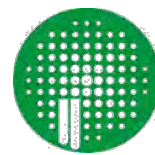




UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA



PgNSB

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS

E SINTÉTICOS BIOATIVOS

HELLANE FABRICIA SOUSA DE LUCENA

Uma nova lignana e outros constituintes químicos de *Hypenia salzmannii* (Benth.) Harley (Lamiaceae)

João Pessoa – PB

2012

HELLANE FABRICIA SOUSA DE LUCENA

Uma nova lignana e outros constituintes químicos de *Hypenia salzmannii* (Benth.) Harley (Lamiaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

João Pessoa – PB

2012

L935u Lucena, Hellane Fabricia Sousa de.

Uma nova lignana e outros constituintes químicos de
Hypenia salzmannii (Benth.) Harley (Lamiaceae) / Hellane
Fabricia Sousa de Lucena.-- João Pessoa, 2012.

166f. : il.

Orientador: Josean Fachine Tavares

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS

1. Produtos Naturais. 2. Lamiaceae. 3. Plantas medicinais.
4. *Hypenia*. 5. *Hypenia salzmannii* (canela-de-urubu).
6. Lignanas.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

HELLANE FABRICIA SOUSA DE LUCENA

Uma nova lignana e outros constituintes químicos de *Hypenia salzmannii* (Benth.) Harley (Lamiaceae)

Dissertação aprovada em 16/02/2012

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Josean Fechine Tavares

Doutor em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal da Paraíba
(Orientador)

Prof. Dr. Jorge Maurício David

Doutor em Química Orgânica
Universidade Federal da Bahia
(Examinador Externo)

Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Vanderlei de Souza

Doutora em Química Orgânica
Universidade Federal da Paraíba
(Examinador Interno)

*Aos meus pais José Zacarias e Maria da Conceição,
pelo apoio, paciência e amor a mim concedidos*

DEDICO

“Os que semeiam entre lágrimas, recolherão com alegria.”

(Salmo 125 : 5)

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pelo dom da minha vida, por todas as graças, bênçãos que recebi neste trabalho, através do Seu amor e misericórdia. Graças a Ti **Jesus** que És o autor maior de todas as coisas.

À **Maria Santíssima**, mãe de Deus, pelas graças recebidas através da Sua intercessão junto ao Pai.

Aos meus pais **José Zacarias** e **Maria da Conceição** por terem me dado a vida. Agradeço por todos os anos de privações em nome da minha educação e da minha formação. Agradeço principalmente por todos os “nãos” que foram os alicerces para minha formação de valores e discernimento do caminho do bem. A vocês o meu amor e gratidão eterna.

Aos irmãos da **Comunidade Missão És Fiel**, nas pessoas de **Mércia Mousinho**, **Neuma Aquino**, **Marilda**, **Laércio de França** e **Greyce Santos**, pelas orações, incentivo, apoio, compreensão e amor. Que Deus os abençoe e os fortaleça.

Aos grandes amigos da graduação em farmácia, **Helena Neta**, **André Menezes**, **Mariana Soares**, **Paula Salgado**, **Fagner Carvalho**, **Guilherme Eduardo** e **Juliana Carreiro**.

À Msc. **Paula Salgado**, amiga que me acompanha desde a graduação. Agradeço por todo apoio, confiança, incentivo, admiração. Por todos os anos de risadas, lutas e dificuldades superadas. Sua presença, amizade e companheirismo tornaram os problemas pequenos e transformaram o estresse em alegria e a tristeza em felicidade nesses dois anos do mestrado. A você minha eterna admiração, carinho, amor e torcida! Deus te abençoe, minha amiga, minha irmã.

À amiga de mestrado **Cinthia Queiroga**, pela amizade, disponibilidade e incentivo. Felizes aqueles que têm a graça de fazer parte da sua vida! Deus te abençoe sempre e abra seus caminhos.

À minha Grande amiga Msc. **Karine Queiroga** por toda amizade e companheirismo. Toda minha gratidão ainda é pequena perto da sua ajuda constante

durante todos os anos de iniciação científica e mestrado. Você será sempre o meu alicerce científico, em quem me espelho todos os dias.

À minha irmã caçula, **Greyce Santos**, grande presente de Deus para mim. Agradeço pelo seu amor, companheirismo, amizade, carinho e compreensão diários e incondicionais, que são essenciais para mim e foram fundamentais para conclusão desse trabalho. A você, minha gratidão e amor eternos, minha irmã.

À **Isis Fernandes** e **Ana Silvia Suassuna** por toda disponibilidade, incentivo e confiança que depositam em mim todos os dias. Agradeço pela amizade sincera, preocupação e doação.

À turma de mestrado: **Ítalo Rossi, Jacqueline Alves, Juliana Carreiro, Viviane Araújo, Patrícia Nérís, Juliana Moura Mendes, Abrahão Filho, Paula Salgado, Fagner Carvalho, Monalisa Brito, Madalena, Rafaela Soares, Otemberg Souza, Sandro Leal, Cinthia Queiroga** e em especial a **Caroline Siqueira e Sara Alves**, amigas excepcionais que tive a graça da convivência diária no laboratório nos anos de mestrado.

Aos amigos de laboratório **Steno Lacerda, Marcelo Duarte (Manso), Sócrates Golzio, Adriana Fernandes, Viviane Marcelino, Camila Figueiredo, Paula Ferreira, Denise Casimiro e Fábio Tenório**.

Aos Profs. **Dr. Josean Fachine Tavares** e **Marcelo Sobral da Silva** pela confiança depositada, orientação e atenção.

À Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral Castello Branco e à aluna Waleska Viana pela realização do bioensaio com *Artemia salina* Leach.

Aos professores de graduação e pós-graduação pela minha formação acadêmica.

À **Vicente Carlos, Alexandro Marinho, Welington Navarro e Sócrates Golzio** pela obtenção dos espectros de RMN, IV e LC-MS.

À **Caroline Manguiera e Tânia Alves** pela disponibilidade e ajuda.

Ao **CNPq** pelo apoio financeiro.

RESUMO

LUCENA, Hellane Fabricia Sousa de. **Uma nova lignana e outros constituintes químicos de *Hypenia salzmannii* (Benth.) Harley (Lamiaceae)**. 166 p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012

A família Lamiaceae possui 7.193 espécies distribuídas em aproximadamente 260 gêneros que ocorrem na forma de ervas, arbustos e árvores distribuídos em ambos os hemisférios e inclui um grande número de plantas medicinais de importância significativa. No Brasil ocorrem aproximadamente de 26 gêneros e 350 espécies. O gênero *Hypenia* (Mart. ex Benth) R. Harley possui distribuição restrita na América do Sul com aproximadamente 27 espécies distribuídas em algumas regiões da Venezuela, Paraguai, Bolívia e Sul do Brasil. Entre essas espécies, a *Hypenia salzmannii* é popularmente conhecida como canela-de-urubu. A população utiliza esta planta para o tratamento de afecções do trato respiratório como gripes, resfriados e outras doenças respiratórias em geral. O presente trabalho descreve os resultados do estudo fitoquímico de *Hypenia salzmannii*. O material botânico foi submetido a processos de extração, partição e cromatografia para isolamento dos constituintes químicos. A estrutura química dos mesmos foi determinada por métodos espectroscópicos no Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, espectrometria de massas e comparações com modelos da literatura. Da fase diclorometano foram isolados três terpenoides: ácido ursólico, ácido oleanólico e ácido betulínico; um esteróide: β -sitosterol-glicosilado; duas flavanonas: isosakuranetina e sakuranetina; duas lignanas: a hinoquinina e a β -peltatina-A-metileter. Da fase acetato de etila foram obtidos um flavonóide glicosilado: hiperina; dois derivados fenólicos: ácido rosmarínico e rosmarinato de metila; e uma nova lignana, a (-)-secoisolaricirenisol-9-O- β -D-glicopiranosídeo-(6''-p-cumaroil). Os resultados obtidos nesse trabalho contribuíram para o conhecimento fitoquímico de *Hypenia salzmannii* e para a o conhecimento quimiotaxonômico do gênero *Hypenia* e da família Lamiaceae.

Palavras-chave: Lamiaceae, *Hypenia*, *Hypenia salzmannii*, lignanas.

ABSTRACT

LUCENA, Hellane Fabricia Sousa de. **A novel lignan and other chemical constituents from *Hypenia salzmannii* (Benth.) Harley (Lamiaceae)**. 166 p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012

The Lamiaceae family composes approximately 260 genera and 7.193 species, occurring as herbs, shrubs and trees, distributed in both hemispheres. It includes a large number of medicinal plants of significative importance. In Brazil, occurs about 26 genera and 350 species. The *Hypenia* (Mart. ex Benth) R. Harley genus presents a restrict distribution in South America with approximately 27 species distributed in some regions of Venezuela, Paraguai, Bolívia and southern Brazil. Among these species, *Hypenia salzmannii* is popularly known as “canela-de-urubu”. The population uses this plant for the treatment of respiratory illnesses such as colds, flu and other respiratory diseases in general. This work describes the results of the phytochemical study of *Hypenia salzmannii*. The plant was subjected to extraction, partition and chromatographic processes for chemical constituents isolation. Their chemical structure were determined by spectroscopic methods of InfraRed (IR) and ^1H e ^{13}C NMR, uni and bidimensional, mass spectrometry and comparisons with literature data. From the dichloromethane extract were isolated three terpenoids: ursolic acid, oleanoic acid and betulinic acid; a steroid: β -sitosterol glycoside; two flavanones: isosakuranetin and sakuranetin; two lignans: hinoquinin and β -peltatin-A-methylether. From the ethyl acetate extract were obtained a flavonoid glycoside: hyperin; two phenolic derivatives: rosmarinic acid and methyl rosmarinate; and a novel lignan, (-)-secoisolaricirensol-9-*O*- β -D-glucopiranoside-(6''-p-cumaroyl). The results from this work contributed to the phytochemical and chemotaxonomic knowledge of *Hypenia salzmannii* (Benth.) Harley, the *Hypenia* genus and Lamiaceae family as well.

Keywords: Lamiaceae, *Hypenia*, *Hypenia salzmannii*, lignans.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa de distribuição da família Lamiaceae em verde	28
Figura 2 - Exemplos de metabólitos secundários isolados de espécies da família Lamiaceae.....	30
Figura 3 - Distribuição do gênero <i>Hypenia</i> em verde	31
Figura 4 - <i>Hypenia salzmännii</i> (Benth.) Harley (Lamiaceae)	33
Figura 5 - Substâncias isoladas de <i>Hypenia salzmännii</i> (Benth.) Harley.....	34
Figura 6 - Representação dos núcleos fundamentais de algumas classes de flavonoides	39
Figura 7 - Representação da biossíntese dos flavonoides (DEWICK, 1994)	44
Figura 8 - Representação esquemática da biossíntese de triterpenos.....	49
Figura 9 - Rota biossintética dos fenilpropanoides (DEWICK, 2002; SIMÕES et. al., 2004)	54
Figura 10 - Esqueleto geral das principais lignanas	56
Figura 11 - Possíveis vias biossintéticas para vários tipos de lignanas. Setas sólidas representam caminhos fundamentados por meio de experimentos, setas quebradas representam caminhos assumidos com base na comparação de estruturas químicas (SUZUKI & UMEZAWA, 2007)	59
Figura 12 -Lignanas com atividade biológica na planta e no homem.....	61
Figura 13 - Aspecto geral do experimento com <i>Artemia salina</i> . (A) Recipiente retangular com divisória contendo furos; (B) Parte coberta do sistema contendo os cistos; (C) Exposição à luz	69
Figura 14 - Espectro na região do Infravermelho de Hs-1 (Pastilhas de KBr)	86
Figura 15 - Espectro de RMN de ^{13}C - APT de Hs-1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)	86
Figura 16 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C - APT de Hs-1 na região de 180,0 a 110 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)	87
Figura 17 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C - APT de Hs-1 na região de 80,0 a 42,0 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)	87
Figura 18 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C - APT de Hs-1 na região de 26,0 a 15,0 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)	88
Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H de Hs-1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)	88

Figura 20 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-1 na região de 5,2 a 2,4 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)	89
Figura 21 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-1 na região de 3,3 a 0,4 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)	89
Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H de Hs-2 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)	91
Figura 23 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-2 na região entre 2,8 e 1,2 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)	91
Figura 24 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-2 na região entre 5,4 e 4,0 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)	92
Figura 25 - Espectro de RMN de ^{13}C - APT de Hs-3 (CDCl_3 , 50 MHz)	98
Figura 26 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C - APT de Hs-3 na região de 132,0 a 108,0 ppm (CDCl_3 , 50 MHz)	98
Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H de Hs-3 (CDCl_3 , 500 MHz)	99
Figura 28 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-3 na região de 7,0 a 3,4 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)	99
Figura 29 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-3 na região de 3,9 a 0,5 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)	100
Figura 30 - Espectro de correlações ^1H X ^{13}C - J_{CH} - HMQC de Hs-3 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)	100
Figura 31 - Expansão do espectro de correlações ^1H X ^{13}C - J_{CH} - HMQC de Hs-3 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)	101
Figura 32 - Espectro de correlações ^1H x ^{13}C -nJCH (n=2 e 3) - HMBC de Hs-3 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)	101
Figura 33 - Espectro de correlações ^1H x ^{13}C -nJCH (n=2 e 3) - HMBC de Hs-3 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)	102
Figura 34 - Espectro de correlação homonuclear COSY de Hs-3 (CDCl_3 , 500 MHz)	102
Figura 35 - Espectro de correlação homonuclear NOESY de Hs-3 (CDCl_3 , 500 MHz)	103
Figura 36 - Espectro de RMN de ^{13}C - APT de Hs-4 (CDCl_3 , 125 MHz)	107
Figura 37 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C - APT de Hs-4 na região de 190,0 a 80,0 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)	107
Figura 38 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C - APT de Hs-4 na região de 60,0 a 30,0 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)	108

Figura 39 – Espectro de RMN de ^1H de Hs-4 (CDCl_3 , 500 MHz)	108
Figura 40 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-4 na região entre 6,4 e 3,8 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)	109
Figura 41 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-4 na região entre 3,4 e 0,8 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)	109
Figura 42 - Espectro na região do Infravermelho de Hs-5 (Pastilha de KBr)	115
Figura 43 - Espectro de ^{13}C – APT de Dicloro Hs-5 (CDCl_3 , 50 MHz)	115
Figura 44 - Expansão do espectro de ^{13}C – APT de Hs-5 na região entre 170 e 90 ppm (CDCl_3 , 50 MHz)	116
Figura 45 - Espectro de ^1H de Hs-5 (CDCl_3 , 200 MHz)	116
Figura 46 - Expansão do espectro de ^1H de Hs-5 na região entre 7,5 e 5,2 ppm (CDCl_3 , 200 MHz)	117
Figura 47 - Expansão do espectro de ^1H de Hs-5 na região entre 4,3 e 0,3 ppm (CDCl_3 , 200 MHz)	117
Figura 48 - Espectro na região do Infravermelho de Hs-6 (Pastilha de KBr)	122
Figura 49 - Espectro de ^{13}C – APT de Hs-6 (CD_3OD , 125 MHz)	122
Figura 50 - Expansão do espectro de ^{13}C – APT de Hs-6 na região entre 180,0 e 116,0 ppm (CD_3OD , 125 MHz)	123
Figura 51 - Expansão do espectro de ^{13}C – APT de Hs-6 na região entre 105,0 e 60,0 ppm (CD_3OD , 125 MHz)	123
Figura 52- Espectro de ^1H de Hs-6 (CD_3OD , 500 MHz)	124
Figura 53- Expansão do espectro de ^1H de Hs-6 na região entre 8,2 e 6,0 ppm (CD_3OD , 500 MHz)	124
Figura 54- Expansão do espectro de ^1H de Hs-6 na região entre 3,90 e 3,38 ppm (CD_3OD , 500 MHz)	125
Figura 55 - Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - J_{\text{CH}}$ – HMQC de Hs-6 (CD_3OD , 500 e 125 MHz)	125
Figura 56- Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - J_{\text{CH}}$ – HMQC Hs-6 (CD_3OD , 500 e 125 MHz)	126
Figura 57- Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - {}^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e 3) – HMBC de Hs-6 (CD_3OD , 500 e 125 MHz)	126
Figura 58 - Espectro de correlações homonuclear – COSY de Hs-6 (CD_3OD , 500 MHz)	127

Figura 59 - Espectro de correlações homonuclear – NOESY de Hs-6 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	127
Figura 60 - Espectro na região do Infravermelho de Hs-7 (Pastilha de KBr).....	131
Figura 61 - Espectro de RMN de ¹³ C – APT de Hs-7 (CD ₃ OD, 50 MHz).....	131
Figura 62 – Expansão do espectro de RMN de ¹³ C – APT de Hs-7 na região entre 155,0 e 65,0 ppm (CD ₃ OD, 50 MHz)	132
Figura 63 - Espectro de RMN de ¹ H de Hs-7 (CD ₃ OD, 200 MHz).....	132
Figura 64 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H de Hs-7 na região entre 7,8 e 6,2 ppm (CD ₃ OD, 200 MHz).....	133
Figura 65 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H de Hs-7 na região entre 5,4 e 0,8 ppm (CD ₃ OD, 200 MHz).....	133
Figura 66 – Espectro na região do Infravermelho de Hs-8 (Pastilha de KBr)	136
Figura 67 - Espectro de RMN de ¹³ C – APT de Hs-8 (CD ₃ OD, 50 MHz).....	136
Figura 68 - Expansão do espectro de RMN de ¹³ C – APT de Hs-8 na região entre 178,0 e 126,0 ppm (CD ₃ OD, 50 MHz).....	137
Figura 69 - Expansão do espectro de RMN de ¹³ C – APT de Hs-8 na região entre 130,0 e 72,0 ppm (CD ₃ OD, 50 MHz)	137
Figura 70 - Expansão do espectro de RMN de ¹³ C – APT de Hs-8 na região entre 80,0 e 30,0 ppm (CD ₃ OD, 50 MHz)	138
Figura 71 - Espectro de RMN de ¹ H de Hs-8 (CD ₃ OD, 200 MHz).....	138
Figura 72 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H de Hs-8 na região entre 7,8 e 6,0 ppm (CD ₃ OD, 200 MHz).....	139
Figura 73- Expansão do espectro de RMN de ¹ H de Hs-8 na região entre 6,4 e 2,0 ppm (CD ₃ OD, 200 MHz).....	139
Figura 74 - Estrutura química do isolariciresinol.....	141
Figura 75 – Estrutura química do <i>p-cumaroil</i>	142
Figura 76 - Estrutura química do secoisolariciresinol	143
Figura 77 - Espectro de massas de Hs-9	149
Figura 78 - Espectro na região do infravermelho de Hs-9 (Pastilhas de KBr)	149
Figura 79 - Espectro de RMN de ¹³ C – APT de Hs-9 (CD ₃ OD, 200 MHz).....	150
Figura 80 - Expansão do espectro de RMN de ¹³ C – APT de Hs-9 de 170,0 a 100,0 ppm (CD ₃ OD, 200 MHz).....	150

Figura 81 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – APT de Hs-9 de 80,0 a 30,0 ppm (CD_3OD , 200 MHz)	151
Figura 82 - Espectro de RMN de ^1H de Hs-9 (CD_3OD , 500 MHz)	151
Figura 83 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-9 de 7,90 a 6,00 ppm (CD_3OD , 500 MHz)	152
Figura 84 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-9 de 4,55 a 3,25 ppm (CD_3OD , 500 MHz)	152
Figura 85 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-9 de 2,86 a 2,38 ppm (CD_3OD , 500 MHz)	153
Figura 86 - Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - J_{\text{CH}}$ – HMQC de Hs-9 (CD_3OD , 500 e 125 MHz)	153
Figura 87 – Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - J_{\text{CH}}$ – HMQC de Hs-9 (CD_3OD , 500 e 125 MHz)	154
Figura 88 – Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - {}^nJ_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) - HMBC de Hs-9 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)	154
Figura 89 – Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - {}^nJ_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) - HMBC de Hs-9 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)	155
Figura 90 – Espectro de correlação homonuclear COSY de Hs-9 (CD_3OD , 500 MHz)	155
Figura 91 – Expansão do espectro de correlação homonuclear COSY de Hs-9 (CD_3OD , 500 MHz)	156
Figura 92 - Espectro de correlação homonuclear NOESY de Hs-9 (CD_3OD , 500 MHz)	156
Figura 93 – Expansão espectro de correlação homonuclear NOESY de Hs-9 (CD_3OD , 500 MHz)	157
Figura 94 - Expansão espectro de correlação homonuclear NOESY de Hs-9 (CD_3OD , 500 MHz)	157

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Solubilização das substâncias.....	70
Tabela 2 - Valores de CL ₅₀ obtidos através do bioensaio com A. salina para o extrato etanólico bruto e fases de <i>Hypenia salzmannii</i>	71
Tabela 3 - Sistemas de eluição utilizados no fracionamento cromatográfico da fase diclorometano do extrato etanólico bruto de <i>Hypenia salzmannii</i> (Benth.) Harley.....	74
Tabela 4 - Método utilizado na cromatografia sob média pressão	76
Tabela 5 - Deslocamentos químicos e tipos de sinal para Hs-1, verificados nos espectros de ¹³ C (125 MHz, respectivamente) unidimensionais em C ₅ D ₅ N e comparação com os dados de RMN de ¹³ C da literatura (FALCÃO et al., 2003) (δ em ppm).	85
Tabela 6 - Dados de RMN ¹³ C de (+) Hinoquinina e (-) Hinoquinina (AGRAWAL & THAKUR, 1985)	95
Tabela 7 - Dados de RMN de ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) de Hs-3 e correlações obtidas em HMQC, COSY, HMBC e NOESY, registrados em CDCl ₃ , J (Hz) e δ (ppm). Valores registrados em comparação com dados da literatura (FRANÇA et al., 2005).	96
Tabela 8 - Deslocamentos químicos e tipos de sinal para Hs-4, verificados nos espectros de RMN ¹ H e ¹³ C (500 e 125 MHz, respectivamente) unidimensionais em CDCl ₃ e comparação com os dados de RMN de ¹³ C e ¹ H da literatura (DAVID et al., 2001; FELICIANO et al., 1989) (δ em ppm e J em Hz).	106
Tabela 9 - Deslocamentos químicos e tipos de sinal para Hs-5, verificados nos espectros de RMN ¹ H e ¹³ C (500 e 125 MHz, respectivamente) unidimensionais em CDCl ₃ e comparação com os dados de RMN de ¹³ C e ¹ H da literatura (VASCONCELOS et. al., 1998)	113
Tabela 10 - Deslocamentos químicos e tipos de sinal para Hs-6, verificados nos espectros de RMN ¹ H e ¹³ C (500 e 125 MHz, respectivamente) unidimensionais em CD ₃ OD e comparação com os dados de RMN de ¹³ C e ¹ H da literatura (GÜVENALP & DEMIZERER, 2005) (δ em ppm e J em Hz).	120
Tabela 11 -Deslocamentos químicos e tipos de sinal para Hs-7, verificados nos espectros de RMN ¹ H e ¹³ C (200 e 50 MHz, respectivamente) unidimensionais em CD ₃ OD e comparação com os dados de RMN de ¹³ C e ¹ H da literatura (CD ₃ OD) (Ögzen et al., 2011) (δ em ppm e J em Hz).....	130
Tabela 12 - Deslocamentos químicos e tipos de sinal para Hs-8, verificados nos espectros de RMN ¹ H e ¹³ C (200 e 50 MHz, respectivamente) unidimensionais em CD ₃ OD e comparação com os dados de RMN de ¹³ C e ¹ H da literatura (CD ₃ OD)(Woo & Piao, 2004) (δ em ppm e J em Hz).....	135

Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de Hs-9 e correlações obtidas em HMQC, COSY, HMBC e NOESY, registrados em CD_3OD , J (Hz) e δ (ppm)	147
---	-----

LISTA DE ESQUEMAS E GRÁFICOS

Esquema 1 - Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Hypenia salzmännii*.68

Esquema 2 - Fracionamento da fase acetato de etila do extrato etanólico bruto das folhas de *Hypenia salzmännii*.75

Esquema 3 - Fracionamento da fase acetato de etila do extrato etanólico bruto das folhas de *Hypenia salzmännii*.77

Gráfico 1 - Viabilidade das larvas do microcrustáceo *Artemia salina* após tratamento com o extrato etanólico bruto das folhas de *Hypenia salzmännii* (Benth.) Harley ($\mu\text{g/mL}$). Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95%71

Gráfico 2 - Viabilidade das larvas do microcrustáceo *Artemia salina* após tratamento com a fase hexânica de *Hypenia salzmännii* (Benth.) Harley ($\mu\text{g/mL}$). Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95%.....72

Gráfico 3 - Viabilidade das larvas do microcrustáceo *Artemia salina* após tratamento com a fase diclorometano de *Hypenia salzmännii* (Benth.) Harley ($\mu\text{g/mL}$). Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95%72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

AcOEt	Acetato de Etila
APT	<i>Attached Proton Test</i>
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
DCM	Diclorometano
cm	Centímetro
compr.	Comprimento
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
EEB	Extrato Etanólico Bruto
EM	Espectrometria de massas
EtOH	Etanol
H₂O	Água
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
KBr	Brometo de potássio
kg	Quilograma
LMCA	Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise
MeOH	Metanol
m	Multiplete
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
min	Minuto

mL	Mililitro
nm	Nanômetro
mm	Milímetro
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
p.	Página
ppm	Partes por milhão
R_f	Fator de Retenção
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Singleto
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico em ppm
μg	Micrograma
μm	Micromêtro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	28
3.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA LAMIACEAE	28
3.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO <i>Hypenia</i>	31
3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE <i>Hypenia salzmanii</i>	33
3.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE FLAVONOIDES	36
3.4.1 Aspectos químicos	36
3.4.1.1 Flavonas, flavonóis e seus O-heterosídeos	37
3.4.1.2 Flavanonas.....	37
3.4.1.3 Isoflavonas.....	38
3.4.1.4 Pterocarpanos	38
3.4.2 Atividades biológicas dos flavonoides	40
3.4.3 Aspectos biossintéticos dos flavonoides.....	41
3.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE TERPENOIDES	45
3.5.1 Aspectos Químicos	45
3.5.2 Atividades Biológicas de Terpenóides	45
3.5.3 Considerações gerais sobre triterpenos	46
3.5.4 Aspectos gerais da biossíntese de triterpenos.....	46
3.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE LIGNÓIDES	53
3.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	62
3.6.1 Ensaios biológicos frente <i>Artemia salina</i> Leach	62
4 PARTE EXPERIMENTAL	64
4.1 ESTUDO FITOQUÍMICO	64
4.1.1 Coleta e identificação do material vegetal	64
4.1.2 Métodos de análise	64
4.1.2.1 Métodos cromatográficos	64
4.1.2.2 Métodos espectrométricos	65

4.1.2.2.1 Infravermelho	65
4.1.2.2.2 Ressonância Magnética Nuclear	65
4.1.2.2.3 Espectrometria de Massas.....	65
4.1.2.3 Pontos de fusão	66
4.1.2.4. <i>Artemia salina</i> Leach.....	66
4.1.3 Processamento das partes aéreas de <i>Hypenia salzmännii</i>	66
4.1.3.1 Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) das partes aéreas de <i>Hypenia salzmännii</i>	66
4.1.3.2 Fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB) das partes aéreas de <i>Hypenia salzmännii</i>	67
4.1.4 Bioensaio EEB e fases de <i>Hypenia</i> frente <i>Artemia salina</i> Leach.....	69
4.1.4.1 Resultados Parciais	70
4.1.5 Fracionamento cromatográfico da fase diclorometano das partes aéreas de <i>Hypenia salzmännii</i>	73
4.1.6.1 Fracionamento cromatográfico em Coluna Cromatográfica de Sílica-Gel.....	73
4.1.6 Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila das folhas de <i>Hypenia salzmännii</i>	76
4.1.6.1 Fracionamento cromatográfico em Coluna Cromatográfica de Sephadex LH-20®	76
4.1.6.2 Fracionamento cromatográfico sob Coluna de Média Pressão.....	76
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
5.1 Determinação estrutural de Hs-1.....	83
5.2 Determinação estrutural de Hs-2.....	90
5.3 Determinação estrutural de Hs-3.....	93
5.4 Determinação estrutural de Hs-4.....	104
5.5 Determinação estrutural de Hs-5.....	110
5.6 Determinação Estrutural de Hs-6.....	118
5.7 Determinação estrutural de Hs-7.....	128
5.8 Determinação estrutural de Hs-8.....	134
5.9 Determinação estrutural de Hs-9.....	140
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	158
REFERÊNCIAS	159

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Sabendo-se que as plantas desempenhavam papel importante nos males existentes na sua vida cotidiana, o homem começou a se interessar em aplicar preparados vegetais de plantas medicinais para as enfermidades que o viessem acometer baseado na experiência popular (YUNES ; CECHINEL-FILHO, 2007).

A cultura popular brasileira é particularmente rica no uso das plantas medicinais. Entretanto, o Brasil tem utilizado apenas uma pequena percentagem da sua biodiversidade e do conhecimento popular para a pesquisa e desenvolvimento de agentes fitoterápicos (CALIXTO, 2005).

Devido a estes aspectos, vê-se um interesse crescente na utilização e pesquisa de plantas medicinais, objetivando fins terapêuticos, aliados à boa aceitabilidade destes produtos no mercado farmacêutico e às altas cifras que circundam a comercialização de fitomedicamentos, observada na última década. O Brasil é o país com maior potencial para pesquisa com espécies vegetais, uma vez que detém a maior e mais rica biodiversidade do planeta (NOLDIN et al., 2006).

Apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna, nas últimas décadas, como o desenvolvimento vertiginoso da síntese química, cerca de 25% dos medicamentos comercializados mundialmente são de origem vegetal, isolados ou produzidos por semi-síntese (FOGLIO et al., 2006).

A grande variedade e complexidade dos metabolitos especiais biossintetizados são específicos das espécies e participam das interações intra e intercelular do próprio organismo ou com células de outros organismos, atuam em processos de polinização pela produção de substâncias que atraem os agentes vivos deste processo ou contribuem para a resistência dos organismos pela defesa contra pestes e outras doenças estabelecendo a competência para a guerra química dos ajustes necessários à convivência e sobrevivência ambiental. Assim, por exemplo, o metabolismo primário assume importância transcendental no crescimento e rendimento agrícola e o metabolismo secundário contribui com os aromas, as cores dos alimentos e também com a resistência contra pestes e

doenças, mantendo a sobrevivência nas condições ambientais favoráveis (BRAZ-FILHO, 2010).

A princípio, os químicos estudavam plantas consagradas pelo uso popular, geralmente incorporadas às farmacopeias da época, limitando-se ao isolamento e à determinação estrutural de substâncias ativas biologicamente. Dada a importância das plantas para a medicina da época, a química e a medicina passaram a ter uma estreita relação, o que permitiu um rápido desenvolvimento de seus campos específicos. Desta forma, muitas substâncias ativas foram conhecidas e introduzidas na terapêutica, permanecendo até hoje como medicamentos (CECHINEL FILHO; YUNES, 2001).

A Química Medicinal, utilizando diferentes estratégias metodológicas complementares, é tradicional e reconhecidamente usada no planejamento de fármacos. Em suas inúmeras atribuições, ela engloba o planejamento racional de novas substâncias bioativas, envolvendo a síntese ou a modificação molecular de substâncias; o isolamento de princípios ativos naturais (plantas, animais, minerais); a identificação ou elucidação da estrutura; a descrição das moléculas desde a sua constituição atômica (passando por relações entre a estrutura e propriedades) até suas características estruturais quando da (s) interação (ões) com os diferentes sistemas biológicos; a compreensão a nível molecular de processos bioquímicos, farmacológicos, toxicológicos e farmacocinéticos (AMARAL; MONTANARI, 2002).

A química de produtos naturais, especialmente de vegetais, se dedica à caracterização estrutural, avaliação de propriedades e investigações biossintéticas de substâncias naturais produzidas pelo metabolismo secundário de organismos vivos (TORSSELL, 1997).

Embora existam, nos dias atuais, diversas estratégias e metodologias disponíveis para que se possa sintetizar e descobrir novos fármacos, a química de Produtos Naturais representa uma destas alternativas de sucesso, historicamente privilegiada. Muitos metabólitos secundários ou especiais se notabilizaram como matérias-primas valiosas para a produção de inúmeros medicamentos contemporâneos (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Apesar dos muitos desafios enfrentados nas últimas décadas, a Química de Produtos Naturais tem tido avanços importantes com a interseção com outras áreas

afins como Bioquímica, Biologia Molecular, Etnofarmacologia, Imunologia, e tecnologias inovadoras de análise e elucidação estrutural como a ressonância magnética nuclear e espectroscopia de massas (FERREIRA ; PINTO, 2010).

Com o desenvolvimento de novas técnicas espectroscópicas, os químicos orgânicos têm conseguido elucidar rapidamente estruturas moleculares complexas de constituintes naturais, até há pouco tempo difíceis de ser identificados. A cada momento são relatadas na literatura novas moléculas, algumas de relevante ação farmacológica. Neste contexto é importante mencionar que as plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica de enfermidades (CECHIEL FILHO ; YUNES, 1998).

Assim, o isolamento e a determinação estrutural de substâncias orgânicas produzidas pelo metabolismo secundário de organismos vivos representam importância fundamental para a fitoterapia e o desenvolvimento científico da própria química de produtos naturais, contribuindo para o avanço de outras atividades científicas e tecnológicas no país (LEMOS et al., 2007).

Percebendo o potencial farmacológico das substâncias isoladas de espécies da família Lamiaceae, a ocorrência de muitas espécies ainda não devidamente exploradas do ponto de vista químico e farmacológico, e reconhecendo o pouco conhecimento sobre o gênero *Hypernia*, optou-se pelo estudo da espécie *Hypernia salzmannii* que possui importância no uso popular e cujos estudos químicos e farmacológicos ainda são pouco conhecidos, fato que poderá conduzir à descoberta de novas fontes de substâncias naturais ativas.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e identificar os constituintes químicos dos extratos orgânicos de *Hypernia salzmännii*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Isolar e caracterizar fitoquimicamente as partes aéreas de *Hypernia salzmännii* (Benth.) Harley, através de métodos de extração, isolamento e purificação dos constituintes químicos;
- ✓ Identificar e/ou elucidar a estrutura dos constituintes químicos desta espécie, através de técnicas espectroscópicas no Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (uni e bidimensionais) e Espectrometria de massas;
- ✓ Realizar o estudo fitoquímico biomonitorado a partir de bioensaio com *Artemia salina* Leach;
- ✓ Contribuir com a quimiotaxonomia da família Lamiaceae.

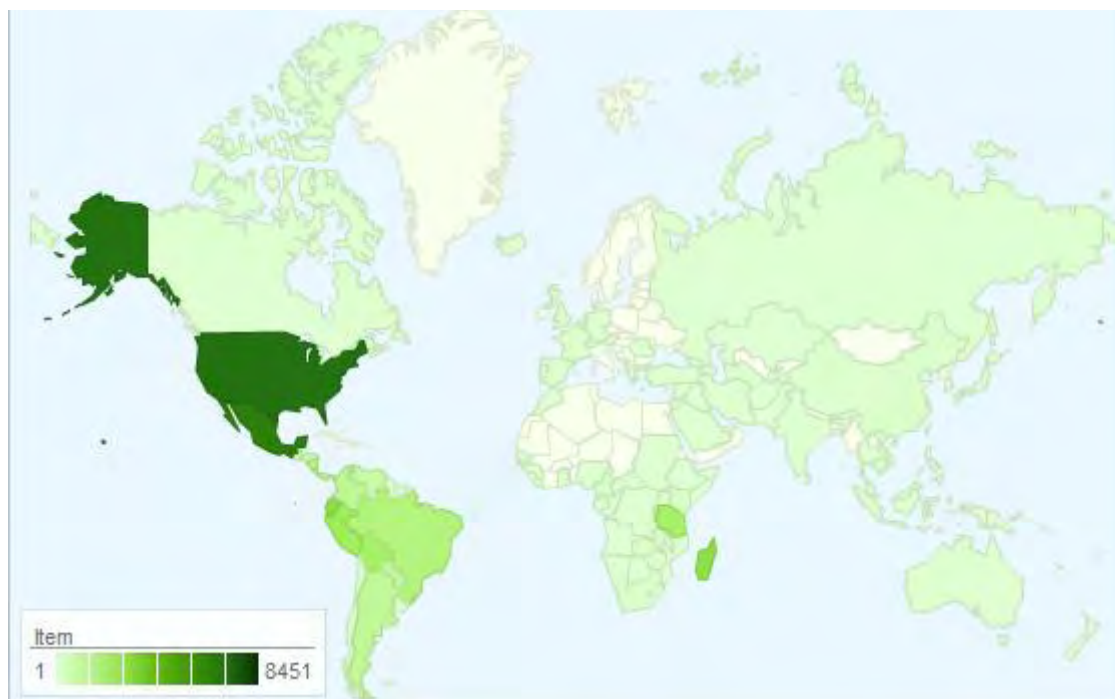
Fundamentação Teórica

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA LAMIACEAE

A família Lamiaceae possui 7.193 espécies distribuídas em aproximadamente 260 gêneros. As plantas dessa família são abundantes na região mediterrânea, porém alguns gêneros como *Salvia* e *Scutellaria* têm distribuição ampla e cosmopolita (Figura 1). No Brasil ocorrem aproximadamente de 26 gêneros e 350 espécies e em outras áreas do Cerrado do Leste da América do Sul, a família Lamiaceae é representada principalmente pela subtribo Hyptidinae (SILVA et al., 2011).

Figura 1 - Mapa de distribuição da família Lamiaceae em verde



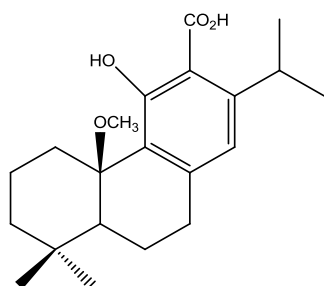
(Fonte: <http://www.tropicos.org/Name/42000291?tab=maps>)

Esta família é composta por ervas, arbustos e árvores distribuídos em ambos os hemisférios e inclui um grande número de plantas medicinais de importância significativa (PEERZADA, 1997).

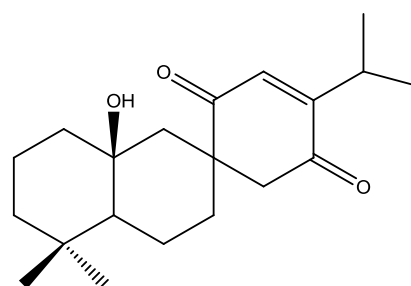
A família Lamiaceae é relativamente bem estudada do ponto de vista fitoquímico. Com respeito ao metabolismo especial, apresenta uma grande variedade de classes de micromoléculas, existindo representantes da via do ácido mevalônico, da via do ácido chiquímico e provenientes de biossíntese mista (Figura 2, p. 30). Essa família tem grande importância econômica por ser fonte de óleos essenciais aromáticos, voláteis essenciais (*Mentha*, *Lavandula*, *Ocimum*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Satureja*, *Thymus*) e de plantas ornamentais. Muitas espécies são utilizadas como condimentos importantes em culinária, sendo apreciadas pelo aroma ou pelo sabor que comunicam aos alimentos (JUDD et al., 2002; MENEZES, 1994) e algumas especiarias na família Lamiaceae são uma fonte bem conhecida de antioxidantes, especialmente polifenóis (HOSSAIN et al., 2010).

Dentre os gêneros da família Lamiaceae, um que se destaca é o gênero *Hyptis*, que é representado por mais de 300 espécies e apresenta uma grande diversidade morfológica na região do cerrado brasileiro. Várias espécies são relatadas como sendo extremamente aromáticas e apresentam, como comumente relatados para os gêneros pertencentes à família Lamiaceae, propriedades medicinais com relevantes atividades farmacológicas estudadas anteriormente (ZELLNER et al., 2009).

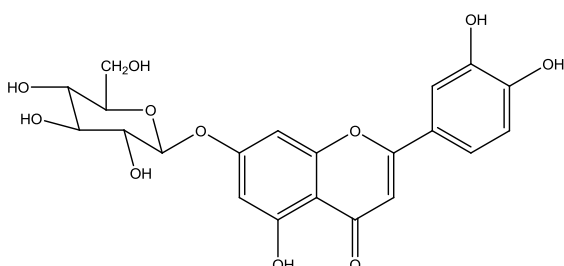
Dentre as atividades biológicas relatadas dos constituintes químicos isolados de plantas da família Lamiaceae, podemos destacar: antifúngica, anti-ulcerogênica, antibacteriana, citotóxica, inibitória do crescimento de células leucêmicas, anti-HIV, antiinflamatória, antinociceptiva e antitumoral (FALCÃO & MENEZES, 2003; ARRIGONI-BLANKA et al., 2008).

Figura 2 - Exemplos de metabólitos secundários isolados de espécies da família Lamiaceae**ácido 12-metoxicarnosico**

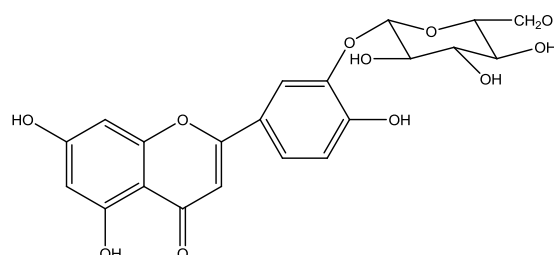
Folhas de *Hyptis martiusii* Benth
(ARAUJO et al., 2004)

**matiusano**

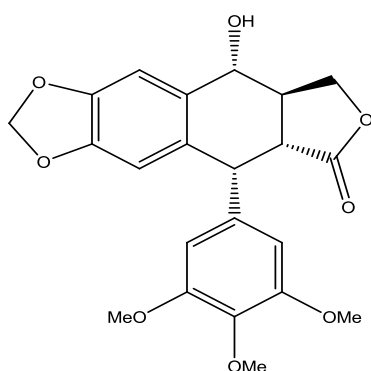
Folhas de *Hyptis martiusii* Benth
(ARAUJO et al., 2004)

**luteonina 7-O-β-glicuropiranosideo**

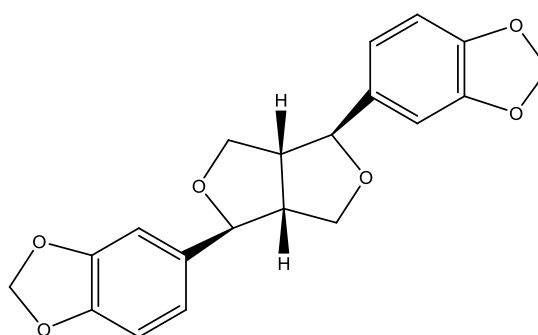
Folhas de *Melissa officinalis* L.
(PATORA & KLIMEK, 2002)

**luteonina 3'-O-β-glicuropiranosideo**

Folhas de *Melissa officinalis* L.
(PATORA & KLIMEK, 2002)

**podofilotoxina**

Folhas de *Teucrium polium* e *Salvia silicica*.
(BONUKLUGIL, 1996)

**(+)-sesamina**

Folhas de *Salvia* ssp. e *Sideritis* ssp.
(DARIAS et. al., 1990)

3.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *Hypernia*

O gênero *Hypernia* (Mart. ex Benth) R. Harley possui distribuição restrita na América do Sul, especialmente no Brasil (Figura 3). Foi recentemente separado do gênero *Hyptis* Jacq. baseado em um largo número de cromossomos e aspectos morfológicos (SILVA et al., 2011).

Figura 3 - Distribuição do gênero *Hypernia* em verde



(Fonte: <http://www.tropicos.org/Name/50144730?tab=maps>)

Este gênero possui 27 espécies reconhecidas com base nas inflorescências densas e frouxas incluindo as seções *Desinfloraceae* Benth. e *Laxifloraceae* Benth (SILVA et. al., 2011).

As espécies de *Hypernia* são geralmente encontradas em solos oligotróficos e arenosos, com níveis elevados de alumínio e são distribuídas em algumas regiões da Venezuela, Paraguai, Bolívia e Brasil. Neste são mais comuns em regiões de cerrado onde uma maior diversidade e endemismo podem ser encontrados (SILVA et. al., 2011).

Nessa região, espécies aromáticas de *Hyperia* são frequentemente relatadas pelo seu uso etnobotânico, como a infusão ou decocção de folhas no tratamento da gripe, resfriados e outras doenças respiratórias comuns (AGRA et al., 2007).

3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE *Hypernia salzmannii*

A espécie *Hypernia salzmannii* (Figura 4) é popularmente conhecida como canela-de-urubu. A população utiliza esta planta para o tratamento de afecções do trato respiratório como gripes, resfriados e outras doenças respiratórias em geral (AGRA et al., 2007).

Para esta espécie, já foram relatadas atividades farmacológicas do seu extrato metanólico, como: ação contra *S. aureus*, *S. subtilis*, *C. albicans* e *M. smegmatis* (FALCÃO & MENEZES, 2003), além de moderada atividade contra radicais livres e antioxidante (DAVID et al., 2007).

Um trabalho realizado com *Hypernia salzmannii* (publicado com a sua sinonímica botânica: *Hyptis salzmannii*) levou ao isolamento do diterpeno então inédito (-)-salzol; três lignanas: (+)-sesamina, (-)-cubenina, (-)-hinoquinina; três flavanonas: isosakuranetina, sakuranetina e a narigenina-7,4'-dimetileter; uma chalcona: 4,2',6'-tri-hidroxi-4'-metoxichalcona; além do ácido p-metoxicinâmico (MESSANA et al., 1990) (Figura 5, p. 34-35).

Figura 4 - *Hypernia salzmannii* (Benth.) Harley (Lamiaceae)

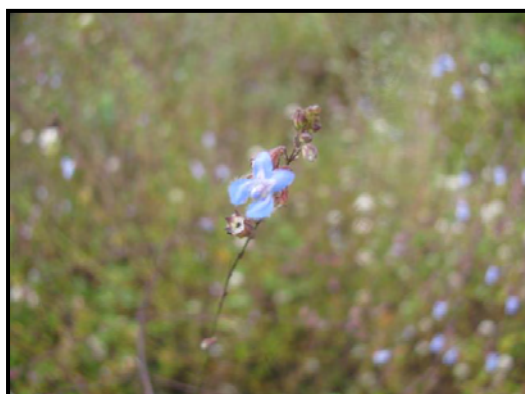


FOTO: JOSEAN FECHINE TAVARES, 2009

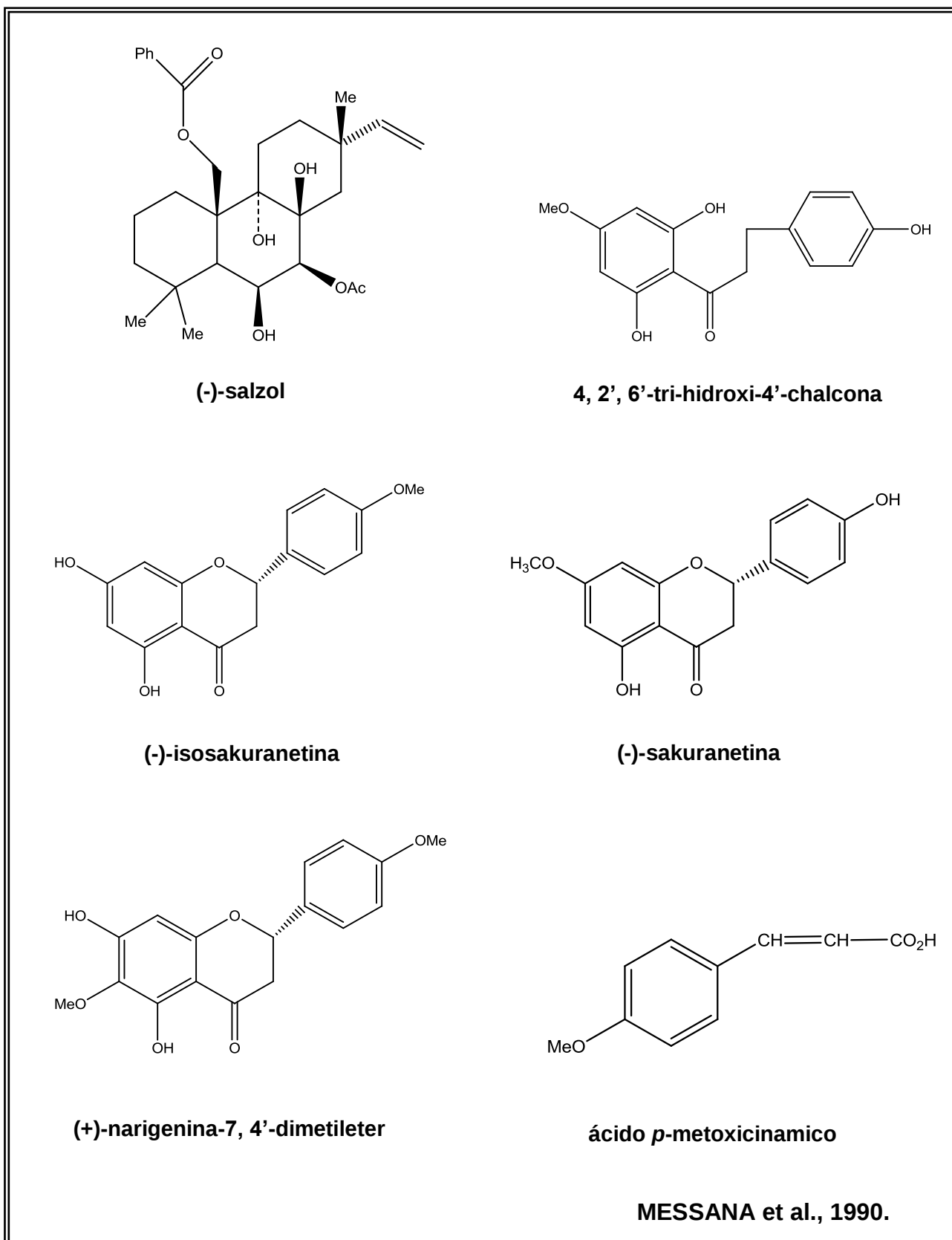
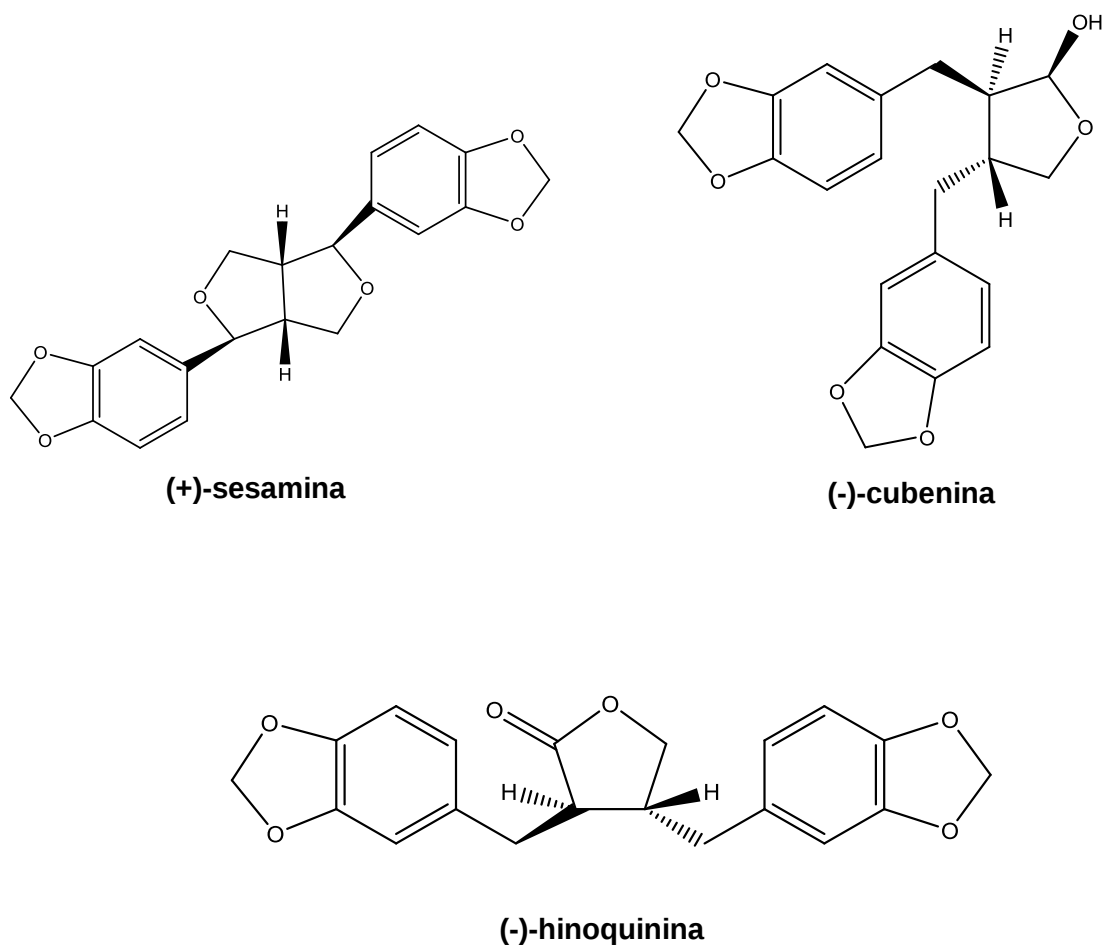
Figura 5 - Substâncias isoladas de *Hypernia salzmännii* (Benth.) Harley

Figura 5 (continuação) - Substâncias isoladas de *Hypernia salzmännii***MESSANA et al., 1990.**

3.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE FLAVONOIDES

Os flavonoides compreendem um grupo de metabólitos amplamente distribuídos no reino vegetal, pouco presente em algas com alguns representantes identificados em briófitas, existindo poucos relatos de ocorrência em fungos. Em pteridófitas, também foram encontrados, mas a sua variabilidade estrutural é pequena. Todavia, estão presentes em abundância em angiospermas, apresentando neste grupo uma enorme variedade estrutural.

Essa classe de substâncias pode ser considerada como marcador taxonômico devido a: abundância relativa em quase todo o reino vegetal, sua especificidade em algumas espécies, sua relativa facilidade de identificação, sua relativa estabilidade e seu acúmulo com menor influência do meio ambiente (VON-POSER; MENTZ, In: SIMÕES, 1999).

3.4.1 Aspectos químicos

Os produtos naturais derivados do esqueleto 1,3; 1,2 e 1,1 diarilpropânico são geralmente classificados em três grandes classes, respectivamente, como: flavonoides propriamente ditos, isoflavonoides e neoflavonoides (BRUNETON, 2001).

Existe uma grande variedade para as formas estruturais dos flavonoides. Todos contêm 15 átomos de carbono arranjados em três anéis ($C_6-C_3-C_6$), que são denominados A, B e C. Como consequência da ligação de dois grupos fenila a uma cadeia de três carbonos, isto é, derivados difenilpropânicos (Figura 6, p. 39).

As variadas classes de flavonoides irão diferir no grau de oxidação e de substituição do anel C, enquanto que compostos individuais em uma classe diferem quanto à substituição dos anéis A e B (PIETTA, 2000). Para os compostos tricíclicos, as unidades carbônicas são denominadas núcleos A, B e C e os carbonos recebem numeração com números ordinários para os núcleos A e C, e os mesmos números, seguidos de uma linha (') para o núcleo B. Alguns autores substituem a numeração 9 e 10 nos flavonoides por 8a e 4a, respectivamente.

Estas substâncias são usualmente oxigenadas e possuem substituintes hidroxila, metoxila, metilenodioxila e prenila. São isolados de um grande número de plantas vasculares, com aproximadamente 8.000 compostos individuais conhecidos (PIETTA, 2000). Um grande número de flavonoides ocorre como O-glicosídeos, no qual um ou mais dos grupos hidroxila do flavonoide estão ligados a um açúcar ou açúcares. Esta forma, chamada conjugada, também é conhecida como heterosídeo. Nos flavonoides C-glicosídeos o açúcar está ligado a um átomo de carbono. Quando o metabólito ocorre sem conjugação com esses carboidratos ou então quando é submetido à hidrólise ácida, é denominado aglicona ou genina (ZUANAZZI, In: SIMÕES, 1999).

3.4.1.1 Flavonas, flavonóis e seus O-heterosídeos

Esses compostos fazem parte de um grande grupo de flavonoides de origens biossintéticas muito próximas. Os flavonóis são flavonas substituídas na posição C-3 por uma hidroxila (Figura 6, p. 39) e estas duas classes são em geral classificadas juntas. As flavonas e flavonóis naturais são freqüentemente oxigenados, substituídos com hidroxilas e/ou metoxilas. Os substituintes encontrados com bastante freqüência são: acila, C-metila, metilenodioxila, isopreno, prenila, pirano, furano e seus derivados clorados. A maior parte das flavonas e flavonóis identificados em plantas está sob forma conjugada, isto é, com um ou mais açúcares ligados aos grupos hidroxila por uma ligação hemiacetal facilmente destruída por hidrólise ácida.

As flavonas (Figura 6, p. 39) são derivadas da 2-fenilcromona e os flavonóis da 3-hidroxi-2-fenilcromona. As flavonas possuindo um grupamento metoxila ou isoprenila ligados ao carbono C-3 são chamadas de 3-metoxi-flavonas ou 3-prenil-flavonas, respectivamente. Alguns tipos de oxigenação, como aqueles das posições dos carbonos 5, 7, 3' e 4' são sempre os mesmos para as duas classes. Isto é devido ao fato de flavonas e flavonóis serem originários da mesma via biossintética (ZUANAZZI; MONTANHA, In: SIMÕES, 2003).

3.4.1.2 Flavanonas

As flavanonas (Figura 6, p. 39) diferem das flavonas por possuírem uma ligação simples entre C-2 e C-3, mas são numeradas da mesma forma. Em

consequência, as flavanonas possuem centro de assimetria em suas moléculas. Contudo, devido ao fato de serem intermediários biogenéticos da maioria dos grupos flavonoídicos, são isolados normalmente em pequenas quantidades. Dessa forma, freqüentemente a estereoquímica é omitida em publicações. As flavanonas possuem dois centros assimétricos possíveis: o núcleo B pode apresentar as configurações 2S ou 2R (BOHM, In: HARBORNE, 1994).

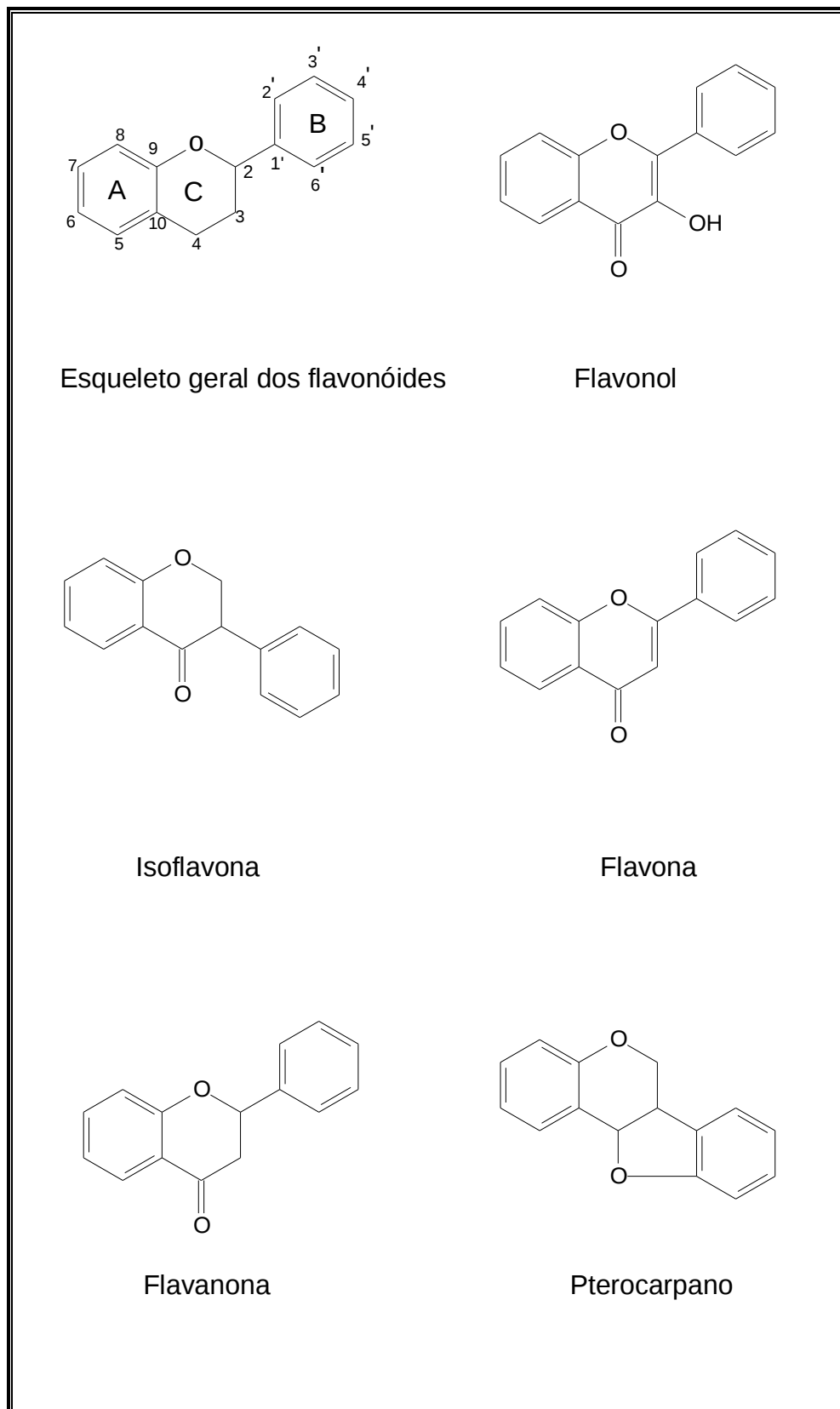
3.4.1.3 Isoflavonas

Os isoflavonoides são caracterizados, como os demais flavonoides, por uma cadeia arila-C3-arila, mas do tipo difenil-1,2-propano (Figura 6, p. 39). Ao contrário das outras classes de flavonoides, sua distribuição taxonômica é restrita. Salvo raríssimas exceções, são de ocorrência exclusiva em Fabaceae. Apesar desta restrição a uma só família botânica, tal classe apresenta uma diversidade estrutural importante (SIMÕES et al., 2007). Isto se deve principalmente por modificações em seu esqueleto cíclico (14 classes). Destacam-se as isoflavonas, que são as mais abundantes. Em vegetais, uma grande parte dos isoflavonoides comporta-se como fitoalexinas (substâncias produzidas pela planta em resposta a uma infecção por um agente patogênico). São conhecidas muitas isoflavonas substituídas com grupamento prenila. A forma mais reduzida pertencente à classe das isoflavonas é a isoflavana (ZUANAZZI; MONTANHA, In: SIMÕES, 2003).

3.4.1.4 Pterocarpanos

Os pterocarpanos são um grupo de substâncias que podem ser descritos como benzo-pirano-furano-benzenos os quais podem ser formados a partir das isoflavonas por acoplamento interno do anel B à posição 4-cetona (Figura 6, p. 39).

Figura 6 - Representação dos núcleos fundamentais de algumas classes de flavonoides



3.4.2 Atividades biológicas dos flavonoides

A grande prevalência de flavonoides e antocianidinas no reino vegetal não é acidental; eles não somente atuam como pigmentos coloridos de flores, mas também como inibidores de enzimas e precursores de substâncias tóxicas, como defesa contra a exposição à radiação ultravioleta, agentes quelantes de metais nocivos para as plantas e como agentes redutores. Em adição, os flavonoides estão envolvidos na transferência de energia, morfogênese e determinação do sexo, níveis de respiração e fotossíntese, ação de hormônios de crescimento e reguladores da planta, expressão de genes e comportamento (SMITH; BANK, 1986). Diversas funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas. Dentre elas, podem-se citar: proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais com finalidade de polinização; antioxidantes; controle da ação de hormônios vegetais; agentes alelopáticos e inibidores de enzimas (HARBORNE, 1989).

Através da cadeia alimentar, animais e humanos ingerem flavonoides, e há muitos dados que apontam para um grande número de atividades destes compostos em humanos. Por exemplo, eles podem ser utilizados como proteção para a integridade vascular (BERETZ; CAZENAVE, 1988), como agentes antiosteoporóticos (EVANS, 1994) e por suas propriedades antihepatotóxicas (SOIKE; PESCHLOW, 1987). Alguns flavonoides foram examinados para a verificação da sua atividade em modelos experimentais de tumores *in vitro* e *in vivo* (BRACKE et al., 1988). Os flavonoides também foram reportados por atuar no trato gastrointestinal como agentes antiúlcera (DI CARLO et al., 1999), anti-secretório e antidiarréico (DI CARLO et al., 1993).

As ações de alguns flavonoides podem estar relacionadas com a sua capacidade de interagir com o óxido nítrico (NO), que é um mediador de vários sistemas biológicos (MONCADA et al., 1991). Outras atividades importantes como agentes antioxidantes e anti-radicais livres (BURDA; OLESZEK, 2001) também são relatadas.

3.4.3 Aspectos biossintéticos dos flavonoides

O esqueleto básico dos flavonoides, dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três carbonos ($C_6-C_3-C_6$), resulta de rotas biossintéticas separadas: a do ácido chiquímico e a do acetato via malonil CoA (Figura 7, p. 44). O anel B e a parte heterocíclica do esqueleto flavônico são originados a partir de um éster do ácido hidroxicinâmico, ordinariamente denominado de 4-cumaril-CoA, ao passo que o núcleo A se origina de três unidades de acetato, via malonil-CoA. Ambos precursores derivam de carboidratos (metabolismo primário). A malonil-CoA é formada do acetil-CoA e CO_2 catalisado pela enzima acetil-CoA carboxilase (ACC). 4-Cumaril-CoA e ésteres dos ácidos hidroxicinâmicos relacionados são supridos pelos primeiros passos da via geral dos fenilpropanóides. Esta via inicia-se a partir do aminoácido aromático fenilalanina, sendo este, por sua vez, sintetizado através da via chiquimato. A chave dessa reação é a desaminação da fenilalanina catalisada pela fenilalanina amônia liase (PAL). Esta enzima liga o metabolismo primário com a via dos fenilpropanóides, sendo que nas plantas está sob o controle de vários fatores internos e externos, tais como: hormônios, níveis de nutrição, luz, infecção por fungos, lesões, entre outros. O produto da reação, trans-cinamato, é hidroxilado ao 4-cumarato pela 4-hidroxilase cinamato, um citocromo P450 monoxigenase de função mista. A ativação do 4-cumarato pela formação do éster CoA é catalisada pela ligase de 4-cumarato-CoA. O 4-cumaril-CoA pode ser hidroxilado na posição 3 para cafeoil-CoA, que pode servir como substrato para a formação de chalconas (GOTTLIEB; BORIN, 1998).

A principal enzima envolvida na formação do esqueleto flavônico é a chalcona sintase (CHS). Esta enzima catalisa a condensação gradual de três unidades de acetato malonil-CoA com 4-cumaril-CoA ao C_{15} intermediário 2',4',6',4'-tetrahidroxichalcona. O composto 6'-deoxichalcona, isoliquiritigenina, é um similar sintetizado a partir do malonil-CoA e do 4-cumaril-CoA via CHS, envolvendo nessa reação uma redutase dependente (NADPH). Os dois tipos de chalcona citados podem ser precursores diretos das auronas e de outros fenilpropanoides. Mas, em particular o 6-hidroxi e 6-deoxichalcona são os precursores imediatos de todos os tipos de flavonoides e isoflavonoides. Contudo, as enzimas envolvidas nesta etapa ainda não são conhecidas. A ligação estereoespecífica da chalcona, catalisada pela enzima chalcona isomerase (CHI), provê a 2S-flavanona com o esqueleto flavonoide

típico. Dois tipos de CHI são conhecidos, uma catalisa a ciclização de 6'-hidroxichalcona a 5-hidroxi-flavanona; a outra CHI conhecida é a enzima chave na isomerização da 6'-hidroxi e 6'-deoxichalcona para a 5-hidroxi e 5-deoxichalcona, respectivamente (HELLER; FORKMANN, 1994).

Flavanonas são precursores diretos da maioria das classes de flavonas e isoflavonas, como também na formação de dois flavonoides intermediários: 4-flavanol e o dehidroflavonol (BOHM, 1994).

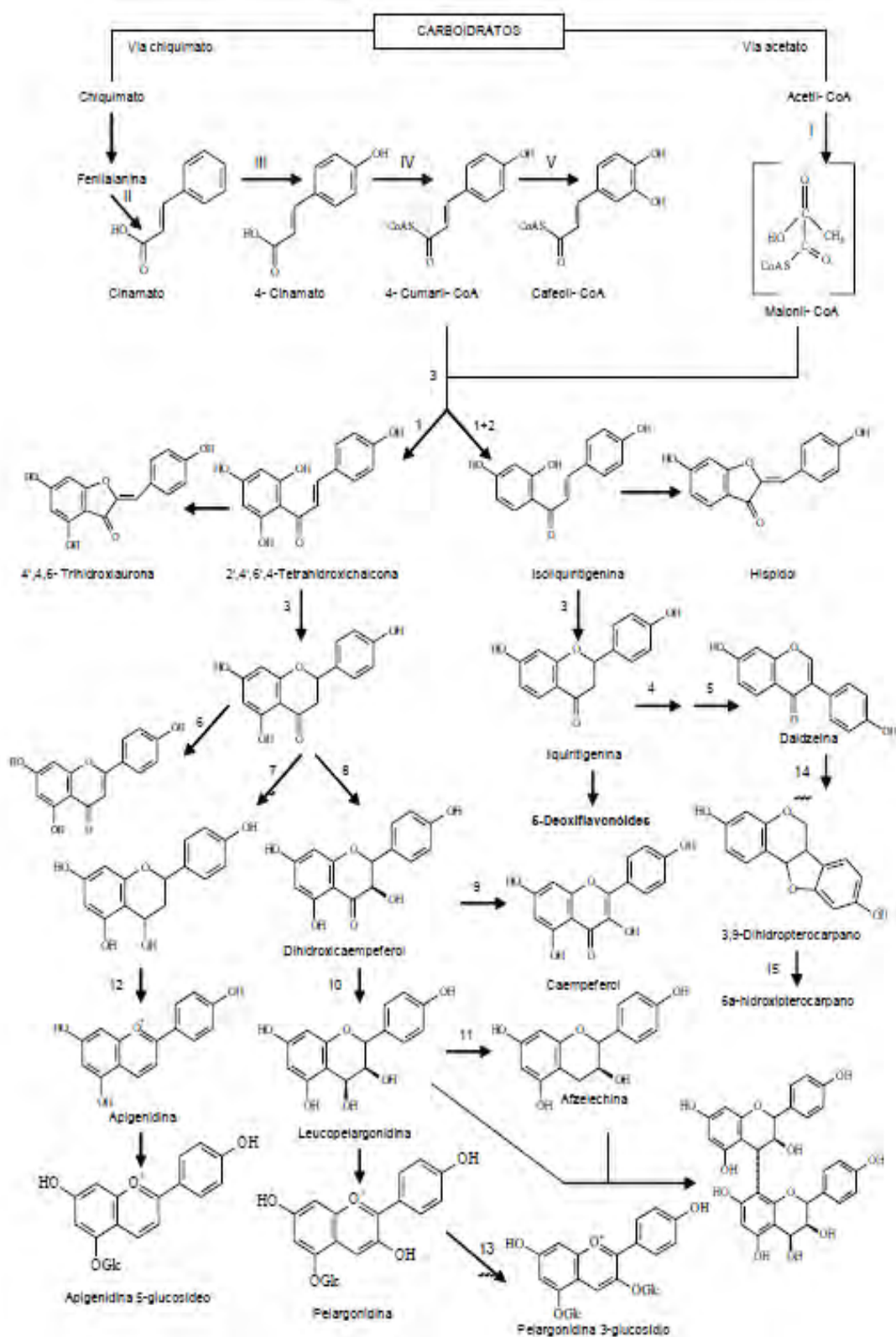
Flavonas são biossintetizadas a partir de flavanonas pela introdução de uma dupla ligação entre C-2 e C-3. Dois tipos de enzimas, a flavona sintase I-2-oxoglutarato dioxigenase dependente (FNS I) e a flavona sintase II (FNS II) são os catalizadores dessa reação. A formação de isoflavonas a partir de flavanonas se dá pela participação da 2-hidroxiisoflavanona sintase (IFS), um citocromo P450 monoxigenase de função mista. Esta enzima aceita tanto 5-hidroxi como 5-deoxiflavanonas como substrato. A reação em questão envolve um rearranjo oxidativo da flavanona, incluindo a troca do anel da posição 2 para a posição 3 (DEWICK, 1994).

Dewick (1994), a partir de experimentos realizados com *Cicer arietinum* (Fabaceae), postulou que a síntese de pterocarpanos procede a partir de isoflavonas, através de um intermediário pterocarpeno. Esse processo é mediado pela enzima pterocarpano sintase (PTS) e envolve a formação de um intermediário pterocarpeno. A transformação de pterocarpanos hidroxilados na posição 6a se dá a partir de ação específica da enzima pterocarpano 6a-hidroxilase (P6aH). As prenilações nesta classe de isoflavonoides são bem freqüentes e ocorrem pela presença de uma enzima específica, a pterocarpano prenil transferase (PTP).

A redução do grupo carbonila das flavonas origina compostos com esqueleto 4-flavanol. Esta reação é catalisada pela flavanona 4-redutase (FNR) e provê os precursores imediatos para a formação de 3-deoxiantocianinas, que, por sua vez, ocorrem em um número restrito de plantas.

Finalmente, as flavanonas podem ser hidroxiladas na posição 3, formando dehidroflavonóis, que são intermediários biossintéticos na formação de flavanóis, catequinas, procianidinas e antocianidinas. Esta reação é catalisada pela 3-flavanona hidroxilase (FHT), uma 2-oxoglutarato dioxigenase dependente.

Dehidroflavonois são substratos diretos para a abundante classe dos flavonóis, como também para a formação de substâncias com esqueleto 3,4-dióis, conhecidos como leucocianidinas. Flavonois são formados a partir de dehidroflavonóis por introdução de uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3, reação esta catalisada pela enzima flavonol sintase (FLS), outra 2-oxoglutarato dioxigenase dependente. A redução de dehidroflavonóis na posição 4, catalisada pela enzima 4-dehidroflavonol redutase (DFR), leva à formação de compostos do tipo *cis*-dióis, que são, por sua vez, intermediários na formação de catequinas, protocianidinas e antocianidinas (HELLER; FORKMANN, 1994).

Figura 7 - Representação da biossíntese dos flavonoides (DEWICK, 1994)

3.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE TERPENÓIDES

Os terpenóides constituem uma classe de metabólitos secundários distribuídos na flora e fauna, marinha e terrestre ocorrendo na forma livre ou em forma de ester, éter e glicosídeo (MAHATO; KUNDU, 1994). São conhecidos pelas suas importantes funções biológicas e fisiológicas e, por isso, muitos são utilizados na área farmacêutica (DEWICK, 2002).

3.5.1 Aspectos Químicos

Esta classe de substâncias constitui uma grande família de metabólitos secundários, compreendendo cerca de 30.000 terpenos, classificados de acordo com o número de unidades de isopreno, que vão se ligando entre si, orientadas em sentido inverso (cabeça-cauda): hemiterpenóides, C₅; monoterpenóides, C₁₀; sesquiterpenóides, C₁₅; diterpenóides, C₂₀; sesterpenos, C₂₅; triterpenóides, C₃₀; e tetraterpenóides C₄₀ (DUBEY et al., 2003). O isopreno (IP) é produzido naturalmente, mas não está envolvido diretamente na formação dos produtos pertencentes a estas classes. As unidades bioquimicamente ativas de isopreno são na realidade o dimetilalil pirofosfato (DMAPP) e o isopentenil pirofosfato (IPP) (NIERO; MALHEIROS, 2007).

3.5.2 Atividades Biológicas de Terpenóides

Os terpenóides apresentam funções variadas nos vegetais e de modo geral possuem diversas atividades farmacológicas (NIERO; MALHEIROS, 2007).

Os monoterpenos são os principais constituintes dos óleos voláteis, importantes comercialmente no fabrico de sabões, detergentes, cosméticos e perfumaria, além de serem atrativos dos polinizadores. Os sesquiterpenos, em geral, apresentam funções protetoras contra fungos e bactérias, enquanto muitos diterpenóides dão origem aos hormônios de crescimento vegetal. Os triterpenóides e seus derivados esteroidais apresentam uma gama de funções como proteção contra herbívoros, alguns são antimitóticos, outros atuam na germinação das sementes e na inibição do crescimento da raiz (NIERO; MALHEIROS, 2007).

3.5.3 Considerações gerais sobre triterpenos

Os triterpenos são metabólitos secundários muito difundidos na natureza, principalmente no Reino Vegetal, especialmente nos látex e resinas como glicosídeos, ésteres ou na forma livre, e são constituídos por múltiplas unidades isoprênicas (C₅). Ocorrem também no Reino Animal como é o caso do esqualeno, obtido do óleo de fígado de tubarão (DEWICK, 2002).

De acordo com os esqueletos básicos são divididos em seis grupos: damarano, gamacerano, lanostano, lupano, oleanano e ursano, onde cada grupo apresenta uma variedade estrutural em decorrência de perda ou adição de grupos metilênicos, abertura de anel ou formação de novos e, principalmente, rearranjos de grupos metílicos do esqueleto padrão (MAHATO; KUNDU, 1994).

Recentemente foram isolados alguns triterpenos com novos esqueletos, porém com uma única via biossintética. Muitos com ciclização incompleta ou com ciclização dentro da cadeia, ou ainda, com duas ciclizações consecutivas sendo que essa ciclização inicia-se desde o final da cadeia (MAHATO; SEM, 1997). Eles apresentam diversas propriedades medicinais, destacando-se os efeitos antiinflamatórios, analgésicos, cardiovasculares e antitumorais (NIERO; MALHEIROS, 2007).

A betulina, é o precursor na biossíntese do ácido betulínico, sendo este o composto biologicamente mais ativo deste grupo. Estes compostos têm apresentado várias atividades biológicas, entre as quais destaca-se a atividade antiinflamatória. Trabalhos recentes também têm demonstrado que os ácidos ursólico e oleanólico exercem inúmeras atividades biológicas, dentre as quais, atividade antiinflamatória, analgésica, antitumoral, anti-HIV e tripanossomicida, além de serem inibidores da acetilcolinesterase, podendo ser utilizados no tratamento do Mal de Alzheimer. Estes são apenas alguns exemplos da importância desta classe de compostos presentes, principalmente, em plantas superiores, muitas delas, encontradas na flora brasileira (NIERO; MALHEIROS, 2007).

3.5.4 Aspectos gerais da biossíntese de triterpenos

Os triterpenos são formados a partir de unidades isoprênicas. Inicialmente ocorre formação da acetoacetil CoA através de condensação do tipo cabeça-cauda,

sendo catalisada pela enzima tiolase. Uma terceira molécula de acetil CoA adiciona-se ao grupo carbonila na posição três da acetoacetil CoA para formar 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA. Este é, então, reduzido a ácido mevalônico, sendo provavelmente precedido pelo intermediário ácido meváldico. Como a reação é praticamente irreversível o ácido mevalônico deve ser o precursor direto para compostos isoprenóides (DEWICK, 2002).

A enzima mevaldate redutase transfere um hidrogênio estereoespecificamente do lado “A” do NADH ou NADPH para o substrato. O ácido mevalônico formado é, então, fosforilado no grupo alcoólico primário para formar o ácido mevalônico monofosfato e em uma segunda etapa da reação o ácido pirofosfato. O isopentenil pirofosfato é obtido de um composto posterior por descarboxilação e eliminação de uma molécula de água. A reação requer a presença de ATP (DEWICK, 2002).

A polimerização do pirofosfato de isopentenila inicia-se com a ionização da ligação CO do pirofosfato de dimetilalila (o qual é formado por isomerização do pirofosfato de isopentenila) resultando em um centro catiônico que sofre adição de uma molécula de pirofosfato de isopentenila gerando pirofosfato de geranila, que na etapa reacional seguinte recebe outra molécula de pirofosfato de isopentenila produzindo o pirofosfato de farnesila (DEWICK, 2002).

O esqualeno é formado através da condensação tipo cabeça-cauda entre moléculas de pirofosfato de farnesila. Trata-se de uma reação estereoespecífica, em que um átomo de hidrogênio do carbono 1 de um dos dois grupos farnesila é recolocado por um átomo de hidrogênio originado do NADPH (LUCKNER, 1969).

A formação dos sistemas de anéis triterpênicos cíclicos a partir do esqualeno inicia-se com a oxidação do composto isoprenóide a esqualeno-2,3-epóxido. O anel epóxido é rompido pela ação de prótons formando o grupo hidroxila no carbono 3 e uma carga positiva no carbono 2. O 3-hidroxi-esqualeno formado cicliza-se espontaneamente. O número e a conformação dos anéis formados dependem das dobras da cadeia do esqualeno (LUCKNER, 1969).

O cátion esteróide sofre um rearranjo Wagner-Meerwein alargando o anel D. Depois, fecha-se um anel adicional seguido de rearranjo Wagner-Meerwein, em que novamente ocorre alargamento construindo o anel E. Esta

estrutura, cátion lupenil, é o material de partida para a síntese dos triterpenos pentacíclicos das séries lupano, friedelano, oleanano e ursano por eliminação de prótons (DEWICK, 2002) (Figura 8, p. 49-52).

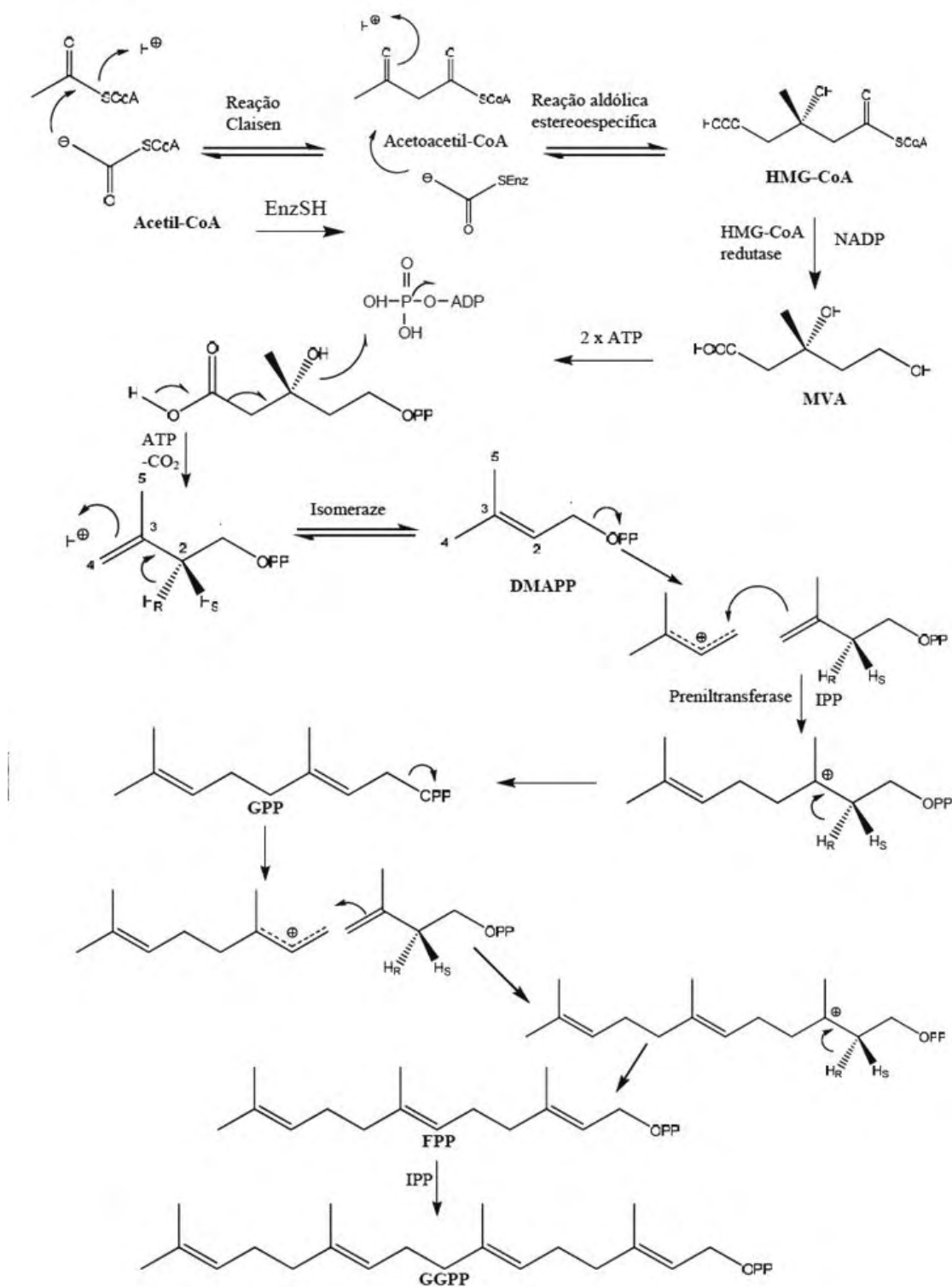
Figura 8 - Representação esquemática da biossíntese de triterpenos

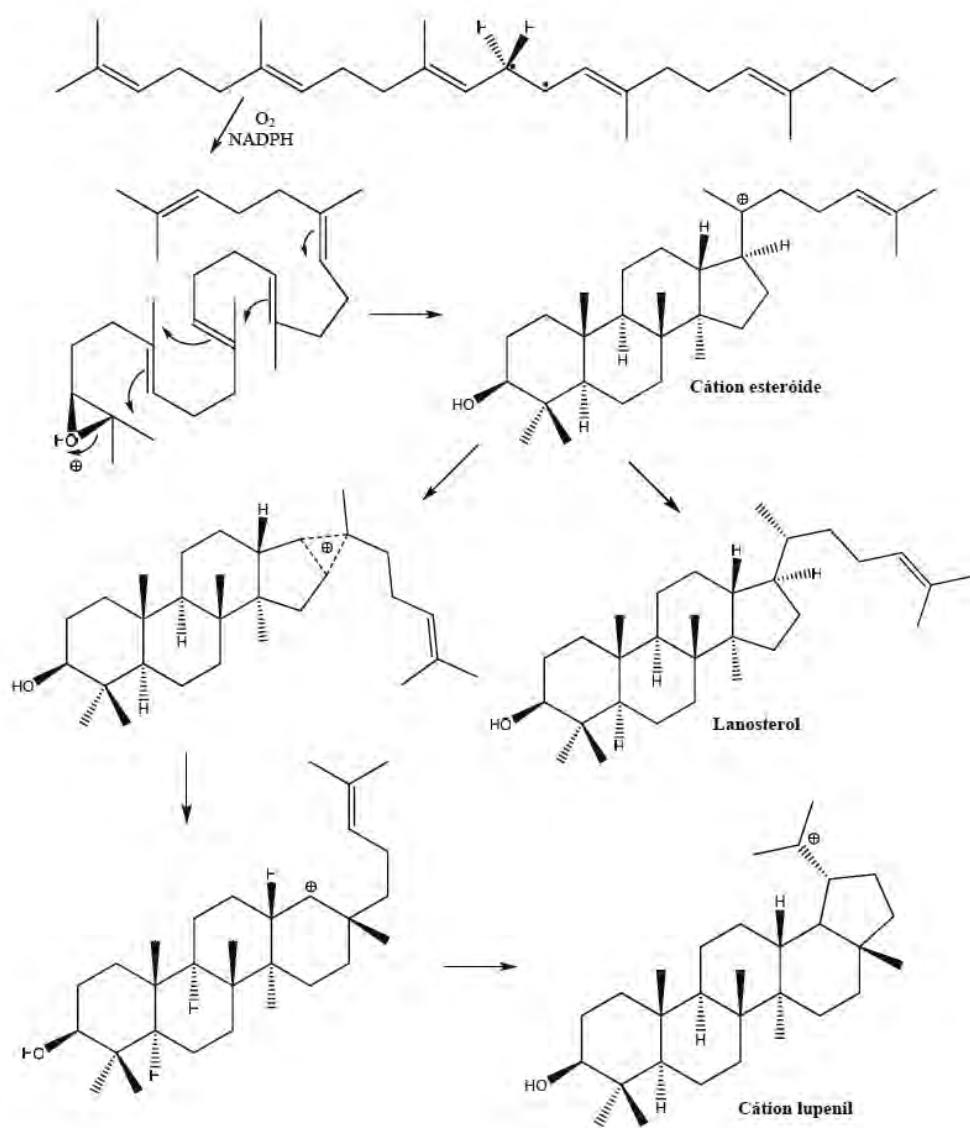
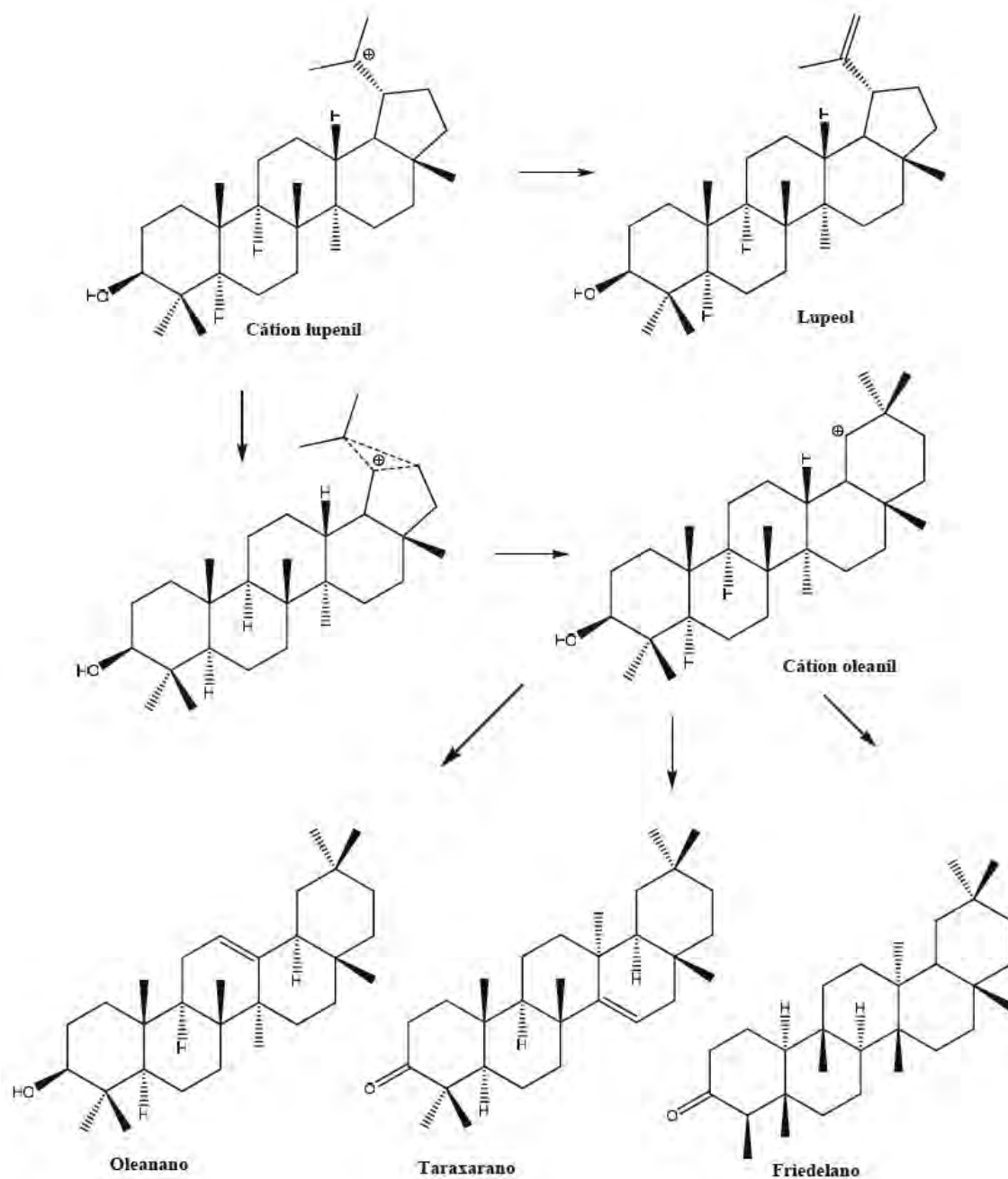
Figura 8 (continuação) - Representação esquemática da biossíntese de triterpenos

Figura 8 (continuação) - Representação esquemática da biossíntese de triterpenos

3.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE LIGNÓIDES

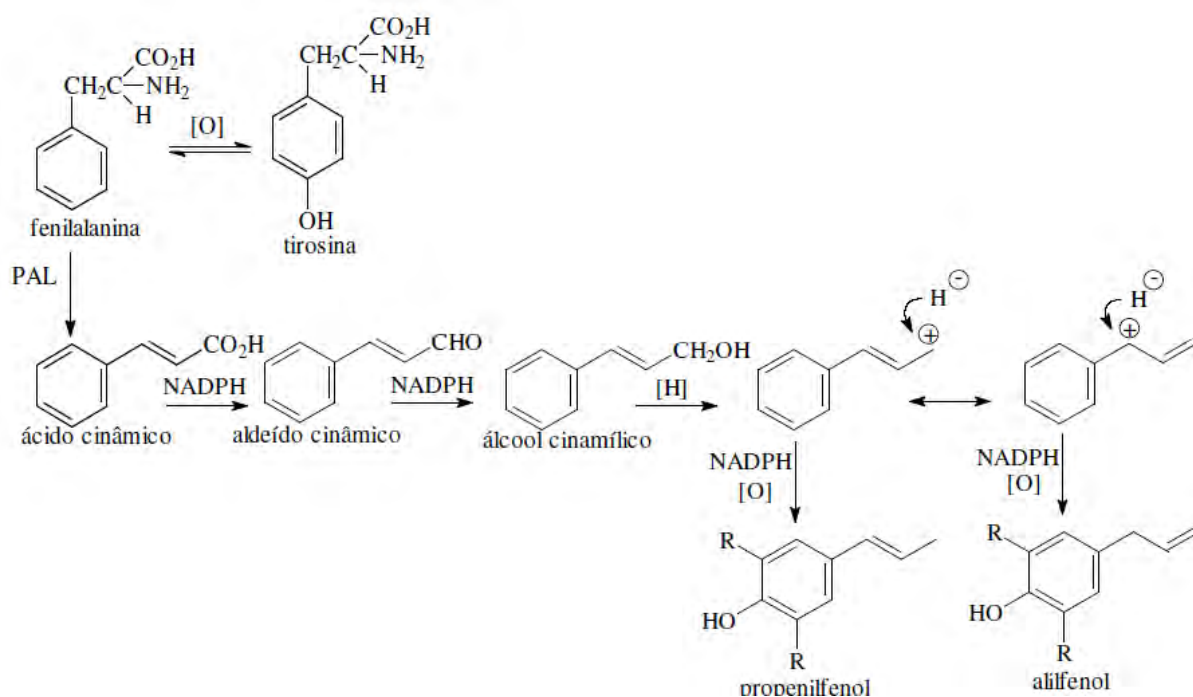
Tradicionalmente, tem-se como os mais importantes grupos de metabólitos secundários vegetais os alcaloides, os terpenoides e os flavonoides, porém nas últimas décadas, percebeu-se que os lignoides também ocupam um lugar de destaque, por estarem amplamente distribuídos no reino vegetal, apresentando importância não só para as plantas que as produzem, servindo como marcadores do processo evolutivo, como para o homem que as extrai ou sintetiza, fato que já levou a aplicações terapêuticas importantes (GOTTLIEB & YOSHIDA, 1984).

Esta classe compreende um grupo com uma grande variação estrutural, que resulta em uma grande diversidade de classes encontradas na natureza como lignanas, neolignanas, alolignanas, norlignanas, oligolignoides e heterolignoides. Destas, as lignanas e neolignanas são as classes mais numerosas.

Os lignoides são micromoléculas cujo esqueleto é formado exclusivamente, ou adicionalmente a outros grupos, pelo grupo fenilpropânico $(C_6.C_3)_n$, sendo n restrito a poucas unidades, mais comumente de 1 a 3.

A ocorrência desta classe química na natureza se limita a plantas vasculares que possuem o tecido enriquecido por ligninas, que são macromoléculas dotadas de um esqueleto em $(C_6.C_3)_n$, onde n abrange um alto número de unidades, entre 2 a 5000, que se depositam nas paredes das células vegetais, com função de promover significativa rigidez ao caule (GOTTLIEB & YOSHIDA, 1984).

A biossíntese dos lignoides envolve os metabólitos primários finais da via metabólica do chiquimato. O caminho biossintético dos arilpropanoides, precursores primários dos lignoides, desenvolve-se a partir da fenilalanina ou da tirosina, pela via redutora, que envolve a formação de ácidos cinâmicos, aldeídos cinâmicos e álcoois cinâmílicos. Se o álcool for convertido a pirofosfato, o éter resultante será altamente susceptível ao ataque nucleofílico, fato conhecido em muitas reduções biológicas. A ação enzimática de NADPH conduziria aos alil e propenil fenóis. Portanto, quatro monômeros estão envolvidos no acoplamento oxidativo do processo biogenético dos lignoides: ácido cinâmico, álcool cinâmílico, propenilfenóis e alilfenóis (Figura 9, p; 54).

Figura 9 - Rota biossintética dos fenilpropanoides (DEWICK, 2002; SIMÕES et. al., 2004)

PAL: enzima fenilalanina amônia liase; NADPH: redução; [H]: redução; [O]: oxidação

As lignanas são dímeros formados através do acoplamento oxidativo de alcoóis cinamílicos entre si ou destes com ácidos cinâmicos, apresentando o carbono gama (C-9) oxigenado, enquanto que as neolignanas são dímeros oxidativos de alilfenóis e de propenilfenóis, entre si ou cruzados e não apresentam o carbono gama (C-9) oxigenado.

Assim o acoplamento oxidativo entre esses radicais (propenila, alila, cinamoila e cinamila) seguidos da adição de um ou dois íons hidretos, adição de íon hidreto mais hidroxila inter ou intramolecular e ciclização e aromatização, produzem a vários tipos de neolignanas e lignanas. Aspectos configuracionais desempenham um papel de grande importância na química e bioquímica dos lignóides. Com algumas exceções, possuem dois, três, cinco e até mais centros assimétricos. Os grupos arila dos precursores são comumente substituídos por grupos hidroxila, metoxila e metilenodioxi, por exemplo, guaiacila (3-OCH₃, 4-OH), veratrila (3,4-OCH₃), piperonila (3,4-O₂CH₂), metóxipiperonila (3-OCH₃, 4,5-O₂CH₂), siringila (3,5-OCH₃) e trimetóxfenila (3,4,5-OCH₃) (SIMÕES et al., 2007).

As lignanas são classificadas em seis subgrupos com base em estruturas gerais (Figura 10, p.56) a dibenzilbutano e dibenzilbutanodiol (formadas por duas unidades C_6-C_3 ligadas $\beta-\beta'$); dibenzilbutirolactônicas (com duas unidades C_6-C_3 ligadas $\beta-\beta'$ adicionadas de uma ponte lactônica $\gamma-\gamma'$); tetrahidrofuranicas substituídas (duas unidades C_6-C_3 ligadas $\beta-\beta'$ e uma ponte de oxigênio); 2,6-diaril-3,7-dioxabicyclo [3.3.0] octanos, também conhecidas como tetrahidrofurofuranicas, (duas unidades C_6-C_3 ligadas $\beta-\beta'$ e duas pontes de oxigênio); derivados arilnaftalenos (duas unidades C_6-C_3 ligadas $\beta-\beta'$ e um $C_2C\alpha$ ligado que deriva uma tetralina ou um naftaleno); e derivados dibenzociclooctadienos (duas unidades C_6-C_3 ligadas $\beta-\beta'$ e um $C_2C\alpha$ ligado que forma uma bifenil) (RIOS, et al., 2002). Os esqueletos podem ser visualizados na Figura 10 (p. 56).

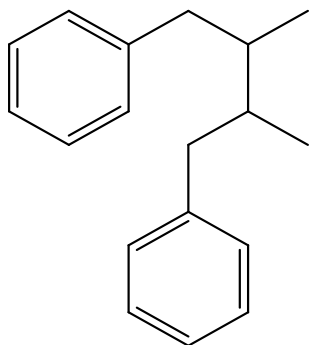
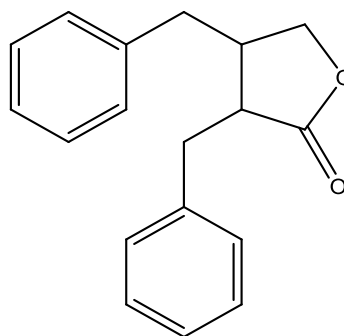
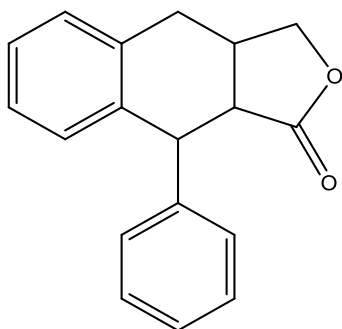
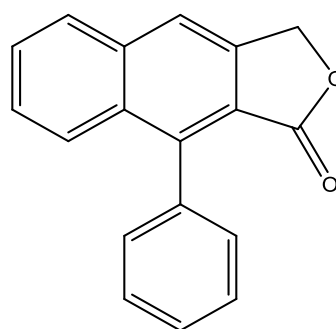
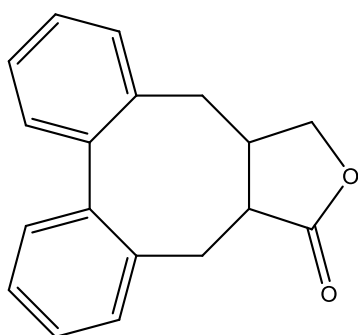
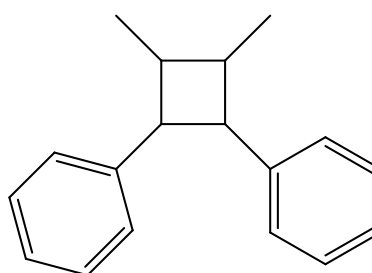
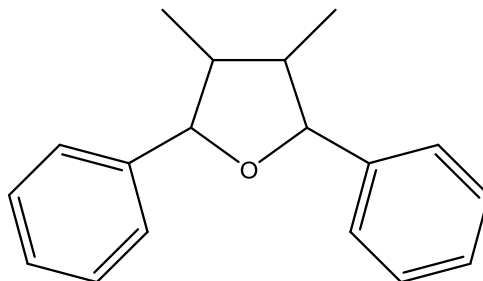
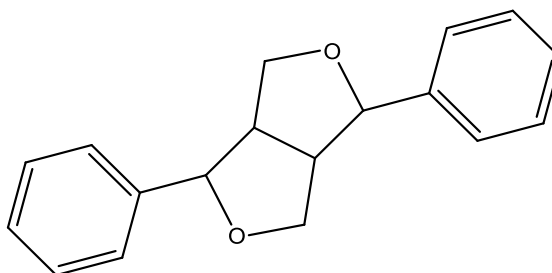
Figura 10 - Esqueleto geral das principais lignanas**Dibenzilbutano****Dibenzilbutirolactônica****Ariltetrahidronaftaleno****Arilnaftaleno****Dibenzociclooctadieno****Ciclobutanica**

Figura 10 (continuação) - Esqueleto geral das principais lignanas**Tetrahidrofurânico****Furofurânico**

(RIOS et al., 2002)

As lignanas de cada subgrupo podem variar substancialmente nos níveis de oxidação de ambos os anéis aromáticos e nas cadeias laterais propil. Além disso, essas lignanas podem ainda ser classificadas em três categorias, dependendo do estado de oxidação das posições (C9) e C9': lignans com oxigênio em 9(9'); lignanas sem oxigênio em 9 (9'); e lignanas ácido dicarboxílico (SUZUKI & UMEZAWA, 2007) (Figura 11, p. 59).

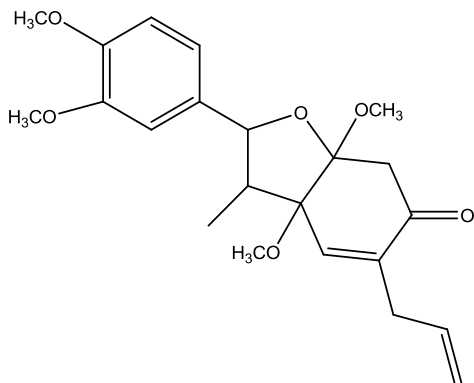
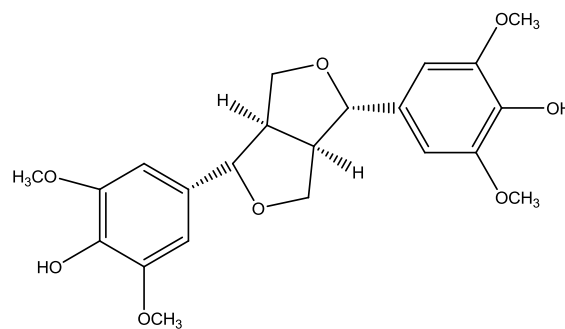
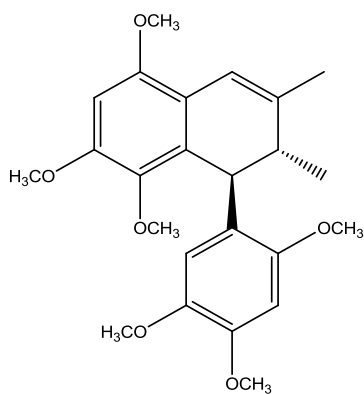
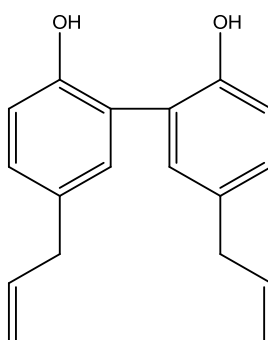
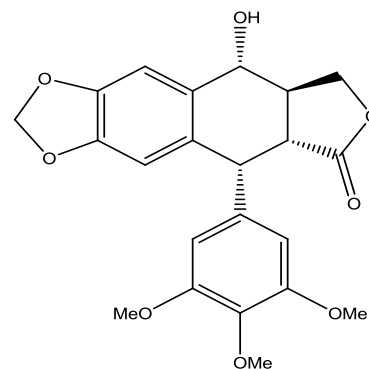
A maioria das lignanas possuem oxigênio em C9 (C9'). Lignanas com e sem C9 (C9') são formadas a partir dos monômeros dos fenilpropanóides correspondentes com e sem oxigênio no C9, respectivamente. Assim, a sua biossíntese diverge das vias biossintéticas do monômeros fenilpropanóides, enquanto a diversidade da substituições aromáticas é, provavelmente, introduzida após dimerização dos fenilpropanóides, ou seja, na conversão de lignanas (SUZUKI & UMEZAWA, 2007) (Figura 11, p. 59).

Das três categorias de lignanas, as com oxigênio (9'), lignanas sem oxigênio (9') e lignanas ácido dicarboxílico (Figura 11, p. 59)., o estudo da biossíntese de lignanas com oxigênio (9') é o mais avançado. Este tipo é formado pela dimerização enantiosseletiva duas unidades de álcool coniferil com o auxílio de proteínas Dirigentes para dar origem a pinoresinol (Furofuranica). A pinoresinol é então reduzida por pinoresinol/lariciresinol redutase, via lariciresinol (furano), para secoisolariciresinol (dibenzilbutanica), que por sua vez é oxidada para matairesinol (dibenzilbutirolactonica) por secoisolariciresinol desidrogenase (SUZUKI & UMEZAWA, 2007) (Figura 11, p. 59).

A conversão do álcool coniferil para matairesinol tem sido demonstrada em diversas espécies de plantas, o que sugere fortemente que esta é a lignana geral da via biossintética. Muitas outras subclasses de lignanas são formadas a partir dessas citadas (Figura 11, p. 59).

Baseado em estudos fitoquímicos, foi mostrado que os lignoides são indicadores do processo evolutivo em angiospermas e desempenham um papel na adaptação ecológica. Evidências mostram que esse grupo de substâncias esteja envolvido em interações de plantas com fungos, insetos ou com outras plantas, e também em aplicações farmacológicas (GOTTLIEB & YOSHIDA, 1984).

Algumas lignanas também possuem atividade biológica comprovada, como siringaresinol, com atividade antifúngica, que foi isolada de *Michelia champaca* (Magnoliaceae), além da podofilotoxina, que possui atividade antimitótica e antineoplásica, isolada de *Podophyllum hexandrum* (Berberidaceae) (MONTEIRO et al., 2007; SIMÕES et al, 2004). As estruturas das lignanas citadas com atividade biológica podem ser visualizadas na Figura 12 (p. 61).

Figura 12 -Lignanas com atividade biológica na planta e no homem**pipereno****siringarenisol****magnoshinina****magnolol****podofilotoxina**

3.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.6.1 Ensaios biológicos frente *Artemia salina* Leach

Os laboratórios de produtos naturais têm inserido dentro de suas rotinas ensaios biológicos simples, no intuito de selecionar e monitorar a pesquisa de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas. Dentre esses bioensaios, encontra-se o ensaio de toxicidade frente *Artemia salina* Leach, que é um microcrustáceo de água salgada comumente usado como alimento para peixes. A simplicidade com que pode ser manuseado, a rapidez dos ensaios e o baixo custo favorece a sua utilização rotineira em diversos estudos, além do que, tais ensaios de letalidade são muito utilizados em análises preliminares de toxicidade geral (LUNA et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2008).

A literatura relata que existe uma correlação entre a toxicidade geral frente *A. salina* e atividades como antifúngica, viruscida e antimicrobiana, parasiticida (SAHPAZ et al., 1994), tripanossomicida (ZANI et al., 1995), entre outras. Há, também, correlação com a citotoxicidade em linhagens celulares tumorais humanas (MacLAUGHLIN, 1991).

Atualmente, um dos debates éticos em ampla evidência está relacionado ao uso de animais em experimentos laboratoriais. Adicionalmente, além da questão ética, existe um fator financeiro envolvido nos estudos de toxicidade *in vivo*. Uma das soluções para essa problemática sugere a realização de ensaios de toxicidade *in vitro*, fortemente recomendados para a realização da fase preliminar de testes, com o intuito de predizer o potencial tóxico de uma substância, utilizando-se, posteriormente, um menor número de animais experimentais (FRESHNEY, 1994; MELO; DURÁN; HAUN, 2001).

Material e Métodos

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 ESTUDO FITOQUÍMICO

4.1.1 Coleta e identificação do material vegetal

O material vegetal (partes aéreas) de *Hypernia salzmännii* (Benth.) Harley foi coletado no Estado da Paraíba, em 17 de junho de 2009 e a exsiccata desta espécie encontra-se catalogada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza – UFPB, sob registro AGRA et al. 7048 sendo identificado pela botânica Prof^a Dra. Maria de Fátima Agra do Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPB.

4.1.2 Métodos de análise

4.1.2.1 Métodos cromatográficos

Foi utilizado na cromatografia em coluna (CC) Sephadex LH-20[®] da AMERSHAM BIOSCIENCES, sílica gel 60 (7734 MERCK - 0,063 – 0,200 mm) e colunas de vidro cilíndricas cujas dimensões variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada. Para cromatografia em camada delgada (CCD), foi usada sílica gel 60 PF254 ART 7749 da MERCK, distribuída sobre placas de vidro utilizando um espalhador mecânico tipo “quickfit”, seguindo técnica descrita por MATOS (1997). As cromatoplasmas obtidas foram secas ao ar livre e ativadas em estufa a 110 °C durante duas horas.

As revelações das substâncias nas CCD analíticas foram executadas pela exposição das placas à lâmpada de irradiação ultravioleta com dois comprimentos de onda (254 e 366 nm) por meio de aparelho MINERALIGHT, modelo UVGL-58. Também foi utilizado como revelador câmara saturada com vapores de iodo. O grau de pureza preliminar das substâncias foi evidenciado por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), determinando-o quando observada uma única mancha após revelação, em pelo menos três sistemas de eluição diferentes.

4.1.2.2 Métodos espectrométricos

4.1.2.2.1 Infravermelho

Os dados espectrais na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro marca BOMEM, modelo MB 100 do Centro de Biotecnologia/UFPB, utilizando-se de 1,0 a 3,0 mg de amostra em pastilhas de KBr, com frequência medida em cm^{-1} .

4.1.2.2.2 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN de ^1H) e Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN de ^{13}C) uni e bidimensionais foram obtidos em espectrômetro da marca MERCURY-VARIAN (LMCA/UFPB) operando a 200 MHz (^1H) e 50 MHz (^{13}C) e VARIAN- NMR-SYSTEM (LMCA/UFPB) operando a 500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C). As amostras para análise foram preparadas solubilizando-as em solvente deuterado da Cambridge Isotope Laboratories (CDCl_3 , CD_3OD e $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e foram referenciados para RMN de ^1H pelos picos característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas destes solventes: clorofórmio (δ_{H} 7,24), metanol (δ_{H} 3,30) e piridina (δ_{H} 7,55). Para os espectros de RMN de ^{13}C , estes mesmos parâmetros foram utilizados: clorofórmio (δ_{C} 77,0), metanol (δ_{C} 49,00) e piridina (δ_{C} 135,5).

As multiplicidades no espectro de RMN ^1H foram indicadas segundo as convenções: *s* (singleto), *sl* (singleto largo), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *dl* (duplete largo), *t* (triplete), *q* (quadruplete), *m* (multiplete).

4.1.2.2.3 Espectrometria de Massas

Foram utilizadas concentrações de 1ng/ μL das amostras para obtenção dos espectros utilizando o espectrômetro de Massas (Bruker, *Ion Trap* Amazon) acoplado a Cromatógrafo Líquido (Shimadzu Séria 20AD (SPD-M20A; controladora: CBM-20; Bomba: LC-20AD (2); Degasificador: DGU-14A).

4.1.2.3 Pontos de fusão

Os pontos de fusão das amostras foram determinados em aparelho digital para ponto de fusão, marca Microquímica, modelo MQAPF-302, com bloco de platina em microscópio óptico tipo “Kofler”, marca REICHERT, modelo R3279, com temperatura que varia de 0-350 °C. Os valores obtidos foram comparados aos da literatura.

4.1.2.4. *Artemia salina* Leach

Os cistos de *Artemia salina* foram armazenados sob resfriamento à 5°C até a execução do experimento. Foram utilizadas larvas de *Artemia salina* L., microcrustáceo da classe Anostraceae, na forma de náuplio, utilizando-se a Concentração Letal Média (CL₅₀) como parâmetro de avaliação da atividade biológica (LOPES et al., 2002). Os testes foram realizados no Laboratório de Ensaios Toxicológicos (LABETOX) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.1.3 Processamento das partes aéreas de *Hypenia salzmannii*

As partes aéreas de *Hypenia salzmannii* foram secas em estufa com ar circulante à temperatura média de 45 °C durante 72 horas. Após a secagem, o material vegetal foi submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico tipo Harley, obtendo-se 3,488 Kg do pó seco.

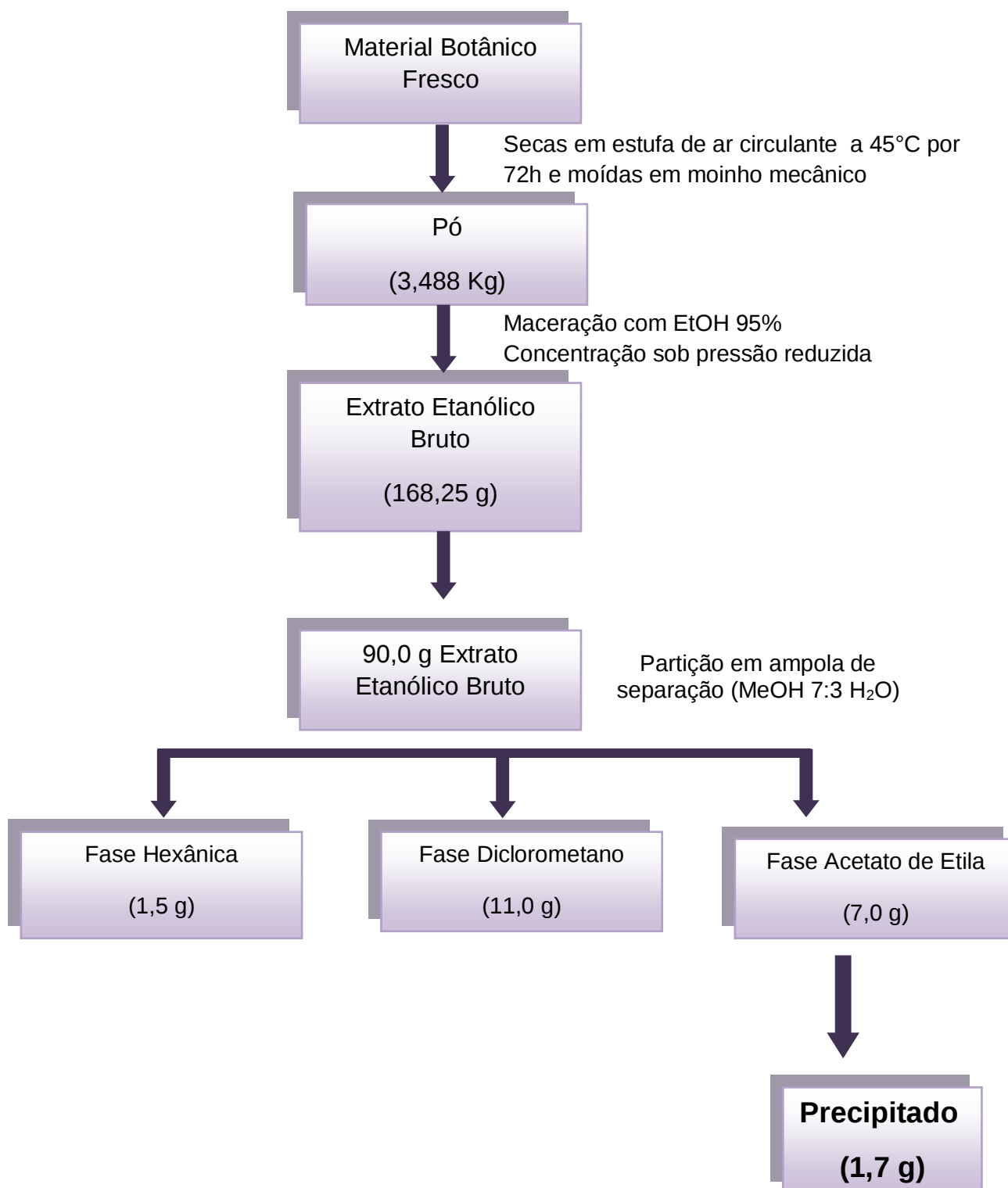
4.1.3.1 Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) das partes aéreas de *Hypenia salzmannii*

O material vegetal seco e pulverizado foi submetido à maceração exaustiva com etanol (EtOH) a 95 %. Foram feitos quatro processos de extração em um intervalo de 72 horas entre eles, para garantir uma máxima extração dos constituintes químicos. A solução etanólica obtida foi filtrada, fazendo-se, em seguida, a evaporação do solvente com o auxílio de um rotaevaporador sob pressão reduzida a uma temperatura média de 40 °C. Após esse processo de evaporação do solvente, obteve-se o extrato etanólico bruto (EEB), que apresentou 168,25 g (4,82 % em relação ao peso seco da planta).

4.1.3.2 Fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB) das partes aéreas de *Hypernia salzmannii*

Uma parte do extrato etanólico bruto (90 g) foi suspenso em uma solução de Metanol/Água (7:3 v/v) e homogeneizado sob agitação mecânica durante aproximadamente 60 minutos. Desse processo resultou um resíduo, que foi reservado, e uma solução hidroalcoólica que foi submetida a uma partição líquido/líquido, em uma ampola de separação, sob agitação manual utilizando consecutivamente solventes de polaridades crescentes, obtendo-se as fases: hexânica, diclorometano e acetato de etila. As soluções obtidas no processo de partição foram tratadas com Na₂SO₄ anidro, para que fosse retirado o excesso de água, e submetidas à filtração sob pressão reduzida. Após esse processo, os solventes foram evaporados em rotaevaporador a uma temperatura média de 40 °C, obtendo-se: 1,5 g de fase hexânica, 11,0 g da fase diclorometano e 7,0 g da fase acetato de etila. Desta última, obteve-se um precipitado (1,70 g) que foi reservado (Esquema 1, p. 68).

Esquema 1 - Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Hypernia salzmännii*.



4.1.4 Bioensaio do EEB e fases de *Hypernia* frente *Artemia salina* Leach

A toxicidade dos extratos de *Hypernia salzmannii* foi avaliada utilizando-se o teste de letalidade com *Artemia salina* (MEYER et al., 1982; NASCIMENTO; ARAÚJO, 1999). Os cistos de *A. salina* foram armazenados sob resfriamento a 4 °C até a execução do experimento. Foram utilizadas larvas de *Artemia salina* L., microcrustáceo da classe Anostraca, na forma de náuplio, utilizando-se a Concentração Letal Média (CL₅₀) como parâmetro de avaliação da atividade biológica.

Em um recipiente retangular de vidro com uma divisória contendo furos de aproximadamente 0,02 cm de espessura e distribuídos uniformemente, foi adicionada água salina artificial (pH 8,5 e 29 °C) preparada pela solubilização de 38 g de sal marinho (Marinex®) em 1 litro de água destilada. O recipiente permaneceu sob iluminação através de uma lâmpada incandescente. Cistos de *Artemia salina* foram incubados durante 24 horas (22 – 29 °C) em um dos lados do recipiente. A parte do sistema contendo os cistos foi coberta com papel alumínio, para que as larvas, após a eclosão dos cistos, fossem atraídas pela luz do outro lado do sistema, forçando-as a atravessar a divisória, e assim sendo coletadas com auxílio de uma pipeta de *Pasteur* (Figura 13).

Figura 13 - Aspecto geral do experimento com *Artemia salina*. (A) Recipiente retangular com divisória contendo furos; (B) Parte coberta do sistema contendo os cistos; (C) Exposição à luz



(Fotos: JOÃO CARLOS PITA, 2010)

Os extratos e fases foram solubilizados (Tabela 1, p. 70) para a obtenção de uma solução mãe de 10 mg/mL. A partir desta efetuou-se diluições para

concentrações de intervalo 10 - 1000 µg/mL. Colocou-se em microtubos as diferentes diluições da solução mãe adicionando em seguida 10 náuplios. Cada concentração foi testada em triplicata e repetida em três experimentos. Um grupo controle foi preparado contendo apenas veículo de ressuspensão e as larvas. Deixou-se o conjunto em incubação sob luz artificial por 24 h realizando em seguida a contagem do número de larvas vivas e mortas, para posterior determinação da CL₅₀ (concentração que produz 50% de letalidade) (LOPES, 2002).

Tabela 1- Solubilização das substâncias

Substâncias	Solventes
Extrato	Tween + DMSO + H ₂ O salina artificial
Fase Hexânica	Tween + DMSO + H ₂ O salina artificial
Fase Dicolometano	DMSO + H ₂ O salina artificial
Fase Acetato de etila	DMSO + H ₂ O salina artificial

4.1.4.1 Resultados Parciais

O ensaio de letalidade com o microcrustáceo *A. salina* foi utilizado para avaliar a toxicidade do extrato etanólico bruto e fases de *Hypenia salzmännii* (Benth.) Harley utilizando a CL₅₀ como parâmetro de avaliação da atividade biológica.

De acordo com o método utilizado a fase acetato de etila do extrato de *H. salzmännii* não apresentou atividade frente a este bioensaio apresentando uma CL₅₀ acima de 1000 µg/mL, indicando uma baixa toxicidade (Tabela 2, p. 71).

A fase hexânica, diclorometano (Gráfico 3, p. 72) bem como o extrato etanólico bruto de *H. salzmännii* (Gráfico 1, p. 71), apresentaram uma boa atividade frente a este estudo, sendo o último o mais bioativo, provavelmente devido à variedade de constituintes químicos biologicamente ativos (Tabela 2, p.71). Nos resultados expostos nos gráficos, observamos uma diminuição da porcentagem de viabilidade de larvas com o aumento da concentração.

Este resultado fornece um direcionamento para o estudo desse extrato e de suas frações, na busca de moléculas biologicamente ativas.

Tabela 2 - Valores de CL₅₀ obtidos através do bioensaio com *A. salina* para o extrato etanólico bruto e fases de *Hypernia salzmännii*

Substâncias	CL ₅₀ (µg/mL) (limite de confiança)
Extrato EtOH	146,5 µg/mL
Fase hexânica	799,9 µg/mL
Fase diclorometano	266,2 µg/mL
Fase acetato de etila	> 1000 µg/mL

Gráfico 1 - Viabilidade das larvas do microcrustáceo *Artemia salina* após tratamento com o extrato etanólico bruto das folhas de *Hypernia salzmännii* (Benth.) Harley (µg/mL). Cada ponto representa média ± erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95%

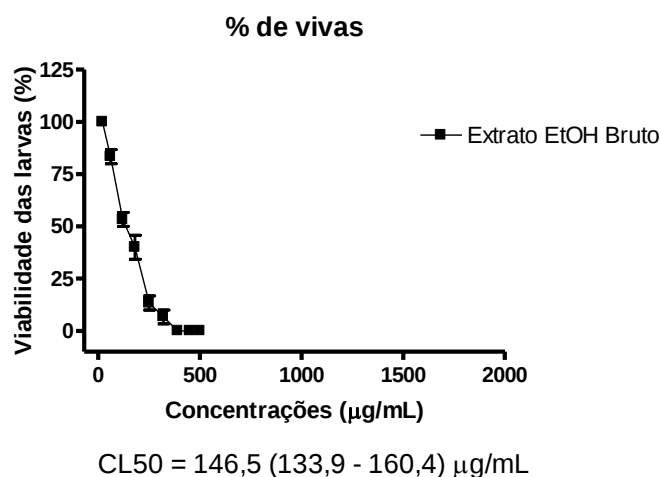
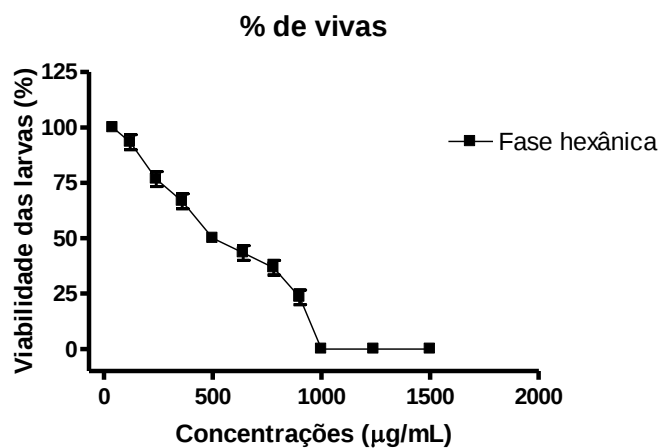
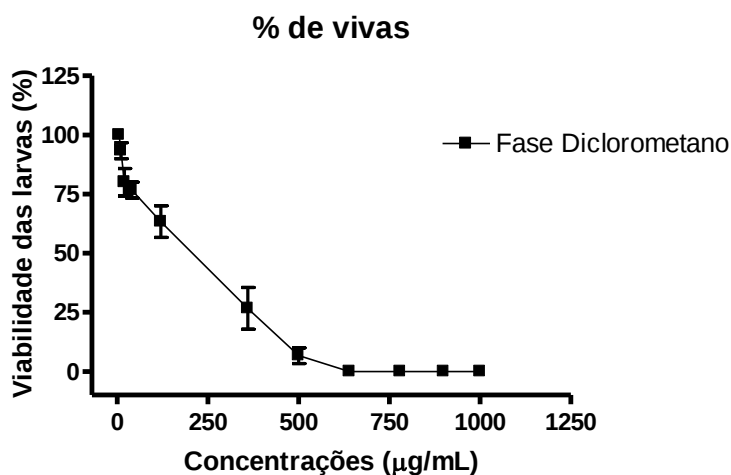


Gráfico 2 - Viabilidade das larvas do microcrustáceo *Artemia salina* após tratamento com a fase hexânica de *Hypenia salzmännii* (Benth.) Harley ($\mu\text{g/mL}$). Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95%



CL50 = 799,9 (505,5 - 1266) $\mu\text{g/mL}$

Gráfico 3 - Viabilidade das larvas do microcrustáceo *Artemia salina* após tratamento com a fase diclorometano de *Hypenia salzmännii* (Benth.) Harley ($\mu\text{g/mL}$). Cada ponto representa média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95%



CL50 = 266,2 (157,8 - 449,0) $\mu\text{g/mL}$

4.1.5 Fracionamento cromatográfico da fase diclorometano das partes aéreas de *Hypernia salzmännii*

4.1.6.1 Fracionamento cromatográfico em Coluna Cromatográfica de Sílica-Gel

A fase diclorometano (10,0 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica (CC), utilizando-se como fase estacionária sílica gel 60 (7734 MERCK - 0,063 – 0,200 mm), e como eluentes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, obedecendo um grau crescente de polaridade. Foram coletadas 50 frações de 125 mL, que foram concentradas individualmente em rotaevaporador (Tabela 3, p. 74; Esquema 2, p. 75).

As frações foram analisadas através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), utilizando diferentes sistemas de eluição e reunidas, quando semelhantes e de acordo com seus fatores de retenção (R_fs), após visualização na luz ultravioleta, em 8 grupos (Esquema 2, p. 75).

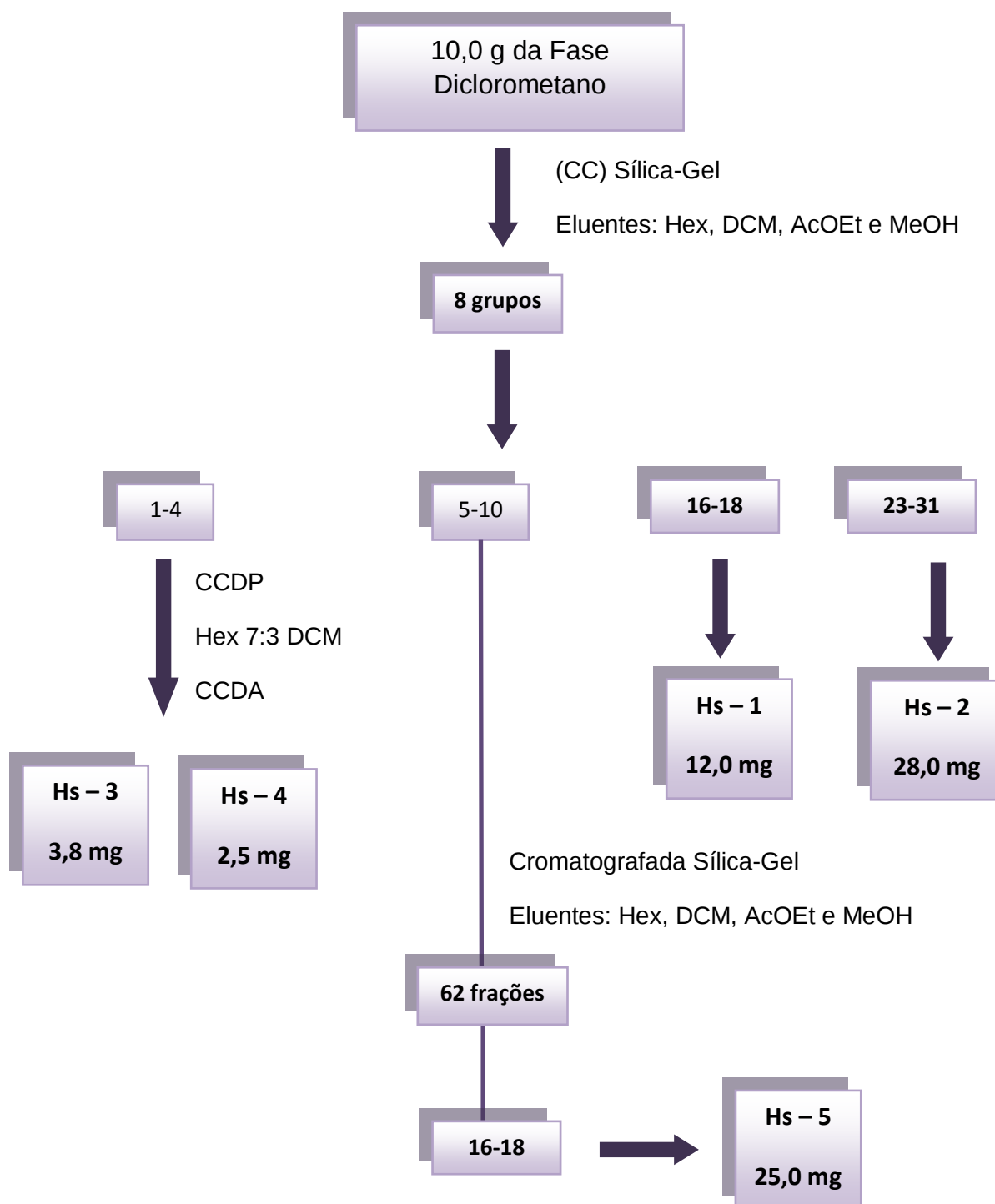
O grupo de frações 16-18 e 23-31 apresentaram grau de pureza considerável na CCDA e foram codificadas, respectivamente, como **Hs-1** (12,0 mg) e **Hs-2** (28,0 mg).

A fração 1-4 (11,0 mg) foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizando hexano e acetato de etila (7:3) como eluentes, obtendo-se 3 subfrações. As frações 1-4.1 e 1-4.2 apresentaram-se na forma de óleo amarelo e após análise em CCDA foram codificadas como **Hs-3** (3,8 mg) e **Hs-4** (2,5 mg).

A fração 5-10 (595,0 mg) foi cromatografada em coluna de sílica-gel, utilizando como eluentes hexano e acetato de etila, puros ou em misturas binárias, em grau crescente de polaridade. Foram obtidas 62 frações e após análise em CCDA, a fração 29 foi codificada como **Hs-5** (25,0 mg).

Tabela 3 - Sistemas de eluição utilizados no fracionamento cromatográfico da fase diclorometano do extrato etanólico bruto de *Hypernia salzmännii* (Benth.) Harley

Sistema de Eluição	Frações Coletadas
Hex/ DCM 50%	1
Hex/ DCM 60%	2
Hex/ DCM 70%	3
Hex/ DCM 90%	4
DCM 100%	5 – 6
DCM / AcOEt 10%	7
DCM / AcOEt 20%	8
DCM / AcOEt 25%	9
DCM / AcOEt 30%	10
DCM / AcOEt 40%	11
DCM / AcOEt 50%	12
DCM / AcOEt 60%	13
DCM / AcOEt 70%	14
DCM / AcOEt 80%	15
DCM / AcOEt 90%	16 – 18
AcOEt 100%	19 – 20
AcOEt/ MeOH 5%	21
AcOEt/ MeOH 10%	22
AcOEt/ MeOH 20%	23 – 31
AcOEt/ MeOH 25%	32 – 35
AcOEt/ MeOH 30%	36 – 37
AcOEt/ MeOH 35%	38 – 42
AcOEt/ MeOH 40%	43 – 45
AcOEt/ MeOH 50%	46
AcOEt/ MeOH 70%	47
MeOH 100%	48 – 50

Esquema 2 - Fracionamento da fase acetato de etila do extrato etanólico bruto das folhas de *Hypernia salzmännii*

4.1.6 Fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila das folhas de *Hypernia salzmännii*

4.1.6.1 Fracionamento cromatográfico em Coluna Cromatográfica de Sephadex LH-20®

O precipitado obtido da fase acetato de etila (1,7 g) foi submetido a uma coluna cromatográfica (CC), utilizando Sephadex LH-20® como gel filtrante e como fase móvel metanol. Neste processo obteve-se um total de 7 frações que foram coletadas em vidros de 15 mL e posteriormente monitoradas em cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) sendo analisadas e reunidas de acordo com os seus fatores de retenção (R_fs), após visualização na luz ultravioleta e revelação em câmara saturada de vapores de iodo. A fração 4 apresentou-se como uma única mancha na CCDA e foi codificada como **Hs-6** (10,0 mg).

4.1.6.2 Fracionamento cromatográfico sob Coluna de Média Pressão

Uma alíquota da fase acetato de etila (5,0 g) foi submetida ao mesmo fracionamento cromatográfico descrito anteriormente, que resultou em 26 frações (Esquema 3, p. 77).

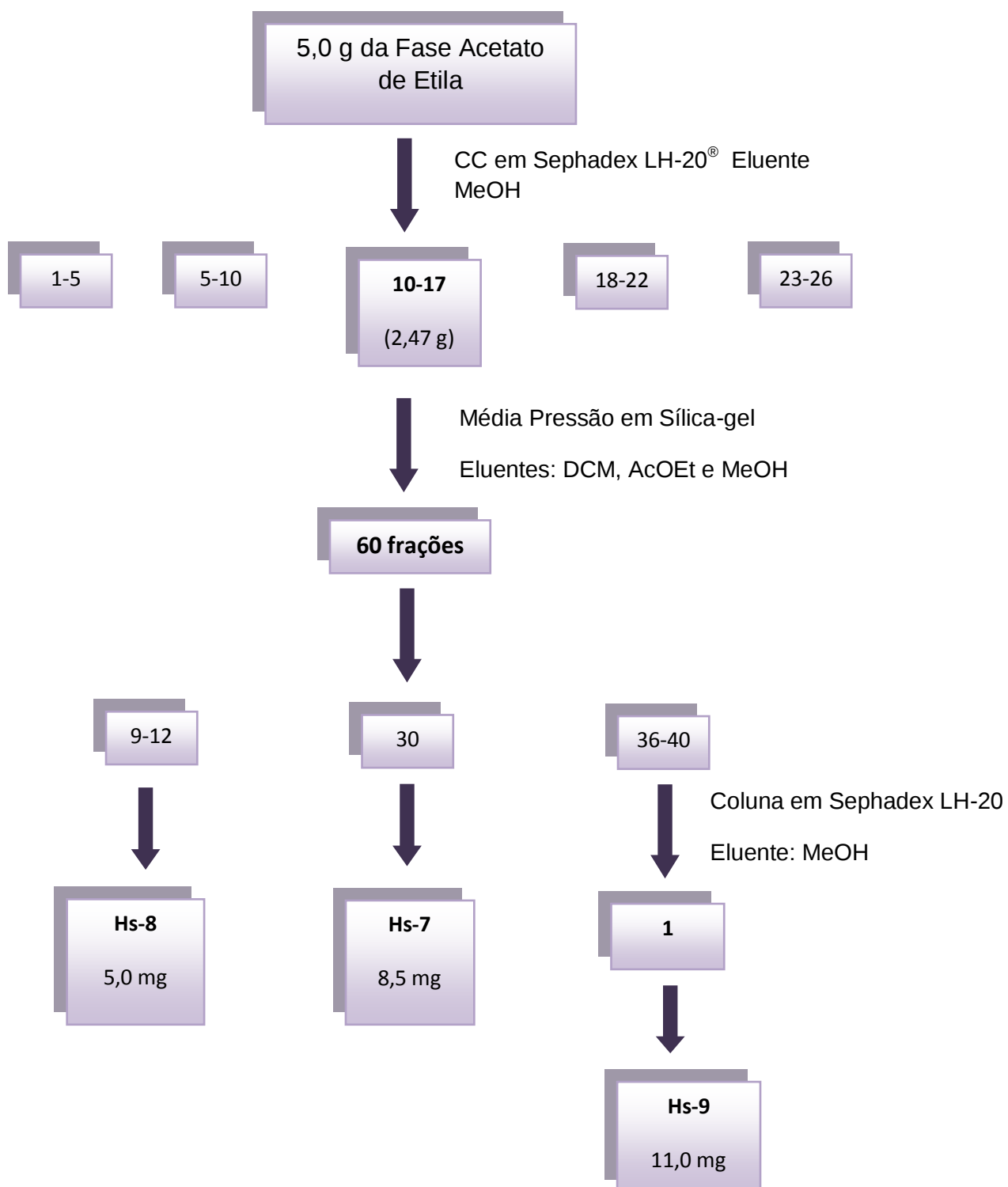
A frações 10 a 17 (2,47 g) foram reunidas e submetidas à cromatografia em coluna de média pressão, utilizando-se como fase estacionária a sílica-gel e como fase móvel diclorometano, acetato de etila e metanol, em sistema gradiente e isocrático, distribuídos em 4 ciclos (Tabela 4):

Tabela 4 - Método utilizado na cromatografia sob média pressão

	Método	Tempo
1º Ciclo	Gradiente (de 100% DCM a 100% de AcOEt)	3 h
2º Ciclo	Isocrático (100% AcOEt)	30 min
3º Ciclo	Gradiente (de 100% de AcOEt a AcOEt 1:1 MeOH)	3 h
4º Ciclo	Isocrático (AcOEt 1:1 MeOH)	30 min

Ao final dos 4 ciclos, obteve-se 480 tubos de ensaio de 20 mL cada, que foram concentrados de acordo com o perfil de UV mostrado pelo equipamento, que resultou num total de 60 frações. Estas foram monitoradas por CCDA, e reunidas de acordo com os seus R_fs (Esquema 3).

Esquema 3 - Fracionamento da fase acetato de etila do extrato etanólico bruto das folhas de *Hypernia salzmännii*.

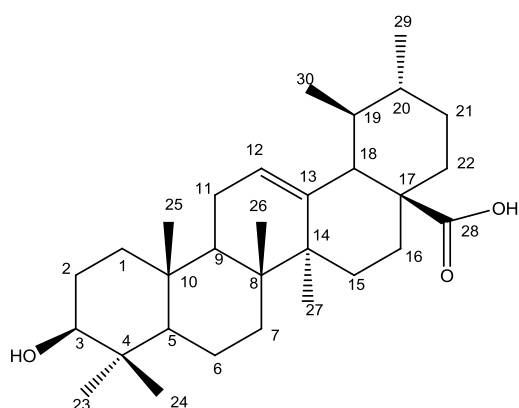


A reunião das frações 9 a 12 e a fração 30 apresentaram-se com satisfatório grau de pureza em CCDA e foram codificadas, respectivamente, como **Hs-8** (5,0 mg) e **Hs-7** (8,5 mg). O grupo de frações 36-40 foi submetido a uma cromatografia em coluna com Sephadex LH-20 e como eluente metanol, e forneceu 4 frações. Estas foram monitoradas em CCDA e a fração 1, ao apresentar aparente grau de pureza, foi codificada como **Hs-9** (11,0 mg).

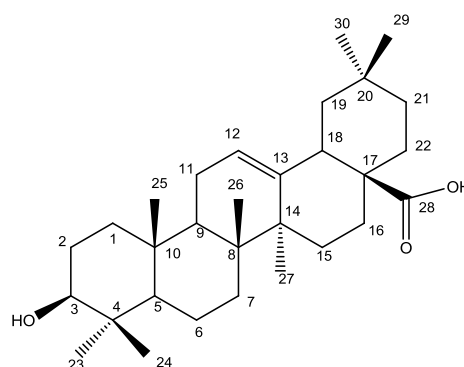
Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

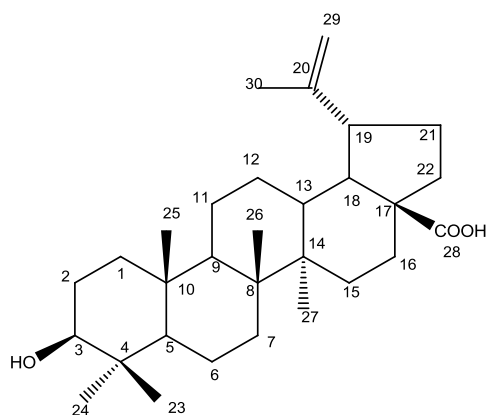
O estudo fitoquímico das partes aéreas de *Hypernia salzmännii* (Benth.) Harley resultou no isolamento de três terpenoides: ácido ursólico, ácido oleanólico e ácido betulínico; um esteróide: β -sitosterol-glicosilado; duas flavanonas: isosakuranetina e sakuranetina; duas lignanas: a hinoquinina e a β -peltatina-A-metileter um flavonóide glicosilado: hiperina; dois derivados fenólicos: ácido rosmarínico e rosmarinato de metila; e uma lignana inétida, a (-)-secoisolaricirenisol-9-O- β -D-glicopiranosídeo-(6-p-cumaroil). Na caracterização dessas substâncias foram utilizadas técnicas espectroscópicas de Infravermelho e RMN de ^1H e ^{13}C , uni e bidimensionais, espectrometria de massas e comparação com dados da literatura.



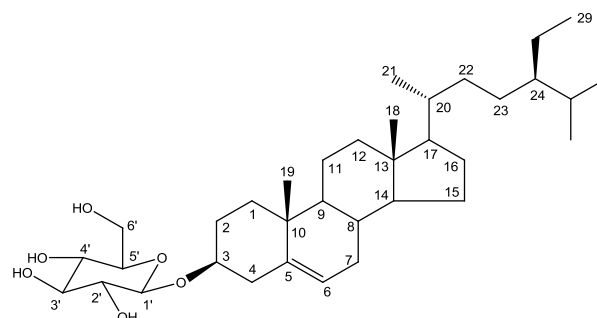
ácido ursólico
(Hs-1a)



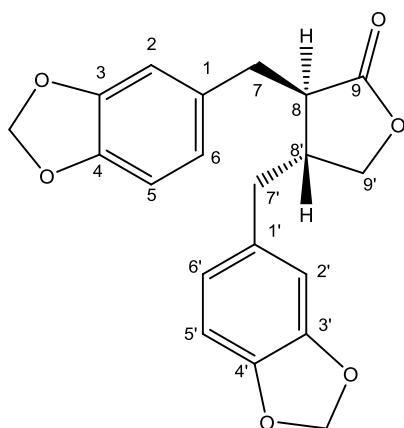
ácido oleanólico
(Hs-1b)



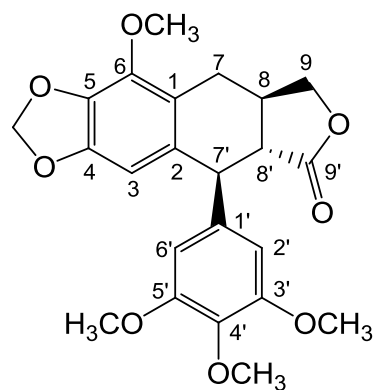
ácido betulínico
(Hs-1c)



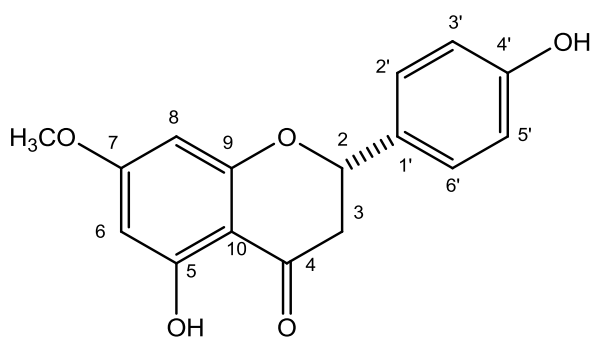
β -sitosterol glicosilado
(Hs-2)



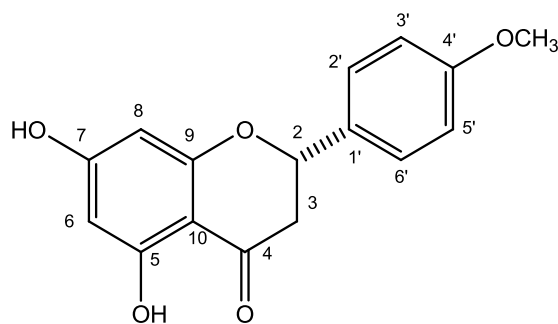
hinoquinina
(Hs-3)



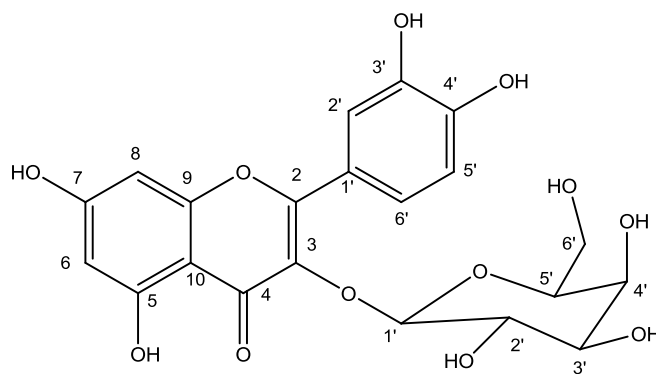
β -peltatina-A-metileter
(Hs-4)



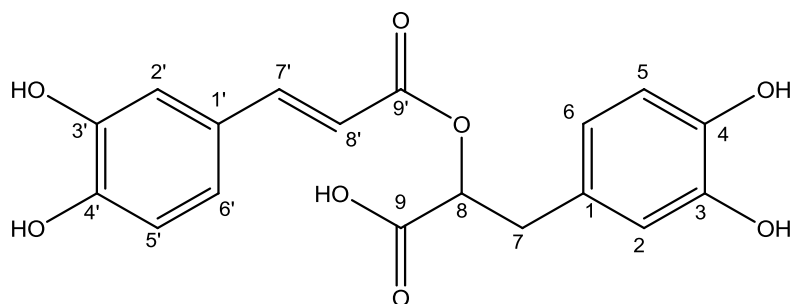
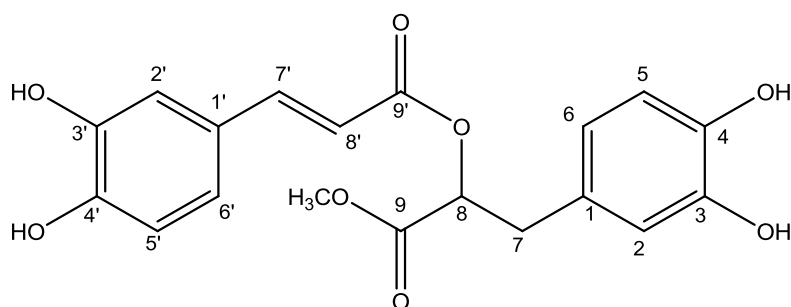
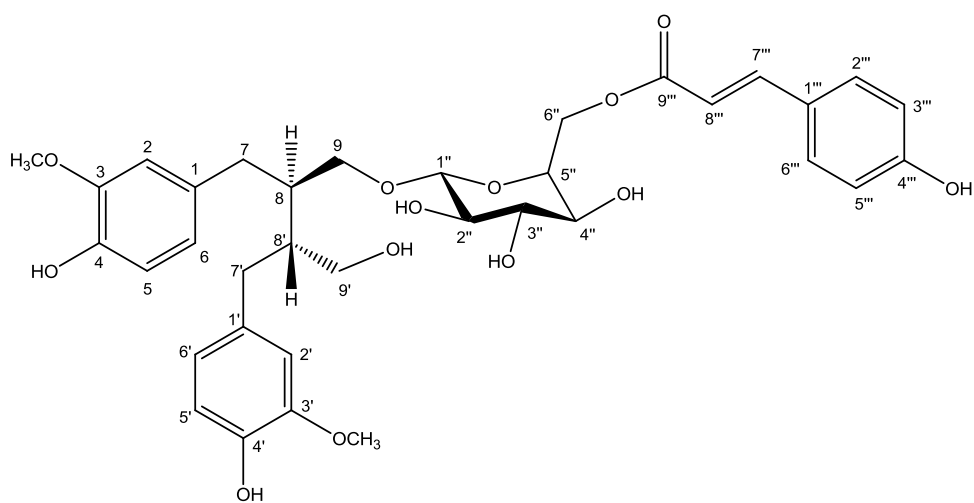
sakuranetina
(Hs-5a)



isosakuranetina
(Hs-5b)



hiperina
(Hs-6)

**ácido rosmarínico****(Hs-7)****rosmarinato de metila****(Hs-8)****(-)-secoisolaricrenisol-9-O-β-D-glicopiranosídeo-(6''-p-cumaroil)****(Hs-9)**

5.1 Determinação estrutural de Hs-1

A fração codificada como Hs-1 foi isolada na forma de um sólido branco.

O espectro no infravermelho obtido em pastilhas de KBr (Figura 14, p. 86) forneceu uma banda larga de absorção de grande intensidade em $3446,79\text{ cm}^{-1}$ característico de estiramento de hidroxila. A banda em $\sim 1100\text{ cm}^{-1}$ foi referente a estiramento C – O de álcool. A absorção em $2927,94\text{ cm}^{-1}$ foi atribuída a C-H sp^3 e a banda em $1458,18\text{ cm}^{-1}$ foi característica de grupo metileno. Ainda, observou-se absorção em $1689,64\text{ cm}^{-1}$, sugestiva de C=O de ácido ou cetona.

O espectro de RMN ^{13}C – APT (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) apresentou 72 sinais (Figura 15, p. 86) sendo a maioria encontrada entre δ_{C} 15,5 e 80,0 e atribuídos a carbonos metínicos, metilênicos, e metílicos. O perfil apresentado nesse espectro sugeriu tratar-se de uma mistura de substâncias de natureza terpênica e/ou esteroidal.

Os sinais em δ_{C} 180,1, 179,8 e 179,1, característicos de grupo carbonila, sugeriram uma mistura de três triterpenos ácidos. A fim de identificar a natureza triterpênica da mistura, foi realizada comparação com dados da literatura (FALCÃO, et al., 2003; MARINHO-JORGE, 2005) para os deslocamentos químicos dos carbonos C-12, C-13, C-18, C-19, C-20 e C-29 que são indicativos da classe dos triterpenos. Os sinais em δ_{C} 125,63 (C-12), δ_{C} 139,23 (C-13), δ_{C} 53,54 (C-18), δ_{C} 39,09 (C-19), δ_{C} 38,9 (C-20) e δ_{C} 16,5 (C-29) foram semelhantes aos deslocamentos da literatura (Figura 17, p. 87) (FALCÃO, et al., 2003) para triterpenos da classe ursano; sinais em δ_{C} 122,5 (C-12), δ_{C} 144,8 (C-13), δ_{C} 42,0 (C-18), δ_{C} 46,4 (C-19), δ_{C} 30,9 (C-20) e δ_{C} 33,2 (C-29) corroboraram com dados da literatura (FALCÃO, et al., 2003) para triterpenos da classe oleanano; já os sinais em δ_{C} 24,8 (C-12), δ_{C} 39,4 (C-13), δ_{C} 48,0 (C-18), δ_{C} 48,1 (C-19), δ_{C} 153,7 (C-20) e δ_{C} 105,04 (C-29) foram característicos de deslocamento químico para triterpenos da classe lupano, quando comparados com a literatura (FALCÃO, et al., 2003).

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Figura 19, p. 88) da mistura de triterpenos e sua expansão apresentaram sinais característicos de três triterpenos.

Um multipeto em δ_H 5,46 foi atribuído aos hidrogênios olefínicos ligados ao carbono C-12 dos ácidos oleanólico e ursólico. Os sinais em δ_H 4,74 e 4,79 (Figura 20, p. 89), foram atribuídos aos hidrogênios do carbono C-29 do ácido betulínico. O duplo dupeto em δ_H 3,25 ($J = 4,0; 14,0$ Hz) foi atribuído aos hidrogênios carbinólicos do carbono C-3 dos três triterpenos sugeridos da mistura. Um dupeto em δ_H 2,62 ($J = 11,5$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio do carbono C-18 do ácido oleanólico. Os multipletos em δ_H 2,28 e em δ_H 1,80 foram atribuídos aos hidrogênios do carbono C-18 do ácido betulínico e do ácido ursólico, respectivamente. Foi observado ainda um envelope de metilas na região entre δ_H 0,87 – 1,22 (Figura 21, p. 89) característicos das metilas dos três triterpenos sugeridos.

Após análise dos dados de RMN de ^{13}C e 1H e comparação com literatura (Tabela 5, p. 85) (FALCÃO, et al., 2003), foi possível identificar três triterpenos na fração Hs-1: ácido ursólico, ácido oleanólico e ácido betulínico, isolados pela primeira vez na espécie. Essas substâncias são marcadores químicos em Lamiaceae, corroborando com a quimiotaxonomia da família (LEMES et al., 2011).

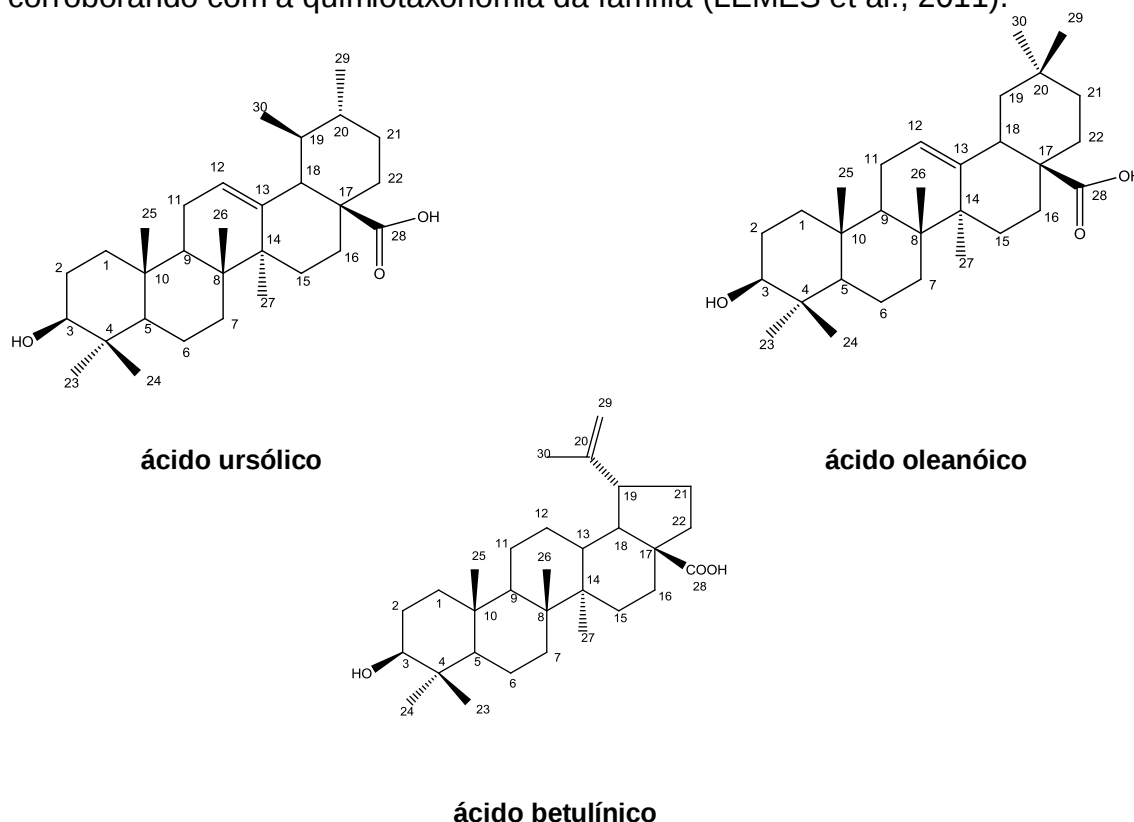


Tabela 5 - Deslocamentos químicos e tipos de sinal para Hs-1, verificados nos espectros de ^{13}C (125 MHz, respectivamente) unidimensionais em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ e comparação com os dados de RMN de ^{13}C da literatura (FALCÃO et al., 2003) (δ em ppm).

	Ácido Ursólico	Ácido Oleanólico	Ácido Betulínico	Hs-1
C	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
1	38,8	38,5	38,5	38,9
2	27,3	27,4	27,2	28,0
3	78,8	78,7	78,1	78,1; 78,0
4	38,8	38,7	38,6	39,0
5	55,4	55,2	54,9	55,8; 53,5
6	18,4	18,3	18,0	18,7
7	33,0	32,6	34,0	32,7; 33,1; 34,2
8	39,6	39,3	40,3	39,9; 39,7; 39,3
9	47,5	47,6	49,9	48,0; 48,2
10	37,0	37,0	37,6	37,4; 37,3; 37,2
11	23,3	23,1	20,5	23,6; 23,8
12	125,5	122,1	25,1	125,6; 122,5; 24,8
13	138,0	143,4	38,3	144,8; 139,2; 39,4
14	42,0	41,6	49,1	42,1; 42,4; 48,2
15	28,2	27,7	30,1	28,6; 28,3; 30,9
16	24,3	23,4	31,7	23,6; 23,8; 31,0
17	48,1	46,6	55,4	46,4; 48,0; 55,8
18	52,8	41,3	46,6	46,6; 42,0; 53,5
19	39,1	45,8	48,5	46,4; 48,1; 39,3
20	38,8	30,6	150,2	153,7; 30,6;
21	30,7	33,8	29,1	30,9; 33,5; 29,9
22	36,7	32,3	36,7	32,7; 37,2
23	28,2	28,1	28,0	28,7
24	15,5	15,6	15,7	15,6; 15,5
25	15,7	15,3	15,8	15,6; 15,5
26	16,9	16,8	15,9	16,5; 16,4
27	23,6	26,0	14,3	26,1; 23,8; 15,5
28	180,0	181,0	180,7	180,1; 179,8; 179,1
29	16,9	33,1	109,5	105,0; 17,4; 33,2
30	21,2	23,6	19,0	23,7; 21,3

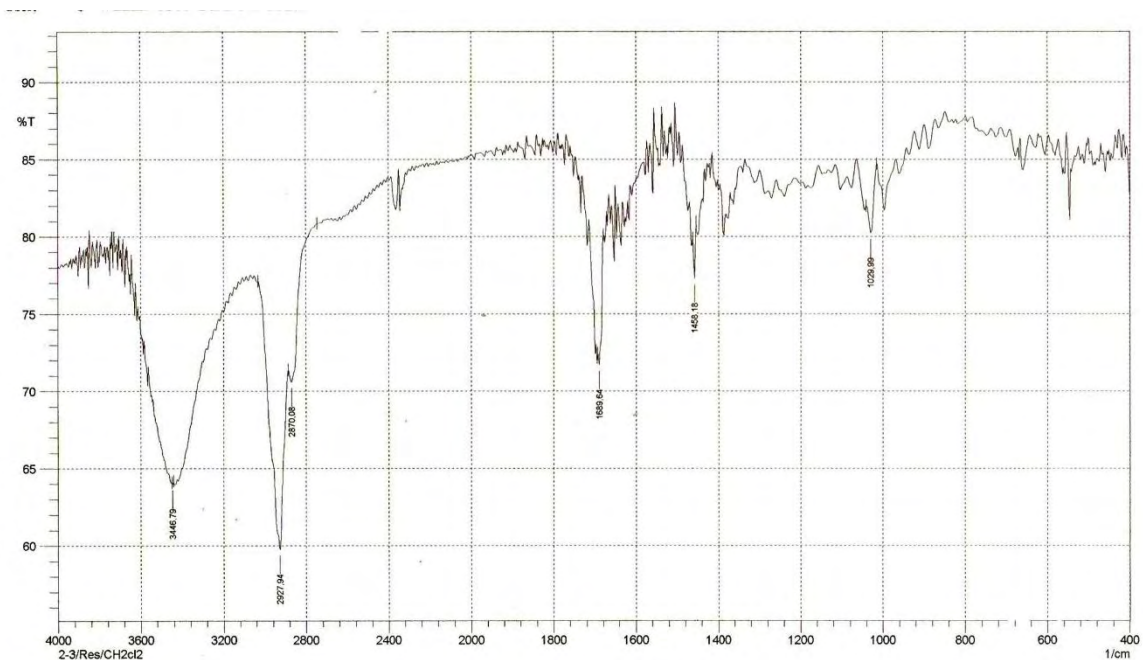
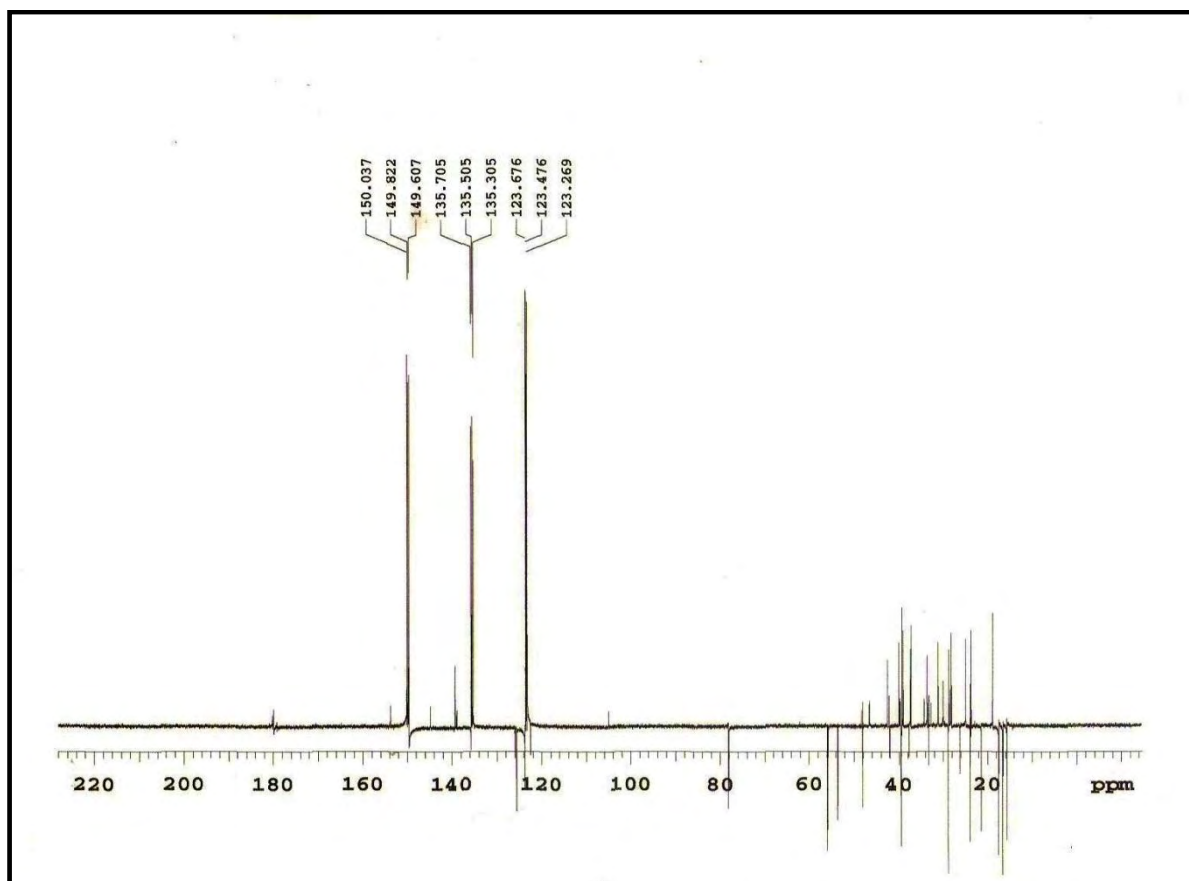
Figura 14 - Espectro na região do Infravermelho de Hs-1 (Pastilhas de KBr)**Figura 15** - Espectro de RMN de ^{13}C - APT de Hs-1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)

Figura 16 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C - APT de Hs-1 na região de 180,0 a 110 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)

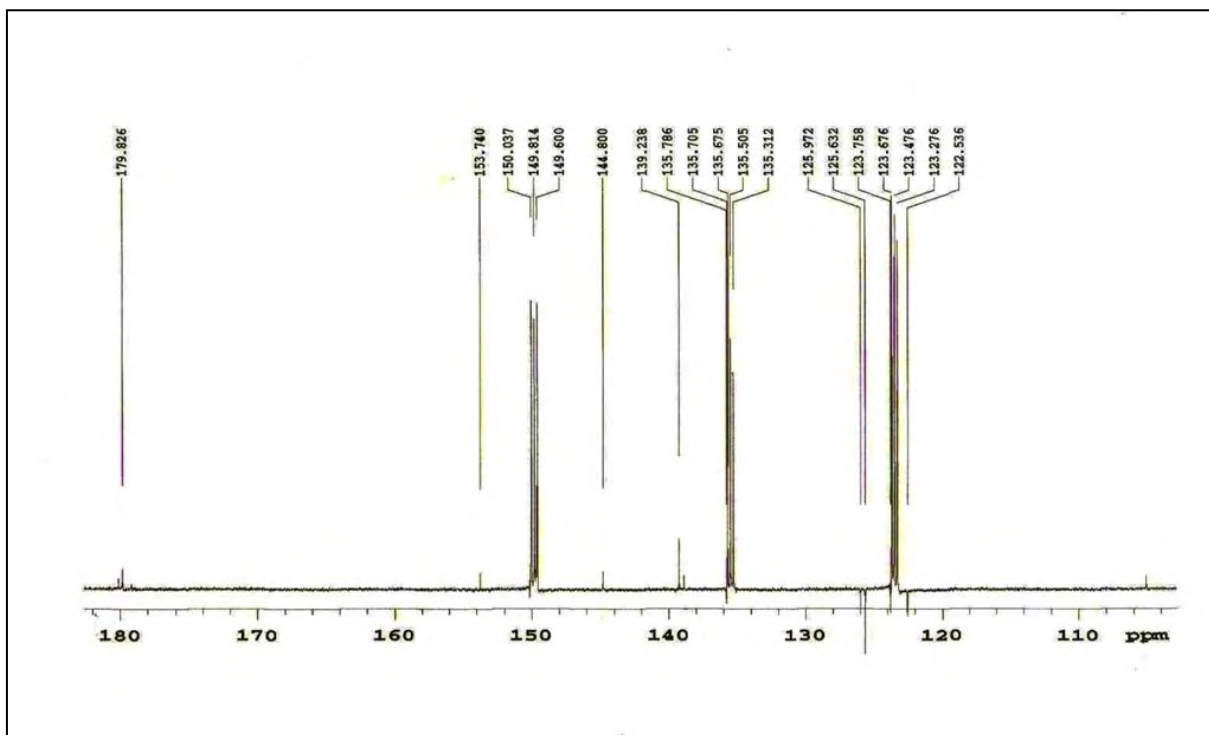


Figura 17 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C - APT de Hs-1 na região de 80,0 a 42,0 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)

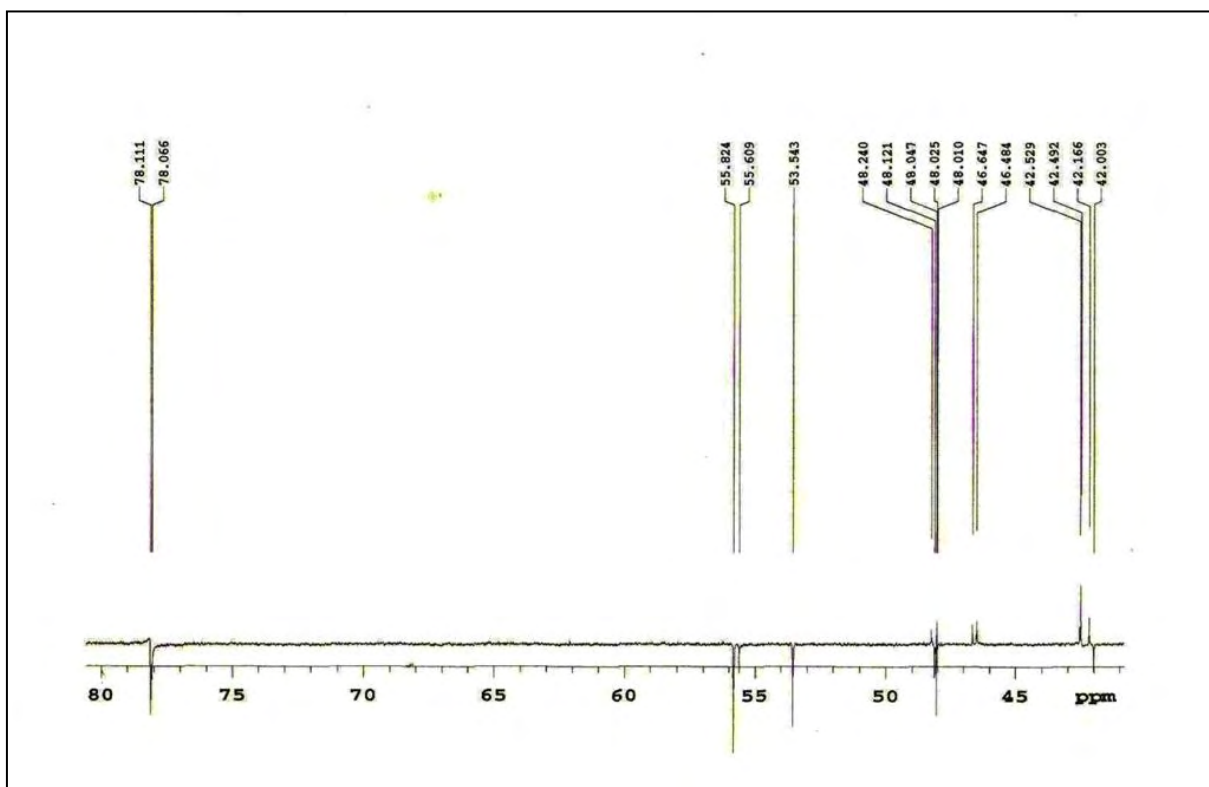


Figura 18 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C - APT de Hs-1 na região de 26,0 a 15,0 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz)

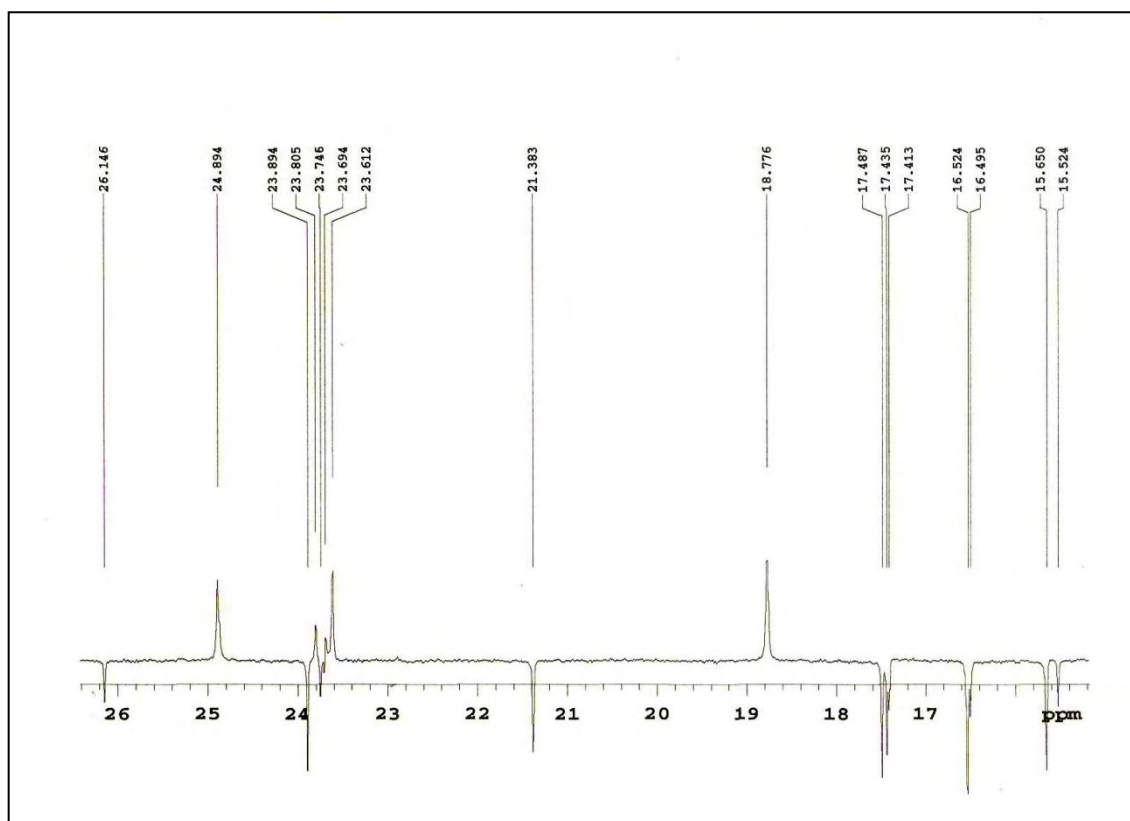


Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H de Hs-1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)

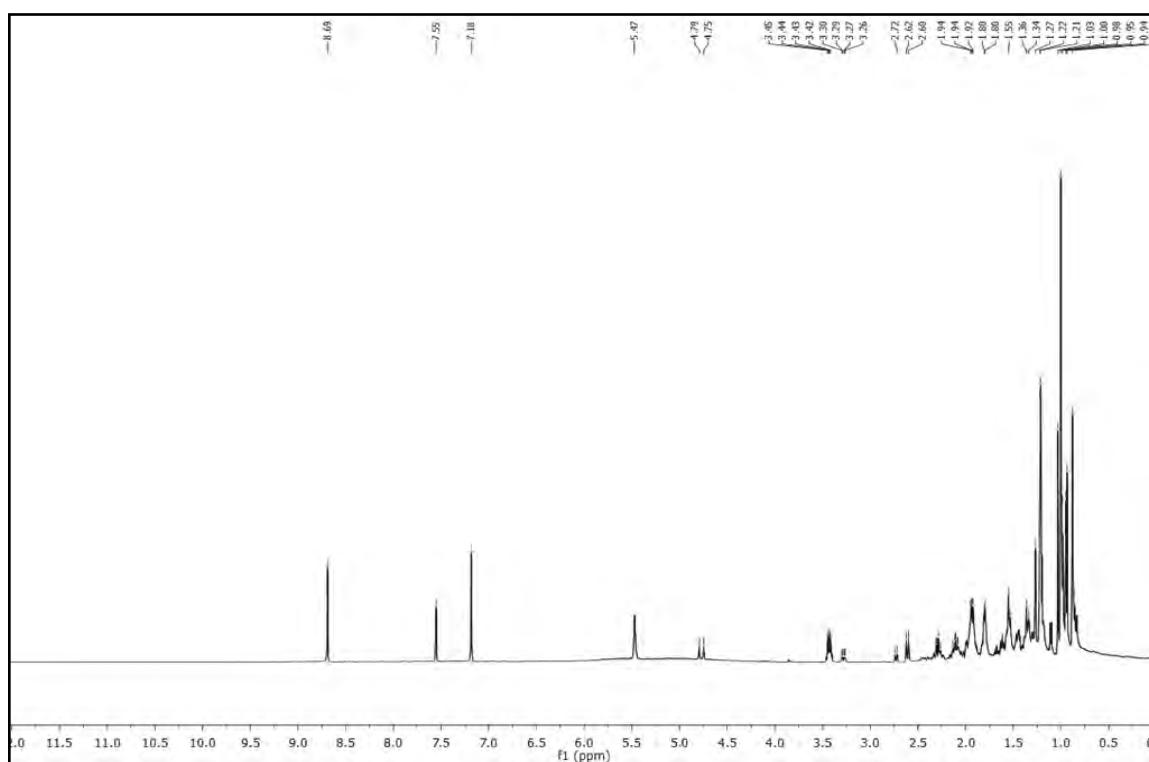


Figura 20 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-1 na região de 5,2 a 2,4 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)

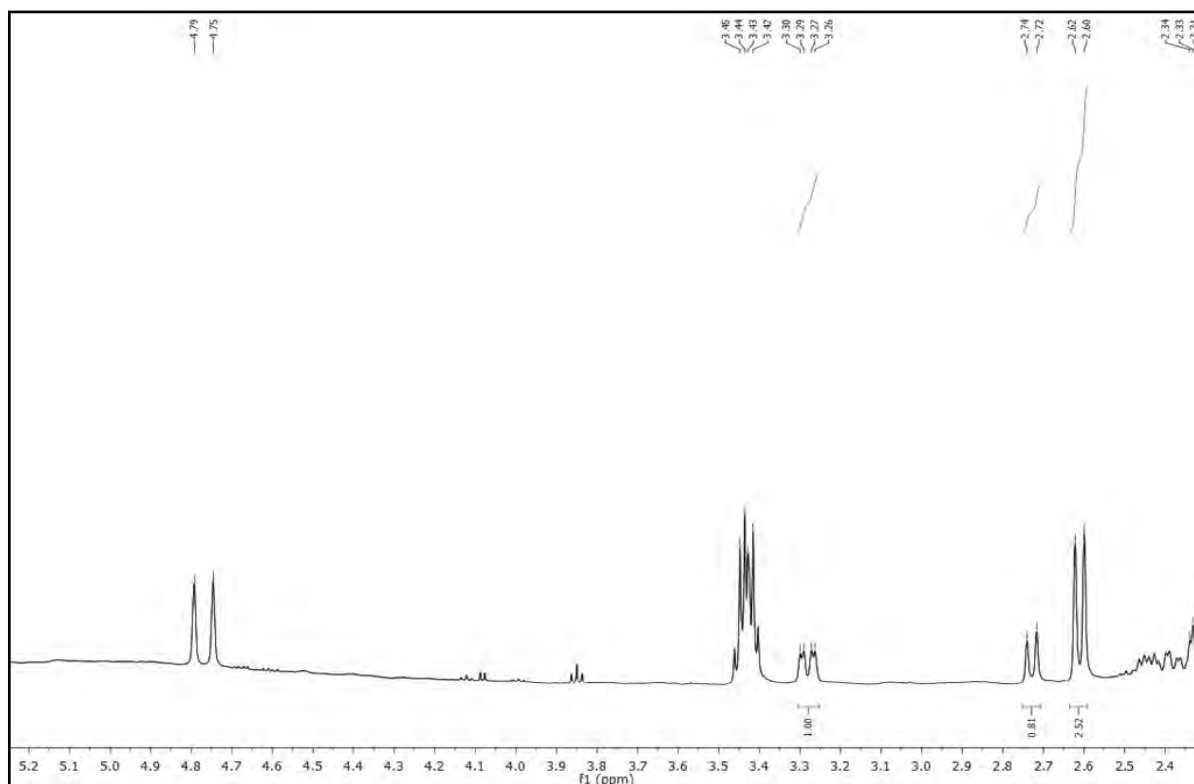
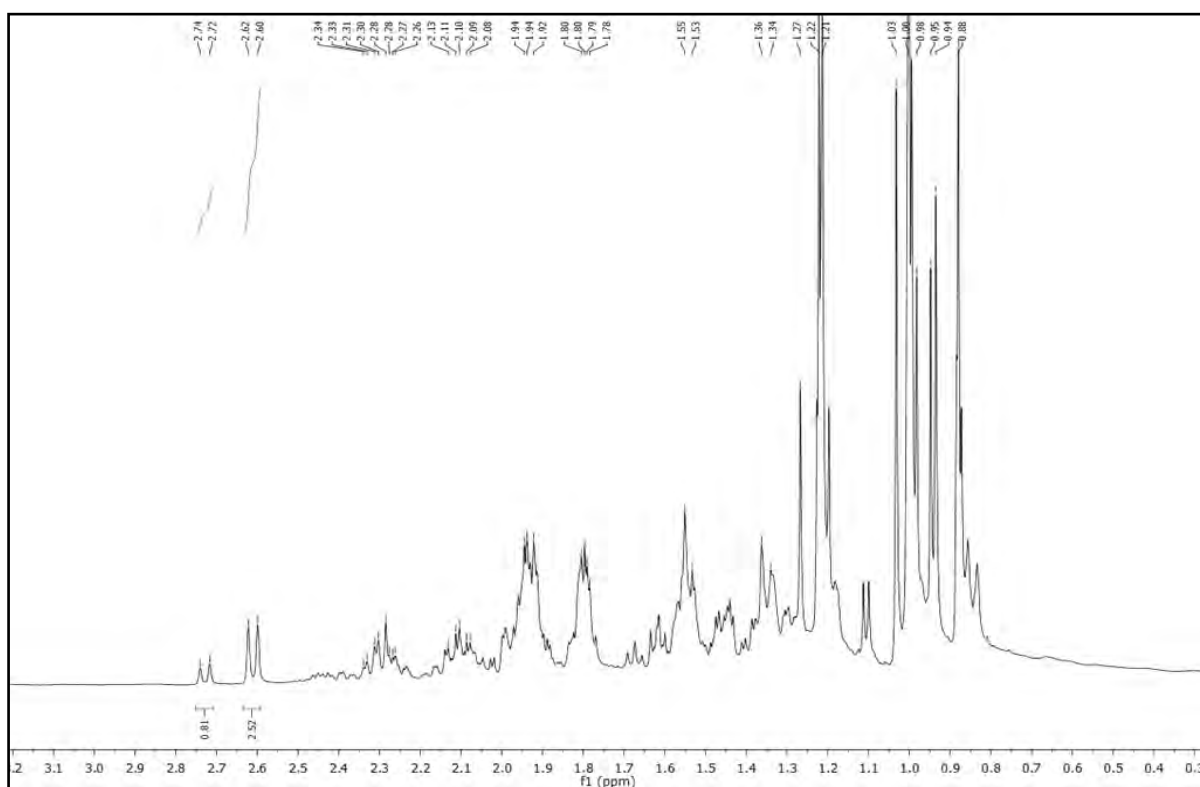


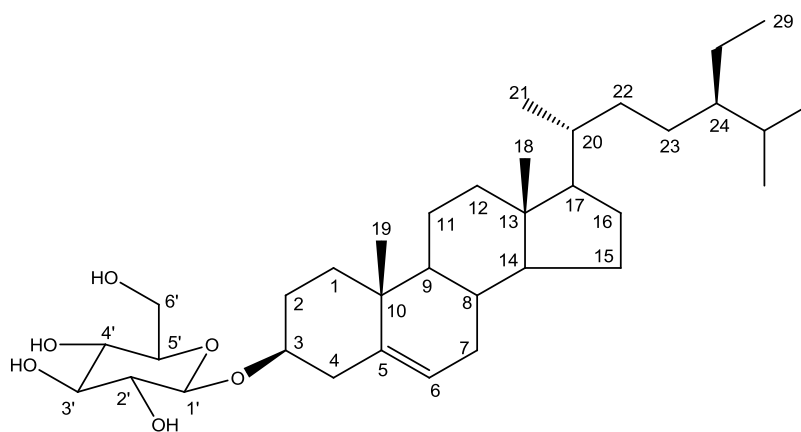
Figura 21 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-1 na região de 3,3 a 0,4 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)



5.2 Determinação estrutural de Hs-2

Na análise do espectro de RMN ^1H de Hs-2 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) (Figura 22, p. 91) foi observado um envelope de absorções entre δ_{H} 0,6 e 2,7 (Figura 23, p. 91) característico de núcleo esteroidal ou triterpênico. A presença de unidade osídica foi sugerida por um conjunto de absorções entre δ_{H} 4,0 e δ_{H} 4,5 (Figura 24, p. 92) típicos de hidrogênios oximetínicos da referida unidade (KASAI et al., 1987). Um multiplete em δ_{H} 3,98 referente ao hidrogênio carbinólico, permitiu propor presença de unidade osídica no C-3, tendo em vista seu deslocamento para campo baixo em Hs-2 quando comparado com o mesmo hidrogênio (H-3) em Hs-1, que absorve em δ_{H} 3,15.

Após análise do espectro de RMN de ^1H e comparação com dados da literatura (MEDEIROS, 2008), pode-se identificar Hs-2 como sendo o **sitosterol-3-O- β -D-glicosídeo**, isolado pela primeira vez na espécie *Hypernia salzmannii*.



β -sitosterol glicosilado

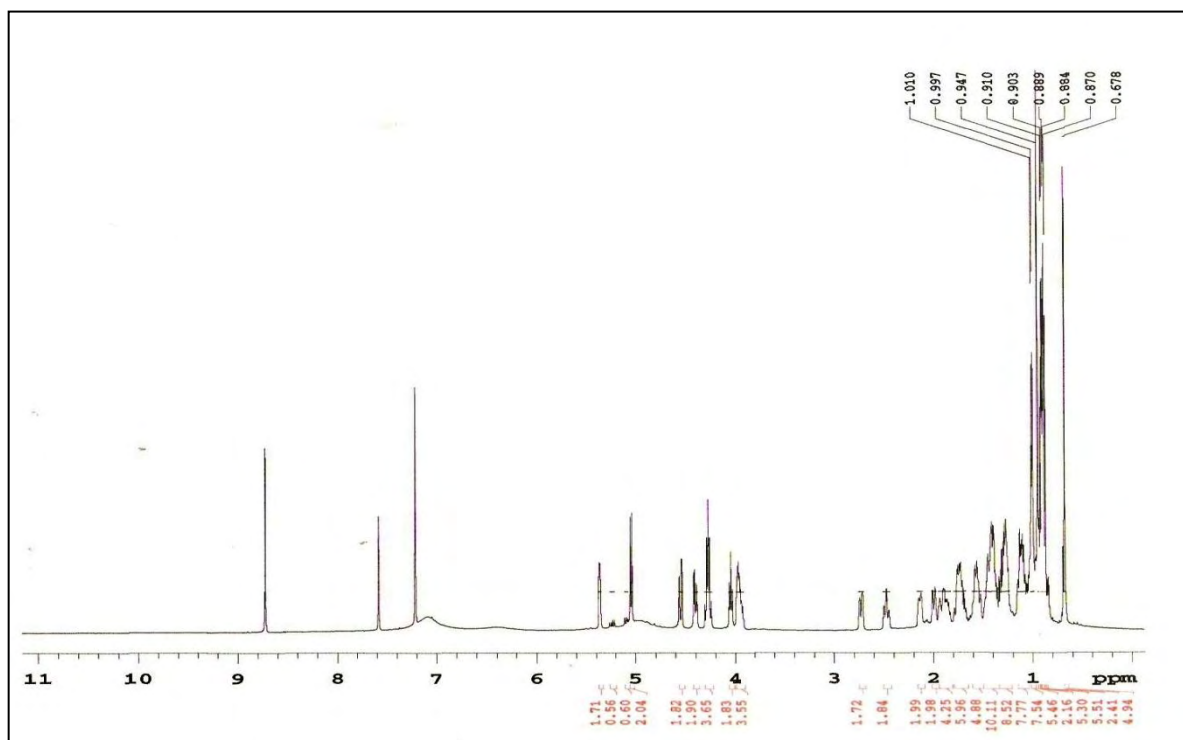
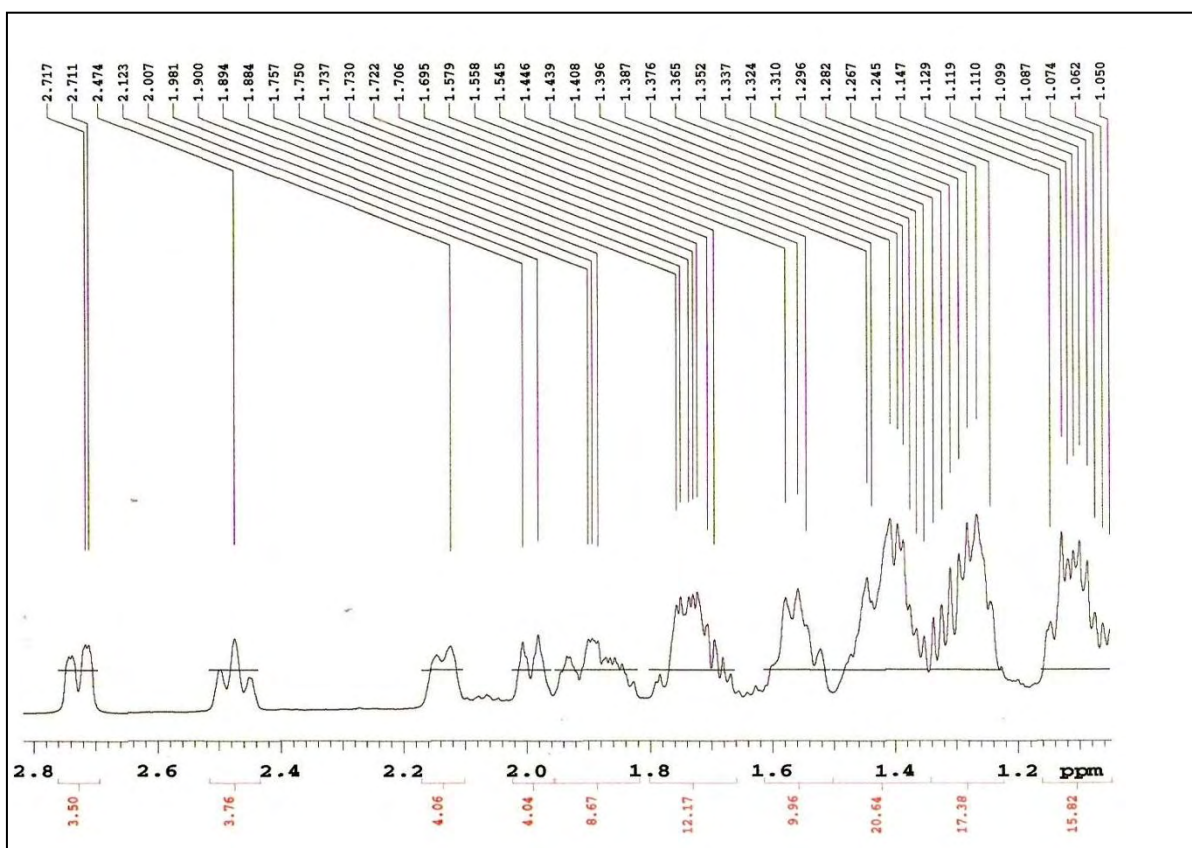
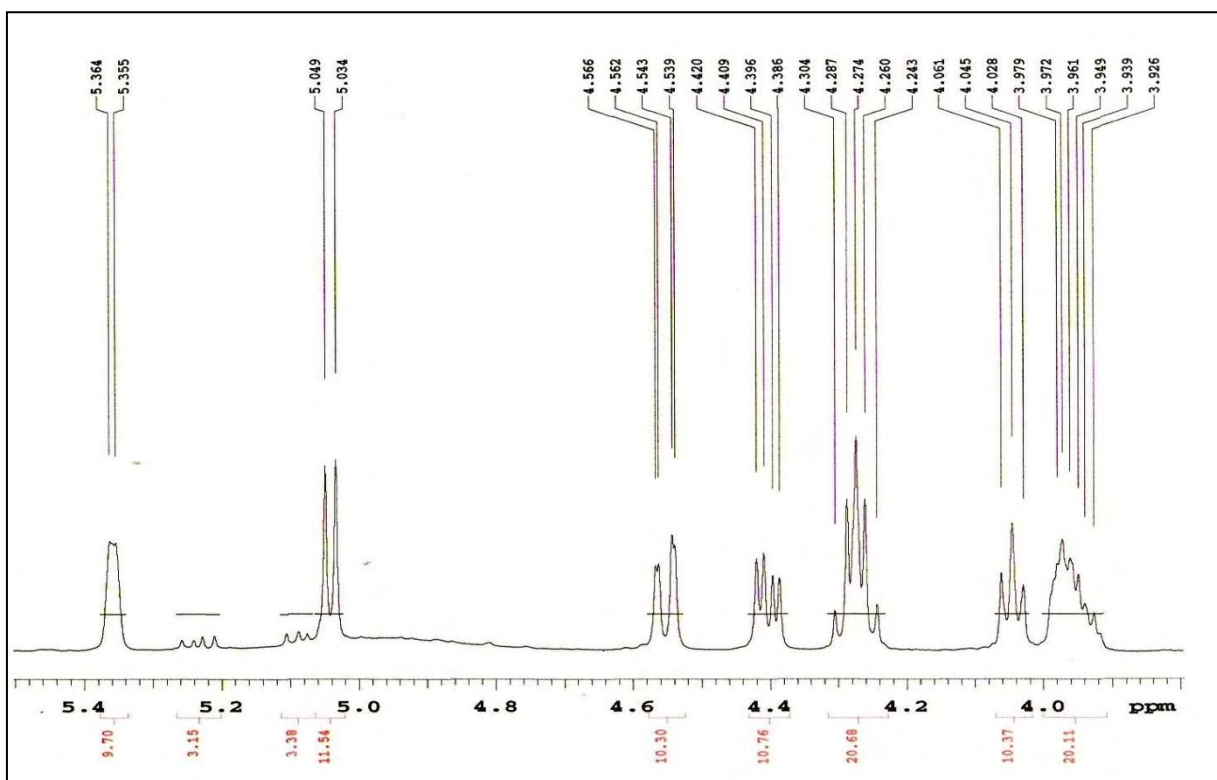
Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H de Hs-2 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)**Figura 23** - Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-2 na região entre 2,8 e 1,2 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)

Figura 24 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-2 na região entre 5,4 e 4,0 ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz)

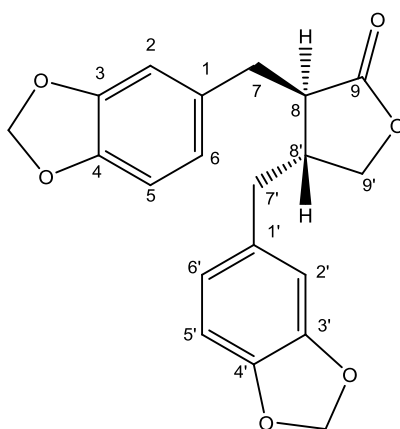


5.3 Determinação estrutural de Hs-3

A substância Hs-3 foi isolada na forma de um óleo amarelo.

O espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 200 MHz) mostrou 19 sinais correspondentes a 5 carbonos metilênicos, 8 metínicos e a 7 carbonos não hydrogenados (Figura 25, p. 98). Os deslocamentos químicos de carbono metilênico em δ_{C} 101,0, característico de grupo metilenodióxi, e de carbonos metínicos em δ_{C} 108,2, 108,3, 108,7, 109,4, 121,5 e 122,2 indicaram a presença de dois grupos arila tri-substituídos (Figura 26, p. 98). Os sinais para carbono não hydrogenado em δ_{C} 178,4, que é característico de lactona em anel de cinco membros, e em δ_{C} 71,1, característico de carbono oximetilênico, sugeriram a existência de um esqueleto dibenzilbutirolactônico (FRANÇA et al., 2005) para a estrutura proposta.

O espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) (Figura 27, p. 99) mostrou na região de aromáticos os dupletos em δ_{H} 6,61 (1H, $J = 1,5$ Hz), δ_{H} 6,68 (1H, $J = 8,5$ Hz), δ_{H} 6,71 (1H, $J = 7,5$), caracterizando um sistema aromático trissubstituído (Figura 28, p. 99). O multipeto em δ_{H} 5,92 – 5,91 indica a presença de hidrogênios de grupo metilenodióxi, confirmando a proposta apresentada no espectro de RMN de ^{13}C . Esses dados em comparação com dados da literatura (FRANÇA et al., 2005; LIMA, 2005) sugeriram que a estrutura tratar-se-ia da lignana dibenzilbutirolactônica **hinoquinina**. Dessa forma, o multipeto em δ_{H} 6,45 foi atribuído aos hidrogênios H-5' e H-6 e o duplo dupeto em δ_{H} 6,58 (1H, $J = 7,5$; 1,5 Hz) foi atribuído ao hidrogênio H-6' da estrutura proposta.



Hinoquinina

A análise dos espectros bidimensionais de correlação heteronuclear HMQC e HMBC) e homonuclear (COSY e NOESY) confirmou os dados obtido a partir da RMN de ^1H e ^{13}C . No espectro HMBC (Figura 32, p. 101), observou-se correlações entre o sinal δ_{C} 131,5 (C-1) com sinais em δ_{H} 2,90 (m) e com δ_{H} 2,68 (d), que foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-7 e H-5. Ainda observou-se correlação entre o sinal δ_{C} 178,4 (C-9) com δ_{H} 2,90 (H-7) e entre o sinal δ_{C} 41,2 (C-8') com esse mesmo grupo de hidrogênios (H-7) (Figura 33, p. 102).

No espectro COSY (Figura 34, p. 102), observou-se correlações entre H-5' (δ_{H} 6,45, m) e H-6' (δ_{H} 6,58, dd) e no NOESY (Figura 35, p. 103) correlações entre δ_{H} 2,45 (m) e δ_{H} 3,90 (m) atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H-7' e H-9', bem entre H-9' com H-8' (δ_{H} 2,48, m). As demais correlações estão compiladas na Tabela 7, p. 96.

A partir da análise dos espectros unidimensionais e bidimensionais, confirmou-se as atribuições da literatura (LOPES, 1983; CONSERVA, 1990) para a substância 3, 4, 3', 4' – dimetilenodioxí – 9 – oxí – 8.8', 9.O.9' – lignana.

Ainda na análise do espectro de ^1H observou-se a presença de um multipeto na região de δ_{H} 3,80 – 3,87 no espectro de RMN de ^1H indicando que esta lignana possui configuração *trans* tratando-se da lignana Hinoquinina (LOPES, 1983). De acordo com a literatura, quando os hidrogênios H-8 e H-8' são *cis*, os hidrogênios carbinólicos H-9' tornam-se equivalentes e geram um singlete largo em δ 4,10. Quando H-8 e H-8' são *trans*, os hidrogênios H-9' não são equivalentes e aparecem como um multipeto em δ 3,90.

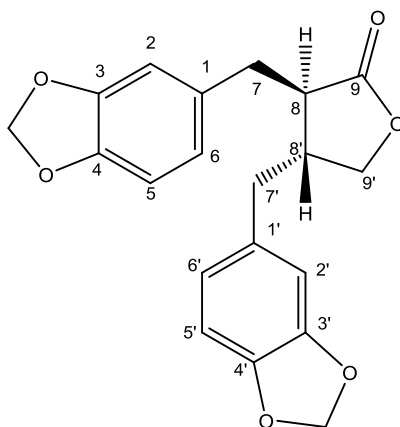
Agrawal & Thakur (1985) relatam diferenças de absorções entre os carbonos (Tabela 6, p. 95) dependendo da sua rotação específica (+) ou (-). Dessa forma, definiu-se que Dicloro Hs-3 trata-se da 8R, 8'R – 3, 4, 3', 4' – dimetilenodioxí – 9 – oxí – 8.8', 9.O.9' – lignana ((-) hinoquinina).

Essa substância foi anteriormente isolada das folhas de *Hypernia salzmannii* (MESSANA et al., 1990).

Tabela 6 - Dados de RMN ^{13}C de (+) Hinoquinina e (-) Hinoquinina (AGRAWAL & THAKUR, 1985)

	(+) Hinoquinina	(-) Hinoquinina
C	δ_c	δ_c
1	131,2	131,4
2	108,4	108,2
3	147,4	147,7
4	145,8	146,3
5	107,8	108,3
6	121,1	121,4
7	34,4	34,8
8	46,1	46,4
9	177,9	178,2
1'	131,0	131,2
2'	109,0	109,3
3'	147,4	147,7
4'	146,0	146,2
5'	107,8	108,7
6'	121,8	122,1
7'	37,9	38,3
8'	41,0	41,2
9'	70,7	71,1
CH ₂ O ₂	100,6	100,9

Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de Hs-3 e correlações obtidas em HMQC, COSY, HMBC e NOESY, registrados em CDCl_3 , J (Hz) e δ (ppm). Valores registrados em comparação com dados da literatura (FRANÇA et al., 2005).



C	HMQC		COSY		HMBC		NOESY
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{HX}	δ_{H}	δ_{CX}	δ_{H}	
					(2J)	(3J)	
C							
1	131,5	----			H-7	H-5	
3 e 3'	147,8	----					
4	146,3	----					
9	178,4	----				H-7	
1'	131,2	----					
4'	146,4	----					
CH							
2	108,2	6,71 (d, $J = 7,5$ Hz)				H-6	
						H-7	
5	108,3	6,68 (d, $J = 8,5$ Hz)	H-6				
6	121,5	6,45 (dd, $J = 4,0$ e $1,5$ Hz)	H-5			H-2	
						H-7	
8	46,5	2,52 (m)					
2'	109,4	6,61 (d, $J = 1,5$ Hz)				H-6'	
5'	108,7	6,45 (m)	H-6'				
6'	122,2	6,58 (dd, $J = 1,5$ e $7,5$ Hz)	H-5'			H-2'	H-7'
8'	41,2	2,48 (m)				H-7	

CH₂				
7	34,8	2,82 (m)		
7'	38,3	2,45 (m)		H-9'
9'	71,1	3,85 (m)		H-8'
CH ₂ O ₂	101,0	5,92 (s)		
CH ₂ O ₂	101,0	5,91 (s)		

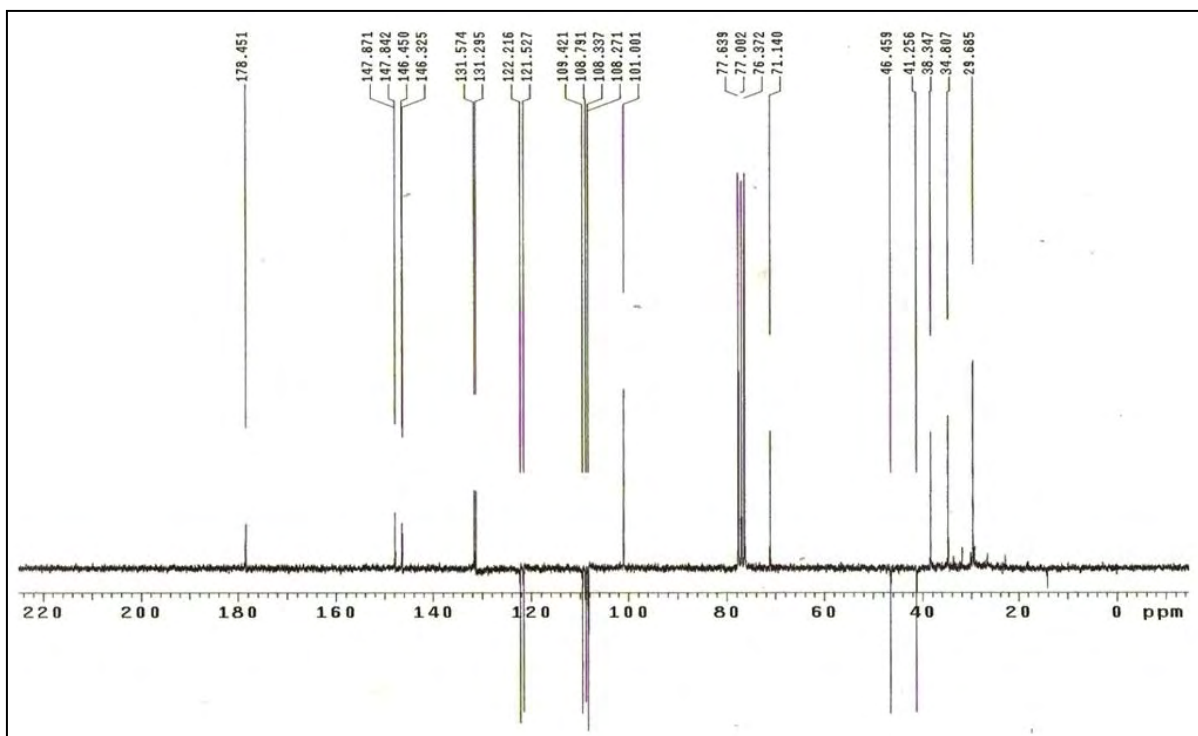
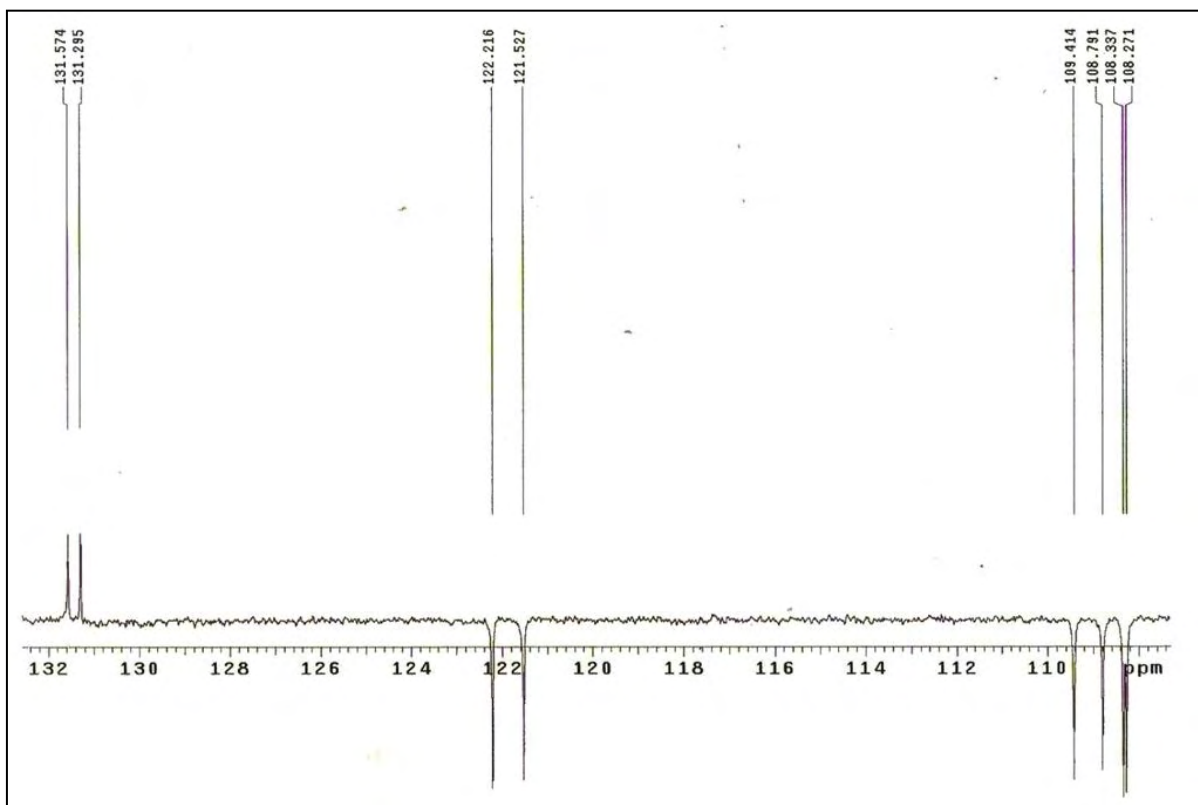
Figura 25 - Espectro de RMN de ^{13}C - APT de Hs-3 (CDCl_3 , 50 MHz)**Figura 26** - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C - APT de Hs-3 na região de 132,0 a 108,0 ppm (CDCl_3 , 50 MHz)

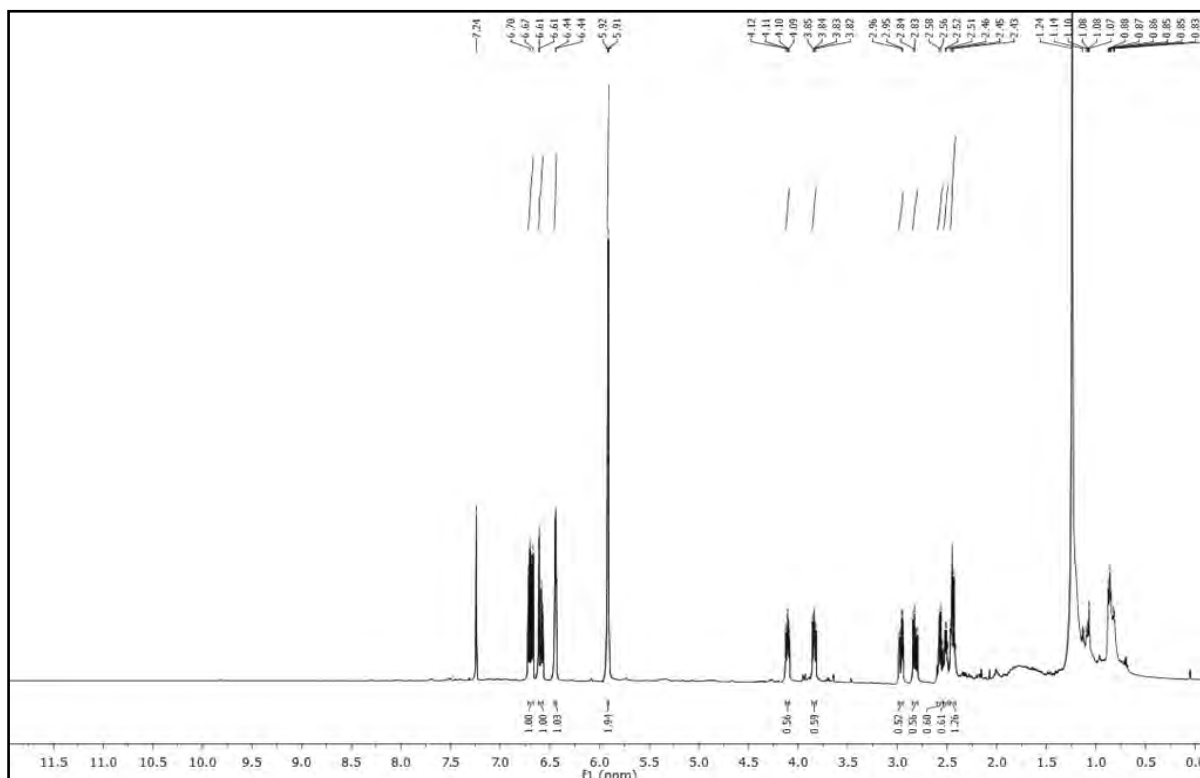
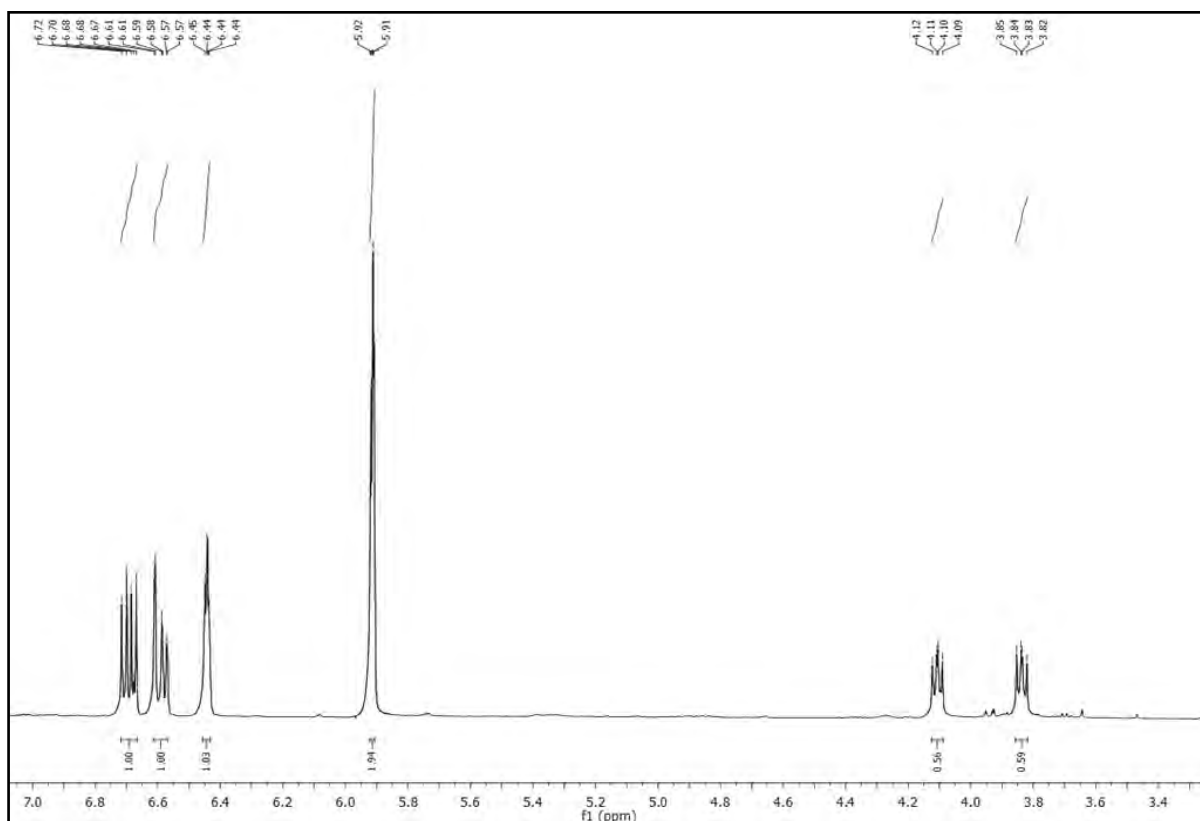
Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H de Hs-3 (CDCl_3 , 500 MHz)**Figura 28** - Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-3 na região de 7,0 a 3,4 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)

Figura 29 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-3 na região de 3,9 a 0,5 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)

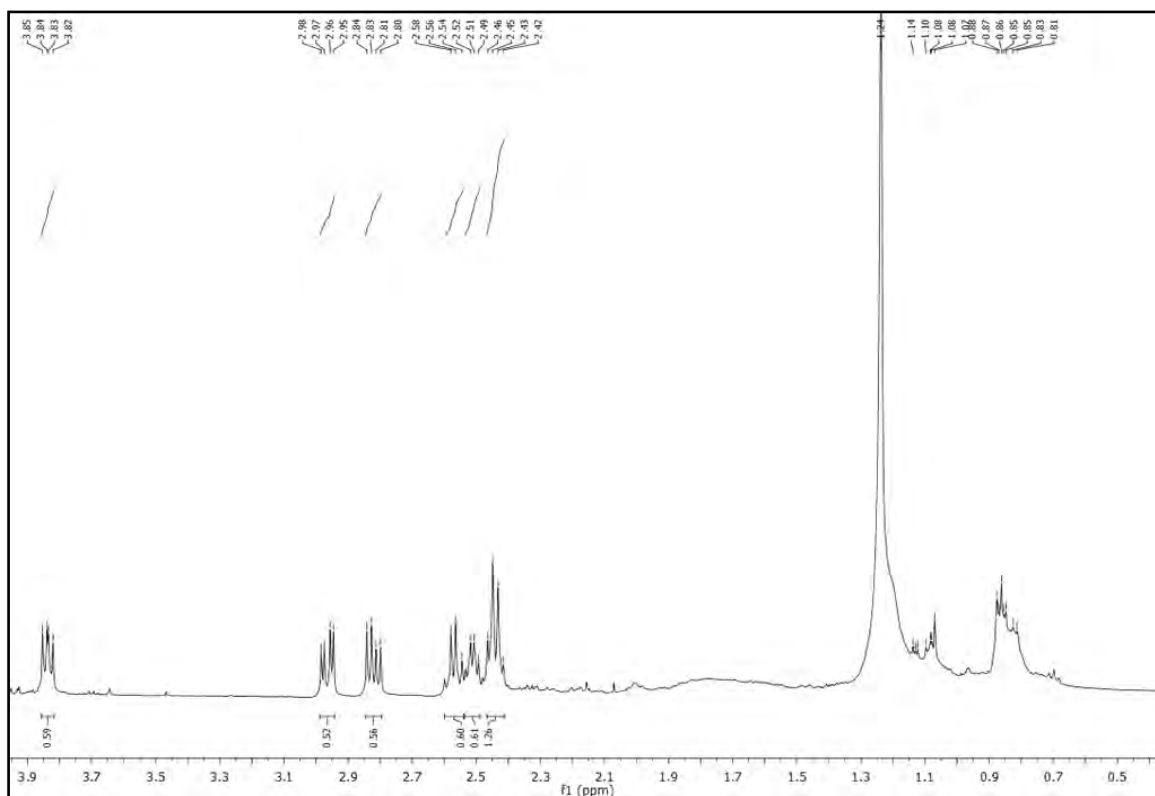


Figura 30 - Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - J_{CH} - HMQC de Hs-3 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)

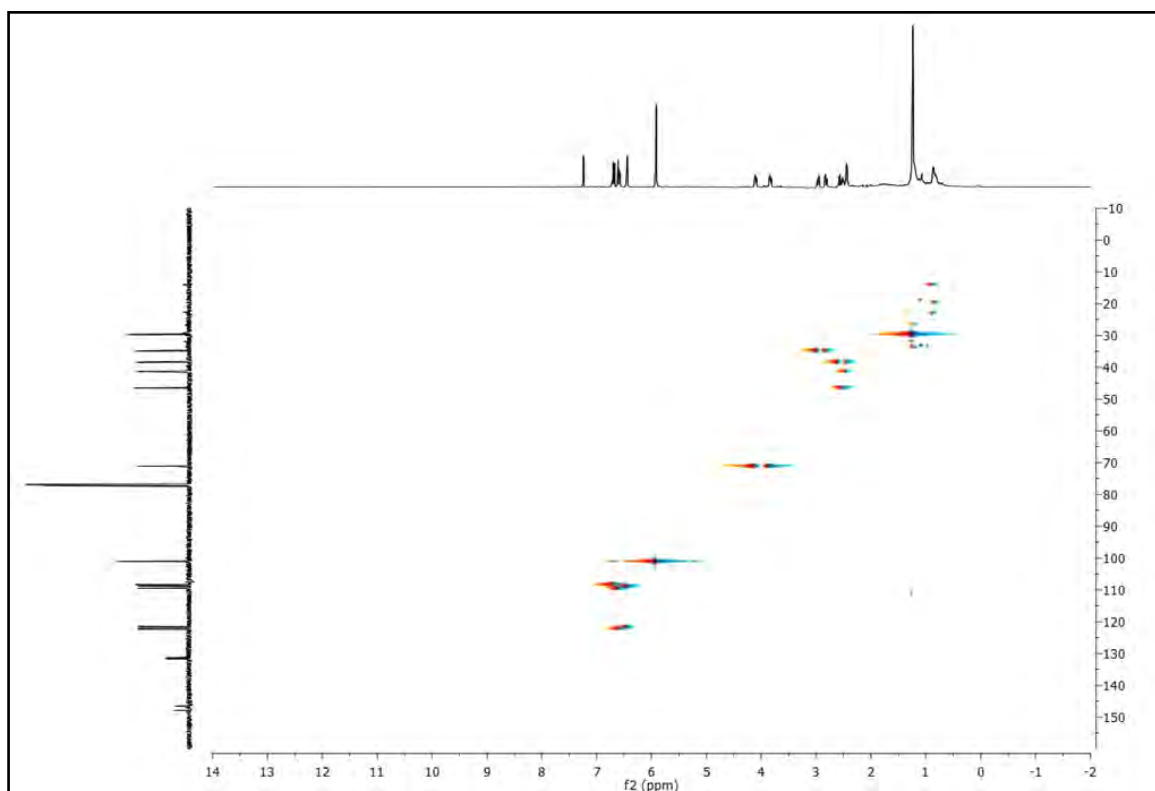


Figura 31 – Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - J_{CH} - HMQC de Hs-3 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)

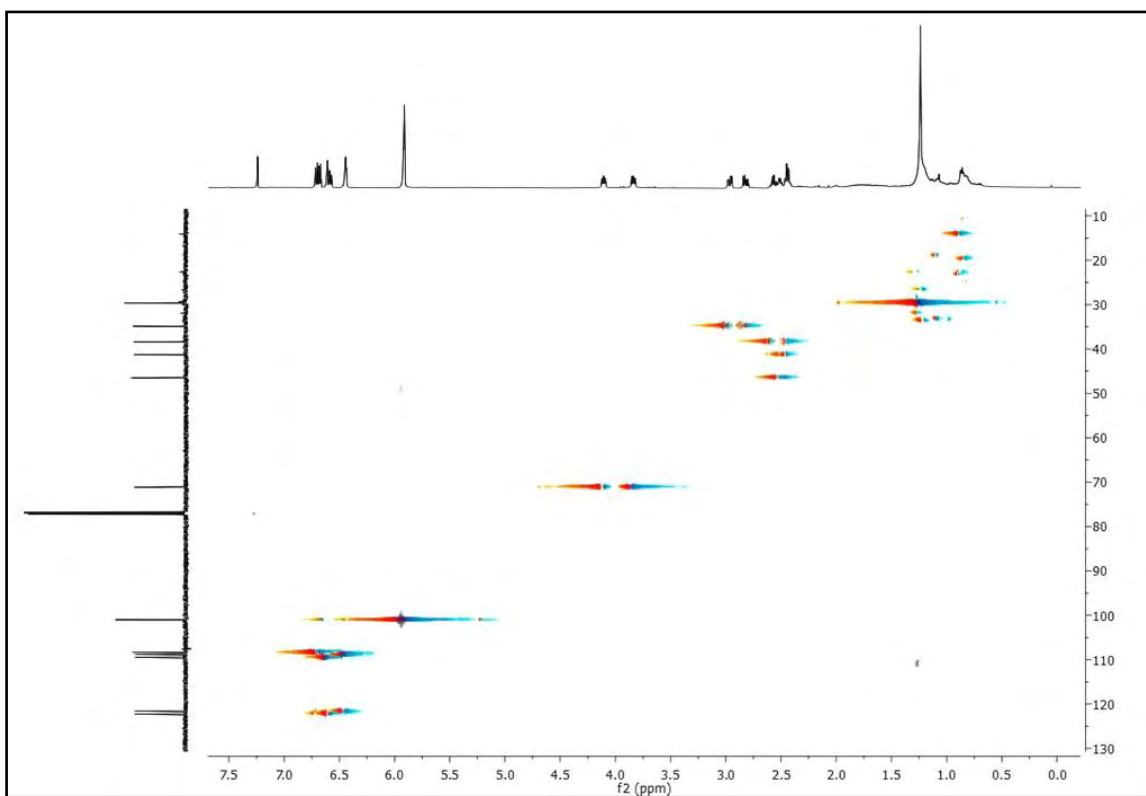


Figura 32 - Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - nJ_{CH} ($n=2$ e 3) - HMBC de Hs-3 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)

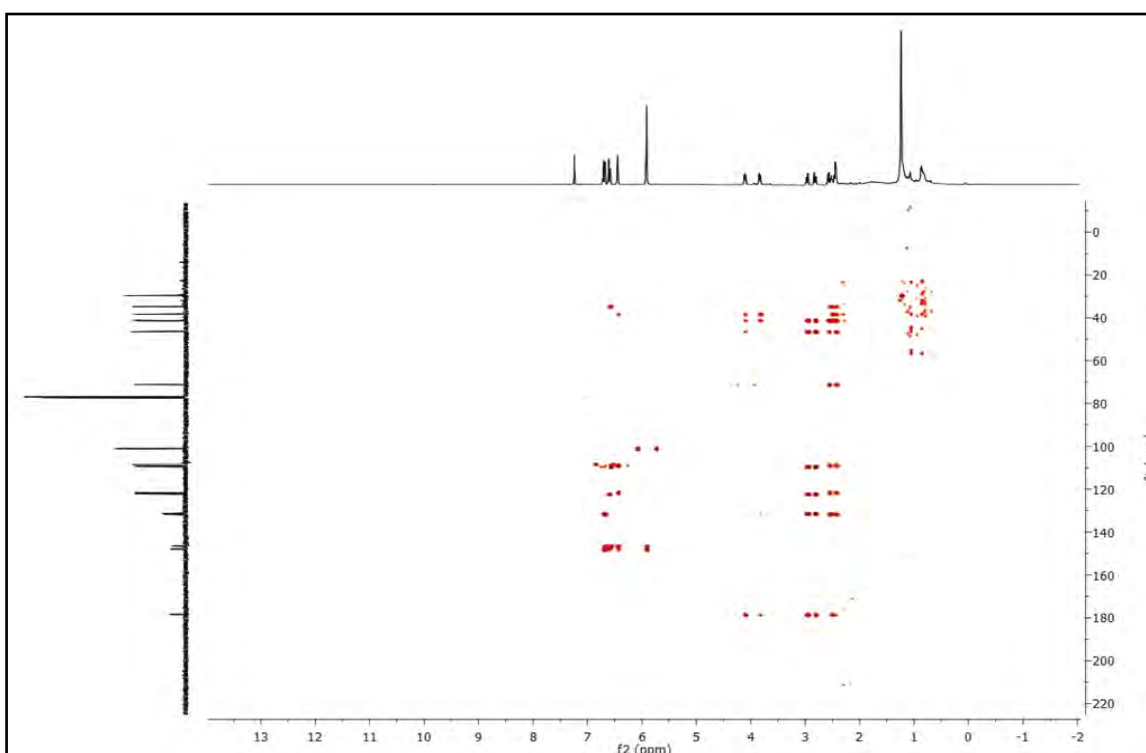


Figura 33 - Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -nJCH (n=2 e 3) - HMBC de Hs-3 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)

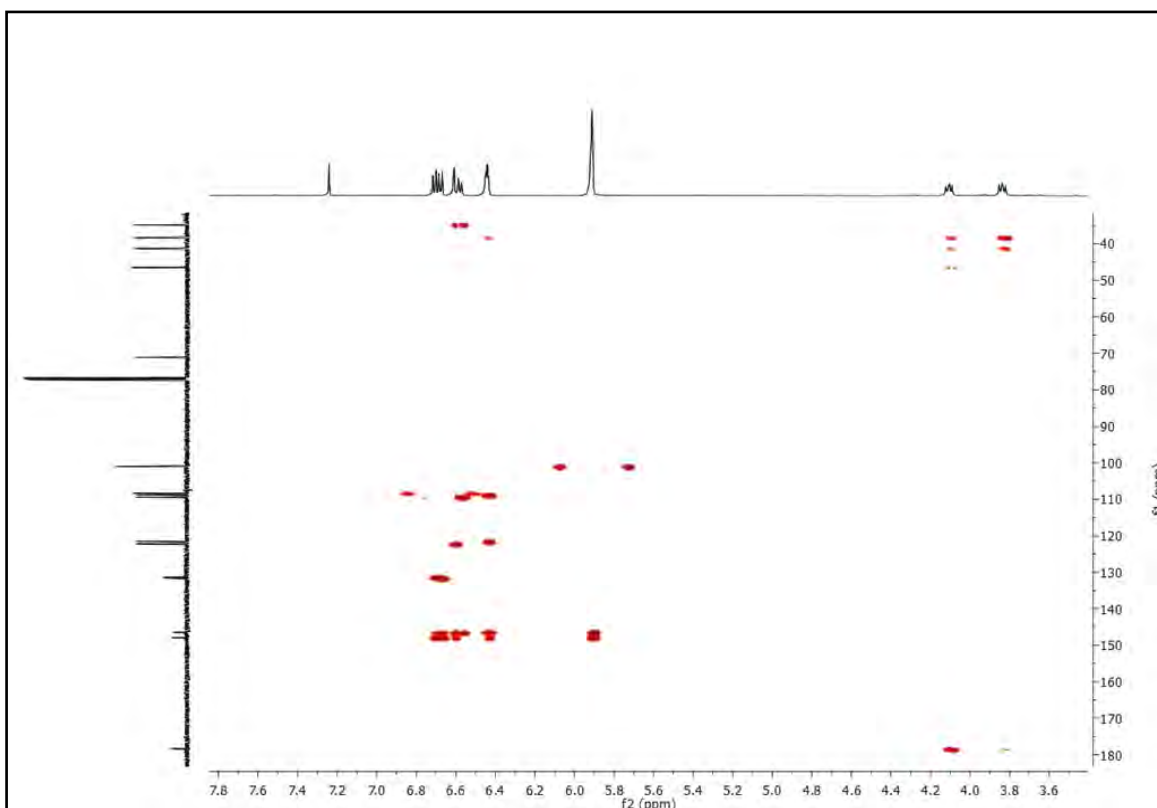


Figura 34 - Espectro de correlação homonuclear COSY de Hs-3 (CDCl_3 , 500 MHz)

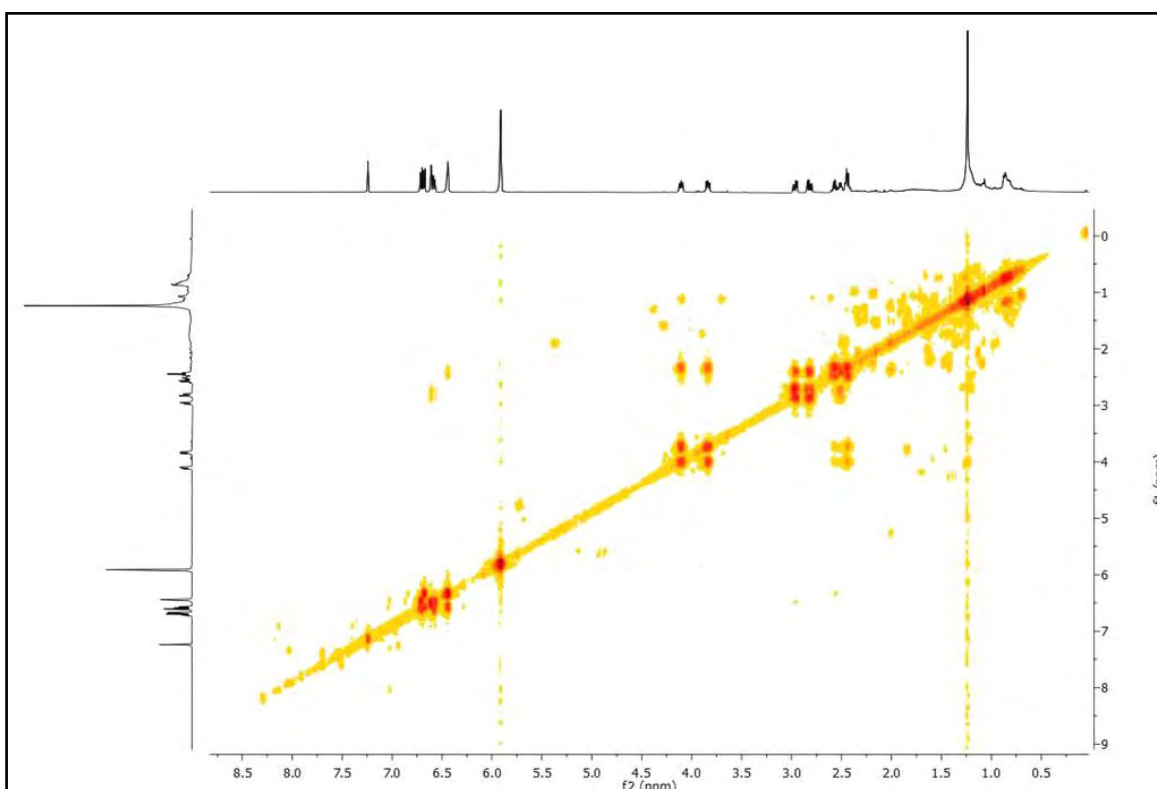
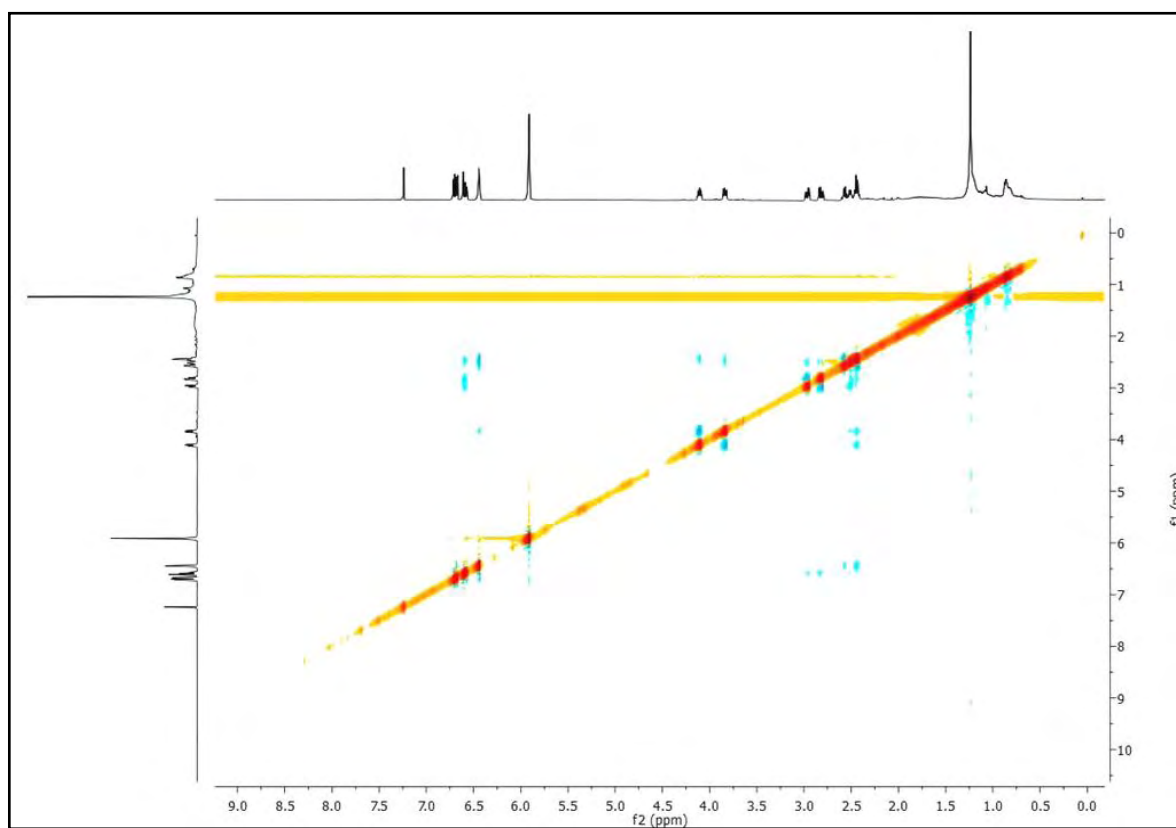


Figura 35 - Espectro de correlação homonuclear NOESY de Hs-3 (CDCl₃, 500 MHz)

5.4 Determinação estrutural de Hs-4

A substância codificada como Hs-4 foi isolada na forma de óleo marrom.

O espectro de RMN de ^{13}C – APT (CDCl_3 , 125 MHz) (Figura 36, p. 107) apresentou 18 sinais, atribuídos a 10 carbonos não hidrogenados, seis carbonos metínicos, três carbonos metilênicos, e três carbonos de grupo OCH_3 .

Os sinais em δ_{C} 152,54, 148,28, 136,18, 134,81 e 131,62 (Figura 37, p. 107) foram característicos de deslocamento químico para carbonos aromáticos. Observou-se sinais para carbonos metilênicos em δ_{C} 27,51 e δ_{C} 72,38, e um sinal em δ_{C} 100,98 ppm que é característico de grupo metilenodióxi.

O espectro de ^{13}C ainda apresentou sinais para carbonos metínicos não aromáticos, em δ_{C} 43,85 e δ_{C} 32,40, bem como sinais característicos de carbono de metoxilas orto substituídas em δ_{C} 60,74, 59,36, e 56,33, sendo esse último atribuído a duas metoxilas devido a intensidade do sinal no espectro (Figura 38, p. 108). Ainda, o sinal em δ_{C} 175,07 foi atribuído a carbono de carbonila de éster.

Comparações feitas com dados da literatura mostraram conjunto de sinais característicos nos espectros de RMN de ^{13}C consistentes com a natureza das lignanas do tipo aril-tetraidronaftaleno lactônicas (DAVID et al., 2001; FELICIANO et al., 1989).

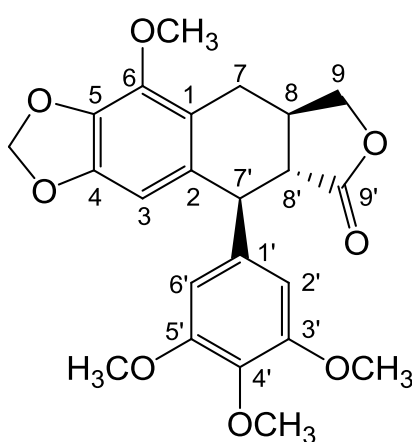
O espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) (Figura 39, p. 108) apresentou dois simpletos em δ_{H} 6,36 (2H, s) e em δ_{H} 6,25 (1H, s) que foram atribuídos a hidrogênios aromáticos. Um multipeto em δ_{H} 5,88 confirmou a atribuição do ^{13}C para grupo metilenodióxi (Tabela 8, p. 106)

Os multipeto em δ_{H} 3,89 (3H, m) e os simpletos em δ_{H} 3,78 (3H, s) e em δ_{H} 3,73 (6H, s) (Figura 40, p. 109) confirmaram os dados do ^{13}C referentes à presença de quatro metoxilas na estrutura. Esses dados de ^1H reforçam a proposta para uma lignana aril-tetraidronaftaleno lactônica (DAVID et al., 2001; FELICIANO et al., 1989).

Ao analisar as expansões do espectro de RMN de ^1H , observou-se sinais característicos de lignana do tipo peltatina: um dupeto em δ_{H} 4,56 (1H, $J = 3,0$ Hz) atribuído ao H-7', um duplo dupeto em 4,46 (1H, $J = 7,0$; indt. Hz) e um multipeto em δ_{H} 3,81 atribuídos ao H-9; dois duplos dupletos em δ_{H} 3,15 (1H, $J = 16,5$; 5,0 Hz) e δ_{H} 2,43 (1H, $J = 16,5$; 6,0 Hz) (Figuras 40 e 41, p. 87) atribuídos aos hidrogênios

metilênicos H-7; e um multipeto em δ_H 2,65 que foram atribuídos aos hidrogênios metínicos H-8 e H-8'.

Após as comparações dos dados de RMN de ^{13}C e 1H com os dados da literatura (DAVID et al., 2001; FELICIANO et al., 1989), foi possível determinar a estrutura de Hs-4 como sendo a **β -peltatina-A-metileter**, isolada pela primeira vez na espécie, sendo este tipo de lignana marcador químico da família Lamiaceae.



β -peltatina-A-metileter

Tabela 8 - Deslocamentos químicos e tipos de sinal para Hs-4, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) unidimensionais em CDCl_3 e comparação com os dados de RMN de ^{13}C e ^1H da literatura (DAVID et al., 2001; FELICIANO et al., 1989) (δ em ppm e J em Hz).

β -peltatina-A-metileter			Hs-4	
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	136,2	--	136,1	--
2	104,5	--	--	--
4	140,9	--	--	--
5	148,4	--	148,2	--
6	121,1	--	120,9	--
1'	131,8	--	131,6	--
3'	152,6	--	152,5	--
4'	134,6	--	134,8	--
5'	152,6	--	152,5	--
9'	175,0	--	175,0	--
CH				
3	137,6	6,20 (s)	104,6	6,25 (s)
8	43,9	2,66 (sl)	43,8	2,64 (m)
2'	108,8	6,33 (s)	108,4	6,33 (s)
6'	108,8	6,33 (s)	108,4	6,33 (s)
7'	32,5	4,54 (d, $J = 3,10$ Hz)	32,4	4,56 (d, $J = 3,0$ Hz)
8'	47,4	2,66 (s)	47,3	2,64 (m)
CH₂				
7	27,5	3,17 (dd, $J = 13,7; 3,2$ Hz)	27,5	3,15 (dd, $J = 16,5; 5,0$ Hz)
		2,66 (dd, $J = 13,7; 3,2$ Hz)		2,64 (m)
9	72,4	4,46 (dd, $J = 6,9; \text{indt. Hz}$)	72,3	4,48 (dd, $J = 7,0; \text{indt. Hz}$)
		3,81 (m)		
O₂CH₂	101,0	5,95 (sl)	100,9	5,88 (m)
OCH₃				
	60,7	3,81 (sl)	60,7	3,89 (m)
	59,4	3,70 (s)	59,3	3,78 (s)
	56,4	3,76 (sl)	56,3	3,76 (s)

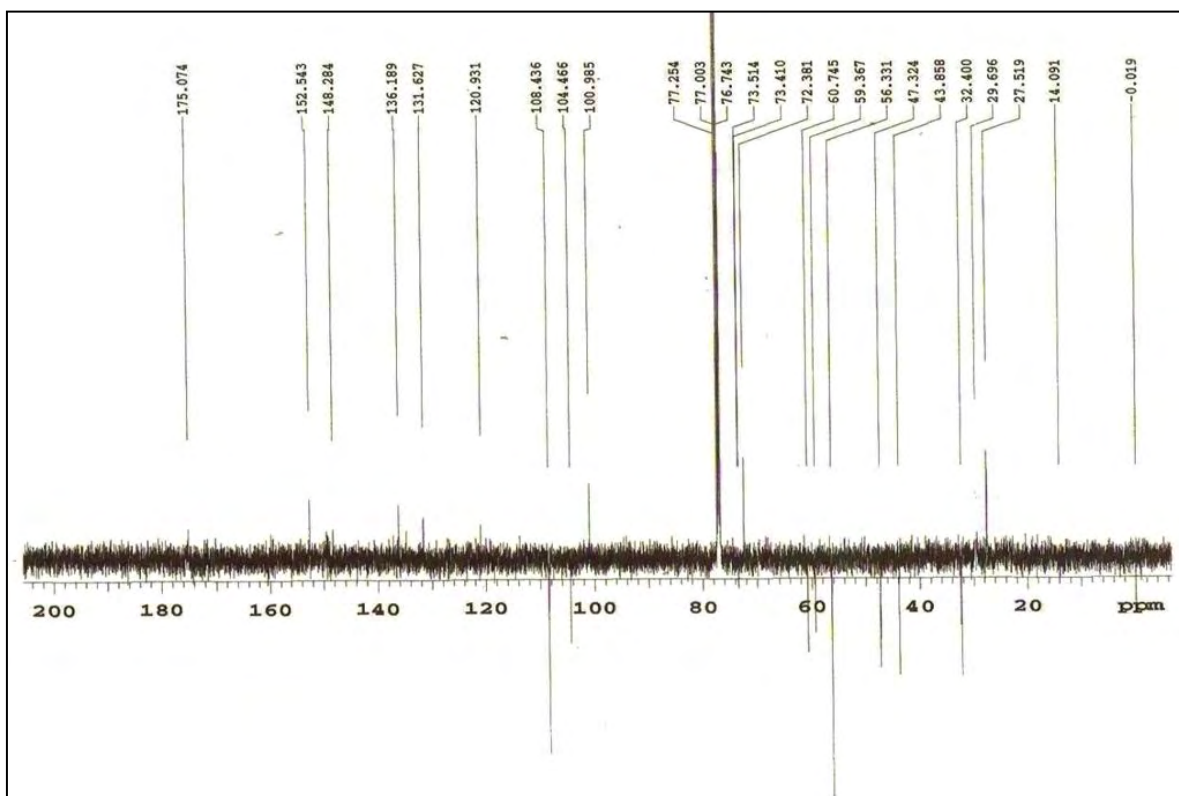
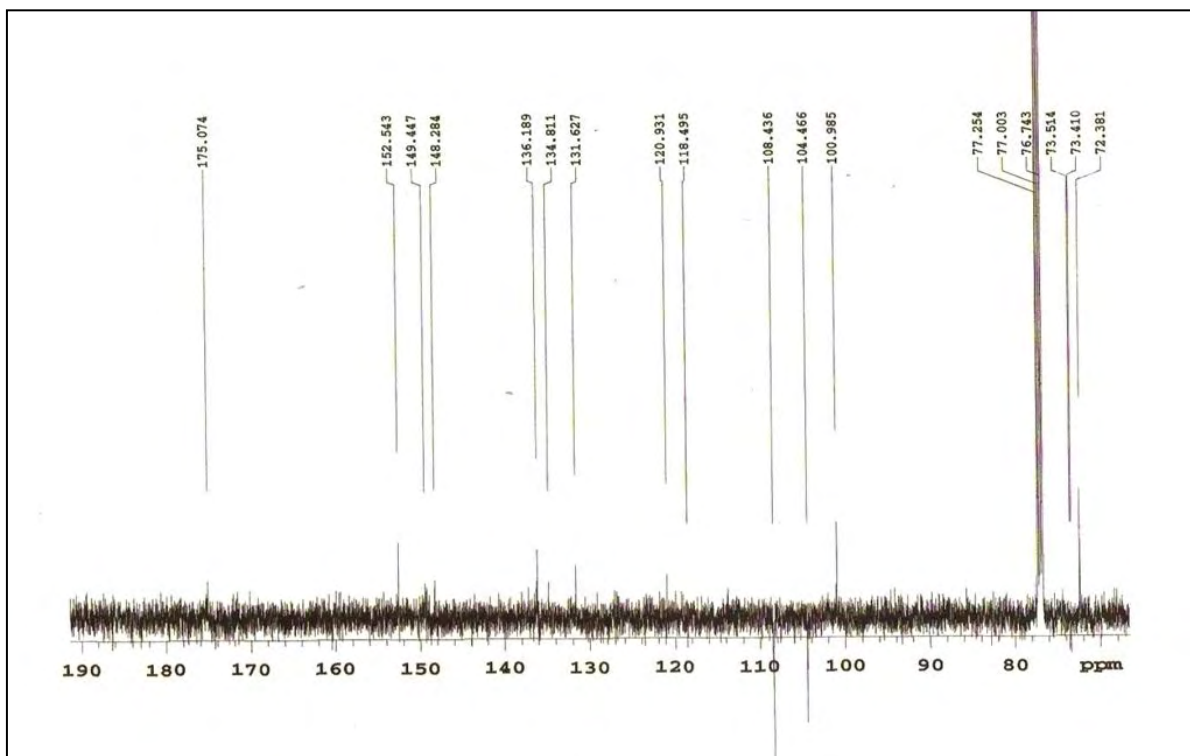
Figura 36 - Espectro de RMN de ^{13}C - APT de Hs-4 (CDCl_3 , 125 MHz)**Figura 37** – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C - APT de Hs-4 na região de 190,0 a 80,0 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)

Figura 38 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C - APT de Hs-4 na região de 60,0 a 30,0 ppm (CDCl_3 , 125 MHz)

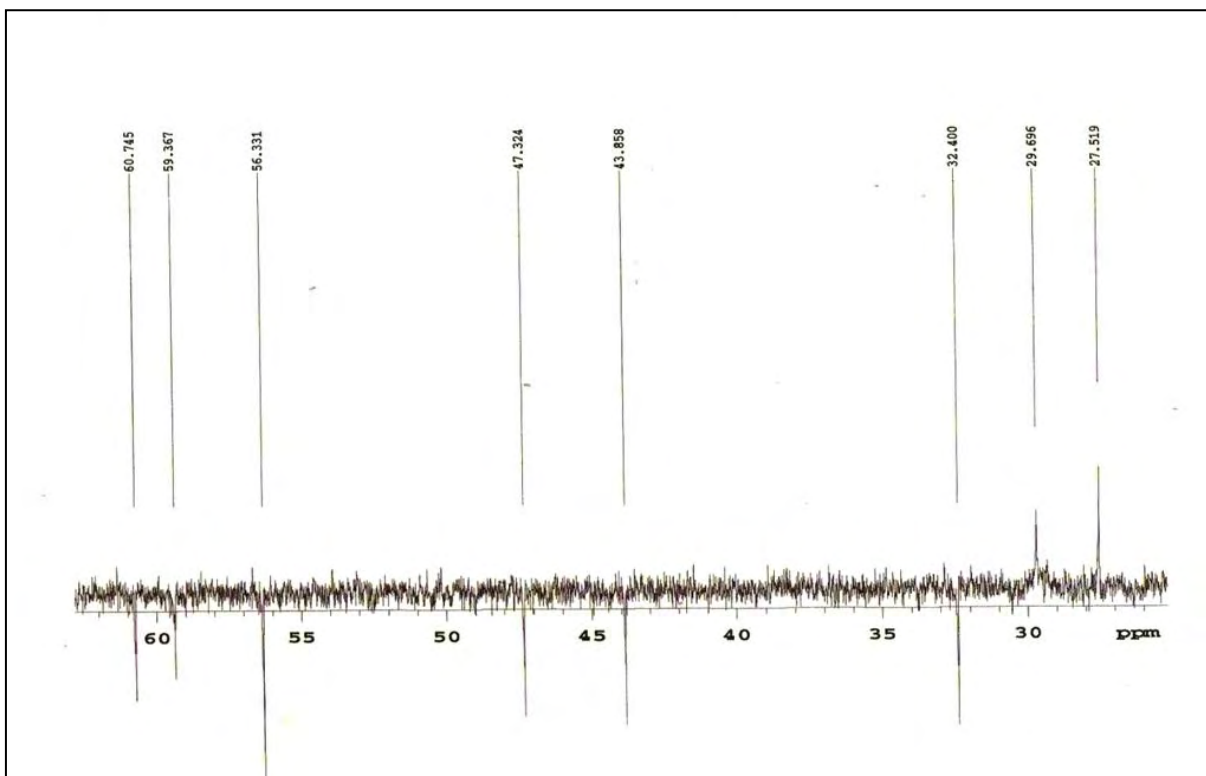


Figura 39 – Espectro de RMN de ^1H de Hs-4 (CDCl_3 , 500 MHz)

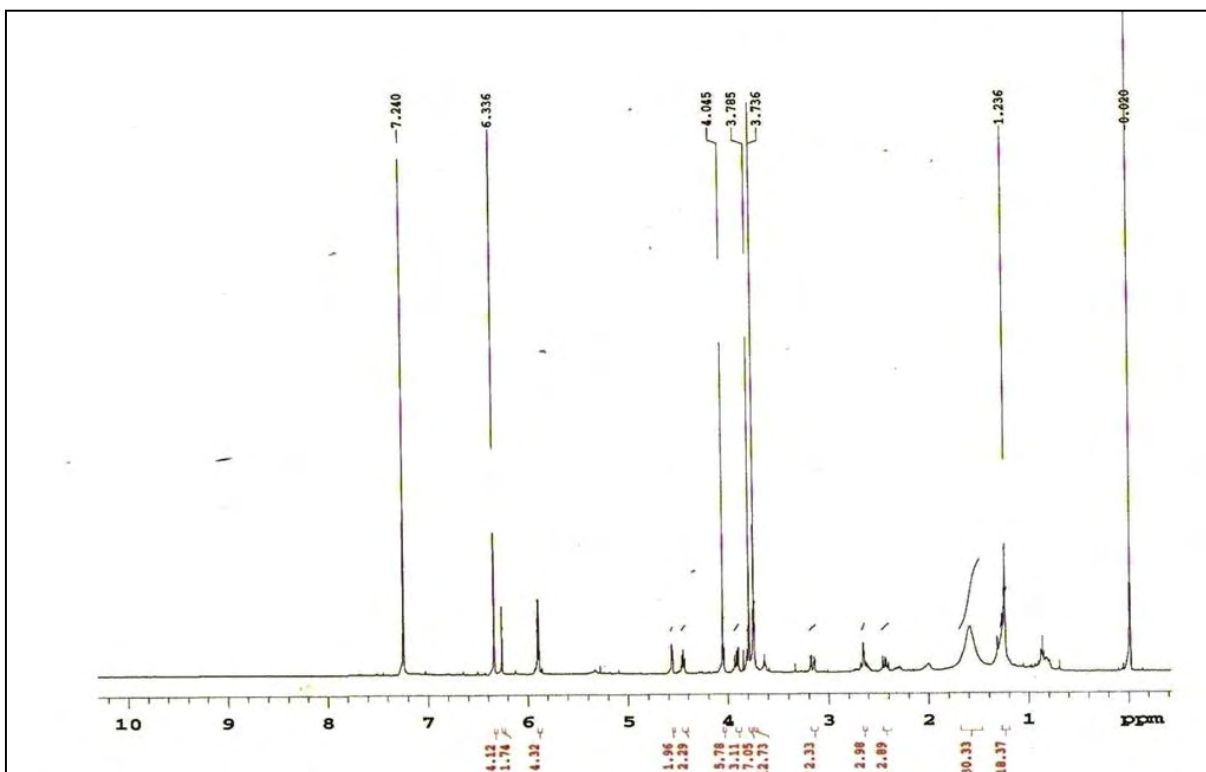


Figura 40 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-4 na região entre 6,4 e 3,8 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)

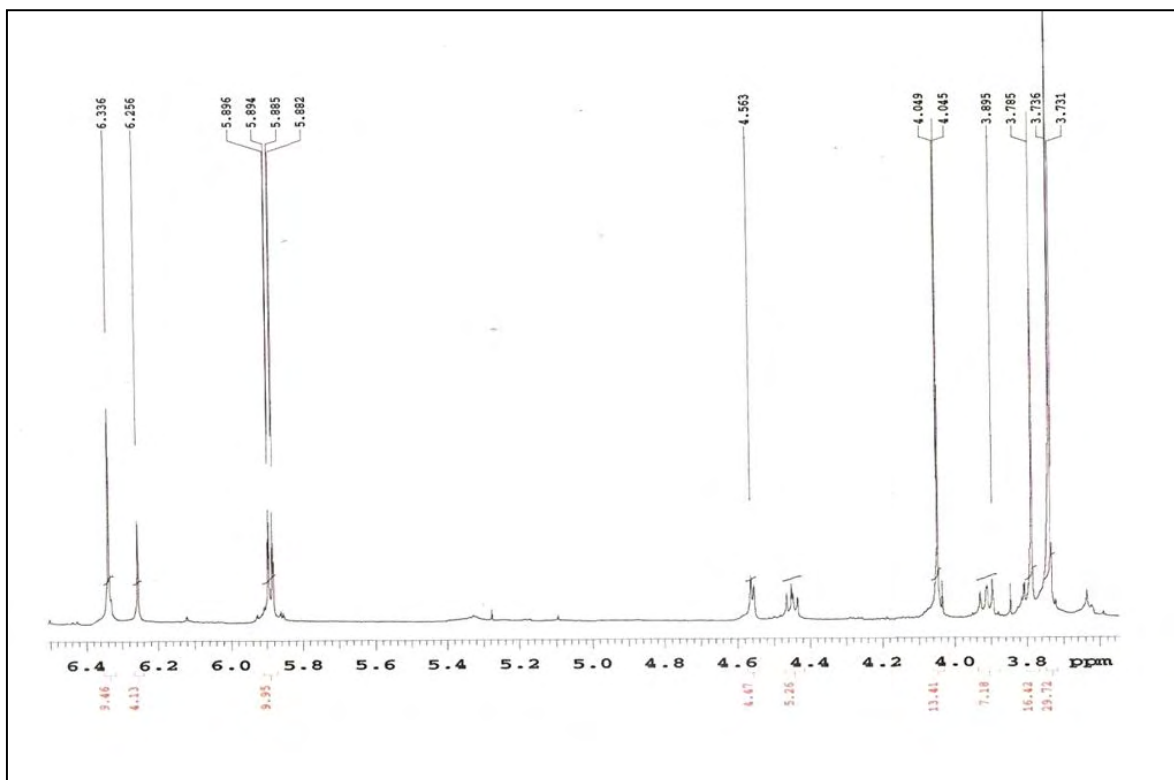
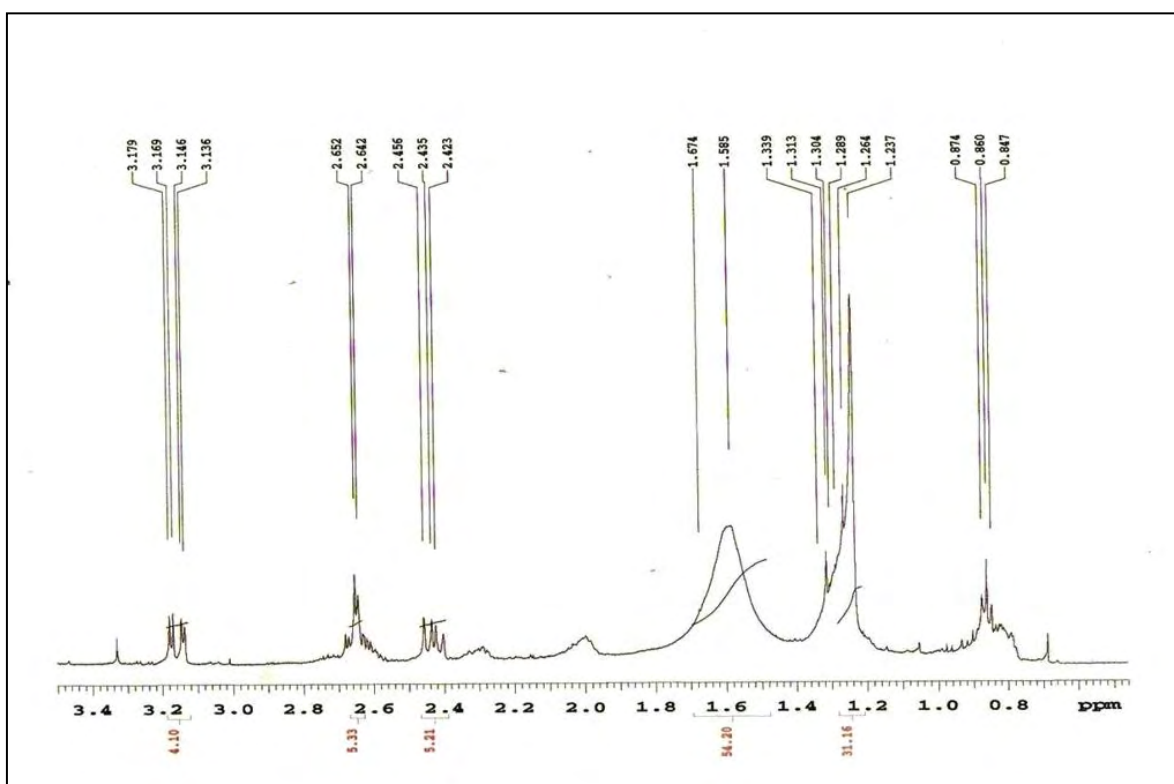


Figura 41 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-4 na região entre 3,4 e 0,8 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)



5.5 Determinação estrutural de Hs-5

As fração codificada como Hs-5 foi isolada na forma de cristais brancos.

No espectro de infravermelho (Figura 42, p. 115), obtido em pastilhas de KBr, observou-se absorções características de hidroxilas fenólicas devido à presença de uma banda em $3500,80\text{ cm}^{-1}$ referente a OH fenólica que corrobora com o sinal em $1263,37\text{ cm}^{-1}$, característico de estiramento C – O fenólico, e em 3.400 cm^{-1} referente a hidroxila em ponte. As absorções em $1637,56\text{ cm}^{-1}$ e $1610,56\text{ cm}^{-1}$ indicaram a presença de carbonila cetônica e as bandas entre $1517,98 - 1400,00\text{ cm}^{-1}$ sugeriram a natureza aromática da substância. Ainda, uma absorção em $2924,09\text{ cm}^{-1}$ indicou a presença de CH_3 .

O espectro de RMN ^{13}C – APT (50 MHz, CDCl_3) apresentou 21 sinais correspondentes a 32 átomos de carbono (Figura 43, p. 115). Destes nove foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, oito a carbonos metínicos, um a carbono metilênico e dois a carbono de metoxila.

Os sinais em δ_{C} 127,96, 127,75, 115,66, 114,21, 96,68, 95,51, 95,10 e 94,29 foram atribuídos a carbonos de natureza aromática (Figura 44, p. 116). Os sinais em δ_{C} 55,37 δ_{C} 55,70 sugeriram a presença de duas metoxilas na molécula. O deslocamento químico em δ_{C} 196,13, característico de carbonila cetônica conjugada, confirmou a sugestão do espectro de infravermelho e dessa forma, esse conjunto de sinais sugeriu a estrutura tratar-se-ia de um flavonóide. Ao analisar um sinal para um carbono metilênico em δ_{C} 43,05, pode-se propor a estrutura de uma flavanona visto que esse valor indica que não há dupla ligação entre os carbonos C-2 e C-3 do anel C do flavonóide.

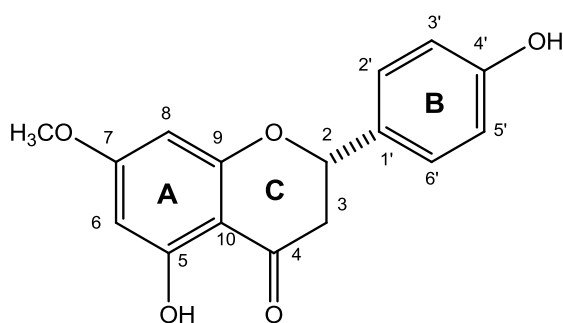
No espectro de RMN ^{13}C pode-se observar que a disposição dos sinais para carbonos aromáticos apresentou-se aos pares. Este fato sugeriu que a fração Hs-5 tratar-se-ia de uma mistura de duas flavanonas.

O espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 45, p. 116) apresentou dois dupletos, em δ_{H} 7,35 ($J = 8,6\text{ Hz}$) e δ_{H} 6,93 ($J = 8,6\text{ Hz}$) atribuídos a hidrogênios aromáticos. A magnitude das constantes de acoplamento sugere relação *orto* entre H-2' e H-6', bem como entre H-3' e H-5', caracterizando um sistema de spins AA'BB' para o anel B de flavonóide substituído no carbono C-4'.

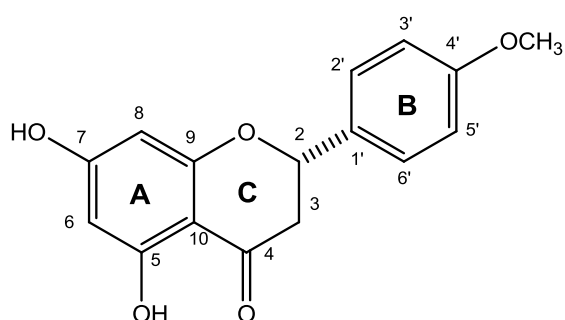
Dois dupletos, em δ_H 6,02 (1H, $J = 2,2$ Hz) e em δ_H 6,05 (1H, $J = 2,2$ Hz), foram atribuídos aos hidrogênios H-8 e H-6, respectivamente, do anel A do flavonóide, com acoplamento *meta* (Figura 46, p. 117).

Os duplos dupletos em δ_H 5,33 (1H, $J = 3,4$; 13,0 Hz), δ_H 3,08 (1H, $J = 12,8$; 17,2 Hz) e δ_H 2,75 (1H, $J = 3,2$; 17,2 Hz) (Figura 47, p. 117) foram característicos de hidrogênios metínicos e metilênicos acoplando *meta*, e de acordo com a literatura (VASCONCELOS et. al., 1998), esses dados se referem aos hidrogênios H-2, H-3a e H-3b, respectivamente, do anel C de uma flavanona, confirmando a sugestão do espectro de RMN de ^{13}C .

Os singletos em δ_H 3,81 e δ_H 3,78 foram atribuídos a duas metoxilas e os simpletos em δ_H 12,81 e δ_H 11,99 foram atribuídos a duas hidroxilas queladas. Comparação com dados da literatura (VASCONCELOS et. al., 1998) indicaram que a fração Hs-5 tratar-se-ia de uma mistura de flavanonas, a sakuranetina e a isosakuranetina. Dessa forma, o sinal em δ_H 3,81 foi atribuído à metoxila substituída na posição 4' do anel B e o sinal em δ_H 12,02 atribuído à hidroxila da posição 5 do anel A da isosakuranetina. O sinal em δ_H 3,78 foi atribuído à metoxila substituída na posição 7 e o sinal em δ_H 11,99 atribuído à hidroxila quelada substituída na posição 5 do anel A da sakuranetina.



Sakuranetina (Hs-5 a)



Isosakuranetina (Hs-5 b)

Ao analisar novamente o espectro de RMN de ^{13}C comparando-o com a literatura (VASCONCELOS et. al., 1998), verificou-se que a inserção da metoxila no C-7 da sakuranetina foi sugerida a partir do sinal em δ_C 168,04 para este carbono quando comparado com a isosakuranetina, em que o deslocamento desse carbono

torna-se mais blindado, em δ_C 164,8 quando há uma hidroxila inserida nele. Dessa forma os sinais em δ_C 96,68 e δ_C 95,51 foram atribuídos aos carbonos C-6 e C-8 da isosakuretina e os sinais em δ 95,10 e δ 94,29 aos carbonos C-6 e C-8 da sakuranetina.

Com base na constante de acoplamento de H-2 ($J = 13,0; 3,4$ Hz), cujos valores remetem a acoplamento axial-axial e axial-equatorial, sugerindo o substituinte em C-2 em posição equatorial (OHMORI et al., 2000).

Os dados de RMN de ^{13}C e 1H e a comparação com os dados da literatura encontram-se dispostos na tabela 9 (p. 113) e permitiram propor que Hs-5a trata-se da sakuranetina e Hs-5b refere-se a isosakuranetina.

Tabela 9 - Deslocamentos químicos e tipos de sinal para Hs-5, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) unidimensionais em CDCl_3 e comparação com os dados de RMN de ^{13}C e ^1H da literatura (VASCONCELOS et. al., 1998)

Sakuranetina			Isosakuranetina		Hs-5	
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
4	196,0	--	196,1	--	196,1	
7	168,0	--	164,9	--	168,0; 164,8	
5	164,2	--	164,3	--	164,2	
9	162,9	--	163,2	--	163,2	
1'	130,5	--	130,3	--	130,2	
10	103,1	--	103,0	--	103,0	
4'	156,1		160,0		156,1; 160,0	
CH						
2'	128,0	7,34 (d, $J = 8,6$ Hz)	127,7	7,38 (d, $J = 8,7$ Hz)	127,9; 127,7	7,35 (d, $J = 8,6$ Hz)
6'	128,0	7,34 (d, $J = 8,6$ Hz)	127,7	7,38 (d, $J = 8,7$ Hz)	127,9; 127,7	7,35 (d, $J = 8,6$ Hz)
3'	115,6	6,89 (d, $J = 8,6$ Hz)	114,2	6,95 (d, $J = 8,7$ Hz)	115,6; 114,2	6,93 (d, $J = 8,6$ Hz)
5'	115,6	6,89 (d, $J = 8,6$ Hz)	114,2	6,95 (d, $J = 8,7$ Hz)	115,6; 114,2	6,93 (d, $J = 8,6$ Hz)

6	95,1	6,08 (d, $J = 2,3$ Hz)	96,7	6,00 (d, $J = 2,3$ Hz)	95,1; 96,7	6,05 (d, $J = 2,2$ Hz)
8	94,2	6,05 (d, $J = 2,3$ Hz)	95,5	5,98 (d, $J = 2,3$ Hz)	94,2; 95,5	6,02 (d, $J = 2,2$ Hz)
2	80,0	5,36 (dd, $J = 3,5; 13,5$ Hz)	78,9	5,36 (dd, $J = 3,1; 13,0$ Hz)	78,95	5,33 (dd, $J = 3,4; 13,0$ Hz)
CH₂						
3a	43,2	3,10 (dd, $J = 13,5; 17,2$ Hz)	43,1	3,10 (dd, $J = 13,0; 17,2$ Hz)	43,05	3,08 (dd, $J = 12,8; 17,2$ Hz)
3b		2,79 (dd, $J = 3,5; 17,2$ Hz)		2,78 (dd, $J = 3,1; 17,2$ Hz)		2,75 (dd, $J = 3,2; 17,2$ Hz)
OCH₃						
	55,7	3,81 (s)	55,4	3,48 (s)	55,7; 55,4	3,78 (s); 3,81 (s)
OH-5						
		12,03 (s)		12,06 (s)		11,99 (s); 12,02 (s)

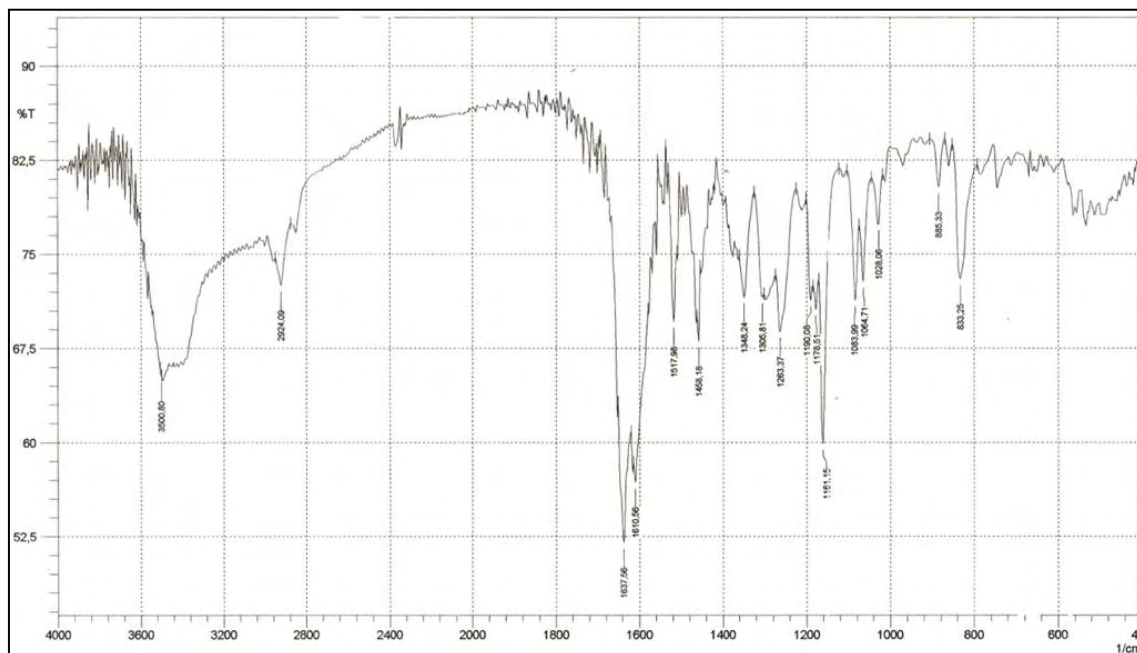
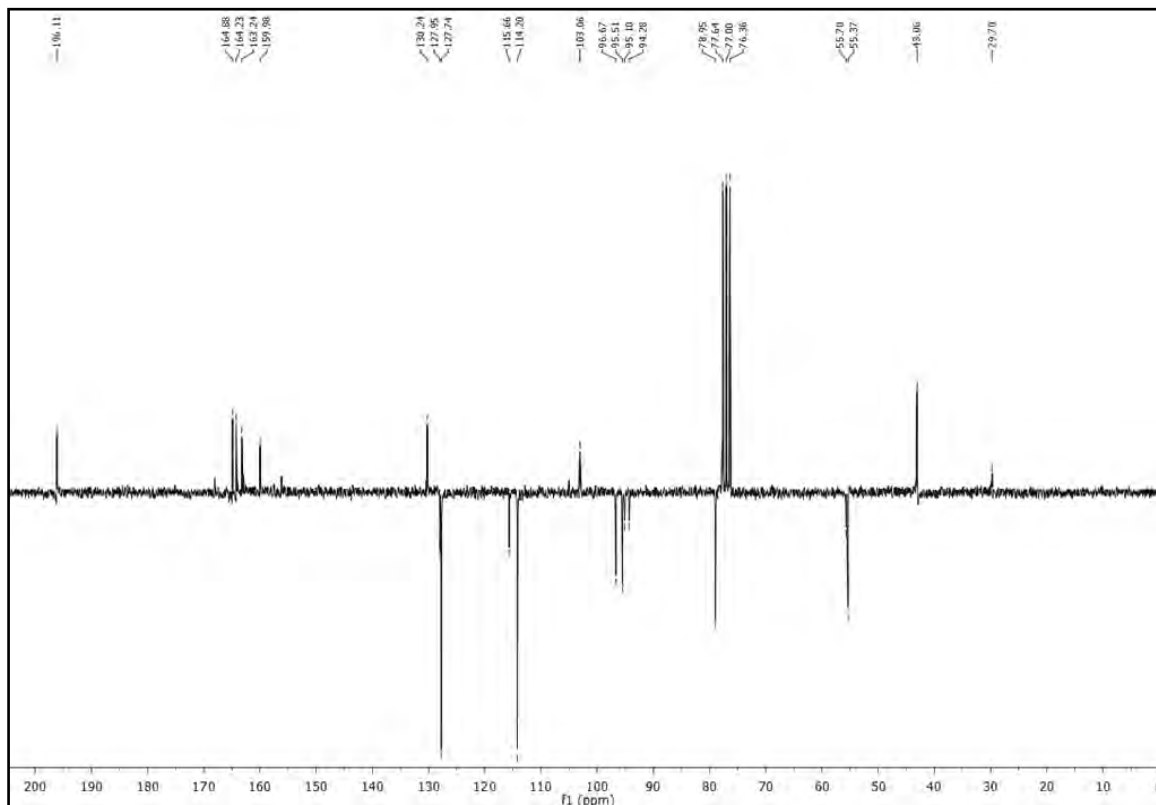
Figura 42 - Espectro na região do Infravermelho de Hs-5 (Pastilha de KBr)**Figura 43** - Espectro de ^{13}C – APT de Dicloro Hs-5 (CDCl_3 , 50 MHz)

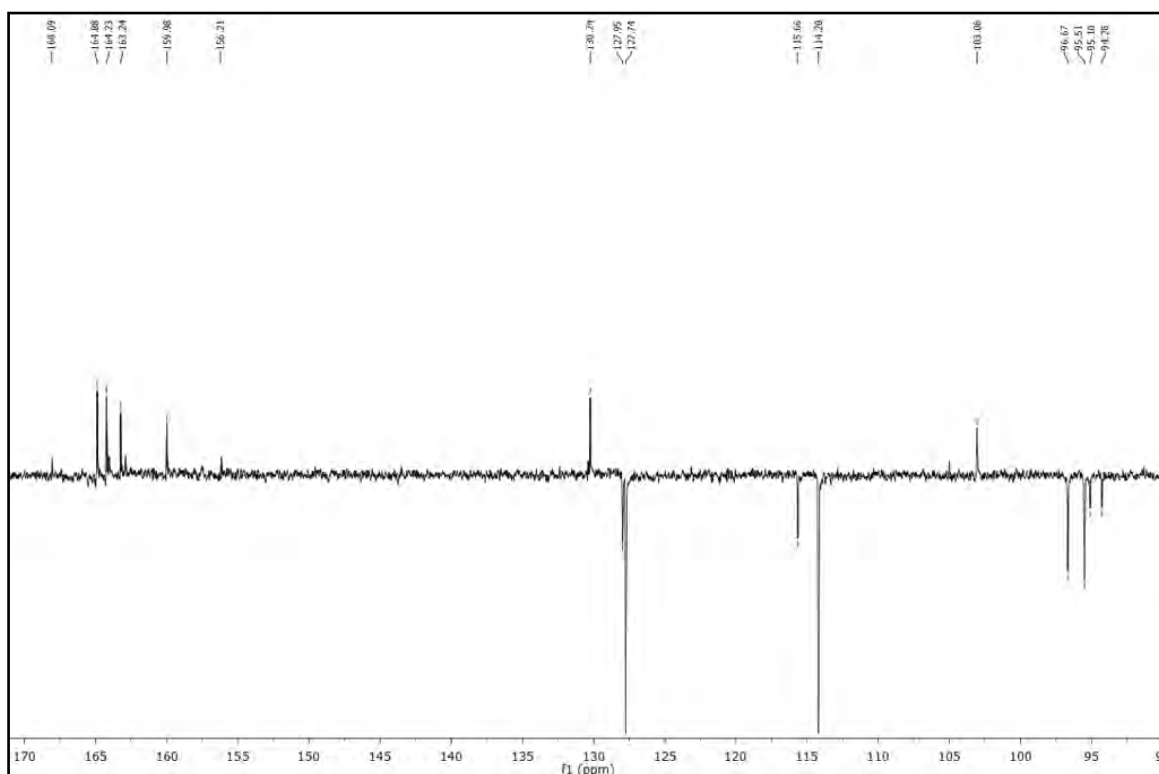
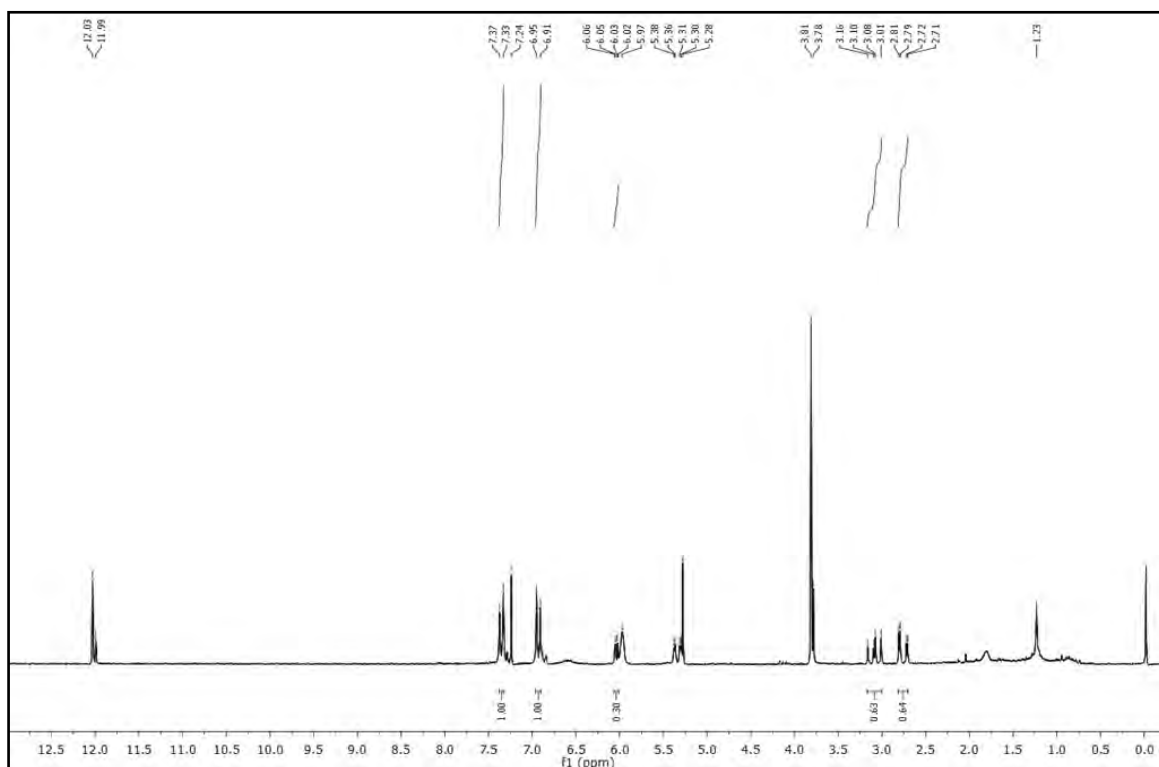
Figura 44 - Expansão do espectro de ^{13}C – APT de Hs-5 na região entre 170 e 90 ppm (CDCl_3 , 50 MHz)**Figura 45** - Espectro de ^1H de Hs-5 (CDCl_3 , 200 MHz)

Figura 46 - Expansão do espectro de ^1H de Hs-5 na região entre 7,5 e 5,2 ppm (CDCl_3 , 200 MHz)

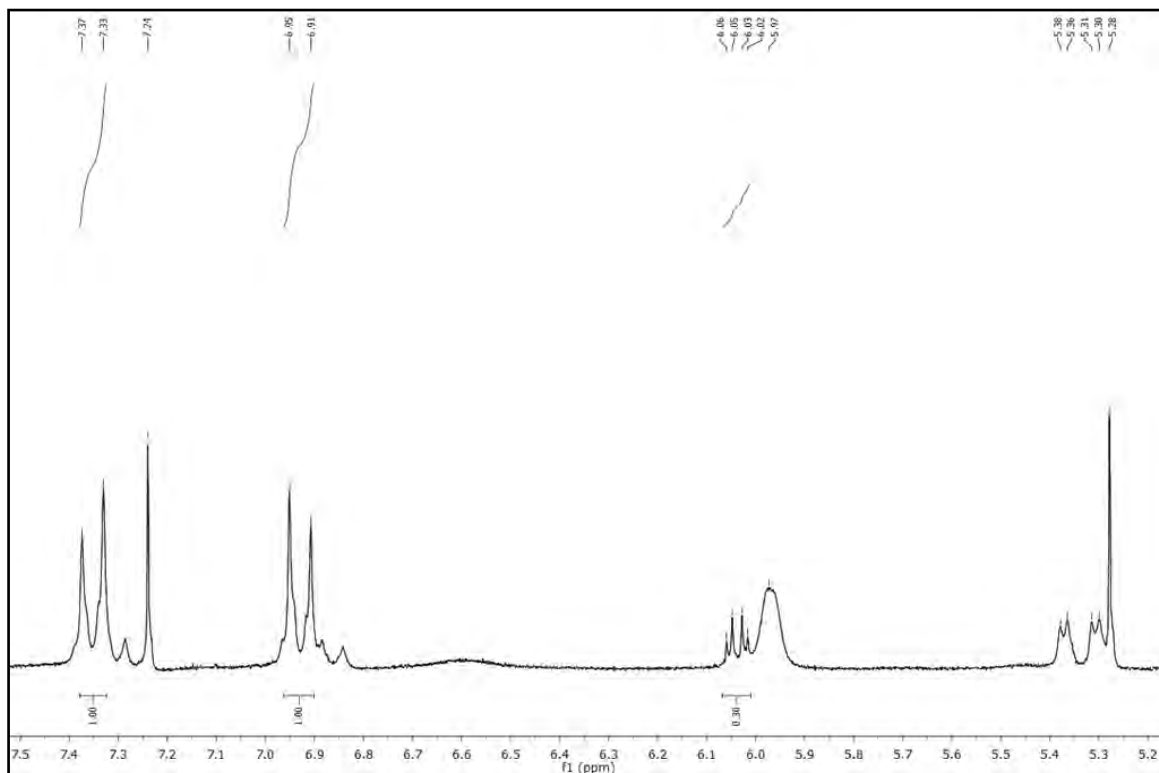
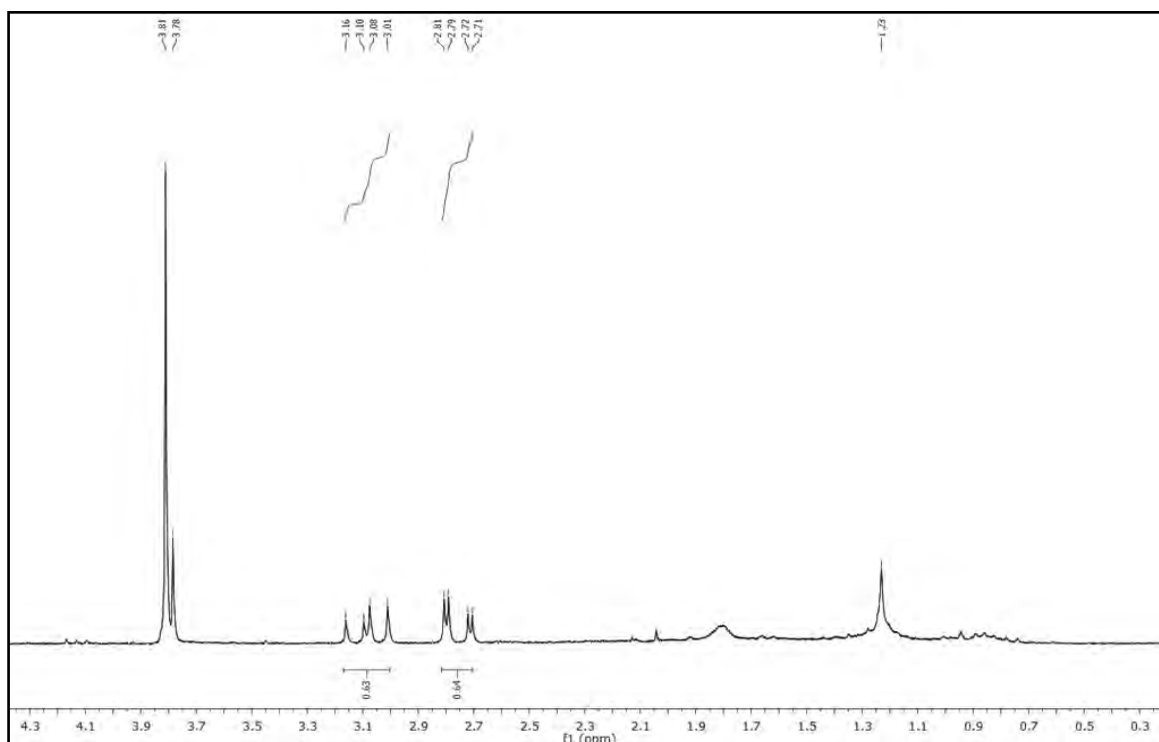


Figura 47 - Expansão do espectro de ^1H de Hs-5 na região entre 4,3 e 0,3 ppm (CDCl_3 , 200 MHz)

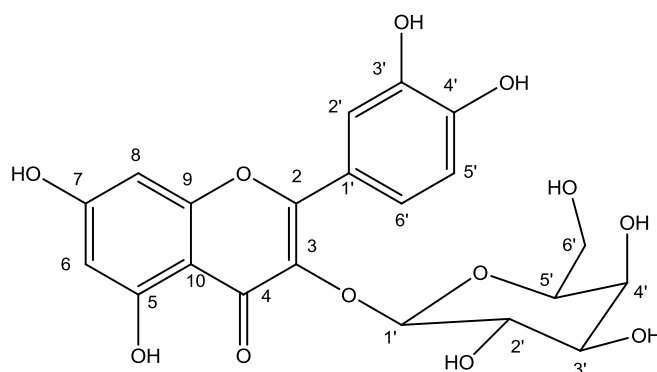


5.6 Determinação Estrutural de Hs-6

A substância codificada como Hs-6 foi isolada na forma de um pó amarelo amorfo com ponto de fusão entre 225 – 226 °C.

O espectro no infravermelho, obtido em pastilhas de KBr (Figura 48, p. 122), observou-se absorções características de hidroxilas fenólicas, devido à presença de uma banda larga de absorção de grande intensidade em 3435,22 cm^{-1} , que corrobora com a absorção em 1203,58 cm^{-1} , característica de estiramento C – O fenólico. A absorção em 1653,00 cm^{-1} indicou a presença de carbonila cetônica e as bandas entre 1606,70 – 1400,00 cm^{-1} indicaram a natureza aromática da substância.

O espectro de ^{13}C RMN – APT (125 MHz, CD_3OD) apresentou 21 sinais correspondentes a 21 átomos de carbono (Figura 49, p. 122). Destes, dez foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, dez a carbonos metínicos e um a carbono metilênico. Os sinais em δ_{C} 166,1, 163,1, 158,8, 158,4, 149,9, 145,8 e 135,8 (Figura 50, p. 123) foram referentes a carbonos aromáticos substituídos e sugeriram esqueleto de flavona para Hs-6. A ausência dos sinais em δ_{C} 104,8, característico do carbono C-3, (STOCHMAL et al., 2001) e δ_{C} 60,3, atribuído a carbono de metoxila (HARNONE, 1994), juntamente com a presença dos sinais em δ_{C} 135,8 e do grupo de sinais característicos de carbonos oximetínicos em δ_{C} 105,4 ppm, 75,1, 77,1, 70,0, 73,2, (Figura 51, p. 123) sugeriram a estrutura de um flavonóide do tipo flavonol sustentado a uma unidade osídica confirmada como sendo a galactose em comparação com dados da literatura (GÜVENALP & DEMIZERER, 2005).



Hiperina

No espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) (Figura 52, p. 124) observou-se dois dupletos em δ_{H} 6,19 (1H, $J = 1,5$ Hz) e δ_{H} 6,39 (1H, $J = 2,0$ Hz) (Figura 53, p. 124) característicos de flavonas oxigenadas nas posições 5 e 7 (HARBONE, 1994). Os dupletos em δ_{H} 7,82 (1H, $J = 2,0$ Hz) e δ_{H} 6,85 (1H, $J = 8,5$ Hz), sugeriram o sistema ABX do anel B da flavona. Ainda, os sinais em δ_{H} 5,14 (1H, d , $J = 8,0$ Hz), δ_{H} 3,80 (1H, m), δ_{H} 3,53 (1H, m), δ_{H} 3,84 (1H, d , $J = 3,84$ Hz), δ_{H} 3,46 p (1H, m) e δ_{H} 3,64 (1H, dd , $J = 11,5$ e $6,5$ Hz) (Figura 54, p. 125) corroboraram com os dados da literatura para uma unidade osídica galactose (GÜVENALP & DEMIZERER, 2005).

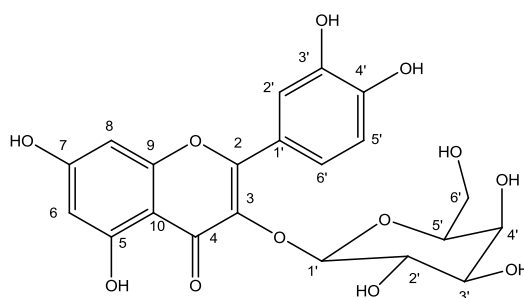
Para o carbono anomérico C-1'' foi indicada uma configuração β mediante o valor da sua constante de acoplamento, $J = 8,0$ Hz (YASUKAWA E TAKIDO, 1987); se o valor dessa constante estivesse em torno de $3,0$ Hz, o carbono anomérico teria configuração α (ROCHA, 1995).

Para confirmação dos dados e da estrutura proposta analisou-se os espectros bidimensionais de correlação heteronuclear (HMQC e HMBC) e homonuclear (COSY e NOESY). Na análise do HMQC (Figura 56, p. 126), observou-se as correlações entre 94,7 ppm (C-8) e 6,39 ppm (H-8), 99,9 ppm (C-6) e 6,20 ppm (H-6), 105,4 ppm (C-1'') e 5,14 ppm (H-1''), 122,9 ppm (C-6') e 7,58 ppm (H-6'), 117,7 ppm (C-2') e 7,82 ppm (H-2').

No espectro HMBC (Figura 57, p. 126), confirmou-se a ligação da galactose ao carbono C-3 do flavonoide através da correlação entre 135,8 ppm (C-3) o hidrogênio anomérico H-1'' (5,14 ppm).

Os demais dados de RMN estão compilados na Tabela 10 (p. 120). Após comparação dos dados espectrais obtidos em com os da literatura (GÜVENALP & DEMIZERER, 2005), foi possível identificar Hs-6 como sendo a Quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo (hiperina), isolada pela primeira vez na espécie.

Tabela 10 - Deslocamentos químicos e tipos de sinal para Hs-6, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) unidimensionais em CD_3OD e comparação com os dados de RMN de ^{13}C e ^1H da literatura (GÜVENALP & DEMIZERER, 2005) (δ em ppm e J em Hz).



Hiperina			Hs-6	
C	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H
2	158,7	--	158,8	--
3	135,2	--	135,8	--
4	178,9	--	179,5	--
5	163,0	--	163,1	--
7	167,2	--	166,1	--
9	158,5	--	158,4	--
10	105,0	--	105,6	--
1'	122,2	--	122,9	--
3'	146,2		145,8	
4'	148,5		149,9	
CH				
6	101,3	6,12 (d, $J = 1,9$ Hz)	99,9	6,20 (d, $J = 1,5$ Hz)
8	95,7	6,30 (d, $J = 1,9$ Hz)	94,7	6,39 (d, $J = 2,0$ Hz)
2'	116,0	7,82 (d, $J = 2,0$ Hz)	117,7	7,82 (d, $J = 2,0$ Hz)
5'	117,6	6,85 (d, $J = 8,5$ Hz)	116,0	6,85 (d, $J = 8,5$ Hz)
6'	122,9	7,57 (dd, $J = 7,5; 2,5$ Hz)	122,9	7,58 (dd, $J = 8,5; 2,5$ Hz)
Gal				
1''	105,8	5,04 (d, $J = 7,6$ Hz)	105,4	5,14 (d, $J = 8,0$ Hz)
2''	73,2	3,82 (m)	73,1	3,80 (m)
3''	75,2	3,54 (m)	75,1	3,53 (m)

4''	70,0	3,85 (d, $J = 2,0$ Hz)	70,0	3,84 (d, $J = 3,0$ Hz)
5''	77,1	3,45 (m)	77,1	3,46 (m)
6''a	61,9	3,58 (dd, $J = 11,0; 7,0$ Hz)	61,9	3,55 (m)
6''b		3,85 (dd, $J = 11,0; 4,0$ Hz)		3,83 (m)

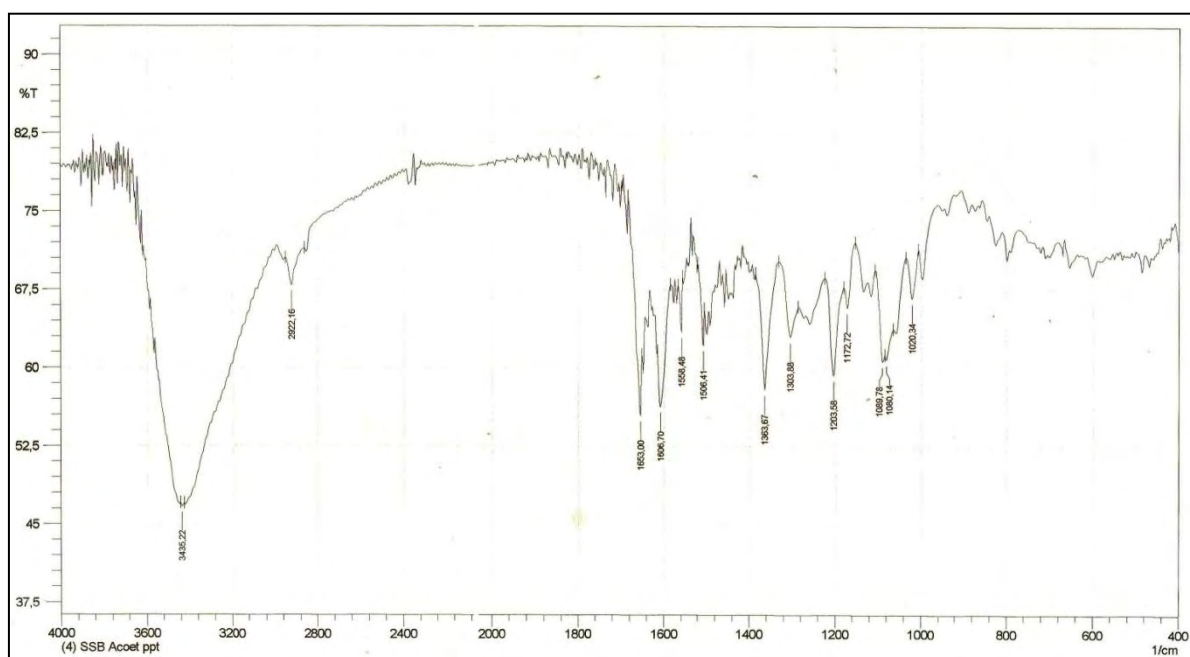
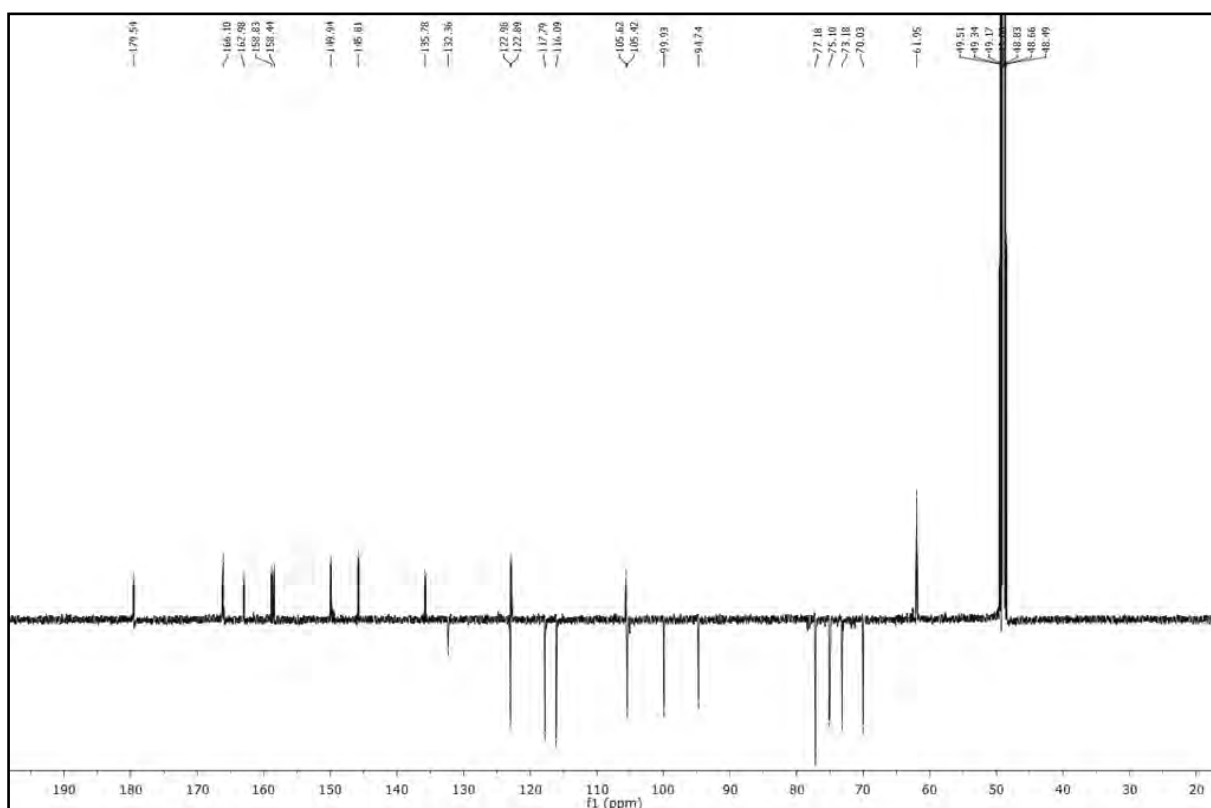
Figura 48 - Espectro na região do Infravermelho de Hs-6 (Pastilha de KBr)**Figura 49** - Espectro de ^{13}C – APT de Hs-6 (CD_3OD , 125 MHz)

Figura 50 - Expansão do espectro de ^{13}C – APT de Hs-6 na região entre 180,0 e 116,0 ppm (CD_3OD , 125 MHz)

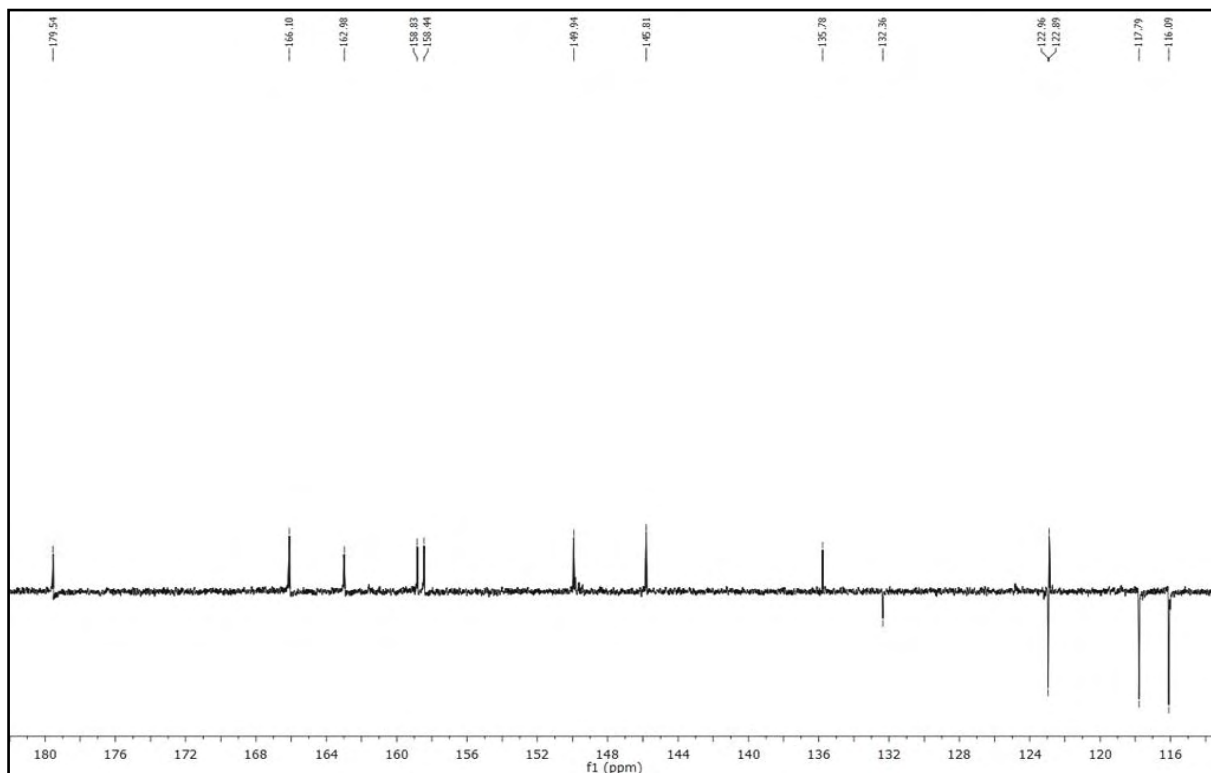


Figura 51 - Expansão do espectro de ^{13}C – APT de Hs-6 na região entre 105,0 e 60,0 ppm (CD_3OD , 125 MHz)

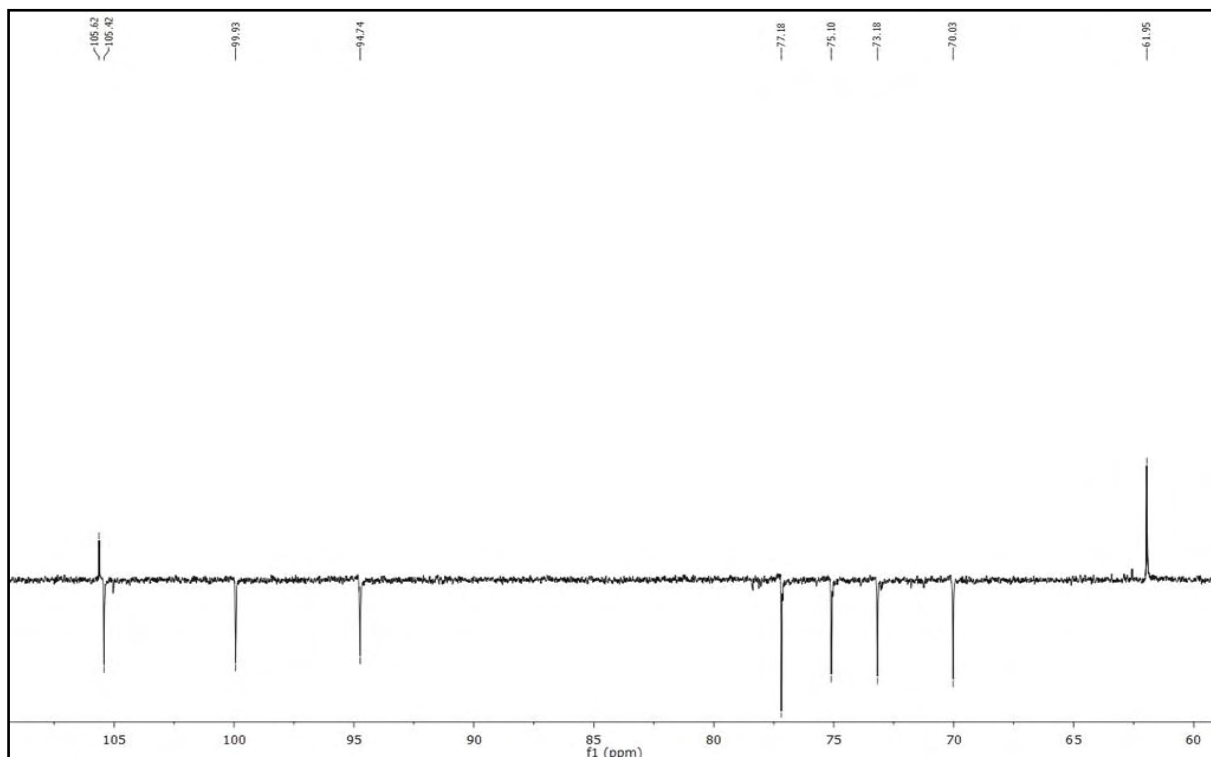


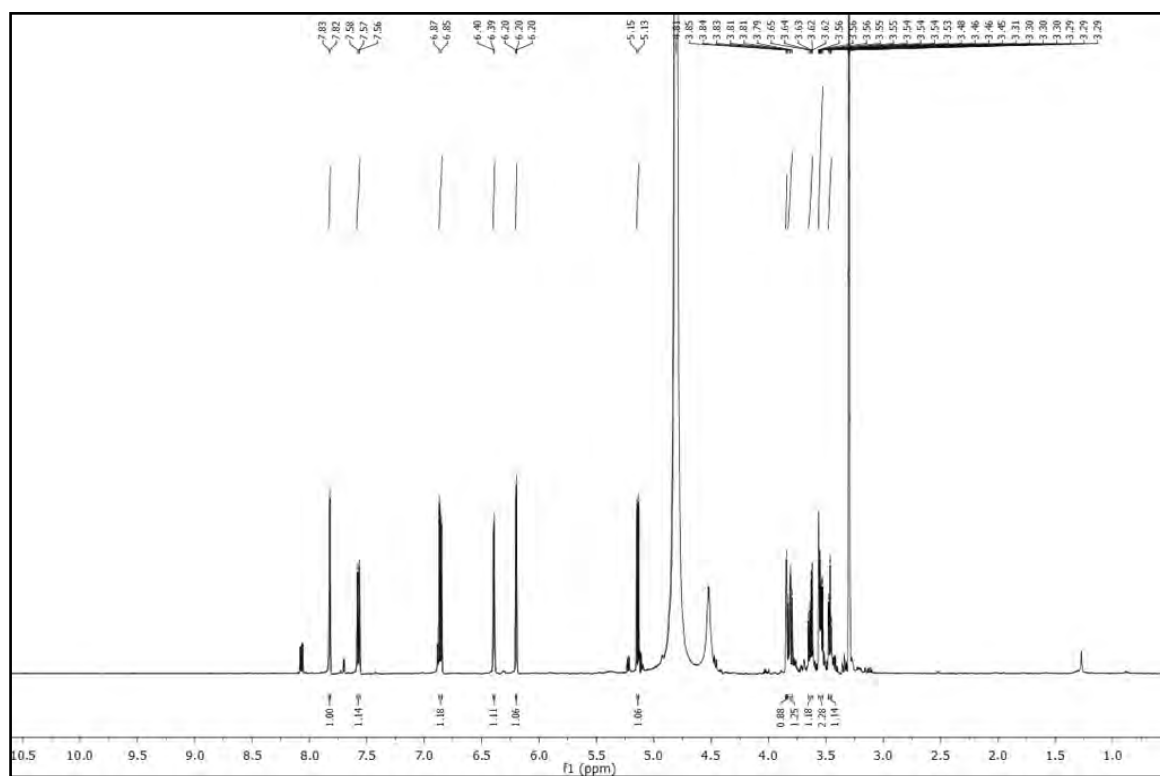
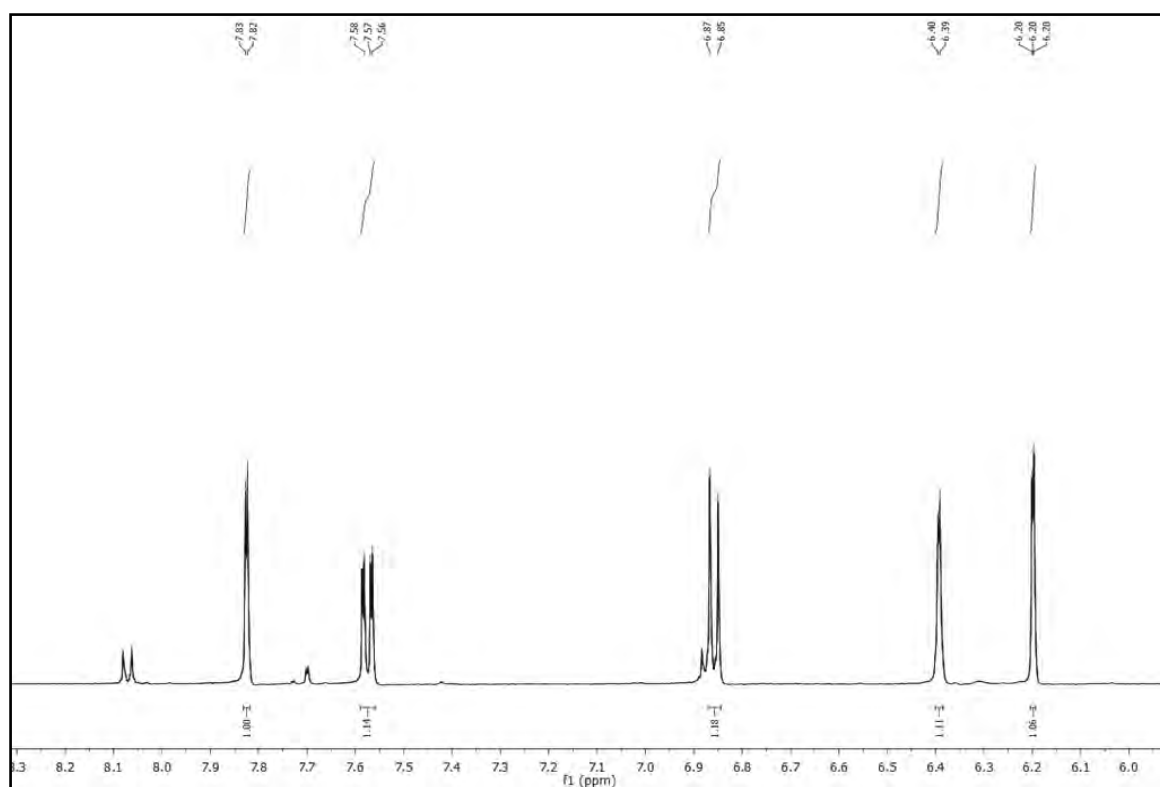
Figura 52- Espectro de ^1H de Hs-6 (CD_3OD , 500 MHz)**Figura 53-** Expansão do espectro de ^1H de Hs-6 na região entre 8,2 e 6,0 ppm (CD_3OD , 500 MHz)

Figura 54- Expansão do espectro de ^1H de Hs-6 na região entre 3,90 e 3,38 ppm (CD_3OD , 500 MHz)

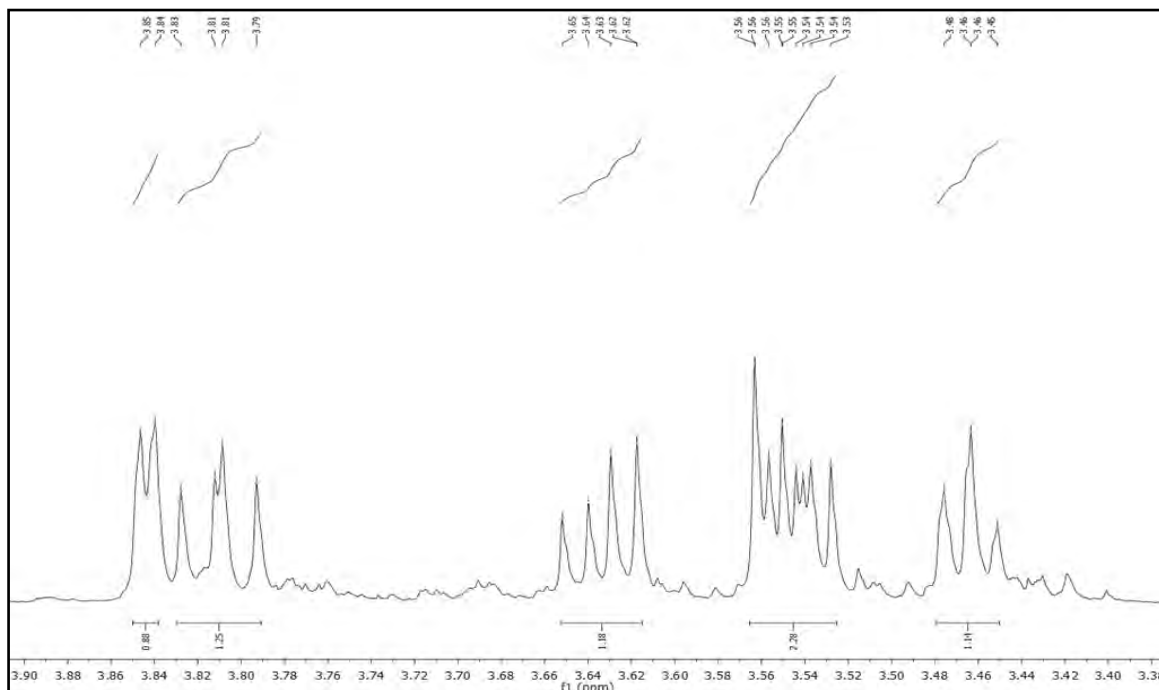


Figura 55 - Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - J_{\text{CH}} - \text{HMQC}$ de Hs-6 (CD_3OD , 500 e 125 MHz)

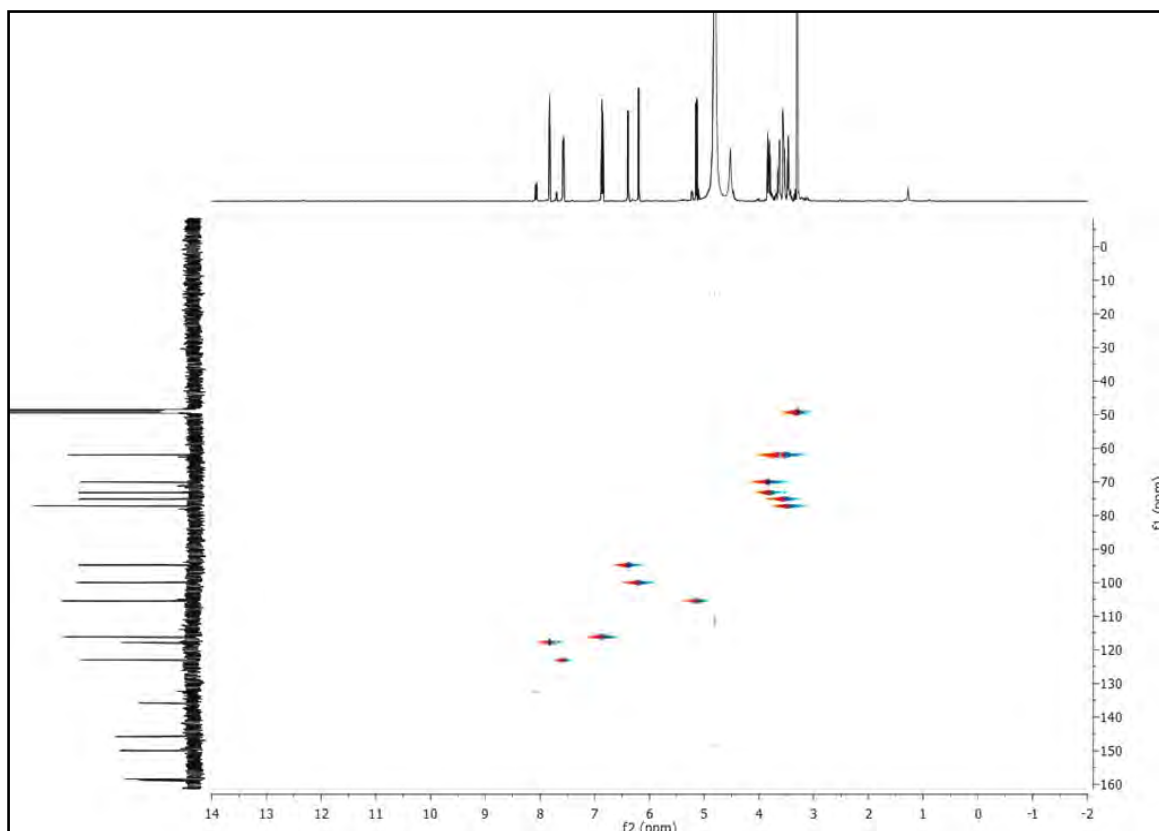


Figura 56- Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - J_{\text{CH}}$ – HMQC Hs-6 (CD_3OD , 500 e 125 MHz)

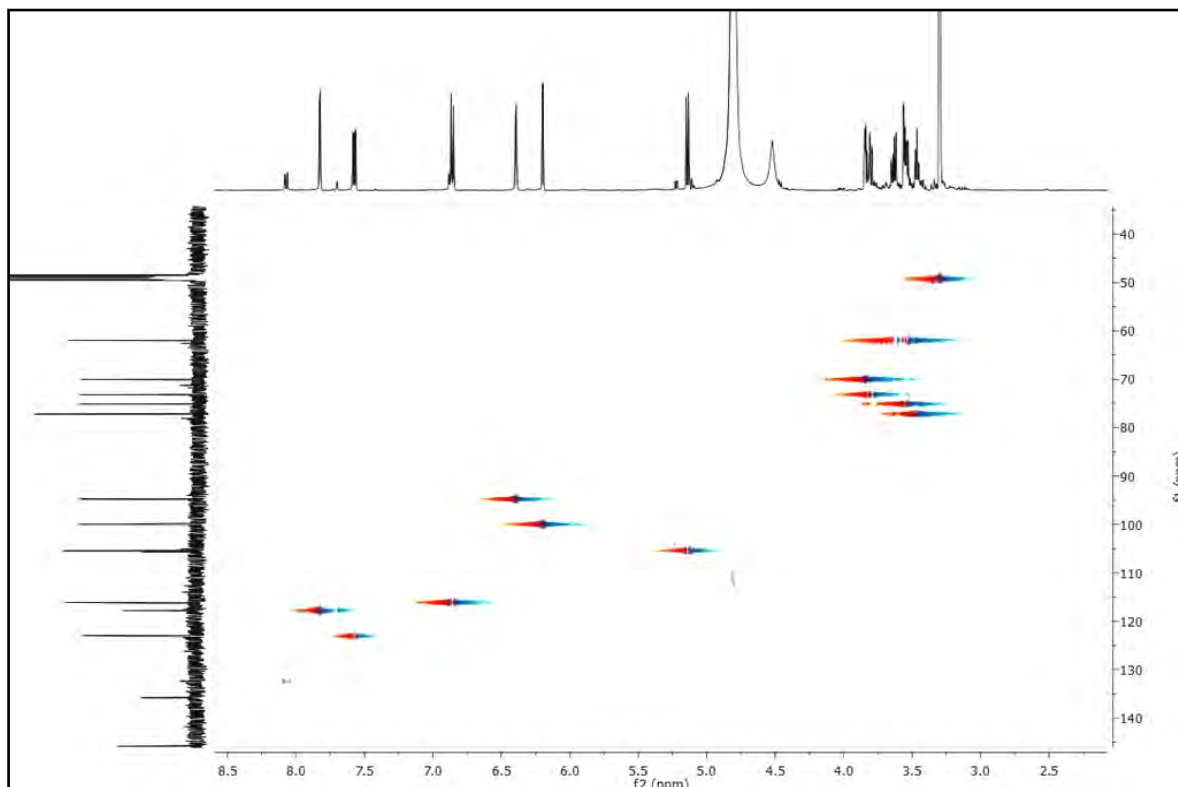


Figura 57- Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - {}^nJ_{\text{CH}}$ ($n = 2$ e 3) – HMBC de Hs-6 (CD_3OD , 500 e 125 MHz)

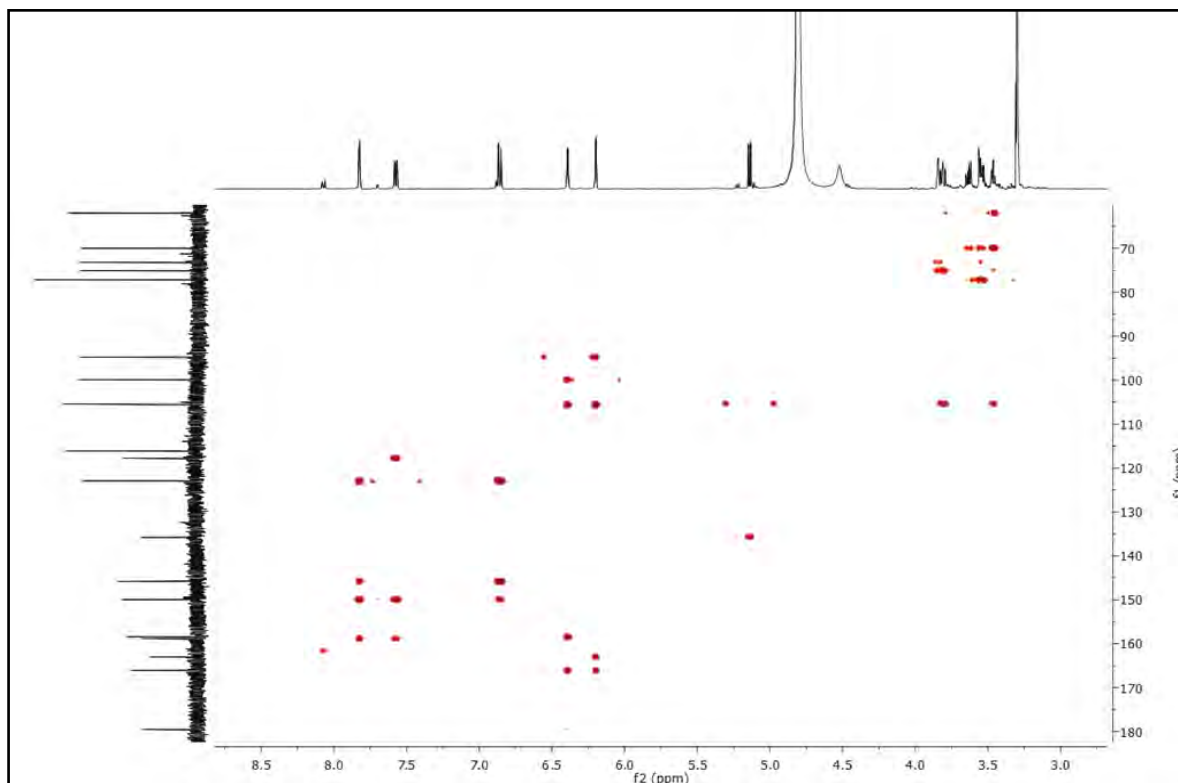
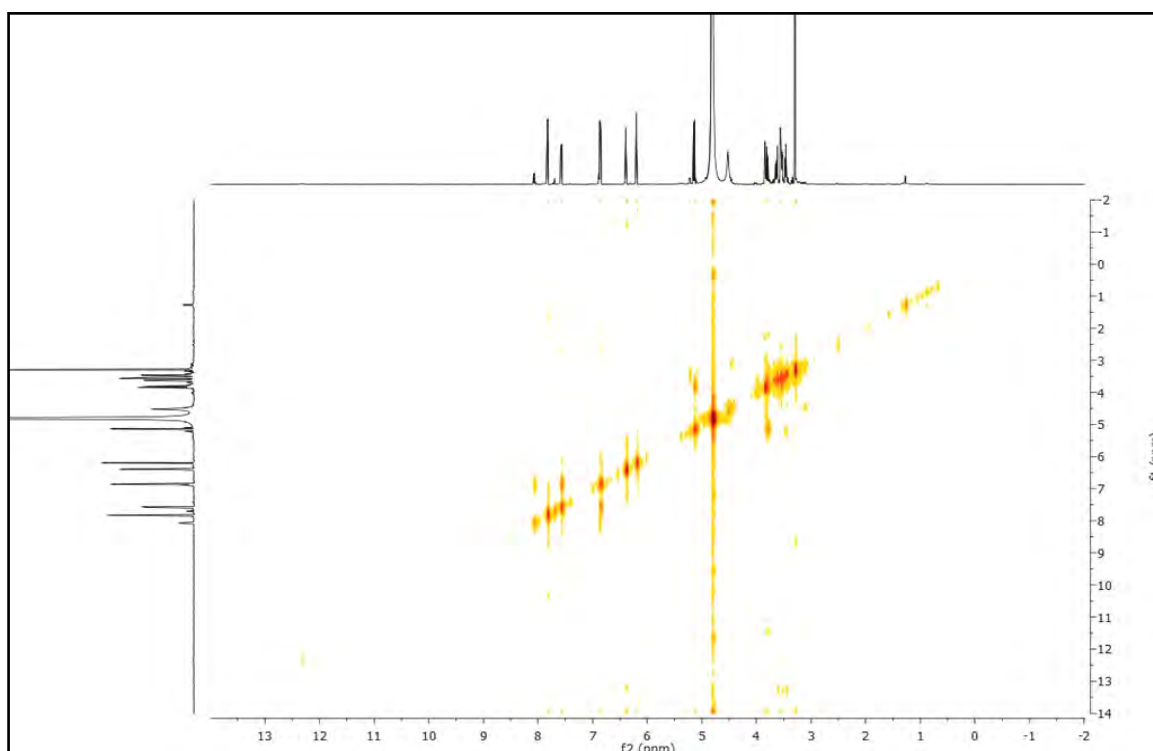
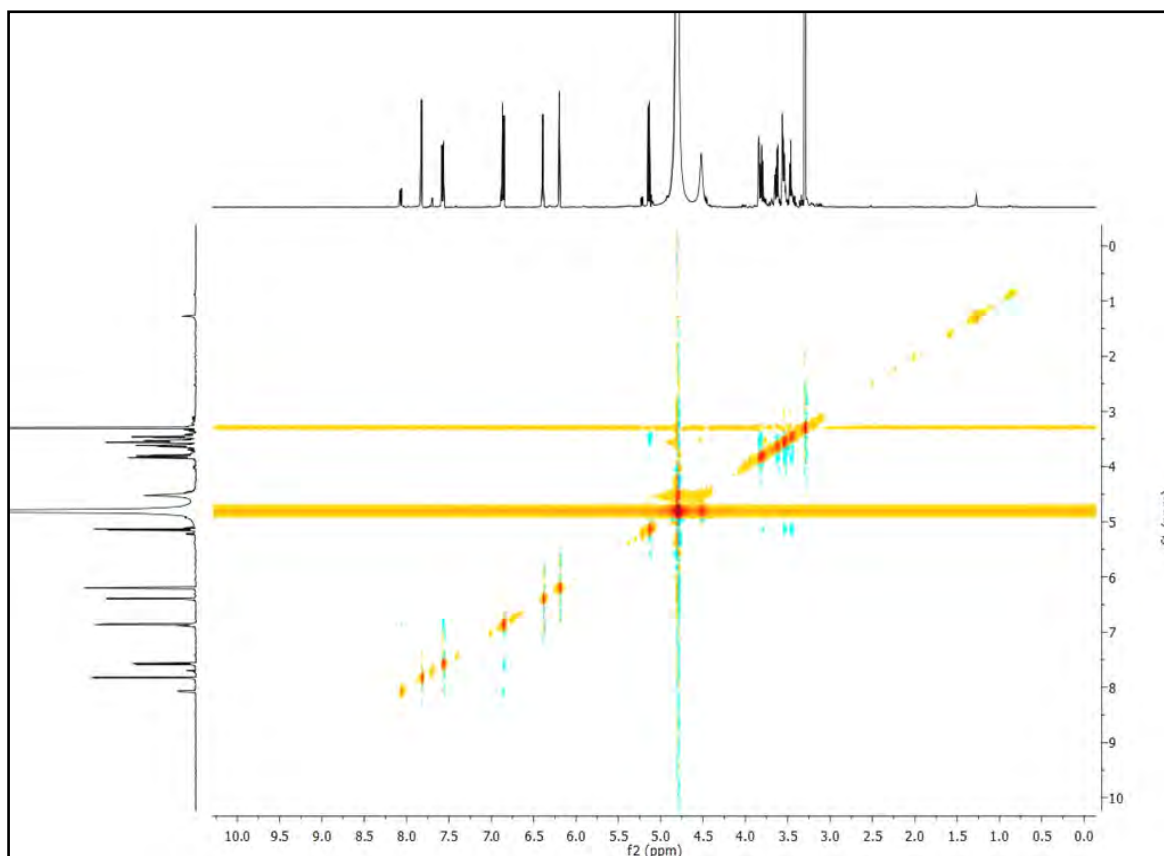


Figura 58 - Espectro de correlações homonuclear – COSY de Hs-6 (CD₃OD, 500 MHz)**Figura 59** - Espectro de correlações homonuclear – NOESY de Hs-6 (CD₃OD, 500 MHz)

5.7 Determinação estrutural de Hs-7

A substância codificada como Hs-7 foi isolada na forma de um sólido amarelo amorfo com ponto de fusão entre 196 – 197 °C.

No espectro de infravermelho obtido em pastilhas de KBr (Figura 60, p. 131) observou-se bandas de absorção em 1718,58 cm^{-1} e 1701,22 cm^{-1} referentes, respectivamente, a estiramento C=O de éster conjugado e de carbonila ácida, bem como bandas entre 1604,77 – 1446,61 cm^{-1} referente a estiramento C=C de sistema aromático. Ainda, observou-se uma larga absorção em 3412,08 cm^{-1} característico de hidroxila fenólica. Esta última corrobora com a absorção em 1284,59 cm^{-1} , referente a estiramento C – O de anel aromático.

O espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) da substância codificada como Hs-7 apresentou 18 sinais correspondentes a 18 átomos de carbono (Figura 61, p. 131). Destes oito foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, nove a carbonos metínicos e um a carbono metilênico. O sinal em δ_{C} 174,48 foi sugestivo de carbono de carboxila e o sinal em δ_{C} 168,46 foi indicativo de carbono de carbonila de éster, corroborando com os dados do espectro de IV. Os sinais em δ_{C} 149,67, 146,74, 146,08, 145,20, 129,24 e 127,59 foram atribuídos a carbonos aromáticos. Os sinais em δ_{C} 123,15, 121,78, 117,53, 116,45, 116,25 e 115,15 (Figura 62, p. 132) foram atribuídos aos carbonos aromáticos não substituídos. Ainda pode-se observar a presença de um sinal em δ_{C} 37,86 referente a carbono metilênico.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD) de Hs-7 apresentou dois grupos de prótons sugestivos de um sistema fenil 1,3,4-trissubstituído, caracterizando um padrão do sistema AMX (Figura 63, p. 132). Os dupletos em δ_{H} 7,54 (1H, *d*, $J = 16$ Hz) e 6,26 (1H, *d*, $J = 16$ Hz) caracterizaram uma ligação *trans* entre prótons olefínicos, devido a magnitude da constante de acoplamento.

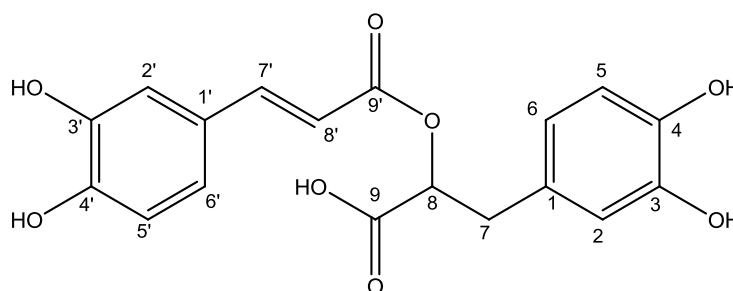
Os sinais em δ_{H} 7,03 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz), δ_{H} 6,77 (1H, *d*, $J = 8$ Hz), δ_{H} 6,94 (1H, *dd*, $J = 8,0$ Hz e $J = 2,0$ Hz), δ_{H} 6,75 (1H, *d*, $J = 2$ Hz), δ_{H} 6,70 (1H, *d*, $J = 8$ Hz) e δ_{H} 6,60 (1H, *dd*, $J = 8$ Hz e $J = 2$ Hz) foram atribuídos a hidrogênios

ligados a carbonos aromáticos e, mediante o valor das constantes de acoplamento, reforçando a sugestão de um sistema AMX (Figura 64, p. 133).

Comparações com dados da literatura (ÖGZEN et al., 2011) sugeriram uma estrutura fenólica do tipo ácido rosmarínico.

O duplo duplete em δ_H 5,18 (1H, *dd*, $J = 8,0$ Hz e $J = 4,0$ Hz) caracteriza o hidrogênio ligado ao carbono metínico C-8 (Figura 65, p. 133). Os sinais em δ_H 3,13 (1H, *dd*, $J = 14$ Hz e $J = 4$ Hz) e δ_H 2,95 (1H, *dd*, $J = 14$ Hz e $J = 8$ Hz), bem como suas constantes para acoplamentos geminais, são característicos dos hidrogênios metilênicos H-7a e H-7b, respectivamente, do ácido rosmarínico. Observou-se ainda, que os sinais que caracterizaram a ligação *trans* corroboraram com o assinalamento da literatura para essa estrutura.

A partir da análise dos dados espectrais de 1H e ^{13}C , juntamente com comparação com dados da literatura (ÖGZEN et al., 2011), identificou-se a substância Hs-7 como sendo o ácido rosmarínico, isolado pela primeira vez no gênero *Hyperia*, e dessa forma, confirmando sua importância quimiotaxonômica para o família Lamiaceae.



ácido rosmarínico

Tabela 11 -Deslocamentos químicos e tipos de sinal para Hs-7, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente) unidimensionais em CD_3OD e comparação com os dados de RMN de ^{13}C e ^1H da literatura (CD_3OD) (ÖGZEN et al., 2011) (δ em ppm e J em Hz).

Ácido Rosmarínico			Hs-7	
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	129,7	--	129,2	--
3	144,8	--	146,0	--
4	143,7	--	145,2	--
9	175,9	--	174,4	--
1'	126,8	--	127,5	--
3'	145,6	--	146,7	--
4'	148,2	--	149,6	--
9'	167,8	--	168,4	--
CH				
2	116,3	6,75 (d, $J = 1,8$ Hz)	117,5	6,75 (d, $J = 2,0$ Hz)
5	115,0	6,67 (d, $J = 8,1$ Hz)	116,2	6,70 (d, $J = 8,0$ Hz)
6	120,6	6,62 (dd, $J = 8,1; 1,8$ Hz)	121,7	6,60 (dd, $J = 8,0; 2,0$ Hz)
8	76,0	5,10 (dd, $J = 9,4; 3,6$ Hz)	74,6	5,18 (dd, $J = 8,0; 4,0$ Hz)
7'	145,5	7,50 (d, $J = 16,0$ Hz)	147,6	7,54 (d, $J = 16,0$ Hz)
8'	113,9	6,26 (d, $J = 16,0$ Hz)	114,3	6,26 (d, $J = 16,0$ Hz)
2'	114,3	7,02 (d, $J = 2,2$ Hz)	115,1	7,03 (d, $J = 2,0$ Hz)
5'	115,3	6,76 (d, $J = 8,1$ Hz)	116,4	6,77 (d, $J = 8,0$ Hz)
6'	121,8	6,92 (dd, $J = 8,1; 2,2$ Hz)	123,1	6,94 (dd, $J = 8,0; 2,0$ Hz)
CH₂				
7	37,5	3,09 (dd, H-7a, $J = 14,3; 3,6$ Hz)	37,8	3,13 (dd, H-7a, $J = 14,0; 4,0$ Hz)
		2,94 (dd, H-7b, $J = 14,3; 9,4$ Hz)		2,95 (dd, H-7b, $J = 14,0; 8,0$ Hz)

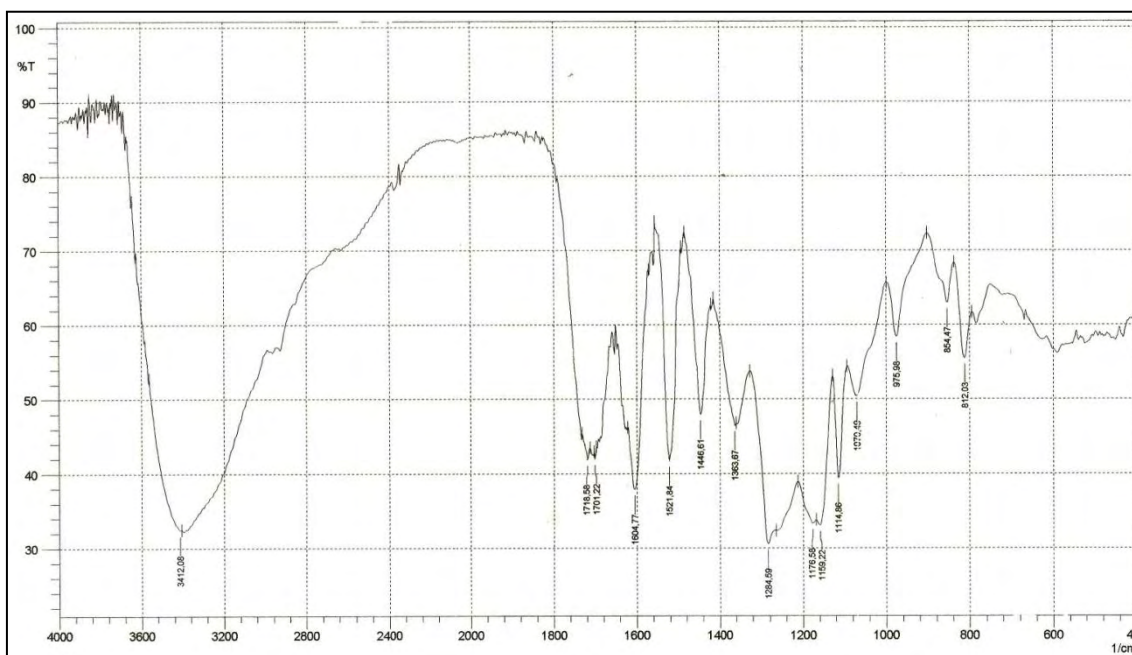
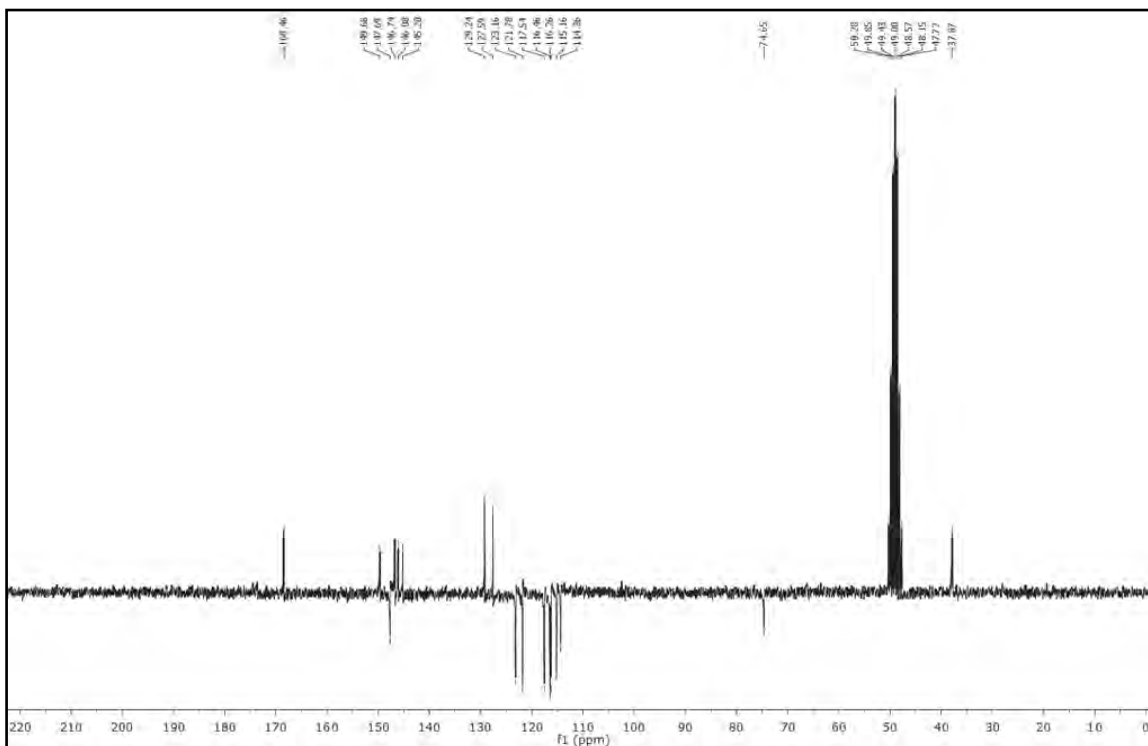
Figura 60 - Espectro na região do Infravermelho de Hs-7 (Pastilha de KBr)**Figura 61** - Espectro de RMN de ^{13}C – APT de Hs-7 (CD_3OD , 50 MHz)

Figura 62 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – APT de Hs-7 na região entre 155,0 e 65,0 ppm (CD_3OD , 50 MHz)

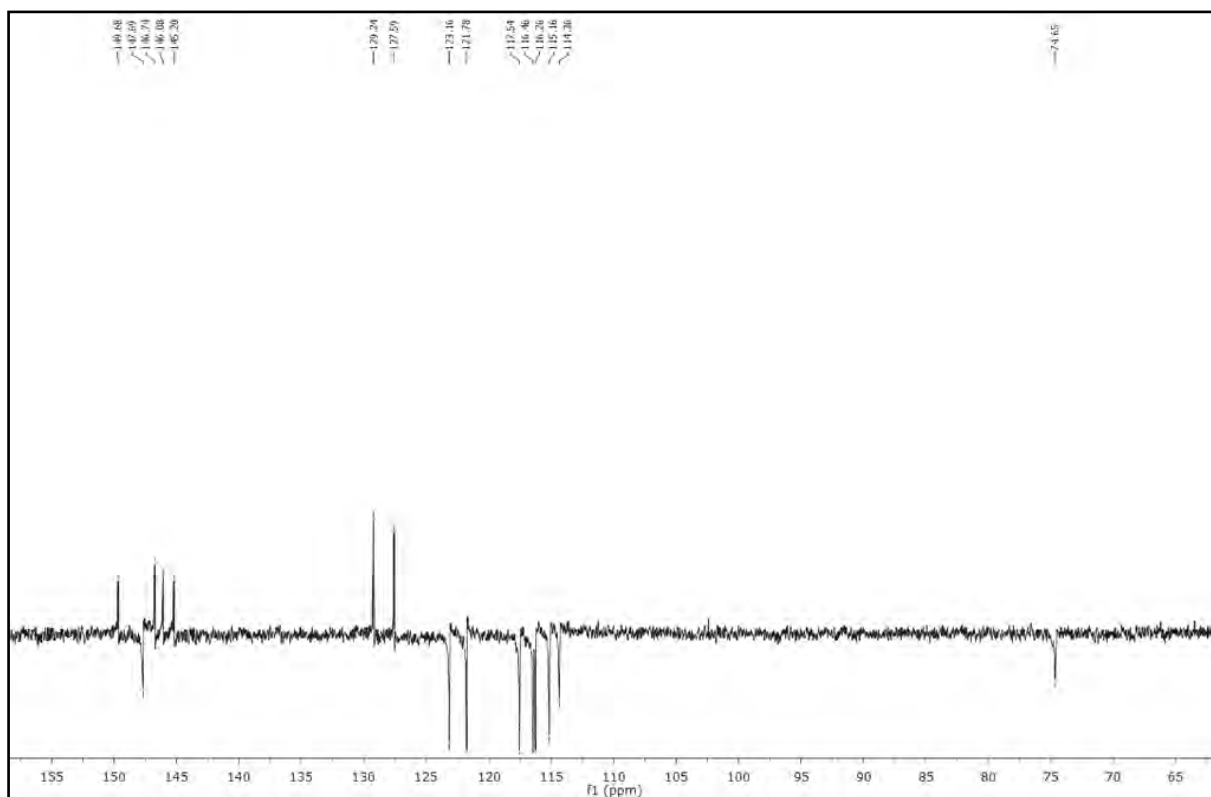


Figura 63 - Espectro de RMN de ^1H de Hs-7 (CD_3OD , 200 MHz)

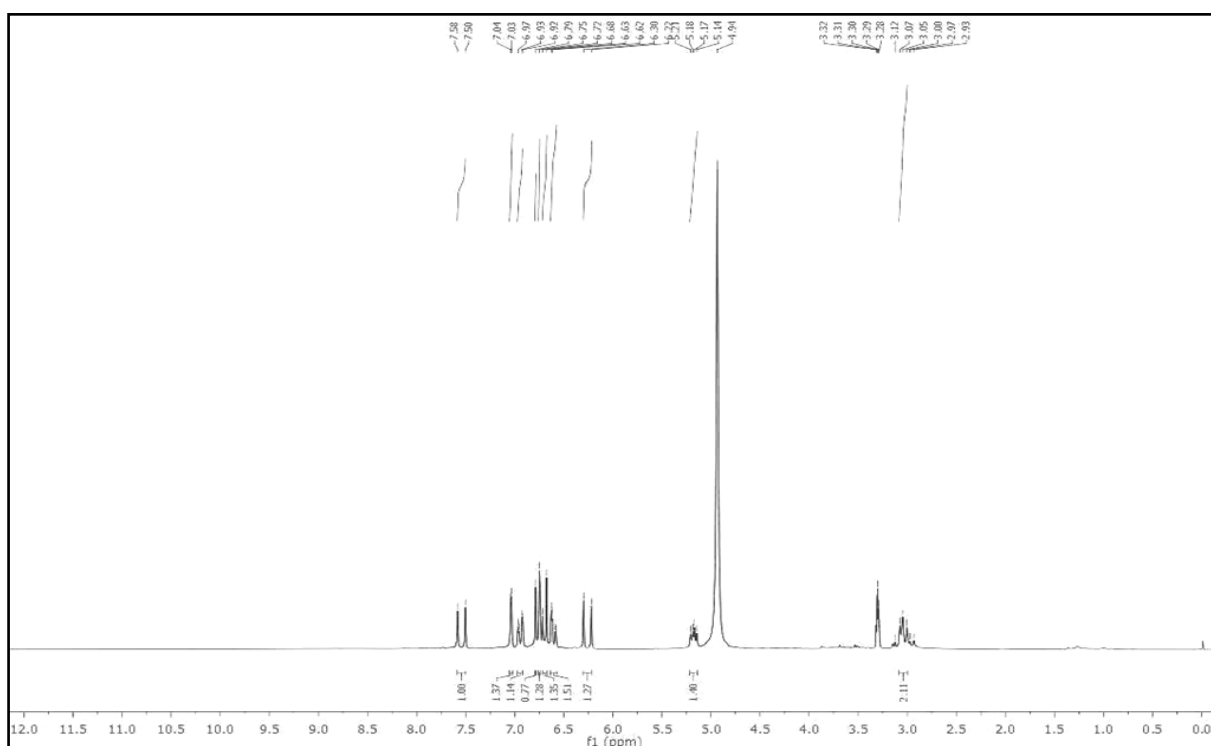


Figura 64 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-7 na região entre 7,8 e 6,2 ppm (CD_3OD , 200 MHz)

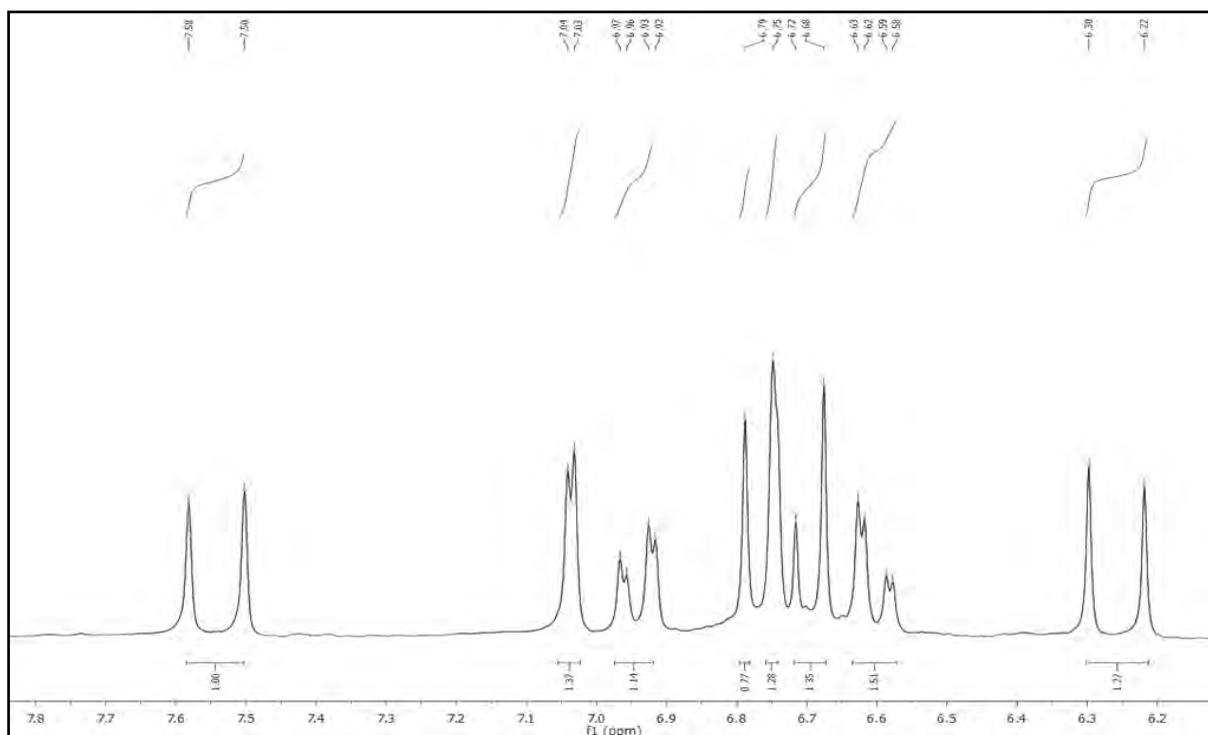
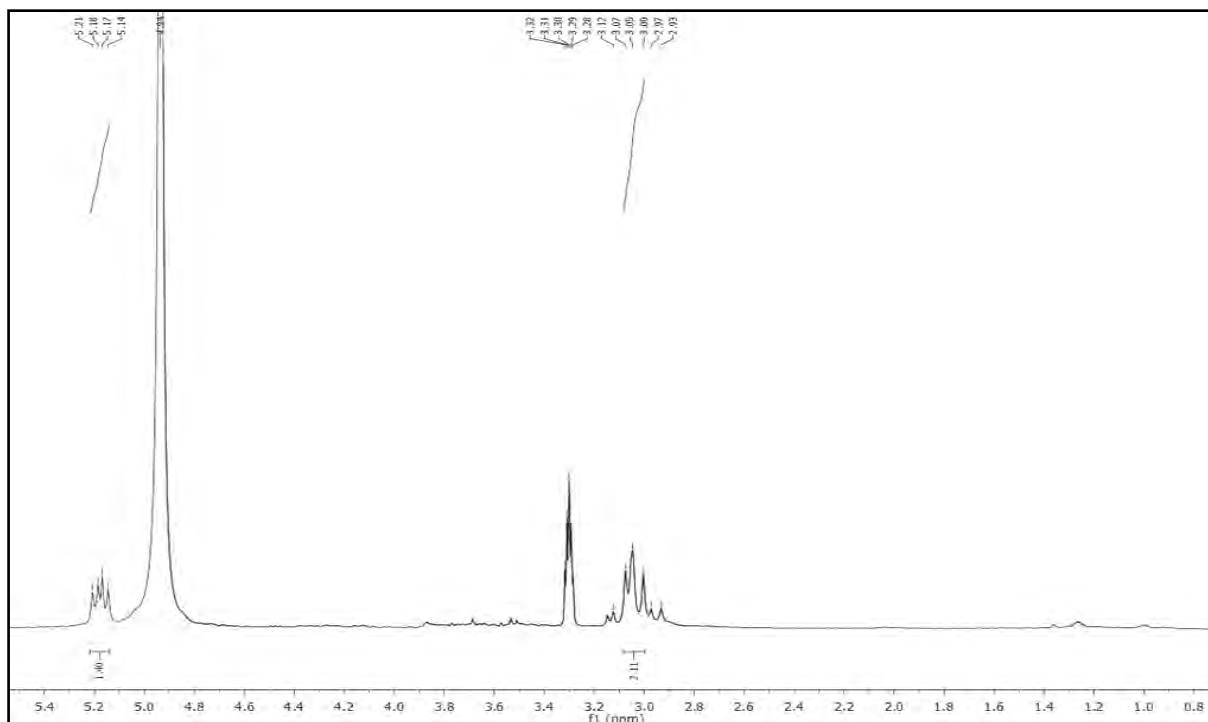


Figura 65 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-7 na região entre 5,4 e 0,8 ppm (CD_3OD , 200 MHz)



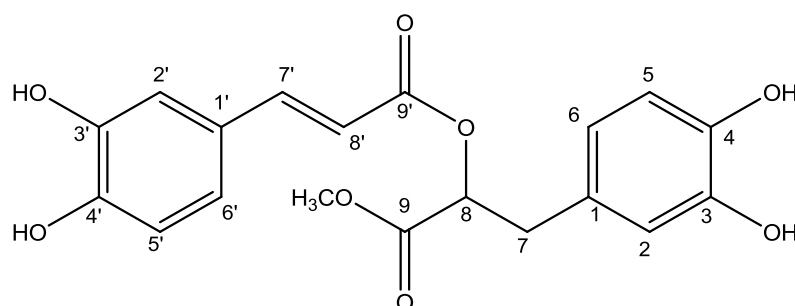
5.8 Determinação estrutural de Hs-8

A substância codificada como Hs-8 foi isolada na forma de um sólido marrom amorfo.

No espectro de infravermelho obtido em pastilhas de KBr (Figura 66, p. 136) observou-se uma absorção em $1734,01\text{ cm}^{-1}$ referente a estiramento C=O de éster conjugado e absorções entre $1627,92 - 1444,68\text{ cm}^{-1}$ referente a C=C de sistema aromático. Observou-se ainda uma banda larga de absorção em $3396,64\text{ cm}^{-1}$ característico de hidroxila fenólica, que corrobora com a absorção em $1284,59\text{ cm}^{-1}$, referente a estiramento C – O de anel aromático. Foi possível observar uma absorção em $2954,95$ indicativa de grupo CH_3 .

O espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) da substância codificada como Hs-8 apresentou 19 sinais correspondentes a 19 átomos de carbono (Figura 67, p. 136). Destes oito foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, nove a carbonos metínicos, um a carbono metilênico e um a carbono de metoxila.

A comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H , e ^{13}C do ácido rosmarínico (Hs-7) com a substância Hs-8 revelaram que ambos compostos eram muito semelhantes, exceto pelo sinal em δ_{C} 52,8 (Figura 70, p. 138) e o singlete em δ_{H} 3,68 (Figura 73, p. 139) que foram atribuídos a uma metoxila. Ainda, efeito de proteção para o carbono 9 em δ_{C} 172,1, que para Hs-7 foi de δ_{C} 174,4. Com base na análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação dos os dados com a literatura (WOO & PIAO, 2004), o composto Hs-8 foi identificado como o rosmarinato de etila, isolado pela primeira vez no gênero *Hypernia*.



rosmarinato de metila

Tabela 12 - Deslocamentos químicos e tipos de sinal para Hs-8, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente) unidimensionais em CD_3OD e comparação com os dados de RMN de ^{13}C e ^1H da literatura (CD_3OD)(Woo & Piao, 2004) (δ em ppm e J em Hz).

Rosmarinato de Metila			Hs-8	
C	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	128,8	--	128,7	--
3	146,3	--	146,1	--
4	145,5	--	145,3	--
9	172,3	--	172,1	--
1'	127,6	--	127,5	--
3'	147,0	--	146,7	--
4'	150,1	--	149,7	--
9'	168,5	--	168,5	--
CH				
2	117,6	6,70 (d, $J = 2,0$ Hz)	117,5	6,69 (d, $J = 2,0$ Hz)
5	116,4	6,69 (d, $J = 8,0$ Hz)	116,3	6,65 (d, $J = 8,0$ Hz)
6	121,9	6,57 (dd, $J = 8,0; 2,0$ Hz)	121,8	6,55 (dd, $J = 8,0; 2,0$ Hz)
8	74,8	5,19 (dd, $J = 7,5; 5,0$ Hz)	74,6	5,17 (dd, $J = 8,0; 6,0$ Hz)
7'	148,1	7,55 (d, $J = 15,5$ Hz)	147,9	7,54 (d, $J = 16,0$ Hz)
8'	114,2	6,26 (d, $J = 15,5$ Hz)	114,1	6,25 (d, $J = 16,0$ Hz)
2'	115,3	7,04 (d, $J = 2,0$ Hz)	115,2	7,03 (d, $J = 2,0$ Hz)
5'	116,6	6,78 (d, $J = 8,5$ Hz)	116,5	6,76 (d, $J = 8,0$ Hz)
6'	123,3	6,95 (dd, $J = 8,5; 2,0$ Hz)	123,1	6,94 (dd, $J = 8,0; 2,0$ Hz)
CH₂				
7	38,0	3,06 (dd, H-7a, $J = 14,5; 5,5$ Hz) 3,00 (dd, H-7b, $J = 14,5; 5,5$ Hz)	37,8	2,81 (dd, H-7b, $J = 12,0; 6,0$ Hz)
OCH₃				
	52,8	3,70 (s)	52,6	3,68 (s)

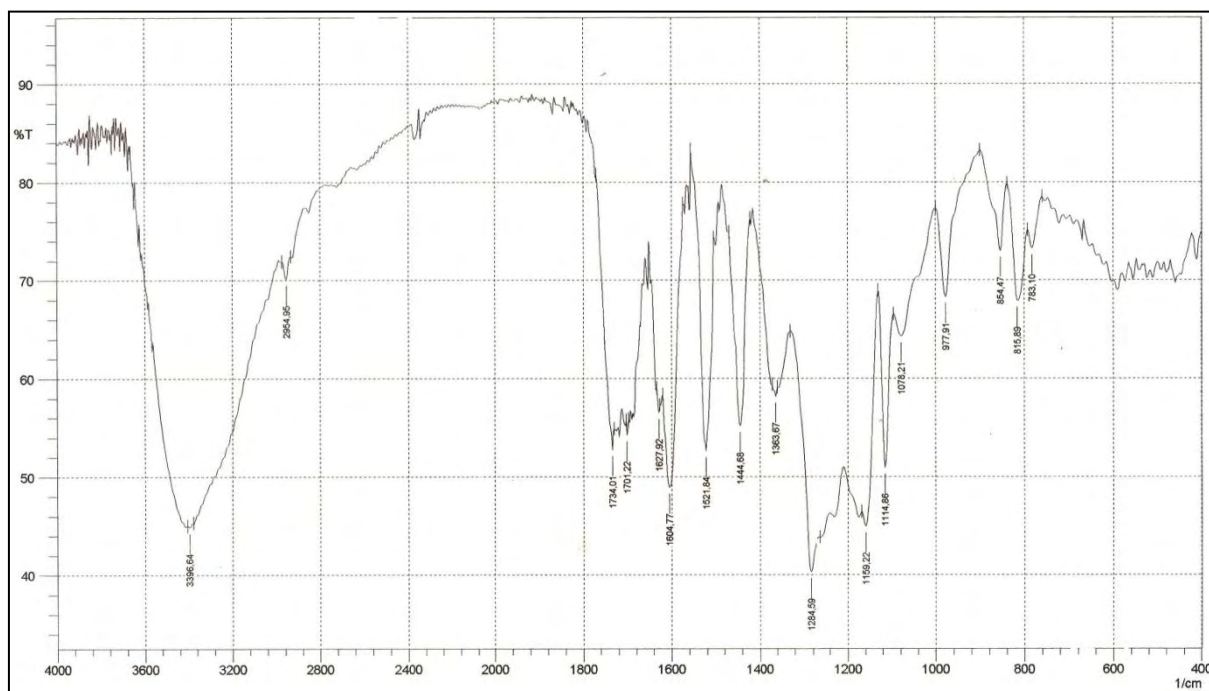
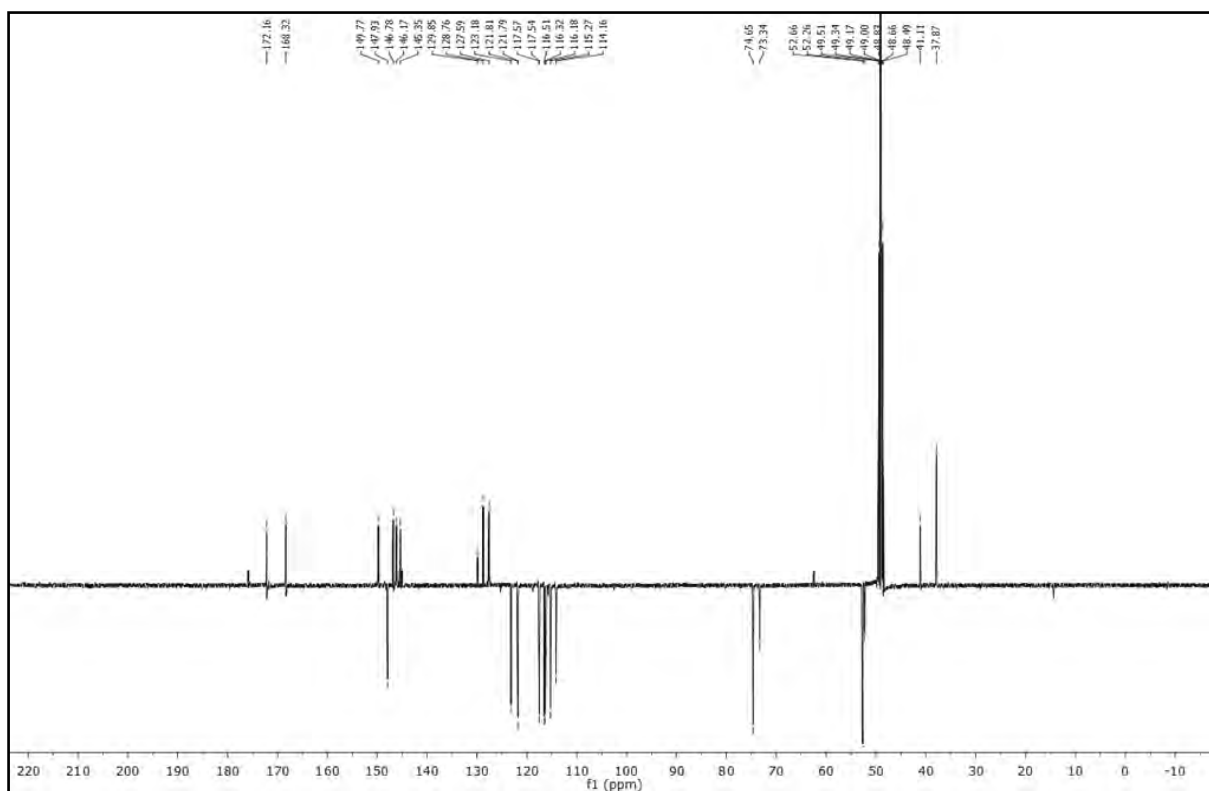
Figura 66 – Espectro na região do Infravermelho de Hs-8 (Pastilha de KBr)**Figura 67** - Espectro de RMN de ^{13}C – APT de Hs-8 (CD_3OD , 50 MHz)

Figura 68 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – APT de Hs-8 na região entre 178,0 e 126,0 ppm (CD_3OD , 50 MHz)

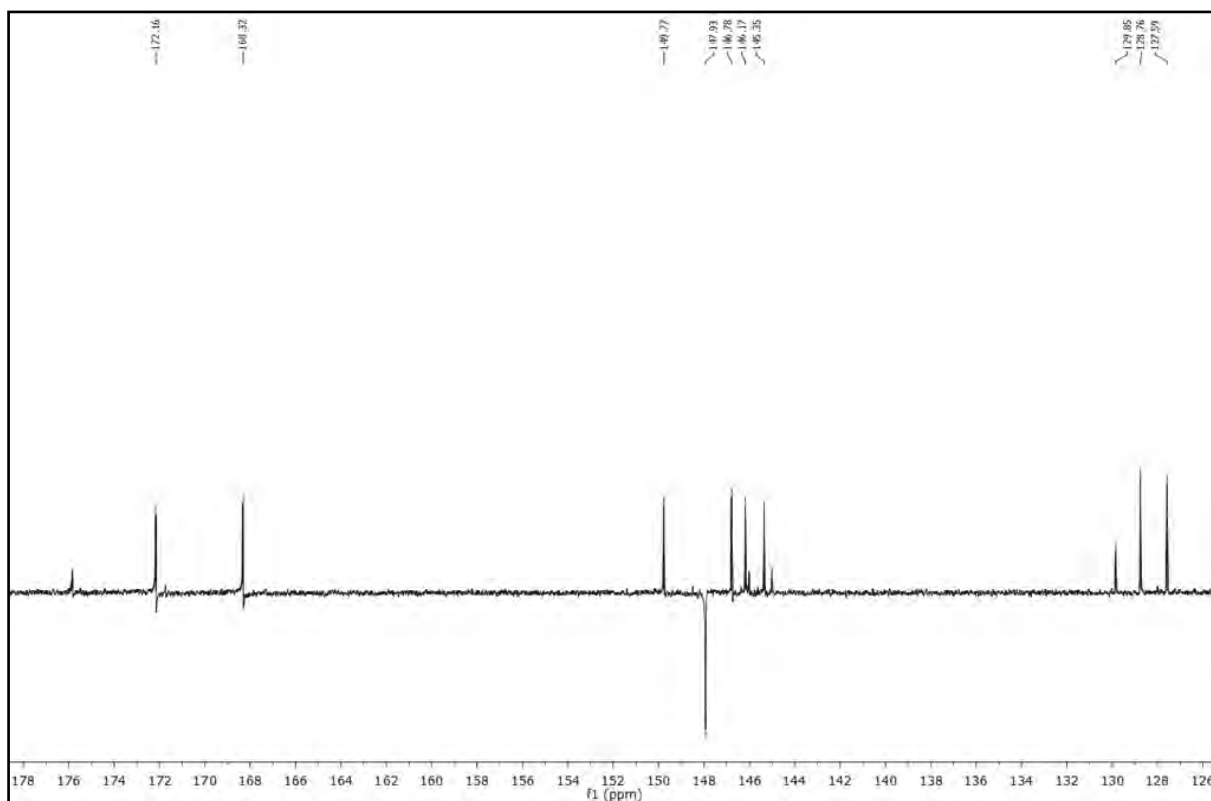


Figura 69 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – APT de Hs-8 na região entre 130,0 e 72,0 ppm (CD_3OD , 50 MHz)

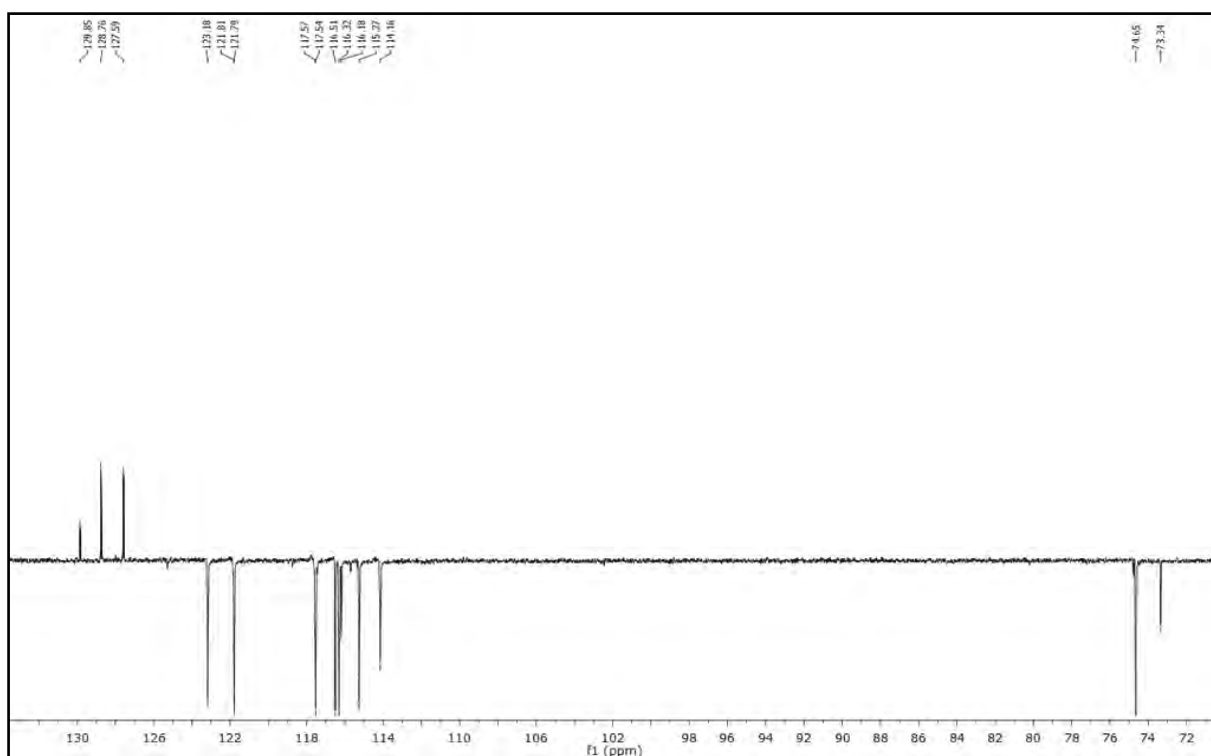


Figura 70 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – APT de Hs-8 na região entre 80,0 e 30,0 ppm (CD_3OD , 50 MHz)

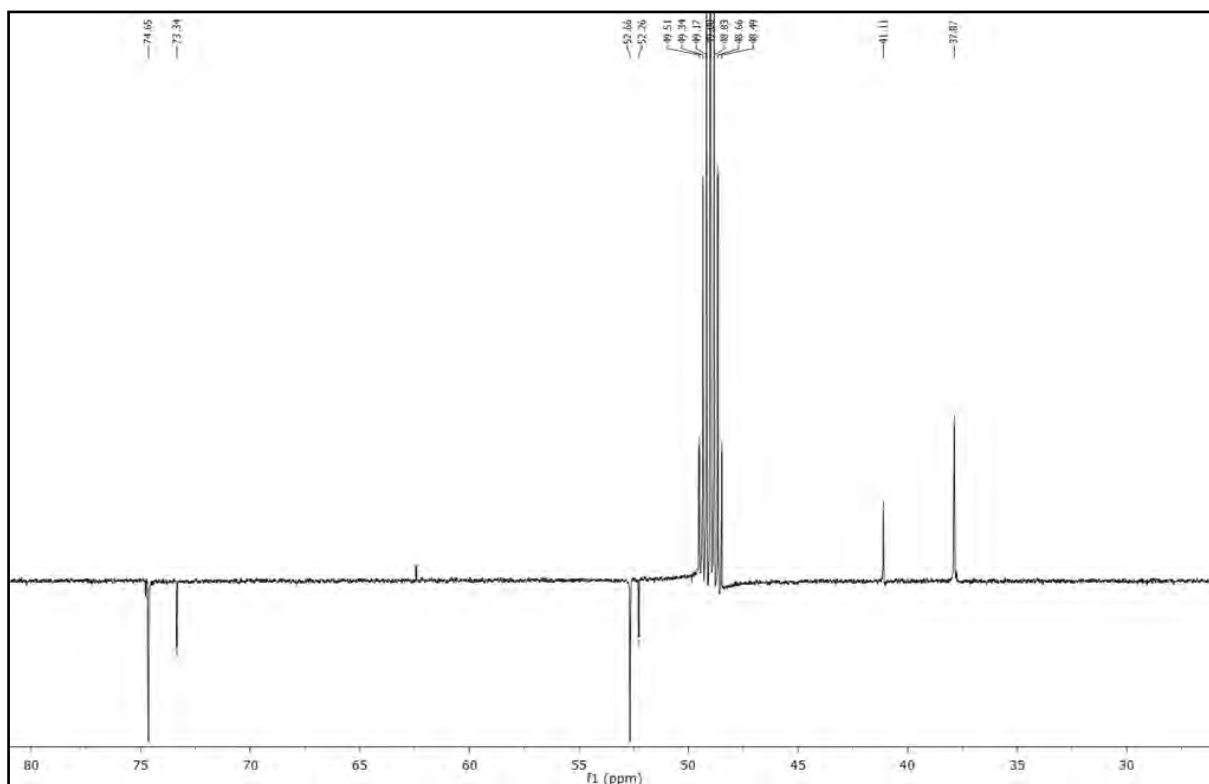


Figura 71 - Espectro de RMN de ^1H de Hs-8 (CD_3OD , 200 MHz)

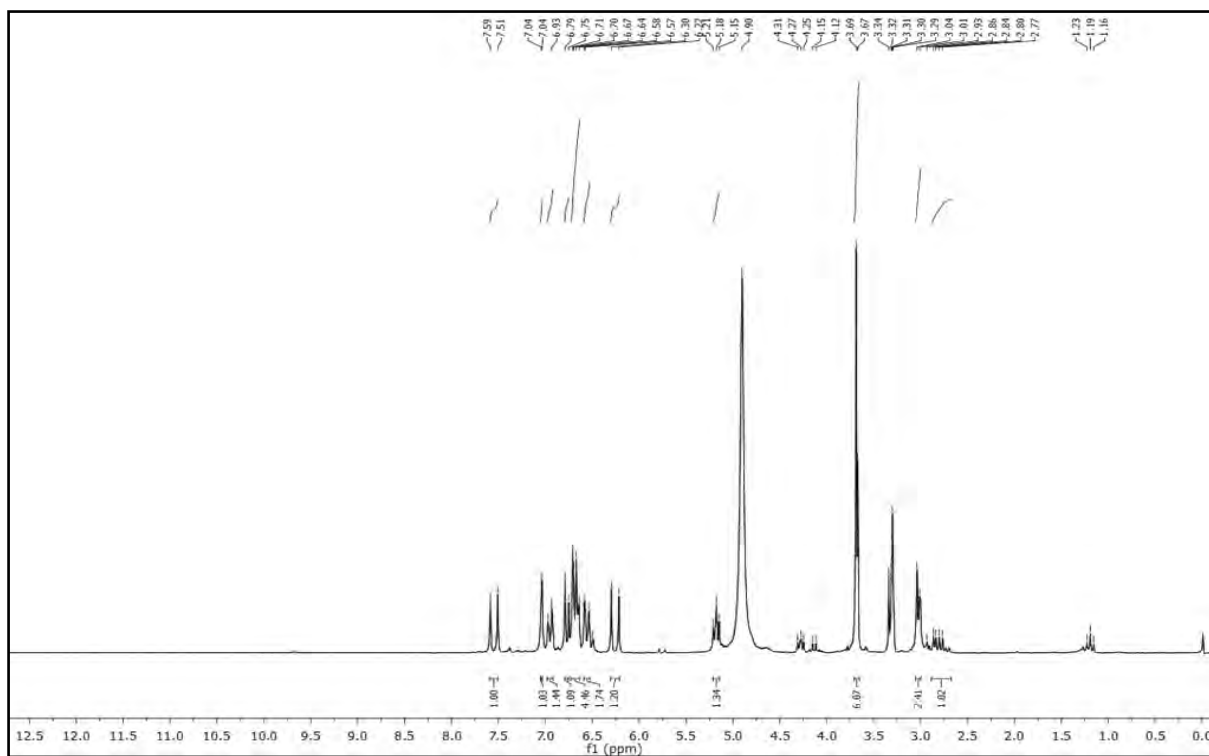


Figura 72 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-8 na região entre 7,8 e 6,0 ppm (CD_3OD , 200 MHz)

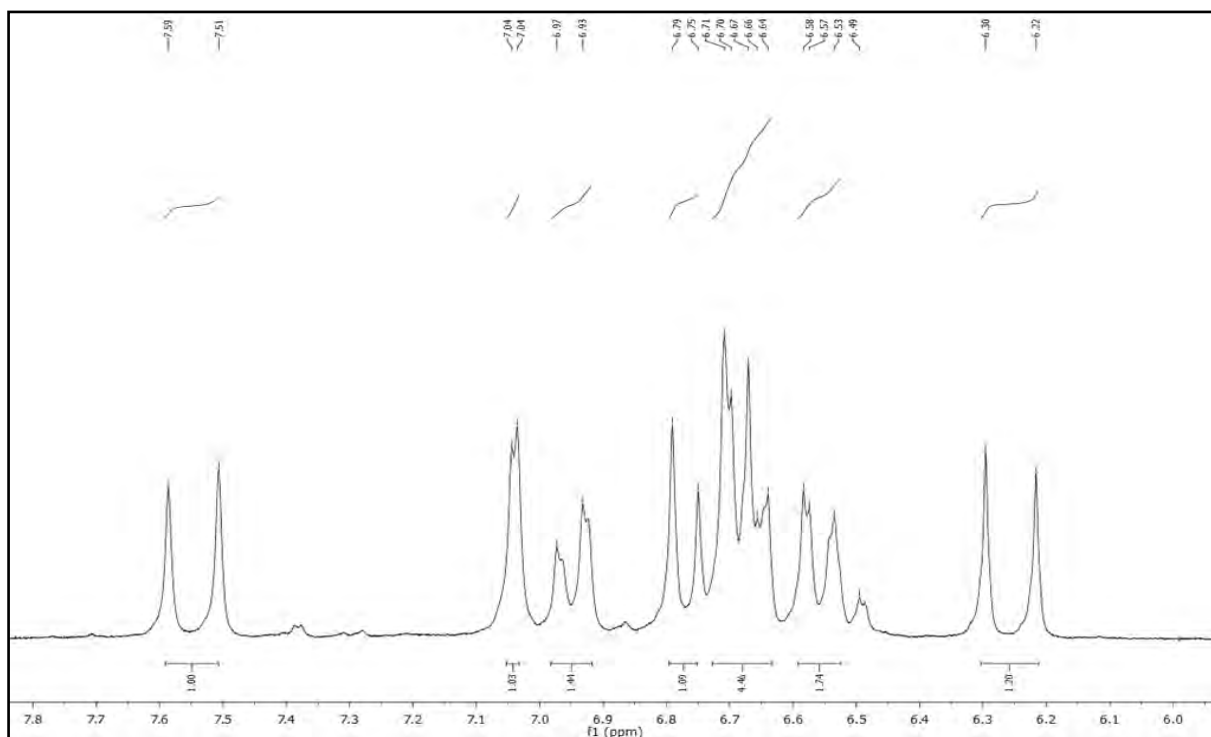
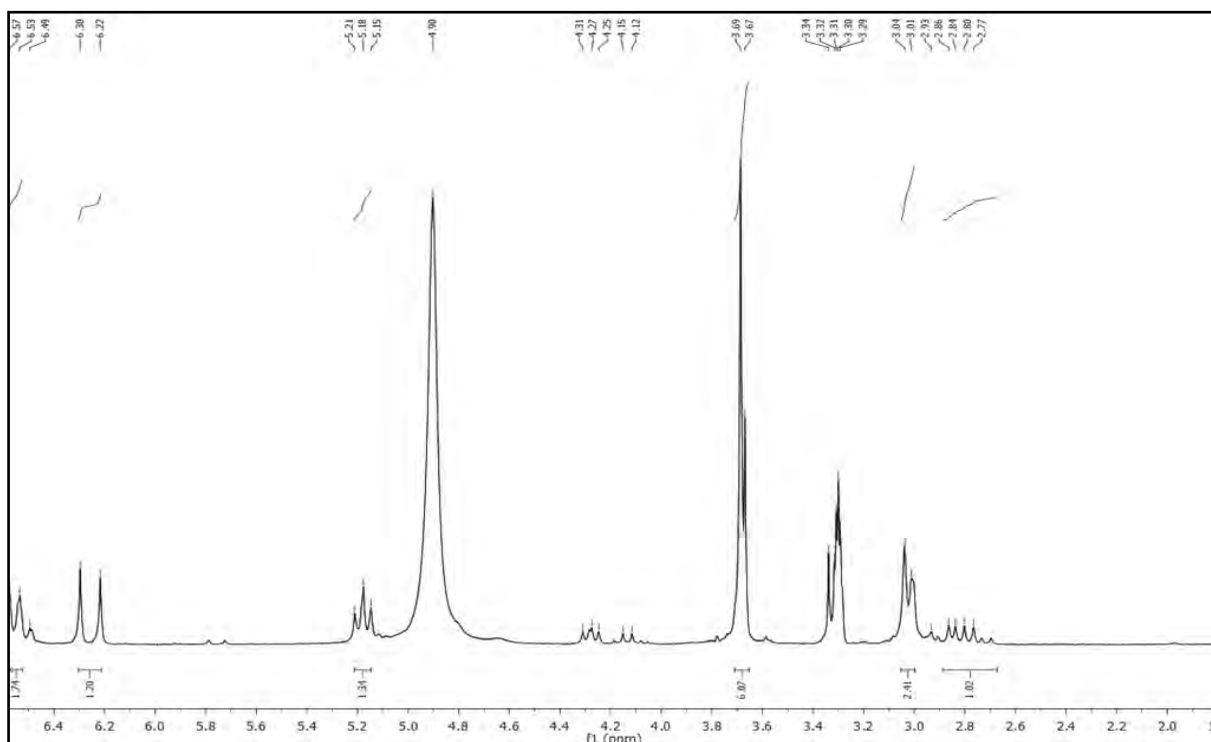


Figura 73 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-8 na região entre 6,4 e 2,0 ppm (CD_3OD , 200 MHz)



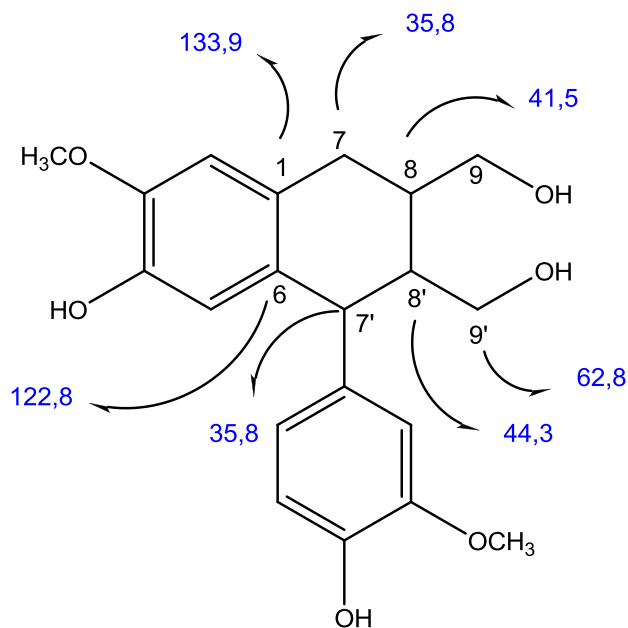
5.9 Determinação estrutural de Hs-9

A substância codificada como Hs-9 foi isolada na forma de óleo marrom. O espectro de massas de alta resolução obtido por ESI-EM (Figura 77, p.149) mostrou o pico do íon molecular em m/z 693.2561 $[M + Na]^+$ compatível com a fórmula molecular $C_{35}H_{42}O_{13}Na$.

No espectro no infravermelho obtido em pastilhas de KBr (Figura 78, p.149) observou-se uma banda larga de absorção de grande intensidade em $3419,79\text{ cm}^{-1}$ referente a estiramento de hidroxila, que corrobora com a banda em $1273,02$, referente a estiramento C – O de fenol. Absorções na região de $1700,00\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídas a estiramento C=O de éster conjugado, bem como as bandas entre $1604,77 - 1516,05\text{ cm}^{-1}$ referentes a C=C de anel aromático. Observou-se ainda, em $2926,01\text{ cm}^{-1}$, absorção sugestiva de grupo CH_2 e CH.

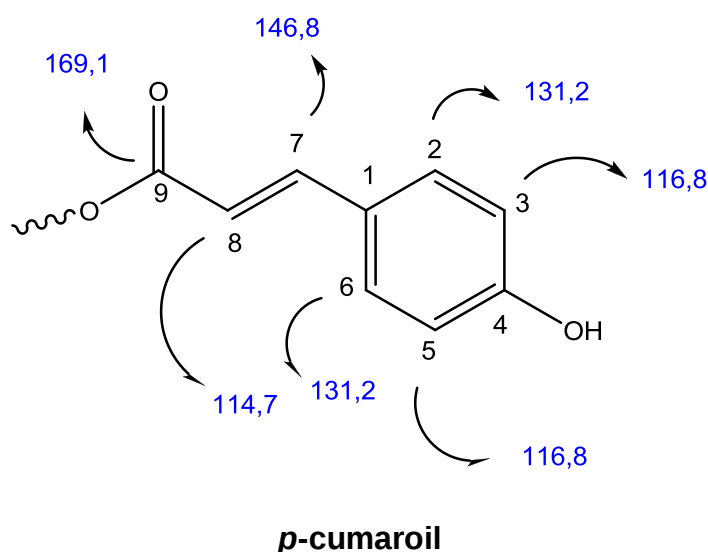
O espectro de RMN de ^{13}C – APT (CD_3OD , 500 MHz) mostrou 31 sinais atribuídos a 35 átomos de carbono, sendo nove não hydrogenados, 19 metínicos, cinco metilênicos e dois metílicos (Figura 79, p. 150). Os sinais em δ_C 56,3 e δ_C 56,2 (Figura 81, p. 151) foram atribuídos a dois carbonos de metoxila. Observaram-se deslocamentos químicos em δ_C 116,8, 139,2, 113,4, 115,7, 122,8, 148,8 e 145,4 característicos de carbonos de grupos aromáticos (Figura 80, p. 150). Já o sinal em δ_C 169,1 corrobora com as absorções observadas no IV para a presença de carbonila de éster na molécula. Os sinais em δ_C 104,3, 75,4, 78,0, 71,8, 79,1 e 64,6 indicaram a existência de uma unidade osídica na estrutura do tipo glicose (GÜVENALP & DEMIREZER, 2004).

De acordo com a literatura (WANG et al., 2006; FONSECA, 1980; LIMA, 2005) os deslocamentos químicos em δ_C 133,9, 122,8, 35,8, 44,3, 62,8, 41,5, além dos sinais para carbonos aromáticos e metoxílicos já citados, sugerem o esqueleto de uma lignana do tipo isolariciresinol, visto que esses valores corroboram, respectivamente, com os carbonos C-1, C-6, C-7 e C-7', C-8', C-9' e C-8 (Figura 74, p. 141).

Figura 74 - Estrutura química do isolariciresinol**isolariciresinol**

No espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz), observou-se dois dupletos em δ_{H} 7,38 ($J = 8,5$ Hz) e 6,77 ($J = 8,5$ Hz) caracterizando um sistema AA'BB' (Figura 83, p. 152). Esses valores, juntamente com os deslocamentos químicos de ^{13}C em δ_{C} 131,2 e 116,8 sugeriram que na estrutura da lignana proposta há um grupo 4-hidroxifenil, de modo que δ_{H} 7,38 foi atribuído aos hidrogênios H-2 e H-6, δ_{H} 6,77 a H-3 e H-5, bem como δ_{C} 131,2 a C-2 e C-6, e δ_{C} 116,8 a C-3 e C-5 (Figura 75, p. 142). Os dupletos em δ_{H} 7,61 ($J = 16,5$) e δ_{H} 6,32 ($J = 16,5$ Hz) indicaram a presença de hidrogênios olefínicos acoplado *trans*. Esses dados, somados ao valor de δ_{C} 169,1 (atribuído a carbonila de éster) e aos deslocamentos em δ_{C} 114,7 e δ_{C} 146,8, corroboram com dados da literatura para a estrutura de um substituinte *p*-cumaroil esterificado (WANG et al., 2006) (Tabela 13, p. 147).

O singlete em δ_{H} 3,70, integrando para seis hidrogênios, foi atribuído a hidrogênios de duas metoxilas, corroborando com os sinais observados no RMN ^{13}C em δ_{C} 56,2 e δ_{C} 56,3.

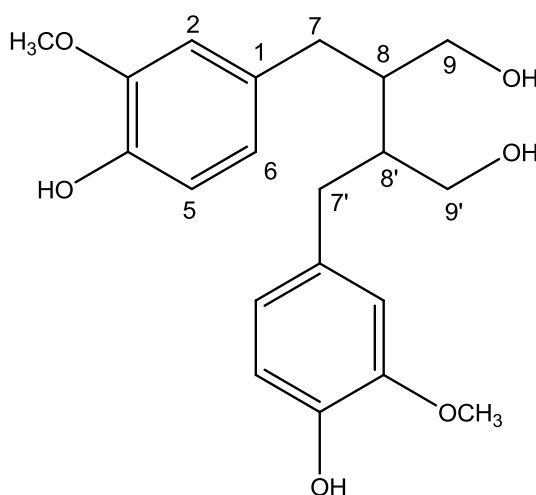
Figura 75 – Estrutura química do *p*-cumaroil

Na região de δ_H 4,49 – 3,32 (Figura 84, p. 152) observou-se sinais característicos de unidade osídica. Comparação com dados da literatura (SILVA et al., 2005) sugeriram que este açúcar tratar-se-ia da glicose, onde um duplete em δ_H 4,22 ($J = 7,5$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio do carbono anomérico; um multiplete em δ_H 3,22 ao H-2; multiplete na região de δ_H 3,32 – 3,80 atribuído aos hidrogênios H-3, H-4; em δ_H 3,55 um multiplete atribuído ao H-5; e dois duplos dupletos em δ_H 4,49 ($J = 12,0; 2,0$ Hz) e δ_H 4,35 ($J = 12,0$ e $6,0$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios metílicos H-6.

Os deslocamentos químicos em δ_H 6,60 (2H, d, $J = 1,5$ Hz), δ_H 3,63 (4H, m) e δ_H 2,00 (2H, m) quando comparados com dados da literatura (LIMA, 2005), corroboram com os valores do esqueleto da lignana isolaricirenisol para os hidrogênios H-2 e H-2', H-9 e H-9' e H-8 e H-8', respectivamente. Porém, para o H-5 não foi observado um singlete, e sim um duplete em δ_H 6,67 ($J = 8,5$ Hz); para a posição 7' não se observou um duplete, mas sim dois duplos dupletos em δ_H 2,72 (1H, $J = 14,0; 7,5$ Hz) e δ_H 2,63 (1H, $J = 14,0$ e $7,0$ Hz). Esses dados indicaram que o carbono C-6 é de natureza metínica; já no isolaricirenisol este carbono é não hidrogenado. Esta informação foi reforçada pela existência de um duplo duplete em δ_H 6,53 (2H, $J = 6,0$ e $2,0$ Hz) que foi atribuído ao hidrogênio H-6. Dessa forma, sugeriu-se que o hidrogênio H-6 está acoplado *orto* com H-5 e *meta* com H-2, descartando a possibilidade de um esqueleto de lignana do tipo isolaricirenisol. Ao

comparar esses dados de RMN de ^1H com os da literatura (PARK et al., 2009) sugeriu-se um novo esqueleto de ligana, do tipo secoisolariciresinol (Figura 76).

Figura 76 - Estrutura química do secoisolariciresinol

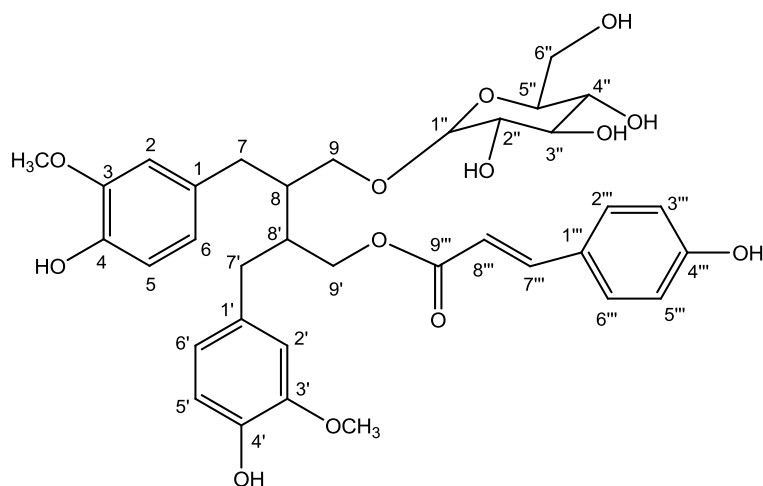
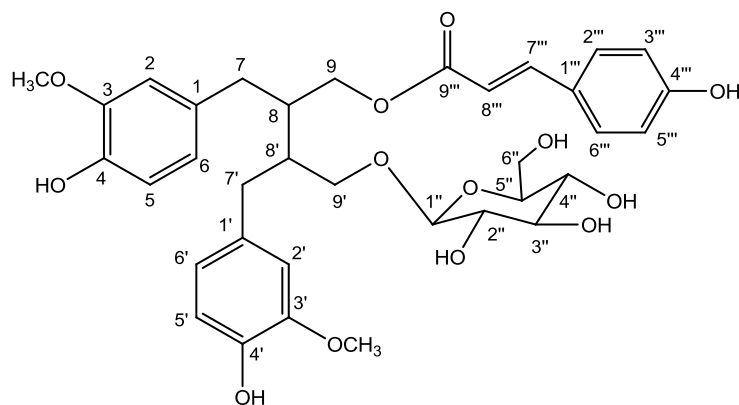
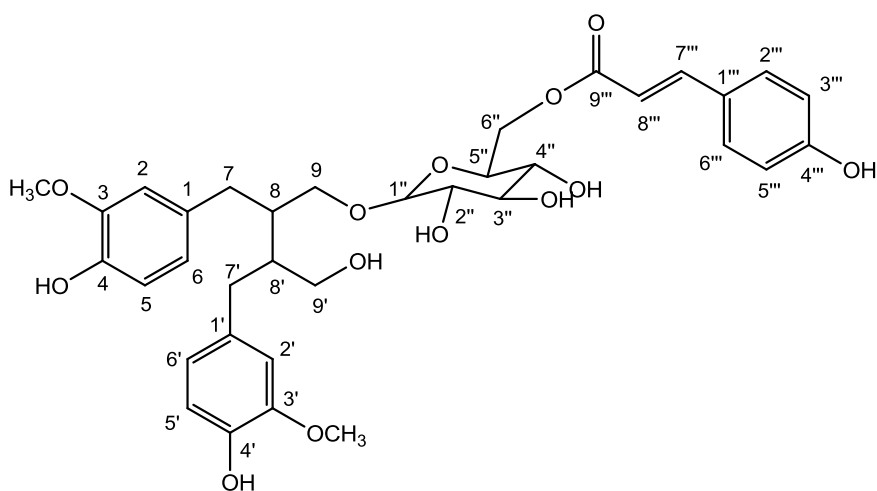


secoisolariciresinol

Sabendo-se que a substância em questão possui um esqueleto de lignana do tipo secoisolariciresinol e que possui uma unidade osídica (glicose) e uma unidade *p*-cumaroil esterificada como substituintes, foram analisados os espectros bidimensionais de correlação homonuclear e heteronuclear para definir a inserção desses grupos na lignana.

O espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMQC (Figura 86, p. 153) permitiu obter informações sobre quais valores de δ_{H} encontravam-se ligados aos respectivos δ_{C} . A sua análise mostrou correlação entre δ_{C} 113,4 e 113,6 (C-2 e C-2') com δ_{H} 6,60 (H-2 e H-2', d, $J = 1,5$ Hz), δ_{C} 115,7 (C-5 e C-5') com δ_{H} 6,67 (H-5 e H-5', d, $J = 8,5$ Hz), δ_{C} 35,8 (C-7 e C-7') com δ_{H} 2,72 (H-7 e H-7', dd, 14,0; 7,5 Hz) e δ_{H} 2,63 (H-7 e H-7', dd, 14,0; 7,0 Hz) e δ_{C} 41,5 (C-8) e δ_{C} 44,3 (C-8') com δ_{H} 2,00 (H-8 e H-8', m), confirmando as informações dos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H que corroboram para o esqueleto da lignana secoisolariciresinol. As demais correlações das unidades osídica e curamoil encontram-se na tabela 13 (p. 147).

Dessa forma, após essas considerações, sugeriram-se três propostas estruturais para Hs-9:

**Proposta (1)****Proposta (2)****Proposta (3)**

Considerando-se que, na literatura (PARK et al., 2009; FONSECA, 1980; LIMA, 2005) o valor do deslocamento químico para os carbonos C-9 e C-9' secoisolariciresinol é de δ_C 62,3, e que, no espectro de RMN de ^{13}C o valor de C-9 encontra-se deslocado para δ_C 70,1, sugeriu-se que um substituinte glicopiranicumaroil encontrava-se ligado ao carbono oximetilênico C-9, visto o efeito de desblindagem observado para o mesmo. Para o carbono C-9' o valor observado foi de δ_C 62,8, que corrobora com os dados da literatura e dessa forma, afastando a possibilidade de inserção de substituinte no carbono oximetilênico C-9'.

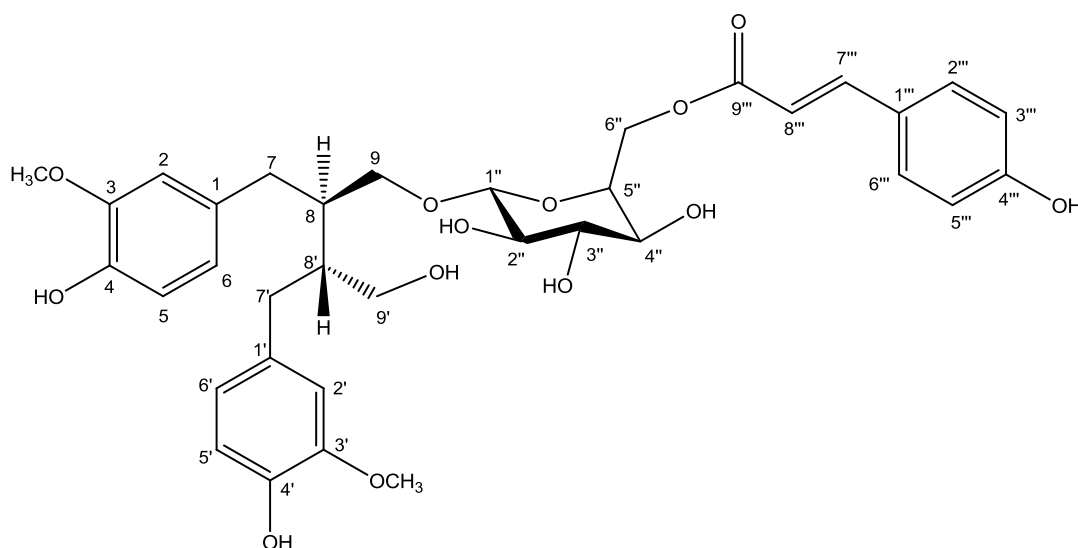
Na análise do espectro HMBC (Figura 89, p. 155), observou-se correlação entre o C-9 (δ_C 70,1) com δ_H 4,22 correspondente ao hidrogênio anomérico, sugerindo que o açúcar está inserido no carbono C-9 da lignana. A ausência de correlação do hidrogênio anomérico com o C-9' reforça a hipótese de não existir substituição nesse carbono. Ainda nesse espectro, observou-se correlações os hidrogênios oximetilênicos H-6'' (δ_H 4,49 e 4,34) da glicose com o carbono carbonílico C-9''' (δ_C 169,1) do grupo cumaroil, o que indicou que este grupo encontrava-se ligado ao oxigênio do C-6'' da glicose (Proposta 3, p. 144). No espectro de correlação homonuclear COSY (Figura 90, p. 155), observou-se correlação entre δ_H 2,72 e 2,63 (H-7 e H-7') com δ_H 2,00 (H-8 e H-8'), δ_H 3,63 (H-9 e H-9') com δ_H 2,00 (H-8), confirmando a inexistência de substituição direta nos carbonos C-9 e C-7 da lignana. As demais correlações podem ser observadas na Tabela 13 (p. 147).

No espectro NOESY (Figura 92, p. 156), observou-se correlação entre δ_H 4,22, referente ao hidrogênio anomérico da glicose, com δ_H 3,55, referente ao hidrogênio H-9 da lignana. Essa correlação confirma que a unidade osídica está inserida no carbono oximetilênico C-9 da lignana. Baseando-se nessas considerações, descartou-se as possibilidades estruturais **1** e **2**, confirmando-se que Hs-9 possuía a estrutura da proposta **3**. As demais correlações podem ser observadas na Tabela 13 (p. 147).

A fim de definir a estereoquímica relativa da estrutura proposta observou-se o valor da constante de acoplamento para o hidrogênio do carbono anomérico do açúcar que foi de $J = 7,5$ Hz, compatível com uma estereoquímica β -D-glicose (SILVA et al., 2005).

Comparação da estrutura proposta com a Hs-3 (hinoquinina) e dos espectros de ^1H , pôde-se propor uma configuração *trans* para os carbonos H-8 e H-8', visto a formação de um multiplete em 3,60 ppm e 3,55 ppm para o H-9' (LOPES, 1983).

Dessa forma, da *Hypernia salzmannii* foi isolada uma nova lignana, a (-)-secoisolaricirenisol-9-O- β -D-glicopiranosídeo-(6''-*p*-cumaroil).



(-)-secoisolaricirenisol-9-O- β -D-glicopiranosídeo-(6''-*p*-cumaroil)

Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de Hs-9 e correlações obtidas em HMQC, COSY, HMBC e NOESY, registrados em CD_3OD , J (Hz) e δ (ppm)

C	HMQC		COSY	HMBC		NOESY
	δ_{C}	δ_{H}	$\delta_{\text{H} \times \delta_{\text{H}}}$	$\delta_{\text{C} \times \delta_{\text{H}}}$ (2J) (3J)	$\delta_{\text{H} \times \delta_{\text{H}}}$	
C						
1	133,9	-----			H-8	
3	148,8	-----			CH_3	
4	145,4	-----				
1'	133,9	-----			H-8'	
3'	148,8	-----			CH_3	
4'	145,4	-----				
1'''	127,1	-----				
4'''	161,2	-----				
9'''	169,1	-----			H-6''	
CH						
2	113,4	6,60 (d , $J = 1,5$ Hz)			H-7	
					H-7	
5	115,7	6,67 (d , $J = 8,5$ Hz)				
6	122,8	6,53 (dd , $J = 6,0$ e $2,0$ Hz)			H-7	
8	41,5	2,00 (m)	H-7/H-9	H-9		
2'	113,6	6,60 (d , $J = 1,5$ Hz)			H-7'	
5'	115,7	6,67 (d , $J = 8,5$ Hz)				
6'	122,8	6,53 (dd , $J = 6,0$ e $2,0$ Hz)			H-7'	
8'	44,3	2,00 (m)	H-7'/H-9'	H-9'	H-7	
2'''	131,2	7,38 (d , $J = 8,5$ Hz)				H-8'''
						H-5'''
3'''	116,8	6,77 (d , $J = 8,5$ Hz)				H-6'''
5'''	116,8	6,77 (d , $J = 8,5$ Hz)				H-2'''
6'''	131,2	7,38 (d , $J = 8,5$ Hz)				H-8'''
7'''	146,8	7,61 (d , $J = 16,5$ Hz)				H-2'''
8'''	114,7	6,32 (d , $J = 15,5$ Hz)				H-2'''

						H-6'''
CH ₂						
7	35,8	2,72 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 14,0; 7,5 Hz)	H-8	H-2		
		2,63 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 14,0; 7,0 Hz)				
9	70,1	3,83 (<i>m</i>); 3,55 (<i>m</i>)	H-8	H-8	H-1''	H-1''
					H-7	
7'	35,8	2,72 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 14,0; 7,5 Hz)	H-8'			
		2,63 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 14,0; 7,0 Hz)				
9'	62,8	3,63 (<i>m</i>); 3,55 (<i>m</i>)	H-8'	H-8'	H-8	
					H-7	
OCH ₃						
	56,3	3,70 (<i>s</i>)				
	56,2					
Gli						
1''	104,3	4,22 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz)	H-2''	H-9		
2''	75,1	3,25 (<i>m</i>)	H-1''			
3''	78,0	3,80 – 3,32 (<i>m</i>)				
4''	71,8	3,80 – 3,32 (<i>m</i>)				
5''	75,4	3,55 (<i>m</i>)	H-6''			
6''	64,6	4,49 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 12,0; 2,0 Hz)	H-5''			
		4,35 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 12,0; 6,0 Hz)				

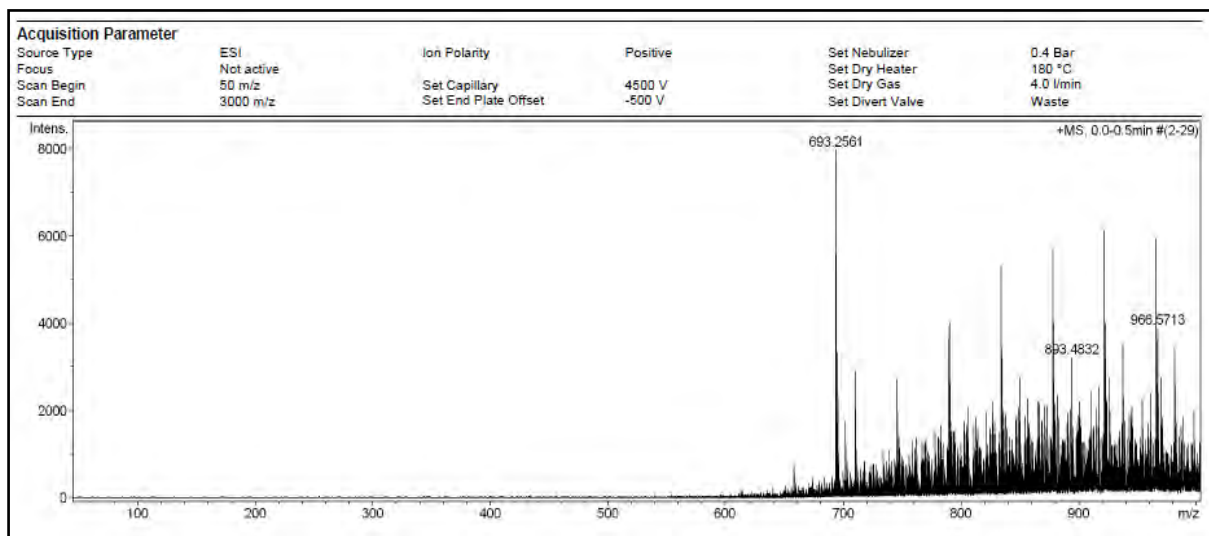
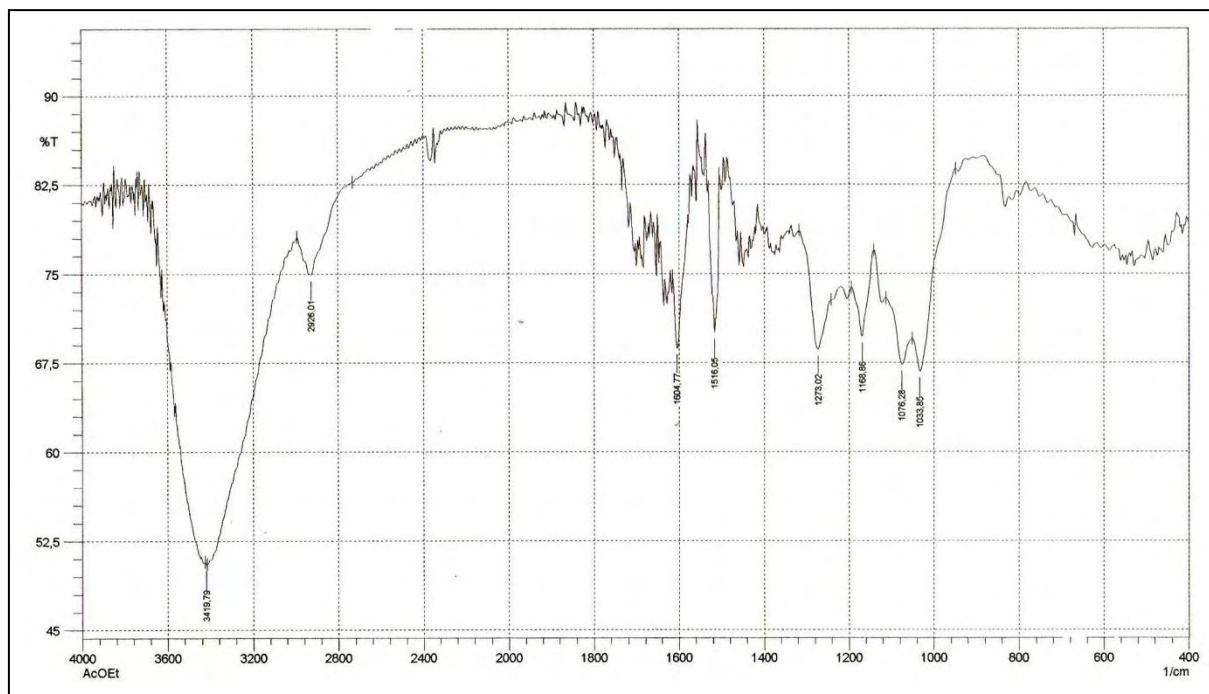
Figura 77 - Espectro de massas de Hs-9**Figura 78** - Espectro na região do infravermelho de Hs-9 (Pastilhas de KBr)

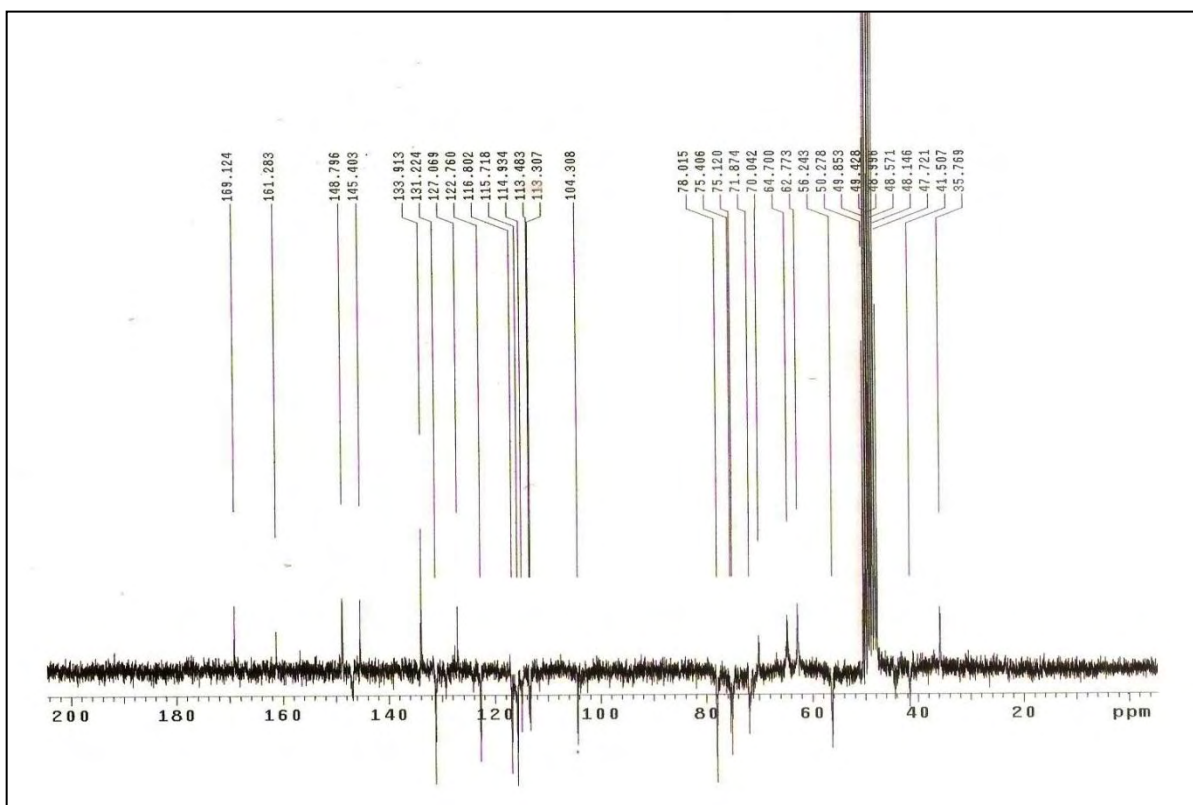
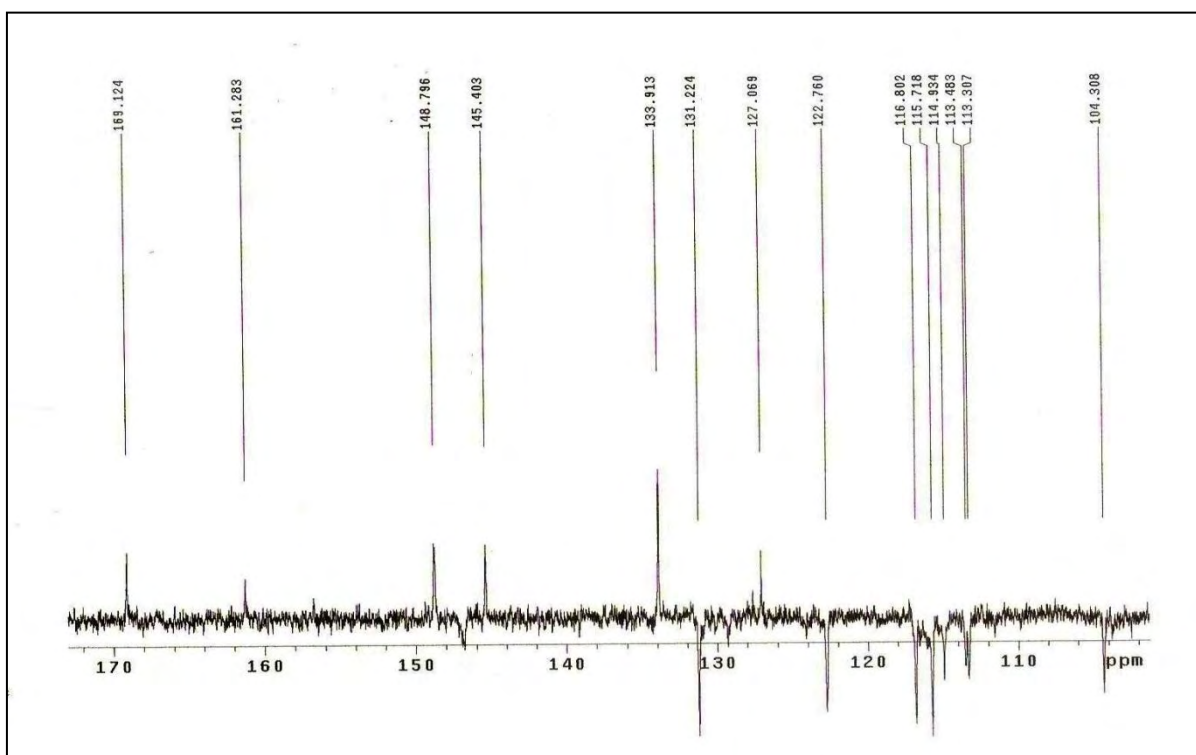
Figura 79 - Espectro de RMN de ^{13}C – APT de Hs-9 (CD_3OD , 200 MHz)**Figura 80** - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – APT de Hs-9 de 170,0 a 100,0 ppm (CD_3OD , 200 MHz)

Figura 81 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – APT de Hs-9 de 80,0 a 30,0 ppm (CD_3OD , 200 MHz)

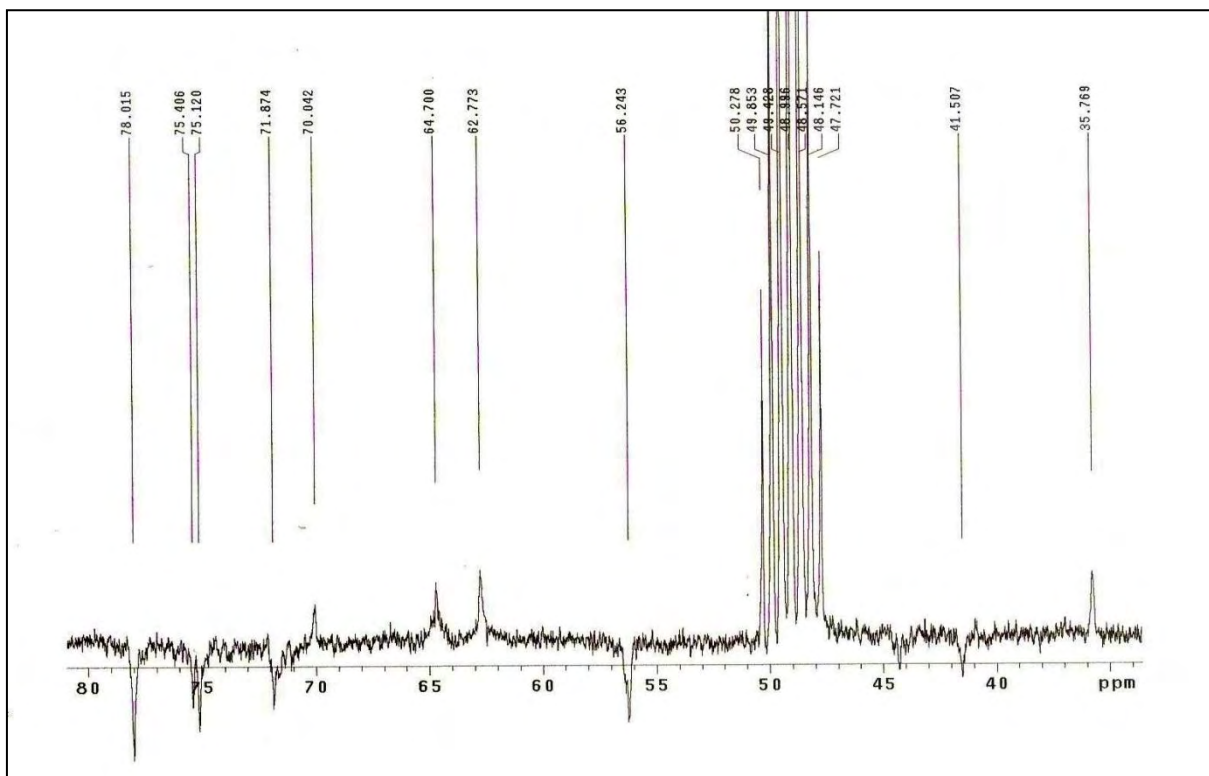


Figura 82 - Espectro de RMN de ^1H de Hs-9 (CD_3OD , 500 MHz)

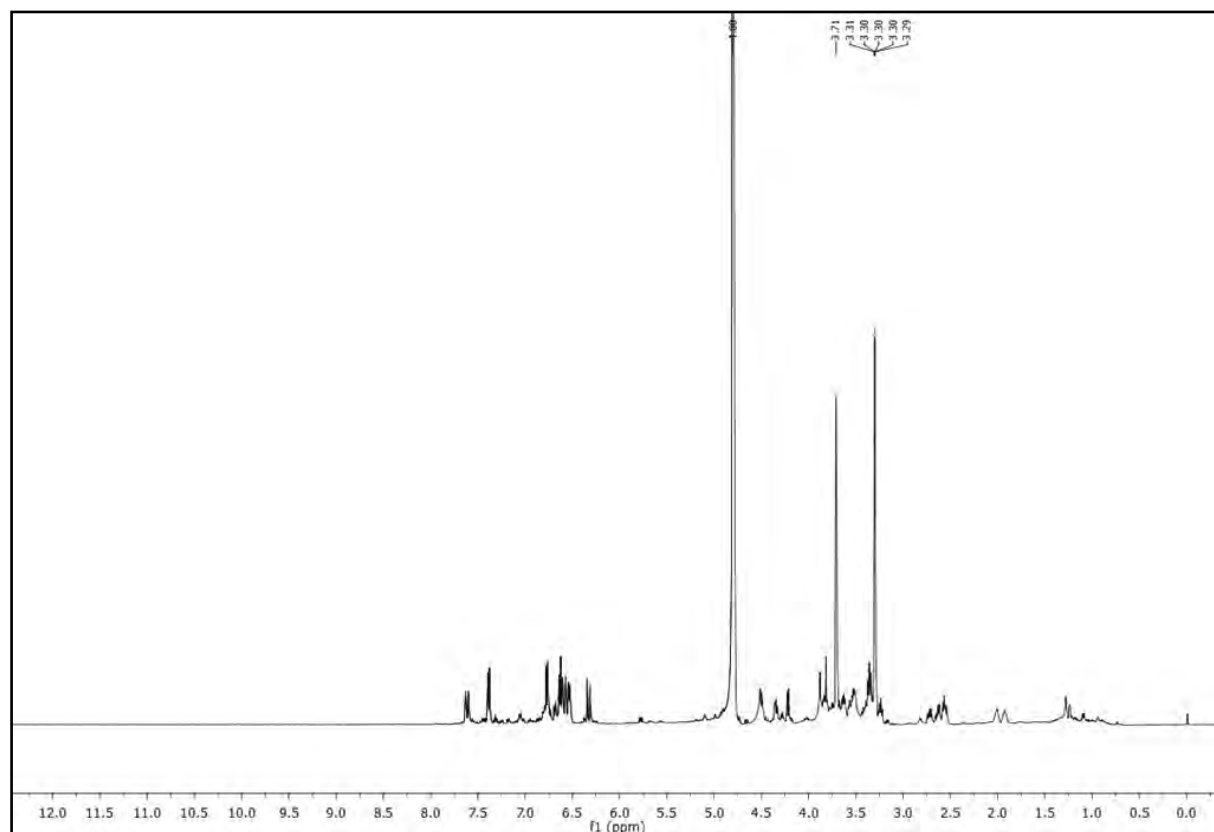


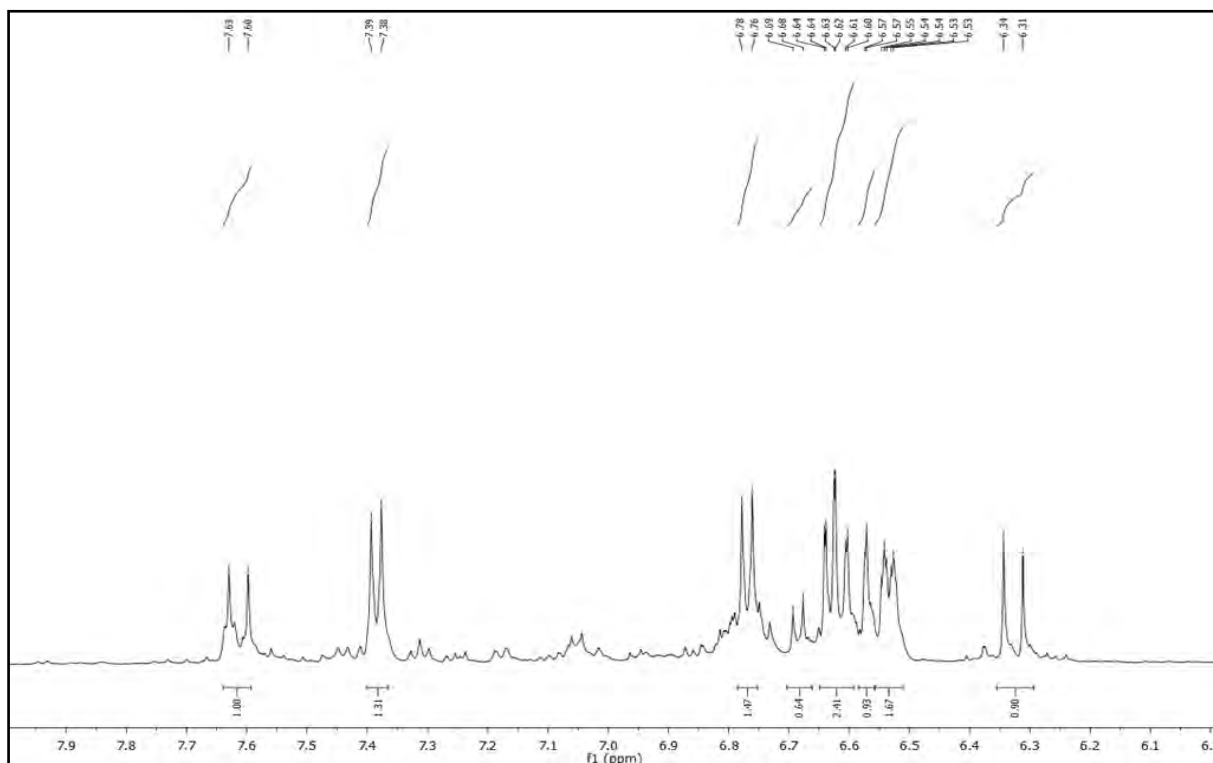
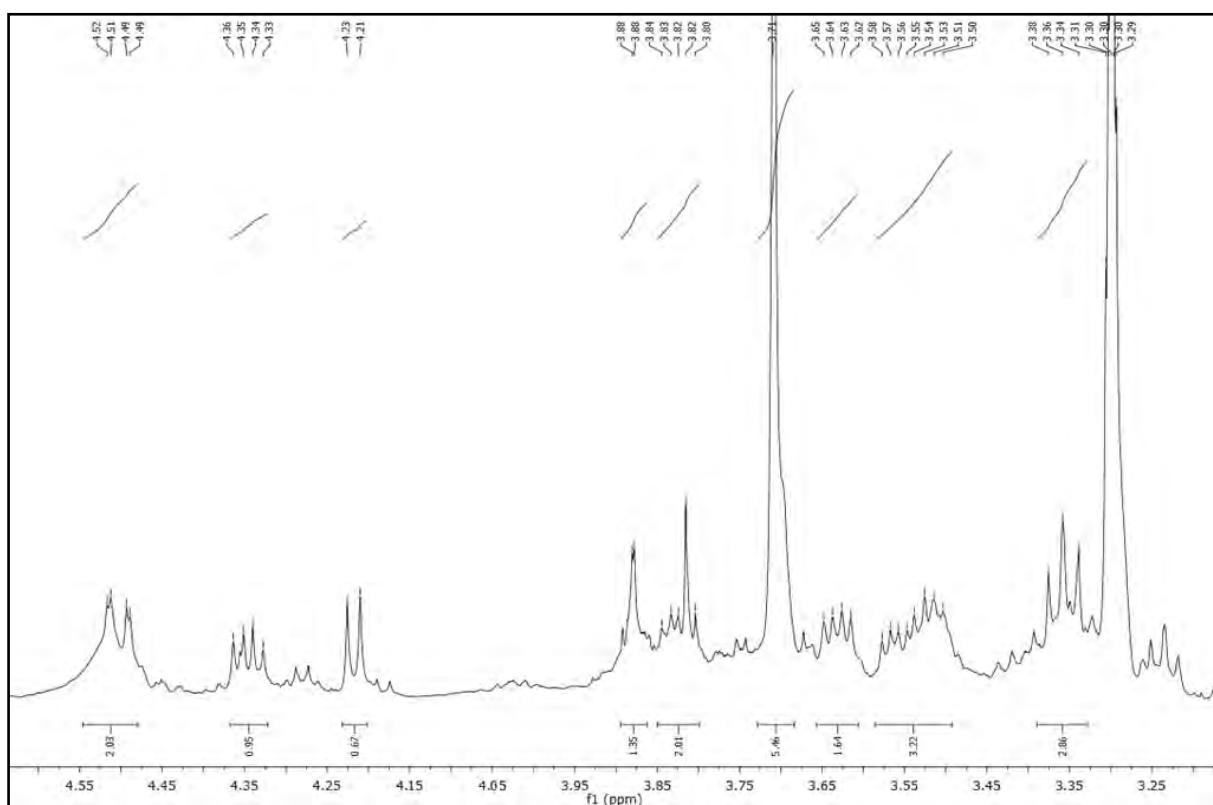
Figura 83 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-9 de 7,90 a 6,00 ppm (CD_3OD , 500 MHz)**Figura 84** – Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-9 de 4,55 a 3,25 ppm (CD_3OD , 500 MHz)

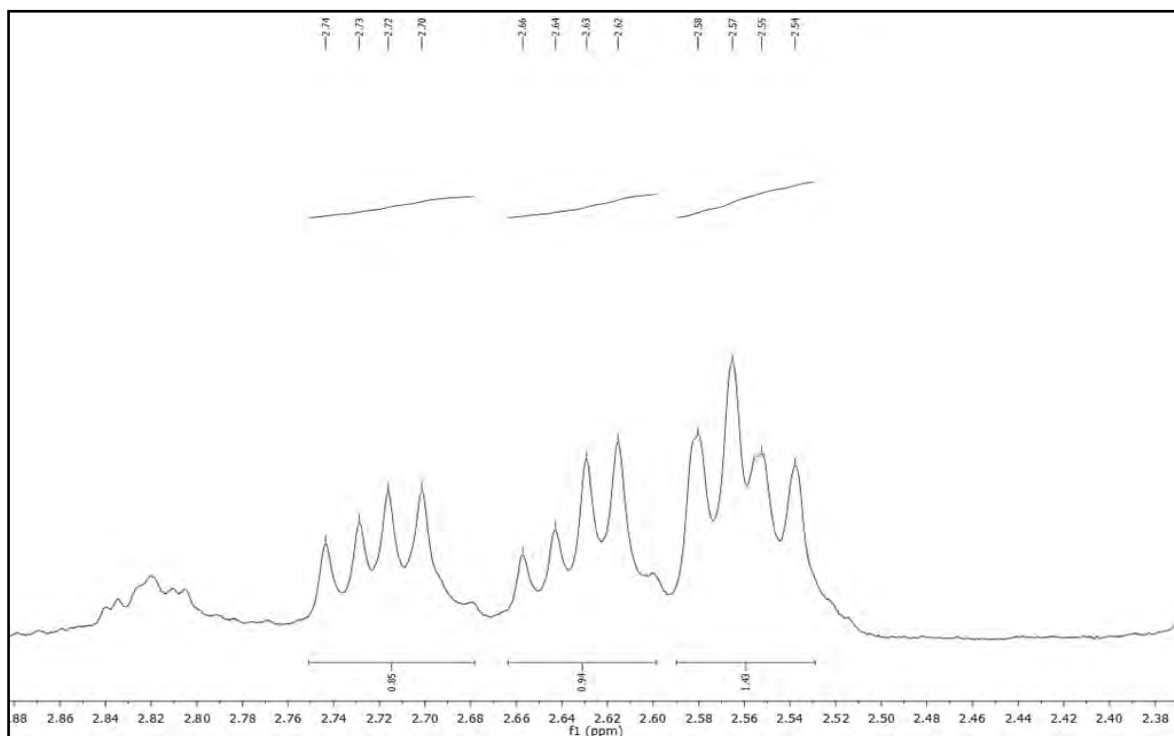
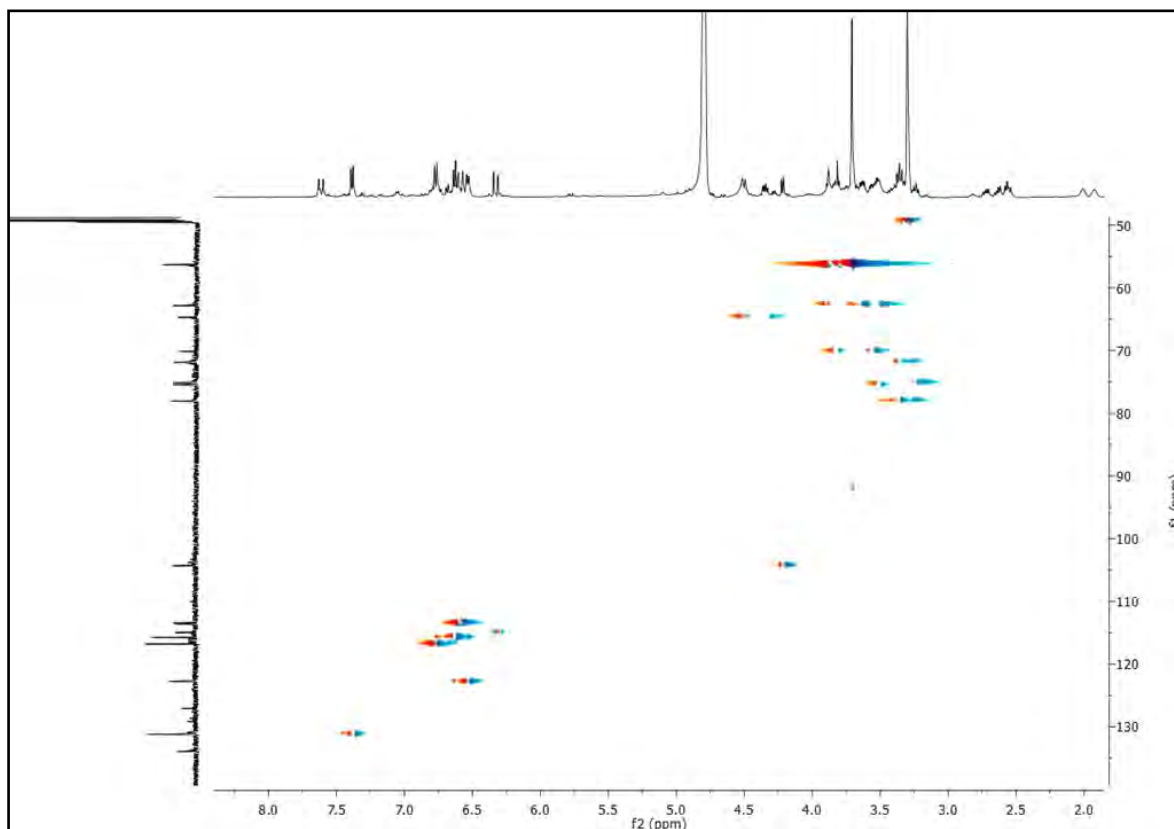
Figura 85 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de Hs-9 de 2,86 a 2,38 ppm (CD_3OD , 500 MHz)**Figura 86** - Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - J_{\text{CH}}$ – HMQC de Hs-9 (CD_3OD , 500 e 125 MHz)

Figura 87 – Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - J_{\text{CH}}$ – HMQC de Hs-9 (CD_3OD , 500 e 125 MHz)

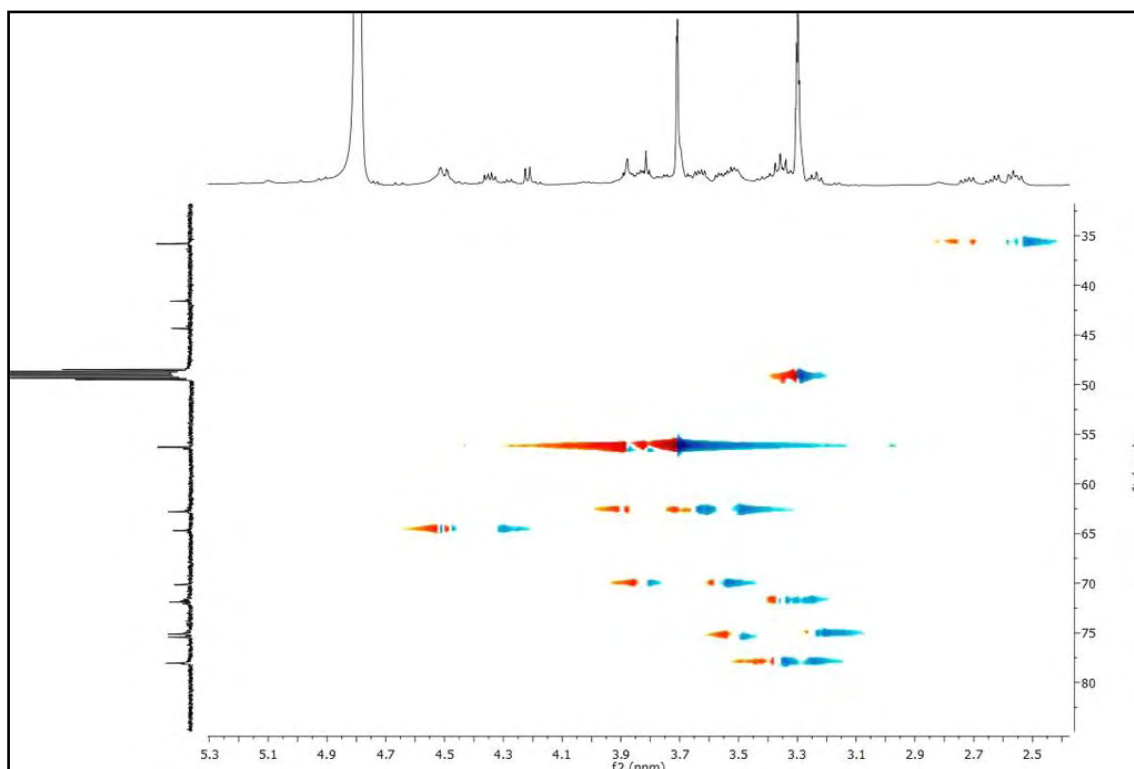


Figura 88 – Espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C} - nJ_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) – HMBC de Hs-9 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)

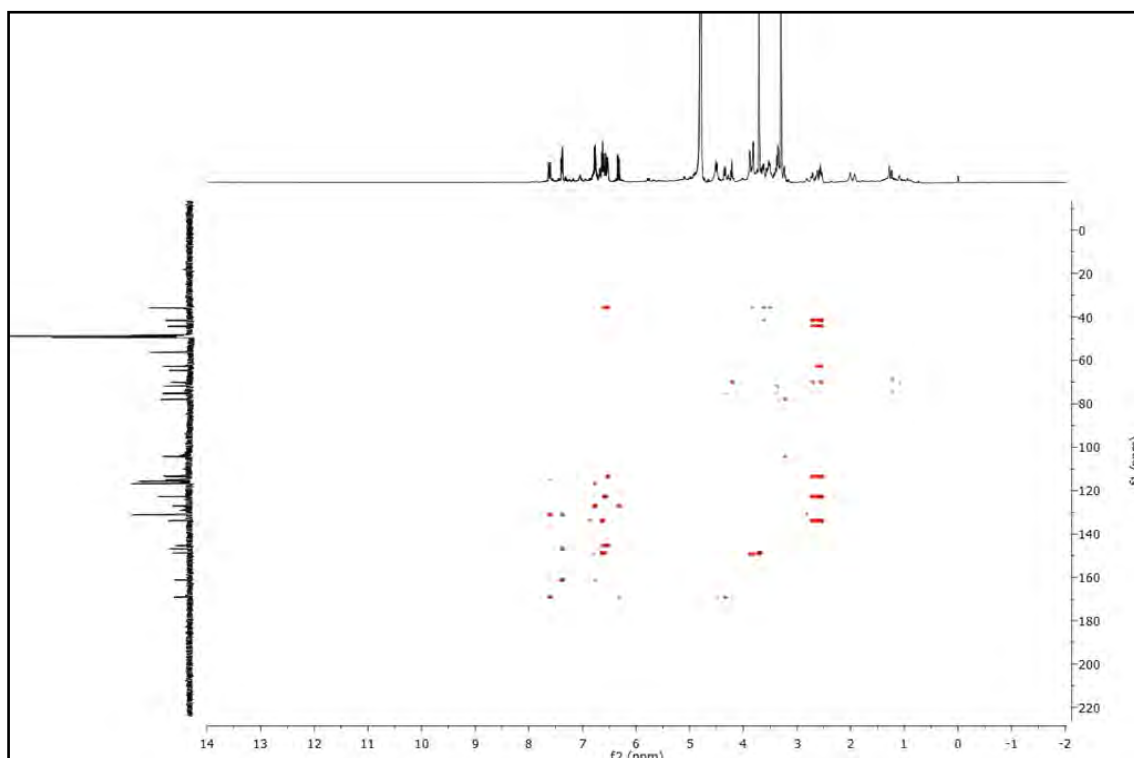


Figura 89 – Expansão do espectro de correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $n\text{JCH}$ ($n=2$ e 3) - HMBC de Hs-9 (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)

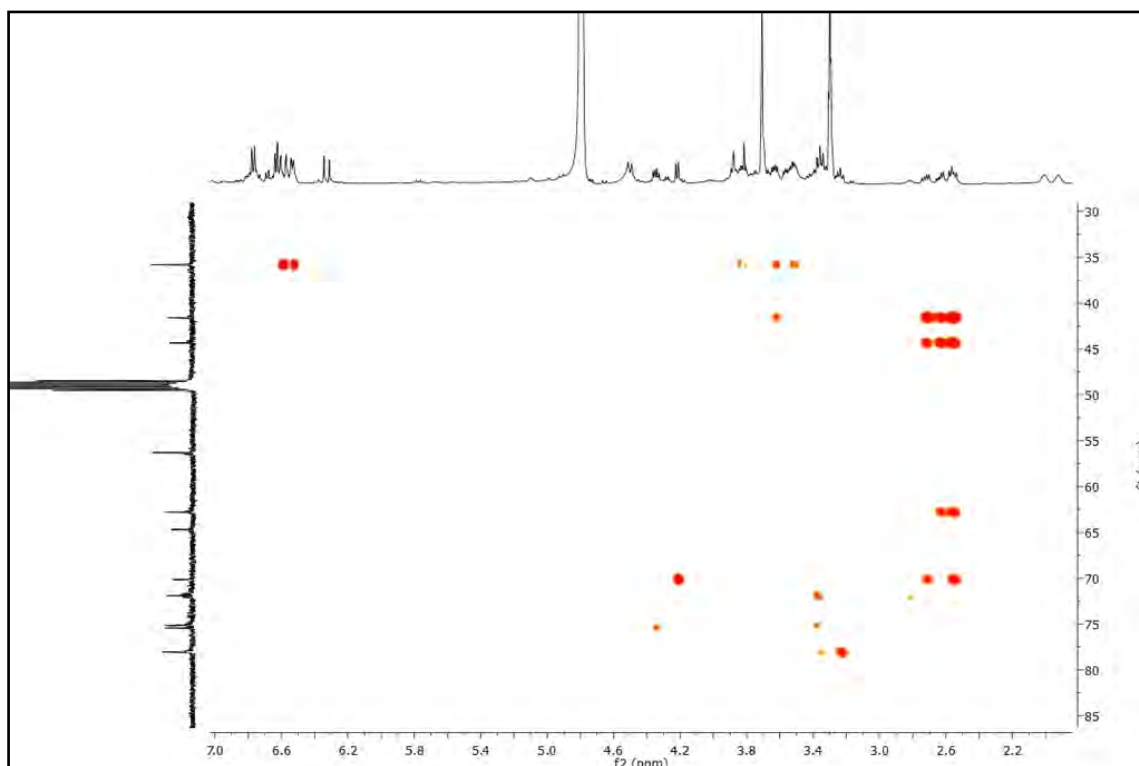


Figura 90 – Espectro de correlação homonuclear COSY de Hs-9 (CD_3OD , 500 MHz)

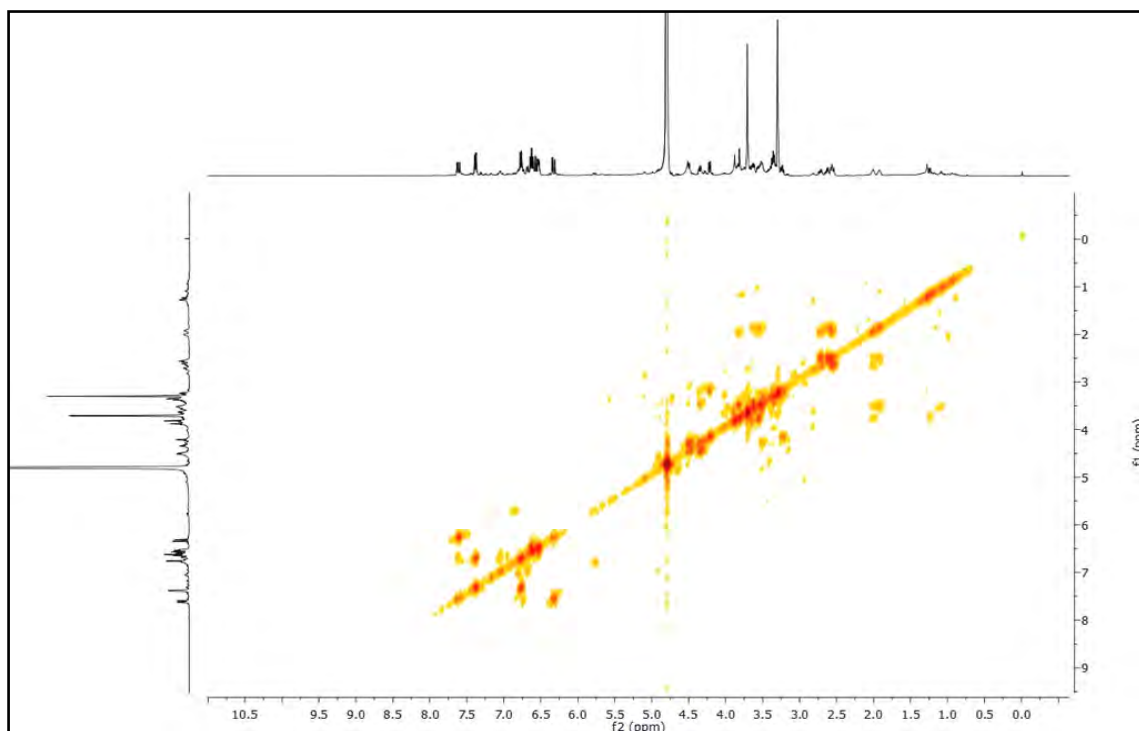


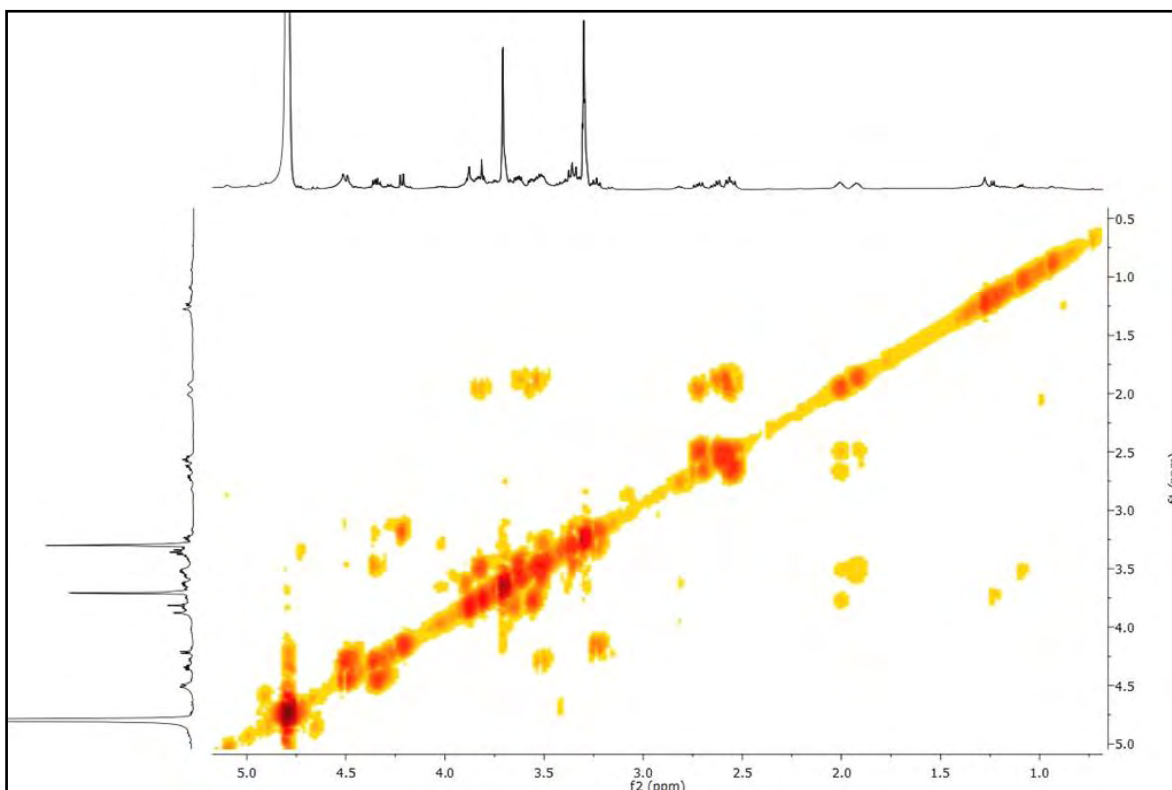
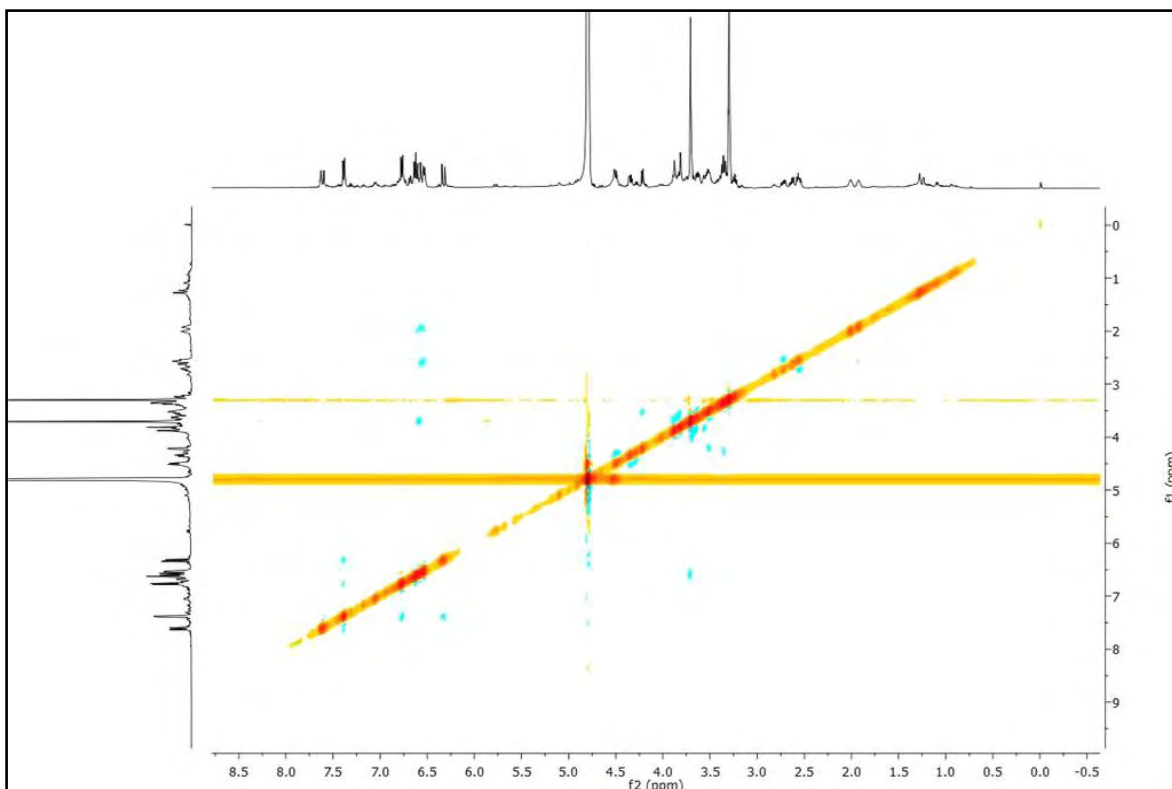
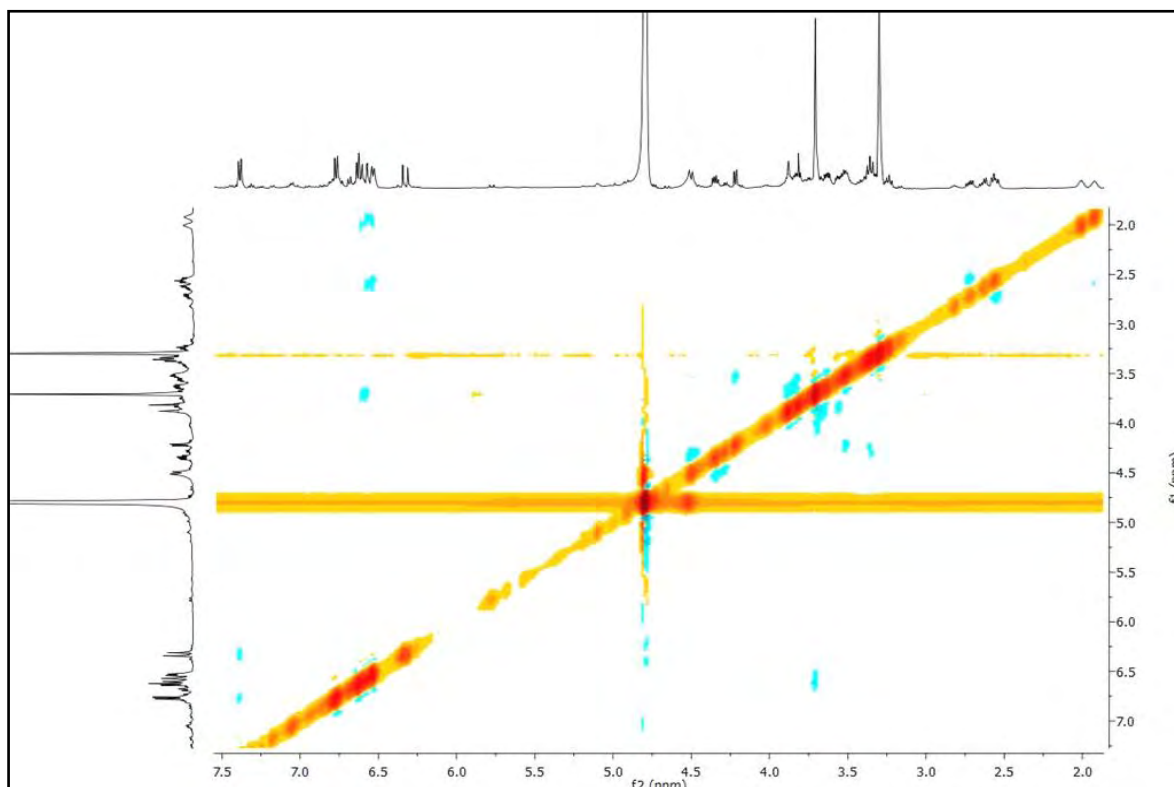
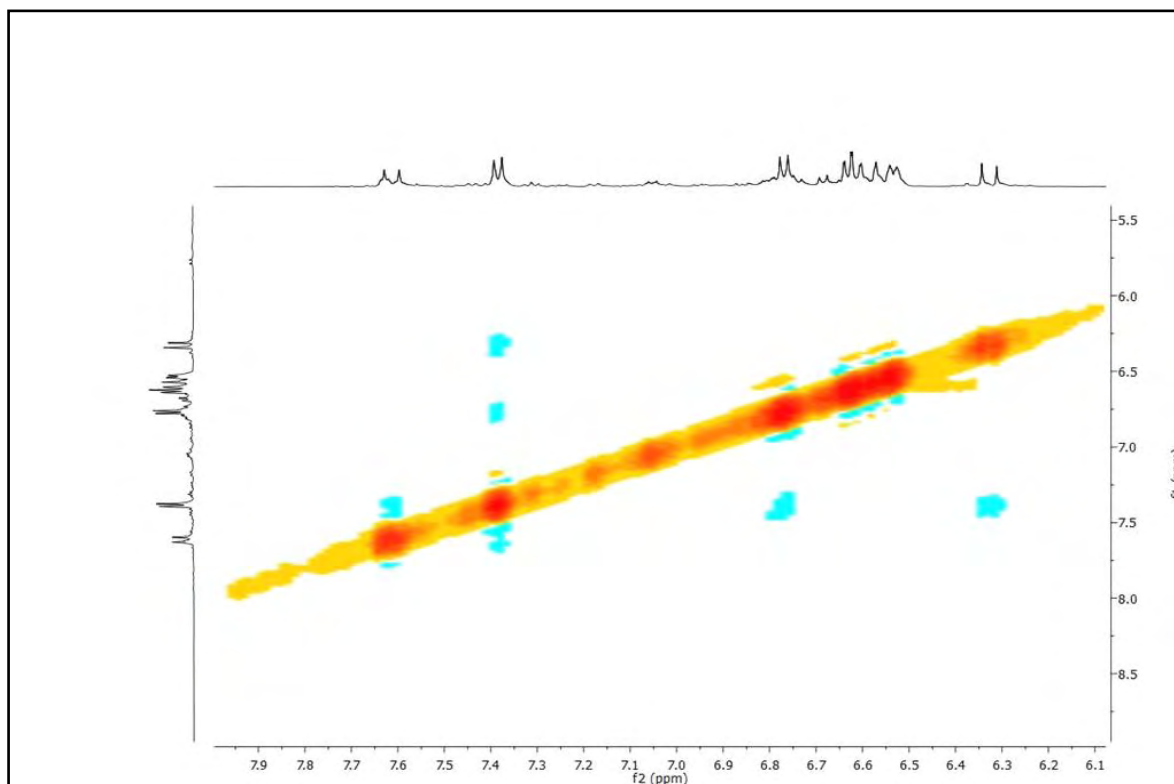
Figura 91 – Expansão do espectro de correlação homonuclear COSY de Hs-9 (CD₃OD, 500 MHz)**Figura 92** - Espectro de correlação homonuclear NOESY de Hs-9 (CD₃OD, 500 MHz)

Figura 93 – Expansão espectro de correlação homonuclear NOESY de Hs-9 (CD₃OD, 500 MHz)**Figura 94** - Expansão espectro de correlação homonuclear NOESY de Hs-9 (CD₃OD, 500 MHz)

6. CONSLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente trabalho cumpriu o objetivo principal que se fundamentou na ampliação do conhecimento quimiotaxonômico do gênero *Hypenia* através do estudo fitoquímico das folhas e raízes de *Hypenia salzmannii*.

Através de métodos cromatográficos usuais e técnicas espectroscópicas de Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C uni e bidimensional e espectrometria de massas, foi possível isolar e identificar três terpenoides: ácido ursólico, ácido oleanólico e ácido betulínico; um esteróide: β -sitosterol-glicosilado; duas flavanonas: isosakuranetina e sakuranetina; duas lignanas: a hinoquinina e a β -peltatina-A-metileter um flavonóide glicosilado: hiperina; dois derivados fenólicos: ácido rosmarínico e rosmarinato de metila; e uma lignana inédita, a (-)-secoisolaricirenisol-9-O- β -D-glicopiranosídeo-(6''-p-cumaroil) das partes aéreas de *Hypenia salzmannii*.

O isolamento de triterpenos, ácido rosmarínico e lignanas desta espécie foi de fundamental importância para a quimiotaxonomia do gênero *Hypenia*, visto que essas classes de substâncias são marcadores químicos da família Lamiaceae.

A existência de grande variedade de lignanas e derivados fenólicos nesta espécie levou ao interesse em dar continuidade ao estudo da mesma através do desenvolvimento de novas técnicas cromatográficas de isolamento e identificação, na busca de novas substâncias para a mesma.

Considerando o uso popular da *Hypenia salzmannii* e o potencial farmacêutico já comprovado de algumas substâncias isoladas dessa espécie, bem como dos seus extratos, pretende-se realizar parcerias para testar possíveis atividades biológicas da lignana inédita.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 111, n. 2, p. 383-395, 2007.
- AGRAWAL, P. K.; BANSAL, M. C. Isoflavonoids. In: AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. New York: Elsevier, 1989, p. 182-235.
- AGRAWAL P. K; THAKUR R.S.¹³C NMR spectroscopy of lignan and neolignan derivatives. **Magnetic Resonance Chemistry**, v. 23, p. 299-418, 1985.
- AMARAL, A. T.; MONTANARI, C. A. Química Medicinal: 25 Anos de planejamento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 39-44, 2002.
- ARAÚJO, E. C. C.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Spectral assignments of new diterpenes from *Hyptis martiusii* Benth. **Magnetic Resonance Chemistry**. v. 42, n. 12, p. 1049-1052, 2004.
- ARRIGONI-BLANK, M. F. et al. Antinociceptive activity of the volatile oils of *Hyptis pectinata* L. Poit. (Lamiaceae) genotypes. **Phytomedicine**. v. 15, n. 5, p. 334-339, 2008.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p.679-688, 2009.
- BARROS, L. F. L. **Estudo químico, atividade antimicrobiana e antioxidante das folhas de *Talauma ovata* A. St. Hil (Magnoliaceae)**. 2008. 140 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- BERETZ, A.; CAZENAVE, J. P. The effect of flavonoids on blood vessel wall interaction. **Progress in Clinical and biological Research**, v. 280, p. 187-200, 1988.
- BOHM, B. A. The minor Flavonoids. In: HARBORNE, J. B. **The Flavonoids: Advances in research since 1986**. London: Chapman & Hall, 1994. p. 387-433.
- BONUKLUGIL, B. Investigation of Podophyllotoxin in some Plants in Lamiaceae Using HPLC. **Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara**. v. 25, n. 1, p. 23-27, 1996.
- BRACKE, M. E.; PESTEL, G.; GASTRONOVO, G.; VYNCKE, B.; FOIDART, J. M.; VAKACT, L. C. A.; MARCEL, M. M. **Plant flavonoids in biology and medicine II: progress in clinical and biological research**. New York: J. B. Liss, 1988.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BREITMAIER, E.; VOELTER, W. **Carbon-13 NMR Spectroscopy: High Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry**. 3. Ed., New York: Ed. Weinheim VHC, 1990. 515 pp.

BRUNETON, J. Farmacognosia, Fitoquímica, **Plantas medicinales**. Espanha: Editora Acribia, 2º ed., parte 2 ,1993, p. 227.

BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 49, n. 6, p. 2774-2779, 2001.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.131-134, 2005.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármacos segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos Ed. Universitária, 2001. p. 17-42.

CECHINEL FILHO, V.; 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**, v. 21, n. 1, p. 99-106, 1998.

CONSERVA L. M. Silva M. S., Braz Filho, R. Lignans from *Aristolochia birostris*. **Phytochemistry**. v. 29, p. 257-260. 1990.

DARIAS, V. et al. Cytostatic and Antibacterial Activity of Some Compounds Isolated from Several Lamiaceae Species from the Canary Islands. **Planta Medica**. v. 56, n. 1, p. 70-72, 1990.

DAVID, J. P. et. al. Lignanas e Triterpenos do Extrato Citotóxico de *Eriope blanchetii*. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 730-733, 2001.

DAVID, J. P. et al. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**. v. 78, p. 215-218, 2007.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2002.

DEWICK, P. M. Isoflavonoids. In: HARBORNE, J. B. **The Flavonoids: advances in research since 1986**. London: Chapman & Hall, 1994. p. 117-237.

DI CARLO, G. et al. Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationship. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 45, n. 12, p. 1054-1059, 1993.

DI CARLO, G. et al. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Science**. v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

DUBEY, V. S.; BHALLA, R.; LUTHRA, R. An Overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Journal of Biosciences**, v. 28, n. 5, p. 637, 2003.

EVANS, J. E. Osteoporosis and the role of diet. **British Journal of Biomedical Science**, v.51, p. 358-370, 1994.

FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero Hyptis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 84, n. 3, p. 69-74, 2003.

FELICIANO, A. S. et al. Lignans from *Juniperus thurifera*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 10, p. 2863-2866, 1989.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A.C. A Fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1829, 2010.

FOGLIO, M. A. et al. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **MultiCiência**, v. 7, p. 1-8, 2006.

FONSECA, S. F. RMN- ¹³C de lignanas de *Araucaria angustifolia*, de neolignanas ariltetralínicas e tetraidrofurânicas e de derivados da podofilotoxina. 1980. 223 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 1980.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animals Cells: A Manual of Basic Technique**. 3th. ed. New York: Wiley-Liss, 1994, p. 486.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Quantitative chemical biology IV: analogies of metabolical mechanism and biological evolution. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 70, p. 719-726, 1998.

GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M. Lignóides: Com Atenção Especial à Química das Neolignanas. **Química Nova**, v. 7, n. 4, p. 250-269, 1984.

GÜVENALP, Z.; DEMIREZER, L. Ö. Flavonol Glycosides from *Asperula arvensis* L. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 29, p. 163-169, 2005.

HELLER, W.; FORKMANN, G. Biosynthesis of flavonoids. In: HARBORNE, J. B. **The Flavonoids**. London: Chapman & Hall, 1994. p. 499-536.

HARBORNE, J. B. **Methods in plant biochemistry**. v. 1. Plant phenolics. London: Academic Press, 1989.

HOSSAIN, M. B. et al. Characterization of Phenolic Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 19, p. 10576-10581, 2010.

JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOGG, E. A., STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Plant Systematics**: a phylogenetic approach. 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002. p. 466-468, p. 470-473.

KASAI, R. et al. Sweet and bitter cucurbitane glycosides from *Hemsleya carnosiflora*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 1371-1376, 1987.

LEMES, G. F. et al. Constituintes químicos de *Hyptidendron canun* (Pohl ex Benth.) R. Harley (Lamiaceae). **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 39-42, 2011.

LEMOS, T. L. G. et al. Quinones from plants of northeastern Brazil: structural diversity, chemical transformations, NMR data and biological activities. **Natural Product Research**, v. 21, n. 6, p.529-550, 2007.

LIMA, V. B. **Estudo fitoquímico de *Himatanthus obovatus* (Muell. Arg.) Woodson (Apocynaceae): Isolamento, elucidação estrutural e atividade biológica**. 2005. 174 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química. UNICAMP, Campinas, 2005.

LOPES, W. B. et al. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. **Horizonte Científico**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2002.

LOPES L. M. X. 1983. **Constituintes químicos de frutos de *Virola sebifera***. Vol. I. 135 p. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo São Paulo, São Paulo 1983.

LUNA, J. S. et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 199-206, 2005.

LUCKNER, M. **Secondary Metabolism in Plants and Animals**. Great Britain: Science Paperbacks, 1969. p. 122-151.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. 13 C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MAHATO, S. B.; SEN, S. Advances in triterpenoid research 1990-1994. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7 p. 1185-1236, 1997.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141p.

McLAUGHLIN, J. L. Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractions. In: Dey PM, Harbone J. B. **Methods in Plant Biochemistry**. New York: Academic Press, 1991. p.1-32.

MEDEIROS, F. A. **Estudo fitoquímico e biológico de espécies Amazônicas: *Pradosia huberi* (Ducke) Ducke (Sapotaceae) e *Licania macrophylla* Bent. (Chrysobalanaceae)**. 2008. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

MELO, P. S.; DURÁN, N.; HAUN, M. Cytotoxicity of derivatives from dehydrocrotonin on V79 cells and *Escherichia coli*. **Toxicology**, v. 159, p. 135-141, 2001.

MENEZES, F. S. **Base química de tendências filogenéticas em Lamiiflorae**. 1994. 94 p. Dissertação (Mestrado) - Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1994.

MESSANA, I. et al. (-)-Salzol, na isopimarane diterpene, and a chalcone from *Hyptis salzmanii*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 1, p. 329-332, 1990.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-4, 1982.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide - physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**. v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MONTEIRO, M. C. M. et al. Constituintes químicos isolados dos caules de *Michelia Champaca*. **Eclética Química**, v. 32, n. 3, p. 13-18, 2007.

NASCIMENTO, I. A.; ARAÚJO, M. M. S. Testes Ecotoxicológicos Marinhos: Análise de Sensibilidade. **Ecotoxicology and Environmental Restoration**, v. 2, n. 1, p. 41-47, 1999.

NASCIMENTO, J. E. et al. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, p. 143-148, 2008.

NASCIMENTO, M. S. J. et al. Effect of Natural 2,5-Diaryl-3,4-dimethyltetrahydrofuran Lignans on Complement Activation, Lymphocyte Proliferation, and Growth of Tumor Cell Lines. **Pharmaceutical Biology**. v. 42, n. 6, p. 449-453, 2004.

NIERO, R.; MALHEIROS, A. Principais Aspectos Químicos e Biológicos de Terpenos. In: Cechinel Filho, V.; Yunes, R. A. **Química de Produtos Naturais, Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia**. Itajaí: Univali, 2007. p. 239-257.

NOLDIN, V. F.; ISAIAS, D. B.; CECHINEL FILHO, V. Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 549-554, 2006.

OHMORI, K.; OHRUI, H.; SUZUKI, K. First synthesis of astilbin, biologically active glycosyl flavonoid isolated from Chinese folk medicine. **Tetrahedron Letters**, v. 41, n. 29, p. 5527-5541, 2000.

ÖZGEN, U. et al. Relationship Between Chemical Structure and Antioxidant Activity of Luteolin and Its Glycosides Isolated from *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus*. **Records of Natural Products**, v. 5, n. 1, p. 12-21, 2011.

PARK, H. B. et al. Lignans from the Roots of *Berberis amurensis*. **Natural Product Sciences**. v.15, n.1, p. 17-21, 2009.

PATORA J.; KLIMEK B. Flavonoids from Lemon Balm (*Melissa officinalis* L., *Lamiaceae*). **Acta Polonica Pharmaceutica - Drug Research**. v. 59, n. 2, p. 139-143, 2002.

PEERZADA, N. Chemical composition of the Essential oil of *Hyptis suaveolens*. **Molecules**. v. 2, n. 11, p. 165-168, 1997.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**. v. 63, n. 7, p.1035-1042, 2000.

RIOS, J. L., GINER, R. M., PRIETO, J. M. New Findings on the Bioactivity of Lignans. **Studies in Natural Products Chemistry**, v.26, p. 183-292, 2002.

ROCHA, L. M. **Investigation phytochimique de Hypericum brasiliense (Gutiferae)**. Lausanne. 1995. 220 p. Tese (Doutorado em Fitoquímica) - Institut de Pharmacognosie et Phytochimie, Université de Lausanne, Lausanne, 1995.

SAHPAZ, S. et al. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. **Planta Medica**, v. 60, p. 538-40, 1994.

SILVA, J. G. S. et al. Chemotaxonomic Significance of Volatile Constituents in *Hypernia* (Mart. ex Benth.) R. Harley (Lamiaceae). **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v. 22, n. 5, p. 955-960, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, 1104 p.

SMITH, D. A.; BANK, S. W. **Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure - activity Relationship**. New York: Alan R. Liss, 1986. p. 113-124.

SOIKE, H.; PESCHLOW, E. L. Characterization of flavonoids from *Bacharis trimera* and their antihepatotoxic properties. **Planta Medica**, v. 53, p. 37-39, 1987.

SONG, Q.; FISCHER, N.H., Biologically Active Lignans and Neolignans from Magnolia Species. **Revista de la Sociedad Química de México**, v. 43, n. 6, p. 211-218, 1999.

SUZUKI, S.; UMEZAWA, T. Biosynthesis of lignans and norlignans. **Journal of Wood Science**. V. 53, p. 274-284, 2007.

TORSSELL, K. B. G.; **Natural Product Chemistry: A mechanistic, biosynthetic and ecological approach**. 2. ed. Stocolm: Apotekarsocieteten-Swedish Pharmaceutical Society, 1997.

VASCONCELOS, J. M. J.; SILVA, A. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S. Chromones and flavanones from *Artemisia campestris* subsp. maritima. **Phytochemistry**, v. 49, n. 5, p. 1421-1424, 1998.

VON-POSER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6. ed. Porto Alegre : Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 75-89.

WANG, Y. et al. Lignans and Triterpenoids from *Cissus repens* (Vitaceae). **Acta Botanica Yunnanica**, v. 28, n. 4, p. 433-437, 2006.

WOO, E. R.; PIAO, M. S. Antioxidative Constituents from *Lycopus lucidus*. **Archives Pharmacal Research**, v. 27, n. 2, p. 173-176, 2004.

YAZUKAWA, K.; TAKIDO, M. A flavonol glycoside from *Lysimanchia mauritana*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 1224-1226, 1987.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Novas perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de Produtos Naturais, Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia**. Itajaí: Univali, 2007. 320 p.

ZANI, C. L. et al. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **Phytomedicine**, v. 2, p. 47-50, 1995.

ZELLNER, B. D. et al. Screening of the Odour-Activity and Bioactivity of the Essential Oils of Leaves and Flowers of Hyptis Passerina Mart. from the Brazilian Cerrado. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**. v. 20, n. 2, p. 322-332, 2009.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed., Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2007. p. 577-614.