

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Luiza Baptista de Oliveira Freitas

Estudo fitoquímico e da atividade biológica de *Banisteriopsis anisandra* (A. Juss) B. Gates e síntese de amidas indólicas para avaliação da atividade alelopática

Belo Horizonte

2010

UFMG-ICEx/DQ.826^a

D. 478^a

LUIZA BAPTISTA DE OLIVEIRA FREITAS

**ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
Banisteriopsis anisandra (A. JUSS) B. GATES E SÍNTESE DE
AMIDAS INDÓLICAS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ALELOPÁTICA**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química – Química Orgânica.

Belo Horizonte

2010

Freitas, Luiza Baptista de Oliveira

F866e Estudo fitoquímico e da atividade biológica de
2010 *Banisteriopsis anisandra* (A.Juss) B. Gates e síntese
D de amidas indólicas para avaliação da atividade
 alelopática./ Luiza Baptista de Oliveira. 2010.

xii; 162f. : il.

Orientadora: Maria Amélia Diamantino Boaventura.

Bibliografia: p.154-162

Mestrado (Dissertação) - Universidade Federal de
Minas Gerais. Departamento de Química.

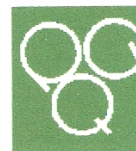
Bibliografia p.

1.Banisteriopsis anisandra - Teses 2.Amidas
indólicas - Teses 3.Testes biológicos - Teses
I.Boaventura, Maria Amélia Diamantino, Orientadora
II.Título

CDU 043



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3499-5732
FAX: 031 - 3499-5700
E-MAIL: pgquimic@zeus.qui.ufmg.br

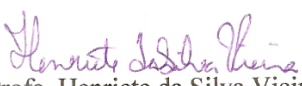


**"Estudo Fitoquímico e da Atividade Biológica de *Banisteriopsis anisandra*
(A.Juss) B. Gates e Síntese de Amidas Indólicas para Avaliação da Atividade
Alelopática"**

Luiza Baptista de Oliveira Freitas

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Profª. Maria Amélia Diamantino Boaventura - Orientadora
UFMG


Profª. Henriete da Silva Vieira
UFMG


Profª. Lucienir Pains Duarte
UFMG

Belo Horizonte, 28 de julho de 2010.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Aos meus pais, irmãos e toda minha família pelo apoio, incentivo, convivência e dedicação.

À Professora Doutora Maria Amélia Diamantino Boaventura pela orientação, disponibilidade, atenção e pelos valiosos conselhos, a quem serei eternamente grata.

Ao Dinho, por todo apoio, carinho e compreensão ao longo dos últimos 5 anos.

À professora Lucienir Pains Duarte pela amizade, valiosas discussões e conselhos e, claro, pelo uso da balança e do aparelho de ponto de fusão.

À professora Henriete da Silva Vieira, pelas ajudas, discussões e disponibilidade em tirar dúvidas.

Aos professores Jarbas Magalhães Resende e Fernando Carazza pelas contribuições nas identificações espectrométricas.

Às professoras Rosemeire Brondi Alves, Rossimíriam Pereira de Freitas e Lúcia Pinheiro Santos Pimenta, pelos valiosos conhecimentos passados e pela amizade.

À professora Dorila Piló Veloso, por ceder alguns reagentes utilizados na síntese.

Ao professor Ricardo José Alves pela amizade, ajuda, aprendizagem, conselhos e por disponibilizar o uso do espectrômetro na região do IV.

À professora Jacqueline Aparecida Takahashi pela contribuição para o teste da atividade antimicrobiana.

À professora Maria Aparecida Resende, à mestranda Thaís e doutoranda Danielle pela contribuição para o teste antifúngico.

À professora Mírian Paz Lopes e ao mestrando Dalton Dittz pela contribuição para o teste de atividade citotóxica.

Àqueles que orientei durante meu trabalho: Kátia, Gabriela, Thiago, e em especial Thaís e Laís, que muito contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Aos amigos de laboratório:

- Thiago, pela ajuda em quase tudo, que sem o qual eu nem teria entrado no mestrado.

- Alessandra, Jociani e Eva, pela amizade e momentos de descontração.

- Aos antigos colegas Rondinelli, Leandro e Wesley, que tiveram um papel fundamental para eu estar aqui hoje.

Aos amigos do DQ:

- Dieguito, Leandro, Guilherme, Fernando e Felipe, pela amizade, ajuda e pelos momentos de descontração.

- Djalma e Fernando César pelos conselhos, incentivo e amizade.

Aos companheiros de mestrado Kekéu e Saulo, pelo incentivo.

À Ivana e ao Ricardo, pelos experimentos de RMN.

À Vany Ferraz, pelas análises em CGAR.

Aos funcionários do Departamento de Química; ao Sr. Romário, o senhor dos milagres; à Arlete; às secretárias Paulete, Kátia e Lílian; à bibliotecária Sônia e ao Sérgio.

A todos que de uma maneira ou outra contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

**Este trabalho foi realizado sob a
orientação da profa. Dra. Maria Amélia
Diamantino Boaventura.**

“Tantas vezes pensamos ter chegado.

Tantas vezes é preciso ir além.”

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

ÍNDICE DE ESQUEMAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABELAS	vii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii

CAPÍTULO 1 – ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Banisteriopsis anisandra* (A. Juss) B. Gates

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Busca por substâncias bioativas.....	1
1.2	Revisão bibliográfica.....	2
1.2.1	A família Malpighiaceae	2
1.2.2	O gênero <i>Banisteriopsis</i>	7
1.2.3	<i>Banisteriopsis anisandra</i>	9
1.2.3.1	Classificação taxonômica.....	9
1.2.3.2	Morfologia.....	10
2	INTRODUÇÃO.....	11
3	PARTE EXPERIMENTAL.....	12
3.1	Materiais e métodos.....	12
3.2	Material vegetal.....	15
3.2.1	Coleta e identificação.....	15
3.2.2	Preparação de extratos.....	15
3.2.3	Marcha química para extração de alcalóides das raízes de <i>B. anisandra</i>	16
3.2.4	Marcha química para extração de alcalóides das folhas de <i>B. anisandra</i>	18
3.2.5	Fracionamento do extrato etanólico das folhas de <i>B. anisandra</i> ...	19
3.2.6	Fracionamento da fração orgânica neutra obtida da marcha química para extração de alcalóides das folhas de <i>B. anisandra</i> ..	20
3.2.7	Fracionamento do extrato hexânico das raízes de <i>B. anisandra</i> ..	21
3.2.8	Fracionamento do extrato em acetato de etila das raízes de <i>B. anisandra</i>	25
3.2.9	Fracionamento do extrato etanólico das raízes de <i>B. anisandra</i> ..	26
4	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL.....	30
4.1	Mistura de hidrocarbonetos (F1).....	30
4.2	Ácido palmítico (F2).....	31
4.3	Lupeol (F3).....	32
4.4	Quercetina-3-O-ramnosídeo (F4).....	34
4.5	Mistura de hidrocarbonetos (R1).....	40
4.6	Oleato de β -sitosterila (R2).....	41
4.7	Friedelina (R3).....	44
4.8	2-hidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (R4).....	45
4.9	2-hidroxi-6,8-dimetoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (R5).....	53
4.10	β -sitosterol.....	60
4.11	Mistura de β -sitosterol e estigmasterol.....	62
4.12	2,8-dihidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (R8).....	64
4.13	Ácido 3,4-dihidroxibenzóico (ácido protocatecuico) (R9).....	70

4.14	Mistura de friedelina e lupenona (lupan-20(29)-en-3-ona) (R10).....	72
4.15	Ácido oléico (R11).....	74
4.16	Mistura de glochidonol, ácido oléico e β -sitosterol (R12).....	75
5	DADOS FÍSICO-QUÍMICOS DAS MISTURAS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	78
6	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	84
6.1	Avaliação da atividade antioxidante de substâncias, frações e extratos de <i>B. anisandra</i>	84
6.1.1	Introdução.....	84
6.1.2	Metodologia de ensaio.....	86
6.1.3	Discussão dos resultados.....	87
6.1.4	Conclusão.....	88
6.2	Avaliação da atividade alelopática de algumas substâncias isoladas de <i>B. anisandra</i> sobre a germinação das sementes e o crescimento das raízes e do caule de plantículas de <i>Lactuca sativa</i> (alface) e <i>Allium cepa</i> (cebola).....	89
6.2.1	Introdução.....	89
6.2.2	Metodologia de ensaio.....	90
6.2.3	Tratamento estatístico.....	91
6.2.4	Discussão dos resultados.....	91
6.2.4.1	Efeito sobre <i>Lactuca sativa</i>	91
6.2.4.2	Efeito sobre <i>Allium cepa</i>	93
6.2.5	Conclusão.....	96
6.3	Avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias, frações e extratos de <i>B. anisandra</i>	96
6.3.1.	Introdução.....	96
6.3.2.	Avaliação da atividade antibacteriana.....	97
6.3.2.1	Metodologia de ensaio.....	98
6.3.2.2	Discussão dos resultados.....	98
6.3.3	Avaliação da atividade antifúngica.....	99
6.3.3.1	Metodologia de ensaio.....	99
6.3.3.2	Discussão dos resultados.....	100
6.3.4	Conclusão.....	101
6.4	Avaliação da atividade citotóxica.....	102
6.4.1	Introdução.....	102
6.4.2	Metodologia de ensaio.....	103
6.4.3	Discussão dos resultados.....	103
6.4.4	Conclusão.....	104

CAPÍTULO 2 – SÍNTESE E ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE AMIDAS INDÓLICAS

1	INTRODUÇÃO	105
1.1	Amidas biologicamente ativas.....	105
1.2	Atividades biológicas de amidas derivadas de alcalóides indólicos.....	105
2	OBJETIVOS	108
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	109
3.1	Preparação da 3,4,5-trimetoxi-anilina (20) a partir do ácido gálico (16).....	109
3.2	Preparação das amidas 22, 24, 26 e 27.....	111
4	PARTE EXPERIMENTAL	114
4.1	Materiais e métodos.....	114
4.2	Purificação e secagem de solventes e reagentes.....	114

4.3	Preparação da 3,4,5-trimetoxi-anilina.....	114
4.3.1	Obtenção do 3,4,5-trimetoxi-benzoato de metila (17) via metilação do ácido gálico (16) com diazometano.....	114
4.3.2	Obtenção do ácido 3,4,5-trimetoxi-benzóico (19) via metilação do ácido gálico (16) com sulfato de dimetila e hidrólise básica.....	116
4.3.3	Obtenção do ácido 3,4,5-trimetoxi-benzóico (19) via hidrólise básica do 3,4,5-trimetoxi-benzoato de metila (17).....	117
4.3.4	Obtenção da 3,4,5-trimetoxi-anilina (20) via reação de Curtius	118
4.4	Preparação das amidas 22 , 24 , 26 e 27	120
4.4.1	Obtenção da <i>N</i> -fenil-1 <i>H</i> -indol-2-carboxamida (22).....	120
4.4.2	Obtenção da <i>N</i> -(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1 <i>H</i> -indol-2-carboxamida (24).....	122
4.4.3	Obtenção da <i>N</i> -fenil-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida (26).....	123
4.4.4	Obtenção da <i>N</i> -(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida (27).....	124
5	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	126
5.1	3,4,5-trimetoxi-benzoato de metila (17).....	126
5.2	3-hidróxi-4,5-dimetoxi-benzoato de metila (18).....	127
5.3	Ácido 3,4,5-trimetoxi-benzóico (19).....	128
5.4	3,4,5-trimetoxi-anilina (20).....	130
5.5	Ácido indol-2-carboxílico (21).....	131
5.6	<i>N</i> -fenil-1 <i>H</i> -indol-2-carboxamida (22).....	133
5.7	<i>N</i> -isopropil- <i>N</i> (isopropilcarbamoil)-1 <i>H</i> -indol-2-carboxamida (23).....	135
5.8	<i>N</i> -(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1 <i>H</i> -indol-2-carboxamida (24).....	137
5.9	Ácido indol-3-carboxílico (25).....	139
5.10	<i>N</i> -fenil-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida (26).....	140
5.11	<i>N</i> -(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida (27).....	143
6	ATIVIDADE BIOLÓGICA	146
6.1	Avaliação da atividade alelopática dos materiais de partida e amidas sintetizadas sobre a germinação das sementes e o crescimento das raízes e do caule de plantículas de <i>Lactuca sativa</i> (alface) e <i>Allium cepa</i> (cebola)...	146
6.1.1	Metodologia de ensaio.....	146
6.1.2	Discussão dos resultados.....	146
6.1.2.1	Efeito sobre <i>Lactuca sativa</i>	146
6.1.2.2	Efeito sobre <i>Allium cepa</i>	148
6.1.3	Conclusão.....	150
7	CONCLUSÃO	152
5.1	Capítulo 1.....	152
5.2	Capítulo 2.....	153
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154
	ANEXO 1	163

ÍNDICE DE ESQUEMAS

CAPÍTULO 1 – ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Banisteriopsis anisandra* (A. Juss) B. Gates

Esquema 1 - Propostas de fragmentações de R4..... 52

Esquema 2 - Propostas de fragmentações de R5..... 60

CAPÍTULO 2 – SÍNTESE E ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE AMIDAS INDÓLICAS

Esquema 1 - Esquema de síntese para obtenção da 3,4,5-trimetóxi-anilina..... 108

Esquema 2 – Esquema de síntese para obtenção das amidas **22**, **24**, **26** e **27**..... 108

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Banisteriopsis anisandra* (A. Juss) B. Gates

Figura 1 - Flavonóides isolados de <i>Malpighia glabra</i>	2
Figura 2 - Substâncias isoladas de <i>Byrsonima intermedia</i>	3
Figura 3 - Substâncias isoladas de <i>Byrsonima microphylla</i>	4
Figura 4 – Outras substâncias isoladas de <i>Byrsonima microphylla</i>	5
Figura 5 - Substâncias isoladas de <i>Lophanthera lactescens</i>	6
Figura 6 - Substâncias isoladas de <i>Diplopterys cabrerana</i>	7
Figura 7 - Substâncias isoladas de <i>Banisteriopsis caapi</i>	8
Figura 8 - Outras substâncias isoladas de <i>Banisteriopsis caapi</i>	8
Figura 9 - Substâncias isoladas de <i>Banisteriopsis argetea</i>	9
Figura 10 - Exsicata de <i>Banisteriopsis anisandra</i> (A. Juss).....	10
Figura 11 - Raízes e folhas de <i>Banisteriopsis anisandra</i> – 2ª Coleta.....	15
Figura 12 - Fluxograma da primeira marcha química para extração de alcalóides das raízes de <i>B. anisandra</i>	17
Figura 13 - Fluxograma da segunda marcha química para extração de alcalóides das raízes de <i>B. anisandra</i>	17
Figura 14 - Fluxograma da terceira marcha química para extração de alcalóides das raízes de <i>B. anisandra</i>	18
Figura 15 - Fluxograma do processo de fracionamento do EEF2.....	20
Figura 16 - Fluxograma do processo de fracionamento do EHR2.....	24
Figura 17 - Fluxograma do processo de fracionamento do EAR2.....	25
Figura 18 - Fluxograma do processo de fracionamento do EER1.....	29
Figura 19 - Espectro de RMN de ¹ H de F4 (CD ₃ OD; 400 MHz).....	35
Figura 20 - Espectro de RMN de ¹³ C e subespectro DEPT-135 de F4 (CD ₃ OD; 100 MHz).....	36
Figura 21 - Mapa de contornos COSY de F4 (CD ₃ OD; 400 MHz).....	36
Figura 22 - Correlações encontradas no mapa de contornos COSY de F4 e valores das constantes de acoplamento (Hz), para os hidrogênios da ramnose.....	37
Figura 23 - Mapa de contornos HMQC de F4 (CD ₃ OD; 400 MHz).....	38
Figura 24 - Expansão do mapa de contornos HMBC de F4 (CD ₃ OD; 400 MHz).....	39
Figura 25 - Expansão do mapa de contornos HMBC de F4 (CD ₃ OD; 400 MHz).....	39
Figura 26 - Espectro de RMN de ¹ H de R4	47
Figura 27 - Alguns fragmentos de R4	47
Figura 28 - Algumas correlações obtidas do mapa de contornos HMBC.....	48
Figura 29 - Correlações encontradas no mapa de contornos HMBC.....	48
Figura 30 - Espectro de RMN de ¹³ C e subespectro DEPT-135 de R4	48
Figura 31 - Mapa de contornos COSY de R4	49
Figura 32 - Mapa de contornos HMQC de R4	49
Figura 33 - Expansão do mapa de contornos HMBC de R4	50
Figura 34 - Expansão do mapa de contornos HMBC de R4	50
Figura 35 - Expansão do mapa de contornos HMBC de R4	51
Figura 36 - Espectro de RMN de ¹ H de R5	54
Figura 37 - Correlações encontradas no mapa de contornos HMBC de R5	55
Figura 38 - Correlações NOESY de R5	55
Figura 39 - Espectro de RMN de ¹³ C e subespectro DEPT-135 de R5	56
Figura 40 - Mapa de contornos COSY de R5	56
Figura 41 - Mapa de contornos HMQC de R5	57
Figura 42 - Expansão do mapa de contornos HMBC de R5	57

Figura 43 - Expansão do mapa de contornos HMBC de R5	58
Figura 44 - Expansão do mapa de contornos NOESY de R5	58
Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H R8 (CDCl_3 ; 400 MHz).....	65
Figura 46 - Correlações NOESY de R8	66
Figura 47 - Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 de R8 (CDCl_3 ; 100 MHz).....	66
Figura 48 - Mapa de contornos COSY de R8 (CDCl_3 ; 400 MHz).....	67
Figura 49 - Mapa de contornos HMQC de R8 (CDCl_3 ; 400 MHz).....	67
Figura 50 - Ampliação do mapa de contornos HMBC de R8 (CDCl_3 ; 400 MHz).....	68
Figura 51 - Ampliação do mapa de contornos HMBC de R8 (CDCl_3 ; 400 MHz).....	68
Figura 52 - Expansão do mapa de contornos NOESY de R8 (CDCl_3 ; 400 MHz).....	69
Figura 53 - Esquema da redução do DPPH.....	85
Figura 54 - Butilhidróxitolueno (BHT).....	85
Figura 55 - Soluções teste, 30 minutos após a adição da solução de DPPH.....	87
Figura 56 - Porcentagem de inibição do DPPH, em três diferentes concentrações, para amostras derivadas de <i>B. anisandra</i> (1 : EAF, 2 : EEF1, 3 : EER1, 4 : F. 101-119 do EEF1, 5 : F. 48-53 do EER1, 6 : quercetina-3-O-ramnosídeo, 7 : ácido 3,4-dihidróxi-benzóico, 8 : BHT).....	87
Figura 57 - Efeito de algumas substâncias isoladas de <i>B. anisandra</i> sobre a germinação de <i>L. sativa</i> (alface).....	92
Figura 58 - Efeito de algumas substâncias isoladas de <i>B. anisandra</i> sobre o crescimento da raiz e do caule de plantículas de <i>L. sativa</i> (alface).....	93
Figura 59 - Efeito de algumas substâncias isoladas de <i>B. anisandra</i> sobre a germinação de <i>Allium cepa</i> (cebola).....	94
Figura 60 - Efeito de algumas substâncias isoladas de <i>B. anisandra</i> sobre o crescimento da raiz e do caule de plantículas de <i>Allium cepa</i> (cebola).....	95
Figura 61 - Redução do MTT por enzima mitocondrial.....	102
Figura 62 - Densidade óptica do controle e das soluções teste em linhagens de células MeWo e células CHO após 72 horas de incubação.....	104
Figura 63 - Viabilidade celular de células MeWo e células CHO após 72 horas de exposição a diferentes concentrações de R8	104

CAPÍTULO 2 – SÍNTESE E ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE AMIDAS INDÓLICAS

Figura 1 - Exemplos de amidas utilizadas em clínica médica.....	105
Figura 2 - Exemplo de fármaco contendo o esqueleto indólico.....	105
Figura 3 - Amidas derivadas do ácido indol-2-carboxílico.....	106
Figura 4 - Amida derivada do ácido 6-hidroxi-indol-2-carboxílico.....	106
Figura 5 - Amidas derivadas do ácido indol-3-carboxílico.....	107
Figura 6 - Outras amidas derivadas do ácido indol-3-carboxílico.....	107
Figura 7 - Mecanismo de formação do diazometano.....	109
Figura 8 - Mecanismo de metilação com diazometano.....	109
Figura 9 - Mecanismo de metilação com $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$	110
Figura 10 - Rearranjo da acilazida levando ao isocianato.....	111
Figura 11 - Mecanismo da reação de acoplamento utilizando-se DIC e DMAP.....	112
Figura 12 - Rearranjo para formação de <i>N</i> -aciluréia.....	113
Figura 13 - Efeito de algumas substâncias sobre a germinação de <i>L. sativa</i>	147
Figura 14 - Efeito de algumas substâncias sobre o crescimento da raiz e do caule de <i>L. sativa</i> (alface).....	148
Figura 15 - Efeito de algumas substâncias sobre a germinação de <i>A. cepa</i>	149
Figura 16 - Efeito de algumas substâncias sobre o crescimento da raiz e do caule de <i>A. cepa</i> (cebola).....	150

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Banisteriopsis anisandra* (A. Juss) B. Gates

Tabela 1 - Dados obtidos por CGAR de F1 e dos padrões de hidrocarbonetos C ₁₄ , C ₁₇ , C ₂₈ , C ₂₉ , C ₃₀ , C ₃₁ , C ₃₂ , C ₃₃ , C ₃₄ e C ₃₅	30
Tabela 2 - Comparação dos dados de RMN de ¹³ C do ácido palmítico (Couperus <i>et al.</i> , 1978) com aqueles encontrados para F2	32
Tabela 3 - Comparação dos dados de RMN de ¹³ C do lupeol (Mahato, 1994) com aqueles encontrados para F3	33
Tabela 4 - Comparação dos dados de RMN de ¹³ C da quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (Beltrame <i>et al.</i> , 2001) com aqueles encontrados para F4	40
Tabela 5 - Dados obtidos por CGAR de R1 e dos padrões de hidrocarbonetos C ₁₁ , C ₁₂ , C ₁₄ , C ₁₅ , C ₁₆ , C ₁₇ , C ₁₈ , C ₂₈ , C ₂₉ , C ₃₀ , C ₃₁ , C ₃₂ , C ₃₃ , C ₃₄ e C ₃₅	41
Tabela 6 - Comparação dos dados de RMN de ¹³ C do oleato de β -sitosterila (David, 2008) com aqueles encontrados para R2	43
Tabela 7 - Comparação dos dados de RMN de ¹³ C da Friedelina (Mahato, 1994) com aqueles encontrados para R3	45
Tabela 8 – Deslocamentos químicos observados para R4 , nos espectros de RMN de ¹ H e ¹³ C (400 MHz, CDCl ₃).....	51
Tabela 9 - Deslocamentos químicos observados para R5 , nos espectros de RMN de ¹ H e ¹³ C (400 MHz, CDCl ₃).....	59
Tabela 10 - Comparação dos dados de RMN de ¹³ C do β -sitosterol (Galotta, 2005) com aqueles encontrados para R6	61
Tabela 11 – Comparação dos dados de RMN de ¹³ C do β -sitosterol e estigmasterol (Galotta, 2005) com aqueles encontrados para R7	63
Tabela 12 - Deslocamentos químicos observados para R8 , nos espectros de RMN de ¹ H e ¹³ C (400 MHz, CDCl ₃).....	70
Tabela 13 - Comparação dos dados de RMN de ¹³ C do ácido protocatecuico (Flamini <i>et al.</i> , 2001) com aqueles encontrados para R9	71
Tabela 14 - Comparação dos dados de RMN de ¹³ C da friedelina (Mahato, 1994) e lupenona (Puapairoj <i>et al.</i> , 2004) com aqueles encontrados para R10 ..	73
Tabela 15 - Comparação dos dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de R11 com aqueles encontrados para o ácido oléico (Oliveira, 2004).....	75
Tabela 16 - Comparação dos dados de RMN de ¹³ C do glochidonol (Ayer <i>et al.</i> , 1984), ácido oléico (Oliveira, 2004) e β -sitosterol (Galotta, 2005) com aqueles encontrados para R12	77
Tabela 17 - Porcentagem de inibição do DPPH e valores de CE ₅₀ de extratos, frações e substâncias isoladas de <i>B. anisandra</i>	88
Tabela 18 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (μ g/mL) para as amostras testadas para quatro leveduras diferentes.....	101

CAPÍTULO 2 – SÍNTESE E ATIVIDADE ALELOPÁTICA DE AMIDAS INDÓLICAS

Tabela 1 - Comparação dos dados de RMN de ¹³ C 3,4,5-trimetóxi-benzoato de metila (Elsinghorst & Tanarro, 2006) com aqueles encontrados para 17	127
Tabela 2 - Comparação dos dados de RMN de ¹³ C 3-hidróxi-4,5-dimetóxi-benzoato de metila (Alam <i>et al.</i> , 2005) com aqueles encontrados para 18	128
Tabela 3 - Comparação dos dados de RMN de ¹³ C ácido 3,4,5-trimetóxi-benzóico (Alam & Tsuboi, 2007) com aqueles encontrados para 19	129

Tabela 4 - Comparação dos dados do espectro de IV da 3,4,5-trimetóxi-anilina (KBr) (Gong <i>et al.</i> , 2009) com aqueles encontrados para 20	131
Tabela 5 - Dados de RMN de ^{13}C de 20	131
Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H de 21	132
Tabela 7 - Comparação dos dados de RMN de ^{13}C do ácido indol-2-carboxílico (CDCl_3 -DMSO- d_6) (Ríos <i>et al.</i> , 1987) com aqueles encontrados para 21	132
Tabela 8 - Comparação dos dados de RMN de ^1H da <i>N</i> -fenil-1 <i>H</i> -indol-2-carboxamida (DMSO- d_6 ; 250 MHz) (Mahboobi <i>et al.</i> , 2002) com aqueles encontrados para 22	134
Tabela 9 - Dados de RMN de ^{13}C de 22	134
Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H de 23	136
Tabela 11 - Dados de RMN de ^{13}C de 23	136
Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H de 24	125
Tabela 13 - Dados de RMN de ^{13}C de 24	125
Tabela 14 - Comparação dos dados de RMN de ^1H do ácido indol-3-carboxílico (Hagemeier <i>et al.</i> , 2001) com aqueles encontrados para 25	139
Tabela 15 - Comparação dos dados de RMN de ^{13}C do ácido indol-3-carboxílico (Hagemeier <i>et al.</i> , 2001) com aqueles encontrados para 25	140
Tabela 16 - Comparação dos dados de RMN de ^1H da <i>N</i> -fenil-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida (DMSO- d_6 ; 400 MHz) (Litina <i>et al.</i> , 2010) com aqueles encontrados para 26	141
Tabela 17 - Comparação dos dados de RMN de ^{13}C da <i>N</i> -fenil-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida (Litina <i>et al.</i> , 2010) com aqueles encontrados para 26	142
Tabela 18 - Comparação dos dados de RMN de ^1H da <i>N</i> -(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida (CD_3Cl_3 ; 400 MHz) (Magoulas & Papaioannou, 2003) com aqueles encontrados para 27	144
Tabela 19 - Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de <i>N</i> -(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida (CD_3Cl_3 ; 400 MHz) (Magoulas & Papaioannou, 2003) com aqueles encontrados para 27	145

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
t.a.	Temperatura ambiente
δ	Deslocamento Químico (ppm)
°C	Graus Celsius
°GL	Graus Gay Lussac
$\bar{\nu}$	Número de onda
λ	Comprimento de onda
1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BHT	Butilhidroxitolueno
CE ₅₀	Concentração efetiva de cinquenta por cento
CGAR	Cromatografia gasosa de alta resolução
CHO	Células normais de ovário de hamster
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CC	Cromatografia em coluna
CCDS	Cromatografia em camada delgada de sílica
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
d	duplete
dd	duplete duplo
dt	duplete triplo
DEPT-135	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 135</i>
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DMT	Dimetiltriptamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EAF	Extrato Aquoso das Folhas de <i>B. anisandra</i>
EAR2	Extrato em Acetato de Etila das Raízes de <i>B. anisandra</i> , 2 ^a coleta
EER1	Extrato Etanólico das Raízes de <i>B. anisandra</i> , 1 ^a coleta
EER2	Extrato Etanólico das Raízes de <i>B. anisandra</i> , 2 ^a coleta
EHR2	Extrato Hexânico das Raízes de <i>B. anisandra</i> , 2 ^a coleta
EEF2	Extrato Etanólico das Folhas de <i>B. anisandra</i> , 2 ^a coleta
EM	Espectrometria de Massas
ESI-EM	Espectrometria de Massas por <i>Electrospray</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FID	Detector de ionização de chama
g	Gramas
HMBC	<i>Heteronuclear-Multiple-Bond-Correlation Spectroscopy</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HSQC	<i>Heteronuclear-Single-Quantum-Coherence Spectroscopy</i>
h	Hora
Hz	Hertz

IAS	Sociedade Internacional de Alelopatia
IC ₅₀	Índice de citotoxicidade de cinquenta por cento
ICEx	Instituto de Ciências Exatas
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
L	Litro
LB	Liebermann-Burchard
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MeWo	Células de melanoma humano
MHz	Megahertz
MM	Massa molar
MOPS	Ácido morfolinopropano-sulfônico
MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
nm	nanômetros
NMDA	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartame
NOESY	<i>Two-Dimensional Nuclear-Overhauser-Effect Spectroscopy</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PF	Ponto de fusão
Rf	Fator de retenção
q	quinteto
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1
s	simpleto
t	triplete
TEA	Trietilamina
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
TTPC	Triterpenos pentacíclicos
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USP	Universidade de São Paulo
UV-VIS	Ultravioleta-visível

RESUMO

O presente trabalho está dividido em dois capítulos. No primeiro capítulo, é relatado o estudo fitoquímico das raízes e folhas de *Banisteriopsis anisandra*, uma planta utilizada na medicina popular no tratamento tópico de infecções fúngicas. Até o presente momento, não foram encontrados na literatura nenhum estudo fitoquímico e nenhuma avaliação da atividade biológica desta espécie.

Foram isoladas das folhas uma mistura de hidrocarbonetos (**F1**), ácido palmítico (**F2**), lupeol (**F3**) e quercetina 3-O-ramnosídeo (**F4**). Das raízes, foram isolados uma mistura de hidrocarbonetos (**R1**), oleato de β -sitosterila (**R2**), friedelina (**R3**), 2-hidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (**R4**), 2-hidroxi-6,8-dimetoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (**R5**), β -sitosterol (**R6**), mistura de β -sitosterol e estigmasterol (**R7**), 2,8-dihidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (**R8**), ácido 3,4-dihidroxibenzóico (**R9**), mistura de friedelina e lupenona (lupan-20(29)-en-3-ona) (**R10**), ácido oléico (**R11**), e mistura de glochidonol, ácido oléico e β -sitosterol (**R12**). Vale à pena destacar que **R4**, **R5** e **R8** são substâncias inéditas.

Em seguida, são apresentados resultados de testes de atividade biológica para extratos, frações e/ou substâncias puras isoladas de *B. anisandra*: teste de atividade antioxidante, de atividade alelopática, de atividade antibacteriana, de atividade antifúngica e de atividade citotóxica.

O segundo capítulo descreve a preparação de quatro amidas derivadas dos ácidos indol-2-carboxílico e indol-3-carboxílico com anilina e 3,4,5-trimetoxi-anilina (**22**, **24**, **26** e **27**), a fim de serem testadas quanto a sua atividade alelopática sobre o crescimento e germinação de *Lactuca sativa* (alface) e *Allium cepa* (cebola). Uma destas amidas (**24**) é inédita, e para nenhuma delas há relatos de sua atividade alelopática.

ABSTRACT

This work is divided into two chapters. In the first chapter is reported the phytochemical study of the roots and leaves of *Banisteriopsis anisandra*, a plant used in folk medicine for topical treatment of fungal infections. To date, were not found in the literature any phytochemical study or evaluation of biological activities of this species.

From leaves of *B. anisandra* were isolated a mixture of hydrocarbons (**F1**), palmitic acid (**F2**), lupeol (**F3**) and quercetin 3-O-rhamnoside (**F4**). From roots, were isolated a mixture of hydrocarbons (**R1**), β -sitosteryl oleate (**R2**), friedelin (**R3**), 2-hydroxy-6-methoxy-7-methyl-9,10-dihydrophenanthrene-1-carbaldehyde (**R4**), 2-hydroxy-6,8-dimethoxy-7-methyl-9,10-dihydrophenanthrene-1-carbaldehyde (**R5**), β -sitosterol (**R6**), a mixture of β -sitosterol and stigmasterol (**R7**), 2,8-dihydroxy-6-methoxy-7-methyl-9,10-dihydrophenanthrene-1-carbaldehyde (**R8**), 3,4-dihydroxybenzoic acid (**R9**), and mixture of friedelin and lupenone (lupane-20 (29)-en-3-one) (**R10**), oleic acid (**R11**), and mixture of glochidonol, oleic acid and β -sitosterol (**R12**). It is worth it to say that **R4**, **R5** and **R8** are described for the first time.

Following, are presented the results of biological activity of extracts, fractions and/or isolated compounds from *B. anisandra*: antioxidant activity, allelopathic activity, antibacterial activity, antifungal activity and cytotoxic activity.

The second chapter describes the preparation of four amide derivatives of indole-2-carboxylic acid and indole-3-carboxylic acid with aniline and 3,4,5-trimethoxy-aniline (**22**, **24**, **26** e **27**), to be tested for their allelopathic activity on the growth and germination of *Lactuca sativa* (lettuce) and *Allium cepa* (onion). One of these amides is new (**24**) and to none of them are reports of their allelopathic activity.

Capítulo 1

1 INTRODUÇÃO

1.1 Busca por substâncias bioativas

A natureza é uma atraente fonte de substâncias com potencial uso terapêutico devido à imensa diversidade química que é encontrada nos milhares de espécies de plantas, animais, microrganismos e organismos marinhos (Patel *et al.*, 2010).

A maioria dos fármacos atualmente em uso clínico são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese planejada a partir de produtos naturais. Embora existam, nos dias atuais, diversas estratégias e metodologias disponíveis para que se possa sintetizar e descobrir novos fármacos, a química de produtos naturais ainda representa uma alternativa de sucesso (Barreiro e Bolzani, 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que aproximadamente 65% da população mundial depende principalmente de medicamentos derivados de plantas medicinais para os cuidados de saúde primários (Cragg *et al.*, 2009). Tem sido estimado que somente de 5-15% das espécies vegetais utilizadas em medicina caseira foram investigadas, restando uma fonte natural de inúmeros organismos vivos contendo significativo número de substâncias inéditas e forte potencial de produtos naturais bioativos, incluindo-se fontes de matérias-primas para o desenvolvimento de novos fármacos. Aproximadamente 74% dos principais produtos medicinais obtidos de fontes vegetais foram descobertos através de orientação baseada em resultados revelados pela medicina popular (Filho, 2010).

Cragg *et al.* (2009) realizaram um estudo de 1024 drogas lançadas desde janeiro de 1981 até outubro de 2008, mostrando que apenas 37% delas tem origem verdadeiramente sintética (isto é, desprovido de inspiração em algum produto natural). A análise demonstrou a contribuição permanente e valiosa da natureza como fonte não só de potenciais agentes quimioterápicos, mas também de compostos que servem de base e inspiração para a semi-síntese ou síntese total de novas drogas.

Grande parte das plantas nativas brasileiras ainda não tem estudos científicos para permitir o seu uso seguro e eficaz. Dessa maneira, é de grande relevância o estudo das plantas que já tem seu uso difundido na medicina popular, a fim de identificar a(s) substância(s) ativa(s) e comprovar suas ações biológicas.

1.2 Revisão Bibliográfica

1.2.1 A família Malpighiaceae

Malpighiaceae é uma família predominantemente tropical com 65 gêneros e cerca de 1.250 espécies, das quais aproximadamente 85% são neotropicais. No Brasil ocorrem 32 gêneros com cerca de 300 espécies, distribuídas em diversas formações vegetais (Costa *et al.* 2006). Os representantes desta família podem ser árvores, arbustos, lianas ou ocasionalmente ervas perenes (Araújo, 2008).

Malpighiaceae é uma das famílias mais presentes no Cerrado. São muito comuns espécies arbustivas e arbóreas dos gêneros *Byrsonima*, *Banisteriopsis* e *Heteropteris* em todo o Brasil (Silva, 2006).

No Brasil, o representante mais conhecido é a acerola (*Malpighia glabra*), de polpa rica em vitamina C. Ribani *et al.* (2009) relataram em seu trabalho os teores dos flavonóides quercetina (1) e kaempferol (2) encontrados nessa fruta fresca e em polpas congeladas.

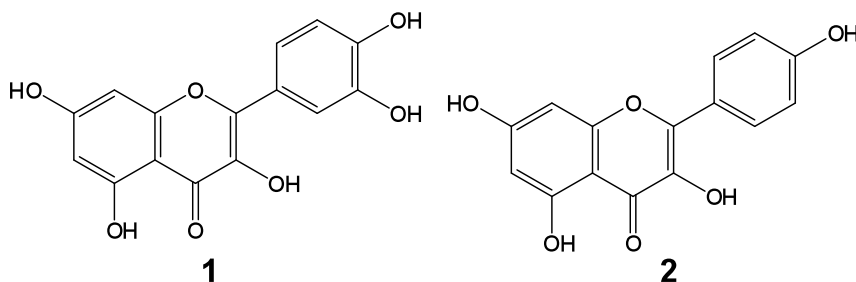


Figura 1 – Flavonóides isolados de *Malpighia glabra*.

Várias espécies pertencentes ao gênero *Byrsonima* ocorrem no nordeste brasileiro, sendo algumas delas (o murici, por exemplo) consumidas na forma de sucos, licores, geléias e doces. Espécies deste gênero são comumente utilizadas como antiasmáticas, antifebris e no tratamento de infecções cutâneas. Folhas e cascas de algumas espécies de *Byrsonima* também são usadas popularmente em disfunções gástricas, infecções cutâneas, picadas de cobra e ainda como anti-diarréicos (Figueiredo *et al.*, 2005).

Sannomya *et al.* (2005) realizaram um estudo fitoquímico de *Byrsonima intermedia* (murici), que é usada popularmente no tratamento de febre, úlcera, asma, e infecções de pele, além do uso como diurético. A análise fitoquímica do extrato metanólico forneceu uma grande quantidade de flavonóides e compostos fenólicos:

quercetina (1), quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (3), quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo (4), quercetina-3-O-(2''-O-galoil)- α -arabinopiranosídeo (5), quercetina-3-O-(2''-O-galoil)- β -galactopiranosídeo (6), (+)-catequina (7), (-)-epicatequina (8), ácido gálico (9), galato de metila (10) e amentoflavona (11).

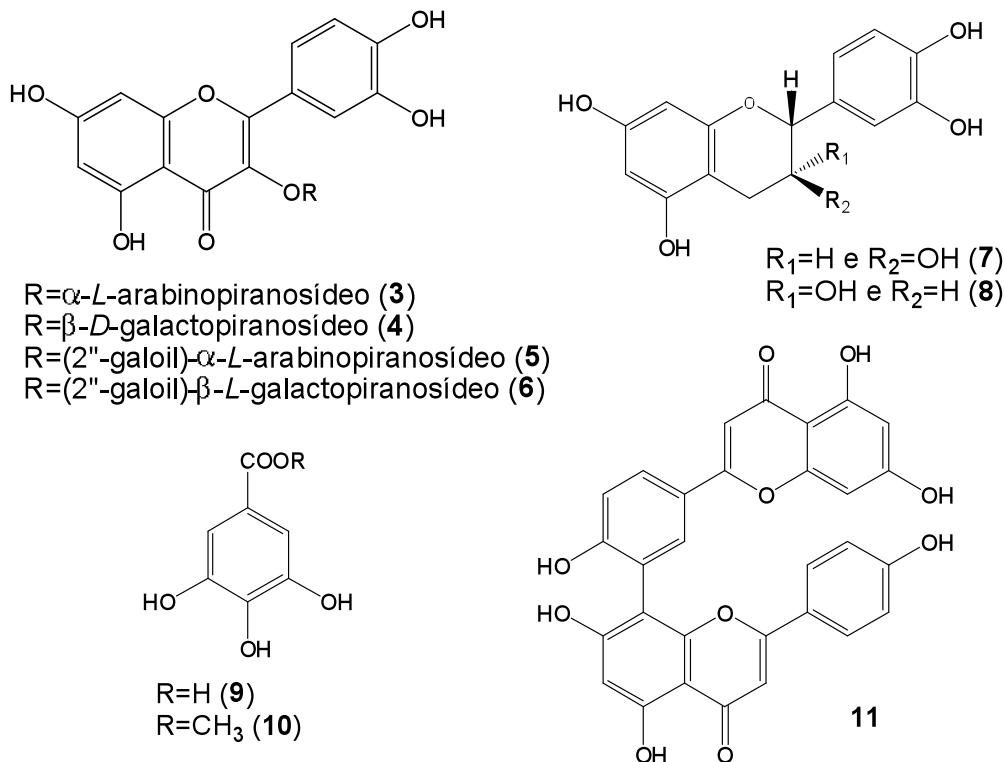


Figura 2 – Substâncias isoladas de *Byrsonima intermedia*.

Figueiredo *et al.* (2005) isolaram de *Byrsonima cinera* os flavonóides quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (3) e (+)-catequina (7), além de comprovarem a atividade antidiarréica dos extratos metanólico e hidrometanólico das suas folhas em camundongos.

O estudo fitoquímico das cascas de *Byrsonima crassifolia*, que são usadas medicinalmente pelos índios Mixe (do México) para tratar desordens gastrointestinais e infecções na pele, levou ao isolamento de proantocianidinas, taninos e ácido gálico (9) (Geiss *et al.*, 1995). Já o estudo de suas folhas levou ao isolamento de glicolipídeos, triterpenos, ácidos triterpênicos, catequinas, e flavonóides (Rastrelli *et al.*, 1997).

Um estudo realizado por Mendes *et al.* (1999) com *Byrsonima microphylla* levou à identificação de uma mistura de triterpenos esterificados: 3 β -eicosanato, -estearato e -palmitato de 24-hidroxi-urs-12-enila (12, 13 e 14, respectivamente), 3 β -eicosanato, -estearato e -palmitato de 24-hidroxi-olean-12-enila (15, 16 e 17,

respectivamente); de dois triterpenos: ácido oleanólico (**18**) e ácido 3 β ,21 α -diidroxius-12-en-28-óico (**19**); do derivado fenólico galato de metila (**10**) e do flavonóide quercetina (**1**).

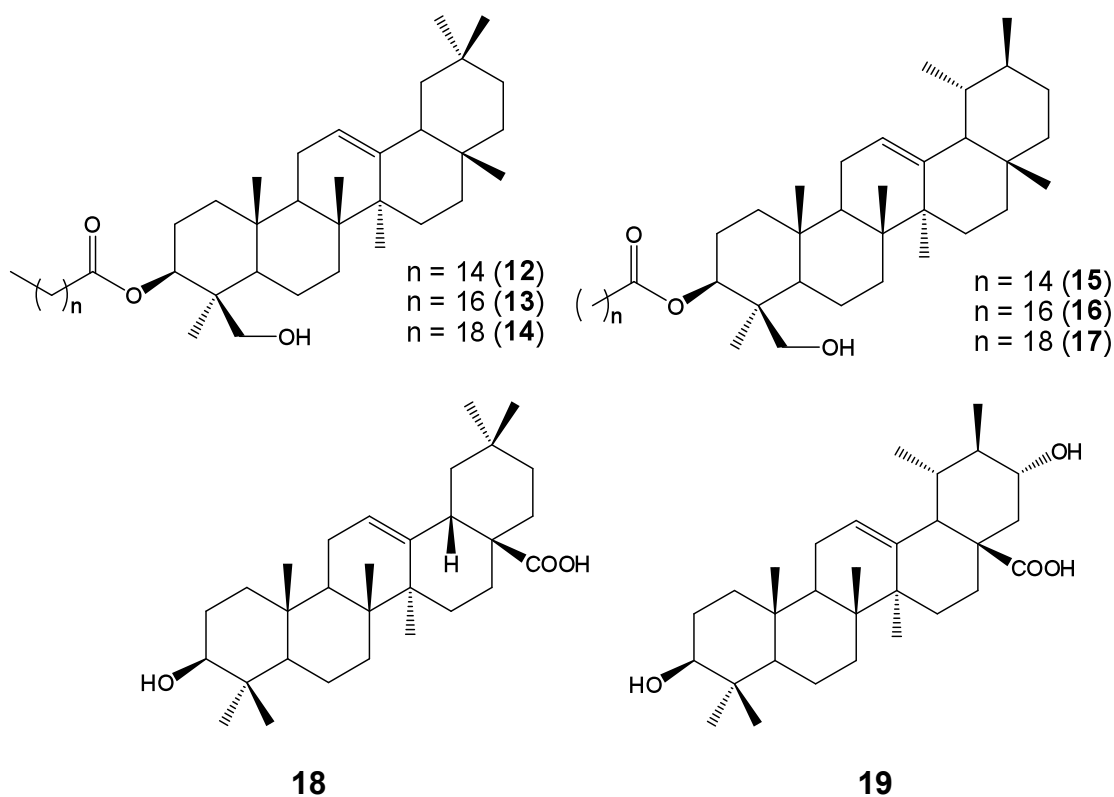
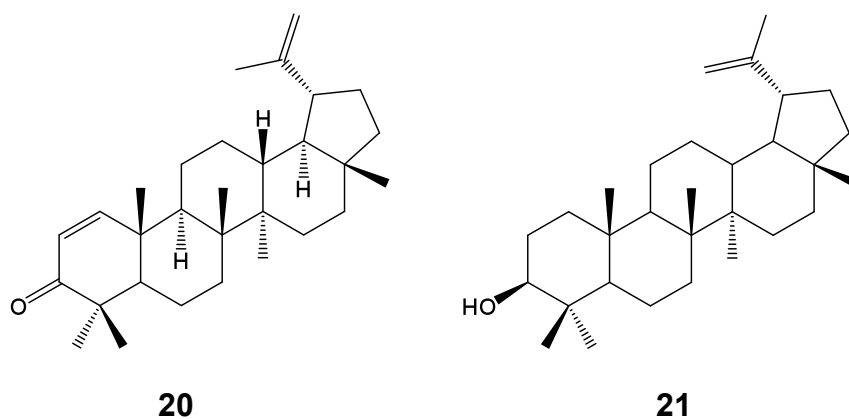


Figura 3 – Substâncias isoladas de *Byrsonima microphylla*.

Outro estudo fitoquímico de *Byrsonima microphylla*, feito por Aguiar *et al.* (2005), levou ao isolamento dos triterpenos Δ^1 -lupenona (**20**), lupeol (**21**), β -amirina (**22**) e betulina (**23**); dos antracenos: 3-hidróxi-2-metóxi-8,8,10-trimetil-8H-antracén-1,4,5-triona (**24**), 3,7-dihidróxi-2-metóxi-8,8,10-trimetil-7,8-dihidro-6H-antracén-1,4,5-triona (**25**); do fenantreno: (2S,10 α R)-2,8-dihidróxi-6-metóxi-1,1,7-trimetil-2,3,10,10a-tetrahydro-1H-fenantren-9-ona (**26**) e do flavonóide: (2S,3S)-3-O-hidróxi-40,5,7-trimetóxi-flavan-3-ol (**27**).



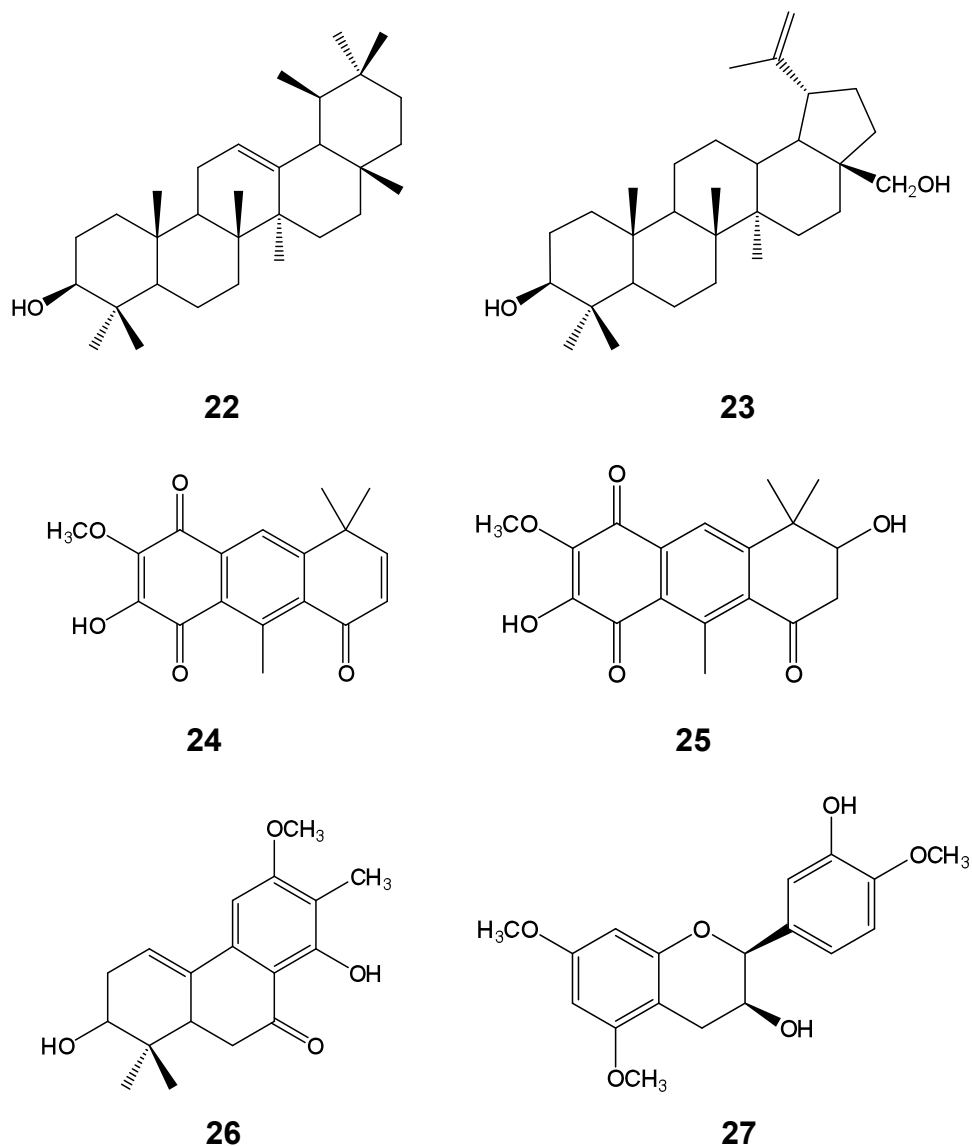


Figura 4 – Outras substâncias isoladas de *Byrsonima microphylla*.

Danelli *et al.* (2009) estudaram a atividade antileishmania de *Lophanthera lactescens* Ducke, um membro da família Malpighiaceae encontrado na região Amazônica. Já é relatado o uso da infusão das folhas e raízes dessa planta no tratamento da malária por indígenas dessa região. O estudo fitoquímico da madeira de *L. lactescens* relatou a presença dos esteróides: estigmast-4,22-dien-3-ona (**28**); ergost-4-en-3-ona (**29**); estigmasterol (**30**); e ergost-5-en-3-ol (**31**) e dos triterpenos: β -amirenona (**32**) e LLD-3 (**33**). Este último, que apresentou resultados promissores nos testes biológicos, demonstrou ser uma droga candidata ao tratamento da leishmaniose.

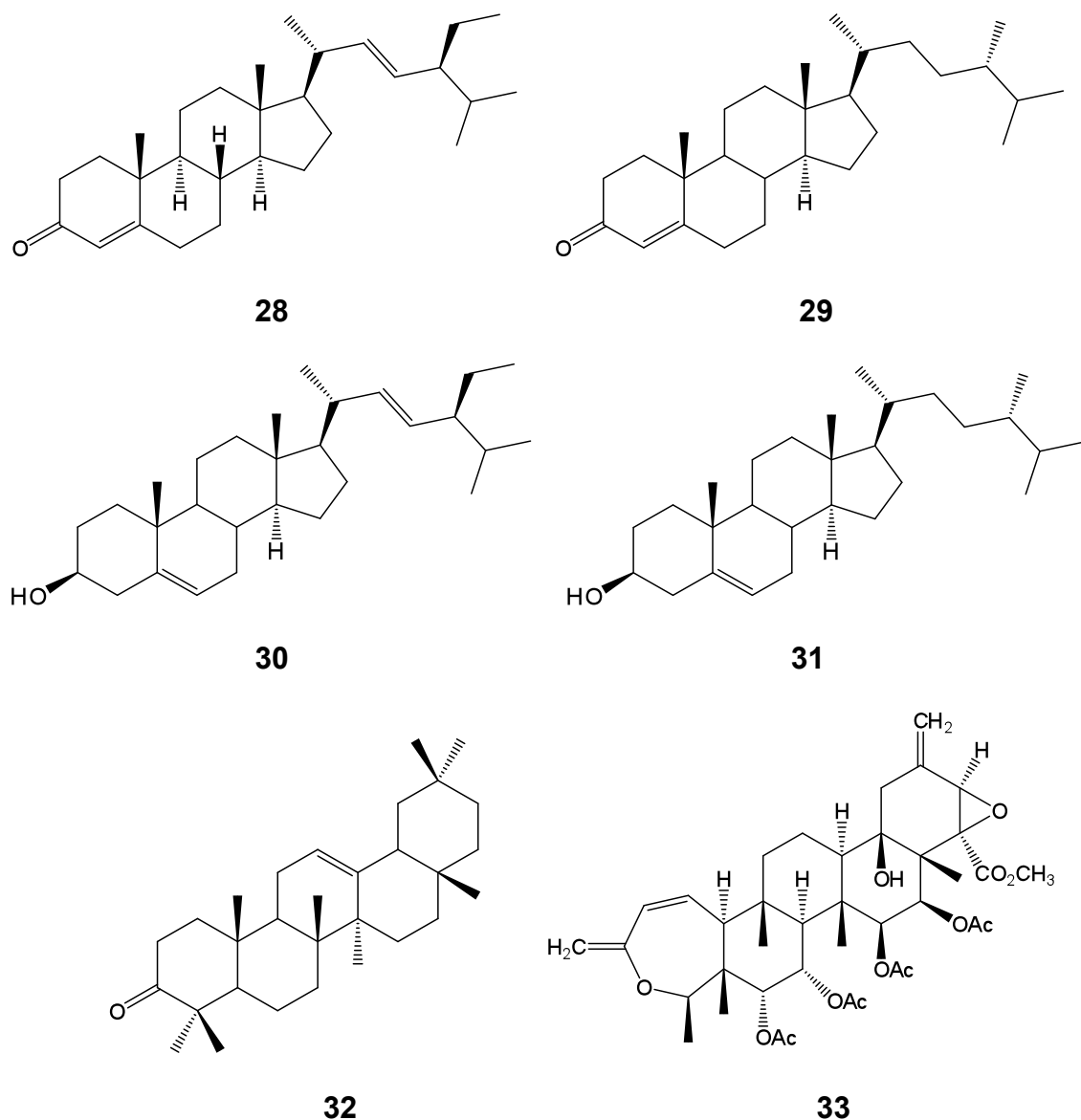


Figura 5 - Substâncias isoladas de *Lophanthera lactescens*.

Diplopterys cabrerana (também conhecida como Oco yajé), uma espécie muito conhecida da família Malpigiaceae, é utilizada no preparo da bebida Ayahuasca. Ayahuasca, um termo quéchua que significa "trepadeira das almas", é uma bebida alucinógena utilizada por muitos indígenas e grupos religiosos (como Santo Daime, Barquinha e União do Vegetal) como sacramento, para induzir estados místicos e espirituais, e para produzir euforia e embriaguez (McKenna, 2004). Ayahuasca é uma infusão ou decocto preparado a partir do cipó *Banisteriopsis caapi* juntamente com uma mistura de várias plantas, sendo utilizadas com maior frequência as espécies *Psychotria viridis* ou *Diplopterys cabrerana*. As folhas dessas plantas, que são necessárias para os efeitos psicoativos da

ayahuasca, contém os alucinógenos *N,N*-dimetiltriptamina (DMT) (**28**) e 5-metóxi-dimetiltriptamina (**29**) (Adam *et al.*, 2008).

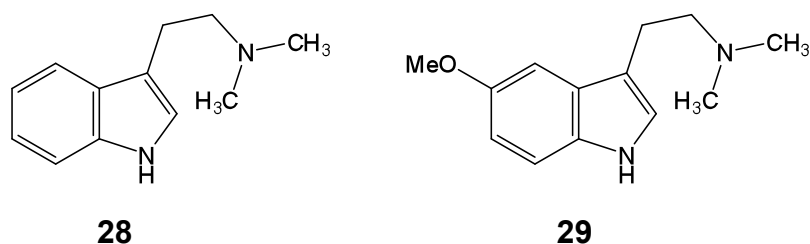


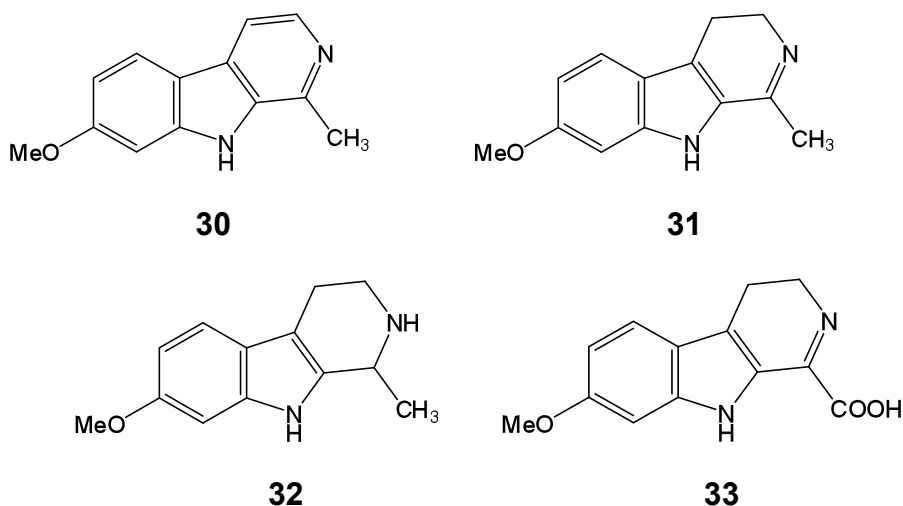
Figura 6 - Substâncias isoladas de *Diplopterys cabrerana*.

1.2.2 O gênero *Banisteriopsis*

O gênero *Banisteriopsis*, que é composto de 92 espécies, é um gênero neotropical de cipós e arbustos, distribuídos principalmente no Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador e Peru (Wang *et al.*, 2010).

Tradicionalmente, *Banisteriopsis caapi* é usada como adjuvante junto à *Psychotria viridis* (também conhecida como chacruna) ou *Diplopterys cabrerana* para o preparo da bebida sagrada e psicoativa Ayahuasca (Wang *et al.*, 2010).

Estudos fitoquímicos em espécies do gênero *Banisteriopsis*, como *B. caapi*, *B. inebrians* e *B. argentea*, estão, até hoje, mais focados em alcalóides β -carbolínicos (Dias, 1977). Os três alcalóides majoritários encontrados em *B. caapi* são a harmina (**30**), harmalina (**31**), tetrahydroharmina (**32**) (McKenna, 2004). Hashimoto e Kawanishi (1975) isolaram outros três alcalóides β -carbolínicos de *B. caapi*: ácido harmalínico (**33**), *N*-óxido-harmina (**34**) e éster metílico do ácido hármico (**35**). Mais tarde, Kawanishi *et al.* (1982) reportaram o isolamento de dois alcalóides de núcleos pirrolidínicos, de *B. caapi*: shihunina (**36**) e dihidroshihunina (**37**).



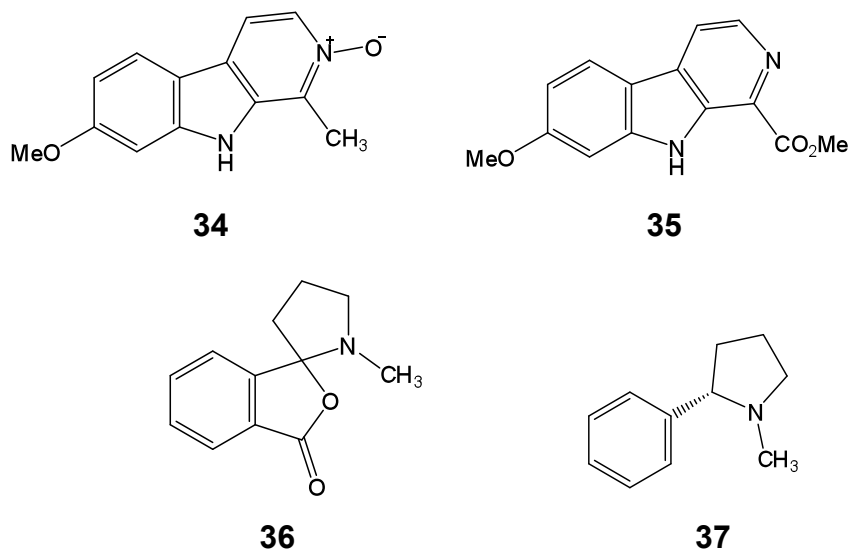


Figura 7 - Substâncias isoladas de *Banisteriopsis caapi*.

Aquino *et al.* (1990) isolaram de *B. caapi* os esteróides estigmasterol (**38**) e β -sitosterol (**39**); os triterpenos ácido ursólico (**40**) e ácido oleanólico (**18**); e o sesquiterpeno nerolidol (**41**).

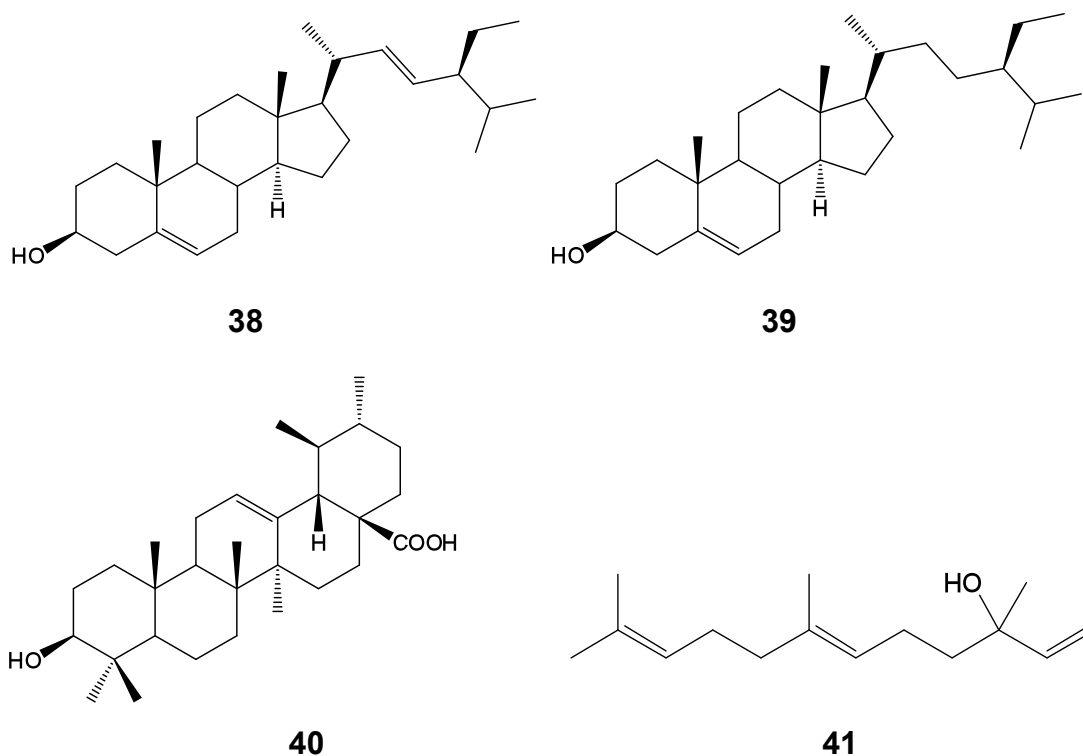


Figura 8 – Outras substâncias isoladas de *Banisteriopsis caapi*.

Ghosal e Mazumder (1971) isolaram de *Banisteriopsis argentea*, espécie que também pode ser empregada no preparo da Ayahuasca, os alcalóides (+)-*N*-metiltetrahydroharmano (**42**), 5-metóxi-tetrahydroharmano (**43**), *N,N*-dimetilriptamina (**28**),

N-óxido-*N,N*-dimetiltriptamina (44), tetrahydroharmina (32), harmalina (31), colina (45) e betaína (46).

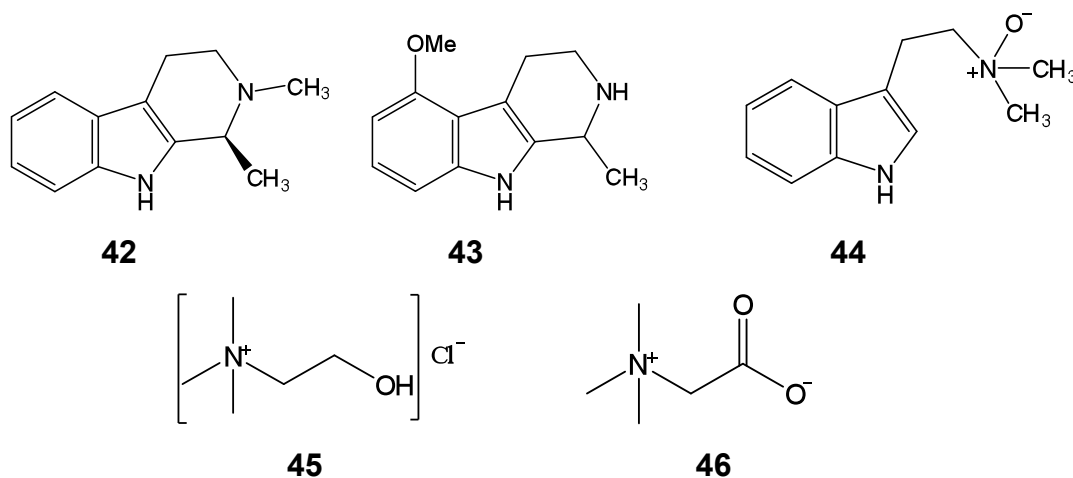


Figura 9 - Substâncias isoladas de *Banisteriopsis argentea*.

1.2.3 *Banisteriopsis anisandra*

Banisteriopsis anisandra (A. Juss) B. Gates, popularmente conhecida como “cipó-de-prata” (Gates, 1982) ou “perinha” (Silva, 2006), é uma espécie da família Malpighiaceae, encontrada na região do Cerrado dos estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo e Bahia (Gates, 1982).

O extrato aquoso de suas folhas é utilizado na medicina popular para o tratamento tópico de infecções fúngicas. Esse foi o motivo que despertou o interesse do nosso grupo de pesquisa sobre essa espécie.

Não existe ainda nenhuma publicação do estudo dos constituintes químicos de *B. anisandra*. A maioria dos estudos fitoquímicos do gênero *Banisteriopsis* está focada na farmacologia dos alcalóides β-carbolínicos psicoativos.

1.2.3.1 Classificação taxonômica

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Malpighiales

Família: Malpighiaceae

Gênero: *Banisteriopsis*

Espécie: *Banisteriopsis anisandra*

1.2.3.2 Morfologia

B. anisandra é uma liana (cipó). Seus ramos têm coloração verde-marrom. Quando jovens, os ramos são chatos, mas depois tornam-se cilíndricos. As folhas são dorsiventrals, hipoestomáticas, com estômatos paracíticos e com células da epiderme adaxial alongadas no sentido anticlinal. As células da epiderme abaxial em vista frontal têm a superfície não papilosa. Apresenta fruto com três sâmaras, cada uma com uma ala dorsal bem desenvolvida e espessamento na margem superior, além de estípulas interpeciolares, pedicelos sésseis, dez estames férteis e três estiletes com estigmas terminais e tricomas em forma de T (Araújo, 2008).

A inflorescência é amarela, sendo que as flores crescem em pares, nas laterais dos ramos. As pétalas são amarelas, lisas, dentadas. Produz poucos frutos, que madurecem rapidamente e logo são dispersos no solo. Ao contrário da maioria das espécies de *Banisteriopsis*, que florescem na estação chuvosa, *B. anisandra* floresce durante o inverno e na seca (Gates, 1982).



Figura 10 - Foto de *Banisteriopsis anisandra* (A. Juss)

2 OBJETIVOS

Foram os objetivos deste trabalho:

- O estudo fitoquímico das raízes e folhas de *Banisteriopsis anisandra*;
- Avaliação das atividades biológicas (antioxidante, alelopática, antimicrobiana, antifúngica e citotóxica) de extratos, frações e/ou substâncias isoladas desta espécie;
- Comprovação do uso popular da espécie *Banisteriopsis anisandra* para o tratamento tópico de infecções fúngicas através de teste de atividade antifúngica do extrato aquoso de suas folhas.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e métodos

Equipamentos, métodos gerais e testes químicos

Os critérios de pureza adotados foram: visualização de uma mancha única em CCDS com eluentes de diferentes polaridades, ponto de fusão, bandas de absorção bem definidas no espectro da região do infravermelho e análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C .

Os solventes utilizados na cromatografia em coluna – acetato de etila, acetona, álcool metílico, benzeno, clorofórmio, diclorometano, n-hexano - foram todos P.A. das marcas Merck, Synth, Quimex e Vetec. O álcool etílico utilizado para extração tinha grau de pureza comercial 96 ou 92 °GL.

As confirmações das substâncias isoladas realizadas por comparação direta envolveram o uso de no mínimo duas das seguintes técnicas: faixa de fusão, CCDS em pelo menos duas diferentes misturas de eluentes, CGAR com padrões, dados do espectro na região do IV e dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C .

A concentração dos extratos e frações foi realizada em evaporador rotatório Büchi Waterbath, sob pressão reduzida.

Cromatografia líquida em coluna (CC)

Para CC foram utilizadas sílica gel 60 Merck (70-230 Mesh), sílica gel 60 Merck (230-400 Mesh, para cromatografia flash), poliamida e Sephadex LH-20. A proporção da amostra e fase estacionária foi, em geral, entre 1:20 a 1:30. Na coluna de Sephadex LH-20, a proporção de mL de suspensão do polímero e de miligrama da amostra foi de aproximadamente 1:1.

A série eluotrópica utilizada nas colunas de sílica gel 60 Merck (70-230 Mesh) variou de acordo com a polaridade da amostra, mas sempre obedecendo a ordem crescente de polaridade: n-hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Nessas colunas, o material a ser cromatografado foi sempre antes incorporado a uma pequena quantidade de sílica.

Para cromatografia em coluna rápida (cromatografia “flash”) foi utilizada sílica gel Merck (230-400 Mesh) como fase estacionária, e a eluição foi isocrática. A altura

e o diâmetro das colunas, assim como a fase móvel, foram estabelecidos de acordo com Still e colaboradores (Still *et al.*, 1978).

Para cromatografia por adsorção em poliamida, a série eluotrópica seguiu uma ordem decrescente de polaridade, iniciando-se por água e terminando com acetato de etila.

Para cromatografia por exclusão foi utilizada como fase estacionária Sephadex LH-20, da Sigma Aldrich, em coluna de 1,2 cm de diâmetro por 45 cm de altura. Os eluentes utilizados foram misturas de clorofórmio e metanol nas proporções 6:4 ou 1:1.

Cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCDS)

A cromatografia em camada delgada foi feita utilizando-se sílica gel 60 G Merck, com espessura de 0,25 mm (para análise qualitativa) ou 0,50 mm (para escala preparativa) sobre placas de vidro, ativadas a 100 °C. Foram utilizados como reveladores vapores de iodo (revelador universal), solução de vanilina/ ácido sulfúrico 20% (v/v) seguido de aquecimento, solução ácida de sulfato cérico seguido de aquecimento (revelador universal), reagente de Dragendorff (revelador específico para aminas), solução de NST/PEG (revelador específico para flavonóides) e luz UV.

Cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR)

A cromatografia gasosa de alta resolução foi realizada em um Cromatógrafo Varian CP-3380, equipado com coluna: DB5 30m x 0,25mm (J&W Scientific). Temp. coluna: 50 °C (1min), 10 °C/min, até 300 °C. Temp. injetor: 300 °C, Split: 1/100. Temp. detector FID: 300 °C. Volume de injeção: 1 µL (conc. 1,0% em hexano).

Pesagem

A pesagem de materiais de até 100 g foi utilizada uma balança analítica da marca Mettler Toledo, modelo AB104. A pesagem de materiais acima de 100 g foi feita em uma balança da marca Mettler, modelo PM 600.

Ponto de fusão

Os pontos e as faixas de fusão foram determinados em aparelho digital MQAPF - 302 e não foram corrigidos (Departamento de Química, UFMG).

Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , subespectros DEPT-135 e mapas de contornos (COSY, HMBC e HMQC) foram obtidos em espectrômetros Bruker Avance DPX-200 (200 MHz) e DRX 400 (400 MHz), do Departamento de Química, ICEX, UFMG. Os solventes deuterados empregados na solubilização das amostras foram CDCl_3 , CD_3OD ou $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$. Como referência interna foram utilizados o pico do tetrametilsilano (TMS) presente no clorofórmio deuterado (δ_{H} e δ_{C} 0,00 ppm), o pico do metanol (δ_{H} 3,31 ppm e δ_{C} 49,00 ppm) ou o pico da acetona (δ_{H} 2,05 ppm e δ_{C} 29,84 ppm) (Gottlieb *et al.*, 1997). Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J), em Hertz (Hz).

Espectrometria na região do IV

Os espectros na região do IV foram obtidos no aparelho Perkin-Elmer *Spectrum One SP-IR Spectrometer* (Departamento de Produtos Farmacêuticos, UFMG), por inserção direta da amostra.

Espectrometria de massas

Alguns espectros foram obtidos em equipamento Thermo Finnigan LCQ, equipado com fonte de ionização por spray eletrostático, do Centro de Pesquisas René Rachou. Outros espectros foram obtidos em equipamento Esquire 3000 Plus, da Bruker Daltonics, da Central Analítica do Instituto de Química da USP. Todas as amostras foram solubilizadas em metanol, e analisadas no modo positivo ou negativo.

Testes químicos

Algumas frações dos extratos vegetais foram submetidas ao teste de Liebermann-Burchard (LB), que consiste em dissolver a amostra em clorofórmio, adicionar gotas de anidrido acético, agitar e, finalmente, adicionar lentamente gotas de H_2SO_4 . O aparecimento de cor violeta ao azul permanente sugere a presença de triterpenos pentacíclicos, enquanto o aparecimento de uma cor azul que logo se transforma em verde sugere a presença de esteróides (Ugaz, 1988).

3.2 Material Vegetal

3.2.1 - Coleta e identificação

O material vegetal (raízes e folhas de *Banisteriopsis anisandra*) foi coletado na região de Curvelo, Minas Gerais, em abril de 2007 (1ª coleta) e em fevereiro de 2009 (2ª coleta). A identificação botânica foi realizada pelo professor Dr. João Renato Stehmann, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. A exsicata está depositada no Herbário do Museu de História Natural da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o número 48724.



Figura 11 - Raízes e folhas de *Banisteriopsis anisandra* – 2ª Coleta

3.2.2 - Preparação de extratos

- **Extrato Etanólico das Folhas de *B. anisandra* (EEF1) – 1ª coleta**

As folhas secas e pulverizadas (453,05 g) foram extraídas com 7 L de etanol 96 °GL, à temperatura ambiente. Após evaporação do solvente, obteve-se 27,16 g do extrato etanólico bruto das folhas de *B. anisandra* (EEF1).

- **Extrato Etanólico das Folhas de *B. anisandra* (EEF2) – 2ª coleta**

As folhas secas e pulverizadas (877,10 g) foram extraídas com 8 L de etanol 96 °GL, à temperatura ambiente. Após evaporação do solvente, obteve-se 80,51 g do extrato etanólico bruto das folhas de *B. anisandra* (EEF2).

- **Extrato Etanólico das Raízes de *B. anisandra* (EER1) – 1ª coleta**

1,49 Kg de raízes foram moídas e secadas em estufa a 40 °C. Em seguida, realizou-se uma extração exaustiva, à temperatura ambiente, com 14 L de etanol, utilizando-se um percolador. 135,55 g do extrato etanólico seco das raízes de *B. anisandra* (EER1) foram obtidos após destilação do solvente sob pressão reduzida.

- **Extrato Hexânico das Raízes de *B. anisandra* – (EHR2) – 2ª coleta**

2,50 Kg de raízes foram moídas e secadas em estufa a 40 °C. Em seguida, realizou-se uma extração exaustiva, à temperatura ambiente, com 15 L de hexano, utilizando-se um percolador. 4,60 g do extrato hexânico seco das raízes de *B. anisandra* (EHR2) foram obtidos após destilação do solvente sob pressão reduzida.

- **Extrato Etanólico das Raízes de *B. anisandra* (EER2) – 2ª coleta**

As raízes, após sofrerem extração com hexano, foram extraídas exaustivamente com 14 L de etanol 96 °GL, num percolador, à temperatura ambiente. 113,00 g do extrato etanólico seco das raízes de *B. anisandra* (EER2) foram obtidos após destilação do solvente sob pressão reduzida.

- **Extrato em Acetato de Etila das Raízes de *B. anisandra* (EAR2) – 2ª coleta**

O extrato em acetato de etila foi obtido após extração direta do EER2 seco com este solvente (partição fase aquosa/ fase orgânica). 4,40 g do extrato em acetato de etila das raízes foram obtidos, após destilação do solvente.

3.2.3 - Marcha química para extração de alcalóides das raízes de *B. anisandra*

Duas marchas químicas diferentes foram realizadas a fim de se isolar alcalóides das raízes de *B. anisandra*. A primeira iniciou-se com a acidificação do meio, visando ao isolamento de alcalóides presentes no material vegetal na forma de base livre; a outra iniciou-se com a basificação do meio, visando à obtenção de alcalóides presentes na forma de sal orgânico.

No primeiro procedimento, 85,00 g do EER1 foram dissolvidos em solução aquosa de HCl 43% (v/v) até atingir um valor de pH 2. Após sofrer partições com éter etílico, a fase aquosa foi basificada com solução concentrada de NH₄OH até atingir pH 9. Extração com éter etílico levou à obtenção de uma fração orgânica supostamente rica em alcalóides (**Figura 12**, pág. 17). No entanto, não foi verificada a presença de alcalóides, por meio da revelação com o reagente Dragendorff, nem nessa fração nem nas outras frações e nem no extrato bruto.

No segundo procedimento (**Figura 13**, pág. 17), as raízes secas e moídas foram alcalinizadas com 1 L de solução de NH₄OH 25% (v/v). Após filtrar a suspensão e extrair o filtrado com 1 L de clorofórmio, adicionaram-se 800 mL de HCl 2 % à fase orgânica. A fase aquosa foi recolhida e alcalinizada com solução

concentrada de NaOH até pH 9. Extração com clorofórmio etílico levou à obtenção de uma fração orgânica supostamente rica em alcalóides que, mais uma vez, não demonstrou a presença de alcalóides com reagente Dragendorff.

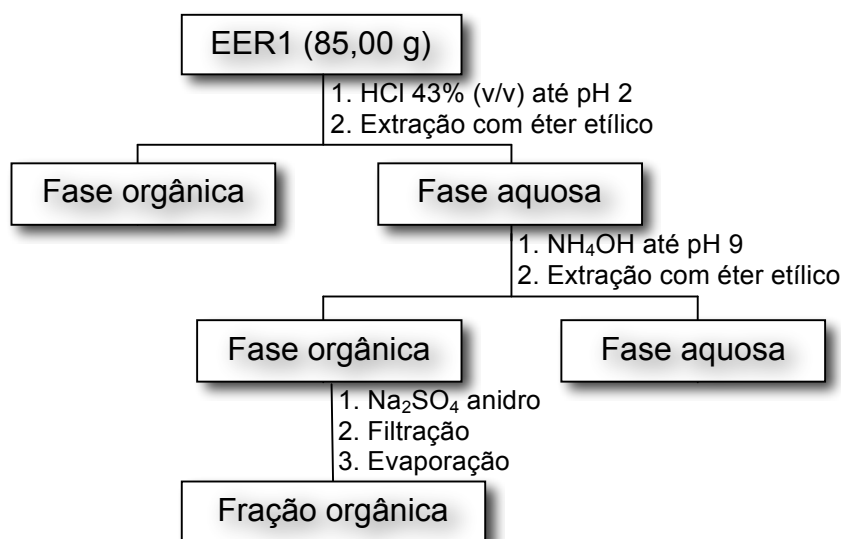


Figura 12 - Fluxograma da primeira marcha química para extração de alcalóides do extrato etanólico das raízes de *B. anisandra*.

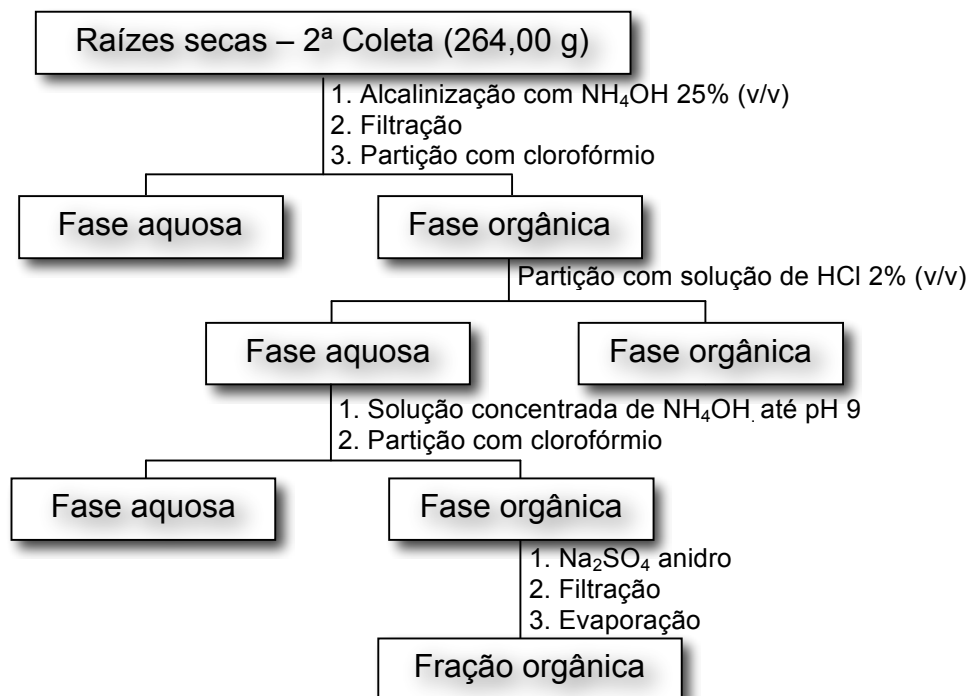


Figura 13 - Fluxograma da segunda marcha química para extração de alcalóides das raízes de *B. anisandra*.

3.2.4 - Marcha química para extração de alcalóides das folhas de *B. anisandra*

O extrato etanólico bruto das folhas de *B. anisandra* também foi submetido a duas marchas químicas diferentes, a fim de se isolar alcalóides.

No primeiro procedimento (**Figura 14**), 80,51 g do EEF2 foram dissolvidos em 400 mL de uma solução aquosa de HCl 43% (v/v) até atingir um valor de pH 2. Após sofrer partições com éter etílico, a fase aquosa foi basificada com solução concentrada de NH_4OH até atingir um valor de pH entre 9 e 10. Extração posterior com éter etílico levou à obtenção de uma fração orgânica supostamente rica em alcalóides. No entanto, não foi verificada a presença de alcalóides, por meio da revelação com o reagente Dragendorff, nem nessa fração nem nas outras frações e nem no extrato bruto.

A fração aquosa 2, de caráter básico, foi neutralizada e extraída com acetato de etila. 2,1 g de um sólido amarelo foram obtidos após remoção do solvente. Essa fração orgânica neutra, de coloração amarela, foi posteriormente purificada.

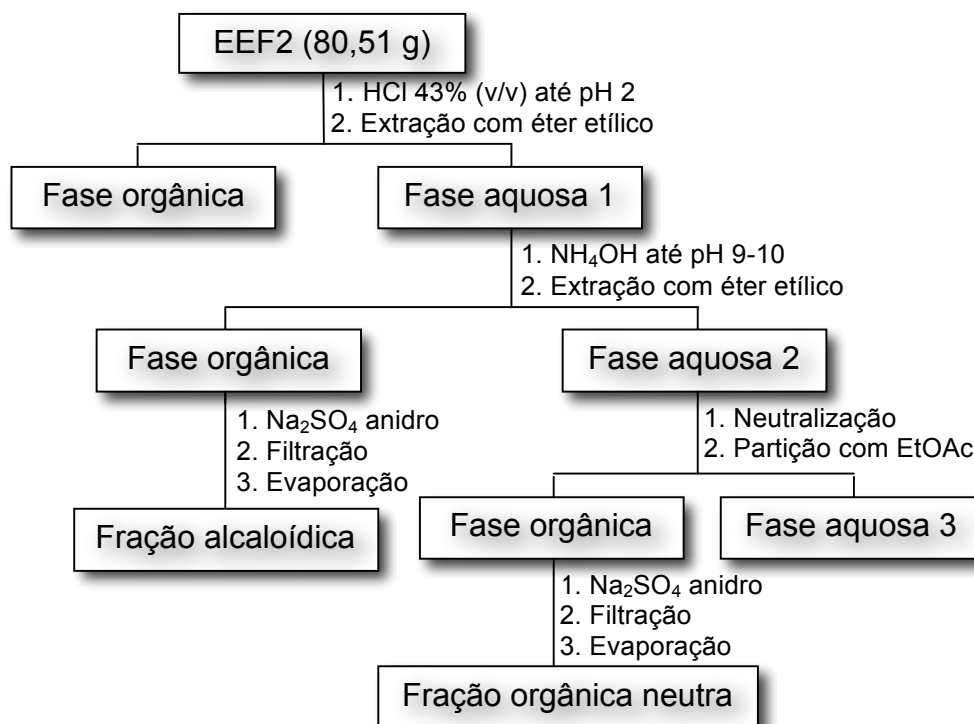


Figura 14 - Fluxograma da terceira marcha química para extração de alcalóides do extrato etanólico das folhas de *B. anisandra*.

No segundo procedimento (esquema semelhante ao da **Figura 13**, pág. 17), 251,00 g de folhas secas e moídas foram alcalinizadas com 1 L de solução de NH_4OH 25% (v/v). Após filtrar a suspensão e extrair o filtrado com 500 mL de

clorofórmio, adicionaram-se 600 mL de HCl 2 % (v/v) à fase orgânica. A fase aquosa foi recolhida e alcalinizada com solução concentrada de NH₄OH até pH 9. Extração com éter etílico levou à obtenção de uma fração orgânica supostamente rica em alcalóides que, mais uma vez, não apresentou nenhuma mancha em CCDS laranja quando revelada com o reagente Dragendorff.

3.2.5 - Fracionamento do Extrato Etanólico das Folhas de *Banisteriopsis anisandra* – (EEF1)

O extrato etanólico seco das folhas de *B. anisandra* (EEF1) (27,16 g) foi submetido a cromatografia em coluna de sílica gel, tendo sido coletadas 132 frações de aproximadamente 250 mL cada, utilizando para eluição a ordem eluotrópica usual, iniciando-se pelo hexano até chegar ao metanol. As frações foram reunidas em 5 grupos, de acordo com comparação do perfil cromatográfico em CCDS. Deste extrato foi possível isolar e identificar 3 substâncias puras, além de 1 mistura de compostos.

Grupo 1: frações 1-44 (108 mg)

O material deste grupo apresentou-se como uma cera de cor amarela. Análise por CCDS indicou duas manchas azuis, após revelação com sulfato cérico. O material foi submetido a cromatografia em coluna de sílica gel, eluída com benzeno e mistura de benzeno/acetona 9:1, em capela. Foram coletadas 14 frações, de 8 mL cada, que foram posteriormente reunidas em 3 subgrupos. O subgrupo 1 (F. 1-3) (92 mg), uma cera cor branca, foi denominado **F1** e identificado como uma mistura de hidrocarbonetos saturados de cadeia longa.

Grupo 2: fração 45 (82 mg)

Apresentou-se como uma cera de cor amarela. Foi submetido a cromatografia em coluna de sílica gel, eluída com benzeno, mistura de benzeno/acetona 1:1 e acetona, em capela. Foram coletadas 21 frações, de 5 mL cada, que foram posteriormente reunidas em 5 subgrupos. O subgrupo 2 (F. 2-4) foi codificado **F2** (21 mg) e identificado como ácido palmítico. O subgrupo 3 (F.6-8) (28 mg) foi lavado com metanol, e o sólido branco cristalino obtido foi denominado **F3** e identificado como lupeol. Os demais subgrupos apresentaram misturas com pouca quantidade de material e não foram trabalhados.

Grupo 3: frações 46-100 (1,23 g)

O material deste grupo apresentou-se como um material amorfo verde. Essa fração não foi trabalhada. Análise por CCDS indicou coloração característica de clorofila (verde a olho nu e vermelha sob luz UV).

Grupo 4: frações 101-119 (2,4 g)

O material deste grupo apresentou-se como um material amorfo de coloração marrom escura. A presença de uma mancha amarela por CCDS foi sugestiva da presença de flavonóide. Primeiramente, realizou-se uma partição desse grupo utilizando-se *n*-hexano (onde a clorofila ficou retida) e metanol (onde a substância de coloração amarela estava presente). Duas purificações sucessivas da fração metanólica - 2 colunas de Sephadex LH-20, utilizando-se como eluente uma mistura de clorofórmio/metanol 6:4 - levaram ao isolamento de **F4** (19 mg), identificado como quercetina-3-O-ramnosídeo.

Grupo 5: frações 120-132 (5,8 g)

O material deste grupo apresentou-se como um material amorfo de coloração marrom escura. A análise por CCDS mostrou grande retenção da mistura no ponto de aplicação. Optou-se em não trabalhar com esse grupo muito polar, devido às dificuldades para se trabalhar com esse tipo de material.

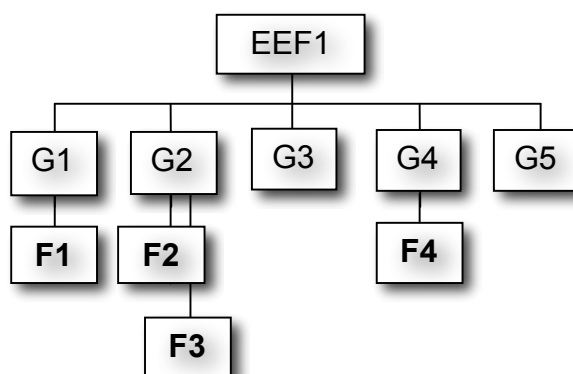


Figura 15 - Fluxograma do processo de fracionamento do EEF1

3.2.6 - Fracionamento da Fração Orgânica Neutra obtida da marcha química para extração de alcalóides das folhas de *B. anisandra*

A fração orgânica neutra (**Figura 48**, pág. 18) (2,10 g) foi submetida a cromatografia em coluna de sílica gel, sendo recolhidas 55 frações de 40 mL cada. A ordem eluotrópica utilizada iniciou-se a partir de uma mistura de diclorometano/acetato de etila 1:1 e terminou com metanol puro. As frações foram

reunidas em 4 grupos, sendo o grupo 3 (que foi eluído em acetato de etila/metanol 8:2), o de interesse, pois continha a maior parte do composto com mancha amarela e quantidade considerável de material (861 mg). Os grupos 1 e 2 apresentaram muitas impurezas e pouca massa, o que inviabilizou o estudo dessas frações. O grupo 4 apresentou-se como uma mancha vermelha bem escura, que ficou muito retida em CCDS, mesmo em eluentes mais polares. Posterior cromatografia do grupo 3 em Sephadex LH-20, utilizando-se como eluente uma mistura de clorofórmio/metanol 6:4, levou ao isolamento de **F4** (803 mg), de ponto de fusão 193-194 °C, identificado como quercetina-3-O-ramnosídeo.

3.2.7 - Fracionamento do Extrato Hexânico das Raízes de *Banisteriopsis anisandra* – (EHR2)

O extrato hexânico seco das raízes de *B. anisandra* (EHR2) (4,6 g) foi submetido a cromatografia em coluna de sílica gel, sendo coletadas 50 frações de aproximadamente 250 mL cada, sendo utilizados para eluição hexano, misturas em diferentes proporções de hexano/diclorometano, diclorometano, misturas em diferentes proporções de diclorometano/acetato de etila, e acetato de etila. As frações foram reunidas em 10 grupos, de acordo com comparação do perfil cromatográfico em CCDS. Deste extrato foi possível isolar e identificar 7 substâncias puras, além de 2 misturas.

Grupo 1: fração 1-17 (307 mg)

O material deste grupo apresentou-se como um óleo transparente-amarelado. Análise por CCDS indicou apenas uma mancha azul, após revelação com sulfato cérico. **R1** (307 mg) foi identificado como uma mistura de hidrocarbonetos saturados de cadeia longa.

Grupo 2: frações 18-19 (335 mg)

Apresentou aspecto oleoso, com alguns sólidos esbranquiçados. O material foi submetido a cromatografia em coluna de sílica gel, eluída com benzeno e misturas em diferentes proporções de benzeno/acetona. Foram coletadas 14 frações, de 8 mL cada, que foram posteriormente reunidas em 3 subgrupos. O subgrupo 1 (F. 1-3) (289 mg) que apresentou, por CCDS, duas manchas azuis de Rf muito próximos após revelação com vanilina/ácido sulfúrico a 20%, foi submetido a

cromatografia em coluna rápida de sílica gel (230-400 Mesh), sendo a eluição isocrática, utilizando-se uma mistura de hexano/acetato de etila 9:1, fluxo da coluna: 2 mL/min., coluna de 16 cm altura x 1 cm diâmetro. Uma cera branco-amarelada foi isolada e denominada **R2** (12 mg), identificada como oleato de β -sitosterila. O subgrupo 2 (F. 4-9) apresentou muitas impurezas e pouca quantidade, o que inviabilizou futuras purificações. O subgrupo 3 apresentou-se como um óleo amarelo, mas não foi estudado devido à pequena quantidade de material e presença de mais impurezas.

Grupo 3: frações 20-25 (86 mg)

Apresentou aspecto oleoso, de cor amarela claro. Apresentou, por CCDS, mancha azul fluorescente com visualização no UV-visível. Devido à grande quantidade de substâncias e à pequena quantidade de material, esta fração não foi trabalhada.

Grupo 4: frações 26-30 (184 mg)

Apresentou aspecto oleoso, com cristais amarelos. A mancha observada em CCDS mostrou absorção no UV, com coloração azul fluorescente. O material foi submetido a cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, utilizando-se como eluente uma mistura de clorofórmio/metanol 6:4. Foram recolhidas 32 frações, de 3 mL cada, que foram reunidas em 3 subgrupos. O subgrupo 1 (F. 1-4) apresentou muitas impurezas e pouca quantidade de material. O subgrupo 2 (F. 5-7) (19 mg) foi recromatografado em uma coluna de sílica gel, eluída com benzeno e benzeno/acetona 9:1, e **R3** (14 mg) foi obtido como cristais incolores, identificado como friedelina. Finalmente, os subgrupos 3 (F. 8-9) e 4 (F. 11-32) apresentaram muita impureza e pouca quantidade, o que inviabilizou futuras purificações.

Grupo 5: fração 31-33 (409 mg)

Apresentou-se como cristais amarelados. O material foi submetido a cromatografia em coluna de sílica gel, eluída com misturas em diferentes proporções de *n*-hexano/ diclorometano. Foram coletadas 33 frações, de 10 mL cada, que foram posteriormente reunidas em 4 subgrupos. Análise comparativa dos subgrupos 1 (F. 1-21) e 2 (F. 22-24) em CCDS com padrão de friedelina (**R3**) indicou a presença desse composto. Análise comparativa do subgrupo 4 (F. 27-29) em CCDS com padrão de lupeol (**F3**) indicou a presença desse composto. O subgrupo 3 (F.25-26)

(137 mg) apresentou grande quantidade de substância amarela, de Rf intermediário aos outros dois compostos citados acima. Este material foi reunido ao Grupo 6 e ao subgrupo 2 do Grupo 7, devido à sua semelhança por CCDS. Finalmente, o subgrupo 5 (F. 30-32) apresentou-se como uma mistura complexa e de pouca quantidade, o que inviabilizou uma posterior purificação.

Grupo 6: frações 34-35 (220 mg)

Apresentou-se como um cristais amarelos, que por CCDS apresentou manchas amarelas intensas, com Rf muito próximos. Os materiais do subgrupo 3 do grupo 5 (137 mg) e do subgrupo 2 do Grupo 7 (102 mg) apresentaram perfis semelhantes por CCDS e foram todos reunidos. A reunião dessas frações (459 mg) foi submetido a cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, utilizando-se como eluente uma mistura de clorofórmio/metanol 6:4. Foram recolhidas 27 frações, de 3 mL cada, que foram reunidas em 4 subgrupos. Os subgrupos 1 (F. 1-8) e 4 (F. 19-27) se apresentaram muito impuros e por isso não foram mais trabalhados. Análise comparativa do subgrupo 2 (F. 9-15) (9 mg) em CCDS com padrões de friedelina (**R3**) indicou a presença desse composto. Finalmente, o subgrupo 3 (16 mg) apresentou duas manchas amarelas bem intensas (tanto antes quanto depois de revelação com sulfato cérico). Esse subgrupo 2 foi submetido a cromatografia em CCDS em escala preparativa. Dois cortes principais foram realizados. Após extração com diclorometano, a fração proveniente do corte superior foi denominada **R4** (5,8 mg), e a do corte inferior denominada **R5** (5,6 mg). Essas frações foram posteriormente identificadas como 2-hidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído e 2-hidroxi -6,8-dimetoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído, respectivamente. Ambas substâncias são inéditas.

Grupo 7: frações 36-42 (783 mg)

Apresentou-se como cristais incolores em meio a um sólido amarelo. O material foi cromatografia em coluna de sílica gel, eluída com benzeno, mistura de benzeno/acetona 1:1 e acetona, em capela. Foram coletadas 36 frações, de 6 mL cada, que foram posteriormente reunidas em 3 subgrupos. Análise comparativa do subgrupo 1 (F. 1-15) em CCDS com padrão de friedelina (**R3**) indicou a presença desse composto, além de outro contaminante de maior Rf. O subgrupo 2 (F. 16-27) (102 mg) apresentou uma mancha amarela muito semelhante àquelas encontradas

nos Grupos 5 e 6, além de outras impurezas. Esse subgrupo foi reunido ao Grupo 6 e o subgrupo 3 do Grupo 5, como descrito anteriormente. O subgrupo 3 (F. 28-36), um sólido branco, foi denominado **R6** (510 mg), identificado como β -sitosterol.

Grupo 8: fração 43 (51 mg)

Apresentou-se como cristais transparente-amarelados. O material foi lavado com metanol e os cristais residuais (32 mg), denominados **R7**, foram identificados como uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol.

Grupo 9: frações 44-46 (56 mg)

O material amorfo de cor amarela que constituiu este grupo apresentou, por CCDS, uma mancha azul fluorescente com visualização no UV-visível e outra mancha amarela, de menor Rf. Ele foi submetido à CCDS escala preparativa. A mancha superior, de cor azul, não forneceu quantidades suficientes para proceder com métodos de identificação da substância. O corte inferior, relativo a uma substância amarela, foi denominado **R8** (32,4 mg) e identificado como 2,8-dihidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído, um composto inédito.

Grupo 10: frações 47-50 (890 mg)

Apresentou-se como um sólido verde-amarelado. Tentativas de purificação dessa fração foram realizadas, como 2 colunas de sílica gel e uma coluna de Sephadex LH-20, mas não foi possível chegar ao isolamento de nenhum composto, pois sempre permanecia uma mistura muito grande de compostos nas frações, visualizadas por CCDS.

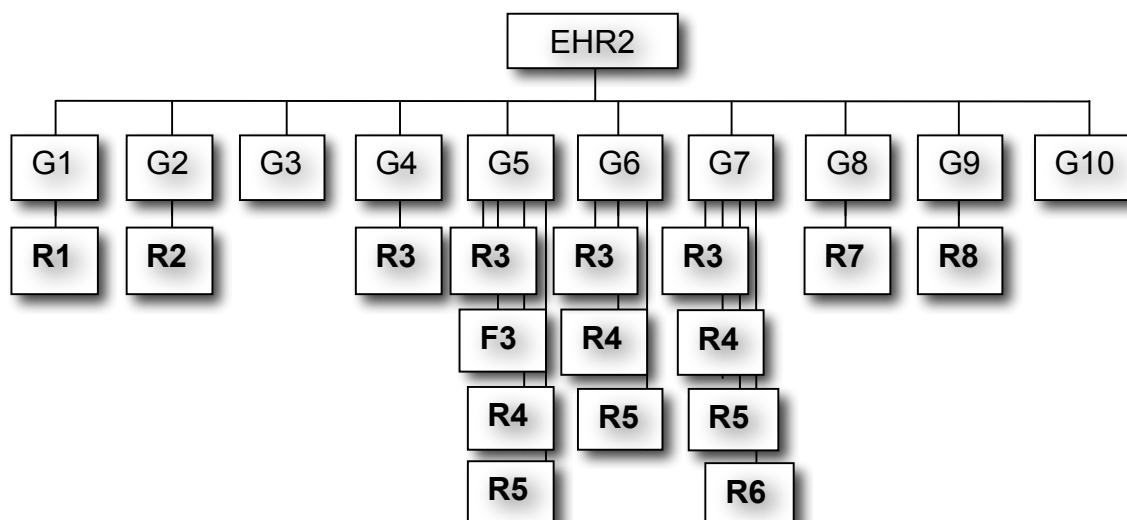


Figura 16 - Fluxograma do processo de fracionamento do EHR2

3.2.8 - Fracionamento do Extrato em Acetato de Etila das Raízes de *Banisteriopsis anisandra* (EAR2) – 2ª coleta

O extrato (4,4 g) foi submetido a cromatografia em coluna de sílica gel, sendo coletadas 24 frações de 250 mL cada, utilizando para eluição diclorometano, misturas em diferentes proporções de diclorometano/acetato de etila, acetato de etila, misturas em diferentes proporções de acetato de etila/metanol e metanol. As frações foram reunidas em 4 grupos, de acordo com comparação do perfil cromatográfico por CCDS. Deste extrato foi possível isolar e identificar 1 substância.

Grupo 1: frações 1-2

Apresentou-se como um óleo amarelo. Análise da sua cromatoplaça demonstrou muitos compostos de Rf muito próximos, o que levou à decisão de não se trabalhar com esse grupo.

Grupo 2: frações 3-12

Apresentou-se como um sólido marrom escuro. Pelas mesmas razões do grupo anterior, optou-se por não trabalhar com este grupo.

Grupo 3: frações 13-16 (155 mg)

Apresentou-se como um sólido amarelado. Após outras duas cromatografias em coluna de sílica gel e uma em coluna de Sephadex LH-20, utilizando-se como eluente uma mistura de clorofórmio/metanol 1:1, **R9** (65 mg) foi isolado e identificado como ácido 3,4-dihidróxi-benzóico.

Grupo 4: frações 17-24 (205 mg)

Apresentou-se como cristais vermelhos. A revelação com sulfato cérico da CCDS mostrou uma mancha de cor vermelha com rastro. Após ser submetido a cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, fez-se o espectro de RMN da fração mais purificada (14 mg), que apresentou-se como uma mistura complexa, a qual não foi possível ser caracterizada.

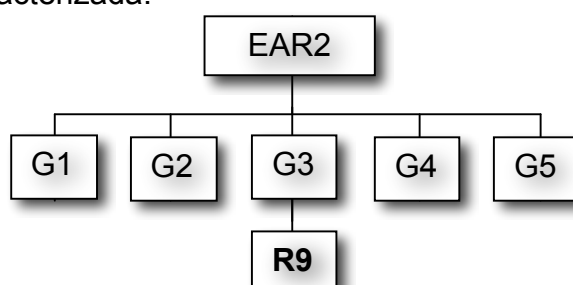


Figura 17 - Fluxograma do processo de fracionamento do EAR2

3.2.9 - Fracionamento do Extrato Etanólico das Raízes de *Banisteriopsis anisandra* – (EER1)

O extrato etanólico seco das raízes de *B. anisandra* (EHR1) (50,55 g) foi cromatografado em coluna de sílica gel, sendo coletadas 53 frações de aproximadamente 400 mL cada, utilizando para eluição a ordem eluotrópica usual, iniciando-se pelo hexano até chegar ao metanol. As frações foram reunidas em 12 grupos, de acordo com comparação do perfil cromatográfico em CCDS. Deste extrato foi possível isolar e identificar 4 substâncias puras, além de 3 misturas.

Grupo 1: fração 1-4 (480 mg)

O material deste grupo apresentou um aspecto oleoso, de coloração branca-amarelada. A análise por CCDS indicou manchas azuis de Rf muito próximos, após revelação com vanilina/ ácido sulfúrico a 20%. O material foi cromatografado em coluna de sílica gel, eluída com benzeno e benzeno/ acetona 9:1 e benzeno acetona 8:2. Foram coletados 12 frações, que foram reunidas em 3 subgrupos. O subgrupo 1 (58 mg), de aspecto leitoso, foi submetido à análise de RMN de ^1H e ^{13}C , entretanto, mostrou uma mistura complexa, que não foi possível elucidar. Os demais subgrupos ainda apresentaram misturas de substâncias e não foram trabalhados.

Grupo 2: frações 5-8 (1,5 g)

O material deste grupo apresentou grande quantidade de sólido, de cor amarelada. O material foi submetido a cromatografia, em 4 etapas, em coluna de Sephadex LH-20, eluída com uma mistura de clorofórmio/metanol 6:4. Foram coletadas 16 frações, de 5 mL cada, que foram posteriormente reunidas em 4 subgrupos. O subgrupo 2 (F. 5-9), caracterizado por cristais incolores, foi denominado **R10** (19 mg) e identificado como uma mistura de lupan-20(29)-en-3-ona (lupenona) e friedelina. As demais frações apresentaram pequena quantidade de amostra.

Grupo 3: frações 9-12 (1,1 g)

O sólido amarelado que constituía esse grupo foi cromatografado em coluna de Sephadex LH-20, eluída com uma mistura de clorofórmio/metanol 6:4. Foram coletadas 40 frações, de 3 mL cada, que foram posteriormente reunidas em 4 subgrupos. Análise comparativa do subgrupo 2 (F. 21-27), denominado **R11** (26 mg), em CCDS com padrão de ácido oléico sugeriu a presença desse composto. O

subgrupo 3 (F. 21-27) foi recromatografado em uma coluna de sílica gel, eluída com benzeno e benzeno/ acetona 9:1, e uma quantidade adicional de **R3** (20 mg - friedelina) foi obtida. Os demais subgrupos não foram trabalhados devido a grande quantidade de impurezas nas frações.

Grupo 4: frações 13-14 (61,3 mg)

O material deste grupo, um sólido amarelo, foi cromatografado em coluna de Sephadex LH-20, eluída com uma mistura de clorofórmio/metanol 6:4. Foram coletadas 20 frações, de 5 mL cada, que foram posteriormente reunidas em 2 subgrupos. O subgrupo 1 (F. 1-12) apresentou uma mistura complexa de substâncias e não foi trabalhado. O subgrupo 2 (F. 12-20), caracterizado pela presença de grande quantidade de sólido amarelo, foi recromatografado em coluna de sílica gel com eluição isocrática (benzeno/ acetona 8:2), em capela. As frações ricas em substância amarela foram então cromatografadas em CCDS escala preparativa, para a retirada de uma impureza de Rf ligeiramente superior ao da substância amarela. Uma quantidade adicional de **R4** (4,5 mg - 2-hidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído) foi obtida.

Grupo 5: frações 15-16 (1,6 g)

Pôde-se observar neste grupo a presença de cristais incolores em meio a um material amorfo amarelado. O material foi cromatografado em coluna de Sephadex LH-20, eluída com uma mistura de clorofórmio/metanol 6:4. Foram coletadas 52 frações, de 3 mL cada, que foram posteriormente reunidas em 6 subgrupos. Análise comparativa do subgrupo 4 (F. 24-26), em CCDS com padrão de lupeol (**F3**), indicou o isolamento de quantidade adicional (12,1 mg) deste. Os subgrupos 3 (F. 13-18) e 5 (F. 27-33) apresentaram quantidades adicionais de lupeol, bastante contaminado. Os demais subgrupos apresentaram pequena quantidade de amostra ou misturas complexas de substâncias e não foram trabalhadas.

Grupo 6: frações 17-20 (223,3 mg)

A feição do material deste grupo foi semelhante àquela do grupo anterior: cristais em meio a material amorfo amarelo claro, que foi cromatografado em coluna de Sephadex LH-20, eluída com uma mistura de clorofórmio/metanol 6:4. Foram coletadas 17 frações, de 5 mL cada, que foram posteriormente reunidas em 2 subgrupos. O subgrupo 1 (F. 1-2) foi recromatografado em coluna de Sephadex LH-

20, também eluída com uma mistura de clorofórmio/metanol 6:4, para fornecer **R6** (12,3 mg), cristais incolores, identificado como uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol. O subgrupo 2 apresentou quantidade adicional de **R6**, contaminado com outras impurezas e não foi trabalhado.

Grupo 7: fração 21 (83 mg)

O material deste grupo apresentou-se como um material pastoso verde, mas devido à complexidade da amostra, optou-se em não trabalhar com ela.

Grupo 8: frações 22-30 (729 mg)

A resina esverdeada que constituía o material deste grupo foi cromatografada em coluna de Sephadex LH-20, eluída com uma mistura de clorofórmio/metanol 6:4. Foram coletadas 30 frações, de 4 mL cada, que foram posteriormente reunidas em 4 subgrupos. O subgrupo 3 (F. 21-25) foi recromatografado nessas mesmas condições, para dar um óleo amarelado, denominado **R11** (28 mg) e identificado como ácido oléico. O subgrupo 4 (F. 26-30) foi também recromatografado, nessas mesmas condições, para fornecer um sólido branco, denominado **R12** (23 mg), que foi identificado como uma mistura de glochidonol, ácido oléico e β -sitosterol. Os demais subgrupos, de coloração verde, não foram trabalhados devido à pequena quantidade de material ou grande número de substâncias.

Grupo 9: frações 31-43 (680 mg)

O material deste grupo, de aspecto pastoso e cor marrom escura, apresentou-se de alta complexidade, sendo que grande parte ficou retida no ponto de aplicação da CCDS. Optou-se por não trabalhar com essa fração.

Grupo 10: frações 44-46 (196 mg)

O material deste grupo, um sólido marrom claro, apresentou por CCDS uma mancha amarela a olho nu e outra azul, quando visualizada com luz UV. Foi cromatografado em coluna de sílica gel, eluída com diclorometano, diclorometano/acetato de etila 1:1 e acetato de etila. Foram coletadas 20 frações, de 10 mL cada, que foram posteriormente reunidas em 4 subgrupos. O subgrupo 2 (que apresentou uma mancha de cor amarela muito intensa em CCDS) e o subgrupo 3 (que apresentou, em CCDS, uma mancha azul quando visualizada com a luz UV), foram cromatografados em CCDS escala preparativa, entretanto o material permaneceu impuro e a quantidade de material obtida foi muito pequena.

Grupo 11: fração 47 (174,2 mg)

O sólido verde-marrom que constituía este grupo foi cromatografado em coluna de Sephadex LH-20, eluída com uma mistura de clorofórmio/metanol 6:4. Foram coletadas 54 frações, de 3 mL cada, que foram posteriormente reunidas em 6 subgrupos. Grande parte do material ficou retido na coluna, levando a grande perda de massa. Os subgrupos tinham pouca quantidade de material, e a tentativa de purificar o subgrupo 2 (F. 5-22) por cromatografia em sílica gel também foi falha, uma vez que as frações recolhidas permaneceram impuras e outra parte ficou retida na coluna.

Grupo 12: frações 48-53 (12,07 g)

O material deste grupo apresentou como um sólido de cor vermelha, que foi cromatografado em coluna de poliamida, eluída com água, água/ metanol 1:1, metanol, metanol/ acetato de etila 1:1, acetato de etila. Foram coletadas 45 frações, de 125 mL cada, que foram posteriormente reunidas em 6 subgrupos. Tentativas posteriores de purificação - colunas de poliamida e Sephadex LH-20 ou CCDS escala preparativa - não tiveram sucesso.

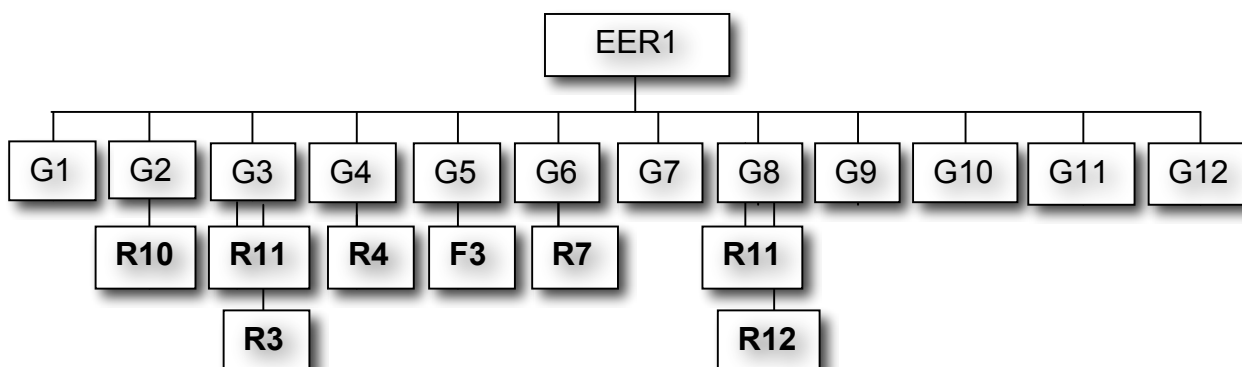
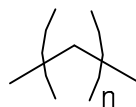


Figura 18 - Fluxograma do processo de fracionamento do EER1

4 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

4.1 Mistura de hidrocarbonetos (F1)



$n = 15 \text{ e } 26-33$

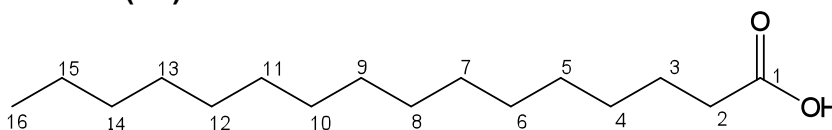
F1 foi isolado do Grupo 1 do EEF1, na forma de uma cera branca. Seu espectro de absorção na região do infravermelho (**Figura 1A**, Anexo 1) apresentou bandas intensas em 2955, 2915, 2873 e 2848 cm^{-1} , referentes às deformações axiais simétricas e assimétricas das ligações C-H dos grupos metila e metileno; bandas em 1472 e 1462 cm^{-1} , referentes à deformação angular das ligações C-H; e banda em 719 cm^{-1} , referente à deformação angular assimétrica no plano de metilenos, característico de alcanos de cadeia linear de sete ou mais carbonos (Silverstein *et al.*, 2007). Esses dados evidenciaram a natureza alifática da mistura, característica de hidrocarbonetos.

A caracterização dos hidrocarbonetos presentes em **F1** foi realizada utilizando-se cromatografia gasosa de alta resolução, CGAR. Foram utilizados como padrões os hidrocarbonetos C_{14} , C_{17} e $\text{C}_{28} - \text{C}_{35}$ (**Figura 2A**, Anexo 1). A análise do cromatograma (**Figura 3A**, Anexo 1) permitiu identificar os principais constituintes de **F1** como sendo $\text{C}_{29}\text{H}_{60}$ (55,16%) e $\text{C}_{31}\text{H}_{64}$ (16,87%), conforme **Tabela 1**.

Tabela 1 - Dados obtidos por CGAR de **F1** e dos padrões de hidrocarbonetos C_{14} , C_{17} , C_{28} , C_{29} , C_{30} , C_{31} , C_{32} , C_{33} , C_{34} e C_{35}

Padrões		F1	
Cn	T. retenção (min)	T. retenção (min)	%
C_{14}	9,0	---	0
C_{17}	12,9	12,9	0,54
C_{28}	23,1	23,1	0,60
C_{29}	23,6	23,7	55,16
C_{30}	24,3	24,3	1,83
C_{31}	25,0	25,0	16,87
C_{32}	25,7	25,7	0,61
C_{33}	26,5	26,5	2,61
C_{34}	27,9	27,9	7,03
C_{35}	30,3	30,3	2,30
Total			87,55

4.2 Ácido Palmítico (F2)



F2 foi isolado do Grupo 2 do EEF1 e apresentou-se como um sólido branco com ponto de fusão 59 °C, solúvel em clorofórmio.

O espectro de absorção na região do IV (**Figura 4A**, Anexo 1) apresentou uma banda larga entre 3300 e 2400 cm^{-1} , característica da deformação axial da ligação O-H de ácido carboxílico; banda em 1698 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação C=O de carboxila; bandas em 2954, 2915, 2871 e 2848 cm^{-1} , referentes às deformações axiais simétricas e assimétricas das ligações C-H dos grupos metila e metilênicos – o que sugere o caráter alifático do composto; e banda em 720 cm^{-1} , referente à deformação angular assimétrica no plano de metilenos, característico de alcanos de cadeia linear de sete ou mais carbonos (Silverstein *et al.*, 2007). Todos esses dados sugerem a presença de uma ácido graxo alifático de cadeia longa.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 5A**, Anexo 1) apresentou um tripleto em δ 0,88 ($J_{16-15}=6,8$ Hz), referente a três hidrogênios, que foi atribuído aos hidrogênios do grupo metila terminal; um tripleto em δ 2,35 ($J_{2-3}=7,5$ Hz) referente a dois hidrogênios, atribuídos aos hidrogênios metilênicos alfa à carbonila; um quinteto em δ 1,63 ($J_{3-2}=7,5$ Hz), atribuído aos hidrogênios metilênicos em posição beta à carbonila; e um simpleto largo em δ 1,26, atribuído aos demais hidrogênios dos grupos metilênicos. A integração desse sinal sugere a presença de 24 hidrogênios.

O espectro de RMN de ^{13}C de (**Figura 6A**, Anexo 1) apresentou sinal em δ 178,95, atribuído ao carbono do ácido carboxílico; um sinal em δ 14,26, referente ao carbono do metila terminal; e uma série de sinais entre δ 33,97 e 22,84, referente aos carbonos metilênicos. Essas atribuições foram feitas juntamente com a análise do subespectro-DEPT 135 (**Figura 6A**, Anexo 1). A comparação destes dados com aqueles obtidos para o ácido palmítico (Couperus *et al.*, 1978) levou à conclusão de que **F2** se tratava deste composto (**Tabela 2**, pág. 32)

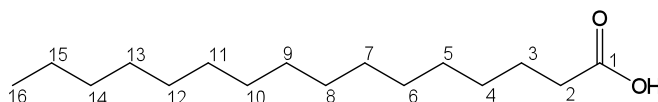
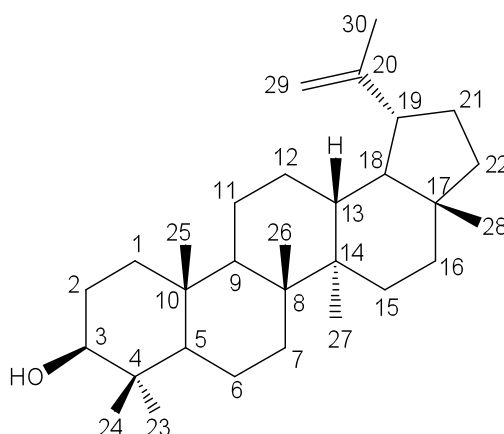


Tabela 2 - Comparação dos dados de RMN de ^{13}C do ácido palmítico (Couperus *et al.*, 1978) com aqueles encontrados para **F2**

Cn	Ácido palmítico	F2	Cn	Ácido palmítico	F2
1	180,66	178,95	9	29,77	29,84
2	34,22	33,98	10	29,77	29,84
3	24,76	24,85	11	29,77	29,82
4	29,17	29,22	12	29,77	29,74
5	29,52	29,51	13	29,34	29,39
6	29,77	29,59	14	32,03	32,08
7	29,77	29,82	15	22,76	22,84
8	29,77	29,82	16	14,12	14,26

4.3 Lupeol (F3)



F3 foi isolado do Grupo 2 do EEF1, do Grupo 5 do EHR2 e do Grupo 5 do EER1. Apresentou-se como um sólido cristalino com faixa de fusão 211-212 °C, solúvel em clorofórmio. Apresentou teste positivo para TTPC frente ao teste de Liebermann-Burchard.

O espectro de absorção na região do IV (**Figura 7A**, Anexo 1) apresentou uma banda larga em 3316 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação O-H; banda em 1638 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação C-H de alqueno; banda em 1035 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação C-O; e bandas em 1013 e 982 cm^{-1} , referente à deformação angular C-H fora do plano de alqueno.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 8A**, Anexo 1) apresentou dois multipletos, cada um com integral referente a 1 hidrogênio, em δ 4,69 e em δ 4,57, atribuídos

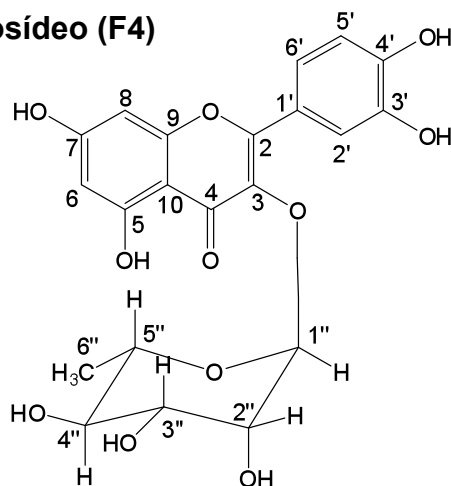
aos hidrogênios da dupla ligação terminal (H-29); um duplete duplo referente a 1 hidrogênio em δ 3,19 ($J_{3ax-2ax}=11,20$ e $J_{3ax-2eq}=4,80$ Hz), atribuído ao hidrogênio carbinólico H-3; um duplete triplo referente a 1 hidrogênio em δ 2,38 ($J=5,5$ Hz), atribuído ao H-19. O espectro apresenta também simpletos em δ 1,03, 0,97, 0,94, 0,83, 0,79, 0,76, referentes aos hidrogênios metílicos do composto.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 9A**, Anexo 1) de **F3** apresentou 30 sinais, o que confirma a presença de um triterpeno. Os sinais em δ 151,14 e 109,47 são característicos dos carbonos olefínicos do esqueleto lupânico (Mahato e Jundi, 1994). Como pode ser comprovado no subespectro DEPT-135 de **F3** (**Figura 10A**, Anexo 1), o sinal em δ 109,47 refere-se ao carbono olefínico C-29. O espectro apresentou também um sinal em δ 79,20, atribuído ao carbono carbinólico C-3. Por comparação com os dados de RMN de ^{13}C de **F3** com aqueles descritos para o lupeol (Mahato e Jundi, 1994) (**Tabela 3**), concluiu-se que **F3** se tratava dessa substância.

Tabela 3 - Comparação dos dados de RMN de ^{13}C do lupeol (Mahato e Jundi, 1994) com aqueles encontrados para **F3**

Cn	Lupeol	F3	Cn	Lupeol	F3
1	38,7	38,89	16	35,5	35,76
2	27,4	27,62	17	43,0	43,17
3	78,9	79,20	18	48,2	48,49
4	38,8	39,03	19	47,9	48,16
5	55,3	55,48	20	150,9	151,14
6	18,3	18,49	21	29,8	30,03
7	34,2	34,46	22	40,0	40,17
8	40,8	41,02	23	28,0	28,15
9	50,4	50,63	24	15,4	15,52
10	37,1	37,35	25	16,1	16,27
11	20,9	21,11	26	15,9	16,15
12	25,1	25,32	27	14,5	14,72
13	38,0	38,24	28	18,0	18,17
14	42,8	43,01	29	109,3	109,47
15	27,4	27,58	30	19,3	19,47

4.4 Quercetina-3-O-ramnosídeo (F4)



F4 foi isolado da fração orgânica neutra obtida da marcha química para extração de alcalóides das folhas de *B. anisandra* e do Grupo 4 do EEF2. Apresentou-se como um sólido amarelo com faixa de fusão 193-194 °C, solúvel em metanol. A mancha referente a **F4** em CCDS apresentou coloração amarela sem revelação, que se tornou ainda mais evidente após revelação com vapor de solução sulfato cérico, seguido de aquecimento.

O espectro de absorção na região do IV (**Figura 11A**, Anexo 1) apresenta uma banda larga e intensa centrada em 3235 cm^{-1} , referente à deformação axial das ligações O-H; uma banda em 1652 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação C=O de carbonila de flavonóides (Agrawal, 1989); bandas em 1597, 1573, 1496 e 1454 cm^{-1} , referente à deformação axial das ligações C=C de anel aromático; e banda em 1058 cm^{-1} , referente à deformação axial das ligações C-O.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 19**, pág. 35) apresentou vários sinais na região de aromáticos, característicos de esqueletos flavonoídicos. Além disso, no espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 22**, pág. 37), a presença de 21 carbonos, sendo quatro na região característica de açúcares (δ 60-80 ppm), proporcionou uma grande evidência para a presença de um flavonóide ligado a uma unidade monossacarídica: 15 sinais referentes ao esqueleto flavonoídico e 6 sinais referentes ao açúcar (Agrawal, 1989).

No espectro de RMN de ^1H de **F4** (**Figura 19**, pág. 35), os sinais dos hidrogênios referentes ao anel A do flavonóide mantiveram entre si uma relação *meta*, atribuída aos hidrogênios H-6 (δ 6,18, d, 1H, $J_{6-8}=2,0\text{ Hz}$) e H-8 (δ 6,35, d, 1H, $J_{8-6}=2,0\text{ Hz}$). Já os sinais do anel B mantiveram uma relação *orto*, atribuída aos hidrogênios H-5' (δ 6,90, d, 1H, $J_{5'-6'}=8,0\text{ Hz}$) e H-6' (δ 7,29, dd, 1H, $J_{6'-5'}=8,4$ e $2,0$

Hz); e *meta*, aos hidrogênios H-6' (δ 7,29, dd, 1H, $J_{6'-2'}=2,0$ Hz) e H-2' (δ 7,34, d, 1H, $J_{2'-6'}=1,6$ Hz).

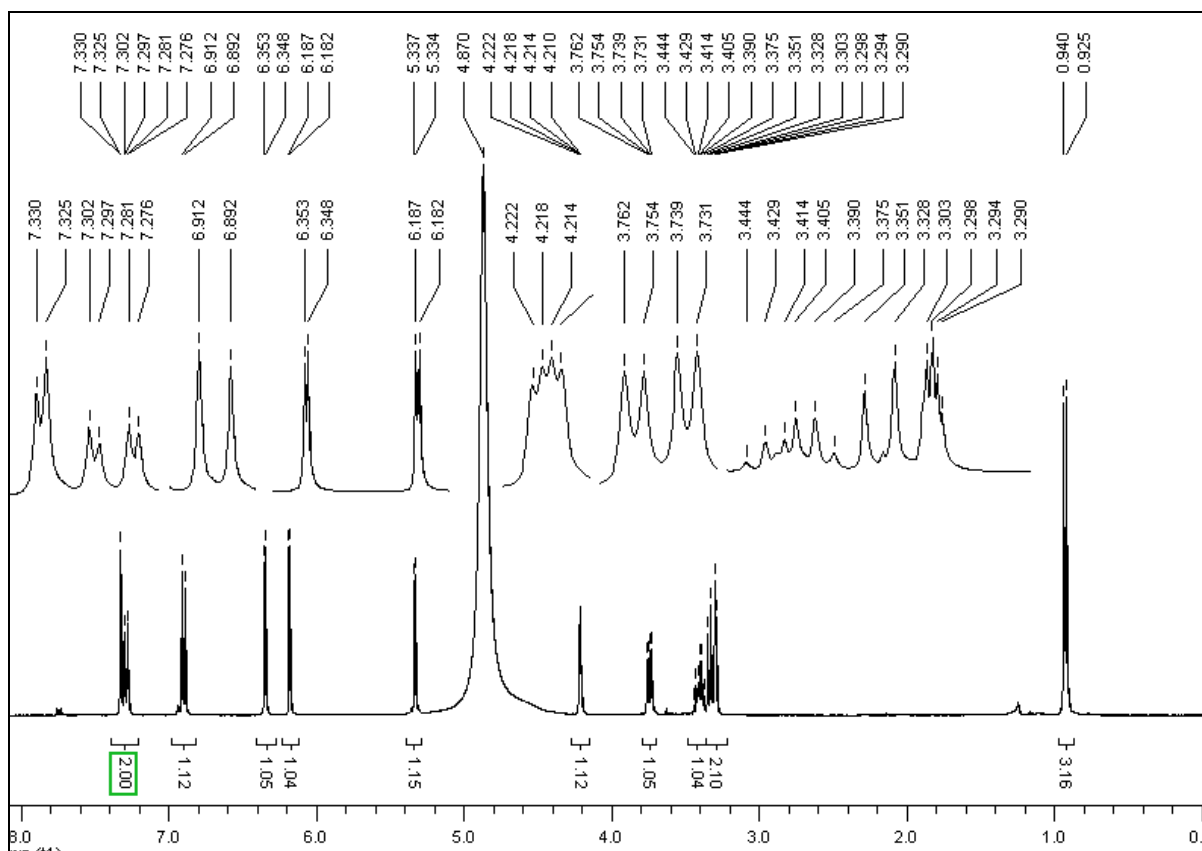
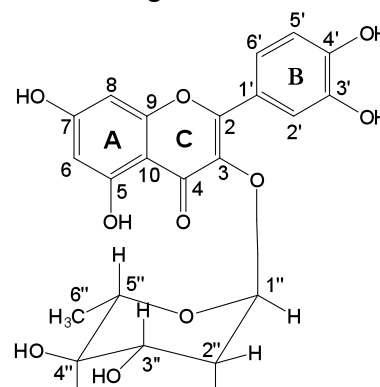


Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H de **F4** (CD_3OD ; 400 MHz).

Nesse mesmo espectro (**Figura 19**), a parte os sinais referentes ao monossacarídeo se apresentaram como: um duplete com integral referente a 3 hidrogênios, em δ 0,93 ($J_{6''-5''}=6,0$ Hz), típico de hidrogênios metílicos (H-6'') da ramnose; um tripleto centrado em δ 3,33 ($J_{4''-3''}$ e $J_{4''-5''}=9,2$ Hz), que está sobreposto com o sinal do metanol residual, atribuído ao H-4''; um multiplete entre δ 3,44 e 3,38, com integral referente a 1 hidrogênio, atribuído ao H-5''; um duplete duplo, referente a 1 hidrogênio, em δ 3,75 ($J_{3''-4''}=9,2$ e $J_{3''-2''}=3,2$ Hz), atribuído ao hidrogênio H-3''; um duplete duplo referente a 1 hidrogênio em δ 4,22 ($J_{2''-3''}=3,2$ e $J_{2''-1''}=1,4$ Hz), atribuído ao hidrogênio H-2''; e um duplete referente a 1 hidrogênio em δ 5,33 ($J_{1''-2''}=1,4$ Hz), atribuído ao hidrogênio anomérico H-1''.



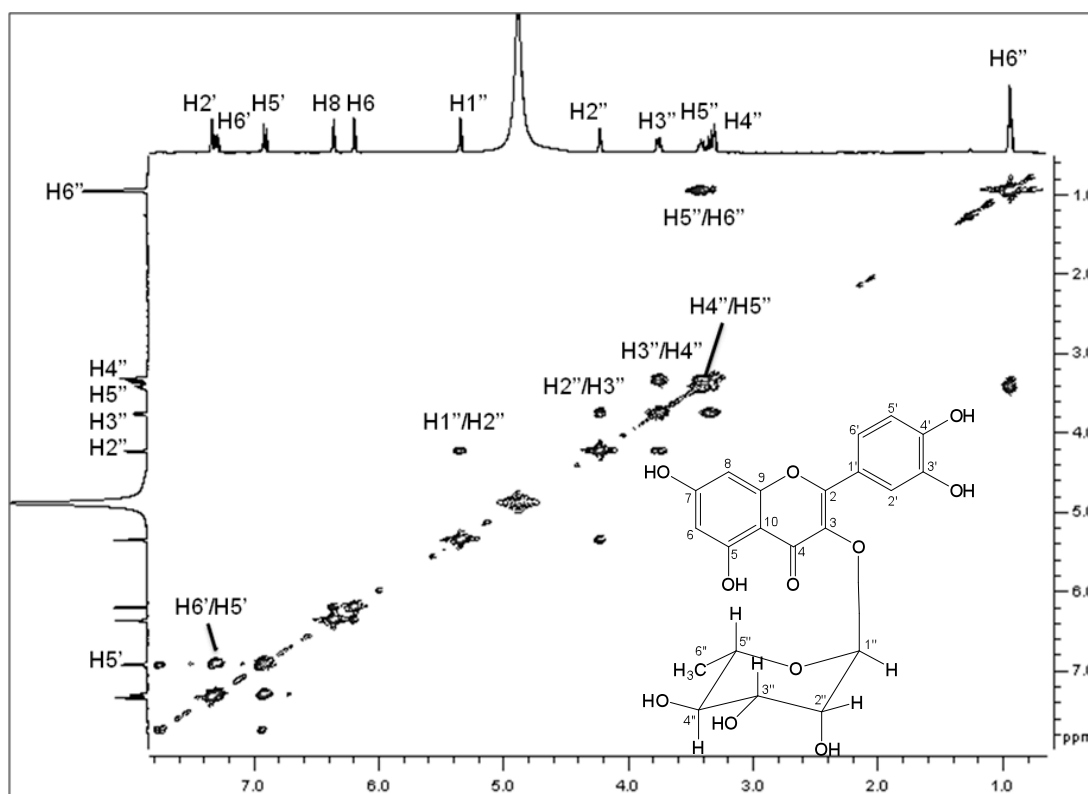


Figura 20 - Mapa de contornos COSY de F4 (CD₃OD; 400 MHz).

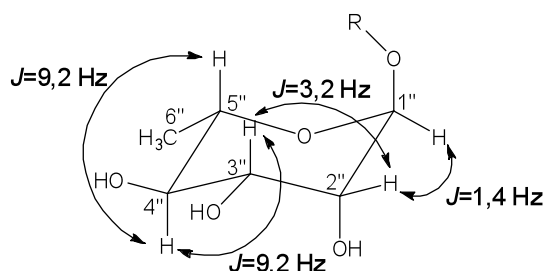


Figura 21 – Correlações encontradas no mapa de contornos COSY de F4 e valores das constantes de acoplamento (Hz), para os hidrogênios da ramnose

Visando à atribuição inequívoca dos sinais de hidrogênio do monossacarídeo, foi analisado o mapa de contornos COSY (**Figura 20**). Tomou-se como ponto de partida o sinal correspondente ao hidrogênio anomérico H-1''. Pôde-se, então, estabelecer através das manchas de correlação as conectividades ente os hidrogênios H-1''/H2'', H-2''/H-3'', H-3''/H-4'' e H-5''/H-6'', respectivamente. Os valores das constantes de acoplamento entre esses hidrogênios sugerem as configuração 1''S, 2''R, 3''R, 4''R e 5''S para o açúcar, o que indica a presença da ramnose. Ele é considerado um açúcar da série-L devido à configuração do C-5'' (o carbono assimétrico mais distante do carbono anomérico), que é igual à do L-gliceraldeído (Sinnott, 2007).

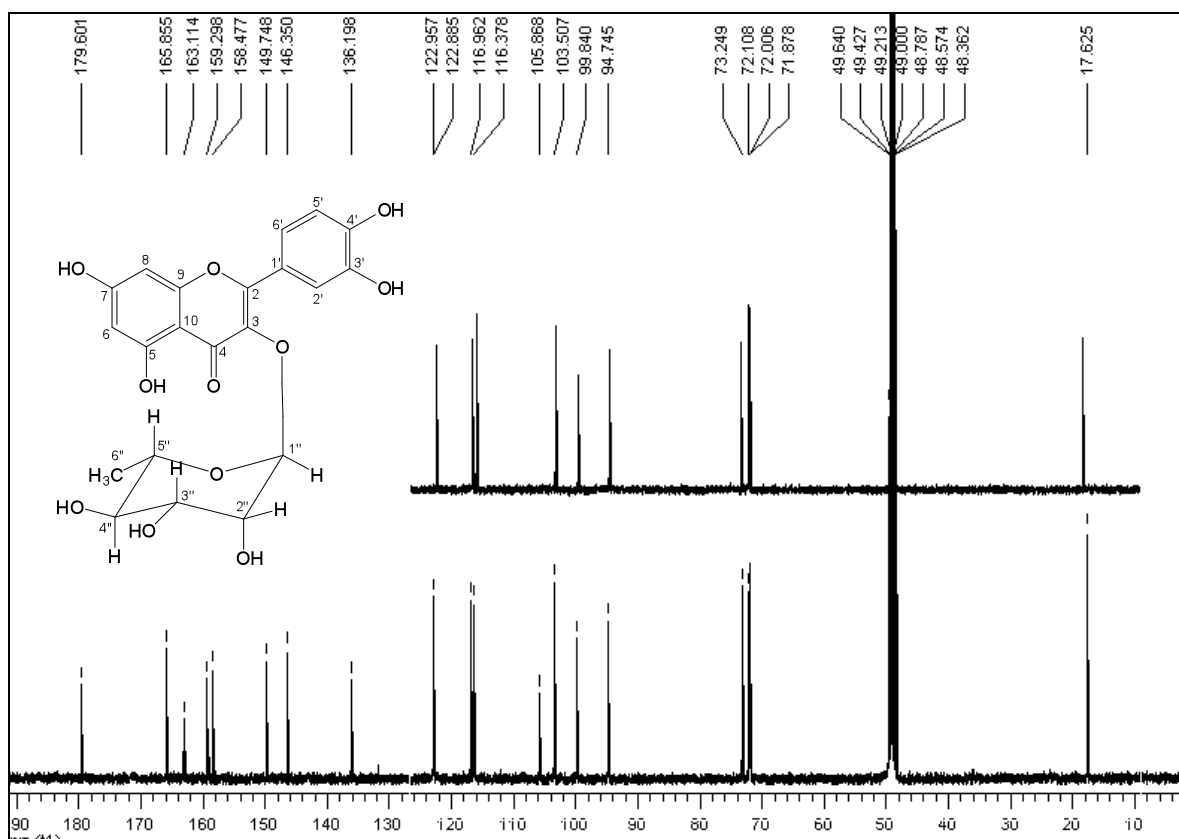


Figura 22 - Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 de **F4** (CD_3OD ; 100 MHz).

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 22**) apresentou 21 sinais, que foram classificados como sendo 5 carbonos aromáticos hidrogenados, 10 carbonos aromáticos não hidrogenados, 4 C-H em deslocamento típico de açúcares, 1 C-H típico de carbono anomérico de açúcar, 1 CH_3 e 1 $\text{C}=\text{O}$, com o auxílio do subspectro DEPT-135 (**Figura 22**).

A análise do mapa de contornos HMQC (**Figura 23**, pág. 38) possibilitou associar os sinais de todos carbonos hidrogenados com os sinais de seus respectivos hidrogênios. A análise das expansões do mapa de contornos HMBC (**Figuras 24 e 25**, pág. 39) na região dos hidrogênios do esqueleto ramnosídico apresentou correlações importantes para a elucidação estrutural, como por exemplo a posição da ligação O-glicosídica, através do acoplamento heteronuclear ($^3J_{\text{CH}}$) entre o hidrogênio anomérico $\text{H}-1''$ e o carbono C-3. Outras correlações importantes referentes ao esqueleto do monossacarídeo foram observadas:

- Entre o $\text{H}-1''$ e o carbono C-2''.
- Entre o $\text{H}-2''$ e os carbonos C-3'' e C-4''.
- Entre o $\text{H}-3''$ e o carbono C-4''.

- Entre o H-4'' e os carbonos C-3'', C-5'' e C-6''.
- Entre o H-5'' e o carbono C-4''.
- Entre os H-6'' e os carbonos C-4'' e C-5''.

A expansão do mapa de contornos HMBC na região dos hidrogênios do esqueleto flavonoídico (**Figuras 24 e 25**, pág. 39) forneceu as seguintes correlações:

- Entre o H-6 e os carbonos C-5, C-7, C-8 e C-10.
- Entre o H-8 e os carbonos C-6, C-7, C-9 e C-10.
- Entre o H-2' e os carbonos C-1', C-3', C-4', C-5' e C-6'.
- Entre o H-6' e os carbonos C-1', C-2', C-4' e C-5'.
- Entre o H-5' e os carbonos C-1', C-3', C-4' e C-6'.

Por análise dos espectros de RMN obtidos e por comparação com os dados de RMN de ¹³C de **F4** com aqueles descritos para a quercetina-3-O-ramnosídeo (Beltrame *et al.*, 2001) (**Tabela 4**, pág. 40), concluiu-se que **F4** se tratava dessa substância.

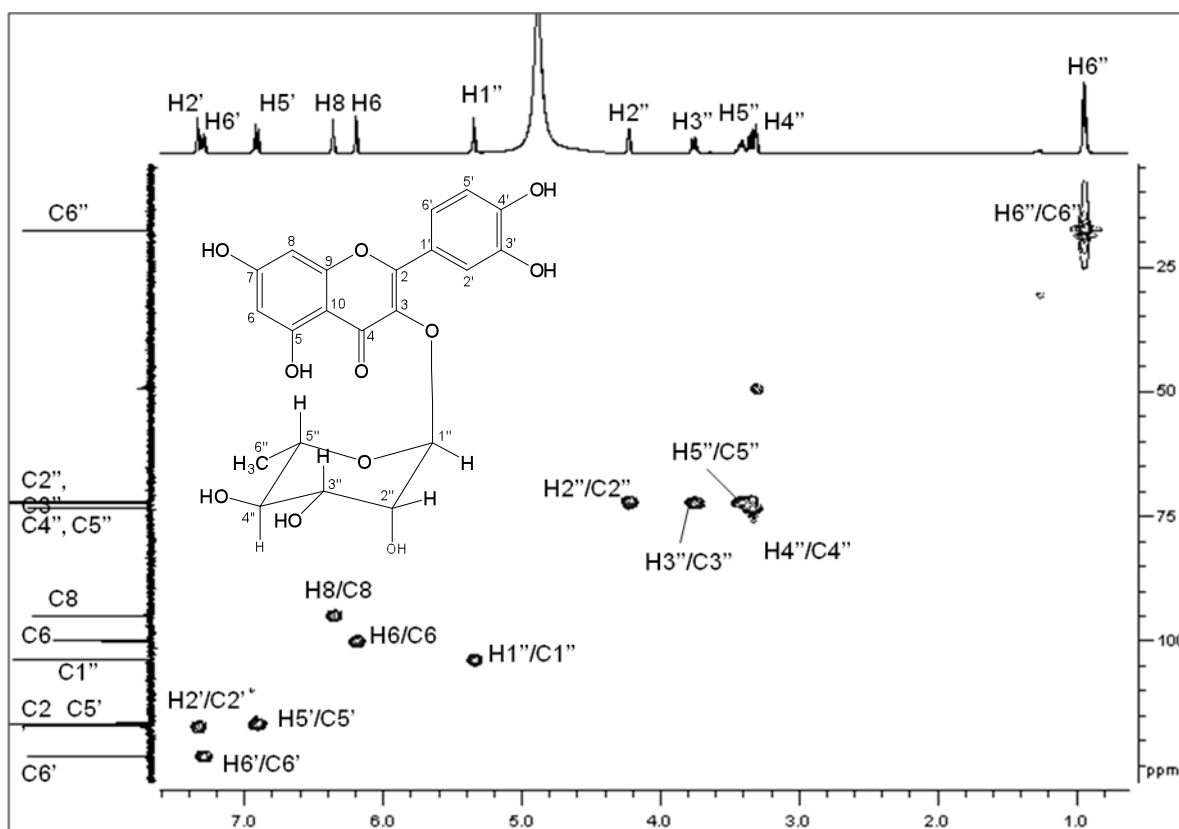


Figura 23 - Mapa de contornos HMBC de **F4** (CD₃OD; 400 MHz).

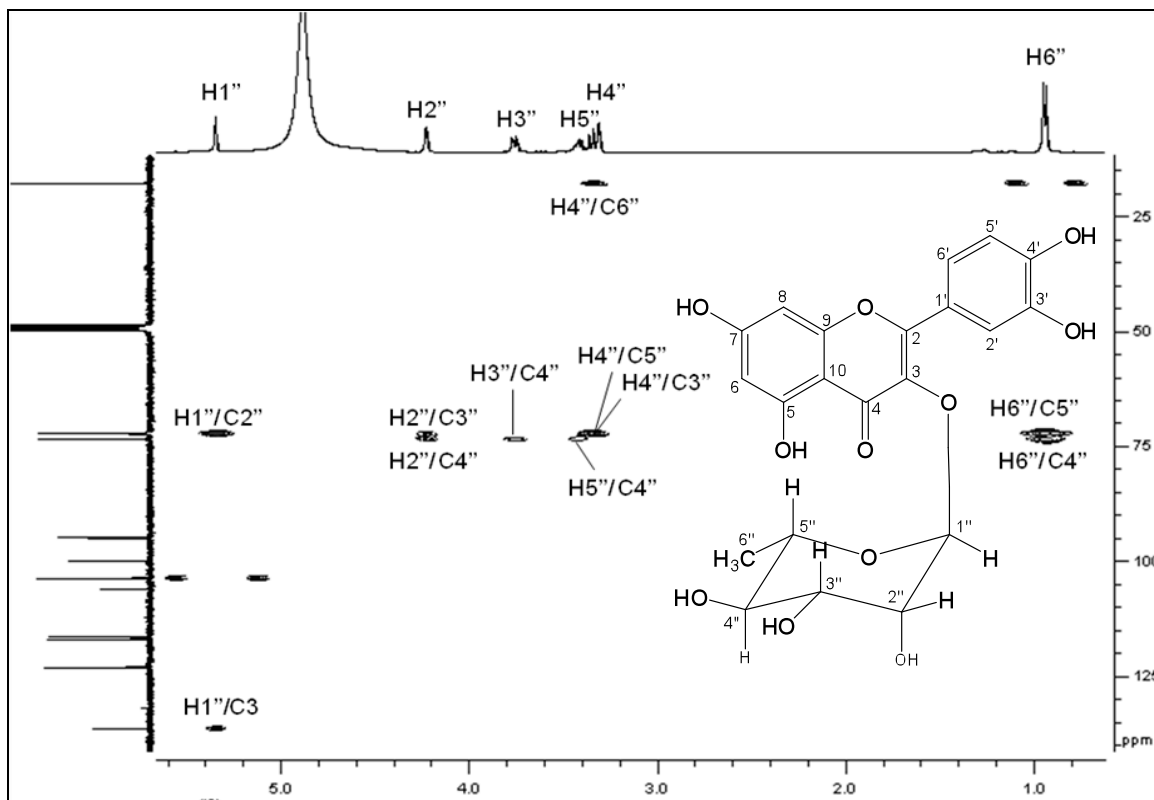


Figura 24 - Expansão do mapa de contornos HMBC de **F4** (CD₃OD; 400 MHz).

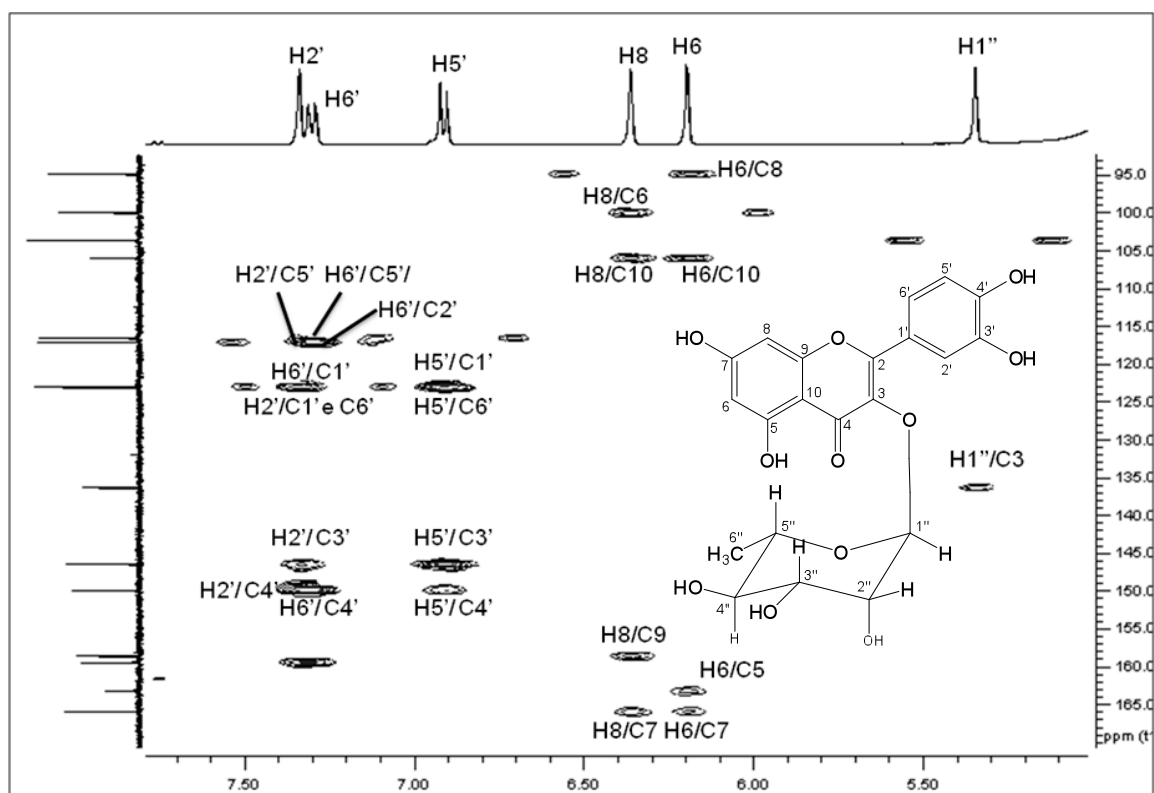
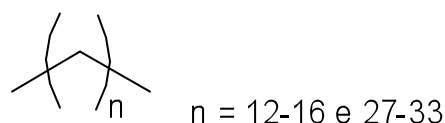


Figura 25 - Expansão do mapa de contornos HMBC de **F4** (CD₃OD; 400 MHz).

Tabela 4 - Comparação dos dados de RMN de ^{13}C da quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (Beltrame *et al.*, 2001) com aqueles encontrados para **F4**

Cn	Quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo	F4	Cn	Quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo	F4
2	158,8	158,48	3'	146,6	146,35
3	136,4	136,20	4'	150,0	149,75
4	179,9	179,60	5'	116,5	116,37
5	163,5	163,11	6'	123,1	122,96
6	99,9	99,84	1''	103,7	103,51
7	166,1	165,86	2''	72,1	71,88
8	94,8	94,74	3''	72,2	72,11
9	158,0	159,30	4''	73,3	73,25
10	106,0	105,87	5''	72,0	72,01
1'	123,1	122,88	6''	17,6	17,62
2'	117,0	116,96			

4.5 Mistura de hidrocarbonetos (R1)



R1 foi isolado do Grupo 1 do EHR2, na forma de um óleo transparente-amarelado. Seu espectro de absorção na região do infravermelho (**Figura 12A**, Anexo 1) apresentou bandas intensas em 2955, 2921 e 2852 cm^{-1} , referentes às deformações axiais simétricas e assimétricas das ligações C-H dos grupos metila e metileno; banda em 1463 cm^{-1} , referente à deformação angular das ligações C-H; e banda em 720 cm^{-1} , referente à deformação angular assimétrica no plano de metilenos, característico de alcanos de cadeia linear de sete ou mais carbonos (Silverstein *et al.*, 2006). Esses dados, portanto, evidenciaram a natureza alifática da mistura.

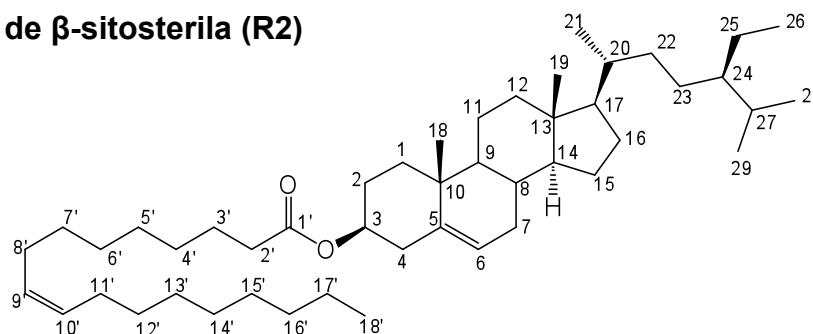
A caracterização dos hidrocarbonetos presentes em **R1** foi realizada utilizando-se cromatografia gasosa de alta resolução, CGAR (**Figura 14A**, Anexo 1). Foram utilizados como padrões uma mistura de hidrocarbonetos C_{14} , C_{17} , C_{28} , C_{29} , C_{30} , C_{31} , C_{32} , C_{33} , C_{34} e C_{35} (**Figura 2A**, Anexo 1) e outra mistura de hidrocarbonetos C_{11} , C_{12} , C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{17} e C_{18} (**Figura 14A**, Anexo 1).

A análise do cromatograma (**Figura 14A**, Anexo 1) permitiu identificar os principais constituintes de **R1** como sendo $C_{18}H_{38}$ (15,04%) e $C_{16}H_{34}$ (10,93%), conforme **Tabela 5**. O cromatograma também sugeriu a presença de $C_{20}H_{42}$, $C_{22}H_{46}$, $C_{24}H_{50}$, $C_{26}H_{54}$ e $C_{28}H_{58}$, mas a ausência destes padrões não permitiu afirmar com certeza a presença destes na amostra analisada.

Tabela 5 - Dados obtidos por CGAR de **R1** e dos padrões de hidrocarbonetos C_{11} , C_{12} , C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{17} , C_{18} , C_{28} , C_{29} , C_{30} , C_{31} , C_{32} , C_{33} , C_{34} e C_{35}

Padrões		R1	
Cn	T. retenção (min)	T. retenção (min)	%
C_{11}	4,8	---	0
C_{12}	6,3	---	0
C_{14}	9,1	9,0	1,93
C_{15}	10,4	10,4	0,41
C_{16}	11,7	11,6	10,93
C_{17}	12,9	12,8	0,60
C_{18}	14,0	13,9	15,04
C_{28}	23,1	---	0
C_{29}	23,6	23,6	1,05
C_{30}	24,3	24,3	2,05
C_{31}	25,0	25,0	1,26
C_{32}	25,7	25,7	1,63
C_{33}	26,5	26,6	0,69
C_{34}	27,9	28,0	2,98
C_{35}	30,3	30,4	2,48
Total			41,05

4.6 Oleato de β -sitosterila (R2)



R2 foi isolado do Grupo 2 do EHR2 e apresentou-se como uma cera branca, solúvel em clorofórmio.

O espectro de absorção na região do IV de **R2** (**Figura 15A**, Anexo 1) apresentou bandas em 2924 e 2853 cm^{-1} , referentes à deformação axial das ligações C-H; banda em 1732 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação C=O da carbonila de éster; banda em 1174 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação C-O; e bandas em 735 cm^{-1} , referente à deformação angular assimétrica no plano de metilenos, característico de alcanos de cadeia linear de sete ou mais carbonos. Esses dados sugerem a presença de um éster e de uma cadeia longa alifática.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 16A**, Anexo 1) apresentou um multipletto com integral referente a 3 hidrogênios, em δ 5,36-5,34, atribuídos aos hidrogênios olefínicos (H-6, H-9' e H-10'); um multipletto com integral referente a 1 hidrogênio, em δ 4,62-4,60, atribuído ao hidrogênio H-3; um multipletto com integral referente a 6 hidrogênios, em δ 2,31-2,24, sendo 4 deles atribuídos aos hidrogênios H-4 e H-2'; e um simpleto referente a 3 hidrogênios em δ 0,68, atribuído aos H-18.

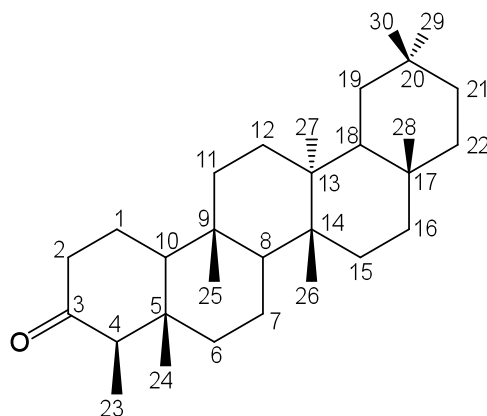
Com base numa análise preliminar do espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 17A**, Anexo 1) e no mapa de contornos HMBC (**Figura 18A**, Anexo 1), **R2** parecia se tratar de uma mistura de ácido oléico (que foi posteriormente isolado das raízes desta espécie) e β -sitosterol. No entanto, análise mais detalhada nos espectros na região do IV e de RMN de ^1H , contribuiu para propor a obtenção de um éster de cadeia longa do β -sitosterol. Primeiramente, ficou evidente no espectro da região do IV a ausência de bandas referentes à deformação axial de O-H álcool (esperada para o β -sitosterol) ou de O-H de ácido carboxílico (esperado para o ácido oléico). Outra evidência foi que a banda referente à deformação C=O de carbonila apareceu em 1732 cm^{-1} , e não em 1708 cm^{-1} , como era de se esperar para o ácido oléico. Esse deslocamento para regiões de maior frequência pode ser explicado por se tratar de uma carbonila de éster, que tem maior caráter de dupla ligação do que a carbonila de um ácido carboxílico. Outra evidência ocorreu no espectro de RMN de ^1H , que apresentou sinal em δ 4,62-4,60, referente ao H-3, enquanto no espectro do β -sitosterol ele se apresenta em δ 3,52. Essa desproteção pode ser explicado pelo maior efeito indutivo retirador de elétrons do oxigênio ligado a C-3, devido à ressonância de seus elétrons com a carbonila do éster. A última evidência ocorreu no espectro de RMN de ^{13}C , onde o sinal da carbonila apareceu em δ 173,31, enquanto que no espectro do ácido oléico ela se apresentou em δ 180,59.

Portanto, apesar de não ter aparecido a correlação entre o C-1' e H-3 no mapa de contornos HMBC, existem várias outras evidências que reforçam a presença do oleato de β -sitosterila. Finalmente, a análise comparativa dos deslocamentos químicos de **R2** com aqueles descritos na literatura (David *et al.*, 2008) para o oleato de β -sitosterila, comprovaram a obtenção deste (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Comparação dos dados de RMN de ^{13}C do oleato de β -sitosterila (David *et al.*, 2008) com aqueles encontrados para **R2**

Cn	Oleato de β -sitosterila	R2	Cn	Oleato de β -sitosterila	R2
1	37,58	37,01	25	29,71	29,17
2	28,24	27,82	26	20,39	19,80
3	74,25	73,70	27	19,60	19,04
4	38,74	38,16	28	23,63	23,08
5	140,29	139,73	29	12,55	11,98
6	123,15	122,57	1'	173,88	173,31
7	32,48	31,91	2'	35,28	34,71
8	32,48	31,91	3'	25,63	25,05
9	50,59	50,04	4'	29,89	29,32
10	37,17	36,60	5'	29,67	29,09
11	21,59	21,03	6'	29,73	29,25
12	40,29	39,74	7'	30,35	29,69
13	42,88	42,32	8'	27,79	27,21
14	57,26	56,70	9'	130,56	129,98
15	24,86	24,29	10'	130,34	129,76
16	28,82	28,24	11'	27,74	27,16
17	56,60	56,05	12'	30,35	29,69
18	12,42	11,85	13'	30,25	29,58
19	19,89	19,31	14'	30,35	29,69
20	36,72	36,15	15'	30,10	29,35
21	19,34	18,77	16'	32,43	31,87
22	34,50	33,95	17'	23,26	22,68
23	26,63	26,11	18'	14,69	14,10
24	46,40	45,86			

4.7 Friedelina (R3)



R3 foi isolado do Grupo G3 do EER1 e dos Grupos 4, 5, 6 e 7 do EHR2. Apresentou-se como um sólido cristalino com faixa de fusão 235-236 °C, solúvel em clorofórmio. Apresentou teste positivo para TTPC frente ao teste de Liebermann-Burchard.

O espectro de absorção na região do IV (**Figura 19A**, Anexo 1) apresentou bandas em 2926 e 2869 cm^{-1} , referentes à deformação axial das ligações C-H e banda em 1714 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação C=O da carbonila da cetona.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 20A**, Anexo 1) apresentou um multipletto em δ 2,39, atribuído aos hidrogênios H-2, característico de hidrogênios em posição alfa à carbonila (Silverstein *et al*, 2007). Apresenta também um quarteto referente a 1 hidrogênio em δ 2,24 ($J_{4-23}=6,5$ Hz), atribuído ao hidrogênio H-4. A ausência de sinais acima de δ 3,00 é um indicativo da ausência de ligações duplas ou hidroxilas. A ausência de duplas ligações é sugestivo de que o triterpeno pentacíclico pertence à classe dos friedelanos. O espectro apresenta também sinais em δ 1,18, 1,05, 1,01, 1,00, 0,95, 0,88 ($J_{23-4}=6,5$ Hz), 0,87, 0,73, referentes aos hidrogênios metílicos do composto. O dupletto presente em δ 0,88, referente aos H-23, permitiu classificar **R3** como um triterpeno da série friedelano.

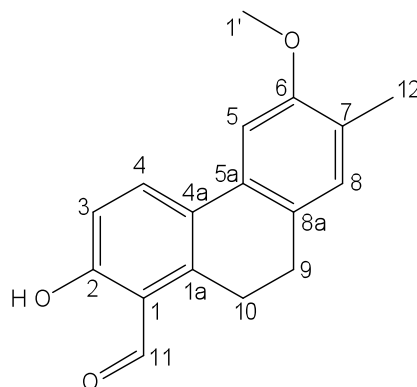
O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 21A**, Anexo 1) apresentou um sinal em δ 213,19, atribuído à carbonila de cetona e mais outros 29 sinais, o que confirma a presença da presença de triterpeno. Dentre os demais 29 carbonos, 8 são metílicos, 11 metilênicos, 4 metínicos e 6 não hidrogenados, de acordo com o subspectro DEPT-135 (**Figura 22A**, Anexo 1). A presença do sinal em δ_{C} 6,80 é característica de metila C-23 de friedelanos que possuem carbonila em C-3 (Mahato e Jundi, 1994). Por comparação com os dados de RMN de ^{13}C de **R3** com aqueles do TTPC

friedelina (Mahato e Jundi, 1994), concluiu-se que **R3** tratava-se dessa substância. A **Tabela 7** contém os dados de deslocamento químico no espectro de RMN de ^{13}C de **R3** em comparação com aqueles da friedelina (Mahato e Jundi, 1994).

Tabela 7 - Comparação dos dados de RMN de ^{13}C da Friedelina (Mahato e Jundi, 1994) com aqueles encontrados para **R3**

Cn	Friedelina	R3	Cn	Friedelina	R3
1	22,3	22,28	16	36,0	36,02
2	41,5	41,53	17	30,0	30,00
3	213,2	213,19	18	42,8	42,80
4	58,2	58,24	19	35,3	35,35
5	42,1	42,14	20	28,1	28,17
6	41,3	41,30	21	32,7	32,78
7	18,2	18,24	22	39,2	39,25
8	53,1	53,11	23	6,8	6,81
9	37,4	37,45	24	14,6	14,65
10	59,4	59,50	25	17,9	17,94
11	35,6	35,63	26	20,2	20,25
12	30,5	30,51	27	18,6	18,65
13	39,7	39,72	28	32,1	32,09
14	38,3	38,30	29	35,0	35,02
15	32,4	32,43	30	31,8	31,77

4.8 2-hidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (R4)



R4 foi isolado dos Grupos 5, 6 e 7 do EHR2 e do Grupo 4 do EER1, como um sólido amarelo, de ponto de fusão 113-114 °C, solúvel em clorofórmio.

O espectro de absorção na região do IV (**Figura 23A**, Anexo 1) apresentou uma banda fraca e larga 3393 cm^{-1} , característica da deformação axial da ligação O-H quando há ligação de hidrogênio intramolecular (Barbosa, 2007); bandas em 2959 , 2927 e 2870 cm^{-1} , referentes à deformação axial das ligações C-H; uma banda intensa em 1638 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação C=O de carbonila de aldeído aromático com ligação de hidrogênio intramolecular (Barbosa, 2007); bandas em 1614 , 1512 , 1467 e 1446 cm^{-1} , referente à deformação axial das ligações C=C de anel aromático.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 26**, pág. 47) apresentou simpleto com integral referente a 1 hidrogênio em δ 12,04, característico de hidrogênio de hidroxila quelada (Silverstein *et al.*, 2007). Apresentou também um simpleto referente a 1 hidrogênio em δ 10,49, característico de deslocamento de hidrogênio de aldeído e atribuído ao H-11; um duplete referente a 1 hidrogênio em δ 7,89 ($J_{4-3}=8,8\text{ Hz}$, acoplamento *orto*), atribuído ao H-4; um simpleto referente a 1 hidrogênio em δ 7,08, atribuído ao H-5; um simpleto referente a 1 hidrogênio em δ 7,02, atribuído ao H-8, um duplete referente a 1 hidrogênio em δ 6,94 ($J_{3-4}=8,8\text{ Hz}$), atribuído ao H-3; um simpleto referente a 3 hidrogênios em δ 3,90, atribuído aos hidrogênios da metoxila; um duplete duplo referente a 2 hidrogênios em δ 3,18 ($J_{10-9}=8,0$ e $6,4\text{ Hz}$), atribuído aos H-10; um duplete duplo referente a 2 hidrogênios em δ 2,80 ($J_{9-10}=8,0$ e $6,4\text{ Hz}$), atribuído aos H-9; e um simpleto referente a 3 hidrogênios em δ 2,24, atribuído aos H-12.

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 30**, pág. 48), em conjunto com a análise do subespectro DEPT-135 (**Figura 30**, pág. 48), observou-se a presença de 17 carbonos, sendo 1 característico de carbonila de aldeído, 12 aromáticos, 2 metilênicos, 1 metílico e 1 referente a uma metoxila. A análise das correlações encontradas nos mapas de contorno COSY, HMQC e HMBC foi fundamental para propor a estrutura do composto.

No mapa de contornos COSY (**Figura 31**, pág. 49), observaram-se os acoplamentos entre H-3/H-4, H-8/H-12 e H-9/H-10. A análise do mapa de contornos HMQC (**Figura 32**, pág. 49) possibilitou associar os sinais de todos carbonos hidrogenados com os sinais de seus hidrogênios correspondentes. Assim, ficou confirmada a presença de um aldeído no composto através da mancha de correlação entre o H-11 (δ 10,49) e o C-11 (δ 195,18).

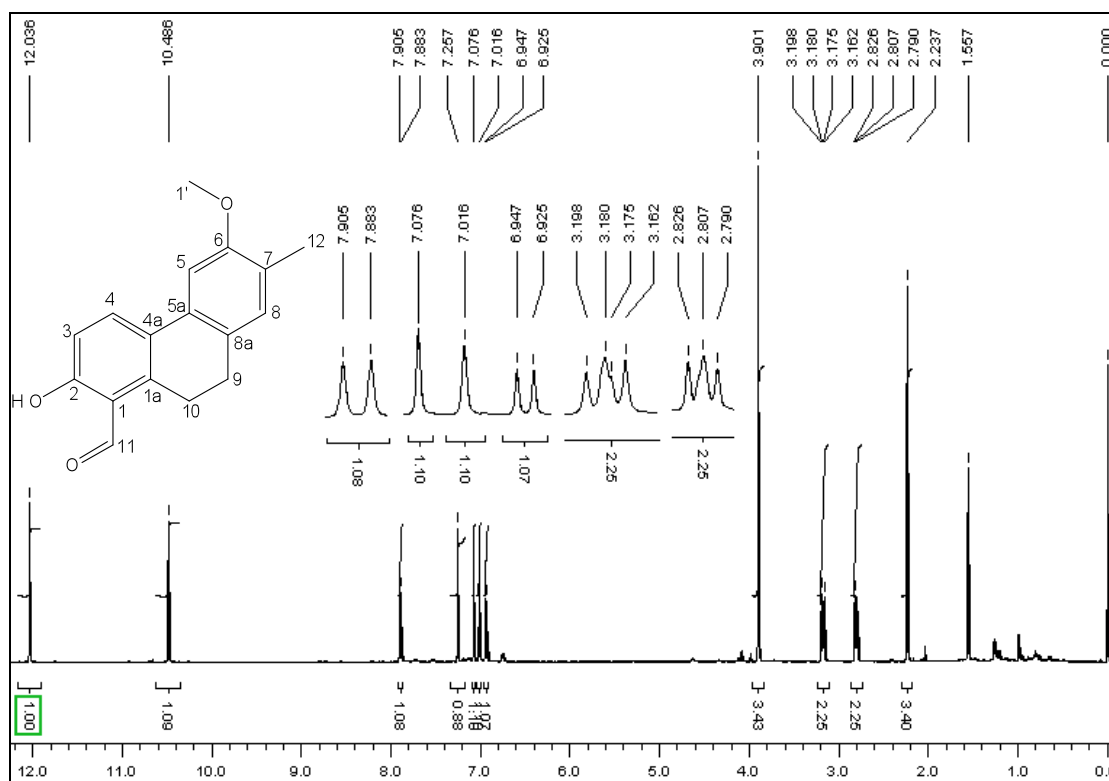


Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H de **R4** (CDCl_3 ; 400 MHz).

Com os dados obtidos pelos espectros descritos anteriormente, alguns fragmentos do composto foram propostos:

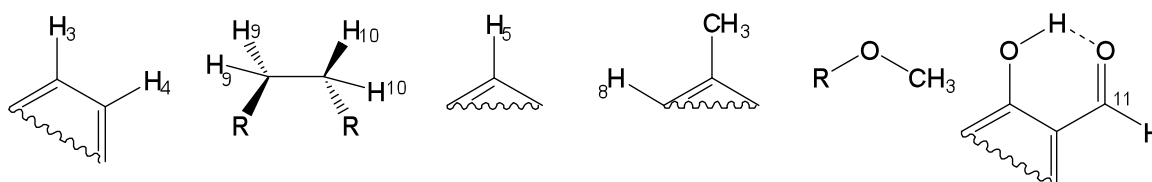


Figura 27 - Alguns fragmentos de **R4**

Apenas com o auxílio do mapa de contornos HMBC (**Figuras 33, 34 e 35**, pág. 50 e 51) foi possível reunir os fragmentos e propor a sua estrutura de **R4**: Na primeira expansão deste (**Figura 33**, pág. 50), já foi possível unir dois fragmentos aromáticos, através das manchas de correlação entre $\text{O}-\text{H}/\text{C}-3$, $\text{O}-\text{H}/\text{C}-1$, $\text{O}-\text{H}/\text{C}-2$, $\text{H}-11/\text{C}-1$ e $\text{H}-11/\text{C}-2$ (**Figura 28**, pág. 48). Outras correlações observadas nas expansões do mapa de contornos HMBC (**Figura 34**, pág. 50) contribuíram para unir os fragmentos do segundo anel aromático de **R4**, como as manchas de correlação entre $\text{H}-5/\text{C}-7$, $\text{H}-8/\text{C}-6$, $\text{H}-8/\text{C}-12$, $\text{H}-12/\text{C}-6$, $\text{H}-12/\text{C}-7$, $\text{H}-12/\text{C}-8$ e $\text{H}-1'/\text{C}-6$ (**Figura 28**, pág. 48).

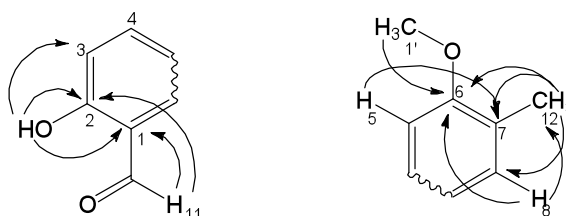


Figura 28 – Algumas correlações obtidas do mapa de contornos HMBC

Finalmente, outras correlações contribuíram para a união dos dois grandes fragmentos anteriores, levando à completa determinação da estrutura de **R4**: manchas de correlação entre: H-3/C-4a, H-4/C-1a, H-4/C-8a, H-5/C-5a, H-10/C-1, H-8/C-8a, H-8/C-9, H-9/C-1a, H-9/C-5a, H-9/C-8, H-9/C-8a, H-10/C-1a e H-10/C-4a (Figura 29).

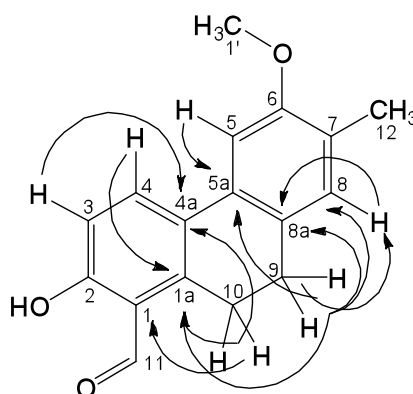


Figura 29 – Correlações encontradas no mapa de contornos HMBC

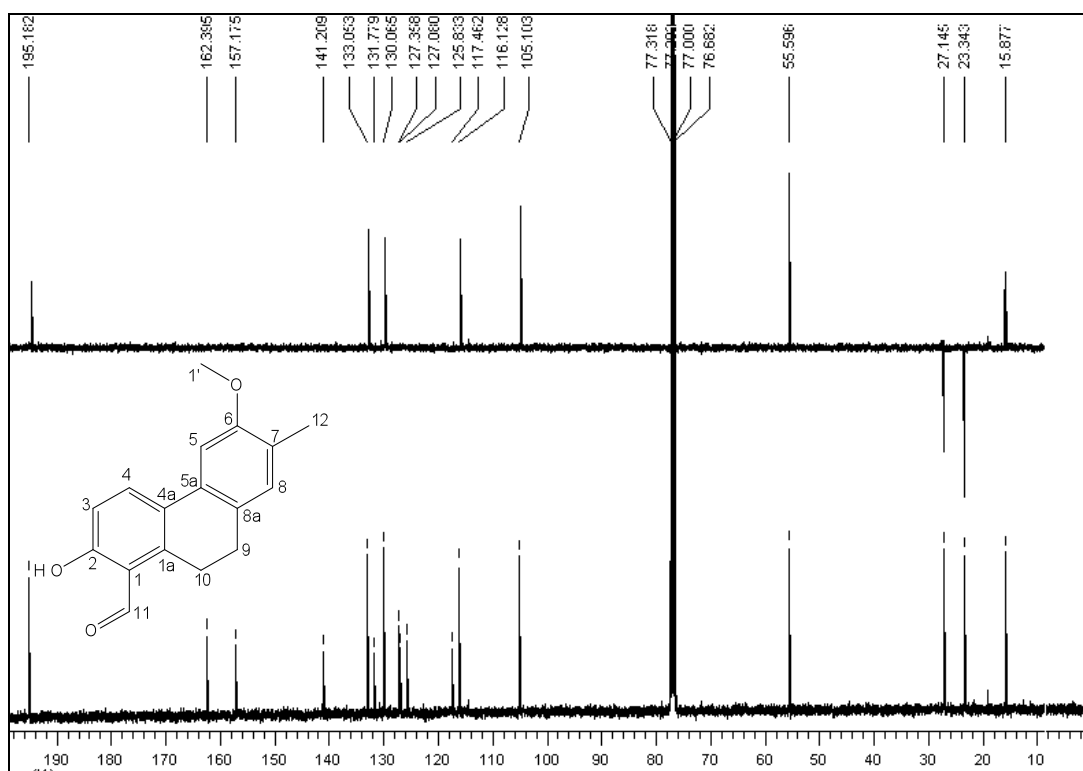


Figura 30 – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 de **R4** (CDCl_3 ; 100 MHz).

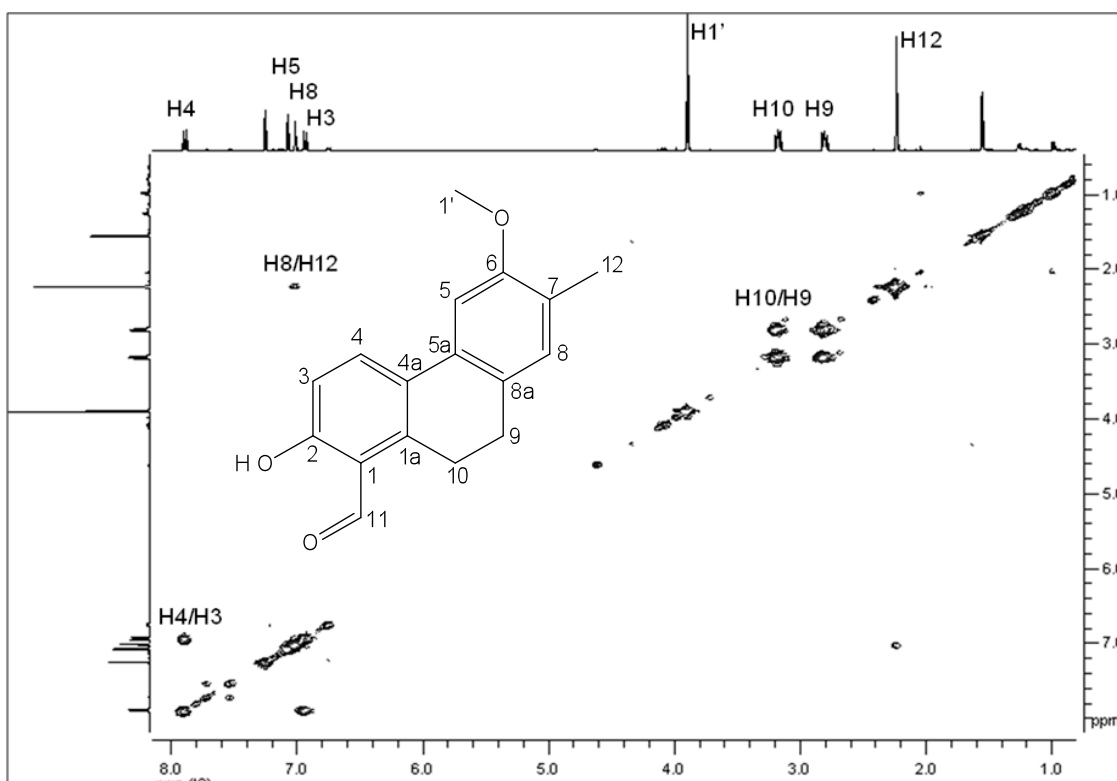


Figura 31 – Mapa de contornos COSY de R4 (CDCl₃; 400 MHz).

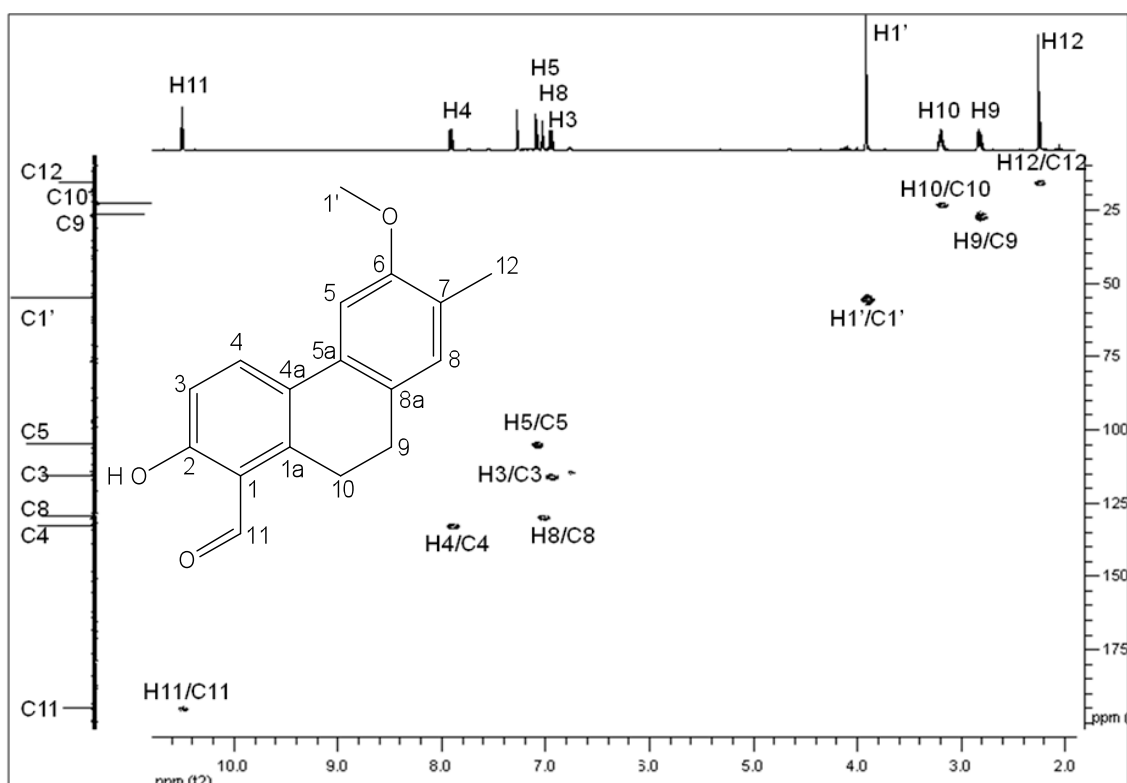


Figura 32 – Mapa de contornos HMQC de R4 (CDCl₃; 400 MHz).

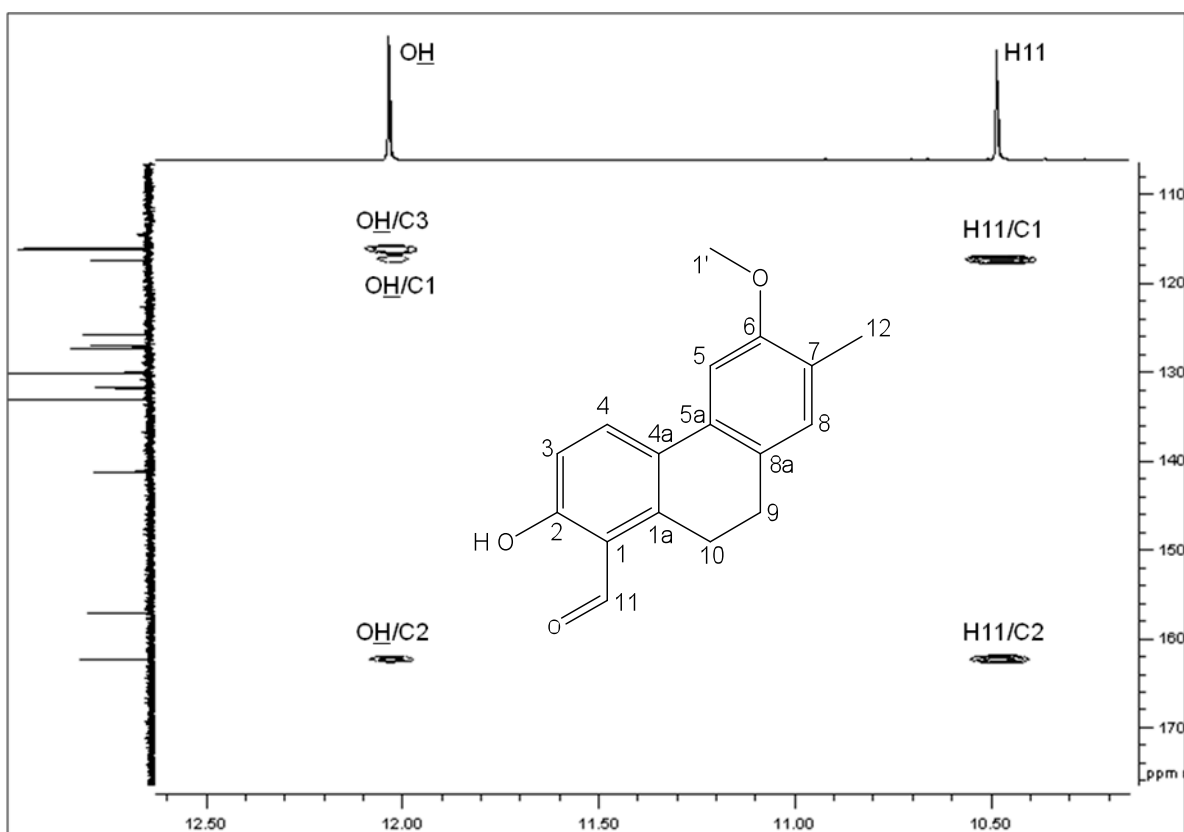


Figura 33 – Expansão do mapa de contornos HMBC de R4 (CDCl₃; 400 MHz).

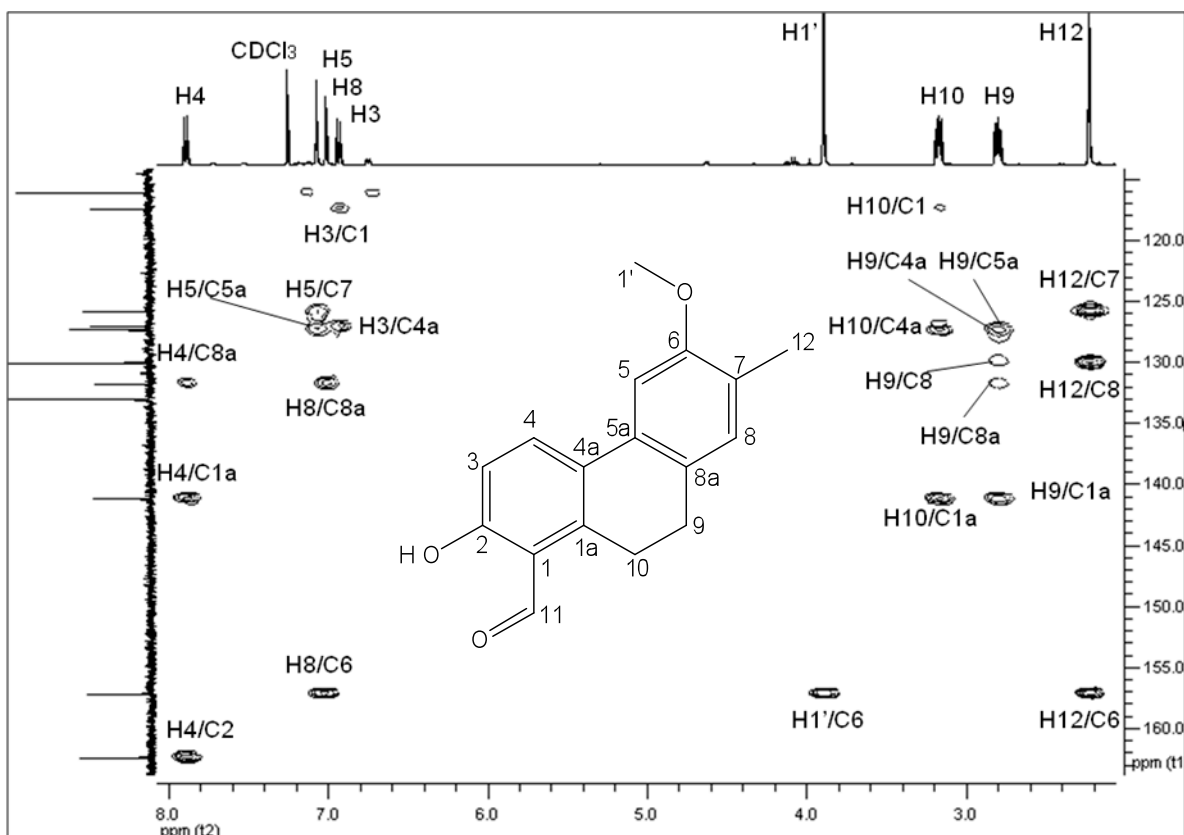


Figura 34 – Expansão do mapa de contornos HMBC de R4 (CDCl₃; 400 MHz).

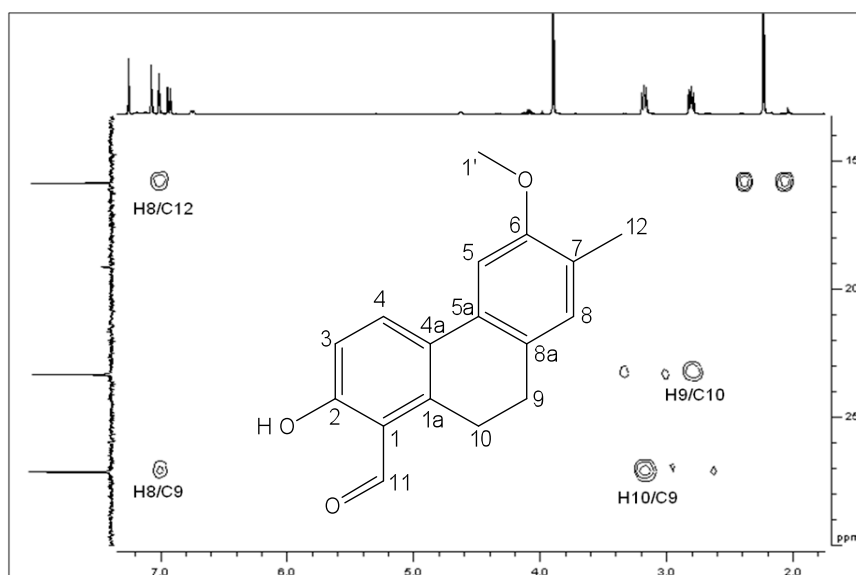
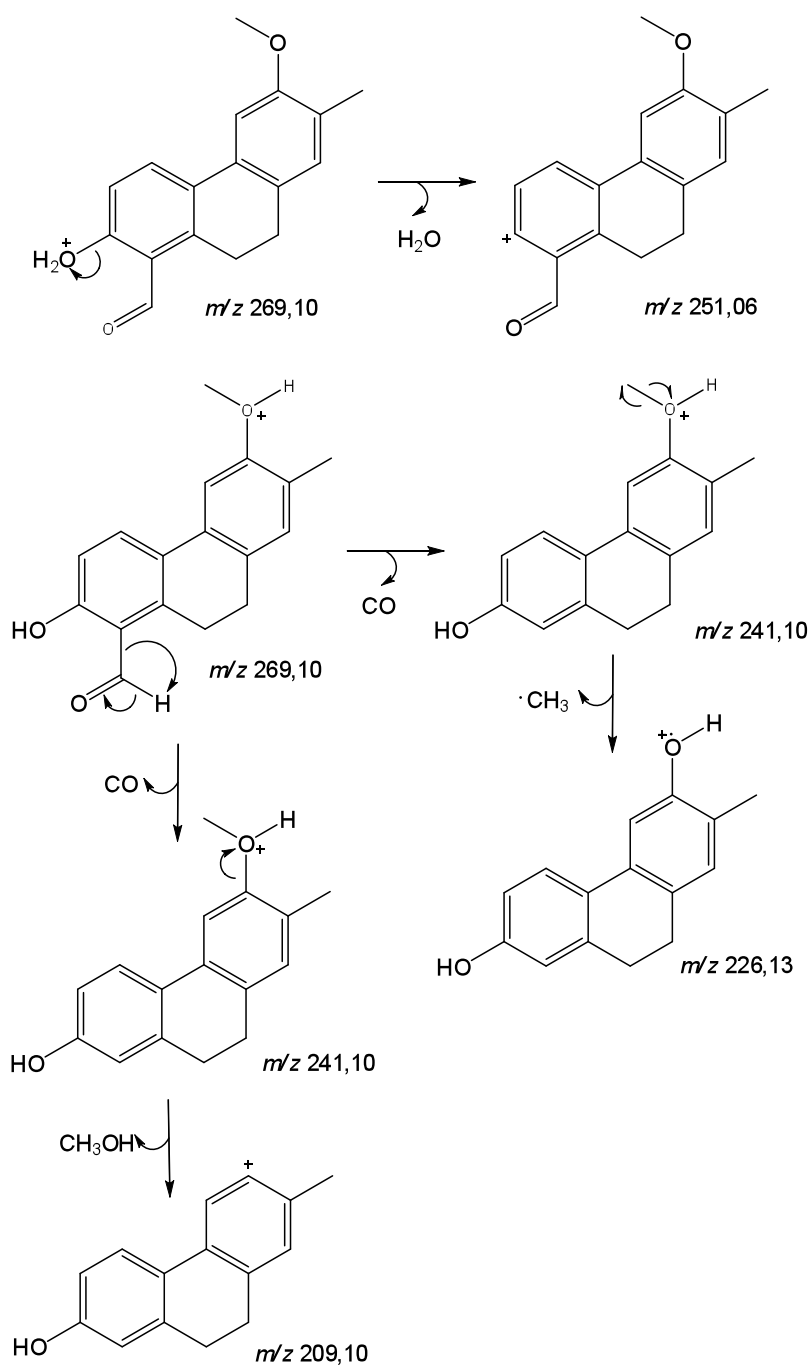


Figura 35 – Expansão do mapa de contornos HMBC de **R4** (CDCl₃; 400 MHz).

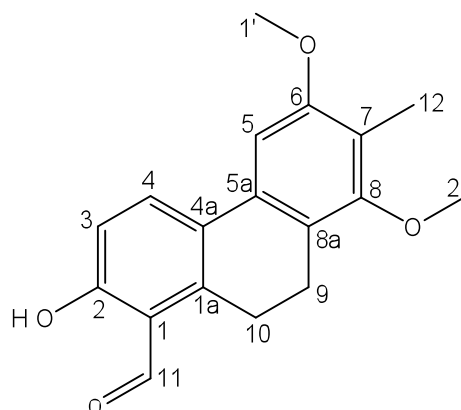
Tabela 8 – Deslocamentos químicos observados para **R4**, nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C (400 MHz, CDCl₃)

Cn	Tipo de carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	=C	117,49	-	OH, H-11, H-10, H-3
2	=C-OH	162,41	-	OH, H-11, H-4
3	=CH	116,14	6,94, d, $J=8,8$ Hz	OH
4	=CH	133,07	7,89, d, $J=8,8$ Hz	-
5	=CH	105,12	7,06, s	-
6	=C-OR	157,20	-	H-8, H-1', H-12
7	=C	125,85	-	H-5, H-12
8	=CH	130,08	7,02, s	H-9, H-12
9	CH ₂	27,16	2,81, dd, $J=8,0$ e $6,4$ Hz	H-8, H-10
10	CH ₂	23,36	3,18, dd, $J=8,0$ e $6,4$ Hz	H-9
11	CHO	195,20	10,49, s	-
12	CH ₃	15,89	2,24, s	H-8
1 ^a	=C	141,23	-	H-4, H-9, H-10
4 ^a	=C	127,10	-	H-3, H-10, H-9
5 ^a	=C	127,38	-	H-5, H-9
8 ^a	=C	131,78	-	H-4, H-8, H-9
1'	OCH ₃	55,61	3,90, s	-
OH	-	-	12,04, s	-

Baseado em todos os dados obtidos, foi proposta a estrutura do 2-hidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-dihidrofenantreno-1-carbaldeído para **R4**. O espectro de massas de **R4** foi obtido por ionização por spray eletrostático (ESI/MS), no modo positivo. Foi observado pico em m/z 269,10 $[M+1]^+$ (**Figura 24A**, Anexo 1). Os outros picos do espectro, referentes a fragmentações do composto, estão representadas no esquema no **Esquema 1**. Não há relatos na literatura para este composto.



Esquema 1 - Propostas de fragmentações de **R4**.

4.9 2-hidroxi-6,8-dimetoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (R5)

R5 foi isolado a partir dos Grupos 5, 6 e 7 do EHR2, como um material amorfo amarelo, de ponto de fusão 151-152 °C, solúvel em clorofórmio.

O espectro de absorção na região do IV (**Figura 25A**, Anexo 1) apresentou bandas em 2956, 2938, 2886 e 2836 cm^{-1} , referentes à deformação axial das ligações C-H; uma banda intensa em 1638 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação C=O de carbonila de aldeído aromático com ligação de hidrogênio intramolecular (Barbosa, 2007); bandas em 1603, 1492 e 1455 cm^{-1} , referentes à deformação axial das ligações C=C de anel aromático.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 36**, pág. 54) de **R5** apresentou-se bastante semelhante àquele de **R4**: simpleto com integral referente a 1 hidrogênio em δ 12,04, característico de hidrogênio de hidroxila quelada; simpleto referente a 1 hidrogênio em δ 10,50, atribuído ao hidrogênio aldeídico H-11; um duplete referente a 1 hidrogênio em δ 7,88 ($J_{4-3}=8,8$ Hz), atribuído ao hidrogênio H-4; e um duplete referente a 1 hidrogênio em δ 6,94 ($J_{3-4}=8,8$ Hz), atribuído ao hidrogênio H-3.

Os sinais relativos aos hidrogênios entre δ 6,93 e 7,10 se apresentaram mais simplificados, indicando um maior grau de substituição no segundo anel aromático: apenas um simpleto referente a 1 hidrogênio em δ 6,93, atribuído ao H-5. No entanto, dois simpletos relativos a duas metoxilas foram observados em δ 3,90 (C-1') e 3,72 (C-2').

Assim como em **R4**, o espectro apresentou também um duplete duplo referente a 2 hidrogênios em δ 3,16 ($J_{10-9}=7,9$ e $J=6,1$ Hz), atribuído ao H-10; um duplete duplo referente a 2 hidrogênios em δ 2,89 ($J_{9-10}=7,9$ e $J=6,1$ Hz), atribuído ao H-9; e um simpleto referente a 3 hidrogênios em δ 2,20, atribuído aos hidrogênios metílicos H-12.

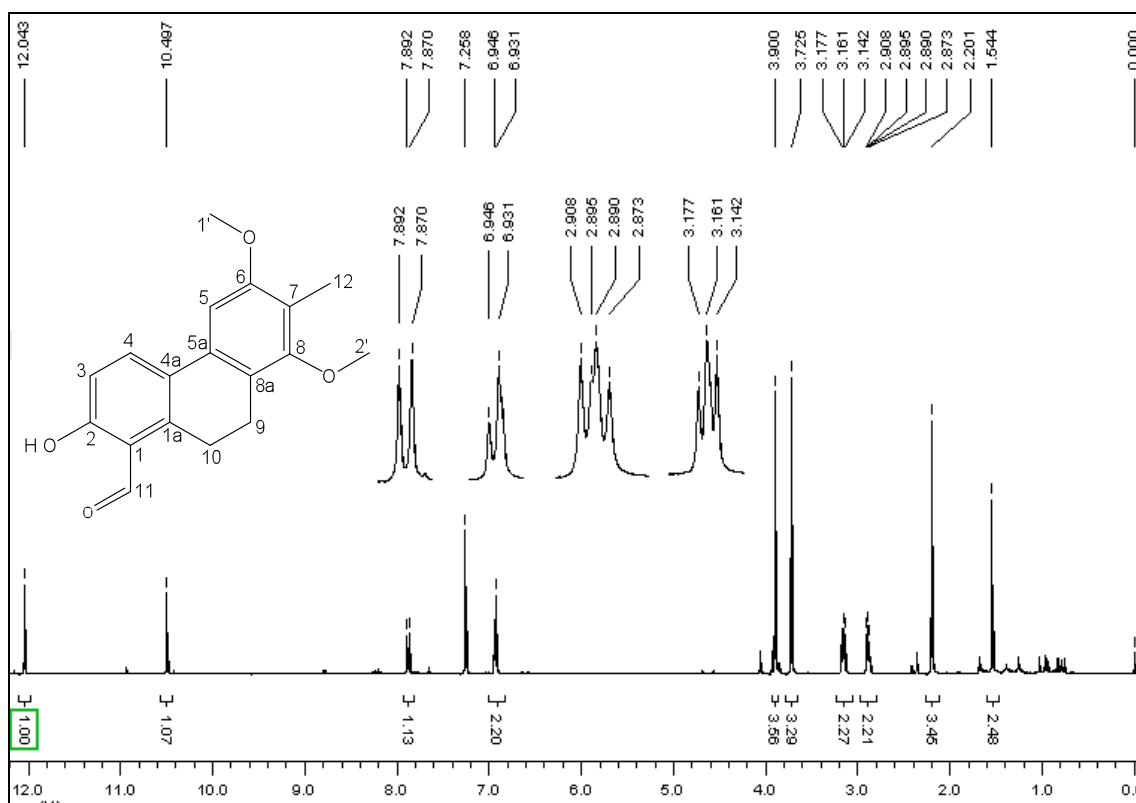


Figura 36 - Espectro de RMN de ^1H de **R5** (CDCl_3 ; 400 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 39**, pág. 56), em conjunto com a análise do subespectro DEPT-135 (**Figura 39**, pág. 56), observou-se a presença de 18 carbonos, sendo 1 característico de carbonila de aldeído, 12 aromáticos, 2 metilênicos, 1 metílico e 2 referentes a duas metoxilas. A análise das correlações encontradas nos mapas de contorno COSY, HMQC e HMBC, assim como para **R4**, foi fundamental para propor a estrutura do composto.

No mapa de contornos COSY (**Figura 40**, pág. 56), observaram-se os acoplamentos H-3/H-4, H-9/H-10, H-1'/H-5, H-12/H-5, e H-11/H-3. O mapa de contornos HMQC (**Figura 41**, pág. 57) possibilitou associar os sinais de todos carbonos hidrogenados com os sinais de seus hidrogênios correspondentes.

Com os dados obtidos pelos mapas de contornos HMBC (**Figuras 42 e 43**, pág. 57 e 58), os fragmentos de **R5** foram unidos. Dessa maneira, verificou-se grande similaridade com **R4** no anel aromático ligado à carbonila aldeídica, devido à presença de manchas de correlações semelhantes: entre O-H/C-1, O-H/C-2, O-H/C-3, H-11/C-3 e H-11/C-2.

A diferença ocorreu no outro anel aromático que, através das correlações do mapa de contornos HMBC (**Figuras 42 e 43**, pág. 57 e 58), possibilitou a sua

elucidação: H-5/C-5a, H-5/C-6, H-5/C-7, H-5/C-8a, H12/C-6, H-12/C-7, H-12/C-8, H-1'/C-6 e H-2'/C-8 (**Figura 37**).

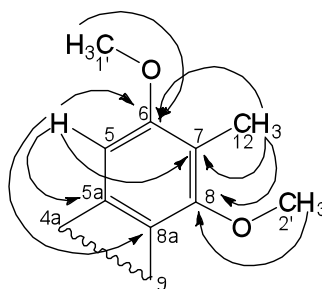


Figura 37 – Correlações encontradas no mapa de contornos HMBC

A união dos dois anéis aromáticos foi feita baseada nas correlações encontradas no mapa de contornos HMBC (**Figuras 42 e 43**, pág. 57 e 58): entre H-4/C-1a, H-4/C-4a, H-5/C-5a, H-5/C-8a, H-9/C-1a, H-9/C-4a, H-9/C-8, H-9/C-8a, H-10/C-1, H-10/C-1a, H-10/C-5a, e H-10/C-8a (muitas das quais são iguais àquelas encontradas para **R4**); e nas correlações observadas no mapa de contornos NOESY (**Figura 44**, pág. 58): entre H-11/H-10, H-1'/H-5, H-4/H-5, H-2'/H-12, H-2'/H-9 e H-9/H-10.

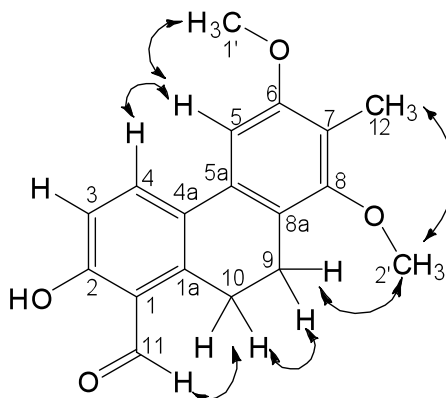


Figura 38 - Correlações NOESY de **R5**.

Baseado em todas as correlações observadas, foi proposta a estrutura do 2-hidroxi-6,8-dimetoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído para **R5**. O espectro de Massas de **R5** foi obtido por ionização por spray eletrostático (ESI/MS), no modo positivo. Foi observado pico em m/z 299,21 $[M+1]^+$ (**Figura 26A**, Anexo 1). Os outros picos do espectro, referentes a fragmentações do composto, estão representadas no esquema **Esquema 2**, pág. 41. Não há relatos na literatura deste composto.

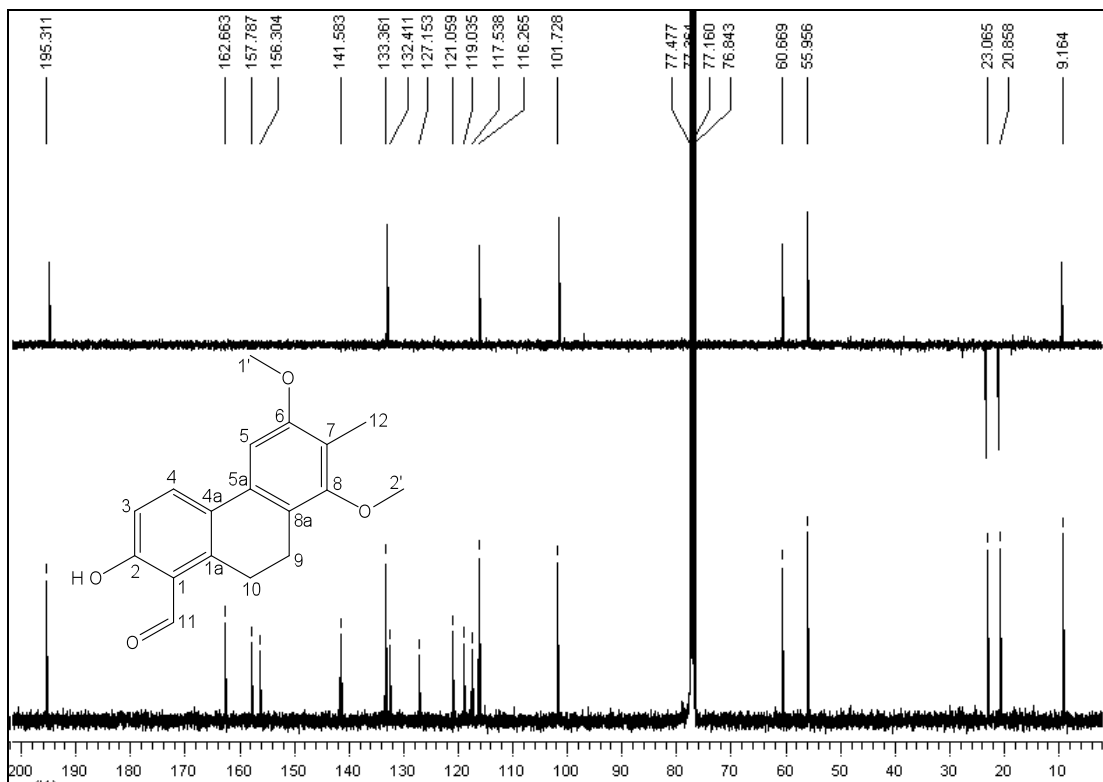


Figura 39 - Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 de **R5** (CDCl_3 ; 100 MHz).

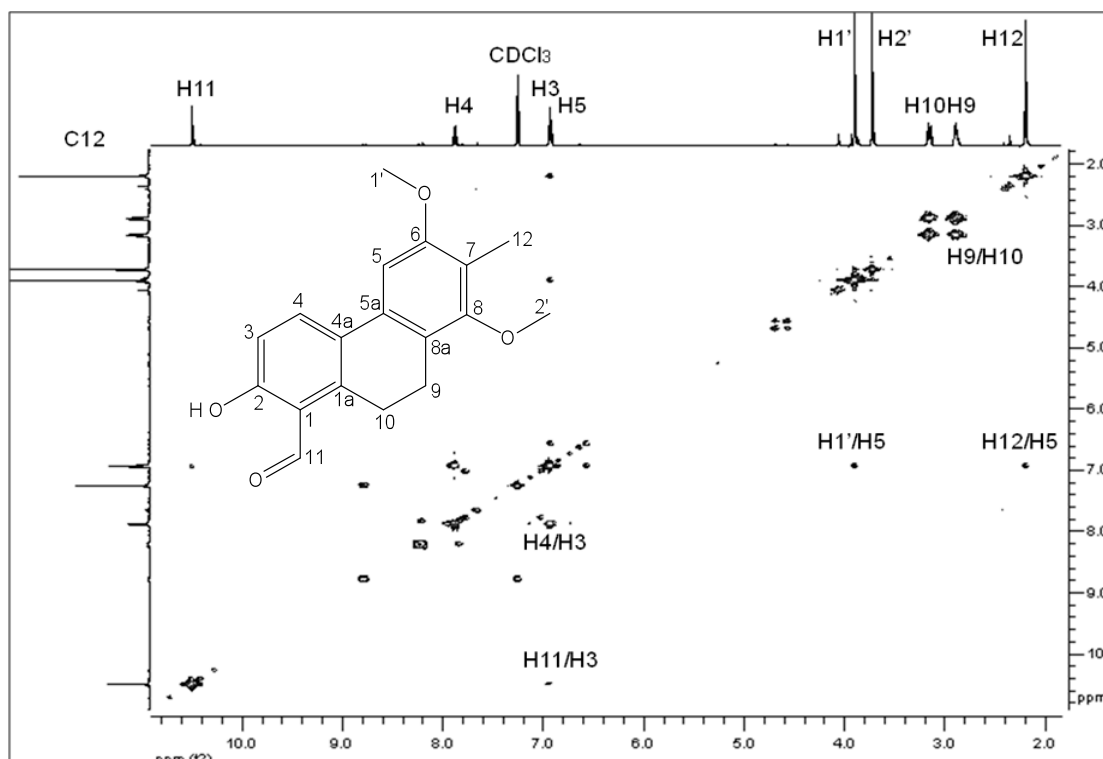


Figura 40 - Mapa de contornos COSY de **R5** (CDCl_3 ; 400 MHz).

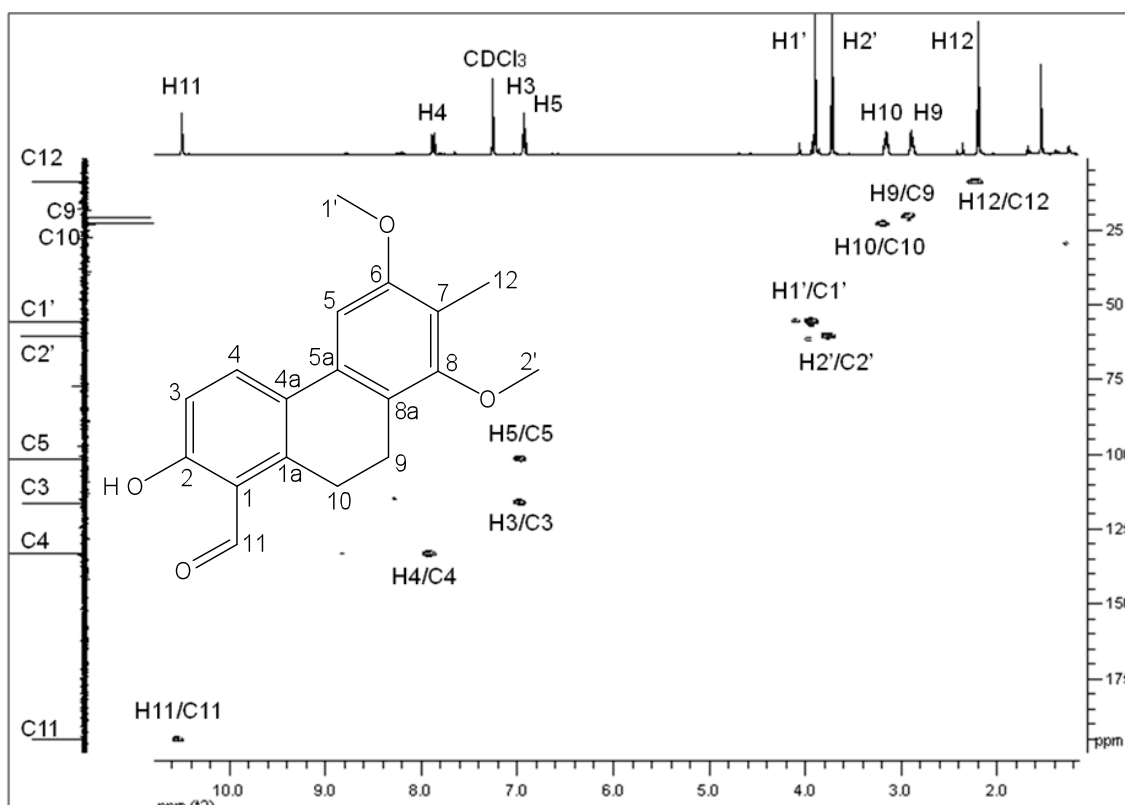


Figura 41 - Mapa de contornos HMBC de **R5** (CDCl₃; 400 MHz).

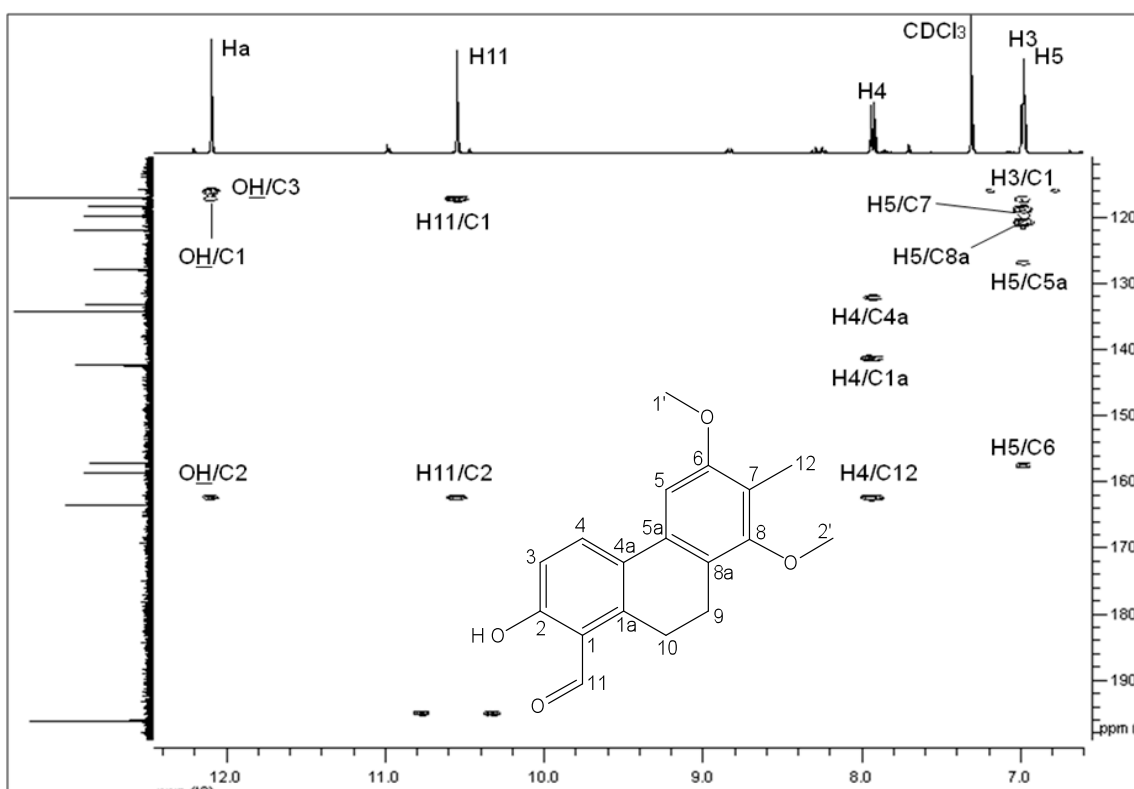


Figura 42 - Expansão do mapa de contornos HMBC de **R5** (CDCl₃; 400 MHz).

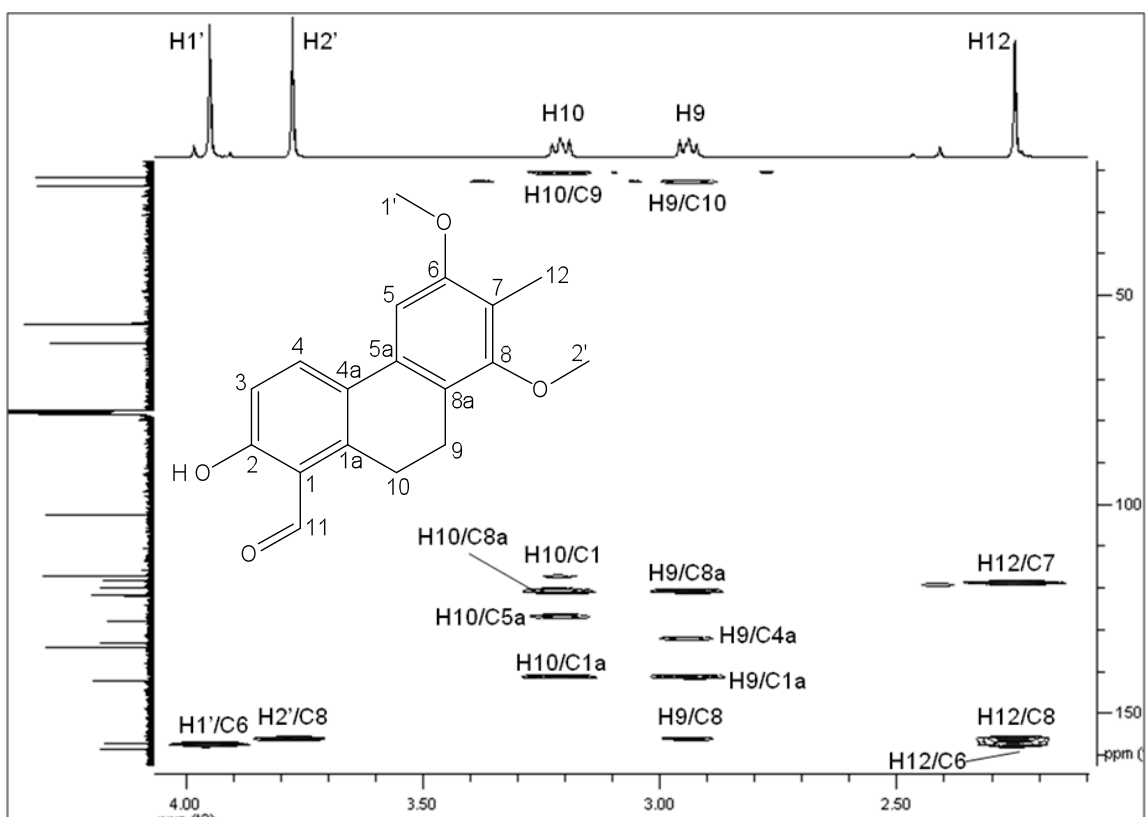


Figura 43 - Expansão do mapa de contornos HMBC de **R5** (CDCl₃; 400 MHz).

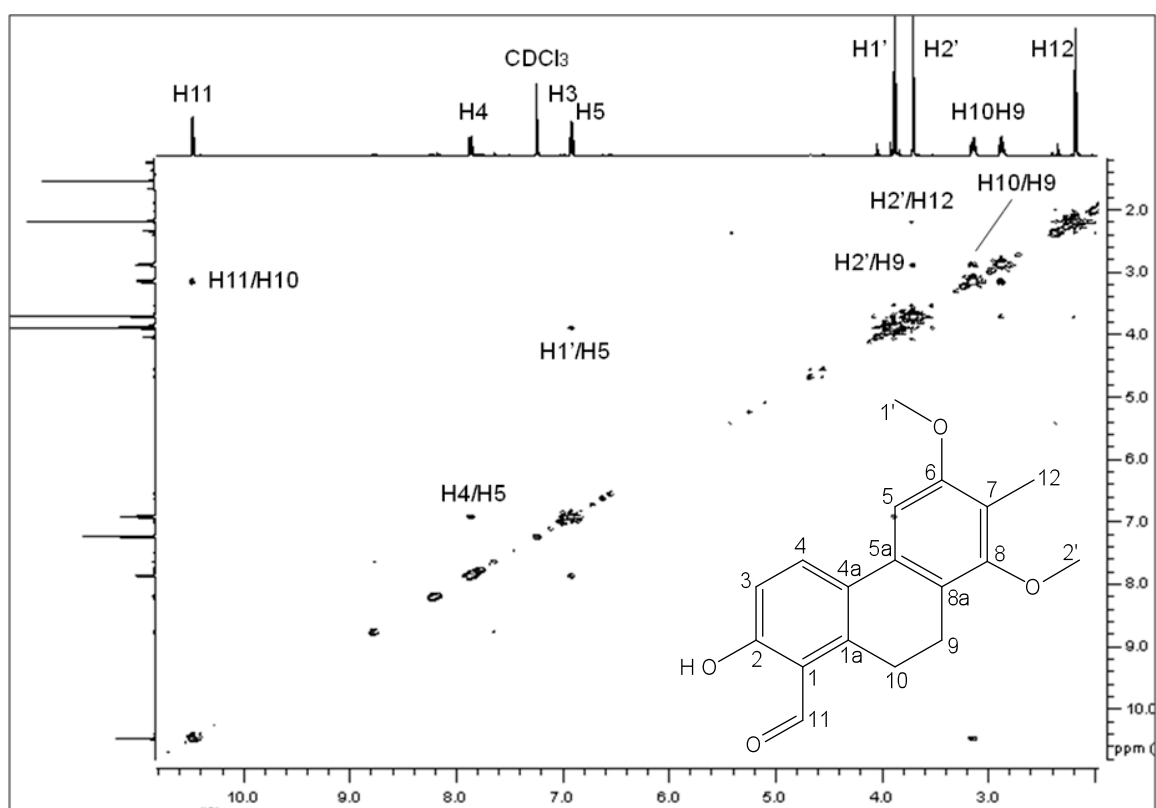
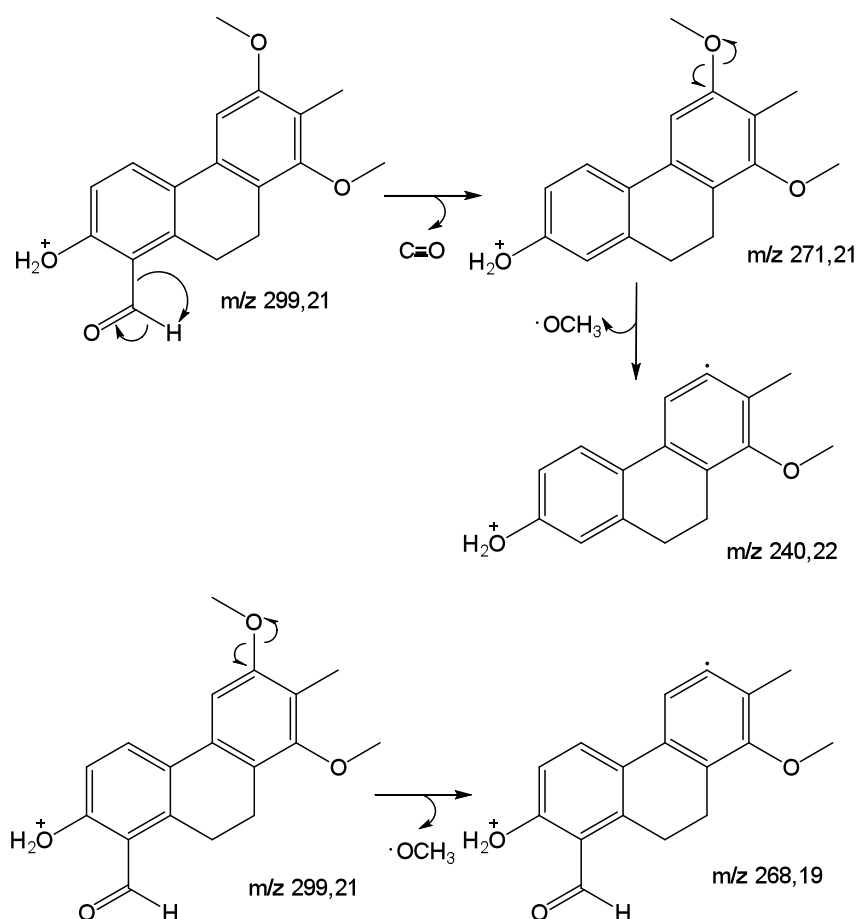


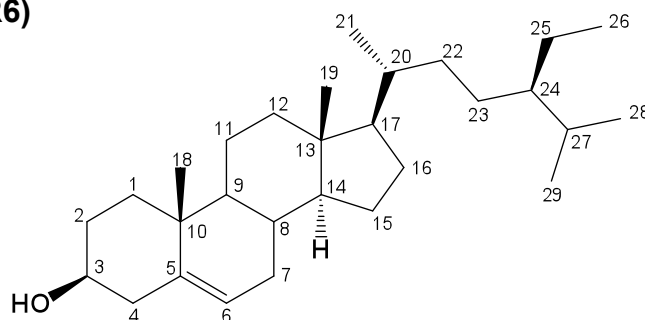
Figura 44 - Expansão do mapa de contornos NOESY de **R5** (CDCl₃; 400 MHz).

Tabela 9 - Deslocamentos químicos observados para **R5**, nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (400 MHz, CDCl_3)

Cn	Tipo de carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	=C	117,54	-	<u>OH</u> , H-11, H-10, H-3
2	=C-OH	162,66	-	<u>OH</u> , H-11, H-4
3	=CH	116,26	6,94, d, $J=8,8$ Hz	<u>OH</u>
4	=CH	133,36	7,88, d, $J=8,8$ Hz	-
5	=CH	101,73	6,93 s	-
6	=C-OR	157,79	-	H-5, H-1', H-12
7	=C	119,04	-	H-5, H-12
8	=C-OR	156,30	-	H-2', H-9, H-12
9	CH_2	20,86	2,89, dd, $J=7,9$ e $6,1$ Hz	H-10
10	CH_2	23,06	3,16, dd, $J=7,9$ e $6,1$ Hz	H-9
11	CHO	195,31	10,50, s	-
12	CH_3	9,16	2,20, s	-
1a	=C	141,58	-	H-4, H-9, H-10
4a	=C	132,41	-	H-4, H-9
5a	=C	127,15	-	H-5, H-10
8a	=C	132,41	-	H-5, H-10, H-9
1'	OCH_3	55,96	3,90, s	-
2'	OCH_3	60,67	3,72, s	-
OH	-	-	12,04, s	-



4.10 β -sitosterol (**R6**)



R6 foi isolado do Grupo 7 do EHR2 e apresentou-se como um cristal incolor com faixa de fusão 130-133 °C, solúvel em clorofórmio. Apresentou teste positivo para esteróide frente ao teste de Liebermann-Burchard.

O espectro de absorção na região do IV (**Figura 27A**, Anexo 1) apresenta uma banda larga entre 3425 e 3296 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação O-H; bandas em 2959, 2933 e 2864 cm^{-1} , referentes às deformações axiais simétricas e assimétricas das ligações C-H dos grupos metila e metilênicos; banda em 1642

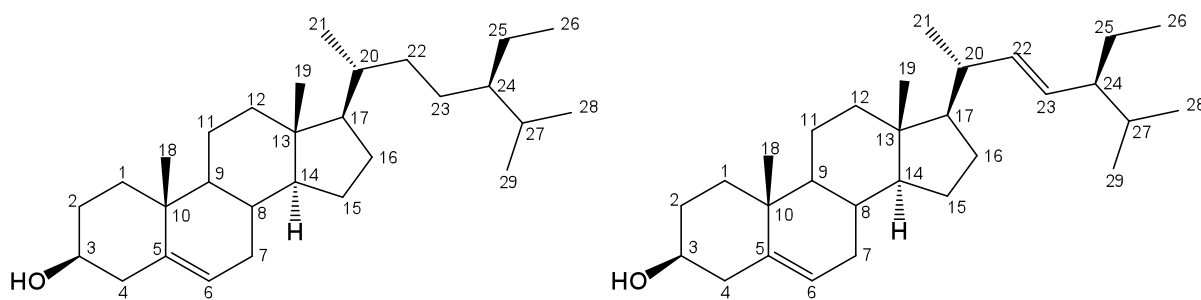
cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação C-H de alqueno; banda em 1052 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação C-O.

O espectro de RMN de ^1H de **R6** (Figura 28A, Anexo 1) apresentou um multipeto referente a 1 hidrogênio em δ 3,52, atribuído ao hidrogênio carbinólico H-3, e um simpleto largo referente a 1 hidrogênio em δ 5,35, atribuído ao hidrogênio olefínico H-6. Os sinais dos demais hidrogênios – metínicos, metilênicos e metílicos – apareceram na região entre δ 2,28 e 0,68.

O espectro de RMN de ^{13}C de **R6** (Figura 29A, Anexo 1) apresentou deslocamentos químicos em δ 140,77 e 121,72, típicos do sistema olefínico entre C-5 e C-6 do β -sitosterol, e em δ 71,82, referente ao carbono carbinólico C-3. Por análise do subespectro DEPT-135 (Figura 30A, Anexo 1), verifica-se que o sinal em δ 121,72 refere-se ao carbono C-6, já que ele se refere a um carbono olefínico hidrogenado. Por comparação dos dados de RMN de ^{13}C obtidos para **R6** com aqueles descritos na literatura (Galotta, 2005) (Tabela 10), foi possível a identificação de **R6** como sendo o β -sitosterol.

Tabela 10 - Comparação dos dados de RMN de ^{13}C do β -sitosterol (Galotta, 2005) com aqueles encontrados para **R6**

Cn	β -sitosterol	R6	Cn	β -sitosterol	R6
1	37,3	37,27	16	28,3	28,25
2	31,6	31,69	17	56,0	56,08
3	71,8	71,82	18	11,9	11,87
4	42,3	42,32	19	19,4	19,40
5	140,8	140,77	20	36,1	36,15
6	121,7	121,72	21	19,0	18,79
7	31,9	31,93	22	33,9	33,97
8	31,9	31,93	23	26,0	26,13
9	50,1	50,16	24	45,8	45,86
10	36,5	36,52	25	29,0	29,19
11	21,1	21,10	26	19,8	19,82
12	39,8	39,79	27	19,0	19,05
13	42,3	42,32	28	23,1	23,10
14	56,8	56,78	29	12,0	11,99
15	24,3	24,31			

4.11 Mistura de β -sitosterol e estigmasterol (R7)

R7 foi isolado do Grupo 8 do EHR2 e do Grupo 6 do EER1. Apresentou-se como um cristal incolor, solúvel em clorofórmio. Demonstrou teste positivo para esteróide frente ao teste de Liebermann-Burchard.

O espectro de absorção na região do IV (**Figura 31A**, Anexo 1) apresentou uma banda larga entre 3427 e 3301 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação O-H; bandas em 2959 , 2934 e 2864 cm^{-1} , referentes às deformações axiais simétricas e assimétricas das ligações C-H dos grupos metila e metilênicos; bandas em 1653 e 1642 cm^{-1} , referentes à deformação axial das ligações C-H de alqueno; e banda em 1052 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação C-O.

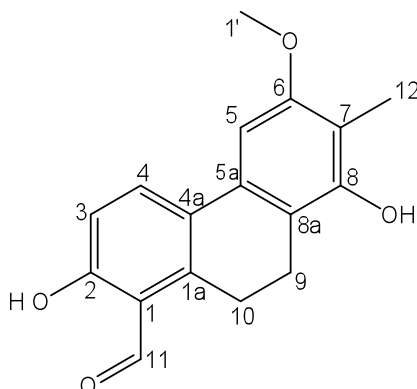
O espectro de RMN de ^1H (**Figura 32A**, Anexo 1) apresentou um multipeto em δ 3,52, atribuído aos hidrogênios carbinólicos H-3 do β -sitosterol e estigmasterol; um dupeto duplo em δ 5,16 ($J_{22-23}=15,2$ e $J_{22-20}=8,4$ Hz), atribuído ao H-22 do estigmasterol; um dupeto duplo em δ 5,02 ($J_{23-22}=15,2$ e $J_{23-24}=8,4$ Hz), atribuído ao H-23 do estigmasterol; e um sinal largo em δ 5,35, atribuído aos hidrogênios olefínicos H-6 dos dois compostos. Os sinais dos demais hidrogênios – metínicos, metilênicos e metílicos – apareceram na região entre δ 2,28 e 0,68.

O espectro de RMN de ^{13}C de **R7** (**Figura 33A**, Anexo 1) e o subespectro DEPT-135 (**Figura 34A**, Anexo 1) apresentaram deslocamentos químicos em δ 140,76 e 121,71, típicos do sistema olefínico entre C-5 e C-6 do β -sitosterol e estigmasterol, em δ 138,30 e 129,29, característico do sistema olefínico entre C-22 e C-23 do estigmasterol; e em δ 71,82, referente ao carbono carbinólico C-3 destes dois esteróides. Por comparação dos dados de RMN de ^{13}C obtidos para **R7** com aqueles descritos na literatura (Galotta, 2005) (**Tabela 11**, pág. 63), foi possível a identificação da mistura de β -sitosterol e estigmasterol em **R7**.

Tabela 11 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C do β -sitosterol e estigmasterol (Galotta, 2005) com aqueles encontrados para **R7**

Cn	β-sitosterol	R7	Estigmasterol	R7
1	37,3	37,26	37,3	37,26
2	31,6	31,68	31,6	31,68
3	71,8	71,81	71,8	71,81
4	42,3	42,31	42,3	42,31
5	140,8	140,76	140,8	140,76
6	121,7	121,71	121,7	121,71
7	31,9	31,92	31,9	31,92
8	31,9	31,92	31,9	31,92
9	50,1	50,15	50,1	50,15
10	36,5	36,51	36,5	36,51
11	21,1	21,09	21,1	21,09
12	39,8	39,79	39,7	39,69
13	42,3	42,32	42,3	42,32
14	56,8	56,78	56,8	56,78
15	24,3	24,30	24,4	24,30
16	28,3	28,24	28,3	28,24
17	56,0	56,07	55,9	55,97
18	11,9	11,86	11,9	11,86
19	19,4	19,39	19,4	19,39
20	36,1	36,15	40,5	40,47
21	19,0	19,04	21,2	21,21
22	33,9	33,96	138,3	138,30
23	26,0	26,11	129,3	129,29
24	45,8	45,86	51,2	51,24
25	29,0	28,90	31,9	31,92
26	19,8	19,81	19,0	18,98
27	19,0	19,04	19,0	18,98
28	23,1	23,08	25,4	25,40
29	12,0	11,98	12,3	12,23

4.12 2,8-dihidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (R8)



R8 foi isolado do Grupo 9 do EHR2 e apresentou-se como um sólido amarelo com faixa de fusão 152-153 °C, solúvel em diclorometano.

O espectro de absorção na região do IV (**Figura 35A**, Anexo 1) apresentou uma banda fraca e larga 3319 cm^{-1} , característica da deformação axial da ligação O-H quando há ligação de hidrogênio intramolecular (Barbosa, 2007); bandas em 2926 , 2897 e 2844 cm^{-1} , referentes à deformação axial das ligações C-H; uma banda intensa em 1642 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação C=O de carbonila de aldeído aromático com ligação de hidrogênio intramolecular (Barbosa, 2007); bandas em 1610 , 1505 e 1455 cm^{-1} , referentes à deformação axial das ligações C=C de anel aromático.

O espectro de RMN de ^1H de **R8** (**Figura 45**, pág. 65) apresentou grande semelhança com o espectro de RMN de ^1H de **R5**, sendo a única diferença significativa a inexistência de um simpleto referente a três hidrogênios em δ próximo a 3,70, o que sugeriu a ausência de uma das metoxilas presentes em **R5**. No lugar dessa metoxila, sugeriu-se então a presença de um grupo hidroxila, já que não havia outro sinal de hidrogênio aromático como em **R4**. A presença dessa hidroxila foi confirmada pelo espectro de Massas (que apresentou um valor de m/z 16 unidades a mais que em **R4** – o que corresponde a um átomo de oxigênio adicional) e pelo deslocamento químico característico de carbono aromático hidroxilado no espectro de RMN de ^{13}C . Sendo assim, o espectro de RMN de ^1H (**Figura 45**, pág. 65) de **R8** apresentou simpleto com integral referente a 1 hidrogênio em δ 12,06, atribuído ao hidrogênio fenólico; um simpleto relativo a 1 hidrogênio em δ 10,48, atribuído ao hidrogênio aldeídico H-11; um duplete referente a 1 hidrogênio em δ 7,88 ($J_{4-3}=8,8\text{ Hz}$), atribuído ao hidrogênio H-4; um duplete referente a 1 hidrogênio em δ 6,92 ($J_{3-4}=8,8\text{ Hz}$), atribuído ao hidrogênio H-3; um simpleto referente a 1 hidrogênio em

δ 6,79, atribuído ao H-5; um simpleto referente a 3 hidrogênios em δ 3,89, atribuído aos H-1'; um duplete duplo referente a 2 hidrogênios em δ 3,18 ($J_{10-9}=7,6$ e $6,8$ Hz), atribuído ao H-10; um duplete duplo referente a 2 hidrogênios em δ 2,84 ($J_{9-10}=7,6$ e $6,8$ Hz), atribuído ao H-9; e um simpleto referente a 3 hidrogênios em δ 2,17, atribuído aos H-12.

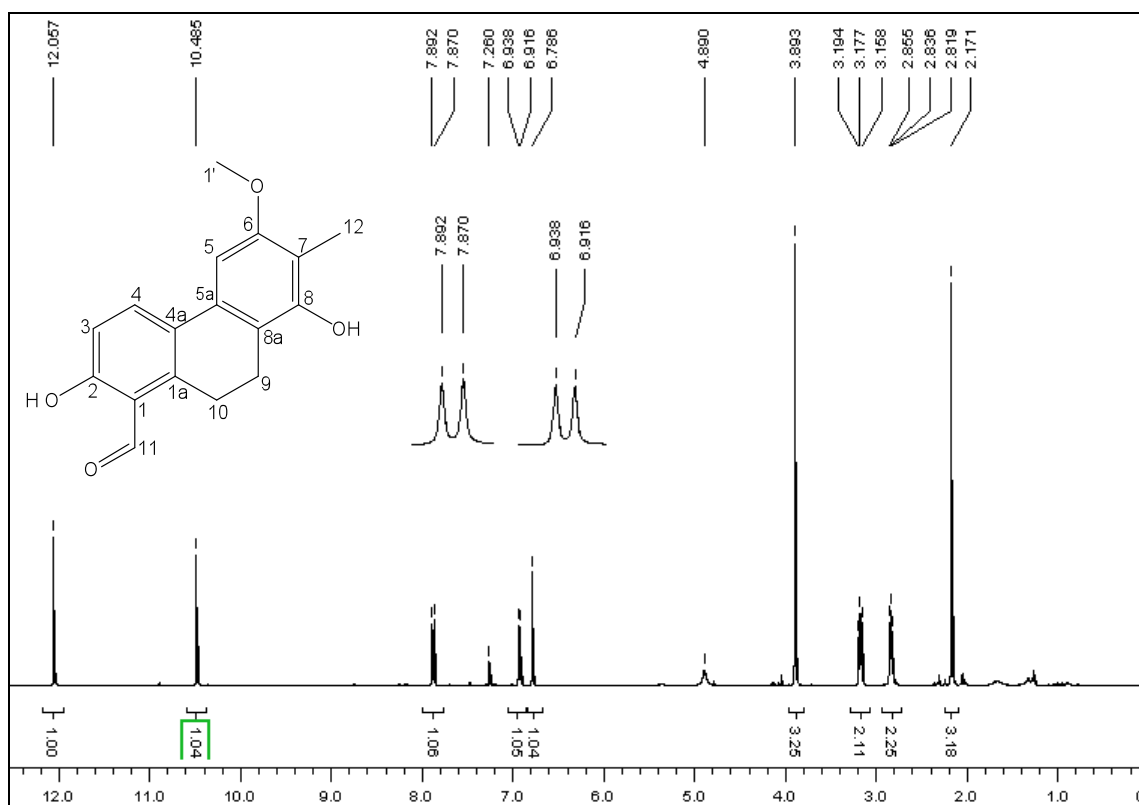


Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H **R8** (CDCl_3 ; 400 MHz).

O espectro de RMN de ^{13}C de **R8** (**Figura 47**, pág. 66) também apresentou grande semelhança com aquele de **R5**, exceto pela ausência de um sinal referente a uma metoxila. As correlações encontradas nos mapas de contornos COSY, HMQC e HMBC foram fundamentais para propor a estrutura do composto.

No mapa de contornos COSY (**Figura 48**, pág. 67), observaram-se os acoplamentos H-4/H-3 e H-9/H-10. A análise do mapa de contornos HMQC (**Figura 49**, pág. 67) possibilitou associar os sinais de todos carbonos hidrogenados com os sinais de seus hidrogênios correspondentes.

A partir da análise dos mapas de contornos HMBC (**Figuras 50 e 51**, pág. 68), verificou-se grande similaridade nas correlações encontradas para **R5** e **R8**. Basicamente, a diferença encontrada no último foi a ausência da correlação entre os hidrogênios da metoxila C-2' e C-8, presente apenas em **R5**. As correlações encontradas para **R8** estão descritas na **Tabela 12**, pág. 70.

As manchas de correlação observadas no mapa de contornos NOESY (entre os hidrogênios H-11/H-10, H-10/H-9, H-3/H-4, H-4/H-5, H-5/H-1' e H-1'/H-12) (Figura 52, pág. 69) reforçou ainda mais a proposta da estrutura de **R8**.

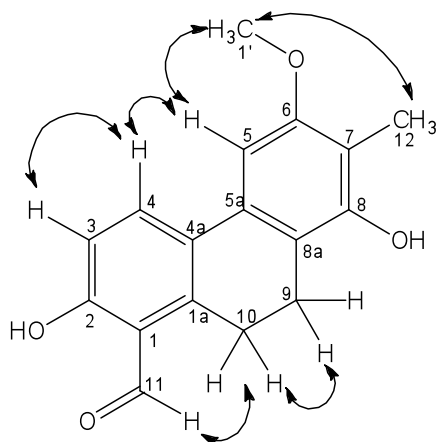


Figura 46 - Correlações NOESY de **R8**.

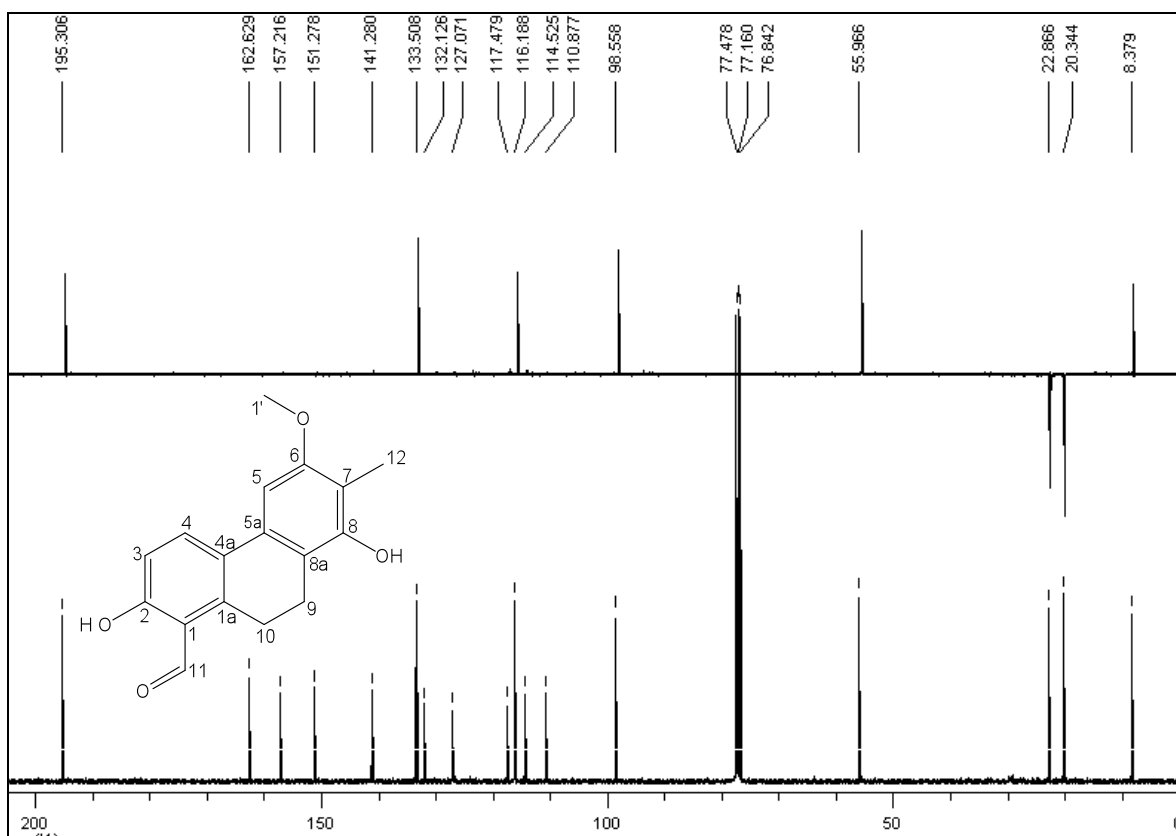


Figura 47 - Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 de **R8** (CDCl_3 ; 100 MHz).

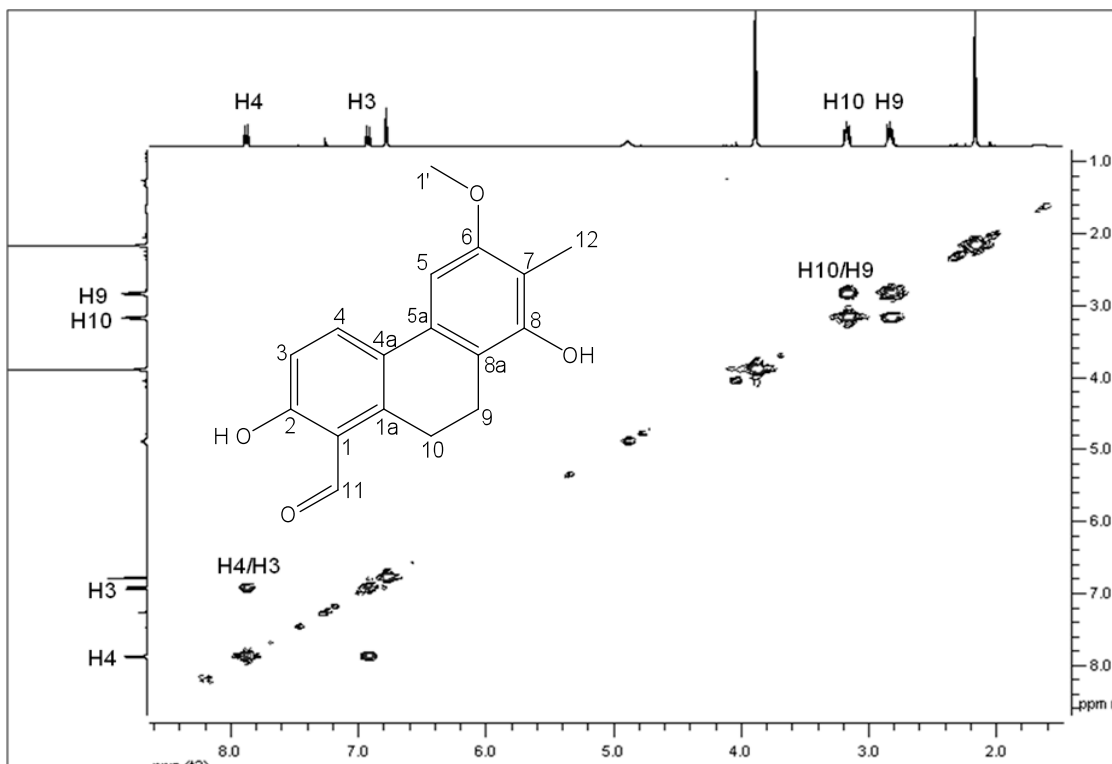


Figura 48 - Mapa de contornos COSY de R8 (CDCl₃; 400 MHz).

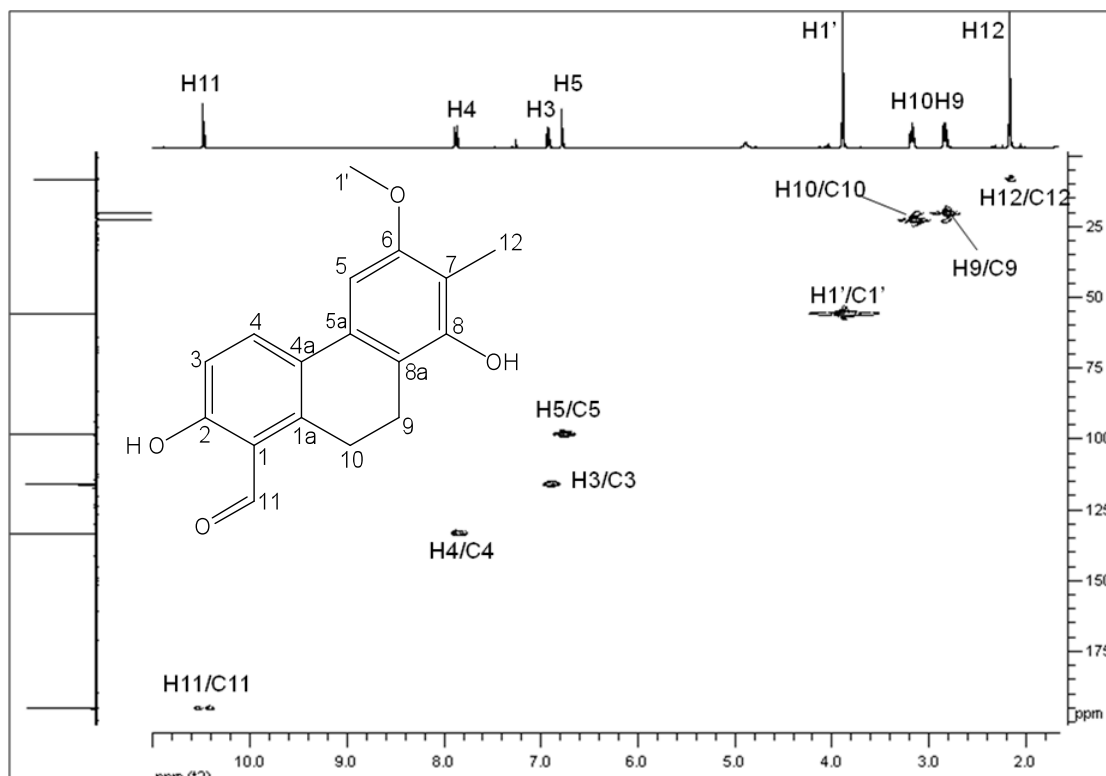


Figura 49 - Mapa de contornos HMBC de R8 (CDCl₃; 400 MHz).

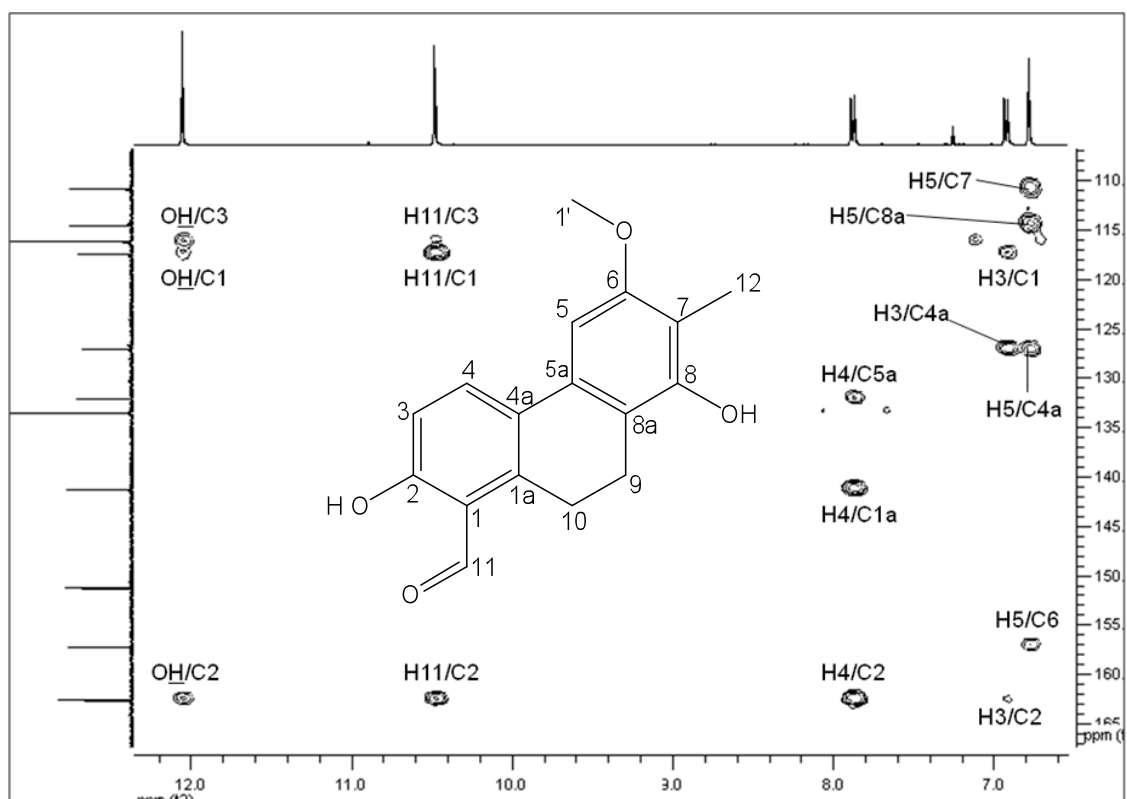


Figura 50 - Expansão do mapa de contornos HMBC de **R8** (CDCl₃; 400 MHz).

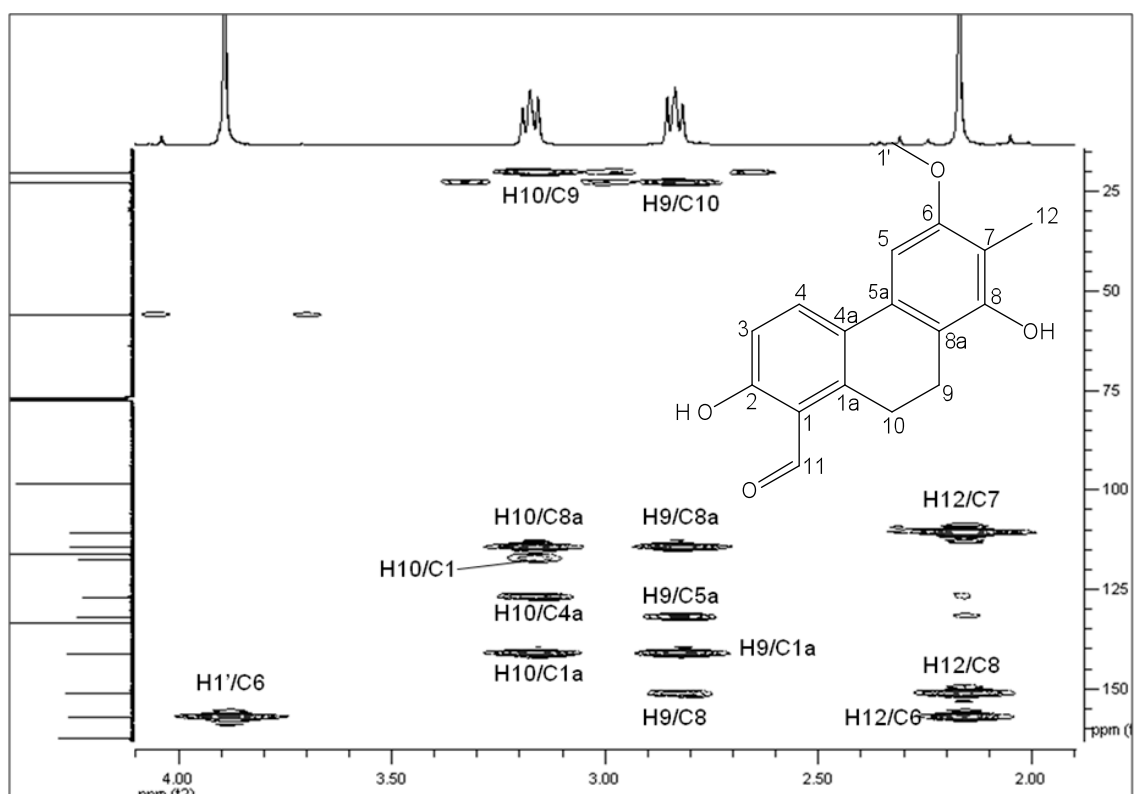


Figura 51 - Expansão do mapa de contornos HMBC de **R8** (CDCl₃; 400 MHz).

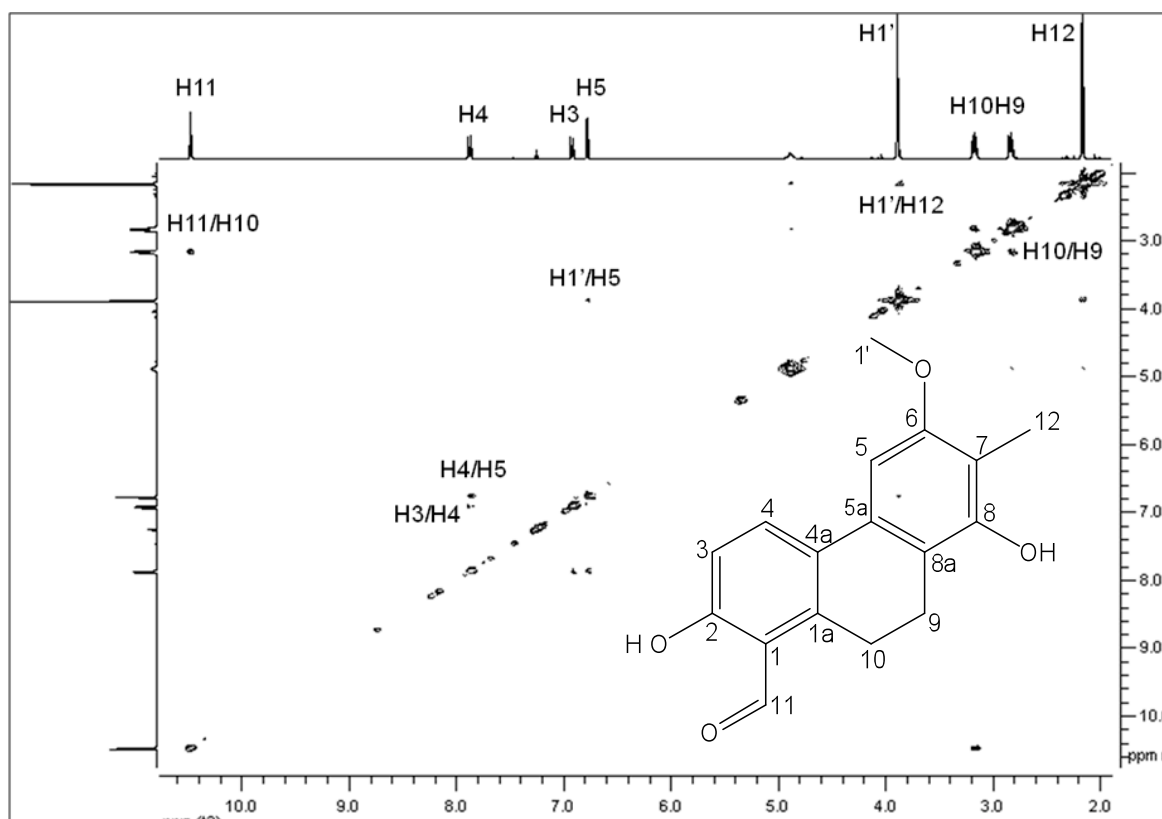


Figura 52 - Expansão do mapa de contornos NOESY de **R8** (CDCl₃; 400 MHz).

Baseado em todas as correlações observadas, foi proposta a estrutura do 2-hidroxi-6,8-dimetoxi-7-metil-9,10-dihydrofenantreno-1-carbaldeído para **R8**. O espectro de Massas de **R8** foi obtido por ionização por spray eletrostático (ESI/MS), no modo negativo. Foram observados picos em m/z 283,0 [M-1]⁻ e m/z 566,9 [2M-1]⁻ (**Figura 36A**, Anexo 1). Não há relatos na literatura deste composto.

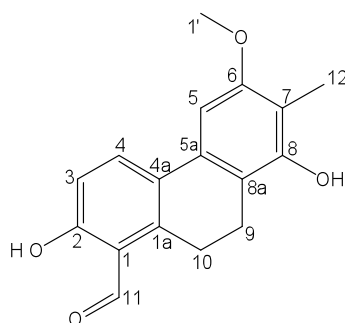
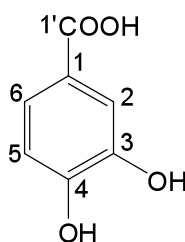


Tabela 12 - Deslocamentos químicos observados para **R8**, nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (400 MHz, CDCl_3)

Cn	Tipo de	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	=C	117,48	-	OH, H-11, H-10, H-3
2	=C-OH	162,63	-	OH, H-11, H-3, H-4
3	=CH	116,19	6,92, d, $J=8,8$ Hz	OH, H-11
4	=CH	133,51	7,88, d, $J=8,8$ Hz	-
5	=CH	98,56	6,79 s	-
6	=C-OR	157,22	-	H-5, H-1', H-12
7	=C	110,88	-	H-5, H-12
8	=C-OR	151,28	-	H-9, H-12
9	CH_2	20,34	2,84, dd, $J=7,6$ e $6,8$ Hz	H-10
10	CH_2	20,87	3,18, dd, $J=7,6$ e $6,8$ Hz	H-9
11	CHO	195,31	10,48, s	-
12	CH_3	8,38	2,17, s	-
1a	=C	141,28	-	H-4, H-9, H-10
4a	=C	127,07	-	H-10, H-5, H-3
5a	=C	132,13	-	H-9, H-4
8a	=C	114,52	-	H-5, H-10, H-9
1'	OCH_3	55,97	3,89, s	-
OH	-	-	12,06, s	-

4.13 Ácido 3,4-dihidroxibenzoico (ácido protocatecuico) (R9)



R9 foi isolado do Grupo 3 do EAR2 como um cristal amarelo claro, de ponto de fusão 193-194 °C, solúvel em metanol.

O espectro de absorção na região do IV (**Figura 37A**, Anexo 1) apresenta uma banda larga 3600 a 2300 cm^{-1} , característica da deformação axial de ligação O-H; uma banda em 1662 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação C=O de carbonila de ácido carboxílico aromático; bandas em 1596, 1528 e 1466 cm^{-1} , referente à deformação axial das ligações C=C de anel aromático.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 38A**, Anexo 1) apresentou 3 sinais na região de hidrogênios aromáticos, sendo 1 simpleto referente a 1 hidrogênio em δ 7,45, atribuído ao H-2; um duplete referente a 1 hidrogênio em δ 7,43 ($J_{6-5} = 8,8$ Hz), atribuído ao H-6 e um duplete referente a 1 hidrogênio em δ 6,80 ($J_{5-6} = 8,8$ Hz), atribuído ao H-5. A presença de 2 dupletos e um simpleto sugere a presença de um anel benzênico 1,3,4 tri-substituído.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 39A**, Anexo 1) e do subespectro DEPT-135 (**Figura 39A**, Anexo 1) evidenciou a presença de 6 sinais na região de aromáticos, sendo três deles hidrogenados, além de um sinal característico de ácido carboxílico (δ 170,34). Esses dados, por comparação com aqueles da literatura (Flamini *et al.*, 2001) (**Tabela 13**), levaram à identificação do ácido 3,4-dihidroxibenzóico ou ácido protocatecuico.

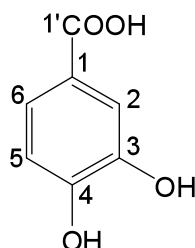
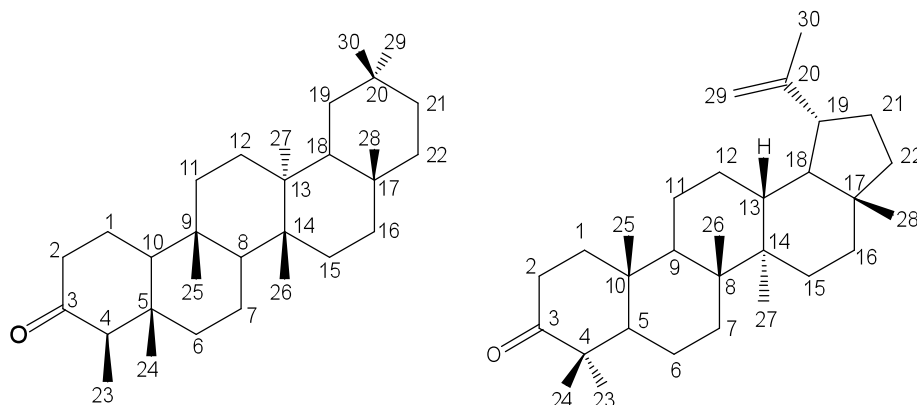


Tabela 13 - Comparação dos dados de RMN de ^{13}C do ácido protocatecuico (Flamini *et al.*, 2001) com aqueles encontrados para **R9**.

Cn	Tipo de carbono	Ácido protocatecuico	R9
1	=C	123,0	122,99
2	=C-H	115,8	115,75
3	=C-OH	146,0	145,94
4	=C-OH	151,5	151,46
5	=C-H	117,7	117,67
6	=C-H	123,9	123,92
1'	COOH	170,3	170,34

4.14 Mistura de friedelina e lupenona (lupan-20(29)-en-3-ona) (R10)



R10 foi isolado do Grupo 2 do EER1 e apresentou-se como um sólido cristalino, solúvel em clorofórmio. Apresentou teste positivo para TTPC frente ao teste de Liebermann-Burchard.

O espectro de absorção na região do IV (**Figura 40A**, Anexo 1) apresenta bandas em 2925 e 2859 cm^{-1} , referentes à deformação axial das ligações C-H e banda em 1713 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação C=O de cetona.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 41A**, Anexo 1) apresentou dois multipletos, cada um com integral referente a 1 hidrogênio, em δ 4,69 e em δ 4,57, atribuídos aos hidrogênios da dupla ligação terminal do esqueleto lupânico (H-29); um simpleto em δ 1,68, referente aos H-30 da lupenona; um multipletto em δ 2,42 a 2,37, atribuído aos hidrogênios H-2 da friedelina e da lupenona, deslocamento característico de hidrogênios em posição alfa à carbonila (Silverstein, 2007). Apresentou também um multipletto referente a 1 hidrogênio em δ 2,22 a 2,23, atribuído ao hidrogênio H-4 do esqueleto friedelânico. O espectro apresenta também sinais em δ 1,25, 1,18, 1,07, 1,05, 1,01, 1,00, 0,95, 0,87, 0,72, referentes aos hidrogênios metílicos dos dois compostos.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figuras 42A e 43A**, Anexo 1) e o subespectro DEPT-135 (**Figuras 44A**, Anexo 1) foram visualmente divididos em dois grupos de sinais principais: um com sinais muito intensos (referente aos sinais da friedelina) e outro com sinais de média intensidade (referente aos sinais da lupenona), o que sugere a presença de uma mistura de triterpenos. É comum nessa classe de substâncias a obtenção de misturas de mesmo Rf por CCDS devido a pequenas diferenças estruturais.

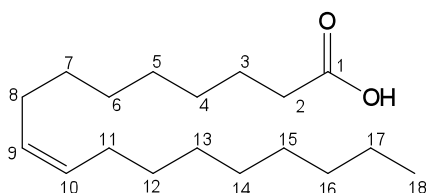
Por comparação com dados de deslocamento químico obtidos no espectro de RMN de ^{13}C para **R10** e aqueles obtidos na literatura para a lupenona (Puapairoj *et*

al., 2005) e friedelina (Mahato e Jundi, 1994) (**Tabela 14**), foi possível a identificação da mistura destes dois compostos em **R10**.

Tabela 14 - Comparação dos dados de RMN de ^{13}C da friedelina (Mahato e Jundi, 1994) e lupenona (Puapairoj *et al.*, 2005) com aqueles encontrados para **R10**

Cn	Friedelina	R10	Lupenona	R10
1	22,3	22,27	34,15	34,15
2	41,5	41,52	39,58	39,62
3	213,2	213,17	218,32	218,16
4	58,2	58,23	47,32	47,33
5	42,1	42,14	54,87	54,94
6	41,3	41,30	19,65	19,68
7	18,2	18,24	33,52	33,58
8	53,1	53,11	40,74	40,79
9	37,4	37,45	49,75	49,80
10	59,4	59,49	36,85	36,89
11	35,6	35,63	21,43	21,48
12	30,5	30,50	25,09	25,17
13	39,7	39,67	38,12	38,18
14	38,3	38,30	42,97	42,99
15	32,4	32,42	27,39	27,44
16	36,0	36,01	35,48	35,52
17	30,0	30,00	42,87	42,90
18	42,8	42,80	48,19	48,26
19	35,3	35,34	47,93	47,96
20	28,1	28,16	150,89	150,87
21	32,7	32,78	29,81	29,84
22	39,2	39,25	39,94	39,98
23	6,8	6,80	26,61	26,65
24	14,6	14,65	21,02	21,03
25	17,9	17,93	15,96	15,96
26	20,2	20,25	15,75	15,78
27	18,6	18,65	14,45	14,48
28	32,1	32,08	17,99	18,01
29	35,0	35,01	109,38	109,38
30	31,8	31,77	19,19	19,31

4.15 Ácido oléico (R11)



R11 foi isolado dos Grupo 3 e 8 do EER1, como um óleo amarelo claro.

O espectro de absorção na região do IV (**Figura 45A**, Anexo 1) de **R11** apresentou uma banda larga em $3400\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$, referente à deformação axial da ligação O-H do ácido carboxílico; uma banda intensa em 1708 cm^{-1} , referente à deformação axial C=O da carbonila do grupo carboxila; banda em 3006 cm^{-1} , referente à deformação axial de C-H de alqueno; bandas em 2922 e 2853 cm^{-1} , referentes às deformações axiais das ligações C-H dos grupos metila e metilênicos; banda em 934 cm^{-1} , referente à deformação angular fora do plano de C-H de alqueno. Observou-se também banda em 722 cm^{-1} , referente à deformação angular assimétrica no plano de metilenos, característico de alcanos de cadeia linear de sete ou mais carbonos (Silverstein *et al.*, 2007). Todos esses dados sugerem a presença de um ácido graxo alifático insaturado de cadeia longa.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 46A**, Anexo 1) apresentou um simpleto largo em δ 11,50, atribuído ao hidrogênio do ácido carboxílico; um tripleto aparente em δ 5,33 ($J_{9-10}=4,5\text{ Hz}$) referente aos dois hidrogênios olefínicos H-9 e H-10; um tripleto em δ 2,33 ($J_{2-3}=6,8\text{ Hz}$) referente a dois hidrogênios metilênicos alfa à carbonila; um duplete aparente largo em δ 2,01 referente a quatro hidrogênios, atribuído aos hidrogênios alílicos H-8 e H-11; um quinteto aparente em δ 1,63 ($J_{3-2}=6,8\text{ Hz}$) referente a dois hidrogênios, atribuído aos hidrogênios metilênicos em posição beta à carbonila; um tripleto em δ 0,88 ($J_{18-17}=5,8\text{ Hz}$) referente a três hidrogênios, que foi atribuído aos hidrogênios do grupo metila terminal (H-18); e um simpleto largo em δ 1,31-1,27 atribuído aos demais hidrogênios dos grupos metilênicos. A integração desse sinal sugere a presença de 20 hidrogênios.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 47A**, Anexo 1) apresentou sinais em δ 180,59, atribuído ao carbono da carbonila; em δ 130,00 e 129,72, referente aos carbonos olefínicos; sinais entre δ 34,19 e 22,79, relativos aos carbonos metilênicos; e sinal em 14,15, relativo ao metila terminal. Essas atribuições foram feitas juntamente com a análise do subspectro DEPT-135 (**Figura 47A**, Anexo 1).

Os dados obtidos acima permitiram propor para **R11** a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{COOH}$, sugerindo tratar-se do ácido oléico ou ácido elaídico. Com relação à

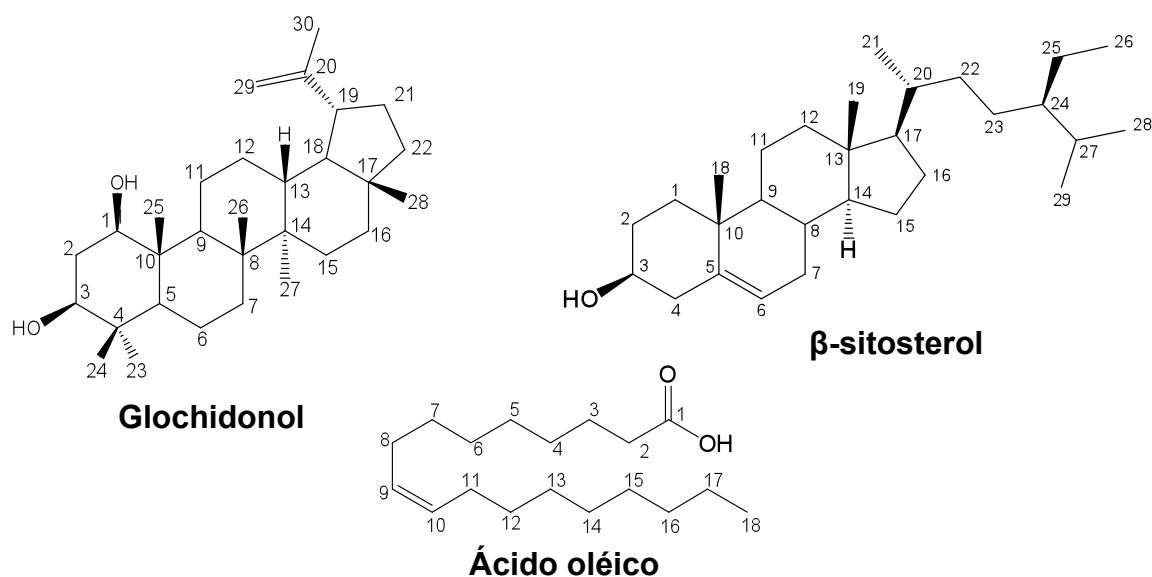
estereoquímica, o isômero *Z* é conhecido como ácido oléico, e o isômero *E* como ácido elaídico. As informações obtidas dos espectros no IV e de RMN de ^1H não foram suficientes para dizer qual isômero obtido, entretanto a análise do estado físico do composto à temperatura ambiente - que era líquido - foi decisiva para a identificação, visto que o ponto de fusão do ácido oléico é de 13 °C e o do ácido elaídico é de 44 °C (Costa *et al.*, 2006).

Os dados dos espectros na região de IV e de RMN de ^1H , juntamente com a comparação dos valores de deslocamento químico de RMN de ^{13}C de **R11** e do ácido oléico isolado por Oliveira (2004) (**Tabela 15**), permitiram propor a estrutura do ácido (*Z*)-9-octadenóico (ácido oléico) para **R11**.

Tabela 15 - Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **R11** com aqueles encontrados para o ácido oléico (Oliveira, 2004)

Cn	Ácido oléico	R11	Cn	Ácido oléico	R11
1	179,50	180,59	10	129,74	129,72
2	33,97	34,20	11	27,16	27,24
3	24,70	24,75	12	29,70	29,78
4	29,25	29,38	13	29,45	29,57
5	29,08	29,17	14	29,53	29,66
6	29,15	29,27	15	29,33	29,46
7	29,78	29,88	16	31,93	32,04
8	27,23	27,30	17	22,70	22,79
9	130,03	130,01	18	14,12	14,15

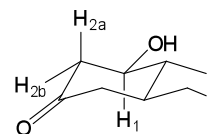
4.16 Mistura de glochidonol, ácido oléico e β -sitosterol (R12)



R12 foi isolado do Grupo 8 do EER1 e apresentou-se como um sólido branco-amarelado, solúvel em clorofórmio. Apresentou teste positivo para TTPC frente ao teste de Liebermann-Burchard.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 48A**, Anexo 1) apresentou um simpleto largo em δ 5,35 referente aos 2 hidrogênios olefínicos H-9 e H-10 do ácido oléico; um tripleto em δ 2,34 ($J_{2-3}=7,5$ Hz) referente a 2 hidrogênios metilênicos alfa à carbonila do ácido oléico; um duplete aparente largo em δ 2,02 referente a 4 hidrogênios, atribuído aos hidrogênios alílicos H-8 e H-11 do ácido oléico; um tripleto em δ 0,88 ($J_{18-17}=6,7$ Hz) referente a 3 hidrogênios, que foi atribuído aos hidrogênios do grupo metila terminal do ácido oléico. Sinais característicos do β -sitosterol apareceram como um multiplete em δ 3,53, atribuído ao hidrogênio carbinólico H-3, e o sinal em δ 5,35, atribuído ao hidrogênio olefínico H-6.

Com relação ao glochidonol, o espectro apresentou um duplete em δ 4,68 ($J_{29a-29b}=1,5$ Hz) referente a 1 hidrogênio olefínico terminal deste triterpeno, H-29a; um duplete em δ 4,56 ($J_{29b-29a}=1,5$ Hz) referente a 1 hidrogênio olefínico terminal, H-29b e simpletos em δ 1,68, 1,06, 1,06, 1,04, 0,98, 0,83 e 0,80, cada um referente a três hidrogênios, que foram atribuídos aos hidrogênios H-30, H-24, H-26, H-23, H-27, H-25 e H-28, respectivamente (Puapairoj *et al.*, 2004). A posição equatorial da hidroxila do glochidonol foi atribuída baseada nos valores das constantes de acoplamento apresentada pelos hidrogênios H-1, H-2a e H-2b:



o duplete duplo em δ 3,91, referente a 1 hidrogênio, atribuído ao hidrogênio carbinólico H-1 do glochidonol, apresentou $J_{1-2a}=8,1$ (valor característico de acoplamento de hidrogênios em posição axial) e $J_{1-2b}=3,4$ Hz, o que sugere que H-1 e H-2a estejam em posição axial, enquanto a hidroxila e H-2b em posição equatorial. Foi também observado no espectro um duplete duplo em δ 3,01 ($J_{2a-2b}=14,3$ e $J_{2a-1}=8,1$ Hz) referente a 1 hidrogênio, atribuído ao hidrogênio H-2a e um duplete duplo em δ 2,23 ($J_{2b-2a}=14,3$ e $J_{2b-1}=3,4$ Hz) referente a 1 hidrogênio, atribuído ao hidrogênio H-2b.

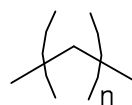
A comparação dos dados do espectro de RMN de ^{13}C de **R12** (**Figuras 49A e 50A**, Anexo 1) com aqueles da literatura (Ayer *et al.*, 1982; Oliveira, 2004 e Galotta, 2005) (**Tabela 16**, pág. 77), levou à identificação das 3 substâncias: glochidonol (sinais de maior intensidade), ácido oléico (sinais de média intensidade) e β -sitosterol (sinais de menor intensidade).

Tabela 16 - Comparação dos dados de RMN de ^{13}C do glochidonol (Ayer *et al.*, 1982), ácido oléico (Oliveira, 2004) e β -sitosterol (Galotta, 2005) com aqueles encontrados para **R12**

Cn	Glochidonol	R12	Ácido oléico	R12	β -Sitosterol	R12
1	79,6	79,67	179,50	179,09	37,3	37,27
2	45,2	45,11	33,97	33,96	31,6	31,63
3	216,1	216,34	24,70	24,74	71,8	71,89
4	47,1	47,19	29,25	29,29	42,3	42,36
5	51,4	51,35	29,08	29,11	140,8	140,76
6	19,6	19,67	29,15	29,18	121,7	121,78
7	33,0	32,94	29,78	29,80	31,9	31,94
8	41,2	41,16	27,23	27,26	31,9	31,94
9	50,8	50,72	130,03	130,06	50,1	50,16
10	43,0	42,98	129,74	129,77	36,5	36,54
11	23,0	23,03	27,16	27,21	21,1	21,12
12	25,2	25,18	29,70	29,73	39,8	39,81
13	38,0	38,00	29,45	29,48	42,3	42,35
14	43,0	42,94	29,53	29,56	56,8	56,80
15	27,5	27,52	29,33	29,36	24,3	24,34
16	35,6	35,54	31,93	31,96	28,3	28,29
17	43,0	42,98	22,70	22,73	56,0	56,09
18	48,3	48,27	14,12	14,18	11,9	12,03
19	48,0	47,97	-	-	19,4	19,45
20	150,7	150,78	-	-	36,1	36,19
21	29,8	29,81	-	-	19,0	18,83
22	40,4	40,00	-	-	33,9	33,96
23	28,0	28,03	-	-	26,0	26,09
24	19,9	19,86	-	-	45,8	45,86
25	11,9	11,90	-	-	29,0	28,98
26	16,0	15,98	-	-	19,8	19,86
27	14,5	14,49	-	-	19,0	19,08
28	18,1	18,08	-	-	23,1	23,10
29	109,5	109,54	-	-	12,0	12,31
30	19,3	19,32	-	-	-	-

5 DADOS FÍSICO-QUÍMICOS DE MISTURAS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

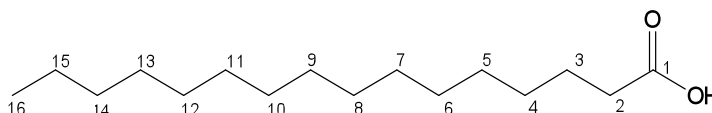
F1 - Mistura de hidrocarbonetos



n = 15 e 26-33

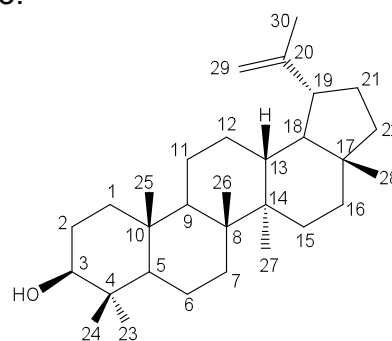
- Aspecto físico: cera branca
- Solubilidade: hexano e clorofórmio
- Fórmula molecular: C_nH_{2n+2}
- IV ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 2955, 2915, 2873 e 2848 (C-H), 1472 e 1462 (C-H), 719 (C-H).
- CGAR: Tr (min): $C_{17}H_{36}$ (0,54%), $C_{28}H_{58}$ (0,60%), $C_{29}H_{60}$ (55,16%), $C_{30}H_{62}$ (1,83%), $C_{31}H_{64}$ (16,87%), $C_{32}H_{66}$ (0,61%), $C_{33}H_{68}$ (2,61%), $C_{34}H_{70}$ (7,03%) e $C_{35}H_{72}$ (2,30%).

F2 - Ácido Palmítico



- Aspecto físico: sólido branco
- Solubilidade: diclorometano e clorofórmio
- Fórmula molecular: $C_{16}H_{32}O_2$ / MM: 256,4 g/mol
- Ponto de fusão: 59 °C
- IV ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3300 a 2400 (O-H), 2954, 2915, 2871 e 2848 (C-H), 1698 (C=O), 720 (C-H).
- RMN de 1H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 2,35 (t, 2H, $J=7,5$ Hz, H-2), 1,63 (quinteto, 2H, $J=7,5$ Hz, H-3), 1,26 (sl, 24H, H-metilênicos) e 0,88 (t, 3H, $J=6,8$ Hz, H-18).
- RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz): **Tabela 2**, pág. 13.

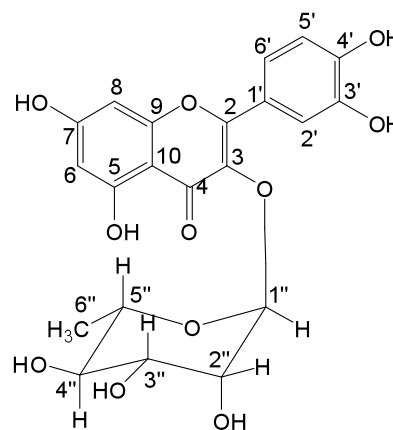
F3 – Lupeol



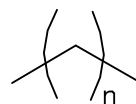
- Aspecto físico: cristais transparentes
- Solubilidade: diclorometano e clorofórmio
- Fórmula molecular: $C_{30}H_{50}O$ / MM: 426,7 g/mol
- Ponto de fusão: 211-212 °C
- IV ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3316 (O-H), 1638 (=C-H), 1035 (C-O), 1013 e 982 (=C-H).
- RMN de 1H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 4,69 (m, 1H, H-29a), 4,57 (m, 1H, H-29b), 3,19 (dd, 1H, $J=11,20$ e 4,80 Hz, H-3), 2,38 (dt, 1H, $J=5,5$ Hz) 1,03, 0,97, 0,94, 0,83, 0,79 e 0,76 (s, 3H, H-metílicos).
- RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz): **Tabela 3**, pág. 14.

F4 - Quercetina 3-O-ramnosídeo

- Aspecto físico: sólido amarelo
- Solubilidade: metanol
- Fórmula molecular: $C_{21}H_{20}O_{11}$ / MM: 448,4 g/mol
- Ponto de fusão: 193-194 °C
- IV ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3235 (O-H), 1652 (C=O), 1597, 1573, 1496 e 1454 (C=C), 1058 (C-O).
- RMN de 1H (CD_3OD , 400 MHz): δ 0,93 (d, 3H, $J=6,0$ Hz, H-6''). 3,33 (t, 1H, $J=9,2$ Hz, H-4''), 3,44-3,38 (m, 1H, H-5''), 3,75 (dd, 1H, $J=3,2$ e 1,4 Hz, H-3''), 4,22 (dd, 1H, $J=3,2$ e 1,4 Hz, H-2''), 5,33 (d, 1H, $J=1,4$ Hz, H-1''), 6,18 (d, 1H, $J=2,0$ Hz, H-6), 6,35 (d, 1H, $J=2,0$ Hz, H-8), 6,90 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, H-5'), 7,29 (dd, 1H, $J=8,4$ e 2,0 Hz, H-6'), 7,34 (d, 1H, $J=1,6$ Hz, H-2').
- RMN de ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz): **Tabela 4**, pág.21.

**R1 – Mistura de hidrocarbonetos**

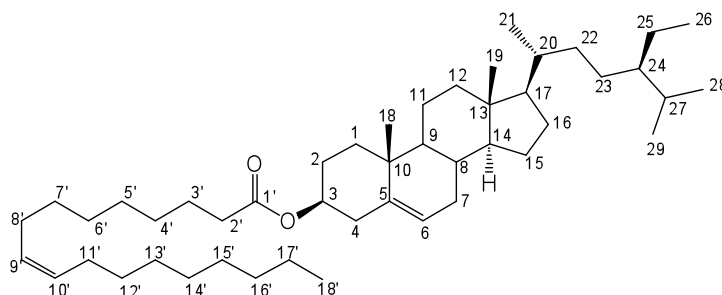
- Aspecto físico: óleo transparente-amarelado
- Solubilidade: hexano e clorofórmio
- IV ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3073 (=C-H), 2955, 2921 e 2852 (C-H), 1641 (C=C), 1463, 720 (C-H).
- CGAR: Tr (min): $C_{17}H_{36}$ (0,54%), $C_{28}H_{58}$ (0,60%), $C_{29}H_{60}$ (55,16%), $C_{30}H_{62}$ (1,83%), $C_{31}H_{64}$ (1,26%), $C_{32}H_{66}$ (1,63%), $C_{33}H_{68}$ (0,69%), $C_{34}H_{70}$ (2,98%) e $C_{35}H_{72}$ (2,48%).



n = 12 - 16 e 27 - 33

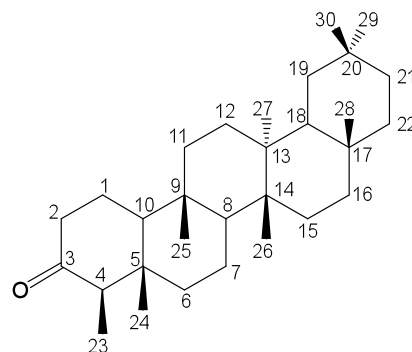
R2 - Oleato de β -sitosterila

- Aspecto físico: cera branca
- Solubilidade: diclorometano e clorofórmio
- Fórmula molecular: $C_{47}H_{82}O_2$ / MM: 676,5 g/mol
- IV ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 2924 e 2853 cm^{-1} (C-H), 1732 cm^{-1} (C=O), 1174 cm^{-1} (C-O), 735 cm^{-1} (C-H).
- RMN de 1H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 5,36-5,34 (m, 3H, H-6, H-9' e H-10'), 4,62-4,60 (m, 1H, H-3), 0,88 (t, 3H, $J=5,8$ Hz, H-18'), 1,31-1,27 (sl, 20H, H-metilênicos), 2,31-2,24 (m, 6H, H-4 e H-2'), 0,68 (s, 3H, H-18).
- RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz): **Tabela 6**, pág. 24.

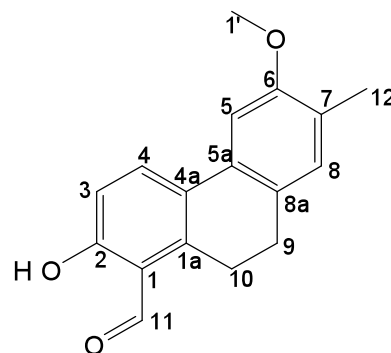


R3 - Friedelina

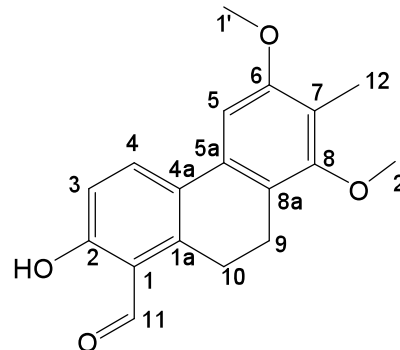
- Aspecto físico: sólido cristalino
- Solubilidade: diclorometano e clorofórmio
- Fórmula molecular: $C_{30}H_{50}O$ / MM: 426,7 g/mol
- Ponto de fusão: 235-236 °C
- IV ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 2926 e 2869 (C-H), 1714 (C=O).
- RMN de 1H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 2,39 (m, 2H, H-2), 2,24 (quarteto, 1H, $J=6,5$ Hz, H-4), 1,18, 1,05, 1,01, 1,00, 0,95, 0,87 e 0,73 (s, 3H, H-metílicos), 0,88 (d, 3H, $J=6,5$ Hz, H-23).
- RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz): **Tabela 7**, pág. 26.

**R4 - 2-hidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído**

- Aspecto físico: sólido amarelo
- Solubilidade: diclorometano e clorofórmio
- Fórmula molecular: $C_{17}H_{16}O_3$ / MM: 268,3 g/mol
- Ponto de fusão: 113-114 °C
- IV ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3393 (O-H), 2959, 2927 e 2870 (C-H), 1715 (C=O), 1614, 1512, 1467 e 1446 (C=C).
- RMN de 1H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 12,04 (s, 1H, H-a), 10,49 (s, 1H, H-11), 7,89 (d, 1H, $J=8,8$ Hz, H-4), 7,08 (s, 1H, H-5), 7,02 (s, 1H, H-8), 6,94 (d, 1H, $J=8,8$ Hz, H-3), 3,90 (s, 3H, H-1'), 3,18 (dd, 2H, $J=8,0$ e 6,4 Hz, H-10), 2,80 (dd, 2H, $J=8,0$ e 6,4 Hz, H-9), 2,24 (s, 3H, H-12).
- RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz): **Tabela 8**, pág. 32.
- ESI/MS (modo positivo, MeOH): m/z 269,10 $[M+1]^+$.

**R5 – 2-hidroxi-6,8-dimetoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído**

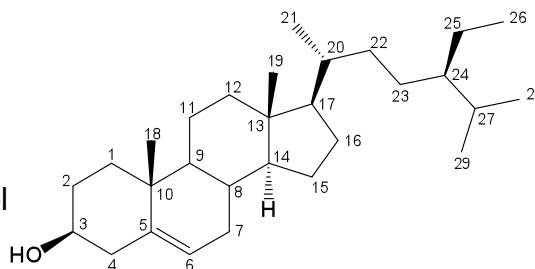
- Aspecto físico: sólido amarelo
- Solubilidade: diclorometano e clorofórmio
- Fórmula molecular: $C_{18}H_{18}O_4$ / MM: 298,3 g/mol
- Ponto de fusão: 151-152 °C
- IV ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 2956, 2938, 2886 e 2836 (C-H), 1638 (C=O), 1603, 1492 e 1455 (C=C).



- RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 12,04 (s, 1H, H-a), 10,50 (s, 1H, H-11), 7,88 (d, 1H, $J=8,8$ Hz, H-4), 6,94 (d, 1H, $J=8,8$ Hz, H-3), 6,93 (s, 1H, H-5), 3,90 (s, 3H, H-1'), 3,72 (s, 3H, H-2'), 3,16 (dd, 2H, $J=7,9$ e 6,1 Hz, H-10), 2,89 (dd, 2H, $J=7,9$ e 6,1 Hz, H-9), 2,20 (s, 3H, H-12).
- RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): **Tabela 9**, pág. 40.
- ESI/MS (modo positivo, MeOH): m/z 299,21 $[\text{M}+1]^+$.

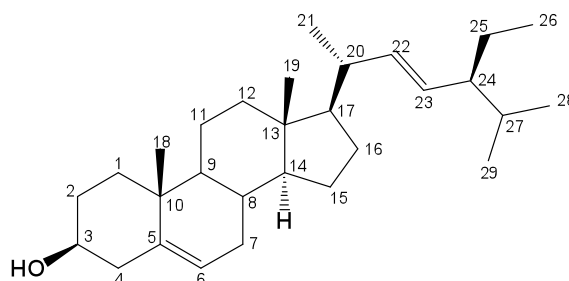
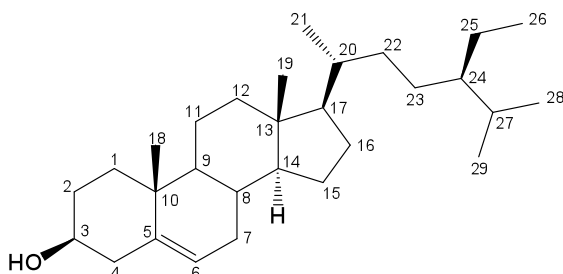
R6 - β -sitosterol

- Aspecto físico: sólido cristalino
- Solubilidade: diclorometano e clorofórmio
- Fórmula molecular/ MM: $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ / 412 g/mol
- Ponto de fusão: 130-133 $^\circ\text{C}$
- IV ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3600 a 3200 (O-H), 2959, 2933 e 2864 (C-H), 1642 (=C-H), 1052 (C-O).
- RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5,35 (sl, 1H, H-6), 3,52 (m, 1H, $J=5,5$ Hz, H-3).
- RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): **Tabela 10**, pág. 42.



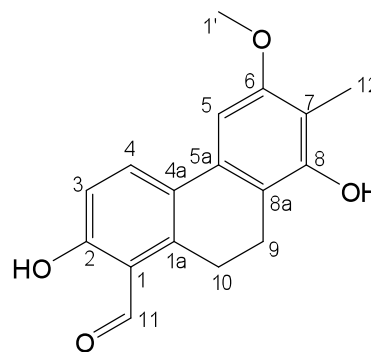
R7 – Mistura de β -sitosterol e estigmasterol

- Aspecto físico: sólido cristalino
- Solubilidade: diclorometano e clorofórmio
- Fórmula molecular: $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ (β -sitosterol) e $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}$ (estigmasterol)
- MM: 412 g/mol (β -sitosterol) e 410 g/mol (estigmasterol)
- IV ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3427 a 3301 (O-H), 2959, 2934 e 2864 (C-H), 1653 e 1642 (=C-H), 1052 (C-O).
- RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5,35 (sl, 1H, H-6), 5,16 (dd, 1H, $J=15,2$ e 8,4 Hz, H-22), 5,02 (dd, 1H, $J=15,2$ e 8,4 Hz, H-23), 3,52 (m, 1H, $J=5,2$ Hz, H-3).
- RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): **Tabela 11**, pág. 44.

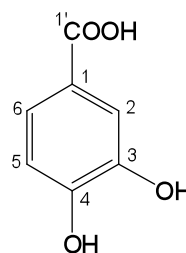


R8 - 2,8-dihidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído

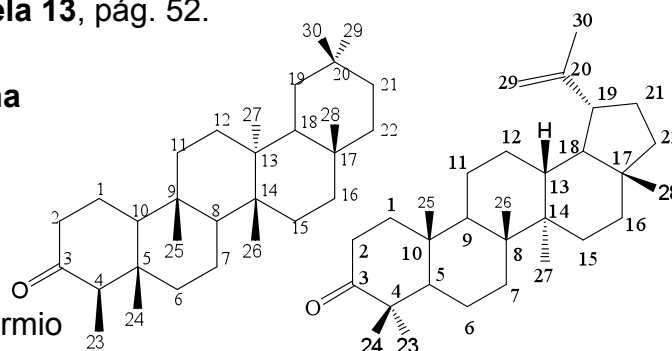
- Aspecto físico: sólido amarelo
- Solubilidade: diclorometano e clorofórmio
- Fórmula molecular: C₁₇H₁₆O₄ / MM: 284,3 g/mol
- Ponto de fusão: 152-153 °C
- IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3319 (O-H), 2926, 2897 e 2844 (C-H), 1642 (C=O), 1610, 1505 e 1455 (C=C).
- RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 12,06 (s, 1H, H-a), 10,48 (s, 1H, H-11), 7,88 (d, 1H, *J*=8,8 Hz, H-4), 6,92 (d, 1H, *J*=8,8 Hz, H-3), 6,79 (s, 1H, H-5), 3,89 (s, 3H, H-1'), 3,18 (dd, 2H, *J*=7,6 e 6,8 Hz, H-10), 2,84 (dd, 2H, *J*=7,6 e 6,8 Hz, H-9), 2,17 (s, 3H, H-12).
- RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): **Tabela 12**, pág. 51.
- ESI/MS (modo negativo, MeOH): *m/z* 283,0 [M-1]⁻ e *m/z* 566,9 [2M-1]⁻.

**R9 - Ácido 3,4-dihidroxibenzóico**

- Aspecto físico: cristal amarelo claro
- Solubilidade: metanol e acetato de etila
- Fórmula molecular: C₇H₆O₄ / MM: 154,1 g/mol
- Ponto de fusão: 193-194 °C
- IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3600 a 2300 (O-H), 1662 (C=O), 1596, 1528 e 1466 (C=C).
- RMN de ¹H (CD₃OD, 200 MHz): δ 7,45 (s, 1H, H-2), 7,43 (d, 1H, *J*= 8,8 Hz, H-6), 6,80 (d, 1H, *J*= 8,8 Hz, H-5).
- RMN de ¹³C (CD₃OD, 50 MHz): **Tabela 13**, pág. 52.

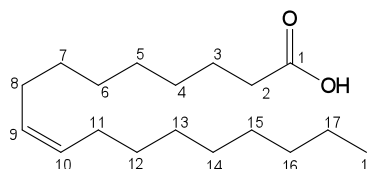
**R10 – Mistura de friedelina e lupenona**

- Aspecto físico: sólido cristalino
- Solubilidade: diclorometano e clorofórmio
- Fórmula molecular: C₃₀H₅₀O (friedelina) e C₃₀H₄₈O (lupenona)
- MM: 426,7 g/mol (friedelina) e 424,7 g/mol (lupenona)
- IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 2925 e 2859 (C-H), 1713 (C=O).



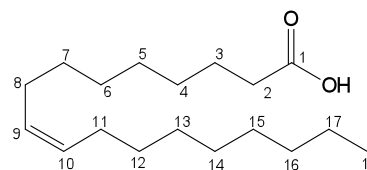
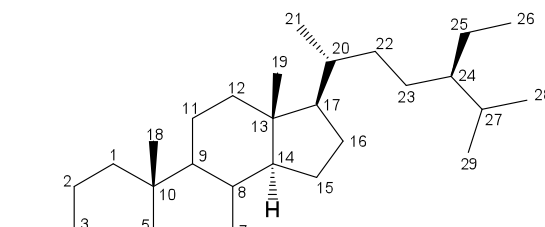
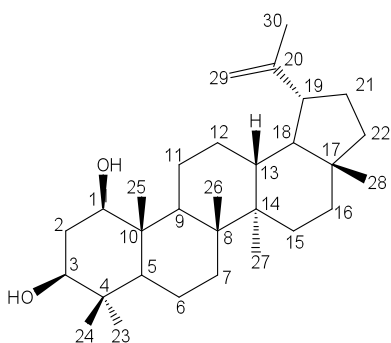
- RMN de ^1H Lupenona (CDCl_3 , 400 MHz): δ 4,69 (m, 1H, H-29a), 4,57 (m, 1H, H-29b), 1,68 (s, 3H, H-30), 1,05 (s, 3H, H-24), 0,94 (s, 3H, H-25).
- RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): **Tabela 14**, pág. 54.

R11 - Ácido Oléico



- Aspecto físico: óleo amarelo claro
- Solubilidade: diclorometano e clorofórmio
- Fórmula molecular: $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$ /MM: 282,5 g/mol
- IV ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3400 a 2400 (O-H), 3006 (=C-H), 2922 e 2853 (C-H), 1708 (C=O), 934 (=C-H), 722 (C-H).
- RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0,88 (t, 3H, $J=5,8$ Hz, H-18), 1,31-1,27 (sl, 20H, H-metilênicos), 1,63 (quinteto aparente, 2H, $J=5,8$ Hz, H-3), 2,01 (d aparente, 4H, H-8 e H-11), 2,33 (t, 2H, ($J=6,8$ Hz, H-2), 5,33 (t, 2H, $J=4,5$ Hz) e 11,50 (s, 1H, COOH).
- RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): **Tabela 15**, pág. 56.

R12 – Mistura de glochidonol, β -sitosterol e ácido oléico



- Aspecto físico: sólido branco-amarelado
- Solubilidade: diclorometano e clorofórmio
- Fórmula molecular: $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$ (glochidonol), $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ (β -sitosterol) e $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$ (ácido oléico)
- MM: 442,7 g/mol (glochidonol), 412 g/mol (β -sitosterol) e 282,5 g/mol (ácido oléico)
- RMN de ^1H do glochidonol (CDCl_3 , 400 MHz): δ 4,68 (d, 1H, $J=1,5$ Hz, H-29a), 4,56 (d, 1H, $J=1,5$ Hz, H-29b), 3,91 (dd, 1H, $J=8,1$ e 3,4 Hz, H-1), 3,01 (dd, 1H, $J=14,3$ e 8,1 Hz, H2a), 2,23 (dd, 1H, $J=14,3$ e 3,4 Hz, H2b), 1,68, 1,06, 1,06, 1,04, 0,98, 0,83, 0,80 (s, 3H, H-metílicos).
- RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): **Tabela 16**, pág. 58.

6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

6.1 - Avaliação da atividade antioxidante de substâncias, frações e extratos de *Banisteriopsis anisandra*

6.1.1 - Introdução

Um antioxidante pode ser definido, a nível industrial, como uma substância natural ou sintética que é adicionada a produtos químicos para prevenir ou retardar sua deterioração pela ação do oxigênio do ar (autoxidação). A autoxidação é causada, em princípio, por reações radicalares em cadeia entre oxigênio e os substratos. Os antioxidantes efetivos são captadores de radicais que interrompem esta reação em cadeia (Huang *et al.*, 2005).

Em bioquímica e medicina, antioxidantes são enzimas ou outras moléculas orgânicas, que são capazes de contra-atacar os efeitos danosos da oxidação em tecidos animais. (Huang *et al.*, 2005). O metabolismo oxidativo, um processo biológico normal, é capaz de gerar radicais livres oxigenados altamente reativos ($O_2^{\cdot-}$, NO^{\cdot} e RSO^{\cdot}). A produção endógena de ERO (espécies reativas de oxigênio) é controlada por mecanismos antioxidantes, compostos por enzimas e doadores de elétrons de baixa massa molecular (como a glutathione, o ácido ascórbico e os α -tocoferóis) que limitam a ação das ERO por eliminá-las ou reparar modificações oxidativas potencialmente danosas à célula (Kohen & Nyska, 2002).

Quando a defesa antioxidante não é 100% eficiente, os radicais livres formados podem levar ao estresse oxidativo, causando danos às células (ao reagir com moléculas biológicas, como o DNA, proteínas ou lípidos, levando a mutações e rompimento de membranas celulares).

Triagens clínicas e estudos epidemiológicos têm estabelecido uma correlação inversa entre a utilização, na alimentação, de frutas e vegetais e a ocorrência de doenças cardiovasculares, inflamações, câncer e doenças degenerativas (como, por exemplo, a doença de Alzheimer) (Huang *et al.*, 2005). Espécies reativas de oxigênio estão envolvidas nessas desordens, por isso o uso de alguns antioxidantes naturais, como flavonoides, polifenóis, carotenoides e vitaminas E e C, tem sido associado a benefícios para a saúde (Bernardi *et al.*, 2007).

Os radicais livres também afetam a qualidade dos alimentos, reduzindo seu conteúdo nutricional e promovendo o desenvolvimento de rancidez e maus odores. O uso de antioxidantes sintéticos, como o butilhidroxianisol (BHA) e o butilhidroxitolueno (BHT) em alimentos acondicionados, está decrescendo em vários países, devido às suas possíveis propriedades tóxicas para a saúde humana e animal.

Assim, o conhecimento e a aplicação da ação antioxidante na redução do estresse oxidativo *in vivo* e a utilização de substâncias possuindo esta ação em indústria alimentícia tem envolvido cada vez mais pesquisadores na busca de antioxidantes potentes, não tóxicos e de custo relativamente barato a partir de várias fontes vegetais (Torres *et al.*, 2005).

O teste de atividade antioxidante que utiliza o 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DDPH) é um método fácil e exato para se medir a capacidade antioxidante de frutas, sucos, substâncias e extratos vegetais (Sanchez-Moreno, 2002). O DPPH é um dos poucos radicais orgânicos estáveis e comercialmente disponíveis, tendo um máximo de absorção, no UV-VIS, em torno de $\lambda=515$ nm. Sob redução, sua coloração violeta desaparece gradualmente. O progresso da reação é convenientemente monitorado por um espectrofotômetro (Foti *et al.*, 2004).

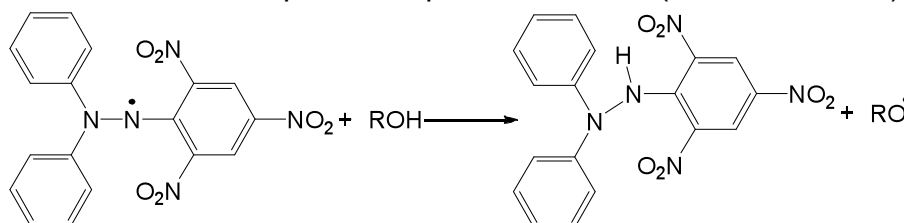


Figura 53 - Esquema da redução do DPPH

O BHT (butilhidróxitolueno) é um antioxidante fenólico que suprime a autooxidação por converter radicais peróxi a hidroperóxidos, por exemplo:



Onde R é um grupo alquila ou arila e ArOH é o BHT ou antioxidantes fenólicos relacionados.

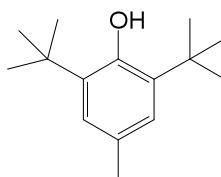


Figura 54 – Butilhidroxitolueno (BHT)

Amostras testadas

Foram testadas sete amostras: EAF (Extrato Aquoso das Folhas - preparado a partir de 1 g de folhas em 10 mL de água), EEF1 (Extrato Etanólico das Folhas – 1ª coleta), EER1 (Extrato Etanólico das Raízes - 1ª coleta), F. 101-119 do EEF1, F. 48-53 do EER1, quercetina-3-O-ramnosídeo (**F4**) e ácido 3,4-dihidroxi-benzóico (**R9**).

6.1.2 - Metodologia de ensaio

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método do DPPH, que consiste basicamente na capacidade de captura do radical livre DPPH pelo antioxidante presente na amostra. A metodologia está de acordo com aquela descrita por Gallota *et. al*, 2008.

As amostras (1 mg) foram solubilizadas em metanol grau espectrofotométrico (Sigma) e transferidas para balões volumétricos de 10 mL. O volume dos balões foi completado com o mesmo solvente. A partir da diluição das soluções de concentração 100 µg/mL, obtiveram-se também soluções nas concentrações de 10 e 1 µg/mL.

Uma solução de DPPH a 20 µg/mL foi preparada em um balão volumétrico, envolto por papel alumínio (para evitar exposição à luz). Alíquotas de 750 µL de cada uma das três diluições das amostras foram colocadas em cubetas de plástico (1 cm de caminho ótico). Em seguida, adicionaram-se a elas 1,5 mL da solução de DPPH. As soluções foram protegidas da incidência de luz durante a realização do ensaio.

As medidas das absorbâncias das amostras foram realizadas 30 minutos após a adição da solução de DPPH. Os experimentos foram realizados em triplicata e as absorbâncias foram medidas em um espectrofotômetro, em $\lambda=517$ nm.

Foi preparado um branco para cada concentração testada para cada amostra. O metanol puro foi utilizado para a correção da linha de base do espectrofotômetro. A título de comparação, avaliou-se a atividade do BHT em soluções de concentrações semelhantes às das amostras.

O percentual de inibição do DPPH foi calculado com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição do DPPH} = (1 - A_a/A_b) \times 100$$

onde A_a = absorbância da amostra e A_b = absorbância da solução de DPPH.

O cálculo da CE₅₀ (concentração efetiva para descolorir 50% da solução de DPPH) foi feito utilizando-se o método Probitos de análise.

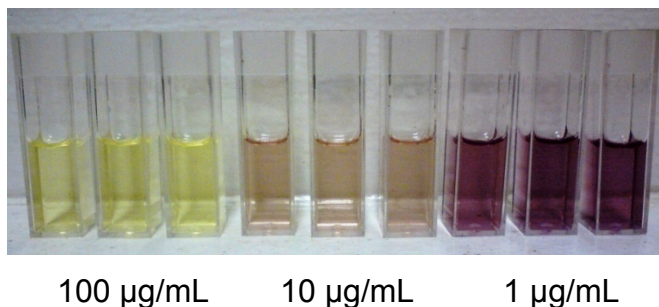


Figura 55 - Soluções teste, 30 minutos após a adição da solução de DPPH

6.1.3 - Discussão dos resultados

As leituras do teste estão descritas na **Figura 56** e na **Tabela 17**, pág. 88. Todos os extratos, frações e substâncias testados foram mais ativos do que o BHT na maior concentração, apresentando valores de CE₅₀ menor do que 56,7 µg/mL.

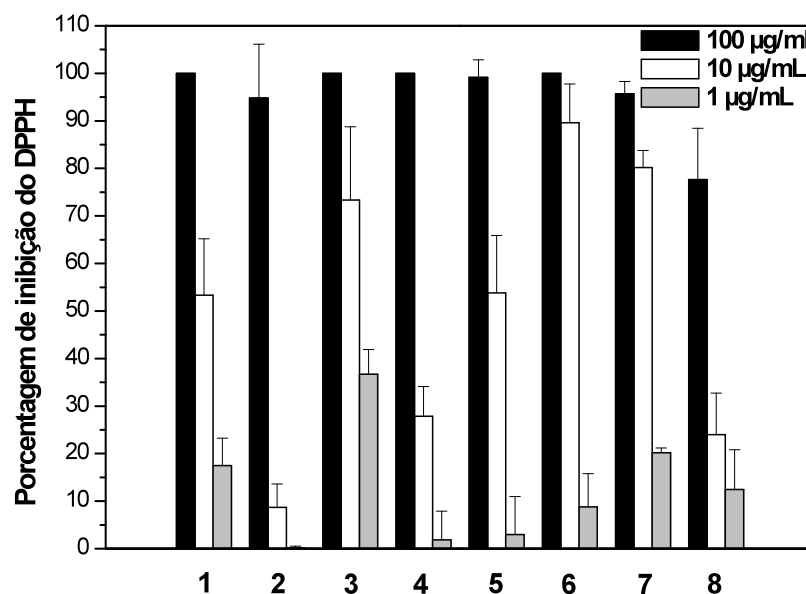


Figura 56 - Porcentagem de inibição do DPPH, em três diferentes concentrações, para amostras derivadas de *B. anisandra* (1: EAF, 2: EEF1, 3: EER1, 4: F. 101-119 do EEF1, 5: F. 48-53 do EER1, 6: quercetina-3-O-ramnosídeo (F4), 7: ácido 3,4-dihidróxi-benzóico (R9), 8: BHT).

Tabela 17 - Porcentagem de inibição do DPPH e valores de CE₅₀ de extratos, frações e substâncias isoladas de *B. anisandra*

Nº	Amostra	% de inibição do DPPH			CE ₅₀ (µg/mL)
		100 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL	
1	EAF	100,00	53,33	17,47	12,7 ± 7,2
2	EEF1	94,78	8,69	0,14	25,6 ± 2,5
3	EER1	100,00	73,37	36,72	2,4 ± 1,58
4	F. 101-119 do EEF1	100,00	27,87	1,87	23,5 ± 7,2
5	F. 48-53 do EER1	99,13	53,80	2,97	24,2 ± 6,6
6	Quercetina-3-O-ramn.	100,00	89,63	8,80	6,0 ± 1,9
7	Ác. 3,4-dihidróxibenzóico	95,70	80,20	20,20	3,3 ± 1,9
8	BHT ^a	77,63	24,00	12,47	56,7 ± 8,6

^a BHT = controle positivo

A amostra mais ativa foi o EER1 (Extrato Etanólico das Raízes - 1^a coleta), que apresentou CE₅₀ igual a 2,4 µg/mL. As substâncias puras também foram muito ativas, sendo o CE₅₀ do ácido 3,4-dihidróxi-benzóico igual a 3,3 µg/mL e o da quercetina-3-O-ramnosídeo igual a 6,0 µg/mL.

Os flavonoides possuem diferentes atividades antioxidantes decorrentes da habilidade para sequestrarem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, as quais estão diretamente relacionadas a alguns critérios estruturais tais como o número de hidroxilas fenólicas, a presença do sistema *orto*-diHidroxi no anel B, uma ligação dupla C₂-C₃ conjugada com a função 4-oxo no anel C ou de um grupo hidroxila no C-3 (Ayres *et al.*, 2009).

6.1.4 - Conclusão

Todas as amostras apresentaram potencial atividade seqüestradora de radicais livres, o que sugere que estas sejam agora submetidas a diferentes testes (como avaliação da peroxidação lipídica, da atividade seqüestradora de metais, do potencial redutor, entre outros) para a avaliação de outros possíveis mecanismos antioxidantes.

6.2 - Avaliação da atividade alelopática de algumas substâncias isoladas de *B. anisandra* sobre a germinação das sementes e o crescimento das raízes e do caule de plantículas de *Lactuca sativa* (alface) e *Allium cepa* (cebola)

6.2.1 – Introdução

Alelopatia é comumente definida como qualquer efeito direto ou indireto (estimulatório ou inibitório) por uma planta ou microrganismo sobre uma outra, através da produção de substâncias químicas liberadas no meio ambiente (Vyvyan, 2002). A Sociedade Internacional de Alelopatia (IAS) definiu, em 1996, o termo de uma maneira mais abrangente como: “a ciência que estuda qualquer processo envolvendo, essencialmente, metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento e desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos, incluindo efeitos positivos e negativos” (Macías *et al.*, 2006).

Atualmente, o principal objetivo da pesquisa de substâncias possuindo atividade alelopática é a busca de herbicidas alternativos, já que o uso indiscriminado, nas últimas décadas, de herbicidas sintéticos provocou um aumento na incidência de resistência das espécies daninhas a serem eliminadas, além da poluição ambiental, com conseqüentes danos para a saúde animal e humana (Macías *et al.*, 2000).

O teste mais comumente utilizado para a detecção de alelopáticos usado em nossos laboratórios (Vieira *et al.*, 2005) é aquele que avalia a germinação de sementes e o crescimento da plantículas de *Lactuca sativa* (alface). Nesse ensaio, as sementes da espécie vegetal selecionada são colocadas sobre papel de filtro em placa de Petri e tratadas com a solução do aleloquímico a ser testado em concentrações variadas (entre 100 e 0,01 $\mu\text{mol/L}$). A germinação e o crescimento da raiz e do caule da plantícula são monitorados em relação a um controle (solução sem aleloquímico).

A consideração mais importante no desenvolvimento de um bioensaio para o estudo alelopático é a seleção da espécie vegetal a ser testada. Espécies vegetais, denominadas "plantas indicadoras", são o fator crucial para a determinação acurada do impacto alelopático, nessa avaliação preliminar da atividade. *Lactuca sativa* L.

(alface), *Raphanus sativus* L. (rabanete), *Lepidium sativum* (agrião) e *Allium cepa* (cebola), dentre outras espécies, têm sido as mais utilizadas nessa etapa da avaliação, principalmente devido à sua grande sensibilidade e sua alta taxa de germinação. As ervas daninhas, que seriam as candidatas de escolha nessa avaliação inicial, visando a detecção de potenciais herbicidas, só são testadas após a atividade ser constatada sobre essas espécies citadas acima, devido ao fato de apresentarem geralmente uma baixa taxa de germinação (Macías *et al.*, 2000).

Os bioensaios preliminares em laboratório precisam ser rápidos, econômicos e relevantes para o sistema em questão, sendo úteis para se estabelecer o potencial alelopático de uma substância pura ou um extrato, mas devendo ser seguidos de estudos em estufas e em campo a fim de se constatar se as observações iniciais são reprodutíveis no meio natural (Duke *et al.* 2000; Vyvyan, 2002).

6.2.2 – Metodologia de ensaio

A avaliação da atividade alelopática foi feita de acordo com a metodologia descrita por Vieira *et al.* (2005) para um modelo de monocotiledônea (cebola) e outro de dicotiledônea (alface).

Foram utilizadas sementes de *Lactuca sativa* L. (alface) variedade Grand Rapids, da marca Isla (nº lote: 26147). As sementes muito pequenas ou danificadas foram desprezadas. Foram adicionadas 25 sementes de alface sobre cada placa de Petri de 100 mm, contendo papel Whatman nº 1, de 90 mm, e 10 mL das soluções teste (100, 1 e 0,01 µmol/L das substâncias a serem testadas) e da solução controle (branco). As soluções teste foram preparadas por dissolução das substâncias em água deionizada tamponada (10 mmol/L do ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico), com pH ajustado entre 6,0 e 6,5 com solução de NaOH. A solução controle (branco) foi a água deionizada tamponada. As concentrações mais baixas que 100 µmol/L, nas soluções teste, foram obtidas por diluição desta. O teste foi realizado em triplicata para cada concentração e para o controle. As placas de Petri foram fechadas e incubadas, no escuro, a 25 °C, por 5 dias. Depois deste tempo, o comprimento de cada raiz e caule das plantículas foram medidos.

Para a espécie *Allium cepa* (cebola), sementes da variedade Baia Periforme foram adquiridas da marca Isla (nº lote: 26556B). O procedimento do bioensaio foi

idêntico ao descrito anteriormente para a alface, exceto pelo tempo de incubação, que para a cebola foi de 7 dias (Macías *et al.*, 2000).

Amostras testadas:

- 1: lupeol (F3)
- 2: quercetina 3-O-ramnosídeo (F4)
- 3: friedelina (R3)
- 4: 2-hidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (R4)
- 5: 2,8-dihidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (R8)
- 6: ácido 3,4-dihidróxibenzóico (R9)

6.2.3 - Tratamento Estatístico

O cálculo da porcentagem de crescimento em relação ao branco foi feito utilizando-se a seguinte equação:

$$\% \text{ crescimento} = \frac{A_m - B}{B} \times 100$$

onde A_m = valor médio da germinação ou do crescimento da amostra e B = valor médio da germinação ou do crescimento do branco.

Considerando-se esta equação fica claro que valores relacionados a efeitos estimulatórios estão representados acima da linha de base e que os relacionados a efeitos inibitórios abaixo dela.

O erro foi estimado para a porcentagem de crescimento, em relação ao branco, para a alface e cebola utilizando-se o método das derivadas. A equação do erro é, portanto:

$$\Delta (\% \text{ crescimento}) = \frac{1}{B} \Delta A_m - \frac{A_m}{B^2} \Delta B \times 100$$

onde os parâmetros A_m e B são os mesmos da equação anterior e ΔA_m e ΔB são os erros estatísticos calculados para a amostra e para o branco, respectivamente, considerando-se um intervalo de confiança de 95%.

6.2.4 - Discussão dos resultados

6.2.4.1 – Efeito sobre *Lactuca sativa*

Os efeitos dos compostos testados sobre a germinação e o crescimento da raiz e do caule de *L. sativa* (alface) estão apresentados nas **Figuras 57 e 58** (pág. 92 e 93).

Todas as substâncias inibiram fortemente a germinação da alface na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$: pelo menos 62%. Aquela que apresentou maior inibição nesta concentração foi o ácido 3,4-dihidroxibenzóico: 82%. Apenas este ácido que demonstrou atividade inibitória na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$: 16%. Alguns compostos estimularam a taxa de germinação, nas concentrações de 1 e 0,01 $\mu\text{mol/L}$, mas nada muito significativo: menos de 12%.

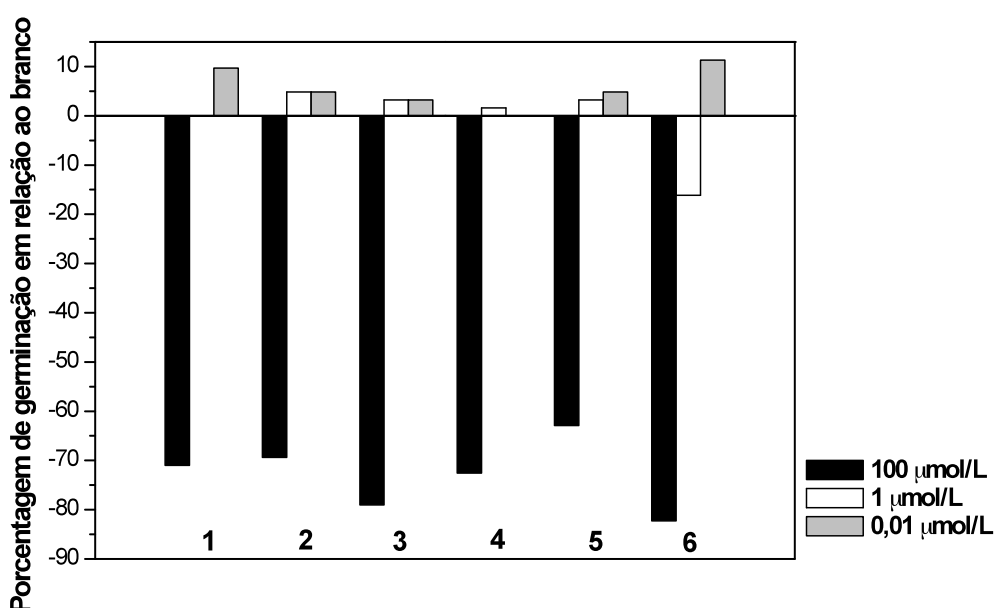


Figura 57 - Efeito de algumas substâncias isoladas de *B. anisandra* (1: lupeol, 2: quercetina 3-O-ramnosídeo, 3: friedelina, 4: 2-hidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído, 5: 2,8-dihidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído, 6: ácido 3,4-dihidroxibenzóico) sobre a germinação de *L. sativa* (alface).

Na **Figura 58** pág. 93, pode-se ver que a friedelina (3) e o 2-hidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (4) foram os compostos que apresentaram a maior atividade inibitória sobre o crescimento da alface: ambos inibiram 100% do crescimento da raiz e do caule, na maior concentração. A quercetina 3-O-ramnosídeo (2) e o ácido 3,4-dihidroxi-benzóico (6) inibiram o crescimento da raiz em 29 e 23%, respectivamente, na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$.

O ácido 3,4-dihidroxibenzóico (6) inibiu 24% do crescimento do caule, na maior concentração. O lupeol (1) estimulou ligeiramente o crescimento do caule: 11%, na maior concentração. O 2,8-dihidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (5) praticamente não alterou o crescimento da alface, em nenhuma concentração testada. Todos compostos foram praticamente inativos nas concentrações de 1 e 0,01 $\mu\text{mol/L}$.

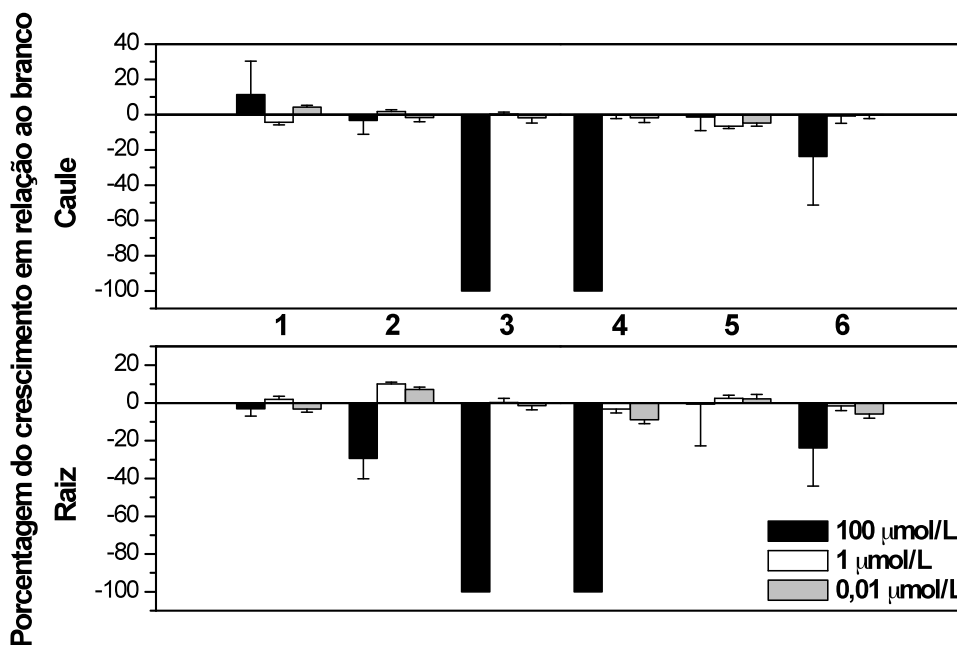


Figura 58 - Efeito de algumas substâncias isoladas de *B. anisandra* (1: lupeol, 2: quercetina 3-O-ramosídeo, 3: friedelina, 4: 2-hidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído, 5: 2,8-dihidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído, 6: ácido 3,4-dihidroxibenzóico) sobre o crescimento da raiz e do caule de plantúculas de *L. sativa* (alface).

6.2.4.2 – Efeito sobre *Allium cepa*

Os efeitos dos compostos testados sobre a germinação e o crescimento da raiz e do caule de *A. cepa* (cebola) estão apresentados nas **Figuras 59 e 60** (pág. 94 e 95).

O efeito sobre a germinação da cebola variou bastante entre as substâncias e suas concentrações, mas não foi tão significativo quanto àqueles efeitos observados

para a alface. O lupeol (1), por exemplo, estimulou a germinação em todas as concentrações testadas, com uma resposta quase dose-dependente. Já a quercetina 3-O-ramnosídeo (2) e o 2-hidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído inibiram a germinação nas três concentrações testadas (4). Só que este último, curiosamente, apresentou maior inibição da germinação com a menor concentração. A friedelina (3) apresentou maior estimulação da germinação: 13% na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$ e 12 % na concentração de 0,01 $\mu\text{mol/L}$. Esse mesmo composto apresentou atividade inibitória na maior concentração. O 2,8-dihidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (4), ao contrário do que ocorreu com o ácido 3,4-dihidroxibenzóico (6), estimulou a germinação nas duas maiores concentrações e inibiu na menor.

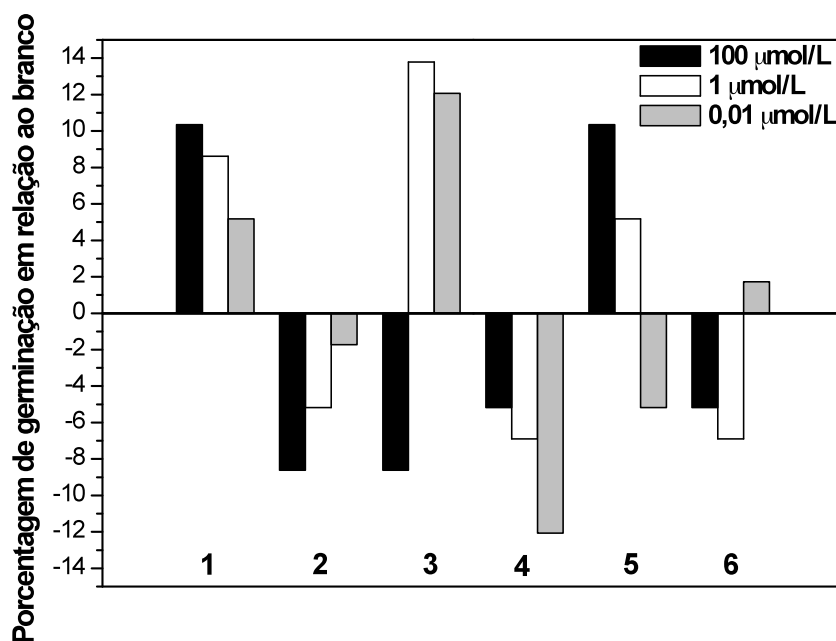


Figura 59 - Efeito de algumas substâncias isoladas de *B. anisandra* (1: lupeol, 2: quercetina 3-O-ramnosídeo, 3: friedelina, 4: 2-hidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído, 5: 2,8-dihidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído, 6: ácido 3,4-dihidroxibenzóico) sobre a germinação de *Allium cepa* (cebola).

Em geral, os efeitos sobre o crescimento das plantículas de cebola foram mais expressivos para a raiz do que para o caule. Mais uma vez, esses efeitos variaram bastante entre as substâncias e suas diferentes concentrações.

O lupeol (1) praticamente não modificou o crescimento do caule, e estimulou o crescimento da raiz de uma maneira inversamente proporcional à concentração. A quercetina 3-O-ramnosídeo (2) inibiu o crescimento do caule nas duas maiores concentrações e estimulou na menor. Ela apresentou o maior efeito estimulatório do crescimento da raiz: 31% na concentração de 0,01 $\mu\text{mol/L}$. A friedelina (3) inibiu o crescimento da raiz em todas concentrações e o da raiz nas duas maiores concentrações. O perfil dos três últimos compostos sobre o crescimento do caule seguiu o mesmo padrão: inibiram na maior concentração e estimularam nas duas menores concentrações. O 2-hidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (4) apresentou o maior efeito inibitório sobre o caule: 11%, na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$. O 2,8-dihidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (5) inibiu o crescimento da raiz nas três concentrações testadas, enquanto o ácido 3,4-dihidroxibenzoico (6) exerceu o efeito contrário.

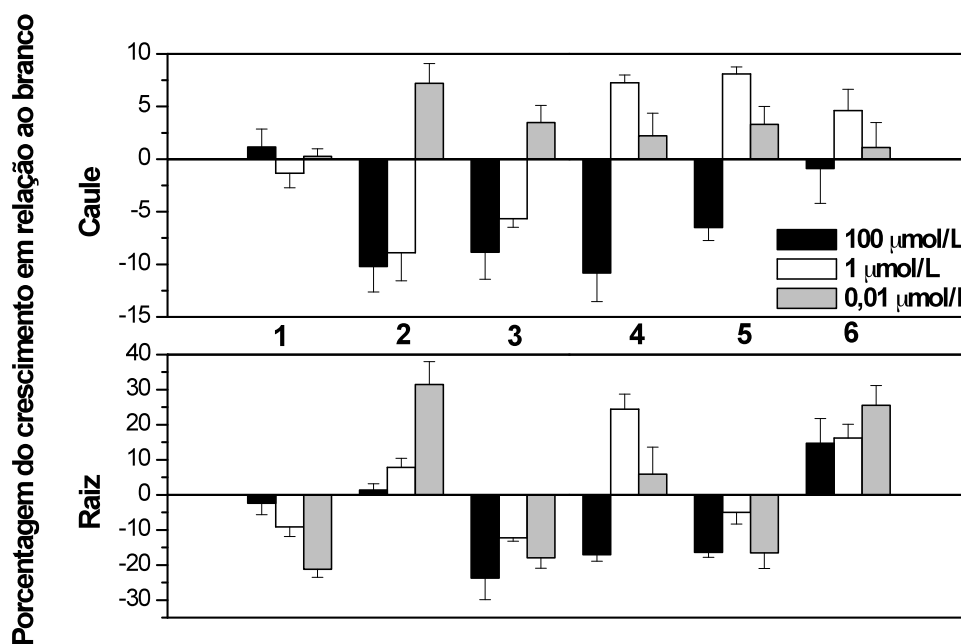


Figura 60 - Efeito de algumas substâncias isoladas de *B. anisandra* (1: lupeol, 2: quercetina 3-O-ramnosídeo, 3: friedelina, 4: 2-hidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído, 5: 2,8-dihidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído, 6: ácido 3,4-dihidroxibenzoico) sobre o crescimento da raiz e do caule de plantículas de *Allium cepa* (cebola).

6.2.5 - Conclusão

Em geral, a alface foi mais sensível às amostras do que a cebola, apresentando resultados mais expressivos, principalmente com relação à inibição da germinação e do crescimento do caule e da raiz.

Como todos os compostos apresentaram ótima atividade inibitória sobre a germinação da alface, vale à pena destacar a friedelina e o 2-hidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-dihidrofenantreno-1-carbaldeído (4), que apresentaram também excelente atividade inibitória sobre o crescimento da raiz e do caule de plantículas de alface.

Com relação à cebola, nenhuma substância exerceu atividade significativa sobre a germinação ou crescimento da raiz e caule.

6.3 Avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias, frações e extratos de *B. anisandra*

6.3.1 - Introdução

Os agentes antimicrobianos, que podem ter origem biológica ou sintética, interferem com os microorganismos, eliminando-os ou inibindo seu metabolismo e/ou sua reprodução, o que permite ao sistema imunológico combatê-los com maior eficácia. A utilização intensa e indiscriminada destes agentes é também acompanhada do aumento da resistência de microorganismos a eles, o que leva à contínua busca por novos antibióticos. Daí a importância de se avaliar tanto produtos naturais, como aqueles obtidos de síntese como potenciais agentes antimicrobianos.

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano (Colombo & Guimarães, 2003). A *Candida albicans* é o patógeno mais comum em humanos e pode ser responsável por causar infecções sistêmicas em pacientes imunossuprimidos. As drogas derivadas dos triazóis são amplamente utilizadas na profilaxia e no tratamento de infecções fúngicas severas. O fluconazol, um inibidor da síntese de ergosterol, é o agente antifúngico mais prescrito para a profilaxia e terapia de candidíases (Costa *et al.*, 2010). No entanto, a emergência da resistência de algumas leveduras a drogas

antifúngicas, explica a importância pela busca de novos agentes, sobretudo que atuem em um mecanismo de ação diferente.

6.3.2 - Avaliação da atividade antibacteriana

Os testes de atividade antibacteriana foram realizados sob coordenação da Profa. Jacqueline Aparecida Takahashi, do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, UFMG.

Para a avaliação da atividade antibacteriana foi utilizado o método de difusão em disco (método de Kirby-Bauer), adaptado, de acordo com a metodologia descrita por Lana *et al.* (2006).

Nesse método, uma quantidade padronizada do microorganismo a ser testado é incorporada ao ágar e colocado em placa de Petri. Na superfície do ágar são colocados discos de papel de filtro impregnados com quantidades conhecidas das substâncias a serem testadas. O sistema é incubado em estufa, a 37 °C, por 48 horas. Durante o período de incubação, a substância difunde-se para o ágar e as células microbianas se multiplicam nas regiões onde não há agentes capazes de inibir o seu crescimento. Assim, se uma substância tem atividade, observa-se um halo de inibição ao redor do disco, após o período de incubação. A leitura é realizada medindo-se o diâmetro do halo de inibição e, em geral, quanto maior o halo de inibição, maior a atividade da amostra. No entanto, quando a difusão da substância para o meio ocorre em uma taxa muito pequena, é possível a ocorrência de um resultado falso-positivo ou uma inibição inexpressiva.

Para o teste, utilizaram-se as seguintes bactérias:

- *Staphylococcus aureus* (Gram +) ATCC 29212
- *Bacillus cereus* (Gram +) ATCC 11778
- *Listeria monocytogenes* (Gram +) ATCC 15313
- *Escherichia coli* (Gram -) ATCC 25922
- *Salmonella thyphimurium* (Gram -) ATCC 14028

As amostras testadas foram: EEF1 (Extato Etanólico das Folhas – 1ª coleta), EER1 (Extrato Etanólico das Raízes – 1ª coleta), F.101-119 do EEF1 (fração rica em flavonóide), **F3** (lupeol), **F4** (quercetina-3-O-ramnosídeo), **R3** (friedelina) e **R12** (mistura de glochidonol, ácido oléico e β -sitosterol).

6.3.2.1 - Metodologia de ensaio

A discos de papel estéreis, com diâmetro de 6,0 mm, foram adicionadas soluções de 2,0 g/mL das amostras a serem testadas, de tal maneira que 100,0 µg de cada uma das amostras foram adicionados aos discos. Foram utilizados, como controle positivo, discos impregnados com cloranfenicol (30,0 µg/disco), ativo para as espécies de bactéria utilizadas. Como controle negativo, foram empregados discos impregnados com o solvente utilizado na solubilização das amostras. Cada disco foi colocado sobre placas de Petri contendo 7,5 mL do meio solidificado, inoculado com as bactérias (0,3 mL da suspensão salina do microorganismo). Esta solução foi preparada da seguinte forma: inicialmente inocularam-se as culturas de microorganismos em tubos contendo 2,0 mL do meio BHI. Estes tubos, contendo os microorganismos no meio de manutenção, foram então incubados em estufa a 37 °C, durante 18 horas. Foram retiradas alíquotas destes meios e transferidas para uma cubeta contendo solução salina na quantidade necessária para que a transmitância da solução do inóculo bacteriano ficasse entre 74-75% (a 600 nm), o que corresponde ao grau 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). As placas contendo as amostras e os controles foram incubadas a 37 °C, por 48 horas. O ensaio foi realizado em duplicata. A sensibilidade dos microorganismos frente aos produtos foi avaliada pela medida do diâmetro do halo de inibição (mm), quando formado, após o período de incubação. Foram consideradas ativas as amostras que causaram halos de inibição iguais ou superiores a 7 mm, já que os discos de papel apresentam diâmetro de 6 mm.

Todos os meios foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, sendo autoclavados a 121 °C, por 15 minutos.

Ágar semi-sólido: ágar antibiótico nº 1 (27,0 g/L) e água destilada qsp 7,5 mL/tubo. Meio BHI: BHI (37,0 g/L) e água destilada qsp 2 mL/tubo. Solução salina: NaCl (9,0 g/L), MgSO₄.7H₂O (0,5 g/L) e água destilada qsp 4,5 mL/tubo.

6.3.2.2 - Discussão dos resultados

De todas as amostras testadas, apenas **R12** (mistura de glochidonol, ácido oléico e β-sitosterol) apresentou um pequeno halo de inibição contra *B. cereus* (halo de 9 mm) e *L. monocytogenes* (halo de 10 mm). Para esses mesmos microorganismos, o halo de inibição do cloranfenicol foi de 31 mm para *B. cereus* e

de 32 mm para *L. monocytogenes*. Assim, a atividade de **R12** não foi muito significativa. Com relação às demais amostras testadas, pode-se dizer apenas que elas foram inativas na concentração testada.

6.3.3 - Avaliação da atividade antifúngica

Os testes de atividade antifúngica foram realizados sob coordenação da Profa. Maria Aparecida Resende, no laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.

A atividade antifúngica foi avaliada através da Concentração Inibitória Mínima, pelo método da microdiluição em caldo, descrito no protocolo de referência M27-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, com modificações. Esse documento está disponibilizado no site da ANVISA (www.anvisa.org.br).

Para o teste, foram usadas as seguintes leveduras:

- *Candida albicans* ATCC 18804
- *Candida tropicalis* ATCC 750
- *Candida parapsilosis* ATCC 20019
- *Candida krusei* ATCC 20298

As amostras testadas foram: extrato aquoso das folhas obtido a partir da extração de 1 g de folhas moída com 10 mL de água (**EAF**), quercetina-3-O-ramnosídeo (**F4**), 2,8-dihidróxi-6-metóxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (**R8**) e ácido 3,4-dihidróxi-benzóico (**R9**) (**Tabela 18**, pág. 101).

6.3.3.1 - Metodologia do ensaio

Os microorganismos foram repicados e mantidos em ágar Sabouraud-dextrose 24 horas antes da realização do ensaio e foram deixados em estufa a 35 °C. Em placas de 96 poços foram colocadas 100 µL das soluções das amostras testadas, que foram preparadas da seguinte maneira: as amostras foram dissolvidas em meio RPMI 1640 e uma quantidade mínima de DMSO (quantidade inferior à máxima permitida) e, a partir da solução mãe, foram preparadas sucessivas diluições de maneira que as concentrações finais testadas para o extrato aquoso fossem de 1000; 500; 250; 125; 62,50; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,91 µg/mL, e para as

demais amostras de 250; 125; 62,50; 31,25; 15,62; 7,81; 3,91; 1,95 e 0,98 µg/mL. O inóculo foi preparado a partir de uma suspensão de cada cultura jovem em solução salina estéril a 0,85% p/V, com leitura de 75 a 77% de transmitância a 530 nm (o que corresponde aproximadamente a 1×10^6 - 5×10^6 UFC/mL). Em seguida, o inóculo foi diluído em meio RPMI até atingir uma concentração de aproximadamente $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Após a adição de 100 µL do inóculo às soluções das amostras, as placas foram incubadas a 35 °C.

Foram feitos, para cada placa de 96 poços, o controle negativo (solução teste e meio RPMI sem o inóculo), controle de crescimento (solução teste, meio RPMI e o inóculo), e controle do solvente (solução teste contendo DMSO numa concentração igual àquela de maior concentração, meio de cultura e inóculo). Além disso, foi preparada outra placa de 96 poços como controle positivo, onde foram adicionadas soluções em diferentes concentrações (64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 µg/mL) do antifúngico fluconazol.

A leitura foi realizada após 48 horas. O valor da CIM foi avaliado com relação à concentração de inibição proeminente (concentração na qual houve inibição de mais de 80% da população microbiana). Esse mesmo tipo de leitura é realizado para o controle positivo (fluconazol). O ensaio foi realizado em duplicata.

O meio de cultura usado foi RPMI 1640 com L-glutamina em tampão a pH 7,0 com ácido morfolinopropano-sulfônico (MOPS) 0,165 mol/L, suplementado com glicose 2%. A esterilização do meio foi realizada por filtração, uma vez que este meio não pode ser autoclavado.

6.3.3.2 - Discussão dos Resultados

Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 18**, pág. 101.

O extrato aquoso foi ativo contra todas leveduras testadas, apresentando CIM de 31,25 µg/mL frente às *C. albicans* e *C. krusei*, e de 62,50 µg/mL para *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Vale a pena ressaltar que sua atividade frente à *C. krusei* foi semelhante àquela do fluconazol, e que sua atividade frente à *C. tropicalis* foi ainda melhor do que a desse fármaco.

O 2,8-dihidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (**R8**) apresentou CIM de 31,25 µg/mL frente às *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, e

de 125,00 µg/mL para *C. tropicalis*. Assim, pode-se concluir que sua atividade também foi semelhante à do fluconazol frente à *C. krusei*.

A quercetina 3-O-ramnosídeo (**F4**) e o ácido 3,4-dihidroxibenzóico (**R9**) não foram ativos nas concentrações testadas para nenhum dos fungos testados, possuindo ambas CIM > 250 µg/mL.

Tabela 18 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (µg/mL) para as amostras testadas para quatro leveduras diferentes

Amostras	Leveduras			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
EAF	31,25	31,25	62,50	62,50
F4	---	---	---	---
R8	31,25	31,25	31,25	125,00
R9	---	---	---	---
Fluconazol	16,00	32,00	2	>64

6.3.4 - Conclusão

Os testes de avaliação da atividade antibacteriana realizados com frações e substâncias puras provenientes de *B. anisandra* utilizando cinco bactérias diferentes não levaram a nenhum resultado positivo.

Através do teste de atividade antifúngica, comprovou-se a atividade do extrato aquoso de *B. anisandra* frente a diferentes espécies de *Candida* ssp., o que explica a utilização deste na medicina popular para o tratamento tópico de infecções fúngicas. No entanto, o estudo fitoquímico foi inconclusivo para a determinação da substância ativa para essa atividade biológica.

Inicialmente pensou-se que a quercetina 3-O-ramnosídeo fosse a responsável pela atividade antifúngica do extrato aquoso de *B. anisandra*, já que há muitos relatos na literatura de flavonóides com atividade antifúngica (Harborne & Willians, 2000). Kuster *et al.* (2009), por exemplo, relataram a atividade da quercetina 3-O-ramnosídeo contra o fungo patogênico *Cladosporium cucumerinum*.

Panizzi *et al.* (2000) relataram que a quercetina 3-O-ramnosídeo foi inativa contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto a aglicona quercetina foi ativa.

6.4 Avaliação da atividade citotóxica

6.4.1 - Introdução

O câncer é um grande problema de saúde pública em todo o mundo. No Brasil, as estimativas para o ano de 2010 apontam que ocorrerão aproximadamente 490 mil casos novos de câncer, número válido também para 2011. Apesar dos variados esforços despendidos na busca de terapias mais eficazes para o tratamento do câncer, o sucesso nos tratamentos medicamentosos tem se mostrado discreto, não somente pelo grau de agressividade da doença ou pelos mecanismos de escape das células neoplásicas, mas também pela toxicidade medular exercida pelos agentes antineoplásicos clássicos (Oliveira *et al.*, 2010). Assim, é de grande relevância a busca por novos agentes citotóxicos, mais eficazes e seguros.

O método MTT é um método colorimétrico eficaz utilizado para medir a viabilidade celular. O MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) é um sal amarelo que é reduzido por enzimas mitocondriais presente em células viáveis. O produto de redução, o formazam, tem coloração azul e é convenientemente monitorado por um espectrofotômetro, em comprimento de onda entre 500 e 600 nm (Mosman, 1983).

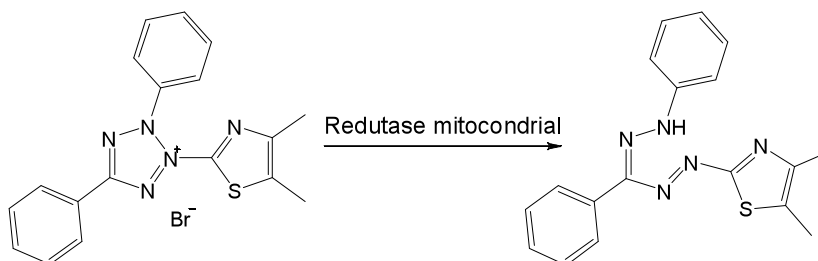


Figura 61 - Redução do MTT por enzima mitocondrial

O teste de atividade citotóxica foi realizado pelo mestrando Dalton Ditzz, sob a coordenação da Professora Dra. Mirian Teresa Paz Lopes, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. com uma substância inédita isolada de *B. anisandra*, o 2,8-dihidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (**R8**), contra duas linhagens celulares:

- MeWo – células de melanoma humano
- CHO – células normais de ovário de hamster chinês

Ambas linhagens foram obtidas do *American Type Culture Collection* (ATCC - The Global Bioresource Center).

6.4.2 - Metodologia de ensaio

O potencial citotóxico foi avaliado através do ensaio do MTT (Denizot, 1986). Neste ensaio, a cada placa de 96 cavidades foram adicionados células (MeWo ou CHO), numa quantidade de 2×10^3 células/cavidade, suspensas em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co.) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (FBS). As placas foram incubadas em estufa de atmosfera úmida, com 5% de CO₂, a 37 °C, por 24 horas, até a adesão total das células à superfície. Em seguida, o meio foi substituído por soluções contendo diferentes concentrações de **R8** (5, 10, 20 e 30 µg/mL). As células foram incubadas nas mesmas condições anteriores, por 72 horas. Após este período, 10 µL de uma solução a 5 mg/mL de MTT em PBS (tampão fosfato de solução salina) foi adicionada a cada cavidade e as placas foram novamente incubadas por mais 4 horas. Em seguida, os sobrenadantes sem células foram aspirados e 100 µL de DMSO foram adicionados a cada cavidade para dissolver os cristais azuis de formazan resultantes da redução do MTT, fazendo homogeneização em agitador de placas. A extensão da redução do MTT a formazan no interior das células foi medida por absorbância a 600 nm, utilizando uma leitora de varredura própria para microplacas (Stat Fax-2100, Awareness Tecn.). As culturas utilizadas como controle não receberam meio contendo **R8**. Cada concentração foi testada em sextuplicata.

As porcentagens de inibição da viabilidade celular foram calculadas com os valores de viabilidade das células expostas à solução de **R8** em relação às células não-expostas, usando o software Graph Pad Prisma 5.0 (Graph Pad Software, Inc.). A concentração inibitória de 50% da população celular (IC₅₀) foi calculada por regressão não linear utilizando-se esse mesmo programa.

6.4.3 - Discussão dos resultados

A densidade óptica do controle e das soluções teste em linhagens de células MeWo e células CHO, medida em espectrofotômetro, está apresentada na **Figura 62**, pág. 104.

Os gráficos da viabilidade celular *versus* concentração e a atividade citotóxica (IC_{50}) de **R8** frente às linhagens celulares MeWo e CHO estão mostrados na **Figura 63**.

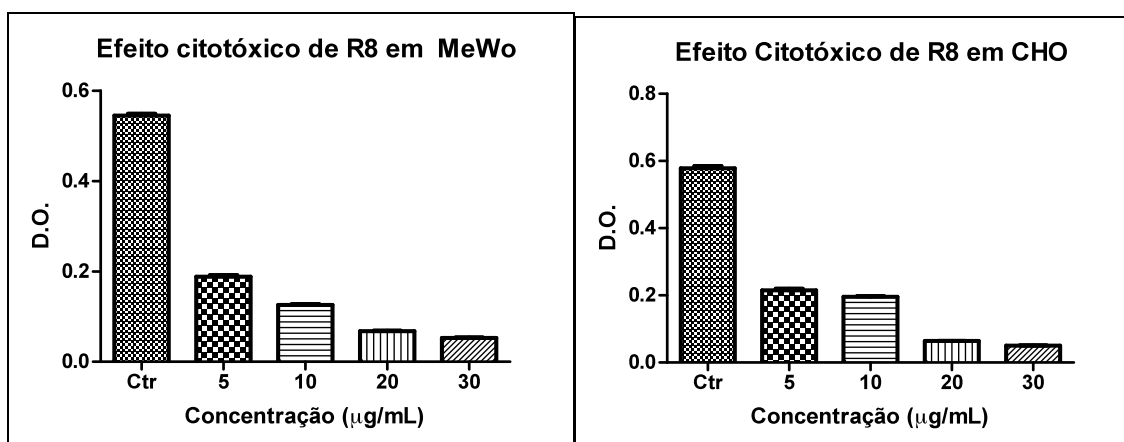


Figura 62 - Densidade óptica do controle e das soluções teste em linhagens de células MeWo e CHO após 72 horas de incubação

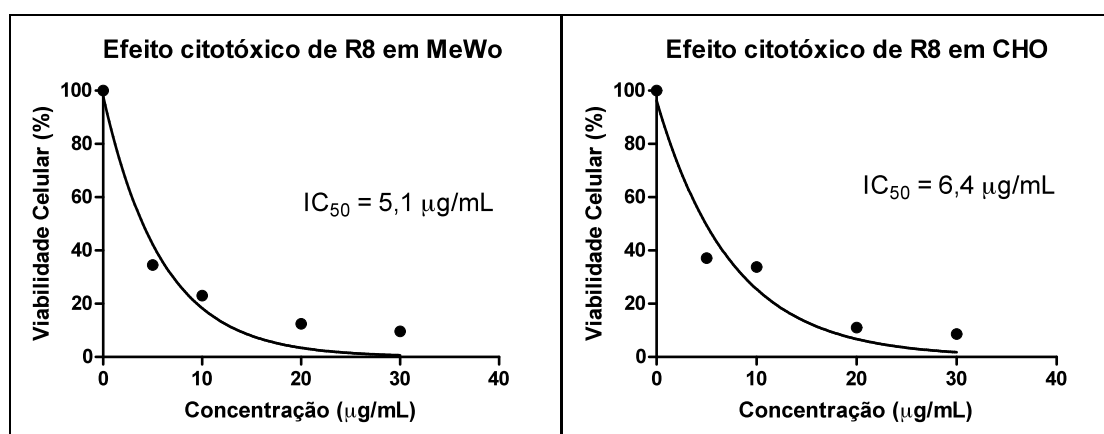


Figura 63 - Viabilidade celular de células MeWo e CHO após 72 horas de exposição a diferentes concentrações de **R8**

A substância **R8** foi ativa frente às duas linhagens testadas, apresentando valores de $IC_{50}=5,1 \mu\text{g/mL}$ para células MeWo, e $IC_{50}=6,4 \mu\text{g/mL}$ para células CHO.

6.4.4 - Conclusão

O teste de atividade citotóxica comprovou a atividade citotóxica da substância 2,8-dihidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-dihidrofenantreno-1-carbaldeído (**R8**) frente às linhagens celulares MeWo e CHO, sendo esta mais seletiva frente a células tumorais. Kovács *et al.* (2008), em uma revisão sobre fenantrenos naturais, relataram atividade citotóxica para esta classe de substância.

Capítulo 2

1 INTRODUÇÃO

1.1 Amidas biologicamente ativas

As amidas são um dos grupos funcionais de maior ocorrência, estando presente em inúmeros produtos naturais e sintéticos de interesse para o homem (Chou et al., 1998).

As amidas encontram emprego importante como produtos farmacêuticos de ampla aplicação em clínica médica, como os analgésicos e antipiréticos acetaminofen (ou paracetamol) (**1**) e salicilamida (**2**), e os antibióticos tetraciclina (**3**) e cefalexina (**4**), que contém um grupo amida em sua estrutura (Costa et al., 2003).

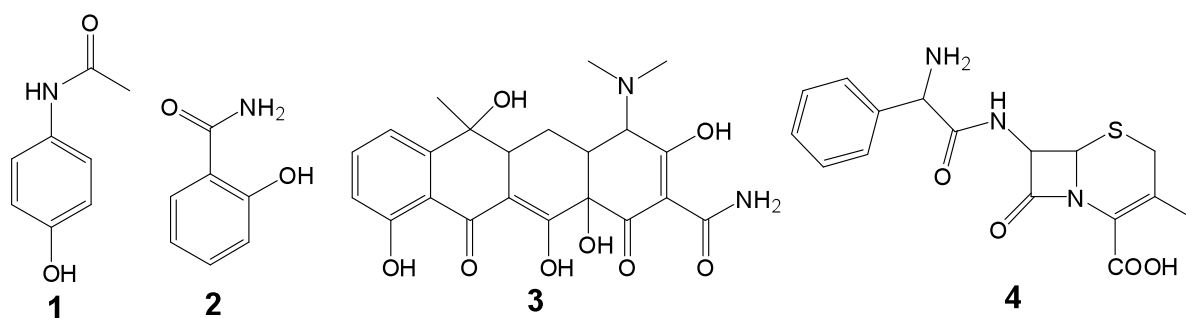


Figura 1 - Exemplos de amidas utilizadas em clínica médica.

1.2 Atividades biológicas de amidas derivadas de alcalóides indólicos

Diversas são as atividades biológicas descritas para amidas derivadas de alcalóides indólicos. Por exemplo, o anti-inflamatório indometacina (**5**) é um exemplo de amida derivada do esqueleto indólico.

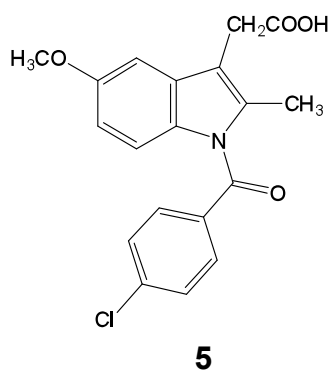


Figura 2 - Exemplo de fármaco contendo o esqueleto indólico.

Amidas derivadas do ácido indol-2-carboxílico (**21**) têm sido descritas por apresentarem uma ampla diversidade de atividades biológicas, como o antagonista

de receptor H4 de histamina (**6**) (Jablonowski *et al.*, 2008) e a amida **7**, que inibe a enzima glicogênio fosforilase (Onda *et al.*, 2003).

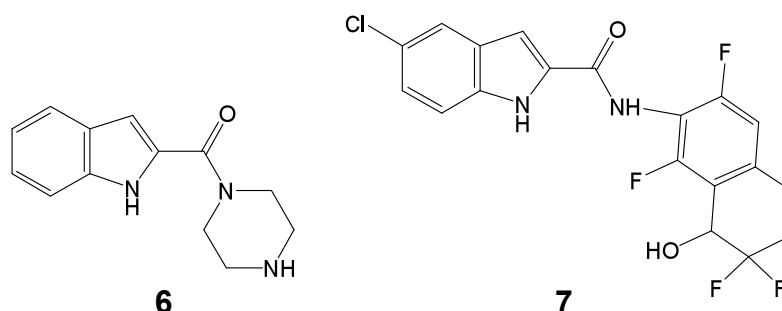


Figura 3 - Amidas derivadas do ácido indol-2-carboxílico.

Uma série de derivados indol-2-carboxamidas, como por exemplo a carboxamida **8**, foi preparada por Borza *et al.* (2003), e identificada como antagonistas do receptor NMDA subtipo NR2B, que está envolvido no efeito de neuroproteção, de antihiperálgia, e na atividade anti-Parkinsoniana em modelos animais.

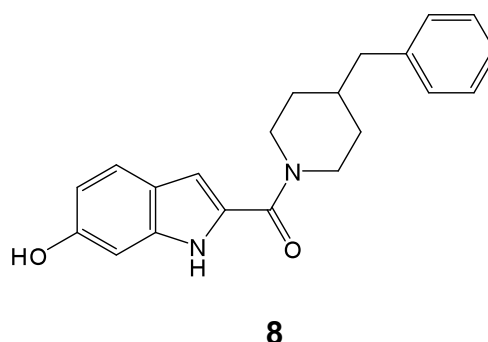


Figura 4 - Amida derivada do ácido 6-hidróxi-indol-2-carboxílico.

Magoulas e Papaioannou (2003) sintetizaram análogos aromáticos do retinóide acitretina, utilizado no tratamento de psoríase, utilizando como materiais de partida o ácido indol-3-carboxílico, a 3,4,5-trimetoxianilina e alguns ácidos dicarboxílicos. Alguns dos análogos sintetizados foram a *N*-fumaril-3',4',5'-trimetoxi-indol-3-carboxanilida (**9**), a *N*-succinil-3',4',5'-trimetoxi-indol-3-carboxanilida (**10**), a *N*-(indol-3-carboxil)-3',4',5'-trimetoxi-indol-3-carboxanilida (**11**) e a *N*-ftalil-3',4',5'-trimetoxi-indol-3-carboxanilida (**12**).

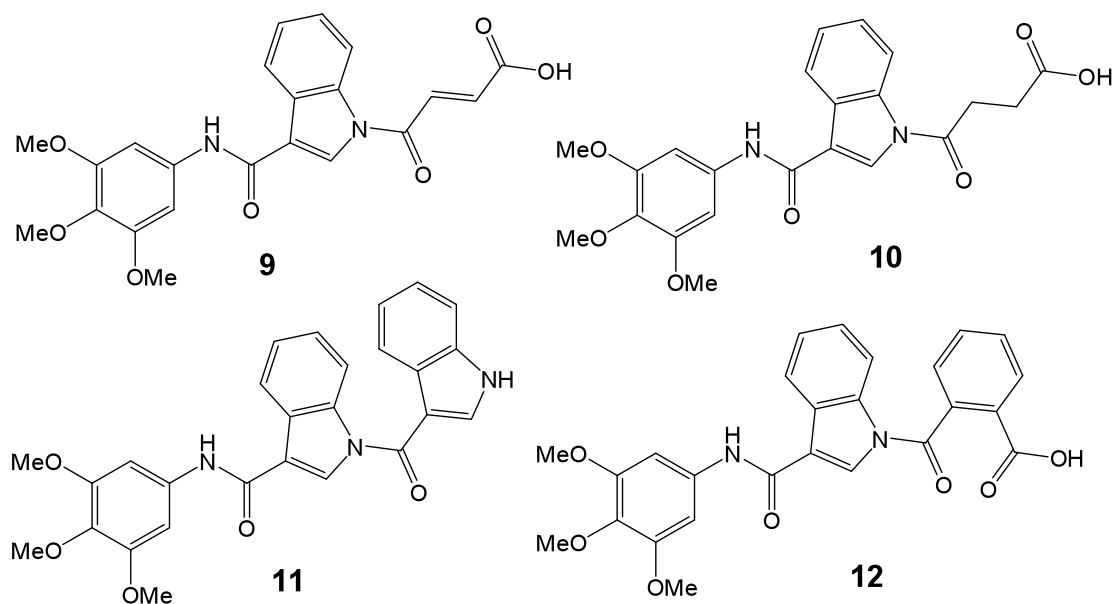


Figura 5 - Amidas derivadas do ácido indol-3-carboxílico.

Litina *et al.* (2010) sintetizaram derivados do ácido indol-3-carboxílico com a finalidade de se avaliar a atividade antioxidante e anti-inflamatória destes compostos. Os compostos antioxidantes mais ativos foram o ácido (*E*)-4-(3-(3-nitrofenilcarbamoil)-1*H*-indol-1-il)-4-oxobut-2-enóico (**13**) e o *t*-butil (*E*)-3-(1-((*E*)-3-benzo[d][1,3]dioxol-5-il)acrilóil)-1*H*-indol-3-il)acrilato (**14**). Aquele que apresentou melhor atividade anti-inflamatória foi o *t*-butil (*E*)-4-(3-(2,4-dimetóxfenilcarbamoil)-1*H*-indol-1-il)-4-oxobut-2-enoato (**15**).

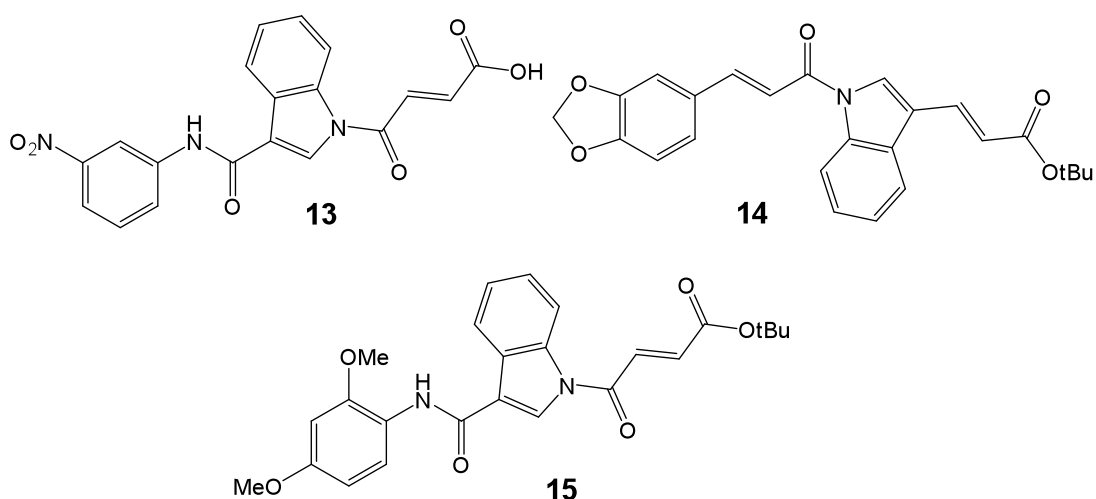
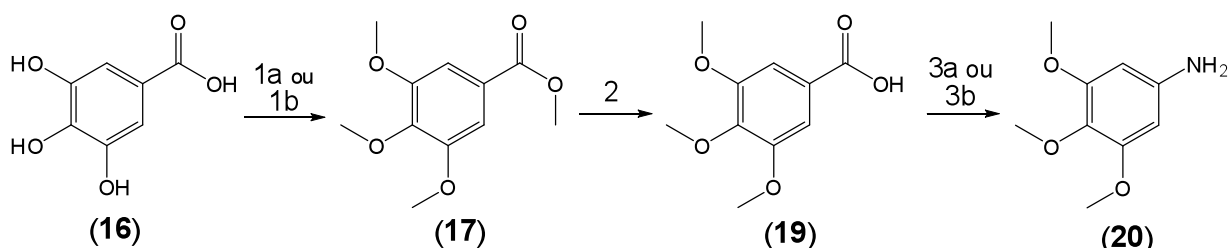


Figura 6 - Outras amidas derivadas do ácido indol-3-carboxílico.

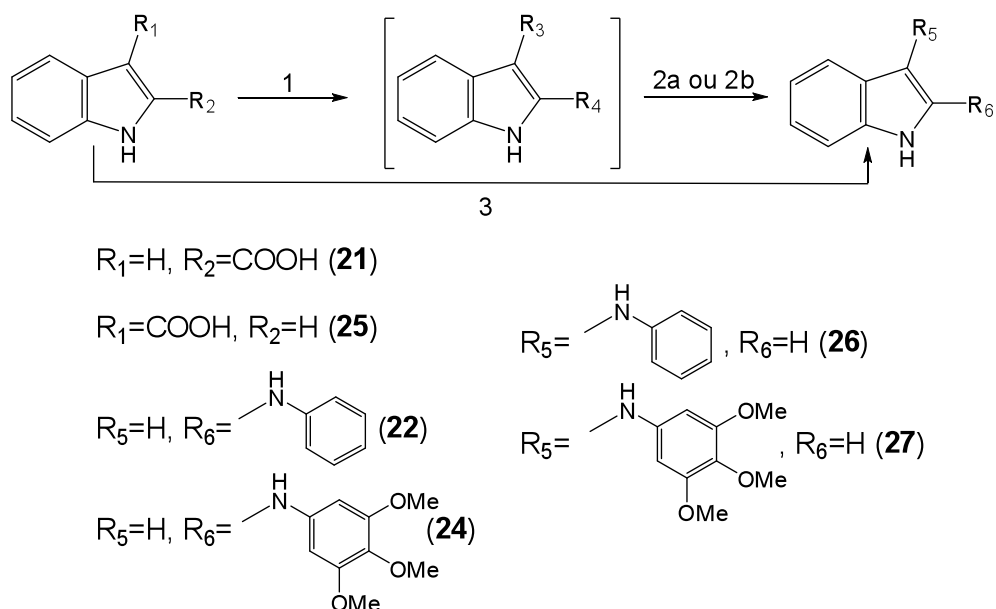
2 OBJETIVOS

Tendo em vista as atividades apresentadas por diversas amidas, a disponibilidade do ácido gálico em nosso laboratório e a nossa experiência (Borgatti, 2010) na preparação de amidas indólicas visando à avaliação da atividade alelopática, foram sintetizadas as amidas **22**, **24**, **26** e **27** a partir da trimetoxianilina (**20**), obtida a partir do ácido gálico (**16**) (**Esquema 1**) e dos ácidos 2-indol carboxílico (**21**) e 3-indol carboxílico (**25**) (**Esquema 2**).



1a. CH_2N_2 , 0 °C. 1b. $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}_4$, K_2CO_3 , acetona, refluxo, 8 h. 2. NaOH 20% (p/V), 2 h. 3a. i SOCl_2 , 1,5 h; ii NaN_3 , $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$, -5-0 °C, 0,5 h; iii tolueno, refluxo, 1 h; iv HCl 8 mol/L, refluxo, 10 min. 3b. i SOCl_2 , 1,5 h; ii NaN_3 , $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$, -5-0 °C, 0,5 h; iii tolueno, refluxo, 1 h; iv NaOH 5 mol/L, refluxo, 20 min.

Esquema 1 - Esquema de síntese para obtenção da 3,4,5-trimetoxi-anilina.



1. SOCl_2 , 0 °C, 1,5 h. 2a. Amina, THF, 0 °C - t.a., 12 h. 2b. Amina, THF, TEA, 0 °C - t.a., 12 h. 3. Anilina, DIC, DMAP, CH_2Cl_2 , 0 °C - t.a., 13 h.

Esquema 2 - Esquema de síntese para obtenção das amidas **22**, **24**, **26** e **27**.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Preparação da 3,4,5-trimetoxi-anilina (20) a partir do ácido gálico (16)

A parte inicial da rota sintética consistiu na obtenção da 3,4,5-trimetoxi-anilina a partir do ácido gálico (**Esquema 1**, pág. 108). Assim, a primeira etapa da síntese foi a metilação do ácido gálico (**16**) utilizando-se diazometano ou sulfato de dimetila.

Existem diversos métodos descritos na literatura para metilação de hidroxilas fenólicas. Dentre estes, destacam-se a metilação via diazometano, sulfato de dimetila, iodeto de metila, entre outros. Optou-se pelos dois primeiros métodos devido à experiência em nosso laboratório com o uso destes métodos, além da disponibilidade destes reagentes.

A metilação com diazometano, um gás amarelo muito reativo, envolve primeiramente a formação do diazometano a partir da reação da *N*-nitroso-*N*-metiluréia com uma solução aquosa de KOH a 50% (p/v). Outros compostos podem gerar esse gás, como por exemplo a *N*-metil-*N*-nitroso-*p*-toluenossulfonamida e a *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina. O mecanismo proposto para a reação está representado na **Figura 7**.

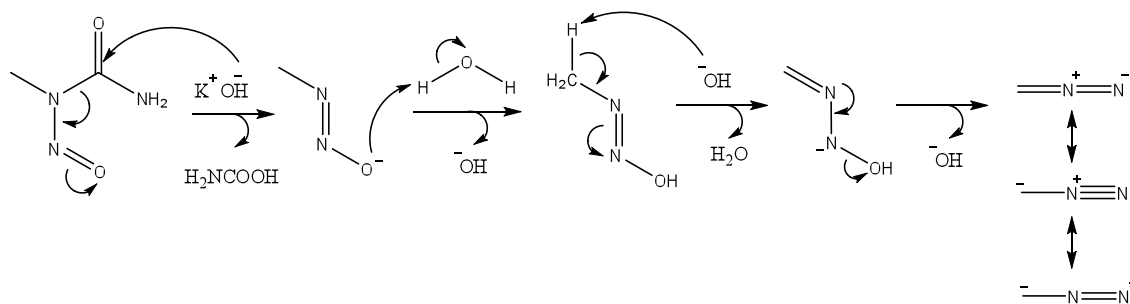


Figura 7 – Mecanismo de formação do diazometano

À medida que o diazometano é formado, ele se acumula na fase etérea, dando uma coloração amarela à mesma. Só depois de a solução adquirir uma coloração muito intensa, a fase etérea é recolhida e a ela se adiciona o substrato a ser metilado. Há intensa liberação de gás (N_2) nesta fase da reação. O mecanismo para a metilação está mostrado na **Figura 8**.

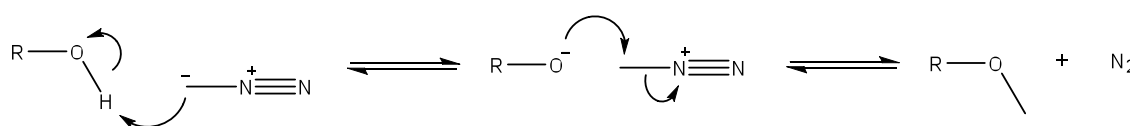


Figura 8 – Mecanismo de metilação com diazometano

A metilação com sulfato de dimetila também é realizada em meio básico, porém em solvente anidro. A grande desvantagem dessa reação é o sulfato de dimetila residual, que é dificilmente removido devido a seu alto ponto de ebulição (188 °C). O mecanismo da reação é demonstrado na **Figura 9**.

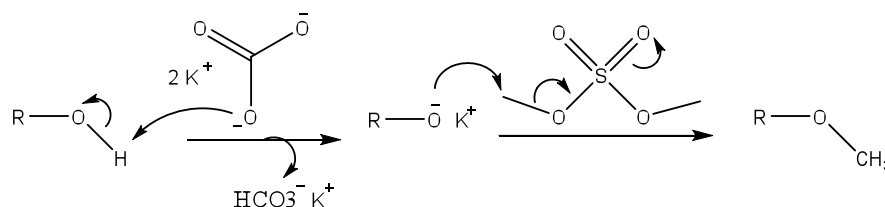


Figura 9 – Mecanismo de metilação com (CH₃)₂SO₄

Mas este problema foi resolvido ao submeter a amostra contaminada com o (CH₃O)SO₂ residual à hidrólise básica, pois desta maneira o contaminante também seria consumido, levando à formação de ácido sulfúrico e metanol. O produto desejado, por sua vez, ficaria insolúvel no meio.

A segunda etapa da síntese foi a hidrólise básica do 3,4,5-trimetóxi-benzoato de metila (**17**) utilizando-se solução aquosa de NaOH a 20% (p/v), sob refluxo.

A terceira etapa consistiu na obtenção da 3,4,5-trimetóxi-anilina, via reação de Curtius. Existem outros métodos para a obtenção de anilinas a partir de ácidos carboxílicos, como a reação de Hofmann (que utiliza Br₂ em meio alcalino ou NaOCl) e reação de Schmidt (que utiliza HN₃). A desvantagem da primeira é que, em anéis aromáticos com grupos ativadores por ressonância (como ocorre com o ácido 3,4,5-trimetóxi-benzóico), há o risco de ocorrer reações secundárias, como a halogenação do anel. Já a segunda reação ocorre em condições mais drásticas e o rendimento geralmente é menor do que aquele obtido pela reação de Curtius.

A reação ou rearranjo de Curtius consiste basicamente na decomposição térmica de uma acilazida em isocianato, com liberação de N₂. A acilazida pode ser preparada por diversos métodos: reação de azida de sódio ou trimetilsilil azida com cloreto de ácido ou anidrido misto; reação de uma acilhidrazina com ácido nitroso ou tetrafluoroborato de nitrosônio; ou tratando diretamente um ácido carboxílico com difenil fosforil azida (Kürti & Czakó, 2005). O isocianato formado pode, então, dependendo do nucleófilo presente no meio, levar à formação de uma amina, uréia, tiouretano, amida, carbamato etc (Fieser & Fieser, 1961).

Optou-se por realizar a reação pela primeira metodologia citada: em quatro etapas sequenciais: formação de cloreto de ácido; adição e eliminação à carbonila, com formação da acil azida; rearranjo da acil azida formada para a obtenção do isocianato, e hidrólise ácida ou básica do isocianato para formar a amina correspondente (**Esquema 1**, pág 107).

O mecanismo proposto para o rearranjo da acilazida para formar o isocianato está representado na **Figura 10**.

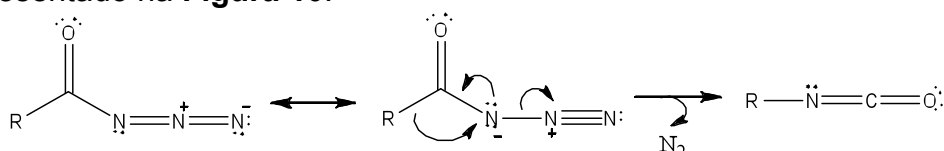


Figura 10 – Rearranjo da acilazida levando ao isocianato

A primeira tentativa de hidrólise do isocianato obtido neste trabalho foi realizada em meio ácido (Kaiser & Weinstock, 1988). A segunda tentativa de hidrólise foi realizada em meio alcalino, de acordo com a metodologia descrita por Jin *et al.* (2006). O rendimento com a hidrólise ácida foi maior. Geralmente só experimentalmente pode-se avaliar qual das hidrólises será mais eficiente (Smith, 1946).

Os rendimentos obtidos para a reação de Curtius foram muito baixos: 14,6%, 20,5% e 11,5% quando realizada por hidrólise ácida, e 5,2%, quando realizada por hidrólise básica. Percebeu-se que nessas reações havia a formação de um sólido pouco solúvel, que, por análise dos dados obtidos no seu espectro de RMN de ^1H e ^{13}C , sugeria a formação de um derivado da uréia com os nitrogênios substituídos pelo grupo 3,4,5-trimetóxi-anilina. A formação de uréias simétricas é um sério problema durante a hidrólise do isocianato (Pfister & Wymann, 1983). No entanto, a identificação do composto formado foi inconclusiva.

3.2 Preparação das amidas **22**, **24**, **26** e **27**

Para a síntese da primeira amida, a *N*-fenil-1*H*-indol-2-carboxamida (**22**), utilizaram-se duas metodologias diferentes:

1) Realizada em duas etapas sequenciais: primeiro houve a formação do cloreto de ácido, de acordo com a metodologia descrita por Sears *et al.* (2005). A segunda etapa foi a reação da anilina com o cloreto de ácido, seguindo a metodologia de Borgatti (2010), modificada. Esse autor usava um excesso muito grande de aminas porque ele desejava obter monoamidas a partir de diaminas

simétricas. Como neste caso não há risco de formação de diamidas, não foi necessário usar excesso tão grande da amina e nem temperatura tão baixa (**Esquema 2**, pág. 108).

2) Realizada via reagente de acoplamento, usando a metodologia de esterificação de Steglich (Neises & Steglich, 1978). Nessa metodologia, o grupo ácido carboxílico reage com o reagente de acoplamento diisopropilcarbodiimida (DIC) para formar um intermediário *O*-acil-isouréia, o que apresenta uma reatividade semelhante à de um anidrido de ácido carboxílico. Em seguida, a *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP) reage rapidamente com esse intermediário (porque ela é um nucleófilo mais reativo que a anilina aromática), fornecendo um outro intermediário ainda mais reativo. Dessa maneira, o DMAP, que é utilizado em quantidade catalítica (10% eq.), age como um transferidor de grupo acila. Em seguida, a amina reage com o novo intermediário, formando a amida desejada (**Figura 11**)

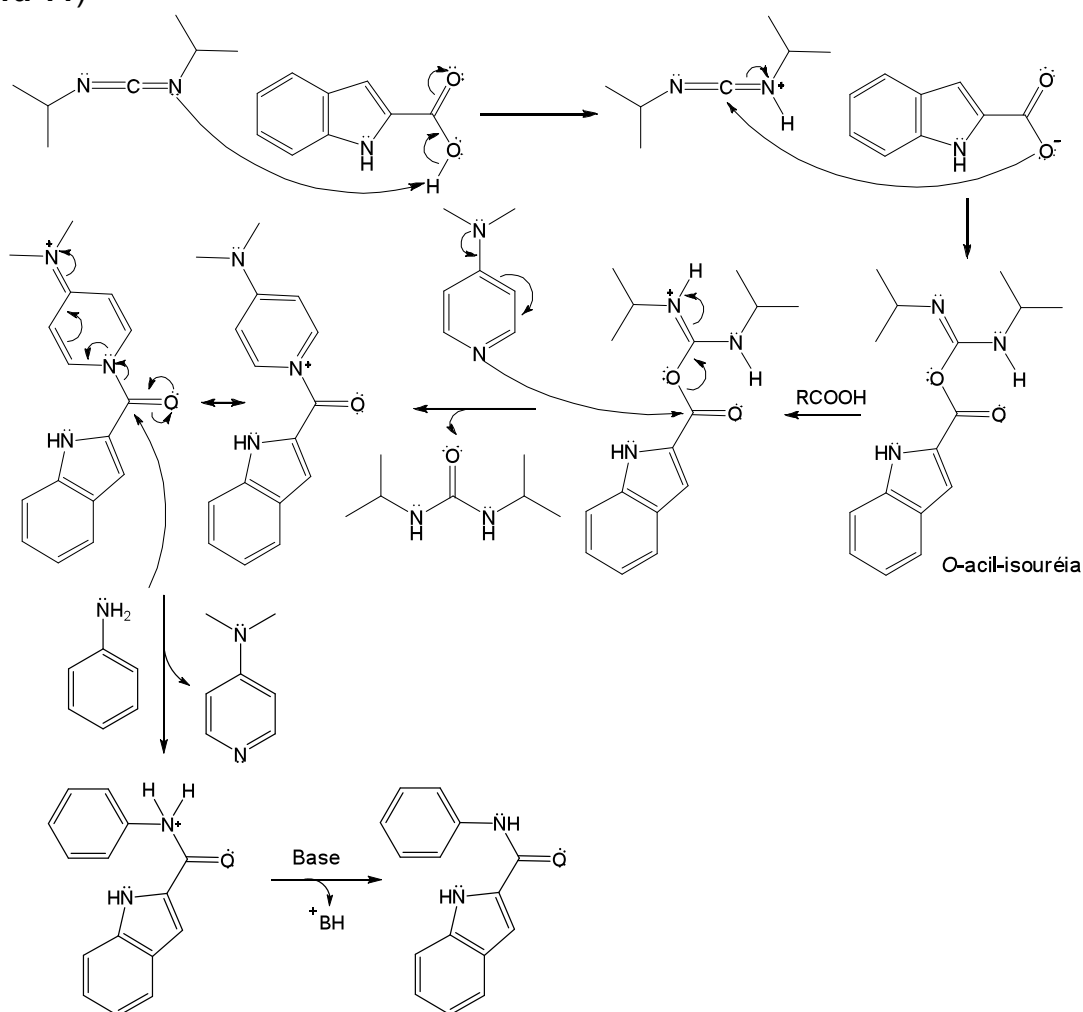


Figura 11 - Mecanismo da reação de acoplamento utilizando-se DIC e DMAP

A relação estequiométrica dos reagentes foi de 1 eq. ácido para 1,2 eq. amina, 0,1 eq. DMAP e 1,4 eq. DIC. Geralmente, não se utiliza DMAP para a síntese de amidas, no entanto quando a amina não é muito reativa, o seu uso pode ser necessário, pois uma reação mais lenta pode levar à formação de *N*-aciluréia como produto indesejado, por migração do grupo acila (**Figura 12**).

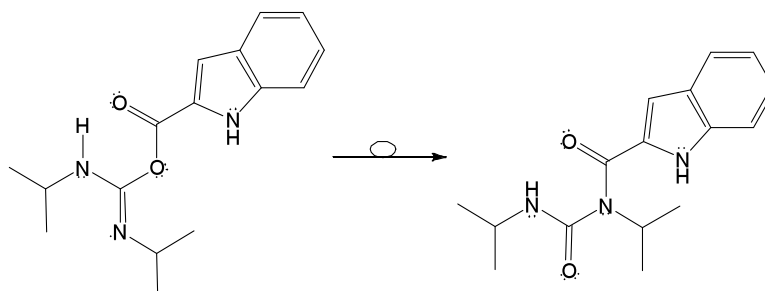


Figura 12 - Rearranjo para formação de *N*-aciluréia

A síntese da *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-2-carboxamida (**24**) foi primeiramente realizada pela metodologia 1 descrita para a síntese da *N*-fenil-1*H*-indol-2-carboxamida (**22**). Como o rendimento desta reação foi muito baixo, outra tentativa da síntese foi realizada, adicionando-se trietilamina à mistura reacional, de acordo com a metodologia descrita por La Regina *et al.* (2008).

A *N*-fenil-1*H*-indol-3-carboxamida (**26**) e a *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-3-carboxamida (**27**) também foram sintetizadas de acordo com a segunda metodologia descrita para a obtenção da *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-2-carboxamida (**24**), pois com ela obteve-se o produto desejado com um rendimento um pouco melhor.

A síntese das amidas **26** e **27** já está descrita na literatura (Litina *et al.*, 2010 e Magoulas & Papaioannou, 2003), e envolve três etapas: a primeira referente à proteção do nitrogênio indólico com (Boc)₂O, a segunda referente à síntese da carboxamida via reagente de acoplamento (PyBrOP), e a terceira referente à desproteção do nitrogênio indólico com ácido trifluoroacético. As amidas **26** e **27** foram obtidas com 50,3% e 29,0% de rendimento global dessas três etapas, respectivamente, que foram rendimentos inferiores àqueles obtidos para essas amidas neste trabalho (84,6% e 41,5%, respectivamente).

Não foi encontrada na literatura nenhuma referência sobre o produto *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-2-carboxamida (**24**) obtido, podendo, assim, ser considerado substância inédita. As demais amidas já foram descritas, mas para nenhuma delas foi relatada a sua atividade alelopática.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais e métodos

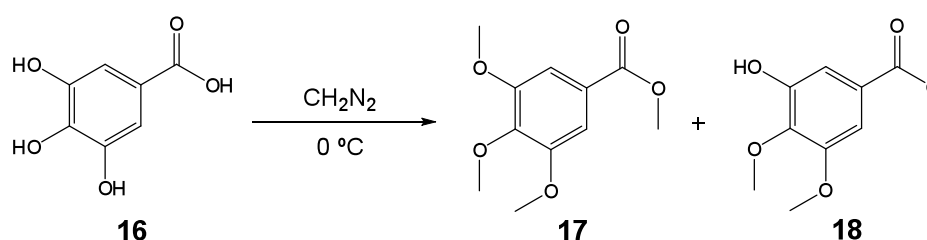
Os materiais e métodos utilizados foram os mesmos descritos no item 3.1 do Capítulo 1 (pág. 59).

4.2 Purificação e secagem de solventes e reagentes

- Tetrahidrofurano anidro: o solvente foi primeiramente tratado com sulfato de sódio anidro, depois foi mantido sob refluxo na presença de sódio metálico e benzofenona até a solução adquirir coloração azul. No momento do uso destilou-se quantidade necessária.
- Acetona anidra: a acetona foi refluxada com sulfato de cálcio. No momento do uso, ela foi destilada.
- Cloreto de tionila: foi destilado, utilizando-se uma micro montagem para destilação simples.
- Carbonato de potássio anidro: foi aquecido a 600 °C, por 3 horas, em uma mufla.

4.3 Preparação da 3,4,5-trimetoxi-anilina

4.3.1 - Obtenção do 3,4,5-trimetoxi-benzoato de metila (17) via metilação do ácido gálico (16) com diazometano



A um funil de separação de 250 mL foram adicionados 100 mL de uma solução de hidróxido de potássio a 50% (p/v) e 100 mL de éter. O funil foi colocado em um recipiente cheio de gelo. Adicionaram-se lentamente, ao longo de 3 horas, aproximadamente 2 g de *N*-nitroso-*N*-metiluréia, mantendo a temperatura a $0\text{ }^\circ\text{C}$. Após a fase etérea ter atingido uma coloração amarela forte, a fase aquosa foi recolhida e à fase etérea (rica em diazometano) foram adicionadas pastilhas de KOH para retirar a água residual. Foram adicionados lentamente à fase etérea 6 g (35,27

mmol) de ácido gálico, sob resfriamento e agitação. Observou-se desprendimento de gás (nitrogênio), e a descoloração da solução. A reação foi acompanhada por CCDS.

Foi necessário preparar mais 100 mL de solução etérea contendo diazometano para haver completo consumo do material de partida. Após a secagem da fase etérea, um óleo amarelo foi obtido. O material foi submetido a cromatografia em coluna de sílica gel seguindo a ordem eluotrópica usual, iniciando-se por n-hexano/diclorometano 1:1 e finalizando-se com acetato de etila. Nas frações 2-9, eluídas em uma mistura de diclorometano/acetato de etila 8:2, foram obtidos 3,81 g de cristais incolores contaminados com um óleo amarelado. Estes foram recristalizados em metanol, levando à obtenção de 3,46 g de cristais transparentes, que foram identificados como 3,4,5-trimetoxi-benzoato de metila (**17**), que foi obtido com 43,4% de rendimento. Nas frações 12-18, eluídas em uma mistura de diclorometano/acetato de etila 6:4, foram obtidos 401 mg de cristais transparentes também contaminados com um óleo amarelado. Após recristalização em metanol, 57 mg de cristais transparentes foram obtidos e identificados como 3-hidroxi-4,5-dimetoxi-benzoato de metila (**18**), que foi obtido com 0,7% de rendimento.

- **3,4,5-trimetoxi-benzoato de metila (17)**

FM/MM: C₁₁H₁₄O₅ / 226,23 g/mol.

Faixa de fusão: 78-79 °C.

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 1713 (C=O), 1590, 1507, 1465 e 1411 (C=C); 1127 (C-O).

RMN de ¹H (CD₃OD, 200 MHz, δ): 7,30 (s, 2 H, H-2 e H-6), 3,91 (s, 12 H, H-2', H-3', H-4' e H-5').

RMN de ¹³C (CD₃OD, 50 MHz, δ): 166,9 (C-1'), 152,94 (C-3 e C-5), 142,17 (C-4), 125,15 (C-1), 106,80 (C-2 e C-6), 60,89 (C-3'), 56,22 (C-2' e C-4'), 52,21 (C-5').

- **3-hidroxi-4,5-dimetoxi-benzoato de metila (18)**

FM/MM: C₁₀H₁₂O₅ / 212,20 g/mol.

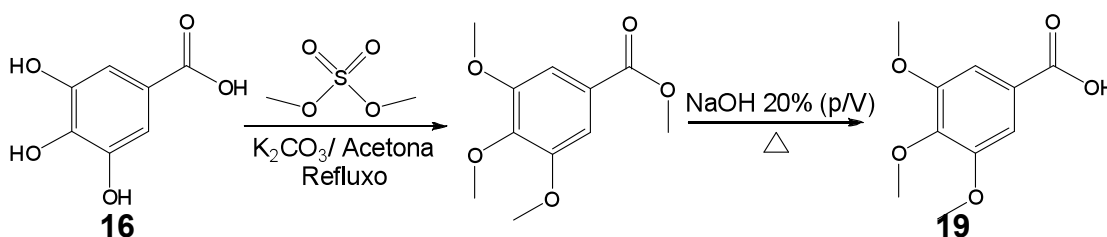
Faixa de fusão: 76-77 °C.

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3373 (O-H); 1697 (C=O); 1590, 1505, 1466 e 1431 (C=C); 1103 (C-O).

RMN de ¹H (CD₃OD, 200 MHz, δ): 7,31 (d, 1H, H-2) 7,20 (d, 1H, H-6), 6,26 (sl, 1H, OH), 3,94 (s, 3H, H-3'), 3,90 (s, 3H, H-2'), 3,89 (s, 3H, H-4').

RMN de ¹³C (CD₃OD, 50 MHz, δ): 166,85 (C-1'), 152,10 (C-5), 149,14 (C-3) 139,67 (C-4), 125,57 (C-1), 110,11 (C-2), 105,65 (C-6), 60,98 (C-3'), 56,04 (C-2'), 52,25 (C-4').

4.3.2 - Obtenção do ácido 3,4,5-trimetoxi-benzóico (19) via metilação do ácido gálico (16) com sulfato de dimetila e hidrólise básica



A um balão de fundo redondo de 1 L, adaptado a um condensador de bolas, foram adicionados 600 mL de acetona anidra, 100 g (723 mmol) de K_2CO_3 calcinado e 70 mL (738 mmol) de sulfato de dimetila. Em seguida, adicionou-se ao mesmo balão uma mistura de 15 g (88 mmol) de ácido gálico em 100 mL de acetona. A mistura foi refluxada, sob agitação magnética, por 8 horas. A evolução da reação foi acompanhada por CCDS.

A mistura da reação foi filtrada para a retirada do excesso de carbonato de potássio. A fase orgânica foi evaporada à pressão reduzida. Em seguida, adicionaram-se ao resíduo 500 mL de acetato de etila e transferiu-se essa mistura para um funil de separação. A fase orgânica foi primeiramente lavada com 240 mL de solução saturada de cloreto de sódio e depois com mais 240 mL de água destilada. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro.

O óleo residual obtido após a remoção do solvente, que ainda estava contaminado com sulfato de dimetila, foi submetido a cromatografia em coluna de sílica gel. O grupo de frações 4-29 (25 g) (que foi eluído em hexano/diclorometano 7:3) apresentou o produto desejado ainda contaminado com sulfato de dimetila. Assim optou-se por fazer a hidrólise dessa mistura, uma vez que o contaminante também seria consumido na hidrólise básica.

Para a hidrólise, adicionaram-se a um balão de 150 mL, 25 g da mistura de 3,4,5-trimetoxi-benzoato de metila e sulfato de dimetila e 45 mL de solução aquosa de NaOH 20% (p/v). A mistura foi aquecida sob refluxo, em banho de óleo, por 2 horas. O fim da reação foi visualizado por CCDS. Depois, a solução foi resfriada e acidificada com 11 mL de HCl concentrado. Filtrou-se a vácuo, à temperatura ambiente. O sólido residual foi submetido a cromatografia em coluna de sílica gel, seguindo a ordem eluotrópica usual iniciando-se por diclorometano e finalizando-se com acetato de etila. Nas frações 6-15, eluídas em uma mistura de diclorometano/acetato de etila 6:4, foram obtidos 12,08 g de cristais transparentes,

que foram identificados como ácido 3,4,5-trimetoxi-benzóico, que foi obtido com um rendimento de 64,6% em relação ao ácido gálico.

- **ácido 3,4,5-trimetóxi-benzóico (19)**

FM/MM: C₁₀H₁₂O₅ / 212,20 g/mol.

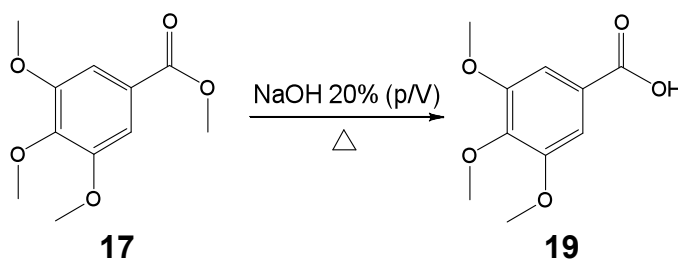
Faixa de fusão: 164-165 °C.

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3017-2519 (O-H); 1681 (C=O); 1585, 1505, 1465 e 1414 (C=C); 1121 (C-O).

RMN de ¹H (CD₃OD, 200 MHz, δ): 11,08 (s, 1H, OH), 7,39 (s, 2H, H-2 e H-6), 3,93 (s, 9H, H-2', H-3' e H-4').

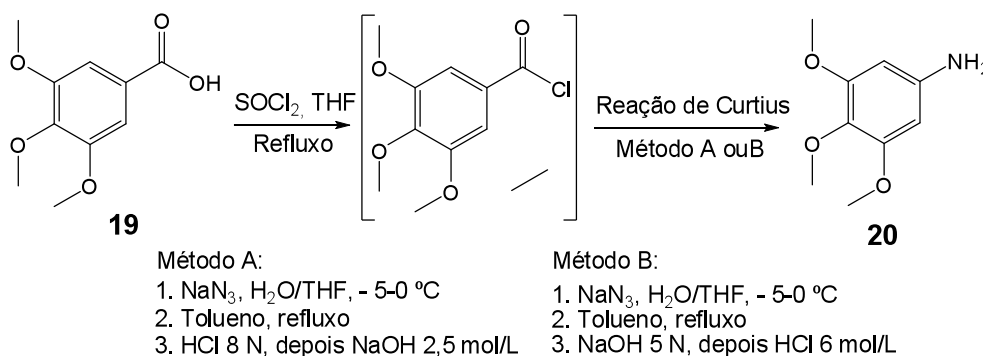
RMN de ¹³C (CD₃OD, 50 MHz, δ): 171,98 (C-1'), 153,03 (C-3 e C-5), 143,02 (C-4), 124,24 (C-1), 107,47 (C-2 e C-6), 61,03 (C-3'), 56,31 (C-2' e C-4').

4.3.3 - Obtenção do ácido 3,4,5-trimetóxi-benzóico (19) via hidrólise básica do 3,4,5-trimetóxi-benzoato de metila (17)



Adicionaram-se 3,46 g (15,31 mmol) de 3,4,5-trimetoxi-benzoato de metila (17) e 8 mL de solução aquosa de NaOH 20% a um balão reacional de 50 mL adaptado a um condensador de refluxo. A mistura foi aquecida sob refluxo, em banho de óleo, por 2 horas. O fim da reação foi acompanhado por CCDS. Depois, a solução foi resfriada e acidificada com 3 mL de HCl concentrado. O sólido formado foi filtrado à vácuo, à temperatura ambiente, e foi purificado da mesma forma que na hidrólise descrita anteriormente. Obtiveram-se 2,97 g de cristais transparentes, identificados como ácido 3,4,5-trimetoxi-benzóico (19), que foram obtidos com 91,4% de rendimento.

4.3.4 – Obtenção da 3,4,5-trimetoxi-anilina (20) via reação de Curtius

**Método A:**

Preparação do cloreto de ácido: a um balão reacional de 25 mL foram adicionados 310 mg (1,46 mmol) de ácido 3,4,5-trimetoxibenzóico, 2 mL de THF anidro e 0,21 mL (2,92 mmol) de cloreto de tionila. A mistura foi aquecida a 60 °C, com agitação magnética, por 1 hora e meia. O excesso de cloreto de tionila e do solvente foi removido a vácuo.

Preparação da acil azida: uma solução de 190 mg (2,92 mmol) de azida de sódio em 0,5 mL de água gelada foi adicionada, lentamente, à solução do cloreto de ácido em 1,5 mL de THF anidro, sendo a temperatura mantida entre -5 e 0 °C. A mistura reacional, que era incolor, adquiriu coloração laranja. A agitação magnética foi mantida por mais 30 minutos após completa adição da azida. Finalizada a reação, adicionaram-se 5 mL de água gelada à mistura reacional e extraiu-se a acilazida com 4 porções de 2 mL de tolueno. A fase orgânica foi reunida e secada com sulfato de sódio anidro, durante 2 horas, com agitação.

Rearranjo da acil azida para formar isocianato: após filtração, a fase toluênica foi transferida para um balão reacional adaptado a um condensador de refluxo e com um agitador magnético. O aquecimento foi iniciado com cautela (devido à liberação de gás N_2), até atingir o refluxo, que foi mantido por 1 hora. O tolueno foi removido no rotavapor, à pressão reduzida.

Hidrólise ácida do isocianato: ao sólido residual (isocianato), adicionaram-se 2 mL de HCl 8 mol/L, sob resfriamento em banho de gelo. Em seqüência, a mistura foi gradualmente aquecida, sob agitação, até atingir o refluxo, que foi mantido por 10 minutos.

Elaboração da reação: o pH da mistura reacional foi ajustado para 12 com a adição de aproximadamente 6 mL de NaOH 2,5 mol/L. Extraiu-se o produto reacional com 3 porções de 8 mL de éter etílico.

O resíduo obtido após a remoção do solvente foi purificado por cromatografia em coluna de sílica flash, utilizando-se como fase móvel uma mistura de hexano/acetato de etila 1:1 (coluna de 10 cm altura x 0,5 cm diâmetro, 2,8 g de fase estacionária, fluxo de 1,5 mL/min). Foram obtidos nas frações 6-11, 39 mg de cristais brancos que adquiriam coloração acinzentada, quando expostos à luz. Esses cristais, identificados como 3,4,5-trimetoxi-anilina (**20**), foram obtidos com rendimento de 14,6%.

Essa mesma reação foi repetida utilizando-se 3,53 e 6,46 g de ácido 3,4,5-trimetoxi-benzóico (**19**), levando ao produto desejado em rendimentos de 20,5% e 11,5%, respectivamente.

Método B:

A partir de 1,435 g (6,77 mmol) de ácido 3,4,5-trimetoxi-benzóico, a metodologia foi repetida até a obtenção do isocianato.

Hidrólise básica do isocianato: ao sólido residual (isocianato), adicionaram-se 3 mL de NaOH 5 mol/L, sob resfriamento com banho de gelo. Em seqüência, a mistura foi gradualmente aquecida, sob agitação, até atingir o refluxo, que foi mantido por 20 minutos. O pH da mistura reacional foi ajustado para 2 com a adição de aproximadamente 18 mL de HCl 6 mol/L. Manteve-se a agitação por mais 5 minutos.

O resíduo obtido após a remoção dos solventes foi purificado da mesma forma que na reação anterior, levando à obtenção de 64 mg da 3,4,5-trimetoxi-anilina (**20**), com rendimento de 5,2%.

- **3,4,5-trimetoxi-anilina (20)**

FM/MM: C₉H₁₃NO₃ / 183,20 g/mol.

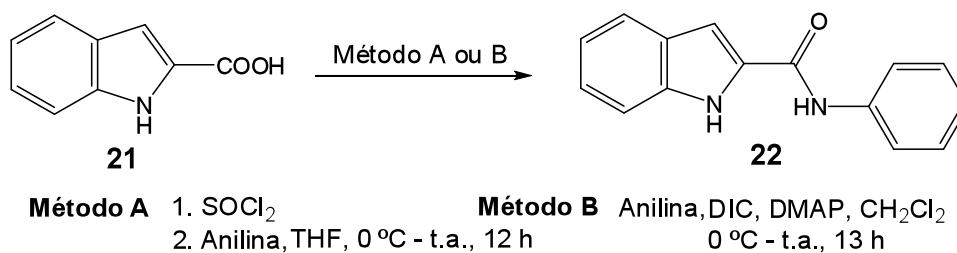
Faixa de fusão: 104-105 °C.

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3422, 3317 e 3216 (N-H); 1590, 1504, 1471 e 1426 (C=C); 1123 (C-O).

RMN de ¹H (CD₃OD, 200 MHz, δ): 5,92 (s, 2H, H-2 e H-6), 3,79 (s, 6H, H-1' e H-3'), 3,76 (s, 3H, H-2'), 3,57 (sl, 2H, NH₂).

RMN de ¹³C (CD₃OD, 50 MHz, δ): 153,86 (C-3 e C-5), 143,08 (C-1), 130,64 (C-4), 92,64 (C-2 e C-6), 61,06 (C-2'), 55,90 (C-1' e C-3').

5.4 Obtenção das amidas 22, 24, 26 e 27

4.4.1 - Obtenção da *N*-fenil-1*H*-indol-2-carboxamida (**22**)**Método A:**

A um balão de fundo redondo de 25 mL equipado com uma rolha de saia, contendo 200,0 mg (1,24 mmol) de ácido indol-2-carboxílico (**21**) foram adicionados 2,2 mL (30,29 mmol) de SOCl₂. A mistura foi resfriada a 0 °C e, após 1,5 hora, o excesso deste reagente foi retirado sob pressão reduzida. A solução, que a princípio era bege claro, adquiriu coloração amarelo ouro. Em seguida, o balão foi colocado em banho de gelo a 0 °C, sendo então adicionados, sob agitação, 140 µL de anilina (1,54 mmol) dissolvidos em 4,0 mL de THF. A mistura reacional adquiriu coloração bege claro. A agitação se prolongou por 2 horas, em banho de gelo. Após análise em CCDS, optou-se por deixar a agitação por mais 10 horas, à temperatura ambiente.

O resíduo obtido após a remoção do solvente foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando-se a ordem eluotrópica usual, iniciando-se com uma mistura de *n*-hexano/diclorometano 1:1 e finalizando-se com acetato de etila. Nas frações 1-7, obteve-se um sólido amarelo claro (149 mg), muito pouco solúvel em água e na grande maioria dos solventes orgânicos, exceto no metanol, no qual foi razoavelmente solúvel. Esse sólido amarelo foi identificado como *N*-fenil-1*H*-indol-2-carboxamida (**22**), que foi obtida com 55,6% de rendimento.

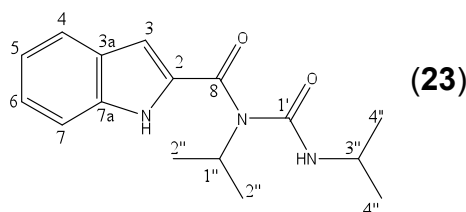
Análise da placa por CCDS, após revelação com vapores de iodo, demonstrou que o produto desejado apresentou R_f semelhante ao do ácido indol-2-carboxílico, porém sem o rastro característico do ácido.

Método B:

A um balão de fundo redondo de 50 mL, equipado com um tubo contendo CaCl₂ anidro, foram adicionados 200 mg de ácido indol-2-carboxílico (1,24 mmol), 15,0 mg de DMAP (0,12 mmol), 140 µL de anilina (1,54 mmol), e 5 mL de THF. O meio reacional foi resfriado a 0 °C, em banho de gelo, e 270 µL de DIC (1,72 mmol)

foram adicionados. O banho de gelo foi removido e a mistura permaneceu em agitação magnética máxima por 1 hora, mas devido à total insolubilidade do material, iniciou-se o aquecimento, e o refluxo a 80 °C foi mantido por mais 12 horas. A reação foi acompanhada por CCDS.

O resíduo obtido após a remoção do solvente foi purificado utilizando-se a mesma metodologia descrita na reação anterior, fornecendo 149 mg de *N*-fenil-1*H*-indol-2-carboxamida, com rendimento de 50,9%. Adicionalmente, a fração 8 (97 mg), eluída em diclorometano/acetato de etila 1:1 foi recromatografada em coluna de sílica gel, levando à obtenção de 104 mg de um cristal amarelo claro, identificado como *N*-isopropil-*N*-(isopropilcarbamoil)-1*H*-indol-2-carboxamida (**23**), um intermediário da reação, com rendimento de 29,2%. Esse produto apresentou R_f em CCDS menor que de todos os reagentes.



- ***N*-fenil-1*H*-indol-2-carboxamida (22)**

FM/MM: C₁₅H₁₂N₂O / 236,27 g/mol.

Faixa de fusão: 193-194 °C.

IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3400 (CON-H); 3350 (N-H); 1652 (C=O, amida I); 1618 (N-H, amida II); 1595, 1528, 1490 e 1441 (C=C).

RMN de ¹H (CD₃OD, 200 MHz, δ): 7,74 (d, 2H, $J=7,6$ Hz, H-2' e H-6'); 7,66 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, H-4); 7,49 (d, 1H, $J=8,4$ Hz, H-7); 7,37 (t, 2H, $J=7,8$ Hz, H-3' e H-5'); 7,32 (s, 1H, H-3); 7,25 (t, 1H, $J=7,8$ Hz, H-6); 7,14 (t, 1H, $J=7,4$ Hz, H-4'); 7,10 (t, 1H, $J=7,6$ Hz, H-5).

RMN de ¹³C (CD₃OD, 50 MHz, δ): 162,11 (C-8); 139,72 (C-1'); 138,46 (C-7a); 132,39 (C-2); 129,76 (C-3' e C-5'); 128,95 (C-3a); 125,25 (C-6 e C-4'); 122,87 (C-4); 121,91 (C-2' e C-6'); 121,21 (C-5); 113,07 (C-7); 105,05 (C-3).

- ***N*-isopropil-*N*-(isopropilcarbamoil)-1*H*-indol-2-carboxamida (23)**

FM/MM: C₁₆H₂₁N₃O₂ / 287,36 g/mol.

Faixa de fusão: 147-148 °C.

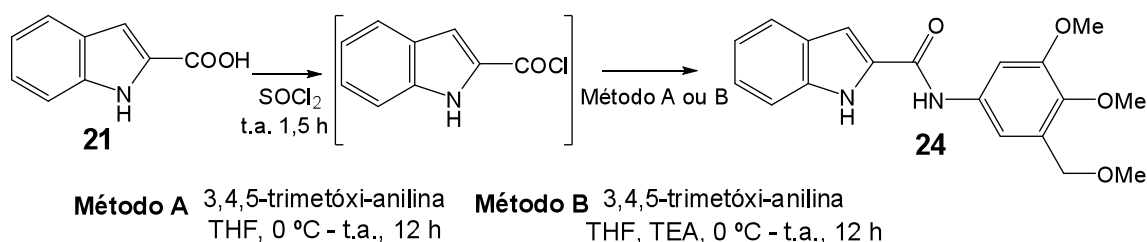
IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3292 (N-H); 1674 (C=O); 1534, 1515 e 1464 (C=C).

RMN de ¹H (CD₃OD, 200 MHz, δ): 7,57 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, H-4); 7,43 (d, 1H, $J=8,4$ Hz, H-7); 7,21 (t, 1H, $J=7,1$ Hz, H-6); 7,05 (t, 1H, $J=7,1$ Hz, H-5); 4,73 (hepteto, 1H, $J=6,8$

Hz, H-1''); 3,83 (hepteto, 1H, $J=6,6$ Hz, H-3''); 1,38 (d, 1H, $J=6,8$ Hz, H-2''); 0,97 (d, 1H, $J=6,6$ Hz, H-4'').

RMN de ^{13}C (CD_3OD , 50 MHz, δ): 163,26 (C-8); 156,49 (C-1'); 131,63 (C-3a); 128,52 (C-2); 138,00 (C-7a); 125,29 (C-6); 122,76 (C-4); 121,22 (C-5); 112,89 (C-7); 106,26 (C-3); 48,44 (C-1''); 44,52 (C-3''); 21,80 (C-4''); 20,86 (C-2'').

4.4.2 – Obtenção da *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-2-carboxamida (**24**)



Método A:

A um balão de fundo redondo de 25 mL equipado com uma rolha de saia, contendo 200,0 mg (1,2 mmol) de ácido indol-2-carboxílico (**21**) foram adicionados 2,2 mL (30,2 mmol) de SOCl_2 . A mistura foi resfriada a 0 °C e, após 1,5 hora, o excesso deste reagente foi retirado sob pressão reduzida. Em seguida, o balão foi mergulhado em banho de gelo a 0 °C, sendo então adicionados, sob agitação, 256 mg (1,4 mmol) da 3,4,5-trimetoxi-anilina dissolvidos em 4,0 mL de THF. A mistura reacional adquiriu coloração bege-marrom. A agitação se prolongou por 2 horas, em banho de gelo. Após análise em CCDS, optou-se por deixar a agitação por mais 10 horas, à temperatura ambiente.

O resíduo obtido após a remoção dos solventes foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando-se a ordem eluotrópica usual, iniciando-se com uma mistura de *n*-hexano/diclorometano 1:1 e finalizando-se com metanol. As frações 3-6 (66,3 mg), que foram eluídas em uma mistura de diclorometano/acetato de etila 1:1, foram recromatografadas em coluna de sílica gel, levando à obtenção de 16 mg de um cristal amarelo claro, identificado como *N*-(3,4,5-trimetóxi-fenil)-1*H*-indol-2-carboxamida (**24**), com rendimento de 4%.

A amida **24** apresentou, por CCDS, R_f semelhante ao do ácido indol-2-carboxílico, no entanto não deixava rasto na placa como ocorria com o ácido.

Método B:

A um balão de fundo redondo de 25 mL equipado com uma rolha de saia, contendo 74,0 mg (0,46 mmol) de ácido indol-2-carboxílico foram adicionados 0,65

mL (8,95 mmol) de SOCl_2 . A mistura foi resfriada a $0\text{ }^\circ\text{C}$ e, após 1,5 hora (a solução adquiriu coloração amarelo ouro), o excesso deste reagente foi removido sob pressão reduzida. A outro balão de fundo redondo de 25 mL foram adicionados 100 mg (0,55 mmol) da 3,4,5-trimetoxi-anilina, 1 mL de THF e 190 μL (1,36 mmol) de trietilamina. Em seguida, adicionou-se a esta mistura o cloreto de ácido gota a gota, dissolvido em 1 mL de THF, em banho de gelo a $0\text{ }^\circ\text{C}$ e sob agitação. A mistura reacional adquiriu primeiramente coloração marrom claro, mas depois ficou marrom mais escuro. A agitação se prolongou por 1 hora, em banho de gelo, e 10 horas, à temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por CCDS.

O resíduo obtido após a remoção do solvente foi purificado da mesma forma que na reação anterior, levando à obtenção de 10,8 mg da *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-2-carboxamida (**24**), com rendimento de 7,2%.

- ***N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-2-carboxamida (**24**)**

FM/MM: $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$ / 326,35 g/mol.

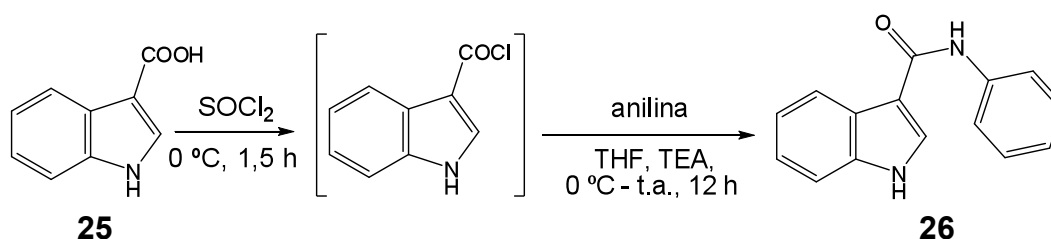
Faixa de fusão: 189-190 $^\circ\text{C}$.

IV ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3395 (CON-H); 3343 (N-H); 2965 e 2938 (C-H); 1647 (C=O, amida I); 1600 (N-H, amida II); 1547, 1506 e 1448 (C=C); 1129 (C-O).

RMN de ^1H (CD_3OD , 200 MHz, δ): 7,66 (d, 1H, $J=7,8$ Hz, H-4); 7,45 (d, 1H, $J=8,2$ Hz, H-7); 7,29 (t, 1H, $J=7,6$ Hz, H-6); 7,16 (s, 1H, H-3); 7,14 (t, 1H, $J=7,6$ Hz, H-7); 7,02 (s, 2H, H-2' e H-6'); 3,84 (s, 9H, H-1'', H-2'' e H-3'').

RMN de ^{13}C (CD_3OD , 50 MHz, δ): 160,52 (C-8); 154,30 (C-3' e C-5'); 138,03 (C-7a); 136,04 (C-1'); 135,57 (C-4'), 132,61 (C-2); 128,73 (C-3a); 124,98 (C-6); 122,71 (C-4); 121,10 (C-5); 113,14 (C-7); 103,94 (C-3); 98,80 (C-2' e C-6'); 60,64 (C-2''); 56,35 (C-1'' e C-3'').

4.4.3 - Obtenção da *N*-fenil-1*H*-indol-3-carboxamida (**26**)



A um balão de fundo redondo de 25 mL equipado com uma rolha de saia, contendo 100,0 mg (0,62 mmol) de ácido indol-3-carboxílico (**25**) foram adicionados 1,1 mL (15,14 mmol) de SOCl_2 . A mistura foi resfriada a $0\text{ }^\circ\text{C}$ e, após 1,5 hora, o excesso deste reagente foi retirado sob pressão reduzida. A solução que a princípio

era bege claro tornou-se amarelo ouro. A outro balão de fundo redondo de 25 mL foram adicionados 160 μL (1,76 mmol) de anilina, 1 mL de THF e 190 μL (1,36 mmol) de trietilamina. Em seguida, adicionou-se o gota a gota o cloreto de tionila dissolvido em 1 mL de THF, em banho de gelo a 0 °C e sob agitação. A mistura reacional adquiriu coloração bege. A agitação se prolongou por 1 hora, em banho de gelo, e 10 horas, à temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por CCDS.

O resíduo obtido após a remoção do solvente foi purificado utilizando-se a mesma metodologia descrita para a purificação da *N*-fenil-1*H*-indol-2-carboxamida. Dessa forma, foram obtidos 124 mg de um cristal amarelo claro, identificado como *N*-fenil-1*H*-indol-3-carboxamida (**26**), com rendimento de 84,6%. O produto obtido apresentou solubilidade fraca em metanol e acetona, e foi insolúvel nos demais solventes orgânicos testados. Seu R_f , por CCDS, apresentou-se entre aqueles da anilina e do ácido indol-3-carboxílico.

- ***N*-fenil-1*H*-indol-3-carboxamida (26)**

FM/MM: $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$ / 236,27 g/mol.

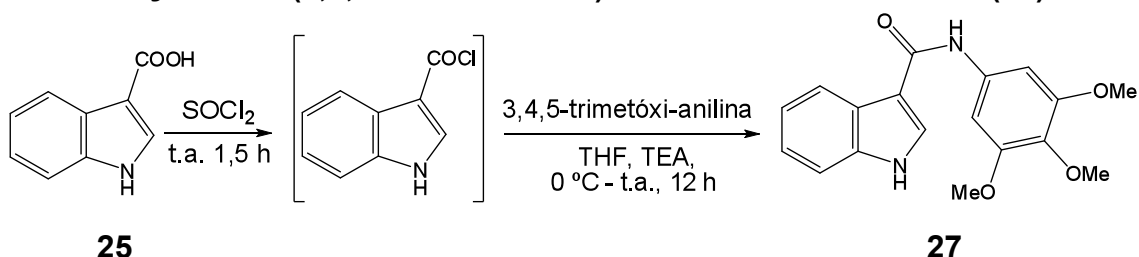
Faixa de fusão: 174–175 °C.

IV ($\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3372 (CON-H); 3255 e 3230 (N-H); 1638 (C=O, amida I); 1617 (N-H, amida II); 1594, 1523, 1498 e 1455 (C=C).

RMN de ^1H (CD_3OD , 400 MHz, δ): 8,20 (d, 1H, $J=6,8$ Hz, H-4); 8,07 (s, 1H, H-2); 7,48 (d, 1H, $J=6,8$ Hz, H-7); 7,30 (t, 2H, $J=7,6$ Hz, H-3' e H-5'); 7,26 (d, 2H, $J=7,6$ Hz, H-2' e H-6'); 7,22 (m, 2H, H-5 e H-6); 7,08 (t, 1H, $J=7,6$ Hz, H-4').

RMN de ^{13}C (CD_3OD , 50 MHz, δ): 166,81 (C-8); 140,20 (C-1'); 138,11 (C-7a); 129,71 (C-3' e C-5'); 129,41 (C-2); 127,56 (C-3a); 124,82 (C-4'); 123,64 (C-6); 122,12 (C-4 e C-5); 122,03 (C-2' e C-6'); 112,78 (C-7); 112,02 (C-3).

4.4.4 - Obtenção da *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-3-carboxamida (**27**)



A um balão de fundo redondo de 25 mL equipado com uma rolha de saia, contendo 74,0 mg (0,46 mmol) de ácido indol-3-carboxílico (**25**) foram adicionados 0,65 mL (8,95 mmol) de SOCl_2 . A mistura foi resfriada a 0 °C e, após 1,5 hora (a

solução adquiriu coloração rosa), o excesso deste reagente foi removido sob pressão reduzida. A outro balão de fundo redondo de 25 mL foram adicionados 100 mg (0,55 mmol) da 3,4,5-trimetoxi-anilina, 1 mL de THF e 190 μ L (1,36 mmol) de trietilamina. Em seguida, adicionou-se o gota a gota o cloreto de ácido dissolvido em 1 mL de THF, a 0 °C e sob agitação. A mistura reacional adquiriu coloração inicial bege, mas depois ficou marrom. A agitação se prolongou por 1 hora, em banho de gelo, e 10 horas, à temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por CCDS.

O resíduo obtido após a remoção do solvente foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando-se a ordem eluotrópica usual, iniciando-se com uma mistura de *n*-hexano/diclorometano 1:1 e finalizando-se com metanol. Nas frações 4-5, obteve-se um sólido em maior quantidade, que apresentava coloração amarela em CCDS após revelação com sulfato cérico. Esse sólido, que estava impuro, foi cromatografado em coluna de sílica flash, utilizando-se como fase móvel uma mistura de acetato de etila/hexano 6:4 (coluna de 15 cm altura x 0,5 cm diâmetro, 3 g de fase estacionária, fluxo de 1,5 mL/min). Foram obtidos, nas frações 9-17, 62,2 mg de um cristal rosa claro, quase incolor, solúvel apenas em acetona. Este foi identificado como *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-3-carboxamida (**27**), que foi obtido com rendimento de 41,5%.

Análise da placa por CCDS, após revelação com vapores de iodo, demonstrou que o produto desejado apresentou *R_f* intermediário entre o do ácido indol-3-carboxílico e o da 3,4,5-trimetoxianilina.

- ***N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-3-carboxamida (**27**)**

FM/MM: C₁₈H₁₈N₂O₄ / 326,35 g/mol.

Faixa de fusão: 200-201 °C.

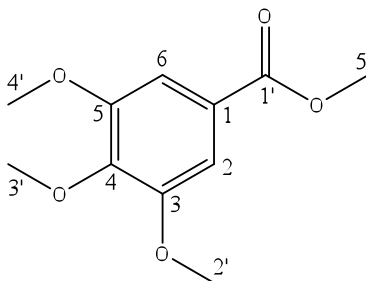
IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3369 (CON-H); 3170 (N-H); 1648 (C=O, amida I); 1600 (N-H, amida II); 1529, 1504 e 1439 (C=C); 1130 (C-O).

RMN de ¹H ((CD₃)₂CO, 200 MHz, δ): 10,86 (sl, 1H, NH); 9,13 (s, 1H, NHCO); 8,38-8,34 (m, 1H, H-4); 8,21 (d, 1H, *J*=2,6 Hz, H-2); 7,52 (m, 1H, H-7); 7,26 (s, 2H, H-2' e H-6'); 7,22-7,18 (m, 2H, H-5 e H-6); 3,79 (s, 6H, H-1'' e H-3''); 3,69 (s, 3H, H-2'').

RMN de ¹³C ((CD₃)₂CO, 50 MHz, δ): 164,18 (C-8), 154,09 (C-3' e C-5'), 137,52 (C-7a), 136,89 (C-1'), 134,79 (C-4'), 128,39 (C-2), 127,46 (C-3a), 123,28 (C-5), 122,24 (C-4), 121,67 (C-6), 112,56 (C-3 e C-7), 98,39 (C-2' e C-6'), 60,54 (C-2''), 56,16 (C-1'' e C-3'').

5 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

5.1 - 3,4,5-trimetoxi-benzoato de metila (17)



O espectro de absorção na região do IV (**Figura 51A**, Anexo 1) de **17** apresentou uma banda em 1713 cm^{-1} , característica da deformação axial da ligação C=O de carbonila de éster aromático; bandas em 1590 , 1507 e 1465 cm^{-1} , referentes às deformações axiais das ligações C=C do anel aromático; e banda em 1127 cm^{-1} , referente à deformação axial das ligações C-O.

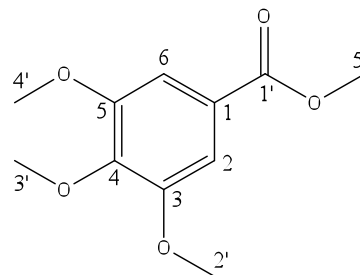
O espectro de RMN de ^1H (**Figura 52A**, Anexo 1) de **17** apresentou apenas dois sinais: um simpleto em δ 7,30, com integral referente a 2 hidrogênios, atribuído aos hidrogênios aromáticos H-2 e H-6; e um simpleto em δ 3,91, referente a 12 hidrogênios, atribuído aos hidrogênios metílicos H-2', H-3', H-4' e H-5'.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 53A**, Anexo 1) de **17** apresentou apenas 8 sinais, devido à sobreposição de alguns sinais: um em δ 166,69, atribuído à carbonila C-1'; quatro na região de aromáticos: 152,94 (C-3 e C-5), 142,17 (C-4), 125,15 (C-1), 106,80 (C-2 e C-6); e três na região de carbonos ligados a heteroátomos: 60,89 (C-3'), 56,22 (C-2' e C-4'), 52,21 (C-5').

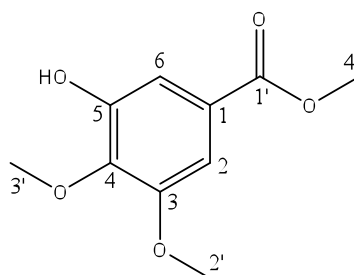
A comparação dos dados de RMN de ^{13}C encontrados para **17** com aqueles descritos por Elsinghorst *et al.* (2006) para o 3,4,5-trimetoxi-benzoato de metila, levou à confirmação de que **17** se tratava dessa substância (**Tabela 1**, pág. 127).

Tabela 1 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C 3,4,5-trimetoxi-benzoato de metila (Elsinghorst *et al.* 2006) com aqueles encontrados para **17**

Cn	Tipo de carbono	3,4,5-trimetoxi-benzoato de metila	17
1	=C	125,12	125,15
2	=C-H	106,78	106,80
3	=C-O	152,91	152,94
4	=C-O	142,16	142,17
5	=C-O	152,91	152,94
6	=C-H	106,78	106,80
1'	C=O	166,68	166,69
2'	O-CH ₃	56,21	56,22
3'	O-CH ₃	60,88	60,89
4'	O-CH ₃	56,21	56,22
5'	O-CH ₃	52,19	52,21



5.2 - 3-hidroxi-4,5-dimetoxi-benzoato de metila (18)



A substância **18** foi obtida como sub-produto da metilação do ácido gálico. A diferença marcante do espectro de absorção na região do IV (**Figura 54A**, Anexo 1) de **18** com relação ao de **17** foi o aparecimento de uma banda em 3373 cm^{-1} , característica da deformação axial da ligação O-H de álcool. Outras bandas importantes apareceram em 1697 cm^{-1} , característica da deformação axial da ligação C=O de carbonila de éster aromático; em 1590 , 1505 e 1466 cm^{-1} , referentes às deformações axiais das ligações C=C do anel aromático; e em 1229 cm^{-1} , referente à deformação axial das ligações C-O.

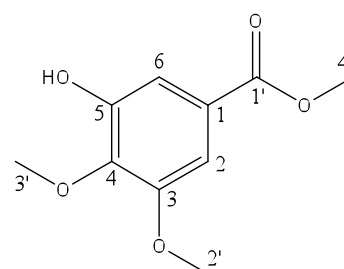
O espectro de RMN de ^1H (**Figura 55A**, Anexo 1) de **18** apresentou seis sinais: um duplete em δ 7,31, com integral referente a 1 hidrogênio, atribuído ao hidrogênio aromático H-2; um duplete em δ 7,20, com integral referente a 1 hidrogênio, atribuído ao hidrogênio aromático H-6; um simpleto largo em δ 6,26,

referente a 1 hidrogênio, atribuído ao hidrogênio da hidroxila; e três simpletos em δ 3,94, 3,90 e 3,89, cada um referente a 3 hidrogênios, atribuídos aos hidrogênios metílicos H-3', H-2' e H-4', respectivamente.

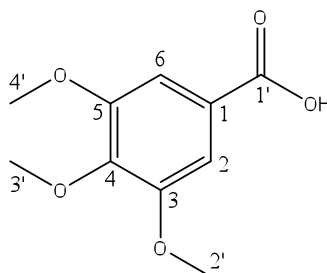
O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 56A**, Anexo 1) de **18** apresentou dez sinais: um em δ 166,85, atribuído à carbonila C-1'; seis na região de aromáticos: 152,10 (C-5), 149,14 (C-3) 139,67 (C-4), 125,57 (C-1), 110,11 (C-2), 105,65 (C-6); e três na região de carbonos ligados a heteroátomos: 60,98 (C-3'), 56,04 (C-2'), 52,25 (C-4'). Por comparação dos dados de RMN de ^{13}C encontrados para **18** com aqueles descritos na literatura (Alam *et al.*, 2005) para o 3-hidróxi-4,5-dimetoxi-benzoato de metila, concluiu-se que **18** se tratava dessa substância (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de 3-hidroxi-4,5-dimetoxi-benzoato de metila (Alam *et al.*, 2005) com aqueles encontrados para **18**

Cn	Tipo de carbono	3-hidroxi-4,5-dimetoxi-benzoato de metila	18
1	=C	125,53	125,57
2	=C-H	109,88	110,11
3	=C-O	148,95	149,14
4	=C-O	139,44	139,67
5	=C-O	151,91	152,10
6	=C-H	105,57	105,65
1'	C=O	166,67	166,85
2'	O-CH ₃	55,96	56,04
3'	O-CH ₃	60,93	60,98
4'	O-CH ₃	52,15	52,25



5.3 - Ácido 3,4,5-trimetoxi-benzóico (19)



As principais diferenças do espectro de absorção na região do IV de **19** (**Figura 57A**, Anexo 1) para aquele de **17** foi o aparecimento de uma banda larga

entre 3017 e 2519 cm^{-1} , característica da deformação axial da ligação O-H de ácido carboxílico e o deslocamento da banda referente à deformação axial de C=O de carbonila de 1713 para 1681 cm^{-1} (devido à menor força de ligação C=O de ácidos carboxílicos). Outras bandas observadas foram em 1585, 1505 e 1465 cm^{-1} , referentes às deformações axiais das ligações C=C do anel aromático; e em 1223 cm^{-1} , referente à deformação axial das ligações C-O.

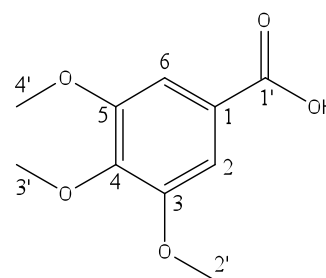
A principal alteração do espectro de RMN de ^1H de **19** (Figura 58A, Anexo 1) para aquele do 3,4,5-trimetoxi-benzoato de metila foi o aparecimento de um sinal em δ 11,08, atribuído ao hidrogênio do ácido carboxílico e a redução do valor da integral do sinal referente aos hidrogênios da metoxila (δ 3,93), de 12 para 9. O sinal dos hidrogênios aromáticos H-2 e H-6 apareceu em δ 7,39, como simpleto.

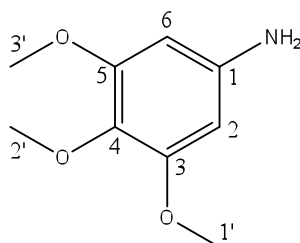
A diferença entre o espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 de **19** (Figura 59A, Anexo 1) para aquele de **17** foi o desaparecimento do sinal referente à metoxila do éster. Os demais sinais apresentaram valores de deslocamento químico muito semelhantes.

Por comparação dos dados de RMN de ^{13}C obtidos para **19** com aqueles encontrados na literatura (Alam & Tsuboi, 2007) para o ácido 3,4,5-trimetoxi-benzóico (Tabela 3), concluiu-se que **19** se tratava dessa substância.

Tabela 3 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C ácido 3,4,5-trimetoxi-benzóico (Alam & Tsuboi, 2007) com aqueles encontrados para **19**

Cn	Tipo de carbono	ácido 3,4,5-trimetoxi-benzóico	19
1	=C	124,04	124,24
2	=C-H	107,30	107,47
3	=C-O	152,86	153,03
4	=C-O	142,86	143,02
5	=C-O	152,86	153,03
6	=C-H	107,30	107,47
1'	C=O	171,98	171,98
2'	O-CH ₃	56,12	56,31
3'	O-CH ₃	60,82	61,03
4'	O-CH ₃	56,12	56,31



5.4 - 3,4,5-trimetoxi-anilina (**20**)

A diferença marcante do espectro de absorção na região do IV de **20** (**Figura 60A**, Anexo 1) com relação aos anteriores, foi a ausência da banda de estiramento C=O de carbonila e o aparecimento de bandas em 3422, 3317 e 3216 cm⁻¹, características da deformação axial da ligação N-H de aminas primárias aromáticas (Silverstein *et al.*, 2007). Outras bandas observadas foram em 1643 cm⁻¹, referente à deformação angular de N-H; em 1590, 1504 e 1471 cm⁻¹, referentes às deformações axiais das ligações C=C do anel aromático; e em 1228 cm⁻¹, referente à deformação axial das ligações C-O.

Uma grande mudança do espectro de RMN de ¹H de **20** (**Figura 61A**, Anexo 1) para aquele de **19** foi o deslocamento do sinal dos hidrogênios aromáticos para campo mais alto: de δ 7,39 foi para δ 5,92. Isso ocorre porque o efeito doador de elétrons por ressonância da anilina blinda mais os hidrogênios aromáticos H-2 e H-6, enquanto a carbonila do ácido exercia efeito contrário (além do efeito anisotrópico, que desprotege os hidrogênios em posição *orto*). Outra alteração foi o aparecimento de um simpleto largo em δ 3,57, referente a 2 hidrogênios, atribuídos aos hidrogênios da amina. Os demais sinais observados no espectro foram: um simpleto em δ 3,79, referente a 6 hidrogênios, atribuído aos hidrogênios metoxílicos H-1' e H-3' e um simpleto em δ 3,57, referente a 3 hidrogênios, atribuído aos hidrogênios metoxílicos H-2'.

A diferença entre o espectro de RMN de ¹³C e subespectro DEPT-135 de **20** (**Figura 62A**, Anexo 1) para aquele de **19** foi a ausência de sinal referente à carbonila. Da mesma forma como ocorreu para os hidrogênios em posição *orto* ao grupo NH₂, seus respectivos carbonos também sofreram maior blindagem (os sinais de C-2 e C-6 apareceram em δ 92,64) devido ao efeito doador de elétrons por ressonância do nitrogênio. O sinal referente a C-3 e C-5 apareceu em δ 153,86, e o de C-4 em δ 130,64. O sinal em δ 61,06 referiu-se ao carbono metoxílico C-2', e o em δ 55,90 referiu-se aos carbonos metoxílicos C-1' e C-3' (**Tabela 5**, pág. 131).

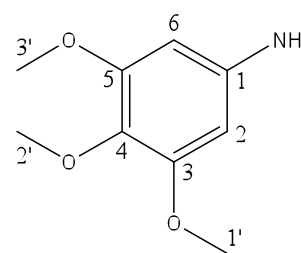
A comparação dos dados do espectro na região do IV encontrados para **20** com aqueles descritos por Gong *et al.* (2009), levou à confirmação de que **20** se tratava dessa substância (**Tabela 4**). Dados de deslocamento de RMN da 3,4,5-trimetoxi-anilina não foram encontrados na literatura.

Tabela 4 – Comparação dos dados do espectro de IV da 3,4,5-trimetoxi-anilina (KBr) (Gong *et al.*, 2009) com aqueles encontrados para **20**

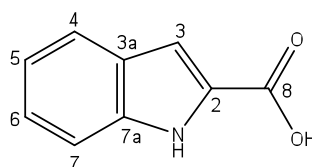
Deformação	Máximo da banda de absorção (cm ⁻¹)	
	3,4,5-trimetóxi-anilina	20
Axial de N-H	3423, 3323, 3217	3422, 3317, 3216
Axial de C=O	1593	1590
Axial de C=C	1507, 1471, 1235	1504, 1471, 1228

Tabela 5 - Dados de RMN de ¹³C de **20**

Cn	Tipo de carbono	20
1	=C-NH ₂	143,08
2	=C-H	92,64
3	=C-O	153,86
4	=C-O	130,64
5	=C-O	153,86
6	=C-H	92,64
1'	O-CH ₃	55,90
2'	O-CH ₃	61,06
3'	O-CH ₃	55,90



5.5 - Ácido indol-2-carboxílico (21)



O ácido indol-2-carboxílico é um produto comercial e sua caracterização estrutural foi realizada a de comparação com as amidas obtidas a partir deste ácido. O espectro de absorção na região do IV de **21** (**Figura 63A**, Anexo 1) apresentou banda em 3346 cm⁻¹, característica da deformação axial da ligação N-H de amina; banda larga entre 3427 e 2000 cm⁻¹, característica da deformação axial da ligação

O-H de ácido carboxílico; banda em 1667 cm^{-1} , característica da deformação axial C=O de ácido carboxílico conjugado; bandas em 1577 , 1516 e 1438 cm^{-1} , referentes às deformações axiais das ligações C=C do anel aromático; e banda em 1187 cm^{-1} , característica da deformação axial da ligação C-O.

O espectro de RMN de ^1H de **21** (**Figura 64A**, Anexo 1) apresentou 5 sinais, cada um referente a 1 hidrogênio: dois dupletos em δ 7,62 ($J=8,0\text{ Hz}$) e 7,44 ($J=8,2\text{ Hz}$), atribuídos aos hidrogênios H-4 e H-7, respectivamente; dois tripletos em δ 7,24 ($J=7,6\text{ Hz}$) e 7,05 ($J=7,5\text{ Hz}$), atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-5, respectivamente; e um simpleto δ 7,16 ($J=7,6\text{ Hz}$), atribuído ao H-3 (**Tabela 6**). O sinal do hidrogênio da amina não apareceu devido à troca rápida com o solvente, o CD_3OD .

O espectro de RMN de ^{13}C de **21** (**Figura 65A**, Anexo 1) apresentou sinais compatíveis com aqueles encontrados na literatura para o ácido indol-2-carboxílico (Ríos *et al.*, 1987) (**Tabela 7**).

Tabela 6 – Dados de RMN de ^1H de **21**

H	21
H-3	7,16 (s, 1H*)
H-4	7,62 (d, 1H, $J=8,0\text{ Hz}$)
H-5	7,05 (t, 1H, $J=7,5\text{ Hz}$)
H-6	7,24 (t, 1H*, $J=7,6\text{ Hz}$)
H-7	7,44 (d, 1H, $J=8,2\text{ Hz}$)

* Sinal sobreposto

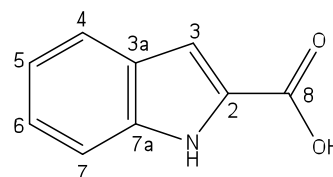
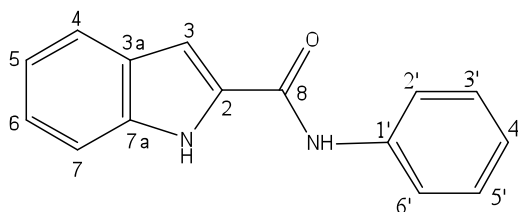


Tabela 7 - Comparação dos dados de RMN de ^{13}C do ácido indol-2-carboxílico ($\text{CDCl}_3\text{-DMSO-}d_6$) (Ríos *et al.*, 1987) com aqueles encontrados para **21**

Cn	Tipo de carbono	ácido indol-2-carboxílico	21
2	=C	128,4	129,16
3	=C-H	107,5	109,28
3a	=C	127,1	128,71
4	=C-H	121,8	123,08
5	=C-H	120,0	121,21
6	=C-H	124,2	125,75
7	=C-H	112,5	113,17
7a	=C	137,4	138,95
8	=COOH	não informado	165,13

5.6 - *N*-fenil-1*H*-indol-2-carboxamida (22)

As principais diferenças encontradas no espectro de absorção na região do IV de **22** (**Figura 66A**, Anexo 1) com relação àquele de **21** foram: o desaparecimento da banda larga de estiramento da ligação O-H de ácido carboxílico; o aparecimento de banda em 3400 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação N-H da amida secundária; e o aparecimento de banda em 1618 cm^{-1} , característica da deformação angular da ligação N-H de amidas (banda de amida II). Outras bandas observadas foram: em 3350 cm^{-1} , característica da deformação axial da ligação N-H de amina; e bandas em 1595 , 1528 , 1490 e 1441 cm^{-1} , referentes às deformações axiais das ligações C=C de anel aromático.

O espectro de RMN de ^1H de **22** (**Figura 67A**, Anexo 1) apresentou os sinais característicos do núcleo indólico de **21**, com pequenas variações, além dos sinais referentes aos hidrogênios da anilina: um duplete referente a 2 hidrogênios em δ 7,74 ($J=7,6\text{ Hz}$), atribuído aos hidrogênios H-2' e H-6'; um tripleto referente a 2 hidrogênios em δ 7,37 ($J=7,8\text{ Hz}$), atribuído aos hidrogênios H-3' e H-5'; e um tripleto em δ 7,14 ($J=7,4\text{ Hz}$), atribuído ao H-4' (**Tabela 8**, pág. 134).

O espectro de RMN de ^{13}C e o subespectro DEPT-135 (**Figura 68A**, Anexo 1) de **22** também apresentaram os sinais característicos do núcleo indólico de **21**, com pequenas variações, além da presença adicional dos sinais referentes aos carbonos da anilina (**Tabela 9**, pág. 134).

Como os sinais ficam muito próximos, a utilização dos mapas de contornos COSY (**Figura 69A**, Anexo 1), HMQC (**Figura 70A**, Anexo 1) e HMBC (**Figura 71A**, Anexo 1) foram cruciais para a atribuição inequívoca dos carbonos e hidrogênios.

O mapa de contornos COSY (**Figura 69A**, Anexo 1), através das correlações entre os hidrogênios H-4/H-5, H-5/H-6 e H-6/H-7, confirmou a atribuição dos hidrogênios do esqueleto indólico. Já as correlações entre H-4'/H-3' e H-5', H-3'/H-2 e H-5'/H-6', contribuiu para confirmar as atribuições dos hidrogênios da anilina.

No mapa de contornos HMQC (**Figura 70A**, Anexo 1) foram observadas as correlações de todos carbonos hidrogenados com seus respectivos hidrogênios. No

mapa de contornos HMBC (Figura 71A, Anexo 1) foram observadas algumas correlações do esqueleto indólico: H-3/C-2 e C-7a; H-4/C-6 e C-7a; H-5/C-3a e C-7; H-6/C-4 e C-7a; H-7/C-3a e C-5; além das correlações referentes à anilina: H-2'/C-4' e C-6'; H-3'/C-1' e C-5'; H-4'/C-2'; H-5'/C-1' e C-3'; H-6'/C-2' e C-4'.

O espectro de Massas de **22** foi obtido por ionização por spray eletrostático (ESI/MS), no modo negativo. Foi observado pico em m/z 234,9 $[M-1]^-$ (Figura 72A, Anexo 1), o que confirma a obtenção da *N*-fenil-1*H*-indol-2-carboxamida. Não foram encontrados dados de RMN de ^{13}C na literatura para este composto.

Tabela 8 – Comparação dos dados de RMN de 1H da *N*-fenil-1*H*-indol-2-carboxamida (DMSO- d_6 ; 250 MHz) (Mahboobi *et al.*, 2002) com aqueles encontrados para **22**

H	<i>N</i> -fenil-1 <i>H</i> -indol-2-carboxamida	22
H-3	7,34-7,49 (m, 1H*)	7,32 (s, 1H)
H-4	7,66-7,70 (m, 1H)	7,66 (d, 1H, $J=8,0$ Hz)
H-5	7,04-7,14 (m, 1H*)	7,10 (t, 1H*, $J=7,6$ Hz)
H-6	7,19-7,26 (m, 1H)	7,25 (t, 1H*, $J=7,8$ Hz)
H-7	7,34-7,49 (m, 1H*)	7,49 (d, 1H, $J=8,4$ Hz)
H-2'	7,80-7,83 (m, 1H*)	7,74 (d, 1H*, $J=7,6$ Hz)
H-3'	7,34-7,49 (m, 1H*)	7,37 (t, 1H*, $J=7,8$ Hz)
H-4'	7,04-7,14 (m, 1H*)	7,14 (t, 1H, $J=7,4$ Hz)
H-5'	7,34-7,49 (m, 1H*)	7,37 (t, 1H*, $J=7,8$ Hz)
H-6'	7,80-7,83 (m, 1H*)	7,74 (d, 1H*, $J=7,6$ Hz)

* Sinal sobreposto

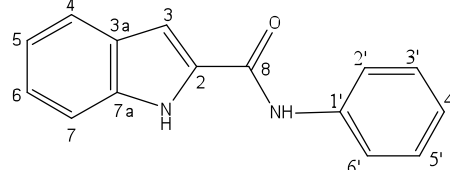
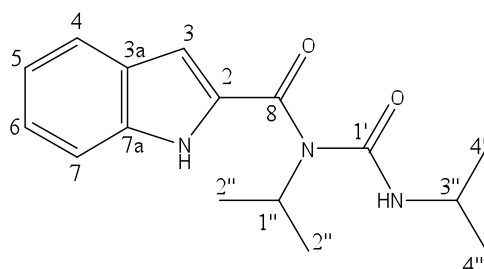


Tabela 9 – Dados de RMN de ^{13}C de **22**

Cn	Tipo de carbono	22	Cn	Tipo de carbono	22
2	=C-H	132,39	8	C=O	162,11
3	=C	105,05	1'	=C	139,72
3a	=C	128,95	2'	=C-H	121,91
4	=C-H	122,87	3'	=C-H	129,76
5	=C-H	121,21	4'	=C-H	125,25
6	=C-H	125,25	5'	=C-H	129,76
7	=C-H	113,07	6'	=C-H	121,91
7a	=C	138,46			

5.7 - *N*-isopropil-*N*-(isopropilcarbamoil)-1*H*-indol-2-carboxamida (**23**)

O espectro de absorção na região do IV de **23** (**Figura 73A**, Anexo 1) apresentou banda em 3292 cm^{-1} , característica da deformação axial da ligação N-H de amina; banda em 1698 cm^{-1} , característica da deformação axial de carbonila de éster conjugado; banda em 1674 cm^{-1} , característica da deformação axial da ligação C=N; bandas em 1534 , 1515 e 1464 cm^{-1} , referentes às deformações axiais das ligações C=C do anel aromático.

Como não era esperado a formação deste produto, logo pensou-se na possibilidade do isolamento de um intermediário da reação. Assim, o padrão dos sinais de RMN de ^1H para **23** foi bem sugestivo da presença de um esqueleto derivado da carbodiimida (DIC) utilizada na reação. O espectro de RMN de ^1H de **23** (**Figura 74A**, Anexo 1) apresentou, além dos sinais característicos do núcleo indólico, dois heptetos em δ 4,73 ($J=6,8\text{ Hz}$) e δ 3,83 ($J=6,6\text{ Hz}$), cada um com integral referente a 1 hidrogênio, atribuídos aos hidrogênios H1'' e H-3'', respectivamente; e dois dupletos em δ 1,38 ($J=6,8\text{ Hz}$) e δ 0,97 ($J=6,6\text{ Hz}$), cada um referente a 6 hidrogênios, atribuídos aos hidrogênios H-2'' e H-4'', respectivamente (**Tabela 10**, pág. 136). O espectro de RMN de ^{13}C e o subespectro DEPT-135 (**Figura 75A**, Anexo 1) de **23** também apresentaram os sinais característicos do núcleo indólico de **21**, com pequenas variações, além da presença adicional dos sinais referentes ao esqueleto derivado da carbodiimida, que foram atribuídos com o auxílio do mapa de contornos HMQC (**Figura 77A**, Anexo 1): um sinal em δ 156,49, referente a um carbono não hydrogenado, atribuído ao C-1'; um sinal em δ 48,44, atribuído ao H-1''; um sinal em δ 44,52, atribuído ao C-3''; um sinal em δ 20,86, atribuído aos C-2''; e um sinal em δ 21,80, atribuído aos C-4'' (**Tabela 11**, pág. 136).

No mapa de contornos COSY (**Figura 76A**, Anexo 1), além das correlações esperadas para o esqueleto indólico: entre H-4/H-5, H-5/H-6 e H-6/H-7, observaram-se também correlações entre H-1''/H-2'' e H-3''/H-4''.

O mapa de contornos HMBC (**Figura 78A**, Anexo 1) apresentou as correlações características do esqueleto indólico: H-3/C-3a e C-7a; H-4/C-3, C-6 e C-7a; H-5/C-2 e C-7; H-6/C-4 e C-7a; H-7/C-2 e C-5; e além das correlações entre H-1''/C-2'', H-2''/C-1'', H-3''/C-4'' e H-4''/C-3''.

Baseado em todos os dados espectrométricos obtidos, foi proposta a estrutura da *N*-isopropil-*N*-(isopropilcarbamoil)-1*H*-indol-2-carboxamida **23**. Não foi encontrada nenhuma referência na literatura para este composto.

Tabela 10 – Dados de RMN de ^1H de **23**

H	23
H-3	6,68 (s, 1H)
H-4	7,57 (d, 1H, $J=8,0$ Hz)
H-5	7,05 (t, 1H, $J=7,1$ Hz)
H-6	7,21 (t, 1H, $J=7,1$ Hz)
H-7	7,43 (d, 1H, $J=8,4$ Hz)
H-1''	4,73 (hepteto, 1H, $J=6,8$ Hz)
H-2''	1,38 (d, 1H, $J=6,8$ Hz)
H-3''	3,83 (hepteto, 1H, $J=6,6$ Hz)
H-4''	0,97 (d, 1H, $J=6,6$ Hz)

* Sinal sobreposto

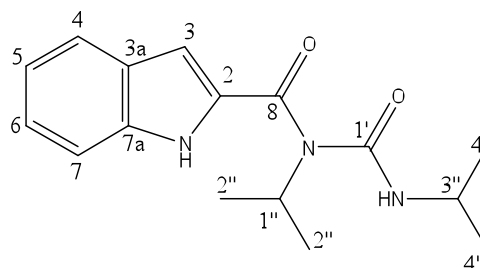
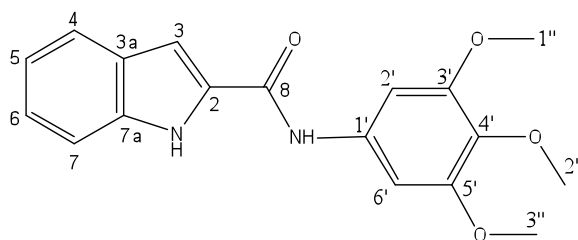


Tabela 11 - Dados de RMN de ^{13}C de **23**

Cn	Tipo de carbono	23	Cn	Tipo de carbono	23
2	=C	128,52	7a	=C	138,00
3	=C-H	106,26	8	C=O	163,26
3a	=C	131,63	1'	C=N	156,49
4	=C-H	122,76	1''	C-N	48,44
5	=C-H	121,22	2''	CH ₃	20,86
6	=C-H	125,29	3''	C-N	44,52
7	=C-H	112,89	4''	CH ₃	21,80

5.8 - N-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1H-indol-2-carboxamida (24)

O espectro de absorção na região do IV de **24** (**Figura 79A**, Anexo 1) apresentou bastante semelhança àquele de **22**: banda em 3395 cm^{-1} , característica da deformação axial da ligação N-H de amida secundária; banda em 3343 cm^{-1} , característica da deformação axial da ligação N-H de amina; banda em 1647 cm^{-1} , característica da deformação axial de carbonila de amida (banda de amida I); banda em 1600 cm^{-1} , característica da deformação angular da ligação N-H de amidas (banda de amida II); e bandas em 1547 , 1506 e 1448 cm^{-1} , referentes às deformações axiais das ligações C=C do anel aromático. A principal diferença foi o aparecimento da banda em 1130 cm^{-1} , referente ao estiramento C-O dos grupos metoxilas.

O espectro de RMN de ^1H de **24** (**Figura 80A**, Anexo 1) apresentou os sinais característicos do núcleo indólico de **21**, com pouquíssimas variações, além da presença adicional de um simpleto referente a 2 hidrogênios em δ 7,02, atribuído aos H-2' e H-6', um simpleto em δ 3,88, referente a 6 hidrogênios, atribuído aos hidrogênios H-1'' e H-3'', e um simpleto em δ 3,71, referente a 3 hidrogênios, atribuído aos hidrogênios H-2'' (**Tabela 12**, pág. 138). Os hidrogênios aromáticos H-2' e H-6' não apresentaram o mesmo deslocamento químico àquele observado para os hidrogênios H-2 e H-6 de **20**, porque agora o par de elétrons do nitrogênio compete pela ressonância com a carbonila, reduzindo assim a densidade eletrônica sobre esses hidrogênios.

O espectro de RMN de ^{13}C e o subespectro DEPT-135 (**Figura 81A**, Anexo 1) de **24** também apresentaram os sinais característicos do núcleo indólico de **21**, com pequenas variações, além da presença adicional dos sinais referentes aos carbonos da 3,4,5-trimetoxi-anilina (**Tabela 13**, pág. 138). Da mesma forma como ocorreu com os hidrogênios, os sinais dos carbonos C-2', C-4' e C-6' apareceram mais desblindados, devido à competição dos elétrons do nitrogênio amídico pela ressonância com a carbonila.

Os mapa de contornos COSY (**Figura 82A**, Anexo 1) apresentou correlações entre os hidrogênios H-4/H-5 e H-6/H-7 do anel indólico. No mapa de contornos HMQC (**Figura 83A**, Anexo 1) foram observadas as correlações de todos carbonos hidrogenados com seus respectivos hidrogênios. Finalmente, no HMBC (**Figura 84A**, Anexo 1) puderam ser observadas correlações do esqueleto indólico H-3/C-2, C3a e C-7a; H-4/C-3, C-6 e C-7a; H-5/C3a e C-7; H-6/C-4 e C-7a; H-7/C3a e C-5. Do esqueleto da 3,4,5-trimetoxianilina, foram observadas as correlações entre NHCO/C-2' e C-6'; H-1''/C-3'; H-2''/C-1', C-3', C-4' e C-6'; H-6'/C-1'; H-6'/C-2'; H-6'/C-3'; H-2''/C-4'; H-6'/C-4'; H-3''/C-5'; e H-6'/C-5'.

Tabela 12 – Dados de RMN de ^1H de **24**

H	24
N-H	11,24 (s, 1H)
NHCO	9,80 (s, 1H)
H-3	7,38 (s, 1H)
H-4	7,66 (d, 1H, $J=8,0$ Hz)
H-5	7,08 (t, 1H, $J=7,6$ Hz)
H-6	7,24 (t, 1H, $J=8,0$ Hz)
H-7	7,55 (d, 1H, $J=8,4$ Hz)
H-2'	7,31 (s, 1H*)
H-6'	7,31 (s, 1H*)
H-1''	3,83 (s, 3H*)
H-2''	3,71 (s, 3H)
H-3''	3,83 (s, 3H*)

* Sinal sobreposto

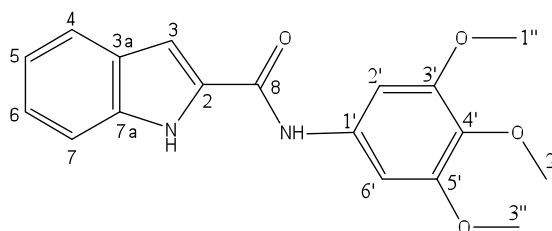
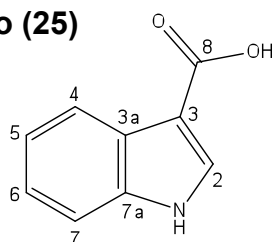


Tabela 13 – Dados de RMN de ^{13}C de **24**

Cn	Tipo de carbono	24	Cn	Tipo de carbono	24
2	=C	132,61	1'	=C	136,04
3	=C-H	103,94	2'	=C-H	98,80
3a	=C	128,73	3'	=C-O	154,30
4	=C-H	122,71	4'	=C-O	135,57
5	=C-H	121,10	5'	=C-O	154,30
6	=C-H	124,98	6'	=C-H	98,80
7	=C-H	113,14	1''	O-CH ₃	56,35
7a	=C	138,03	2''	O-CH ₃	60,64
8	C=O	160,52	3''	O-CH ₃	56,35

O espectro de Massas de **24** foi obtido por ionização por spray eletrostático (ESI/MS), no modo negativo. Foi observado pico em m/z 325,0 $[M-1]^-$ (**Figura 85A**, Anexo 1), o que confirma a obtenção da *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-2-carboxamida. Não foi encontrada nenhuma referência na literatura para este composto.

5.9 - Ácido indol-3-carboxílico (**25**)



O ácido indol-3-carboxílico é um produto comercial e sua caracterização estrutural foi realizada a fim de comparação com as amidas obtidas a partir deste ácido. O espectro de absorção na região do IV de **25** (**Figura 86A**, Anexo 1) apresentou banda em 3297 cm^{-1} , característica da deformação axial da ligação N-H de amina; banda larga entre 3297 e 2000 cm^{-1} , característica da deformação axial da ligação O-H de ácido carboxílico; banda em 1621 cm^{-1} , característica da deformação axial C=O de ácido carboxílico conjugado; e bandas em 1580 , 1519 e 1440 cm^{-1} , referentes às deformações axiais das ligações C=C do anel aromático.

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C do ácido indol-3-carboxílico (**25**) (**Figuras 87 e 88**, Anexo 1) apresentaram sinais análogos àqueles descritos na literatura (Hagemeier *et al.*, 2001). Os sinais dos hidrogênios aromáticos do anel benzênico apareceram entre δ 8,08 e 7,18 e aquele relativo ao H-2 apareceu em δ 7,96 como um simpleto (**Tabela 14**). O sinal do carbono da carbonila apareceu em δ 169,28. Os sinais referentes aos carbonos aromáticos foram observados entre δ 138,16 e 108,66 (**Tabela 15**, pág. 140).

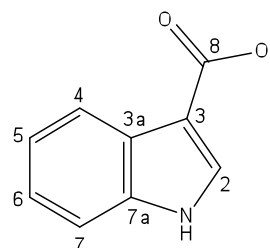
Tabela 14 – Comparação dos dados de RMN de ^1H do ácido indol-3-carboxílico (Hagemeier *et al.*, 2001) com aqueles encontrados para **25**

H	ácido indol-3-carboxílico	25
H-2	7,94 (s)	7,96 (s, 1H)
H-4	8,06 (dd, $J = 7,7$ e $1,3$)	8,10-8,06 (m, 1H)
H-5	7,16 (ddd, $J = 7,7$; $7,7$ e $1,3$)	7,20-7,16 (m*, 1H)
H-6	7,19 (ddd, $J = 7,7$; $7,7$ e $1,3$)	7,20-7,16 (m*, 1H)
H-7	7,43 (dd, $J = 7,7$ e $1,3$)	7,18-7,14 (m, 1H)

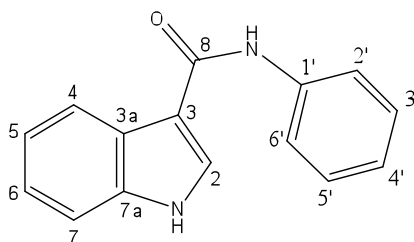
* Sinal sobreposto

Tabela 15 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C do ácido indol-3-carboxílico (Hagemeier *et al.*, 2001) com aqueles encontrados para **25**

Cn	Tipo de carbono	ácido indol-3-carboxílico	25
2	=C-H	133,4	133,41
3	=C	108,7	108,66
3a	=C	127,6	127,51
4	=C-H	122,0	121,99
5	=C-H	122,4	122,38
6	=C-H	123,6	123,58
7	=C-H	112,9	112,88
7a	=C	138,2	138,16
8	COOH	não detectado	169,28



5.10 - *N*-fenil-1*H*-indol-3-carboxamida (**26**)



O espectro de absorção na região do IV de **26** (Figura 89A, Anexo 1) apresentou bastante semelhança àquele de **22**: banda em 3372 cm^{-1} , característica da deformação axial da ligação N-H de amida secundária; bandas em 3255 e 3230 cm^{-1} , características da deformação axial da ligação N-H de amina; banda em 1638 cm^{-1} , característica da deformação axial de carbonila de amida (banda de amida I); banda em 1617 cm^{-1} , característica da deformação angular da ligação N-H de amidas (banda de amida II); e bandas em 1594 , 1523 , 1498 e 1455 cm^{-1} , referentes às deformações axiais das ligações C=C do anel aromático.

O espectro de RMN de ^1H de **26** (Figura 90A, Anexo 1) apresentou os sinais característicos do núcleo indólico de **25**, com pequenas variações, além dos sinais referentes aos hidrogênios da anilina: um duplete referente a 2 hidrogênios em δ 7,26 ($J=7,6\text{ Hz}$), atribuído aos hidrogênios H-2' e H-6'; um tripleto referente a 2 hidrogênios em δ 7,30 ($J=7,6\text{ Hz}$), atribuído aos hidrogênios H-3' e H-5'; e um tripleto em δ 7,08 ($J=7,6\text{ Hz}$), atribuído ao H-4' (Tabela 16, pág. 141).

O espectro de RMN de ^{13}C e o subespectro DEPT-135 (**Figura 91A**, Anexo 1) de **26** também apresentaram os sinais característicos do núcleo indólico de **25**, com pequenas variações, além da presença adicional dos sinais referentes aos carbonos da anilina (**Tabela 17**, pág. 142).

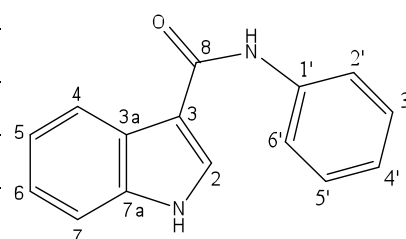
A utilização dos mapas de contornos COSY (**Figura 92A**, Anexo 1), HMQC (**Figura 93A**, Anexo 1) e HMBC (**Figura 94A**, Anexo 1) foi crucial para a atribuição inequívoca dos carbonos e hidrogênios.

O mapa de contornos COSY (**Figura 92A**, Anexo 1) apresentou correlações do esqueleto indólico entre os hidrogênios H-4/H-5; H-7/H-6. Também apareceram correlações entre H-2'/H-3'; H-4'/H-3' e H-5'; e H-6'/H-5', do esqueleto da anilina.

No mapa de contornos HMQC (**Figura 93A**, Anexo 1) foram observadas as correlações de todos carbonos hidrogenados com seus respectivos hidrogênios. Finalmente, no mapa de contornos HMBC (**Figura 94A**, Anexo 1) puderam ser observadas correlações do esqueleto indólico: H-2/C-3, C-3a e C-7a; H-4/C-3a e C-5; H-5/C-3a, C-7 e C-7a; H-6/C-3a, C-7 e C-7a; H-7/C-6 e C-7a; além das correlações referentes à anilina: H-2'/C-1', C-4' e C-6'; H-3'/C-1' e C-5'; H-4'/C-2', C-3', C-5' e C-6'; H-5'/C-1', C-3'; H-6'/C-1', C-2' e C-4'.

Tabela 16 – Comparação dos dados de RMN de ^1H da *N*-fenil-1*H*-indol-3-carboxamida (DMSO- d_6 ; 400 MHz) (Litina *et al.*, 2010) com aqueles encontrados para **26**

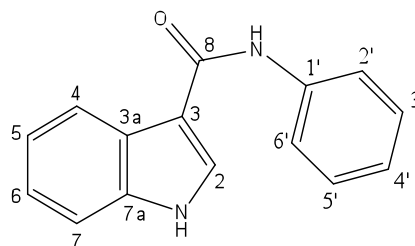
H	<i>N</i> -fenil-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida	26
N-H	11,73 (s, 1H)	não detectado
NHCO	9,71 (s, 1H)	não detectado
H-2	8,29 (s, 1H)	8,07 (s, 1H)
H-4	7,47 (d, 1H, $J=7,6$ Hz)	8,20 (d, 1H, $J=6,8$ Hz)
H-5	7,16 (2t, 1H*, $J=7,6$ Hz)	7,22-7,15 (m, 1H*)
H-6	7,11 (2t, 1H*, $J=7,6$ Hz)	7,22-7,15 (m, 1H*)
H-7	8,19 (d, 1H, $J=7,6$ Hz)	7,48 (d, 1H, $J=6,8$ Hz)
H-2'	7,77 (d, 1H*, $J=7,6$ Hz)	7,26 (d, 1H*, $J=7,6$ Hz)
H-3'	7,30 (t, 1H*, $J=7,6$ Hz)	7,30 (t, 1H*, $J=7,6$ Hz)
H-4'	7,03 (t, 1H, $J=7,6$ Hz)	7,08 (t, 1H, $J=7,6$ Hz)
H-5'	7,30 (t, 1H*, $J=7,6$ Hz)	7,30 (t, 1H*, $J=7,6$ Hz)
H-6'	7,77 (d, 1H*, $J=7,6$ Hz)	



* Sinal sobreposto

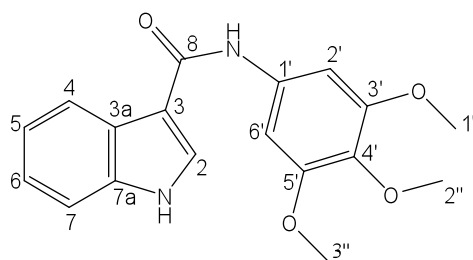
Tabela 17 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C da *N*-fenil-1*H*-indol-3-carboxamida (Litina *et al.*, 2010) com aqueles encontrados para **26**

Cn	Tipo de carbono	<i>N</i> -fenil-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida	26
2	=C-H	129,1	129,41
3	=C	111,0	112,02
3a	=C	136,7	127,56
4	=C-H	121,1	122,12
5	=C-H	121,6	122,12
6	=C-H	122,6	123,64
7	=C-H	112,4	112,78
7a	=C	126,9	138,11
8	C=O	166,5	166,81
1'	=C	140,3	140,20
2'	=C-H	120,2	122,03
3'	=C-H	129,0	129,71
4'	=C-H	123,1	124,82
5'	=C-H	129,0	129,71
6'	=C-H	120,2	122,03



A atribuição dos carbonos C-3a e C-7a está propositalmente invertida com aquela descrita na literatura (Litina *et al.*, 2010), devido às correlações encontradas no mapa de contornos HMBC.

O espectro de Massas de **26** foi obtido por ionização por spray eletrostático (ESI/MS), no modo negativo. Foi observado pico em m/z 234,9 $[\text{M}-1]^-$ (**Figura 95A**, Anexo 1), o que confirma ainda mais a obtenção da *N*-fenil-1*H*-indol-3-carboxamida.

5.11 - *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-3-carboxamida (**27**)

As principais diferenças encontradas no espectro de absorção na região do IV de **27** (**Figura 96A**, Anexo 1) com relação àquele de **25** foram: o desaparecimento da banda larga de estiramento da ligação O-H de ácido carboxílico; o aparecimento de banda em 3369 cm^{-1} , referente à deformação axial da ligação N-H da amida secundária; o aparecimento de banda em 1600 cm^{-1} , característica da deformação angular da ligação N-H de amidas (banda de amida II); e o aparecimento de banda em 1130 cm^{-1} , referente ao estiramento C-O dos grupos metoxilas. Outras bandas observadas foram em 3170 cm^{-1} , característica da deformação axial da ligação N-H de amina; e bandas em 1529 , 1504 e 1439 cm^{-1} , referentes às deformações axiais das ligações C=C de anel aromático. Esse espectro também apresentou bastante semelhança com aquele de **24**.

O espectro de RMN de ^1H de **27** (**Figura 97A**, Anexo 1) apresentou sinais característicos do núcleo indólico de **25**, com pequenas variações, além da presença adicional de um simpleto largo em δ 10,86, com integral referente a 1 hidrogênio, atribuído ao hidrogênio ligado ao nitrogênio do núcleo indólico; um simpleto em δ 9,13, com integral referente a 1 hidrogênios, atribuído ao hidrogênio do nitrogênio da amida; um simpleto referente a 2 hidrogênios em δ 7,26, atribuído aos hidrogênios H-2' e H-6'; um simpleto em δ 3,79 referente a 6 hidrogênios, atribuído aos hidrogênios metoxílicos H-1'' e H-3''; e um simpleto em δ 3,69 referente a 3 hidrogênios, atribuído aos hidrogênios metoxílicos H-2'' (**Tabela 18**, pág. 144).

O espectro de RMN de ^{13}C e o subespectro DEPT-135 (**Figura 98A**, Anexo 1) de **27** também apresentaram os sinais característicos do núcleo indólico de **25**, com pequenas variações, além da presença adicional dos sinais referentes aos carbonos da 3,4,5-trimetoxi-anilina (**Tabela 19**, pág. 145).

O mapa de contornos COSY (**Figura 99A**, Anexo 1), através das correlações entre os hidrogênios N-H/H-2, H-4/H-5, H-6/H-7, H-2'/H-1'' e H-6'/H-3'' contribuiu para confirmar as atribuições propostas.

No mapa de contornos HMQC (**Figura 100A**, Anexo 1) foram observadas as correlações de todos carbonos hidrogenados com seus respectivos hidrogênios. No mapa de contornos HMBC (**Figura 101A**, Anexo 1) puderam ser observadas correlações do núcleo indólico entre H-2/C-3; C-3a, C-4 e C-7a; H-4/C-3a e C-5; H-5/C-3a, C-4 e C-7; H-6/C-3a, C-4 e C-7; H-7/C-4, C-6 e C-7a. Também ficou evidenciada a ligação amídica com a correlação NHCO/C-8. A parte correspondente à 3,4,5-trimetoxi-anilina apresentou as correlações NHCO/C-2' e C-6'; H-6'/C-2'; H-2'/C-3', C-4', C-5' e C-6'; H-6'/C-3', C-4' e C-5'; H-1''/C-3'; H-2''/C-4'; e H-3''/C-5'. A atribuição dos carbonos C-2, C-3, C-4 e C-7a está propositalmente em desacordo com aquela descrita na literatura (Magoulas & Papaioannou, 2004), devido às correlações encontradas no mapa de contornos HMQC e HMBC.

O espectro de Massas de **27** foi obtido por ionização por spray eletrostático (ESI/MS), no modo negativo. Foi observado pico em m/z 325,0 [M-1]⁻ (**Figura 102A**, Anexo 1), o que confirma a obtenção da *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-3-carboxamida.

Tabela 18 – Comparação dos dados de RMN de ¹H da *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-3-carboxamida (CD₃Cl₃; 400 MHz) (Magoulas & Papaioannou, 2004) com aqueles encontrados para **27**

H	<i>N</i> -(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida	27
N-H	10,96 (sl, 1H)	10,86 (sl, 1H)
NHCO	9,00 (s, 1H)	9,13 (s, 1H)
H-2	8,07 (d, 1H, $J=2,9$ Hz)	8,21 (d, 1H, $J=2,6$ Hz)
H-4	7,45 (m, 1H)	8,38-8,34 (m, 1H)
H-5	7,24 (m, 1H [*])	7,22-7,18 (m, 1H [*])
H-6	7,24 (m, 1H [*])	7,22-7,18 (m, 1H [*])
H-7	8,26 (m, 1H)	7,52-7,48 (m, 1H)
H-2'	7,17 (s, 1H [*])	7,26 (s, 1H [*])
H-6'	7,17 (s, 1H [*])	7,26 (s, 1H [*])
H-1''	não informado	3,79 (s, 3H [*])
H-2''	não informado	3,69 (s, 3H)
H-3''	não informado	3,79 (s, 3H [*])

* Sinal sobreposto

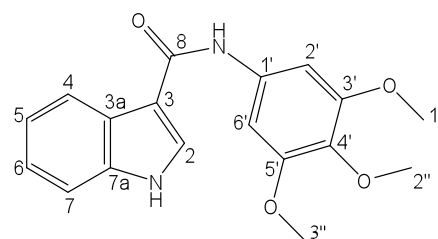
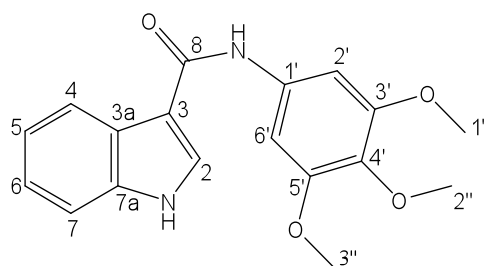


Tabela 19 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-3-carboxamida (CD_3Cl_3 ; 400 MHz) (Magoulas & Papaioannou, 2004) com aqueles encontrados para **27**

Cn	Tipo de carbono	<i>N</i> -(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1 <i>H</i> -indol-3-carboxamida	27
2	=C-H	134,01	128,39
3	=C	128,70	112,56
3a	=C	126,34	127,46
4	=C-H	112,29	122,24
5	=C-H	121,46	123,28
6	=C-H	121,37	121,67
7	=C-H	111,87	112,56
7a	=C	122,81	137,52
8	C=O	166,52	164,18
1'	=C	135,99	136,89
2'	=C-H	98,17	98,39
3'	=C-O	153,35	154,09
4'	=C-O	não informado	134,79
5'	=C-O	153,35	154,09
6'	=C-H	98,17	98,39
1''	O-CH ₃	56,31	56,16
2''	O-CH ₃	61,15	60,54
3''	O-CH ₃	56,31	56,16



6 TESTE DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

6.1 - Avaliação da atividade alelopática dos materiais de partida e amidas sintetizadas sobre a germinação das sementes e o crescimento das raízes e do caule de plantículas de *Lactuca sativa* (alface) e *Allium cepa* (cebola)

6.1.1 – Metodologia de ensaio

A avaliação da atividade alelopática foi feita utilizando-se a mesma metodologia descrita para a avaliação das substâncias isoladas de *B. anisandra* (item 6.2.2, pág. 90). A única diferença foi a variedade e o fabricante da cebola, que desta vez foi com a variedade Baia Periforme, do fabricante TOPSEED Garden (nº lote: 007947).

Amostras testadas

- 1: ácido indol-2-carboxílico
- 2: ácido indol-3-carboxílico
- 3: 3,4,5-trimetoxi-anilina
- 4: *N*-fenil-1*H*-indol-2-carboxamida
- 5: *N*-fenil-1*H*-indol-3-carboxamida
- 6: *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-2-carboxamida
- 7: *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-3-carboxamida
- 8: *N*-isopropil-*N*-(isopropilcarbamoil)-1*H*-indol-2-carboxamida

6.1.2 - Discussão dos resultados

6.1.2.1 - Efeito sobre *Lactuca sativa*

Os efeitos dos compostos testados sobre a germinação e o crescimento da raiz e do caule de *L. sativa* (alface) estão apresentados nas **Figuras 13 e 14** (pág. 147 e 148).

Com exceção da *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-2-carboxamida (6), todas as substâncias testadas apresentaram grande inibição da germinação da alface na concentração de 100 µmol/L, sendo que a 3,4,5-trimetoxi-anilina (3) inibiu 100% da germinação nesta concentração. A *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-3-carboxamida (7) exerceu atividade inibitória significativa mesmo na concentração de 1 µmol/L: 61%. Dessa maneira, fica claro que a associação do

ácido indol-3-carboxílico (3) com a 3,4,5-trimetoxi-anilina (3) levou à formação de uma amida com maior atividade alelopática. O ácido indol-3-carboxílico (2) também apresentou atividade inibitória sobre a germinação na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$: 28%. As demais substâncias apresentaram efeito inibitório da germinação nessa concentração, mas pouco significativos.

O ácido indol-3-carboxílico (2) foi mais ativo que o ácido indol-2-carboxílico (1), mas o mesmo não pode ser dito para os seus derivados. Por exemplo, o derivado da anilina com o ácido indol-3-carboxílico (5) foi menos ativo que o seu derivado com o ácido indol-2-carboxílico (4), enquanto o derivado da 3,4,5-trimetoxi-anilina com o ácido indol-3-carboxílico (7) foi mais ativo que o seu derivado com o ácido indol-2-carboxílico (6).

Todos os derivados do ácido indol-2-carboxílico estimularam a germinação da alface na menor concentração, mas nenhum demonstrou atividade significativa.

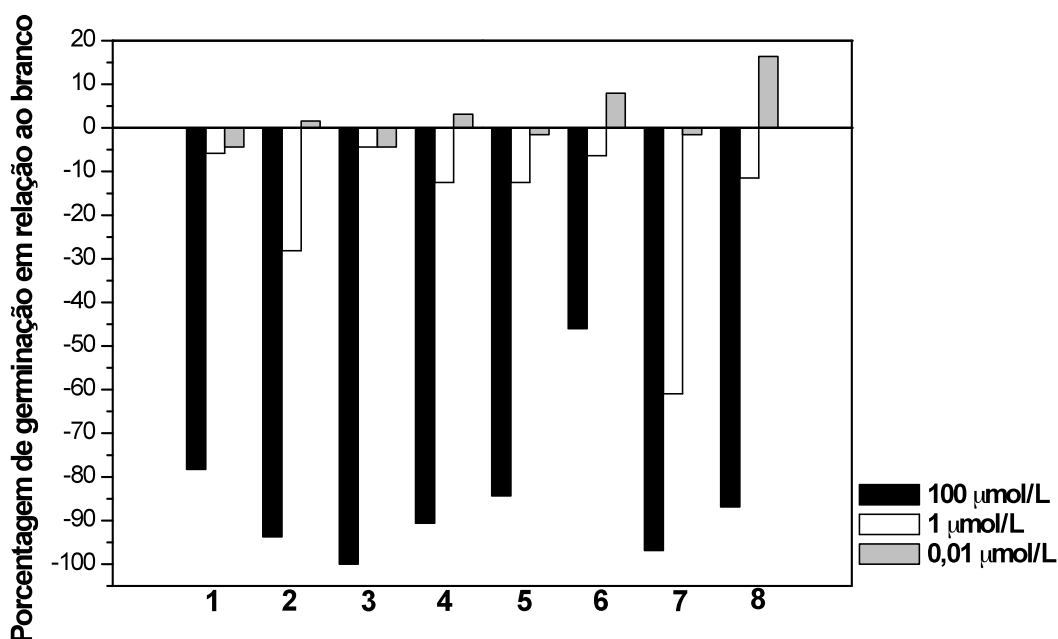


Figura 13 - Efeito de 1 (ácido indol-2-carboxílico), 2 (ácido indol-3-carboxílico), 3 (3,4,5-trimetoxi-anilina), 4 (*N*-fenil-1*H*-indol-2-carboxamida), 5 (*N*-fenil-1*H*-indol-3-carboxamida), 6 (*N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-2-carboxamida), 7 (*N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-3-carboxamida), 8 (*N*-isopropil-*N*(isopropilcarbamoil)-1*H*-indol-2-carboxamida) sobre a germinação de *L. sativa* (alface).

Com exceção da *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-2-carboxamida (6), que apresentou inibição do crescimento do caule e da raiz de 45% e 37% na maior concentração, respectivamente, as demais substâncias apresentaram 100% de inibição do crescimento da raiz e do caule das plantículas de alface na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$.

Nas demais concentrações, praticamente não houve alteração do crescimento da raiz e do caule.

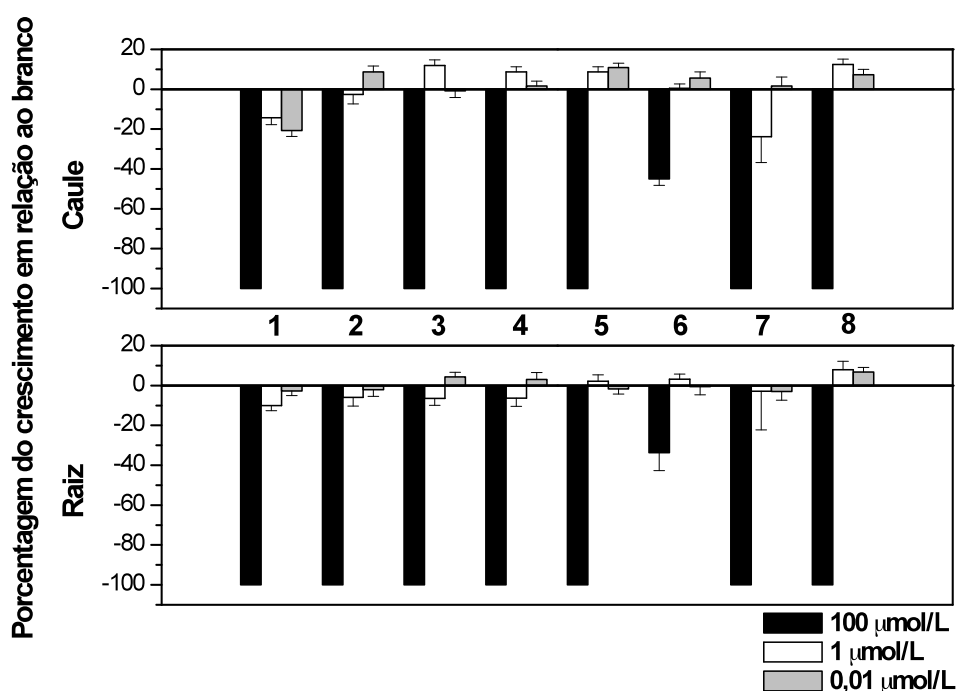


Figura 14 - Efeito de 1 (ácido indol-2-carboxílico), 2 (ácido indol-3-carboxílico), 3 (3,4,5-trimetoxi-anilina), 4 (*N*-fenil-1*H*-indol-2-carboxamida), 5 (*N*-fenil-1*H*-indol-3-carboxamida), 6 (*N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-2-carboxamida), 7 (*N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-3-carboxamida), 8 (*N*-isopropil-*N*(isopropilcarbamoil)-1*H*-indol-2-carboxamida) sobre o crescimento da raiz e do caule de *L. sativa* (alface).

6.1.2.2 - Efeito sobre *Allium cepa*

Os efeitos dos compostos testados sobre a germinação e o crescimento da raiz e do caule de *A. cepa* (cebola) estão apresentados nas **Figuras 15 e 16** (pág. 149 e 150). Todas as substâncias inibiram a germinação da cebola, mesmo em concentrações mais baixas. Os compostos mais ativos foram a 3,4,5-trimetóxi-anilina (3), a *N*-isopropil-*N*(isopropilcarbamoil)-1*H*-indol-2-carboxamida (8) e o ácido indol-2-carboxílico (1), que inibiram 30%, 27% e 21%

da germinação, respectivamente. Essas duas primeiras substâncias apresentaram também melhor efeito inibitório da germinação na menor concentração (24% e 26%, respectivamente).

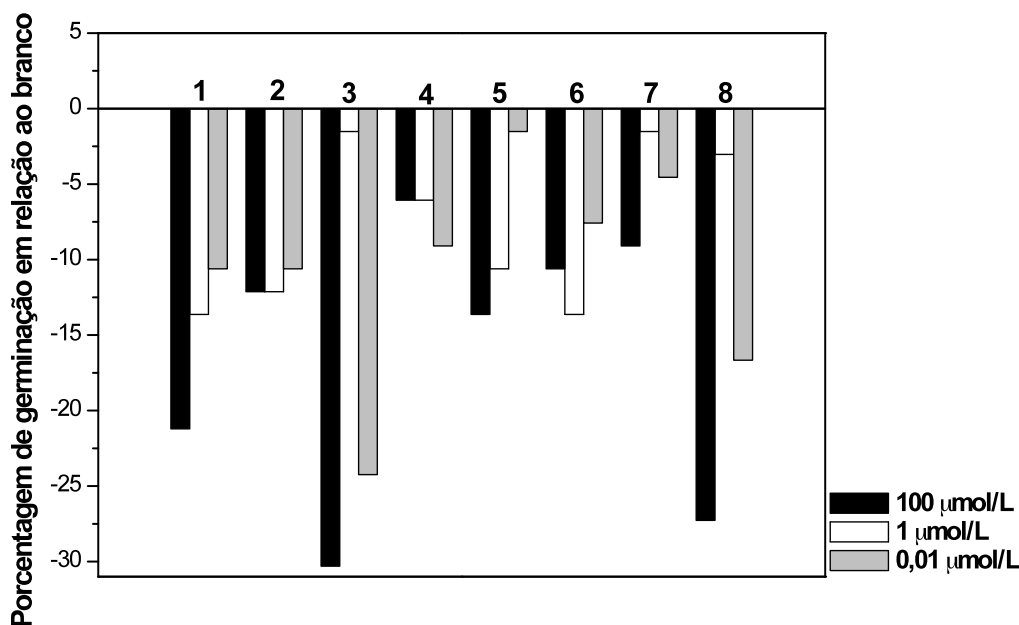


Figura 15 - Efeito de 1 (ácido indol-2-carboxílico), 2 (ácido indol-3-carboxílico), 3 (3,4,5-trimetoxi-anilina), 4 (*N*-fenil-1*H*-indol-2-carboxamida), 5 (*N*-fenil-1*H*-indol-3-carboxamida), 6 (*N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-2-carboxamida), 7 (*N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-3-carboxamida), 8 (*N*-isopropil-*N*(isopropilcarbamoil)-1*H*-indol-2-carboxamida) sobre a germinação de *A. cepa* (cebola).

Todas substâncias inibiram o crescimento da raiz e do caule das plantículas de cebola na concentração de 100 µmol/L, sendo que a *N*-fenil-1*H*-indol-3-carboxamida (5) apresentou a melhor atividade: 23% de inibição do crescimento do caule e 60% de inibição do crescimento da raiz.

Com relação ao caule, todas amostras estimularam seu crescimento, em pelo menos em uma das concentrações testadas. A substância que promoveu a maior taxa de crescimento do caule foi a *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-3-carboxamida (7): 11% de estímulo.

Já em relação ao crescimento da raiz, os efeitos variaram bastante entre as substâncias e suas diferentes concentrações. O ácido indol-2-carboxílico

(1), por exemplo, foi a substância que mais estimulou seu crescimento: 16%, enquanto a *N*-fenil-1*H*-indol-2-carboxamida (4) e a *N*-isopropil-*N*-(isopropilcarbamoil)-1*H*-indol-2-carboxamida (8) praticamente não exerceram efeito significativo.

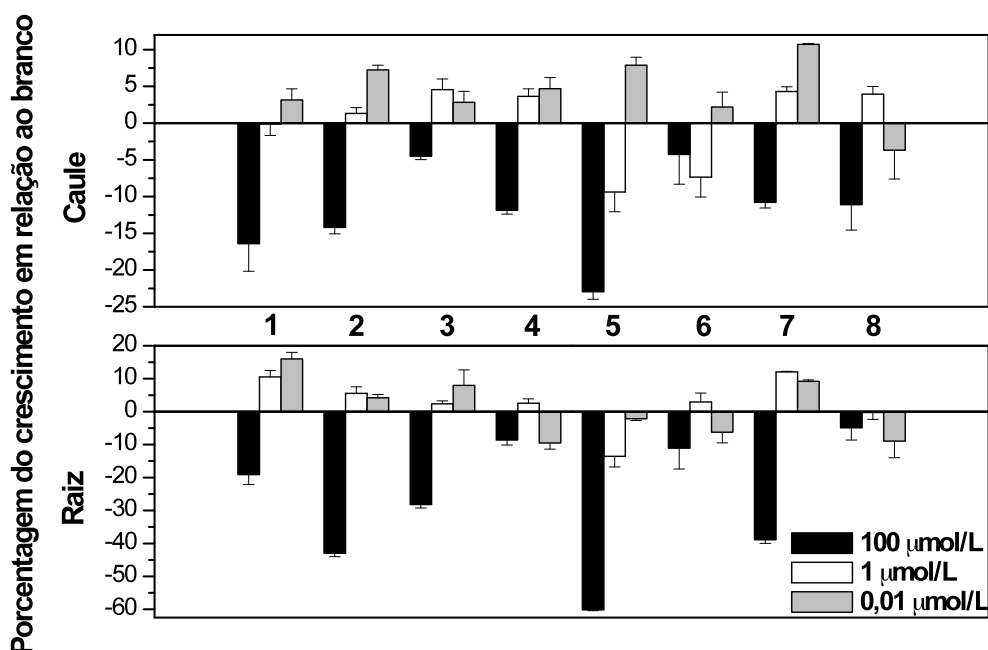


Figura 16 - Efeito de 1 (ácido indol-2-carboxílico), 2 (ácido indol-3-carboxílico), 3 (3,4,5-trimetoxi-anilina), 4 (*N*-fenil-1*H*-indol-2-carboxamida), 5 (*N*-fenil-1*H*-indol-3-carboxamida), 6 (*N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-2-carboxamida), 7 (*N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-3-carboxamida), 8 (*N*-isopropil-*N*-(isopropilcarbamoil)-1*H*-indol-2-carboxamida) sobre o crescimento da raiz e do caule de *A. cepa* (cebola).

6.1.3 - Conclusão

Em geral, a alface foi mais sensível às amostras do que a cebola, apresentando resultados mais expressivos.

Com exceção da *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-2-carboxamida (6), todos materiais de partida e amidas exerceram ótima atividade inibitória da germinação e do crescimento da raiz e do caule de *Lactuca sativa* L. (alface), merecendo destaque a *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-3-carboxamida (7),

que exerceu atividade inibitória significativa da germinação mesmo na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$.

Com relação à cebola, a maior taxa de inibição da germinação (30%) ocorreu com a 3,4,5-trimetoxi-anilina (3). De forma geral, o efeito inibitório do crescimento da raiz foi mais expressivo do que o do caule. Nenhuma substância exerceu atividade significativa sobre o estímulo do crescimento do caule.

Lactuca sativa L. (alface) tem sido freqüentemente utilizada em testes de atividade alelopática. No entanto, esta planta é muito sensível aos aleloquímicos mesmo em baixas concentrações, o que pode, às vezes, superestimar a atividade real (Xuan *et al.*, 2005). Testes futuros em plantas de cultivo comum, em vegetais, e nas principais ervas daninhas, podem trazer maior impacto agrônômico.

5 CONCLUSÃO

5.1 Capítulo 1

O estudo fitoquímico de *Banisteriopsis anisandra* levou, no total, ao isolamento de 5 misturas e 11 substâncias puras, sendo 3 destas inéditas (**R4**, **R5** e **R8**). Das folhas, foram isolados uma mistura de hidrocarbonetos (**F1**), ácido palmítico (**F2**), lupeol (**F3**) e quercetina 3-O-ramnosídeo (**F4**). Das raízes, foram isolados uma mistura de hidrocarbonetos (**R1**), oleato de β -sitosterila (**R2**), friedelina (**R3**), 2-hidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (**R4**), 2-hidroxi-6,8-dimetoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (**R5**), β -sitosterol (**R6**), mistura de β -sitosterol e estigmasterol (**R7**), 2,8-dihidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (**R8**), ácido 3,4-dihidroxibenzóico (**R9**), mistura de friedelina e lupenona (lupan-20(29)-en-3-ona) (**R10**), ácido oléico (**R11**), e mistura de glochidonol, ácido oléico e β -sitosterol (**R12**).

Ao contrário do que ocorre com as outras espécies do gênero *Banisteriopsis*, não foi isolado nem detectado nenhum alcalóide nas raízes e folhas de *B. anisandra*.

Com relação ao teste de atividade antioxidante, todas as amostras testadas apresentaram atividade melhor do que a do BHT. Aquela que apresentou melhor atividade foi o Extrato Etanólico das Raízes (1ª Coleta), que apresentou um CE_{50} de 2,4 $\mu\text{g/mL}$.

No teste de atividade alelopática, todos os compostos testados apresentaram ótima atividade inibitória sobre a germinação da alface. A friedelina (**R3**) e o 2-hidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (**R4**) merecem destaque por também exercerem excelente atividade inibitória sobre o crescimento da raiz e do caule de plantículas de alface. Referente à cebola, nenhuma substância exerceu atividade significativa sobre a germinação ou crescimento da raiz e caule.

O teste de atividade antibacteriana não levou a nenhum resultado positivo, mas o teste de atividade antifúngica apresentou resultados interessantes: o extrato aquoso das folhas de *B. anisandra* e o 2,8-dihidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (**R8**) foram ativos frente a

diferentes espécies de *Candida* ssp., sendo o primeiro ainda mais ativo que o fluconazol frente a *C. tropicalis*. Dessa maneira, explica-se a utilização do extrato aquoso das folhas na medicina popular para o tratamento tópico de infecções fúngicas. No entanto, o estudo fitoquímico foi inconclusivo para a determinação da substância ativa para essa atividade biológica.

O teste de atividade citotóxica demonstrou a atividade citotóxica da substância 2,8-dihidroxi-6-metoxi-7-metil-9,10-diidrofenantreno-1-carbaldeído (**R8**) frente às linhagens celulares MeWo e CHO.

5.2 Capítulo 2

Quatro amidas derivadas dos ácidos indol-2-carboxílico e indol-3-carboxílico com anilina e 3,4,5-trimetoxi-anilina foram obtidas:

- *N*-fenil-1*H*-indol-2-carboxamida (**22**),
- *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-2-carboxamida (**24**),
- *N*-fenil-1*H*-indol-3-carboxamida (**26**),
- *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-3-carboxamida (**27**),

sendo a amida (**24**) inédita. Um sub-produto formado, a *N*-isopropil-*N*(isopropilcarbamoil)-1*H*-indol-2-carboxamida (**23**), também foi avaliada quanto à sua atividade alelopática.

As amidas **26** e **27** foram obtidas por uma metodologia mais simples e eficiente do que aquelas encontradas na literatura (Litina *et al.*, 2010 e Magoulas e Papaioannou, 2003).

Com exceção da *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-2-carboxamida (**24**), todas amostras testadas exerceram ótima atividade inibitória da germinação e do crescimento da raiz e do caule de *Lactuca sativa* L. (alface), merecendo destaque a *N*-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-1*H*-indol-3-carboxamida (**27**), que exerceu atividade inibitória significativa mesmo na concentração de 1 µmol/L.

Com relação à atividade alelopática em *Allium cepa* (cebola), todas as substâncias inibiram sua germinação, mesmo em concentrações mais baixas. O crescimento da raiz e do caule das plantículas de cebola também foi inibido por todas amostras na maior concentração. O efeito estimulatório do crescimento da raiz ou do caule, no entanto, não foi muito significativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam L. Halberstadt & Mahalah R. Buell & Virginia L. Masten & Victoria B. Risbrough & Mark A. Geyer. Modification of the effects of 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine on exploratory behavior in rats by monoamine oxidase inhibitors. *Psychopharmacology*, vol. 201 (1), p. 55-66, 2008.
- Agrawal, P.K., Carbon-13 NMR of Flavonoids. P. K. Agrawal, EUA, 564 p., 1989.
- Aguiar, R. M.; David, J.P.; David, J.M.. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. *Phytochemistry*, vol. 66, p. 2388-2392, 2005.
- Alam, A., Takaguchi, Y.; Ito, H.; Yoshida, T.; Tsuboi, S.. Multi-functionalization of gallic acid towards improved synthesis of a- and b-DDB. *Tetrahedron*, vol. 61, p. 1909-1918, 2005.
- Alam, A.; Tsuboi, S. Total synthesis of 3,3',4-tri-O-methylellagic acid from gallic acid. *Tetrahedron*, vol. 63 (42), p. 10454-10465, 2007.
- Aquino, R.; de Crescenzo, S.; de Simone, F.. Constituents of *Banisteriopsis caapi*. *Fitoterapia*, vol. LXII (5), p. 453, 1990.
- Araújo, Josiane Silva. Anatomia foliar de 16 espécies de Malpighiaceae ocorrentes em área de cerrado (MG). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 39 p., 2008.
- Ayer, W. A.; Flanagan, R. J.; Reffstrup, T.. Metabolites of bird's nest fungi. *Tetrahedron*, vol. 38 (10), p. 1409-1412, 1982.
- Ayres, M. C.; Chaves, M. H.; Rinaldo, D.; Vilegas, W.; Júnior, G. M. V.. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. *Química Nova*, vol. 32 (6), p. 1509-1512, 2009.
- Barbosa, L. C. A.. Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Viçosa, Ed. UFV, 189 p., 2007.
- Barreiro, E. J.; Bolzani, V. D.. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*, vol. 33 (3), 2009.
- Beltrame, F. L.; Sartoretto, J. L.; Bazotte, R. B., Cuman, R. N.; Cortez, D. A. G. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético do *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). *Química Nova*, v. 24 (6), p. 783-785, 2001.

- Bernardi, A. P. M.; Alarcón, C. L.; Aspee, A.; Rech, S.; Poser, G. L. V.; Bride, O. R.; Lissp, E.. Antioxidant activity of flavonoids isolated from *Hypericum ternum*. J. Chil. Chem. Soc, vol. 52 (4), p. 1326-1329, 2007.
- Borgatti, T. F.. Síntese e atividade alelopática de carboxamidas indólicas. Dissertação de Mestrado. Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEX, UFMG. Tese de mestrado, 91p., 2010.
- Borza, I.; Kolok, S.; Gere, A.; Csongor, E. A.; Agai, B.; Tarkanyi, G.; Horvath, C.; Szalai, G. B.; Bozo, E.; Kiss, C.; Bielik, A.; Nagy, J.; Farkas, S.; Domany, G.. Indole-2-carboxamides as novel NR2B selective NMDA receptor antagonists. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, vol. 13, p. 3859-3861, 2003.
- Chou, W. C.; Tan, C. W.; Chen, S. F.; Ku, H.. One-pot neat reactions of carboxylic esters and alkylenediamines for efficient preparation of *N*-acylalkylenediamines. J. Org. Chem., vol. 63, p. 10015-10017, 1998.
- Costa, P.; Pili, R., Pinheiro, V.; Vasconcellos, M.. Substâncias carboniladas e derivados. Porto Alegre: Bookman, 411 p., 2003.
- Costa, C. B. N.; Costa, J. A. S.; Ramalho, M.. Biologia reprodutiva de espécies simpátricas de Malpighiaceae em dunas costeiras da Bahia, Brasil. Revista Brasil. Bot., Vol. 29 (1), p.103-114, 2006.
- Costa, A. G. V.; Bressan, J.; Sabarense, M.. Trans fatty acids: foods and effects on health. Arch. Latinoam. Nutr, vol. 56(1), p. 12-21, 2006.
- Costa, C. R.; Jesuíno, R. S. A.; Lemos, J. A.; Fernandes, O. F. L.; Souza, L. K. H.; Passos, X. S.; Silva, M. R. R.. Effects of antifungal agents in sap activity of *Candida albicans* isolates. Mycopathologia, vol. 169, p. 91-98, 2010.
- Colombo, A. L.; Guimarães, T.. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* ssp. Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop., vol. 35 (5), p. 599-607, 2003.
- Couperus, P. A.; Clague, A. D. H.; Dongen, J. P. C. M.. Carbon-13 chemical shifts of some model carboxylic acid and esters. Organic Magnetic Resonance, vol. 11 (12), p. 590-597, 1978.
- Cragg, G. M.; Grothaus, P. G.; Newman, D. J.. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. Chem. Rev., vol. 109 (7), p. 3012-3043, 2009.

- Danelli, M. G. M.; Soares, D. C.; Abreu, H. S.; Peçanha, L. M. T.; Saraiva, E. M.. Leishmanicidal effect of LLD-3, a nor-triterpene isolated from *Lophanthera lactescens*. *Phytochemistry*, vol. 70, p. 608-614, 2009.
- David, Diane Julien; Geoffroy, P.; Marchioni, E.; Raul, F.; Werner, D.A., Miesch, M.. Synthesis of highly pure oxyphytosterols and (oxy)phytosterols esters. Part II. (Oxy)-sitosterol esters derived from oleic acid and from 9,10-dihydroxystearic acid. *Steroids*, vol. 73, p. 1098-1109, 2008.
- Denizot, F.; Lang, R.. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immun. Meth.*, vol. 89, p. 271-277, 1986.
- Dias, S. M. C.. Constituição química e aspectos farmacológicos da família Malpighiaceae. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, vol. 44, p. 1-15, 1977.
- Duarte, L. P. Estudo químico, estrutural e da atividade antibacteriana de triterpenos pentacíclicos isolados dos galhos e raízes de *Austroplenkia populnea*. Tese de Doutorado, Departamento de química, UFMG, 243 p., 2000.
- Duke, S. O.; Dayan, F.; Rimando, A.; Schrader, K. K.; Aliotta, G.; Oliva, A.; Romagni, J. G.. Chemical from nature for weed management. *Weed Sci.*, vol. 50 (2), p. 138-151, 2002.
- Elsinghorst, P. W.; Tanarro, C. M. G.; Gutschow, M.. Novel heterobivalent tacrine derivatives as cholinesterase inhibitors with notable selectivity toward butyrylcholinesterase. *J. Med. Chem.*, vol. 49, p. 7540-7544, 2006.
- Fieser, L. F.; Fieser, M. *Advanced organic chemistry*. Nova Iorque, Van Nostrand Reinhold, 1158 p., 1961.
- Figueiredo, M. E.; Michelin, D. C.; Sannomiya, M. Silva, M. A.; Santos, L. C.; Almeida, L. F. R.; Brito, A. R. M. S.; Salgado, H. R. N.; Vilegas, W.. Avaliação química e da atividade anti-diarréica das folhas de *Byrsonima cinera* DC. (Malpighiaceae). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 41 (1), p. 79-83, 2005.
- Filho, R. B. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Química Nova*, vol. 33 (1), p. 229-239, 2010.
- Filho, V. C.; Yunes, R. A.. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, vol. 21 (1), p. 99-105, 1998.

- Flamini, G.; Antognoli, E.; Morelli, I. Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy. *Phytochemistry*, vol. 57 (4), p. 559-564, 2001.
- Foti, M. C.; Daquino, C.; Geraci, C.. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH[•] radical in alcoholic solutions. *J. Org. Chem.*, vol. 69 (7), p. 2309-2314, 2004.
- Galotta, A. L. Q.. Estudo químico e farmacológico da espécie *Euterpe precatória* (Martius) Arecaceae. Tese de Doutorado, Departamento de Química, UFMG, 341 p., 2005.
- Galotta, A. L. Q.; Boaventura, M. A. D.; Lima, A. R. S.. Antioxidant and cytotoxic activities of 'açai' (*Euterpe precatória* Mart.). *Química Nova*, vol. 31, p. 1427-1430, 2008.
- Gálvez, M.; Martín-Cordero, C.; Houghton, P. J.; Ayuso, M. J.. Antioxidant activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53 (6), p. 1927-1933, 2005.
- Gates, B.. *Banisteriopsis*, *Diplopterys* (Malpighiaceae). *Flora Neotropica Monograph*, New York Botanical Garden, Nova Iorque, p. 150-152, 1982.
- Geiss, F.; Heinrich, M.; Hunkler, D.; Rimpler, H.. Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. *Phytochemistry*, vol. 39 (3), p. 635-643, 1995.
- Gohar, A.; Gedara, S. R.; Baraka, H. N. New acylated flavonol glycoside from *Ceratonia siliqua* L. seeds. *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 35 (5), p. 424-428, 2009.
- Ghosal, S.; Mazumder, U. K.. Alkaloids of the leaves of *Banisteriopsis argentea*. *Phytochemistry*, vol. 10 (3), p. 2840-2842, 1971.
- Gong, J.; Huang, K.; Wang, L.; Yang, L.; Feng, Y.; Li, H.; Li, X.; Zeng, S.; Wu, X.; Stockigt, J.; Zhao, Y.; Qu, J.. *Bioorg. & Med. Chem.*, vol. 17 (9), p. 3414-3425, 2009.
- Gottlieb, H.G.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *J. Org. Chem.*, vol. 62, p. 7512-7515, 1997.
- Hagemeyer, J.; Schneider, B.; Oldham, N. J.; Hahlbrock, K. Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in *Arabidopsis thaliana* leaves infected with virulent or avirulent *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strains. *Proc. Natl. Academy Sci. U.S.A.*, vol. 98, p. 753-58, 2001.
- Harborne, J. B.; Williams, C. A.. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, vol. 55, p. 481-504, 2000.

- Hashimoto, Y., Kawanishi, K.. New organic bases from Amazonian *Banisteriopsis caapi*. *Phytochemistry*, vol. 14, p. 1633-1635, 1975.
- Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L.. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53 (6), p. 1841-1856, 2005.
- Jablonowski, J. A.; Grice, C. A.; Chai, W.; Dvorak, C. A.; Venable, J. D.; Kwok, A. K.; Ly, K. S.; Wei, J.; Baker, S. M.; Desai, P. J.; Jiang, W.; Wilson, S. J.; Thurmond, R. L.; Karlsson, L.; Edwards, J. P.; Lovenberg, T. W.; Carruthers, N. I. The first potent and selective non-imidazole human histamine H4 receptor antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 46 (19), p. 3957-3960, 2003.
- Jin, Y.; Zhou, Z. Y.; Tian, W.; Yu, Q.; Long, Y. Q.. 4'-Alkoxy substitution enhancing the anti-mitotic effect of 5-(3',4',5'-substituted)aniline-4-hydroxy-8-nitroquinazolines as a novel class of anti-microtubule agents. *Bioorg. & Med. Chem. Letters*, vol. 16, p. 5864-5869, 2006.
- Kaiser, C.; Weinstock, J.. Amines from carboxylic-carbonic anhydrides: 1-phenylcyclopentylamine. *Organic Synthesis Coll.*, vol. 6, p. 910-913, 1988.
- Kawanishi, K.; Uhara, Y.; Hashimoto, Y.. Shihuine and dihydroshihuine from *Banisteriopsis caapi*. *J. Nat. Prod.*, vol. 45, p. 637, 1982.
- Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena antioxidants redox reactions and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.*, vol. 30, p. 620-50, 2002.
- Kovács, A.; Vasas, A.; Hohmann, J.. Natural phenanthrenes and their biological activity. *Phytochemistry*, vol. 69, p. 1084-1110, 2008.
- Kürti, L.; Czakó, B.. Strategic application of named reactions in organic synthesis: background and detailed mechanisms. Amsterdam, Elsevier Academic Press, 758 p., 2005.
- Kuster, R. M.; Arnold, N.; Wessjohann, L.. Anti-fungal flavonoids from *Tibouchina grandifolia*. *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 37, p 63-65, 2009.
- Lana, E. J. L.; Carazza, F.; Takahashi, J. A. Antibacterial evaluation of some new 2-aryl-3,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, p. 2053-2056, 2006.
- La Regina, G.; Silvestri, R.; Gatti, V.; Lavecchia, A.; Novellino, E.; Befani, O.; Turini, P.; Agostinelli, E.. Synthesis, structure-activity relationships and molecular modeling studies

- of new indole inhibitors of monoamine oxidases A and B. *Bioorg. & Med. Chem.*, vol. 16, p. 9729-9740, 2008.
- Litina, D. H.; Magoulas, G. E.; Krokidis, M.; Papaioannou, D.. Syntheses and evaluation of the antioxidant activity of acitretin analogs with amide bond(s) in the polyene spacer. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 45 (1), p. 298-310, 2010.
 - Ugaz, L.. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, p. 1-7, 1988.
 - Macías, F. A.; Castellano, D.; Molinillo J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 48, 2512-2521, 2000.
 - Macías, F.A.; Chinchilla, N.; Varela, R.M.; Molinillo, J.M.G.. Bioactive steroids from *Oryza sativa* L.. *Steroids*, vol. 71, p. 603-608, 2006.
 - Magoulas, G.; Papaioannou, D.. Synthetic studies towards the development of a novel class of acitretin-type retinoids. *Arkivoc*, vol. 6, p. 213-227, 2004.
 - Mahato, S.B., Jundi, A. P., ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, vol. 37 (6), 1994.
 - Mahboobi, S.; Teller, S.; Pongratz, H.; Hufsky, H.; Sellmer, A.; Botzki, A.; Uecker, A.; Beckers, T.; Baasner, J.; Scha, C.; Uberall, F.; Kassack, M. U.; Dove, S.; Bohmer, F. D.. Bis(1*H*-2-indolyl)methanones as a novel class of inhibitors of the platelet-derived growth factor receptor kinase. *J. Med. Chem.*, vol. 45, p. 1002-1018, 2002.
 - McKenna, D. J.. Clinical investigations of the therapeutic potential of Ayahuasca: rationale and regulatory challenges. *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 102, p. 111-129, 2004.
 - Mendes, C. C.; Cruz, F. G.; David, J. M.; Nascimento, I. P.; David, J. P.. Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Byrsonima microphylla*. *Química Nova*, vol. 22 (2), 1999.
 - Miranda, R.R.S., Estudo Fitoquímico e Avaliação de potencial Farmacológico de *Maytenus salicifolia* Reissek. Tese de doutorado, Departamento de Química, UFMG, 351 p., 2007.
 - Mosman, T.. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. of Immun. Meth.*, vol. 65 (1-2), p. 55-63, 1983.

- Neises, B.; Steglich, W.. *Angew.* Simple method for the esterification of carboxylic acids. *Chem. Int. Ed.*, vol. 17, p. 522-524, 1978.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M.. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.*, vol. 70, p. 461-477, 2007.
- Oliveira, D. M.. Estudo Fitoquímico de Raízes de *Maytenus acanthophylla* Reissek (Celastraceae) e avaliação da atividade antibacteriana do extrato clorofórmico. Dissertação de Mestrado, Departamento de química, UFMG, 137 p., 2004.
- Oliveira, L. P.; Pinheiro, R. C.; Vieira, M. S.; Paula, J. R.; Bara M. T. F.; Valadares, M. C.. Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., Punicaceae. *Rev. bras. farmacogn.*, vol. 20 (2), p. 201-207, 2010.
- Onda, K.; Shiraki, R.; Ogiyama, T.; Yokoyama, K.; Momose, K.; Katayama, N.; Orita, M.; Yamaguchi, T.; Furutani, M.; Hamada, N.; Takeuchi, M.; Ohta, M.; Tsukamoto, S.. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of N-bicyclo-5-chloro-1H-indole-2-carboxamide derivatives as potent glycogen phosphorylase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 16, p. 10001-10012, 2008.
- Panizzi, L.; Catalano, S.; Miarelli, C.; Cioni, P. L.; Campeol, E.. *In vitro* Antimicrobial Activity of Extracts and Isolated Constituents of *Geum rivale*. *Phytother. Res.*, vol. 14, p. 561-563, 2000.
- Patel, B.; Das, S.; Prakash, R., Yasir, M. Natural bioactive compound with anticancer potential. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*, vol. 1, p. 32-41, 2010.
- Pfister, J. R.; Wymann, W. E. A useful variant of the Curtius reaction. *Synthesis*, vol. 1, p. 38-40, 1983.
- Puapairoj, P.; Naengchomnong, W.; Kijjoa, A.; Pinto, M. M.; Pedro, M.; Nascimento, M. S. J.; Silva, A. M. S.; Herz, W. Cytotoxic activity of lupane-type triterpenes from *Glochidion sphaerogynum* and *Glochidion eriocarpum* two of which induce apoptosis. *Planta Med*, vol. 71, p. 208-213, 2005.
- Rartrellil, L.; Detommasi, N.; Berger, I.; Caceres, A.; Saraiva, A.; Simone, F. Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytochemistry*, vol. 45 (4), p. 647-650, 1997.
- Ribani, R. H.; Huber, L. S.; Amaya, D. B. R.. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 22, p. 263-268, 2009.

- Ríos, M. S. M.; Espiñeira, J.; Natham, P. J.. ^{13}C NMR spectroscopy of indole derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*, vol. 25, p. 377-395, 1987.
- Sánchez-Moreno, C.. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, vol. 8, p.121-137, 2002.
- Sears, R. B.; Carpenter, R. A.; Whitlock, C. R. A general synthesis of tris-indole derivatives as potencial iron chelators. *Molecules*, vol. 10, p. 488-491, 2005.
- Silva, F. R. G.. Florística, estrutura e padrões de dispersão em um cerrado, Quartel Geral, MG. Dissertação de Mestrado (Botânica). Universidade Federal de Viçosa, 70 p., 2006.
- Silverstein, R.M.; Webster, F.X.; Kiemle, D.J. Identificação de compostos orgânicos. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.; 7ª Ed., 490 p.,2007.
- Sannomiya, M.; Fonseca, V. B.; Silva, M.A.; Rocha, L. R. M., Santos, L. C., Lima, C. A. H.; Brito, A. R. M. S.; Vilegas, W.. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 97 (1), p. 1-6, 2005.
- Sinnott, G. E. M.. Carbohydrate chemistry and biochemistry - Structure and mechanism. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 766 p., 2007.
- Smith, P. A. S.. Organic Reactions, vol. 3. Nova lorque, p. 378, 1946.
- Souza Filho; A. P. S.; Santos, R. A.; Santos, L. S.; Guilhon, G. M. P.; Santos, A. S.; Arruda, M. S. P.; Muller, A. H.; Arruda, A. C.; Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. *Planta Daninha*, vol. 24 (4), Viçosa, 2006.
- Still, W. C., Kahn, M., Mitra, A. rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.*, vol. 43 (14), p. 2923-2925, 1978.
- Torres, D. E. G.; Mancini, D. A. P.; Torres, R. P.; Mancini-filho, J.. Antioxidant activity of macambo (*Theobroma bicolor* L.) extracts. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 104, p. 278-281, 2002.
- Ugaz, O. L.. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. Lima: Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica de Perú, p. 1-7, 1988.
- Vieira H. S., Takahashi, J. A., Pimenta L. P. S., Boaventura, M. A. D.. Effects of kaurane diterpene derivatives on germination and growth of *Lactuca sativa* seedlings. *Zeitschrift für Naturforschung C.*, vol. 60 (1-2), p. 72-78, 2005.

- Vyvyan, J. R.. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron*, vol. 58 (9), p. 1631-1646, 2002.
- Wang, S-Y.; Kuo, Y-H.; Chang, H-N.; Kang, P-L.; Tsay, K-F. L.; Yang, N-S.; Shyur, L-F.. Profiling and characterization antioxidant activities in *Anoectochilus formosanus* Hayata. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50 (7), p. 1859-1865, 2002.
- Wang, Y. H.; Samoylenko, V.; Tekwania, B. L.; Khana, I. A.; Millerd, L. S.; Chaurasiyaa, N. D.; Rahmana, M.; Tripathia, L. M.; Khana, S. I.; Joshi, V. C.; Wiggera, F. T.; Muhammad, I.. Composition, standardization and chemical profiling of *Banisteriopsis caapi*, a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson's disease. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 128 (3), p. 662-671, 2010.
- Xuan, T. R.; Shinkichi, T.; Khanh, T. D.; Min, C. I.. Biological control of weeds and plant pathogens in paddy rice by exploiting plant allelopathy: an overview. *Crop Protection*, vol. 24, p. 197-206, 2005.
- Zhang, H. L.; Nagatsu, A.; Okuyama, H.; Mizukami, H.; Sakakibara, J.. Sesquiterpene glycosides from cotyon oil cake. *Phytochemistry*, vol. 48 (4), p. 665-668, 1998.

ANEXO 1

1 Espectros das substâncias isoladas no estudo fitoquímico de *Banisteriopsis anisandra*

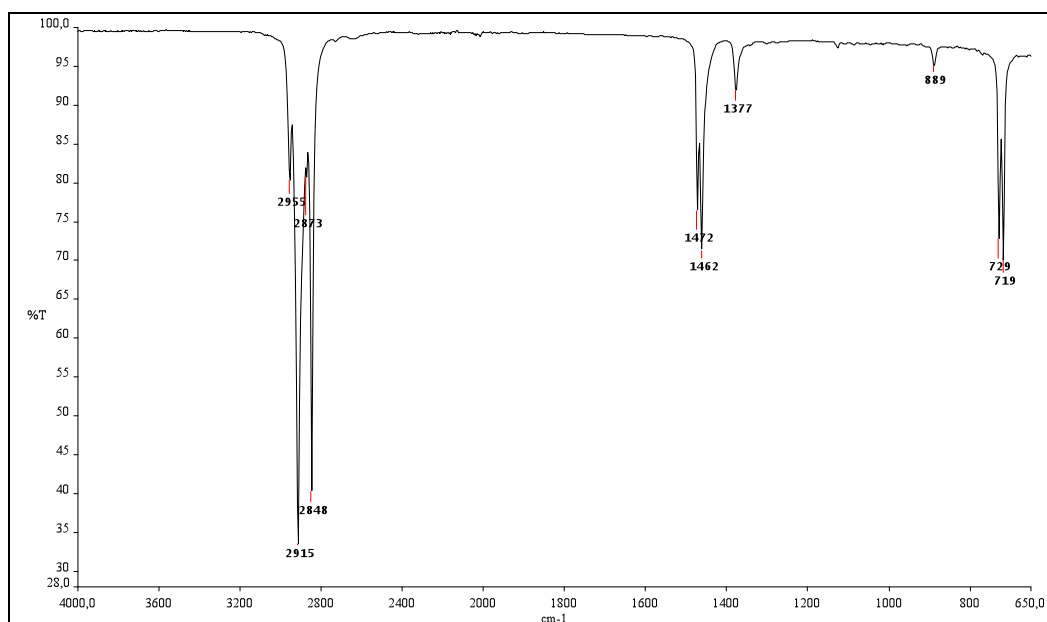


Figura 1A - Espectro de absorção na região do infravermelho de F1.

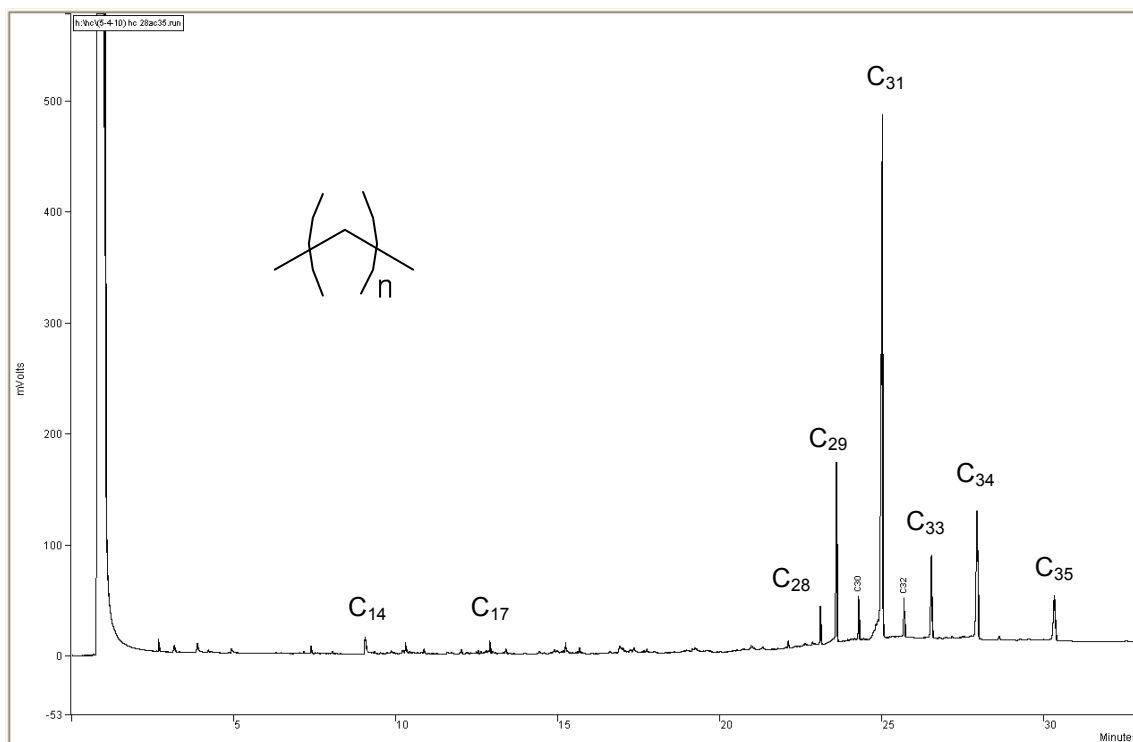


Figura 2A – Cromatograma dos padrões de hidrocarbonetos C₁₄, C₁₇, C₂₈, C₂₉, C₃₀, C₃₁, C₃₂, C₃₃, C₃₄ e C₃₅. Coluna: DB5 30m x 0,25mm (J&W Scientific). Temp. coluna: 50 °C (1min), 10 °C/min, até 300 °C. Temp. injetor: 300 °C, Split: 1/100. Temp. detector FID: 300 °C. Volume de injeção: 1 µL (conc. 1,0% em hexano).

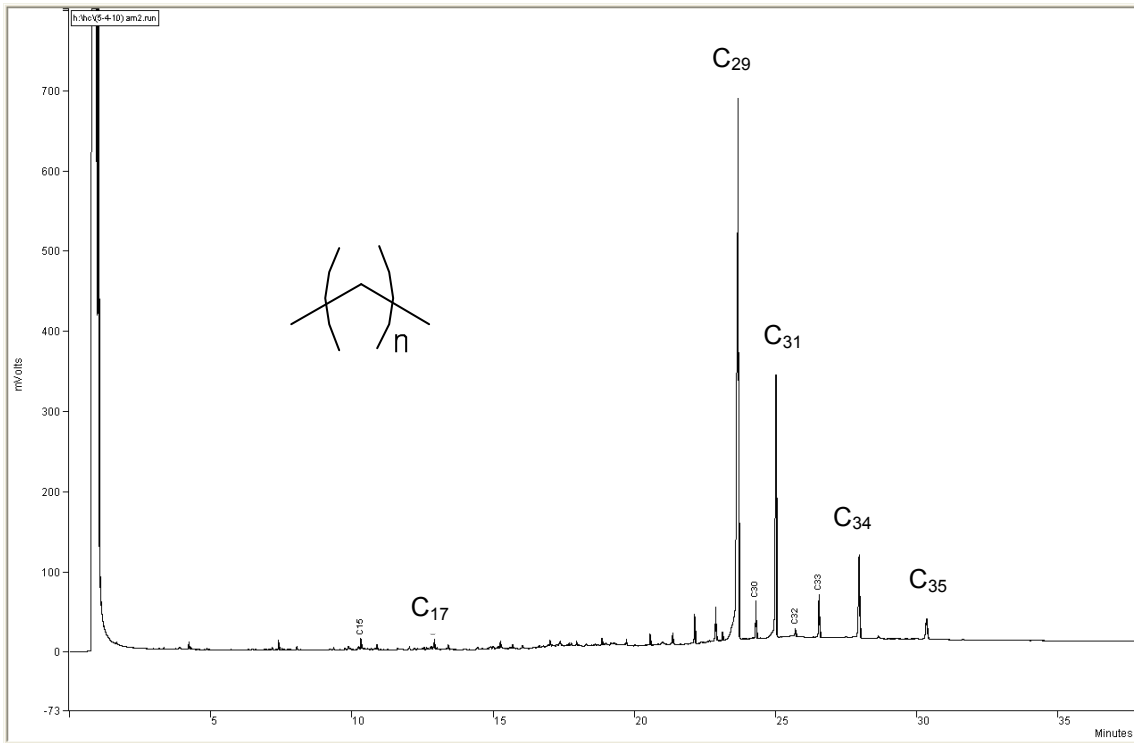


Figura 3A - Cromatograma de F1. Coluna: DB5 30m x 0,25mm (J&W Scientific). Temp. coluna: 50 °C (1min), 10 °C/min, até 300 °C. Temp. injetor: 300 °C, Split: 1/100. Temp. detector FID: 300 °C. Volume de injeção: 1 µL (conc. 1,0% em hexano).

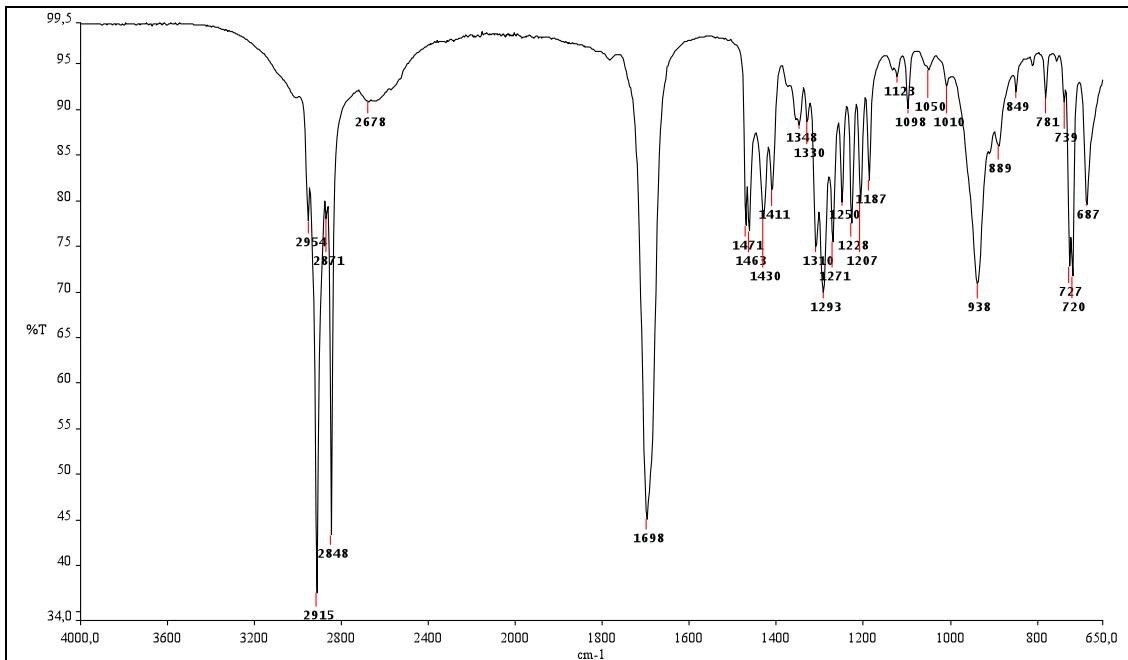


Figura 4A – Espectro de absorção na região do infravermelho de F2.

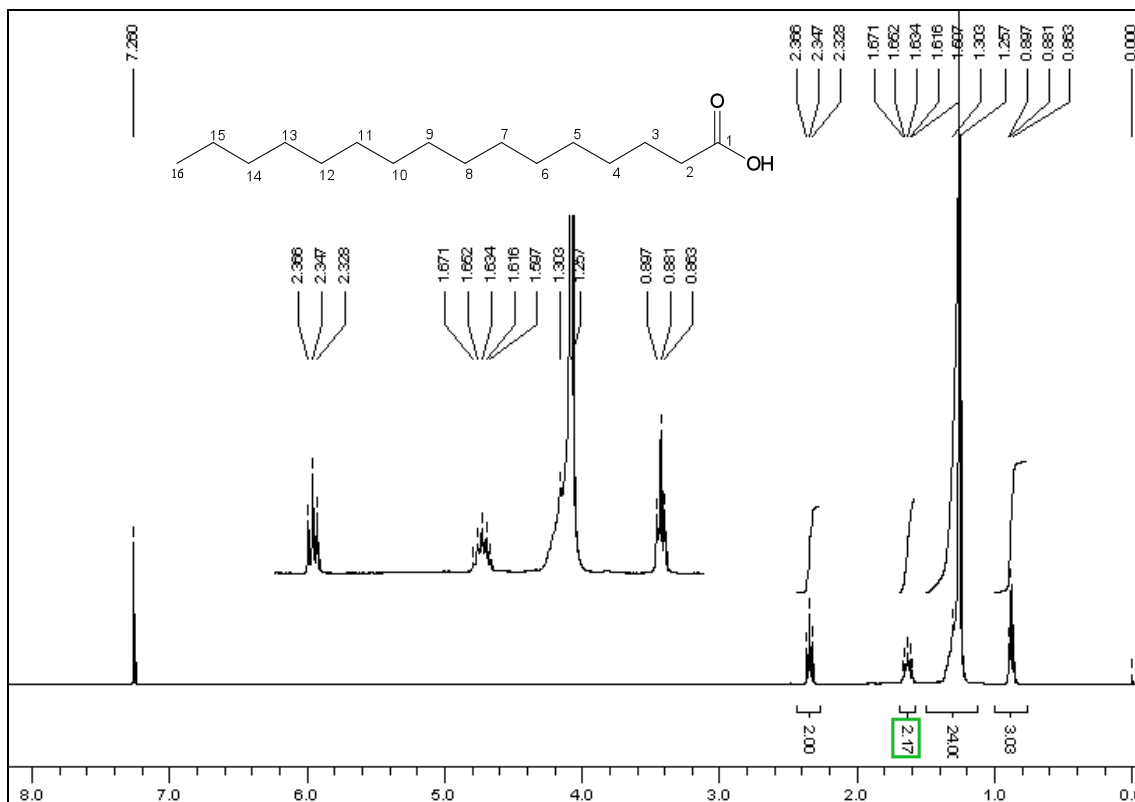


Figura 5A – Espectro de RMN de ^1H de F2 (CDCl_3 ; 400 MHz).

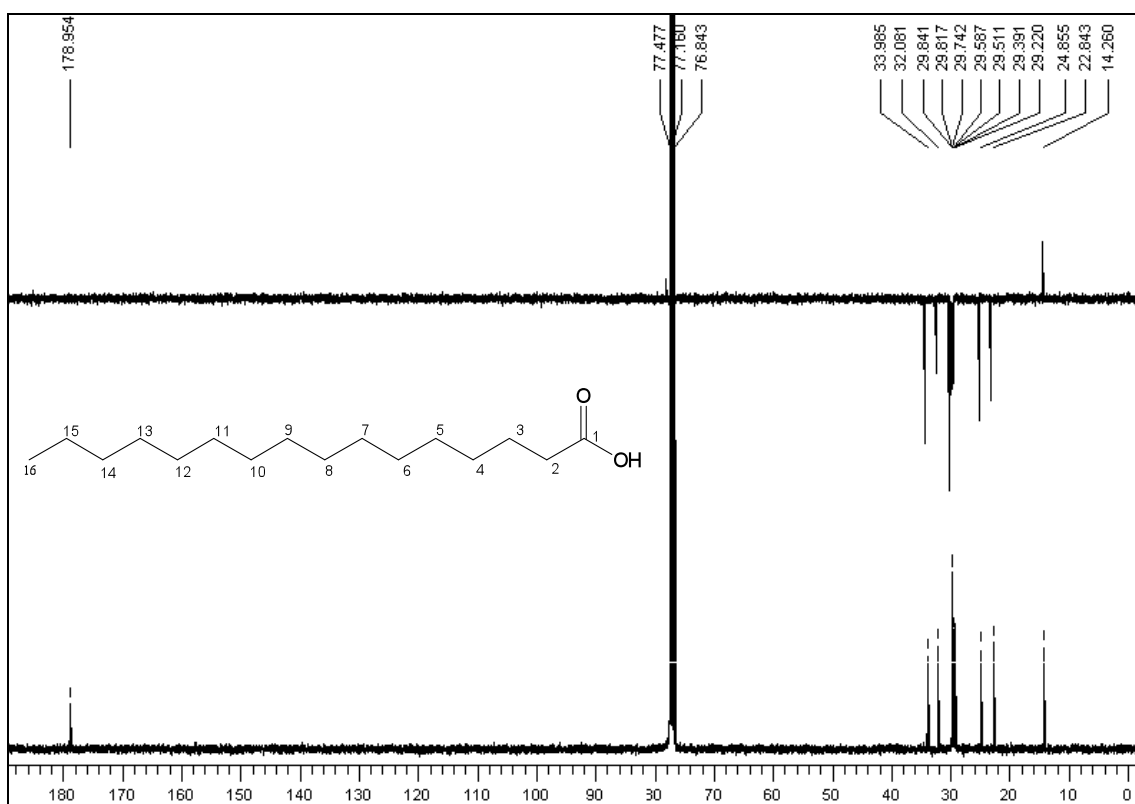


Figura 6A – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 de F2 (CDCl_3 ; 100 MHz).

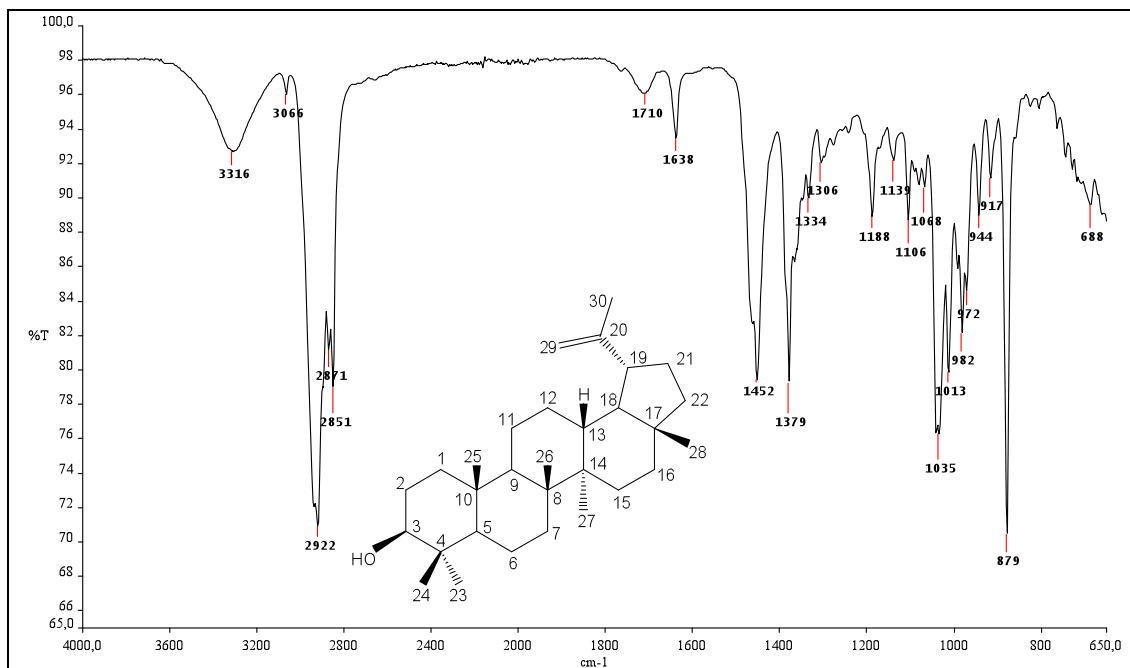


Figura 7A – Espectro de absorção na região do infravermelho de F3.

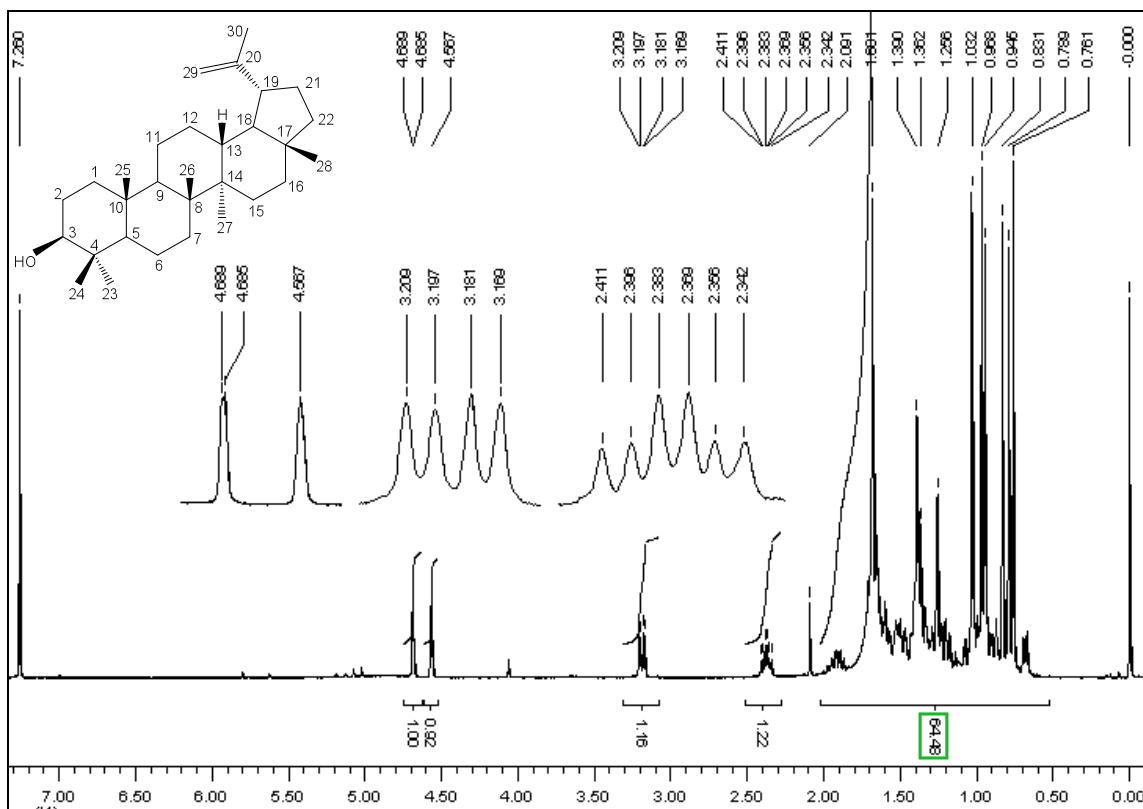


Figura 8A – Espectro de RMN de ¹H de F3 (CDCl₃; 400 MHz).

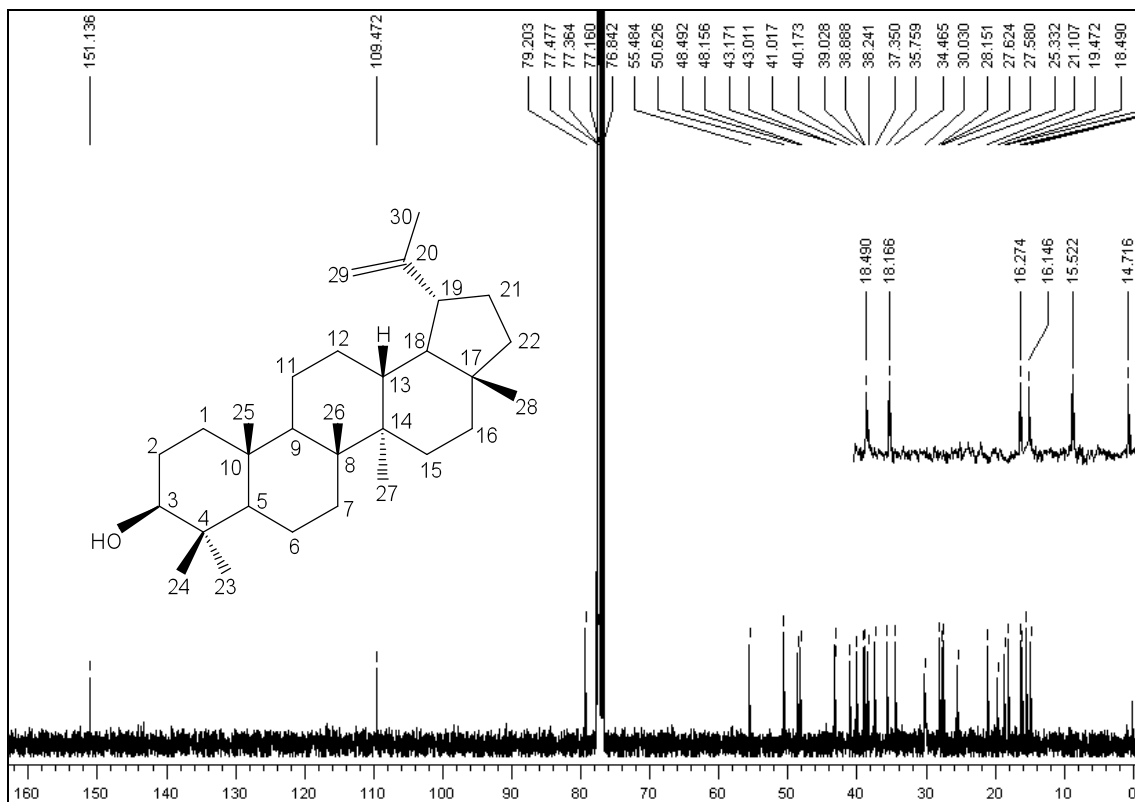


Figura 9A – Espectro de RMN de ^{13}C de F3 (CDCl_3 ; 100 MHz).

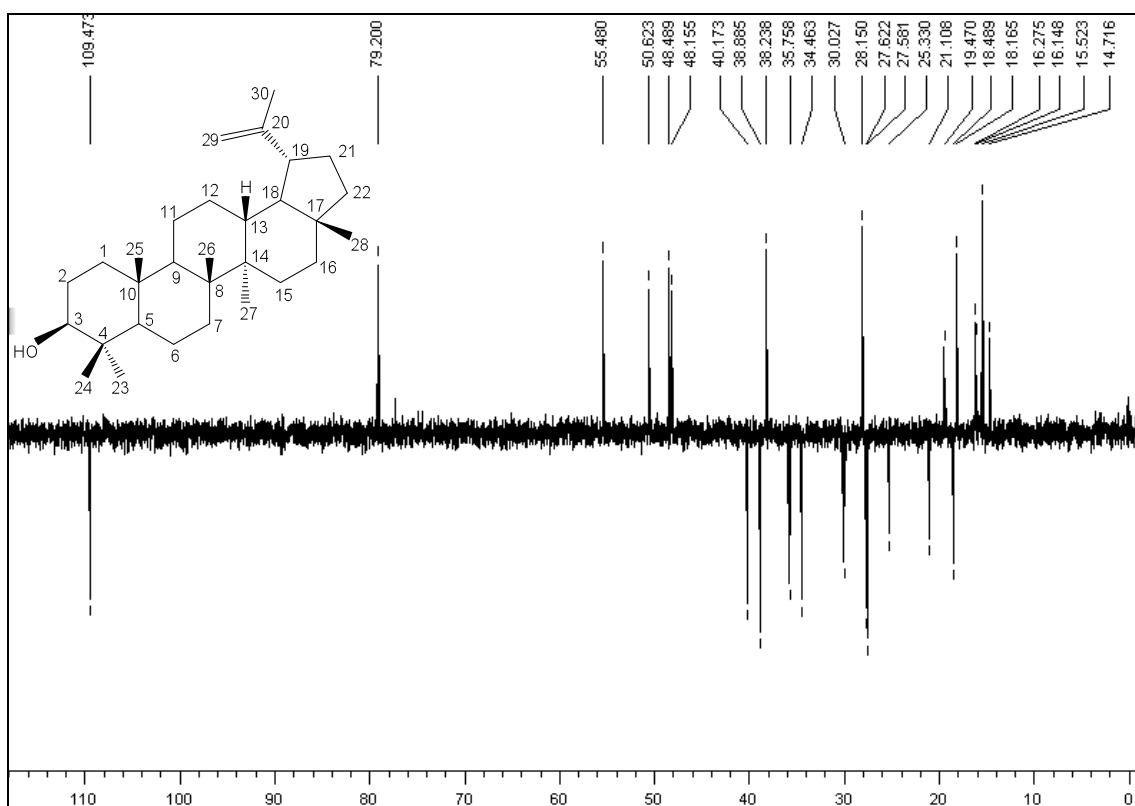


Figura 10A – Subespectro DEPT-135 de F3 (CDCl_3 ; 100 MHz).

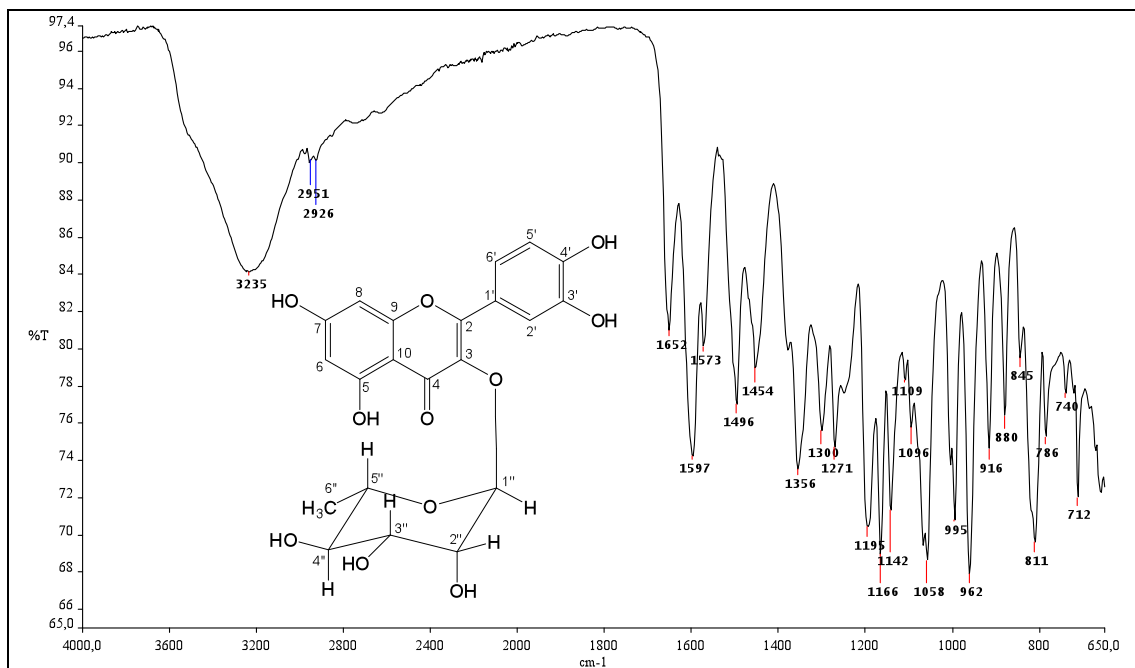


Figura 11A - Espectro de absorção na região do infravermelho de F4.

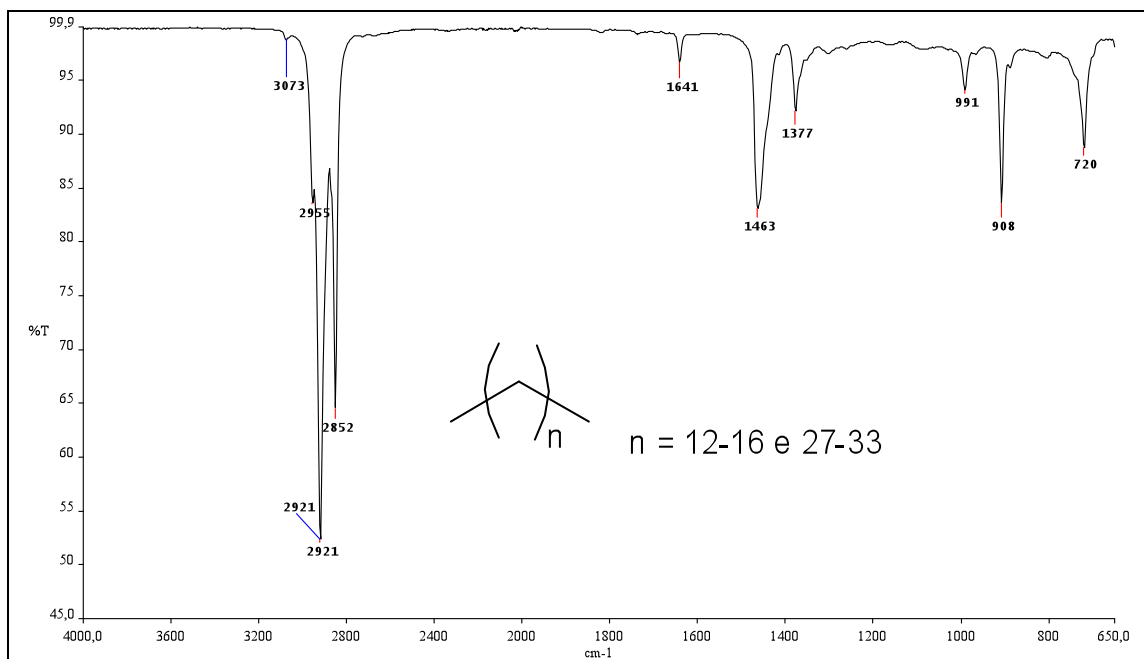


Figura 12A – Espectro de absorção na região do infravermelho de R1.

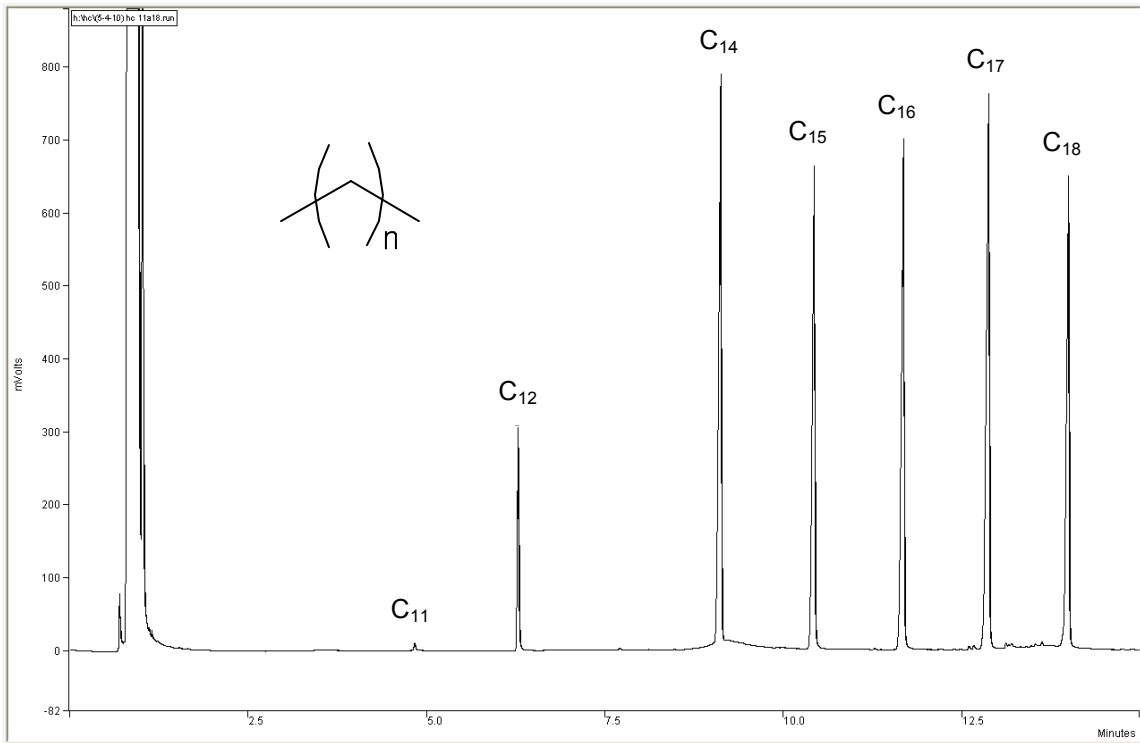


Figura 13A - Cromatograma dos padrões de hidrocarbonetos C₁₁, C₁₂, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇ e C₁₈. Coluna: DB5 30m x 0,25mm (J&W Scientific). Temp. coluna: 50 °C (1min), 10 °C/min, até 300 °C. Temp. injetor: 300 °C, Split: 1/100. Temp. detector FID: 300 °C. Volume de injeção: 1 µL (conc. 1,0% em hexano).

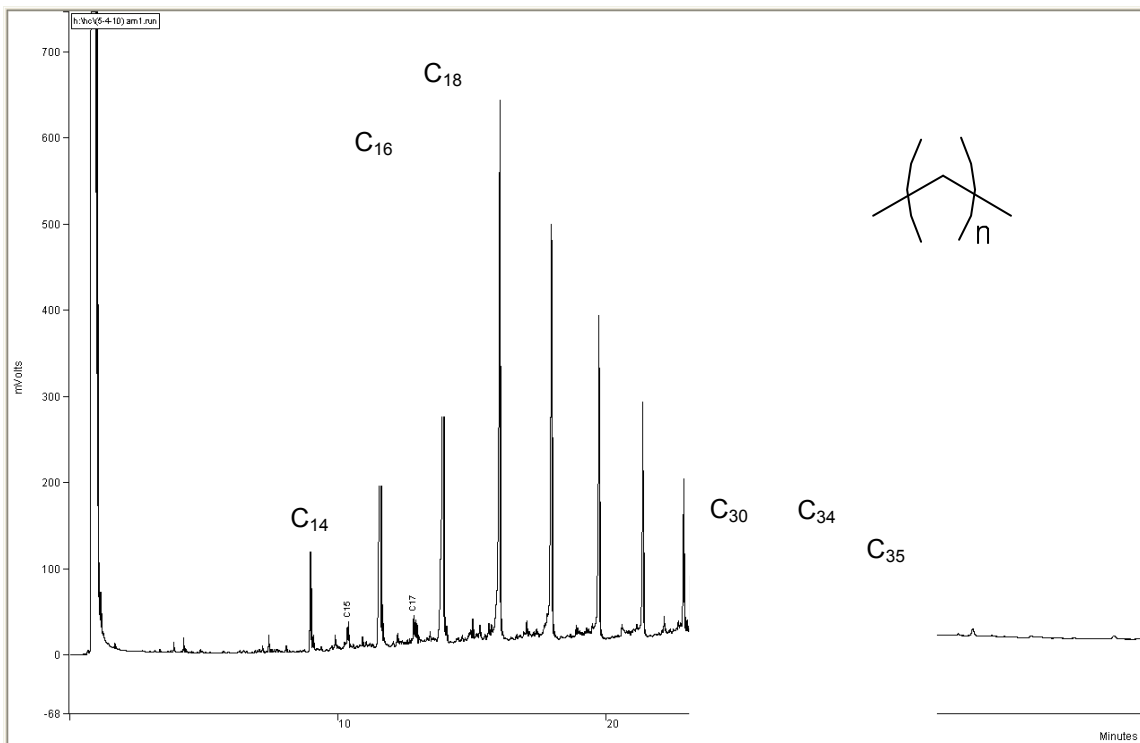


Figura 14A - Cromatograma de R1. Coluna: DB5 30m x 0,25mm (J&W Scientific). Temp. coluna: 50 °C (1min), 10 °C/min, até 300 °C. Temp. injetor: 300 °C, Split: 1/100. Temp. detector FID: 300 °C. Volume de injeção: 1 µL (conc. 1,0% em hexano).

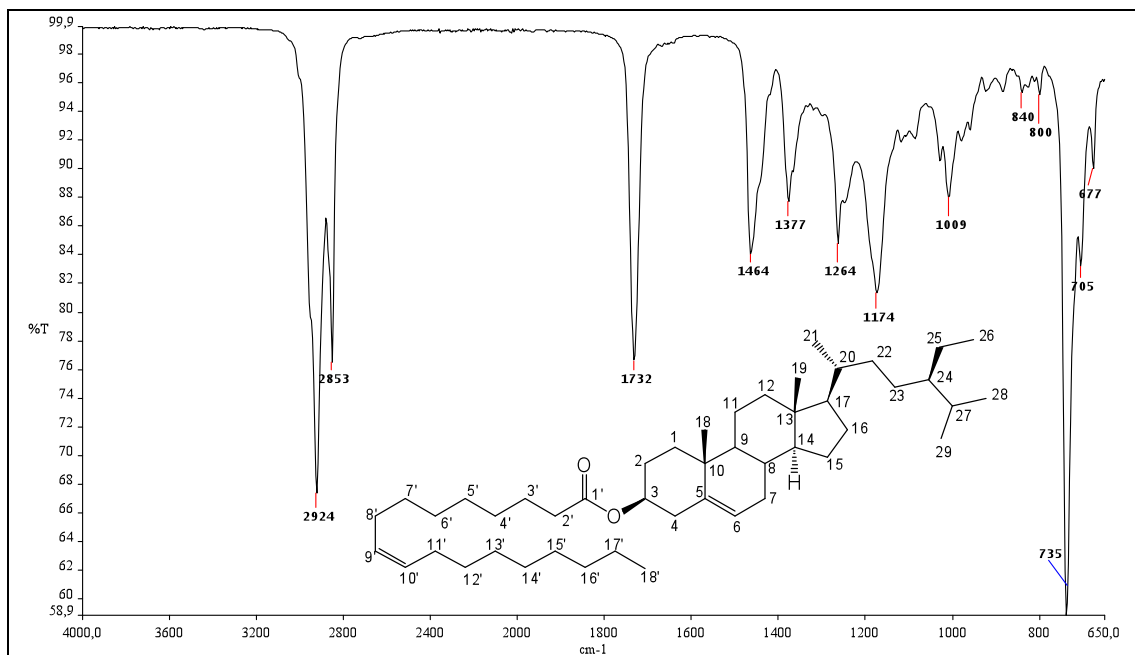


Figura 15A - Espectro de absorção na região do infravermelho de R2.

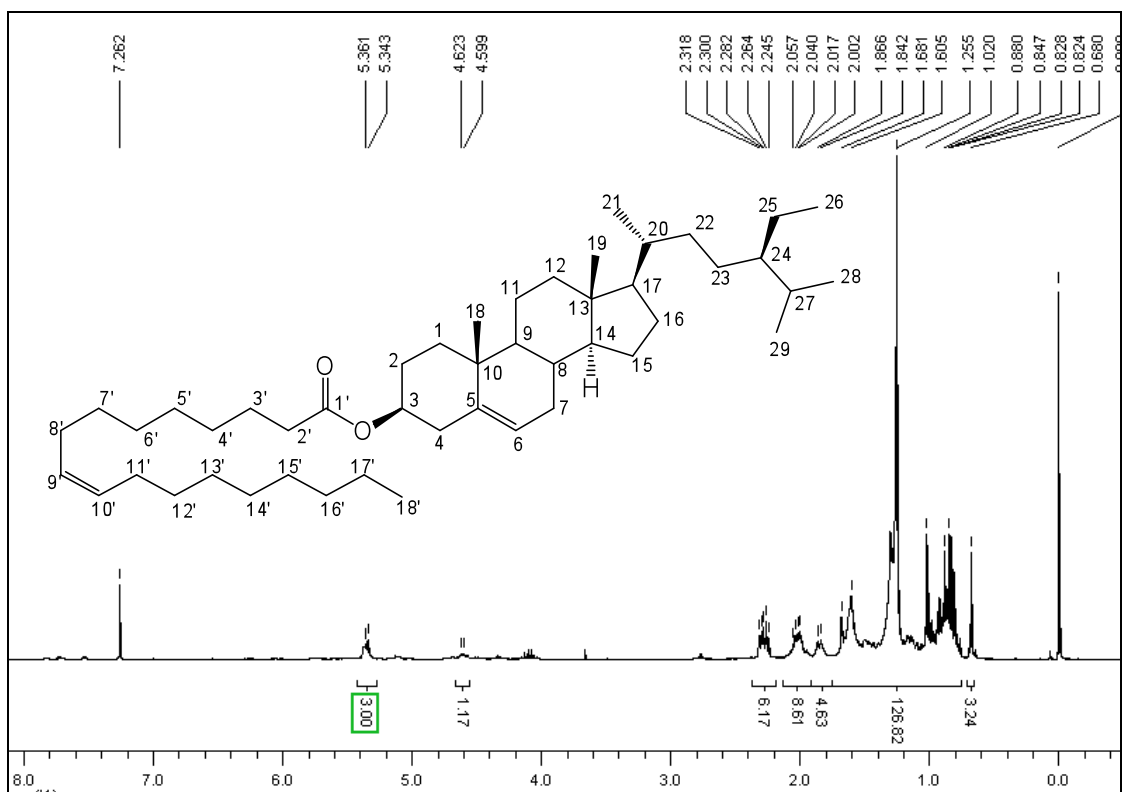


Figura 16A - Espectro de RMN de ¹H de R2 (CDCl₃; 400 MHz).

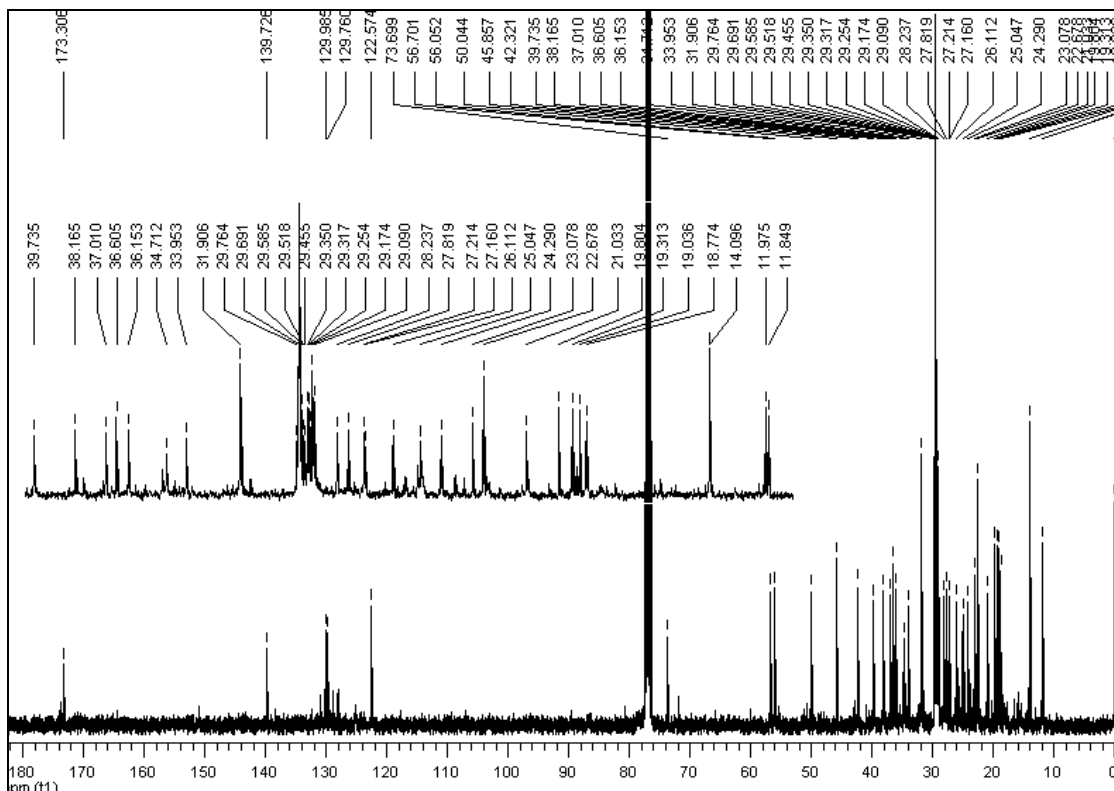


Figura 17A - Espectro de RMN de ^{13}C de R2 (CDCl_3 ; 100 MHz).

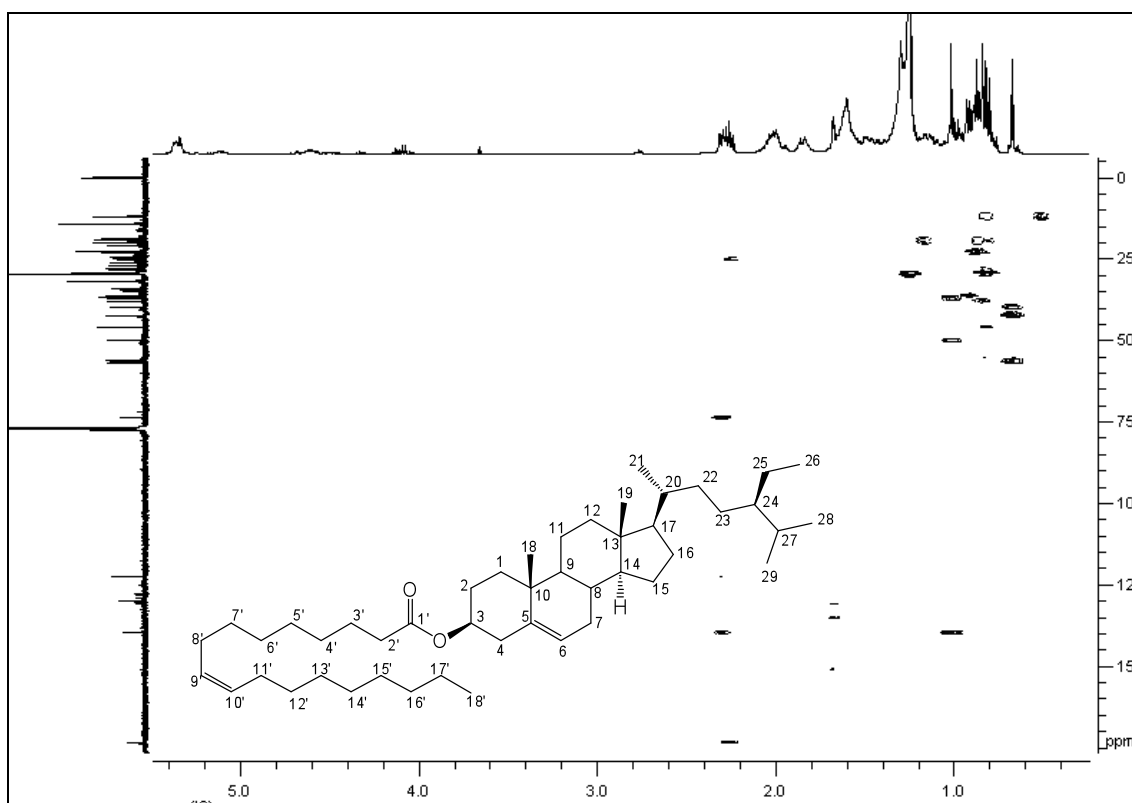


Figura 18A - Expansão do mapa de contornos HMBC de R2 (CDCl_3 ; 400 MHz).

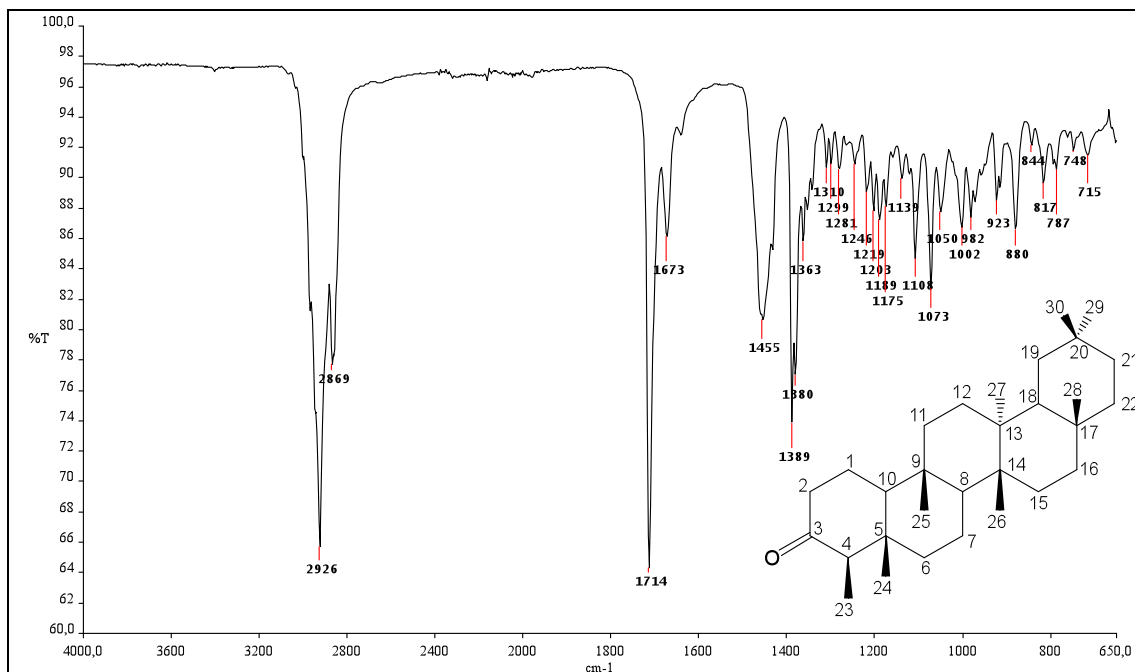


Figura 19A - Espectro de absorção na região do infravermelho de R3.

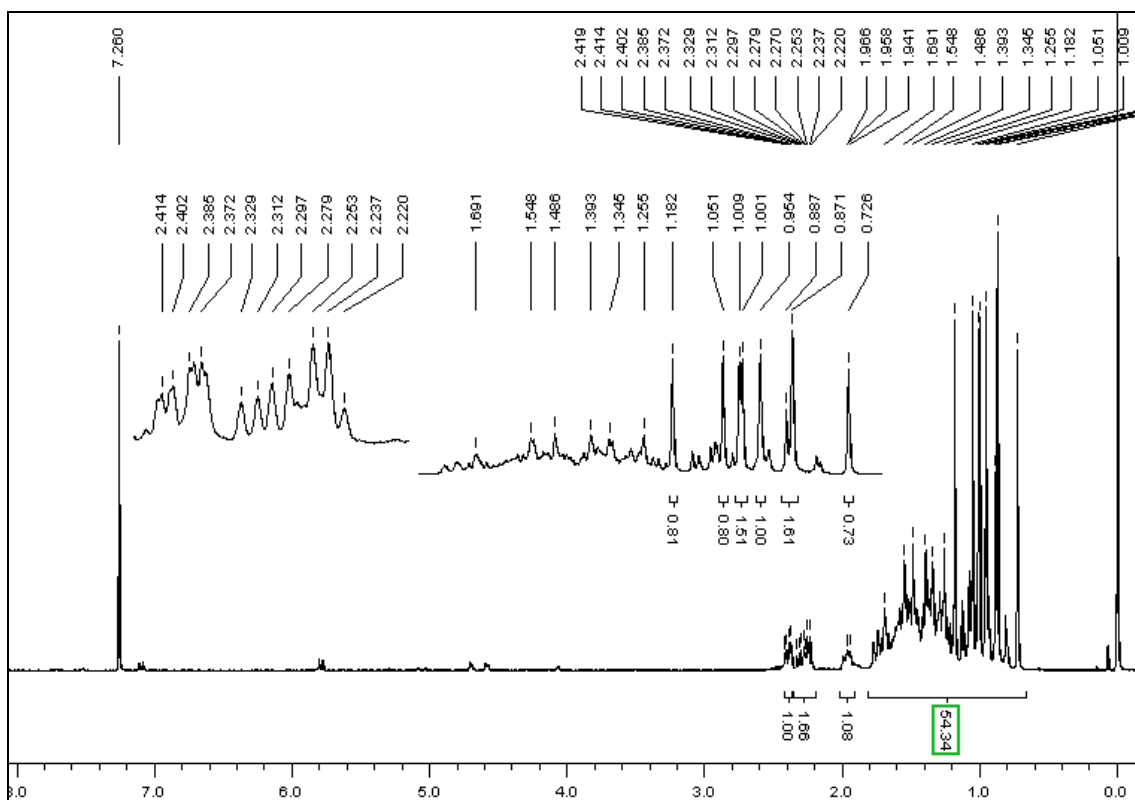


Figura 20A - Espectro de RMN de ¹H de R3 (CDCl₃; 400 MHz).

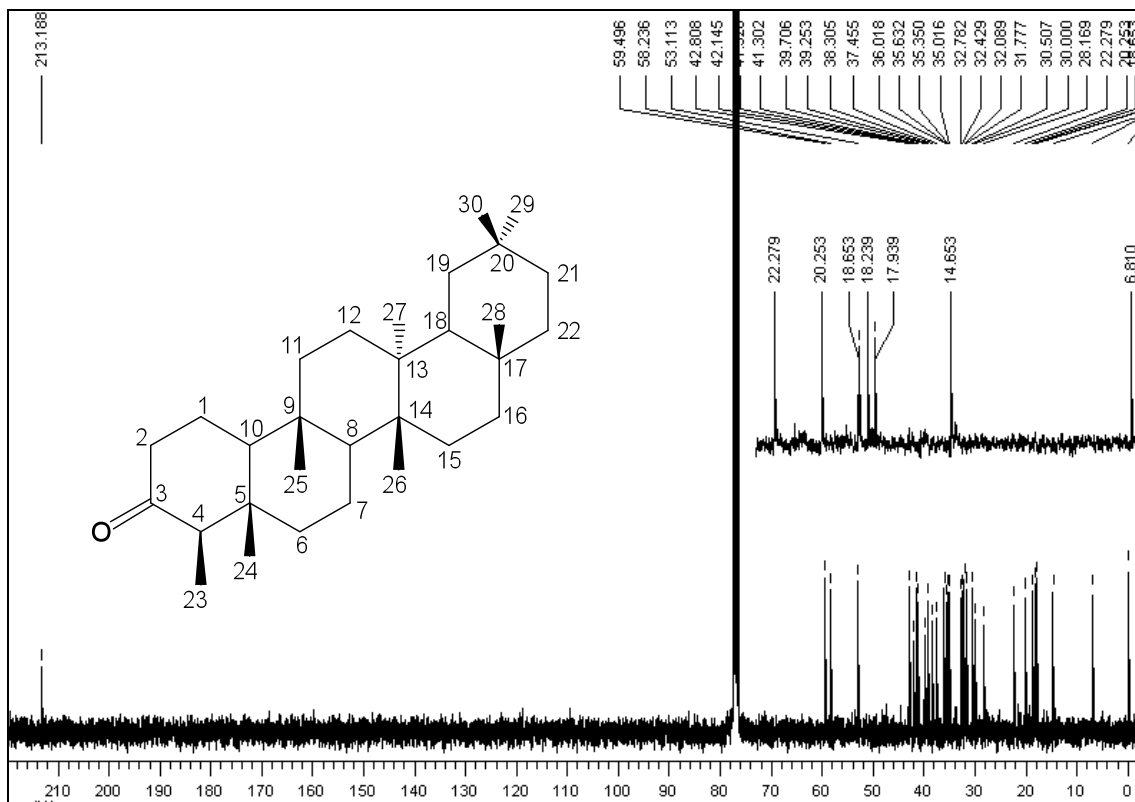


Figura 21A - Espectro de RMN de ^{13}C de **R3** (CDCl₃; 100 MHz).

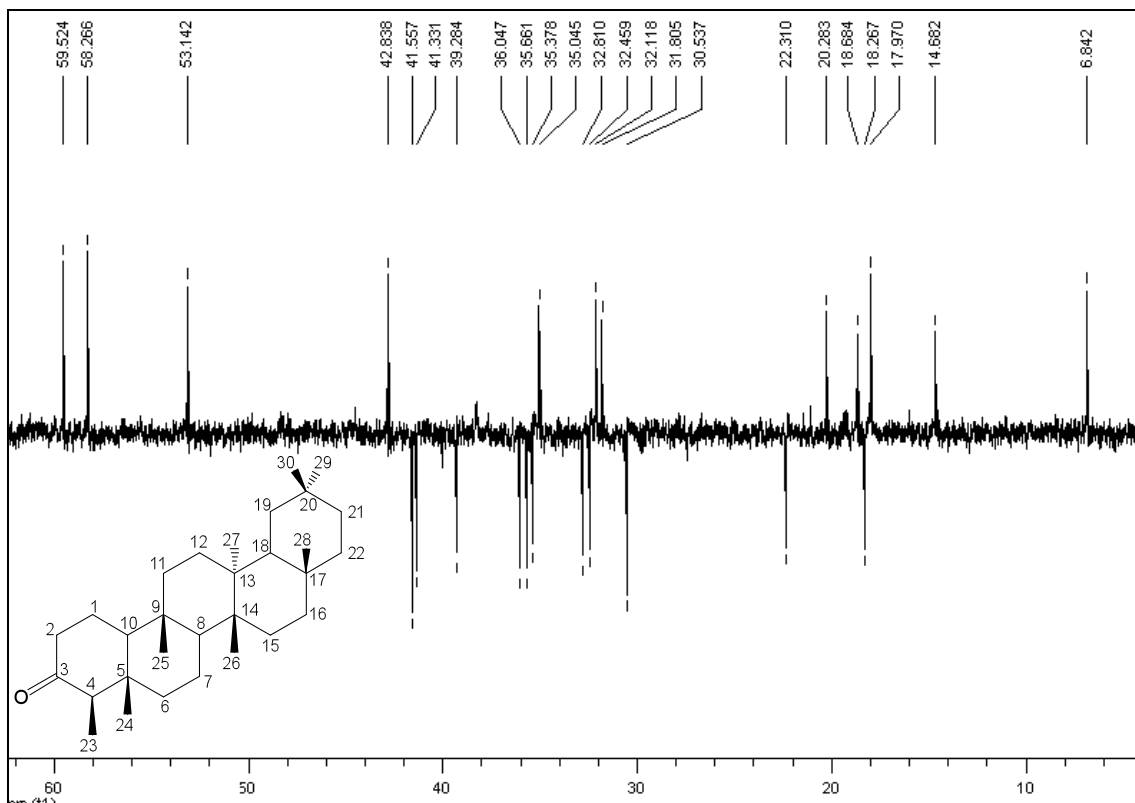


Figura 22A - Subespectro DEPT-135 de **R3** (CDCl₃; 100 MHz).

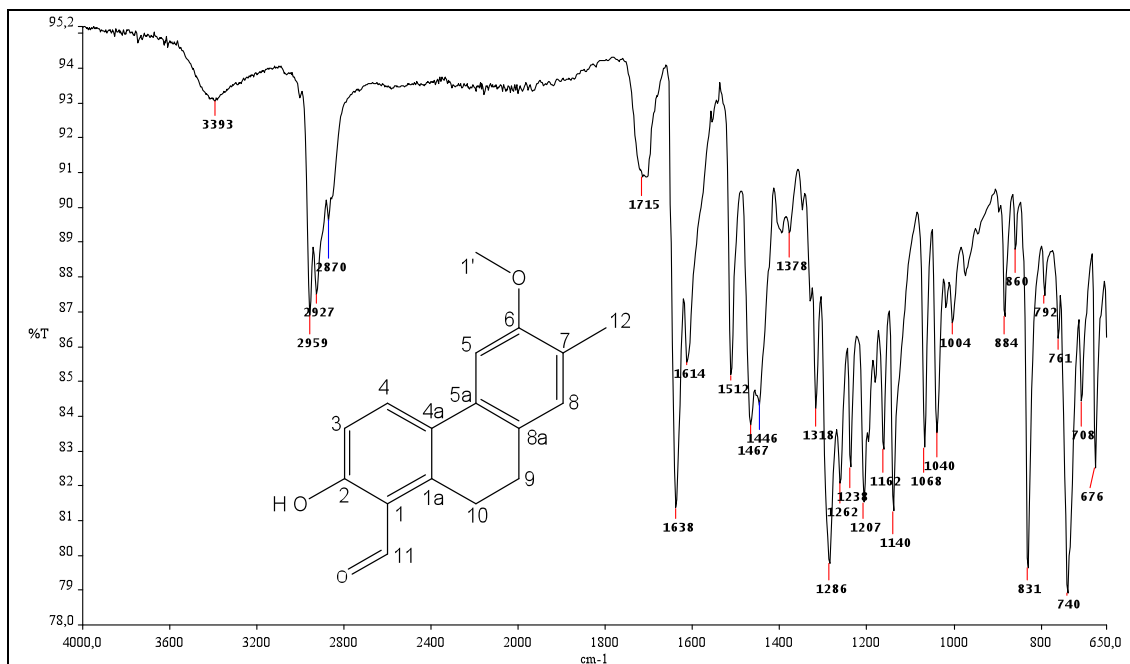


Figura 23A - Espectro de absorção na região do infravermelho de R4.

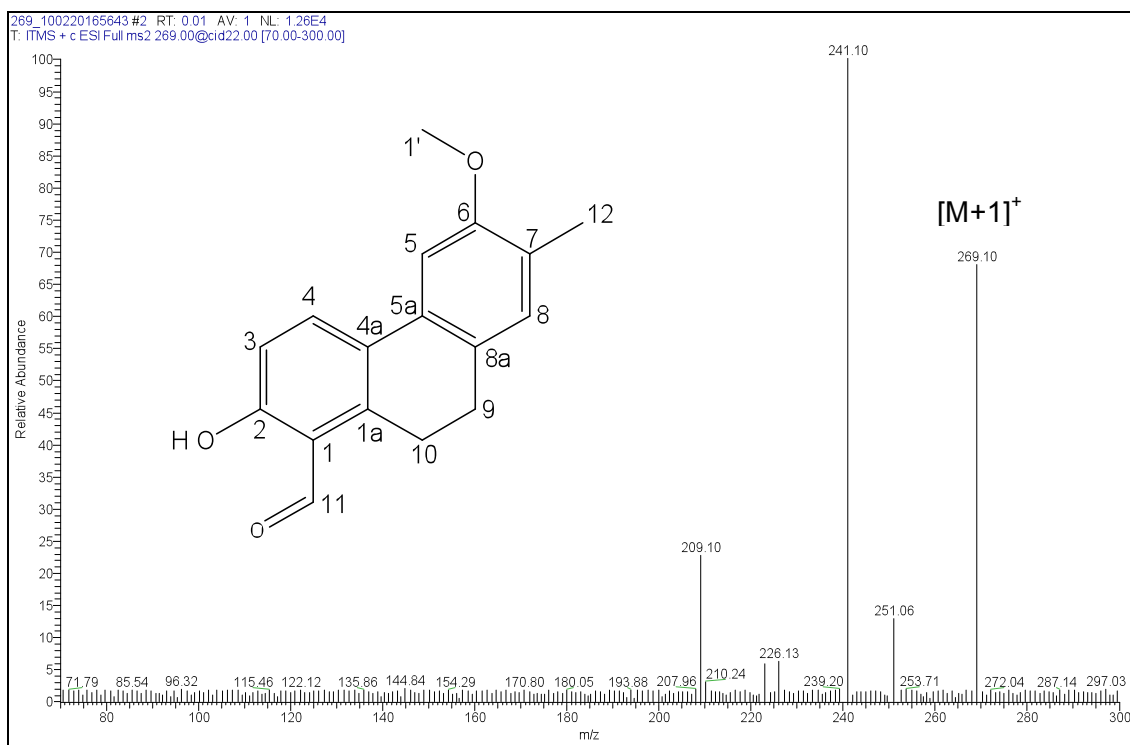


Figura 24A - Espectro de Massas de R4 (ionização por electrospray - modo positivo).

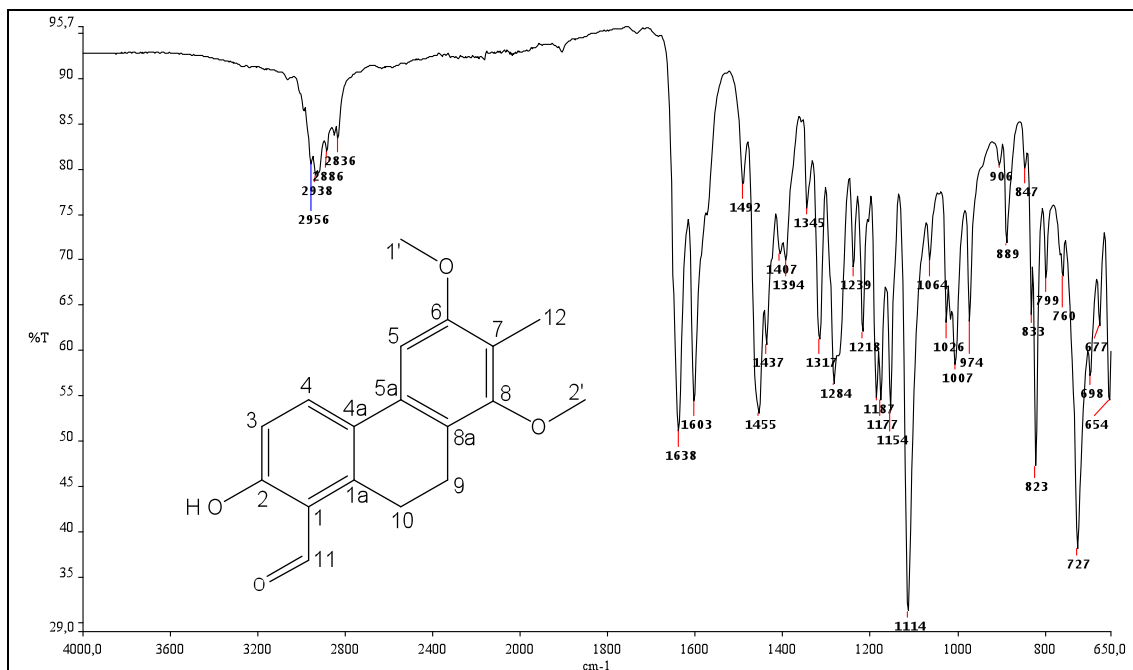


Figura 25A - Espectro de absorção na região do infravermelho de R5.

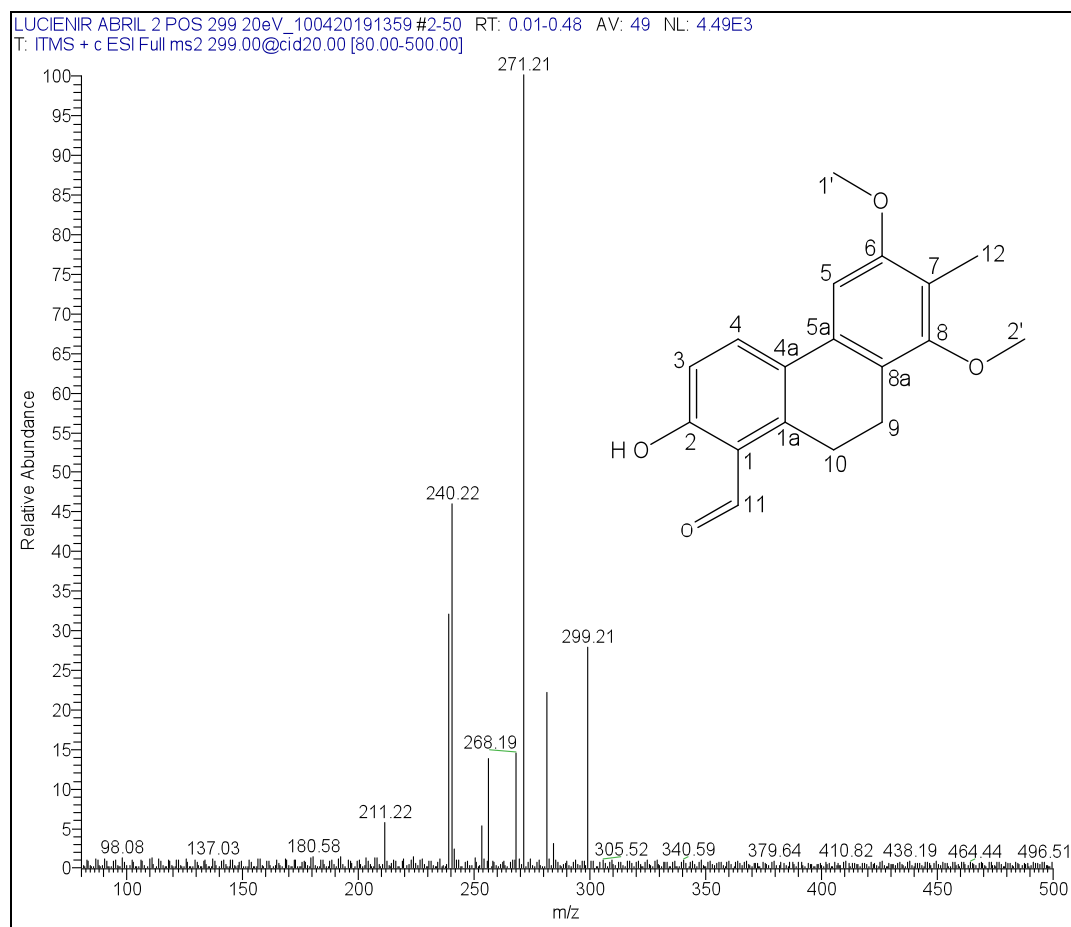


Figura 26A - Espectro de Massas de R5 (ionização por electrospray - modo positivo).

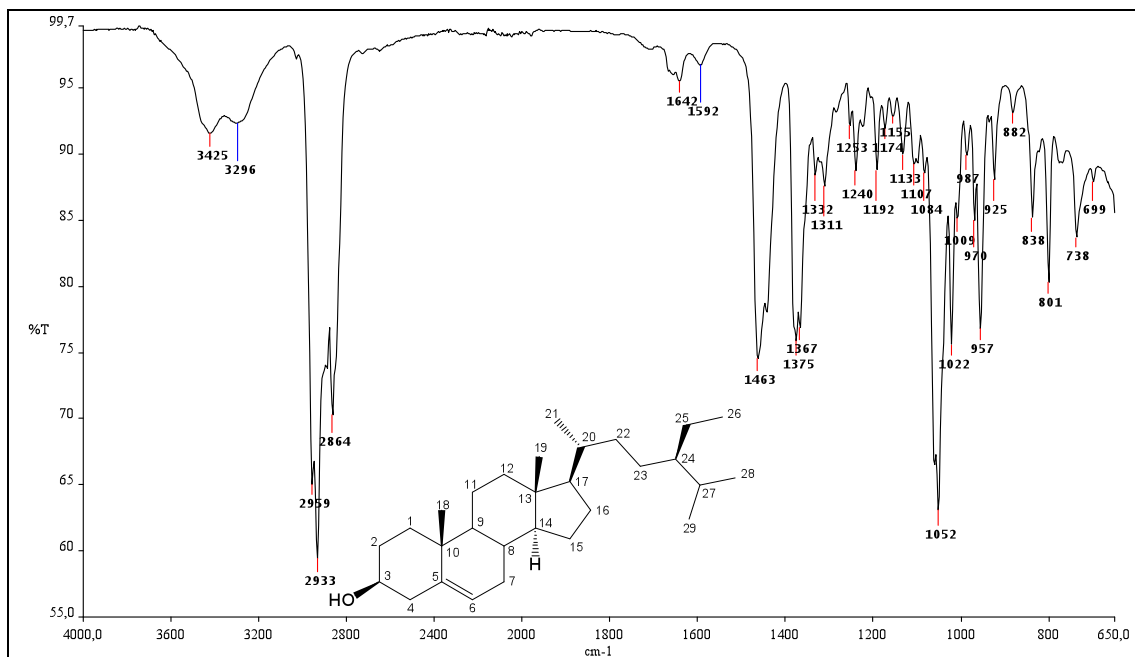


Figura 27A - Espectro de absorção na região do infravermelho de R6.

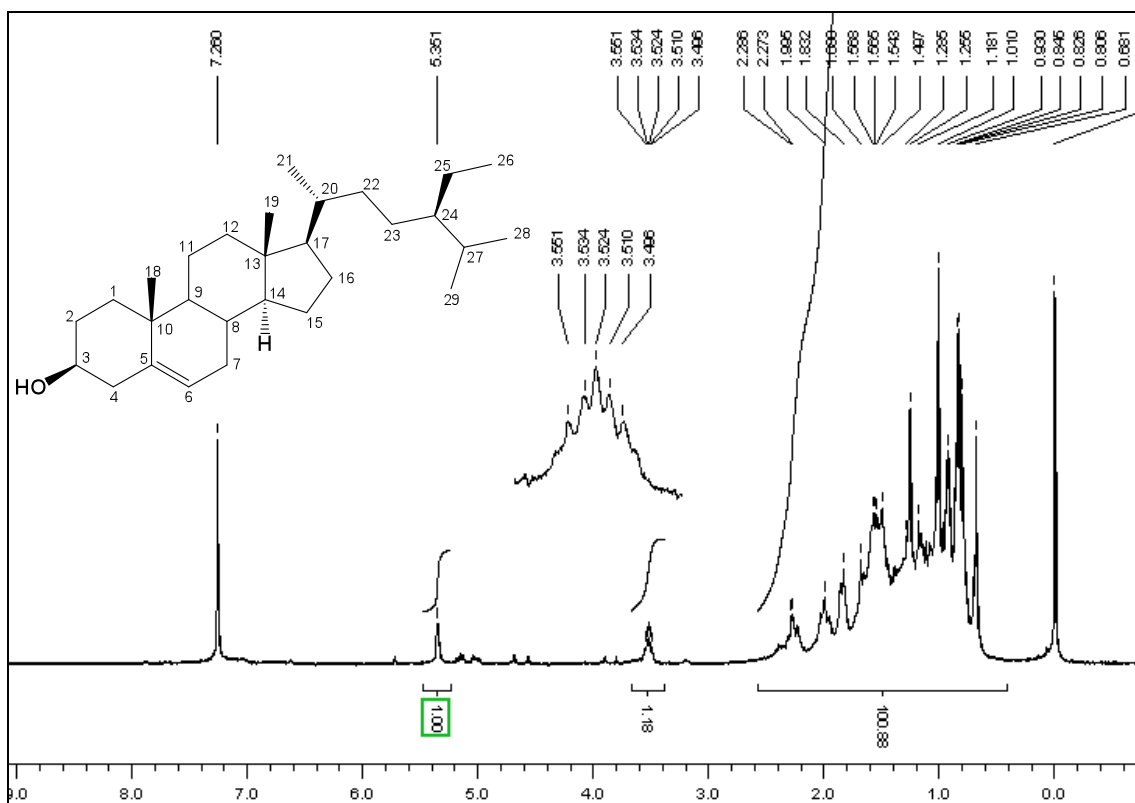


Figura 28A - Espectro de RMN de ¹H de R6 (CDCl₃; 400 MHz).

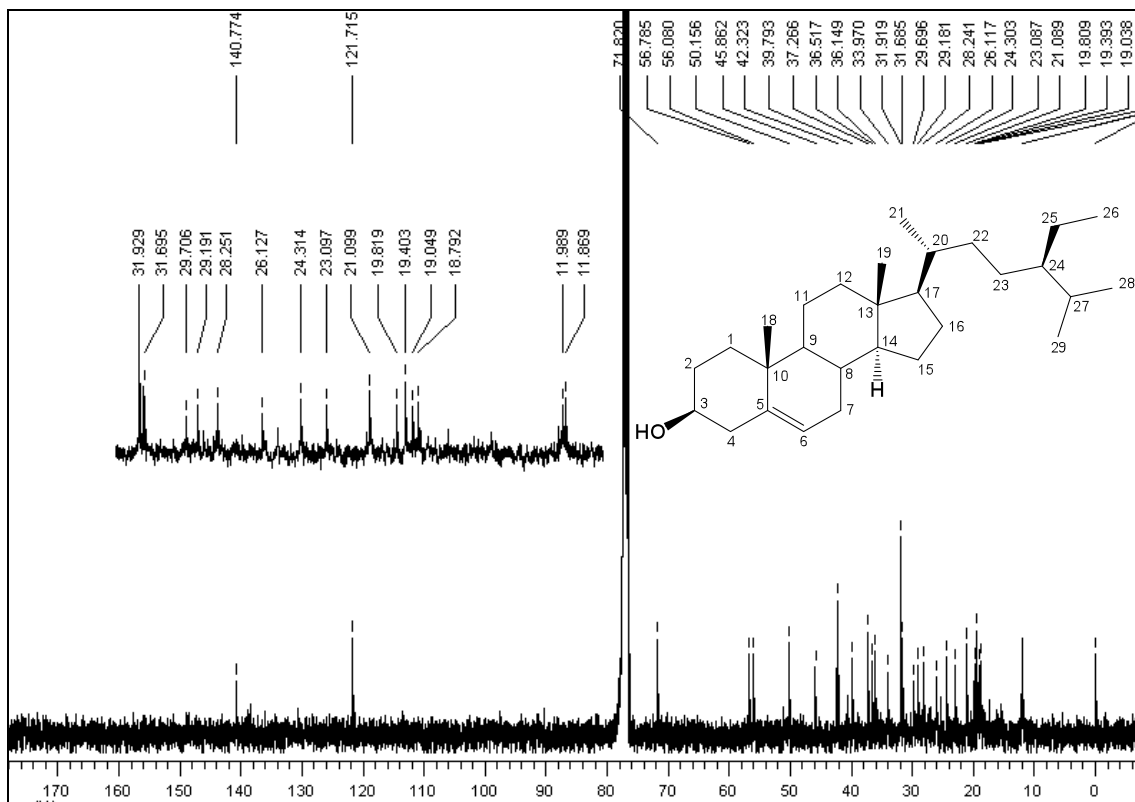


Figura 29A - Espectro de RMN de ^{13}C de **R6** (CDCl_3 ; 100 MHz).

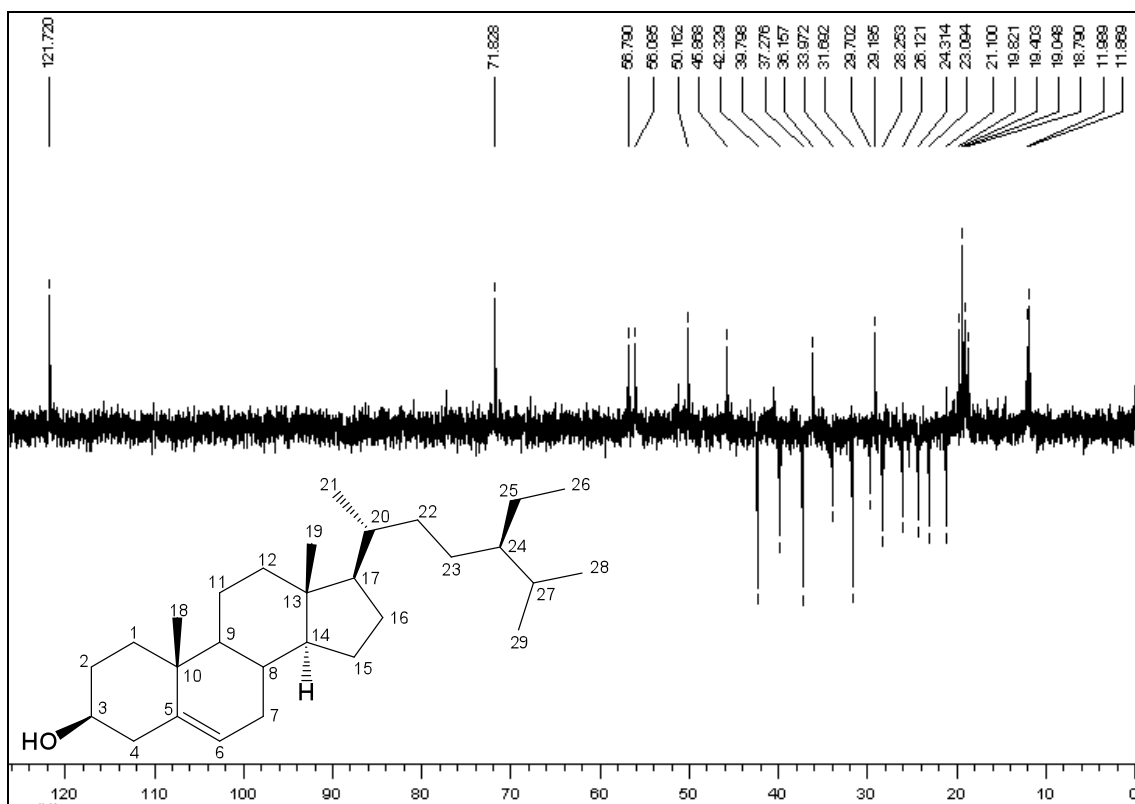


Figura 30A - Subespectro DEPT-135 de **R6** (CDCl_3 ; 100 MHz).

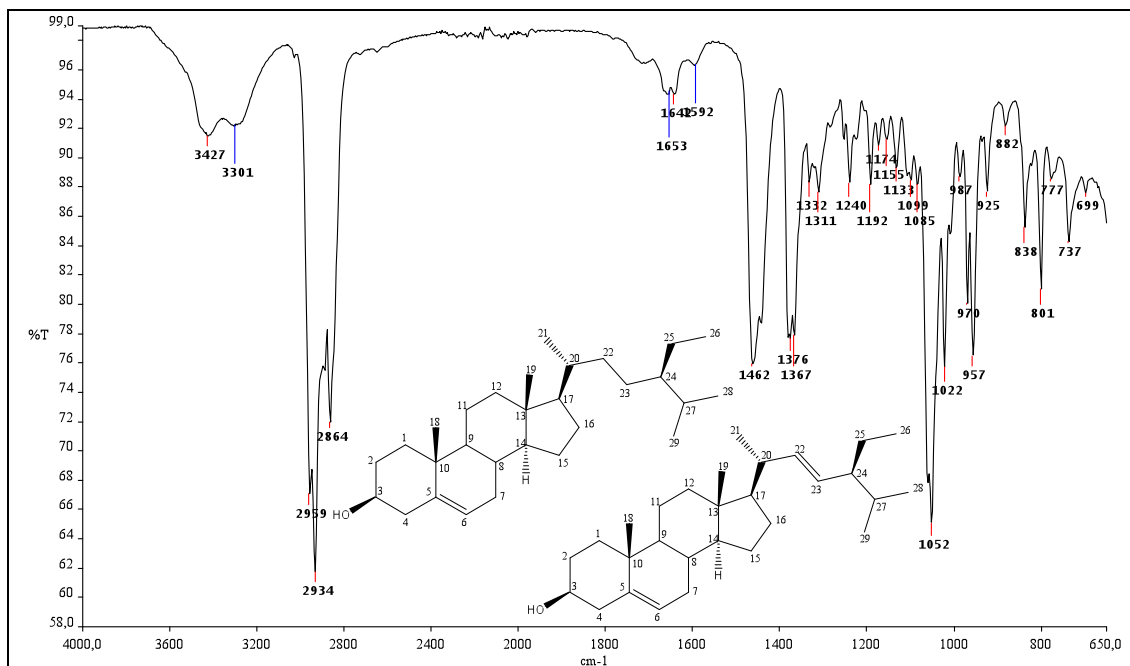


Figura 31A - Espectro de absorção na região do infravermelho de R7.

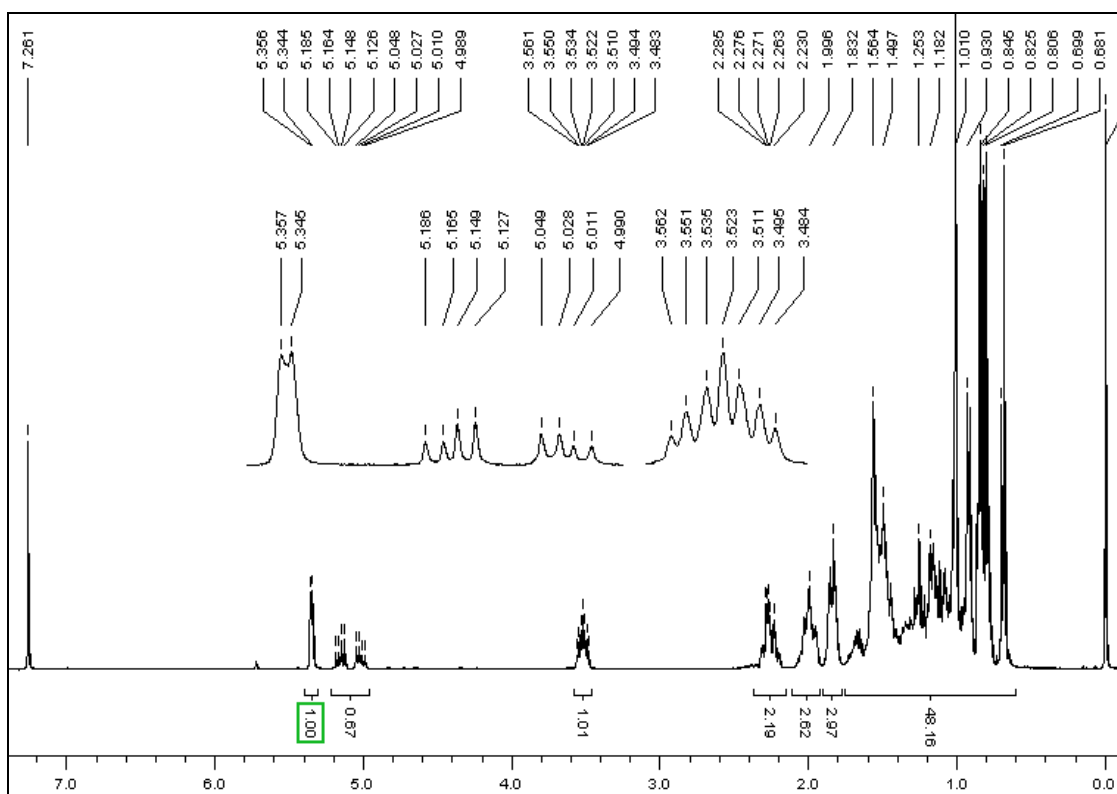


Figura 32A - Espectro de RMN de ¹H de R7 (CDCl₃; 400 MHz).

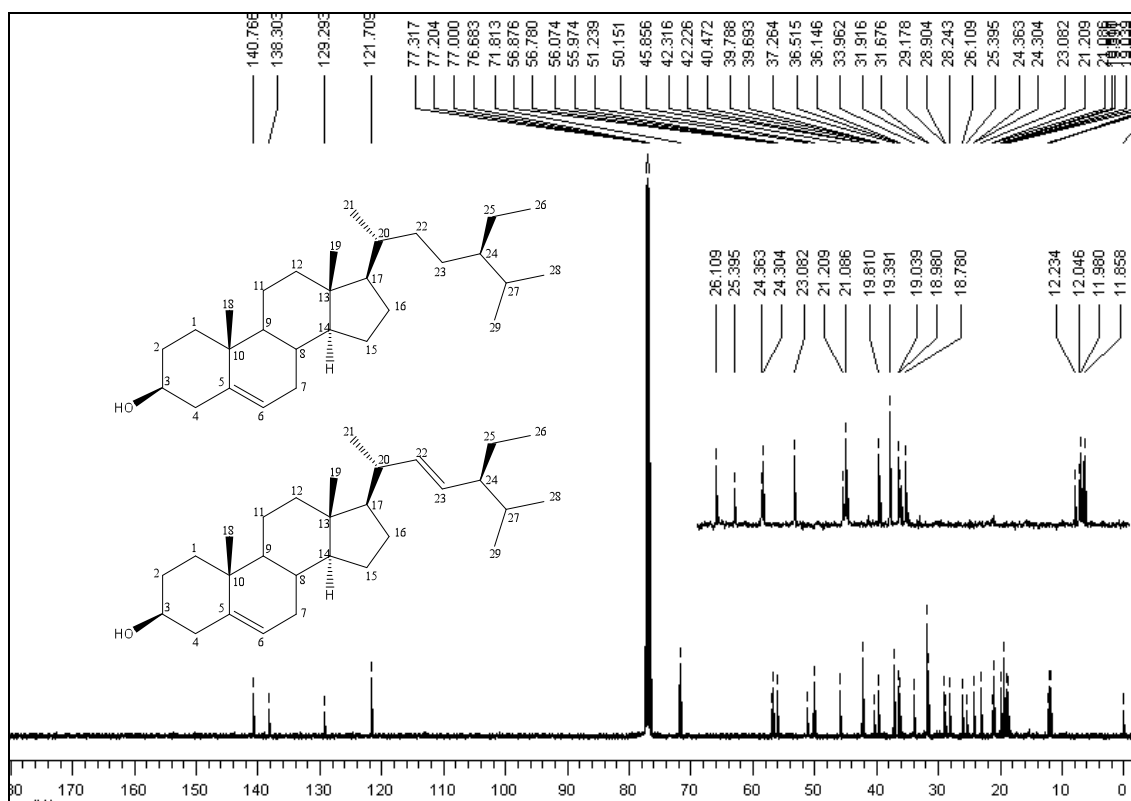


Figura 33A - Espectro de RMN de ^{13}C de R7 (CDCl_3 ; 100 MHz).

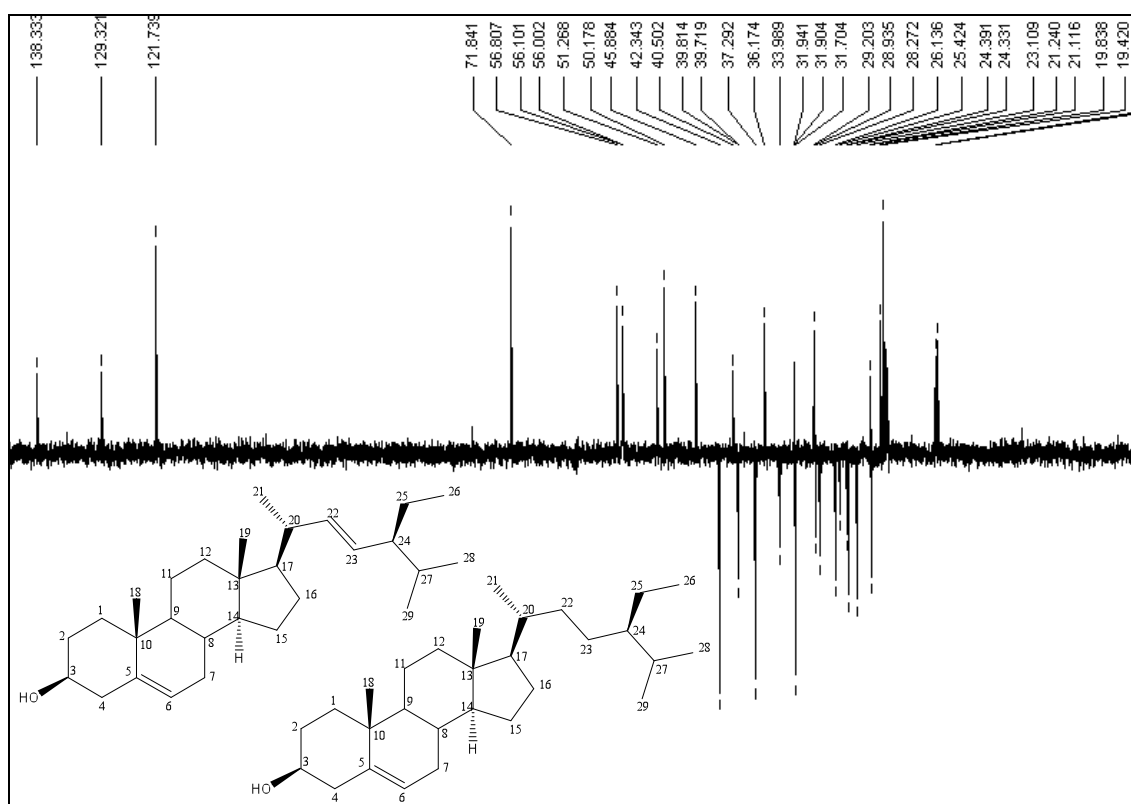


Figura 34A - Subespectro DEPT-135 de R7 (CDCl_3 ; 100 MHz).

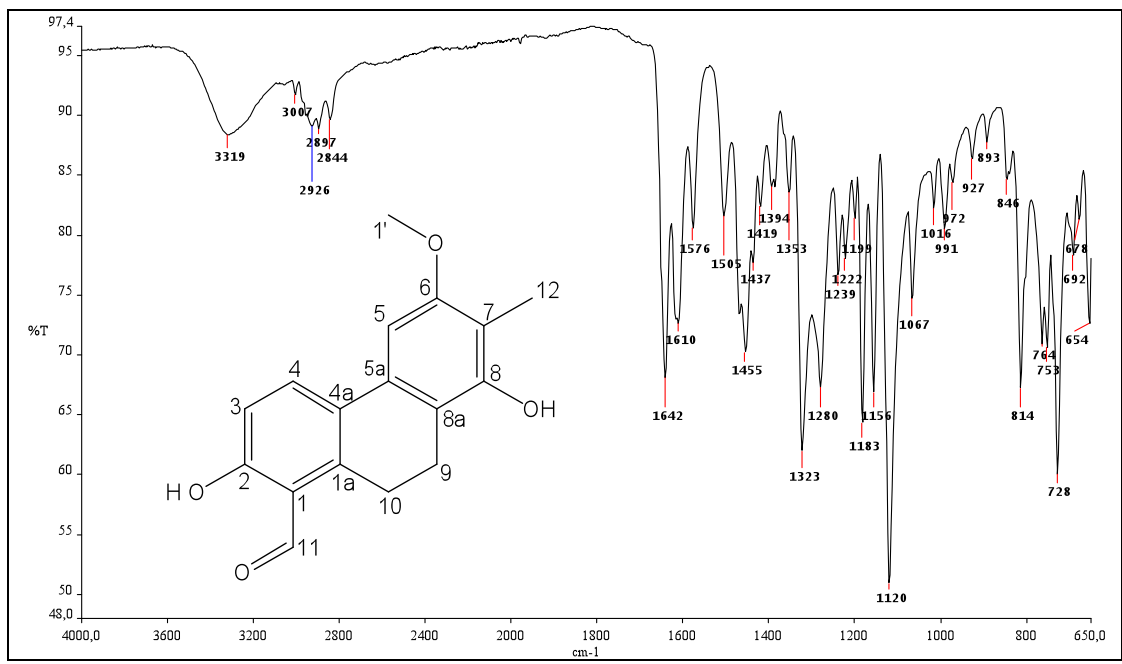


Figura 35A - Espectro de absorção na região do infravermelho de R8.

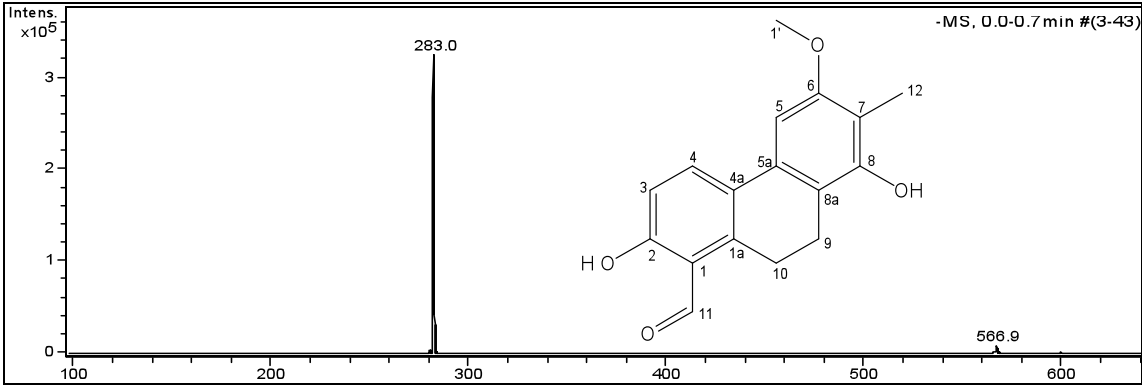


Figura 36A - Espectro de Massas de R8, (ionização por electrospray - modo negativo).

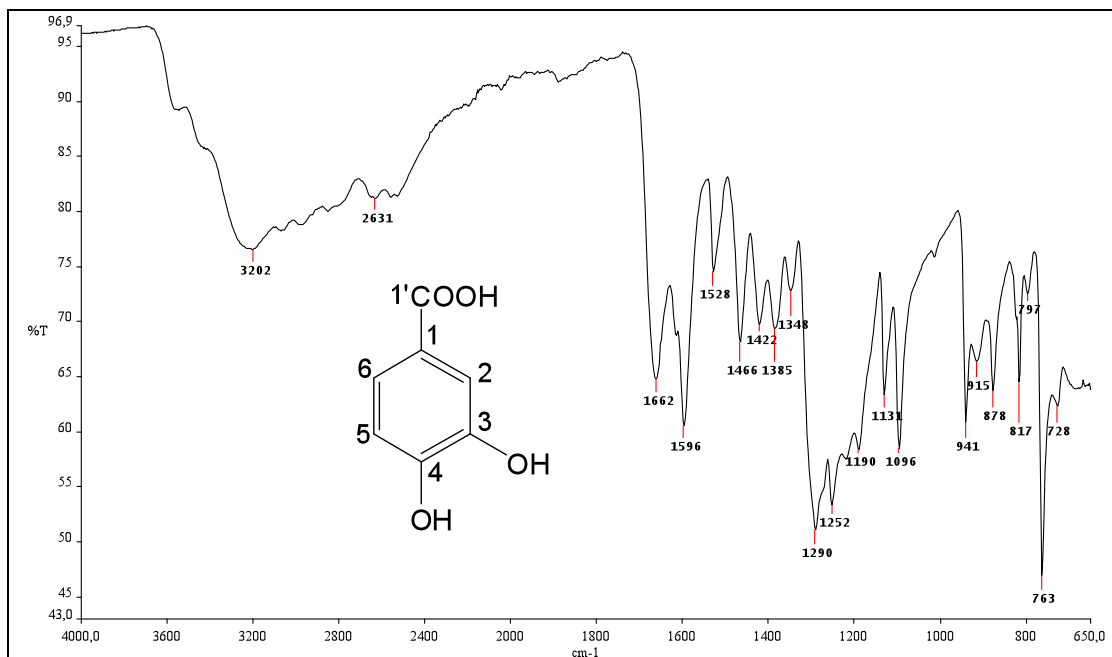


Figura 37A - Espectro de absorção na região do infravermelho de R9.

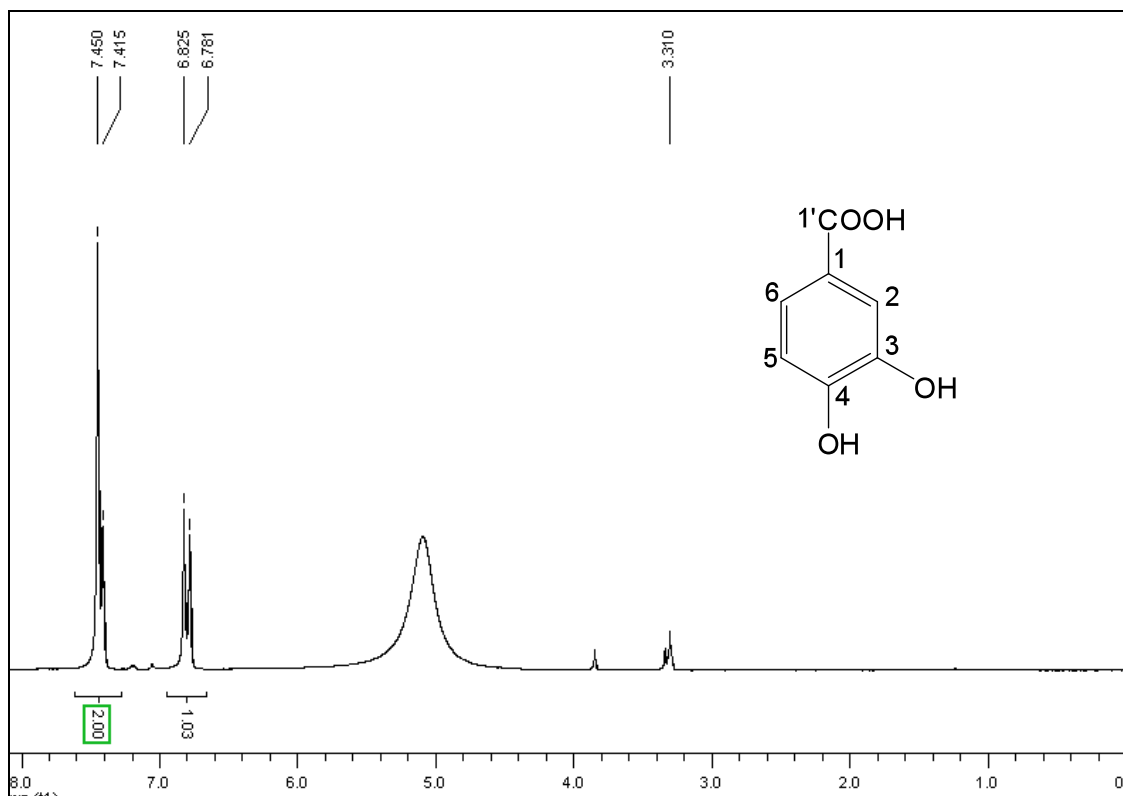


Figura 38A - Espectro de RMN de ^1H de R9 (CDCl_3 ; 200 MHz).

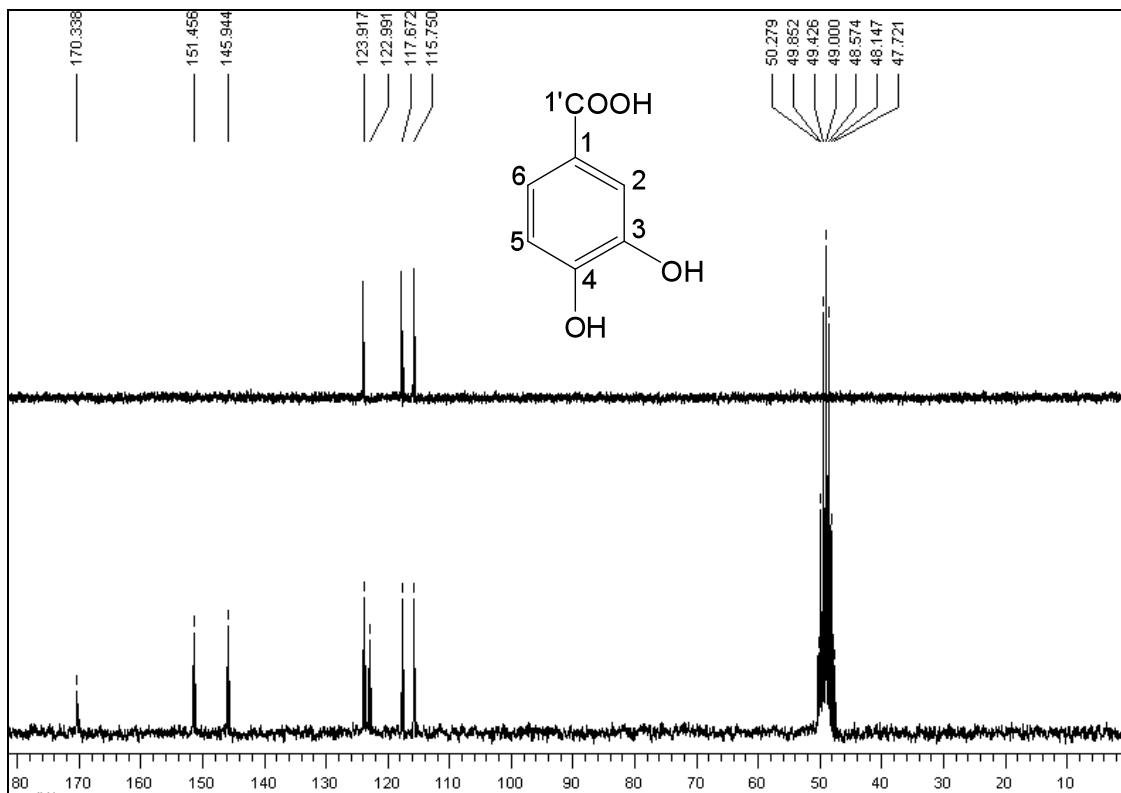


Figura 39A - Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 de **R9** (CDCl_3 ; 50 MHz).

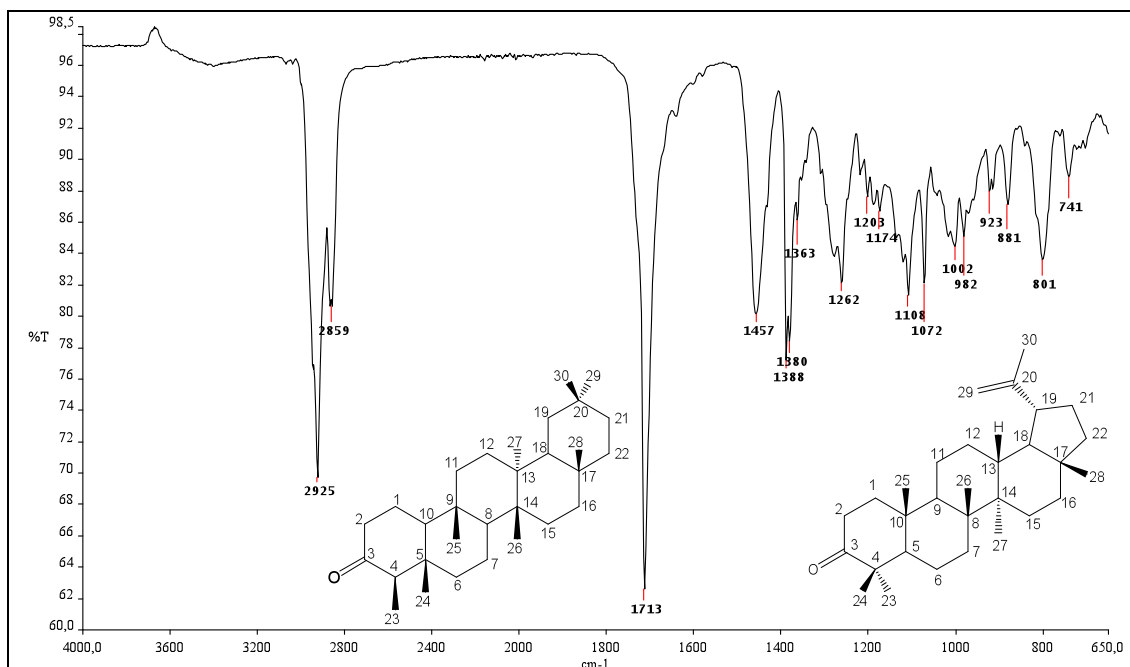


Figura 40A - Espectro de absorção na região do infravermelho de **R10**.

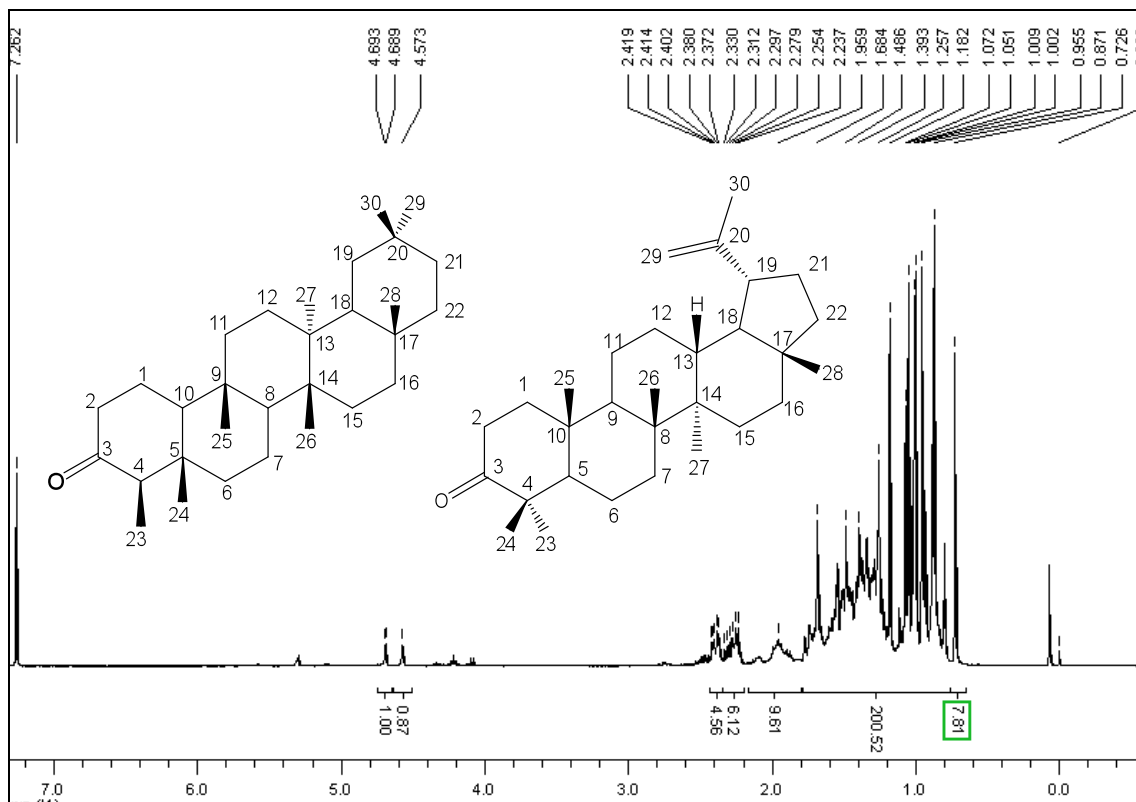


Figura 41A - Espectro de RMN de ^1H de R10 (CDCl_3 ; 400 MHz).

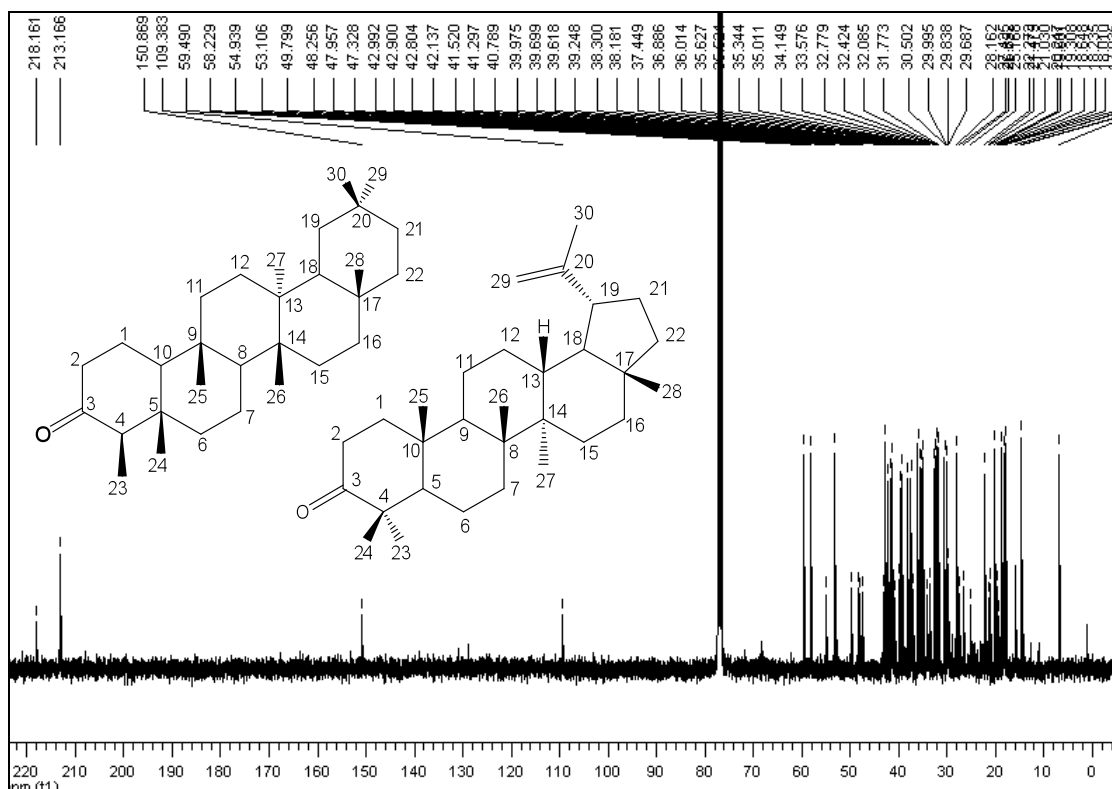


Figura 42A - Espectro de RMN de ^{13}C de R10 (CDCl_3 ; 100 MHz).

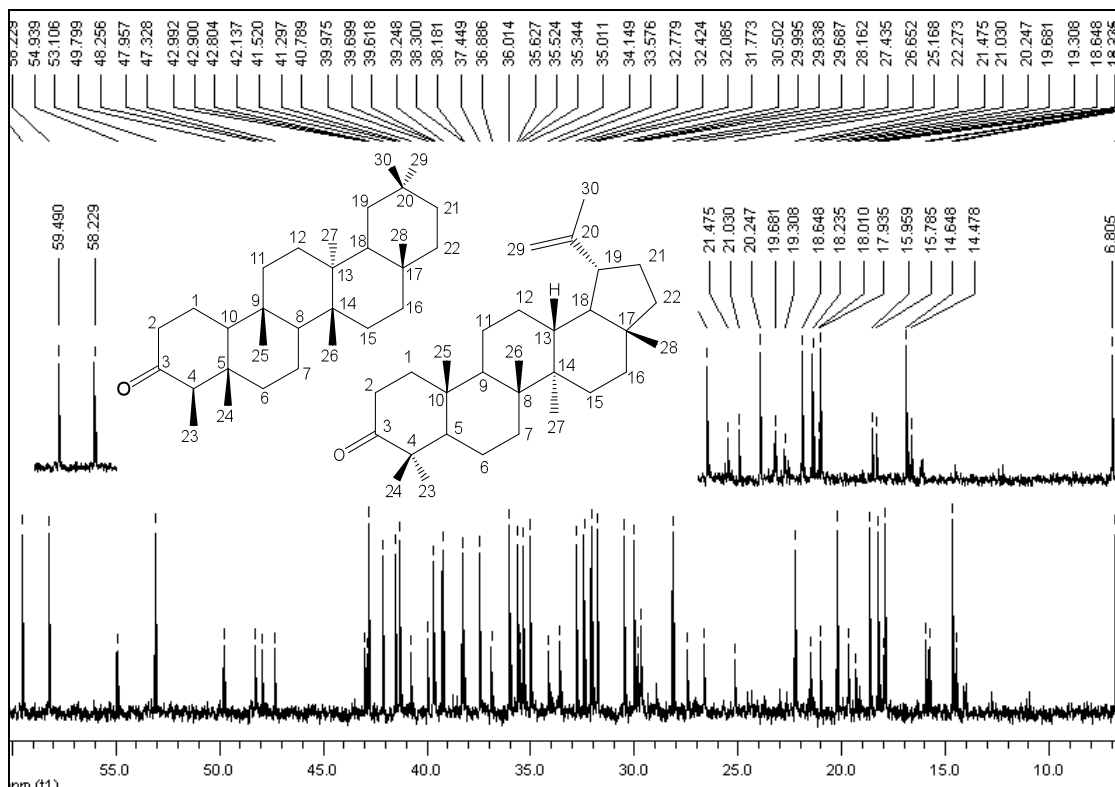


Figura 43A - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de R10 (CDCl_3 ; 100 MHz).

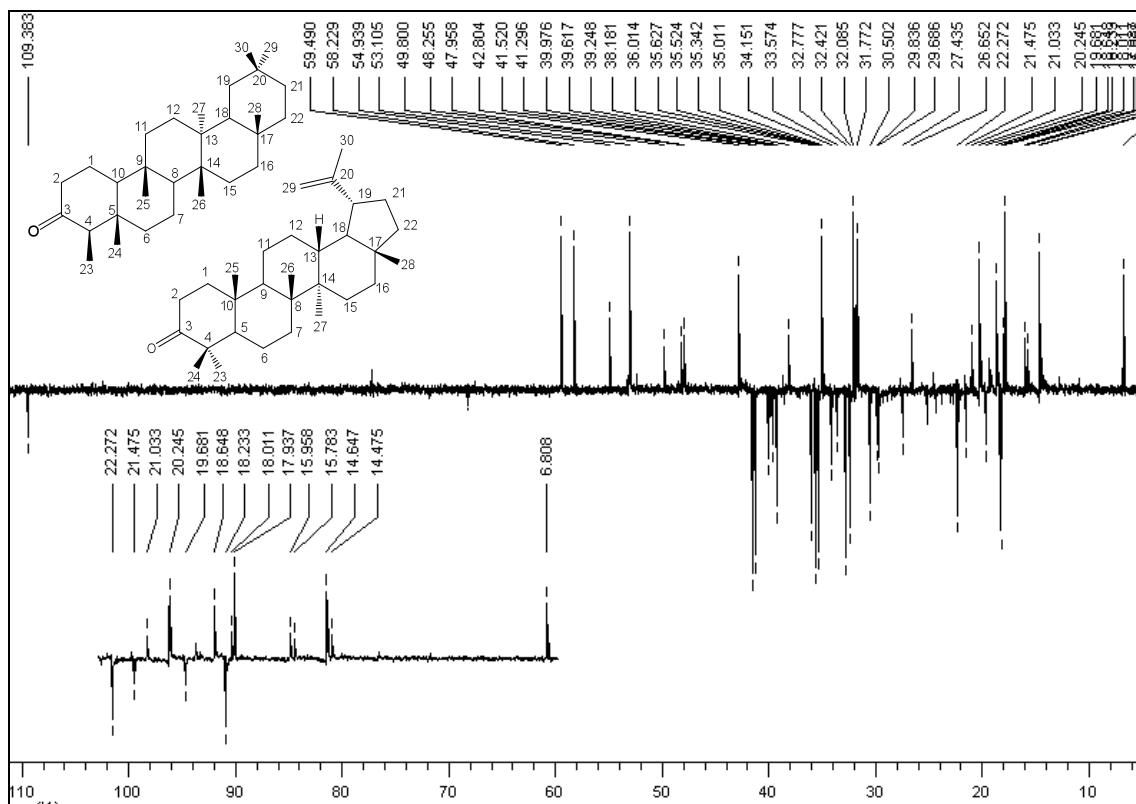


Figura 44A - Subespectro DEPT-135 de R10 (CDCl_3 ; 100 MHz).

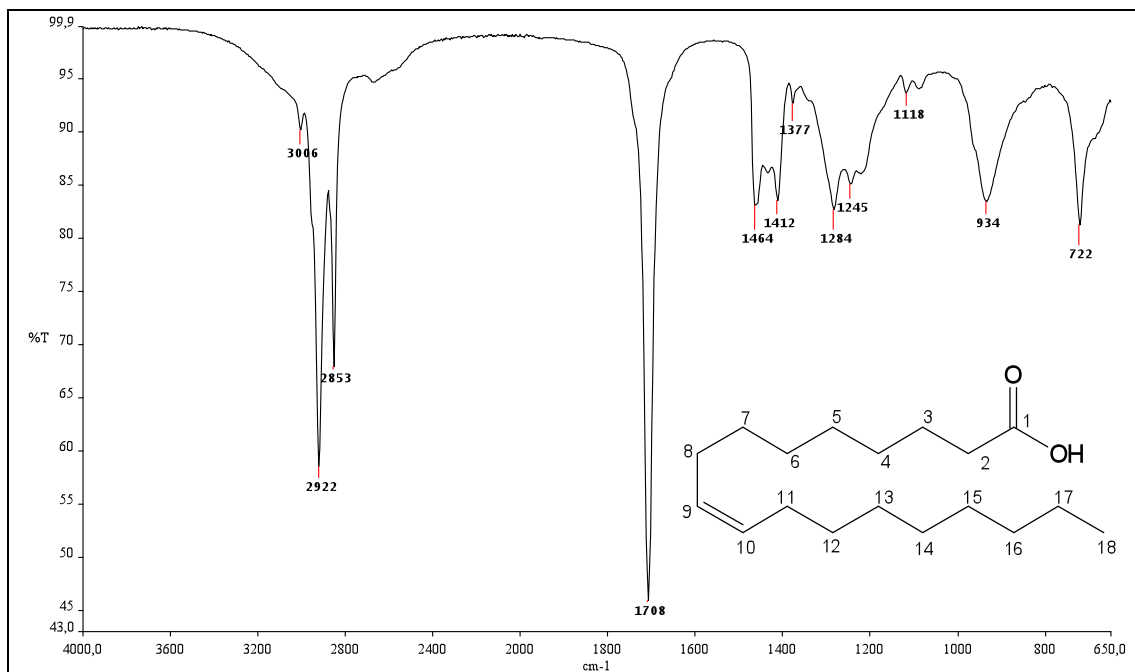


Figura 45A - Espectro de absorção na região do infravermelho de R11.

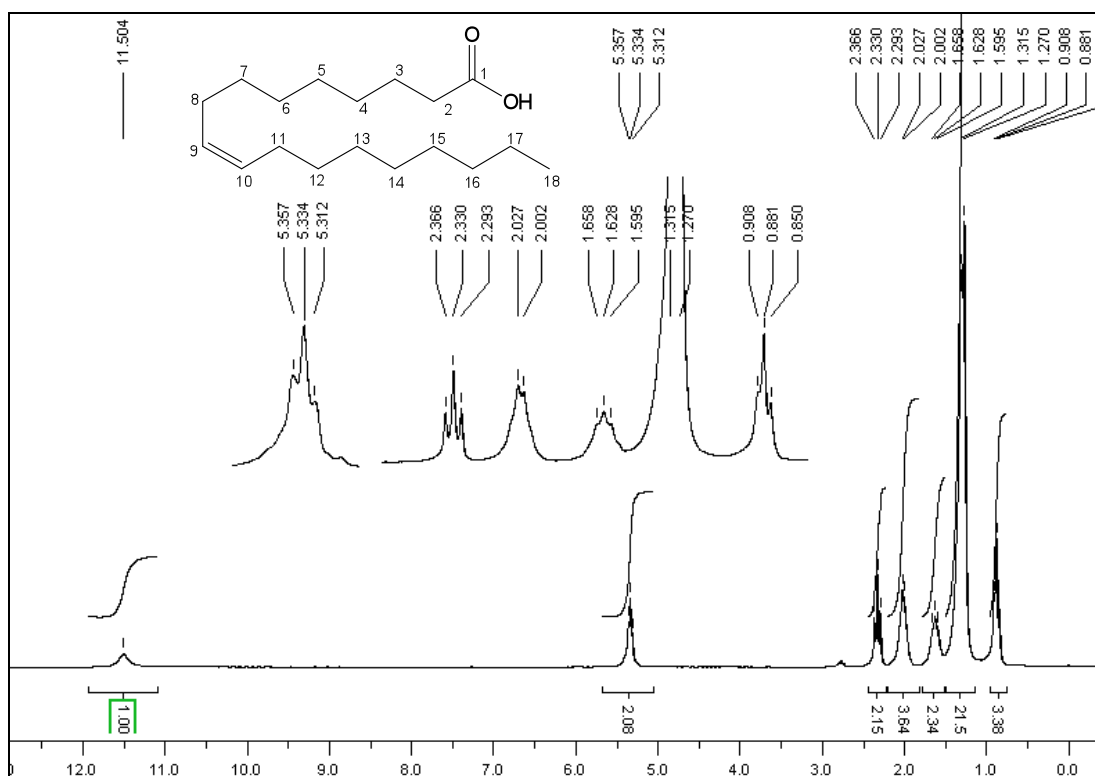


Figura 46A - Espectro de RMN de ¹H de R11 (CDCl₃; 200 MHz).

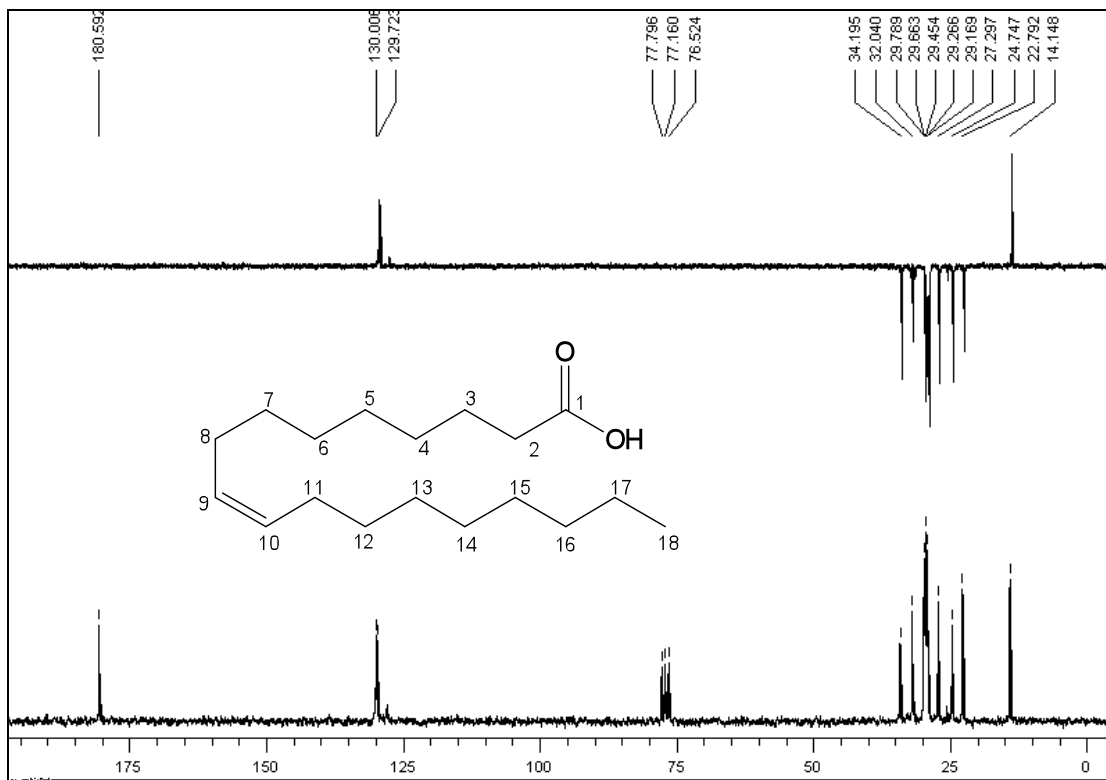


Figura 47A - Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 de R11 (CDCl_3 ; 50 MHz).

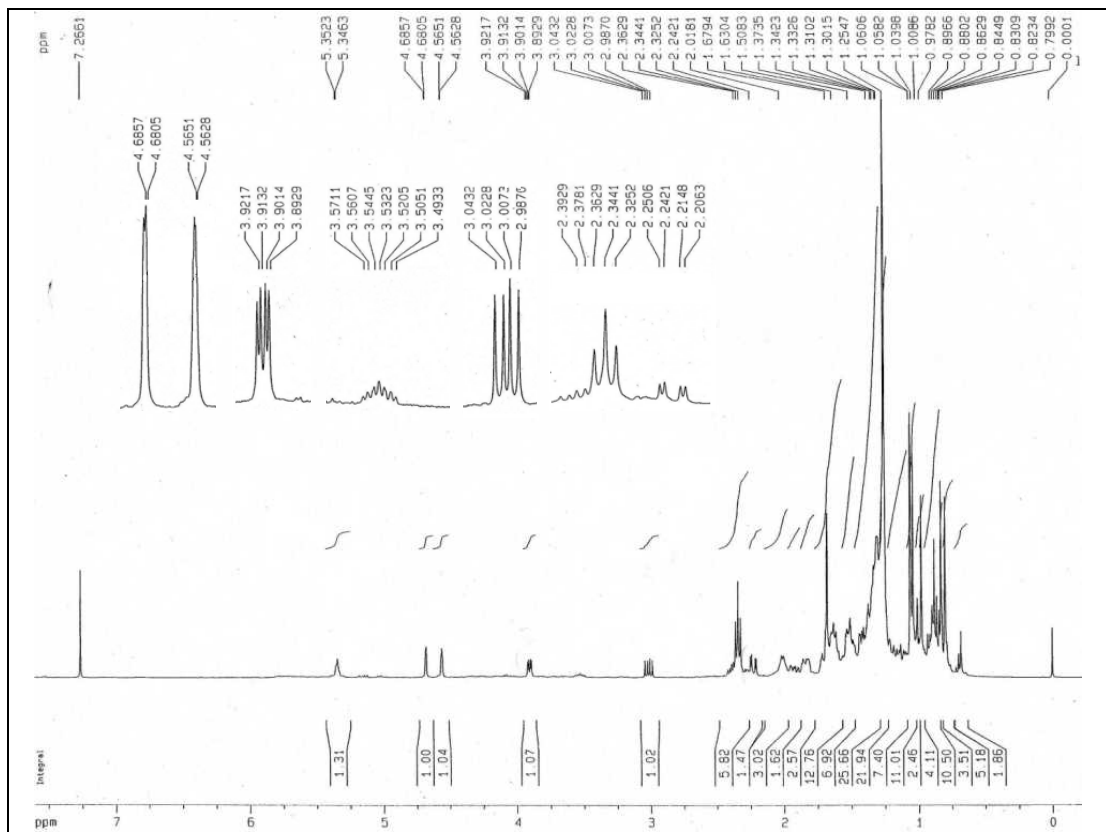


Figura 48A - Espectro de RMN de ^1H de R12 (CDCl_3 ; 400 MHz).

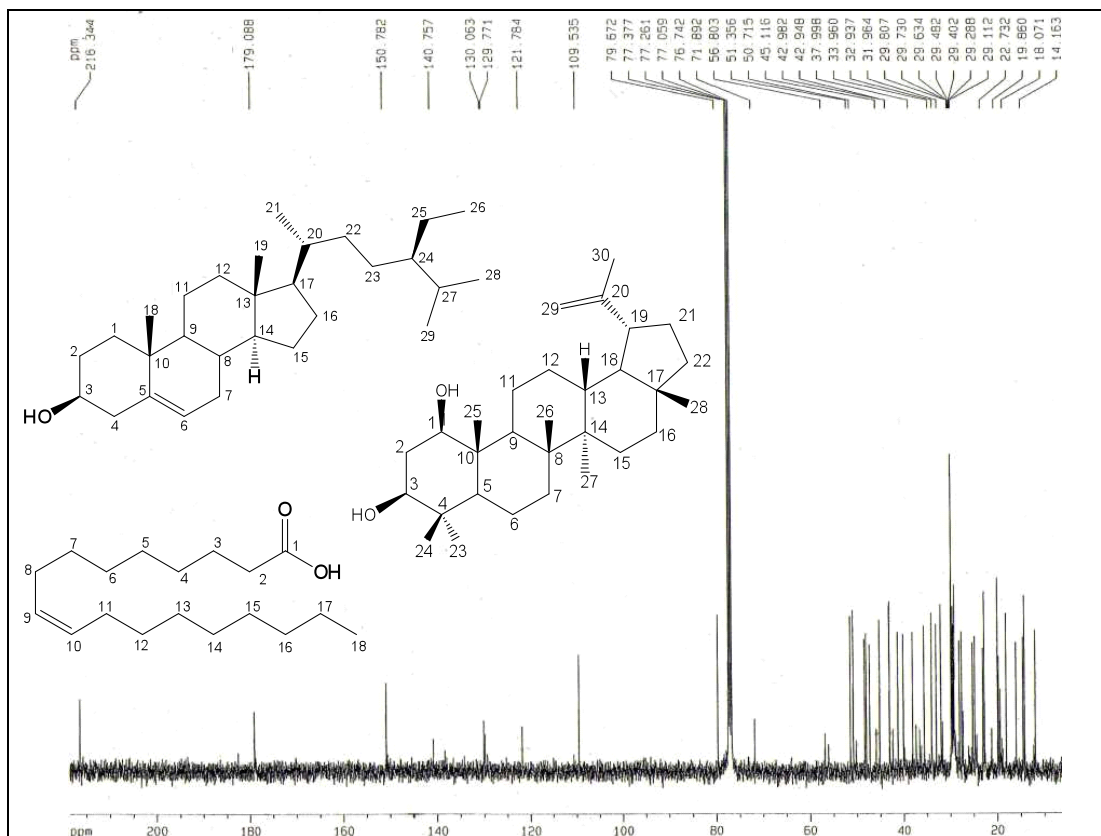


Figura 49A - Espectro de RMN de ^{13}C de R12 (CDCl_3 ; 100 MHz).

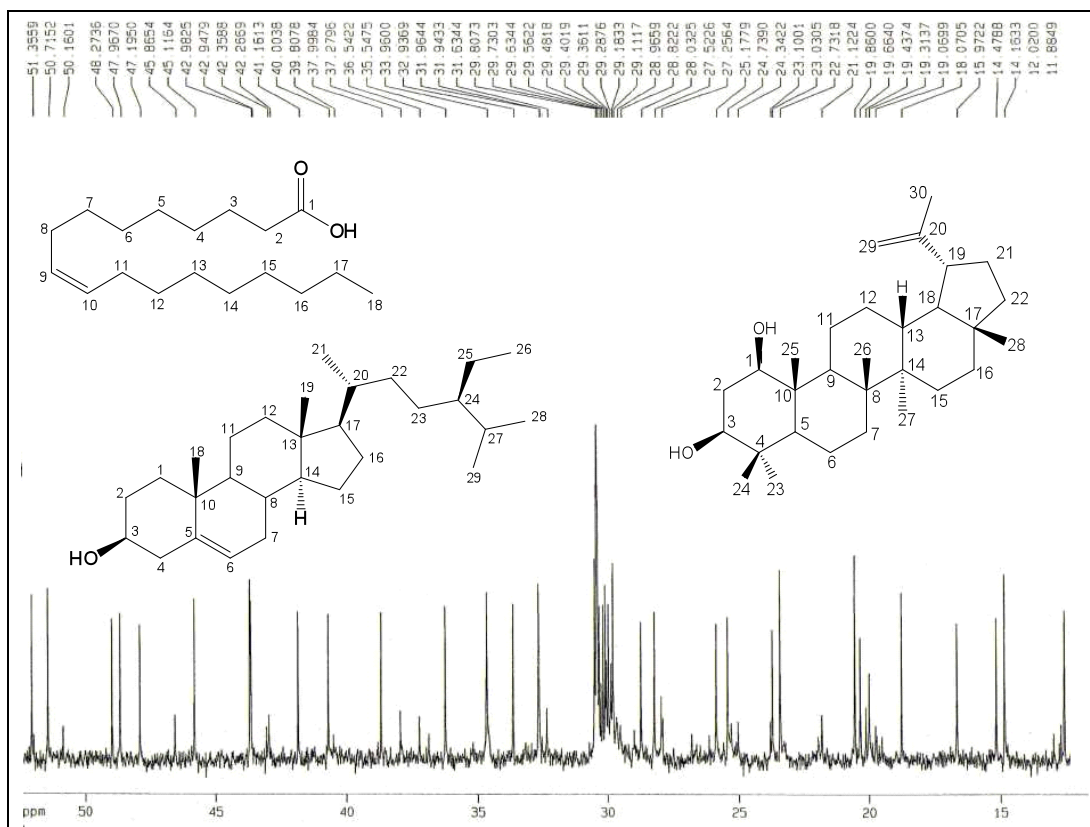


Figura 50A - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de R12 (CDCl_3 ; 100 MHz).

2 Espectros das substâncias descritas no Capítulo 2

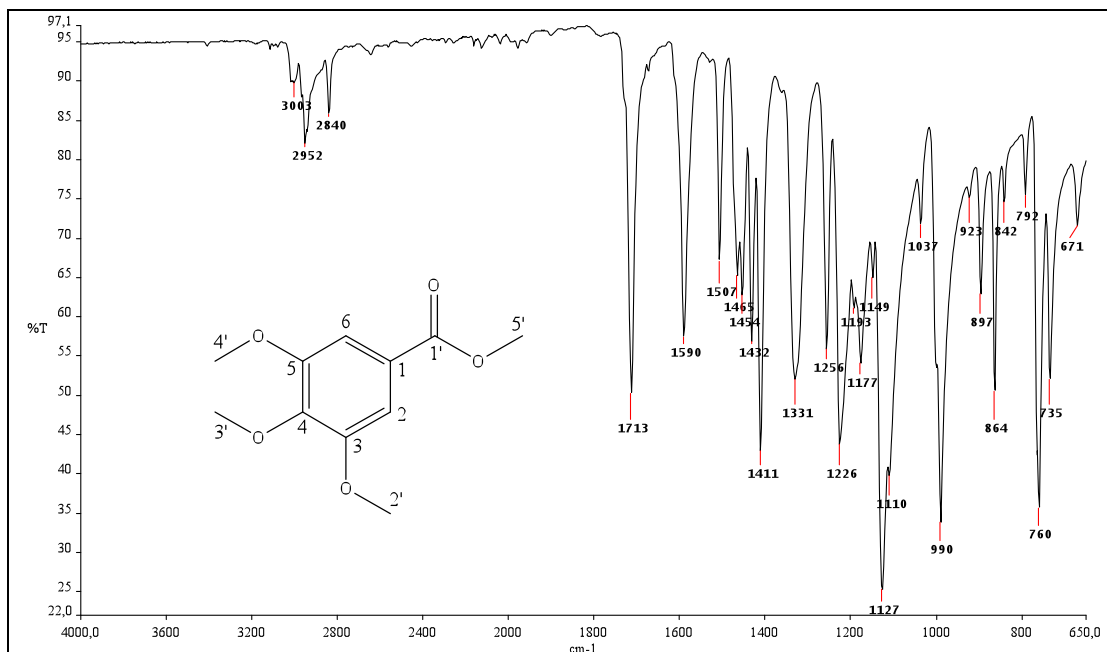


Figura 51A – Espectro de absorção na região do infravermelho de 17.

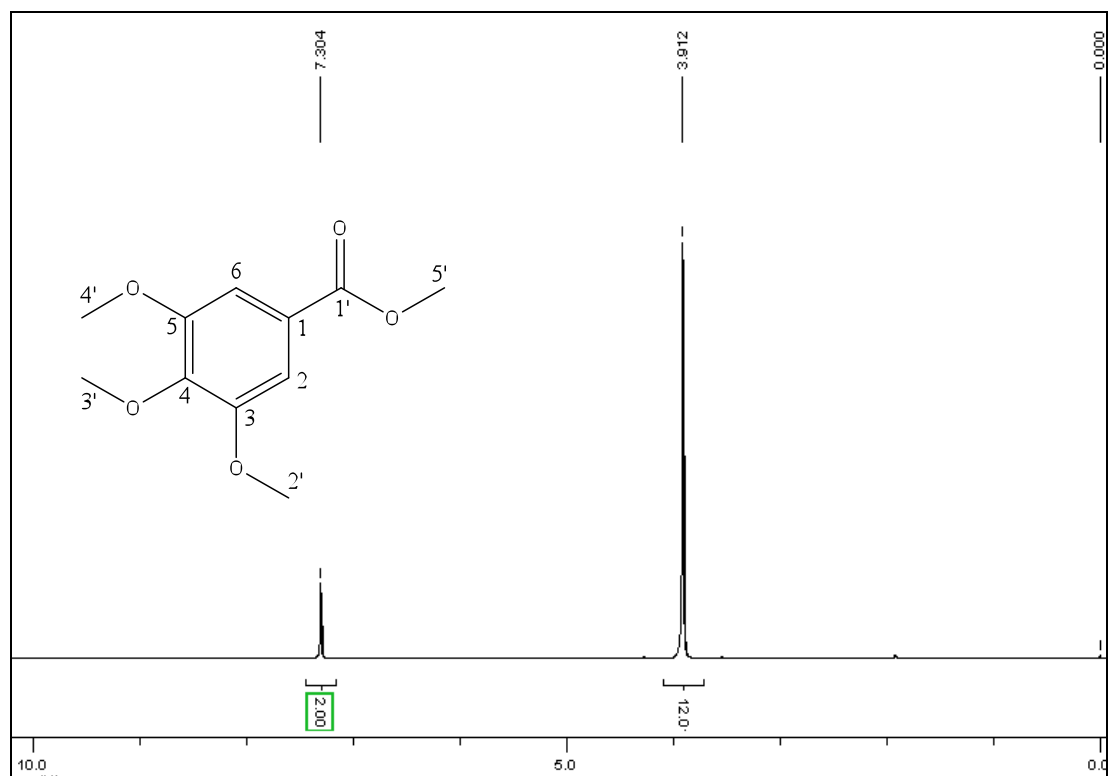


Figura 52A – Espectro de RMN de ¹H de 17.

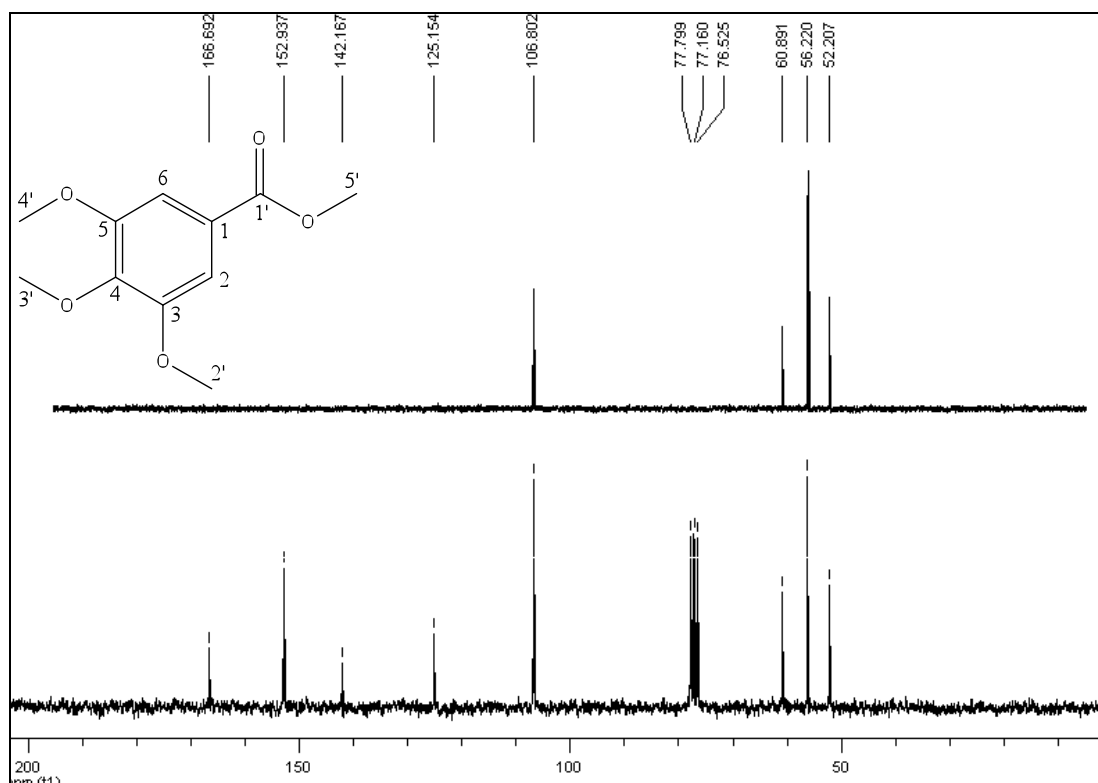


Figura 53A – Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro DEPT-135 de **17** (CDCl_3 ; 50 MHz).

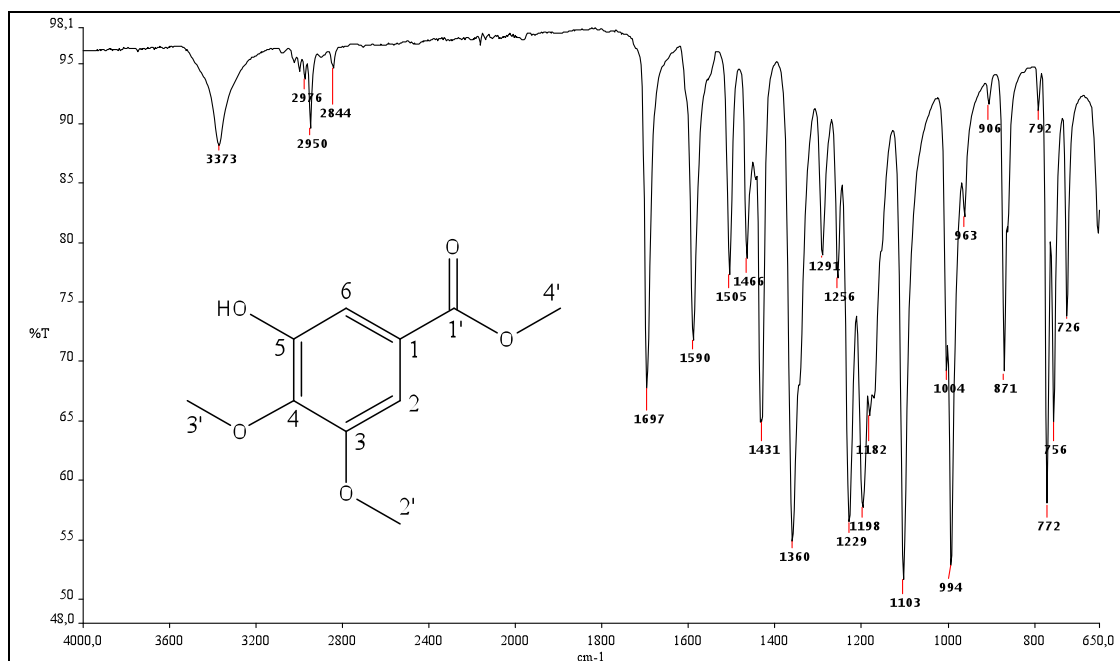


Figura 54A – Espectro de absorção na região do infravermelho de **18**.

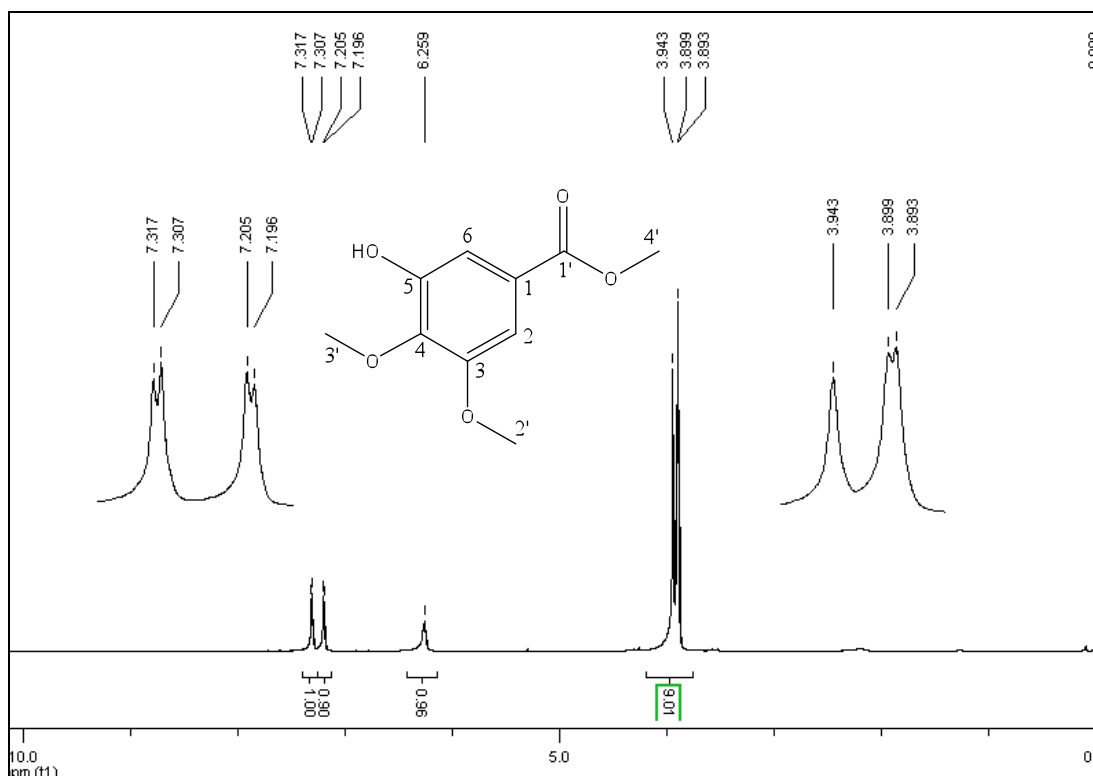


Figura 55A – Espectro de RMN de ¹H de **18** (CDCl₃; 200 MHz).

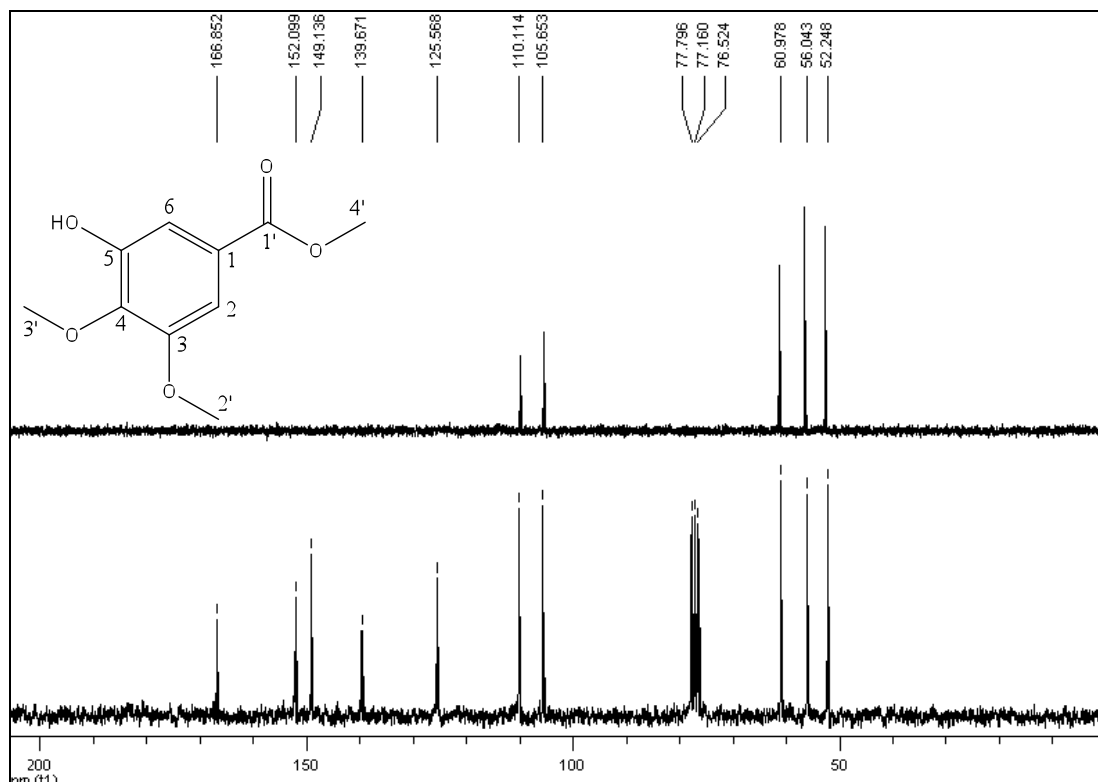


Figura 56A – Espectro de RMN de ¹³C e subespectro DEPT-135 de **18** (CDCl₃; 50 MHz).

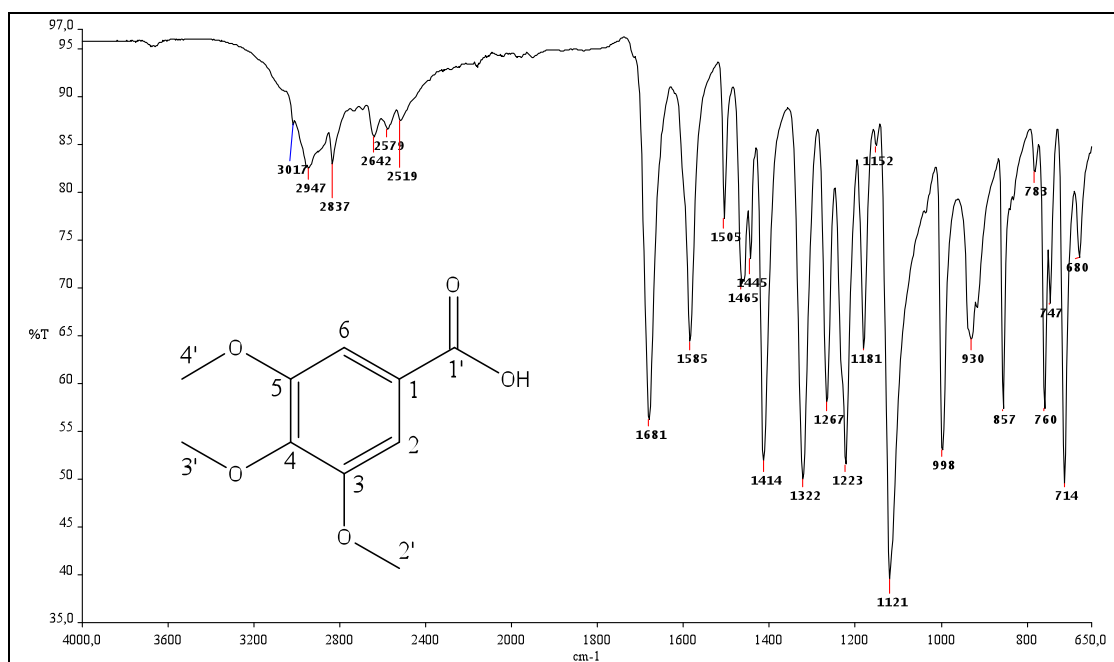


Figura 57A – Espectro de absorção na região do infravermelho de **19**.

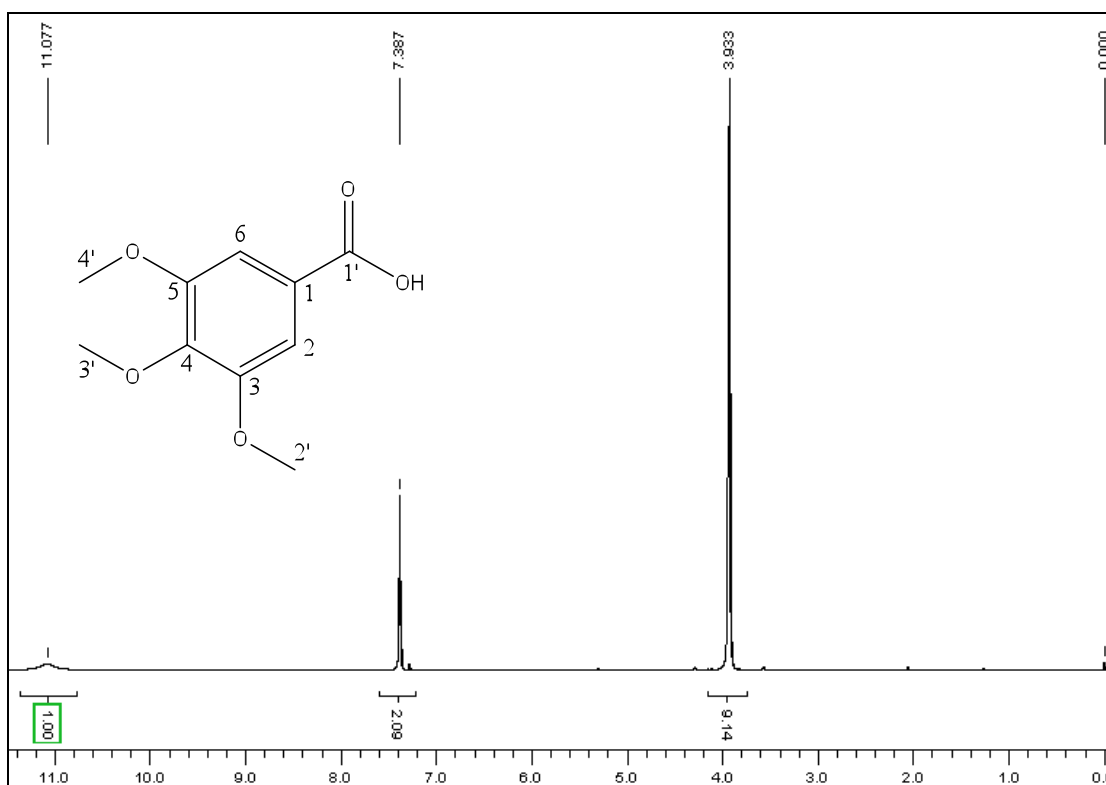


Figura 58A – Espectro de RMN de ¹H de **19** (CDCl₃; 200 MHz).

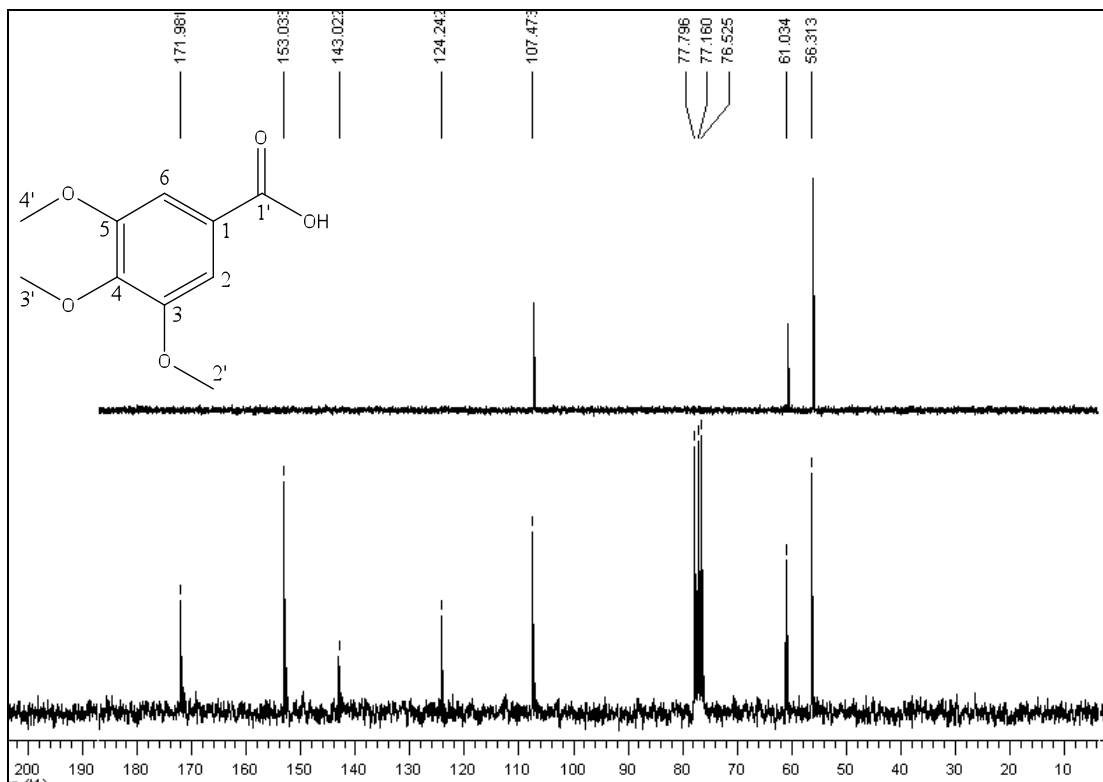


Figura 59A – Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 de **19** (CDCl_3 ; 50 MHz).

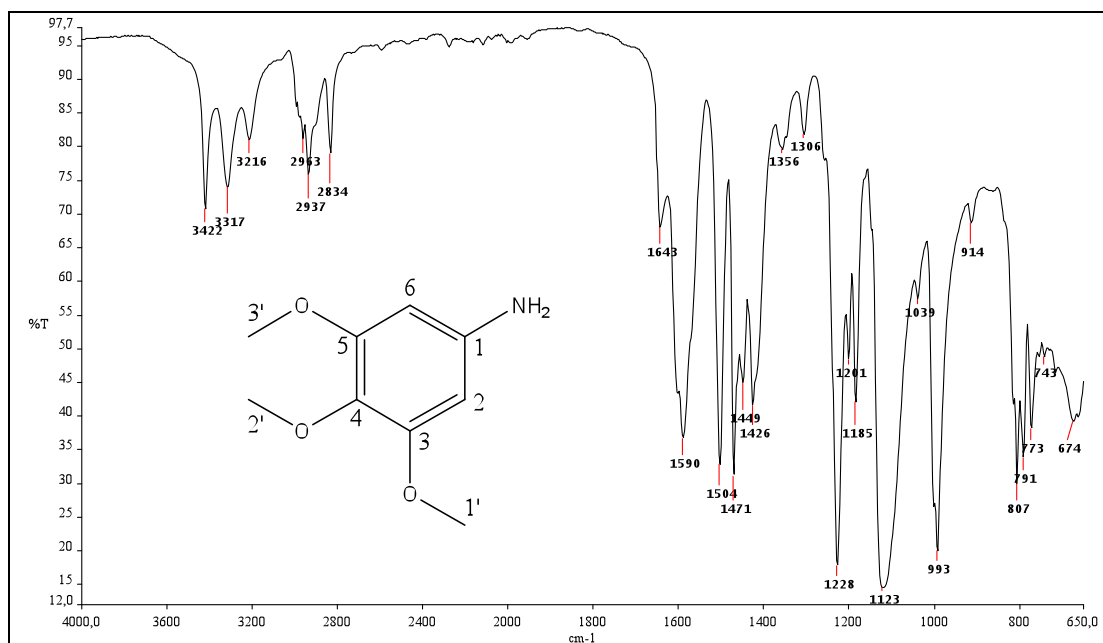


Figura 60A – Espectro de absorção na região do infravermelho de **20**.

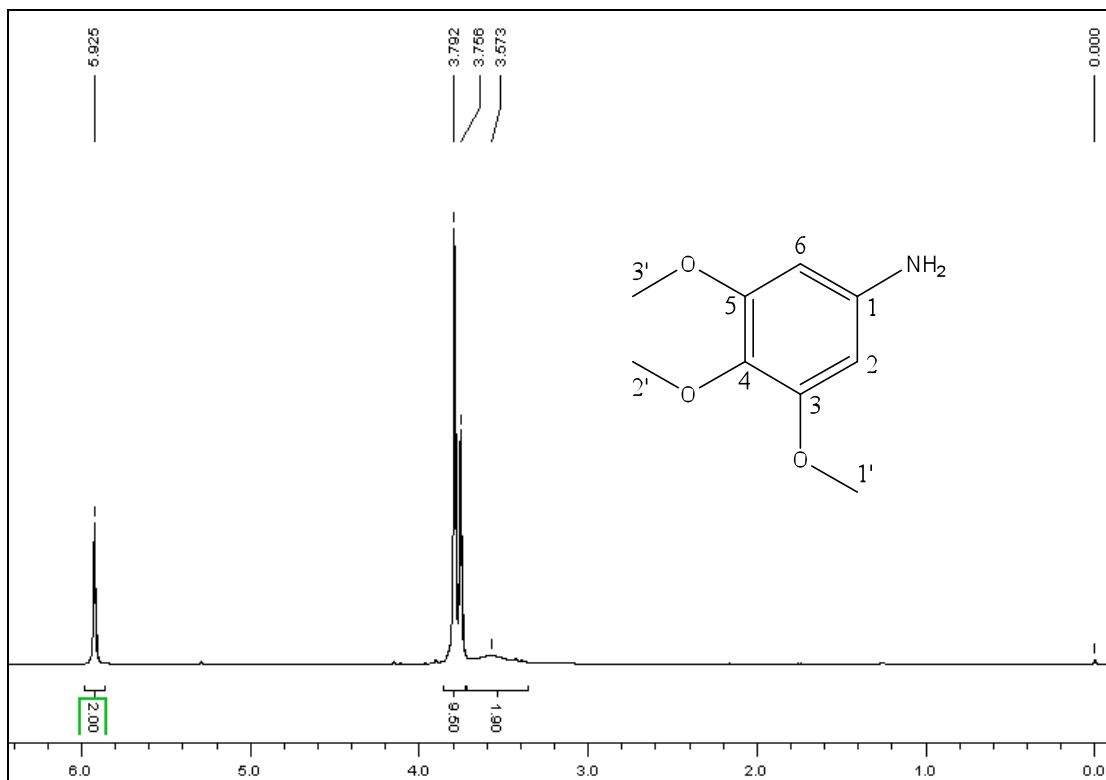


Figura 61A – Espectro de RMN de ¹H de **20** (CDCl₃; 200 MHz).

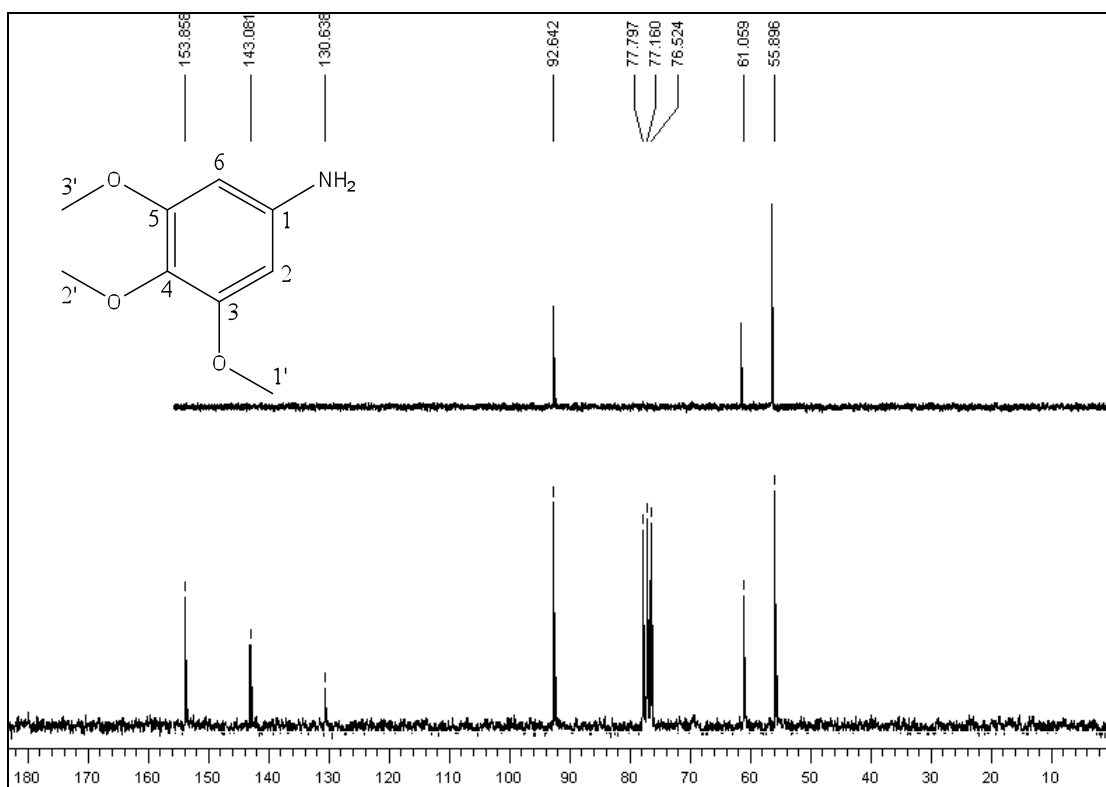


Figura 62A – Espectro de RMN de ¹³C e subspectro DEPT-135 de **20** (CDCl₃; 50 MHz).

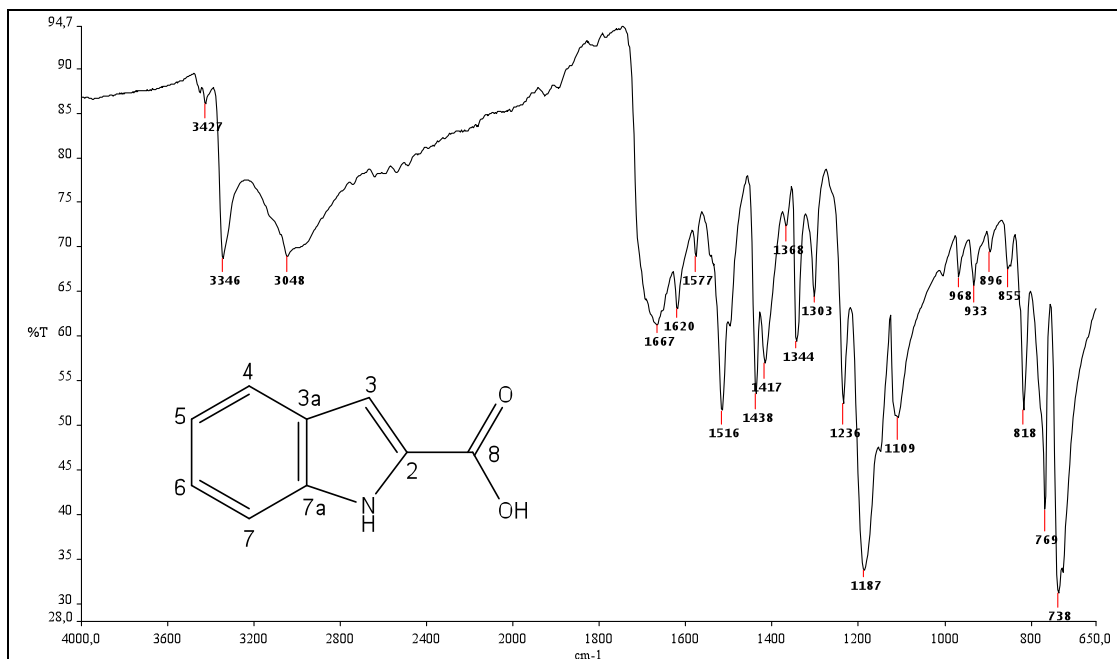


Figura 63A – Espectro de absorção na região do infravermelho de 21.

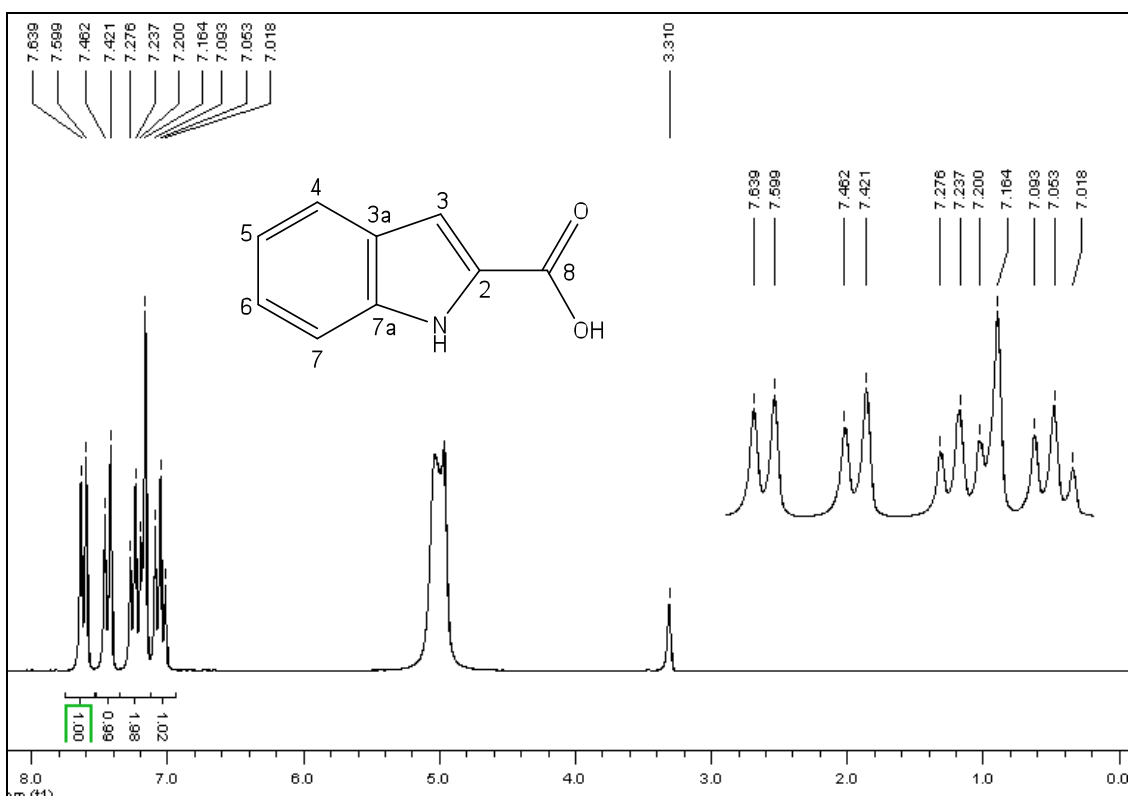


Figura 64A – Espectro de RMN de ¹H de 21 (CD₃OD; 200 MHz).

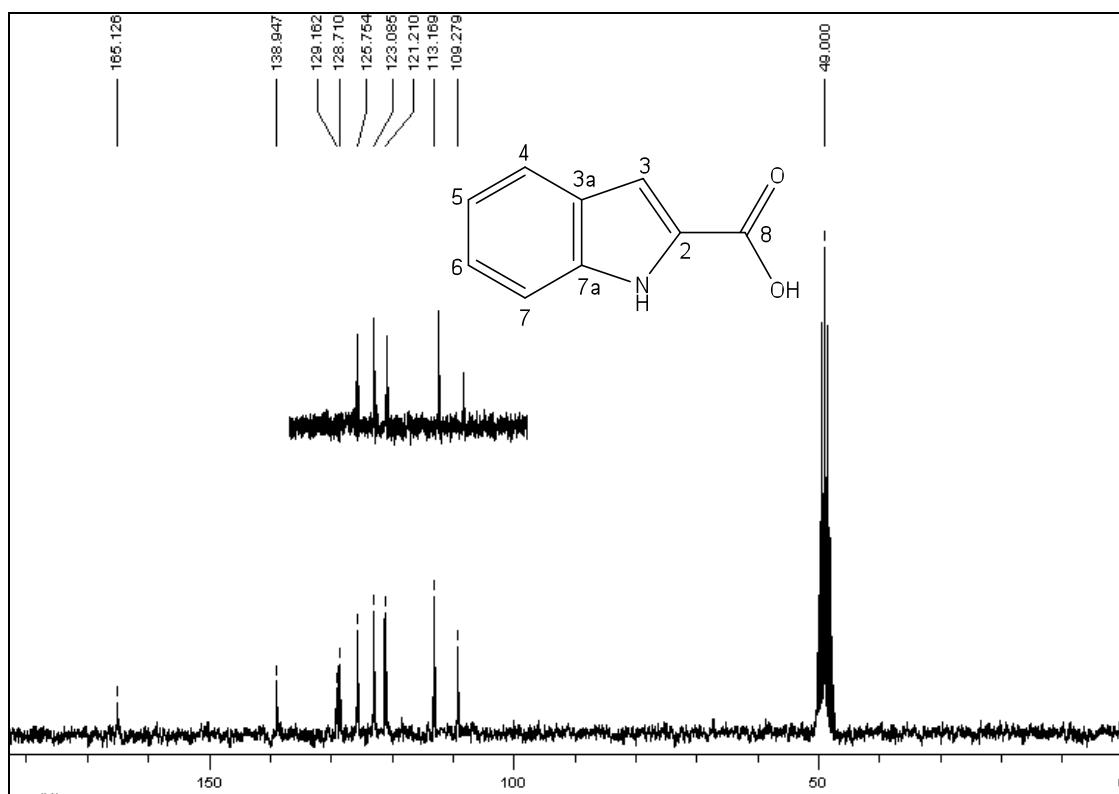


Figura 65A – Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 de **21** (CD_3OD ; 50 MHz).

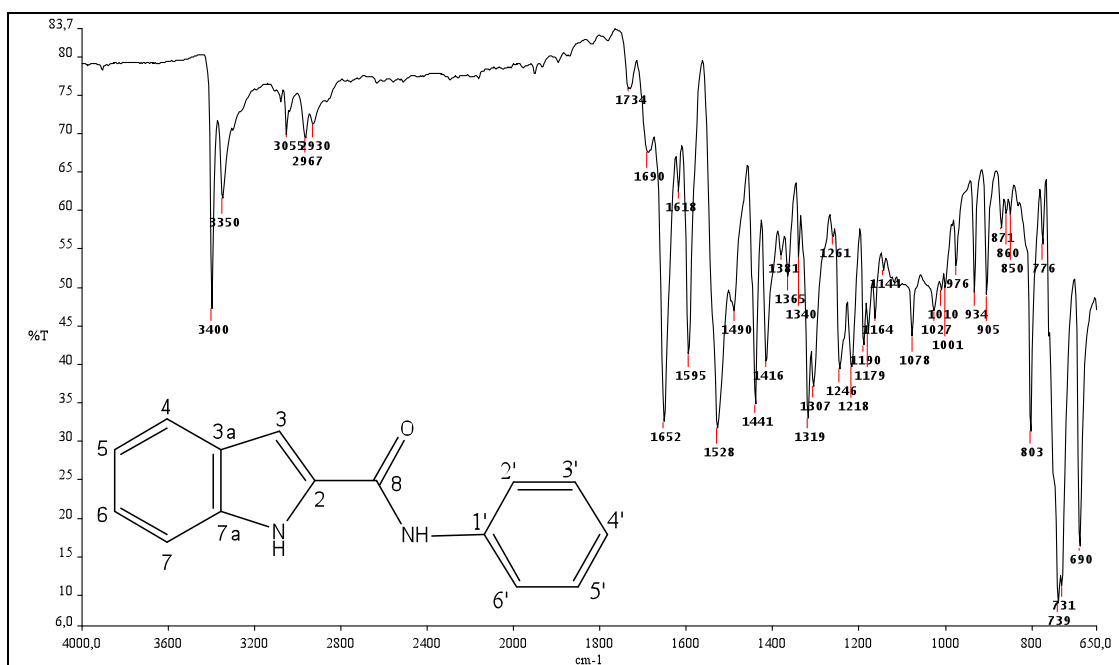


Figura 66A – Espectro de absorção na região do IV de **22**.

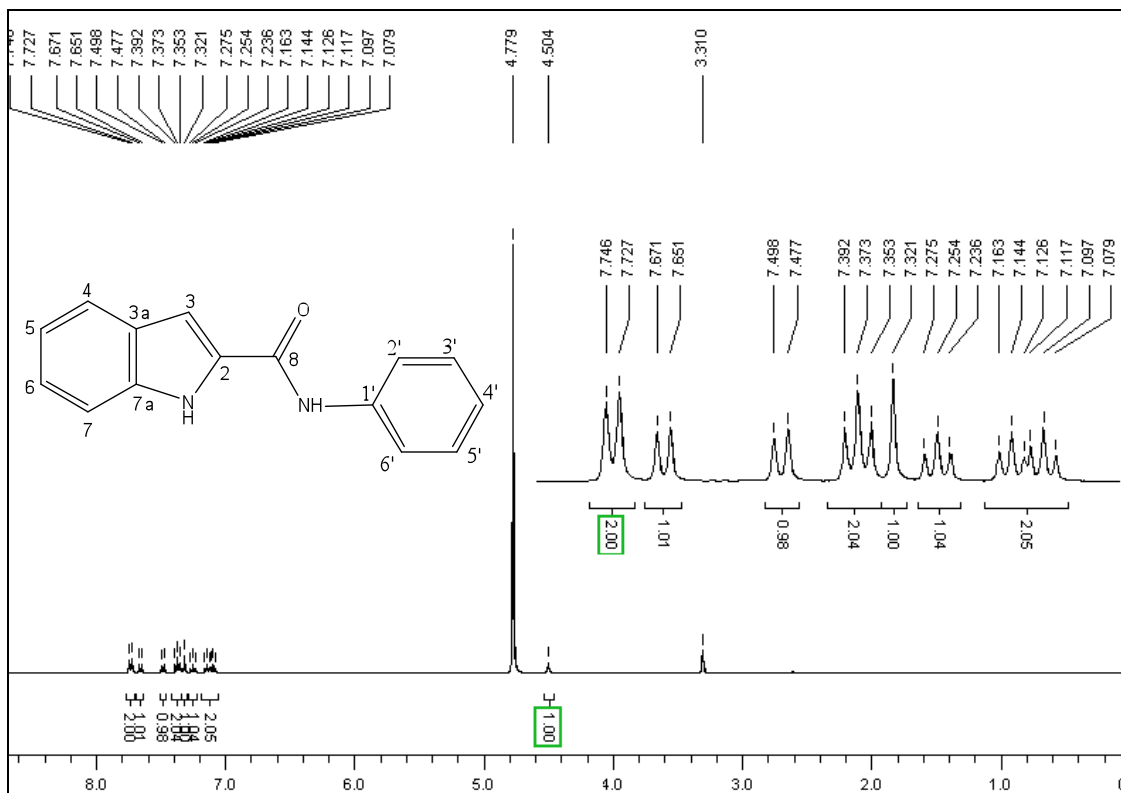


Figura 67A – Espectro de RMN de ¹H de **22** (CD₃OD; 400 MHz).

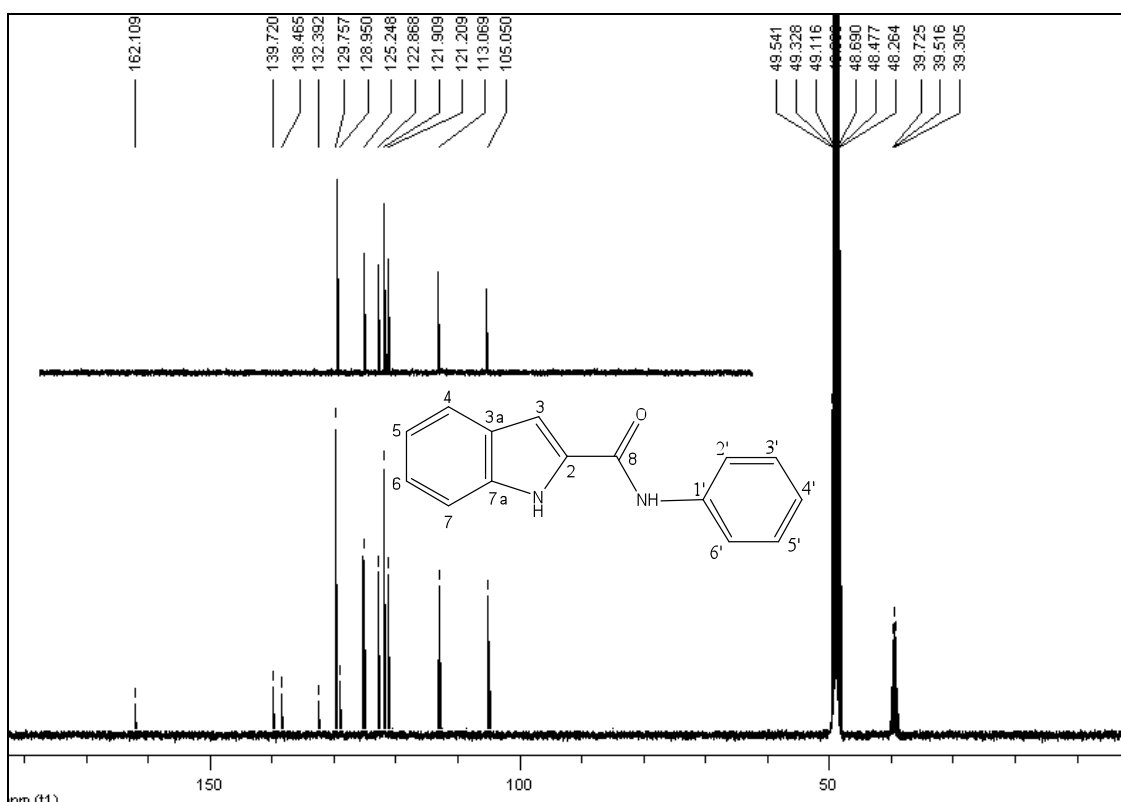


Figura 68A – Espectro de RMN de ¹³C e subspectro DEPT-135 de **22** (CD₃OD; 100 MHz).

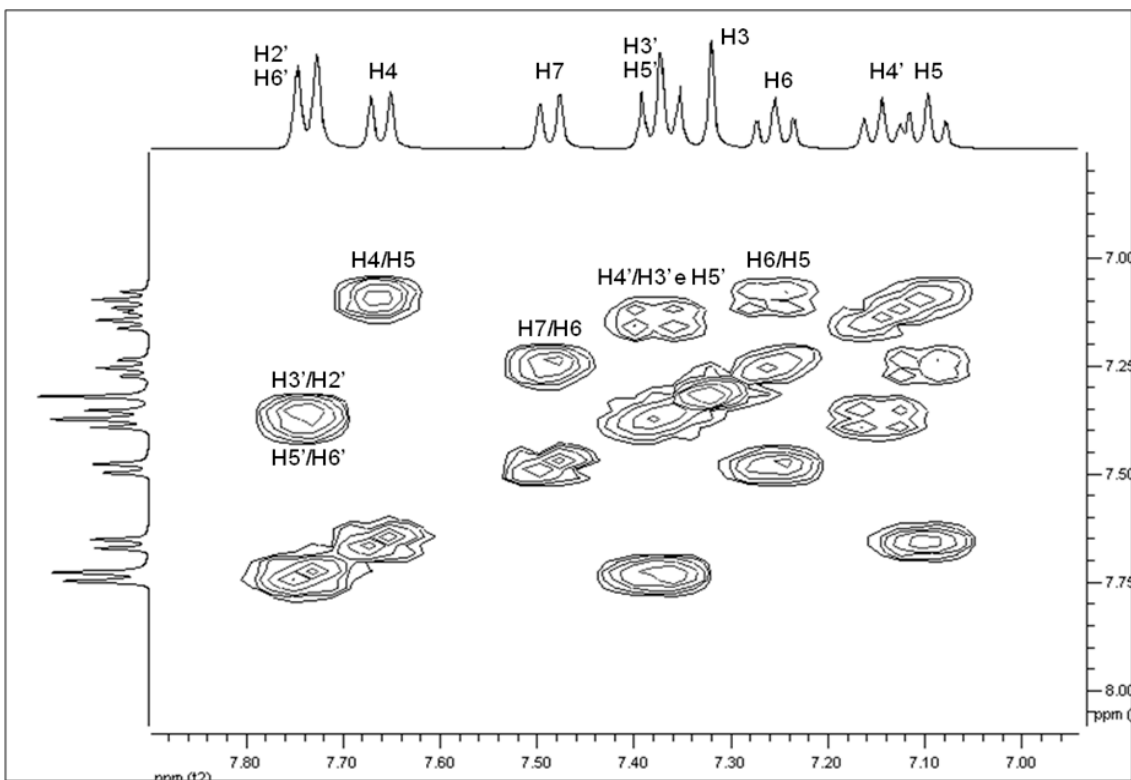


Figura 69A – Expansão do mapa de contornos COSY de **22** (CD₃OD; 400 MHz).

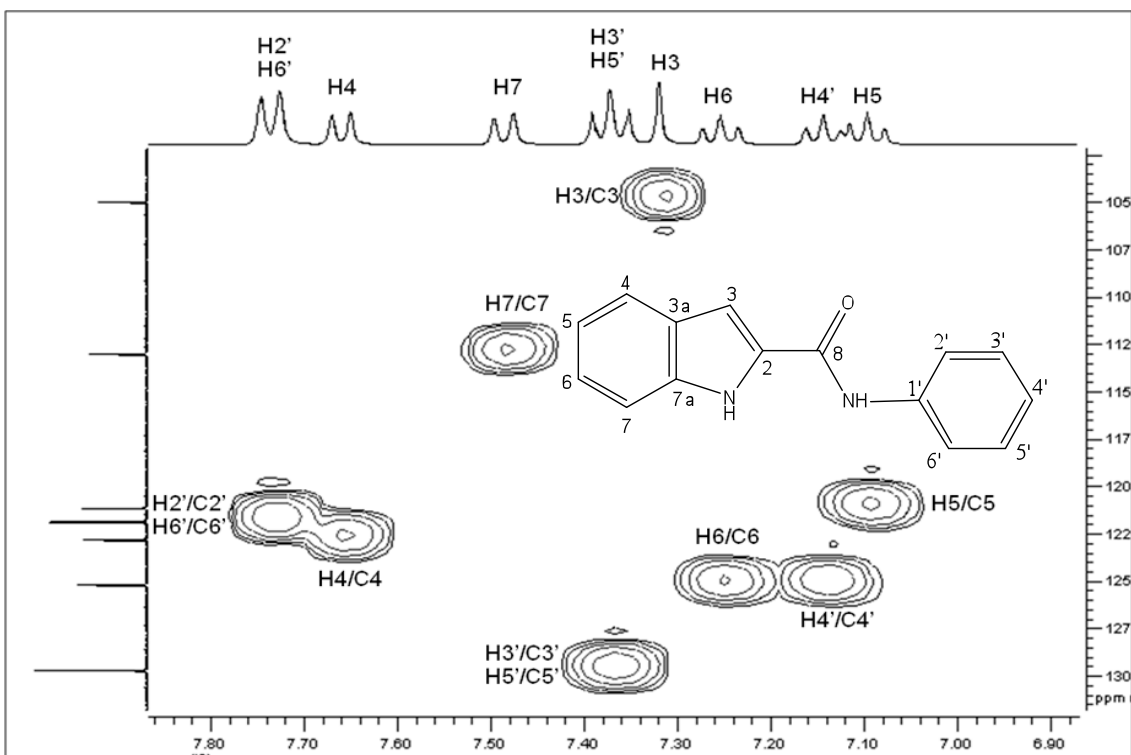


Figura 70A – Expansão do mapa de contornos HMQC de **22** (CD₃OD; 400 MHz).

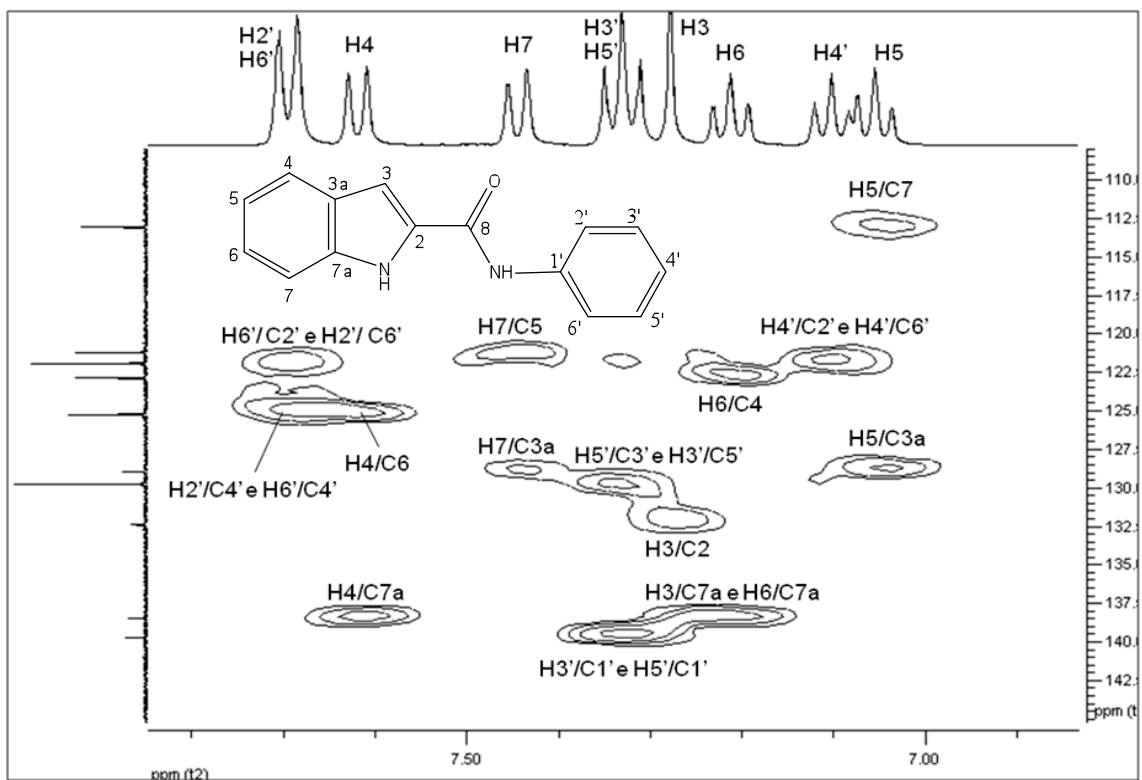


Figura 71A – Expansão do mapa de contornos HMBC de **22** (CD₃OD; 400 MHz).

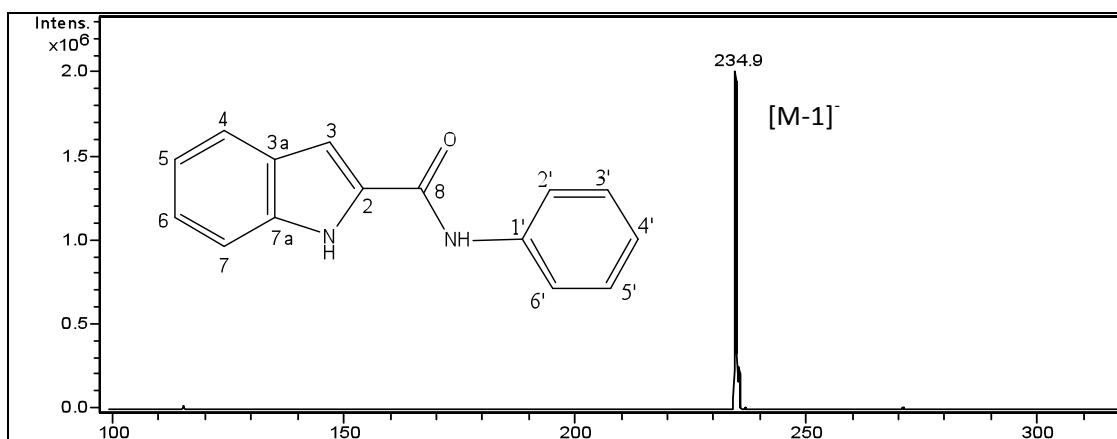


Figura 72A – Espectro de Massas de **22** (ionização por electrospray - modo negativo).

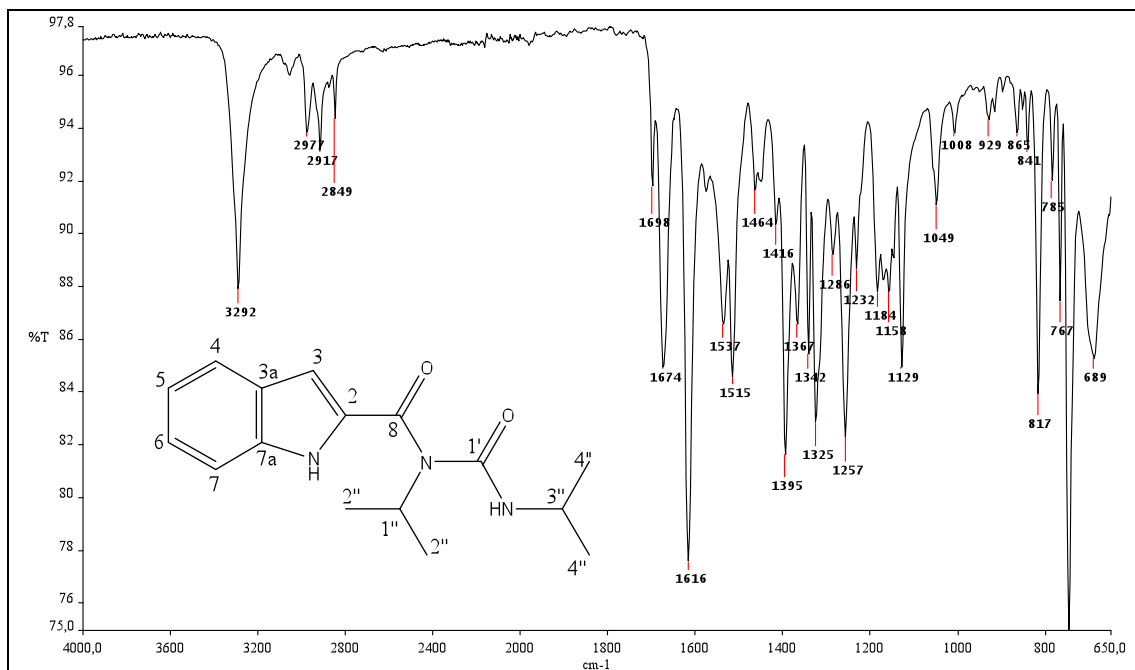


Figura 73A – Espectro de absorção na região do IV de **23**.

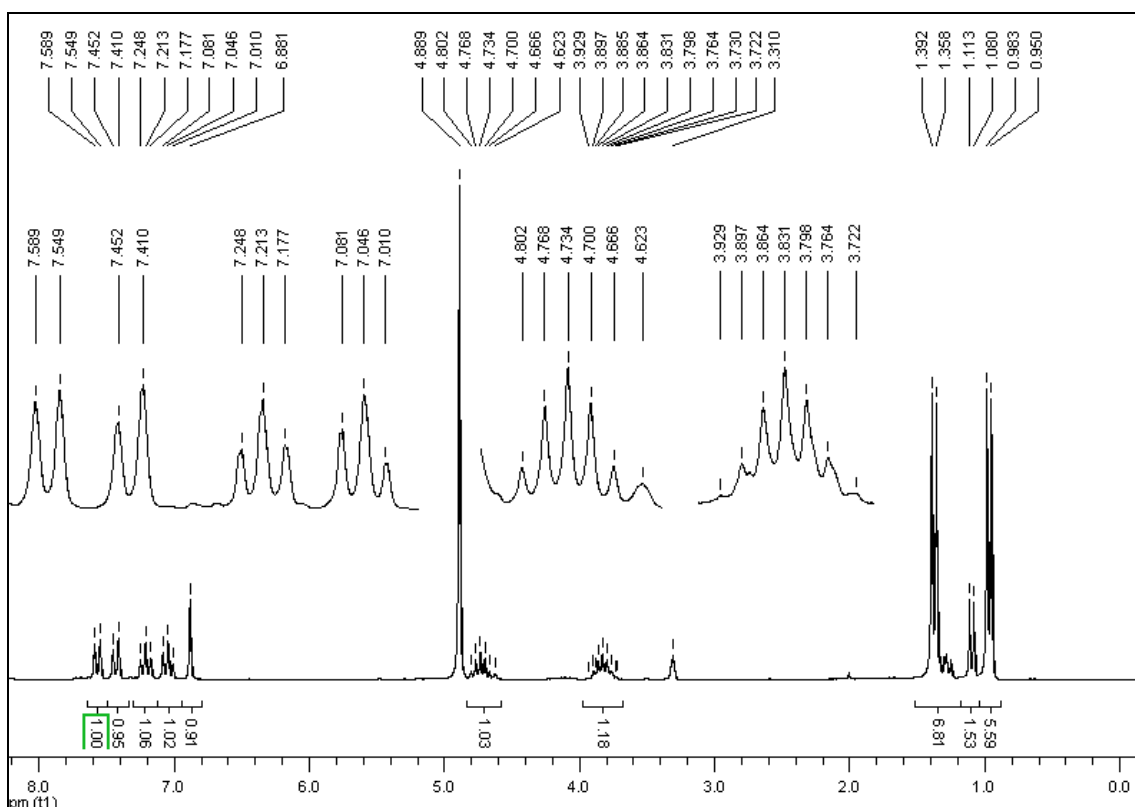


Figura 74A – Espectro de RMN de ^1H de **23** (CD₃OD; 200 MHz).

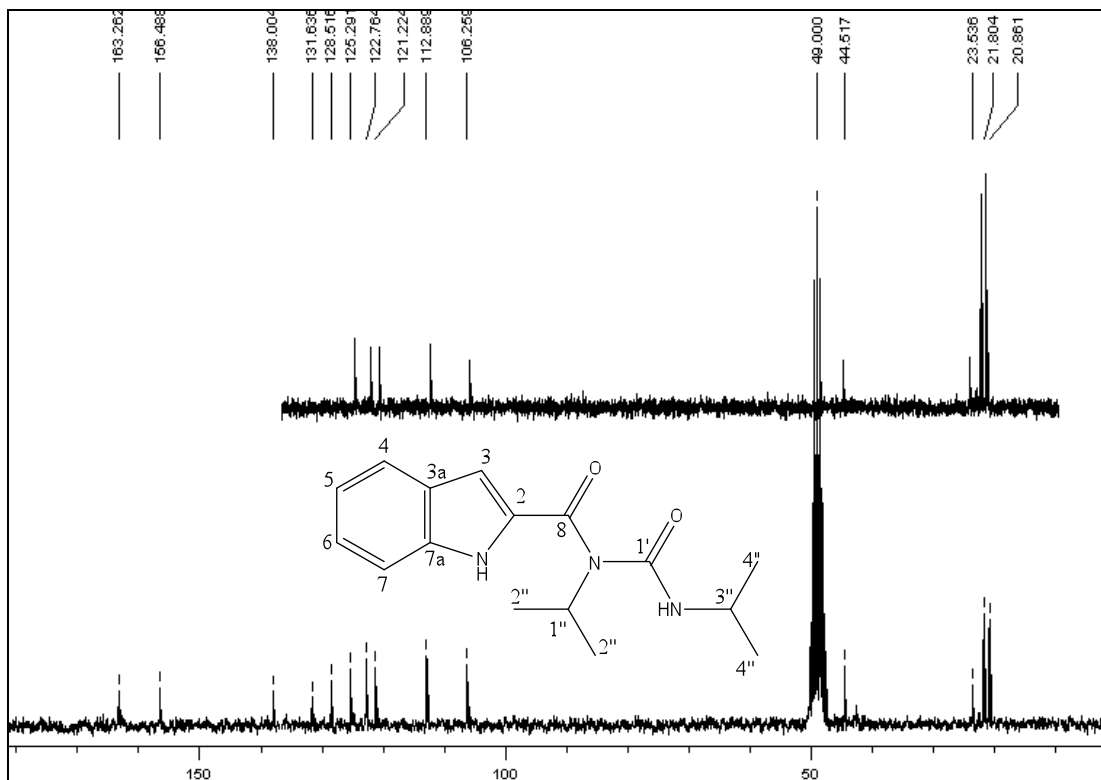


Figura 75A – Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 de **23** (CD_3OD ; 50 MHz).

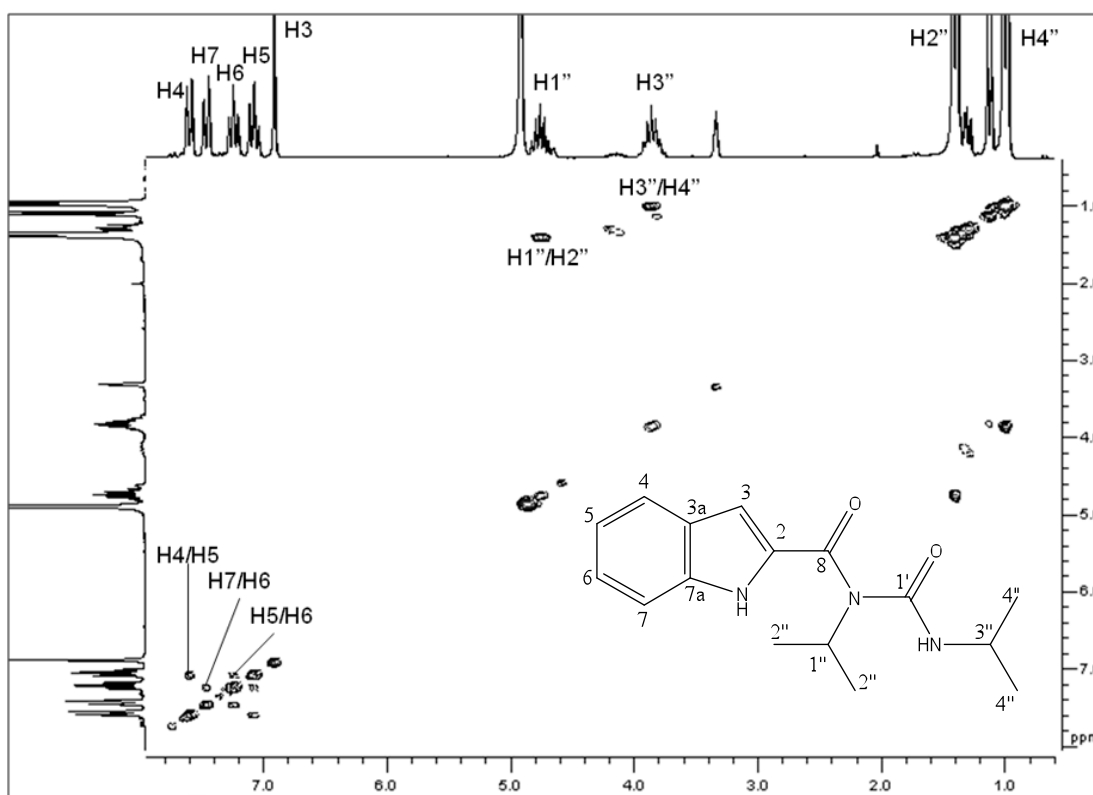


Figura 76A – Expansão do mapa de contornos COSY de **23** (CD_3OD ; 400 MHz).

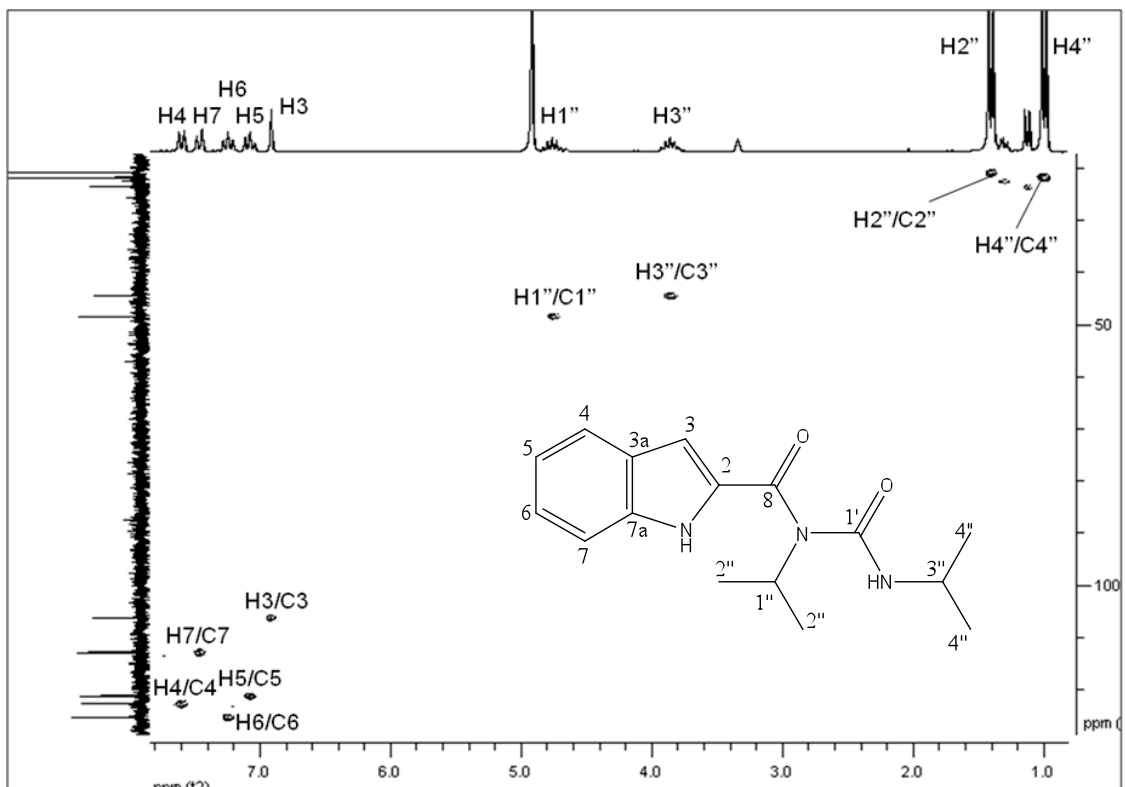


Figura 77A – Expansão do mapa de contornos HMQC de **23** (CD₃OD; 400 MHz).

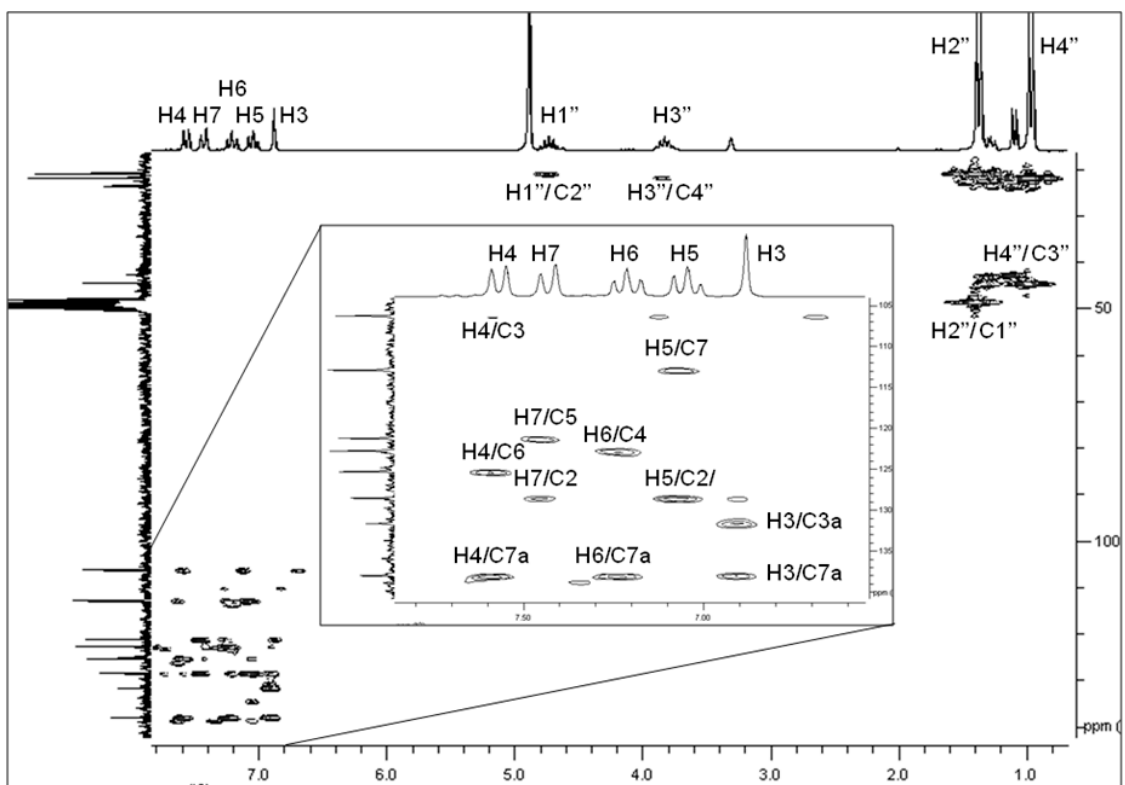


Figura 78A – Mapa de contornos HMBC de **23** e sua expansão (CD₃OD; 400 MHz).

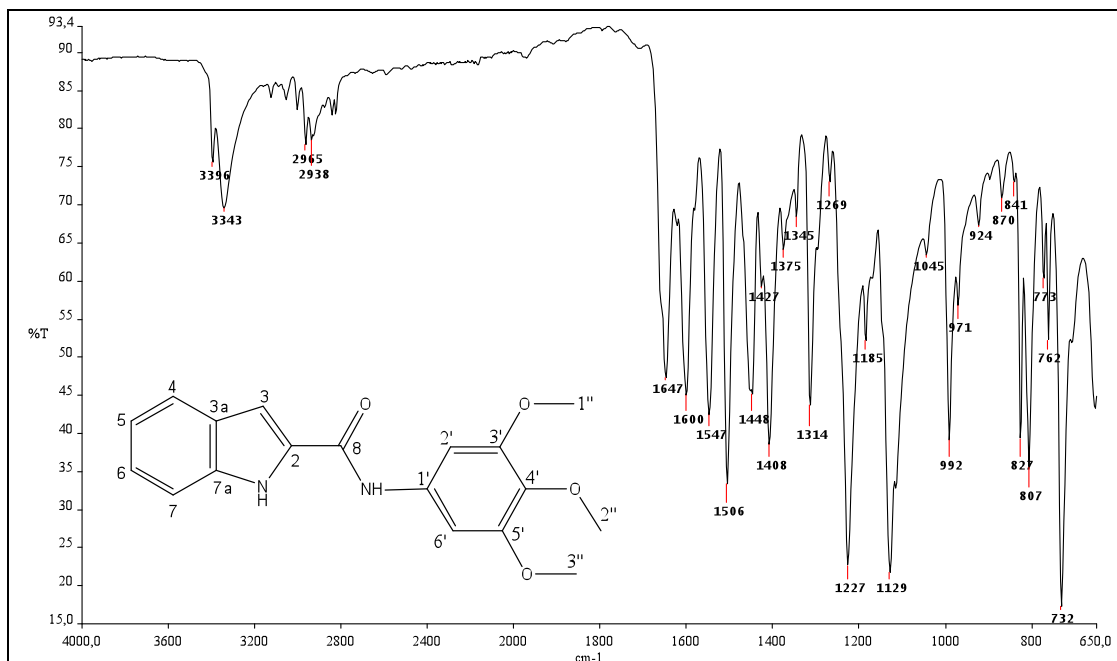


Figura 79A – Espectro de absorção na região do infravermelho de **24**.

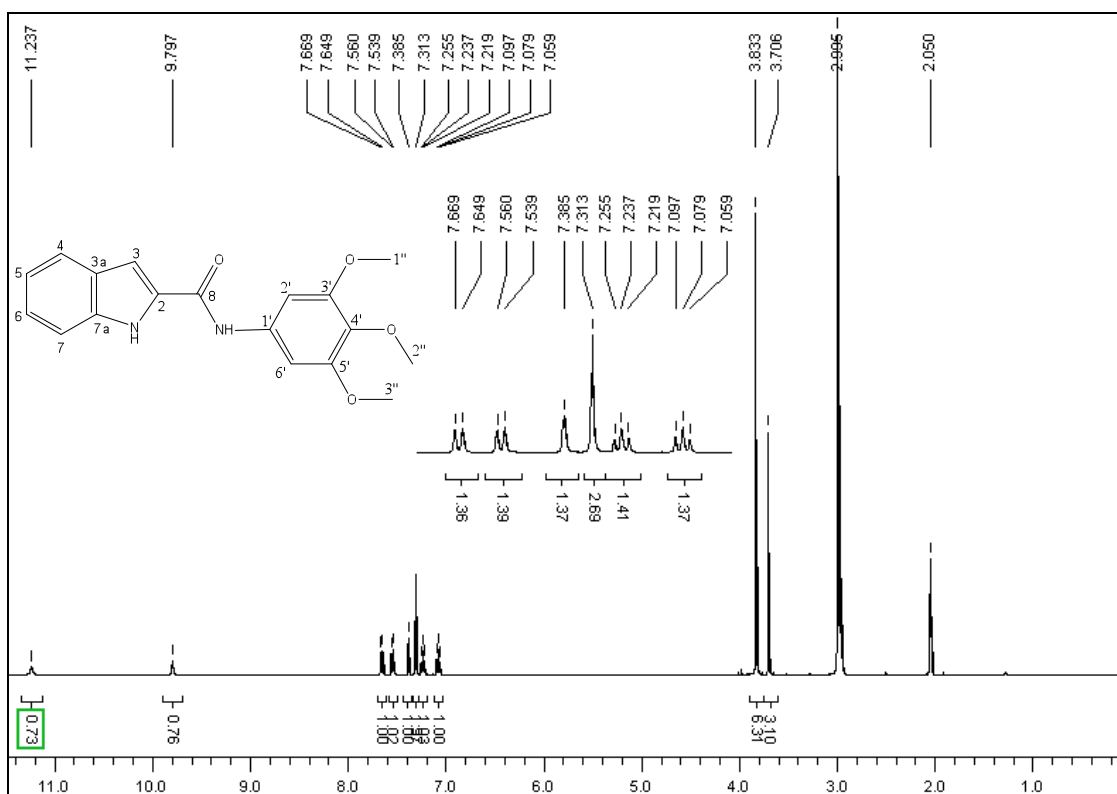


Figura 80A – Espectro de RMN de ^1H de **24** ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$; 400 MHz).

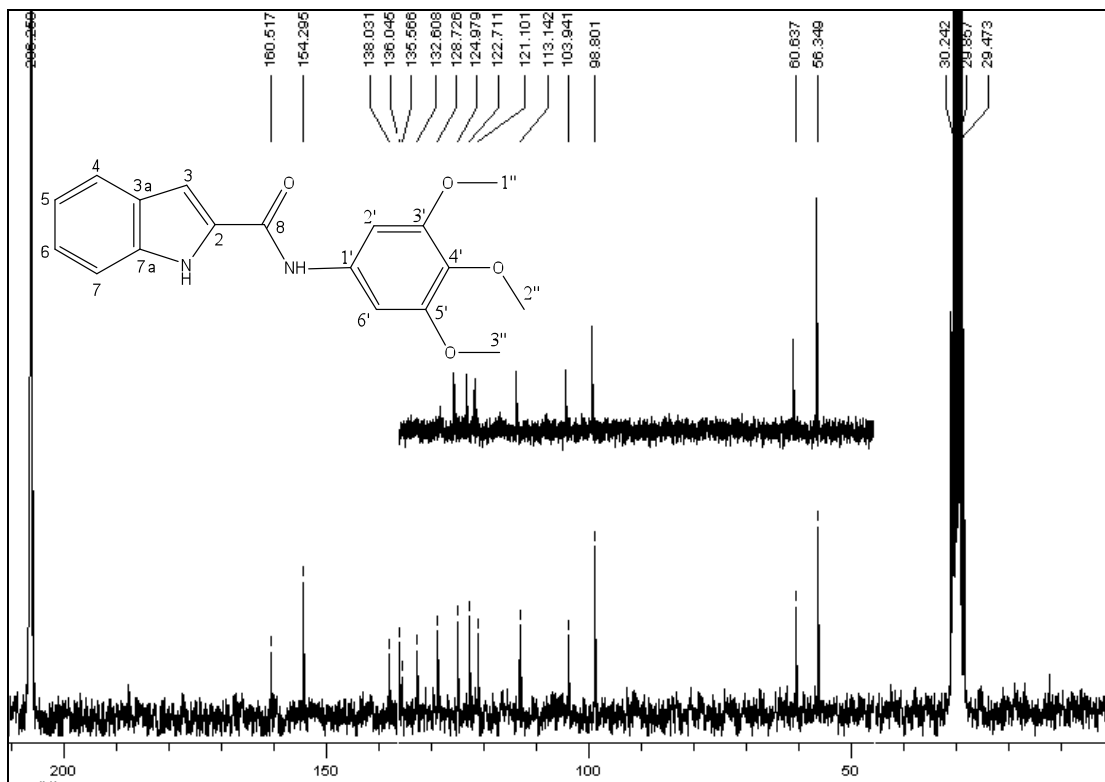


Figura 81A – Espectro de RMN de ¹³C e subespectro DEPT-135 de **24** ((CD₃)₂CO; 100 MHz).

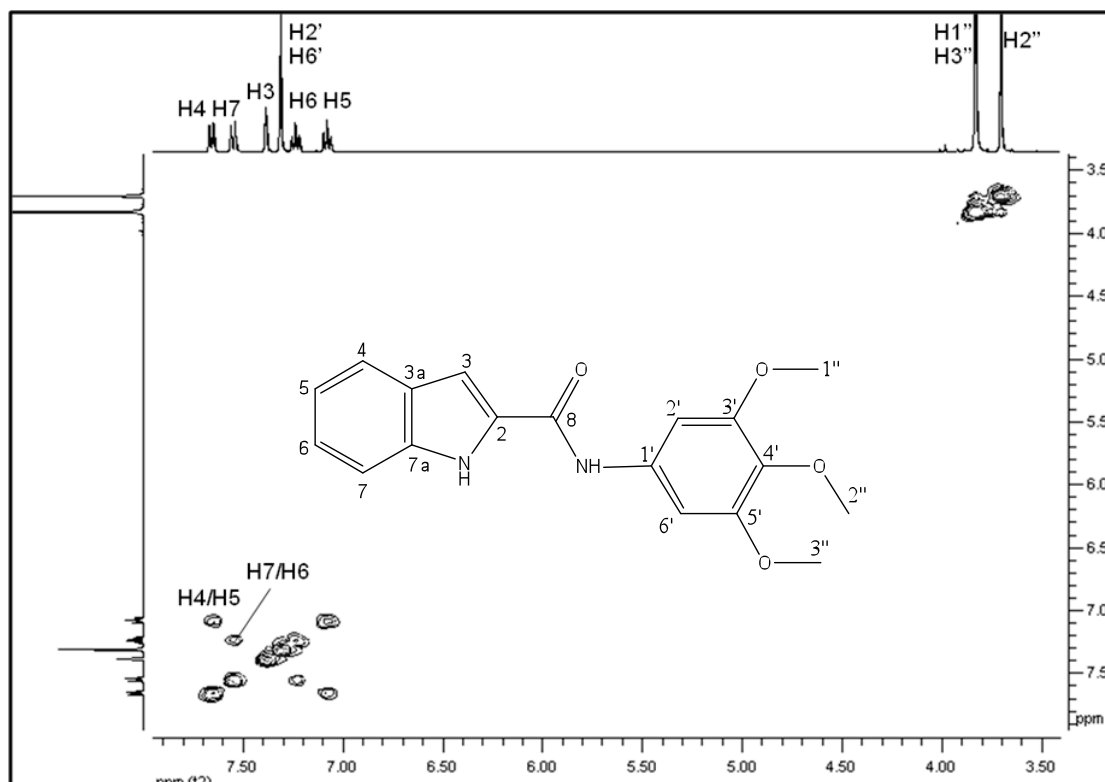


Figura 82A – Expansão do mapa de contornos COSY de **24** ((CD₃)₂CO; 400 MHz).

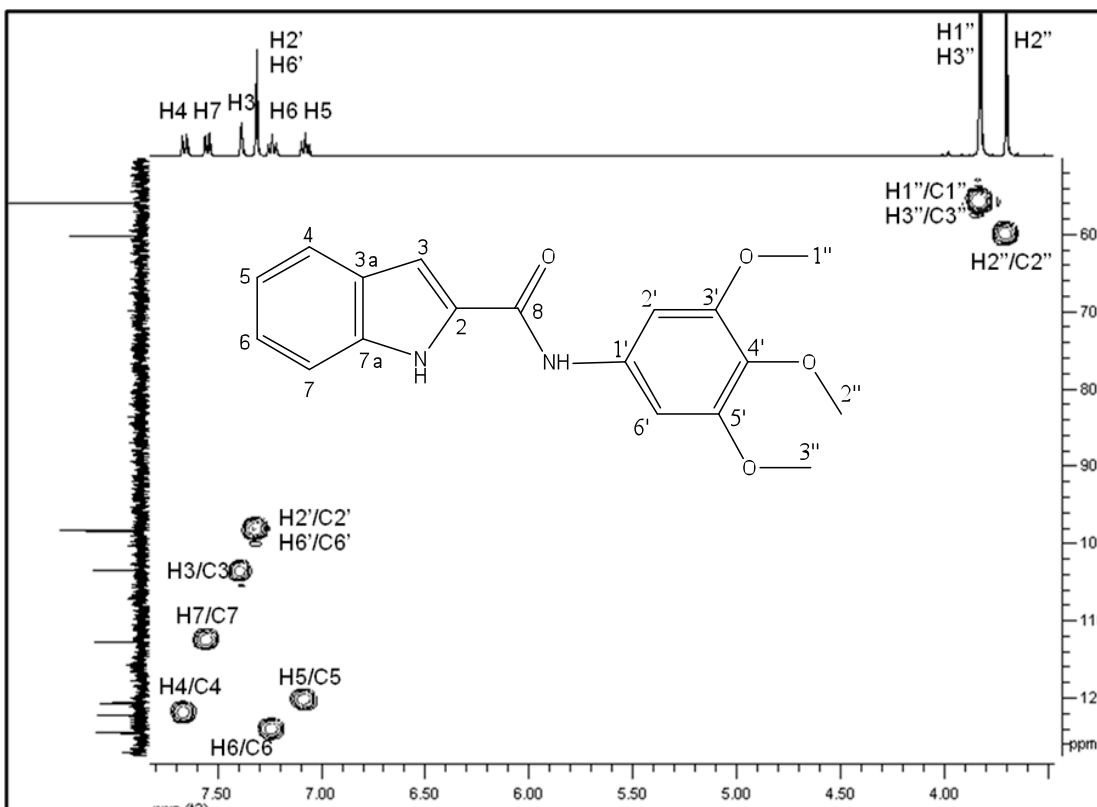


Figura 83A – Expansão do mapa de contornos HMBC de **24** ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$; 400 MHz).

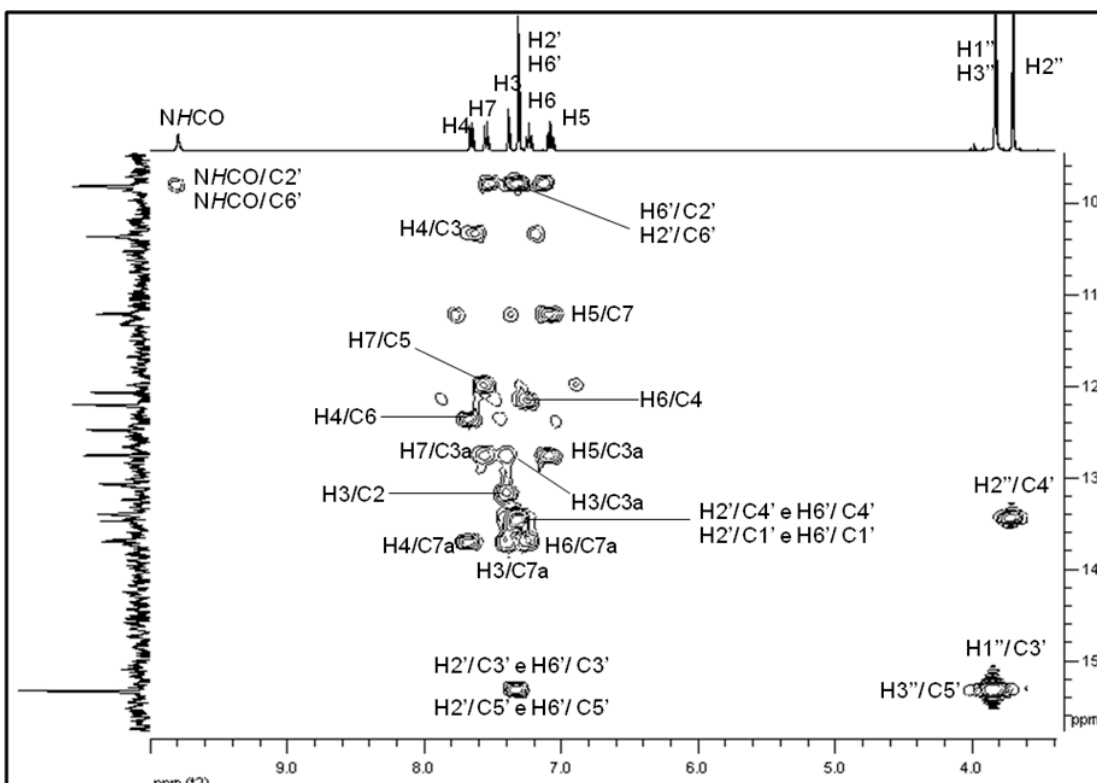


Figura 84A – Expansão do mapa de contornos HMBC de **24** ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$; 400 MHz).

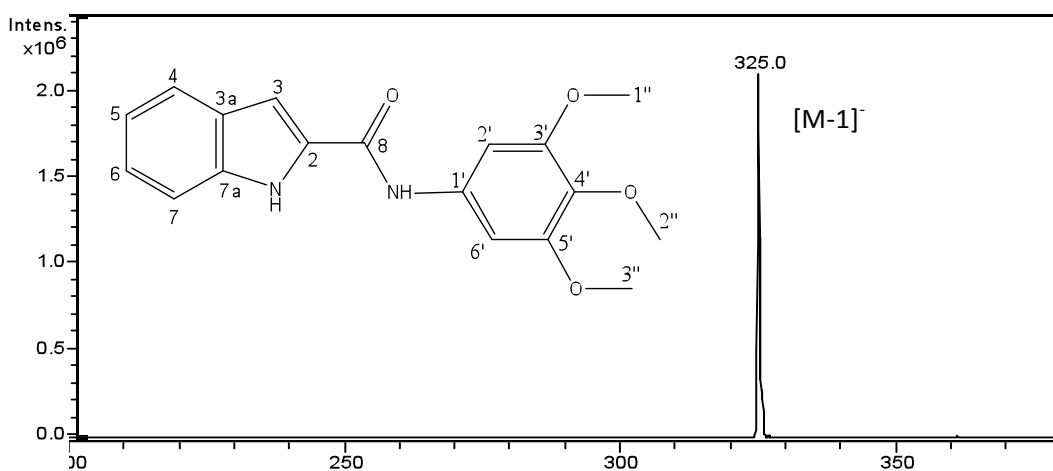


Figura 85A – Espectro de Massas de **24** (ionização por electrospray - modo negativo).

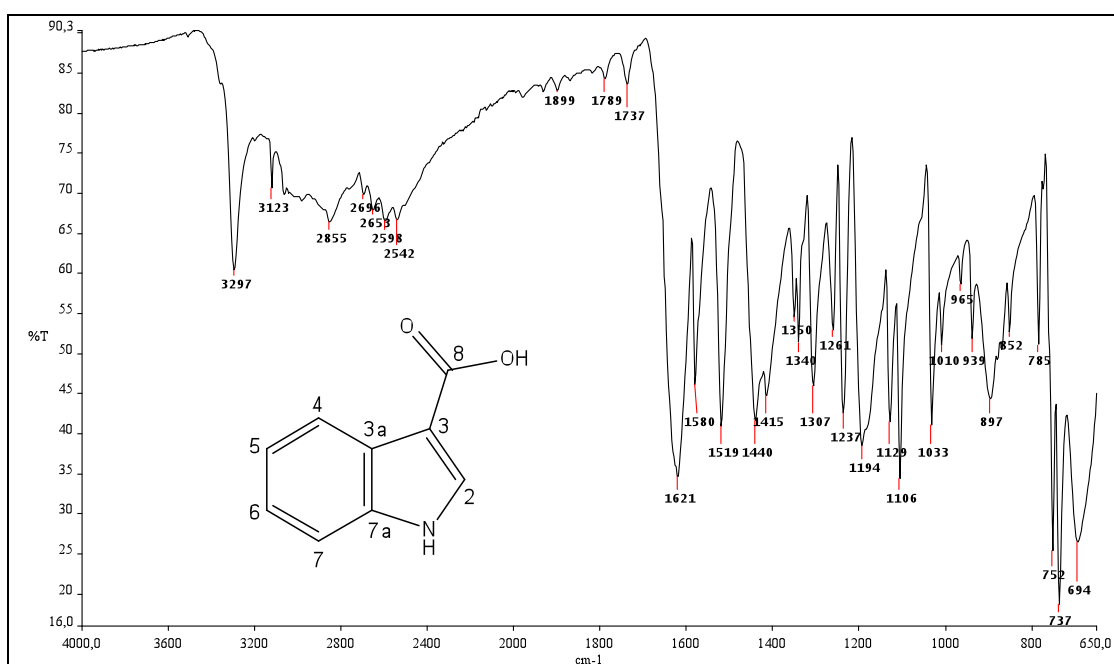


Figura 86A – Espectro de absorção na região do IV de **25** (ácido-indol-3-carboxílico).

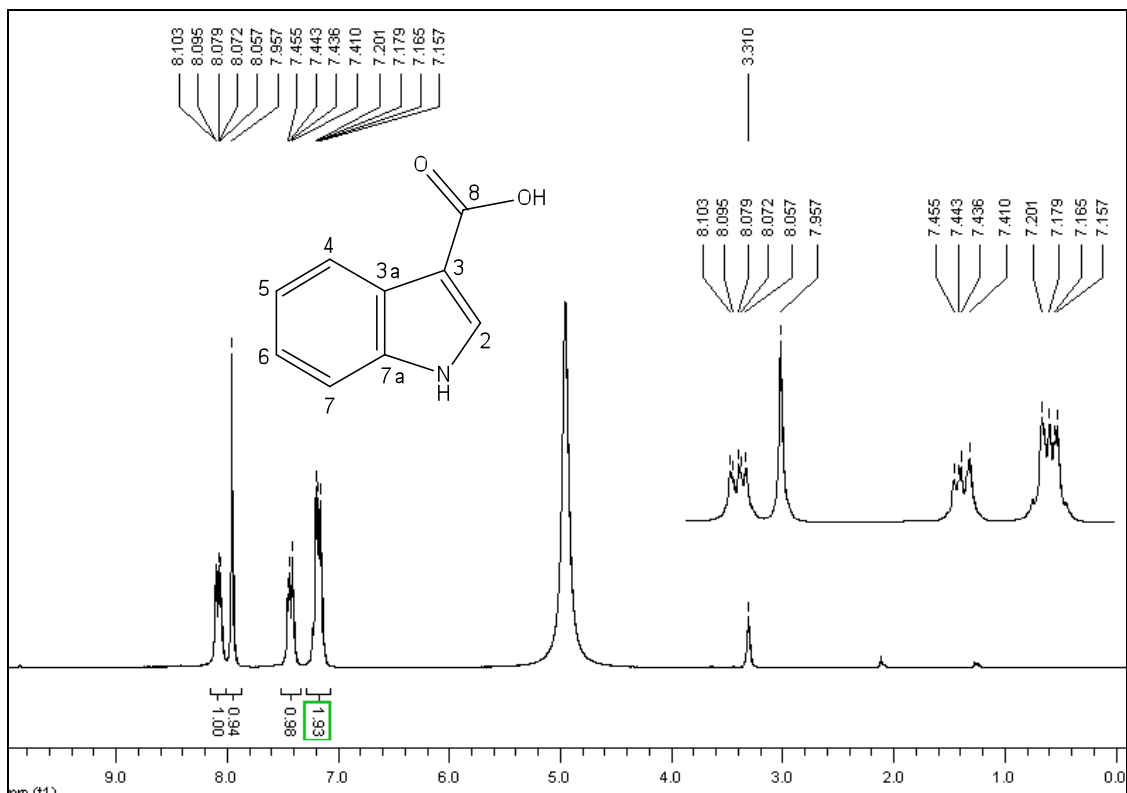


Figura 87A – Espectro de RMN de ^1H de **25** (CD₃OD; 200 MHz).

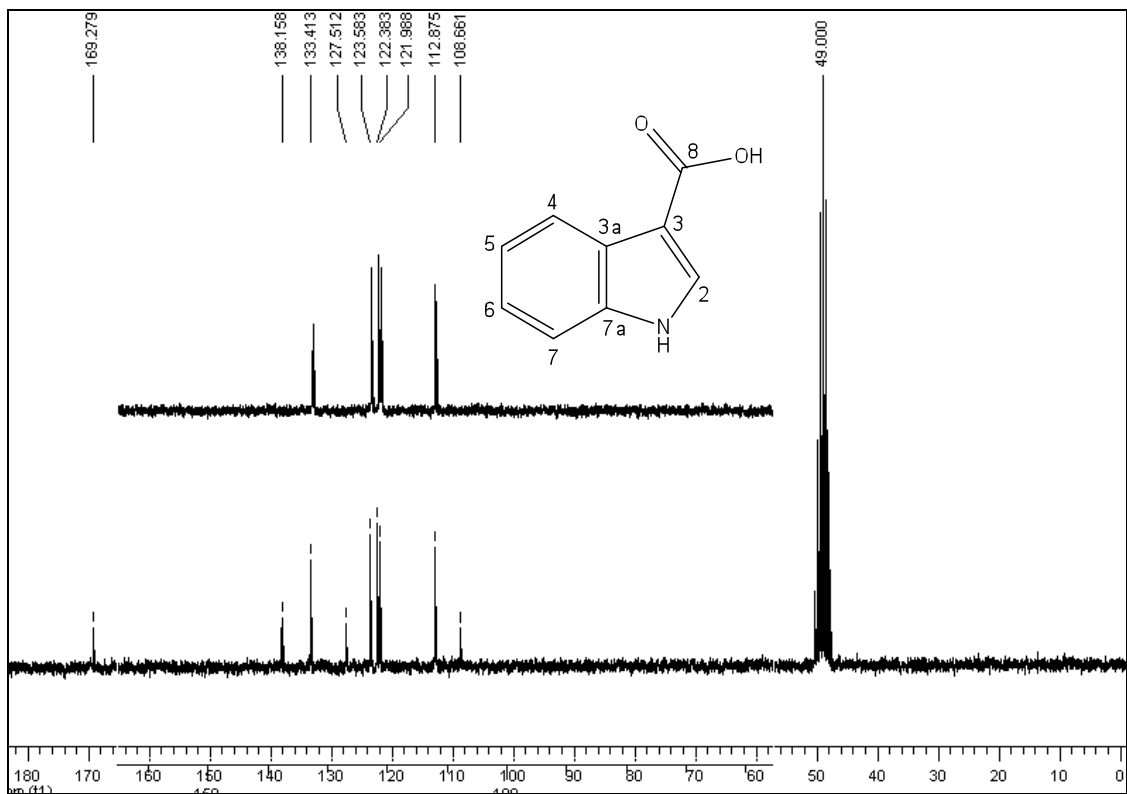


Figura 88A – Espectro de RMN de ^{13}C de **25** (CD₃OD; 50 MHz).

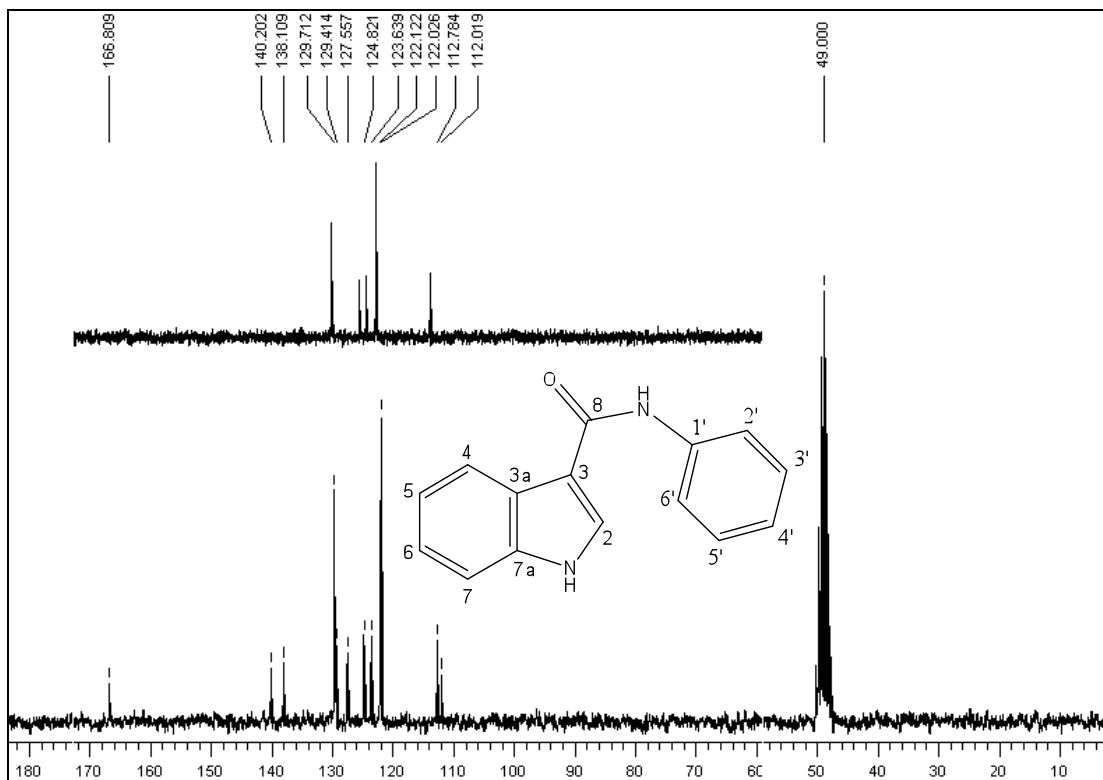


Figura 91A – Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 de **26** (CD_3OD ; 50 MHz).

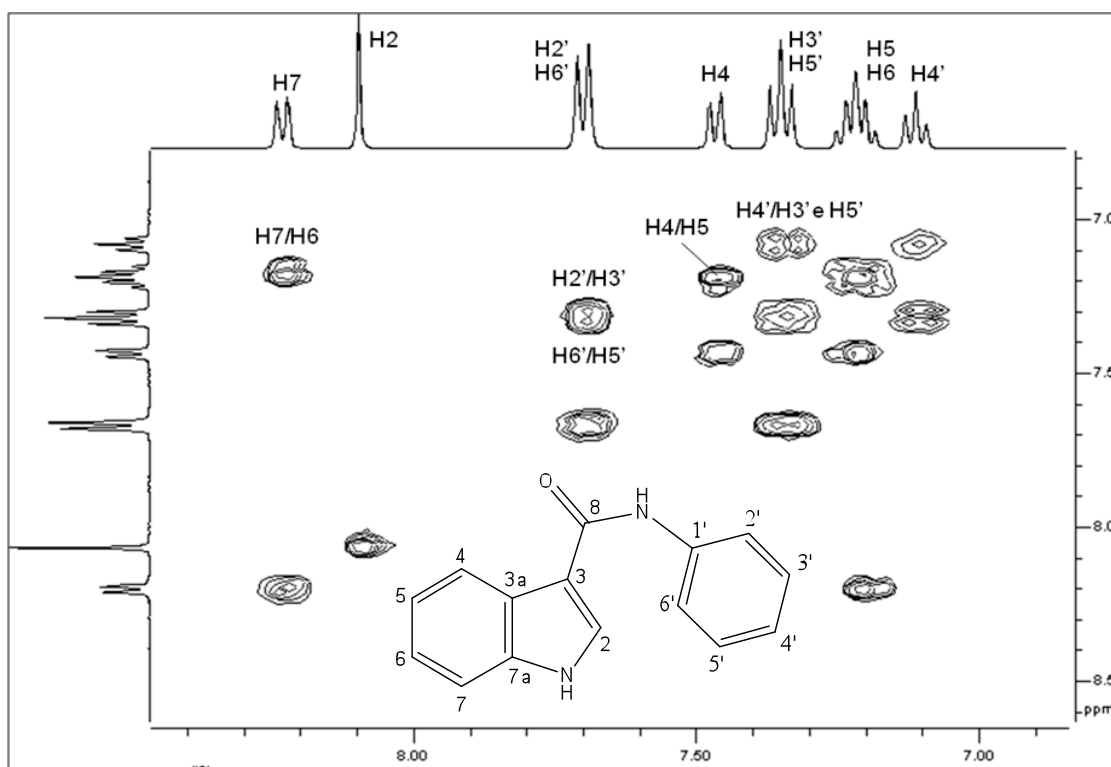


Figura 92A – Expansão do mapa de contornos COSY de **26** (CD_3OD ; 400 MHz).

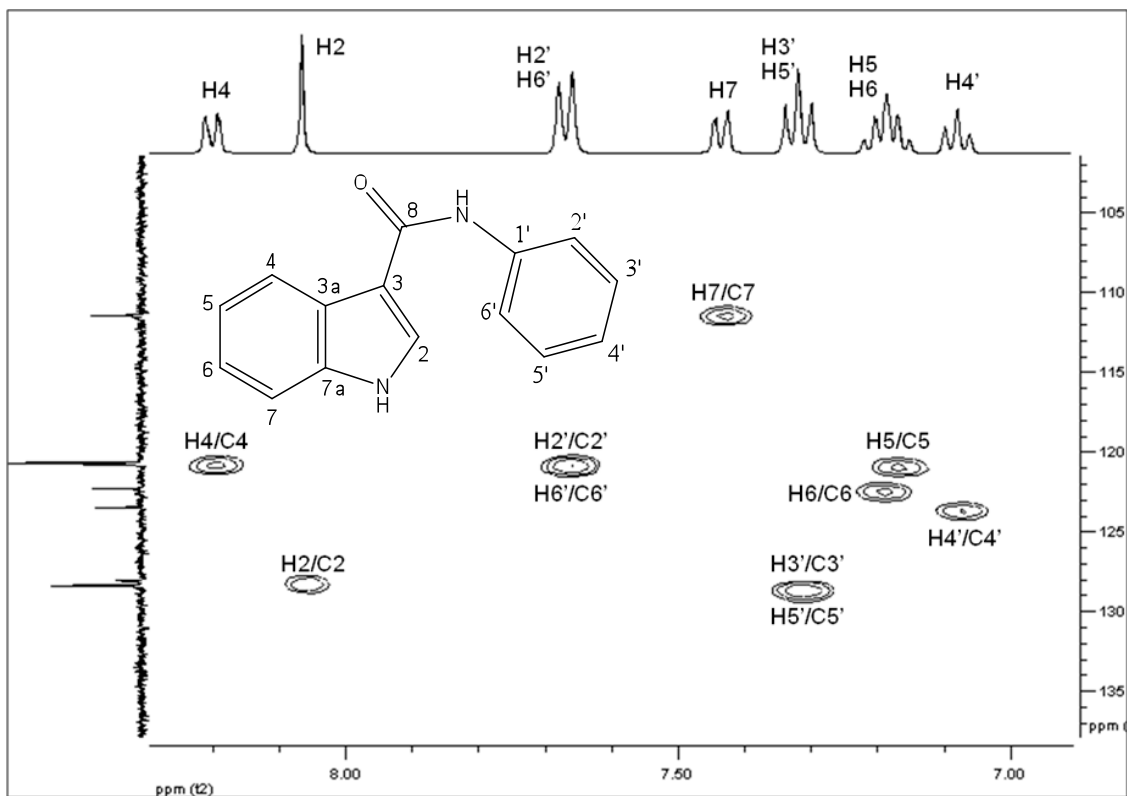


Figura 93A – Expansão do mapa de contornos HMQC de **26** (CD₃OD; 400 MHz).

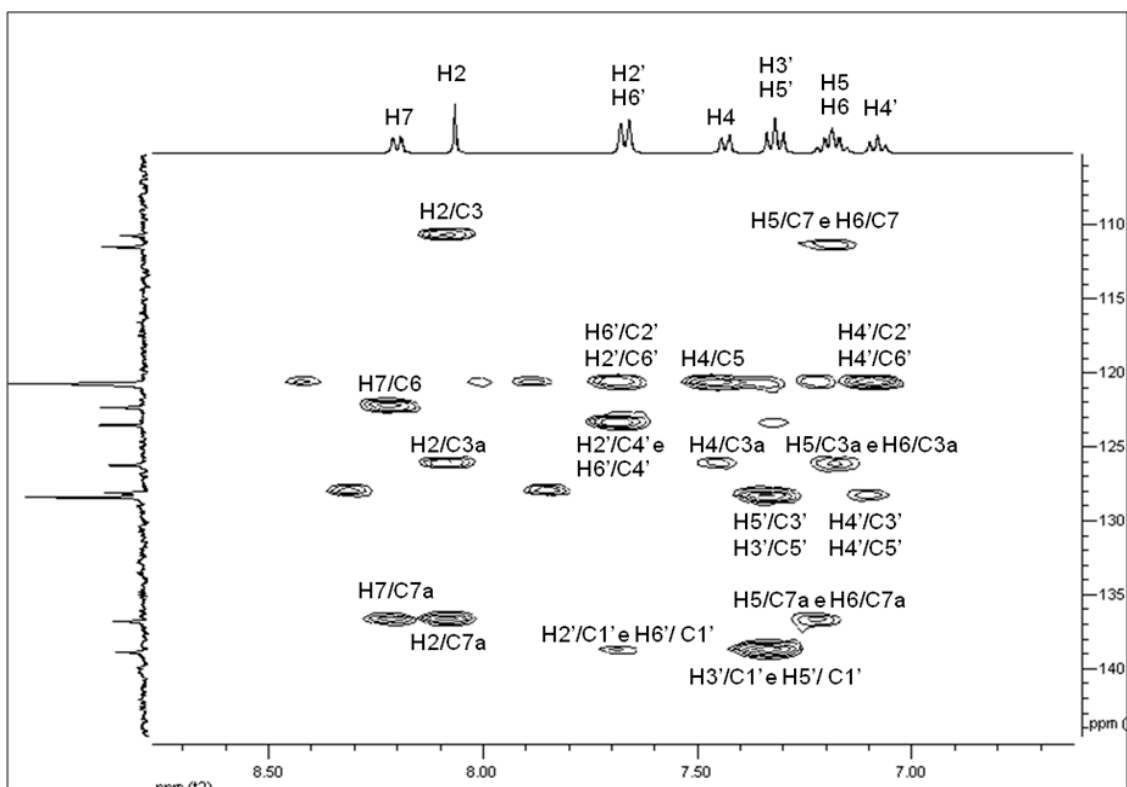


Figura 94A – Expansão do mapa de contornos HMBC de **26** (CD₃OD; 400 MHz).

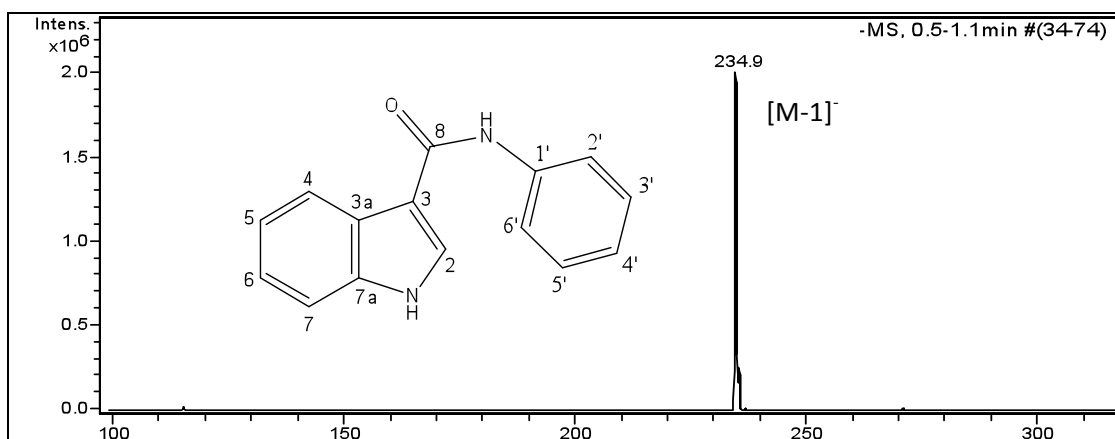


Figura 95A – Espectro de Massas de **26** (ionização por electrospray - modo negativo).

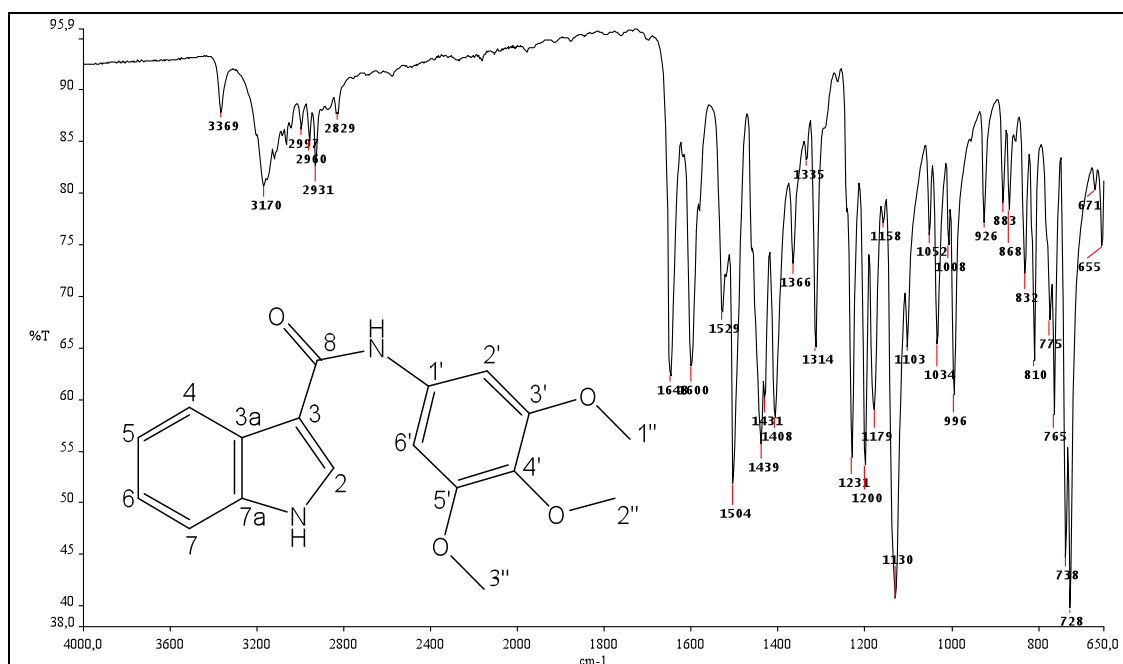


Figura 96A – Espectro de absorção na região do IV de **27**.

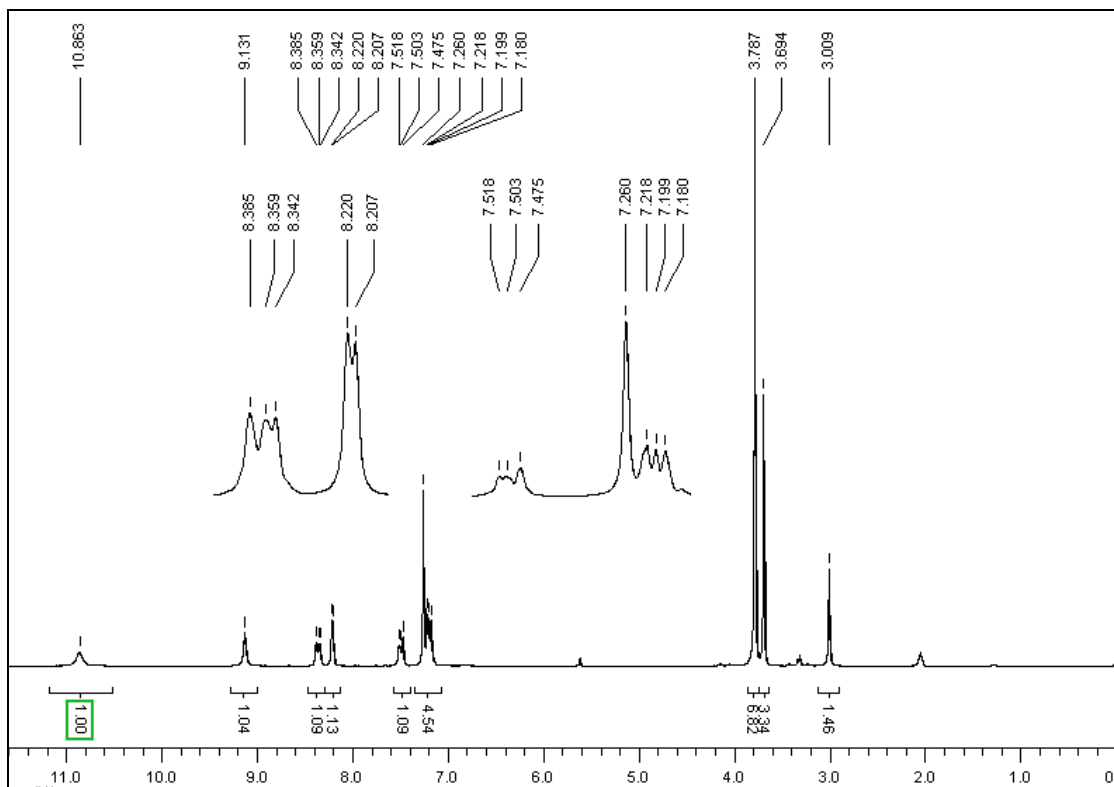


Figura 97A - Espectro de RMN de ^1H de **27** ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$; 400 MHz).

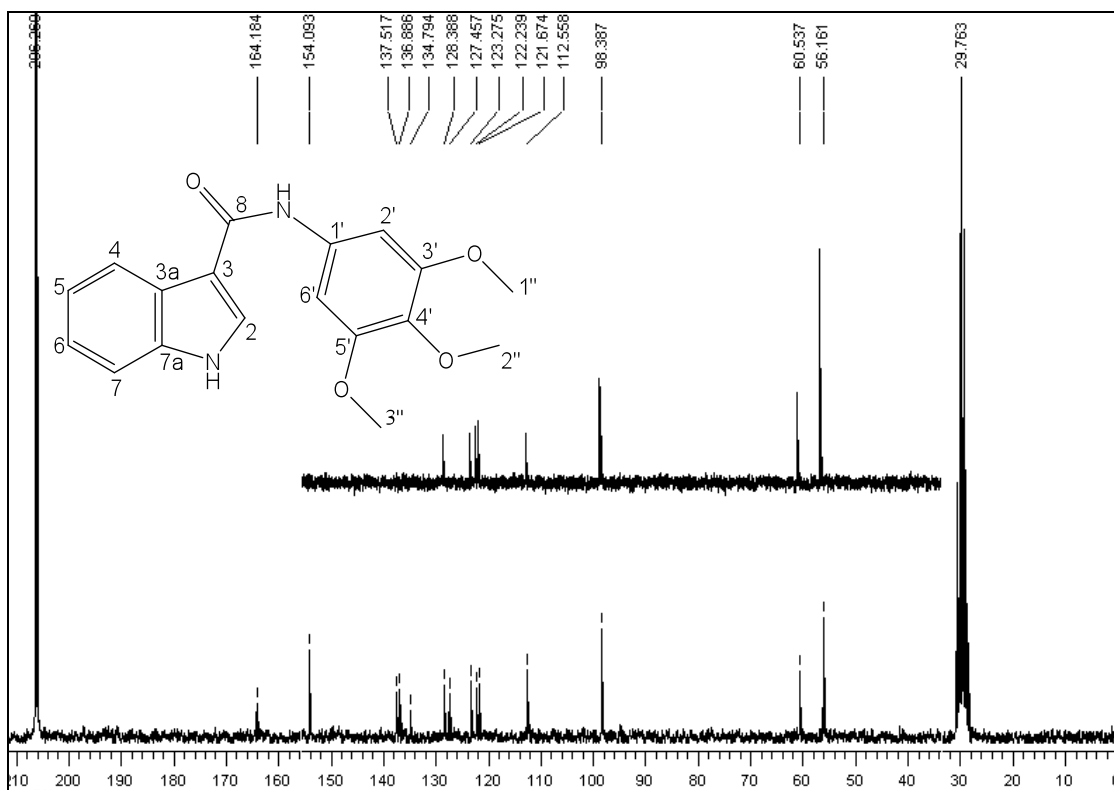


Figura 98A - Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 de **27** ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$; 50 MHz).

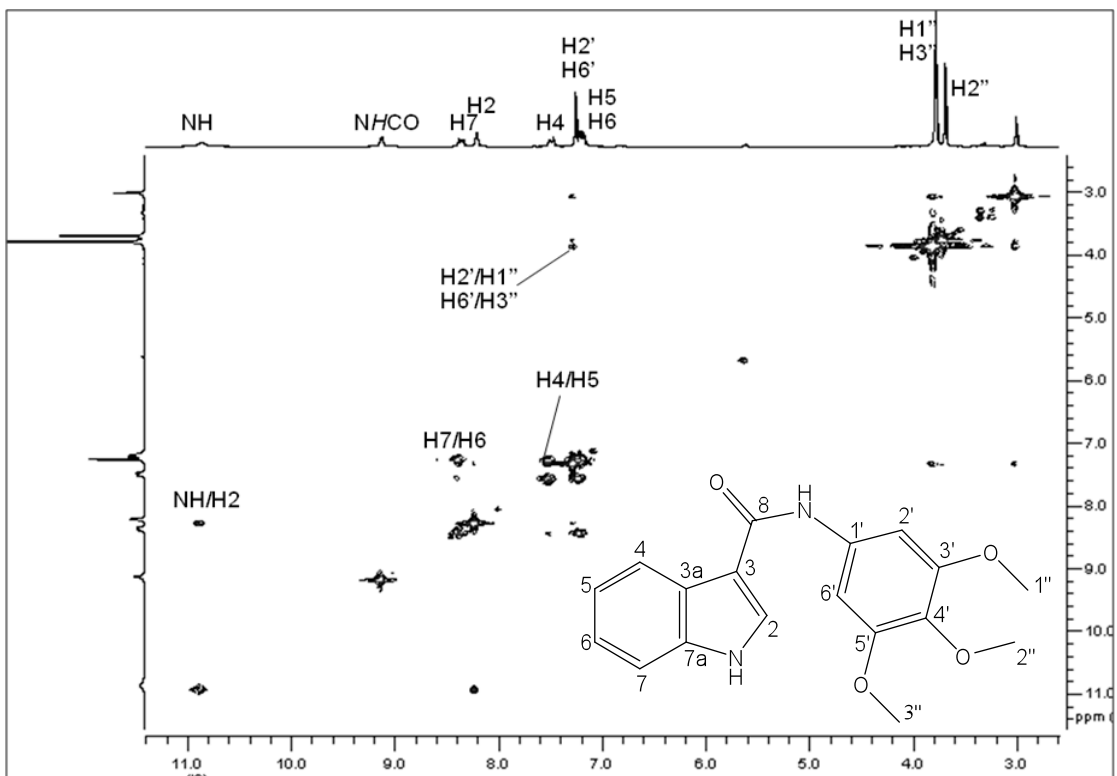


Figura 99A – Expansão do mapa de contornos COSY de **27** ((CD₃)₂CO; 400 MHz).

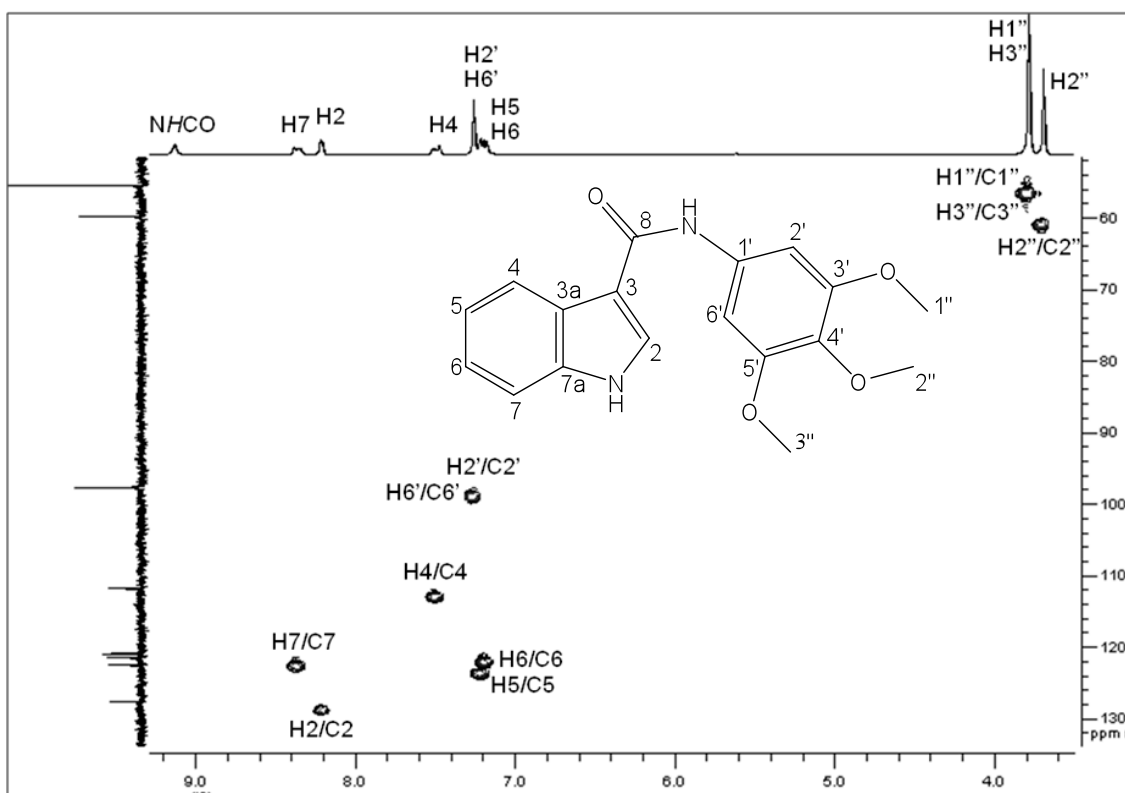


Figura 100A – Expansão do mapa de contornos HMBC de **27** ((CD₃)₂CO; 400 MHz).

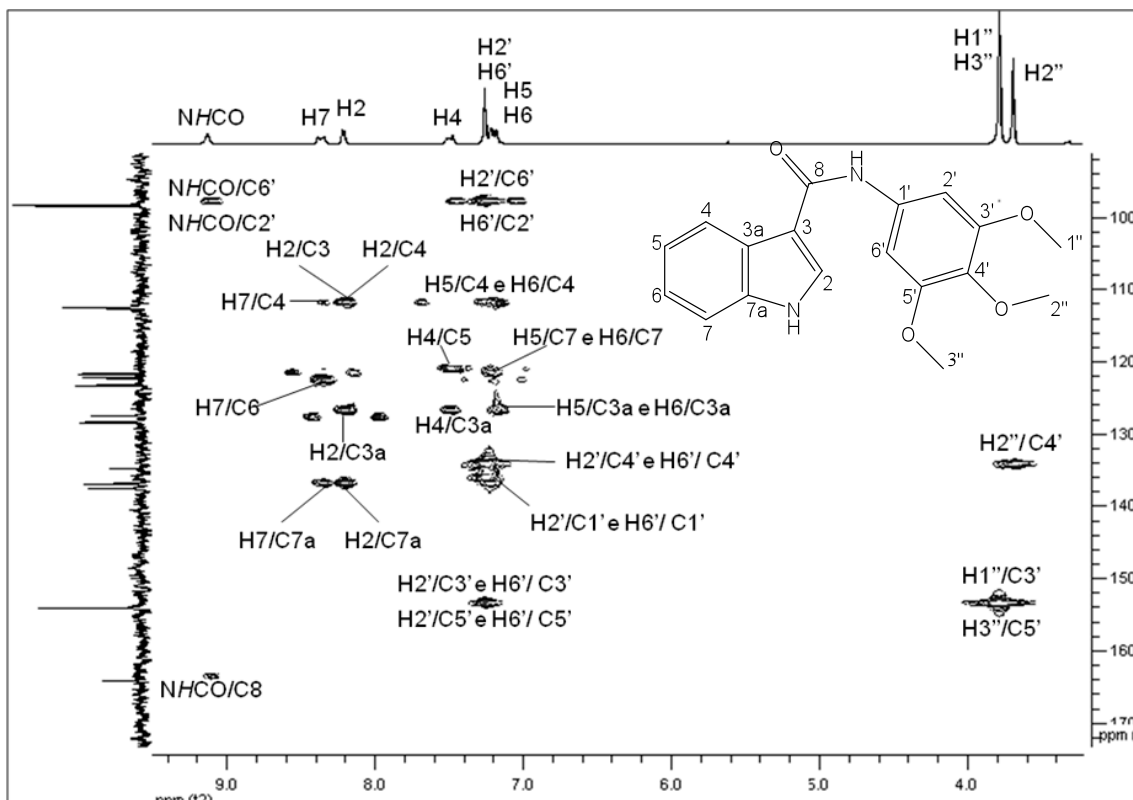


Figura 101A – Expansão do mapa de contornos HMBC de **27** ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$; 400 MHz).

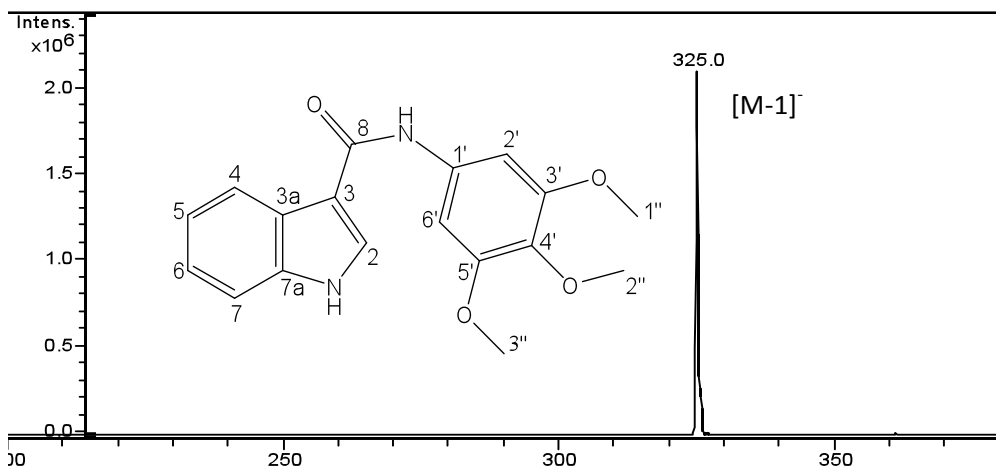


Figura 102A – Espectro de Massas de **27** (ionização por electrospray - modo negativo).