

Universidade Estadual de Campinas - Unicamp

Instituto de Química

Departamento de Química Orgânica

TESE DE DOUTORADO

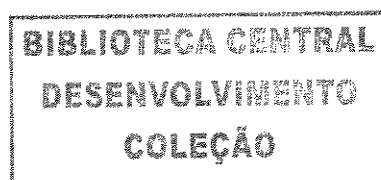
**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Himatanthus obovatus*
(Muell. Arg.). Woodson (APOCYNACEAE): Isolamento,
elucidação estrutural e atividade biológica.**

Valéria Bittencourt de Lima.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Marques Braga

Campinas - SP

Maio 2005



CHAMADA _____
 T/UNICAMP
 L 628e
 EX
 OMBO BCI 65894
 ROC. 16-2-00086-05
 C ☐ D ☒
 PREÇO 11,00
 DATA 05/10/04
 Nº CPD _____

ii

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

BIB ID - 365948

L628e Lima, Valéria Bittencourt de.
 Estudo fitoquímico de *Himatanthus obovatus* (Muell. Arg.) Woodson (APOCYNACEAE): isolamento, elucidação estrutural e atividade biológica / Valéria Bittencourt de Lima. -- Campinas, SP: [s.n], 2005.

Orientadora: Raquel Marques Braga.

Tese – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Lignanas. 2. *Himatanthus obovatus*. 3. Iridóides.
 4. Nor isoprenóides. I. Braga, Raquel Marques.
 II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Phytochemical studies of *Himatanthus obovatus* (Muell. Arg.) Woodson (Apocynaceae): isolation, structure elucidation and biological activity.

Palavras-chave em inglês: Lignans, *Himatanthus obovatus*, Iridoids, Nor isoprenoids.

Área de concentração: Química Orgânica.

Titulação: Doutora em Ciências.

Banca examinadora: Raquel Marques Braga (Presidente Orientadora), Vera Lúcia G. Rehder, Cecília Maria Alves de Oliveira, Eva Gonçalves Magalhães, Sebastião F. Fonseca.

Data de defesa: 13/05/2005.

Ao Celso (Txai) por ser minha metad

À Luisa por unir ainda mais nossas metades
mudar o rumo das nossas vidas....para muito melho

À Família Bittencourt (Wil, Bety, Dan e Dr
pela força, amor, carinho (e outras 1000 coisas!)

("Família, família, almoça junto todo dia, nunca perde essa mania, família...

Agradeço...

À Raquel, pela orientação e por ter me dado a possibilidade de entrar no "mundo da Fitoquímica".

Aos Profs. Drs. Eva, Cecília, Sebastião e Vera por aceitarem julgar este trabalho,

Aos amigos: Cáritas, Elias (desde 85), Lucília (e claro sua outra metade, Sergio), Marcelo, Paiva, Paulinho (também desde 85), Ray, Silvana, que tanto ajudaram: na bancada e na vida,

À Rita e à Valéria ("de Deus"), que com a alegria e a jovialidade delas nos fizeram mais alegres e jovens também,

Às botânicas (que se transformaram em grandes amigas) Ingrid, Andréa e Ângela que, além das coletas, nos ensinaram muito sobre as plantas...,

Aos Profs. Drs. Eva e Aderbal e às suas alunas: Ana Lúcia, Celira, Lourdes, Miriam e Valéria, pelos seminários, trocas de idéias, de artigos e pela possibilidade de realizarmos os testes de bioautografia juntas,

À Profa. Anita pela possibilidade de realizar os testes de bioautografia em seu laboratório,

Ao Dr. João Ernesto de Carvalho, à Luciana e à Márcia (CPQBA/Unicamp) pela realização dos ensaios de citotoxicidade,

Às Sonias do RMN que, com seus espectros, nos ajudaram a elucidar nossas "loucas" estruturas,

À Bel e ao André da CPG que com muito carinho e competência sempre nos ajudaram na parte burocrática,

Ao pessoal da biblioteca do IQ, em especial à Rose, que também com muita competência nos ajudaram tanto,

Aos funcionários do Instituto que, cada um a seu modo, facilitaram nosso dia-a-dia,

À Profa. Dra Carol Collins pela correção do artigo e do Abstract,

Ao CNPq pela bolsa concedida, ao FAEP-UNICAMP pelo custeio da viagem de coleta até o Mato Grosso e finalmente à FAPESP pelo dinheiro que nos garantiu a sobrevivência no laboratório.

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS

Valéria Bittencourt de Lima

Nascimento:- 12/07/66 - Casa Branca (SP)

FORMAÇÃO ACADÊMICA

✓ **Doutorado:-** Janeiro/1997 até a presente data

Projeto:- Estudo fitoquímico de *Himatanthus obovatus* (Apocynaceae): isolamento, elucidação estrutural e atividade biológica

Orientadora:- Profa. Dra. Raquel Marques Braga

Departamento de Química Orgânica - Instituto de Química - UNICAMP

Bolsa CNPq – 03/1997 a 02/2001

✓ **Mestrado:-** Março/1991 a Novembro/1994

Projeto:- Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C de alguns derivados ciclodecânicos

Orientadora:- Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

Departamento de Química Orgânica - Instituto de Química – UNICAMP

Bolsa CNPq – 03/1991 a 08/1993

✓ **Licenciatura e Bacharelado em Química** - 1985 a 1989

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

✓ **Tecnologia de Alimentos** - 1981 a 1983

Colégio Técnico de Campinas - COTUCA/UNICAMP

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

✓ **Projeto CNPq/RHAE:-** Fevereiro/1995 a Janeiro/1997

Projeto:- Aplicação da CGTase na produção de ciclodextrinas

Orientadora:- Profa. Dra. Terezinha de Jesus Garcia Salva

Laboratório de Fermentações Industriais - Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL)

Bolsa DTI/RHAE/CNPq - 02/1995 a 10/1996

✓ **Professora PIII:-** Março a Dezembro/1994 (Registro MEC:- 195.615 - LP)

EEPSG Dom Barreto e EEPSG Adalberto Nascimento – Campinas - SP

✓ **Pesquisadora Junior:-** Janeiro a Novembro/1990

Laboratório de Desenvolvimento - Planalquímica Industrial LTDA – Campinas - SP

✓ **Iniciação Científica:-** Janeiro/1988 a Dezembro de 1989

Projeto:- Obtenção de substratos quirais a partir do lanosterol

Orientadora:- Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

Departamento de Química Orgânica - Instituto de Química – UNICAMP

Bolsa FAPESP- 03/1989 a 12/1989

✓ **Estágio:-** Março a Agosto/1984

Projeto:- Determinação e quantificação de corantes em alimentos

Orientadora:- Profa. Dra. Maria Cecília de Figueiredo Toledo

Laboratório de Toxicologia de Alimentos - Engenharia de Alimentos - UNICAMP

PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS

✓ “Testes biológicos de extratos e de substâncias isoladas de *Himatanthus obovatus*”, V Jornada Paulista de Plantas Medicinais, 24 a 29 de setembro de 2001, UNESP - Botucatu - SP, Lima V. B., Braga R. M., Koch I. e Sartori A. L. B..

- ✓ "Estudo fitoquímico de *Plumeria rubra* L. (Apocynaceae)", V Jornada Paulista de Plantas Medicinais, 24 a 29 de setembro de 2001, UNESP - Botucatu - SP, Kepler A. F., Braga R. M., **Lima V. B.** e Spina A. P..
- ✓ "Phytochemical Study of *Himatanthus obovatus* (Apocynaceae)", 22nd IUPAC International Symposium on the Chemistry of Natural Products, 3 a 8 de setembro de 2000, Universidade Federal de São Carlos – SP, **Lima V. B.**, Braga R. M., Koch I. e Sartori A. L. B..
- ✓ "Estudo Fitoquímico de *Himatanthus obovatus*", 23^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 23 a 26 de maio de 2000, Poços de Caldas - MG, **Lima V. B.**, Braga R. M. e Koch I., PN117.
- ✓ "Nor-isoprenóides de *Himatanthus obovatus*", 22^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 23 a 26 de maio de 1999, Poços de Caldas - MG, **Lima V. B.**, Braga R. M. e Koch I..
- ✓ "Estudo Fitoquímico de *Himatanthus obovatus* (Apocynaceae)", XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 13 a 17 de outubro de 1998, Águas de Lindóia - SP, **Lima V. B.**, Braga R. M., Algodres A. A. e Koch I., PT 03.005.
- ✓ "Aplicação de ciclodextrina glicosiltransferase de *Bacillus circulans* nº 76 na produção de β -ciclodextrina", II Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - 10 a 14 de novembro de 1997, Universidade Estadual de Campinas – SP, Salva T. J. G. e **Lima V. B.**..
- ✓ "Isolamento e seleção de bactéria produtora de ciclodextrina glicosiltransferase", XV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 4 a 7 de agosto de 1996, Poços de Caldas – MG, Salva T. J. G., **Lima V. B.** e Pagan A. P., resumo 221.
- ✓ "Dynamic NMR Spectroscopy of seco-lanostanes", 19th IUPAC Symposium on the Chemistry of Natural Products, 16 a 20 de janeiro de 1994, Karachi – Paquistão, **Lima V. B.**, Fujiwara F. Y. e Marsaioli A. J., página 205.
- ✓ "Estudo espectroscópico de um sistema ciclodecânico envolvendo troca conformacional lenta", IV Encontro de Usuários de RMN - AUREMN, 11 a 15 de maio de 1993, Angra dos Reis - RJ, **Lima V. B.**, Fujiwara F. Y. e Marsaioli A. J., página 89.
- ✓ "Estudo espectroscópico de 8,9-seco e 8,9-seco-7,9-ciclolanostanos", 15^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - SBQ, 27 a 31 de maio de 1992, Caxambu - MG, **Lima V. B.**, Marsaioli A. J. e Rehder V. G., QO110.

CURSOS EXTRACURRICULARES

- ✓ "Métodos Farmacológicos utilizados na validação de Plantas Medicinais com atividade no sistema nervoso central, com atividade antiviral e com atividade anticancerígena", durante o XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 13 a 17 de outubro de 1998, Águas de Lindóia - SP.
- ✓ "Métodos Farmacológicos utilizados na validação de Plantas Medicinais com atividades analgésica/antiinflamatória, com atividade cardiovascular e com atividade gastrointestinal", durante o XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 13 a 17 de outubro de 1998, Águas de Lindóia - SP.
- ✓ "RMN em 2D e 3D", 10 a 12 de agosto de 1998, no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas - SP.
- ✓ "Two Dimensional Nuclear Magnetic Resonance (NMR)", Centro de Pesquisas da Petrobrás - CENPES, 06 a 13 de agosto de 1992, Rio de Janeiro - RJ.

ARTIGO PUBLICADO

✓ Terezinha de Jesus Garcia Salva, **Valéria Bittencourt de Lima**, Alessandra Perterlini Pagan, **1997**, "Screening of alkalophilic bacteria for cyclodextrin glycosyltransferase production", *Revista de Microbiologia* 28, 157-164.

ARTIGO SUBMETIDO

✓ **Valéria Bittencourt de Lima**, Raquel Marques Braga, Andréa Pozetti Spina e Luiza Sumiko Kinoshita, "Relationship between the chemical and the botanical date of *Himatanthus obovatus* (Apocynaceae)", artigo submetido em 08/03/2005 a *Biochemical Systematics and Ecology*, Elsevier ID N° BSE_raquel.AT.iqm.unicamp.br_20050308/1, Paper BSE/2567.

ARTIGO EM ELABORAÇÃO

✓ **Valéria Bittencourt de Lima**, Raquel Marques Braga, João Ernesto de Carvalho, Luciana Konecny Kohn e Márcia A. Antonio, "Brine shrimp, anticancer and bioautography assays of extracts and isolated compounds from *Himatanthus obovatus* (Apocynaceae)"

RESUMO

Palavras-chave: - *Himatanthus obovatus*, lignanas, iridóides, nor-isoprenóides

Nosso trabalho tem por objetivo o isolamento e a elucidação estrutural dos metabólitos secundários de *Himatanthus obovatus* (família Apocynaceae, sub-família Rauvolfioideae). Apenas cinco espécies de *Himatanthus* já foram estudadas do ponto de vista químico. O material de *H. obovatus* utilizado nesse trabalho foi coletado na Chapada dos Guimarães (MT) e em Casa Branca (SP). Utilizando diferentes metodologias de extração e tratamento dos extratos etanólicos brutos foram isoladas 5 lignanas: pinoresinol, isolariciresinol, hidroxipinoresinol, lariciresinol e olivil; 3 nor-isoprenóides: blumenol C, blumenol A e um nor-isoprenóide inédito; o iridóide plumieride, misturas dos terpenos: acetato de lupeol + acetato de α -amirina + acetato de β -amirina + germanicol e stigmasterol + β -sitosterol + campesterol e, após a acetilação do extrato etanólico bruto, o glicitol inositol. Os extratos Diclorometânico (CDCb) e Etanólico (CECb) da casca de *H. obovatus* (Casa Branca (SP)) foram submetidos aos testes com *Artemia salina* Leach. e de atividade antiproliferativa frente à 4 linhagens celulares derivadas de tumores humanos: leucemia (K562), pulmão (NCI460), melanoma (UACC62) e mama (MCF7). Os resultados dos dois testes foram bastante coerentes, já que ambos mostraram resultados promissores para o extrato CDCb. Os testes de bioautografia foram realizados com os extratos da casca de *H. obovatus* (Casa Branca): CHCb (heptano), CDCb (diclorometano) e CECb (etanol) e com as substâncias isoladas: pinoresinol, isolariciresinol, blumenol C, blumenol A, nor-isoprenóide inédito, hidroxipinoresinol, lariciresinol, plumieride e inositol, frente aos fungos: *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Candida albicans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium oxysporium*, *Penicillium oxalicum*, *P. funicullosum* e *Rhizopus orizae*. e frente às bactérias: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurim*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. Foram observadas atividades bactericida para as lignanas: isolariciresinol frente à bactéria *S. mutans* e lariciresinol frente à bactéria *S. aureus*. Os compostos isolados de *H. obovatus* permitiram comparar filogeneticamente este gênero aos gêneros *Tabernaemontana* e *Rauvolfia* (pertencentes às mesmas família e sub-família), estudados anteriormente em nosso grupo de pesquisas e ricos em alcalóides indólicos.

ABSTRACT

Key words - *Himatanthus obovatus*, lignans, iridoids, nor-isoprenoids,

Our objective is the isolation and identification of the compounds from *Himatanthus obovatus* (family Apocynaceae and sub-family Rauvolfioideae). Five species from genus *Himatanthus* have been chemically studied. *H. obovatus* was collected in Chapada dos Guimarães (MT state, Brazil) and in Casa Branca (SP state, Brazil). We used different methodologies for extraction and purification of the extracts, yielding 5 lignans: pinoresinol, isolariciresinol, hydroxypinoresinol, lariciresinol and olivil; 3 nor-isoprenoids: blumenol C, blumenol A and one unknown nor-isoprenoid; the iridoid plumieride, a mixture of terpenes: lupeol acetate + α -amirin acetate + β -amirin acetate + germanicol and stigmasterol + β -sitosterol + campesterol and, after acetylation of the crude ethanolic extract, the glycitol inositol. The diclorometanic (CDCb) and ethanolic (CECb) extracts from the bark of *H. obovatus* (Casa Branca - SP) have been tested with *Artemia salina* Leach. and for antiproliferative activity against 4 carcinoma cell lines derived from human cancer: leukemia (K562), lung (NCI1460), melanoma ((UACC62) and breast (MCF7).. The good results with the CDCb extract in both tests suggest that this extract is a development candidate. The Bioautography tests were made with the heptanic (CHCb), diclorometanic (CDCb) and ethanolic (CECb) extracts from the bark of *H. obovatus* (Casa Branca - SP) and with the isolated substances: pinoresinol, isolariciresinol, blumenol C, blumenol A, the unknown nor-isoprenoid, hydroxypinoresinol, lariciresinol, plumieride and inositol against the fungi: *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Candida albicans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium oxysporium*, *Penicillium oxalicum* *P. funicullosum* and *Rhizopus orizae* and against the bacteria: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurim*, *Staphilococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. We observed bactericide activity at the lignans: isolariciresinol against the bacteria *S. mutans* and lariciresinol against the bacteria *S. aureus*. The compounds isolated from *H. obovatus* allowed us to phylogenetically compare this genus to the genera *Tabernaemontana* and *Rauvolfia* (belonging to the same family and sub-family), previously studied in our group and rich in indolic alkaloids.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	;
Índice de tabelas	x
Índice de figuras	:
Índice de esquemas	>
Índice de espectros	x
1. Introdução	
1.1. A família Apocynaceae e o gênero <i>Himatanthus</i>	
1.2. A família Apocynaceae e os alcalóides indólicos	
1.3. Revisão bibliográfica do gênero <i>Himatanthus</i>	
1.4. Etnofarmacognosia, estudo químico e atividade biológica	
1.4.1. <i>Himatanthus obovatus</i>	
1.4.2. <i>Himatanthus sucuuba</i>	
1.4.3. <i>Himatanthus phagedaenicus</i>	
1.5. Classes de compostos isoladas do gênero <i>Himatanthus</i> e sua biossíntese	
1.5.1. Lignanas	
1.5.2. Iridóides	
1.5.3. Nor-isoprenóides	:
1.5.4. Terpenos	:
1.5.5. Inositóis	:
1.6. Ensaio biológicos	:
1.6.1. Teste de letalidade utilizando <i>Artemia salina</i> Leach. (Brine shrimp)	:
1.6.2. Testes de bioautografia	:
1.6.3. Testes de atividade antiproliferativa	:
2. Objetivos	:
3. Parte Experimental	:
3.1. Materiais e métodos	:
3.2. Coleta do material botânico	:
3.3. Obtenção e purificação dos extratos	:
3.3.1. Obtenção do extrato etanólico das folhas de <i>H. obovatus</i> (Chapada dos Guimarães – MT) e tratamento ácido-base	:
3.3.1.A. Purificação do extrato FDA (Folhas, Diclorometano, Ácido)	:
3.3.1.B. Purificação do extrato FDN (Folhas, Diclorometano, Neutro)	:
3.3.1.C. Purificação do extrato FDB (Folhas, Diclorometano, Básico)	:

	X
3.3.2. Obtenção do extrato etanólico da casca + caule de <i>H. obovatus</i> (Chapada dos Guimarães - MT)	3
3.3.2.A. Tratamento ácido do extrato etanólico da casca + caule de <i>H. obovatus</i> (Chapada dos Guimarães - MT)	3
3.3.2.A.a. Purificação do extrato CPA (Casca + caule, Ácido)	3
3.3.2.B. Partição do extrato etanólico da casca + caule (item 3.3.2.) de <i>H. obovatus</i> (Chapada dos Guimarães - MT)	4
3.3.2.B.a. Purificação do extrato CDCh (Casca + caule, Diclorometano, Chapada dos Guimarães) de <i>H. obovatus</i>	4
3.3.3. Obtenção do extrato etanólico da casca de <i>H. obovatus</i> coletada em Casa Branca (SP)	4
3.3.3.A. Purificação do extrato CDCb (Casca, Diclorometano, Casa Branca) de <i>H. obovatus</i>	4
3.3.3.B. Purificação do extrato CECb (Casca, Etanol, Casa Branca) de <i>H. obovatus</i>	5
3.3.4. Acetilação do extrato CECb de <i>H. obovatus</i> (Casa Branca - SP)	5
3.3.4.A. Purificação do extrato CECb acetilado de <i>H. obovatus</i> (Casa Branca - SP)	5
3.4. Testes de atividade biológica	5
3.4.1. Testes de letalidade para <i>Artemia salina</i> (Leach.)	5
3.4.2. Testes de Bioautografia	5
3.4.3. Testes de Atividade Anti proliferativa	6
4. Resultados e discussão	6
4.1. Folhas de <i>H. obovatus</i> coletadas na Chapada dos Guimarães - MT	6
4.1.1. Extrato FDA (Folhas, Diclorometano, Ácido) de <i>H. obovatus</i>	6
4.1.2. Extrato FDN (Folhas, Diclorometano, Neutro) de <i>H. obovatus</i>	7
4.2. Casca + caule de <i>H. obovatus</i> coletados na Chapada dos Guimarães - MT	7
4.2.1. Extrato CPA (Casca + caule, Ácido) de <i>H. obovatus</i>	7
4.3. Partição do extrato etanólico da Casca + caule de <i>H. obovatus</i> (Chapada dos Guimarães - MT)	8
4.3.1. Extrato CDCh (Casca + caule, Diclorometano, Chapada dos Guimarães) de <i>H. obovatus</i>	8
4.4. Extrato etanólico da casca de <i>H. obovatus</i> (Casa Branca - SP)	8
4.4.1. Extrato CDCb (Casca, Diclorometano, Casa Branca) de <i>H. obovatus</i>	8
4.4.2. Extrato CECb (Casca, Etanol, Casa Branca) de <i>H. obovatus</i>	9

4.5. Testes biológicos	10
4.5.1. Testes de letalidade utilizando <i>Artemia salina</i>	10
4.5.2. Testes de Bioautografia	10
4.5.3. Testes de Atividade anti-proliferativa	10
5. Correlação entre os dados químicos e botânicos de <i>H. obovatus</i> (Apocynaceae).	10
6. Conclusões	1
7. Bibliografia	1
Espectros	1

LISTA DE ABREVIATURAS

C# - carbono quaternário

CC - cromatografia em coluna

CCA - cromatografia em camada analítica

CCP - cromatografia em camada preparativa

CG/EM - cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

COSY (Correlated spectroscopy) - espectro bidimensional de correlação homonuclear (^1H)

δ - deslocamento químico (em ppm)

d - dubleto

dd - duplo dubleto

ddd - duplo duplo dubleto

DEPT (Distortionless enhancement by polarization transfer) - espectro de RMN ^{13}C com intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização. Juntamente com espectro de RMN ^{13}C , diferencia entre carbonos primários, secundários, terciários e quaternários.

d l - dubleto largo

EM - Espectro de massas

Esp. - Espectros

Esq. - Esquemas

EV - elétron volts

Extratos:

FDA, FDN e FDB - Extratos das Folhas em Diclorometano (Ácido, Neutro e Básico) de *Himatanthus obovatus* - Chapada dos Guimarães - MT)

CPA – Extrato da Casca + Caule Ácido de *Himatanthus obovatus* - Chapada dos Guimarães - MT)

CHCh, CDCh e CECh - Extratos da Casca + Caule (Heptânico, Diclorometânico e Etanólico) de *Himatanthus obovatus* - Chapada dos Guimarães - MT)

CHCb, CDCb e CECb - Extratos da Casca (Heptânico, Diclorometânico e Etanólico) de *Himatanthus obovatus* - Casa Branca - SP)

FAEP - Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa

Fig. - Figuras

HETCOR (**H**eteronuclear shift **c**orrelation) - espectro bidimensional de RMN de correlação heteronuclear ($^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$) a uma ligação

HMBC (**H**eteronuclear **m**ultiple **b**ond **c**oherence) - espectro bidimensional de RMN correlação heteronuclear ($^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$) de longa distância

HMQC (**H**eteronuclear **m**ultiple **q**uantum **c**oherence) - espectro bidimensional de RMN correlação heteronuclear ($^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$) a uma ligação

Hz – Hertz

IV – espectro na região do infravermelho

J – constante de acoplamento (em Hz)

CL₅₀ (concentração letal) - concentração letal para 50% dos indivíduos testados

m – multiplete

m/z - relação massa/carga

M⁺ - íon molecular

NOE – Efeito Overhauser Nuclear

ppm – parte por milhão

RMN¹³C – espectro de ressonância magnética nuclear de carbono -13

RMN¹H – espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio -1

RMN2D – ressonância magnética nuclear bidimensional

s – singleto

sl – singleto largo

t – tripleto

Tab. - Tabelas

ÍNDICE DE TABELAS

Tab. 1:- Testes para avaliação da presença de alcalóides nas espécies de <i>Himatanthus</i> do herbário do INPA - Manaus.	6
Tab. 2:- Espécies de <i>Himatanthus</i> estudadas quimicamente.	8
Tab. 3:- Agrupamento das frações obtidas na purificação do extrato FDA de <i>H. obovatus</i> (Chapada dos Guimarães - MT)	31
Tab. 4:- Agrupamento das frações obtidas na purificação do extrato FDN de <i>H. obovatus</i> (Chapada dos Guimarães - MT)	34
Tab. 5:- Agrupamento das frações obtidas na purificação do extrato CPA de <i>H. obovatus</i> (Chapada dos Guimarães - MT)	38
Tab. 6:- Agrupamento das frações obtidas na purificação do extrato CDCh de <i>H. obovatus</i> (Chapada dos Guimarães - MT)	44
Tab. 7:- Agrupamento das frações obtidas na purificação do extrato CDCb de <i>H. obovatus</i> (Casa Branca - SP).	48
Tab. 8:- Agrupamento das frações obtidas na purificação do extrato CECb de <i>H. obovatus</i> (Casa Branca - SP).	52
Tab. 9:- Agrupamento das frações obtidas na purificação do extrato etanólico acetilado da casca de <i>H. obovatus</i> (Casa Branca - SP).	55
Tab. 10:- Fungos e bactérias utilizados nos testes de Bioautografia.	60
Tab. 11:- Resultados obtidos nos testes de Bioautografia	62
Tab. 12:- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e de ^1H do pinoresinol <u>14</u> .	67
Tab. 13:- Deslocamentos químicos dos carbonos 1 e 2 do pinoresinol <u>14</u> , quando a relação dos hidrogênios 1 e 2 é cis ou trans.	68
Tab. 14:- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e de ^1H do isolariciresino <u>33</u> .	72
Tab. 15:- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e de ^1H do blumenol C <u>63</u> .	74
Tab. 16:- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e de ^1H do blumenol A <u>64</u> .	76
Tab. 17:- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e de ^1H do nor-isoprenóide <u>65</u> .	78
Tab. 18:- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C dos carbonos olefínicos dos terpenos presentes na fração VH30F3.	81
Tab. 19:- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de alguns carbonos dos triterpenos <u>22</u> , <u>20</u> , <u>21</u> e <u>66</u> .	82
Tab. 20:- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C dos carbonos olefínicos dos terpenos presentes na fração VH31F6	84
Tab. 21:- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e de ^1H do hidroxipinoresinol <u>68</u> .	90
Tab. 22:- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e de ^1H do lariciresinol <u>69</u> .	93
Tab. 23:- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e de ^1H do olivil <u>70</u> .	96
Tab. 24:- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e de ^1H do plumieride <u>11</u> .	99
Tab. 25:- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e de ^1H do inositol <u>71</u> .	101
Tab. 11:- Resultados obtidos nos testes de Bioautografia (Repetição da Tabela 11 - Parte Experimental)	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1:- Estruturas do taxol <u>1</u> , do etoposídeo <u>2</u> e da artemisinina <u>3</u> .	2
Fig. 2:- Fotos da espécie de <i>H. obovatus</i> coletada na Chapada dos Guimarães (MT)	5
Fig. 3:- Estruturas isoladas das espécies de <i>Himatanthus</i> estudadas quimicamente.	9
Fig. 4:- Exemplos de lignanas.	16
Fig. 5:- Exemplos de neolignanas.	16
Fig. 6:- Estrutura do blumenol B <u>52</u> .	20
Fig. 7:- Clivagem dos carotenóides (C40) levando aos nor-isoprenóides (C13 e C15).	21
Fig. 8:- Estruturas do D-pinitol <u>56</u> e do mio-inositol <u>57</u> .	23
Fig. 9:- Mapas mostrando os locais de coleta da <i>H. obovatus</i> : Casa Branca (SP) e Chapada dos Guimarães (MT)	29
Fig. 10:- Deslocamentos químicos de alguns isômeros do pinoresinol <u>14</u> .	68
Fig. 11:- Proposta da configuração relativa dos hidrogênios 1 e 2 e 5 e 6 para o pinoresinol <u>14</u> .	69
Fig. 12:- Estruturas dos terpenos <u>20</u> , <u>21</u> , <u>22</u> e <u>66</u> .	81
Fig. 13:- Fragmentos característicos de triterpenos pentacíclicos Δ^{12} -insaturados e da série lupano	83
Fig. 14:- Estruturas dos terpenos <u>55</u> , <u>56</u> e <u>57</u> .	84
Fig. 15:- Curva concentração/% de crescimento para o extrato CDCb de <i>H. obovatus</i> .	106
Fig. 16:- Curva concentração/% de crescimento para o extrato CECb de <i>H. obovatus</i> .	106
Fig.17:- Parte da árvore filogenética resultante do trabalho de Potgieter e Albert (2001), mostrando a relação de parentesco entre os gêneros <i>Himatanthus</i> , <i>Tabernaemontana</i> e <i>Rauvolfia</i> .	108
Fig.18:- Caminho biossintético simplificado para a formação de lignanas, nor-isoprenóides, iridóides, terpenos e alcalóides indólicos.	109

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esq. 1:- Esquema geral da biossíntese das lignanas e das neolignanas.	17
Esq. 2:- Caminho biossintético proposto para lignanas.	18
Esq. 3:- Caminho biossintético simplificado para os iridóides e seco-iridóides.	20
Esq. 4:- Terpenos derivados do isopreno	22
Esq. 5:- Formação dos aminoglicosídeos passando pelos inositóis.	23
Esq. 6:- Esquema de extração ácido-base das folhas de <i>H. obovatus</i> (Chapada dos Guimarães - MT).	30
Esq. 7:- Purificações por CCP das frações reunidas, descritas na Tabela 3.	32
Esq. 8:- Purificações por CCP das frações reunidas, descritas na Tabela 4.	35
Esq. 9:- Tratamento ácido do extrato etanólico da casca + caule de <i>H. obovatus</i> (Chapada dos Guimarães - MT).	37
Esq. 10:- Purificações por CCP das frações reunidas, descritas na Tabela 5.	39
Esq. 11:- Partição do extrato etanólico da casca + caule de <i>H. obovatus</i> (Chapada dos Guimarães - MT).	43
Esq. 12:- Purificações por CCP das frações reunidas, descritas na Tabela 6.	45
Esq. 13:- Partição do extrato etanólico da casca de <i>H. obovatus</i> (Casa Branca).	46
Esq. 14:- Purificações por CCP das frações reunidas, descritas na Tabela 7.	49
Esq. 15:- Purificação por CC do extrato CECb de <i>H. obovatus</i> (Casa Branca).	53
Esq. 16:- Purificação por CCP da fração descritas na Tabela 9.	56
Esq. 17:- Diluição dos extratos brutos de <i>H. obovatus</i> ou das substâncias puras para o teste utilizando <i>Artemia salina</i> .	58
Esq. 6:- Esquema de extração ácido-base das folhas de <i>H. obovatus</i> (Repetição do Esquema 6 da Parte Experimental)	65
Esq. 9:- Tratamento ácido do extrato etanólico da casca + caule de <i>H. obovatus</i> (Repetição do Esquema 6 da Parte Experimental)	79
Esq. 11:- Partição do extrato etanólico da casca + caule de <i>H. obovatus</i> (Repetição do Esquema 6 da Parte Experimental)	86
Esq. 13:- Partição do extrato etanólico da casca de <i>H. obovatus</i> (Repetição do Esquema 6 da Parte Experimental)	87
Esq. 18:- Fragmentação proposta para o hidroxipinoresinol <u>68</u> .	89

ÍNDICE DE ESPECTROS

Esp. 1:- Espectro de IV do pinoresinol <u>14</u> .	117
Esp. 2:- Espectro de massas do pinoresinol <u>14</u> .	117
Esp. 3:- Espectro de RMN ¹³ C do pinoresinol <u>14</u> .	118
Esp. 4:- Espectro DEPT do pinoresinol <u>14</u> .	118
Esp. 5:- Espectro HSQC do pinoresinol <u>14</u> .	119
Esp. 6:- Espectro de RMN ¹ H do pinoresinol <u>14</u> .	120
Esp. 7:- Espectro de NOESY 1D do pinoresinol <u>14</u> .	121
Esp. 8:- Espectro gCOSY do pinoresinol <u>14</u> .	122
Esp. 9:- Espectro de IV do isolariciresinol <u>33</u> .	123
Esp. 10:- Espectro de RMN ¹³ C do isolariciresinol <u>33</u> .	123
Esp. 11:- Espectro DEPT do isolariciresinol <u>33</u> .	124
Esp. 12:- Espectro HSQC do isolariciresinol <u>33</u> .	124
Esp. 13:- Espectro de RMN ¹ H do isolariciresinol <u>33</u> .	125
Esp. 14:- Espectro gCOSY do isolariciresinol <u>33</u> .	126
Esp. 15:- Espectro de massas do isolariciresinol <u>33</u> .	127
Esp. 16:- Espectro de IV do blumenol C <u>63</u> .	128
Esp. 17:- Espectro de massas do blumenol C <u>63</u> .	128
Esp. 18:- Espectro de RMN ¹³ C do blumenol C <u>63</u> .	129
Esp. 19:- Espectro DEPT do blumenol C <u>63</u> .	129
Esp. 20:- Espectro HMQC do blumenol C <u>63</u> .	130
Esp. 21:- Espectro COSY do blumenol C <u>63</u> .	130
Esp. 22:- Espectro de RMN ¹ H do blumenol C <u>63</u> .	131
Esp. 23:- Espectro de IV do blumenol A <u>64</u> .	132
Esp. 24:- Espectro de massas do blumenol A <u>64</u> .	132
Esp. 25:- Espectro de RMN ¹³ C do blumenol A <u>64</u> .	133
Esp. 26:- Espectro DEPT do blumenol A <u>64</u> .	133
Esp. 27:- Espectro de RMN ¹ H do blumenol A <u>64</u> .	134
Esp. 28:- Espectro gCOSY do blumenol A <u>64</u> .	135

Esp. 29:- Espectro de IV do nor-isoprenóide <u>65</u> .	136
Esp. 30:- Espectro de massas do nor-isoprenóide <u>65</u> .	136
Esp. 31:- Espectro de RMN ¹³ C do nor-isoprenóide <u>65</u> .	137
Esp. 32:- Espectro DEPT do nor-isoprenóide <u>65</u> .	137
Esp. 33:- Espectro gCOSY do nor-isoprenóide <u>65</u> .	138
Esp. 34:- Espectro de RMN ¹ H do nor-isoprenóide <u>65</u> .	138
Esp. 35:- Espectro de CICLENOE3 do nor-isoprenóide <u>65</u> .	139
Esp. 36:- Espectro HSQC do nor-isoprenóide <u>65</u> .	140
Esp. 37:- Espectro de RMN ¹³ C da fração VH30F3	141
Esp. 38:- Espectro de RMN ¹ H da fração VH30F3	141
Esp. 39:- Espectro de massas da fração VH30F3	142
Esp. 40:- Espectro de RMN ¹³ C da fração VH31F6	143
Esp. 41:- Espectro de RMN ¹ H da fração VH31F6	143
Esp. 42:- Espectro de massas da fração VH31F6	144
Esp. 43:- Espectro de RMN ¹³ C da fração VH49F3	145
Esp. 44:- Espectro de RMN ¹ H da fração VH49F3	145
Esp. 45:- Espectro de RMN ¹³ C da fração VH50F5	146
Esp. 46:- Espectro de RMN ¹ H da fração VH50F5	146
Esp. 47:- Espectro de massas da fração VH50F5	147
Esp. 48:- Espectro de IV do hidroxipinoresinol <u>68</u> .	148
Esp. 49:- Espectro de RMN ¹³ C do hidroxipinoresinol <u>68</u> .	149
Esp. 50:- Espectro DEPT do hidroxipinoresinol <u>68</u> .	149
Esp. 51:- Espectro HSQC do hidroxipinoresinol <u>68</u> .	150
Esp. 52:- Espectro de RMN ¹ H do hidroxipinoresinol <u>68</u> .	151
Esp. 53:- Espectro gCOSY do hidroxipinoresinol <u>68</u> .	152
Esp. 54:- Espectro de CICLENOE do hidroxipinoresinol <u>68</u> .	153
Esp. 55:- Espectro de massas do hidroxipinoresinol <u>68</u> .	154

Esp. 56:- Espectro de IV do lariciresinol <u>69</u> .	155
Esp. 57:- Espectro de massas do lariciresinol <u>69</u> .	155
Esp. 58:- Espectro de RMN ¹³ C do lariciresinol <u>69</u> .	156
Esp. 59:- Espectro DEPT do lariciresinol <u>69</u> .	156
Esp. 60:- Espectro HMQC do lariciresinol <u>69</u> .	157
Esp. 61:- Espectro de RMN ¹ H do lariciresinol <u>69</u> .	158
Esp. 62:- Espectro gCOSY do lariciresinol <u>69</u> .	159
Esp. 63:- Espectro de IV do olivil <u>70</u> .	160
Esp. 64:- Espectro de massas do olivil <u>70</u> .	160
Esp. 65:- Espectro de RMN ¹³ C do olivil <u>70</u> .	161
Esp. 66:- Espectro DEPT do olivil <u>70</u> .	161
Esp. 67:- Espectro Hetcor do olivil <u>70</u> .	162
Esp. 68:- Espectro de RMN ¹ H do olivil <u>70</u> .	163
Esp. 69:- Espectro gCOSY do olivil <u>70</u> .	164
Esp. 70:- Espectro de IV do plumieride <u>11</u> .	165
Esp. 71:- Espectro de RMN ¹³ C do plumieride <u>11</u> .	166
Esp. 72:- Espectro DEPT do plumieride <u>11</u> .	166
Esp. 73:- Espectro Hetcor do plumieride <u>11</u> .	167
Esp. 74:- Espectro de RMN ¹ H do plumieride <u>11</u> .	168
Esp. 75:- Espectro COSY do plumieride <u>11</u> .	169
Esp. 76:- Espectro de massas do plumieride <u>11</u> .	169
Esp. 77:- Espectro de IV do inositol <u>71</u> .	170
Esp. 78:- Espectro de massas do inositol <u>71</u> .	170
Esp. 79:- Espectro de RMN ¹³ C do inositol <u>71</u> .	171
Esp. 80:- Espectro DEPT do inositol <u>71</u> .	171
Esp. 81:- Espectro HSQC do inositol <u>71</u> .	172
Esp. 82:- Espectro de RMN ¹ H do inositol <u>71</u> .	173
Esp. 83:- Espectro COSY do inositol <u>71</u> .	174

1. INTRODUÇÃO

Através dos tempos o homem tem recorrido à natureza para satisfazer as suas necessidades de alimento, abrigo, vestuário, medicamentos, corantes, aromas, entre outros (Newman *et al.*, 2000).

O uso de plantas no tratamento de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana (Maciel *et al.*, 2002). Povos como os Egípcios, Chineses, Indianos, Gregos, Africanos entre outros, contribuíram substancialmente para o conhecimento sobre a utilização das plantas como medicamentos, mas considera-se que o primeiro produto natural puro isolado foi a morfina em 1826 e a primeira droga pura semi-sintética baseada em um produto natural foi a aspirina em 1899 (Newman *et al.*, 2000).

Vários produtos naturais foram isolados de plantas superiores e utilizados como agentes clínicos antes da 2ª Guerra Mundial e muitos deles continuam a ser utilizados até hoje, como por exemplo a quinina, a morfina, a codeína, a atropina. Os antibióticos começaram a ser descobertos estudando-se uma série de produtos naturais isolados de espécies de *Penicillium*, *Cephalosporium* e *Streptomyces* durante, e após a 2ª Guerra Mundial. Nos anos posteriores à 2ª Guerra houve relativamente poucas descobertas de novas drogas naturais, com exceções notáveis para o isolamento da reserpina de espécies de *Rauvolfia* (utilizado como tranquilizante), da vinblastina e da vincristina de *Catharanthus roseus* (efetivas na terapia do câncer) (Phillipson, 2001).

Nos últimos anos o interesse da indústria farmacêutica na pesquisa de produtos naturais biologicamente ativos voltou a aumentar e isto pode ser ilustrado pela utilização clínica de 3 drogas: o taxol 1, o etoposídeo 2 e a artemisinina 3 (Phillipson, 2001).

No início dos anos 60 verificou-se que o extrato bruto da *Taxus brevifolia* (Taxaceae) era ativo contra células cancerosas. Em 1971 a complexa estrutura do diterpeno taxol 1 foi elucidada, em 1979 foi descoberto seu modo de ação e somente nos anos 90 o taxol 1 e seu derivado semi-sintético mostraram ser clinicamente efetivos contra o câncer de mama e ovário (Phillipson, 2001).

A raiz da *Podophyllum peltatum* (Berberidaceae) fornece uma resina, cujo maior constituinte é a lignana podofilotoxina que inibe a divisão celular, indicando uma potencial atividade anti-câncer. Entretanto, esta lignana é tóxica, mas seu derivado semi-sintético, o etoposídeo 2, tem sido utilizado clinicamente no tratamento de câncer de pulmão e da leucemia (Phillipson, 2001). A podofilotoxina, além de outras lignanas,

têm sido estudados como precursores de agentes antivirais (incluindo o HIV) e de agentes antitumorais (Apers *et al.*, 2003).

A artemisinina 3 é uma lactona sesquiterpênica isolada das folhas e das inflorescências da *Artemisia annua* (Asteraceae) e é utilizada na China no tratamento da malária há mais de mil anos. Entretanto seu princípio ativo só foi isolado e caracterizado em 1972 pelos chineses (Roberts *et al.*, 1997).

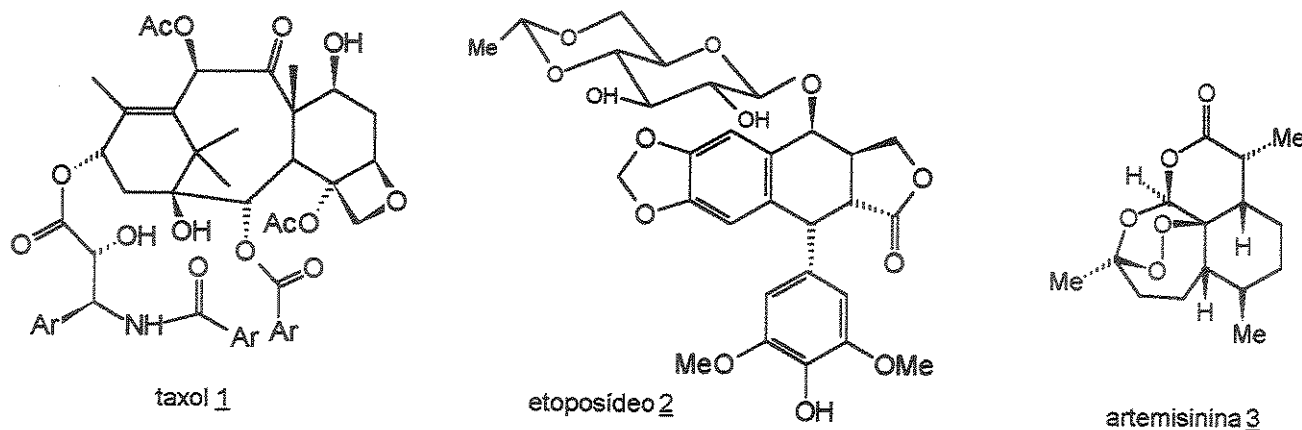


Figura 1:- Estruturas do taxol 1, do etoposídeo 2 e da artemisinina 3.

No período entre 1959 e 1980, aproximadamente 25% das receitas médicas enviadas nas farmácias americanas descrevia a utilização de extratos de plantas ou de princípios ativos derivados de plantas superiores, sendo que em 1993, 50% das drogas mais prescritas neste país tinham um produto natural como princípio ativo ou como precursor na síntese do princípio ativo (Newman *et al.*, 2000).

Nos países em desenvolvimento uma grande parcela da população não tem condição de adquirir os medicamentos nas farmácias e utilizam as plantas para suas necessidades básicas de saúde (Phillipson, 2001), sendo que nas regiões mais pobres do Brasil, e até mesmo nas grandes cidades, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres (Maciel *et al.*, 2002). A Organização Mundial da Saúde estima que atualmente 80% da população mundial recorra às plantas para o tratamento de saúde (Newman *et al.*, 2000).

Enquanto as importações brasileiras caíram quase 15% em 1999, as compras de medicamentos no país aumentaram 23%. Apesar do Brasil ser detentor da maior biodiversidade do planeta, é um dos maiores importadores de insumos farmacêuticos do mundo. A biodiversidade foi definida durante a ECO-1992 como a "variabilidade entre os

organismos vivos de todas as fontes incluindo ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos e os complexos ecológicos dos quais eles são parte, isto inclui a diversidade dentro das espécies, entre espécies e dos ecossistemas”. O Brasil é o país com a maior diversidade vegetal do mundo com cerca de 55.000 espécies catalogadas, de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies (Sandes e Biasi, 2001). Das espécies vegetais existentes no mundo, estima-se que 16% encontram-se na região Amazônica brasileira, sendo que menos de 10% destas espécies foram estudadas quimicamente e um número menor ainda teve suas propriedades biológicas caracterizadas. Isto significa que uma enorme quantidade de compostos bioativos ainda não foi descoberta e provavelmente nunca será (Pletsch, 1999), já que a estimativa é de que 1.000 espécies vegetais são extintas por ano no planeta (3 por dia). Se a destruição continuar no ritmo atual, até o ano de 2015, entre 4 e 8% das espécies das florestas tropicais podem desaparecer (Sandes e Biasi, 2001).

A enorme biodiversidade existente no Brasil e o advento de modernas técnicas de biotecnologia (processos fermentativos, micropropagação e engenharia genética) fizeram com que se abrisse uma janela de oportunidades para o Brasil liderar o mercado de produtos naturais (Pletsch, 1999), embora o país não tenha legislação para controlar seu imenso patrimônio genético e nem tecnologia para explorar esse patrimônio (Sandes e Biasi, 2001).

Nota-se a enorme importância que a utilização de produtos naturais tem pelo surgimento nos últimos anos de novas revistas que se dedicam aos aspectos da química de produtos naturais, como a *Phytochemical Analysis*, *Natural Product Letters*, *Phytotherapy Research*, *Thay Journal of Pharmacognosy*, entre outras, além do aumento significativo no número de artigos publicados em revistas dessa área. O *Journal of Natural Products* publicou em 1984 1088 páginas em 6 volumes e em 1994 este número subiu para 1787 páginas em 12 volumes. Além disso, foram lançados inúmeros livros científicos ou populares sobre a utilização de produtos naturais, além de trabalhos em congressos científicos e compilações detalhadas sobre metabólitos secundários de plantas (Cordell, 1995).

1.1. A Família Apocynaceae e o Gênero *Himatanthus*

As famílias Apocynaceae e Asclepiadaceae foram reconhecidas como uma única família, Apocynaceae s.l., que consiste de 424 gêneros distribuídos em 5 sub-famílias (Endress e Bruyns, 2000). Apocynaceae s. l. é uma das famílias mais numerosas dentro das Angiospermas, com cerca de 3700 espécies pantropicais (Judd *et. al.*, 2002).

O gênero *Himatanthus* Willd. ex Schult., é um gênero pantropical de Apocynaceae s.l. pertencente à sub-família Rauvolfioideae e à Tribo Plumerieae (Endress e Bruyns, 2000). Em estudo recente, *Himatanthus* foi considerado com nove espécies para a América do Sul (Spina, 2004):

- H. articulatus* (Vahl) Woodson,
- H. attenuatus* (Benth.) Woodson,
- H. bracteatus* (A. DC.) Woodson,
- H. drasticus* (Mart.) Plumel,
- H. obovatus* (Muell. Arg.) Woodson,**
- H. phagedaenicus* (Mart.) Woodson,
- H. revolutus* (Huber) Spina & Kinoshita,
- H. semilunatus* Markgr.,
- H. tarapotensis* (Schum. ex Markgr.) Plumel,

sendo que a *H. articulatus* também ocorre no Panamá (Spina, 2004). No trabalho de Spina (2004) não foram aceitos os sub-gêneros *Obovatae* (*Himatanthus*) e *Lanceolata* propostas por Plumel (1990) e a circunscrição das espécies e variedades, sugeridas por Woodson (1938) e Plumel (1990). A espécie *H. obovatus* (Figura 2), amplamente distribuída no Brasil e na Bolívia, ocorre principalmente em vegetação de cerrado, cerradão e campo sujo, nos Estados do Norte (PA e RO), do Nordeste (MA, PI, AL e BA), do Centro-Oeste (MT, MS, GO e TO) e no Sudeste (MG e SP) (Spina, 2004). A classificação botânica da *Himatanthus obovatus* é mostrada a seguir:

Família: Apocynaceae s.l.

Sub-família: Rauvolfioideae Kostel.

Tribo: Plumerieae E. Mey.

Gênero: *Himatanthus* Willd. ex Schult.

Sub-gênero: *Obovatae* Plumel

Espécie: *obovatus* (Muell. Arg.) Woodson.

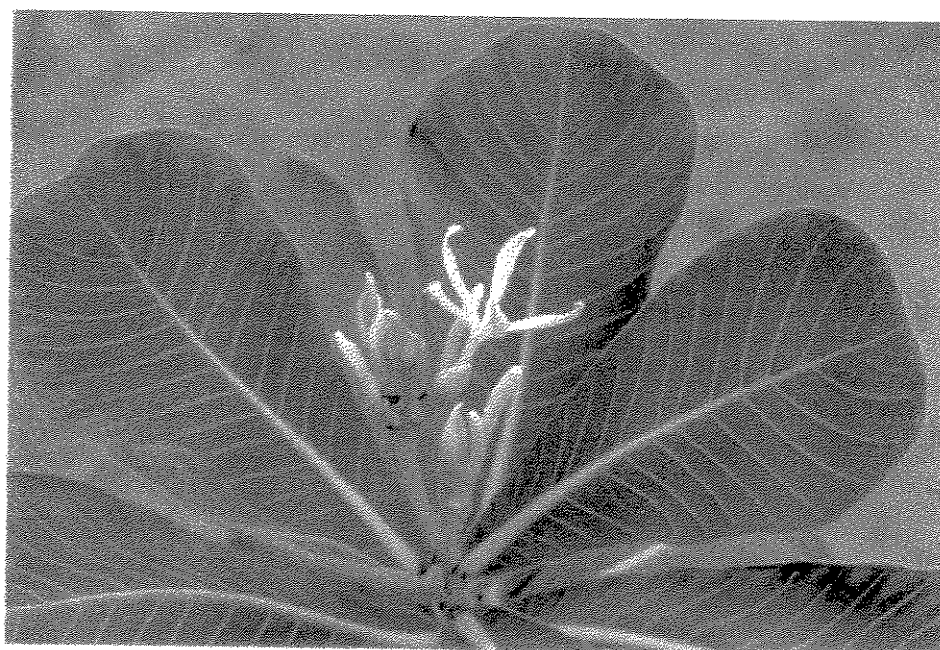
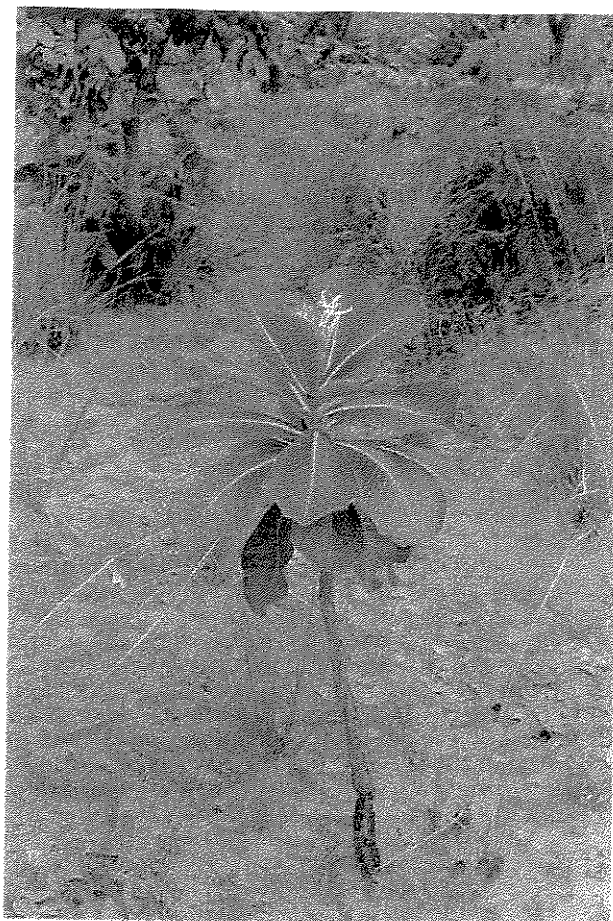


Figura 2:- Fotos da espécie de *H. obovatus* coletada na Chapada dos Guimarães (MT).

1.2. A Família Apocynaceae e os alcalóides indólicos

A maioria dos alcalóides indólicos é encontrada em três famílias da Ordem Gentianales: Loganiaceae, Rubiaceae e Apocynaceae (Schripsema *et al.*, 1999). Vários gêneros da família Apocynaceae, como por exemplo, *Ervatania*, *Alstonia*, *Aspidosperma*, *Geissopermum*, *Hunteria*, *Kopsia*, *Picralina*, *Vinca*, *Rhazia*, *Rauvolfia*, *Tabernaemontana*, entre outras, são fontes de alcalóides indólicos (Siddiqui *et al.*, 1987), embora esta classe de compostos pareça não ter significado taxonômico nesta família (Rocha *et al.*, 1982).

Nas Apocynaceas, os alcalóides indoloterpênicos têm sido isolados de uma única subfamília, a Rauvolfioideae, a qual pertencem, entre outras, os gêneros *Himatanthus*, *Rauvolfia* e *Tabernaemontana*, estas duas últimas ricas em alcalóides indólicos (Rocha *et al.*, 1982) e já estudadas em nosso grupo de pesquisa.

Algumas espécies de *Himatanthus* registradas no herbário do INPA-Manaus, foram testadas quanto à presença de alcalóides. (Tabela 1 - Rocha *et al.*, 1982).

Tabela 1:- Testes para avaliação da presença de alcalóides nas espécies de *Himatanthus* do herbário do INPA-Manaus (Rocha *et al.*, 1982).

<i>Himatanthus</i>	Folhas	Caule
<i>articulatus</i> (Vahl) Woods.	-	+
<i>attenuatus</i> (Mull. Arg.) Woods.	-	+
<i>bracteatus</i> (DC) Woods. (sinomizada em <i>H. phagedaenicus</i>)	-	-
<i>phagedaenicus</i> (Mart.) Woods. (sinomizada em <i>H. bracteatus</i>)	-	
<i>sucuuba</i> (Spruce) Woods. (sinomizada em <i>H. articulatus</i>)	-	

- negativo, + positivo fraco, ++ positivo, +++ positivo forte

1.3. Revisão bibliográfica do gênero *Himatanthus*

Do ponto de vista químico foram estudadas, até o momento, 5 espécies de *Himatanthus*: *H. obovatus* (Müll. Arg.) Woodson (Vilegas *et al.*, 1992), *H. fallax* (Müll. Arg.) Plumel (Abdel-Kader *et al.*, 1997), *H. sucubus* (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson (Perdue e Blomster, 1978; Endo *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 1998-C; Wood *et al.*, 2001), *H. phagedaenicus* (Mart.) Woodson (Vanderlei *et al.*, 1991; Veloso *et al.*, 1999) e *H. articulatus* (Vahl) Woodson (Barreto *et al.*, 1998; Ferrigni e Hasegawa, 1976). A Tabela 2 e a Figura 3 mostram os metabólitos isolados destas espécies. São descritos o isolamento de lignanas, terpenos, iridóides, ácidos e um glicitol.

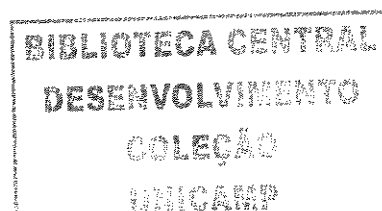


Tabela 2:- Espécies de *Himatanthus* estudadas quimicamente.

<i>Himatanthus</i>	Parte da planta estudada	Metabólitos isolados	Referências
<i>obovatus</i>	Extr. acet. de etila da raiz	Iridóides <u>4</u> , <u>5</u> e <u>6</u>	Vilegas <i>et al.</i> , 1992
<i>phagedaenicus</i> (considerada como <i>H. bracteatus</i>)	Extr. etanólico do caule seguido de partição	Terpenos <u>20</u> , <u>21</u> , <u>22</u> e <u>27</u> Iridóides <u>5</u> , <u>6</u> , <u>7</u> , <u>8</u> e <u>9</u> Sacarose acetilada	Vanderlei <i>et al.</i> , 1991
	Extrato clorofórmico da raiz	Iridóide <u>10</u>	Veloso <i>et al.</i> , 1999
<i>fallax</i> (considerada como <i>H. articulatus</i>)	Extr. do caule Seguido de partição	Iridóides <u>5</u> , <u>6</u> e <u>11</u> Lignanas <u>14</u> , <u>15</u> e <u>16</u>	Abdel-Kader <i>et al.</i> , 1997
<i>articulatus</i>	Extr. éter de petróleo da raiz	Terpeno <u>18</u>	Ferrigni e Hasegawa, 1976
	Extr. hex. da raiz	Terpenos <u>22</u> , <u>23</u> , <u>26</u> e <u>27</u>	Barreto <i>et al.</i> , 1998
	Extr. met. da raiz	Iridóides <u>5</u> , <u>6</u> , <u>12</u> e <u>13</u> glicitol <u>17</u>	
	Extr. met. das folhas	Terpeno <u>25</u>	
	Extr. hex. do látex	Terpenos <u>18</u> , <u>19</u> , <u>22</u> , <u>23</u> e <u>24</u>	
<i>sucuuba</i> (sinonimizada em <i>H. articulatus</i>)	Extr. 50% etanol/água da casca	Iridóide <u>4</u>	Perdue e Blomster, 1978
	Extr. met. seguida de partição	Ácidos <u>28</u> , <u>29</u> , <u>30</u> , <u>31</u> e <u>32</u> Iridóides <u>5</u> , <u>6</u> e <u>10</u>	Endo <i>et al.</i> , 1994
	Extr. hex. das cascas	Iridóides <u>5</u> e <u>6</u> Terpenos <u>18</u> , <u>22</u> e <u>23</u>	Silva <i>et al.</i> , 1998
	Extr. hex. do látex	Terpenos <u>18</u> , <u>22</u> e <u>23</u>	Miranda <i>et al.</i> , 2000
	Extr. etan. das cascas seguida de partição	Iridóide <u>5</u> Terpenos <u>18</u> , <u>22</u> , <u>23</u>	Wood <i>et al.</i> , 2001

Figura 3:- Estruturas isoladas das espécies de *Himatanthus* estudadas quimicamente.

IRIDÓIDES

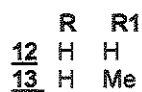
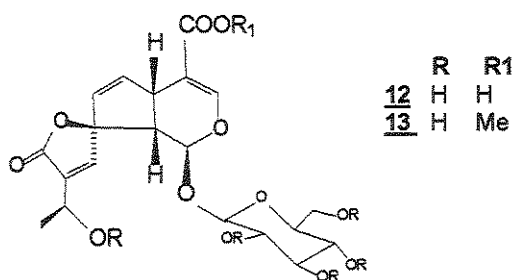
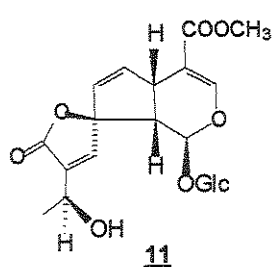
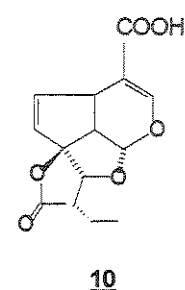
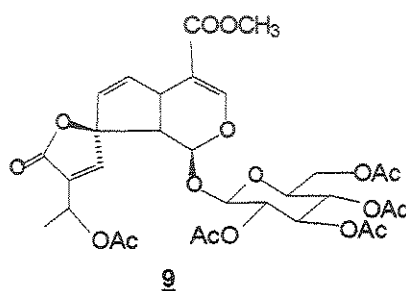
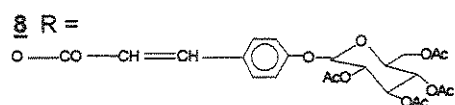
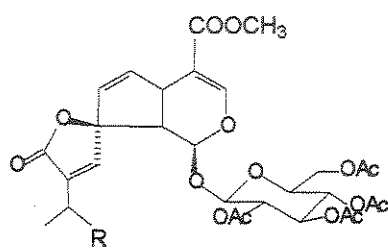
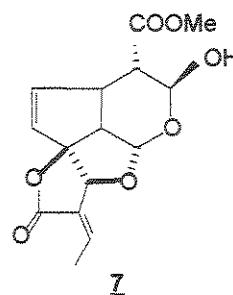
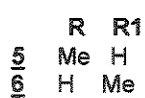
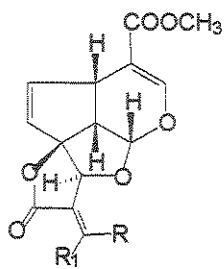
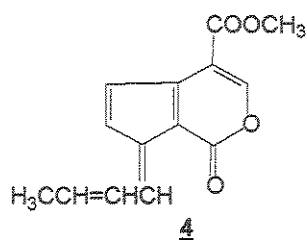


Fig. 3 (continuação):- Estruturas isoladas das espécies de *Himatanthus* estudadas quimicamente.

LIGNANAS

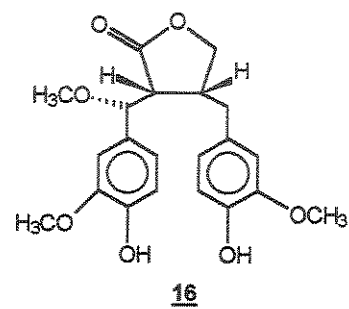
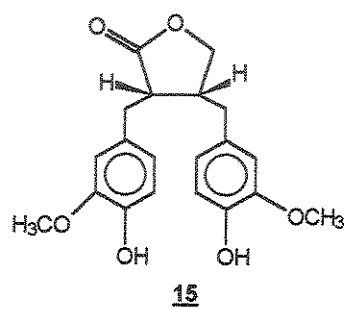
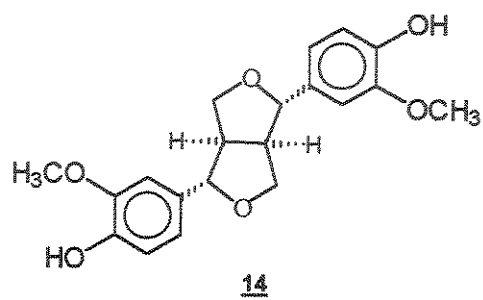
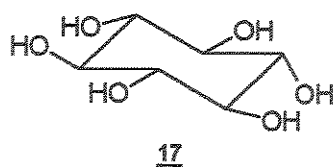


Fig. 3 (continuação):- Estruturas isoladas das espécies de *Himatanthus* estudadas quimicamente.

GLICITOL



TERPENOS

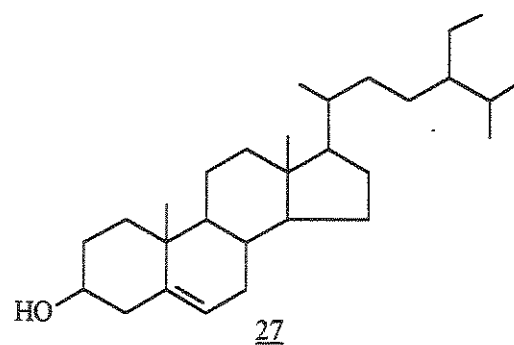
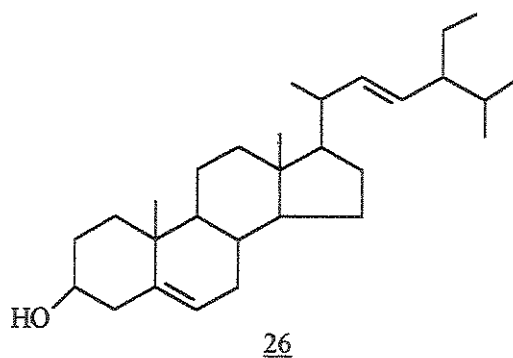
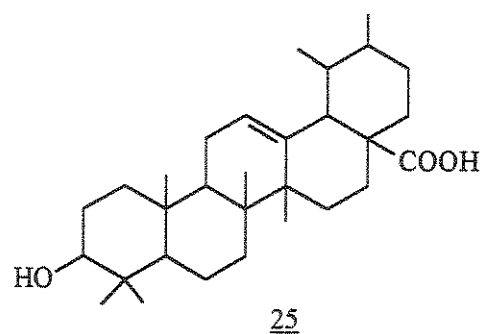
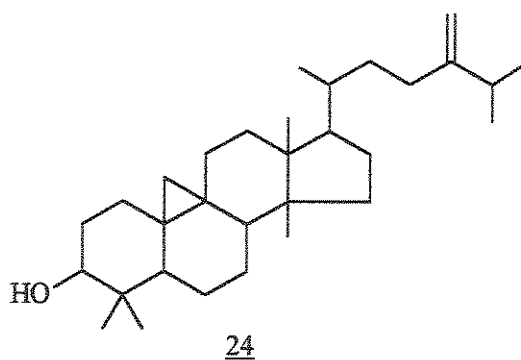
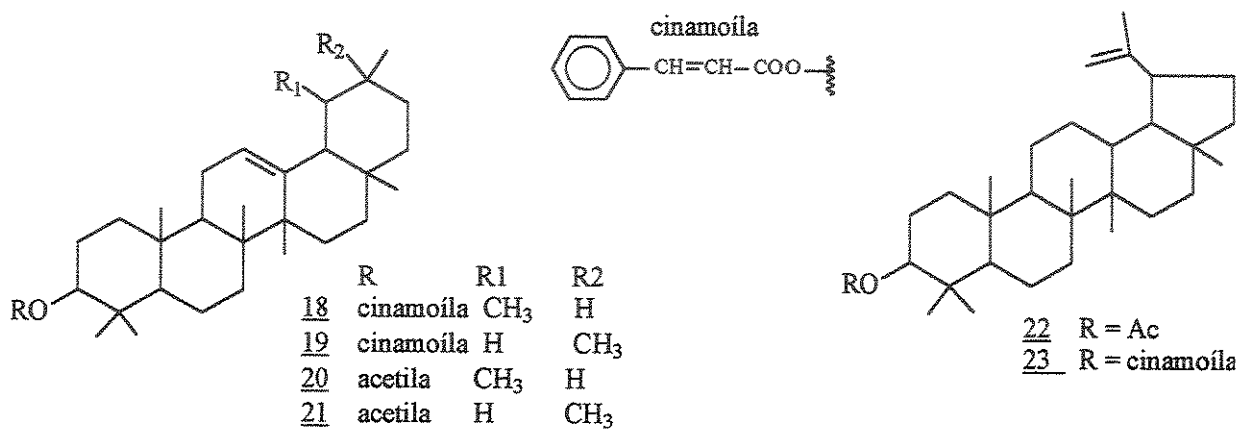
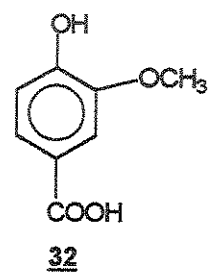
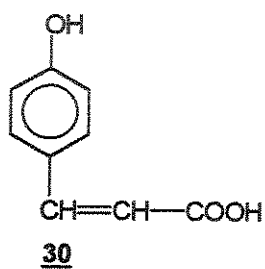
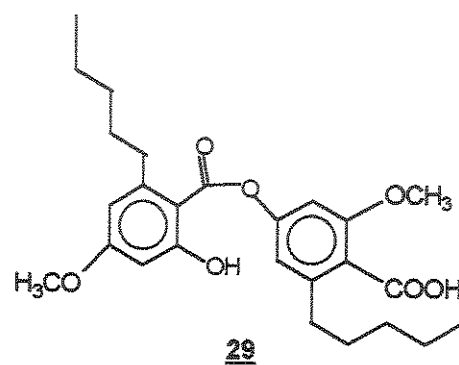
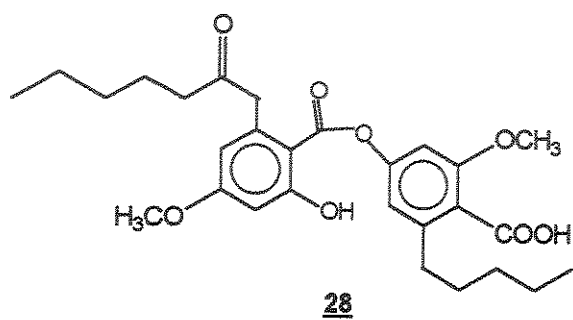


Fig. 3 (continuação):- Estruturas isoladas das espécies de *Himatanthus* estudadas quimicamente.

ÁCIDOS



1.4. Etnofarmacognosia, estudo químico e atividade biológica

1.4.1. *Himatanthus obovatus*

O chá das folhas de *H. obovatus*, também conhecida no Brasil como “tiborna”, “Angélica”, “pau-de-leite”, “janaúba” e “leiteira” é utilizado no Norte do Brasil como depurativo, no tratamento de pressão alta, de manchas na pele, espinhas e coceiras e, o látex desta espécie é utilizado no tratamento de úlceras estomacais (Coelho e Azevedo, 2000).

Vilegas e colaboradores (1992) trabalharam com o extrato acetato de etila da raiz de *H. obovatus* e isolaram os iridóides plumericina 5 e isoplumericina 6. Os extratos acetato de etila da raiz, folhas, casca e tronco de *H. obovatus* e os iridóides 5 e 6, foram testados quanto à atividade antifúngica frente aos fungos *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*. Os resultados foram negativos para os extratos, mas positivos para os iridóides. A análise por CCD dos extratos que apresentaram resultados negativos mostrou a ausência destes dois iridóides em suas composições.

Souza-Fagundes e colaboradores (2002) testaram 313 extratos de plantas brasileiras (de 136 espécies pertencentes a 36 famílias) quanto à inibição da proliferação de linfócitos em sangue periférico humano (PBMC) estimulada pela fitohemaglutinina A (PHA). Os extratos de três plantas, entre elas, a *H. obovatus*, foram capazes de inibir a replicação in vitro de PBMC humano. Os resultados obtidos encorajam o grupo a continuar a investigação sobre as propriedades imunomodulatórias destes extratos e seus componentes.

1.4.2. *Himatanthus sucubus*

Na medicina popular brasileira o látex e a casca da *H. sucubus*, também conhecida como “sucubus” e “janaguba”, são muito utilizados no tratamento de gastrite, hemorróidas, anemia, artrite, verminose e câncer (Lima *et al.*, 2000).

Silva e colaboradores (1998-A), testaram a atividade antifúngica do extrato hexânico da casca de *H. sucubus* frente ao fungo *Cladosporium shaerospermum* observando um forte halo de inibição para o extrato. A purificação monitorada do extrato mostrou que a fração bioativa era composta pelos iridóides plumericina 5 e isoplumericina 6, que quando isolados mostraram uma atividade cinco vezes maior que

a atividade observada para o antibiótico nistadina utilizado como padrão. Silva e colaboradores (1998-B) também testaram o látex de *H. sucuuba* frente à algumas linhagens de células cancerosas e descobriram que as frações bioativas eram compostas pelo iridóide plumericina 5 e uma mistura de esteróides. Este mesmo grupo de pesquisas (Silva *et al.*, 1998-C), testou as atividades analgésica e antiinflamatória do látex de *H. sucuuba* e observou que as frações bioativas eram compostas pelos cinamatos de α - e β -amirina 18 e 19, cinamato de lupeol 23, acetato de lupeol 22 e açúcares. Este mesmo grupo (Miranda *et al.*, 2000) relatou a identificação dos compostos responsáveis pela atividade antiinflamatória e analgésica do látex de *H. sucuuba* por CG-EM como sendo os triterpenos cinamatos de lupeol 23 e de α -amirina 18 e o acetato de lupeol 22.

Ribeiro-dos-Santos e colaboradores (1998) testaram os extratos aquosos da casca e das folhas de *H. sucuuba* frente a várias linhagens neoplásicas "*in vitro*" (mieloma de camundongo, neuroblastoma de camundongo, plasmocitoma de camundongo, timona de camundongo, sarcoma induzido por metil colantreno e células epiteliais de rim de macaco). Os autores observaram inibição no crescimento de "várias destas linhagens neoplásicas".

Lima e colaboradores (2000) testaram as atividades analgésica e antiinflamatória do látex e da casca de *H. sucuuba*. Os autores observaram boa atividade analgésica e antiinflamatória no extrato hexânico do látex (devido aos cinamatos de α - e β -amirina 18 e 19 e acetato de lupeol 22) e atividade antiinflamatória do extrato hidroalcoólico da casca.

O extrato metanólico da casca de *H. sucuuba* mostrou ser inibidor seletivo da enzima monoaminaoxidase B (MAO-B). O resultado da purificação monitorada deste extrato mostrou que a substância responsável por esta atividade era o ácido confluêntico 28. Substâncias com essa atividade são utilizadas no tratamento de alguns tipos de depressão e do mal de Parkinson (Endo *et al.*, 1994).

Com o objetivo de encontrar metabólitos secundários com potencial atividade anti-câncer, Wood e colaboradores (2001) fizeram uma partição monitorada do extrato etanólico da casca de *H. sucuuba*. A purificação do extrato que se mostrou mais promissor levou ao isolamento de 4 triterpenos pentacíclicos.

Pelo fato do látex e da infusão da casca de *H. sucubus* serem muito utilizados na medicina popular, Fernandes e colaboradores (2000), testaram a toxicidade aguda do látex e do extrato aquoso da casca desta planta. A partir dos resultados obtidos os autores “admitem que existe uma boa margem de segurança para o emprego de *H. sucubus* nas indicações da medicina popular”.

1.4.3. *Himatanthus phagedaenicus*

Na medicina popular brasileira a *H. phagedaenicus*, também conhecida como “angélica do mato”, “banana de papagaio” e “leiteiro”, é muito utilizada como catártica, depurativa e anti-helmíntica. O extrato etanólico da casca de *H. phagedaenicus* mostrou ter efeitos espasmódicos (Vanderlei e Souza-Brito, 1986).

1.5. Classes de compostos isoladas do gênero *Himatanthus* e sua biossíntese

1.5.1. Lignanas

O termo “lignóide” designa os metabólitos secundários cujos esqueletos são formados pelo grupo fenilpropânico $(C_6-C_3)_n$, onde $n=1, 2, 3...$. Os lignóides dividem-se em lignanas, neolignanas, alolignanas, norlignanas, oligolignóides e heterolignóides. Mais de 500 lignóides são descritos na literatura, sendo que 90% destes, pertencem aos grupos das lignanas e das neolignanas (Barbosa Filho, 1999).

As lignanas (termo criado em 1942 por Haworth), são dímeros formados através do acoplamento oxidativo de álcoois cinâmicos entre si, ou destes com ácidos cinâmicos. Estruturalmente os dois resíduos *n*-propilbenzênicos apresentam o carbono gama (C9) oxigenado, como por exemplo, o pinoresinol 14 e o isolariciresinol 33 (Figura 4) (Barbosa Filho, 1999).

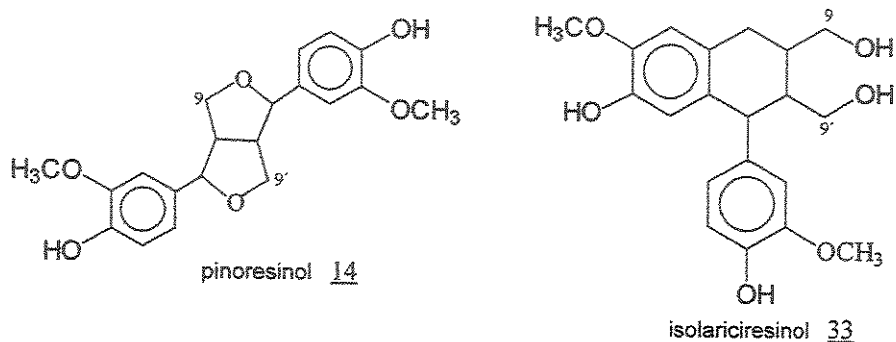


Figura 4:- Exemplos de lignanas (Barbosa Filho, 1999).

As neolignanas (termo criado em 1978 por Gottlieb), são dímeros oxidativos de alil fenóis e de propenilfenóis, entre si ou cruzados, e não apresentam o carbono gama (C9) oxigenado, como por exemplo, a grandisina 34 e a licarina 35 (Figura 5) (Barbosa Filho, 1999).

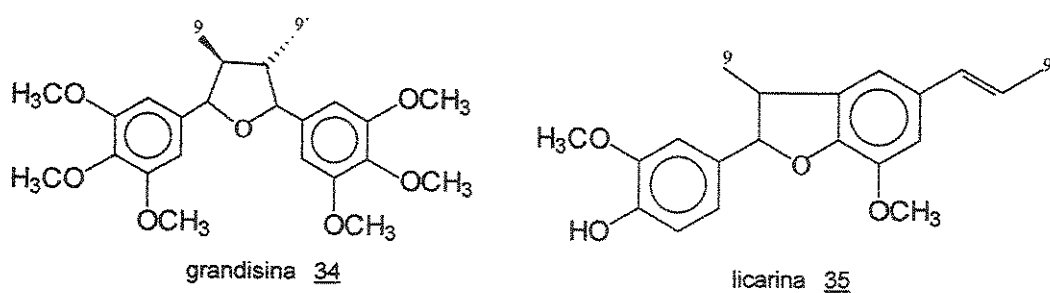
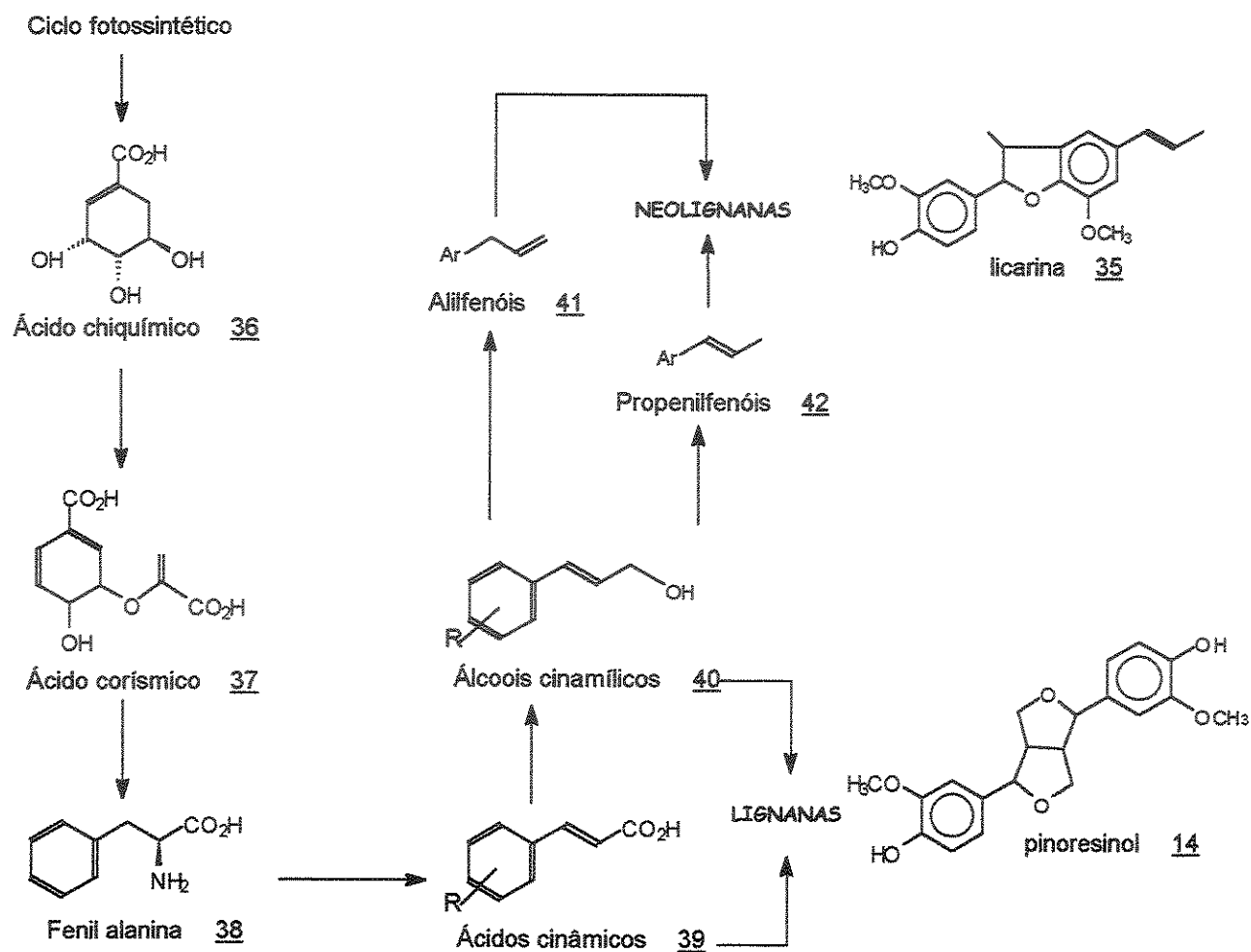


Figura 5:- Exemplos de neolignanas (Barbosa Filho, 1999).

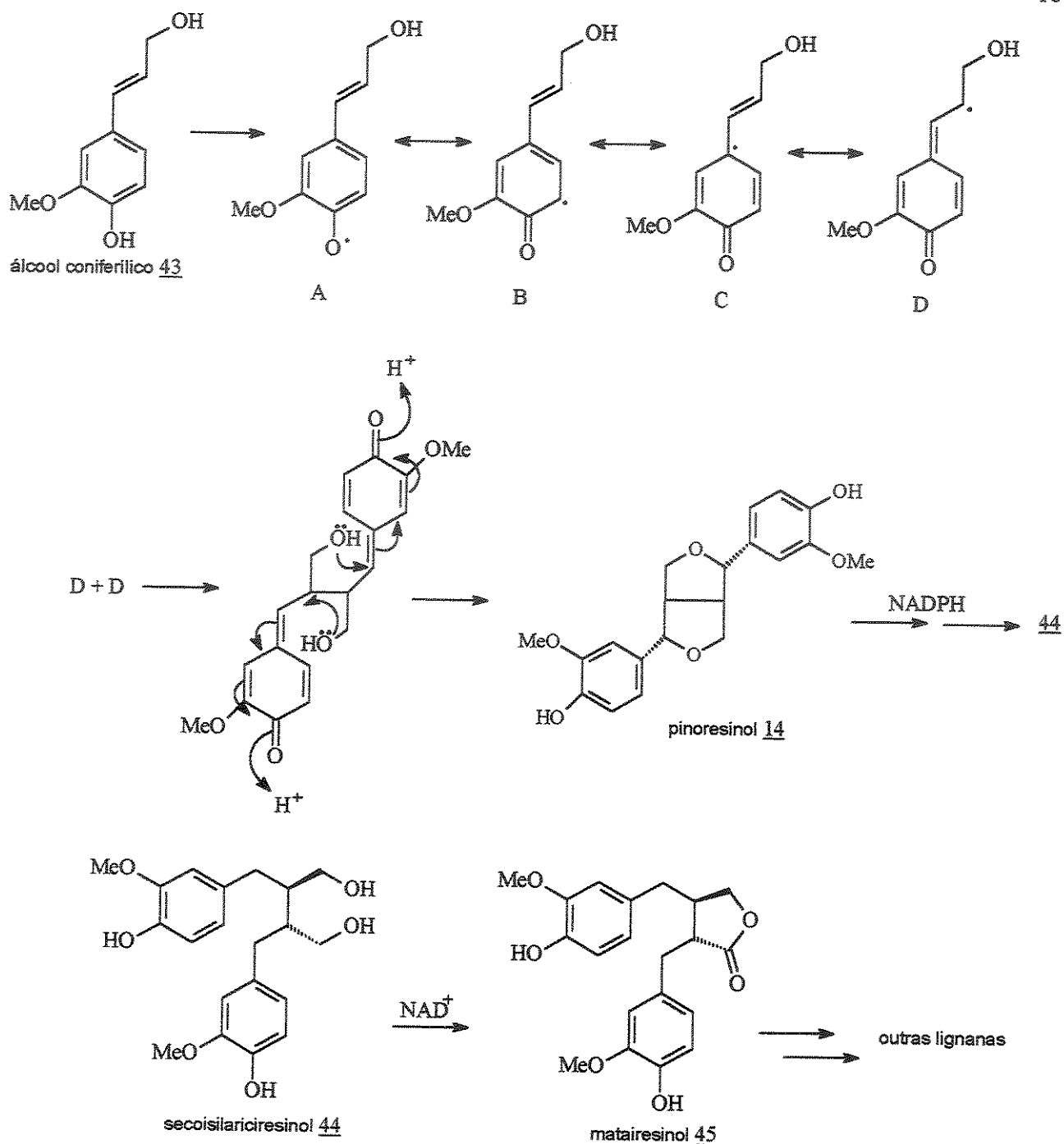
Um esquema geral da biossíntese das lignanas e das neolignanas é apresentado no Esquema 1 (Barbosa Filho, 1999 e Dewick, 1997).



Esquema 1: Esquema geral da biossíntese das lignanas e das neolignanas (Barbosa Filho, 1999 e Dewick, 1997).

A biossíntese dos lignóides, principalmente das lignanas e neolignanas, pode ser explicada pelo acoplamento oxidativo entre unidades monoméricas radicalares. Esses radicais podem apresentar várias estruturas canônicas de ressonância e, diferentes tipos de acoplamento entre esses radicais levam à formação dos vários tipos de lignóides existentes (Barbosa Filho, 1999 e Dewick, 1997).

O Esquema 2 mostra o caminho biossintético proposto para algumas lignanas (Dewick., 1997).



Esquema 2:- Caminho biossintético proposto para lignanas (Dewick, 1997).

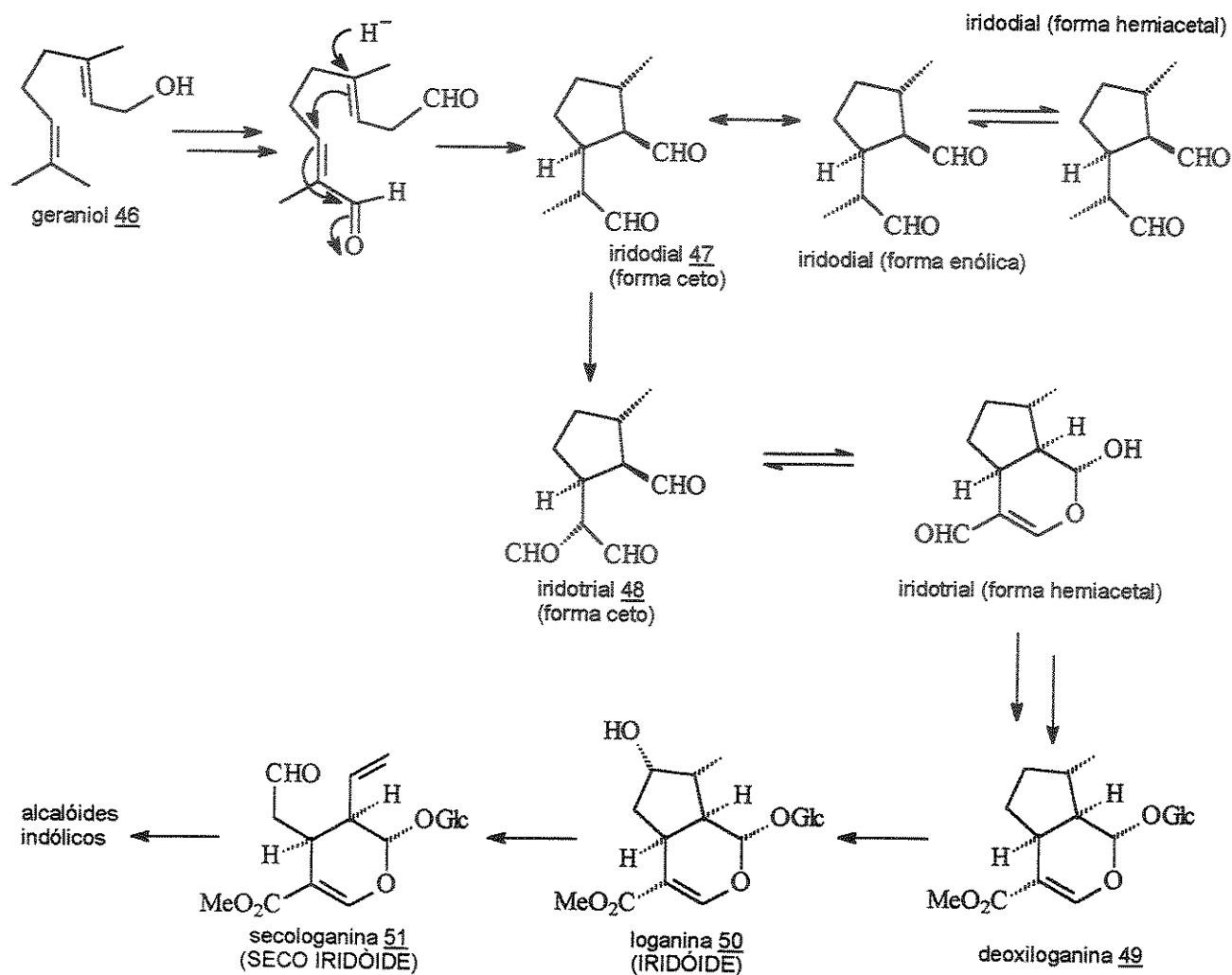
Baseando-se em fitoquímica comparada, Gottlieb (1982) mostrou que os lignóides indicam o processo evolutivo de Angiospermas e desempenham um papel na adaptação ecológica. Há evidências que esse grupo de substâncias esteja envolvido em interações de plantas com fungos, insetos ou com outras plantas. Harmatha e Dinan

(2003) citam que as lignanas têm um papel significativo na defesa das plantas contra os insetos, agindo muitas vezes como reguladores da alimentação destes.

1.5.2. Iridóides

Iridóides são derivados monoterpênicos que, normalmente, contém um anel ciclopentano fundido a um anel de 6 membros oxigenado, como por exemplo a deoxiloganina 49, sendo que na natureza, geralmente eles ocorrem na forma glicosilada (Gershenson e Mabry, 1983). Espécies pertencentes à Família Apocynaceae produzem tanto iridóides quanto seco-iridóides (Waterman e Gay, 1987).

A seguir é mostrado um esquema da biossíntese de iridóides e seco-iridóides (Esquema 3). A loganina 50 é um intermediário chave na biossíntese dos iridóides e tem um papel importante na biossíntese de alcalóides indólicos (Dewick, 1997).



Esquema 3:- Caminho biossintético simplificado para os iridóides e seco-iridóides (Dewick, 1997).

1.5.3. Nor-isoprenóides

Nor-isoprenóides são compostos que têm 13 ou 15 átomos de carbono, como por exemplo o blumenol B 52 (Figura 6).

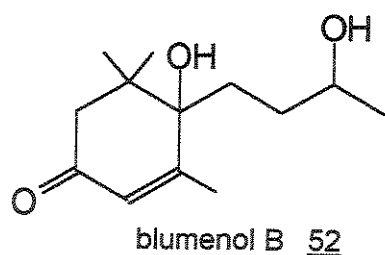


Figura 6:- Estrutura do blumenol B 52

Isoe (1970) em seu trabalho, propõe que uma grande variedade de substâncias C13 e C15 são provenientes da clivagem fotooxidativa da cadeia poliênica dos carotenóides. Lutz e Winterhalter (1992), isolaram nor-isoprenóides e terpenos irregulares de *Cydonia oblonga* (Família Rosaceae) e sugerem que estas duas classes de compostos são provenientes da degradação de carotenóides (Figura 7). Entretanto, apesar dos vários estudos sobre este assunto, pouco se conhece a respeito dos sistemas catalíticos que agem no início da degradação dos carotenóides nas plantas.

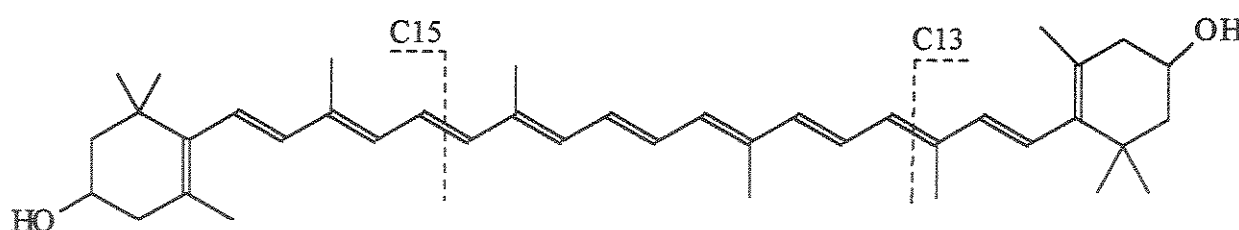


Figura 7:- Clivagem dos carotenóides (C40) levando aos nor-isoprenóides (C13 e C15) (Lutz e Winterhalter, 1992).

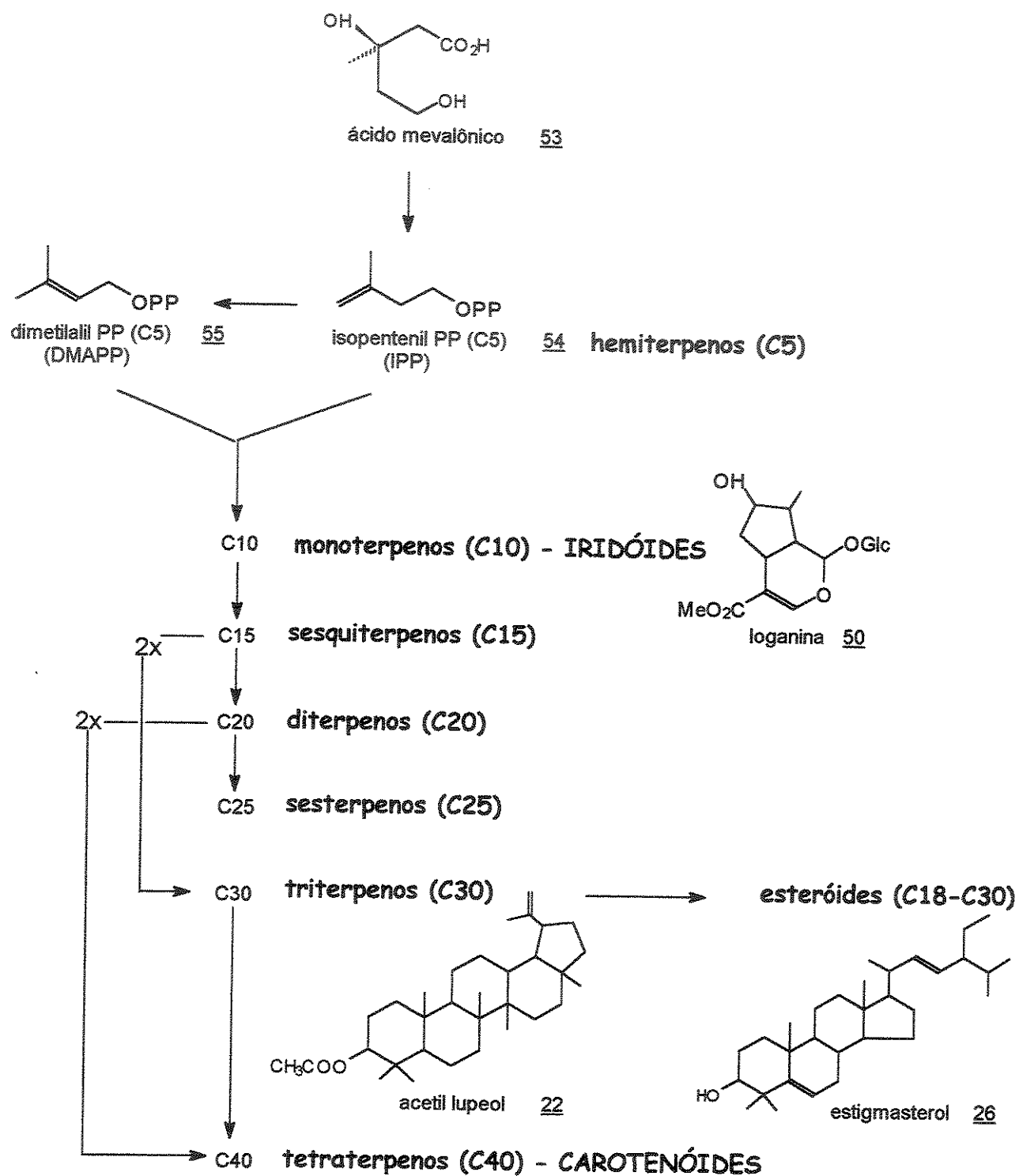
Os tetraterpenos são representados apenas por uma classe de compostos, os carotenóides. Estes compostos têm um papel importante na fotossíntese, mas também são encontrados em tecidos de plantas que não realizam a fotossíntese, como por exemplo, em fungos e bactérias (Dewick, 1997).

Estudos mais recentes indicam que a formação dos isoprenóides é derivada, além da rota do mevalonato, de uma outra rota a partir do piruvato e do gliceraldeído-3-fosfato (Krewzwieser *et al.*, 1999). Acredita-se que este outro caminho é responsável pela formação dos isoprenos isolados de plantas, incluindo os carotenóides, monoterpenos, diterpenos, entre outros (Waterman e Gray, 1987).

1.5.4. Terpenos

Os terpenóides são derivados de unidades de isopreno C5. As estruturas derivadas do isopreno são classificadas em hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterpenos (C25), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) (Esquema 4) (Dewick, 1997).

A condensação de unidades de isopreno dá origem à algumas das classes de compostos isoladas durante este trabalho, como por exemplo os iridóides, os nor-isoprenóides, os triterpenos e os esteróides.



Esquema 4:- Terpenos derivados do isopreno (Dewick, 1997).

1.5.5. Inositóis

Inositóis são ciclohexanos hexasubstituídos. O D-pinitol 56 e o mio-inositol 57 (Figura 8) são os ciclitóis mais encontrados nas plantas (Kuo *et al.*, 1997).

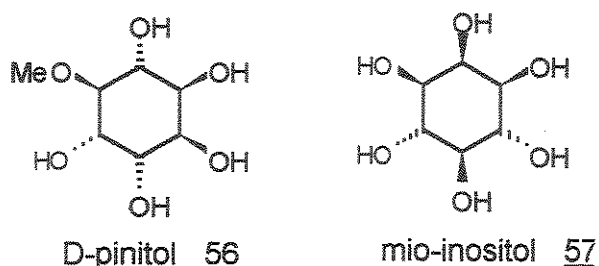
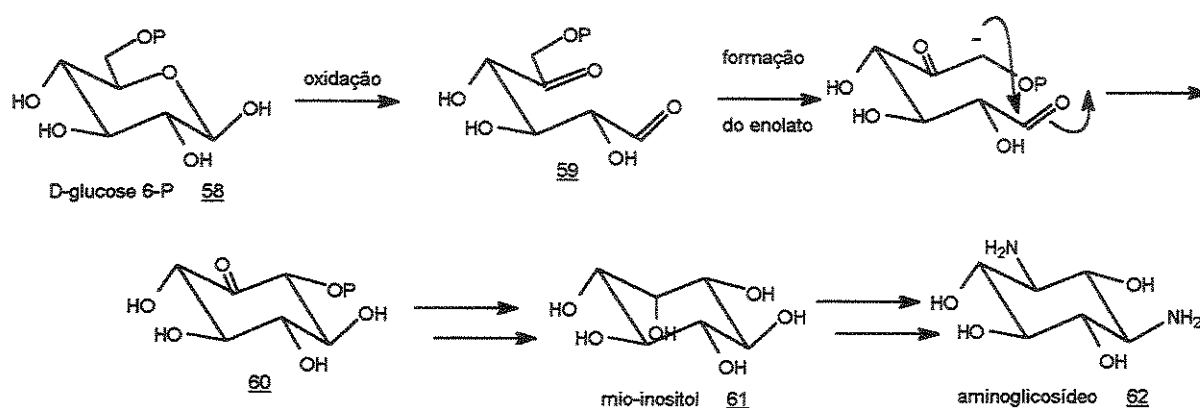


Figura 8:- Estruturas do D-pinitol e do mio-inositol (Kuo *et al.*, 1997).

Na literatura são encontrados relatos de atividades biológicas para os inositóis, como por exemplo, atividade hipoglicêmica, anti-diabética, potencializadora da secreção da adrenalina, auxiliar na remoção do colesterol do sangue, entre outras. Narayanan e colaboradores (1987) particionaram o extrato alcoólico de *Bougainvillea spectabilis* (Família Nyctaginaceae) com solventes de polaridades diferentes e purificaram o extrato metanólico, que se mostrou bioativo, utilizando cromatografia em coluna. Isolaram em grande quantidade o D-pinitol 56, que mostrou ter atividade hipoglicêmica em ratos.

Os mio-inositóis, formados a partir dos carboidratos, estão no caminho biossintético dos amino-glicosídeos, que são agentes antibióticos importantes (Dewick, 1997), como mostrado no Esquema 5.



Esquema 5:- Formação dos aminoglicosídeos passando pelos inositóis (Dewick, 1997).

1.6. Ensaios Biológicos

Atualmente existe uma tendência em direção à pesquisa interdisciplinar, exigindo a colaboração entre profissionais das várias áreas, para que “problemas” cada vez mais complexos sejam resolvidos. Como consequência disso a separação tradicional entre as diversas áreas profissionais está ficando cada dia menos distinta. No caso dos químicos de produtos naturais, o isolamento e a caracterização dos metabólitos secundários das plantas têm sido o primeiro passo para responder a uma série de várias outras questões (Ghisalberti, 1993). A procura por produtos naturais com atividade biológica complementa o isolamento de metabólitos secundários tradicionalmente feito pelos químicos de produtos naturais (Cole, 1994).

O que se vê atualmente é a necessidade crescente de testes biológicos simples, que sejam capazes de detectar um largo espectro de atividades farmacológicas e que possam ser realizados por químicos de produtos naturais em seus laboratórios a baixos custos, sendo assim possível monitorar o fracionamento dos extratos das plantas em busca de possíveis atividades biológicas (Meyer *et al.*, 1982).

1.6.1. Teste de letalidade utilizando *Artemia salina* Leach (Brine shrimp)

O teste de letalidade utilizando *Artemia salina* Leach é um teste de fácil realização, de baixo custo e que utiliza pequenas quantidades de extratos e de substâncias puras. O objetivo deste teste é fornecer respostas preliminares a respeito da possível atividade citotóxica e/ou inseticida de extratos e de substâncias isoladas, para que só então sejam feitos testes mais específicos e mais caros (Ghisalberti, 1993).

Os ovos de *A. salina* Leach são colocados em solução de sal marinho para eclodirem fornecendo um grande número de larvas. Os extratos e/ou substâncias puras são testados em frascos contendo solução de sal marinho e larvas de camarão. Após 24 horas as larvas sobreviventes são contadas e são calculados estatisticamente os valores de CL_{50} com intervalos de confiança de 95% (Ghisalberti, 1993).

A toxicidade frente a *A. salina* parece estar correlacionada à citotoxicidade diante de linhagens celulares de tumores, como por exemplo, das linhagens 9KB (carcinoma nasofaríngeo humano) e L1210 (leucemia em ratos) (Rosa *et al.*, 1994).

1.6.2. Testes de bioautografia

Os testes de bioautografia são utilizados para avaliação bactericida e fungicida de extratos e/ou substâncias puras. Esta metodologia tem a vantagem de ser rápida, de fácil execução, relativamente barata e necessitar de uma quantidade pequena de material a ser testado. Os resultados são de fácil interpretação, já que a inibição no crescimento dos microrganismos é de fácil visualização (Cole, 1994).

Os extratos e/ou substâncias puras a serem testados, juntamente com o bactericida ou fungicida comerciais são aplicados em placa de CCA que, após eluição, é colocada em placa de Petri. O meio de cultura apropriado é colocado na placa de Petri e, após o seu endurecimento, a cultura do microrganismo é espalhada sobre ele. Após o período de incubação, a placa é observada para avaliar se existe inibição no crescimento do microrganismo utilizado (Rios *et al.*, 1988).

1.6.3. Testes de atividade antiproliferativa

Atualmente, considera-se o câncer a segunda maior causa de morte por doenças na maioria dos países, sendo superado apenas pelas doenças cardiovasculares. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a cada ano a doença atinge 9 milhões de pessoas levando à óbito 5 milhões de pacientes (Boyle, 1987).

Os tratamentos possíveis são: **cirurgia**, no caso em que o tumor está localizado e ainda não gerou metástases; **radioterapia**, nos casos em que o tumor, também localizado, não pode ser extraído totalmente na cirurgia e **quimioterapia**, tratamento que utiliza agentes citotóxicos, que eliminam as células neoplásicas, diminuindo o crescimento do tumor e a proliferação desordenada das células. No caso da quimioterapia, existem inúmeros efeitos colaterais, como por exemplo, náusea, vômito, febre e diarreia, além do fato dos agentes quimioterápicos utilizados poderem gerar resistência às drogas (Kohn, 2000).

Existe a necessidade do desenvolvimento de novas drogas para o tratamento do câncer e a utilização de substâncias isoladas de plantas para esta finalidade tem sido utilizada com sucesso há vários anos. Na década de 70, nenhuma das empresas farmacêuticas mais importantes do mundo mantinha qualquer programa de pesquisas na

área de produtos naturais e, atualmente, pelo menos metade delas, têm como prioridade a pesquisa de novos fármacos a partir de espécies vegetais (Kohn, 2000).

Os extratos a serem testados, nas concentrações de 15,625; 31,250; 62,500 e 125,000 $\mu\text{g/mL}$, são adicionados em placas de 96 divisões, sendo que cada placa contém uma linhagem celular derivada de tumor humano. Após um período de incubação, as células são fixadas com a solução 50% de ácido tricloroacético e são coradas com solução 0,4% de sulforodamina B em solução 1% de ácido acético (SRB). Faz-se a leitura óptica em leitor de ELISA a 540 nm (Skehan *et al.*, 1990).

2. OBJETIVOS

☞ Isolamento e determinação estrutural dos metabólitos secundários presentes nos vários extratos da espécie *Himatanthus obovatus* (Apocynaceae).

☞ Avaliação da atividade biológica dos extratos e substâncias isoladas através dos ensaios de letalidade utilizando *Artemia salina* Leach (indicativo de uma possível atividade citotóxica e/ou inseticida), bioautografia (atividade bactericida e fungicida) e testes de atividade antiproliferativa frente à algumas linhagens tumorais humanas.

☞ Correlação entre os metabólitos secundários encontrados e o estudo de sistemática vegetal apresentado na tese de Doutorado de Andréa P. Spina (Spina, 2004).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais e Métodos

Os espectros de RMN¹H, de RMN¹³C (totalmente desacoplado e DEPT), NOE, NOESy 1D, cycleNOE e espectros bidimensionais (HETCOR, HSQC, HMBC, COSY e gCOSY) foram obtidos em um espectrômetro Gemini 300 BB (Varian) ou Bruker AC 300/P com campo de 7 tesla ou em um espectrômetro Inova 500 (Varian) com campo de 11 tesla. As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (Merck) ou, quando necessário, em uma mistura de clorofórmio e metanol deuterados (Merck), utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) são indicados em ppm e as constantes de acoplamento (J) são indicadas em Hertz (Hz).

Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrofotômetros Perkin-Elmer, modelo 1600 e FT/IR Bomem MB em filmes utilizando CH₂Cl₂.

Os espectros de massas (baixa resolução), foram obtidos em um espectrômetro de massas, modelo VG AutoSpec (Fisions Instruments), utilizando a técnica de impacto eletrônico a 70 eV.

As análises utilizando Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) foram realizadas em um aparelho Shimadzu, equipado com coluna capilar de sílica fundida J&W Scientific DB-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) e os espectros de massas (EM) foram obtidos utilizando a técnica de impacto eletrônico a 70 eV. Os EM obtidos foram comparados aos espectros de massas da biblioteca do aparelho (NIST).

Os extratos brutos de *Himatanthus obovatus* foram purificados por Cromatografia em Coluna (CC) sob média pressão em sílica-gel (230-400 Mesh – Merck).

As frações obtidas destas colunas foram purificadas, dependendo da quantidade de amostra, ou por CC sob média pressão em sílica-gel (230-400 Mesh – Merck), ou por Cromatografia em Camada Preparativa (CCP) em sílica-gel (H e HF₂₅₄ – Merck).

Os extratos brutos obtidos foram testados quanto à possível presença de alcalóides utilizando o reagente de Mayer (Ugaz, 1988).

As placas de Cromatografia em Camada Analítica (CCA) foram reveladas sob luz ultravioleta (UV - 254 e 366 nm) e borrifadas com solução de ácido sulfúrico / metanol (1:1 – v/v) seguida de carbonização em chapa de aquecimento ou, com reagente de

Dragendorff e solução de $H_2SO_4/MeOH$ (1:1), também seguida de carbonização em chapa de aquecimento.

3.2. Coleta do material botânico

O material vegetal (folhas e caule) de *Himatanthus obovatus* (Apocynaceae) utilizado no início deste trabalho, foi coletado na Chapada dos Guimarães (MT) (Figura 9 - A) em viagem realizada no período de 06 a 16 de janeiro de 1998. As exsicatas deste material estão depositadas no Herbário UEC do Instituto de Biologia - Unicamp (Ingrid Koch 808, Lucília Kato, Raquel M. Braga & Renato Belinello – UEC 135208).

Para a continuação do nosso trabalho, foi realizada uma nova coleta da casca de *H. obovatus* em Casa Branca (SP) (Figura 9 - B) em julho de 1998. A exsicata deste material está depositada no Herbário UEC do Instituto de Biologia -Unicamp (Ângela L. B. Sartori 316, Valéria B. de Lima – UEC 105704).

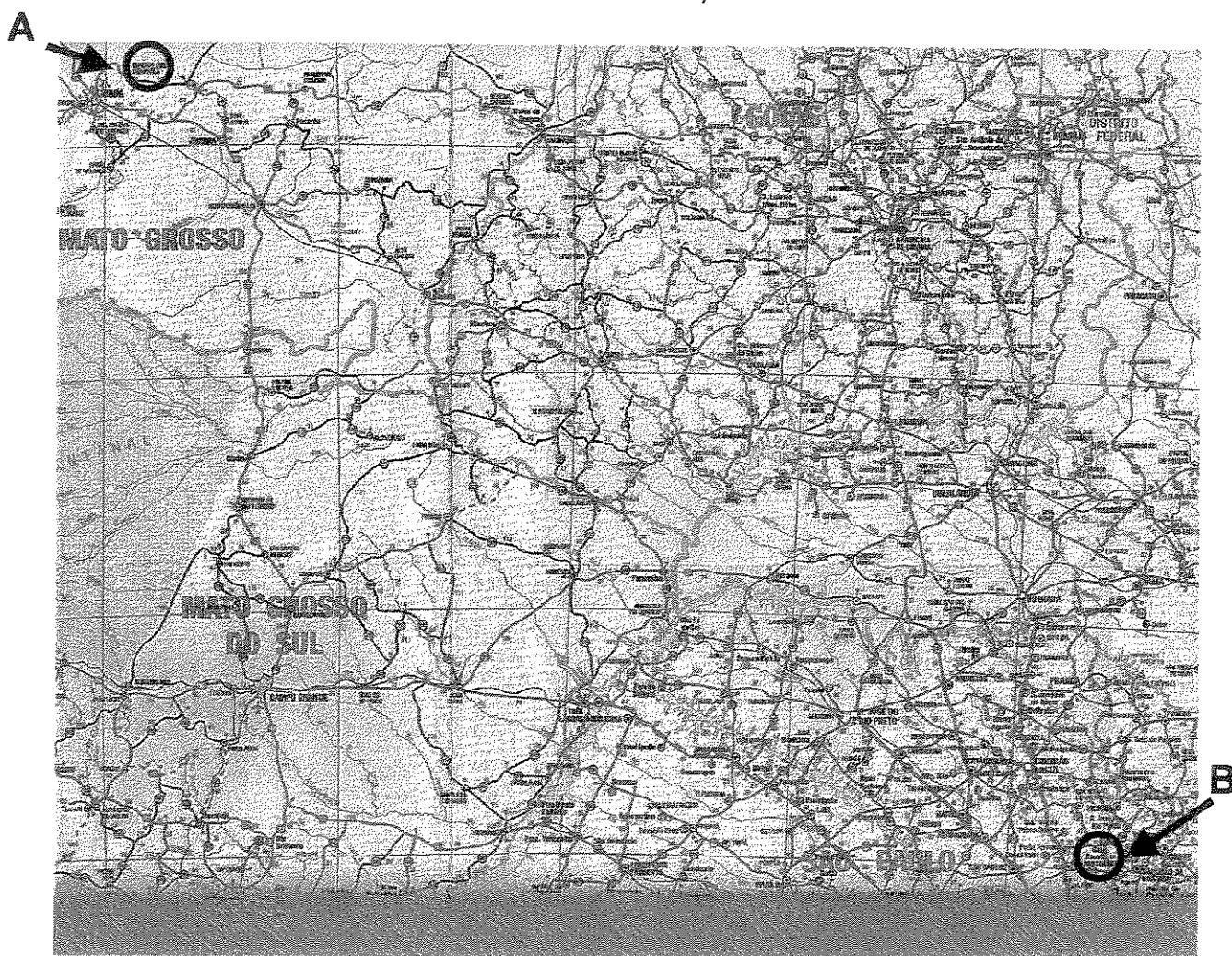


Figura 9:- Mapa mostrando os locais de coleta da *H. obovatus* :
Chapada dos Guimarães - MT (A) Casa Branca - SP (B)

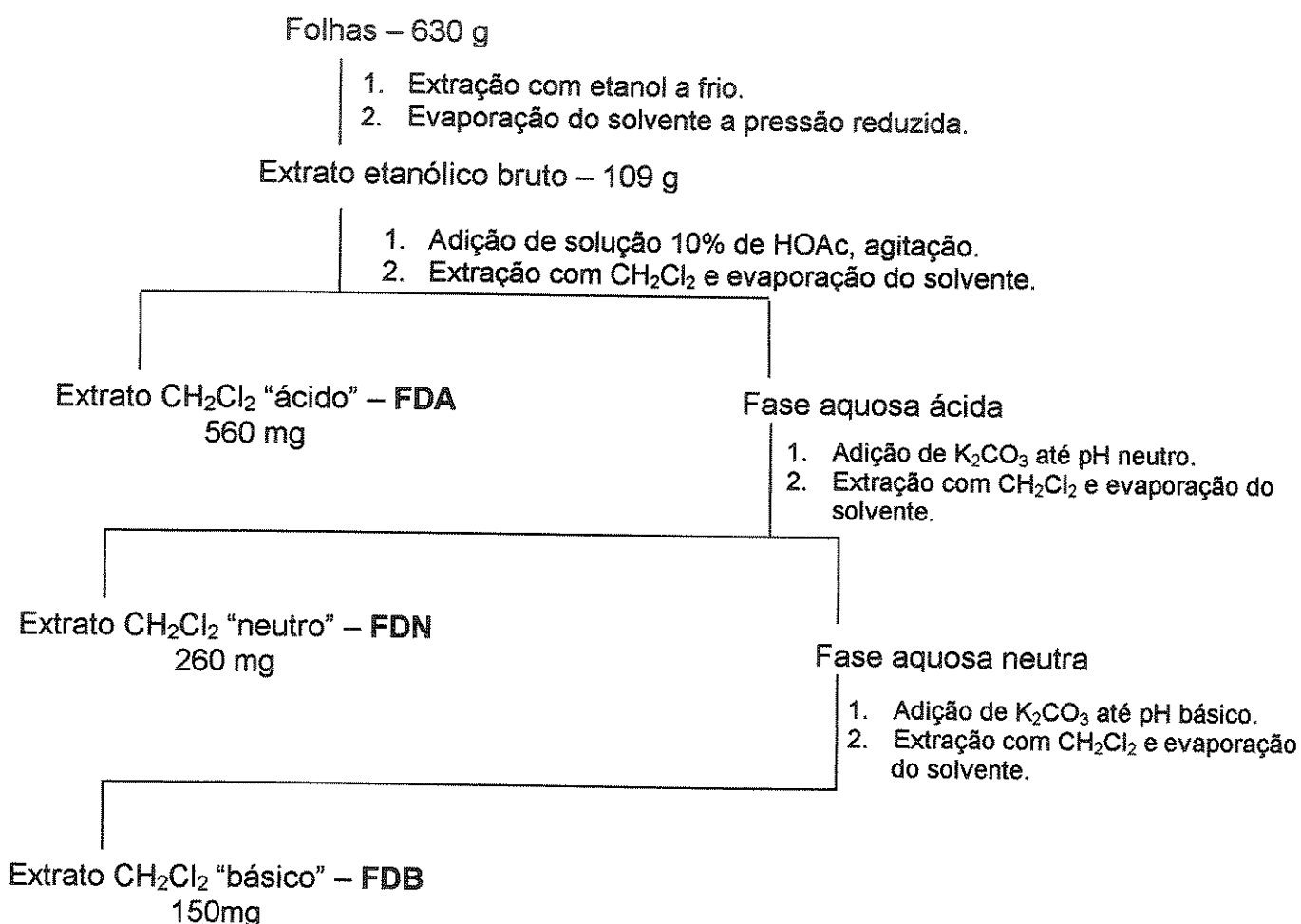
3.3. Obtenção e purificação dos extratos

3.3.1. Obtenção do extrato etanólico das folhas de *H. obovatus* coletadas na Chapada dos Guimarães (MT) e tratamento ácido-base.

As folhas de *H. obovatus* (630 g), coletadas na Chapada dos Guimarães (MT) foram secas ao ar, moídas e submetidas várias vezes à extração a frio utilizando etanol que, ao final, foi removido sob pressão reduzida obtendo-se 109 g de extrato etanólico.

O extrato etanólico bruto foi submetido a tratamento ácido-base padrão para isolamento de alcalóides como mostrado no Esquema 6.

Esquema 6:- Esquema de extração ácido-base das folhas de *H. obovatus* (Chapada dos Guimarães - MT)



FDA - Folhas, Diclorometano, **Á**cido, **FDN** - Folhas, Diclorometano, Neutro e **FDB** - Folhas, Diclorometano, **B**ásico.

3.3.1.A. Purificação do extrato FDA (Folhas, Diclorometano, Ácido)

O extrato FDA (560,0 mg) de *H. obovatus* foi purificado utilizando-se cromatografia em coluna (CC) sob média pressão em sílica-gel (230-400 Mesh). Os compostos foram eluídos em diclorometano / metanol, inicialmente na proporção 98:2 e a polaridade foi sendo aumentada gradativamente até 75:25.

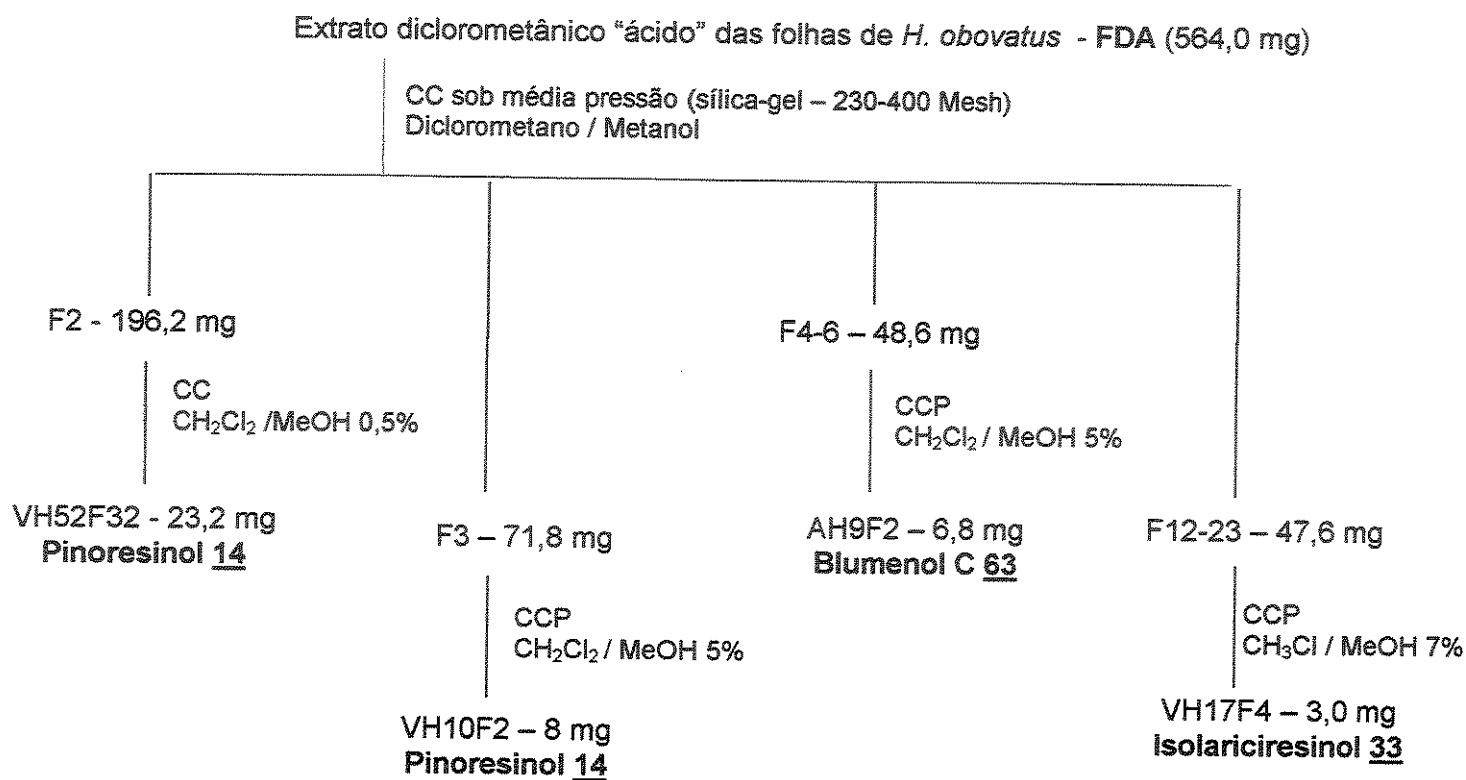
Foram obtidas 44 frações que, após análise por cromatografia em camada analítica (CCA), foram agrupadas em 10 grupos (Tabela 3).

Tabela 3:- Agrupamento das frações obtidas na purificação do extrato FDA de *H. obovatus* (Chapada dos Guimarães - MT).

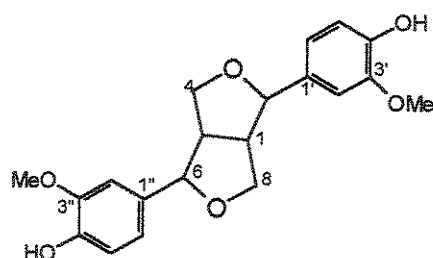
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	Frações reunidas	Massa (mg)	Compostos isolados
98 : 2	1	15,9	
	2	196,2	Pinoresinol <u>14</u>
	3	71,8	Pinoresinol <u>14</u>
	4 –6	48,6	Blumenol C <u>63</u>
	7 –11	31,6	
	12 –23	47,6	Isolariciresinol <u>33</u>
95 : 5	24 – 25	30,5	
	26 – 40	56,7	
90 : 10	41 – 43	16,3	
75 : 25	44	19,1	
Total		534,3 (95%)	

O Esquema 7 mostra as purificações das frações F2, F3, F4-6 e F12-23, utilizando CC e CCP.

Esquema 7:- Purificações por CCP das frações reunidas, descritas na Tabela 3.



Pinoresinol 14 (lignana)



Nome IUPAC:- 4,4'-diidroxi-3,3'-dimetoxi-7,9':7',9-diepoxilignana

C₂₀H₂₂O₆ - MM 358

Isolado de: *Himatanthus fallax* (Apocynaceae) (Abdel-Kader *et al.*, 1997).

RMN¹H: Esp. 6, Tabela 13.

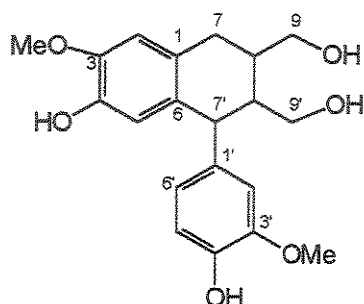
RMN¹³C: Esp. 3, Tabela 13.

DEPT, HSQC, gCOSY, NOESy1D:- Espectros 4, 5, 8 e 7.

IV: Esp. 1, (filme em CH₂Cl₂) $\nu_{\text{máx.}}$ (cm⁻¹):- 3385 (forte e larga - OH), 1716 (fraca e larga), 1603 e 1514 (C=C Aromáticos), 1384 (OH).

EM: Esp. 2, [m/z (%):- 358 [M]⁺ (10), 327 (12), 205 (35), 189 (15), 180 (17), 163 (46), 151(100), 137 (70), 109 (19), 91 (16), 81 (18), 65 (14), 55 (11).

Isolariciresinol 33 (ou ciclolariciresinol - lignana)



Nome IUPAC:- 5,3-dimetoxi-2,7'-ciclolignana-4,4',9,9'-tetraol

C₁₉H₂₂O₆ - MM 360

Isolado de: *Urtica dioica* L. (Urticaceae) (Schottner *et al.*, 1997) e *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) (Fonseca *et al.*, 1978).

RMN¹H: Esp. 13, Tabela 14.

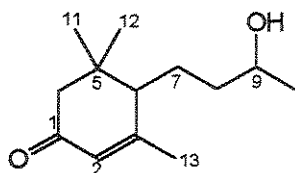
RMN¹³C: Esp. 10, Tabela 14.

DEPT, HSQC, gCOSY:- Espectros 11, 12 e 14.

IV: Esp. 9 (filme em CH₂Cl₂) $\nu_{\text{máx.}}$ (cm⁻¹):- 3412 (forte e larga - OH), 1730 (fraca e larga), 1604 e 1512 (C=C Aromáticos), 1379 (OH).

EM: Esp. 15 [m/z (%):- 360 [M]⁺ (90), 311 (83), 284 (21), 255 (21), 241 (40), 219 (16), 187 (12), 175 (34), 149 (47).

Blumenol C 63 (nor-isoprenóide)



Nome IUPAC:- 2-cyclohexeno-1-ona,4-(3-hidroxi-butila)-3,5,5-trimetila

C₁₃H₂₂O₂ - MM 210

Isolado de: *Salvia nemorosa* (Labiatae) (Takeda *et al.*, 1997).

RMN¹H: Esp. 22, Tabela 15.

RMN¹³C: Esp. 18, Tabela 15.

DEPT, HMQC, COSY:- Espectros 19, 20 e 21.

IV: Esp. 16 (filme em CH_2Cl_2) $\nu_{\text{máx.}}$ (cm^{-1}):- 3411 (larga e forte - OH), 1736, 1650 ($\text{C}=\text{O}$ - $\text{C}=\text{C}$), 1459, 1378, 1258, 1125.

EM: Esp. 17 [m/z (%):- 210 [M]+ (90), 177 (40), 150 (60), 135 (94), 123 (87), 108 (95), 95 (100), 69 (86).

3.3.1.B. Purificação do extrato FDN (Folhas, Diclorometano, Neutro).

O extrato FDN (260,0 mg) de *H. obovatus* foi purificado utilizando-se CC sob média pressão em sílica-gel (230-400 Mesh). Os compostos foram eluídos da coluna em diclorometano / metanol, inicialmente na proporção 98:2 e a polaridade foi sendo aumentada gradativamente até 80:20.

Foram obtidas 91 frações que, após análise por CCA, foram agrupadas em 13 grupos (Tabela 4).

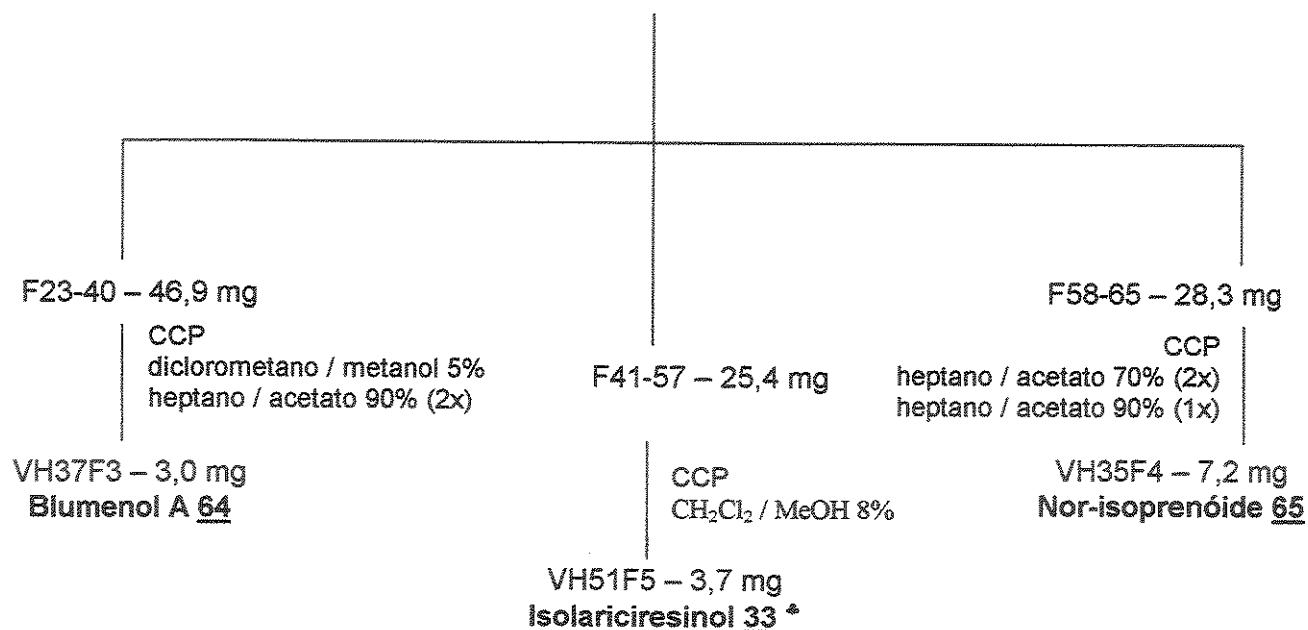
Tabela 4:- Agrupamento das frações obtidas na purificação do extrato FDN de *H. obovatus* (Chapada dos Guimarães - MT).

$\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$	Frações reunidas	Massa (mg)	Compostos isolados
98 : 2	1-5	19,5	
	6	0,7	
	7	2,7	
	8 – 10	23,5	
	11 – 13	20,8	
	14 – 18	15,3	
	19 – 22	16,4	
	23 – 40	46,9	Blumenol A <u>64</u>
95 : 5	41 – 57	25,4	Isolariciresinol <u>33</u>
	58 – 65	28,3	Nor-isoprenóide <u>65</u>
90 : 10	66 – 71	21,0	
	72 – 90	25,4	
80 : 10	91	5,9	
Total		251,8 (97%)	

O Esquema 8 mostra as purificações das frações F23-40, F41-57 e F58-65, utilizando CCP.

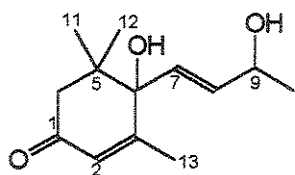
Esquema 8:- Purificações por CCP das frações reunidas, descritas na Tabela 4.

Extrato diclorometânico “neutro” das folhas de *H. obovatus* – FDN (260,0 mg)



* **Observação:-** A substância 33 já foi isolada anteriormente do extrato FDA e seus dados estão descritos na página 33.

Blumenol A 64 (nor-isoprenóide)



Nome IUPAC:- 6,9-diidroxi-9-apo-ε-caroten-1-ona

C₁₃H₂₀O₃ - MM 224

Isolado de: *Perrottetia multiflora* (Celastraceae) (González *et al.*, 1994)

RMN¹H:- Esp. 27, Tabela 16.

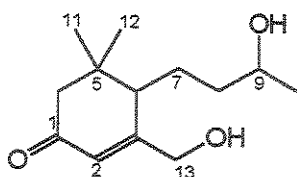
RMN¹³C:- Esp. 25, Tabela 16.

DEPT, gCOSY:- Espectros 26 e 28.

IV:- Esp. 23 (filme em CH₂Cl₂) ν_{máx.} (cm⁻¹):- 3409 (forte e larga - OH), 1736, 1655 (C=C-C=O), 1439, 1374, 1274.

EM:- Esp. 24 [m/z (%):- 224 [M]⁺ (0,5), 69 (7), 79 (15), 107 (9), 124 (100), 135 (8), 150 (8), 168 (8).

Nor-isoprenóide 65 (inédito)



Nome IUPAC:- 2-cyclohexeno-1-ona,4-(3-hidroxi-butila)-3-hidroximetila,5,5-dimetila

C₁₃H₂₂O₃ - MM 226

RMN¹H:- Esp. 34, Tabela 17.

RMN¹³C:- Esp. 31, Tabela 17.

DEPT, HSQC, gCOSY, cycleNOE:- Espectros 32, 36, 33 e 35.

IV:- Esp. 29 (filme em CH₂Cl₂) $\nu_{\text{máx.}}$ (cm⁻¹):- 3419 (forte e larga OH), 1642 (C=C-C=O), 1459, 1369, 1296.

EM:- Esp. 30 [m/z (%):- 226 [M]⁺ (10), 55 (72), 67 (43), 79 (53), 95 (100), 109 (80), 121 (53), 135 (50), 152 (45), 179 (27), 208 (44).

3.3.1.C. Purificação do extrato FDB (Folhas, Diclorometano, Básico).

O extrato FDB (150,0 mg) de *H. obovatus* foi purificado utilizando-se CC sob média pressão em sílica-gel (230-400 Mesh). Os compostos foram eluídos da coluna em diclorometano / metanol na proporção 99:1 e a polaridade foi sendo aumentada gradativamente até 80:20. Foram obtidas 119 frações que, após análise por cromatografia em camada analítica (CCA), foram agrupadas em 20 frações.

Após o agrupamento, foram feitas novas análises das frações utilizando-se CCA que indicaram que as frações ainda estavam bastante impuras. Devido às pequenas quantidades obtidas, optamos pela utilização da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) para avaliação das frações. Os cromatogramas apresentaram muitos picos, sendo que as comparações dos espectros de massas de cada pico com a biblioteca do aparelho (NIST) não esclareceu sobre a classe de compostos que estava presente nas misturas. Isto nos desencorajou a purificar estas frações.

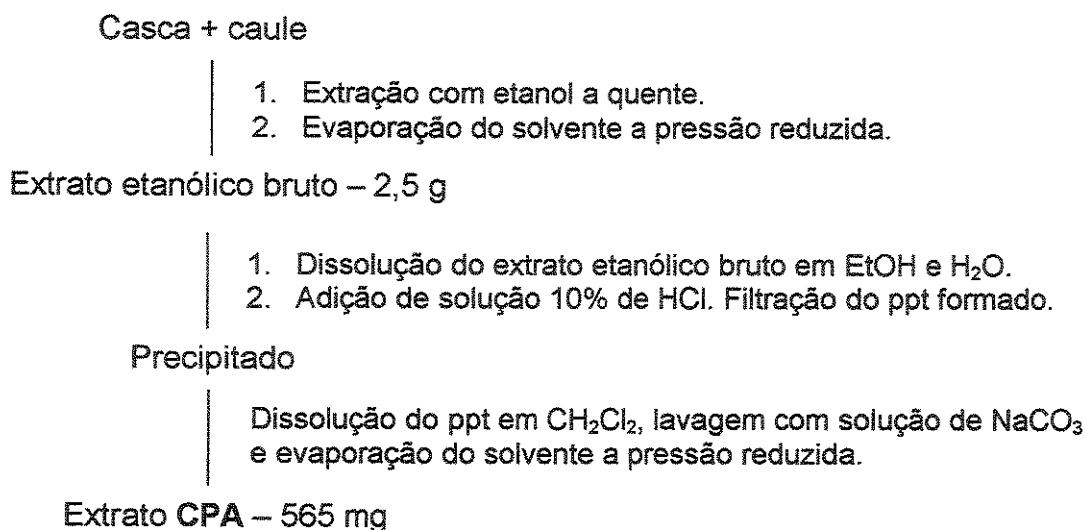
3.3.2. Obtenção do extrato etanólico da casca + caule de *H. obovatus* coletados na Chapada dos Guimarães - MT

A casca + caule de *H. obovatus* (325 g), coletados na Chapada dos Guimarães - MT foram moídas e submetidas à extração em Soxhlet utilizando-se etanol, que foi removido em rota-evaporador sob pressão reduzida obtendo-se 16,4 g de extrato.

3.3.2.A. Tratamento ácido do extrato etanólico da casca + caule de *H. obovatus* (Chapada dos Guimarães - MT)

Parte do extrato etanólico (2,5 g - item 3.3.2.) foi solubilizado em uma mistura de etanol e água. Vagarosamente foi adicionada a esta solução uma solução aquosa de ácido clorídrico 10% até que não houvesse mais a precipitação de um sólido branco. O precipitado foi filtrado, solubilizado em diclorometano e após lavagem com solução de NaHCO_3 , obteve-se 565,0 mg do extrato denominado **CPA** (Esquema 9).

Esquema 9:- Tratamento ácido do extrato etanólico da casca + caule de *H. obovatus* (Chapada dos Guimarães - MT).



3.3.2.A.a. Purificação do extrato CPA (Casca + caule, Ácido).

O extrato CPA de *H. obovatus* (565,0 mg - item 3.3.2.A) foi purificado utilizando-se CC sob média pressão em sílica-gel (230-400 Mesh). Os compostos foram eluídos da coluna com as misturas de solventes heptano / acetato de etila na proporção 95 : 5 e, em seguida, diclorometano / metanol na proporção 95 : 5.

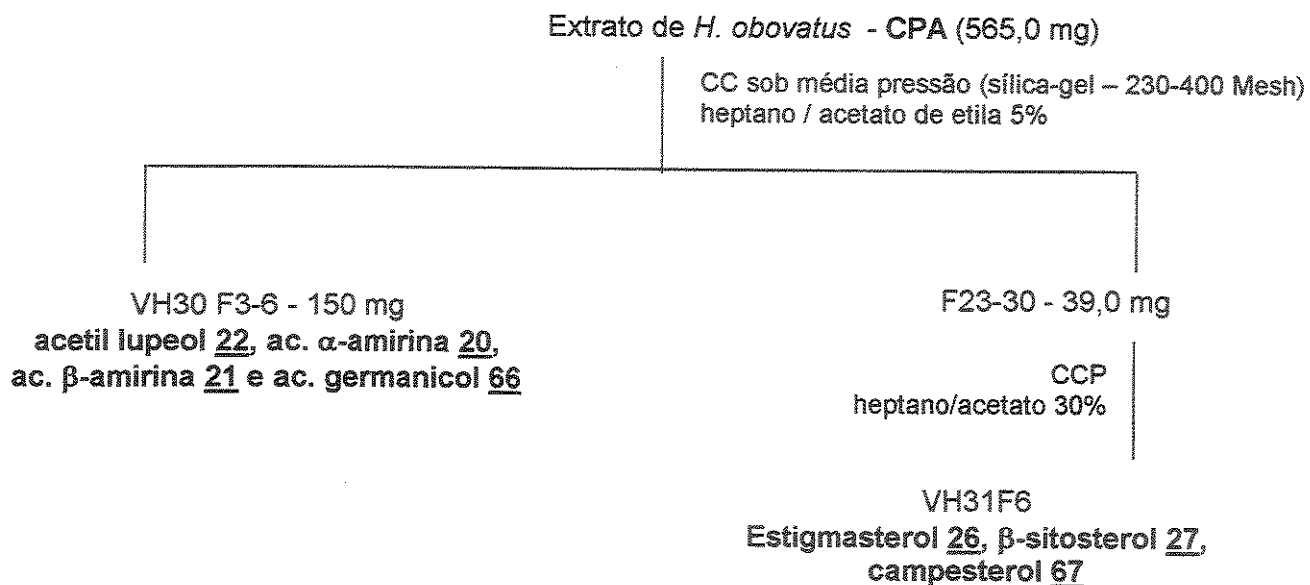
Foram obtidas 64 frações que, após análise por CCA, foram agrupadas em 11 grupos (Tabela 5).

Tabela 5:- Agrupamento das frações obtidas na purificação do extrato CPA de *H. obovatus* (Chapada dos Guimarães - MT).

Heptano:acetato	Frações reunidas	Massa (mg)	Compostos isolados
95 : 5	1 - 2	82,0	
	3 - 6	150,0	acetil lupeol <u>22</u> , ac. α -amirina <u>20</u> , ac. β -amirina <u>21</u> e ac. germanicol <u>66</u>
	7 - 11	16,4	
	12 - 13	12,4	
	14 - 22	64,5	
	23 - 30	39,0	estigmasterol <u>26</u> , β -sitosterol <u>27</u> e campesterol <u>67</u>
	31 - 37	63,7	
	38 - 47	23,0	
CH ₂ Cl ₂ /MeOH 5%	48 - 53	16,0	
	54 - 56	0,7	
	57 - 64	9,3	
Total		477,0 (84%)	

O Esquema 10 mostra a purificação das frações F3-6 e F23-30 utilizando CC e CCP.

Esquema 10:- Purificações por CC e CCP das frações reunidas, descritas na Tabela 5.



VH30F3

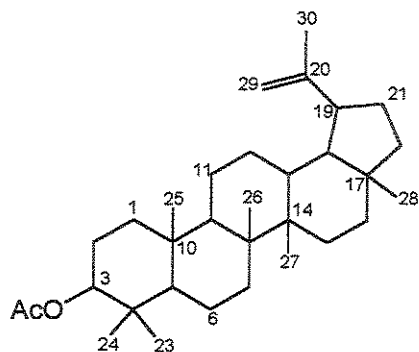
(acetil lupeol + ac. α -amirina + ac. β -amirina + ac. germanicol)

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃ / TMS):- Esp. 38.

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃ / TMS):- Esp. 37.

EM: Esp. 39.

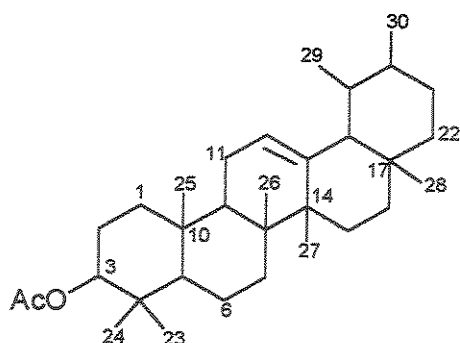
Acetil lupeol 22 (triterpeno)



Nome IUPAC:- Lup-20-(29)-en-3 β -acetoxi

C₃₂H₅₂O₂ - MM 468

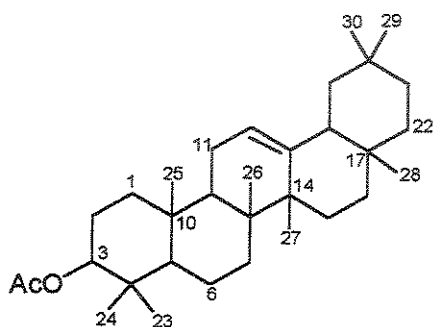
Acetil α -amirina 20 (triterpeno)



Nome IUPAC:- Urs-12-en-3 β -acetoxi

$C_{32}H_{54}O_2$ - MM 470

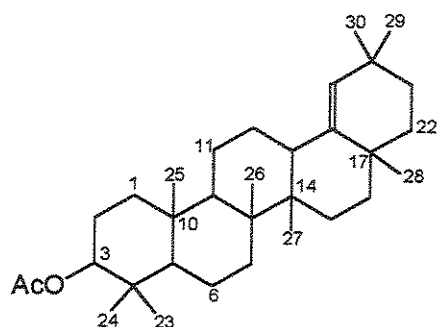
Acetil β -amirina 21 (triterpeno)



Nome IUPAC:- Olean-12-en-3 β -acetoxi

$C_{32}H_{54}O_2$ - MM 470

Acetil germanicol 66 (triterpeno)



Nome IUPAC:- Olean-18-en-3 β -ol

$C_{32}H_{52}O_2$ - MM 468

VH31F6

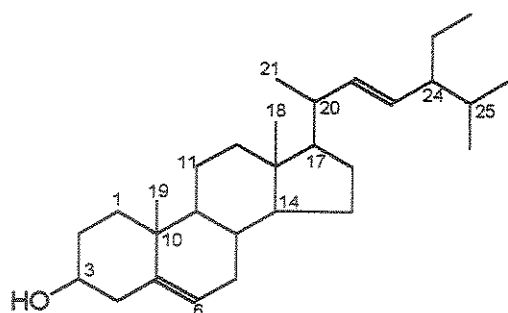
(estigmasterol + β sitosterol + campesterol)

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃ / TMS):- Esp. 41.

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃ / TMS):- Esp. 40.

EM: Esp. 42.

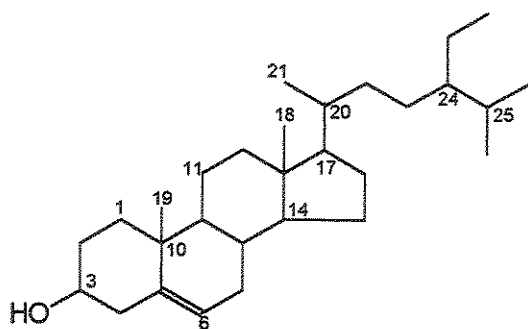
Estigmasterol 26 (esteróide)



Nome IUPAC:- 3 β -stigmast-5, 22-dien-3-ol

C₂₉H₄₈O - MM 412

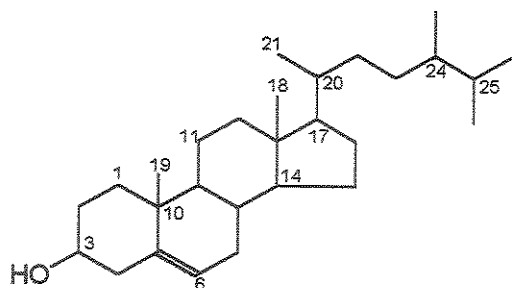
β -sitosterol 27 (esteróide)



Nome IUPAC:- 3 β -stigmast-5-en-3-ol

C₂₉ H₅₀O - MM 414

Campesterol 67 (esteróide)



Nome IUPAC:- (24R)-5-ergosten-3 β -ol

C₂₈ H₄₈ O - MM 400

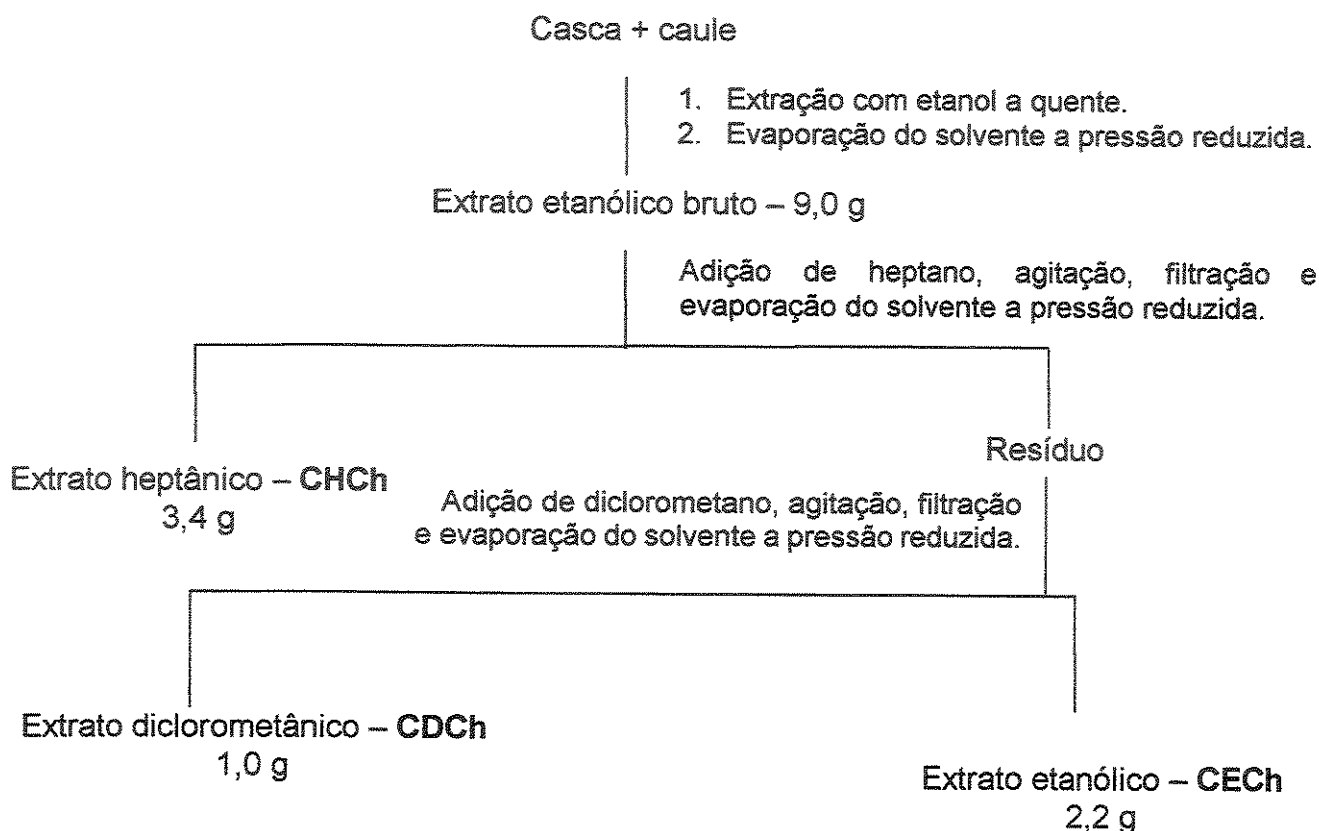
Embora os testes de Mayer para alcalóides realizados com os extratos etanólicos de *Himatanthus obovatus*, tenham dado resultados positivos, não foram isolados alcalóides como era nosso objetivo inicial e, portanto, optamos pela realização de uma extração por partição de solventes com polaridades diferentes do extrato etanólico da casca + caule de *H. obovatus* (Chapada dos Guimarães - MT).

3.3.2.B. Partição do extrato etanólico da casca + caule (item 3.3.2.) de *H. obovatus* (Chapada dos Guimarães - MT)

Parte do extrato etanólico (9,0 g) foi submetido a uma partição com solventes de polaridades diferentes (heptano, diclorometano e etanol), obtendo-se os extratos denominados **CHCh**, **CDCh** e **CECh** como mostrado no Esquema 11.

(CHCh – Casca + caule, Heptano, Chapada dos Guimarães, CDCh – Casca + caule, Diclorometano, Chapada dos Guimarães e CECh – Casca + caule, Etanol, Chapada dos Guimarães).

Esquema 11:- Partição do extrato etanólico da casca + caule (item 3.3.2.) de *H. obovatus* (Chapada dos Guimarães - MT).



3.3.2.B.a. Purificação do extrato CDCh (Casca + caule, Diclorometano, Chapada dos Guimarães) de *H. obovatus*.

O extrato CDCh de *H. obovatus* (0,82 g - item 3.3.2.B) foi purificado utilizando-se CC sob média pressão em sílica-gel (230-400 Mesh). Os compostos foram eluídos da coluna inicialmente em diclorometano (100%), aumentando-se gradativamente a polaridade com metanol até a proporção de 75:25.

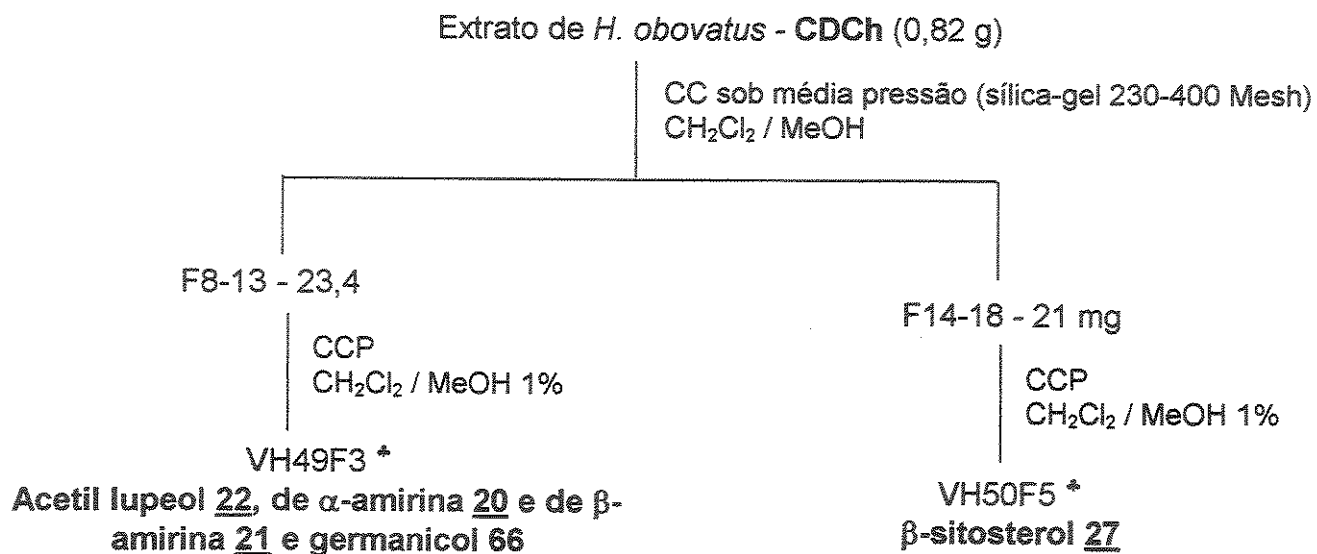
Foram obtidas 98 frações que, após análise por cromatografia por CCA, foram reunidas em 22 grupos (Tabela 6).

Tabela 6:- Agrupamento das frações obtidas na purificação do extrato CDCh de *H. obovatus* (Chapada dos Guimarães – MT).

CH ₂ Cl ₂ /MeOH	Frações reunidas	Massa (mg)	Compostos isolados
100 : 0	1 - 7	231,4	
	8 - 13	23,4	acetil lupeol <u>22</u> , ac. α -amirina <u>20</u> , ac. β -amirina <u>21</u> e ac. germanicol <u>66</u>
98 : 2	14 - 18	21,0	β -sitosterol <u>27</u>
	19 - 20	4,7	
	21 - 23	8,6	
	24	4,4	
	25 - 27	111,3	
	28	15,3	
	29 - 31	18,8	
	32 - 34	14,5	
	35 - 38	11,2	
96 : 4	39 - 42	13,9	
	43 - 53	59,0	
	54 - 55	16,3	
92 : 8	56 - 61	43,6	
	62 - 65	16,4	
	66 - 72	31,1	
85 : 15	73 - 76	20,5	
	77 - 83	33,9	
80 : 20	84 - 89	32,1	
	90 - 97	16,4	
75 : 25	98	21,5	
Total		769 (93%)	

O Esquema 12 mostra as purificações das frações F8-13 e F14-18, utilizando CCP.

Esquema 12:- Purificações por CCP das frações reunidas, descritas na Tabela 6.



* **Observação:-** As substâncias 20, 21, 22, 27, 66 e 67 já foram isoladas anteriormente do extrato CPA e seus dados estão descritos nas páginas 39 a 41.

VH49F3

(ac. de lupeol + ac. de α-amirina + ac. de β-amirina + germanicol)

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃ / TMS):- Esp. 44.

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃ / TMS):- Esp. 43.

VH50F5

(β sitosterol)

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃ / TMS):- Esp. 46.

RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃ / TMS):- Esp. 45.

EM: Esp. 47.

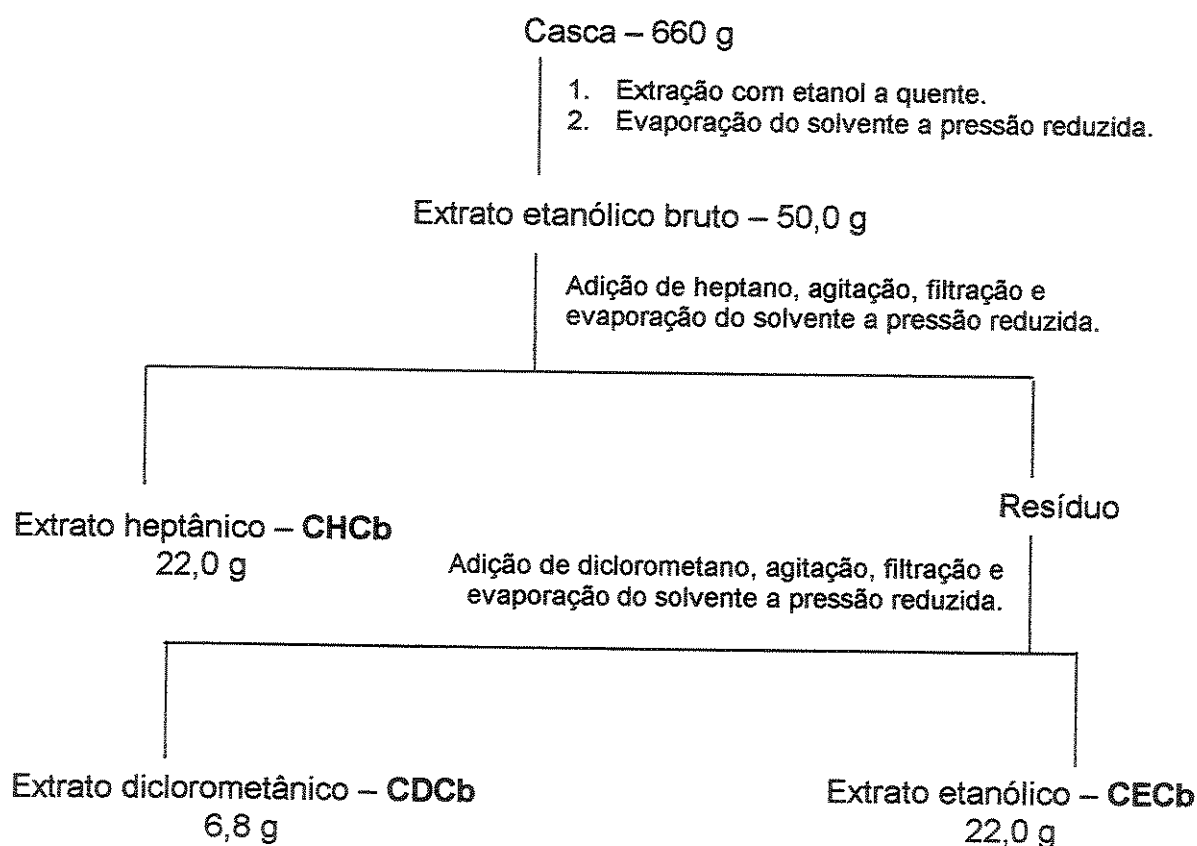
Em julho de 1998, foi realizada uma nova coleta de *Himatanthus obovatus* na cidade de Casa Branca, interior do Estado de São Paulo.

3.3.3. Obtenção do extrato etanólico da casca de *H. obovatus* coletada em Casa Branca (SP)

A casca de *H. obovatus* (660 g) foi moída e submetida à extração em Soxhlet utilizando etanol, que foi removido a pressão reduzida obtendo-se 50 g de extrato. Foi feita uma partição líquido-líquido com solventes de polaridades diferentes (heptano, diclorometano e etanol) obtendo-se os extratos denominados **CHCb**, **CDCb** e **CECb**, como mostrado no Esquema 13.

(**CHCb** – Casca, Heptano, Casa Branca, **CDCb** – Casca, Diclorometano, Casa Branca e **CECb** – Casca, Etanol, Casa Branca).

Esquema 13:- Partição do extrato etanólico da casca de *H. obovatus* (Casa Branca - SP).



3.3.3.A. Purificação do extrato CDCb (Casca, Diclorometano, Casa Branca) de *H. obovatus*.

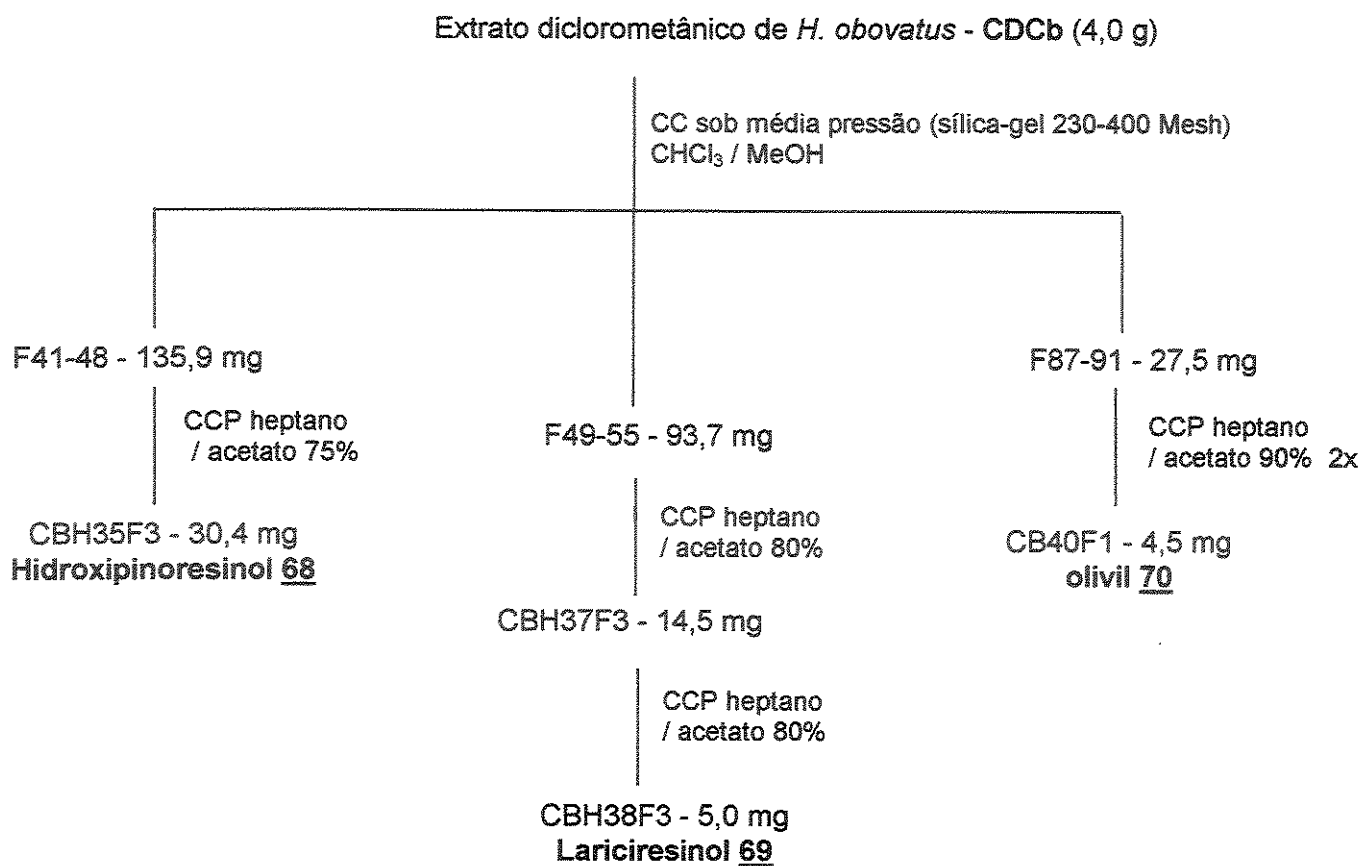
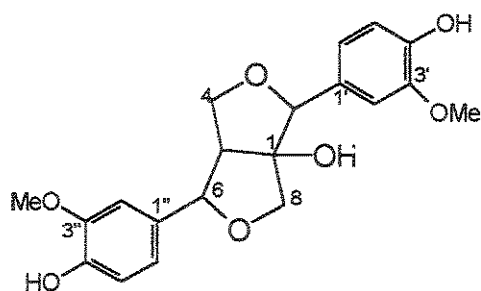
O extrato CDCb (4,0 g) de *H. obovatus* foi purificado utilizando-se CC sob média pressão em sílica-gel (230-400 Mesh). Os compostos foram eluídos da coluna com a mistura em clorofórmio / metanol, inicialmente na proporção 99:1 e a polaridade foi sendo aumentada gradativamente até 50:50.

Foram obtidas 172 frações que, após análise por CCA, foram reunidas em 26 grupos (Tabela 7).

Tabela 7:- Agrupamento das frações obtidas na purificação do extrato CDCb de *H. obovatus* (Casa Branca - SP).

CHCl ₃ /MeOH	Frações reunidas	Massa (mg)	Compostos isolados
100 : 0	1 - 10	245,6	
	11 - 13	29,8	
99 : 1	14 - 16	48,9	
98 : 2	17 - 22	23,4	
	23 - 30	48,9	
	31 - 34	494,8	
	35 - 38	261,6	
	39 - 40	68,3	
	41 - 48	135,9	Hidroxipinoresinol <u>68</u>
	49 - 55	93,7	Lariciresinol <u>69</u>
	56 - 58	57,6	
	59 - 70	103,0	
	71 - 73	18,7	
95 : 5	74 - 80	51,3	
	81 - 86	130,3	
	87 - 91	27,5	Olivil <u>70</u>
	92 - 101	122,4	
90 : 10	102 - 110	108,3	
	111 - 116	151,1	
	117 - 122	109,6	
	123 - 133	324,3	
80 : 20	134 - 141	162,9	
	142 - 154	209,6	
50 : 50	155 - 169	203,3	
	170 - 171	50,3	
	172	48,3	
Total		3329 (83%)	

O Esquema 14 mostra as purificações das frações F41-48, F49-55 e F87-91, utilizando CCP.

Esquema 14:- Purificações por CCP das frações reunidas descritas na Tabela 7.**Hidroxipinoresinol 68 (lignana)**

Nome IUPAC:- 2,6-Bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3,7-dioxabicyclo [3.3.0] octan-1-ol

C₂₀H₂₂O₇ - MM 374

Isolado de: *Olea europaea* L. (Oleaceae) (Tsukamoto *et. al.*, 1984A)

RMN¹H:- Esp. 52, Tabela 21.

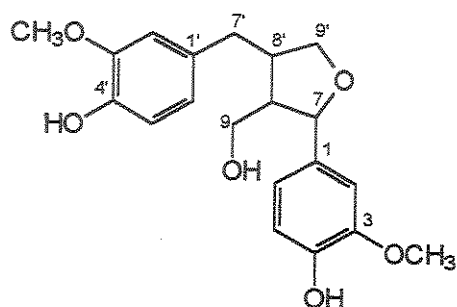
RMN¹³C:- Esp. 49, Tabela 21.

DEPT, HSQC, gCOSY, cycleNOE:- Espectros 50, 51, 53 e 54.

IV:- Esp. 48 (filme em CH₂Cl₂) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹):- 3386 (forte e larga - OH), 1729, 1612 e 1517 (C=C Aromáticos), 1374 (OH)

EM:- Esp. 55 [m/z (%):- 374 [M]⁺ (100), 222 (20), 193 (15), 165 (31), 151 (75), 137 (52).

Lariciresinol **69** (lignana)



Nome IUPAC:- 4,4',9-trihidroxi-3,3'-dimetoxi-7,9'-epoxilignana

C₂₀H₂₄O₆ - MM 360

Isolado de: *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) (Fonseca *et. al.*, 1978)

RMN¹H:- Esp. 61, Tabela 22.

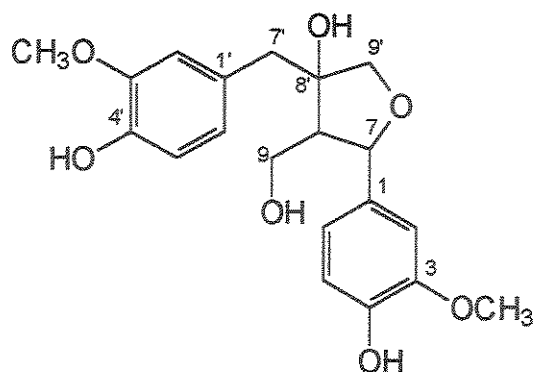
RMN¹³C:- Esp. 58, Tabela 22.

DEPT, HMQC, gCOSY:- Espectros 59, 60 e 62.

IV:- Esp. 56 (filme em CH₂Cl₂) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹):- 3385 (forte e larga - OH), 1718, 1603 e 1516 (C=C Aromáticos), 1384 (OH)

EM:- Esp.57 [m/z (%):- 360 [M]⁺ (81), 345 (4), 236(10), 221 (8), 205 (10), 194 (24), 151 (37), 137 (100)

Olivil 70 (lignana)



Nome IUPAC:- 4,4',9,8"-tetrahidroxi-3,3'-dimetoxi-7,9'-epoxilignana

C₂₀H₂₄O₇ - MM 376

Isolado de: *Strophanthus gratus* (Apocynaceae) (Cowan *et al.*, 2001)

RMN¹H:- Esp. 68, Tabela 23.

RMN¹³C:- Esp. 65, Tabela 23.

DEPT, HETCOR, gCOSY:- :- Espectros 66, 67 e 69.

IV:- Esp. 63 (filme em CH₂Cl₂) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹):- 3405 (forte e larga - OH), 1726 (fraca e larga), 1603 e 1515 (C=C Aromáticos), 1377 (OH).

EM:- Esp. 64 [m/z (%):- 376 [M]⁺ (60), 327 (18), 297 (23), 153 (40), 137 (100).

3.3.3.B. Purificação do extrato CECb (Casca, Etanol, Casa Branca) de *H. obovatus*.

O extrato CECb (5,0 g) foi purificado utilizando-se CC sob média pressão em sílica-gel (230-400 Mesh). Os compostos foram eluídos da coluna com a mistura dos solventes clorofórmio / metanol, inicialmente na proporção 85:15 que foi sendo aumentada gradativamente até 50:50.

Foram obtidas 140 frações que, após análise por CCA, foram reunidas em 17 grupos (Tabela 8).

Tabela 8:- Agrupamento das frações obtidas na purificação do extrato CECb de *H. obovatus* (Casa Branca - SP).

CHCl ₃ /MeOH	Frações reunidas	Massa (mg)	Compostos isolados
85 : 15	1 - 3	9,6	
	4 - 10	165,3	
	11 - 12	49,6	
	13 - 15	55,4	
	16 - 19	73,8	
	20 - 29	520,8	Plumieride <u>11</u>
	30 - 35	71,9	
	36 - 57	213,5	
80 : 20	58 - 64	217,5	
	65 - 84	786,3	
75 : 25	85 - 99	215,0	
	100 - 105	96,1	
70 : 30	106 - 117	1054,6	
	118 - 121	25,4	
60 : 40	122 - 128	34,5	
50 : 50	129 - 139	124,1	
	140	213,3	
Total		3.927 (79%)	

O Esquema 15 mostra a purificação da fração F20-29, utilizando CC.

Esquema 15:- Purificação por CC do extrato **CECb** de *H. obovatus*
(Casa Branca - SP).

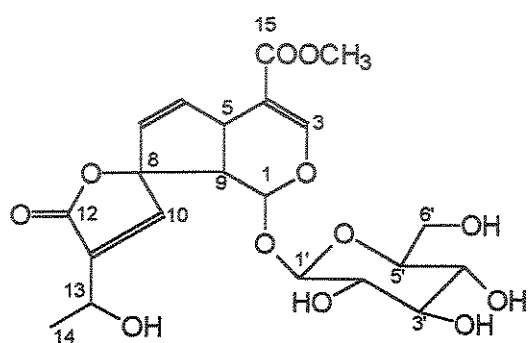
Extrato **CECb** de *H. obovatus* - (5,0 g)

CC sob média pressão (sílica-gel 230-400 Mesh)
 CHCl_3 / MeOH

CB8F20-29 - 520,8 mg

Plumieride 11

Plumieride 11



$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$ - MM 470

Isolado de: *Himatanthus fallax* (Apocynaceae) (Abdel-Kader et. al., 1997).

RMN¹H:- Esp. 74, Tabela 24.

RMN¹³C:- Esp. 71, Tabela 24.

DEPT, HETCOR, COSY:- Espectros 72, 73 e 75.

IV:- Esp. 70 (filme em CH_2Cl_2) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}):- 3422 (forte e larga - OH), 1727 (forte - carbonila α - β insaturadas), 1635 ($\text{C}=\text{O}$)

EM:- Esp. 76 [m/z (%):- 470 [$\text{M}]^+$, 307 (42), 167, 149 (100)

3.3.4. Acetilação do extrato CECb de *H. obovatus* (Casa Branca - SP)

O extrato CECb (5,0 g) de *H. obovatus* foi acetilado utilizando-se anidrido acético, piridina e dimetil amino piridina (DMAP) em diclorometano. A reação foi mantida em agitação à temperatura ambiente durante a noite. Foram obtidos 4,60 g do extrato acetilado, sendo que o controle da reação foi feito obtendo-se espectros no infravermelho dos extratos antes e após a reação de acetilação.

3.3.4.A. Purificação do extrato CECb acetilado de *H. obovatus* (Casa Branca - SP)

O extrato CECb acetilado de *H. obovatus* (4,60 g) foi purificado utilizando-se CC sob média pressão em sílica-gel (230–400 Mesh). Os compostos foram eluídos da coluna com a mistura dos solventes heptano / acetato de etila e, em seguida, foi usada a mistura clorofórmio / metanol.

Foram obtidas 145 frações que, após análise por CCA, foram reunidas em 38 grupos (Tabela 9).

Tabela 9:- Agrupamento das frações obtidas na purificação do extrato etanólico acetilado da casca (CECb acetilado) de *H. obovatus* (Casa Branca - SP).

Heptano/acetato	Frações reunidas	Massa (mg)	Compostos isolados
50 : 50	1 – 4	63,0	
	5	25,9	
	6	290,0	
	7	979,3	
	8 – 9	991,0	Inositol <u>71</u>
	10	185,7	
	11 – 15	917,6	
	16 – 20	112,6	
	21 – 25	91,5	
70 : 30	26	11,5	
	27 – 28	43,6	
	29	30,2	
	30 – 33	37,7	
	34 – 39	31,4	
	40 – 44	15,4	
0 : 100	45 – 53	36,2	
	54 – 63	30,1	
CHCl ₃ / MeOH			
100 : 0	64 – 67	10,0	
	68 – 75	4,9	
99 : 1	76 – 83	4,5	
	84 – 89	4,7	
95 ; 5	90 – 93	85,4	
	94 - 101	33,6	
90 : 10	102 – 110	107,7	
	111 – 120	86,3	
80 : 20	121 – 125	28,1	
	126 – 131	90,3	

Tabela 9 (continuação):- Agrupamento das frações obtidas na purificação do extrato etanólico acetilado da casca (**CECb acetilado**) de *H. obovatus* (Casa Branca - SP).

CHCl ₃ / MeOH	Frações reunidas	Massa (mg)	Compostos isolados
	132 – 135	31,4	
	136	24,1	
	137	37,7	
	138	29,7	
	139	25,9	
	140	6,0	
0 : 100	141	0	
	142	28,4	
	143	23,0	
	144	16,1	
	145	11,1	
Total		4.582 (99%)	

O Esquema 16 mostra a purificação da fração F8-9 utilizando CCP.

Esquema 16:- Purificação utilizando CC e CCP do extrato CECb acetilado.

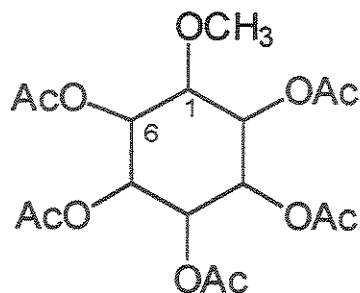
Extrato **CECb** acetilado – 4,60 g

CC sob média pressão (sílica-gel 230-400 Mesh)
heptano / acetato 1 : 1

CB26F8-9 (465, 0 mg)

CCP
heptano / acetato 1 : 1 (2x)

CB31F4

Inositol 71

Nome IUPAC:- inositol o-metil-penta acetato

C₁₇H₂₄O₁₁ - MM 404

RMN¹H:- Esp. 82, Tabela 25.

RMN¹³C:- Esp. 79, Tabela 25.

DEPT, HSQC, COSY:- Espectros 80, 81 e 83.

IV:- Esp. 77 (filme em CH₂Cl₂) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹):- 3407, 1752, 1370, 1226.

EM:- Esp. 78[m/z (%):- 405 [M]⁺ (12), 345 (100), 331 (12), 303 (7), 182 (40).

3.4. Testes de atividade biológica

3.4.1. Testes de letalidade para *Artemia salina* (Leach.)

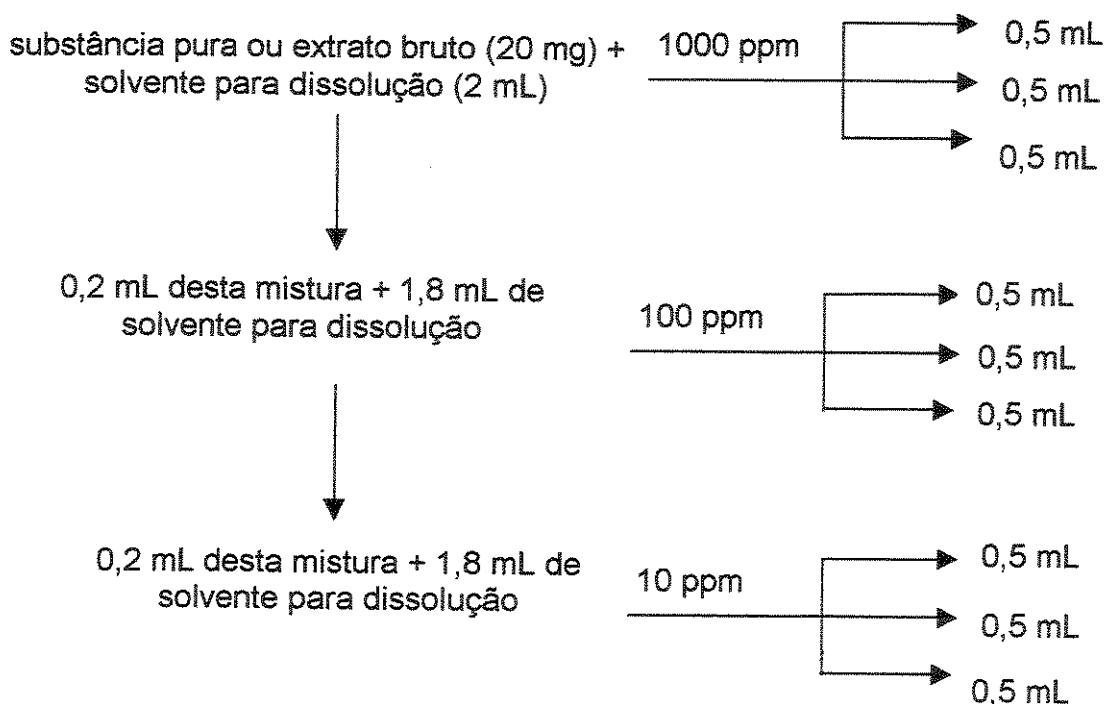
Ovos de *Artemia salina* foram colocados para eclodir em solução de sal marinho (38 g/L) durante 48 horas na claridade.

Os extratos a serem testados (nas concentrações de 1000, 100 e 10 ppm, cada uma delas em triplicata - Esquema 17) foram colocados em pequenos frascos de vidro transparentes aos quais foram adicionados duas gotas de dimetilsulfóxido (para solubilização dos extratos), cerca de 3 mL de solução salina (38 g/L), 10 larvas de *Artemia salina* e o volume foi ajustado a 5 mL com a solução salina.

Os frascos foram deixados em repouso, na claridade, e, após 24 horas fez-se a contagem do número de larvas vivas.

Os dados obtidos foram analisados em programa Finmey (cedido pelo idealizador do teste) para análise estatística, obtendo-se ao final os valores de CL₅₀ para os extratos testados, com um intervalo de confiança de 95%.

Esquema 17:- Diluição dos extratos brutos de *H. obovatus* ou substâncias puras para o teste utilizando *Artemia salina*.



3.4.2. Testes de Bioautografia

Os extratos, as substâncias puras (20 μ g) a serem testados e o antifúngico ciclopirox olamina (ou o bactericida clorafenicol) foram aplicados em cromatoplasas analíticas de 5,5 x 5,5 cm (Merck) que foram desenvolvidas em fases móveis adequadas.

Para cada microrganismo testado (fungo ou bactéria), foram feitas duas placas iguais, sendo que uma delas foi utilizada no teste de bioautografia e a outra foi posteriormente "revelada" com solução de ácido sulfúrico / metanol (v : v - 1: 1) seguida de aquecimento, funcionando como placa controle.

Uma das placas foi colocada em placa de Petri previamente esterilizada. Adicionou-se à placa de Petri aproximadamente 20 mL do meio de cultura apropriado ao crescimento do microrganismo (fungo ou bactéria) e esta foi deixada em repouso até que o meio se solidificasse. A suspensão do microrganismo (contendo aproximadamente 10⁶ células/mL) foi espalhada na placa de Petri com o auxílio de uma alça de Digralski, também esterilizada. Cada placa foi envolvida com filme de PVC transparente e incubada durante sete dias a 27°C (no caso de fungos) ou durante dois dias a 37°C (no caso de bactérias). Passado o tempo de incubação foi observada a existência ou não de halos de inibição no crescimento dos microrganismos, comparando-se cada placa com a sua respectiva placa controle e com um branco (placa de Petri sem cromatoplasa analítica onde também foi inoculado o microrganismo).

Tanto os meios de cultura quanto as suspensões de microrganismos foram fornecidos pela Coleção de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello", de Campinas - SP.

Os testes foram realizados inicialmente no laboratório da Profa. Dra. Anita J. Marsaioli (IQ/UNICAMP), sob a supervisão da aluna de pós doutorado Marisa Alves Nogueira (Junho/1999) e, em uma segunda etapa, no laboratório do Prof. Dr. Aderbal F. Magalhães e da Profa. Dra. Eva G. Magalhães (IQ/UNICAMP) (Abril/2001) juntamente com seus alunos de Doutorado.

Os microrganismos testados estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10:- Fungos e bactérias utilizados nos testes de Bioautografia.

	Microrganismos
	Testados
	Fungos
	<i>Alternaria alternata</i> - CCT 1250
	<i>Aspergillus fumigatus</i> - CCT 01277
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> - CCT 5039
	<i>Fusarium oxysporium</i> - CCT 3244
	<i>Penicillium oxalicum</i> - CCT 4815
	<i>Rhizopus orizae</i> -CCT 4964
	Fungos
	<i>Alternaria alternata</i> - CCT 1250
	<i>Aspergillus fumigatus</i> - CCT 01277
	<i>Aspergillus niger</i> - CCT 1435
	<i>Candida albicans</i> - CCT 0776
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> - CCT 5039
	<i>Fusarium oxysporium</i> - CCT 3244
	<i>Penicillium funicullosum</i> - CCT 0490
	<i>Rhizopus orizae</i> -CCT 4964
	Bactérias
	<i>Bacillus subtilis</i> CCT 0089
	<i>Escherichia coli</i> CCT 5050
	<i>Micrococcus luteus</i> CCT 2720
	<i>Salmonella typhimurium</i> CCT 0528
	<i>Staphylococcus aureus</i> CCT 4295
	<i>Streptococcus mutans</i> CCT3440

3.4.2.A. Meios de cultura utilizados:

Para bactérias (meio **NA** (Ágar Nutriente)): Peptona (5,0 g) + Extrato de carne (3,0 g) + Ágar (15 g) + Água destilada (1000 mL).

Para fungos (meio **MA** (Ágar Malte)): Extrato de Malte (20,0 g) + Ágar (20,0 g) + Água Destilada (1000 mL).

3.4.2.B. Extratos e/ou substâncias puras testadas

Fungos (Junho/1999):- extratos **CHCb**, **CDCb** e **CECb**

Pinoresinol 14, Blumenol C 63, Blumenol A 64, Nor-isoprenóide 65 e Plumieride 11

Fungos (Abril/2001):- Pinoresinol 14, Isolariciresinol 33, Blumenol C 63, Blumenol A 64, Nor-isoprenóide 65, Hidroxipinoresinol 68, Lariciresinol 69, Plumieride 11 e Inositol 71

Bactérias (Abril/2001):- Pinoresinol 14, Isolariciresinol 33, Blumenol C 63, Blumenol A 64, Nor-isoprenóide 65, Hidroxipinoresinol 68, Lariciresinol 69, Plumieride 11 e Inositol 71

Tabela 11:- Resultados obtidos nos testes de Bioautografia (= não foi observado halo de inibição / + observou-se halo de inibição).

FUNGOS - Junho / 1999	Extratos e substâncias testados							
	CHCb	CDCb	CECb	<u>14</u>	<u>63</u>	<u>64</u>	<u>65</u>	<u>11</u>
<i>Alternaria alternata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium oxalicum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

Fungos e Bacterias testados	Substâncias testadas								
	<u>14</u>	<u>33</u>	<u>63</u>	<u>64</u>	<u>65</u>	<u>68</u>	<u>69</u>	<u>11</u>	<u>71</u>
<i>Alternaria alternata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium funicullosum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphilococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus mutans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-

3.4.3. Testes de Atividade Anti proliferativa

Os extratos diclorometânico e etanólico (CDCb e CECb) de *Himatanthus obovatus* (coletada em Casa Branca) foram testados para inibição da proliferação de células "in vitro".

Estes testes foram realizados pela então aluna de Mestrado Luciana Konecny Kohn e por Marcia A. Antonio, orientadas pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP).

A avaliação da atividade anticâncer de cada extrato foi realizada utilizando-se 4 linhagens celulares, derivadas de 4 tipos de tumores humanos:

☞ K-562 - leucemia

☞ NCI-460 - pulmão

☞ UACC-62 - melanoma

☞ MCF 7 - mama

Os extratos, nas concentrações de 15,625; 31,250; 62,500 e 125,000 $\mu\text{g/mL}$, foram adicionados em placas de 96 divisões, sendo que cada placa continha uma linhagem celular.

Após um período de incubação de 48 horas, as células foram fixadas através da adição de ácido tricloroacético 50%. Após 60 minutos, o ácido foi removido e as placas foram lavadas em água corrente para, após secagem, serem coradas com a sulforodamina B 0,4% em ácido acético 1% (SRB). Após 30 minutos, o excesso de SRB foi removido das placas através da lavagem destas com solução 1% de ácido acético. O corante foi solubilizado pela adição do tampão tris base.

A leitura óptica foi realizada em leitor de ELISA a 540 nm (Skehan *et al.*, 1990).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nosso grupo tem trabalhado com espécies dos gêneros *Tabernaemontana* e *Rauvolfia* (pertencentes à Família Apocynaceae e à sub-família Rauvolfioideae), ambos ricos em alcalóides indólicos.

Durante uma viagem realizada pelas então alunas de Doutorado Ingrid Koch (Departamento de Botânica - Instituto de Biologia - Unicamp), Lucília Kato (Departamento de Química Orgânica - Instituto de Química - Unicamp) e pela Profa. Dra. Raquel Marques Braga (Departamento de Química Orgânica - Instituto de Química - Unicamp) ao Mato Grosso foram coletadas inúmeras espécies vegetais, entre as quais, a *Himatanthus obovatus*, pertencente à mesma família e à mesma sub-família dos gêneros *Tabernaemontana* e *Rauvolfia*. Além disso, pelo fato de existir um número reduzido de trabalhos na literatura do gênero *Himatanthus* e nenhum destes trabalhos descrever o isolamento de alcalóides, iniciamos o estudo desta planta visando o isolamento de alcalóides indólicos.

O material vegetal de *H. obovatus* utilizado no início deste trabalho foi coletado na região da Chapada dos Guimarães (MT) na viagem realizada no período de 06 a 16 de janeiro de 1998 com apoio financeiro da FAEP - Unicamp. A exsicata deste exemplar está depositada no Herbário UEC do Instituto de Biologia (Unicamp) com a identificação: Ingrid Koch 808, Lucília Kato, Raquel M. Braga & Renato Belinello (UEC135208).

Em julho de 1998 foi realizada uma nova coleta de *H. obovatus* na cidade de Casa Branca (SP) para a continuação do nosso trabalho. A exsicata deste material está depositada no Herbário UEC do Instituto de Biologia (Unicamp) com a identificação: Ângela L. B. Sartori 316, Valéria B. de Lima (UEC 105704).

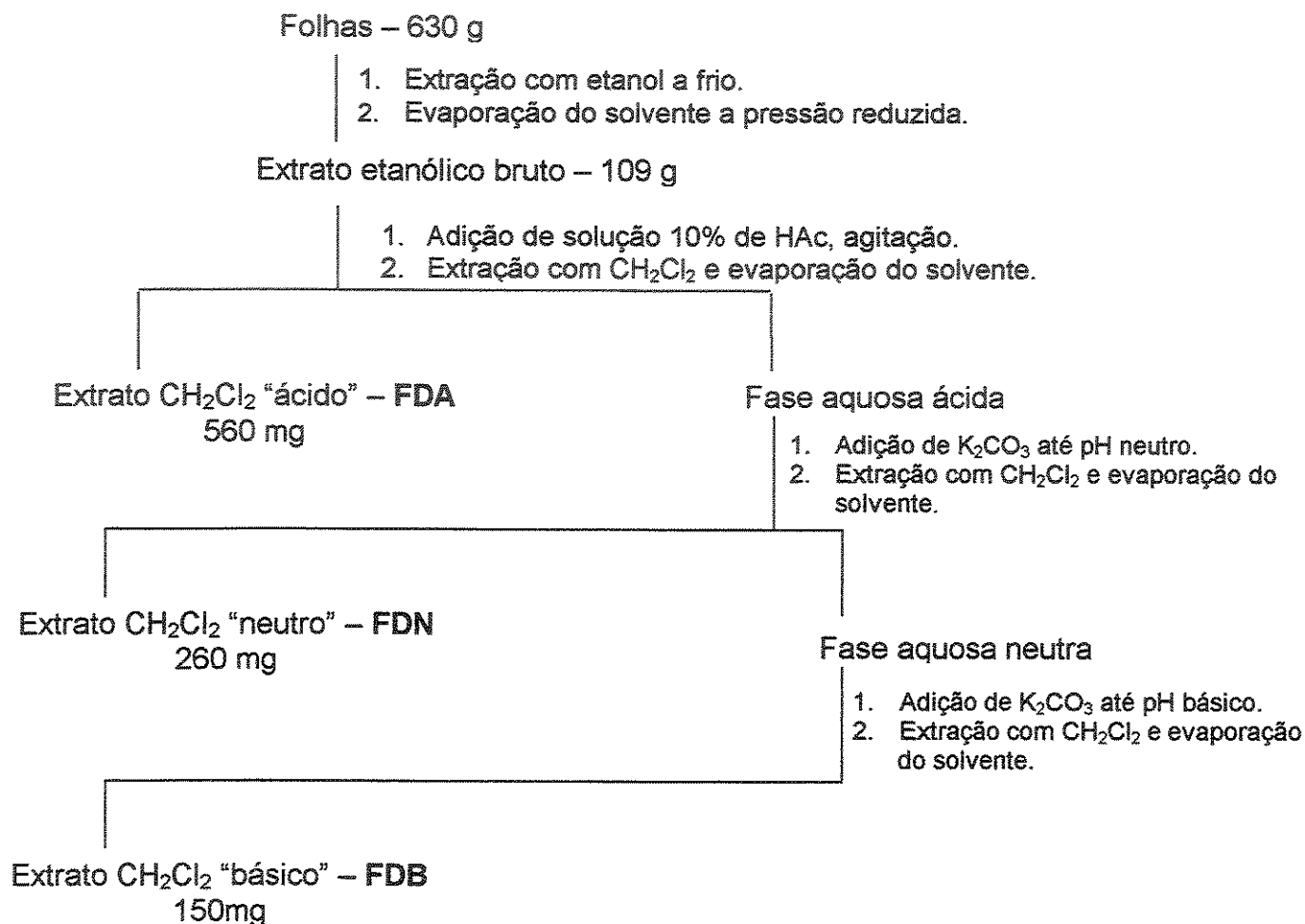
4.1. Folhas de *Himatanthus obovatus* coletadas na Chapada dos Guimarães - MT

As folhas de *H. obovatus* (630 g), secas em uma estufa durante a viagem de coleta, foram moídas e extraídas a frio utilizando-se etanol. Obteve-se 109 g do extrato etanólico bruto.

A formação de precipitado branco com reagente de Mayer indicou teste positivo para a presença de alcalóides no extrato etanólico bruto, o que nos levou a realizar a

extração ácido-base deste extrato, conforme descrito no Esquema a seguir (repetição do esquema 6 - Parte Experimental).

Esquema 6:- Esquema de extração ácido-base das folhas de *H. obovatus*
(Chapada dos Guimarães - MT)



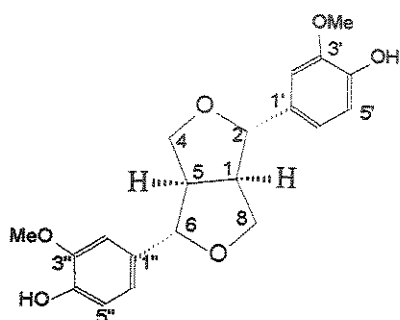
FDA - Folhas, **D**iclorometano, **Á**cido, **FDN** - Folhas, **D**iclorometano, **N**eutro e **FDB** - Folhas, **D**iclorometano, **B**ásico.

4.1.1. Extrato FDA (Folhas, Diclorometano, Ácido) de *H. obovatus*.

A purificação do extrato FDA foi realizada em coluna cromatográfica (CC) sob média pressão e as frações obtidas foram purificadas por cromatografia em camada preparativa (CCP). Obtivemos três substâncias cujos espectros de RMN em 1D e 2D, IV e espectro de massas não eram característicos de alcalóides indólicos como era nossa expectativa inicial.

Analisando-se os dados espectrais das substâncias isoladas chegamos às estruturas das lignanas Pinoresinol 14 e Isolariciresinol 33 e do nor-isoprenóide Blumenol C 63. As estruturas são mostradas como um dos enantiômeros para indicar a configuração relativa e não a configuração absoluta.

Pinoresinol 14



No espectro de IV de VH52F32 (Esp. 1) observa-se bandas em 1603 e 1514 cm^{-1} características das ligações C=C de anéis aromáticos. São observadas também uma banda forte e larga em 3385 cm^{-1} e outra em 1384 cm^{-1} características de grupamentos O-H (Silverstein e Webster, 1998).

No espectro de massas de VH52F32 (Esp. 2) observa-se o pico de íon molecular m/z igual a 358 e a perda de 31 unidades de massa do íon molecular, característica da perda de grupamentos metoxila.

Analisando-se os espectros de RMN^{13}C e DEPT (Esp. 3 e 4) de VH52F32 observa-se a presença de 10 sinais referentes a 1 CH_3 , 1 CH_2 , 5 CH e 3 Carbonos quaternários. Considerando-se apenas estes sinais de Carbono e Hidrogênio seria esperado um pico de íon molecular m/z aproximadamente igual a 130, entretanto o observado no espectro de massas é igual a 358. Isto nos fez pensar em uma molécula simétrica, onde cada sinal no espectro de RMN^{13}C corresponderia a dois carbonos da molécula.

Observa-se 6 sinais no espectro de RMN¹³C típicos de anel aromático: 3 sinais referentes à CH em δ 108,8; 114,4 e 119,1, que no HSQC (Esp. 5) se relacionam respectivamente com o dubleto a δ 6,91, com o dubleto a δ 6,88 e com o duplo dubleto a δ 6,82 (Tabela 12) e 3 sinais referentes à carbonos quaternários que aparecem em δ 133,0; 145,4 e 146,9. Estes dados são coerentes com a presença de anel aromático tri-substituído (Esp. 6, RMN ¹H).

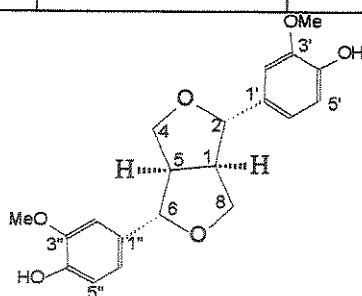
O espectro de RMN¹³C também mostra um sinal em δ 56,1 (CH₃) que se relaciona no espectro de HSQC a um singlete em δ 3,90, característico de grupamentos metoxila.

Observa-se ainda os sinais em δ 71,8 (CH₂), que no HSQC se relaciona a um multiplete em δ 3,80-3,90 e a um duplo dubleto em δ 4,25 (6,9 e 9,1 Hz) e, o sinal em δ 86,0 (CH) que se relaciona a um dubleto em δ 4,74 (4,4 Hz). Estes deslocamentos sugerem a presença de carbonos ligados à átomos de oxigênio.

Os dados espectrais de VH52F32 são concordantes com os dados da lignana pinoresinol 14, isolada anteriormente de *H. fallax* (Abdel-Kader, 1997).

Tabela 12:- Deslocamentos químicos de RMN ¹³C e de ¹H do pinoresinol 14.

Carbono	δ (ppm) de ¹³ C	Tipo de carbono	δ (ppm) de ¹ H	J (Hz)
1 e 5	54,3	CH	3,06	dd (5 e 6)
OCH ₃	56,1	CH ₃	3,90	s
4 e 8	71,8	CH ₂	3,80 a 3,90 4,27	m dd (7 e 9)
2 e 6	86,0	CH	4,77	d (4)
2' e 2''	108,8	CH	6,91	d (2)
5' e 5''	114,4	CH	6,88	d (8)
6' e 6''	119,1	CH	6,82	dd (2 e 8)
1' e 1''	133,0	C#	-	-
4' e 4''	145,4	C#	-	-
3' e 3''	146,9	C#	-	-



A confirmação da configuração relativa dos carbonos C1-C2 e C5-C6 do pinoresinol 14 foi feita por comparação com os dados de RMN¹³C da literatura dos compostos dieudesmin 72 (Agrawal e Thakur, 1985), (+)-pinoresinol 73 (Tsukamoto *et. al.*, 1984-B), epipinoresinol 74 (Rhaman *et. al.*, 1990) e (-)-pinoresinol 75 (Lin-gen *et. al.*, 1982), conforme descrito na Tabela 13 e na Figura 10.

Tabela 13:- Deslocamentos químicos dos Carbonos 1 e 2 do pinoresinol 14, quando a relação dos hidrogênios 1 e 2 é cis ou trans

	δ C1 (ppm)	δ C2 (ppm)
H _{1,2} cis	49,5	83,9
H _{1,2} trans	53,6	85,2

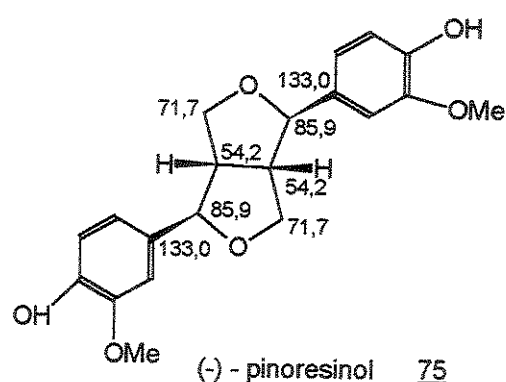
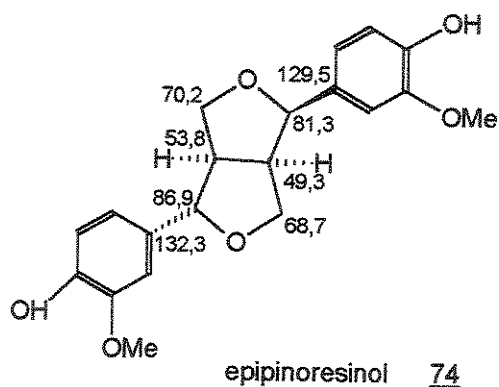
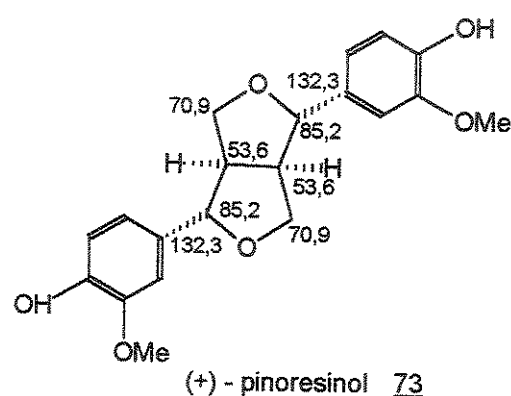
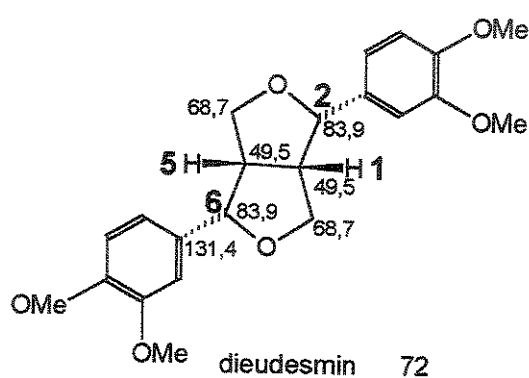


Figura 10:- Deslocamentos químicos de alguns isômeros do pinoresinol 14.

Os resultados observados no espectro de NOESY 1D do pinoresinol 14 (Esp. 7) possibilitaram a atribuição dos deslocamentos químicos dos prótons H8 - α e β , e também sugerem que a configuração relativa dos hidrogênios H1-H2 e dos hidrogênios H5-H6 de 14 seja trans. Quando foi irradiado o próton H6- β em δ 4,77 houve um aumento do sinal em δ 3,91 referente ao H8- β e quando foi irradiado o próton H8- α em δ 4,27 houve um incremento dos sinais em δ 3,91 referente ao próton H8- β e em δ 3,06 referente ao próton H1- α , conforme mostrado na Figura 11 .

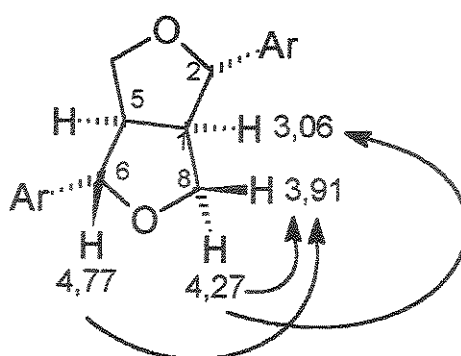
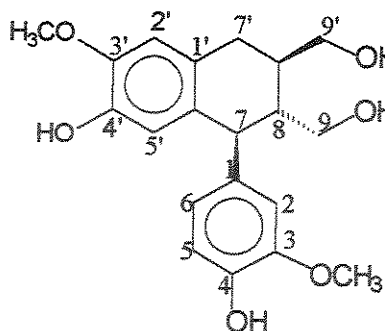


Figura 11:- Proposta da configuração relativa dos hidrogênios 1 e 2 e 5 e 6 para o pinoresinol 14.

O espectro de massas de VH52F32 é coerente com o espectro de massas do pinoresinol apresentado no artigo de Duffield (1967) e com a fragmentação proposta para o pinoresinol por Lin-gen e colaboradores (1982).

Vale salientar que, dos trabalhos do gênero *Himatanthus* descritos na literatura até o momento, compostos da classe das lignanas tinham sido isolados apenas da *H. fallax* (Abdel-Kader *et. al.*, 1997), portanto esta é a segunda vez que lignanas são isoladas do gênero *Himatanthus*.

Isolariciresinol **33**



No espectro de IV de VH17F4 (Esp. 9) observa-se bandas em 1604 e 1512 cm^{-1} características das ligações C=C de anéis aromáticos e uma banda forte e larga em 3412 cm^{-1} característica do grupamento O – H (Silverstein e Webster, 1998).

Analizando-se os espectros de RMN¹³C e DEPT de VH17F4 (Esp. 10 e 11) observa-se a presença de sinais referentes a 2 CH₃, 3 CH₂, 8 CH e 7 carbonos quaternários.

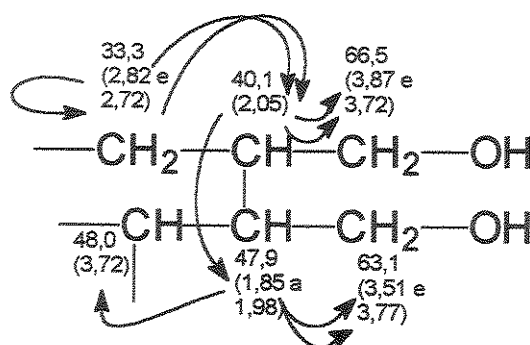
Os sinais referentes a 5 CH e a 7 carbonos quaternários com deslocamentos químicos (δ) superiores a 110 ppm, relacionados no HSQC (Esp. 12) à hidrogênios na região entre δ 6,5 e 6,7 nos indicam a presença de dois anéis aromáticos substituídos (Tabela 14).

O espectro de RMN¹³C mostra 2 sinais em δ 55,89 (CH₃) e 55,96 (CH₃) relacionados no HSQC à hidrogênios em δ 3,83 e 3,86, indicando a presença de 2 grupamentos metoxila (Esp. 13, RMN ¹H).

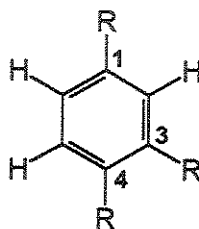
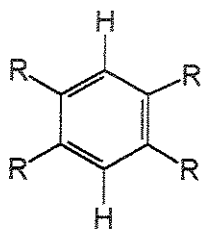
O sinal em δ 33,3 está relacionado no espectro de HSQC aos hidrogênios em δ 2,82 (dd - 15,9 e 11,7 Hz) e em 2,72 (dd - 15,9 e 4,4 Hz). Estes dois hidrogênios estão relacionados no gCOSY (Esp. 14) ao multipeto em δ 1,96-2,06 (relacionado ao carbono em δ 40,1) e este está relacionado ao duplo dubleto em δ 3,72 (11,0 e 6,1 Hz) e ao multipeto em δ 3,86-3,88 (relacionados ao carbono em δ 66,5). O sinal em δ 66,5 é característico de um carbono ligado à oxigênio.

O multipeto em δ 1,96-2,06 está relacionado no gCOSY ao multipeto em δ 1,85-1,98, que no HSQC está relacionado ao carbono em δ 47,9. O multipeto em δ 1,85-1,98 está relacionado ao hidrogênio em δ 3,72 (d - 11,0 Hz) (relacionado ao carbono em 48,0) e também aos hidrogênios em δ 3,51 (dd - 11,0 e 5,4 Hz) e 3,77 (dd - 11,0 e 2,5 Hz) (relacionados ao carbono em δ 63,1). O sinal em δ 63,1 também é característico de um

carbono ligado à oxigênio. As correlações observadas nos espectros gCOSY e HSQC são mostradas a seguir.



Os singletos em δ 6,22 e 6,58 podem ser atribuídos aos hidrogênios de um anel aromático tetrasubstituído, onde os hidrogênios estão na posição "para" **(A)**. Os sinais em δ 6,59 (d - 1,9 Hz), δ 6,65 (dd - 1,93 e 7,97 Hz) e em δ 6,84 (d - 7,97 Hz) podem ser atribuídos aos hidrogênios de um anel aromático substituído nos carbonos C1, C3 e C4 **(B)**.



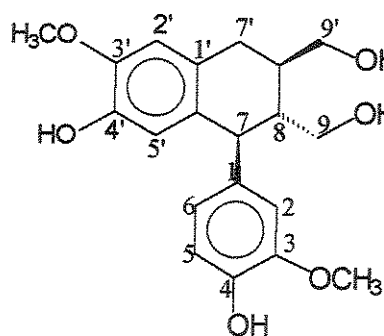
(A) hidrogênios em posição "para" **(B)** substituição dos carbonos C1, C3 e C4

A estrutura proposta para VH17F4 é a da lignana isolariciresinol 33, cujos dados espectrais observados são coerentes com os dados do Isolariciresinol isolado de *Urtica dioica* por Schottner *et al.* (1997) e de *Araucaria angustifolia* por Fonseca *et al.* (1978).

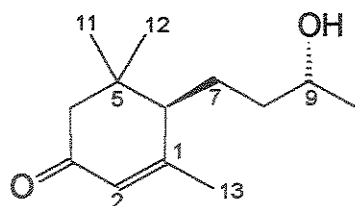
Apesar de compostos da classe das lignanas já terem sido isolados de *Himatanthus fallax*, esta é a primeira descrição do isolamento do isolariciresinol para este gênero.

Tabela 14:- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e de ^1H do isolariciresinol 33.

Carbono	δ (ppm) de ^{13}C	Tipo de carbono	δ (ppm) de ^1H	J (Hz)
1	133,1	C#	-	-
2	111,4	CH	6,59	d (2)
3	145,0	C#	-	-
4	143,6	C#	-	-
5	114,2	CH	6,84	d (8)
6	122,4	CH	6,65	dd (2 e 8)
7	48,0	CH	3,72	d (11)
8	47,9	CH	1,85 a 1,98	m
9	63,1	CH ₂	3,51 e 3,77	dd (11 e 5) dd (11 e 3)
1'	127,5	C#	-	-
2'	110,1	CH	6,58	s
3'	146,7	C#	-	-
4'	144,5	C#	-	-
5'	115,4	CH	6,22	s
6'	137,0	C#	-	-
7'	33,3	CH ₂	2,72 e 2,82	dd (16 e 4) dd (16 e 12)
8'	40,1	CH	1,96 a 2,06	m
9'	66,5	CH ₂	3,72 e 3,86 a 3,88	dd (11 e 6) ml
OCH ₃	56,0	CH ₃	3,86	s
OCH ₃	55,9	CH ₃	3,83	s



Blumenol C 63



No espectro de IV de AH9F2 (Esp. 16) observa-se uma banda larga e forte a 3411 cm^{-1} , característica do grupamento O-H e uma banda forte a 1650 cm^{-1} característica da ligação C=O quando este grupamento está conjugado à uma dupla ligação, diminuindo o caráter π da ligação C=O, sugerindo a presença de uma carbonila α,β -insaturada (Silverstein e Webster, 1998).

No espectro de massas de AH9F2 (Esp. 17) observa-se o pico de íon molecular m/z igual a 210.

Nos espectros de RMN ^{13}C e DEPT de AH9F2 (Esp. 18 e 19) são observados 13 sinais referentes a 4 CH_3 , 3 CH_2 , 3 CH e 3 carbonos quaternários (Tabela 15).

Os sinais em δ 165,9 (C#); 125,3 (CH, relacionado no HMQC (Esp. 20) ao singlete em δ 5,83) e 199,8 (C#) são característicos de carbonilas α,β -insaturadas.

O hidrogênio em δ 5,83 (s) se relaciona no COSY (Esp. 21) ao singlete em δ 2,0 que, no HMQC, se relaciona à metila em δ 24,7. O hidrogênio em δ 2,0 também se relaciona no COSY ao multiplete em δ 1,82 a 1,92 que, no HMQC se relaciona ao CH em δ 51,1.

Observa-se também no COSY a relação entre os hidrogênios metílicos em δ 1,21 e δ 3,76 (Esp. 22, RMN ^1H). O hidrogênio em δ 3,76 se relaciona no HMQC ao sinal em δ 68,1 característico de carbono ligado a um grupamento hidroxila.

Estas observações são coerentes com o número de átomos de Carbono e Hidrogênio mostrados nos espectros de RMN ^{13}C e DEPT e com a presença de um grupamento hidroxila e um grupamento cetônico na molécula.

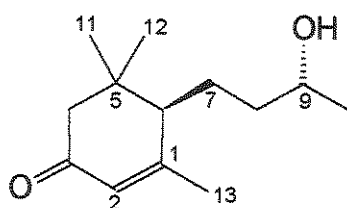
Com base nos dados espectrais propusemos que a estrutura de AH9F2 fosse a do nor-isoprenóide Blumenol C 63.

Os dados obtidos são coerentes com os dados do Blumenol C isolado de *Salvia nemorosa* (Takeda *et al.*, 1997).

Nos trabalhos descritos na literatura até o momento, a classe dos nor-isoprenóides não havia sido isolada do gênero *Himatanthus*, sendo esta a primeira descrição desta classe de compostos para o gênero.

Tabela 15:- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e de ^1H do blumenol C 63.

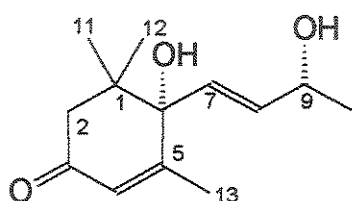
Carbono	δ (ppm) de ^{13}C	Tipo de carbono	δ (ppm) de ^1H	J (Hz)
1	165,9	C#	-	-
2	125,3	CH	5,83	s
3	199,8	C#	-	-
4	47,1	CH ₂	2,04 e 2,40	d (18) d (18)
5	36,3	C#	-	-
6	51,1	CH	1,82 a 1,92	m
7	26,2	CH ₂		
8	38,6	CH ₂		
9	68,1	CH	3,76	m
10	23,8	CH ₃	1,21	d (6)
11	27,2	CH ₃	1,08	s
12	28,8	CH ₃	1,02	s
13	24,7	CH ₃	2,0	d (2)



4.1.2. Extrato FDN (Folhas, Diclorometano, Neutro) de *H. obovatus*.

A purificação do extrato FDN foi realizada em CC sob média pressão e as frações obtidas foram purificadas por CCP. Foram isoladas três substâncias: 2 nor-isoprenóides: o Blumenol A 64 e o nor-isoprenóide inédito 65 e a lignana, já isolada anteriormente, Isolariciresinol 33.

Blumenol A 64



No espectro de IV de VH37F3 (Esp. 23) observa-se uma banda larga e forte a 3409 cm^{-1} , característica do grupamento O-H e uma banda forte a 1655 cm^{-1} característica da ligação C=O quando este grupamento está conjugado à uma dupla ligação, diminuindo o caráter π da ligação C=O (Silverstein e Webster, 1998).

O espectro de massas de VH37F3 (Esp. 24) mostra o pico base em m/z 124 (100%) e os fragmentos em 168 (8); 150 (8); 135 (8); 79 (15) e 69 (7), concordantes com os dados de massa para o blumenol A isolado de *Cannabis sativa* (Cannabinaceae) por Bercht e colaboradores (1976).

Analisando-se os espectros de RMN^{13}C e DEPT de VH37F3 (Esp. 25 e 26), ambos obtidos com uma nanosonda devido à pequena quantidade de amostra, observa-se a presença de 13 sinais referentes a 4 CH_3 , 1 CH_2 , 4 CH e 4 carbonos quaternários (Tabela 16).

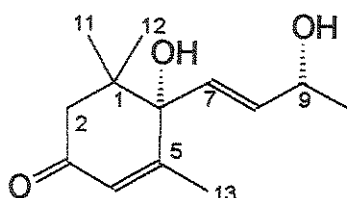
O espectro de RMN^{13}C de VH37F3 apresenta semelhanças com o espectro do Blumenol C, diferindo deste quanto à presença de dois CH sp^2 e de um CH ligado à grupamento hidroxila em δ 79,0 e a ausência de 2 CH_2 sp^3 e de um CH em 51,1. Os sinais característicos de carbonos sp^2 em δ 129,0 (CH - 5,87 - dd - 4,8 e 16,0 Hz) e em δ 135,6 (CH - 5,79 - d - 16,0 Hz) mostram a presença de uma dupla ligação de configuração trans. O dd em δ 5,87 (H8) e a simplificação do multiplete relativo ao hidrogênio H9 (para o blumenol C em δ 3,76 (m) e para o VH37F3 em δ 4,42 (m)), mostram que a dupla ligação de VH37F3 está localizada nos carbonos C7-C8 (Esp 27, RMN^1H).

O dubleto em δ 1,30 (6,2 Hz - H10) está relacionado no gCOSY (Esp. 28) ao multiplete em δ 4,42 (H9) e este está relacionado ao duplo dubleto em δ 5,87 (4,8 e 16,0 Hz - H8).

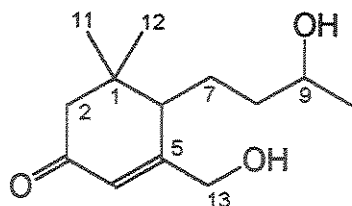
A estrutura proposta para VH37F3 é a do blumenol A 64 e os dados espectrais são concordantes com os dados do blumenol A isolado de *Perrottetia multiflora* (González *et al.*, 1994).

Tabela 16:- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e de ^1H do Blumenol A 64.

Carbono	δ (ppm) de ^{13}C	Tipo de carbono	δ (ppm) de ^1H	J (Hz)
1	41,1	C#	-	-
2	49,6	CH ₂	2,45 2,25	d (17) d (17)
3	198,3	C#	-	-
4	126,8	CH	5,91	m
5	163,2	C#	-	-
6	79,0	C#	-	-
7	135,6	CH	5,79	d (16)
8	129,0	CH	5,87	dd (16 e 5)
9	68,0	CH	4,42	m
10	23,7	CH ₃	1,30	d (6)
11	24,0	CH ₃	1,09	s
12	22,9	CH ₃	1,02	s
13	19,0	CH ₃	1,90	d (1)



Nor-isoprenóide 65 - INÉDITO

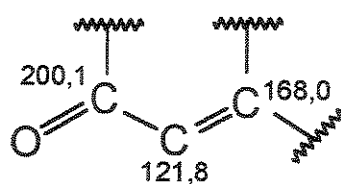


No espectro de IV de VH35F4 (Esp. 29) observa-se uma banda larga e forte a 3419 cm^{-1} , característica do grupamento O-H e uma banda forte a 1642 cm^{-1} característica da ligação C=O α,β -insaturada (Silverstein e Webster, 1998).

No espectro de massas de VH35F4 (Esp. 30), observa-se o pico de íon molecular m/z igual a 226 e a perda de 18 unidades de massa, característico para a perda de água de moléculas que têm grupamentos hidroxila.

No espectro de RMN¹³C de VH35F4 (Esp. 31) são observados 13 sinais, como no caso dos nor-isoprenóides blumenol C 63 e blumenol A 64, que por análise do DEPT (Esp. 32) nos mostram 3 sinais referentes a 3 CH₃, 4 CH₂, 3 CH e 3 carbonos quaternários (Tabela 17).

Assim como no caso dos nor-isoprenóides 63 e 64 isolados anteriormente, observamos nos espectros de RMN¹³C, DEPT e IV de VH35F4, a presença de uma carbonila conjugada à uma dupla ligação:

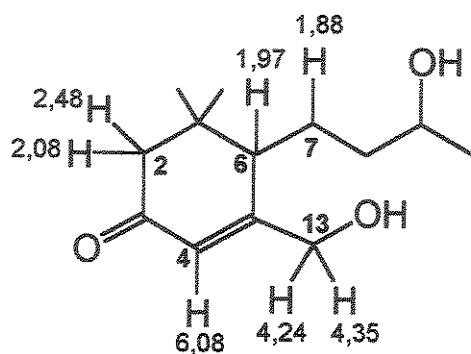


No DEPT do blumenol C 63 observa-se sinal referente a um CH₃ em δ 24,7 (C13) que não é observado no DEPT de VH35F4. Neste espectro observa-se um sinal referente a um CH₂ em δ 64,8, (característico de carbono ligado à grupamentos hidroxila) que não é observado no DEPT de 63.

No espectro gCOSY de VH35F4 (Esp. 33), observa-se uma correlação entre o hidrogênio em δ 6,08 (H4) e os hidrogênios em δ 4,24 e 4,35 (H13) e entre o hidrogênio em δ 3,76 (H9) e os hidrogênios em δ 1,20 (H10) e 1,50 (H8) (Esp. 34, RMN ¹H).

No espectro cycleNOE de VH35F4 (Esp. 35) observa-se um incremento nos sinais em δ 2,08 (H2), 1,97 (H6) e 1,88 (H7) quando o hidrogênio em δ 2,48 (H2) é irradiado.

Quando o hidrogênio em δ 6,08 (H4) é irradiado, observa-se um aumento dos sinais em δ 4,24 e 4,35 (H13).



nor-isoprenóide 65

Os dados espectrais observados nos levaram a propor a estrutura do nor-isoprenóide 65, que é inédita. Vale lembrar que a classe dos nor-isoprenóides ainda não havia sido isolada de espécies do gênero *Himatanthus*, sendo este o terceiro nor-isoprenóide isolado de *H. obovatus* durante o nosso trabalho.

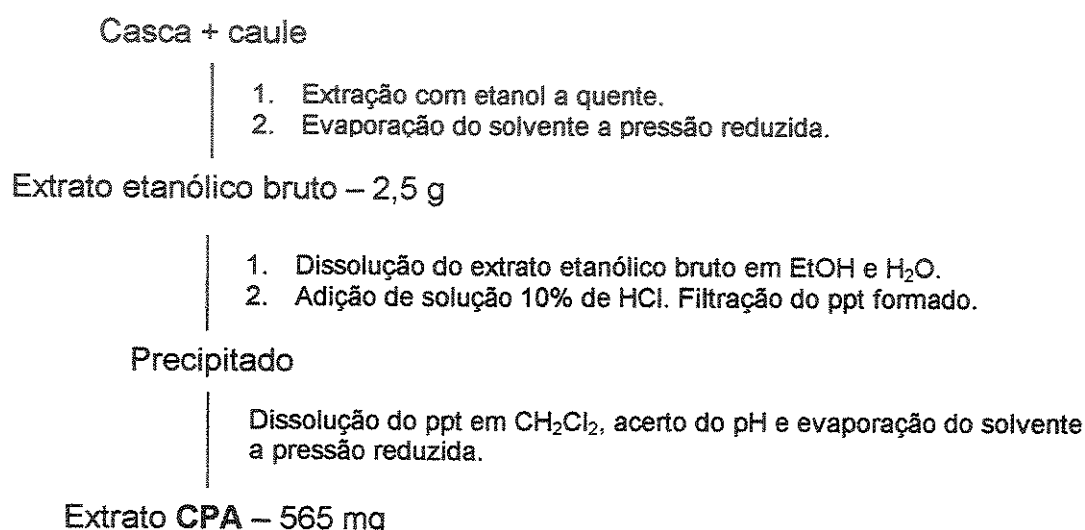
Tabela 17:- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e de ^1H do nor-isoprenóide 65.

Carbono	δ (ppm) de ^{13}C	Tipo de carbono	δ (ppm) de ^1H	J (Hz)
1	36,3	C#	-	-
2	47,7	CH ₂	2,48 2,08	d (18) d (18)
3	200,1	C#	-	-
4	121,8	CH	6,08	s
5	168,0	C#	-	-
6	46,0	CH	1,97	s largo
7	26,1	CH ₂	1,48 a 1,60 1,88 a 1,92	m m
8	38,0	CH ₂	1,48 a 1,60	m
9	67,6	CH	3,78 a 3,84	m
10	23,7	CH ₃	1,20	d (6)
11	27,4	CH ₃	1,09	s
12	28,6	CH ₃	1,02	s
13	64,8	CH ₂	4,24 4,35	d (17) d (17)

4.2. Casca + caule de *H. obovatus* coletados na Chapada dos Guimarães - MT.

Com o término dos extratos obtidos a partir das folhas de *H. obovatus*, realizamos a extração da casca + caule utilizando etanol (Parte experimental - item 3.3.2). Obtivemos 16,4 g de extrato bruto, dos quais 2,5 g sofreram tratamento ácido (Parte experimental - item 3.3.2.A) obtendo-se o extrato denominado **CPA** como mostrado no Esquema a seguir (repetição do esquema 9 - Parte Experimental).

Esquema 9:- Tratamento ácido do extrato etanólico da casca + caule de *H. obovatus* (Chapada dos Guimarães - MT).



4.2.1. Extrato CPA (Casca + caule, Ácido) de *H. obovatus*.

A purificação do extrato **CPA** foi realizada em CC sob média pressão e as frações obtidas foram purificadas por CCP. Foram obtidas duas frações: VH30F3 e VH31F6. A análise dos dados espectrais destas frações demonstraram tratar-se de misturas dos terpenos: acetato de lupeol 22 + acetato de α -amirina 20 + acetato de β -amirina 21 + acetil germanicol 66 (VH30F3) e estigmasterol 26 + β -sitosterol 27 + campesterol 67 (VH31F6).

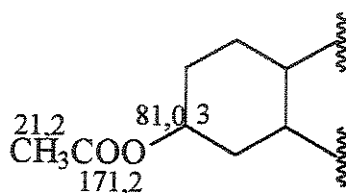
Apesar da grande variedade de esqueletos carbônicos e funcionalização dos triterpenos, existe uma quantidade significativa destes que têm estruturas simples, com apenas um grupo funcional oxigenado no C3 e uma única ligação dupla. Provavelmente a simplicidade das estruturas destes triterpenos é o que permite encontrá-los

frequentemente nas plantas, mas também faz com que seu comportamento frente à cromatografia em coluna e em camada delgada sejam iguais, impossibilitando sua separação (Olea, 1990).

A RMN¹³C permite a identificação dos componentes de uma mistura de triterpenos simples com a mesma funcionalização. Os valores de deslocamentos químicos de RMN¹³C dos carbonos sp² dão uma informação inicial sobre os tipos de esqueletos carbônicos dos triterpenos da mistura. Em seguida, a comparação dos valores de deslocamentos químicos, principalmente de carbonos metínicos e metílicos com valores da literatura possibilita determinar os constituintes da mistura (Olea, 1990).

Fração VH30F3

Observa-se no espectro de RMN¹³C de VH30F3 (Esp. 37) três sinais (δ 81,0; 171,2 e 21,2) que indicam a presença de um átomo de oxigênio ligado ao carbono C3 das moléculas presentes na mistura:



Em seguida comparamos os deslocamentos dos carbonos olefínicos de VH30F3 com os da literatura, lembrando que as intensidades dos sinais dos carbonos de uma ligação dupla de um composto da mistura devem ser semelhantes (Olea, 1990 e Olea e Roque, 1990). Os deslocamentos de RMN¹³C dos “pares” de carbonos olefínicos são mostrados na Tabela 18.

Tabela 18:- Deslocamentos de RMN¹³C dos carbonos olefínicos dos terpenos presentes na fração VH30F3

Deslocamentos de RMN ¹³ C de C olefínicos (Olea e Roque, 1990)	Série	Exemplo	Deslocamentos de RMN ¹³ C (ppm) observados	Composto
C29 e C20 109,3 e 150,5	lupano	acetil lupeol	109,4 e 151,1	<u>22</u>
C12 e C13 121,7 e 145,1	Δ^{12} oleanano	acetil β - amirina	121,7 e 145,3	<u>21</u>
C19 e C18 129,8 e 142,6	Δ^{18} oleanano	acetil germanicol	129,9 e 142,8	<u>66</u>
C12 e C13 124,1 e 139,4	ursano	acetil α - amirina	124,0 e 139,7	<u>20</u>

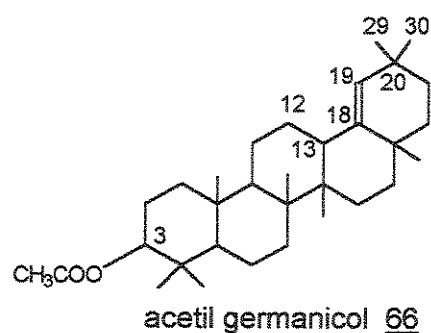
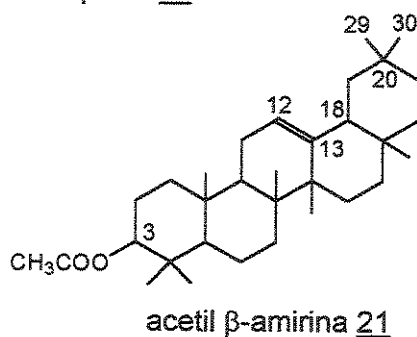
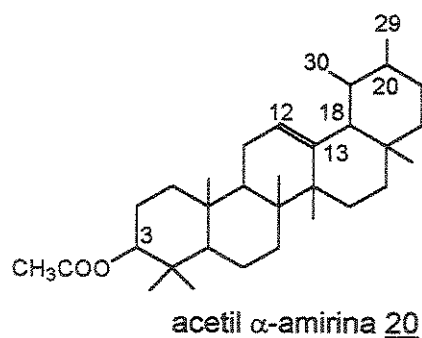
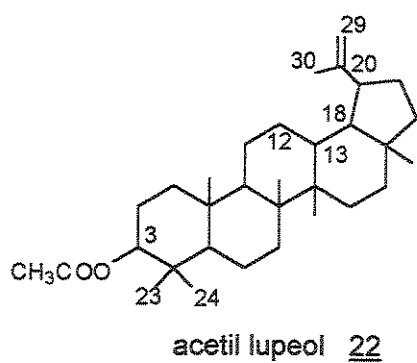


Figura 12:- Estruturas dos terpenos 20, 21, 22 e 66.

Na tabela 19, são apresentados alguns deslocamentos de RMN¹³C da fração VH30F3 (comparados com os dados encontrados no trabalho de Olea, 1990), que nos auxiliaram na proposta dos metabólitos presentes na mistura.

Tabela 19:- Deslocamentos de RMN¹³C observados para alguns carbonos dos triterpenos 22, 20, 21 e 66.

C	Ac. Lupeol <u>22</u>	Ac. α -amirina <u>20</u>	Ac. β -amirina <u>21</u>	Ac. germanicol <u>66</u>
12	25,1	124,0	121,7	26,5
13	38,1	139,7	145,3	38,5
18	48,0	59,1	47,3	142,8
19	47,9	39,7	46,9	129,9
20	151,1	39,6	30,9	32,4
29	109,4	23,4	33,3	31,3
30	19,3	21,4	23,7	29,1

O espectro de RMN¹H da mistura de terpenos VH30F3 (Esp. 38) é complexo, mas alguns sinais característicos podem ser observados. Observa-se um multiplete entre δ 2,30-2,42 referente ao hidrogênio H19 do acetil germanicol 66 e dois multipletos em δ 4,57 e 4,69 referentes aos hidrogênios H29 do acetil lupeol 22 (Reynolds, 1986). Observa-se também os sinais referentes aos hidrogênios olefínicos em δ 5,18 (m, H12 da acetil β -amirina 21) e em δ 5,12 (m, H12 da acetil α -amirina 20) (Aragão, 1990).

Observa-se no espectro de massas de VH30F3 (Esp. 39) os picos representantes dos fragmentos a, b, c e d em m/z 218, 203 e 189 característicos de triterpenos pentacíclicos Δ^{12} – insaturados (acetil β -amirina 21) e da série lupano (acetil lupeol 22), conforme mostrado na Figura 13 (Aragão, 1990).

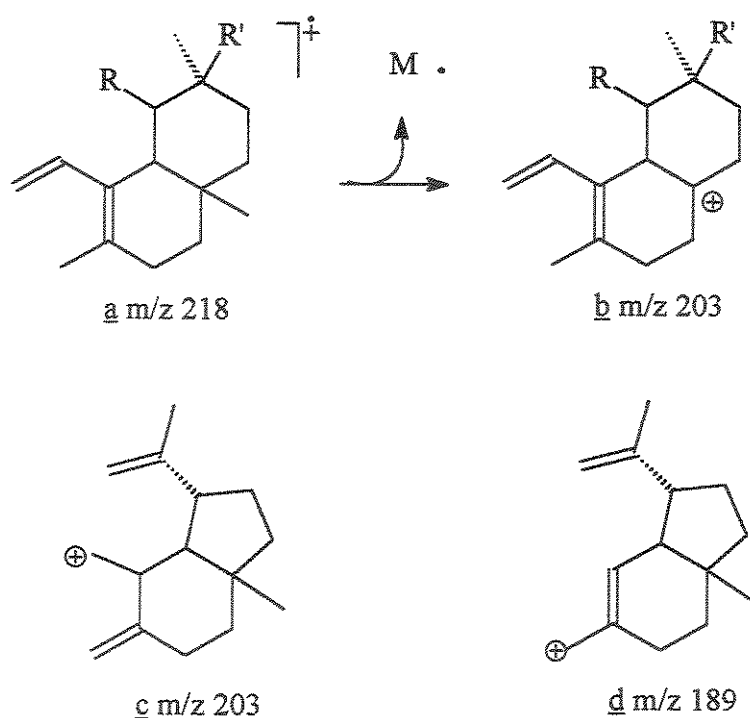
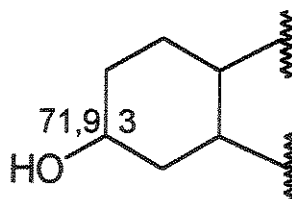


Figura 13:- Fragmentos característicos de triterpenos pentacíclicos Δ^{12} – insaturados (acetil β -amirina 21) e da série lupano (acetil lupeol 22) (Aragão, 1990).

Os terpenos acetil lupeol, acetil α -amirina e acetil β -amirina já foram isolados, dentre outras plantas, da *H. articulata* (Barreto *et al.*, 1998) e *H. phagedaenica* (Vanderlei *et al.*, 1991). O acetato de lupeol também já foi isolado de *H. sucuba* (Silva *et al.*, 1998-C e Wood *et al.*, 2001).

Fração VH31F6

Inicialmente observamos no espectro de RMN¹³C de VH31F6 (Esp. 40) o sinal característico do carbono oxigenado em δ 71,9 que indica a presença de um grupamento hidroxila no carbono C3 dos compostos presentes na mistura.



Os deslocamentos de RMN¹³C dos “pares” de carbonos olefínicos são mostrados na Tabela 20.

Tabela 20:- Deslocamentos de RMN¹³C dos carbonos olefínicos dos terpenos presentes na fração VH31F6

Deslocamentos de RMN ¹³ C de C olefínicos (Ruiz, 2003)	Deslocamentos de RMN ¹³ C (ppm) observados	Deslocamentos característico para os compostos
C5 e C6 140,7 e 121,7	141,0 e 121,9	<u>55</u> , <u>56</u> e <u>57</u>
C22 e C23 138,3 e 129,2	138,5 e 129,0	<u>55</u>
C22 e C23 33,9 e 26,0	33,9 e 26,0	<u>56</u> e <u>57</u>

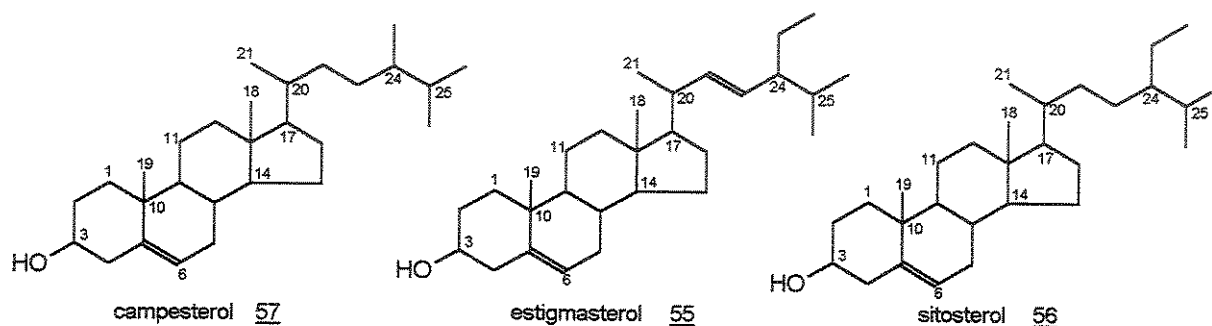


Figura 14:- Estruturas dos terpenos 55, 56 e 57.

O espectro de RMN¹H de VH31F6 (Esp. 41) tem a região entre δ 0,6 e 2,4 bastante complexa. Observa-se o multipeto em δ 3,50 característico do hidrogênio carbinólico H3 e o dubleto em δ 5,35 característico do hidrogênio olefínico H6 para o estigmasterol 55, β -sitosterol 56 e campesterol 57. Observa-se também os multipletos em δ 5,08 e em δ 5,10 característicos dos hidrogênios olefínicos H22 e H23 da cadeia lateral para o estigmasterol 55.

O espectro de massas de VH31F6 (Esp. 42) é concordante com os dados da literatura para os esteróides 55, 56 e 57 (Schmidt, 1983), sendo que os principais picos são:

- para o estigmasterol 55:- 255, 213,
- para o β -sitosterol 56:- 414, 381, 303, 273, 255, 213,
- para o campesterol 57:- 400, 382, 367, 315, 289, 273, 255, 213.

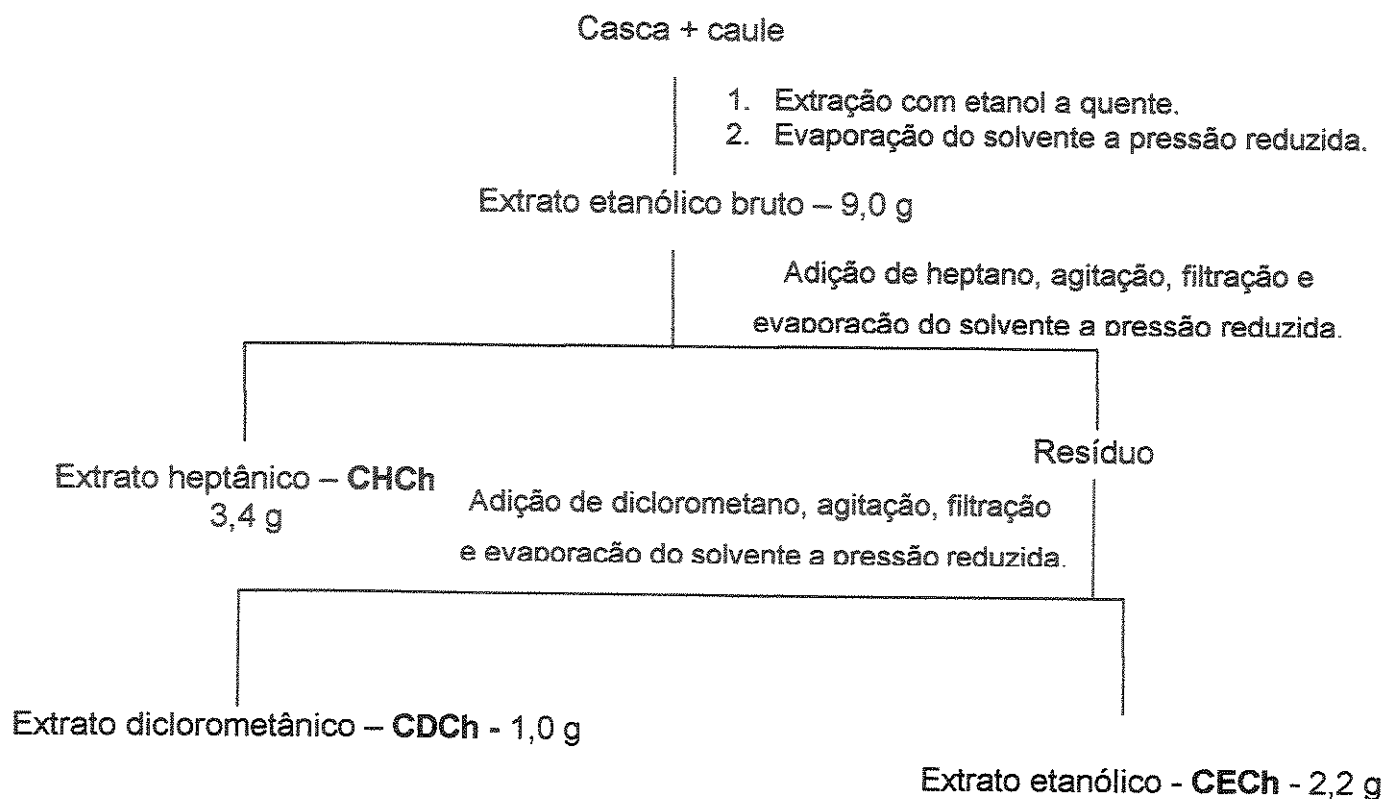
O esteróide β -sitosterol foi isolado, dentre outras plantas, da *H. phagedaenica* (Vanderlei *et al.*, 1991) e *H. articulata* (Barreto *et al.*, 1998), enquanto o estigmasterol foi isolado também de *H. articulata* (Barreto *et al.*, 1998).

Embora os testes de Mayer para alcalóides realizados com os extratos etanólicos de *H. obovatus* tenham dado resultados positivos, não foram isolados alcalóides indólicos como era nosso objetivo inicial e, portanto, optamos pela realização de uma extração do extrato etanólico da casca + caule de *H. obovatus* (Chapada dos Guimarães - MT) por partição com solventes de polaridades diferentes.

4.3. Partição do extrato etanólico da Casca + caule de *H. obovatus* (Chapada dos Guimarães – MT).

Parte do extrato etanólico (9,0 g) foi submetida a uma extração com solventes de polaridades diferentes, conforme mostrado no Esquema a seguir (repetição do esquema 11 - Parte Experimental).

Esquema 11:- Partição do extrato etanólico da casca + caule (item 3.3.2.) de *H. obovatus* (Chapada dos Guimarães - MT).



CHCh – Casca + caule, Heptano, Chapada dos Guimarães, CDCh – Casca + caule, Diclorometano, Chapada dos Guimarães e CECh – Casca + caule, Etanol, Chapada dos Guimarães).

4.3.1. Extrato CDCh (Diclorometano, Casca + caule, Chapada dos Guimarães) de *H. obovatus*.

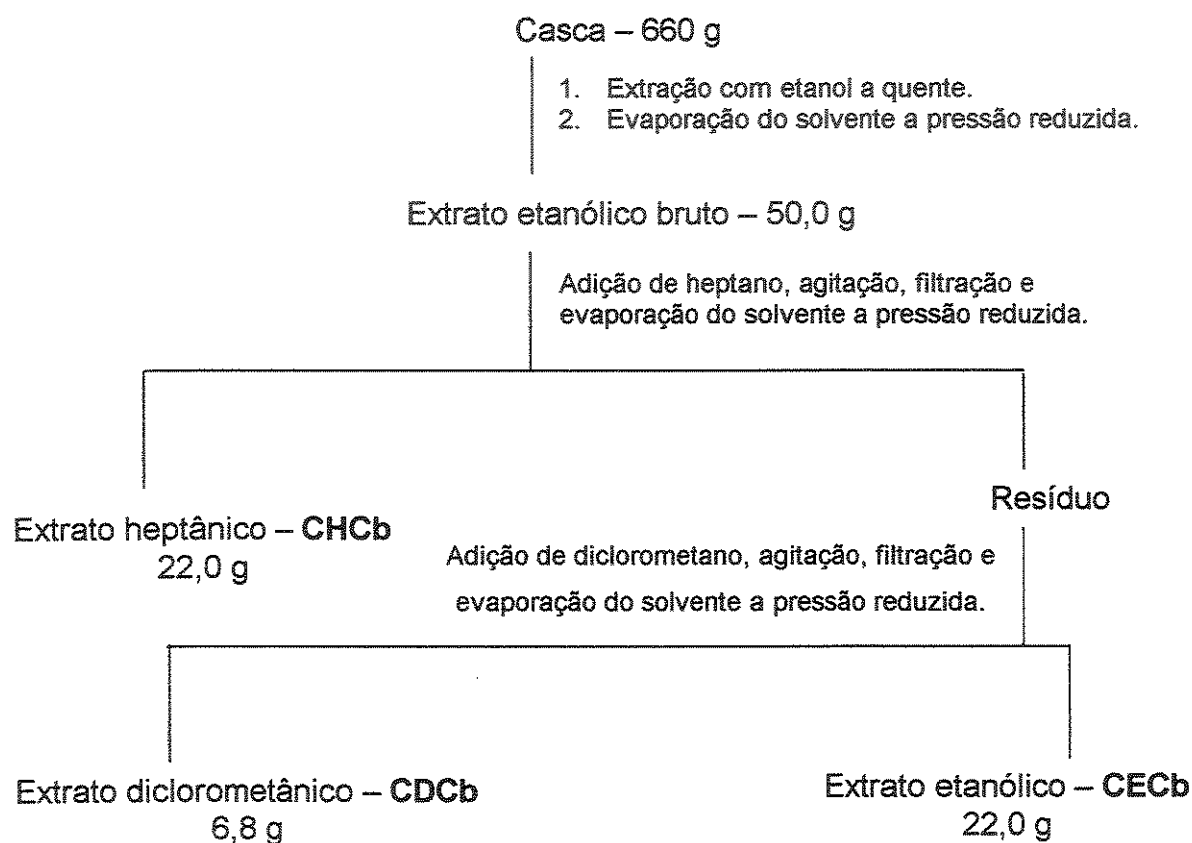
A purificação do extrato CDCh foi realizada em CC sob média pressão e as frações obtidas foram purificadas por CCP. Foram obtidas duas frações: VH49F3 e VH50F5. A análise dos dados espectrais destas frações demonstraram tratar-se de misturas dos terpenos: acetato de lupeol 22 + acetato de α -amirina 20 + acetato de β -amirina 21 + acetil germanicol 66 (VH49F3) e β -sitosterol 27 (VH50F5).

Estas misturas já foram isoladas anteriormente do extrato CPA e a análise espectroscópica dos terpenos presentes nas misturas apresentam-se discutidas no item 4.2.1..

4.4. Extrato etanólico da Casca de *H. obovatus* (Casa Branca - SP).

A casca de *H. obovatus*, coletada no interior do Estado de São Paulo, foi seca, moída e submetida à extração em Soxhlet utilizando-se etanol. Obteve-se 50 g de extrato bruto que foi particionado com solventes de polaridades diferentes (heptano, diclorometano e etanol), obtendo-se os extratos CHCb, CDCb e CECb, conforme mostrado no Esquema a seguir (repetição do esquema 13 - Parte Experimental).

Esquema 13:- Partição do extrato etanólico da casca de *H. obovatus* (Casa Branca - SP).

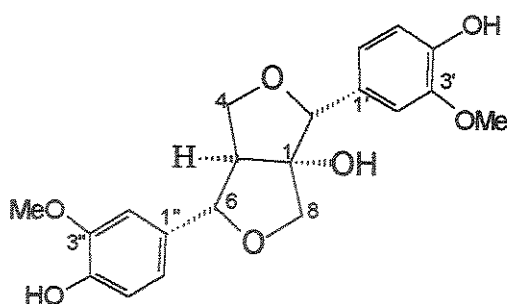


(CHCb – Casca, Heptano, Casa Branca, CDCb – Casca, Diclorometano, Casa Branca e CECb – Casca, Etanol, Casa Branca).

4.4.1. Extrato CDCb (Casca, Diclorometano, Casa Branca) de *H. obovatus*.

A purificação do extrato CDCb foi realizada em CC sob média pressão e as frações obtidas foram purificadas por CCP. Foram isoladas 3 lignanas: o hidroxipinoresinol 68, o lariciresinol 69 e o olivil 70.

Hidroxipinoresinol 68



No espectro de IV de CB35F3 (Esp. 48) observa-se bandas em 1612 e 1517 cm^{-1} características das ligações C=C de anéis aromáticos. São observadas também uma banda forte e larga em 3386 cm^{-1} e outra em 1374 cm^{-1} características de grupamentos hidroxila (Silverstein e Webster, 1998).

Analisando-se os espectros de RMN¹³C e DEPT de CB35F3 (Esp. 49 e 50) observa-se a presença de 20 sinais referentes a 2 CH₃, 2 CH₂, 9 CH e 7 carbonos quaternários. Destes, 12 são sinais característicos de anéis aromáticos, sendo 6 CH e 6 carbonos quaternários (Tabela 21).

O espectro de RMN¹³C mostra os sinais em δ 55,9 e 56,0 (CH₃) que se relacionam no HSQC (Esp. 51) aos singletos em δ 3,90 e 3,92, indicando a presença de 2 grupamentos metoxila na molécula (Esp. 52, RMN¹H).

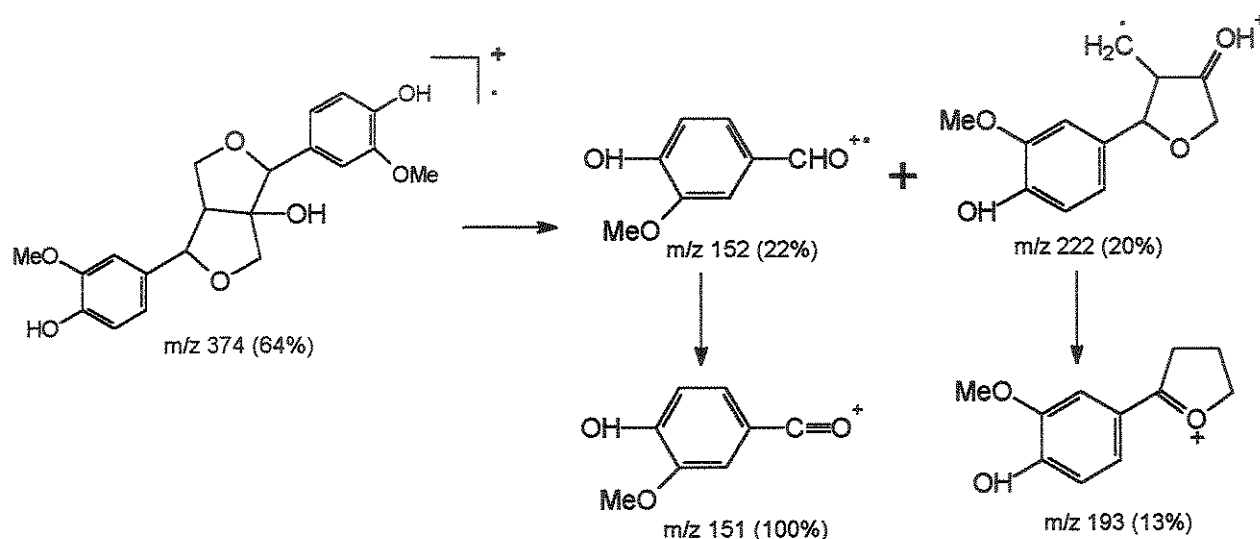
Observa-se no HSQC o sinal em δ 71,6 (C4 - CH₂) que se relaciona ao duplo duplete em δ 3,84 (6,6 e 9,5 Hz) e ao tripleto em δ 4,53 (8,8 Hz); o sinal em δ 74,6 (C8 - CH₂) que se relaciona no HSQC ao duplete em δ 3,91 (5,1 Hz) e ao duplete em δ 4,06 (9,5 Hz); o sinal em δ 85,8 (C6 - CH) que se relaciona no HSQC ao duplete em δ 4,87 (5,1 Hz) e finalmente o sinal em δ 87,8 (C2 - CH) que se relaciona no HSQC ao singlete em δ 4,84, sinais bastante desprotegidos e característicos de carbonos ligados à átomos de oxigênio.

No gCOSY de CB35F3 (Esp. 53) observa-se a relação entre o hidrogênio em δ 4,87 (H6) e o hidrogênio em δ 3,12 (H5) e entre este (H5) e os hidrogênios em δ 3,84 e 4,53 (H4).

No espectro cycleNOE de CB35F3 (Esp. 54) observa-se um incremento nos sinais em δ 3,12 (H5) e 3,84 (H4) e/ou 3,91 (H8) quando o hidrogênio em δ 4,53 (H4) é irradiado. Quando o hidrogênio em δ 4,06 (H8) é irradiado, observa-se um aumento dos sinais em δ 3,84 (H4) e/ou 3,90 (H8) e em δ 4,84 (H2) e/ou 4,87 (H6).

A comparação dos dados espectroscópicos com os dados da literatura nos permitiu propor que a estrutura de CB35F3 fosse a da lignana hidroxipinoresinol 68.

O espectro de massas de CB35F3 (Esp. 55) é concordante com a fragmentação descrita por Chiba e colaboradores (1979) para o hidroxipinoresinol, como mostrado no esquema 18.

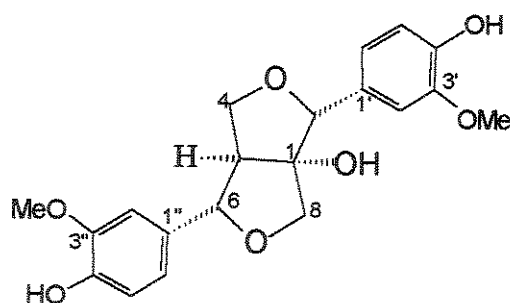


Esquema 18:- Fragmentação proposta para o hidroxipinoresinol por Chiba e colaboradores (1979).

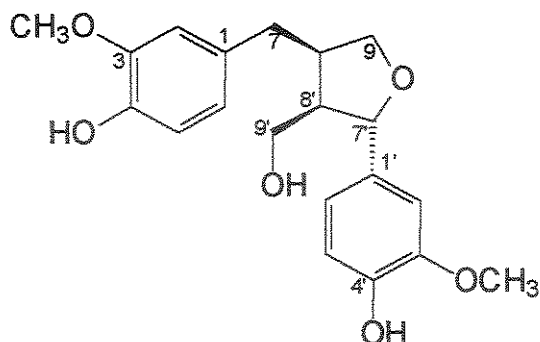
Esta é a primeira vez que o hidroxipinoresinol 68 é isolado de espécies do gênero *Himatanthus*, mas já foi isolado de *Olea europaea* (Oleaceae – Tsukamoto *et al.*, 1984-A) e de *Fraxinus mandshurica* (Oleaceae – Tsukamoto *et al.*, 1984-B).

Tabela 21:- Deslocamentos químicos de RMN¹³C e de ¹H do hidroxipinoresinol 68 (♣, ♦, ♠ - sinais que podem ser trocados) .

Carbono	δ (ppm) de ¹³ C	Tipo de carbono	δ (ppm) de ¹ H	J (Hz)
1	91,6	C#	-	-
2	87,8	CH	4,84	s
4	71,6	CH ₂	3,84 4,53	dd (7 e 10) t (9)
5	60,0	CH	3,12	
6	85,8	CH	4,87	d (5)
8	74,6	CH ₂	3,91 4,06	d (5) d (10)
1'	127,0	C#	-	-
2'	109,0♣	CH	6,98	d (5)
3'	146,9♦	C#	-	-
4'	145,4♦	C#	-	-
5'	114,3	CH	6,90	s
6'	119,6♣	CH	6,87	d
1''	132,3	C#	-	-
2''	109,4♣	CH	6,98	d (5)
3''	146,0♦	C#	-	-
4''	145,7♦	C#	-	-
5''	114,7	CH	6,95	t (8)
6''	119,6♣	CH	6,87	d
OCH ₃	55,9	CH ₃	3,90	s
OCH ₃	56,0	CH ₃	3,92	s



Lariciresinol **69**



No espectro de IV de CB38F3 (Esp. 56) observa-se bandas em 1603 e 1516 cm^{-1} características das ligações C=C de anéis aromáticos. São observadas também uma banda forte e larga em 3385 cm^{-1} e outra em 1384 cm^{-1} , características de grupamentos hidroxila (Silverstein e Webster, 1998)

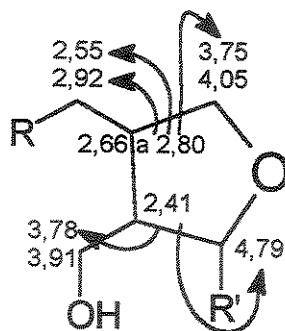
No espectro de massas de CB38F3 (Esp. 57) observa-se o pico de íon molecular m/z igual a 360.

Analisando-se os espectros de RMN^{13}C e DEPT de CB38F3 (Esp. 58 e 59) observa-se a presença de 20 sinais referentes a 1 CH_3 , 3 CH_2 , 9 CH e 6 carbonos quaternários. Destes, 12 são sinais característicos de anéis aromáticos, sendo 6 CH e 6 carbonos quaternários (Tabela 22).

O espectro de RMN^{13}C mostra o sinal em δ 56,1 (CH_3) que se relaciona no HMQC (Esp. 60) a dois singletos, um em δ 3,87 e outro em δ 3,89, indicando a presença de 2 grupamentos metoxila na molécula (Esp. 61, RMN^1H).

São observados 3 sinais desprotegidos (2 CH_2 e 1 CH), indicando estarem ligados à átomos de oxigênio. São eles: o sinal em δ 61,1 ($\text{C9}' - \text{CH}_2$) relacionado no HMQC a um multiplete em δ 3,78 e a um multiplete em δ 3,91; o sinal em δ 73,1 ($\text{C9} - \text{CH}_2$) relacionado eno espectro de HMQC a um multiplete em δ 3,75 e a um duplo dubleto em δ 4,05 (6,3 e 8,5 Hz) e o sinal em δ 83,0 ($\text{C7}' - \text{CH}$) relacionado no HMQC a um dubleto em δ 4,79 (6,6 Hz).

No gCOSY de CB38F3 (Esp. 62) observa-se correlações entre os hidrogênios em δ 3,78 e 3,91 (2 $\text{H9}'$) e o hidrogênio em δ 2,41 ($\text{H8}'$) e entre este ($\text{H8}'$) e o hidrogênio em δ 4,79 ($\text{H7}'$). Observa-se também a correlação entre o hidrogênio em δ 2,41 ($\text{H8}'$) e o hidrogênio em δ 2,66 (H8); e entre este (H8) e os hidrogênios em δ 2,55 e 2,92 (2 H7) e o hidrogênio em δ 3,75 (H9). A partir das correlações observadas nos espectros HMQC e gCOSY propõe-se:

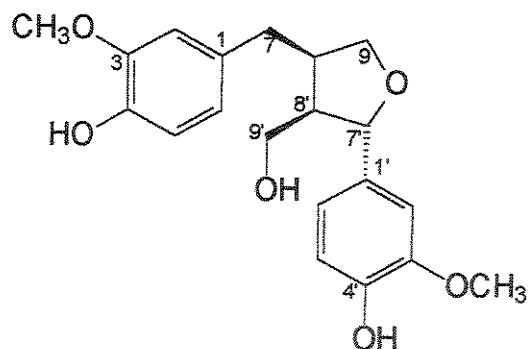


Sugerimos que os grupamentos R e R' sejam os anéis aromáticos substituídos e comparando-se os dados deste composto com dados espectroscópicos de lignanas na literatura propusemos que a estrutura de CB38F3 seja a da lignana lariciresinol 69.

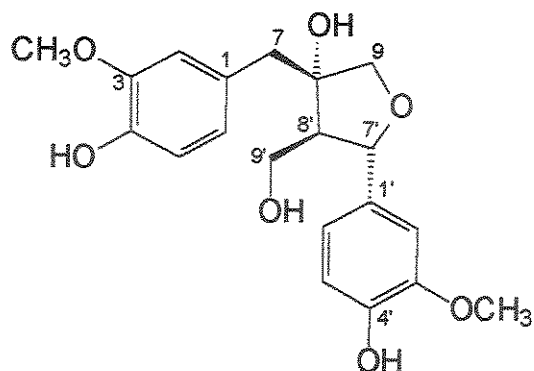
Esta é a primeira descrição da lignana 69 em espécies do gênero *Himatanthus*, que já foi isolado anteriormente de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae – Fonseca *et al.*, 1978).

Tabela 22 :- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e ^1H do lariciresinol 69 (♣♦♣ - sinais que podem ser trocados).

Carbono	δ (ppm) de ^{13}C	Tipo de carbono	δ (ppm) de ^1H	J (Hz)
1	132,6♣	C#	-	-
2	111,5	CH	6,69	d (2)
3	144,3♦	C#	-	-
4	146,9♦	C#	-	-
5	114,7♣	CH	6,86	t (8)
6	121,4	CH	6,71	d (2)
7	33,5	CH ₂	2,55 2,92	dd (11 e 13) dd (5 e 14)
8	42,5	CH	2,66 a 2,80	m
9	73,1	CH ₂	3,75 4,05	m dd (6 e 9)
1'	135,1♣	C#	-	-
2'	108,5	CH	6,89	s
3'	145,4♦	C#	-	-
4'	147,0♦	C#	-	-
5'	114,4♣	CH	6,86	t (8)
6'	119,0	CH	6,82	t (9)
7'	83,0	CH	4,79	d (7)
8'	52,8	CH	2,41	quint (7)
9'	61,1	CH ₂	3,78 3,91	m m
OCH ₃	56,1	CH ₃	3,87	s
OCH ₃	56,1	CH ₃	3,89	s



Olivil 70



No espectro de IV de CB40F1 (Esp. 63) observa-se bandas em 1603 e 1515 cm^{-1} características das ligações C=C de anéis aromáticos. São observadas também uma banda forte e larga em 3405 cm^{-1} e outra em 1377 cm^{-1} , características de grupamentos hidroxila (Silverstein e Webster, 1998).

No espectro de massas de CB40F1 (Esp. 64) observa-se o pico de íon molecular m/z igual a 376.

Analisando-se os espectros de RMN¹³C e DEPT de CB40F1 (Esp. 65 e 66) observa-se a presença de 20 sinais referentes a 2 CH₃, 3 CH₂, 8 CH e 7 carbonos quaternários, sendo que 12 destes sinais são característicos de anel aromático (Tabela 23).

O espectro de RMN¹³C mostra dois sinais, um em δ 55,90 e outro em 55,95 (CH₃) que se relacionam no Hetcor (Esp. 67) a dois singletos, um em δ 3,90 e outro em δ 3,91, indicando a presença de 2 grupamentos metoxila na molécula (Esp.68, RMN¹H).

Os 12 sinais referentes à carbonos aromáticos e os 2 sinais referentes à grupamentos metoxila são bastante semelhantes aos sinais do lariciresinol 69. A diferença entre o íon molecular de CB40F1 (m/z = 376) e do lariciresinol 69 (m/z = 360) é de 16 unidades de massa, sugerindo que podemos ter uma estrutura semelhante à da lignana 69 com um grupamento hidroxila a mais.

Observa-se 4 sinais bastante desprotegidos desprotegidos (2 CH₂, 1 CH e 1 C#), indicando estarem ligados à átomos de oxigênio. São eles: o sinal em δ 60,7 (C9' - CH₂) relacionado no Hetcor a um multipletto entre δ 3,8 e 4,0 e a um dubleto largo em δ 5,6 (12,8 Hz) e o sinal em δ 83,2 (C7' - CH) relacionado no Hetcor a um dubleto em δ 4,71 (8,1 Hz), deslocamentos bastante semelhantes aos deslocamentos dos carbonos C9' e C7' do lariciresinol 69; o sinal em δ 77,0 (C9 - CH₂) relacionado no Hetcor a dois

dubletos, um em δ 3,68 (9,2 Hz) e outro em δ 3,92 (9,2 Hz) e o carbono quaternário em δ 81,2 (C8).

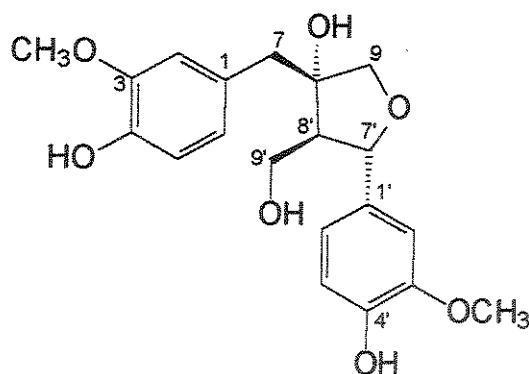
Conhecendo-se os efeitos de desproteção que a substituição de um grupamento hidroxila causa ao carbono diretamente ligado a ele e a seus carbonos vizinhos, sugerimos que a estrutura de CB40F1 é a da lignana olivil 70, semelhante ao lariciresinol 69 com um grupamento hidroxila ligado ao carbono C8.

No espectro gCOSY de CB40F1 (Esp. 69) são observadas as correlações entre os hidrogênios em δ 3,8 a 4,0 (H9') e 2,50 (H8') e entre este (H8') e o próton em δ 4,71 (H7').

Esta é a primeira descrição da lignana 70 em espécies do gênero *Himatanthus*, que já foi isolado anteriormente de *Strophantus gratus* (Apocynaceae – Cowan *et. al*, 2001), juntamente com o pinioresinol 14 e o hidroxipinioresinol 68, também isolados de *H. obovatus*.

Tabela 23:- Deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H do olivil 70 (♣♦♠ - sinais que podem ser trocados).

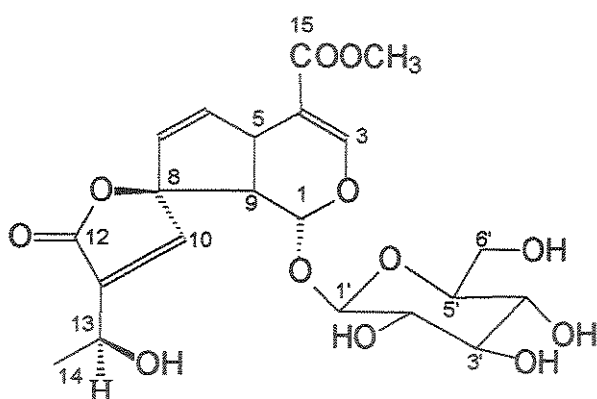
Carbono	δ (ppm) de ^{13}C	Tipo de carbono	δ (ppm) de ^1H	J (Hz)
1	133,8♦	C#	-	-
2	112,7	CH	6,82	d (2)
3	144,7♣	C#	-	-
4	146,8♣	C#	-	-
5	114,1♠	CH	6,89	
6	122,8	CH	6,78	dd (2 e 8)
7	39,1	CH ₂	2,96 3,08	d (14) d (14)
8	81,2	C#	-	-
9	77,0	CH ₂	3,68 3,92	d (9) d (9)
1'	128,2♦	C#	-	-
2'	108,7	CH	7,02	s
3'	145,4♣	C#	-	-
4'	146,5♣	C#	-	-
5'	114,4♠	CH	6,89	
6'	119,5	CH	6,89	
7'	83,2	CH	4,71	d (8)
8'	58,9	CH	2,50	ddd (6 e 8)
9'	60,7	CH ₂	3,8 a 4,0 5,6	m d largo (13)
OCH ₃	55,9	CH ₃	3,90*	s
OCH ₃	56,0	CH ₃	3,91*	s



4.4.2. Extrato CECb (Casca, Etanol, Casa Branca) de *H. obovatus*.

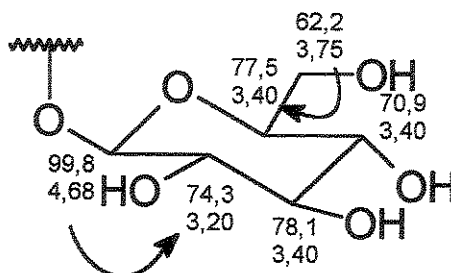
A purificação do extrato CECb foi realizada em CC sob média pressão. Obtivemos o plumieride 11.

Plumieride 11



No espectro de IV de CB8F20 (Esp. 70) observa-se uma banda forte e larga em 3422 cm^{-1} e outra em 1381 cm^{-1} características de grupamentos hidroxila. Observa-se também uma banda forte em 1727 cm^{-1} e outra em 1635 cm^{-1} característica da ligação C=O quando este grupamento está conjugado à uma dupla ligação, diminuindo o caráter π da ligação C=O (Silverstein e Webster, 1998).

Analisando-se o espectro de RMN ^{13}C e DEPT de CB8F20 (Esp. 71 e 72) observa-se a presença de 21 sinais referentes a 2 CH_3 , 1 CH_2 , 13 CH e 5 carbonos quaternários. Seis deslocamentos observados nestes espectros são característicos de uma unidade glicosídica ligada à oxigênio (Tabela 24).



Observa-se um sinal em δ 51,9 (CH_3) que se relaciona no Hetcor (Esp. 73) aos hidrogênios em δ 3,75 (s), bastante característico para metilas de grupamentos metoxila (Esp. 74, RMN ^1H). Observa-se outro sinal em δ 22,3 (CH_3) que se relaciona no Hetcor aos hidrogênios em δ 1,42 (d, 6,6 Hz). Este hidrogênio se relaciona no COSY (Esp. 75) ao hidrogênio em 4,56 (dd, 1,1 e 6,6 Hz), que por sua vez se relaciona no Hetcor ao

carbono (CH) em δ 63,3, região característica de carbonos ligados à grupamentos hidroxila.

Observa-se seis sinais referentes à dupla ligações. Um destes pares tem um carbono em δ 129,7 (CH) que se relaciona no Hetcor a um hidrogênio em δ 5,50 (dd, 2,2 e 5,5 Hz) e outro em δ 141,4 (CH) que se relaciona no Hetcor a um hidrogênio em δ 6,46 (dd, 2,6 e 5,5 Hz). No COSY observa-se a correlação entre estes dois hidrogênios.

Observa-se um sinal em δ 40,2 (C5 - CH) que se relaciona no Hetcor ao hidrogênio em δ 3,94 (m) sendo que este, no COSY, se relaciona ao hidrogênio em δ 2,93 (dd, 5,1 e 7,7 Hz). No HETCOR o hidrogênio em δ 2,93 se relaciona ao carbono (C9 - CH) em δ 50,3 e no COSY se relaciona ao hidrogênio em δ 5,23 (d, 5,1 Hz). No Hetcor o hidrogênio em δ 5,23 se relaciona ao carbono (CH - C1) em δ 94,0. Este carbono está bastante desprotegido e sugerimos que esteja ligado à dois átomos de oxigênio.

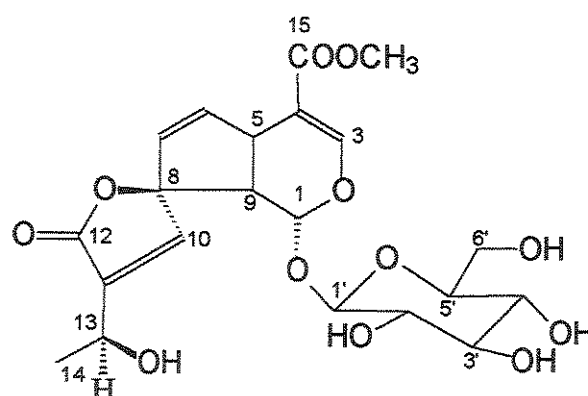
Observa-se um sinal em δ 97,7 (C#) característico de anéis com junção "spiro".

Com base nos dados espectroscópicos de CB8F20 e a comparação destes com dados da literatura, propusemos sua estrutura como sendo a do plumieride 11.

O plumieride havia sido isolado anteriormente da *Himatanthus fallax* (Abdel-Kader *et al.*, 1997) e de *Plumeria acutifolia* (Abe *et al.*, 1988).

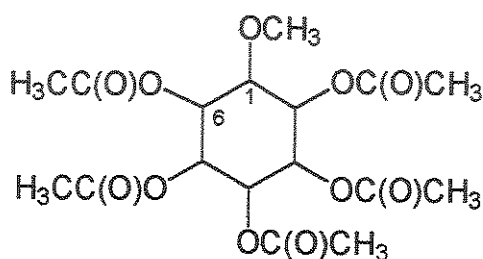
Tabela 24:- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e ^1H do plumieride 11.

Carbono	δ (ppm) de ^{13}C	Tipo de carbono	δ (ppm) de ^1H	J (Hz)
1	94,0	CH	5,23	d (5)
3	150,1	CH	7,37	d (2)
4	110,6	C#	-	-
5	40,2	CH	3,94	m
6	141,4	CH	6,46	dd (3 e 6)
7	129,7	CH	5,50	dd (2 e 6)
8	97,7	C#	-	-
9	50,3	CH	2,93	dd (5 e 8)
10	152,3	CH	7,49	d (2)
11	138,3	C#	-	-
12	172,6	C#	-	-
13	63,3	CH	4,56	dd (1 e 7)
14	22,3	CH_3	1,42	d (7)
15	168,2	C#	-	-
OCH_3	51,9	CH_3	3,75	s
1 – Glc	99,8	CH	4,68	d (8)
2 – Glc	74,3	CH	3,20	
3 – Glc	78,1	CH	3,35	m
4 – Glc	70,9	CH	3,35	m
5 – Glc	77,5	CH	3,35	m
6 – Glc	62,2	CH_2	3,75	



Pelo fato do extrato CECb ser bastante polar, optamos pela acetilação desse extrato a fim de facilitar a sua purificação por CC e por CCP. Obtivemos dessa forma o inositol 71.

Inositol 71



No espectro de IV de CB31F4 (Esp. 77) observa-se uma banda forte em 1753 cm^{-1} característica de carbonilas e no espectro de massas (Esp. 78) observa-se o pico de íon molecular m/z igual a 405 e a perda de 60 unidades de massa, característica de um grupamento acetila.

Analisando-se os espectros de RMN^{13}C e DEPT de CB31F4 (Esp. 79 e 80) observa-se a presença de 15 sinais referentes a 5 CH_3 , 6 CH e 4 carbonos quaternários (Tabela 25). Os sinais dos 4 carbonos quaternários variam entre δ 169,6 e 170,1 e são característicos de carbonilas de grupamento acetato e 4 dos sinais de CH_3 variam entre δ 20,6 e 20,8 podendo ser atribuídas às metilas do grupamento acetato.

No espectro de RMN^{13}C (Esp. 79) a expansão da região entre δ 169,0 e 171,0 mostra 4 sinais, sendo que o sinal em δ 170,0 tem intensidade maior em relação aos outros três sinais (δ 169,6, 169,9 e 170,1). Isto nos sugere a presença de cinco carbonos quaternários.

Observa-se um sinal em δ 58,3 relacionado no HSQC (Esp. 81) ao singleto em δ 3,36, característico de grupamento metoxila (Esp. 82, RMN^1H).

Os sinais dos 6 CH são característicos de carbonos ligados à átomos de oxigênio. O singleto em δ 3,36 (OCH_3) se relaciona no COSY (Esp. 83) ao hidrogênio em δ 3,42 (dd - 9,9 e 2,6 Hz), que no HSQC se relaciona ao carbono em δ 77,2. O sinal em δ 3,42 se relaciona ao hidrogênio em δ 5,74 (t - 2,6 Hz) que se relaciona ao carbono em δ 66,2. O sinal em δ 5,74 se relaciona ao hidrogênio em δ 4,96 (dd - 2,9 e 10,6 Hz) que se relaciona ao carbono em δ 69,2. O sinal em δ 4,96 se relaciona ao hidrogênio em δ 5,48

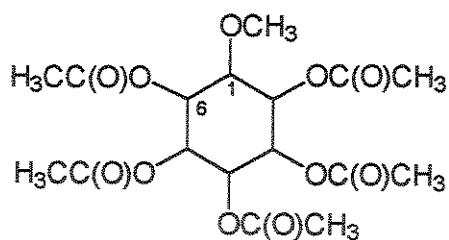
(t - 10,3 Hz) que se relaciona ao carbono em δ 69,5. O sinal em δ 5,48 se relaciona ao hidrogênio em δ 5,38 (t - 10,3 Hz) que se relaciona ao carbono em δ 71,0. O sinal em 5,38 se relaciona ao hidrogênio em δ 5,13 (t - 9,9 Hz) que se relaciona ao carbono em δ 71,2.

Comparando-se os dados de CB31F4 com dados espectroscópicos de glicitóis na literatura propusemos que a estrutura seja a do inositol-O-metil-pentacetato 71.

Esta é a segunda descrição do isolamento de inositóis de espécies de *Himatanthus*, sendo isolado anteriormente de *H. articulata* (Barreto et al., 1998).

Tabela 25:- Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e ^1H do inositol 71.

Carbono	δ (ppm) de ^{13}C	Tipo de carbono	δ (ppm) de ^1H	J (Hz)
1	77,2	CH	3,42	dd (10 e 3)
2	66,2	CH	5,74	t (3)
3	69,2	CH	4,96	dd (3 e 11)
4	69,5	CH	5,48	t (10)
5	71,0	CH	5,38	t (10)
6	71,2	CH	5,13	t (10)
OC(O) <u>CH</u> ₃	20,5	CH ₃	2,02	s
OC(O) <u>CH</u> ₃	20,5	CH ₃	2,02	s
OC(O) <u>CH</u> ₃	20,6	CH ₃	2,02	s
OC(O) <u>CH</u> ₃	20,7	CH ₃	2,06	s
OC(O) <u>CH</u> ₃	20,8	CH ₃	2,20	s
<u>O</u> CH ₃	58,3	CH ₃	3,36	s
OC(O) <u>C</u> CH ₃	169,6	C#	-	-
OC(O) <u>C</u> CH ₃	169,9	C#	-	-
OC(O) <u>C</u> CH ₃	170,0	C#	-	-
OC(O) <u>C</u> CH ₃	170,0	C#	-	-
OC(O) <u>C</u> CH ₃	170,1	C#	-	-



4.5. Testes biológicos

4.5.1. Testes de letalidade utilizando *Artemia salina*

O teste de letalidade utilizando *A. salina* é um teste de fácil realização, de baixo custo e que necessita de pouca quantidade de amostra para ser realizado. Este teste fornece respostas preliminares a respeito de uma possível atividade citotóxica e/ou inseticida de extratos e de substâncias puras, para que em seguida sejam feitos testes mais específicos com as amostras que se mostraram mais promissoras (Meyer *et al.*, 1982).

A literatura relata que existe uma correlação entre a toxicidade geral frente a *Artemia salina* e a citotoxicidade diante de linhagens celulares humanas de tumores sólidos (Cavalcante *et al.*, 2000).

Durante o nosso trabalho, foram testados os extratos CDCb (Casca, Diclorometano, Casa Branca) e CECb (Casca, Etanol, Casa Branca) de *Himatanthus obovatus*. O extrato CDCb mostrou ser tóxico, já que o resultado de CL₅₀ obtido foi bem menor que 1.000 µg/mL (Meyer *et al.*, 1982).

Extratos testados	CL ₅₀ (µg/mL)
Extr. diclorometânico - CDCb	344
Extr. etanólico - CECb	>> 1.000

4.5.2. Testes de Bioautografia

Os testes de bioautografia são rápidos, de fácil execução, relativamente baratos e necessitam de uma pequena quantidade de extrato ou substância pura a serem testados. Estes testes avaliam a atividade bactericida ou antifúngica dos extratos e substâncias puras dependendo do tipo de microorganismo utilizado.

Em uma primeira oportunidade foram testados 6 fungos (*Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium oxysporium*, *Penicillium oxalicum* e *Rhizopus orizae*) frente aos extratos CHCb (Casca, Heptano, Casa Branca), CDCb (Casca, Diclorometano, Casa Branca) e CECb (Casca, Etanol, Casa Branca) de *Himatanthus obovatus* e das substâncias puras pinioresinol 14, blumenol C 63, blumenol A 64, nor-isoprenóide 65 e plumieride 11. Não foram observados halos de inibição em nenhum dos casos como pode ser observado na Tabela 11 (repetição da tabela 11 - Parte Experimental).

Em uma segunda oportunidade foram testados 8 fungos (*Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium oxysporium*, *Penicillium funicullosum* e *Rhizopus orizae*) e 6 bactérias (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurim*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*) frente às substâncias puras pinoresinol 14, isolariciresinol 33, blumenol C 63, blumenol A 64, nor-isoprenóide 65, hidroxipinoresinol 68, lariciresinol 69, plumieride 11 e inositol 71.

Foram observadas atividades bactericida das lignanas isolariciresinol 33 frente à bactéria *S. mutans* e lariciresinol 69 frente à bactéria *S. aureus* (Tabela 11).

Extratos de *H. obovatus* já foram testados frente aos fungos *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*, mas não foram observadas atividades em nenhum dos extratos testados (Vilegas et al., 1992).

Tabela 11:- Resultados obtidos nos testes de Bioautografia (- não foi observado halo de inibição / + observou-se halo de inibição) (Repetição da Tabela 11 - Parte Experimental).

FUNGOS - Junho / 1999	Extratos e substâncias testados							
	CHCb	CDCb	CECb	<u>14</u>	<u>63</u>	<u>64</u>	<u>65</u>	<u>11</u>
<i>Rhizopus oryzae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alternaria alternata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium oxalicum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

Fungos e Bacterias testados	Substâncias testadas								
	<u>14</u>	<u>33</u>	<u>63</u>	<u>64</u>	<u>65</u>	<u>68</u>	<u>69</u>	<u>11</u>	<u>71</u>
<i>Alternaria alternata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium funicullosum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphilococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus mutans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-

4.5.3. Teste de Atividade anti-proliferativa

O teste de atividade anti-proliferativa é um teste específico que avalia a inibição da proliferação de células derivadas de tumores humanos. Os testes foram realizados pelas pesquisadoras Luciana K. Kohn e Marcia A. Antonio, orientadas pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP).

Foram testados os extratos CDCb (Casca, Diclorometano, Casa Branca) e CECb (Casca, Etanol, Casa Branca) de *Himatanthus obovatus*. A atividade anticâncer de cada extrato foi testada utilizando-se 4 linhagens celulares derivadas de 4 tipos de tumores humanos: leucemia (K562), pulmão (NCI460), melanoma (UACC62) e mama (MCF7).

A partir dos resultados obtidos foram construídas curvas porcentagem de crescimento / concentração para os extratos CDCb (Figura 15) e CECb (Figura 16).

No caso do extrato CDCb observa-se um aumento da inibição de crescimento para as linhagens de melanoma, mama e leucemia de forma concentração dependente. Estes resultados demonstram que o extrato CDCb é bastante promissor, sendo coerente com os resultados obtidos nos testes de letalidade utilizando *A. salina*, onde o valor de CL_{50} encontrado foi 344 $\mu\text{g/mL}$.

Já no caso do extrato CECb não se observa a diminuição na porcentagem de crescimento para nenhuma das linhagens celulares testadas a medida que a concentração aumenta. Estes resultados também são coerentes com os resultados obtidos nos testes de letalidade utilizando *A. salina*, onde o valor de CL_{50} encontrado foi maior que 1.000 $\mu\text{g/mL}$.

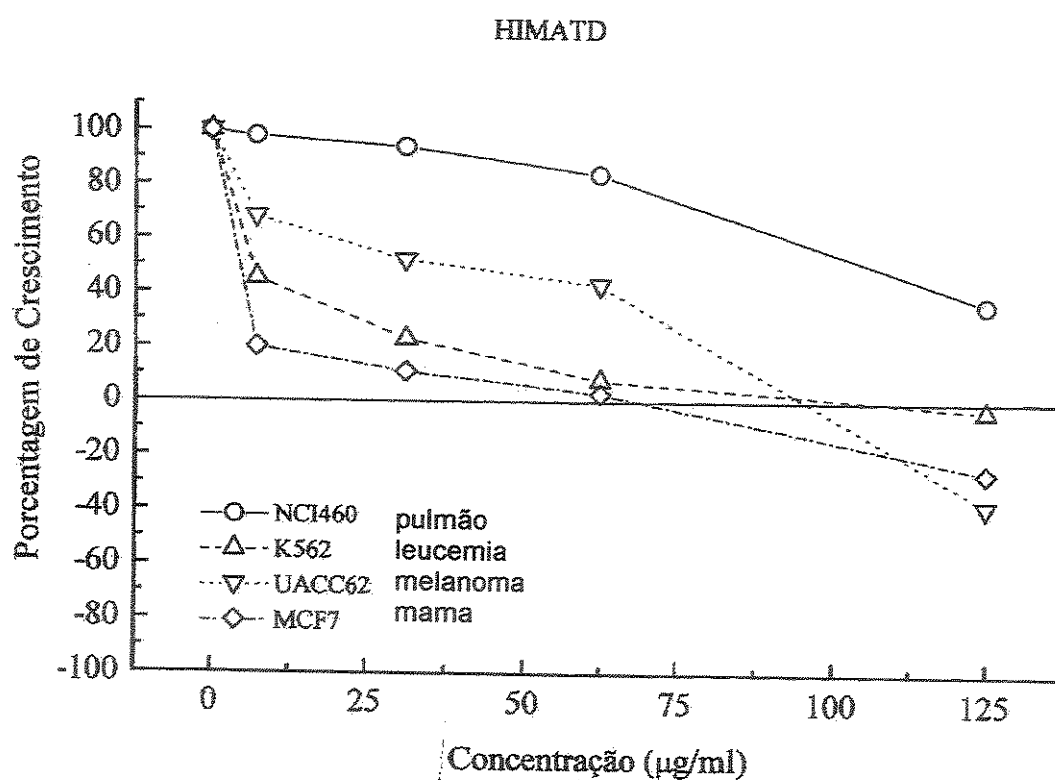


Figura 15:- Curva Concentração / % de crescimento para o extrato CDCb de *H. obovatus*.

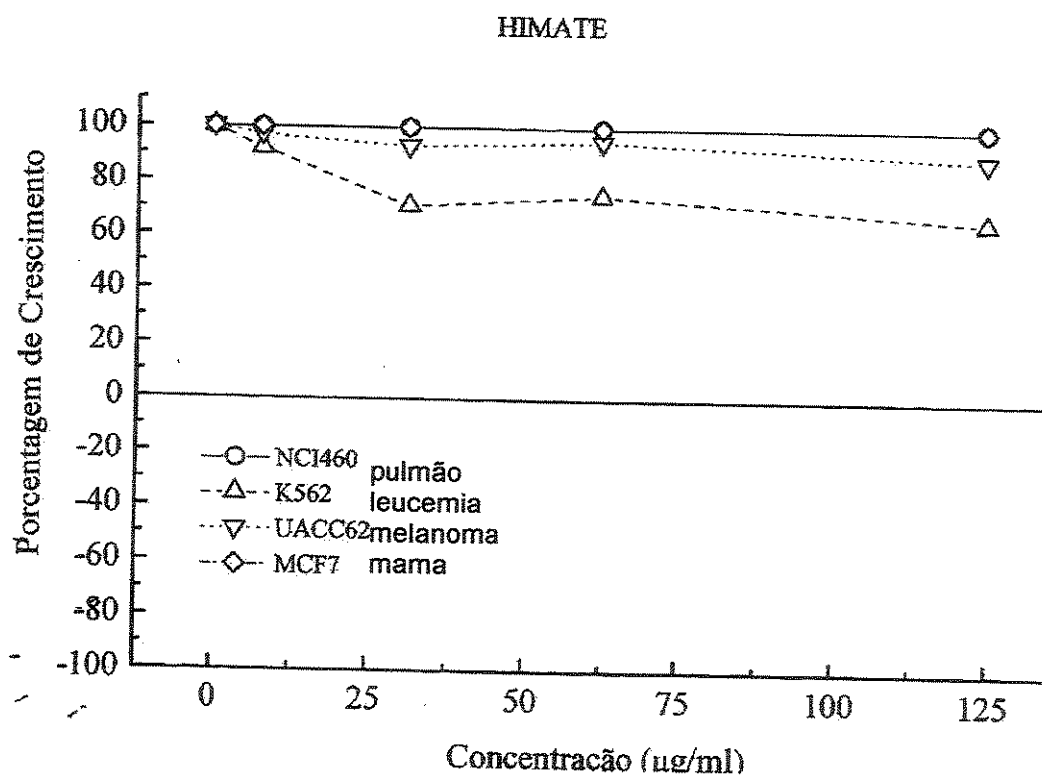


Figura 16:- Curva Concentração / % de crescimento para o extrato CECb de *H. obovatus*.

5. Correlação entre os dados químicos e botânicos de *H. obovatus* (Apocynaceae)

Os resultados alcançados no estudo fitoquímico de *H. obovatus* nos levou a correlacionar os dados químicos e os dados botânicos de *H. obovatus*, apresentados na tese de Doutorado de Andréa Pozetti Spina (Spina, 2004) intitulada “Estudos taxonômico, micro-morfológico e filogenético do gênero *Himatanthus* Willd. ex Schult. (Apocynaceae: Rauvolfioidea-Plumerieae)”.

Embora o gênero *Himatanthus* pertença à mesma família e sub-família dos gêneros *Tabernaemontana* e *Rauvolfia*, este não apresenta alcalóides indólicos, mas outras classes de compostos.

Segundo a análise filogenética de Potgieter e Albert (2001), os gêneros *Tabernaemontana* e *Rauvolfia* (gêneros estudados em nosso grupo de pesquisa, ricos em alcalóides indólicos) estão posicionados em um ramo mais basal que o gênero *Himatanthus*, que está mais proximamente relacionado filogeneticamente e morfologicamente aos gêneros *Plumeria* e *Allamanda* (Figura 17).

De acordo com Endress e Bryns (2000), nas tribos Tabernaemontaneae e Vinceae (gêneros *Tabernaemontana* e *Rauvolfia* respectivamente) ocorrem principalmente alcalóides indólicos e na tribo Plumerieae (gêneros *Himatanthus*, *Plumeria* e *Allamanda*) devem ocorrer principalmente iridóides. Alguns dos metabólitos secundários isolados dos gêneros *Plumeria* e *Allamanda* são iridóides (Coppen e Cobb, 1983; Anderson *et al.*, 1988) e lignanas (Anderson *et al.*, 1988).

A biossíntese de alcalóides indólicos e de lignanas ocorrem por vias alternativas dentro de uma mesma via biossintética (Figura 18). As lignanas e neolignanas são formadas tendo como intermediária a fenilalanina (rota **A**), enquanto que os alcalóides indólicos utilizam o triptofano (rota **B**), ambos vindos do ácido corísmico. O isolamento de lignanas de *H. obovatus*, mostra que a rota **A** é preferencial em relação à rota **B**.

Estas observações reforçam ainda mais a nossa idéia sobre a importância de se trabalhar com profissionais de outras áreas para que os resultados obtidos sejam mais completos.

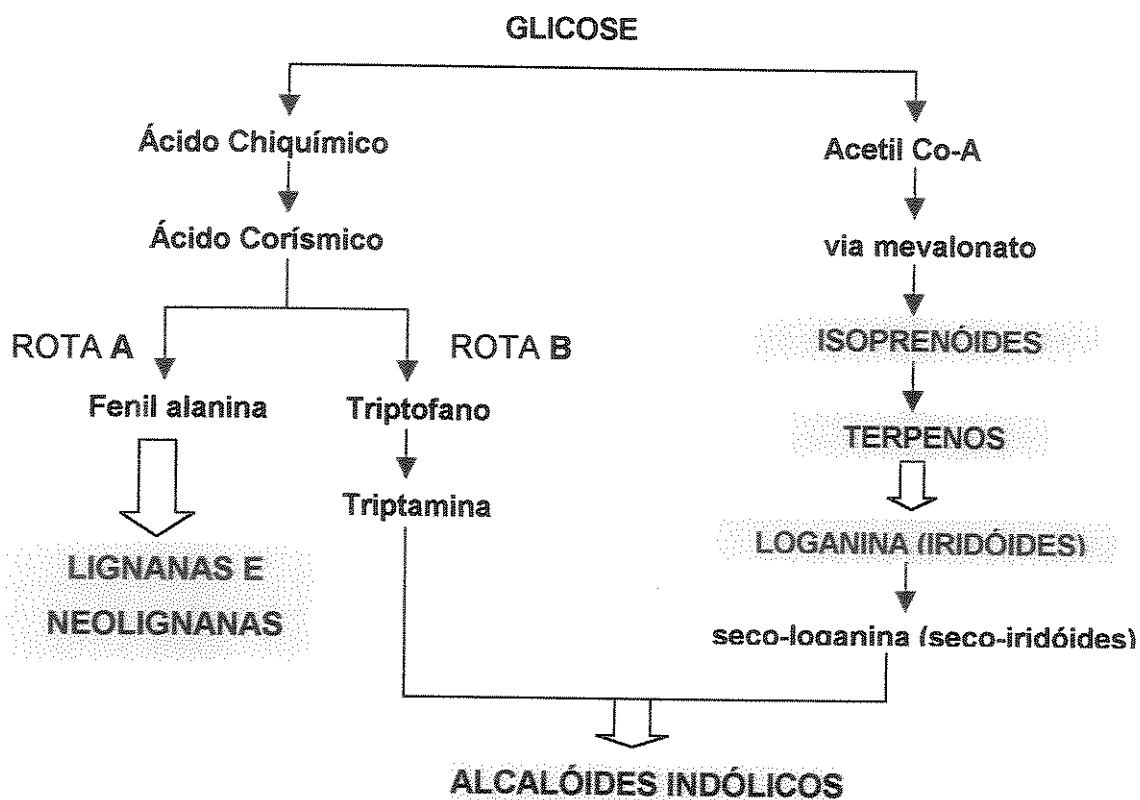


Figura 18:- Caminho biossintético simplificado para a formação de lignanas, nor-isoprenóides, iridóides, terpenos e alcalóides indólicos.

6. CONCLUSÕES

Muito embora os gêneros *Himatanthus*, *Tabernaemontana* e *Rauvolfia* pertençam às mesmas família e sub-família, os metabólitos encontrados em *Himatanthus* pertencem à classes distintas dos alcalóides indólicos isolados de *Tabernaemontana* e *Rauvolfia*.

De *Himatanthus obovatus* foram isolados duas lignanas (pinioresinol e isolariciresinol); três nor-isoprenóides (blumenol A, blumenol C e nor-isoprenóide inédito) e duas misturas de terpenos (acetato de lupeol + acetato de α -amirina + acetato de β -amirina + acetil germanicol e stigmasterol + β -sitosterol + campesterol) dos extratos das folhas e da casca + caule de *H. obovatus* coletados na Chapada dos Guimarães (MT).

Também foram isoladas outras três lignanas (hidroxipinioresinol, lariciresinol e olivil), o iridóide plumieride e, após a acetilação, o inositol O-metil-pentaacetato dos extratos da casca de *H. obovatus* coletada em Casa Branca (SP).

Esta foi a primeira vez que nor-isoprenóides foram isolados de espécies do gênero *Himatanthus*, sendo que um dos nor-isoprenóides isolados é inédito e a segunda vez que lignanas e um glicitol foram isolados de espécies desse gênero. Iridóides e terpenos foram isolados em maior número das outras espécies de *Himatanthus* estudadas quimicamente.

Os testes com *A. salina* foram realizados com os extratos diclorometânico e etanólico (CDCb e CECb) da casca de *H. obovatus* coletada em Casa Branca (SP). O resultado observado para o extrato CDCb se mostrou promissor, sendo que o valor de CL₅₀ observado foi igual a 344 μ g/mL, enquanto para o extrato CECb o valor foi maior que 1.000 μ g/mL.

Os testes de atividade antiproliferativa também foram realizados com os extratos CDCb e CECb utilizando-se 4 linhagens celulares derivadas de 4 tipos de tumores humanos (pulmão, leucemia, melanoma e mama). Os resultados observados para o extrato CDCb são bastante promissores e também coerentes com o resultado do teste utilizando-se *A. salina* para este extrato. Os resultados observados para o extrato CECb não foram promissores, mas coerentes com o resultado do teste utilizando-se *A. salina* para este extrato.

Os testes de bioautografia foram realizados com os extratos CDCb e CECb e com várias substâncias isoladas, sendo que obtivemos indicação de atividade bactericida

para duas das lignanas isoladas: o isolariciresinol frente à *Streptococcus mutans* e o lariciresinol frente a *Staphilococcus aureus*.

A correlação dos dados químicos com os dados botânicos de *H. obovatus* mostra que a classificação botânica é coerente, já que as classes de compostos isoladas de *H. obovatus* se assemelham às classes de compostos isoladas das espécies dos gêneros *Plumeria* e *Allamanda* descritas na literatura (gêneros filogeneticamente e morfolologicamente mais próximos), sendo diferentes dos compostos isolados de espécies de *Tabernaemontana* e *Rauvolfia*.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Kader M. S., Wisse J., Evans R., Van der Werf H. e Kingston D. G., **1997**, *J. of Nat. Prod.*, 1294-1297.
- Abe F., Chen R.-F. e Yamauchi T., **1988**, *Chem. Pharm. Bull.*, 36 (8), 2784-2789.
- Agrawal P. K. e Thakur R. S., **1985**, *Magn. Res. Chem.*, 23 (6), 389-418.
- Anderson J. E., Chang C. J. e McLaughlin J. L., **1988**, *J. Nat. Prod.*, 51 (2), 307-308.
- Apers S., Vlietinck A. e Pieters L., **2003**, *Phytochemistry Reviews*, 2, 201-217.
- Aragão P. C. A., Toledo J. B., Morais A. A. e Braz Filho R., **1990**, *Química Nova*, 13 (4), 254-259.
- Barbosa Filho J. M., **1999**, Lignanas, neo-lignanas e seus análogos, *In: SIMÕES C. M. O. et al., Farmacognosia, da planta ao medicamento*, 1ª edição, Florianópolis, Editora da UFSC, Porto Alegre, Editora da Universidade/UFRGS, p. 471.
- Barreto A. S., Carvalho M. G., Nery I. A., Gonzaga L. e Kaplan M. A. C., **1998**, *J. Braz. Chem. Soc.*, 9 (5), 430-434.
- Bercht C. A. L., Samrah H. M., Lousberg J. J. CH., Theuns H. e Salemink C. A., **1976**, 15, 830-831.
- Boyle P., **1987**, *Lancet*, , 349 (suppl. II), 23-26.
- Cavalcante M. F., Oliveira M. C. C., Velandia J. R. e Echevarria A., **2000**, *Química Nova*, 23 (1), 20-22.
- Chiba M., Okabe K., Hisada S., Shima K., Takemoto T. e Nishibe S., **1979**, *Chem. Pharm. Bull.*, 27 (11), 2868-2873.
- Coelho M. F. B. e Azevedo R. A. B., **2000**, *In: XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Recife (PE), Livro de Resumos do XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*, AG027.
- Cole M. D., **1994**, *Biochem. Syst. and Ecol.*, 22 (8), 837-856.
- Coppen J. J. W. e Cobb A. L., **1983**, *Phytochemistry*, 22 (1), 125-128.
- Cordell G. A., **1995**, *Phytochemistry*, 40 (6), 1585-1612.
- Cowan S., Stewart M., Abbiw D. K., Latif Z., Sarker S. D. and Nash R. I., **2001**, *Fitoterapia*, 72, 80-82.
- Dewick P. M., **1997**, "Medicinal Natural Products - A Biosynthetic Approach", 1ª edição, New York, John Wiley & Sons.

Duffield A. M., **1967**, *J. Heteroc. Chem.*, 4, 16-22.

Endo Y., Hayashi H., Sato T., Maruno M., Ohta T. e Nozoe S., **1994**, *Chem. Pharm. Bull.*, 42 (6), 1198-1201.

Endress M. E. e Bruyns P. V., **2000**, *The Botanical Review*, 66 (1), 1-56.

Fernandes M. Z. L. C. M., Fernandes R. M., Souza M. C. B. B. e Lopes J. B., **2000**, Em: XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Recife (PE), Livro de Resumos do XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, TO19.

Ferrigni N. R. e Hasegawa M., **1976**, *Rev. Latinoamer. Quím.*, 7, 146.

Fonseca S. F., Campello J. P., Barata L. E. S. e Rúveda E. A., **1978**, *Phytochemistry*, 17, 499-502.

Fonseca S. F., Nielsen L. T. e Rúveda E. A., **1979**, *Phytochemistry*, 18, 1703-1708.

Gershenzon J. E. e Mabry T. J., **1983**, *Nordic J. Botany*, 3 (1), 5-34.

Gonzalez A. G., Guillermo J. A., Ravelo A. G. e Jimenez I. A., **1994**, *J. of Nat. Prod.*, 57 (3), 400-402.

Ghisalberti E. L., **1993**, Detection and isolation of bioactive natural products, *In: Bioactive Natural Products*, Cap. 2, p. 9-57, CRC Press Inc..

Gottlieb O. R., **1982**, *Apud: BARBOSA FILHO J. M.*, Lignanas, neo-lignanas e seus análogos, *In: SIMÕES C. M. O. et al.*, **1999**, *Farmacognosia, da planta ao medicamento*, 1ª edição, Florianópolis, Editora da Universidade/UFRGS, Porto Alegre, p. 471.

Harmatha J. e Dinan L., **2003**, *Phytochemistry Reviews*, 2, 321-330.

Isoe S., **1970**, *Chem. and Biology*, 8, 575-580.

Judd W. S., Campbell C. S., Kellogg E. A., Stevens P. F. e Donoghue M. J., **2002**, *Plant systematics – a phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, 576p.

Kato L., **2001**, "Estudo fitoquímico de espécies brasileiras de *Rauvolfia* (Apocynaceae)", Tese de Doutorado, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Unicamp, sob orientação da Profa. Dra. Raquel Marques Braga.

Kohn L. K., **2000**, "Visão multidisciplinar dos estudos pré-clínicos para obtenção de novas drogas antineoplásicas a partir de espécies vegetais", exame de qualificação de mestrado, Faculdade de Ciências Médicas/Unicamp.

Kreuzwieser J., Schnitzler J. P. e Steinbrecher R., **1999**, *Plant Biol.*, 149-159.

Kuo T. M., Lowell C. A. e Nelsen T. C., **1997**, *Phytochemistry*, 45 (1), 29-35.

Lima J. A., Miranda A. L. P., Rezende C. M. e Pinto A. C., **2000**, Em: XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Recife (PE), Livro de Resumos do XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, FG069.

Lin-gen Z., Seligmann O., Jurcic K. e Wagner H., **1982**, *Planta Medica*, 45, 172-176.

Lutz A. e Winterhalter P., **1992**, *Tetrahedron Letter*, 33 (36), 5169-5172.

Maciel M. A. M., Pinto A. C., Veiga Jr V. F., Grynberg N. F. e Echevarria A., **2002**, *Química Nova*, 25 (3), 429-438.

Meyer B. N., Ferrigni N. R., Putnam J. E., Jacobsen L. B., Nichols D. E. e McLaughlin J. L., **1982**, *Planta Medica*, 45, 31-34.

Miranda A. L. P., Silva J. R. A., Rezende C. M., Neves J. S., Parrini S. C., Pinheiro M. L. B., Cordeiro M. C., Tamborini E. e Pinto A. C., **2000**, *Planta Medica*, 66, 284-286.

Narayanan C. R., Joshi D. D., Mujumdar A. D. e Dhekne V. V., **1987**, *Current Science*, 56 (3), 139-141.

Newman D. J., Cragg G. M. e Snader K. M., **2000**, *Nat. Prod. Rep.*, 17, 215-234.

Olea R. S. G., **1990**, "Metodologia para identificação dos componentes de misturas de triterpenos por RMN¹³C", Dissertação de Mestrado, Instituto de Química – USP, sob orientação da Profa. Dra. Nídia Franca Roque.

Olea R. S. G. e Roque N. F., **1990**, *Química Nova*, 13 (4), 278-281.

Perdue G. P. e Blomster R. N., **1978**, *J. Pharm. Sci.*, 67 (9), 1322-1323.

Phillipson J. D., **2001**, *Phytochemistry*, 56, 237-243.

Pletsch M., **1999**, *Biotecnologia*, 4, 1-7, "Compostos naturais biologicamente ativos", disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/bio/home.htm>

Plumel M. M., **1990**, *Compte Rendu des Seances de la Societe de Biogeographie*, 66 (3), 103-127.

Potgieter K. e Albert A. V., **2001**, *Ann. Missouri Gard.*, 88, 523-549.

Rahman M. M. A., Dewick P. M., Jackson D. E. e Lucas J. A., **1990**, *Phytochemistry*, 29 (6), 1971-1980.

Reynolds W. F., McLean S., Poplawski J., Enriquez R. G., Escobar L. I. e Leon I., **1986**, *Tetrahedron*, 42 (13), 3419-3428.

Ribeiro dos Santos R., Soares R. O. A., Ferreira E. F., Gibaldi D., Stutz C. M., Siani A. C., Guimarães A. C., Cordeiro M. S. C. e Borrás M. R. L., Silva J. R. A., Pessoni R. A. B., Vieira C. C. J., Bolzani V. S., Young C. M. e Pinto A. C., **1998**, Em: XV Simpósio de

Plantas Medicinais do Brasil, Águas de Lindóia (SP), Livro de Resumos do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 01.047.

Rios J. L., Recio M. C. e Villar A., **1988**, *J. Ethnopharmac.*, 23, 127-149.

Robbers J. E., Speedie M. K. e Tyler V. E., **1997**, "Farmacognosia e farmacologia", Baltimore, Editorial Premier, São Paulo, p. 98.

Rocha A. I., Luz A. I. e Rodrigues W. A., **1982**, *Acta Amazônica*, 12 (2), 381-387.

Rosa S., Giulio A. e Iodice C., **1994**, *J. Nat. Prod.*, 57 (12), 1711-1716

Ruiz A. L. T. G., **2003**, "Estudo fitoquímico de algumas espécies de *Eleocharis* R. Br. (Cyperaceae). Isolamento, elucidação estrutural e atividade biológica", Tese de Doutorado, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), orientadora: Profa. Dra. Eva Gonçalves Magalhães.

Sandes A. R. R. e Biasi G. D., **2001**, "Biodiversidade e diversidade química e genética", disponível em: http://www.biotechnologia.com.br/bio/13_h.htm

Schmidt J., Lien N. T., Khoi N. H. e Adam G., **1983**, *Phytochemistry*, 22 (4), 1032-1033.

Schöttner M., Ganßer D. e Spiteller G., **1997**, *Planta Medica*, 63, 529-532.

Schripsema J., Dagnino D. e Gosmann G., **1999**, Alcalóides indólicos, *In: SIMÕES C. M. O. et al.*, Farmacognosia, da planta ao medicamento, 1ª edição, Florianópolis, Editora da Universidade/UFRGS, Porto Alegre, p. 679

Siddiqui S., Haider S. I., Salman A. S. e Sultana N., **1987**, *Pakistan J. Sci. Ind. Res.*, 30 (1), 71-80.

Silva J. R. A., Pessoni R. A. B., Vieira C. C. J., Bolzani V. S., Young C. M. e Pinto A. C., **1998-A**, Em: XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Águas de Lindóia (SP), Livro de Resumos do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 03.117.

Silva J. R. A., Pessoni R. A. B., Vieira C. C. J., Rezende C. M., Miranda A. L. P. e Pinto A. C., **1998-B**, Em: XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Águas de Lindóia (SP), Livro de Resumos do XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 01.190.

Silva J. R. A., Rezende C. M., Pinto A. C., Pinheiro M. L. B., Cordeiro M. C., Tamborini E., Young C. M. e Bolzani V. S., **1998-C**, *Química Nova*, 21 (6), 702-704.

Silverstein R. M. e Webster F. X., **1998**, "Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos", 6ª edição, Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos Editora S.A..

Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J. T., Bokesch H., Kenney S. e Boyd M. R., **1990**, *J. Natl. Cancer Inst.*, 82 (13), 1107-1112.

Souza-Fagundes E. M., Queiroz A. B. R., Martins Filho O. A., Gazzinelli G., Corrêa-Oliveira R., Alves T. M. A. e Zani C. L., **2002**, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97 (8), <http://memorias.ioc.fiocruz.br>

Spina A. P., **2004**, "Estudo taxonômico, micro-morfológico e filogenético do gênero *Himatanthus* Willd. ex Schult. (Apocynaceae: Rauvolfioidea-Plumerieae)", Tese de Doutorado, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), orientadora: Profa. Dra. Luiza Sumiko Kinoshita, co-orientador: Prof. Dr. Volker Bittrich.

Takeda Y., Zhang H., Matsumoto T., Otsuka H., Oosio Y., Honda G., Tabata M., Fujita T., Sun H., Sezik E. e Yesilada E., **1997**, *Phytochemistry*, 44 (1), 117-120.

Tsukamoto H., Hisada S. e Nishibe S., **1984-A**, *Chem. Pharm. Bull.*, 32 (7), 2730-2735.

Tsukamoto H., Hisada S. e Nishibe S., **1984-B**, *Chem. Pharm. Bull.*, 32 (11), 4482-4489.

Ugaz O. L., **1988**, "Investigación Fitoquímica", Pontificia Universidad Catolica del Peru – Fondo Editorial, p. 192.

Vanderlei M. F. e Souza-Brito A. R. M., **1986**, *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 19(4-5), 573A.

Vanderlei M. F., Silva M. S., Gottlieb H. G. e Braz-Filho R., **1991**, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2 (2), 51-55.

Veloso M. P., Nagem T. J. e Oliveira T. T., **1999**, *Biochem. Systematics and Ecology*, 27, 669-671.

Vilegas J. H. I., Hachich E. M., Garcia M., Brasileiro A., Carneiro M. A. G. e Campos V. L. B., **1992**, *Rev. Latinoamer. Quim.*, 23/1-22/4, 44-45.

Waterman P. G. e Gray A. I., **1987**, *Nat. Prod. Rep.*, 175-203.

Wood C. A., Lee K., Vaisberg A. J., Kingston D. G. I., Neto C. C. e Hammond G. B., **2001**, *Chem. Pharm. Bull.*, 49 (11), 1477-1478.

Woodson R. E., **1938**, Studies in Apocynaceae. VII - An evaluation of the genera *Plumeria* L. and *Himatanthus* Willd., *Ann. Missouri Bot. Gard.* 25:189-224.

File # 1: VHO52F32

Mode # 2 (Mid-IR)

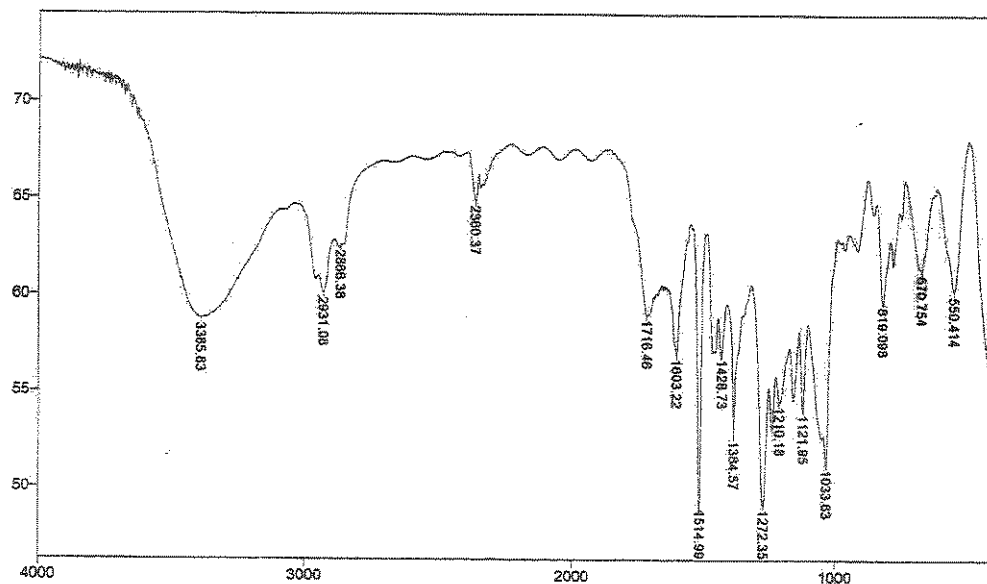
26/03/99 11:15

Sample Description:

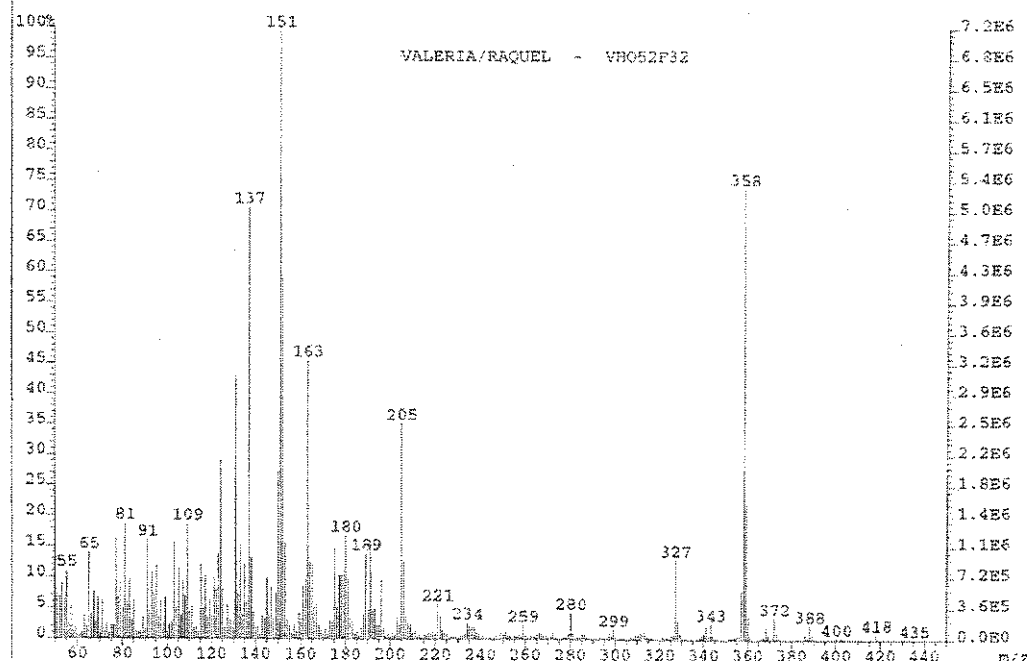
Scans = 10

Res = 4 cm⁻¹ 21 scans/min

Apod = Cosine

Transmittance / Wavenumber (cm⁻¹)Esp. 1:- Espectro de IV do pinosresinol 14.

File: MAR29A Ident: 250_258 Win 1000PPM Acq: 29-MAR-1999 13:56:43 13:44 Cal: MAR29
 AutoSpec EI+ Magnet BpM: 151 BpI: 7170276 TIC: 111049384 Flags: HALL

Esp. 2:- Espectro de massa do pinosresinol 14.

Pulse Sequence: e2pul

Solvent: CDCl₃

Ambient temperature

File: 2ev24vb1c

INOVA-500 "inova500"

PULSE SEQUENCE

Relax: delay 1.500 sec

Pulse 42.5 degrees

Acq. time 0.800 sec

Width 20000.0 Hz

10000 repetitions

OBSERVE C13, 75.4519868 MHz

DECOUPLE H1, 300.0588576 MHz

Power 56 dB

continuously on

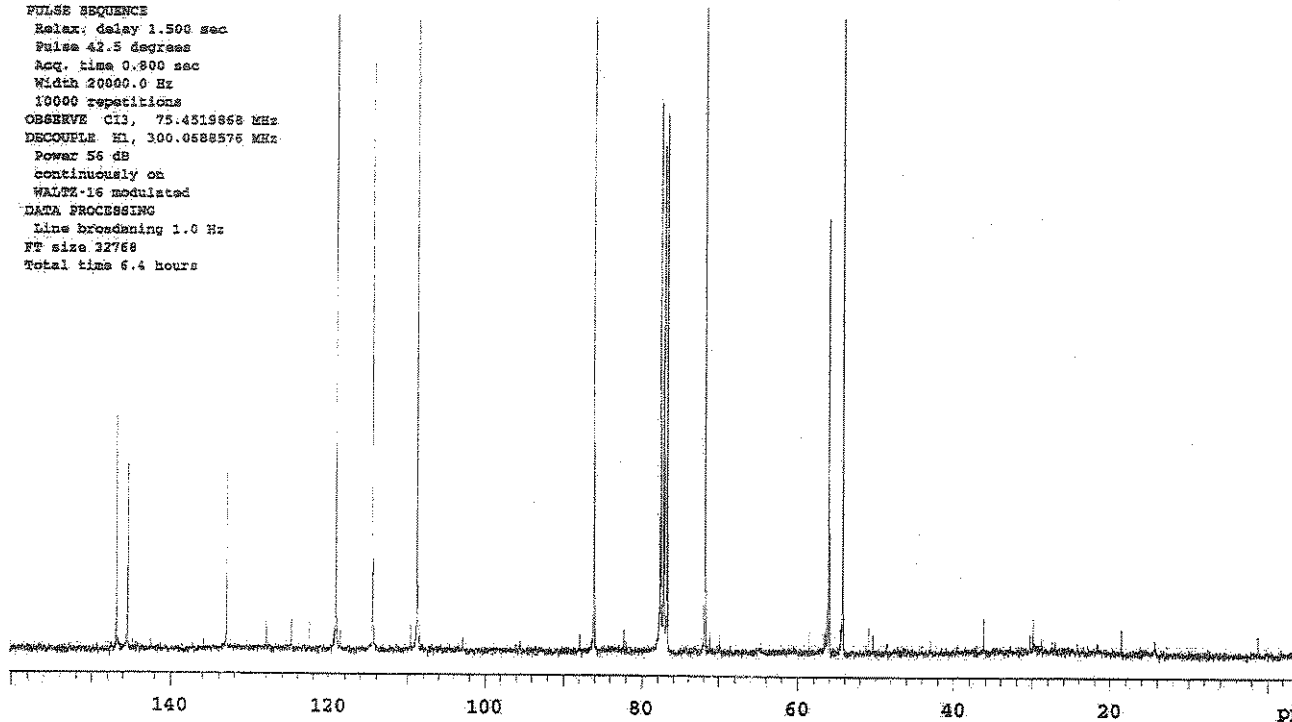
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

Line broadening 1.0 Hz

FT size 32768

Total time 6.4 hours



Variable Line Width (VWL) spectrum

Solvent: cdcl3

Ambient temperature

File: 2ev24vb1c

INOVA-500 "inova500"

PULSE SEQUENCE: dept

Relax: delay 1.500 sec

Pulse 42.5 degrees

Acq. time 1.100 sec

Width 20000.0 Hz

1000 repetitions

OBSERVE C13, 75.4519868 MHz

DECOUPLE H1, 300.0588576 MHz

Power 56 dB

or during acquisition

off during delay

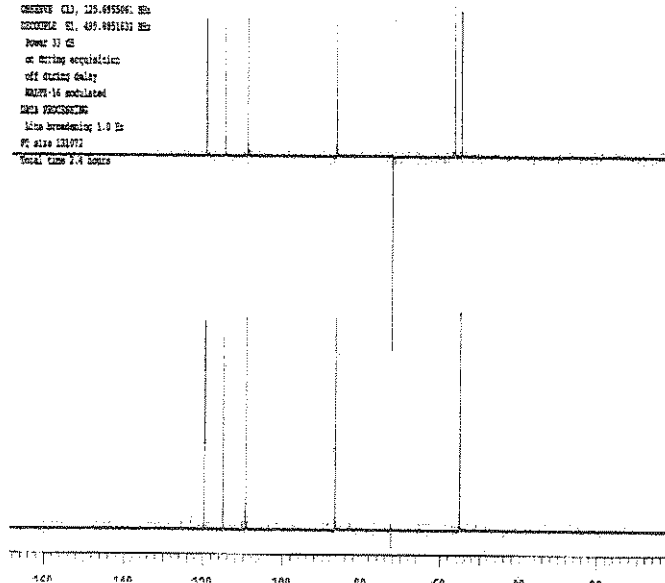
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

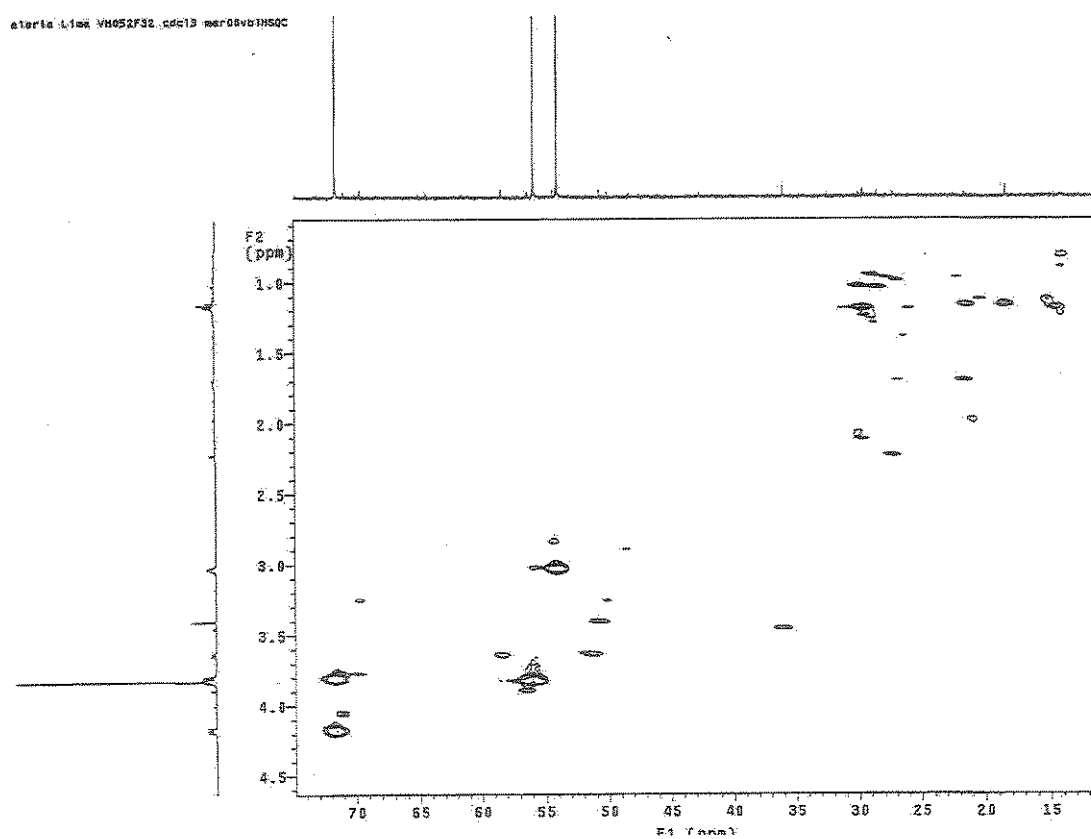
Line broadening 1.0 Hz

FT size 32768

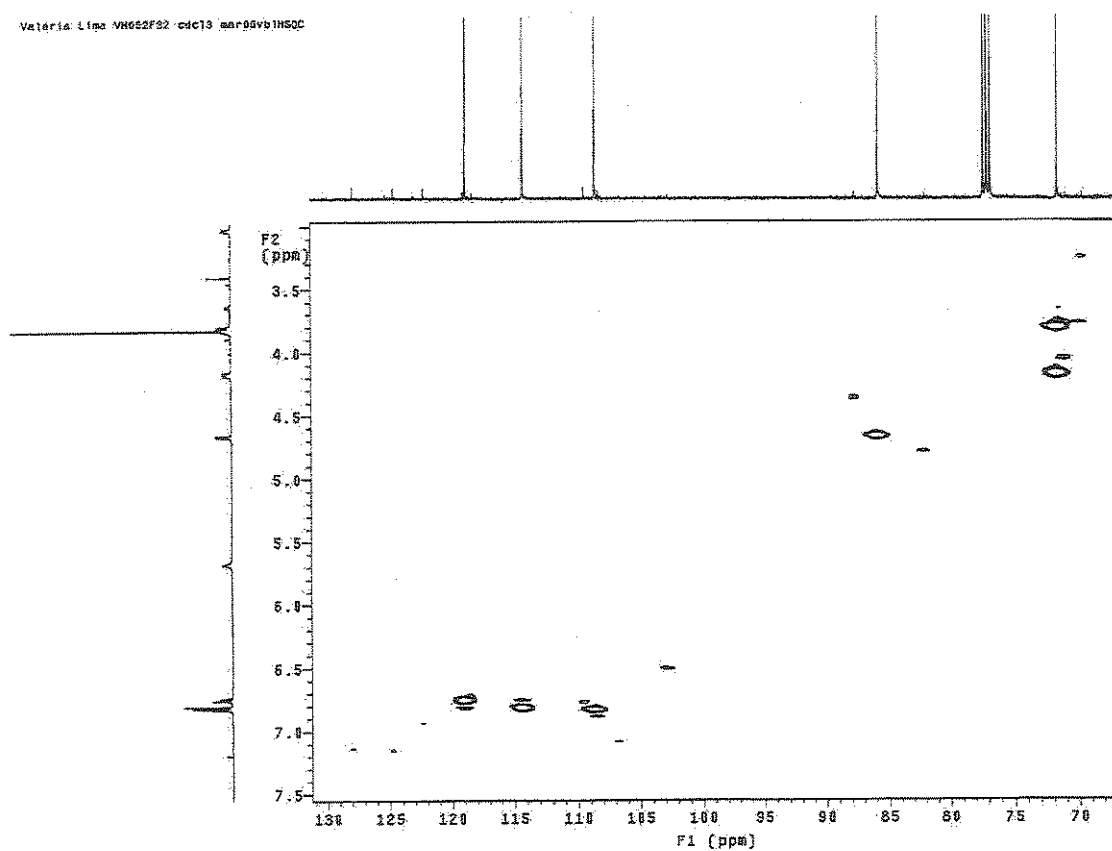
Total time 7.4 hours



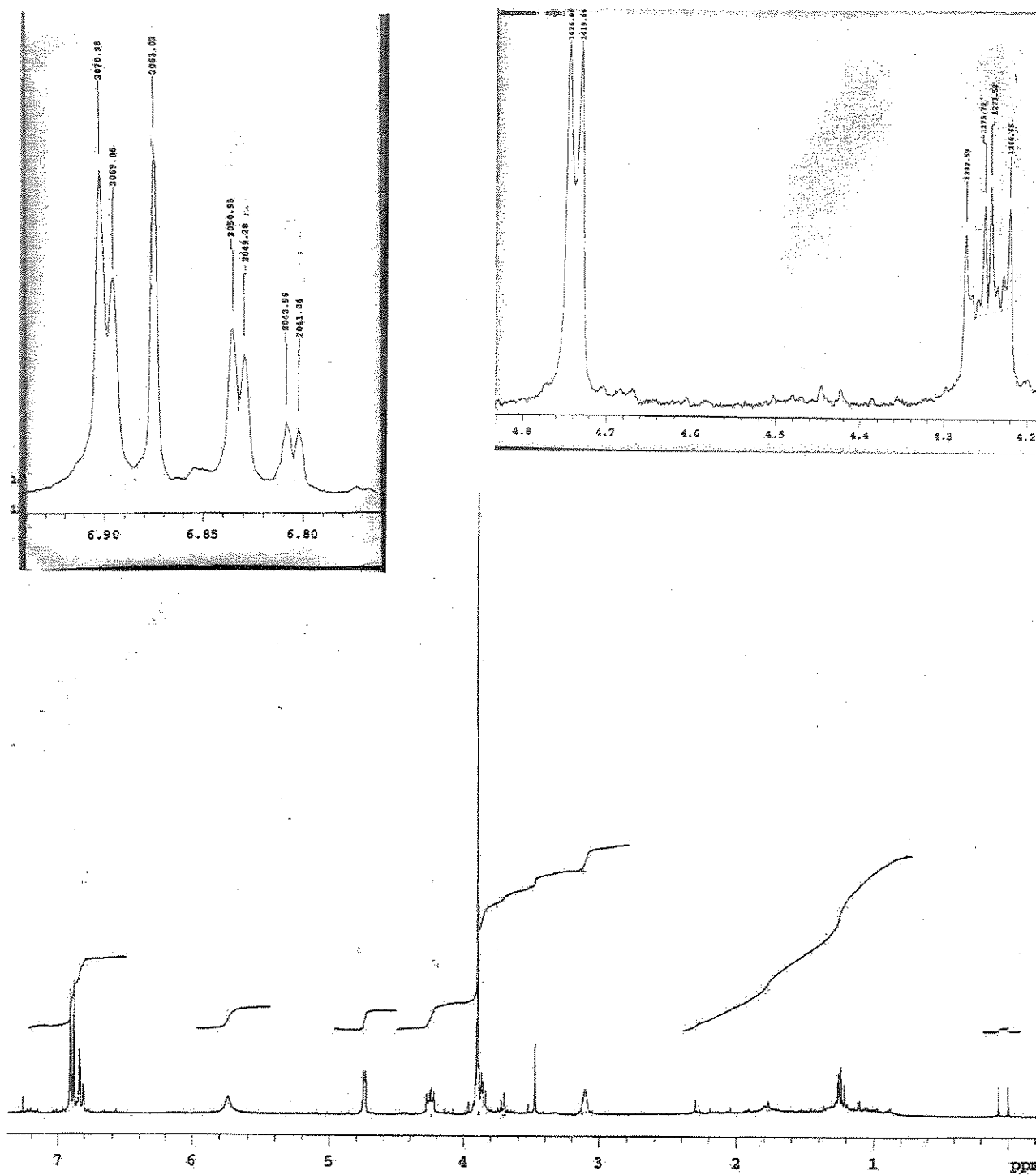
Esp. 3 e 4:- Espectros de RMN¹³C e DEPT do pinosresinol 14.



Valeria-11m-VH052F32-cdc13-mar08vb1HSQC

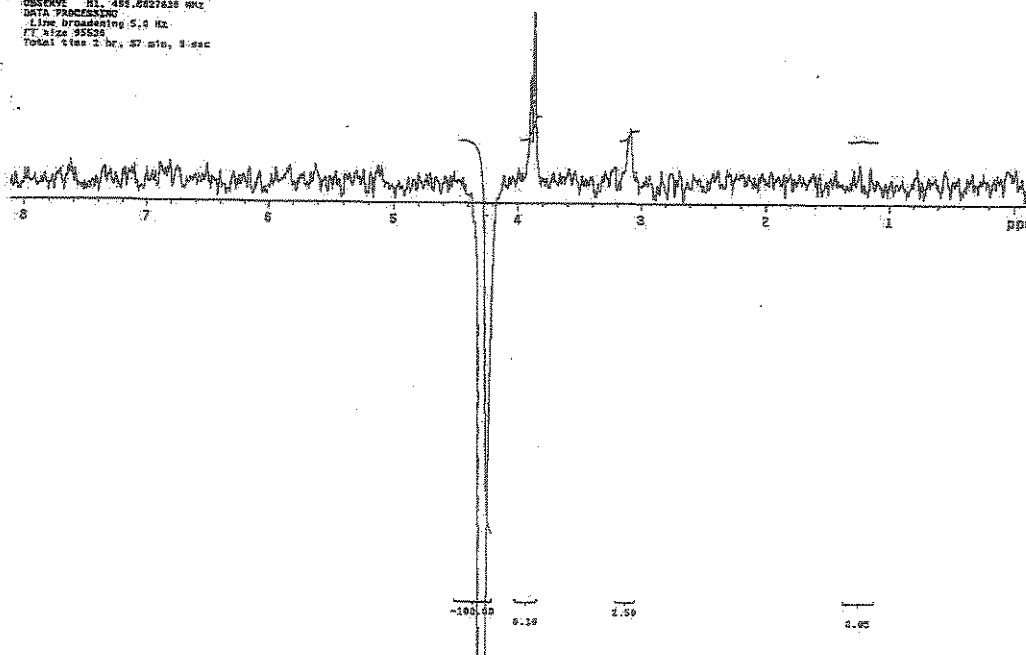


Esp. 5:- Espectros HSQC do pinosresinol 14.



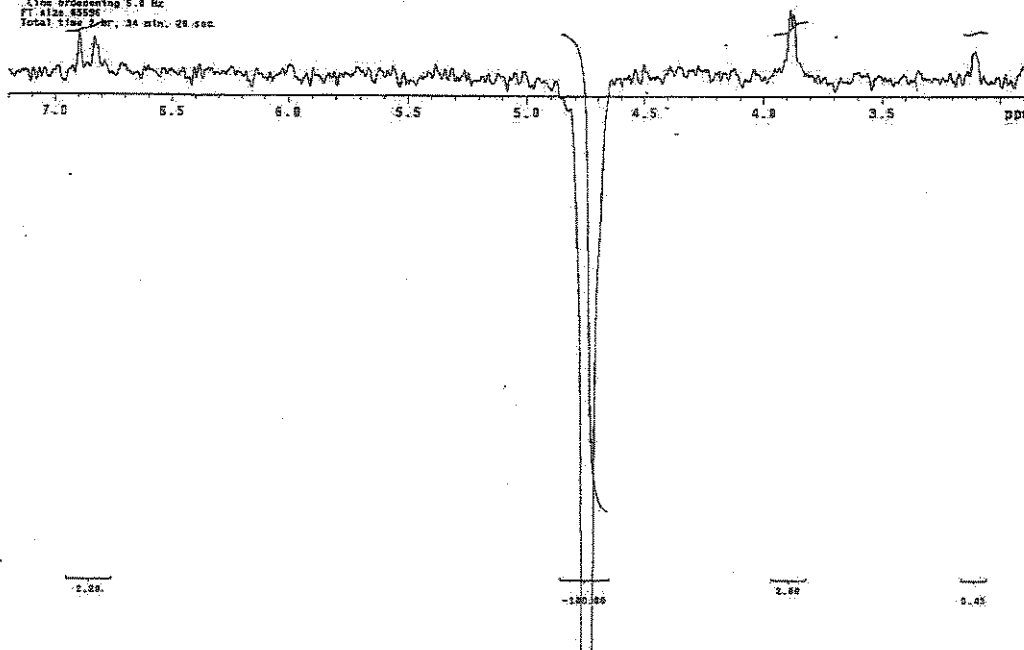
Esp. 6:- Espectro de RMN ^1H do pinoresinol 14.

Ambient temperature:
INOVA-500 "INOVA500"
PULSE SEQUENCE: NOESY1D
Relax. delay 5.000 sec
Pulse 90.0 degree
Mixing 6.500 sec
Acq. time 3.277 sec
width 12680.0 Hz
400 repetitions
OBSERVE F1 400.0227638 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 5.0 Hz
FT size 32768
Total time 2 hr, 37 min, 9 sec



Valeria VINOGRADOVA/4.75 OUTUBRO/NOVEMBRO

Pulse Sequence: NOESY1D
Solvent: CHCl3
Ambient temperature:
INOVA-500 "INOVA500"
PULSE SEQUENCE: NOESY1D
Relax. delay 5.000 sec
Pulse 90.0 degree
Mixing 6.500 sec
Acq. time 3.277 sec
width 12680.0 Hz
400 repetitions
OBSERVE F1 400.0227638 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 5.0 Hz
FT size 32768
Total time 2 hr, 34 min, 28 sec



Esp. 7:- Espectro NOESy 1D do pinosresinol 14.

Valeria Lima VHS2F32 cdc13 mar02vblgCOSY

Pulse Sequence: gCOSY.

Solvent: CDCl₃

Temp: 25.0 C / 298.1 K

INSTR: G300 "10000502"

Pulse Sequence: gCOSY

Relax. delay: 2.000 sec

Acq. time: 0.180 sec

Width: 5507.0 Hz

2D Width: 5507.0 Hz

4 repetitions

255 increments

OBSERVE: H1, 499.8826638 MHz

DATA PROCESSING

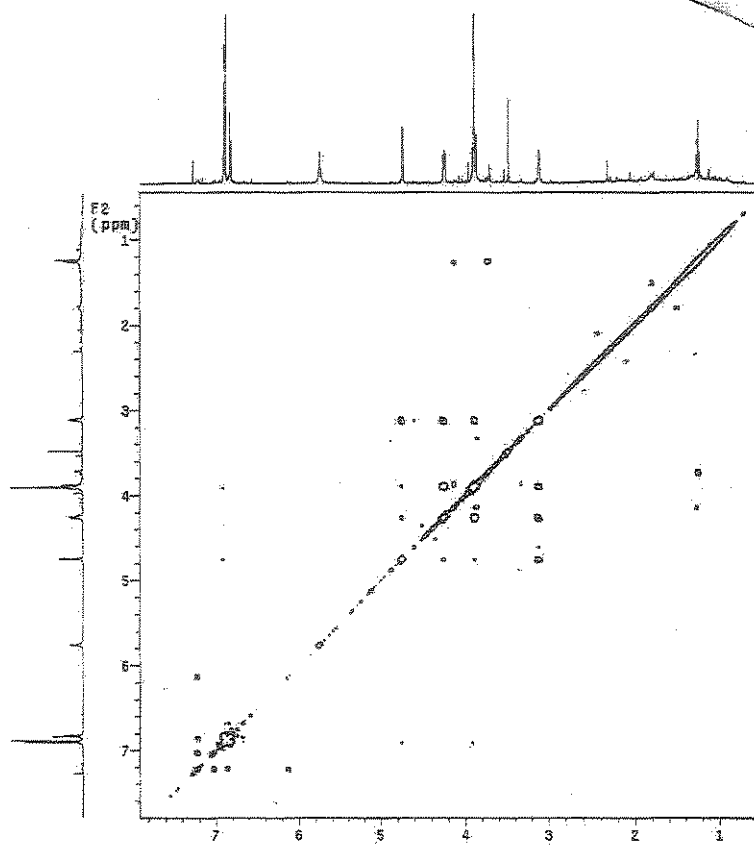
Sq. sine bell: 0.091 sec

F1 DATA PROCESSING

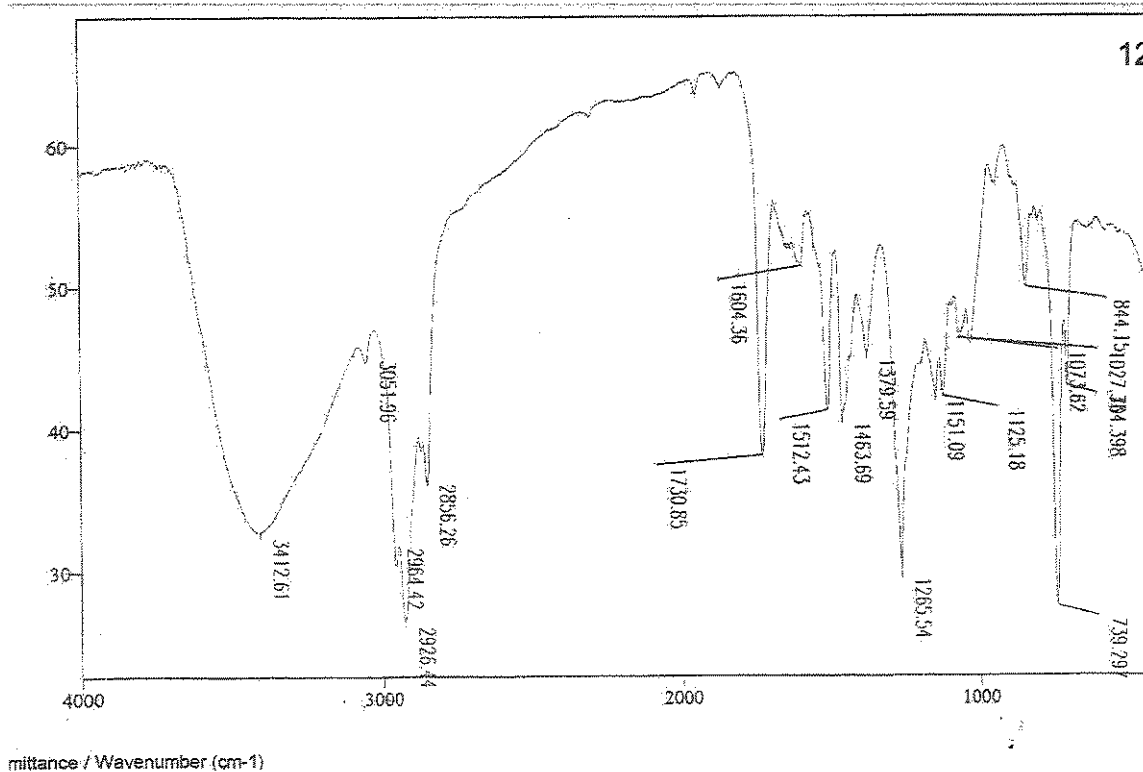
Sine bell: 0.046 sec

FT size: 2048 x 2048

Total time: 36 minutes



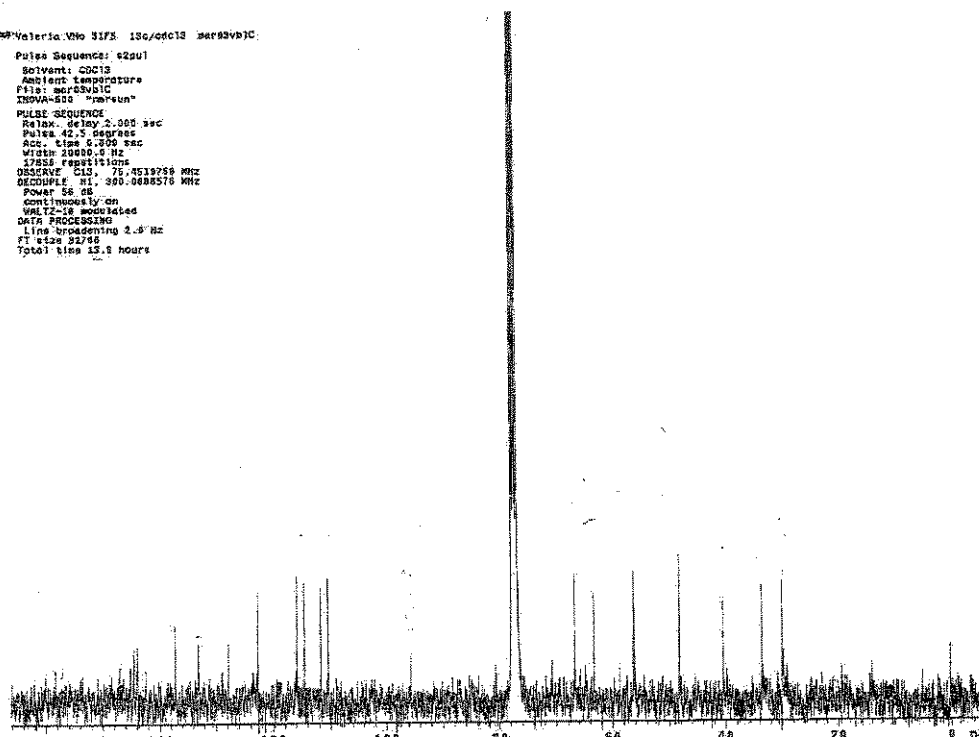
Esp. 8:- Espectro gCOSY do pinoresinol 14.



Esp. 9:- Espectro de IV do isolariciresinol 33.

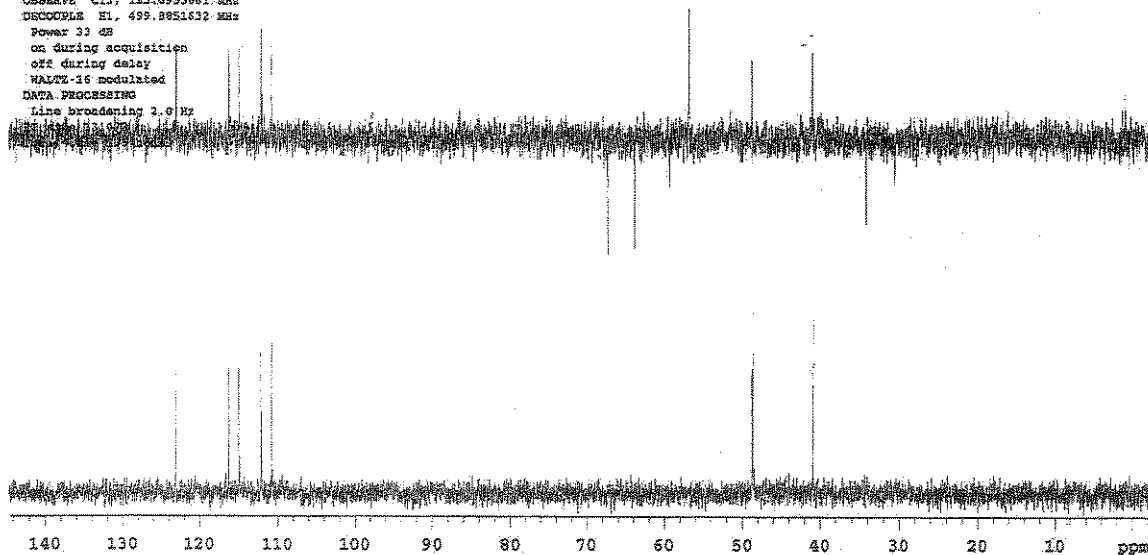
Volterra Vito 3173 13C/40013 mersavhic

Pulse Sequence: g2su1
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 File: mersavhic
 INOVA-500 "mrsun"
 PULSE SEQUENCE
 Relax. delay 2.000 sec
 Pulse 42.5 degrees
 Acc. time 0.000 sec
 Width 10000.0 Hz
 17850 repetitions
 OBSERVE CH: 75.4519758 MHz
 DECOUPLE H1: 300.060576 MHz
 Power 56.00
 continuous on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 2.0 Hz
 FT size 32768
 Total time 15.9 hours



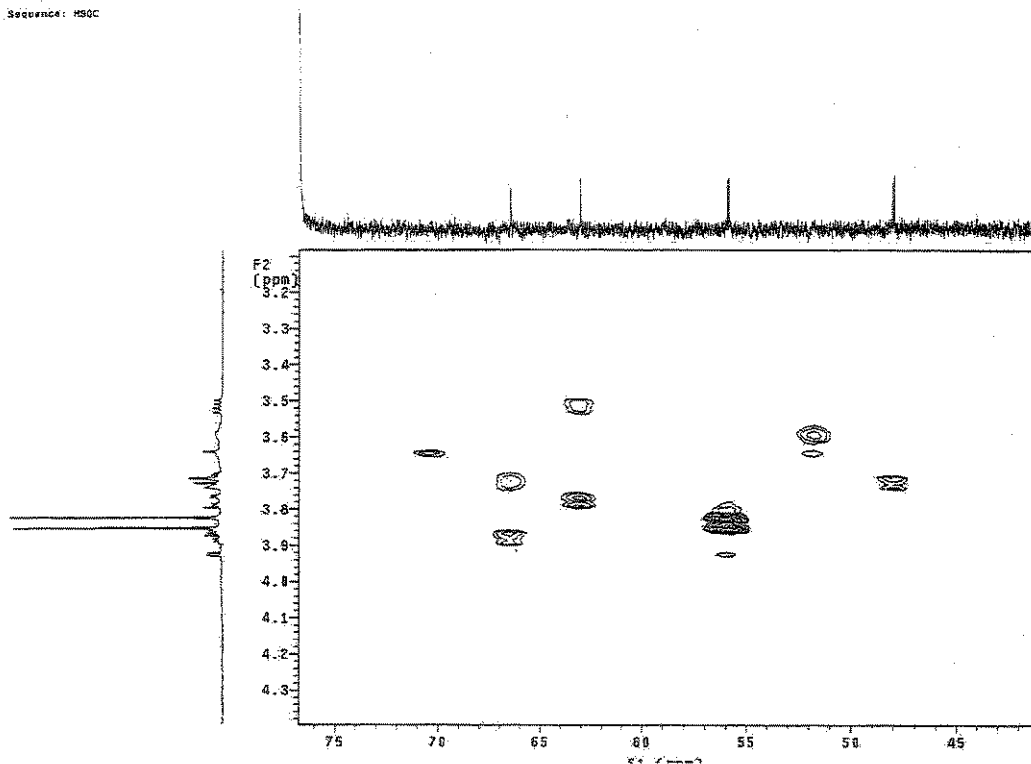
Esp. 10:- Espectro de RMN ¹³C do isolariciresinol 33.

File: mar09vbl01
 GEMINI-300MR "gemini"
 PULSE SEQUENCE: sept
 Relax. delay 2.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Acq. time 1.084 sec
 Width 32000.0 Hz
 3200 repetitions
 OBSERVE C13, 125.6955951 MHz
 DECOUPLE H1, 499.8051632 MHz
 Power 33 dB
 on during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 2.0 Hz



Esp. 11:- Espectro DEPT do isolariciresinol 33.

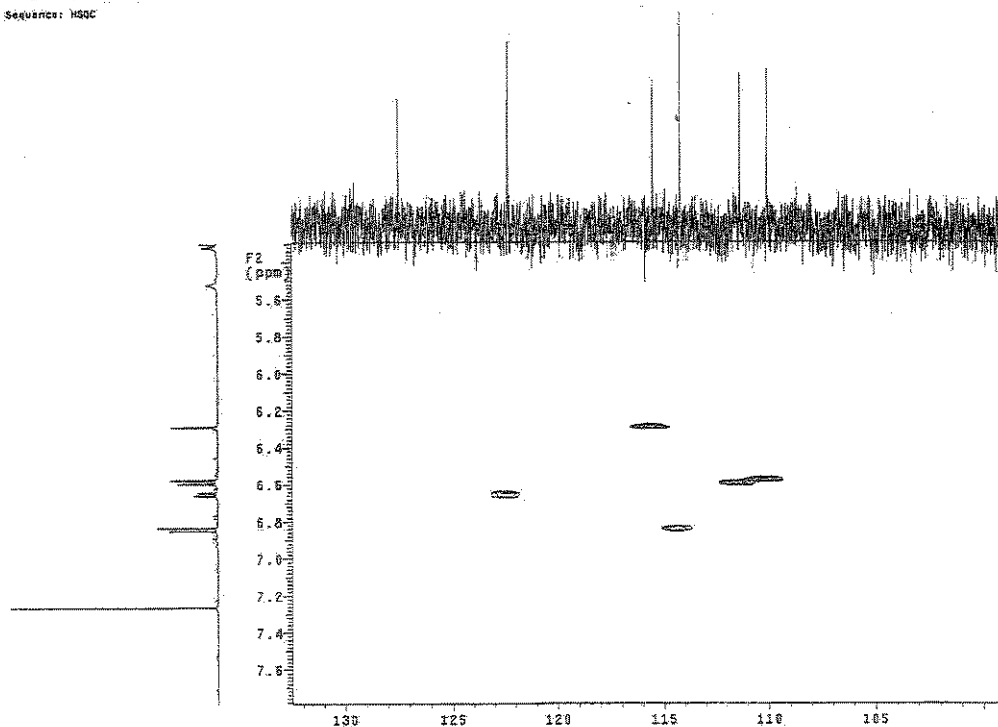
Valeria VH051FS, cdc13 mcd10vblHSQC
 Pulse Sequence: HSQC



Esp. 12:- Espectro HSQC do isolariciresinol 33.

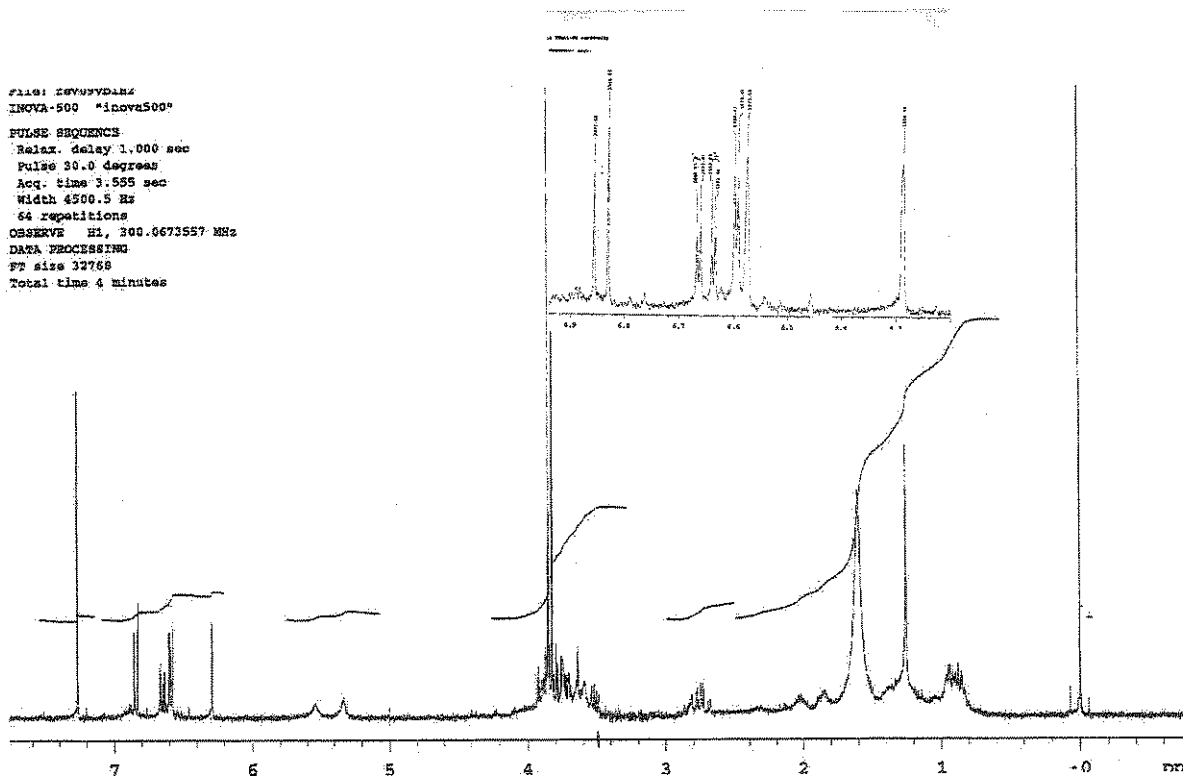
Valeria vp051r3, cocj3 m019v01MSQC
Pulse Sequence: HSQC

125



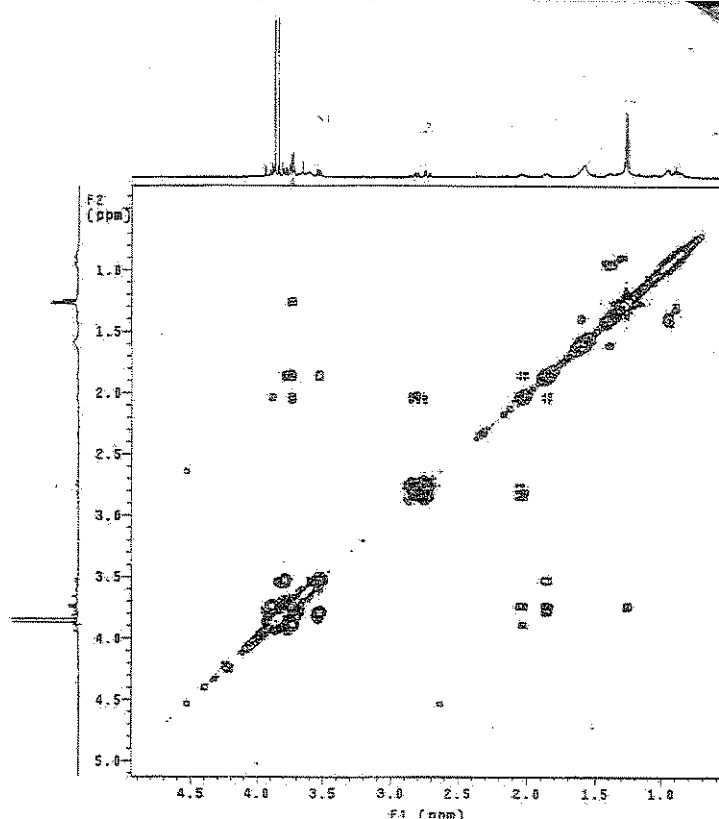
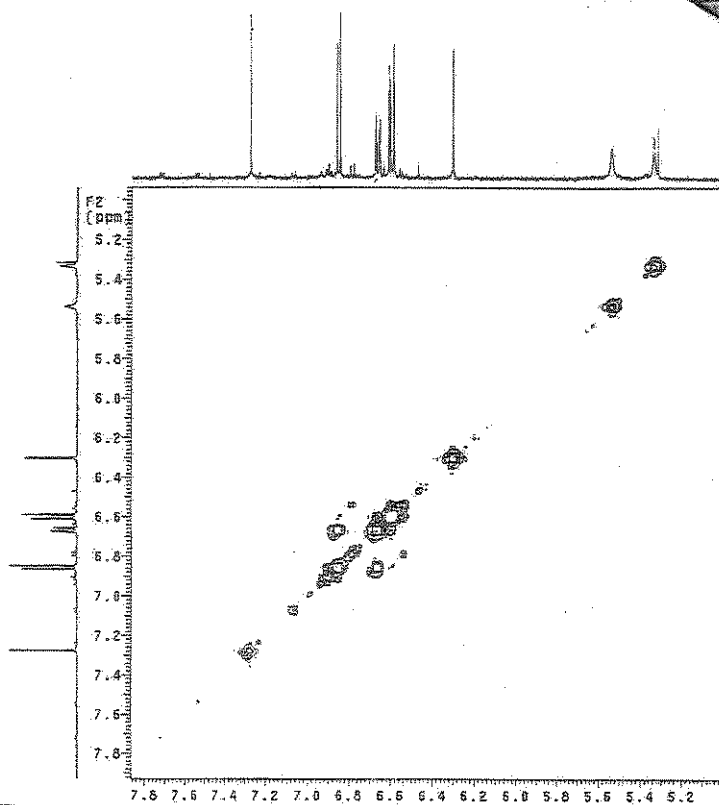
Esp. 12 (continuação):- Espectro HSQC do isolariciresinol 33.

File: 20050501.D
INNOVA-500 "inova500"
PULSE SEQUENCE
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 30.0 degrees
Acq. time 3.555 sec
Width 4500.5 Hz
64 repetitions
OBSERVE H1, 300.0673557 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 4 minutes

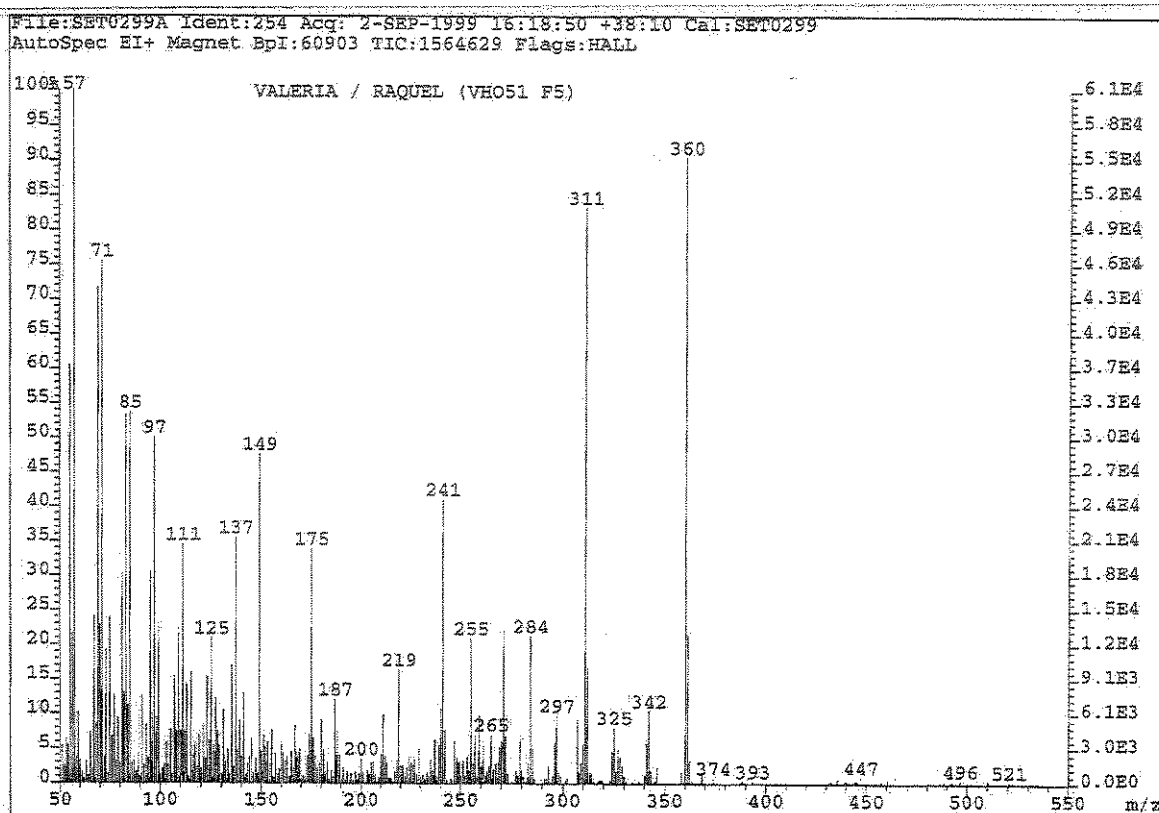


Esp. 13:- Espectro de IV do isolariciresinol 33.

Valeria VHD51-F5 maridvulgCOSY
 Pulse Sequence: gcosy
 Solvent: CDCl3
 Temp.: 27.0 C / 300.1 K
 INOVA-500 "LUDV500"
 PULSE SEQUENCE: gcosy
 Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.223 sec
 Width 4589.5 Hz
 2D Width 4589.5 Hz
 8 repetitions
 256 increments
 OBSERVE H1: 400.1629530 MHz
 DATA PROCESSING
 Sine bell 0.122 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Sine bell 0.025 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 42 minutes



Esp. 14:- Espectro gCOSY do isolaricresinol 33.



Esp. 15:- Espectro de massas do isolariciresinol 33.

File # 1 : AHO9F2

Mode = 2 (Mid-IR)

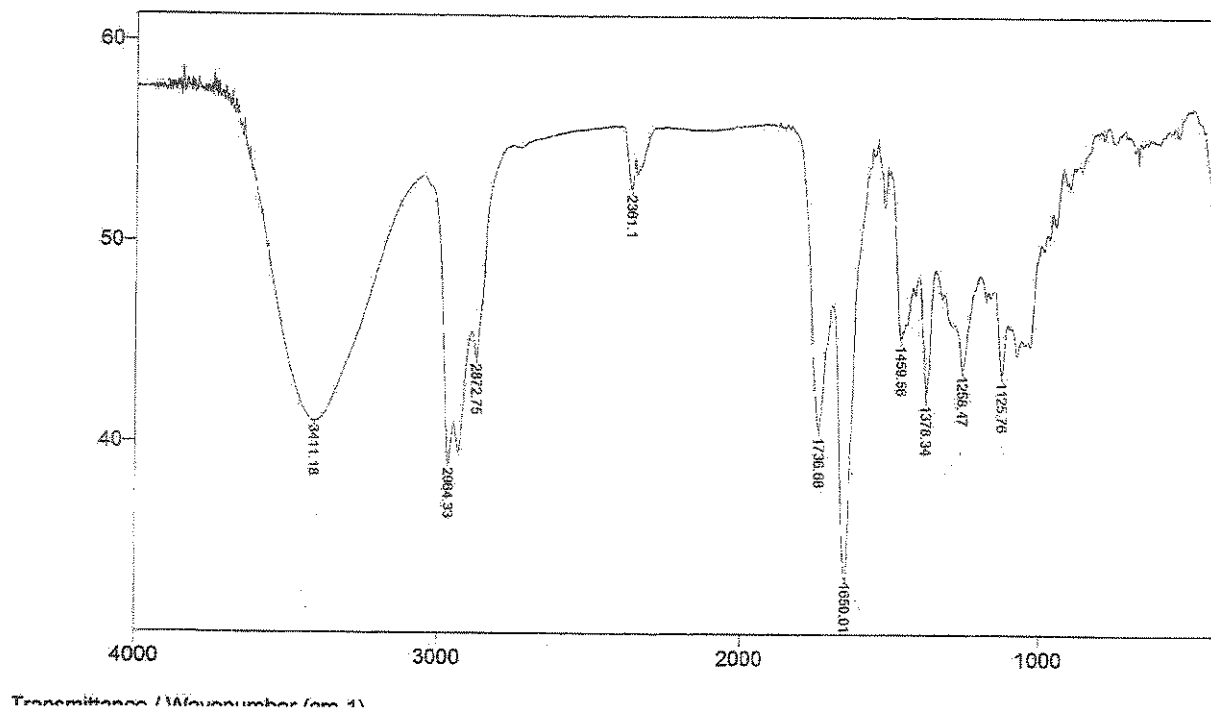
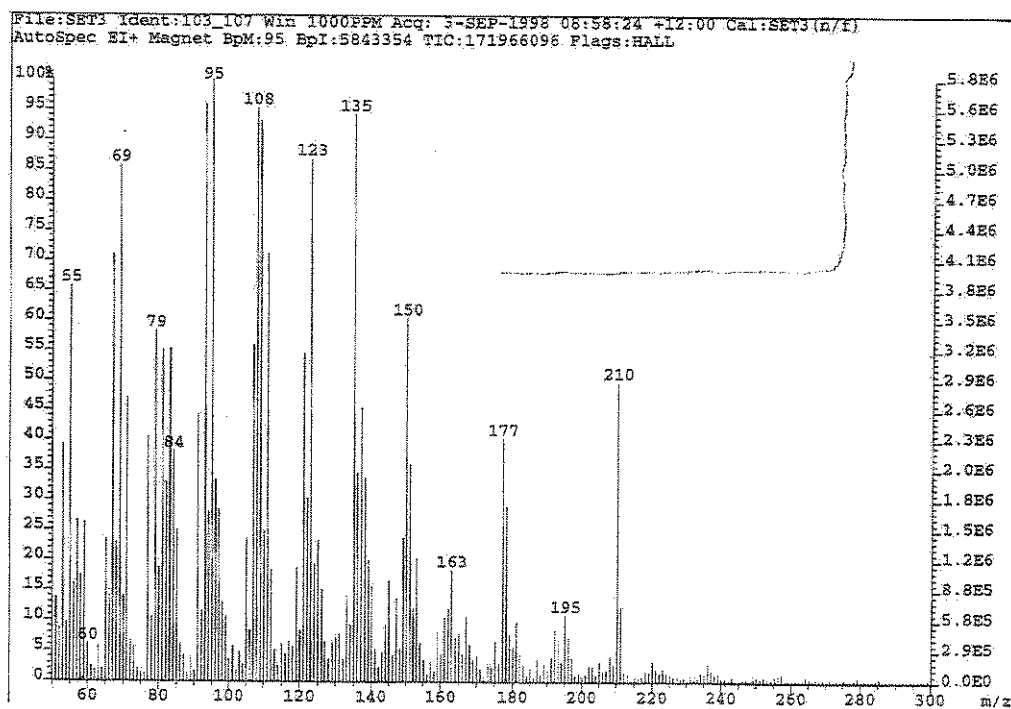
24/06/98 17:13

Sample Description: 24-06-98

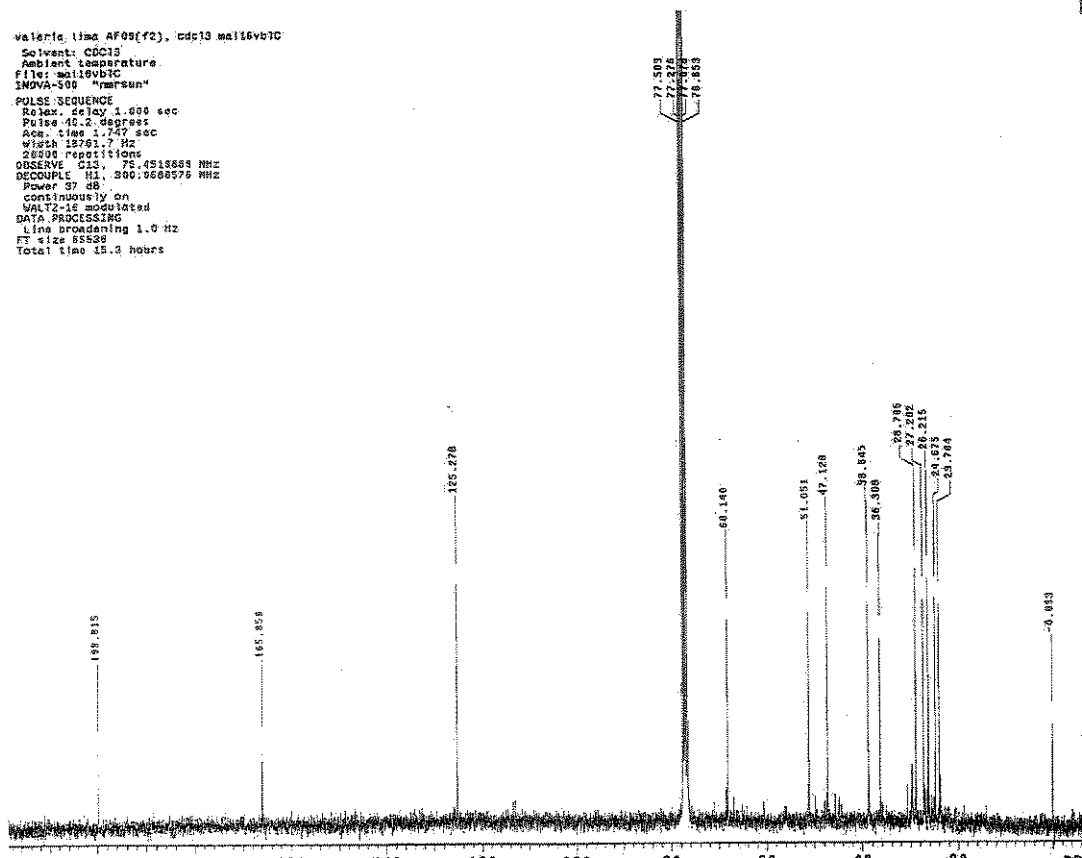
Scans = 10

Res = 4 cm⁻¹ 20 scans/min

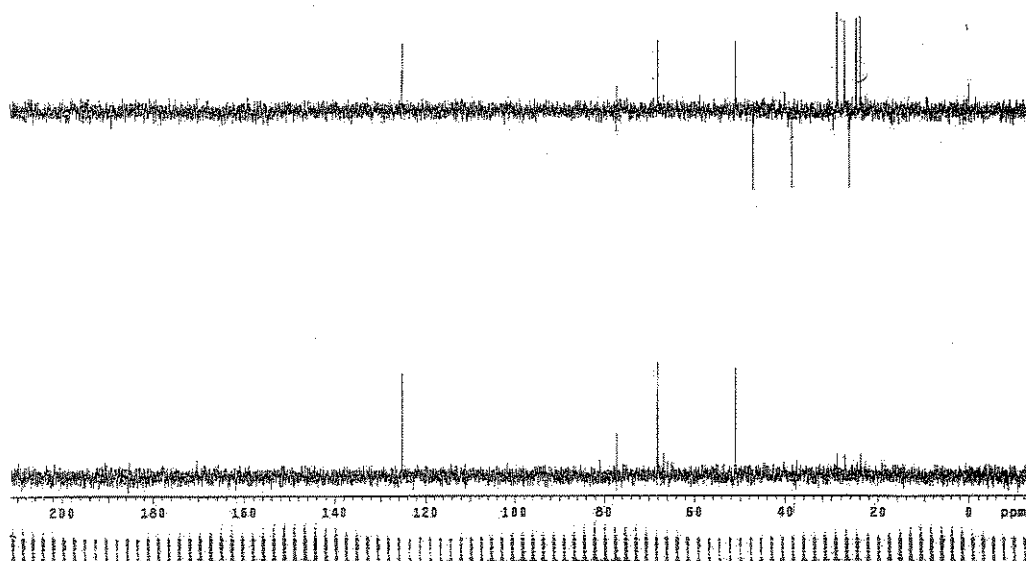
Apod = Cosine

Esp. 16:- Espectro de IV do blumenol C 63.Esp. 17:- Espectro de massas do blumenol C 63.

valerie lima AF09(f2), cdc13 mal16vb10
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 File: mal16vb10
 INOVA-500 "marsun"
 PULSE SEQUENCE
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 40.2 degree
 Acq. time 1.747 sec
 Width 12761.7 Hz
 20000 repetitions
 OBSERVE C13, 75.45135649 MHz
 DECOUPLE H1, 300.0660576 MHz
 Power 07 dB
 continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 15.3 hours



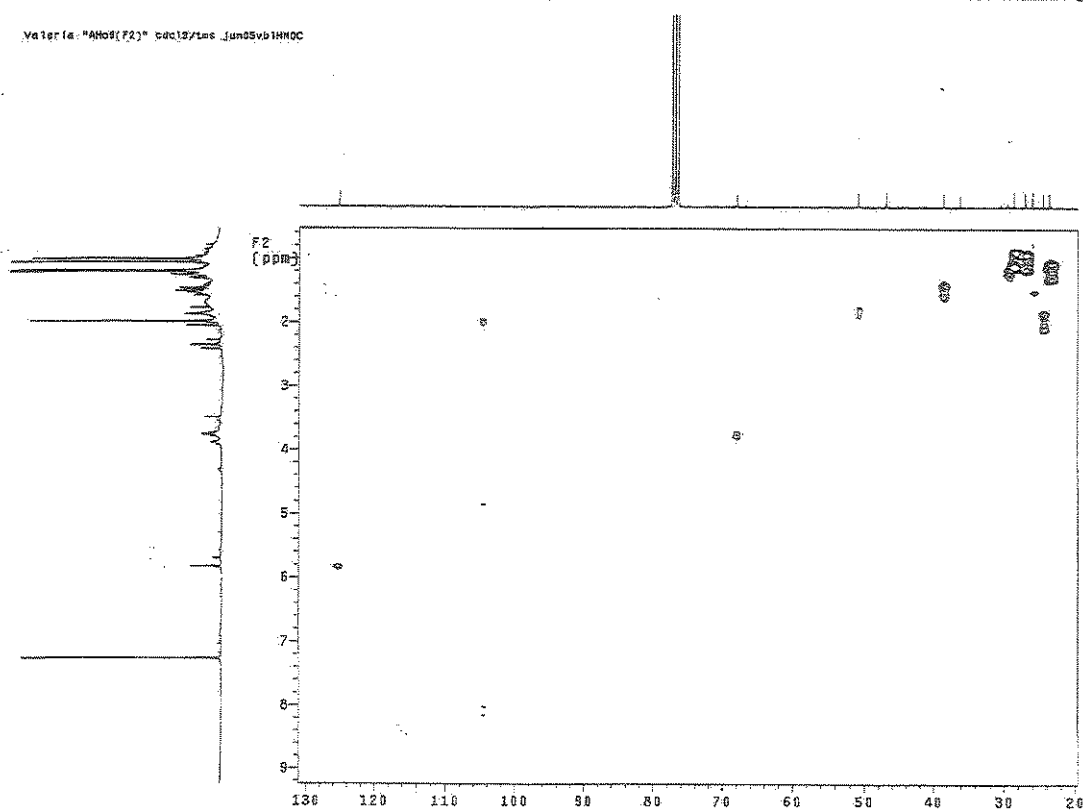
valerie lima AF09(f2), cdc13 mal16vb10
 Solvent: cdc13
 Ambient temperature
 GENI-30000 "gemin1"
 PULSE SEQUENCE: gcpd
 Relax. delay 2.000 sec
 Pulse 90.0 degree
 Acq. time 1.747 sec
 Width 12761.7 Hz
 20000 repetitions
 OBSERVE C13, 75.45135649 MHz
 DECOUPLE H1, 300.0660576 MHz
 Power 07 dB
 on during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 2.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 5.3 hours



Esp. 18 e 19:- Espectros de RMN ^{13}C e DEPT do blumenol C 63.

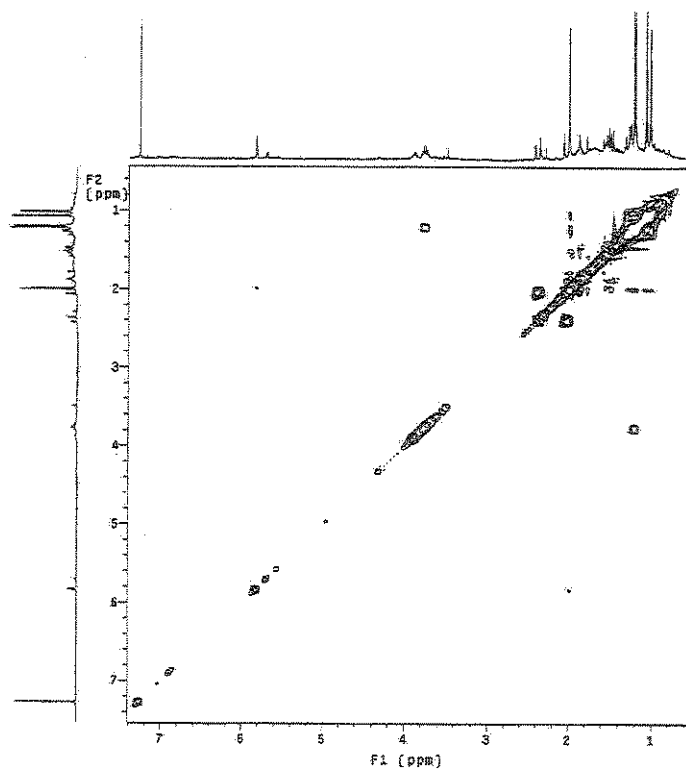
Valeria "AM09(F2)" cdc13/tas_jun05vbiHMQC

130

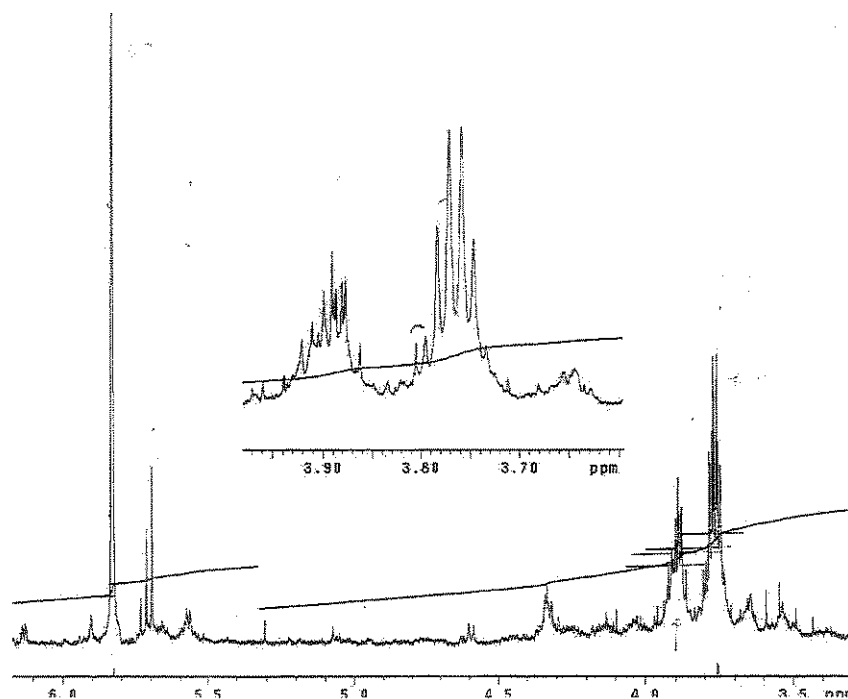
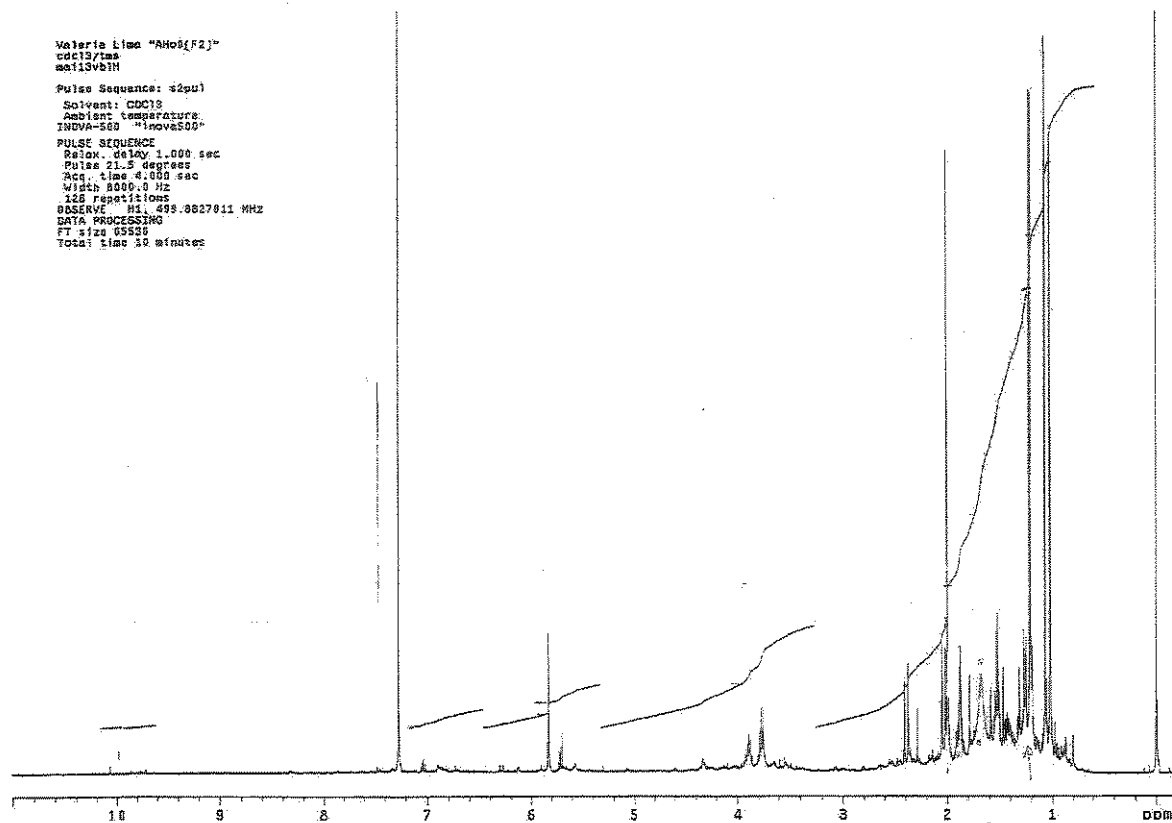


Esp. 20:- Espectro HMQC do blumenol C 63.

Valeria "AM09(F2)" cdc13/tas_jun05vbiCOSY
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 File: jun05vbiCOSY
 GEMINI-3000B "gemint"
 PULSE SEQUENCE: relayzgpg
 Ratio delay 1.000 sec
 CDSY 30-380
 Acq. time 0.150 sec
 Width 3245.3 Hz
 2D width 3245.3 Hz
 32 repetitions
 128 increments
 OBSERVE F1 300.0073541 MHz
 DATA PROCESSING
 Sine bell 0.079 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Sine bell 0.033 sec
 FT size 2054 x 1024
 Total time 40 minutes

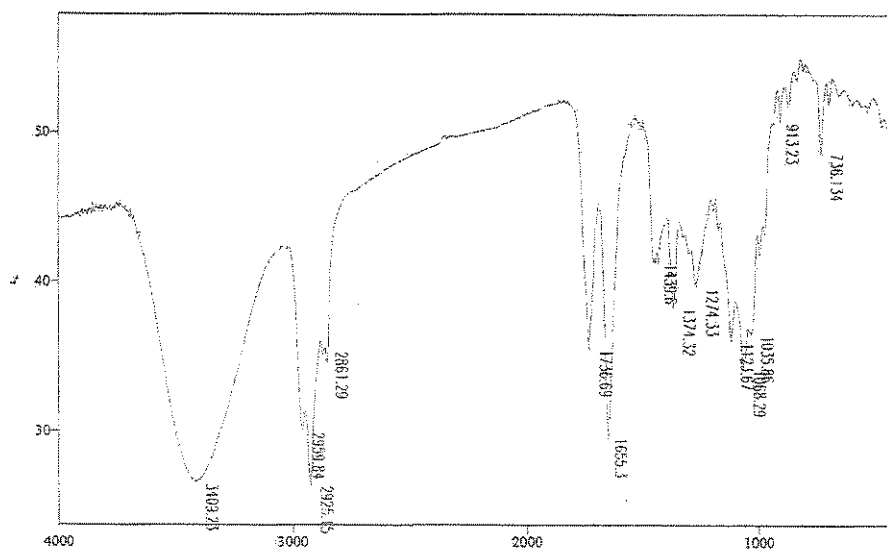


Esp. 21:- Espectro COSY do blumenol C 63.



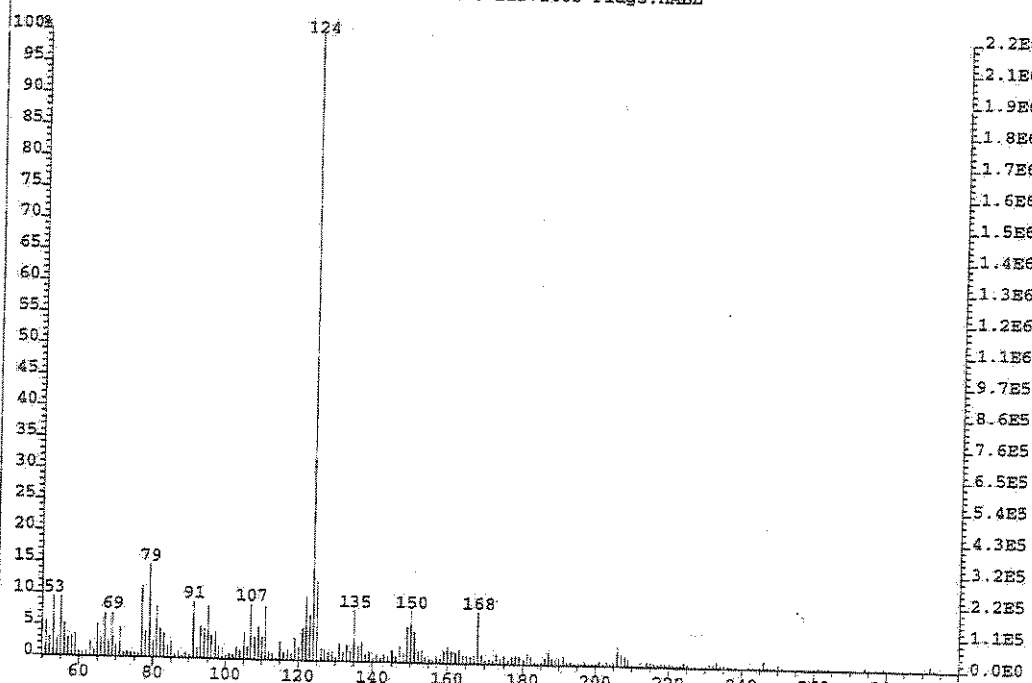
Esp. 22:- Espectro de RMN ^1H do blumenol C 63.

File # 1: VHO27F3 Mode = 2 (Mid-IR) 8/4/00 10:45 AM
 Sample Description: Valeria Filme
 Scans = 16 Res = 4 cm-1 20 scans/min Apod = Cosine



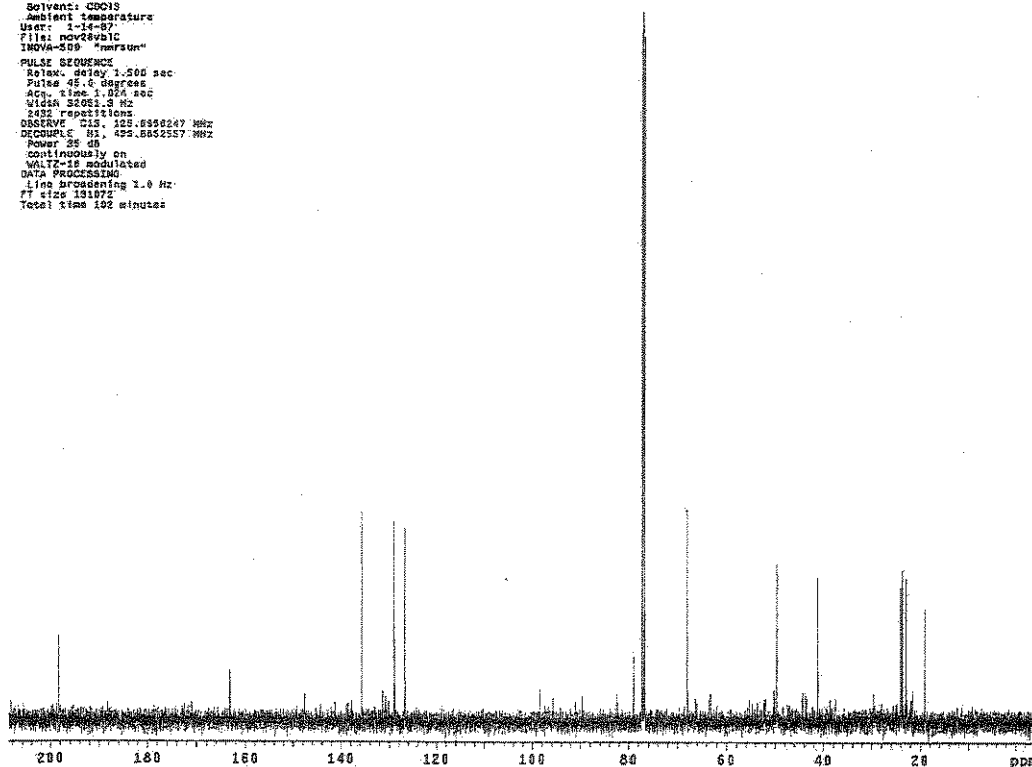
Esp. 23:- Espectro de IV do blumenol A 64.

File: DEZ11B Ident:184_187 Win 1000PPM Acq:11-DEC-1998 14:58:31 +18:24 Cal:DEZ11B(n/z)
 AutoSpec EI+ Magnet BpM:124 BpI:2162304 TIC:11571485 Flags:HALL



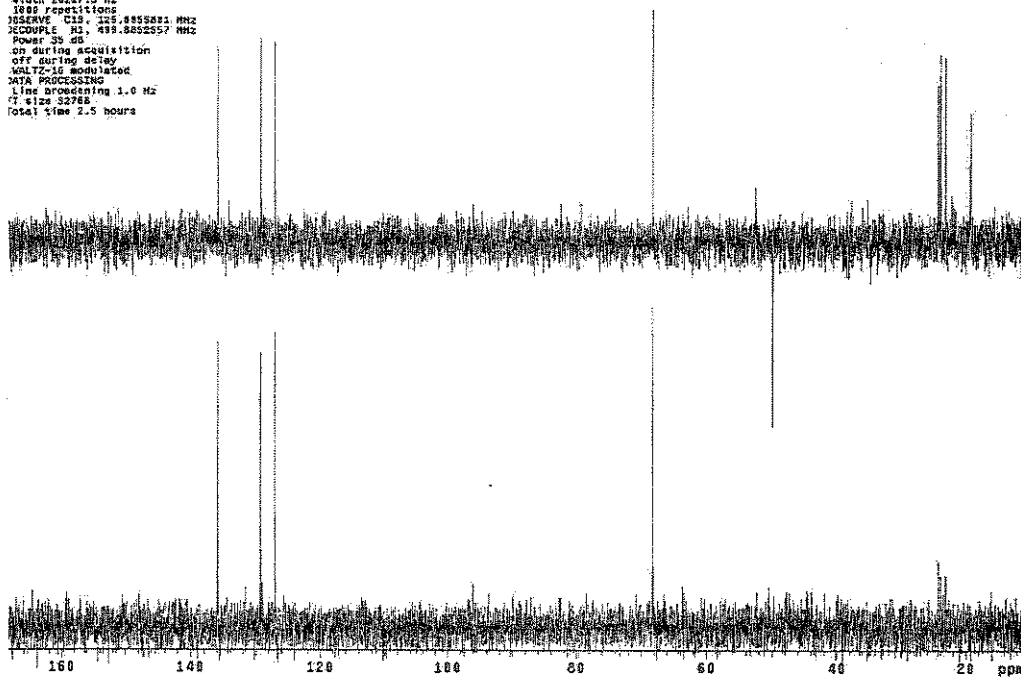
Esp. 24:- Espectro de massas do blumenol A 64.

Valeria "VH037(F3)" cdc13/ nanosonda nov26vb1C
 Pulse Sequence: s2po1
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 User: 1-14-87
 File: nov26vb1C
 INOVA-500 "narsun"
 PULSE SEQUENCE
 Relax. delay 1.260 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 1.024 sec
 Width 20263.3 Hz
 2432 repetitions
 OBSERVE CH 125.6350267 MHz
 DECOUPLE H1 499.8652557 MHz
 Power 35 dB
 Continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 F1 size 131872
 Total time 102 minutes



Valeria "VH037(F3)" cdc13/ nanosonda nov26vb1D

Pulse Sequence: dept
 Solvent: cdc13
 Ambient temperature
 File: nov26vb1D
 INOVA-500 "narsun"
 PULSE SEQUENCE: dept
 Relax. delay 2.000 sec
 Pulse 99.0 degrees
 Acq. time 0.010 sec
 Width 20263.3 Hz
 1600 repetitions
 OBSERVE CH 125.6350267 MHz
 DECOUPLE H1 499.8652557 MHz
 Power 35 dB
 on during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 F1 size 32768
 Total time 2.5 hours



Esp. 25 e 26:- Espectros de RMN ^{13}C e DEPT do blumenol A 64.

Valeria "VH037(F3)" cdc19 nov09vbtH

Pulse Sequence: s2pu1

Solvent: CDCl3

Ambient temperature

File: nov09vbtH

INNOVA-500 "turkey"

PULSE SEQUENCE

Pulse 28.4 degrees

Acq. time 2.567

Width 6000.0 Hz

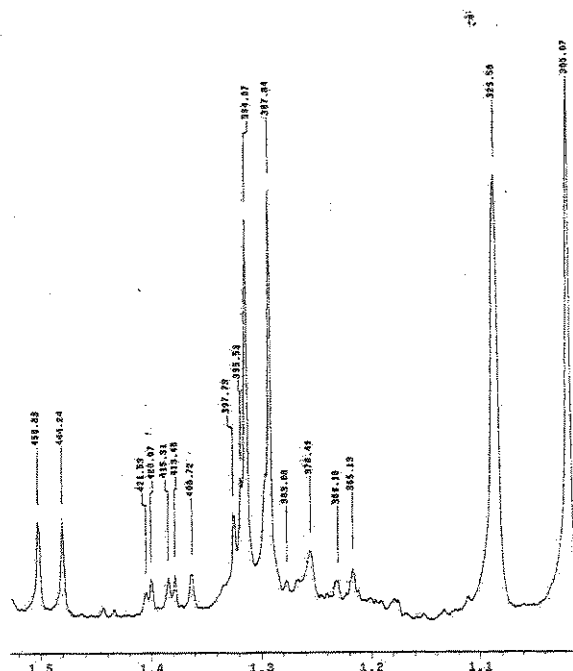
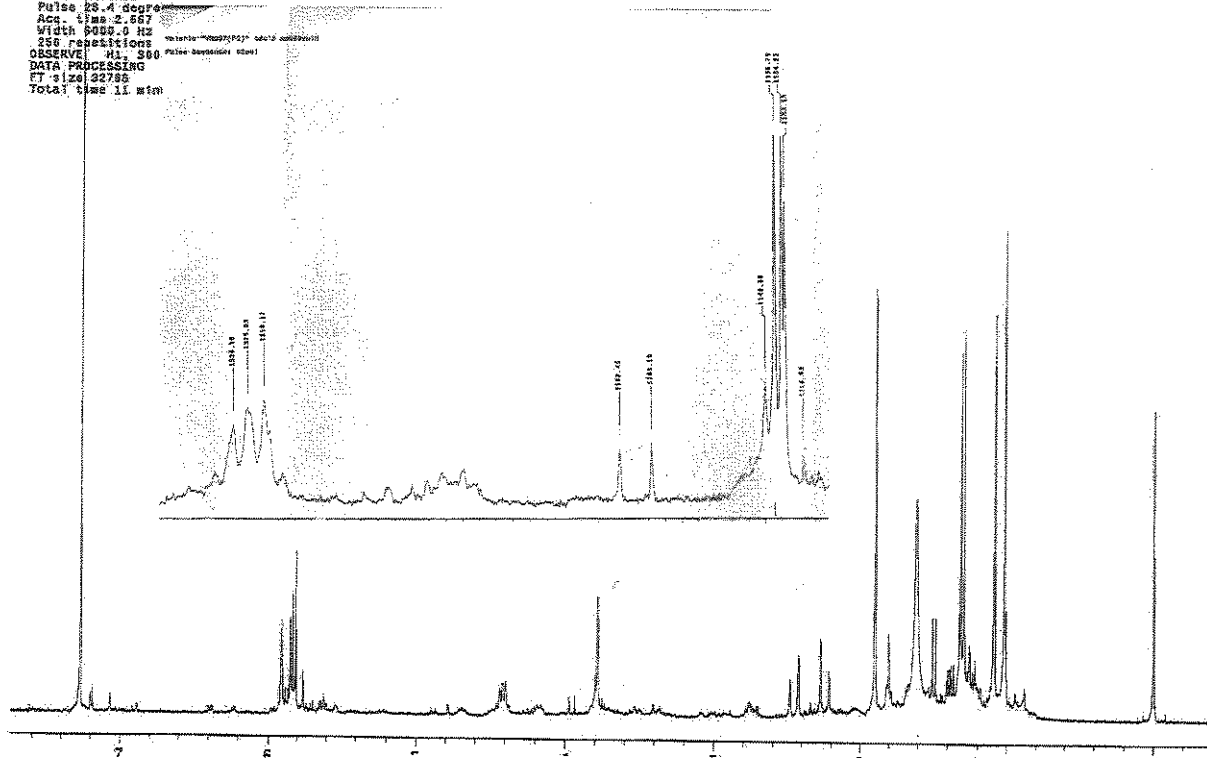
256 resolutions

OBSERVE H1, S00

DATA PROCESSING

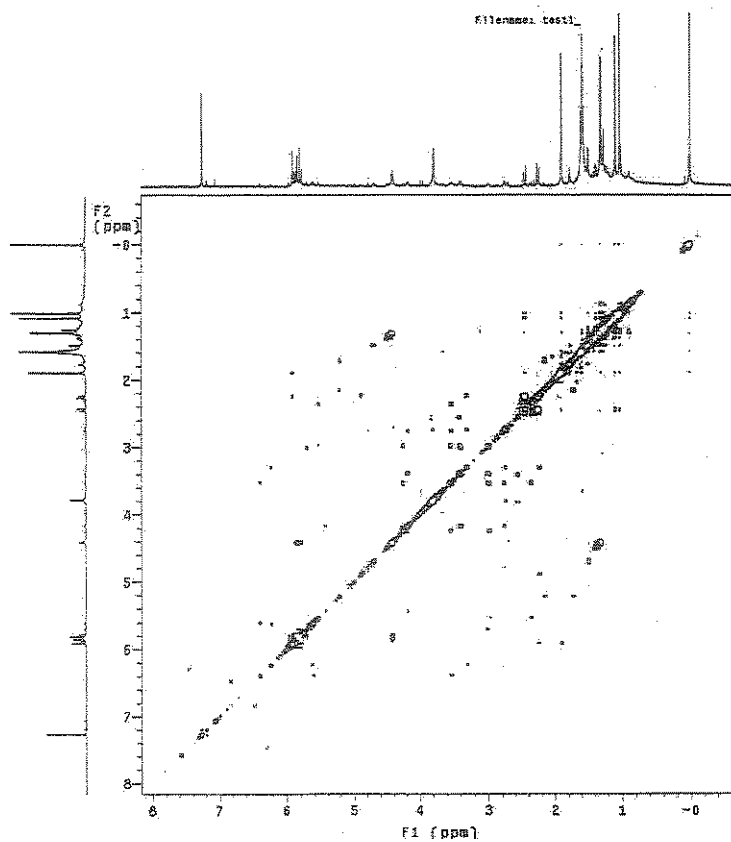
FT 0.126 22755

Total time 11 min



Esp. 27:- Espectro de RMN ^1H do blumenol A 64.

Valerfa "VH037(F3)" cdc13 de217vblgCOSY
 Pulse Sequence: gCOSY
 Solvent: CDCl3
 Temp: 30.0 C / 323.1 K
 INRG: S99 -"inova999"
 PULSE SEQUENCE: gCOSY
 Relax. delay: 2.000 sec
 Acq. time: 0.251 sec
 Width: 4435.1 Hz
 2D width: 4435.1 Hz
 3D repetitions: 128
 128 increments
 OBSERVE: H1, 499.8827594 MHz
 DATA PROCESSING
 Seq. time bell: 0.115 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Seq. time bell: 0.423 sec
 FT size: 2048 x 2048
 Total time: 3.2 hours



Esp. 28:- Espectro gCOSY do blumenol A 64.

File # 1: VHO35F4

Mode = 2 (Mid-IR)

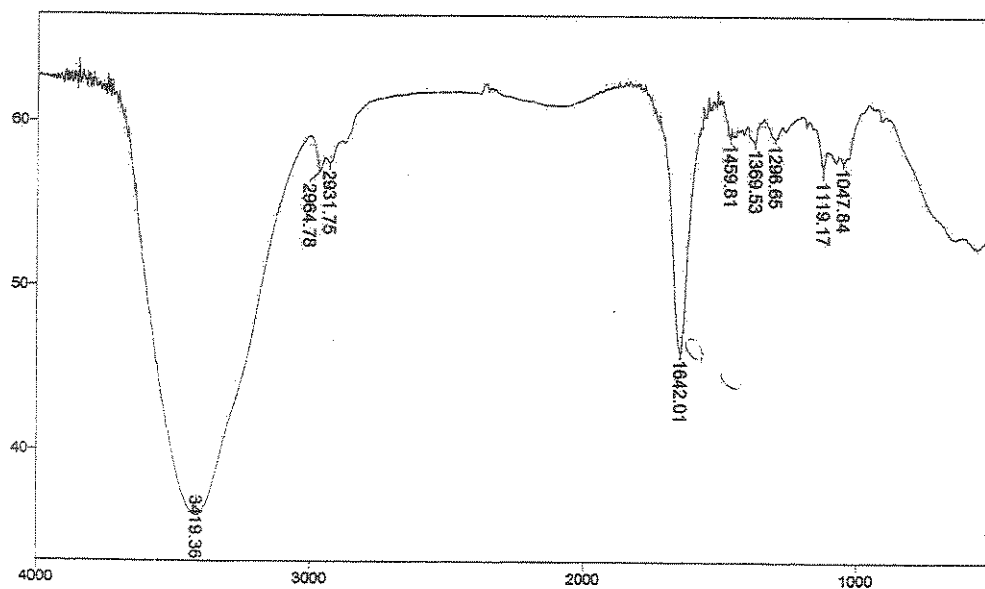
01/12/98 10:14

Sample Description:

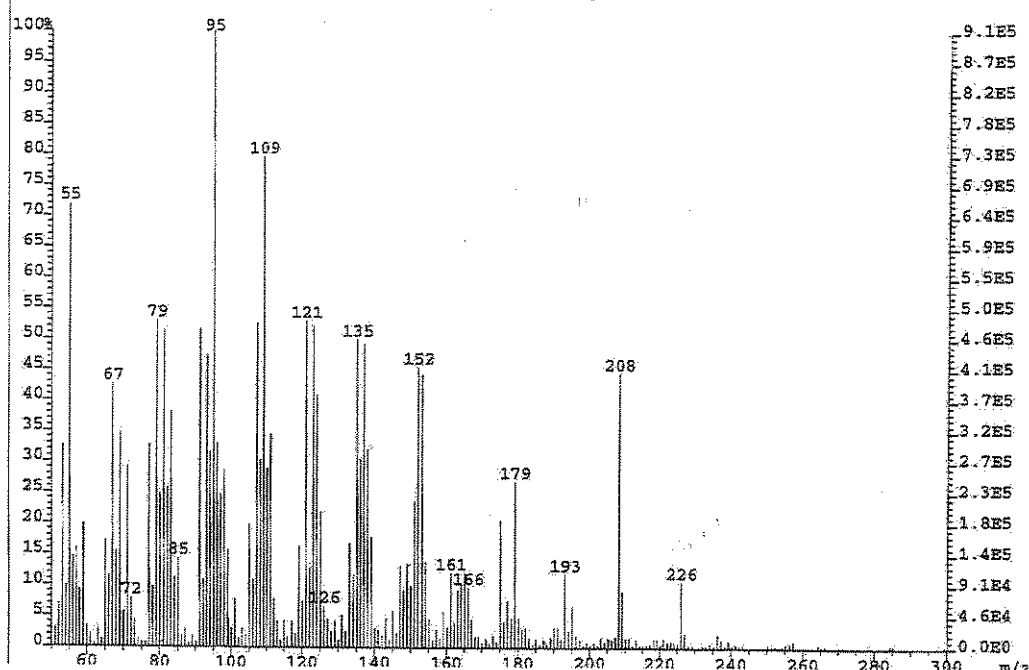
Scans = 7

Res = 4 cm-1 20 scans/min

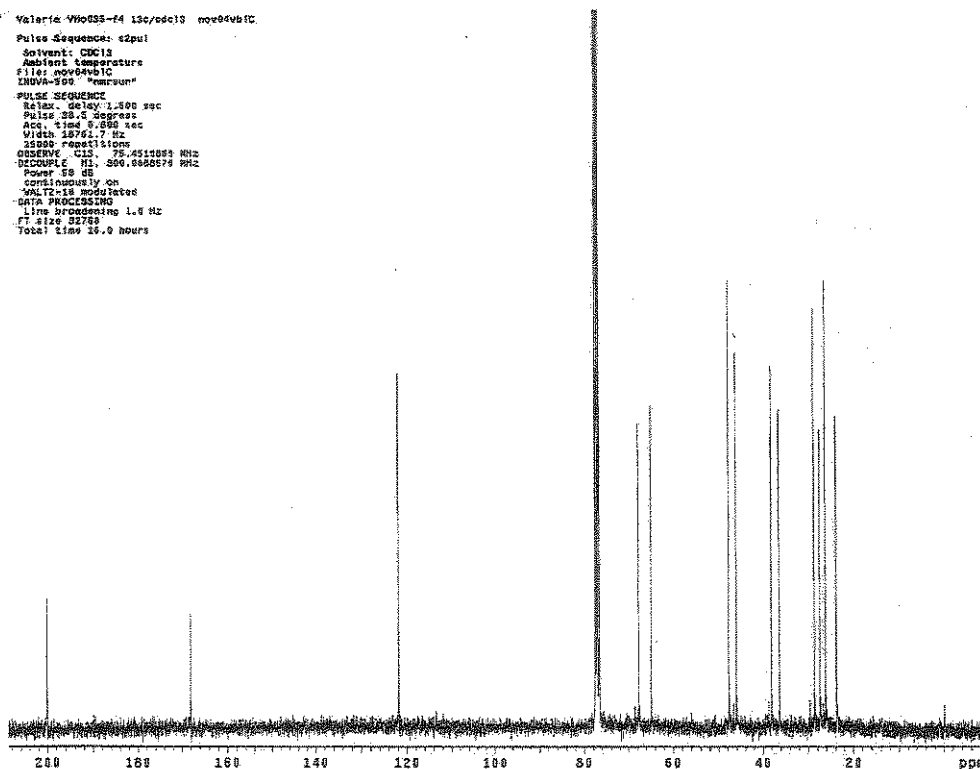
Apod = Cosine

Esp. 29:- Espectro de IV do nor-isoprenoíde 65.

File:DEZ3 Ident:50-20 Win 1000PPM Acq: 3-DEC-1998 14:20:45 Cal:DEZ3(n/E)
 AutoSpec EI+ Magnet BpM:95 BpI:914944 TIC:21202356 Flags:HALF

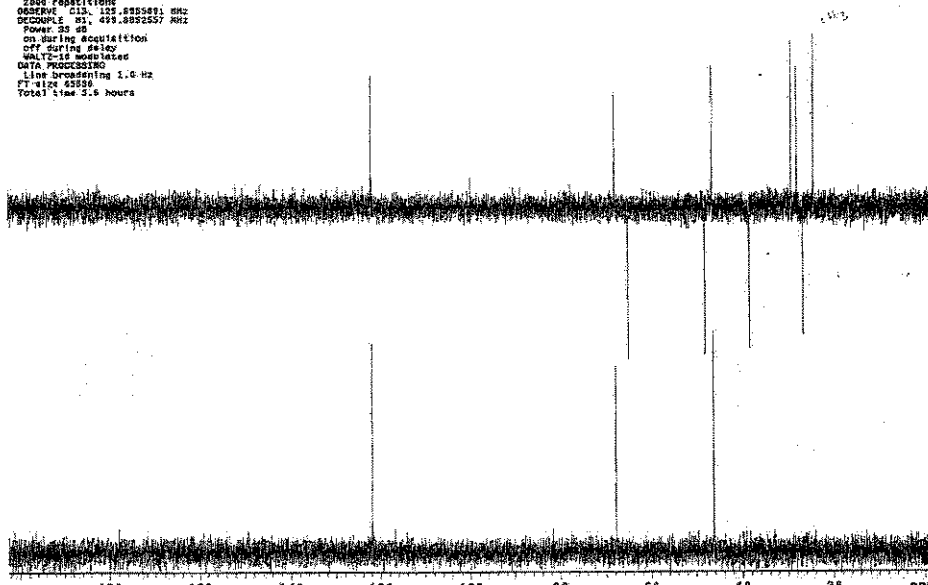
Esp. 30:- Espectro de massas do nor-isoprenoíde 65.

Valeria W0655-F4 13c/cdc13 nov06v010
 Pulse Sequence: c2pul
 Solvent: CDC13
 Ambient temperature
 File: nov06v010
 INOVA-500 "nucrun"
 PULSE SEQUENCE
 Relax. delay: 1.500 sec
 Pulse: 33.3 degrees
 Acq. time: 3.000 sec
 Width: 12761.7 Hz
 5000 repetitions
 OBSERVE: C13, 75.4510093 MHz
 DECOUPLE: H1, 500.6080679 MHz
 Power: 50 dB
 continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening: 1.0 Hz
 FT size: 32768
 Total time: 16.0 hours



Esp. 31:- Espectro de RMN ^{13}C do nor-isoprenóide 65.

Valeria W0655(F4)*-cdc13 nov06v010
 Pulse Sequence: dept
 Solvent: cdc13
 Ambient temperature
 File: nov06v010
 INOVA-500 "nucrun"
 PULSE SEQUENCE: dept
 Relax. delay: 2.000 sec
 Pulse: 10.0 degrees
 Acq. time: 1.000 sec
 Width: 12851.4 Hz
 2500 repetitions
 OBSERVE: C13, 125.8555891 MHz
 DECOUPLE: H1, 499.8052557 MHz
 Power: 30 dB
 on during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening: 1.0 Hz
 FT size: 45536
 Total time: 3.0 hours



Esp. 32:- Espectro DEPT do nor-isoprenóide 65.

valeria.VH035F4.nov25vb1gCOSY

Pulse Sequence: gCOSY

Solvent: CDCl3

Temp. 27.0 C / 300.1 K

INNOVA-500 "INNOVA500"

PULSE SEQUENCE: gCOSY

Relax. delay 1.000 sec

Acq. time 0.255 sec

Width 4175.0 Hz

2D Width 4175.0 Hz

32 repetitions

128 increments

OBSERVE H1 499.8827616 MHz

DATA PROCESSING

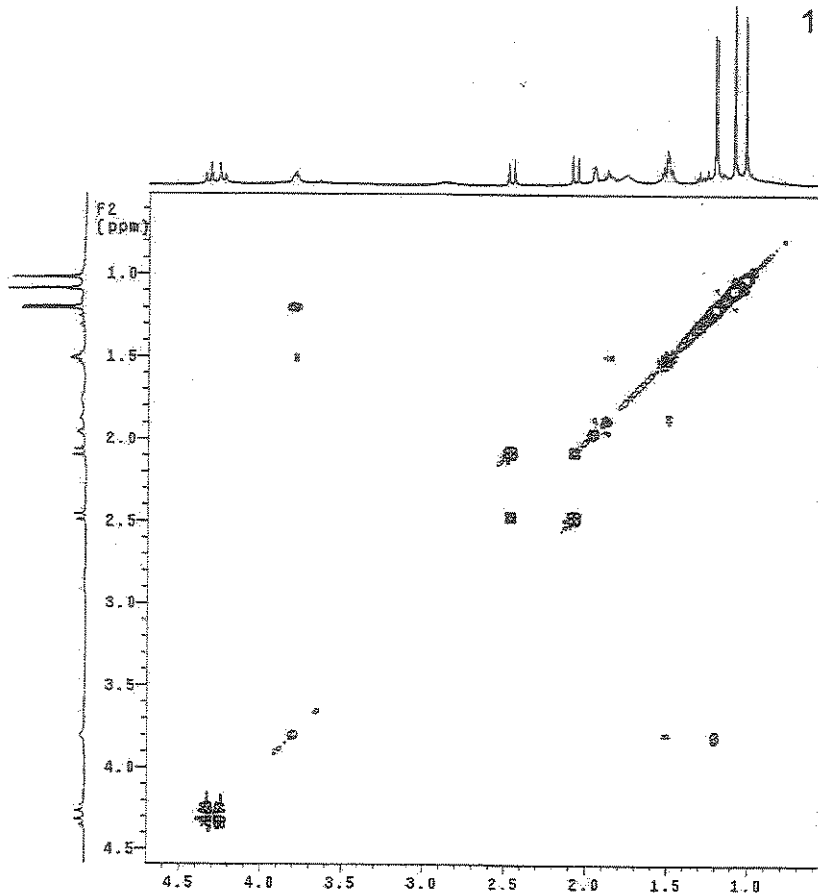
Sq. sine bell 0.125 sec

FI DATA PROCESSING

Sine bell 0.031 sec

FT size 2048 x 2048

Total time 55 minutes



138

Esp. 33:- Espectro gCOSY do nor-isoprenóide 65.

Valeria.VH035(F4).cdc13.nov53vb1h

Pulse Sequence: zgpg30

Solvent: CDCl3

Ambient temperature

File: nov53vb1h

INNOVA-500 "INNOVA500"

PULSE SEQUENCE

Pulse 20.4 degrees

Acq. time 2.847 sec

Width 6000.0 Hz

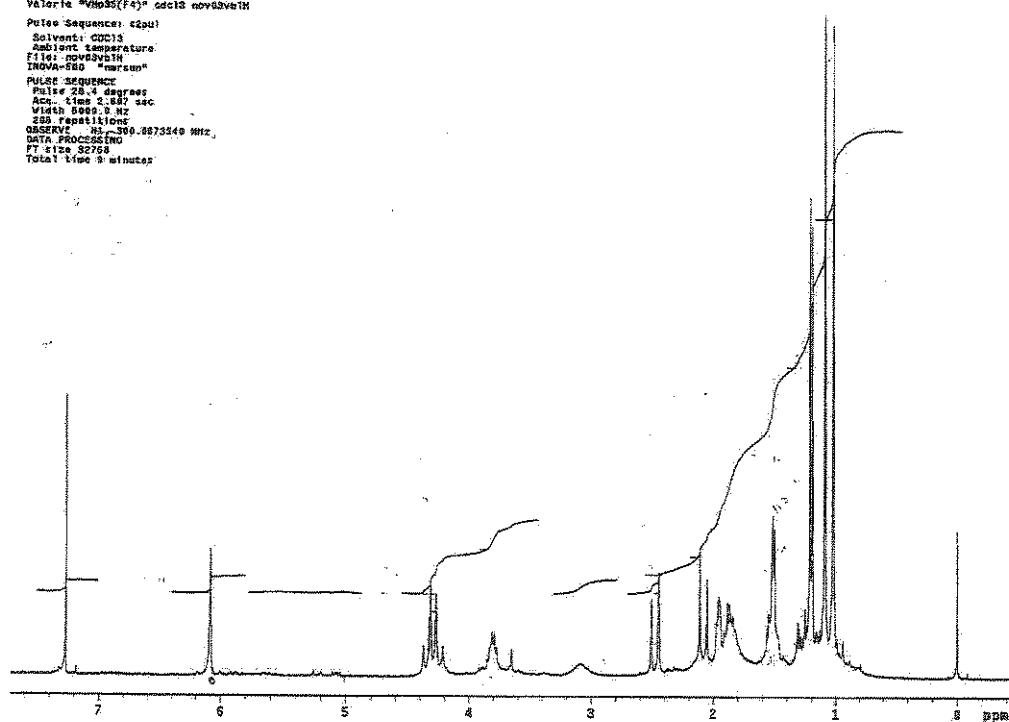
320 repetitions

OBSERVE H1 500.8873540 MHz

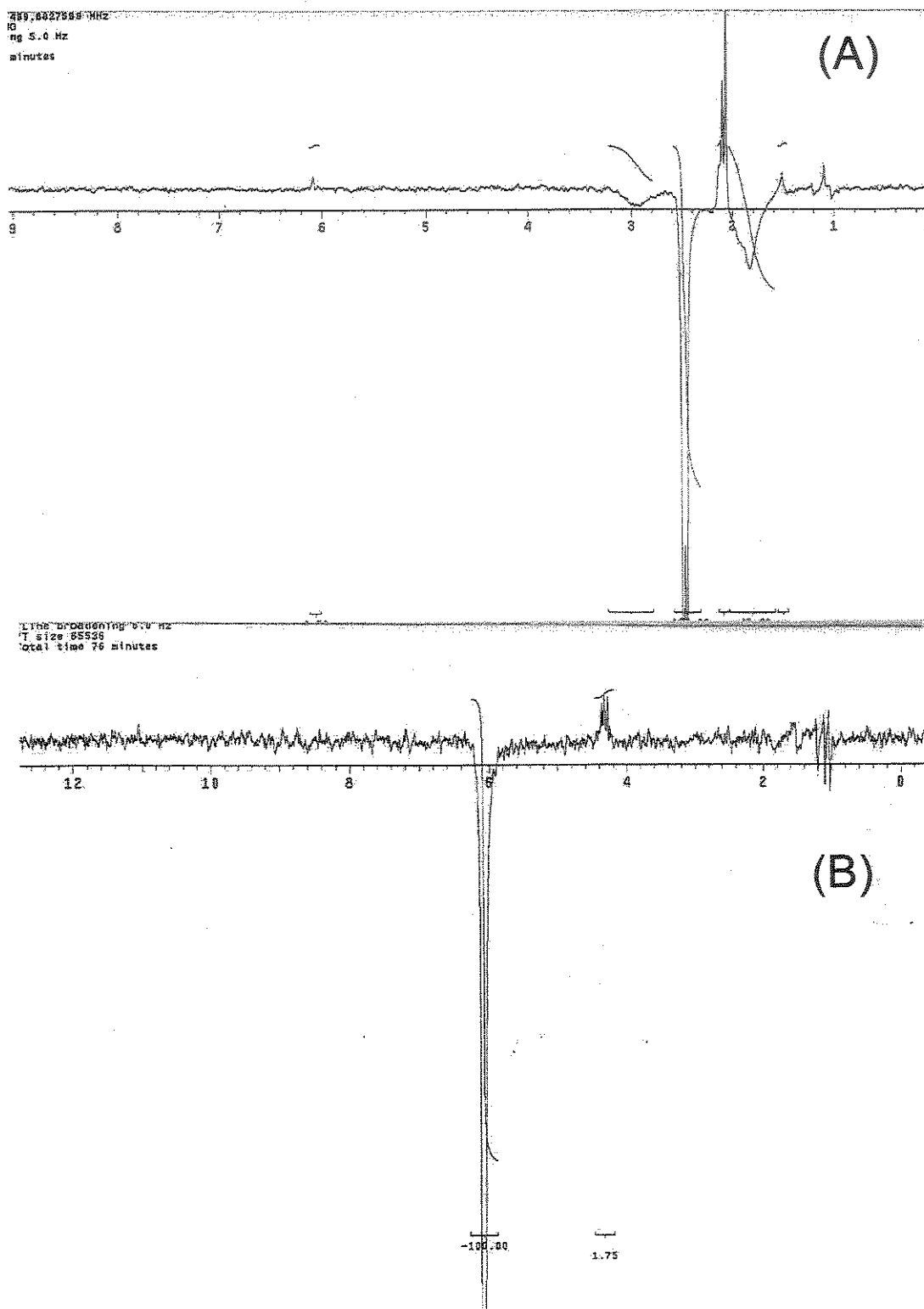
DATA PROCESSING

FT size 32768

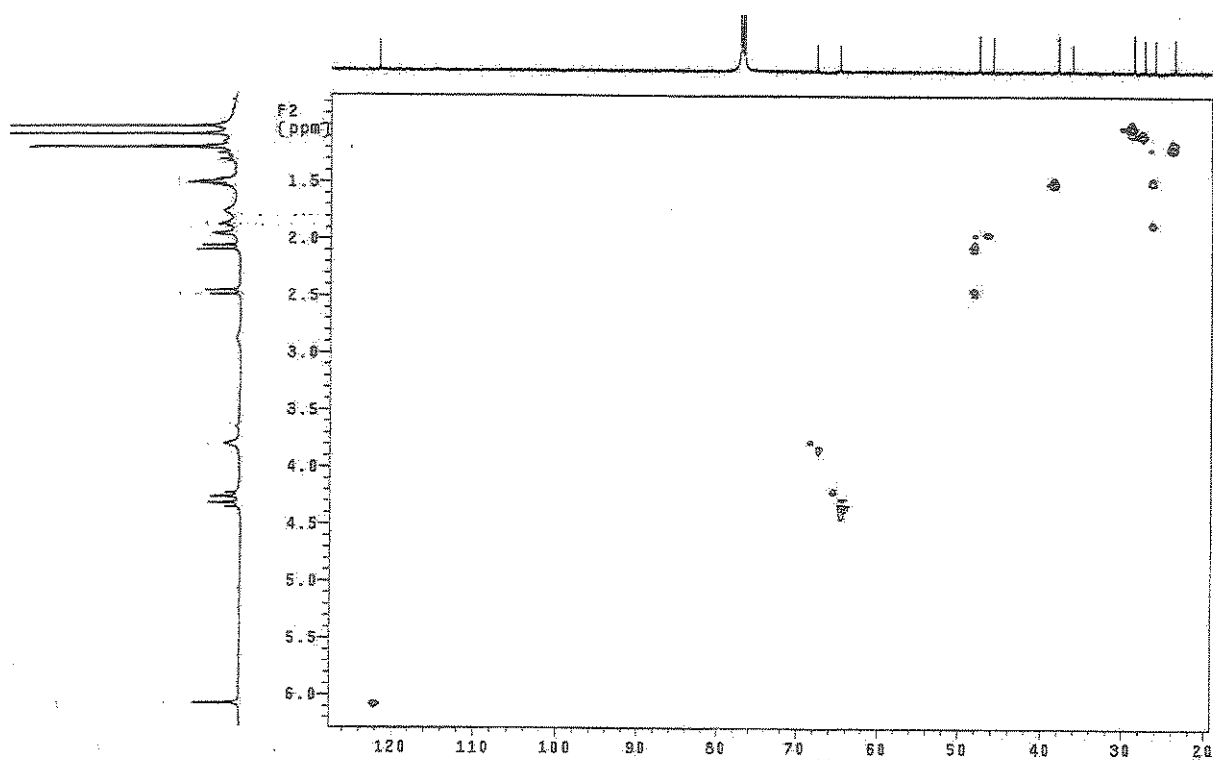
Total time 9 minutes



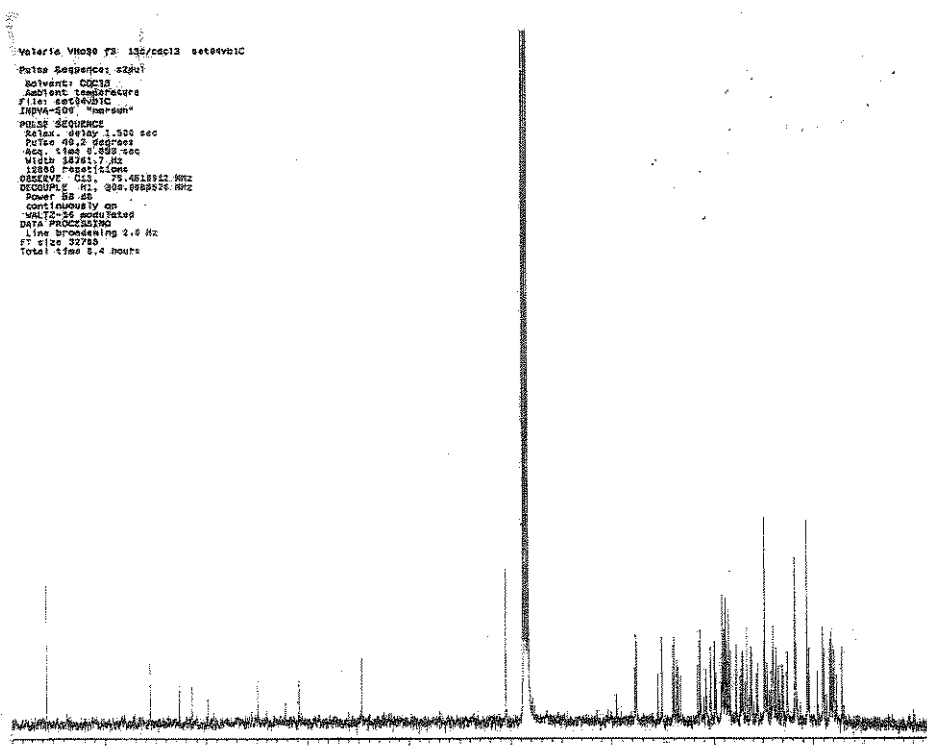
Esp. 34:- Espectro de RMN ^1H do nor-isoprenóide 65.



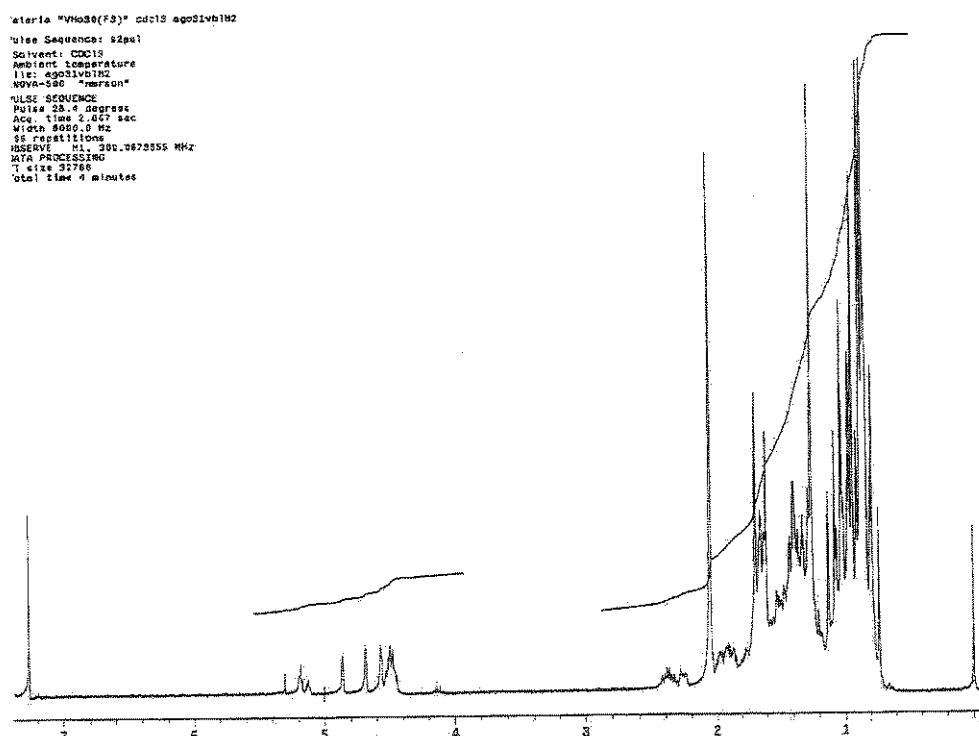
Esp. 35:- Espectros de CICLENOE3 do nor-isoprenóide 65 (Irradiação dos hidrogênios em δ 2,48 (A) e 6,08 (B) ppm).



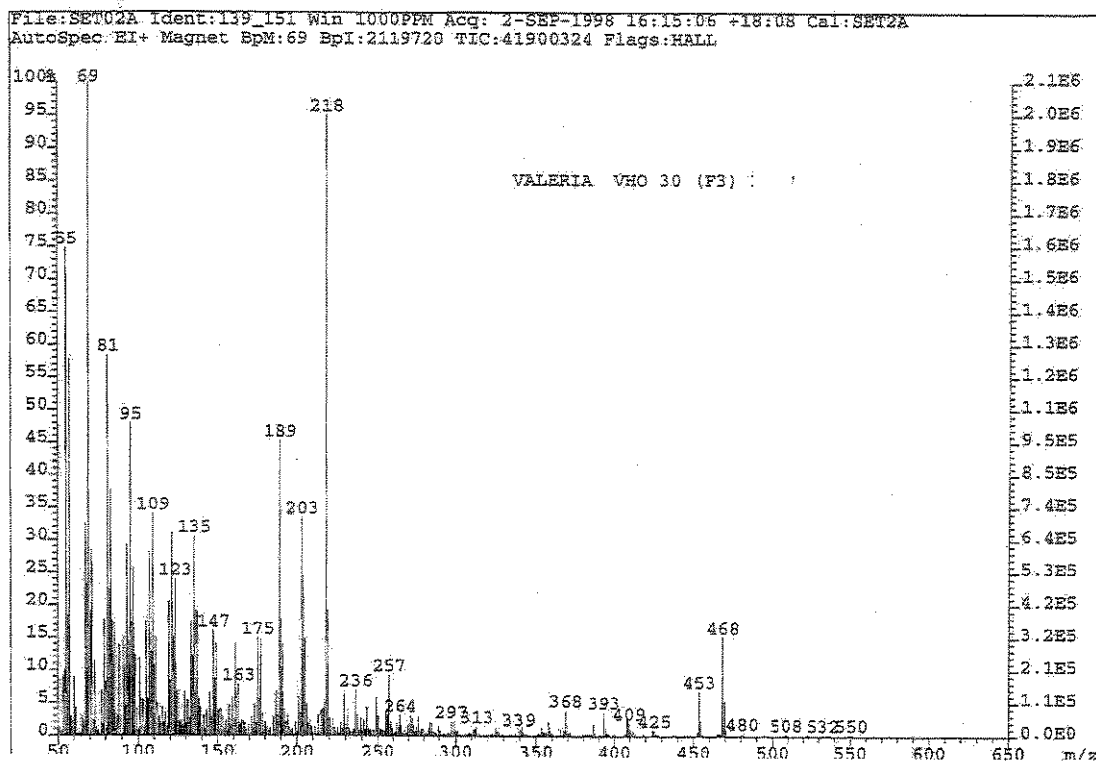
Esp. 36:- Espectro HSQC do nor-isoprenóide 65.



Esp. 37:- Espectro de RMN ^{13}C da fração VH30F3



Esp. 38:- Espectro de RMN ^1H da fração VH30F3.

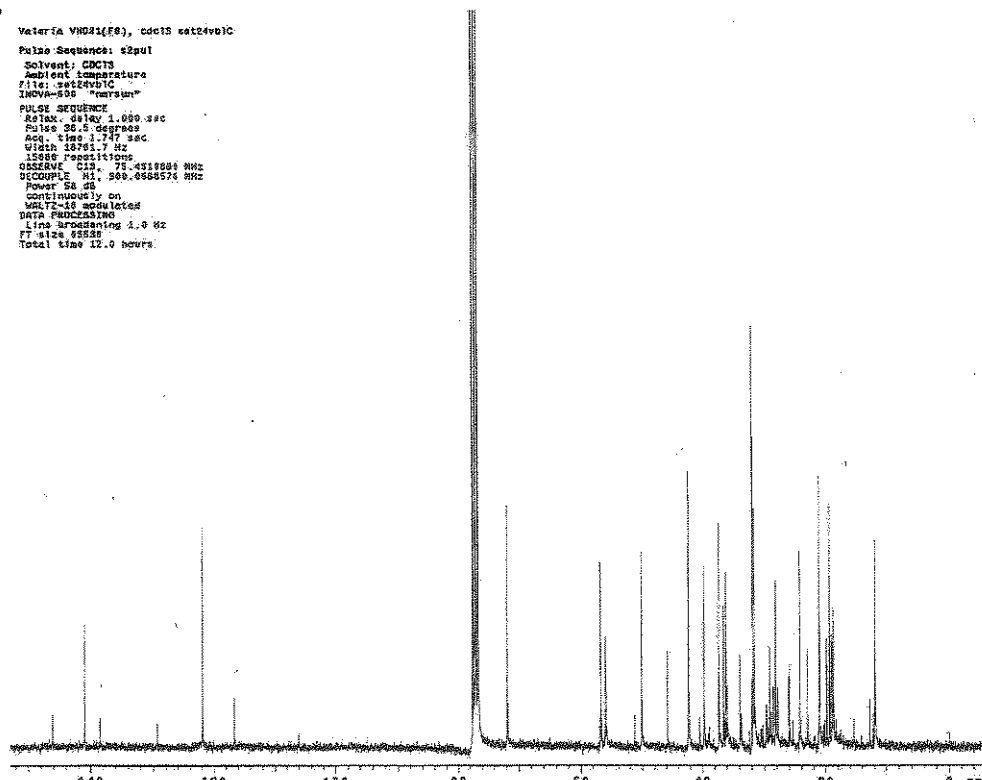


Esp. 39:- Espectro de massas da fração VH30F3

```

Vetaria VH031(F6), cdc13 sat24vb1C
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
File: sat24vb1C
INSTR: JNM-500 "magnam"
PULSE SEQUENCE
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 36.5 degrees
Acq. time 1.747 sec
Width 18761.7 Hz
13369 repetitions
OBSERVE C13, 75.4318888 MHz
DECOUPLE H1, 500.0685574 MHz
Power 50
Continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 12.0 hours

```

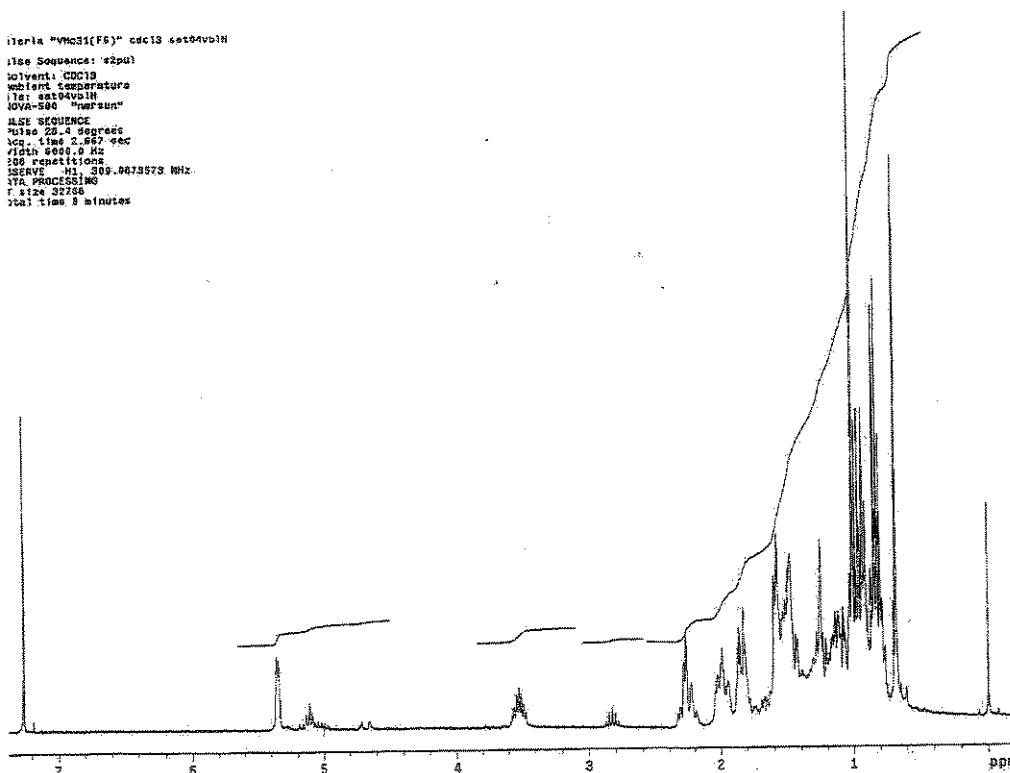


Esp. 40:- Espectro de RMN ^{13}C da fração VH31F6.

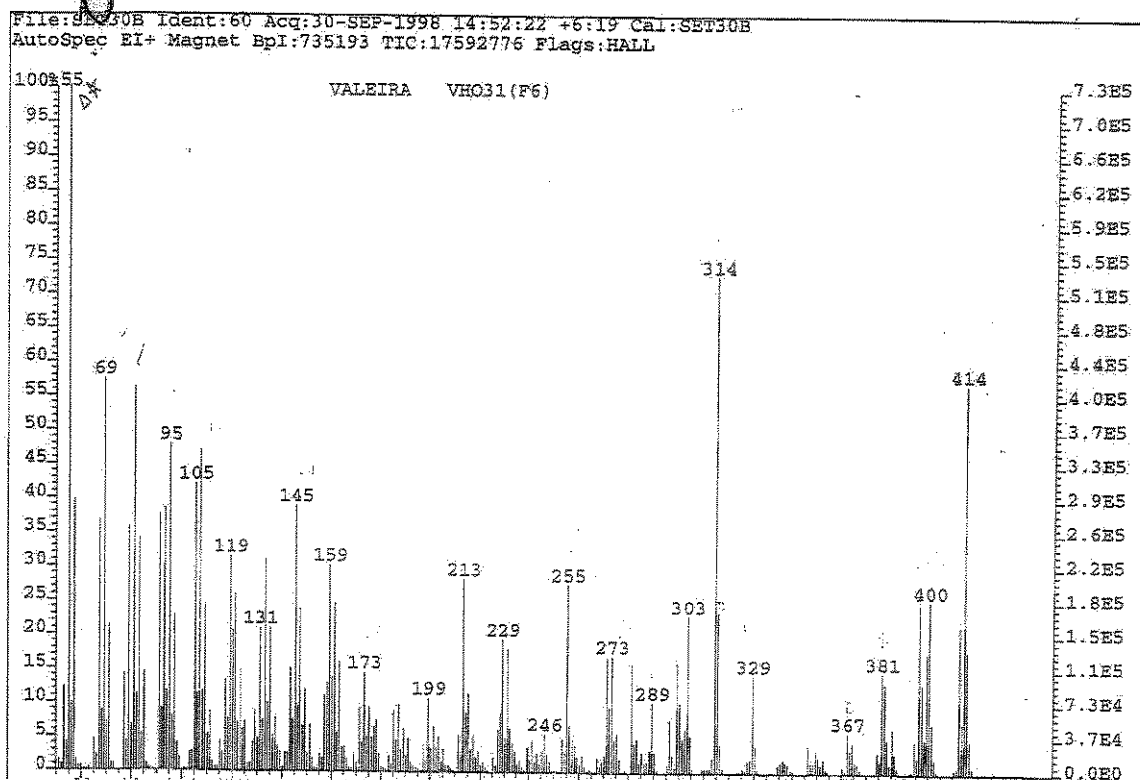
```

Vetaria "VH031(F6)" cdc13 sat04vb1H
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
File: sat04vb1H
INSTR: JNM-500 "magnam"
PULSE SEQUENCE
Pulse 28.4 degrees
Acq. time 2.857 sec
Width 6000.0 Hz
100 repetitions
OBSERVE H1, 500.0673573 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 8 minutes

```



Esp. 41:- Espectro de RMN ^1H da fração VH31F6.



Esp. 42:- Espectro de massas da fração VH31F6.

Valeria VH49F3 13c/cdcl3 mar08vbiC

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CDCl3

Ambient temperature

File: mar08vbiC

INOVA-500 "inova500"

PULSE SEQUENCE

Relax. delay 1.500 sec

Pulse 42.5 degrees

Acq. time 0.800 sec

Width 20000.0 Hz

21632 repetitions

OBSERVE C13, 75.4519944 MHz

DECOUPLE H1, 300.0688576 MHz

Power 56 dB

continuously on

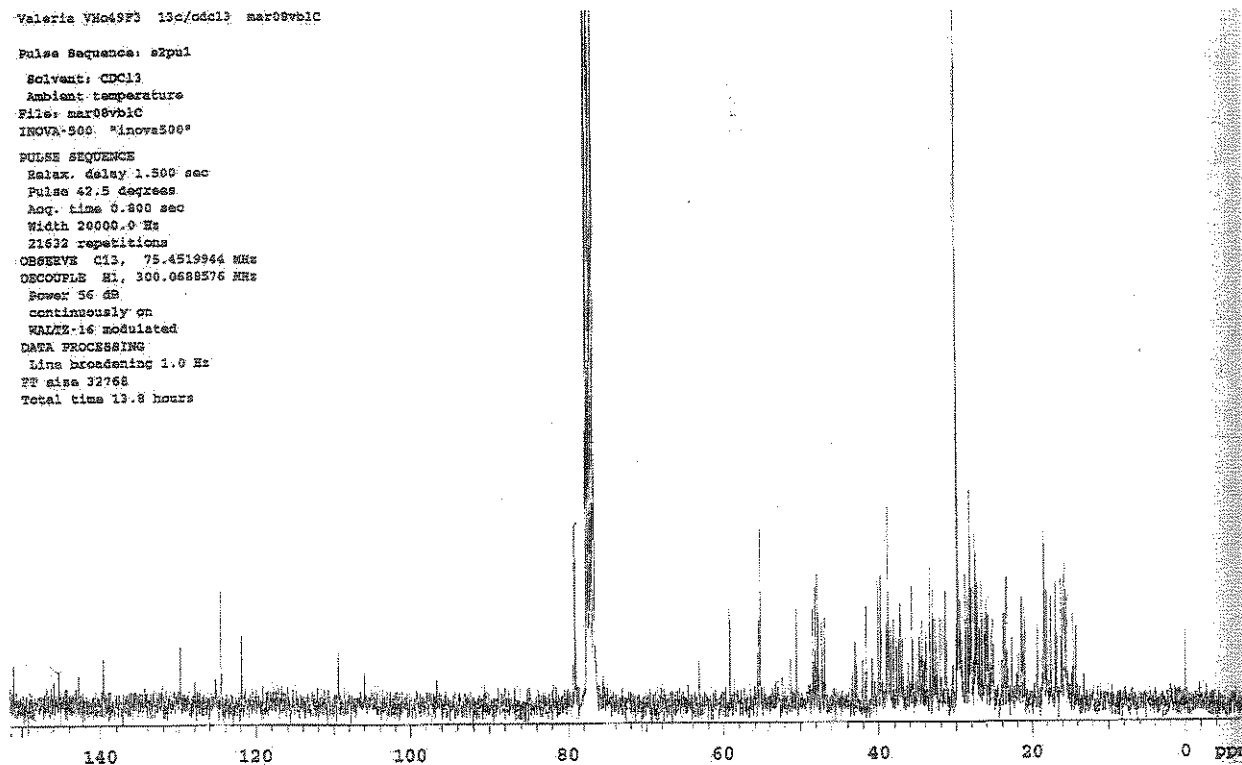
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

Line broadening 1.0 Hz

FT size 32768

Total time 13.8 hours



Esp. 43:- Espectro de RMN¹³C da fração VH49F3.

AP3

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CDCl3

Ambient temperature

File: sev08vbiE1

INOVA-500 "anraun"

PULSE SEQUENCE

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 30.0 degrees

Acq. time 3.595 sec

Width 4500.5 Hz

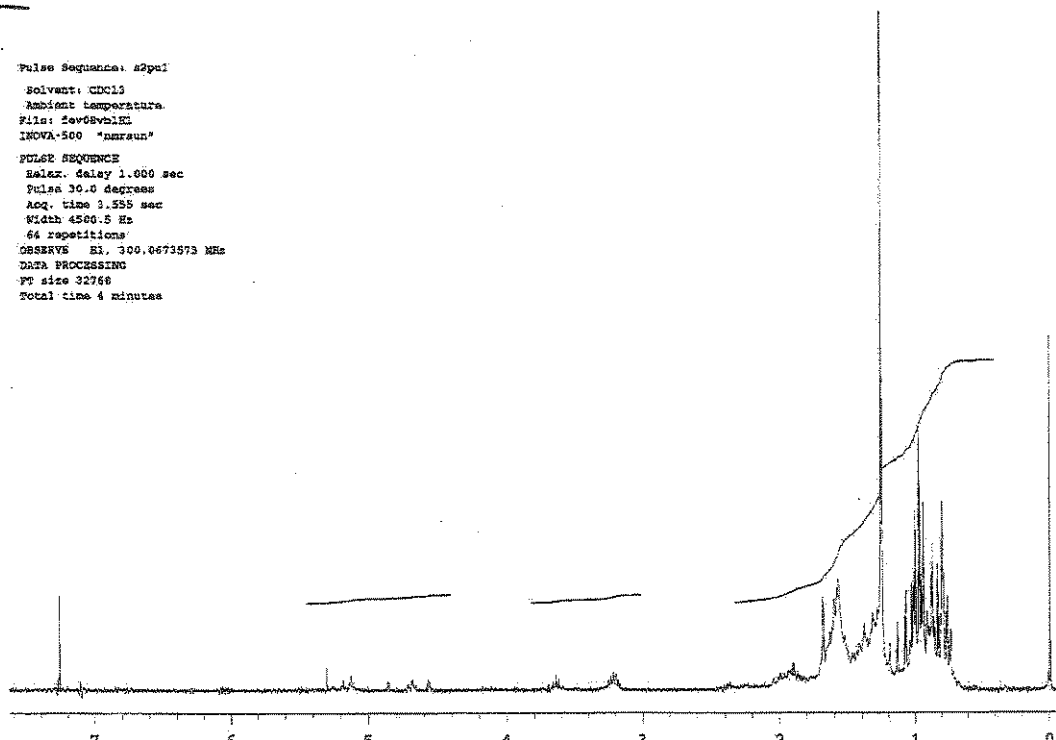
64 repetitions

OBSERVE H1, 300.0673573 MHz

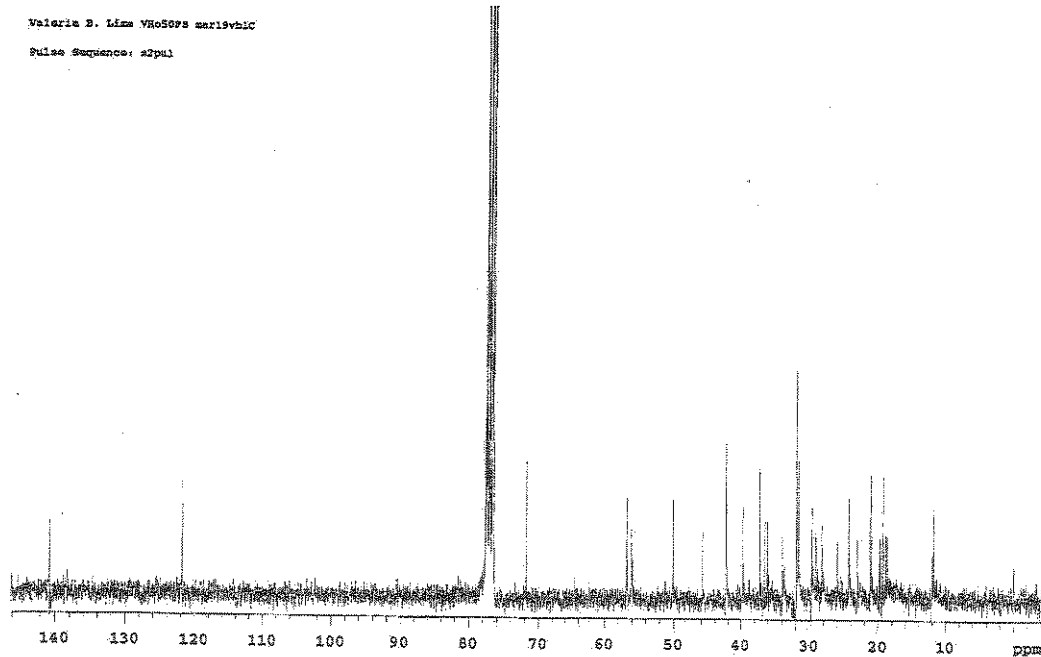
DATA PROCESSING

FT size 32768

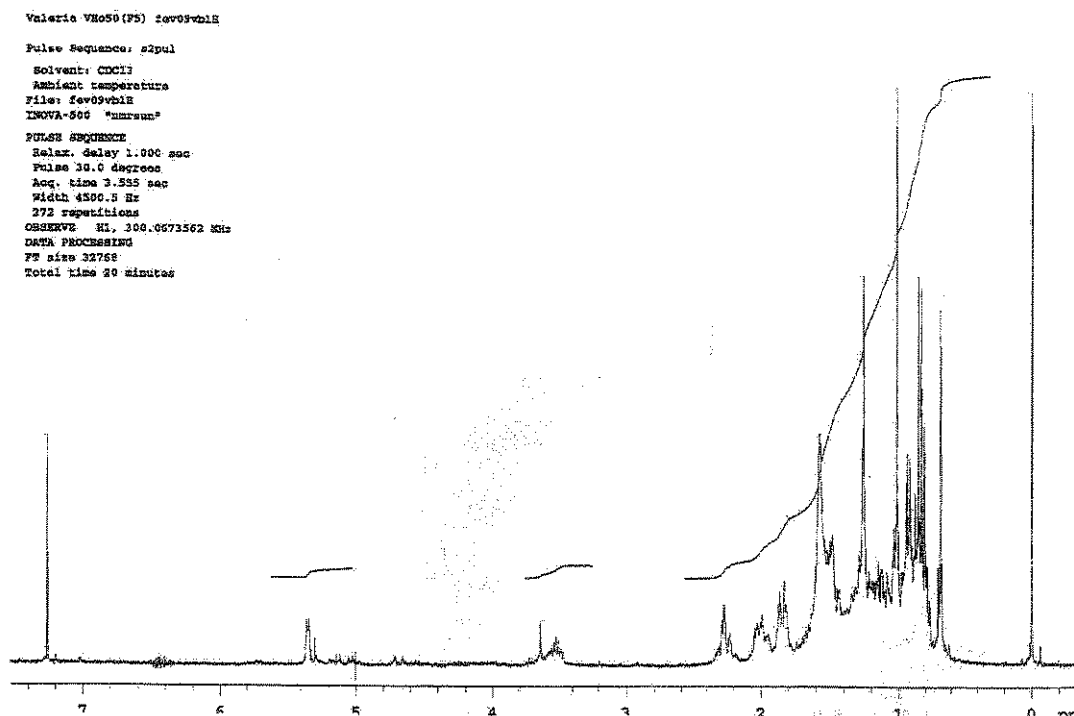
Total time 4 minutes



Esp. 44:- Espectro de RMN¹H da fração VH49F3.

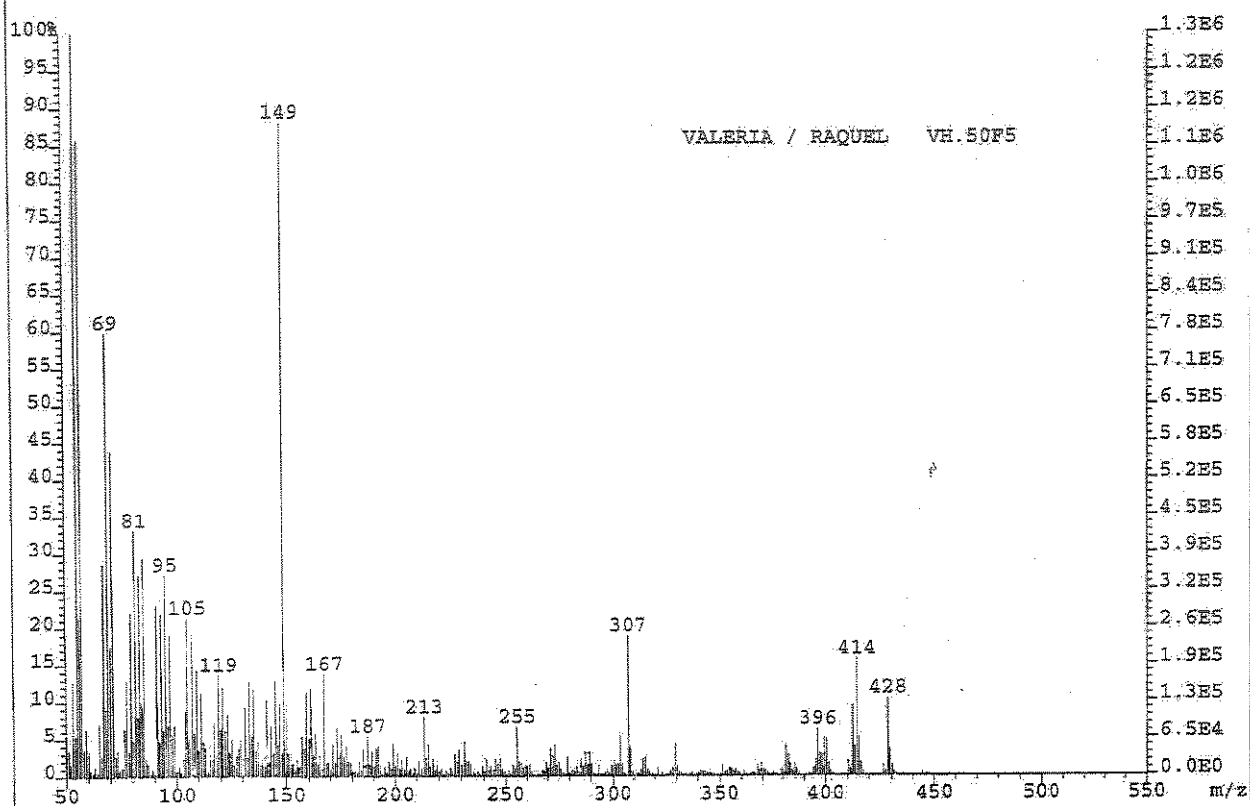


Esp. 45:- Espectro de RMN¹³C da fração VH50F5.



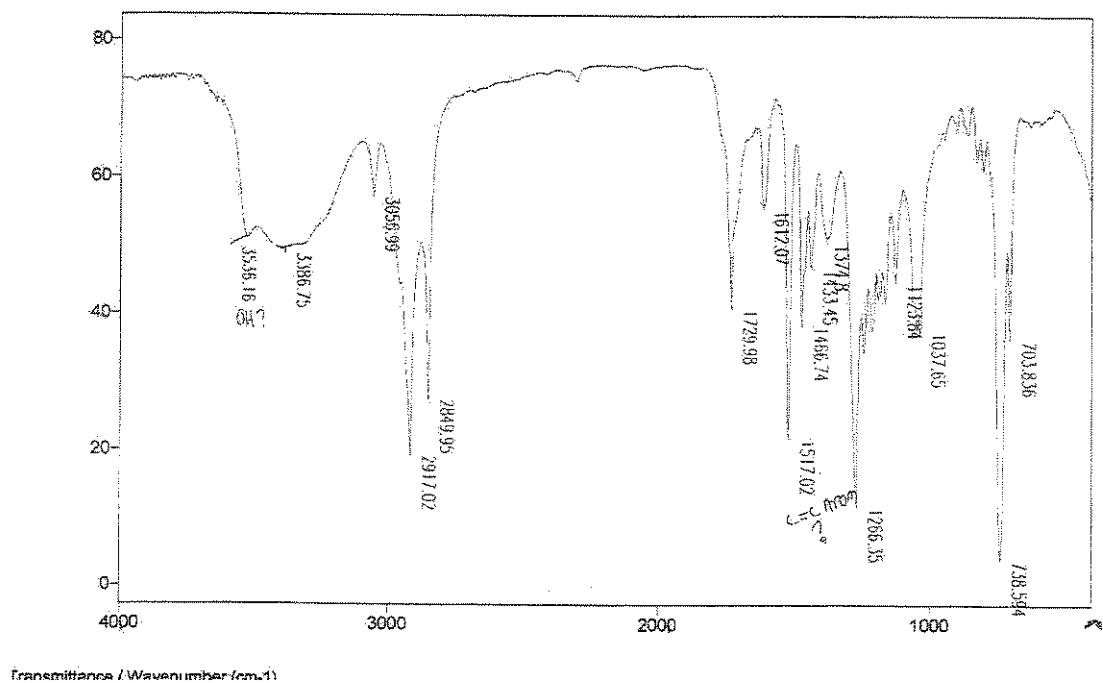
Esp. 46:- Espectro de RMN¹H da fração VH50F5.

File: MAR6-01 Ident: 62_81 Win 100PPM Acq: 6-MAR-2001 11:57:18 +8:10 Cal: MAR6-01
AutoSpecE EI+ Magnet BpM: 55 BpI: 1294515 TIC: 21800248 Flags: HALL

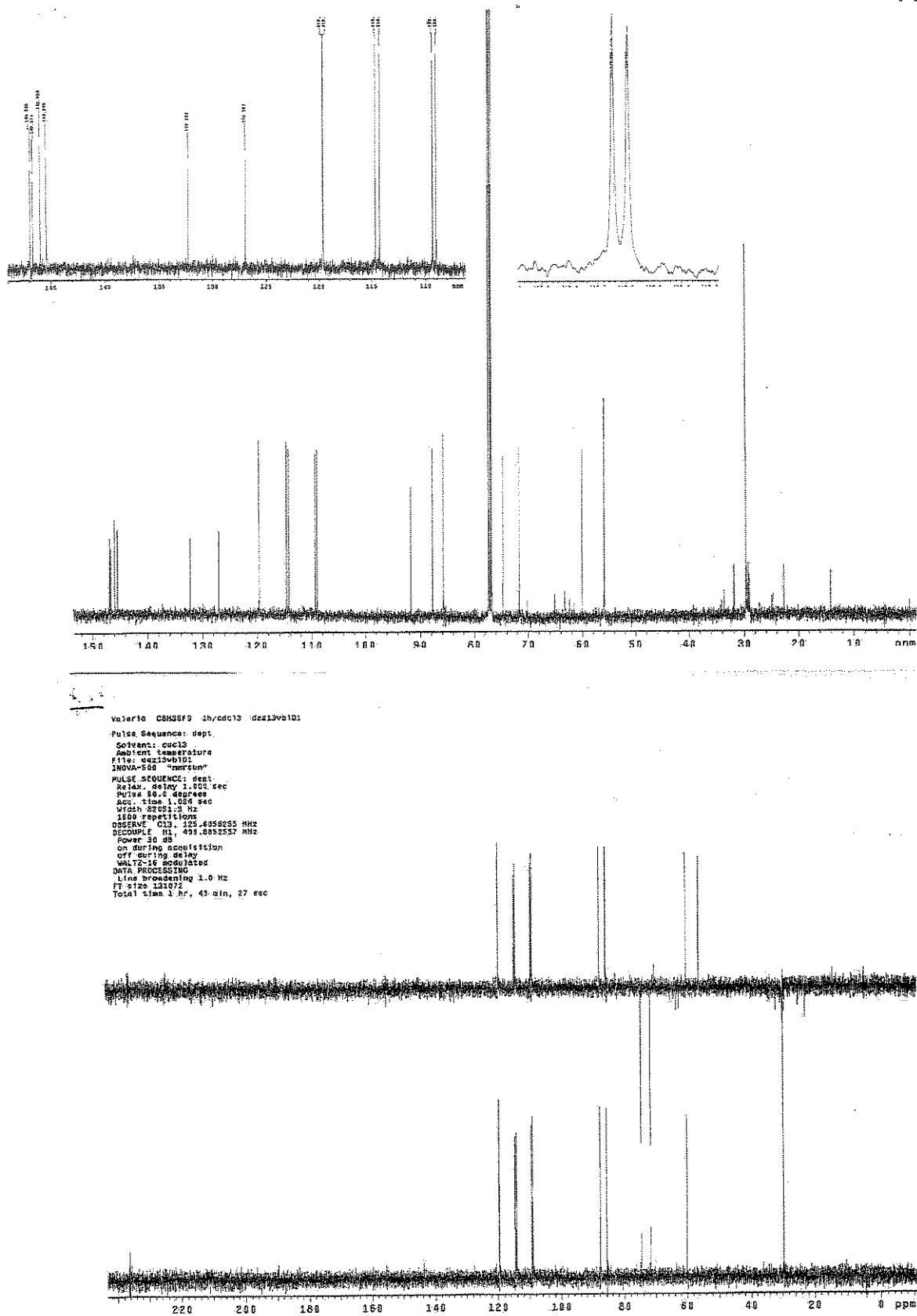


Esp. 47:- Espectro de massas da fração VH50F5.

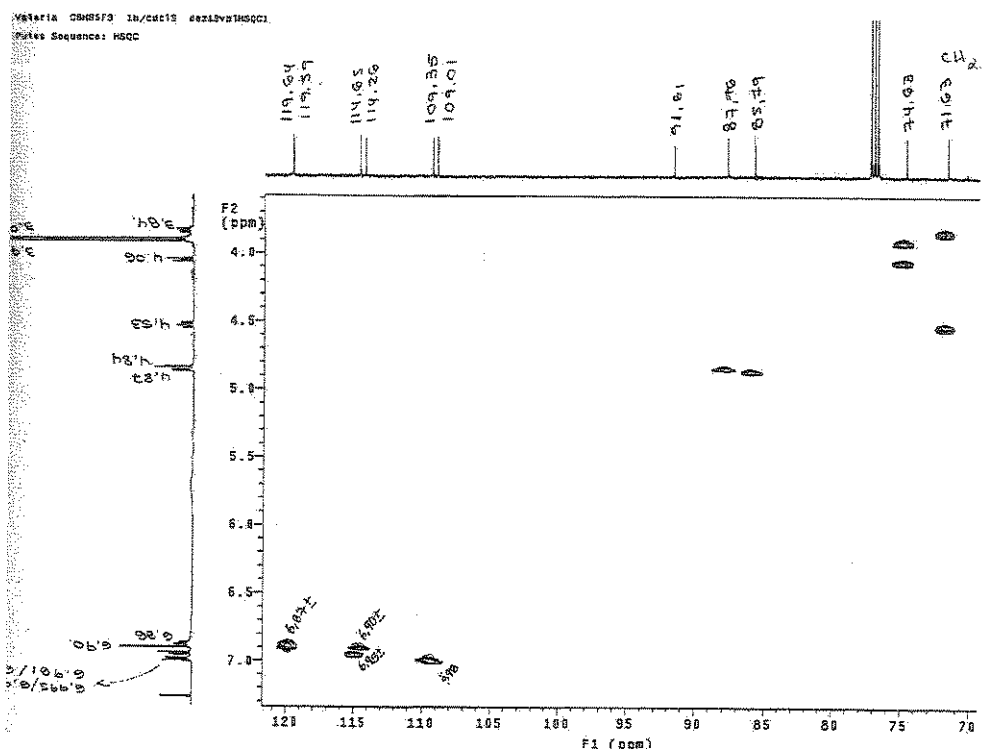
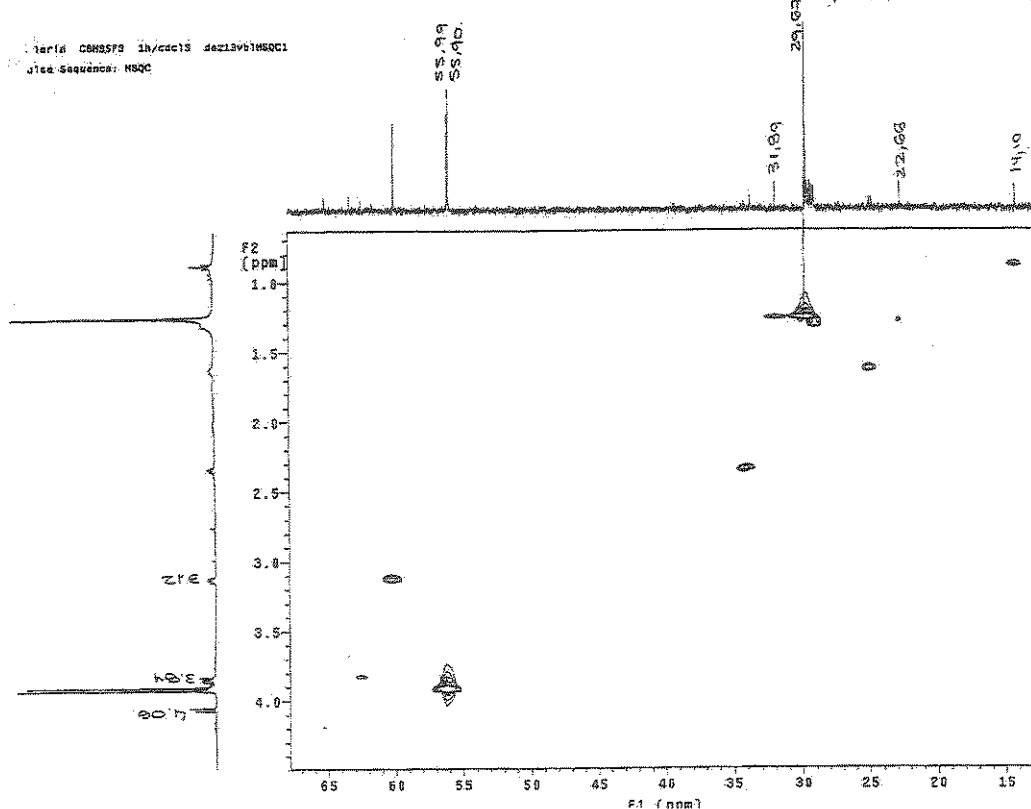
File # 1 : ACBH35F3 Mode = 2 (Mid-IR) 1/3/00 11:08 AM
 Sample Description: valeria filme
 Scans = 16 Res = 4 cm-1 20 scans/min Apod = Cosine



Esp. 48:- Espectro de IV do hidroxipinoresinol 68.

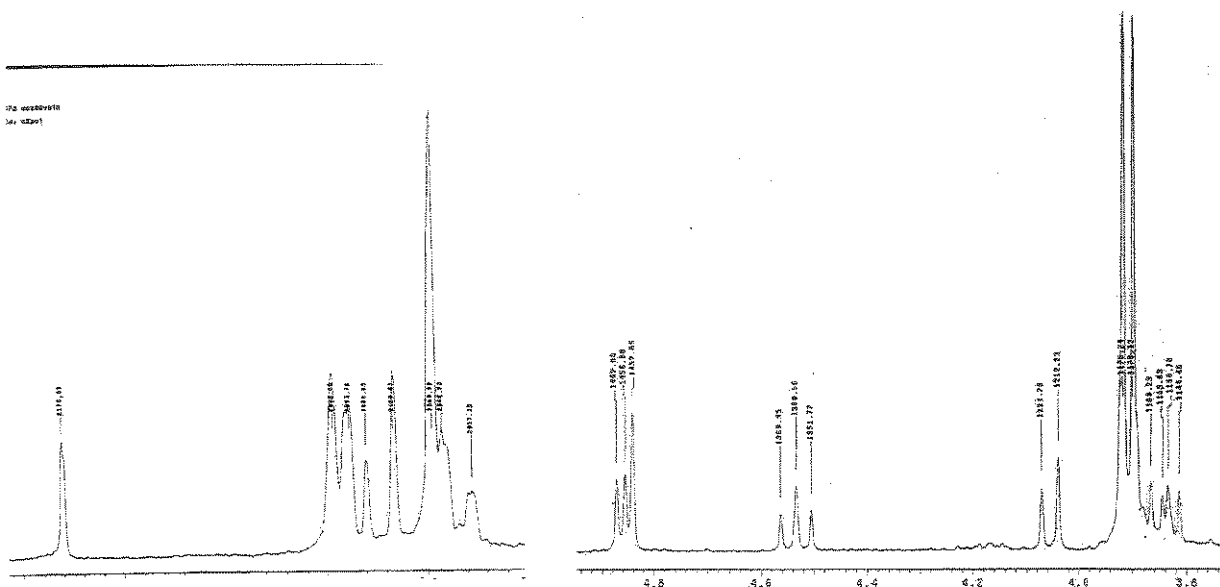


Esp. 49 e 50 :- Espectros de RMN ^{13}C e DEPT do hidroxipinoresinol 68.

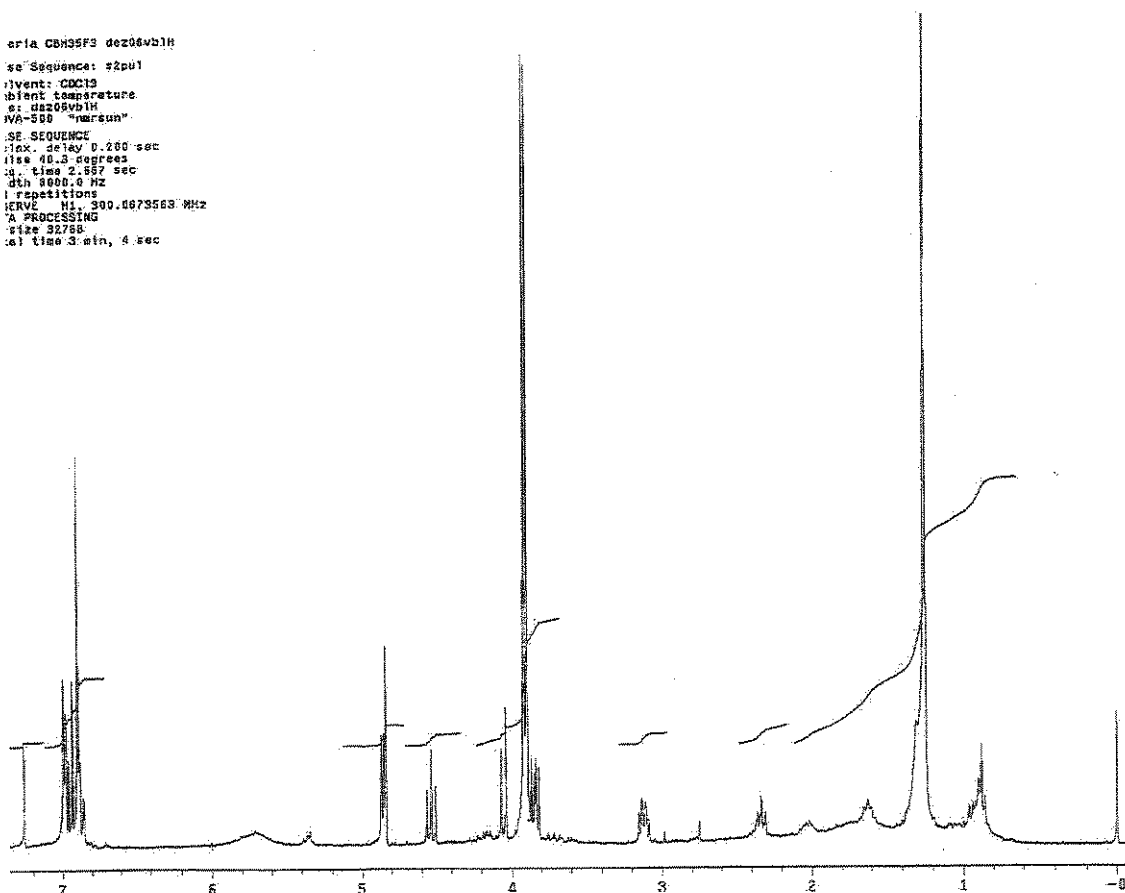


Esp. 51:- Espectro HSQC do hidroxipinoresinol 68.

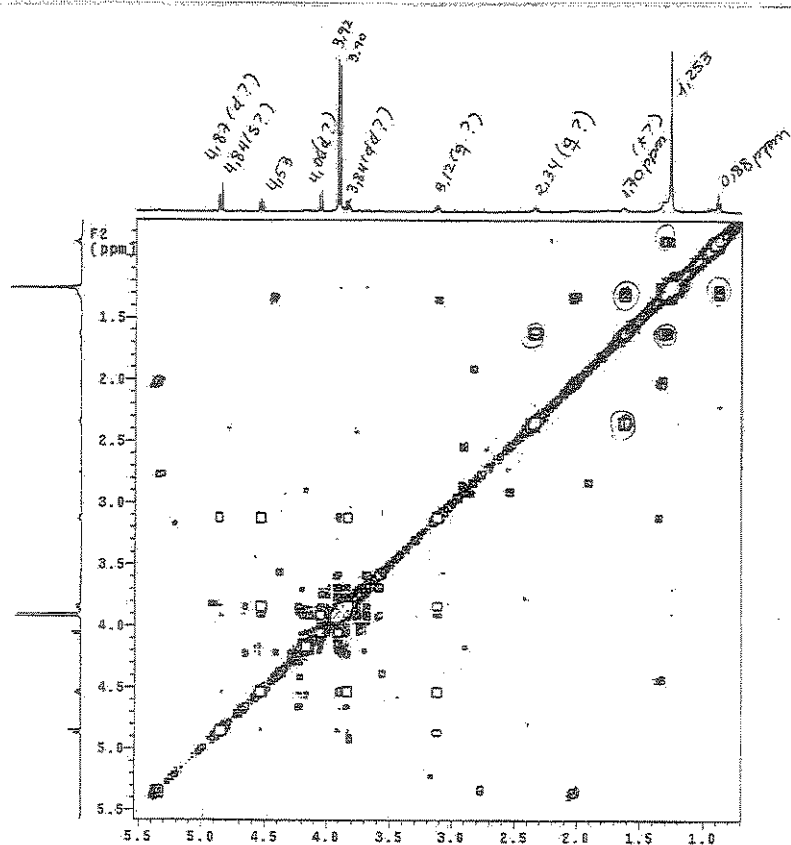
7A: 00000000
3A: 00000000



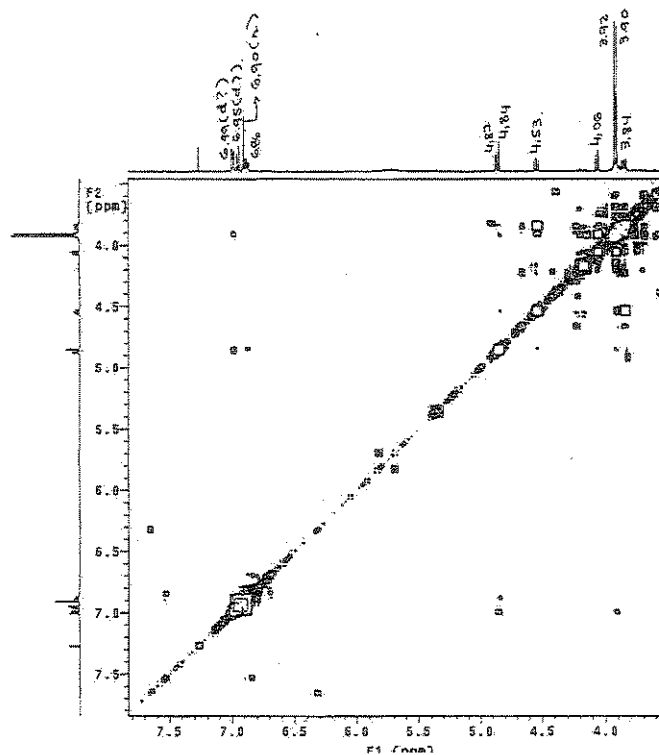
aria C0H95F3 de200vblH
se Sequence: #2pu1
Solvent: CDCl3
Solvent temperature:
e: de200vblH
NVA-500 "nucsun".
SE SEQUENCE
PICK: delay D: 200 sec
rise 40.0 degrees
acq. time 2.557 sec
Qth 8000.0 Hz
1 repetitions
F1: 300.1363563 MHz
A PROCESSING
size 32768
sol time 3 min, 4 sec

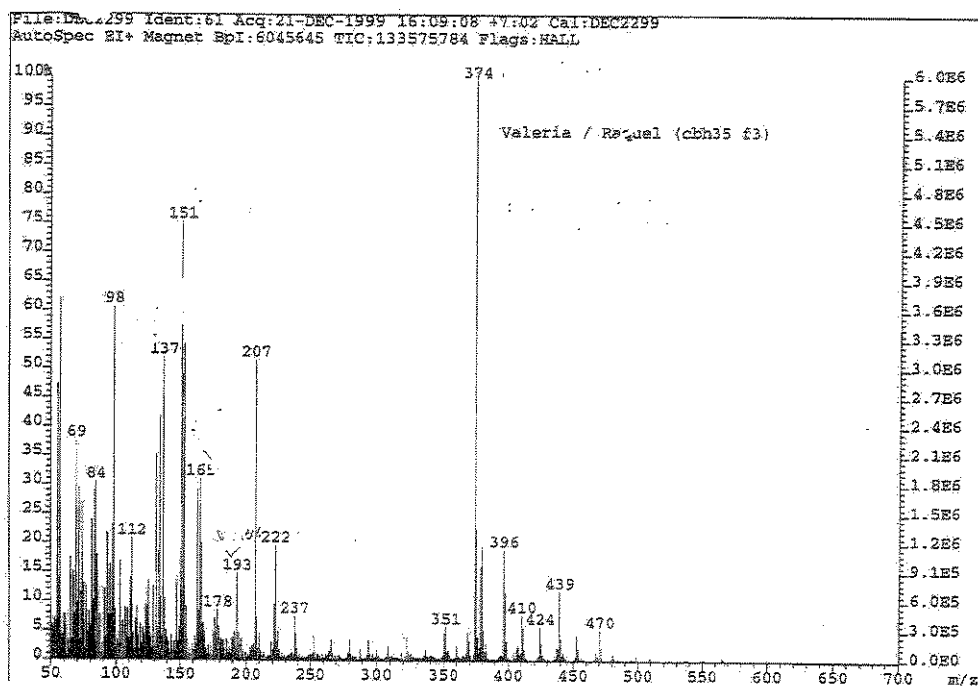


Esp. 52:- Espectro de RMN ^1H do hidroxipinoresinol **68**.



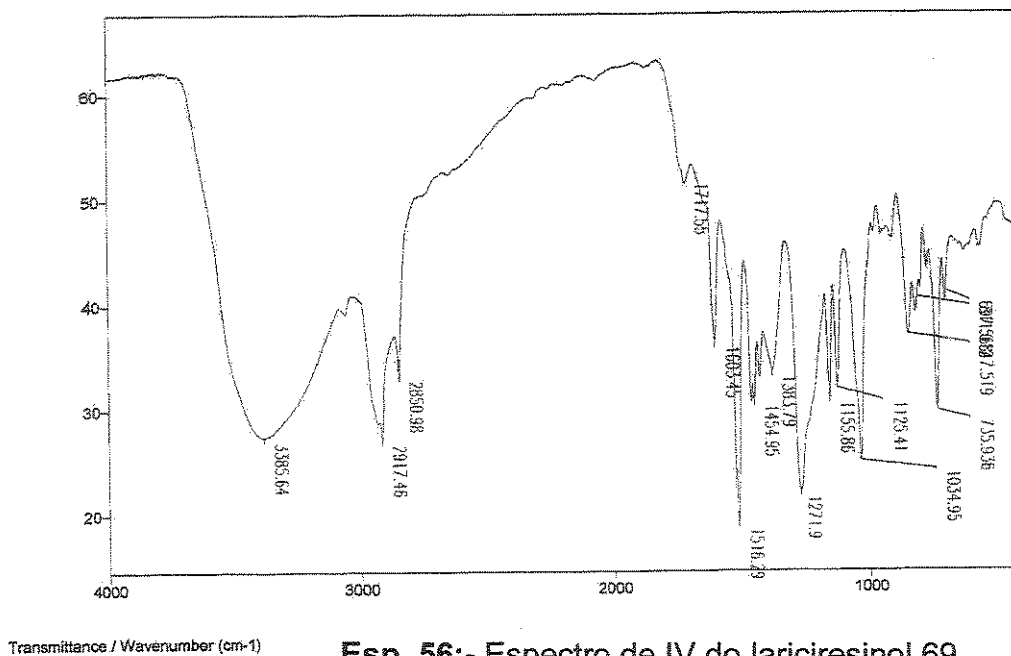
8vb1gCOSY1

Esp. 53:- Espectro gCOSY do hidroxipinoresinol 68.

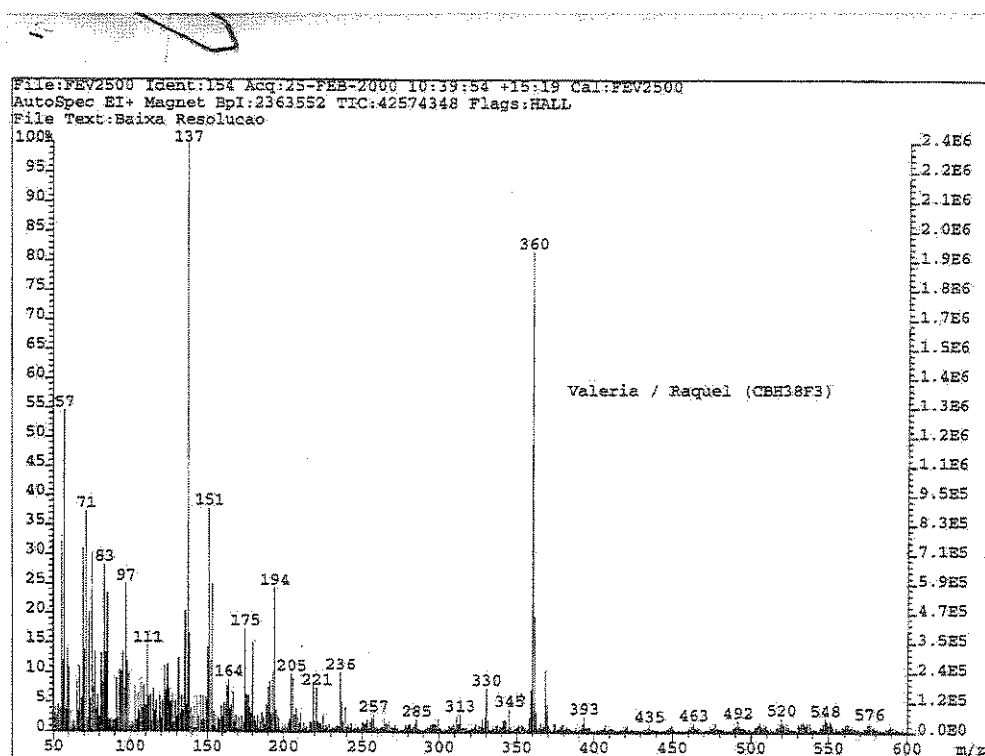


Esp. 55:- Espectro de massas do hidroxipinoresinol 68

File # 1: CBH38F3 Mode = 2 (Mid-IR) 2/28/00 10:51 AM
 Sample Description: Valeria Filme
 Scans = 16 Res = 4 cm-1 20 scans/min Apod = Cosine



Esp. 56:- Espectro de IV do lariciresinol 69.

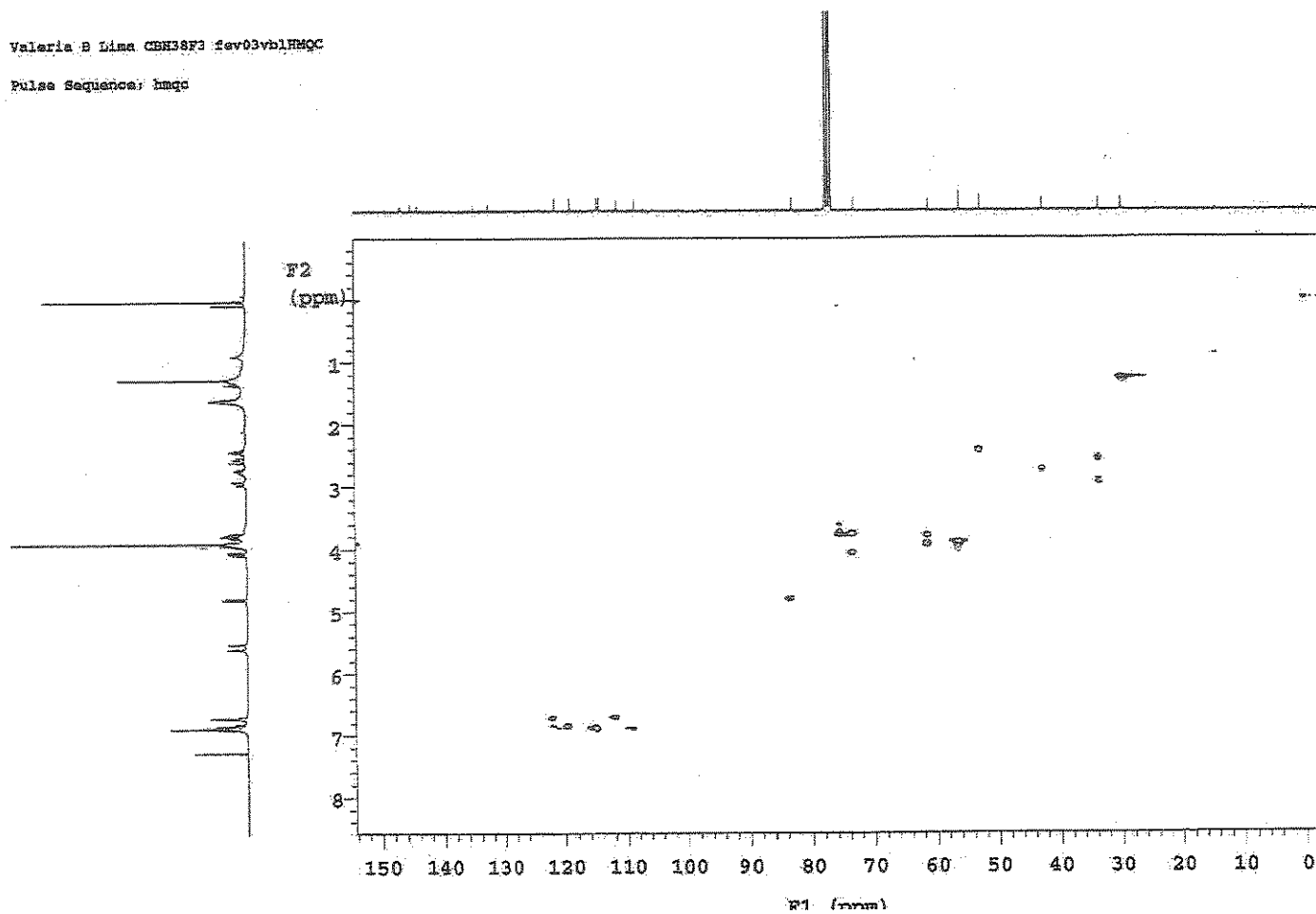


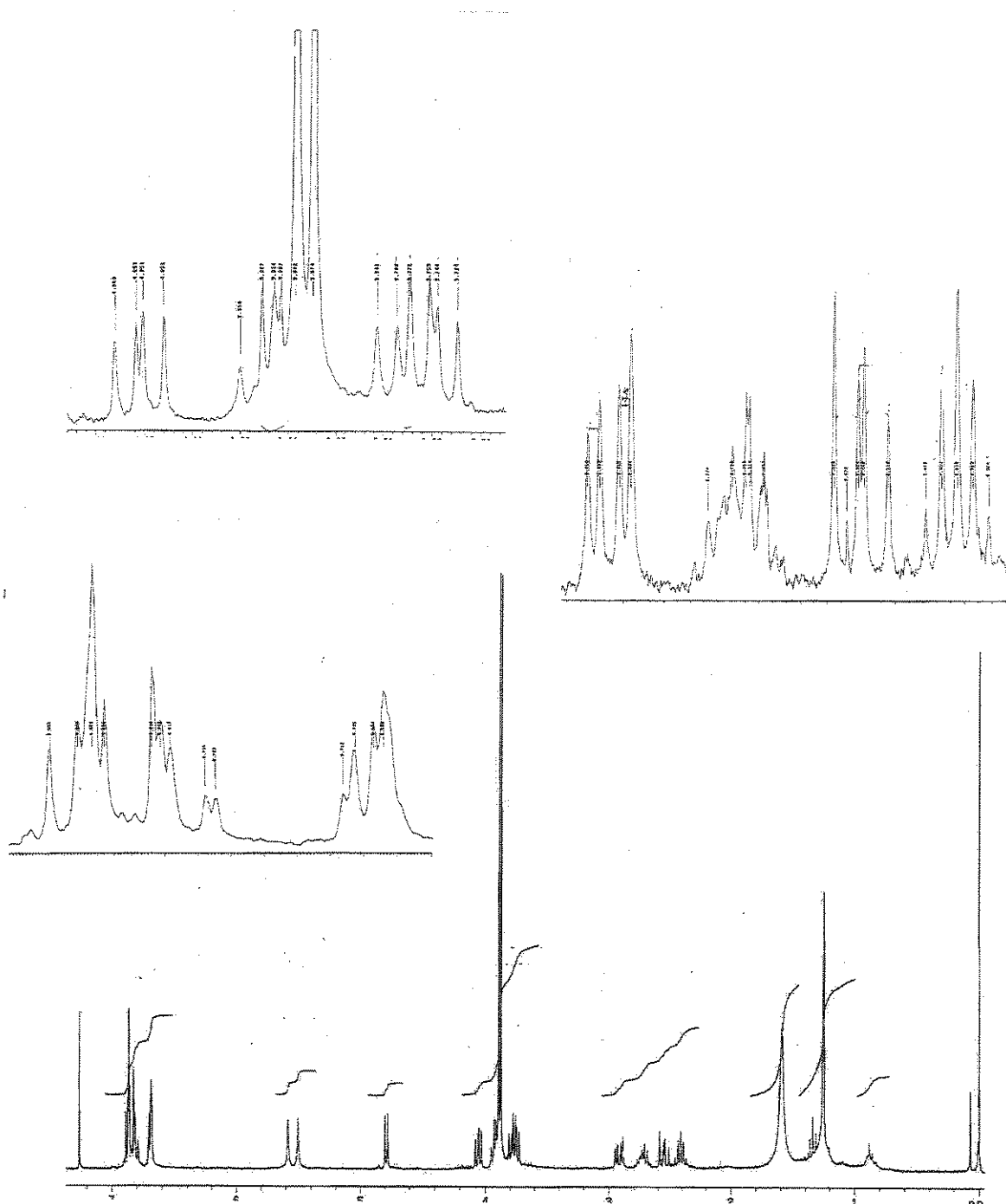
Esp. 57:- Espectro de massas do lariciresinol 69.



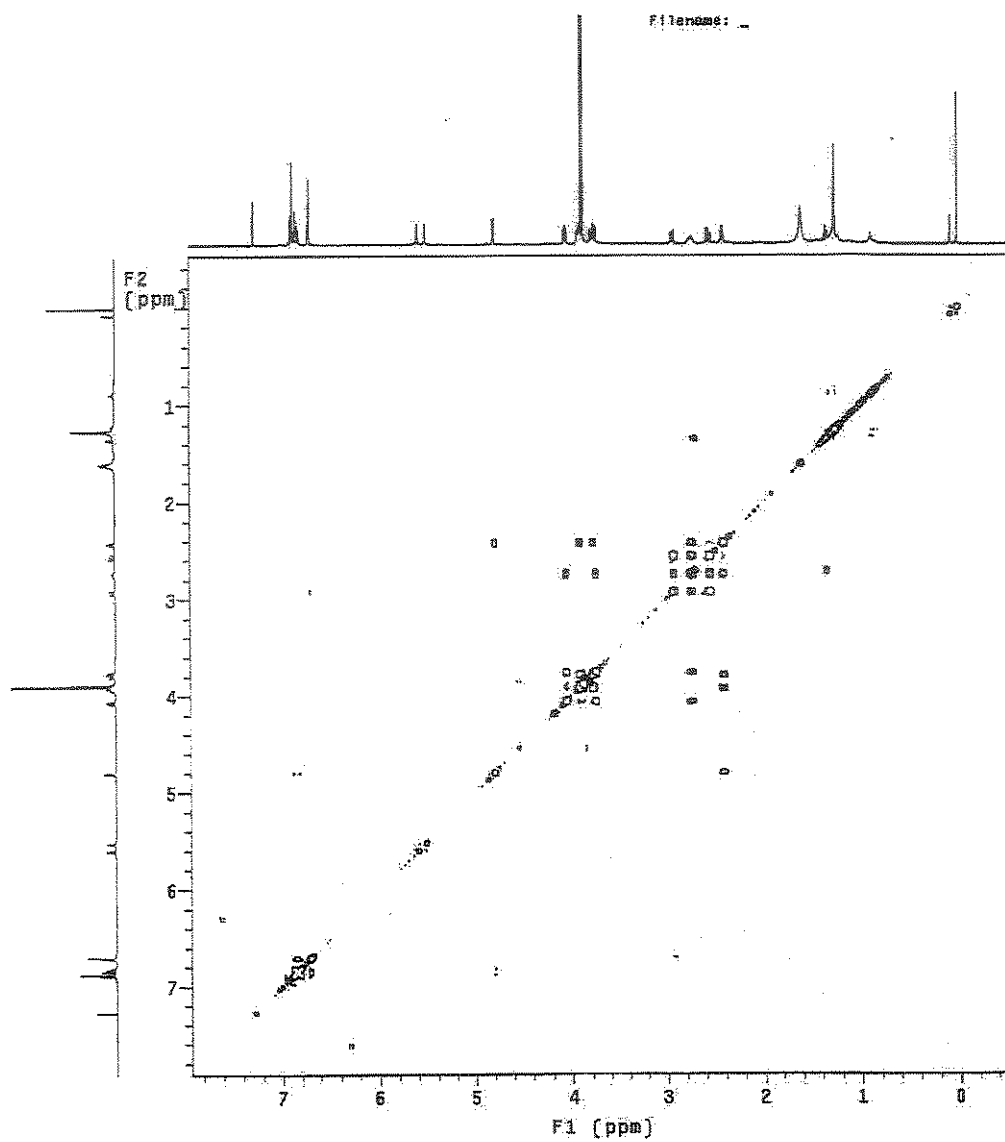
Valeria B Lima CEN38F3 fev03vblHMQC

Pulse Sequence: hmqc

Esp. 60:- Espectro HMQC do lariciresinol 69.



Esp. 61:- Espectro de RMN ^1H do lariciresinol 69.



Esp. 62:- Espectro gCOSY do lariciresinol 69.

File: # 1 - CBH40F-1

Mode = 2 (Mid-IR)

7/7/00 10:24 AM

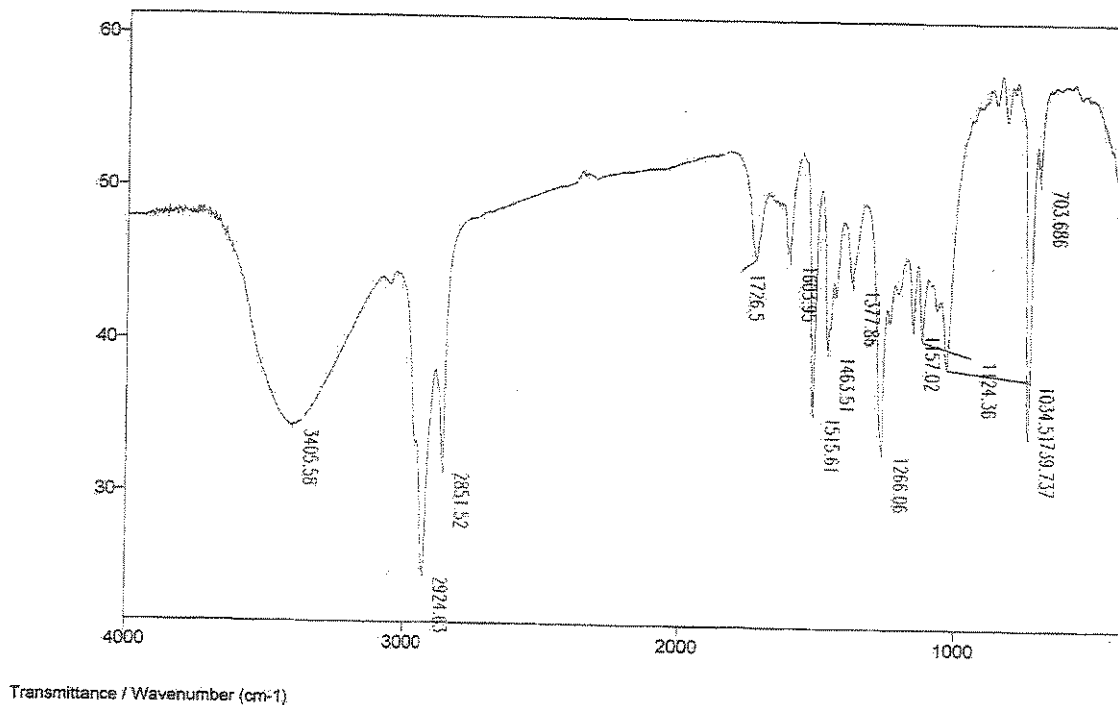
Sample Description: Valeria filme

Scans = 16

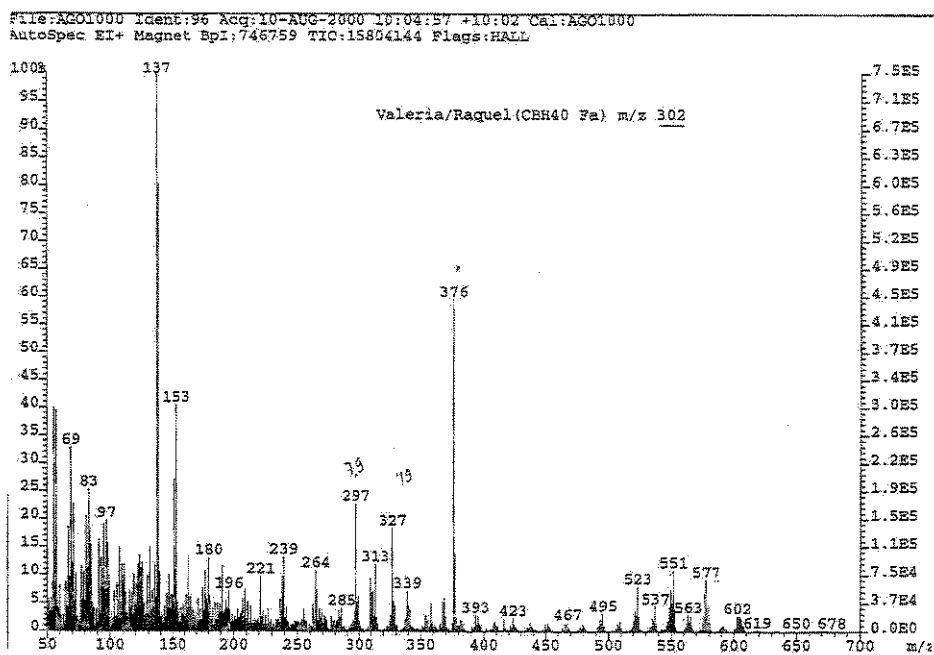
Res = 4 cm-1 20 scans/min

Apod = Cosine

160

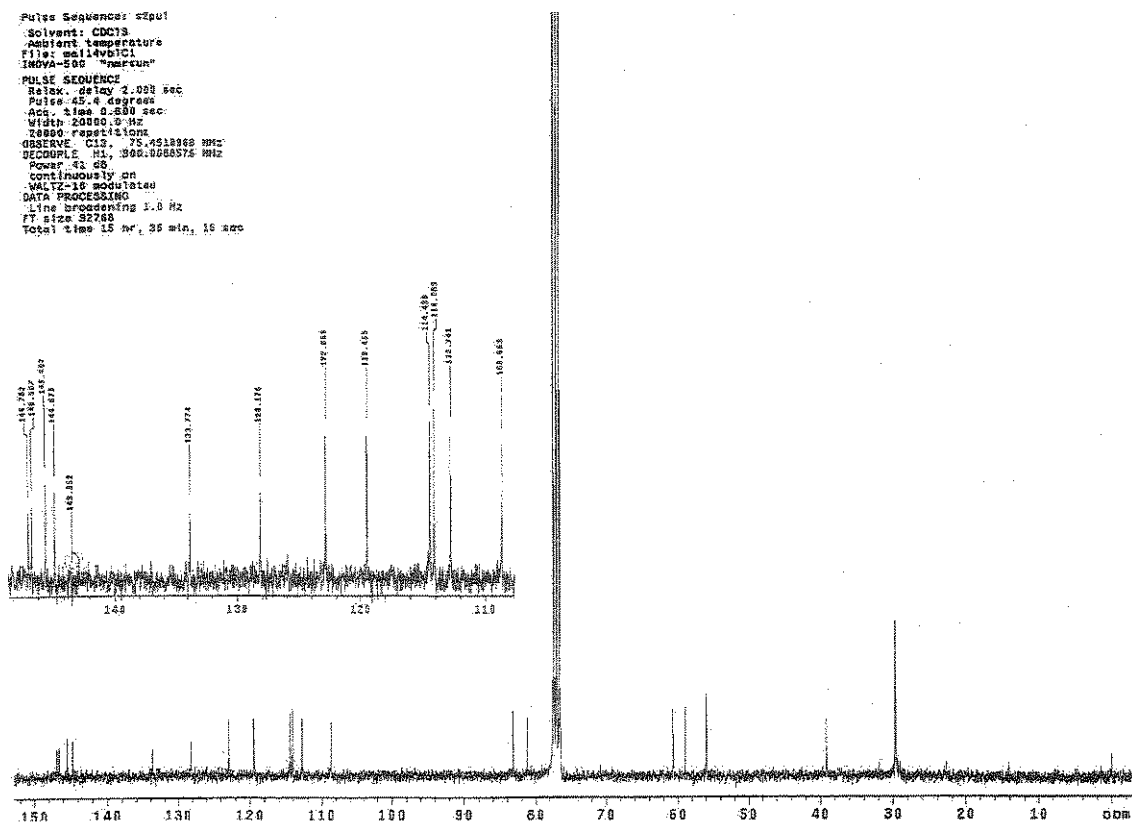


Esp. 63:- Espectro de IV do olivil 70.

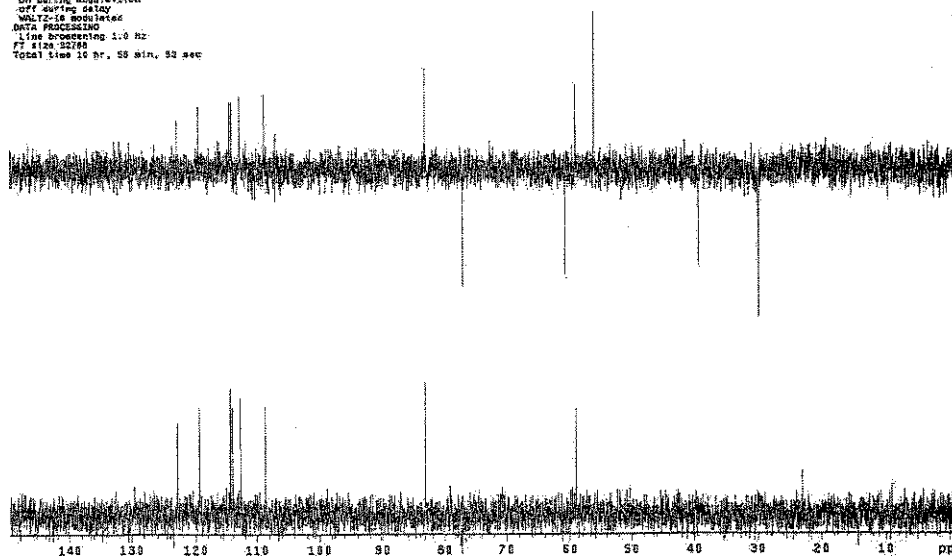


Esp. 64 :- Espectro de massas do olivil 70.

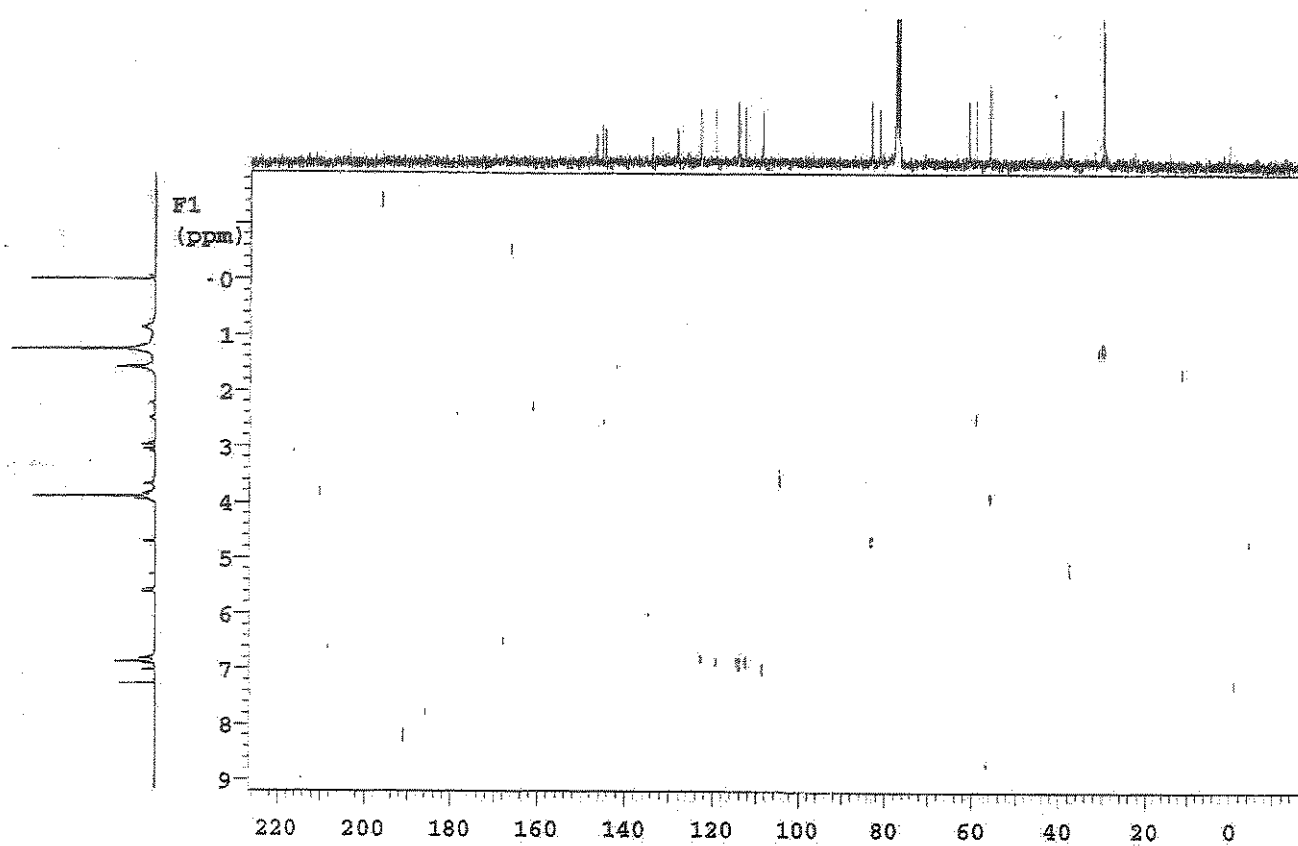
Pulse Sequence: zgpg30
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 File: m014v0101
 INOVA-500 "mestun"
 PULSE SEQUENCE
 Relax. delay 2.000 sec
 Pulse: 45.0 degrees
 Acq. time 0.500 sec
 Width 20000.0 Hz
 7000 repetitions
 OBSERVE: C13, 75.4518968 MHz
 DECOUPLE: H1, 200.608575 MHz
 Power 43.00
 continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 32768
 Total time 10 hr, 35 min, 16 sec



Vectoria CDMS01 CDCl3 m014v010
 Pulse Sequence: zgpg30
 Solvent: cdcl3
 Ambient temperature
 File: m014v0101
 INOVA-500 "mestun"
 PULSE SEQUENCE: zgpg30
 Relax. delay 2.000 sec
 Pulse: 45.0 degrees
 Acq. time 0.500 sec
 Width 17500.0 Hz
 7000 repetitions
 OBSERVE: C13, 75.4518968 MHz
 DECOUPLE: H1, 200.608575 MHz
 Power 43.00
 on during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 32768
 Total time 10 hr, 35 min, 32 sec

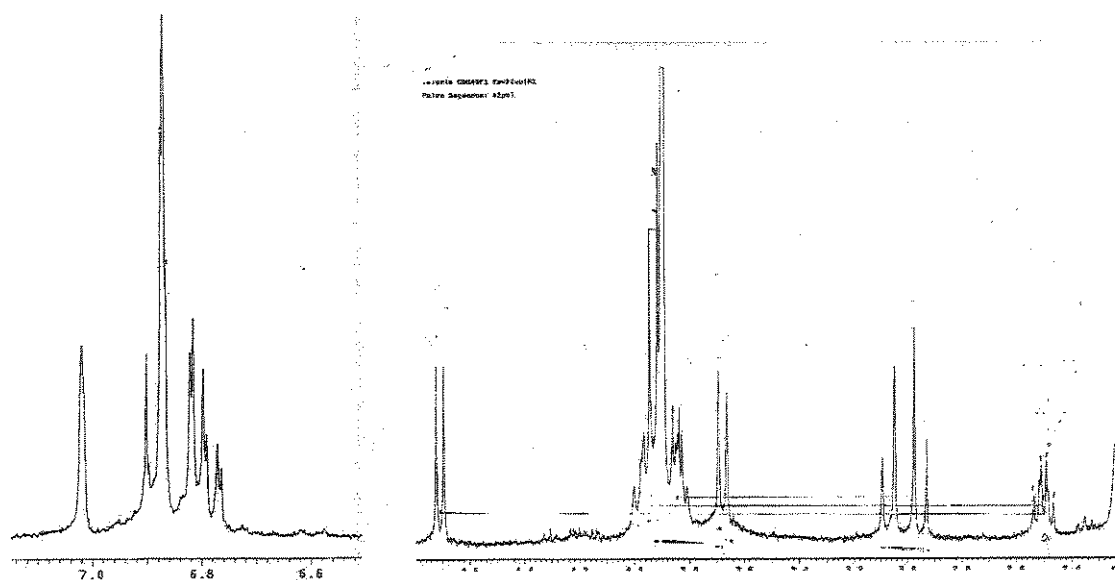
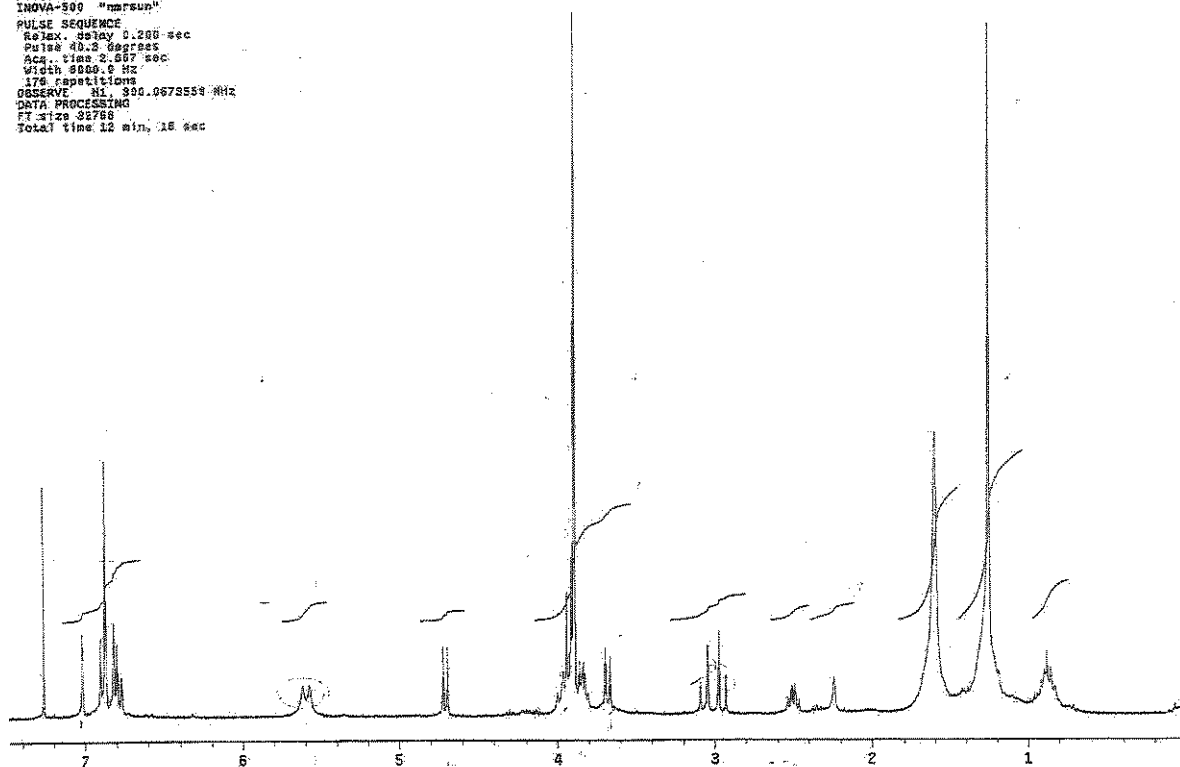


Esp. 65 e 66 :- Espectros de RMN ^{13}C e DEPT do olivil 70.

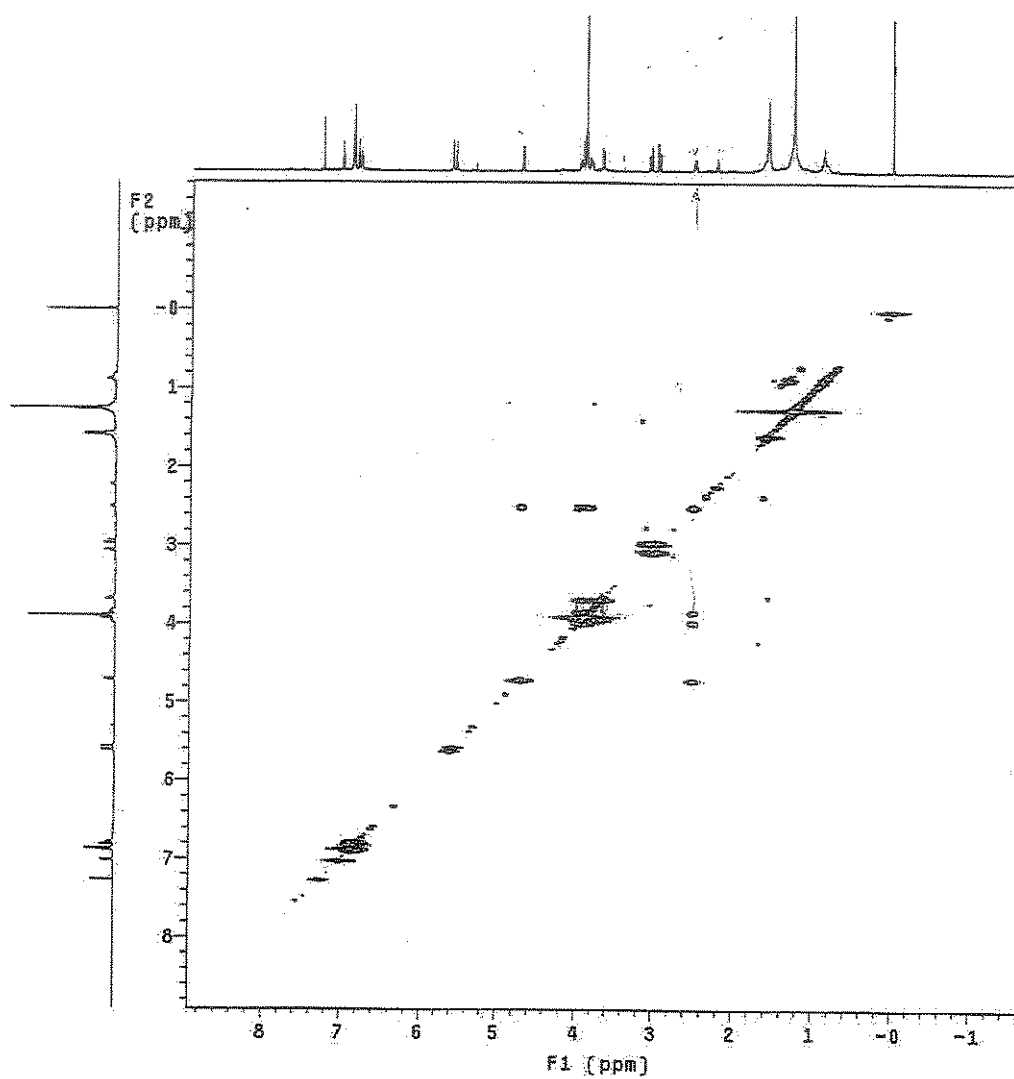


Esp. 67:- Espectro HETCOR do olivil 70.

Valeria CDR40F1 fav22vb1M2
Pulse Sequence: zgpg30
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
File: fav22vb1M2
INOVA-500 "marsup"
PULSE SEQUENCE
Relax. delay 0.200 sec
Pulse 40.0 degrees
Acq. time 2.557 sec
Width 9000.0 Hz
170 repetitions
OBSERVE: H1, 300.0673553 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 12 min, 18 sec

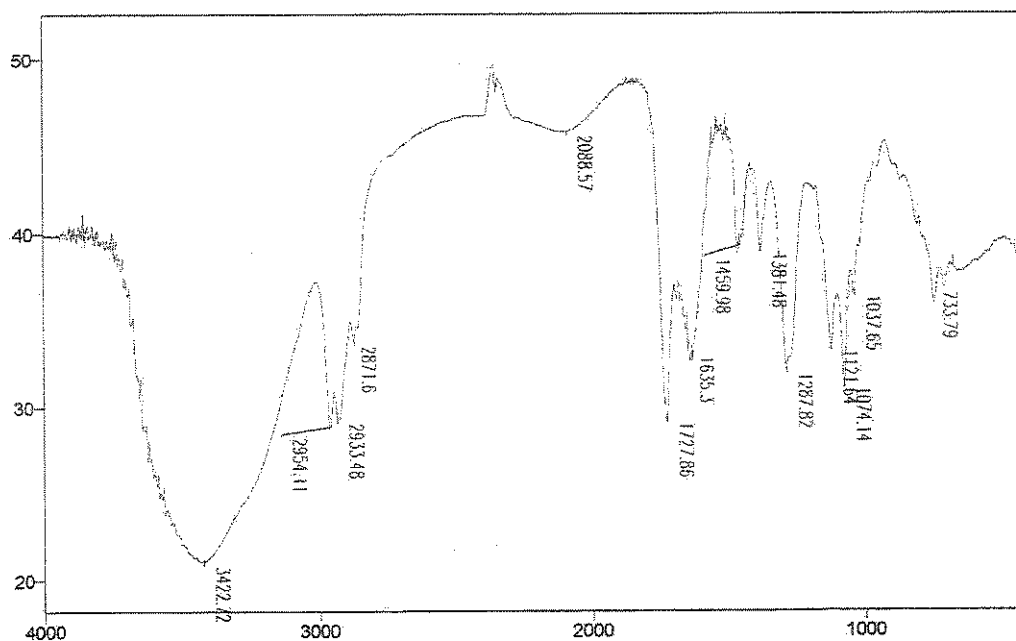


Esp. 68:- Espectro de RMN ^1H do olivil 70.



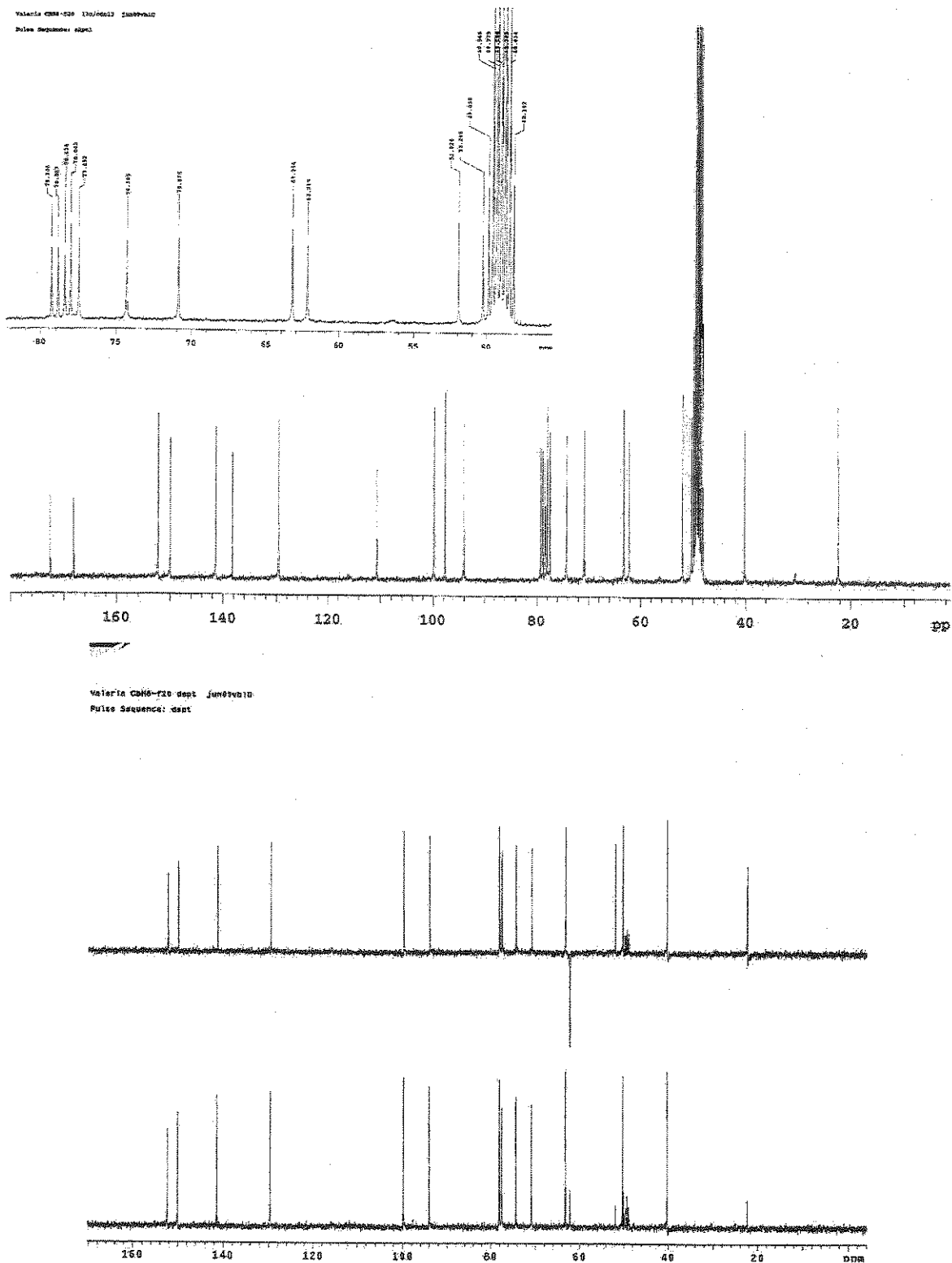
Esp. 69:- Espectro gCOSY do olivil 70.

File # 1: CBH0F20 Mode = 2 (Mid-IR) 5/26/99 3:23 PM
Sample Description: Val'eria filmes
Scans = 16 Res = 4 cm-1 20 scans/min Apod = Cosine

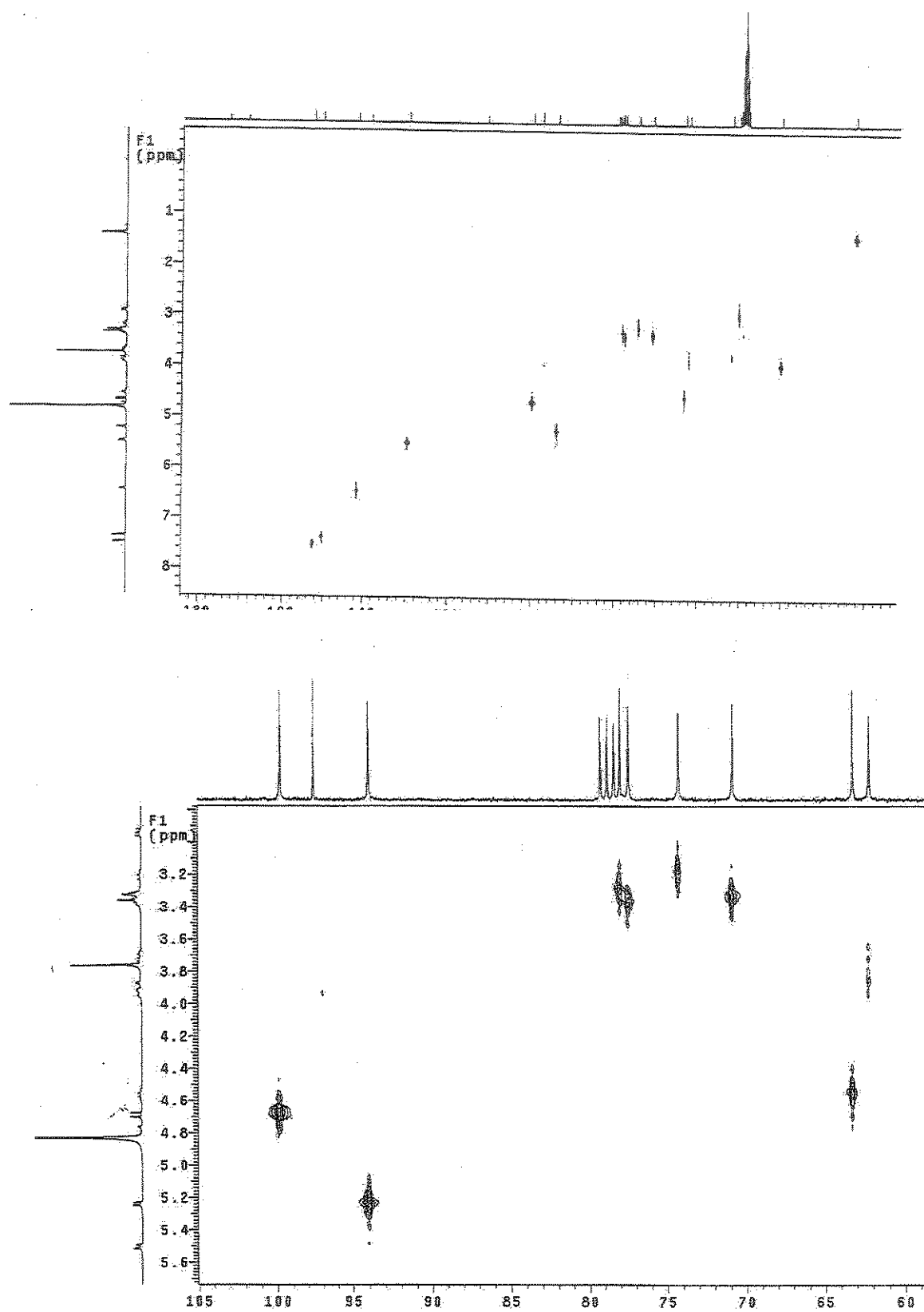


Transmittance / Wavenumber (cm-1)

Esp.70:- Espectro de IV do plumieride 11.



Esp. 71 e 72:- Espectros de RMN ^{13}C e DEPT do plumieride 11.



Esp. 73:- Espectro HETCOR do plumieride 11.

Valeria CBH8F20 jun07vb124

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: cd3od

Ambient temperature

File: jun07vb124

INOVA-500 "narsun"

PULSE SEQUENCE

Relax. delay 0.200 sec.

Pulse 30.7 degrees

Acq. time 2.667 sec

Width 5000.0 Hz

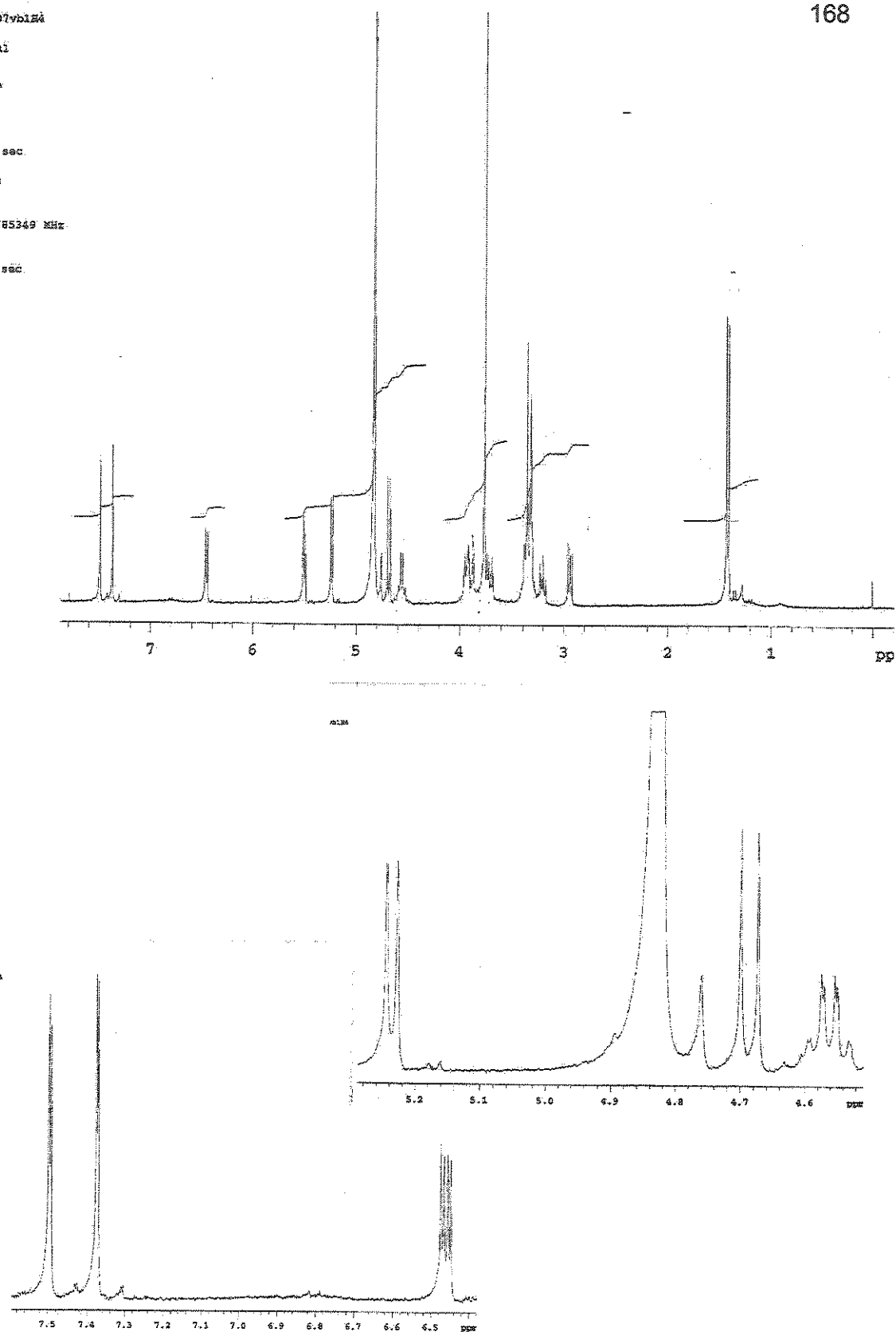
48 repetitions

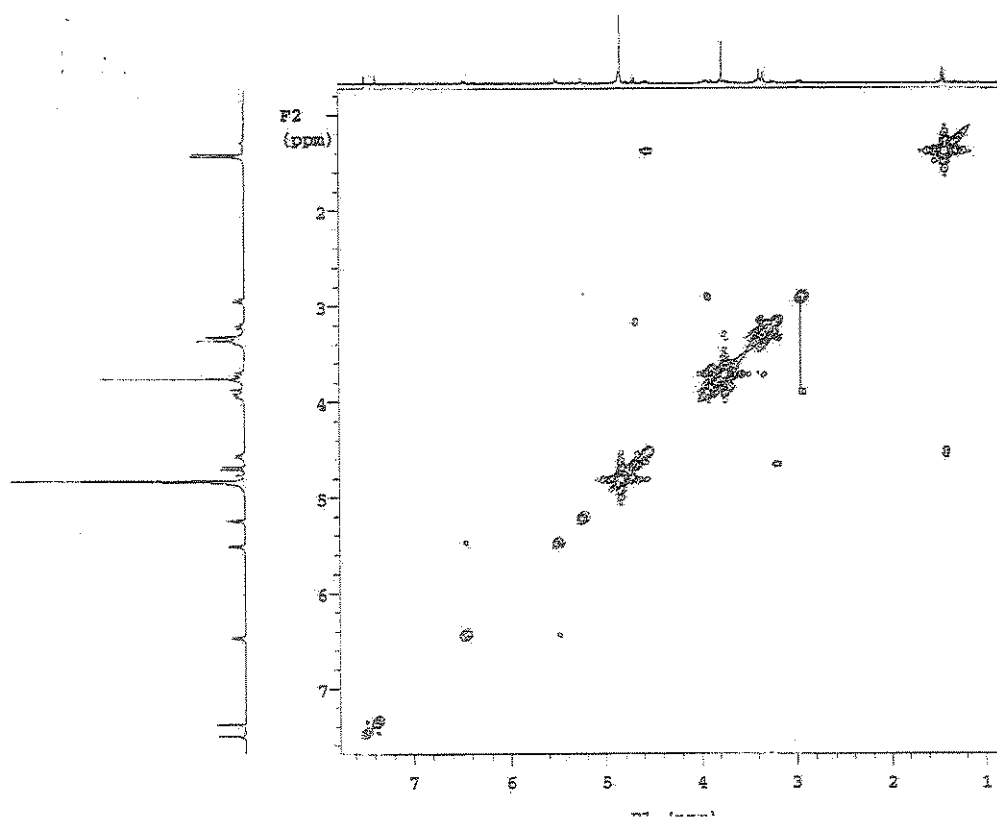
OBSERVE H1, 300.0685349 MHz

DATA PROCESSING

FT size 32768

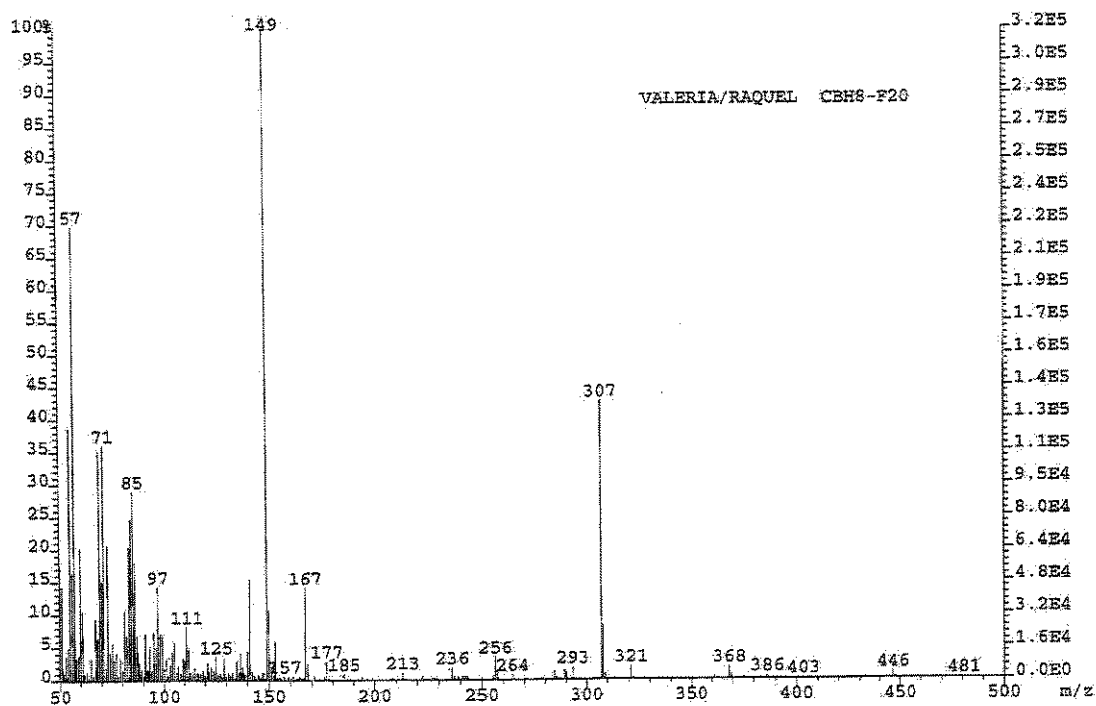
Total time 3 min, 4 sec.

Esp. 74:- Espectro de RMN ^1H do plumieride 11.



Esp. 75:- Espectro COSY do plumieride 11.

File:MAI27A Ident:453_459 Win 1000PPM Acq:27-MAY-1999 15:16:34 +45:05 Cal:MAI27A
AutoSpec EI+ Magnet BpM:149 BpI:318034 TIC:2867215 Flags:HALI



Esp. 76:- Espectro de massas do plumieride 11.

File # 1: ~~C832624~~ C831 F4

Mode = 2 (Mid-IR)

10/27/99 10:23 AM

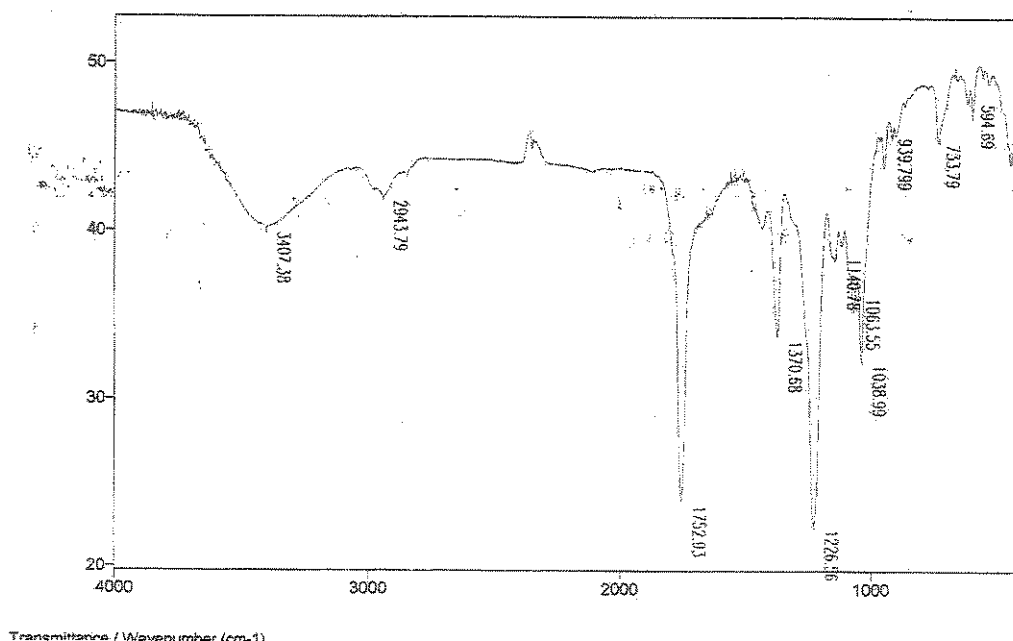
Sample Description: Valeria filme

Scans = 16

Res = 4 cm-1 20 scans/min

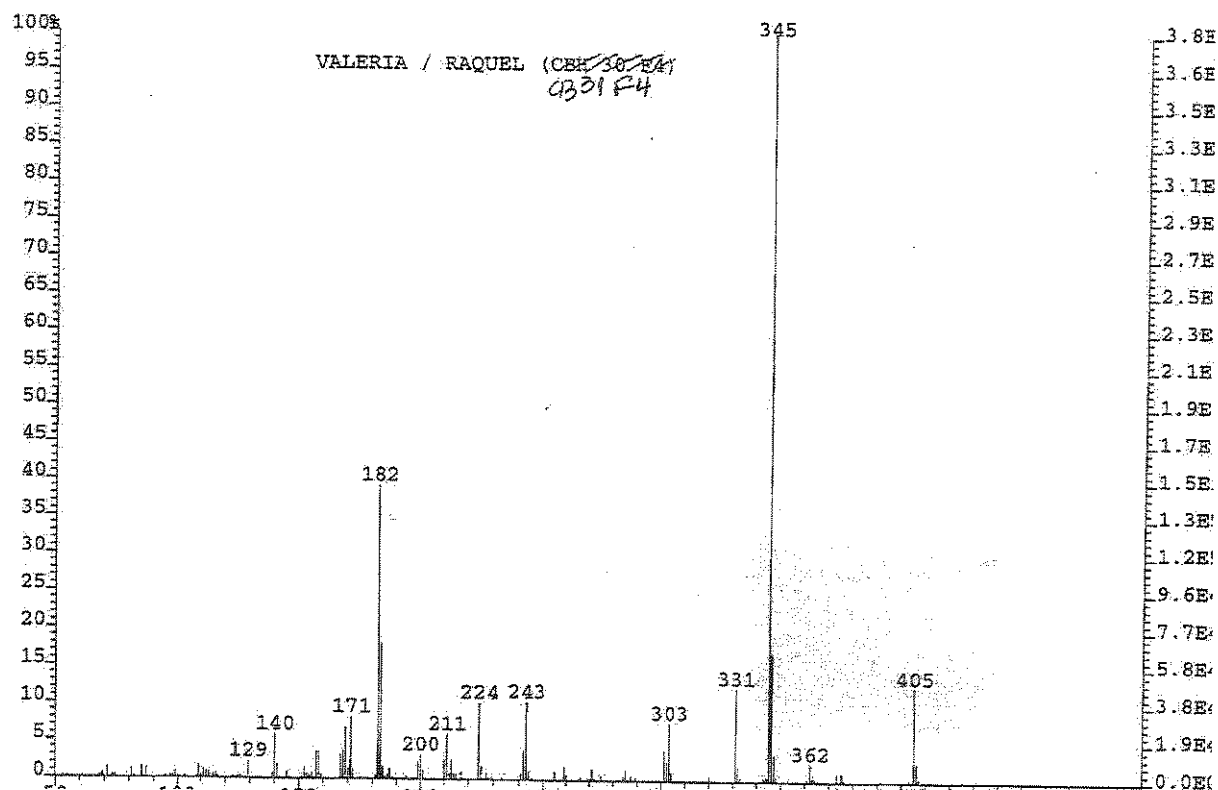
Apod = Cosine

170

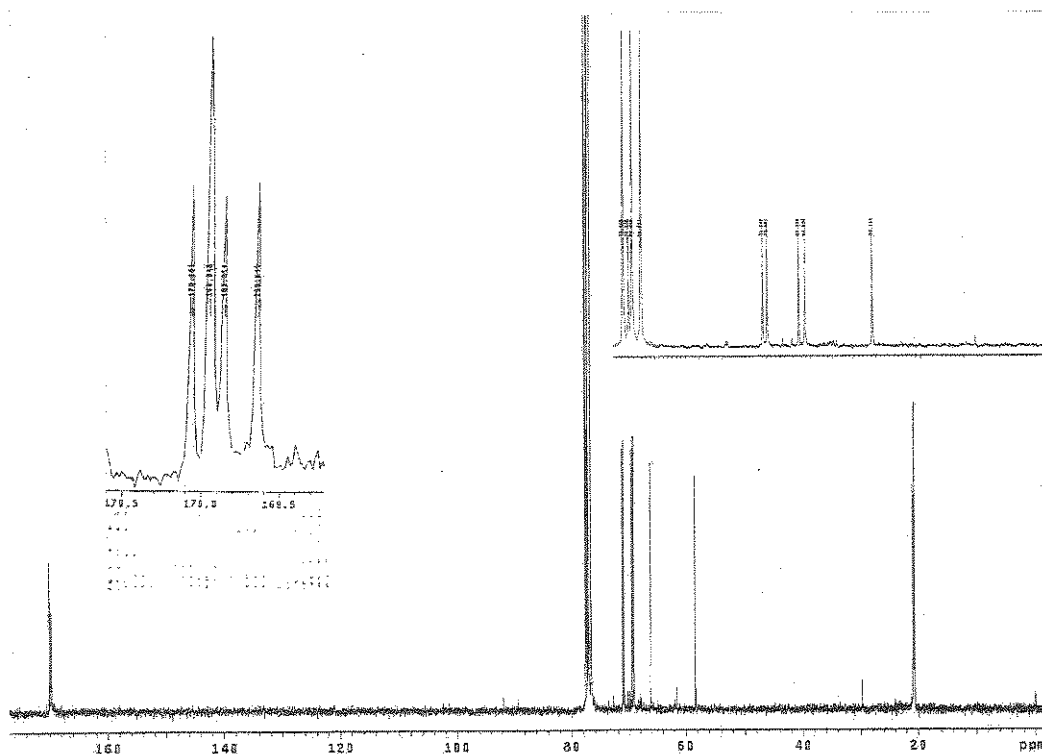


Esp. 77:- Espectro de IV do inositol 71.

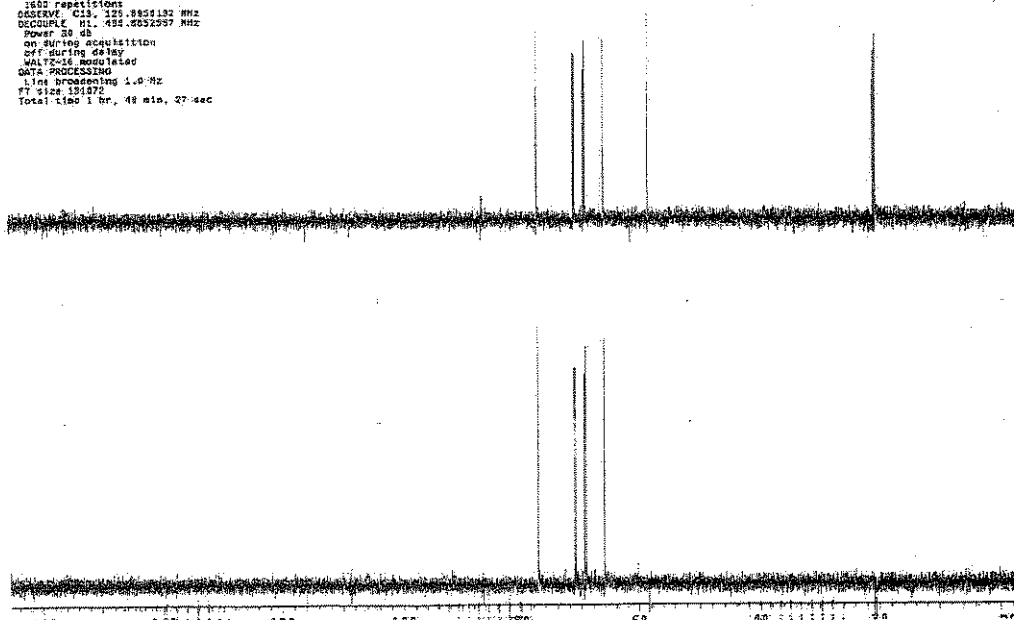
File: NOV399 Ident: 123 Acq: 3-NOV-1999 10:30:46 +15:35 Cal: NOV399
 AutoSpec EI+ Magnet BpI: 383604 TIC: 1778036 Flags: HALL



Esp. 78:- Espectro de massas do inositol 71



Valerio C8H31F4 nov02v010
 Pulse Sequence: dept
 Solvent: cdcl3
 Ambient temperature
 f101 nov02v010
 INOVA-500 "narsun"
 Pulse Sequence: dept
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 99.0 degrees
 Acq. time 1.020 sec
 Width 20001.0 Hz
 1600 repetitions
 OBSERVE C13 125.985132 MHz
 DECOUPLE H1 400.6032537 MHz
 Power 20 dB
 on during acquisition
 off during delay
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 131072
 Total time 1 hr, 48 min, 27 sec

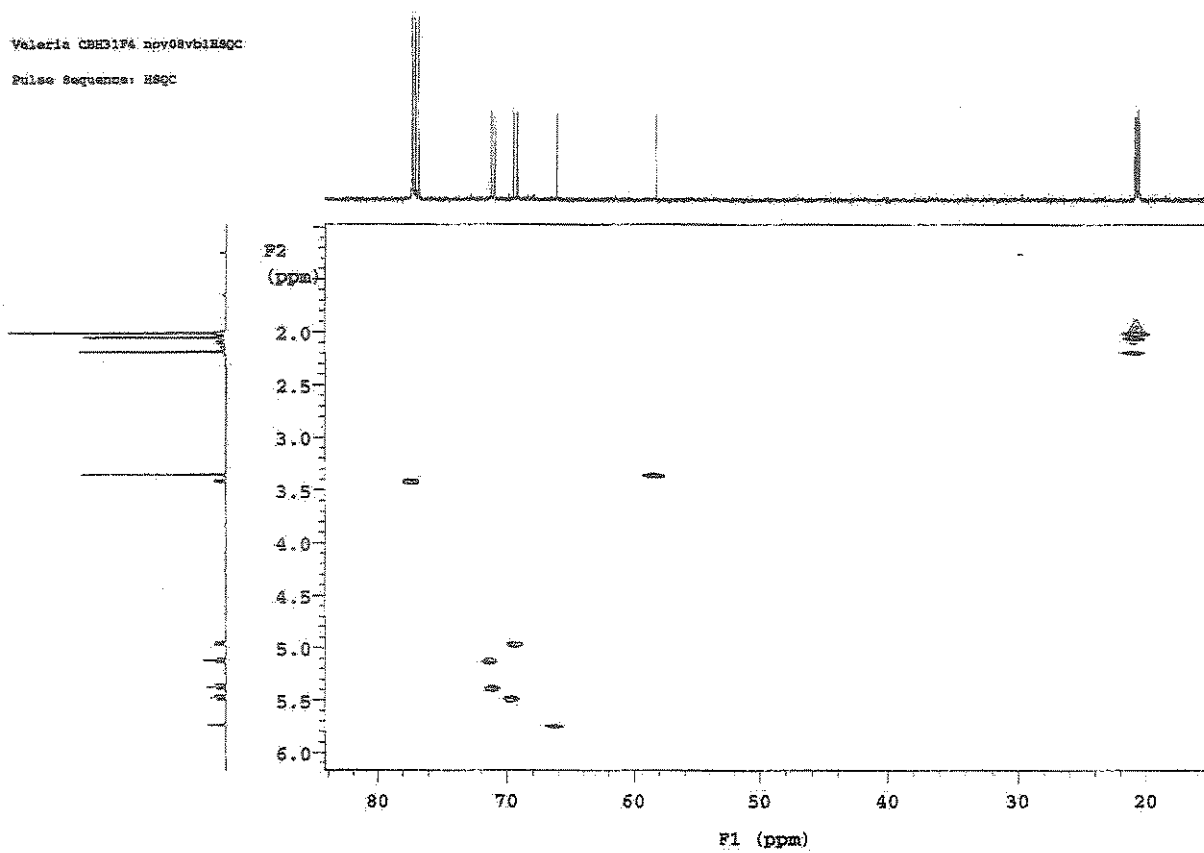


Esp.79 e 80:- Espectros de RMN ^{13}C e DEPT do inositol 71.

Valeria CBH31F4 noy08vb12HQC

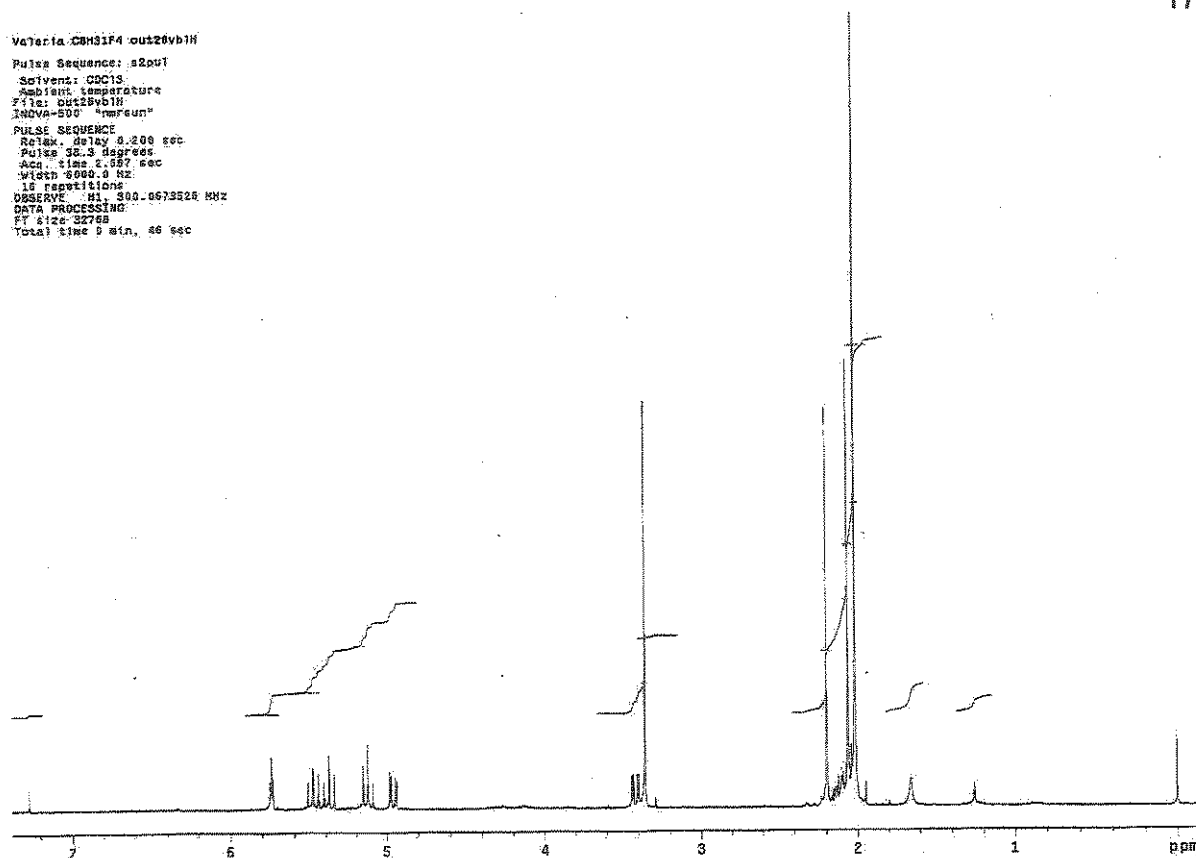
Pulse Sequence: HSQC

172

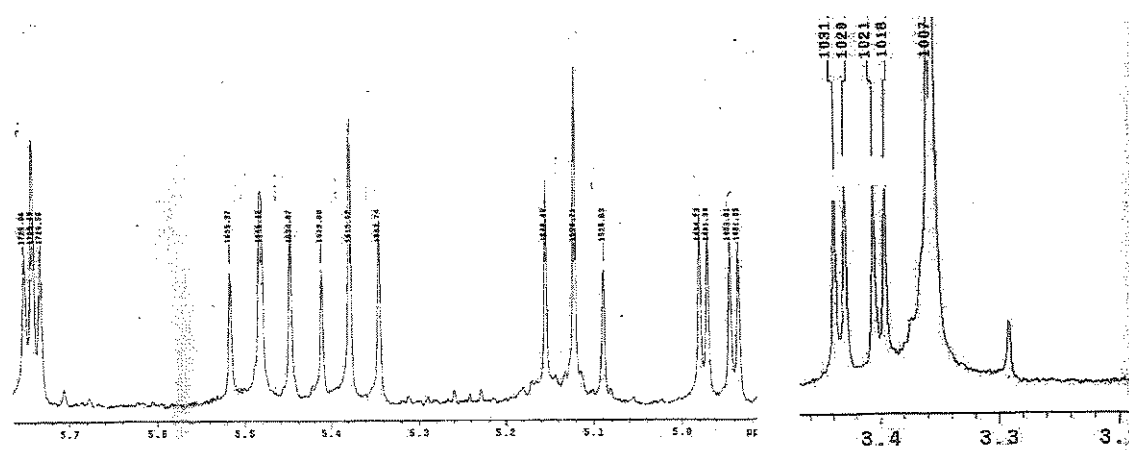


Esp. 81:- Espectro HSQC do inositol 71.

Vateria.CM31F4_out26vb1H
 Pulse Sequence: zgpg30
 Solvent: CDCl3
 Ambient temperature
 File: out26vb1H
 INOVA-500 "nmrfeun"
 PULSE SEQUENCE
 Relax. delay 8.200 sec
 Pulse 32.3 degrees
 Acq. time 6.657 sec
 Width 6000.0 Hz
 16 repetitions
 OBSERVE: H1 300.0673526 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 9 min, 46 sec



SEQUENCE: zgpg30



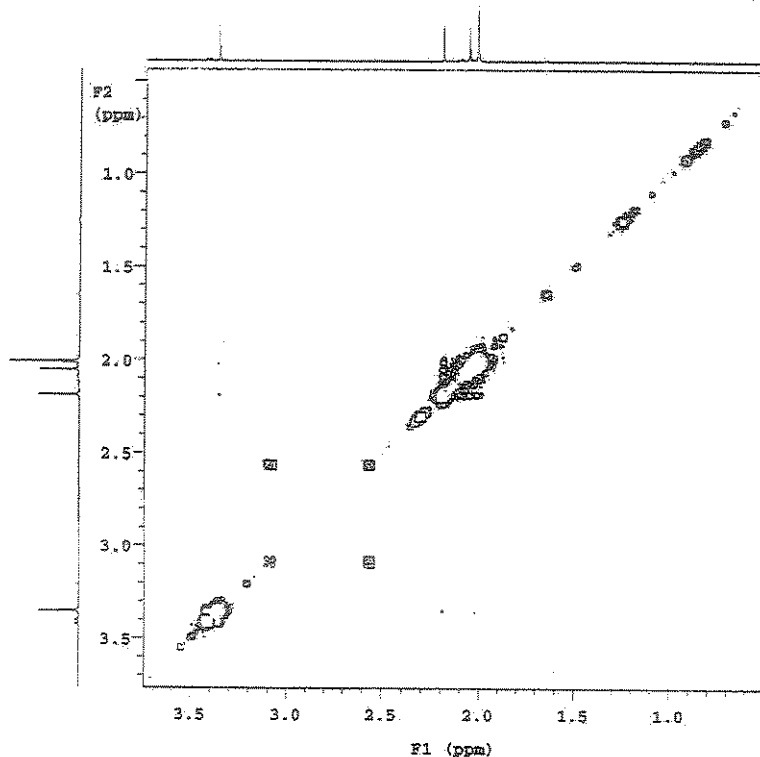
Esp. 82:- Espectro de RMN ^1H do inositol 71.

Valeria CBB31F4 nov08vblCOSY

Pulse Sequence: gCOSY

Solvent: CDCl₃
Temp. 25.0 C / 298.1 K
File: nov08vblCOSY
GEMINI-300MR "geminii"

PULSE SEQUENCE: gCOSY
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.231 sec
Width 4441.0 Hz
2D Width 4441.0 Hz
15 repetitions
128 increments
OBSERVE: H1, 499.8827579 MHz
DATA PROCESSING
Sf. sine bell 0.115 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.029 sec
F1 size 2048 x 2048
Total time 1 hr, 24 min, 0 sec

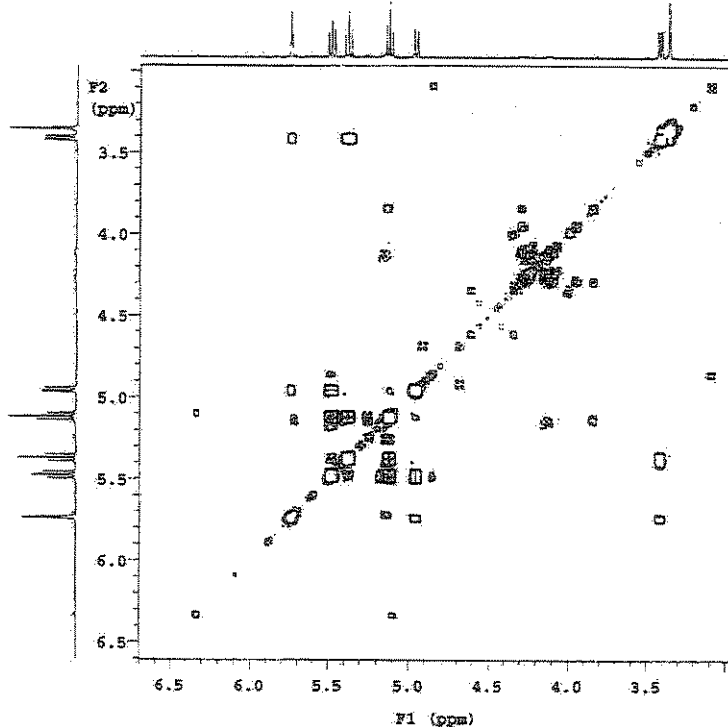


Valeria CBB31F4 nov08vblCOSY

Pulse Sequence: gCOSY

Solvent: CDCl₃
Temp. 25.0 C / 298.1 K
File: nov08vblCOSY
GEMINI-300MR "geminii"

PULSE SEQUENCE: gCOSY
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.231 sec
Width 4441.0 Hz
2D Width 4441.0 Hz
15 repetitions
128 increments
OBSERVE: H1, 499.8827579 MHz
DATA PROCESSING
Sf. sine bell 0.115 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.029 sec
F1 size 2048 x 2048
Total time 1 hr, 24 min, 0 sec



Esp. 83:- Espectro COSY do inositol 71.