

1. Introdução

As plantas são detentoras de uma grande diversidade de compostos químicos que estão englobados em dois grandes grupos. Os metabólitos primários ou macromoléculas. Nesse grupo estão os lipídeos, protéicos e glicídeos que estão presentes em todas as células vegetais. Esses compostos são essenciais nos processos como respiração e fotossíntese (SEIGLER, 1998). Ao contrário, os metabólitos secundários ou micromoléculas estão presentes em determinados grupos de plantas e desempenham um papel importante na adaptação das plantas aos seus ambientes. Esses compostos são sintetizados pelos vegetais para a sua sobrevivência e preservação (SIMÕES, 2003).

Os metabólitos secundários desempenham funções diversas nas plantas. Alguns atuam como compostos de defesa contra herbívoros, bactérias, fungos, insetos e vírus, tais como os taninos de sabor adstringente, presentes em frutos verdes, que são responsáveis pela preservação do fruto até o desenvolvimento da semente. Outras classes de substâncias que atuam como compostos de defesa são as saponinas, cumarinas, limonóides, quassinóides, lactonas sesquiterpênicas, iridóide e alcalóides. Enquanto, outros tais como os flavonóides, os carotenóides e o α -tocoferol atuam como protetores dos raios ultravioletas. Pois, devido as suas propriedades antioxidantes agem contra as espécies reativas de oxigênio. Por outro lado, alguns atuam de maneira oposta, como atrativos de insetos, pássaros e morcegos e são responsáveis pela polimerização de muitas plantas. Nesse grupo estão incluídos os pigmentos como flavonóides, antocianinas, betalaínas e os óleos voláteis contendo. monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides (HARBONE, 2000). Além disso, muitos metabólitos secundários desempenham funções fisiológicas, como por exemplo, os alcalóides que estão envolvidos no armazenamento de N (WINK, 2003).

Os metabólitos secundários também estão envolvidos nos processos de alelopatias ou interação planta/planta, nos quais existem uma competição entre as

plantas com a finalidade de garantir o fornecimento de água, luz e nutrientes. Nesse processo estão envolvidos principalmente os mono e sesquiterpenos (SIMÕES, 2003).

Portanto, as plantas são uma importante fonte de produtos naturais bioativos e com grande diversidade estrutural. Muitos metabólitos secundários são utilizados sem alteração estrutural ou com apenas pequenas modificações para a produção de novos fármacos, ou ainda são usados como modelo para a síntese de novas substâncias ativas. Nos últimos anos, os cientistas estão desenvolvendo novo método de obtenção novos fármacos através da biossíntese geneticamente construída. Nessa, as enzimas de uma rota biossintética já existente para a produção de produto natural, são alteradas pela engenharia genética com o objetivo de redirecionar a biossíntese para formar um novo composto (NINA HALL, 2004). De grande valor terapêutico, utilizados na medicina hoje, destacam-se os fármacos extraídos de plantas superiores, tais como os alcalóides da "vinca" vincristina e vimblastina, extraídos de *Catharanthus roseus*. Esses apresentam atividades antitumorais, sendo a vincristina utilizada no tratamento de leucemia infantil e a vimblastina no tratamento do câncer de testículo. Seus derivados semi-sintéticos vinorelbina e vindesina são utilizados no tratamento de câncer de pulmão e leucemia, respectivamente (SIMÕES, 2003).

A podofilotoxina uma lignana extraída de espécies do gênero *Podophyllum* com atividade escarotica e seus derivados semi-sintéticos Etoposídeo e Teniposídeo são antitumorais utilizados no tratamento de câncer de pulmão, testículos e tumores cerebrais (SIMÕES, 2003; STAHELIN e WARTBURG, 1991). Outro antitumoral muito utilizado é o Paclitaxel (Taxol) extraído das cascas do tronco de *Taxus brevifolia* é utilizado no tratamento de câncer de ovário, mama, cabeça e pescoço (NINNA HALL, 2004; SIMÕES, 2003).

O interesse no estudo fitoquímico de espécies do gênero *Erythroxylum* fundamenta-se na importância que este gênero tem para a família Erythroxylaceae e na diversidade de espécies deste gênero no Estado da Bahia. Além disto destaca-se que, existem poucas referências sobre o estudo químico das espécies do gênero, bem como o fato deste gênero ser fonte de alcalóides biologicamente ativos.

1.1 A família Erythroxylaceae

Erythroxylaceae é uma família pertencente à divisão das Angiospermas e está incluída na ordem das Geraniales e subclasse das Dicotiledôneas, que compreende aproximadamente 250 espécies distribuídas por apenas quatro gêneros: *Aneulophus*, *Nectaropetalum*, *Pinacopodium* e *Erythroxylum* (HEGNAUER, 1981; JOLY, 2002; EVANS, 1981). Alguns taxonomistas consideram que a família Erythroxylaceae deve ser incluída juntamente com Humiriaceae, Hugoniaceae, Oxonanthaceae, numa abrangente família Linaceae. Aparentemente não existem diferenças claras entre Erythroxylaceae e Lineaceae e, isso pode ser ilustrado por gêneros como *Aneulophus* e *Nectaropetalum* que dependendo dos autores são incluídas em uma ou em outra família (HEGNAUER, 1981; RURY, 1981).

1.2 O gênero *Erythroxylum*

Erythroxylum é o mais importante da família, contendo cerca de 97% das espécies que estão incluídas em nove seções *Leptogramme*, *Heterogyne*, *Archerythroxylum*, *Megalophyllum*, *Mastigophorum*, *Microphyllum*, *Pogonophorum*, *Macrocalyx* e *Rhabdophyllum* (PLOWMAN, 2004). Essas são amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais apresentando extensas áreas de diversidade na América do Sul e Madagascar.

Erythroxylum é composto de plantas arbustivas ou pequenas árvores, que possuem madeira dura e durável, sendo muitas espécies usadas nas construções de casas, barcos, na carpintaria e esculturas, como por exemplo, *E. capense*, *E. ferruginum*, *E. laurifolium*, *E. ecarinatum* e *E. australe*. Além disto, dos cernes de algumas espécies extraem-se uma tinta vermelha utilizada para tingir algodão e lã (EL-IMAM, 1988). Enquanto outras espécies têm aplicação na “medicina popular” com diferentes fins terapêuticos, sendo diuréticos, tônicos, afrodisíacos, antidiarréicos, vermífugos, antitérmico e inalantes nos casos de asma (HEGNAUER, 1981; LORENZI, 2002; RAHMAN, 1998; ZANOLARI, 2003).

No Brasil ocorrem mais de 85 espécies deste gênero (CORRÊA, 1984) principalmente na Mata Atlântica e nas Restingas. Só no estado da Bahia já foram catalogadas 45 espécies (PLOWMAN, 1985) destacando-se que 10 delas eram novas. A maior concentração de espécies no estado ocorre ao longo da costa nos solos arenosos, das restingas e das florestas de restingas e nos campos cerrados.

Estudos fitoquímicos indicam que o gênero *Erythroxylum* é rico em alcalóides tropânicos nas folhas e frutos (BRACHET, 1997; BRINGMANN, 2000; CHAVEZ, 2002; CHRISTEN, 1995; EI-IMAM, 1998; GRIFFIN, 2000; Mi, 2002; PAYOL HILL, 2000; ZANOLARI, 2003; ZUANAZZI, 2003). Nas folhas estão presentes os flavonóides, especialmente flavonóis como a quercetina e kaempferol, bem como seus 3-glicosídeos. Sendo que tanto a quercetina quanto o kaempferol são considerados características quimiotaxonomicas desse gênero (BOHM, 1988; CHAVEZ, 1996; INIGO, 1985; KOLODZIEJ, 1991; JOHNSON, 2003) e também é comum a ocorrência de triterpenos principalmente de esqueleto oleanano (BARREIROS, 2002; CHAVEZ, 1996; INIGO, 1985). NA madeira de algumas espécies foram detectados diterpenos dos tipos *ent*-Kauranos, *ent*-beyeranos, *ent*-devadaranos e *ent*-labdanos (ANSELL, 1993; KAPADI, 1964; MARTIN, 1968; McCRINDLE, 1968; SOMAN, 1964) Quadro 1.

Quadro 1 – Metabólitos secundários de espécies de *Erythroxylum*

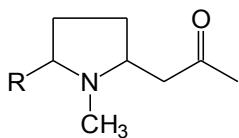
Espécies	Subst. Isoladas	Partes utilizadas	referências
<i>E. novogranatense</i>	1, 4, 6, 8, 10, 14, 26, 27, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 93, 101, 102, 186, 187, 204, 218, 219, 225, 226, 233	folhas, raízes e sementes	Hegnauer, 1981 Kolodziej, 1991 Johnson, 1998 Moore, 1994
<i>E. coca</i>	1, 4, 6, 8, 10, 14, 26, 27, 79, 80, 80, 82, 83, 84, 85, 93, 101, 102, 172, 186, 187, 189, 191, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 221, 222, 225, 234	folhas, raízes e sementes	Hegnauer, 1981 Johnson, 1998 Johnson, 2002 Moore, 1994
<i>E. dikindti</i>	10, 13, 22, 26, 27, 40, 79, 80, 81, 94, 95,	casca das raízes e folhas	Al-Yahya, 1978
<i>E. cuneatum</i>	8, 27, 31, 36, 38, 162, 163	folhas e casca do caule cernes	El-Imam, 1988 Ansell, 1993
<i>E. ecarinatum</i>	27, 86	folhas	El-Imam, 1988
<i>E. australe</i>	19, 20, 37, 39, 57, 60, 61, 79, 90, 106, 107, 108, 109, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 130, 133, 134, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 156	raízes, casca das raízes, cernes e folhas	Ansell, 1993 Griffin, 1978 El-Imam, 1988
<i>E. monogynum</i>	1, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 26, 27, 28, 34, 40,	folhas, casca das raízes e casca do	Connolly, 1964 Murray, 1964 Kapadi, 1964

	58, 59, 80, 84, 95, 96, 106, 110, 111, 126, 130, 131, 182, 133, 134, 135, 153, 154, 155	caule e caule sem casca	Soman, 1964 Connolly, 1966 Martin, 1968 Agar, 1976 Christen, 1995
<i>E. lucidum</i>	1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 20, 21, 76	casca do caule	Brachet, 1997
<i>E. alaternifolium</i>	75	folhas	Payo-Hill, 2000
<i>E. rotundifolium</i>	31, 51, 65, 66, 67, 103, 129	folhas, caule e casca do caule cernes	Payo-Hill, 2000 Chavéz, 2002 Alsell, 1993
<i>E. zeylanicum</i>	15, 16, 29, 35, 48	folhas e raízes	Bringmann, 2000
<i>E. moonii</i>	12, 74, 98, 99, 104 , 105	folhas	Rahman, 1998 Khattak, 2002
<i>E. zambesiacum</i>	1, 4, 8, 10, 13, 16, 17, 24, 25, 30, 31, 33, 34, 37, 38, 56, 58, 59, 62, 63, 64, 76, 77, 89, 97, 127, 128, 140, 141, 142	casca das raízes e casca do caule cernes	Evans, 1981 Chisten, 1993 Chisten, 1995 Ansell, 1993
<i>E. argentinum</i>	1, 6, 10, 27, 87, 129, 170, 171, 172, 182, 184, 187, 188, 191, 217, 218, 219, 220, 218, 231, 232	folhas cernes	El-Imam, 1985 Inigo, 1985 Zuanazzi, 2001 Alsell, 1993
<i>E. barbatum</i>	130, 182, 183, 189, 193, 194, 196, 198, 218, 231, 232	- cernes do tronco	Bohm, 1988 Santos, 2003
<i>E. campestre</i>	189, 196, 199, 201, 202, 203, 218	-	Bohm, 1988
<i>E. cuspidifolium</i>	194, 196	-	Bohm, 1988
<i>E. daphnites</i>	188, 189, 197	-	Bohm, 1988
<i>E. engleri</i>	191, 192, 218	-	Bohm, 1988
<i>E. laurifolium</i>	188, 191	folhas	Bezanger- Beauquesne, 1965
<i>E. cf. loefggrenii</i>	188, 1189, 190, 191, 192, 193, 218, 227,	-	Bohm, 1988

	228, 229, 230		
<i>E. pruinatum</i>	188, 189, 190, 191, 192, 193, 1196, 218	-	Bohm, 1988
<i>E. squamatum</i>	189, 193, 198, 218	-	Bohm, 1988
<i>E. suberosum</i>	188, 189, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199	-	Bohm, 1988
<i>E. subracemosum</i>	189, 190, 191, 192, 218		Bohm, 1988
<i>E. subrotundum</i>	218	-	Bohm, 1998
<i>E. tenue</i>	190, 192, 193, 211, 218	-	Bohm, 1988
<i>E. vacciniifolium</i>	52, 53, 54, 55, 67, 68, 69, 70, 72, 73, 188, 189, 190, 192, 193, 194, 195, 196, 200, 201, 207, 208, 209, 211, 218	-	Bohm, 1988 Zanolari, 2003
<i>E. hypericifolium</i>	13, 29, 32, 37, 47, 42, 43, 48, 88, 91	folhas, casca do caule e casca das raízes	Al-Said, 1989
<i>E. pervillei</i>	49, 50, 71	raízes	Mi, 2002

<i>E. pelleterianum</i>	27, 79	folhas	Zuanazzi, 2001
<i>E. microphyllum</i>	27, 79	folhas	Zuanazzi, 2001
<i>E. mamacoca</i>	27, 86	-	El-Imam, 1985
<i>E. cumanense</i>	31, 91	raízes	El-Imam, 1985 Al-Said, 1989
<i>E. amazonicum</i>	41	-	El-Imam, 1985
<i>E. glaucum</i>	7, 27	-	El-Imam, 1985
<i>E. sideroxyloides</i>	41, 52, 143, 144, 145, 146	folhas e cascas cernes	Al-Said, 1989 Alsell, 1993
<i>E. pictum</i>	130, 133, 157, 158, 159, 160, 161, 164, 165, 166, 167, 168, 169	cernes	Alsell, 1993
<i>E. macrocarpum</i>	144, 145	cernes	Alsell, 1993
<i>E. leal costae</i>	172, 180, 181, 188, 205, 215, 216	folhas	Chaves, 1996

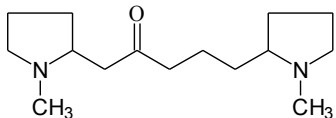
Quadro 2 - Alcalóides isolados de *Erythroxylum*



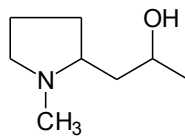
1: R= H ; Higrina

2: R= CH₃COCH₂

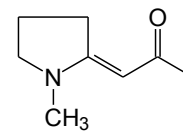
3: R= CH₃CHOHCH₂



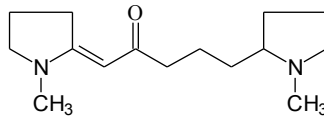
6: Cuscohigrina



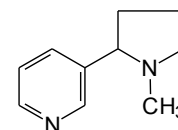
4: Higrolina



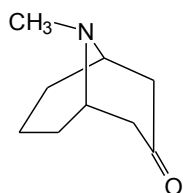
5: Deidrohigrina



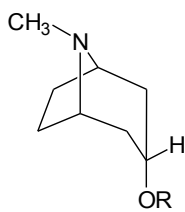
7: Deidrocuscohigrina



8: Nicotina



9: Pseudopeletierina



10: R= H; Tropina

11: R= COCH(CH₃)₂

12: R= COCH=CHC₆H₅

13: R= COCH₂C₆H₅

14: R= COC₆H₅

15: R= CO(3',4',5'-trimetoxibenzoil)

16: R= CO

(3',4',5'-trimetoxicinamoil)

17: R= (2-metil) butil

18: R= CO(CH₂)₂CH(CH₃)₂

19: R= COCH₂(4-OH)-C₆H₄

20: R= COCH₃

21: R= COCH(OH)CH₂C₆H₅

22: R= 2-furoil

23: R= COCH₂(3-OH)C₆H₄

24: R= COCH₂CH(CH₃)₂

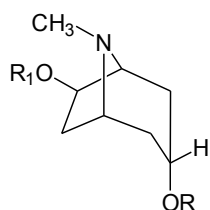
25: R= CO(3,4-dimetoxibenzoil)

26: R= H φ Tropina

27: R= COC₆H₅

28: R= COCH₂C₆H₅

29: R= COCH=CHC₆H₅



45: R= COCH₂C₆H₅;

R₁=COCH₃

46: R= H; R₁=COCH₂C₆H₅

47: R= R₁=COCH=CHC₆H₅

30: R= R₁= H

31: R= H; R₁= COC₆H₅

32: R= COCH₂C₆H₅; R₁= H

33: R= CO(3,4,5-trimetoxibenzoil);
R₁= H

34: R= (3,4,5-trimetoxicinamoil);
R₁= COC₆H₅

35: R= CO(3,4,5-trimetoxibenzoil);
R₁= COCH₃

36: R= R₁= COC₆H₅

37: R= COCH=CHC₆H₅; R₁=H

38: R= H;

R₁= CO(CH₃)C=C(CH₃)H

39: R= CO(CH₃)C=C(CH₃)H;
R₁= H

40: R=COCH(CH₃)CH₂CH₃;
R₁= H

41: R= COC₆H₅; R₁= H

42: R= COC₆H₅; R₁= COCH₃

43: R= COCH₃; R₁= COCH₂C₆H₅

44: R= H; R₁= COCH₂C₆H₅

67: R= (E)-CO(3,4,5-
trimetoxicinamoil); R₁= COC₆H₅;
R₂= COCH₃

68: R= H; R₁= Mpc; R₂= H

69: R= Mpc= R₁= Mpc; R₂= H

70: R=R₁= Mpc; R₂=COCH₃

71: R= CO(3,4,5-trimetoxibenzoil);
R₁= CO(3,4,5-trimetoxicinamoil);

48: R= COCH=CHC₆H₅;
R₁=COCH₃

49: R=CO(3,4,5-
trimetoxibenzoil);
R₁=CO(3,4,5-
trimetoxicinamoil)

50: R=R₁= CO(3,4,5-
trimetoxidicinnamoil)

51: R= (Z) e (E)-CO(3,4,5-
trimetoxicinamoil);
R₁=COC₆H₅

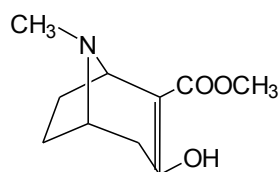
52: R= H; R₁= Mpc

53: R= Mpc; R₁= Pc

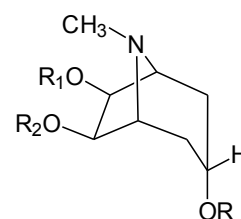
54: R=R₁= Mpc

55: R= Hdmb; R₁= Mpc

56: R= H; R₁=
COCH₂CH(CH₃)₂



79: metil ecgonidina



57: R= COC₆H₅, R₁=R₂= H

58: R= CO(2-metil) butil;
R₁=R₂= H

59: R= CO(3,4,5-trimetoxi
benzoil); R₁=R₂= H

60: R= COCH=CHC₆H₅,
R₁=R₂= H

61: R= O(CH₃)C=C(CH₃)H;
R₁=R₂= H

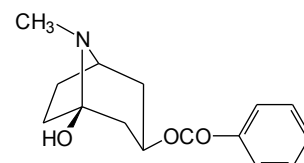
62: R₁= COC₆H₅, R=R₂= H

63: R=CO(3,4,5-
trimetoxicinamoil);
R₁= COC₆H₅; R₂= H

64: R= CO(3,4,5-
trimetoxicinamoil);
R₁= COC₆H₅; R₂= COCH₃

65: R=(E)-CO(3,4,5-
trimetoxicinamoil); R₁=
CO(3,4,5-trimetoxibenzoil);
R₂= H

66: R= (E)-CO(3,4,5-
trimetoxicinamoil); R₁=
COC₆H₅; R₂=H



$R_2 = H$

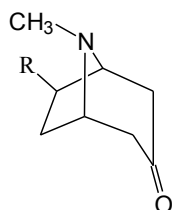
72: $R = Hdmb$; $R_1 = Mpc$; $R_2 = H$

73: $R = COCH_2(3-OH)C_6H_4$; $R_1 = R_2 = H$

74: $R = R_2 = H$; $R_1 =$

$OCOCH(CH_3)CH(OH)Ph$

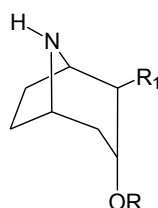
75: $R = R_2 = COC_6H_5$; $R_1 = H$



76: $R = H$ Tropinona

77: $R = OH$

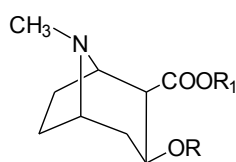
78: $R = OCOC_6H_5$



93: $R = H$; $R_1 = COOH$ Norecgonina

94: $R = COCH_2CH(CH_3)_2$; $R_1 = H$

Poroidina



80: $R = R_1 = H$ Ecgonina

81: $R = H$; $R_1 = CH_3$

82: $R = COC_6H_5$; $R_1 = CH_3$

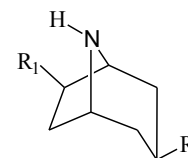
Cocaína

83: $R = H$; $R_1 = CH=CHC_6H_5$

84: $R = COC_6H_5$;

$R_1 = CH_2CH=CHC_6H_5$

85: 1-hidroxi-tropacocaína

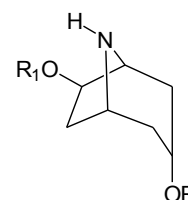


86: $R = OCOC_6H_5$; $R_1 = H$

Nortropacocaína

87: $R = R_1 =$

$OCO(CH_3)C=C(CH_3)H$



88: $R = COC_6H_5$; $R_1 = H$

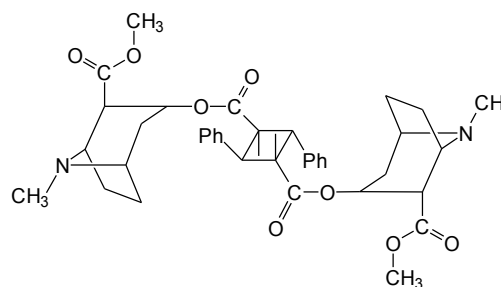
89: $R = CO(3,4,5-$
trimetoxibenzoil); $R_1 = H$

90: $R = H$;

$R_1 = CO(CH_3)C=C(CH_3)H$

91: $R = COCH_2C_6H_5$; $R_1 = H$

92: $R = COCH_3$; $R_1 = H$



101: α -Truxilina

95: R= COCH(CH₃)CH₂CH₃; R₁= H

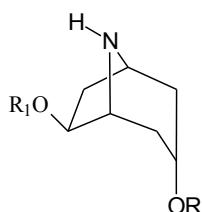
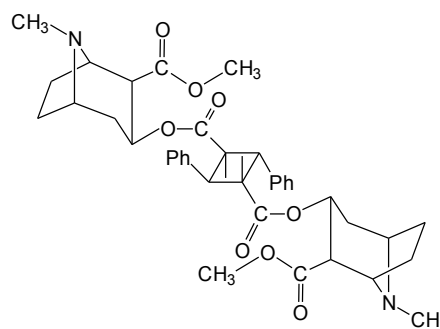
Isoporoidina

96: R= COCH(CH₃)₂; R₁= H

97: R=CO(3,4,5- trimetoxibenzoil);

R₁= H

98: R= COCH₂C₅H₆; R₁= H

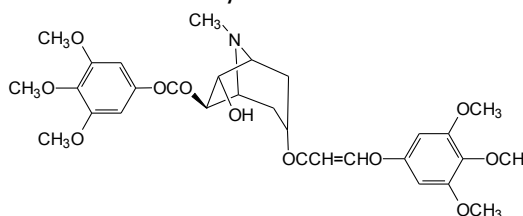


99: R= COCH(CH₃)₂; R₁=H

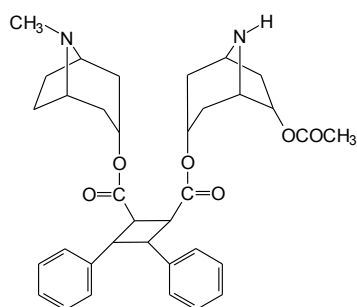
3 α -Isobutil-7 β -hidroxinortropano

100: R= H; R₁= COCH₂C₆H₅

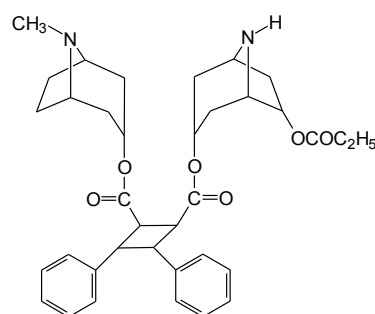
102: β - Truxilina



103: 3 α -(3,4,5-trimetoxicinamoil)-7 β -(3,4,5-trimetoxibenzoil)-6 α -hidroxitropano

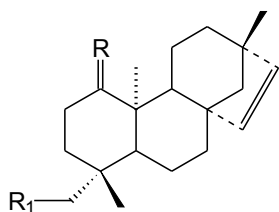


104: Mooniina B



105: Mooniina A

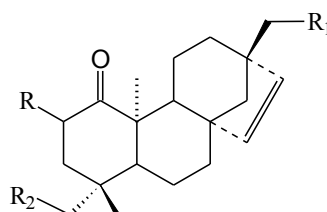
Quadro 3 - Diterpenos isolados de *Erythroxyllum*



106: R= H₂; R₁= H

107: R= O; R₁= H

108: R=O; 15,16 epoxido; R₁= H

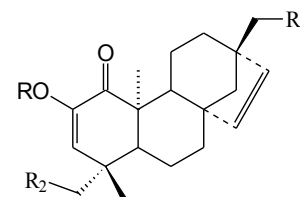


112: R- β -OH; R₁=R₂= H

113: R=R₁= H; R₂= OH

114: R= R₂= H; R₁= OH

115: R= β -OH; R₁= OH; R₂= H



117: R=R₁=R₂= H

Diosfenol

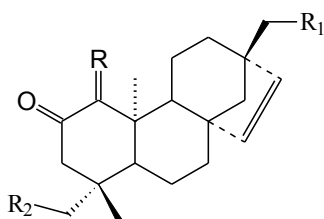
118: R= R₂= H; R₁= OH

119: R=R₁= H; R₂= OH

109: R= H, β -OH; R₁= H

110: R= H₂; R₁= OH

111: R= O; R₁= OH



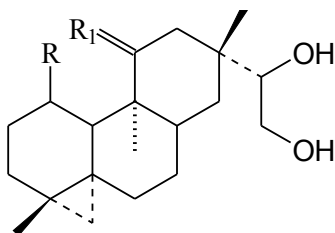
120: R= H, α -OH; R₁=R₂= H

121: R= H, β -OH; R₁=R₂= H

122: R= H₂; R₁=R₂= H

123: R= H, β -OH; R₁= OH; R₂= H

124: R= β -OH; R₁= H; R₂= OH

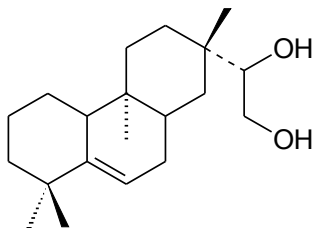


130: R= H; R₁= H₂ Eritroxidiol X

131: R= H, R₁= H, α -OH

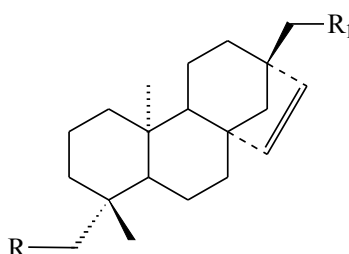
Eritroxitriol Q

132: R= H; R₁= H, α -OAc



136: *ent*-ros-5-en-15,16-diol

116: R= β -OH; R₁= H; R₂= OH



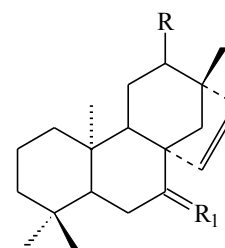
125: R=R₁= OH

Eritroxidiol A

126: R= H; R₁= OH

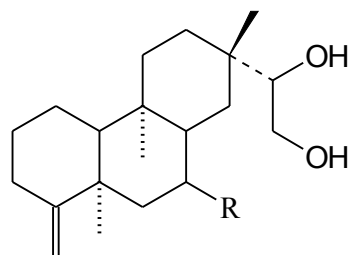
Eritroxilol B

127: R= CHO; R₁= H



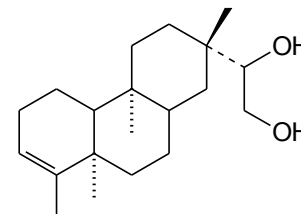
128: R= β -OH; R₁= H₂

129: R= H; R₁= O

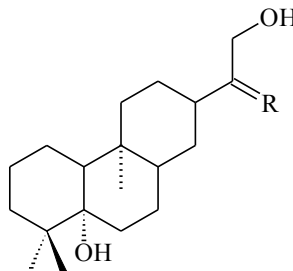


133: R= H Eritroxidiol Y

134: R= β -OH



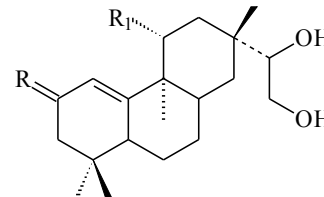
135: Eritroxidiol Z



137: R= H, OH

138: R= O

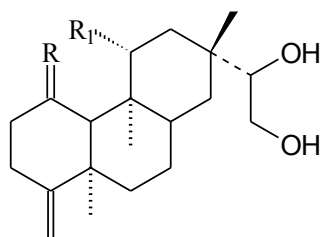
139: R= H₂



140: R= H₂; R₁= H

141: R= H₂; R₁= Oac

142: R= O; R₁= H

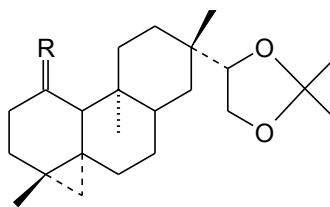


143: R= O; R₁= H

144: R= H₂; R₁= OH

145: R= H₂; R₁= Oac

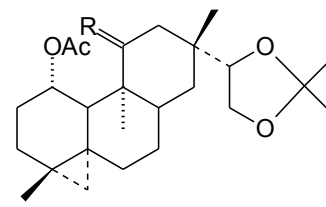
146: R= H, α-OAc, R₁= OH



147: R=H, α-OH

148: R= H, α-OAc

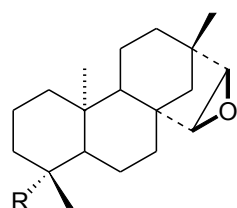
149: R=O



150: R= H, α-OH

151: R= H, α-Oac

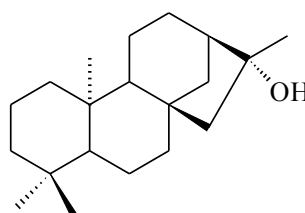
152: R= O



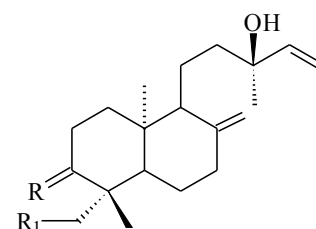
153: R= CH₃

154: R=CH₂OH

155: R= CH₂OAc



156: *ent*-Kauran-16-β-ol

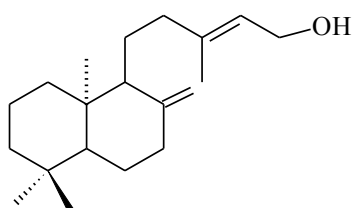


157: R= H₂; R₁= H

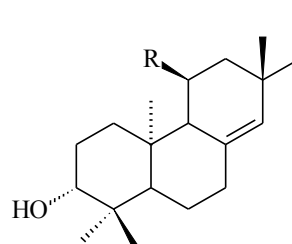
158: R= O; R₁= H

159: R= H, β-OH; R₁= H

160: R= H₂; R₁= OH

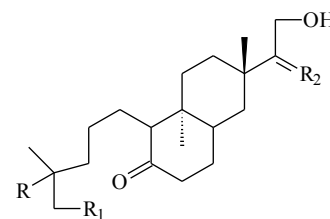


161: R= *ent*-labda-8(17),13-E-dien-15-ol



162: R= H *ent*-pimara-8(14),15-dien-3β-ol

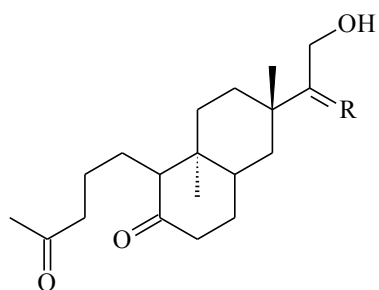
163: R= OH



164: R= OH; R₁= H; R₂= H, OH

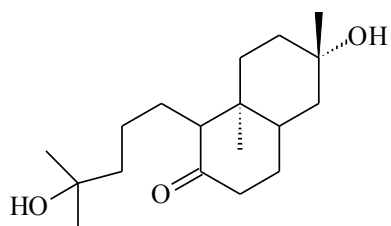
165: R=R₁= -O-; R₂= H, OH

166: R= OH, R₁= OH; R₂= H, OH



167: R= H, OH

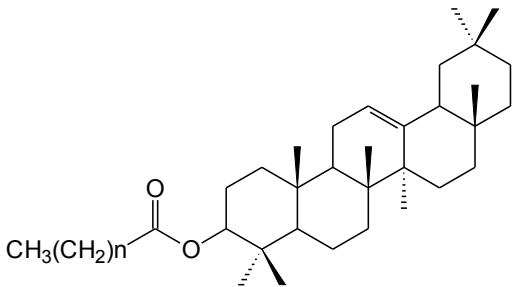
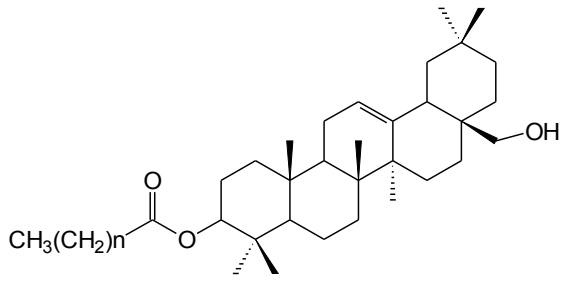
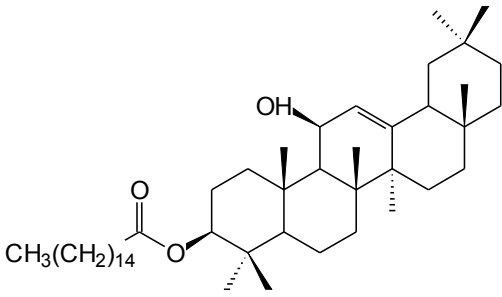
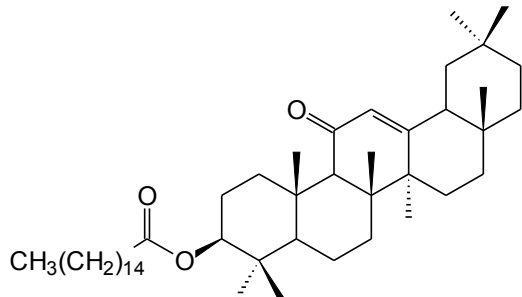
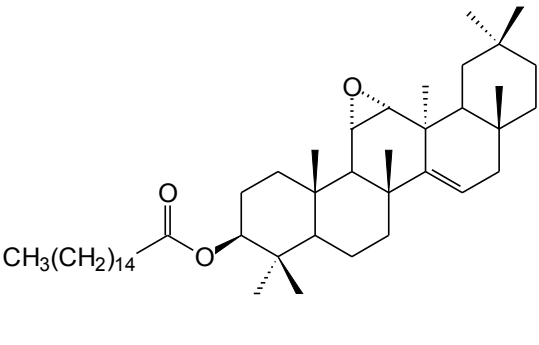
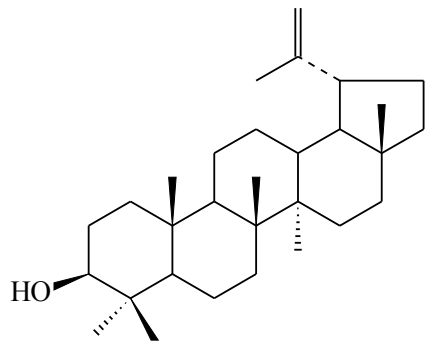
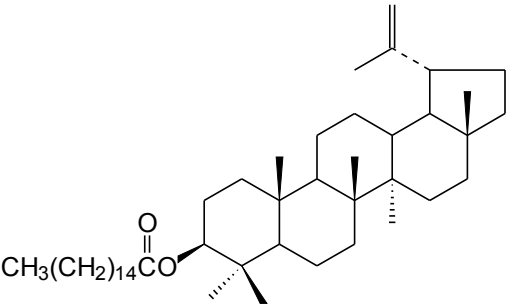
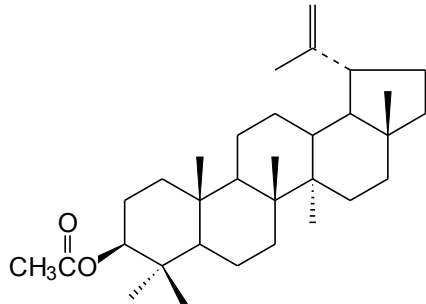
168: R= O

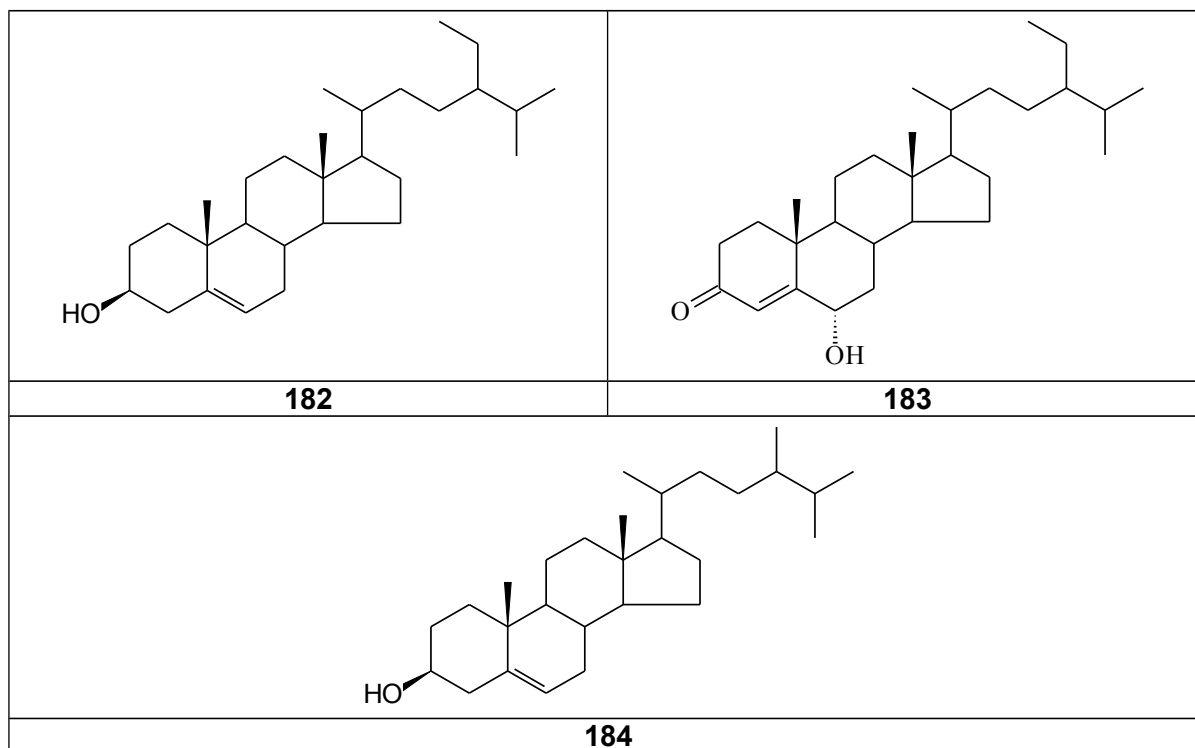


169: *ent*-4,13 α -dihidroxi-
15,16-bisnorpictan-5-ona

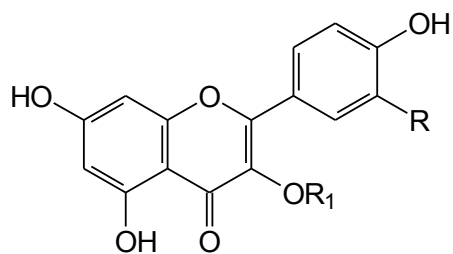
Quadro 4 – Triterpenos e Esteróides isolados de *Erythroxyllum*

<p>A tetracyclic triterpene skeleton with a double bond at C-12 and methyl groups at C-10, C-13, C-14, and C-15. A hydroxyl group is at C-3.</p>	<p>A tetracyclic triterpene skeleton with a double bond at C-12 and methyl groups at C-10, C-13, C-14, and C-15. A hydroxyl group is at C-3.</p>
170	171

	
<p>172: n= 14 Palmitato de β-amirila 173: n=16 Estearato de β-amirila</p>	<p>174: n= 14 Palmitato de Eritrodioila 175: n=16 Estearato de Eritrodioila</p>
	
<p>176: Palmitato de 3β, 11β-dihidroxi-olean-12-enila</p>	<p>177: Palmitato de 3β-hidroxi-11-oxo-olean-12-enila</p>
	
<p>178: Palmitato de 11α, 12α-epoxi-taraxeroila</p>	<p>179</p>
	
<p>180</p>	<p>181</p>



Quadro 5 - Flavonóides isolados de *Erythroxylum*



186: R= H; R₁=OH Kampeferol

187: R= OH; R₁= OH Quercetina

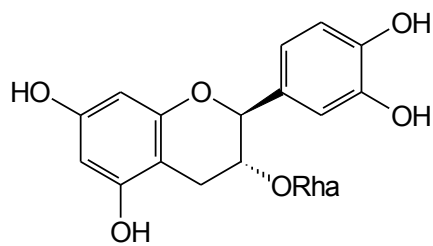
188: R= OH; R₁= rha

189: R= OH; R= glc

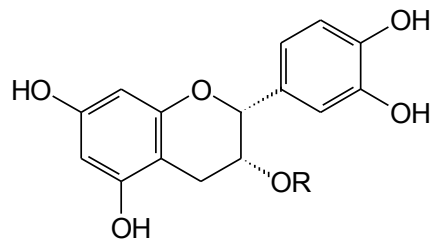
190: R= H; R₁= rha

191: R= OH; R₁= glc-(6''→1''')-rha

192: R= H; R₁= glc-(6''→1''')-rha



204: Catequina-3-raminosídeo



205: R= H *Epicatequina*

206: R= rha

193: R= H; R₁= glc

194: R= H; R₁= ara

195: R= H; R₁= xyl

196: R= OH; R₁= ara

197: R= OH; R₁= gal

198: R= OH; R₁= glc-(6''→1''')-xyl

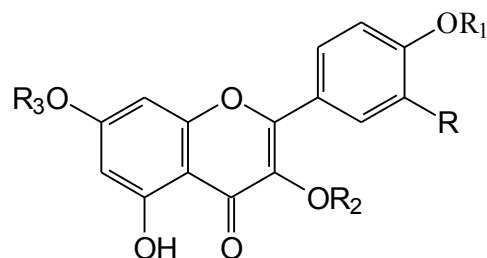
199: R= OH; R₁= glc-(6''→1''')-ara

200: R= H; R₁= gal

201: R= OH; R₁= xyl

202: R= OH; R₁= glc-(6''→1''')-glc

203: R= H; R₁= glc-(6''→1''')-xyl



207: R=R₁=H; R₁= H; R₂= ara; R₃= rha

208: R= OH; R₁= H; R₂= rha; R₃= glc

209: R= OH; R₁= H; R₂=R₃= rha

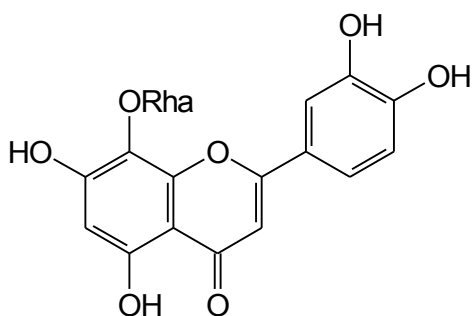
210: R=OH; R₁= H; R₂= glc; R₃= ara

211: R= H; R₁= H; R₂= glc; R₃= rha

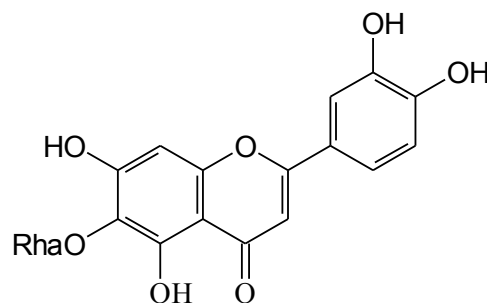
212: R=R₁=H; R₂= glc-(6''→1''')-rha; R₃= rha

213: R=R₂=R₃= H; R₁= glc-(6''→1''')-rha

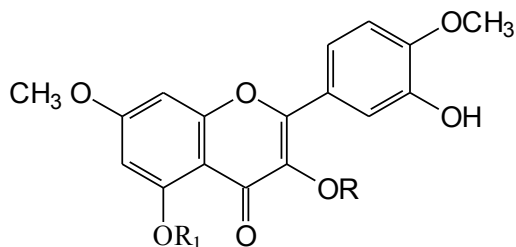
214: R=R₃= H; R₁=R₂= rha



215: 8-hidroxi-luteolina-8-ramnosídeo



216: 6-hidroxi-luteolina-6-ramnosídeo

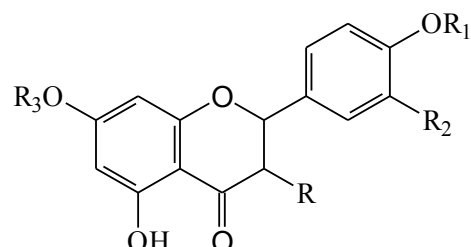


217: R=R₁= H Ombuína

218: R= glc-(6''→1''')-rha; R₁= H

219: R= glc; R₁= H

220: R= glc-(6''→1''')-rha; R₁= glc



221: R= H

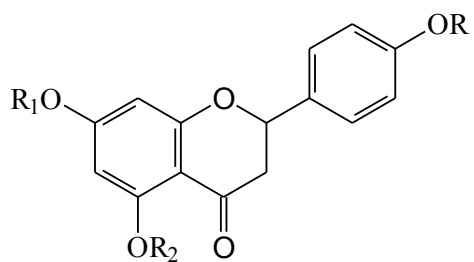
222: R= rha

223: R= H₂; R₁= H; R₂= OEt; R₃= rha

224: R= H₂; R₁= H; R₂= OH; R₃= rha

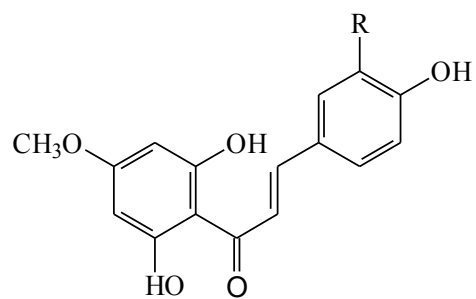
225: R= OH; R₁= H; R₂= OH; R₃= H

226: R= OH; R₁= R₂= R₃= H



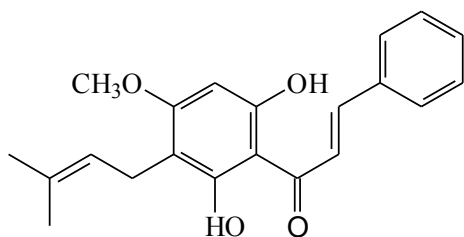
227: R=R₂= H; R₁= CH₃

228: R=R₁= CH₃; R₂= glc

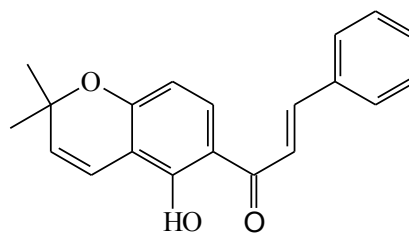


229: R= H

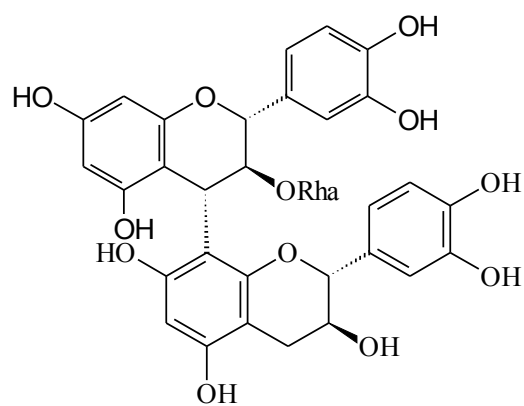
230: R= OH



231

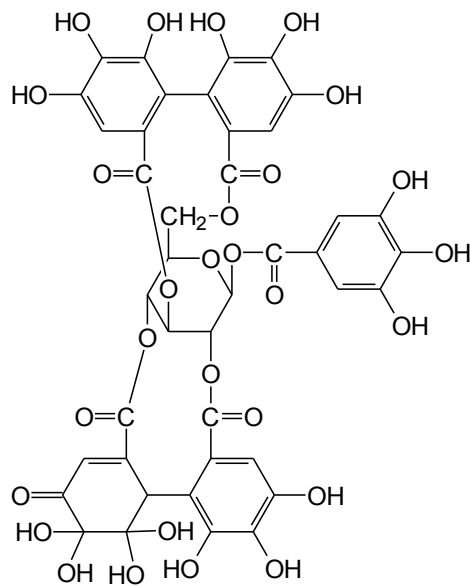


232



233

Quadro 6 - Tanino isolado de *E. coca*



234: Geraniina

Este trabalho teve início no Mestrado onde foram realizados os estudos dos extratos hexânicos das folhas de *E. nummularia* e *E. passerinum* tendo sido isolados de *E. nummularia* os triterpenos **170**, **172-175** e **179** e de *E. passerinum* os triterpenos **170**, **172**, **174**, **176-179**, além do esteróide **182** em ambas as espécies (Quadro 4, p.18).

Em continuação aos estudos com espécies do gênero *Erythroxyllum* relata-se aqui o estudo dos extratos clorofórmicos e acetato de etila de *E. nummularia*, *E. passerinum* e *E. barbatum*. Nesse trabalho foram isolados principalmente flavonóides e diterpenos do esqueleto rianodano. Estes diterpenos são de ocorrência inédita na família Erythroxyllaceae.

1.3 Flavonóides

Os flavonóides são uns dos mais importantes grupos de compostos naturais. Eles estão presentes em quase todo reino vegetal e ocorrem em todas as partes da planta e são os responsáveis pelo aspecto colorido da mesma. E podem ser encontrados com uma grande diversidade de estruturas na forma livre (aglicoma) ou conjugado com açúcares (heterosídeos).

Dentre as principais classes de flavonóides podemos destacar as flavonas, flavanonas, flavanas, flavonóis, antocianinas, chalconas, auronas, proantocianidinas, leucoantocianidinas, biflavonóides, isoflavonóides e os neoflavonóides. Esses compostos são responsáveis por diversas funções nas plantas tais como: protetores contra os raios ultravioleta, antioxidantes, polimerizadores, controle da ação de hormônios, inibidores de enzimas, além de protos contra insetos, vírus, bactérias e fungos (HARBONE, 2000).

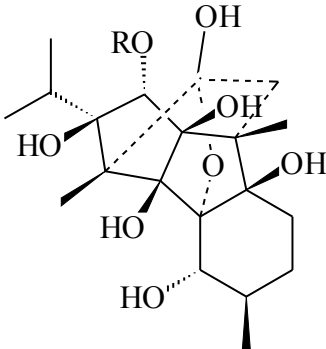
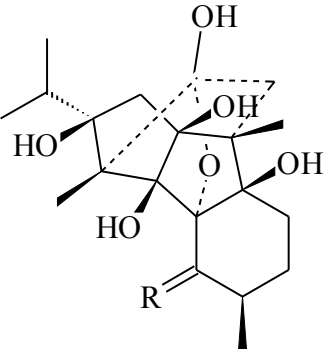
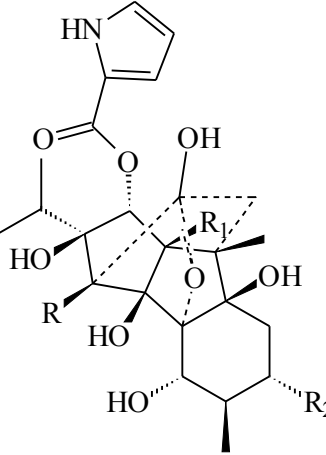
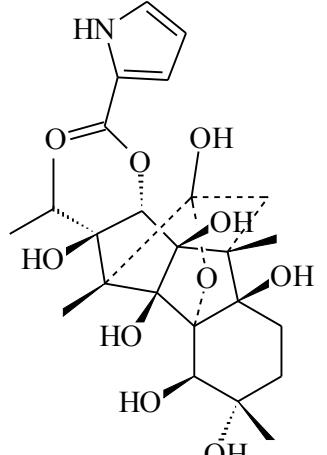
Devido as suas diferentes propriedades, os flavonóides tem um grande interesse econômico, como por exemplo, corantes para alimentos. Além disso, esses compostos também apresentam importância farmacológica, como por exemplo, propriedades antiinflamatórias, antitumoral, antiviral, antioxidante, entre outras.

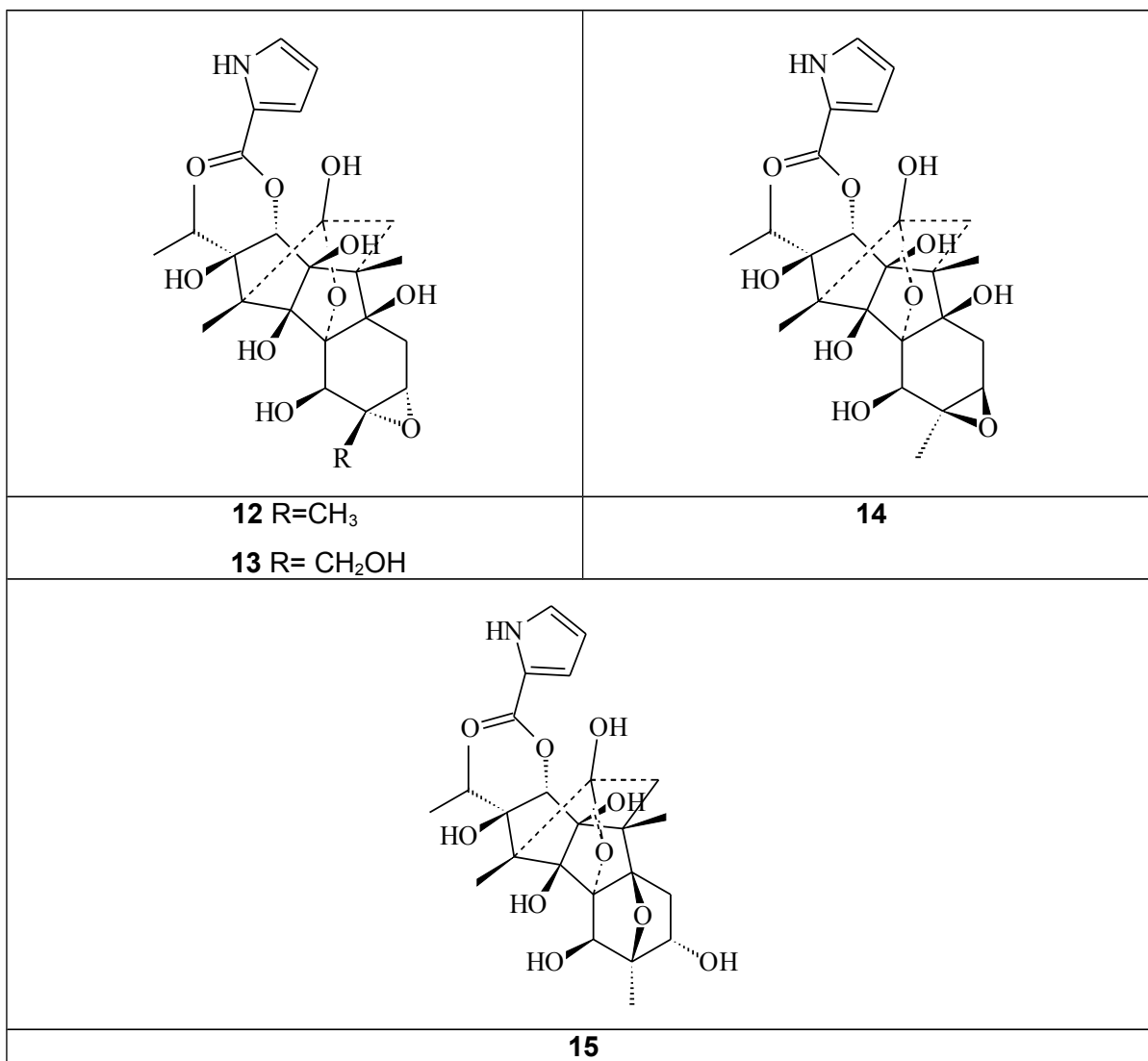
1.4 Diterpenos de esqueleto Rianodano

Os diterpenos do grupo rianodano são de ocorrência rara encontrados até o presente momento apenas na família Lauraceae, nos gêneros *Cinnamomum* e *Persea* e como alcalóides na família Flacourtiaceae e Loganiaceae. Os rianodanos são diterpenos pentacíclicos e têm sido amplamente investigados do ponto de vista de suas atividades inseticidas. Um diterpeno que foi muito investigado é a rianodina (**7**), esse tem a estrutura alcaloídica com o anel α -pirrol-éstercarboxilato na posição 3. A rianodina foi isolada pela primeira vez de *Ryania speciosa*, planta pertencente a família Flacourtiaceae, nativa do norte da América do Sul e bacia Amazônica (SIMÕES, 2003; WATERHOUSE, 1985). O Pó da madeira do caule de *Ryania speciosa* foi muito utilizado nos últimos cinquenta anos como inseticida para o controle de insetos na agricultura e jardins (GONZÁLEZ-COLOMA, 1992; LEHMBERG, 1994; WATERHOUSE, 1985;). Entretanto, devido a sua alta toxicidade para os mamíferos e custo muito elevado teve seu uso limitado como inseticida. Encontram-se também sob investigação os diterpenos não alcaloídicos cinnzeilanina (**4**) e cinnzeilanol (**3**) isolados das cascas de *Cinnamomum zeylanicum* e *C. cassia* e do caule de *Persea indica*, bem como o rianodol (**1**) isolado também do caule de *Persea indica*. Essa última é endêmica da

floresta das ilhas Canárias. O rianodol tem sido muito utilizado como inseticida principalmente de uso doméstico, para o controle de pragas como baratas e moscas. Estudos realizados com relação a estrutura *versus* atividade revelam que o rianodol e os demais diterpenos são mais seletivo para insetos do que para mamíferos, ou seja, são menos tóxicos para os mamíferos do que os alcalóides derivados da rianodina, sugerindo o modo de ação diferente destes compostos (GONZÁLEZ-COLOMA, 1992). E os substituintes presentes nos C-3 e C-10 são os mais importantes para a atividade destas substâncias. Portanto, a presença do grupo éster pirrolcarboxilato no C-3 não influencia na atividade inseticida dos alcalóides. Outros diterpenos do grupo rianodano vêm sendo investigados quanto ao seu potencial inseticida (Quadro 14, p. 23).

Quadro 14 - Diterpenos do grupo rianodano

Diterpenos isolados de <i>Persea indica</i>	
	
<p>1 R= H rianodol 2 R= COCH₃</p>	<p>3 R= α-OH 4 R= α-OCOCH₃ 5 R= β-OH 6 R= O</p>
Alcalóides isolados de <i>Spigelia anthelmia</i> (Loganiaceae)	
	
<p>7 R= CH₃; R₁= OH; R₂= H 8 R= CH₃; R₁= R₂= H 9 R= CH₂OH; R₁= R₂= H 10 R= CH₂OH; R₁= H; R₂= OH</p>	<p>11</p>



2. Objetivos

2.1. Contribuir para o estudo fitoquímico do gênero.

2.2. Isolar os constituintes químicos dos extratos das folhas de *E. nummularia*, *E. barbatum* e *E. passerinum*, além dos constituintes químicos dos frutos de *E. passerinum*.

2.3. Determinar as estruturas das substâncias através de métodos espectrométricos.

2.4. Realizar testes de atividade citotóxica, imunomoduladora, moluscicida, e larvicida com os extratos e as substâncias puras isoladas, visando obter moléculas candidatas á fármacos.

3. Experimental

3.1 Materiais e Métodos

3.1.1 Solventes, reagentes e equipamentos

Nas separações por CC os adsorventes utilizados foram sílica gel 60 da Merck com diâmetro de partícula entre 0,63-0,200 mm e 200-400 mm, sílica gel 60 H com diâmetro de 15 μm da Merck e Sephadex LH-20 da Pharmachia para a CE.

Nas CCDC foram utilizadas placas pré-preparadas de sílica gel 60 PF_{254+366 mm} da Merck. Nas CCDP foram utilizadas placas pré-preparadas de sílica gel F₂₅₄ de 1mm de espessura (Merck), e placas de alta resolução de sílica fluorescente PF_{254 mm} com 200 μm de espessura, da Whatman.

Os solventes utilizados foram hexano, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila, metanol acetona e ácido acético das marcas Merck, Quimex, Synth e Vetec, todos em grau PA.

A evaporação do solvente foi feita à pressão reduzida utilizando evaporador rotatório da marca Buchii.

As placas de CCDP foram reveladas por irradiação com luz UV (254 e 366 nm). Enquanto as placas de CCDC foram reveladas com luz UV (254 e 365 nm) e reveladores químicos. Dentre estes, os mais utilizados foram reagente de Liebermann-Burchard, Anisaldeído em Ácido sulfúrico, Vanilina em ácido sulfúrico (Stahl, 1969) e vapores de Iodo.

Os espectros de RMN foram obtidos em aparelho GEMINI 300 da Varian operando a 300 MHz para ¹H e 75 MHz para ¹³C e em aparelho INOVA 500 da Varian operando a 500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C, tendo como referencial interno o sinal do solvente deuterado e do tetrametilsilano.

Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetro de massas-EM HP modelo 5988-A.

Os espectros de IV foram obtidos em aparelho da JASCO modelo VALOR III em filme de acetona.

Os espectros de UV foram obtidos em espectrofotômetro Cary da Varian modelo 320.

3.2. Coleta e identificação do material vegetal

Para a realização deste trabalho foram estudados três espécimes do gênero: *E. nummularia* Peyr, *E. passerinum* Mart e *E. barbatum* O. E. Schulz.

E. nummularia Peyr está incluído na seção *Archerythroxyllum* (PLOWMAN, 2004) e no Brasil pode ser encontrado nos Estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Pernambuco e Piauí.

E. passerinum Mart. ocorre nos Estado da Bahia, Alagoas, Espírito Santo, Maranhão, Pernambuco e Rio de Janeiro.

E. barbatum O. E. Schulz faz parte da seção *Pogonophorum* (SANTOS, 2003) e pode ser encontrado nos Estados do Ceará, Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Pará e Piauí.

As folhas de *E. nummularia* foram coletadas em Março de 1999, na reserva do Campus da Universidade Estadual de Feira de Santana (Feira de Santana-BA). A espécie foi identificada pelo Prof Luciano P. de Queiroz e a exsicata encontra-se depositada no Herbário da UEFS sob o número 10442 (Figura 1, p. 28).

As folhas de *E. passerinum* foram coletadas em Outubro de 1998 na restinga do Parque Metropolitano da lagoa de Pituaçu (Salvador-BA) e os frutos em Outubro de 2000 na região de Siribinha (Conde-BA). A espécie foi identificada pela Profa. Maria Lenise S. Guedes e a exsicata encontra-se depositada no Herbário Alexandre Leal Costa do Instituto de Biologia da UFBA sob o número 043630 (Figura 2, p. 29).

As folhas de *E. barbatum* foram coletadas em Fevereiro de 2004 na Serra das Almas (Crateús-CE). A espécie foi identificada pelo Prof. F. S. Araújo e a exsicata encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra no Departamento de Biologia da UFCE sob o número 1297.

Figura 1- Exsicata de *E. nummularia*

Figura 2- Exsicata de *E. passerinum*

3.3. Obtenção dos extratos Orgânicos das folhas de *E. nummularia*

As folhas foram secas em estufa a 40 °C com ventilação. Após a secagem foram moídas fornecendo 1,2 Kg. Em seguida esse material foi submetido a maceração por três vezes consecutivas com MeOH e posteriormente foi particionado com hexano:MeOH/H₂O (9:1), CHCl₃:MeOH/H₂O (6:4) e AcOEt:H₂O (Figura 3).

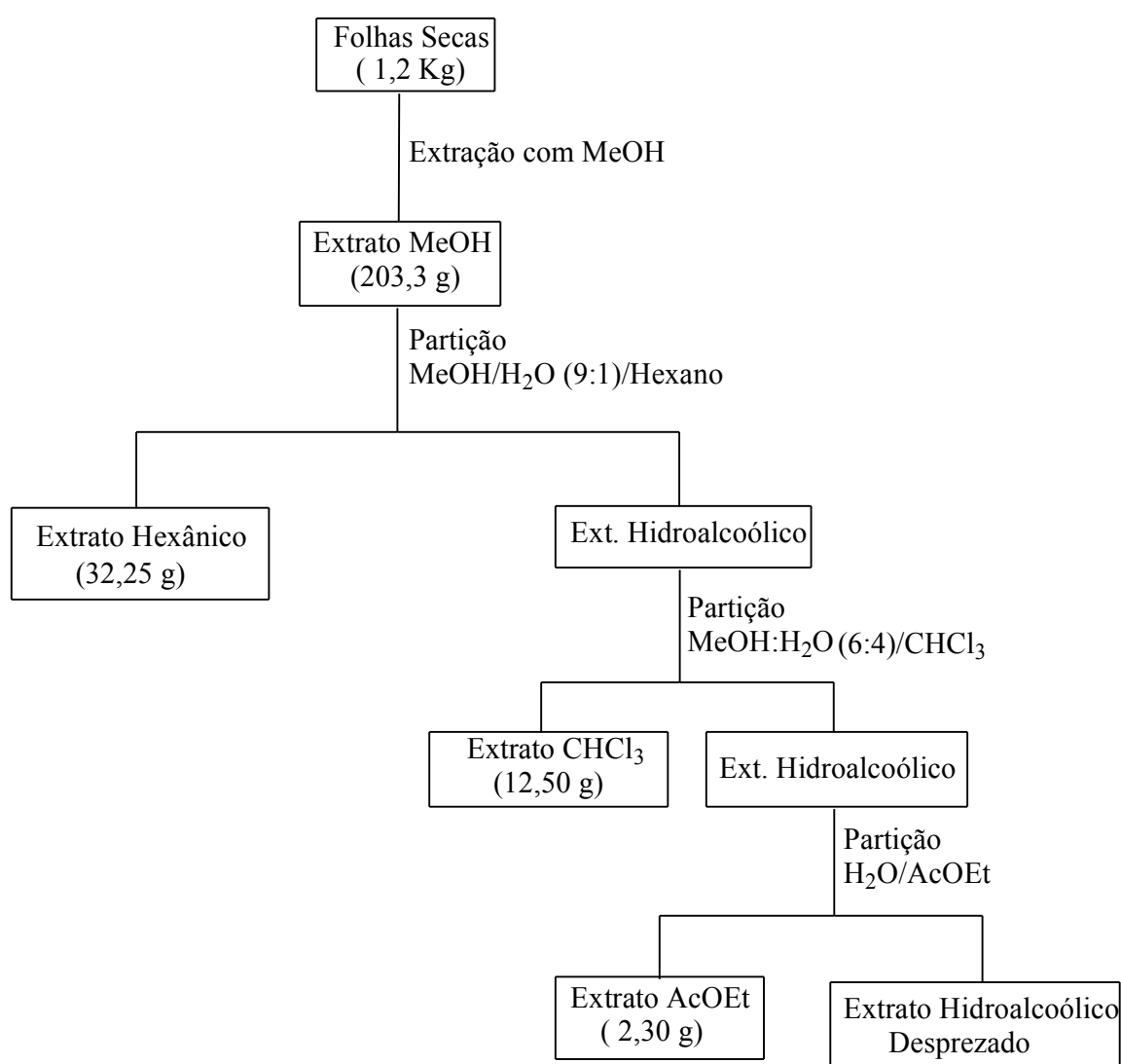


Figura 3 – Obtenção dos extratos orgânicos das folhas de *E. nummularia*

3.4. Purificação do extrato CHCl_3 das folhas de *E. nummularia*

O extrato de CHCl_3 (2,51 g) foi submetido a CC de sílica gel 60 utilizando como eluente mistura de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ em grau crescente de polaridade. Foram recolhidas dessa coluna principal vinte três frações de aproximadamente 50 ml cada, que foram agrupadas em outras onze subfrações após análise em CCDC utilizando o reagente de Liebermann-Burchard como revelador químico (Tabela 1).

Tabela 1 – Frações obtidas da CC principal do extrato CHCl_3 das folhas de *E. nummularia*

Código	F. agrupadas	Massa (mg)	Sistema ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$)
ENC 4	1-4	35,5	CHCl_3
ENC 10	5-10	39,3	CHCl_3
ENC 12	11-12	75,5	9:1
ENC 16	13-16	180,8	9:1
ENC 20	17-20	128,4	8:2 e 7:3
ENC 22	21-22	209,7	1:1
ENC 23	23	338,2	MeOH

3.4.1 – Purificação da fração ENC 10

A fração ENC 10 (39,3 mg) foi fracionada através de CE em gel de Sephadex LH-20 utilizando $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) como eluentes. Foram coletadas cinco frações que com base no perfil da CCDC utilizando mistura de Hex/AcOEt (8:2) como fase móvel e, AlCl_3 e luz UV como reveladores foram reunidas em três subfrações (Tabela 2).

Tabela 2 – Frações obtidas da CE de ENC 10

Código	F. reunidas	Massa (mg)	Substância Isolada
ENC10.1	1	15,2	clorofila
ENC10.3	2-3	18,3	graxa
ENC10.5	4-5	5,5	EN1

De acordo com a CCDC as frações ENC 10.1 e 10.3 tratavam-se de substância de natureza graxa e clorofila, respectivamente. Entretanto, a fração ENC 10.5 com base na CCDC, era constituída de uma substância pura, que após análise de RMN de ^1H e ^{13}C foi identificada como 7,4'-dimetilquercetina (**EN1**).

3.4.2 – Purificação da fração ENC 12

A fração ENC 12 (75,5 mg) foi purificada por meio de CC sob pressão de N₂ utilizando gel de sílica 60 H como fase estacionária e mistura de CHCl₃/MeOH (9:1) e (1:1) como fase móvel. Foram coletadas vinte e cinco frações de aproximadamente 15 ml que foram reunidas em três subfrações, após análise da CCDC (Tabela 3).

Tabela 3 – Frações obtidas da CC de ENC 12

Código	F. reunidas	Massa (mg)	Sistema (CHCl ₃ /MeOH)	Substância Isolada
ENC12.10	1-10	19,8	9:1	graxa
ENC12.11	11	31,7	9:1	EN2
ENC12.25	12.25	23,8	9:1 e 1:1	ftalato

A fração ENC 12.11 foi submetida a novo fracionamento através de CE levando assim, ao isolamento da substância **EN2** (21,0 mg) que foi identificada como 3 α - metoxi-2,6,12 β -trihidroxi-15-hidroxi-1 α -hidroxi-rianodano.

A fração ENC 16 (180,8 mg) foi submetida a CC de sílica gel 60 utilizando hex/AcOEt como eluentes coletando-se treze frações que foram agrupadas em quatro subfrações. As frações ENC16-3 e ENC16-4 levaram ao isolamento de triglicerídeos, após serem analisadas por RMN de ¹H e ¹³C. A fração ENC 20 foi desprezada por ser constituída também em grande quantidade por triglicerídeos. A fração ENC 22 apresentava-se como cristais em mistura com clorofila, sendo posteriormente, feita uma lavagem com metanol obtendo-se os cristais (48,1 mg) que após análise do ponto de fusão observou-se que tratava-se de um composto inorgânico.

3.5. Purificação do extrato AcOEt das folhas de *E. nummularia*

O extrato AcOEt (1,3 g) foi fracionado por meio de CC de sílica gel 60 utilizando como fase móvel CHCl₃/MeOH em grau crescente de polaridade. Foram

recolhidas vinte e três frações de aproximadamente 100 ml que foram reunidas com base na CCDC, em outras seis subfrações (Tabela 4).

Tabela 4 – Frações obtidas da CC principal do extrato AcOEt das folhas de *E. nummularia*

Código	F. reunidas	Massa (mg)	Sistema CHCl ₃ /MeOH
ENAC 2	1-2	36,7	CHCl ₃
ENAC 6	3-6	26,0	95:5
ENAC 9	7-9	307,0	9:1 e 8:2
ENAC 13	10-13	339,4	8:2 e 7:3
ENAC 19	14-19	276,0	7:3 e 6:4
ENAC 23	20-23	111,9	1:1 e MeOH

3.5.1 – Purificação da fração ENAC 6

A fração ENAC 6 com base no perfil da CCDC tendo como fase móvel CHCl₃/MeOH (9:1) e utilizando AlCl₃ como revelador químico, mostrou ser constituída de uma substância em mistura com clorofila. Posteriormente foi submetida a CE em gel de Sephadex LH-20 e mistura de CH₂Cl₂/MeOH (1:1) como eluente, sendo coletadas cinco frações que foram agrupadas em duas subfrações. A fração ENAC 6.1 (22,3 mg) era constituída de clorofila e a fração ENAC 6.2 (3,7 mg) constituía-se de uma substância pura com base no perfil da CCDC revelada com AlCl₃, mas devido à pequena quantidade de massa não foi identificada.

3.5.2 – Purificação da fração ENAC 9

A fração ENAC 9 com base na análise da CCDC mostrou que tratava-se de uma mistura de duas substâncias. Sendo submetida a CC sob pressão utilizando sílica gel 60 H e mistura de CHCl₃/MeOH como eluentes em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas vinte e duas frações que foram agrupadas em cinco subfrações (Tabela 5).

Tabela 5 – Frações obtidas da CC de ENAC 9

Código	F. reunidas	Massa (mg)	Sistema CHCl ₃ /MeOH	Substâncias Isoladas
ENAC 9.6	1-6	9,4	CHCl ₃ e 9:1	-

ENAC 9.12	7-12	12,0	9:1	EN3
ENAC 9.16	13-16	161,6	8:2	EN3 e EN4
ENAC 9. 19	17-19	38,5	7:3 e 6:4	EN4
ENAC 9.22	20-22	75,5	1:1 e MeOH	corante

A fração ENAC 9.12 de acordo com o perfil da CCDC eluída com mistura de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1) e revelada com o reagente de Liebermann-Burchard revelou ser constituída de apenas uma substância. Após análise de RMN de ^1H e ^{13}C essa substância foi identificada como quercetina **EN3**. Enquanto, a fração ENAC 9.16 tratava-se de uma mistura de **EN3** e *epicatequina* **EN4** e a fração ENAC 9.19 também era constituída de **EN4**.

3.5.3 – Purificação da fração ENAC 13

De acordo com a CCDC a fração ENAC 13 (399,4 mg) revelou ser constituída de duas substâncias. Sendo, posteriormente purificada por meio de CC de sílica gel 60 utilizando como fase móvel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ coletando-se trinta frações de 70 ml aproximadamente, que foram reunidas em quatro subfrações (Tabela 6).

Tabela 6 – Frações obtidas da CC de ENAC 13

Código	F.reunidas	Massa (mg)	Sistema $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	Subst. Isoladas
ENAC13.5	1-5	29,2	95:5 e 9:1	corante
ENAC13.16	6-16	216,3	85:15 e 8:2	EN4 e EN5
ENAC13.23	17-23	22,0	7:3	EN5
ENAC13.30	24-30	81,6	6:4; 1:1 e MeOH	corante

Com base na CCDC observou-se que a fração ENAC 13.16 era composta de duas substâncias, **EN4** já isolada anteriormente e **EN5**. E a fração ENAC 13.23 tratava-se de uma substância pura **EN5** que foi identificada como quercetina-3-glicopiranosídeo, após análise de RMN de ^1H e ^{13}C .

3.6. Obtenção dos extratos Orgânicos das folhas de *E. passerinum*

As folhas de *E. passerinum* foram submetidas aos mesmos procedimentos descritos anteriormente para as folhas de *E. nummularia* p. 30 fornecendo os

extratos orgânicos (Figura 4, p. 36). Apenas o extrato AcOEt foi submetido a fracionamento. Os mesmos procedimentos foram aplicados para os frutos de *E. passerinum* (Figura 5, p. 37).

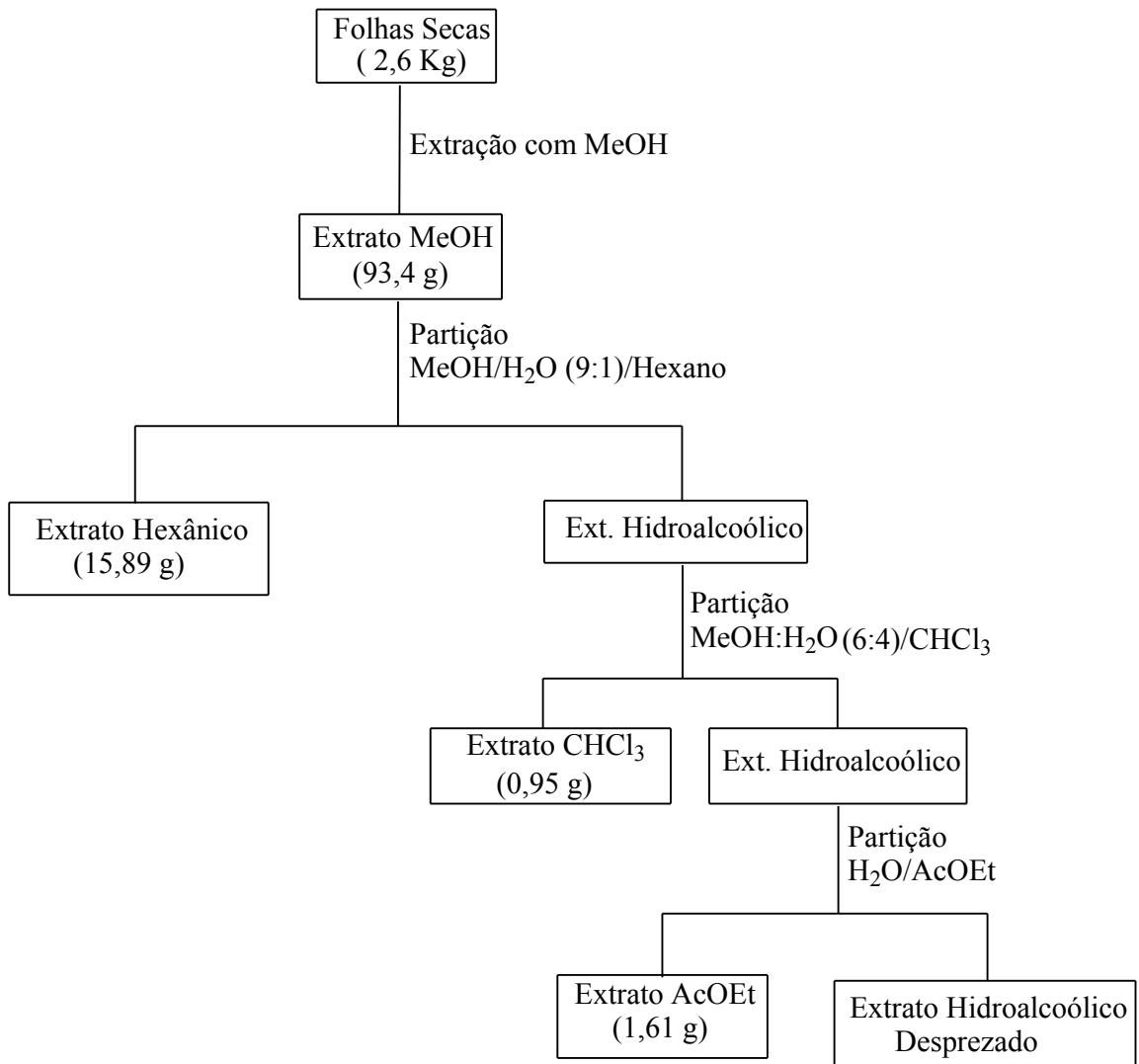


Figura 4 – Obtenção dos extratos Orgânicos das folhas de *E. passerinum*

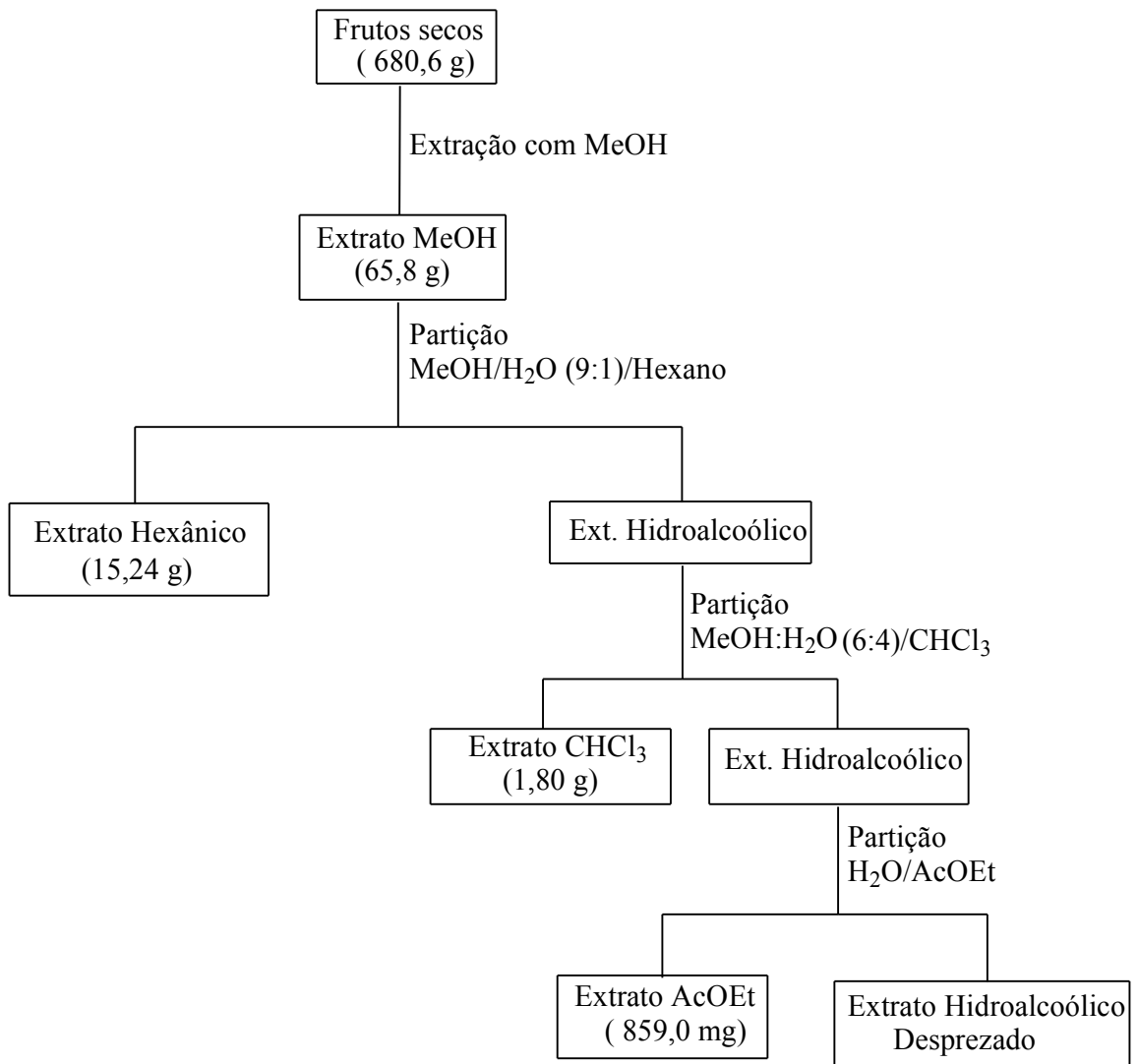


Figura 5 – Obtenção dos extratos Orgânicos dos frutos de *E. passerinum*

3.7. Purificação do extrato Acetato de Etila das folhas de *E. passerinum*

O extrato AcOEt (2,3 g) foi submetido a CC de sílica gel 60 utilizando mistura de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ como fase móvel. Desta coluna foram coletadas vinte e três frações de 100 ml aproximadamente, que após análise da CCDC foram agrupadas em cinco outras subfrações (Tabela 12).

Tabela 12 – Frações obtidas da CC Principal do extrato AcOEt das folhas de *E. passerinum*

Código	F. reunidas	Massa (mg)	Sistema ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$)
EPAC 2	1-2	39,5	CHCl_3
EPAC 6	3-6	44,8	9:1
EPAC 8	7-8	225,6	8:2
ENCH 11	9-11	226,8	8:2 e 7:3
ENCH 23	12-23	1028,4	6:4; 1:1; AcOEt e MeOH

Com base na CCDC utilizando mistura de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ em vários gradientes de polaridade como fase móvel e como revelador químico os reagentes de Liebermann-Burchard e AlCl_3 , pode-se observar que a fração EPAC 6 era constituída de uma mistura de duas substâncias. Sendo, então submetida a fracionamento.

3.7.1 – Purificação da fração EPAC 6

A fração EPAC 6 (44,8 mg) foi purificada por meio de CE em gel de Sephadex LH-20 utilizando $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) como eluente fornecendo três frações (Tabela 13). Desta forma, foram isoladas as substâncias **EP1** que foi identificada como 3,10- α -diidroxí-2,6,12 β -trihidroxí-11-hidroxí-rianodano e **EN3** quercetina.

Tabela 13 – Frações obtidas da CE de EPAC 6

Código	Frações	Massa (mg)	Substância Isolada
EPAC 6.1	1	12,4	EP1
EPAC 6.2	2	9,3	graxa
EPAC 6.3	3	23,1	EN3

3.7.2 – Purificação da fração EPAC 8

A fração EPAC 8 (225,6 mg) com base no perfil da CCDC era composta de duas substâncias. Sendo, posteriormente submetida a CC sob pressão utilizando como eluente mistura de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ em grau crescente de polaridade. Foram recolhidas dezesseis frações que foram reunidas em cinco subfrações (Tabela 14).

Tabela 14 – Frações obtidas da CC de EPAC 8

Código	F. reunidas	Massa (mg)	Sistema ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$)	Subst. Isoladas
EPAC 8.3	1-3	29,3	95:5 e 9:1	graxa
EPAC 8.7	4-7	68,3	8:2	EN4
EPAC 8.12	8-12	97,1	8:2 e 7:3	EN4 e EN5
EPAC 8.14	13-14	18,0	7:3	EN5
EPAC 8.16	15-16	10,2	1:1 e MeOH	graxa

De acordo com o perfil da CCDC a fração EPAC 8.7 apresentou uma substância pura, que de acordo com as suas características foi comparada ao padrão já isolado anteriormente em *E. nummularia* e foi identificada como a

epicatequina (**EN4**). A fração EPAC 8.14 também revelou-se como uma substância pura que após análise de RMN de ^1H e de ^{13}C foi identificada como quercetina-3-O-glicopiranosídeo (**EN5**). Enquanto, a fração EPAC 8.12 era composta da mistura das duas substâncias **EN4** e **EN5**.

3.7.3 – Purificação da fração EPAC 11

Pode-se verificar com base na análise da CCDC que a fração EPAC 11 (226,8 mg) era constituída de uma mistura de três substâncias. Sendo, desta forma submetida a CCDP utilizando 100 ml de uma mistura de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8:2) e vinte gotas de ácido acético eluindo a placa por três vezes. Desta placa foi isolada a substância **EN5** já identificada anteriormente.

3.7.4 – Purificação da fração EPAC 23

A fração EPAC 23 (1028,4 mg) foi purificada através de CC de fase reversa utilizando como fase estacionária poliamida e como fase móvel mistura de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$. Foram recolhidas onze frações que foram extraídas com AcOEt e após análise da CCDC foram reunidas em seis subfrações (Tabela 15).

Tabela 15 – Frações obtidas da CC de EPAC 23

Código	F. reunidas	Massa (mg)	Sistema ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$)	Subst. Isoladas
EPAC 23.2	1-2	153,3	8:2 e 7:3	graxa
EPAC 23.3	3	13,8	6:4	graxa
EPAC 23.5	4-5	4,2	1:1 e 4:6	-
EPAC 23.7	6-7	40,1	3:7	-
EPAC 23.8	8	65,2	2:8	EN5
EPAC 23.11	9-11	136,6	MeOH	graxa

Com base no perfil da CCDC a fração EPAC 23.7 era constituída de uma única substância que devido à pequena quantidade de massa não foi identificada.

3.8. Purificação do extrato CHCl_3 dos frutos de *E. passerinum*

O extrato CHCl_3 (1,8 g) foi solubilizado em 10 ml de CHCl_3 e extraído com 70 ml de solução ácida de HCl 1N. A fase aquosa ácida foi alcalinizada e extraída com CHCl_3 . A fase CHCl_3 (170,8 mg) obtida a partir da extração da fase aquosa foi submetida a CC sob pressão utilizando sílica gel 60 H como fase estacionária e mistura de $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ como fase móvel. Foram coletadas setenta frações de 20 ml aproximadamente que foram agrupadas em outras quatro subfrações (Tabela 16).

Tabela 16 – Frações obtidas da CC principal do extrato CHCl_3 dos frutos de *E. passerinum*

Código	F. reunidas	Massa (mg)	Sistema ($\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$)	Subst. Isoladas
EPCFr 11	1-11	10,7	1:1	graxa
EPCFr 31	12-31	78,5	1:1 e 4:6	EN2
EPCFr 40	32-40	54,8	3:7	graxa
EPCFr 70	41-70	16,8	AcOEt e MeOH	graxa

De acordo com o perfil da CCDC utilizando vários sistemas de solventes como fase móvel e como revelador químico os reagentes de Liebermann-Burchard e Vanilina. A fração EPCFr 31 era composta de uma única substância **EN2** também isolada nas folhas de *E. nummularia*.

3.9. Purificação do extrato AcOEt dos frutos de *E. passerinum*

O extrato AcOEt (859, 0 mg) foi submetido aos mesmos procedimentos do extrato CHCl_3 . Sendo que a fase aquosa foi alcalinizada e extraída com AcOEt. A fase AcOEt (100,6 mg) purificada por meio de CC sob pressão utilizando como eluente mistura de $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ coletando-se cinquenta frações que foram reunidas em quatro subfrações com base na CCDC (Tabela 17).

Tabela 17 – Frações obtidas da CC principal do extrato AcOEt dos frutos de *E. passerinum*

Código	F. reunidas	Massa (mg)	Sistema (CHCl ₃ /AcOEt)	Subst. Isoladas
EPACFr 12	1-12	16,5	1:1	graxa
EPACFr 27	13-27	23,8	1:1 e 4:6	EN2
EPACFr 40	28-40	13,5	3:7	EP1
EPACFr 50	41-50	16,8	AcOEt e MeOH	graxa

Com base na CCDC a fração EPACFr 27 era constituída da substância **EN2** já isolada anteriormente, enquanto a fração EPACFr 40 era composta por outra substância **EP1** também isolada nas folhas de *E. passerinum*.

3.10. Obtenção dos extratos Orgânicos das folhas de *E. barbatum*

As folhas secas e moídas (5,4 Kg) foram submetidas a maceração com MeOH por três vezes consecutivas obtendo-se o extrato MeOH. Esse extrato MeOH foi particionado com CHCl₃:MeOH/H₂O (6:4) e AcOEt:H₂O (Figura 6, p.43). O extrato acetato de etila desta espécie, em screening farmacológico preliminar apresentou atividade imunomoduladora e tripanocida.

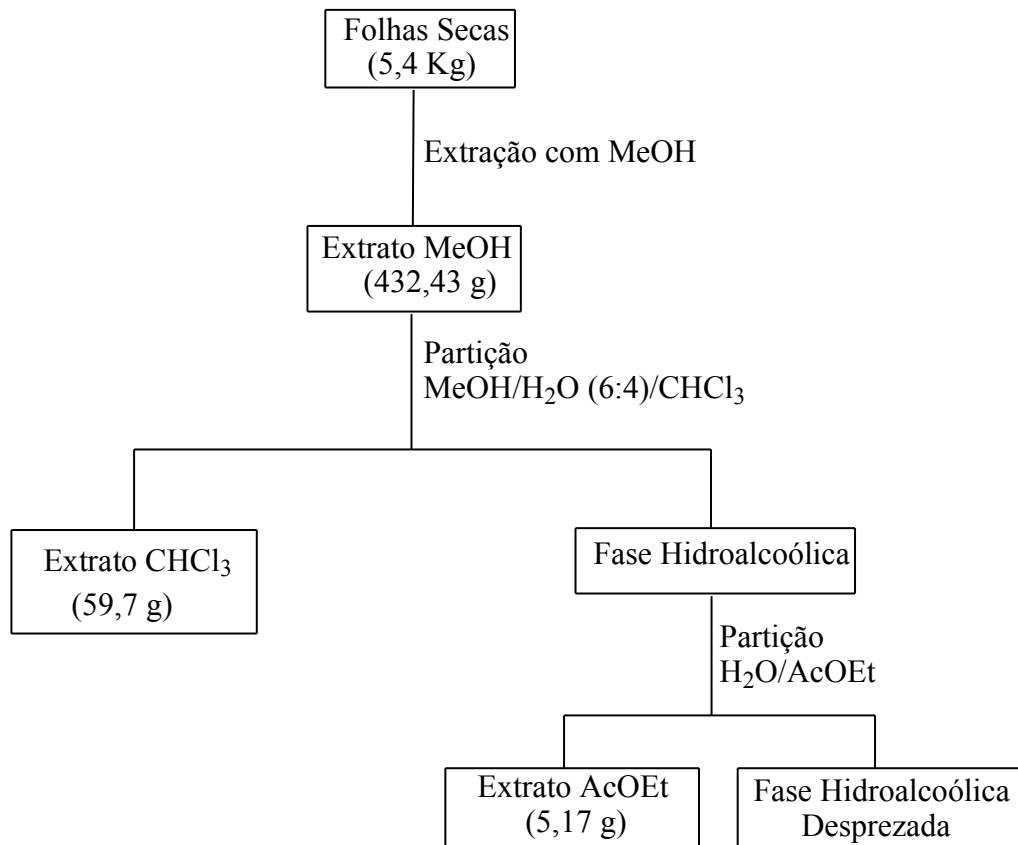


Figura 6 – Obtenção dos extratos Orgânicos das folhas de *E. barbatum*

3.11. Purificação do extrato CHCl_3 das folhas de *E. barbatum*

Uma parte do extrato CHCl_3 (2,07 g) foi submetida a cromatografia em coluna filtrante utilizando sílica gel 60 como fase estacionária e os sistemas hexano, hex:AcOEt (9:1), hex:AcOEt (8:2), hex:AcOEt (7:3), hex:AcOEt (1:1) e MeOH como eluentes. Desta forma, foram obtidas seis frações que foram reunidas em outras quatro subfrações após análise em CCDC utilizando Liebermann-Burchard e Vanilina como reveladores químicos (Tabela 13). A fração EBC1 foi desprezada, pois era constituída de grande quantidade de material graxo. Apenas as frações EBC 3 e EBC 5 de acordo com o perfil da CCDC mostraram ser de interesse.

Tabela 13 – Frações obtidas da CC principal do extrato CHCl_3 das folhas de *E. barbatum*

Código	F. reunidas	Massa (mg)	Sistema (hex/AcOEt)
EBC 1	1	175,0	hexano
EBC 3	2-3	379,5	9:1 e 8:2
EBC 5	4-5	217,4	7:3 e 1:1
EBC 6	6	446,1	MeOH

3.11.1 – Purificação da fração EBC 3

A fração EBC 3 (379,5 mg) foi submetida a CC de sílica gel 60 utilizando mistura de hex/AcOEt como fase móvel sendo coletadas trinta e nove frações de aproximadamente 20 ml que foram agrupadas em outras seis subfrações segundo a CCDC (Tabela 14).

Tabela 14 – Frações obtidas da CC de EBC 3

Código	F. reunidas	Massa (mg)	Sistema	Subst.
--------	-------------	------------	---------	--------

			(hex/AcOEt)	Isoladas
EBC 3.14	1-14	8,6	hexano	-
EBC 3.16	15-16	8,3	98:2	EB1
EBC 3.18	17-18	30,2	98:2	EB1
EBC 3.25	19-25	33,3	95:5	triglicérido
EBC 3.32	26-32	29,1	95:5 e 9:1	EB2 e EB3
EBC 3.39	33-39	189,0	9:1; 8:2 e AcOEt	-

Com base no perfil da CCDC verificou-se que a fração EBC 3.16 era constituída de substância pura que foi identificada de acordo com a RMN de ^1H e ^{13}C como β -amirina esterificada com ácido graxo (**EB1**). Igualmente a fração EBC 3.32 também mostrou ser constituída de uma única substância que quando analisada por RMN de ^1H e ^{13}C foi identificada como sendo uma mistura de β -amirina e lupeol (**EB2**) e (**EB3**).

3.11.2. Purificação da fração EBC 5

A fração EBC 5 (217,4 mg) foi submetida a CC de sílica gel 60 utilizando mistura de $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ como eluente. Dessa coluna foram coletadas quatorze

frações que após análise de CCDC foram reunidas em quatro subfrações (Tabela 15).

Tabela 15 – Frações obtidas da CC de EBC 5

Código	F. reunidas	Massa (mg)	Sistema (CHCl ₃ /AcOEt)	Subst. Isoladas
EBC 5.2	5	47,3	CHCl ₃	graxa
EBC 5.6	6	55,7	CHCl ₃	EB4
EBC 5.10	7-10	19,7	CHCl ₃	-
EBC 5.12	11-12	31,3	9:1 e 8:2	EB5
EBC 5. 14	11-14	60,0	7:3; 1:1 e AcOEt	graxa

A fração EBC 5.6 quando comparada com o padrão mostrou ser composta de β -sitosterol (**EB4**), enquanto a fração EBC 5.10 era composta pela substância (**EB5**) e graxa. A fração EBC 5.12 de acordo com a CCDC tratava-se de uma única substância que foi identificada como uma feofitina-a (**EB5**).

3.12. Purificação do extrato AcOEt das folhas de *E. barbatum*

A fase Acetato (5,17 g) foi submetida a fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel 60, utilizando mistura de CHCl₃/MeOH como eluente em grau crescente de polaridade. Foram coletadas 25 frações que após análise em

CCDC usando Liebermann Burchard como reagente químico foram reunidas em outras oito subfrações (Tabela 16).

Tabela 16 – Frações obtidas da CC principal do extrato AcOEt das folhas de *E. barbatum*

Código	F. reunidas	Massa (mg)	Sistema (CHCl ₃ /MeOH)
EBAC 4	1-4	49,0	CHCl ₃
EBAC 5	5	49,8	CHCl ₃
EBAC 6	6	40,7	CHCl ₃
EBAC 10	7-10	112,4	9:1
EBAC 12	11-12	123,8	8:2
EBAC 14	13-14	1403,3	8:2 e 75:25
EBAC 16	15-16	1671,4	7:3
EBAC 25	17-25	992,4	6:4; 1:1 e MeOH

A fração EBAC 10 de acordo com a CCDC era composta por uma única substância que quando comparada com o padrão foi identificada como quercetina (**EN3**), já isolada anteriormente.

3.12.1 Purificação da fração EBAC 12

A fração EBAC 12 com base na CCDC era constituída de duas substâncias. Sendo posteriormente, submetida a novo fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel com diâmetro de partícula entre 200-400 µm e utilizando como eluente mistura de CHCl₃/MeOH em grau crescente de polaridade. Foram coletadas cinco frações que foram reagrupadas em quatro subfrações (Tabela 17, p. 48).

Tabela 17 – Frações obtidas da CC de EBAC 12

Código	F. reunidas	Massa (mg)	Sistema (CHCl ₃ /MeOH)	Subst. Isoladas
EBAC12.2	1-2	10,2	CHCl ₃ e 9:1	EN3
EBAC12.3	3	42,0	9:1 e 8:2	EN3 e EN4
EBAC12.4	4	45,0	8:2	EN4
EBAC12.5	5	7,1	AcOEt	corante

De acordo com o perfil da CCDC a fração EBAC 12.2 era constituída pela quercetina (**EN3**). A fração EBAC 12.4 também era composta por uma única substância que quando comparada com o padrão foi identificada como *epicatequina* (**EN4**). Enquanto a fração EBAC 12.3 tratava-se de uma mistura das substâncias **EN3** e **EN4**.

3.12.3 Purificação da fração EBAC 14

A fração EBAC (1403,3 mg) foi submetida a CC de sílica gel 60 utilizando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ como eluente. Dessa coluna foram coletadas vinte e cinco frações que após análise em CCDC utilizando Liebermann Burchard como reagente químico foram reunidas em quatro subfrações (Tabela 18).

Tabela 18 – Frações obtidas da CC de EBAC 14

Código	F. reunidas	Massa (mg)	Sistema ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$)	Subst. Isoladas
EBAC14.6	1-6	84,1	9:1	-
EBAC14.12	7-12	100,5	8:2	EN4
EBAC14.16	13-16	178,3	75:25 e 7:3	EB6
EBAC14.25	17-25	849,5	6:4; AcOEt e MeOH	Corante e EB6

Com base no perfil da CCDC a fração EBAC 14.12 era composta pela substância **EN4**. Enquanto a fração EBAC14.16 após análise em CCDC tendo como fase móvel mistura de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8:2) eluindo a placa por duas vezes e utilizando o AlCl_3 como revelador, mostrou ser constituída também de uma única substância que foi identificada como sendo a quercetina-3-ramnopiranosídeo (**EB6**).

3.12.4 Purificação da fração EBAC 16

A fração EBAC 16 (1671,4 mg) com base na CCDC era composta de duas substâncias. Essa posteriormente, foi submetida a CC de sílica gel 60 utilizando

mistura de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ como eluente. Dessa coluna foram recolhidas vinte e três frações que foram agrupadas em outras cinco subfrações (Tabela 19).

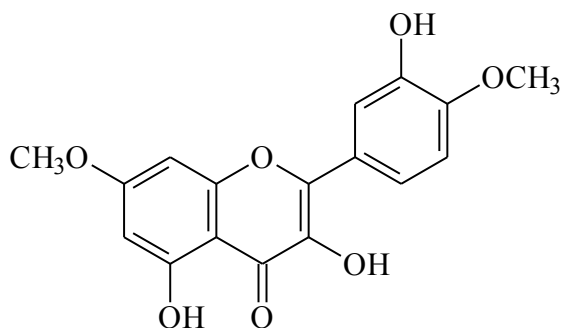
Tabela 19 – Frações obtidas da CC de EBAC 16

Código	F. reunidas	Massa (mg)	Sistema ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$)	Subst. Isoladas
EBAC16.6	1-6	129,7	9:1	corante
EBAC16.9	7-9	398,9	8:2 e 7:3	EB7
EBAC16.10	10	34,6	7:3	-
EBAC16.12	11-12	8,6	7:3	EB8
EBAC16.23	13-23	733,0	6:4; 1:1 e MeOH	EB8 e corante

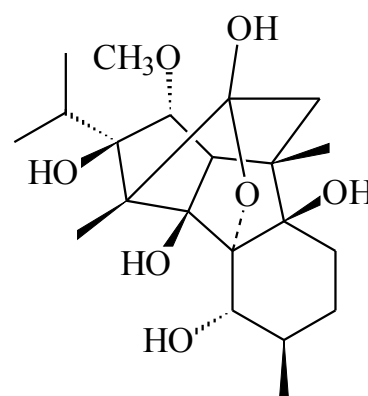
Uma porção (100 mg) da fração EBAC 16.9 foi submetida a CCDP utilizando mistura de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8:2) eluindo a placa por duas vezes, assim levou ao isolamento da substância 7, 4'-dimetilquercetina-3-rutinosídeo **EB7** (10,2 mg). Enquanto a fração EBAC 16.12 de acordo com o perfil da CCDC mostrou ser uma única substância que com base na RMN de ^1H e ^{13}C foi identificada como quercetina-3-rutinosídeo **EB8**.

Quadro 7 - Substâncias Isoladas das folhas de *E. nummularia*

Extrato CHCl_3

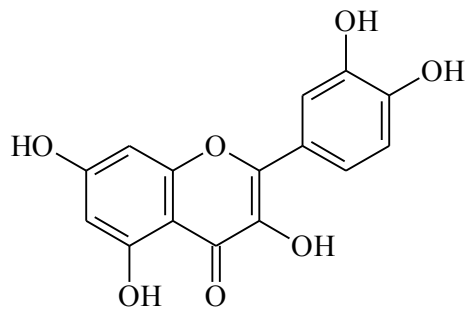


4',7-dimetil-quercetina (**EN1**)

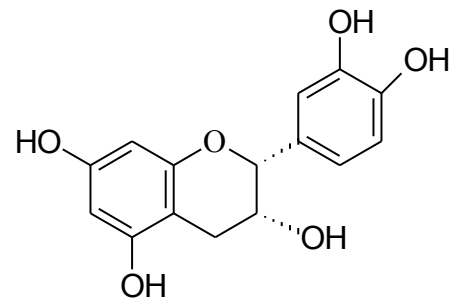


3 α - metoxi-2,6,12 β -trihidroxi-15-hidroxi-1 α -
hidroxi-rianodano (**EN2**)

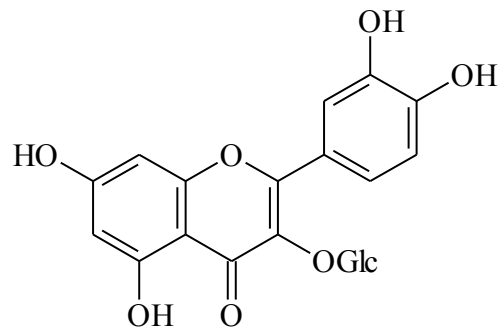
Extrato AcOEt



Quercetina (**EN3**)

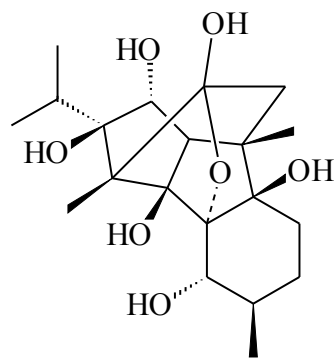


Epicatequina (**EN4**)

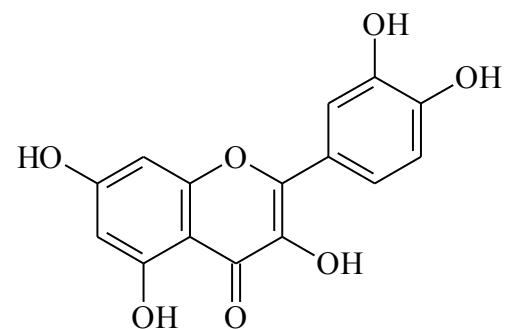


Quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (**EN5**)

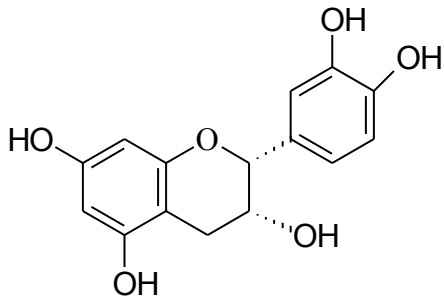
Quadro 8 - Substâncias Isoladas do extrato AcOEt das folhas de *E. pesserinum*



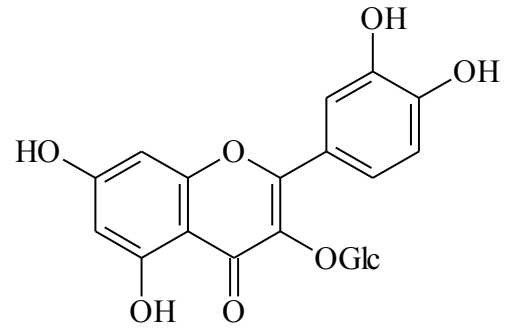
3,10- α -diidroxi-2,6,12 β -trihidroxi-11-hidroxi-rianodano (**EP1**)



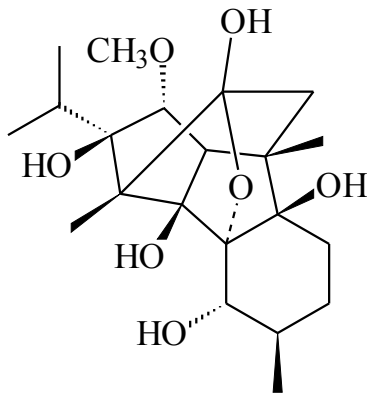
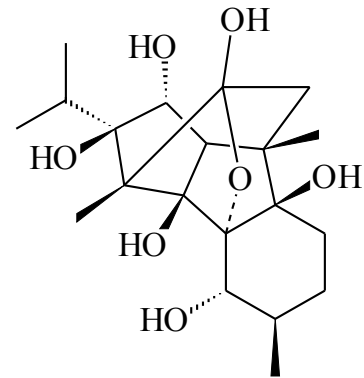
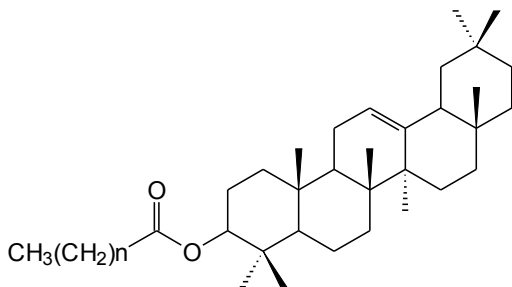
Quercetina (**EN3**)



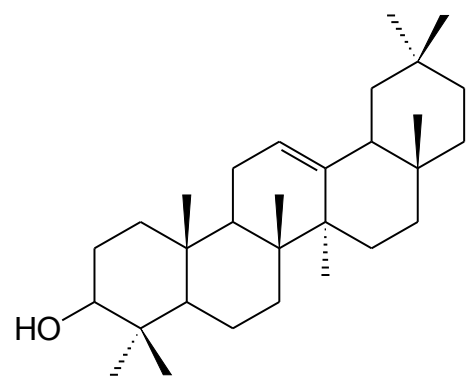
Epicatequina (EN4)



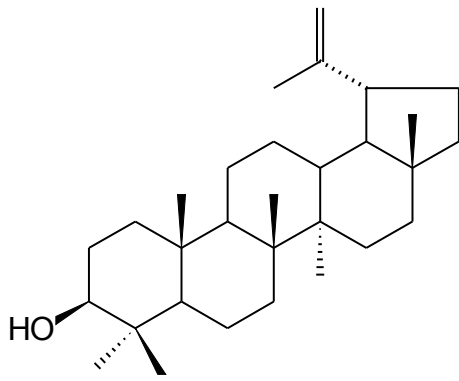
Quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo (EN5)

Quadro 9 - Substâncias isoladas dos frutos de *E. passerinum*3α- metoxi-2,8,12β-trihidroxi-15-hidroxi-10α-
hidroxi-rianodano (EN2)3,10-α-diidroxi-2,6,12β-trihidroxi-15-hidroxi-
rianodano (EP1)Quadro 10 - Substâncias Isoladas das folhas de *E. barbatum*Extrato CHCl₃

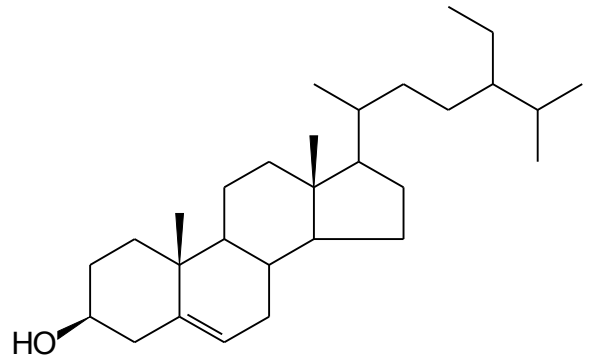
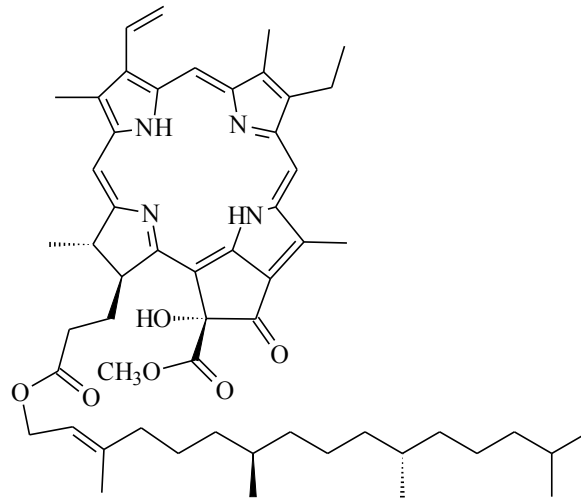
palmitato de β-amirina (EB1)



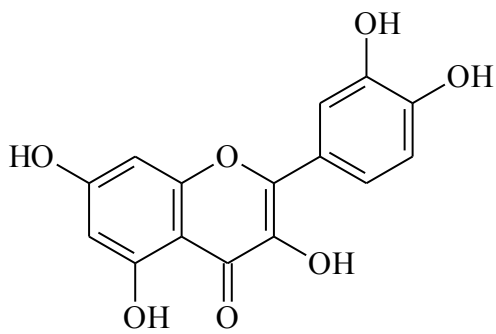
β-amirina (EB2)



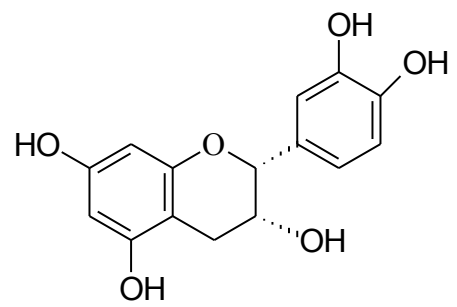
Lupeol (EB3)

 β -sitosterol (EB4)13²-(OH)-Feofitina a (EB5)

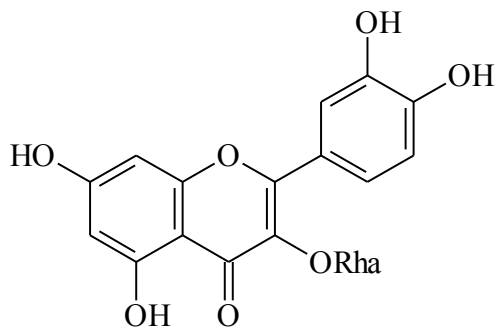
Extrato AcOEt



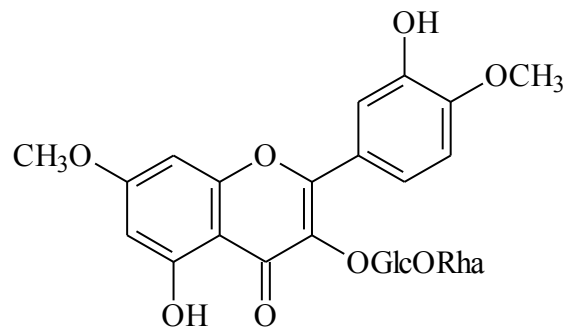
Quercetina (EN3)



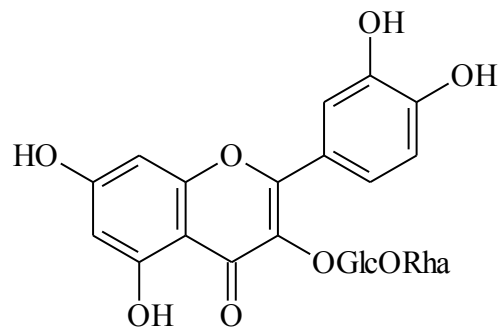
Epicatequina (EN4)



Quercetina-3-O-ramnopiranosídeo (**EB6**)



7, 4'-dimetilquercetina-3-O-rutinosídeo (**EB7**)



Quercetina-3-O-rutinosídeo (**EB8**)

3.13. Metodologia dos testes de atividade

3.13.1 Metodologia do teste de citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade foi utilizada a metodologia da letalidade das larvas de *Artemia salina* (BST) desenvolvido por MEYER (1982) e adaptado por SERRANO (1996).

Para a realização do teste de citotoxicidade os ovos de *Artemia salina* foram colocados para eclodir em um aquário contendo água artificial do mar sob oxigenação. Após 48 h dez larvas foram transferidas para uma ampola de vidro

contendo a solução do extrato bruto ou da substância pura. Após 24 horas foi feita a contagem dos camarões sobreviventes. Os testes preliminares foram realizados em duplicatas nas concentrações de 1000, 500 e 100 mg/l para extratos e nas concentrações de 100, 75, 50, 25 e 10 mg/l para as substâncias. As amostras foram solubilizadas em 0,2 µl de DMSO. A realização do teste de letalidade da *A. salina* foi acompanhada por um teste em branco com DMSO.

O índice de letalidade é determinado utilizando o método *probit analysis* do software Stats Direct statistical. São considerados positivos segundo ANDERSON (1991) os resultados de LC₅₀ em concentrações menores ou igual a 200 mg/l.

3.13.2 Metodologia do teste larvicida

Para a realização do teste larvicida foi utilizada a metodologia descrita por CONSOLARI (1994).

Para a utilização do teste larvicida os ovos de *Aedes aegypti* foram colocados para eclodir em uma bacia com água desclorada. Foram preparadas soluções aquosas com o extrato nas concentrações de 500 e 100 ppm e com as substâncias puras nas concentrações de 100, 75, 50 e 10 ppm. Em seguida foram adicionadas dez larvas em cada recipientes contendo a solução. A contagem das larvas vivas e mortas foi efetuada após 24 h e 48 h. Os testes preliminares foram realizados em duplicatas utilizando larvas jovens com cerca de dois dias. As amostras foram solubilizadas em 0,5 µl de DMSO e acompanhadas por um branco com DMSO.

3.13.3 Metodologia do teste moluscicida

Para a realização do ensaio moluscicida foi utilizada a metodologia descrita por MARSTON (1991).

Para a realização do teste foram utilizados caramujos adultos e de tamanhos uniformes da espécie *Biomphalaria glabrata* criados em aquário e embriões com cerca de dois dias. Para o ensaio com caramujos adultos foram utilizadas soluções aquosas do extrato nas concentrações de 100, 50 e 10 ppm e com as substâncias puras nas concentrações de 10 ppm e para o ensaio com embriões foram utilizadas soluções nas concentrações de 10 e 1 ppm. Posteriormente foram colocados cinco caramujos em cada recipientes contendo a solução, os quais ficaram em contato

com esta por 24 h. Para o teste com os embriões a desova foi colocada em contato com a solução por 24 h. Após 24 h foi observado através de microscópio, os batimentos cardíacos dos caramujos bem como, o desenvolvimento dos embriões. Em seguida os caramujos e a desova ficaram em contato com água e a cada 24 h era feita a observação até completar 96 h. Após este período foi feita a contagem dos caramujos e embriões vivos e mortos. Os testes preliminares foram realizados em duplicatas. As amostras foram solubilizadas em 0,1 µl de DMSO. Como controle positivo utilizou-se a niclosamida.

4. Dados Físicos e Espectroscópicos das Substâncias Isoladas

EB1 - palmitato de β -amirila ou palmitato de 3β -hidroxi-olean-12-enila:

sólido amorfo branco; $C_{46}H_{80}O_2$; MM= 664;

EMIE (70 eV) m/z (int. rel.): $[M]^+$ 664 (1), 409 (3), 218 (100), 203 (22), 189 (10);

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 5,19 (*t*, 1H, H-12); 4,51 (*t*, 1H, H-3); 1,14 (*s*, 3H, H-27);

1,03 (*s*, 3H, H-25); 1,01 (*s*, 3H, H-23); 0,98 (*s*, 3H, H-26); 0,97 (*s*, 3H, H-30);

0,94 (*s*, 3H, H-29); 0,87 (*s*, 3H, H-24); 0,77 (*s*, 3H, H-28);

RMN ^{13}C : Tabela 24, p. 141;

EB2 - β -amirina ou 3β -hidroxi-olean-12-eno:

sólido cristalino branco; $C_{30}H_{50}O$; MM= 426;

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 5,19 (*t*, 1H, H-12); 3,20 (*m*, 1H, H-3); 1,14 (*s*, 3H, H-27);

1,03 (*s*, 3H, H-25); 1,0 (*s*, 3H, H-23); 0,97 (*s*, 3H, H-26); 0,95 (*s*, 3H, H-30);

0,94 (*s*, 3H, H-29); 0,86 (*s*, 3H, H-24); 0,76 (*s*, 3H, H-28);

RMN ^{13}C : Tabela 24, p. 141;

EB3 - Lupeol ou 20(29)-Lupen- 3β -ol:

sólido cristalino branco; $C_{30}H_{50}O$, MM= 426;

RMN 1H ($CDCl_3$): δ 4,69 (*d*, $J=1,1$ Hz, 1H, H-29); 4,57 (*d*, $J=1,1$ Hz, 1H, H-29);

3,22 (*m*, 1H, H-3); 0,74 (*s*, 3H, H-28); 0,78 (*s*, 3H, H-27); 0,80 (*s*, 3H, H-26);

0,92 (*s*, 3H, H-25); 0,94 (*s*, 3H, H-24); 1,01 (*s*, 3H, H-23); 1,68 (*s*, 3H, H-30);

RMN ^{13}C : Tabela 25, p. 144;

EB4 - β -sitosterol ou Estgmast-5-en- β -ol:

sólido cristalino incolor; $C_{29}H_{48}O$, MM= 414;

EB5 – $13^2(\text{OH})$ -Feofitina a:

sólido amorfo verde; $\text{C}_{54}\text{H}_{73}\text{O}_6\text{N}_4$, MM= 873;

RMN ^1H (CDCl_3): δ 9,60 (s, 1H, H-10); 9,41 (s, 1H, H-5); 8,69 (s, 1H, H-20); 8,10 (m, 1H, H-3¹); 6,22 (dd, 2H, H-3²); 5,19 (t, 1H, H-P2); 4,70 (d, 1H, H-17); 4,51 (m, 1H, H-18); 4,49 (d, 2H, H-P1); 4,20 (m, 2H, H-8¹); 3,70 (s, 3H, H-12¹); 3,60 (s, 3H, H-13⁴); 3,40 (s, 3H, H-2¹); 3,19 (s, 3H, H-7¹); 2,30 (m, 1H, H-17¹); 2,10 (ind, 2H, H-17²); 1,89 (m, 2H, H-P4); 1,61 (ind, 3H, H-8²); 1,59 (ind, 2H, H-8¹); 1,40-0,70 (H-P3¹ e H-P5-P16);

RMN ^{13}C : Figura 113, p. 147;

EN1 –7, 4'-dimetilquercetina:

sólido cristalino amarelo; $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$, MM= 330;

UV λ_{max} (MeOH) nm: 370; + AlCl_3 350, 425; + AlCl_3/HCl 350, 425; + NaOAc 395; + NaOMe 345, 435;

EMIE (70 eV) m/z (int. rel.): $[\text{M}]^+$ 330 (100), 301 (7), 287 (11), 167 (22), 57 (55), 315 (34);

RMN ^1H (CD_3CO): δ 7,90 (dd, 1H, J= ind., H-6'); 7,81 (d, 1H, J= ind., H-2'); 7,13 (d, 1H, J= 8,0 Hz, H-5'); 6,73 (d, 1H, J= 1,65 Hz, H-8); 6,32 (d, 1H, J= 1,65 Hz, H-6); ; 3,90 (s, 6H, OCH_3);

RMN ^{13}C Tabela 20, p. 98;

EN3 – Quercetina:

sólido cristalino amarelo; $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$, MM= 302;

UV λ_{max} (MeOH) nm: 255, 372; + AlCl_3 270, 451; + $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ 265, 430;

EMIE (70 eV) m/z (int. rel.): $[\text{M}]^+$ 302 (100), 285 (3), 153 (14), 137 (24);

RMN ^1H (CD_3CO): δ 7,81 (d, 1H, J= 2,1 Hz, H-2'); 7,70 (dd, 1H, J= 2,2 e 8,5 Hz, H-6'); 6,98 (d, 1H, J= 8,5 Hz, H-5'); 6,25 (d, 1H, J= 2,1 Hz, H-6); 6,51 (d, 1H, J= 2,1 Hz, H-8);

RMN ^{13}C Tabela 20, p. 98;

EN4 - Epicatequina

sólido cristalino incolor; $C_{15}H_{14}O_6$, MM= 290;

EMIE (70 eV) m/z (int. rel.): $[M]^+$ 290 (14), 152 (35), 139 (100), 123 (36);

RMN 1H (CD_3CO): δ 6,98 (*d*, 1H, J= 1,9 Hz, H-2'); 6,80 (*dd*, 1H, J= 1,9 e 8,2 Hz, H-6'); 6,76 (*d*, 1H, J= 8,2 Hz, H-5'); 5,92 (*d*, 1H, J= 2,3 Hz, H-6); 5,95 (*d*, 1H, J= 2,3 Hz, H-8);

RMN ^{13}C Tabela 21 p. 105;

EN5 - Quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo:

sólido cristalino; $C_{21}H_{20}O_{12}$, MM= 464;

UV λ_{max} (MeOH) nm: 255, 355; + $AlCl_3$ 275, 420; $AlCl_3/HCl$ 265, 360, 400;

EMIE (70 eV) m/z (int. rel.): $[M]^+$ 302 (100), 285 (3), 153 (14), 137 (24);

RMN 1H (CD_3OD): δ 7,71 (*d*, 1H, J= 1,8 Hz, H-2'); 7,58 (*dd*, 1H, J= ind. e 8,4 Hz, H-6'); 6,87 (*d*, 1H, J= 8,7 Hz, H-5'); 6,39 (*sl*, 1H, J= ind., H-8); 6,20 (*sl*, 1H, J= ind., H-6); 5,24 (*d*, 1H, J= 7,2 Hz, H-1''); 3,72 (*dd*, 1H, H-5''); 3,60-3,36 (*m*, H-2'', H-3'' e H-4'');

RMN ^{13}C Tabela 20, p. 98;

EB6 - Quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo:

sólido cristalino amarelo; $C_{21}H_{17}O_{11}$, MM= 445;

RMN 1H (CD_3CO): δ 7,49 (*d*, 1H, J= 2,1 Hz, H-2'); 7,39 (*dd*, 1H, J= 2,1 Hz e 8,4 Hz, H-6'); 6,98 (*d*, 1H, J= 8,1 Hz, H-5'); 6,46 (*d*, 1H, J= 2,4 Hz, H-8); 6,25 (*d*, 1H, J= 2,4 Hz, H-6); 5,49 (*d*, 1H, J= 7,8 Hz, H-1''); 4,23 (*sl*, 1H, H-2'') 3,98-3,33 (*m*, 1H, H-2'', H-3'' e H-4''); 0,91 (*d*, 3H, J= 6,0 Hz, H-6'');

RMN ^{13}C Tabela 20, p. 98;

EB7 -7,4' -dimetilquercetina-3-O-rutinosídeo:

sólido cristalino amarelo; $C_{21}H_{17}O_{11}$, MM= 630;

UV λ_{max} (MeOH) nm: 255, 350; + $AlCl_3$ 270, 360, 400; $AlCl_3/HCl$ 270, 355, 400; + MeONa 265, 375; MeONa +5 min 265, 375; + AcONa 260, 355;

RMN 1H (CD_3OD+CD_3CO): δ 7,67 (*d*, 1H, J= 2,1 Hz, H-2'); 7,64 (*dd*, 1H, J= 2,1 e 8,4 Hz, H-6'); 6,88 (*d*, 1H, J= 8,4 Hz, H-5'); 6,41 (*d*, 1H, J= 2,1 Hz, H-8); 6,22

(*d*, 1H, *J*= 2,1 Hz, H-6); 5,11 (*d*, 1H, *J*= 7,5 Hz, H-1''); 4,54 (*d*, 1H, *J*= 6,3 Hz, H'''); 3,83-3,37 (*m*, H-açúcares); 1,13 (*d*, 3H, *J*= 6,3 Hz, H-6''');

RMN ¹³C Tabela 20, p. 98;

EB8 - Quercetina-3-O-rutinosídeo:

sólido cristalino amarelo; C₂₁H₁₇O₁₁, MM= 536;

UV λ_{max} (MeOH) nm: 255, 350; + AlCl₃ 270, 420; + AlCl₃/HCl 270, 355, 395; + MeONa 270, 330, 395;

RMN ¹H (CD₃OD): δ 7,80 (*dd*, 1H, *J*= 2,1 e 8,4 Hz, H-6'); 7,73 (*d*, 1H, *J*= 2,1 Hz, H-2'); 7,10 (*d*, 1H, *J*= 8,7 Hz, H-5'); 6,65 (*d*, 1H, *J*= 2,1 Hz, H-8); 6,36 (*d*, 1H, *J*= 2,1 Hz, H-6); 5,25 (*d*, 1H, *J*= 7,8 Hz, H-1''); 4,36 (*sl*, 1H, H-1'''); 3,97 (*s*, 1H, OCH₃); 3,92 (*s*, 1H, OCH₃); 3,89-3,33 (*m*, H-açúcares); 1,11 (*d*, 3H, *J*= 6,3 Hz, H-6''');

RMN ¹³C Tabela 20, p. 98;

EN2 - 3α-metoxi-2,8,12β-trihidroxi-15-hidroxi-10α-hidroxi-rianodano:

sólido cristalino incolor; pf= 197-198° C;

C₂₁H₃₄O₇, MM= 398;

[α]_D²⁵ = - 5.11 (MeOH, c. 0.99);

IV ν_{max} acetona (cm⁻¹) 3421 (OH);

Análise Elementar: Encont C, 60,50; H, 8,41% C₂₁H₃₄O₇.H₂O; requer C, 63,48; H, 8,82%;

EMIE (70 eV) m/z (int. rel.): [M]⁺ 398 (2), 355 [M-43]⁺ (22), 337 [M-61]⁺ (81), 277 [M-121]⁺ (100);

RMN ¹H (CD₃OD): δ 3,77 (*d*, 1H, *J*= 10,0 Hz, H-10); 3,37 (*s*, 3H, H-21); 3,34 (*d*, 1H, *J*= 1,5 Hz, H-3); 2,66 (*d*, 1H, *J*= 1,5 Hz, H-4); 2,09 (*ddt*, 1H, *J*= 12,0, 6,5 e 1,0 Hz, H-7α); 1,97 (*hept.*, 1H, *J*= 6,5 e 2,0 Hz, H-13); 1,82 (*m*, 1H, *J*= 7,0 Hz, H-9); 1,75 (*dd*, 1H, *J*= 14,0 e 2,0 Hz, H-14α); 1,57 (*dd*, 2H, *J*= 10,0 Hz, H-8); 1,55 (*dd*, 1H, *J*= 13,5 e 3,0 Hz, H-14β); 1,33 (*s*, 3H, H-16); 1,29 (*ddt*, 1H, *J*= 12,5, 4,0 e 2,5 Hz, H-7β); 1,06 (*d*, 3H, *J*= 6,5 Hz, H-17); 1,03 (*d*, 3H, *J*= 6,5 Hz, H-20); 0,94 (*s*, 3H, H-19); 0,93 (*d*, 3H, *J*= 7,0 Hz, H-18);

RMN ¹³C Tabela 22, p. 123;

EP1 – 3, 10 α -diidroxi-2,6,12 β -triidroxi-15-hidroxi-rianodano:

sólido cristalino incolor; pf= 216-217° C (decomp.);

C₂₀H₃₂O₇, MM= 384;

$[\alpha]_D^{25} = + 38.33$ (MeOH, c. 0.77);

IV ν_{\max} acetona (cm⁻¹) 3414 (OH);

Análise elementar: Encont C, 56,06; H, 7,78% C₂₀H₃₂O₇.2H₂O; requer C, 62,50; H, 8,33%

EMIE (70 eV) m/z (int. rel.): [M]⁺ 384 (2), 341 [M-43]⁺ (20), 323 [M-61]⁺ (43), 277 [M-107]⁺ (100).

RMN ¹H (CD₃OD): δ 3,81 (*d*, 1H, J= 1,5 Hz, H-3); 3,75 (*d*, 1H, J= 10,0 Hz, H-10); 2,55 (*d*, 1H, J= 1,5 Hz, H-4); 2,06 (*ddt*, 1H, J= 12,0, 6,5 e 1,0 Hz, H-7 α); 1,98 (*sept.*, 1H, J= 6,5 e 2,0 Hz, H-13); 1,81 (*m*, 1H, J=6,5 Hz, H-9); 1,72 (*dd*, 1H, J=14,0 e 2,0 Hz, H-14 α); 1,56 (*dd*, 2H, J=8,0 Hz, H-8); 1,55 (*dd*, 1H, J= 13,5 e 3 Hz, H-14 β); 1,33 (*s*, 3H, H-16); 1,26 (*ddt*, 1H, J=12,5, 4,0 e 2,5 Hz, H-7 β); 1,07 (*d*, 3H, J= 7,0 Hz, H-17); 1,01 (*d*, 3H, J= 6,5 Hz, H-20); 0,96 (*d*, 3H, J= 6,5 Hz, H-18); 0,92 (*s*, 3H, H-19);

RMN ¹³C: Tabela 23, p. 124;

5. Resultados e Discussão

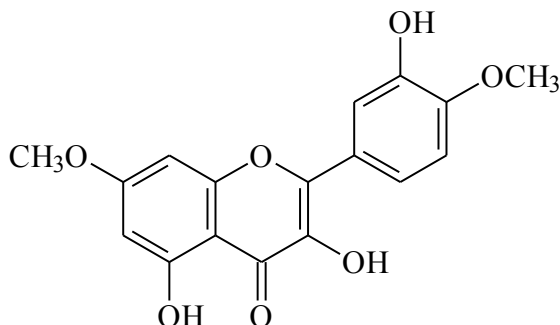
5.1. Determinação Estrutural

5.1.1 Flavonóis e seus O-Heterosídeos

Os flavonóis são flavonas que foram substituídas na posição C-3 por uma hidroxila. A maioria dos flavonóis são encontrados sob a forma conjugada com açúcares ligados aos grupos hidroxílicos.

Esses compostos apresentam alguns dados de RMN de ^{13}C em comum, tais os carbonos não hidrogenados referentes aos C-2, C-3 (δ 146,1 \pm 0,9 e 136,7 \pm 0,6) e C-4 (δ 176,5 \pm 0,6) do anel C (AGRAWAL, 1984).

5.1.2 Identificação da 7, 4'-dimetil-quercetina **EN1**



A substância **EN1** revelou positivo com o reagente AlCl_3 indicando tratar-se de um flavonóide. O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 9, p. 66) revelou sinais característicos de flavonol, tais como, aqueles referentes aos C-2, C-3 e ao C-4 em δ 146,9, δ 136,7 e δ 176,5, respectivamente. Foi possível observar também dois sinais de carbonos em δ 56,31 e δ 56,45 característicos de carbonos oximetilílicos o que indicou substituição em duas hidroxilas. Além disso, observou-se ainda que o C-5'

em δ 112,15 estava protegido cerca de $\Delta\delta$ 4,04 ppm em relação ao mesmo carbono da quercetina (Tabela 20, p. 98), bem como os carbonos C-6 em δ 98,41 e δ C-8 em δ 92,77 ligeiramente protegidos quando comparados aos C-6 em δ 99,16 e ao C-8 em δ 94,42 da quercetina. Essas observações propõem que as metoxilas estavam substituídas nas posições C-4' e C-7.

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 6 a 8, p. 65 e 66) corroborou com essas informações mostrando sinais em δ 6,32 (d, $J=1,65$ Hz) e em δ 6,73 (d, $J=1,65$ Hz) atribuídos ao H-6 e ao H-8, e ainda o dubleto em δ 7, 13 com $J=8,4$ Hz referente ao H-5' ligeiramente desprotegidos quando comparados aos mesmos hidrogênios da quercetina. Verificou-se também a presença de sinal em δ 3,91, singleto integrando para seis hidrogênios referentes aos grupos metoxílicos, além do singleto em δ 12,11 integrando para um hidrogênio, característico de hidrogênio quelado da hidroxila fenólica na posição β a carbonila.

Os espectros de UV (Figuras 10 a 12 p. 65 e 66) confirmaram a posição das metoxilas através da análise com reagentes diagnósticos de deslocamento (MABRY, 1970). Assim, foi possível observar com a adição de NaOMe o deslocamento batocrômico da banda I de 65 nm sem aumento da intensidade do sinal, após 5 min, indicando que a OH-4' está substituída. Isto foi confirmado com a adição dos reagentes NaOAc que mostrou o deslocamento batocrômico da banda I de 25 nm sem o decaimento desse sinal, após 10 min, indicando a substituição das OH-7 e OH-4'. Com a adição do reagente AlCl_3 foi possível observar o deslocamento batocrômico de 55 nm da banda I, sem que fosse observado deslocamento hipsocrômico, após a adição de HCl, confirmando que não há no anel B presença de hidroxilas em posição orto.

Comparação desses resultados com os da literatura para a ombuina (AGRAWAL, 1984) permitiram identificar a substância **EN3** como 7, 4'-dimetil-quercetina (ombuina).

O espectro de massas por IE a 70 eV (Figura 13, p. 67) confirmou essa substância através do pico do íon molecular em m/z 330 (pico base), além dos fragmentos em m/z 315 $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$, 287 $[\text{M}-\text{CH}_3-\text{CO}]^+$ e 167 $[\text{A}_1 + \text{H}]^+$ todos característicos para flavonol com grupos metoxílicos nos anéis A e B (HARBONE, 1975). As principais fragmentações foram detalhadas no Quadro 11.



Figura 6 – Espectro de RMN de ¹H de **EN1** [300 MHz, (CD₃)₂O, δ (ppm)]

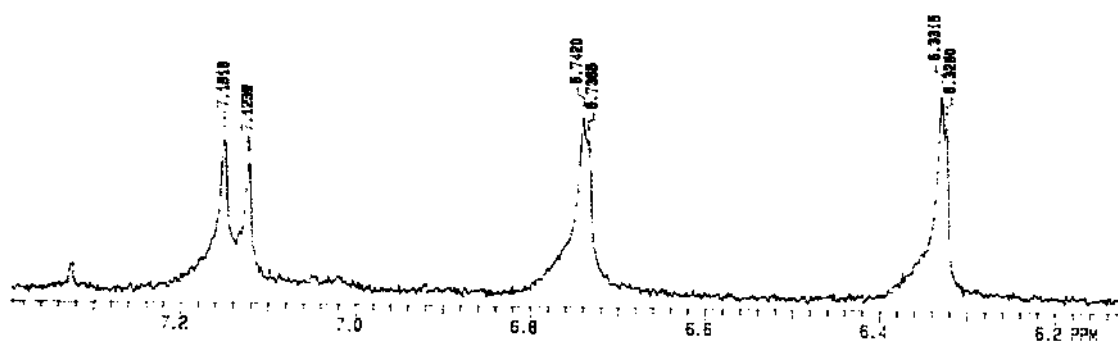


Figura 7 – Espectro de RMN de ¹H de **EN1** (Ampliação) [300 MHz, (CD₃)₂O, δ (ppm)]

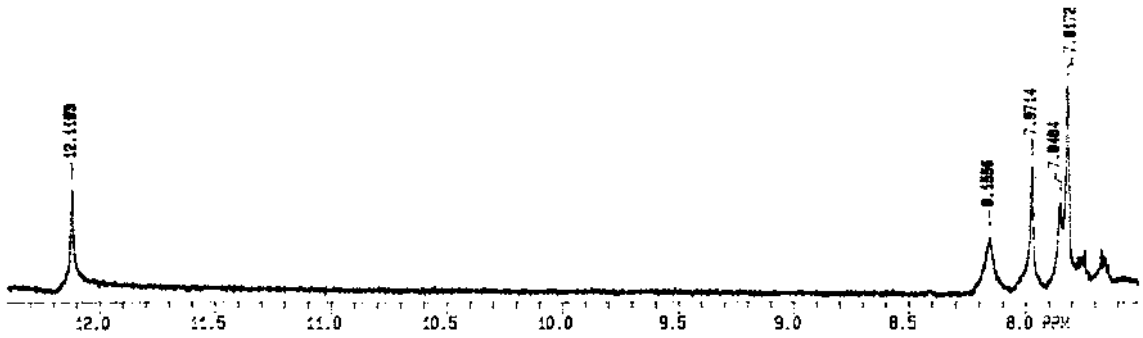


Figura 8 – Espectro de RMN de ^1H de **EN1** (Ampliação) [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$, δ (ppm)]

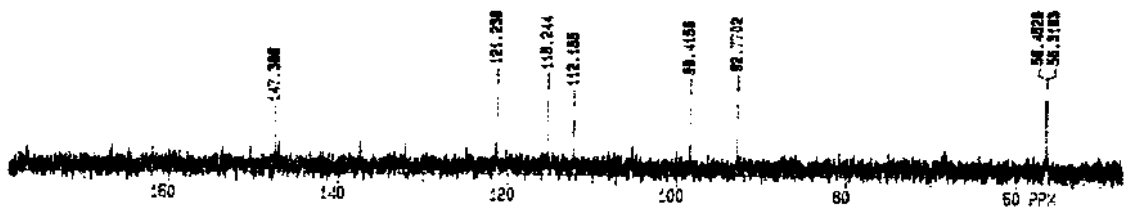


Figura 9 – Espectro de RMN de ^{13}C de **EN1** (Ampliação) [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$, δ (ppm)]

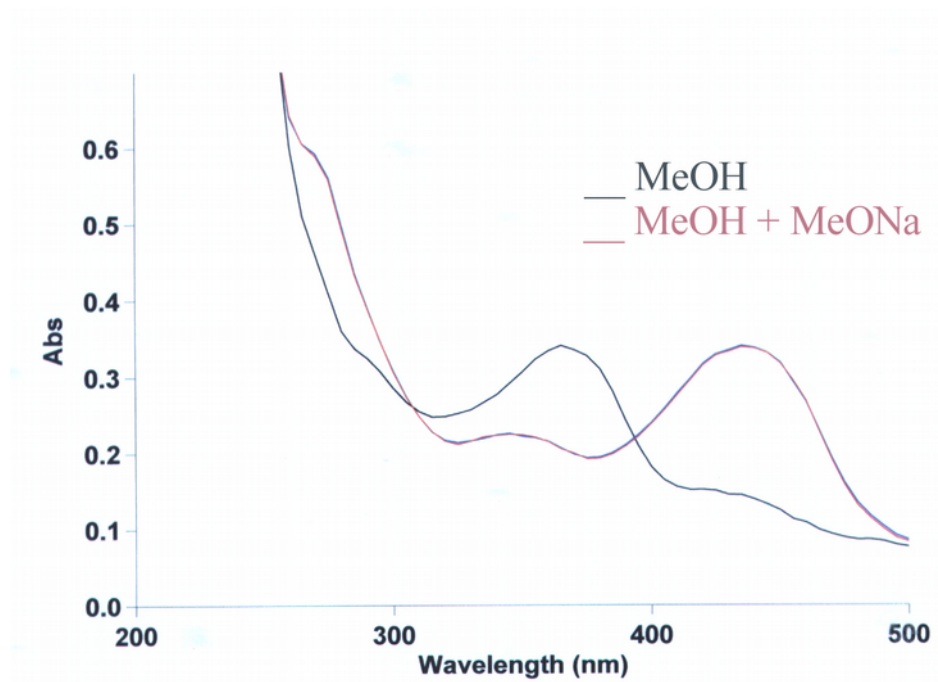
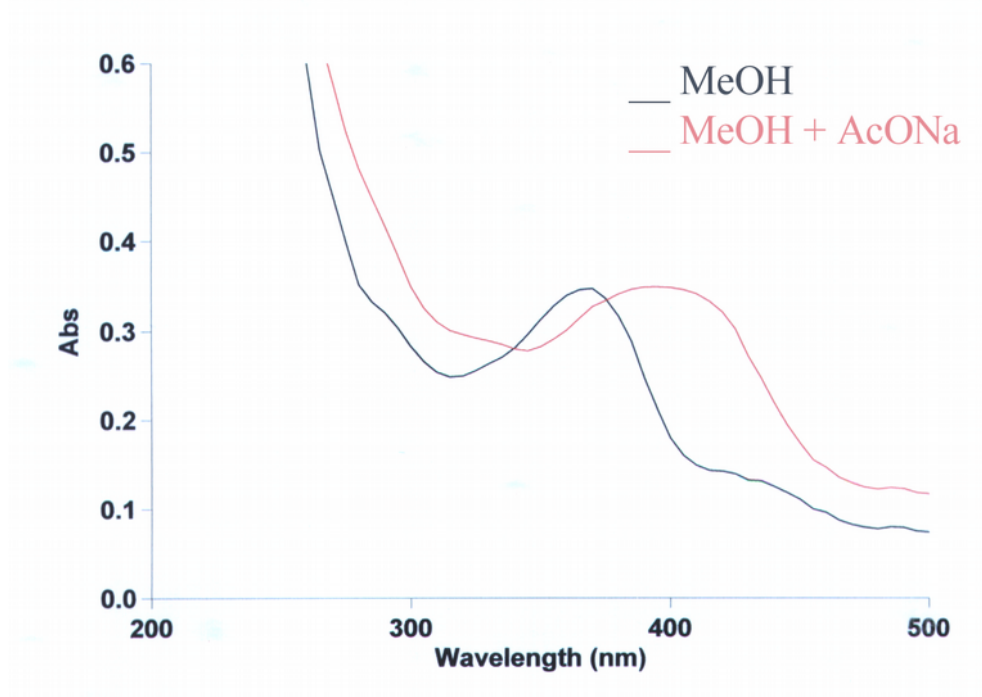
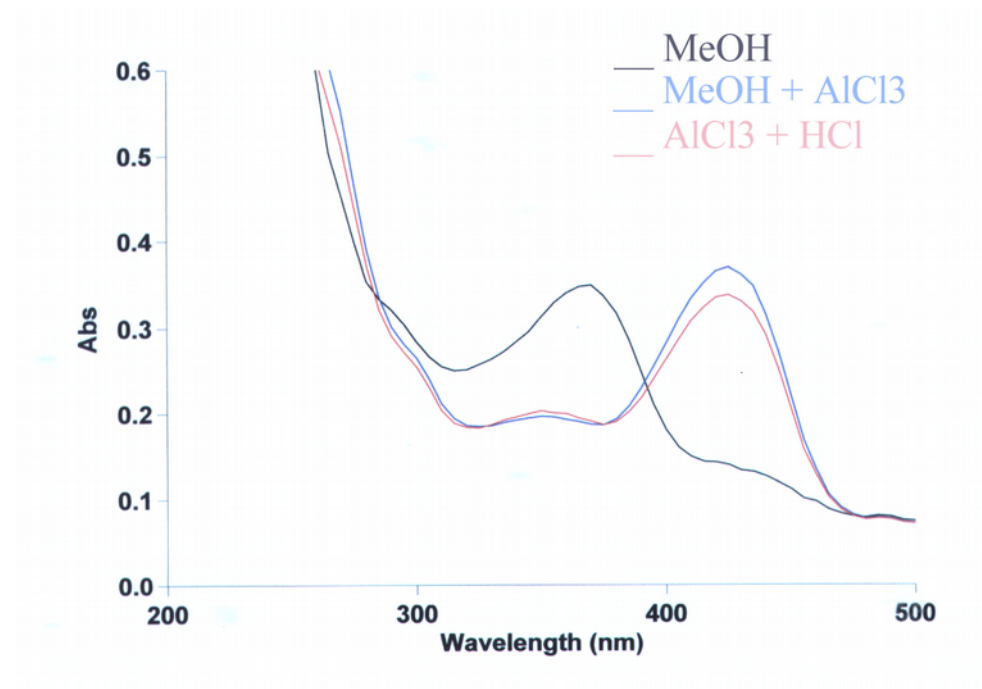


Figura 10– Espectro de UV de **EN1** com MeONa

Figura 11 – Espectro de UV de **EN1** com AcONaFigura 12 – Espectro de UV de **EN1** com AlCl₃

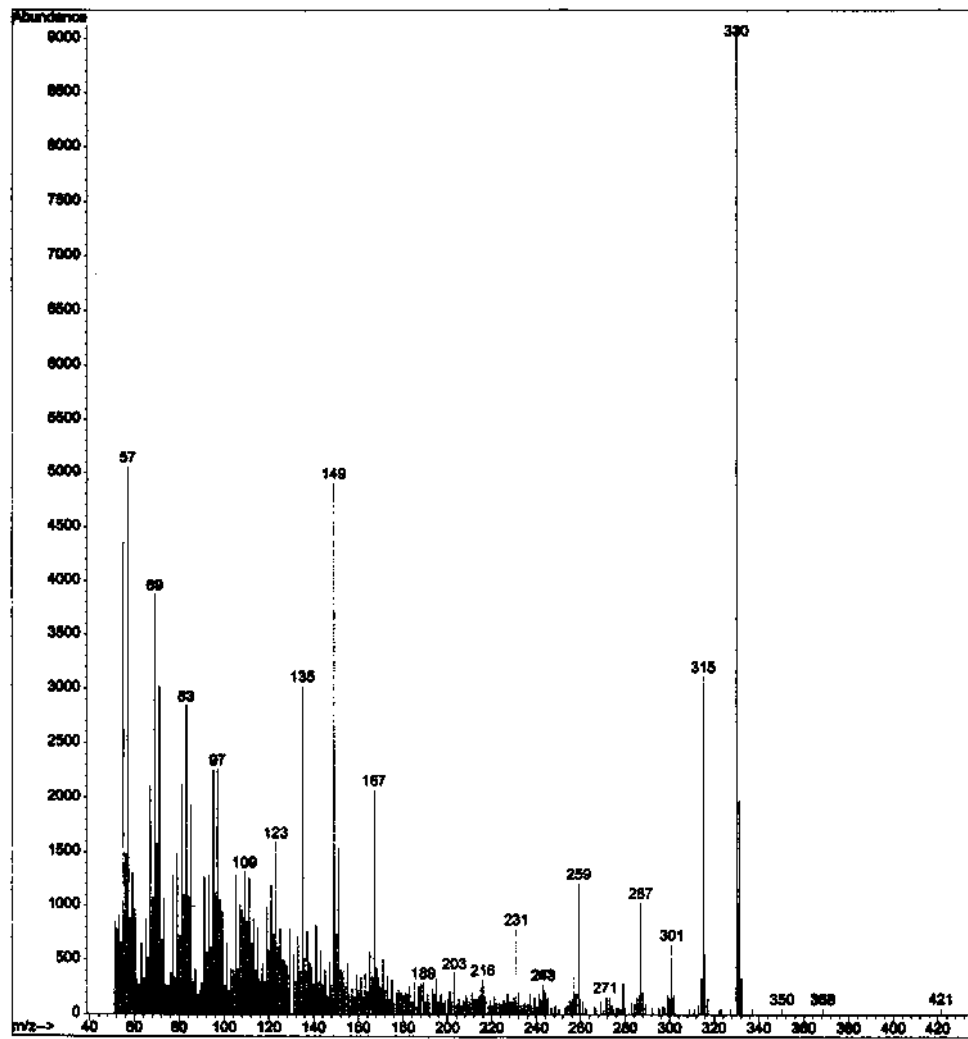
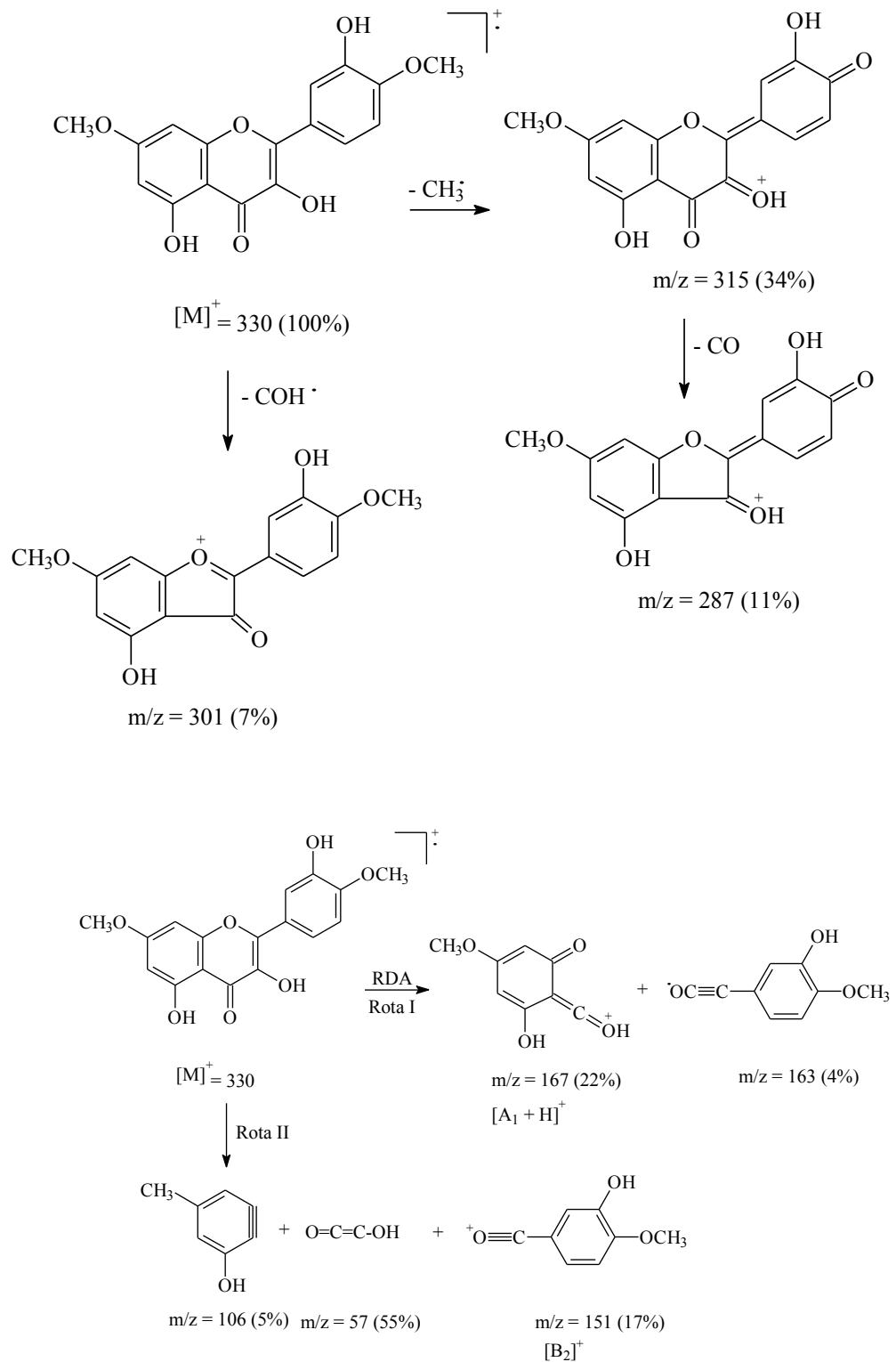
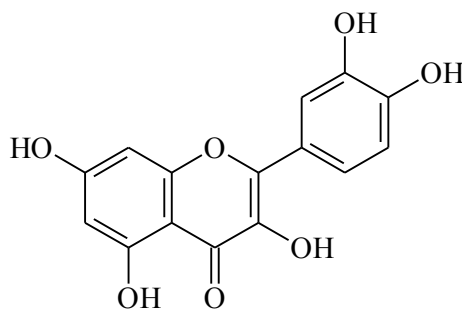


Figura 13 – Espectro de massas de EN1

Quadro 11- Principais Fragmentações de EN1



5.1.3 Identificação da Quercetina **EN3**



O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 16 a 18, p. 71 a 72) da substância **EN3** revelou a presença de quinze átomos de carbonos que de acordo com o espectro de DEPT 135° (Figura 10, p. 73) foram assinalados como cinco sinais de carbonos metínicos e dez sinais de carbonos não hidrogenados. Entre estes, verificou-se aqueles sinais característicos para flavonol como o sinal de carbono carbonílico em δ 176,76 referente ao C-4 e os dois sinais de carbonos não hidrogenado em δ 136,74 e δ 146,98 referentes aos C-3 e C-2, respectivamente.

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 14 a 15, p. 70) mostrou um sistema de substituição AMX. Assim verificou-se dois dubletos, um em δ 7,81 integrando para um hidrogênio com ($J= 2,2$ Hz) atribuído ao H-2' e outro em δ 6,98 com ($J= 8,5$ Hz) referente ao H-5', assim como o duplo dubleto em δ 7,69 atribuído ao H-6' acoplado com os H-2' e H-5' com ($J= 8,5$ e $2,2$ Hz). Além dos dubletos em δ 6,25 e δ 6,51 atribuídos aos H-6 e H-8, ambos com ($J= 2,1$ Hz).

Comparação desses valores com os encontrados na literatura (AGRAWAL, 1984; HARBONE, 1982) permitiram identificar a substância **EN3** como sendo a Quercetina. O espectro de massas por IE a 70 eV (Figura 20, p. 73) confirmou essa substância através do pico do íon molecular em $m/z= 302$ condizente com a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ da Quercetina. As principais fragmentações estão detalhadas no Quadro 12.

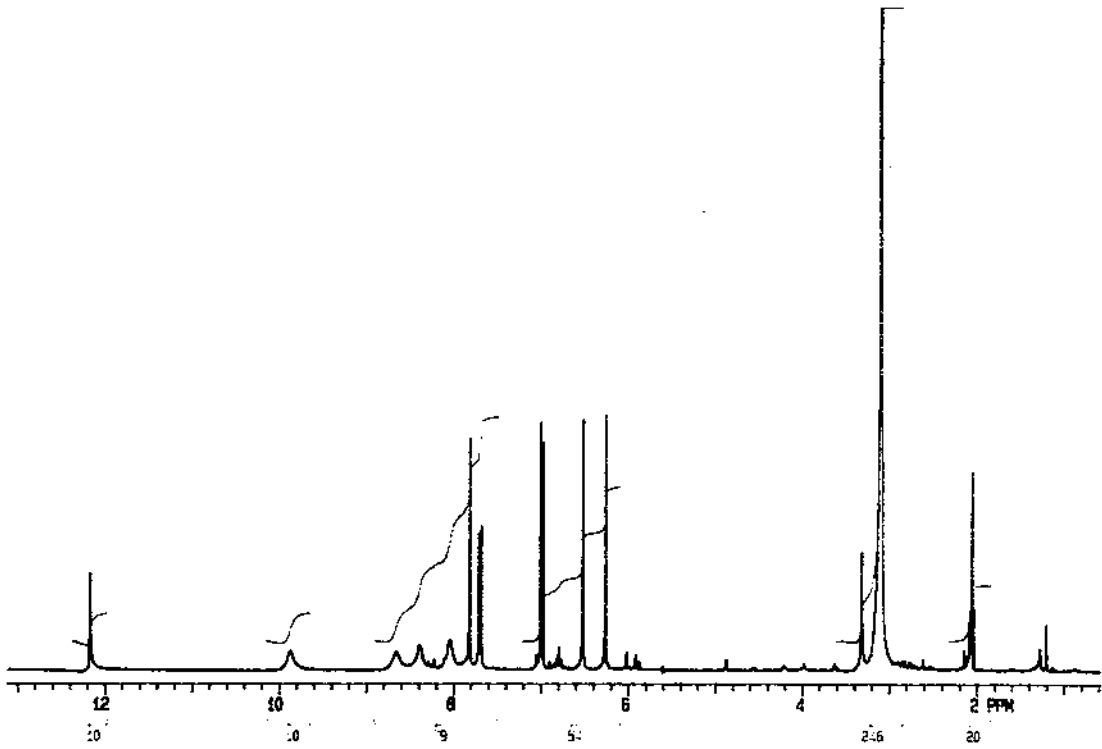


Figura 14 – Espectro de RMN de ^1H de **EN3** [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$, δ (ppm)]

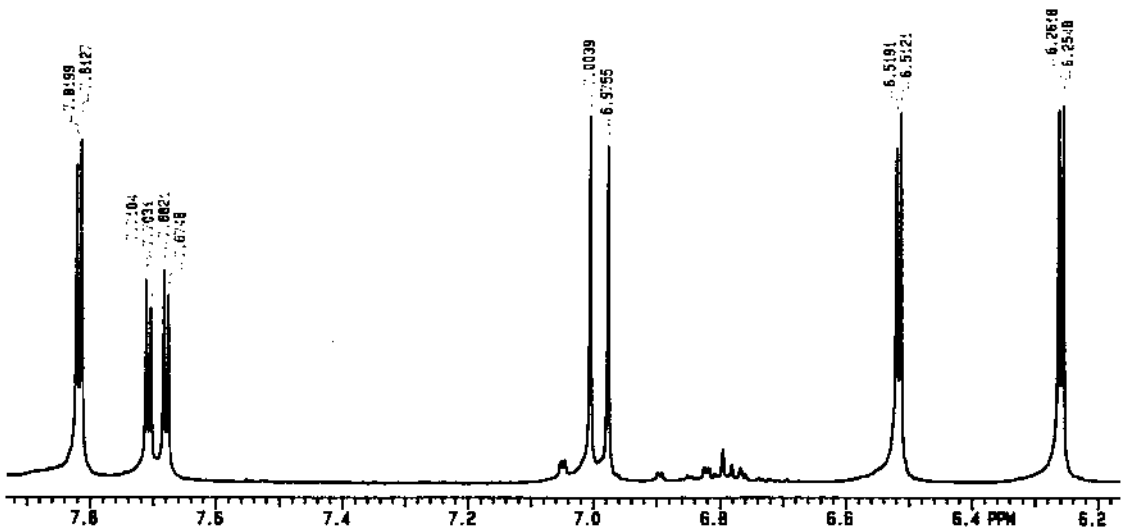


Figura 15 – Espectro de RMN de ^1H de **EN3** (Ampliação) [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$, δ (ppm)]

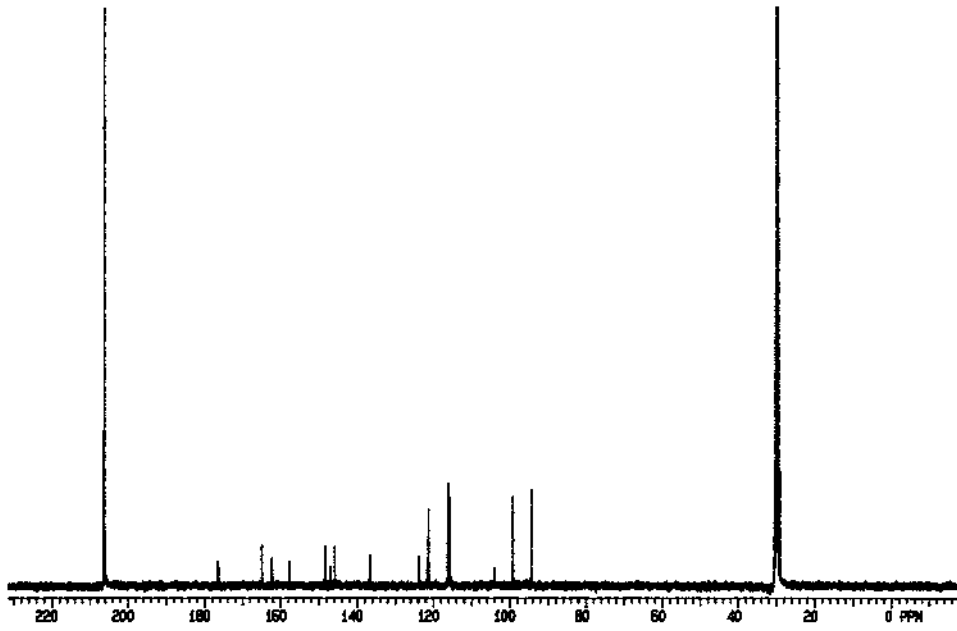


Figura 16 – Espectro de RMN de ^{13}C de **EN3** [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$, δ (ppm)]

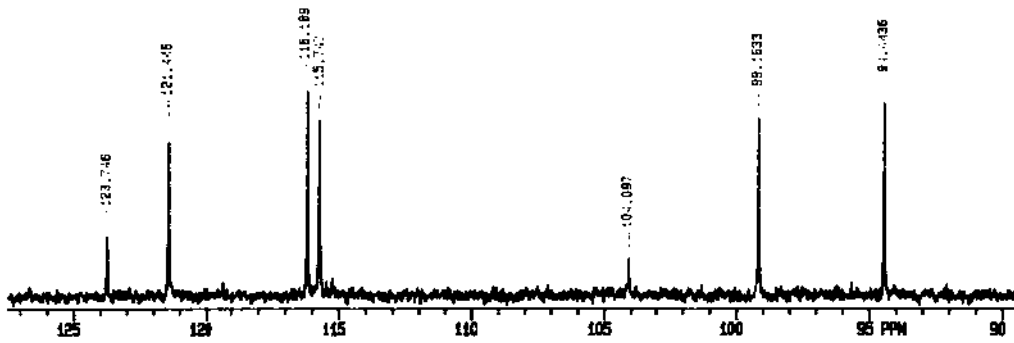


Figura 17 – Espectro de RMN de ^{13}C de **EN3** (Ampliação) [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$, δ (ppm)]

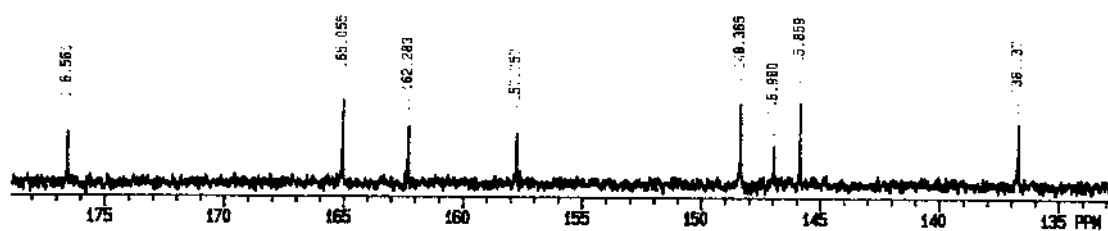


Figura 18 – Espectro de RMN de ¹³C de **EN3** (Ampliação) [75 MHz, (CD₃)₂O, δ (ppm)]

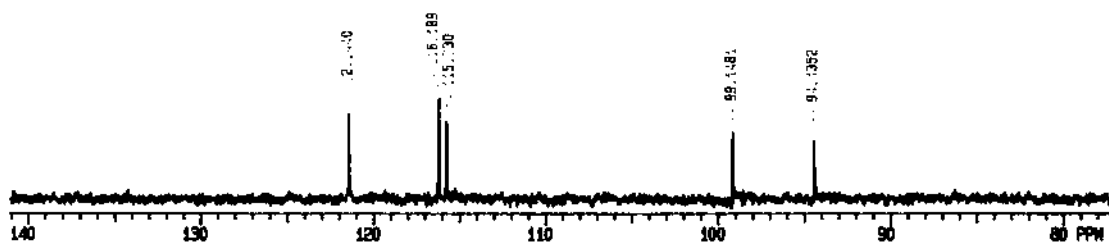


Figura 19 – Espectro de DEPT 135° de **EN3** (Ampliação) [75 MHz, (CD₃)₂O, δ (ppm)]

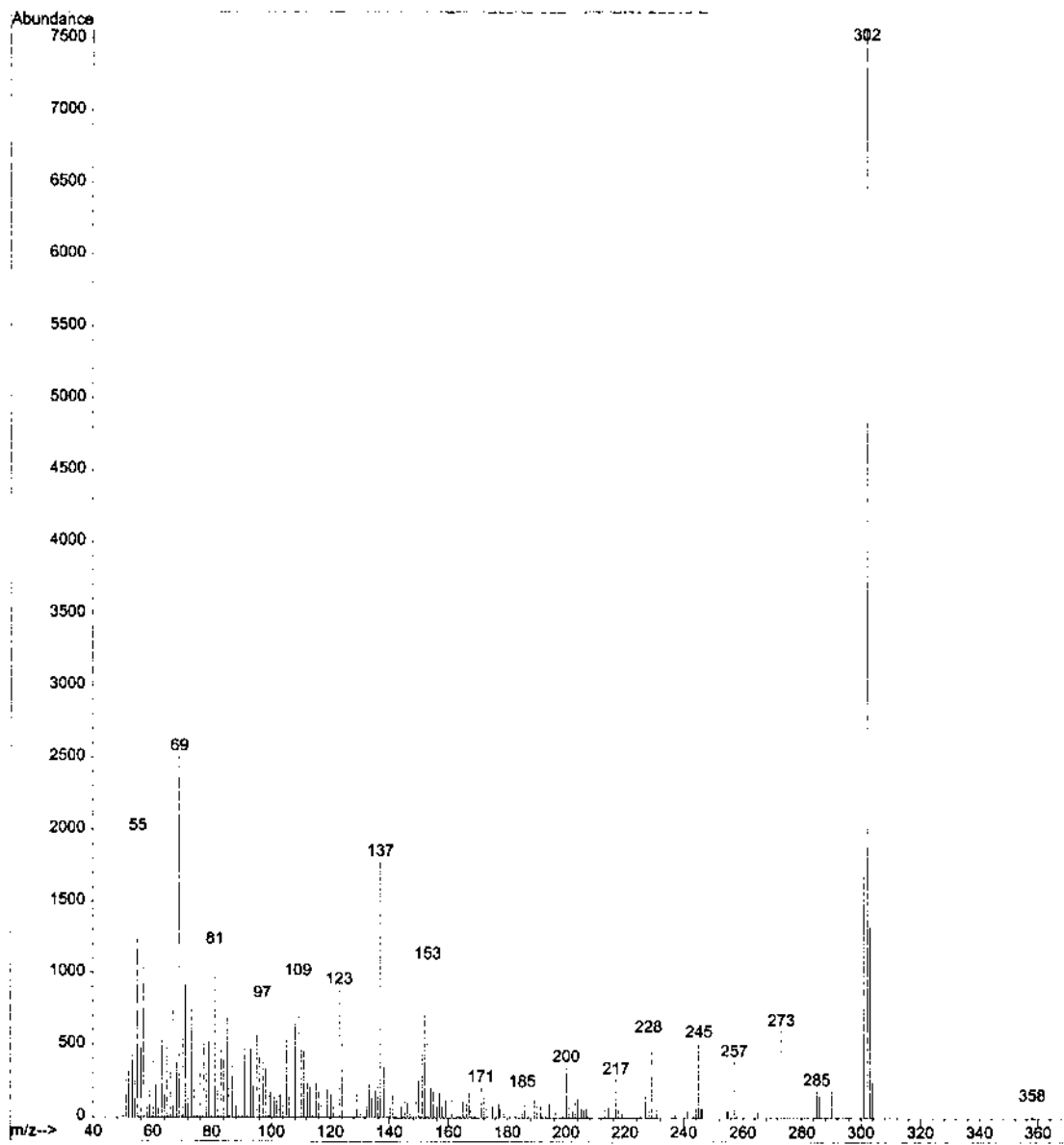
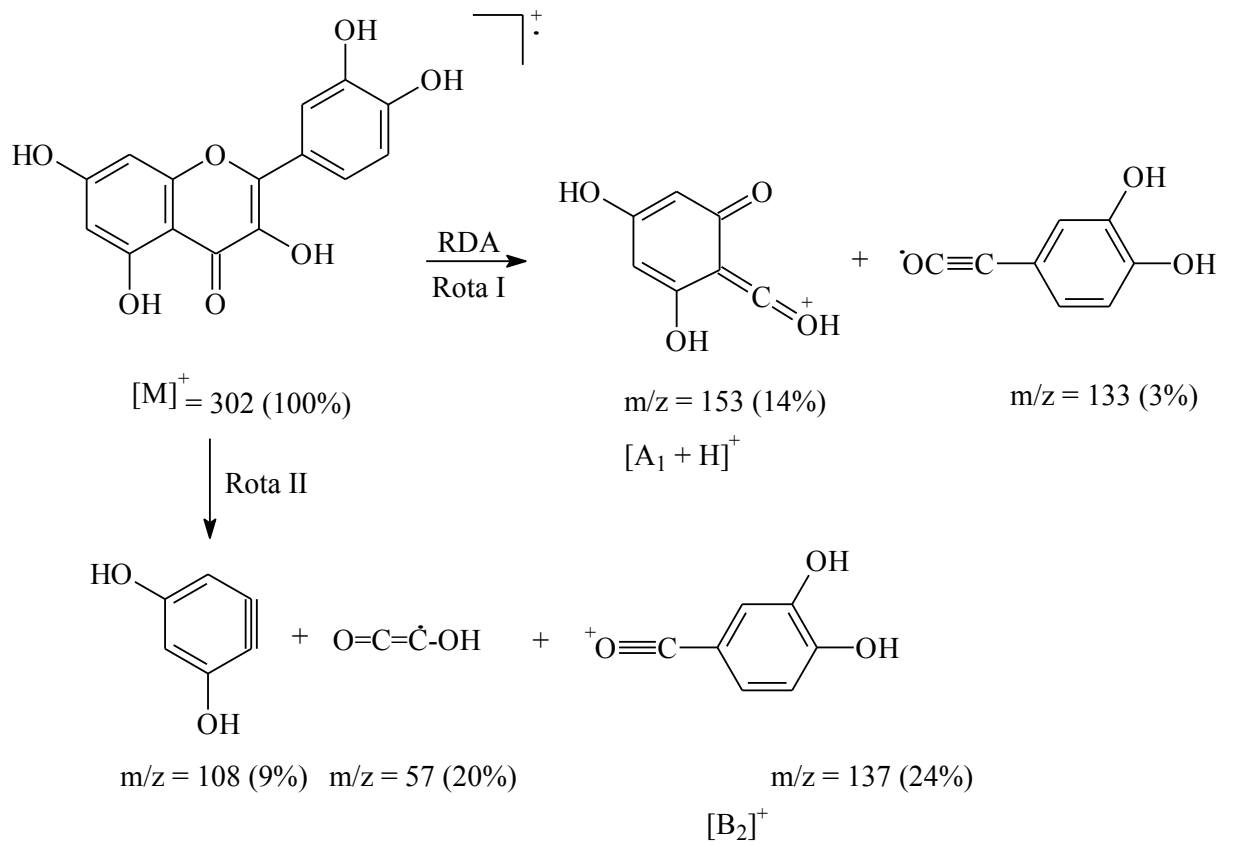
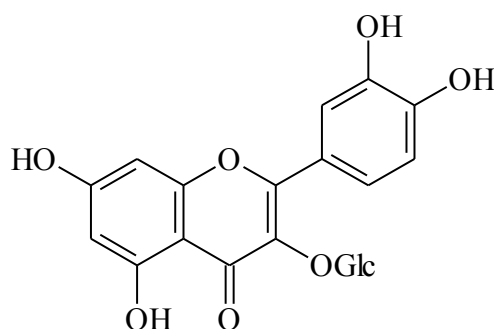


Figura 20 – Espectro de massas de EN3

Quadro 13- Principais Fragmentações de **EN3**



5.1.4 Identificação da Quercetina-3-glicopiranosídeo **EN5**



O espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 25 a 28, p. 78 a 81) desta substância mostrou a presença de vinte e um sinais de carbonos que foram assinalados segundo o espectro de DEPT 135° (Figura 29, p. 81) como sendo um sinal de carbono metilênico, dez carbonos metínicos e dez de carbonos não hidrogenados. Assim, foi possível observar, além daqueles sinais referentes aos carbonos para os anéis A e B presentes na substância **EN3**, sinais referentes a uma unidade de açúcar. Análise detalhada desses espectros permitiram verificar que o açúcar era um glicosídeo. Observou-se também que os sinais referentes aos C-2 e C-4 em δ 158,40 e δ 179,41 estavam desprotegidos cerca de ($\Delta\delta$ 10,00) e ($\Delta\delta$ 3,00) ppm em comparação aos carbonos da Quercetina (**EN3**) em δ 146,98 e δ 176,76, respectivamente, sugerindo a substituição do açúcar na posição 3.

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 21 a 24, p. 76 a 79) corroborou com esses valores mostrando, além dos hidrogênios aromáticos, os sinais referentes aos hidrogênios ligados a carbonos oxigenados na região entre δ 3,24 e 3,74, assim como o dubleto em δ 5,24 ($J = 7,2$ Hz) referente ao hidrogênio anomérico pertencentes ao açúcar.

A posição do açúcar foi confirmada através da análise do espectro de UV (Figura 30, p. 80) com reagentes de deslocamentos. Assim, a adição de AlCl_3 causou efeito batocrômico na banda I de 65 nm e, após adição de HCl percebeu-se o deslocamento hipsocrômico de 20 nm devido a decomposição do complexo formado entre as hidroxilas em orto no anel B.

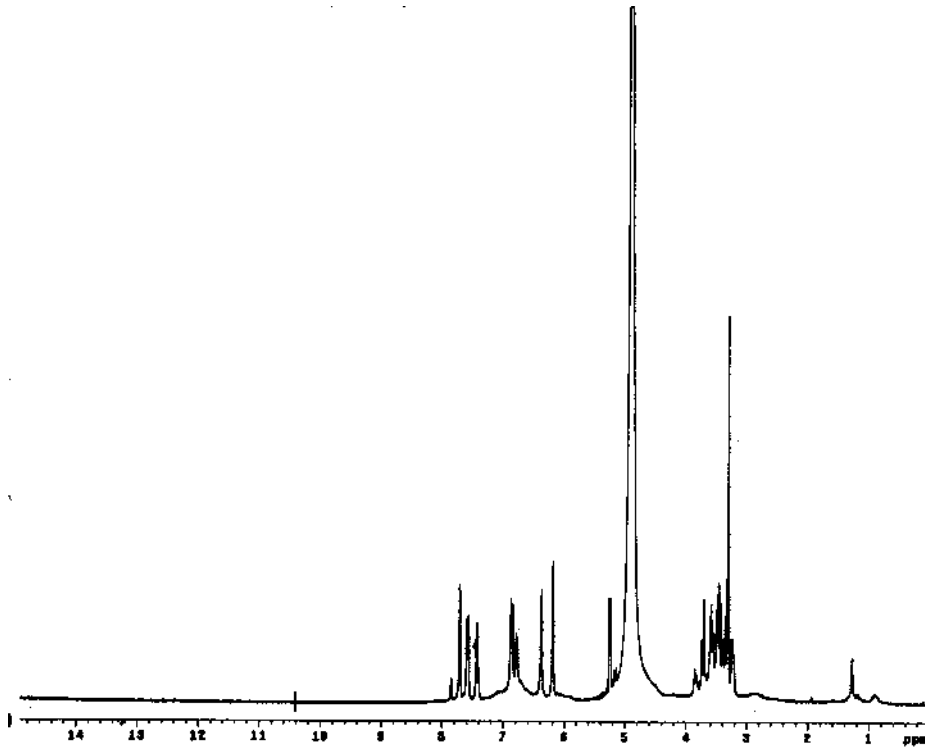


Figura 21 – Espectro de RMN de ^1H de **EN5** [300 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

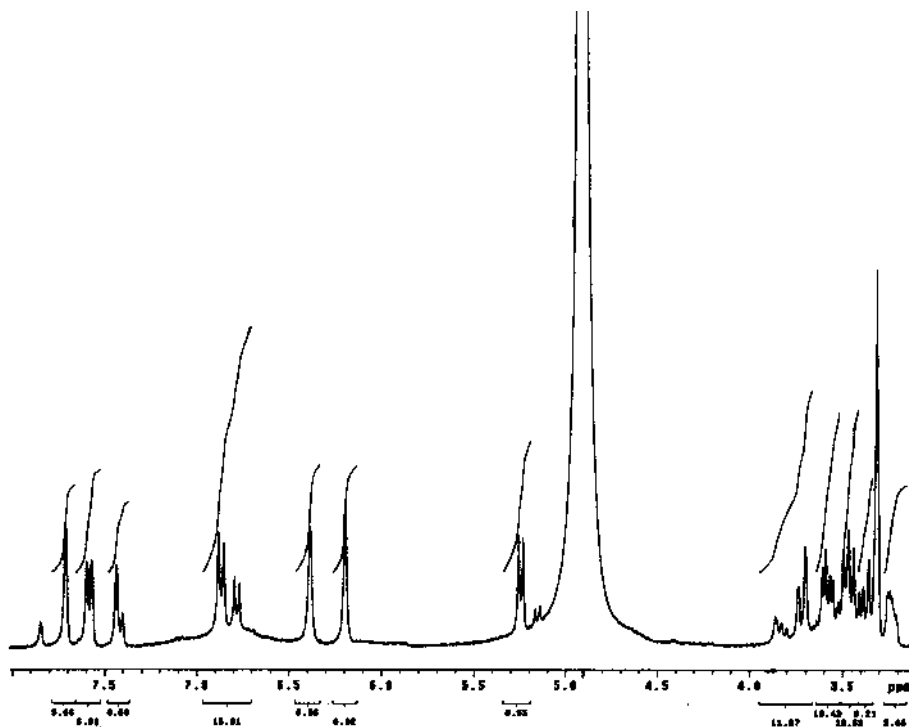


Figura 22 – Espectro de RMN de ^1H de **EN5** [300 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

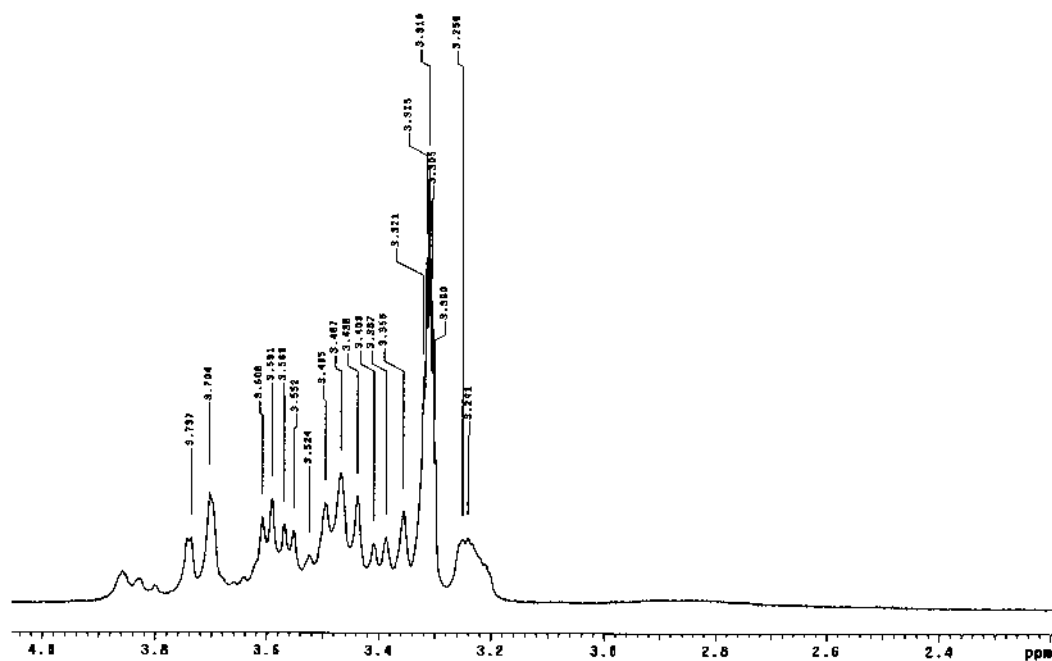


Figura 23 – Espectro de RMN de ¹H de **EN5** (Ampliação) [300 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

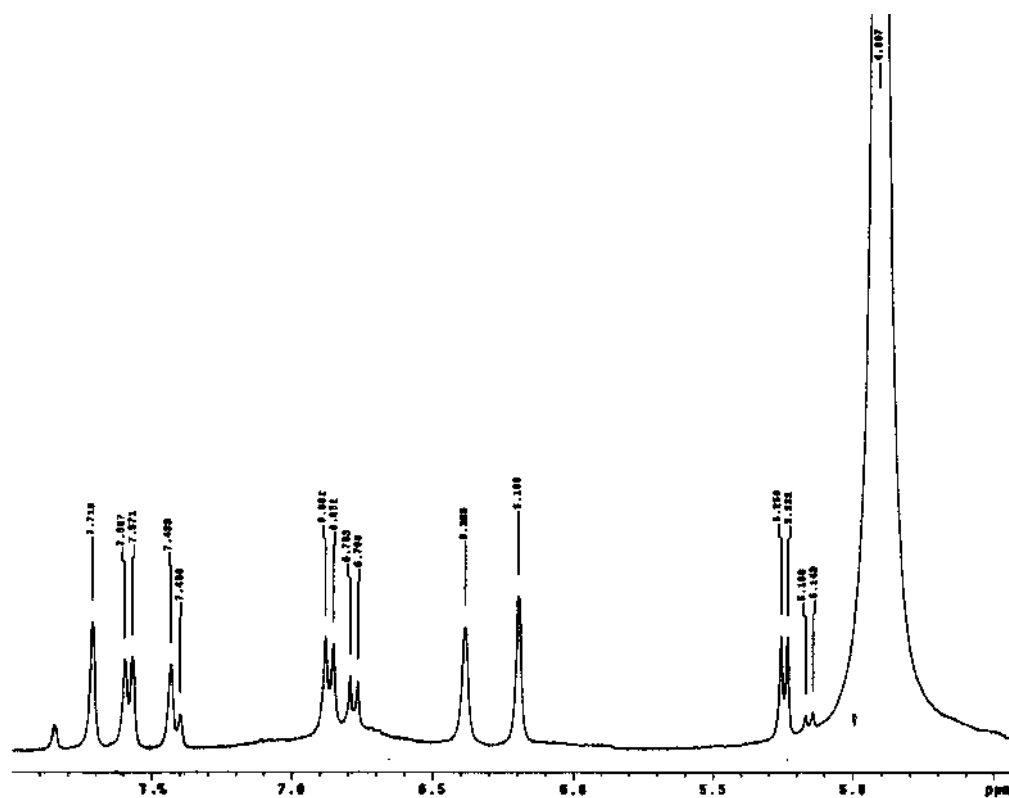


Figura 24 – Espectro de RMN de ¹H de **EN5** [300 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

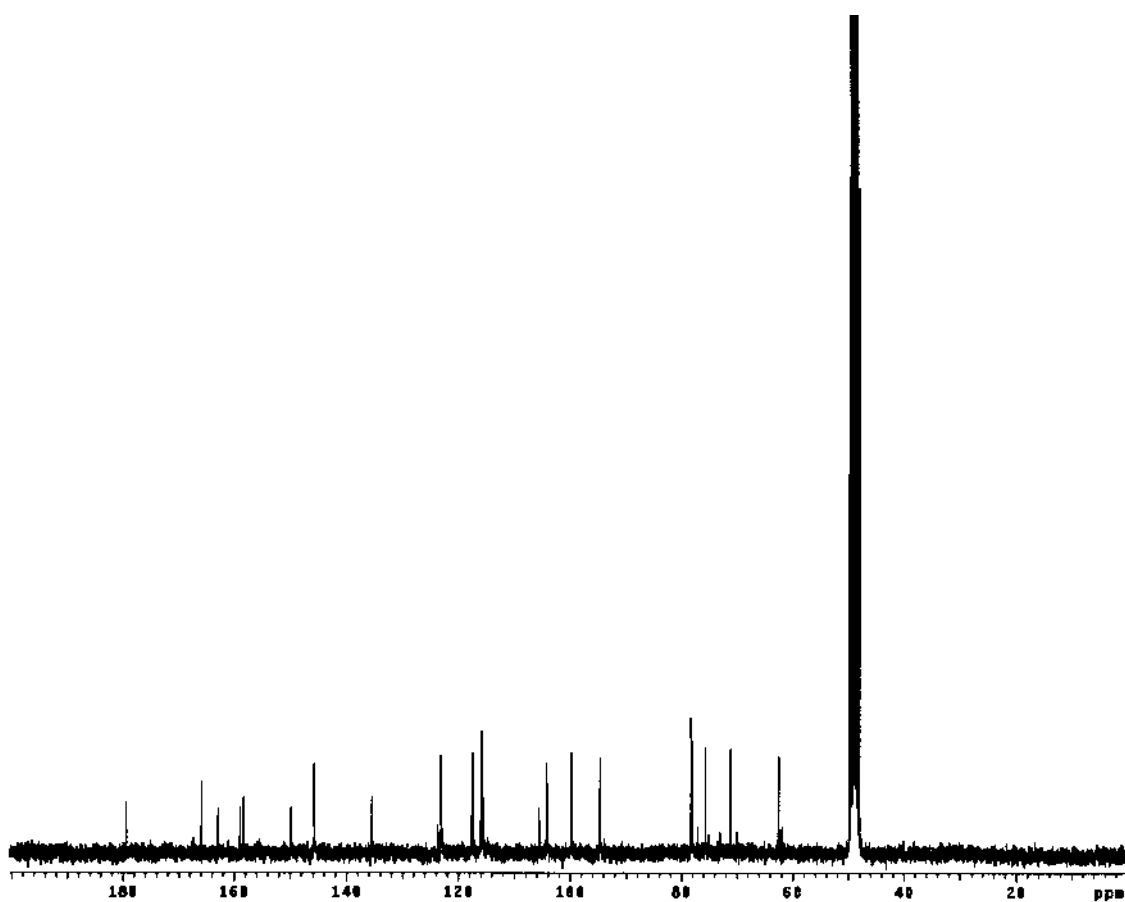


Figura 25 – Espectro de RMN de ^{13}C de **EN5** [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

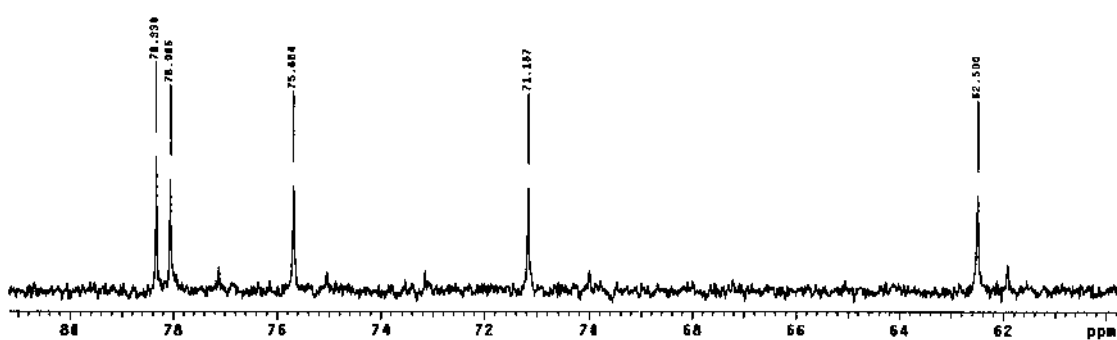


Figura 26 – Espectro de RMN de ^{13}C de **EN5** (Ampliação) [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

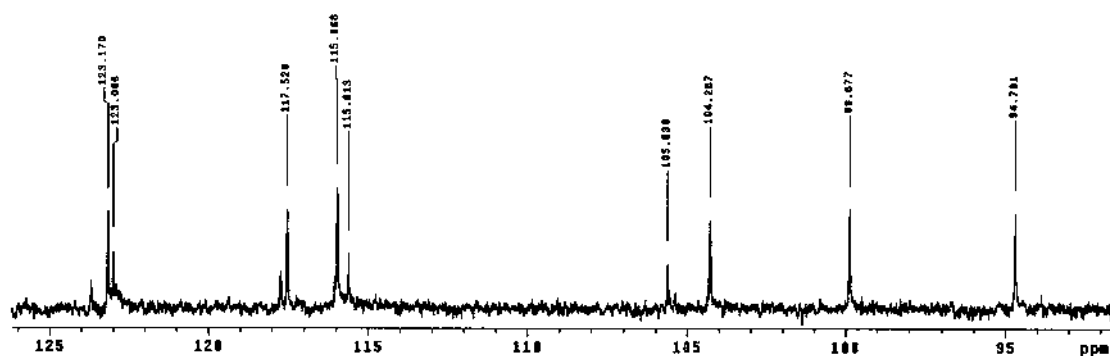


Figura 27 – Espectro de RMN de ^{13}C de **EN5** (Ampliação) [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

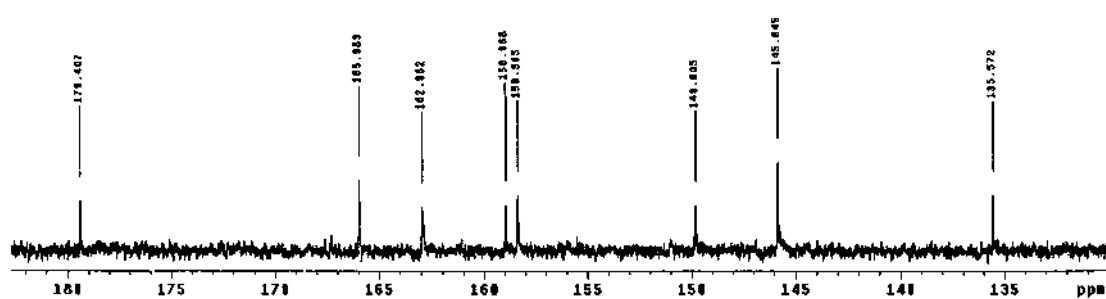


Figura 28 – Espectro de RMN de ^{13}C de **EN5** (Ampliação) [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

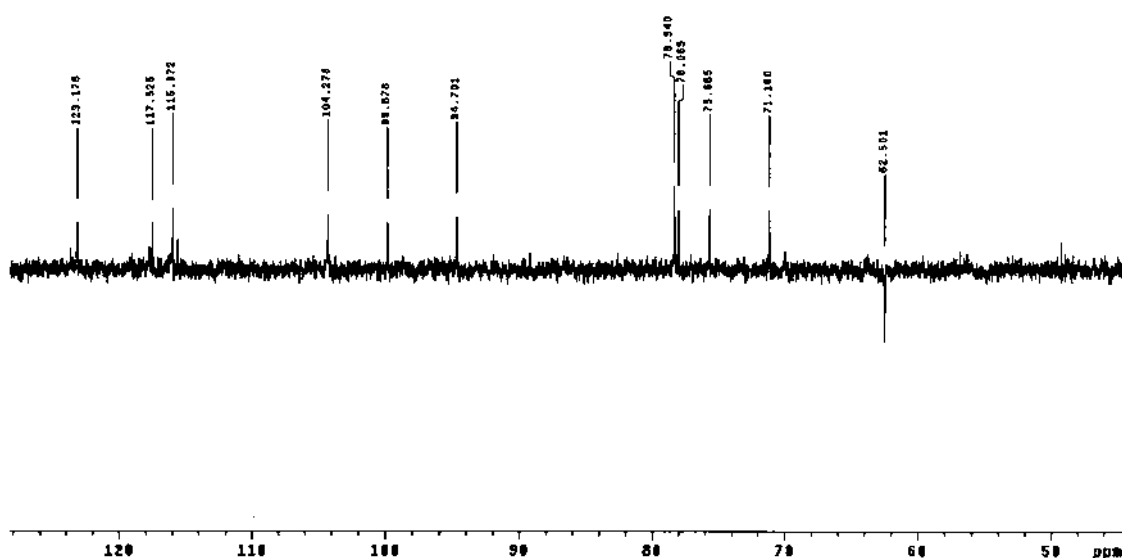


Figura 29 – Espectro de DEPT 135° de **EN5** (Ampliação) [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

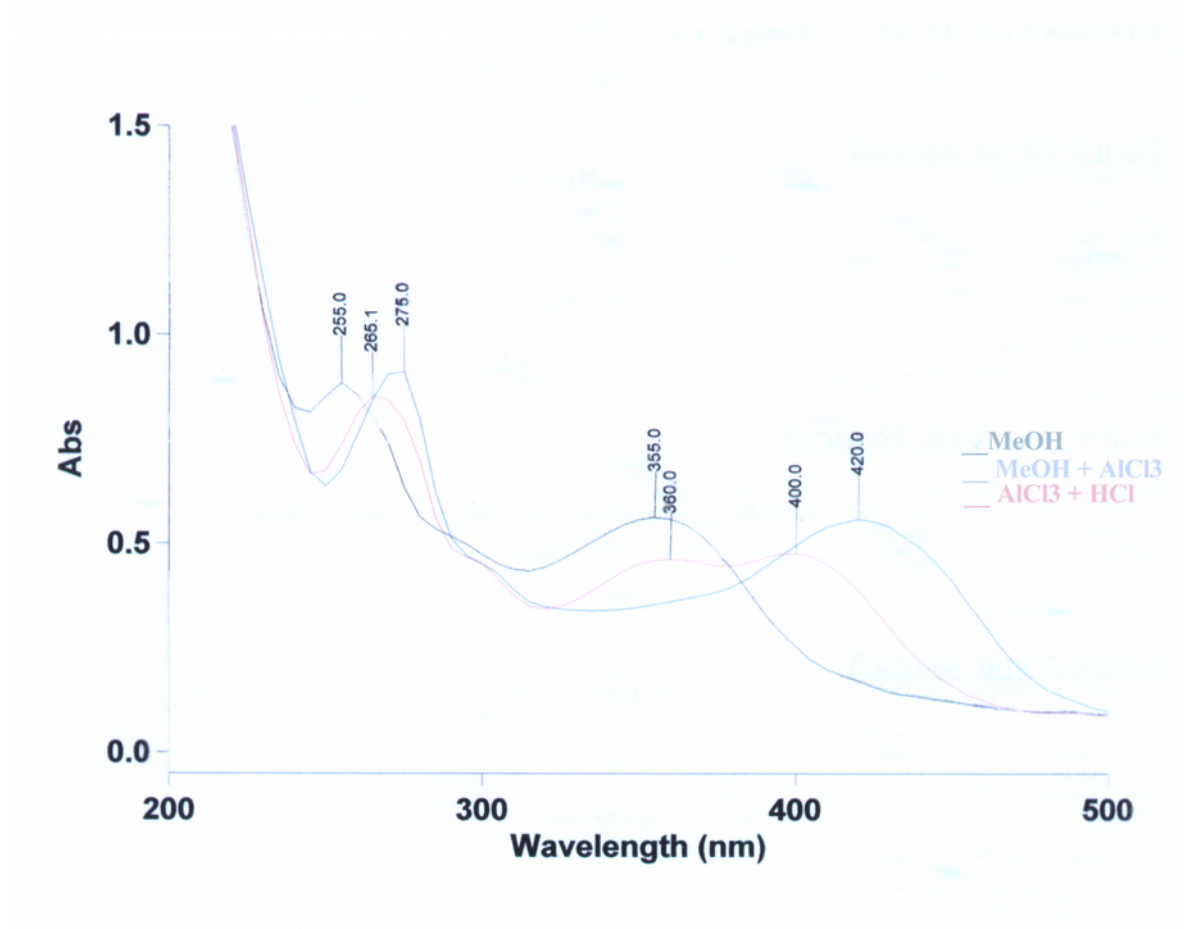
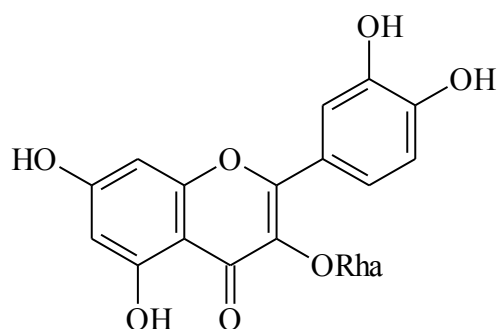


Figura 30 – Espectro de UV com AlCl₃ de EN5

5.1.5 Identificação da Quercetina-3-ramnopiranosídeo **EB6**



O espectro de RMN de ^1H desta substância (Figuras 31 a 33 p. 82 e 83) foi similar ao espectro da substância **EN5**. Assim foi possível observar sinais na região entre (δ 6,25-7,49) referentes aos hidrogênios aromáticos, além daqueles sinais em (δ 3,32-3,98) e δ 5,80 *d* pertencentes aos hidrogênios do açúcar. Entretanto, foi possível verificar também a presença do dubleto em δ 0,91 integrando para três hidrogênios o que sugeriu a presença do grupo ramnosídeo na molécula.

Através da análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 34 e 35 p. 83 e 84) foi possível observar, além daqueles sinais pertencentes ao anéis A e B, sinais referentes a unidade de açúcar, diferentes daqueles observados para a substância **EN5**. Entre estes, verificou-se a presença de sinal de carbono metílico em δ 17,73, bem como ausência do sinal em 62,5 referente ao CH_2 oximetilênico da glicose indicando que a unidade de açúcar presente na molécula era a ramnose.

Comparação desses valores de deslocamentos químicos com os da literatura (AGRAWAL, 1984; HARBONE, 1982) permitiram identificar a substância **EB6** como Quercetina-3-ramnopiranosídeo.

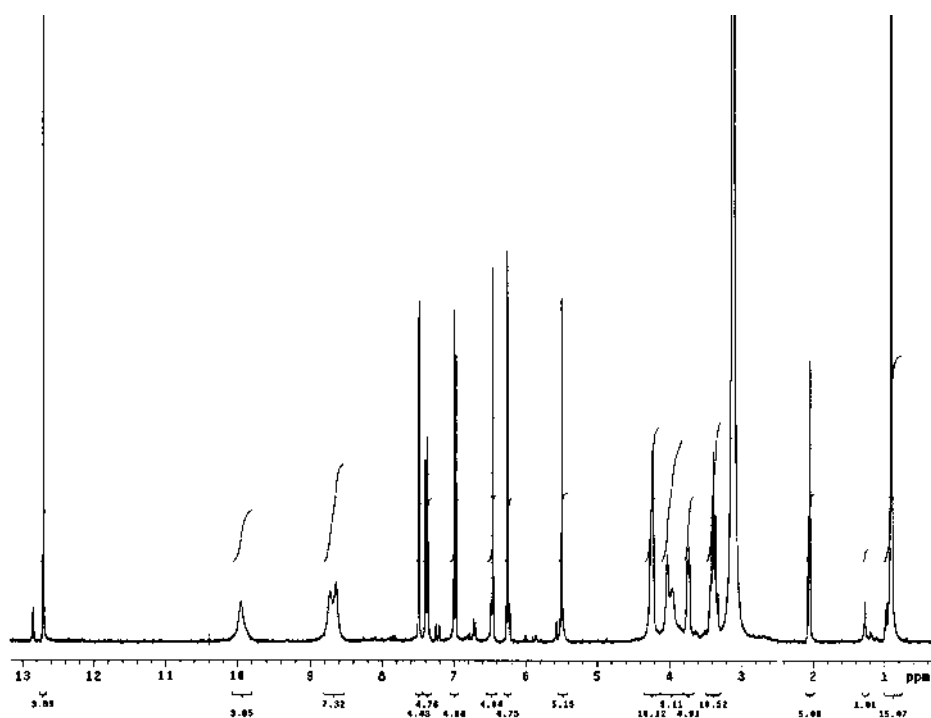


Figura 31 – Espectro de RMN de ^1H de **EB6** [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$, δ (ppm)]

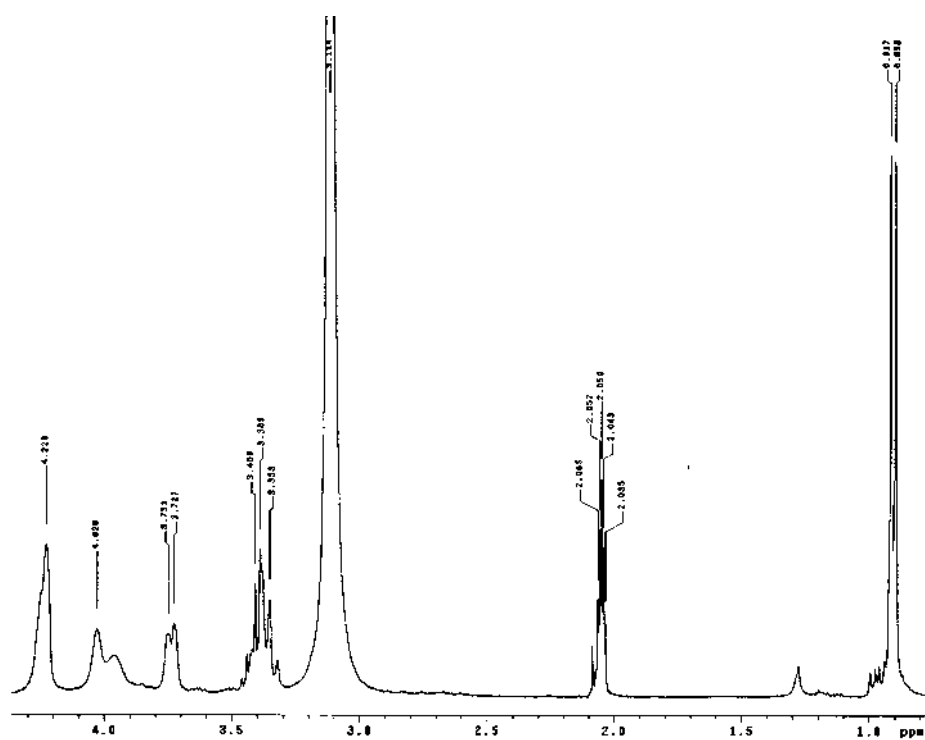


Figura 32 – Espectro de RMN de ^1H de **EB6** (Ampliação) [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$, δ (ppm)]

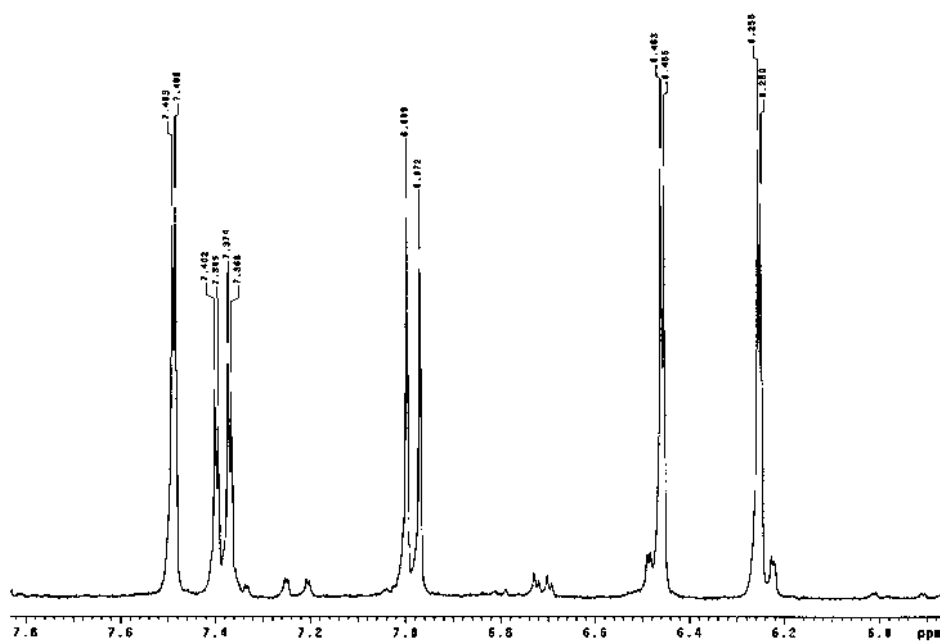


Figura 33 – Espectro de RMN de ^1H de **EB6** (Ampliação) [300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$, δ (ppm)]

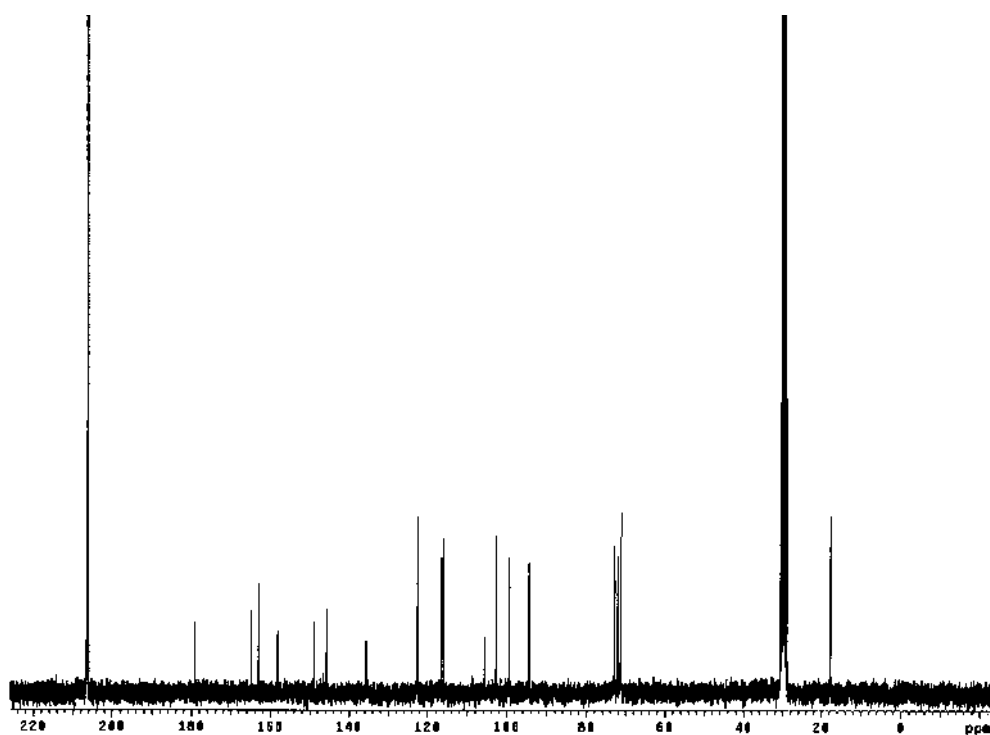


Figura 34 – Espectro de RMN de ^{13}C de **EB6** [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$, δ (ppm)]

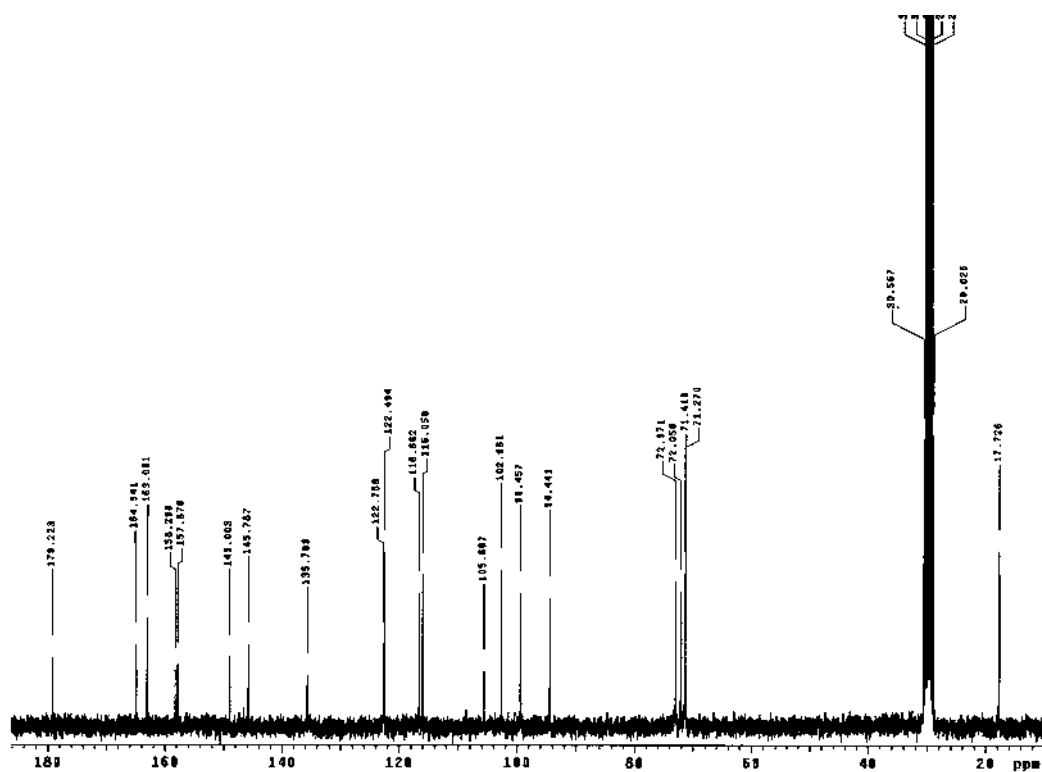


Figura 35 – Espectro de RMN de ^{13}C de **EB6** (Ampliação) [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$, δ (ppm)]

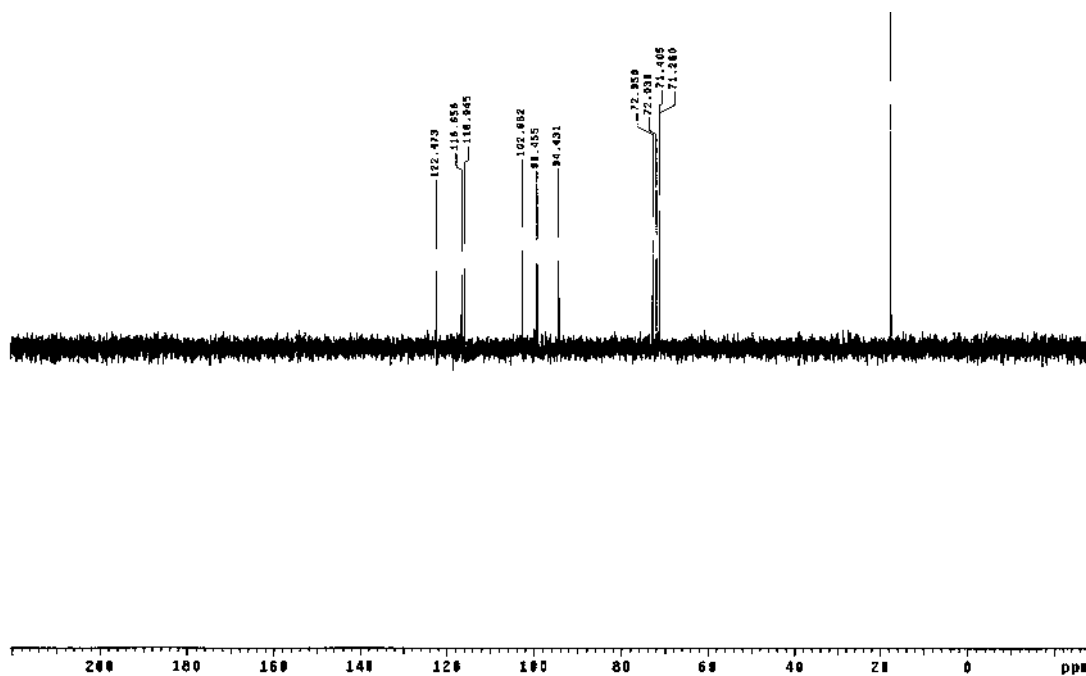
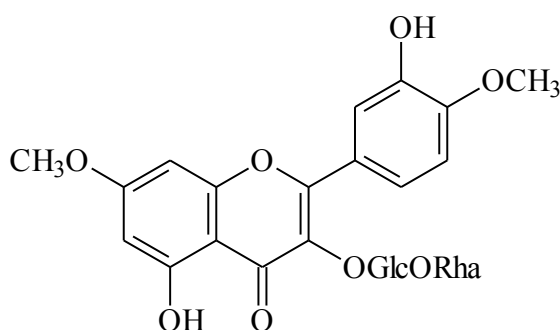


Figura 36 – Espectro de DEPT 135° de **EB6** (Ampliação) [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

5.1.6 Identificação da 7,4'-dimetilquercetina-3-rutinosídeo **EB7**



O espectro de RMN de ^{13}C (PND e DEPT 135°) desta substância (Figuras 40 a 42 p. 88 e 89) mostrou a presença de vinte e nove carbonos. Foi possível verificar entre estes, além de todos aqueles sinais presentes na substância **EB6**, dois sinais adicionais em δ 56,60 e δ 56,64 referentes a carbonos metoxílicos sugerindo que duas hidroxilas estão substituídas, assim como sinais referentes a outra unidade de açúcar que pode ser confirmado através do sinal em δ 104,35 referentes ao carbono anomérico do segundo açúcar. A análise detalhada desses espectros permitiu identificar a unidade de açúcar presente na molécula como sendo o rutinosídeo, devido a presença do sinal em δ 68,53 correspondente ao carbono oximetilênico que estava desprotegido cerca de $\Delta\delta$ 6,1 ppm em comparação ao mesmo carbono pertencente a glicose em (δ 62,50) na substância **EN5**. Observou-se também que os sinais em δ 112,0, δ 99,2 e δ 93,33 correspondentes aos C-5', C-6 e C-8 estavam protegidos, enquanto os sinais em δ 151,68 e δ 167,40 referentes aos C-4' e C-7 encontravam-se levemente desprotegidos em relação aos mesmos carbonos da substância **EB6** (Tabela 20 p. 97). Essas observações aliadas aos efeitos de proteção e desproteção indicaram substituição das metoxilas nos C-4' e C-7.

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 37 e 39, p. 86 e 87) corroborou com esses dados mostrando, além de todos os sinais pertencentes aos hidrogênios aromáticos na região (δ 6,35-7,80) com suas respectivas constantes de acoplamentos, dois sinais em δ 3,91 e δ 3,97 integrando para três hidrogênios referentes aos grupos metoxílicos. Além disso, verificou-se também a presença de multipletos complexos na região entre (δ 3,30-3,90) pertencentes aos hidrogênios do açúcar, assim como o

dubleto em δ 5,25 e um *s*/ em δ 4,36 correspondentes aos hidrogênios anoméricos da glicose e ramnose, respectivamente.

Os espectros de UV (Figuras 45 a 47, p. 90 e 91) confirmaram a posição das metoxilas e do açúcar através da adição de reagentes diagnósticos de deslocamento. Assim, com a adição de MeONa observou-se deslocamento batocrômico de 25 nm na banda I (300-380 nm) sem aumento da intensidade e sem decomposição do sinal, após 5 min, indicando ausência de hidroxila livre na posição 4'. A adição de AcONa provocou o deslocamento batocrômico de 5 nm nas bandas I e II indicando ausência de hidroxilas livres nas posições 4', 7 e 3. Enquanto, a adição de AlCl_3 causou o deslocamento batocrômico de 50 nm na banda I sem mostrar nenhum retorno no deslocamento, após a adição de HCl, indicando ausência de hidroxilas em orto no anel B.

Comparação desses valores com os da literatura (INIGO, 1985) permitiram identificar a substância **EB7** como 7, 4'-dimetilquercetina-3-rutinosídeo.

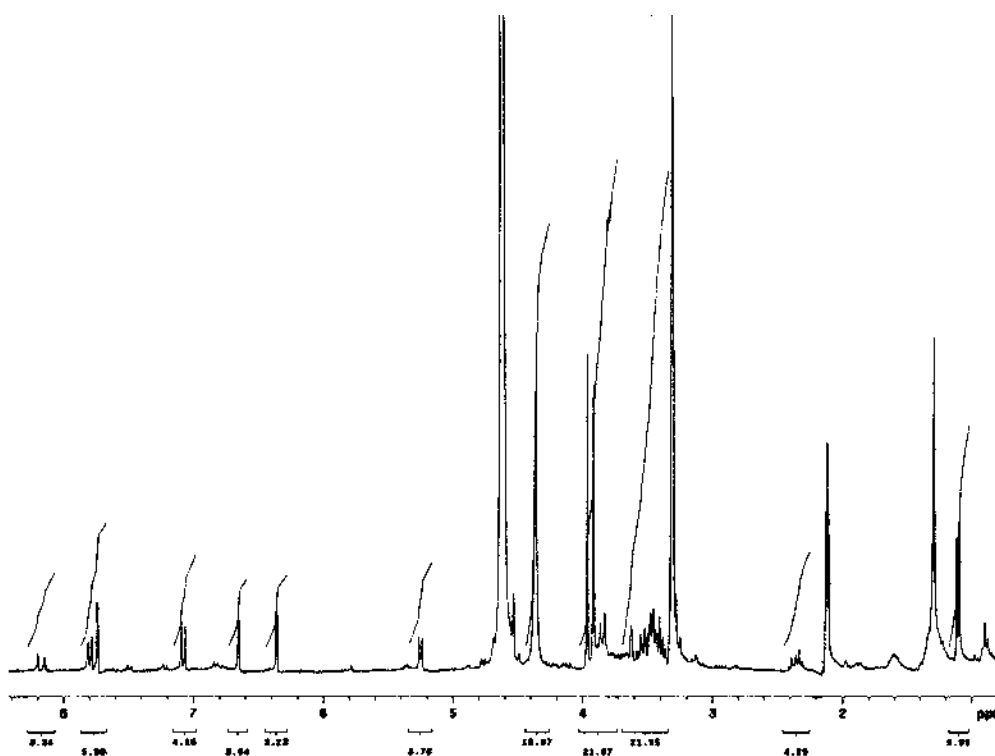


Figura 37 – Espectro de RMN de ^1H de **EB7** [300 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

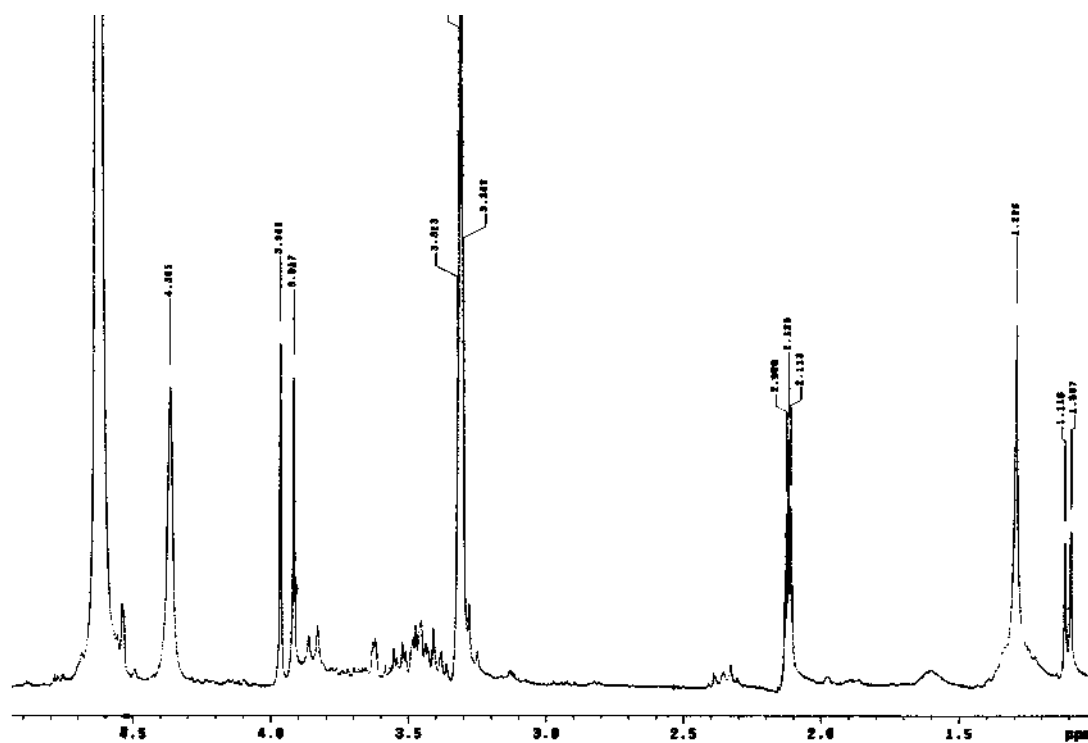


Figura 38 – Espectro de RMN de ¹H de **EB7** (Ampliação) [300 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

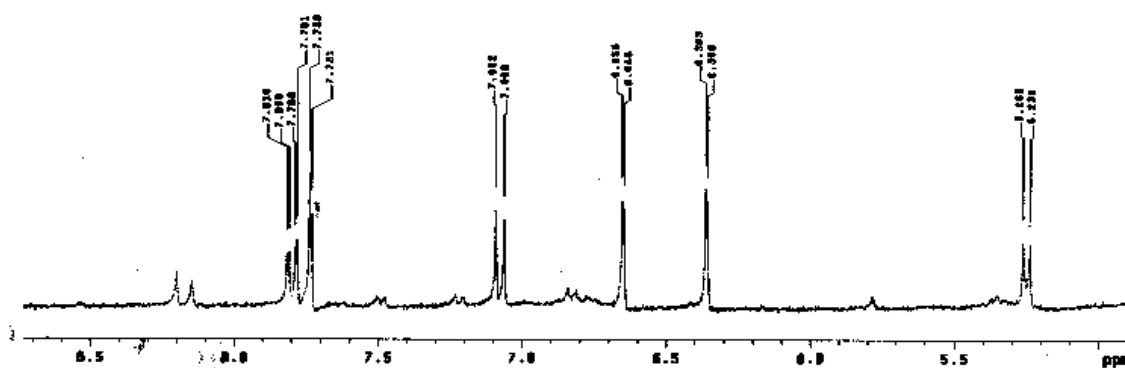


Figura 39 – Espectro de RMN de ¹H de **EB7** (Ampliação) [300 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

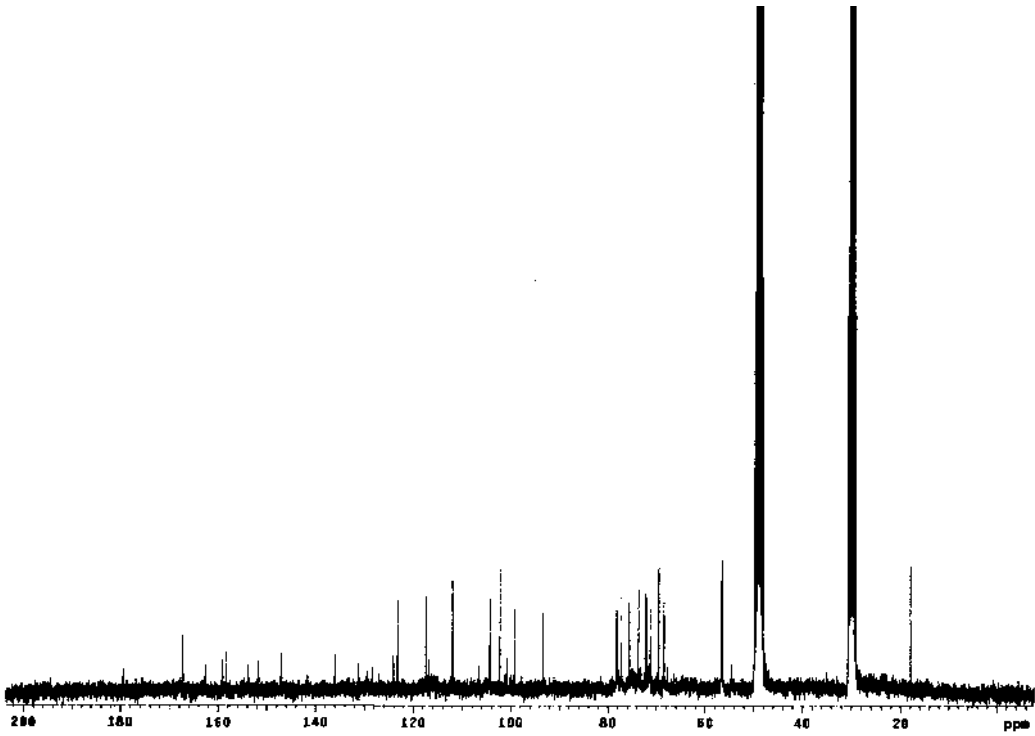


Figura 40 – Espectro de RMN de ^{13}C de **EB7** [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

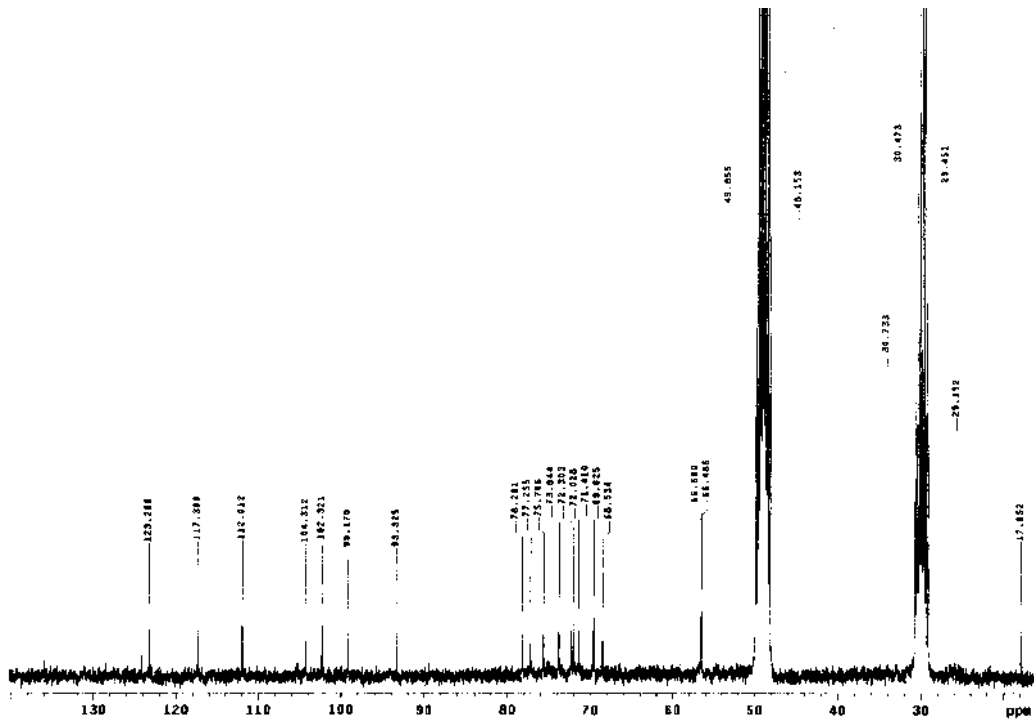


Figura 41 – Espectro de RMN de ^{13}C de **EB7** (Ampliação) [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

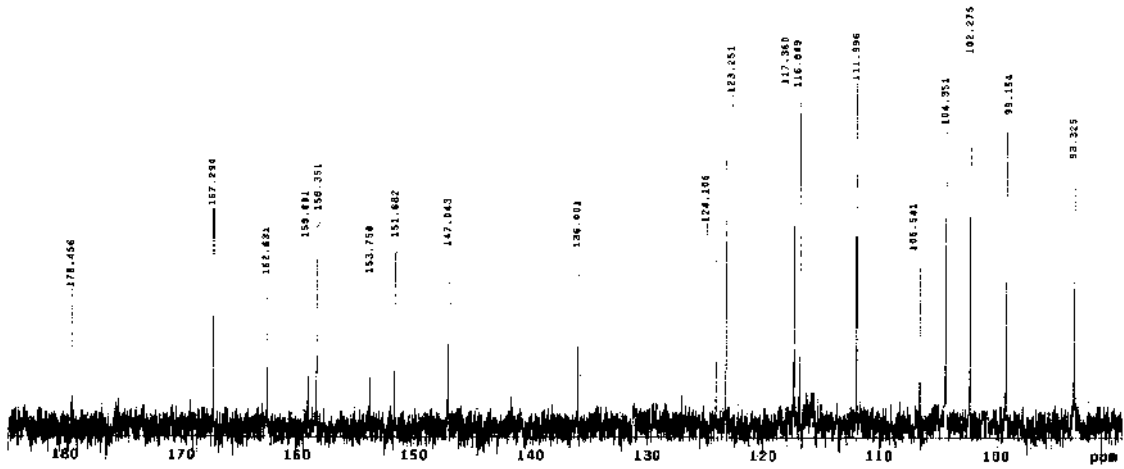


Figura 42 – Espectro de RMN de ^{13}C de **EB7** (Ampliação) [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

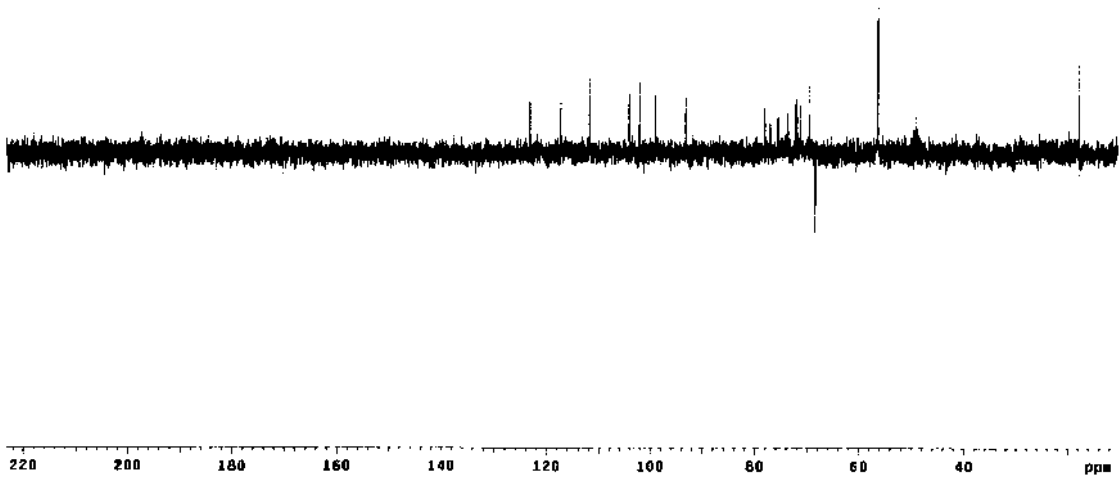


Figura 43 – Espectro de DEPT 135° de **EB7** [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

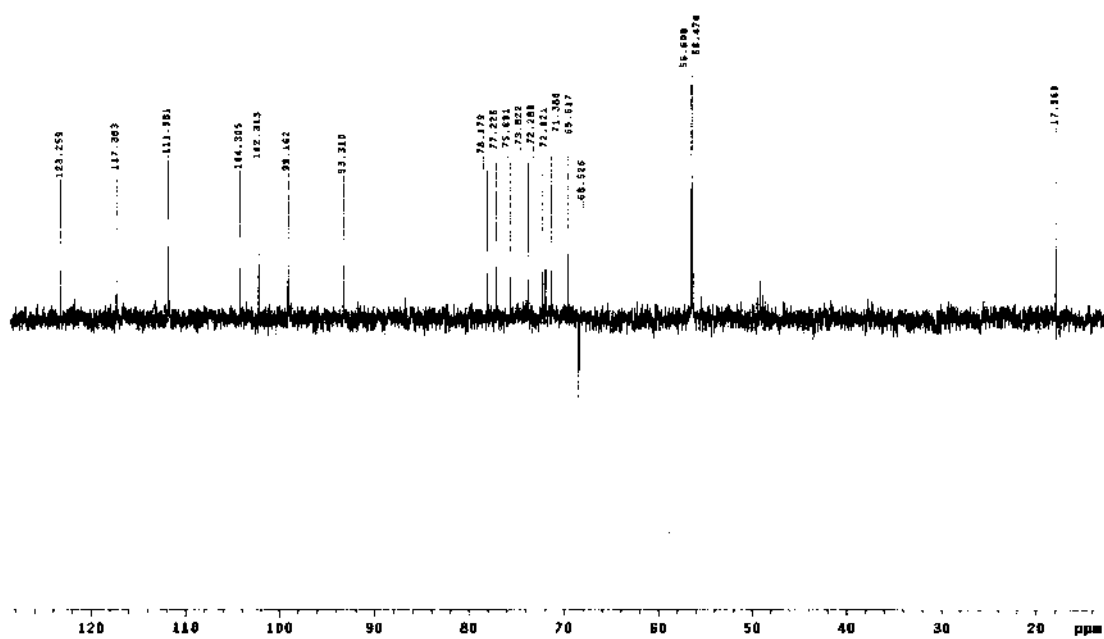


Figura 44 – Espectro de DEPT 135° de **EB7** (Ampliação) [75 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

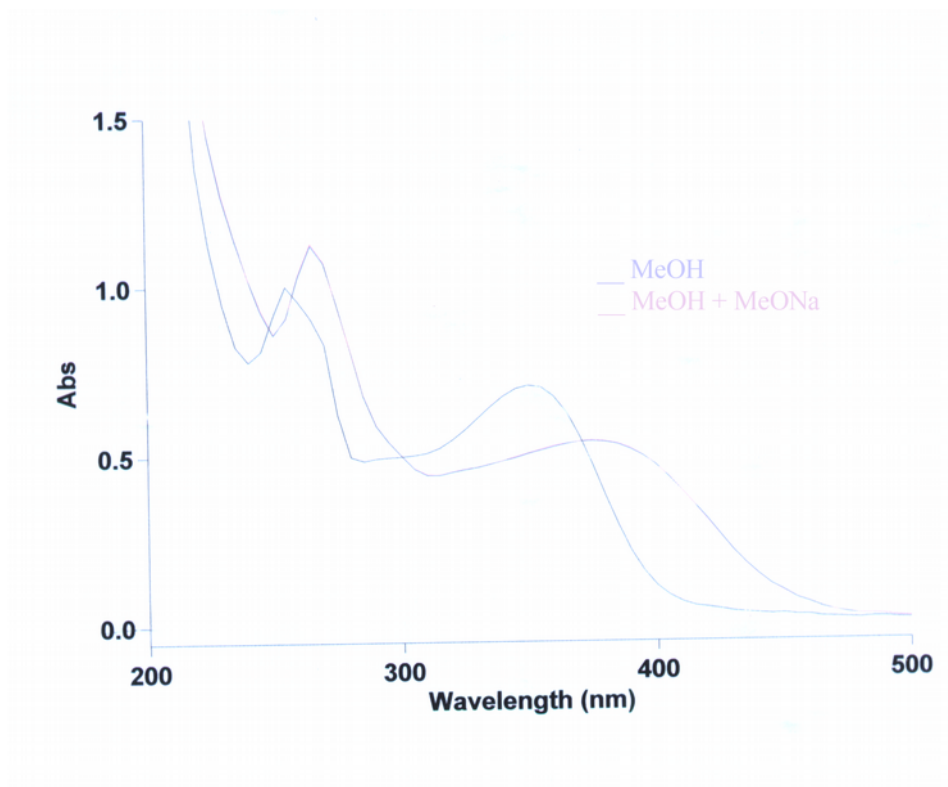
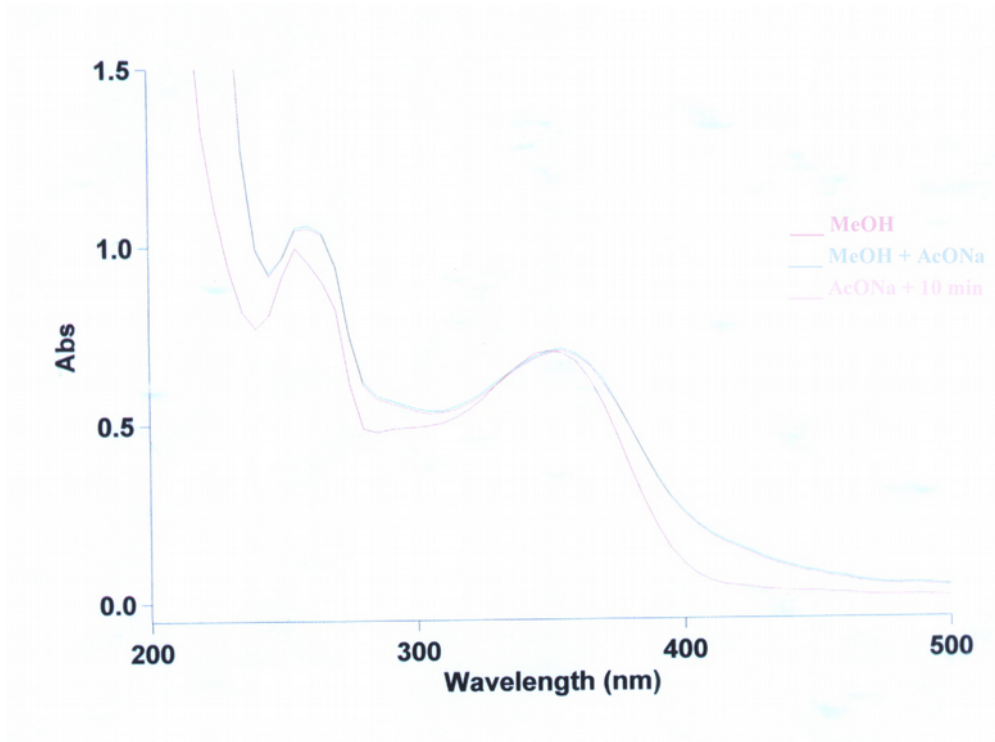
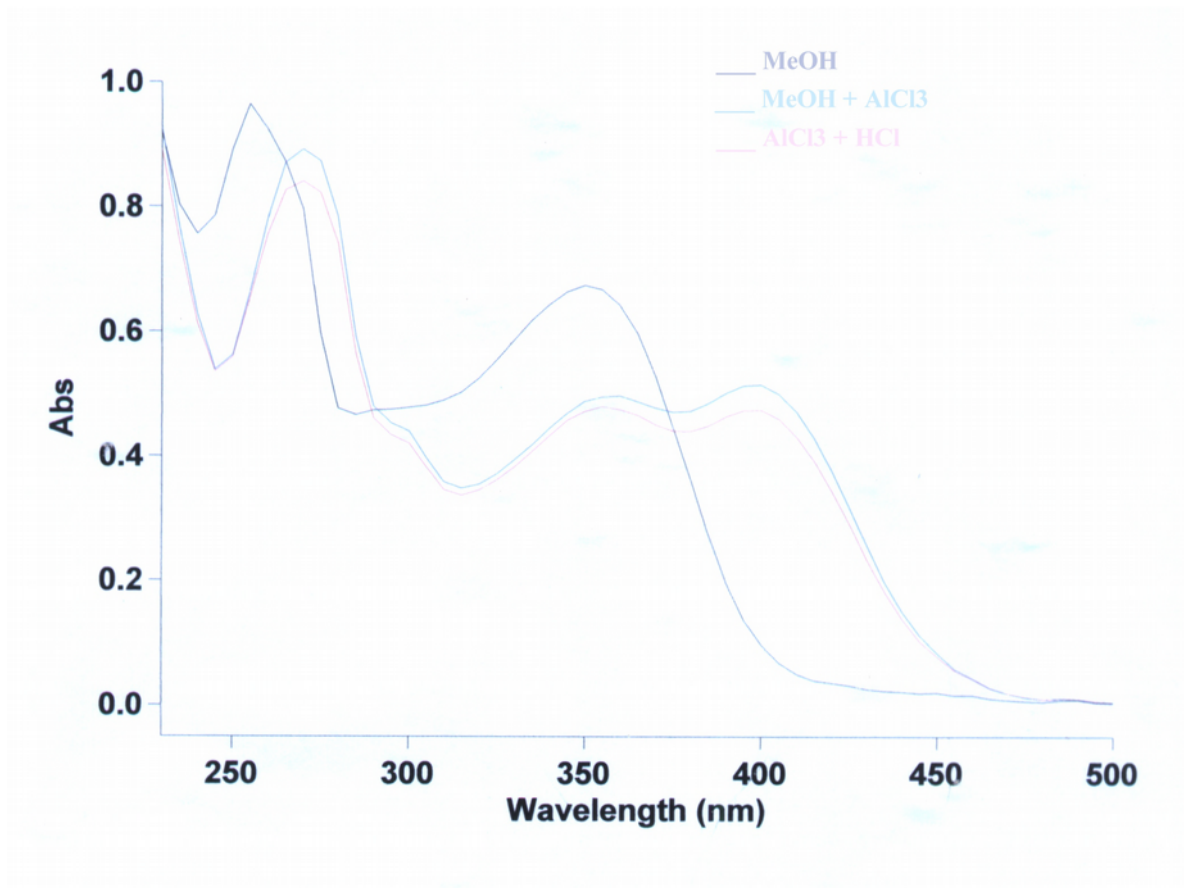
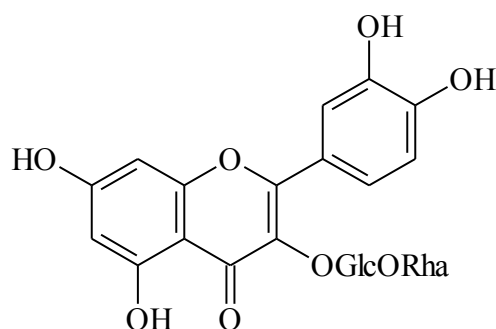


Figura 45 – Espectro de UV de **EB7** com MeONa

Figura 46 – Espectro de UV de **EB7** com AcONaFigura 47 – Espectro de UV de **EB7** com AlCl₃

5.1.7 Identificação da Quercetina-3-rutinosídeo **EB8**



O espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 51 a 53 p. 94 e 95) desta substância apresentou vinte e sete sinais de carbonos. A partir da análise deste espectro e do espectro de DEPT 135° (Figuras 54 e 55, p. 96) observou-se para a parte do flavonóide, sinais para cinco carbonos metínicos e dez sinais para carbonos não hidrogenados similares aos observados para a substância **EB6** (Tabela 20, p. 97). Além destes sinais, foram observados oito sinais na região entre (δ 78,19-69,71) correspondentes a carbonos metínicos e ainda o sinal de carbono metílico em δ 17,88, bem como o sinal de carbono metilênico em δ 68,57. Este espectro revelou também dois sinais de carbonos metínicos em δ 104,70 e δ 102,42 pertencentes aos anoméricos dos açúcares. Estes valores de deslocamentos químicos indicaram a presença de um grupo rutinosídeo na molécula.

A partir da análise do espectro de RMN de ^1H (Figuras 48 a 50, p. 93 e 94) pode-se verificar dois dubleto em δ 1,13 e em δ 4,54 ambos com $J= 6,5$ Hz referentes aos H-6''' e H-1''' da rarnose, além do dubleto em δ 5,11 correspondente ao H-1'' da glicose.

A posição do açúcar foi confirmada a partir da análise do espectro de UV com adição de AlCl_3 (Dados físicos p. 60) que causou deslocamento batocrômico de 70 nm na banda I e ao adicionar HCl verificou-se retorno de 25 nm em virtude da decomposição do complexo formado entre as hidroxilas dos C-4' e C-3'.

Comparação desses valores de deslocamentos com os obtidos da literatura (AGRAWAL, 1984; HARBONE, 1982) e com os da substância **EB6** indicaram que a substância **EB8** tratava-se da Quercetina-3-rutinosídeo.

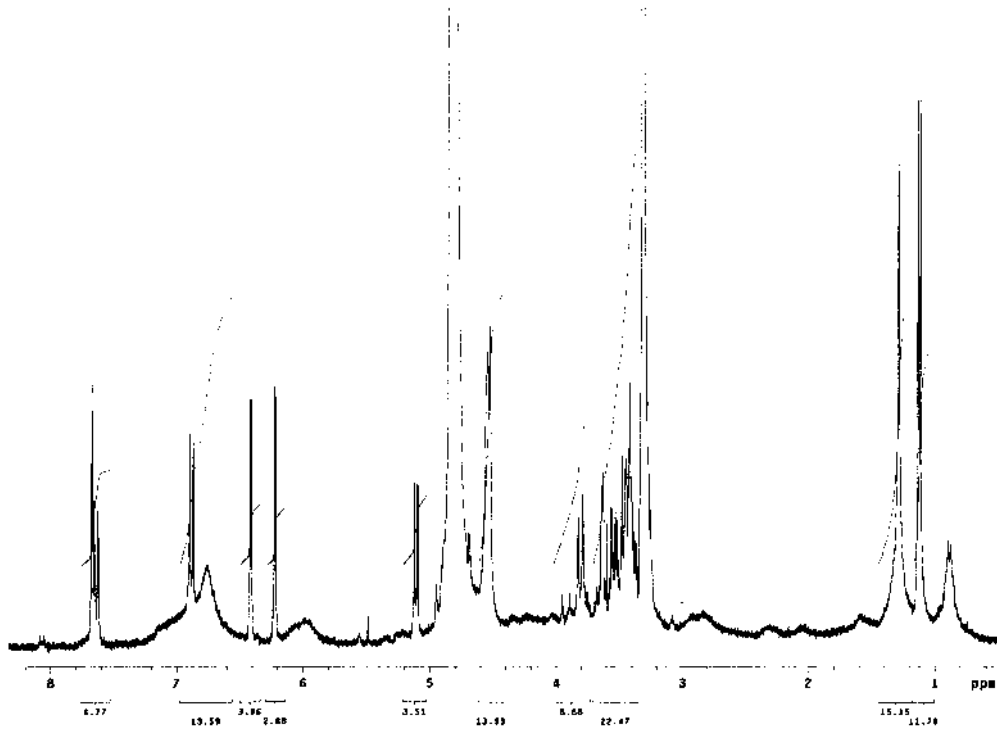


Figura 48 – Espectro de RMN de ¹H de **EB8** (Ampliação) [300 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

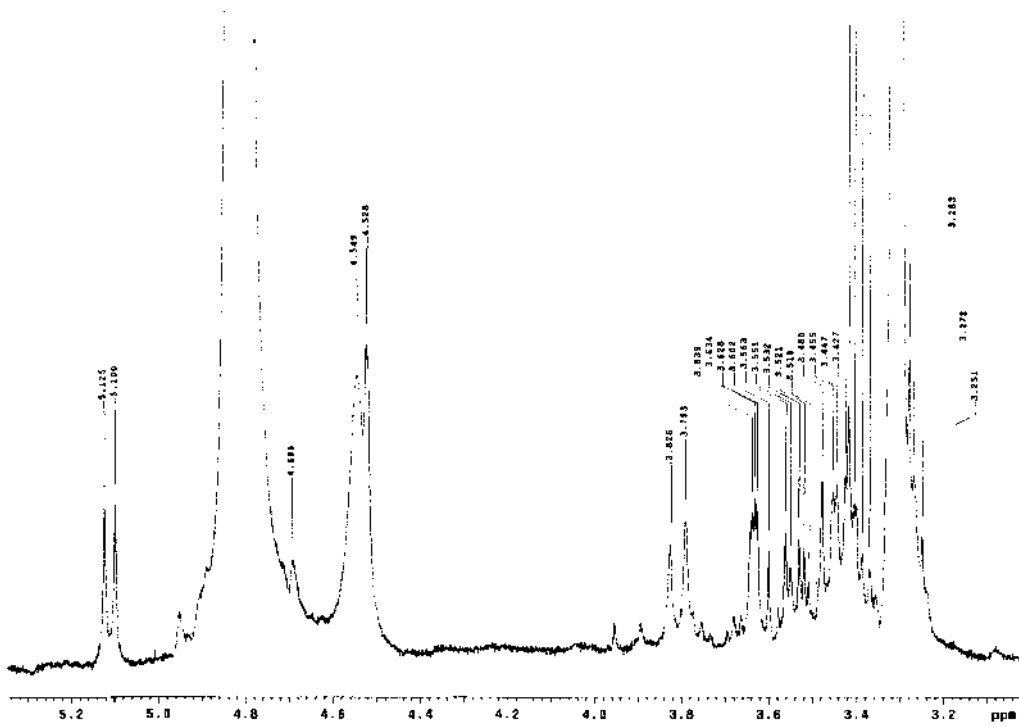


Figura 49 – Espectro de RMN de ¹H de **EB8** (Ampliação) [300 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

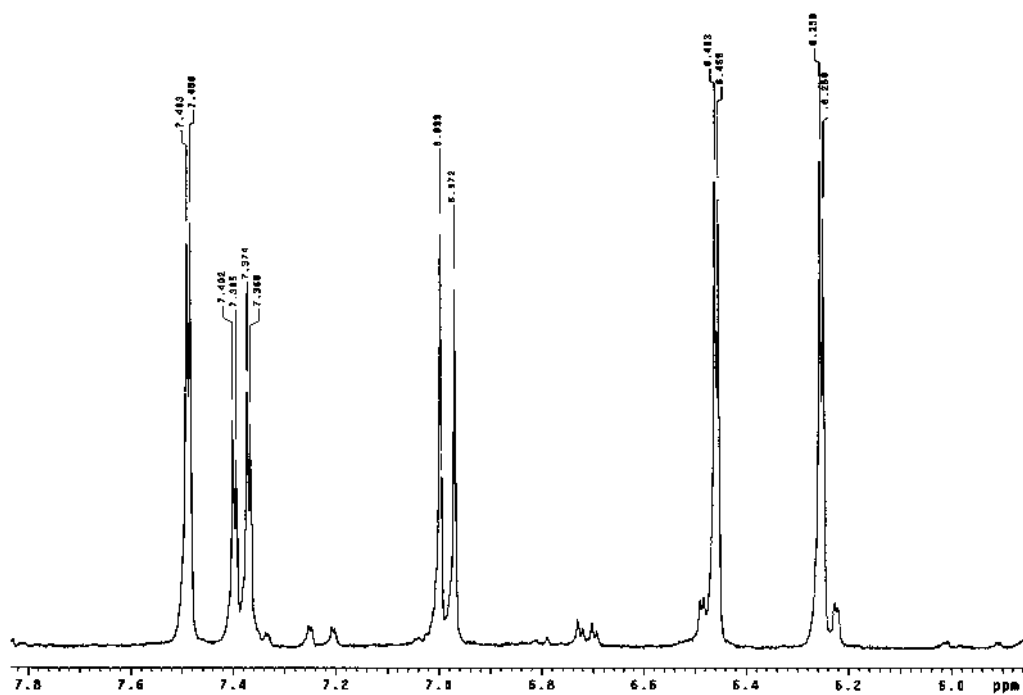


Figura 50 – Espectro de RMN de ¹H de **EB9** (Ampliação) [300 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

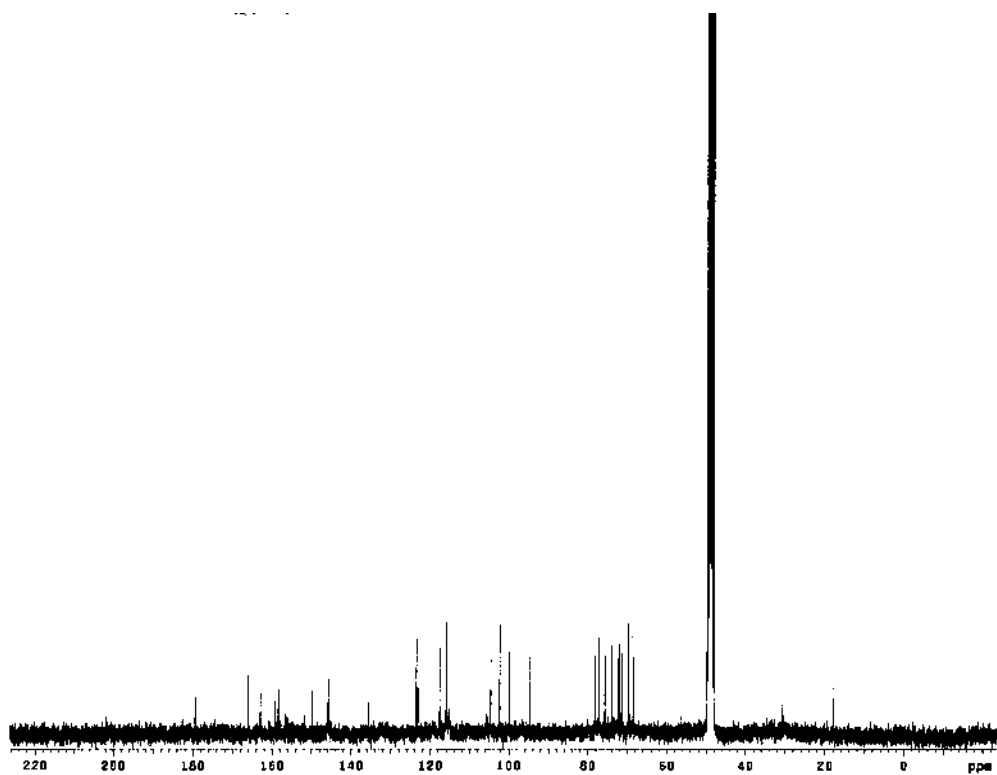


Figura 51 – Espectro de RMN de ¹³C de **EB8** [75 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

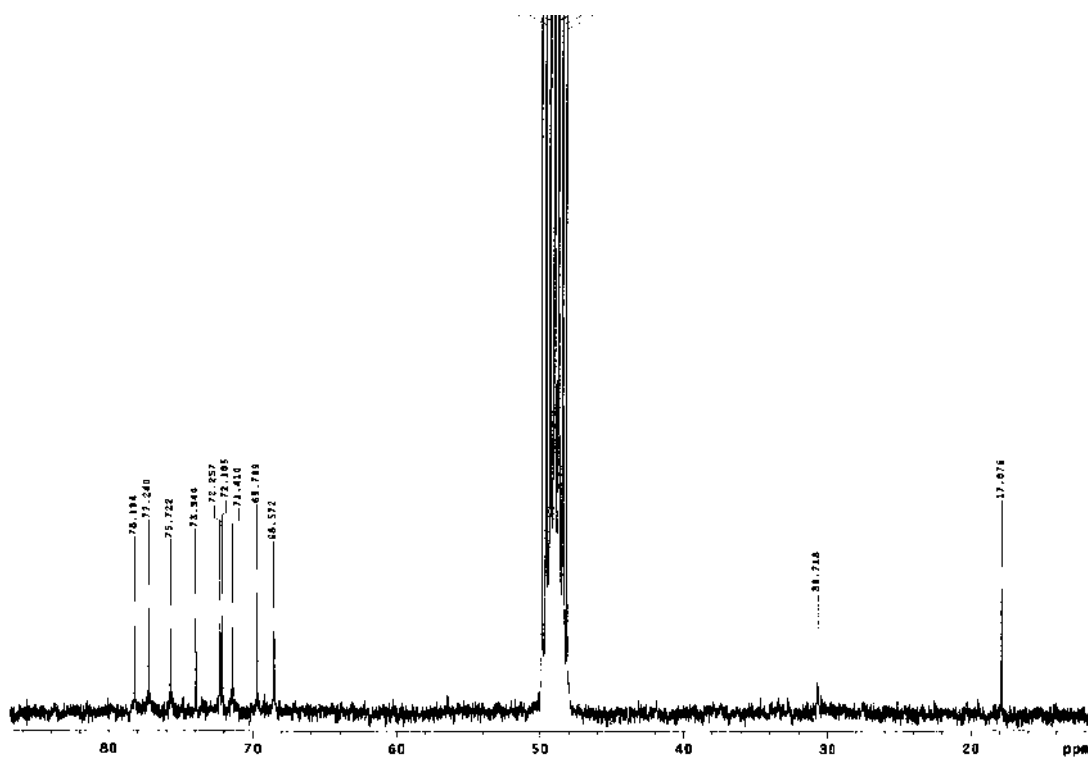


Figura 52 – Espectro de RMN de ^{13}C de **EB8** (Ampliação) [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

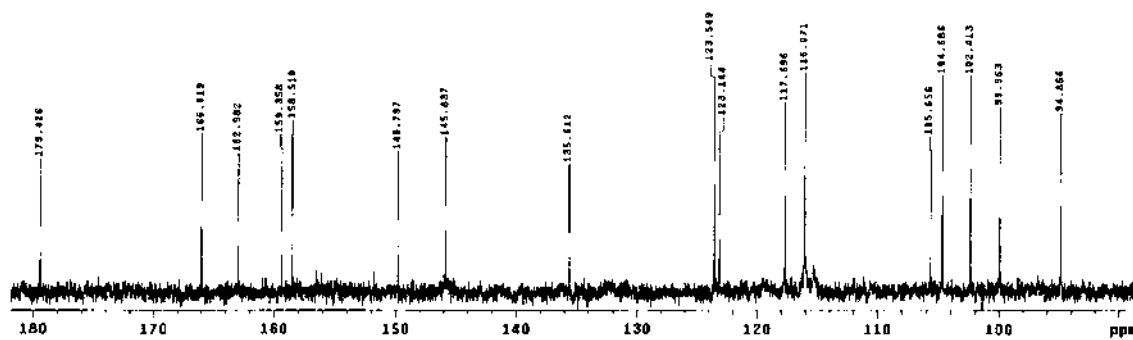


Figura 53 – Espectro de RMN de ^{13}C de **EB8** (Ampliação) [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

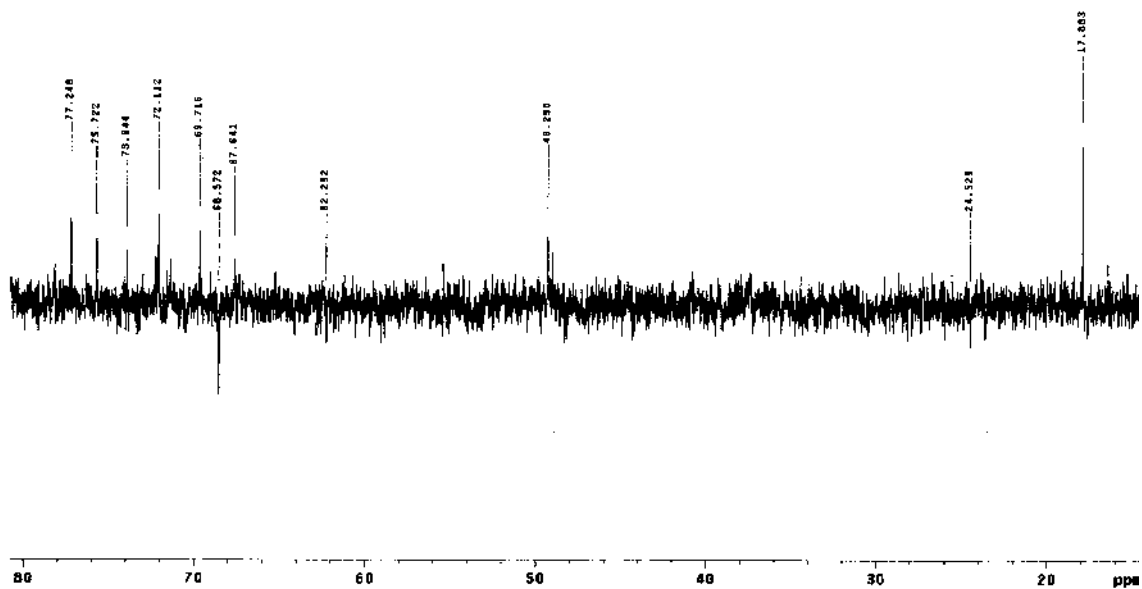


Figura 54 – Espectro de DEPT 135° de **EB8** (Ampliação) [75 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

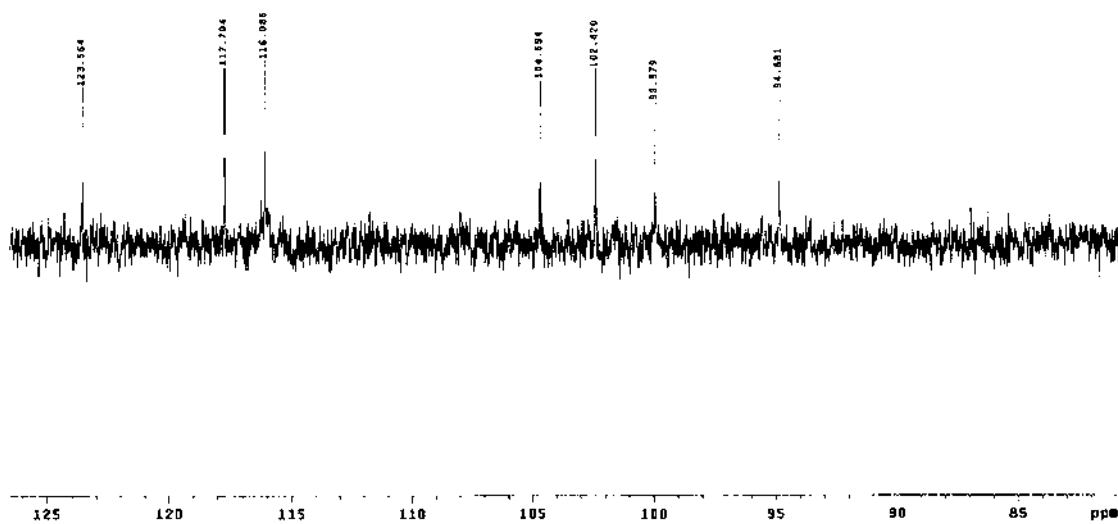


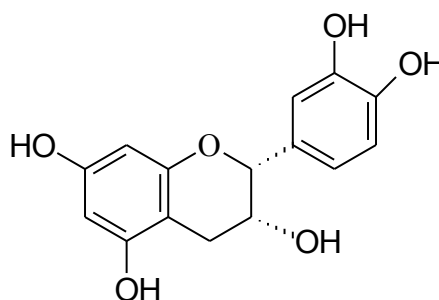
Figura 55 – Espectro de DEPT 135° de **EB8** (Ampliação) [75 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

Tabela 21– Dados de RMN ^{13}C dos flavonóis [75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{OD}$, CD_3OD^* , δ (ppm)

C	EN1	EN3	EN5 *	EB6	EB7 *	EB8 *
2	146,97	146,98	158,39	157,88	158,35	158,52
3	137,32	136,74	135,57	135,67	136,00	135,61
4	176,50	176,76	179,41	179,22	179,46	179,43
5	161,90	162,28	162,96	163,09	162,63	162,98
6	98,41	99,16	99,87	99,47	99,15	99,98
7	164,90	165,05	165,98	164,94	167,29	166,02
8	92,77	94,42	94,70	94,45	93,32	94,88
9	156,00	157,76	158,97	158,30	159,09	159,36
10	104,59	104,10	105,63	105,67	106,54	105,66
1'	124,30	123,75	123,00	122,76	124,11	123,14
2'	115,24	115,73	115,97	116,06	117,36	116,07
3'	147,39	145,86	145,84	145,79	147,04	145,84
4'	150,10	148,36	149,81	149,00	151,68	149,80
5'	112,15	116,19	117,52	116,66	112,00	117,70
6'	121,24	121,44	123,17	122,49	123,25	123,55
1''	-	-	104,28	102,68	104,35	104,68
2''	-	-	75,68	71,41	75,71	75,72
3''	-	-	78,06	72,05	78,20	78,19
4''	-	-	71,17	72,96	71,41	71,41
5''	-	-	78,34	71,27	77,25	77,24
6''	-	-	62,50	17,73	68,53	68,57
1'''	-	-	-	-	102,27	102,42
2'''	-	-	-	-	72,03	72,10
3'''					72,30	72,25
4'''					73,84	73,94
5'''					69,62	69,71
6'''					17,95	-
OCH ₃					56,48	-
OCH ₃					56,60	-

5.2. Flavanol

5.2.1 Identificação da *Epicatequina* EN4



Assim como todos os flavonóides isolados anteriormente, a substâncias **EN4** também revelou positivo com o reagente AlCl_3 . Análise dos espectro de RMN de ^1H (Figuras 56 a 58, p. 99 e 100). mostrou, além dos sinais referentes aos hidrogênios aromáticos na região entre δ 5,95-6,98, dois duplo dubletos em δ 2,74 e δ 2,87 característicos de flavanol CH_2 -4. Além desses, mostrou um sinal em δ 4,17 (*m*, 1 H) referente ao H-3 e ainda um *sl* em δ 4,81 (H-2) indicando uma configuração relativa *cis* para os hidrogênios nas posições 2 e 3.

Análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 59 a 61, p. 100 e 101) permitiu observar a presença de quinze sinais de carbonos que foram assinalados de acordo com o espectro de DEPT 135° como sendo um sinal de carbono metilênico, sete de carbonos metínicos e sete de carbonos não hidrogenados. A partir da análise detalhada desse espectro foi possível observar a presença dos sinais em δ 29,26 δ 67,48 atribuídos ao carbono metilênico na posição 4, e ao C-3, respectivamente. Esses valores corroboraram com as informações do espectro de RMN de ^1H confirmando que as substâncias **EN4** eram um flavanol.

O EMIE a 70 eV (Figura 63, p. 102) pode confirmar a estrutura proposta para essa substância através do pico do íon molecular em m/z 290 referente a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ condizente com a da *Epicatequina*. As principais fragmentações foram detalhadas no Quadro 13.

Comparação desses valores com os da literatura (AGRAWAL, 1984) permitiram identificar as substâncias **EN4** como *Epicatequina*.

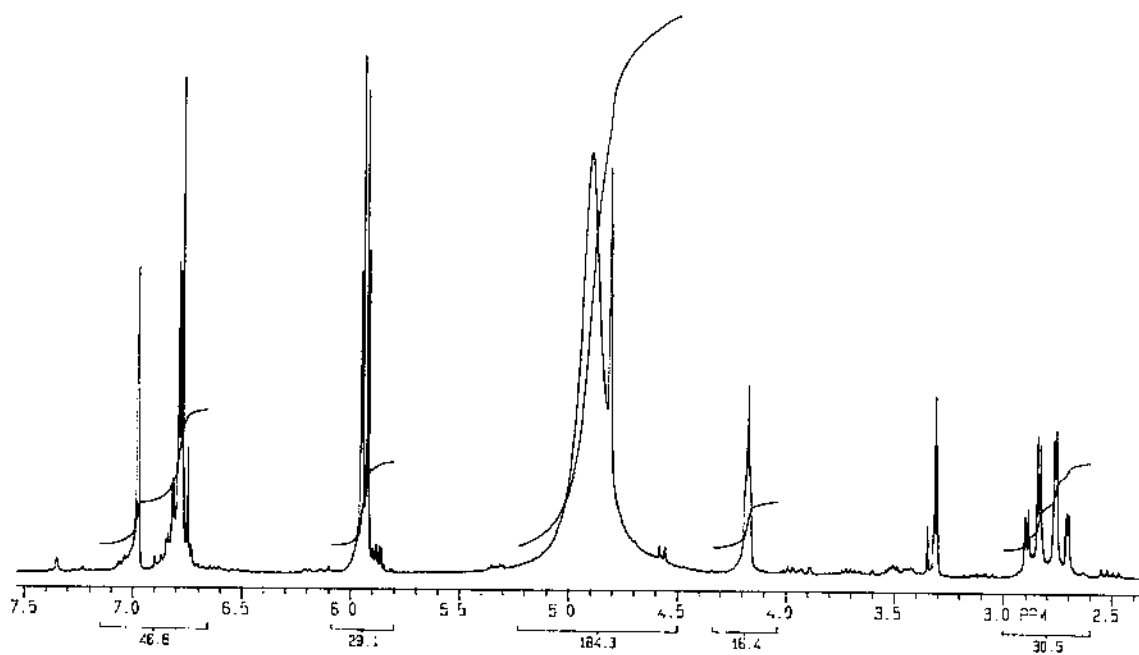


Figura 56 – Espectro de RMN de ^1H de **EN4** [300 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

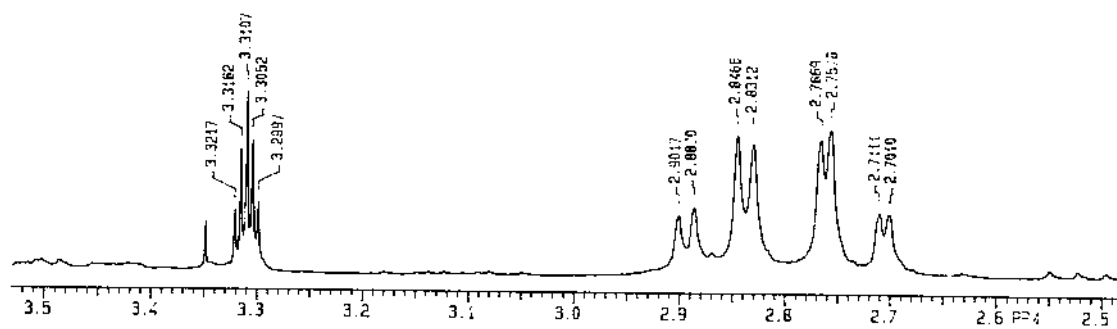


Figura 57 – Espectro de RMN de ^1H de **EN4** (Ampliação) [300 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

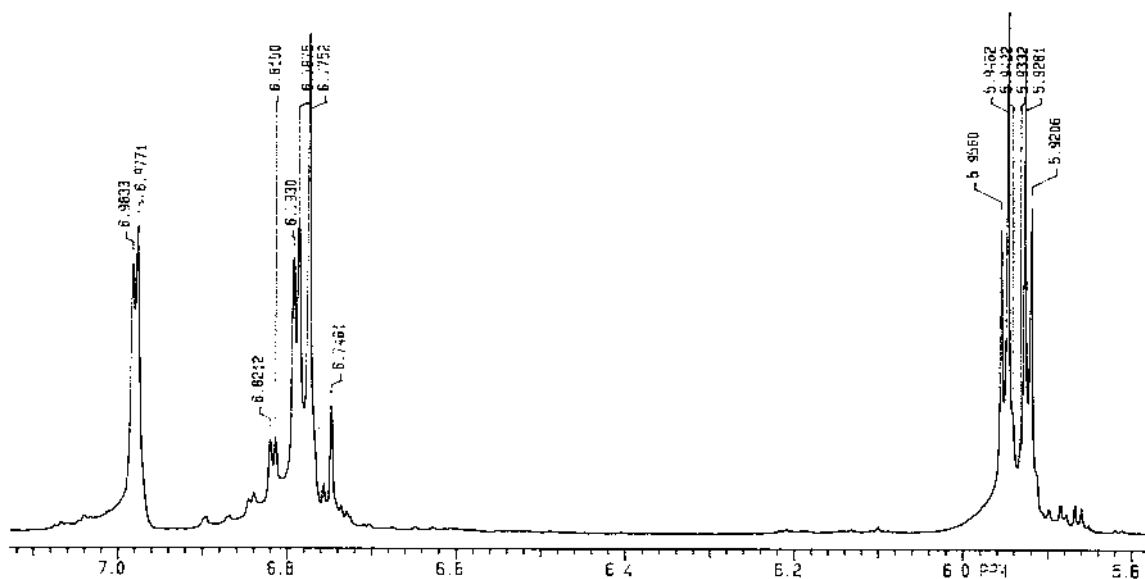


Figura 58 – Espectro de RMN de ^1H de EN4 (Ampliação) [300 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

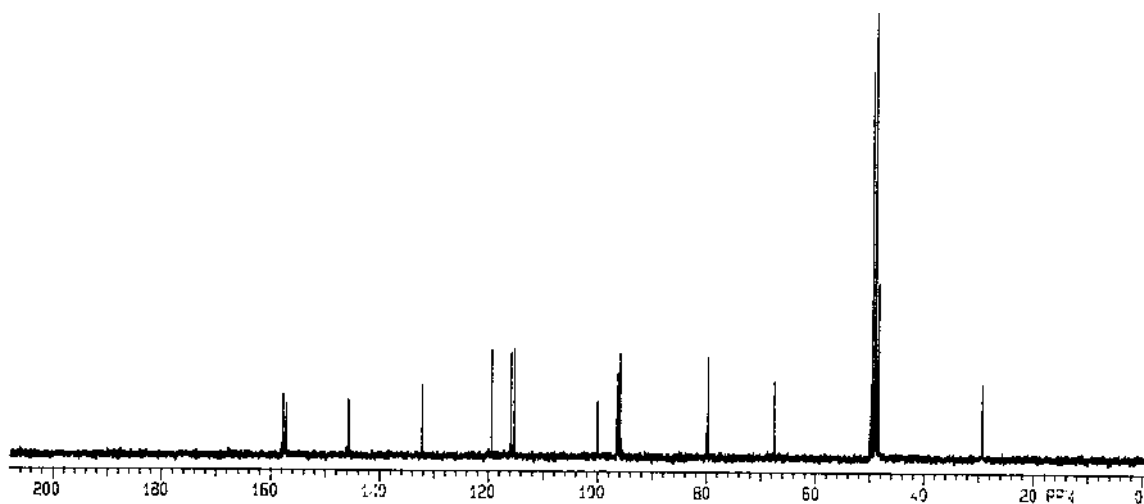


Figura 59 – Espectro de RMN de ^{13}C de EN4 (Ampliação) [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

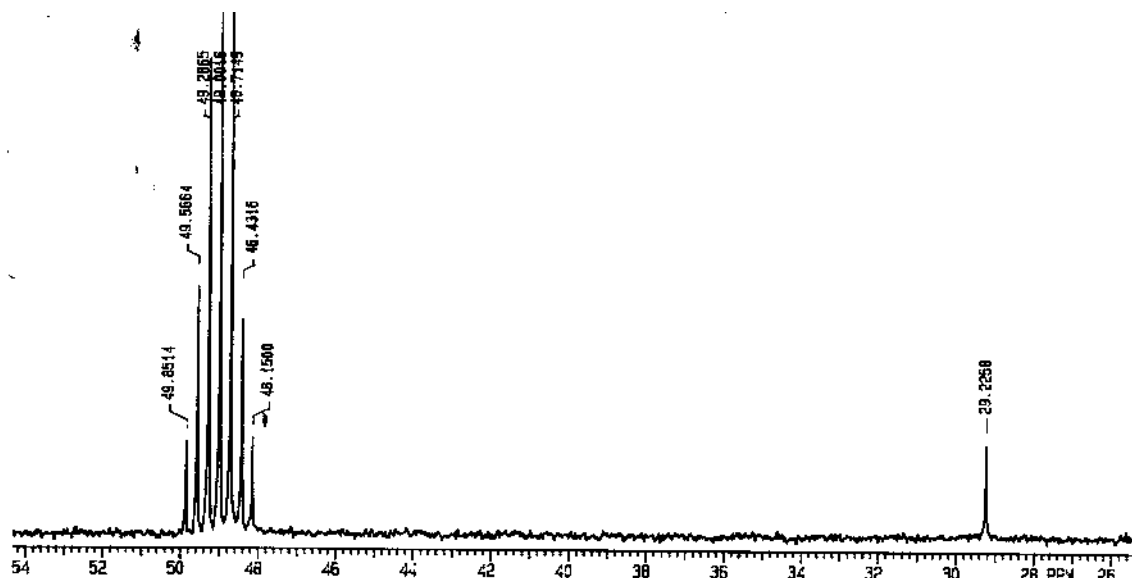


Figura 60 – Espectro de RMN de ^{13}C de **EN4** (Ampliação) [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

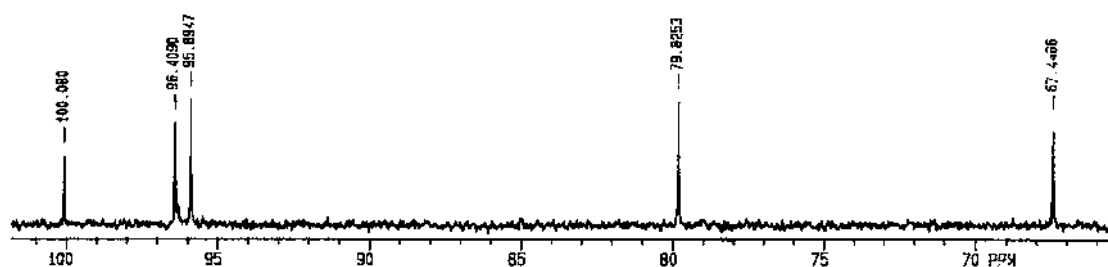


Figura 61 – Espectro de RMN de ^{13}C de **EN4** (Ampliação) [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

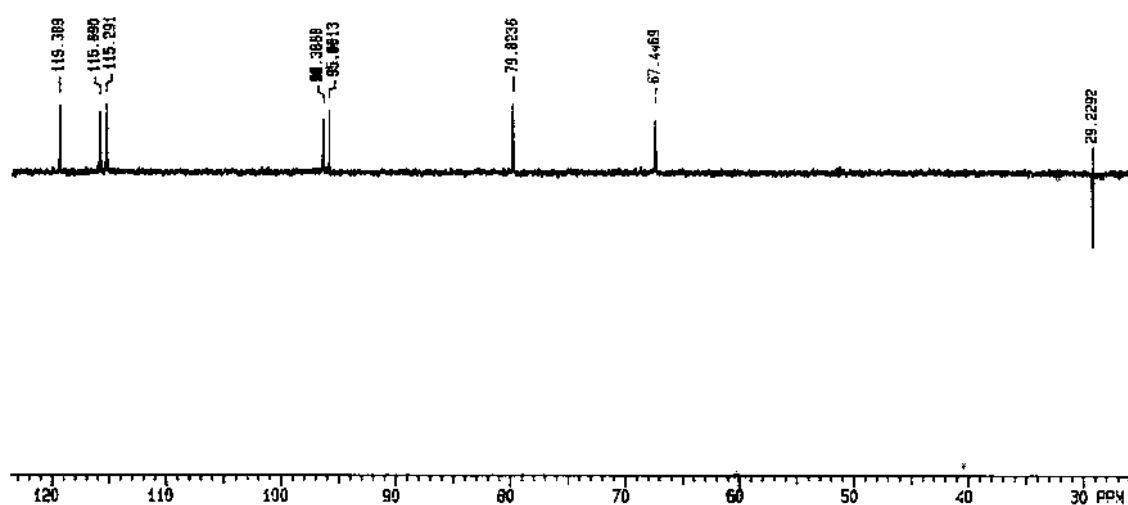


Figura 62 – Espectro de DEPT 135° de **EN4** (Ampliação) [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

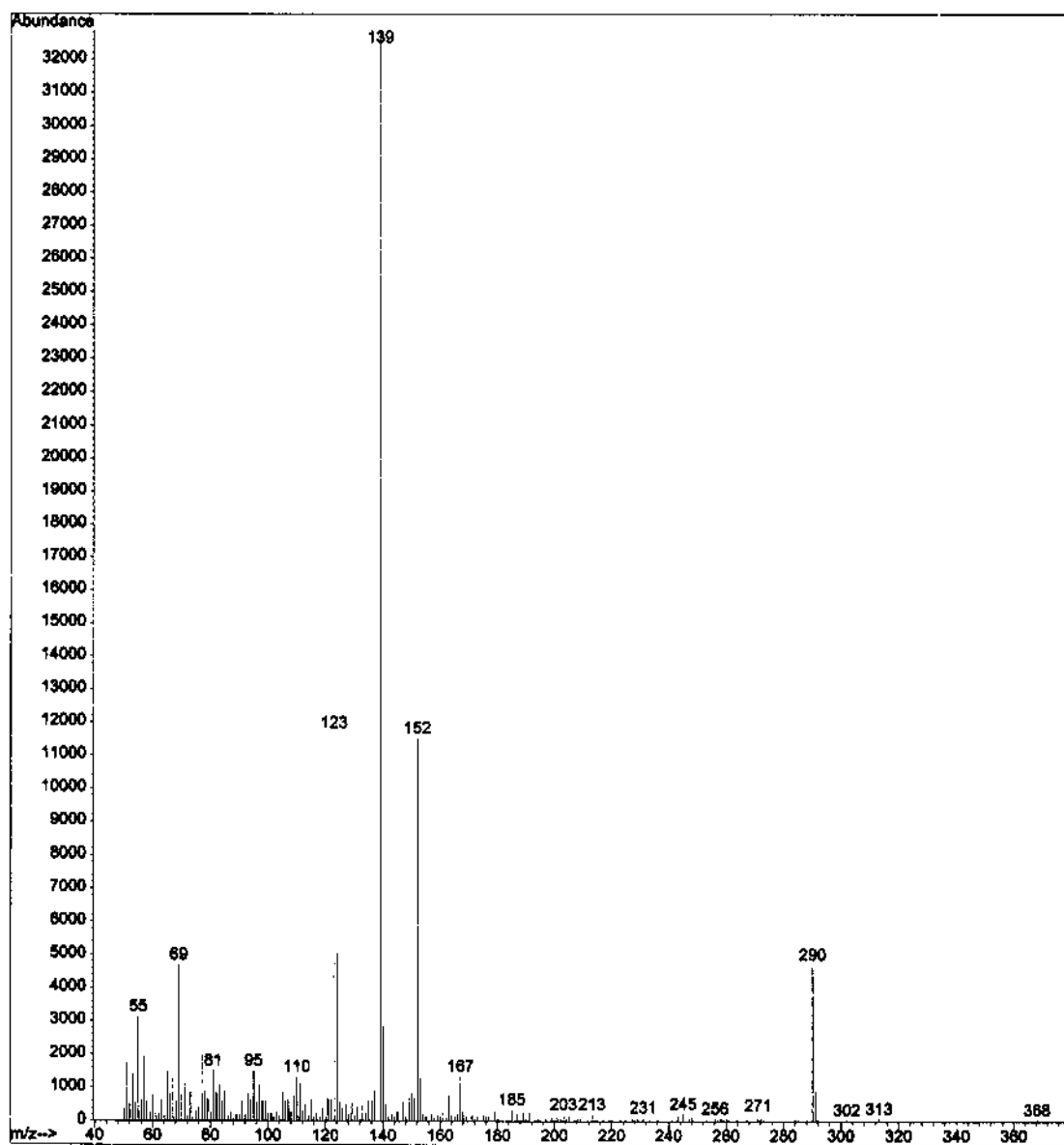


Figura 63 – Espectro de massas de EN4

Quadro 13 - Principais Fragmentações de EN4

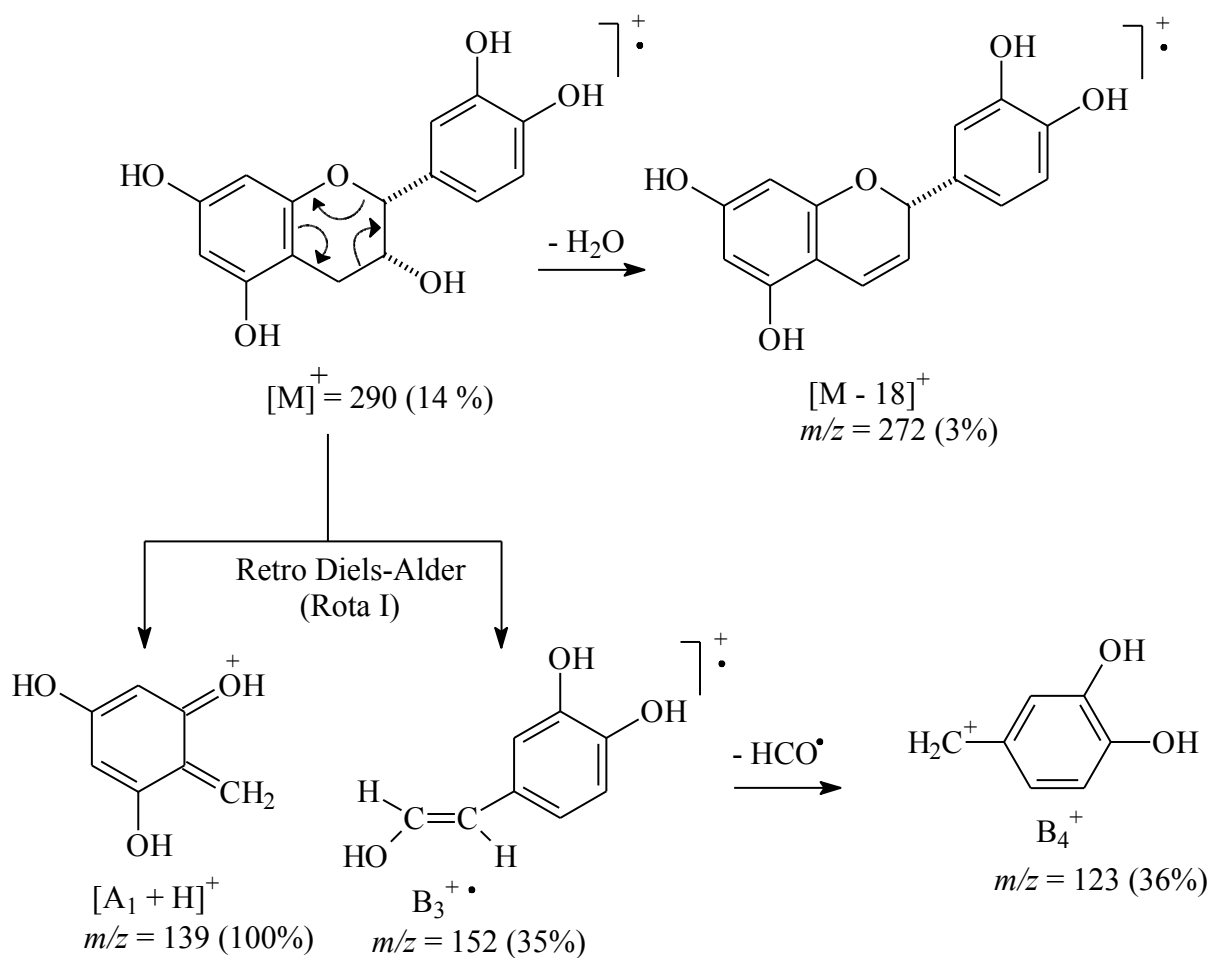
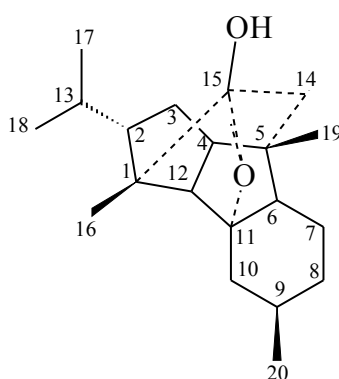


Tabela 22– Dados de RMN ^{13}C da epicatequina [75 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

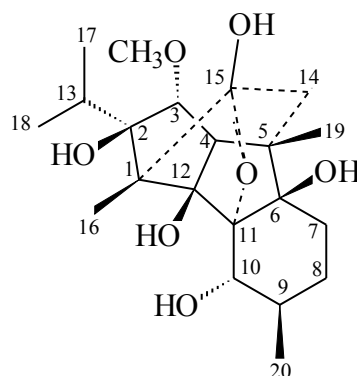
C	EN4
2	79,84
3	67,48
4	29,26
5	157,96
6	96,37
7	157,64
8	95,87
9	157,34
10	100,06
1'	132,29
2'	115,29
3'	145,73
4'	145,90
5'	115,87
6'	119,39

5.3. Diterpenos de esqueleto rianodado



Os diterpenos do grupo rianodano apresentam alguns dados de RMN de ^1H em comum, destacando-se os dois dubletos em δ 0,90 e 1,10 ppm ($J= 6,5$ Hz), respectivamente. Estes são referentes aos H-17 e H-18, que estão acoplado com o hidrogênio vizinho H-13. Apresentam ainda o singlete em *c.a.* de (δ 1,30) referente ao grupo metílico H-16, além da presença de dois dubletos na região entre δ 1,50-1,70) e δ 1,75-2,00 pertencentes aos H-14. O espectro de RMN de ^{13}C destes também apresentam alguns sinais característicos como, destacando-se cinco sinais de carbonos metílicos em torno de (δ 9,6; 15,1; 18,3; 18,7; 19,1), bem como o sinal em δ 33,9 referente ao C-13.

5.3.1 Identificação do 3 α -metoxi-2,8,12 β -triidroxi-11-hidroxi-10 α -hidroxi-rianodano **EN2**



O espectro de RMN de ^{13}C desta substância (Figuras 68 e 69, p. 110) revelou a presença de 21 sinais que de acordo com os espectros de DEPT 135° e 90° (Figuras 70 a 72, p. 111 e 112) foram registrados como 6 carbonos metílicos, 3 carbonos metilênicos, 5 carbonos metínicos e 7 carbonos não hidrogenados, todos característicos para diterpeno pentacíclico do tipo rianodano (WATERHOUSE, 1985). A partir da análise detalhada desses espectros, foi possível observar o sinal de carbono metílico em δ 56,62 sugerindo a presença de grupo metoxílico. Além disso, verificou-se também o sinal de CH em δ 87,0 referente ao C-3, protegido cerca de 3 ppm quando comparado ao mesmo carbono para a rianodina (δ 90,9). Ainda em comparação com a rianodina foi observado ausência do sinal de carbono não hidrogenado em δ 92,1 (C-4) e a presença de sinal de CH em δ 59,62 (C-4). Esses sinais indicaram a ausência da hidroxila no C-4 em comparação a rianodina. Estas informações foram corroboradas pelo espectro de RMN ^1H (Figuras 64 a 67, p. 108 e 109) que apresentou o singleto em δ 3,37 integrando para 3 hidrogênios, característico de hidrogênio oximetílico, bem como o sinal em δ 2,66 (*d*, $J=1,5$ Hz, H-4) que acopla com o hidrogênio em δ 3,34 (*s*). O espectro de RMN de ^1H mostrou ainda 5 sinais para hidrogênios de CH (δ 3,77; 3,34; 2,66; 1,97; 1,82), 5 sinais de CH_2 (δ 2,09; 1,75; 1,57; 1,55; 1,29) e 5 sinais de CH_3 (δ 1,33; 1,06; 1,03; 0,94; 0,93), além daquele em δ 3,37 de OCH_3 . Através do espectro de HMQC (Figuras 73 a 76, p. 112 a 114) foi possível observar a correlação do hidrogênio em δ 3,37 (*s*) com o carbono em δ 56,62 permitindo atribuir o deslocamento químico da posição C-21. Análise do espectro de HMBC (Figuras 77 a 81 p. 114 a 116) permitiu observar a

correlação do hidrogênio em δ 3,34 (H-3) com os carbonos em δ 98,53 (C-12), 56,62 (C-21), 46,82 (C-5) e 34,24 (C-13). Além disso, verificou-se também a correlação do hidrogênio em δ 0,94 (H-19) com os carbonos em δ 59,63 (C-4), 41,83 (C-14), 46,82 (C-5) e 83,48 (C-6), assim como a correlação do hidrogênio em δ 0,93 (H-18) com os carbonos em δ 85,49 (C-2), 34,24 (C-13), 18,61 (C-17). Verificou-se ainda, a correlação do hidrogênio em δ 1,06 (H-17) com os carbonos em δ 34,24 (C-13), 18,69 (C-18), 85,49 (C-2) supondo a presença de grupo isopropila. Essa correlação foi confirmada pelo espectro de TOCSY (Figuras 82 e 83, p. 117 e 118) que mostrou a correlação do sinal em δ 1,97 atribuído ao H-13 com sinais dos hidrogênios em δ 0,93 e 1,06 referentes aos H-18 e H-17, respectivamente. A estereoquímica relativa para o C-3 foi baseada no espectro de nOe diff que ao irradiar o H-21 em δ 3,37 verificou-se incrementos nos sinais em δ 1,06 (H-17) e 0,93 (H-18). O espectro de NOESY também mostrou a correlação do δ 3,37 (H-21) com o H-18 (0,93) e H-14 (1,55) (Figuras 86 e 87, p. 121). Essas correlações espaciais permitiram indicar que o grupo OCH_3 estava na posição α para.

Comparação desses dados com os da literatura para a rianodina (WATERHOUSE, 1985) permitiram identificar a substâncias **EN2** como 3 α -metoxi-2,6,12 β -trihidroxí-15-hidroxi-10 α -hidroxí-rianodano. O espectro de massas por IE a 70 eV (Figura 84, p. 119) mostrou o pico do íon molécula em m/z 398 sugerindo a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_7$. Através da análise elementar que mostrou C, 60,50, H, 8,41% para a fórmula $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pode-se confirmar essa substância.

O espectro de Infravermelho (Figura 85, p. 120) mostrou uma banda larga em 3735 cm^{-1} relativa a deformação axial de OH.

Este é o primeiro relato na literatura desta substância, bem como do primeiro registro em espécies da família Erythroxylaceae.

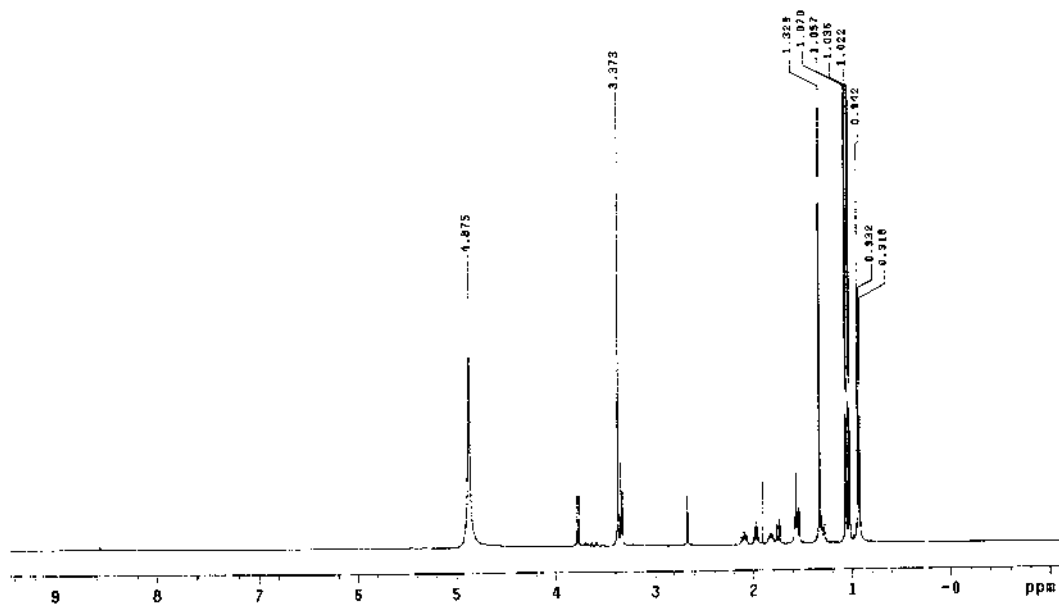


Figura 64 – Espectro de RMN de ¹H de **EN2** [500 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

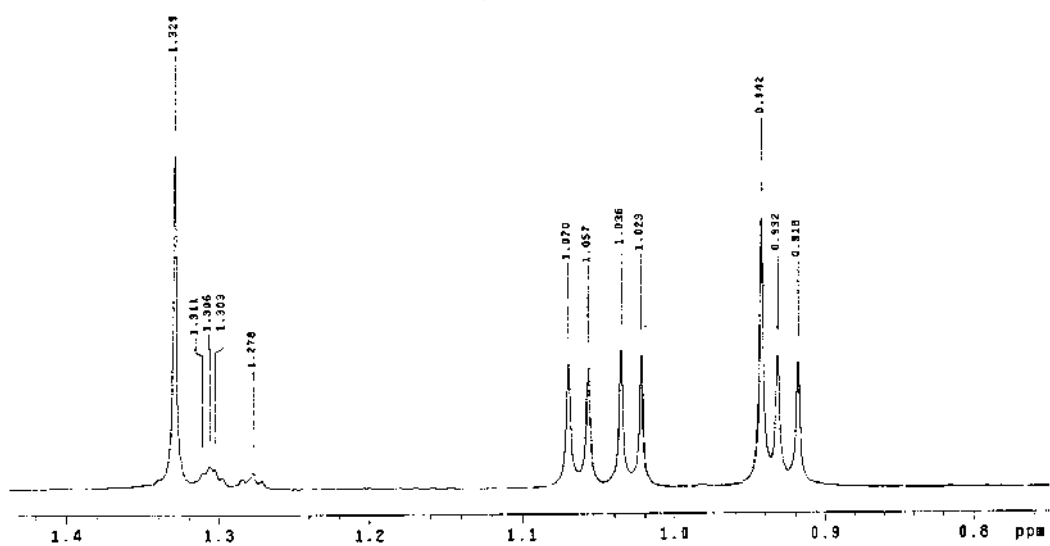


Figura 65 – Espectro de RMN de ¹H de **EN2** (Ampliação) [125 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

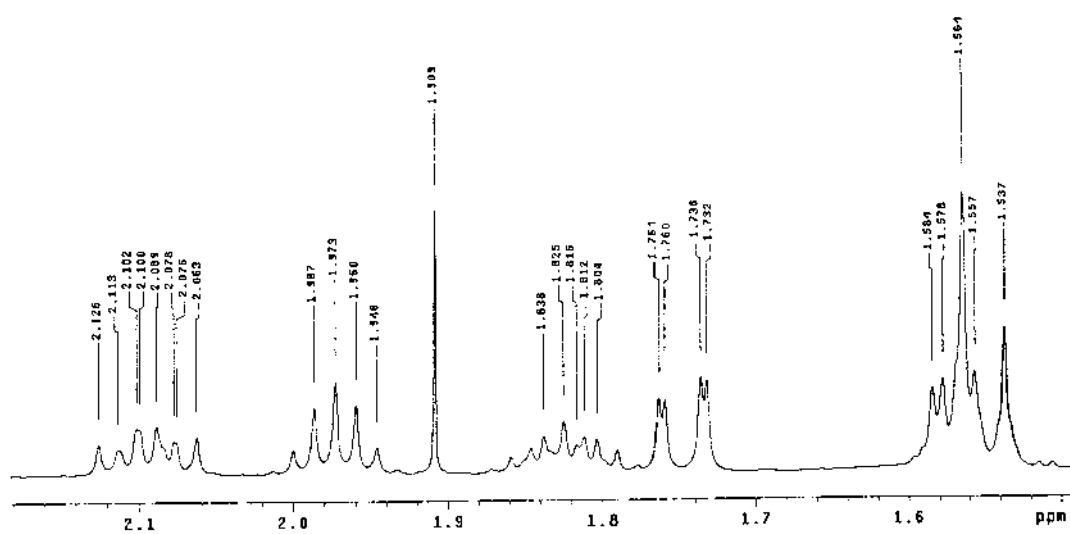


Figura 66 – Espectro de RMN de ^1H de **EN2** (Ampliação) [125 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

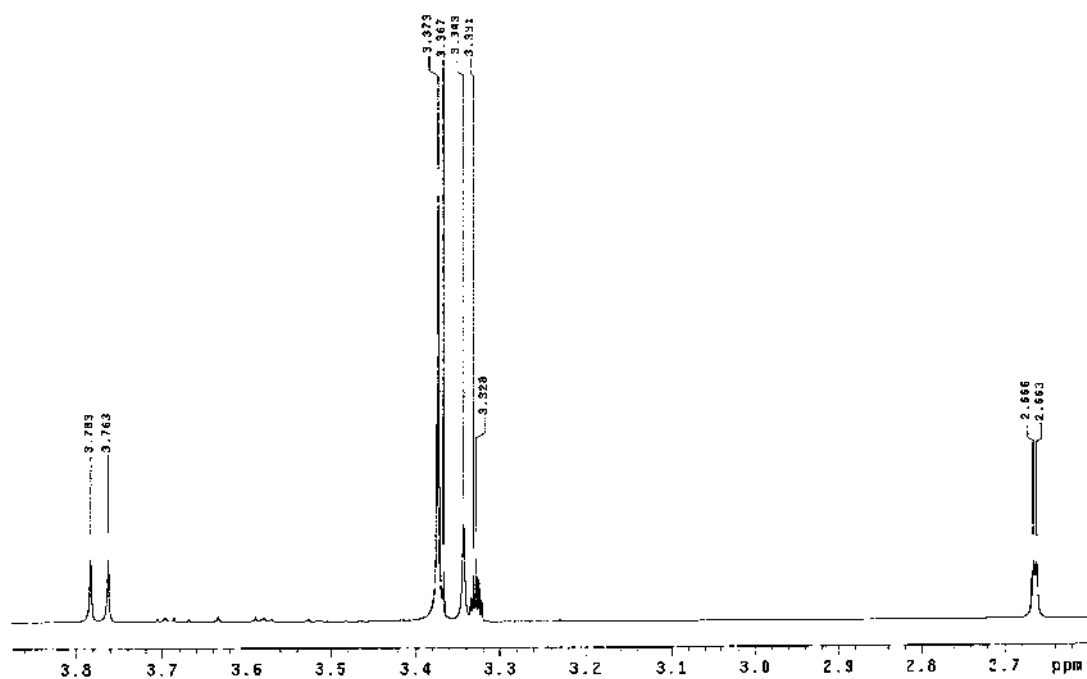


Figura 67 – Espectro de RMN de ^1H de **EP5** (Ampliação) [125 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

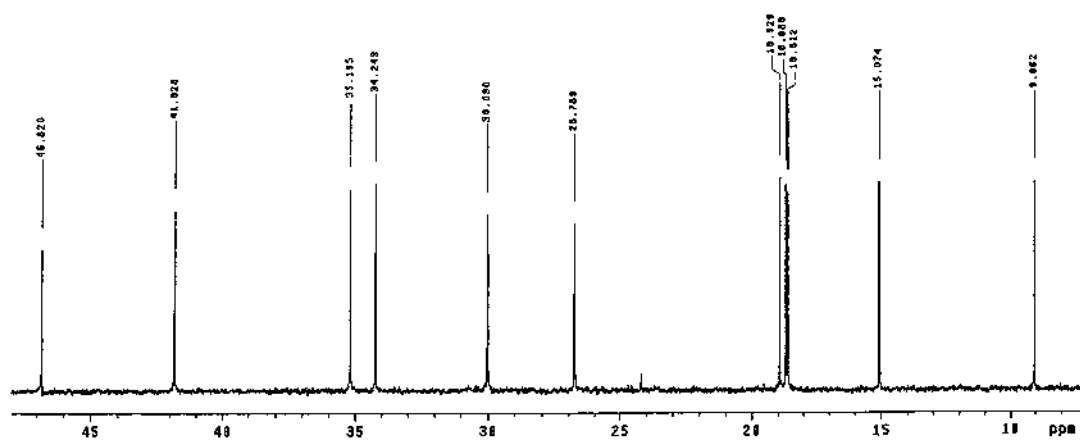


Figura 68 – Espectro de RMN ^{13}C de **EN2** (Ampliação) [125 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

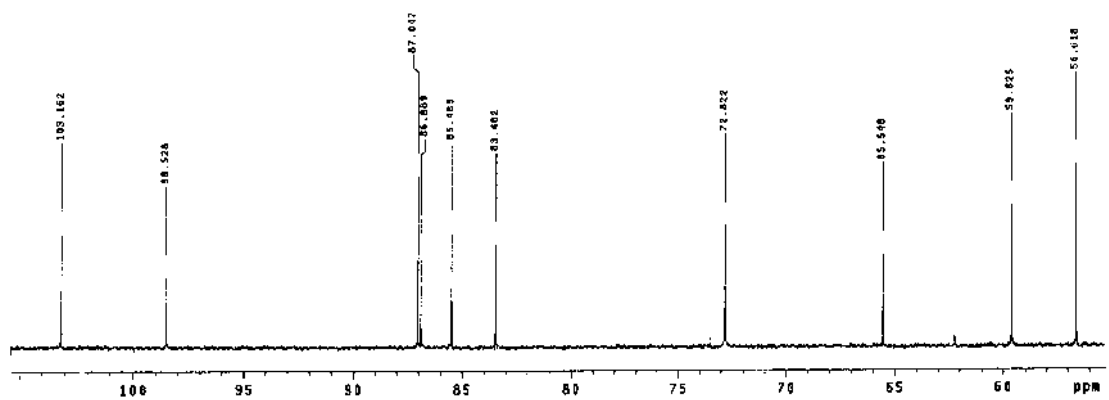


Figura 69 – Espectro de RMN ^{13}C de **EN2** (Ampliação) [125 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

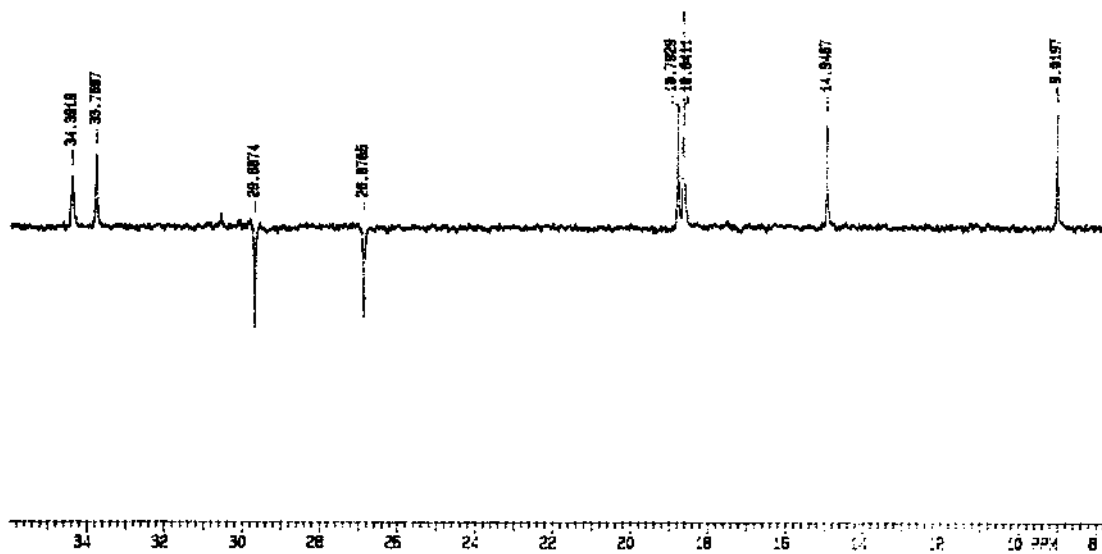


Figura 70 – Espectro de DEPT 135° de **EN2** [75 MHz, (CD₃)₂O, δ (ppm)]

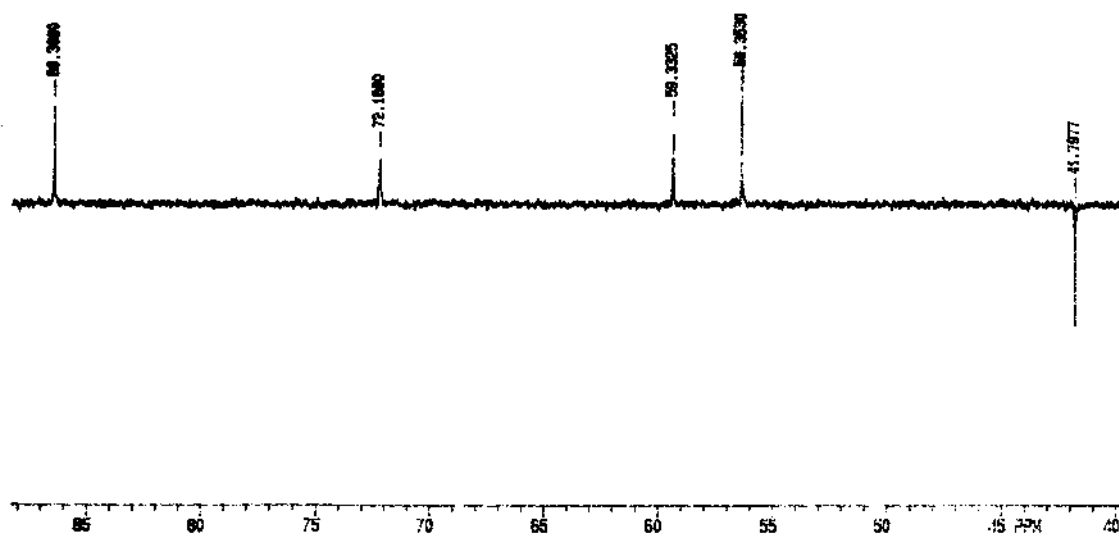


Figura 71 – Espectro de DEPT 135° **EN2** (Ampliação) [75 MHz, (CD₃)₂O, δ (ppm)]

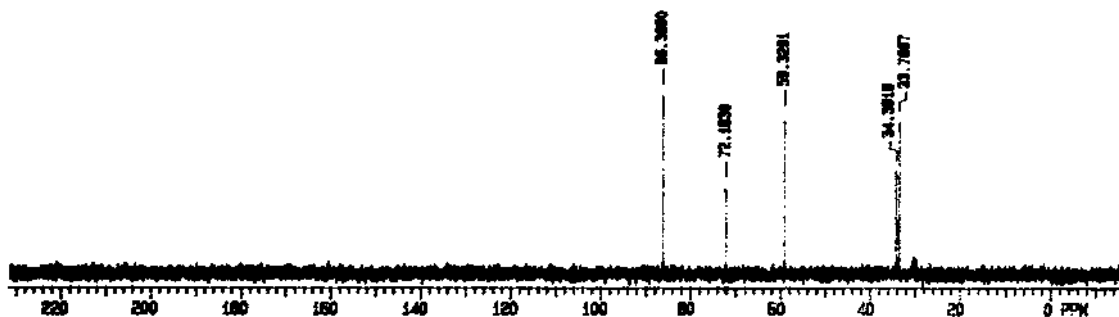


Figura 72 – Espectro de DEPT 90° de **EN2** [75 MHz, (CD₃)₂O, δ (ppm)]

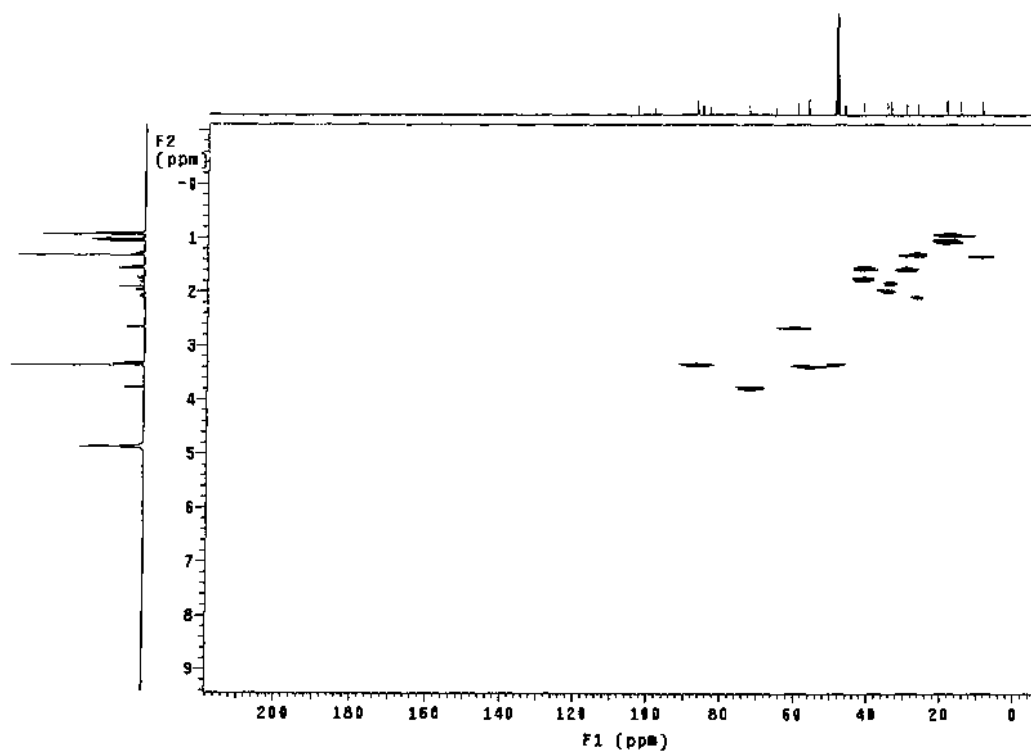


Figura 73 – Espectro de HMQC de **EN2** [125 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

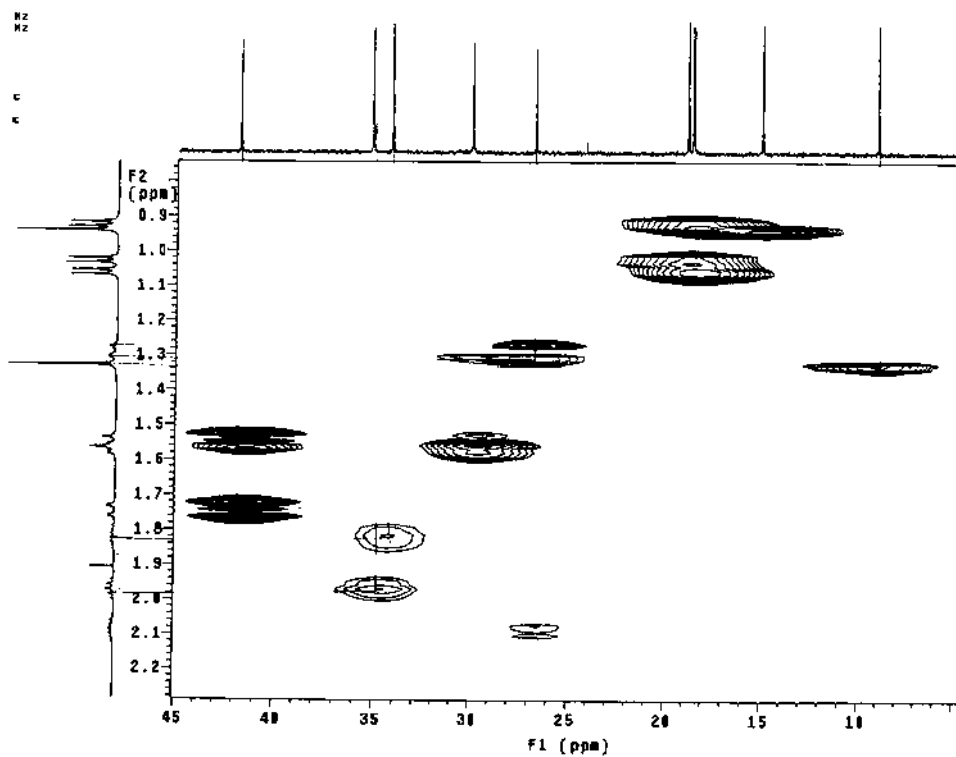


Figura 74 – Espectro de HMQC de **EN2** (Ampliação) [125 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

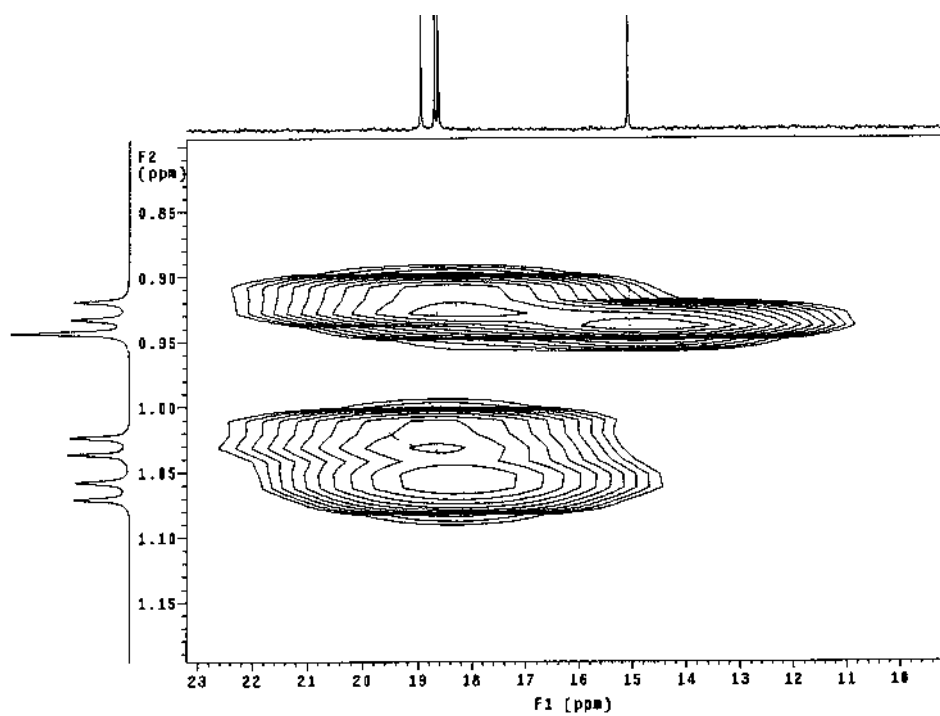


Figura 75 – Espectro de HMQC de **EN2** (Ampliação) [125 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

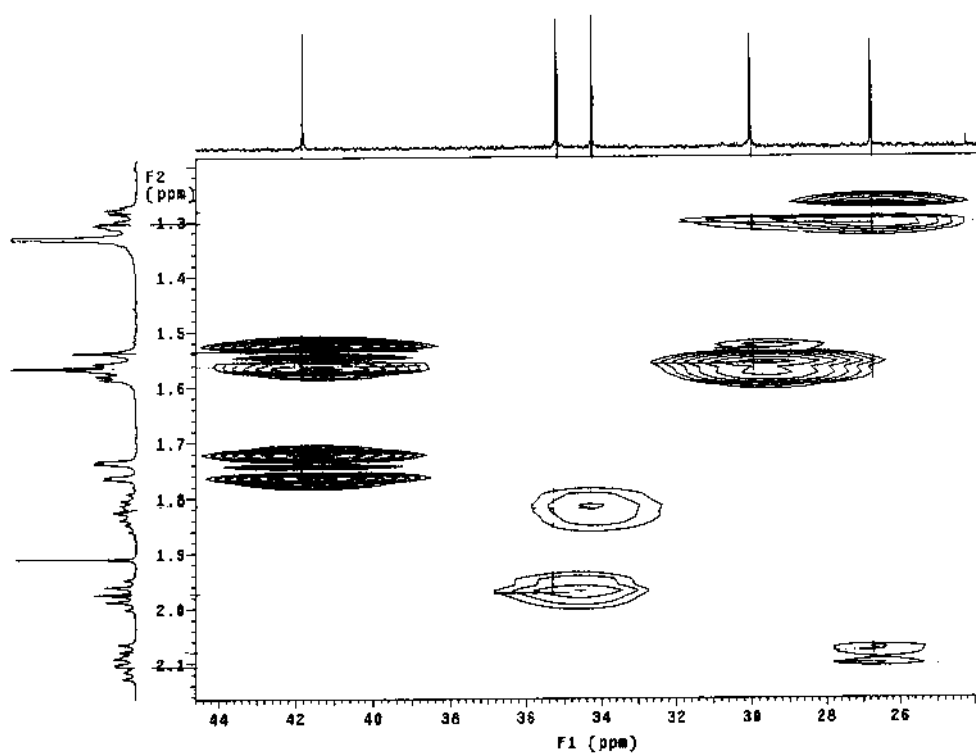


Figura 76 – Espectro de HMQC de **EN2** (Ampliação) [125 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

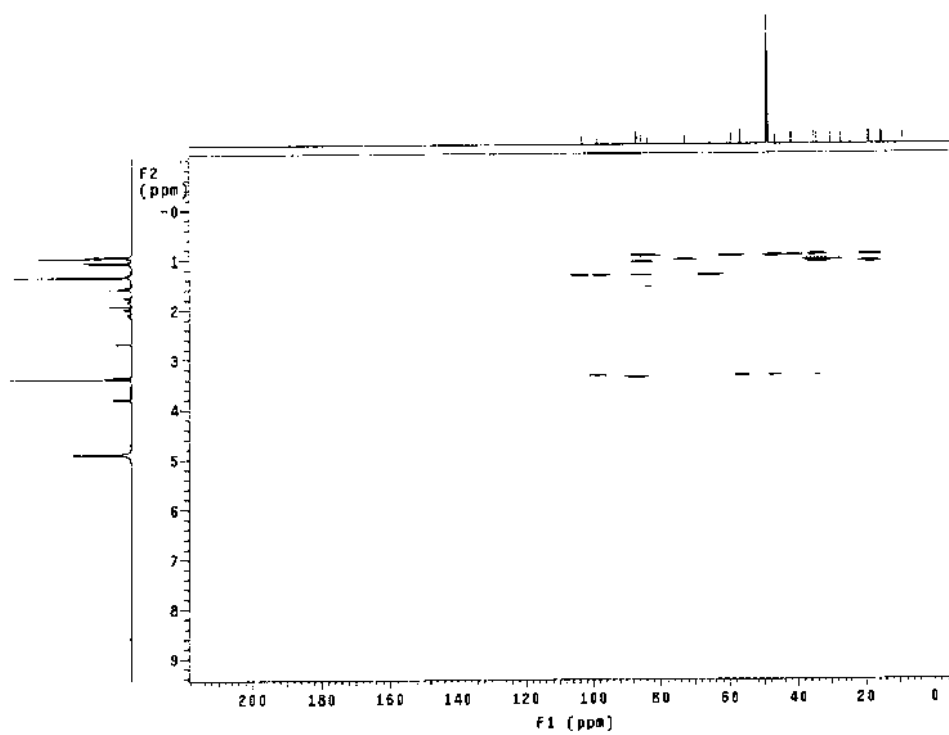


Figura 77 – Espectro de HMBC de **EN2** [125 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

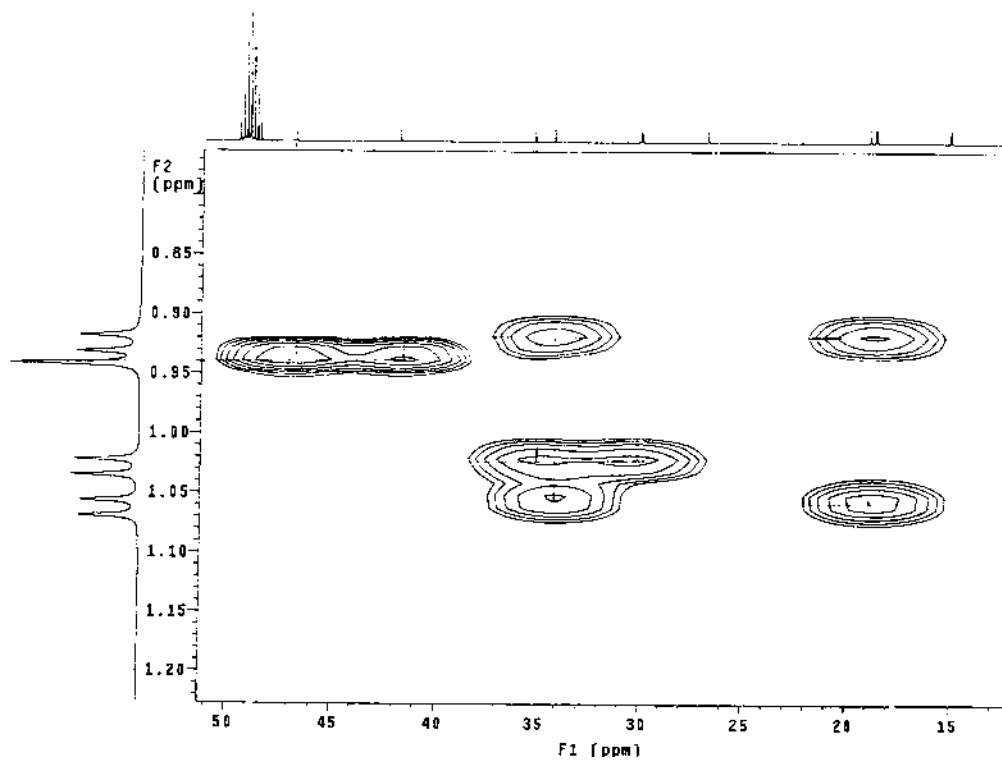


Figura 78 – Espectro de HMBC de **EP5** (Ampliação) [125 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

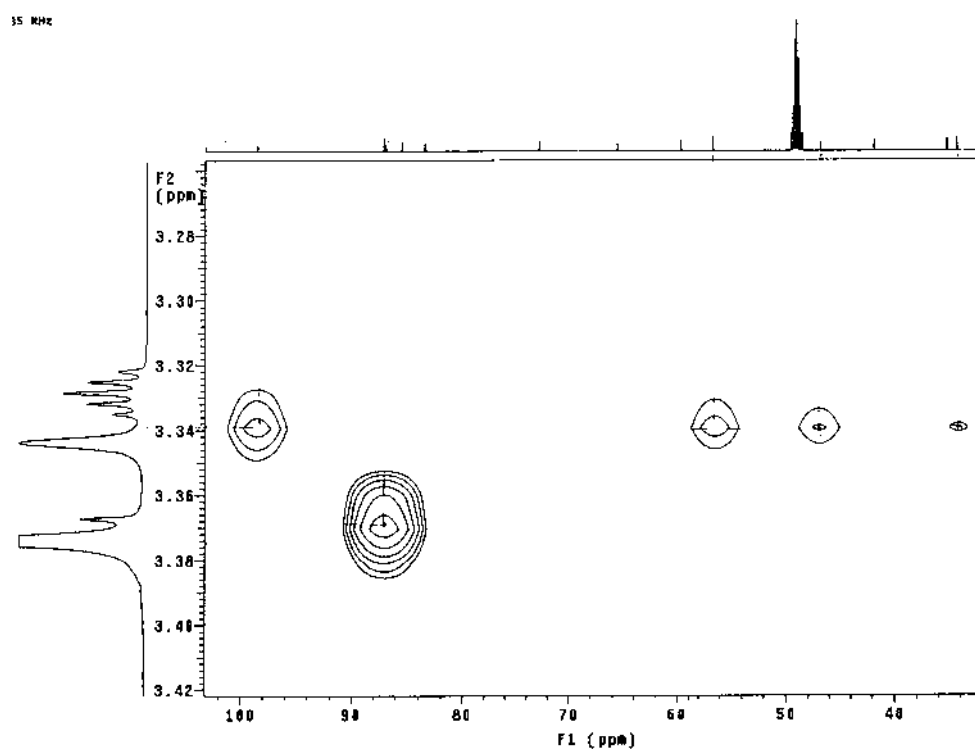


Figura 79 – Espectro de HMBC de **EN2** (Ampliação) [125 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

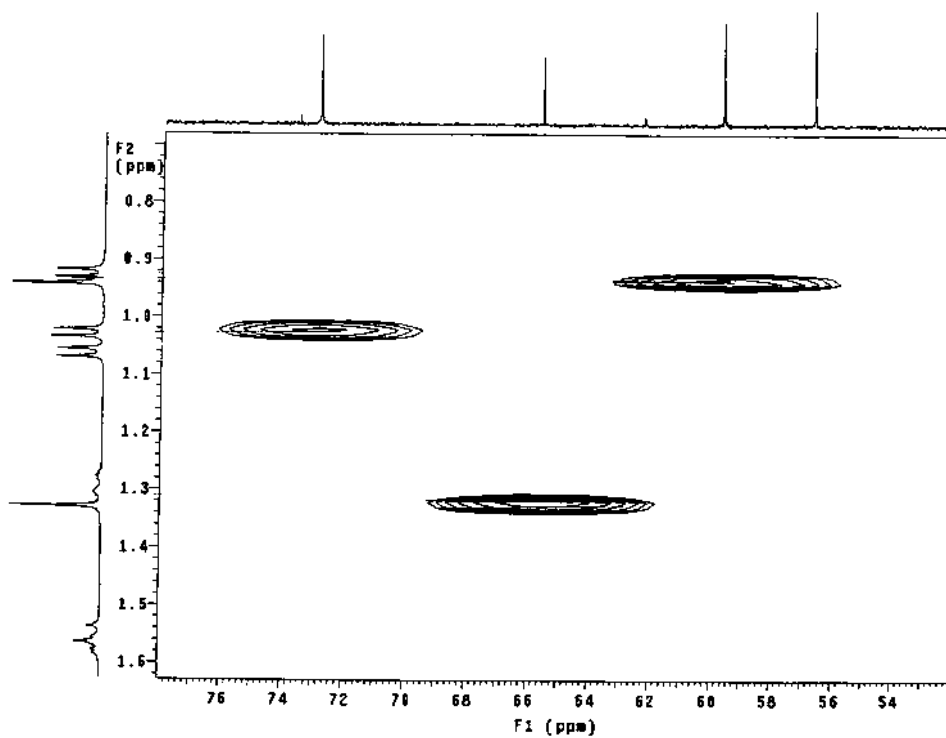


Figura 80 – Espectro de HMBC de **EN2** (Ampliação) [125 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

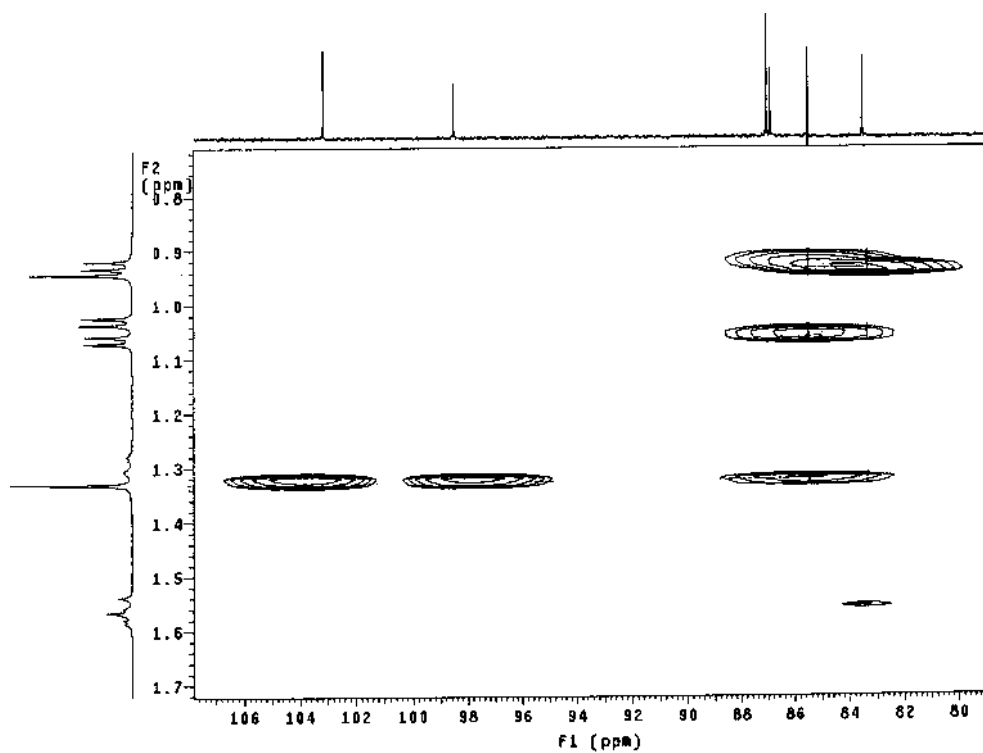


Figura 81 – Espectro de HMBC de **EN2** (Ampliação) [125 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

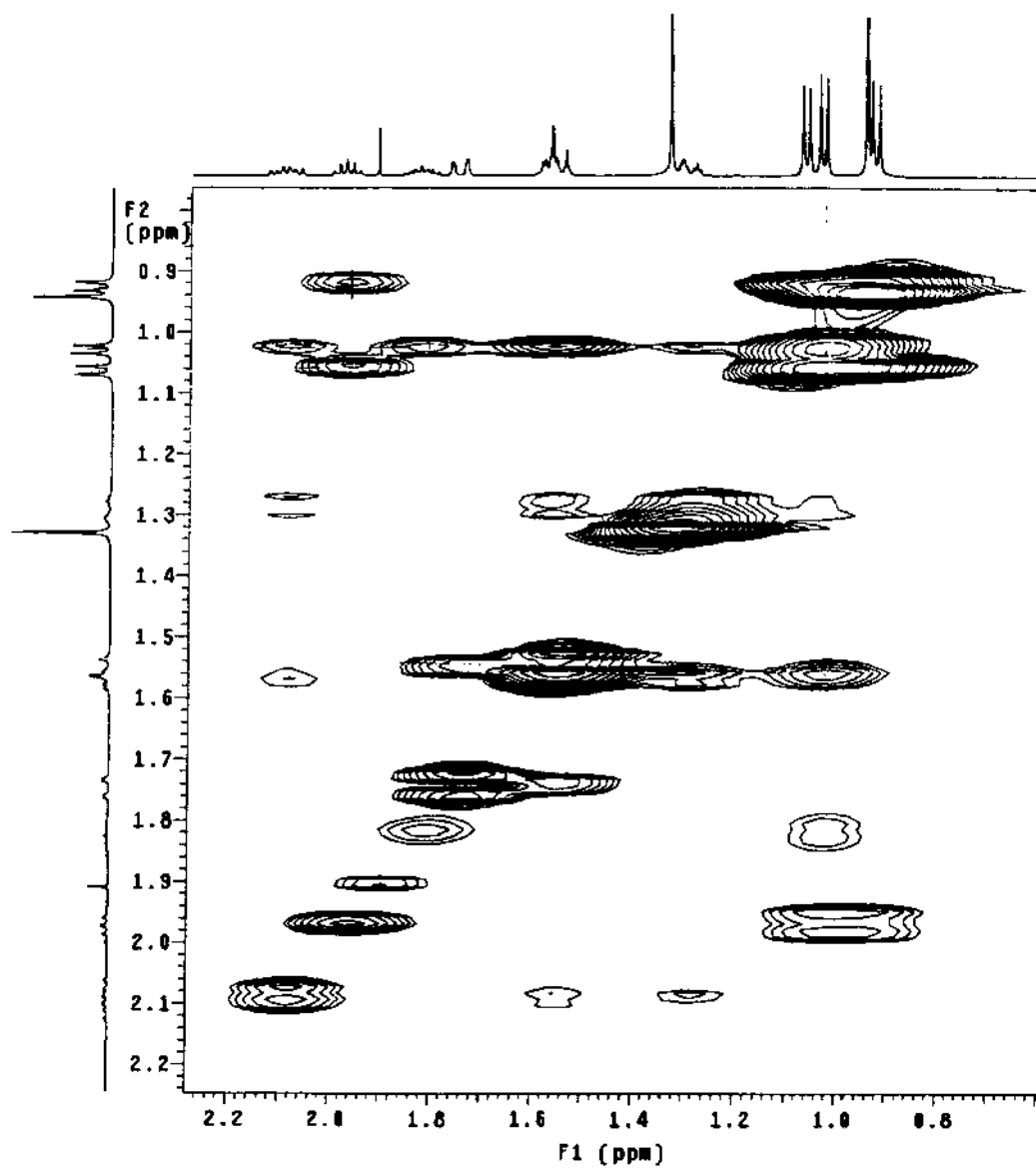


Figura 82 – Espectro de TOCSY de **EP5** (Ampliação) [125 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

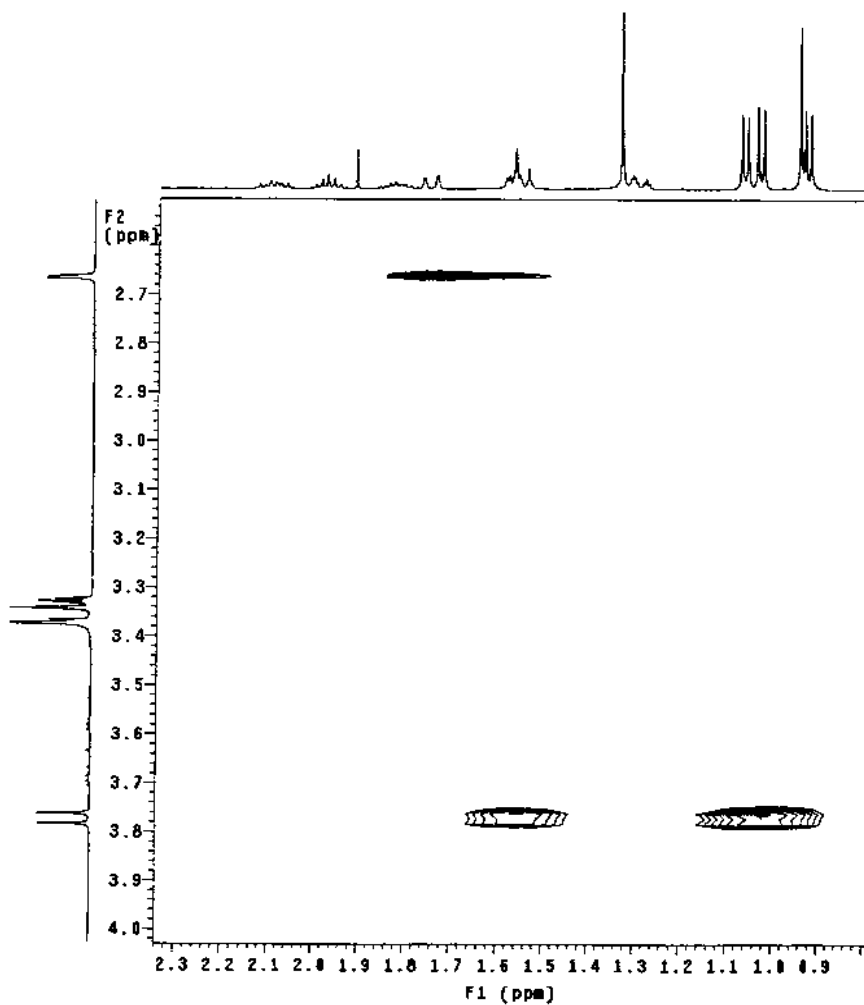


Figura 83 – Espectro de TOCSY de **EN2** (Ampliação) [125 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

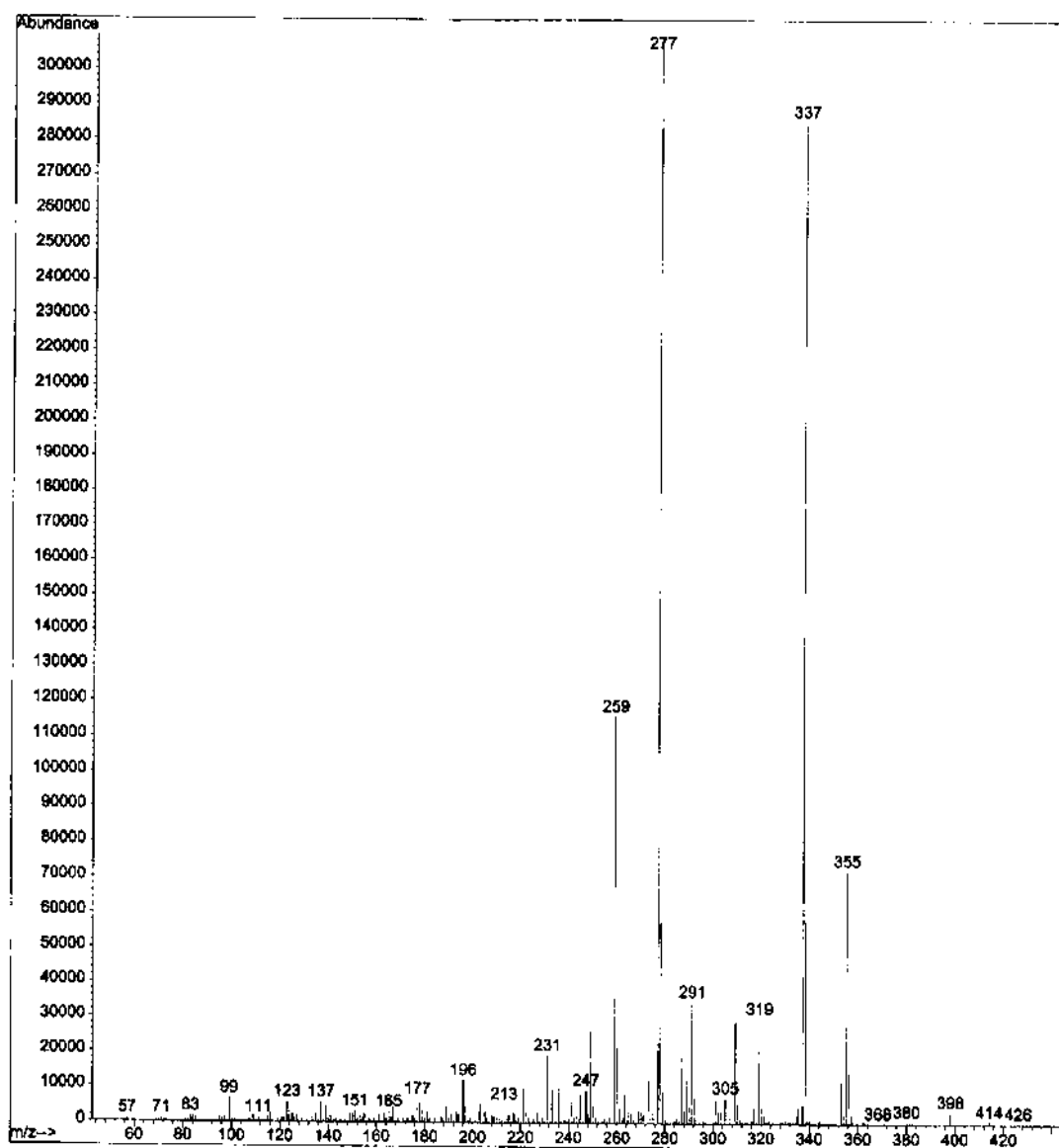


Figura 84 – Espectro de Massas de EN2

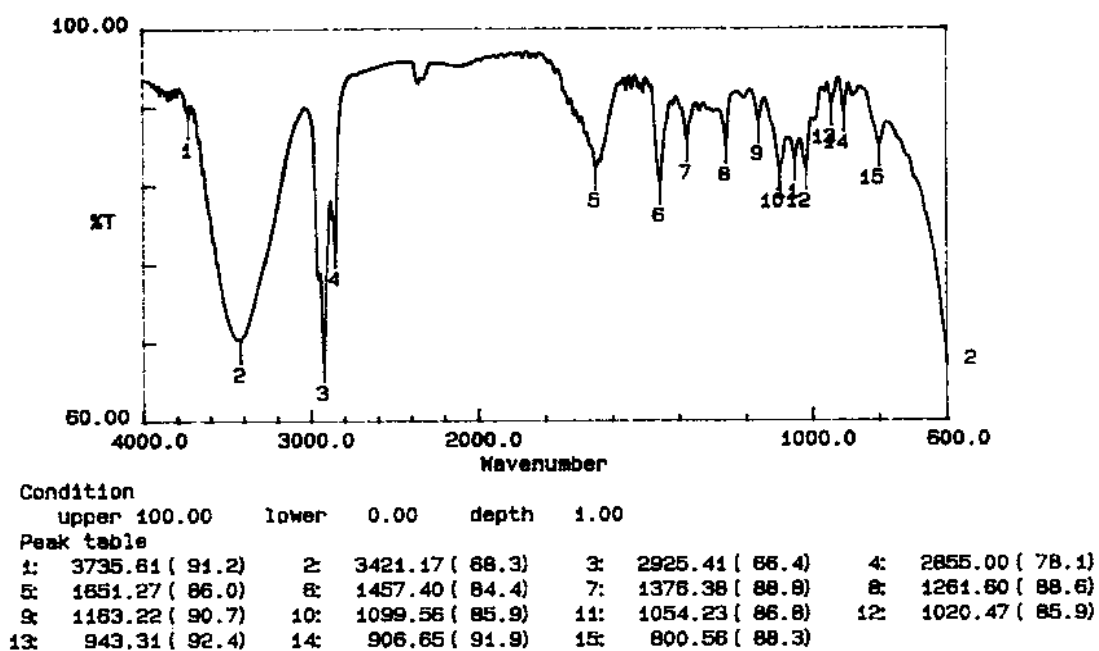


Figura 85 – Espectro de IV de EN2

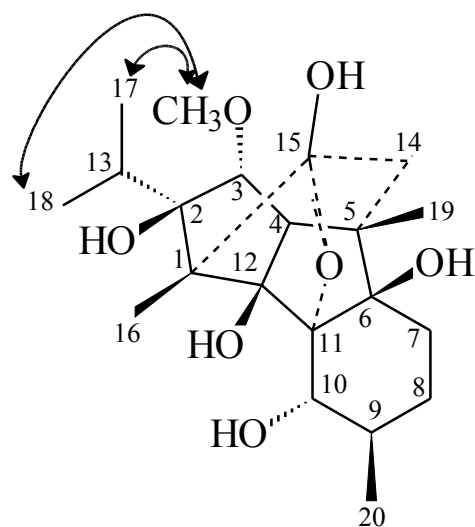


Figura 86 – Incrementos observados nos experimentos de nOe diff

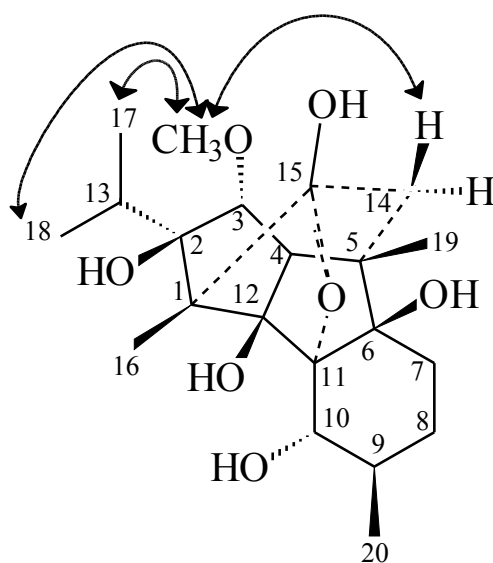
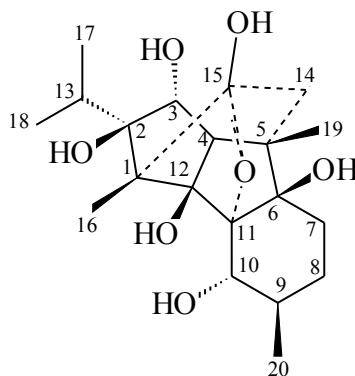


Figura 87 – Correlações observadas no espectro de NOESY

Tabela 22 – Dados de RMN de **EN2** em (500 MHz, 125 MHz, CD₃OD, δ (ppm))

C	δ C	δ H (multipl., J)	HMBC (¹ H- ¹³ C)	TOCSY (¹ H- ¹ H)	Rianodina *
1	65,55				65,7
2	85,49				83,6
3	87,05	3,34 (d) 1,5 Hz	C-5, 12, 13, 21		90,9
4	59,62	2,66 (d) 1,5 Hz	C-19	14 α e 14 β	92,1
5	46,82				49,5
6	83,48				85,5
7	26,79	7 α 2,10 (ddt) 12 Hz 7 β 1,29 (ddt) 12 Hz			26,9
8	30,03	1,57 (m) 10,5 Hz			29,1
9	35,19	1,82 (sept.) 6,5 Hz			35,2
10	72,82	3,77 (d) 10 Hz	C-20	7, 8 α e 20	72,5
11	86,89				87,5
12	98,53				97,0
13	34,24	1,97 (sept.) 6.5		17, 18	30,5
14	41,83	14 α 1,75 (dd) 14 Hz 14 β 1,55 (dd) 14 Hz	C-19	4	42,4
15	103,16				102,7
16	9,06	1,33 (s)	C-1, 2, 12, 15		10,9
17	18,61	1,06 (d) 6,5 Hz	C-2, 13, 18	13	19,3
18	18,69	0,93 (d) 7,0 Hz	C-2, 13, 17	13	19,8
19	15,10	0,94 (s)	C-4, 5, 6, 14		13,1
20	18,93	1,03 (d) 6,5 Hz	C-8, 9,10	7 α , 7 β , 8, 9,	19,1
21	56,62	3,37 (s)			161,1
22					123,0
					116,1
					110,5
					124,9

* Solvente: C₅D₆N

5.3.2 Identificação do 3,10- α -diidroxi-2,6,12 β -trihidroxi-15-hidroxi-rianodano**EP1**

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 91 p. 126) da substância **EP1** também apresentou sinais característicos do esqueleto rianodano. A partir da análise desse espectro foi possível observar a presença de sinais para vinte átomos de carbonos, que de acordo com os espectros de DEPT 135° e 90° (Figuras 92 e 93, p. 127) foram registrados como cinco carbonos metílicos, três carbonos metilênicos, cinco carbonos metínicos e sete de carbonos não hidrogenados similares àqueles observados para a substância **EN2**. Entretanto, foi possível verificar a ausência do sinal em δ 56,62 referente ao carbono metoxílico, além do efeito de proteção de cerca de $\Delta\delta$ 11,0 ppm do sinal em δ 76,0 referente ao C-3 e de desproteção do C-4 de cerca de $\Delta\delta$ 4,0 ppm do sinal δ 63,21 quando comparados ao composto **EN2**. Essas observações juntamente com os efeitos de proteção e desproteção verificados para os C-4 (63,21) e C-3 (76,0) em comparação aos C-4 (59,62) e C-3 (87,0) do composto **EN2** sugeriram a substituição no C-3 por um grupo hidroxílico. Esses dados foram corroborados pelo espectro de RMN de ^1H (Figuras 88 a 90 p. 124 e 125) que mostrou o sinal em δ 2,55 (1H, d, $J=1,5$ Hz) referente ao H-4, bem como o sinal em δ 3,81 (1H, d, $J=1,5$ Hz) característico para hidrogênio oximetínico, que foi atribuído ao H-3. O espectro de HMQC (Figuras 94 a 96, p. 127 e 128) mostrou a correlação do hidrogênio em δ 3,81 com o carbono em δ 76,0 (C-3) confirmando o que foi observado nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . O espectro de HMBC (Figuras 97 a 100 p. 129 e 130) permitiu observar a correlação do hidrogênio em δ 3,81 com os carbonos em δ 32,84 (C-13), 45,90 (C-5), 97,34 (C-12). A estereoquímica relativa no C-3 foi proposta de acordo com o experimento de nOe

diff (Figura 102, p. 132) que mostrou incrementos nos sinais em δ 2,55 (H-4), 1,07 (H-17), e 1,98 (H-13) ao irradiar o sinal em 3,81 atribuído ao H-3. Essas correlações espaciais indicaram que o grupo OH em C-3 deve estar em posição α .

Comparação destes deslocamentos químicos com os observados para o rianodol (GONZALEZ-COLOMA, 1990) e rianodina (Tabelas 23, p. 133) permitiram identificar as substâncias **EP1** como 3,10 α -diidroxi-2,6,12 β -triidroxi-15-hidroxi-rianodano.

O espectro de massas por IE (Figura 101, p. 131) mostrou o pico do íon molecular em m/z 384 referente a fórmula molecular C₂₀H₃₂O₇. Os dados da análise elementar que indicou C, 56,06 e H, 7,88% para a fórmula C₂₀H₃₂O₇.2H₂O confirmaram esta substância.

Este é o primeiro relato do isolamento do 3,10 α -diidroxi-2,6,12 β -triidroxi-15-hidroxi-rianodano, além de ser também o primeiro registro de substâncias deste esqueleto na família Erythroxyllaceae.

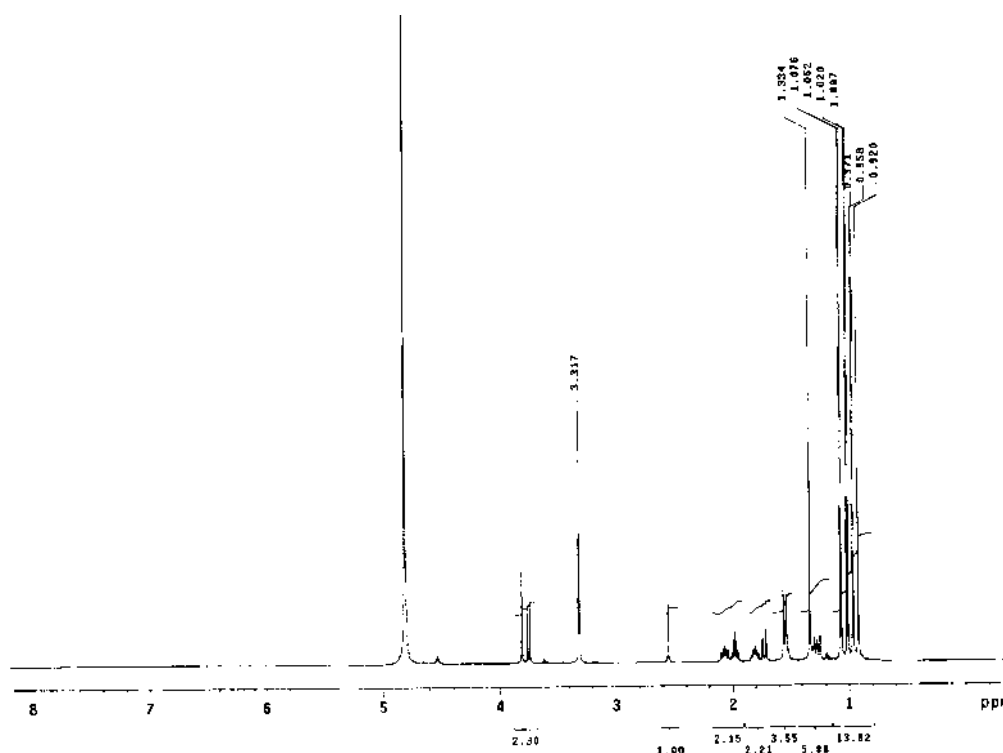


Figura 88 – Espectro de RMN de ¹H de **EP1** [125 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

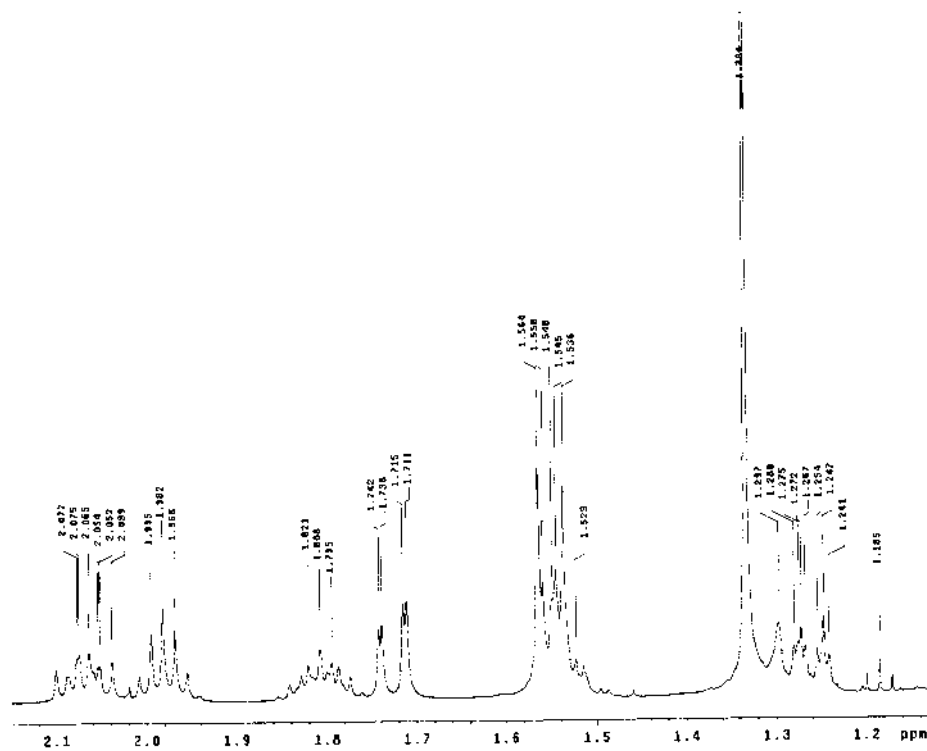


Figura 89 – Espectro de RMN de ^1H de **EP1** (Ampliação) [125 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

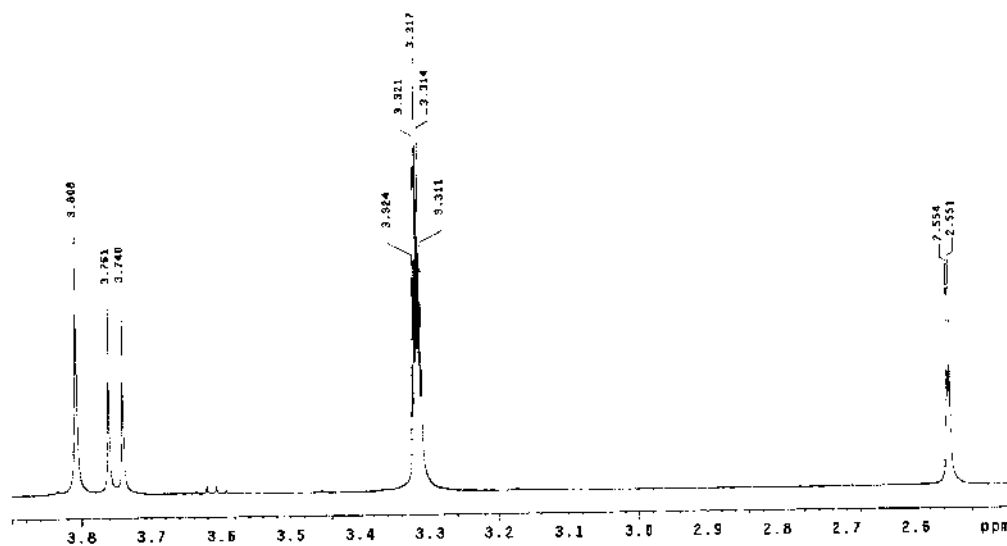


Figura 90 – Espectro de RMN de ^1H de **EP1** (Ampliação) [125 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

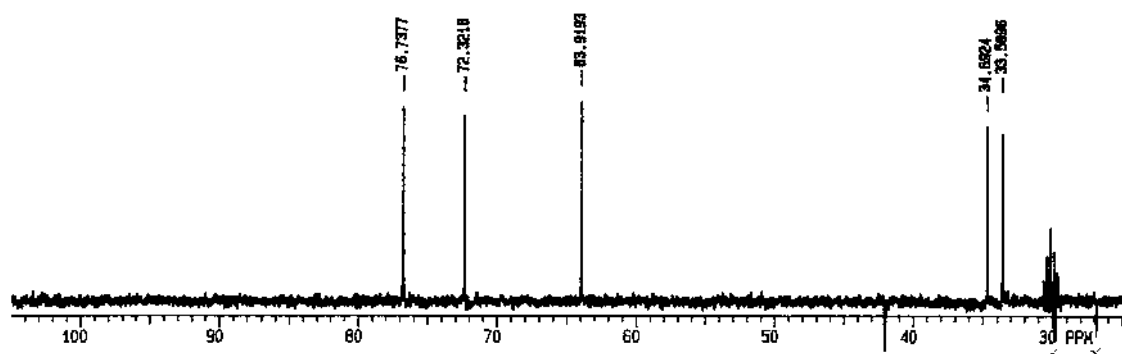


Figura 93 – Espectro de DEPT 90° de **EP1** (Ampliação) [75 MHz, (CD₃)₂O, δ (ppm)]

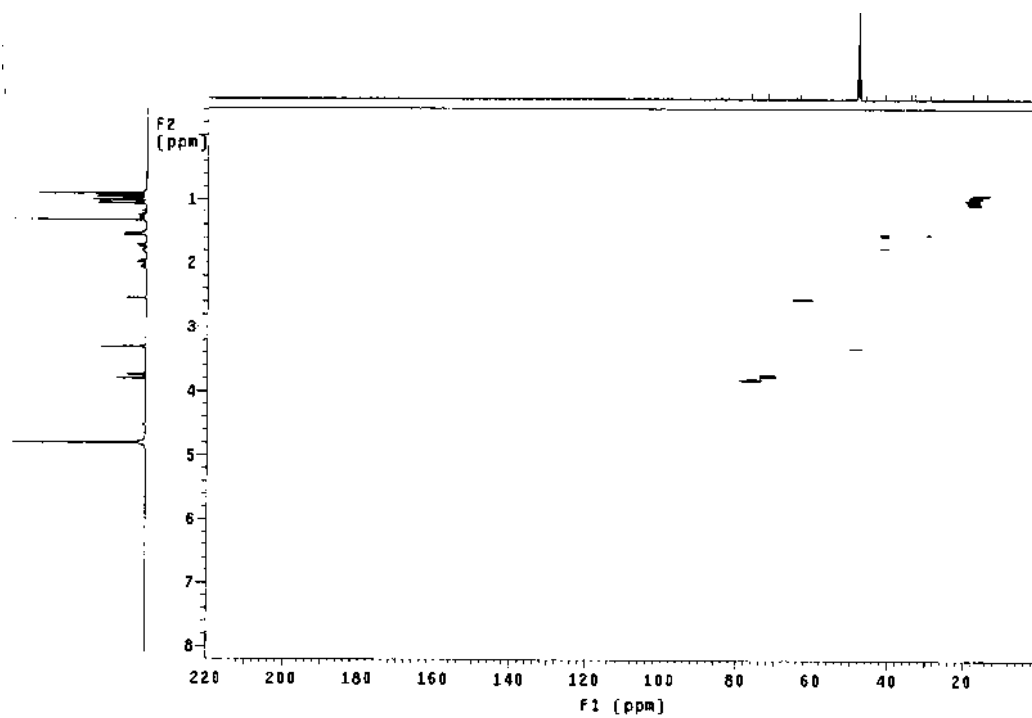


Figura 94 – Espectro de HMQC de **EP1** [125 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

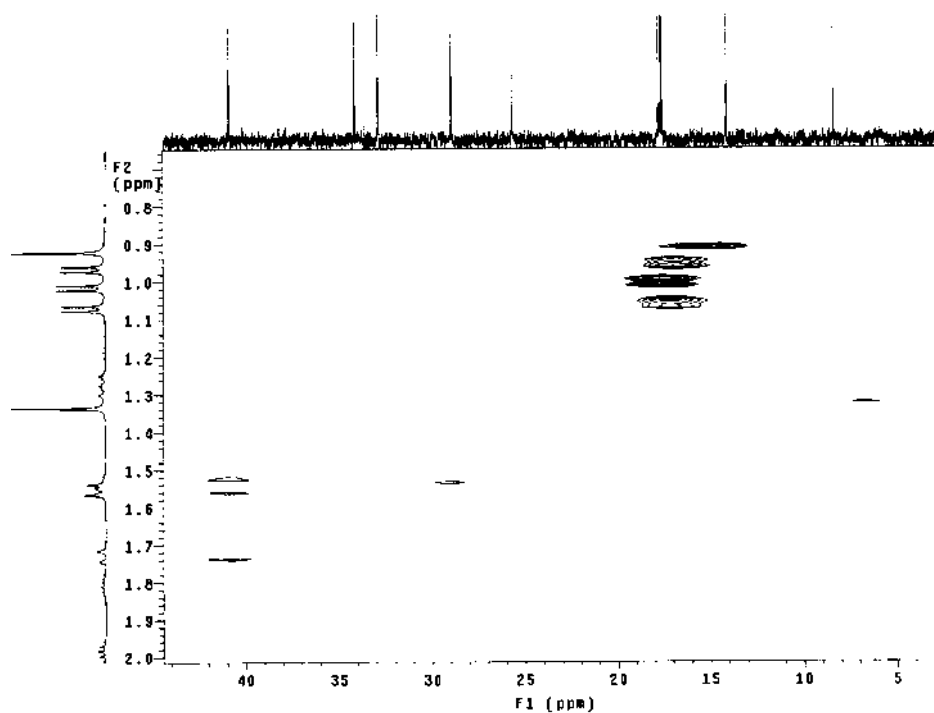


Figura 95 – Espectro de HMQC de **EP1** (Ampliação) [125 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

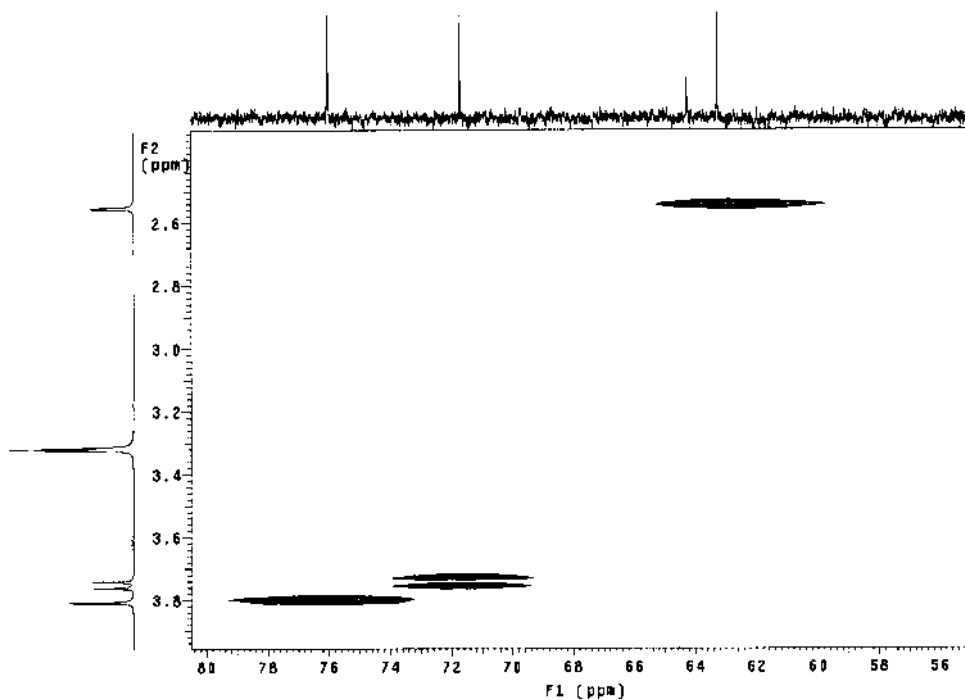


Figura 96 – Espectro de HMQC de **EP1** (Ampliação) [125 MHz, CD_3OD , δ (ppm)]

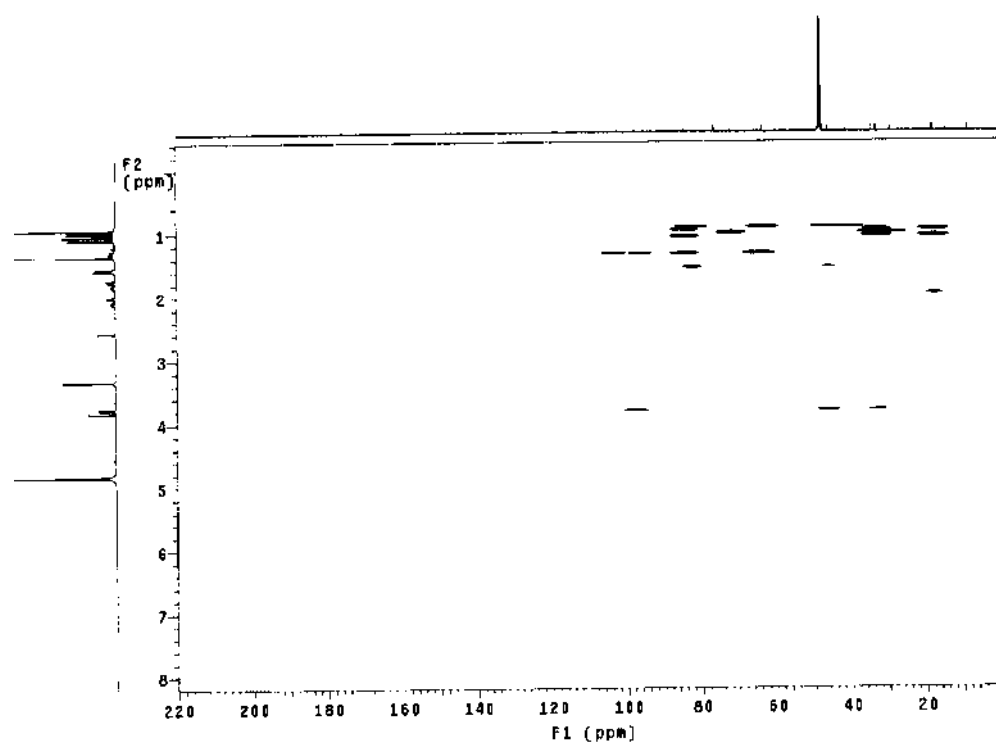


Figura 97 – Espectro de HMBC de **EP1** [125 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

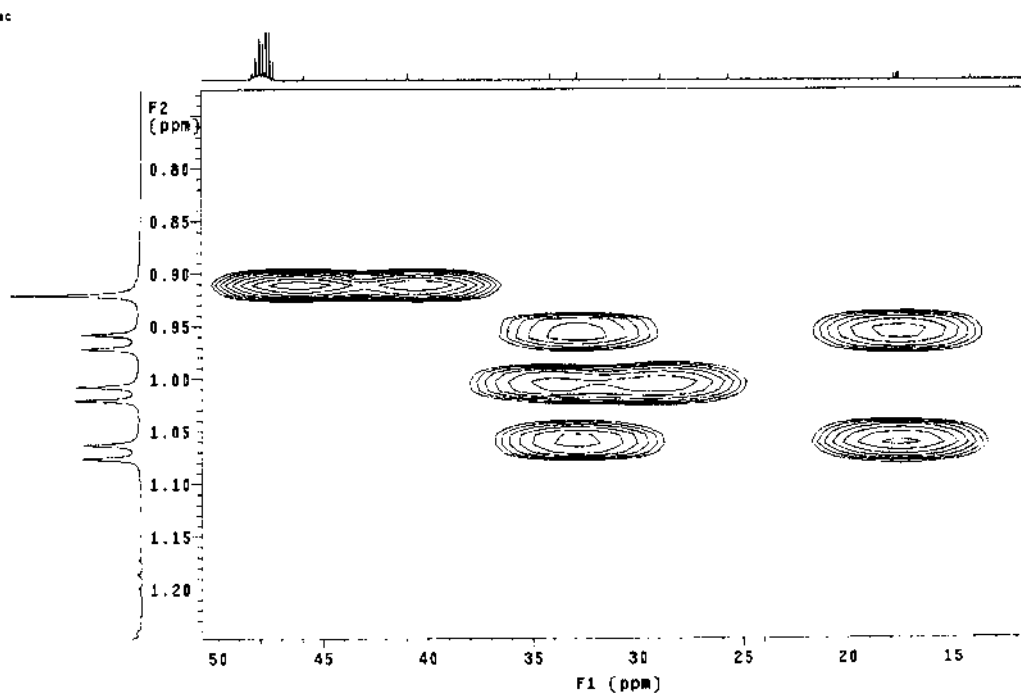


Figura 98 – Espectro de HMBC de **EP1** (Ampliação) [125 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

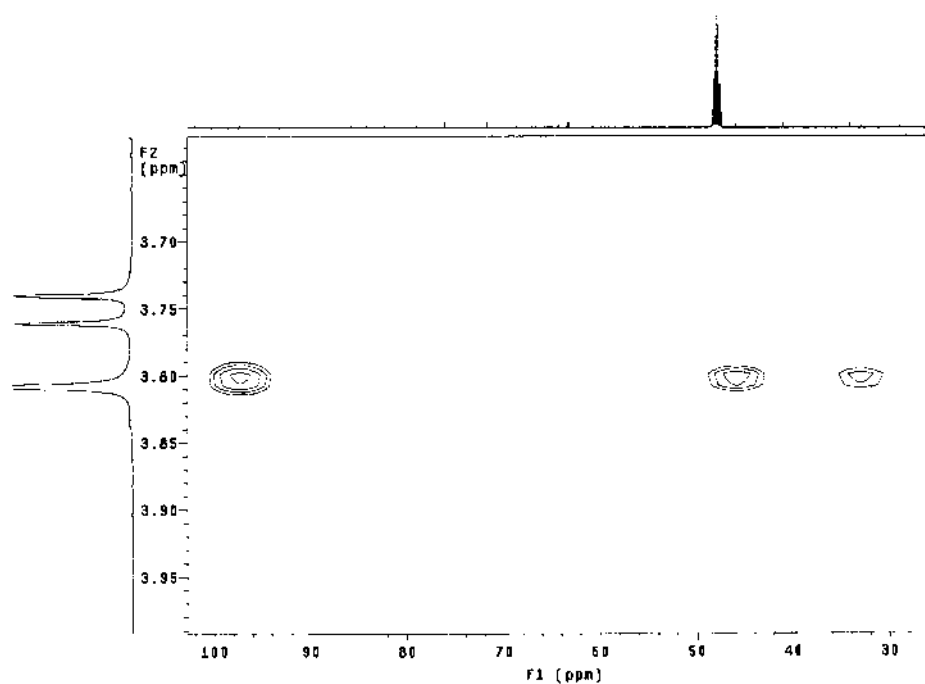


Figura 99 – Espectro de HMBC de **EP1** (Ampliação) [125 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

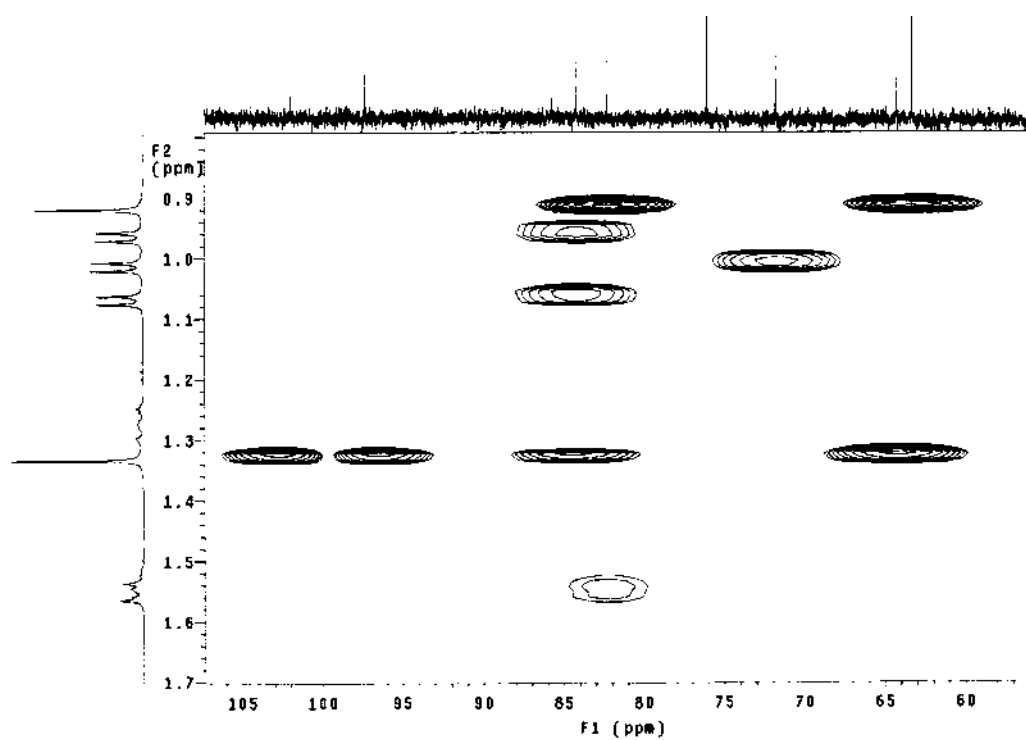


Figura 100 – Espectro de HMBC de **EP1** (Ampliação) [125 MHz, CD₃OD, δ (ppm)]

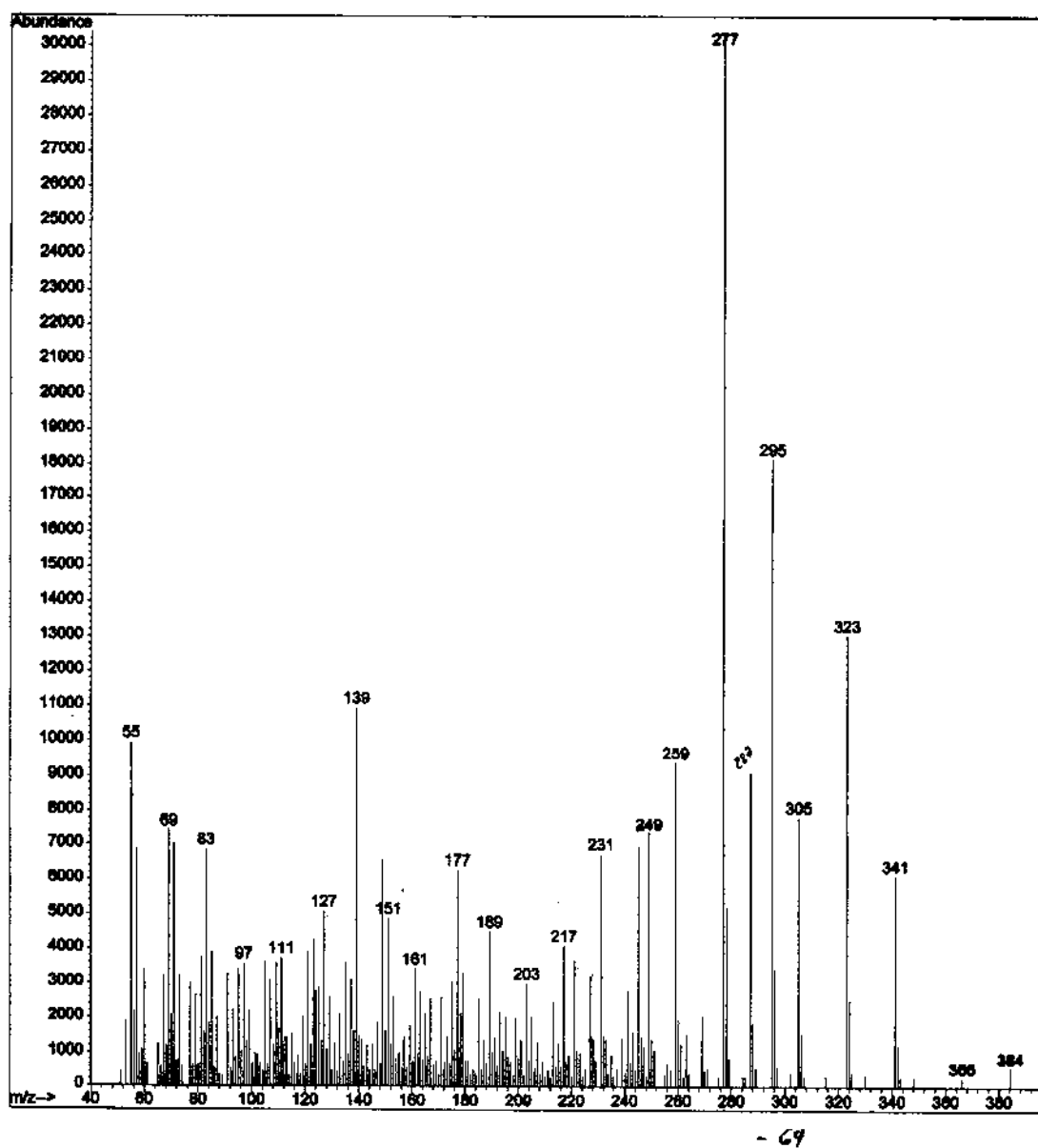


Figura 101– Espectro de massas de EP1

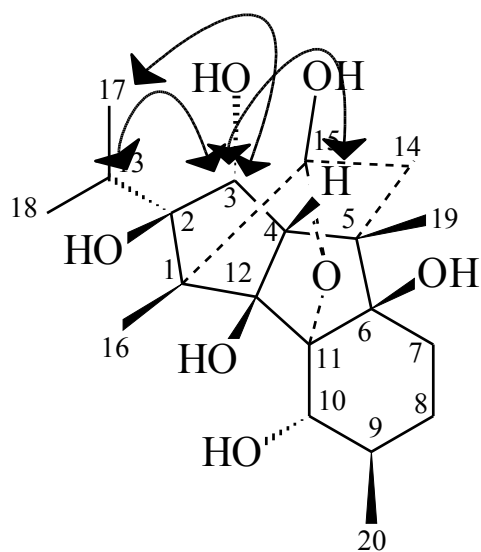


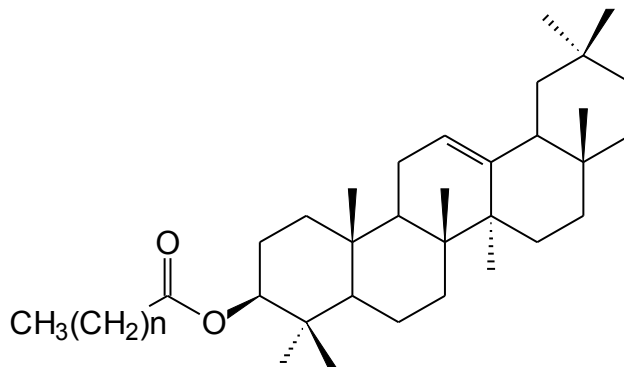
Figura 102 – Incrementos observados nos experimentos de nOe diff

Tabela 23 – Dados de RMN de **EP1** [CD₃OD, 500 MHz (H) e 125 MHz (C)]

C	δ C	δ H (multipl., J)	HMBC (¹ H- ¹³ C)	NOEDIFF (¹ H- ¹ H)
1	64,22			
2	84,15			
3	76,01	3,81 (d) 1,5 Hz	C-5, 12, 13	
4	63,21	2,55 (d) 1,5 Hz	C-19	
5	45,90			
6	82,25			
7	25,63	7 α 2,06 (ddt) 12 Hz 7 β 1,26 (ddt) 12 Hz		7 β , 14 α
8	28,90	1,56 (m)	C-9	
9	34,10	1,81 (sept.) 6,5 Hz	C-20	8, 10, 20
10	71,70	3,75 (d) 10,5 Hz	C-20	9, 20
11	85,70			
12	97,34			
13	32,84	1,98 (sept.) 6.5		16, 17, 18
14	40,87	14 α 1,72 (dd) 14 Hz 14 β 1,55 (dd) 14 Hz	C-19	7 α , 14 β , 19
15	102,02			
16	8,34	1,33 (s)	C-1, 2, 12, 15	
17	17,52	1,07 (d) 7,0 Hz	C-2, 13, 18	
18	17,60	0,96 (d) 6,5 Hz	C-2, 13, 17	3, 13, 17
19	14,10	0,92 (s)	C-4, 6, 5, 14	
20	17,73	1,01 (d) 6.5 Hz	C-8, 9, 10,	8, 9,10

5.3. Triterpenos de esqueleto Oleanano

5.3.1 Identificação do palmitato de β -amirina (**EB1**)



Os espectros de RMN de ^{13}C da substância **EB1** (Figuras 104 a 106, p. 136 e 137) apresentaram 30 sinais para átomos de carbono, além dos sinais correspondentes ao ácido graxo. A partir da análise desses espectros de RMN de ^{13}C (DEPT 135° e PND) foi possível observar para a parte triterpênica desta substância, sinais para oito carbonos metílicos, dez carbonos metilênicos, cinco carbonos metínicos e sete carbonos não hidrogenados. Além destes sinais, foram ainda observados vários sinais na região compreendida entre δ 29,00-30,00 referentes a parte graxa. A presença dos sinais para grupos metílicos (δ 28,06; δ 15,55; δ 16,78; δ 16,80; δ 25,97; δ 28,41; δ 33,34 e δ 23,70) e dos sinais para a ligação dupla em δ 121,65 e 145,21 indicaram que esta substância era um triterpeno pertencente ao grupo oleanano. O sinal em δ 80,58 referente ao carbono oximetínico na posição 3, ligeiramente desprotegido quando comparado ao da β -amirina (δ 79,0) e ainda o sinal em δ 23,60 atribuído ao C-2, protegido cerca de 3,7 ppm, sugeriu esterificação do C-3. Além destes sinais deslocados, característicos para o C-2 e C-3 do esqueleto oleanano, a presença do sinal para carbono não hidrogenado em δ 173,71 corroborou a hipótese da esterificação do ácido graxo pelo triterpeno. Estes dados confirmaram ainda que a esterificação ocorreu na posição 3 da parte triterpênica. Os demais sinais foram coincidentes com aqueles da β -amirina (Tabela 24, p. 140).

Análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 103 p. 135) mostrou, além do tripleto em δ 5,19 pertencente ao H-12, o tripleto em δ 4,5 referente ao hidrogênio

oximetínico na posição 3. Este estava desprotegido cerca de (Δ 1,3 ppm) em relação ao valor normal encontrado para a β -amirina confirmando a hipótese que o triterpeno estava esterificado nessa posição.

A comparação destes deslocamentos químicos com os obtidos da literatura para o palmitato de β -amirina (BARREIROS, 2002; CHAVEZ, 1996) permitiu identificar a substância e **EB1** como β -amirina esterificada com ácido graxo. De acordo com os espectros de massas obtidos após a reação de transesterificação foi possível concluir que a substância **EB1** era o palmitato de β -amirina.

O EMIE a 70 eV dessa substância (Figura 109, p. 139) mostrou o pico do íon molecular em m/z 664. Também foi observado o pico em m/z 409 referente a perda do ácido graxo [M-255] e o pico base em m/z 218, relativo a fragmentação do tipo Retro Diels-Alder.

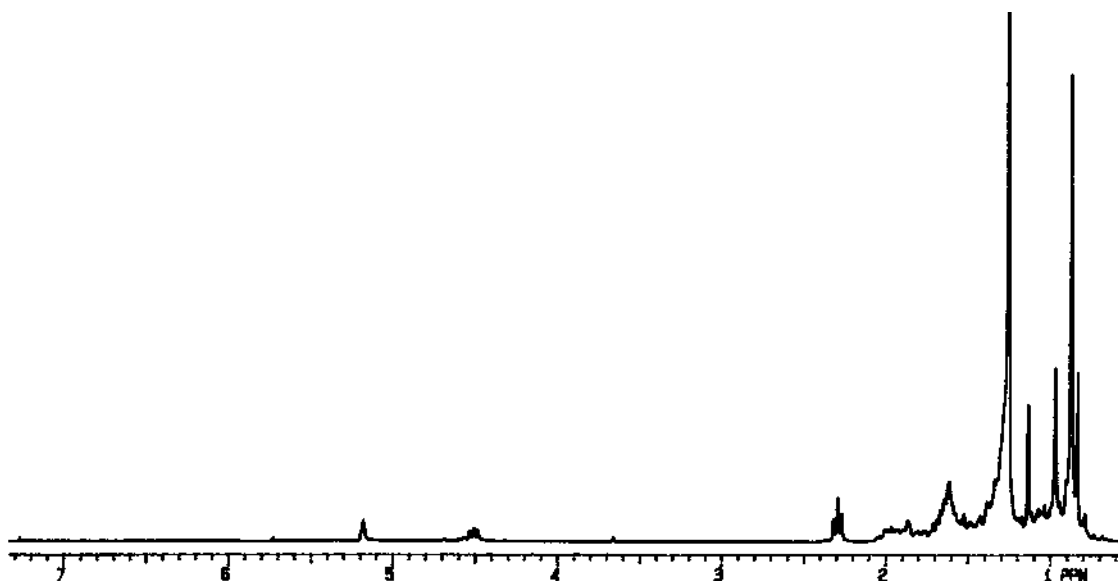


Figura 103 – Espectro de RMN de ¹H de **EB1** [300 MHz, CDCl₃, δ (ppm)]

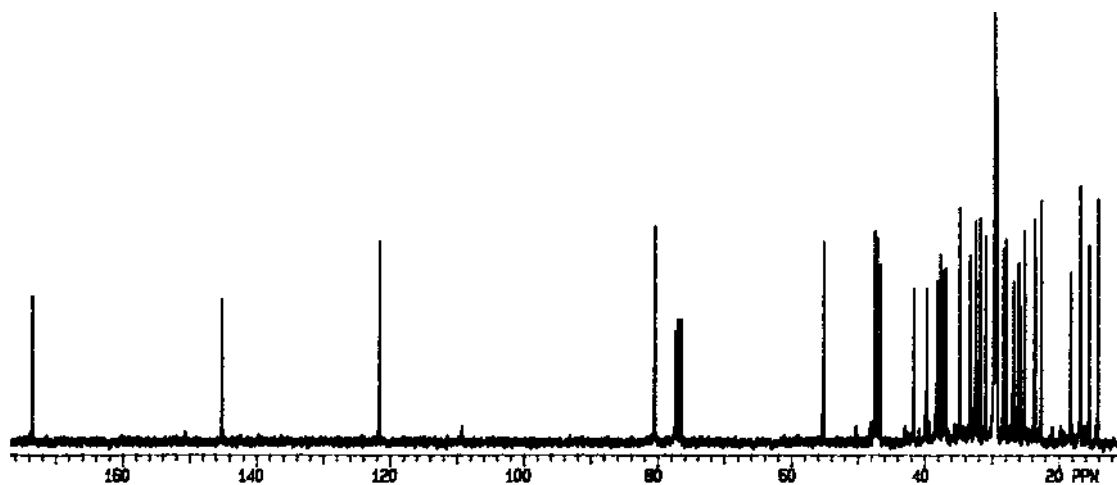


Figura 104 – Espectro de RMN ^{13}C de **EB1** [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

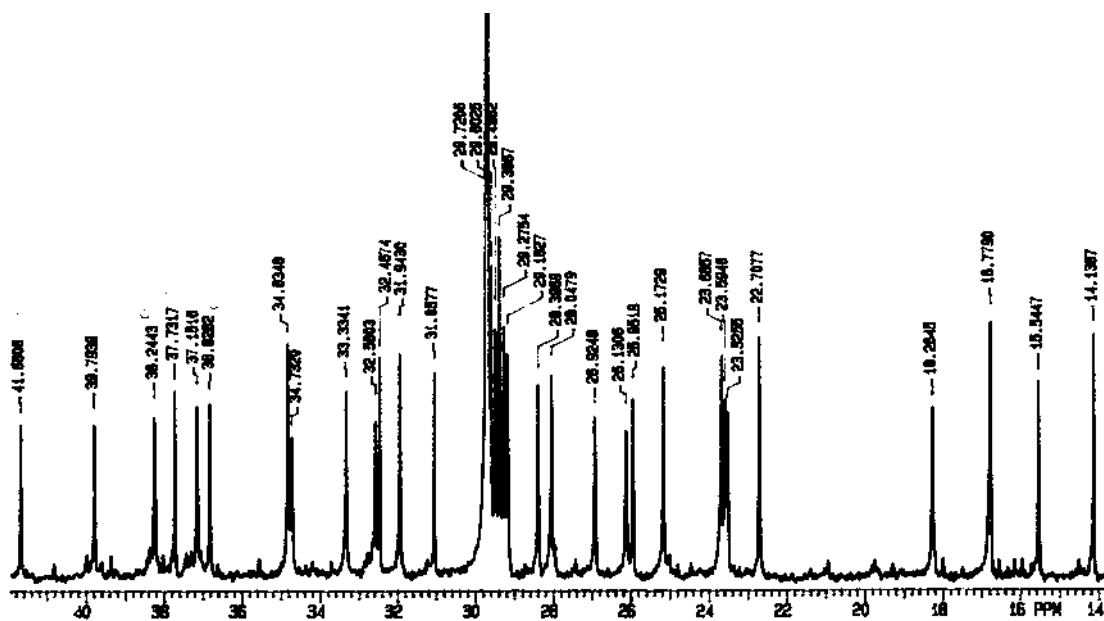


Figura 105 – Espectro de RMN ^{13}C de **EB1** (Ampliação) [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

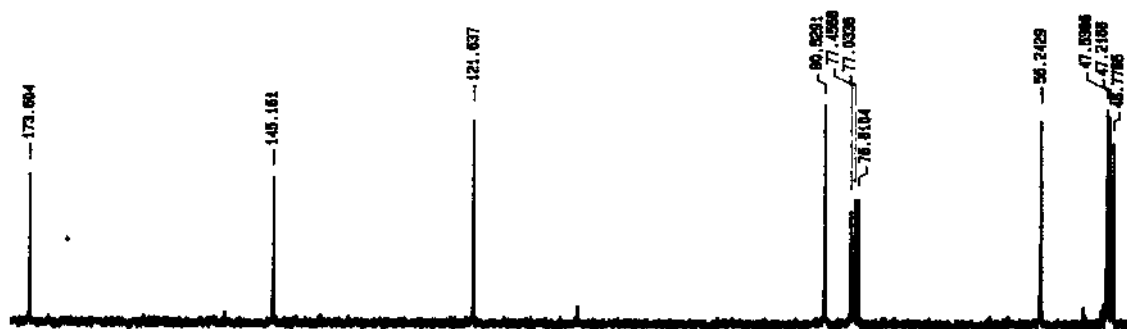


Figura 106 – Espectro de RMN ^{13}C de **EP1** [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

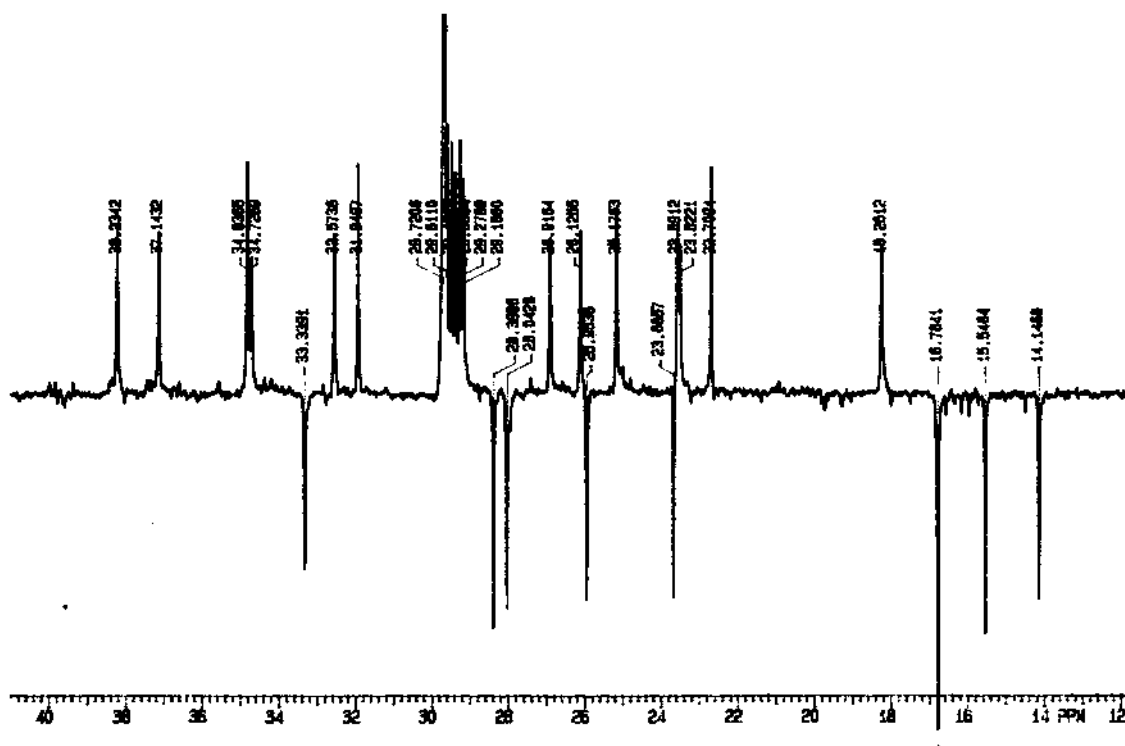


Figura 107 – Espectro de DEPT 135° de **EB1** (Ampliação) [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

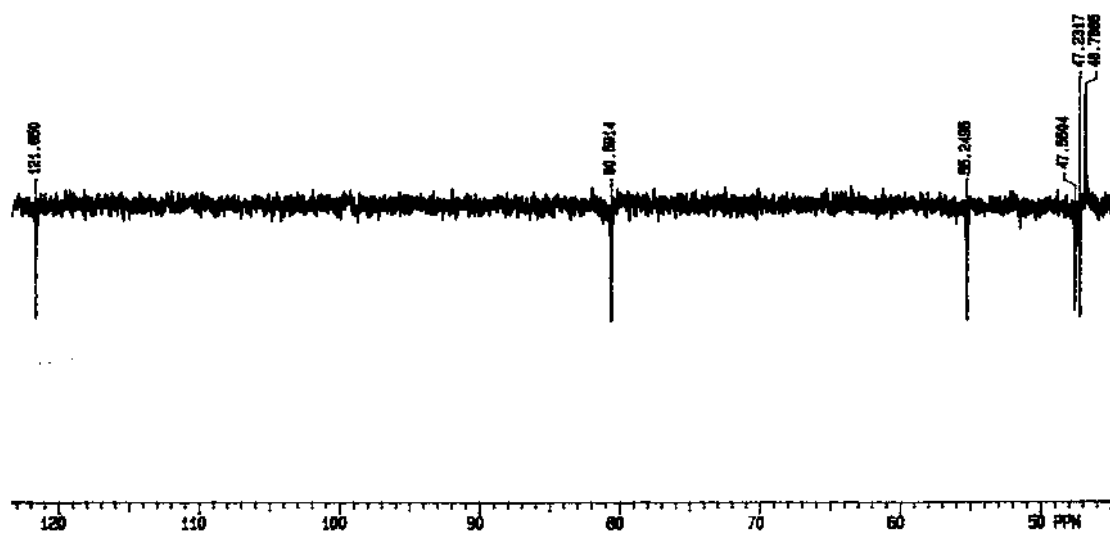


Figura 108 – Espectro de DEPT 135° de **EB1** (Ampliação) [75 MHz, CDCl₃, δ (ppm)]

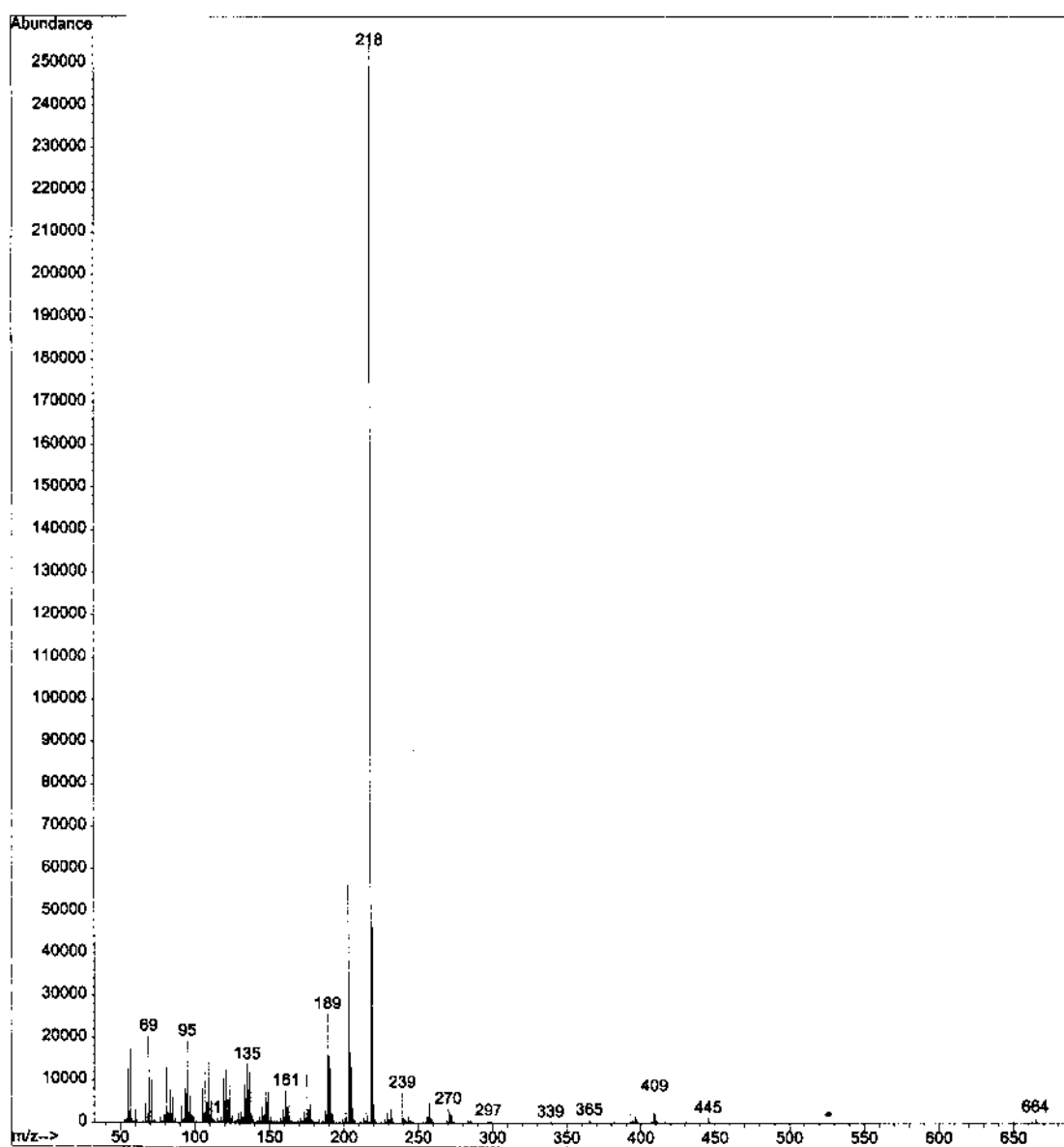
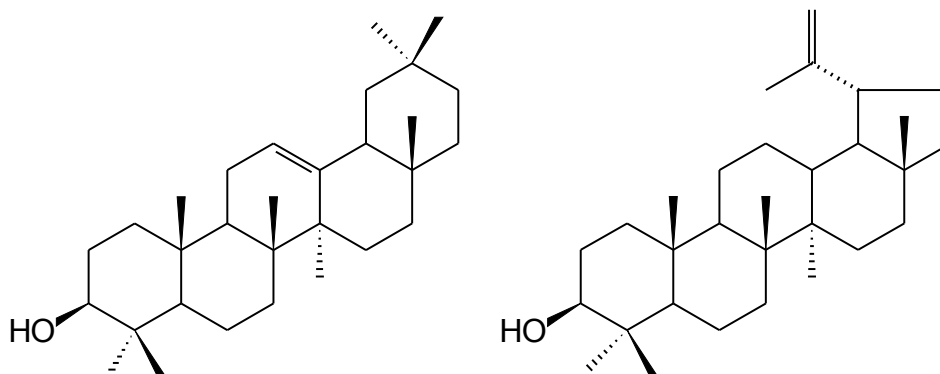
Figura 109 – Espectro de Massas de **EB1**

Tabela 24 – Dados de RMN de ^{13}C de **EB1** e **EB2** [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

C	EB1	EB2
1	38,25	38,58
2	23,60	27,20
3	80,59	79,03
4	37,76	38,84
5	55,26	55,27
6	18,26	18,37
7	32,60	32,63
8	39,81	39,77
9	47,55	47,61
10	36,85	38,74
11	23,54	23,52
2	121,65	121,70
13	145,21	145,10
14	41,72	41,70
15	26,15	26,14
16	26,92	26,92
17	32,50	32,48
18	47,23	47,21
19	46,79	46,80
20	31,10	31,07
21	34,74	34,72
22	37,15	37,13
23	28,06	28,08
24	15,55	15,49
25	16,79	15,58
26	16,82	16,79
27	25,97	25,98
28	28,41	28,39
29	33,34	33,34
30	23,70	23,68
COO	173,72	
CH ₃	14,13	

5.3.2 Identificação da mistura de β -amirina **EB2** e lupeol **EB3**



Análise do espectro de RMN de ^{13}C mostrou 60 sinais de carbono (Figura 111, p 142) indicando tratar-se da mistura de duas substâncias. Esses sinais foram registrados como quinze carbonos metílicos, vinte e um carbonos metilênicos, onze carbonos metínicos e treze não hidrogenados. Entre estes, foram observados os sinais em δ 121,70 e em δ 145,10 correspondentes a ligação dupla entre os carbonos C-12 e C-13 da β -amirina, bem como o sinal em δ 79,03 referente ao carbono oximetínico H-3. Da mesma forma, foi possível observar os sinais referentes a carbono metilênico em δ 109,9 e a carbono não hidrogenado em δ 150,96, característicos da ligação dupla do esqueleto lupano. O espectro de RMN de ^1H (Figura 110, p. 142) apresentou, além dos sinais característicos do esqueleto lupano sinais correspondentes ao esqueleto oleanano.

Assim, o espectro de RMN de ^1H mostrou o tripleto em δ 3,19 referente ao H-3 e o sinal em δ 5,19, referente ao H-12 da β -amirina, além de dois sinais para hidrogênios olefínicos em δ 4,69 e δ 4,57 característicos do grupo isopropileno do lupeol.

Uma vez que o triterpeno de esqueleto lupano encontrava-se em maior quantidade a identificação dos sinais de cada um dos componentes da mistura foi facilmente realizada. Comparação dos valores obtidos com os da literatura (MAHATO, 1994) permitiu identificar que essa mistura era constituída de lupeol e β -amirina.

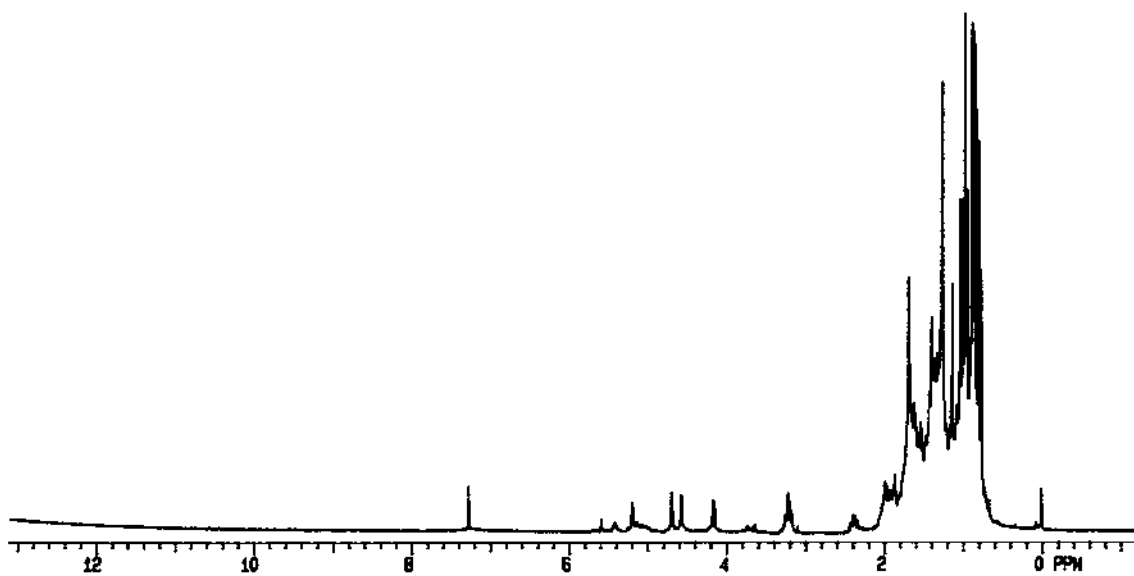


Figura 110 – Espectro de RMN de ^1H de **EB2** [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

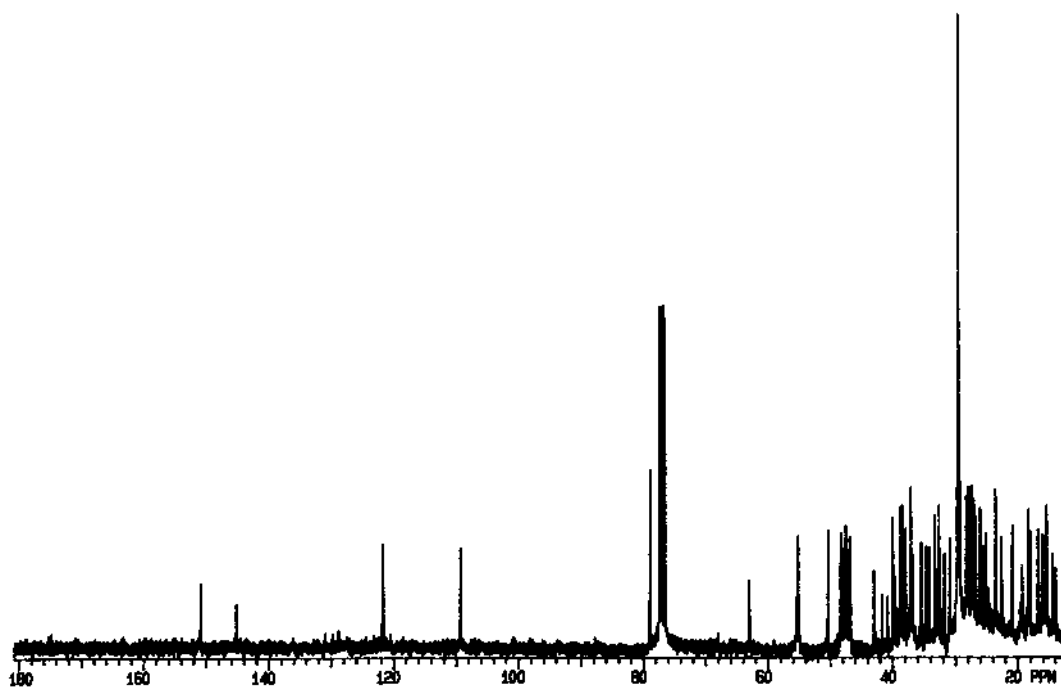


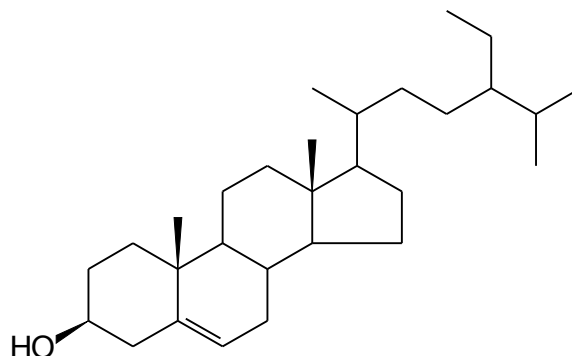
Figura 111 – Espectro de RMN ^{13}C de **EB2** [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

Tabela 25 – Dados de RMN de ^{13}C do lupeol [75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

C	EB3
1	38,68
2	27,40
3	79,03
4	38,75
5	55,15
6	18,30
7	34,25
8	40,81
9	50,41
10	36,93
11	20,91
12	25,10
13	38,03
14	42,81
15	27,40
16	35,56
17	42,98
18	48,27
19	47,97
20	150,96
21	29,82
22	39,99
23	27,97
24	15,36
25	15,96
26	16,11
27	14,53
28	17,99
29	109,31
30	19,30

5.4 Esteróide

5.4.1 Identificação do β -sitosterol **EB4**



A substância **EB4** revelou com o reagente de Liebermann-Burchard e devido à polaridade do solvente no qual esta foi isolada, bem como a sua natureza cristalina, suspeitou-se que era o β -sitosterol. Assim, a análise em CCDC da amostra procedeu através da comparação com o padrão de β -sitosterol em diferentes sistemas de eluentes possibilitando confirmar que a substâncias **EB4** era o β -sitosterol.

5.5 Porfirina

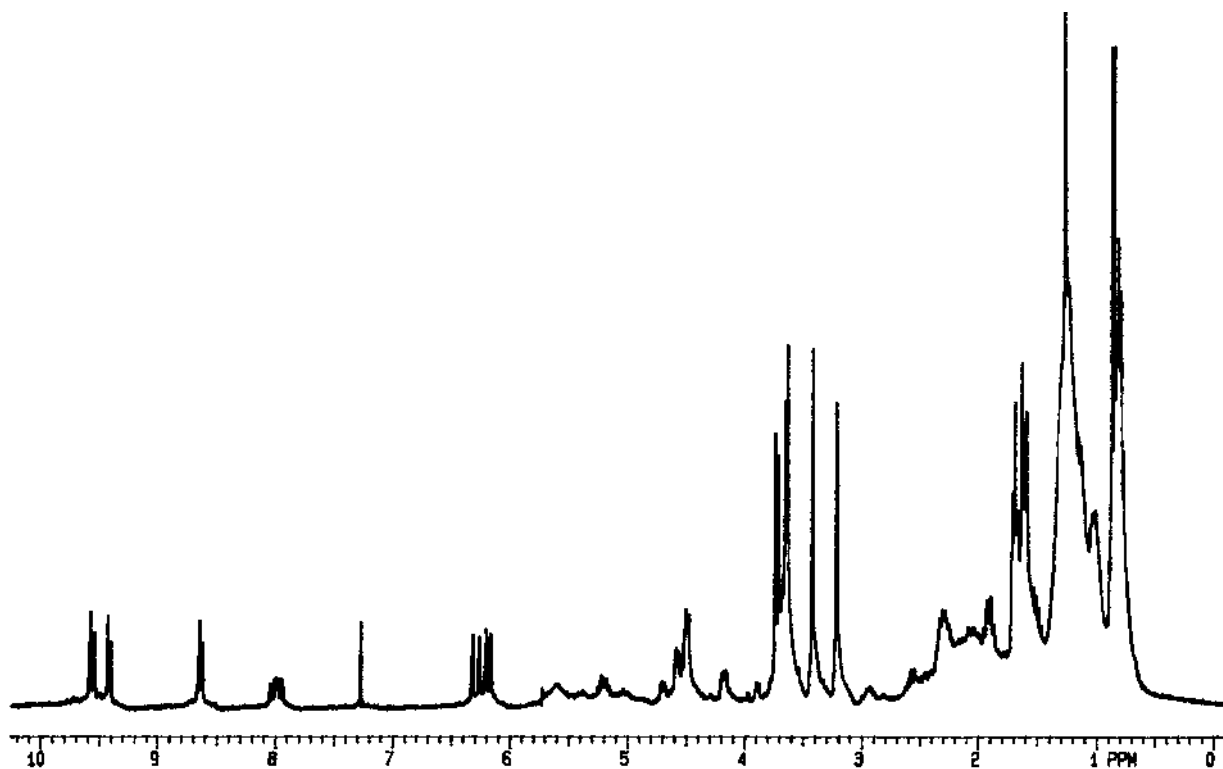


Figura 112 – Espectro de RMN de ^1H de **EB5** [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

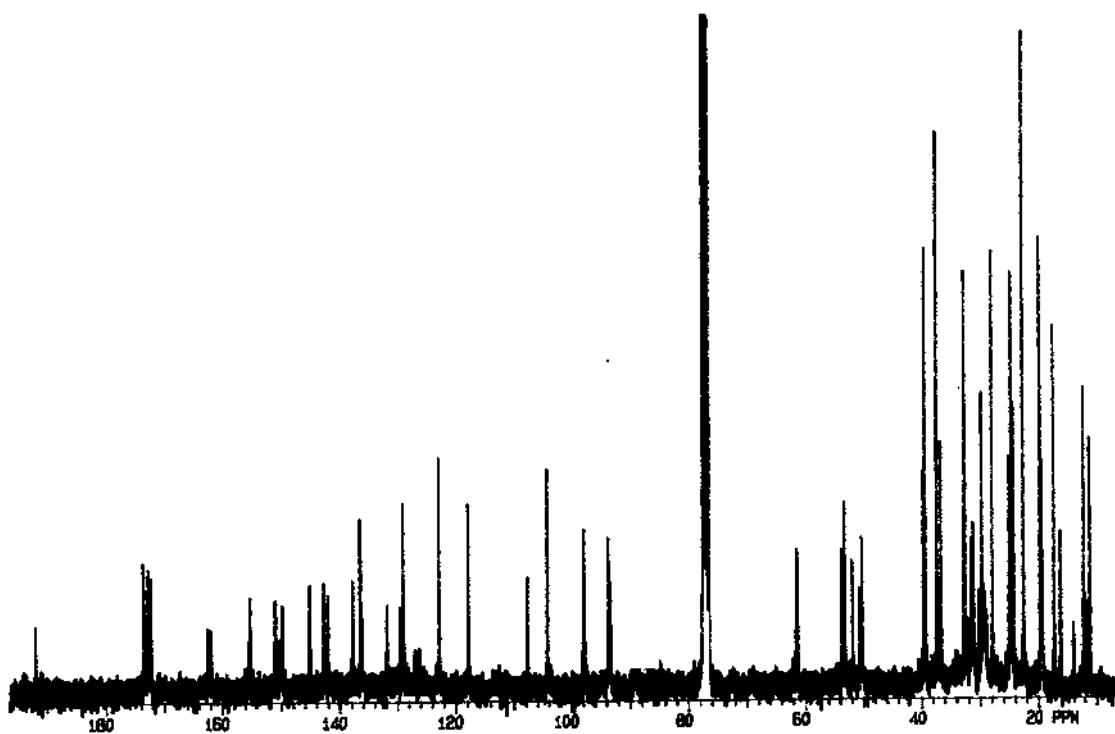


Figura 113 – Espectro de RMN de ^{13}C de **EB5** [300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)]

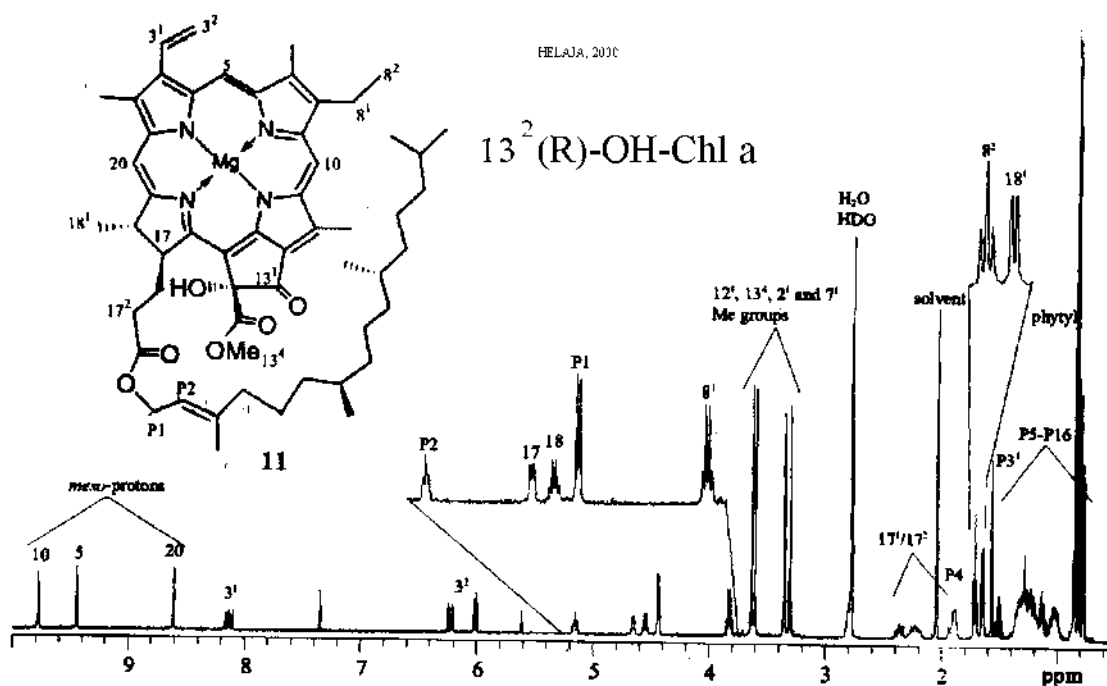


Figura 114 – Espectro de RMN de ^1H literatura [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$, δ (ppm)]

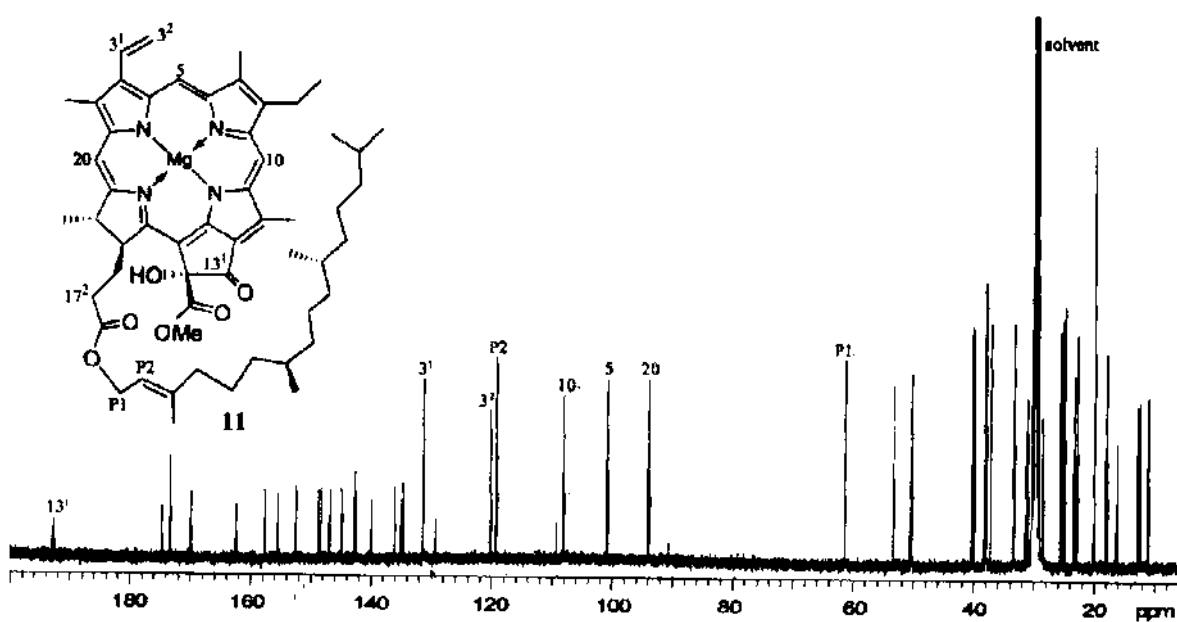


Figura 115 – Espectro de RMN de ^{13}C literatura [500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{O}$, δ (ppm)]

5.6. Resultado dos testes de Atividade

5.6.1 Teste de citotoxicidade

Com a finalidade de alcançar os objetivos propostos neste trabalho foram realizados testes de citotoxicidade com os extratos clorofórmico e acetato de etila das folhas de *E. barbatum* e com o extrato MeOH dos frutos de *E. nummularia* e acetato de etila dos frutos de *E. passerinum*, bem como com a substância **EN2**.

Entre os extratos testados, destacou-se apenas o extrato acetato de etila dos frutos de *E. passerinum* (EP_{tr}Ac) que apresentou 90% de atividade na concentração de 100 mg/l. Enquanto, os extratos de *E. barbatum* e de *E. nummularia* foram inativos com ($LC_{50} > 1000$ mg/l) . Entretanto, a substância **EN2** apresentou 50% de mortalidade a uma concentração de 25 mg/l. Para calcular a concentração letal foram utilizadas concentrações de 75 , 50 , 25 e 10 mg/l obtendo a $LC_{50} = 21,8$ para a substância **EN2** (Figura 116).

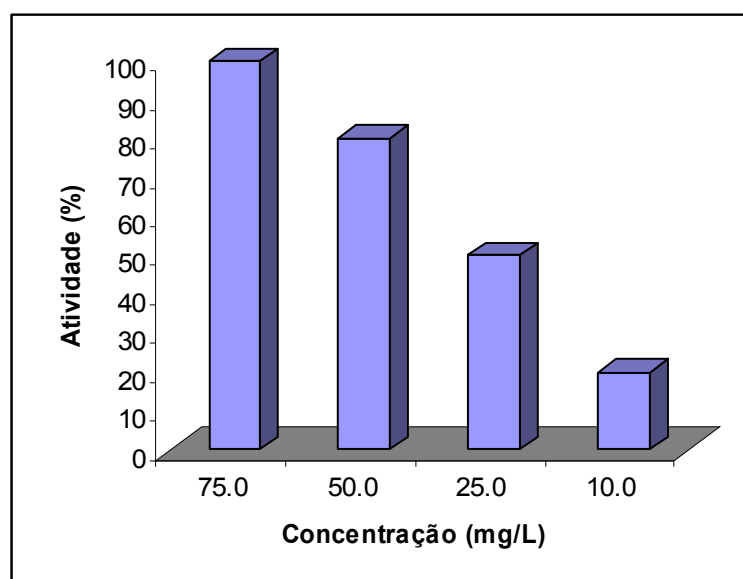


Figura 116 – Atividade citotóxica de **EN2**

5.6.2 Teste Larvicida

O teste com as larvas do *aedes aegypti* foi realizado com o extrato MeOH dos frutos de *E. nummularia* e acetato de etila dos frutos de *E. passerinum*, além da substância **EN2**. Neste teste os extratos brutos tanto de *E. nummularia*, quanto *E. passerinum* foram inativos. *E. nummularia* apresentou 50% de mortalidade na concentração de 500 ppm e *E. passerinum* causou mortalidade de 60%, após 48 h. Porém, a substância **EN2** causou mortalidade de 100% das larvas na concentração de 100 ppm, após 48 h. Abaixo desta concentração a substância **EN2** foi inativa (Figura 117).

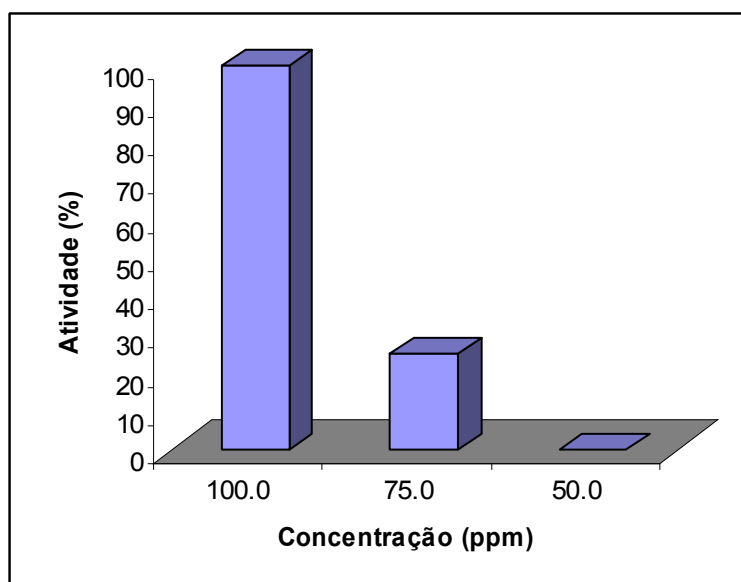


Figura 117 – Atividade Larvicida de **EN2**

5.6.3 Teste Moluscicida

Este ensaio foi realizado com o extrato MeOH dos frutos de *E. nummularia* e acetato de etila de *E. passerinum*, assim como com a substância **EN2**. Neste teste os extratos brutos tanto de *E. nummularia*, quanto *E. passerinum* foram inativos, bem como a substância **EN2**. O extrato de acetato de etila de *E. passerinum* causou 20% de mortalidade dos caramujos adultos, após 96 h. Entretanto, o teste realizado com embriões pode-se verificar desenvolvimento anormal ao longo do teste e 50% de mortalidade com 48 h e 100% após 96 h, em todas as amostras analisadas.

5.6.4 Teste de atividade imunomoduladora

Foram realizados também testes de atividade imunomoduladora com as substâncias Quercetina (**EN3**), Epicatequina (**EN4**) e Quercetina-3-ramnopiranosídeo (**EB6**). Destacando-se a substância **EB6** com 43,33% de inibição de (NO) e 57,50% de inibição para Linf. ConA, seguida pela **EN4** com 42,89% de inib. de (NO) e 76,46 inib. para Linf. ConA e **EN3** com 33,17 % de inib. de (NO) e 75,19 inibição para Linf. ConA.

6. Considerações finais

Este trabalho vem contribuir para o conhecimento da composição química das espécies de *Erythroxylum* que ocorrem no Brasil. A literatura relata a ocorrência de mais de 85 %, entretanto, pouco sabe-se sobre sua constituição química.

Assim, a partir do estudo do extrato clorofórmico de *E. barbatum* foram isolados triterpenos de esqueleto oleanano como β -amirina e β -amirina esterificada com ácido graxo. Esta última, de acordo com os resultados obtidos com outras espécies deste gênero (BARREIROS, 2002; CHAVEZ, 1996; INIGO, 1985) pode-se afirmar que a esterificação de ácido graxo com triterpenos é uma característica comum entre as espécies que ocorrem na América do Sul.

A partir do extrato acetato de etila das folhas das três espécies estudadas foram isolados flavonóides, principalmente flavonóis, como a quercetina (**EN3**) que é considerada característica quimiotaxonômica desse gênero e seus derivados glicosilados, além do flavanol epicatequina (**EN4**).

A partir dos frutos de *E. passerinum* foram isoladas as substâncias 3α -metoxi-2,8,12 β -trihidroxi-15-hidroxi-10 α -hidroxi-rianodano (**EN2**) e 3,10- α -diidroxi-2,6,12 β -trihidroxi-15-hidroxi-rianodano (**EP1**). Estas substâncias são inéditas na literatura, bem como é o primeiro relato desse esqueleto na família Erythroxylaceae.

Com relação aos testes de atividade citotóxica com os extratos, destaca-se o extrato acetato de etila com 100% de atividade na concentração de 100 mg/l. Essa atividade é devido provavelmente, a presença das substâncias **EN2** e **EP1**. A substância **EN2** apresentou atividade citotóxica com 50% de mortes numa concentração de 25 mg/l apresentando o LC_{50} = 21,8 com intervalo de confiança entre 13,9-33,6. Porém, com respeito ao teste larvicida, os extratos brutos foram inativos e a substância **EN2** foi ativa até a concentração de 100 ppm. Todos os extratos foram inativos para o teste de atividade moluscicida, bem como a substância **EN2**.

As substâncias **EN3**, **EN4** e **EB6** apresentaram atividade imunomoduladora.

Referências

- AGAR, J. T. H.; EVANS, W. C. Alkaloids of the Genus *Erythroxylum*. *Journal of Chemical Society. Perkin I*, 1976, p.1550-1553.
- AGRAWAL, P. K. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Oxford-New York, Elsevier, 1989, p.150-167.
- AL-SAID, M. S.; EVANS, W. C.; GROUT, R. J. Alkaloids of *Erythroxylum Hypericifolium* stem bark. *Phytochemistry*, 1989, v. 28, p. 671-673.
- AL-YAHYA, M. A. I.; EVANS, W. C.; GROUT, J. R. Alkaloids of the Genus *Erythroxylum*. Part 2. *E. dekindtii* (Engl) O. E. Schultz. *Journal of Chemical Society. Perkin I*, 1978, p. 2130-2132.
- ANDERSON, J. E.; GOETZ, C. M.; MCLAUGHLIN, J. L.; SUFFNESS, M. A blind comparasion of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities and antitumour prescreens, 1991, *Phytochemical Analysis*, v. 2, p. 107-111.
- ANSELL, S. M.; PEGEL, K. H.; TAYLOR, D. A. H. Diterpenes from the Timber of *Erythroxylum pictum*. *Phytochemistry*, 1993, v. 32, p. 937-943.
- ANSELL, S. M.; PEGEL, K. H.; TAYLOR, D. A. H. Diterpenes from the Timber of *Erythroxylum pictum*. *Phytochemistry*, 1993, v. 32, p. 945-952.
- ANSELL, S. M.; PEGEL, K. H.; TAYLOR, D. A. H. Diterpenes from the Timber of *Erythroxylum pictum*. *Phytochemistry*, 1993, v. 32, p. 953-959.
- BEAUQUESNE-BEZANGER, M. L.; GUILBERT, N. M.; DENECK, M. D. Recherches sur l' *Erythroxylum laurifolium* Lam. De la Réunion. *Annales pharmaceutiques françaises*, 1965, v. 23, p.377-384.
- BOHM, B. A., LOO, T., NICHOLLS, K. W., PLOWMAN, T. Flavonoid Variation in *Erythroxylum*. *Phytochemistry*, 1988, v. 27, p.833-837.
- BRACHET, A.; MUNOZ, O.; GUPTA, M.; VEUTHEY, J.; CHRISTEN, P. Alkaloids of *Erythroxylum lucidum* Stem-Bark. *Phytochemistry*, 1997, v. 46, p.1439-1442.
- BRINGMANN, G.; GÜNTHER, C.; MÜHLBACHER, J.; LALITH, M. D.; GUNATHILAKE, P.; ANURA W. Tropane alkaloids from *Erythroxylum zeylanicum* O. E. Schultz . *Phytochemistry*, 2000, v. 53, p.409-416.

- BUSER, HANS-RUDOLF; ARN, H.; GUERIN, P.; RAUSCHER, S. Determination of Double Bond Position in Mono-Unsaturated Acetates by Mass Spectrometry of Dimethyl Disulfide Adducts. *Analytical Chemistry*, 1983, v. 55, p.818-822.
- CHÁVEZ, J. P.; DOS SANTOS, I. D.; CRUZ, F. G.; DAVID, J. M. Flavonoids and triterpene ester derivatives from *Erythroxylum leal costae*. *Phytochemistry*, 1996, v. 41, p.941-943.
- CHRISTEN, P.; ROBERTS, M. F.; PHILLIPSON, J. D.; EVANS, W. C. Alkaloids of *Erythroxylum monogynum* Root- Bark., 1995, v. 38, p.1053-1056.
- CONNOLLY, J. D.; HARDING, A. E. Constituents of *Erythroxylon* Species. Part VII. Diterpenoids from *Erythroxylon australe*. *Journal of Chemical Society. Perkin I*, 1972, p.1996-2000.
- CONNOLLY, J. D.; McCRINDLE, R. MURRAY, R. D. H.; RENFREW. A. J.; OVERTON, K. H.; MELERA, A. Constituentes of *Erythroxylon monogynum* Roxb. Part II. Erythroxydiols X, Y and Z; Two Novel Skeletal Types of Diterpenoids. *Journal of Chemical Society. (C)*, 1966, p. 268-273.
- CONNOLLY, J. D.; McCRINDLE, R.; MURRAY, R. D. H.; OVERTON, K. H. Constituents of *Erythroxylum monogynum* Roxb. II. Erythroxydiols X and Y. Two Novel Skeletal Types of Diterpenoids. *Tetrahedron Letters*, 1964, n. 28, p.1859-1866.
- CONNOLLY, J. D.; GUNN, D. M.; McCRINDLE, R.; MURRAY, R. D. H.; OVERTON, K. H. Constituents of *Erythroxylon monogynum* Roxb. Part II. Erythroxytriols P and Q. *Journal of Chemical Society. (C)*, 1978, p. 2130-2132.
- CONSOLARI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. Principais Mosquitos de Importância Sanitária do Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994, 228 p.
- GONZÁLEZ-COLOMA, A.; GUTIÉRREZ, C.; HÜBNER, H.; ACHENBACH, H.; TERRERO, D.; FRAGA, B. M. Selective Insect Antifeedant and Toxic Action of Ryanoid. *Journal Agricultural Food Chemical*. 1999, v. 47, p.4419-4424.
- GONZÁLEZ-COLOMA, A.; HERNANDEZ, M. G.; PERALES, A.; FRAGA, B. M. *Journal of Chemical Ecology*, 1990, v. 16, p.2723-2733.
- CORREA, M. P. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984, v. I a VI.
- EL-IMAM, Y. M. A.; EVANS, W. C.; GROUT, R. J. Alkaloids of *Erythroxylum cuneatum*, *E. ecarinatum* and *E. australe*. *Phytochemistry*, 1988, v. 27, p. 2181-2184.
- EVANS, W. C. The Comparative Phytochemistry of the Genus *Erythroxylum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 1981, v.3, p. 265-277.

- GRIFFIN, W. J. A Phytochemical Investigation of *Erythroxylum australe* F. Muell. *Australian Journal of Chemistry*, 1978, v. 31, p. 1161-1165.
- GONZÁLEZ-COLOMA, A.; CABRERA, R.; CASTAÑERA, P.; GUTIÉRREZ, C.; FRAGA, B. M. Insecticidal Activity and Diterpene Content of *Persea indica*. *Phytochemistry*, 1992, V.31, p.1549-1552.
- HALL, Nina. *Neoquímica*. Porto Alegre: Ed. Bookman, 2004, p.181-190.
- HARBONE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. *The Flavonoids*. 1 ed. New York: Academic Press, 1975, p. 90-99.
- HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoids research since 1992, *Phytochemistry*, 2000, v. 55, p. 481-504.
- HEGNAUER, R. Chemotaxonomy of Erythroxylaceae (including some Ethnobotanical notes on old World Species). *Journal of Ethnopharmacology*, 1981, v. 3, p. 279-292.
- HELAJA, Julo. Structural Analysis of Natural Chlorin Derivatives Utilizing NMR Spectroscopy and Molecular Modelling. *Academic Dissertation*. Finlandia:Helsinki, 2000, p. 19-26.
- INIGO, R. P. A.; POMILIO, A. B. Flavonoids from *Erythroxylum argentinum*. *Phytochemistry*, 1985, v. 24, p. 347-349.
- ISOGAI, A.; SUZUKI, A.; TAMURA, S.; MURAKOSHI, S.; OHASHI, Y.; SASADA, Y. Structure of Cinnzeylanine and Cinnzeylanol, Polyhydroxylated Pentacyclic Diterpenes from *Cinnamomum zeylanicum* Ness. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1976, v. 40, p. 2305-2306.
- JOLY, Aylthon Brandão. *Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal*, 13 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002, p. 384, 396.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas*. 1 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002, 203 p.
- KAPADI, A. H.; DEV, S. The Diterpenoids of *Erythroxylon monogynum*-I. monogynol. *Tetrahedron Letters*, 1964, n. 19, p. 1171-1180.
- KAPADI, A.H.; DEV, S. The Diterpenoids of *Erythroxylon monogynum*-III further constituents, the absolute stereochemistry of monogynol and hydroxymonogynol. *Tetrahedron Letters*, 1964, n. 38, p. 2751-2757.
- KHATTAK, K. F.; RAHMAN, ATTA-UR; CHOUDHARY, M. I.; HEMALAL, K. D.; TILLEKERATNE, L. M. New Tropane Alkaloids from *Erythroxylum moonii*. *Journal of Natural Products*, 2002, v. 65, p.929-931.

- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. *The Systematic Identification of Flavonoids*. New York: Springer-Verlag, 1970, p.37-54.
- MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids-A Compilation and some Salient Features. *Phytochemistry*, 1994, v. 37, p. 1517-1575.
- MARKHAM, K. R. *Techniques of Flavonoids Identification*. New York: Academic Press, 1982, 88p.
- MARTIN, A.; MURRAY, R. D. H. Constituents of *Erythroxylon monogynum* Roxb. Part IV. Two Nor-diterpenoids Tertiary Alcohols and Three Diterpenoid Epoxides. *Journal of Chemical Society (C)*, 1968, p. 2529-2533.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Assays for Molluscicidal, Cercaricidal, Schistosomicidal and Piscicidal Activities. In: DEY, P. M.; HARBONE, J. B. *Methods in Plant Biochemistry*. Assay for Bioactivity. San Diego, CA: Ed. Academic Press Limited, 1991, v. 6, p.165-166.
- McCRINDLE, R.; MARTIN, A.; MURRAY, R. D. H. Constituents of *Erythroxylon monogynum* Roxb. Part I. (+)-Hibaene, [(+)-Stachene], Erythroxylo A (Monogynol), Erythroxylo B and Erythroxydiol A. *Journal of Chemical Society (C)*, 1968, p. 2349-2354.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D.E.; McLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 1982, v. 45, p. 31-34.
- MI, Q.; CUI, B.; SILVA, G. L.; LANTVIT, D.; LIM, E.; CHAI, H.; HOLLINGSHEAD, M. G.; MAYO, J. G.; KINGHORN, A. D.; PEZZUTO, J. M. *Cancer Letters*, 2002, v. 184, p.13-20.
- MOORE, J. M.; HAYS, P. A.; COOPER, D. A.; CASALE, J. F.; LYNDON, J. 1-Hydroxytropacocaine: An abundant Alkaloid of *E. novogranatense* Var. *Novogranatense* and Var. *Truxillense*. *Phytochemistry*, 1994, v. 36, p. 357-360.
- PAYO-HILL, A. L.; DOMINGUEZ, R. S.; SUAREZ, M. O.; BATISTA-BAEZ, M.; CASTRO, H. T. V.; RASTRELLI, L.; AQUINO, R. Tropane alkaloids from the leaves and stem bark of *Erythroxylum alaternifolium* and *Erythroxylum rotundifolium*. *Phytochemistry*, 2000, v. 54, p.927-932.
- PLOWMAN, T.; HENSOLD, N. Names, types, and distribution of neotropical species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). *Brittonia*, 2004, v. 56, p. 1-53.
- PLOWMAN, T. Fieldiana. *Botany*, 1987, v. 19, p.1-41.

- RAHMAN, A. U., KHATTAK, K. F., NIGHAT, F., SHABBIR, M., HEMALAL, K. D., TILLEKERATNE, L. M. Dimeric Tropane Alkaloids from *Erythroxylum moonii*. *Phytochemistry*, 1998, v. 48, p.377-383.
- DOS SANTOS, C. C.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Micromolecular secondary metabolites of *Erythroxylum barbatum*. *Biochemical systematics and ecology*, 2003, v. 31, p. 661-664.
- SEIGLER, D. S.; Plant Secondary Metabolism. Boston: Kluwer Academic, 1998, p.1-12.
- SERRANO, C.; ORTEGA, T.; VILLAR, A. M. Biological Activity of Traditional Medicines from Spain and Guatemala. Artemia salina Bioassay: A Revision. *Phytother. Res.*, 1996, v.10, S118-120.
- SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Ed. da UFSC, 2003.
- SOMAN, R.; DEV, S. The Diterpenoids of *Erythroxylum monogynum*-II. Devadarool, a new type in Tetracyclic Diterpenoids. *Tetrahedron Letters*, 1964, n. 19, p.1181-1185.
- SOMAN, R.; DEV, S.; MISRA, R.; PANDEY, R. C. The Diterpenoids of *Erythroxylum monogynum*-IV. Allodevadarool, Devadarool and Hydroxydevadarool. *Tetrahedron Letters*, 1964, n. 49, p.3767-3773.
- STÄHELIN, H. F.; WARTBURG, V.; A The chemical and biological route from podophyllotoxin glucoside to etoposide: ninth cain memorial award lecture. *Cancer Res.*, 1991, v. 51, p. 5-15.
- WATERHOUSE, A. L.; HOLDEN, I.; CASIDA, J. E. Ryanoid Insecticides: Structural Examination by Fully Coupled Two-dimensional ^1H - ^{13}C Shift Correlation Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of the Chemical Society. Perkin Trans. II*, 1985, p 1011-1016.
- WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 2003, v. 64, p. 3-19.
- YAGI, A.; TOKUBUCHI, N.; NOHARA, T.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I.; KODA, A. The Constituents of Cinnamomi Cortex. I. Structures of Cinnassiol A and Its Glucoside. *Chem. Pharm. Bull*, 1980, v. 28, p.1432-1436.
- ZANOLARI, B.; WOLFENDER, J. L.; GUILLET, D.; MARSTON, A. QUEIROZ, E. F.; PAULO, M. Q.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of tropane alkaloids from *Erythroxylum vacciniifolium* by liquid chromatography-UV detection-multiple mass

spectrometry and liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectrometry.

Journal of chromatography A, 2003, v. 1020, p. 75-89.

ZANOLARI, B.; GUILLET, D.; MARSTON, A. QUEIROZ, E. F.; PAULO, M. Q.;

HOSTETTMANN, K. Tropane Alkaloids from the Bark of *Erythroxylum vacciniifolium*.

Journal of Natural Products, 2003, v. 66, p.497-501.

ZUANAZZI, J. A. S.; TREMEA, V.; LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES,

A. T. Alkaloids of *Erythroxylum* (Erythroxilaceae) species from Southern Brazil.

Biochemical systematics and ecology, 2001, v. 29, p. 819-825.