aos dos compostos **1** e **2**.

A posição dos substituintes OH, CHO e CH₃ no anel aromático foi determinada por sucessivos experimentos de NOE juntamente com as correlações heteronucleares (H, C-gHMBC) a longa distância.

No experimento de diferença de NOE (NOESY 1D) (**E-22**, **E-23**) a irradiação da metila aromática em δ 2,14, causou um incremento de 0,46% no hidrogênio aromático em δ 7,08. O hidrogênio aromático também foi irradiado e observou-se um incremento de 3,25% no hidrogênio do aldeído em δ 9,61 e um incremento de 2,03% nos hidrogênios da metila aromática (δ 2,11). Estes resultados estabeleceram a posição do hidrogênio aromático entre o grupo aldeído e a metila (**Figura 15**).

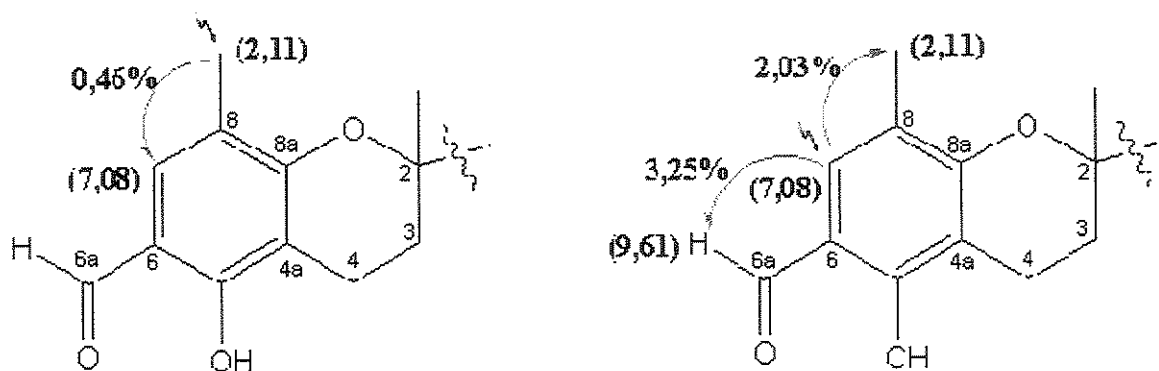


Figura 15. Incrementos observados no experimento de diferença de NOE.

No entanto, os experimentos de NOE não foram eficientes para estabelecer se a metila (δ 2,11) estaria vizinha ao C-4 ou O-1. Isto foi solucionado pelas correlações heteronucleares (H, C-gHMBC) (**E-24**, **E-25**, **E-26**) entre a metila no C-8 (δ 2,11) com C-8a (δ_{C} 159,7, $^3J_{\text{C,H}}$) e C-8 (δ_{C} 118,7, $^2J_{\text{C,H}}$). Além disso, correlações a longa distância do H-4 (δ_{H} 2,68) com

C-4a (δ_C 108,2, $^2J_{C,H}$), C-2 (δ_C 77,7, $^3J_{C,H}$), C-3 (δ_C 29,8, $^2J_{C,H}$) e C-5 (δ_C 160,1, $^3J_{C,H}$) e do OH fenólico (δ_H 11,6) com C-4a (δ_C 108,2, $^3J_{C,H}$), C-5 (δ_C 160,1, $^2J_{C,H}$) e C-6 (δ_C 113,1, $^3J_{C,H}$) foram fundamentais para estabelecer a estrutura do composto (3) (Figura 16).

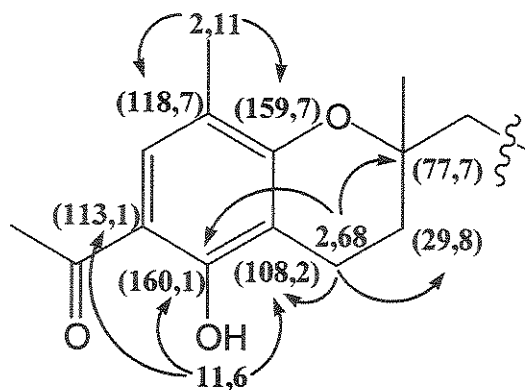


Figura 16. Correlações heteronucleares H, C-gHMBC observadas no composto 3.

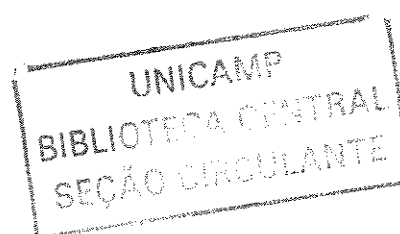
Analisando os resultados verificamos que este composto é inédito e pertence à mesma classe química dos compostos (1) e (2), diferindo apenas no padrão de substituição do sistema biciclo.

As atribuições de 1H e ^{13}C dos compostos (2) e (3) estão detalhadas na Tabela 3.

Tabela 3. Deslocamentos de ^1H e ^{13}C (ppm) dos compostos (2) e (3), obtidos por RMN de 1D e 2D.

2			3	
C#	^{13}C	^1H (δ)	^{13}C	^1H (δ)
2	75,1	-	77,7	-
2a	24,0	1,25 (3H, s)	23,9	1,32 (3H, s)
3	31,4	1,78 (1H, ddd, $J \approx 12$, 12 e 6,5 Hz) 1,73 (1H, ddd, $J \approx 12$, 12 e 6,5 Hz)	29,8	1,87-1,75 (2H, m)
4	22,2	2,65 (1H, ddd, $J \approx 12$, 12 e 6,5 Hz) 2,71 (1H, ddd, $J \approx 12$, 12 e 6,5 Hz)	15,7	2,68 (2H, m)
4a	118,2	-	108,2	-
5	112,1	6,37 (1H, s)	160,1	-
5a	-	-	-	11,6 (OH, s)
6	145,6	-	113,1	-
6a	-	-	194,2	9,61 (1H, s)
7	121,6	-	131,9	7,08 (1H, s)
7a	11,8	2,11 (3H, s)	-	-
8	125,7	-	118,7	-
8a	146,2	-	159,7	-
8b	11,9	2,13 (3H, s)	15,3	2,11 (3H, s)
1	168,5	-	168,4	-
1a	51,2	3,73 (3H, s)	51,1	3,72 (3H, s)
2	126,6	-	126,6	-
2a	20,6	1,88 (3H, s)	20,6	1,88 (3H, s)
3	143,3	5,91 (1H, td, $J = 7,2$ e 1,3 Hz)	143,2	5,90 (1H, td, $J = 7,3$ e 1,4 Hz)
4	27,9	2,54 (2H, m)	27,9	2,54 (2H, m)
5	39,1	2,05 (2H, m)	39,0	2,05 (2H, m)
6	134,1	-	134,1	-
6a	15,7	1,57 (3H, s)	15,7	1,60 (3H, s)
7	124,9	5,11 (1H, m)	124,7	5,12 (1H, m)
8	26,5	2,05 (2H, m)	26,5	2,05 (2H, m)
9	39,6*	1,97 (2H, tl, $J = 7,5$ Hz)	39,5*	1,97 (2H, m)
10	135,0	-	135,4	-
10a	15,8	1,59 (3H, s)	15,8	1,58 (3H, s)
11	124,3	5,11 (1H, m)	123,7	5,12 (1H, m)
12	22,1	2,12 (2H, m)	22,0	2,12 (2H, m)
13	39,6*	1,62 – 1,55 (2H, m)	39,6*	1,72-1,60 (2H, m)

*valores intercambiáveis



II.2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Vários processos fisiológicos e patológicos como artrites reumáticas, asma, câncer, arteriosclerose, inflamações intestinais, doenças degenerativas do Sistema Nervoso Central (SNC), mal de Alzheimer e mal de Parkinson estão associados, em parte, com a produção descontrolada de radicais livres e o desequilíbrio entre fatores pró e antioxidantes (estresse oxidativo).

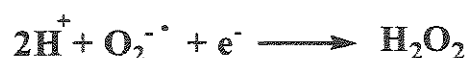
Os radicais livres de oxigênio são produzidos nas células eucarióticas aeróbicas a partir de agentes do meio ambiente (radiações de ultravioleta), como também de processos metabólicos normais, como a respiração celular. Sabe-se, também, que os organismos aeróbicos possuem eficientes mecanismos de defesa contra os radicais livres de oxigênio, caracterizados por um conjunto de enzimas e compostos antioxidantes, que mantêm estas espécies oxidantes em concentrações sub-tóxicas. Entretanto, quando ocorre um desequilíbrio entre os processos de produção e destruição das espécies reativas de oxigênio, se estabelece uma condição de estresse oxidativo, em que o ataque oxidativo das biomoléculas é favorecido. A busca por agentes capazes de interferir na geração de radicais livres de oxigênio e com as reações por eles desencadeadas, evitando o envelhecimento celular e desenvolvimento de enfermidades correlacionadas, passou a ser uma das prioridades nos setores médico e farmacêutico, impulsionando esforços científicos nas áreas de química e farmacologia de produtos naturais⁴⁸.

Os radicais livres de oxigênio são formados através de passos sucessivos de reduções monoelétrônicas do oxigênio⁴⁹, gerando

⁴⁸ Sies, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 1058-1071.

⁴⁹ Cadenas, E. *Ann. Ver. Biochem.* **1989**, 58, 79-110.

seqüencialmente os radicais ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os radicais hidroxilas ($HO^{\cdot}$), como ilustrado abaixo:



Dentre as espécies reativas de oxigênio, o oxidante mais potente é o radical hidroxila ($HO^{\cdot}$), o qual é capaz de reagir rapidamente com praticamente todas as biomoléculas como lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, levando ao desenvolvimento da toxicidade celular⁵⁰. Portanto, substâncias capazes de reagir com os radicais hidroxila, ou de impedir o prosseguimento de suas cadeias de reações radicalares, constituem valiosos elementos na proteção antioxidante dos sistemas biológicos. Substâncias fenólicas, carotenóides e substâncias contendo enxofre ou nitrogênio são os principais exemplos de antioxidantes^{51, 52, 53} (**Figura 17**).

⁵⁰ Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, 246, 501-514.

⁵¹ Laughton, M.J.; Halliwell, B.; Evans, P.J.; Hoult, J.R. *Biochem. Pharmacol.* **1989**, 38, 2859-2865.

⁵² Pietta, P.G. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 1035-1042.

⁵³ Sies, H.; Stahl, W. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, 62, 1315S-1321S.

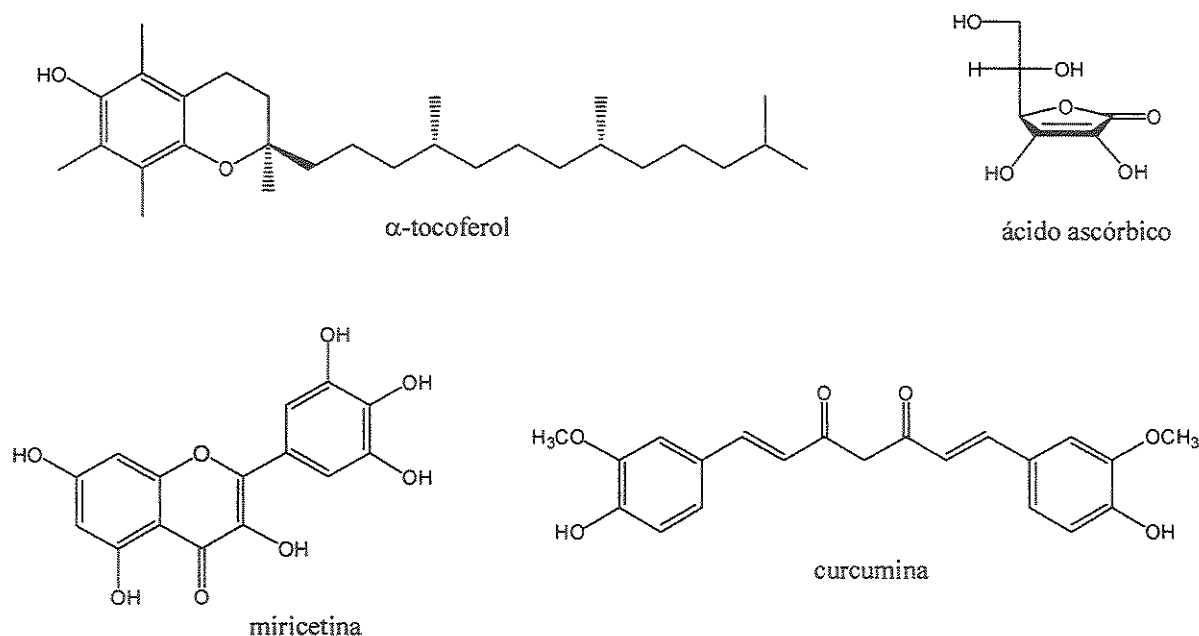


Figura 17: Compostos com propriedades antioxidantes

Diante do exposto e da importância da descoberta de novas substâncias antioxidantes, buscamos nesta etapa do trabalho avaliar o potencial antioxidante dos compostos **1**, **2** e **3** isolados. Para tanto, empregamos a técnica de CCD⁵⁴ com β -caroteno. Nesse ensaio, as amostras foram aplicadas em cromatoplacas as quais foram nebulizadas com uma solução de β -caroteno em diclorometano (0,02%) e, em seguida, expostas à luz. Após duas horas, nas áreas onde existiam substâncias antioxidantes verificou-se a permanência da coloração laranja do β -caroteno. Este resultado evidenciou a propriedade antioxidante dos 3 compostos isolados do látex de *C. grandiflora* (**Figura 18**).

⁵⁴ Pratt, D.E. Miller, E.E. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1984**, 61, 1064-1068.

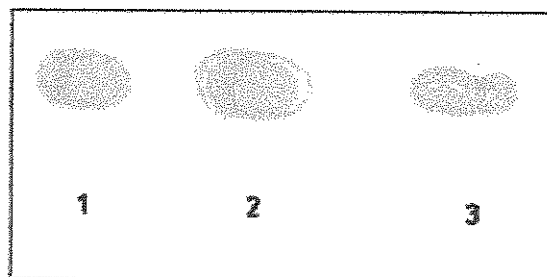


Figura 18. Teste em CCD com β -caroteno.

A atividade antioxidante desta classe de compostos é bem conhecida e vêm despertando o interesse de vários grupos de pesquisa. Recentemente, Niwa e col.⁵⁵ investigaram as relações entre estrutura e atividade antioxidante de compostos cromanos *versus* *dl*- α -tocoferol. Para tanto, vários análogos de compostos cromanos foram sintetizados baseados no ácido garcinólico (Figura 19) variando o tamanho da cadeia lateral e seu estado de oxidação, os substituintes do anel aromático e a ausência do anel pirano.

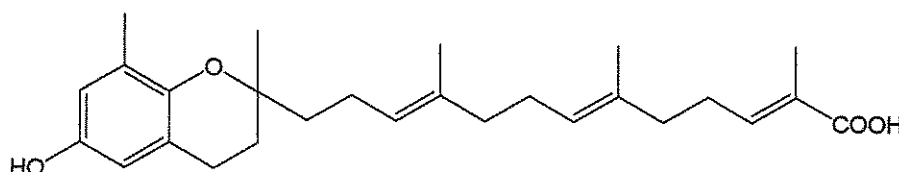


Figura 19. Estrutura do ácido garcinólico⁵⁶.

O estudo revelou que a diminuição do número de carbonos na cadeia lateral (de farnesil para geranil, isoprenil e H) causaram um aumento na atividade na ordem de 9 vezes e, a saturação ou insaturação da cadeia não tem nenhuma influência. No entanto, a presença do grupo hidroxila no anel aromático parece essencial para a atividade, pois os éteres derivados não

⁵⁵ Niwa, M.; Takaya, Y.; Terashima, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1619-1625.

⁵⁶ Terashima, K.; Shimamura, T.; Tanabayashi, M.; Aqil, M.; Akinniyi, J.A.; Niwa, M. *Heterocycles* **1997**, *45*, 1559-1566.

mostraram nenhum potencial antioxidante. O mesmo resultado foi observado na ausência do anel pirano.

Estes resultados demonstraram a importância do esqueleto cromano e do grupamento hidroxila no mecanismo antioxidativo, o que pode ser útil para o planejamento de novos agentes para prevenção de doenças causadas pelo estresse oxidativo.

II.3 CONCLUSÃO

Investigando a composição química do látex dos frutos de *C. grandiflora*, foi possível isolar e caracterizar 3 compostos sendo todos pertencentes a classe dos tocoferóis.

- O composto (1) foi caracterizado como o éster metílico do ácido *cis*- δ -tocotrienólico, já descrito na literatura como principal constituinte do látex do tronco de *C. grandiflora*.
- O composto (2): (2*Z*, 6*E*, 10*E*)-13-(6-hidroxi-2, 7, 8-trimetil-3, 4-diidro-2H-2-cromenil)-2, 6, 10-trimetil-2, 6, 10-tridecatrienoato de metila, apresentou os dados espectroscópicos quase idênticos aos do composto (1), diferindo apenas pela presença de uma metila a mais no sistema aromático.
- O composto (3): (2*Z*, 6*E*, 10*E*)-13-(6-formil-5-hidroxi-2,8-dimetil-3,4-diidro-2H-2-cromenil)-2, 6, 10-trimetil-2, 6, 10-tridecatrienoato de metila, mostrou-se também muito similar aos compostos (1) e (2). A principal diferença entre eles está na presença de um grupo aldeído no sistema aromático do composto (3).

Todos os compostos isolados do látex de *C. grandiflora* tiveram seu potencial antioxidante avaliado através do teste em CCD com β -caroteno. O teste revelou que os três compostos apresentam atividade antioxidante.

Os compostos 2 e 3 são inéditos e estão sendo relatados pela primeira vez na literatura.

II.4 PARTE EXPERIMENTAL

II.4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

✓ Os solventes e reagentes comerciais foram utilizados sem purificação prévia e, quando verificou-se a necessidade de reagentes e solventes com um maior grau de pureza, estes foram tratados conforme as técnicas descritas na literatura⁵⁷. Utilizou-se solventes das marcas Nuclear, Synth, CRQ e Merck.

✓ As placas de cromatografia em camada fina preparativa foram preparadas no espalhador Quickfit com 1 mm de espessura, sobre suporte de vidro (20x20 cm), usando uma mistura de 160 mL de água destilada, 30g de sílica gel G e 50g de G F₂₅₄ da marca Merck. Em seguida, as placas foram ativadas em estufa à 60°C.

A detecção dos compostos foi feita utilizando irradiação com lâmpada ultravioleta (254 nm).

✓ Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em um Espectrômetro Micromass modelo VG AutoSpec, operando a 70 eV.

✓ Os espectros de absorção na região do Ultravioleta foram obtidos em um Espectrofotômetro Hewlett Packard 8452A, equipado com detector de absorção na região do UV visível e com um conjunto de diodos.

⁵⁷ Perrin, D.D.; Amarego, W.; Perrin, D.R. Purification of Laboratory Chemicals 1980, Pergamon Press Oxford.

✓ Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em filme empregando-se um espectrofotômetro Perkin-Elmer 1600-FTIR e utilizando celas de NaCl.

✓ Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em espectrômetros Varian modelos Gemini 300 (300,1 MHz) ou INOVA 500 (499,9 MHz). Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm tomando-se como padrões de referência interna o tetrametilsilano (TMS, δ 0,00) ou CHCl_3 (δ 7,27). Os sinais obtidos foram caracterizados como: s (singleto), sl (singleto largo), d (dubleto), dl (dubleto largo), t (triplete), q (quarteto), m (multiplete), dd (duplo dubleto), dt (duplo triplete), dq (duplo quarteto), td (triplo dubleto), tl (triplete largo), tt (triplo triplete), ddd (duplo duplo dubleto). As constantes de acoplamento (J) foram expressas em Hz.

✓ Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos em espectrômetros Varian modelos Gemini 300 (75,5 MHz) ou INOVA 500 (125,7 MHz). Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm tomando-se como padrões de referência interna o tetrametilsilano (TMS, δ 0,00) ou CHCl_3 (δ 77,00). O número de hidrogênios ligados aos átomos de carbono foi determinado através dos espectros de RMN de ^{13}C , com auxílio das técnicas de ^{13}C – DEPT (90° e 135° , onde CH_3/CH = sinal positivo, CH_2 = sinal negativo e C_0 (quaternário) = ausente).

✓ As rotações ópticas foram determinadas em um Polarímetro Perkin Elmer modelo 341. Para as medições, foram empregadas uma lâmpada de sódio (589 nm), uma cela de vidro de 1 cm e clorofórmio como solvente.

II.4.2 MATERIAL VEGETAL

Os frutos foram coletados na Fazenda Santa Elisa do Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas – SP, e identificados pelo Dr. Volker Bittrich. As excicatas estão depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (Departamento de Botânica) com a identificação: *Clusia grandiflora* Splitg. (#95/153).

II.4.3 OBTENÇÃO DO LÁTEX DOS FRUTOS

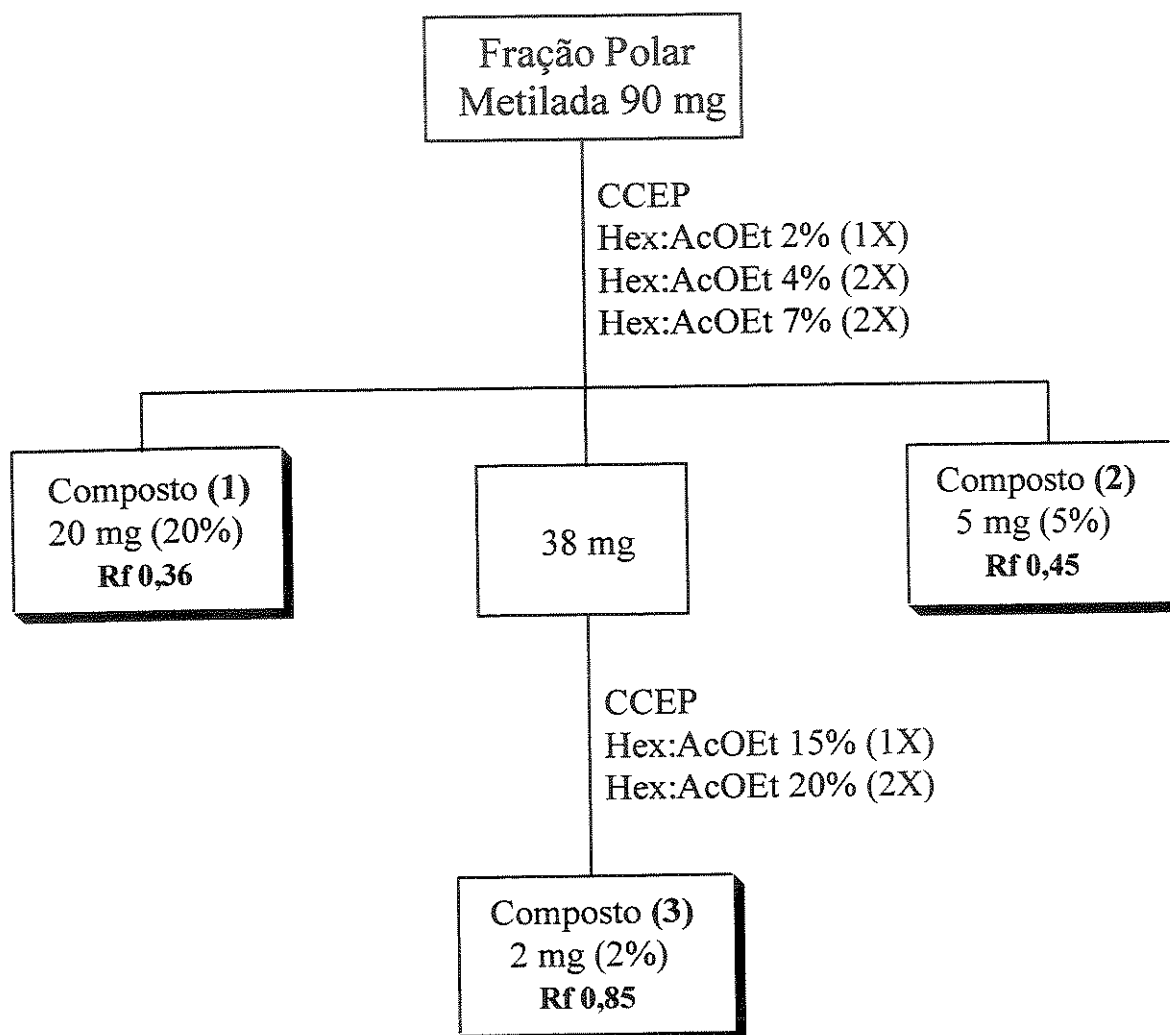
500 mg de látex foram obtidas de 8 frutos, os quais foram cortados transversalmente, com o auxílio de uma faca, e o látex exsudado foi recolhido rapidamente em um béquer com metanol, pois é facilmente oxidado em contato com o ar. O extrato, de coloração alaranjada, foi filtrado para remoção dos polissacarídeos precipitados, o solvente removido sob vácuo em evaporador rotativo e armazenado a -10°C.

II.4.4 ANÁLISE QUÍMICA DO LÁTEX

Uma alíquota de 100 mg do látex bruto foi submetida à cromatografia em camada espessa preparativa, e eluída duas vezes usando como eluente hexano/acetato de etila (9:1). A faixa polar (R_f 0,0-0,23) revelada no UV, foi extraída com acetato de etila, filtrada e o solvente removido, obtendo-se 90 mg.

II.4.5 ANÁLISE DA FRAÇÃO POLAR

A fração polar (90 mg) foi metilada com 10 mL de uma solução etérea de CH_2N_2 . A mistura reacional foi deixada na capela a temperatura ambiente e, após 1 hora de reação, o solvente foi evaporado e o extrato metilado foi fracionado por cromatografia em camada espessa preparativa, usando várias misturas de eluentes, na separação de seus constituintes, conforme **Esquema 3**.



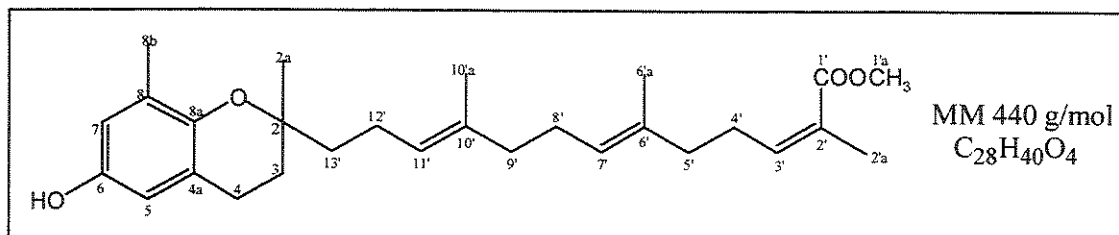
Esquema 3. Procedimento de análise da fração polar metilada

Os compostos isolados foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de 1D e 2D (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, g-HMBC, DEPT 135° e 90°), UV, IV e EM.

II.4.6 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Este ensaio foi realizado de acordo com a metodologia de Pratt e Miller⁵⁴. Os compostos isolados **1**, **2** e **3** foram aplicados em uma cromatoplaça, a qual foi nebulizada com uma solução de β -caroteno em diclorometano (0,02%) e, em seguida, exposta à luz. Após duas horas, nas áreas onde existiam substâncias antioxidantes verificou-se a permanência da coloração alaranjada do β -caroteno. Este resultado evidencia a atividade antioxidante do composto testado.

II.4.7 DADOS ESPECTROSCÓPICOS DO COMPOSTO (1)



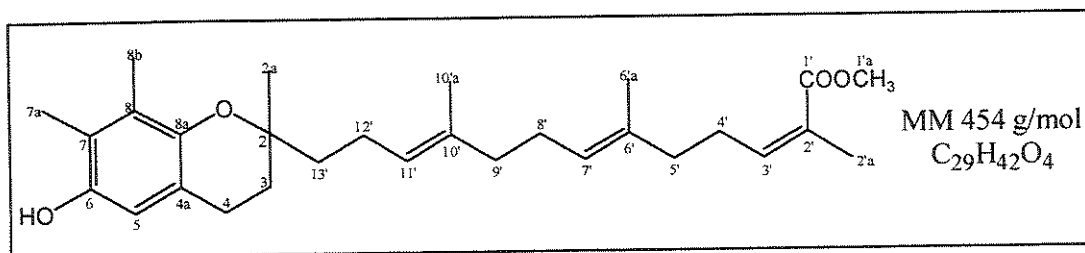
13-(3,4-diidro-6-hidroxi-2,8-dimetil-2H-1-benzopiran-2-il)-
2,6,10-trimetiltrideca -(2Z, 6E, 10E)- trienoato de metila

- **Aspecto Físico:** óleo amarelo escuro
- $[\alpha]_D^{20}$ - 20 (CHCl₃, *c.* 3,9)
- **IV** (filme, ν_{max} . cm⁻¹): 3421, 1717, 1219.

➤ **RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS):** δ 1,25 (3H, *s*, H-2a), 1,57 (3H, *s*, H-6'a), 1,58 (3H, *s*, H-10'a), 1,65-1,54 (2H, *m*, H-13'), 1,79-1,72 (2H, *m*, H-3), 1,88 (3H, *s*, H-2'a), 1,97 (2H, *tl*, $J=7,6$ Hz, H-9'), 2,09-2,05 (6H, *m*, H-5', H-8', H-12'), 2,12 (3H, *s*, H-8b), 2,54 (2H, *m*, H-4'), 2,68 (2H, *m*, H-4), 3,73 (3H, *s*, OMe), 5,11 (2H, *m*, H-7' e H-11'), 5,91 (1H, *td*, $J=7.3$ Hz e 1.4 Hz, H-3'), 6,38 (1H, *d*, $J=2,9$ Hz, H-5), 6,47 (1H, *d*, $J=2,9$ Hz, H-7).

➤ **RMN ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3/TMS):** δ 15,7 (C-6'a), 15,8 (C-10'a), 16,0 (C-8b), 20,6 (C-2'a), 22,1 (C-4), 22,4 (C-12'), 24,0 (C-2a), 26,5 (C-8'), 27,9 (C-4'), 31,3 (C-3), 39,0 (C-5'), 39,5* (C-9'), 39,6* (C-13'), 51,2 (OCH₃), 75,2 (C-2), 112,6 (C-5), 115,6 (C-4a), 121,1 (C-7), 124,3 (C-11'), 124,9 (C-7'), 126,6 (C-2'), 127,2 (C-8), 134,1 (C-6'), 135,0 (C-10'), 143,3 (C-3'), 145,8 (C-6), 147,8 (C-8a), 168,6 (C-1').

II.4.8 DADOS ESPECTROSCÓPICOS DO COMPOSTO (2)



(2Z, 6E, 10E)-13-(6-hidroxi-2, 7, 8-trimetil-3, 4-diidro-2H-2-cromenil)-
2, 6, 10-trimetil-2, 6, 10-tridecatrienoato de metila

➤ **Aspecto Físico:** óleo amarelo

➤ $[\alpha]_D^{20} +10$ (CHCl_3 , *c.* 0,7)

➤ **UV (MeOH), λ_{max} :** 298 nm

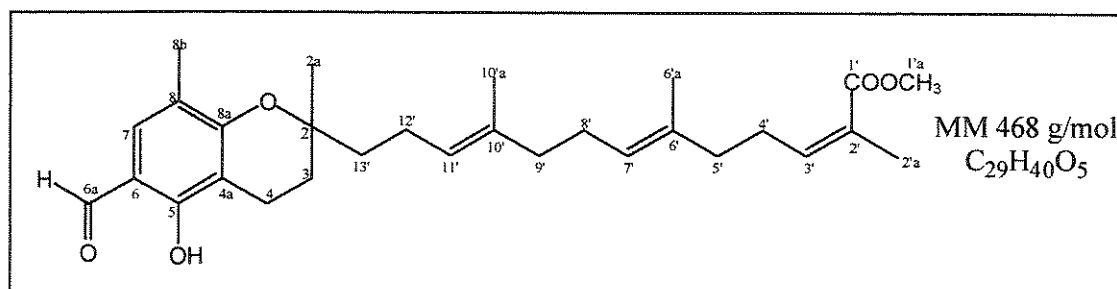
➤ **IV (filme, ν_{max} cm^{-1}):** 3459, 2927, 1715, 1645, 1440, 1221.

➤ **EM de alta resolução:** $M^+ \cdot 454,29647$, calculado para $C_{29}H_{42}O_4$ 454,30831 e principais fragmentos m/z (%) 454 ($M^+ \cdot 98$), 191,1004 (32), 189,0850 (19), 151,0727 (100), 121,0970 (20), 93,0671 (15), 81,0674 (10), 55,0533 (16).

➤ **RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$ / TMS):** δ 1,25 (3H, *s*, H-2a), 1,57 (3H, *s*, H-6'a), 1,59 (3H, *s*, H-10'a), 1,62-1,55 (2H, *m*, H-13'), 1,73 (1H, *td*, $J=12$ e 6,5 Hz, H-3), 1,78 (1H, *td*, $J=12$ e 6,5 Hz, H-3), 1,88 (3H, *s*, H-2'a), 1,97 (2H, *tl*, $J=7,5$ Hz, H-9'), 2,05 (4H, *m*, H-5', H-8'), 2,11 (3H, *s*, H-7a), 2,12 (2H, *m*, H-12' superposto com metila), 2,13 (3H, *s*, H-8b), 2,54 (2H, *m*, H-4'), 2,65 (1H, *td*, $J=12$ Hz e 6,5 Hz, H-4), 2,71 (1H, *td*, $J=12$ Hz e 6,5 Hz, H-4), 3,73 (3H, *s*, OMe), 5,11 (2H, *m*, H-7' e H-11'), 5,91 (1H, *td*, $J=7.2$ Hz e 1.3 Hz, H-3'), 6,37 (1H, *s*, H-5).

➤ **RMN ^{13}C (125,69 MHz, $CDCl_3$ / TMS):** δ 11,8 (C-7a), 11,8 (C-8b), 15,7 (C-6'a), 15,8 (C-10'a), 20,6 (C-2'a), 22,1 (C-12'), 22,2 (C-4), 24,0 (C-2a), 26,5 (C-8'), 27,9 (C-4'), 31,4 (C-3), 39,1 (C-5'), 39,6* (C-13'), 39,6* (C-9'), 51,2 (OCH₃), 75,1 (C-2), 112,1 (C-5), 118,2 (C-4a), 121,6 (C-7), 124,3 (C-11'), 124,9 (C-7'), 125,7 (C-8), 126,6 (C-2'), 134,1 (C-6'), 135,0 (C-10'), 143,3 (C-3'), 145,6 (C-6), 146,2 (C-8a), 168,5 (C-1').

II.4.9 DADOS ESPECTROSCÓPICOS DO COMPOSTO (3)



(2Z, 6E, 10E)-13-(6-formil-5-hidroxi-2,8-dimetil-3,4-diidro-2H-2-cromenil)-
2,6,10-trimetil-2,6,10-tridecatrienoato de metila

- **Aspecto Físico:** óleo amarelo
- $[\alpha]_D^{20} +80$ (CHCl₃, *c.* 0,1)
- **UV (MeOH), λ_{max} :** 298 nm
- **IV (filme, ν_{max} cm⁻¹):** 3418, 2925, 2853, 1716, 1634, 1331.
- **EM de alta resolução:** $M^+ \cdot 468,28446$, calculado para C₂₉H₄₀O₅ 468,28757 e principais fragmentos *m/z* (%) 468 ($M^+ \cdot 8$), 165,0452 (28), 149,0159 (33), 111,1098 (32), 97,0941 (49), 85,0955 (41), 83,0797 (69), 71,0797 (60), 57,0656 (100), 55,0500 (77).
- **RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃/ TMS):** δ 1,32 (3H, *s*, H-2a), 1,58 (3H, *s*, H-10'a), 1,60 (3H, *s*, H-6'a), 1,72-1,60 (2H, *m*, H-13' superposto com metila), 1,87-1,75 (2H, *m*, H-3), 1,88 (3H, *s*, H-2'a), 1,97 (2H, *m*, H-9'), 2,05 (4H, *m*, H-5', H-8'), 2,11 (3H, *s*, H-8b), 2,12 (2H, *m*, H-12' superposto com metila), 2,54 (2H, *m*, H-4'), 2,68 (2H, *m*, H-4), 3,72 (3H, *s*, OMe), 5,12 (2H, *m*, H-7' e H-11'), 5,90 (1H, *td*, *J*=7,3 Hz e 1,4 Hz, H-3'), 7,08 (1H, *s*, H-7), 9,61 (1H, *s*, 6a), 11,62 (1H, *s*, OH).
- **RMN ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃/ TMS):** δ 15,3 (C-8b), 15,7 (C-6'a), 15,7 (C-4), 15,8 (C-10'a), 20,6 (C-2'a), 22,0 (C-12'), 23,9 (C-2a), 26,5 (C-8'), 27,9 (C-4'), 29,8 (C-3), 39,0 (C-5'), 39,5* (C-9'), 39,6* (C-13'), 51,1 (OCH₃), 77,7 (C-2), 108,2 (C-4a), 113,1 (C-6), 118,7 (C-8), 123,7 (C-11'), 124,7 (C-7'), 126,6 (C-2'), 131,9 (C-7), 134,1 (C-6'), 135,4 (C-10'), 143,2 (C-3'), 159,7 (C-8a), 160,1 (C-5), 168,4 (C-1'), 194,2 (C-6a).

CAPÍTULO III – RESINAS

III.1 INTRODUÇÃO

Como mencionado anteriormente, as resinas florais são conhecidas em duas famílias de Angiospermae: Euphorbiaceae (*Dalechampia*) e Guttiferae (*Clusia*, *Clusiella*, *Tovomitopsis*).

Investigações sobre a composição química das resinas florais de espécies de *Dalechampia* mostraram que esta é composta de triterpenóides²³, enquanto que as de *Clusia* são compostas basicamente de benzofenonas poliisopreniladas⁵⁸. Estes tipos de compostos e outras estruturas benzofenônicas do tipo 2,4,6-triidróxi-benzofenonas e alquil-aril-cetonas poliisopreniladas foram também isoladas nos gêneros *Garcinia* e *Rheedia* (subfamília Clusoideae), não somente na resina, mas em diversos órgãos da planta^{59,60,61}, inclusive no látex.

De acordo com relatos da literatura a seguir, as benzofenonas poliisopreniladas são as responsáveis pelas propriedades medicinais das resinas de espécies da família Guttiferae.

Delle Monache e col.⁶² investigaram o extrato acetônico da raiz de *Clusia paralicola*. A separação dos constituintes do extrato levou ao isolamento da paralicolina A, um fenantreno prenilado, a qual mostrou atividade *in vitro* frente a células de carcinoma humano de nasofaringe KB e

⁵⁸ a) Oliveira, C.M.; Porto, A.M.; Bittrich, V.; Marsaioli, A.J. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6427-6430;

b) Oliveira, C.M.; Porto, A.M.; Bittrich, V.; Marsaioli, A.J. *Phytochemistry* **1999**, 50, 1073-1079.

⁵⁹ a) Cuesta-Rubio, O.; Velez-Castro, H.; Frontana-Urbe, B.A.; Cárdenas, J. *Phytochemistry* **2001**, 57, 279-283; b) Henry, G.E.; Jacobs, H.; McLean, S.; Reynolds, W.; Yang, J.P. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 4575-4578.

⁶⁰ Cuesta-Rubio, O.; Velez-Castro, H.; Cuellar, A.; Rojas, N.; Rastrelli, L.; Aquino, R. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 1013-1015.

⁶¹ Alves, T.M.A.; Alves, R.O.; Romanha, A.J.; Santos, M.H.; Nagem, J.T.; Zani, C.L. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 369-371.

⁶² Delle Monache, F.; Delle Monache, G.; Cavalcanti, J.F.; Pinheiro, R.M. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 563-566.

células leucêmicas P388. Num trabalho posterior realizado por Wall e col.⁶³, com o extrato em clorofórmio da raiz de *C. paralicola*, três novos derivados bifênilos clusiaparalicolina A, B e C foram isolados. Estes três compostos também apresentaram atividade inibitória moderada contra células KB.

O extrato orgânico de 4 membros da família Guttiferae, *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* e *Clusia rósea*, foram investigados por Cragg e col.⁶⁴. Os ensaios de atividade anti-HIV mostraram que as substâncias guttiferona A-E e o xantochymol, são os princípios ativos do extrato analisado.

A atividade antimicrobiana das resinas florais de *C. grandiflora*, *C. insignis*, *C. lanceolata*, *C. nemorosa* hermafrodita, *C. renggerioides*, *C. spiritu-sanctensis* e *C. weddelliana* foi comprovada contra várias bactérias gram positivas e gram negativas²⁴.

Recentemente, o estudo do própolis produzido por abelhas *Apis mellifera* em Cuba, forneceu a benzofenona poliisoprenilada nemorosona como seu constituinte majoritário. Este composto apresentou atividade citotóxica contra carcinoma epitelial (HeLa), carcinoma epidermóide (Hep-2), câncer de próstata (PC-3) e câncer do sistema nervoso central (U251), além de exibir potencial antioxidante²⁷.

Itoigawa e col.²⁸ estudaram o extrato etanólico de *Garcinia assigu* e isolaram duas novas benzofenonas, isogarcinol 13-*O*-metil éter e garcinol 13-*O*-metil éter, além dos compostos conhecidos isogarcinol, garcinol, clusianona e macurina. Todos os compostos, com exceção da macurina, apresentaram

⁶³ Wall, M.E.; Seo, E.K.; Huang, L.; Wani, M.C.; Navarro, H.; Mukherjee, R.; Farnsworth, N.R.; Kinghorn, A.D. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 1484-1487.

⁶⁴ Cragg, G.M.; Gustafson, K.R.; Blunt, J.W.; Munro, M.H.G.; Fuller, R.W.; McKee, T.C.; Cardellinall, J.H.; McMahon, J.B.; Boyd, M.R. *Tetrahedron* **1992**, 46, 10093-10102.

potencial anti-câncer igual ou superior quando comparados com o ácido glicirrético, um conhecido agente antitumoral.

Frente a estas observações, esta etapa do trabalho teve como principal objetivo isolar, identificar e avaliar a atividade biológica dos constituintes das resinas de espécies do gênero *Clusia*.

III.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.2.1 ANÁLISE QUÍMICA DA RESINA DO HÍBRIDO DE *C. weddelliana* x *paralicola*

Foi investigada nesta etapa do trabalho a resina floral do híbrido interespecífico *C. weddelliana* x *paralicola* (**Figura 20**), que foi coletado e identificado pelo Dr. Volker Bittrich e que encontra-se em cultivo na área do Departamento de Biologia da Unicamp. Nosso principal objetivo foi verificar alterações nas substâncias químicas produzidas no metabolismo da espécie híbrida em relação aos seus genitores.



Figura 20. Híbrido de *C. weddelliana* x *paralicola*

A coleta da resina foi realizada com uma espátula e, em seguida, dissolvida em acetato de etila. A derivatização da resina com diazometano foi necessária por torná-la mais estável, e facilitar o isolamento e caracterização dos compostos por técnicas espectroscópicas de RMN de 1D e 2D (COSY, HSQC, g-HMBC), IV e EM.

Este estudo resultou no isolamento de 3 compostos: metil clusianona (4), dimetil weddellianona B 5 e dimetil weddellianona A 6, os quais estão ilustrados abaixo (Figura 21) e que já haviam sido isolados e relatados na literatura^{58, 24}.

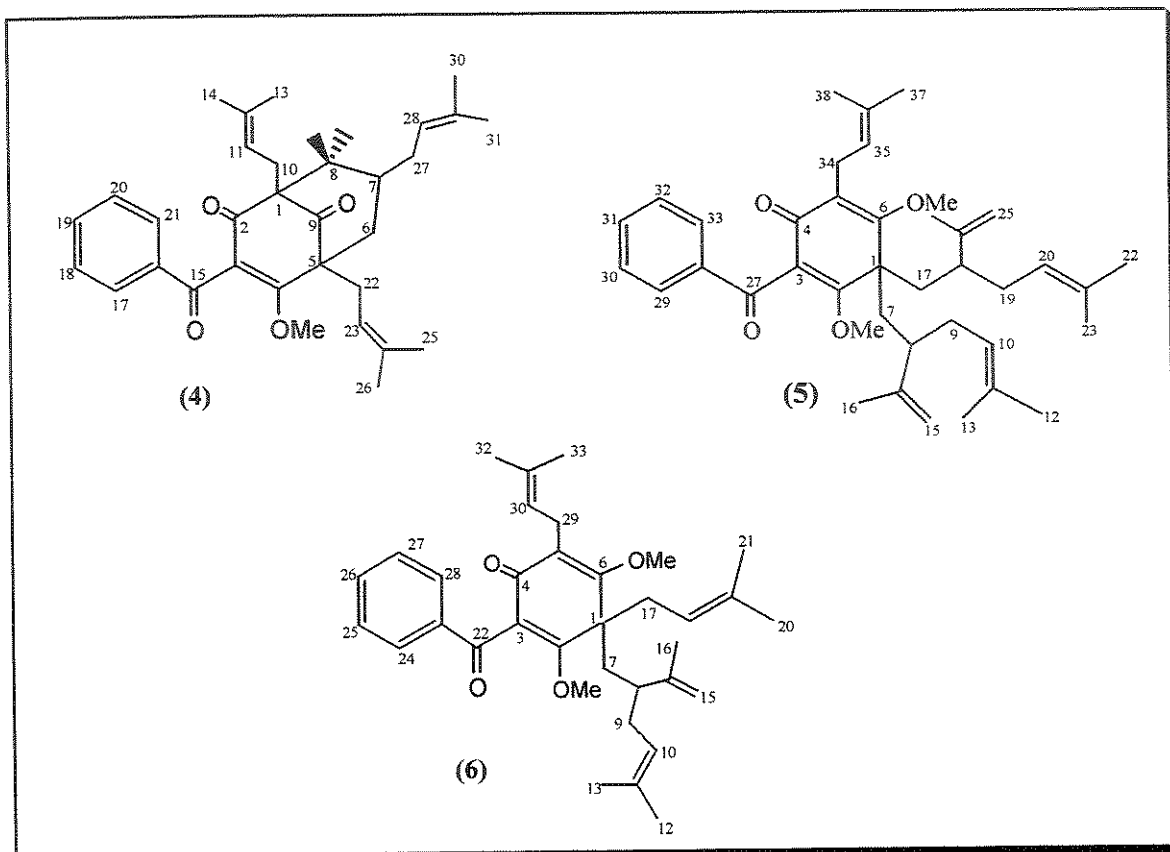


Figura 21. Compostos isolados do híbrido de *C. weddelliana* x *paralicola*.

A quantificação das resinas florais metiladas dos respectivos parentais *C. weddelliana* e *C. paralicola* foi realizada por Porto e col²⁴, através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Esta análise revelou o composto 4 como o componente majoritário das duas resinas (Tabela 4).

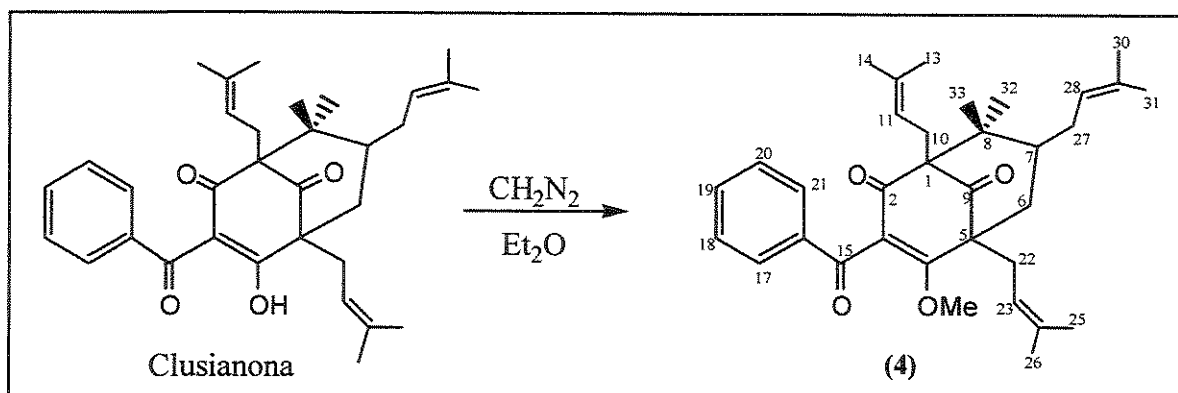
Tabela 4. Quantificação por CLAE das resinas de *C. weddelliana* e *C. paralicola*

Resina Floral	Composto (Quantificação por CLAE %)
<i>C. paralicola</i>	4 (74,6); 5 (4,9), 6 (0,5)
<i>C. weddelliana</i>	4 (56,5); 5 (7,0), 6 (8,5)

Este mesmo resultado foi observado durante o isolamento dos constituintes da resina da espécie híbrida, onde o composto **4** mostrou-se responsável por 32% da massa total desta resina e, os compostos **5** e **6** por 1,5% e 1,75%, respectivamente.

O cruzamento entre as espécies diferentes *C. weddelliana* e *C. paralicola* não gerou alterações significativas nas substâncias químicas produzidas pela espécie híbrida. Todos compostos isolados também estão presentes nas espécies genitoras, variando apenas suas abundâncias.

III.2.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO (**4**)



O composto **4** foi obtido na forma de um sólido branco, com p.f. 107-108°C e $[\alpha]_D^{20} +219$ (CHCl_3 , c. 1,2).

O espectro na região do IV (**E-27**) apresentou uma banda de absorção em 1727 cm^{-1} relacionado ao estiramento de uma carbonila não conjugada e em 1644 e 1673 cm^{-1} referentes ao estiramento de carbonilas conjugadas.

A análise do espectro de RMN de ^1H (**E-28**) revelou a presença de 5 hidrogênios aromáticos em δ 7,83 (2H), δ 7,54 (1H) e δ 7,43 (2H), indicando a presença de um anel monossubstituído.

Na região de δ 5,09 (2H) e δ 4,81 (1H) observou-se dois sinais atribuídos a três hidrogênios olefínicos e em δ 1,53 (3H), δ 1,59 (6H), δ 1,65 (3H), δ 1,69 (3H) e δ 1,73 (3H) cinco sinais de metilas vinílicas. Verificou-se ainda a presença de dois grupos metílicos em δ 0,74 (3H) e δ 1,05 (3H) e um sinal em δ 3,62 atribuído a uma metoxila.

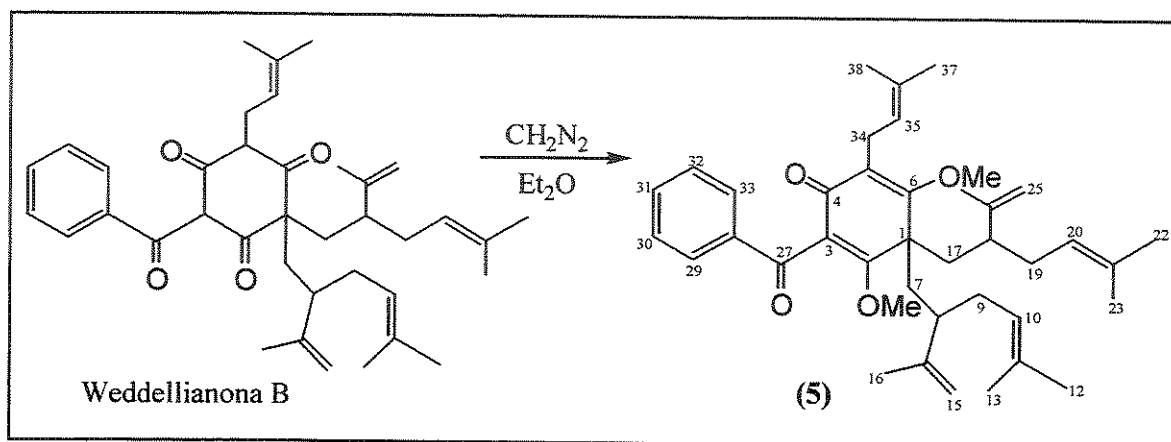
O espectro de RMN de ^{13}C (**E-29**) revelou 34 sinais, os quais pela análise de DEPT 135° e 90° (**E-30**) foram classificados quanto ao padrão de hidrogenação como sendo 9 carbonos metínicos, 4 metilênicos, 9 metílicos e 12 não hidrogenados ($\text{C}_{34}\text{H}_{44}$). A análise de RMN de ^{13}C também confirmou a presença de duas carbonilas conjugadas em δ 195,5 e δ 195,6, uma não conjugada em δ 207,7 e um carbono metoxílico em δ 60,7, além de três unidades isoprenílicas em δ : [24,5 (CH_2), 120,0 (CH), 134,2 (C_o), 26,1 (CH_3), 18,1 (CH_3)]; [30,7 (CH_2), 122,5 (CH), 133,1 (C_o), 25,8 (CH_3), 18,0 (CH_3)]; [27,9 (CH_2), 120,0 (CH), 133,6 (C_o), 25,9 (CH_3), 17,9 (CH_3)].

Comparando os resultados espectroscópicos obtidos com dados da literatura, este composto foi caracterizado como sendo o derivado metilado do produto natural clusianona, a qual foi isolada e caracterizada pela primeira vez da raiz de *C. congestiflora*⁶⁵. Mais recentemente, foi encontrada nos frutos de

⁶⁵ McCandlish, E.L.; Hanson, J.C.; Stout, G.H. *Acta Cryst.* **1976**, B32, 1793-1800.

*C. sandinensis*⁶⁶ e nas resinas florais de *C. spiritu-sanctensis*, *C. weddelliana* (macho), *C. lanceolata* (macho), *C. burchellii* (macho), *C. panapanari* (fêmea), *C. paralicola* (macho), *C. pernambucensis* (fêmea) e *C. fluminensis* (macho)²⁴.

II.2.3 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO (5)



O composto **5** foi obtido na forma de um óleo amarelo. O espectro na região do IV (**E-31**) apresentou bandas intensas características de carbonilas conjugadas em 1673 cm^{-1} e 1648 cm^{-1} .

A análise por espectrometria de massas de baixa resolução (**E-32**) forneceu o pico íon molecular m/z 598 que foi coerente com o valor calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{O}_4$.

O espectro de RMN de ^1H (**E-33**) revelou a presença de 5 hidrogênios aromáticos em δ 7,41 (2H), δ 7,50 (1H) e δ 7,89 (2H), característicos de um anel monossubstituído.

⁶⁶ Delle Monache, F.; Delle Monache, G.; Gacs-Baitz, E. *Phytochemistry* **1991**, 30, 2003-2005.

Na região de δ 4,72 e δ 4,65 verificou-se dois singletos que foram atribuídos a 4 hidrogênios referentes à duas duplas terminais e em δ 5,00 (2H) e δ 5,10 (1H) observou-se dois sinais atribuídos a 3 hidrogênios olefinicos. Observou-se ainda a presença de 8 metilas vinílicas em δ 1,56 (6H), δ 1,62 (6H), δ 1,64 (3H) e δ 1,69 (9H), além de dois grupos metoxilas em δ 3,50 e δ 4,03.

A análise de RMN de ^{13}C (**E-34**) confirmou a presença de duas carbonilas conjugadas em δ 196,0 e δ 187,7, dois carbonos metoxílicos em δ 58,9 e δ 61,5, e um sinal em δ 111,5 referente a dois carbonos metilênicos das duplas terminais.

O espectro de RMN de ^{13}C também apresentou vários carbonos com os mesmos deslocamentos químicos em δ : 43,9 (2CH₂), 42,7 (2CH), 147,0 (2C_o), 111,5 (2CH₂) e 18,1 (2CH₃), indicando que este composto apresenta dois substituintes idênticos.

No experimento de RMN de ^1H de diferença de NOE (NOESY 1D) (**E-35**, **E-36**, **E-37**) buscamos estabelecer a posição correta dos 2 grupos metoxila na estrutura do composto. Portanto, iniciamos com a irradiação da metoxila em δ_{H} 4,03, a qual causou um incremento de 1,29% no sinal em δ_{H} 3,15 (H-34), um incremento de 0,33% no hidrogênio olefínico em δ 5,10 (H-35) e um incremento de 1,32% no sinal em δ_{H} 1,93-2,04 (H-17, H-18, H-19). Os hidrogênios em δ_{H} 3,15 (H-34) também foram irradiados e observou-se um incremento de 3,33% na metoxila em δ_{H} 4,03, um incremento de 2,15% na metila vinílica em δ_{H} 1,64 (H-38) e um incremento de 1,40% no hidrogênio vinílico em δ_{H} 5,10 (H-35). Estes resultados evidenciam a vizinhança da metoxila em δ 4,03 com uma unidade isoprenílica.

A irradiação da outra metoxila em δ_H 3,50 causou um incremento de 0,69% no hidrogênio aromático em δ_H 7,89 (H-29), um incremento de 0,43% nos hidrogênios da dupla terminal em δ 4,65 (H-15) e um incremento de 0,79% na metila vinílica em δ_H 1,62 (H-16). Analisando todos os resultados obtidos neste experimento, foi possível estabelecer as posições desses dois grupos metoxila em δ_H 4,03 e δ_H 3,50 sobre os carbonos C-6 e C-2 respectivamente, conforme a (Figura 22).

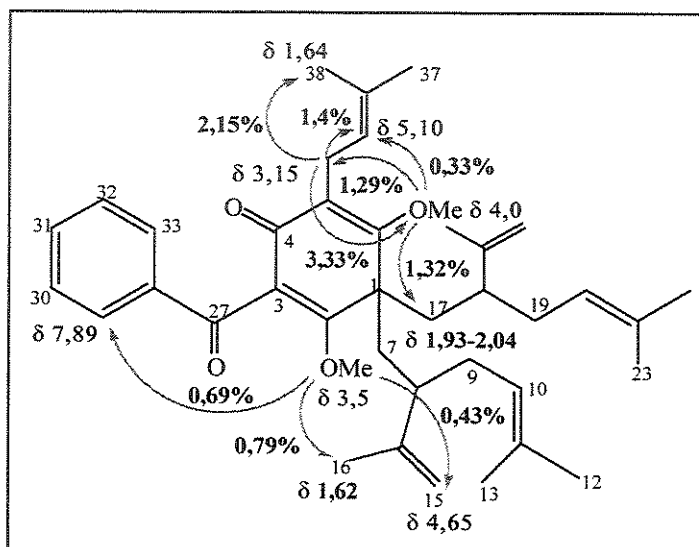
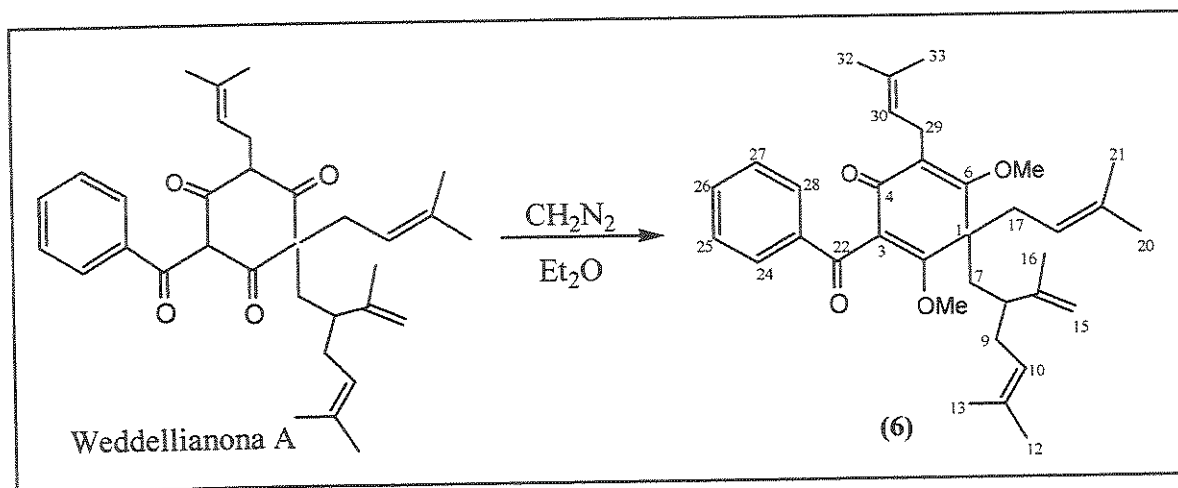


Figura 22. Incrementos observados no experimento de NOE.

Comparando os dados espectroscópicos obtidos com os dados reportados na literatura para weddelianona B²⁴ e considerando que a resina foi previamente metilada, este composto foi caracterizado como sendo o derivado metilado do produto natural weddelianona B.

III.2.4 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO COMPOSTO (6)



Este composto foi isolado na forma de um óleo amarelo com $[\alpha]_D^{20} -46$ (CHCl_3 , c. 0,49).

O espectro na região do IV (**E-38**) apresentou bandas intensas características de carbonilas conjugadas em 1675 cm^{-1} e 1652 cm^{-1} .

A análise do espectro de RMN de ^1H (**E-39**) indicou a presença de 5 hidrogênios aromáticos em δ 7,87 (2H), δ 7,47 (1H) e δ 7,40 (2H), sugerindo a presença de um anel aromático monossustituído.

Na região de δ 4,78 e δ 4,65 verificou-se dois singletos que foram atribuídos aos hidrogênios da dupla terminal e em δ 5,00 (2H) e δ 5,09 (1H) observou-se dois sinais atribuídos a 3 hidrogênios olefinicos. Verificou-se ainda a presença de 7 metilas vinílicas em δ 1,58 (3H), δ 1,59 (3H), δ 1,62 (3H), δ 1,65 (6H), δ 1,68 (3H) e δ 1,76 (3H), além de dois grupos metoxilas em δ 3,50 e δ 3,97.

O espectro de RMN de ^{13}C (**E-40**) revelou 35 sinais, os quais pela análise de DEPT 135° e 90° (**E-41**) foram classificados quanto ao padrão de hidrogenação como sendo 9 carbonos metínicos, 5 metilênicos, 9 metílicos e

12 não hidrogenados ($C_{35}H_{46}$). A análise de RMN de ^{13}C também confirmou a presença de duas carbonilas conjugadas em δ 196,0 e δ 187,7, dois carbonos metoxílicos em δ 58,9 e δ 61,7, e um sinal em δ 112,6 de carbono metilênico de dupla terminal.

Analizando os resultados de RMN de 1H e RMN de ^{13}C e comparando com dados da literatura, concluímos que este composto é o derivado metilado do produto natural weddellianona A, que também se encontra presente nas resinas de *C. weddelliana*, *C. lanceolata*, *C. burchelli*, *C. fluminensis*, *C. hilariana*, *C. panapanari*, *C. paralicola* e *C. pernambucensis*²⁴.

III.3 ATIVIDADE ANTICÂNCER

Produtos naturais (vegetais, fungos ou animais) representam a fonte mais abundante e acessível de substâncias com estruturas não usuais que apresentam eficiência antitumoral. Vários quimioterápicos utilizados atualmente em diversas neoplasias são derivados de produtos naturais como a vimblastina (Velban[®]) e vincristina (Oncovi[®]), isoladas da *Vinca rosea*, o etoposídeo (Vepesid[®], VP 16-213), derivado do *Podophyllum peltatum* e o paclitaxel (Taxol[®]) isolado da árvore *Taxus brevifolia* (**Figura 23**).

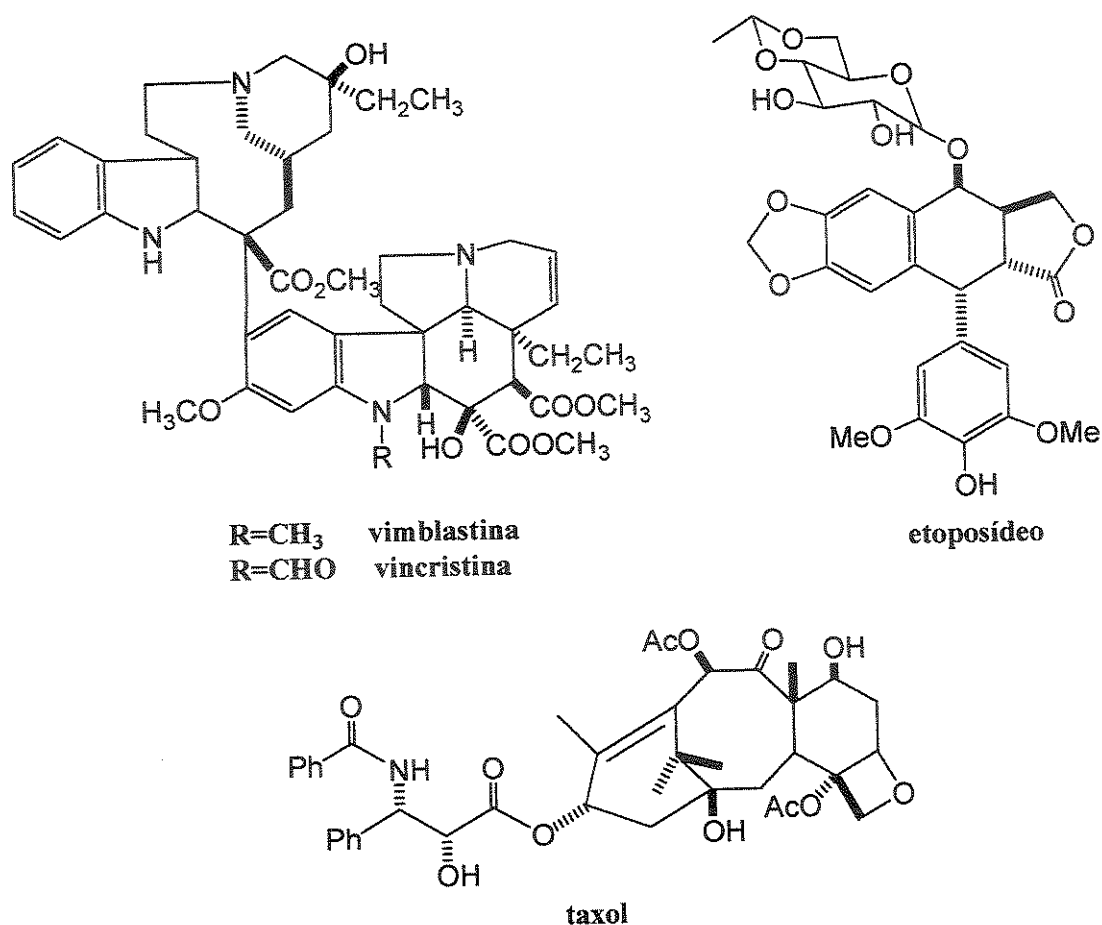


Figura 23. Quimioterápicos derivados de plantas.

Baseados no elevado potencial biológico demonstrado pelas plantas, principalmente as pertencentes à família Guttiferae, esta etapa do trabalho teve como principal objetivo avaliar a atividade antitumoral das resinas florais de 8 espécies de *Clusia*: *C. grandiflora*, *C. hilariana*, *C. renggerioides*, *C. nemorosa hermafrodita*, *C. fluminensis*, *C. lanceolata*, *C. paralicola* e *C. spiritu-sanctensis*. Um levantamento da literatura, descrito na **Tabela 5**, mostra os constituintes químicos presentes nas resinas destas espécies.

Tabela 5. Compostos químicos isolados de *Clusia*.

RESINA	COMPOSTOS
<i>C. grandiflora</i> ^{67,58}	Nemorosona, nemorosona II, grandona
<i>C. hilariana</i> ²⁴	Nemorosona, weddellianona A, lanceolatona, hilarianona
<i>C. renggerioides</i> ⁶⁷	Nemorosona II, 7- <i>epi</i> -nemorosona
<i>C. nemorosa herm.</i> ^{67,58}	Nemorosona, hidroxi-nemorosona, xantona
<i>C. fluminensis</i> ²⁴	Clusianona, weddellianona A, lanceolatona, spiritona
<i>C. lanceolata</i> ²⁴	Clusianona, weddellianona A, lanceolatona
<i>C. paralicola</i> ²⁴	Clusianona, weddellianona A, weddellianona B
<i>C. spiritu-sanctensis</i> ^{24,58}	Clusianona, spiritona

III.3.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE CÉLULAS CANCEROSAS

Foi avaliada a atividade antiproliferativa das resinas das 8 espécies de *Clusia* citadas anteriormente, em 8 linhagens de células de câncer humano: UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI ADR (mama resistente), 7860 (renal), NCI-460 (pulmão), PC 03 (próstata), OVCAR 03 (ovário) e HT-29 (cólon). Este estudo foi realizado em colaboração com o Prof. João Ernesto de Carvalho do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) de Campinas. Os resultados obtidos neste ensaio estão ilustrados na **Tabela 6**.

⁶⁷ Oliveira, C. M. A.; Porto, A. L. M.; Bittrich, V.; Marsaioli, A. J. *Phytochemistry*, **1999**, *50*, 1073-1079.

Tabela 6. IC₅₀ das resinas florais de *Clusia* em células de câncer humano.

Resinas	IC ₅₀ (µg/mL)*							
	UACC62	MCF - 7	NCI ADR	786-0	NCI - 460	PC 03	OVCAR 03	HT 29
<i>C. grandiflora</i>	6,32	66,37	4,60	32,32	2,07	29,92	23,03	25,14
<i>C. hilariana</i>	0,0021	0,82	0,55	2,89	3,66	1,87	1,51	0,41
<i>C. renggerioides</i>	2,45	0,80	1,17	NC	1,55	1,96	1,9	0,93
<i>C. nemorosa</i> h.	2,90	1,30	1,44	NC	1,64	2,45	4,42	1,24
<i>C. fluminensis</i>	1,80	0,26	0,53	NC	NC	1,27	1,77	1,18
<i>C. lanceolata</i>	2,69	2,07	1,68	4,62	0,72	3,4	3,10	0,001
<i>C. paralicola</i>	1,95	1,52	0,62	149,1	0,54	1,82	8,05	55,6
<i>C. spiritus sanctensis</i>	3,29	NC	1,31	NC	0,90	1,78	1,37	1,32
Doxorrubicina	1,74	2,92	2,32	0,57	1,95	9,33	61,27	52,73

* IC₅₀ – concentração capaz de inibir 50% do crescimento das células tumorais.

Os resultados de atividade antiproliferativa obtidos para resina de *C. grandiflora* não foram tão bons como os apresentados para as outras resinas. Sua ação citotóxica foi evidenciada somente para células de ovário e cólon.

Já a resina de *C. hilariana* apresentou resultados muito interessantes. Entre todas resinas testadas, esta apresentou os melhores efeitos inibitórios para células de melanoma (IC₅₀ 0,0021 µg/mL) e de rins (IC₅₀ 2,89 µg/mL).

A resina de *C. renggerioides* apresentou boa atividade citotóxica contra quase todas linhagens celulares, quando comparada a doxorrubicina, com exceção para as células de melanoma e rins. Seus resultados mais

significativos foram para as linhagens celulares de ovário (IC₅₀ 1,9 µg/mL) e cólon (IC₅₀ 0,93 µg/mL).

A resina de *C. nemorosa* hermafrodita, assim como as outras, demonstrou bons resultados neste ensaio, com exceção para as células de melanoma, onde não apresentou atividade inibitória satisfatória.

Os resultados apresentados para resina de *C. fluminensis* foram mais interessantes. Entre todas resinas testadas, esta apresentou os melhores efeitos inibitórios para células de mama (IC₅₀ 0,26 µg/mL), mama resistente (IC₅₀ 0,53 µg/mL) e próstata (IC₅₀ 1,27 µg/mL).

Já a resina de *C. lanceolata* mostrou, entre todas as resinas, a melhor atividade citotóxica para células de cólon (IC₅₀ 0,001 µg/mL) e *C. paralicola*, para células pulmonar (IC₅₀ 0,54 µg/mL).

A resina de *C. spiritu-sanctensis* mostrou boa atividade antiproliferativa para 5 das 8 linhagens celulares avaliadas, sendo a mais ativa em células do ovário (IC₅₀ 1,37 µg/mL).

Uma análise geral dos resultados revelou que os metabólitos secundários (benzofenonas poliisopreniladas) presentes nas espécies de *Clusia* são eficientes agentes antitumorais e promissores protótipos para medicamentos contra diversos tipos de câncer. No entanto, é difícil atribuir o efeito citotóxico a um determinado composto ou a uma mistura deles. Observando os compostos, até o momento isolados destas 8 espécies de *Clusia*, tentou-se relacionar as estruturas químicas com as atividades apresentadas, mas não foi possível correlacionar os dados de uma maneira lógica. Por exemplo, *C. lanceolata* a qual apresenta em sua composição as benzofenonas clusianona, weddellianona A e lanceolatona (**Tabela 5**) apresentou um ótimo efeito inibitório para células de cólon (IC₅₀ 0,001

µg/mL). Já a resina de *C.paralicola* que apresenta uma composição semelhante, diferindo apenas por um composto, apresentou o pior resultado entre todas espécies (IC₅₀ 55,6 µg/mL). Com base nestes dados poderíamos sugerir que a atividade está relacionada a lanceolatona. Porém, *C. fluminensis*, que também apresenta esta benzofenona na sua composição, não demonstrou um resultado tão expressivo como observado para *C. lanceolata*. Como demonstrado neste exemplo podemos fazer outras relações semelhantes, mas não conclusivas à respeito da estrutura química responsável pela atividade da resina. Qualquer tentativa de relacionar estes dados seria mera especulação. O ideal seria avaliar o efeito inibitório de células cancerosas com cada composto isoladamente para sabermos, realmente, qual composto é ativo. Infelizmente, não foi possível isolar os constituintes de todas estas resinas durante este trabalho. Somente a resina de *C. spiritu-sanctensis* foi profundamente investigada, como será demonstrado a seguir, mas abre-se a perspectiva para futuros estudos nesta área.

Porém estes dados são extremamente valiosos no que diz respeito à indicação de qual caminho se deve seguir para encontrar novos protótipos para cada tipo de câncer.

III.3.2 ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS CONSTITUINTES DA RESINA DE *Clusia spiritu-sanctensis*

Devido aos bons resultados apresentados pelas resinas brutas no ensaio citotóxico, procedeu-se ao isolamento, identificação e avaliação do potencial biológico dos constituintes puros da resina de *C. spiritu-sanctensis* a qual apresentou maior facilidade de separação de seus componentes por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), conforme **Figura 24**. Este trabalho foi realizado na Universidade de Essen - Alemanha, em colaboração com o Dr. Half Hilger e Dr. David Diaz-Carballo

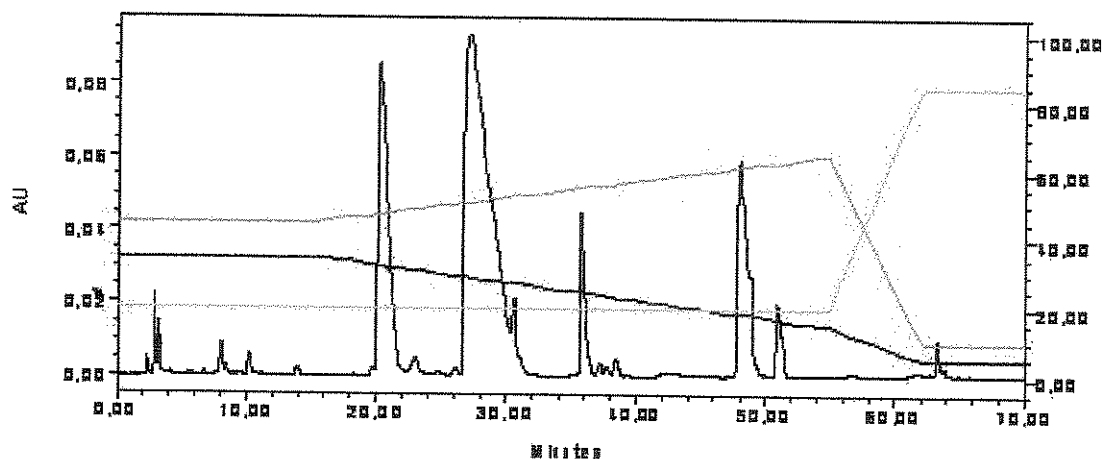


Figura 24. Cromatograma da resina bruta de *C. spiritu-sanctensis*

Nesta técnica de separação empregamos uma coluna de fase reversa sob condições isotérmicas ($40 \pm 1^\circ\text{C}$) e utilizamos como fase móvel formiato de amônio, metanol e acetonitrila em modo gradiente. Foi possível separar 4 compostos puros: A ($T_R = 22,8$ min), B ($T_R = 25,22$ min), C ($T_R = 36,39$ min) e D ($T_R = 38,68$ min). Devido a pouca quantidade obtida, somente o composto A foi analisado por técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C , e os resultados obtidos

indicam que este composto corresponde a Clusianona. A seguir, estes compostos tiveram seu potencial antineoplásico avaliado individualmente em células de carcinoma de cólon (HCT-8), utilizando mesmo procedimento descrito no item III.3.1. Os resultados obtidos estão expressos na **Tabela 7** abaixo.

Tabela 7. Concentração inibitória dos compostos puros.

COMPOSTO	IC ₅₀ (µg/mL)
A	23,5
B	6,25
C	50,0
D	5,65

Analisando os resultados pode-se constatar que os compostos B e D apresentam elevada ação citotóxica para células de carcinoma de cólon quando comparados a Doxorrubicina (IC₅₀ 52,73 µg/mL). Então, achamos relevante avaliarmos em que etapa do Ciclo Celular estes compostos (B e D) estariam inibindo a replicação do DNA defeituoso (câncer).

O Ciclo Celular (**Figura 25**) é composto de uma seqüência ordenada de fases (G1, S, G2 e M) que ocorrem desde a formação de uma célula até sua própria divisão em duas células filhas.

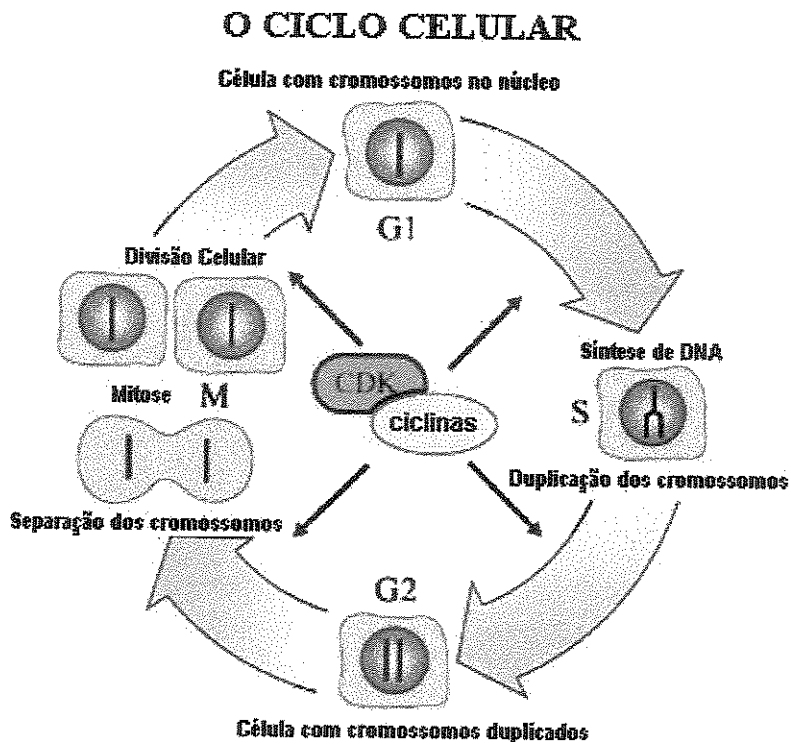


Figura 25. Fases do Ciclo celular.

A Fase G1 compreende o tempo decorrido entre o final da Mitose e o início da Síntese. Neste período a célula aumenta de tamanho e prepara as proteínas de que necessita para a síntese de DNA. Na Fase S ocorre a síntese do DNA e a duplicação desse material hereditário nos cromossomos. A Fase seguinte (G2), a qual compreende o período entre o final da síntese e o início da mitose, representa um tempo adicional para o crescimento celular, de maneira que a célula possa assegurar uma completa replicação do DNA antes da Mitose. Finalmente, na fase Mitótica (M), o DNA duplicado é eqüitativamente dividido entre as duas células filhas⁶⁸.

Distúrbios nas fases do Ciclo Celular podem gerar doenças graves, como algumas alterações cromossômicas e o câncer. Portanto, este é regulado

⁶⁸ Lewin, B. Genes VII 2000, Oxford University Press, 835-874.

para parar em pontos específicos onde são checados as condições do meio extracelular e da própria célula. São conhecidos dois pontos de controle:

- ♦ em G1- antes da célula entrar na fase S
- ♦ em G2- antes da célula entrar em Mitose.

Se for constatada alguma anormalidade em qualquer um destes pontos, o ciclo celular é temporariamente interrompido até que o defeito seja reparado. Este controle é realizado por proteínas altamente específicas, denominadas ciclinas.

A avaliação do Ciclo Celular foi realizada no aparelho de Citometria de Fluxo Coulter Epics XL, o qual se baseia em captar a quantidade de fluorescência emitida por uma população celular em suspensão, com o uso de raio laser e de iodeto de propídio como agente fluorescente. O equipamento (Figura 26) fornece gráficos específicos (histograma de DNA), a partir da correlação entre o número de células em cada Fase do Ciclo Celular e seu conteúdo de DNA.

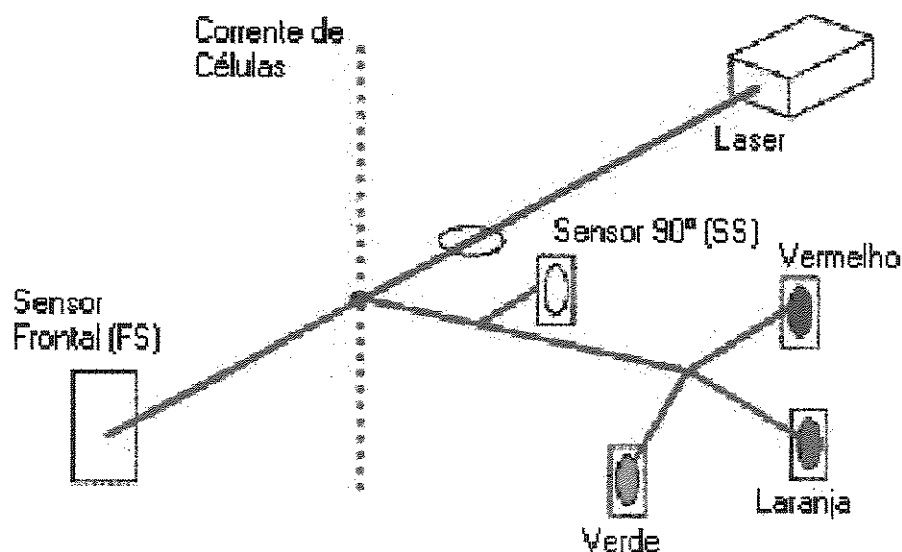
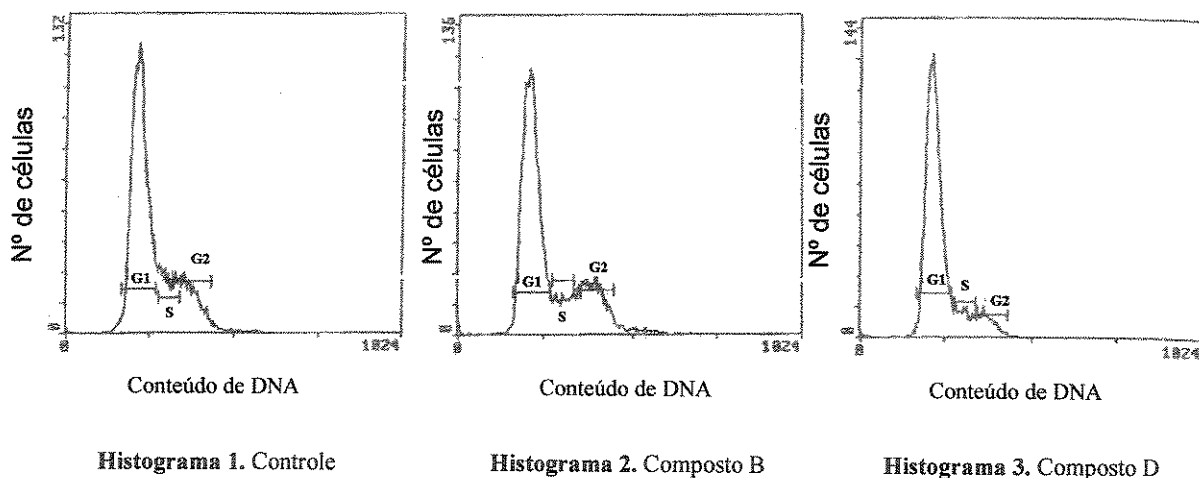


Figura 26. Representação esquemática de um Citômetro de Fluxo.

Para esta análise aplicamos 2 vezes a IC_{50} dos compostos B e D na suspensão celular, e os histogramas obtidos são mostrados abaixo:



Analisando os resultados pode-se observar que os dois compostos inibem a proliferação celular em algum estágio do ciclo celular. Comparando as células tratadas com o composto B (**Histograma 2**) com as células controle (**Histograma 1**), notamos uma diminuição no número de células na fase S do ciclo celular onde ocorre a duplicação do DNA. Isto indica que este composto interfere na proliferação celular em S. Já o composto D (**Histograma 3**) quando comparado as células controle, apresenta uma diminuição acentuada no número de células tanto na fase S quanto na fase G2. O que indica que este composto bloqueia a continuidade do ciclo celular na primeira fase (G1). A inibição nesta etapa (G1) é desejável, já que o processo de síntese e duplicação do DNA não é iniciado, evitando assim, a multiplicação de células cancerosas.

Esta análise mostrou que estes compostos, em baixas concentrações, são capazes de interferir na proliferação celular, bem como a fase do ciclo celular em que isto ocorre.

III.3.3 TESTE DE INIBIÇÃO DE TOPOISOMERASE

As drogas antineoplásicas podem apresentar vários mecanismos de ação a fim de impedir a proliferação de células cancerosas, entre eles a inibição da topoisomerase^{69,70,71}.

As topoisomerasas são enzimas que controlam e modificam os estados topológicos do DNA. Os mecanismos básicos de ação dessas enzimas sobre o DNA podem ser resumidos em: quebra de uma das fitas de DNA, passagem da outra fita através do corte seguida de re-ligação da fita cortada. Com isso, essas enzimas permitem a diminuição da tensão nas fitas de DNA e o maior acesso de outras enzimas essenciais para a replicação do DNA, transcrição, reparo, recombinação, etc⁷².

Atualmente, são conhecidas dois tipos de topoisomerasas: a I e a II. A característica comum a todas as topoisomerasas é a sua capacidade de quebrar e refazer ligações fosfodiéster presentes em toda extensão do DNA. As drogas que interagem com a topoisomerase I são representadas pelos análogos da Camptotecina, que interagem com o complexo formado pela enzima-DNA, prevenindo a re-ligação da fita, após o corte realizado pela topoisomerase. O tratamento com essas drogas geralmente paralisa o ciclo celular na fase G₂ ou induzem apoptose das células paralisadas na fase S do ciclo celular. A topoisomerase II é o alvo de muitas outras drogas, tais como as aminoacridinas, as antraciclinas (doxorubicina, idarrubicina) e as epipodofilotoxinas (etoposídeo e tenoposídeo). Essas drogas inibidoras de topoisomerase II interagem com o DNA, intercalando-se entre os pares de

⁶⁹ Drlica, K.; Franco, R.J. *Biochemistry* **1998**, 27, 2253-2259.

⁷⁰ Gewirtz, D.A. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, 57, 727-741.

⁷¹ Wang, H.; Mao, Y.; Zhou, N.; Hu, J.; Hsieh, T.S.; Liu, L.F. *The J. Biological Chem.* **2001**, 276, 15990-15995.

⁷² Bjornsti, M.A. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **1991**, 1, 99-103.

bases nucleotídeas, inibindo a re-ligação do DNA quebrado, gerando conseqüentes danos à síntese de DNA^{73,74}.

A busca por agentes inibidores mais eficientes motivaram-nos a investigar a possível ação dos compostos isolados de *C. spiritu-sanctensis* sobre a atividade da topoisomerase. Este estudo foi realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da USP/SP, em colaboração com o Prof. Gabriel Padilha e a pós doutoranda Renata Lígia de Araújo Furlan.

Para estabelecer a ação dos compostos frente à topoisomerase foram testadas diferentes concentrações de A, B, C e D, tais como: 10, 30, 50, 70, 100 ng/μL, que foram incubadas com a topoisomerase e o DNA de plasmídeo em tampão fosfato salino (PBS KS+). A reação foi incubada por 15 minutos a 30°C. Para interromper a reação enzimática, as amostras foram colocadas no gelo e imediatamente foi adicionado o tampão de amostra. O resultado foi determinado em gel de agarose 0,7% a 80V e as análises de quantificação foram feitas no programa GelAnalysis.

Os resultados dos ensaios foram determinados, através dos efeitos da topoisomerase no relaxamento do DNA superespiralado que, por sua vez, pode ser alterado pela ação das drogas. O composto A testado foi o que apresentou melhor resultado (**Figura 27**).

⁷³ Felix, C.A *Medical and Pediatric Oncology* **2001**, 36, 525-535.

⁷⁴ Willmore, E.; Errington, F.; Tilby, M.J.; Austin, C.A. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, 63, 1807-1815.

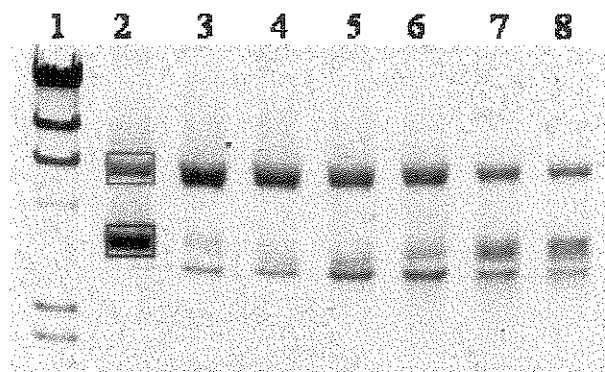


Figura 27. Ensaio de atividade da topoisomerase. 1. Lambda Hind III, 2. PBS kS 60ng, 3. PBS kS 60ng + topo, 4. PBS kS 60ng + topo + 10 ng/ uL A, 5. PBS kS 60ng + topo + 30 ng/ uL A, 6. PBS kS 60ng + topo + 50 ng/ uL A, 7. PBS kS 60ng + topo + 70 ng/ uL A, 8. PBS kS 60ng + topo + 100 ng/ uL A. DNA superespiralado (SC) ☐, DNA circular (Cir) ☐

A análise deste gel mostrou que quando o plasmídio está em presença da topoisomerase (canaleta 3), há uma redução acentuada da banda que refere-se ao DNA superespiralado e, conseqüentemente, um aumento da banda circular quando comparada com a canaleta 2. Nas reações enzimáticas que continham 70 e 100 ng/ μ L do composto A, foi verificado um efeito muito baixo da atividade da topoisomerase, como pode ser observado através das concentrações de DNA superespiralado (SE) e circular (Cir) discriminados na **Tabela 8**.

Tabela 8. Concentrações de DNA superespiralado e circular após aplicação do composto A.

Canaleta	SE	Cir
2	64,73%	35,27%
3	11,14%	88,86%
4	20,00%	80,00%
5	40,87%	59,13%
6	46,61%	53,39%
7	62,97%	37,03%
8	65,65%	34,35%

Estes resultados sugerem que o composto A é capaz de inibir a atividade da topoisomerase nas concentrações de 70 e 100 ng/ μ L, um resultado melhor do que o observado para a doxorrubicina, que é a droga mais utilizada no tratamento de diversos tipos de câncer e que também atua de forma a inibir a topoisomerase.

Os compostos B, C e D também apresentaram uma diminuição na ação da topoisomerase (**Figura 28**), porém, quando comparados com os resultados de A, um efeito menor na inibição desta enzima foi observado (**Tabela 9**).

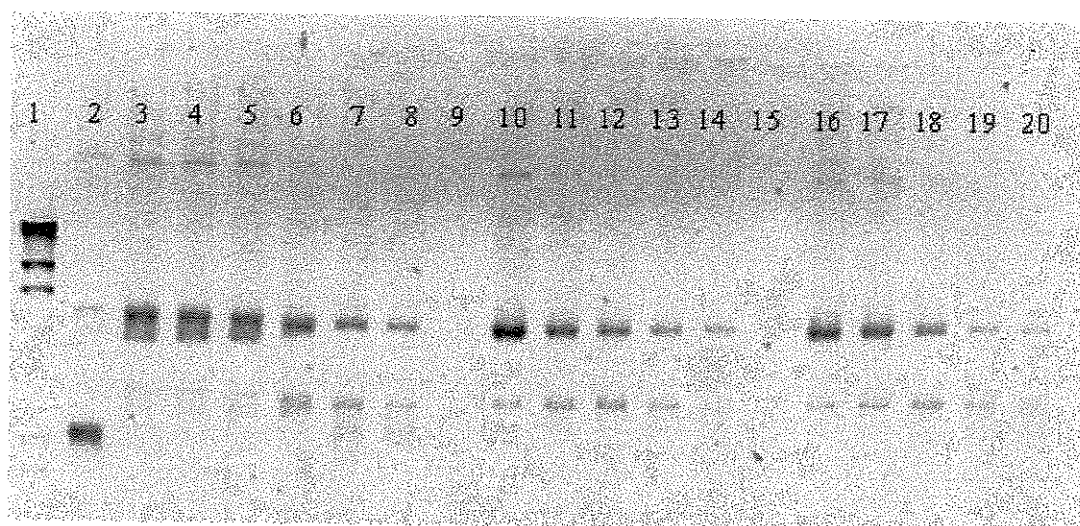


Figura 28. Ensaio de atividade da topoisomerase. 1. Lambda Hind III, 2. PBS kS 60ng, 3. PBS kS 60ng + topo, 4. PBS kS 60ng + topo + 10 ng/ uL B, 5. PBS kS 60ng + topo + 30 ng/ uL B, 6. PBS kS 60ng + topo + 50 ng/ uL B, 7. PBS kS 60ng + topo + 70 ng/ uL B, 8. PBS kS 60ng + topo + 100 ng/ uL B, 9. sem amostra, 10. PBS kS 60ng + topo + 11 ng/ uL C, 11. PBS kS 60ng + topo + 30 ng/ uL C, 12. PBS kS 60ng + topo + 50 ng/ uL C, 13. PBS kS 60ng + topo + 70 ng/ uL C, 14. PBS kS 60ng + topo + 100 ng/ uL C, 15. sem amostra, 16. PBS kS 60ng + topo + 11 ng/ uL D, 17. PBS kS 60ng + topo + 30 ng/ uL D, 18. PBS kS 60ng + topo + 50 ng/ uL D, 19. PBS kS 60ng + topo + 70 ng/ uL D, 20. PBS kS 60ng + topo + 100 ng/ uL D.

Tabela 9. Concentrações de DNA superespiralado e circular após aplicação dos compostos B, C e D.

Canaleta	DNA SE	DNA Cir
2	91%	9%
3	29%	71%
4	28%	72%
5	32%	68%
6	52%	48%
7	68%	32%
8	70%	30%
10	19%	81%
11	42%	58%
12	53%	47%
13	59%	41%
14	56%	44%
16	23%	77%
17	34%	66%
18	56%	44%
19	69%	31%
20	67%	33%

No entanto, este ensaio revelou que o mecanismo de ação destes compostos, principalmente A (clusianona), está na inibição da ação da enzima topoisomerase, interferindo no relaxamento do DNA superespiralado e, conseqüentemente, inviabilizando o crescimento celular. Pode-se sugerir também, que a atividade antineoplásica apresentada nos testes anteriores, deve-se à quebra do ciclo celular, uma vez que, estes compostos inibidores congelam o complexo DNA-topoisomerase levando a sua fragmentação por

apoptose. Além disso, evidenciou a importância das benzofenonas como potenciais agentes terapêuticos no tratamento das diversas neoplasias.

III.4 CONCLUSÃO

◆ O estudo da composição química da resina do híbrido interespecífico *C.weddelliana* x *C.paralicola* revelou a presença dos mesmos compostos já isolados e caracterizados nos seus genitores, porém em abundâncias diferentes. As benzofenonas metil clusianona, dimetil weddellianona A e dimetil weddellianona B foram os três compostos encontrados sendo a metil clusianona seu constituinte majoritário responsável por 32% da constituição total desta resina, seguida da dimetil weddellianona A (1,75%) e dimetil weddellianona B (1,50%).

◆ O ensaio de atividade antiproliferativa com as 8 resinas de espécies de *Clusia* *C. grandiflora*, *C. hilariana*, *C. renggerioides*, *C. nemorosa hermafrodita*, *C. fluminensis*, *C. lanceolata*, *C. paralicola* e *C. spiritu-sanctensis* mostrou que os constituintes destas resinas, basicamente benzofenonas poliisopreniladas, apresentam pronunciada atividade antitumoral para algumas linhagens celulares, quando comparados a Doxorubicina. Estes resultados também revelam uma nova e promissora classe de compostos no tratamento de diversos tipos de câncer.

◆ O estudo da resina de *C.spiritu-sanctensis* por cromatografia líquida de alta eficiência permitiu o isolamento de 4 compostos (A, B, C e D). Após a análise

dos dados espectrais pode constatar que o composto A é a clusianona. E os demais, infelizmente não puderam ter suas estruturas definidas devido a pouca quantidade obtida. O ensaio de atividade antiproliferativa com estes 4 compostos constatou que os compostos B (IC_{50} 6,25 $\mu\text{g/mL}$) e D (IC_{50} 5,65 $\mu\text{g/mL}$) possuem elevada atividade citotóxica para células de carcinoma de colon (Doxorrubicina (IC_{50} 52,73 $\mu\text{g/mL}$)). E, na avaliação do ciclo celular, podemos observar que o composto B inibe a proliferação celular na fase S, enquanto o composto D atua na primeira fase (G1) bloqueando a continuidade do ciclo celular.

◆ A investigação do mecanismo de ação destes compostos (A, B, C e D) revelou que estes atuam inibindo a ação da enzima topoisomerase no relaxamento das fitas de DNA e, conseqüentemente, afetam o crescimento celular.

III.5 PARTE EXPERIMENTAL

Os materiais e equipamentos utilizados no estudo das resinas estão descritos no item II.4.1, com as seguintes exceções:

- ✓ Análises por Cromatografia Líquida - foram feitas no HPLC Waters Alliance 2695 (Waters Corporation) com detector de absorção na região do UV visível, equipado com uma coluna (4x250 mm, 4µm) Nucleosil C-18 (Macherey-Nagel), sob condições isotérmicas (40 ±1°C) e utilizando como fase móvel formiato de amônio, metanol e acetonitrila (Merck) em modo gradiente.
- ✓ Análises por Citometria de Fluxo – foram feitas no equipamento Coulter Epics XL (Beckman Coulter) usando o software XL System II (procedimento no item III.5.5).

III.5.1 MATERIAL VEGETAL

As espécies de *Clusia* estudadas foram coletadas e identificadas pelo Dr. Volker Bittrich do Instituto de Biologia da Unicamp e as *voucher specimens* depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), conforme **Tabela 10**.

Tabela 10. Espécies estudadas durante a execução deste trabalho.

ESPÉCIES	Nº EXCICATA
<i>Clusia grandiflora</i> Splitg.	#95/153 fem.
<i>Clusia hilariana</i> Schltdl.	# 97/248 masc.
<i>Clusia renggerioides</i> Planch. & Triana	#97/1 masc.
<i>Clusia fluminensis</i> Planch & Triana	#97/249 masc.
<i>Clusia spiritu-sanctensis</i> G. Mariz	# 95/185 masc.
<i>Clusia lanceolata</i> Cambess.	# 96/27 fem.
<i>Clusia paralicola</i> G. Mariz	# 97/5a masc.
<i>Clusia nemorosa</i> G. Mey.	# 95/150 herm.

III.5.2 EXTRAÇÃO DAS RESINAS

As resinas foram cuidadosamente coletadas utilizando-se espátula e, a seguir, dissolvidas em solvente orgânico (acetato de etila). A solução foi seca sobre Na₂SO₄ anidro, o solvente removido em evaporador rotativo e o resíduo metilado com solução etérea de diazometano. A derivatização permitiu o uso da cromatografia em coluna e em camada espessa preparativa na purificação dos compostos sem que houvesse decomposição.

III.5.3 ANÁLISE QUÍMICA DO HÍBRIDO *C. weddelliana* x *paralicola*

A resina metilada (2,0 g) foi submetida à cromatografia em coluna usando um gradiente de hexano:AcOEt (0% a 20% de acetato de etila). Foram obtidas 7 frações e somente as frações 4, 5 e 6 foram estudadas.

A fração 4 (0,750 g) foi submetida à cromatografia em coluna. O composto **4** foi eluído com uma mistura de hexano:AcOEt 3% (0,647 g, 32%).

A fração 5 (0,210 g) foi inicialmente submetida à cromatografia em camada espessa preparativa contínua (15 horas), usando como eluente hexano:AcOEt 2%. Obteve-se 2 frações: 51 (0,090 g) e 52 (0,090 g).

A fração 52 foi analisada por cromatografia em camada espessa preparativa impregnada com AgNO₃ 10%, usando como eluente uma mistura de benzeno:AcOEt 2,5%. Após 5 corridas, o composto **5** foi isolado (0,030 g, 1,5%).

A fração 6 (0,226 g) foi primeiramente submetida à cromatografia em camada espessa preparativa contínua (6 horas), usando como eluente hexano:AcOEt 3%. Obteve-se 2 frações: 61 (0,050 g) e 62 (0,010g).

A fração 61 foi submetida à cromatografia em camada espessa preparativa contínua (5 horas) usando como eluente hexano:AcOEt 3%. Obteve-se o composto **6** (0,035 g) com 1,75% de rendimento.

III.5.4 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

As células utilizadas no ensaio citotóxico foram doadas pelo Instituto Nacional do Câncer, Washington/USA, e cultivadas em frascos de 25 cm² (Nunc Brand Products) contendo 5 mL de meio de cultura RPMI 1640 com 5% de soro fetal bovino (Gibco BRL Life Technologies). Adicionou-se 100 µL desta suspensão celular em cada poço das 8 placas de cultura celular (Nunc Brand Products). Estas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade. Após, as soluções das resinas em DMSO foram adicionadas em diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25,0 e 250 µg/mL)

e incubou-se, novamente, por 48 horas a 37°C. Então, o meio foi removido, 50 µL de solução colorante de sulforodamina B 0,4% em ácido acético 1% foi adicionado. As placas foram incubadas a 4°C durante 30 minutos e, após esse período, foram lavadas 4 vezes com uma solução de ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. O corante ligado as proteínas celulares foi solubilizado com uma solução de Trizma Base na concentração de 10 µM e pH 10,5 por 5 minutos em ultrassom. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 560 nm em um leitor de microplacas.

Foram calculadas as médias das absorbâncias descontadas de seus respectivos brancos e, através da fórmula abaixo, foi determinada a inibição de crescimento (IC) de cada amostra.

$$100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$$

Onde:

T- é a média da absorbância da célula tratada;

C- é o controle;

T₀- é o controle das células no dia da adição das drogas.

- ◆ Se T>C a droga estimulou o crescimento, não apresenta IC.
- ◆ Se T≥T₀ mas <C, a droga é citostática
- ◆ Se T<T₀ a droga é citocida

O resultado obtido foi subtraído de 100%, obtendo-se então, a porcentagem de inibição de crescimento. As amostras foram consideradas ativas quando apresentaram inibição de crescimento superior a 50%.

III.5.5 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR

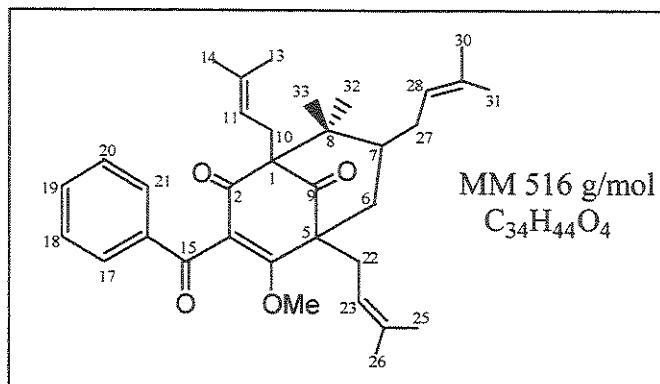
Neste ensaio foram utilizadas células HCT-8 que foram cultivadas em frascos de 25 cm² contendo 5 mL de meio de cultura RPMI 1640 com 5% de soro fetal bovino (Gibco BRL Life Technologies). Um frasco foi tratado com a solução etanólica do composto B na concentração de 12,5 µg/mL e outro com uma solução etanólica do composto D na concentração de 11,30 µg/mL por um período de 4h a 37°C. Após o tratamento, o meio de cultura foi removido e as células aderidas foram tratadas com 1,5 mL de trypsin (Nutricell Cell Nutrient) e ressuspensas em 5 mL de meio de cultura RPMI 1640 com 5% de soro fetal bovino. Em seguida, foram centrifugadas por 5 min a 1500 rpm, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em PBS (136,8 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄). As células foram fixadas com 3 mL de etanol 80% por uma noite a 4°C. No dia seguinte, a suspensão celular foi centrifugada e lavada com 5 mL de PBS para remover o excesso de etanol. Após, foram tratadas por 30 minutos com 0,5 mL de uma solução contendo 4 µg/mL de iodeto de propídio, 0,1 % de RNase (1mg/mL) e 1% de Triton X-100 (Sigma Chemical Co.), e analisadas no Citômetro de Fluxo Coulter Epics XL.

III.5.6 TESTE DE INIBIÇÃO DE TOPOISOMERASE

A extração da topoisomerase foi feita a partir de células promielocíticas HL-60 que foram cultivadas no meio RPMI 1640 suplementado com 2 mM L-glutamina, 10mM tampão HEPES, 10% de soro bovino fetal (FBS, Gibco BRL Life Technologies) e 1% penicilina/ estreptomicina (Gibco BRL Life Technologies) sob atmosfera de 5% CO₂.

Para estabelecer ação dos compostos frente a topoisomerase foram testadas diferentes concentrações de A, B, C e D, tais como: 10, 30, 50, 70, 100 mM, que foram incubadas com 1 unidade de topoisomerase em tampão contendo 0,5 mM DTT e 0,5 mM ATP mais 60ng de DNA de plasmídio em solução tampão fosfato salino PBS (KS+) (Stratagene). A reação foi incubada por 15 minutos a 30°C. Para interromper a reação enzimática as amostras foram colocadas no gelo e imediatamente foi adicionado o tampão de amostra (DNA- loading buffer). O resultado foi determinado em gel de agarose 0,7% a 80V com um tempo de corrida de aproximadamente 2 horas. As análises de quantificação foram feitas no programa GelAnalysis (desenvolvido pelo doutorando Felix Mas, Instituto de Física da USP).

III.5.7 DADOS ESPECTROSCÓPICOS DO COMPOSTO (4)

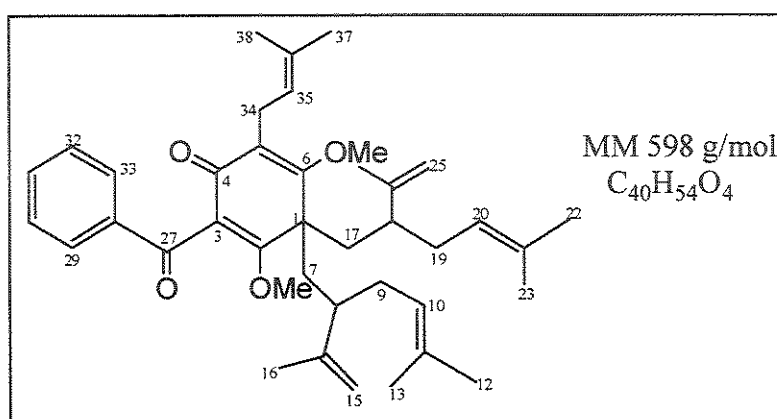


Metil clusianona

- **Aspecto Físico:** sólido branco
- **P.F.:** 107-108 °C
- **[α]_D²⁰** +219 (CHCl₃, *c.* 1,2)
- **IV** (KBr, ν_{max} cm⁻¹): 2967, 1727, 1673, 1644, 1581
- **RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃/ TMS):** δ 0,74 (3H, s, H-32 axial), 1,05 (3H, s, H-33 equatorial), 1,44 (1H, t, J=13,25 Hz, H-6 axial), 1,53 (3H, s, H-26), 1,59 (6H, s, H-13 e H-14), 1,65 (3H, s, H-31), 1,69 (3H, s, H-30), 1,73 (3H, s, H-25), 1,73 (1H, sobreposição, H-27), 1,90 (1H, m, H-7), 2,07 (1H, dd, J=13,7 Hz e 4,3 Hz, H-6 equatorial), 2,16 (1H, dl, J=11,3 Hz, H-27), 2,46 (1H, dd, J=13,0 Hz e 5,2 Hz, H-10), 2,51 (2H, m, H-22), 2,56 (1H, dd, J=13,0 e 5,2 Hz, H-10), 3,62 (3H, s, OMe), 4,81 (1H, m, H-11), 5,09 (2H, m, H-23 e H-28), 7,43 (2H, tl, J=7,8 Hz, H-18 e H-20), 7,54 (1H, tt, J=7,3 Hz e 1,2 Hz, H-19), 7,83 (2H, dd, J=8,0 Hz e 1,2 Hz, H-17 e H-21)
- **RMN ¹³C (125,69 MHz, CDCl₃/ TMS):** δ 15,9 (C-32), 17,9 (C-31), 18,0 (C-26), 18,1 (C-14), 22,4 (C-33), 24,5 (C-10), 25,8 (C-25), 25,9 (C-29), 26,1 (C-13), 27,9 (C-27), 30,7 (C-22), 40,2 (C-6), 41,7 (C-7), 47,0 (C-8), 57,7 (C-5), 60,7 (OMe), 71,0 (C-1), 120,0 (C-11 e C-28), 122,5 (C-23), 122,6 (C-3),

128,6 (C-18 e C-20), 129,2 (C-17 e C-21), 133,1 (C-24), 133,4 (C-19), 133,6 (C-29), 134,2 (C-12), 137,9 (C-16), 172,9 (C-4), 195,5 (C-2), 195,6 (C-15), 207,7 (C-9).

III.5.8 DADOS ESPECTROSCÓPICOS DO COMPOSTO (5)

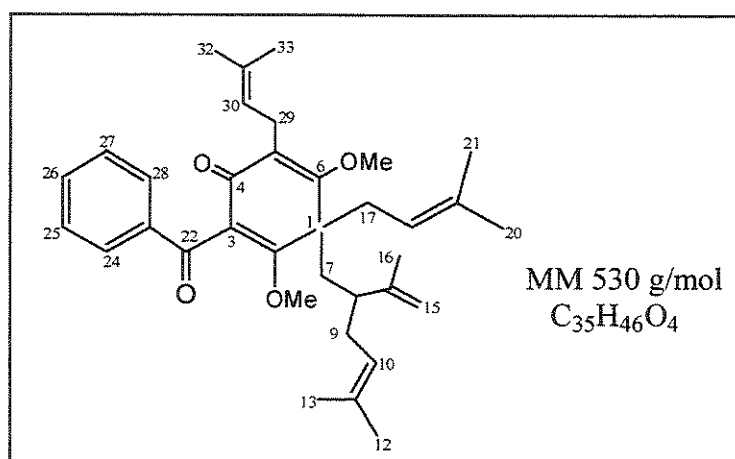


Dimetil weddellianona B

- **Aspecto Físico:** óleo amarelo
- **IV** (filme, ν_{max} cm⁻¹): 2970, 2927, 1673, 1648, 1453, 1226
- **EM de baixa resolução:** M⁺ 598, calculado para C₄₀H₅₄O₄
- **RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃/ TMS):** δ 1,56 (6H, s, H-13, H-23), 1,62 (6H, s, H-16 e H-24), 1,64 (3H, s, H-38), 1,69 (9H, s, H-12, H-22 e H-37), 1,93-2,04 (10H, m, H-7, H-8, H-9, H-17, H-18 e H-19), 3,18 (2H, d, J=6,5 Hz, H-34), 3,50 (3H, s, OMe), 4,03 (3H, s, OMe), 4,65 (2H, s, H-15 e H-25), 4,72 (2H, s, H-15 e H-25), 5,00 (2H, sl, t, H-10 e H-20), 5,10 (1H, m, H-35), 7,41 (2H, t, J=7,7 Hz, H-30 e H-32), 7,50 (1H, t, J=7,5 Hz, H-31), 7,89 (2H, dd, J=7,0 Hz e 1,0 Hz, H-29 e H-33)

➤ **RMN ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3/TMS):** δ 18,0 (C-38), 18,1 (C-16 e C-26), 19,1 (C-13 e C-23), 23,2 (C-34), 25,6 (C-37), 25,9 (C-12 e C-22), 33,4 (C-9 e C-19), 42,7 (C-8 e C-18), 43,9 (C-7 e C-17), 52,7 (C-1), 58,9 (OMe), 61,5 (OMe), 111,5 (C-15 e C-25), 118,4 (C-5), 120,7 (C-35), 122,6 (C-10 e C-20), 122,8 (C-3), 128,8 (C-30 e C-32), 129,2 (C-29 e C-33), 131,4 (C-31), 131,9 (C-36), 132,7 (C-11 e C-21), 138,5 (C-28), 147,0 (C-14 e C-24), 169,5 (C-6), 169,6 (C-2), 187,7 (C-4), 196,0 (C-27).

III.5.9 DADOS ESPECTROSCÓPICOS DO COMPOSTO (6)



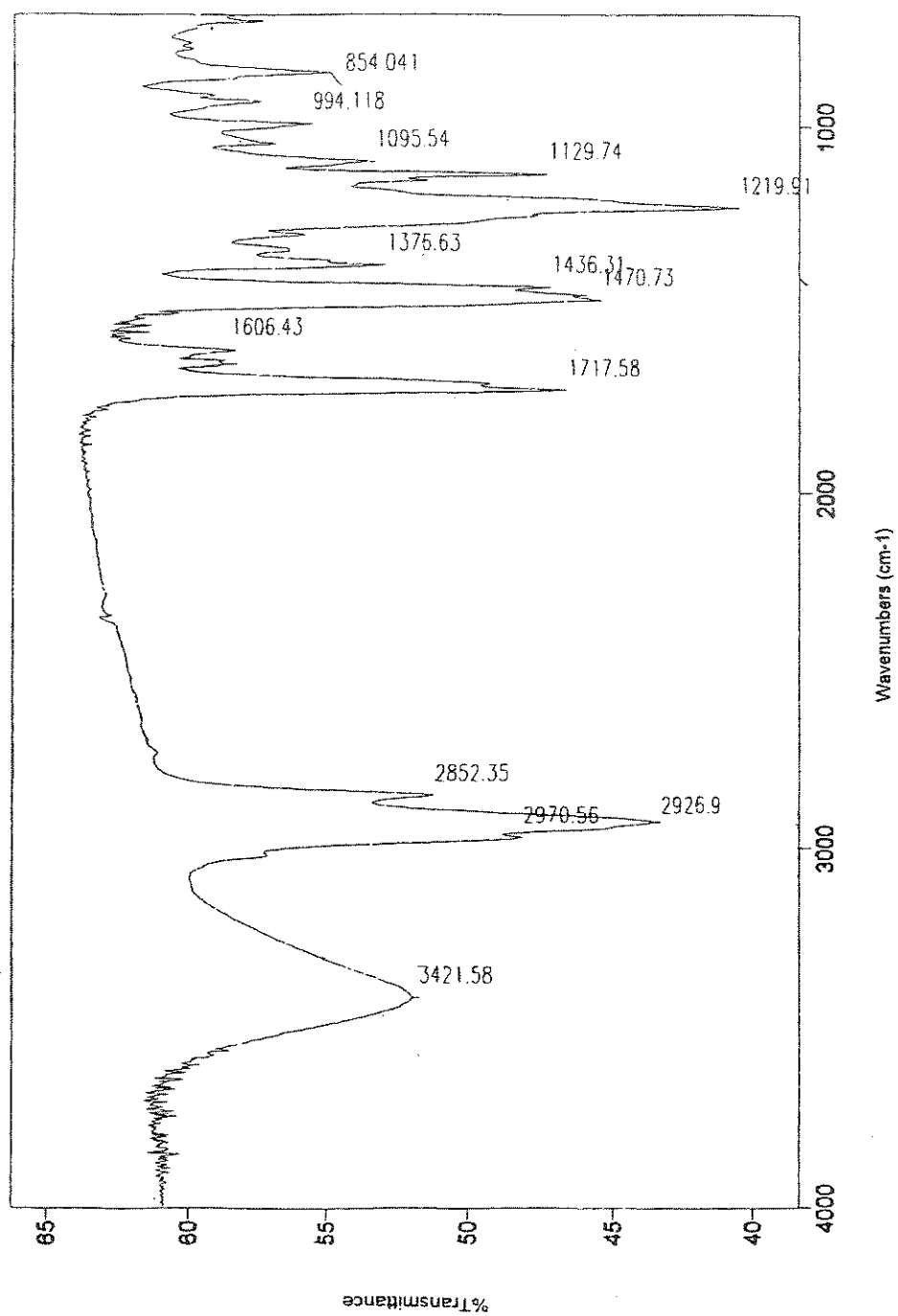
Dimetil weddellianona A

- **Aspecto Físico:** óleo amarelo
- $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -46 (CHCl_3 , c. 0,49).
- **IV** (filme, ν_{max} cm^{-1}): 2969, 2931, 1675, 1652, 1448, 1365.
- **RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3/TMS):** δ 1,58 (3H, s, H-21), 1,59 (3H, s, H-13), 1,62 (3H, s, H-16), 1,65 (6H, s, H-32 e H-33), 1,68 (3H, s, H-12), 1,76 (3H, s, H-20), 1,97 (3H, sl, H-8 e H-9), 2,12 (2H, m, H-7), 2,51 (1H, dd,

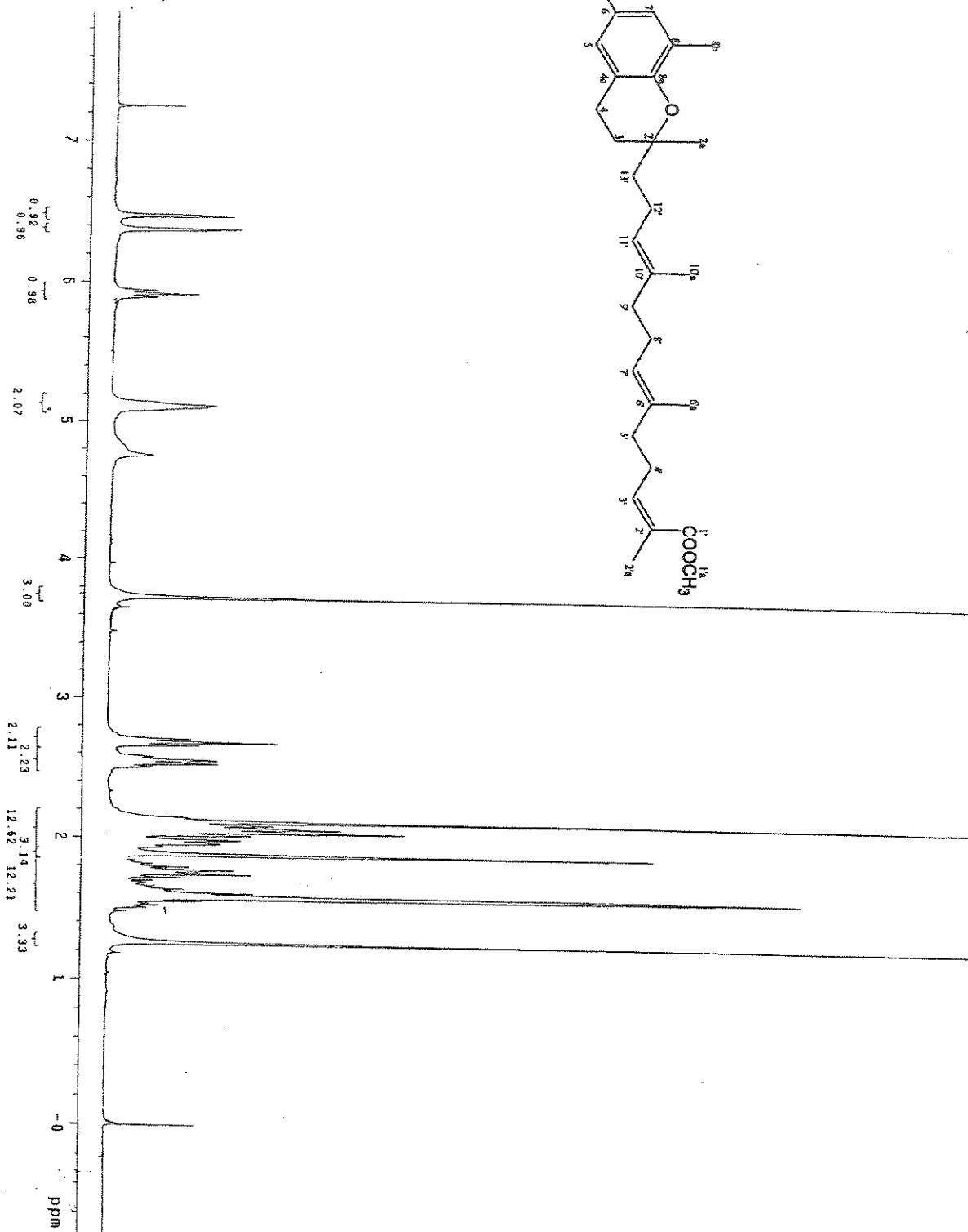
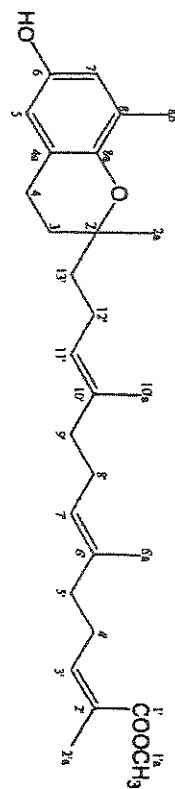
J=15,0 Hz e 5,1 Hz, H-17), 2,62 (1H, dd, J=15,0 Hz e 9,0 Hz, H-17), 3,12 (1H, dd, J=11,7 Hz e 6,2 Hz, H-29), 3,21 (1H, dd, J=12,0 Hz e 6,2 Hz, H-29), 3,50 (3H, s, OMe), 3,97 (3H, s, OMe), 4,65 (1H, s, H-15), 4,78 (1H, s, H-15), 5,0 (2H, sl, H-10 e H-18), 5,09 (1H, m, H-30), 7,40 (2H, t, J=7,3 Hz, H-25 e H-27), 7,47 (1H, t, J=7,3 Hz, H-26), 7,87 (2H, d, J= 7,0 Hz, H-24 e H-28).

➤ **RMN ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3 / TMS):** δ 18,0 (C-21 e C-23), 18,1 (C-13), 18,6 (C-16), 22,9 (C-29), 25,6 (C-32), 25,8 (C-12), 26,1 (C-20), 33,7 (C-9), 37,8 (C-17), 40,1 (C-7), 44,4 (C-8), 53,3 (C-1), 58,9 (OMe), 61,7 (OMe), 112,3 (C-15), 118,5 (C-18), 122,5 (C-5 e C-10), 122,6 (C-3), 122,8 (C-30), 128,4 (C-25 e C-27), 129,0 (C-24 e C-28), 131,8 (C-11 e C-31), 132,7 (C-26), 134,6 (C-19), 138,5 (C-23), 146,3 (C-14), 169,3 (C-2), 169,5 (C-6), 187,7 (C-4), 196,0 (C-22).

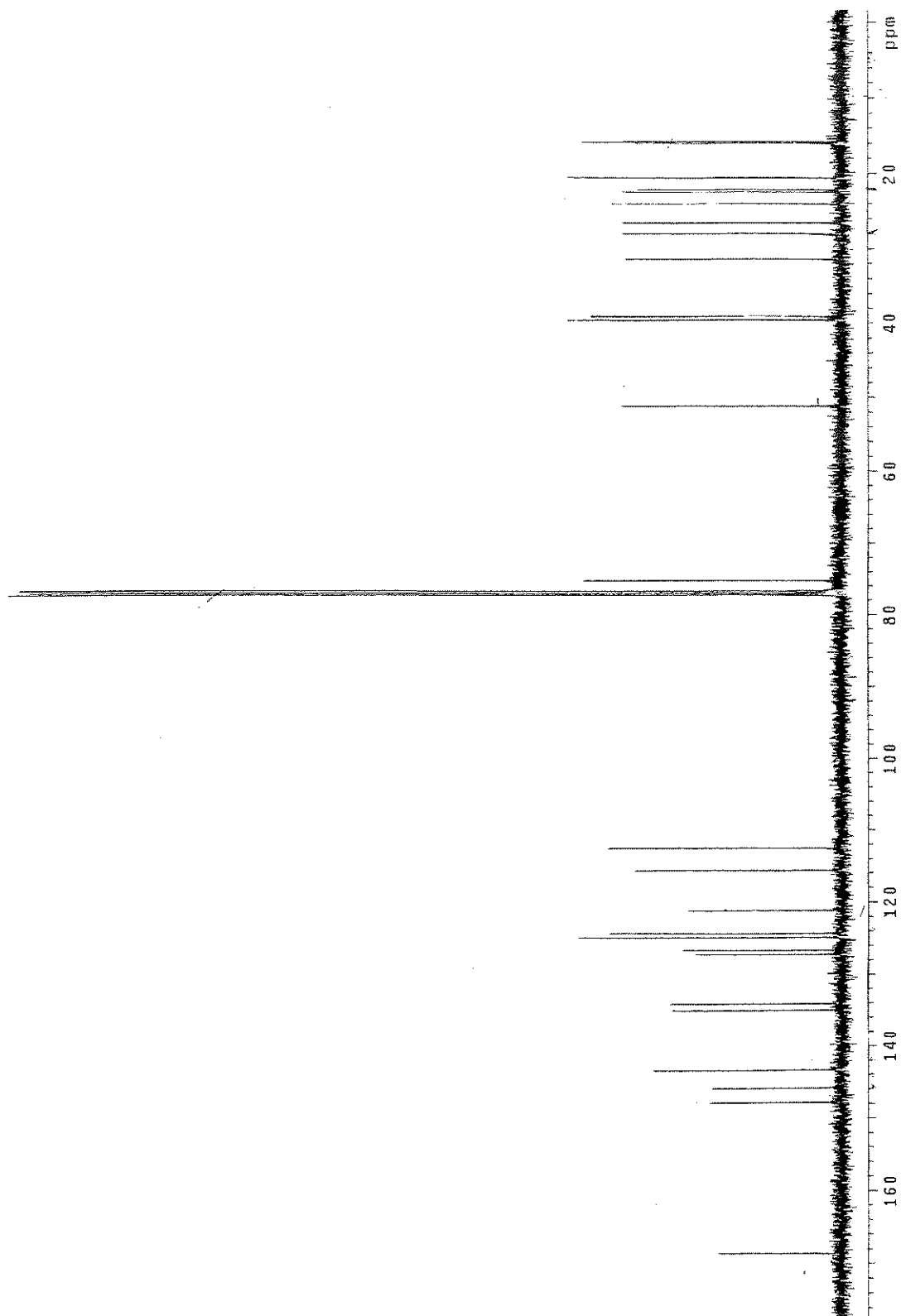
ESPECTROS



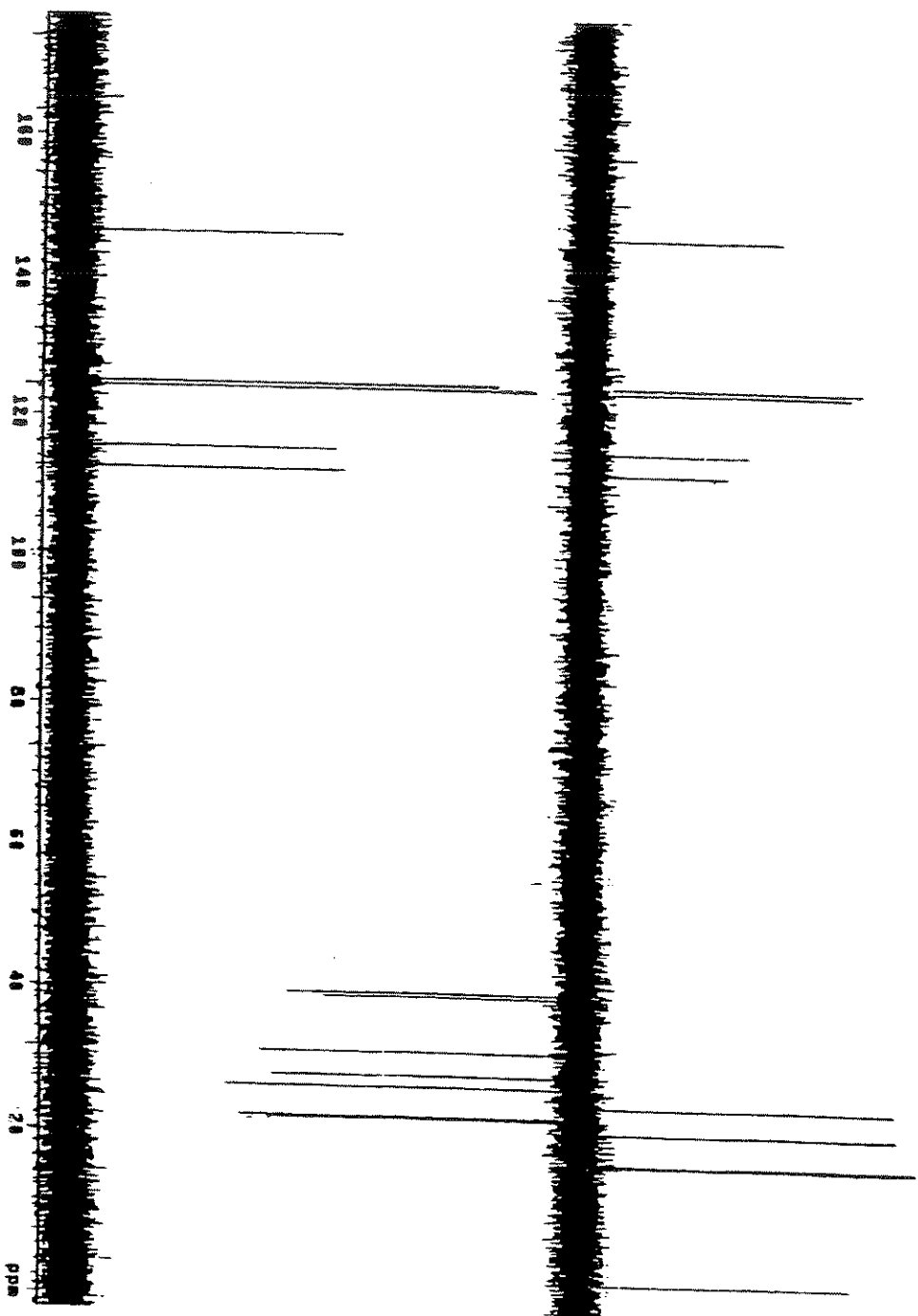
E-1 Espectro no Infravermelho (KBr) do composto (1)



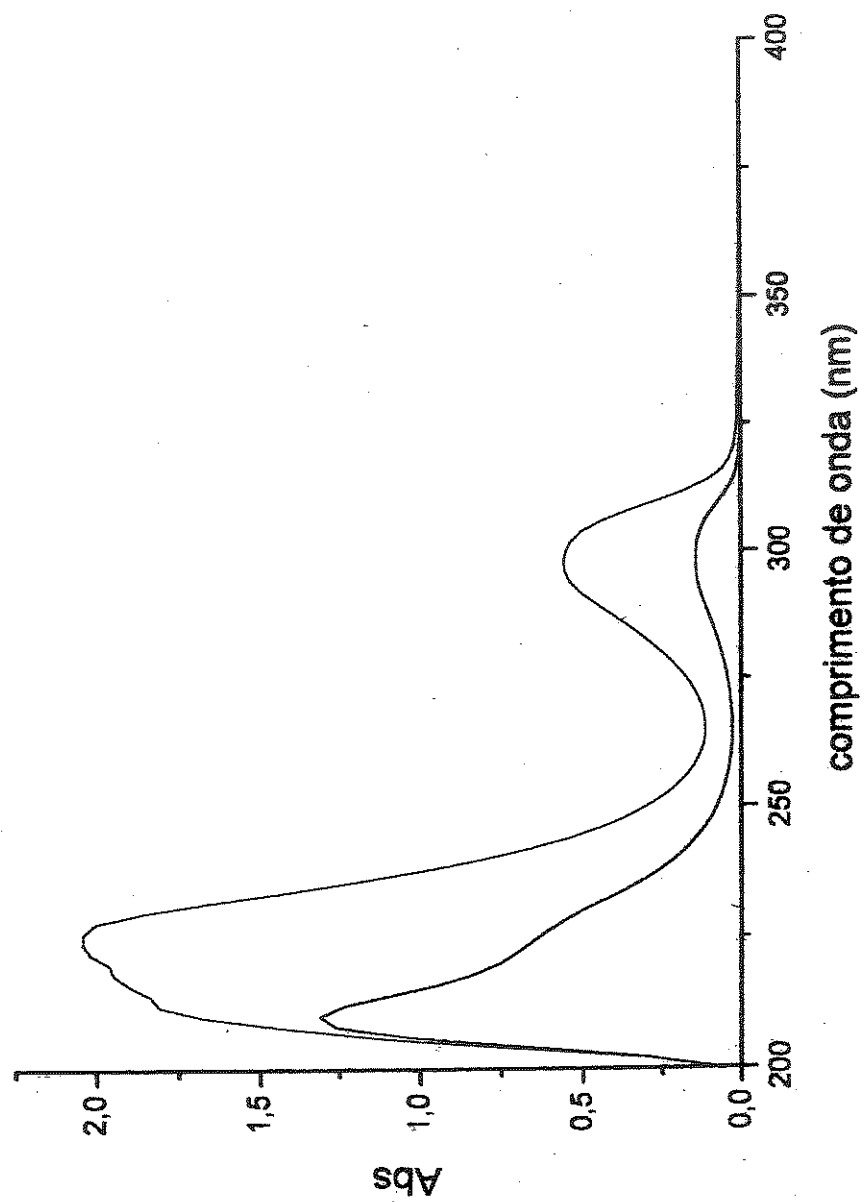
F-2 Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto (1)



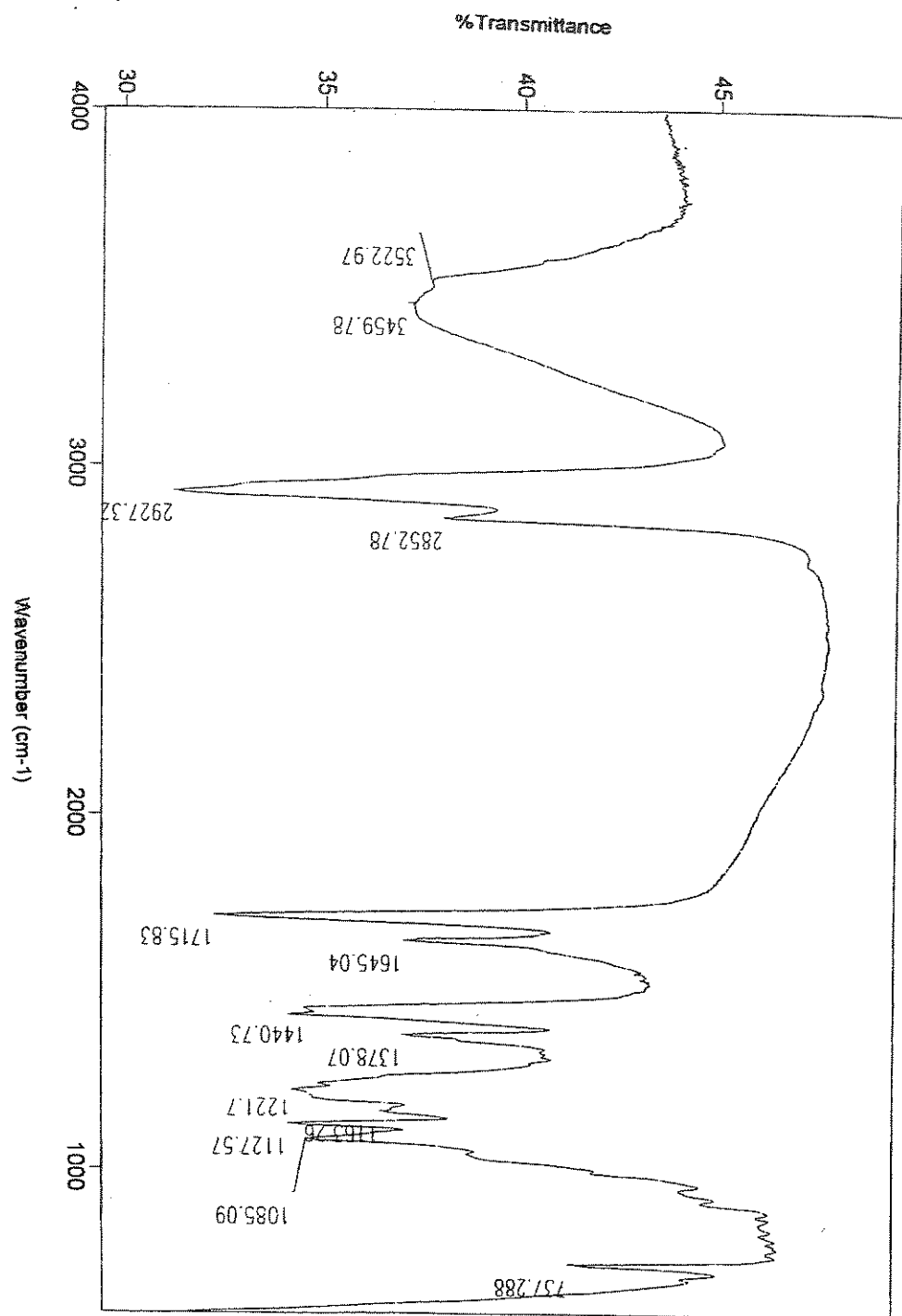
E-3 Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3) do composto **(1)**



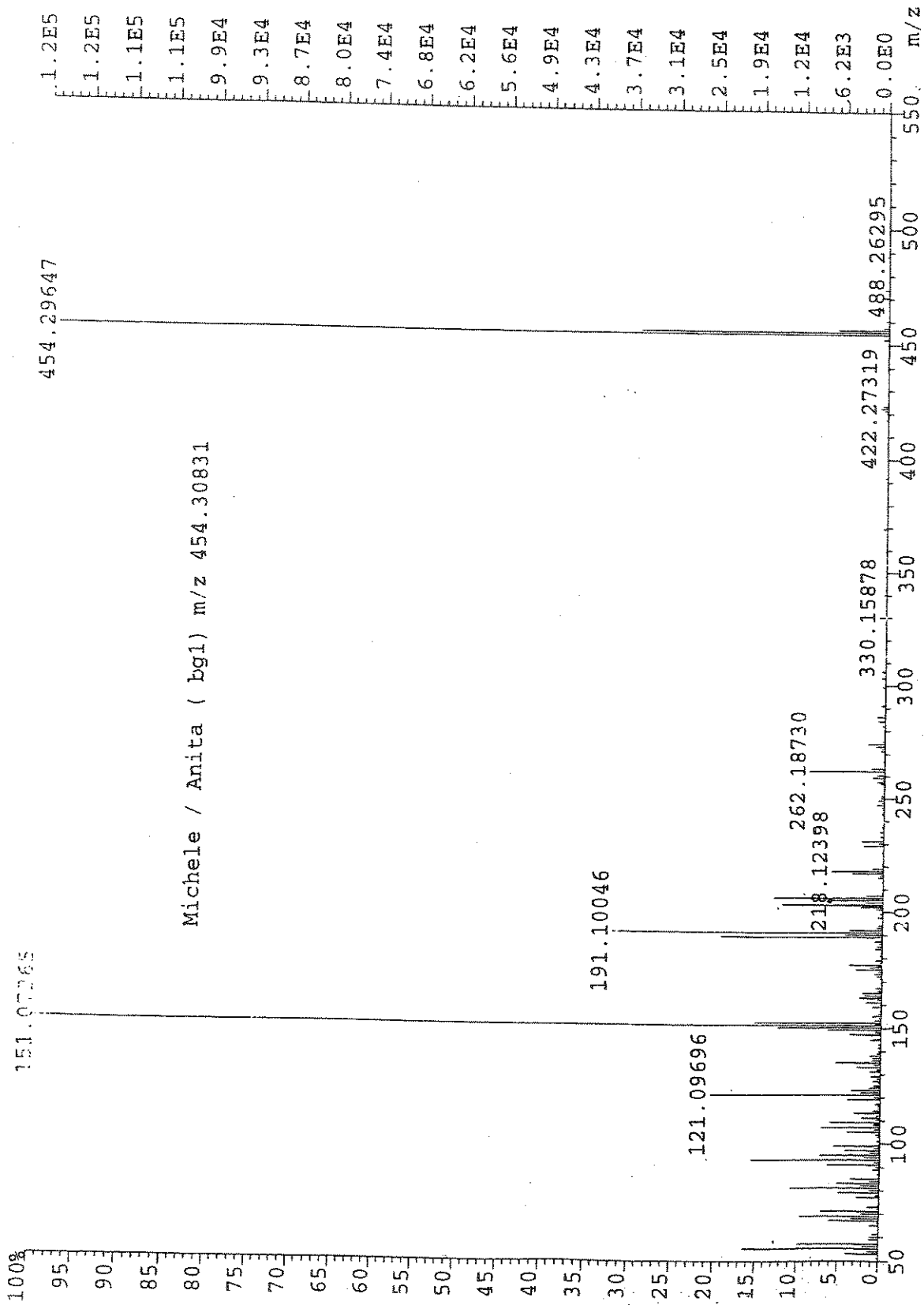
E-4 Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° (125,69 MHz, CDCl_3) do composto (1)



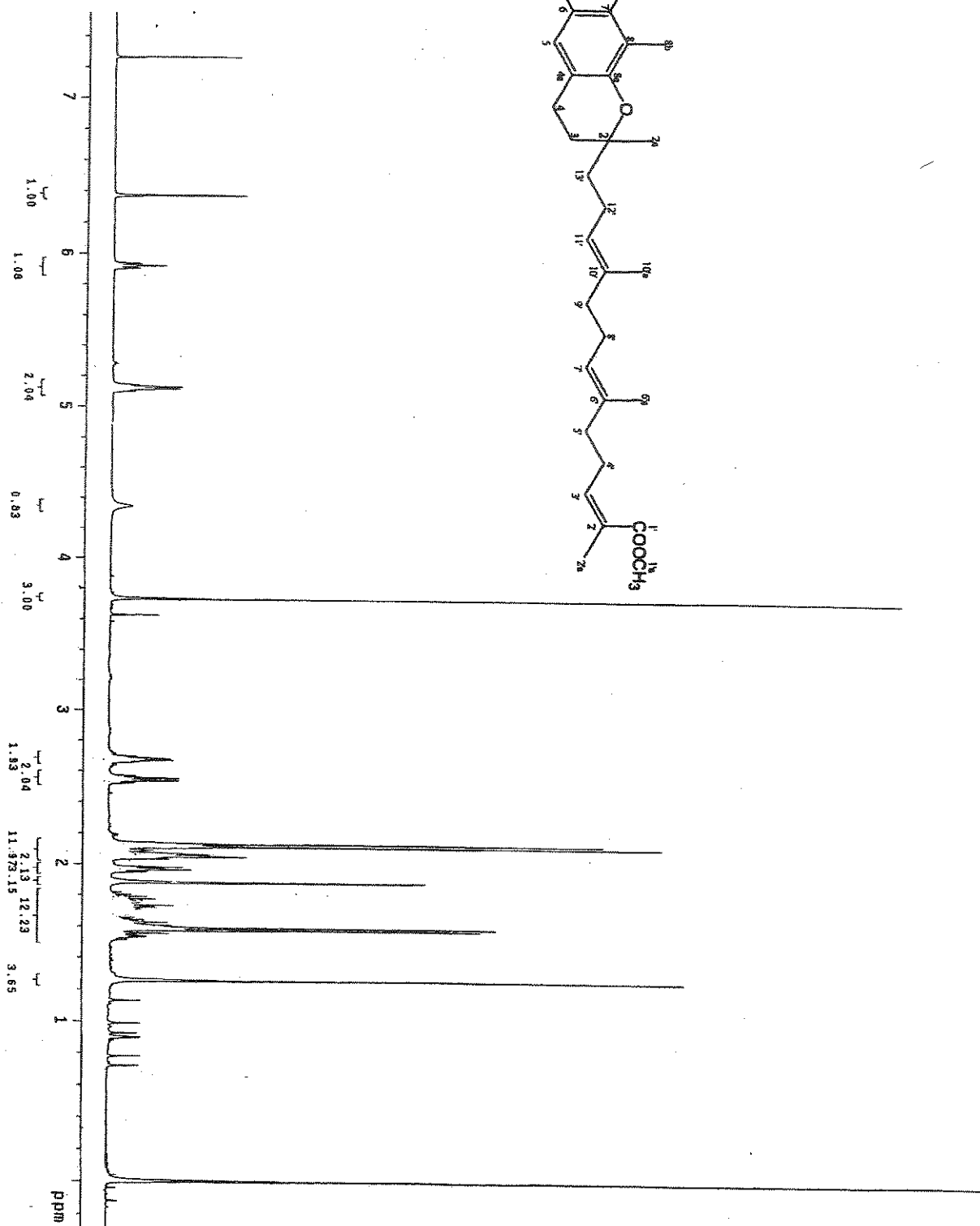
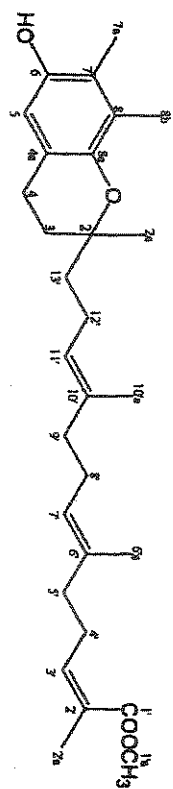
E-5 Espectro no Ultravioleta do composto (2)



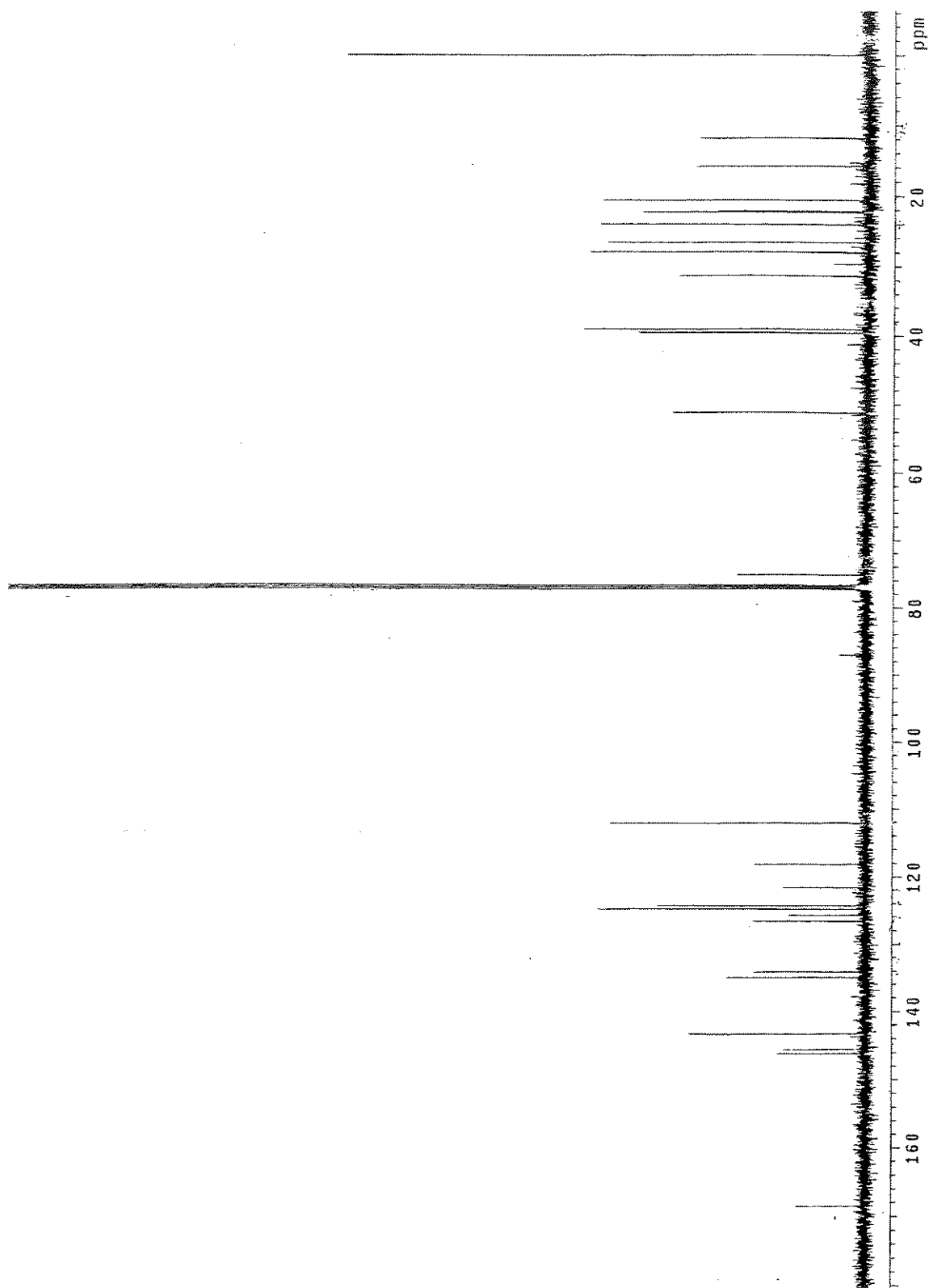
E-6 Espectro no Infravermelho (KBr) do composto (2)



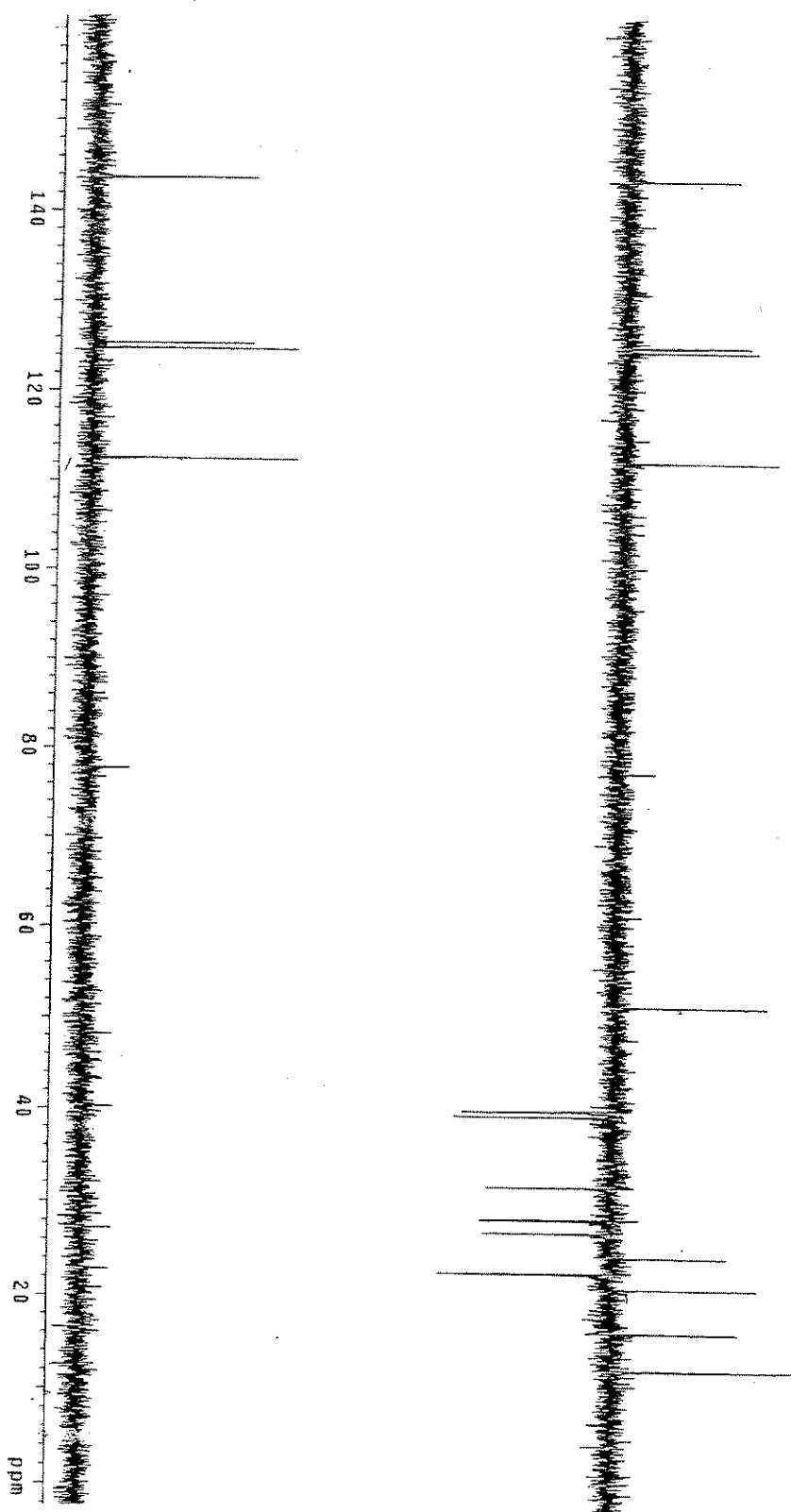
E-7 Espectro de Massas de alta resolução (IE, 70 eV) do composto (2)



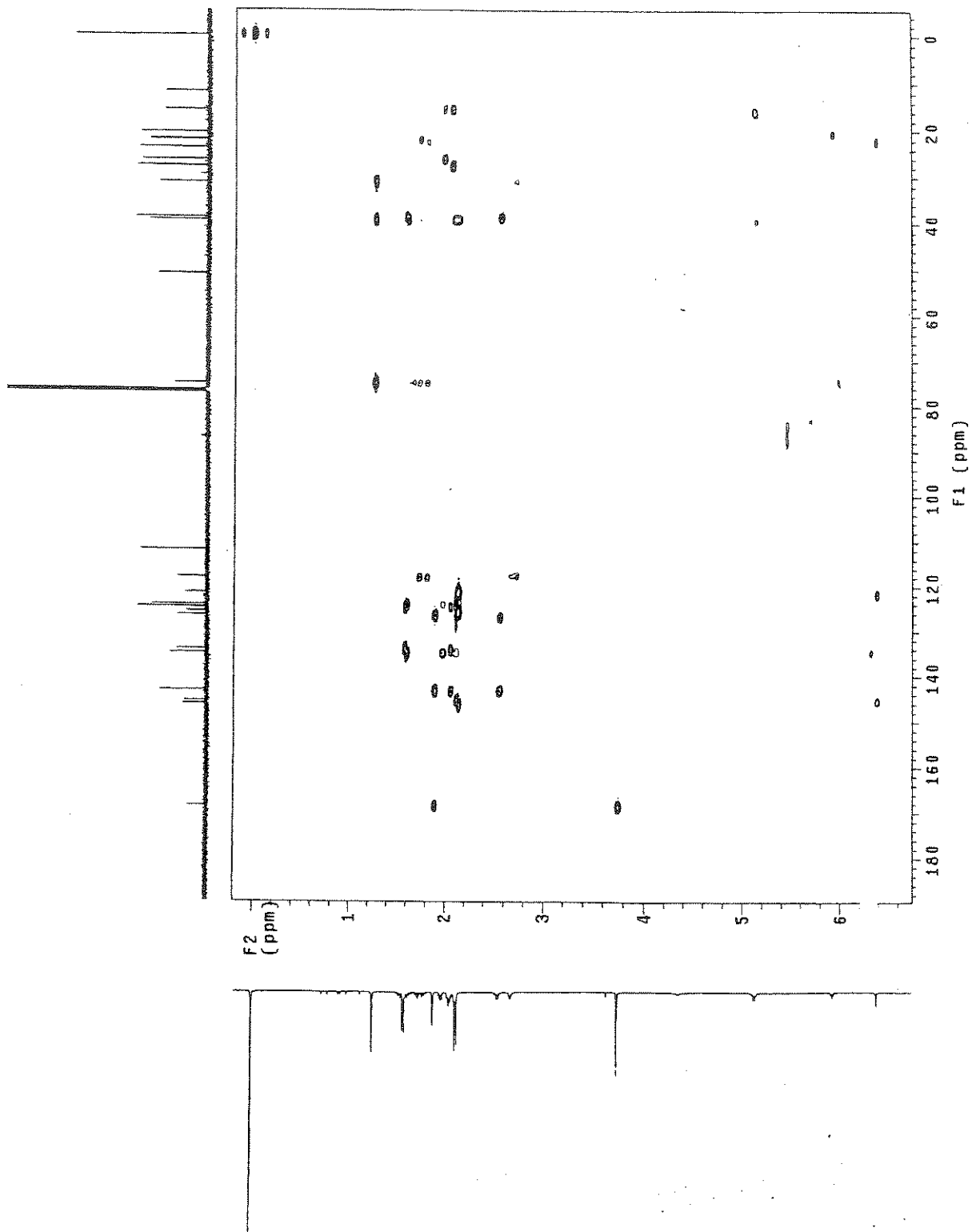
E-8 Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto (2)



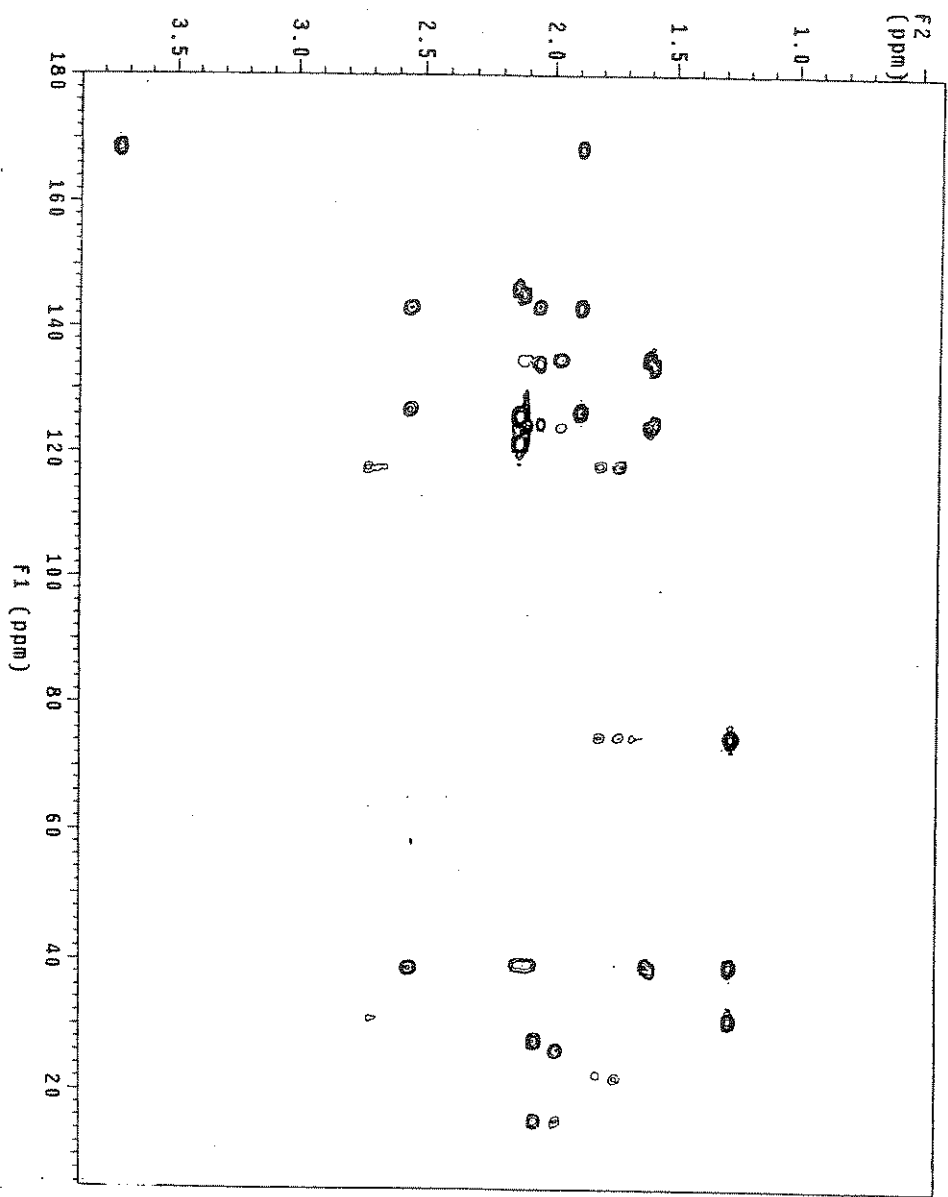
E-9 Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3) do composto (2)



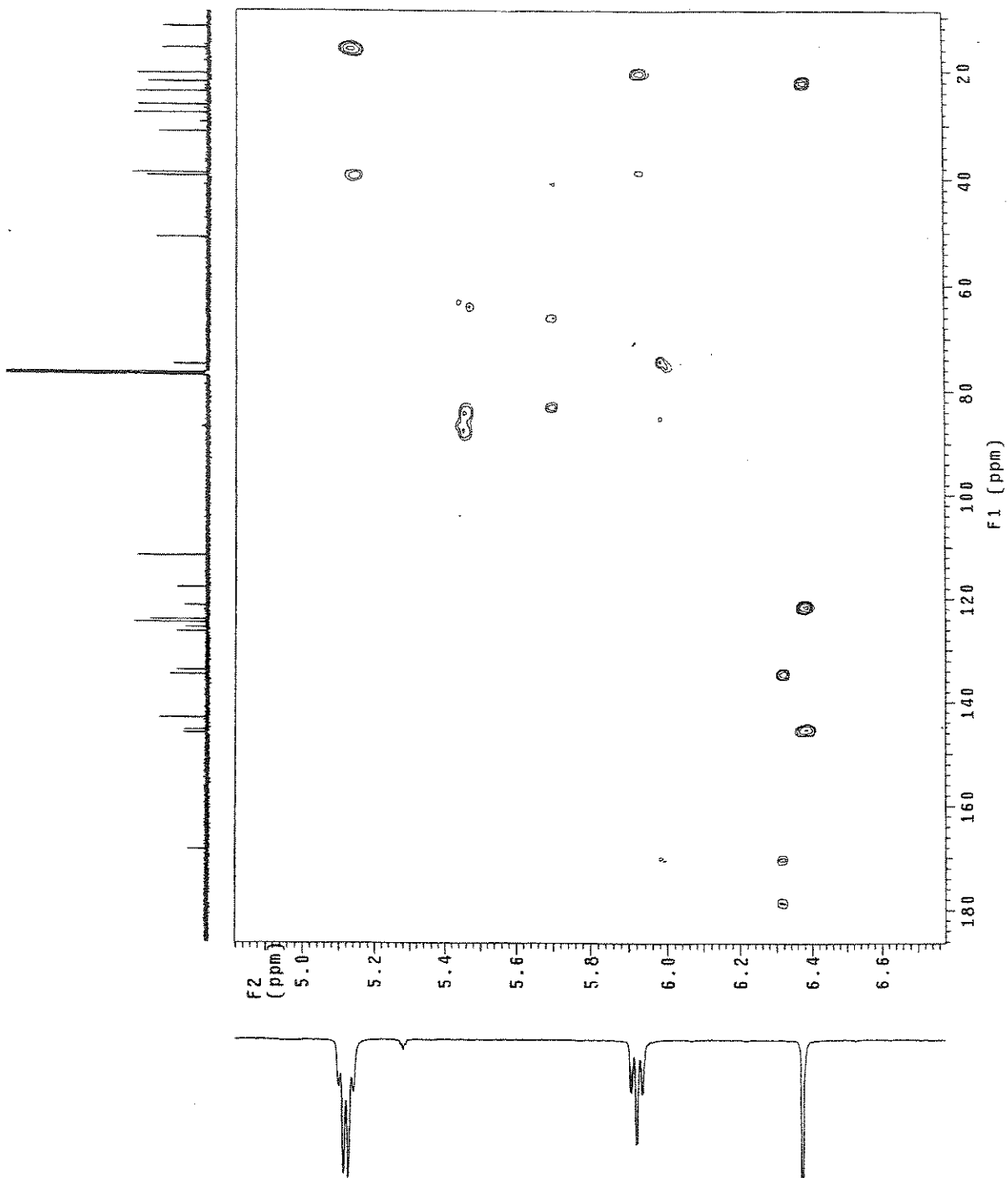
E-10 Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° (125,69 MHz, CDCl_3) do composto (**2**)



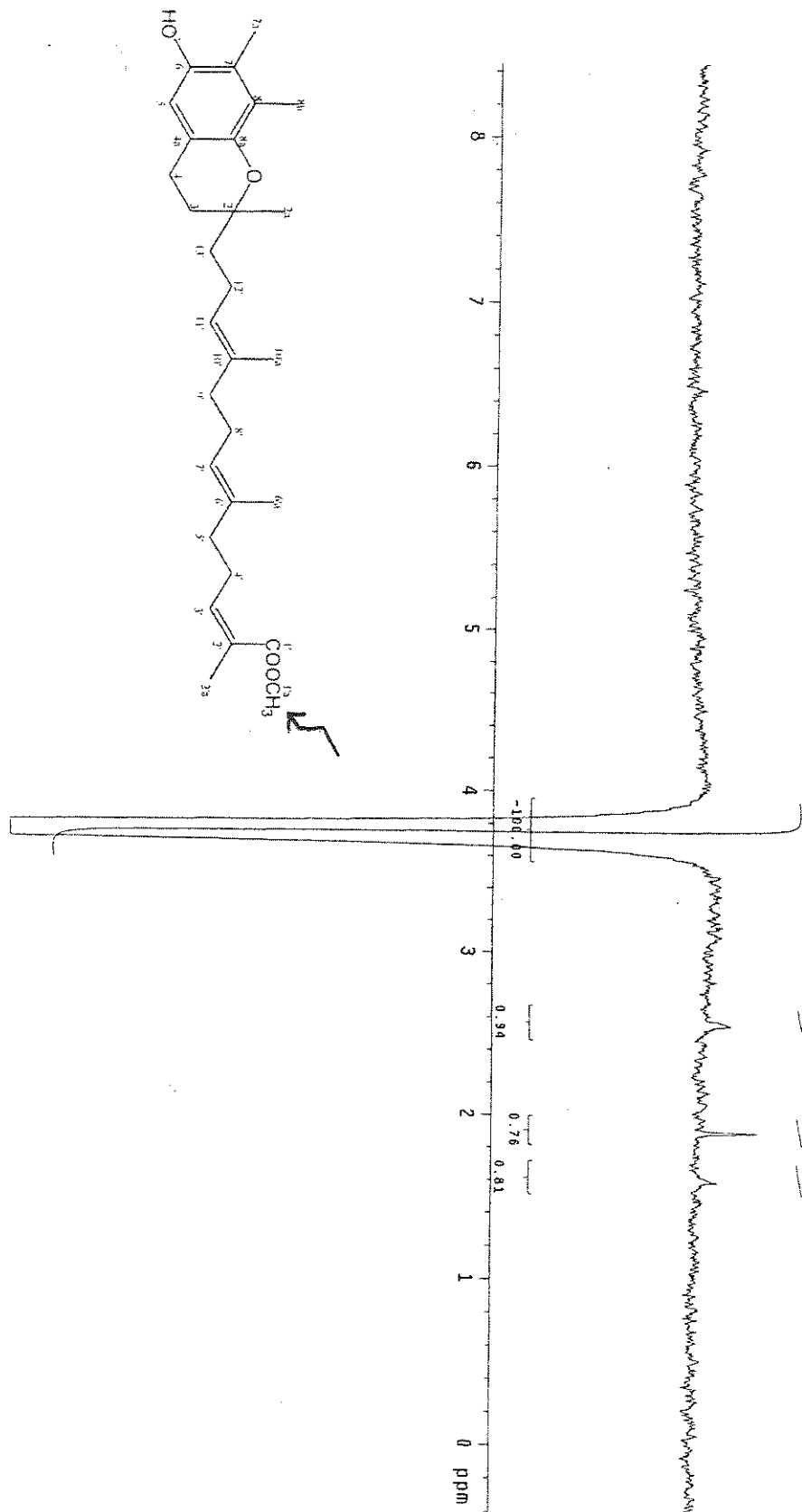
E-11 Espectro de RMN de 2D de correlação heteronuclear de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125,69 MHz) a múltiplas ligações (gHMBC, CDCl_3) do composto (**2**)



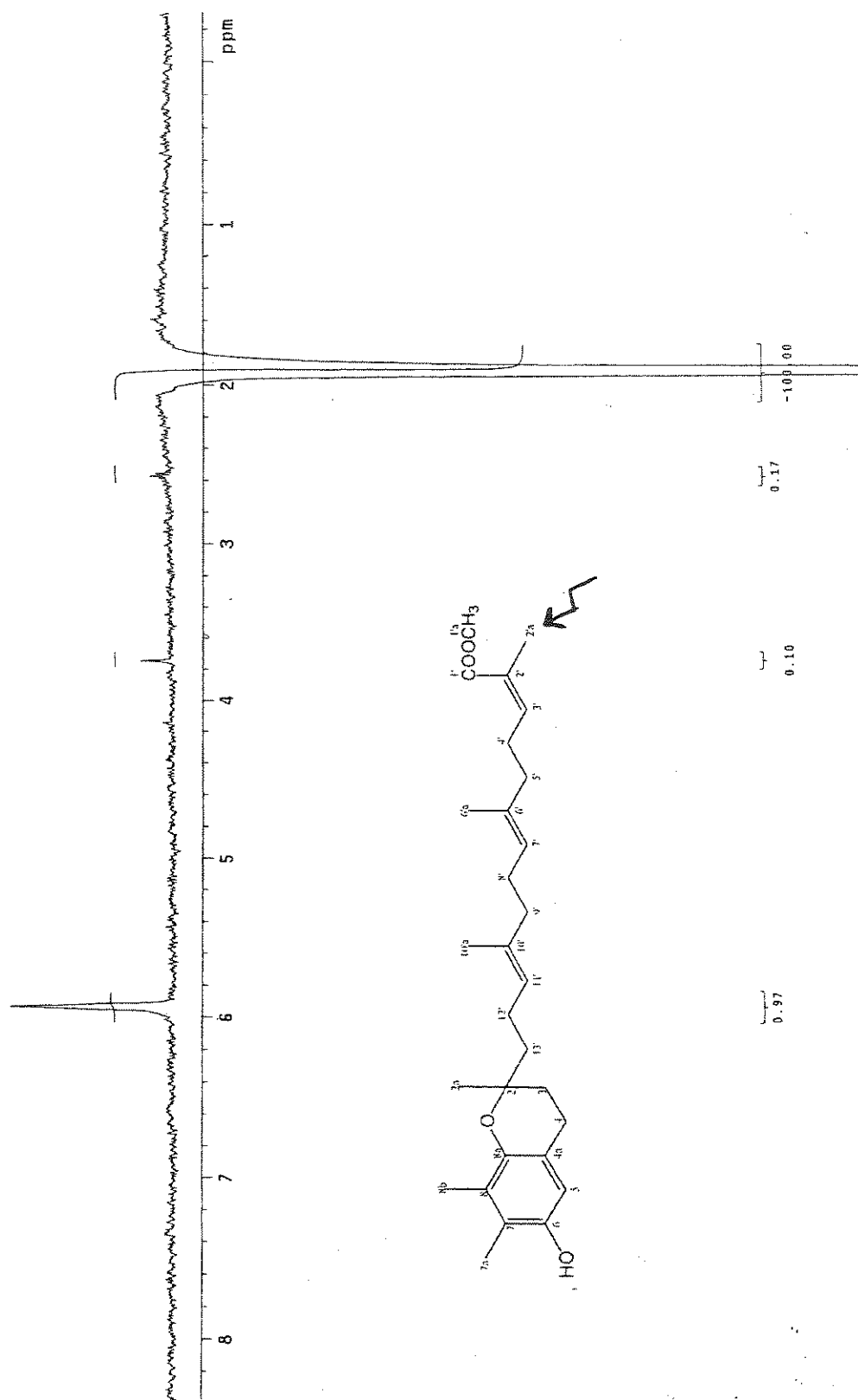
E-12 Expansão do espectro E-11 na região entre δ 1,0 - δ 3,8 (F2)



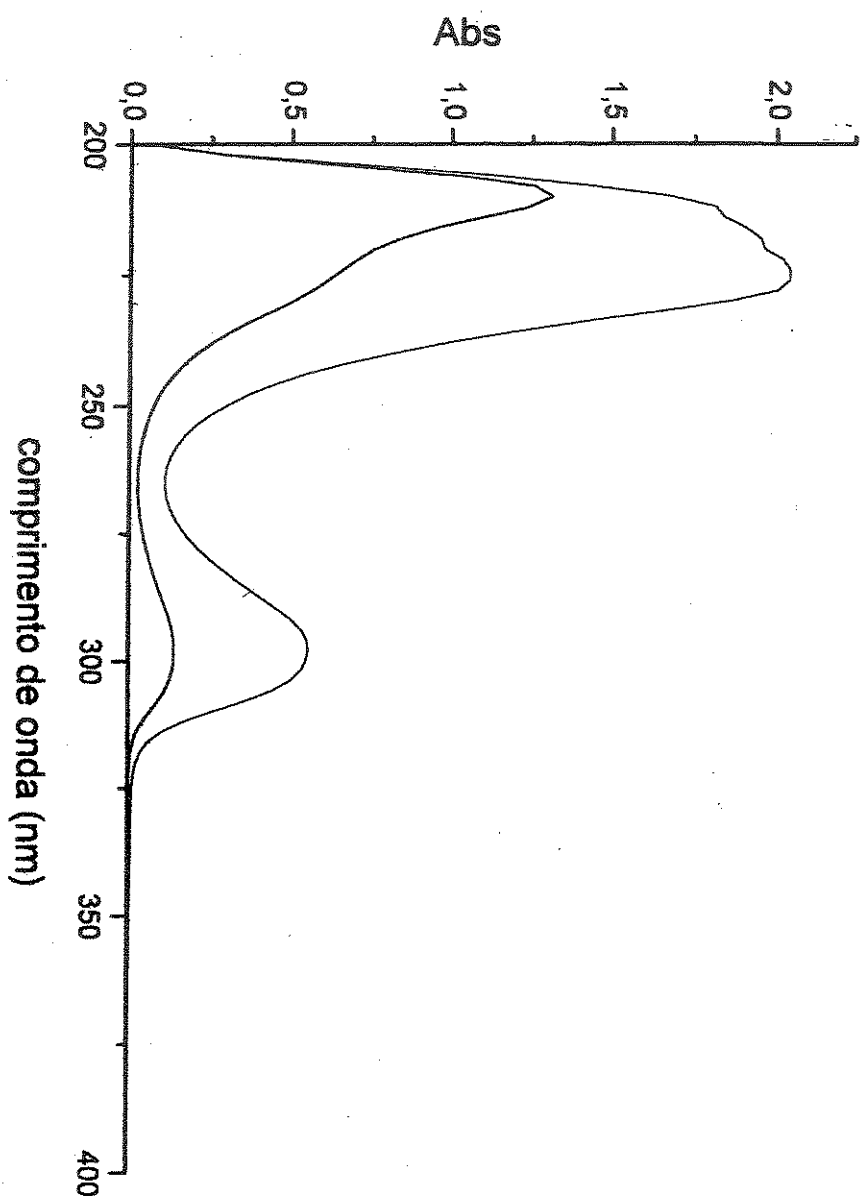
E-13 Expansão do espectro E-11 na região entre δ 4,9 - δ 6,7 (F2)



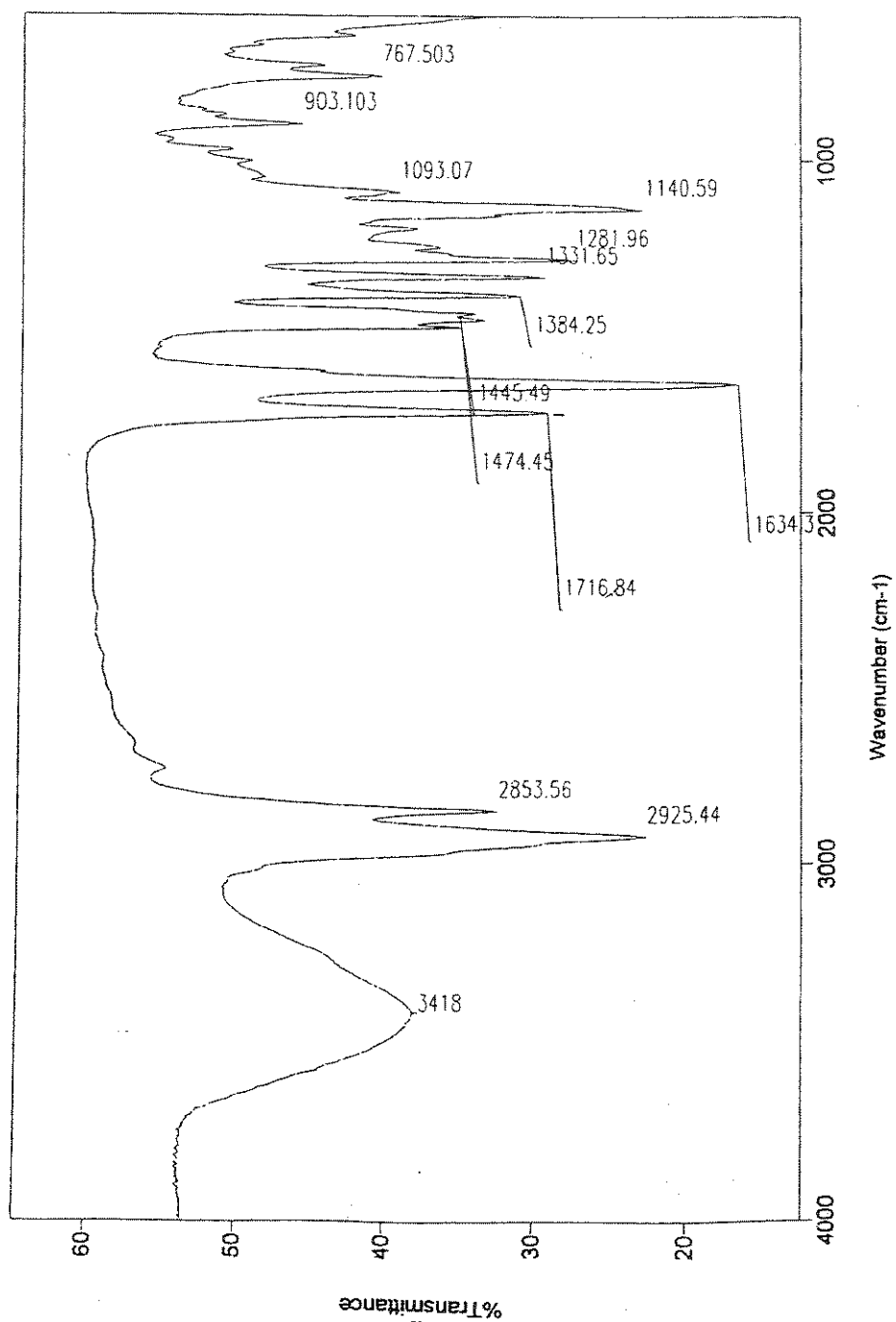
E-14 Espectro de RMN de ^1H (500 MHz). Experimento de diferença de NOE (NOESY 1D)



E-15 Espectro de RMN de ¹H (500 MHz). Experimento de diferença de NOE (NOESY 1D)

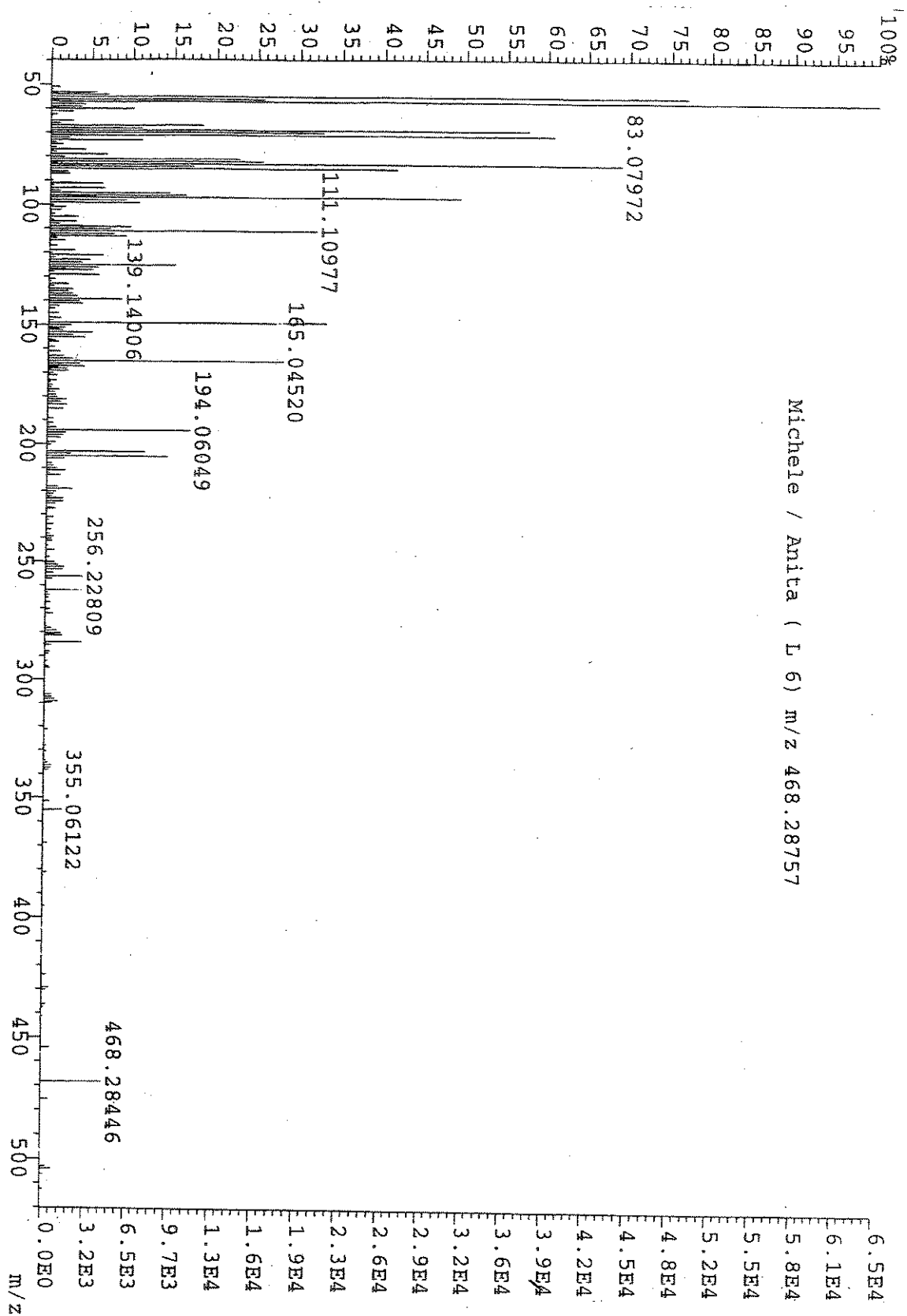


E-16 Espectro no Ultravioleta do composto (3)

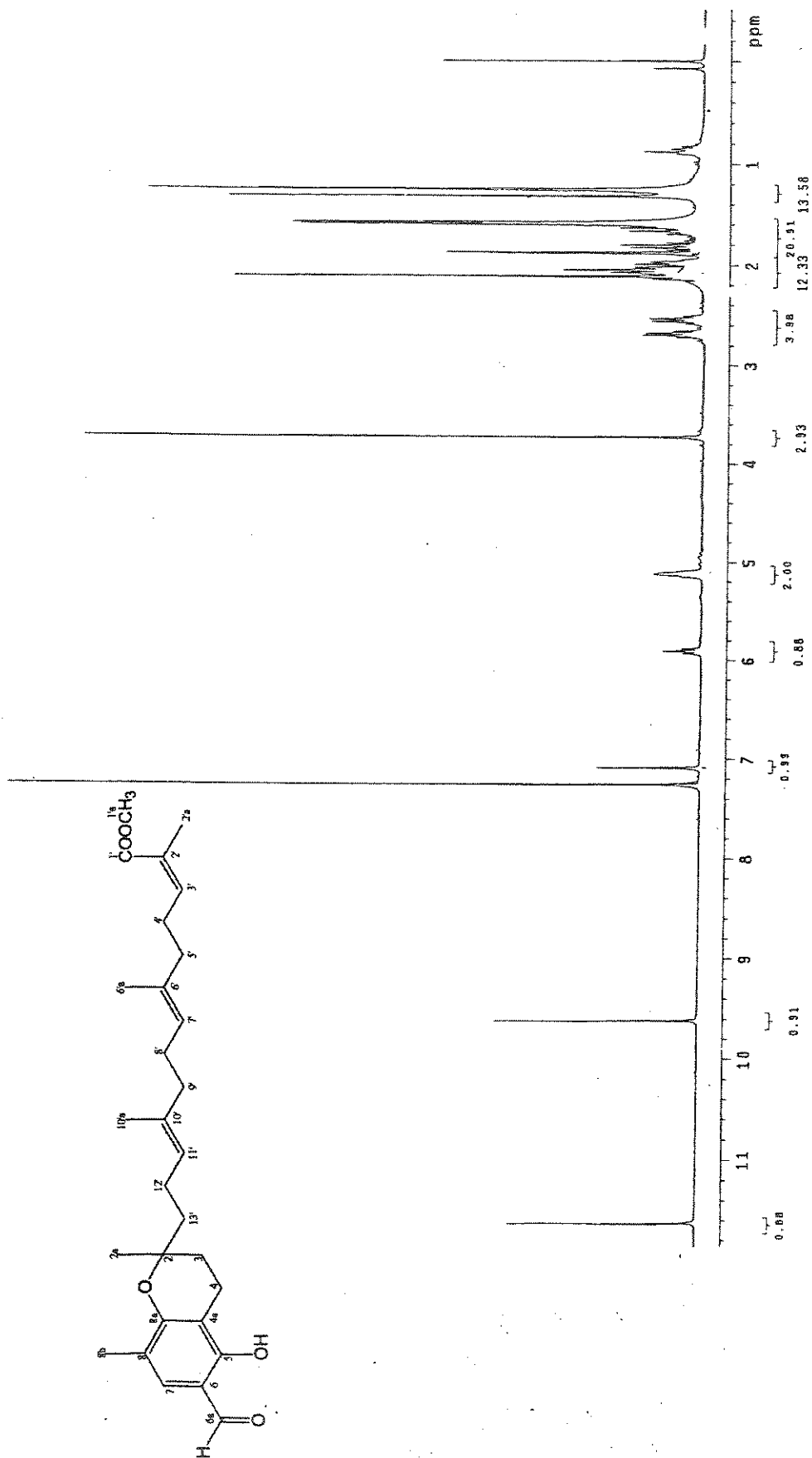


E-17 Espectro no Infravermelho (KBr) do composto (3)

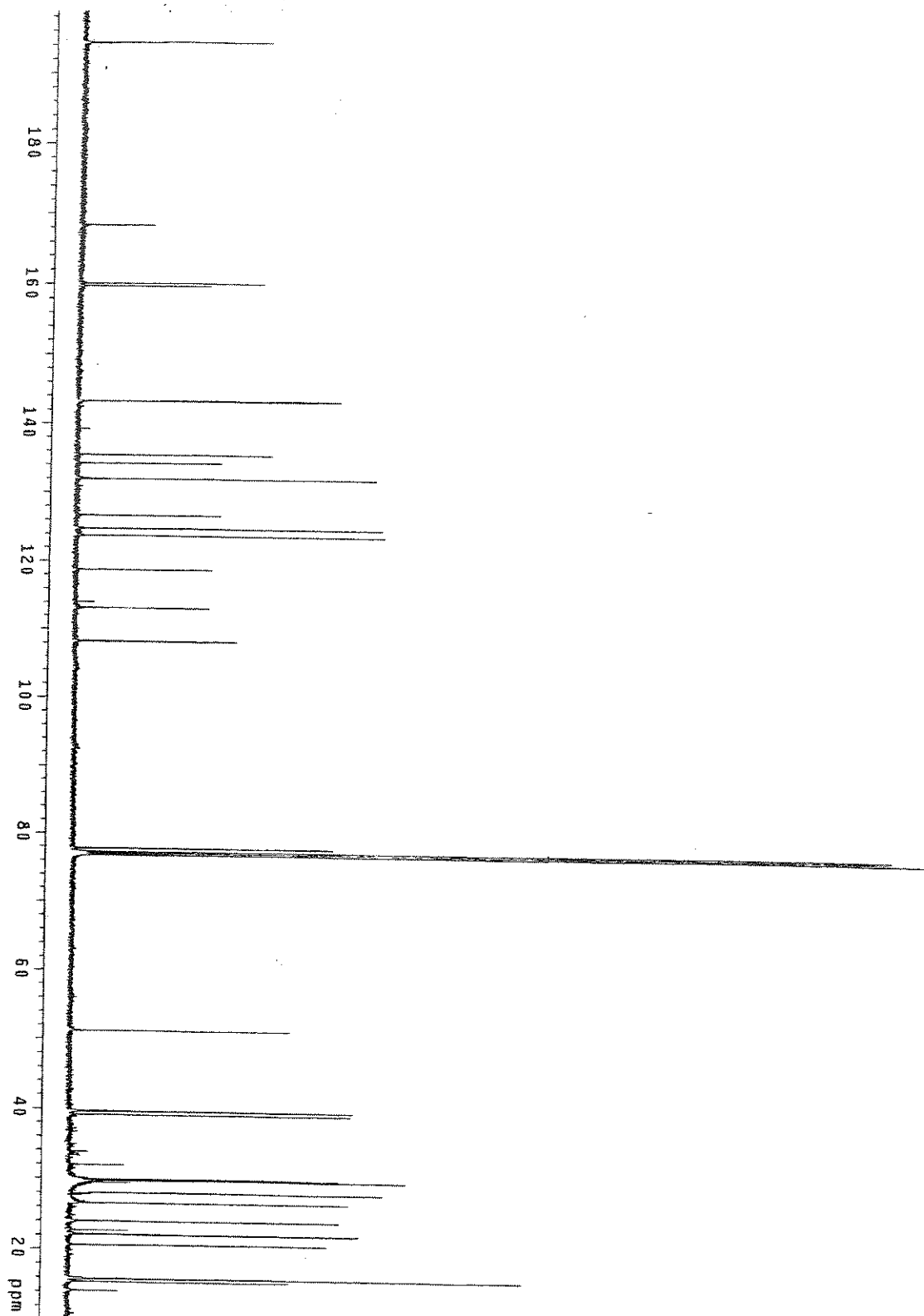
Michele / Anita (L 6) m/z 468.28757



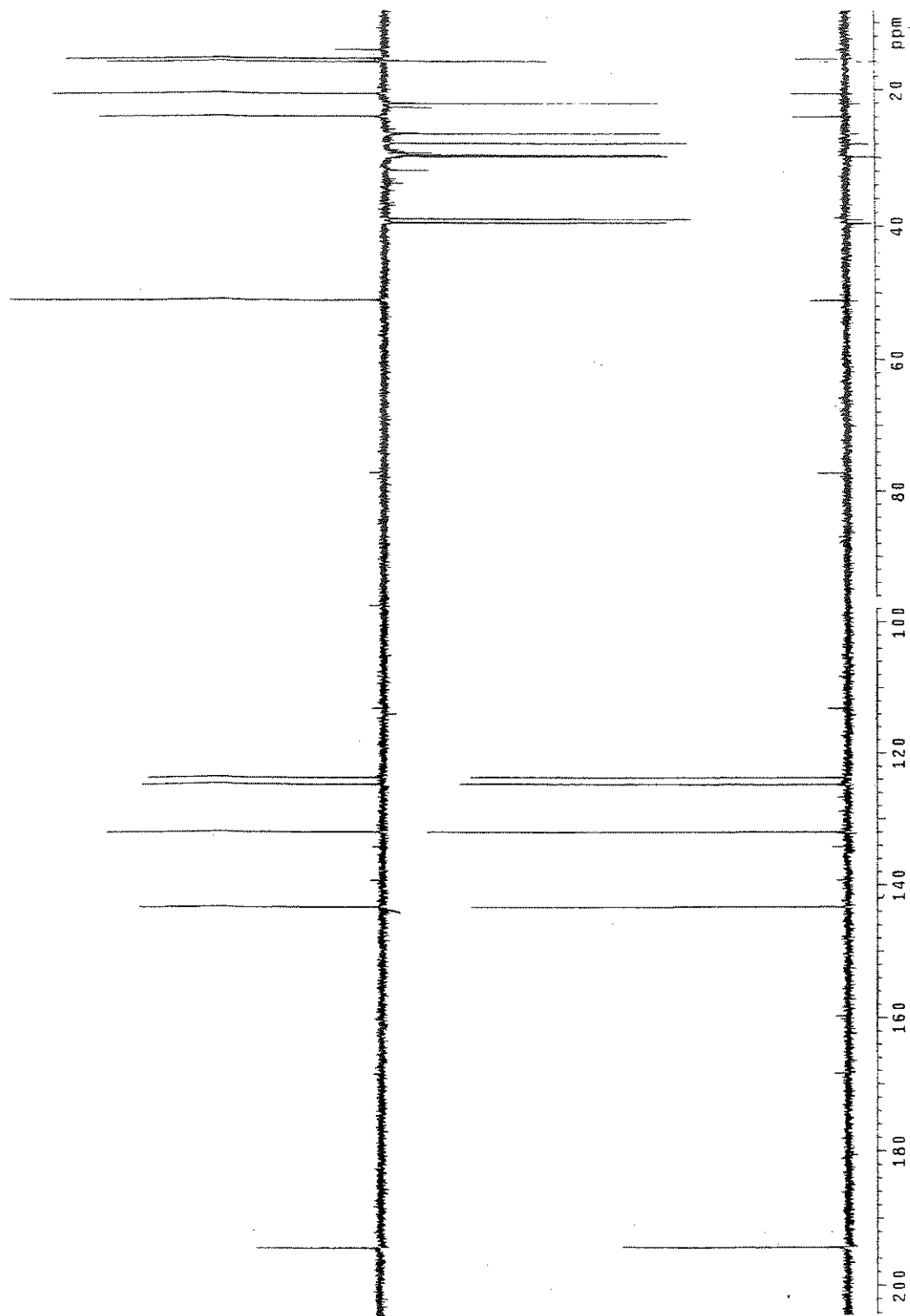
E-18 Espectro de Massas de alta resolução (IE, 70 eV) do composto (3)



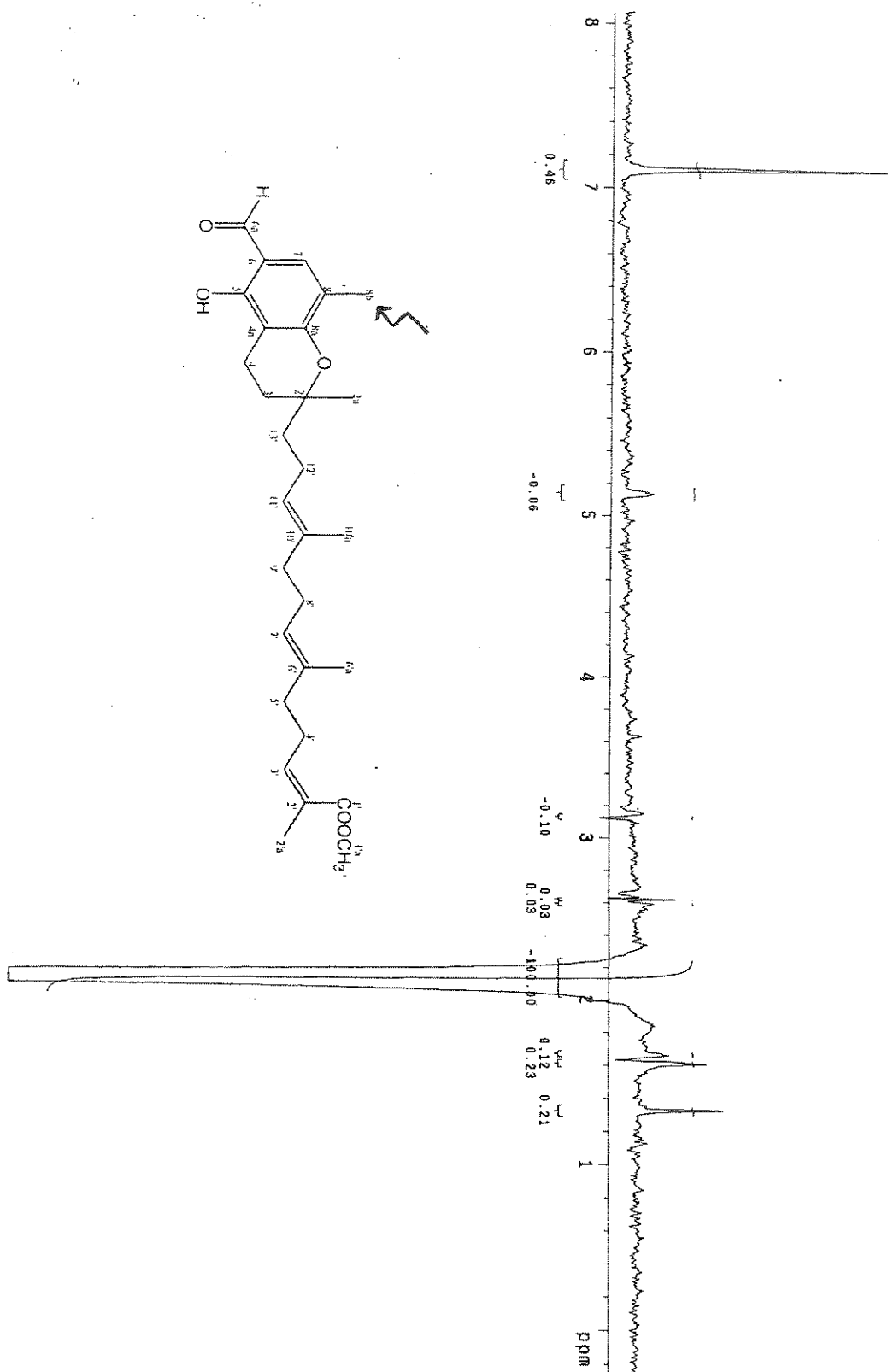
E-19 Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto (3)



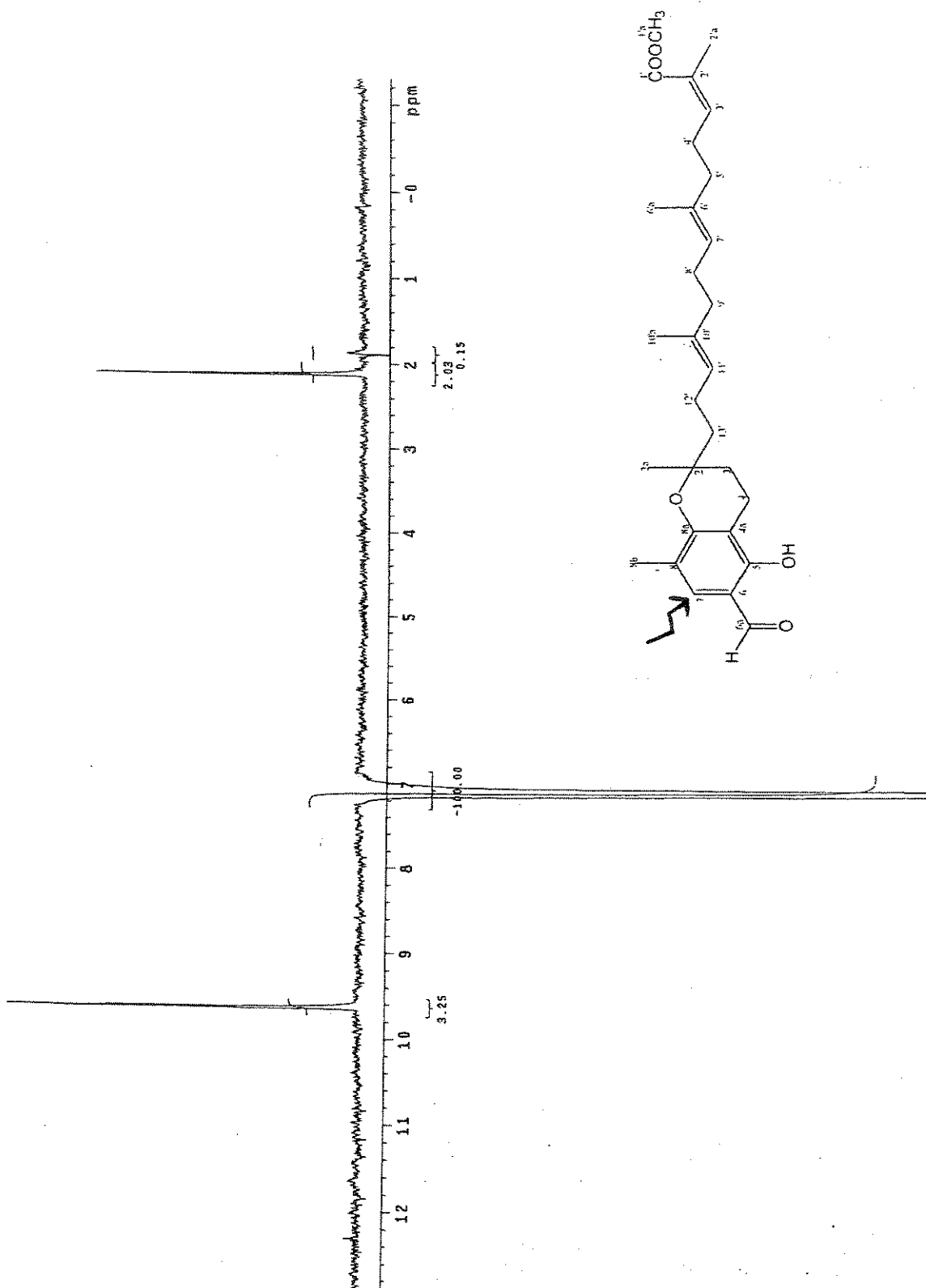
E-20 Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3) do composto (3)



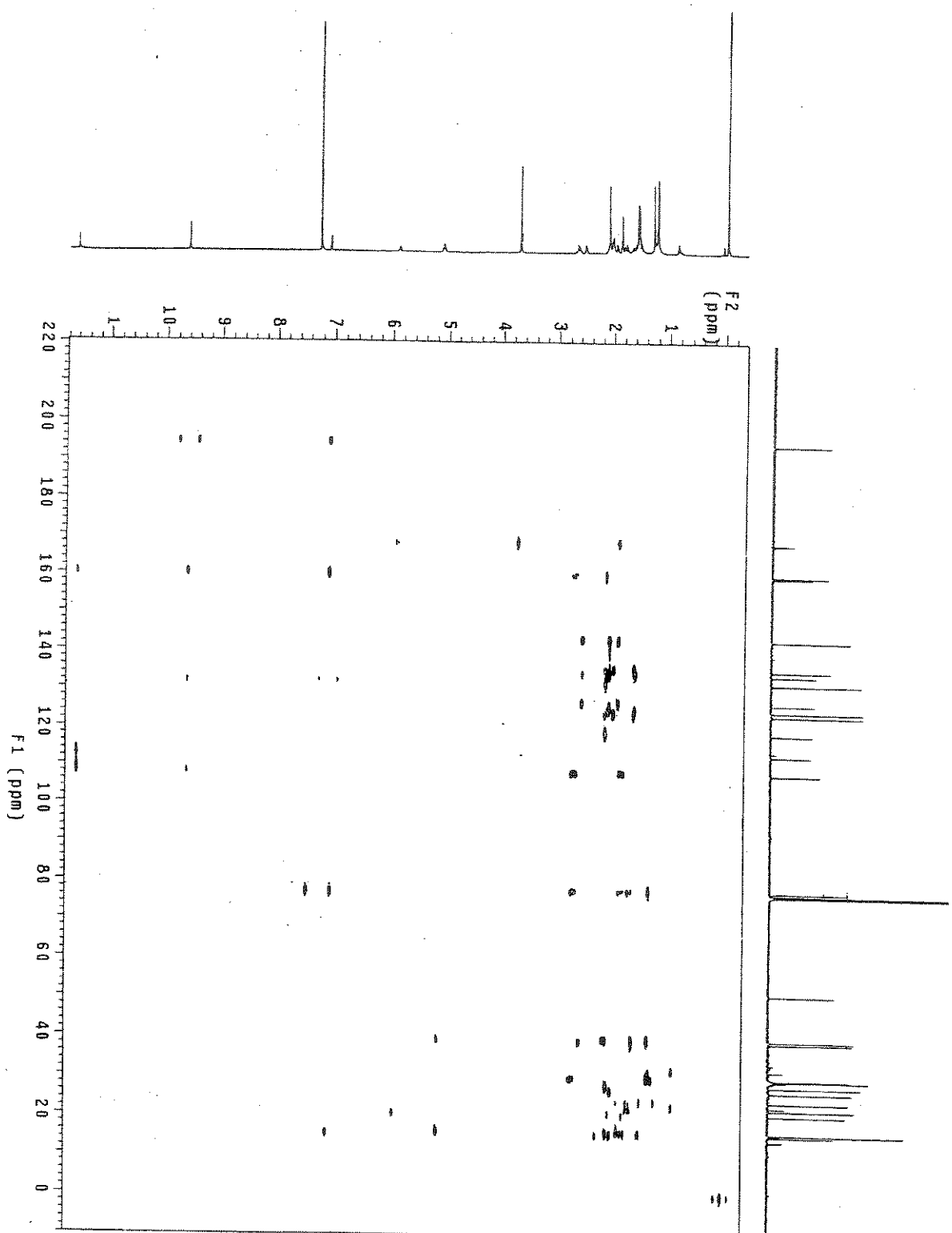
E-21 Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° (125,69 MHz, CDCl_3) do composto (3)



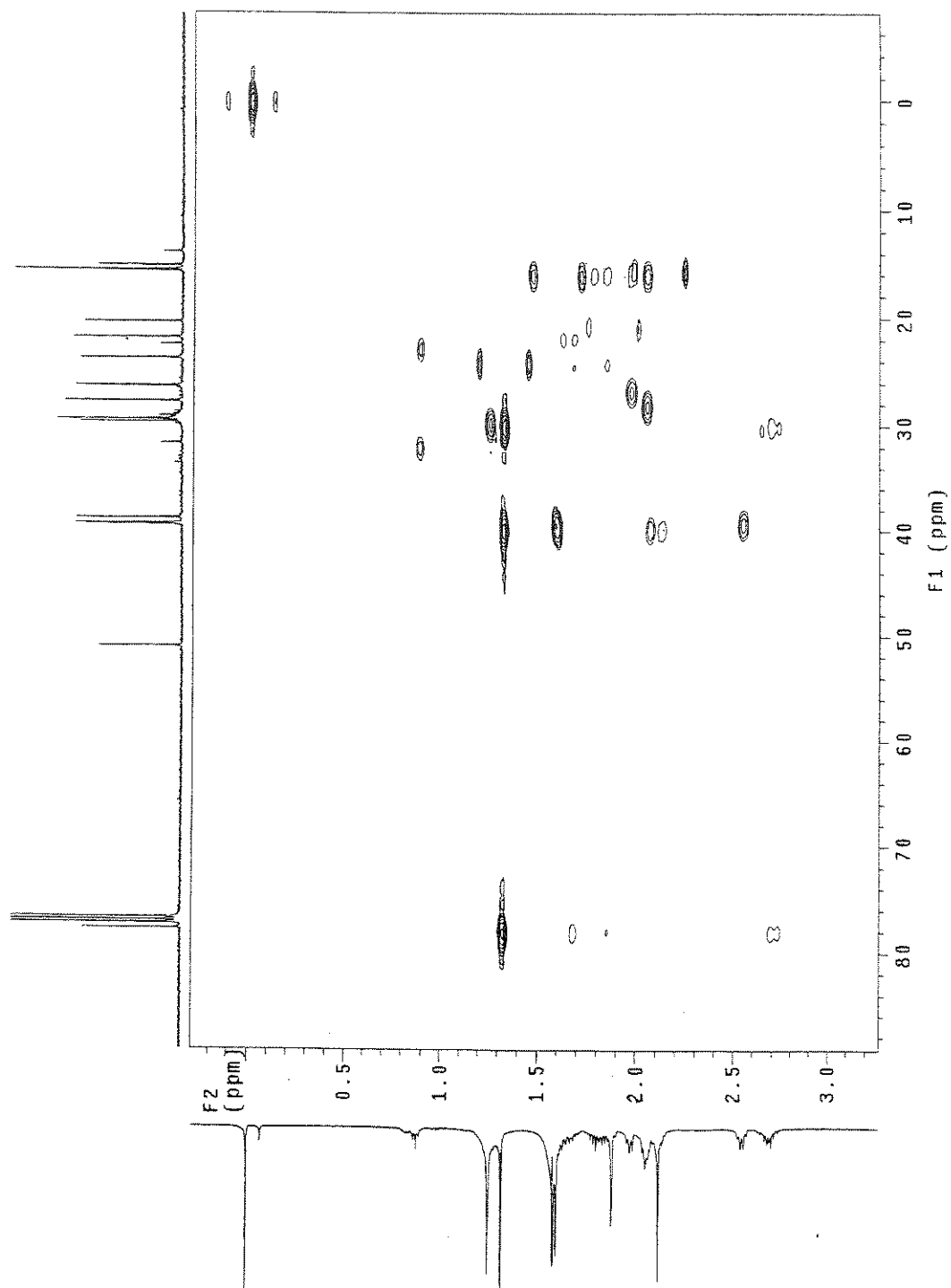
E-22 Espectro de RMN de ^1H (500 MHz). Experimento de diferença de NOE (NOESY 1D)



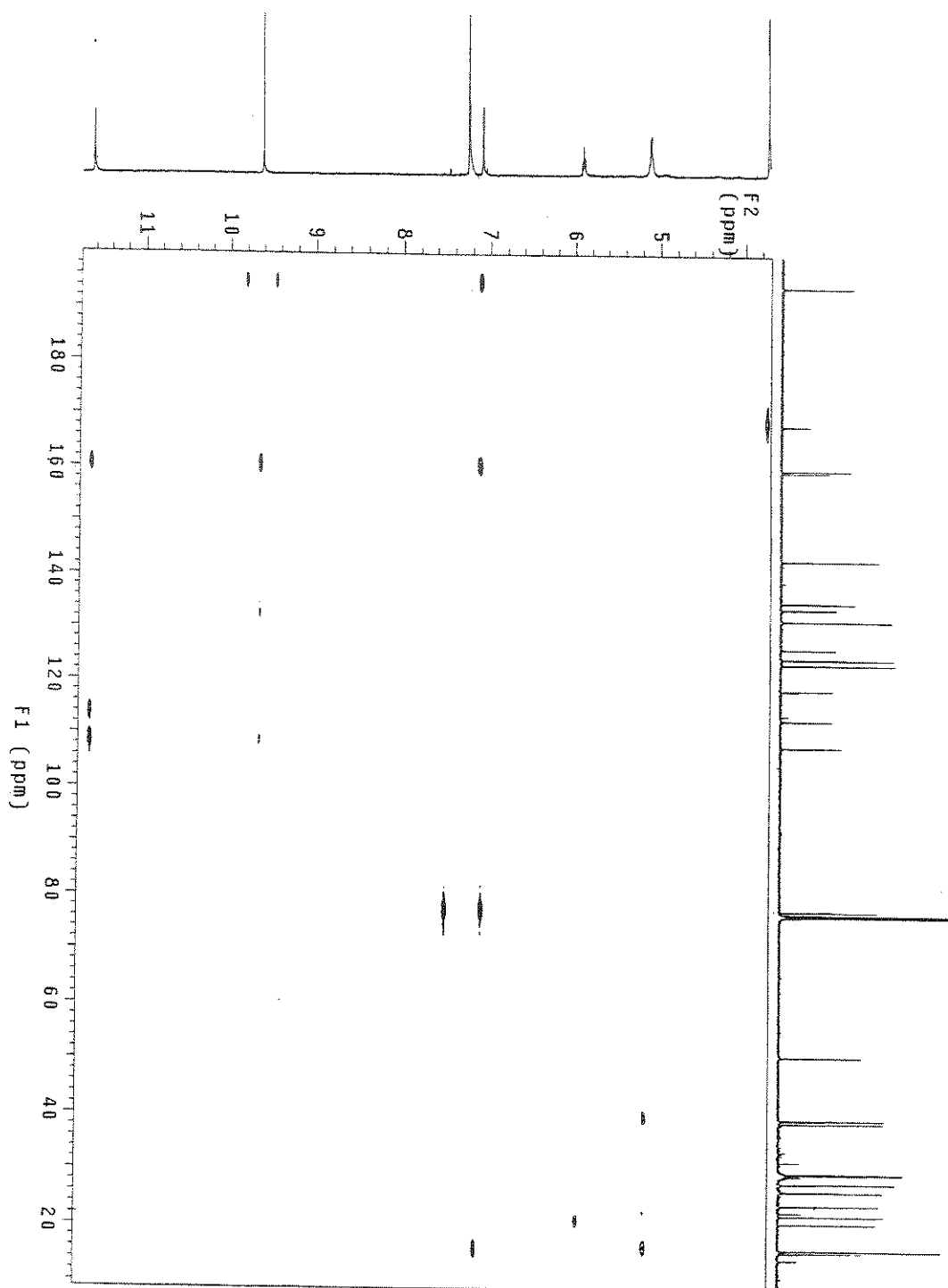
E-23 Espectro de RMN de ^1H (500 MHz). Experimento de diferença de NOE (NOESY 1D)



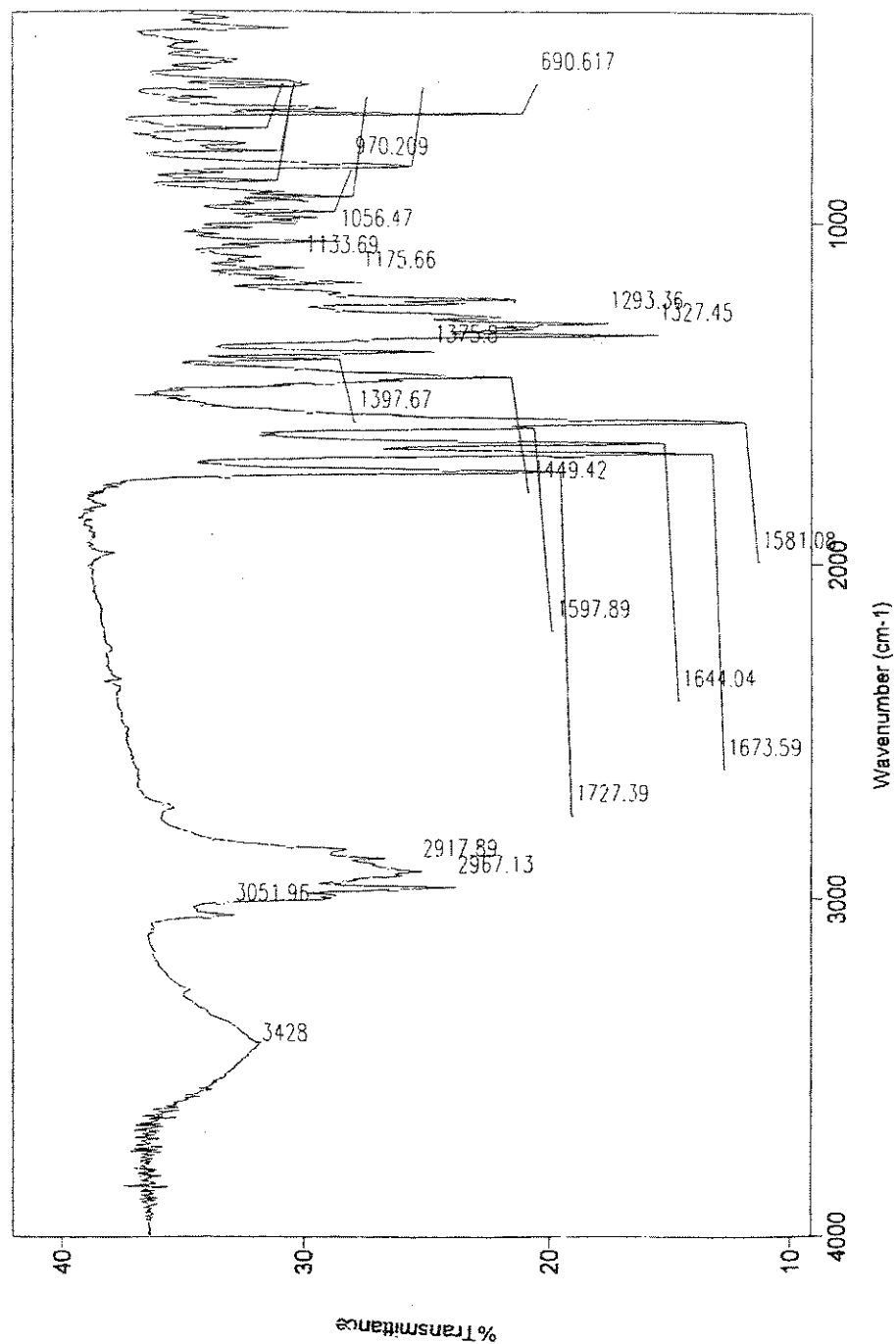
E-24 Espectro de RMN de 2D de correlação heteronuclear de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125,69 MHz) a múltiplas ligações (gHMBC, CDCl_3) do composto (**3**)



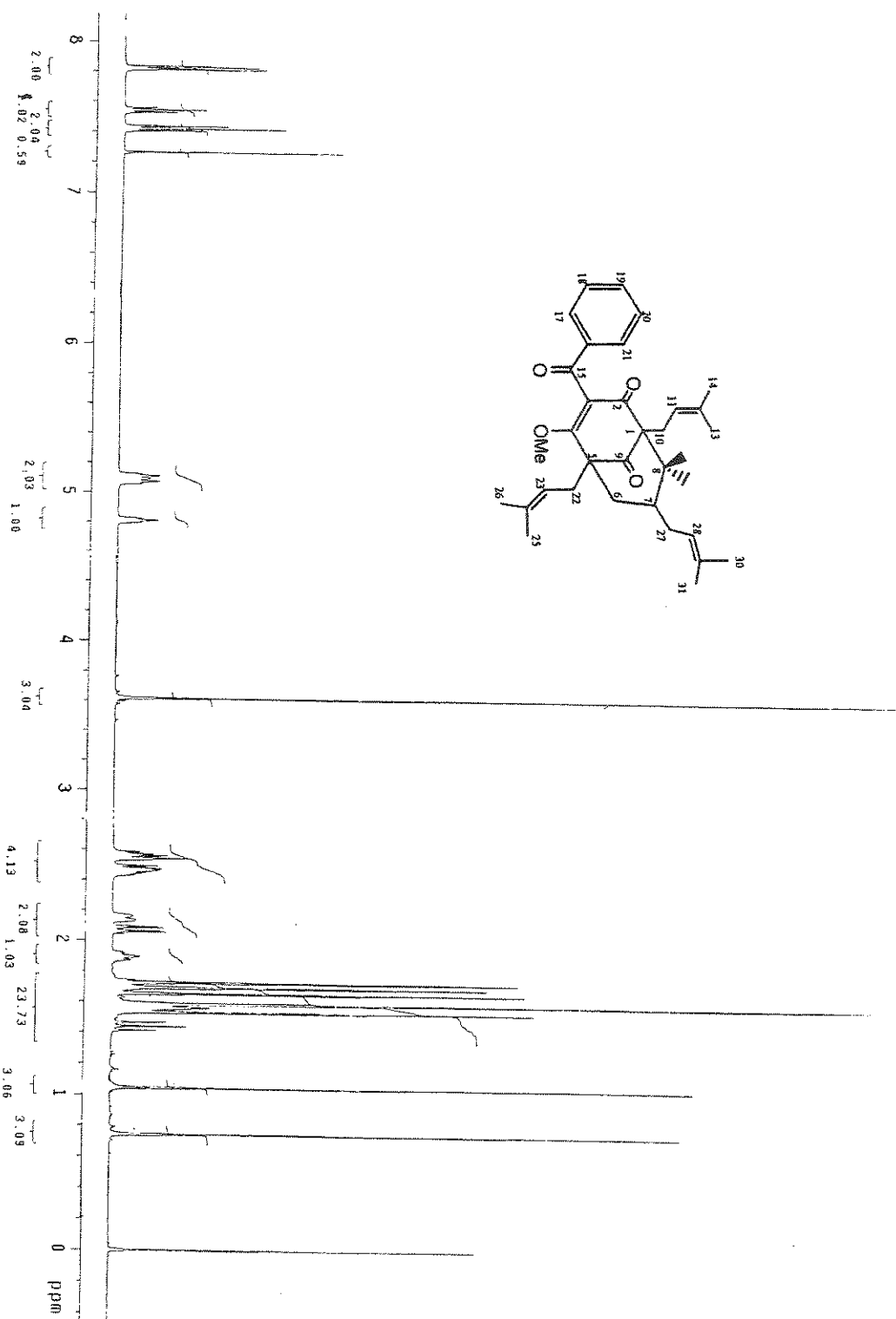
E-25 Expansão do espectro E-24 na região entre δ 1,0 - δ 3,0 (F2)



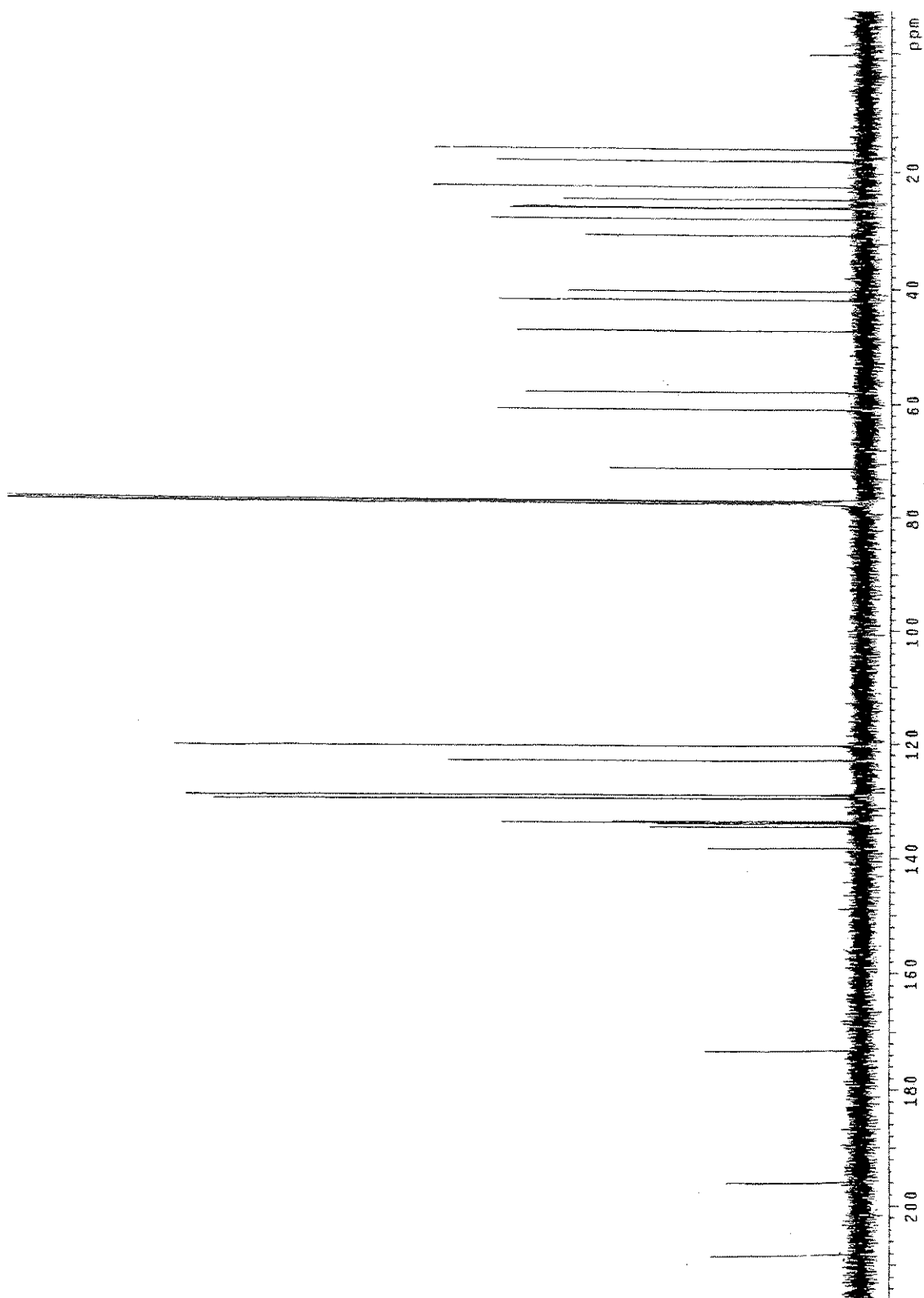
E-26 Expansão do espectro E-24 na região entre δ 3,8 - δ 11,6 (F2)



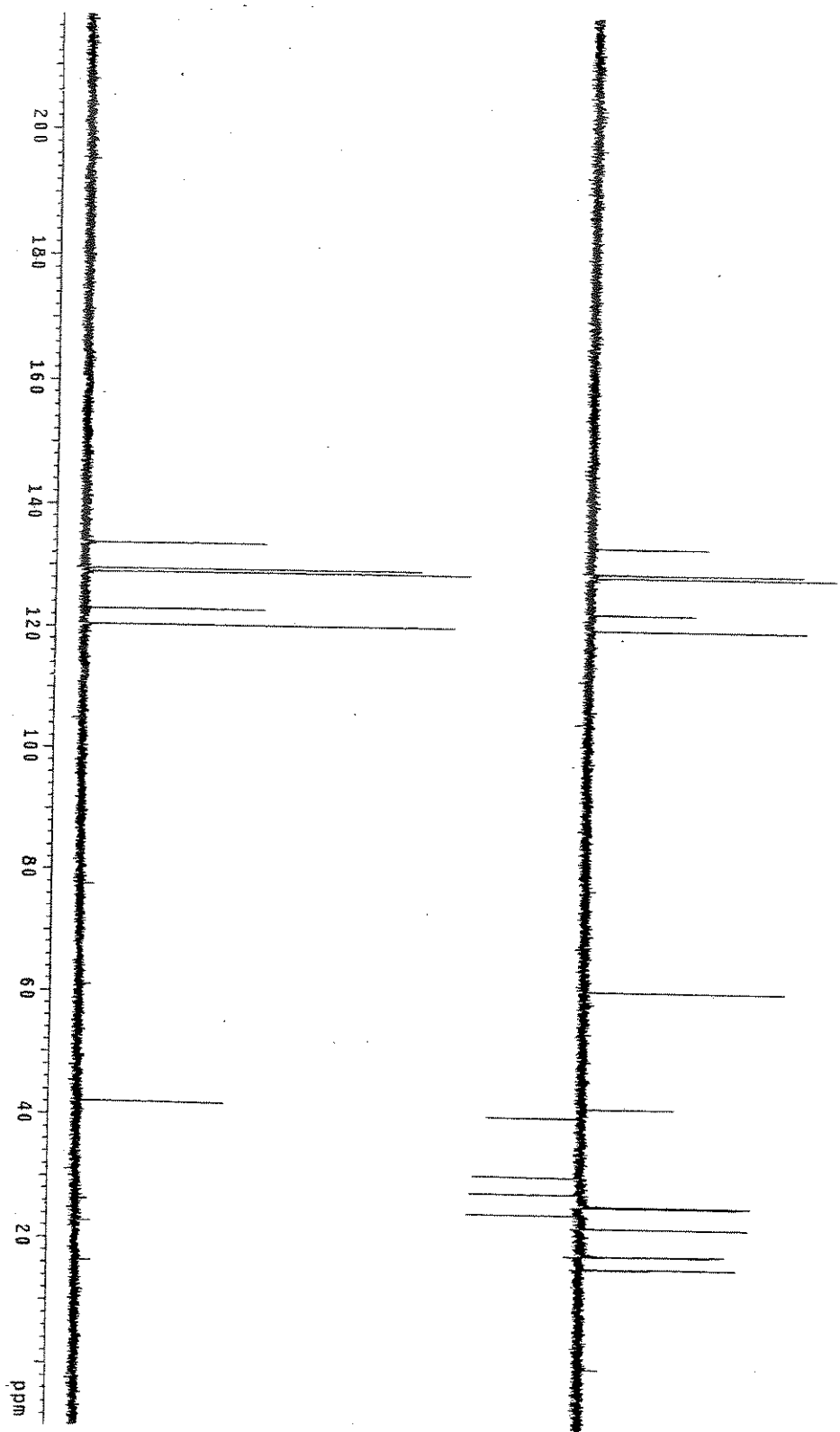
E-27 Espectro no Infravermelho (KBr) do composto (4)



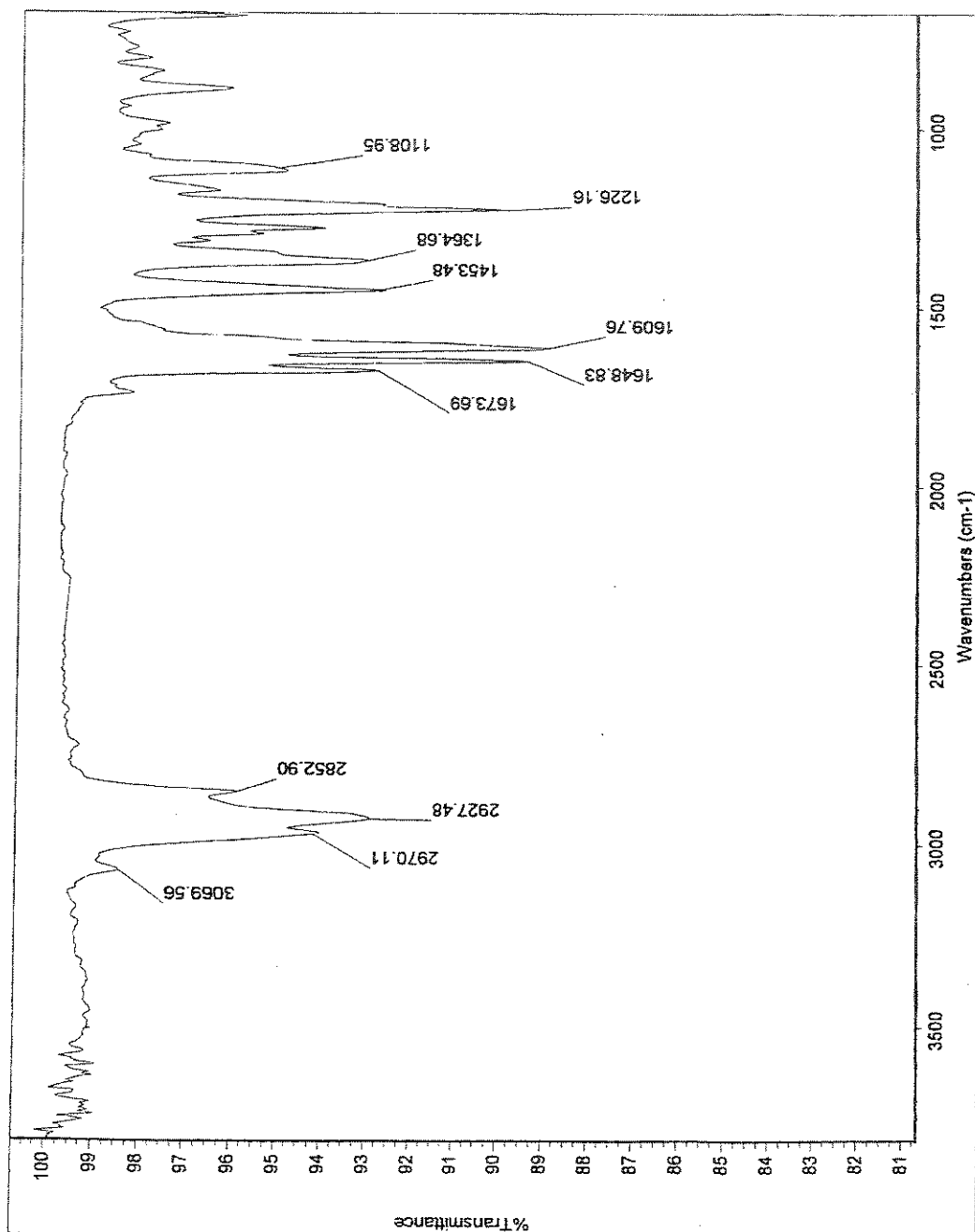
E-28 Espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) do composto (**4**)



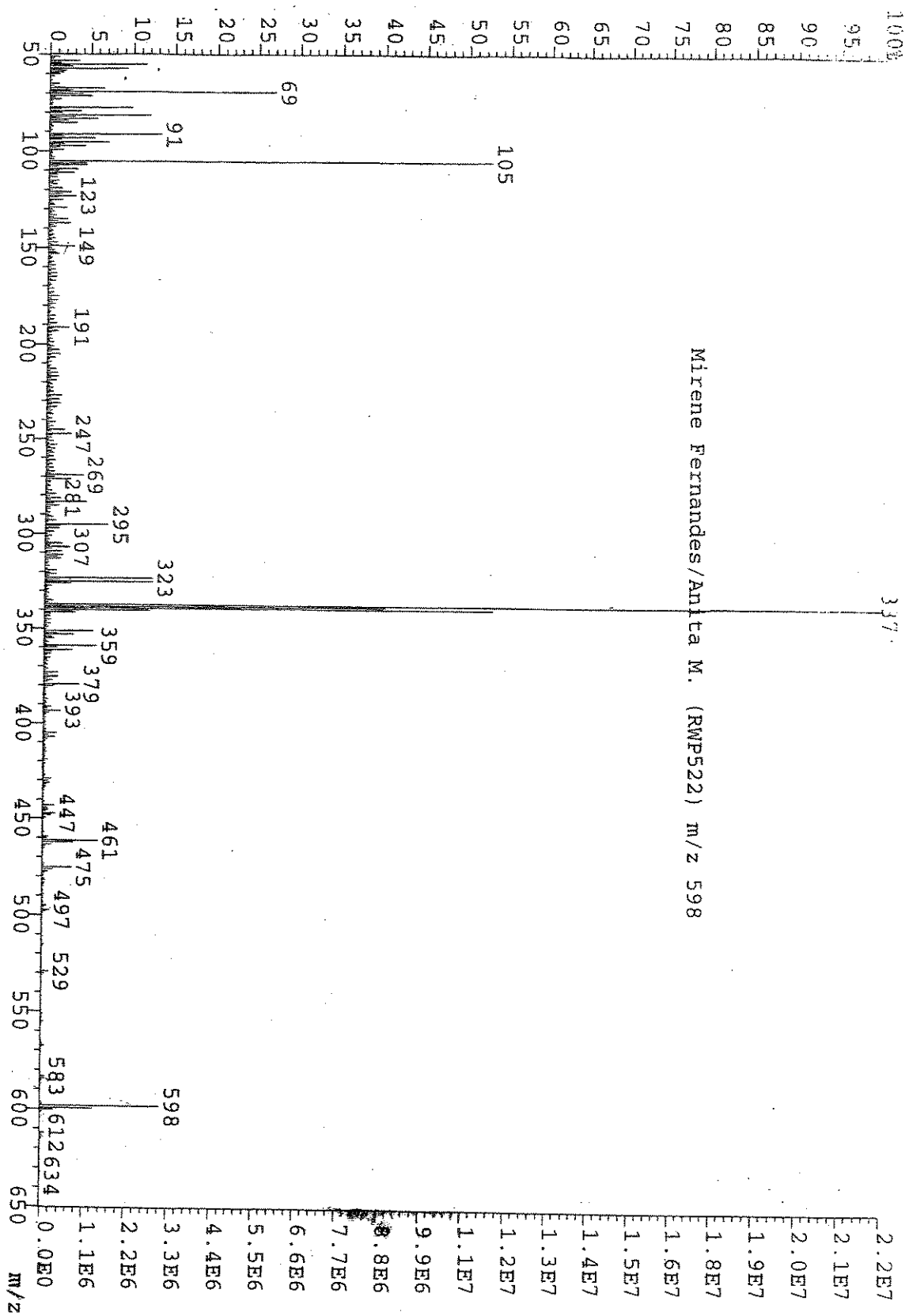
E-29 Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3) do composto (4)



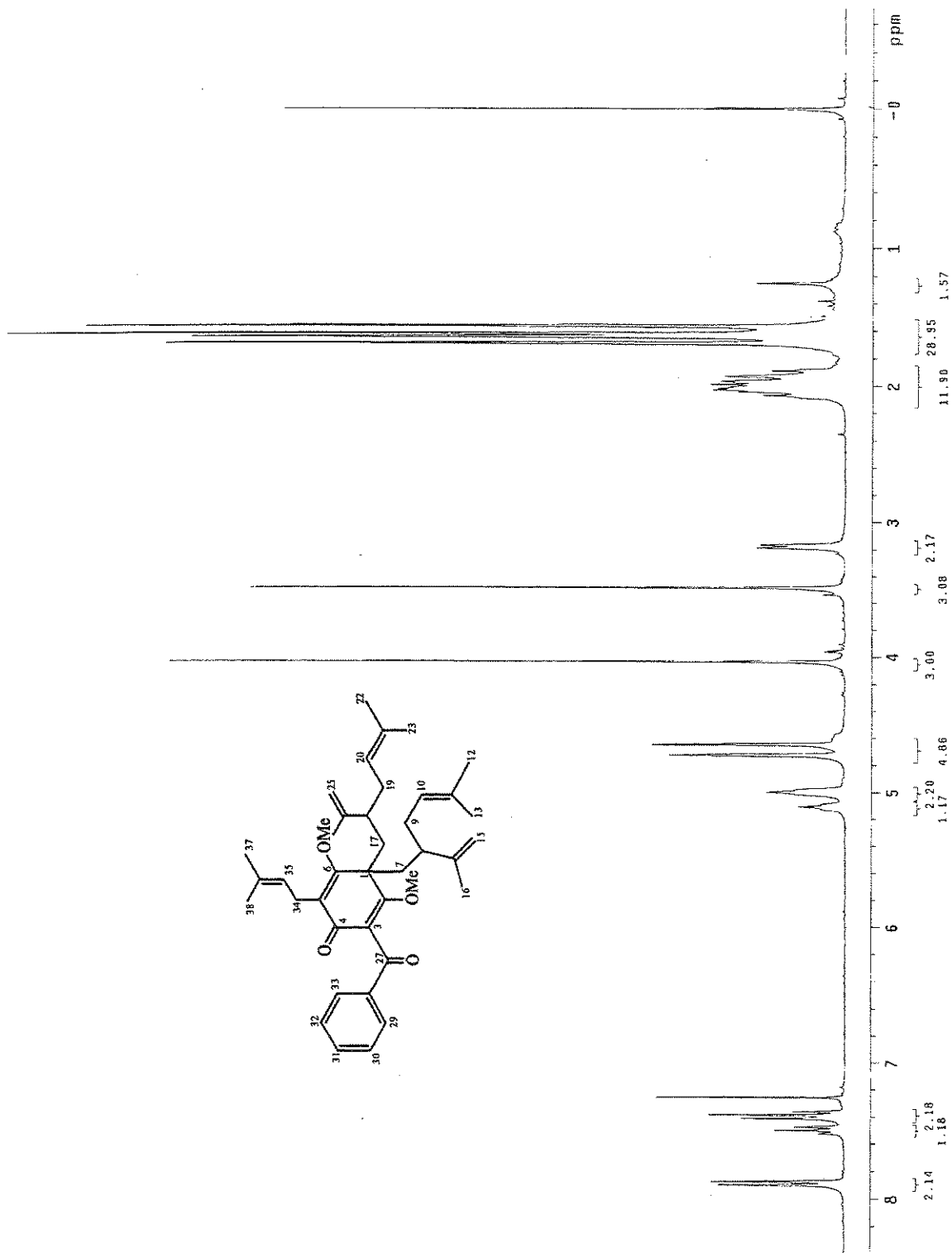
E-30 Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° (125,69 MHz, CDCl_3) do composto (4)



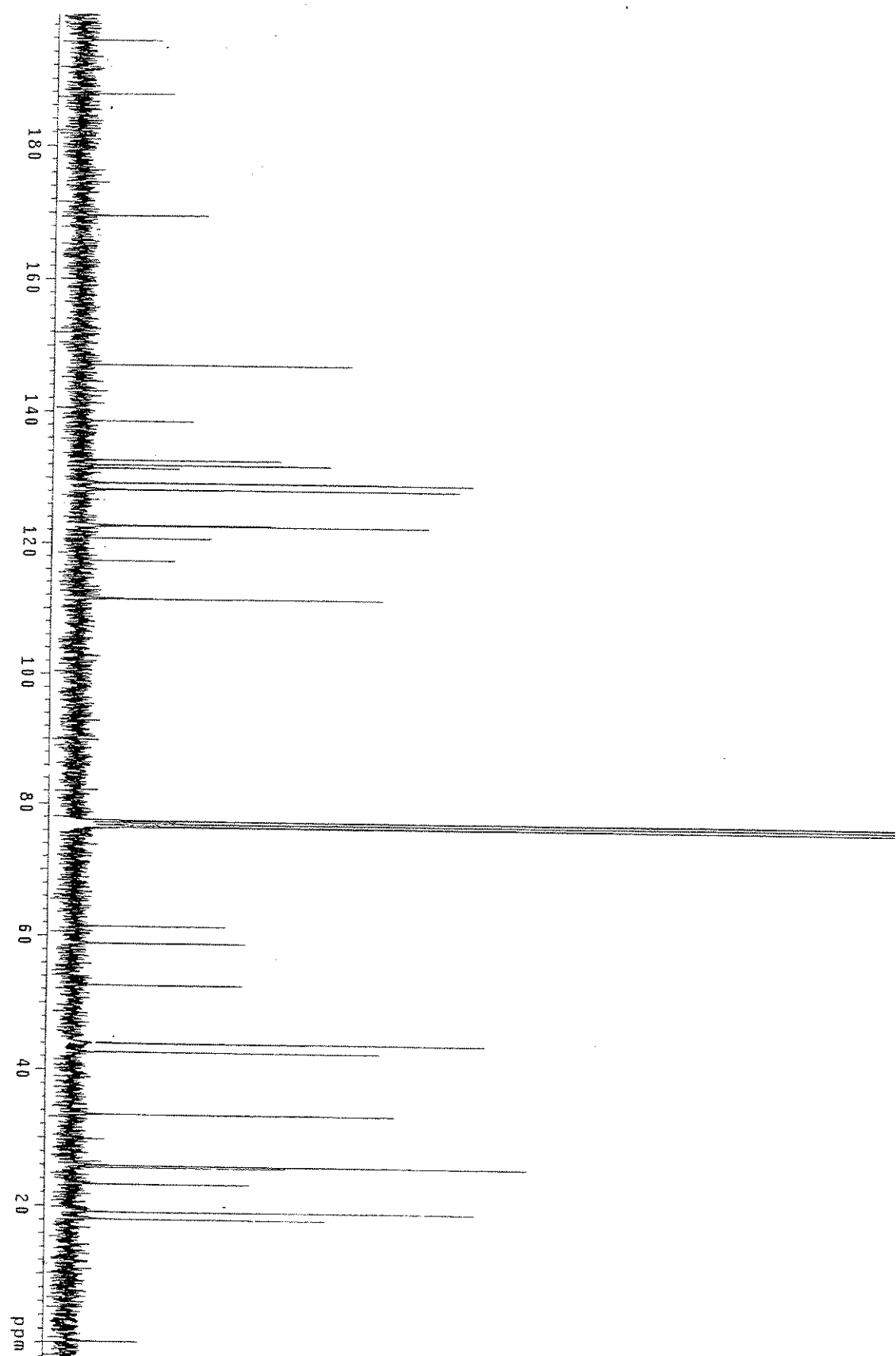
E-31 Espectro no Infravermelho (KBr) do composto (5)



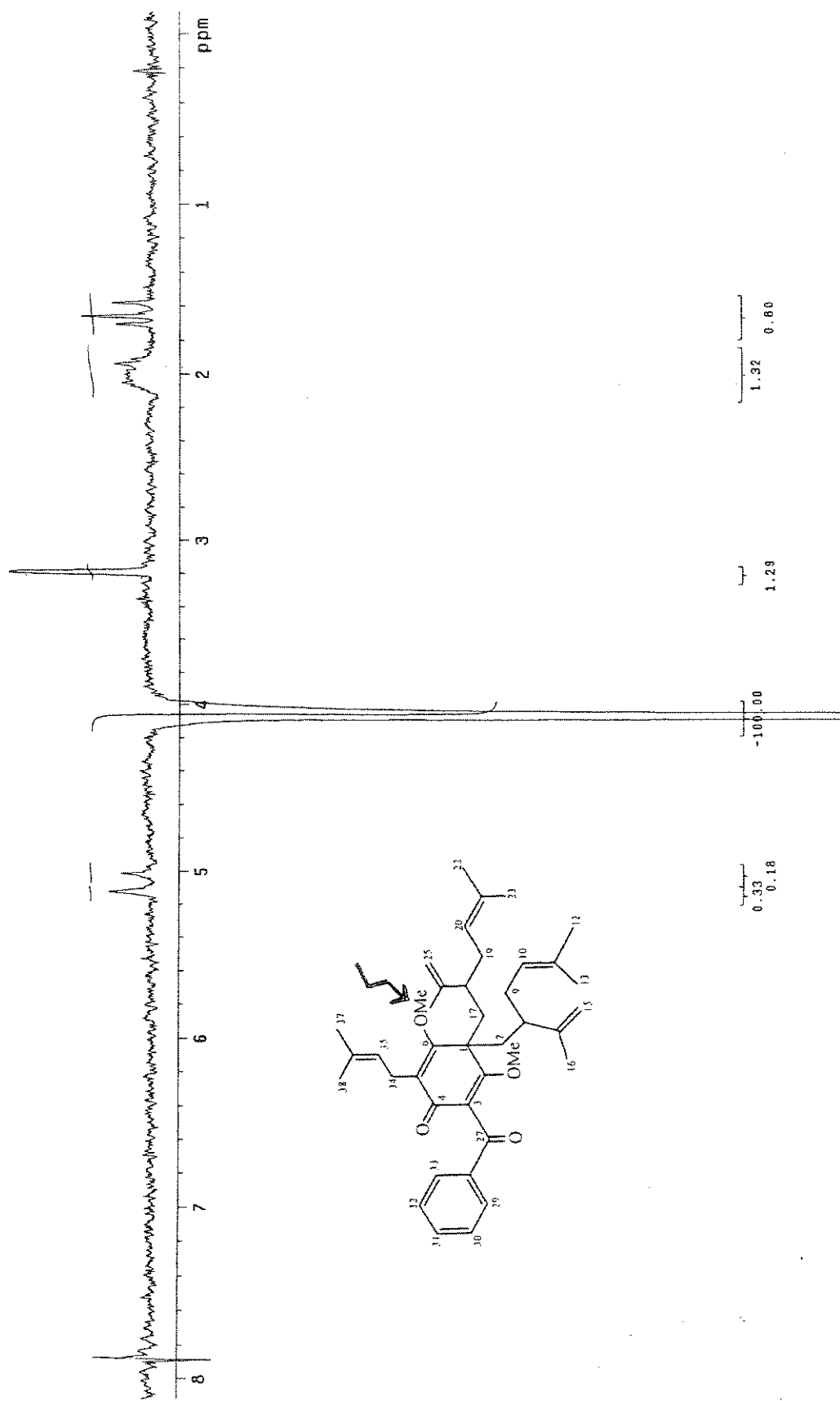
E-32 Espectro de Massas (IE, 70 eV) do composto (5)



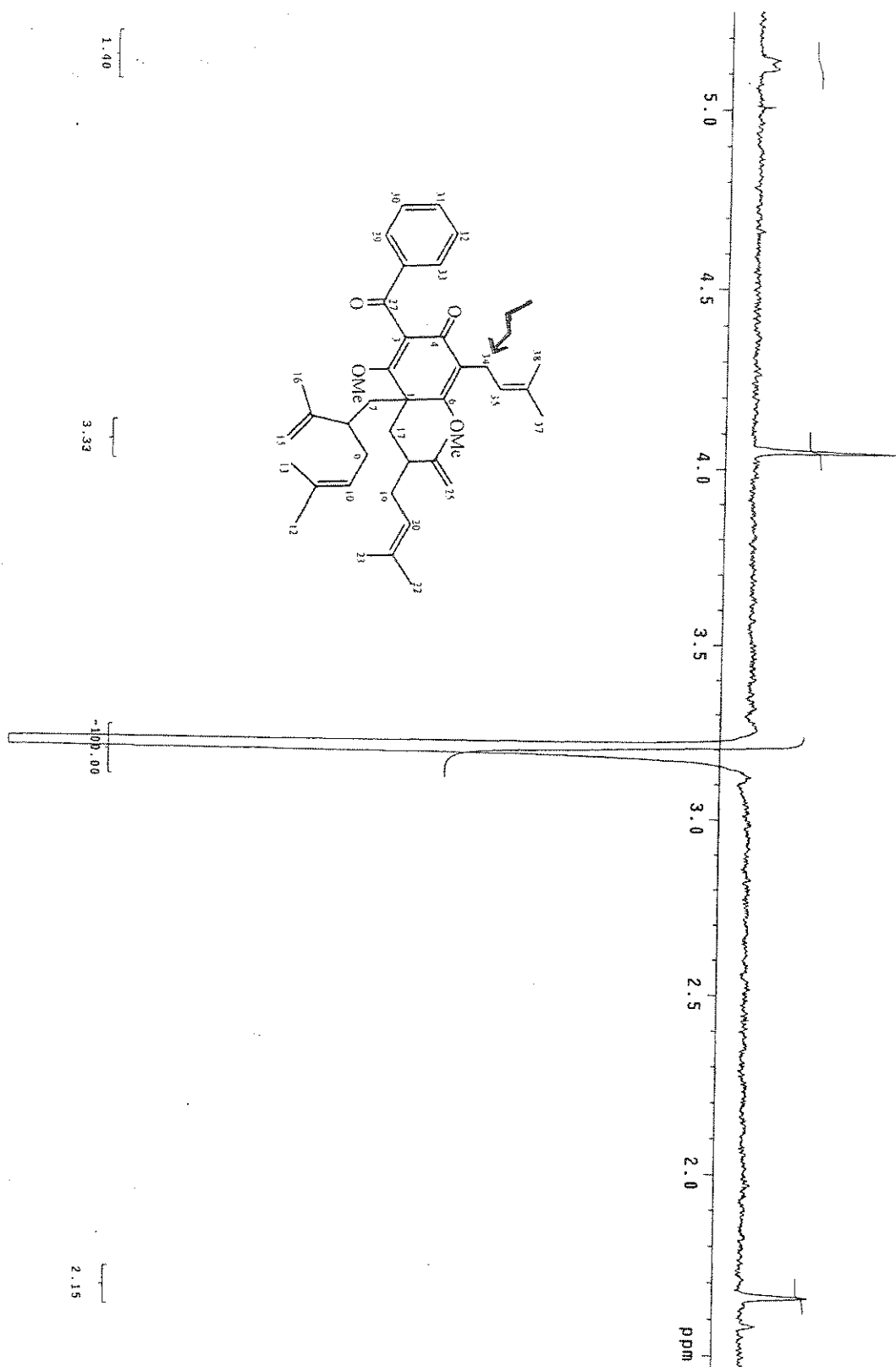
E-33 Espectro de RMN de ^1H (300MHz, CDCl_3) do composto (**5**)



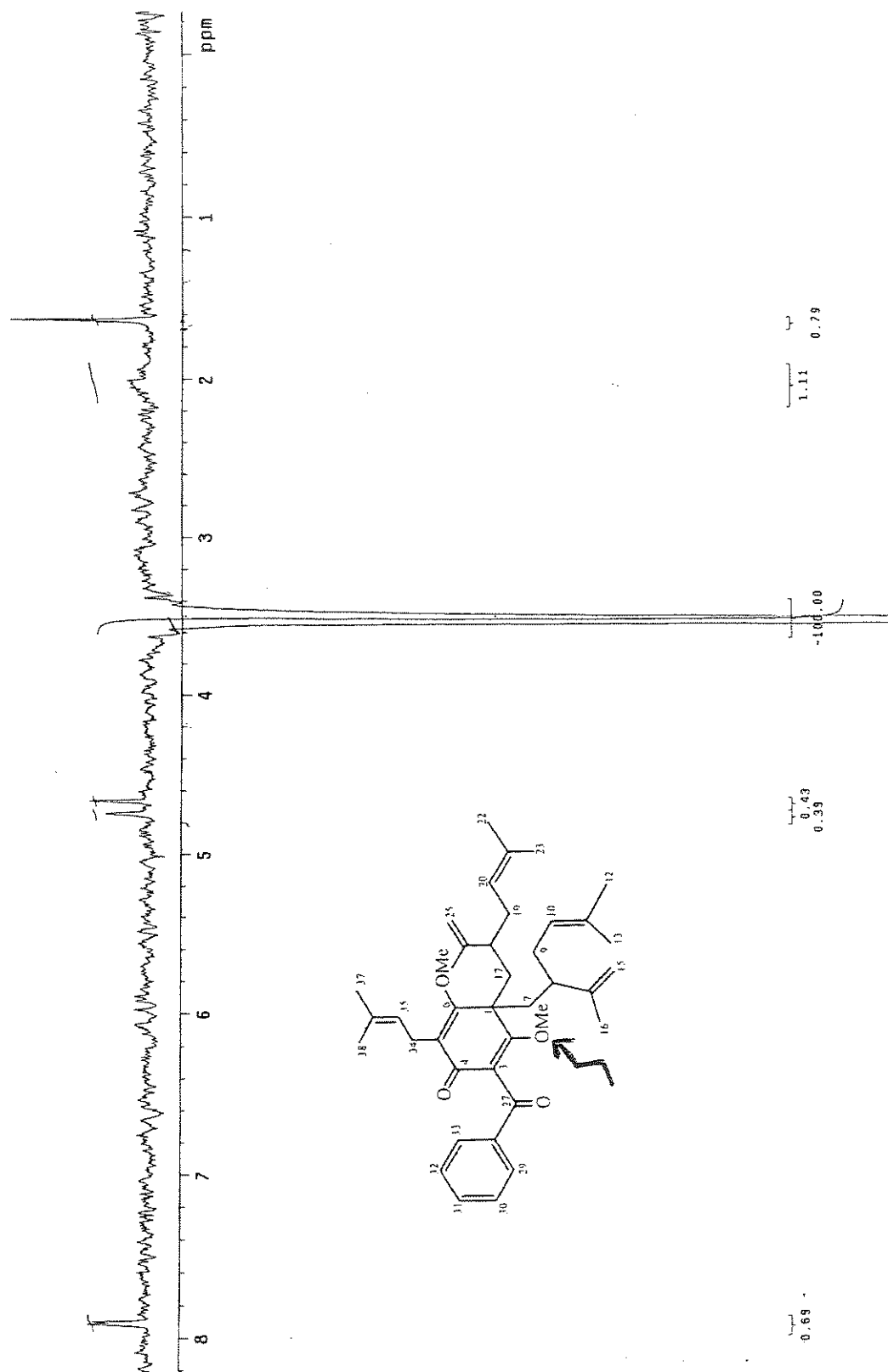
E-34 Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3) do composto (5)



E-35 Espectro de RMN de ^1H (500 MHz). Experimento de diferença de NOE (NOESY 1D)

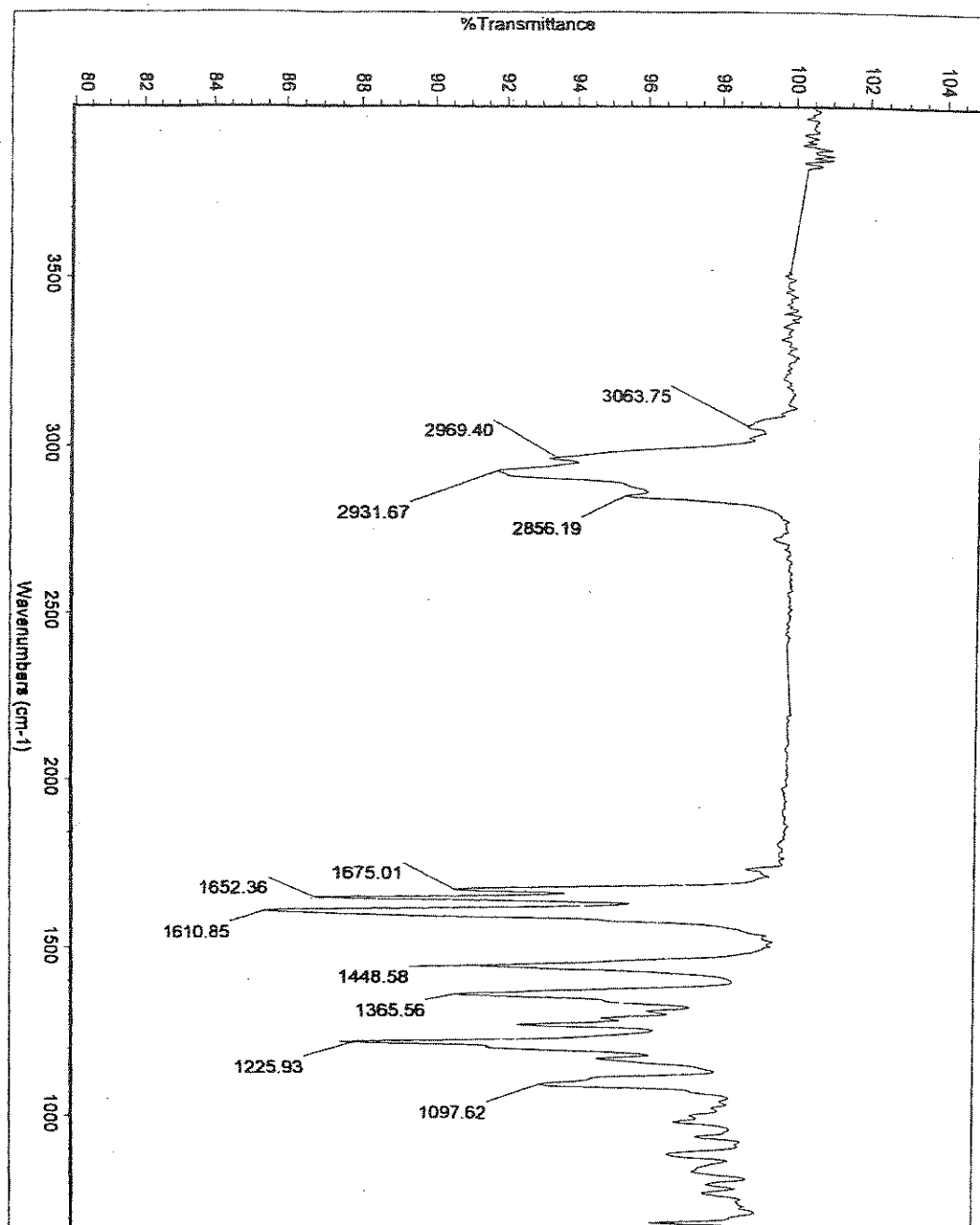


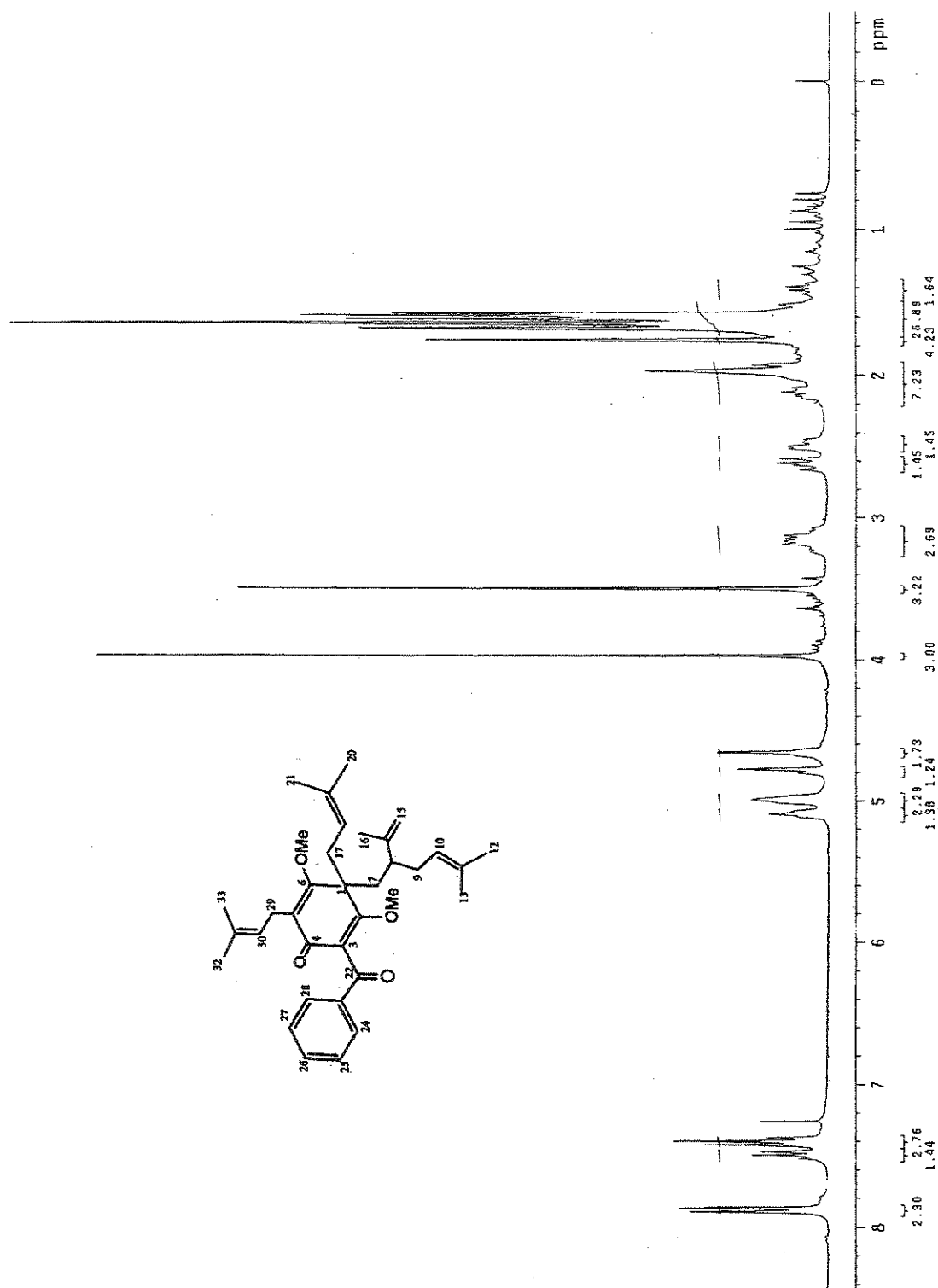
E-36 Espectro de RMN de ^1H (500 MHz). Experimento de diferença de NOE (NOESY 1D)



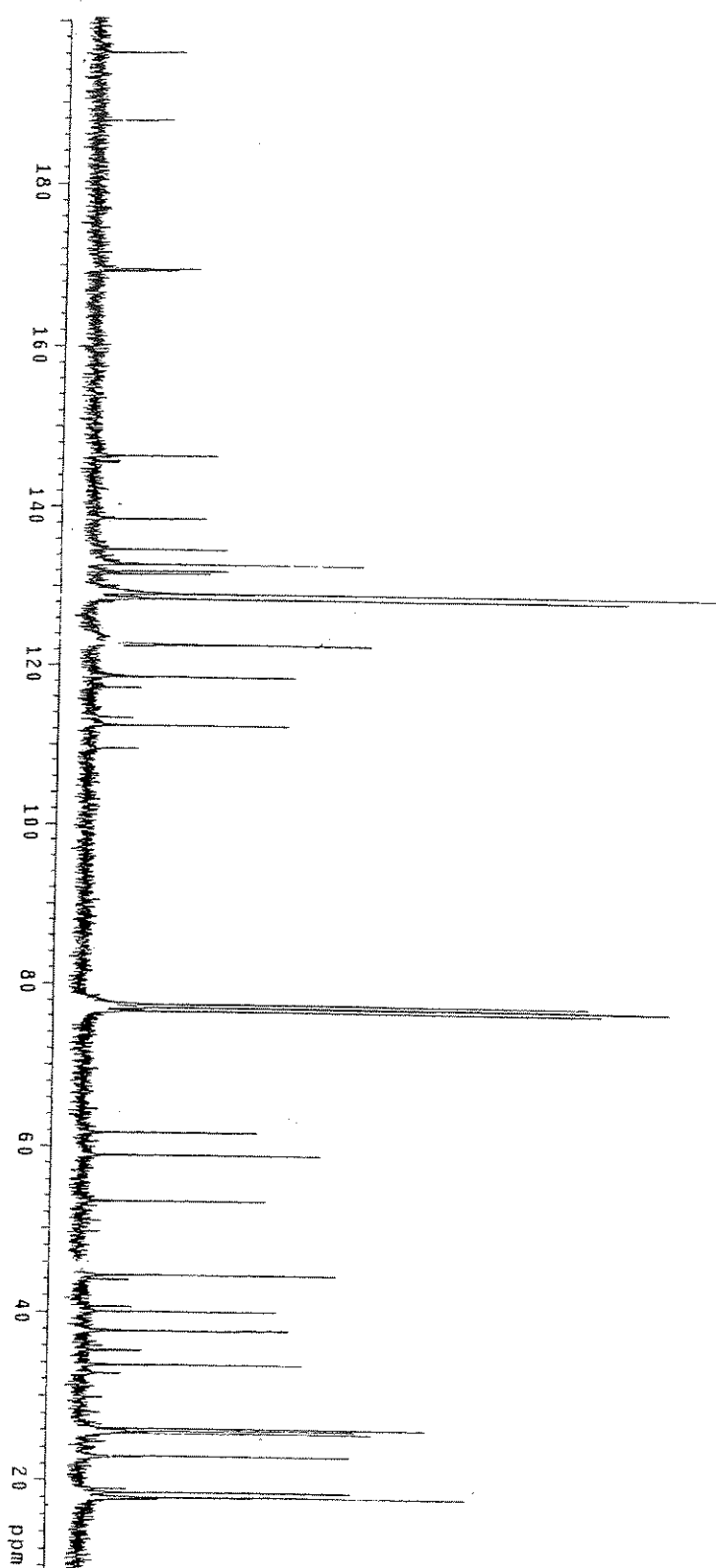
E-37 Espectro de RMN de ^1H (500 MHz). Experimento de diferença de NOE (NOESY 1D)

E-38 Espectro no Infravermelho (KBr) do composto (6)

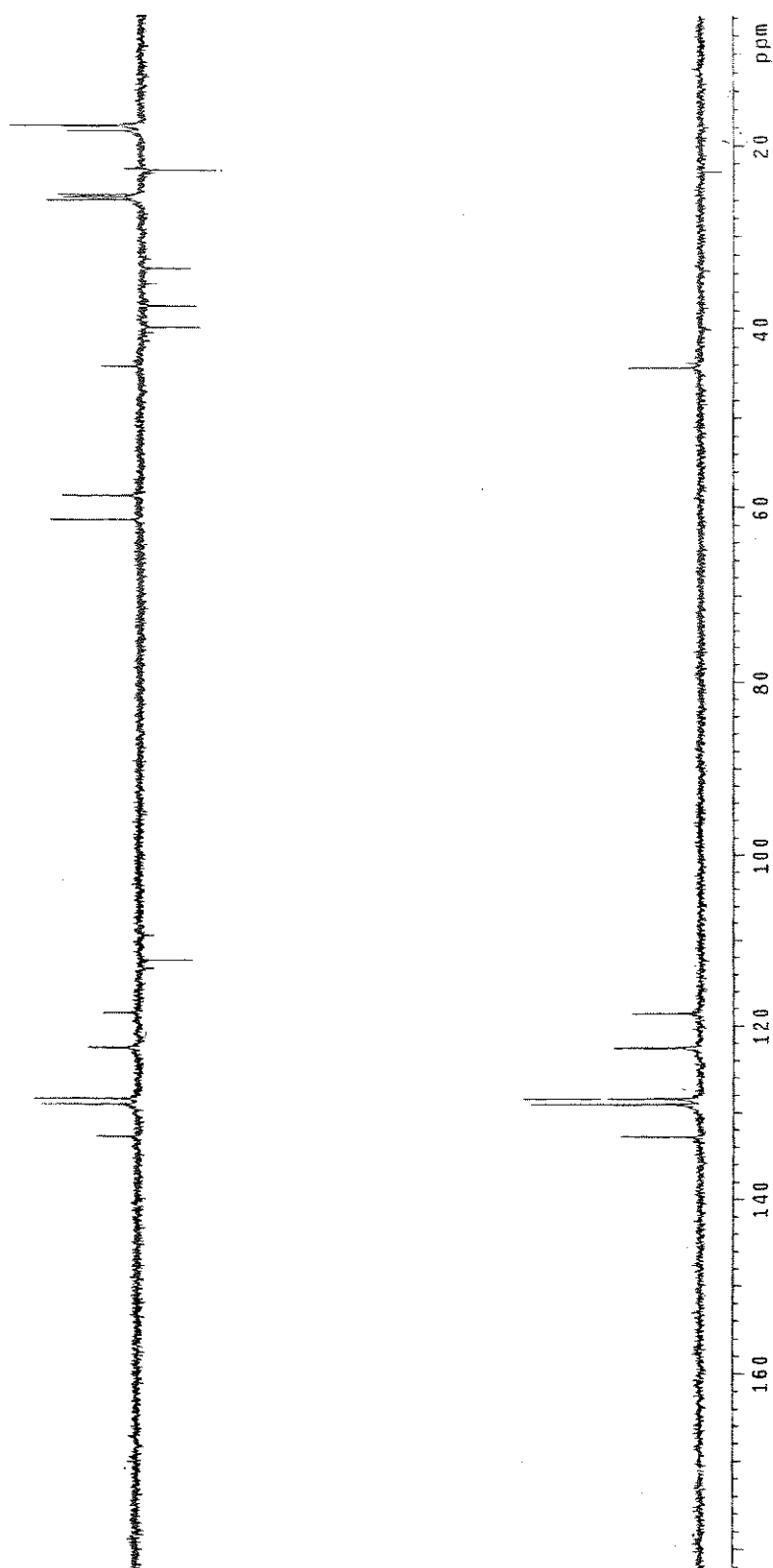




E-39 Espectro de RMN de ¹H (300MHz, CDCl₃) do composto (**6**)



E-40 Espectro de RMN de ^{13}C (125,69 MHz, CDCl_3) do composto (6)



E-41 Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° e DEPT 90° (125,69 MHz, CDCl_3) do composto **(6)**