

Vanderlúcia Fonseca de Paula

**ESTUDO QUÍMICO DE *Ochroma lagopus* SWARTZ E SÍNTESE DE
AMIDAS DERIVADAS DA PIPERINA, COM AVALIAÇÃO
DE SUAS RESPECTIVAS ATIVIDADES INSETICIDA**

Tese Apresentada ao Departamento
de Química do Instituto de Ciências
Exatas da Universidade Federal de
Minas Gerais, como Parte dos
Requisitos Necessários, para Obtenção
do Título de Doutor em Ciências-
Química.

Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte - MG
Fevereiro - 1999



CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 499-5732
FAX: 031 - 499-5700

UFMG

“ESTUDO QUÍMICO DE *OCHROMA LAGOPUS* SWARTZ E SÍNTESE DE AMIDAS
DERIVADAS DA PIPERINA, COM AVALIAÇÃO DAS SUAS RESPECTIVAS
ATIVIDADES INSETICIDA”

VANDERLÚCIA FONSECA DE PAULA

Tese aprovada pela Banca Examinadora constituída pelos Professores:

Dorila Piló Veloso (Orientadora)
Departamento de Química - ICEX - UFMG

Luiz Cláudio de Almeida Barbosa
Departamento de Química - UFV

João Batista Fernandes
Departamento de Química - UFSCar

Mayra Marques Magalhães Rubinger
Departamento de Química - UFV

Grácia Divina de Fátima Silva
Departamento de Química - ICEX - UFMG

Délio Soares Raslan
Departamento de Química - UFV

Belo Horizonte, 03 de fevereiro de 1999

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx

ESTUDO QUÍMICO DE *Ochroma lagopus* SWARTZ E SÍNTESE DE
AMIDAS DERIVADAS DA PIPERINA, COM AVALIAÇÃO
DE SUAS RESPECTIVAS ATIVIDADES INSETICIDA

Este trabalho foi realizado sob orientação
da Profa. Dorila Piló-Veloso - UFMG
e co-orientação do Prof. Luiz Cláudio de
Almeida Barbosa - UFV

Belo Horizonte
Fevereiro - 1999

"Aprendi a transformar o medo em respeito, o respeito em confiança. Descobri, como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de tudo querer".

(Amyr Klink)

Dedico este trabalho, especialmente,

aos meus pais: Nilson e Aparecida;

aos meus irmãos: Nizio, Marinalva,

Nivaldo e Solange;

e aos meus sobrinhos: Gustavo e Vanessa.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Química - ICEX, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Dorila Piló-Veloso, pela orientação segura e dedicada, pelas críticas construtivas, e, sobretudo, pela amizade e apoio.

Ao professor Luiz Cláudio de Almeida Barbosa (LASA - UFV), pela importante co-orientação deste trabalho, pelos ensinamentos, pela confiança, além da amizade e incentivo constante, dispensados nas diversas etapas deste trabalho.

Ao professor Marcelo Coutinho Picanço (Entomologia - UFV), pela colaboração na realização dos testes biológicos, além das sugestões, que muito contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

Ao professor Oliver W. Howarth (Univ. de Warwick - Inglaterra), pela obtenção de vários espectros de ressonância magnética nuclear.

Ao professor Antônio Lelis Pinheiro (Engenharia Florestal - UFV), pelas informações e pela classificação da planta.

À professora Quézia Bezerra (UFSCAR) pela cessão de seu laboratório e contribuição nas separações realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência reciclante.

Aos professores Eduardo Euclides de Lima Borges (UFV) e Gulab Newandram Jham (UFV), pela amizade e cessão de seus laboratórios para realização das análises por cromatografia gasosa (CG) e por CG acoplada à espectrometria de massas.

Ao amigo Emanuel, que durante o seu estágio no Laboratório de Entomologia Agrícola, muito contribuiu na realização dos ensaios biológicos, de forma dedicada e competente.

Aos técnicos Antônio Carlos e Ricardo Martins (LASA - UFV), pela convivência amigável e presteza durante a realização deste trabalho.

Às professoras Célia Regina Maltha (UFV) e Tânia Toledo (UFV) pela grande amizade e pelo incentivo constante, principalmente, nas etapas mais difíceis.

Ao professor Antônio Jacinto Demuner (UFV), pela contribuição e sugestões apresentadas durante toda a realização deste trabalho.

Aos amigos Gelson (UNICAMP) e Márcia Veloso (UFRJ) pelos artigos e demais serviços prestados nas respectivas instituições.

Aos amigos **do LASA**: Adilson, Alessandra, Almir, Andreia, Ângelo, Carlos, Daniel, Fernando Barcelos, Fernando Macedo, Flávia, Géssy, Jéferson, Larissa, Leandro, Leonardo, Luciano, Malu, Mauro, Patrícia, Pedro, Remilson, Rita, Roqueline e Vanessa; **do Lab. de Entomologia**: Alfredo, Flávio, Hebert, Ivênio, Leandro, Marcelo, Márcio, Sérgio e Wellington; **da UFMG**: Agostinho, Belinelo, Cláudia, Marcelo Henrique, Mauro César, Ossian, Roberto e Vera; e demais colegas de curso, pela agradável convivência, pelo apoio e pela amizade.

Aos secretários do Curso de Pós-Graduação, em especial a Paulete e Cristina, pela amizade e atenção.

Aos técnicos Márcio (UFV) e Anna Cristina (UFMG) pela obtenção dos espectros no infravermelho.

Aos técnicos do Laremar, Ricardo e Ivana, pela obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear.

À Universidade Federal de Viçosa, junto à Pro-Reitoria de Administração, pela concessão de transporte Viçosa a Belo Horizonte durante todo o período de realização deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de forma positiva para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Conteúdo	Página
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ESQUEMAS	xviii
LISTA DE ABREVIATURAS	xix
RESUMO	01
ABSTRACT	03
INTRODUÇÃO GERAL	05
CAPÍTULO I ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE <i>Ochroma lagopus</i> SWARTZ (BOMBACACEAE)	08
I.1. Introdução	09
I.1.1. Características Gerais da Família Bombacaceae	09
I.1.2. A Química da Família Bombacaceae	10
I.1.2.1. Gêneros Estudados	10
I.1.2.1.1. <i>Quararibea</i>	10
I.1.2.1.2. <i>Durio</i>	11
I.1.2.1.3. <i>Adansonia</i>	12
I.1.2.1.4. <i>Salmalia</i>	14
I.1.2.1.5. <i>Ceiba</i>	17
I.1.2.1.6. <i>Pseudobombax</i>	18
I.1.2.1.7. <i>Chorisia</i>	18
I.1.2.1.8. <i>Pachira</i>	18
I.1.2.1.9. <i>Bombacopsis</i>	19
I.1.2.1.10. <i>Ochroma</i>	19

I.1.3. Descrição Botânica, Caracterização e Utilização de <i>Ochroma lagopus</i>	22
I.2. Parte Experimental	25
I.2.1. Materiais e Métodos	25
I.2.2. Preparo dos Extratos	28
I.2.3. Isolamento dos Constituintes Químicos	28
I.2.3.1. Caule	28
I.2.3.2. Casca	31
I.2.3.2.1. Extrato Hexânico	31
I.2.3.2.1.1. Análise dos Ácidos Graxos e Triacilglicerídeos das Frações CcH(1)1-114	31
I.2.3.2.2. Extrato Etanólico	32
I.2.3.2.2.1. Preparo dos Ésteres Metílicos dos Ácidos Graxos Presentes na Fração CcE(2)10.2	34
I.2.3.2.2.2. Hidrólise dos Glicosídeos Presentes em OCcE3	34
I.2.3.2.2.3. Análise dos Açúcares por CG	34
I.2.3.2.2.4. Acetilação de OCcE4	34
I.2.4. Dados Físicos e Espectroscópicos das Substâncias Isoladas de <i>O. lagopus</i>	35
I.2.4.1. Boehmenan [49]	35
I.2.4.2. Boehmenan B [50]	36
I.2.4.3. Boehmenan C [51]	37
I.2.4.4. Boehmenan D [52]	38
I.2.4.5. Carolignana A [53]	39
I.2.4.6. Carolignana B [54]	40
I.2.4.7. Carolignana C [55]	42
I.2.4.8. Carolignana D [56]	43
I.2.4.9. Carolignana E [57]	44
I.2.4.10. Carolignana F [58]	45
I.2.4.11. Diferulato de secoisolariciresinoila [59]	46
I.2.4.12. Mistura de β -Sitosterol [60] e Estigmasterol [61]	47
I.2.4.13. Daucosterol (β -Sitosterol-3- <i>O</i> - β -D-glicosídeo) [62] e Estigmasterol-3- <i>O</i> - β -D-glicosídeo [63]	47
I.2.4.14. OCcE4: Manitol [64]	48

I.2.5. Ensaio Biológico com Extratos do Caule, da Casca e com Algumas Frações para Avaliação de suas Atividades Inseticidas	49
I.3. Resultados e Discussão	50
I.3.1. Constituintes Químicos do Extrato Etanólico do Caule	50
I.3.1.1. Caracterização das Frações Obtidas Após Separação por CLAE Reciclante	50
I.3.1.2. Identificação dos Constituintes de Cada Fração, Obtidos Após Separação por CLAE Reciclante	56
I.3.1.2.1. Frações OCE1 e OCE6: Boehmenan [49]	56
I.3.1.2.2. Fração OCE2: Boehmenan [49], Boehmenan B [50] e Boehmenan C e [51]	57
I.3.1.2.3. Fração OCE9: Boehmenan D [52]	63
I.3.1.2.4. Fração OCE10: Carolignana A [53]	72
I.3.1.2.5. Fração OCE11: Carolignana B [54]	85
I.3.1.2.6. Fração OCE12: Carolignana B [54], Carolignana C [55] e Carolignana D [56]	94
I.3.1.2.7. Fração OCE8: Carolignana E [57] e Carolignana F [58].....	99
I.3.1.2.8. Frações OCE5 e OCE13: Diferulato de Secoisolariciresinila [59]	112
I.3.2. Constituintes Químicos da Casca	127
I.3.2.1. Extrato Hexânico	127
I.3.2.1.1. Mistura de Ácidos Graxos e Triacilglicerídeos	127
I.3.2.2. Extrato Etanólico	128
I.3.2.2.1. Mistura de Ácidos Graxos	128
I.3.2.2.2. OCcE2: Mistura de β -Sitosterol [60] e Estigmasterol [61] .	130
I.3.2.2.3. OCcE3: Mistura de Daucosterol (β -Sitosterol-3-O- β -D-Glicosídeo) [62] e Estigmasterol-3-O- β -D-Glicosídeo) [63]	131
I.3.2.2.4. OCcE4: Manitol [64]	135
I.3.3. Ensaio Biológico	136
I.4. Conclusão	137
I.5. Bibliografia	139

CAPÍTULO II	
SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE AMIDAS DERIVADAS DA PIPERINA	144
II.1. Introdução	147
II.2. Parte Experimental	149
II.2.1. Materiais e Métodos	149
II.2.2. Síntese das Amidas Derivadas da Piperina [65]	151
II.2.2.1. Obtenção da Piperina [65]	151
II.2.2.2. Obtenção do Ácido Pipérico [83]	151
II.2.2.3. Síntese das Amidas [82a-p]	151
II.2.2.4. Dados Físicos e Espectroscópicos das Amidas Naturais, Piperina [65] e Piperilina [80], e das Amidas Sintéticas [82a-p]	155
II.2.2.4.1. Piperina [65]	155
II.2.2.4.2. Piperilina [80]	156
II.2.2.4.3. N-Etilpiperamida [82a]	157
II.2.2.4.4. N,N-Dietilpiperamida [82b]	158
II.2.2.4.5. N-Isopropilpiperamida [82c]	159
II.2.2.4.6. N,N-Diisopropilpiperamida [82d]	160
II.2.2.4.7. N-Butilpiperamida [82e]	161
II.2.2.4.8. N-Isobutilpiperamida [82f]	162
II.2.2.4.9. N-Pentilpiperamida [82g]	163
II.2.2.4.10. N-Isopentilpiperamida [82h]	164
II.2.2.4.11. N-Hexilpiperamida [82i]	165
II.2.2.4.12. N-Decilpiperamida [82j]	166
II.2.2.4.13. N-Cicloexilpiperamida [82k]	167
II.2.2.4.14. N-Adamantilpiperamida [82l]	168
II.2.2.4.15. N-[2-(Piperidin-1-il)etil]piperamida [82m]	169
II.2.2.4.16. N-[2-(Morfolin-4-il)etil]piperamida [82n]	170
II.2.2.4.17. N-(1-Benzilpiperidin-4-il)piperamida [82o]	171
II.2.2.4.18. N-[2-(Piridin-2-il)etil]piperamida [82p]	172
II.2.3. Ensaios Biológicos	173
II.2.3.1. Ensaios em Placa de Petri com Papel Impregnado com as Substâncias	173
II.2.3.2. Ensaios de Aplicação Tópica	173
II.2.3.2.1. Curvas Dose-Mortalidade das Amidas que Apresentaram Toxicidade a <i>Ascia monuste orseis</i>	176

II.3. Resultados e Discussão	177
II.3.1. Síntese das Amidas [82a-p] Derivadas da Piperina [65]	177
II.3.2. Ensaios Biológicos	190
II.3.2.1. Ensaios em Placa de Petri com Papel Impregnado com as Substâncias	190
II.3.2.2. Ensaios de Aplicação Tópica	190
II.3.2.2.1. Curvas Dose-Mortalidade das Amidas que Apresen- taram Toxicidade para <i>A.monuste orseis</i>	200
II.4. Conclusão	206
II.5. Bibliografia	208
CONCLUSÃO GERAL	211
Apêndice	212

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela		Página
I.1	Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) Para os Compostos [49], [50] e [52]	71
I.2	Deslocamentos Químicos (δ) de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100,6 MHz) Para os Compostos [49], [53] e [54]	93
I.3	Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) Para os Compostos [53], [54], [55], [56], [57] e [58]	110
I.4	Deslocamentos Químicos (δ) de RMN de ^{13}C Obtidos Para OCcE3 e Comparação Destes com Valores da Literatura	134

CAPÍTULO II

II.1	Amidas [82a-p] Sintetizadas a Partir do Ácido Pipérico [83]	153
II.2	Doses ($\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ da Larva) Utilizadas na Confecção das Curvas Dose-Mortalidade de Cada Amida para Larvas de Primeiro Ínstar de <i>A. monuste orseis</i>	176
II.3	Rendimento das Amidas [82a-p] Obtidas a Partir do Ácido Pipérico [83] Proveniente da Hidrólise da Piperina [65]	179
II.4	Mortalidade (%) de Larvas de Primeiro Ínstar de <i>Ascia monuste orseis</i> 48 Horas Após Exposição às 16 Substâncias. A Dose Aplicada Foi $40,0 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ da Larva e as Condições Foram: $25 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, $70 \pm 5\%$ de Umidade Relativa e Fotoperíodo de 12 Horas	192

Tabela	Página
II.5 Mortalidade (%) de Adultos <i>Acanthoscelides obtectus</i> 48 Horas Após Exposição às 16 Substâncias. A Dose Aplicada Foi 2,61 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ do Inseto e as Condições Foram: $25 \pm 0,5$ °C, 70 ± 5 % de Umidade Relativa e Fotoperíodo de 12 Horas	193
II.6 Mortalidade (%) de Adultos de <i>Brevicoryne brassicae</i> 6 Horas Após Exposição às 16 Substâncias. A Dose Aplicada Foi 31,25 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ do Inseto e as Condições Foram: $25 \pm 0,5$ °C, $70 \pm 5\%$ de Umidade Relativa e Fotoperíodo de 12 Horas	194
II.7 Mortalidade (%) de Adultos de Operárias <i>Cornitermes cumulans</i> 6 Horas Após Exposição às 16 Substâncias. A Dose Aplicada Foi 1,19 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ do Inseto e as Condições Foram: $25 \pm 0,5$ °C, $70 \pm 5\%$ de Umidade Relativa e Fotoperíodo de 12 Horas	195
II.8 Mortalidade (%) de Adultos de <i>Protopolybia exigua</i> 12 Horas Após Exposição às 16 Substâncias. A Dose Aplicada Foi 2,63 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ do Inseto e as Condições Foram: $25 \pm 0,5$ °C, $70 \pm 5\%$ de Umidade Relativa e Fotoperíodo de 12 Horas	196
II.9 Equações de Regressão das Curvas Dose ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ da Larva) vs Mortalidade para Lagartas de Primeiro Ínstar Larval de <i>Ascia monuste orseis</i>	201
II.10 Doses Letais (DL's) e Respetivos Intervalos de Confiança das Amidas Testadas para Larvas de Primeiro Ínstar de <i>Ascia monuste orseis</i>	203
II.11 Índices de Toxicidade Relativa (ITR) de Cada Amida para Larvas de Primeiro Ínstar de <i>Ascia monuste orseis</i>	203

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura		Página
I.1	a) Flor de <i>Ochroma lagopus</i> e b) Corte longitudinal mostrando algumas abelhas mortas	20
I.2	Ilustração de <i>Ochroma lagopus</i> : a) Árvore, b) Ramo com Folhas e Flor, c) Fruto com Lanosidade Abundante, d) Sementes, e) Caule com Casca e f) Madeira (Fonte: Lorenzi, 1992)	23
I.3	Esquema Simplificado do Fracionamento do Extrato Etanólico do Caule (CE) de <i>Ochroma lagopus</i>	29
I.4	Esquema Simplificado do Fracionamento do Extrato Etanólico da Casca (CcE) de <i>Ochroma lagopus</i>	32
I.5	Cromatogramas Analíticos Obtidos para as Frações a) CE(14)19, b) CE(16)35 e c) CE(16)41, nas Condições Descritas no Item 8, da p. 26	52
I.6	Cromatogramas dos Constituintes das Frações a) CE(14)19, b) CE(16)35 e c) CE(16)41, Separados por CLAER, nas Condições Descritas no Item 9(a), da p. 26	53
I.7	Cromatogramas Obtidos Para as OCE1-12, Após Separação em CLAER, Para Verificar Seus Respetivos Graus de Pureza, nas Condições do Item 9(b), p. 27	55
I.8a	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE2 (Compostos [49], [50] e [51]), Região de δ 7,8 a 6,2	59
I.8b	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE2 (Compostos [49], [50] e [51]), Região de δ 6,0 a 4,0	60
I.8c	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE2 (Compostos [49], [50] e [51]), Região de δ 4,0 a 2,4	61

Figura	Página
I.9a Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE9 (Composto [52]), Região de δ 7,8 a 5,8	65
I.9b Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE9 (Composto [52]), Região de δ 5,6 a 4,0	66
I.9c Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE9 (Composto [52]), Região de δ 4,0 a 2,0	67
I.10 Espectro de Massas (IE) da Fração OCE9 (Composto [52])	69
I.11 Espectro no Infravermelho da Fração OCE10 (Composto [53]) em KBr	73
I.12a Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE10 (Composto [53]), Região de δ 7,8 a 6,2	74
I.12b Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE10 (Composto [53]), Região de δ 6,0 a 4,4	75
I.12c Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE10 (Composto [53]), Região de δ 4,4 a 2,0	76
I.13a A: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100,6 MHz) da Fração OCE10 (Composto [53]) e B: DEPT, Região de δ 140 a 110	78
I.13b A: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100,6 MHz) da Fração OCE10 (Composto [53]) e B: DEPT, Região de δ 110 a 70	79
I.13c A: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100,6 MHz) da Fração OCE10 (Composto [53]) e B: DEPT, Região de δ 70 a 25	80
I.14 Simulação em Computador do Homólogo Acíclico da Boehmenan [49], Representando a Configuração em Torno da Ligação C7',C8': a) <i>eritro</i> e b) <i>treo</i>	82
I.15 Espectro de Massas (IE) da Fração OCE10 (Composto [53])	84
I.16a Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE11 (Composto [54]), Região de δ 7,8 a 6,2	86

Figura	Página
I.16b Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE11 (Composto [54]), Região de δ 6,0 a 4,0	87
I.16c Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE11 (Composto [54]), Região de δ 4,0 a 2,0	88
I.17a A: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100,6 MHz) da Fração OCE11 (Composto [54]) e B: DEPT, Região de δ 170 a 90	89
I.17b A: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100,6 MHz) da Fração OCE11 (Composto [54]) e B: DEPT, Região de δ 90 a 20	90
I.18 Mapa de Contorno COSY $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ da Fração OCE11 (Composto [54])	92
I.19a Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE12 (Compostos [54], [55] e [56]), Região de δ 7,8 a 6,6	96
I.19b Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE12 (Compostos [54], [55] e [56]), Região de δ 6,4 a 4,8	97
I.19c Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE12 (Compostos [54], [55] e [56]), Região de δ 4,4 a 2,0	98
I.20a Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE8 (Compostos [[57] e [58]), Região de δ 7,8 a 6,2	100
I.20b Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE8 (Compostos [[57] e [58]), Região de δ 6,0 a 4,2	101
I.20c Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE8 (Compostos [[57] e [58]), Região de δ 4,2 a 2,0	102
I.21 Espectros Parciais Resultantes dos Experimentos de Desacoplamento dos Hidrogênios Aromáticos dos Compostos [57] e [58]: A) Antes de Irradiar em δ 6,76 e B) Após Irradiação em δ 6,76	104
I.22 Espectros Parciais Obtidos por Técnica de Dupla Irradiação de Sinais dos Compostos [57] e [58]: a) Espectro normal; com irradiação em b) δ 5,09; c) δ 4,89; d) δ 4,75; e) δ 4,54; f) δ 4,31	106
I.23 Simulação em Computador da Parte Central da Estrutura [57], Representando C7', C8' na Forma <i>treo</i>	107

Figura	Página
I.24 Simulação em Computador da Parte Central da Estrutura [58], Representando C7',C8' na Forma <i>eritro</i>	107
I.25 Espectro de Massas (IQ) da Fração OCE8 (Compostos [57 e [58])	109
I.26 Espectro no Infravermelho das Frações OCE5 e OCE13 (Composto [59]) em KBr	113
I.27a Espectro de RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz) das Frações OCE5 e OCE13 (Composto [59]), Região de δ 7,6 a 6,4	114
I.27b Espectro de RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz) das Frações OCE5 e OCE13 (Composto [59]), Região de δ 5,0 a 2,0	115
I.28 Espectro de RMN de ¹³ C (DMSO-d ₆ , 100,6 MHz) das Frações OCE5 e OCE13 (Composto [59])	118
I.29 Espectro de RMN de ¹³ C - DEPT (DMSO-d ₆ , 100,6 MHz) das Frações OCE5 e OCE13 (Composto [59])	119
I.30 Espectros Resultantes dos Experimentos de nOe Realizados Para o Composto [59]	120
I.31a Mapa de Contornos COSY ¹ H ¹ H das Frações OCE5 e OCE13 (Composto [59]), Compreendendo a Região de δ 9,0 a 6,0	121
I.31b Mapa de Contornos COSY ¹ H ¹ H das Frações OCE5 e OCE13 (Composto [59]), Compreendendo a Região de δ 5,0 a 2,0	122
I.32 Espectro Obtido por Técnica de Dupla Irradiação das Frações OCE5 e OCE13 OCE13 (Composto [59]): a) Com Irradiação do Sinal em δ 2,20 e b) Espectro Padrão para Comparação	123
I.33 Espectro de Massas (IQ) das Frações OCE5 e OCE13 (Composto [59])	125
I.34 Cromatograma dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos Presentes no Extrato Hexânico da Casca de <i>Ochroma lagopus</i>	127
I.35 Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) da Fração CcE10.2 (Mistura de Ácidos Graxos)	129

Figura	Página
I.36 Cromatograma dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos Presentes no Extrato Etanólico da Casca de <i>Ochroma lagopus</i>	130
I.37 Projeções de Newman para os Carbonos 1 e 2 de α e β -Glicose	133
I.38 Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do Manitol [64]	136

CAPÍTULO II

II.1 Aplicação Tópica de 1,0 μL de Solução Contendo 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Cada Amida em a) Larva de Primeiro Ínstar de <i>Ascia monuste orseis</i> e b) em Adultos de <i>Acanthoscelides obtectus</i>	175
II.2 Espectro no Infravermelho (KBr) da N-isopentilpiperamida [82h] .	182
II.3a Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da N-isopentilpiperamida [82h]	183
II.3b Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da N-isopentilpiperamida [82h], com Ampliação da Região δ 6,55 a 7,45	184
II.3c Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da N-isopentilpiperamida [82h], com Ampliação da Região δ 0,8 a 1,6	185
II.4 Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) da N-isopentilpiperamida [82h]	186
II.5 Espectro DEPT 135 (CDCl_3 , 50 MHz) da N-isopentilpiperamida [82h]	187
II.6 Espectro de Massas (IQ) da N-isopentilpiperamida [82h]	188
II.7 Curvas Dose ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ da Larva) vs Mortalidade (Próbite) de <i>Ascia monuste orseis</i> para Seis Amidas ([65], [80], [82a], [82b], [82d] e [82e]) Testadas	200
II.8 Índices de Toxicidade Relativa (ITR) para as Seis Amidas ([65], [80], [82a], [82b], [82d] e [82e]) Testadas em Função da Mortalidade de <i>A. monuste orseis</i>	204

APÊNDICE

Figura	Página
1	Espectro no Infravermelho (KBr) das Frações OCE1 e OCE6 (Composto [49]) 213
2A	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) das Frações OCE1 e OCE6 (Composto [49]), Região de δ 7,6 a 6,0 214
2B	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) das Frações OCE1 e OCE6 (Composto [49]), Região de δ 5,8 a 1,8 215
3A	Espectro de a) RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100,6 MHz) e b) DEPT 135 das Frações OCE1 e OCE6 (Composto [49]), Região de δ 168 a 132 216
3B	Espectro de a) RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100,6 MHz) e b) DEPT 135 das Frações OCE1 e OCE6 (Composto [49]), Região de δ 130 a 86.. 217
3C	Espectro de a) RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100,6 MHz) e b) DEPT 135 das Frações OCE1 e OCE6 (Composto [49]), Região de δ 80 a 28 ... 218
4	Espectro de Massas (IE) das Frações OCE1 e OCE6 (Composto [49]) 219

LISTA DE ESQUEMAS

CAPÍTULO I

Esquema		Página
I.1	Principais Fragmentações Apresentadas pelos Compostos [49], [50], [51] e [52] na Espectrometria de Massas	70
I.2	Fragmentos Mostrando as Possibilidades Estruturais [A] e [B] Para o Composto Presente na Fração OCE10	81
I.3	Principais Fragmentações Representadas nos Espectros de Massas dos Compostos [53], [54], [55], [56], [57] e [58]	111
I.4	Principais nOes Observados Entre os Hidrogênios do Composto [59]	120
I.5	Principais Fragmentações Representadas para o Composto [59]	126

CAPÍTULO II

II.1	Rota Sintética das Amidas [82a-p] a Partir do Acido Pipérico [83]	152
II.2	Principais Fragmentações Apresentadas Pelas Piperamidas [82a-p]	189

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	Acetato de etila
CCD	Cromatografia em camada delgada
CcE	Extrato etanólico da casca
CcH	Extrato hexânico da casca
CE	Extrato etanólico do caule
CG	Cromatografia em fase gasosa
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CH	Extrato hexânico do caule
CHN	Análise elementar para carbono, hidrogênio e nitrogênio
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAER	Cromatografia líquida de alta eficiência reciclante
COSY	“Correlated Spectroscopy”
d	Dupleto
dd	Dupleto duplo
ddd	Duplo dupleto duplo
ddl	Dupleto duplo largo
DEPT	“Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”
dl	Dupleto largo
DL	Dose letal
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE	Éter etílico
EM	Espectrometria de massas
EMAR	Espectrometria de massas de alta resolução
EtOH	Etanol
FB	Extrato benzênico da folha
FE	Extrato etanólico da folha

Fig.	Figura(s)
Gli	Glicose
HETCOR	“Heteronuclear Correlated Spectroscopy”
Hz	Hertz
IC	Ionização química
IE	Impacto eletrônico
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento escalar
lit.	Literatura
m	Multiplete
m/z	Razão entre a massa do fragmento e sua carga elétrica
MeOH	Metanol
MM	Massa molar
mult.	Multiplicidade
nOe	“Nuclear Overhauser Effect”
nOediff	diferença de “Nuclear Overhauser Effect”
OCE	Extrato etanólico do caule de <i>Ochroma lagopus</i>
p.	Página
Py	Piridina
q	Quarteto
Rf	Fator de retenção em cromatografia de camada delgada
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Simpleto
sl	Simpleto largo
t	Triplete
td	Triplete duplo
T _f	Temperatura de fusão
THF	Tetraidrofurano

tl	Tripleto largo
t_R	Tempo de retenção
tt	Tripleto triplo
UV	Ultravioleta
v/v	Volume por volume
$\bar{\nu}$	Número de ondas (cm^{-1})
ν	Estiramento
δ	Deslocamento químico
δ_s	Deformação angular

RESUMO

Palavras-chave: *Ochroma lagopus*; Bombacaceae; lignanas; boehmenan; piperamidas; atividade inseticida.

Neste trabalho são descritas dezesseis substâncias naturais isoladas de *Ochroma lagopus* das quais nove são inéditas. O isolamento destas substâncias foi feito por cromatografia em coluna de sílica gel, sendo que algumas do extrato etanólico do caule, após serem submetidas a este processo de separação, foram isoladas por CLAE reciclante, em escala semi-preparativa. A identificação destas foi realizada a partir de dados de EM, IV, RMN de ^1H e de ^{13}C (empregando-se técnicas 1D e 2D). Os produtos naturais inéditos são as lignanas denominadas: boehmenan B, C e D e carolignana A, B, C, D, E e F. As demais substâncias identificadas foram: boehmenan, diferulato de secoisolariciresinila, β -sitosterol, estigmasterol, daucosterol, estigmasterol-3-*O*- β -D-glicosídeo e manitol. Extratos de *O. lagopus*, bem como algumas frações destes, foram testados para avaliar suas possíveis ações sobre várias espécies de insetos. No entanto, nenhum deles apresentou atividade inseticida para as espécies testadas.

Foram ainda obtidas as amidas naturais piperina e piperilina, isoladas da pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), e dezesseis amidas sintéticas derivadas da piperina: N-etilpiperamida, N,N-dietilpiperamida, N,N-diisopropilpiperamida, N-butilpiperamida, N-isobutilpiperamida, N-isopentilpiperamida, N-cicloexilpiperamida, N-isopropilpiperamida, N-pentilpiperamida, N-hexilpiperamida, N-decilpiperamida, N-adamantilpiperamida, N-[2-(piperidin-1-il)etil]piperamida, N-[2-(morfolin-4-il)etil]piperamida, N-(1-benzilpiperidin-4-il)piperamida e N-[2-(piridin-2-il)etil]piperamida. Para as nove últimas substâncias citadas, não foi

encontrada nenhuma referência na literatura consultada. Todas as amidas foram submetidas a testes biológicos para avaliar as respectivas atividades contra insetos das espécies *Acanthoscelides obtectus* Say, *Ascia monuste orseis* Latr., *Brevicoryne brassicae* L., *Cornitermes cumulans* Kollar, *Protopolybia exigua* DeSaus, *Rhizopertha dominica* Fabr e *Sitophilus zeamais* Mots. A maioria das amidas sintéticas e as duas naturais apresentaram atividade inseticida para pelo menos uma das espécies testadas. Dentre estas espécies, *A. monuste* e *B. brassicae* foram as mais suscetíveis a tais substâncias.

ABSTRACT

In this work were described sixteen natural compounds isolated from *Ochroma lagopus*, among which, nine are new. These compounds were isolated by column chromatography on silica gel, and some fractions of the ethanolic extract from the heartwood, after repeated column chromatographics, were also submitted to semipreparative-scale recycling HPLC. The structures of these compounds were elucidated by detailed IR, MS, one- and two-dimensional $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectroscopic studies. The novel natural products isolated were lignans named: boehmenan B, C, and D, and carolignan A, B, C, D, E and F. The other compounds identified were boehmenan, secoisolariciresinoyl diferulate, β -sitosterol, stigmasterol, daucosterol, stigmasterol-3-*O*- β -D-glycoside, and mannitol. Extracts and fractions of *O. lagopus* were tested in order to evaluate their possible activities against several insect species. However, they showed no insecticidal activity against the tested species.

In the second part of this work the natural amides, piperine and piperiline, were isolated from black pepper (*Piper nigrum*), and the following piperine derivatives were synthesized: N-ethylpiperamide, N,N-diethylpiperamide, N,N-diisopropylpiperamide, N-butylpiperamide, N-isobutyl-piperamide, N-isopentyl-piperamide, N-cyclohexylpiperamide, N-isopropyl-piperamide, N-pentylpiperamide, N-hexylpiperamide, N-decylpiperamide, N-adamantylpiperamide, N-[2-(piperidin-1-yl)ethyl]piperamide, N-[2-(morpholin-4-yl)ethyl]piperamide, N-(1-benzylpiperidin-4-yl)piperamide and N-[2-(pyridin-2-yl)ethyl]piperamide. For the

last nine compounds it was not found any report in the literature. All these amides were submitted to biological assays in order to evaluate their activities against *Acanthoscelides obtectus* Say, *Ascia monuste orseis* Latr., *Brevicoryne brassicae* L., *Cornitermes cumulans* Kollar, *Protopolybia exigua* DeSaus, *Sitophilus zeamais* Mots e *Rhizopertha dominica* Fabr. Most of the amides, natural and synthetic, showed insecticidal activity for at least one species. Among these species, *A. monuste* e *B. brassicae* were the most susceptible to this group of compounds.

INTRODUÇÃO GERAL

Este trabalho é constituído de duas partes. Na primeira parte, o Capítulo I, apresenta o estudo químico de *Ochroma lagopus* Swartz (Bombacaceae) bem como a avaliação da atividade inseticida tanto dos seus extratos brutos, etanólicos do caule e da casca, e hexânico desta última, quanto de algumas frações destes extratos.

As plantas superiores são excelentes fontes de produtos biologicamente ativos. Muitas delas têm sido exploradas como importantes fontes de compostos inseticidas, tais como nicotina, piretróides, rotenona, “ryania”, azadiractina e “sabadilla” (YOSHIDA *et al.*, 1994).

Mas, atualmente, inseticidas botânicos tradicionais desempenham um papel secundário na agricultura mundial (BENNER, 1993), apesar da busca por estes tipos de agroquímicos ser de grande interesse. Uma das grandes vantagens no uso de tais inseticidas é a possibilidade de proporcionar novos modos de ação, reduzindo o risco de resistência cruzada, uma vez que o uso de inseticidas sintéticos tem levado ao desenvolvimento de resistência em algumas pragas (GONZALEZ-COLOMA, *et al.*, 1993).

Além disso, os metabólitos secundários de plantas ainda possuem grandes potenciais para inspirar e influenciar a pesquisa agroquímica moderna. Certamente, poucos destes produtos naturais atingirão o mercado por si só, mas muitos deles

poderão servir de protótipos para produtos sintéticos, tais como os piretróides naturais, isolados de *Chrysanthemum cinerariaefolium*, serviram para os piretróides sintéticos.

A química de produtos naturais, quer seja baseada em plantas superiores, microorganismos ou outras fontes, é uma ciência muito difícil, mas não se tem dúvida de que a pesquisa a ela dedicada eventualmente será compensada pela descoberta de novas classes de substâncias e modelos estruturais que poderão num futuro, talvez não muito distante, ser utilizados para a aplicação industrial (BENNER, 1993).

Tendo em vista essas considerações, a observação da grande mortalidade de abelhas e outros insetos em flores de *Ochroma lagopus*, tanto no Estado de São Paulo (NOGUEIRA-NETO, 1970) quanto na região de Viçosa (PAULA *et al.*, 1997), foi a principal responsável pelo interesse no estudo desta planta, uma vez que o isolamento e a identificação de alguma substância ativa ampliaria o grupo de compostos naturais que poderiam ser utilizados como inseticidas.

Além disso, em virtude dos poucos estudos químicos realizados em plantas da família Bombacaceae, acreditou-se que o isolamento e a identificação de substâncias desta planta, ainda que estas não apresentassem atividade inseticida, poderiam contribuir de forma significativa para ampliar o conhecimento sobre os metabólitos secundários de plantas desta família, especificamente, de *O. lagopus*.

O presente trabalho é uma continuidade do estudo químico anterior de *O. lagopus* (PAULA, 1995) e tem como objetivos principais: concluir o estudo do extrato etanólico do caule que, até então, tinha sido apenas parcialmente analisado, realizar o estudo de extratos da casca e, posteriormente, submeter a testes biológicos tais extratos e as substâncias isoladas, a fim de verificar suas possíveis atividades inseticidas.

Pretendia-se, ainda, realizar um estudo do néctar floral desta planta a fim de isolar e identificar os constituintes diferentes de açúcares e aminoácidos protéicos e submetê-los a testes biológicos com insetos para verificar sua toxidez. No entanto,

devido ao pequeno período de sua floração e à escassez de flores no período de realização deste trabalho, esta etapa ficou prejudicada.

A segunda parte, apresentada no Capítulo II relata o estudo da síntese de amidas derivadas da piperina (piperamidas), que resultou na obtenção de dezesseis substâncias: N-etilpiperamida, N,N-dietilpiperamida, N-isopropilpiperamida, N,N-diisopropilpiperamida, N-butilpiperamida, N-isobutilpiperamida, N-pentilpiperamida, N-isopentilpiperamida, N-hexilpiperamida, N-decilpiperamida, N-cicloexilpiperamida, N-adamantilpiperamida, N-[2-(piperidin-1-il)etil]piperamida, N-(1-benzilpiperidin-4-il)piperamida, N-[2-(morfolin-4-il)etil]piperamida e N-[2-(piridin-2-il)etil]piperamida. Além disso, são apresentados os resultados dos testes de avaliação da atividade inseticida destas substâncias.

A atividade inseticida da piperina, primeira amida a ser isolada de espécies de *Piper* (PARMAR *et al.*, 1997), é bastante conhecida, sendo mais tóxica que o piretro para moscas domésticas.

A literatura relata várias sínteses de amidas análogas às derivadas do gênero *Piper*, tentando esclarecer a relação estrutura-atividade inseticida. Entretanto, poucos derivados sintéticos foram submetidos a testes biológicos (GBEWONYO *et al.*, 1993).

Assim, visando contribuir para um maior conhecimento da relação entre atividade biológica e a estrutura química de piperamidas, partiu-se para o estudo da ação inseticida das substâncias sintetizadas neste trabalho.

Alguns resultados interessantes foram observados, verificando-se uma certa especificidade da toxicidade, dependendo da espécie de inseto utilizada nos testes biológicos.

CAPÍTULO I

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE *Ochroma lagopus* SWARTZ

I.1. INTRODUÇÃO

I.1.1. Características Gerais da Família Bombacaceae

A família Bombacaceae (Malvales) possui cerca de 28 gêneros (*Adansonia*, *Aguiaria*, *Bernoullia*, *Bombacopsis*, *Catostemma*, *Cavanillesia*, *Ceiba*, *Chorisia*, *Coelostegia*, *Cullenia*, *Durio*, *Eriotheca*, *Gyranthera*, *Huberodendron*, *Kostermansia*, *Neesia*, *Neobuchia*, *Ochroma*, *Pachira*, *Phagmotheca*, *Pseudobombax*, *Quararibea*, *Rhodognaphalon*, *Rhodognaphalopsis*, *Salmalia* (ou *Bombax*), *Scleronema*, *Septotheca* e *Spirotheca*) e 200 espécies, distribuídas exclusivamente em regiões tropicais (JOLY, 1991). Dentre as espécies, somente *Bombacopsis glabra*, *Ceiba pentandra*, *Chorisia speciosa*, *Eriotheca candolleana*, *Eriotheca gracilipes*, *Eriotheca pubescens*, *Ochroma lagopus*, *Pachira aquatica* e *Pseudobombax grandiflorum* são nativas do Brasil (LORENZI, 1992).

São plantas arbóreas, geralmente com tronco bastante engrossado, com folhas grandes, em geral digitadas ou inteiras, alternas com estípulas caducas. Apresentam flores grandes e vistosas, cíclicas, axilares, em geral pentâmeras, diclamídeas, hermafroditas e de simetria radial, e frutos secos, capsulares loculicida. Suas sementes são em geral oleaginosas, cobertas por pêlos originados da parede interna do endocarpo, que auxiliam a dispersão pelo vento (JOLY, 1991).

I.1.2. A Química da Família Bombacaceae

Apesar da importância econômica de algumas espécies, tais como aquelas dos gêneros *Ochroma*, *Ceiba* e *Durio*, pouco é conhecido sobre a fitoquímica de membros desta família (GIBBS, 1974; RAFFAUF *et al.*, 1984; SCOGIN, 1986). Dos vinte e oito gêneros pertencentes a esta família (JOLY, 1991), apenas dez deles são registrados na literatura com algum tipo de estudo químico: *Quararibea*, *Durio*, *Adansonia*, *Salmalia* (ou *Bombax*), *Ceiba*, *Pseudobombax*, *Chorisia*, *Pachira*, *Bombacopsis* e *Ochroma*.

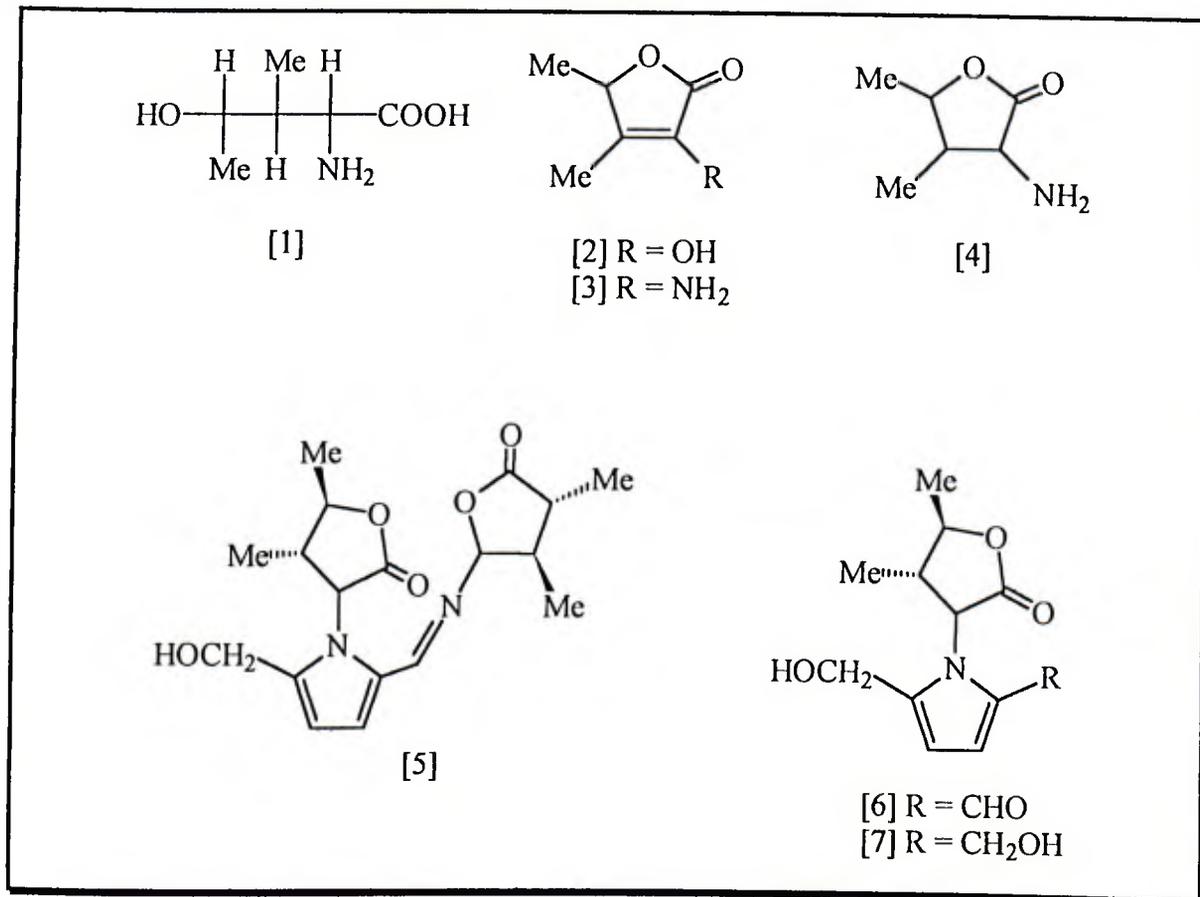
Uma breve revisão sobre os estudos químicos realizados em cada espécie da família Bombacaceae será apresentada a seguir, onde cada gênero é descrito separadamente.

I.1.2.1. Gêneros Estudados

I.1.2.1.1. *Quararibea*

As flores de *Q. funebris*, fortemente odoríferas, são usadas desde o período pré-Colombiano como um aditivo às bebidas de chocolate. Na medicina folclórica é conhecida como “*flor de cocoa*”, sendo usada para controlar temores psicopáticos, regular menstruação e como remédio para tosse (RAFFAUF *et al.*, 1984; ZENNIE *et al.*, 1986; ZENNIE *et al.*, 1990). Existe ainda alguma evidência de que as flores podem ser alucinógenas (ZENNIE *et al.*, 1986).

Das flores de *Q. funebris* foram isolados o aminoácido (2S,3S,4R)- γ -hidroxi-isoleucina [1], as lactonas [2-4] e os alcalóides pirrólicos funebrina [5] (RAFFAUF *et al.*, 1984), funebral [6] (ZENNIE *et al.*, 1986) e funebradiol [7] (ZENNIE *et al.*, 1990). Os compostos [2] a [7] são biogeneticamente derivados da γ -hidroxi-isoleucina.



I.1.2.1.2. *Durio*

Durio zibethinus Murr. é uma árvore frutífera conhecida popularmente como “durião da Ásia” (JOLY, 1991). Seu fruto é comestível e bastante comercializado, podendo medir até 30 cm de diâmetro e pesar até 7 kg (PEREZ-ARBELAEZ, 1956). A sua polpa é muito saborosa, o que justifica ser considerado o fruto mais apreciado do Oriente e “o melhor do mundo”, porém possui um desagradável odor aliáceo predominante ou de cebolas podres. Suas sementes são igualmente comestíveis e sobretudo consideradas como afrodisíacas (PIO CORREA, 1984).

Uma análise dos constituintes voláteis deste fruto foi realizada por BALDRY *et al.* (1972), revelando a presença de mais de vinte compostos, incluindo diferentes ésteres, tioésteres e tióis. Foram caracterizados metanotiol, etanotiol, propanotiol, dimetiltioéter, dietiltioéter, sulfeto de hidrogênio, dissulfeto de dietila, metanol, etanol, propan-1-ol, 3-metilbutan-1-ol, acetaldeído, propionaldeído, acetato de

metila, acetato de etila, propionato de metila, propionato de propila, isobutirato de etila, butirato de etila, α -metilbutirato de metila, α -metilbutirato de etila, α -metilbutirato de propila, isovalerato de etila, metacrilato de etila e etilbenzeno.

Em outro estudo deste mesmo fruto, realizado por WONG e TIE (1995), sessenta e três constituintes voláteis foram identificados, compreendendo trinta ésteres, dezesseis compostos contendo enxofre, cinco cetonas, oito alcanos e quatro outros. Entre estes, foram identificados compostos voláteis não muito comuns em plantas, tais como *cis*- e *trans*-3,5-dimetil-1,2,4-tritriolano e S-alquil-ésteres de ácidos alquiltiocarboxílicos.

I.1.2.1.3. *Adansonia*

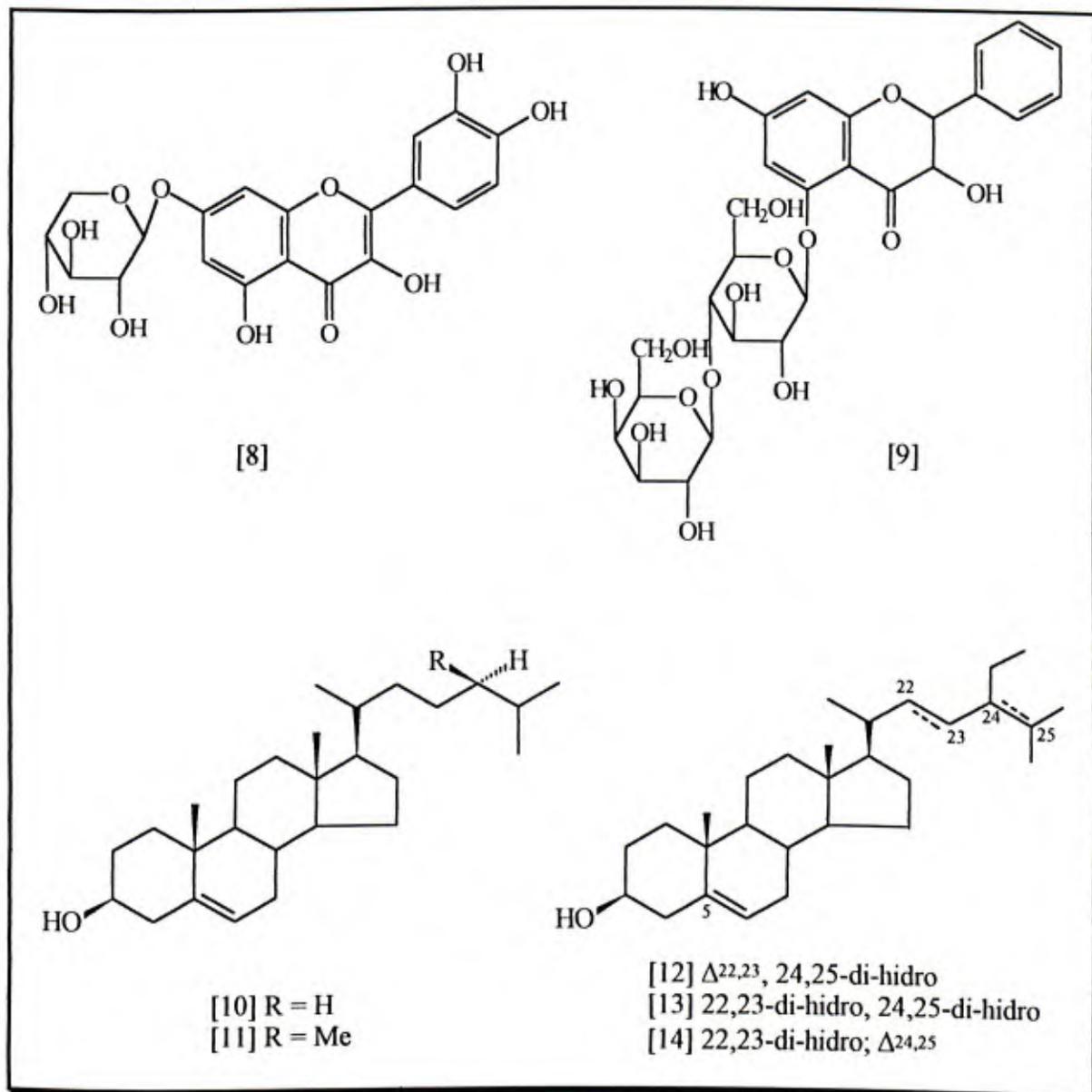
O gênero *Adansonia*, comumente conhecido como “baobab” compreende oito espécies (RAMADAN *et al.*, 1994; BIANCHINI *et al.*, 1982), das quais seis são endêmicas em Madagascar (*A. grandidieri*, *A. fony*, *A. za*, *A. madagascariensis*, *A. suarezensis* e *A. perrieri*), uma na África (*A. digitata*) e uma na Austrália (*A. gregorii*) (BIANCHINI *et al.*, 1982). Dentre estas espécies, a mais estudada tem sido *A. digitata*.

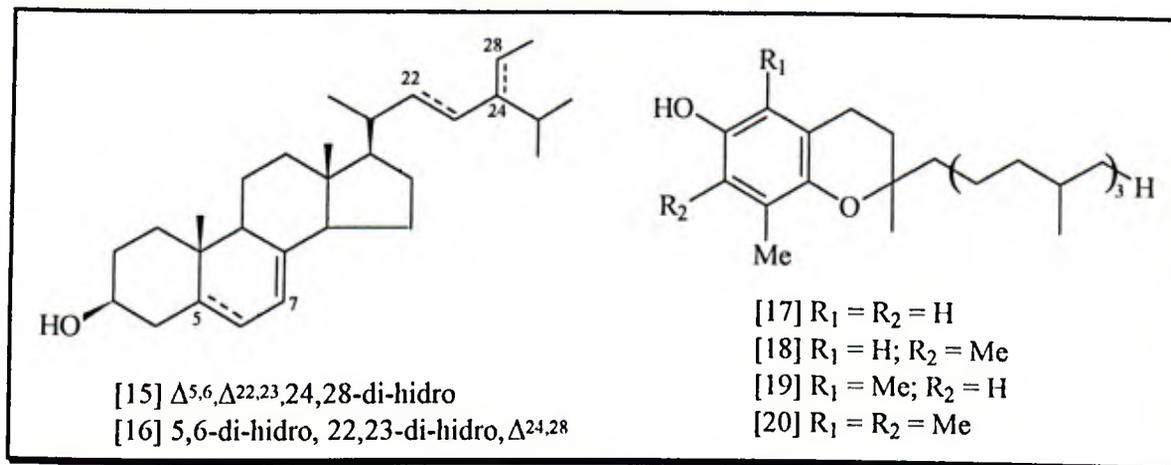
A. digitata é usada na medicina tradicional tanto como antipirético, adstringente na diarreia e disenteria, quanto como substituta da cinchona em várias preparações medicinais (RAMESH *et al.*, 1992; RAMADAN *et al.*, 1994). Além disso, suas atividades anti-inflamatória, analgésica e antipirética foram comprovadas por RAMADAN *et al.* (1994).

Com relação aos seus constituintes químicos, do caule foi isolada quercetina 7-O- β -D-xilopiranosídeo [8] (CHAUHAN *et al.*, 1982) e das raízes, 3,7-di-hidroxi-flavan-4-ona-5-O- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosídeo [9] (CHAUHAN *et al.*, 1984), além dos ácidos graxos palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico (RAMESH *et al.*, 1992).

Um “screening” fitoquímico da polpa de seu fruto revelou a presença de taninos, esteróides, triterpenos, saponinas e carboidratos (RAMADAN *et al.*, 1994).

As sementes de *A. digitata* também foram estudadas, juntamente com as sementes de outras cinco espécies deste gênero (*A. grandidieri*, *A. za*, *A. fony*, *A. madagascariensis* e *A. suarezensis*). Nas seis espécies foram identificados os esteróides colesterol [10], campesterol [11], estigmasterol [12], β -sitosterol [13], isofucosterol [14], Δ^7 -estigmasterol [15] e Δ^7 -avenasterol [16]; os tocoferóis δ -, γ - e β -tocoferol [17 a 19]; vários alcanos de cadeia longa e o esqualeno. O α -tocoferol [20] também foi identificado em quatro das seis espécies estudadas, estando ausente apenas em *A. za* e *A. fony* (BIANCHINI *et al.*, 1982).

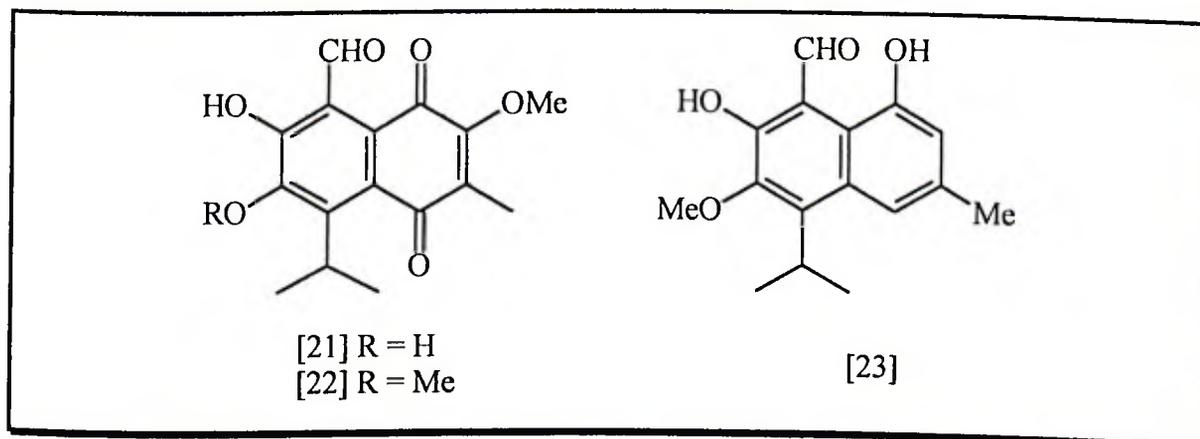




I.1.2.1.4. *Salmalia*

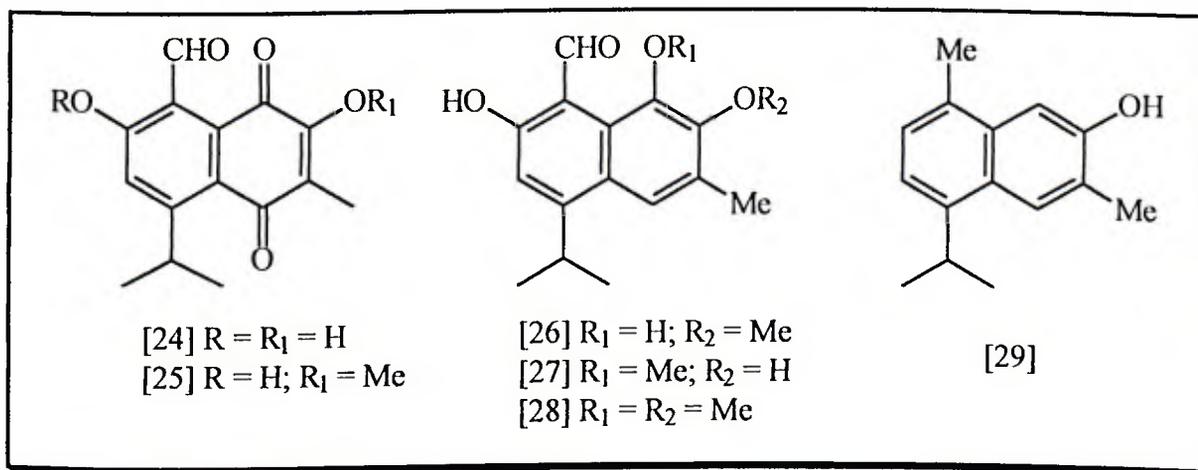
Neste gênero a única espécie estudada é *Salmalia malabaricum* [sin. *Salmalia malabarica*, *Bombax malabaricum*], uma planta bastante utilizada em preparações medicinais indígenas (CHAUHAN *et al.*, 1980). As raízes desta planta possuem ação estimulante e são utilizadas como ingrediente essencial em preparados afrodisíacos, administrados em casos de impotência (SOOD *et al.*, 1982).

Nos primeiros estudos químicos da casca da raiz desta planta foi proposta a presença das naftoquinonas [21] e [22] (SESHADRI *et al.*, 1971) e do naftol [23] (SESHADRI *et al.*, 1973).



Posteriormente, BELL *et al.* (1978) em estudos comparativos entre os gêneros *Gossypium* (Malvaceae) e *Bombax* (ou *Salmaalía*) revisaram as estruturas dessas naftoquinonas e do naftol, sugerindo que fossem substituídas por [24], [25] e [26], respectivamente, pois estas explicariam melhor os dados de UV e RMN de ^1H obtidos.

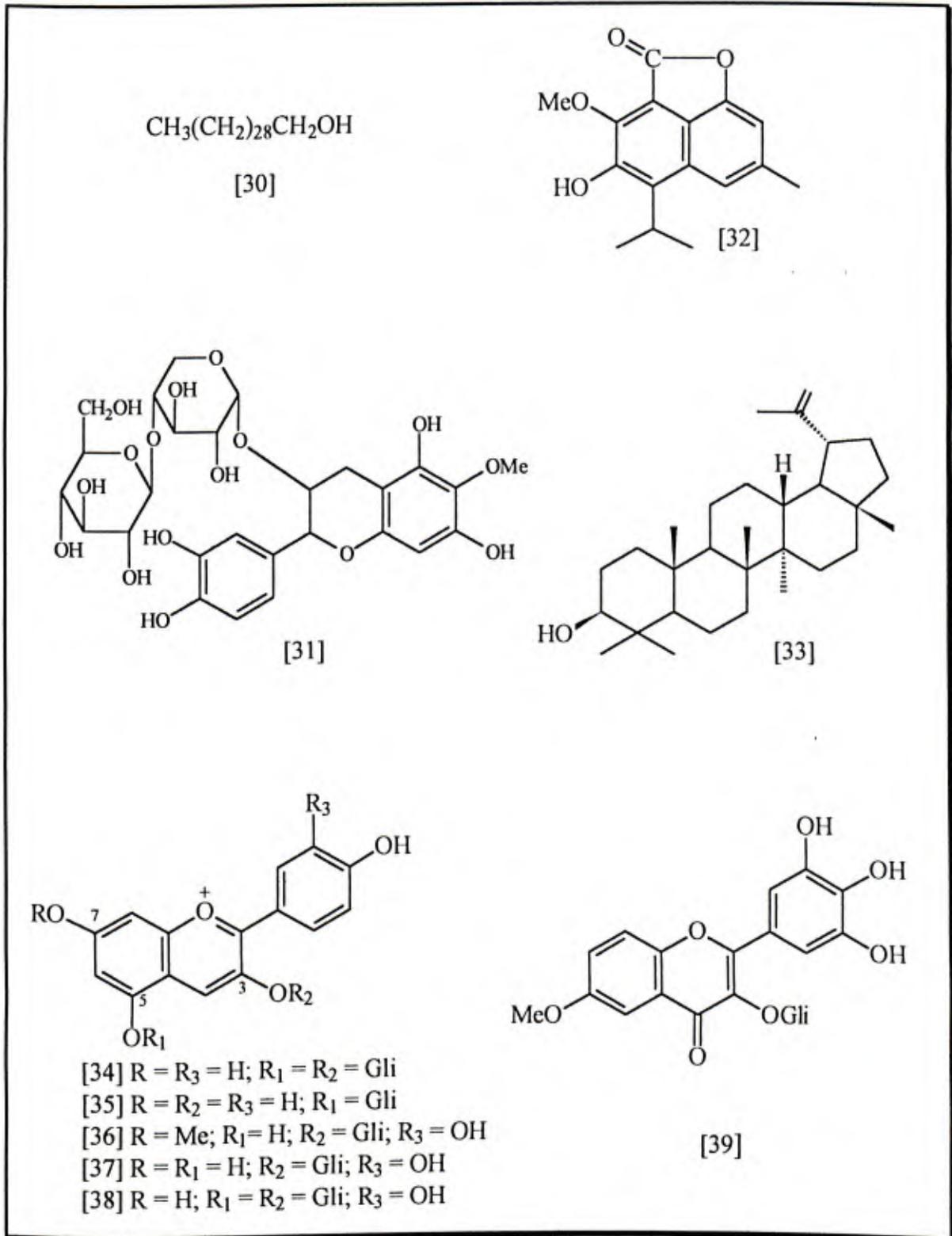
Na continuação do estudo da casca da raiz de *S. malabaricum*, SANKARAM *et al.* (1981) isolaram e identificaram uma naftoquinona [25], denominada 8-formil-7-hidroxi-5-isopropil-3-metil-2-metoxi-1,4-naftoquinona, confirmando a estrutura proposta por BELL *et al.* (1978). Além disso, identificaram outros três compostos fenólicos [27], [28] e [29].



Das raízes desta planta ainda foram isolados β -sitosterol [13], triacontan-1-ol [30], a flavana glicosilada caracterizada como 5,7,3',4'-tetraidroxi-6-metoxiflavana-3-O- β -D-glicopiranosil- α -D-xilopiranosídeo [31] (CHAUHAN *et al.*, 1980) e a lactona sesquiterpênica 6-hidroxi-5-isopropil-3-metil-7-metoxi-8,1-naftaleno-carbolactona [32] (SOOD *et al.*, 1982).

Das cascas do caule foram isolados β -sitosterol [13] e lupeol [33] (MUKERJEE *et al.*, 1971), e das flores as antocianinas pelargonidina 3,5-diglicosídeo [34] (RIZK *et al.*, 1989), pelargonidina 5-glicosídeo [35], cianidina 7-O-metil-3-glicosídeo [36] (NIRANJAN *et al.*, 1973), cianidina 3-glicosídeo [37] e

cianidina 3,5-diglicosídeo [38] (SCOGIN, 1986), além da flavona glicosilada [39] (RIZK *et al.*, 1989).



I.1.2.1.5. *Ceiba*

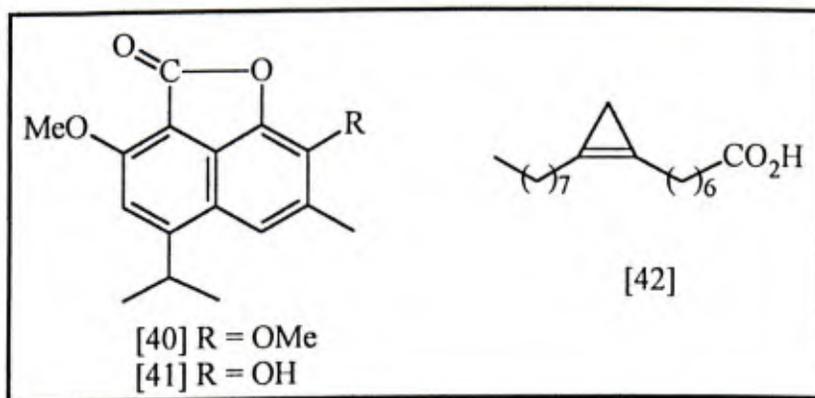
Apenas duas espécies deste gênero foram estudadas sob o ponto de vista químico: *Ceiba pentandra* e *Ceiba acuminata*.

C. pentandra Gaertner [sin. *Bombax pentandrum* L.] é uma árvore encontrada em todas regiões mais quentes, ocidentais e meridionais da Índia (RAO *et al.*, 1993), bem como em todo trópico americano (PEREZ-ARBELAEZ, 1956). É usada como diurético (RAO *et al.*, 1993), sendo o chá de suas cascas empregado para fortalecer os cabelos, após repetidos banhos. Esse mesmo chá é fornecido às vacas após o parto, para expulsão da placenta (PEREZ-ARBELAEZ, 1956).

Comercialmente, a lã sedosa que envolve sua semente, conhecida como “kapok”, é de grande importância, sendo usada como matéria-prima para fabricação de colchões, travesseiros, almofadas etc. (PEREZ-ARBELAEZ, 1956).

A casca da raiz de *C. pentandra* teve o seu primeiro estudo químico realizado por RAO *et al.* (1993), que isolaram e identificaram as lactonas sesquiterpênicas 5-isopropil-3-metil-2,7-dimetoxi-8,1-naftalenocarbolactona [40] e 2-hidroxi-5-isopropil-3-metil-7-metoxi-8,1-naftalenocarbolactona [41], além dos compostos [25] e [29].

Do óleo de sementes de *C. pentandra* foi isolado o ácido malvático ou “bombácico” [42] (GIBBS, 1974).



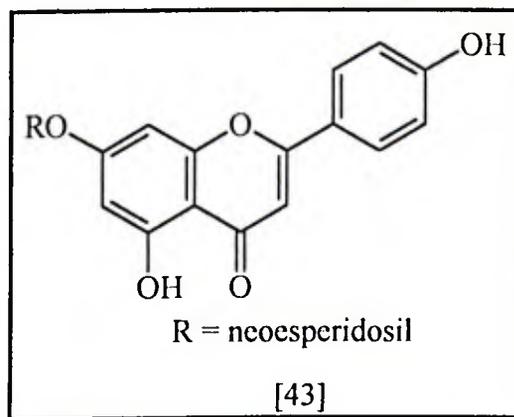
O único estudo realizado sobre a composição química de *C. acuminata* resultou na identificação da cianidina 3-glicosídeo [37], como um de seus pigmentos florais (SCOGIN, 1986).

I.1.2.1.6. *Pseudobombax*

O único estudo químico realizado com as espécies *P. ellipticum* e *P. grandiflorum* resultou na caracterização dos pigmentos cianidina 3-glicosídeo [37] e cianidina 3,5-diglicosídeo [38], a partir das flores (SCOGIN, 1986).

I.1.2.1.7. *Chorisia*

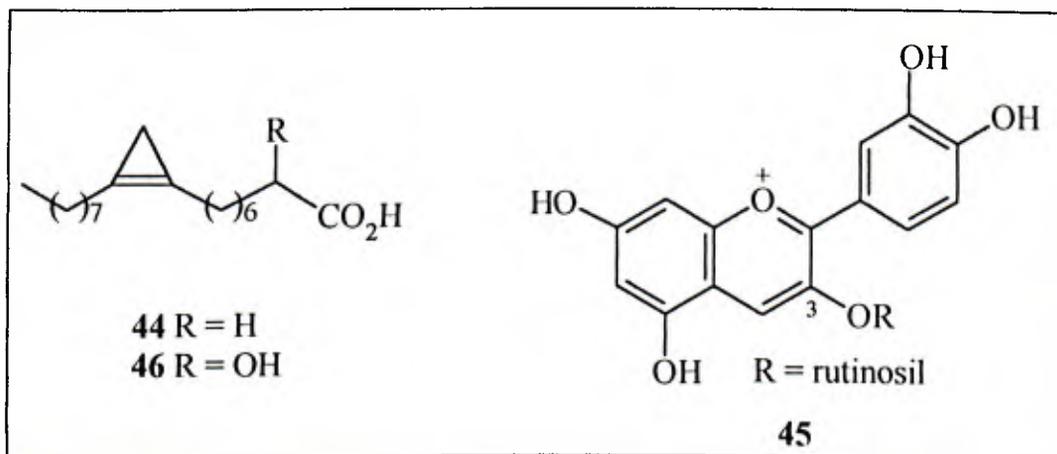
Sobre o gênero *Chorisia*, também foram realizados poucos estudos químicos. São relatados apenas o isolamento e identificação de apigenina-7-neoesperidosídeo (roifolina) [43] de folhas das espécies *C. insignis*, *C. speciosa*, *C. pubiflora* e *C. crispiflora* (COUSSIO, 1964) e das antocianinas florais cianidina 3-glicosídeo [37] e 3,5-diglicosídeo [38] de *C. speciosa* (SCOGIN, 1986).



I.1.2.1.8. *Pachira*

Os únicos estudos sobre a constituição química de espécies deste gênero relatam a presença dos ácidos palmítico (RIZK *et al.*, 1989) e estercúlico [44]

(GIBBS, 1974) como constituintes do óleo de sementes de *P. aquatica* [sin. *Bombax aquaticum*], das antocianinas cianidina 3-glicosídeo [37] e cianidina 3-rutinosídeo [45] de flores desta mesma espécie (SCOGIN, 1986), além do ácido 2-hidroxiestercúlico [46], de sementes de *P. insignis* (GIBBS, 1974).



I.1.2.1.9. *Bombacopsis*

Neste gênero foi relatada apenas a presença do ácido 2-hidroxiestercúlico [46], no óleo de sementes de *Bombacopsis glabra* (GIBBS, 1974).

I.1.2.1.10. *Ochroma*

A este gênero pertence uma única espécie, denominada *Ochroma lagopus* Swartz (GREENHOUSE, 1935).

Suas flores (Figura I.1a) são responsáveis por grande mortalidade de insetos, principalmente abelhas (Figura I.1b), na região de Viçosa, MG (PAULA, 1995; PAULA *et al.*, 1997). Informações prévias de mortalidade de abelhas em flores de *O. lagopus*, no Estado de São Paulo, já haviam sido relatadas por NOGUEIRA-NETO (1970).

Com relação à constituição química das flores desta espécie, foi constatada a presença do pigmento cianidina 3-glicosídeo [37] no cálice (SCOGIN, 1986); dos

carboidratos glicose, frutose e sacarose; além dos aminoácidos protéicos lisina, histidina, ácido aspártico, asparagina, treonina, serina, glicina, ácido glutâmico, glutamina, alanina, cistina, valina, metionina, isoleucina e fenilalanina, no néctar. No pólen, além destes aminoácidos, foram ainda identificados arginina, prolina e tirosina (PAULA, 1995 e PAULA *et al.*, 1997).



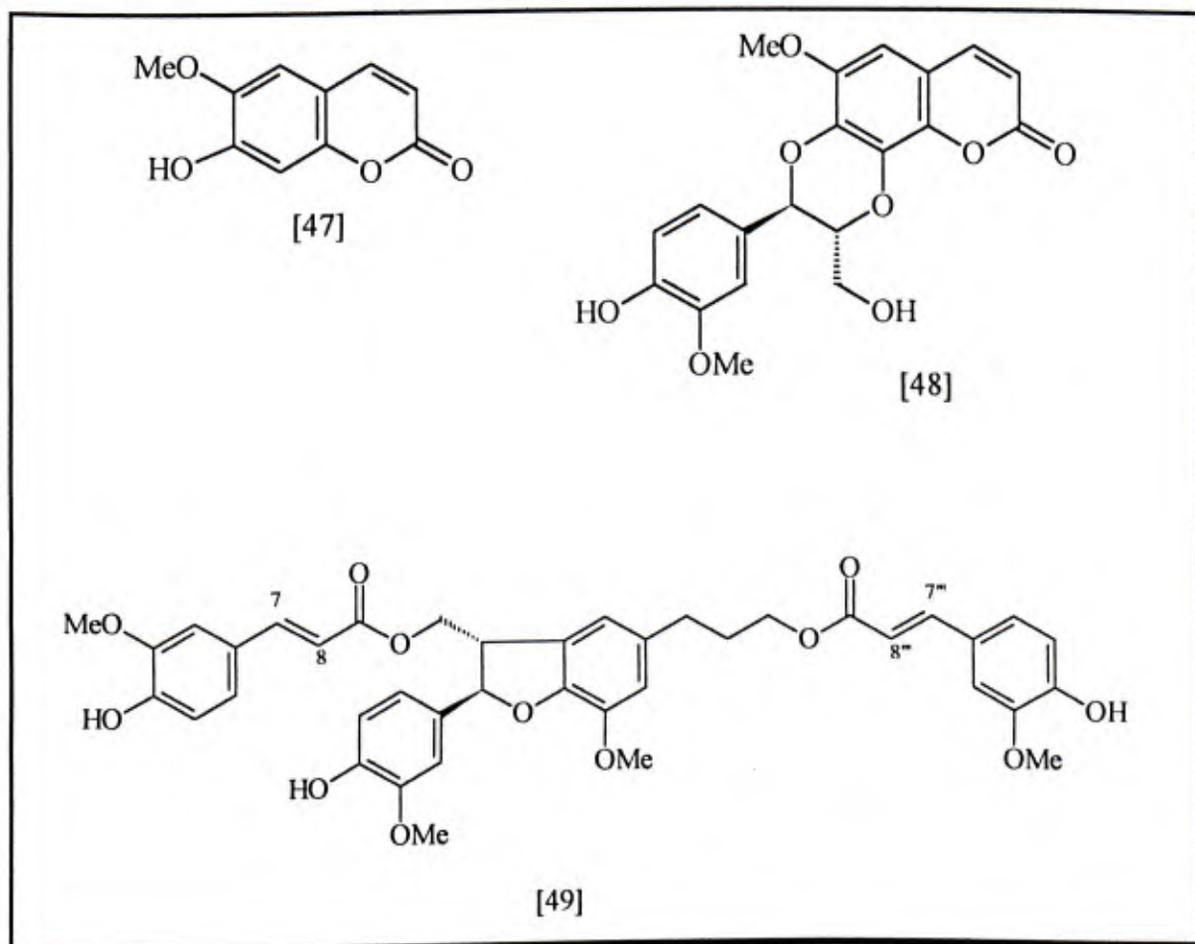
a)

Figura I.1. a) Flor de *Ochroma lagopus*.

b)

b) Corte longitudinal mostrando algumas abelhas mortas.

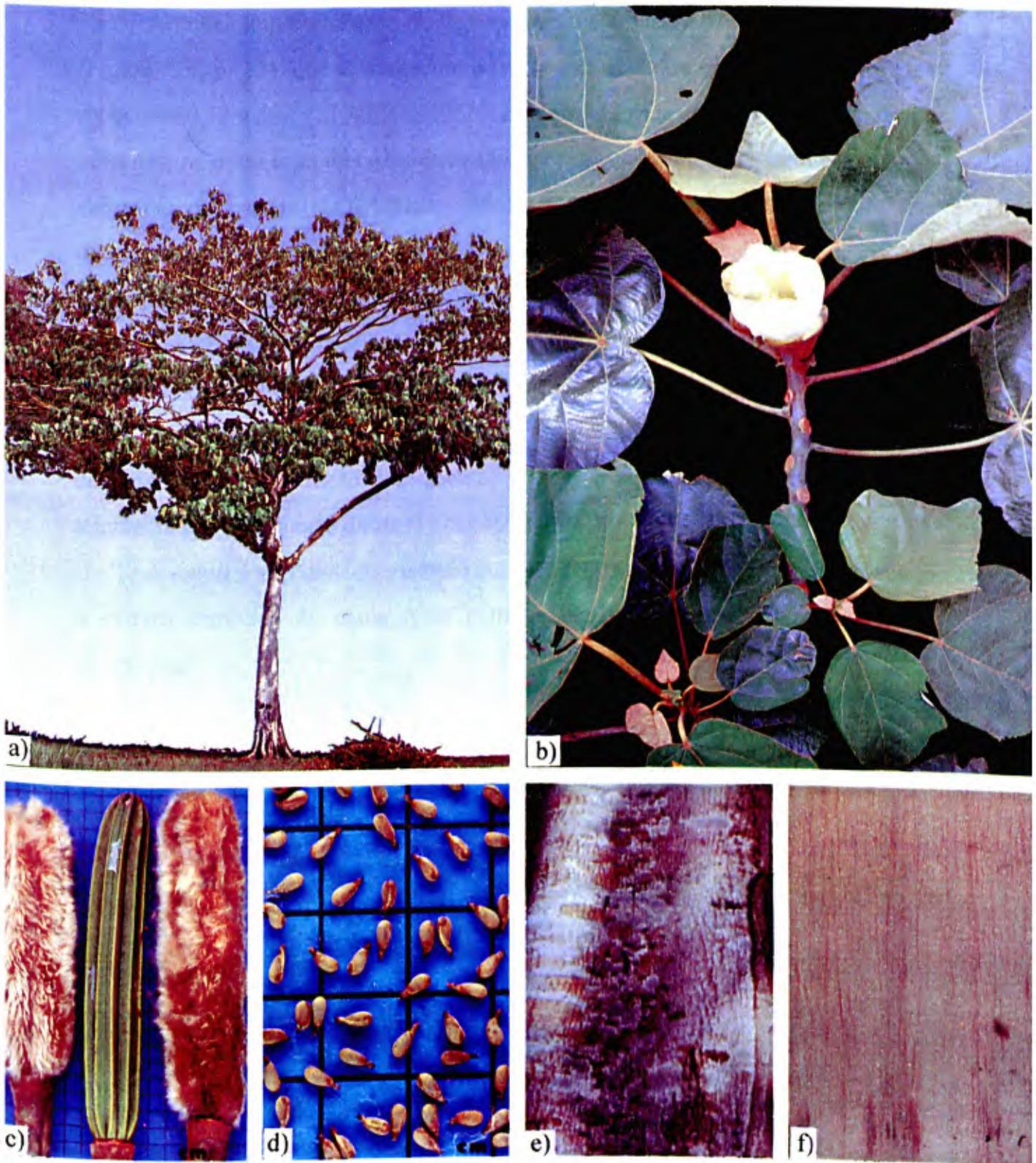
O extrato hexânico do caule de *O. lagopus* também foi estudado, resultando no isolamento e identificação dos ácidos palmítico e oléico, de triacilgliceróis derivados dos ácidos palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico, além dos esteróides estigmasterol [12] e β -sitosterol [13]. Do extrato etanólico foram isolados e identificados três compostos pertencentes a três classes de produtos naturais (cumarina, cumarinolignana e lignana) ainda não verificadas em plantas da família Bombacaceae. São eles, a cumarina escopoletina [47], a cumarinolignana cleomiscosina A [48] e a lignana “boehmenan” [49] (PAULA, 1995; PAULA *et al.*, 1996).



1.1.3. Descrição Botânica, Caracterização e Utilização de *Ochroma lagopus*

A planta conhecida popularmente como pau de balsa, pata de lebre, pau de jangada, balso (Brasil), balsa (Brasil, Equador e Filipinas), topa (Peru), guano (Cuba), miraguano (São Domingos), palo de lamo (Venezuela), tauri (Bolívia) e "Bob-wood" (Inglaterra) (PIO CORREA, 1984) foi descrita cientificamente como *Ochroma lagopus*, por Olaf Swartz em 1788 (GREENHOUSE, 1935), sendo a única espécie pertencente ao gênero *Ochroma* (BAKER *et al.*, 1968). Portanto, quaisquer nomes diferentes deste, tais como *Ochroma pyramidale* (Cav.) Urb., *O. obtusa* Rowlee, *O. glandiflorum* Rowlee, *Bombax angulata* Moc. e Sessé, *Bombax pyramidale* Cav. ex Lam., passaram a ser considerados sinônímia.

O. lagopus é caracterizada como uma árvore de desenvolvimento muito rápido, podendo atingir até 30 metros de altura (Figura I.2a, p. 23). Apresenta raízes pobremente desenvolvidas, grossas e arredondadas, possui caule cilíndrico, com ramificação monopodial alternada em indivíduos jovens e simpodial nos adultos. Sua casca é geralmente de cor parda, lisa em indivíduos jovens, finamente estriada transversal e longitudinalmente nos adultos; lenticelada, sendo as lenticelas equidimensionais e ligeiramente alargadas, distribuídas irregularmente, ou em linhas verticais descontínuas (Figura I.2e, p. 23). Suas folhas são simples, alternas, cordiformes inteiras a lobadas, com 35 cm de largura ou mais, cor verde na face superior e ferruginosa na face inferior, pecíolo e ápice do ramo terminal (Figura I.2b, p. 23). Suas flores são mucilaginosas, com até 20 cm de altura (Figura I.1a, p. 20), solitárias, axilares e subterminais (Figura I.2b, p. 23); o cálice possui cinco sépalas de forma variada: duas triangulares e três em forma de leque, cinco pétalas de cor branca e consistência carnosa (KROLL e RIOS, 1992); e o fruto é deiscente pentavalvar alargado (28 x 3 cm) e possui valvas lenhosas: a lanosidade interna é abundante, de cor marrom (Figura I.2c, p. 23), com pequenas sementes imersas em seu interior, com forma de "patas de cabra" (Figura I.2d, p. 23), que é o significado de *lagopus* (PEREZ-ARBELAEZ, 1956).



Fonte: LORENZI, 1992.

FIGURA 1.2 - Ilustração de *Ochroma lagopus*: a) Árvore, b) Ramo com Folhas e Flor, c) Fruto com Lanosidade Abundante, d) Sementes, e) Caule com Casca e f) Madeira.

A maior importância de *O. lagopus* está na comercialização de sua madeira (Figura I.2f, p. 23), que é conhecida como a menos densa do mundo, com massa específica $0,12 \text{ g.cm}^{-3}$ (SCHERY, 1956). É muito utilizada na fabricação de barcos e jangadas, na confecção de bóias salva-vidas, brinquedos, isolantes térmicos e como substituta da cortiça (LORENZI, 1992). Suas cascas são utilizadas com fins medicinais. Nas Guianas e na Amazônia são tidas como eméticas (HUEK, 1972) e seus chás também são fornecidos às vacas, após o parto, para expulsão da placenta (PEREZ-ARBELAEZ, 1956). A paina do fruto é bastante usada para enchimento de almofadas e travesseiros (HUEK, 1972).

A árvore ainda é útil para plantios mistos destinados à recomposição de áreas degradadas de preservação permanente, graças ao seu rápido desenvolvimento e tolerância à luminosidade direta (LORENZI, 1992).

A seguir é apresentado o estudo químico realizado neste trabalho, envolvendo o extrato etanólico do caule e os extratos hexânico e etanólico da casca de *O. lagopus*.

I.2. PARTE EXPERIMENTAL

I.2.1. Materiais e Métodos

- 1- Para todas as separações cromatográficas em coluna, foi utilizada sílica gel 60 (de 70 a 230 Mesh-ASTM, Merck).
- 2- Para todas análises cromatográficas em camada delgada (CCD), utilizaram-se placas de sílica gel 60 F₂₅₄, da Merck, de 0,25 mm de espessura.
- 3- Como reveladores foram utilizadas radiação ultravioleta ($\lambda=254$ e 365 nm) e solução de ácido fosfomolibdico (12 g de $2\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 20\text{MoO}_3 \cdot 48\text{H}_2\text{O}$ / 250 mL de EtOH; CASEY *et al.*, 1990).
- 4- Todas as frações foram concentradas à pressão reduzida, utilizando-se evaporador rotatório.
- 5- As temperaturas de fusão foram determinadas em bloco de Kofler R. Winkel Sottingen, Modelo 17717, com as devidas correções.

6- As análises de ácidos e ésteres graxos foram realizadas em Cromatógrafo a Gás Shimadzu GC 17-A, equipado com injetor automático AOC-17 e detector de ionização de chama (FID) acoplado a um registrador e integrador (microcomputador) C-R7A Shimadzu. A coluna utilizada foi uma capilar LM 100 de 30 m x 0,32 mm (di). O fluxo do gás de arraste (N₂) foi 1,1 mL/min. As temperaturas foram: do injetor, 240 °C, do detector, 280 °C e da coluna, 225 °C isotérmica. A razão de “split” foi de 1/10 e a purga de 5 mL/min.

7- As análises dos açúcares, na forma de seus alditois-acetatos foram realizadas em Cromatógrafo a Gás Shimadzu GC 14-A, equipado com detector de ionização de chama (FID) acoplado a um registrador e integrador Chromatopac C-R6A da Shimadzu, do Laboratório de Pesquisa do Prof. Eduardo Euclides Borges (Silvicultura), Departamento de Engenharia Florestal - UFV. A coluna utilizada foi uma SP 2330 (empacotada) de 2,1 m x 2 mm (di). O fluxo do gás de arraste (N₂) foi 20 mL/min. As temperaturas foram: do injetor, 250 °C, do detector, 250 °C e da coluna, 200 °C isotérmica durante 10 minutos e, então, programada na razão de 1 °C/min, até atingir a temperatura máxima de 220 °C, permanecendo isotérmica durante 10 min.

8- A análise cromatográfica, por CLAE, das frações CE(14)19, CE(16)35 e CE(16)41 do caule, foi realizada no Laboratório de Pesquisa do Professor Gulab N. Jham, Departamento de Química - UFV. O sistema consistiu de uma bomba modelo GBCLC 1150 e de um detector UV variável CG 435, operando a 290 nm, acoplado a um registrador CG e integrador/processador modelo CG-100. A coluna utilizada foi de sílica (30 cm x 4 mm di) e a fase móvel, uma mistura de diclorometano: acetato de etila (3:1, v/v), contendo 1% de HCOOH, a um fluxo de 0,7 mL/min.

9 (a) - A separação cromatográfica dos constituintes do caule por CLAE reciclante (CLAER) em escala semi-preparativa foi realizada no Laboratório de Produtos

Naturais do Departamento de Química - UFSCar, São Carlos. O sistema consistiu de uma bomba LC-6AD e um detector SPD-6AV, operado a 290 nm, ambos da Shimadzu, um injetor 7125 Rheodyne com um “loop” de 500 µL e um registrador e integrador “chromatopac” C-R4A da Shimadzu. A separação foi realizada usando uma coluna de sílica (25 cm x 3,0 cm di) Shim-Pack e uma mistura de diclorometano: acetato de etila (3:1, v/v) como fase móvel, a um fluxo de 3 mL/min.

(b) Os cromatogramas analíticos das frações obtidas após separação em CLAE reciclante foram obtidos num sistema consistindo de uma bomba LC-10AD e um detector SPD-6AV, operado a 290 nm, ambos da Shimadzu, um injetor 7125 Rheodyne com um “loop” de 20 µL e um registrador e integrador chromatopac C-R6A da Shimadzu. A separação foi realizada usando uma coluna de sílica (25 cm x 4,6 mm di) Shim-Pack e a mesma mistura de solvente anteriormente citada, a um fluxo de 1 mL/min.

10- Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrômetro Mattson Instruments FTIR, no Departamento de Química - ICEx - UFMG, Belo Horizonte.

11- Os espectros de ressonância magnética nuclear a 400 MHz foram obtidos na Universidade de Warwick, Inglaterra, em um aparelho Bruker WM 400 e no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução (LAREMAR) do Departamento de Química - ICEx - UFMG, Belo Horizonte, em um aparelho Bruker DRX 400.

12- Os espectros de massas foram registrados em um espectrômetro V. G. ANALYTICAL ZAB-IF, no Departamento de Química da Universidade de Gales, País de Gales.

I.2.2. Preparo dos Extratos

Folhas (1,850 kg), casca (1,400 kg) e caule (3,850 kg) de *Ochroma lagopus* foram coletados no Setor de Dendrologia do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa - MG e, posteriormente, secados à temperatura ambiente e em estufa a 40 °C. Em seguida, foram moídos e submetidos a extrações sucessivas com hexano (ou benzeno) e etanol em aparelho tipo Soxhlet. Após as extrações, os solventes foram removidos à pressão reduzida em evaporador rotatório para obtenção dos extratos hexânicos (H) ou benzênicos (B) e etanólicos (E) de folhas (F), casca (Cc) e caule (C) de *Ochroma lagopus*, denominados FB, CcH (13,50 g), CH (11,34 g), FE, CcE (21,00 g) e CE (39,22 g), respectivamente.

I.2.3. Isolamento dos Constituintes Químicos

I.2.3.1. Caule

O extrato etanólico do caule de *O. lagopus* foi parcialmente estudado após sucessivos fracionamentos por cromatografia em coluna de sílica gel, conforme apresentado na Figura I.3 (p. 29). As frações destacadas em vermelho nesta figura, exceto OCE13, foram submetidas a separação em CLAE reciclante como descrito no item 9a (p. 26).

Estas frações foram submetidas à uma análise por CLAE, nas condições descritas no item 8 (p. 26), para verificar as melhores condições de separação e, então, submetidas à separação em CLAE reciclante, em escala semi-preparativa. Para as frações CE(16)35 e CE(16)41 foram feitas duas injeções, sendo cada uma de aproximadamente 95 mg/500µL de solvente, enquanto 60 mg da fração CE(14)19 foram injetados de uma única vez. Para separação de alguns de seus constituintes foram necessários cinco ciclos de aproximadamente 40 min cada, para a fração CE(16)41, oito ciclos para a fração CE(16)35 e cinco ciclos para a fração CE(14)19.

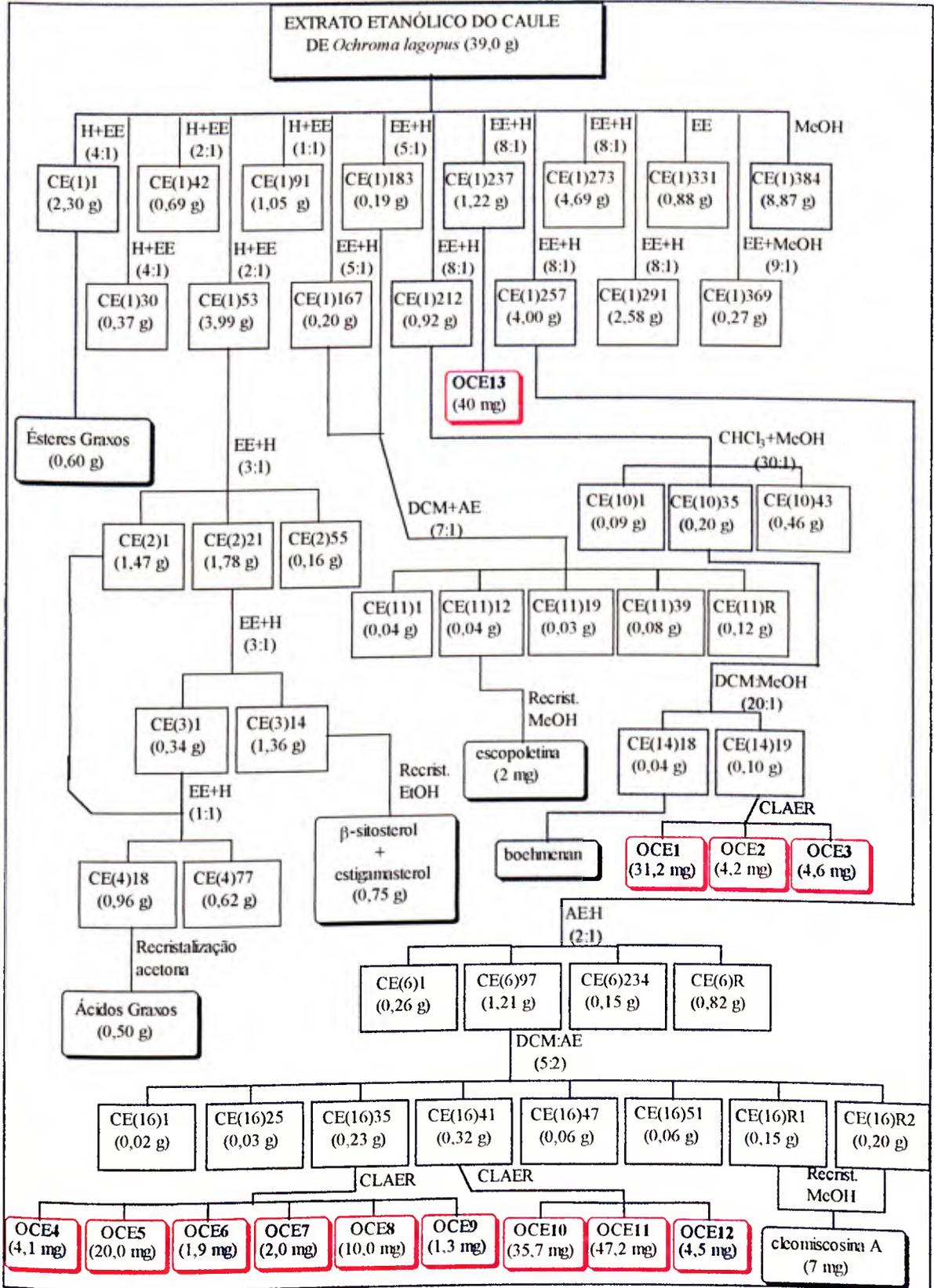


Figura I.3 - Esquema Simplificado do Fracionamento do Extrato Etanólico do Caule (CE) de *Ochroma lagopus*.

A fração CE(1)237 foi lavada várias vezes com acetona e recristalizada em MeOH, obtendo-se assim o composto cristalino OCE13, que teve sua temperatura de fusão determinada e foi identificado com base em seus espectros no IV, de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C , envolvendo as técnicas DEPT, COSY HH e nOediff.

1.2.3.2. Casca

1.2.3.2.1. Extrato Hexânico

O extrato hexânico (13,5 g) da casca (CcH) de *Ochroma lagopus* foi submetido a uma análise preliminar em CCD e depois a um fracionamento em coluna de sílica gel, iniciando-se a eluição com hexano:éter dietílico (4:1), com aumento gradativo da polaridade. Neste fracionamento foram coletadas um total de 220 frações, de aproximadamente 50 mL, cada. Estas frações foram analisadas por CCD e separadas em 12 grupos, de acordo com a semelhança entre os Rfs de seus constituintes. Para cada grupo de frações foi obtido o espectro no IV, a partir do que os oito primeiros grupos, constituídos das frações 1 a 114 (9,1 g; 67% do extrato) foram reunidos por constituírem misturas de ésteres e ácidos graxos. A mistura resultante (CcH(1)1-114) foi analisada para determinação de seus constituintes graxos.

1.2.3.2.1.1. Análise dos Ácidos Graxos e triacilglicerídeos das Frações CcH(1)1-114

A mistura de ácidos graxos e de triacilglicerídeos foi analisada por CG através dos respectivos ésteres metílicos, sendo o método de preparo destes derivados aquele descrito por JHAM *et al.* (1982).

Hidrólise: a 10 mg da amostra (CcH(1)1-114) contida em um tubo de ensaio adicionou-se 1 mL de solução de KOH em MeOH (0,5 mol.L⁻¹) e aqueceu-se por 5 min a 100 °C.

Esterificação: à solução obtida adicionaram-se 400 µL de HCl 36% : MeOH (4:1, v/v) e aqueceu-se novamente a 100 °C, por 5 min.

Extração dos ésteres metílicos: ao tubo resfriado adicionaram-se 2 mL de H₂O e, em seguida, os derivados obtidos foram extraídos com hexano (2 x 3 mL). Após a extração, a fase orgânica foi secada com MgSO₄ anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório. O resíduo obtido após completa remoção do solvente foi redissolvido em 1 mL de hexano e analisado por CG, nas condições descritas no item 6, p. 26.

I.2.3.2.2. Extrato Etanólico

O extrato etanólico foi submetido ao fracionamento em coluna cromatográfica em sílica gel. Um total de 410 frações de aproximadamente 100 mL foram coletadas e combinadas em 17 grupos de acordo com suas similaridades em cromatografia de camada delgada (CCD). Vários grupos foram novamente submetidos a cromatografia em coluna de sílica gel e/ou recristalizados para obtenção de substâncias puras e algumas misturas. Esta etapa é apresentada de forma resumida na Figura I.4 (p. 32), onde os destaques em vermelho indicam as frações analisadas.

As estruturas dos compostos foram elucidadas pela análise dos espectros no infravermelho (IV), de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H) e de carbono 13 (RMN de ¹³C) em uma e duas dimensões (1D e 2D) e pela temperatura de fusão (T_f).

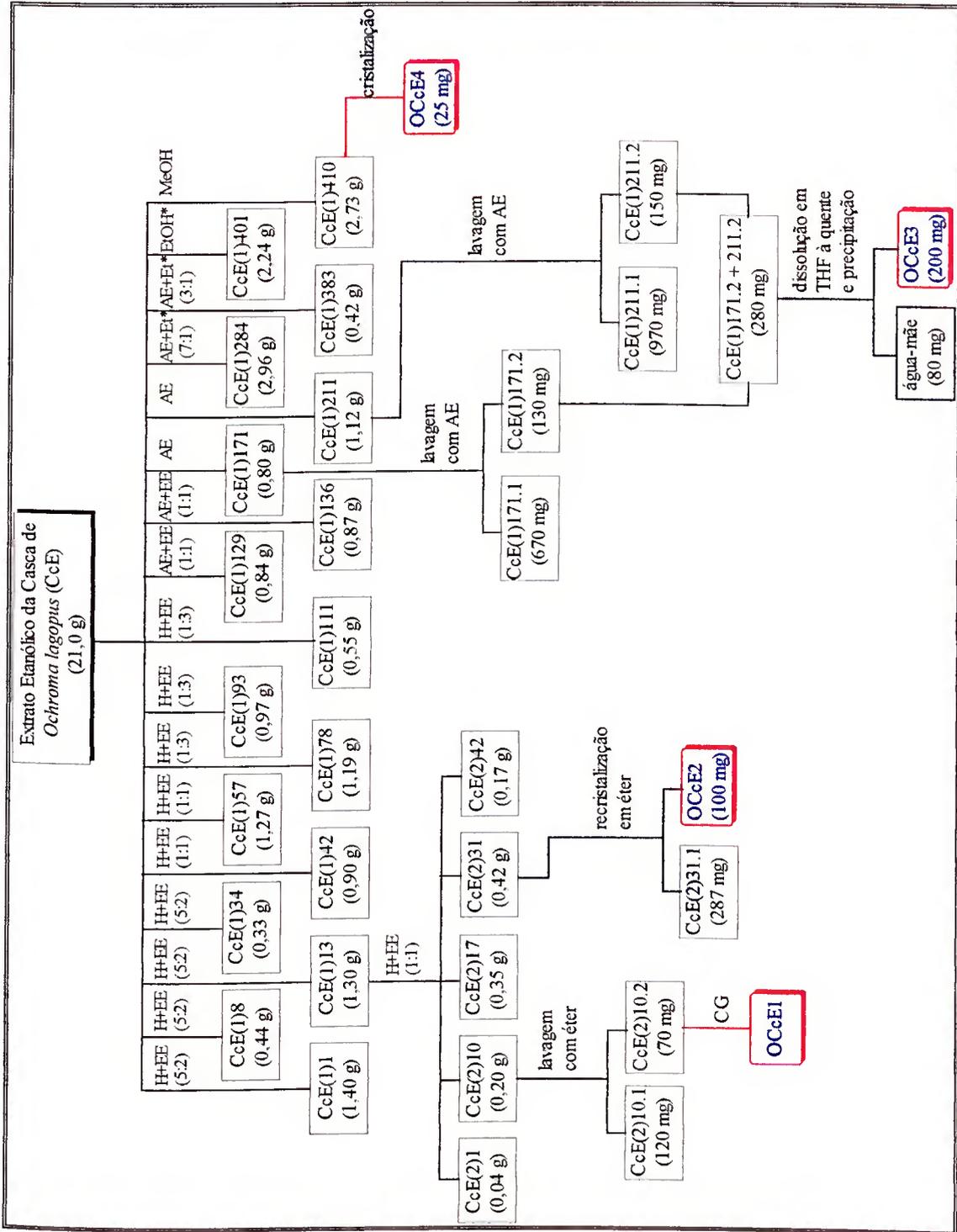


Figura I.4 - Esquema Simplificado do Fracionamento do Extrato Etanólico da Casca (CcE) de *Ochroma lagopus*.

I.2.3.2.2.1. Preparo dos Ésteres Metílicos dos Ácidos Graxos Presentes na Fração CcE(2)10.2

Os ácidos graxos livres foram analisados por meio de seus respectivos ésteres metílicos e o preparo destes derivados foi baseado no procedimento descrito por CHRISTIE (1987): 5 mg da amostra contidos em um tubo de ensaio foram dissolvidos em 0,3 mL de BF_3/MeOH (14% de BF_3 em metanol, Sigma). O tubo foi aquecido a 60 °C por 10 minutos e, então, resfriado, para posterior extração dos ésteres metílicos com hexano (2 x 3 mL). A fase orgânica foi separada, lavada com solução saturada de NaCl (2 x 5 mL), secada com Na_2SO_4 anidro e, finalmente, filtrada. A solução resultante foi concentrada à pressão reduzida, até completa remoção do solvente. Os ésteres metílicos obtidos foram redissolvidos em 1,0 mL de hexano e analisados por CG, nas condições descritas no item 6, p. 26.

I.2.3.2.2.2. Hidrólise dos Glicosídeos Presentes em OCcE3

OCcE3 (5 mg) contendo uma mistura de dois glicosídeos foi hidrolisada com 1 mL de MeOH : HCl 36% (1:1), a 100 °C por 15 minutos. O hidrolisado foi neutralizado com solução saturada de NaHCO_3 e o solvente evaporado. Extração com $\text{CHCl}_3:\text{H}_2\text{O}$ (1:1) (IRIBARREN, 1987) proporcionou a obtenção da fase orgânica contendo a aglicona e a fase aquosa contendo o açúcar, que foram comparados por CCD e CG, respectivamente, com amostras padrões.

I.2.3.2.2.3. Análise dos Açúcares por CG

O açúcar proveniente da hidrólise dos glicosídeos foi reduzido a seu respectivo alditol e, posteriormente, acetilado para identificação por CG. O procedimento utilizado foi aquele descrito por ENGLYST *et al.* (1984), com pequenas modificações.

1-Redução do Açúcar (obtenção do alditol): a 0,5 mL da fase aquosa resultante da hidrólise do glicosídeo adicionou-se NH_4OH 12 mol.L^{-1} (100 μL) em um tubo com tampa rosqueada, até o meio tornar-se básico. Em seguida, adicionaram-se 100 μL de NaBH_4 (50 mg.mL^{-1} de NH_4OH 3 mol.L^{-1}), uma gota de octan-2-ol e deixou-se o tubo a 40°C em banho de água, por 1 hora. Após a redução do açúcar, o excesso do NaBH_4 foi eliminado pela adição de ácido acético glacial ($\approx 100 \mu\text{L}$), até o meio tornar-se ácido.

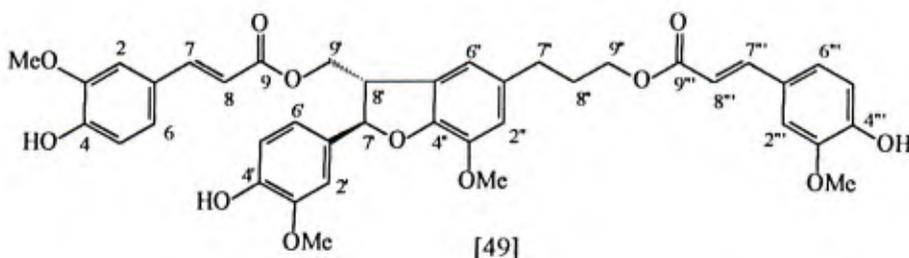
2-Acetilação do Alditol: à solução resultante da etapa 1 adicionaram-se 0,5 mL de 1-metilimidazol, 5,0 mL de anidrido acético, deixando a solução em repouso à temperatura ambiente por 10 min. Após este tempo, adicionou-se 1 mL de etanol, seguido de agitação e repouso por 5 min, mantendo-se o tubo sempre fechado. Em seguida, adicionaram-se 4 mL de água. Ao tubo, em banho de gelo, adicionaram-se 4 mL de KOH $7,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e, depois de alguns minutos, mais 4 mL de KOH $7,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Finalmente, o tubo foi agitado por inversão para separação das duas fases. Para melhor visualizar a separação das duas fases, foi adicionada uma gota de solução de azul de bromofenol 0,4% (em etanol). A fase orgânica foi então removida com auxílio de micro-pipeta e analisada por CG, nas condições descritas no item 7 (p. 26). Uma mistura contendo os açúcares glicose, galactose, manose, xilose, arabinose e ramnose também foi preparada, utilizando-se o mesmo procedimento, para comparação com a amostra.

I.2.3.2.2.4. Acetilação de OCcE4

O procedimento de preparo do acetato de OCcE4 é o mesmo descrito na etapa 2 do item I.2.3.2.2.3 (p. 34)

1.2.4. Dados Físicos e Espectroscópicos das Substâncias Isoladas de *O. lagopus*

1.2.4.1. Boehmenan [49]



Óleo viscoso incolor

UV (MeOH) λ_{max} : 325 e 289 nm

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3400, 3063, 3000, 2925, 2840, 1700, 1631, 1600, 1518, 1270, 1162, 1125 e 960.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 7,58 (d, $J_{7''-8''}=16,0$, H7''), 7,48 (d, $J_{7-8}=16,0$, H7), 7,05 (dd, $J_{6'-5'}=8,3$ e $J_{6'-2'}=2,1$, H6'), 7,05 (dd, $J_{6'''-5'''}=8,3$ e $J_{6'''-2'''}=2,1$, H6'''), 7,00 (d, $J_{2''-6''}=2,1$, H2''), 6,96 (d, $J_{2-6}=2,1$, H2), 6,93 (d, $J_{2'-6'}=2,1$, H2'), 6,92 (d, $J_{5-6}=8,3$, H5), 6,91 (d, $J_{5'''-6'''}=8,3$, H5'''), 6,89 (d, $J_{5'-6'}=8,3$, H5'), 6,87 (dd, $J_{6'-5'}=8,3$ e $J_{6'-2'}=2,1$, H6'), 6,70 (sl, H6''), 6,68 (sl, H2''), 6,28 (d, $J_{8'''-7'''}=16,0$, H8'''), 6,22 (d, $J_{8-7}=16,0$, H8), 5,92 (sl, 4'''-OH), 5,92 (sl, 4-OH), 5,65 (sl, 4'-OH), 5,48 (d, $J_{7'-8'}=7,7$, H7'), 4,57 (dd, $J_{9'b-9'a}=11,1$ e $J_{9'b-8'}=5,1$, H9'b), 4,41 (dd, $J_{9'a-9'b}=11,1$ e $J_{9'a-8'}=7,8$, H9'a), 4,22 (t, $J_{9''-8''}=6,5$, H9''), 3,95-3,80 (m, H8'), 3,91 (s, 3''-OMe*), 3,91 (s, 3'''-OMe*), 3,88 (s, 3'-OMe*), 3,82 (s, 3-OMe*), 2,69 (t, $J_{7''-8''}=7,5$, H7'') e 2,02 (tt, $J_{8''-7''}=7,5$ e $J_{8''-9''}=6,5$, H8'').

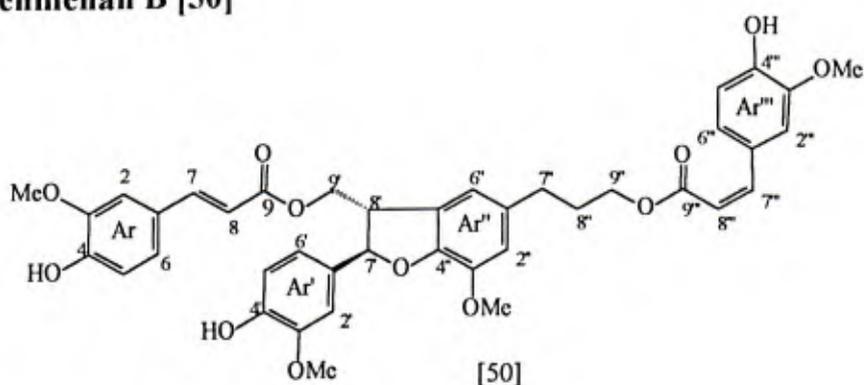
* As atribuições das metoxilas podem estar trocadas.

RMN de ^{13}C (100,6 MHz, CDCl_3) δ : 167,18 (C9'''), 165,84 (C9), 148,04 (C4'), 147,87 (C3'''), 146,68 (C3'''), 146,68 (C3), 146,52 (C3'), 146,16 (C4''), 145,58 (C4), 145,37 (C7), 144,74 (C7'''), 144,01 (C4'''), 134,81 (C1'), 132,43 (C1''), 127,30

(C5''), 126,58 (C1'''), 126,58 (C1), 122,92 (C6 ou C6'''), 122,87 (C6 ou C6'''), 119,57 (C6'), 116,03 (C6''), 115,24 (C8'''), 114,64 (C8), 114,61 (C5 ou C5'''), 114,59 (C5 ou C5'''), 114,01 (C5'), 112,40 (C2''), 109,34 (C2 ou C2'''), 109,27 (C2 ou C2'''), 108,73 (C2'), 88,77 (C7'), 65,26 (C9'), 63,60 (C9''), 55,88 (OMe), 55,81 (3 x OMe), 50,55 (C8'), 32,01 (C7'') e 30,56 (C8'').

EM (IE), m/z (%): 712 (7) [M]⁺, 518 (100), 342 (15), 324 (23), 194 (46), 177 (86), 145 (18) e 51 (44).

I.2.4.2. Boehmenan B [50]



Óleo viscoso incolor

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3400, 3063, 3003, 2930, 2840, 1705, 1631, 1600, 1518, 1270, 1158, 1125 e 963.

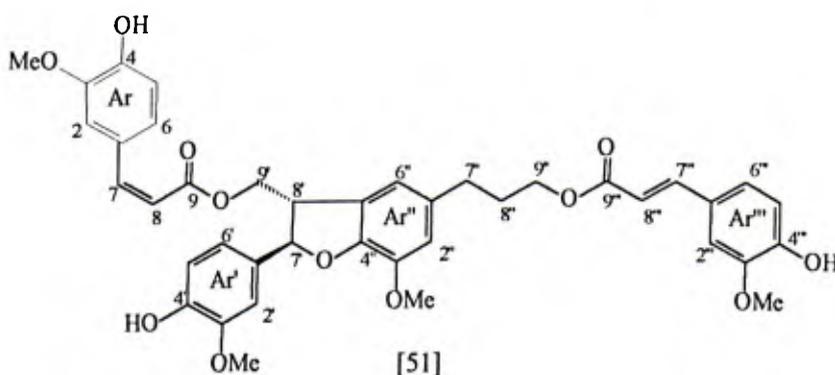
RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (mult., J/Hz): 7,77 (d, J_{2'''-6'''}=2,0, H2'''), 7,60 (d, J₇₋₈=16,0, H7), 7,09 (dd, J₆₋₅=8,0 e J₆₋₂=2,0, H6), 7,08 (dd, J_{6'''-5'''}=8,0 e J_{6'''-2'''}=2,0, H6'''), 7,04 (d, J₂₋₆=2,0, H2), 6,92 (m, H2'), 6,92 (m, H6'), 6,91 (d, J_{5'''-6'''}=8,0, H5'''), 6,90 (m, H5'), 6,88 (d, J₅₋₆=8,0, H5), 6,80 (d, J_{7'''-8'''}=12,8, H7'''), 6,66 (sl, H2''), 6,66 (sl, H6''), 6,29 (d, J₈₋₇=16,0, H8), 5,89 (s, 4'''-OH), 5,84 (sl, 4-OH), 5,81 (d, J_{8'''-7'''}=12,8, H 8'''), 5,59 (s, 4'-OH), 5,50 (d, J_{7'-8'}=7,4, H7'), 4,58 (dd, J_{9'b-9'a}=11,0 e J_{9'b-8'}=5,7, H9'b), 4,40 (dd, J_{9'a-9'b}=11,1 e J_{9'a-8'}=7,8, H9'a), 4,21 (t, J_{9'-8'}=6,5, H9''),

3,95-3,90 (m, H8'), 3,92 (s, 3'''-OMe*), 3,92 (s, 3''-OMe*), 3,82 (s, 3'-OMe*), 3,82 (s, 3-OMe), 2,68 (t, $J_{7''-8''}=7,8$, H7'') e 2,00 (tt, $J_{8''-7''}=7,8$ e $J_{8''-9''}=6,5$, H8'').

* As atribuições das metoxilas podem estar trocadas.

EM (IE), m/z (%): 712 (7) [M]⁺, 536 (3), 518 (100), 342 (16), 324 (22), 194 (46), 177 (88), 145 (177) e 51 (43).

1.2.4.3. Boehmenan C [51]



Óleo viscoso incolor

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3400, 3063, 3003, 2930, 2840, 1705, 1631, 1600, 1518, 1270, 1158, 1125 e 963.

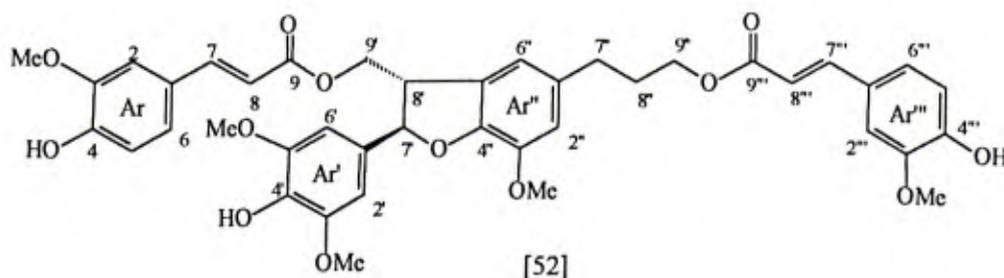
RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (mult., J/Hz): 7,72 (d, $J_{2-6}=2,0$, H2), 7,48 (d, $J_{7'''-8'''}=16,0$, H7'''), 7,11 (dd, $J_{6-5}=8,0$ e $J_{6-2}=2,0$, H6), 7,04 (dd, $J_{6'''-5'''}=8,0$ e $J_{6'''-2'''}=2,0$, H6'''), 6,98 (d, $J_{2''-6''}=2,0$, H2''), 6,90 (d, $J_{5-6}=8,0$, H5), 6,90 (m, H5'), 6,89 (m, H2'), 6,86 (d, $J_{5'''-6'''}=8,0$, H5'''), 6,86 (m, H6'), 6,79 (d, $J_{7-8}=12,8$, H7), 6,65 (sl, H2''), 6,64 (sl, H6''), 6,21 (d, $J_{8'''-7'''}=16,0$, H8'''), 5,85 (s, 4-OH), 5,84 (sl, 4'''-OH), 5,75 (d, $J_{8-7}=12,8$, H8), 5,58 (s, 4'-OH), 5,42 (d, $J_{7'-8'}=7,4$, H7'), 4,47 (dd, $J_{9'b-9'a}=11,0$ e $J_{9'b-8'}=5,7$, H9'b), 4,36 (dd, $J_{9'a-9'b}=11,0$ e $J_{9'a-8'}=7,0$, H9'a), 4,14 (t, $J_{9''-8''}=6,5$, H9''), 3,92 (s, 3'''-OMe*), 3,92 (s, 3''-OMe*), 3,83-3,78 (m, H8'), 3,82 (s,

3-OMe), 3,82 (s, 3'-OMe*), 2,62 (t, $J_{7''-8''}=7,8$, H7'') e 1,95 (tt, $J_{8''-7''}=7,8$ e $J_{8''-9''}=6,5$, H8'').

* As atribuições das metoxilas podem estar trocadas.

EM (IE), m/z (%): 712 (7) $[M]^+$, 536 (3), 518 (100), 324 (23), 194 (46), 177 (88) e 51 (43).

I.2.4.4. Boehmenan D [52]



Óleo viscoso incolor

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3400, 3060, 3000, 2928, 2841, 1702, 1630, 1600, 1520, 1267, 1162, 1128 e 960.

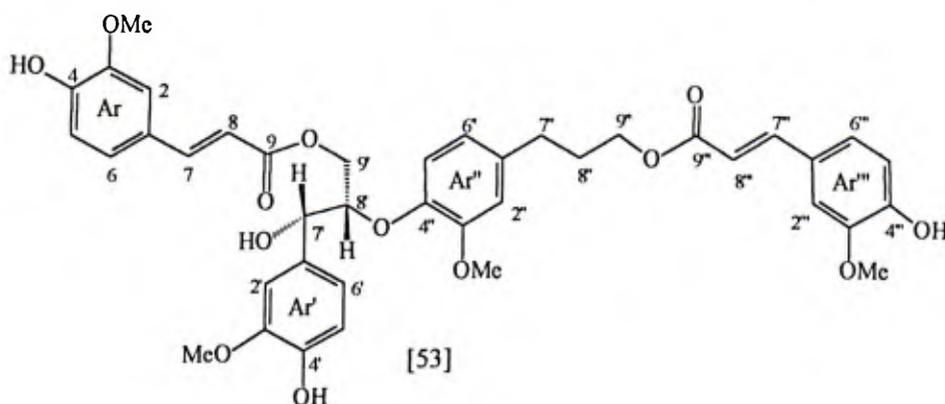
RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 7,58 (d, $J_{7'''-8'''}=16,0$, H7'''), 7,47 (d, $J_{7-8}=16,0$, H7), 7,06 (dd, $J_{6''-5''}=8,0$ e $2,0$, H6'''), 7,02 (d, $J_{2'''-6'''}=2,0$, H2'''), 7,02 (dd, $J_{6-5}=8,0$ e $J_{6-2}=2,0$, H6), 6,96 (d, $J_{2-6}=2,0$, H2), 6,91 (d, $J_{5'''-6'''}=8,0$, H5'''), 6,70 (sl, H6''), 6,65 (s, H6'), 6,65 (s, H2'), 6,65 (sl, H2''), 6,29 (d, $J_{8'''-7'''}=16,0$, H8'''), 6,22 (d, $J_{8-7}=16,0$, H8), 5,84 (s, 4-OH[#]), 5,83 (s, 4'''-OH[#]), 5,48 (s, 4'-OH), 5,44 (d, $J_{7'-8'}=7,8$, H7'), 4,60 (dd, $J_{9'b-9'a}=11,2$ e $J_{9'b-8'}=5,0$, H9'b), 4,43 (dd, $J_{9'a-9'b}=11,2$ e $J_{9'a-8'}=8,0$, H9'a), 4,22 (t, $J_{9''-8''}=6,5$, H9''), 3,95-3,80 (m, H8'), 3,92 (s, 3''-OMe*),

3,91 (s, 3^{'''}-OMe*), 3,89 (s, 3'-OMe*), 3,83 (s, 3-OMe*), 3,83 (s, 5'-OMe*), 2,70 (t, $J_{7''-8''}=7,5$, H7'') e 2,02 (tt, $J_{8''-7''}=7,5$ e $J_{8''-9''}=6,5$, H8'').

As atribuições destas [#]hidroxilas e *metoxilas podem estar trocadas.

EM (IE), m/z (%): 742 [M]⁺ (não encontrado), 548 (100), 372 (22), 315 (5), 194 (40) e 177 (85).

I.2.4.5. Carolignana A [53]



Óleo viscoso incolor

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3400, 3070, 3005, 2982, 2930, 2840, 1704, 1630, 1600, 1523, 1272, 1160, 1120, 1042, 850 e 774.

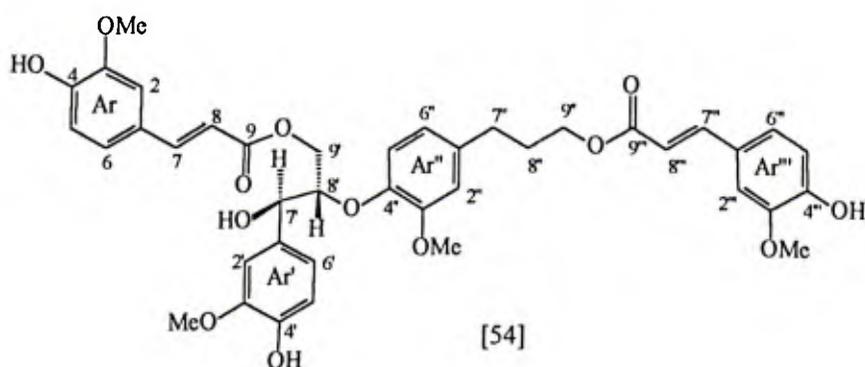
RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (mult., J/Hz): 7,60 (d, $J_{7''-8''}=16,0$, H7'''), 7,49 (d, $J_{7-8}=16,0$, H7), 7,08 (dd, $J_{6''-5''}=8,3$ e $J_{6''-2''}=2,1$, H6'''), 7,02 (dd, $J_{6-5}=8,3$ e $J_{6-2}=2,1$, H6), 7,02 (d, $J_{2''-6''}=2,1$, H2'''), 7,02 (d, $J_{2-6}=2,1$, H2), 7,01 (d, $J_{2'-6'}=2,0$, H2'), 6,97 (d, $J_{5''-6''}=8,3$, H5'''), 6,91 (d, $J_{5-6}=8,3$, H5), 6,90 (d, $J_{5-6}=8,0$, H5'), 6,87 (d, $J_{5'-6'}=7,9$, H5'), 6,82 (dd, $J_{6'-5'}=8,0$ e $J_{6'-2'}=2,0$, H6'), 6,76 (d, $J_{2''-6''}=2,0$, H2''), 6,75 (dd, $J_{6''-5''}=7,9$ e $J_{6''-2''}=2,0$, H6''), 6,29 (d, $J_{8''-7''}=16,0$, H8'''), 6,22 (d, $J_{8-7}=16,0$, H8), 5,89 (sl, 4-OH), 5,89 (sl, 4^{'''}-OH), 5,60 (sl, 4'-OH), 4,91 (d, $J_{7'-8'}=3,0$,

H7'), 4,5-4,4 (m, H9'b), 4,5-4,4 (m, H8'), 4,28 (dd, $J_{9'a-9'b}=16,1$ e $J_{9'a-8'}=7,0$, H9'a), 4,21 (t, $J_{9''-8''}=6,5$, H9''), 4,20 (sl, 7'-OH), 3,92 (s, 3''-OMe), 3,92 (s, 3'''-OMe), 3,86 (s, 3-OMe), 3,86 (s, 3'-OMe), 2,69 (dd, $J_{7''a-7''b}=7,7$ e $J_{7''-8''}=7,2$, H7'') e 2,05-2,00 (m, H8'').

RMN de ^{13}C (100,6 MHz, CDCl_3) δ : 167,19 (C9'''), 166,98 (C9), 151,26 (C4'), 147,92 (C3''), 147,89 (C3'), 146,64 (C3), 146,64 (C3'''), 146,47 (C4''), 145,11 (C7), 145,00 (C4), 144,96 (C4'''), 144,83 (C7'''), 137,27 (C1'), 130,92 (C1''), 126,75 (C1), 126,75 (C1'''), 122,93 (C6), 122,93 (C6'''), 120,96 (C6''), 120,63 (C5''), 119,12 (C6'), 115,23 (C8'''), 114,62 (C5), 114,86 (C8), 114,57 (C5'''), 114,00 (C5'), 112,29 (C2''), 109,24 (C2), 109,20 (C2'''), 108,70 (C2'), 84,40 (C8'), 71,94 (C7'), 63,52 (C9''), 62,49 (C9'), 55,83 (3 x OMe), 55,75 (OMe), 31,89 (C7'') e 30,25 (C8'').

EM (IE), m/z (%): 730 $[\text{M}]^+$ (não encontrado), 712 (9), 536 (3), 518 (7), 506 (10), 358 (25), 194 (43), 177 (37), 164 (100) e 137 (28).

I.2.4.6. Carolignana B [54]



Óleo viscoso incolor

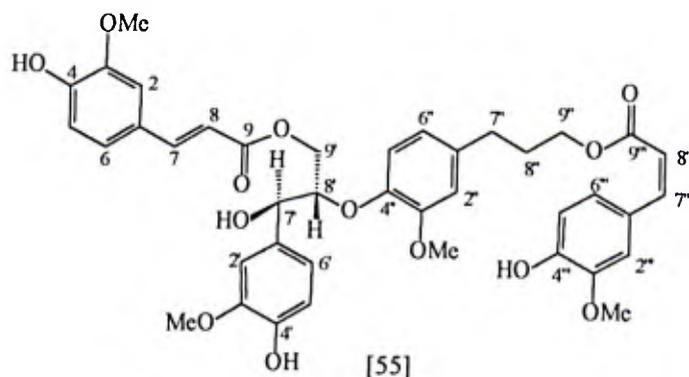
IV (KBr, $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3400, 3070, 3005, 2982, 2930, 2840, 1704, 1630, 1600, 1523, 1272, 1160, 1120, 1042, 850 e 774.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (mult.,J/Hz): 7,60 (d, $J_{7''''-8''''}=16,0$, H7'''), 7,53 (d, $J_{7-8}=16,0$, H7), 7,08 (dl, H6'''), 7,07 (dd, $J_{6-5}=8,3$ e $J_{6-2}=2,1$, H6), 7,02 (d, $J_{2''''-6''''}=2,0$, H2'''), 7,02 (d, $J_{2'-6'}=2,0$, H2'), 6,90 (d, $J_{5''''-6''''}=8,3$, H5'''), 6,90 (d, $J_{5-6}=8,3$, H5), 6,89 (d, $J_{5'-6'}=8,0$, H5'), 6,87 (dd, $J_{6'-5'}=8,0$ e $J_{6'-2'}=2,0$, H6'), 6,85 (d, $J_{5''-6''}=7,9$, H5''), 6,76 (d, $J_{2''-6''}=2,0$, H2''), 6,74 (dd, $J_{6''-5''}=7,9$ e $J_{6''-2''}=2,0$, H6''), 6,29 (d, $J_{8''''-7''''}=16,0$, H8'''), 6,25 (d, $J_{8-7}=16,0$, H8), 5,92 (sl, 4-OH), 5,92 (sl, 4'''-OH), 5,62 (sl, 4'-OH), 4,92 (d, $J_{7'-8'}=8,0$, H7'), 4,22-4,18 (m, H8'), 4,34 (dd, $J_{9'b-9'a}=12,0$ e $J_{9'b-8'}=3,4$, H9'b), 4,20 (t, $J_{9''-8''}=6,5$, H9''), 4,20 (7'-OH), 4,11 (dd, $J_{9'a-9'b}=12,0$ e $J_{9'a-8'}=5,0$, H9'a), 3,93 (s, 3-OMe), 3,92 (s, 3'-OMe), 3,89 (s, 3''-OMe), 3,84 (s, 3'''-OMe), 2,69 (dd, $J_{7''-a-7''-b}=7,2$ e $J_{7''-8''}=7,0$, H7'') e 2,03-1,97 (m, H8'').

RMN de ^{13}C (100,6 MHz, CDCl_3) δ : 167,19 (C9'''), 166,68 (C9), 150,66 (C4'), 148,03 (C3''), 147,66 (C3'), 147,60 (C3), 147,60 (C3'''), 146,55 (C4''), 145,93 (C4), 145,55 (C4'''), 145,35 (C7), 144,84 (C7'''), 137,31 (C1'), 131,10 (C1''), 126,68 (C1'''), 126,68 (C1), 123,10 (C6), 122,95 (C6'''), 120,90 (C6''), 120,55 (C5''), 120,30 (C6'), 115,26 (C8'''), 114,63 (C5), 114,63 (C5'''), 114,63 (C8), 114,25 (C5'), 112,24 (C2''), 109,26 (C2'''), 109,26 (C2), 109,19 (C2'), 86,19 (C8'), 74,28 (C7'), 63,51 (C9''), 62,91 (C9'), 55,86 (OMe), 55,83 (OMe), 55,81 (OMe), 55,69 (OMe), 31,89 (C7''), 30,28 (C8'').

EM (IE), m/z (%): 730 $[\text{M}]^+$ (não encontrado), 712 (9), 536 (3), 518 (7), 506 (10), 358 (25), 194 (43), 177 (37), 164 (100) e 137 (28).

I.2.4.7. Carolignana C [55]



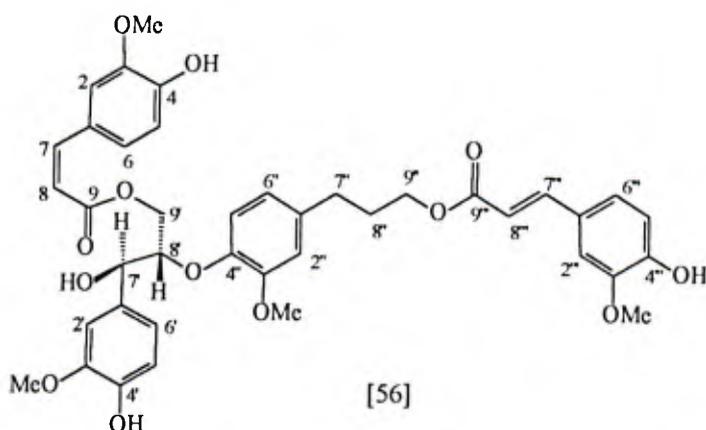
Óleo viscoso incolor

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3400, 3070, 3005, 2982, 2930, 2840, 1704, 1630, 1600, 1523, 1272, 1160, 1120, 1042, 850 e 774.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 7,73 (d, $J_{2''-6''}=2,0$, $\text{H}2''$), 7,53 (d, $J_{7-8}=16,0$, $\text{H}7$), 7,08 (m, $\text{H}6$), 7,06 (m, $\text{H}6''$), 7,02 ($\text{H}2'$), 7,01 (m, $\text{H}2$), 6,92 (m, $\text{H}5''$), 6,86 (m, $\text{H}5'$), 6,85 (d, $J_{5-6}=8,0$, $\text{H}5$), 6,81 (d, $J_{7''-8''}=12,8$, $\text{H}7''$), 6,76 ($\text{H}6'$), 6,70 ($\text{H}2''$), 6,30 (d, $J_{8-7}=16,0$, $\text{H}8$), 5,85 (sl, 4-OH), 5,85 (sl, 4'''-OH), 5,82 (d, $J_{8''-7''}=12,8$, $\text{H}8''$), 5,58 (sl, 4'-OH), 4,92 (d, $J_{7'-8'}=8,2$, $\text{H}7'$), 4,34 (dd, $J_{9'b-9'a}=12,0$ e $J_{9'b-8'}=3,2$, $\text{H}9'b$), 4,22-4,18 (m, $\text{H}8'$), 4,20 (t, $J_{9''-8''}=6,5$, $\text{H}9''$), 4,11 (dd, $J_{9'a-9'b}=12,0$ e $J_{9'b-8'}=5,4$, $\text{H}9'a$), 3,94 (s, 3-OMe), 3,94 (s, 3''-OMe), 3,82 (s, 3'-OMe), 3,82 (s, 3'''-OMe), 2,62 (t, $J_{7''-8''}=7,8$, $\text{H}7''$) e 1,94 (tt, $J_{8''-7''}=7,8$ e $J_{8''-9''}=6,5$, $\text{H}8''$).

EM (IE), m/z (%): 730 $[\text{M}]^+$ (não encontrado), 712 (9), 536 (3), 518 (7), 506 (10), 358 (25), 194 (43), 177 (37), 164 (100) e 137 (28).

I.2.4.8. Carolignana D [56]

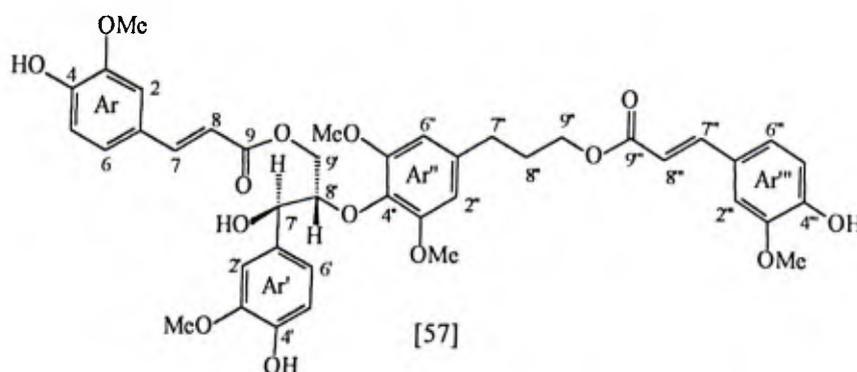


IV (KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3400, 3070, 3005, 2982, 2930, 2840, 1704, 1630, 1600, 1523, 1272, 1160, 1120, 1042, 850 e 774.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 7,71 (d, $J_{2,6}=2,0$, H2), 7,61 (d, $J_{7''-8''}=16,0$, H7'''), 7,11 (dd, $J_{6'''-5'''}=8,0$ e $J_{6'''-2'''}=2,0$, H6'''), 7,10 (dd, $J_{6-5}=8,0$ e $J_{6-2}=2,0$, H6), 7,02 (H2'), 7,01 (m, H2'''), 6,92 (m, H5), 6,92 (m, H5'), 6,86 (d, $J_{5''-6''}=8,0$, H5'''), 6,82 (d, $J_{7-8}=12,8$, H7), 6,76 (H6'), 6,70 (H2''), 6,30 (d, $J_{8''-7''}=16,0$, H8'''), 5,85 (sl, 4'''-OH), 5,85 (sl, 4-OH), 5,80 (d, $J_{8-7}=12,8$, H8), 5,58 (sl, 4'-OH), 4,82 (d, $J_{7'-8'}=8,2$, H7'), 4,28 (dd, $J_{9''b-9''a}=12,0$ e $J_{9''a-8''}=3,2$, H9''b), 4,13 (t, $J_{9''-8''}=6,5$, H9''), 4,12-4,08 (m, H8'), 4,04 (dd, $J_{9''a-9''b}=12,0$ e $J_{9''a-8''}=5,4$, H9''a), 3,94 (s, 3''-OMe), 3,93 (s, 3'''-OMe), 3,81 (s, 3'-OMe), 3,81 (s, 3-OMe), 2,69 (t, $J_{7''-8''}=7,8$, H7'') e 2,01 (tt, $J_{8''-9''}=7,8$ e $J_{8''-9''}=6,5$, H8'').

EM (IE), m/z (%): 730 $[\text{M}]^+$ (não encontrado), 712 (9), 536 (3), 518 (7), 506 (10), 358 (25), 194 (43), 177 (37), 164 (100) e 137 (28).

I.2.4.9. Carolignana E [57]



Óleo viscoso incolor

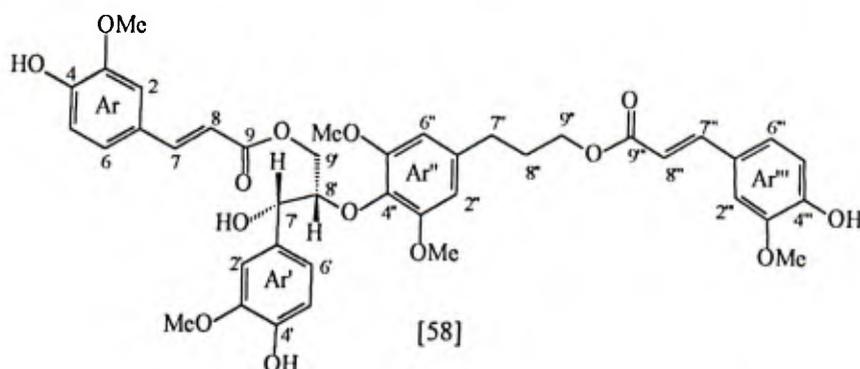
IV (KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3400, 3072, 3000, 2980, 2932, 2843, 1702, 1628, 1600, 1520, 1457, 1437, 1360, 1270, 1161, 1119, 1040, 850 e 770.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 7,62 (d, $J_{7''-8''}=16,0$, $\text{H}7''$), 7,55 (d, $J_{7-8}=16,0$, $\text{H}7$), 6,76 (dd, $J_{5'-6'}=8,0$ e $J=1,8$, $\text{H}5'$), 6,42 (sl, $\text{H}2''$), 6,42 (sl, $\text{H}6''$), 6,35 (d, $J_{8''-7''}=16,0$, $\text{H}8''$), 6,30 (d, $J_{8-7}=16,0$, $\text{H}8$), 5,87 (sl, $4''\text{-OH}$), 3,94 (s, 3-OMe), 5,87 (sl, 4-OH), 5,57 (sl, $4'\text{-OH}$), 5,09 (dd, $J_{7'-8'}=8,4$ e $J_{7'-7'\text{-OH}}=1,6$, $\text{H}7'$), 4,75 (d, $J_{7\text{-OH}-7}=1,6$, $7'\text{-OH}$), 4,22 (t, $J_{9''-8''}=6,5$, $\text{H}9''$), 4,13 (dd, $J_{9'a-9'b}=12,0$ e $J_{9'a-8''}=6,0$, $\text{H}9'a$), 3,99 (dd, $J_{9'b-9'a}=12,0$ e $J_{9'b-8''}=3,0$, $\text{H}9'b$), 3,92 (s, 3'-OMe), 3,89 (s, 3''-OMe), 3,81 (s, 3'''-OMe), 2,72-2,66 (m, $\text{H}7''$), 2,05-1,97 (m, $\text{H}8''$), *H2, *H2', *H5, *H6, *H6', *H8', *H2'', *H5'' e *H6''.

* As ressonâncias desses hidrogênios de [57] foram similares àquelas dos hidrogênios de [58], mas não foram completamente atribuídas.

EM (IE), m/z (%): 766 [M^+] (não observado), 548 (1), 388 (26), 194 (100), 177 (33), 164 (20), 137 (16) e 91 (9).

I.2.4.10. Carolignana F [58]



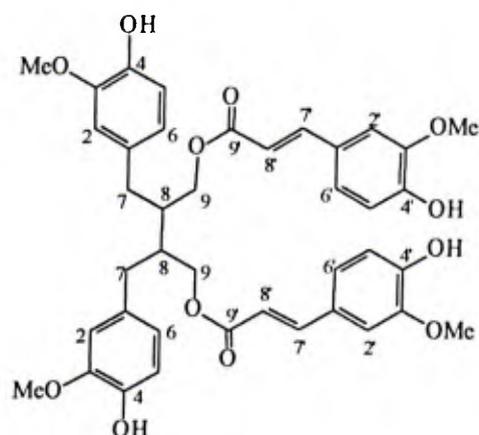
Óleo viscoso incolor

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3400, 3072, 3000, 2980, 2932, 2843, 1702, 1628, 1600, 1520, 1457, 1437, 1360, 1270, 1161, 1119, 1040, 850 e 770.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 7,61 (d, $J_{7''-8''}=16,0$, $\text{H}7''$), 7,50 (d, $J_{7-8}=16,0$, $\text{H}7$), 7,08 (dd, $J_{6''-2''}=8,0$, $2,0$, $\text{H}6''$), 7,01 (m, $\text{H}2''$), 7,01 (d, $J_{2'-6'}=1,8$, $\text{H}2'$), 7,01 (m, $\text{H}6$), 7,00 (m, $\text{H}2$), 6,88 (d, $J_{6'-2'}=8,0$, $\text{H}6'$), 6,86 (m, $\text{H}5''$), 6,86 (m, $\text{H}5$), 6,76 (dd, $J_{5'-6'}=8,0$ e $J=1,8$, $\text{H}5'$), 6,44 (sl, $\text{H}2''$), 6,44 (sl, $\text{H}6''$), 6,29 (d, $J_{8''-7''}=16,0$, $\text{H}8''$), 6,24 (d, $J_{8-7}=16,0$, $\text{H}8$), 5,86 (sl, 4-OH), 5,84 (sl, 4'''-OH), 5,53 (sl, 4'-OH), 4,89 (t, $J_{7'-8'}=J_{7'-7'-\text{OH}}=3,0$, $\text{H}7'$), 4,54 (ddd, $J_{8'-9'a}=7,7$, $J_{8'-9'b}=4,0$ e $J_{8'-7'}=3,0$, $\text{H}8'$), 4,43 (dd, $J_{9'a-9'b}=11,8$, $J_{9'a-8'}=7,7$, $\text{H}9'a$), 4,31 (dd, $J_{9'b-9'a}=11,8$ e $J_{9'b-8'}=4,0$, $\text{H}9'b$), 4,30 (d, $J_{7'-\text{OH}-7'}=3,0$, 7'-OH), 4,23 (t, $J_{9''-8''}=6,5$, $\text{H}9''$), 3,92 (s, 3-OMe), 3,91 (s, 3'-OMe), 3,88 (s, 3''-OMe), 3,84 (s, 3'''-OMe), 2,69 (t, $J_{7''-8''}=7,5$, $\text{H}7''$) e 2,05-1,97 (m, $\text{H}8''$).

EM (IE), m/z (%): 766 [M^+] (não observado), 548 (1), 388 (26), 194 (100), 177 (33), 164 (20), 137 (16) e 91 (9).

1.2.4.11. Diferulato de Secoisolariciresinila [59]



$T_f=182-184\text{ }^\circ\text{C}$

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3400, 1700, 1630, 1600, 1520, 1255, 1245, 1150 e 1020.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (mult., J/Hz): 9,59 (s, 4'-OH), 8,69 (s, 4-OH), 7,53 (d, $J_{7'-8'}=15,9$, H7'), 7,29 (d, $J_{2'-6'}=1,9$, H2'), 7,09 (dd, $J_{6'-5'}=8,2$ e $J_{6'-2'}=1,9$, H6'), 6,78 (d, $J_{5'-6'}=8,2$, H5'), 6,67 (s, H2), 6,66 (d, $J_{5-6}=8,0$, H5), 6,53 (dd, $J_{6,5}=8,0$ e $J_{6-2}=1,4$, H6), 6,47 (d, $J_{8'-7'}=15,9$, H8'), 4,27 (dd, $J_{9'a-9'b}=11,4$ e $J_{9'a-8'}=6,5$, H9a), 4,08 (dd, $J_{9'b-9'a}=11,4$ e $J_{9'b-8'}=5,1$, H9b), 3,81 (s, 3'-OMe), 3,68 (s, 3-OMe), 2,76 (dd, $J_{7a-7b}=13,9$ e $J_{7a-8}=6,1$, H7a), 2,57 (dd, $J_{7a-7b}=13,9$ e $J_{7b-8}=8,3$, H7b), 2,20 (m, H8).

RMN de ^{13}C (100,6 MHz, DMSO- d_6) δ : 167,54 (C9'), 150,26 (C3), 148,81 (C3'), 148,28 (C4), 145,94 (C7'), 145,53 (C4'), 131,68 (C1), 126,29 (C1'), 124,05 (C6'), 121,91 (C6), 116,38 (C5'), 116,14 (C5), 115,27 (C8'), 113,69 (C2'), 112,08 (C2), 64,67 (C9), 56,57 (3'-OMe), 56,25 (3-OMe), 40,83 (C8) e 34,69 (C7).

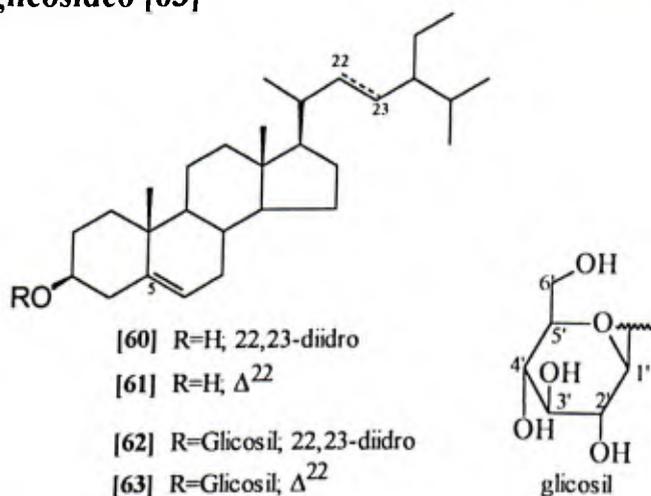
EM (IQ), m/z (%): 714 [M^+] (3), 538 (3), 316 (16), 194 (24), 177 (64), 147 (47) e 137 (100).

I.2.4.12. Mistura de β -Sitosterol [60] e Estigmasterol [61]

T_f = 130-132 °C, (EtOH)

IV, RMN de ^1H e de ^{13}C (PAULA, 1995).

I.2.4.13. Daucosterol (β -Sitosterol-3-*O*- β -D-glicosídeo) [62] e Estigmasterol-3-*O*- β -D-glicosídeo [63]



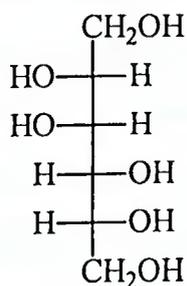
T_f = 246-248 °C dec. (THF).

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3400, 2960, 2930, 2850, 1080 e 1030.

RMN de ^1H (DMSO- d_6) δ (mult., J/Hz): 5,33 (d, J=4,8, H6 sit. + est.), 5,16, (dd, $J_{22-21}=8,60$ e $J_{22-23}=15,00$, H22 est.), 5,03 (dd, $J_{23-24}=8,60$ e $J_{23-22}=15,00$, H23 est.), 4,87 (d, $J_{2'(\text{OH})-2'}=4,74$, 2'-OH), 4,85 (d, $J_{3'(\text{OH})-3'}=4,74$, 3'-OH) e 4,84 (d, $J_{4'(\text{OH})-4'}=4,89$, 4'-OH), 4,41 (t, $J_{6'(\text{OH})-6'}=5,80$, 6'-OH), 4,22 (d, $J_{1'-2'}=7,77$, H1'), 3,64 (ddd, $J_{6'a-5}=1,60$, $J_{6'a-6'(\text{OH})}=5,80$ e $J_{6'a-6'b}=10,49$, H6'a), 3,50-3,40 (m, H3 sit. + est.), 3,48-3,44 (m, H6'b), 3,44-3,40 (m, H3 sit. + est.), 3,15-2,98 (m, H3', H4' e H5') e 2,90 (m, H2').

RMN de ^{13}C (100,6 MHz, DMSO- d_6) δ : 141,33 (C5), 122,07 (C6), 101,67 (C1'), 77,81 (C5'), 77,65 (C3'), 77,62 (C3), 74,34 (C2'), 70,99 (C4'), 61,98 (C6'), 57,05 (C14), 56,31 (C17), 50,48 (C9), 46,03 (C24), 42,73 (C13), 40,11 (C4), 39,19 (C12), 37,71 (C1), 37,09 (C10), 36,35 (C20), 34,23 (C22), 32,30 (C7 ou C8), 32,25 (C7 ou C8), 30,14 (C2), 29,59 (C25), 28,66 (C16), 26,34 (C23), 24,73 (C15), 23,49 (C28), 21,47 (C11), 20,58 (C27), 19,97 (C19), 19,81 (C21 ou C26), 19,49 (C21 ou C26), 12,67 (C18 ou C29), 12,54 (C18 ou C29).

I.2.4.14. OCcE4: Manitol [64]



[64]

$T_f=165-166\text{ }^\circ\text{C}$ (MeOH/ H_2O), do hexaacetato ($121-122\text{ }^\circ\text{C}$, EtOAc)

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3400, 3300, 2900, 1100 e 1050.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ (mult., J/Hz): 4,39 (d, $J_{2(\text{OH})-2}=5,4$, 2-OH), 4,32 (t, $J_{1(\text{OH})-1}=J_{1(\text{OH})-1'}=5,7$, 1-OH), 4,12 (d, $J_{3(\text{OH})-3}=7,0$, 3-OH), 3,61 (ddd, $J_{1,2}=3,4$, $J_{1-1(\text{OH})}=5,7$ e $J_{1-1'}=10,7$, H1), 3,54 (ddd, H3), 3,45 (m, H2) e 3,37 (m, H1').

RMN de ^{13}C (100,6 MHz, DMSO- d_6) δ : 71,2 (C3), 69,6 (C2) e 63,7 (C1).

1.2.5. Ensaios Biológicos com Extratos do Caule, da Casca e com Algumas Frações para Avaliação de suas Atividades Inseticidas

Os extratos etanólico e hexânico do caule (CE e CH) e da casca (CcE e CcH) de *Ochroma lagopus*, bem como as frações CE(14)19, CE(16)35 e CE(16)41, das quais foram isoladas as lignanas boehmenan [49], p. 35, boehmenan B-D [50-52], p. 36 a 38, carolignana A-F [53-58], p. 39 a 45, e diferulato de secoisolariciresinila [59], p. 46, foram submetidos a ensaios biológicos em placas de Petri e por aplicação tópica. Os ensaios foram realizados utilizando a mesma metodologia descrita no Capítulo II, nos itens II.2.3.1 e II.2.3.2 (p. 173).

Nos ensaios em placa de Petri os extratos foram dissolvidos em hexano ou etanol e as frações em clorofórmio, todos na concentração de 2 mg.mL⁻¹. As espécies de insetos utilizadas foram o pulgão *Brevicoryne brassicae* L. (Homoptera: Aphididae), o caruncho do milho *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae), o cupim *Cornitermes cumulans* Kollar (Isoptera: Termitidae), a lagarta da couve *Plutela xilostella* L. (Lepidoptera, Plutellidae) e a vespa *Protopolybia exigua* DeSaus (Hymenoptera: Vespidae).

Os ensaios de aplicação tópica foram realizados somente com as frações CE(14)19, CE(16)35 e CE(16)41, pois, os extratos não foram solúveis em acetona na concentração de 10 mg.mL⁻¹. As espécies de insetos utilizadas neste ensaio foram as mesmas dos ensaios utilizando as amidas naturais e sintéticas, descritos no item II.2.3.2 (Capítulo II, p. 173): o curuquerê da couve *Ascia monuste orseis* Latr. (Lepidoptera, Pieridae), o besouro do feijão *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae), *B. brassicae*, *C. cumulans* e *P. exigua*.

I.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

I.3.1. Constituintes Químicos do Extrato Etanólico do Caule

I.3.1.1. Caracterização das Frações Obtidas após Separação por CLAE Reciclante

Os vários fracionamentos do extrato etanólico do caule de *O. lagopus* (Fig. I.3, p. 29) possibilitaram a obtenção de algumas substâncias puras e algumas misturas simples as quais foram identificadas por métodos espectroscópicos (IV, EM, RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , envolvendo uso de técnicas nOe, COSY $^1\text{H}^{13}\text{C}$, COSY $^1\text{H}^1\text{H}$, etc), ponto de fusão e cromatografia em fase gasosa (PAULA, 1995).

No entanto, muitas das frações obtidas não foram estudadas anteriormente, tais como CE(14)19, CE(16)35 e CE(16)41, que eram constituídas de misturas complexas de substâncias muito similares, as quais apresentavam um único ponto quando analisadas por CCD. Estas e as demais frações agora estudadas encontram-se em destaque (cor vermelha) na Figura I.3 (p. 29).

A análise dos espectros no infravermelho das frações CE(14)19, CE(16)35 e CE(16)41 mostrou uma grande semelhança estrutural entre os seus constituintes e, também, uma grande semelhança entre estes e a lignana boehmenan, isolada previamente da fração CE(14)18 (PAULA, 1995).

A análise por CLAE, revelou que todas estas frações se tratavam de misturas relativamente complexas, tendo os compostos tempos de retenção muito próximos.

Os cromatogramas resultantes desta análise são apresentados nas Figuras I.5 (a), (b) e (c), p. 52

Através dos cromatogramas pode-se observar que a fração CE(14)19 é constituída de pelo menos três compostos (Fig. I.5a, p. 52), uma delas (1) não observada nas outras duas frações. A fração CE(16)35 é constituída de no mínimo onze compostos (Fig. I.5b, p. 52), sendo que pelo menos quatro delas (5, 6, 11 e 12) encontravam-se em maior concentração. Finalmente, a fração CE(16)41 apresentou um cromatograma (Fig. I.5c, p. 42) semelhante, em termos de constituição, ao da fração CE(16)35. Entretanto, observaram-se diferenças nas concentrações dos principais constituintes de cada fração. Em vistas dessas diferenças, essas duas frações não foram reunidas.

Por estes cromatogramas verificou-se que seria muito difícil a separação destes constituintes por CLAE, em escala semi-preparativa, pois a quantidade de amostra injetada seria bem maior e, conseqüentemente, ocorreria uma perda em resolução, quando comparado com uma injeção analítica. Portanto, para que fosse possível a separação por CLAE, em escala semi-preparativa, foi necessário utilizar um aparelho equipado com uma válvula reciclante. Com isso, seria possível reciclar a amostra quantas vezes fossem necessárias, desde que não houvesse um grande alargamento dos picos, até a separação dos constituintes. Uma pequena diferença entre os tempos de retenção de dois constituintes, que não possibilitava a separação pelo processo usual, aumentava gradativamente com o número de ciclos (número de vezes que a amostra passa pela coluna), até possibilitar a coleta destes, separadamente.

Os cromatogramas da separação dos constituintes das frações CE(14)19, CE(16)35 e CE(16)41, por CLAER são apresentados nas Figuras I.6a, I.6b e I.6c (p. 53), respectivamente.

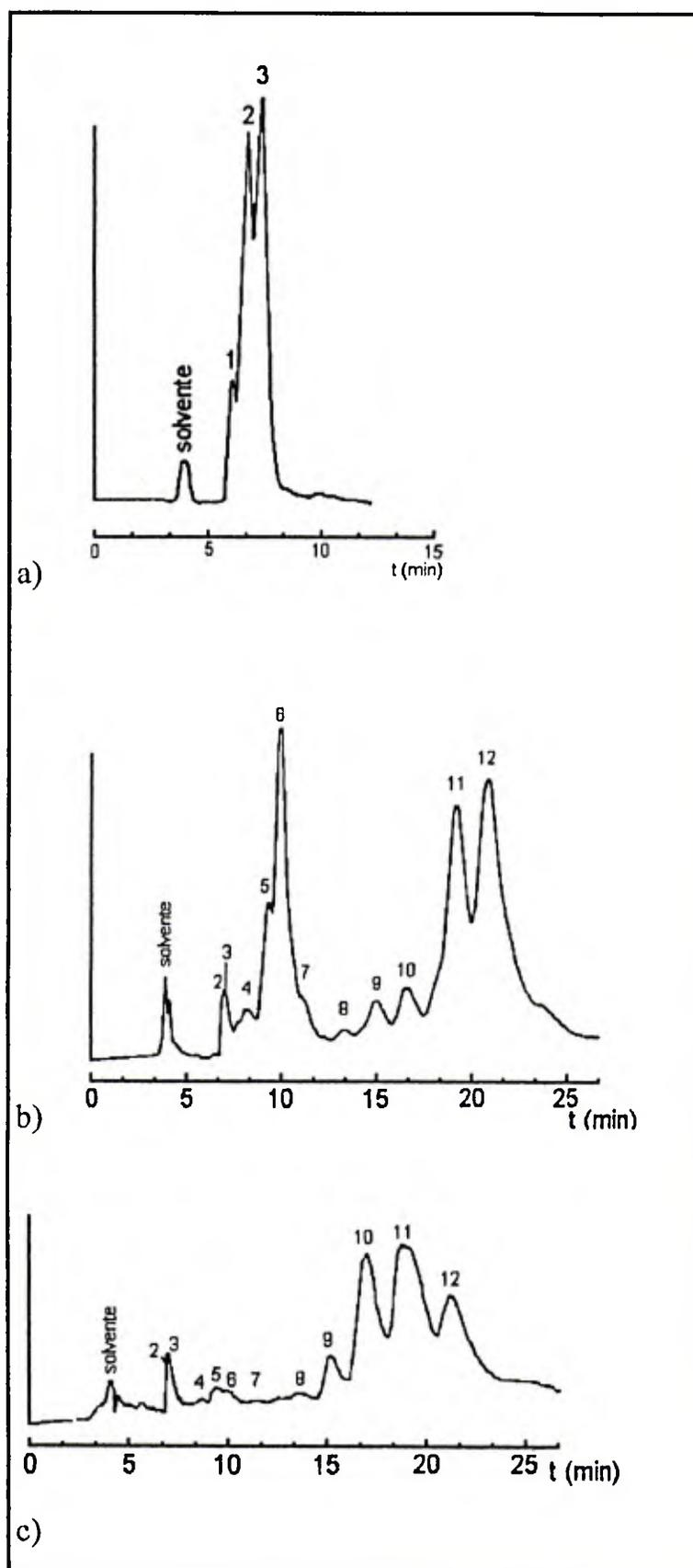


Figura I.5 - Cromatograma Analítico Obtido para as Frações a) CE(14)19, b) CE(16)35 e c) CE(16)41, nas Condições Descritas no Item 8, da p. 26.

Nas Figuras I.6a, I.6b e I.6c (p. 53) podem ser observados o número de ciclos necessários para separação dos constituintes de cada fração e verificar o quanto se ganhou em resolução a partir do 2º ciclo. Além disso, pode-se deduzir que sem a presença da válvula de reciclagem no aparelho de CLAE não seria possível a separação dos constituintes das frações CE(14)19, CE(16)35 e CE(16)41, pois, no 1º ciclo, que corresponderia a um cromatograma obtido em um aparelho sem a válvula, praticamente nenhuma resolução dos picos foi observada.

De CE(14)19 foram coletadas três frações: OCE1, OCE2 e OCE3; de CE(16)35 foram coletadas seis frações: OCE4, OCE5, OCE6, OCE7, OCE8 e OCE9; e de CE(16)41, três outras frações: OCE10, OCE11 e OCE12. Todas as frações consistiam em óleos muito viscosos, à exceção da fração OCE5 que era constituída de um sólido branco cristalino.

Para as doze frações foram obtidos os espectros no infravermelho, de ressonância magnética nuclear e de massas. Da única fração (OCE5) que consistiu em um material branco cristalino foi também determinado o ponto de fusão.

Cada fração coletada foi novamente submetida à análise por CLAE, em coluna analítica, nas condições descritas no item 9(b) (p. 27), com vistas a confirmar sua pureza. Os cromatogramas resultantes dessa análise são apresentados na Figura I.7 (p. 55) e, conforme pode ser observado, todas as frações analisadas apresentaram um único pico.

No entanto, quando essas frações foram analisadas por RMN de ^1H , verificou-se que apenas as frações OCE1, OCE5, OCE6, OCE9, OCE10 e OCE11 eram constituídas de compostos puros. As frações OCE2, OCE8 e OCE12 eram constituídas de misturas de dois ou três isômeros e as frações OCE3, OCE4 e OCE7 eram constituídas de misturas de vários isômeros e, conseqüentemente, estas últimas não puderam ter seus constituintes identificados, uma vez que os espectros de RMN de ^1H das mesmas eram muito complexos.

Por meio do espectro de RMN de ^1H verificou-se, ainda, que OCE6 era constituída do mesmo composto da fração OCE1.

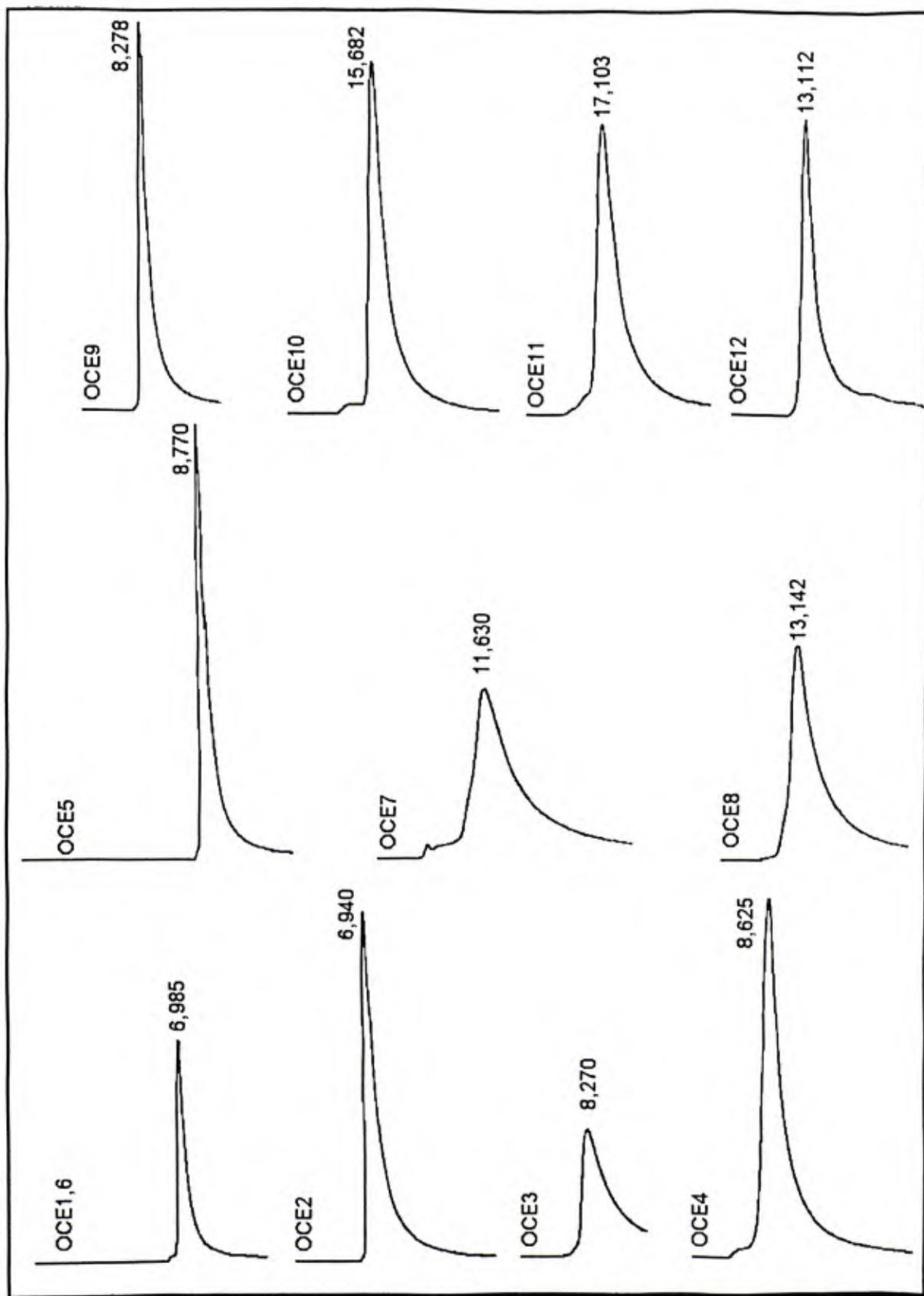


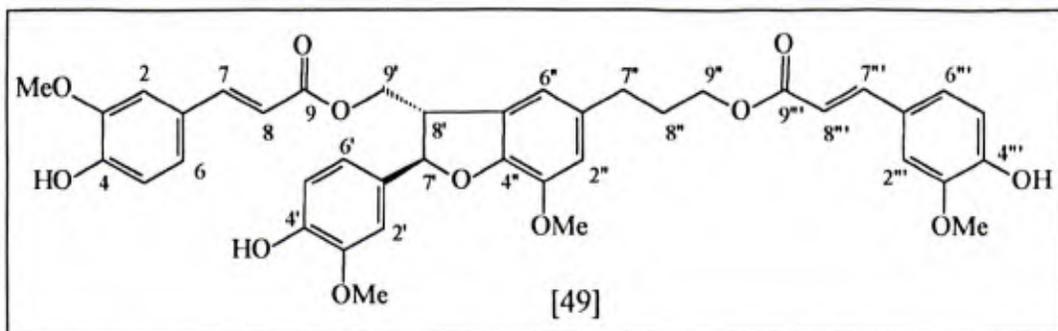
Figura I.7 - Cromatogramas Obtidos Para as Frações OCE1-12, Após Separação em CLAER, Para Verificar Seus Respetivos Graus de Pureza, nas Condições do Item 9(b), p. 27.

I.3.1.2. Identificação dos Constituintes de Cada Fração, Obtidos Após Separação por CLAE Reciclante

A elucidação estrutural dos compostos presentes nas frações OCE1 a OCE12 foi feita, principalmente, por estudos espectroscópicos detalhados de RMN de ^1H e ^{13}C , uni- e bi-dimensional (1D e 2D), sendo complementada por análises espectroscópicas no IV, de massas (EM) e ainda, pelo ponto de fusão, no caso do composto presente na fração OCE5.

A identificação dos constituintes de cada fração será descrita individualmente, a seguir. A discussão, não necessariamente, será feita por ordem de obtenção das frações, mas sim, por ordem de semelhança dos compostos presentes, para facilitar a discussão e/ou comparação dos dados.

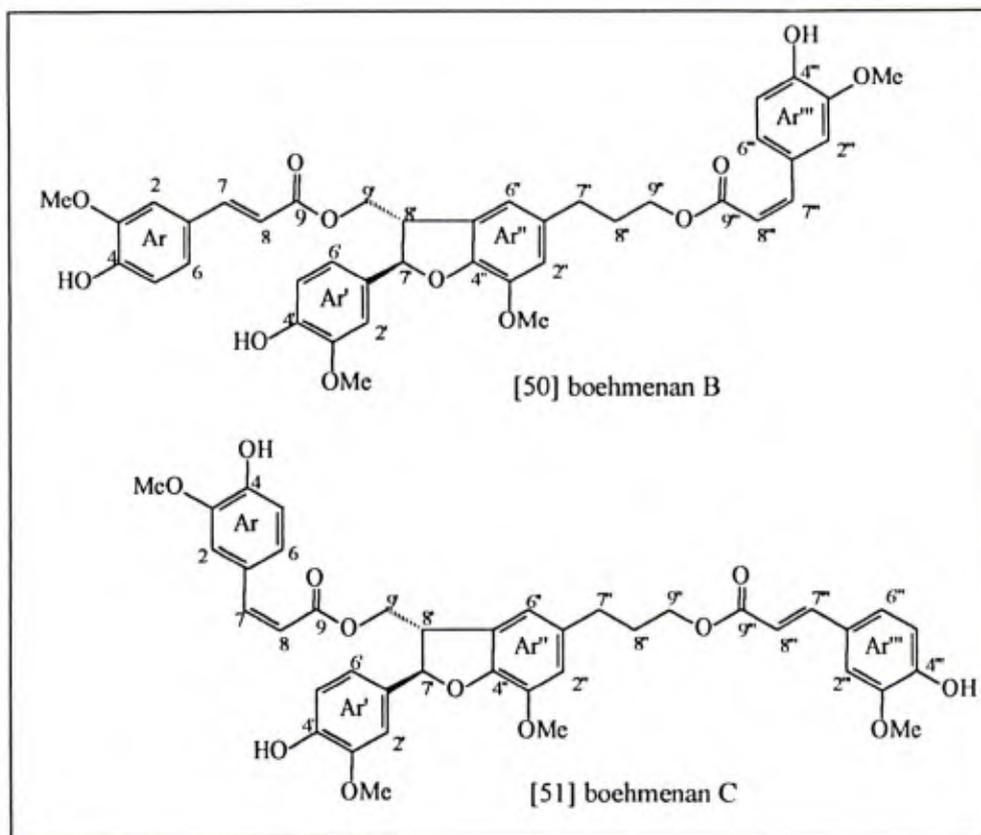
I.3.1.2.1. Frações OCE1 e OCE6: Boehmenan [49]



O espectro de RMN de ^1H revelou que as frações OCE1 e OCE6 consistiam em um único e mesmo composto e, estes dados, associados aos do espectro de massas, revelaram que este composto se tratava da boehmenan [49], isolada previamente deste extrato (PAULA, 1995) e de *Boehmeria tricuspis* (TAKEMOTO *et al.*, 1975). Embora boehmenan [49] seja um composto já isolado de *Ochroma lagopus* e sua determinação estrutural tenha sido feita detalhadamente em estudos prévios (PAULA, 1995), seus dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C serão reproduzidos nas Tabelas I.1 e I.2 (p. 71 e 93, respectivamente) para comparação com aqueles dos outros compostos. Seus espectros no IV (Figura 1, p. 213), de RMN de ^1H (Figuras

2A, p. 214 e 2B, p. 215), de RMN de ^{13}C (Figuras 3A, p. 216, 3B, p. 217 e 3C, p. 218) e massas (Figura 4, p. 219) também serão apresentados no Apêndice (p. 212).

1.3.1.2.2. Fração OCE2: Boehmenan [49], Boehmenan B [50] e Boehmenan C [51]



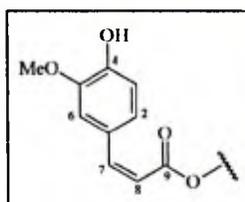
O espectro no IV da fração OCE2 foi muito semelhante ao espectro da boehmenan [49] (Fig. 1, Apêndice, p. 213), apresentando absorções principais em 3400 (OH), 3063, 3003 ($=\text{C-H}$), 2930, 2840 ($-\text{C-H}$), 1705 (C=O , α,β -insat.), 1631, 1600, 1518 (C=C), 1270, 1158, 1125 (C-O) e 963 cm^{-1} (C=C).

O espectro de massas desta fração também foi idêntico àquele da boehmenan [49] (Fig. 4, apêndice, p. 219), apresentando o pico do íon molecular $[\text{M}]^+$ em m/z (%) = 712 (7), correspondente à fórmula $\text{C}_{40}\text{H}_{40}\text{O}_{12}$, assim como outras importantes fragmentações em m/z (%) = 518 (100) $[\text{M} - \text{ácido ferúlico}]^+$, 324 (23) $[\text{M} - 2 \times \text{ácido ferúlico}]^+$, 194 (46) $[\text{ácido ferúlico}]^+$, 177 (88) $[\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_3]^+$ e 51 (43). Os fragmentos correspondentes a estes picos serão apresentados no Esquema I.1 (p. 70).

Os espectros de RMN de ^1H (Figuras I.8a, I.8b e I.8c, p. 59 a 61) revelaram a presença de três compostos na fração OCE2, sendo um deles claramente identificado como boehmenan [49] e os outros dois, estreitamente relacionados a ela. Esta grande semelhança entre os dois compostos e a boehmenan foi evidenciada pela sobreposição de vários sinais e pela pequena diferença nos deslocamentos químicos daqueles sinais dos três compostos que não foram coincidentes entre si.

Uma das principais diferenças observadas nos espectros (p. 59 a 61) foi que em vez dos quatro sinais correspondentes aos quatro hidrogênios *trans*-olefínicos (Tabela I.1, p. 71), H7 e H8, H7''' e H8''', característicos da boehmenan [49] apareceram quatro sinais, correspondendo a um hidrogênio cada, dois em δ 7,60 e 6,29 (J=16 Hz, H7 e H8) atribuídos ao composto denominado [50] e outros dois respectivamente em δ 7,48 e 6,21 (J=16 Hz, H7''' e H8'''), atribuídos ao composto denominado [51]. Outros quatro sinais, cada um também correspondendo a um hidrogênio olefínico, atribuídos aos compostos [50] e [51], apareceram em δ 6,80 e 5,81 (J=12,8 Hz, H7''' e H8''') e em δ 6,89 e 5,75 (J=12,8 Hz, H7 e H8), respectivamente. Tais sinais evidenciaram a presença de uma ligação dupla *cis*, que ainda foi confirmada pelo valor de nOe (11%) observado entre os hidrogênios H7'''/H8''' e H7/H8 de [50] e [51], respectivamente.

Em consequência da presença da ligação dupla *cis* em cada composto, verificou-se um deslocamento dos dois dupletos devidos a H2''' de [50] e H2 de [51], respectivamente, quando comparados com os mesmos hidrogênios correspondentes da boehmenan [49] (Tab. I.1, p. 71). Os sinais de H2''' e H2, que em [49] apareceram em δ 7,00 e 6,96, respectivamente, devido à geometria *cis* da ligação dupla em [50] e [51], são fortemente desblindados pela carbonila, aparecendo em δ 7,77 e 7,72, respectivamente.



As demais ressonâncias dos hidrogênios de [50] e [51] foram muito semelhantes àsquelas da boehmenan [49] (Tabela I.1, p. 71).

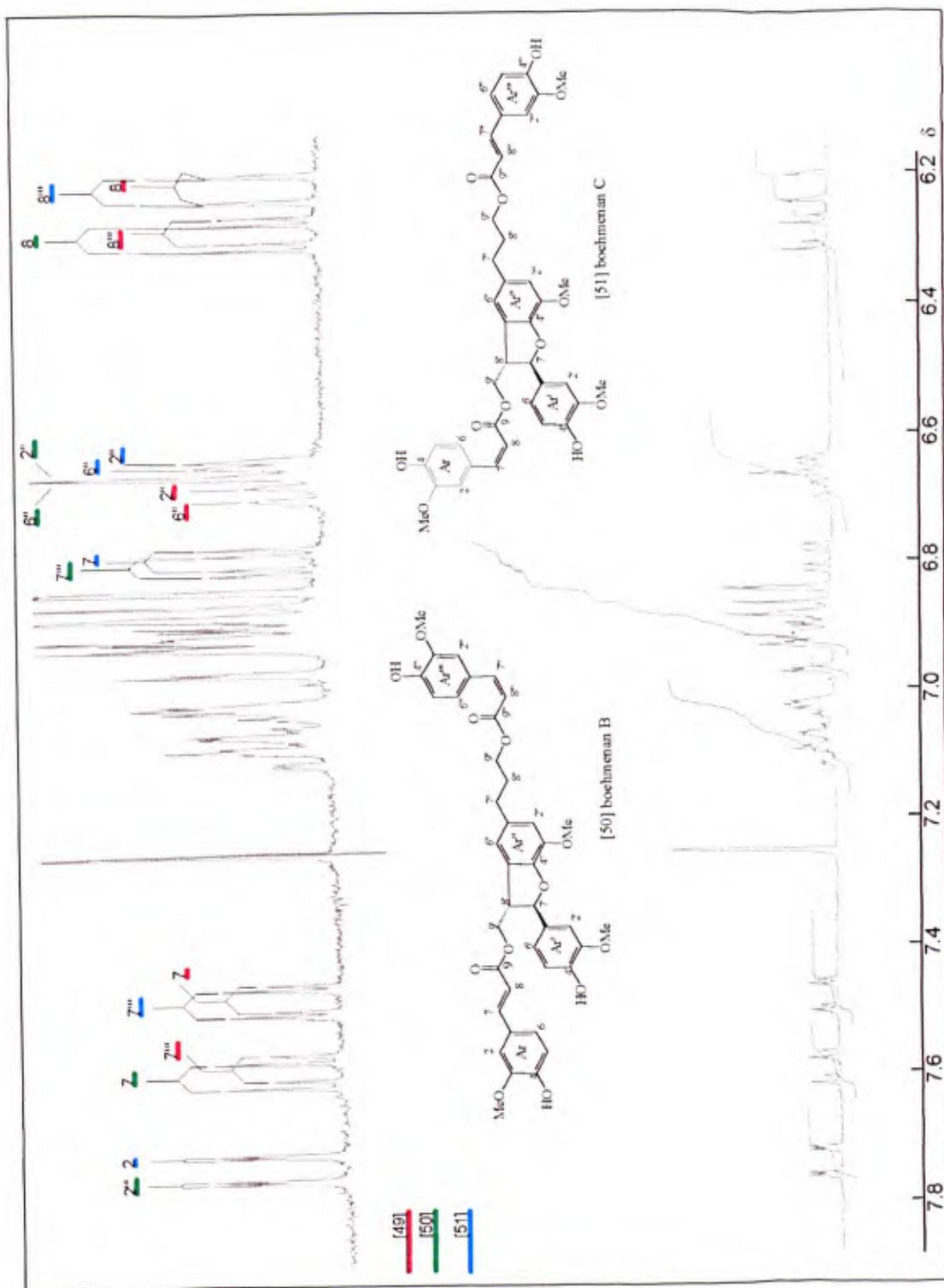


Figura 1.8a - Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) da Fração OCE2 (Compostos [49], [50] e [51]), Região de δ 7,8 a 6,2.

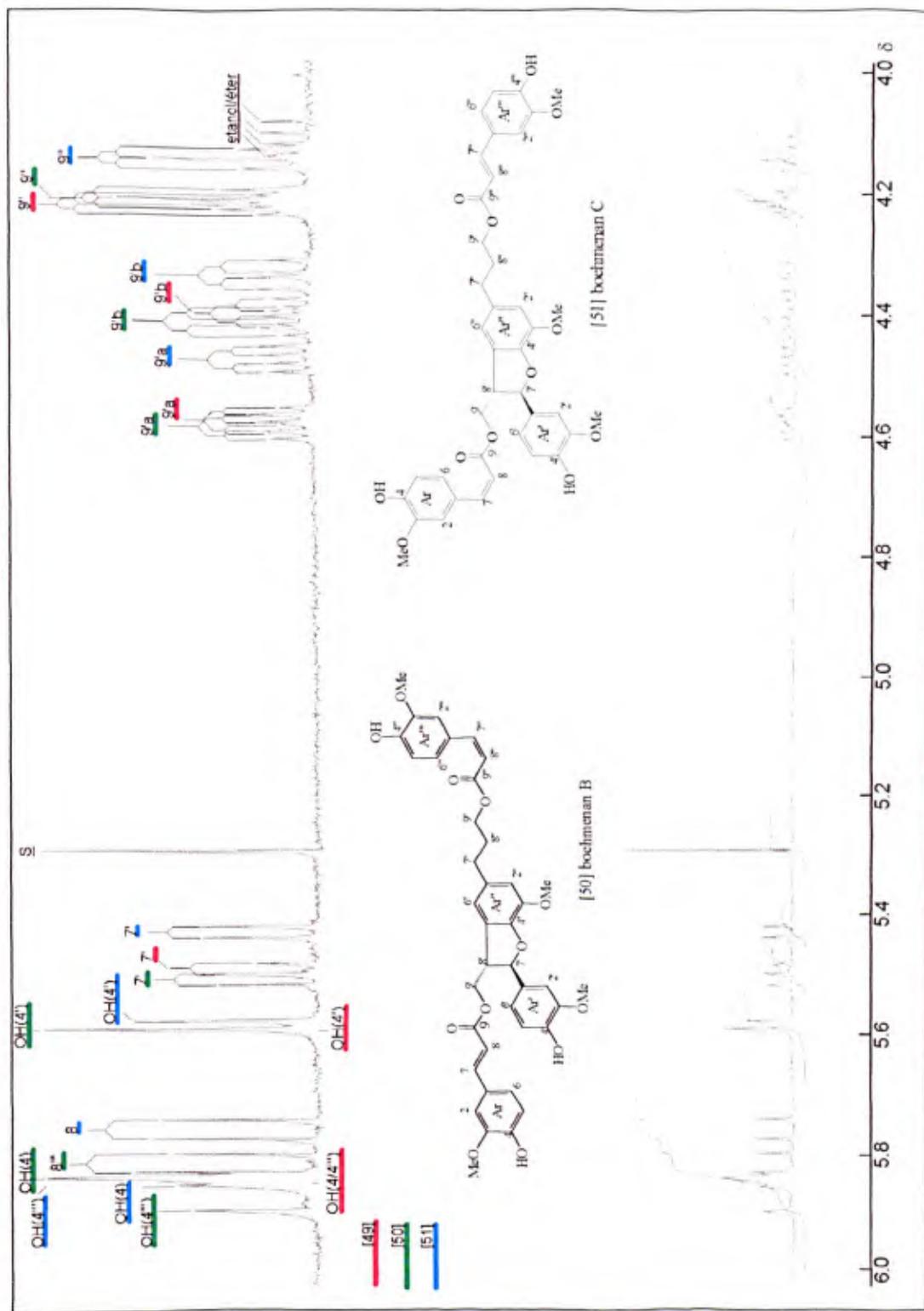


Figura I.8b - Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) da Fração OCE2 (Compostos [49], [50] e [51]), Região de δ 6,0 a 4,0.

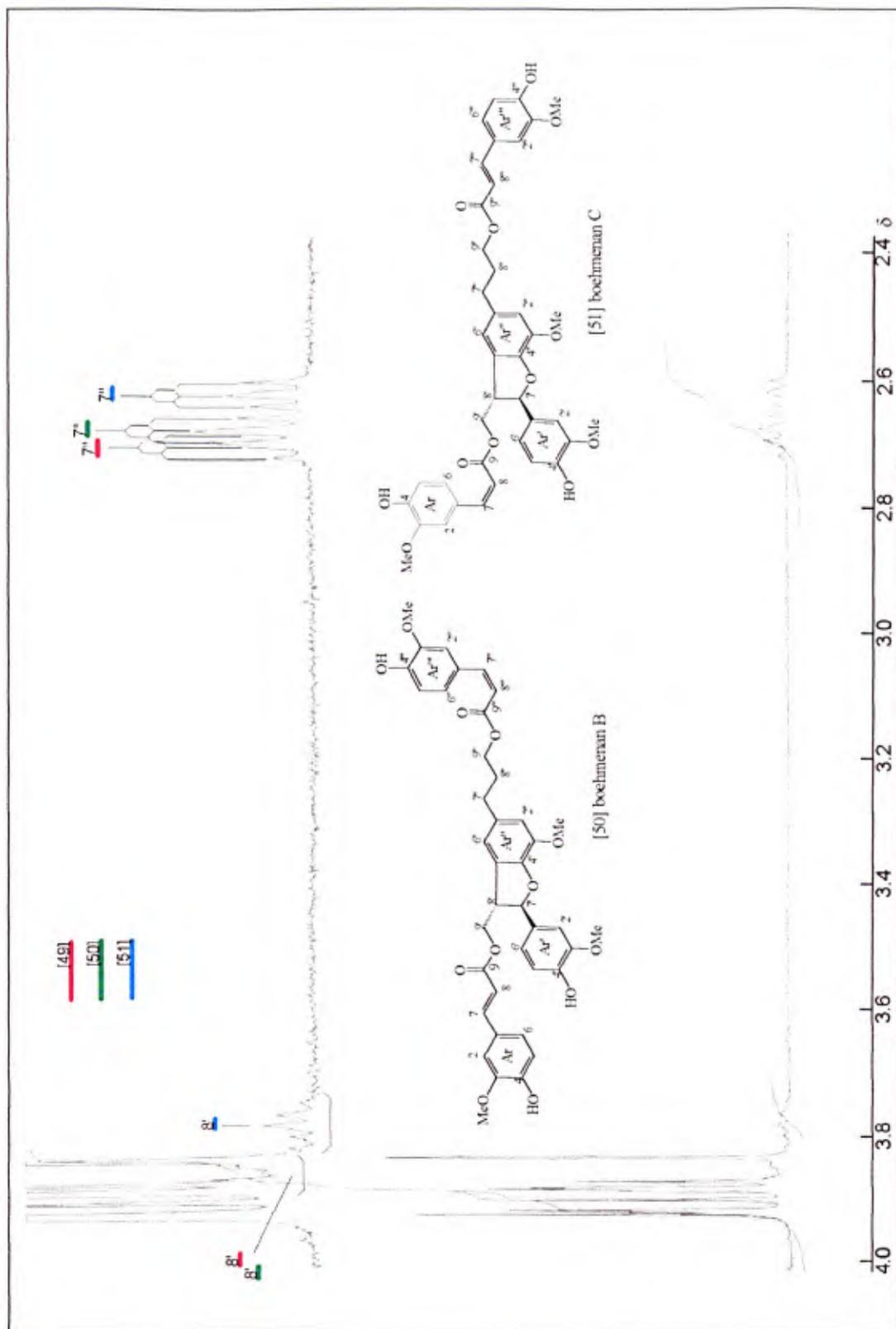


Figura I.8c - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE2 (Compostos [49], [50] e [51]), Região de δ 4,0 a 2,4.

observada para a boehmenan ($J_{7,8'}=7,7$ Hz). Portanto, a estereoquímica relativa entre C7' e C8' de [50] e [51] foi também considerada *trans*.

Os simpletos respectivamente observados em δ 5,58 (1H), 5,59 (1H), 5,84 (2H), 5,85 (1H) e 5,89 (1H) no espectro da Fig. I.8b (p. 60) foram atribuídos às três hidroxilas dos compostos [50] e [51].

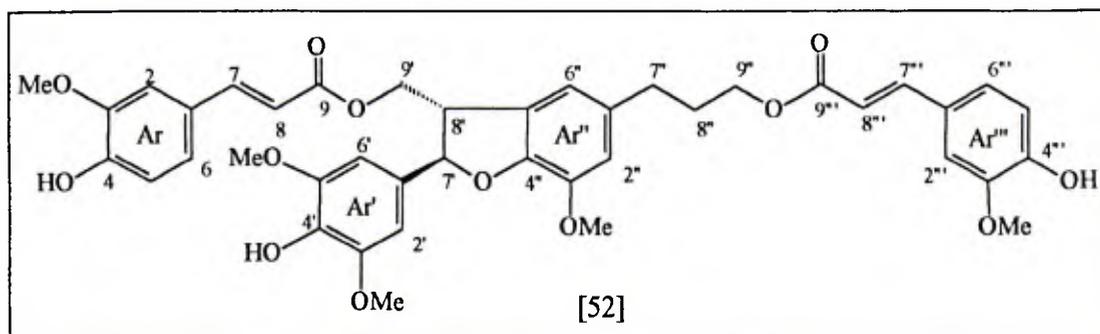
Os simpletos alargados observados na Fig. I.8a (p. 59) em δ 6,66 e 6,64 (H2'' e H6'' de [50]) e em δ 6,66 e 6,65 (H2'' e H6'' de [51]) confirmaram a presença do anel aromático Ar'' tetrassubstituído assimétrico (p. 57).

Os sinais dos demais hidrogênios aromáticos apareceram na região de δ 6,86 a 7,09, com exceção de H2''' e H2, de [50] e [51], respectivamente, que, como visto anteriormente, apareceram mais desblindados. As atribuições completas destes sinais de hidrogênios, bem como todas as outras, para [50] e [51], serão apresentadas na Tab. I.1 (p. 71), juntamente com aquelas da boehmenan [49].

Diante destes dados chegou-se à conclusão que os compostos [50] e [51] (p. 57) diferiam da boehmenan [49] (p. 56) apenas por apresentarem uma das ligações duplas *cis*, ora do lado direito, como em [50], ora do lado esquerdo, como em [51]. Assim foram identificados dois novos compostos ainda não descritos na literatura, seja como constituintes de plantas ou como produtos sintéticos.

Devido à grande semelhança de [50] e [51] com a boehmenan [49], eles foram denominados boehmenan B e C, respectivamente (p. 57).

I.3.1.2.3. Fração OCE9: Boehmenan D [52]



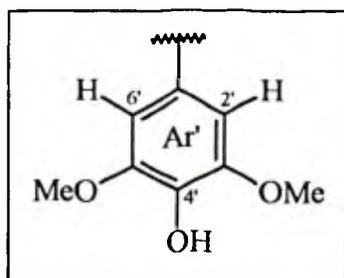
O espectro no IV da fração OCE9 foi também muito similar àquele da boehmenan [49] (Figura 1, p. 213, Apêndice) e mostrou as principais absorções em 3400 (OH), 3060, 3000 ($\underline{=C-H}$), 2928, 2841 ($\underline{-C-H}$), 1702 (C=O), 1630, 1600 e 1520 (C=C) e 1267, 1162, 1128 cm^{-1} (C-O).

Os espectros de RMN de ^1H (Figuras I.9a, I.9b e I.9c, p. 65 a 67) revelaram que esta fração era constituída de um único composto, cujas ressonâncias dos hidrogênios eram também muito similares às da boehmenan [49].

Uma das principais diferenças observadas neste espectro, quando comparado ao espectro da boehmenan [49], foi a presença de um sinal devido a uma metoxila extra em δ 3,83 apresentado na Fig. I.9c, (s, 6H, 2 x OMe; p. 67), resultando num total de 42 hidrogênios, em vez dos 40 apresentados pela boehmenan [49] (Figuras 2A, p. 214 e 2B, p. 215; Apêndice).

Outras importantes diferenças foram o desaparecimento do sinal de H5' entre δ 6,90-6,89 (Fig. I.9a, p. 65) e o deslocamento para regiões de sinais mais blindados (δ 6,65) das ressonâncias correspondentes a H2' e H6' (Figura 2A, p. 214; Apêndice) que no espectro de OCE9 (Fig. I.9a, p. 65) apareceram magneticamente equivalentes como um simpleto (2H) em δ 6,65, em vez de um duplete (δ 6,93) e duplete duplo (δ 6,87), respectivamente, como apareceram no espectro de boehmenan [49] (p. 214). Estes dados evidenciaram a localização da metoxila extra em C5', uma vez que nenhuma outra diferença significativa foi observada nos demais sinais.

O fato dos sinais de H2' e H6' aparecerem como simpletos com mesmo valor de δ é explicado pela equivalência química desses dois hidrogênios, pois, com a introdução da metoxila extra em C5', o anel Ar' tornou-se simétrico, como pode ser observado a seguir:



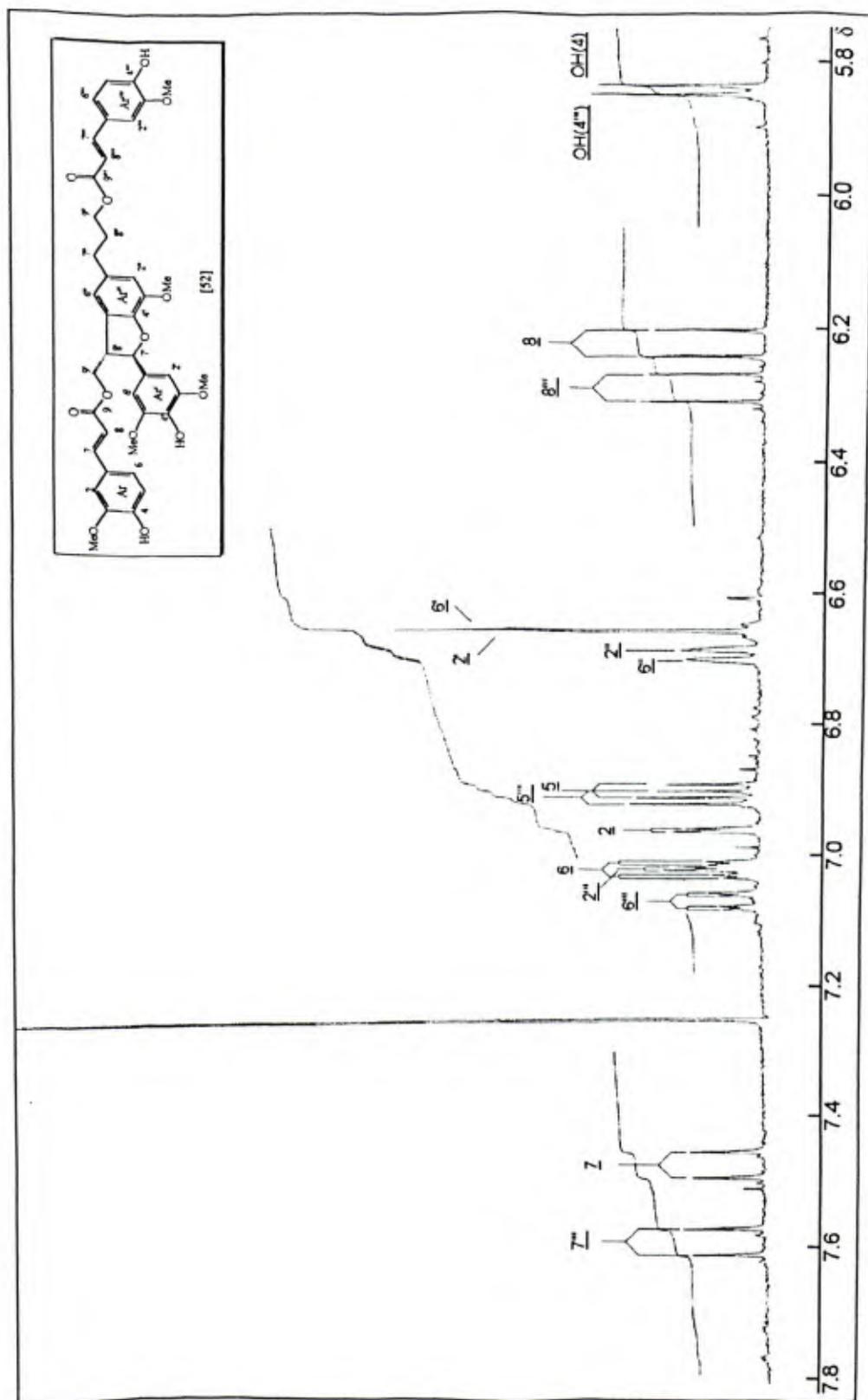


Figura I.9a - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE9 (Composto [52]), Região de δ 7,8 a 5,8.

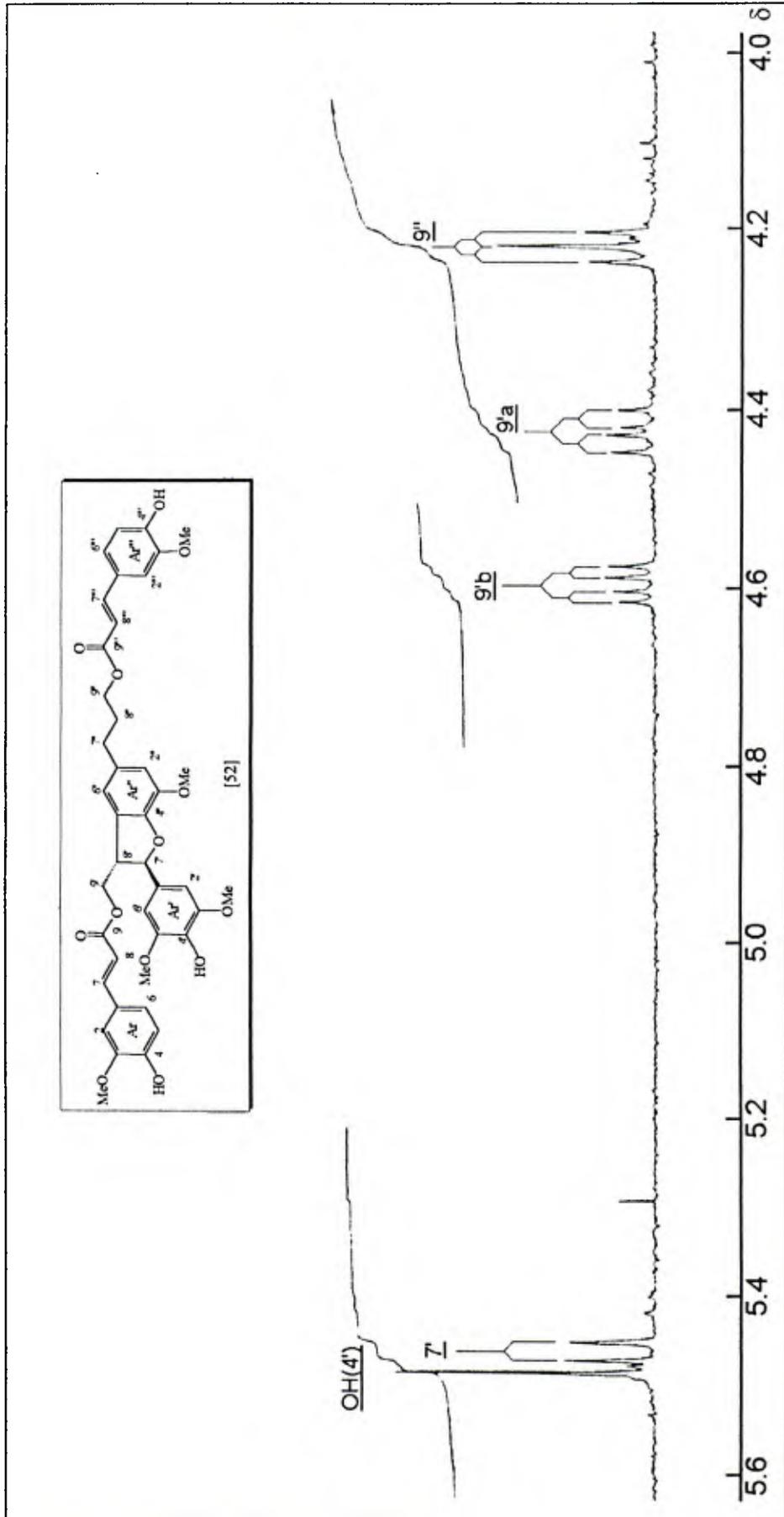


Figura I.9b - Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) da Fração OCE9 (Composto [52]), Região de δ 5,6 a 4,0.

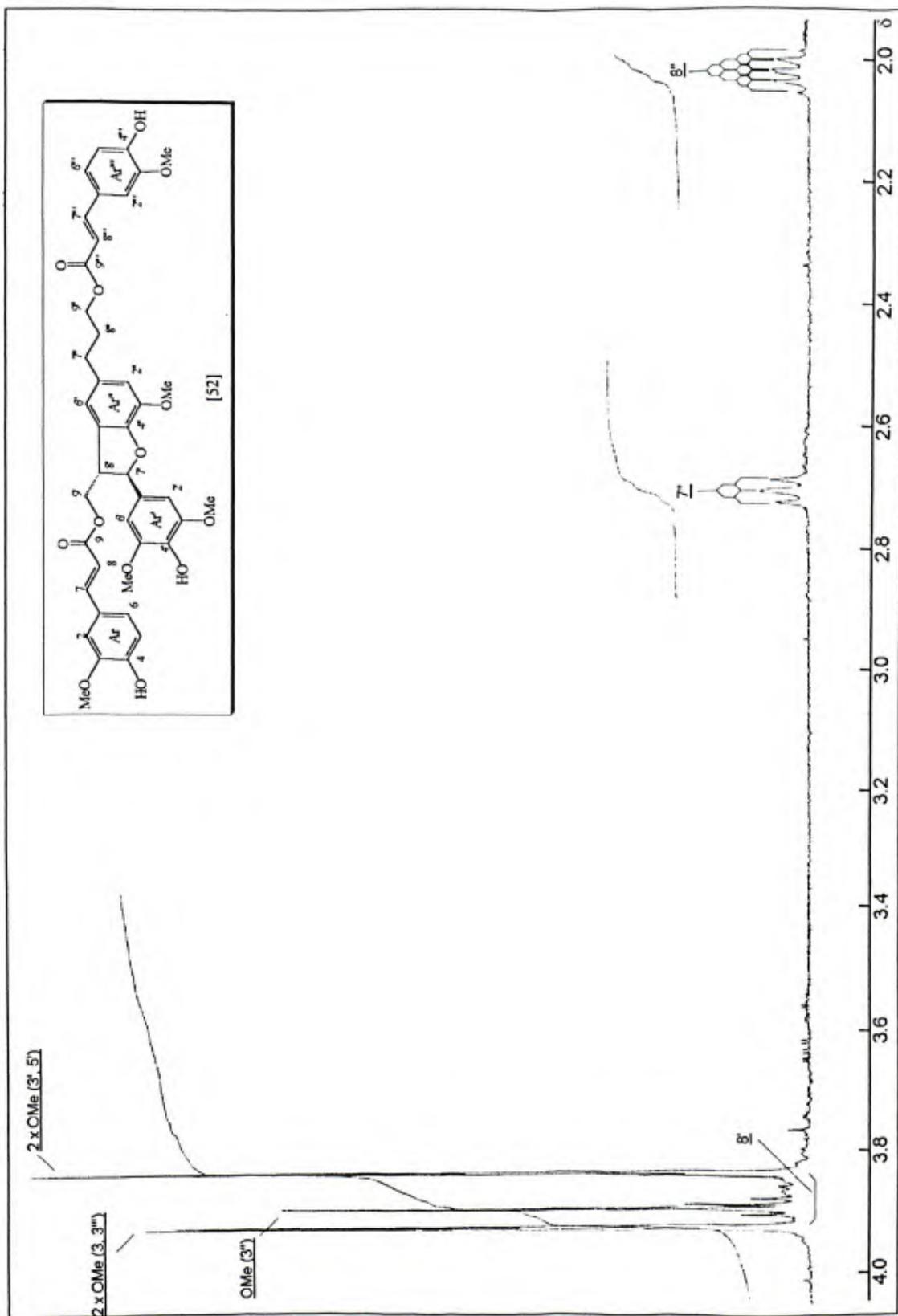


Figura I.9c - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE9 (Composto [52]), Região de δ 4,0 a 2,0.

Ainda pode ser observado na Figura I.9a (p. 65) que, em consequência da simetria e equivalência magnética de H2' e H6' e da substituição de H5', a região de hidrogênios aromáticos ficou bastante simplificada, facilitando as demais atribuições correspondentes aos anéis Ar e Ar''' (p. 63). A presença de dois sistemas de *spin* dos hidrogênios aromáticos AMX, Ar e Ar''', entre δ 7,10 a 6,85, pertencentes às correspondentes unidades de ferulato, assim como na boehmenan [49] (p. 56), também foi observada para este composto. Os sinais em δ 7,02 (dd, $J_1=8,0$ e $J_2=2,0$ Hz, H6), δ 6,90 (d, $J=8,0$ Hz, H5) e δ 6,96 (d, $J=2,0$ Hz, H2) foram atribuídos aos hidrogênios do grupo Ar e aqueles observados em δ 7,06 (dd, $J_1=8,0$ e $J_2=2,0$ Hz, H6'''), δ 6,91 (d, $J=8,0$ Hz, H5''') e δ 7,02 (d, $J=2,0$ Hz, H2''') aos do grupo Ar'''.

As ligações duplas *trans* presentes nas duas unidades de ferulato também foram evidenciadas pelos dois pares de dupletos ($J=16,0$ Hz) em δ 7,47 (H7) e 6,22 (H8) e δ 7,58 (H7''')/6,29 (H8'''). Todas as outras ressonâncias deste composto foram muito similares àquelas da boehmenan [49] e seus deslocamentos químicos estão relacionados na Tabela I.1 (p. 71).

A estereoquímica relativa de C7' e C8' foi considerada a mesma da boehmenan [49], pois, $J_{7,8}$ foi praticamente o mesmo (7,8 Hz e 7,7 Hz, respectivamente) para os dois compostos. Portanto, determinou-se que o composto presente na fração OCE9 diferia da boehmenan [49] pela presença de uma metoxila em C5', correspondendo, desta forma, à estrutura apresentada para o composto [52], na p. 63.

A estrutura proposta para [52] ainda foi confirmada pelo espectro de massas (Fig. I.10, p. 69) que, embora não tenha apresentado o pico do íon molecular $[M^+]$ em $m/z=742$, apresentou picos devidos a fragmentações facilmente caracterizáveis em m/z (%) = 548 (100) $[M - \text{ácido ferúlico}]^+$, 354 (15) $[M - 2 \times \text{ácido ferúlico}]^+$, 194 (40) $[\text{ácido ferúlico}]^+$ e 177 (85) $[C_{10}H_9O_3]^+$. Estas fragmentações são apresentadas no Esq. I.1 (p. 70), juntamente com aquelas propostas apresentadas para interpretar os espectros de massas dos compostos [49], [50] e [51]. O composto [52] ainda não havia sido descrito na literatura e, também, pela grande semelhança com a boehmenan [49] foi denominado boehmenan D.

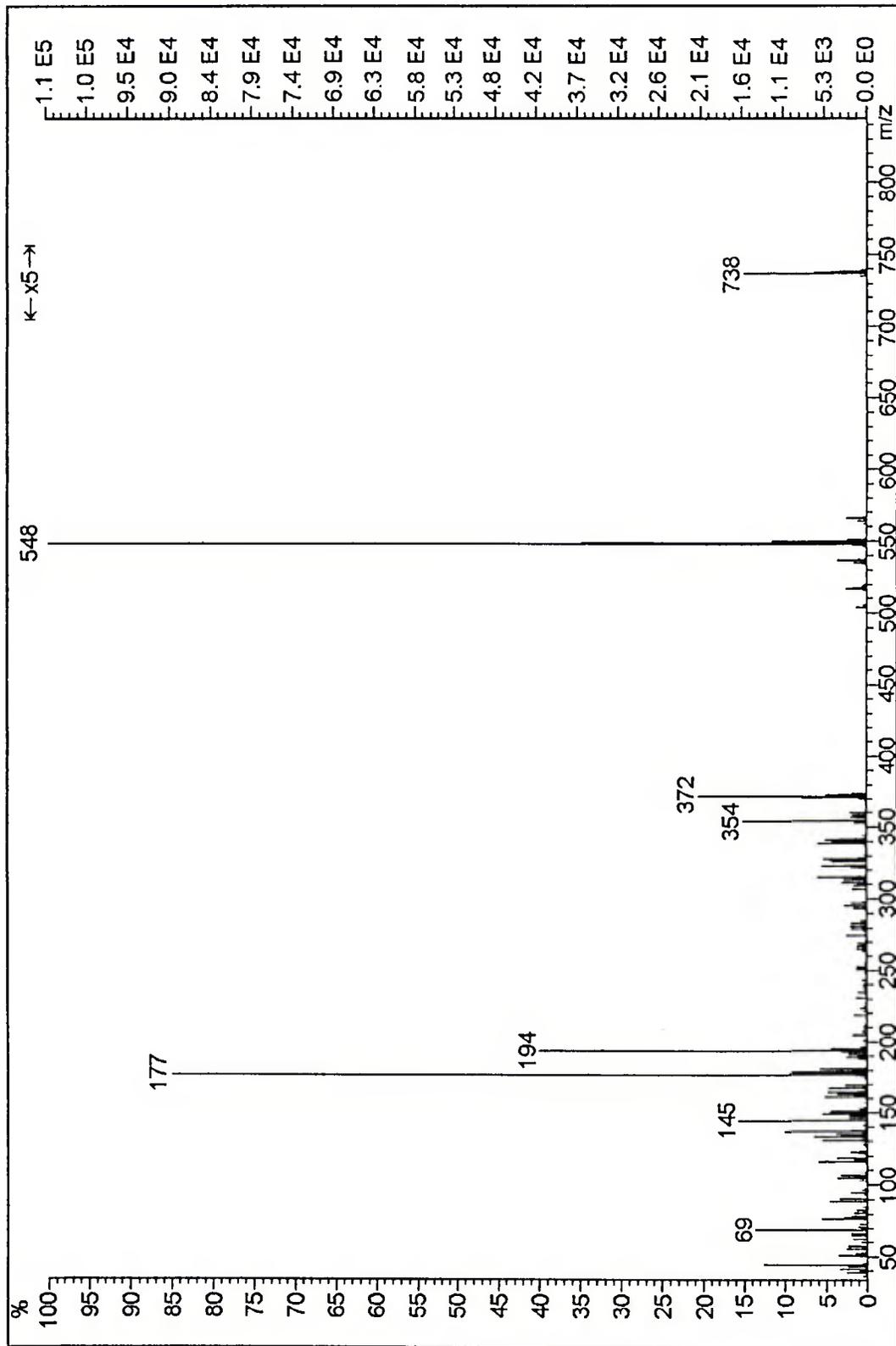
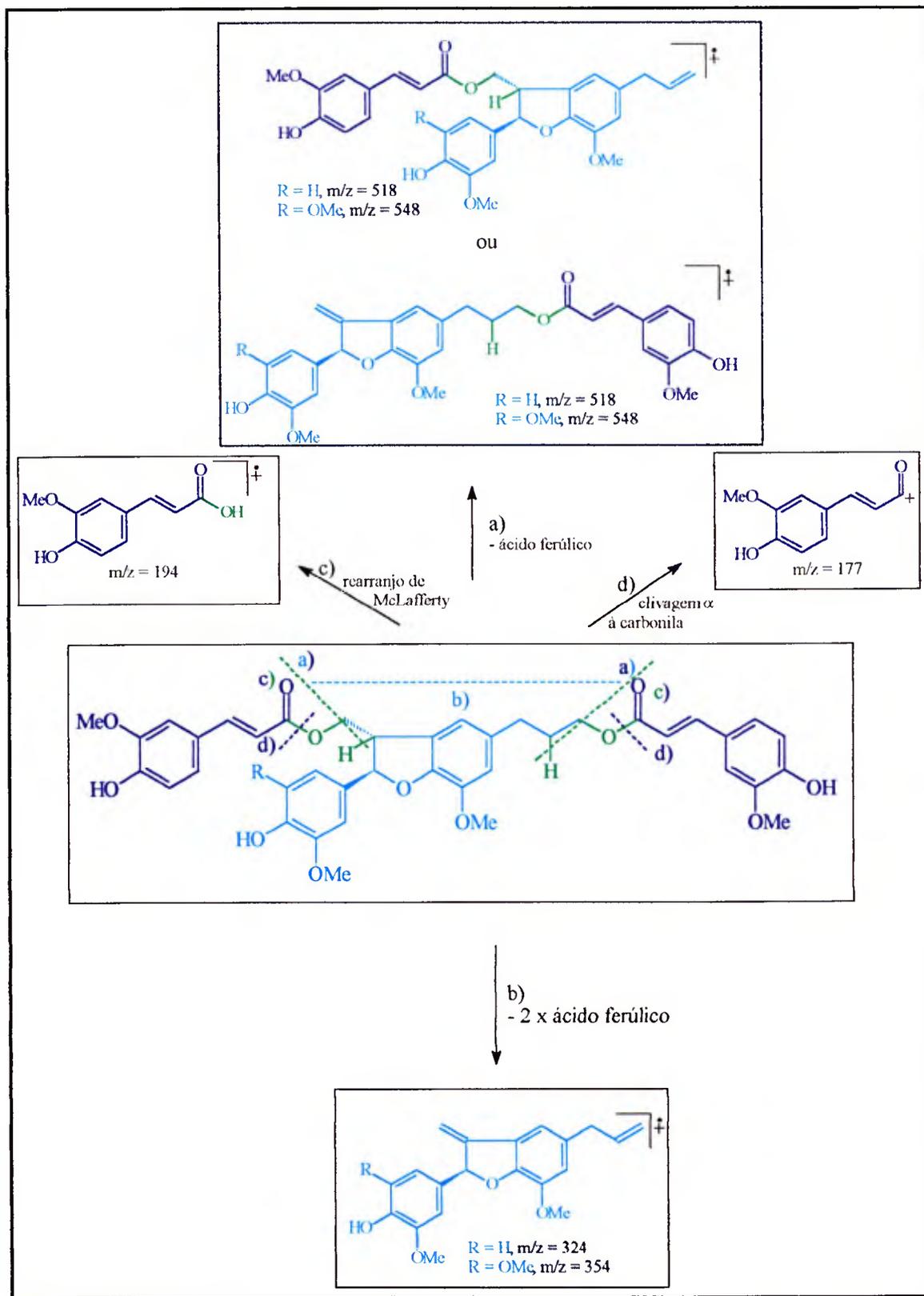


Figura I.10 - Espectro de Massas (IE) da Fração OCE9 (Composto [52]).



Esquema I.1 - Principais Fragmentações Apresentadas pelos Compostos [49], [50], [51] e [52] na Espectrometria de Massas.

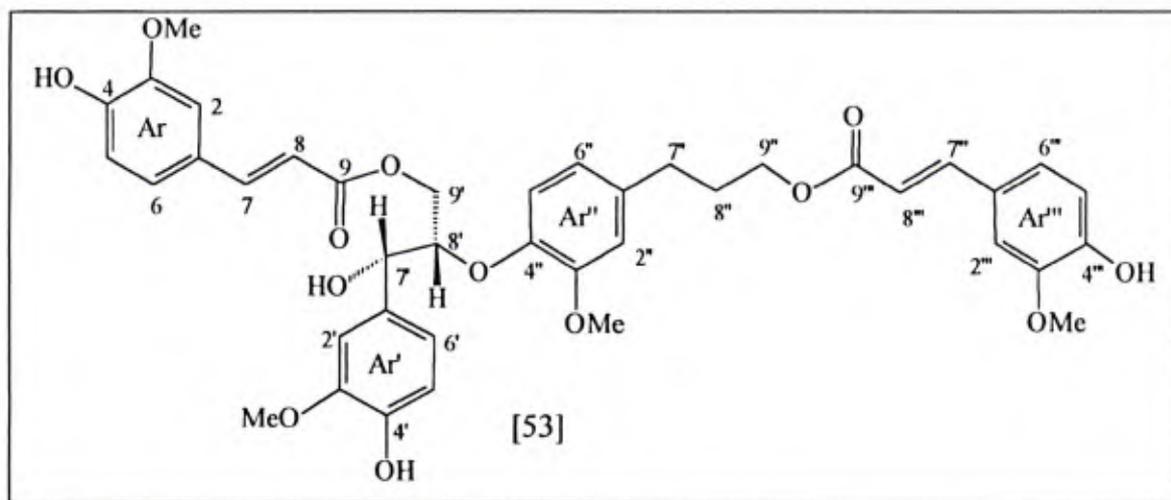
Tabela I.1. Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para os compostos [49], [50], [51] e [52]

H	[49] $\delta^{\#}$ (m,J/Hz)	[50] δ (m,J/Hz)	[51] δ (m,J/Hz)	[52] δ (m,J/Hz)
2	6,96(d,2,1)	7,04(d,2,0)	7,72(d,2,0)	6,96(d,2,0)
3-OMe*	3,82(s)	3,82(s)	3,82(s)	3,83(s)
4-OH	5,92(sl)	5,84(sl)	5,85(s)	5,84(s) ou 5,83(s)
5	6,92(d,8,3)	6,88(d,8,0)	6,90(d,8,0)	6,90(d,8,0)
6	7,05(dd,8,3;2,1)	7,09(dd,8,0;2,0)	7,11(dd,8,0;2,0)	7,02(dd,8,0;2,0)
7	7,48(d,16,0)	7,60(d,16,0)	6,79(d,12,8)	7,47(d,16,0)
8	6,22(d,16,0)	6,29(d,16,0)	5,75(d,12,8)	6,22(d,16,0)
2'	6,93(d,2,1)	6,92(m)	6,89(m)	6,65(s)
3'-OMe*	3,88(s)	3,82(s)	3,82(s)	3,89(s)
4'-OH	5,65(sl)	5,59(s)	5,58(s)	5,48(s)
5'	6,89(d,8,3)	6,90(m)	6,90(m)	-----
5'-OMe*	-----	-----	-----	3,83 (s)
6'	6,87(dd, 8,3;2,1)	6,92(m)	6,86(m)	6,65(s)
7'	5,48(d,7,7)	5,50(d,7,4)	5,42(d,7,4)	5,44(d,7,8)
8'	3,85(m)	3,85(m)	3,78(m)	3,86(m)
9'b	4,57(dd,11,1;5,1)	4,58(dd,11,0;5,7)	4,47(dd,11,0;5,7)	4,60(dd,11,2;5,0)
9'a	4,41(dd,11,1;7,8)	4,40(dd,11,1;7,8)	4,36(dd,11,0;7,0)	4,43(dd,11,2;8,0)
2''	6,68(sl)	6,66(sl)	6,65(sl)	6,65(sl)
3''-OMe*	3,91(s)	3,92(s)	3,92(s)	3,92(s) ou 3,91(s)
6''	6,70(sl)	6,66(sl)	6,64(sl)	6,70(sl)
7''	2,69(t,7,5)	2,68(t,7,8)	2,62(t,7,8)	2,70(t,7,5)
8''	2,02(tt,7,5;6,5)	2,00(tt,7,8;6,5)	1,95(tt,7,8;6,5)	2,02(tt,7,5;6,5)
9''	4,22(t,6,5)	4,21(t,6,5)	4,14(t,6,5)	4,22(t,6,5)
2'''	7,00(d,2,1)	7,77(d,2,0)	6,98(d,2,0)	7,02(d,2,0)
3'''-OMe*	3,91(s)	3,92(s)	3,92(s)	3,92(s) ou 3,91(s)
4'''-OH	5,92(sl)	5,89(s)	5,84(sl)	5,83(s) ou 5,84(s)
5'''	6,91(d,8,3)	6,91(d,8,0)	6,86(d,8,0)	6,91(d,8,0)
6'''	7,05(dd,8,3;2,1)	7,08(dd,8,0;2,0)	7,04(dd,8,0;2,0)	7,06(dd,8,0;2,0)
7'''	7,58(d,16,0)	6,80(d,12,8)	7,48(d,16,0)	7,58(d,16,0)
8'''	6,28(d,16,0)	5,81(d,12,8)	6,21(d,16,0)	6,29(d,16,0)

* Algumas das atribuições das metoxilas podem estar trocadas.

Os valores de deslocamentos químicos de [49] foram obtidos do espectro deste composto puro.

I.3.1.2.4. Fração OCE10: Carolignana A [53]



O espectro no IV da fração OCE10 (Figura I.11, p. 73) mostrou-se muito semelhante àquele da boehmenan [49] (Figura 1, p. 213, Apêndice), apresentando absorções em 3400 (OH), 3070, 3005 ($=\underline{C-H}$), 2982, 2930, 2840 ($-\underline{C-H}$), 1704 (C=O), 1630, 1600, 1523 (C=C arom.) e 1272, 1160, 1120 cm^{-1} (C-O).

Os espectros de RMN de ^1H (Figuras I.12a, I.12b e I.12c, p. 74 a 76) desta fração revelaram que esta era constituída de um único composto e apresentou sinais correspondentes a 42 hidrogênios, a maioria deles com deslocamentos químicos (δ), multiplicidades e constantes de acoplamentos muito parecidos com aqueles apresentados pela boehmenan [49], sugerindo uma relativa semelhança entre eles.

Assim como para o espectro de RMN de ^1H da boehmenan [49] (p.214 e 215), foram observados sinais devidos a: a) quatro metoxilas, representadas respectivamente pelos simpletos em torno de δ 3,86 (2 x OMe) e de δ 3,92 (2 x OMe) (Figura I.12c, p. 76); b) quatro hidrogênios olefinicos (*trans*) respectivamente em δ 7,60 (d, $J=16$ Hz, $\text{H}7''''$), δ 7,49 (d, $J=16$ Hz, $\text{H}7$), δ 6,29 (d, $J=16$ Hz, $\text{H}8''''$) e δ 6,22 (d, $J=16$ Hz, $\text{H}8$) (Figura I.12a, p. 74); c) seis hidrogênios de unidade $\text{C}_3 - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ evidenciados respectivamente em δ 2,05-2,00 (m, 2H, $\text{H}8''$), δ 2,69 (ddl, $J_1=7,7$ e $J_2=7,2$ Hz, 2H, $\text{H}7''$) e δ 4,21(t, $J=6,5$ Hz, 2H, $\text{H}9''$) (Figura I.12c, p. 76). Estes dados são também apresentados na Tabela I.3 (p. 110).

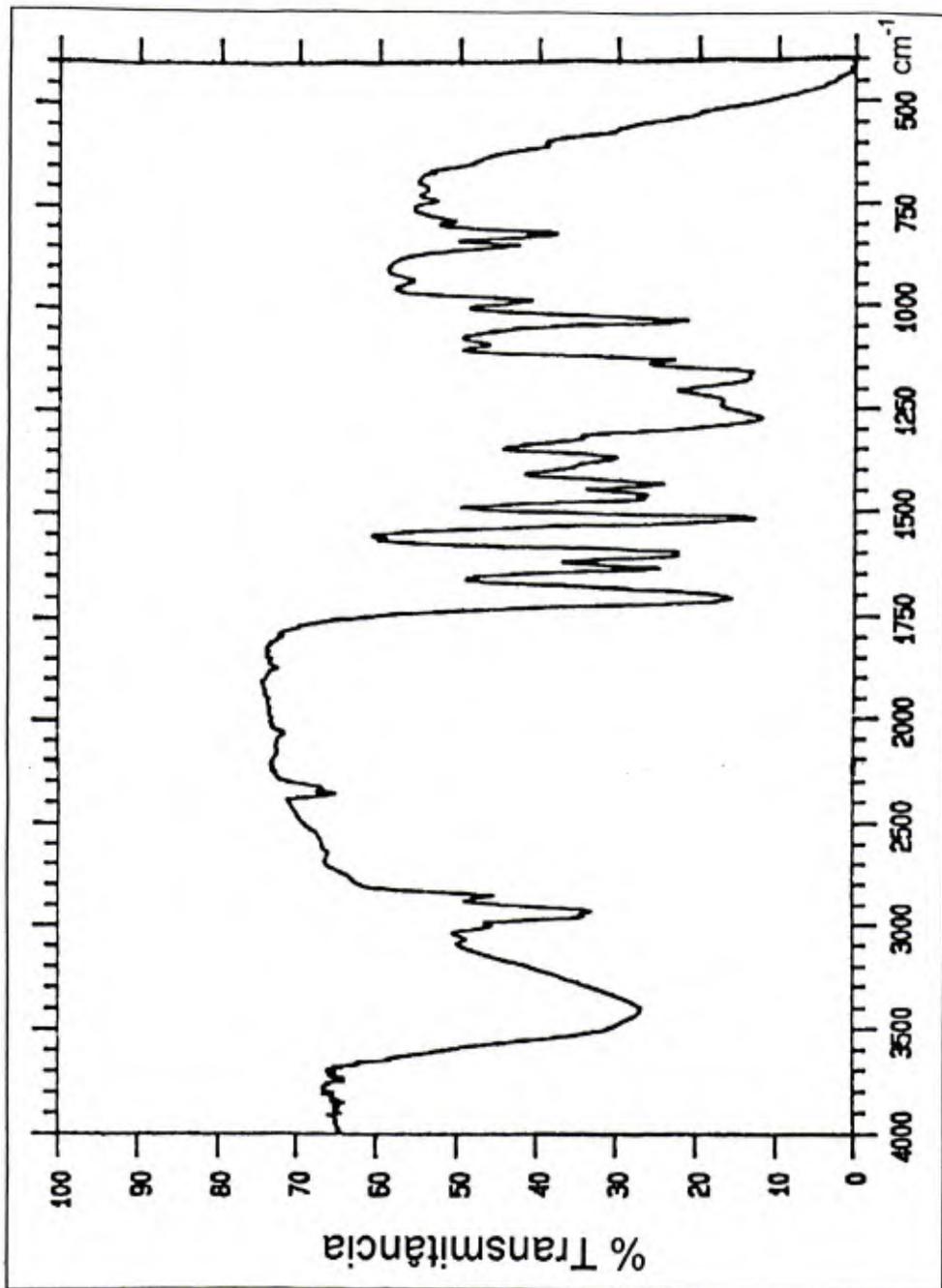


Figura I.11 - Espectro no Infravermelho da Fração OCE10 (Composto [53]) em KBr.

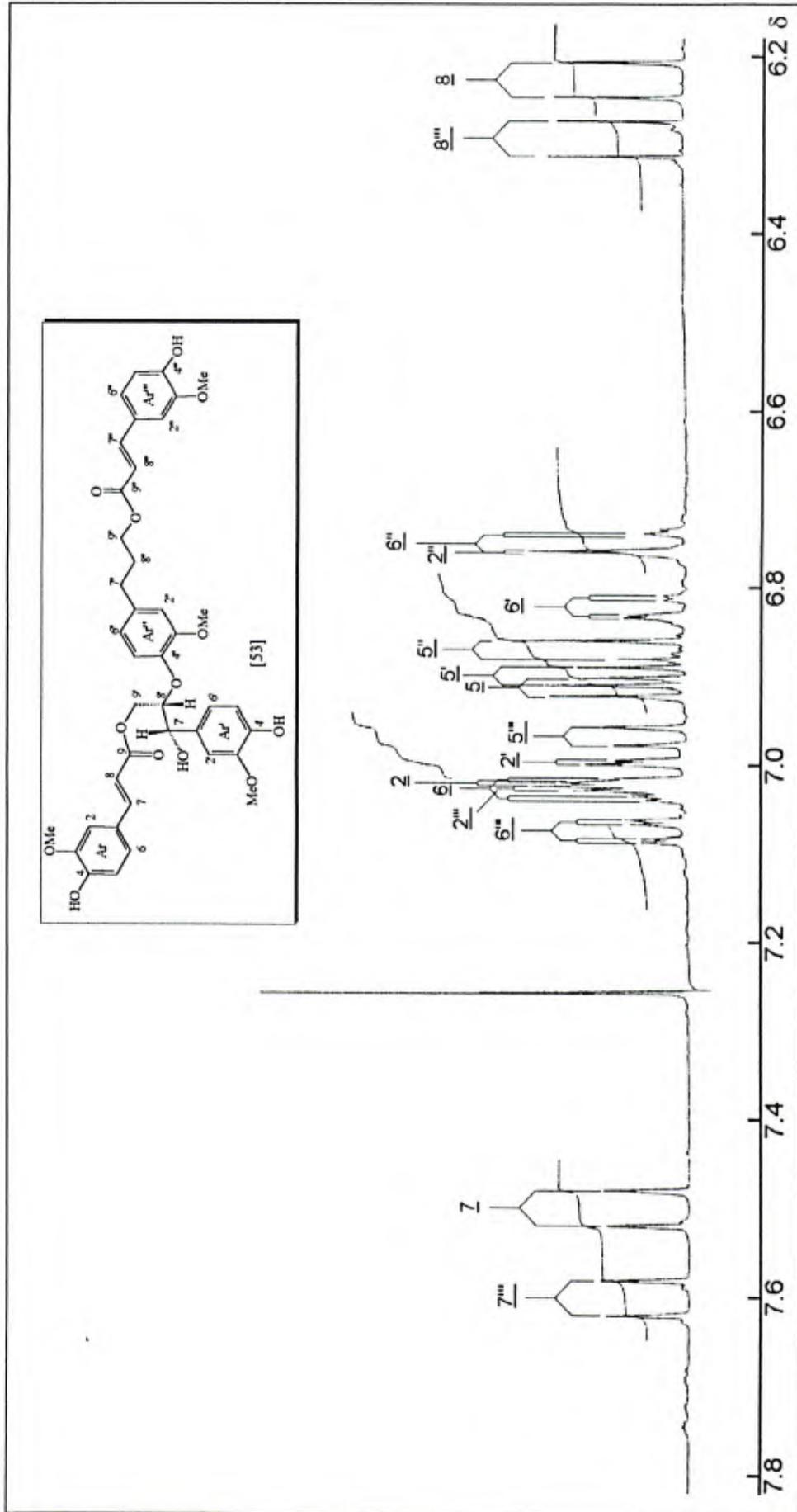


Figura I.12a - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE10 (Composto [53]), Região de δ 7,8 a 6,2.

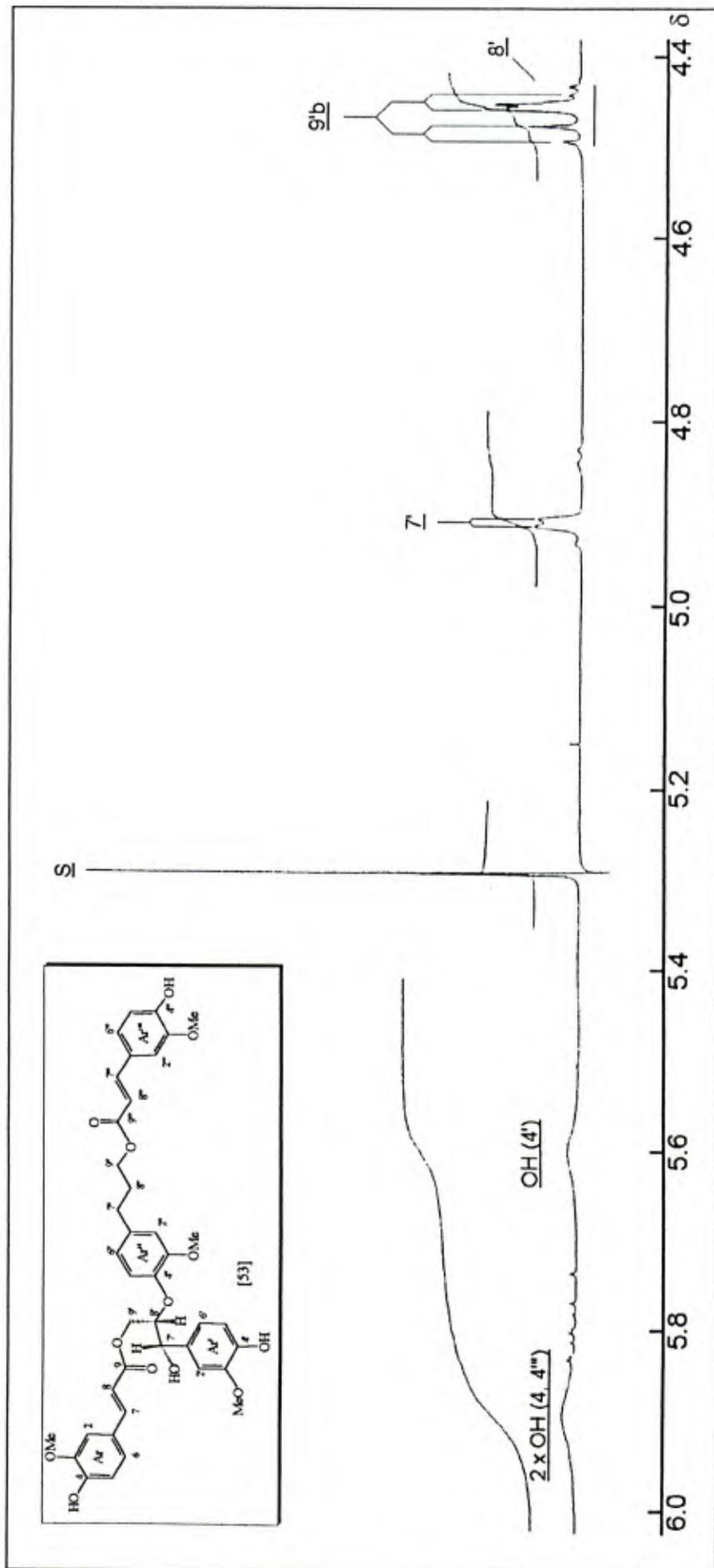


Figura I.12b - Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) da Fração OCE10 (Composto [53]), Região de δ 6,0 a 4,4.

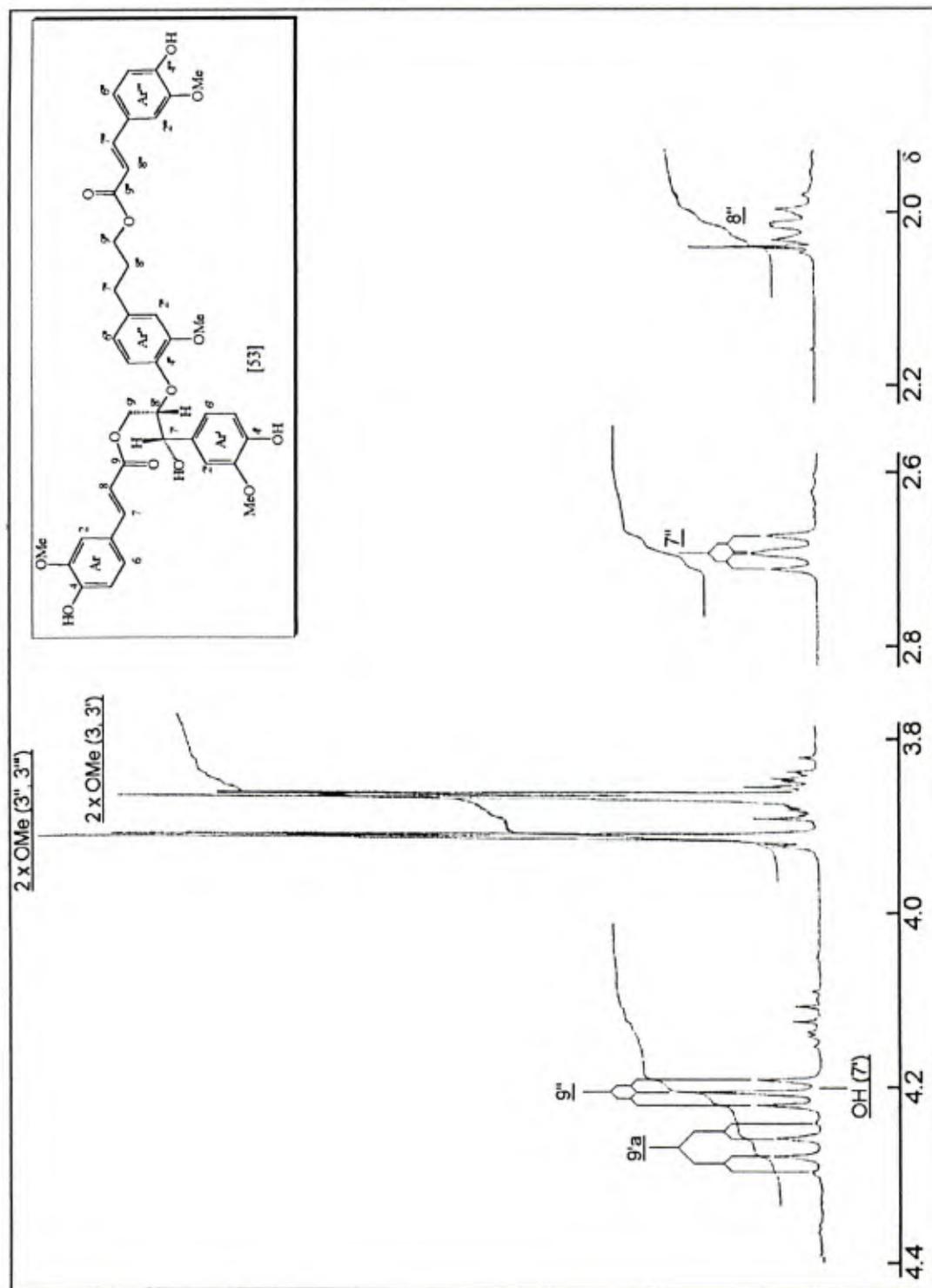


Figura I.12c - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE10 (Composto [53]), Região de δ 4,4 a 2,0.

As principais diferenças observadas no espectro de RMN de ^1H de OCE10 quando comparado com o de [49] (p. 214 e 215) foram a presença de sinais devidos a uma hidroxila (δ 4,20, s, 7-OH) (Fig. I.12c, p. 76) e a um hidrogênio aromático (δ 6,87, d, $J=7,9$ Hz, H5'') (Fig. I.12a, p. 74) não observados no espectro de [49] (p. 214). Sinais largos devidos a outras hidroxilas (Fig. I.12b, p. 75) em δ 5,89 (s, 2H, 4- e 4'''-OH) e em δ 5,60 (s, 4'-OH) e outros sinais devidos a onze hidrogênios aromáticos, compreendidos na região de δ 6,82 a 7,08 (p. 74) foram também observados. O aparecimento de um sinal do hidrogênio aromático H-5'' em δ 6,87 (d, $J=7,9$ Hz) e a alteração na multiplicidade dos sinais de H2'' e H6'' em δ 6,76 (d, $J=2,0$ Hz) e δ 6,75 (dd, $J=7,9$ e $J=2,0$ Hz) (Fig. I.12a, p. 74), respectivamente, que no espectro de [49] (p. 214) apareciam como simpletos alargados, sugeriram uma abertura do anel di-hidrofurano, caracterizando a principal diferença entre [53] e a boehmenan [49]. Esta hipótese foi confirmada pelo espectro de RMN de ^{13}C (DEPT) (Fig. I.13a, p. 78) que mostrou uma ressonância de carbono hidrogenado em δ 120,63 (C-5''), em vez do sinal em δ 127,30, como no espectro de [49] (Fig. 3B, p. 217, Apêndice), onde este sinal de C-5'' foi atribuído a um carbono quaternário. Os demais sinais de RMN de ^{13}C , deste composto, podem também ser observados nas Fig. I.13a, I.13b e I.13c (p. 78 a 80). Os dados referentes a estes espectros encontram-se na Tabela I.2 (p. 93).

A presença de uma segunda unidade C_3 (-CH₂-CH-CH-), assim como no composto [49], também foi verificada pela análise do espectro de OCE10, porém com algumas variações consideráveis nos deslocamentos químicos e nas constantes de acoplamento. A ressonância de H-7', que para a boehmenan [49] aparecia em δ 5,48 (p. 215), como um duplete com $J_{7,8'}=7,7$ Hz, para OCE10 é observado em δ 4,91, como um duplete com $J=3,0$ Hz. O sinal de H8', que em [49] é observado em δ 3,85 (m), aparece um pouco mais desblindado, em δ 4,5-4,4 (m). O sinal de C8' também foi desblindado $\Delta\delta$ 34 em relação à boehmenan [49], sendo observado em δ 84,40 (Fig. I.13b, p. 79). Os sinais dos hidrogênios geminais 9'a e 9'b aparecem ligeiramente mais blindados, respectivamente, em δ 4,28 (dd, $J=16,1$ e $J=7,0$ Hz) e δ 4,47 (dd). Os sinais correspondentes a esta unidade C_3 podem ser observados nas Fig. I.12b e I.12c (p. 75 a 76).

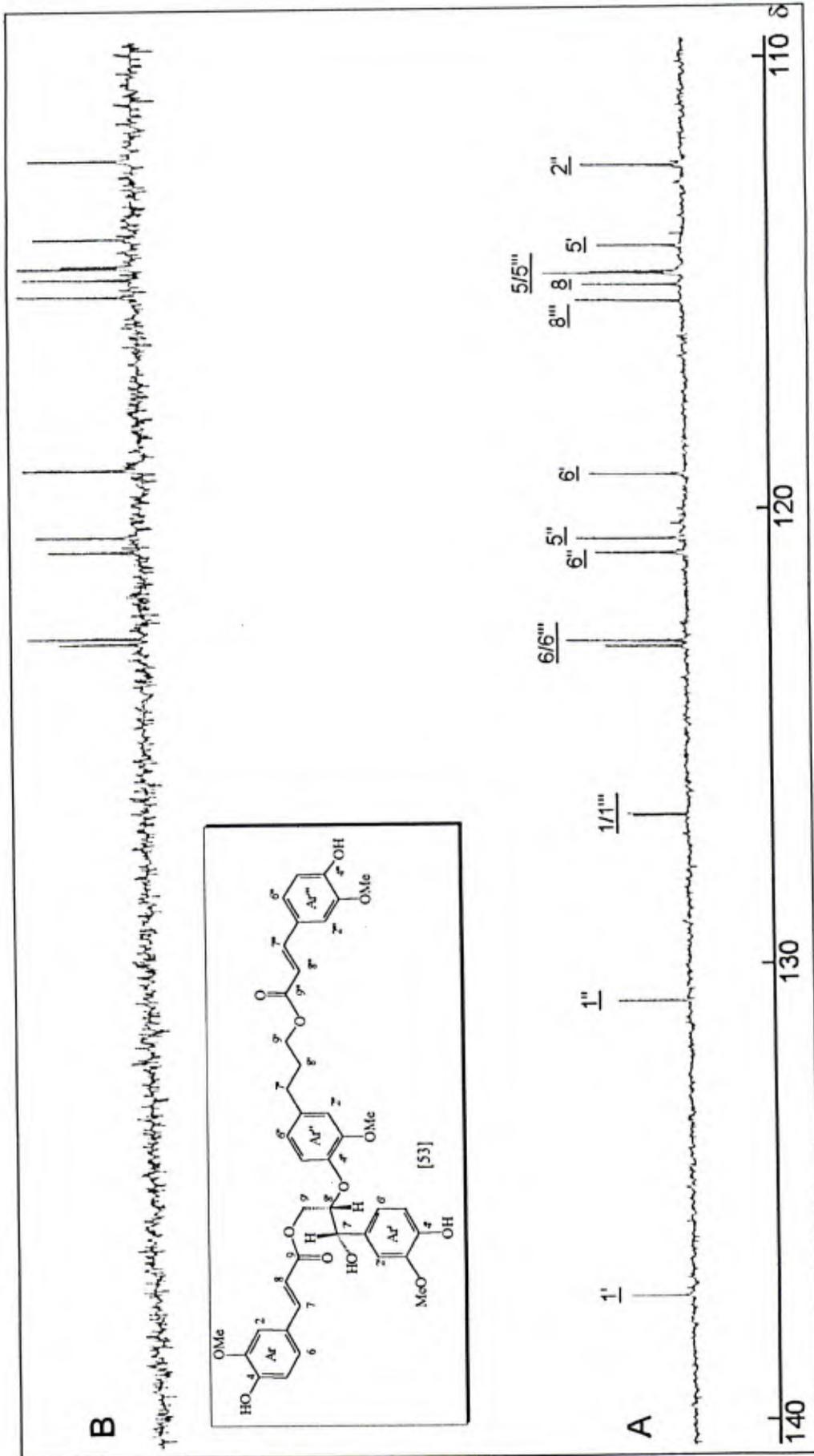


Figura I.13a - A: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100,6 MHz) da Fração OCE10 (Composto [53]) e B: DEPT, Região de δ 140 a 110.

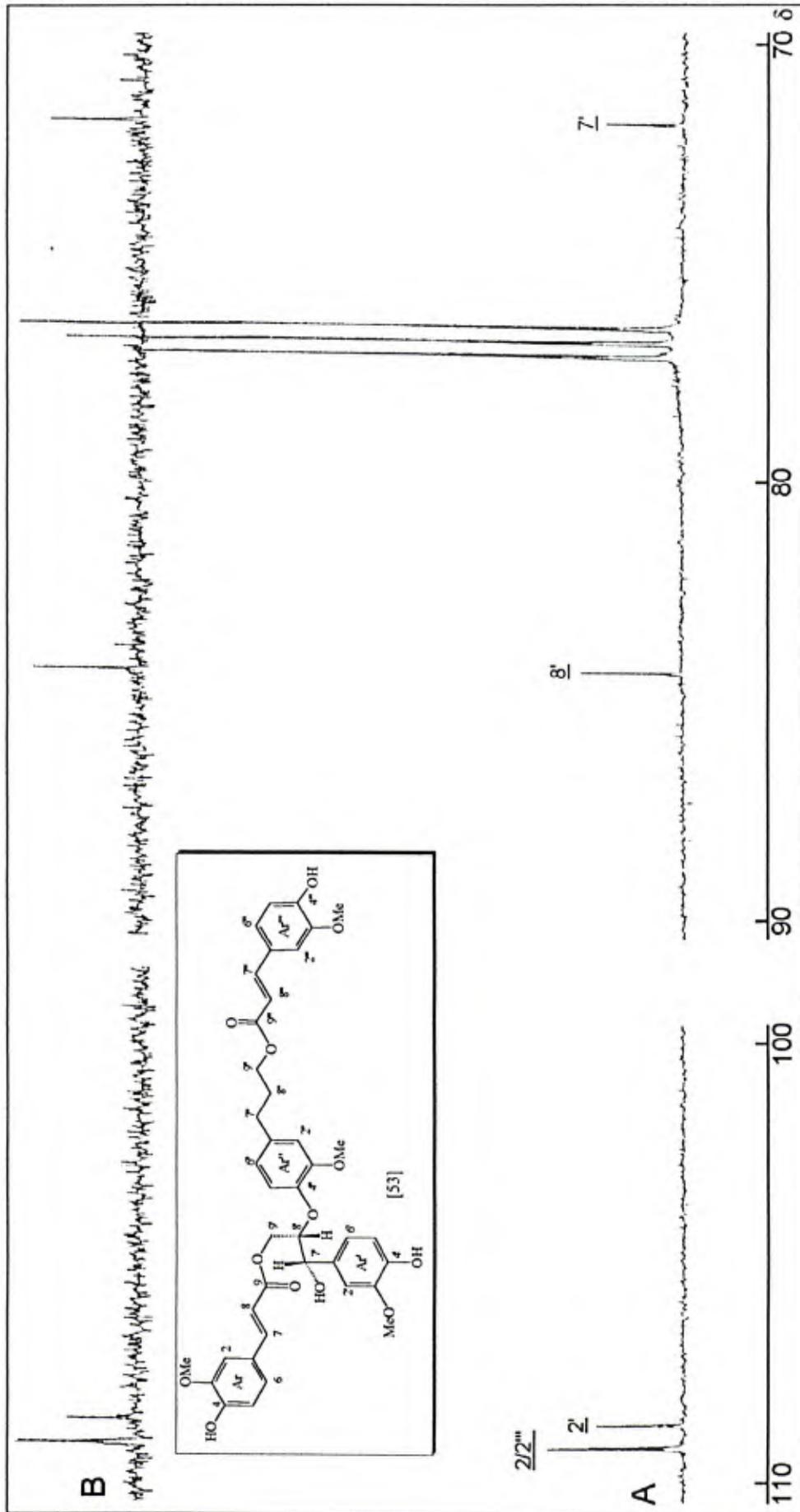


Figura I.13b - A: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100,6 MHz) da Fração OCE10 (Composto [53]) e B: DEPT, Região de δ 110 a 70.

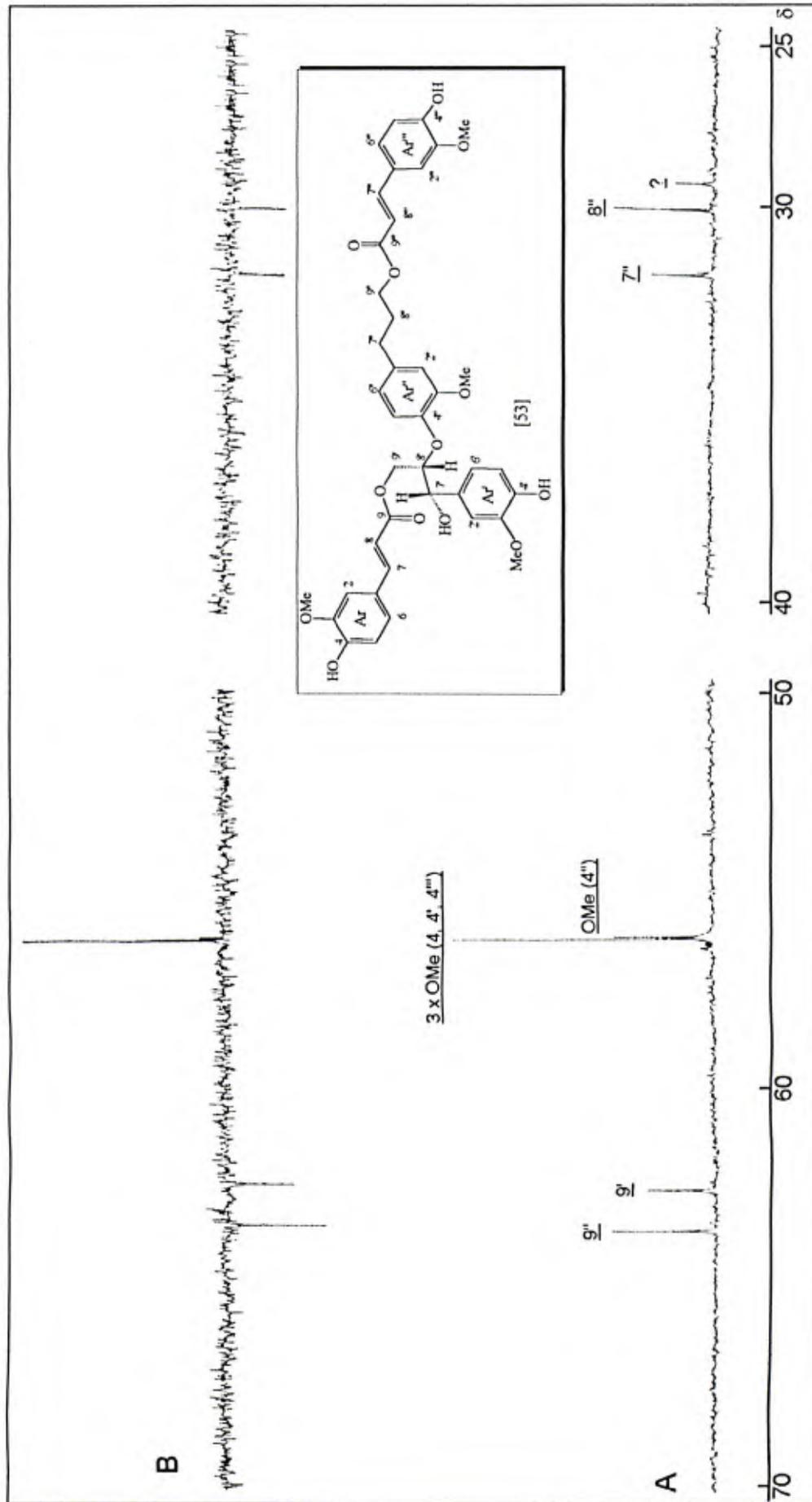
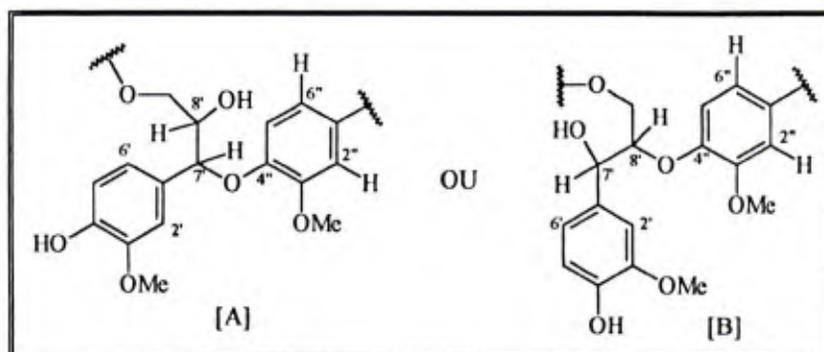


Figura I.13c - A: Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 100,6 MHz) da Fração OCE10 (Composto [53]) e B: DEPT, Região de δ 70 a 25.

Com base nestes dados restaram ainda duas possibilidades para a estrutura deste composto: o posicionamento da hidroxila em C8' e uma ligação éter entre C7' e C4'' ou vice-versa, conforme apresentado no Esquema I.2.



Esquema I.2 - Fragmentos Mostrando as Possibilidades Estruturais [A] e [B] Para o Composto Presente na Fração OCE10.

Experimentos de diferença de nOe (nOediff) possibilitaram confirmar a localização da ligação éter em C8' e C4'' [B] devido aos 9% de nOe observados entre H8' e H5'' e nenhum efeito observado entre H7' e H5''. É interessante notar que ligninas apresentam em suas estruturas fragmentos semelhantes a este (PILÓ-VELOSO *et al.*, 1993), onde estruturas do tipo β -O-4 ou C8'-O-4'' preponderam sobre as do tipo α -O-4 ou C7'-O-4''.

Uma vez determinada a localização da ligação éter, restava definir a estereoquímica relativa dos grupos ligados a C7' e C8'. Isso só foi possível através da simulação em computador, utilizando o programa PCModel PI-3.2 (Serena Software), onde a hidroxila em C7' foi fixada ora do mesmo lado de H8', forma *treo* (Fig. I.14b, p. 82), ora do lado contrário de H8', forma *eritro* (Fig. I.14a, p. 82), e as constantes de acoplamentos entre H7' e H8' foram calculadas, em cada caso. A comparação entre a constante de acoplamento observada no espectro de RMN de ^1H de [53] ($J_{7,8}=3,0$ Hz) e as calculadas por computador ($J=2,9$ Hz e $J=8,0$ Hz, Fig. I.14a e I.14b) permitiram concluir que os hidrogênios ligados respectivamente a C7' e C8' encontram-se na forma *eritro* ou seja, H7' encontra-se *SIN* em relação a H8'. Estas comparações podem ser observadas nos modelos apresentados nas Fig. I.14a e I.14b (p. 82), que apresentam também as constantes de acoplamento calculadas.

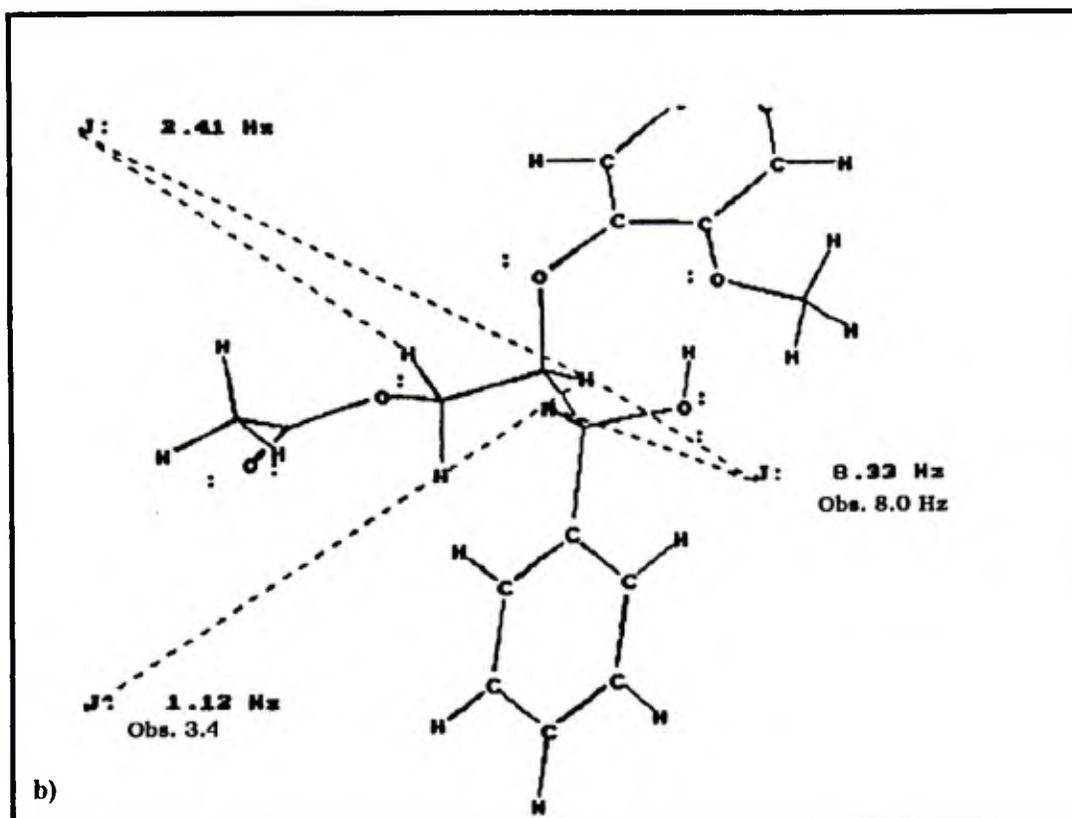
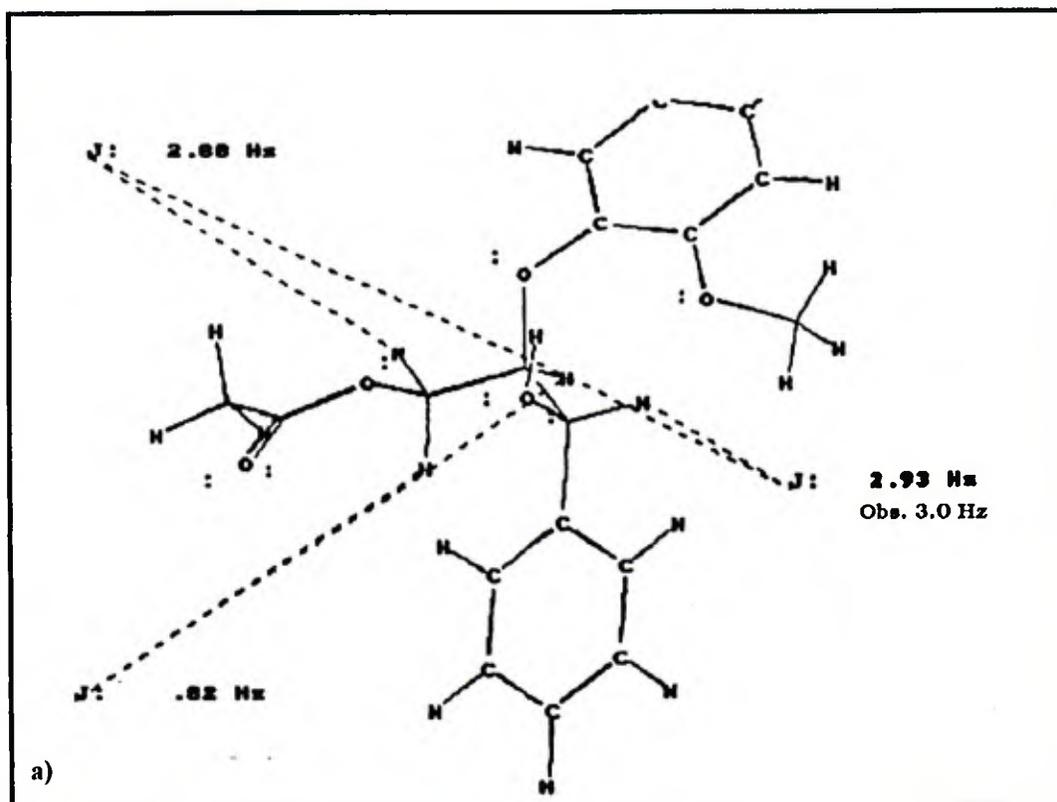


Figura I.14 - Simulação em Computador do Análogo Acíclico da Boehmenan [49], Representando a Configuração em Torno da Ligação C7',C8': a) *eritro* e b) *threo*.

Assim como na boehmenan [49], duas unidades de ferulato completaram a molécula, sendo tais unidades caracterizadas por dois sistemas aromáticos AMX (1,3,4-trissubstituídos), dois sistema olefinicos e por duas carbonilas de éster. A parte aromática (Ar) da primeira unidade de ferulato foi caracterizada pelos sinais no espectro apresentado na Fig. I.12a (p. 74): a) em δ 7,01 (d, $J_{2-6}=2,1$ Hz, H2); b) em δ 6,91 (d, $J_{3-6}=8,3$ Hz, H5); e c) em δ 7,02 (dd, $J_{6-5}=8,3$ e $J_{6-2}=2,1$ Hz, H6). A segunda unidade (Ar'') foi caracterizada pelos sinais: a) em δ 7,01 (d, $J_{2''-6''}=2,0$ Hz, H2''); b) em δ 6,94 (d, $J_{3''-6''}=8,3$ Hz, H5''); e c) em δ 7,08 (dd, $J_{6''-5''}=8,3$ e $J_{6''-2''}=2,0$ Hz, H6'').

Desta forma, foi possível propor a estrutura [53] para OCE10, que também revelou-se como mais um constituinte inédito desta classe de compostos, sendo este denominado carolignana A.

Além dos dados de RMN de ^1H (Tab. I.3, p. 110), os dados de RMN de ^{13}C (Tab. I.2, p. 93) também foram compatíveis com a estrutura proposta, que ainda foi confirmada pelo espectro de massas (Figura I.15, p. 84). Este, embora não tenha apresentado o pico do íon molecular $[\text{M}]^+$ em $m/z=730$, correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{40}\text{H}_{42}\text{O}_{13}$, apresentou picos devidos a fragmentos característicos de m/z (%): 712 (9) $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$, 536 (3) $[\text{M} - \text{ácido ferúlico}]^+$ e 518 (7) $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} - \text{ácido ferúlico}]^+$, 194 (43) $[\text{ácido ferúlico}]^+$, 177 (37) $[\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_3]^+$ e 164 (100) $[\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2]^+$. A formação destes fragmentos está também apresentada no Esquema I.3 (p. 111).

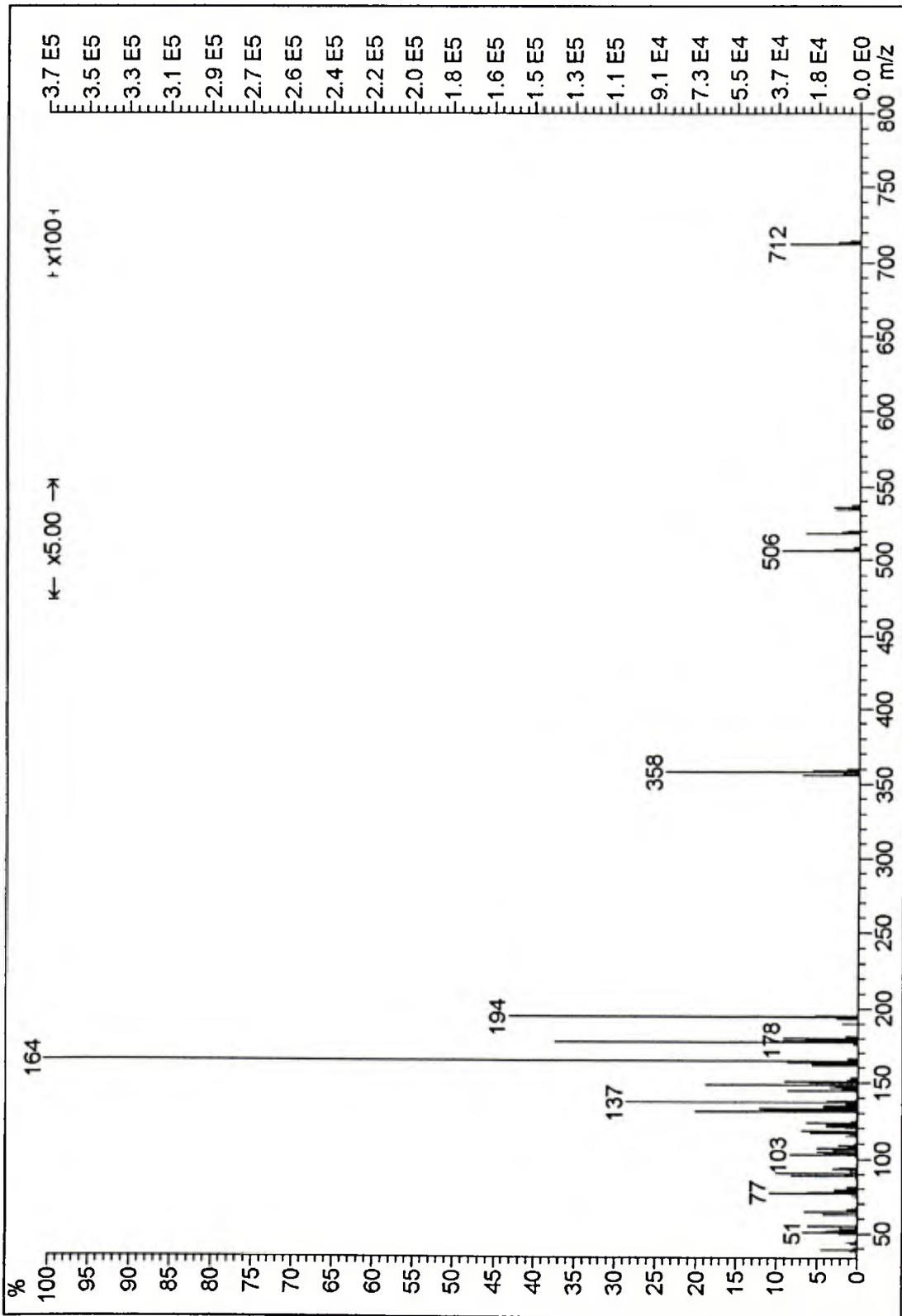
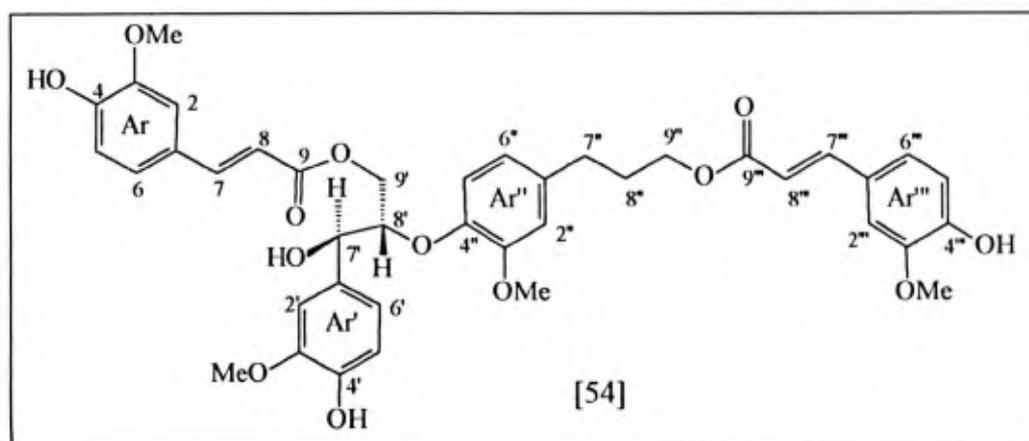


Figura I.15 - Espectro de Massas (IE) da Fração OCE10 (Composto [53]).

I.3.1.2.5. Fração OCE11: Carolignana B [54]



O espectro no IV desta fração foi semelhante ao da fração OCE10. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (Fig. I.16a (p. 86), I.16b (p. 87) e I.16c (p. 88) e, I.17a (p. 89) e I.17b (p. 90)) mostraram que OCE11 era constituída de um composto puro, cujas ressonâncias foram muito similares àquelas do composto [53] (p. 74 a 76 e 78 a 80). A única diferença significativa observada foi na constante de acoplamento escalar de H7' com H8'. No espectro de [53] o sinal de H7' apareceu como um duplete em δ 4,91 com $J_{7,8'}=3,0$ Hz (Fig. I.12b, p. 75), enquanto no espectro da fração OCE11 ele aparece também com um duplete em δ 4,92, porém, com $J_{7,8'}=8,0$ Hz (Fig. I.16b, p. 87). Este fato sugeriu uma diferença na estereoquímica relativa em relação à ligação C7'e C8'. Assim, embora os dados de RMN não tenham possibilitado a determinação da estereoquímica absoluta deste composto, novamente por meio de computador, usando o programa PCModel PI-3.2 (Serena Software), simulou-se a estrutura de OCE11. Os dados foram coerentes com a proposta de uma inversão na estereoquímica relativa dos grupos ligados a C7' e C8', quando comparada com a do composto [53]. Desta forma, obtiveram-se valores para as constantes de acoplamentos escalares calculadas, estreitamente relacionadas àquelas obtidas no espectro de RMN de ^1H . Estes dados confirmaram a estrutura proposta, representada por [54] e podendo ser visualizada na Fig. I.14b (p. 82).

Portanto, [53] e [54] são dois epímeros, caracterizados com a forma *eritro* e *treo*, ambos inéditos, sendo o último denominado carolignana B.

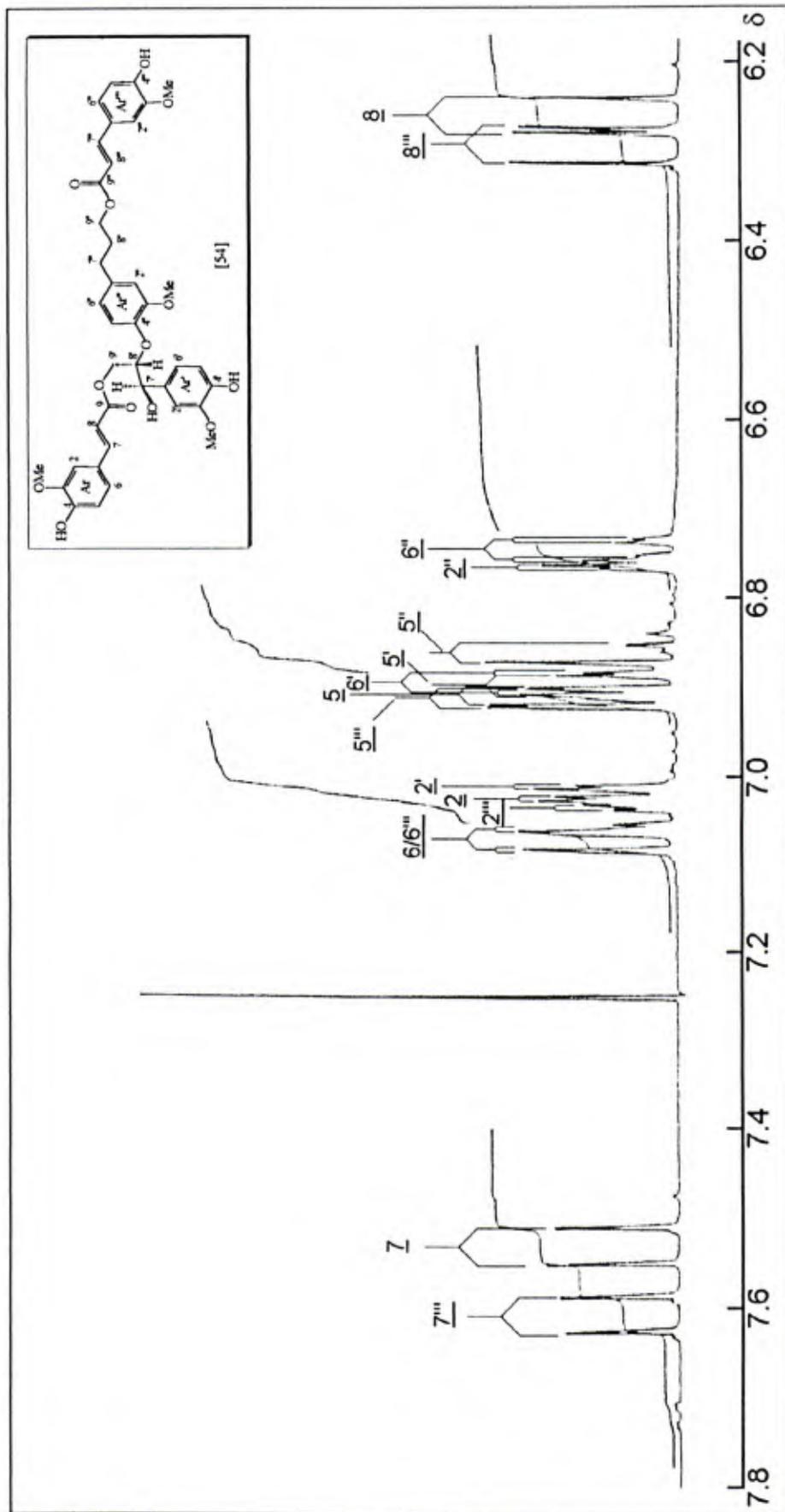


Figura I.16a - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE11 (Composto [54]), Região de δ 7,8 a 6,2.

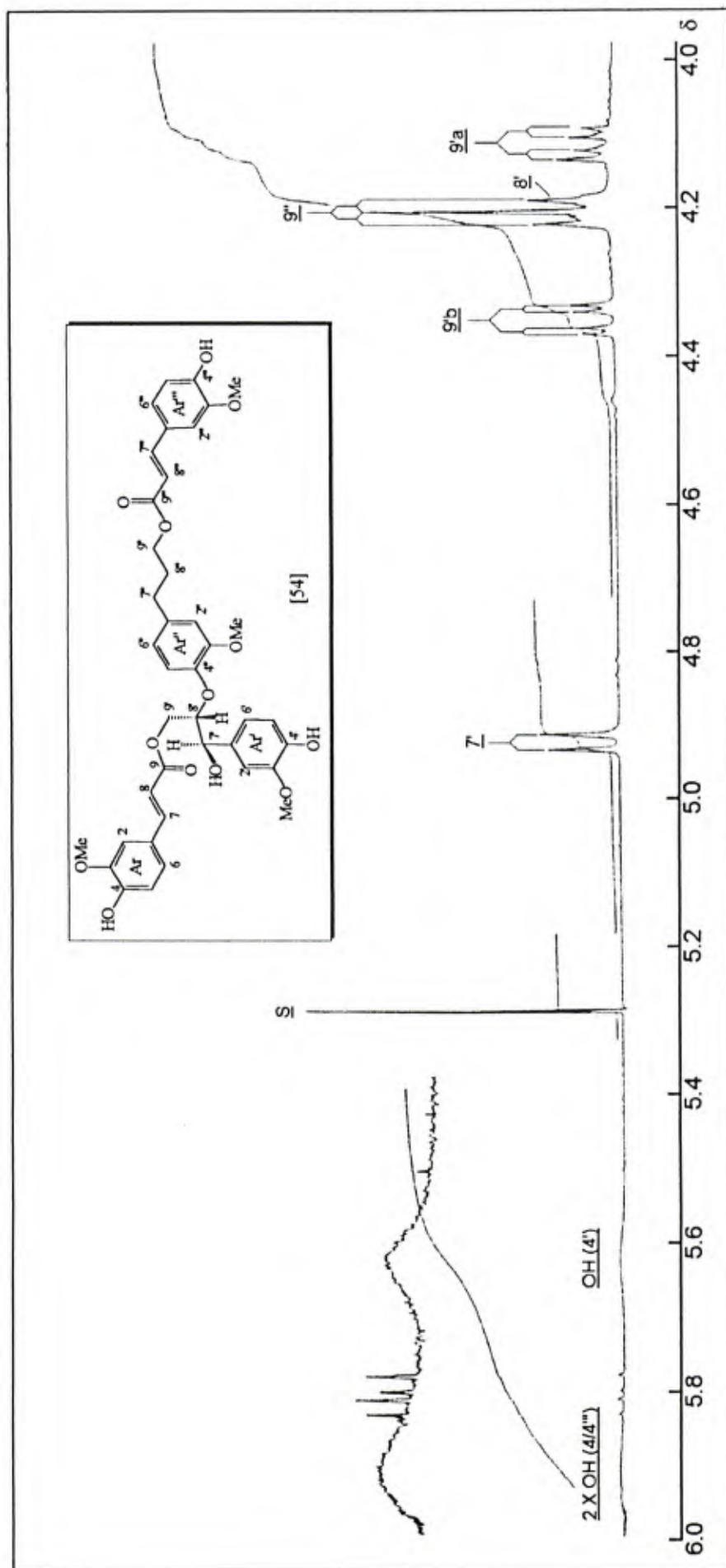


Figura I.16b - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE11 (Composto [54]), Região de δ 6,0 a 4,0.

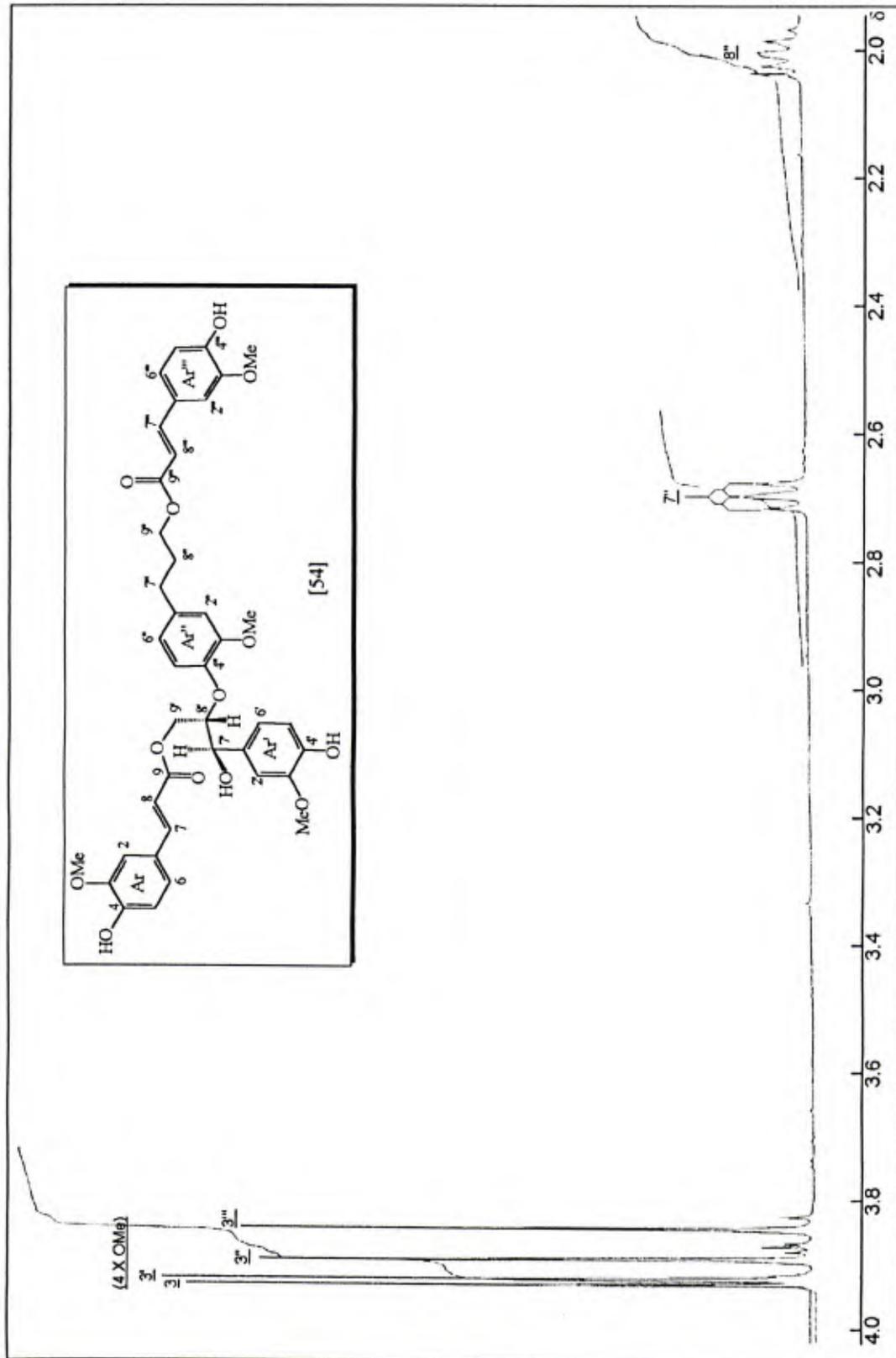


Figura I.16c - Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) da Fração OCE11 (Composto [54]), Região de δ 4,0 a 2,0.

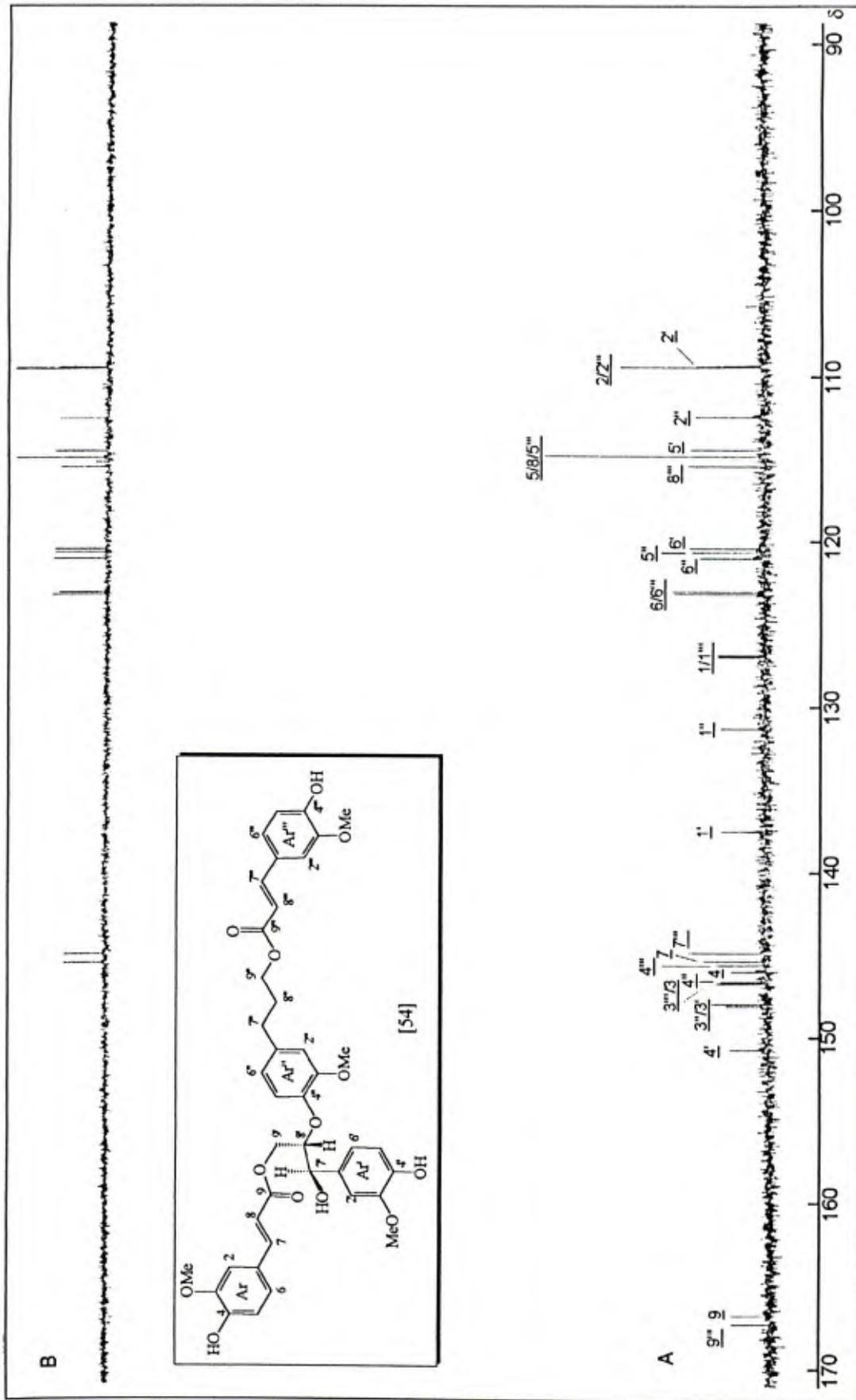


Figura I.17a - A: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100,6 MHz) da Fração OCEI1 (Composto [54]) e B: DEPT, Região de δ 170 a 90.

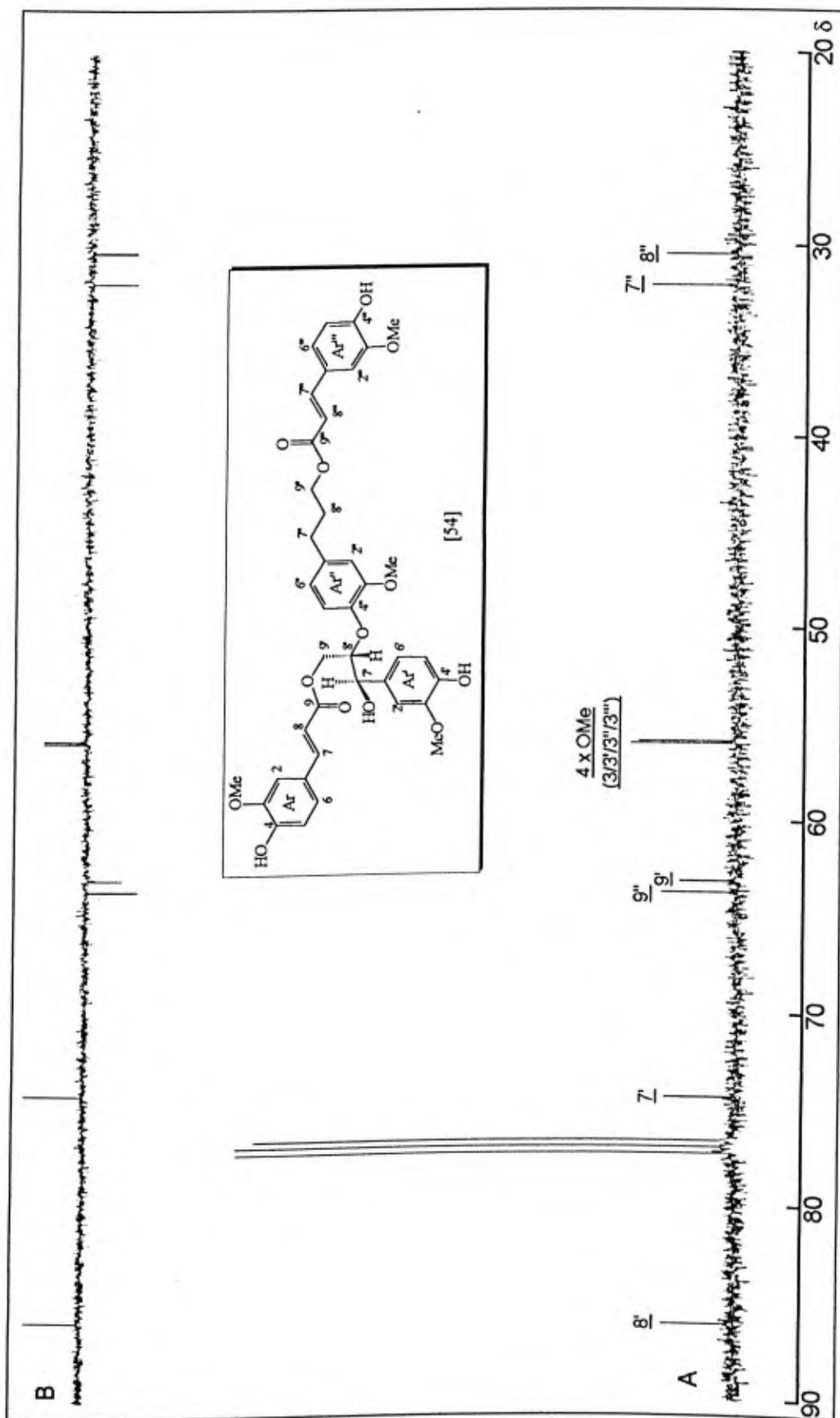


Figura I.17b - A: Espectro de RMN de ¹³C (CDCl₃, 100,6 MHz) da Fração OCE11 (Composto [54]) e B: DEPT, Região de δ 90 a 20.

Os dados de RMN de ^{13}C e de ^1H de [54] encontram-se na Tabela I.2 (p. 93) e I.3 (p. 110), respectivamente, juntamente com os dados dos compostos [49] e [53]. As atribuições dos hidrogênios e carbonos foram feitas com auxílio das técnicas COSY $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (Figura I.18, p. 92) e DEPT.

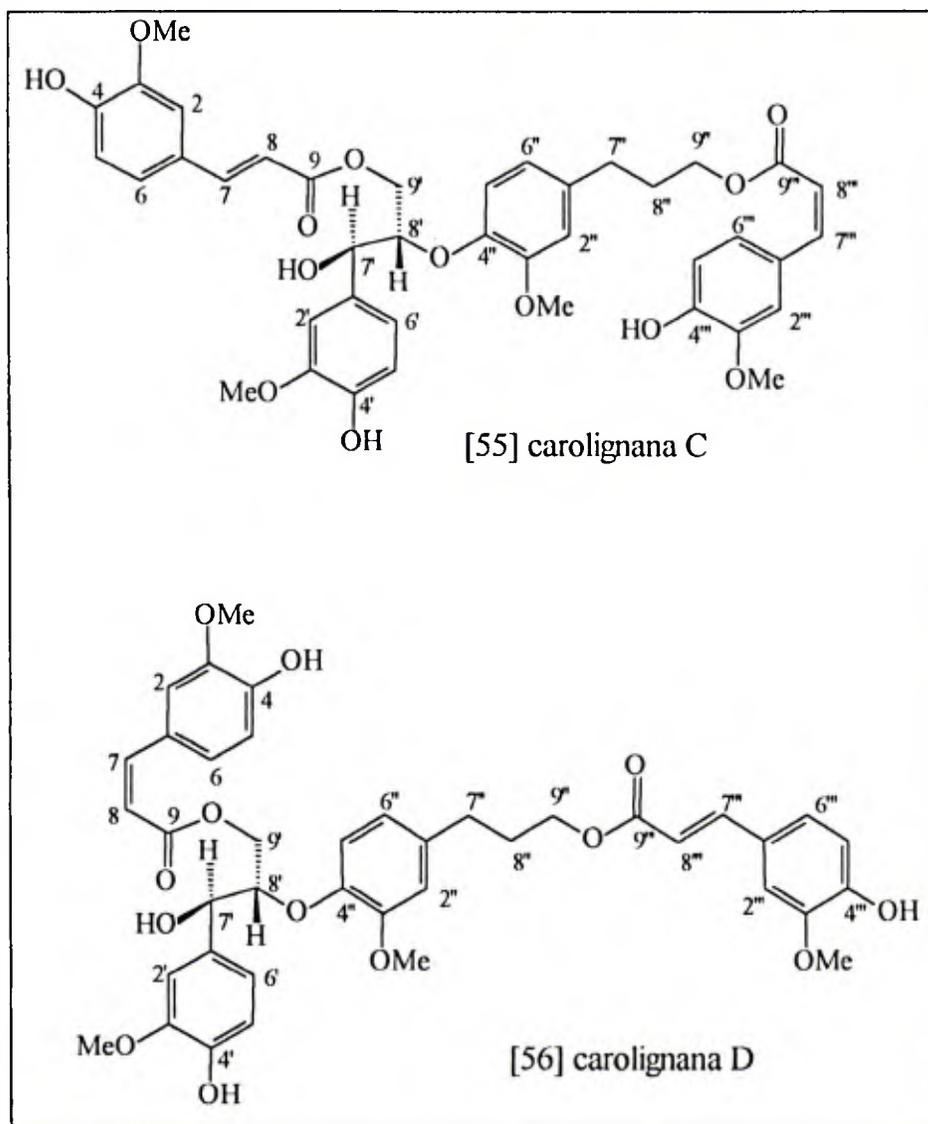
O espectro de massas deste composto, como esperado, apresentou picos correspondentes às mesmas fragmentações do composto [53] (Figura I.15, p. 84). As equações de formação dos fragmentos serão apresentadas no Esquema I.3 (p. 111).

Tabela I.2. Deslocamentos Químicos (δ) de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100,6 MHz) para os Compostos [49], [53] e [54](a)

C	[49]	[53]	[54]
1	126,58	126,75	126,68
2	109,27 (ou 109,34)	109,24	109,26
3	146,68	146,64	147,60
4	145,58	145,00	145,93
5	114,61 (ou 114,59)	114,62	114,63
6	122,92 (ou 122,87)	122,93	123,10
7	145,37	145,11	145,35
8	114,64	114,86	114,63
9	165,84	166,98	166,68
1'	134,81	137,27	137,31
2'	108,73	108,70	109,19
3'	146,52	147,89	147,66
4'	148,04	151,26	150,66
5'	114,01	114,00	114,25
6'	119,57	119,12	120,30
7'	88,77	71,94	74,28
8'	50,55	84,40	86,19
9'	65,26	62,49	62,91
1''	132,43	130,92	131,10
2''	112,40	112,29	112,24
3''	147,87	147,92	148,03
4''	146,16	146,47	146,55
5''	127,30	120,63	120,55
6''	116,03	120,96	120,90
7''	32,01	31,89	31,89
8''	30,56	30,25	30,28
9''	63,60	63,52	63,51
1'''	126,58	126,75	126,68
2'''	109,34 (ou 109,27)	109,20	109,26
3'''	146,68	146,64	147,60
4'''	144,01	144,96	145,55
5'''	114,59 (ou 114,61)	114,57	114,63
6'''	122,87 (ou 122,92)	122,93	122,95
7'''	144,74	144,83	144,84
8'''	115,24	115,23	115,26
9'''	167,18	167,19	167,19
OMe	55,81	55,83	55,86
OMe	55,81	55,83	55,83
OMe	55,88	55,83	55,69
OMe	55,81	55,75	55,81

(a) Atribuições foram feitas com auxílio das técnicas COSY $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (p. 92) e DEPT 135 (p. 78 a 80; p. 89 e 90).

I.3.1.2.6. Fração OCE12: Carolignana B [54], Carolignana C [55] e Carolignana D [56]



Apesar da fração OCE12 ter apresentado um único pico quando analisada por CLAE, seus espectros de RMN de ^1H (Figuras I.19a, p. 96; I.19b, p. 97; e I.19c, p. 98) revelaram a presença de uma mistura constituída de 36% do composto [54] e outros dois isômeros denominados [55] e [56], presentes na proporção de 28% e 36%, respectivamente. As ressonâncias de ambos compostos, [55] e [56], foram muito semelhantes àquelas de [54], algumas delas até coincidentes. As principais diferenças observadas para [55] e [56] foram nos sinais de H7''' e H8''' e H7 e H8 que no composto [54] são observados como quatro dupletos respectivamente em δ 7,60 e

6,29 e δ 7,53 e 6,22, todos com $J=16,0$ Hz (*trans*), enquanto em [55] apareceram em δ 7,53 e 6,30 ($J=16,0$ Hz, *trans*, H7 e H8) e em δ 6,81 e 5,82 ($J=12,8$ Hz, *cis*, H7'' e H8''), respectivamente, já em [56] apareceram em δ 6,82 e 5,80 ($J=12,8$ Hz, *cis*, H7 e H8) e em δ 7,61 e 6,30 ($J=16$ Hz, *trans*, H7''' e H8'''), respectivamente (Fig. I.19a, p. 96 e I.19b, p. 97). Iniciando a numeração de ambos compostos no lado esquerdo da molécula, o composto [55] teria a ligação dupla do lado esquerdo (C7/C8) *trans* e a do lado direito (C7'''/C8''') *cis*, enquanto no composto [56] seria o inverso, C7/C8 *cis* e C7'''/C8''' *trans* (p. 94).

A presença da ligação *cis* em [55] e [56] provocou uma desblindagem de aproximadamente $\Delta\delta$ 0,7 nos sinais de H2''' (δ 7,73, $J=2$ Hz) e H2 (δ 7,71, $J=2$ Hz), respectivamente, quando comparados com aqueles correspondentes do composto [54] (Fig. I.19a, p. 96).

A estereoquímica relativa em torno da ligação C7' e C8' de ambos isômeros foi considerada a mesma do composto [54] -*treo*-, pois, eles apresentaram uma constante de acoplamento entre H7' e H8' relativamente grande ($J=8,2$ Hz), bem próxima daquela observada para [54] ($J_{7,8}=8,0$ Hz). Estas constantes foram medidas nos dupletos em δ 4,92 e 4,82 (Fig. I.19b, p. 97), atribuídos a H7' de [55] e [56], respectivamente, uma vez que H8' aparece como um multipletto, devido ao seu acoplamento com outros hidrogênios além de H7'.

Os demais dados de RMN de ^1H de [55] e [56] foram muito semelhantes aos do composto [54] e são apresentados na Tabela I.3 (p. 110).

Com estes dados foi possível chegar às estruturas dos compostos [55] e [56], muito semelhante àquela do composto [54], com exceção da estereoquímica de uma das ligações duplas que é diferentemente *cis*, em cada composto. Confirmando as estruturas propostas, o espectro de massas da fração OCE12 apresentou picos correspondendo às mesmas fragmentações dos compostos [53] e [54] (Figura I.15, p. 84), cujas formações também poderão ser observadas no Esquema I.3 (p. 111).

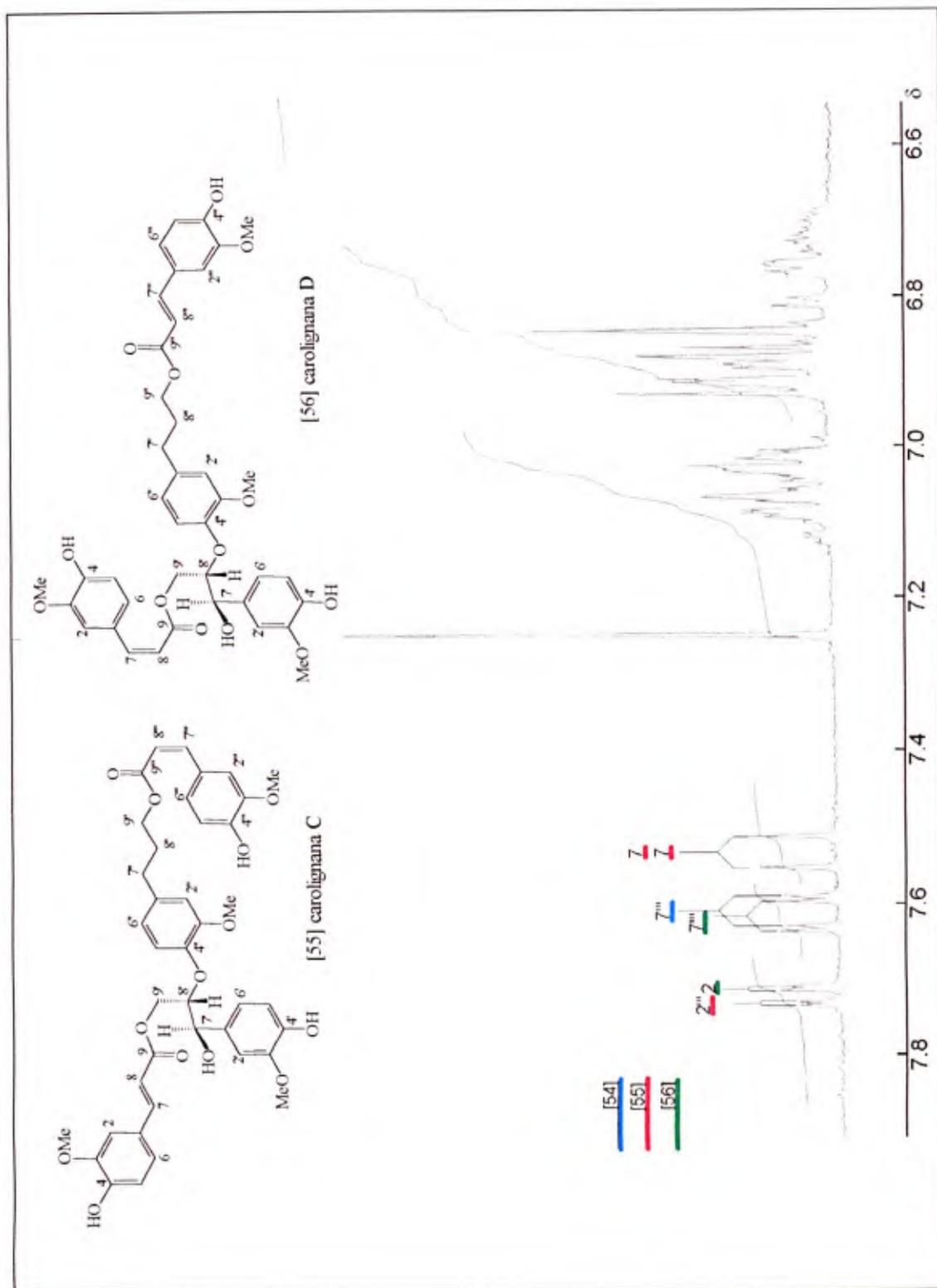


Figura I.19a - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração OCE12 (Compostos [54], [55] e [56]), Região de δ 7,8 a 6,6.

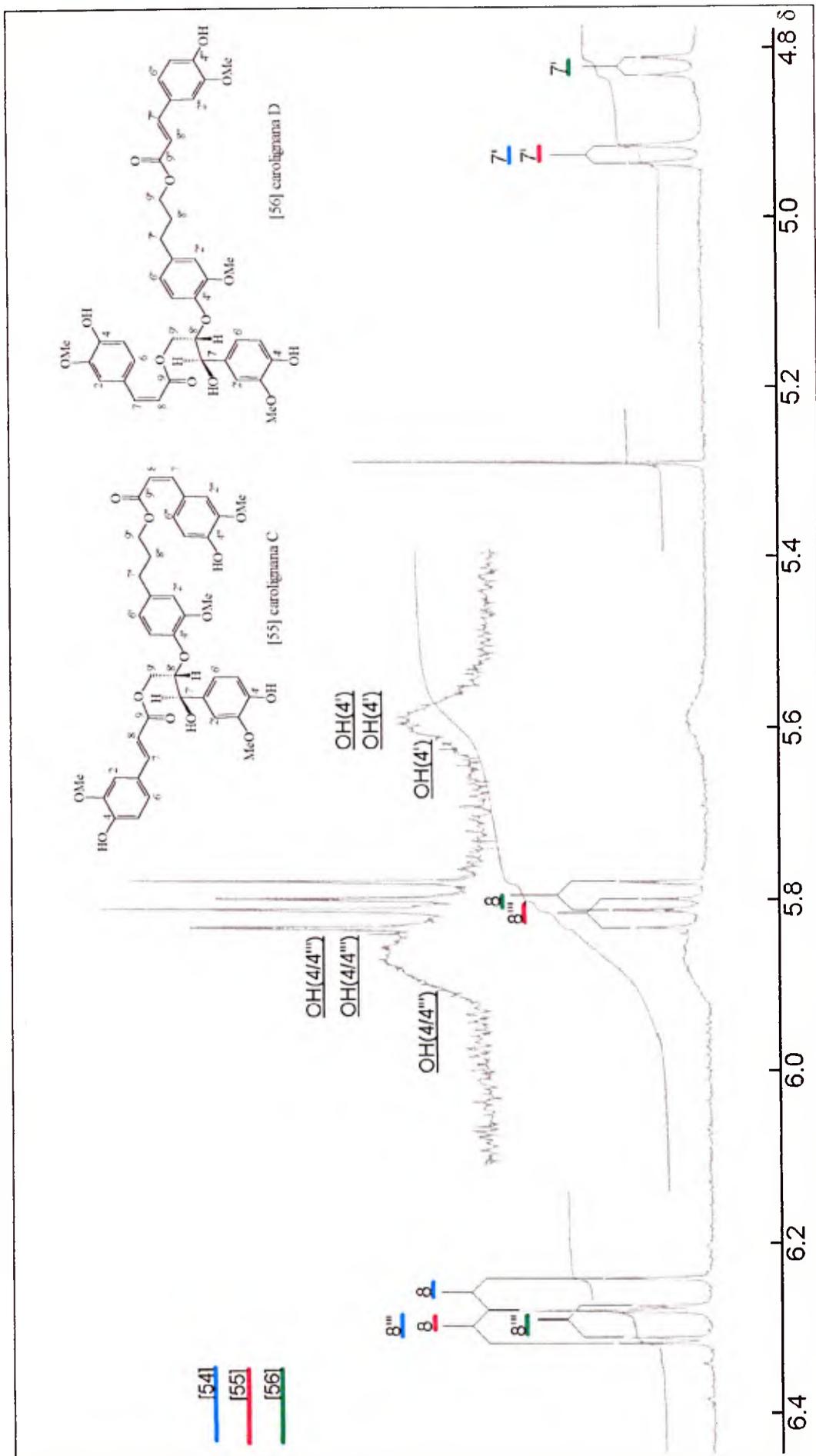


Figura I.19b - Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) da Fração OCE12 (Compostos [54], [55] e [56]), Região de δ 6,4 a 4,8.

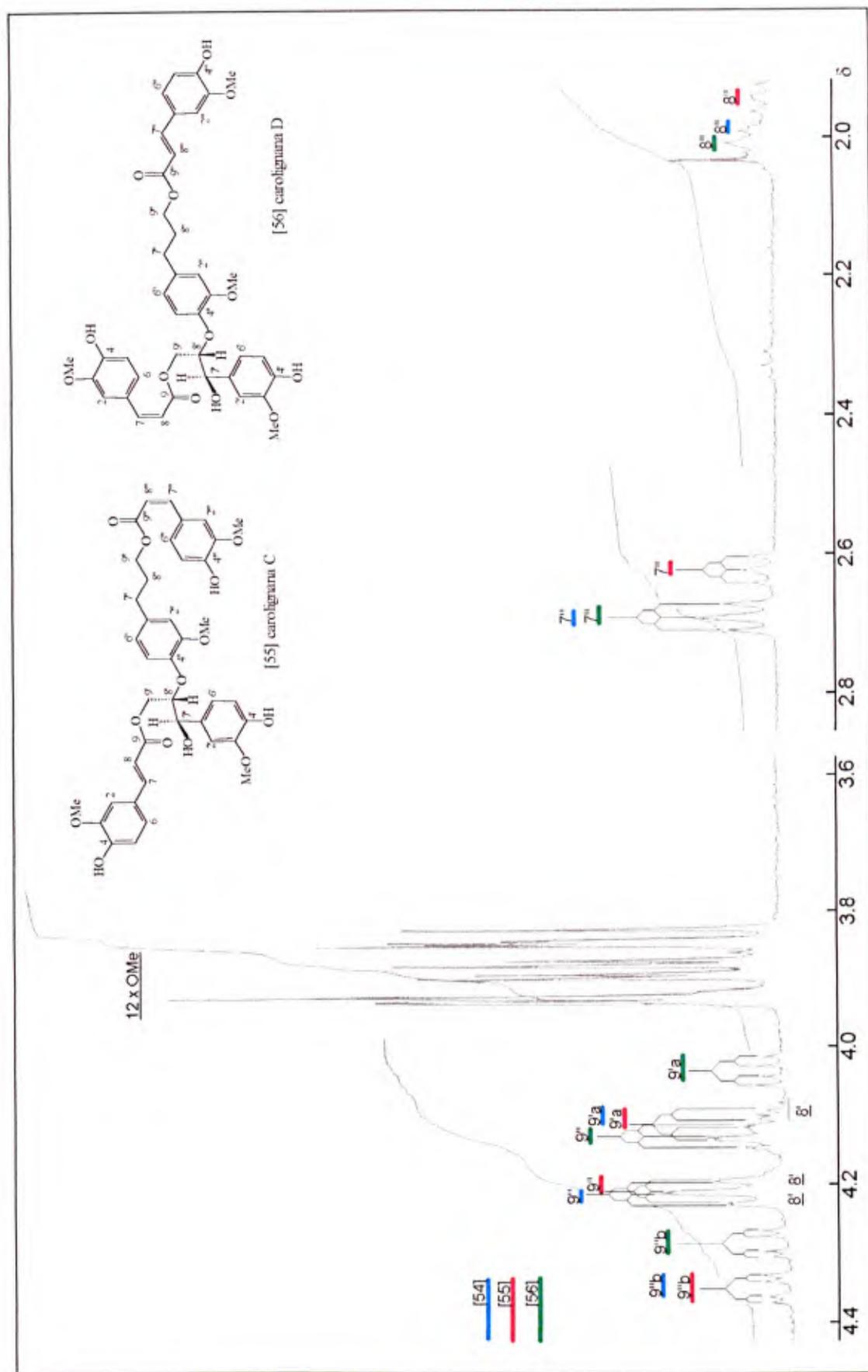
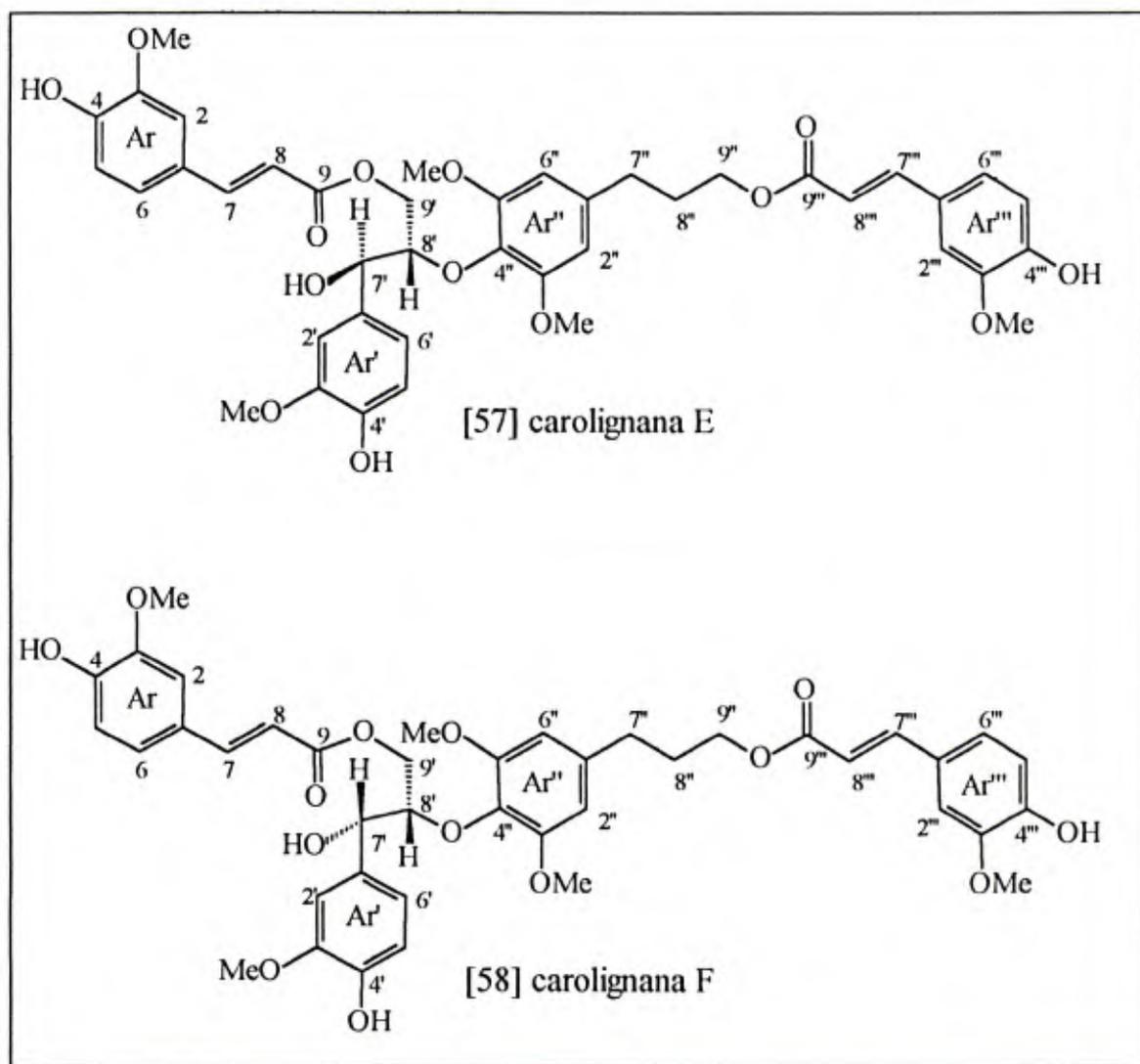


Figura I.19c - Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) da Fração OCE12 (Compostos [54], [55] e [56]), Região de δ 4,4 a 2,0.

I.3.1.2.7. Fração OCE8: Carolignana E [57] e Carolignana F [58]



O espectro no IV da fração OCE8 foi semelhante aos das frações discutidas anteriormente. Os espectros de RMN de ^1H (Figuras I.20a, p. 100; I.20b, p. 101; e I.20c, p. 102) mostraram que esta fração era constituída por dois compostos, [57] e [58], na razão de 1:4, e de estruturas muito semelhantes àquelas dos compostos [54] e [53], respectivamente. A principal diferença observada neste espectro foi a presença de sinais de metoxilas extras, atribuídos aos compostos [57] e [58], resultando num total de cinco metoxilas em cada um, representadas pelos simpletos em δ 3,94, 3,92, 3,81 (3H, cada) e 3,84 (6H) para [57] e, δ 3,92, 3,91, 3,88 (3H, cada) e 3,84 (6H) para [58] (Fig. I.20c, p. 102).

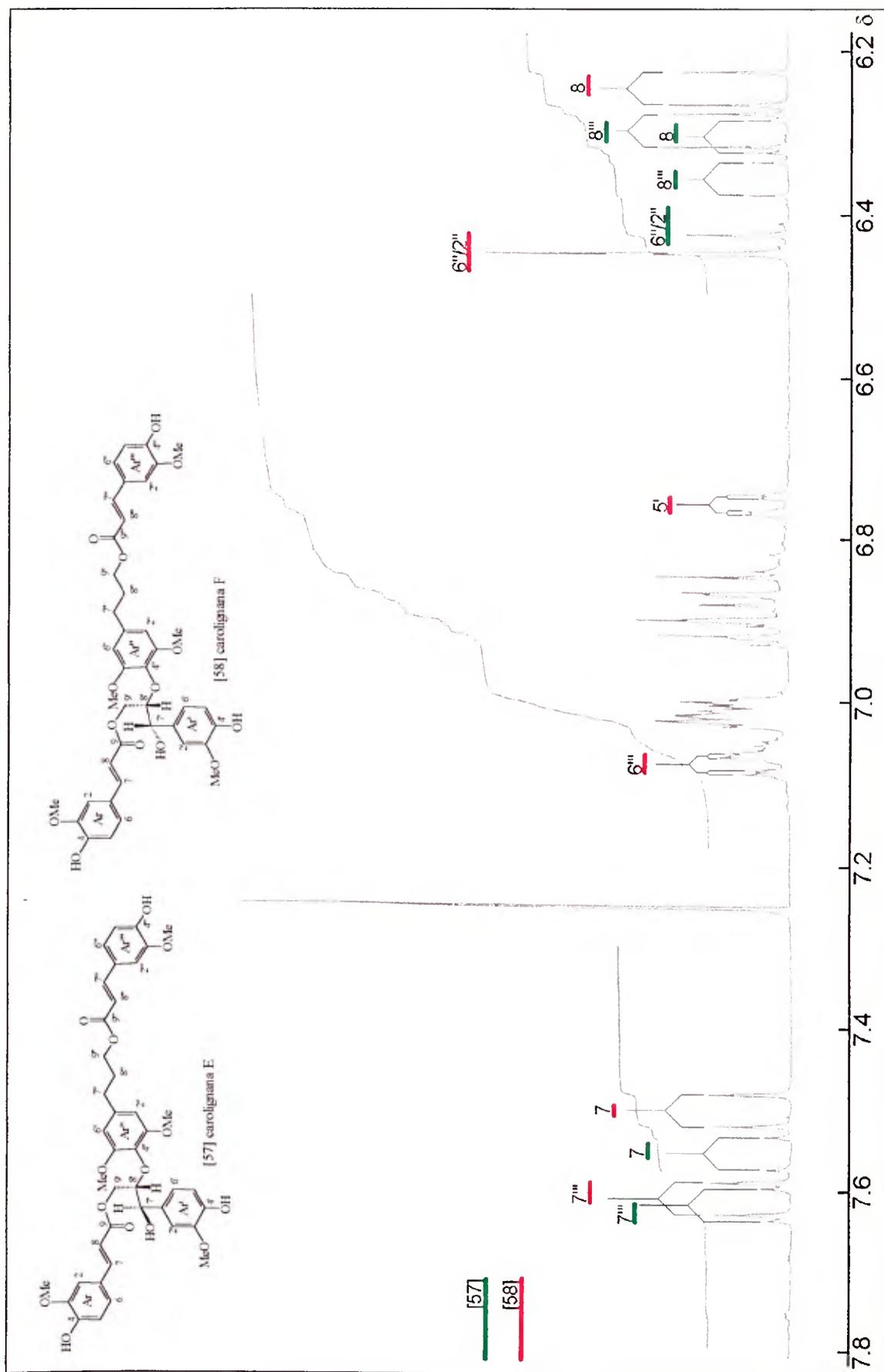


Figura I.20a - Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) da Fração OCE8 (Compostos [57] e [58]), Região de δ 7,8 a 6,2.

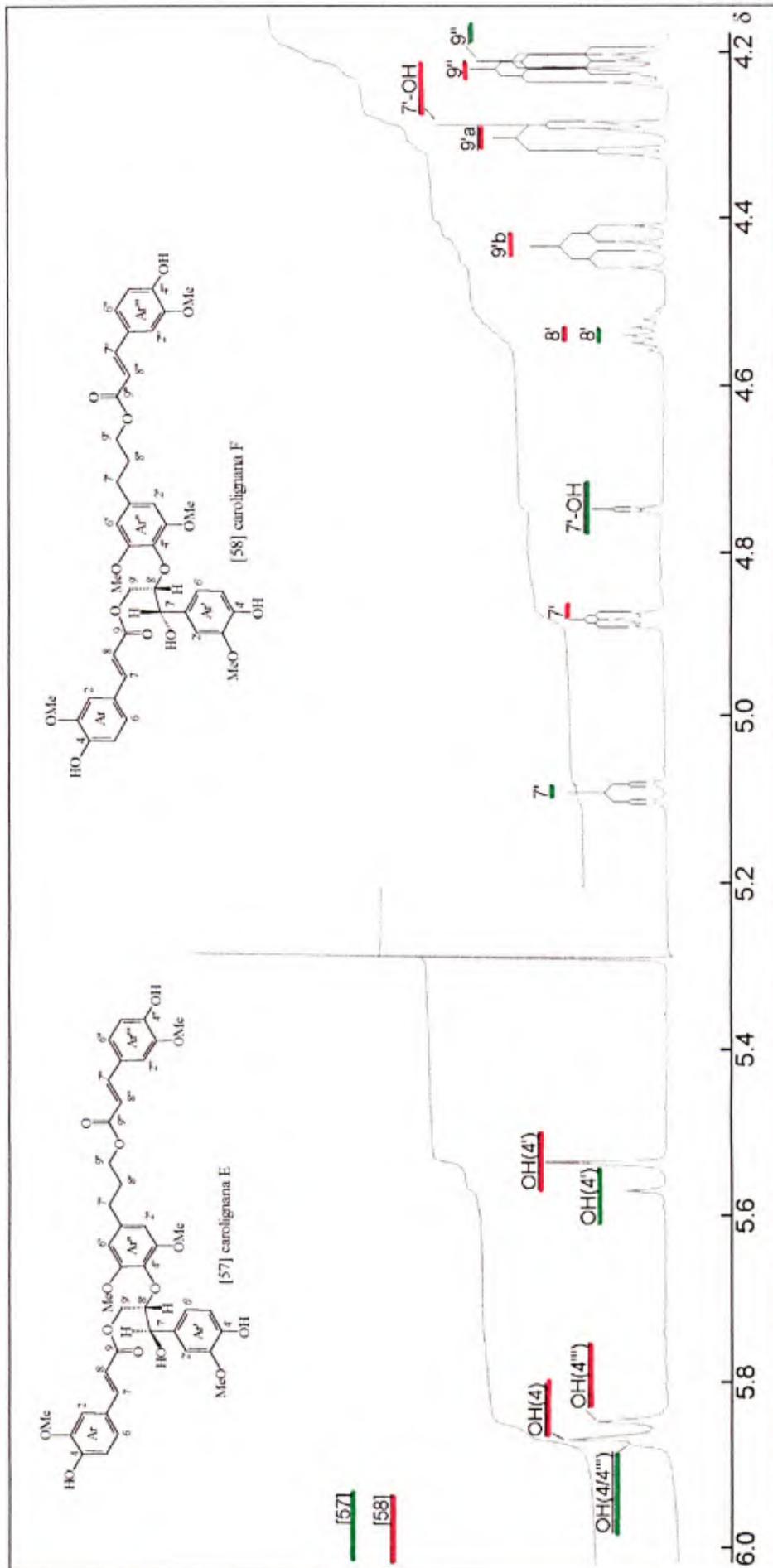


Figura I.20b - Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) da Fração OCE8 (Compostos [57] e [58]), Região de δ 6,0 a 4,2.

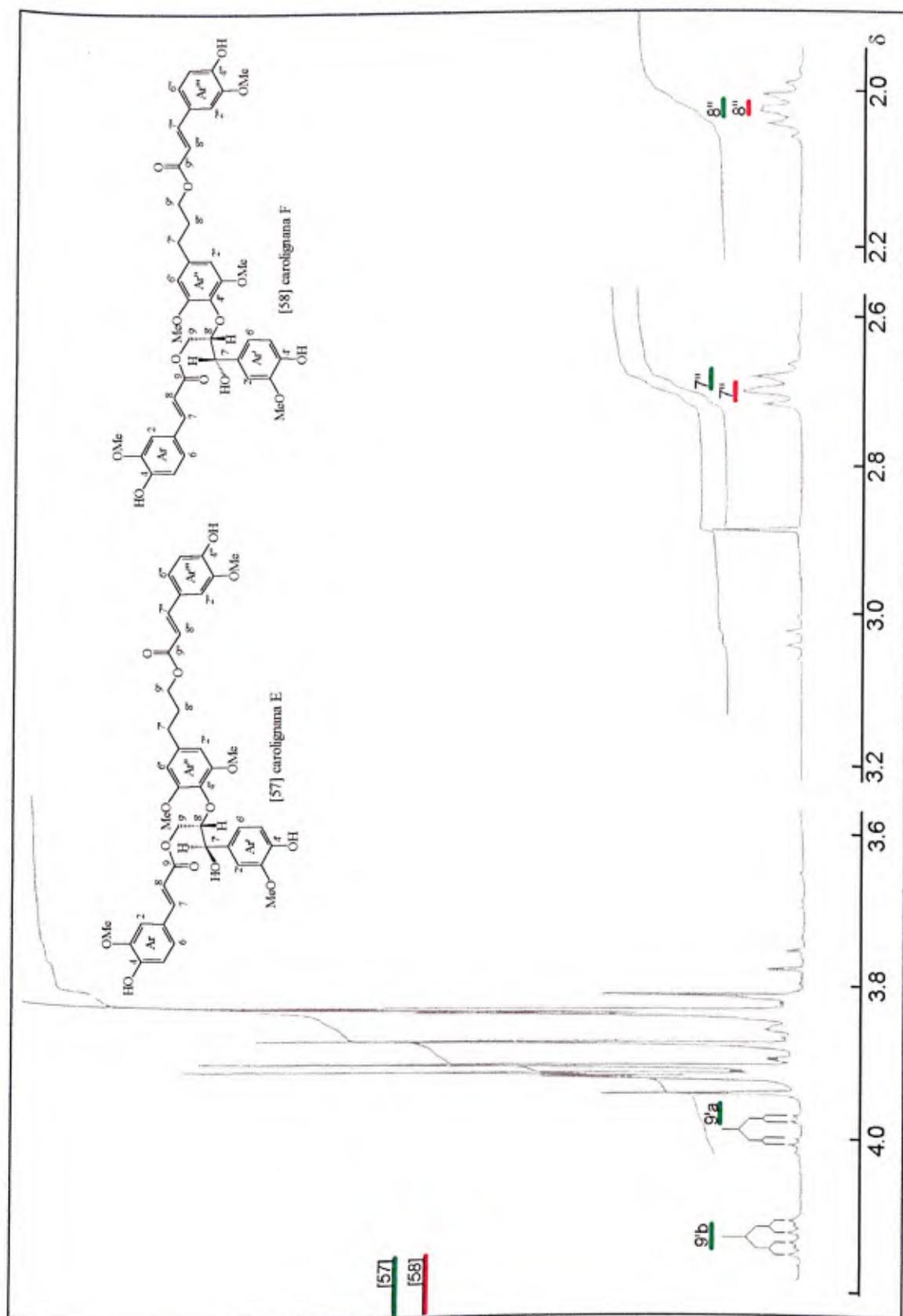


Figura I.20c - Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) da Fração OCE8 (Compostos [57] e [58]), Região de δ 4,2 a 2,0.

Outra diferença observada foi a alteração na forma dos sinais de H2'' e H6'' destes dois compostos, quando comparados com aqueles de [54] e [53]. Nos espectros de [54] (Fig. I.16a, p. 86) e [53] (Fig. I.12a, p. 74) o sinal de H2'' (δ 6,76) foi observado como um duplete, devido ao seu acoplamento com H6'', enquanto H6'' (δ 6,74) originou um duplete duplo pelo fato de acoplar também com H5'', além de H2''. Já nos espectros de [57] e [58] (Fig. I.20a, p. 100) estes dois hidrogênios proporcionaram um único sinal (s, 2H) para cada composto, em δ 6,42 e 6,44, respectivamente, sugerindo ter havido a substituição de H5'' por uma metoxila. A localização desta metoxila em C5'' explica o fato de H2'' e H6'' serem representados pelo mesmo sinal pois, visto que outra metoxila estava presente em C3'', o anel Ar'' tornou-se simétrico e, conseqüentemente, H2'' e H6'' tornaram-se química e magneticamente equivalentes.

Os demais sinais foram muito semelhantes àqueles dos compostos [54] e [53]. As duas unidades de ferulato foram evidenciadas pelos sinais dos hidrogênios olefínicos *trans* ($J=16,0$ Hz) em δ 7,62 (H7'''), 7,55 (H7), 6,35 (H8''') e 6,30 (H8) para o composto [57] e os correspondentes sinais dos hidrogênios em δ 7,61, 7,50, 6,29 e 6,24, para o composto [58].

Os dois sistemas AMX aromáticos (1,3,4-trissubstituídos) foram caracterizados pelos sinais observados na região de δ 6,80-7,10 e uma completa atribuição para [58] foi possível com auxílio de experimentos de desacoplamento, proporcionado pela irradiação dupla do sinal em δ 6,76, atribuído a H5' (Fig. I.21, p. 104). Como os sinais do composto [57] também são observados nesta mesma região, não foi possível fazer a atribuição completa para este composto, devido à superposição daqueles sinais aos do composto principal.

A principal diferença observada entre os sinais de ressonância de [57] e [58] foi que [58], principal composto, apresenta um tripleto centrado em δ 4,89 com $J_{7',8'}=J_{7',7'-OH}=3,0$ Hz para H7 e um duplete ($J=3,0$ Hz) em δ 4,30 para 7'-OH. Já o espectro de [57], apresenta um duplete duplo em δ 5,09 com $J_{7',8'}=8,4$ Hz e $J_{7',7'-OH}=1,6$ Hz para H7' e um duplete ($J=1,6$ Hz) em δ 4,75 para 7'-OH.

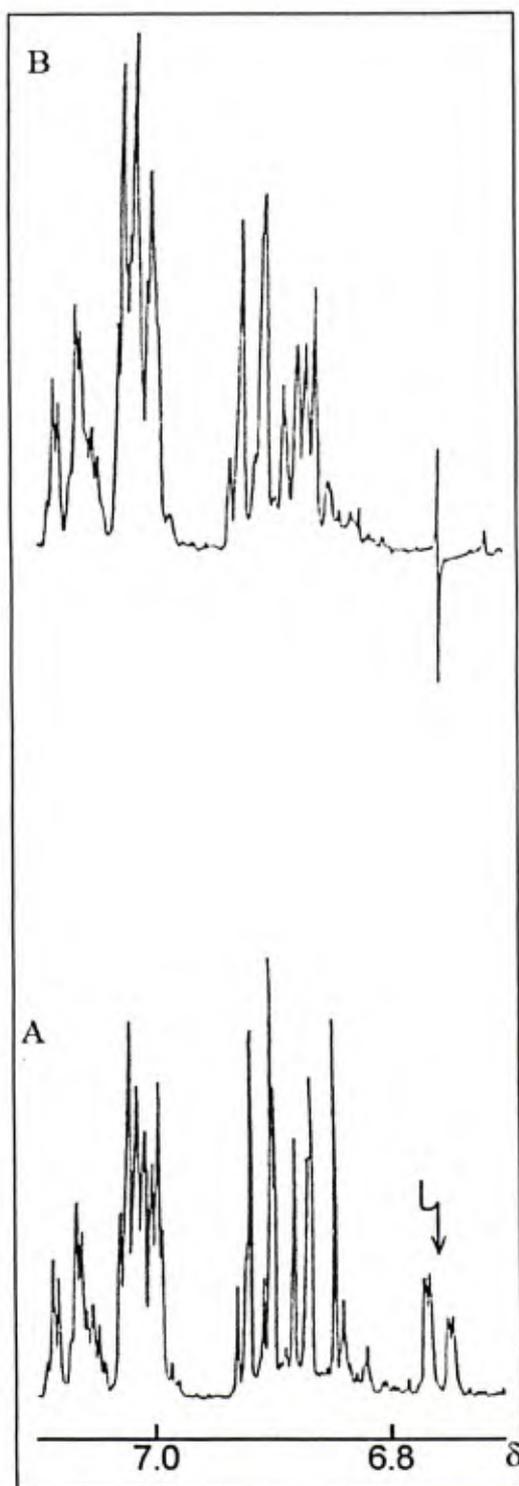


Figura 1.21 - Espectros Parciais Resultantes dos Experimentos de Desacoplamento dos Hidrogênios Aromáticos dos Compostos [57] e [58]: A) Antes de Irradiar em δ 6,76 e B) Após Irradiação em δ 6,76.

Não só as atribuições dos sinais de H7' e 7'-OH, mas também as de H8', H9'a e H9'b, foram confirmadas por experimentos de desacoplamento por dupla irradiação no espectro de RMN de ^1H (Fig. I.22, p. 106). No espectro de [58], com a irradiação do sinal de H7' (δ 4,89, t), o sinal em δ 4,30 (7'-OH; Fig. I.22c, p. 106) que antes aparecia como um duplete tornou-se um simpleto, confirmando o acoplamento entre ambos. Além disso, observou-se também uma pequena modificação no multiplete em δ 4,54, atribuído a H8'. Para o espectro de [57], também após irradiação do sinal de H7' (δ 5,09, dd; Fig. I.22b, p. 106), o duplete em δ 4,75 (7'-OH) tornou-se um simpleto. Nenhuma alteração foi observada em outro sinal, sugerindo, portanto, que o sinal de H8' de [57] era coincidente com o de [58]. A coincidência dos sinais de H8' dos dois compostos foi confirmada pela irradiação do multiplete em δ 4,54 (Fig. I.22e, p. 106) que resultou na simplificação não só do sinal de H7' de [58], mas também no de [57]. Além disso, com a irradiação do sinal de H8' observou-se também uma alteração nos sinais em δ 4,43 (dd, $J_1=11,8$ e $J_2=7,7$ Hz) e δ 4,31 (dd, $J_1=11,8$ e $J_2=4,0$ Hz) atribuídos a H9'a e H9'b, respectivamente, do principal composto.

A diferença observada em $J_{7,8'}$ de [57] e [58] sugeriu que estes dois compostos eram epímeros, cuja única diferença seria a estereoquímica relativa dos grupos ligados a C7' e C8'. Como para [58] $J_{7,8'}$ foi idêntico ao do composto [53], foi proposta a mesma estereoquímica relativa para estes dois compostos, ou seja a forma *treo*. Já o composto [57] apresentou um $J_{7,8'}$ muito parecido ao do composto [54], sugerindo que estes dois compostos também apresentavam a mesma estereoquímica relativa *eritro*. Estas propostas ainda foram confirmadas por meio de simulação destes modelos em computador (Figuras I.23 e I.24, p. 107), usando o programa PCModel PI-3.2 (Serena Software), fornecendo valores para constantes de acoplamento calculadas ($J_{7,8'}=9,60$ Hz [57], Fig. 23; $J_{7,8'}=2,21$ Hz [58], Fig. I.24, p. 107) para cada composto, próximas àquelas obtidas no espectro de RMN de ^1H ($J_{7,8'}=8,4$ Hz [57] e $J_{7,8'}=3,0$ Hz [58], Tab. I.3, p. 110).

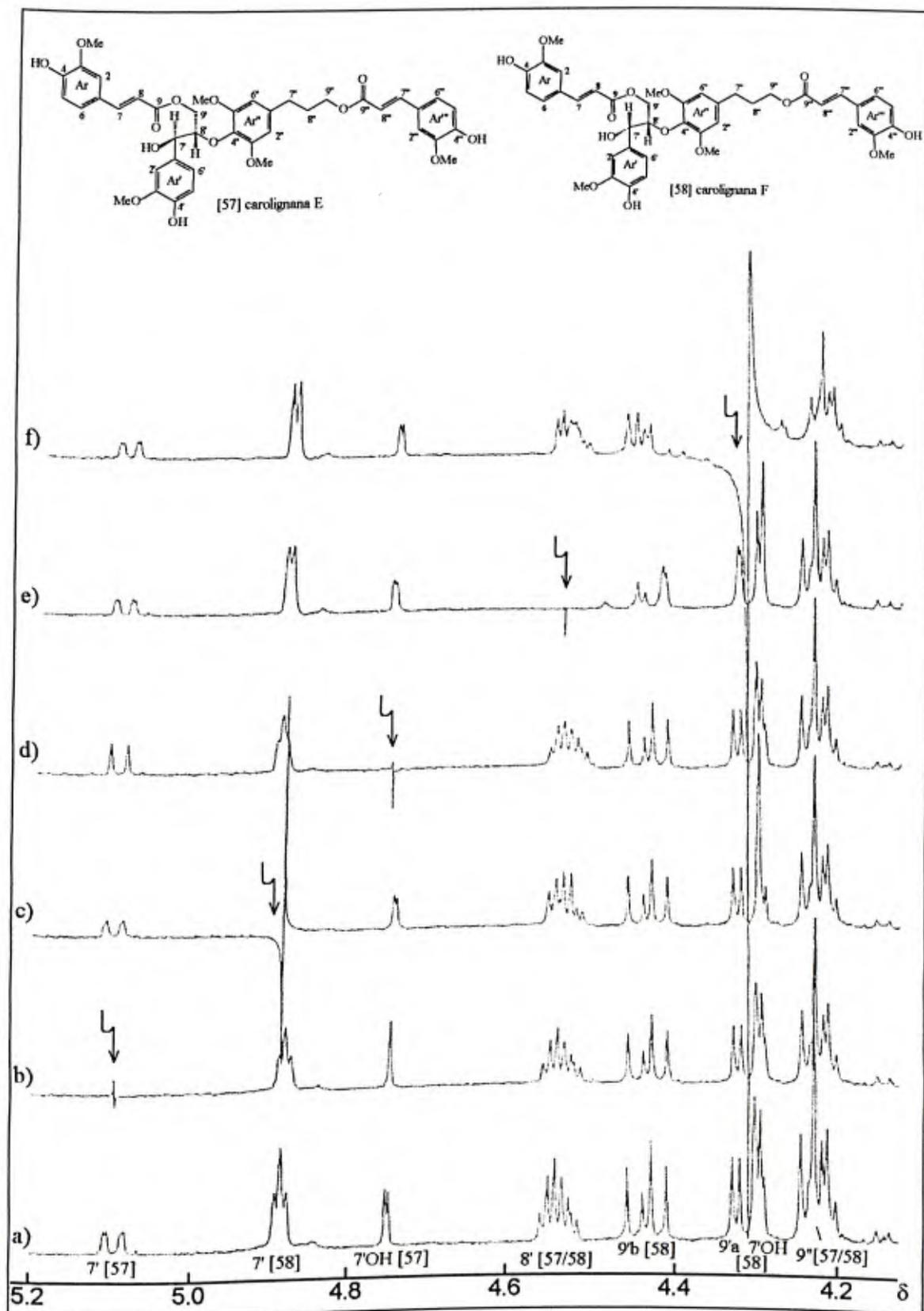


Figura I.22 - Espectros Parciais Obtidos por Técnica de Dupla Irradiação de Sinais dos Compostos [57] e [58]: a) Espectro Normal; com Irradiação dos Sinais em: b) δ 5,09; c) δ 4,89; d) δ 4,75; e) δ 4,54; f) δ 4,31.

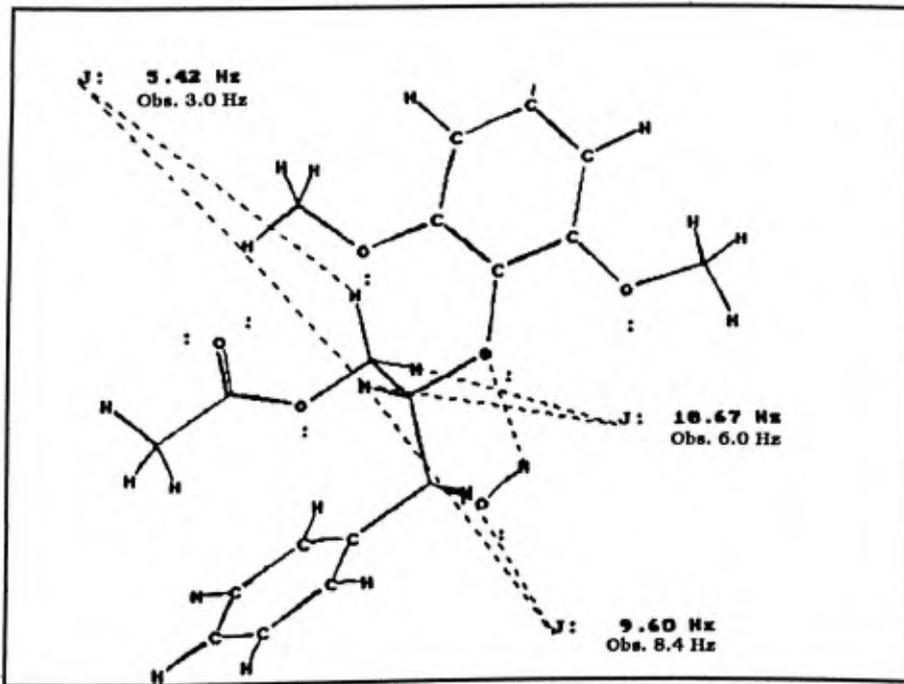


Figura I.23 - Simulação em Computador da Parte Central da Estrutura [57], Representando C7',C8' na forma *treo*.

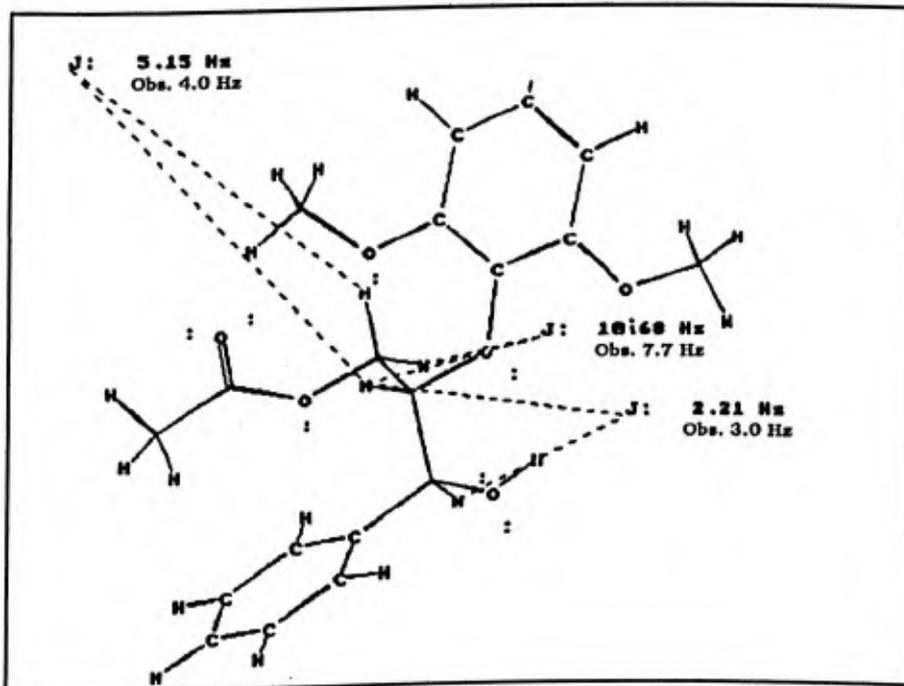


Figura I.24 - Simulação em Computador da Parte Central da Estrutura [58], Representando C7',C8' na forma *eritro*.

Portanto, a única diferença observada entre os dois pares de compostos [53] e [58] e [54] e [57], respectivamente, foi a substituição de um hidrogênio em C5'' por uma metoxila no último composto de cada par.

Todas as possíveis atribuições para os sinais de ressonância de [57] e [58] são apresentadas na Tabela I.3 (p. 110) juntamente com aquelas dos compostos [53] e [54] para facilitar a comparação entre cada par de compostos.

O espectro de massas de [57] e [58] (Figura I.25, p. 109) apresentou picos representativos de fragmentações semelhantes às dos compostos [53 a 56], diferindo apenas pela presença dos picos de fragmentos contendo uma metoxila adicional, reforçando a proposta estrutural. O pico do íon molecular $[M^+]$ em $m/z=742$ não foi observado. Os principais picos observados foram aqueles de fragmentos apresentando m/z (%): 548 (100) $[M - \text{ácido ferúlico}]^+$, 372 (22), 354 (15), 315 (5), 194 (40) $[\text{ácido ferúlico}]^+$, 177 (85) $[C_{10}H_9O_3]^+$. Os fragmentos correspondentes a estes valores de massa são apresentados no Esquema I.3 (p. 111).

Os compostos [57] e [58] também são descritos pela primeira vez na literatura e foram denominados carolignana E e F, respectivamente.

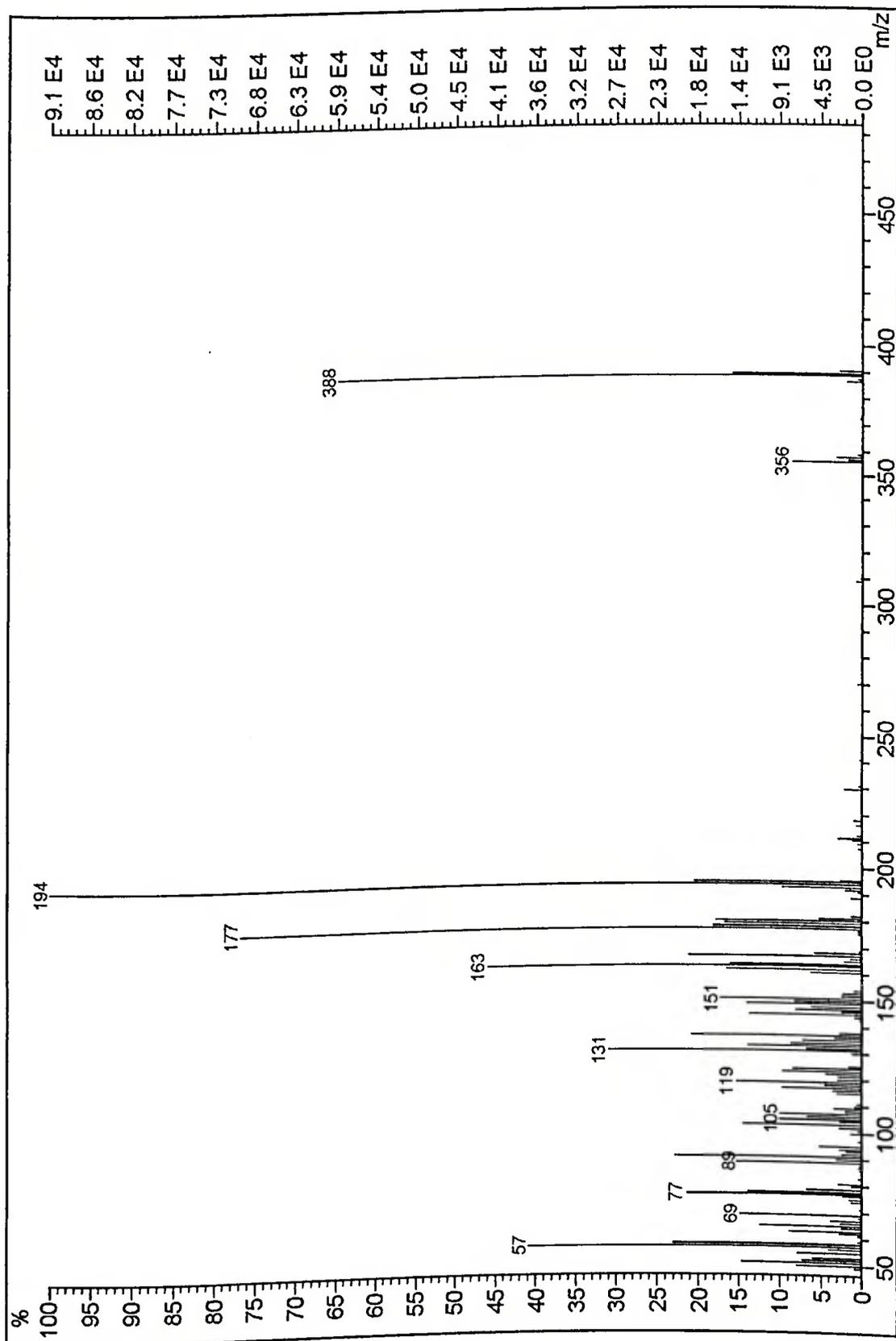
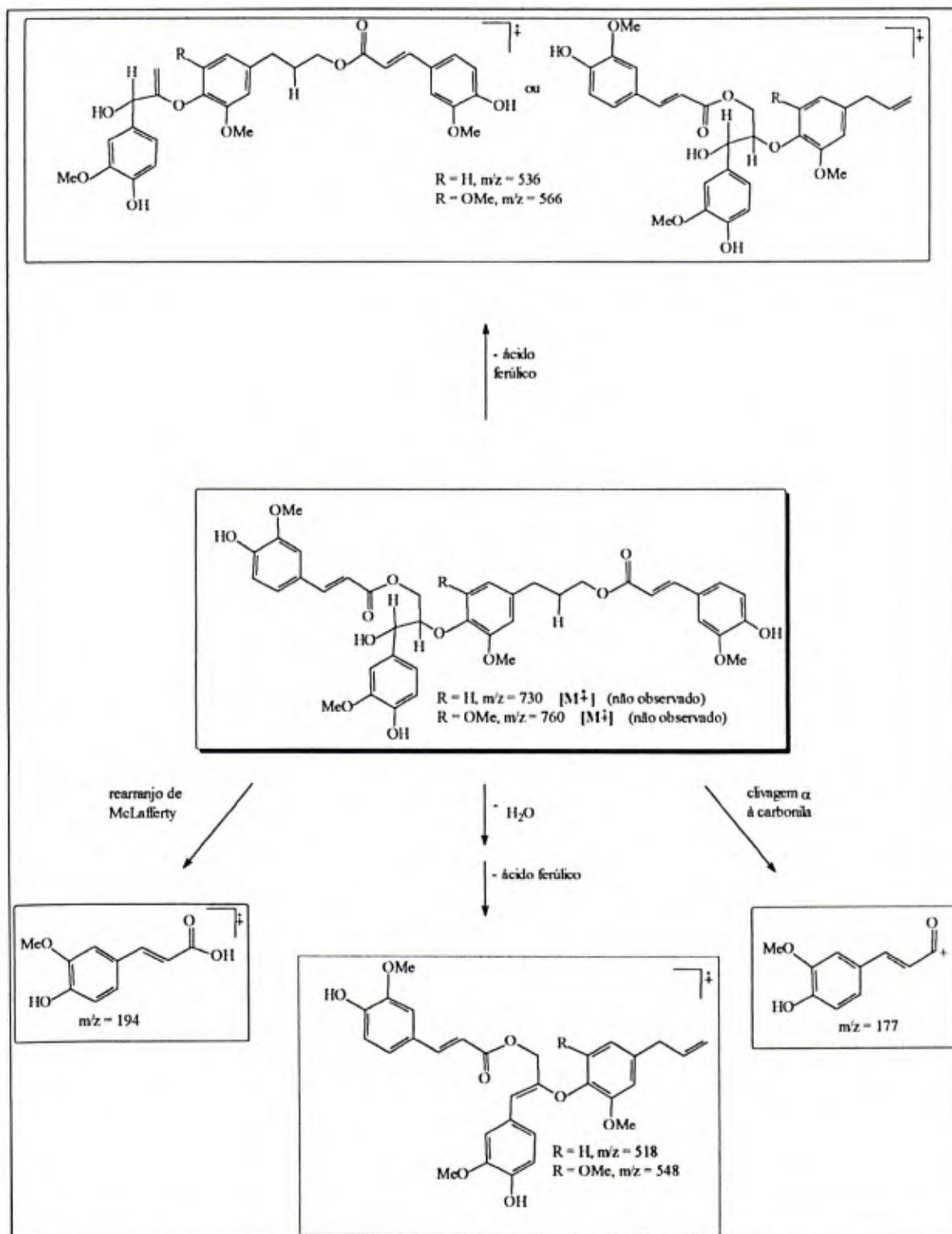


Figura I.25 - Espectro de Massas (IQ) da Fração OCE8 (Compostos [57] e [58]).

Tabela I.3. Dados de RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) Para os Compostos [53], [54], [55], [56], [57], [58] e [58]

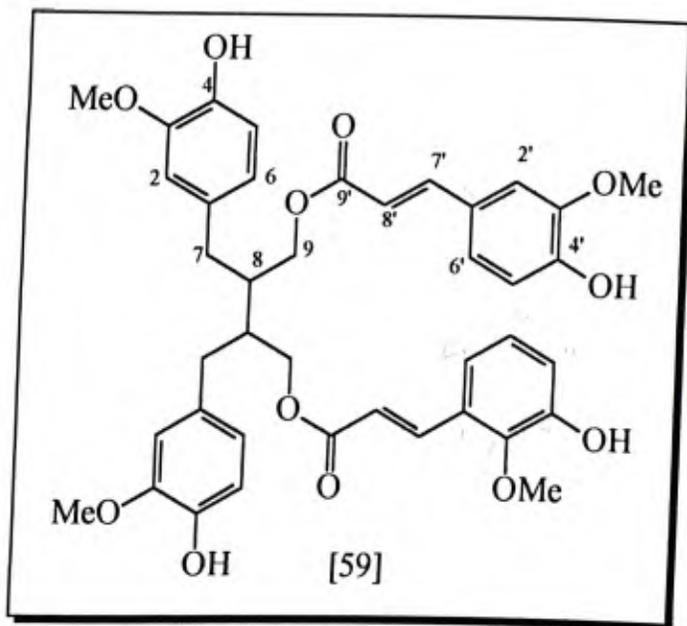
H	[53] δ(m,J)	[54] δ(m,J)	[55] δ(m,J)	[56] δ(m,J)	[57] δ(m,J)	[58] δ(m,J)
2	6,99(d,2,1)	7,02(d,2,0)	7,01(m)	7,71(d,2,0)	*	7,00(m)
3 (OMe)	3,86(s)	3,93(s)	3,94(s)	3,81(s)	3,94(s)	3,92(s)
4 (OH)	5,89(s,br)	5,92(s,br)	5,85(s,br)	5,85(s,br)	5,87(s,br)	5,86(s,br)
5	6,91(d,8,3)	6,90(d,8,3)	6,85(d,8,0)	6,92(m)	*	6,86(m)
6	7,02(dd,8,3;2,1)	7,07(dd,8,3;2,1)	7,08(m)	7,10(dd,8,0;2,0)	*	7,01(m)
7	7,49(d,16,0)	7,53(d,16,0)	7,53(d,16,0)	6,82(d,12,8)	7,55(d,16,0)	7,50(d,16,0)
8	6,22(d,16,0)	6,25(d,16,0)	6,30(d,16,0)	5,80(d,12,8)	6,30(d,16,0)	6,24(d,16,0)
2'	7,01(d,2,0)	7,02(d,2,0)	7,02	7,02	*	7,01(d,1,8)
3' (OMe)	3,86(s)	3,92(s)	3,82(s)	3,81(s)	3,92(s)	3,91(s)
4' (OH)	5,60(s,br)	5,62(s,br)	5,58(s,br)	5,58(s,br)	5,57(s,br)	5,53(s,br)
5'	6,87(d,8,0)	6,90(d,8,0)	6,86(m)	6,92(m)	6,76(dd,8,0;1,8)	6,76(dd,8,0;1,8)
6'	6,82(dd,8,0;2,0)	6,87(dd,8,0;2,0)	6,76	6,76	*	6,88(d,8,0)
7'	4,91(d,3,0)	4,92(d,8,0)	4,92(d,8,2)	4,82(d,8,2)	5,09(dd,8,4;1,6)	4,89(t,3,0)
7-OH					4,75(d,1,6)	4,30(d,3,0)
8'	4,45(m)	4,20(m)	4,20(m)	4,10(m)	*	4,54(ddd,7,7;4,0;3,0)
9'	4,28(dd,16,1;7,0)	4,11(dd,12,0;5,0)	4,11(dd,12,0;5,4)	4,04(dd,12,0;5,4)	4,13(dd,12,0;6,0)	4,43(dd,11,8;7,7)
	4,47(m)	4,34(dd,12,0;3,4)	4,34(dd,12,0;3,2)	4,28(dd,12,0;3,2)	3,99(dd,12,0;3,0)	4,31(dd,11,8;4,0)
2''	6,76(d,2,0)	6,76(d,2,0)	6,70	6,70	6,42(s,br)	6,44(s,br)
3'' (OMe)	3,92(s)	3,89(s)	3,94(s)	3,94(s)	3,89(s)	3,88(s)
5''	7,01(d,7,9)	7,13(d,7,9)	---	---	---	---
6''	6,75(dd,7,9;2,0)	6,74(dd,7,9;2,0)	---	---	6,42(s,br)	6,44(s,br)
7''	2,69(dd,7,7;7,2)	2,69(dd,7,2;7,0)	2,62(t,7,8)	2,69(t,7,8)	2,68(m)	2,69(t,7,5)
8''	2,01(m)	2,00(m)	1,94(t,7,8;6,5)	2,01(t,7,8;6,5)	2,03(m)	2,03(t,7,5;6,5)
9''	4,21(t,6,5)	4,20(t,6,5)	4,20(t,6,5)	4,13(t,6,5)	4,22(t,6,5)	4,23(t,6,5)
2'''	7,01(d,2,1)	7,02(d,2,0)	7,73(d,2,0)	7,01(m)	*	7,01(m)
3''' (OMe)	3,92(s)	3,84(s)	3,82(s)	3,93(s)	3,81(s)	3,84(s)
4''' (OH)	5,89(s,br)	5,92(s,br)	5,85(s,br)	5,85(s,br)	5,87(s,br)	5,84(s,br)
5'''	6,94(d,8,3)	6,89(d,8,3)	6,92(m)	6,86(d,8,0)	*	6,86(m)
6'''	7,08(dd,8,3;2,1)	7,08(d,br)	7,06(m)	7,11(dd,8,0;2,0)	*	7,08(dd,8,0;2,0)
7'''	7,60(d,16,0)	7,60(d,16,0)	6,81(d,12,8)	7,61(d,16,0)	7,62(d,16,0)	7,61(d,16,0)
8'''	6,29(d,16,0)	6,29(d,16,0)	5,82(d,12,8)	6,30(d,16,0)	6,35(d,16,0)	6,29(d,16,0)

(*) As ressonâncias destes hidrogênios para o isômero minoritário foram similares àquelas do principal isômero, mas não foram completamente atribuídas.



Esquema I.3 - Principais Fragmentações Representadas nos Espectros de Massas dos Compostos [53], [54], [55], [56], [57] e [58].

I.3.1.2.8. Frações OCE5 e OCE13: Diferulato de Secoisolariciresinila [59]



A fração OCE5, constituída de um material branco cristalino de $T_f=182-184$ °C, apresentou um espectro no IV (Fig. I.26, p. 113) muito semelhante aos das demais lignanas discutidas previamente, apresentando absorções principais em 3400 (OH fenólica), 1700 (C=O, α,β -insaturada) e 1630, 1600 e 1520 (C=C arom.). Este espectro foi ainda idêntico ao da fração OCE13, constituída também de um sólido cristalino com $T_f=190-192$ °C, obtida após fracionamento do extrato etanólico em coluna (Figura I.3, p. 29) e recristalização.

Os espectros de RMN de ^1H de ambas frações (Figuras I.27a, p. 114 e I.27b, p. 115) confirmaram que eram constituídas de um mesmo composto puro, que apresentou dezesseis sinais bem definidos, sem qualquer superposição. A presença de um grupo ferulato foi evidenciada por meio dos sinais em δ 7,53 (d, $J=15,9$ Hz) e δ 6,47 (d, $J=15,9$ Hz), correspondentes aos hidrogênios *trans*-olefínicos, H7' e H8', respectivamente, e dos sinais em δ 9,59 (s, 4'-OH), δ 3,81 (s, 3'-OMe), δ 7,29 (d, $J=1,9$ Hz, H2'), δ 7,09 (dd, $J_1=8,2$ e $J_2=1,9$ Hz, H6') e δ 6,78 (d, $J=8,2$ Hz, H5'), que caracterizaram o anel guaiacílico.

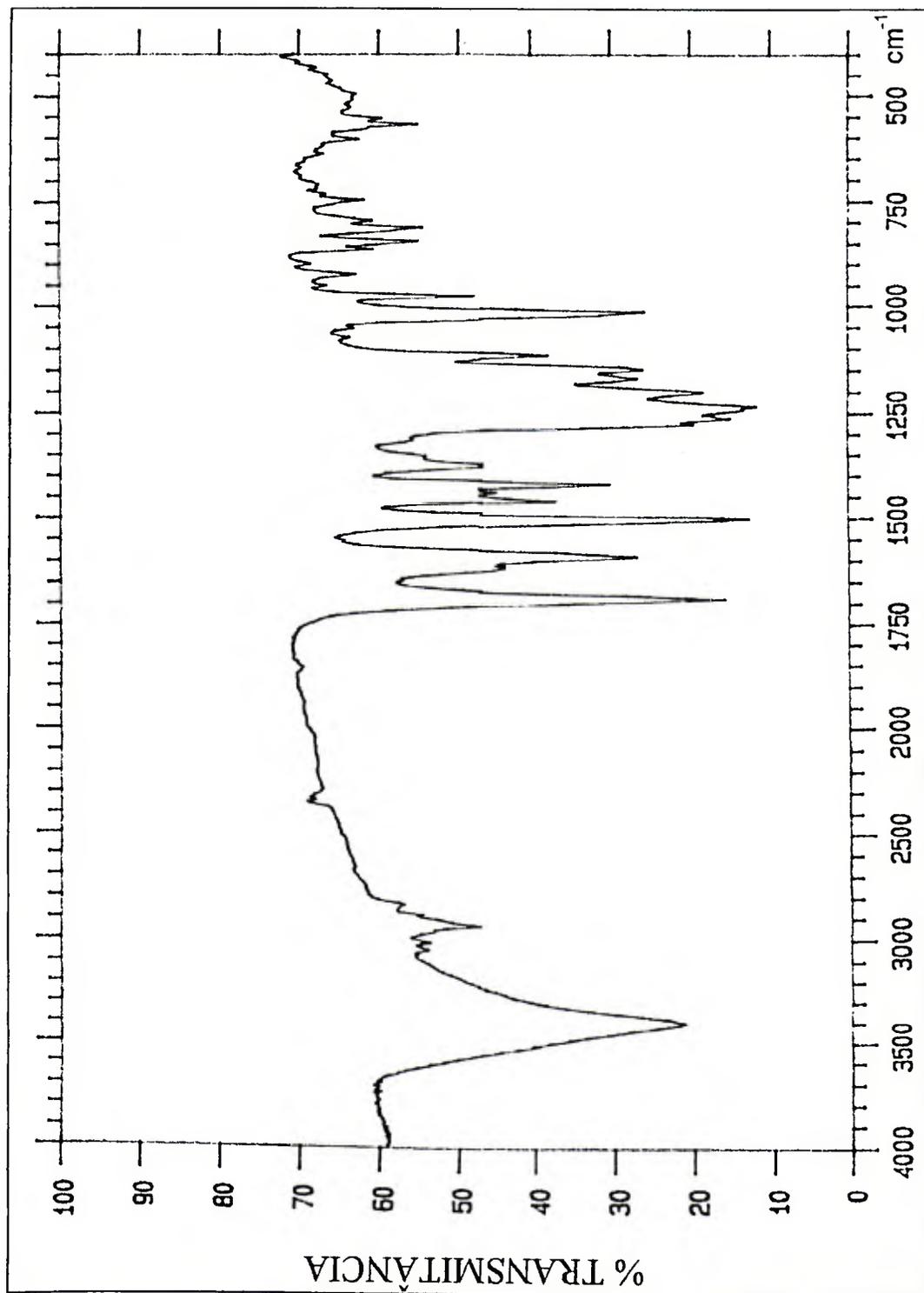


Figura I.26 - Espectro no Infravermelho das Frações OCE5 e OCE13 (Composto [59]) em KBr.

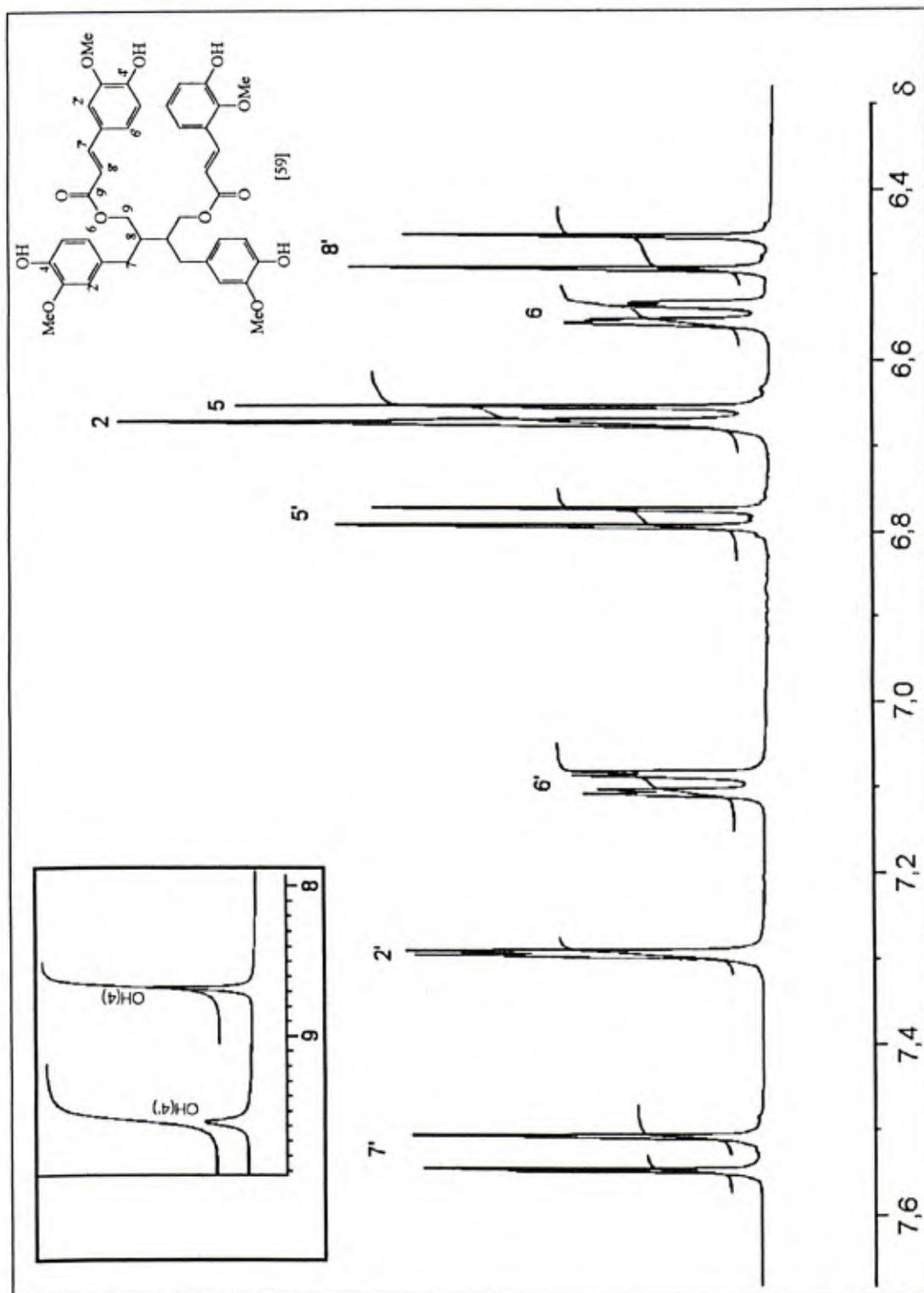


Figura I.27a - Espectro de RMN de ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) das Frações OCE5 e OCE13 (Composto [59]), Região de δ 7,6 a 6,4.

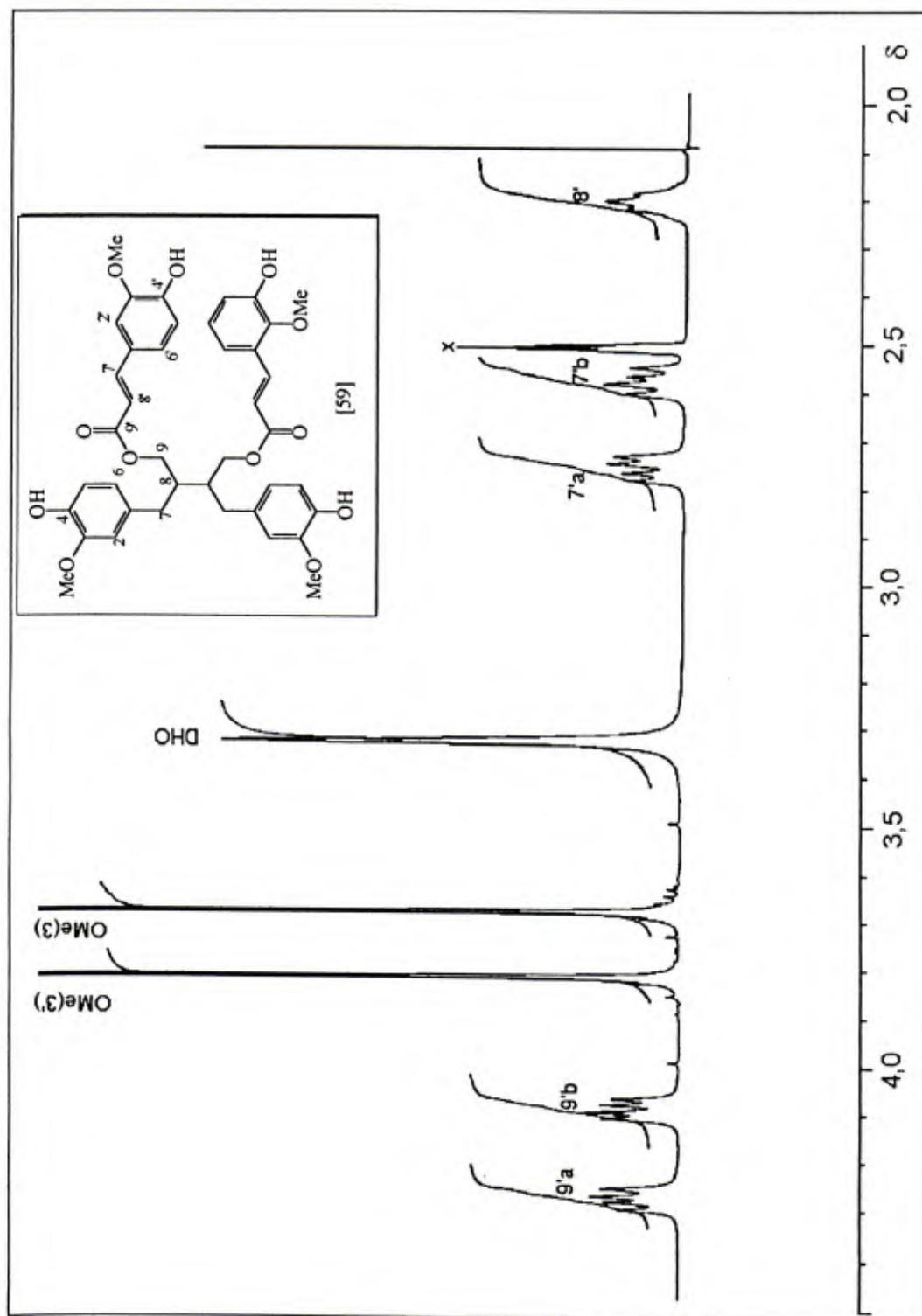


Figura I.27b - Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 400 MHz) das Frações OCE5 e OCE13 (Composto [59]), Região de δ 5,0 a 2,0.

Um segundo anel guaiacílico foi evidenciado nas Figuras I.27a (p. 114) e I.27b (p. 115) pelos sinais em δ 8,69 (s, 4-OH), δ 3,68 (s, 3-OMe), δ 6,67 (s, H2), δ 6,66 (d, $J_{5-6}=8,0$ Hz, H5) e δ 6,53 (dd, $J_{6,5}=8,0$ e $J_{6-2}=1,4$ Hz, H6). O espectro da Fig. I.27b (p. 115) ainda permitiu a observação de sinais que foram atribuídos a uma unidade C_3 , $-CH_2CHCH_2-$, caracterizada pelos sinais em δ 2,20 (m, H8), δ 2,57 (dd, $J_{7b-7a}=13,9$ e $J_{7b-8}=8,3$ Hz, H7b), δ 2,76 (dd, $J_{7a-7b}=13,9$ e $J_{7a-8}=6,1$ Hz, H7a), δ 4,08 (dd, $J_{9b-9a}=11,4$ e $J_{9b-8}=5,1$ Hz, H9b) e δ 4,27 (dd, $J_{9a-9b}=11,4$ e $J_{9a-8}=6,5$ Hz, H9a). Nesta unidade C_3 , provavelmente, um CH_2 estaria ligado ao grupo ferulato e o outro ligado à unidade guaiacilica.

O espectro de RMN de ^{13}C (Fig. I.28, p. 118) apresentou sinais devidos a vinte carbonos: um em δ 167,54, correspondendo à carbonila de éster conjugada da unidade ferulato (C-9'); doze correspondendo a carbonos aromáticos, dos quais, seis são quaternários (δ 150,26, C3; δ 148,81, C3'; δ 148,28, C4; δ 145,53, C4'; δ 131,68, C1; δ 126,29, C1') e seis são hidrogenados (δ 124,05, C6'; δ 121,91, C6; δ 116,38, C5'; δ 116,14, C5; δ 113,69, C2' e δ 112,08, C2); dois olefinicos (δ 145,94, C7' e δ 115,27 C8'); dois CH_2 (δ 64,67, C9 e δ 34,69, C7) e um CH (δ 40,83, C8) alifáticos, além de duas metoxilas (δ 56,57, OMe-3' e δ 56,25, OMe-3). Estas atribuições foram feitas com auxílio do espectro DEPT 135 (Fig. I.29, p. 119). O sinal devido a C8 apresenta-se sobreposto ao sinal do solvente (DMSO) e só pôde ser visto no espectro DEPT.

Estes dados permitiram a proposta da parte da estrutura da molécula representada no Esquema I.4 (p. 120), sendo esta hipótese confirmada por experimentos de nOe (Figura I.30, p. 120), também representados no Esquema I.4 (p. 120) e, ainda, pelos acoplamentos observados no experimento COSY $^1H^1H$ (Figuras I.31a, p. 121 e I.31b, p. 122).

Pela técnica COSY $^1H^1H$ (Figura I.31a, p. 121) foram observados os acoplamentos entre os hidrogênios *orto* (H5 e H6 e H5' e H6') de cada sistema aromático e dos hidrogênios *trans* olefinicos (H7' e H8'). Na Figura I.31b (p. 122) foram observados acoplamentos dos sinais atribuídos aos hidrogênios geminais H7a e H7b bem como H9a e H9b. Porém, os acoplamentos menores tais como aqueles

esperados entre H2 e H6, H2' e H6' e entre H8 e H7a, H7b, H9a e H9b não foram observados. Isto pode ter sido devido aos parâmetros empregados para o experimento. Para comprovar a atribuição do sinal em δ 2,20 a H8 fez-se uma irradiação na frequência deste sinal, que aparecia como um multipletto, observando-se, assim, sua simplificação e a simplificação dos sinais correspondentes a H7a, H7b, H9a e H9b, que passaram de duplos dupletos a dupletos. A alteração destes sinais pode ser observada na Figura I.32a (p. 123). Desta forma foram confirmadas as atribuições dos sinais correspondentes a H7a, H7b, H8, H9a e H9b.

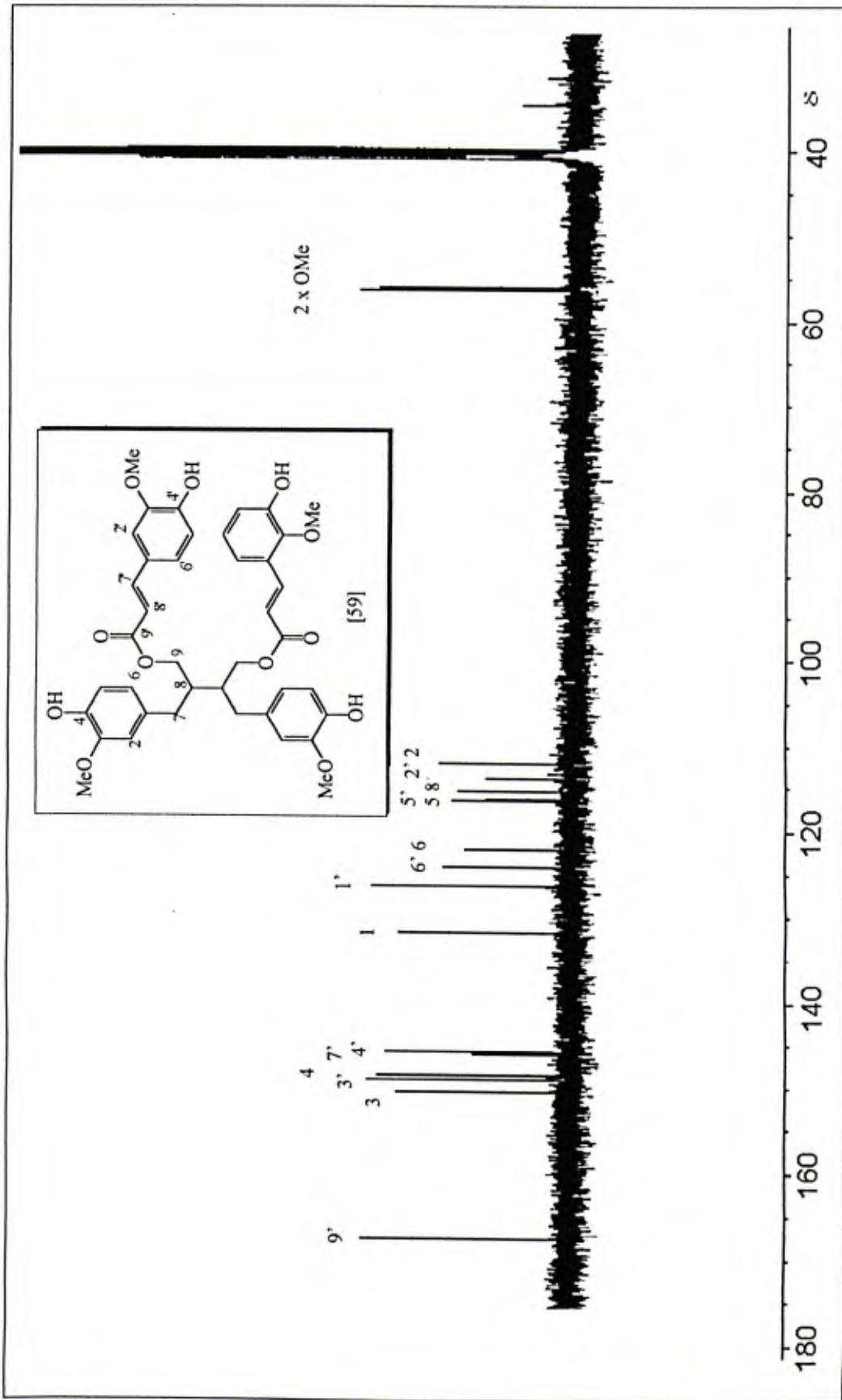


Figura I.28 - Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-d_6 , 100,6 MHz) das Frações OCE5 e OCE13 (Composto [59]).

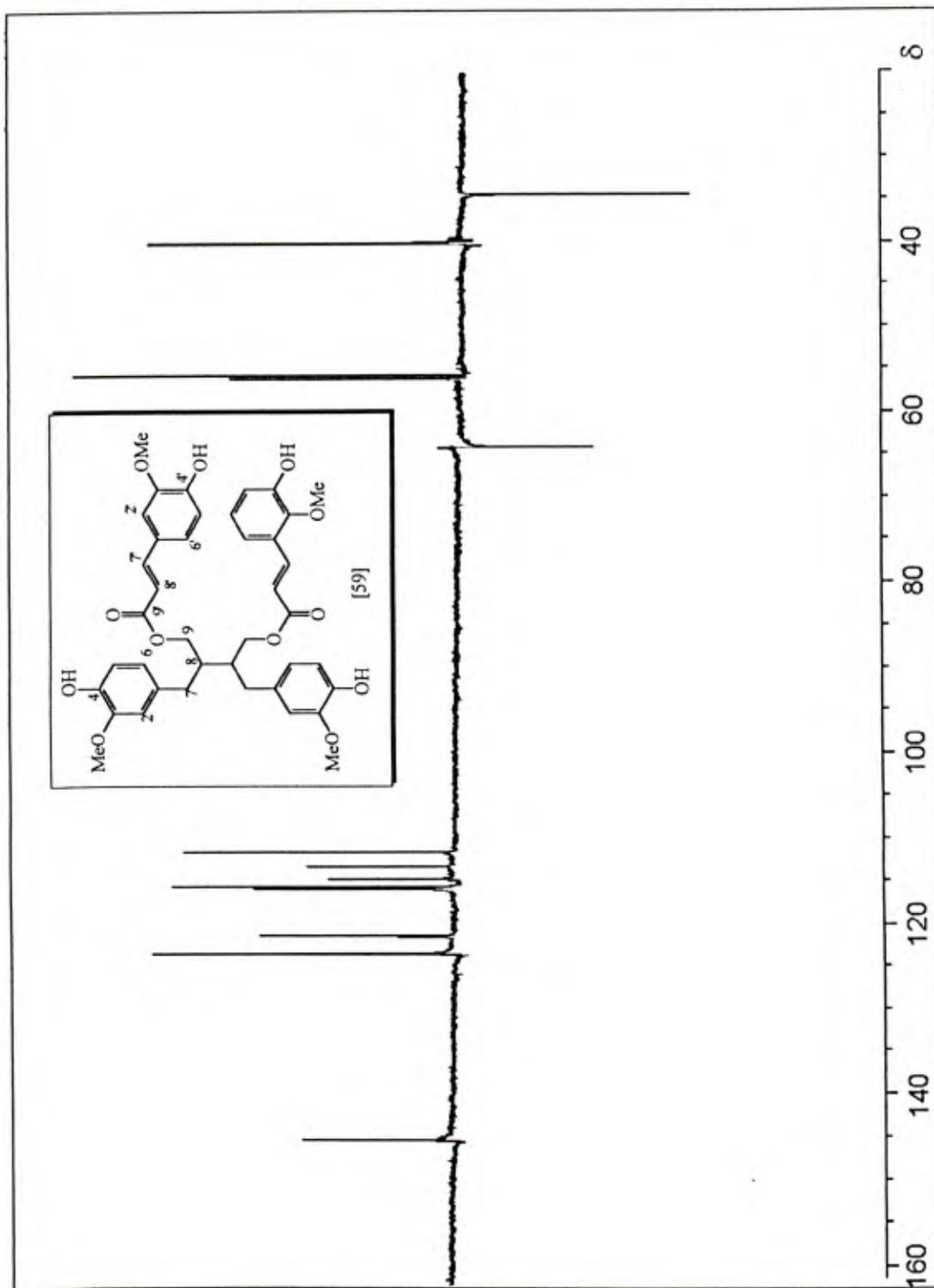
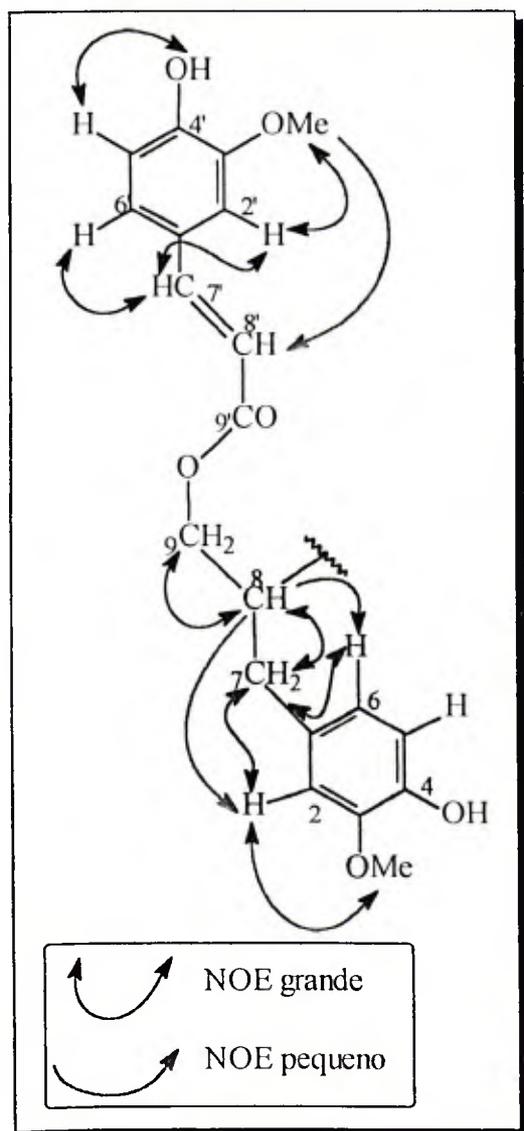


Figura I.29 - Espectro de RMN de ^{13}C - DEPT (DMSO- d_6 , 100,6 MHz) das Frações OCE5 e OCE13 (Composto [59]).



Esquema I.4 - Principais nOes Observados entre os Hidrogênios do Composto [59].

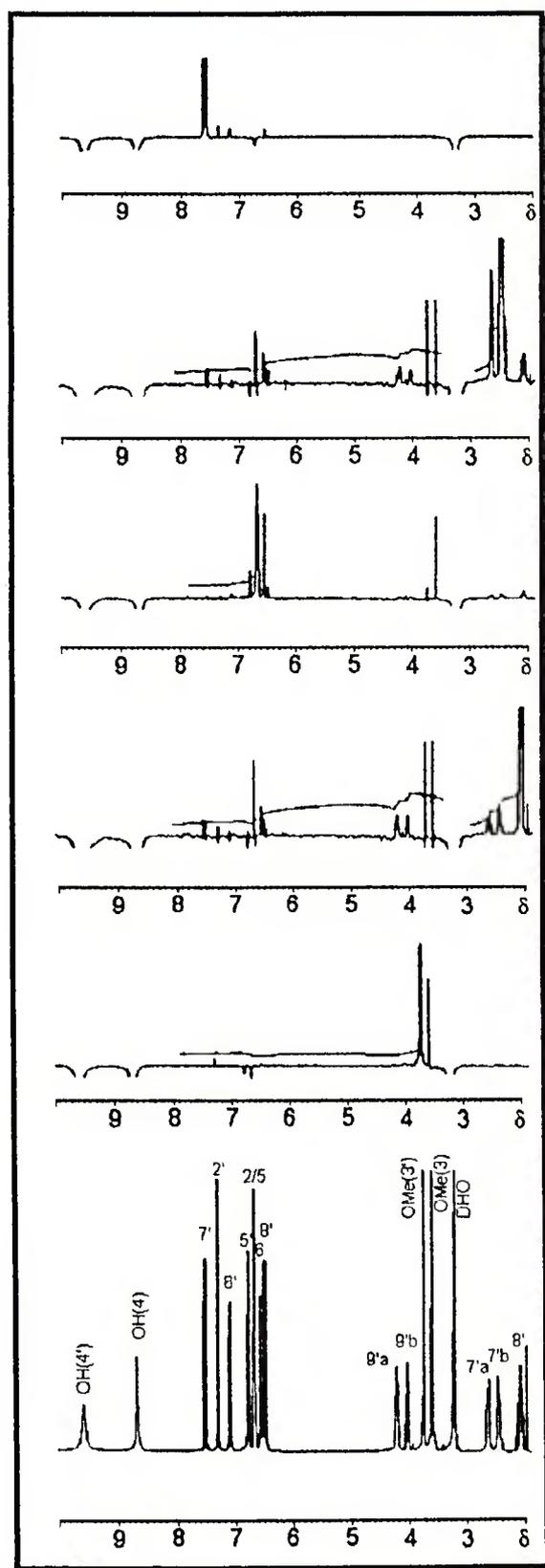


Figure I.30 - Espectros Resultantes dos Experimentos de nOe Realizados para o Composto [59].

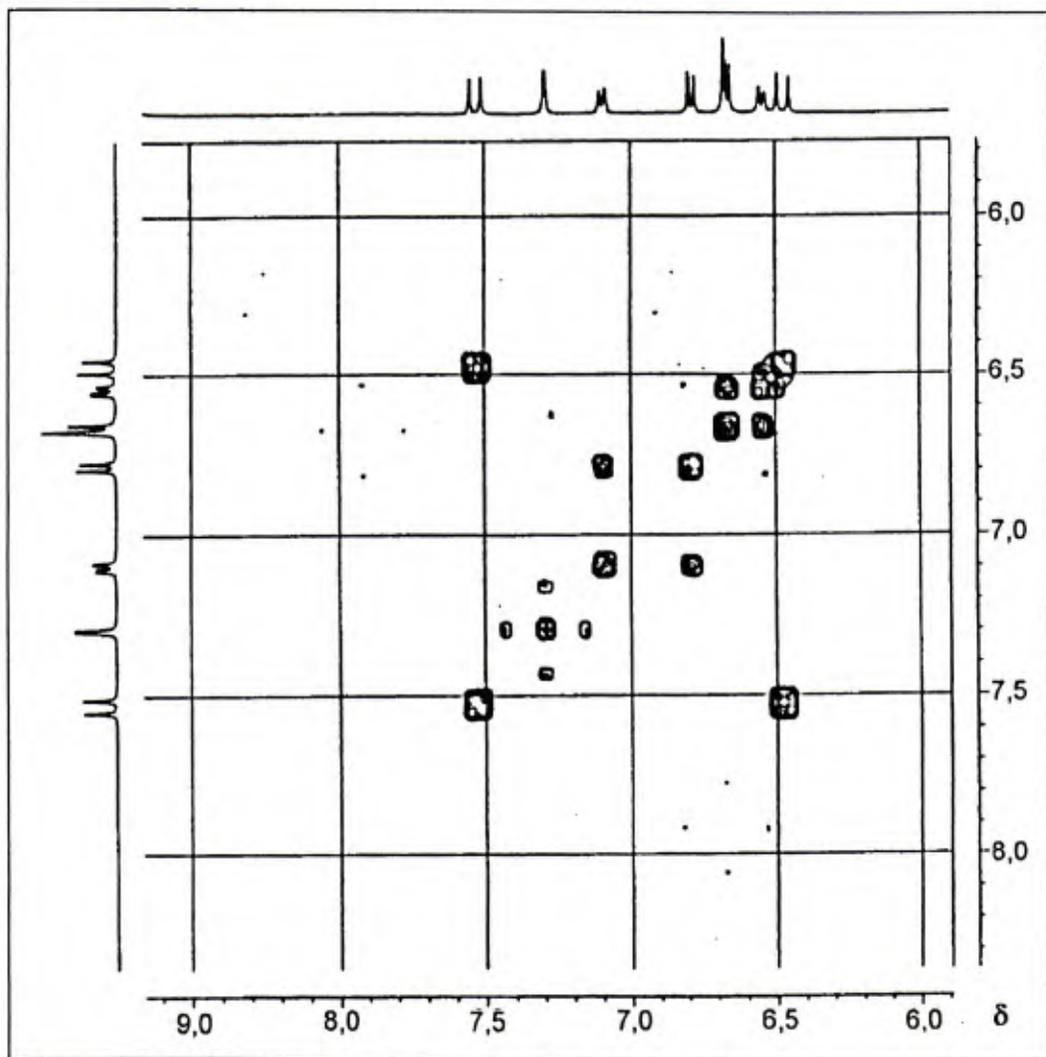


Figura I.31a - Mapa de Contornos COSY $^1\text{H}^1\text{H}$ das Frações OCE5 E OCE13 (Composto [59]), Compreendendo a Região de δ 9,0 a 6,0.

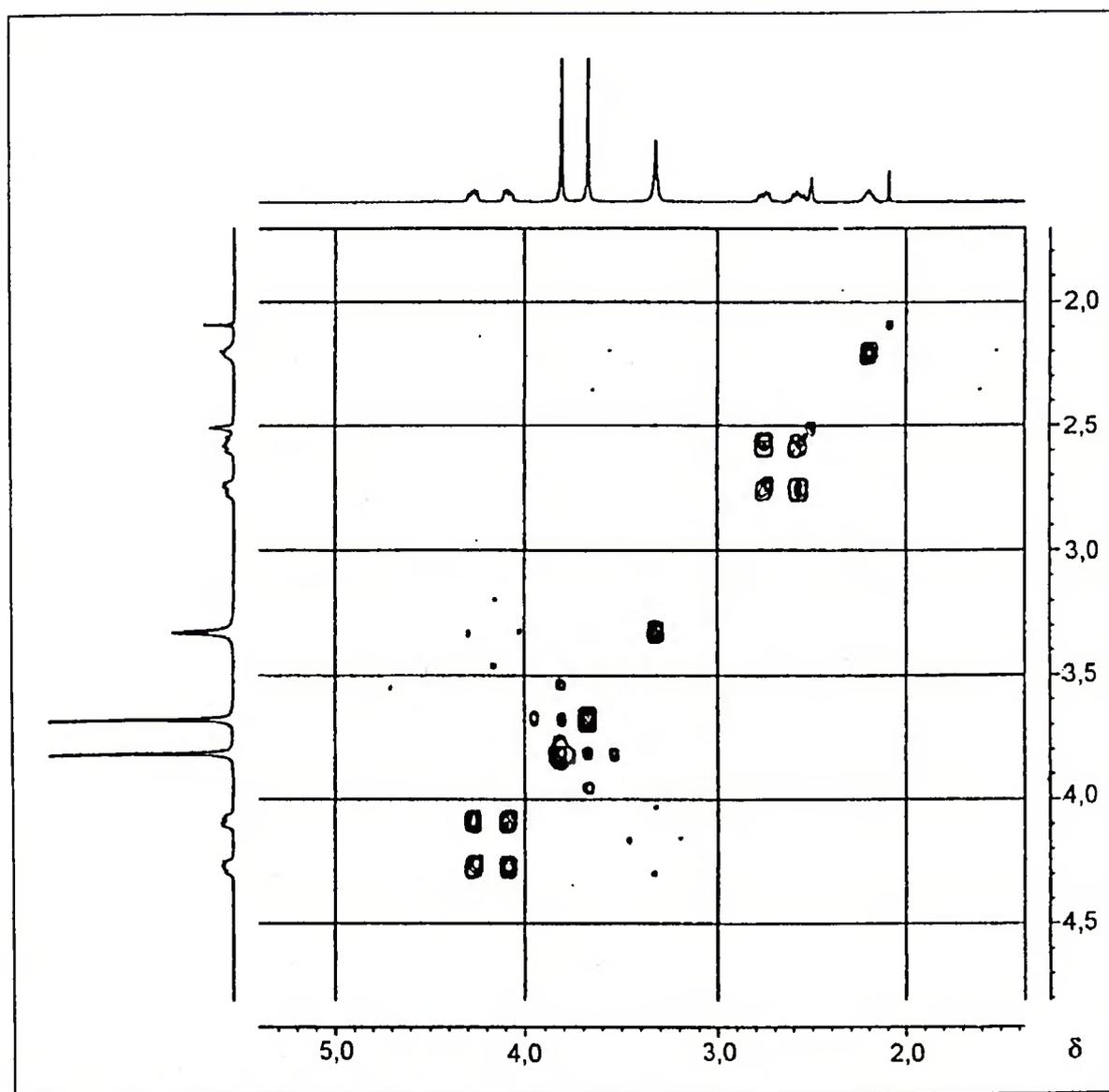


Figura I.31b - Mapa de Contornos COSY $^1\text{H}^1\text{H}$ das Frações OCE5 E OCE13 (Composto [59]), Compreendendo a Região de δ 5,0 a 2,0.

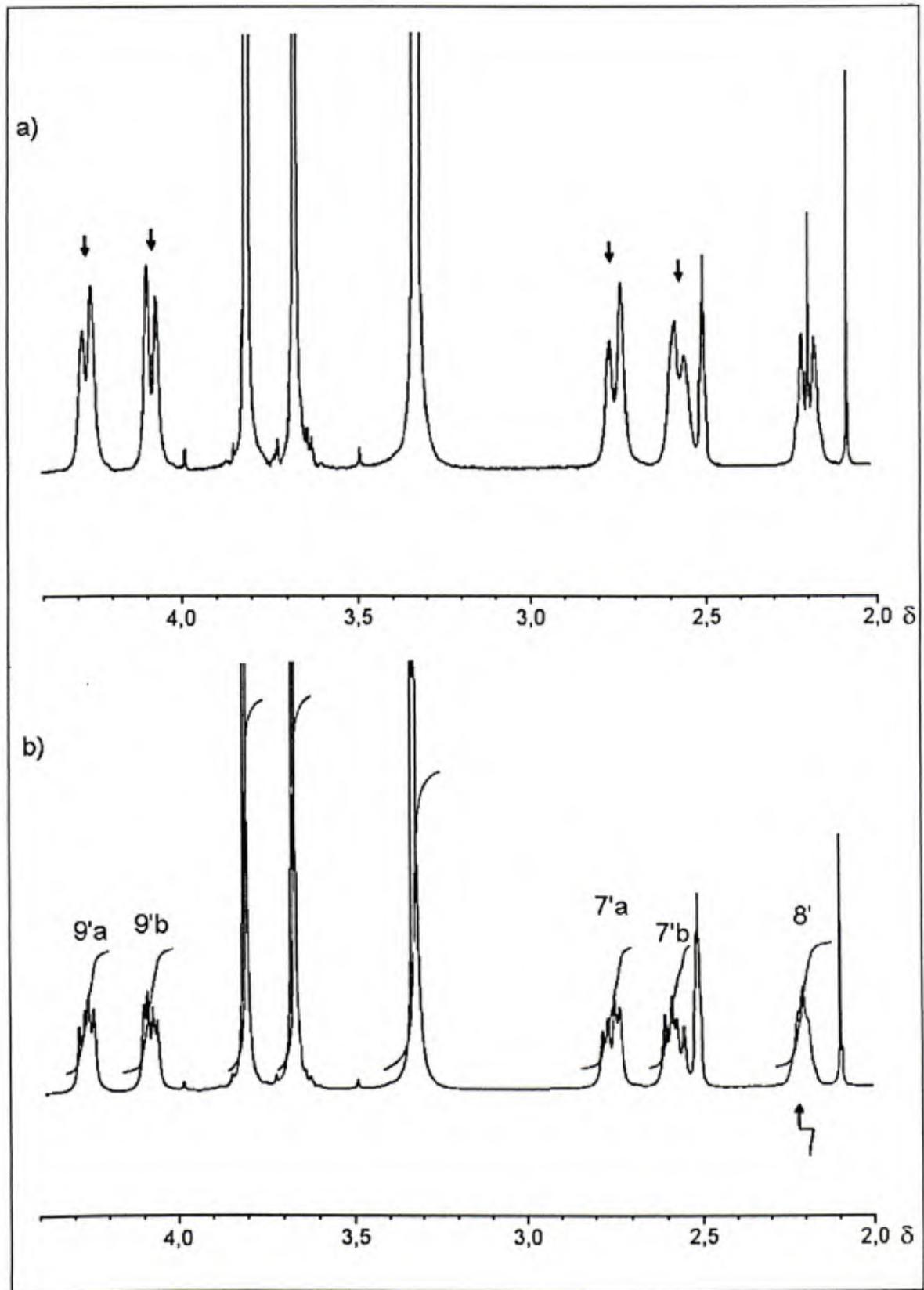


Figura I.32 - Espectro Obtido por Técnica de Dupla Irradiação das Frações OCE5 e OCE13 (Composto [59]): a) com Irradiação do Sinal em δ 2,20 e b) Espectro Padrão para Comparação.

A não observação de qualquer outro sinal nos espectros de RMN de ^1H de OCE5 e OCE13, associada aos dados de seus espectros de massas (Figura I.33, p. 125), sugeriram que a outra parte da molécula só poderia ser idêntica àquela proposta no Esquema I.4 (p. 120), tratando-se, então, de uma molécula simétrica. Somente a união destes dois fragmentos idênticos poderia explicar satisfatoriamente os dados obtidos. Portanto, chegou-se, finalmente, à proposição da estrutura da lignana diferulato de secoisolariciresinoíla para o composto [59]. Os dados de RMN de ^1H e T_f do composto [59] apresentaram-se de acordo com os da literatura (NOMURA *et al.*, 1981) para o diferulato de secoisolariciresinoíla.

O espectro de massas (Figura I.33, p. 125) apresentou o pico do íon molecular [M^+] em $m/z = 714$ (3,3 %), correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{40}\text{H}_{42}\text{O}_{12}$. Além disso, alguns dos picos neste espectro (Figura I.33, p. 125), representativos das principais fragmentações observadas, tais como m/z (%) = 538 (2,7), 316 (16), 194 (24), 177 (64), 147 (47) e 137 (100), estão de acordo com a estrutura proposta, e os fragmentos podem ser observados no Esquema I.5 (p. 126).

Esta lignana havia, previamente, sido isolada de *Alnus japonica* (NOMURA *et al.*, 1975 e 1981), de *Machilus thumbergii* (KARIMONE *et al.*, 1991) e de *Corylus sieboldiana* (WATANABE *et al.*, 1992), sendo pela primeira vez isolada de uma planta da família Bombacaceae.

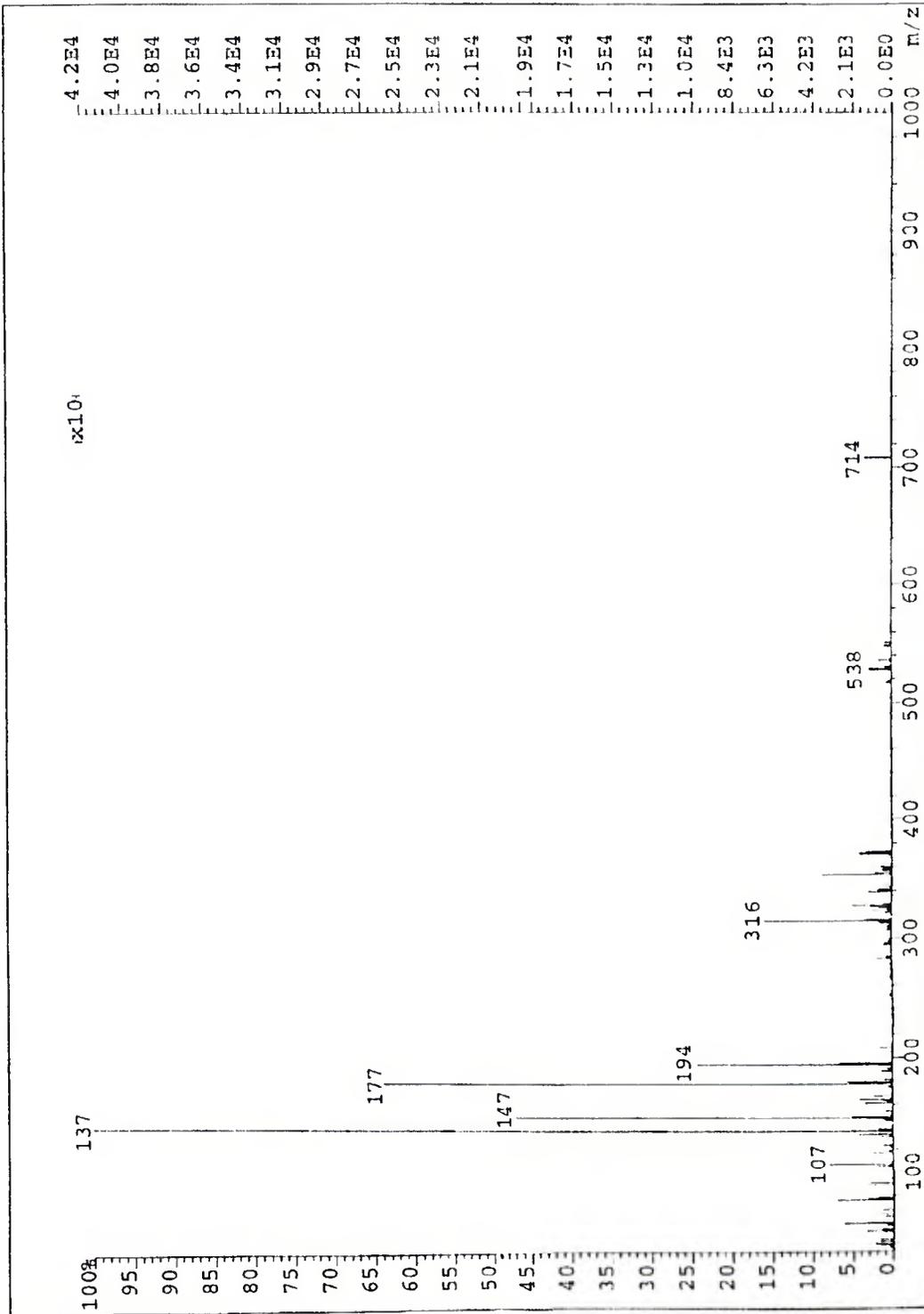
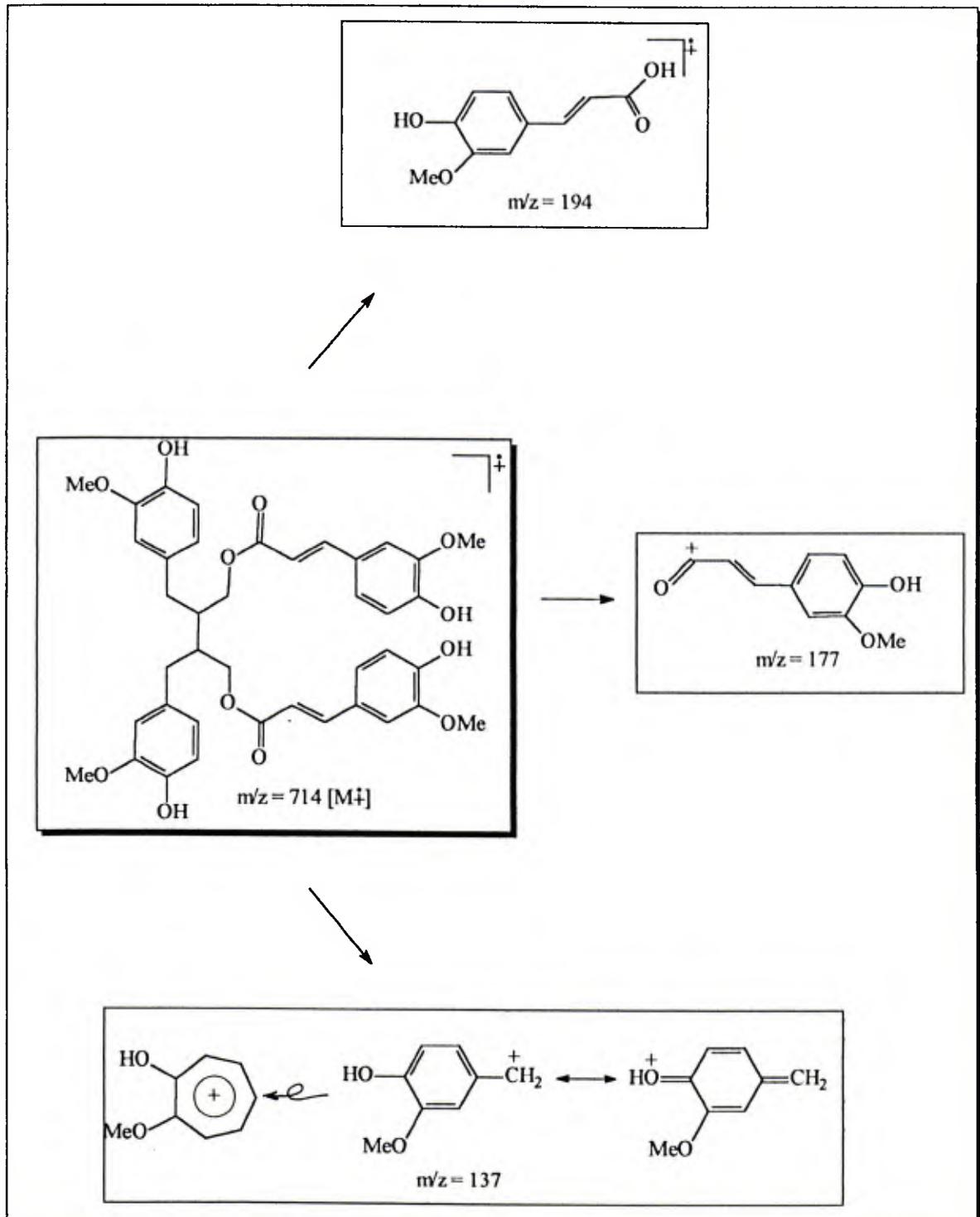


Figura I.33 - Espectro de Massas (IQ) das Frações OCE5 e OCE13 (Composto [59]).



Esquema I.5 - Principais Fragmentações Representadas para o Composto [59].

I.3.2. Constituintes Químicos da Casca

I.3.2.1. Extrato Hexânico

I.3.2.1.1. Mistura de Ácidos Graxos e Triacilglicerídeos

O espectro no IV da fração CcH(1)1-114 apresentou as principais absorções em 3500-2500 (ν OH, de ácido), 2925 e 2850 (ν -C-H), 1745 (ν C=O, de éster), 1710 (ν C=O, de ácido), 1470 e 1385 (δ_s C-H), 1170 (ν C-O) e 720 cm^{-1} (δ_s $[\text{CH}_2]_n$, $n > 4$), indicando tratar-se de uma mistura de ácidos graxos e triacilglicerídeos. Esta fração foi analisada por CG e revelou a presença de derivados dos ácidos palmítico (24%), esteárico (6%), oléico (32%) e linoléico (38%). As percentagens relativas apresentadas foram calculadas com base nas áreas dos picos, que foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões e por co-injeções. O cromatograma desta fração pode ser observado na Figura I.34.

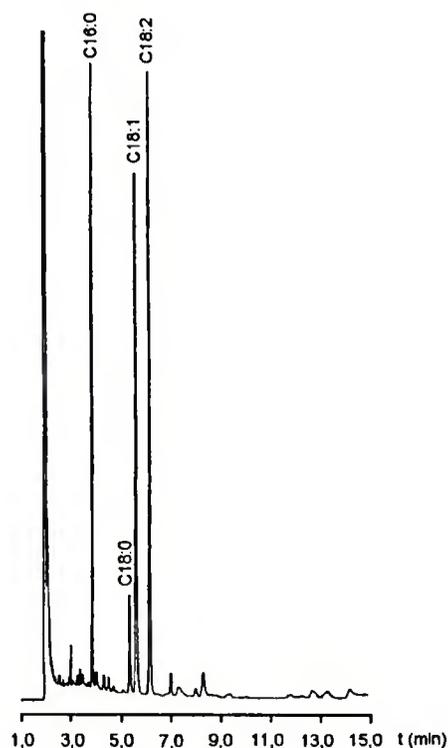


Figura I.34 - Cromatograma dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos Presentes no Extrato Hexânico da Casca de *Ochroma lagopus*.

1.3.2.2. Extrato Etanólico

1.3.2.2.1. Mistura de ácidos Graxos

O espectro no IV da fração CcE(2)10.2 apresentou as principais absorções em 3500-2500 (ν OH, de ácido), 2915 e 2830 (ν -C-H), 1720 (ν C=O), 1450 (δ_s C-H) e 725 cm^{-1} (δ_s $[\text{CH}_2]_n$, $n > 4$), sugerindo tratar-se de ácido(s) graxo(s). O espectro de RMN de ^1H (Figura I.35) desta fração apresentou absorções em δ 2,37 (t, $J=7,5$ Hz, CH_2 (2)), 1,64 (quint, $J=7,5$ Hz, CH_2 (3)), 1,28 (m, 18 x CH_2), 0,90 (t, $J=6,6$ Hz, CH_3), sugerindo que se tratava do ácido docosanóico. Pelo espectro de RMN de ^{13}C não foi possível chegar à esta conclusão, pois este apresentou alguns sinais sobrepostos, dificultando a determinação do número exato de átomos de carbono. Os sinais foram observados em δ 179,47 (C=O), 33,97 (CH_2), 31,95 (CH_2), 29,72 (n x CH_2), 29,68 (CH_2), 29,66 (CH_2), 29,61 (CH_2), 29,46 (CH_2), 29,38 (CH_2), 29,26 (CH_2), 29,09 (CH_2), 24,71 (CH_2), 22,71 (CH_2) e 14,12 (CH_3). Considerando a integração dos sinais dos carbonos, o sinal em δ 29,72 poderia corresponder a sinais de 9 a 10 CH_2 , o que resultaria num total de 22 a 23 carbonos.

Os espectros de RMN, portanto, indicaram fortemente que a fração CcE(2)10.2 era constituída de um ácido graxo puro, provavelmente o ácido docosanóico. No entanto, quando esta fração foi analisada por CG (Figura I.36, p. 130) verificou-se que não era constituída somente deste ácido, mas sim, de uma mistura contendo os ácidos palmítico (3,1%), esteárico (5,4%), oléico (0,8%), linoléico (0,5%), icosanóico (6,8%), henicosanóico (5,1%), docosanóico (26,9%), tricosanóico (17,9%) e tetracosanóico (24,0%), todos identificados na forma de seus respectivos ésteres metílicos.

Também pode ser verificado no cromatograma da Figura I.36, que além destes, dois outros ácidos, denominados A e B, com mais de 24 carbonos estão presentes nesta fração, nas proporções de 3,8 e 5,7 %, respectivamente. No entanto, eles não foram identificados, devido à não disponibilidade destes padrões.

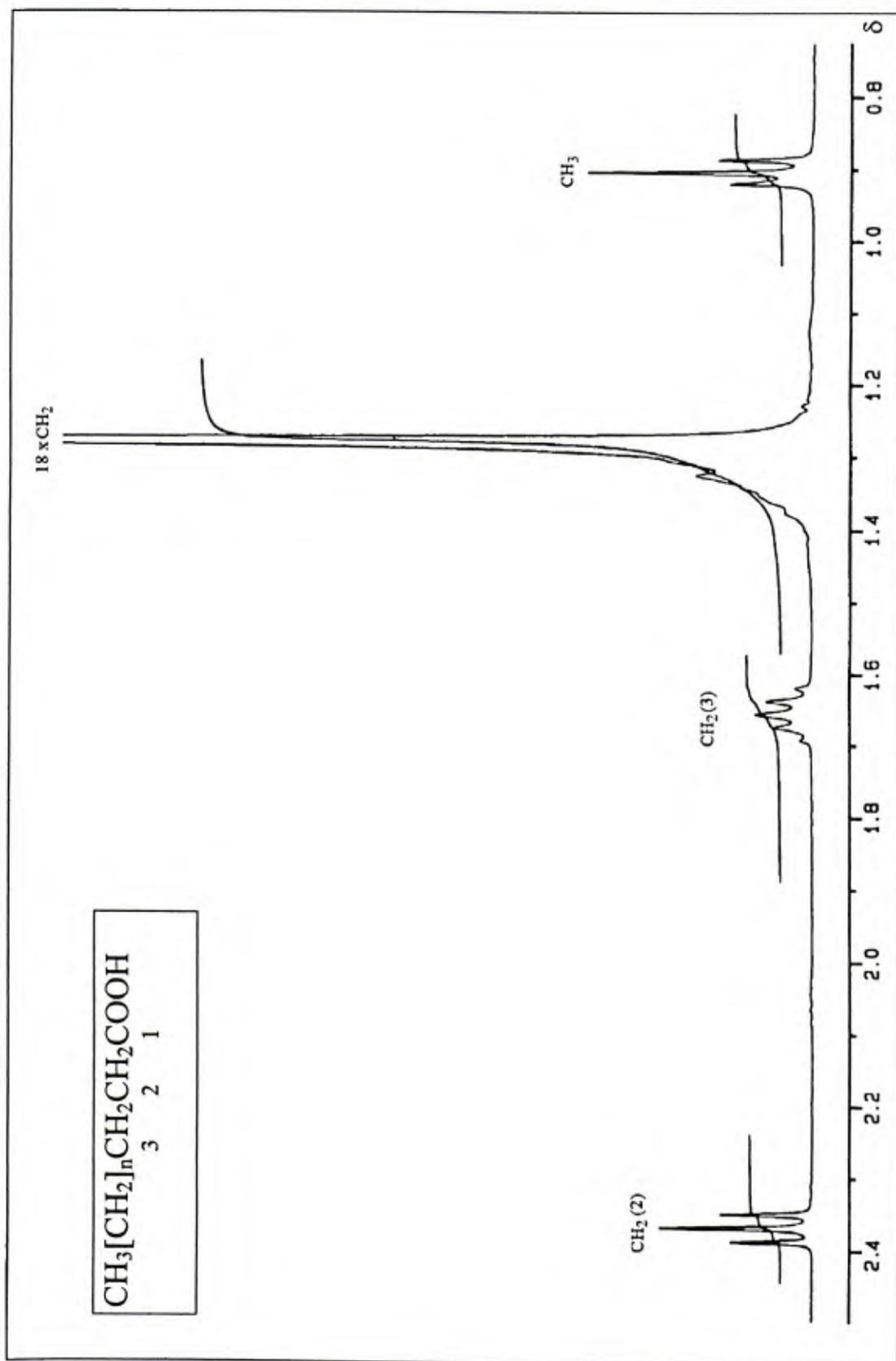


Figura I.35 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da Fração CcE(2)10.2 (Mistura de Ácidos Graxos).

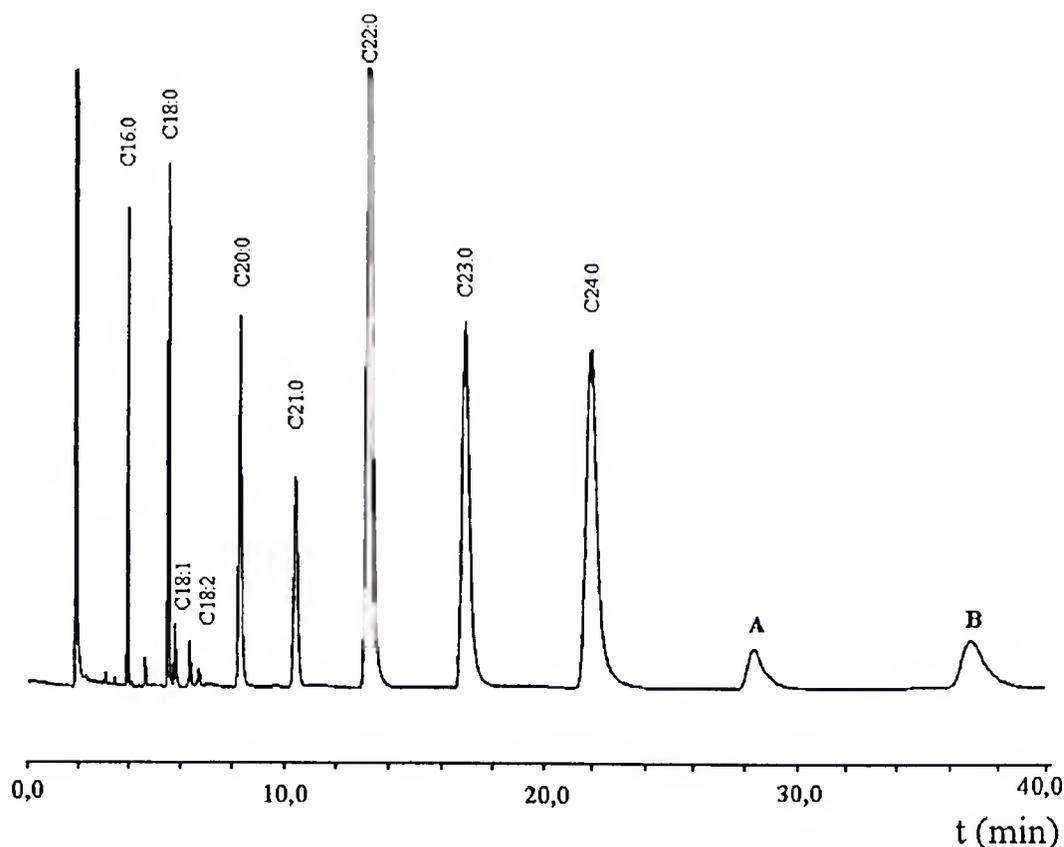
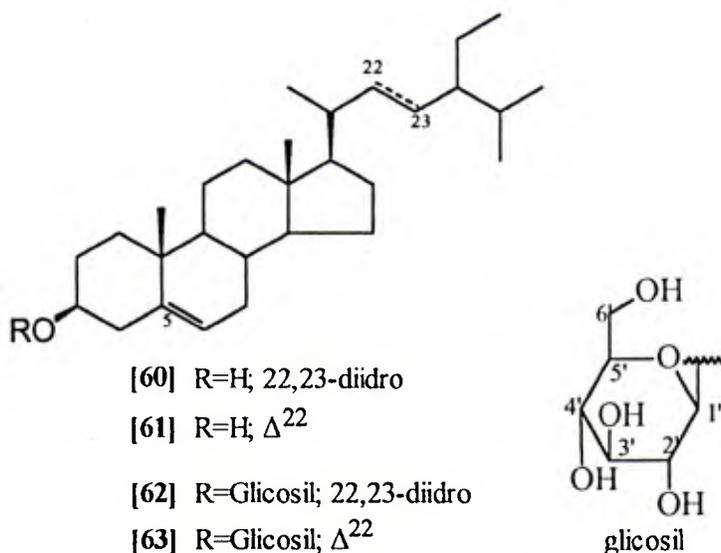


Figura I.36 - Cromatograma dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos Presentes no Extrato Etanólico da Casca de *Ochroma lagopus*.

1.3.2.2.2. OCcE2: Mistura de β -Sitosterol [60] e Estigmasterol [61]

A fração OCcE2 contendo uma mistura β -sitosterol [60] e estigmasterol [61], na proporção de 80:20, foi identificada pela análise de seus espectros no IV, de massas e de RMN de ^1H e ^{13}C , além da comparação com padrão autêntico, por CCD. A T_f (130-132 °C, EtOH) e os dados de RMN de ^1H e ^{13}C revelaram-se muito semelhantes àqueles registrados na literatura (BREITMAIER, 1993; GOULART *et al.*, 1993; PAULA, 1995).

I.3.2.2.3. OCcE3: Mistura de Daucosterol (β -Sitosterol-3-O- β -D-glicosídeo) [62] e Estigmasterol-3-O- β -D-glicosídeo [63]



Verificou-se que OCcE3 era constituída de um sólido branco amorfo de $T_f = 246-248$ °C dec. (THF). O espectro no IV apresentou absorções de ν O-H em 3400 cm^{-1} , ν -C-H em 2960 , 2930 e 2850 cm^{-1} e ν C-O em 1080 e 1030 cm^{-1} , revelando a sua natureza alifática.

O espectro de RMN de ^1H apresentou um padrão de multiplicidades e deslocamentos químicos muito semelhante àquele apresentado por uma mistura de β -sitosterol [60] + estigmasterol [61] isolada previamente do caule de *O. lagopus* (PAULA, 1995). Além dos sinais de [60] e [61], este espectro mostrou também outros nove sinais, na região de δ 2,89-4,90, característicos de açúcares, indicando tratar-se de uma mistura de [62] + [63].

Os sinais em δ 4,87 (d, $J=4,74$ Hz), δ 4,85 (d, $J=4,74$ Hz) e δ 4,84 (d, $J=4,89$ Hz) foram atribuídos a OH-2', OH-3' e OH-4', baseado nas suas multiplicidades e no desaparecimento destes sinais quando o espectro foi obtido na presença de D_2O ; o sinal em δ 4,41 (t, $J=5,80$ Hz) foi atribuído a OH-6'; o sinal em δ 4,22 (d, $J=7,77$ Hz), atribuído a H1' e o sinal em δ 3,64 (ddd, $J_{1'-2'}=1,60$; $J_{1'-1(\text{OH})}=5,80$ e $J_{1'-1}=10,49$

Hz), atribuído a H6'a. Os demais sinais correspondentes ao açúcar apresentaram-se mais complexos e, em alguns casos, sobrepostos, dificultando as suas atribuições e a determinação de suas multiplicidades. O sinal de H6'b aparece em $\delta \approx 3,46$ (m) parcialmente sobreposto pelo sinal de H3 de β -sitosterol (sit.) [60] + estigmasterol (est.) [61], que aparece em $\delta \approx 3,42$. Os sinais de H3', H4' e H5' aparecem como multipletos na região de δ 3,15-2,98 e o sinal de H2' aparece como um multipletto em δ 2,90. Os demais sinais que aparecem neste espectro correspondem aos hidrogênios de β -sitosterol + estigmasterol e aqueles que puderam ser atribuídos foram H6 (δ 5,33, d, $J=4,8$ Hz, sit. + est.), H22 (δ 5,16, dd, $J_{22-21}=8,60$ e $J_{22-23}=15,00$ Hz, est.), H23 (δ 5,03, dd, $J_{23-24}=8,60$ e $J_{23-22}=15,00$ Hz, est.) e H3 (δ 3,40-3,50, m, sit.+ est.).

Uma comparação dos dados de RMN de ^1H do açúcar presente nesta mistura de glicosídeos com valores da literatura (AGRAWAL, 1992; HOBLEY & HOWARTH, 1997) indicou tratar-se da glicose. Para confirmar esta proposta, a mistura foi hidrolisada, sendo o açúcar obtido na fase aquosa reduzido e acetilado para comparação com um padrão, através de análise por CG. Esta análise confirmou ser, de fato, a glicose o açúcar presente nos glicosídeos.

O valor da constante de acoplamento entre H1' e H2' ($J_{1,2}=7,77$ Hz) permitiu concluir que se tratava da β -glicose ($J_{1,2}$ na faixa de 6 a 8 Hz) (AGRAWAL, 1992), pois, no caso da α -glicose esta constante de acoplamento se encontra na faixa de 1-4 Hz.

A previsão dos valores de $J_{1,2}$ para as duas formas da glicose pode ser feita com base na Equação de Karplus-Conroy (BREITMAIER, 1993), que permite calcular a constante de acoplamento entre hidrogênios vicinais, em função do ângulo entre estes.

Equação de Karplus-Conroy:

$${}^3J_{\text{HH}} = a \cos^2 \phi - 0,28 \quad \text{para } \phi > 90^\circ, a = 8,5$$

$$\phi < 90^\circ, a = 9,5$$

Se forem observadas as estruturas das moléculas da α -glicose e da β -glicose, utilizando projeções de Newman, conforme apresentado na Figura I.37, podemos verificar que o ângulo (ϕ) entre H1 e H2 é igual a 180° para β -glicose e $\cong 60^\circ$ para α -glicose. Desta forma é possível obter os valores aproximados de $J_{1,2}$ em ambos os casos.

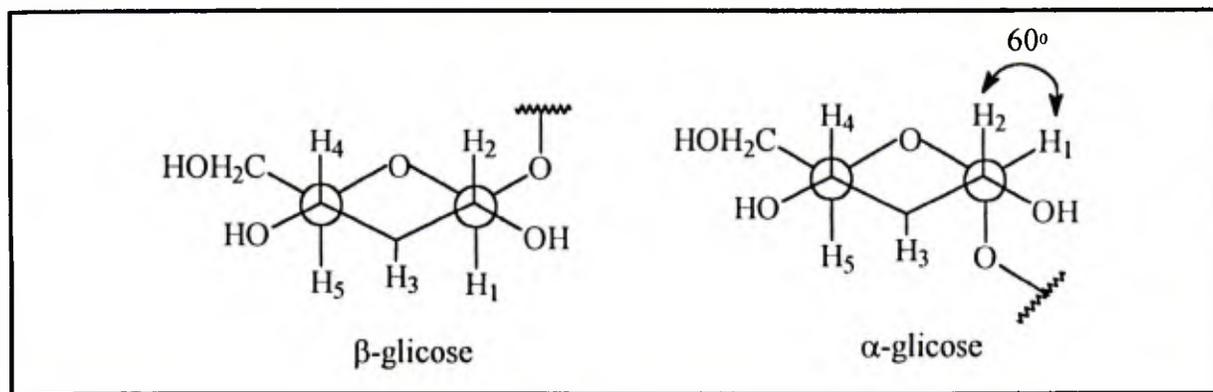


Figura I.37 - Projeções de Newman para os Carbonos 1 e 2 de α e β -Glicose.

O espectro de RMN de ^{13}C confirmou a presença de seis sinais correspondentes à glicose, além daqueles de β -sitosterol + estigmasterol. Os deslocamentos químicos destes sinais apresentaram-se de acordo com valores da literatura (IRIBARREN & POMILIO, 1983), conforme pode ser verificado na Tabela I.4 (p. 134).

A temperatura de fusão ($246\text{-}248^\circ\text{C}$, dec.) apresentou-se ligeiramente inferior ao valor da literatura (BUCKINGHAM, 1994) para daucosterol [62], uma vez que este corresponde a aproximadamente 80 % desta mistura.

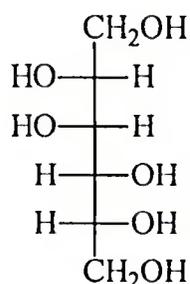
Tabela I.4 - Deslocamentos Químicos (δ) de RMN de ^{13}C Obtidos para OCcE3 e Comparação Destes com Valores da Literatura¹.

C	β -Sitosterol-3-O- β -glicosídeo (literatura) ¹	OCcE3 (sinais do principal constituinte)
	δ (25,2 MHz, Py-d ₅)	δ (100,6 MHz, DMSO-d ₆)
1	37,6	37,71
2	30,4	30,14
3	78,1	77,62
4	40,0	40,11
5	140,8	141,33
6	121,9	122,07
7	32,2	32,30 ^c
8	32,2	32,25 ^c
9	50,4	50,48
10	37,0	37,09
11	21,4	21,47
12	39,4	39,19
13	42,6	42,73
14	56,9	57,05
15	24,6	24,73
16	28,6	28,66
17	56,3	56,31
18	12,1 ^a	12,54 ^a
19	19,5	19,97
20	36,5	36,35
21	19,1 ^b	19,49 ^b
22	34,3	34,23
23	26,5	26,34
24	46,1	46,03
25	29,6	29,59
26	19,3 ^b	19,81 ^b
27	20,1	20,58
28	23,5	23,49
29	12,3 ^a	12,67 ^a
1'	102,6	101,67
2'	75,3	74,34
3'	78,5	77,65
4'	71,7	70,99
5'	78,6	77,81
6'	62,9	61,98

¹Iribarren & Pomilio (1983).

^{a,b,c} Atribuições com letras idênticas na mesma coluna podem estar trocadas.

I.3.2.2.4. OCcE4: Manitol [64]



[64]

O espectro no IV de OCcE4 apresentou absorções intensas de ν O-H em 3400 e 3300 cm^{-1} , indicando que se tratava de um composto poli-hidroxilado, e absorções de ν -C-H em 2900 cm^{-1} e de ν C-O em 1100 e 1050 cm^{-1} . O espectro de RMN de ^1H (Figura I.38, p. 136) apresentou três sinais bem distintos na região de δ 4,1 a 4,4 e outros quatro sinais na região de δ 3,3 a 3,7, cada um correspondente a um hidrogênio.

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou apenas três sinais em δ 71,2; 69,6 e 63,7. O experimento COSY $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ permitiu atribuir os sinais em δ 4,39 (d, $J=5,4$ Hz), 4,32 (t, $J=5,7$ Hz) e 4,12 (d, $J=7,0$ Hz) a três hidroxilas (OH-2, OH-1 e OH-3, respectivamente), uma vez que estes não apresentaram qualquer correlação com os sinais de carbono. Além disso, foi possível também atribuir os sinais de carbono em δ 63,7 a um CH_2 e os sinais em δ 69,6 e 71,2 a dois CH. Estes dados sugeriram que se tratava de um alditol simétrico de seis carbonos. Os dois hidrogênios associados ao carbono de δ 63,7 foram atribuídos a H1 e H1', cujas ressonâncias são observadas em δ 3,61 (ddd, $J_1=3,4$; $J_2=5,7$ e $J_3=10,7$ Hz) e δ 3,37 (m), respectivamente. Os sinais dos outros dois hidrogênios, H2 e H3, aparecem em δ 3,45 (m) e δ 3,54 (ddd), respectivamente.

No entanto, somente pelos espectros no IV, de RMN de ^1H e de ^{13}C não foi possível afirmar a estereoquímica correta do alditol e, portanto, identificá-lo. Por comparação das T_f deste alditol (165-166 $^\circ\text{C}$, MeOH/ H_2O) e de seu hexaacetato (121-122 $^\circ\text{C}$, EtOAc) com valores da literatura (BECK & HOPF, 1990) para os

alditóis mais comumente encontrados em plantas ficou evidente que se tratava do manitol [64]. A estrutura do manitol ainda foi confirmada por CG, por meio do derivado hexaacetato, por comparação com uma amostra padrão.

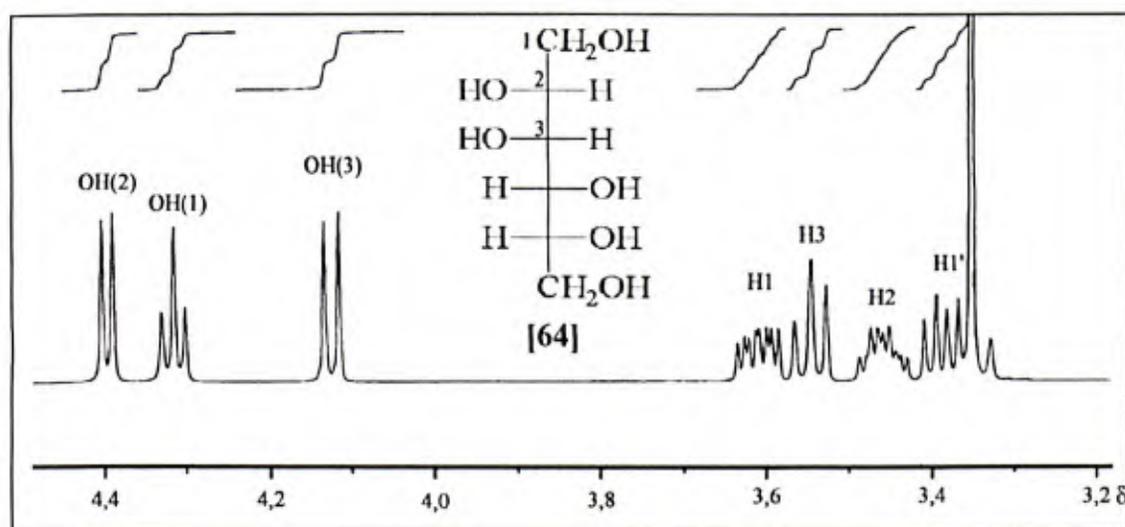


Figura I.38 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do manitol [64].

I.3.3. Ensaio Biológicos

Nenhum dos extratos e frações discutidos neste capítulo, ao serem submetidos aos ensaios biológicos, seja em placa de Petri ou por aplicação tópica, apresentou qualquer atividade inseticida para as espécies testadas.

I.4. CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu isolar e identificar substâncias inéditas do caule de *Ochroma lagopus*, empregando a técnica de separação cromatográfica líquida de alta eficiência reciclante.

Dos onze compostos obtidos após separação em CLAE reciclante e identificados nas frações OCE1-OCE12, apenas o composto [49], denominado boehmenan, havia, previamente, sido isolado do caule de *O. lagopus* (PAULA, 1995). Os outros dez compostos, todos caracterizados como lignanas muito similares à boehmenan [49], são inéditos em plantas da família Bombacaceae e apenas o composto [59], denominado diferulato de secoisolariciresinila, já havia sido descrito na literatura (NOMURA *et al.*, 1981; KARIMONE *et al.*, 1991; WATANABE *et al.*, 1992) como um constituinte de plantas.

Das nove lignanas inéditas, isoladas do caule de *O. lagopus*, seis delas [53], [54], [55], [56], [57] e [58] diferenciam-se da boehmenan [49], principalmente, em relação à ausência do anel diidrofurano presente nesta última. As seis lignanas apresentaram-se muito semelhantes e, portanto, foram chamadas de carolignana A, B, C, D, E e F, respectivamente. As três lignanas restantes [50], [51] e [52] possuem o mesmo esqueleto básico da boehmenan [49], com pequenas variações estruturais e, portanto, foram chamadas de boehmenan B, C e D, respectivamente.

A presença de lignanas ainda não tinha sido verificada em nenhuma outra planta da família Bombacaceae e pelos resultados deste trabalho, no entanto, esta parece ser a principal classe de substâncias que ocorre em *O. lagopus*.

Os compostos isolados da casca de *O. lagopus* são comumente encontrados em plantas e, portanto, não possuem grande significado quimiotaxonômico. No entanto, é interessante ressaltar que nenhuma cumarina e/ou lignana presente no caule desta planta, foi encontrada na casca. Nenhum dos principais constituintes (alcalóides, flavonóides, ácidos graxos com anel ciclopropeno e derivados do naftaleno) isolados de várias outras espécies desta família (PAULA *et al.*, 1997) foi também encontrado em *O. lagopus*.

Pode-se ainda concluir que a atividade inseticida verificada para *O. lagopus* parece não ter nenhuma relação com os constituintes da casca e do caule, principalmente lignanas, pois estes não se apresentaram ativos para as várias espécies de insetos, de diferentes Ordens, submetidos aos testes.

I.5. BIBLIOGRAFIA

- AGRAWAL, P.K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**, **31**(10): 3307-3330, 1992.
- BAKER, C.A. & BRINK, R.C.B. van der. **Flora of Java**. Netherlands, Wolters, 1968, 3v. p.647.
- BALDRY, J.; DOUGAN, J.; HOWARD, G.E. Volatile flavouring constituents of durian. **Phytochemistry**, **11**: 2081-2084, 1972.
- BECK, E. & HOPF, H. Branched-chain sugars and sugars alcohols. **Methods Plant Biochem.**, **2**: 235-238, 1990.
- BELL, A.A.; STIPANOVIC, R.D.; O'BRIEN, D.H.; FRYXELL, P.A. Sesquiterpenoid aldehyde quinones and derivatives in pigment glands of *Gossypium*. **Phytochemistry**, **17**: 1297-1305, 1978.
- BENNER, J.P. Pesticidal compounds from higher plants. **Pestic. Sci.**, **39**(2): 95-102, 1993.
- BIANCHINI, J-P.; RALAIMANARIVO, A.; GAYDOU, E.M.; WAEGELL, B. Hydrocarbons, sterols and tocopherols in the seeds of six *Adansonia* species. **Phytochemistry**, **21**(8): 1981-1987, 1982.
- BREITMAIER, E. **Structure elucidation by NMR in organic chemistry**. John Wiley & Sons, Chichester, 1993. 265 p.
- BUCKINGHAM, J. **Dictionary of natural products**. 1.ed. v.5. London: Chapman & Hall, 1994. p.5258.

- CASEY, M.; LEONARD, J.; LYGO, B.; PROCTER, G. **Advanced practical organic chemistry**. New York, Chapman & Hall, 1990, 264p.
- CHAUHAN, J.S.; CHATURVEDI, R.; KUMAR, S. A new flavonol glycoside from the stem of *Adansonia digitata*. **Ind. J. Chem.**, **21B**: 254-255, 1982.
- CHAUHAN, J.S.; KUMAR, S.; CHATURVEDI, R. A new flavanone glycoside from *Adansonia digitata* roots. **Planta Medica**, **50**(1): 113, 1984.
- CHAUHAN, J.S.; SULTAM, M.; SRIVASTAVA, S.K. Constituents from *Salmalia malabaricum*. **Can. J. Chem.**, **58**: 328-330, 1980.
- CHRISTIE, W.W. **Lipid analysis**, 2nd. Ed., Pergamon Press, Oxford, 1987. p. 53
- CORREA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 1984; V.2, p 545.
- COUSSIO, J.D. Isolation of rhoifolin from *Chorisia* species (Bombacaceae). **Experientia**, **20**: 562, 1964.
- ENGLYST, H. N. & CUMMINGS, J. H. Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. **Analyst**, **109**: 937-942, 1984.
- GIBBS, R.D. **Chemotaxonomy of flowering plants**. Montreal, McGill-Queens University Press, 1974, 4v.
- GONZALEZ-COLOMA, A.; REINA, M.; CABRERA, R.; SOCORRO-MONZON, A.R.; FRAGA, B.M. *Persea indica* as a natural source of the insecticide ryanodol. **Phytochemistry**, **34**(2): 397-400, 1993.
- GOULART, M.O.F., SANTANA, A.E.G., LIMA, R.A., CAVALCANTE, S.H., CARVALHO, M.G., BRAZ-FILHO, R. Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrofolonas A e B. **Química Nova**, **16**(2): 95-100, 1993.
- GREENHOUSE, S. The culture of the balsa tree in Equador. **J. For.**, **33**: 870-876, 1935.
- HOBLEY, P. & HOWARTH, O. W. Ring ^1H and ^{13}C NMR shifts in aldopyranose and aldofuranose monosaccharides: conformational analysis and solvent dependence. **Magnetic Resonance in Chemistry**, **34**(10): 755, 1996.

- HUECK, K. **As florestas da América do Sul**. Tradução: Hans Reichardt. Editora Polígono, São Paulo, 1972. p. 131.
- IRIBARREN, A.M. & POMILIO, A.B. Components of *Bauhinia candicans*. **J. Nat. Prod.**, **46(5)**: 752-753, 1983.
- IRIBARREN, A. M., POMILIO, A. B. Sitosterol 3-O- α -D-xyluronofuranoside from *Bauhinia candicans*. **Phytochemistry**, **26(3)**: 857-858, 1987.
- JHAM, G.N.; TELES, F.F.F.; CAMPOS, L.G. Use of aqueous HCl/MeOH as esterification reagent for analysis of fatty acids derived from soybean lipids. **J. Amer. Org. Chem. Soc.**, **59(3)**: 132-133, 1982.
- JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 10. ed. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 1991. 777 p.
- KARIMONE, H.; MIMAKI, Y.; SASHIDA, Y. A butanolide and phenolics from *Machilus thunbergii*. **Phytochemistry**, **30(1)**: 315-319, 1991.
- KROLL, A.B. & RIOS, J. Las Bombacaceas arboreas del Dantas. **Rev. Flor. del Peru**, **19 (1)**: 35-68, 1992.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras - manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**; Editora Plantarum; Nova Odessa, 1992; p 59.
- MUKHERJEE, J. & ROY, B. Chemical examination of *Salmalia malabarica* Schott & Endl. syn. *Bombax malabaricum* Dc. **J. Ind. Chem. Soc.**, **48(8)**: 769-770, 1971.
- NIRANJAN, G.S. & GUPTA, P.C. Anthocyanins from the flowers of *Bombax malabaricum*. **Planta Medica**, **24**: 196-199, 1973.
- NOGUEIRA-NETO, P. **A criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo, Editora Tecnapis, 1970, 365 p.
- NOMURA, M. & TOKOROYAMA, T. Further phenolic components from *Alnus japonica* Steud. **J. C. S. Chem. Comm.**, 316-317, 1975.
- NOMURA, M.; TOKOROYAMA, T.; KUDOTA, T. Biarylheptanoids and others constituents from wood of *Alnus japonica*. **Phytochemistry**, **20**: 1097-1104, 1981.
- PAULA, V.F. "Estudo Químico e da Interação Inseto-Planta em *Ochroma lagopus*" Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 1995.

- PAULA, V.F.; BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; HOWARTH, O.W.; VELOSO, D.P. Constituintes químicos de *Ochroma lagopus* Swartz. **Química Nova**, **19**(3): 225-229, 1996.
- PAULA, V.F.; BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A. J.; CAMPOS, L.A.O.; PINHEIRO, A. L. Entomotoxicity of the Nectar from *Ochroma lagopus* Swartz (Bombacaceae). **Ciência e Cultura**, **49**(4): 274-277, 1997.
- PAULA, V. F., BARBOSA, L. C. A., DEMUNER, A. J., PILO-VELOSO, D. A química da família Bombacaceae. **Química Nova**, **20**(6): 627-630, 1997.
- PEREZ-ARBELAEZ, E. **Plantas utiles de Colômbia**. 3.ed. Bogotá, Camacho Roldan, 1956, 831 p.
- PILO-VELOSO, D.; NASCIMENTO, E.A.; MORAIS, S.A.L. Isolamento e análise estrutural de ligninas. **Química Nova**, **16**(5): 435-448, 1993.
- RAFFAUF, R.F.; ZENNIE, T.M.; ONAN, K.D.; Le QUESNE, P.W. Funebrine, a structurally novel pyrrole alkaloid, and other γ -hidroxyisoleucine-related metabolites of *Quararibea funebris* (Llave) Vischer (Bombacaceae). **J. Org. Chem.**, **49**: 2714-2718, 1984.
- RAMADAN, A.; HARRAZ, F.M.; EL-MOUGY, S.A. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic, effects of the fruit pulp of *Adansonia digitata*. **Fitoterapia**, **65**(5): 418-422, 1994.
- RAMESH, D.; DENNIS, T.J.; SHINGARE, M.S. Constituents of *Adansonia digitata* root bark. **Fitoterapia**, **63**(3): 278-279, 1992.
- RAO, K.V.; SRERAMULU, K.; GUNASEKAR, D. Two new sesquiterpene lactones from *Ceiba pentandra*. **J. Nat. Prod.**, **56**(12): 2041-2045, 1993.
- RIZK, A.M.; AL-NOWAIHI, A.S. **The phytochemistry of the horticultural plants of Qatar**. Oxford, Alden Press, 1989, p. 29-31.
- SANKARAM, A.V.B.; REDDY, N.S.; SHOOLERY, J.N. New sesquiterpenoids of *Bombax malabaricum*. **Phytochemistry**, **20**(8): 1877-1881, 1981.
- SCHERY, R.W. **Plantas utiles al hombre**. Madrid, Salvat Editores, 1956, 756 p.
- SCOGIN, R. Reproductive phytochemistry of Bombacaceae: floral anthocyanins and nectar constituents. **Aliso**, **11**(3): 377-385, 1986.
- SESHADRI, V.; BATTA, A.K.; RANGASWAMI, S. Phenolic components of *Bombax malabaricum* (root-bark). **Curr. Sci.**, (23): 630-631, 1971.

- SESHADRI, V.; BATTI, A.K.; RANGASWAMI, S. Phenolic components of *Bombax malabaricum*. **Ind. J. Chem.**, **11**:825, 1973.
- SOOD, R.P.; SURI, K.A.; SURI, O.P.; DHAR, K.L.; ATAL, C.K. Sesquiterpene lactone from *Salmalia malabarica*. **Phytochemistry**, **21**(8): 2125-2126, 1982.
- TAKEMOTO, T.; MIYASE, T.; KUSANO, G. Boehmenan, a new lignan from the roots of *Boehmeria tricuspidis*. **Phytochemistry**, **14**: 1890-1891, 1975.
- WATANABE, N.; SASAYA, T.; OZAWA, S. **Mokusai Gakkaishi**, **38**: 796, 1992. (Abstract do Chemical Abstract: CA **118**: 171239u).
- WONG, K.C. & TIE, D.Y. Volatile constituents of durian (*Durio zibethinus* Murr.). **Flavour Fragrance Journal**, **10**(2): 79-83, 1995.
- ZENNIE, T.M. & CASSADY, J.M. Funebradiol, a new pyrrole lactone alkaloid from *Quararibea funebris* flowers. **J. Nat. Prod.**, **53**(6): 1611-1614, 1990.
- ZENNIE, T.M. & CASSADY, J.M. Funebral, a new pyrrole lactone alkaloid from *Quararibea funebris*. **J. Nat. Prod.**, **49**(4): 695-698, 1986.
- YOSHIDA, H.A. & TOSCANO, N.C. Comparative effects of selected natural insecticides on *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae. **J. Econ. Entomol.**, **87**(2):305-310, 1994.

CAPÍTULO II

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE AMIDAS DERIVADAS DA PIPERINA

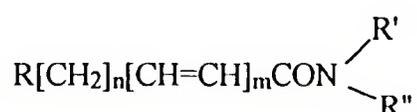
II.1. INTRODUÇÃO

Propriedades inseticidas de extratos de frutos da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L., Piperaceae) são conhecidas desde 1924 (SCOTT & McKIBBEN, 1978). Estes extratos mostraram-se tóxicos para moscas domésticas *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae), para o mosquito *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae) e para o gorgulho do feijão de corda (“adzuki”) *Callosobruchus chinensis* L. (Coleoptera: Bruchidae) (MIYAKADO *et al.*, 1989). Estes extratos também são altamente tóxicos para o bicudo do algodão *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), carunchos do arroz *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae) e do feijão *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae), além de serem repelentes para adultos da lagarta da espiga do milho *Heliothis zea* Boddie (Lepidoptera: Heliothinae) (SU, 1977; SCOTT & McKIBBEN, 1978). São também tóxicos ao gorgulho do feijão caupi *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) (SU & HORVAT, 1981) e a *Zabrotes subfasciatus* Boheman (Coleoptera: Bruchidae), outra espécie de caruncho do feijão (FLORES *et al.*, 1993).

Os constituintes químicos desse extrato têm sido frequentemente estudados, dentre os quais, as amidas lipofílicas insaturadas. Estas, além de constituírem o principal grupo de metabólitos da planta (AHN *et al.*, 1992; PARMAR *et al.*, 1997), são as principais responsáveis pelas atividades inseticidas.

A piperina [65], primeira amida a ser isolada de espécies de *Piper* (PARMAR *et al.*, 1997), é o principal constituinte de *Piper nigrum*, sendo responsável pela pungência dos frutos (KIUCHI *et al.*, 1988).

Aproximadamente 145 amidas já foram isoladas de plantas da família Piperaceae (PARMAR *et al.*, 1997). Estas amidas possuem estruturas do tipo representado a seguir:



R pode ser metil ou fenil substituído por grupos hidroxil, metoxil ou metilendioxil, estendido geralmente por dois grupos CH=CH (*E* ou *Z*) e/ou grupos C≡C, algumas vezes com intervenção de grupos metileno. No entanto, considerando a fórmula geral, n pode variar de 0 a 14 e m de 0 a 3. A geometria *E* da ligação dupla é mais frequente do que a *Z*. Os grupos R' e R'' mais frequentes são H e isobutil ou, ainda, heterociclos nitrogenados de cinco e seis membros (pirrolidina e piperidina, respectivamente).

Atividade inseticida foi registrada para 28 dessas amidas, a maioria isobutilamidas, mas algumas derivadas das piperidilamidas, tal como a piperina [65], contendo sistemas 2-eno ou 2,4-dieno, podendo apresentar, ou não, insaturações adicionais (ELLIOTT *et al.*, 1987a).

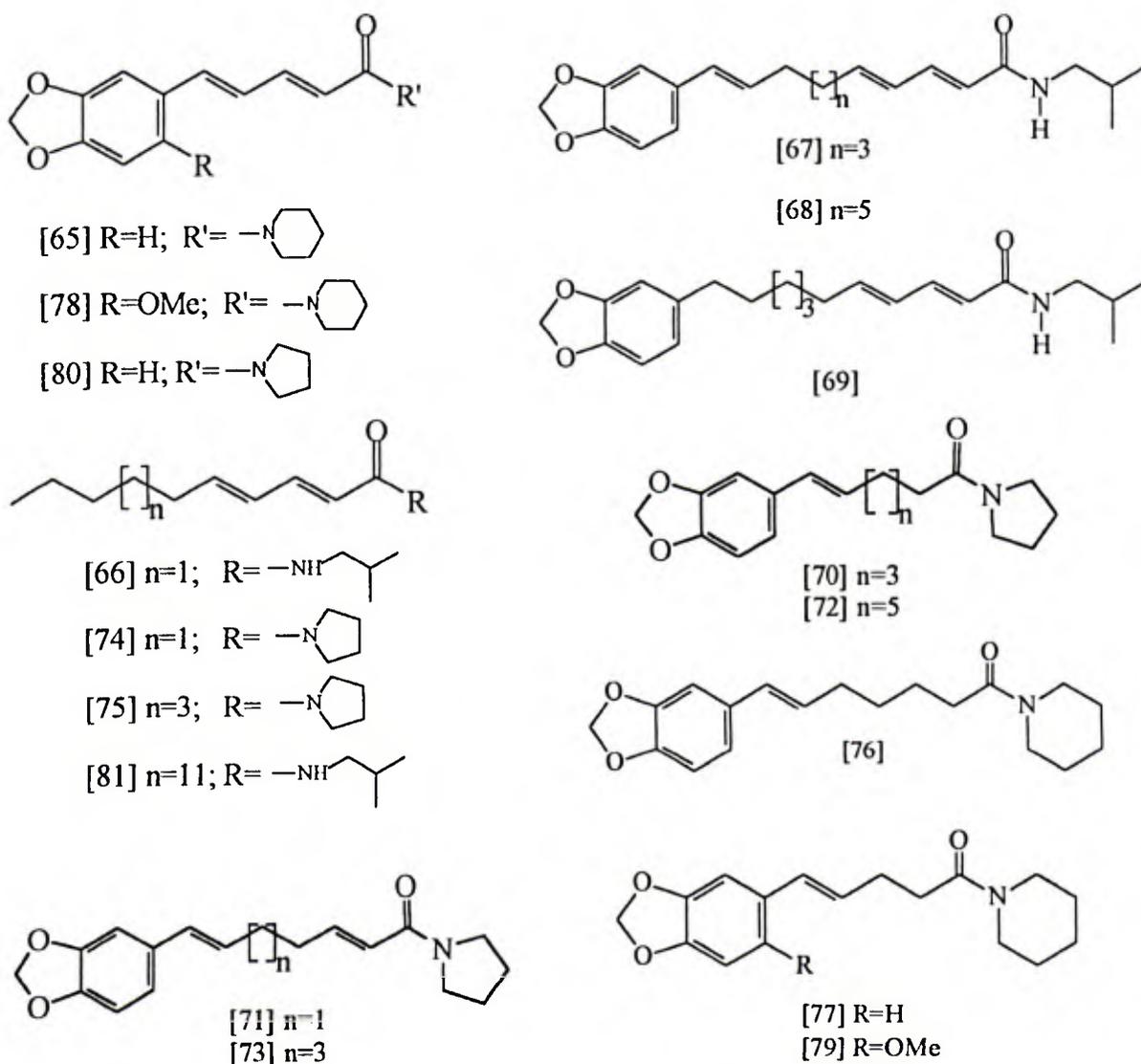
A atividade inseticida da piperina [65] já é conhecida há várias décadas, mostrando-se mais tóxica do que o piretro para moscas domésticas (SYNERHOLM *et al.*, 1945; MIYAKADO *et al.*, 1989).

Outras amidas isoladas de *P. nigrum* com atividade inseticida são conhecidas, entre elas a (2*E*,4*E*)-*N*-isobutildeca-2,4-dienamida (=pelitorina) [66], a (2*E*,4*E*,10*E*)-11-(3,4-metilenodioxifenil)-*N*-isobutilundeca-2,4,10-trienamida (=piperida) [67] e a (2*E*,4*E*,12*E*)-13-(3,4-metilenodioxifenil)-*N*-isobutiltrideca-2,4,12-trienamida (=guineensina) [68], que apresentaram toxicidade a adultos de *C. maculatus* (SU & HORVAT, 1981).

Piperida [67], guineensina [68] e diidropiperida [69] apresentaram toxicidade a machos adultos de *C. chinensis* (PARMAR *et al.*, 1997). Segundo

MIYAKADO *et al.* (1985), para este inseto a atividade é mais elevada quando os compostos são N-isobutildienamidas com onze a treze átomos de carbono entre os grupos amida e anel aromático.

KIUCHI *et al.* (1988) isolaram outras sete amidas de *P. nigrum* que apresentaram atividade larvicida para larvas de segundo instar de *Toxocara canis* (Ascaridida: Toxocaridae). São elas 1-[(*E*)-7-(3,4-metilenodioxifenil)hept-6-enoil]pirrolidina [70], 1-[(2*E*,6*E*)-7-(3,4-metilenodioxifenil)hept-2,6-dienoil]pirrolidina [71], 1-[(*E*)-9-(3,4-metilenodioxifenil)non-8-enoil]pirrolidina [72], 1-[(2*E*,8*E*)-9-(3,4-metilenodioxifenil)nona-2,8-dienoil]pirrolidina [73], 1-[(2*E*,4*E*)deca-2,4-dienoil]pirrolidina [74], 1-[(2*E*,4*E*)dodeca-2,4-dienoil]pirrolidina [75] e 1-[(*E*)-9-(3,4-metilenodioxifenil)non-8-enoil]piperidina ou piperoleína-B [76].



Seis amidas isoladas de *P. guineense* apresentaram atividade anti-alimentar para larvas de quinto ínstar de *Chilo partellus* Swinhoe (Lepidoptera: Pyralidae). Piperina [65] e α,β -diidropiperina [77] foram as mais ativas, wisanina [78], α,β -diidrowisanina [79] e tricostaquina (=piperilina) [80] apresentaram atividades intermediárias e (2*E*,4*E*)-N-isobutilicosa-2,4-dienamida [81] foi a menos ativa. Neste caso, a presença de um grupo metilenodioxifenil e um grupo amida alicíclico parecem fundamentais para a alta atividade anti-alimentar (PARMAR *et al.*, 1997).

Na tentativa de esclarecer os requerimentos estruturais para a atividade inseticida destas amidas, vários trabalhos de sínteses foram desenvolvidos (SYNERHOLM *et al.*, 1945; ELLIOTT *et al.*, 1986; ELLIOTT *et al.*, 1987a-d; BLADE, 1990; MIYAKADO *et al.*, 1989), alguns deles utilizando as próprias amidas naturais como material de partida. Entretanto, apesar do desenvolvimento das várias amidas sintéticas, poucas delas foram testadas para verificar suas atividades inseticida e, conseqüentemente, muito pouco se sabe sobre a relação entre suas estruturas e as respectivas atividades biológicas (GBEWONYO *et al.*, 1993).

Baseado neste fato, este trabalho tem como objetivo a síntese e avaliação da atividade inseticida de uma série de amidas [82a-p] derivadas da piperina [65], uma vez que esta, por ser o principal constituinte dos frutos da pimenta-do-reino, pode ser facilmente obtida. Além disso, a piperina [65] pode ser facilmente convertida no ácido pipérico [83] e, a partir deste, várias amidas poderão ser sintetizadas.

Devido às propriedades inseticidas da piperina [65] ela será utilizada como padrão de comparação dos resultados obtidos nos ensaios biológicos, tanto para as amidas sintéticas [82a-p] quanto para a piperilina [80], outra amida natural isolada da pimenta-do-reino.

II.2. PARTE EXPERIMENTAL

II.2.1. Materiais e Métodos

- 1- Para todas as separações cromatográficas em coluna, foi utilizada sílica gel 60 (de 70 a 230 Mesh-ASTM, Merck).
- 2- Para todas análises cromatográficas em camada delgada (CCD), utilizaram-se placas de sílica gel 60 F₂₅₄, da Merck, de 0,25 mm de espessura.
- 3- Como reveladores foram utilizados radiação ultravioleta ($\lambda=254$ e 365 nm) e solução de ácido fosfomolibdico (12 g de 2H₃PO₄.20MoO₃.48H₂O / 250 mL de EtOH ; CASEY *et al.*, 1990).
- 4- Todas as frações foram concentradas à pressão reduzida, em evaporador rotatório.
- 5- Os solventes utilizados foram das marcas Merck, Vetec, Grupo Química e Reagen e os reagentes, da Sigma e Aldrich. O THF utilizado na síntese das amidas foi devidamente secado de acordo com o procedimento descrito por PERRIM & ARMAREGO (1988).

- 6- As temperaturas de fusão, não corrigidas, foram determinadas em um aparelho MQAPF-301.
- 7- Os espectros no IV foram obtidos em pastilhas de KBr, em um espectrômetro Mattson Instruments FTIR, no Departamento de Química - ICEX - UFMG e em um espectrômetro FTIR PARAGON 1000 - Perkin Elmer, no Departamento de Química - UFV.
- 8- Os espectros de RMN de ^1H a 200 MHz e de ^{13}C a 50 MHz foram obtidos em um aparelho Bruker DPX 200 no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução (LAREMAR) do Departamento de Química - ICEX - UFMG.
- 9- Os espectros de massas de alta resolução por ionização química (NH_3 como gás ionizante) foram registrados em espectrômetro V. G. ANALYTICAL ZAB-IF, no Departamento de Química da Universidade de Reading, Inglaterra e por impacto eletrônico em espectrômetro VG AutoSpecFisons Instruments, no Instituto de Química da UNICAMP. Os demais espectros foram obtidos por CG/EM - QP5000 da Shimadzu, por impacto eletrônico, no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN), Departamento de Química - UFV.

Condições cromatográficas para as análises por CG/EM: A coluna utilizada foi uma DB1 (metilsilicone) de 30 m x 0,25 mm (di) e o gás de arraste foi He. A pressão utilizada foi de 150 kPa e as temperaturas foram: do injetor, 250 °C; do detector (interface), 280 °C e da coluna, inicialmente 200 °C e, então, programada na razão de 5 °C/min até atingir a temperatura máxima de 290 °C, permanecendo isotérmica durante 20 min. A razão de “split” foi 1/50.

- 10- As análises elementares foram realizadas em um aparelho Elemental Analyzer 2400 CHN, Perkin-Elmer, no Instituto de Química da USP, São Paulo.

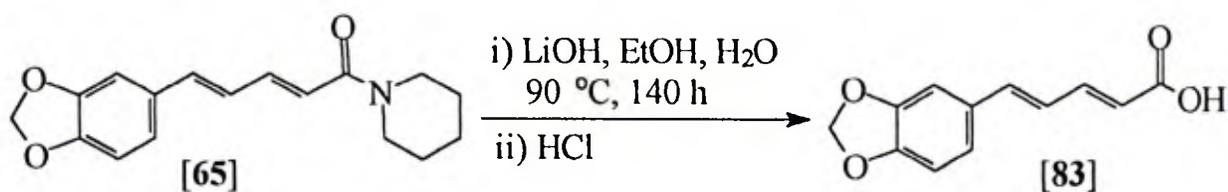
II.2.2. Síntese das Amidas Derivadas da Piperina [65]

II.2.2.1. Obtenção da Piperina [65]

A piperina [65] foi obtida de frutos da pimenta-do-reino por extração com etanol 95 % (IKAN, 1991), em aparelho tipo Soxhlet, e purificada por fracionamento do extrato em coluna de sílica gel, utilizando-se como eluente uma mistura de éter dietílico:hexano (2:1). Desta mesma forma também foi isolada a piperilina [80], uma amida análoga à piperina.

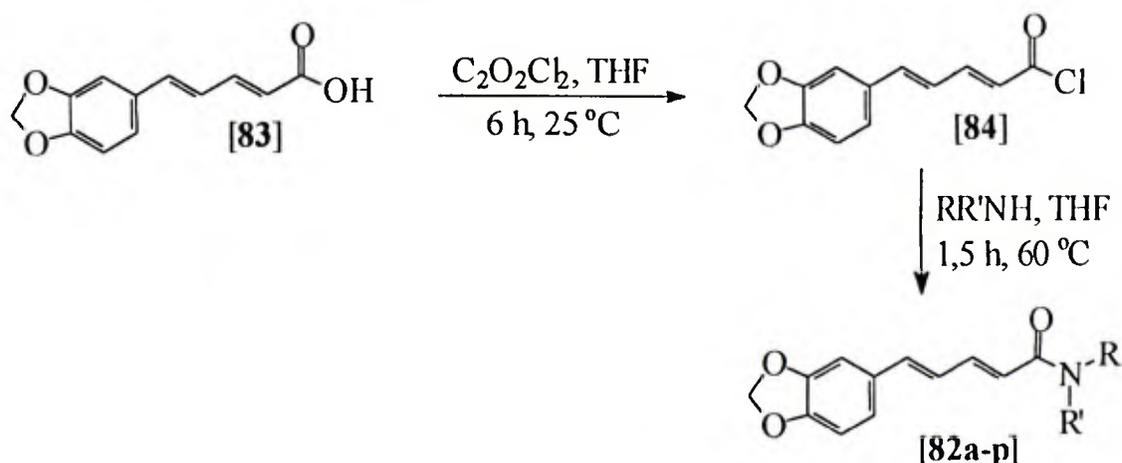
II.2.2.2. Obtenção do Ácido Pipérico [83]

Para obtenção do ácido pipérico [83], foram refluxados por 140 h, 6 g de piperina [65] em uma solução contendo 500 mL de EtOH 95 %, 9 g de LiOH.H₂O e 100 mL de H₂O. Após a hidrólise a solução foi acidificada até pH 2,0, por adição de cerca de 35 mL de HCl conc., e filtrada. O precipitado obtido foi recristalizado em THF levando à obtenção do ácido pipérico [83] em 85 % de rendimento.



II.2.2.3. Síntese das Amidas [82a-p]

As amidas [82a-p] foram obtidas a partir do ácido pipérico [83] (SLOOP, 1995) proveniente da hidrólise da piperina [65] conforme o Esquema II.1.



Esquema II.1 - Rota Sintética das Amidas [82a-p] a Partir do Ácido Pipérico [83].

Etapa 1 - Obtenção do cloreto de ácido [84]: em um balão de fundo redondo (50 mL) dissolveu-se o ácido pipérico (500 mg, 2,29 mmol) em THF seco (10 mL) e, em seguida, foi adicionado o cloreto de oxalila (1 mL, 11,5 mmol). Ao balão foi adaptado um tubo contendo $CaCl_2$ e a solução foi mantida sob agitação durante 6 h, à temperatura ambiente. Após este tempo, o solvente e o excesso de cloreto de oxalila foram completamente removidos sob pressão reduzida em evaporador rotatório, levando à obtenção de um resíduo alaranjado.

Etapa 2 - Obtenção das amidas [82a-p]: o resíduo alaranjado obtido na etapa 1 foi dissolvido em THF seco (4 mL) e, a esta solução, foram adicionados cerca de 5 mmol (aproximadamente dois equivalentes) de cada amina ou, como no caso daquelas mais caras, foi utilizado um equivalente da amina, na presença de trietilamina para reagir com o HCl formado. A mistura reacional foi mantida sob agitação, a 60 °C, durante 1,5 a 2,0 h. Em seguida, o solvente e o excesso da amina (as mais voláteis) foram eliminados em evaporador rotatório. O resíduo obtido foi fracionado em coluna de sílica gel para obtenção das amidas puras. Um total de 16 amidas foram sintetizadas e estas são apresentadas na Tabela II.1 (p. 153), que apresenta também o sistema de eluentes utilizado na purificação de cada uma delas. Os rendimentos estão relacionados na Tabela II.3 (p. 179).

Tabela II.1 - Amidas [82a-p] Sintetizadas a Partir do Ácido Pipérico [83]

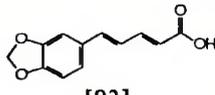
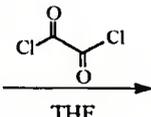
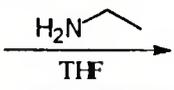
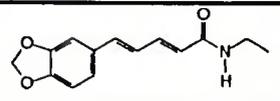
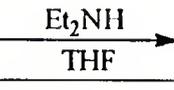
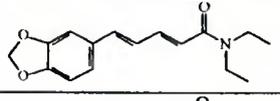
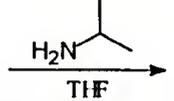
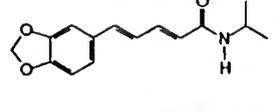
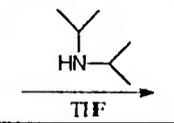
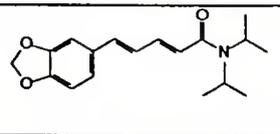
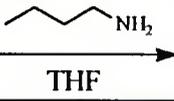
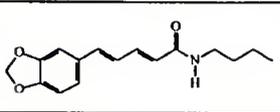
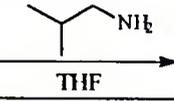
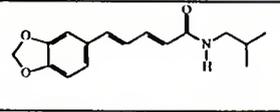
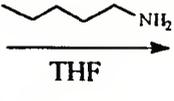
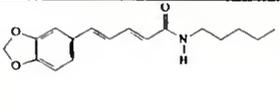
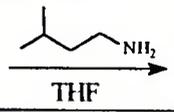
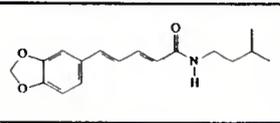
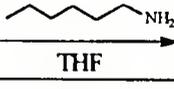
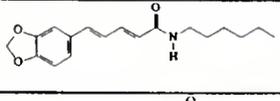
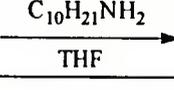
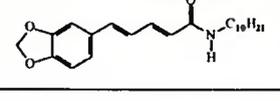
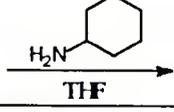
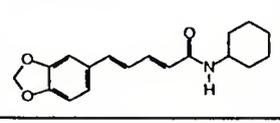
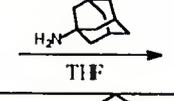
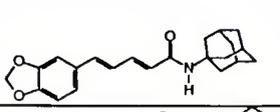
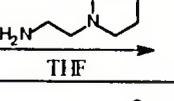
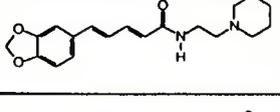
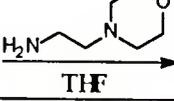
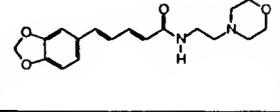
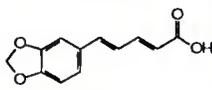
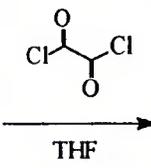
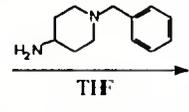
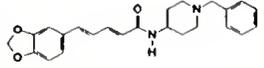
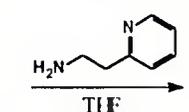
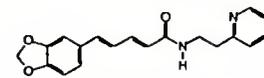
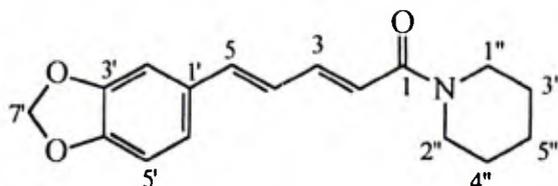
Material de Partida	1ª Etapa	2ª Etapa	Produto Principal	Cód. [82]	Eluente p/ fracionamento
 <p>[83] Ácido Pipérico (500 mg)</p>				a	EE:Hex (2:1)
				b	Hex:AE (2:1)
				c	EE:Hex (2:1)
				d	EE:Hex (2:1)
				e	EE:Hex (2:1)
				f	EE:Hex (2:1)
				g	EE:Hex (2:1)
				h	EE:Hex (2:1)
				i	EE:Hex (2:1)
				j	EE:Hex (2:1)
				k	EE:Hex (2:1)
				l	EE:Hex (2:1)
				m	AE:EtOH (9:1)
		n	AE:EtOH (9:1)		

Tabela II.1, Continuação ...

Material de Partida	1ª Etapa	2ª Etapa	Produto Principal	Cód. [82]	Eluente p/ fracionamento
 [83] Ácido Pipérico (500 mg)				o	AE:EtOH (9:1)
				p	AE:EtOH (7:1)

II.2.2.4. Dados Físicos e Espectroscópicos das Amidas Naturais, Piperina [65] e Piperilina [80], e das Amidas Sintéticas [82a-p]

II.2.2.4.1. Piperina [65]



$T_f = 128-130\text{ }^\circ\text{C}$ (132-133 $^\circ\text{C}$, lit.¹)

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3007, 2941, 2861, 1634, 1612, 1584, 1492, 1449, 1253, 1032 e 998.

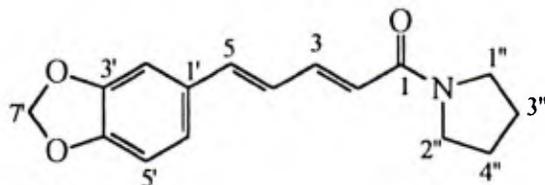
RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 7,40 (ddd, $J_{3-2}=15,0$, $J_{3-4}=7,0$ e $J_{3-5}=3,5$, H3), 6,98 (d, $J_{2-6'}=1,6$, H2'), 6,89 (dd, $J_{6'-5'}=8,0$ e $J_{6'-2'}=1,6$, H6'), 6,82-6,57 (m, H5, H5', H4), 6,44 (d, $J_{2-3}=15,0$, H2), 5,97 (s, H7'), 3,62 (m, H1''), 3,54 (m, H2'') e 1,75-1,53 (m, H3'', H4'', H5'').

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 165,43 (C1), 148,20 (C3'), 148,12 (C4'), 142,46 (C3), 138,20 (C5), 131,03 (C1'), 125,38 (C4), 122,49 (C2), 120,09 (C6'), 108,48 (C5'), 105,68 (C2'), 101,27 (C7'), 46,87 (C1''), 43,27 (C2''), 26,68 (C3''), 25,67 (C4'') e 24,67 (C5'').

EM (CG/EM, IE), m/z (%): 285 (23) [M^+], 201 (59), 173 (31), 143 (27) e 115 (100).

¹ KIUCHI *et al.*, 1988

II.2.2.4.2. Piperilina [80]



$T_f=132-133\text{ }^{\circ}\text{C}$ (142-143 $^{\circ}\text{C}$ lit.¹)

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 2983, 2954, 2895, 2871, 1638, 1592, 1500, 1488, 1446, 1422, 1252, 1039 e 994.

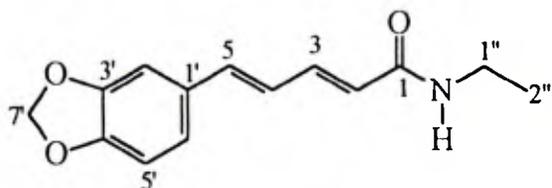
RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 7,43 (ddd, $J_{3,2}=15,0$, $J_{3,4}=8,4$ e $J_{3,5}=2,0$, H3), 6,99 (d, $J_{2',6'}=1,6$, H2'), 6,90 (dd, $J_{6',5'}=8,0$ e $J_{6',2'}=1,6$, H6'), 6,84-6,60 (m, H5, H5', H4), 6,26 (d, $J_{2,3}=15,0$, H2), 5,97 (s, H7'), 3,56 (t, $J_{1'',3''}=6,9$, H1''), 3,56 (t, $J_{2'',4''}=6,9$, H2'') e 2,00-1,80 (m, H3'' e H4'').

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 164,99 (C1), 148,22 (C3'), 148,22 (C4'), 141,83 (C3), 138,73 (C5), 131,02 (C1'), 125,23 (C4), 122,58 (C2), 121,41 (C6'), 108,50 (C5'), 105,72 (C2'), 101,30 (C7'), 46,51 (C1''), 45,95 (C2''), 26,15 (C3'') e 24,37 (C4'').

EM (CG/EM, IE), m/z (%): 271 (23) [M^+], 201 (66), 173 (28), 143 (30) e 115 (100).

¹ KIUCHI *et al.*, 1988

II.2.2.4.3. N-etilpiperamida [82a]



$T_f=162-164\text{ }^\circ\text{C}$ (164-165 $^\circ\text{C}$, lit.²)

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3288, 3080, 2974, 2886, 1641, 1607, 1544, 1503, 1488, 1255 e 991.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 7,35 (dd, $J_{3-2}=15,0$ e $J_{3-4}=9,8$, H3), 6,97 (d, $J_{2'-6'}=1,5$, H2'), 6,88 (dd, $J_{6'-5'}=8,0$ e $J_{6'-2'}=1,5$, H6'), 6,77 (d, $J_{5-4}=15,0$, H5), 6,76 (d, $J_{5'-6'}=8,0$, H5'), 6,65 (dd, $J_{4-5}=15,0$, $J_{4-3}=9,8$, H4), 5,97 (s, H7'), 5,90 (d, $J_{2-3}=15,0$, H2), 5,58 (m, NH), 3,40 (m, H1'') e 1,19 (t, $J_{2''-1''}=7,2$, H2'').

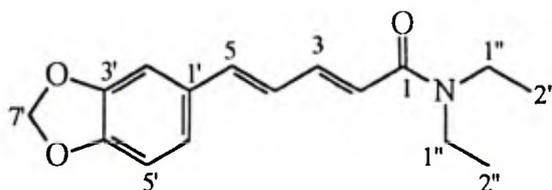
RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 165,99 (C1), 148,21 (C3'), 148,21 (C4'), 140,85 (C3), 138,75 (C5), 130,90 (C1'), 124,70 (C4), 123,22 (C2), 122,53 (C6'), 108,47 (C5'), 105,73 (C2'), 101,27 (C7'), 34,49 (C1'') e 14,90 (C2'').

CHN (%): calculado: C (68,56), H (6,16) e N (5,71) e obtido: C (68,44), H (6,16) e N (5,72).

EM (CG/EM, IE), m/z (%): 245 (27) [M^+], 201(27), 173 (56), 143 (33), 115 (100), 100 (22) e 44 (52).

² SYNERHOLM *et al.*, 1945

II.2.2.4.4. N,N-dietilpiperamida [82b]



$T_f=85-87\text{ }^\circ\text{C}$ ($94-95\text{ }^\circ\text{C}$, lit.²)

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 2975, 2886, 1640, 1602, 1520, 1505, 1488, 1475, 1450, 1430, 1253 e 993.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 7,44 (ddd, $J_{3-2}=15,0$, $J_{3-4}=7,5$ e $J_{3-5}=3,0$, H3), 6,98 (d, $J_{2-6'}=1,6$, H2'), 6,89 (dd, $J_{6'-5'}=8,0$ e $J_{6'-2'}=1,6$, H6'), 6,78-6,74 (m, H5, H5', H4), 6,36 (d, $J_{2-3}=15,0$, H2), 5,97 (s, H7'), 3,47-3,40 (m, 2 x H1'') e 1,28-1,14 (t, $J_{2''-1''}=7,2$, 2 x H2'').

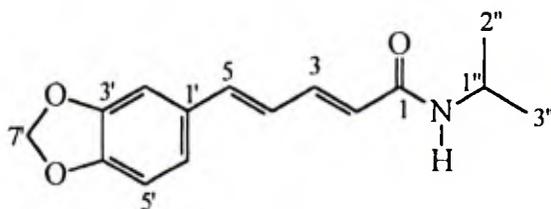
RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 166,27 (C1), 148,60 (C3'), 148,54 (C4'), 142,88 (C3), 138,82 (C5), 131,44 (C1'), 125,75 (C4), 122,91 (C2), 120,65 (C6'), 108,88 (C5'), 106,10 (C2'), 101,67 (C7'), 42,61 (C1''), 41,36 (C2''), 15,41 (C3'') e 13,64 (C4'').

CHN (%): calculado: C (70,31), H (7,01) e N (5,12) e obtido: C (69,69), H (6,86) e N (5,16).

EM (CG/EM, IE), m/z (%): 273 (25) [M^+], 201 (83), 173 (27), 143 (30), 115 (100), 100 (20) e 72 (25).

² SYNERHOLM *et al.*, 1945

II.2.2.4.5. N-isopropilpiperamida [82c]



$T_f=171-173\text{ }^\circ\text{C}^{\#}$

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3247, 3059, 2971, 2915, 1643, 1605, 1545, 1504, 1491, 1458, 1438, 1259 e 999.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 7,34 (dd, $J_{3-2}=14,8$ e $J_{3-4}=9,7$, H3), 6,96 (d, $J_{2'-6'}=1,6$, H2'), 6,88 (dd, $J_{6'-5'}=8,0$ e $J_{6'-2'}=1,6$, H6'), 6,77 (d, $J_{5-4}=15,4$, H5), 6,76 (d, $J_{5'-6'}=8,0$, H5'), 6,65 (dd, $J_{4-5}=15,4$, $J_{4-3}=9,7$, H4), 5,97 (s, H7'), 5,89 (d, $J_{2-3}=14,8$, H2), 5,54 (dl, $J_{\text{NH}-1''}=7,5$, NH), 4,19 (m, H1''), 1,20 (d, $J_{2''-1''}=4,5$, H2'') e 1,20 (d, $J_{3''-1''}=4,5$, H3'').

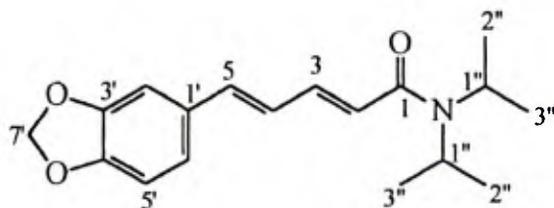
RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 165,29 (C1), 148,21 (C3'), 148,21 (C4'), 140,78 (C3), 138,68 (C5), 130,93 (C1'), 124,73 (C4), 123,55 (C2), 122,55 (C6'), 108,49 (C5'), 105,74 (C2'), 101,29 (C7'), 41,47 (C1''), 22,86 (C2'') e 22,86 (C3'').

CHN (%): calculado: C (69,48), H (6,61) e N (5,40) e obtido: C (69,36), H (6,61) e N (5,54).

EM (CG/EM, IE), m/z (%): 259 (27) [M^+], 201 (34), 173 (53), 143 (31), 115 (100) e 58 (30).

[#] Para esta amida não foi encontrado na literatura nenhum dado físico ou espectroscópico.

II.2.2.4.6. N,N-diisopropilpiperamida [82d]



$T_f=81-83\text{ }^\circ\text{C}$ (86-87 $^\circ\text{C}$, lit.²)

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3070, 3004, 2967, 2932, 1637, 1617, 1589, 1503, 1489, 1444, 1335, 1253 e 984.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 7,35 (ddd, $J_{3-2}=15,0$, $J_{3-4}=6,0$ e $J_{3-5}=4,3$, H3), 6,98 (d, $J_{2-6}=1,6$, H2'), 6,89 (dd, $J_{6-5}=8,0$ e $J_{6-2}=1,6$, H6'), 6,84-6,65 (m, H5, H5', H4), 6,37 (d, $J_{2-3}=15,0$, H2), 5,97 (s, H7'), 4,10 (m, 2 x H1''), 1,33 (sl, 2 x H2'') e 1,33 (sl, 2 x H3'').

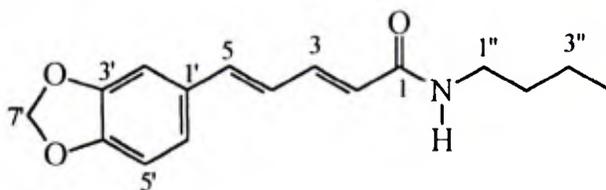
RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 166,31 (C1), 148,24 (C3'), 148,08 (C4'), 141,27 (C3), 137,78 (C5), 131,22 (C1'), 125,63 (C4), 123,16 (C2), 122,38 (C6'), 108,50 (C5'), 105,75 (C2'), 101,27 (C7'), 47,25 (C1''), 21,25 (C2'') e 21,25 (C3'').

CHN (%): calculado: C (71,73), H (7,69) e N (4,65) e obtido: C (71,29), H (7,66) e N (4,58).

EM (CG/EM, IE), m/z (%): 301 (14) [M^+], 201 (100), 174 (44), 143 (25), 115 (84) e 100 (50).

² SYNERHOLM *et al.*, 1945

II.2.2.4.7. N-butilpiperamida [82c]



$T_f=144-145\text{ }^\circ\text{C}$ (151 $^\circ\text{C}$, lit.²)

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3291, 3071, 2970, 2870, 1642, 1604, 1540, 1500, 1448, 1261 e 998.

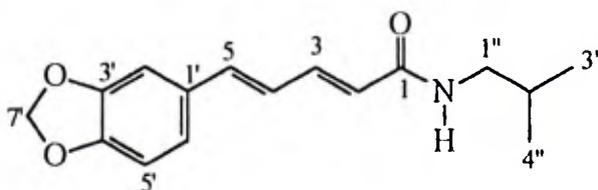
RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 7,35 (dd, $J_{3-2}=15,0$ e $J_{3-4}=9,7$, H3), 6,97 (sl, H2'), 6,88 (dl, $J_{6'-5'}=8,1$, H6'), 6,77 (d, $J_{5-4}=15,0$, H5), 6,76 (d, $J_{5'-6'}=8,1$, H5'), 6,65 (dd, $J_{4-5}=15,0$ e $J_{4-3}=9,7$, H4), 5,97 (s, H7'), 5,91 (d, $J_{2-3}=15,0$, H2), 5,64 (sl, NH), 3,35 (q, $J_{1''-\text{NH}}=J_{1''-2''}=6,7$, H1''), 1,74-1,28 (m, H2'') 1,74-1,28 (m, H3'') e 0,93 (t, $J_{4''-3''}=7,1$, H4'').

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 166,12 (C1), 148,22 (C3'), 148,22 (C4'), 140,89 (C3), 138,77 (C5), 130,91 (C1'), 124,71 (C4), 123,27 (C2), 122,57 (C6'), 108,50 (C5'), 105,73 (C2'), 101,31 (C7'), 39,43 (C1''), 31,80 (C2''), 20,13 (C3'') e 13,78 (C4'').

EMAR-IC, m/z (%): 274,1443 (100) $[\text{M}+1]^+$, 201,0562 (13), 173,0601 (14), 130,9920 (9), 115, (8) e 68,9952 (7).

² SYNERHOLM *et al.*, 1945

II.2.2.4.8. N-isobutilpiperamida [82f]



$T_f=160-161\text{ }^\circ\text{C}$ (165-166 $^\circ\text{C}$, lit.²)

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3300, 2962, 2930, 1643, 1620, 1560, 1552, 1506, 1480, 1448, 1255 e 990.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 7,36 (dd, $J_{3-2}=15,0$ e $J_{3-4}=9,7$, H3), 6,96 (d, $J_{2-6}=1,6$, H2'), 6,88 (dd, $J_{6-5}=8,0$ e $J_{6-2}=1,6$, H6'), 6,77 (d, $J_{5-4}=15,0$, H5), 6,76 (d, $J_{5-6}=8,0$, H5'), 6,65 (dd, $J_{4-5}=15,0$ e $J_{4-3}=9,7$, H4), 5,97 (s, H7'), 5,94 (d, $J_{2-3}=15,0$, H2), 5,71 (tl, NH), 3,22 (dd, $J_{1''-2''}=6,7$ e $J_{1''-\text{NH}}=6,3$, H1''), 1,82 (m, H2''), 0,94 (d, $J_{3''-2''}=6,7$, H3'') e 0,94 (d, $J_{4''-2''}=6,7$, H4'').

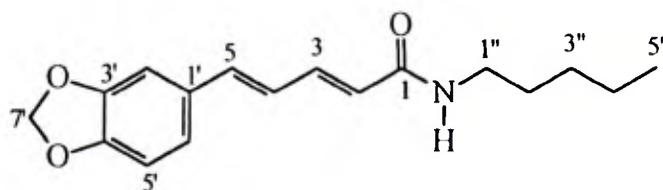
RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 166,20 (C1), 148,22 (C3'), 148,22 (C4'), 140,96 (C3), 138,78 (C5), 130,91 (C1'), 124,71 (C4), 123,31 (C2), 122,57 (C6'), 108,50 (C5'), 105,73 (C2'), 101,30 (C7'), 47,03 (C1''), 28,66 (C2''), 20,16 (C3'') e 20,16 (C4'').

CHN (%): calculado: C (70,31), H (7,01) e N (5,12) e obtido: C (70,63), H (7,00) e N (5,21).

EM (CG/EM, IE), m/z (%): 273 (27) [M^+], 201 (52), 173 (56), 143 (31), 115 (100), 96 (30) e 41 (42).

² SYNERHOLM *et al.*, 1945

II.2.2.4.9. N-pentilpiperamida [82g]



$T_f=139-141\text{ }^\circ\text{C}^\#$

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3288, 3072, 2951, 2880, 1642, 1605, 1541, 1500, 1449, 1261 e 989.

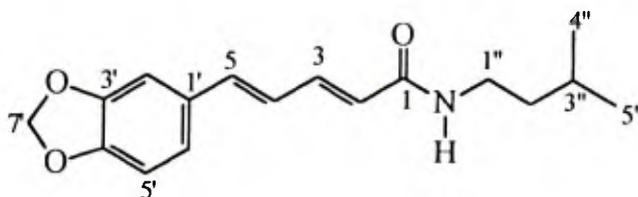
RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 7,35 (dd, $J_{3,2}=15,0$ e $J_{3,4}=9,7$, H3), 6,96 (d, $J_{2,6'}=1,6$, H2'), 6,88 (dd, $J_{6',5'}=8,0$ e $J_{6',2'}=1,6$, H6'), 6,77 (d, $J_{5,4}=15,0$, H5), 6,76 (d, $J_{5',6'}=8,0$, H5'), 6,65 (dd, $J_{4,5}=15,0$ e $J_{4,3}=9,7$, H4), 5,97 (s, H7'), 5,92 (d, $J_{2,3}=15,0$, H2), 5,67 (tl, NH), 3,35 (td, H1''), 1,55 (tt, $J_{2''3''}=7,1$ e $J_{2''1''}=6,8$, H2''), 1,40-1,20 (m, H3''), 1,40-1,20 (m, H4'') e 0,90 (t, $J_{5''4''}=6,7$, H5'').

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 166,11 (C1), 148,22 (C3'), 148,22 (C4'), 140,86 (C3), 138,75 (C5), 130,92 (C1'), 124,73 (C4), 123,32 (C2), 122,57 (C6'), 108,49 (C5'), 105,73 (C2'), 101,31 (C7'), 39,70 (C1''), 29,41 (C2''), 29,13 (C3''), 22,39 (C4'') e 13,99 (C5'').

EMAR-IC, m/z (%): 288,1594 (100) $[\text{M}+1]^+$, 201,0563 (15), 173,0602 (14) e 115,0518 (7).

[#] Para esta amida não foi encontrado na literatura nenhum dado físico ou espectroscópico.

II.2.2.4.10. N-isopentilpiperamida [82h]



$T_f=136-138\text{ }^\circ\text{C}$ (144-145 $^\circ\text{C}$, lit.²)

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3300, 3070, 3004, 2975, 2967, 2935, 1645, 1610, 1550, 1503, 1489, 1450, 1260 e 990.

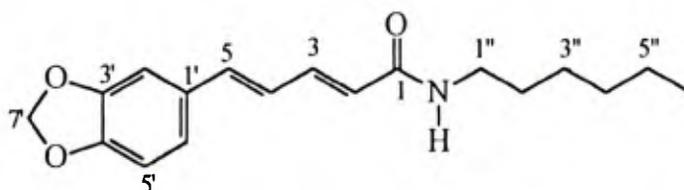
RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 7,35 (dd, $J_{3-2}=15,0$ e $J_{3-4}=9,7$, H3), 6,96 (d, $J_{2-6}=1,6$, H2'), 6,88 (dd, $J_{6-5}=8,0$ e $J_{6-2}=1,6$, H6'), 6,77 (d, $J_{5-4}=15,0$, H5), 6,76 (d, $J_{5-6}=8,0$, H5'), 6,65 (dd, $J_{4-5}=15,0$ e $J_{4-3}=9,7$, H4), 5,97 (s, H7'), 5,91 (d, $J_{2-3}=15,0$, H2), 5,62 (tl, NH), 3,37 (td, $J_{1''-2''}=7,4$ e $J_{1''-\text{NH}}=5,8$, H1''), 1,63 (m, H3''), 1,49-1,38 (m, H2''), 0,93 (d, $J_{4''-3''}=6,5$, H4'') e 0,93 (d, $J_{5''-3''}=6,5$, H5'').

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 166,51 (C1), 148,62 (C3'), 148,62 (C4'), 141,26 (C3), 139,16 (C5), 130,92 (C1'), 125,11 (C4), 123,69 (C2), 122,97 (C6'), 108,89 (C5'), 106,13 (C2'), 101,70 (C7'), 39,00 (C1''), 38,40 (C2''), 26,31 (C3''), 22,88 (C4'') e 22,88 (C5'').

EMAR-IC, m/z (%): 288,1594 (100) $[\text{M}+1]^+$, 201,0571 (19), 173,0603 (18), 130,9920 (23), 115,0519 (22) e 68,9952 (17).

² SYNERHOLM *et al.*, 1945

II.2.2.4.11. N-hexilpiperamida [82i]



$T_f=132-133\text{ }^\circ\text{C}^\#$

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3310, 3070, 3004, 2970, 2930, 2860, 1638, 1610, 1540, 1500, 1450, 1256 e 989.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 7,35 (dd, $J_{3,2}=15,0$ e $J_{3,4}=9,7$, H3), 6,97 (d, $J_{2,6'}=1,6$, H2'), 6,88 (dd, $J_{6',5'}=8,0$ e $J_{6',2'}=1,6$, H6'), 6,78 (d, $J_{5,4}=15,0$, H5), 6,77 (d, $J_{5',6'}=8,0$, H5'), 6,65 (dd, $J_{4,5}=15,0$ e $J_{4,3}=9,7$, H4), 5,97 (s, H7'), 5,91 (d, $J_{2,3}=15,0$, H2), 5,60 (tl, NH), 3,35 (td, H1''), 1,54 (m, H2''), 1,37-1,25 (m, H3'', H4'' e H5'') e 0,89 (t, $J_{6'',5''}=6,5$, H6'').

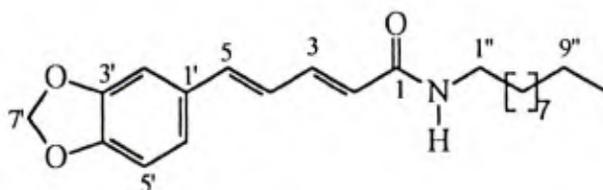
RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 166,09 (C1), 148,22 (C3'), 148,22 (C4'), 140,89 (C3), 138,77 (C5), 130,92 (C1'), 124,72 (C4), 123,28 (C2), 122,57 (C6'), 108,50 (C5'), 105,74 (C2'), 101,31 (C7'), 39,74 (C1''), 31,52 (C2''), 29,69 (C3''), 26,65 (C4''), 22,57 (C5'') e 14,02 (C6'').

CHN (%): calculado: C (71,73), H (7,69) e N (4,65) e obtido: C (71,81), H (7,30) e N (4,70).

EM (CG/EM, IE), m/z (%): 301 (23) [M^+], 201 (44), 173 (81), 143 (33), 115 (100) e 43 (72).

[#] Para esta amida não foi encontrado na literatura nenhum dado físico ou espectroscópico.

II.2.2.4.12. N-decilpiperamida [82j]



$T_f=136-138\text{ }^\circ\text{C}^\#$

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3298, 2960, 2920, 2840, 1640, 1615, 1530, 1502, 1475, 1452, 1260 e 992.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 7,35 (dd, $J_{3-2}=15,0$ e $J_{3-4}=9,7$, H3), 6,97 (d, $J_{2'-6'}=1,6$, H2'), 6,88 (dd, $J_{6'-5'}=8,0$ e $J_{6'-2'}=1,6$, H6'), 6,78 (d, $J_{5-4}=15,0$, H5), 6,77 (d, $J_{5'-6'}=8,0$, H5'), 6,65 (dd, $J_{4-5}=15,0$ e $J_{4-3}=9,7$, H4), 5,97 (s, H7'), 5,91 (d, $J_{2-3}=15,0$, H2), 5,59 (tl, NH), 3,34 (td, H1''), 1,52 (m, H2''), 1,26 (m, H3'', H4'', H5'', H6'', H7'', H8'', H9'') e 0,88 (t, H10'').

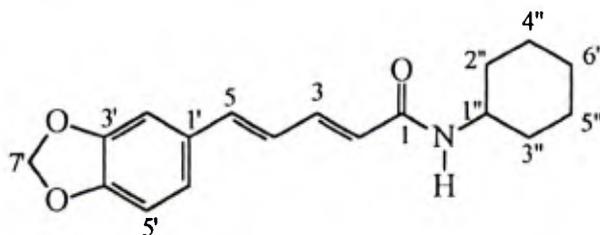
RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 166,09 (C1), 148,22 (C3'), 148,22 (C4'), 140,88 (C3), 138,76 (C5), 130,92 (C1'), 124,72 (C4), 123,28 (C2), 122,56 (C6'), 108,50 (C5'), 105,74 (C2'), 101,30 (C7'), 39,75 (C1''), 31,89 (C2''), 29,73 (C3''), 29,56 (C4''), 29,56 (C5''), 29,31 (C6''), 29,31 (C7''), 26,99 (C8''), 22,68 (C9'') e 14,11 (C10'').

CHN (%): calculado: C (73,92), H (8,74) e N (3,92) e obtido: C (74,31), H (8,65) e N (4,01).

EM (CG/EM, IE), m/z (%): 357 (19) [M^+], 201 (56), 173 (98), 143 (31), 135 (30), 115 (89), 96 (28), 55 (39) e 43 (100).

[#] Para esta amida não foi encontrado na literatura nenhum dado físico ou espectroscópico.

II.2.2.4.13. N-cicloexilpiperamida [82k]



$T_f=199-200\text{ }^\circ\text{C}$ (188-189 $^\circ\text{C}$, lit.²)

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3320, 3073, 3006, 2970, 2930, 1642, 1615, 1585, 1504, 1478, 1451, 1258 e 987.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 7,34 (dd, $J_{3-2}=14,9$ e $J_{3-4}=9,8$, H3), 6,97 (d, $J_{2'-6'}=1,6$, H2'), 6,88 (dd, $J_{6'-5'}=8,1$ e $J_{6'-2'}=1,6$, H6'), 6,77 (d, $J_{5-4}=15,0$, H5), 6,76 (d, $J_{5'-6'}=8,1$, H5'), 6,65 (dd, $J_{4-5}=15,0$ e $J_{4-3}=9,8$, H4), 5,97 (s, H7'), 5,89 (d, $J_{2-3}=14,9$, H2), 5,45 (dl, $J_{\text{NH}-1''}=7,3$, NH), 3,88 (m, H1''), 1,96 (m, H2''), 1,75 (m, H3'') e 1,50-1,05 (m, H4'', H5'' e H6'').

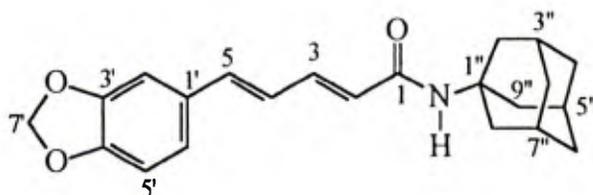
RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 165,15 (C1), 148,21 (C3'), 148,21 (C4'), 140,77 (C3), 138,65 (C5), 130,95 (C1'), 124,75 (C4), 123,63 (C2), 122,54 (C6'), 108,49 (C5'), 105,74 (C2'), 101,30 (C7'), 48,28 (C1''), 33,28 (C2''), 33,28 (C3''), 25,59 (C6''), 24,90 (C4'') e 24,90 (C5'').

CHN (%): calculado: C (72,22), H (7,07) e N (4,68) e obtido: C (72,16), H (6,96) e N (4,78).

EM (CG/EM, IE), m/z (%): 299 (23) [M^+], 216 (27), 201 (45), 173 (48), 143 (30), 115 (100) e 96 (58).

² SYNERHOLM *et al.*, 1945

II.2.2.4.14. N-adamantilpiperamida [82ℓ]



$T_f=150-151\text{ }^\circ\text{C}^\#$

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3390, 2907, 2848, 1655, 1617, 1521, 1504, 1246 e 997.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 7,27 (dd, $J_{3-2}=15,0$ e $J_{3-4}=9,6$, H3), 6,97 (d, $J_{2'-6'}=1,6$, H2'), 6,88 (dd, $J_{6'-5'}=8,0$ e $J_{6'-2'}=1,6$, H6'), 6,77 (d, $J_{5'-6'}=8,0$, H5'), 6,75 (d, $J_{5-4}=15,0$, H5), 6,64 (dd, $J_{4-5}=15,0$ e $J_{4-3}=9,6$, H4), 5,97 (s, H7'), 5,85 (d, $J_{2-3}=15,0$, H2), 5,26 (sl, NH), 2,06 (m, 9H, H2'', H3'', H4'', H5'', H6'', H7'', H8'', H9'' e H10'') e 1,67 (m, 6H, H2'', H4'', H6'', H8'', H9'' e H10'').

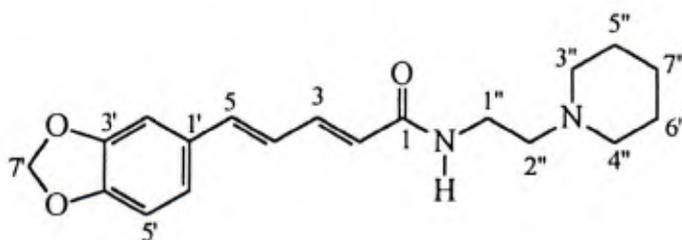
RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 165,20 (C1), 148,20 (C3'), 148,14 (C4'), 140,25 (C3), 138,39 (C5), 131,02 (C1'), 124,76 (C4), 124,69 (C2), 122,49 (C6'), 108,49 (C5'), 105,73 (C2'), 101,28 (C7'), 52,11 (C1''), 41,75 (C2''), 41,75 (C8''), 41,75 (C9''), 36,40 (C4''), 36,40 (C6''), 36,40 (C10''), 29,49 (C3''), 29,49 (C5'') e 29,49 (C7'').

CHN (%): calculado: C (75,19), H (7,17) e N (3,99) e obtido: C (74,72), H (7,08) e N (4,12).

EM (CG/EM, IE), m/z (%): 351 (13) [M^+], 201 (14), 173 (10), 172 (11), 143 (9), 135 (100) e 115 (39).

[#] Para esta amida não foi encontrado na literatura nenhum dado físico ou espectroscópico.

II.2.2.4.15. N-[2-(piperidina-1-il)etil]piperamida [82m]



$T_f=128-129\text{ }^\circ\text{C}^{\#}$

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3299, 3078, 2929, 2850, 2782, 1642, 1607, 1550, 1503, 1489, 1447, 1257, 1037 e 991.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 7,35 (ddl, $J_{3-2}=15,0$ e $J_{3-4}=9,6$, H3), 6,97 (d, $J_{2'-6'}=1,6$, H2'), 6,89 (dd, $J_{6'-5'}=8,0$ e $J_{6'-2'}=1,6$, H6'), 6,78 (d, $J_{5-4}=15,0$, H5), 6,77 (d, $J_{5'-6'}=8,0$, H5'), 6,67 (dd, $J_{4-5}=15,0$ e $J_{4-3}=9,6$, H4), 6,31 (tl, NH), 5,98 (s, H7'), 5,97 (d, $J_{2-3}=15,0$, H2), 3,44 (td, H1''), 2,48 (t, $J_{2''-1''}=6,1$, H2''), 2,41 (t, H3''), 2,41 (t, H4''), 1,59 (m, H5''), 1,59 (m, H6'') e 1,47 (m, H7'').

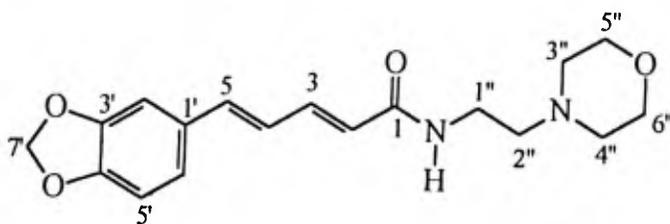
RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 166,12 (C1), 148,22 (C3'), 148,22 (C4'), 140,69 (C3), 138,61 (C5), 130,98 (C1'), 124,83 (C4), 123,48 (C2), 122,53 (C6'), 108,51 (C5'), 105,74 (C2'), 101,30 (C7'), 57,21 (C1''), 54,30 (C3''), 54,30 (C4''), 36,10 (C2''), 25,91 (C5''), 25,91 (C6'') e 24,34 (C7'').

CHN (%): calculado: C (69,49), H (7,37) e N (8,53) e obtido: C (67,18), H (7,40) e N (8,19).

EM (CG/EM, IE), m/z (%): 328 (2) [M^+], 201 (3), 173 (3), 143 (2), 111 (16) e 98 (100).

[#] Para esta amida não foi encontrado na literatura nenhum dado físico ou espectroscópico.

II.2.2.4.16. N-[2-(morfolin-4-il)etil]piperamida [82n]



$T_f=165-167\text{ }^\circ\text{C}^\#$

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3265, 3082, 2972, 2935, 2816, 1647, 1617, 1560, 1499, 1447, 1253, 1115 e 988.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 7,36 (dd, $J_{3-2}=15,0$ e $J_{3-4}=9,7$, H3), 6,97 (sl, H2'), 6,89 (dd, $J_{6'-5'}=8,1$ e $J_{6'-2'}=1,4$, H6'), 6,79 (d, $J_{5-4}=15,0$, H5), 6,78 (d, $J_{5'-6'}=8,1$, H5'), 6,67 (dd, $J_{4-5}=15,0$ e $J_{4-3}=9,7$, H4), 6,18 (tl, NH), 5,98 (s, H7'), 5,97 (d, $J_{2-3}=15,0$, H2), 3,73 (m, H5''), 3,73 (m, H6''), 3,47 (td, H1'') e 2,60-2,46 (m, H2'', H3'' e H4'').

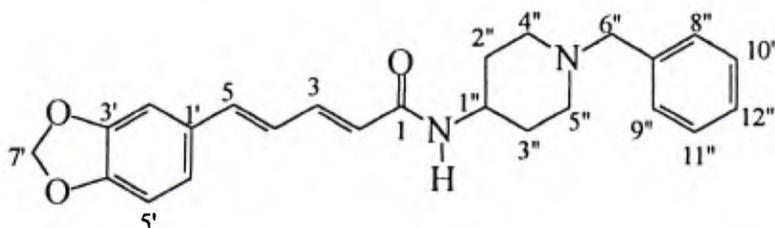
RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 166,11 (C1), 148,20 (C3'), 148,20 (C4'), 140,99 (C3), 138,88 (C5), 130,84 (C1'), 124,62 (C4), 123,06 (C2), 122,57 (C6'), 108,48 (C5'), 105,68 (C2'), 101,28 (C7'), 66,85 (C5''), 66,85 (C6''), 57,06 (C1''), 53,32 (C3''), 53,32 (C4'') e 35,66 (C2'').

CHN (%): calculado: C (65,44), H (6,71) e N (8,48) e obtido: C (56,26), H (7,22) e N (9,04).

EM (CG/EM, IE), m/z (%): 330 (3) [M^+], 201 (3), 113 (25) e 100 (100).

[#] Para esta amida não foi encontrado na literatura nenhum dado físico ou espectroscópico.

II.2.2.4.17. N-(1-benzilpiperidin-4-il)piperamida [82o]



$T_f=166-168\text{ }^\circ\text{C}^\#$

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$): 3304, 3072, 3024, 2944, 2930, 2794, 2754, 1642, 1607, 1542, 1501, 1489, 1445, 1367, 1339, 1255, 1040 e 992.

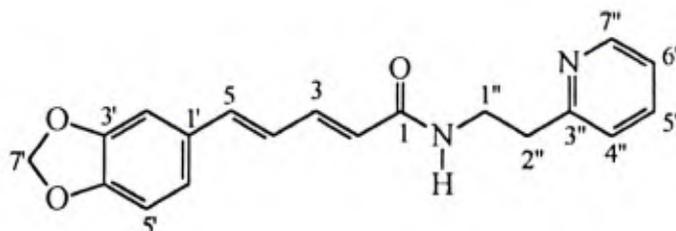
RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 7,34 (dd, $J_{3,2}=15,0$ e $J_{3,4}=10,0$, H3), 7,33-7,23 (m, H8''-H12''), 6,96 (d, $J_{2',6'}=1,6$, H2'), 6,88 (dd, $J_{6',5'}=8,1$ e $J_{6',2'}=1,6$, H6'), 6,78 (d, $J_{5,4}=15,4$, H5), 6,76 (d, $J_{5',6'}=8,1$, H5'), 6,61 (dd, $J_{4,5}=15,4$ e $J_{4,3}=10,0$, H4), 5,97 (s, H7'), 5,88 (d, $J_{2,3}=15,0$, H2), 5,45 (dl, $J_{\text{NH}-1''}=8,1$, NH), 3,92 (m, H1''), 3,50 (s, H6''), 2,82 (m, H4'' ou H5''), 2,14 (td, $J_{(4''-2'' \text{ ou } 5''-3'')}=11,5$ e $J_{(4'' \text{ ou } 5''-1'')}=2,1$, H4'' ou H5''), 1,95 (m, H2'' ou H3'') e 1,48 (dq, $J=11,5$, $J=3,4$, H2'' ou H3'').

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 165,37 (C1), 148,22 (C3'), 148,22 (C4'), 141,03 (C3), 138,87 (C5), 138,43 (C7''), 130,89 (C1'), 129,10 (C8''), 129,10 (C9''), 128,22 (C10''), 128,22 (C11''), 127,03 (C12''), 124,65 (C4), 123,29 (C2), 122,60 (C6'), 108,50 (C5'), 105,74 (C2'), 101,30 (C7'), 63,10 (C6''), 52,31 (C4''), 52,31 (C5''), 46,67 (C1''), 32,40 (C2'') e 32,40 (C3'').

EMAR-IE, m/z (%): 390,1943 (19) $[\text{M}^+]$, 330,2951 (31), 284,2177 (12), 217,0578 (31), 173,0910 (25), 172,0887 (99), 148,0241 (36), 116,5903 (46) e 91,0399 (100).

[#] Para esta amida não foi encontrado na literatura nenhum dado físico ou espectroscópico.

II.2.2.4.18. N-[2-(piridin-2-il)etil]piperamida [82p]



$T_f=138-139\text{ }^\circ\text{C}^\#$

IV (KBr, $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$): 3299, 3088, 2928, 1643, 1606, 1553, 1499, 1445, 1256, 1039 e 994.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (mult., J/Hz): 8,53 (m, $\text{H7}''$), 7,62 (ddd, $J_{6''-7''}=J_{6''-5''}=7,7$ e $J_{6''-4''}=1,8$, $\text{H6}''$), 7,33 (dd, $J_{3-2}=15,1$ e $J_{3-4}=9,7$, H3), 7,18 (dd, $J_{4''-5''}=7,7$ e $J_{4''-6''}=1,8$, $\text{H4}''$), 7,16 (ddd, $J_{5''-4''}=J_{5''-6''}=7,7$ e $J_{5''-7''}=1,8$, $\text{H5}''$), 6,96 (d, $J_{2'-6'}=1,6$, $\text{H2}'$), 6,88 (dd, $J_{6'-5'}=8,1$ e $J_{6'-2'}=1,6$, $\text{H6}'$), 6,76 (d, $J_{5-4}=15,2$, H5), 6,76 (d, $J_{5'-6'}=8,0$, $\text{H5}'$), 6,65 (dd, $J_{4-5}=15,2$ e $J_{4-3}=9,7$, H4), 6,63 (tl, NH), 5,97 (s, $\text{H7}'$), 5,91 (d, $J_{2-3}=15,0$, H2), 3,77 (td, $J_{1''-2''}=6,5$ e $J_{1''-\text{NH}}=5,8$, $\text{H1}''$) e 3,04 (t, $J_{2''-1''}=6,5$, $\text{H2}''$).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 166,04 (C1), 159,70 ($\text{C3}''$), 149,13 ($\text{C7}''$), 148,15 ($\text{C3}'$), 148,15 ($\text{C4}'$), 140,66 (C3), 138,58 (C5), 136,64 ($\text{C4}''$) 130,91 ($\text{C1}'$), 124,77 (C4), 123,51 (C2), 123,51 ($\text{C6}''$), 122,48 ($\text{C6}'$), 121,56 ($\text{C5}''$), 108,45 ($\text{C5}'$), 105,69 ($\text{C2}'$), 101,25 ($\text{C7}'$), 38,78 ($\text{C1}''$) e 36,88 ($\text{C2}''$).

CHN (%): calculado: C (70,79), H (5,63) e N (8,69) e obtido: C (71,04), H (5,68) e N (8,70).

EM (CG/EM, IE), m/z (%): 322 (28) [M^+], 201 (23), 143 (17), 115 (83), 106 (100) e 93 (75).

[#] Para esta amida não foi encontrado na literatura nenhum dado físico ou espectroscópico.

II.2.3. Ensaios Biológicos

II.2.3.1. Ensaios em Placa de Petri com Papel Impregado com as Substâncias

Ensaios biológicos preliminares, em placas de Petri ($\phi=9$ cm), foram realizados com o caruncho do milho *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae), o besouro do feijão *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae), o caruncho do trigo *Rhizopertha dominica* Fabr. (Coleoptera: Bostrichidae), o pulgão *Brevicoryne brassicae* L. (Homoptera: Aphididae), o cupim *Cornitermes cumulans* Kollar (Isoptera: Termitidae) e a vespa *Protopolybia exigua* DeSaus (Hymenoptera: Vespidae), para avaliar as toxicidades, por contato, das amidas sintéticas, bem como compará-las às das amidas naturais.

As amidas sintetizadas [82a-p] e as amidas naturais, piperina [65] e piperilina [80] foram dissolvidas em CHCl_3 , para o preparo de solução contendo 2 mg de cada amida/mL. Em cada placa contendo disco de papel de filtro foi adicionado 1 mL desta solução, mantendo-se a placa aberta durante aproximadamente 30 min para evaporação do solvente. Para cada espécie foram realizadas três repetições contendo 10 insetos cada uma. As placas foram mantidas em estufa incubadora a 25 ± 5 °C e 70 ± 5 % de umidade relativa. Após o período de incubação de 72 h para *S. zeamais*, 48 h para *A. obtectus*, 72 h para *R. dominica*, 6 h para *B. brassicae*, 6 h para *C. cumulans* e 24 h para *P. exigua* foi feita a avaliação da mortalidade. Para cada espécie foi feito um controle, onde foi aplicado apenas o solvente (CHCl_3).

II.2.3.2. Ensaios de Aplicação Tópica

A fim de verificar e comparar a eficiência da metodologia utilizada preliminarmente (item II.2.3.1) outros ensaios biológicos foram realizados. Nestes ensaios foram utilizadas larvas de primeiro ínstar do curuquerê da couve *Ascia monuste orseis* Latr. (Lepidoptera, Pieridae), adultos de *A. obtectus*, de *B. brassicae* e de *P. exigua* e operários de *C. cumulans*. Foram medidas as massas de dez grupos

contendo dez insetos e, a massa média, de um inseto para cada espécie, foi de 0,25, 3,83, 0,32, 3,80 e 8,41 mg, respectivamente.

O ensaio consistiu na aplicação tópica de 10 µg de cada amida por inseto, de forma que a dose (µg.mg⁻¹ do inseto) de cada substância aplicada foi de 40,0 para *A. monuste orseis*, 2,61 para *A. obtectus*, 31,25 para *B. brassicae*, 1,19 para *C. cumulans* e 2,63 para *P. exigua*.

As amidas foram dissolvidas em acetona na concentração de 10 mg.mL⁻¹ e 1 µL desta solução foi aplicado por inseto, com auxílio de micro-seringa, conforme observado na Figura II.1a e II.1b, na aplicação em larvas de *A. monuste orseis* e em adultos de *A. obtectus*, respectivamente. Na testemunha foi aplicado 1 µL de acetona. Para cada amida foram realizadas quatro repetições, sendo utilizados, em média, dez insetos por repetição.

Após a aplicação de cada substância, as larvas de *A. monuste orseis* foram colocadas em potes plásticos com tampa perfurada, contendo um disco de folha de couve, e levadas à estufa incubadora, onde permaneceram por 48 horas a 25 ± 0,5 °C e umidade relativa de 75 ± 5%, com fotoperíodo de 12 horas. Os insetos das demais espécies foram colocados em placas de Petri (φ=9 cm) e mantidos em estufa incubadora, nas mesmas condições acima. O período de incubação foi de 48, 6, 6 e 12 h, respectivamente, para *A. obtectus*, *B. brassicae*, *C. cumulans* e *P. exigua*.

Após o período de incubação adequado para cada espécie foi feita a avaliação da mortalidade e os resultados experimentais foram submetidos a análise de variância e teste de média de Scott - Knott a p < 0,05.



a)



b)

Figura II.1 - Aplicação Tópica de $1,0 \mu\text{L}$ de Solução Contendo 10 mg.mL^{-1} de Cada Amida em a) Larva de Primeiro Ínstar de *Ascia monuste orseis* e b) em Adultos de *Acanthoscelides obtectus*.

II.2.3.2.1. Curvas Dose-Mortalidade das Amidas que Apresentaram Toxicidade a *Ascia monuste orseis*

As amidas sintéticas N-etilpiperamida [82a], N,N-dietilpiperamida [82b], N,N-diisopropilpiperamida [82d] e N-butilpiperamida [82e], além das amidas naturais piperina [65] e piperilina [80], apresentaram toxicidade para as larvas de *A. monuste orseis*, conforme mostrado na (Tabela II.4, p. 192) e foram, portanto, selecionadas para a confecção das curvas dose-mortalidade, através das quais poderão ser obtidas as DL's.

Um segundo bioensaio foi então realizado, onde várias doses foram testadas para cada amida, das quais pelo menos quatro foram selecionadas para a confecção das curvas. As doses utilizadas são apresentadas na Tabela II.2.

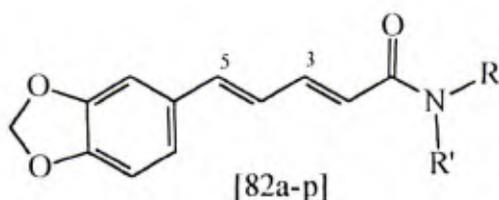
Tabela II.2 - Doses ($\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ da Larva) Utilizadas na Confecção das Curvas Dose-Mortalidade de Cada Amida para Larvas de Primeiro Ínstar de *A. monuste orseis*

Amidas	Doses ($\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ da larva)				
Piperina [65]	8,0	12,0	20,0	30,0	----
Piperilina [80]	10,0	12,0	40,0	60,0	----
N-Etilpiperamida [82a]	32,0	56,0	64,0	72,0	----
N,N-Dietilpiperamida [82b]	1,6	3,2	4,0	6,0	10,0
N,N-Diisopropilpiperamida [82d]	6,0	10,0	16,0	32,0	----
N-Butilpiperamida [82e]	30,0	48,0	64,0	80,0	----

Os valores de mortalidade obtidos para cada amida, nas respectivas doses aplicadas foram corrigidos em relação ao controle, e então, submetidos à análise de próbite para obtenção das curvas dose-mortalidade. Através destas curvas foi possível estimar as doses letais (DL's) e calcular o índice de toxicidade relativa (ITR) para as seis amidas testadas.

II.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.3.1. Síntese das Amidas [82a-p] Derivadas da Piperina [65]



Dezesseis amidas [82a-p] foram obtidas em rendimentos variáveis conforme pode ser observado na Tabela II.3 (p. 179). Estas amidas, por serem derivadas do ácido pipérico [83], foram chamadas genericamente de piperamidas.

Todas as amidas N-substituídas apresentaram dados espectroscópicos semelhantes para a parte da molécula derivada do ácido pipérico [83], diferindo apenas na parte derivada da amina. No entanto, para as amidas N,N-dissubstituídas (piperina, piperilina, N,N-dietilpiperamida e N,N-diisopropilpiperamida) foram observadas diferenças significativas, em termos de multiplicidade, dos sinais de H3 e H5 (espectro de RMN de ^1H) quando comparados aos mesmos sinais no espectro das amidas N-substituídas.

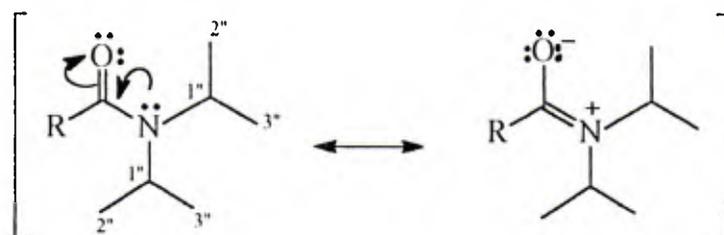
Nas amidas N-substituídas o sinal de H3 é observado como um dd, devido ao acoplamento com H4 e H2, com $J_{3-2} \cong 15$ e $J_{3-4} \cong 9,7$ Hz, respectivamente. Já nas

amidas N,N-dissubstituídas, H3 além de acoplar com H4 e H2 com valores de J semelhantes aos observados para as amidas N-substituídas, acopla também com H5, com $J_{3,5}$ variando de 2,0 a 4,3 Hz. O sinal de H3 para as amidas N,N-dissubstituídas aparece, portanto, como um duplo duplo duplo (ddd).

O sinal correspondente a H5 deveria, então, apresentar quatro linhas, constituindo um duplo duplo, já que este acopla com H4 e H3. No entanto, isto não é observado, devido à razão $\Delta\nu/J$ ser pequena (ABRAHAM *et al.*, 1988), em conseqüência, as linhas externas deste sinal não são observadas e as linhas internas aparecem mais intensas. O mesmo acontece com as linhas do sinal de H4.

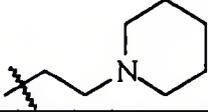
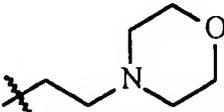
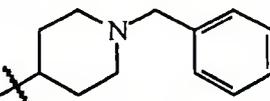
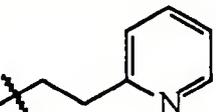
Como H4 e H5 apresentam sinais com deslocamentos químicos muito próximos e ainda superpostos ao sinal de H5', esta região do espectro tornou-se bastante complexa, dificultando a atribuição.

Nos espectros de RMH de ^{13}C a única observação importante a ser considerada é com relação ao sinal de C1'' no espectro da N,N-diisopropilpiperamida [82d]. Este sinal, é bem menos intenso do que aquele correspondente às duas metilas do grupo isopropil e, devido ao fato de estar ligado ao nitrogênio quadrupolar, aparece tão alargado que praticamente não é observado no espectro sem ampliação. Este alargamento se deve também à baixa rotação em torno da ligação entre o N e o C da carbonila, devida ao seu caráter parcial de ligação dupla (ABRAHAM *et al.*, 1988):



Como conseqüência da semelhança entre os dados espectroscópicos das piperamidas, a discussão detalhada da determinação estrutural de todas elas é muito similar. Sendo assim, será apresentada a discussão detalhada dos espectros da N-isopentilpiperamida [82h], utilizada como exemplo, para demonstrar como estes dados foram utilizados na confirmação das estruturas propostas.

Tabela II.3 - Rendimento das Amidas [82a-p] Obtidas a Partir do Ácido Pipérico [83] Proveniente da Hidrólise da Piperina [65]

Amida [82]	Substituintes		Rendimento (%)
	R	R'	
a	H	Et	60
b	Et	Et	87
c	H	<i>i</i> -Pr	40
d	<i>i</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	85
e	H	Bu	69
f	H	<i>i</i> -Bu	83
g	H	Pentil	45
h	H	<i>i</i> -Pentil	78
i	H	Hexil	80
j	H	Decil	56
k	H	Cicloexil	89
l	H	Adamantil	68
m	H		28
n	H		73
o	H		35
p	H		80

O espectro no IV (Figura II.2, p. 182) da N-isopentilpiperamida [82h] apresentou as principais absorções ($\bar{\nu}$, cm^{-1}) em: 3298 (ν N-H) e 1540 (δ_s N-H), por se tratar de uma amida N-substituída; em 3070 (ν =CH), 2960, 2880 (ν -CH), confirmando a natureza aromática e alifática; em 1642 (ν C=O), devido à amida ser conjugada; em 1604, 1500 e 1490 (ν C=C), pela presença, tanto de um anel aromático, quanto de um sistema dieno; em 1260 (ν C-O), devido ao grupo metilenodioxí e, em 990 (HC=C-H), caracterizando a presença de ligação dupla *trans*.

O espectro de RMN de ^1H (Figuras II.3a, II.3b e II.3c, p. 183 a 185) apresentou sinais em δ 7,35 (dd, $J_{3,2}=15,0$ e $J_{3,4}=9,7$ Hz, H3), 6,77 (d, $J_{5,4}=15,0$ Hz, H5), 6,65 (dd, $J_{5,4}=15,0$ e $J_{3,4}=9,7$ Hz, H4) e 5,91 (d, $J_{3,2}=15,0$ Hz, H2) que caracterizaram o sistema dieno *trans*, conjugado. O grupo metilenodioxifenil foi confirmado pelos sinais devidos aos hidrogênios aromáticos em δ 6,96 (d, $J_{2',6'}=1,6$ Hz, H2'), 6,88 (dd, $J_{6',5'}=8,0$ e $J_{6',2'}=1,6$ Hz, H6'), 6,76 (d, $J_{5',6'}=8,0$ Hz, H5') e pelo sinal em δ 5,97 (s, H7') apresentado pelos hidrogênios do grupo metilenodioxí. Estes sinais apresentaram-se de acordo com o que se esperava para a parte da molécula derivada do ácido pipérico [83].

A parte derivada da amina ficou também caracterizada pelo sinal em δ 5,62 (tl), devido ao grupo NH e pelos sinais dos hidrogênios alifáticos do grupo isopentil em δ 3,37 (td, H1''), 1,75 a 1,50 (m, H3''), 1,49 a 1,38 (m, H2''), e 0,93 (d, $J=6,5$ Hz, H4'' e H5'').

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura II.4, p.186) apresentou o sinal da carbonila (C1) em δ 166,51, de acordo com o valor previsto para uma amida (SILVERSTEIN *et al.*, 1991). Os sinais dos carbonos aromáticos quaternários C3' e C4' foram observados em δ 148,62, mais desblindados do que C1' (δ 130,92), pelo fato de estarem ligados aos oxigênios do grupo metilenodioxí. Os demais sinais dos carbonos aromáticos (C2', C5' e C6') apareceram em δ 106,13, 108,89 e 122,97, respectivamente. O sistema dieno foi caracterizado pelos sinais de CH em δ 141,26 (C3), 139,16 (C5), 125,11 (C4) e 123,69 (C2) e o grupo metileno, pelo sinal de CH_2 em δ 101,70 (C7'), valor este, de acordo com o previsto para um carbono ligado a

dois oxigênios. Os sinais dos demais carbonos alifáticos apareceram em δ 39,00 (C1''), 38,40 (C2''), 26,31 (C3'') e 22,88 (C4'' e C5''). A atribuição dos sinais aos respectivos carbonos foi ainda confirmada pelo espectro de DEPT 135 (Figura II.5, p. 187), que permitiu, por comparação, a distinção dos tipos de carbono (C, CH, CH₂ ou CH₃). Neste espectro os sinais de carbono quaternário (C) não são observados, os de CH e CH₃ apareceram em fase positiva e os de CH₂ em fase negativa.

Finalmente, os dados obtidos por EM de alta resolução (Figura II.6, p. 188) permitiram comprovar a determinação estrutural da amida, uma vez que o pico $[M+1]^+$ em $m/z=288,1594$ apresentou-se de acordo com o valor calculado (288,1521). Além disso, os demais picos em $m/z=201,0571$, 173,0603, 130,9920 e 115,0519 podem ser explicados por fragmentações características deste tipo de molécula (KIUCHI *et al.*, 1988). Estas fragmentações são apresentadas no Esquema II.2 (p. 189), onde são ilustradas as principais fragmentações de todas as piperamidas [82a-p].

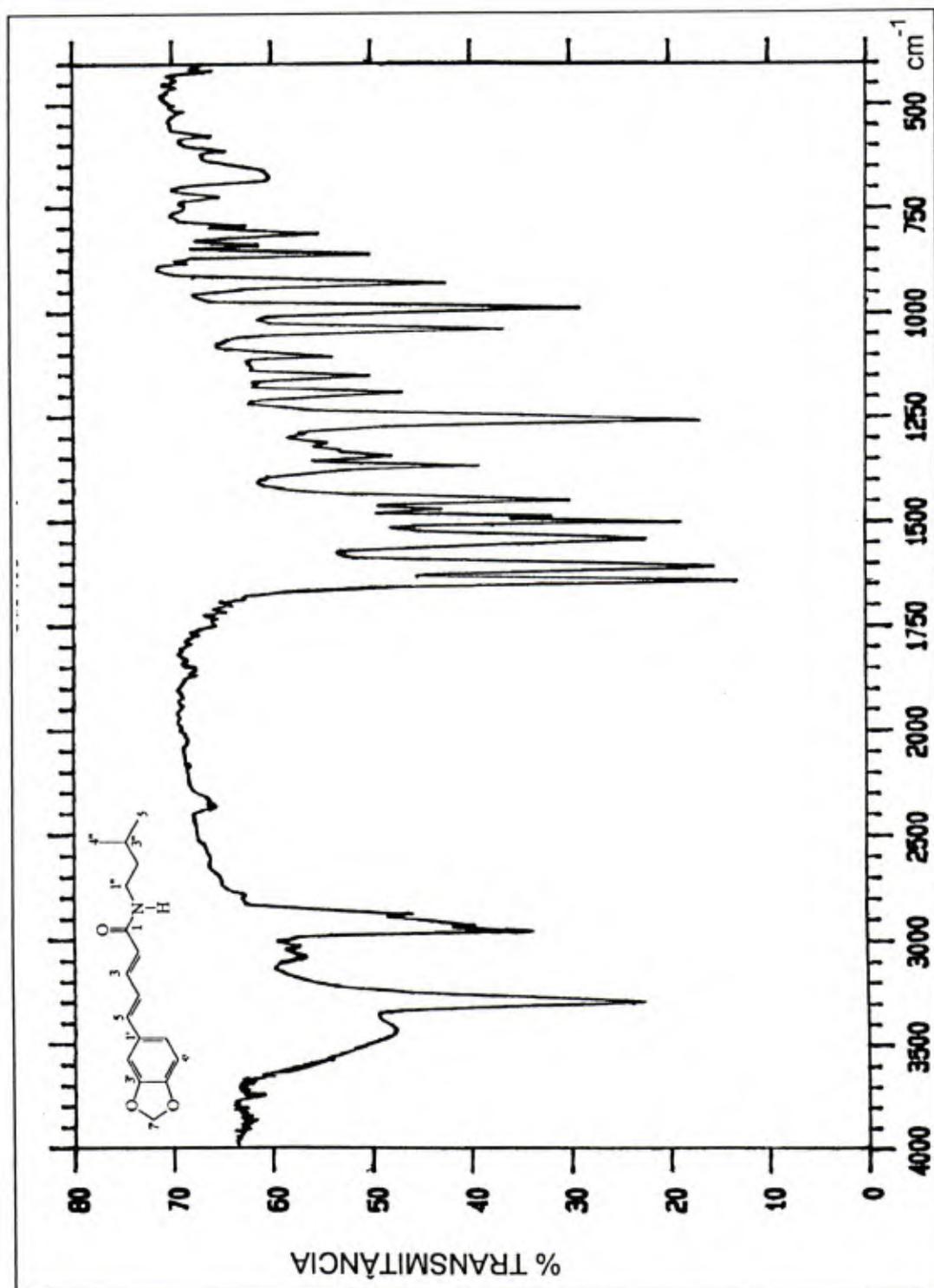


Figura II.2 - Espectro no Infravermelho (KBr) da N-isopentilpiperamida [82h].

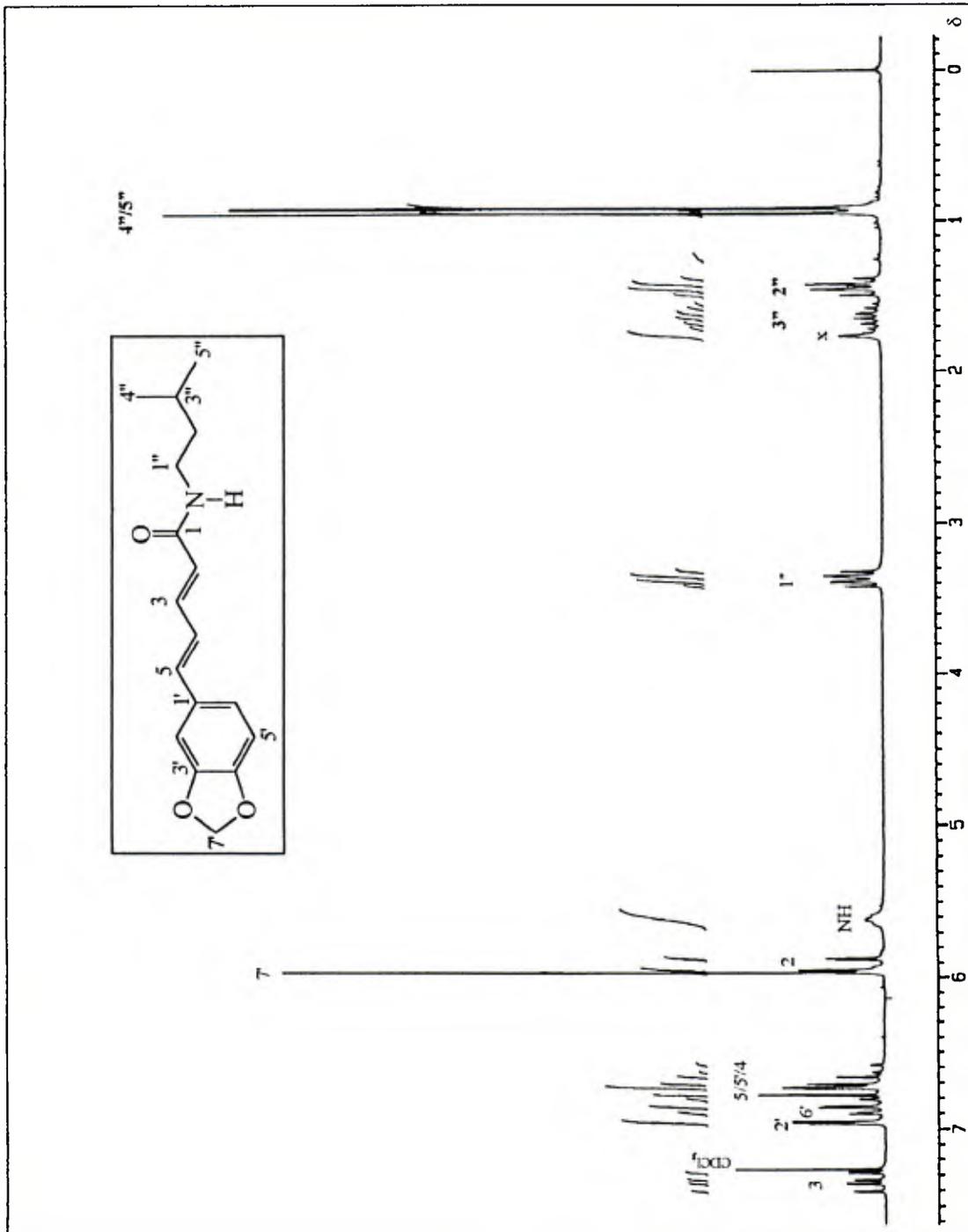


Figura II.3a - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) da N-isopentilpiperamida [82h].

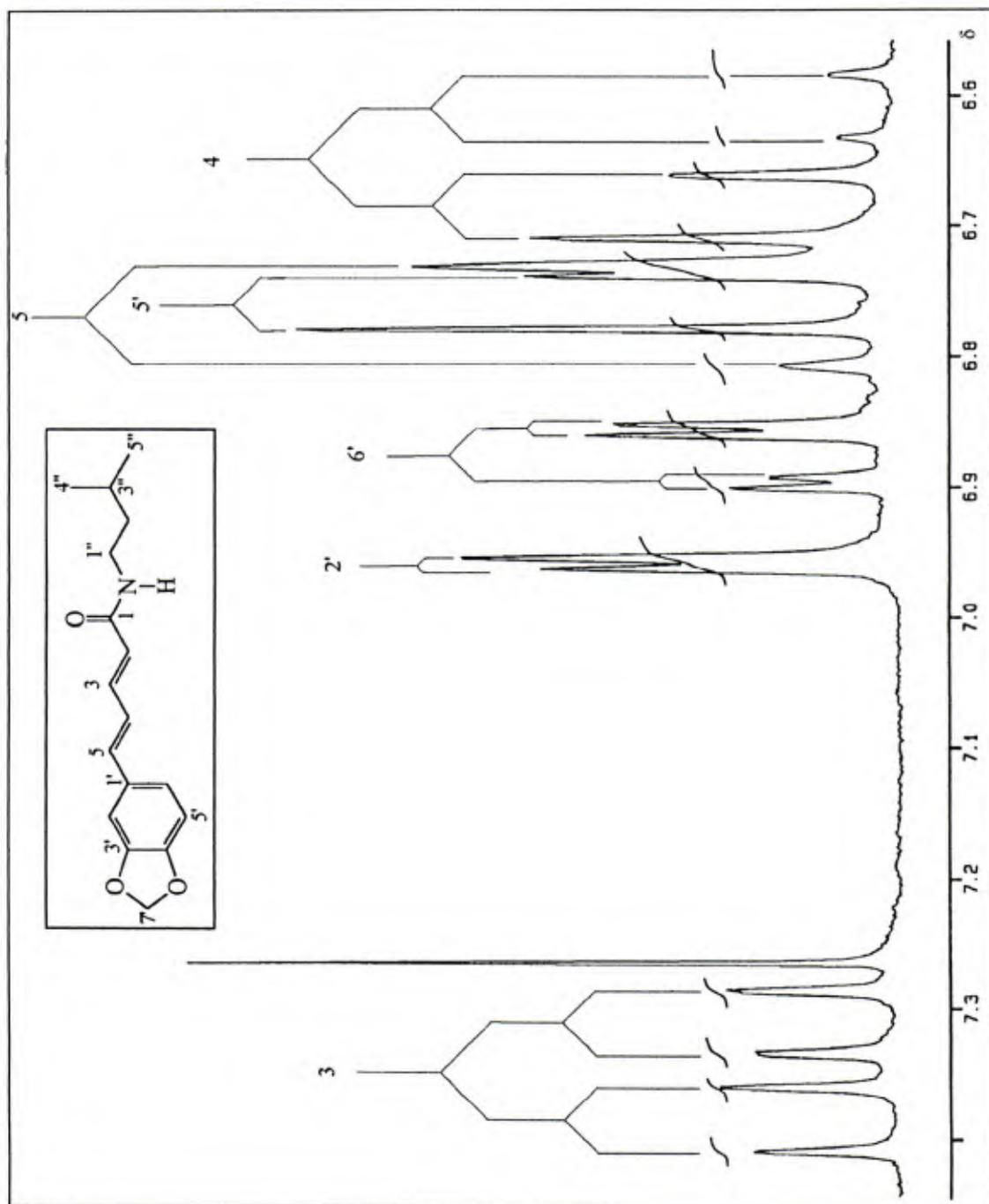


Figura II.3b - Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) da N-isopentilpiperamida [82h], com Ampliação da Região δ 6,55 a 7,45.

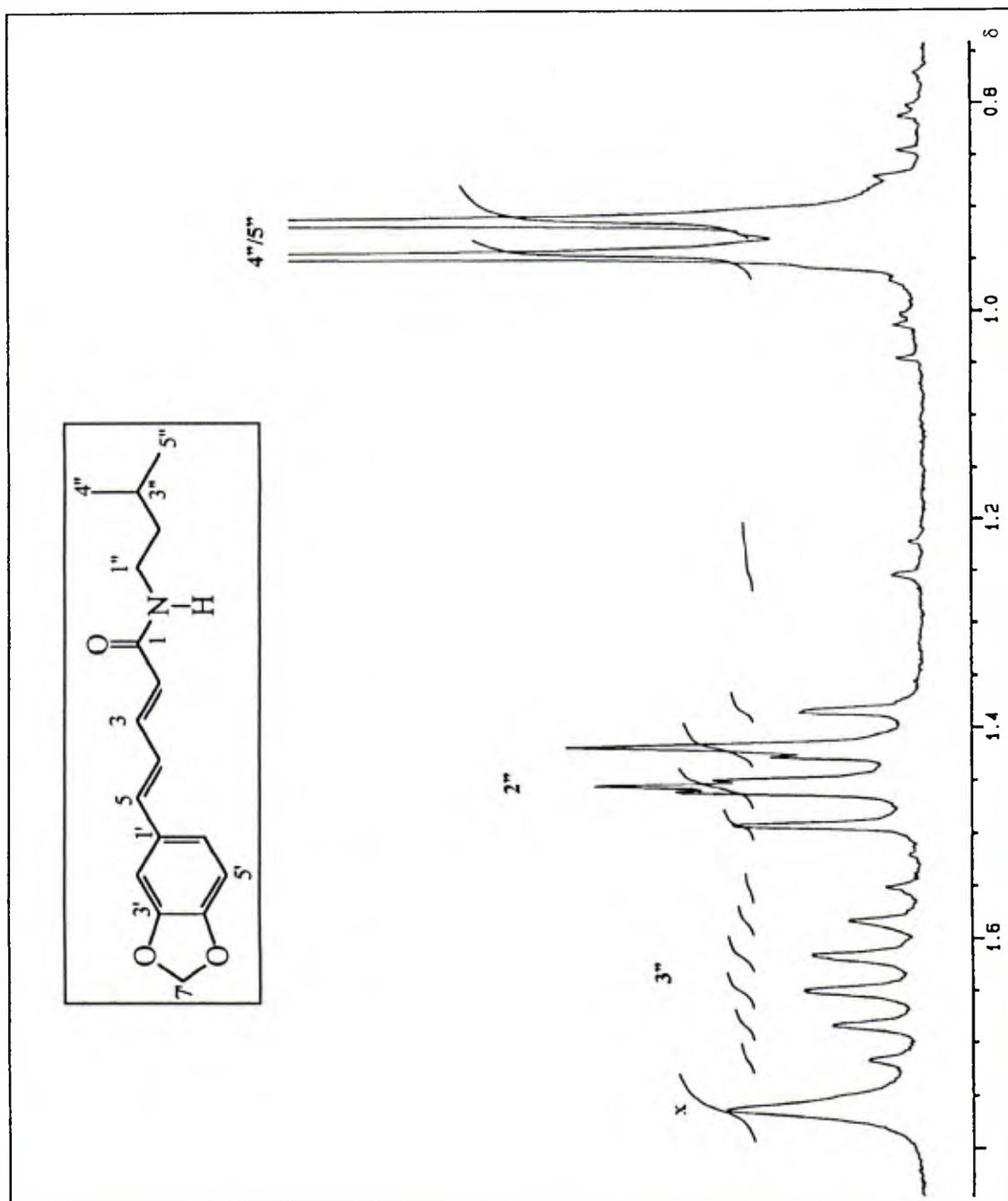


Figura II.3c - Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz) da N-isopentilpiperamida [82h], com Ampliação da Região δ 0,8 a 1,6.

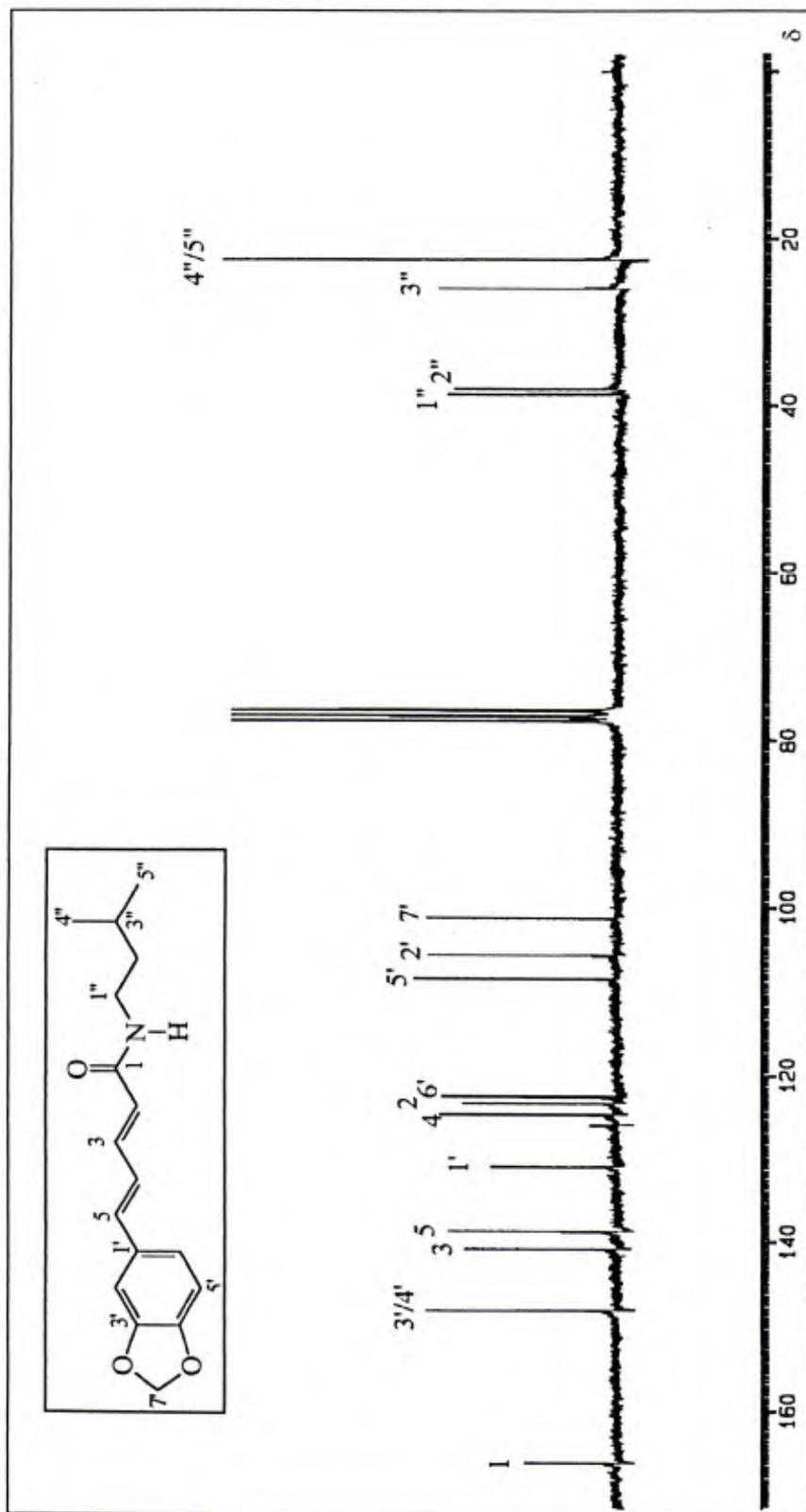


Figura II.4 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) da N-isopentilpiperamida [82h].

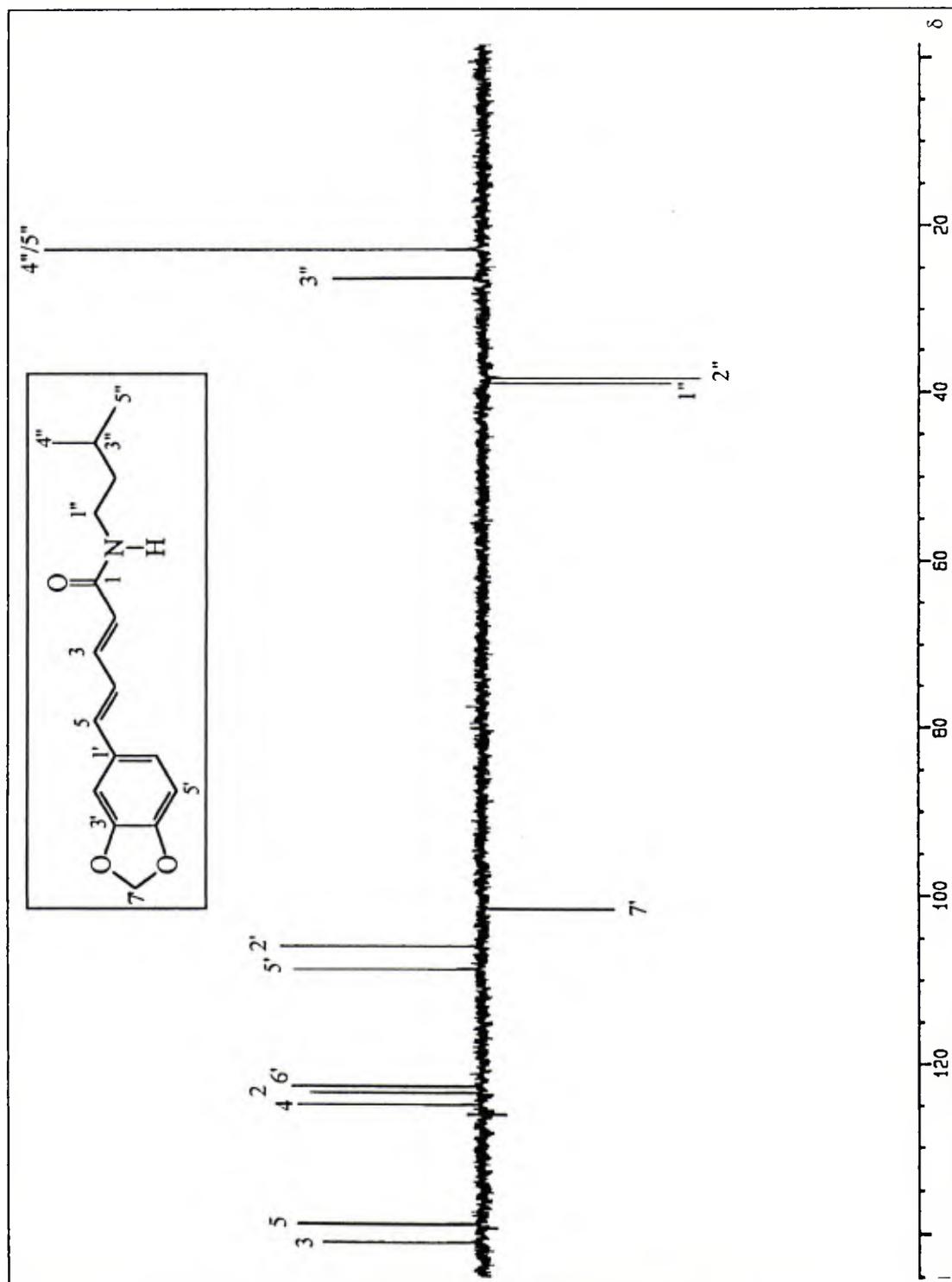
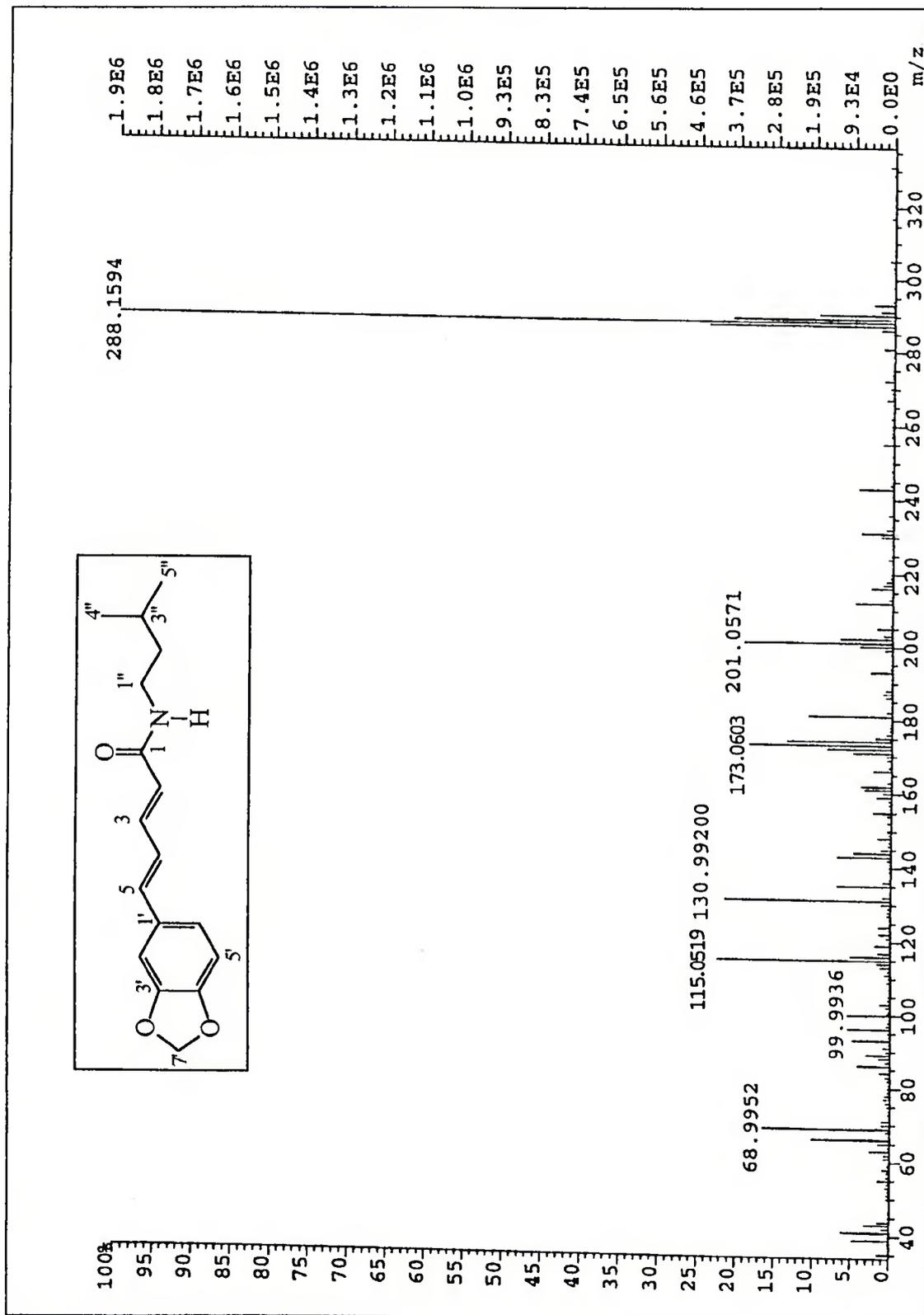
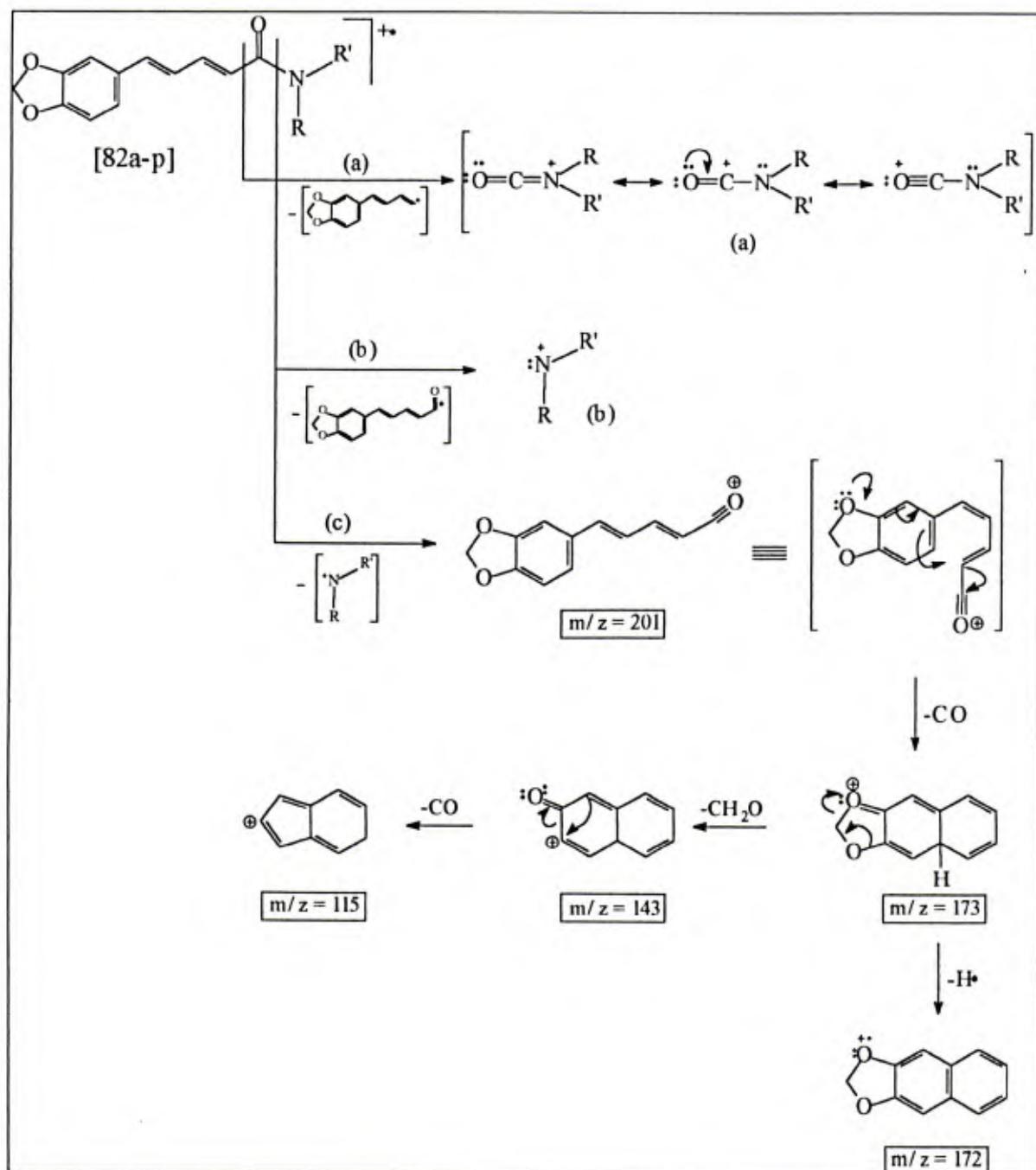


Figura II.5 - Espectro DEPT 135 (CDCl₃, 50 MHz) da N-isopentilpiperamida [82h].





Esquema II.2 - Principais Fragmentações Apresentadas Pelas Piperamidas [82a-p].

II.3.2. Ensaios Biológicos

II.3.2.1. Ensaios em Placas de Petri com Papel Impregnado com as Substâncias

Nos ensaios realizados em placas de Petri, conforme descrito no item II.2.3.1 (p. 173), com insetos das espécies *S. zeamais*, *A. obtectus*, *R. dominica*, *B. brassicae*, *C. cumulans* e *P. exigua*, nenhuma das amidas testadas, naturais (piperina [65] e piperilina [80]) ou sintéticas ([82a-p]), causaram mortalidade que as diferenciasse estatisticamente do controle.

Diante dos resultados obtidos algumas questões foram levantadas com relação à eficiência da metodologia, como tempo de exposição, e à concentração utilizada. Como os ensaios foram realizados em condições de inanição, o tempo de exposição dos insetos às substâncias não puderam ser prolongados, exceto para *S. zeamais*, *A. obtectus*, *R. dominica*, cujas mortalidades foram avaliadas após 72, 48 e 72 h de exposição, respectivamente. Devido à disponibilidade de quantidades limitadas das substâncias, não foi possível testar concentrações maiores, pois, resultaria em consumo elevado destas, impossibilitando o teste de outras metodologias, bem como a realização de testes com outras espécies de insetos.

No entanto, somente com estes dados não se pode afirmar que tais substâncias não apresentem atividade inseticida para as espécies testadas, principalmente, para *B. brassicae*, *C. cumulans* e *P. exigua*, que ficaram expostas por período de tempo curto.

II.3.2.2. Ensaios de Aplicação Tópica

Nos ensaios realizados por meio de aplicação tópica das substâncias, conforme descrito no item II.2.3.2 (p. 173), foram utilizadas cinco espécies de insetos, *A. monuste orseis*, *A. obtectus*, *B. brassicae*, *C. cumulans* e *P. exigua*, pertencentes a cinco diferentes ordens (Lepidoptera, Coleoptera, Homoptera, Isoptera e Hymenoptera, respectivamente), sendo que quatro destas espécies já

havam sido testadas pela metodologia anterior (placa de Petri). O principal objetivo foi comparar as duas metodologias e verificar, caso algumas das amidas ([65], [80] e [82a-p]) apresentassem atividade, quais espécies de insetos seriam mais sensíveis a elas.

Todas as amidas sintéticas foram testadas, na concentração de 10 mg.mL⁻¹, exceto [82j] e [82k], que não foram solúveis em acetona nesta concentração e não apresentaram atividade em concentrações menores. Foram também testadas as amidas naturais, piperina [65] e piperilina [80], isoladas da pimenta-do-reino, com o objetivo de verificar suas respectivas toxicidades, e compará-las às daquelas sintetizadas.

Os efeitos das substâncias testadas, na concentração de 10 mg.mL⁻¹, ou seja, nas doses (µg.mg⁻¹ da larva ou do inseto) de 40,0 para *A. monuste orseis*, 2,61 para *A. obtectus*, 31,25 para *B. brassicae*, 1,19 para *C. cumulans* e 2,63 para *P. exigua*, são apresentados nas Tabelas II.4, II.5, II.6, II.7 e II.8 (p. 192 a 196), respectivamente.

Tabela II.4 – Mortalidade (%) de Larvas de Primeiro Ínstar de *Ascia monuste orseis* 48 Horas Após Exposição às 16 Substâncias. A Dose Aplicada Foi $40,0 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ da Larva e as Condições Foram: $25 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, $70 \pm 5\%$ de Umidade Relativa e Fotoperíodo de 12 Horas.

Substâncias	Mortalidade (%)*
[82b]	97,50 A
[82d]	95,00 A
[65]	95,00 A
[82a]	45,00 B
[82e]	40,00 B
[80]	40,00 B
[82f]	20,00 C
[82h]	20,00 C
[82i]	15,00 C
[82m]	15,00 C
[82ℓ]	15,00 C
controle	14,29 C
[82c]	15,00 C
[82g]	7,50 C
[82o]	7,50 C
[82n]	5,00 C
[82p]	7,50 C

* As médias seguidas pela mesma letra não diferem, entre si, pelo teste de Scott – Knott a $p < 0,05$.

Tabela II.5 – Mortalidade (%) de Adultos *Acanthoscelides obtectus* 48 Horas Após Exposição às 16 Substâncias. A Dose Aplicada Foi $2,61 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ do Inseto e as Condições Foram: $25 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, $70 \pm 5 \%$ de Umidade Relativa e Fotoperíodo de 12 Horas.

Substâncias	Mortalidade (%)*
[82ℓ]	30,00 A
[82o]	25,00 A
[82d]	25,00 A
[65]	25,00 A
[82m]	25,00 A
[82p]	12,50 B
[82g]	12,50 B
[82f]	12,50 B
[82a]	12,50 B
[80]	10,00 B
[82n]	7,50 B
[82b]	10,00 B
[82e]	10,00 B
controle	9,00 B
[82h]	5,00 C
[82c]	5,00 C
[82i]	0,00 C

* As médias seguidas pela mesma letra não diferem, entre si, pelo teste de Scott – Knott a $p < 0,05$.

Tabela II.6 - Mortalidade (%) de Adultos de *Brevicoryne brassicae* 6 Horas Após Exposição às 16 Substâncias. A Dose Aplicada Foi $31,25 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ do Inseto e as Condições Foram: $25 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, $70 \pm 5\%$ de Umidade Relativa e Fotoperíodo de 12 Horas.

Substâncias	Mortalidade (%)*
[82o]	92,50 A
[82g]	82,50 A
[82i]	82,50 A
[80]	82,50 A
[82a]	75,00 A
[82c]	70,00 B
[82n]	70,00 B
[82f]	67,50 B
[82h]	65,00 B
[82m]	62,50 B
[82p]	62,50 B
[82ℓ]	55,00 B
[82d]	52,50 B
[82b]	35,00 C
[65]	30,00 C
controle	24,00 C
[82e]	7,50 D

* As médias seguidas pela mesma letra não diferem, entre si, pelo teste de Scott – Knott a $p < 0,05$.

Tabela II.7 - Mortalidade (%) de Adultos de Operárias *Cornitermes cumulans* 6 Horas Após Exposição às 16 Substâncias. A Dose Aplicada Foi $1,19 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ do Inseto e as Condições Foram: $25 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, $70 \pm 5\%$ de Umidade Relativa e Fotoperíodo de 12 Horas.

Substâncias	Mortalidade (%)*
[82d]	42,50 A
[82b]	27,50 B
[82m]	25,00 B
[80]	22,50 B
[82o]	17,50 C
[82e]	15,00 C
controle	14,00 C
[82i]	12,50 C
[82f]	12,50 C
[82ℓ]	12,50 C
[82n]	12,50 C
[82p]	12,50 C
[82g]	10,00 C
[82c]	10,00 C
[65]	7,50 C
[82h]	5,00 C
[82a]	5,00 C

* As médias seguidas pela mesma letra não diferem, entre si, pelo teste de Scott – Knott a $p < 0,05$.

Tabela II.8 - Mortalidade (%) de Adultos de *Protopolybia exigua* 12 Horas Após Exposição às 16 Substâncias. A Dose Aplicada Foi $2,63 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ do Inseto e as Condições Foram: $25 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, $70 \pm 5\%$ de Umidade Relativa e Fotoperíodo de 12 Horas.

Substâncias	Mortalidade (%)*
[82d]	45,01 A
[82ℓ]	33,19 B
[82o]	31,63 B
[82e]	27,10 B
[82g]	25,55 B
[82m]	17,79 C
[82c]	15,41 C
[80]	13,20 C
[82n]	10,99 C
[82p]	10,66 C
[82h]	9,55 C
[65]	8,60 C
[82b]	7,66 C
[82f]	5,89 C
controle	4,03 C
[82i]	3,88 C
[82a]	2,50 C

* As médias seguidas pela mesma letra não diferem, entre si, pelo teste de Scott – Knott a $p < 0,05$.

De forma geral, as espécies mais suscetíveis à ação das piperamidas foram *A. monuste* e *B. brassicae* (Tabelas II.4 a II.8, p. 192 a 196).

Somente seis amidas apresentaram atividades larvicidas para *A. monuste orseis*, quando avaliadas após 48 h de exposição. Três delas, N,N-dietilpiperamida [82b], N,N-diisopropilpiperamida [82d] e piperina [65], foram altamente tóxicas, causando mortalidade de 97,5, 95,0 e 95,0%, respectivamente. Outras três, N-etilpiperamida [82a], N-butilpiperamida [82e] e piperilina [80], apresentaram apenas médias toxicidades: 45,0, 40,0 e 40,0%, respectivamente. Estas seis amidas foram, portanto, selecionadas para a confecção de curvas mortalidade-dose, conforme será apresentado no item II.3.2.2.1 (p. 200), com o objetivo de se determinar as respectivas DL's para as larvas de primeiro instar de *A. monuste orseis*. Larvas de 2º, 3º, 4º e 5º instar foram também submetidas à este mesmo ensaio, no entanto, nenhuma das amidas apresentaram toxicidades (Tabela II.4, p. 192).

Após 48 h de exposição, somente cinco piperamidas, N-adamantilpiperamida [82ℓ], N-(1-benzilpiperidin-4-il)piperamida [82o], N,N-diisopropilpiperamida [82d], piperina [65] e N-[2-(piperidin-1-il)etil]piperamida [82m], apresentaram efeito inseticida para *A. obtectus*. Entretanto, as mortalidades causadas por estas substâncias foram baixas (30,0, 25,0, 25,0, 25,0 e 25,0%, respectivamente). A baixa toxicidade destas substâncias, possivelmente esteja associada aos fatos das dosagens empregadas e o tempo de exposição terem sido baixos. Já as demais amidas não se diferenciaram estatisticamente do controle (Tabela II.5, p. 193).

Dois fatores devem, portanto, ser considerados neste caso. Um deles é que, a massa média de cada inseto da espécie *A. obtectus* foi cerca de quinze vezes maior do que aquela das larvas de *A. monuste orseis*. Consequentemente, a dose aplicada em *A. obtectus* foi cerca de quinze vezes menor, o que poderia justificar a menor toxicidade apresentada pelas amidas. Porém, o segundo fator a ser considerado é que tratam-se de espécies de ordens diferentes, as quais, geralmente, possuem suscetibilidades diferentes a uma mesma substância.

Das dezesseis amidas testadas pelo menos treze apresentaram toxicidade, com 6 h de exposição, a *B. brassicae*. Cinco delas, N-(1-benzilpiperidin-4-

il)piperamida [82o], N-pentilpiperamida [82g], N-hexilpiperamida [82i], piperilina [80] e N-etilpiperamida [82a], foram altamente tóxicas, causando 92,5, 82,5, 82,5, 82,5 e 75,0% de mortalidade, respectivamente. As outras oito, N-isopropilpiperamida [82c], N-[2-(morfolin-4-il)etil]piperamida [82n], N-isobutilpiperamida [82f], N-isopentilpiperamida [82h], N-[2-(piperidin-1-il)etil]piperamida [82m], N-[2-(piridin-2-il)etil]piperamida [82p], N-adamantilpiperamida [82ℓ] e N,N-diisopropilpiperamida [82d], apresentaram toxicidades que variaram de 70,0 a 52,5% (Tabela II.6, p. 194).

Pelo fato de grande variedade das amidas testadas terem apresentado toxicidade a *B. brassicae*, fica difícil fazer qualquer tipo de correlação com relação à estrutura e atividade inseticida destas a esta espécie.

Após 6 h de exposição a N,N-diisopropilpiperamida [82d] apresentou a maior toxicidade a *C. cumulans*, seguida pela N,N-dietilpiperamida [82b], N-[2-(piperidin-1-il)etil]piperamida [82m] e piperilina [80]. Entretanto, as mortalidades causadas por estas substâncias foram baixas (42,5, 27,5, 25,0 e 22,5%, respectivamente) (Tabela II.7, p. 195). Este resultado pode ter sido uma consequência da baixa dosagem aplicada ($1,19 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ do inseto) comparada com aquelas para *A. monuste orseis* e *B. brassicae* ($40,0$ e $31,25 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ da larva ou inseto, respectivamente). Além disso, com um tempo de exposição maior do que 6 h, com inanição, a mortalidade no controle foi relativamente alta, o que impossibilitou verificar se o tempo de 6 h era suficiente para as substâncias apresentarem atividade inseticida mais acentuada.

Para *P. exigua* a N,N-diisopropilpiperamida [82d] apresentou toxicidade média (45,01% de mortalidade) e as piperamidas N-adamantilpiperamida [82ℓ], N-(1-benzilpiperidin-4-il)piperamida [82o], N-butilpiperamida [82e] e N-pentilpiperamida [82g] apresentaram toxicidades relativamente baixas, de 33,19, 31,63, 27,10 e 25,55% de mortalidade, respectivamente. As demais amidas testadas não diferenciaram estatisticamente do controle (Tabela II.8, p. 196). Também neste caso, a baixa toxicidade pode ser consequência tanto da baixa dosagem ($2,63 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ do inseto) aplicada, quanto do curto tempo de exposição (12 h).

Apesar deste ensaio não ter sido realizado em condições de inanição, a mortalidade observada no controle, com tempos de exposição maiores do que 12 h, foi alta, impossibilitando trabalhar com esta variável.

De todas as espécies testadas, somente para *A. monuste orseis* foi possível fazer certa correlação entre as estruturas das amidas que apresentaram atividade larvicida. As amidas que foram altamente tóxicas foram as N,N-dissubstituídas (N,N-dietilpiperamida, N,N-diisopropilpiperamida e piperina). A única exceção neste caso, foi a piperilina que, apesar de ser N,N-dissubstituída, apresentou atividade larvicida apenas moderada. Verificou-se ainda que as demais amidas que apresentaram toxicidade moderada para esta espécie foram amidas N-substituídas, com grupos alquila de cadeia curta, não ramificada (N-etilpiperamida e N-butilpiperamida). As amidas N-substituídas com grupos alquila de mesmo número de átomos de carbono, porém de cadeia ramificada (N-isopropilpiperamida e N-isobutilpiperamida) já não apresentaram atividade. Para verificar a consistência destes resultados seria interessante que outras piperamidas, tais como a N-metilpiperamida, N,N-dimetilpiperamida, a própria piperamida não substituída, além de outras N,N-dissubstituídas, fossem sintetizadas e testadas para esta espécie.

Apesar da literatura (MIYAKADO *et al.*, 1985; ELLIOT *et al.*, 1987a) citar que a maioria das substâncias ativas seja do tipo isobutilamidas, isto não foi observado neste trabalho. A N-isobutilpiperamida apresentou atividade somente para *B. brassicae* que foi uma espécie sensível à maioria das piperamidas.

Embora muitos trabalhos (SU, 1977; SCOTT & McKIBBEN, 1978; SU & HORVAT, 1981; MIYAKADO *et al.*, 1989; FLORES *et al.*, 1993) relatem a atividade inseticida de extratos de pimenta-do-reino para pragas de grãos armazenados, entre elas *A. obtectus*, as piperamidas testadas não apresentaram atividade significativa para estes insetos. Pode ser que a concentração testada não tenha sido suficiente para causar a mortalidade, ou ainda, que as amidas responsáveis pela atividade do extrato da pimenta sejam estruturalmente diferentes das piperamidas testadas. Além disso, é importante ressaltar que a maioria dos

ensaios realizados com os extratos foi por tratamento dos grãos (ingestão) e não por aplicação tópica (contato), como realizado neste trabalho.

II.3.2.2.1. Curvas Dose-Mortalidade das Amidas que Apresentaram Toxicidade a *A. monuste orseis*

As curvas dose-mortalidade obtidas para as amidas N-etilpiperamida [82a], N,N-dietilpiperamida [82b], N,N-diisopropilpiperamida [82d], N-butilpiperamida [82e], piperina [65] e piperilina [80], que apresentaram toxicidade para *A. monuste orseis* (Tabela II.4, p. 192) são apresentadas na Figura II.7.

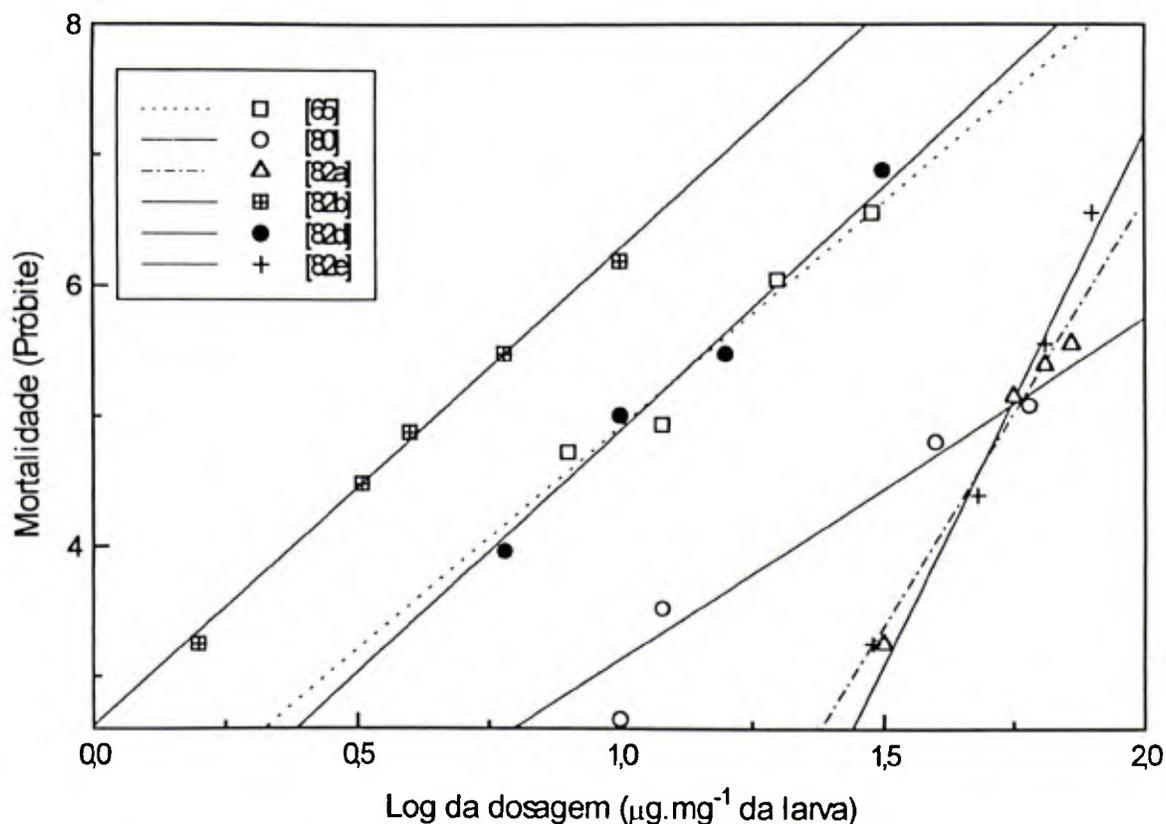


Figura II.7 - Curvas Dose ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ da Larva) vs Mortalidade (Próbite) de *Ascia monuste orseis* para Seis Amidas ([65], [80], [82a], [82b], [82d] e [82e]) Testadas.

As equações linearizadas das curvas apresentadas na Figura II.7 (p. 200), para cada amida, são apresentadas na Tabela II.9, juntamente com os respectivos valores de probabilidade e de Qui-quadrado.

Tabela II.9 - Equações de Regressão das Curvas Dose ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ da Larva) vs Mortalidade para Lagartas de Primeiro Ínstar Larval de *Ascia monuste orseis*

Amida	Equação*	Qui-quadrado	Probabilidade
piperina [65]	$y = 1,50 + 3,42x$	5,52	0,06
piperilina [80]	$y = 0,51 + 2,62x$	3,36	0,18
N-etilpiperamida [82a]	$y = -6,44 + 6,55x$	3,79	0,15
N,N-dietilpiperamida [82b]	$y = 2,62 + 3,66x$	0,64	0,89
N,N-diisopropilpiperamida [82d]	$y = 1,17 + 3,72x$	3,36	0,18
N-butilpiperamida [82e]	$y = -9,19 + 8,18x$	4,90	0,08

* y = mortalidade (próbite)

x = logaritmo da dose (μg da amida/ mg da larva)

Os coeficientes angulares são importantes para se prever o aumento ou a queda da toxicidade de determinada substância (ATKINS *et al.*, 1973). Valores altos de inclinação indicam que pequenas variações na dosagem da substância ativa levaria a grandes variações na taxa de mortalidade da larva, ou seja, resultaria numa resposta homogênea da população a esta substância. Por outro lado, para valores baixos de inclinação, mesmo com grandes variações na dosagem da substância ativa ocorreriam pequenas variações na taxa de mortalidade, ou seja, a população responderia a esta de forma heterogênea.

A curva dose-mortalidade obtida para N-butilpiperamida [82e] foi a que apresentou o maior coeficiente angular (8,18), significando que as larvas de

A curva dose-mortalidade que apresentou menor coeficiente angular (2,62) foi a da piperilina [80], revelando que esta mesma população responde de forma heterotogênea a esta amida, quando comparada com as demais.

A resposta homogênea de determinada população de insetos a uma substância ativa, muitas vezes, apresenta desvantagens, como por exemplo, se considerarmos que um pequeno decréscimo na dosagem recomendada implicará em considerável redução da mortalidade, prejudicando assim o controle. Por outro lado, o aumento da dosagem resultará na perda da substância, pois, doses bem menores já teriam sido suficientes para se fazer o controle da população suscetível. Deve-se ainda ser considerado que com a resposta homogênea da população à substância ativa, rapidamente os indivíduos suscetíveis seriam eliminados, resultando na seleção dos indivíduos resistentes, que provavelmente passariam este carácter para futuras gerações.

Quando uma população de insetos suscetíveis responde heterogeneamente à uma substância, como as larvas de *A. monuste orseis* expostas à piperilina [80], existe maior confiabilidade na dosagem aplicada, pois, somente não ocorreria o controle desejado se esta fosse muitas vezes menor do que a dose recomendada. Dosagens bem maiores do que a recomendada também não levariam à eliminação de uma população maior deste mesmo inseto mas, no entanto, poderiam afetar outras espécies.

Através das curvas dose-mortalidade foi também possível estimar as doses letais (DL's) e seus respectivos intervalos de confiança, para cada amida. Estes valores encontram-se na Tabela II.10 (p. 203).

Tabela II.10 - Doses Letais (DL's/ $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ da larva) e Respective Intervalos de Confiança das Amidas Testadas para Larvas de Primeiro Íntar de *Ascia monuste orseis*

Amidas	Doses Letais (DL's/ $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ da larva)		
	50	90	95
[65]	10,57 9,37-11,66	25,02 21,79-30,39	31,89 26,84-40,95
[80]	51,58 44,60-61,86	158,82 118,85-243,38	217,91 155,15-361,06
[82a]	55,68 52,87-58,46	87,30 80,35-98,29	99,06 89,50-114,88
[82b]	4,48 4,13-4,87	10,03 8,74-12,03	12,58 10,67-15,70
[82d]	10,75 9,79-11,76	23,76 20,68-28,63	29,69 25,13-37,33
[82e]	53,87 51,41-56,29	77,25 72,65-83,70	85,49 79,48-94,28

Por meio das DL's obtidas para cada amida foi possível determinar os seus respectivos índices de toxicidade relativa (ITR), que são apresentados na Tabela II.11. O valor de ITR para cada uma foi obtido pela razão da maior DL, ou seja, da DL da amida menos tóxica, pela DL da respectiva amida.

Tabela II.11 - Índices de Toxicidade Relativa (ITR) de Cada Amida para Larvas de Primeiro Íntar de *Ascia monuste orseis*

Amidas	Índices de Toxicidade Relativa (ITR)		
	50	90	95
[65]	5,27	6,35	6,83
[80]	1,08	1	1
[82a]	1	1,82	2,20
[82b]	12,42	15,83	17,32
[82d]	5,18	6,69	7,34
[82e]	1,03	2,06	2,55

O valor de ITR indica quantas vezes uma substância é mais potente do que a outra. Pode-se verificar pela Tabela II.11 (p. 203) que os valores de ITR foram significativamente distintos, dependendo da DL considerada. Considerando as DL₉₀ e DL₉₅, observa-se que a piperilina [80] foi a menos tóxica das seis amidas e, portanto, sua ITR foi igual a 1. No entanto, se for considerada a DL₅₀, verifica-se que a amida N-etilpiperamida [82a] foi a menos tóxica (ITR=1).

A Figura II.8 apresenta as curvas de ITR em função da mortalidade (%), obtidas para cada uma das seis amidas. Para avaliar a eficácia de cada amida serão considerados os valores de ITR obtidos na DL₅₀.

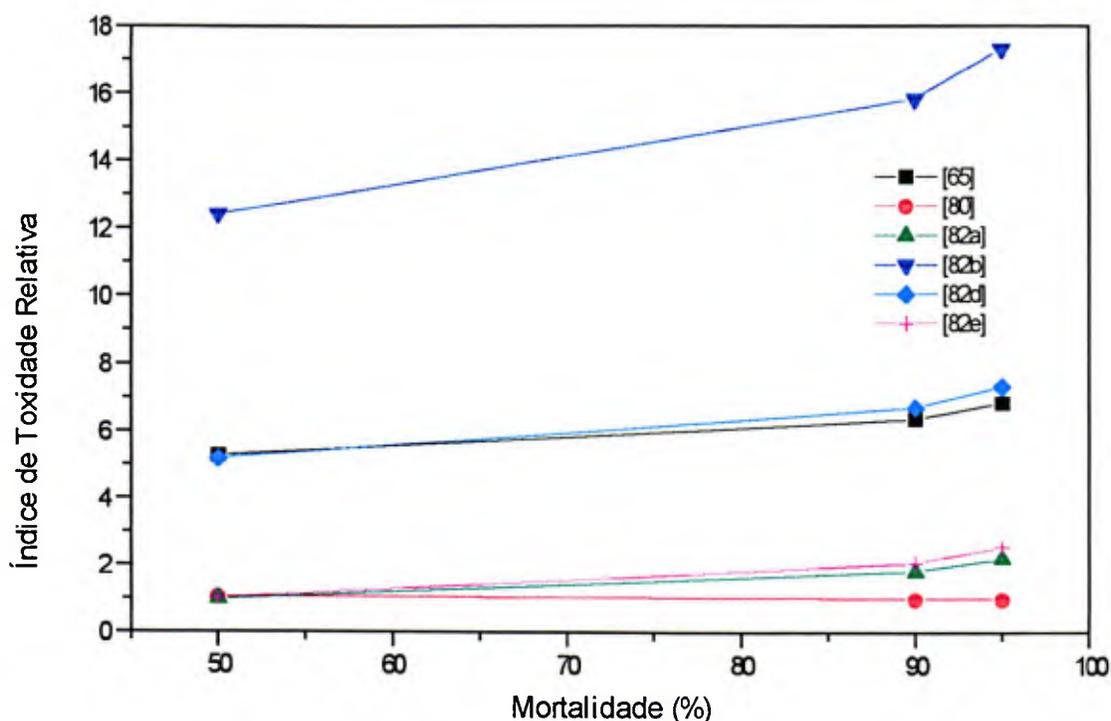


Figura II.8 - Índices de Toxicidade Relativa (ITR) para as Seis Amidas ([65], [80], [82a], [82b], [82d] e [82e]) Testadas em Função da Mortalidade de *A. monuste orseis*.

Conforme pode ser observado na Tabela II.11 (p. 203), para causar a mortalidade de 50% das larvas de *A. monuste orseis*, a N,N-dietilpiperamida [82b] mostrou-se 2,4 vezes mais eficiente do que a piperina [65], enquanto a N,N-diisopropilpiperamida [82d] apresentou aproximadamente a mesma eficiência desta. A N-etilpiperamida [82a] e a N-butilpiperamida [82e] apresentaram a mesma eficiência da piperilina [80]. No entanto, foram 5,3 e 5,1 vezes, respectivamente, menos eficientes do que a piperina [65]. Estes resultados também podem ser observados na Figura II.8 (p. 204), onde verifica-se que todas as amidas, exceto a piperilina [80], apresentaram-se mais eficientes para causar a mortalidade de 90 e 95% das larvas do que para causar a mortalidade de 50%.

Em síntese, para causar uma mortalidade de 50 a 95% das larvas, a piperilina [80] apresentou eficiência decrescente, enquanto as demais amidas apresentaram eficiência crescente.

II.4. CONCLUSÃO

Este trabalho propiciou a síntese de dezesseis amidas derivadas da piperina, sendo que para oito delas não se encontra nenhuma referência na literatura consultada. Os testes biológicos realizados com estas amidas apresentaram resultados interessantes. Observou-se que não houve correlação entre as estruturas das amidas e a toxicidade apresentada para as diversas espécies de insetos, exceto para *A. monuste orseis*.

Para *A. monuste orseis* as amidas mais tóxicas, em ordem decrescente, foram N,N-dietilpiperamida [82b], N,N-diisopropilpiperamida [82d], piperina [65], N-etilpiperamida [82a], N-butilpiperamida [82e] e piperilina [80].

Para *A. obtectus*, as amidas que apresentaram toxicidades, relativamente baixas, foram N-adamantilpiperamida [82ℓ], N-(1-benzilpiperidin-4-il)piperamida [82o], N,N-diisopropilpiperamida [82d], piperina [65] e N-[2-(piperidin-1-il)etil]piperamida [82m]. A amida mais tóxica para *A. obtectus* apresentou toxicidade menor (30,0% de mortalidade) do que a da amida menos tóxica para *A. monuste orseis* (40,0% de mortalidade).

Para *B. brassicae* a maioria das amidas foi tóxica. Assim, N-(1-benzilpiperidin-4-il)piperamida [82o], N-pentilpiperamida [82g], N-hexilpiperamida [82i], piperilina [80] e N-etilpiperamida [82a] foram altamente tóxicas, enquanto N-isopropilpiperamida [82c], N-[2-(morfolin-4-il)etil]piperamida [82n], N-isobutilpiperamida [82f], N-isopentilpiperamida [82h], N-[2-(piperidin-1-il)etil]piperamida [82m], N-[2-(piridin-2-il)etil]piperamida [82p], N-adamantilpiperamida [82ℓ] e N,N-diisopropilpiperamida [82d] apresentaram toxicidades que variaram de 70,0 a 52,5%. Mesmo com a grande

variedade de amidas que apresentaram atividade inseticida para *B. brassicae* não foi possível fazer qualquer tipo de correlação com aquelas que foram tóxicas para as duas espécies anteriores, pois pelo menos três ([82b], [65] e [82e]) das seis amidas que foram tóxicas para *A. monuste orseis* foram as únicas que não apresentaram toxicidade para *B. brassicae*.

Para *C. cumulans*, a N,N-diisopropilpiperamida [82d] apresentou toxicidade média, enquanto, N,N-dietilpiperamida [82b], N-[2-(piperidin-1-il)etil]piperamida [82m] e piperilina [80] apresentaram toxicidades relativamente baixas.

Para *P. exigua*, a N,N-diisopropilpiperamida [82d] apresentou toxicidade média, no entanto, as piperamidas N-adamantilpiperamida [82ℓ], N-(1-benzilpiperidin-4-il)piperamida [82o], N-butilpiperamida [82e] e N-pentilpiperamida [82g] apresentaram toxicidades baixas.

De maneira geral, pode-se verificar que, das dezesseis amidas naturais e sintéticas, somente a N,N-diisopropilpiperamida [82d] apresentou toxicidade para as cinco espécies testadas. Ela foi a mais tóxica para *C. cumulans* e *P. exigua*, a segunda mais tóxica para *A. monuste orseis* e *A. obtectus* e, no entanto, foi uma das menos tóxicas para *B. brassicae*, que foi a espécie mais sensível à maioria das demais amidas testadas.

O fato de algumas espécies terem sido mais sensíveis às amidas, como verificado para *A. monuste orseis* e *B. brassicae*, pode estar relacionado tanto com a dosagem aplicada quanto com a suscetibilidade destes insetos a estas substâncias. No entanto, como essas espécies foram as que receberam as maiores doses de cada substância (40,0 e 31,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ da larva ou do inseto, respectivamente), parece mais provável que a maior mortalidade observada para cada uma delas, quando comparadas com as outras espécies, seja devido às maiores doses aplicadas. Entretanto, pode-se ter a indicação de certa seletividade de ação de determinada amida, dependendo do inseto estudado.

Os resultados obtidos neste estudo apontam para uma necessidade de obtenção de um maior número de derivados relacionados às substâncias utilizadas para avaliação da atividade nas diferentes espécies de insetos.

II.5. BIBLIOGRAFIA

- ABRAHAM, R.J.; FISHER, J.; LOFTUS, P. **Introduction to NMR spectroscopy**. John Wiley & Sons, Chichester, 1988. 271 p.
- AHN, J-W.; AHN, M-J.; ZEE, O-P.; KIM, E-J., LEE, S-G.; KIM, H.J.; KUBO, I. Piperine alkaloids from *Piper retrofractum* fruits. **Phytochemistry**, **31**(10): 3609-3612, 1992.
- ATKINS, E.L.; GERYWOOD, E.A.; McDONALD, R.L. **Toxicity of pesticides and other agricultural chemicals to honey bees. Laboratory Studies**. California, University of California, 1973. 36 p.
- BLADE, R.J. Some aspects of synthesis and structure-activity in insecticidal lipid amides. P. 151-169. In: **Recent advances in the chemistry of insect control II**, 1990.
- BREITMAIER, E. **Structure elucidation by NMR in organic chemistry**. John Wiley & Sons, Chichester, 1993. 265 p.
- CASEY, M.; LEONARD, J.; LYGO, B.; PROCTER, G. **Advanced practical organic chemistry**. New York, Chapman & Hall, 1990, 264p.
- ELLIOTT, M. FARNHAM, A.W.; JANES, N.F.; JOHNSON, D.M.; PULMAN, D.A.; SAWICKI, R.M. Insecticidal amides with selective potency against a resistant (*super-kdr*) strain of houseflies (*Musca domestica* L.). **Agric. Biol. Chem.**, **50**(5): 1347-1349, 1986.
- ELLIOTT, M. FARNHAM, A.W.; JANES, N.F.; JOHNSON, D.M.; PULMAN, D.A. Synthesis and insecticidal activity of lipophilic amides. Part 1: Introductory

- survey, and discovery of an active synthetic compound. **Pestic. Sci.**, **18**: 191-201, 1987a.
- ELLIOTT, M. FARNHAM, A.W.; JANES, N.F.; JOHNSON, D.M.; PULMAN, D.A. Synthesis and insecticidal activity of lipophilic amides. Part 4: The effect of substituents on the phenyl group of 6-phenylhexa-2,4-dienamides. **Pestic. Sci.**, **18**: 223-228, 1987b.
- ELLIOTT, M. FARNHAM, A.W.; JANES, N.F.; JOHNSON, D.M.; PULMAN, D.A. Synthesis and insecticidal activity of lipophilic amides. Part 5: Influence on activity of varying the substituent on nitrogen. **Pestic. Sci.**, **18**: 229-238, 1987c.
- ELLIOTT, M. FARNHAM, A.W.; JANES, N.F.; JOHNSON, D.M.; PULMAN, D.A. Synthesis and insecticidal activity of lipophilic amides. Part 6: 6-(disubstituted-phenyl)hexa-2,4-dienamides. **Pestic. Sci.**, **18**: 239-244, 1987d.
- FLORES, W.L.; SAMPAIO, L.S.V.; MARQUES, O.M.; COSTA, J.A. Efeito dos extratos de pimenta do reino e cinamomo e do malation no controle do caruncho *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) armazenadas. **Insecta**, **2**(1): 11-22, 1993.
- GBEWONYO, W.S.K.; CANDY, D.J.; ANDERSON, M. Structure-activity of insecticidal amides from *Piper guineense* root. **Pestic. Sci.**, **37**: 57-66, 1993.
- IKAN, R. **Natural products: a laboratory guide**. 2. Ed. San Diego, Academic Press, 1991, 360 p.
- KIUCHI, F.; NAKAMURA, N.; TSUDA, Y.; KONDO, K.; YOSHIMURA, H. Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans. IV. Isolation and identification of larvicidal principles in pepper. **Chem. Pharm. Bull.**, **36**(7): 2452-2465, 1988.
- MIYAKADO, M., NAKAYAMA, I.; INOUE, M.; HATAKOSHI, M.; OHNO, N. The Piperaceae amides. 6. Chemistry and insecticidal activities of Piperaceae amides and their synthetic analogs. **J. Pestic. Sci.**, **10**(1): 11-17, 1985.
- MIYAKADO, M. NAKAYAMA, I.; OHNO, N. Insecticidal unsaturated isobutylamides. In: ARNASON, J.T.; PHILOGÉNE, B.J.R.; MORAD, P. (eds). **Insecticidas of plant origin**. ACS Symposium Series; 387. New York, Maple Press, 1989, p. 173-187.
- PARMAR, V.S. *et al.* Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, **46**(4): 597-673, 1997.

- PERRIM, D.D; ARMAREGO, W.L.F. **Purification of laboratory chemicals**. 3. ed. Oxford: Pergation, 1988. 340 p.
- SCOTT, W.P. & McKIBBEN, G.H. Toxicity of black pepper extract to boll weevils. **J. Econ. Entomol.**, **71**(2): 343-344, 1978.
- SILVERSTEIN, R.M.; BRASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. **Spectrometric identification of organic compounds**. 5. Ed. New York, John Wiley & Sons, 1991, 420 p.
- SLOOP, J.C. Microscale synthesis of the natural products carpanone and piperine. **J. Chem. Educ.**, **72**(2): A25-A28, 1995.
- SU, H.C.F. Insecticidal properties of black pepper to rice weevils and cowpea weevils. **J. Econ. Entomol.**, **70**(1): 18-21, 1977.
- SU, H.C.F. & HORVAT, R. Isolation, identification, and insecticidal properties of *Piper nigrum* amides. **J. Agric. Food Chem.**, **29**, 115-118, 1981.
- SYNERHOLM, M.E.; HARTZELL, A.; ARTHUR, J.M. Derivatives of piperic acid and their toxicities toward houseflies. **Contributions from Boyce Thompson Institute**, **13**: 433-442, 1945.

CONCLUSÃO GERAL

Apesar das substâncias isoladas do caule e casca de *Ochroma lagopus* não terem apresentado atividade inseticida para as várias espécies testadas, este estudo foi de grande contribuição científica, uma vez que a constituição química desta planta era praticamente desconhecida. Assim, o isolamento e identificação de seus microconstituintes químicos serviram para ampliar o número de substâncias naturais conhecidas, isoladas de plantas, pois, das dezesseis substâncias relatadas neste trabalho, nove são inéditas.

A obtenção de uma série de amidas análogas à piperina foi também de grande importância, não só no desenvolvimento da metodologia usada nos ensaios biológicos, de maneira geral, como também, como padrão de comparação para as substâncias isoladas de *O. lagopus*. Dessa forma, este trabalho também contribuiu na ampliação de modelos estruturais para verificar a relação entre a estrutura e a atividade inseticida desta classe de substâncias. Embora alguns resultados interessantes tenham sido obtidos, seria importante que outras amidas fossem sintetizadas e submetidas a testes biológicos para que possam ser obtidos dados mais conclusivos sobre este tema de pesquisa.

APÊNDICE

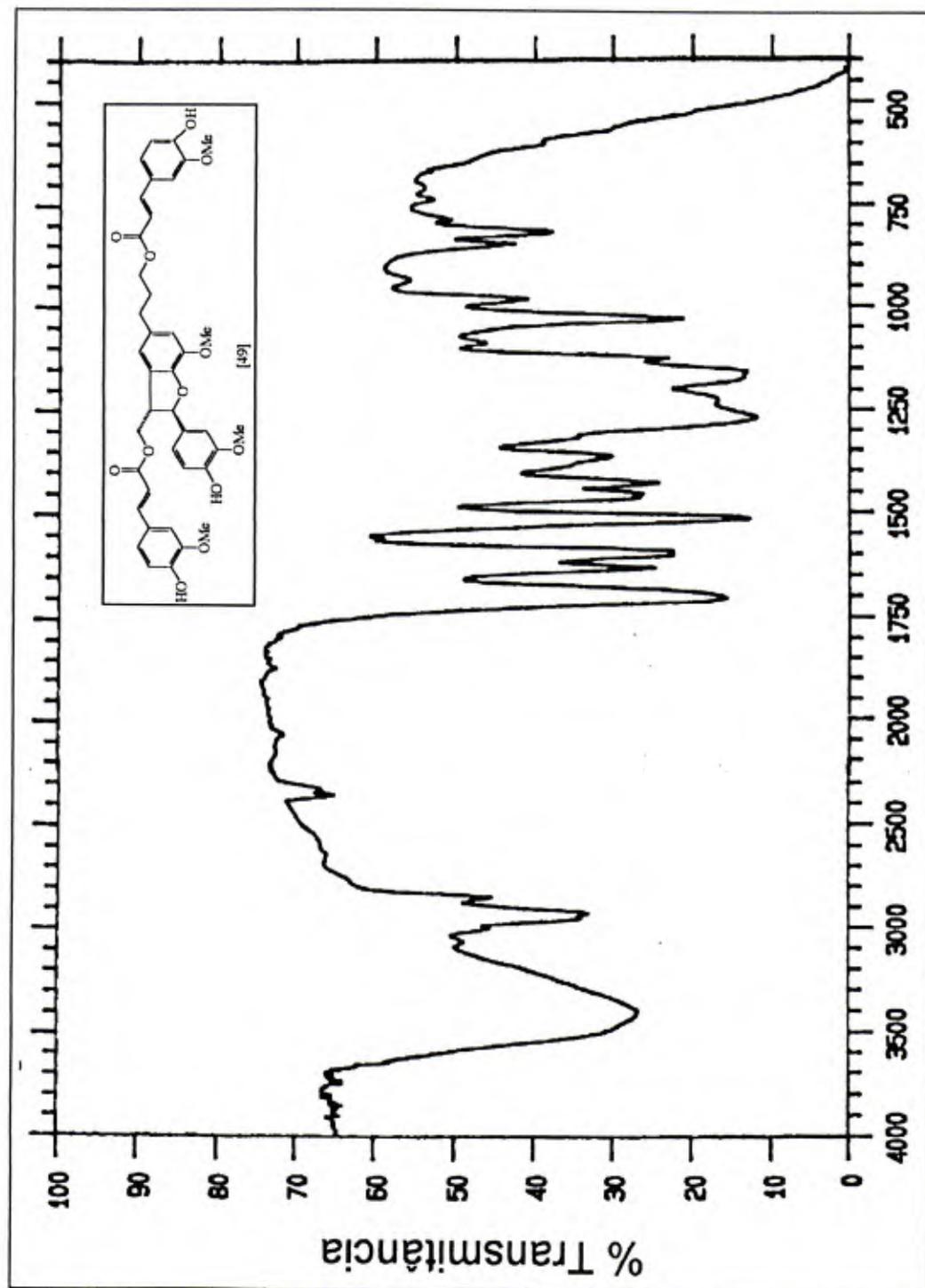


Figura 1- Espectro no Infravermelho (KBr) das Frações OCE1 e OCE6 (Composto [49]).

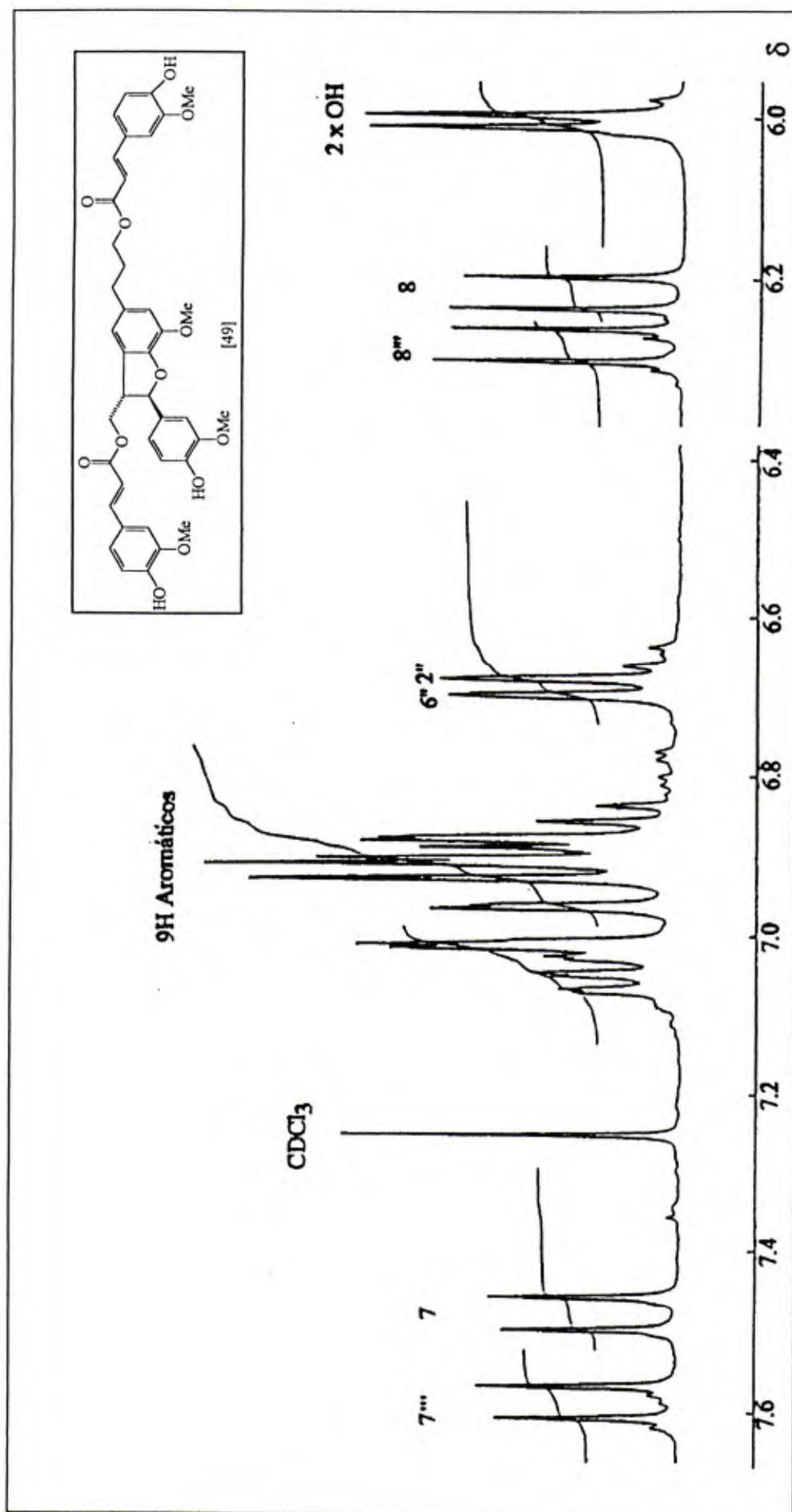


Figura 2A - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) das Frações OCE1 e OCE6 (Composto [49]), Região de δ 7,6 a 6,0.

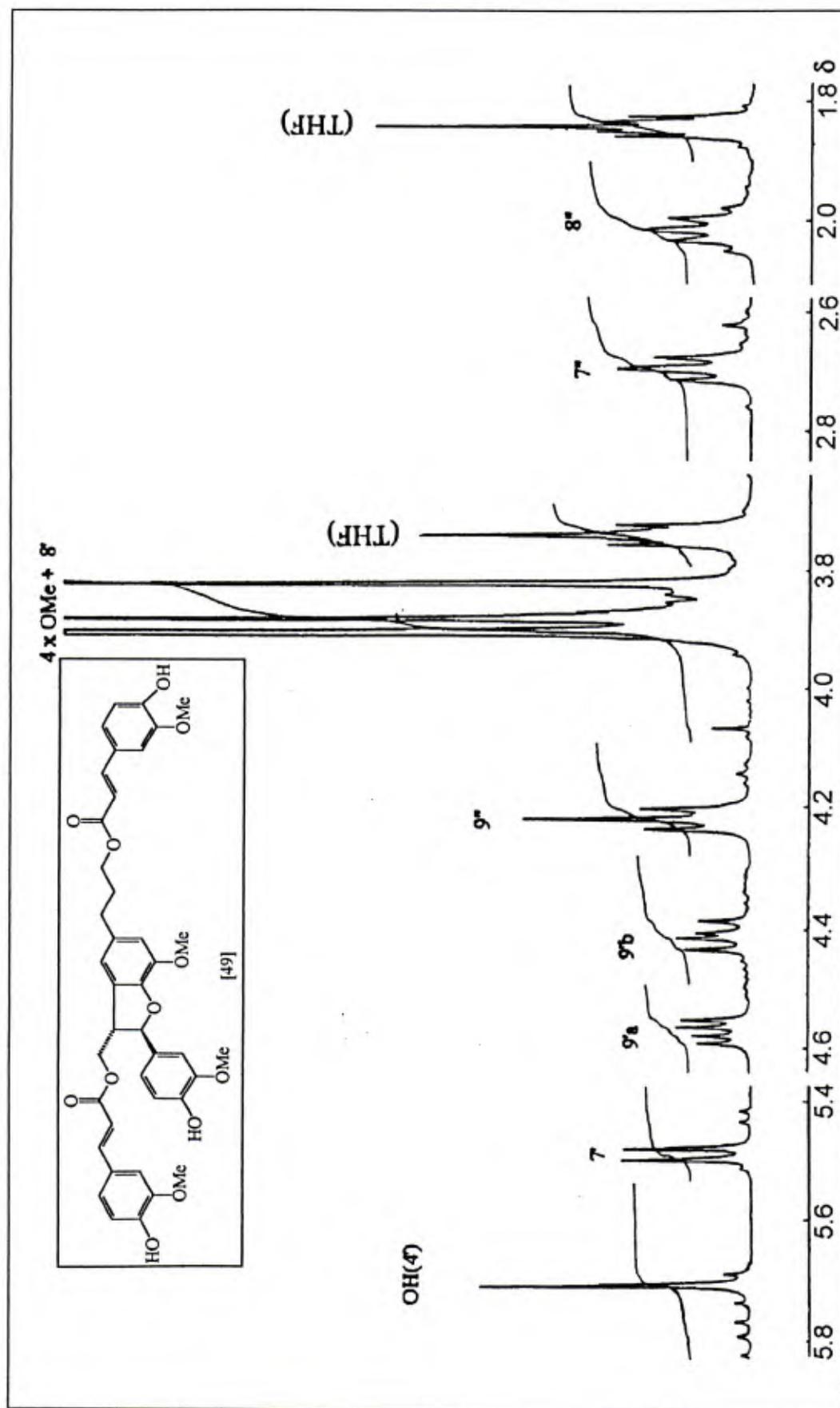


Figura 2B - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) das Frações OCE1 e OCE6 (Composto [49]), Região de δ 5,8 a 1,8.

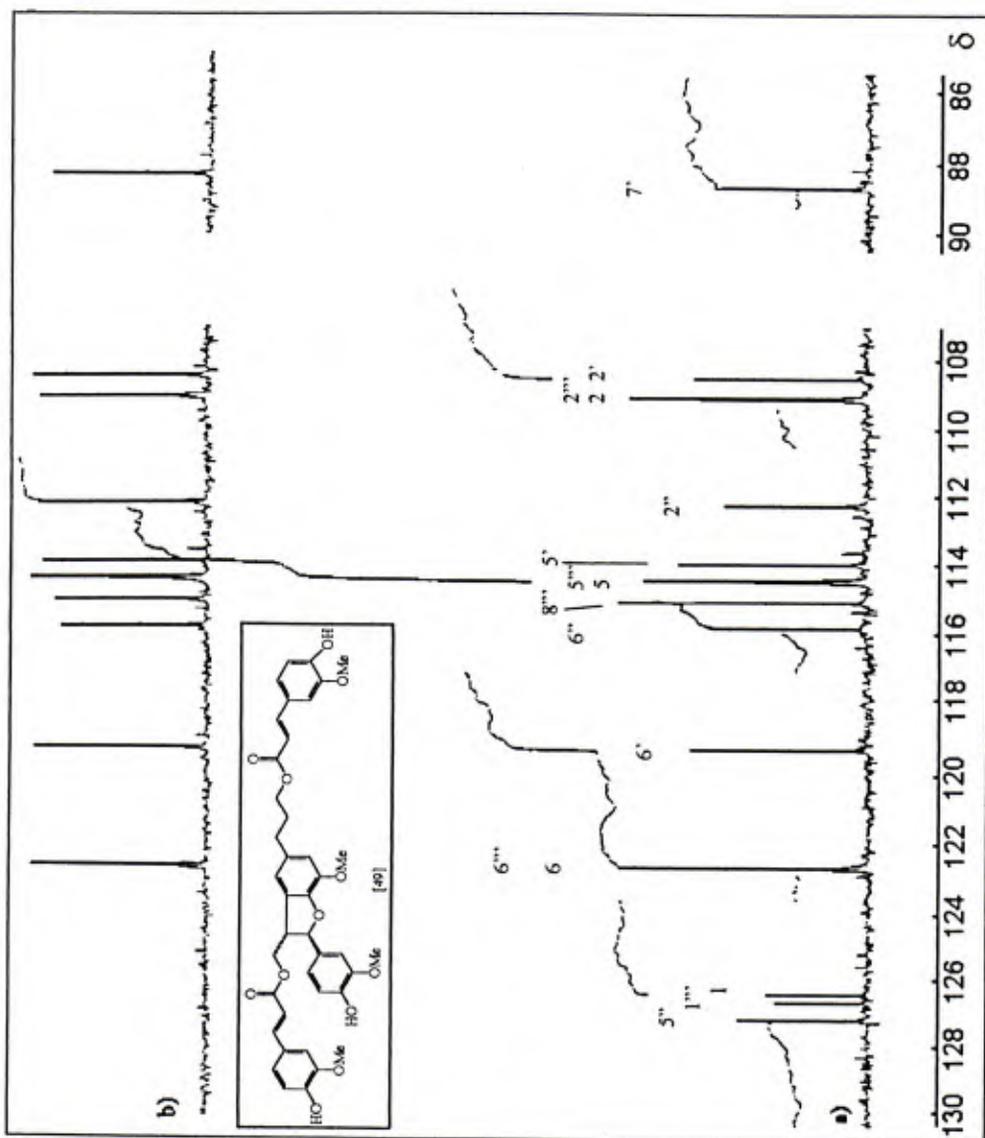


Figura 3B - Espectro de a) RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100,6 MHz) e b) DEPT 135 das Frações OCE1 e OCE6 (Composto [49]), Região de δ 130 a 86.

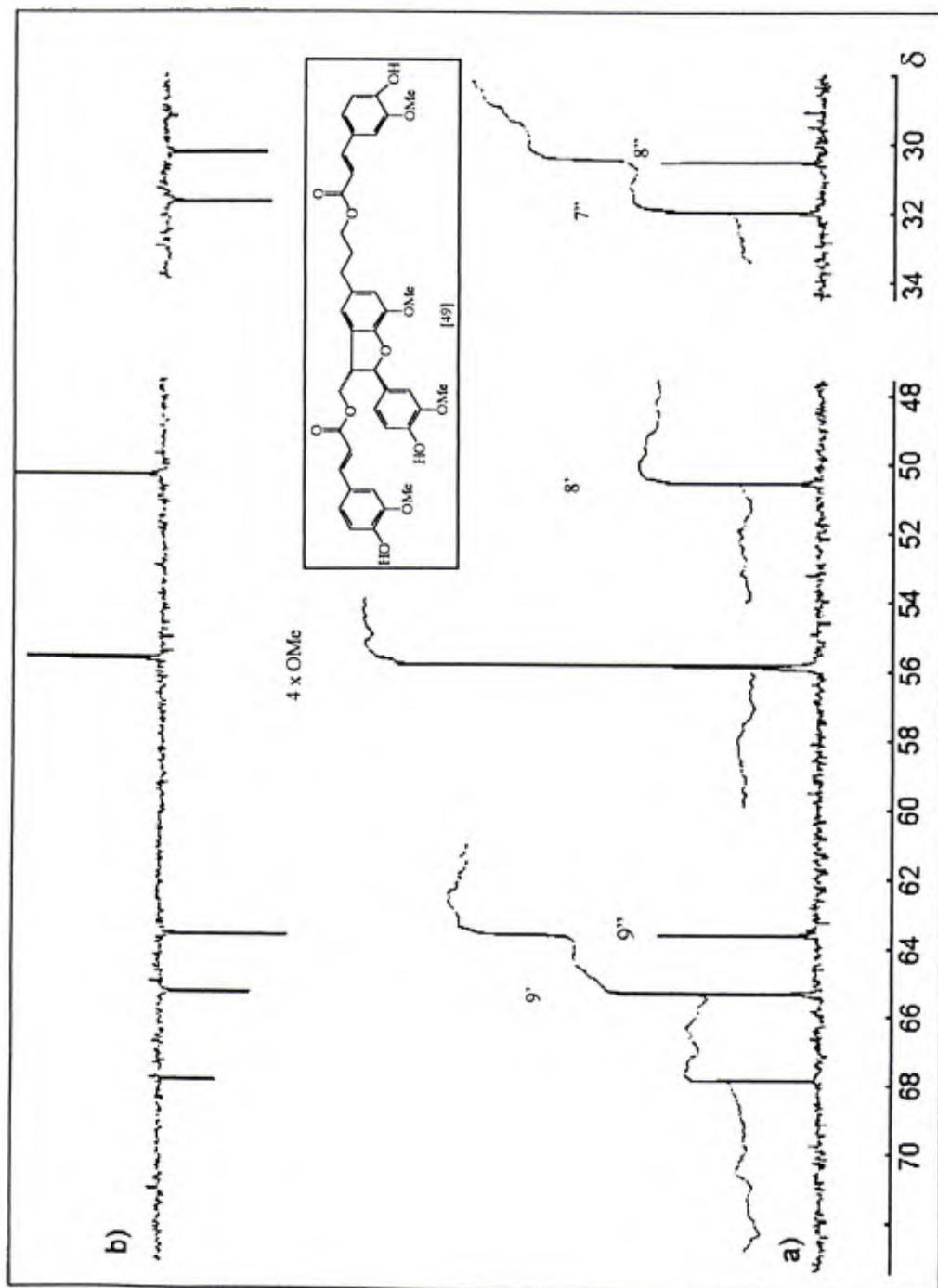


Figura 3C - Espectro de a) RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100,6 MHz) e b) DEPT 135 das Frações OCE1 e OCE6 (Composto [49]), Região de δ 80 a 28.

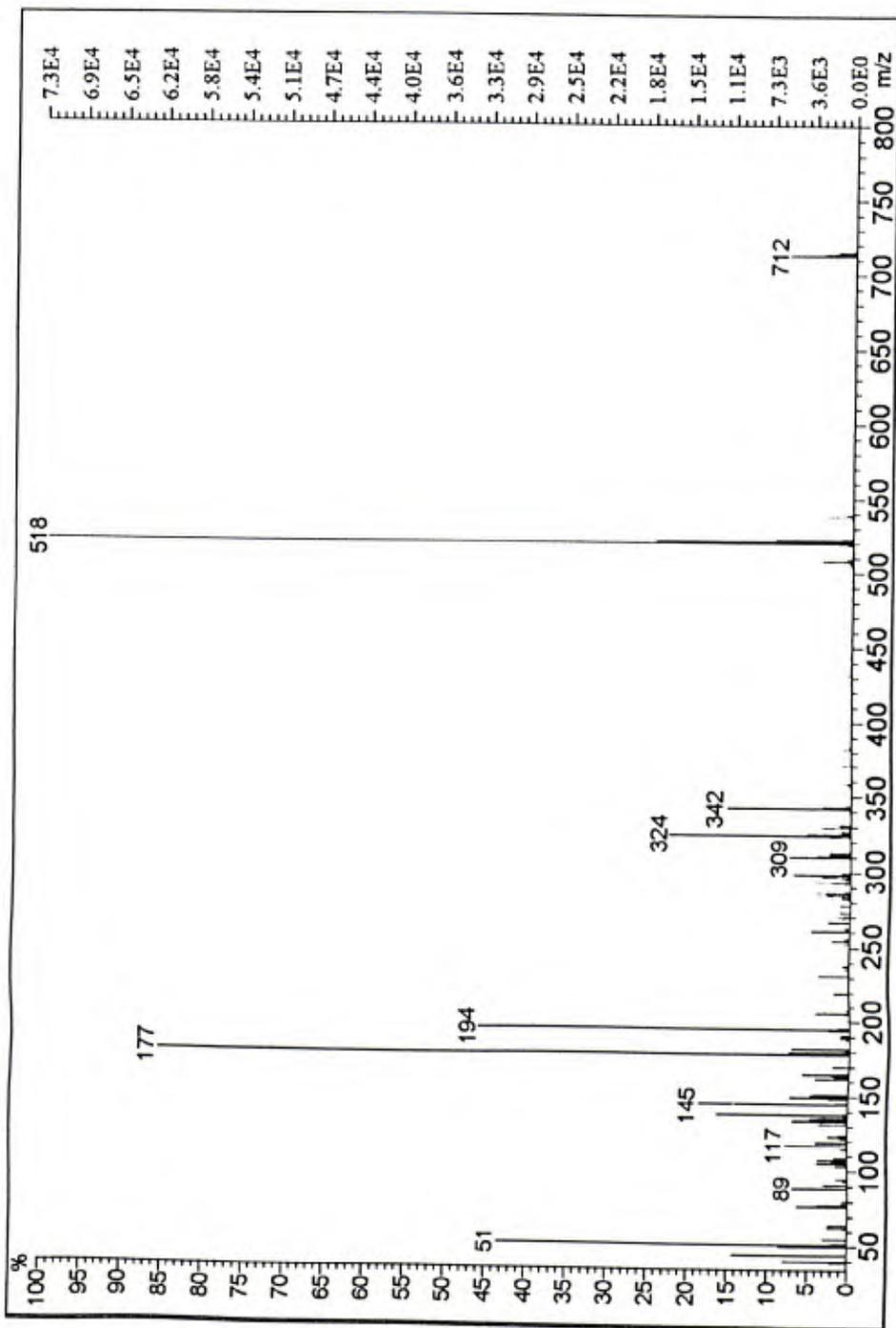


Figura 4 - Espectro de Massas (IE) das Frações OCE1 e OCE6 (Composto [49]).