

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS

FÁBIO HENRIQUE TENÓRIO DE SOUZA

FITOQUÍMICA DE *Borreria verticillata* (L.) G. MEY.,
Borreria ocymoides (BURM. F.) DC. E *Richardia brasiliensis*
GOMES (RUBIACEAE)

SARVENTIA ÆDIFICAT

João Pessoa – PB
2013

FÁBIO HENRIQUE TENÓRIO DE SOUZA

**FITOQUÍMICA DE *Borreria verticillata* (L.) G. MEY.,
Borreria ocymoides (BURM. F.) DC. E *Richardia brasiliensis*
GOMES (RUBIACEAE)**

Tese 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 Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Área de Concentração Farmacoquímica.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Celidarque da Silva Dias

João Pessoa – PB

2013

S729f Souza, Fábio Henrique Tenório de.
Fitoquímica de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey., *Borreria ocymoides* (Burm. f.) DC. e *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae) / Fábio Henrique Tenório de Souza.- João Pessoa, 2013.
202f. : il.
Orientadora: Celidarque da Silva Dias
Tese (Doutorado) – UFPB/CCS
1. Produtos naturais. 2. Farmacoquímica. 3. Rubiaceae.
4. *Borreria verticillata*. 5. *Borreria ocymoides*. 6. *Richardia brasiliensis*. 7. Fitoquímica.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

FÁBIO HENRIQUE TENÓRIO DE SOUZA

FITOQUÍMICA DE *Borreria verticillata* (L.) G. MEY., *Borreria ocymoides* (BURM. F.) DC. E *Richardia brasiliensis* GOMES (RUBIACEAE)

Tese defendida em 27 de Setembro de 2013

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Celidarque da Silva Dias

PhD em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (Farmacoquímica)
Departamento de Ciências Farmacêuticas – Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Orientadora)

Profa. Dra. Liana Clébia de Moraes Pordeus

PhD em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (UFPB)
Departamento de Fisiologia e Patologia
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Membro Externo)

Profa. Dra. Nataly Albuquerque dos Santos

PhD em Química (UFPB)
Departamento de Química
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Membro Externo)

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues

PhD em Química Orgânica (USC)
Departamento de Biologia Celular e Molecular
Centro de Biotecnologia
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Membro Interno)

Profa. Dra. Barbara Viviana de O. Santos

PhD em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (UFPB)
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Membro Interno)

BOLA DE MEIA, BOLA DE GUDE

Milton Nascimento e Fernando Brant

Há um menino
Há um moleque
Morando sempre no meu coração
Toda vez que o adulto balança
Ele vem pra me dá a mão

Há um passado no meu presente
Um sol bem quente lá no meu quintal
Toda vez que a bruxa me assombra
O menino me dá a mão

E me fala de coisas bonitas
Que eu acredo
Que não deixarão de existir
Amizade, palavra, respeito
Caráter, bondade, alegria e amor

Pois não posso
Não devo
Não quero
Viver como toda essa gente
Insiste em viver
E não posso aceitar sossegado
Qualquer sacanagem ser coisa normal

Dedico este trabalho aos meus amados pais, **Cícero Mariano de Souza e Maria Aparecida Tenório de Souza**, por todo o amor, o carinho, a preocupação e a dedicação que sempre demonstraram ter a mim. Pelos esforços (e sei que foram muitos) e noites mal dormidas em favor de minha educação e que me permitiram chegar até aqui. Saibam que esta vitória é NOSSA. Que estas palavras sejam a expressão da minha gratidão por tudo que lhes devo. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Para esta etapa ser concretizada foi preciso muito esforço, determinação, paciência e perseverança, e nada disso eu conseguiria sozinho. Minha eterna gratidão a todos aqueles que colaboraram para que este sonho pudesse ser concretizado.

As minhas irmãs, **Flávia Danielly Tenório de Souza** e **Flaviane Michelly Tenório de Souza** pelo carinho e convivência quase sempre harmoniosa (risos) e também por juntas, suportarem esse irmão chatíssimo, mas que ama muito de vocês.

As eternas amigas **Daysianne Pereira de Lira**, **Analúcia Guedes Silveira Cabral** (Frustreca) e **Thaisa Leite Rolim** pela amizade sincera, ensinamentos, conversas sempre acompanhadas de muito bom humor, pelo carinho, por compartilhar os desafios, as esperanças, os desafios e as dificuldades. Muitíssimo obrigado, principalmente pela generosidade e preocupação de TODAS.

Ao casal de amigos **Socrates Gózio dos Santos** e **Adriana Maria Fernandes de Oliveira** pela amizade eterna, pelo carinho, pelo exemplo de companheirismo e lealdade. Vocês foram um incentivo para que eu concluísse este doutorado. Obrigado pela torcida, pelos ensinamentos, conversas agradáveis, por escutarem meus desabafos e sonhos e pelos jantares sempre muito saborosos.

A amiga **Danielle Serafim Pinto** pela amizade, carinho, cumplicidade e ensinamentos desde a época de iniciação científica. A **Anna Cláudia de Andrade Tomaz** também pela amizade sincera, carinho e por sempre torcer pela minha vitória. A **Charlane Kelly Souto Pereira** por ser uma pessoa sincera, amiga eterna, sensível e divertida, pelo compartilhamento de nossos dramas profissionais, pelo carinho e torcida.

A **Fabiana Lima Silva** pela amizade sincera, conversas, por compartilhar dos conhecimentos, pelos debates e críticas construtivos e pela torcida. A **Madalena Rocha Teles** (Gal) pela amizade divertida e sincera, pela preocupação, apoio e carinho. Também a **Vanine Mota Lemos**, a **Camila Carolina Bertozzo** e a **Ana Silvia Suassuna Carneiro Lúcio** pela amizade sincera e torcida.

A **Manuela Torres Souto**, **Christiane Bezerra de Araújo**, **Gabriela Lemos de Azevedo Maia**, **Karine Formiga Queiroga** (Ridxxxxícula) e **Juliana da Silva Brandi Oliveira** pela mesma amizade e por saber que mesmo distante torcem pela minha vitória.

A todos os amigos da turma de Doutorado 2009/2010 pela boa convivência e cumplicidade: **Ana Carolina de Carvalho Correia**, **Antonia Rosangela Soares Penha**, **Bruna Priscilla Vasconcelos Dantas**, **Camila Silva de Figueiredo**, **Charlane Kelly Souto Pereira**, **Daysianne Pereira de Lira**, **Fillipe de Oliveira Pereira**, **João Carlos Lima Rodrigues Pita**, **Marcelo Cavalcante Duarte**, **Maria do Carmo de Alustau**, **Thaisa Leite Rolim**, **Tiago Bezerra de Sá de Sousa Nogueira**, **Vitor Prates Lorenzo**, **Vivyanne dos Santos Falcão Silva**, **Wemerson Neves Matias** e **Rubens Batista Benedito**. Foi muito bom conhecer todos vocês.

Aos demais pós-graduandos Farmacoquímica, **Tainá Souza Silva**, **Vivianne Marcelino de Medeiros**, **Isis Fernandes Gomes**, **Hellane Fabrícia Sousa de Lucena**, **Jessica Celestino Ferreira Sousa**, **Rafaela dos Santos Soares**, **Sara Alves Lucena Madeiro**, **Ricardo Carneiro Montes**, **Marianne Guedes Fernandes**, **Sandro de Sousa Leal**, **Cinthia Silveira Queiroga**, **Jaqueline e Raquel Bezerra** e pela amizade, companheirismo e excelente convivência.

Aos amigos da Farmacologia, **Paula Regina Rodrigues Salgado** (Amada Mestra), **Fabíola Leles de Carvalho**, **Fagner Carvalho Leite**, **Jacqueline Alves Leite**, **Débora Ribeiro Meireles**, **Diogo Vilar da Fonseca**, **Tatianne Mota Batista**, **Tatyanna Kelvia Gomes de Souza**, **Heloisa Mara Batista Fernandes**, **Abrahão Alves de Oliveira Filho**, **Viviane Alves** pela amizade. Aos amigos do Laboratório de Farmacobotânica, **Kiriaki Nurit Silva** e **Nathalia Diniz Araújo**, pelos conselhos,

incentivos e amizade, e por ensinar os famosos cortes botânicos extremamente finos e manuais.

A minha orientadora, a professora **Celidarque da Silva Dias**, pela preocupação e ensinamentos durante esses sete anos de convívio. Por ter sempre confiado e acreditado em mim, aceitando ser minha orientadora desde a época da iniciação científica e por permitir e apoiar, sem reclamar (risos), a realização de tantos outros projetos desta minha vida tão hiperativa.

A professora **Sandra Rodrigues Mascarenhas** pela amizade, confiança, dedicação, incentivo e pelas diversas oportunidades proporcionadas, em particular, o convívio com os surdos que me tornou uma pessoa mais humana. Muito obrigado “*minha cara*”.

Ao professor **Josean Fechine Tavares** por ter contribuído com a minha formação na área de espectroscopia e por permitir realizar o estágio docêncio na disciplina “Fitoquímica”. A professora **Maria de Fátima Vanderlei de Souza** por também ter contribuído com a minha formação na área da espectroscopia no infravermelho e espectrometria de massas e pelo exemplo de dedicação.

Aos demais professores da Pós-Graduação, em especial, **Bagnólia Araújo Costa, Eduardo de Jesus Oliveira, Luis Cezar Rodrigues, Maria Célia de Oliveira Chaves e Marcia Regina Piuvezam** pelos ensinamentos.

Aos professores membros da banca examinadora, **Liana Clébia de Moraes Pordeus, Luis Cezar Rodrigues, Nataly Albuquerque dos Santos e Barbara Viviana de Oliveira Santos**, por aceitar o convite e colaborar com o meu trabalho.

Aos técnicos do Núcleo de Caracterização e Análise (NUCAL), **Vicente Carlos de Oliveira Costa e Alexsandro Fernandes**, pelo apoio na obtenção dos espectros de RMN. A **Severino Francisco Alves** (Seu Biu) pelo período em que destilou os solventes que foram utilizados neste trabalho. A **Wellington Lima Navarro** por realizar os experimentos de Infravermelho e por sempre estar disponível. A secretaria do curso de Pós-Graduação em Produtos Naturais e

Sintéticos, **Caroline Medeiros Mangueira**, por está sempre atenta e disponível a ajudar. A **Crispim**, do Biotério Thomas George, pelo fornecimento dos animais durante minha tentativa em realizar a parte farmacológica e por está sempre disponível a ajudar. A **Raimundo Nonato da Silva Filho** pela enorme ajuda nos experimentos, bem como, pela amizade, excelente convivência e por ser um exemplo de funcionário público. E a todos os seguranças e funcionários da limpeza e da manutenção por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar.

Aos amigos do Hospital de Emergência e Trauma Senador Humberto Lucena: aos farmacêuticos **Soloniel da Costa Silva, Ana Cristina Paulino, Teresa Cristina Melo, Valeska Ferreira, Elane Cristina Santos, Maria Raquel, Manuela Barbosa Cordeiro, Jucyleia Marques, Francisca Estrela, Suzanne Botelho, Thayse Viana Palomaro, Maria Betânia**, bem como, a **Mikaelly Laurindo** e aos demais auxiliares por ajudarem a flexibilizar meus horários para que fosse possível a realização dos experimentos e a concretização do doutorado.

A Universidade Federal da Paraíba pelo suporte técnico e estrutural; a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido e a todos os brasileiros que por meio do pagamento dos impostos, torna possível o desenvolvimento de pesquisas em nosso país.

A **Aquele** que eu nem sei ao certo quem é, mas que com certeza foi e é responsável para que tudo isto fosse real no dia de hoje, a quem eu devo a minha vida, minhas vitórias e o privilégio de conhecer todas estas pessoas.

Fábio Henrique Tenório de Souza

RESUMO

Os gêneros *Borreria* G. Mey. e *Richardia* L. pertencem a família Rubiaceae. *Borreria verticillata* (vassoura-de-botão) apresenta alcaloides indólicos e isoquinolínicos, iridoides, esteroides e sesquiterpenos e é utilizada popularmente para diabetes, infecções bacterianas, eczema, reumatismo, antitérmica e analgésica. *Borreria ocymoides* é utilizada no tratamento de micoses e eczemas e em decorrência da semelhança morfo-anatômica com *B. verticillata* acredita-se que possa estar sendo utilizada com as mesmas finalidades que esta última. Apesar de não haver relato na literatura do ponto de vista químico, triagens fitoquímicas preliminares revelaram presença de saponinas, taninos, glicosídios e antraquinonas. *Richardia brasiliensis* (ervanço e poaia) apresenta terpenóides, flavonóides e cumarinas. Estudos etnofarmacológicos indicam propriedades emética, antidiabética, vermífuga e para o tratamento de eczema, queimaduras, bronquite, gripe, hemorróida e malária avícola. Este trabalho objetivou contribuir com os estudos fitoquímicos da família Rubiaceae utilizando *B. verticillata*, *B. ocymoides* e *R. brasiliensis*. Para isto, as espécies vegetais foram coletadas, identificadas e depositadas no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB). Após secagem e pulverização, o pó das plantas foi submetido a processos de extração e particionamento. Em seguida, a fase cromatográfica foi submetida a métodos cromatográficos e espectroscópicos para isolamento e identificação das substâncias, respectivamente. *B. verticillata* revelou o predomínio metabólitos secundários pertencentes à classe dos terpenoides (β -sitosterol, estigmasterol, ácido betulínico, ácool betulínico, ácido oleanólico, ácido ursólico, uvaol e 3β -hidroxiurs-11-en-28,13- β -olídio), bem como, derivados porfirínicos (feofitina a, feofitina b e 15^1 -hidroxi-(15^1 -S)-porfirinolactona a). *B. ocymifolia* apresentou predomínio de substâncias fenólicas uma vez que foram isoladas cumarinas (escopoletina, umbelifera e cumarieletefina), antraquinonas (2-hidroxi-3-metoxi-6-metilantraceno-9,10-diona e 2-hidroxi-3-metilantraceno-9,10-diona), além do ácido p-hidroxicinâmico e ácido ursólico, mostrando um perfil químico diferente para essas borrérias morfologicamente semelhantes. *R. brasiliensis* demonstrou a presença dos terpenóides: ácido ursólico e uvaol.

Palavras-chave: Rubiaceae, *Borreria verticillata*, *Borreria ocymoides*, *Richardia brasiliensis*, Fitoquímica.

ABSTRACT

The genera *Borreria* G. Mey. and *Richardia* L. belong to Rubiaceae family. *Borreria verticillata* (vassoura-de-botão) presents indole and isoquinoline alkaloids, iridoids, sesquiterpenes and steroids. It is popularly used for diabetes, bacterial infections, eczema, rheumatism, analgesic and antipyretic. *Borreria ocymoides* is used to treat fungal infections and eczema and due to morphological and anatomical similarity with *B. verticillata* is believed that might be being used with the same purposes as *B. verticillata*. Although there are no reports in the chemical literature, preliminary phytochemical screening revealed the presence of saponins, tannins, glycosides and anthraquinones. *Richardia brasiliensis* (ervanço and poaia) presents terpenoids, flavonoids and coumarins. Ethnopharmacological studies indicate emetic, antidiabetic, anthelmintic properties and for the treatment of eczema, burns, bronchitis, influenza and hemorrhoid. This work contributed to the phytochemical family Rubiaceae using *B. verticillata*, *B. ocymoides* and *R. brasiliensis*. For this, the plants were collected, identified and deposited in the “Prof. Lauro Pires Xavier (JPB)” herbarium. Dried and pulverized, the powder plant was subjected to extraction and partitioning. Then, the phase chromatography was subjected to chromatographic and spectroscopic methods for isolation and identification of substances, respectively. *B. verticillata* revealed the predominance of secondary metabolites belonging to the class of terpenoids (β -sitosterol, stigmasterol, betulinic acid, alcohol betulinic, oleanolic acid, ursolic acid, uvaol and 3β -hydroxyurs-11-en-28,13- β -olide) and as porphyrin derivatives (pheophytin a, pheophytin b and 15^1 -hydroxy-(15^1 -S)-porphyrin lactone a). *B. ocymifolia* showed a predominance of phenolic substances as coumarins (scopoletin, umbelliferone and cumariletephyn), anthraquinones (2-hydroxy-3-methoxy-6-metilantracen-9,10-dione and 2-hydroxy-3-metilantracen-9,10-dione), and *p*-hydroxycinnamic acid and ursolic acid, showing a different chemical profile to morphologically similar *Borreria*. *R. brasiliensis* showed the presence of terpenoids: ursolic acid and uvaol.

Keywords: Rubiaceae, *Borreria verticillata*, *Borreria ocymoides*, *Richardia brasiliensis*, Phytochemical.

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 Analítica
CCEN	Centro de Ciências Exatas e da Natureza
CD₃OD	Metanol deuterado
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CHCl₃	Clorofórmio
CH₃OH	Metanol
cm	Centímetro
compr.	Comprimento
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
<i>d</i>	Duplo
<i>dd</i>	Duplo duplo
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EEB	Extrato Etanólico Bruto
EtOH	Etanol
g	Gramas
H₂O	Água
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
KBr	Brometo de potássio
kg	Quilograma
<i>m</i>	Multiplo
MeOD	Metanol deuterado

MeOH	Metanol
mg	Miligramma
MHz	Megahertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
n-BuOH	n-butanol
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NUCAL	Núcleo de Caracterização e Análise
OMS	Organização Mundial de Saúde
pág.	Página
ppm	Partes por milhão
q	Quarteto
R_f	Fator de Retenção
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Simpleto
sl	Simpleto largo
SUS	Sistema Único de Saúde
t	Tripleto
tq	Tripleto de quintetos
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico em ppm
μg	Micrograma

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Etapas envolvidas no processo de obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto das espécies estudadas	37
Esquema 2	Etapas do processamento cromatográfico da fase clorofórmica de <i>Borreria verticillata</i>	41
Esquema 3	Etapas do processamento cromatográfico da fase clorofórmica de <i>Borreria ocymoides</i>	43
Esquema 4	Etapas do processamento cromatográfico da fase clorofórmica de <i>Richardia brasiliensis</i>	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição geográfica da família Rubiaceae representado em vermelho	8
Figura 2	Ilustração de alguns representantes da família Rubiaceae: <i>Coffea arabica</i> (a) <i>Ixora</i> sp. (b), <i>Cinchona</i> sp. (c) e <i>Psychotria ipecacuanha</i> (d) com detalhes referentes ao sistema reprodutor da planta	9
Figura 3	Exemplos de substâncias isoladas de espécies pertencentes a família Rubiaceae	12
Figura 4	Distribuição geográfica do gênero <i>Borreria</i> G. Mey. representada pelas áreas em amarelo	14
Figura 5	Exemplos de substâncias isoladas de espécies pertencentes ao gênero <i>Borreria</i>	16
Figura 6	Distribuição geográfica de <i>Borreria verticillata</i> (L.) G. F. W. Meyer representado em verde	20
Figura 7	Partes aéreas de <i>Borreria verticillata</i> (L.) G. Meyer	21
Figura 8	Substâncias isoladas de <i>Borreria verticillata</i> (L.) G. Meyer	22
Figura 9	Distribuição geográfica de <i>Borreria ocymoides</i> (Burm. f.) DC. representada pelas áreas em amarelo	24
Figura 10	Partes aéreas de <i>Borreria ocymoides</i> (Burm. f.) DC.	25
Figura 11	Distribuição geográfica do gênero <i>Richardia</i> no mundo, representada nas áreas em amarelo	26
Figura 12	Exemplos de substâncias isoladas do gênero <i>Richardia</i> (L.)	29
Figura 13	Distribuição geográfica de <i>Richardia brasiliensis</i> , representada nas áreas em amarelo	30
Figura 14	Partes aéreas de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes	31
Figura 15	Substâncias isoladas de <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes	32
Figura 16	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de Bv-1	51
Figura 17	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de Bv-1	52

Figura 18	Esqueleto carbônico dos principais tipos de triterpenos encontrados em vegetais e deslocamentos químicos dos carbonos metínicos utilizados neste trabalho como norteadores	54
Figura 19	Deslocamentos químicos dos carbonos C-1, C-3, C-5 e C-23 na ausência e na presença de hidroxilas com orientação α ou β , e projeção de Newman para visualização do efeito γ -gauche sofrido pelo carbono C-23 quando a hidroxila apresenta orientação β	56
Figura 20	Espectro de RMN ^1H ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OH}$, 200 MHz) de Bv-2	58
Figura 21	Espectro de RMN ^{13}C -APT ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OH}$, 50 MHz) de Bv-2 ..	59
Figura 22	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de Bv-3	62
Figura 23	Espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 50 MHz) de Bv-3	63
Figura 24	Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de Bv-4	65
Figura 25	Espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de Bv-4	67
Figura 26	Espectro de RMN ^{13}C – APT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de Bv-4	68
Figura 27	Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de Bv-5	70
Figura 28	Espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de Bv-5	72
Figura 29	Espectro de RMN ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de Bv-5	73
Figura 30	Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de Bv-6	78
Figura 31	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Bv-6	80
Figura 32	Espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 125 MHz) de Bv-6	81
Figura 33	Espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Bv-6	82
Figura 34	Expansão do espectro HMQC de Bv-6 na região de (3,0 – 5,2 ppm) x (70,0 – 125,0 ppm)	82
Figura 35	Expansão do espectro HMQC de Bv-6 na região de (0,6 – 1,7 ppm) x (34,0 – 56,0 ppm)	83
Figura 36	Expansão do espectro HMQC de Bv-6 na região de (0,9 – 1,9 ppm) x (17,0 – 33,0 ppm)	83
Figura 37	Expansão do espectro HMQC de Bv-6 na região de (0,7 – 1,0 ppm) x (14,0 – 18,5 ppm)	84

Figura 38	Espectro HMBC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Bv-6	84
Figura 39	Expansão do espectro HMBC de Bv-6 na região de (3,0 – 3,7 ppm) x (15,0 – 55,0 ppm)	85
Figura 40	Expansão do espectro HMBC de Bv-6 na região de (0,7 – 2,0 ppm) x (80,0 – 140,0 ppm)	85
Figura 41	Expansão do espectro HMBC de Bv-6 na região de (1,3 – 2,0 ppm) x (15,0 – 70,0 ppm)	86
Figura 42	Expansão do espectro HMBC de Bv-6 na região de (0,7 – 1,5 ppm) x (15,0 – 55,0 ppm)	86
Figura 43	Espectro COSY (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Bv-6	87
Figura 44	Expansão do espectro COSY de Bv-6 na região de (1,5 – 5,0 ppm) x (1,5 – 5,0 ppm)	87
Figura 45	Expansão do espectro COSY de Bv-6 na região de (0,5 – 2,1 ppm) x (0,5 – 2,1 ppm)	88
Figura 46	Espectro NOESY (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Bv-6	88
Figura 47	Expansão do espectro NOESY de Bv-6 na região de (0,6 – 2,1 ppm) x (0,6 – 2,1 ppm)	89
Figura 48	Deslocamentos químicos dos carbonos olefínicos simulado no programa ChemBioDraw Ultra 12.0 para diferentes alcenos dissubstituídos	91
Figura 49	Espectro de Infravermelho (KBr, cm ⁻¹) de Bv-7	93
Figura 50	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de Bv-7	96
Figura 51	Espectro de RMN ¹³ C – APT (CDCl ₃ , 125 MHz) de Bv-7	97
Figura 52	Espectro HMQC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Bv-7	98
Figura 53	Expansão do espectro HMQC de Bv-7 na região de (3,2 – 6,0 ppm) x (80,0 – 130,0 ppm)	98
Figura 54	Expansão do espectro HMQC de Bv-7 na região de (0,7 – 2,1 ppm) x (50,0 – 63,0 ppm)	99
Figura 55	Expansão do espectro HMQC de Bv-7 na região de (0,6 – 1,9 ppm) x (14,0 – 40,0 ppm)	99
Figura 56	Expansão do espectro HMQC de Bv-7 na região de (0,6 – 1,3 ppm) x (13,0 – 21,0 ppm)	100

Figura 57	Espectro HMBC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Bv-7	100
Figura 58	Expansão do espectro HMBC de Bv-7 na região de (5,5 – 6,0 ppm) x (35,0 – 90,0 ppm)	101
Figura 59	Expansão do espectro HMBC de Bv-7 na região de (1,5 – 2,1 ppm) x (130,0 – 180,0 ppm)	101
Figura 60	Expansão do espectro HMBC de Bv-7 na região de (1,9 – 3,2 ppm) x (15,0 – 60,0 ppm)	102
Figura 61	Expansão do espectro HMBC de Bv-7 na região de (0,7 – 1,7 ppm) x (77,0 – 92,0 ppm)	102
Figura 62	Expansão do espectro HMBC de Bv-7 na região de (0,8 – 1,4 ppm) x (51,0 – 62,0 ppm)	103
Figura 63	Expansão do espectro HMBC de Bv-7 na região de (1,3 – 1,8 ppm) x (15,0 – 46,0 ppm)	103
Figura 64	Expansão do espectro HMBC de Bv-7 na região de (0,7 – 1,3 ppm) x (13,0 – 33,0 ppm)	104
Figura 65	Expansão do espectro HMBC de Bv-7 na região de (0,7 – 1,2 ppm) x (35,0 – 46,0 ppm)	104
Figura 66	Espectro COSY (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Bv-7	105
Figura 67	Expansão do espectro COSY de Bv-7 na região de (1,5 – 6,0 ppm) x (1,5 – 6,0 ppm)	105
Figura 68	Expansão do espectro COSY de Bv-7 na região de (0,6 – 2,4 ppm) x (0,6 – 2,4 ppm)	106
Figura 69	Espectro NOESY (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Bv-7	106
Figura 70	Expansão do espectro NOESY de Bv-7 na região de (0,6 – 3,2 ppm) x (0,6 – 3,2 ppm)	107
Figura 71	Expansão do espectro NOESY de Bv-7 na região de (0,6 – 2,2 ppm) x (0,6 – 2,2 ppm)	107
Figura 72	Espectro de Infravermelho (KBr, cm ⁻¹) de Bv-8	112
Figura 73	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) de Bv-8	113
Figura 74	Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 50 MHz) de Bv-8	114
Figura 75	Espectro de Infravermelho (KBr, cm ⁻¹) de Bv-9	117

Figura 76	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de Bv-9	118
Figura 77	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de Bv-9	119
Figura 78	Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de Bv-10	123
Figura 79	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Bv-10	124
Figura 80	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de Bv-10	125
Figura 81	Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de Bo-1	127
Figura 82	Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de Bo-1	128
Figura 83	Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) de Bo-1	128
Figura 84	Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de Bo-2	129
Figura 85	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Bo-2	132
Figura 86	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de Bo-2	132
Figura 87	Espectro de RMN ^1H ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, 500 MHz) de Bo-3	134
Figura 88	Expansão do espectro de RMN ^1H ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, 500 MHz) de Bo-3	135
Figura 89	Espectro de RMN ^{13}C – BB ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, 125 MHz) de Bo-3	135
Figura 90	Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de Bo-4	140
Figura 91	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Bo-4	140
Figura 92	Espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 125 MHz) de Bo-4	141
Figura 93	Correlações a duas e três ligações entre os hidrogênios e carbonos no espectro HMBC e correlações espaciais no espectro NOESY observadas nos espectros de Bo-5	144
Figura 94	Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de Bo-5	146
Figura 95	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Bo-5	146
Figura 96	Espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 125 MHz) de Bo-5	147
Figura 97	Espectro de RMN ^{13}C – BB (CDCl_3 , 125 MHz) de Bo-5	147
Figura 98	Espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Bo-5	148
Figura 99	Expansão do espectro HMQC de Bo-5 na região de (7,5 – 8,3 ppm) x (106,0 - 136,0 ppm)	148

Figura 100	Espectro HMBC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Bo-5	149
Figura 101	Expansão do espectro HMBC de Bo-5 na região de (7,5 - 8,2 ppm) x (125,0 - 190,0 ppm)	149
Figura 102	Expansão do espectro HMBC de Bo-5 na região de (7,4 - 8,2 ppm) x (15,0 - 32,0 ppm)	150
Figura 103	Expansão do espectro HMBC de Bo-5 na região de (2,4 - 4,2 ppm) x (125,0 - 155,0 ppm)	150
Figura 104	Espectro COSY (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Bo-5	151
Figura 105	Espectro NOESY (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Bo-5	151
Figura 106	Correlações a duas e três ligações entre os hidrogênios e carbonos no espectro HMBC e correlações espaciais no espectro NOESY observadas nos espectros de Bo-6	153
Figura 107	Espectro de Infravermelho (KBr, cm ⁻¹) de Bo-6	155
Figura 108	Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) de Bo-6	155
Figura 109	Espectro de RMN ¹³ C – APT (CD ₃ OD, 125 MHz) de Bo-6	156
Figura 110	Espectro HMQC (CD ₃ OD, 500 e 125 MHz) de Bo-6	156
Figura 111	Expansão do espectro HMQC de Bo-6 na região de (7,5 - 8,3 ppm) x (60,0 - 170,0 ppm)	157
Figura 112	Espectro HMBC (CD ₃ OD, 500 e 125 MHz) de Bo-6	157
Figura 113	Expansão do espectro HMBC de Bo-6 na região de (7,5 - 8,2 ppm) x (115,0 - 185,0 ppm)	158
Figura 114	Expansão do espectro HMBC de Bo-6 na região de (1,6 – 3,0 ppm) x (130,0-165,0 ppm)	158
Figura 115	Espectro COSY (CD ₃ OD, 500 e 125 MHz) de Bo-6	159
Figura 116	Espectro NOESY (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Bo-6	159

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Metabólitos secundários de espécies de <i>Borreria</i> (classe química, substâncias isoladas, espécie correspondente e referências)	18
Quadro 2	Metabólitos secundários de espécies do gênero <i>Richardia</i> (classe química, substâncias isoladas, espécie correspondente e referências)	28
Quadro 3	Dados de coleta, número de exsicatas, massa do material botânico fresco e seco, massa do EEB e volumes de solventes utilizados na partição e massa das fases obtidas para as espécies estudadas neste trabalho	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Deslocamentos químicos e tipos de sinais para os átomos de carbono e hidrogênio de Bv-1, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente) em CDCl_3 , bem como, os deslocamentos químicos dos carbonos (δ_{C}^*) apresentados por Tomaz (2008) para β -sitosterol e estigmasterol	50
Tabela 2	Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_{H}) e carbono (δ_{C}) de Bv-2, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OH}$), bem como, aqueles apresentados por Maia (2008) para o ácido betulínico (200 e 50 MHz, respectivamente, CDCl_3)	57
Tabela 3	Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_{H}) e carbono (δ_{C}) de Bv-3, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente, CDCl_3), bem como, aqueles apresentados por Maia (2008) para o álcool betulínico (200 e 50 MHz, respectivamente, CDCl_3)	61
Tabela 4	Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_{H}) e carbono (δ_{C}) de Bv-4, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), bem como, aqueles apresentados por Seebacher e colaboradores (2003) para o ácido oleanólico (600 e 200 MHz, respectivamente, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	66
Tabela 5	Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_{H}) e carbono (δ_{C}) de Bv-5, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), bem como, aqueles apresentados por Seebacher e colaboradores (2003) para o ácido ursólico (600 e 200 MHz, respectivamente, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	71
Tabela 6	Deslocamentos químicos para os átomos de carbono (δ_{C}) de Bv-6, verificados no espectro de RMN ^{13}C – APT (125 MHz, CDCl_3), bem como, aqueles apresentados por Siddiqui e colaboradores (1989) para a obtusalina (100 MHz, CDCl_3), por Siddiqui e Begum (1999) para obtusol (125 MHz, CDCl_3) e por Zhang e colaboradores (2012) para uvaol (125 MHz, CDCl_3) ...	75
Tabela 7	Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para os átomos de carbono (δ_{C}) e hidrogênio (δ_{H}) da substância Bv-6, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C – APT (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CDCl_3	79

Tabela 8	Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para os átomos de carbono (δ_C) e hidrogênio (δ_H) da substância Bv-7, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C – APT (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em $CDCl_3$	94
Tabela 9	Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Bv-7, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente, $CDCl_3$), bem como, aqueles apresentados por Pinto (2008) para o 3 β -hidroxiurs-11-en-28,13- β -olídio (200 e 50 MHz, respectivamente, $CDCl_3$)	95
Tabela 10	Dados de RMN 1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente, em $CDCl_3$) para Bv-8 e da Feofitina <i>a</i> citados por Schwikkard e colaboradores (1998) (300 e 75 MHz, respectivamente, $CDCl_3$)	111
Tabela 11	Dados de RMN 1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente, em $CDCl_3$) para Bv-9 e da Feofitina <i>b</i> citados por Schwikkard e colaboradores (1998) (300 e 75 MHz, respectivamente, $CDCl_3$)	116
Tabela 12	Dados de RMN 1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente, em $CDCl_3$) para Bv-10 e da porfirinolactona (400 e 100 MHz, respectivamente, em $CDCl_3$) citado por National (2004)	122
Tabela 13	Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Bo-1, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente, CD_3OD), bem como, aqueles apresentados por Souza Filho e colaboradores (2005) para o ácido <i>p</i> -hidroxicinâmico (300 e 75 MHz, respectivamente, CD_3OD)	127
Tabela 14	Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Bo-2, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente, $CDCl_3$), bem como, aqueles apresentados por Pinto e colaboradores (2008) para escopoletina (200 e 50 MHz, respectivamente, $CDCl_3$) e por Jiang e colaboradores (1996) para isoescopoletina (400 e 100 MHz, respectivamente, $CDCl_3$)	131
Tabela 15	Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Bo-3, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C – BB (500 e 125 MHz, respectivamente, C_3D_6O), bem como, aqueles apresentados por Liu e Tian (2004) para umbeliferona (500 e 125 MHz, respectivamente, C_3D_6O)	134

Tabela 16	Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Bo-4, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente, $CDCl_3$), bem como, aqueles apresentados por Tenório-Souza (2009) para cumarieletefina (500 e 125 MHz, respectivamente, $CDCl_3$)	139
Tabela 17	Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para os átomos de carbono (δ_C) e hidrogênio (δ_H) da substância Bo-5, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C – APT ou BB (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em $CDCl_3$..	144
Tabela 18	Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Bo-5, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente, $CDCl_3$), bem como, aqueles apresentados por Huang e colaboradores (2008) para o 7-hidroxi-3-metil-6-metoxi-9,10-antraquinona (500 e 125 MHz, respectivamente, $DMSO-d_6$)	145
Tabela 19	Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para os átomos de carbono (δ_C) e hidrogênio (δ_H) da substância Bo-6, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C – APT ou BB (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CD_3OD	154
Tabela 20	Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Bo-6, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente, CD_3OD), bem como, aqueles apresentados por Ismail, Alias e Osman (2012) para o 2-hidroxi-3-metil-9,10-antraquinona (300 e 75,5 MHz, respectivamente, C_3D_6O)	154

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	05
2.1. Objetivo geral	06
2.2. Objetivos específicos	06
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	07
3.1. Rubiaceae Jussieu: aspectos farmacobotânicos, químicos, etnofarmacológicos e farmacológicos	08
3.2. Gênero <i>Borreria</i> G. Mey.: aspectos farmacobotânicos, químicos e farmacológicos	14
3.2.1. <i>Borreria verticillata</i> (L.) G. Meyer	20
3.2.2. <i>Borreria ocymoides</i> (Burm. f.) DC	24
3.3. Gênero <i>Richardia</i> Linnaeus: aspectos farmacobotânicos, químicos e farmacológicos	26
3.3.1. <i>Richardia brasiliensis</i> Gomes	30
4. DESCRIÇÃO METODOLÓGICA	34
4.1. Coleta e identificação do material botânico	35
4.2. Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto (EEB)	35
4.3. Isolamento e purificação dos constituintes químicos	38
4.3.1. Processamento cromatográfico da fase clorofórmica de <i>Borreria verticillata</i>	39
4.3.2. Processamento cromatográfico da fase clorofórmica de <i>Borreria ocymoides</i>	42
4.3.3. Processamento cromatográfico da fase clorofórmica de <i>Richardia brasiliensis</i>	44

4.4. Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados	45
4.4.1. <i>Espectroscopia de infravermelho (IV)</i>	45
4.4.2. <i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	45
4.4.3. <i>Ponto de fusão</i>	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1. Determinação estrutural de Bv-1	49
5.2. Determinação estrutural de Bv-2	53
5.3. Determinação estrutural de Bv-3	60
5.4. Determinação estrutural de Bv-4	64
5.5. Determinação estrutural de Bv-5	69
5.6. Determinação estrutural de Bv-6	74
5.7. Determinação estrutural de Bv-7	90
5.8. Determinação estrutural de Bv-8	108
5.9. Determinação estrutural de Bv-9	115
5.10. Determinação estrutural de Bv-10	120
5.11. Determinação estrutural de Bo-1	126
5.12. Determinação estrutural de Bo-2	129
5.13. Determinação estrutural de Bo-3	133
5.14. Determinação estrutural de Bo-4	136
5.15. Determinação estrutural de Bo-5	142
5.16. Determinação estrutural de Bo-6	152
5.17. Determinação estrutural de Bo-7	160
5.18. Determinação estrutural de Rb-1 e Rb-2	160
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	161
REFERÊNCIAS	163

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os processos naturais para sobrevivência e evolução das plantas têm requerido adaptações das mesmas no sentido de atrair polinizadores, aumentar sua variabilidade genética, competir por espaço e, principalmente, se defender do ataque de herbívoros e patógenos em geral. Nesse sentido, as plantas têm desenvolvido ao longo de milhões de anos um complexo arsenal químico, responsável pela modulação do próprio metabolismo e também capaz de atuar em alvos moleculares específicos dos predadores (FERREIRA; PINTO, 2010).

Tais compostos químicos, conhecidos como metabólitos primários e secundários, também apresentam a capacidade de alcançar alvos terapêuticos de doenças humanas e isto possivelmente tenham sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais pelo homem (VIEGAS-JUNIOR; BOLZANI, 2006).

Esses conhecimentos passados aos europeus no período das Grandes Navegações por povos de diferentes culturas na Ásia, no Oriente Médio e na recém-descoberta América fizeram com que muitas dessas espécies medicinais fossem gradualmente sendo levadas e utilizadas na Europa. O comércio dos primeiros medicamentos provenientes de compostos isolados de plantas medicinais, bem sucedido até a Segunda Guerra, sofreu um grande declínio com o desenvolvimento de fármacos sintéticos, planejados a partir de modelos estruturais, e também com a descoberta de antibióticos produzidos por fermentação de fungos (CARDOSO, 2003).

Entretanto, nos últimos anos as indústrias farmacêuticas aumentaram a pesquisa com plantas, com o intuito de descobrir novas substâncias ativas (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003). Parte do interesse da indústria farmacêutica por produtos naturais deve-se à busca de novas substâncias com ação farmacológica única, ainda não descobertas por síntese (CARDOSO, 2003).

Para isso, diversas estratégias e metodologias têm sido empregadas como forma de se alcançar tais objetivos, sendo a química de produtos naturais uma das alternativas mais bem sucedidas historicamente. Nessa linha, muitos metabólitos

secundários se notabilizaram como matérias-primas valiosas para a produção de inúmeros medicamentos contemporâneos, comprovando que o estudo cooperativo entre Química de Produtos Naturais, a Botânica e a Farmacologia são imprescindíveis para a descoberta de fármacos inovadores (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Hoje estima-se que cerca de 20.000 espécies de plantas sejam conhecidas por diferentes povos por suas propriedades no tratamento de diversas enfermidades (FERREIRA; PINTO, 2010). Porém, a humanidade aproveita-se de uma fração muito pequena das plantas e o reino vegetal ainda permanece como uma grande incógnita (PINTO et al., 2002). Estima-se que apenas 5% de cerca de 350 mil espécies de plantas terrestres existentes no planeta têm sido estudadas fitoquimicamente e uma percentagem ainda menor têm sido avaliadas sob os aspectos farmacológicos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

O Brasil, segundo estimativas da Convenção da Diversidade Biológica (CDB), hospeda entre 15 a 20% de toda a biodiversidade do planeta, muitos completamente desconhecidos. Por isso a preservação dos biomas que abrigam todo o território brasileiro é fundamental tanto pelo valor intrínseco dessa riqueza biológica como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

A Caatinga apresenta-se como o bioma predominante na Paraíba, ocupando 92% da área. É caracterizada pelo elevado endemismo de espécies e gêneros vegetais, representados por árvores e arbustos lenhosos, espécies de suculentas e raras lianas, sendo a única grande região natural brasileira cujos limites estão inteiramente restritos ao território nacional. Apesar disso, ela é proporcionalmente a menos estudada com relação a sua biodiversidade (SILVA, 2005). Por outro lado, a Mata Atlântica ocupa porcentagem bem menos expressiva do estado da Paraíba (8% da área), entretanto constitui-se em um dos biomas mais estudadas, devido a sua alta heterogeneidade, cobrindo amplo rol de zonas climáticas e formações vegetacionais, de tropicais a subtropicais (TABARELLI et al., 2005).

Considerando-se o potencial químico-farmacológico de espécies vegetais localizadas nos dois biomas predominantes na Paraíba, este trabalho relata o estudo de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey., *Borreria ocymoides* (Burm. f.) D.C. e *Richardia*

brasiliensis Gomes, família Rubiaceae, cujos estudos químicos e farmacológicos ainda são pouco conhecidos, o que poderá conduzir à descoberta de novas fontes de substâncias naturais ativas.

Esse interesse pelas plantas medicinais e pelos produtos naturais aumenta ao considerarmos a problemática para os tratamentos atuais de várias patologias. As drogas ansiolíticas comercializadas, por exemplo, podem apresentar risco de dependência e síndrome de abstinência (ANDREATINI et al., 2001). Os analgésicos e anti-inflamatórios, por sua vez, podem produzir ulceração gástrica, intolerância gastrintestinal, bloqueio da agregação plaquetária e reações de hipersensibilidade (GYLMAN, 1996). Considerando isto, há a necessidade de investigação e pesquisa de novas drogas que possam diminuir tais efeitos colaterais e reações adversas e tratar de modo efetivo e seguro estas desordens, seja com o extrato bruto ou com os compostos isolados da imensa flora brasileira.

Desta forma, o conhecimento cada vez mais aprofundado das espécies vegetais, desenvolvido por estudos integrados nas áreas de química e farmacologia, e outras ciências afins, é fundamental para dar suporte e maior longevidade ao uso do potencial natural ainda existente no planeta.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- ✓ Contribuir com os estudos fitoquímicos e farmacológicos da família Rubiaceae utilizando três espécies: *Borreria verticillata* (L.) G. Mey., *Borreria ocymoides* (Burm. f.) D.C. e *Richardia brasiliensis* Gomes.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Extrair os constituintes químicos de *Borreria verticillata*, *Borreria ocymoides* e *Richardia brasiliensis* utilizando técnicas de maceração usuais.
- ✓ Isolar e purificar os constituintes químicos majoritários de *Borreria verticillata*, *Borreria ocymoides* e *Richardia brasiliensis* utilizando métodos cromatográficos, tais como, cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e preparativa (CCDP), cromatografia líquida em média pressão (CLMP) e cromatografia em coluna (CC).
- ✓ Determinar as estruturas dos constituintes químicos isolados de *Borreria verticillata*, *Borreria ocymoides* e *Richardia brasiliensis* utilizando métodos espectroscópicos, tais como, infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN ^1H e ^{13}C) uni e bidimensionais.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Rubiaceae Jussieu: aspectos farmacobotânicos, químicos, etnofarmacológicos e farmacológicos

Rubiaceae é considerada uma das maiores famílias das angiospermas, e a maior da ordem Gentianales. Segundo Delprete e Jardim (2012), apresenta cerca de 650 gêneros e aproximadamente 13.000 espécies, classificadas em quatro subfamílias (Cinchonoideae, Ixoroideae, Antirheoideae e Rubioideae) e 39 tribos. Habita as regiões tropicais e subtropicais do globo (Figura 1, pág. 08) (PEREIRA; BARBOSA, 2004; PEREIRA et al., 2006; VIEIRA et al., 2006; MONGRAND et al., 2005). No Brasil, a família Rubiaceae é representada por 18 tribos, 101 gêneros e 1.010 espécies, distribuídas por diversas formações vegetais e apresentando grande ocorrência na mata atlântica (PEREIRA et al., 2006). Pereira e Barbosa (2004) compilaram 66 gêneros e 277 espécies para a região Nordeste do país.

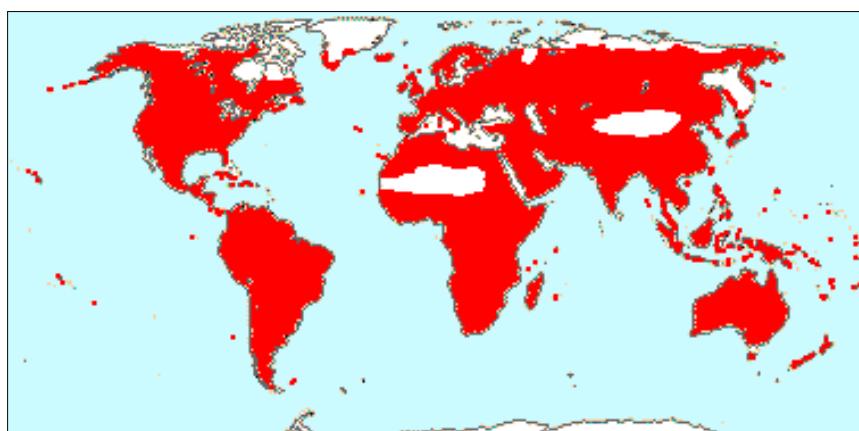


Figura 1. Distribuição geográfica da família Rubiaceae representado em vermelho (Adaptado de: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APWeb/>, Acesso em: 04 de Julho de 2013).

Representantes da família Rubiaceae são importantes componentes de subbosques de florestas neotropicais, onde há alta diversidade de sistemas reprodutivos e de polinização (VIEIRA et al., 2006). Várias de suas espécies são fontes de recursos para animais que se alimentam de pólen, néctar e frutos, sendo essenciais para o equilíbrio dos ecossistemas (LOPES; BUZATO, 2005).

Espécies dessa família (Figura 2, pág. 9) apresentam grande importância econômica, sendo exploradas como alimentícias (*Coffea arabica* L. e *Genipa americana* L.), ornamentais (*Ixora* spp., *Mussaenda* spp. e *Gardenia* spp.) e medicinais (*Cinchona pubescens* Vahl, empregada no tratamento da malária) (COELHO et al., 2006). Certas Rubiáceas também provocam danos ao setor agropecuário brasileiro, incluindo espécies daninhas de *Borreria*, *Richardia* e *Diodia*, conhecidas popularmente como poaias e espécies causadoras de intoxicação ao gado, principalmente pertencentes aos gêneros *Palicourea* e *Psychotria*, popularmente conhecidas como “mata-ratos” ou “erva-de-rato” (SOUZA; LORENZI, 2008).

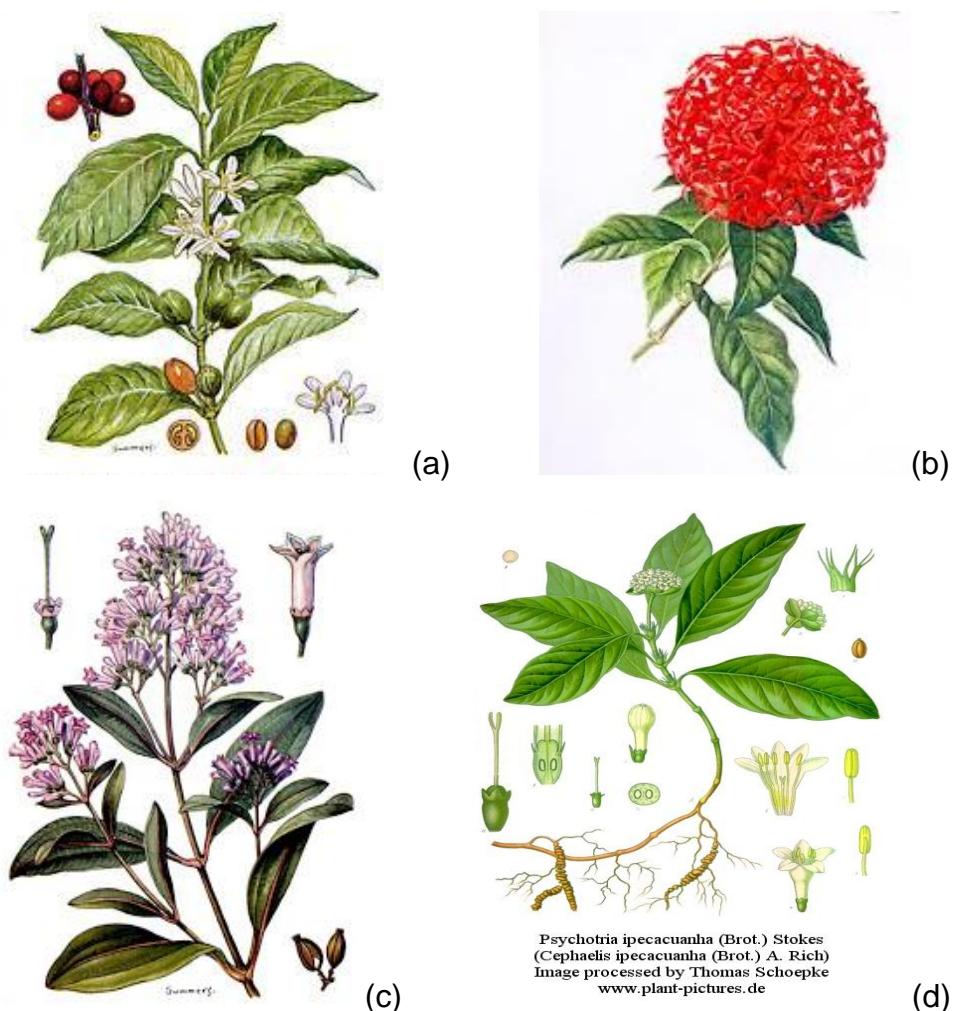


Figura 2. Ilustração de alguns representantes da família Rubiaceae: *Coffea arabica* (a) *Ixora* sp. (b), *Cinchona* sp. (c) e *Psychotria ipecacuanha* (d) com detalhes referentes ao sistema reprodutor da planta (Fonte: <http://www.botanical.com>, Acesso em: 13 de Julho de 2013).

Segundo Souza e Lorenzi (2008), a família Rubiaceae possui espécies que se apresentam como (Figura 2, pág. 9): ervas, subarbustos, arbustos ou árvores, menos frequentemente lianas; folhas opostas, menos frequentemente verticiladas, simples, quase sempre com estípulas interpeciolares. Inflorescência geralmente cimosa, às vezes formando glomérulo ou reduzida a uma única flor; flores vistosas, bissexuadas ou menos frequentemente unissexuadas, actinomorfas, geralmente diclamídeas; cálice 4-5-mero, geralmente dialissépalo, estames em número igual ao das pétalas, epipétalos, anteras rimosas; disco nectarífero presente ou não; ovário ínfero (súpero em *Pagamea*), 2(-5)-carpelar, (1-)2(-5)-locular, placentação axial, ereta ou pêndula, raramente parietal, geralmente uni a pauciovulada. Fruto cápsula, esquizocarpo, drupa ou baga.

Do ponto de vista etnomedicinal e farmacológico, diversas propriedades têm sido evidenciadas para algumas espécies de Rubiaceae: *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes, cuja presença de dois alcalóides em suas raízes, a emetina e a cefaelina, conferem-lhe propriedades emética, amebicida e expectorante (ASSIS; GIULIETTI, 1999; ROSSI et al., 2005); *Galianthe brasiliensis* (Spreng) E. L. utilizada na medicina popular como emética, além da efetiva atividade antiproliferativa do extrato metanólico bruto de suas partes aéreas, podendo estar relacionada, em parte, ao ácido ursólico e ao asperulosídeo presentes na espécie (MOURA et al., 2006); *Uncaria callophylla* indicada na Tailândia para o tratamento da hipertensão arterial e diversas enfermidades (CARBONEZI et al., 2004); *Uncaria gambir* utilizada na Malásia, na forma de pasta e loções, para alívio de queimaduras e afecções epidérmicas (CARBONEZI et al., 2004); e a *Gonzalagunia rosea* Standl cujo extrato metanólico apresenta bioatividade contra *Candida albicans* e *Fusarium solani* (NIÑO et al., 2006).

As investigações fitoquímicas revelaram os alcaloides indólicos como sendo os principais marcadores químicos desta família (CARBONEZI et al., 2004). No entanto, a família produz alcaloides pertencentes a mais de dez classes diferentes, onde se destacam os isoquinolínicos e os quinolínicos (CORDELL et al., 2001). Estudos taxonômicos também sugerem que Rubiaceae apresenta um acúmulo de três grupos distintos de iridoides, o que parece representar um padrão de tendência evolutiva (INOUE et al., 1988). A presença de iridoides é de grande relevância devido ao fato de também serem marcadores taxonômicos (BRUNETON, 1993).

Além destes compostos, também foram evidenciados antraquinonas (AHMAD et al., 2005; KAMIYA et al., 2005), saponinas triterpênicas (HAMERSKI et al., 2005), flavonoides (HAMERSKI et al., 2005; PINTO et al., 2008, TENÓRIO-SOUZA, 2009), lignoides (SILVA et al., 2006; KAMIYA et al., 2004), terpenos (PINTO et al., 2008; SU et al., 2003), amidas (BANDYOPADHYAY et al., 2007), cucurbitacinas (OLMEDO et al., 2007; GUERRERO-ANALCO et al., 2005), cumarinas (BENEVIDES et al., 2004; PINTO et al., 2008), feofitinas (TOMAZ et al., 2008; TENÓRIO-SOUZA, 2009) e derivados benzenóides (TOMAZ et al., 2008; PINTO et al., 2008). A Figura 3 (pág. 12 e 13) mostra a estrutura de algumas substâncias isoladas de espécies de Rubiaceae.

Neste contexto, a família Rubiaceae possibilitou a obtenção de compostos de interesse comercial e diversidade de usos farmacêuticos, decorrentes de suas atividades farmacológicas. Muitas destas substâncias foram e ainda são empregadas na terapêutica de diferentes sintomas e enfermidades. Como exemplos destas substâncias podem-se citar: cafeína (*Coffea arabica*), utilizada em diversos medicamentos; emetina, (*Cephaelis ipecacuanha*) com atividade emética e antiamebicida; quinidina (*Cinchona ledgeriana*), utilizada por suas propriedades antimalária e tônica; e ioimbina (*Pausinystalia yoimba*) com efeito afrodisíaco (CORDELL et al., 2001).

Tendo em vista a variedade de constituintes químicos apresentados pelas espécies de Rubiaceae e a importância destes na pesquisa de potencialidades terapêuticas, o conhecimento aprofundado desta família gera perspectivas para a química e farmacologia.

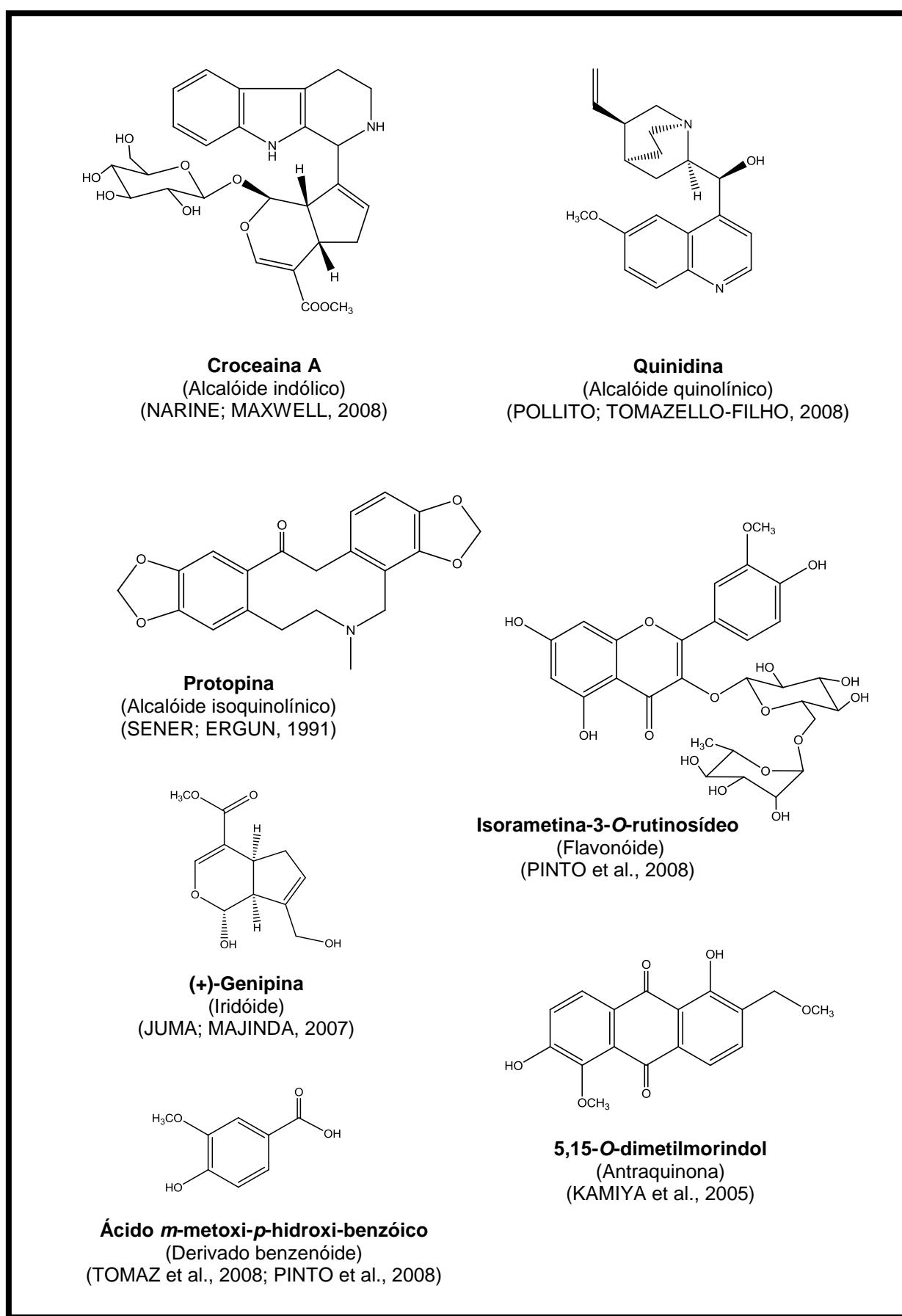


Figura 3. Exemplos de substâncias isoladas de espécies pertencentes a família Rubiaceae.

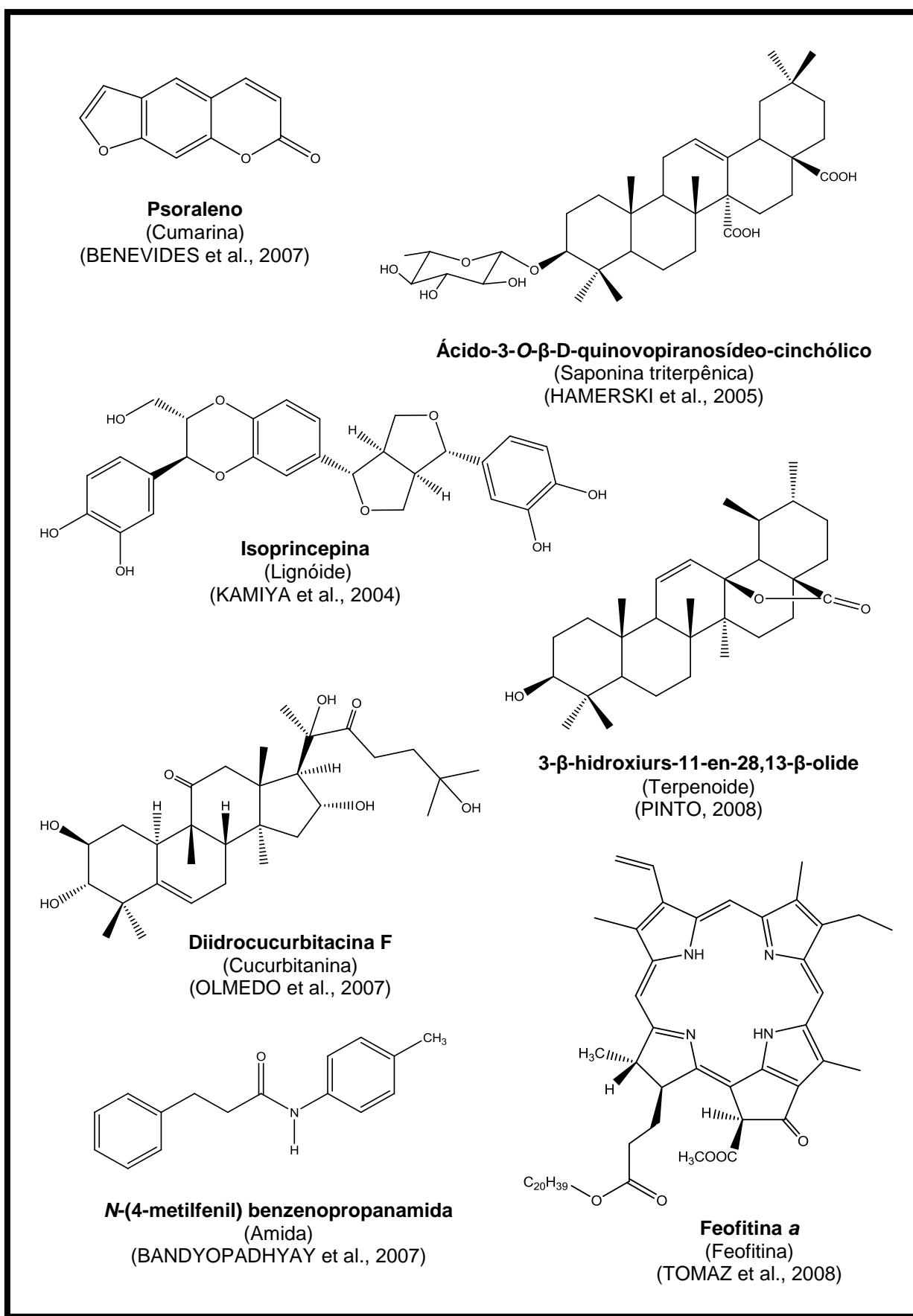


Figura 3 (cont.). Exemplos de substâncias isoladas de espécies pertencentes a família Rubiaceae.

3.2. Gênero *Borreria* G. Mey.: aspectos farmacobotânicos, químicos e farmacológicos

O gênero *Borreria* G. Mey. (= *Spermacoce* L.), pertencente à tribo Spermacoceae, abrange a maioria das plantas herbáceas da subfamília Rubioideae. É o maior gênero dentro da tribo Spermacoceae apresentando cerca de 280 espécies, distribuídas na América e em áreas tropicais da África, Ásia e Ilhas do Pacífico (Figura 4, pág. 14) (CONSERVA; FERREIRA-JUNIOR, 2012), muitas das quais de ocorrência restrita ao Brasil (ANDERSSON, 1992), onde são registradas 36 espécies (SCHUMANN, 1988). Para o Nordeste, Barbosa e colaboradores (2006) compilaram 22 borrérias.

Espécies deste gênero são relatadas como “ervas daninhas” e atuam competindo pelo espaço e por recursos de crescimento com diversas culturas, tais como, o arroz (GOGOI et al., 2002; KALITA, 2001), o abacaxi (SISON; BUKIDNON, 2000), o feijão (JUNQUEIRA NETTO et al., 1983), o algodão (VICTORIA FILHO; CRUZ, 1982) e o café (SIRSI et al., 1981).

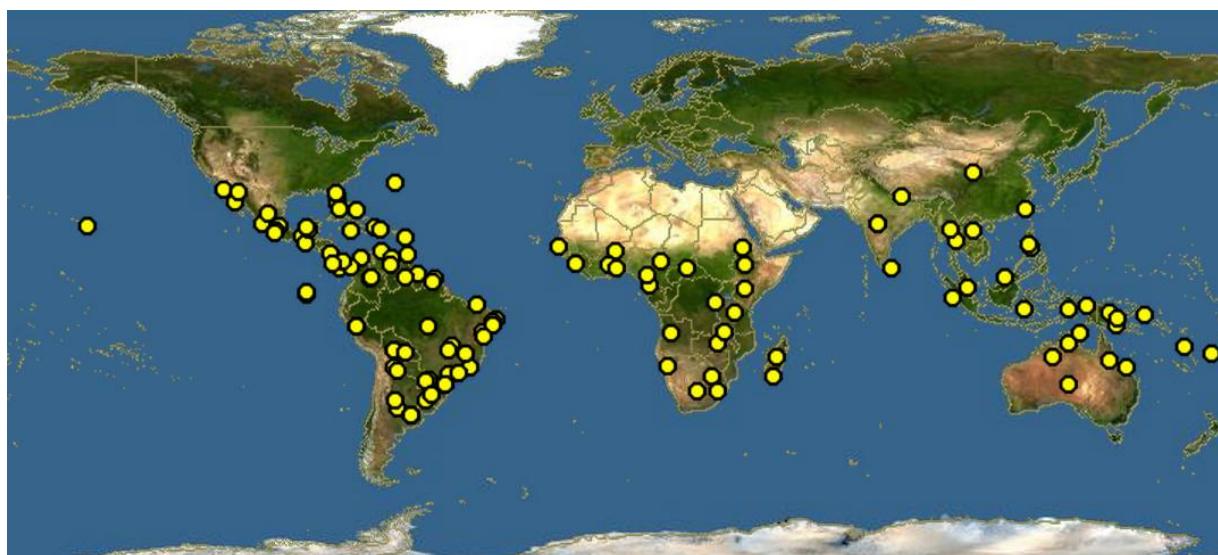


Figura 4. Distribuição geográfica do gênero *Borreria* G. Mey. representada pelas áreas em amarelo (Fonte: <http://wwwdiscoverlife.org/mp/20m?kind=Borreria>, Acesso em: 29 de Julho de 2013).

É o gênero de Spermacoceae que mais apresenta conflitos nomenclaturais (PEREIRA, 2007) e suas espécies são conhecidas popularmente por poaias (BARROS, 2009). Apresentam-se como ervas eretas ou prostradas, raramente escandentes; caule rugoso ou liso; folhas membranáceas peninérveas, com

estípulas invaginantes setosas; flores diminutas, densas, sésseis, axilares ou em glomérulos terminais compostos, alvas, andróginas; cálice com 2 – 4 lacínios; corola campanulada com 4 lacínios valvares; anteras versáteis dorsifixas; hipanto turbinado ou cônico dímero; estilete simples; estigma capitado ou bífido; óvulos presos ao septo do ovário; e esquizocarpo com dois mericarpos ou cápsula septicida, valvas presas pela base; semente pequena, convexa dorsalmente; endosperma rígido; embrião reto; e cotilédones oblongos foliáceos (SCHUMANN, 1988).

Estudos etnofarmacológicos revelaram que várias espécies de *Borreria* são utilizadas na medicina popular. *Borreria hispida*, popularmente conhecida como “erva-botão”, é utilizada para dor de cabeça, disenteria e para o tratamento de diabetes e hemorroidas (VASANTHI et al., 2009). É prática, ao sul da Índia, utilizar o decocto desta planta para reduzir o perfil lipídico e tratar a obesidade (MUDALAIR, 2003) e também como estimulante (PURUSHOTHAMAN; KALYANI, 1979).

Na Nigéria, as folhas de *Borreria ocymoides*, conhecida pelos nigerianos por “Abia Ikana”, são utilizadas para tratar eczema e micoses. Neste caso, a seiva do vegetal, obtida por esmagamento, é colocada sobre o ferimento ou a lesão (EBANA et al., 1991).

O infuso das raízes de *Borreria latifolia*, chamada de “poaia-do-campo”, é utilizada pela população como antidesintética, expectorante e vominativa (RODRIGUES; CARVALHO, 2001), além disso, suas partes aéreas também são utilizadas na alimentação (KAMIYA, 2002).

Diante desse contexto, espécies do gênero *Borreria* têm sido objeto de diversos estudos químico-farmacológicos, na tentativa de isolar e identificar substâncias bioativas que justifiquem o uso destas plantas na medicina popular.

Do ponto de vista químico, apenas sete espécies de *Borreria* foram estudadas e resultaram no isolamento de alcaloides indólicos, alcalóides isoquinolínicos, flavonoides, iridoides, triterpenoides, esteroides, diterpenoides e sesquiterpenoides (Figura 5, pág. 16 e 17; Quadro 1, pág. 18 e 19).

Embora os trabalhos químicos feitos com espécies de *Borreria* não tenham resultado no isolamento de saponinas, taninos, glicosídios e antraquinonas, estas foram evidenciadas em triagens fitoquímicas feitas com *Borreria ocymoides* coletada na Nigéria (EBANA et al., 1991), bem como, com *Borreria pusilla* (SINHA; DOGRA, 1985; ANDRE et al., 1976) e *Borreria verticillata* (ANDRE et al., 1976), ambas de Madagascar.

Os dados sobre os constituintes voláteis para espécies de *Borreria* também são escassos. Estes foram extraídos apenas de duas espécies: *Borreria verticillata* (EKPENDU et al., 2001) e *Borreria scrabra* (EKPENDU et al., 2002). Os resultados mostraram semelhanças na composição química do óleo essencial com a presença de ácidos graxos (como o ácido hexadecanóico), monoterpenos (linalool, eugenol, β -bisaboleno e E- β -farneseno) e alguns compostos oxigenados.

Comparação dos esqueletos básicos destas classes de compostos químicos, isolados de espécies de *Borreria*, denota a grande variedade metabólica deste gênero e gera expectativas sobre as possíveis relações quimiotaxonômicas que as espécies de *Borreria* possam ter entre si e entre representantes de outros gêneros.

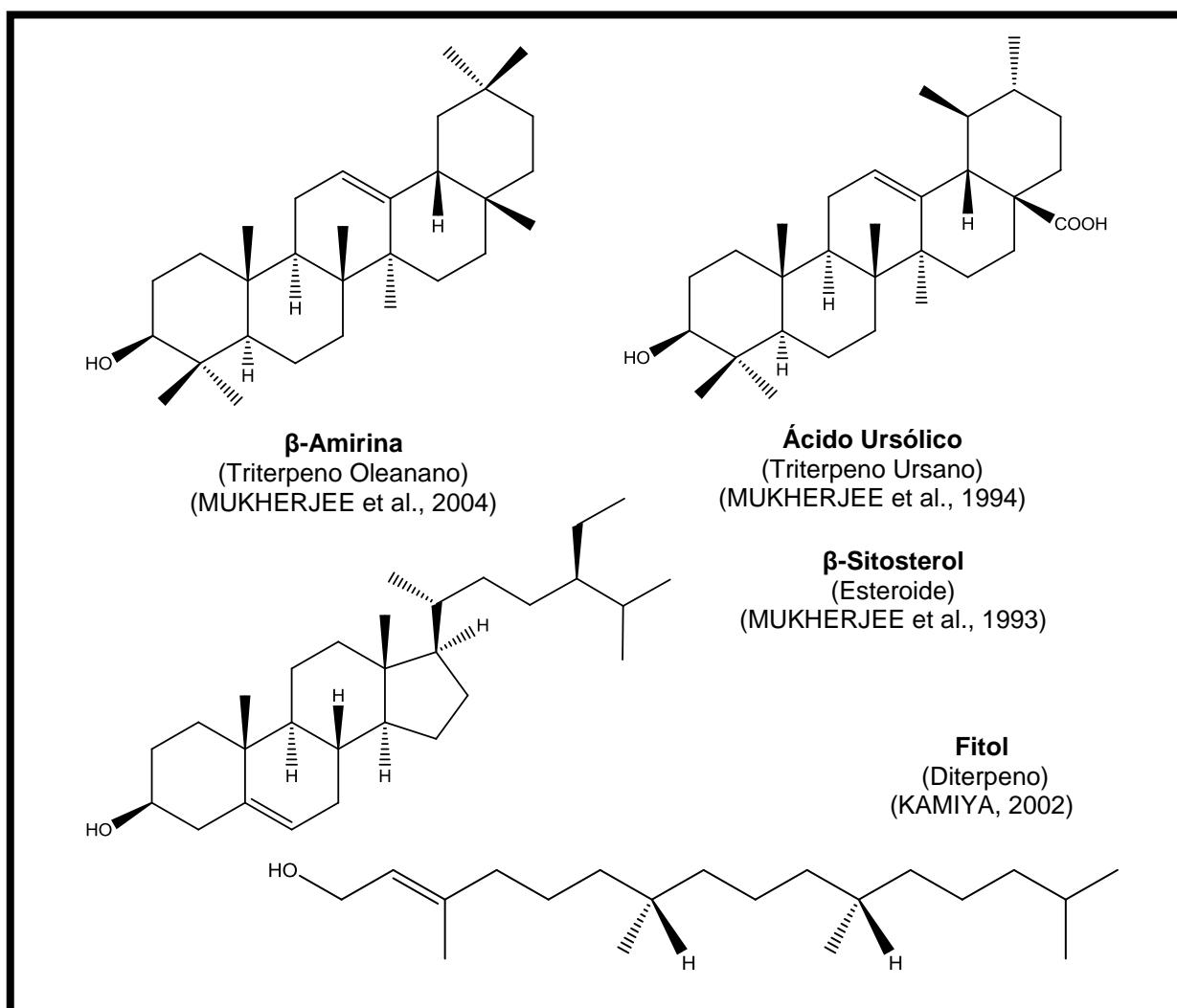


Figura 5. Exemplos de substâncias isoladas de espécies pertencentes ao gênero *Borreria*.

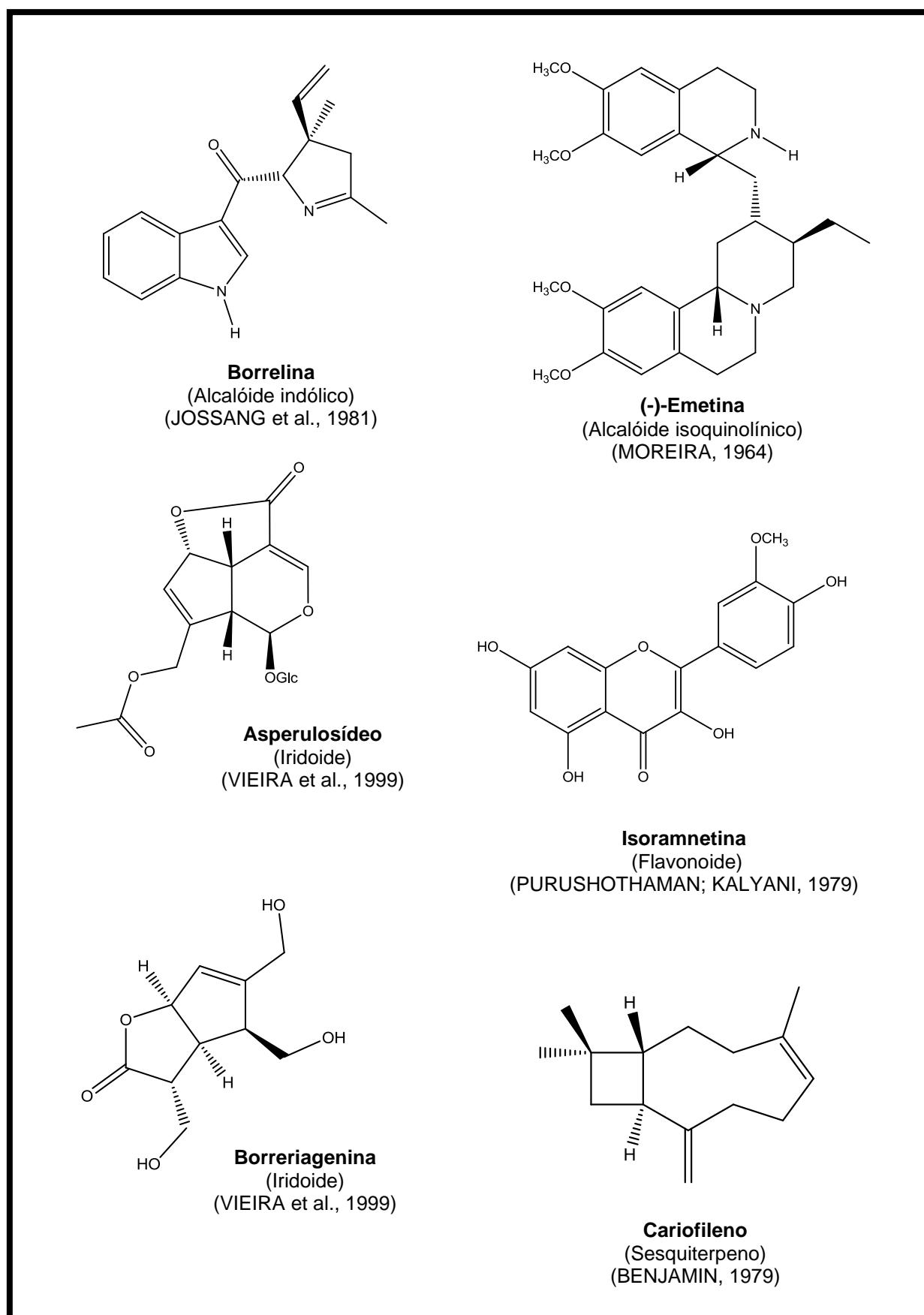


Figura 5 (cont.). Exemplos de substâncias isoladas de espécies pertencentes ao gênero *Borreria*.

Quadro 1. Metabólitos secundários de espécies de *Borreria* (classe química, substâncias isoladas, espécie correspondente e referências).

Classe do composto	Substância isolada	Espécie vegetal	Referência
Alcalóide indólico	Deidroborrecarpina	<i>B. capitata</i>	JOSSANG et al., 1981
	Borrecoxina	<i>B. capitata</i>	JOSSANG et al., 1981
	Borrecarpina	<i>B. capitata</i>	JOSSANG et al., 1977
	Deidroborrecapina	<i>B. capitata</i>	JOSSANG et al., 1981
	Borrelina	<i>B. capitata</i>	JOSSANG et al., 1981
	Borrerina	<i>B. verticillata</i>	BALDE et al., 1991
	Borreverina	<i>B. verticillata</i>	BALDE et al., 1991
	Isoborreverina	<i>B. verticillata</i>	BALDE et al., 1991
	Espermacoceina	<i>B. verticillata</i>	BALDE et al., 1991
	Verticillatina A	<i>B. verticillata</i>	MOREIRA et al., 2010
	Verticillatina B	<i>B. verticillata</i>	MOREIRA et al., 2010
Alcalóide isoquinolínico	(-)-Emetina	<i>B. verticillata</i>	MOREIRA, 1964
Flavonóide	Isoramnetina	<i>B. hispida</i>	PURUSHOTHAMAN; KALYANI, 1979
	Astragalina	<i>B. pusilla</i>	BHADORIA; GUPTA, 1981
		<i>B. stricta</i>	SHARMA; GUPTA, 1987
	Quercetina	<i>B. pusilla</i>	BHADORIA; GUPTA, 1981
		<i>B. stricta</i>	SHARMA; GUPTA, 1987
	Rutina	<i>B. pusilla</i>	BHADORIA; GUPTA, 1981
		<i>B. stricta</i>	SHARMA; GUPTA, 1987
	Violaquercetrina	<i>B. stricta</i>	BHADORIA; GUPTA, 1981
Iridóide	Ácido asperulosídico	<i>B. latifolia</i>	KAMIYA, 2002
		<i>B. verticillata</i>	SAINTY et al., 1981
	Dafilosideo	<i>B. latifolia</i>	KAMIYA, 2002
		<i>B. verticillata</i>	VIEIRA et al., 1999
	Deacetildafilosideo	<i>B. verticillata</i>	MOREIRA et al., 2009
	10-Hidroxiloganina	<i>B. latifolia</i>	KAMIYA, 2002
	Escandosida	<i>B. latifolia</i>	KAMIYA, 2002
	6-O-acetyl-escandosideo	<i>B. latifolia</i>	KAMIYA, 2002
		<i>B. verticillata</i>	MOREIRA et al., 2009
	Asperulosídeo	<i>B. verticillata</i>	SAINTY et al., 1981 VIEIRA et al., 1999
	Borreriagenina	<i>B. verticillata</i>	VIEIRA et al., 1999
	Feretosídeo	<i>B. verticillata</i>	SAINTY et al., 1981

Quadro 1 (cont.). Metabólitos secundários de espécies de *Borreria* (classe química, substâncias isoladas, espécie correspondente e referências).

Classe do composto	Substância isolada	Espécie vegetal	Referência
Iridóide	Deacetilasperulosídeo	<i>B. verticillata</i>	SAINTY et al., 1981
	Deacetilasperulosídeo-metil ester	<i>B. verticillata</i>	SAINTY et al., 1981
	Ácido deacetilasperulosídico	<i>B. verticillata</i>	SAINTY et al., 1981
	6'-O-(2-gliceril)-escandosida metil ester	<i>B. latifolia</i>	KAMIYA, 2002
Triterpeno	6'-O-(2-gliceril)-escandosida metil ester	<i>B. verticillata</i>	MOREIRA et al., 2010
	β-amyrina	<i>B. articulatis</i>	MUKHERJEE et al., 2004
	Erytrodiol	<i>B. articulatis</i>	MUKHERJEE et al., 1993
	Ácido epikatônico	<i>B. articulatis</i>	MUKHERJEE et al., 1993
	Ácido 3-α-acetoxi-olean-12-en-29-óico	<i>B. articulatis</i>	MUKHERJEE et al., 2004
	Ácido 3-ceto-olean-12-en-29-óico	<i>B. articulatis</i>	MUKHERJEE et al., 1993
	Ácido ursólico	<i>B. articulatis</i>	MUKHERJEE et al., 1994
		<i>B. pusilla</i>	SHARMA; GUPTA, 1987
		<i>B. hispida</i>	KAPOOR et al., 1969
		<i>B. stricta</i>	SHARMA; GUPTA, 1987
	Ácido ursólico metil éster	<i>B. articulatis</i>	MUKHERJEE et al., 1994
	Uvaol	<i>B. articulatis</i>	MUKHERJEE et al., 1994
Esteróide	β-sitosterol	<i>B. articulatis</i>	MUKHERJEE et al., 1993
		<i>B. pusilla</i>	BHADORIA; GUPTA, 1981
		<i>B. verticillata</i>	ANDRE et al., 1976
		<i>B. hispida</i>	KAPOOR et al., 1969
		<i>B. stricta</i>	SHARMA; GUPTA, 1987
	Daucosterol	<i>B. pusilla</i>	BHADORIA; GUPTA, 1981
	Campesterol	<i>B. verticillata</i>	ANDRE et al., 1976
	Estigmasterol	<i>B. verticillata</i>	ANDRE et al., 1976
	Sitosterol-β-D-glugosídeo	<i>B. stricta</i>	BHADORIA; GUPTA, 1981
Diterpeno	Fitol	<i>B. latifolia</i>	KAMIYA, 2002
Sesquiterpeno	Cariofileno	<i>B. verticillata</i>	BENJAMIN, 1979
	Guaiaeno	<i>B. verticillata</i>	MOREIRA et al., 2009

3.2.1. *Borreria verticillata* (L.) G. Meyer

Borreria verticillata (L.) G. Meyer. tem distribuição neotropical (ANDERSON, 1992), sendo encontrada no México e nas Américas Central e do Sul (Figura 6, pág. 20) (SCHUMANN, 1988; STEYERMARK, 1974; LORENCE, 1999), ocorrendo com maior frequência em locais secos e abertos (MELO; BARBOSA, 2007). Floresce nos meses de junho, julho e setembro e frutifica em julho (MELO; BARBOSA, 2007).



Figura 6. Distribuição geográfica de *Borreria verticillata* (L.) G. F. W. Meyer representado em verde (Fonte: <http://www.tropicos.org/MapsCountry.aspx?maptype=3&lookupid=27903086>, Acesso em: 29 de Agosto de 2010).

Caracteriza-se pelo hábito, disposição e forma das folhas e inflorescências (PEREIRA; BARBOSA, 2004), apresentando-se como (Figura 7, pág. 21) erva ereta, ramificada; folha séssil, lanceolada, ápice agudo, verticilada, glabra; estípulas fimbriadas; inflorescências em glomérulos globosos, terminais e axilares, involucrados; flores alvas e sésseis, 2,5 – 3 mm de comprimento; cálice esverdeado, com dois lacínios inconspicuos; corola campanulada, com pêlos no ponto de inserção dos estames; estames presos na fauce, alternos com as pétalas; estilete terminal, inteiro; cápsula; sementes elípticas (MELO; BARBOSA, 2007).

Quimicamente, a espécie é conhecida por apresentar alcalóides indólicos e isoquinolínicos, iridóides, esteróides e sesquiterpenos (Quadro 1, pág. 18 e 19; Figura 8, pág. 22). Os dados sobre os constituintes voláteis para *Borreria verticillata* revelaram a presença de ácidos graxos (como o ácido hexadecanóico), monoterpenos (linalool, eugenol, β -bisabolene e E- β -farnesene) e compostos oxigenados (EKPENDU et al., 2001).



Figura 7. Partes aéreas de *Borreria verticillata* (L.) G. Meyer (Foto: Tenório-Souza, 2010).

No contexto etnomedicinal, *Borreria verticillata* (vassoura-de-botão, erva-botão e poaia) é a que mais se destaca entre as poaias em todas as culturas. Na Índia, o decocto da planta inteira é utilizado para diabetes, dismenorréia e amenorréia (AYENSU, 1978). No Senegal, é utilizada para tratar infecções bacterianas e hanseníase (MAYNART et al., 1980). O endocarpo dos frutos é usado pelos jamaicanos como diurético e como remédio para amenorréia (ASPREY; THORNTON, 1955). As partes aéreas do vegetal são utilizadas, na Nigéria, para o tratamento do eczema (BENJAMIN, 1979). Noelli (1998) em sua pesquisa histórica sobre a farmacologia da tribo Guarani, afirma que a “Ype ka’acoene”, nome atribuído ao vegetal pelos índios, era utilizado pelos mesmos como emética. Na Paraíba - Brasil, o cozimento das raízes e folhas é utilizado oralmente ou em banhos no tratamento de dermatoses para coceira e lesões de pele (PEREIRA et al., 2005). No Pará, é usada para diarréia, hemorróida, dor de urina e gripe (FREITAS; FERNANDES, 2006). Ainda no mesmo estado, a comunidade negra de Itacoã utiliza-a para combater as dores de cabeça, as infecções pulmonares e o reumatismo (SCOLES, 2006). E há quem a utilize também como expectorante (FERREIRA; ROSA; 2009), antipirético e analgésico (VIEIRA et al., 1999).

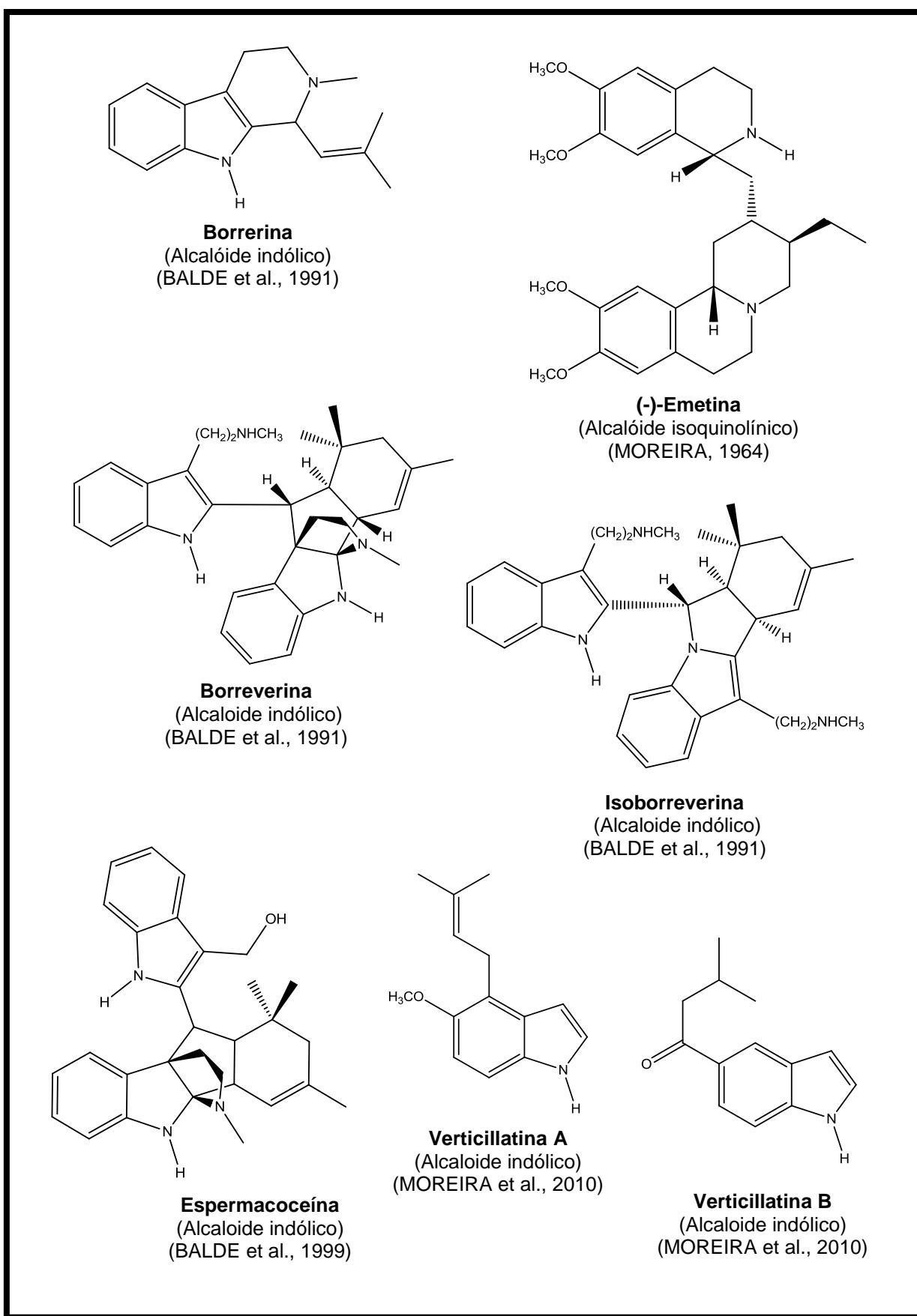


Figura 8. Substâncias isoladas de *Borreria verticillata* (L.) G. Meyer.

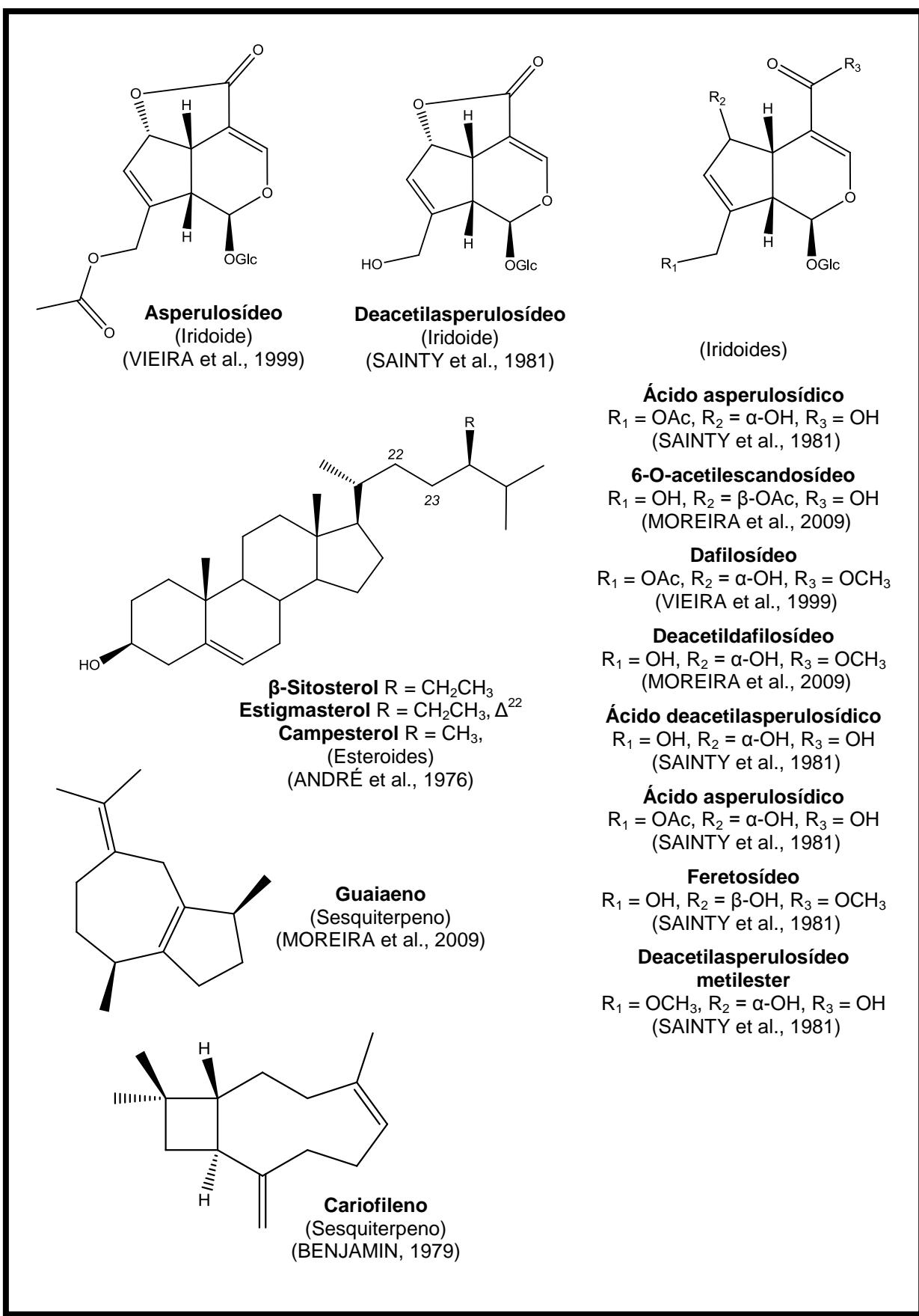


Figura 8 (continuação). Substâncias isoladas de *Borreria verticillata* (L.) G. Meyer.

Algumas das atividades mencionadas pela população já foram constatadas por meio de estudos farmacológicos. Estudos antibacterianos com *Borreria verticillata* indicaram atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Monilia albicans* (SOUSA; MATOS; TAVARES, 1969) e cepas multiresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* (PEIXOTO NETO et al., 2002). O óleo essencial mostrou-se tóxica ao *Schistosoma hematobium* no estágio de ovo (CIM 500 mg/mL) miracídeo e cercaria (CIM 100 µm/mL) (ADEWUNMI; MARQUIS, 1983). Além disso, o extrato aquoso das raízes provocou contração uterina (BARROS et al., 1970).

3.2.2. *Borreria ocymoides* (Burm. f.) DC.

Borreria ocymoides (Burm. f.) DC. é uma espécie pantropical comum em todo continente americano mas também ocorre em partes da África e Índia (CHIQUIERI; DI MAIO; PEIXOTO, 2004). No Brasil, já foi encontrada nos estados do Amazonas, Bahia, Ceará e Paraíba (Figura 9, pág. 24). Desenvolvem-se as margens da vegetação ou no interior das matas, florescendo e frutificando entre os meses de novembro a março (CABRAL; MIGUEL; SALAS, 2011).

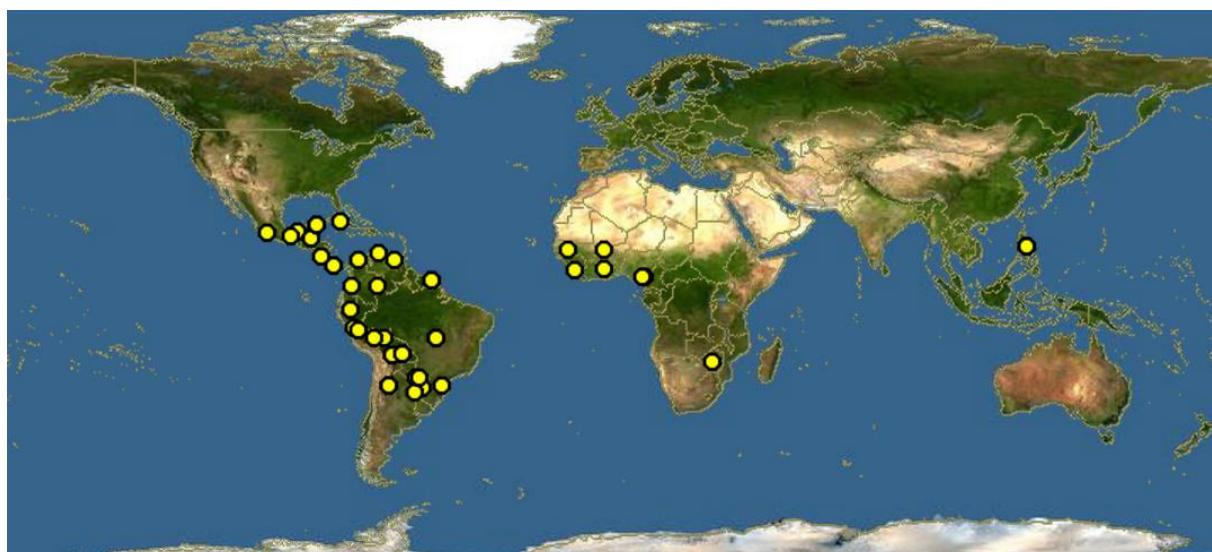


Figura 9. Distribuição geográfica de *Borreria ocymoides* (Burm. f.) DC. representada pelas áreas em amarelo (Fonte: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Borreria+ocymoides>, Acesso em: 26 de Agosto de 2013).

Trata-se de uma erva anual (Figura 10, pág. 25) com aproximadamente 0,3 m de altura. Caracteriza-se por possuir caule ciliado, com folhas oval-elípticas com 3-5 pares de nervuras laterais, pecíolos curtos, pseudoverticiladas, axilares; inflorescências em glomérulos axilares, flores com corola menor do que o cálice, branca, 2 sépalas, estames e estigmas inclusos; cápsula glabra ou glabrescente, elíptica a obovoide (WARD, 2011; CABRAL; MIGUEL; SALAS, 2011).



Figura 10. Partes aéreas de *Borreria ocymoides* (Burm. f.) DC. (Foto: TAVARES, 2004).

Triagens fitoquímicas feitas com espécies nigerianas deram resultados positivos para alcaloides, saponinas, taninos, glicosídios e antraquinonas (EBANA et al., 1991).

Na Nigéria, o suco das folhas é aplicado sobre o ferimento ou a lesão para combater micoses e eczemas. Estudos antibacterianos foram realizados com os extratos aquoso, etanólico, bem como, com frações alcaloidicas ou ricas em glicosídeos cardiotônicos mostrando-se eficazes contra diversos micro-organismos: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiela pneumoniae*, *Escherichia coli*, estreptococos β -hemolíticos, bem como, contra *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Neisseria gonorrhoeae* (EBANA, et al., 1991; CONSERVA; FERREIRA, 2012).

Os estudos escassos a respeito desta espécie aliados a grande semelhança morfo-anatômica com *Borreria verticillata* faz sugerir a possibilidade de *Borreria ocymoides* estar sendo equivocadamente utilizada com as mesmas finalidades. Por isto o estudo químico e farmacológico destas espécies é importantíssimo para garantir mais segurança no uso terapêutico.

3.3. Gênero *Richardia* Linnaeus: aspectos farmacobotânicos, químicos e farmacológicos

O gênero *Richardia* Linnaeus pertence à subfamília Rubioideae da tribo Spermacoceae. É constituído por 16 espécies (GROENINCKX et al., 2009) distribuídas desde os Estados Unidos até a América do Sul (Figura 11, pág. 26) (LEWIS; OLIVER, 1974). No Brasil, está representado por oito espécies distribuídas de forma descontínua por todo o território brasileiro (ANDERSSON, 1992).

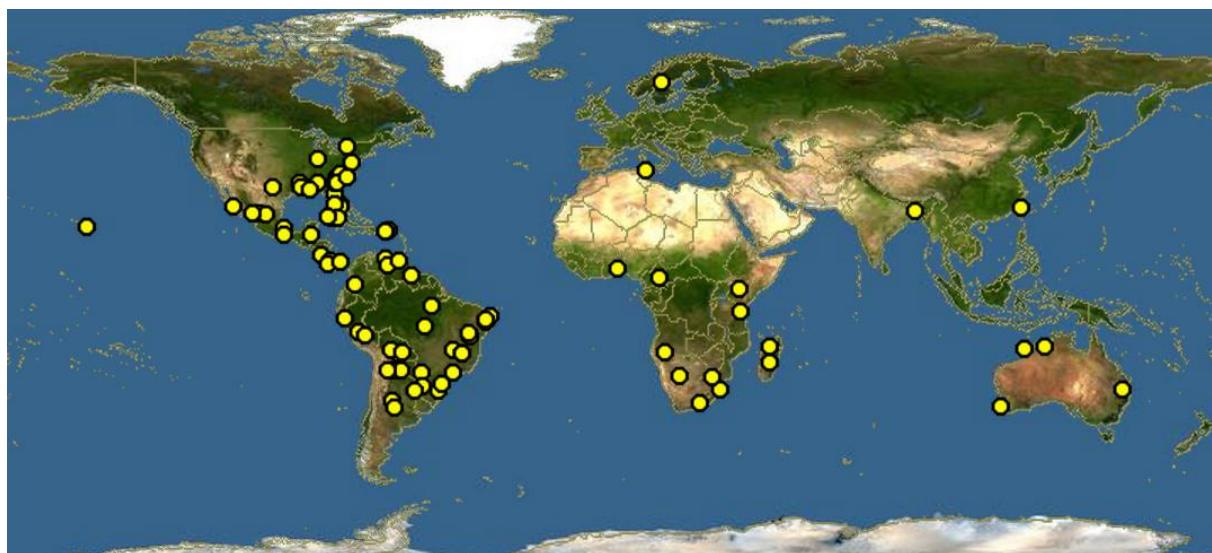


Figura 11. Distribuição geográfica do gênero *Richardia* no mundo, representada nas áreas em amarelo. (Fonte: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Richardia>, Acesso em: 26 de Agosto de 2013).

Conhecidas popularmente como poaias (SOUZA; LORENZI, 2008), espécies deste gênero são citadas na literatura como ervas daninhas e atuam competindo pelo espaço e por recursos de crescimento com diversas culturas (HAUSEAR; PARHAM, 1969; MONQUERO; CHRISTOFFOLETI, 2003).

Compreende ervas anuais ou perenes, eretas ou prostradas. Ramos cilíndricos ou tetragonais, pubescentes; folhas opostas, sésseis ou subsésseis, estípulas persistentes. Apresentam inflorescências sésseis, com algumas ou numerosas flores suportadas por duas a quatro brácteas foliáceas, ovais, dispostas em cruz; flores sésseis, frequentemente tetrâmeras, actinomorfas; cálice rotáceo, persistente ou decíduo, lobos lanceolados, glabros ou pilosos; corola infundibuliforme, glabras ou pubescentes; ovário com três ou quatro carpelos, um óvulo por lóculo, placentação axial; estilete cilíndrico, exerto, estigma 3-4-lobado. Fruto geralmente pubescente, esquizocarpo, separando-se em 3-4 mericarpos indeiscentes; sementes plano-convexas, superfície dorsal lisa, superfície ventral sulcada (PEREIRA, 2007; LEWIS; OLIVER, 1974).

Sob o ponto de vista químico, apenas três espécies foram estudadas: *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltl.) Steud (TOMAZ et al., 2008; PEREIRA, 2011), *Richardia scabra* L. (MONGRAND et al., 2005; AYYANAR; IGNACIMUTHU; 2005) e *Richardia brasiliensis* Gomes (PINTO et al., 2008; PINTO, 2008; TENÓRIO-SOUZA, 2009) (Quadro 2, pág. 28; Figura 12, pág. 29). De *Richardia grandiflora* foram isolados e caracterizados dois compostos fenólicos, esteróides, feofitinas e triterpenos (TOMAZ et al., 2008; PEREIRA, 2011). A avaliação da composição lipídica das folhas de *Richardia scabra* feita em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) permitiu identificar a presença de vários ácidos graxos (MONGRAND et al., 2005); além disso, possui como constituinte majoritário a emetina (AYYANAR; IGNACIMUTHU; 2005). Já os estudos fitoquímicos realizados com *Richardia brasiliensis* revelaram-na como bioprodutora de diferentes classes de metabólitos: cumarinas, flavonóides, triterpenos, esteroides, feofitinas e ácidos fenólicos (PINTO et al., 2008; PINTO, 2008; TENÓRIO-SOUZA, 2009).

Quadro 2. Metabólitos secundários de espécies do gênero *Richardia* (classe química, substâncias isoladas, espécie correspondente e referências).

Classe do composto	Substância isolada	Espécie vegetal	Referências
Ácidos graxos voláteis	Ácido mirístico	<i>R. scabra</i>	MONGRAND et al., 2005
	Ácido palmítico	<i>R. scabra</i>	MONGRAND et al., 2005
	Ácido palmitoléico	<i>R. scabra</i>	MONGRAND et al., 2005
	Ácido esteárico	<i>R. scabra</i>	MONGRAND et al., 2005
	Ácido linoléico	<i>R. scabra</i>	MONGRAND et al., 2005
	Ácido 9,12,15-octadecatrienóico	<i>R. scabra</i>	MONGRAND et al., 2005
Alcaloide	Emetina	<i>R. scabra</i>	AYYANAR; IGNACIMUTHU; 2005
Compostos fenólicos	Ácido <i>m</i> -metoxi- <i>p</i> -hidroxi-benzóico	<i>R. grandiflora</i>	TOMAZ et al., 2008
		<i>R. brasiliensis</i>	PINTO et al., 2008
	Ácido <i>o</i> -hidroxi-benzóico	<i>R. grandiflora</i>	TOMAZ et al., 2008
	Ácido <i>p</i> -hidroxi-benzóico	<i>R. brasiliensis</i>	PINTO et al., 2008
Cumarinas	Escopoletina	<i>R. brasiliensis</i>	PINTO et al., 2008
	Cedrellopsina	<i>R. brasiliensis</i>	TENÓRIO-SOUZA, 2009
	Norbraylina	<i>R. brasiliensis</i>	TENÓRIO-SOUZA, 2009
	Braylina	<i>R. brasiliensis</i>	TENÓRIO-SOUZA, 2009
	Cumarieletefina	<i>R. brasiliensis</i>	TENÓRIO-SOUZA, 2009
Derivados porfirínicos	Feofitina a	<i>R. grandiflora</i>	TOMAZ et al., 2008
	13 ² -hidroxi-(13 ² -S)-feofitina a	<i>R. grandiflora</i>	PEREIRA, 2011
	15 ¹ -hidroxi-(15 ¹ -S)-porfirinolactona a	<i>R. brasiliensis</i>	TENÓRIO-SOUZA, 2009
Esteróides	Estigmasterol	<i>R. grandiflora</i>	TOMAZ et al., 2008
		<i>R. brasiliensis</i>	TENÓRIO-SOUZA, 2009
	β -sitosterol	<i>R. grandiflora</i>	TOMAZ et al., 2008
		<i>R. brasiliensis</i>	ADOLPHO et al., 2008
		<i>R. brasiliensis</i>	TENÓRIO-SOUZA, 2009
	β -sitosterol glicosilado	<i>R. brasiliensis</i>	ADOLPHO et al., 2008
Flavonoides	Isorametina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	<i>R. brasiliensis</i>	PINTO et al., 2008
	Canferol	<i>R. brasiliensis</i>	TENÓRIO-SOUZA, 2009
Triterpenos	Ácido ursólico	<i>R. grandiflora</i>	PEREIRA, 2011
	Ácido oleanólico	<i>R. grandiflora</i>	PEREIRA, 2011
		<i>R. brasiliensis</i>	PINTO et al., 2008
	3 β -hidroxiurs-11-en-28,13 β -olide	<i>R. brasiliensis</i>	PINTO, 2008

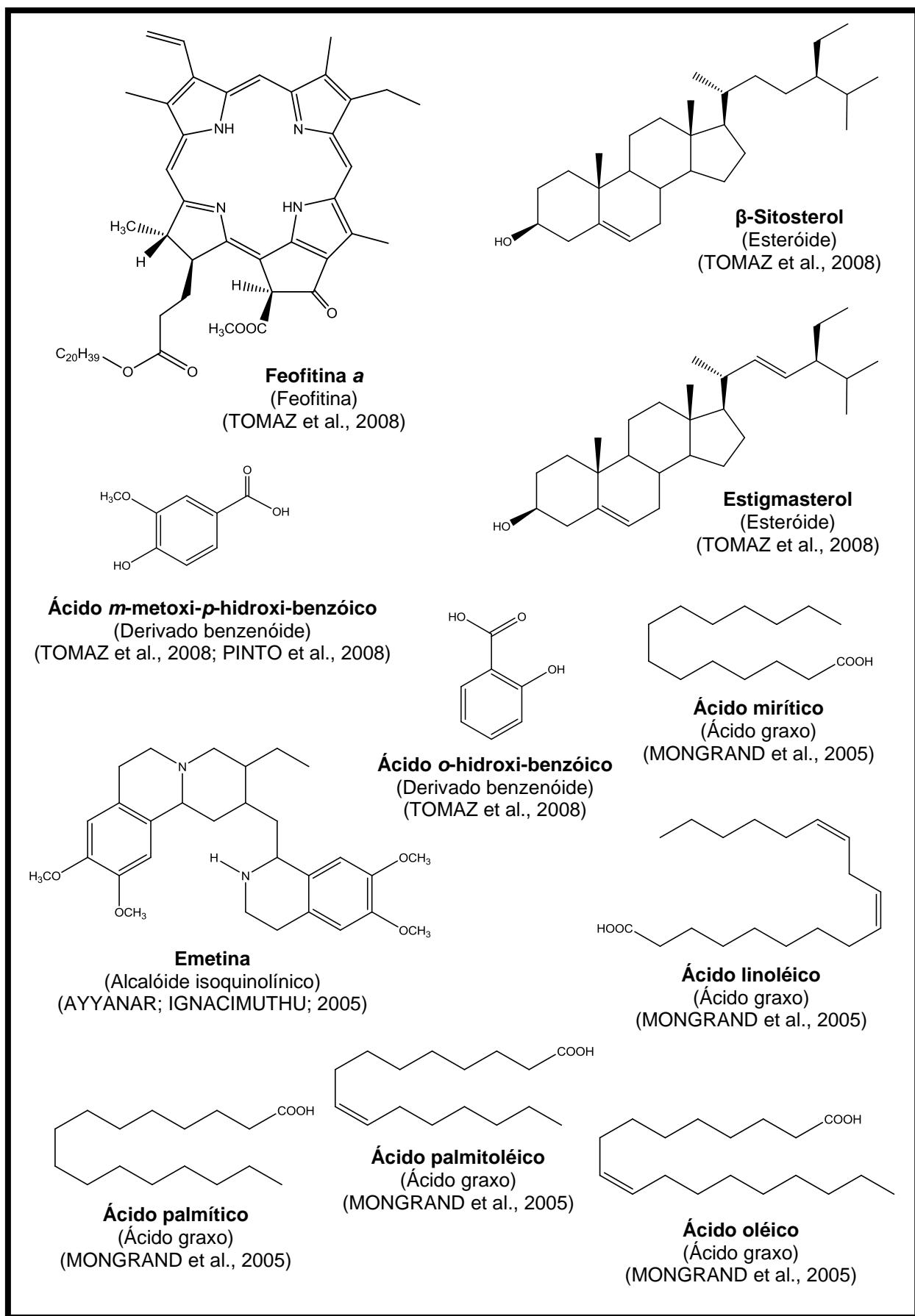


Figura 12. Exemplos de substâncias isoladas do gênero *Richardia* (L.).

Estudos etnofarmacológicos revelaram que a espécie *Richardia grandiflora*, conhecida popularmente como ervanço, poaia ou ipeca-mirim, é indicada popularmente para uso contra hemorroidas e como vermífugo na forma de decocto (AGRA et al., 2007a; AGRA et al., 2007b). Na Índia, as folhas de *Richardia scabra*, (“Pachai-amman paccharisi”), é usada na preparação de uma pasta que é aplicada externamente para tratar doenças de pele (AYYANAR; IGNACIMUTHU; 2005).

3.3.1. *Richardia brasiliensis* Gomes

Richardia brasiliensis Gomes é popularmente conhecida por ervanço, poaia branca, ipeca (AGRA et al., 2007b; PEDRINHO JÚNIOR et al., 2004), falsa-ipecuanha (GROTH, 1980), erva-de-botão e erva pedreira (SOARES et al., 2004), sendo geralmente encontrada à beira de rodovias, córregos e estradas de ferro, e de presença marcante nas regiões agrícolas do Centro-Oeste, Sul e Sudeste do Brasil (PEDRINHO JÚNIOR et al., 2004).

Esta espécie é comumente encontrada no centro da América do Sul, desde os Andes até o Oceano Atlântico, tendo sido também introduzida em países como os Estados Unidos, México, Jamaica, sudeste e leste da África, Havaí (LEWIS; OLIVER, 1974) e Espanha (BARTOLI et al., 2007) (Figura 13, pág. 30).

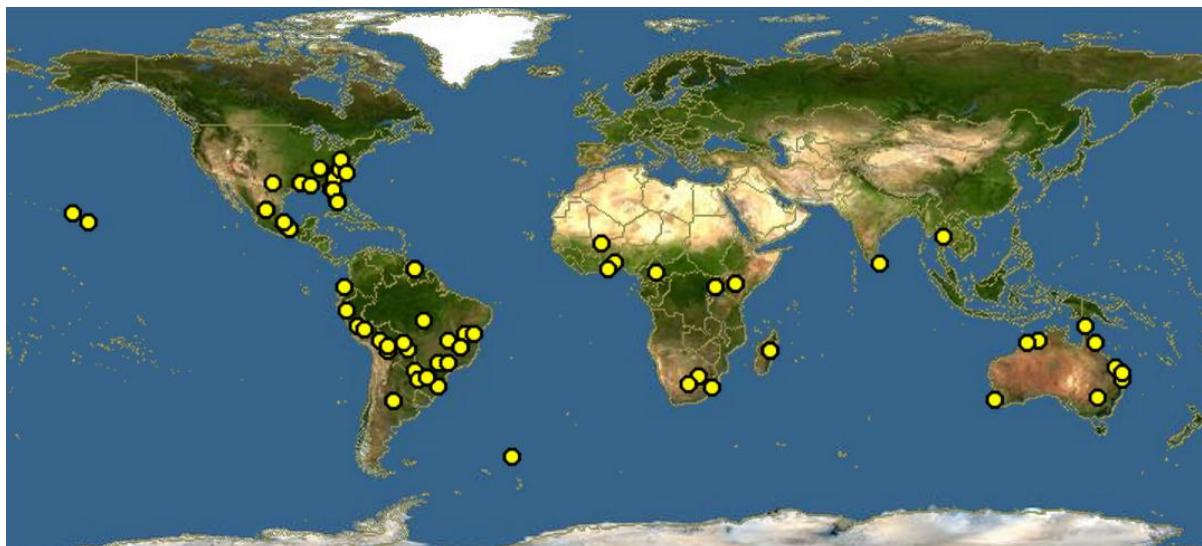


Figura 13. Distribuição geográfica de *Richardia brasiliensis*, representada nas áreas em amarelo. (Fonte: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Richardia+brasiliensis>, Acesso em: 26 de Agosto de 2013).

Botanicamente (Figura 14, pág. 31) espécie apresenta-se como ervas prostadas ou eretas, até 30 cm comp. Ramos cilíndricos. Folhas obovadas ou oblongas; lâmina foliar, ápice agudo ou obtuso, base aguda a atenuada, subsésseis, pubescente em ambas as faces. Flores em glomérulos terminais achatados, 2-4 brácteas foliáceas. Cálice 6-mero; sépalas triangulares, ciliadas. Corola pubérula externamente, anel de pêlos na metade inferior do tubo, lilás na porção apical. Seis estames, filetes fixos na fauce da corola. Estilete exserto; estigma trifido, ramos estigmáticos e papilosos. Ovário 3-locular. Fruto esquizocárpico, face ventral carenada, face dorsal convexa. Semente com face ventral angulosa (TENÓRIO-SOUZA, 2009).



Figura 14. Partes aéreas de *Richardia brasiliensis* Gomes (Foto: TENÓRIO-SOUZA, 2009).

Sob o ponto de vista fitoquímico, *Richardia brasiliensis* apresentou constituintes pertencentes a diferentes classes de metabólitos (Quadro 2, pág. 28; Figura 15, pág. 32 e 33): ácidos fenólicos, cumarinas, triterpenos, esteroides, flavonóides e feofitinas (PINTO et al., 2008b; PINTO, 2008; ADOLPHO et al., 2008; TENÓRIO-SOUZA, 2009). Porém, triagens fitoquímicas preliminares demonstraram que, além dessas classes de metabólitos, *Richardia brasiliensis* também continha taninos, alcalóides, saponinas, glicosídeos cardiotônicos e antraquinonas (EDEOGA et al., 2005; ADEKUNLE, 2000).

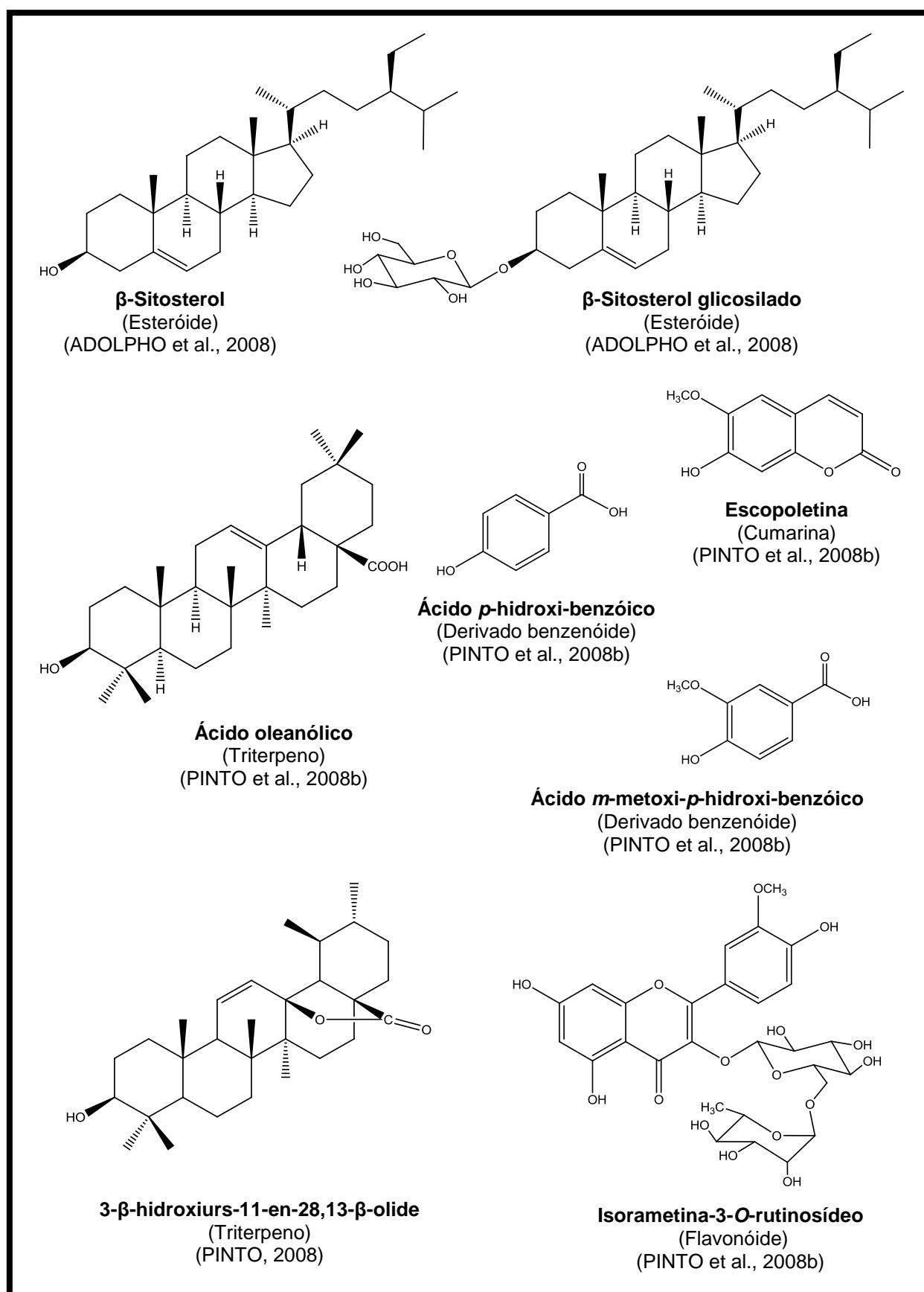


Figura 15. Substâncias isoladas de *Richardia brasiliensis* Gomes.

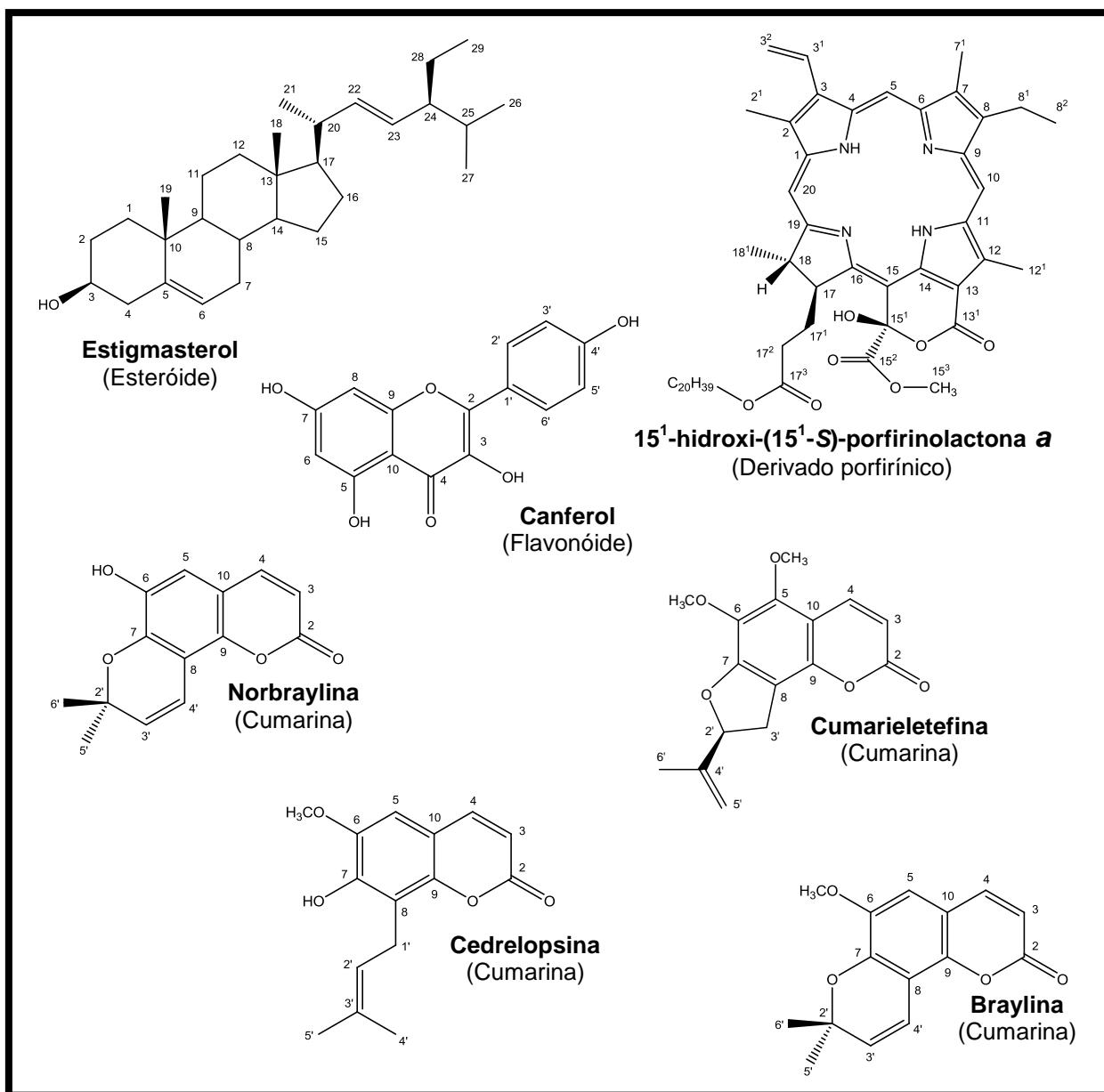


Figura 15 (continuação). Substâncias isoladas de *Richardia brasiliensis* Gomes.

É utilizada na medicina popular como emética (DEL VITTO et al., 1997; ADOLPHO et al., 2006; GRANDI et al., 1989), antidiabética (SOARES et al., 2004; ADOLPHO et al., 2006), vermífuga e contra hemorróida (AGRA et al., 2007b). O infuso e o decocto das raízes de *Richardia brasiliensis* também são utilizados pela população por apresentar propriedade expectorante (GRANDI et al., 1989). Além disso, é empregada na cura de eczema, tratamento de queimaduras, contra a malária avícola (EDEOGA et al., 2005) e também no tratamento de bronquite e gripe (MERÉTIKA, 2008).

DESCRIÇÃO METODOLÓGICA

4. DESCRIÇÃO METODOLÓGICA

4.1. Coleta e identificação do material botânico

A época da coleta de *Borreria verticillata* foi em fevereiro de 2010, de *Borreria ocymoides* em abril de 2010 e de *Richardia brasiliensis* Gomes em setembro de 2008. A primeira e a terceira foram coletadas no *Campus I* da Universidade Federal da Paraíba em João Pessoa – Paraíba e a segunda no Pico do Jabre - Paraíba.

A identificação das espécies do gênero *Borreria* foi realizada com auxílio de chaves analíticas, diagnoses e descrições de Bacigalupo (1972) e Cabral e Bacigalupo (1999) e para *Richardia brasiliensis*, utilizou-se as descrições de Lewis e Oliver (1974) e Groth (1980). Amostras do material coletado foram herborizadas seguindo o método descrito por Forman e Bridson (1989) e as exsicatas foram depositadas no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) da UFPB (Quadro 3, pág. 36).

4.2. Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto (EEB)

As partes aéreas dos vegetais foram desidratadas em estufa com ar circulante à temperatura média de 45,0 °C durante 72 horas e reduzidas a pó com auxílio de moinho mecânico. Posteriormente, os constituintes químicos do pó das plantas foram extraídos com etanol (EtOH) a 95 % em recipiente de aço inoxidável sob maceração por 72 horas, sendo este processo repetido por quatro vezes, obtendo-se o extrato etanólico (Esquema 1, pág. 37; Quadro 3, pág. 36).

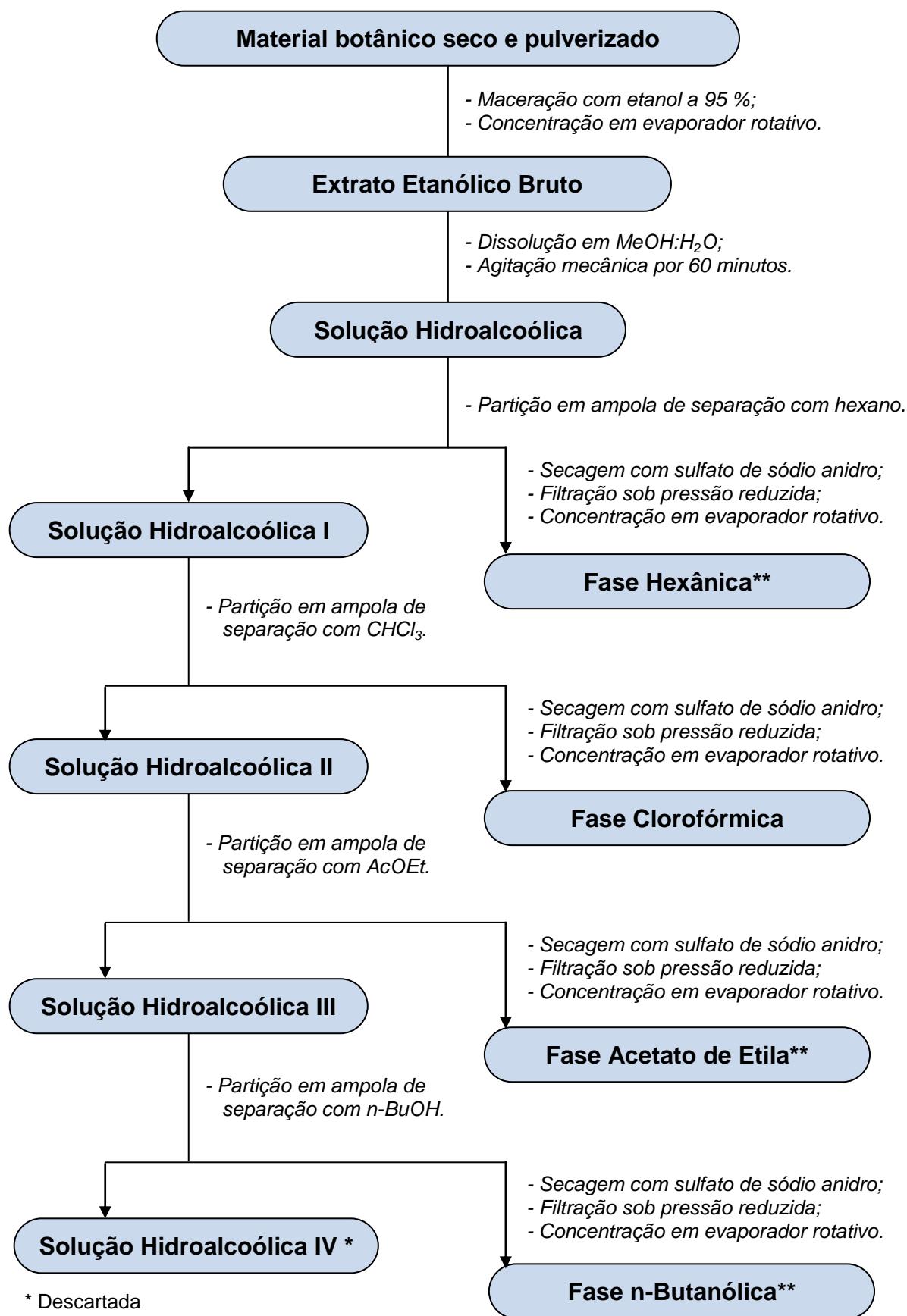
A solução extrativa resultante foi concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida a 40,0 °C obtendo-se o extrato etanólico bruto (EEB). Parte deste extrato foi dissolvido em uma solução de CH₃OH:H₂O e homogeneizado sob agitação mecânica por 60 minutos, obtendo-se uma solução hidroalcoólica que foi particionada separadamente e consecutivamente com hexano, clorofórmio (CHCl₃), acetato de etila (AcOEt) e n-butanol (n-BuOH), em ampola de separação.

As soluções obtidas no processo de partição foram tratadas com sulfato de sódio anidro para secagem, submetidos à filtração sob pressão reduzida e concentradas em rotaevaporador à temperatura média de 40,0 °C obtendo-se as fases hexânica, clorofórmica, acetato de etila e n-butanólica (Esquema 1, pág. 37; Quadro 3, pág. 36).

Quadro 3. Dados de coleta, número de exsicatas, massa do material botânico fresco e seco, massa do EEB e volumes de solventes utilizados na partição e massa das fases obtidas para as espécies estudadas neste trabalho.

	<i>Borreria verticillata</i>	<i>Borreria ocymoides</i>	<i>Richardia brasiliensis</i>
Data da coleta	Fevereiro de 2010	Abril de 2010	Setembro de 2008
Local da coleta	João Pessoa – PB (Campus I – UFPB)	Pico do Jabre - PB	João Pessoa – PB (Campus I – UFPB)
Número da exsicata	Tenório-Souza et al., 02	Tenório-Souza et al., 03	Tenório-Souza 01
Material botânico fresco	11,4 kg	6,0 kg	30,0 kg
Material botânico seco e pulverizado (rendimento)	3,4 kg (29,8 %)	1,6 kg (26,7 %)	3,8 kg (12,7 %)
EEB (rendimento)	490,0 g (14,4 %)	200,0 g (12,5 %)	353,0 g (9,3 %)
EEB para partição	290,0 g	100,0 g	300 g
Proporção CH ₃ OH:H ₂ O	7:3 (v/v)	7:3 (v/v)	3:7 (v/v)
Volume de hexano	4500 mL	2000 mL	3000 mL
Volume de CHCl ₃	4500 mL	2000 mL	1500 mL
Volume de AcOEt	4500 mL	2000 mL	1500 mL
Volume de n-BuOH	2000 mL	1000 mL	1500 mL
Fase hexânica	30,9 g	4,5 g	56,1 g
Fase clorofórmica	25,6 g	14,9 g	29,4 g
Fase acetato de etila	8,7 g	9,5 g	10,9 g
Fase n-butanólica	18,7 g	16,1 g	37,2 g

Esquema 1. Etapas envolvidas no processo de obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto das espécies estudadas.



4.3. Isolamento e purificação dos constituintes químicos

O isolamento, a purificação e a análise dos constituintes químicos foram realizados utilizando métodos cromatográficos: cromatografia em coluna (CC), cromatografia líquida de média pressão (CLMP) e cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e preparativa (CCDP).

Para as CC utilizou-se sílica gel (ART 7734 da MERCK de partículas com dimensões entre 63 – 200 μm e 70 – 230 mesh) ou Sephadex-LH20, tendo como suporte colunas de vidro cilíndricas cujos comprimentos e diâmetros variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada. As amostras foram acondicionadas sobre o topo da coluna, procedendo-se então a eluição com os solventes comerciais hexanos, diclorometano (CH_2Cl_2) e metanol (CH_3OH) destilados na UFPB, puros ou em misturas binárias.

Para a CLMP utilizou-se o cromatógrafo da Büchi® com um sistema de bomba e injetor de solventes automático e, como fase estacionária, sílica gel F60 (SiliaFlash® F60 com partículas de dimensões entre 40 – 63 μm e 230 – 400 mesh). A amostra foi adicionada no topo da coluna, após o preenchimento com fase estacionária. Os solventes utilizados foram os mesmos citados para CC e o fluxo da fase móvel foi de 10,0 mL/min.

A CCDA e a CCPD foram empregadas para análise e purificação das frações obtidas por CC, respectivamente. Para isto, foram usadas placas de vidro (10,0 x 20,0 cm e 20,0 x 20,0 cm) preparadas com uma suspensão de sílica gel PF₂₅₄ (ART 7749 da MERCK) em água destilada (1:2 m/v) distribuída sobre a placa de vidro com ajuda de um espalhador mecânico tipo *quick fit*, seguindo técnica descrita por Matos (1997). As cromatoplacas obtidas foram secas ao ar livre e ativadas em estufa a 100,0 °C durante duas horas.

A revelação das substâncias em CCDA foi executada pela exposição das cromatoplacas à lâmpada de radiação ultravioleta (UV) sob dois comprimentos de ondas, 254 e 366 nm, em aparelho MINERALIGHT (modelo UVGL-58), bem como, pela impregnação das placas em cubas de vidro saturadas com vapores de iodo.

Por CCDA, as frações semelhantes foram reunidas de acordo com os fatores de retenção (R_f). O grau de pureza foi estimado quando observada uma única mancha após revelação das cromatoplacas, além da observação dos espectros das referidas substâncias.

A recuperação das amostras separadas por CCDP foi feita por extração com CH_2Cl_2 e/ou $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (9:1 v/v), seguida de filtração sob pressão reduzida e concentração em evaporador rotativo.

4.3.1. Processamento cromatográfico da fase clorofórmica de *Borreria verticillata*

Uma alíquota de 10,0 g da fase clorofórmica foi submetida à CC utilizando-se 200,0 g sílica gel 60, como fase estacionária. Como fase móvel foi utilizado hexanos, CH_2Cl_2 e CH_3OH . Inicialmente a eluição foi com hexano, em seguida com uma mistura de hexano e CH_2Cl_2 , posteriormente apenas com CH_2Cl_2 e finalizando com uma mistura de CH_2Cl_2 e CH_3OH . Em princípio, o gradiente polar de concentração aumentava sempre 1 % a cada 200,0 mL, porém quando a eluição passou a ser realizada com uma mistura de CH_2Cl_2 e CH_3OH , a concentração aumentou 0,1 % a cada 200,0 mL e, somente quando a proporção de CH_2Cl_2 e CH_3OH atingiu 99:1 (v/v), voltou a aumentar 1 % a cada 200,0 mL até a proporção de CH_2Cl_2 e CH_3OH atingir 8:2 (v/v), quando então o procedimento cromatográfico era encerrado.

Desta forma foram obtidas 137 frações que foram concentradas em evaporador rotativo. As frações foram analisadas comparativamente através de CCDA utilizando diferentes sistemas de eluição e reunidas, quando semelhantes, em 22 grupos de acordo com os R_f , após análise à luz UV e impregnação com vapores de iodo (Esquema 2, pág. 41).

As frações 58-65 e 84-90 cristalizaram-se espontaneamente, após evaporação dos solventes, e análise em CCDA revelaram uma única mancha sendo então codificadas como **Bv-1** e **Bv-3**, respectivamente.

A fração 91-93 foi submetida a uma CCDP utilizando Hex:AcOEt (8:2 v/v) para eluição, obtendo-se oito subfrações. As subfrações (91-93).2 e (91-93).4, após análise por CCDA, receberam os códigos **Bv-6** e **Bv-8**, respectivamente.

A fração 94-97 também foi submetida a CCDP utilizando o mesmo sistema de eluição anteriormente mencionado, obtendo-se oito subfrações. As subfrações (94-97).3 e (94-97).6, após CCDA, apresentaram uma única mancha, sendo a primeira com R_f semelhante a Bv-8, e receberam os códigos **Bv-8** e **Bv-9**, respectivamente.

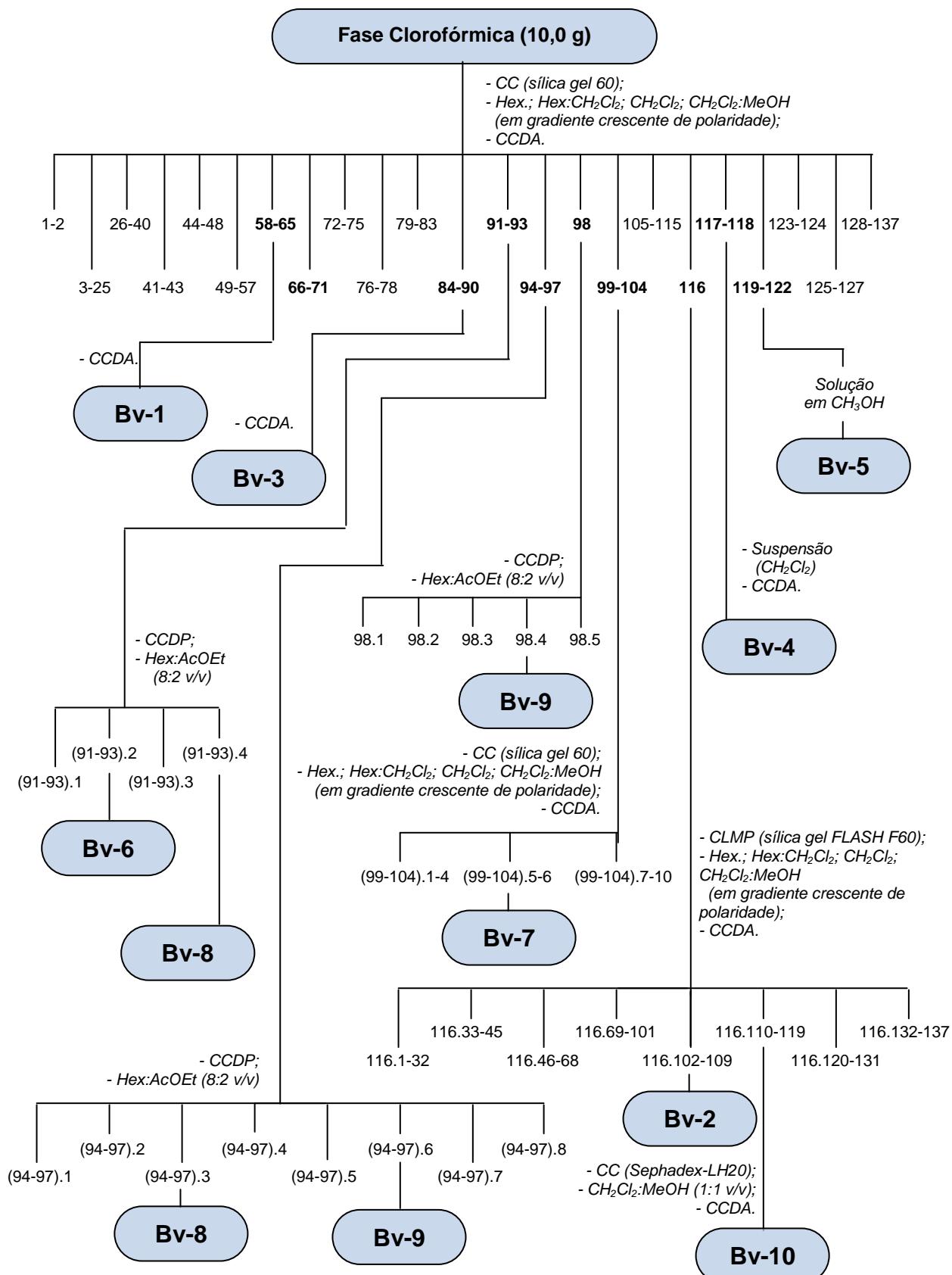
A fração 98 também foi submetida ao mesmo sistema cromatográfico citado no parágrafo anterior e neste processo foi obtido cinco subfrações. A subfração 98.4, quando analisada por CCDA, apresentou uma só mancha com R_f semelhante a Bv-9 e quando analisada espectroscopicamente, foi codificada também com **Bv-9**.

A fração 99-104 foi recromatografada em uma pequena coluna preenchida com sílica gel 60 e eluída com hexano, CH_2Cl_2 e CH_3OH , puros ou em misturas binárias seguindo um gradiente polar de concentração, obtendo-se 30 subfrações que foram reunidas em 11 grupos após monitoramento por CCDA. A subfração (99-104).5-7 recebeu o código **Bv-7**.

A fração 116 foi recromatografada em CLMP, utilizando sílica gel flash e solventes hexano, CH_2Cl_2 e CH_3OH , puros ou em misturas binárias. O fluxo da fase móvel foi de 10,0 mL/min e o gradiente de polaridade aumentava de maneira idêntica a procedimento cromatográfico da fase clorofórmica porém com mudanças de polaridade ocorrendo a cada 10,0 mL, sendo obtidas 137 subfrações. Estas foram reunidas em 10 grupos, após monitoramento por CCDA. A subfração (116) 102-109 formou um precipitado e foi codificada como **Bv-2**. A subfração (116) 110-119 foi submetida a CC utilizando sephadex-LH20 e $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1, v/v), obtendo-se 28 subfrações. A subfração (116) 110-119.1-5 recebeu o código **Bv-10**.

A fração 117-118 foi suspensa em CH_2Cl_2 e codificada como **Bv-4**. As frações de 119 a 122 ao serem concentradas apresentaram uma parte solúvel em CH_2Cl_2 e outra permaneceu no balão de destilação só sendo retirada com CH_3OH . As frações solúveis em CH_3OH apresentaram-se como um sólido amorfó branco e, após CCDA e análise espectral, foram reunidas e receberam o código **Bv-5**.

Esquema 2 Etapas do processamento cromatográfico da fase clorofórmica de *Borreria verticillata*.



4.3.2. Processamento cromatográfico da fase clorofórmica de *Borreria ocymoides*

Uma alíquota de 10,0 g da fase clorofórmica de *Borreria ocymoides* também foi submetida à CC utilizando procedimento idêntico ao realizado no fracionamento cromatográfico da fase clorofórmica de *Borreria verticillata*, obtendo-se também 137 frações que foram concentradas em evaporador rotativo. Após análises comparativas utilizando CCDA em diferentes sistemas de eluição, estas frações foram reunidas, quando semelhantes, em 15 grupos, após análise à luz UV e impregnação com vapores de iodo (Esquema 3, pág. 43).

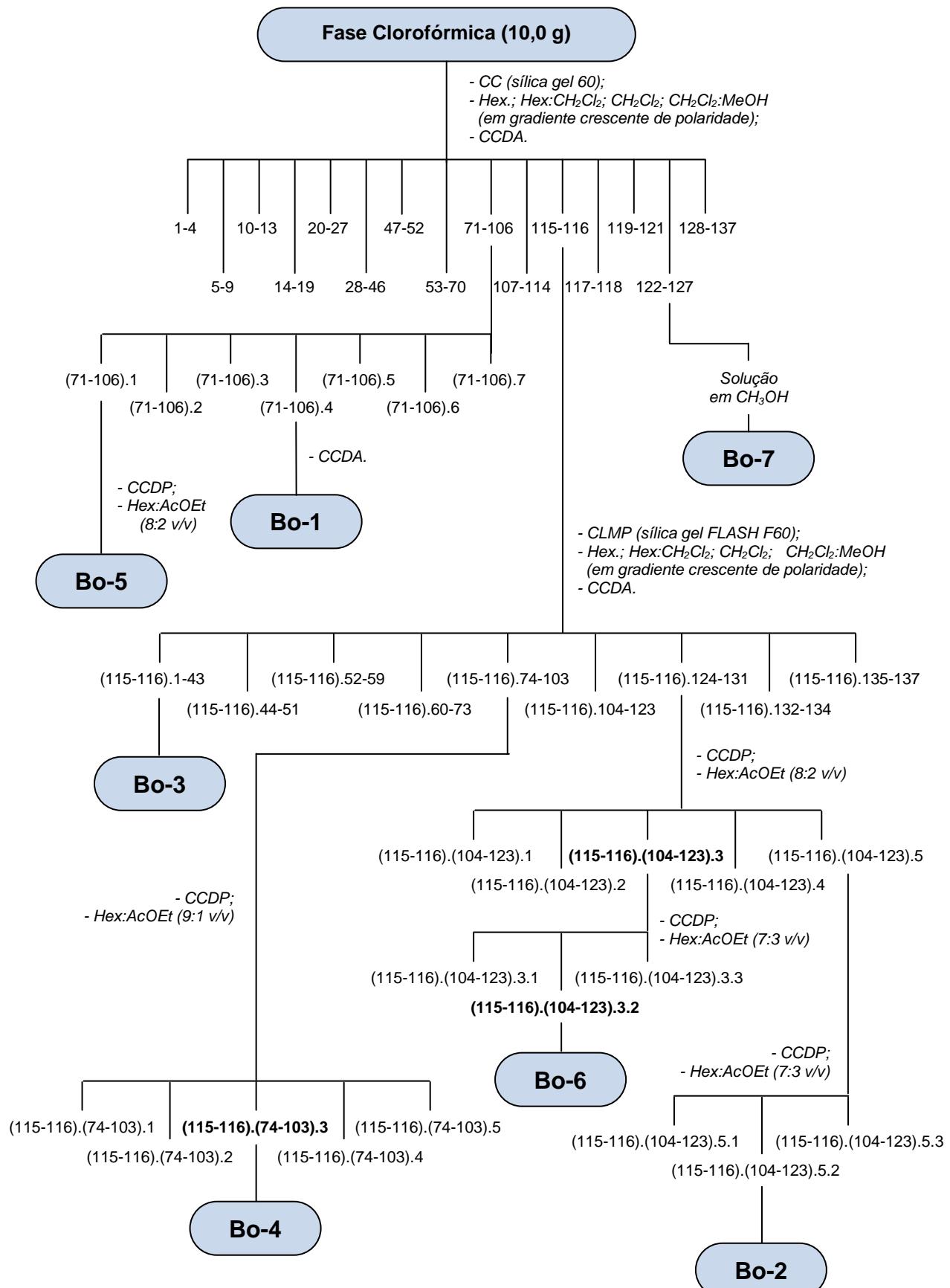
A fração 71-106 foi submetida a uma CCDP utilizando Hex:AcOEt (8:2 v/v), obtendo-se sete subfrações. A subfração (71-106).4, após análise por CCDA, recebeu o código **Bo-1**. A subfração (71-106).1 foi recromatografada em CCDP utilizando as mesmas condições, obtendo-se uma fração codificada por **Bo-5**.

A fração 115-116 foi cromatografada em CLMP (mesmo procedimento mencionado para *Borreria verticillata*) obtendo-se 137 subfrações. Estas foram reunidas em 10 grupos, após CCDA. A subfração (115-116).1-43 foi codificada em **Bo-3**. A subfração (115-116).74-103 foi submetida a uma CCDP em fase móvel Hex:AcOEt (9:1 v/v) obtendo-se cinco subfrações. A subfração (115-116).(74-103).3 revelou-se como uma única mancha fluorescente à luz UV e foi codificada em **Bo-4**.

A subfração (115-116).104-123, após CCDP utilizando Hex:AcOEt (8:2 v/v) formou cinco faixas. A subfração (115-116).(104-123).3 foi novamente submetida a CCDP com fase móvel Hex:AcOEt (7:3 v/v) obtendo-se três frações. A subfração (115-116).(104-123).3.2 cristalizou-se após evaporação dos solventes e recebeu o código **Bo-6**. A subfração (115-116).(104-123).5 também foi recromatografada em CCDP com Hex:AcOEt (7:3 v/v) obtendo-se três frações. A subfração (115-116).(104-123).5.2 também cristalizou após evaporação dos solventes e foi codificada em **Bo-2**.

As frações de 119 a 121 apresentaram coincidentemente um comportamento semelhante à fração 119-122 de *Borreria verticillata*, e, após CCDA e análise espectral, foram reunidas e receberam o código **Bo-7**.

Esquema 3 Etapas do processamento cromatográfico da fase clorofórmica de *Borreria ocymoides*.

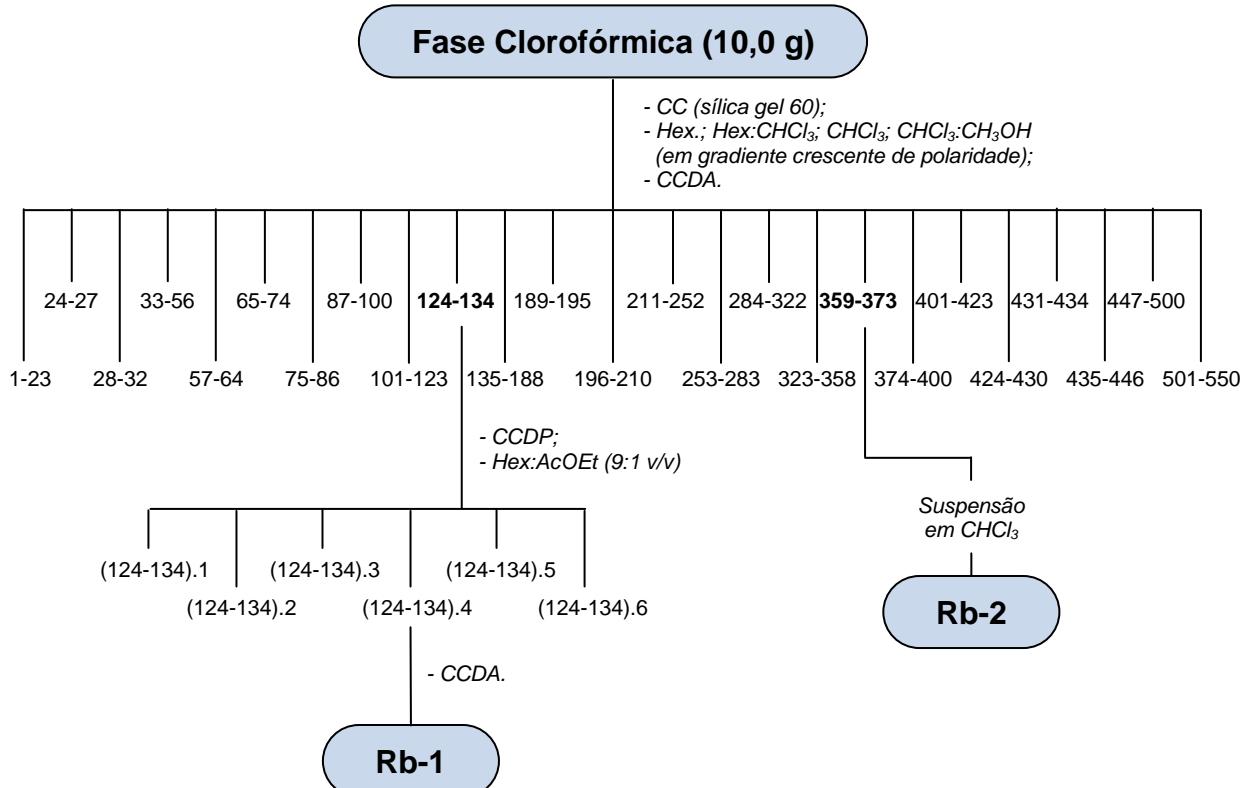


4.3.3. Processamento cromatográfico da fase clorofórmica de *Richardia brasiliensis*

Uma alíquota da fase clorofórmica (10,0 g) foi submetida à CC utilizando-se como fase estacionária sílica gel 60 (200,0 g) eluindo inicialmente com hexanos e finalizando com uma mistura CHCl_3 e CH_3OH , em gradiente crescente de polaridade. Nesta CC foram coletadas 550 frações de 100,0 mL cada, que foram concentradas em evaporador rotativo. Após análise por CCDA utilizando diferentes sistemas de eluição, as frações foram reunidas em 25 grupos de acordo com os R_f (Esquema 4, pág. 44).

A fração 124-134 foi submetida a uma CCDP utilizando Hex:AcOEt (9:1 v/v) para eluição, obtendo-se seis subfrações. A subfração (124-134).4, após análise por CCDA, recebeu o código **Rb-1**. A fração 359-373 foi suspensa em CHCl_3 obtendo-se um precipitado branco e foi codificada por **Rb-2**.

Esquema 4 Etapas do processamento cromatográfico da fase clorofórmica de *Richardia brasiliensis*.



4.4. Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados

A estrutura química das substâncias isoladas foi caracterizada mediante o uso de métodos espectroscópicos e comparação com modelos da literatura. Além disso, também foi determinado os pontos de fusão das amostras.

4.4.1. Espectroscopia de infravermelho (IV)

Os espectros na região do IV (4000 a 400 cm^{-1}), que dão informações sobre os prováveis grupos funcionais presentes na molécula (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010), foram obtidos em aparelho de BOMEM FT-IR (modelo MB 100) do CCS/UFPB, utilizando uma pequena quantidade de amostra em pastilha de brometo de potássio (KBr), com frequência medida em cm^{-1} .

4.4.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , que informa sobre os diferentes hidrogênios e carbonos da molécula, respectivamente (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010), foram obtidos em espectrômetros VARIAN-NMR-SYSTEM 500 MHz e VARIAN-NMR-SYSTEM 200 MHz, ambos do Núcleo de Caracterização e Análise (NUCAL) da UFPB. As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-se pequena quantidade das mesmas em solventes deuterados da marca *Cambridge Isotope Laboratories*: acetona ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$), clorofórmio (CDCl_3), metanol (CD_3OD) e piridina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) deuterados.

Os deslocamentos químicos (δ) em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz foram referenciados para RMN de ^1H pelos sinais característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas dos solventes: $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ (δ_{H} 2,00), CHCl_3 (δ_{H} 7,24), CH_3OH (δ_{H} 3,30) e $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ (δ_{H} 7,55).

Para os espectros de RMN de ^{13}C , os deslocamentos químicos foram referenciados pelos sinais dos carbonos dos solventes deuterados: $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ (δ_{C} 29,0), CDCl_3 (δ_{C} 77,0), CD_3OD (δ_{C} 49,0) e $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (δ_{C} 135,5).

As multiplicidades dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H foram indicadas segundo as convenções: *s* (singleto), *sl* (singleto largo), *d* (dobleto), *dd* (duplo dobleto), *dl* (dobleto largo), *t* (tripleto), *q* (quarteto) e *m* (multipleto).

Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos pela técnica APT com a seguinte convenção: os sinais de carbonos não-hidrogenados (C) e metilênicos (CH_2) acima da linha base e sinais de carbonos metínicos (CH) e metílicos (CH_3) abaixo da linha base; e alguns foram obtidos também pela técnica Broad Band (BB).

Os espectros de RMN também foram otimizados para as técnicas bidimensionais: HMQC, espectro de correlação heteronuclear, que permite fazer uma correlação entre hidrogênios e seus respectivos carbonos; HMBC que permite fazer uma correlação entre hidrogênios e carbonos a duas (^2J) e três (^3J) ligações; COSY, estabelece as correlações entre hidrogênios que são responsáveis, entre si, pelo desdobramento do sinal, e assim discernir a multiplicidade dos sinais observados no espectro de RMN ^1H ; e NOESY, técnica homonuclear que mostra correlações espaciais dos hidrogênios da molécula (KAISER, 2000).

Os dados espectrais foram comparados com modelos da literatura permitindo fazer a maioria das atribuições, e os demais foram feitos com base na análise dos espectros bidimensionais.

4.4.3. Ponto de fusão

O ponto de fusão de cada substância foi determinado em aparelho digital para ponto de fusão (MQAPF – 302) da Microquímica Equipamentos LTDA, com temperatura variando de 0 – 350 °C.

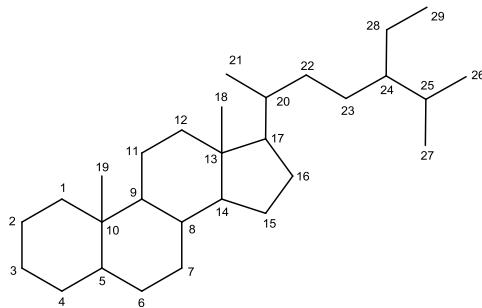
RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação estrutural de Bv-1

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Figura 16, pág. 51) apresentou um conjunto de deslocamentos químicos simples e de alta multiplicidade, característicos de hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos, em δ_{H} 0,6 - 2,5 que aliado a presença de sinais intensos e outros duplicados, no espectro de RMN ^{13}C - APT (50 MHz, CDCl_3) (Figura 17, pág. 52), indicaram que Bv-1 tratava-se de uma mistura de duas substâncias, ambas apresentando o mesmo esqueleto carbônico: núcleo esteroidal do tipo estigmasteno (C_{29}) (KOJIMA et al., 1990).

Características físico-químicas de Bv-1	
Estado físico	Sólido
Forma	Cristais brancos
Solubilidade	CH_2Cl_2
Massa/Rendimento	113,0 mg / 1,13 %
Ponto de fusão	Não determinado (amostra em mistura)
Fluorescência (254 nm)	Ausente
Fluorescência (366 nm)	Ausente
Fator de retenção (R_f)	0,63 (Hex/AcOEt 9:1)



Núcleo esteroidal do tipo estigmasteno

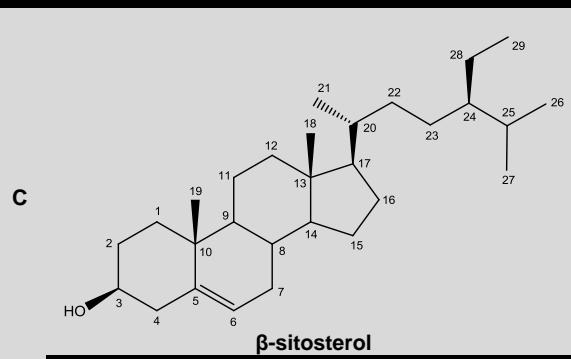
Um multiplet em δ_{H} 3,49 e um sinal em δ_{C} 71,7 (Figura 16 e 17, pág. 51 e 52, respectivamente), referentes ao hidrogênio e carbono oximetínicos, possibilitaram sugerir a presença de função álcool em C-3 (TOMAZ, 2008).

Um duplo largo em δ_{H} 5,32 ($J = 5,0$ Hz) e dois duplos-dupletos, acoplando *trans* entre si, em δ_{H} 4,98 ($J = 8,2$ e 15,2 Hz) e 5,13 ($J = 8,2$ e 15,2 Hz) permitiram sugerir duas unidades olefínicas para Bv-1, tri e dissubstituída, respectivamente (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010). Sinais para carbonos metínicos em

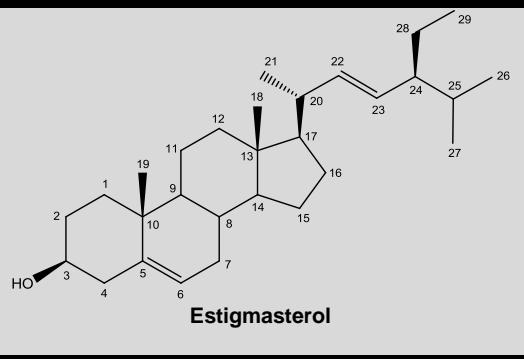
δ_C 121,7 (2C) e não hidrogenado em δ_C 140,7 (2C), bem como, outros em δ_C 138,3 (1C) e 129,2 (1C) para carbonos metínicos, são compatíveis com dupla ligação localizada em C-5 e C-6 (para as duas substâncias da mistura) e em C-22 e C-23 (para apenas um delas), respectivamente (TOMAZ, 2008).

Sendo assim, os dados espectrais observados em RMN de 1H e ^{13}C fundamentados por comparações com aqueles apresentados por Tomaz (2008) (Tabela 1, pág. 50) permitiram identificar Bv-1 como sendo uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol.

Tabela 1. Deslocamentos químicos e tipos de sinais para os átomos de carbono e hidrogênio de Bv-1, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente) em $CDCl_3$, bem como, os deslocamentos químicos dos carbonos (δ_C^*) apresentados por Tomaz (2008) para β -sitosterol e estigmasterol.



β -sitosterol



Estigmasterol

δ_C

δ_C^*

δ_H

δ_C

δ_C^*

δ_H

	δ_C	δ_C^*	δ_H		δ_C	δ_C^*	δ_H
1	37,2	37,2			37,2	37,2	
2	31,6	31,4			31,6	31,4	
3	71,7	71,7	3,49 (m, 1H)		71,7	71,7	3,49 (m, 1H)
4	42,2	42,1			42,2	42,1	
5	140,7	140,7			140,7	140,7	
6	121,7	121,6	5,32 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H)		121,7	121,6	5,32 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H)
7	31,9	31,9			31,9	31,9	
8	31,9	31,8			31,9	31,8	
9	50,1	50,1			50,1	50,1	
10	36,5	36,4			36,5	36,4	
11	21,1	21,0			21,1	21,0	
12	39,7	39,7			39,6	39,6	
13	42,2	42,2			42,2	42,2	
14	56,7	56,7			56,8	56,8	
15	24,2	24,3			24,3	24,3	
16	28,2	28,2			28,9	28,9	
17	56,0	56,0			55,9	55,9	
18	11,8	11,8	0,65 (s, 3H)		11,9	11,9	0,67 (s, 3H)
19	19,4	19,3	0,98 (s, 3H)		19,4	19,3	0,98 (s, 3H)
20	36,1	36,1			40,5	40,5	
21	18,8	18,7			21,2	21,2	
22	33,9	34,0			138,3	138,3	
23	26,0	26,0			129,2	129,2	
24	45,8	45,7			51,2	51,2	
25	29,1	29,0			32,4	29,0	
26	19,8	19,8	0,89 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H)		20,1	20,1	0,89 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H)
27	19,0	19,0	0,79 (d, $J = 5,6$ Hz, 3H)		18,9	18,9	0,79 (d, $J = 5,6$ Hz, 3H)
28	23,0	23,0			25,3	25,4	
29	12,0	12,0			12,2	12,2	

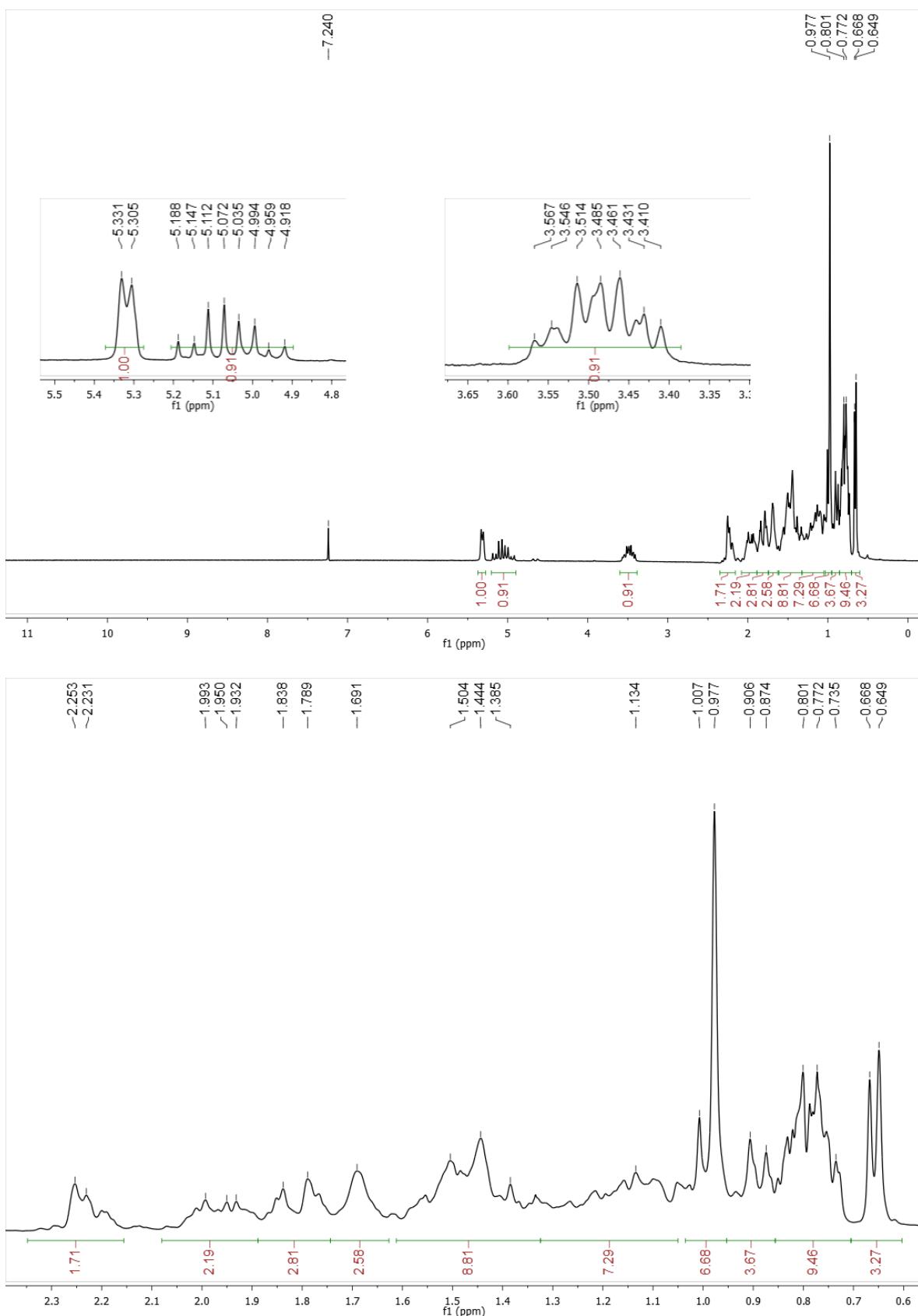


Figura 16. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de Bv-1.

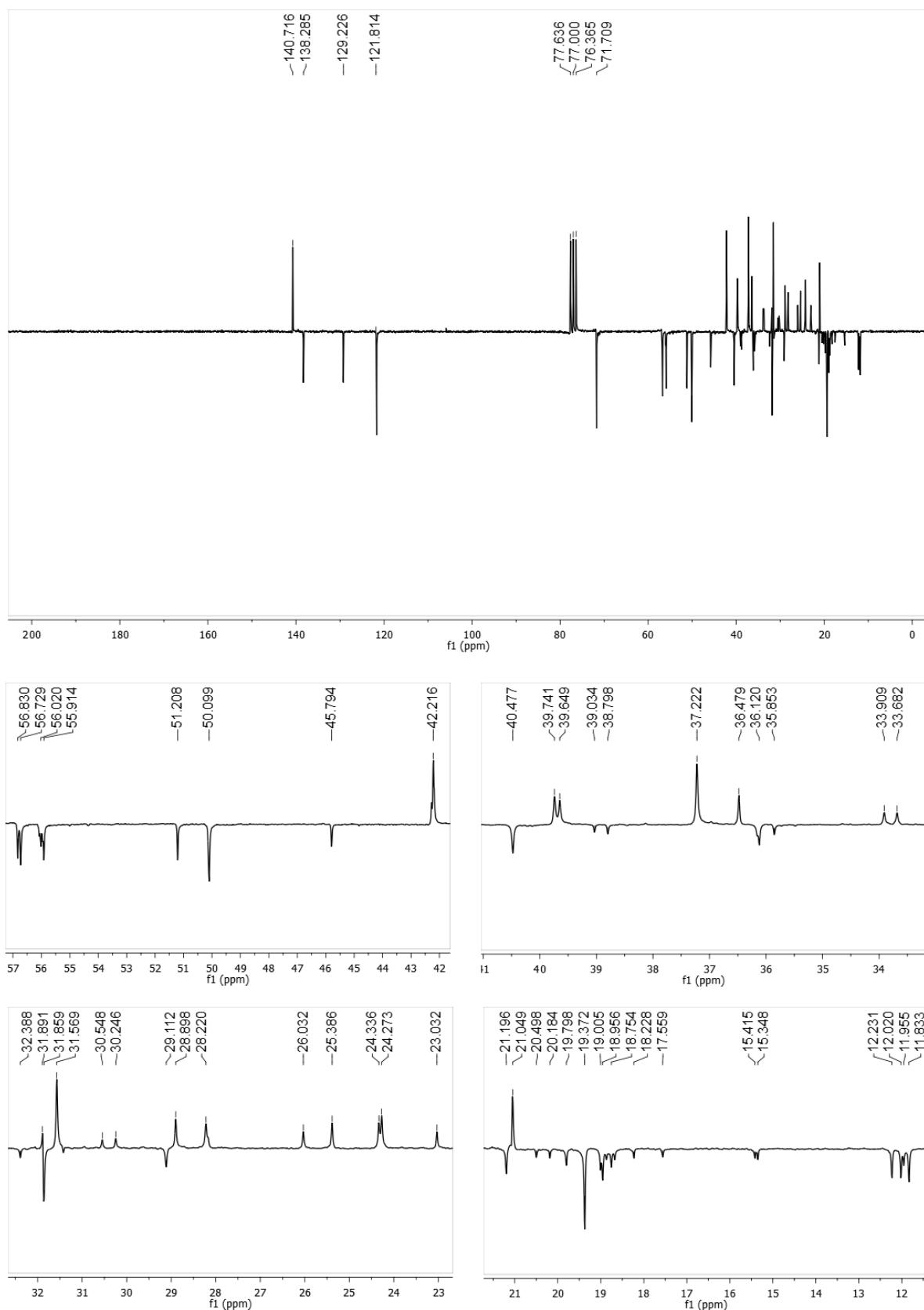


Figura 17. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de Bv-1.

5.2. Determinação estrutural de Bv-2

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) (Figura 20, pág. 58) apresentou um conjunto de sinais de alta multiplicidade em δ_{H} 0,5 – 2,2 característicos de substâncias pertencentes a classe dos terpenoides (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

Um total de 30 sinais, observados no espectro de RMN ^{13}C – APT (50 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) (Figura 21, pág. 59), corroborou com a proposta de terpenóide para Bv-2 e permitiu sugerir que o mesmo se tratava de um triterpeno (SIMÕES et al., 2010).

Os triterpenos compreendem um grande grupo de metabólitos secundários divididos em várias classes de acordo com o esqueleto básico, resultado de perda ou adição de grupos metilênicos, abertura de anel e, principalmente, rearranjos de grupos metílicos do esqueleto padrão (MAHATO; KUNDU, 1994). Os mais comuns no reino vegetal são os da série lupano, oleanano, ursano e friedelano (SIMÕES et al., 2010).

Utilizando as revisões de Mahato e Kundu (1994) e Ahmad e Rahman (1994) foi possível observar um padrão nos deslocamentos químicos dos carbonos metílicos para cada série de triterpenos que, neste trabalho, serão utilizados como norteadores para estabelecer o esqueleto básico do triterpeno em questão. Estes deslocamentos químicos são apresentados juntamente com os esqueletos básicos de cada série de triterpeno na Figura 18 (pág. 54).

Características físico-químicas de Bv-2	
Estado físico	Sólido
Forma	Amorfo branco
Solubilidade	CH_3OH
Massa/Rendimento	79 mg / 0,79 %
Ponto de fusão	262-263 °C
Fluorescência (254 nm)	Ausente
Fluorescência (366 nm)	Ausente
Fator de retenção (R_f)	0,11 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 9:1)

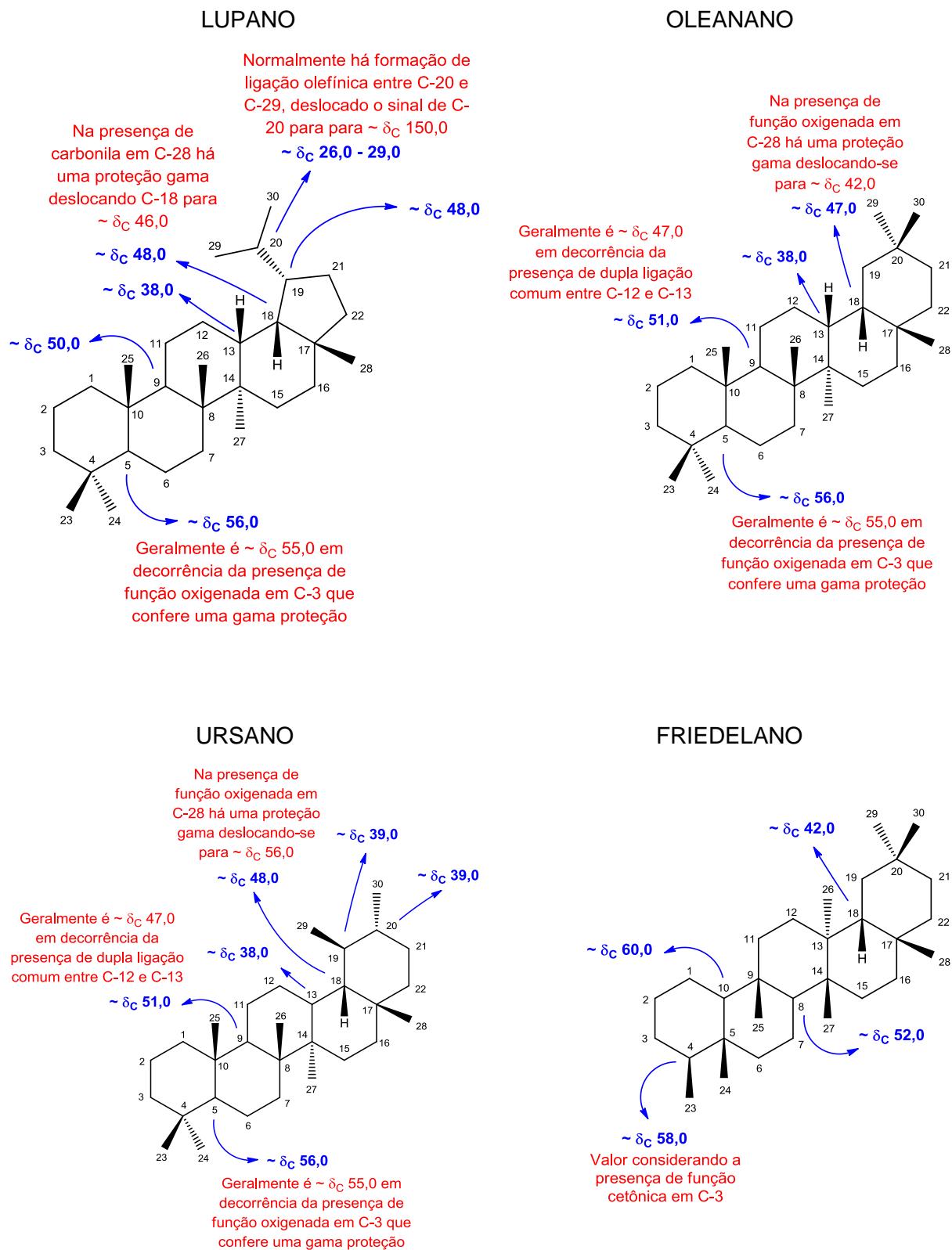


Figura 18. Esqueleto carbônico dos principais tipos de triterpenos encontrados em vegetais e deslocamentos químicos dos carbonos metínicos utilizados neste trabalho como norteadores.

Observando o espectro de RMN ^{13}C – APT (Figura 21, pág. 59) foi possível observar sinais para carbonos metínicos em δ_{C} 55,2 (C-5), 50,4 (C-9), 49,1 (C-19), 46,9 (C-18) e 38,2 (C-13), caracterizando Bv-2 como um triterpeno da série lupano.

Os sinais para carbonos sp^2 em δ_{C} 150,6 e 109,4 corroboraram com a proposta de triterpeno da série lupano uma vez que são característicos dos carbonos C-20 e C-29, respectivamente, do grupo vinila terminal, comum nesta classe de composto (OLEA; ROQUE, 1990). No espectro de RMN ^1H (Figura 20, pág. 58), os singuleto largos na região olefínica em δ_{H} 4,53 e 4,66 para os hidrogênios geminais H-29 e o singuleto em δ_{H} 1,63 (C-30) característico de hidrogênios de metila ligada a carbono olefínico confirmaram a presença do grupo isoprênico, comum na série lupano.

O duplo dupleto em δ_{H} 3,12 ($J = 6,0$ e $9,4$ Hz), observado no espectro de RMN ^1H (Figura 20, pág. 58), e o sinal em δ_{C} 78,9, observado no espectro de RMN ^{13}C (Figura 21, pág. 59), permitiram sugerir a presença de hidroxila para Bv-2 (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

Durante a biossíntese, os triterpenos geralmente sofrem hidroxilação em C-3 (SIMÕES et al., 2010). Aqueles que não possuem hidroxila em C-3 (Figura 19, pág. 56) apresentam sinais em aproximadamente δ_{C} 42,0 e o carbono C-5 aparece em δ_{C} 56,0, quando se encontra hidroxilado, C-3 absorve em δ_{C} 79,0 – 76,0 e C-5 sofre γ -proteção e gera um sinal em δ_{C} 55,0 (MAHATO; KUNDU, 1994). Com base nestes dados e na constatação da presença dos sinais em δ_{C} 78,9 e 55,2, o grupo hidroxila foi inserido na posição 3 do esqueleto triterpênico.

A estereoquímica dessa hidroxila foi determinada pela observação dos sinais para os carbonos C-1, C-3 e C-23 e comparação com os dados da literatura (Figura 19, pág. 56). Quando a hidroxila em C-3 apresenta orientação equatorial este carbono fica 3 ppm menos protegido que C-3 com hidroxila axial, além disso, a metila axial C-23 é aproximadamente 7,0 ppm mais protegida e o grupo metíleno C-1 é 2,0 ppm mais desprotegido (MAHATO; KUNDU, 1994). Essa variação é observada em decorrência do efeito de compressão γ -gauche dependente da presença e orientação espacial da hidroxila (PAVIA et al., 2010). A presença dos sinais em δ_{C} 78,9 (C-3), 38,6 (C-1) e 15,3 (C-23) permitiu sugerir que a hidroxila em C-3 apresenta orientação equatorial.

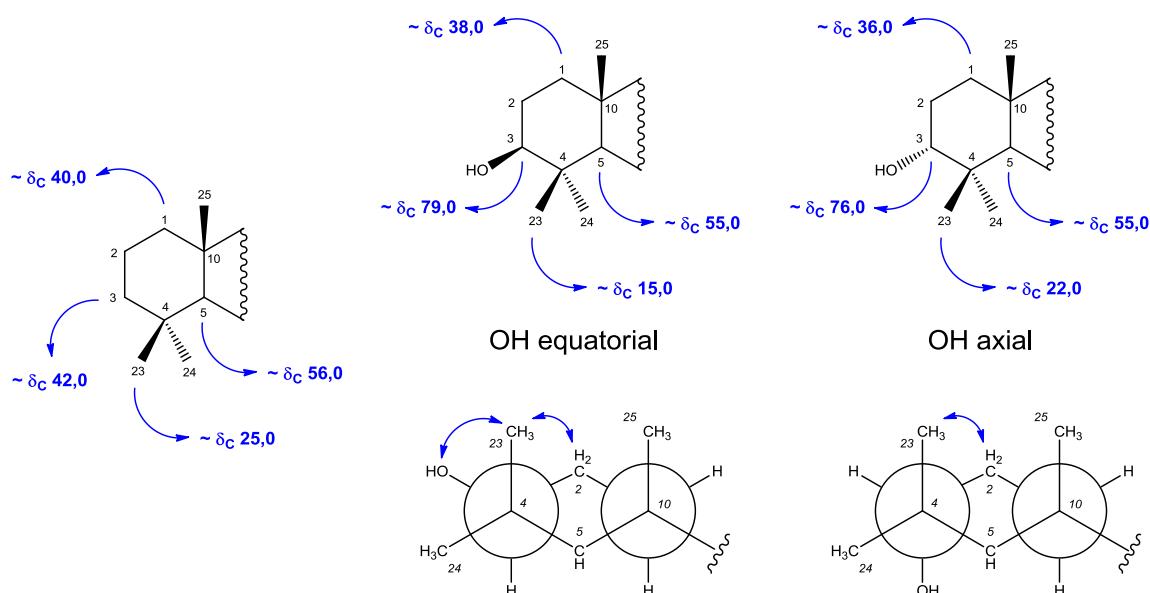
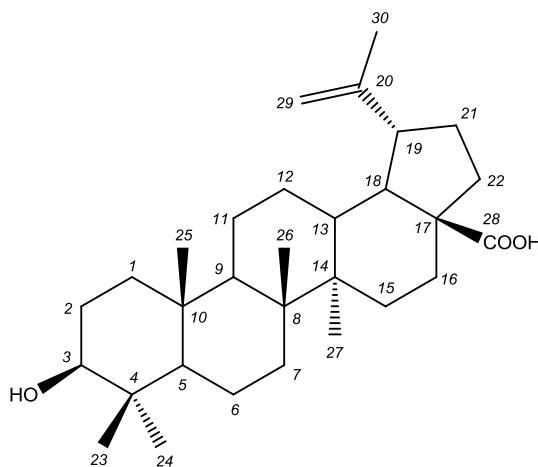


Figura 19. Deslocamentos químicos dos carbonos C-1, C-3, C-5 e C-23 na ausência e na presença de hidroxilos com orientação α ou β , e projeção de Newman para visualização do efeito γ -gauche sofrido pelo carbono C-23 quando a hidroxila apresenta orientação β .

Adicionalmente observou-se no espectro de RMN ^{13}C – APT (Figura 21, pág. 59) um sinal em δ_{C} 179,4 indicando que Bv-2 apresentava uma função ácido carboxílico em C-28.

Sendo assim, os espectros de RMN ^1H e ^{13}C unidimensionais e comparações com dados da literatura (Tabela 2, pág. 57) permitiram identificar Bv-2 como o ácido lup-20(29)-en-28-oico, conhecido como ácido betulínico, relatado pela primeira vez no gênero *Borreria*.

Esta substância apresenta várias atividades com destaque para o poder inibitório de melanomas em seres humanos, do vírus HIV em linfócitos H9 (FUJIOKA et al., 1994) e da atividade antitumoral exercida pelo 7,12-dimetilbenzo[a]antraceno (MAHATO; SEM, 1997).



Ácido betulínico

Tabela 2. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Bv-2, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente, $CDCl_3 + CD_3OH$), bem como, aqueles apresentados por Maia (2008) para o ácido betulínico (200 e 50 MHz, respectivamente, $CDCl_3$).

C	Bv-2		Ácido betulínico	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	38,6	-	38,6	-
2	27,0	-	27,0	-
3	78,9	3,12 (dd, $J = 6,0$ e 9,4 Hz, 1H)	78,8	3,11 (m, 1H)
4	38,7	-	38,7	-
5	55,2	0,61 (dl, $J = 10,8$ Hz, 1H)	55,2	-
6	18,2	-	18,2	-
7	34,2	-	34,2	-
8	40,6	-	40,6	-
9	50,4	-	50,4	-
10	37,1	-	37,1	-
11	20,8	-	20,8	-
12	25,4	-	25,4	-
13	38,2	-	38,2	-
14	42,3	-	42,3	-
15	30,5	-	30,5	-
16	32,2	-	32,1	-
17	56,1	-	56,1	-
18	46,9	-	46,9	-
19	49,1	-	49,1	-
20	150,6	-	150,6	-
21	29,6	-	29,6	-
22	37,1	-	37,1	-
23	15,3	0,76 (s, 3H)	15,2	0,75 (s, 3H)
24	27,8	0,69 (s, 3H)	27,8	0,68 (s, 3H)
25	15,8	0,86 (s, 3H)	15,8	0,87 (s, 3H)
26	16,0	0,90 (s, 3H)	16,0	0,89 (s, 3H)
27	14,6	0,91 (s, 3H)	14,6	0,90 (s, 3H)
28	179,4	-	179,6	-
29	109,4	4,53 (sl, 1H) 4,66 (sl, 1H)	109,4	4,53 (sl, 1H) 4,65 (sl, 1H)
30	19,2	1,62 (s, 3H)	19,2	1,62 (s, 3H)

Legenda: (dd) duplo duplo; (dl) duplo largo; (s) singuleto; (sl) singuleto largo.

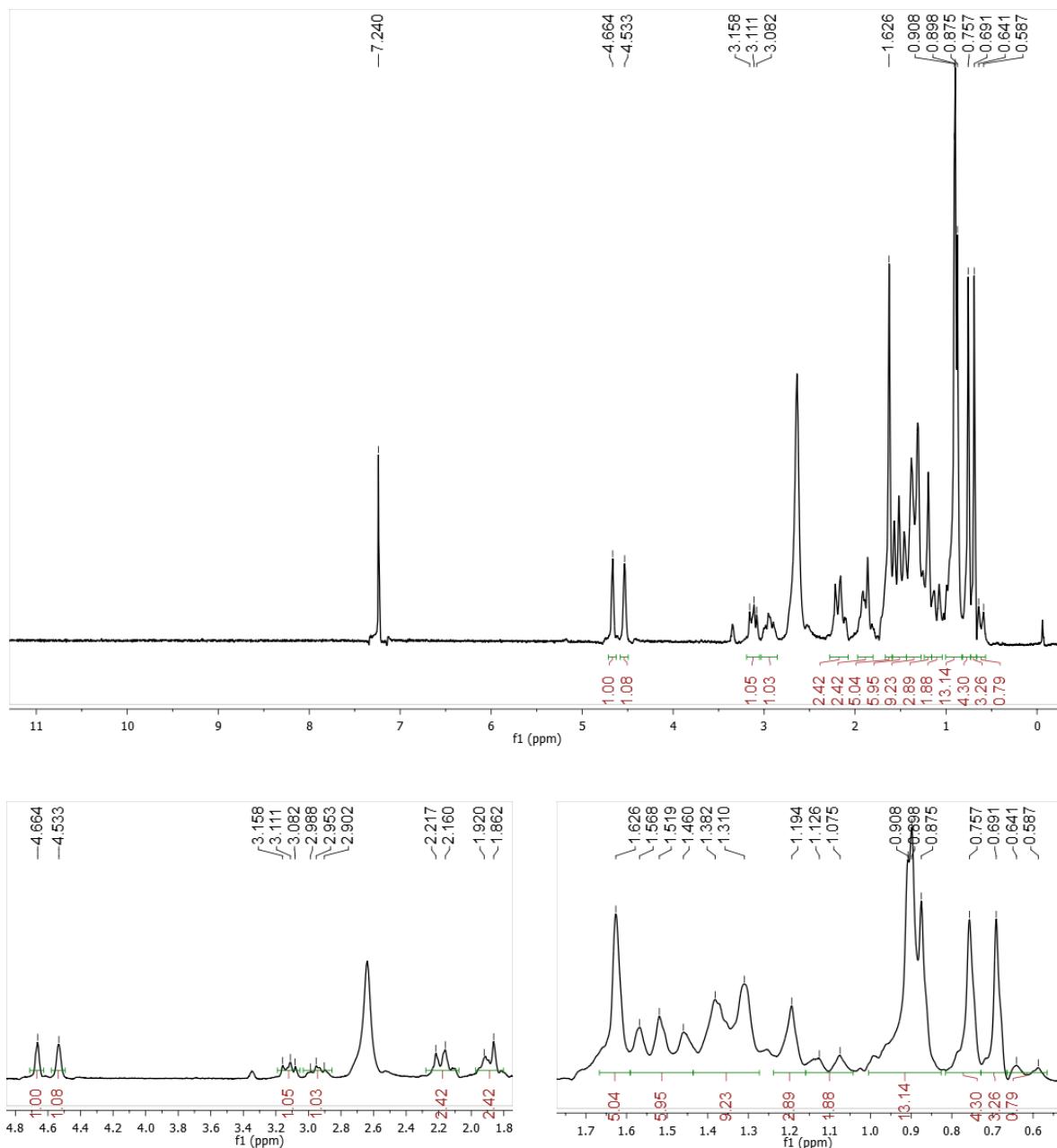


Figura 20. Espectro de RMN ^1H ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OH}$, 200 MHz) de Bv-2.

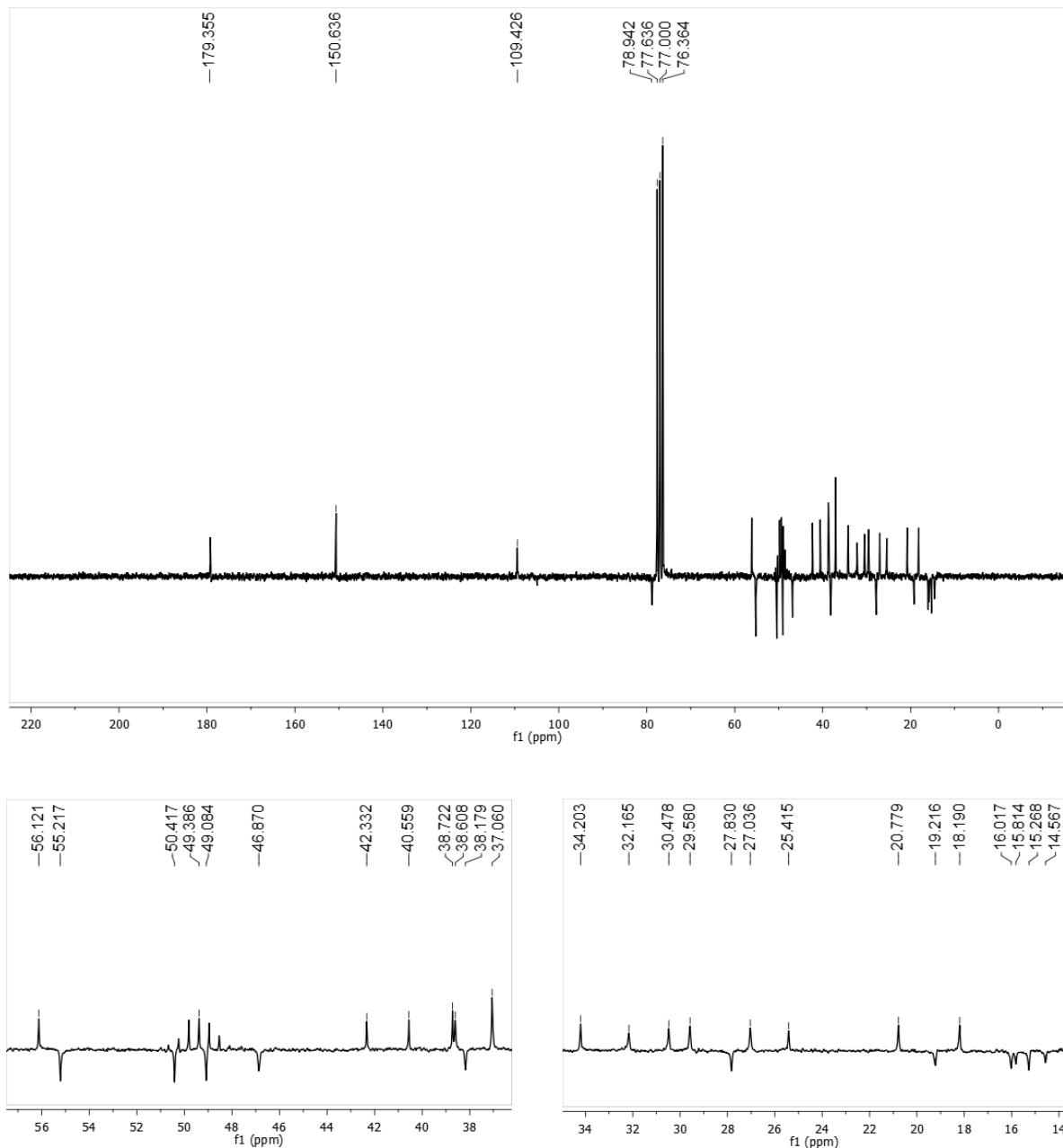


Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C – APT ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OH}$, 50 MHz) de Bv-2.

5.3. Determinação estrutural de Bv-3

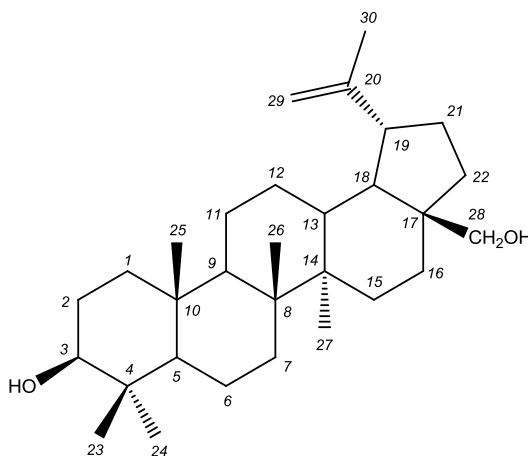
Em Bv-3, deslocamentos químicos em δ_H 0,6 – 2,4 (hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos), em δ_H 4,56 e 4,66 (hidrogênios olefínicos terminais) observados no espectro de RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$) (Figura 22, pág. 62), bem como, os sinais para carbonos metínicos em δ_C 55,2 (C-5), 50,3 (C-9), 48,7 (C-19), 47,6 (C-18) e 37,3 (C-13) e para carbonos sp^2 em δ_C 150,5 (C-20) e 109,7 (C-29) observados no espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) (Figura 23, pág. 63) também estavam em conformidade com triterpenos da série lupano com dupla ligação envolvendo os carbonos C-20 e C-29, de forma semelhante a Bv-2. O duplo dupletô em δ_H 3,17 ($J = 5,0$ e 10,0 Hz, H-3) e o sinal em δ_C 79,0 (C-3) também permitiram sugerir a presença de hidroxila com orientação β para Bv-3 (Figura 19, pág. 56).

Características físico-químicas de Bv-3	
Estado físico	Sólido
Forma	Cristal branco
Solubilidade	$CHCl_3$
Massa/Rendimento	31 mg / 0,31 %
Ponto de fusão	227-228 °C
Fluorescência (254 nm)	Ausente
Fluorescência (366 nm)	Ausente
Fator de retenção (R_f)	0,15 (CH_2Cl_2/CH_3OH 9:1)

No entanto, diferentemente de Bv-2, a ausência de sinal para carbonila no espectro de RMN ^{13}C (Figura 23, pág. 63) juntamente com a observação da presença de um dupletô em δ_H 3,31 ($J = 10,6$ Hz), um duplo dupletô em δ_H 3,78 ($J = 1,4$ e 10,8 Hz) e o sinal em δ_C 60,5 indicaram a presença de um grupo oximetilênico em C-28 para Bv-3 (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

Assim, os espectros de RMN 1H e ^{13}C e comparações com dados da literatura (Tabela 3, pág. 61) permitiram identificar Bv-3 como o lup-20(29)-ene-3,28-diol, mas conhecido como álcool betulínico, relatado pela primeira vez no gênero *Borreria*.

Esta substância apresenta várias atividades destacando-se a antitumoral, anti-inflamatória e antiviral contra o vírus HIV (ACHREM-ACHREMOWICZ; JANECZKO, 2003), bem como, hepatoprotetora na citotoxicidade oferecida pelo acetominofeno (SZUSTER-CIESIELSKA; KANDEFER-SZERSZEN, 2005).



Álcool betulínico

Tabela 3. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Bv-3, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente, $CDCl_3$), bem como, aqueles apresentados por Maia (2008) para o álcool betulínico (200 e 50 MHz, respectivamente, $CDCl_3$).

C	Bv-3		Álcool betulínico	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	38,7	-	38,7	-
2	27,3	-	27,3	-
3	79,0	3,17 (<i>dd</i> , $J = 5,0$ e $10,0$ Hz, 1H)	79,0	3,16 (<i>d</i> , $J = 6,0$ e $10,0$ Hz, 1H)
4	38,8	-	38,8	-
5	55,2	0,66 (<i>dl</i> , $J = 9,2$ Hz, 1H)	55,3	-
6	18,3	-	18,3	-
7	34,2	-	34,2	-
8	40,9	-	40,9	-
9	50,4	-	50,4	-
10	37,1	-	37,1	-
11	20,8	-	20,8	-
12	25,2	-	25,2	-
13	37,3	-	37,3	-
14	42,7	-	42,7	-
15	27,0	-	27,0	-
16	29,1	-	29,1	-
17	47,7	-	47,8	-
18	47,6	-	47,8	-
19	48,7	-	48,7	2,30 (<i>m</i> , 1H)
20	150,5	-	150,5	-
21	29,7	-	29,7	-
22	34,0	-	33,9	-
23	28,0	0,73 (<i>s</i> , 3H)	28,0	0,73 (<i>s</i> , 3H)
24	15,4	0,80 (<i>s</i> , 3H)	15,3	0,79 (<i>s</i> , 3H)
25	16,1	0,94 (<i>s</i> , 3H)	16,1	0,94 (<i>s</i> , 3H)
26	16,0	0,95 (<i>s</i> , 3H)	16,0	0,95 (<i>s</i> , 3H)
27	14,7	1,00 (<i>s</i> , 3H)	14,7	0,99 (<i>s</i> , 3H)
28	60,5	3,31 (<i>d</i> , $J = 10,6$ Hz, 1H) 3,78 (<i>dd</i> , $J = 1,4$ e $10,8$ Hz, 1H)	60,5	-
29	109,7	4,56 (<i>sl</i> , 1H) 4,66 (<i>sl</i> , 1H)	109,7	4,55 (<i>m</i> , 1H) 4,65 (<i>d</i> , $J = 1,6$ Hz, 1H)
30	19,1	1,66 (<i>sl</i> , 3H)	19,1	1,65 (<i>s</i> , 3H)

Legenda: (*dd*) duplo duplo; (*dl*) duplo largo; (*d*) duplo; (*m*) multiplo; (*s*) singuleto; (*sl*) singuleto largo.

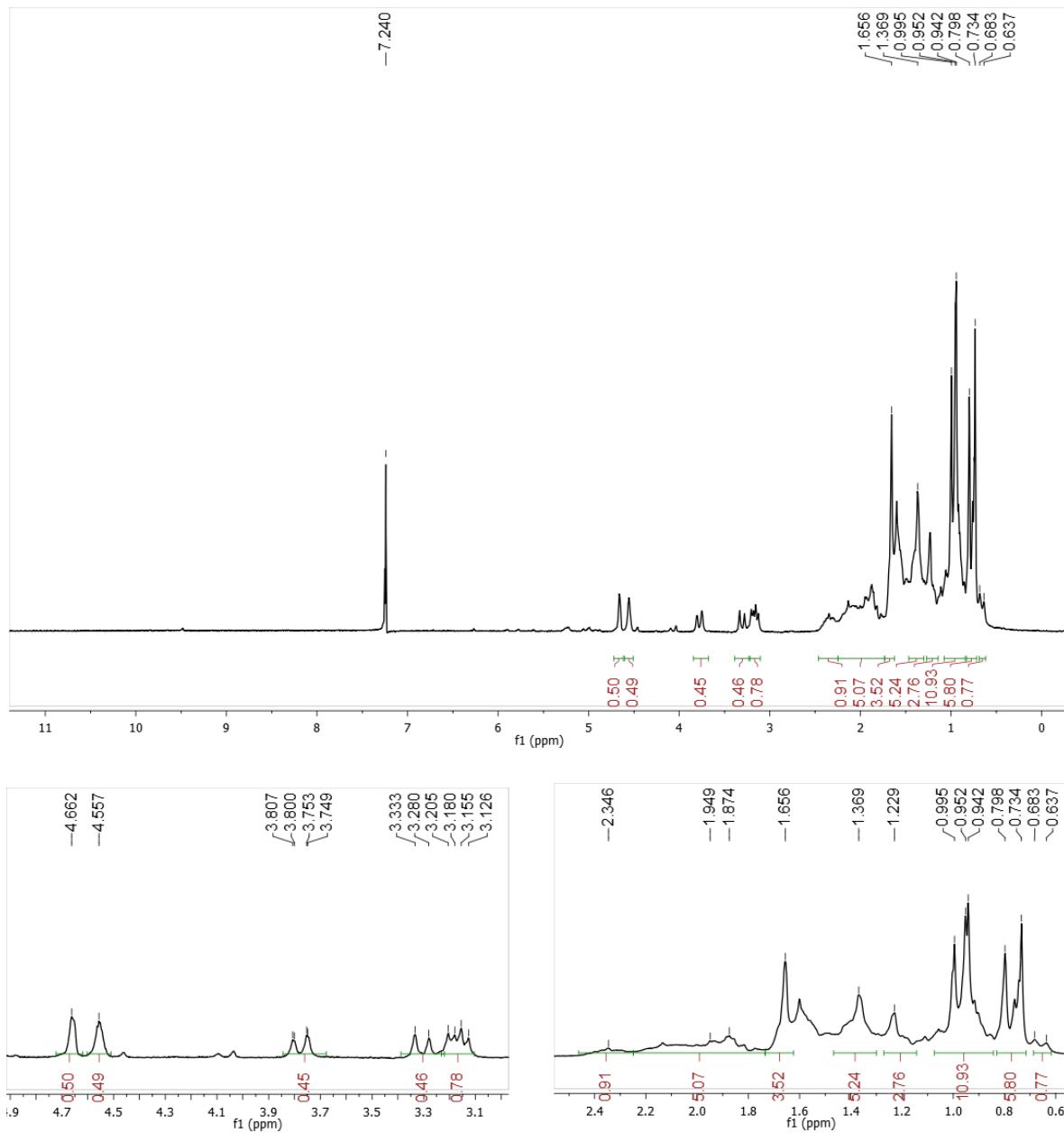


Figura 22. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de Bv-3.

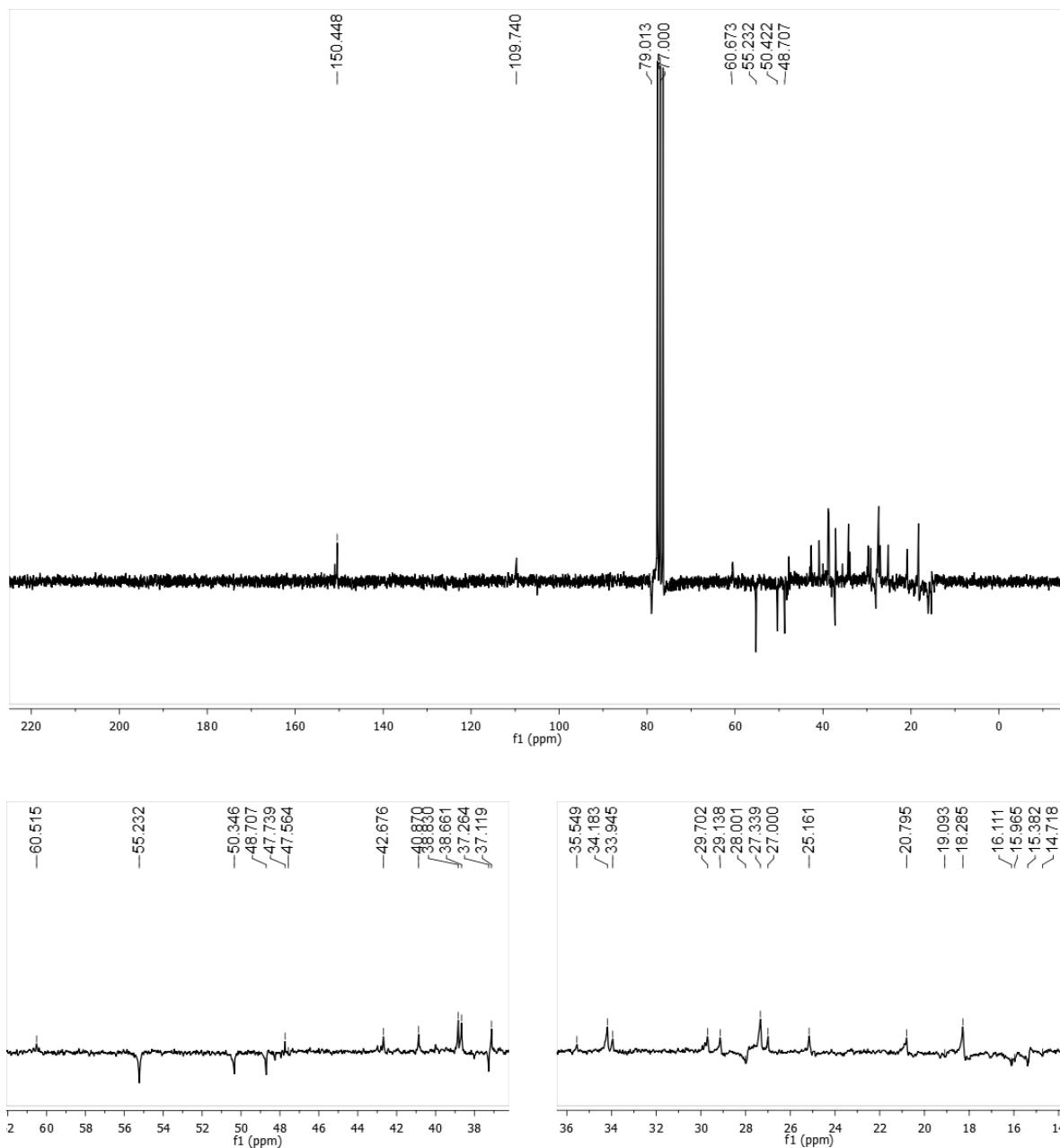


Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 50 MHz) de Bv-3.

5.4. Determinação estrutural de Bv-4

Absorções no espectro de IV (2943 e 2856 cm^{-1}) e no espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (δ_{H} 0,8 – 2,2) (Figura 24 e 25, pág. 65 e 67, respectivamente) indicaram que Bv-4 também se tratava de um terpenoide (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010), assim como Bv-3.

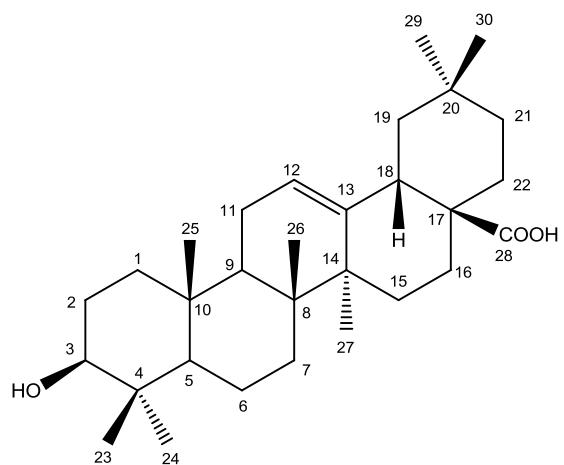
Características físico-químicas de Bv-4	
Estado físico	Sólido
Forma	Amorfo branco
Solubilidade	CHCl_3
Massa/Rendimento	103 mg / 1,03 %
Ponto de fusão	309-311 °C
Fluorescência (254 nm)	Ausente
Fluorescência (366 nm)	Ausente
Fator de retenção (R_f)	0,12 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 9:1)

O espectro de RMN ^{13}C – APT (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Figura 26, pág. 68) apresentou 30 sinais dos quais se destacaram aqueles para carbonos metínicos em δ_{C} 55,7 (C-5), 48,0 (C-9) e 42,0 (C-18) que são compatíveis com triterpenos da série oleanano (Figura 18, pág. 54). O triploto em δ_{H} 5,48 (J = 3,8 Hz, H-12) e os sinais em δ_{C} 122,5 (C-12) e 144,7 (C-13) corroboraram com esta proposta uma vez que são característicos de triterpenos da série oleanano com dupla ligação em C-12 e C-13 (MAHATO; KUNDU, 1994).

O duplo duploto em δ_{H} 3,43 (J = 6,0 e 10,5 Hz), observado no espectro de RMN ^1H (Figura 25, pág. 67), e o sinal em δ_{C} 78,0, bem como, δ_{C} 55,7 (C-5), 38,8 (C-1) e 16,5 (C-23) observados no espectro de RMN ^{13}C – APT (Figura 26, pág. 68), permitiram sugerir a presença de hidroxila equatorial em C-3.

Adicionalmente, o espectro de RMN ^{13}C – APT (Figura 26, pág. 68) apresentou um sinal em δ_{C} 180,1 característicos de carbonila, que juntamente com uma absorção larga, no espectro de IV (Figura 24, pág. 65), em 3457 – 2400 cm^{-1} e outra intensa em 1689 cm^{-1} , típicos de estiramento de O-H e C=O, indicaram que Bv-4 apresentava uma função ácido carboxílico (PAVIA et al., 2010). Esta unidade foi inserida em C-28 pela observação do sinal em δ_{C} 42,0 que é característico do carbono C-18 quando o mesmo apresenta função oxigenada em C-28.

Sendo assim, os espectros de IV e RMN de ^1H e ^{13}C unidimensionais e comparações com dados da literatura (Tabela 4, pág. 66) permitiram identificar Bv-4 como sendo um triterpeno da série oleanano, o ácido 3- β -hidroxiolean-12-en-28-óico, conhecido como ácido oleanólico, relatado pela primeira vez no gênero *Borreria*.



Ácido oleanólico

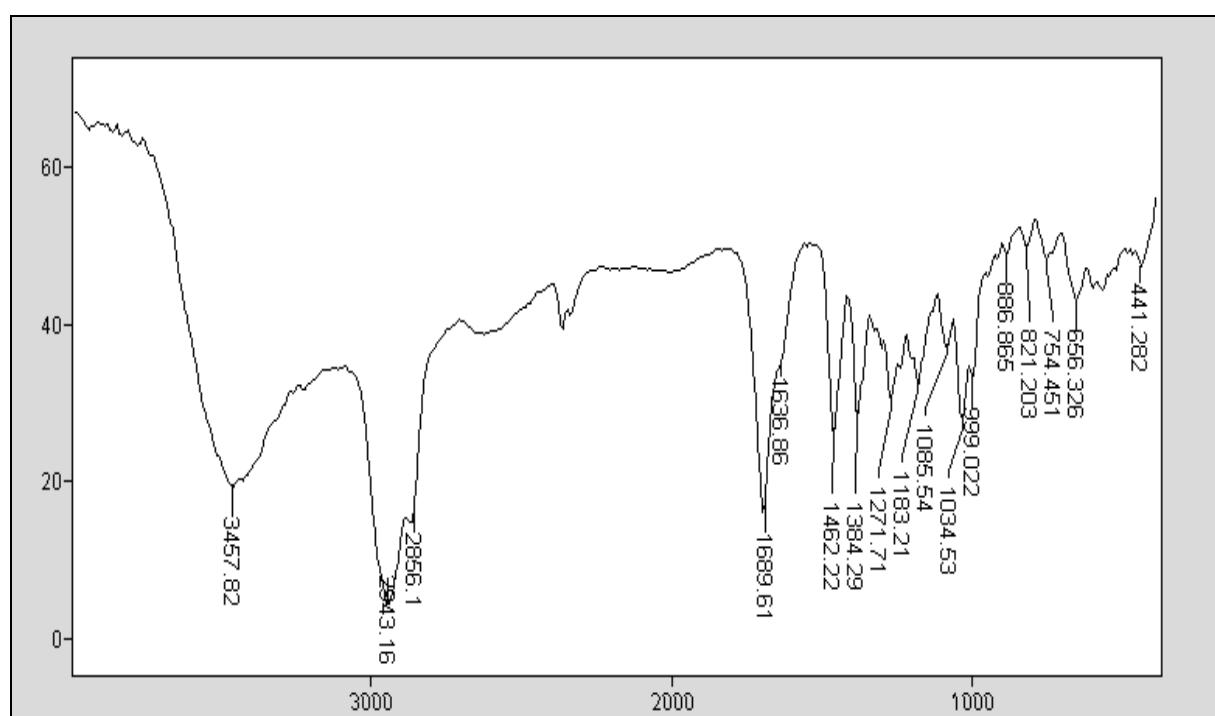


Figura 24. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de Bv-4.

Tabela 4. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Bv-4, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente, C_5D_5N), bem como, aqueles apresentados por Seebacher e colaboradores (2003) para o ácido oleanólico (600 e 200 MHz, respectivamente, C_5D_5N).

C	Bv-4		Ácido Oleanólico	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	38,8	1,00 (m, 1H) α 1,55 (m, 1H) β	39,0	1,02 (m, 1H) α 1,57 (m, 1H) β
2	28,0	1,82 (m, 1H) α 1,82 (m, 1H) β	28,1	1,82 (m, 1H) α 1,82 (m, 1H) β
3	78,0	3,43 (dd, J = 6,0 e 10,5 Hz, 1H)	78,2	3,44 (dd, 1H)
4	39,3	-	39,4	-
5	55,7	0,85 (dl, J = 11,5 Hz, 1H)	55,9	0,88 (d, 1H)
6	18,7	1,58 (m, 1H) α 1,37 (m, 1H) β	18,8	1,58 (m, 1H) α 1,39 (m, 1H) β
7	33,2	1,51 (m, 1H) α 1,33 (m, 1H) β	33,4	1,53 (m, 1H) α 1,36 (m, 1H) β
8	39,7	-	39,8	-
9	48,0	1,67 (<i>t</i> , J = 9,0 Hz, 1H)	48,2	1,71 (<i>t</i> , 1H)
10	37,3	-	37,4	-
11	23,8	1,96 (m, 1H) α 1,96 (m, 1H) β	23,8	1,96 (m, 1H) α 1,96 (m, 1H) β
12	122,5	5,48 (<i>t</i> , J = 3,5 Hz, 1H)	122,6	5,49 (s, 1H)
13	144,7	-	144,8	-
14	42,1	-	42,2	-
15	28,2	1,19 (m, 1H) α 2,17 (m, 1H) β	28,4	1,22 (m, 1H) α 2,19 (m, 1H) β
16	23,6	2,10 (m, 1H) α 1,93 (m, 1H) β	23,8	2,12 (<i>t</i> , 1H) α 1,96 (m, 1H) β
17	46,4	-	46,7	-
18	42,0	3,29 (dd, J = 4,0 e 14,0, 1H)	42,1	3,30 (dd, 1H)
19	46,6	1,82 (m, 1H) α 1,30 (m, 1H) β	46,6	1,83 (m, 1H) α 1,32 (m, 1H) β
20	30,9	-	31,0	-
21	34,1	1,44 (m, 1H) α 1,19 (m, 1H) β	34,3	1,46 (m, 1H) α 1,23 (m, 1H) β
22	33,1	1,80 (m, 1H) α 2,03 (m, 1H) β	33,2	1,82 (m, 1H) α 2,04 (m, 1H) β
23	16,5	1,00 (s, 1H)	16,5	1,02 (s, 1H)
24	28,7	1,22 (s, 1H)	28,8	1,24 (s, 1H)
25	15,5	0,88 (s, 1H)	15,6	0,93 (s, 1H)
26	17,4	1,01 (s, 1H)	17,5	1,04 (s, 1H)
27	26,1	1,27 (s, 1H)	26,2	1,30 (s, 1H)
28	180,1	-	180,0	-
29	33,2	0,93 (s, 1H)	33,4	0,97 (s, 1H)
30	23,7	0,99 (s, 1H)	23,8	1,02 (s, 1H)

Legenda: (d) duplo; (dd) duplo duplo; (dl) duplo duplo largo; (m) multiplo; (s) singuleto; (*t*) triploto.

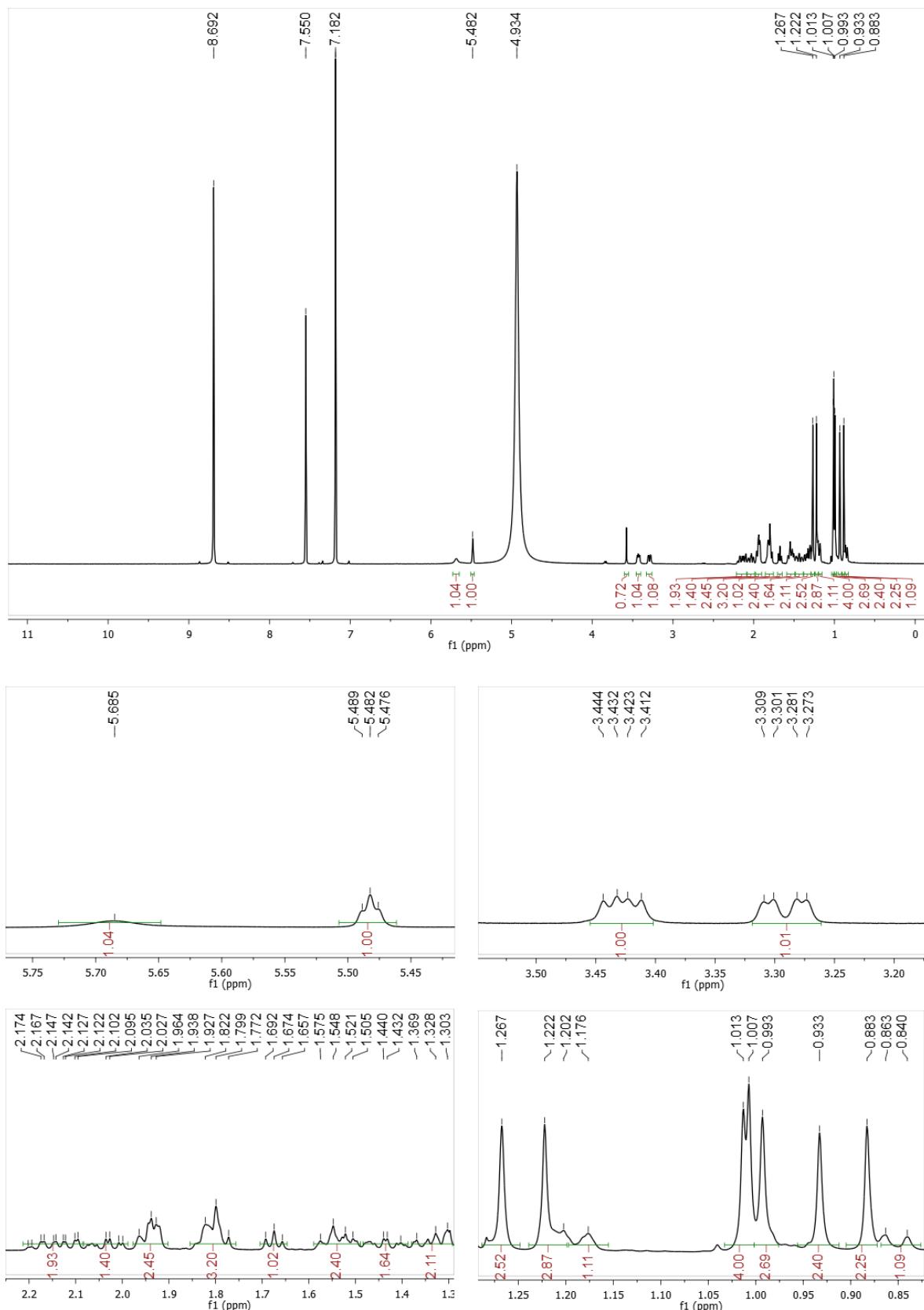


Figura 25. Espectro de RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) de Bv-4.

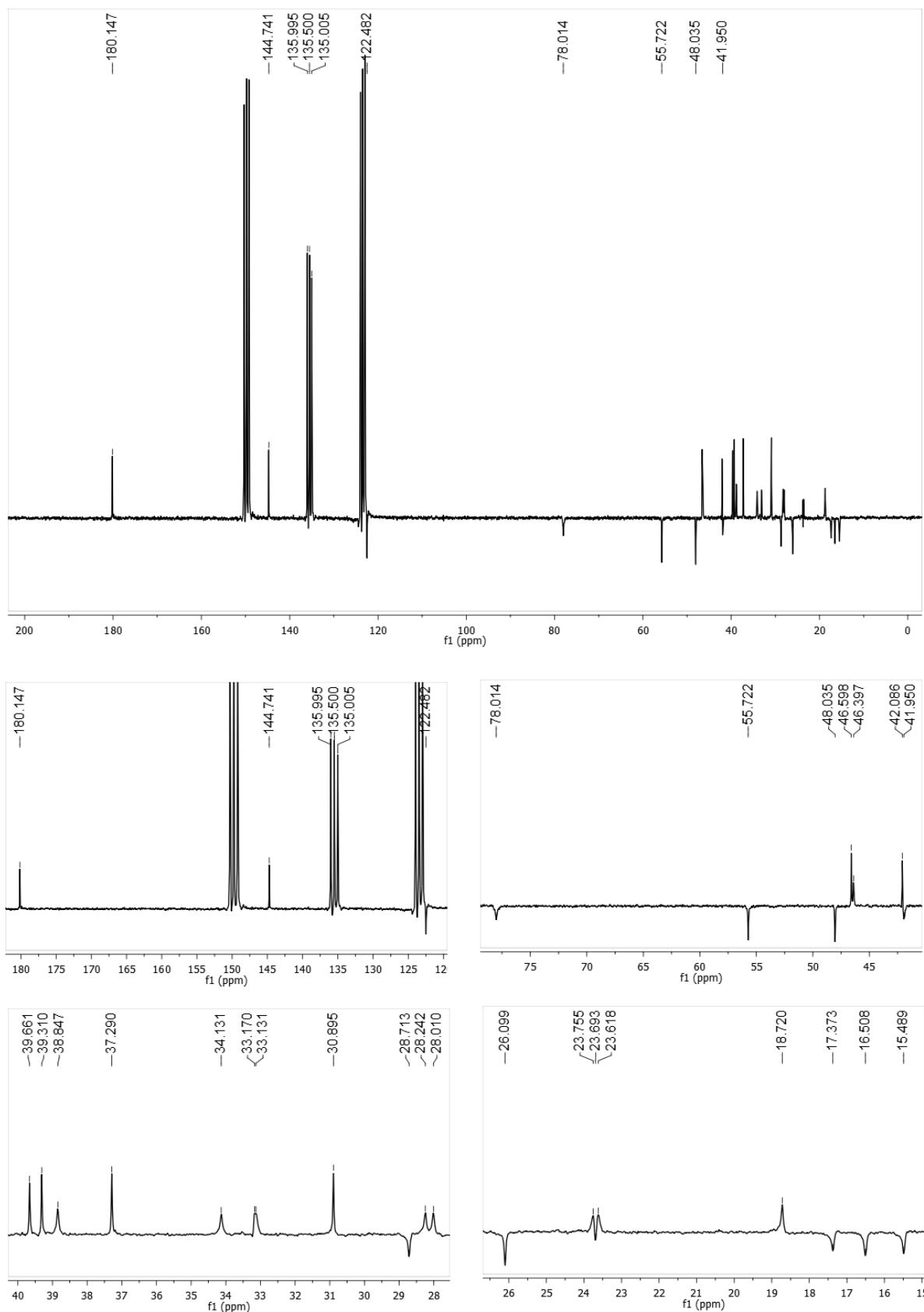


Figura 26. Espectro de RMN ^{13}C – APT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de Bv-4.

5.5. Determinação estrutural de Bv-5

Bv-5 também apresentou absorções no espectro de IV (Figura 27, pág. 70) em 2850 e 2924 cm⁻¹, que juntamente com os deslocamentos químicos de alta multiplicidade no espectro de RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N) (Figura 28, pág. 72) em δ_H 0,8 – 2,0 indicaram tratar-se de um terpenoide (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

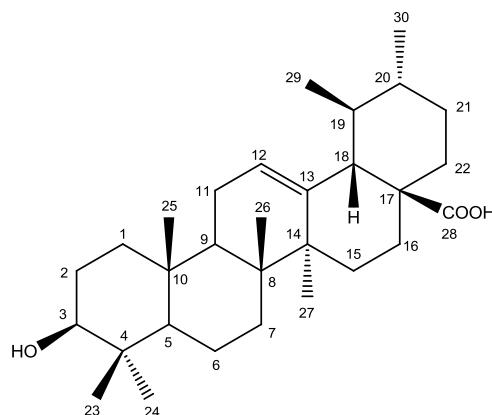
Características físico-químicas de Bv-5	
Estado físico	Sólido
Forma	Amorfo branco
Solubilidade	CHCl ₃
Massa/Rendimento	103 mg / 1,03 %
Ponto de fusão	309-311 °C
Fluorescência (254 nm)	Ausente
Fluorescência (366 nm)	Ausente
Fator de retenção (R _f)	0,12 (CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 9:1)

No espectro de RMN ¹³C – APT (125 MHz, C₅D₅N) (Figura 29, pág. 73), a presença de 30 sinais incluindo aqueles para carbonos metínicos em δ_C 55,8 (C-5), 53,5 (C-18), 48,0 (C-9), 39,4 (C-20) e 39,5 (C-19) indicaram que o terpenoide pertencia à classe dos triterpenos da série ursano (Figura 18, pág. 54). O triploto em δ_H 5,48 (J = 3,5 Hz, H-12) e os sinais em δ_C 125,6 e 139,2 corroboraram com esta proposta pois são característicos dos carbonos olefínicos C-12 e C-13 quando o triterpeno pertence a série ursano (MAHATO; KUNDU, 1994).

Nos espectros também foi possível observar um duplo duploto em δ_H 3,44 (J = 6,0 e 10,0 Hz) e o sinal em δ_C 78,1 (Figura 28 e 29, pág. 72 e 73) para um grupo oximetílico (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010). Estes dados juntamente com os sinais em δ_C 55,8 (C-5), 39,0 (C-1) e 16,6 (C-23) sugeriram a presença de hidroxila em C-3 com orientação equatorial.

O espectro de RMN ¹³C – APT (Figura 29, pág. 73) apresentou um sinal em δ_C 179,9, uma absorção larga, no espectro de IV (Figura 27, pág. 70), em 3419 - 2400 cm⁻¹ (estiramento O-H) e outra intensa em 1689 cm⁻¹ (estiramento C=O) também indicaram que Bv-5 apresenta função ácido carboxílico. Este grupo foi inserido em C-28 pela observação do sinal em δ_C 53,5, característico do carbono C-18 quando o mesmo apresenta função oxigenada em C-28 (Figura 18, pág. 54).

Desta forma, os espectros de IV e RMN de ^1H e ^{13}C unidimensionais e comparações com dados da literatura (Tabela 5, pág. 71) permitiram identificar Bv-5 como sendo um triterpeno da série ursano, o ácido 3- β -hidroxi-urs-12-en-28-óico, mais conhecido como ácido ursólico.



Ácido ursólico

Esta substância já foi relatada em algumas espécies do gênero *Borreria*: *B. articularris* (MUKHERJEE et al., 2004), *B. pusilla*, *B. stricta* (SHARMA; GUPTA, 1987) e *B. hispida* (KAPOOR et al., 1969), no entanto, trata-se do primeiro relato em *B. verticillata* e *B. ocymoides*.

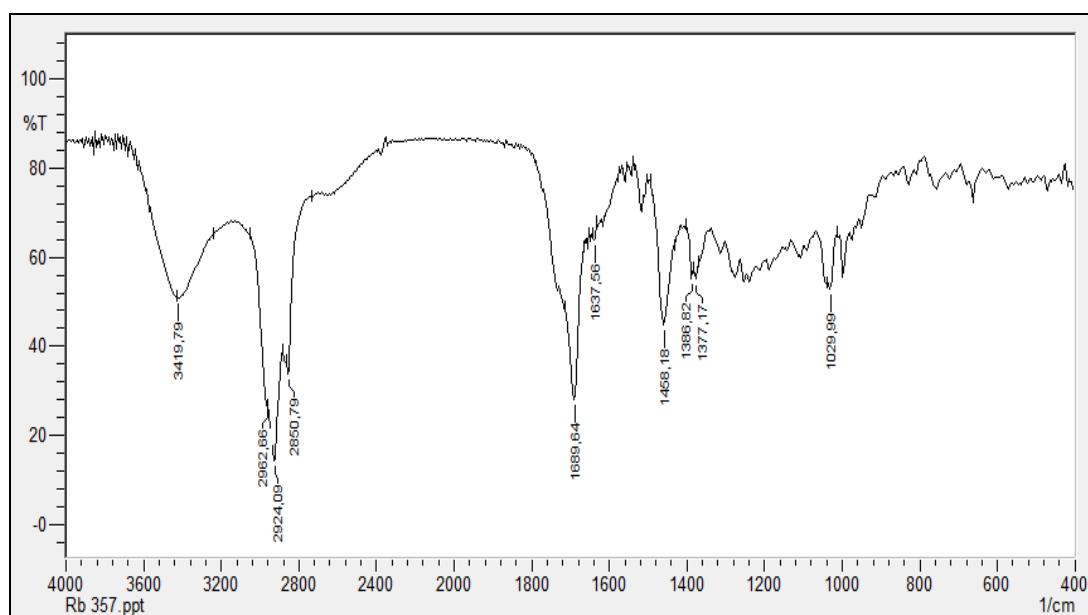


Figura 27. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de Bv-5.

Tabela 5. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Bv-5, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente, C_5D_5N), bem como, aqueles apresentados por Seebacher e colaboradores (2003) para o ácido ursólico (600 e 200 MHz, respectivamente, C_5D_5N).

C	Bv-5		Ácido Ursólico	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	39,0	0,97 (<i>m</i> , 1H) α 1,53 (<i>m</i> , 1H) β	39,2	1,00 (<i>m</i> , 1H) α 1,58 (<i>m</i> , 1H) β
2	28,1	1,81 (<i>m</i> , 1H) α 1,81 (<i>m</i> , 1H) β	28,2	1,81 (<i>m</i> , 1H) α 1,81 (<i>m</i> , 1H) β
3	78,1	3,44 (<i>dd</i> , J = 6,0 e 10,0 Hz, 1H)	78,2	3,44 (<i>dd</i> , 1H)
4	39,4	-	39,6	-
5	55,8	0,88 (<i>d</i> , J = 12,0 Hz, 1H)	55,9	0,88 (<i>d</i> , 1H)
6	18,8	1,53 (<i>m</i> , 1H) α 1,36 (<i>m</i> , 1H) β	18,8	1,58 (<i>m</i> , 1H) α 1,39 (<i>m</i> , 1H) β
7	33,6	1,55 (<i>m</i> , 1H) α 1,34 (<i>m</i> , 1H) β	33,7	1,59 (<i>m</i> , 1H) α 1,39 (<i>m</i> , 1H) β
8	39,9	-	40,1	-
9	48,0	1,62 (<i>m</i> , 1H)	48,1	1,65 (<i>m</i> , 1H)
10	37,4	-	37,5	-
11	23,6	1,93 (<i>m</i> , 1H) α 1,93 (<i>m</i> , 1H) β	23,7	1,96 (<i>m</i> , 1H) α 1,96 (<i>m</i> , 1H) β
12	125,6	5,48 (<i>t</i> , J = 3,5 Hz, 1H)	125,7	5,49 (<i>s</i> , 1H)
13	139,2	-	139,3	-
14	42,7	-	42,6	-
15	28,7	1,19 (<i>m</i> , 1H) α 2,32 (<i>td</i> , J = 4,0 e 13,5 Hz, 1H) β	28,8	1,22 (<i>m</i> , 1H) α 2,33 (<i>t</i> , 1H) β
16	24,9	2,11 (<i>td</i> , J = 4,5 e 13,5 Hz, 1H) α 1,99 (<i>m</i> , 1H) β	25,0	2,14 (<i>t</i> , 1H) α 2,01 (<i>m</i> , 1H) β
17	48,0	-	48,1	-
18	53,5	2,62 (<i>d</i> , J = 11,0 Hz, 1H)	53,6	2,63 (<i>d</i> , 1H)
19	39,5	1,47 (<i>m</i> , 1H)	39,5	1,49 (<i>m</i> , 1H)
20	39,4	1,04 (<i>m</i> , 1H)	39,4	1,05 (<i>m</i> , 1H)
21	31,0	1,40 (<i>m</i> , 1H) α 1,45 (<i>m</i> , 1H) β	31,1	1,40 (<i>m</i> , 1H) α 1,49 (<i>m</i> , 1H) β
22	37,2	1,96 (<i>m</i> , 1H) α 1,96 (<i>m</i> , 1H) β	37,4	1,97 (<i>m</i> , 1H) α 1,97 (<i>m</i> , 1H) β
23	16,6	1,01 (<i>s</i> , 3H)	16,5	1,02 (<i>s</i> , 3H)
24	28,8	1,23 (<i>s</i> , 3H)	28,8	1,24 (<i>s</i> , 3H)
25	15,7	0,88 (<i>s</i> , 3H)	15,7	0,92 (<i>s</i> , 3H)
26	17,5	1,04 (<i>s</i> , 3H)	17,5	1,06 (<i>s</i> , 3H)
27	23,9	1,21 (<i>s</i> , 3H)	24,0	1,24 (<i>s</i> , 3H)
28	179,9	-	179,7	-
29	17,4	0,99 (<i>d</i> , J = 6,5 Hz, 3H)	17,5	1,02 (<i>d</i> , 3H)
30	21,4	0,94 (<i>d</i> , J = 6,0 Hz, 3H)	21,4	0,97 (<i>d</i> , 3H)

Legenda: (*d*) duplo; (*dd*) duplo duplo; (*dl*) duplo largo; (*m*) multiplo; (*s*) singuleto; (*t*) triplo; (*td*) triplo de dupletos.

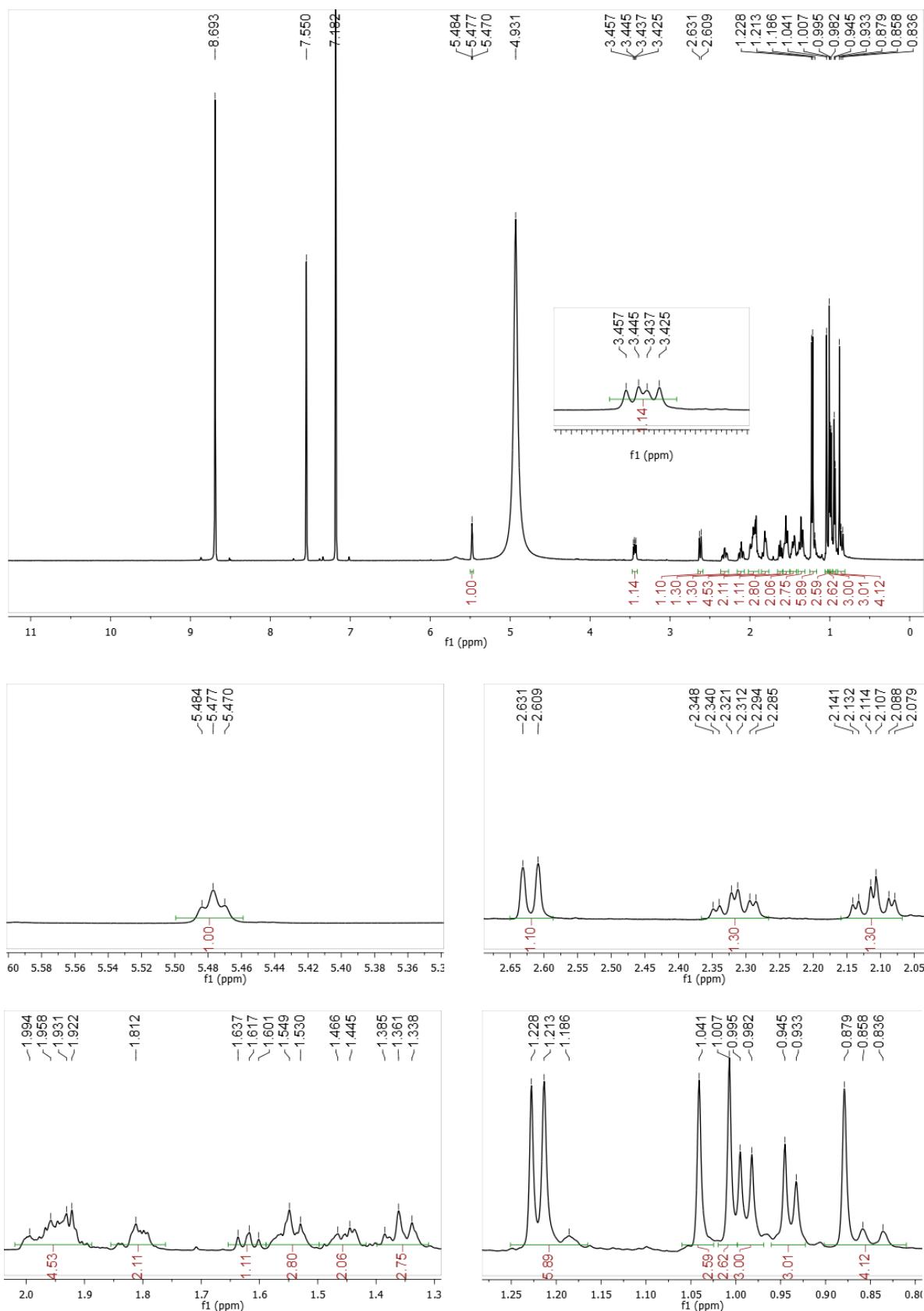


Figura 28. Espectro de RMN ¹H (C_5D_5N , 500 MHz) de Bv-5.

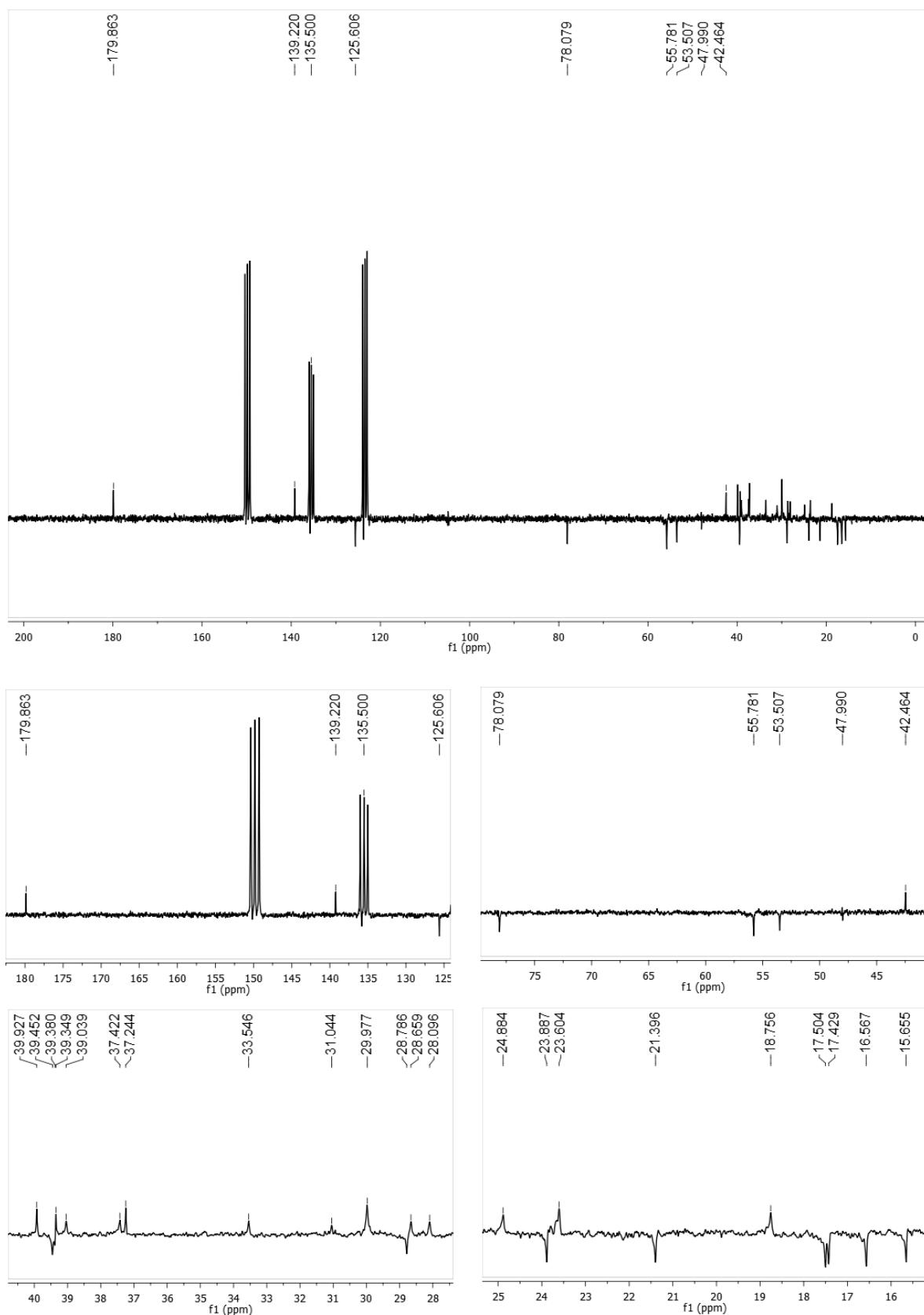


Figura 29. Espectro de RMN ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125 MHz) de Bv-5.

5.6. Determinação estrutural de Bv-6

Os espectros de IV e de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Figura 30 e 31 pág. 78 e 80, respectivamente) apresentaram absorções intensas em 2850 e 2924 cm^{-1} e os deslocamentos químicos de alta multiplicidade em δ_{H} 0,70 – 1,95, respectivamente. Estes dados, juntamente com os 30 sinais, observados no espectro de RMN ^{13}C – APT (125 MHz, CDCl_3) (Figura 32, pág. 81), sugeriram que Bv-6 é uma substância que pertence a classe dos triterpenos (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

Características físico-químicas de Bv-6	
Estado físico	Sólido
Forma	Amorfo branco
Solubilidade	CHCl_3
Massa/Rendimento	2,6 mg / 0,026 %
Ponto de fusão	215-216 °C
Fluorescência (254 nm)	Ausente
Fluorescência (366 nm)	Ausente
Fator de retenção (R_f)	0,23 (Hex/AcOEt 8:2)

O duplo dupletos em δ_{H} 3,21 ($J = 5,0$ e 11,5 Hz) e o sinal em δ_{C} 79,1 (Figura 31 e 32, pág. 80 e 81), juntamente com os sinais em δ_{C} 55,2 (C-5), 38,2 (C-1) e 16,8 (C-23), sugeriram a presença de hidroxila em C-3 com orientação equatorial (MAHATO; KUNDU, 1994).

O triploto em δ_{H} 5,12 ($J = 3,5$ Hz, H-12) e os sinais em δ_{C} 125,1 e 138,7 são compatíveis com dupla ligação envolvendo os carbonos C-12 e C-13, respectivamente (MAHATO; KUNDU, 1994). Além disso, dois dupletos em δ_{H} 3,18 ($J = 11,0$ Hz) e 3,51 ($J = 11,0$ Hz) e o sinal em δ_{C} 69,9 indicaram a presença de um grupo oximetilênico para Bv-6 (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

Os demais dados de RMN ^1H e ^{13}C em comparação com os dados publicados na literatura (Tabela 6, pág. 75) revelaram-se semelhantes aos de três triterpenos: obtusalina (SIDDIQUI et al., 1989), obtusol (SIDDIQUI; BEGUM, 1999) e uvaol (ZHANG et al., 2012):

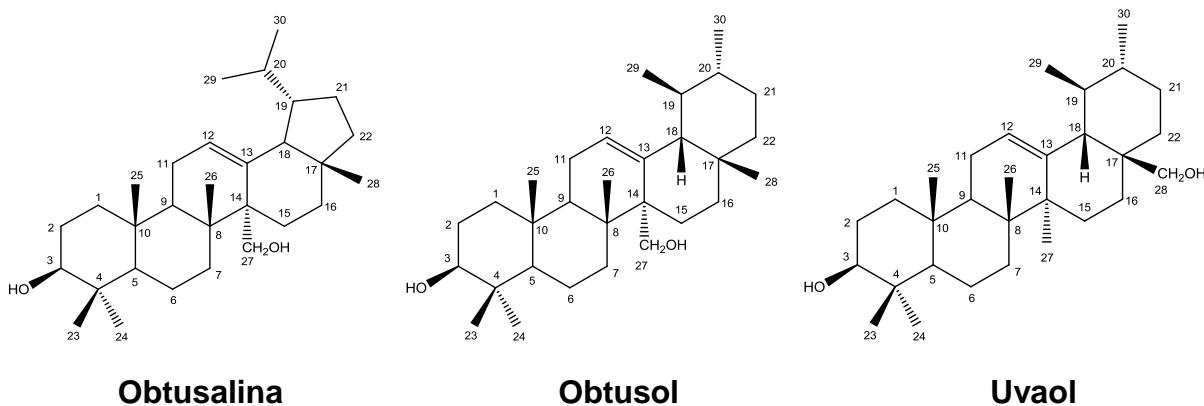


Tabela 6. Deslocamentos químicos para os átomos de carbono (δ_c) de Bv-6, verificados no espectro de RMN ^{13}C – APT (125 MHz, CDCl_3), bem como, aqueles apresentados por Siddiqui e colaboradores (1989) para a obtusalina (100 MHz, CDCl_3), por Siddiqui e Begum (1999) para obtusol (125 MHz, CDCl_3) e por Zhang e colaboradores (2012) para uvaol (125 MHz, CDCl_3).

Bv-6	Obtusalina		Obtusol		Uvaol	
	δ_c		δ_c		δ_c	
138,7	138,8	(C-13)	138,8	(C-13)	138,1	(C-13)
125,1	125,1	(C-12)	125,1	(C-12)	124,5	(C-12)
79,1	79,1	(C-3)	79,1	(C-3)	78,5	(C-3)
69,9	69,9	(C-27)	69,9	(C-27)	69,4	(C-28)
55,2	55,2	(C-5)	55,3	(C-18)	54,7	(C-5)
54,1	54,0	(C-18)	54,2	(C-5)	53,5	(C-18)
47,7	47,7	(C-9)	47,8	(C-9)	47,1	(C-9)
42,1	42,1	(C-14)	42,2	(C-17)	41,4	(C-14)
40,1	40,1	(C-8)	40,1	(C-8)	39,6	(C-8)
39,5	39,5	(C-19)	39,5	(C-19)	39,0	(C-20)
39,4	39,4	(C-20)	39,4	(C-4)	38,8	(C19)
38,2	38,8	(C-1)	38,9	(C-1)	38,3	(C-1)
38,2	38,8	(C-17)	38,8	(C-20)	38,3	(C-17)
38,0	38,0	(C-4)	38,0	(C-14)	37,4	(C-4)
36,9	36,9	(C-10)	36,9	(C-10)	36,3	(C-10)
35,2	35,2	(C-22)	35,2	(C-22)	34,6	(C-21)
32,9	32,9	(C-7)	32,9	(C-7)	32,4	(C-7)
30,6	30,7	(C-21)	30,7	(C-15)	30,1	(C-22)
28,1	28,2	(C-24)	29,7	(C-2)	27,5	(C-24)
27,3	27,3	(C-2)	28,2	(C-24)	26,7	(C-2)
26,0	26,0	(C-16)	27,3	(C-21)	25,5	(C-15)
23,4	23,4	(C-11)	26,1	(C-11)	22,8	(C-11)
23,4	23,4	(C-15)	23,4	(C-16)	22,8	(C-16)
23,3	23,3	(C-28)	23,4	(C-30)	22,8	(C-27)
21,1	21,3	(C-29)	21,3	(C-29)	20,8	(C-30)
18,4	18,4	(C-6)	18,4	(C-6)	17,9	(C-6)
17,4	17,3	(C-30)	17,4	(C-28)	16,8	(C-29)
16,8	16,8	(C-23)	16,8	(C-23)	16,3	(C-26)
15,7	15,7	(C-26)	15,7	(C-25)	15,1	(C-23)
15,6	15,6	(C-25)	15,6	(C-26)	15,1	(C-25)

Uma análise extensiva dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C uni (Figura 31 e 32, pág. 80 e 81, respectivamente) e bidimensionais (HMQC, HMBC, COSY e NOESY) (Figura 33 a 47, pág. 82 a 89) permitiu obter as seguintes informações acerca da estrutura química de Bv-6:

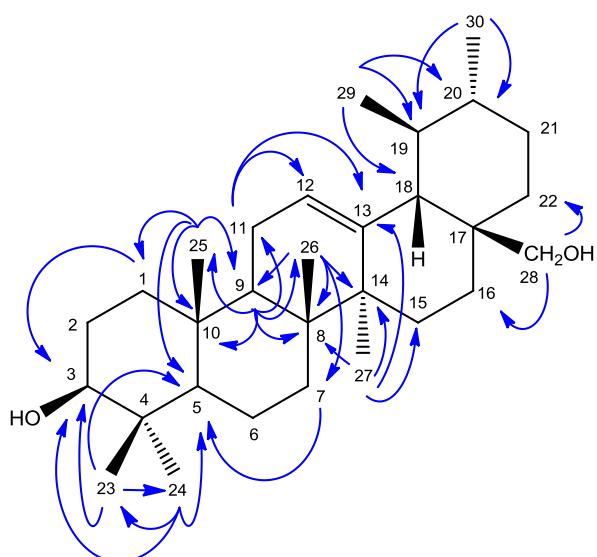
- O espectro de RMN ^{13}C – APT (Figura 32, pág. 81) apresentou sinais para carbonos metínicos em δ_{C} 55,2 (C-5), 54,1 (C-18), 47,7 (C-9), 39,4 (C-20) e 39,5 (C-19) que, como visto anteriormente (Figura 18, pág. 54) são compatíveis com triterpenos da série ursano e não lupano;
- Sinais no RMN ^{13}C – APT (Figura 32, pág. 81) em δ_{C} 125,1 (C-12) e 138,7 (C-13) também são característicos de triterpenos do tipo Δ^{12} ursano (MAHATO; KUNDU, 1994);
- No espectro de correlação heteronuclear HMBC (Figura 38, 39, 40, 41 e 42, pág. 84, 85 e 86) observou-se uma correlação entre o duplo em δ_{H} 0,92 ($J = 6,0$ Hz, H-29) com o sinal em δ_{C} 54,1 (C-18) que somente é possível se o triterpeno pertencer à série ursano, já que os hidrogênios da metila do grupo isopropila do triterpenos da série lupano estão a quatro ligações do carbono C-18;

Todas estas observações corroboraram com triterpenos da série ursano e eliminaram a possibilidade de Bv-6 ser a obtusalina.

- Correlação no espectro HMBC (Figura 38, 39, 40, 41 e 42, pág. 84, 85 e 86) entre o sinal em δ_{C} 138,7 (C-13) e o singuleto em δ_{H} 1,08 (3H) só é possível se a metila em questão corresponder ao da posição 27 já que os hidrogênios de metilas da posição 26 ou 28 estão a quatro ligações do carbono C-13;
- Na série ursano, o sinal em aproximadamente δ_{H} 1,08 (Figura 31, pág. 80) é típico dos hidrogênios em H-27 (MAHATO; KUNDU, 1994), o que corrobora com a observação anterior e elimina a possibilidade de Bv-6 ser obtusol já que nesta estrutura o grupo oximetilênico ocupa a posição 27;

- O sinal em δ_{C} 54,1 (Figura 32, pág. 81) para o carbono C-18 é comum quando o triterpeno apresenta função oxigenada em C-28 (Figura 18, pág. 54).
- Outra correlação no espectro HMBC (Figura 38, 39, 40, 41 e 42, pág. 84, 85 e 86) entre os dupletos em δ_{H} 3,18 e 3,51 ($J = 11,0$ Hz) dos hidrogênios oximetilênicos com dois carbonos metilênicos em δ_{C} 23,4 e 35,2 não é possível se o grupo CH_2OH ocupar a posição 27 mas é compatível com a posição 28 como em uvaol.

O espectro de correlação heteronuclear HMQC e as expansões (Figura 33, 34, 35, 36 e 37, pág. 82, 83 e 84) confirmaram as atribuições feitas aos hidrogênios e aos carbonos da molécula. Os demais espectros bidimensionais HMBC, COSY e NOESY (Figura 33 a 47, pág. 82 a 89) também confirmaram as atribuições feitas aos hidrogênios e carbonos e permitiram fazer o assinalamento completo deste triterpeno.



Correlações HMBC

Apesar dos dados espectrais de Bv-6 serem idênticos aos de obtusalina e obtusol (Tabela 6, pág. 75), a análise detalhada dos espectros de IV e RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (Tabela 7. pág. 79) permitiu identificá-la como ácido 3 β ,28-diidroxi-urs-12-eno, mas conhecido como uvaol. Esta substância já foi mencionada

para *Borreria articulatis* (MUKHERJEE et al., 1993) mas trata-se do primeiro relato em *Borreria verticillata*.

Além da importância quimiotaxonômica para o gênero *Borreria*, este resultado levanta a hipótese de um possível erro na determinação estrutural da obtusalina e do obtusol realizada por Siddiqui e colaboradores (1989) e por Siddiqui e Begum (1999), respectivamente, já que é pouco provável a existência de várias substâncias químicas apresentando os mesmos dados espectrais.

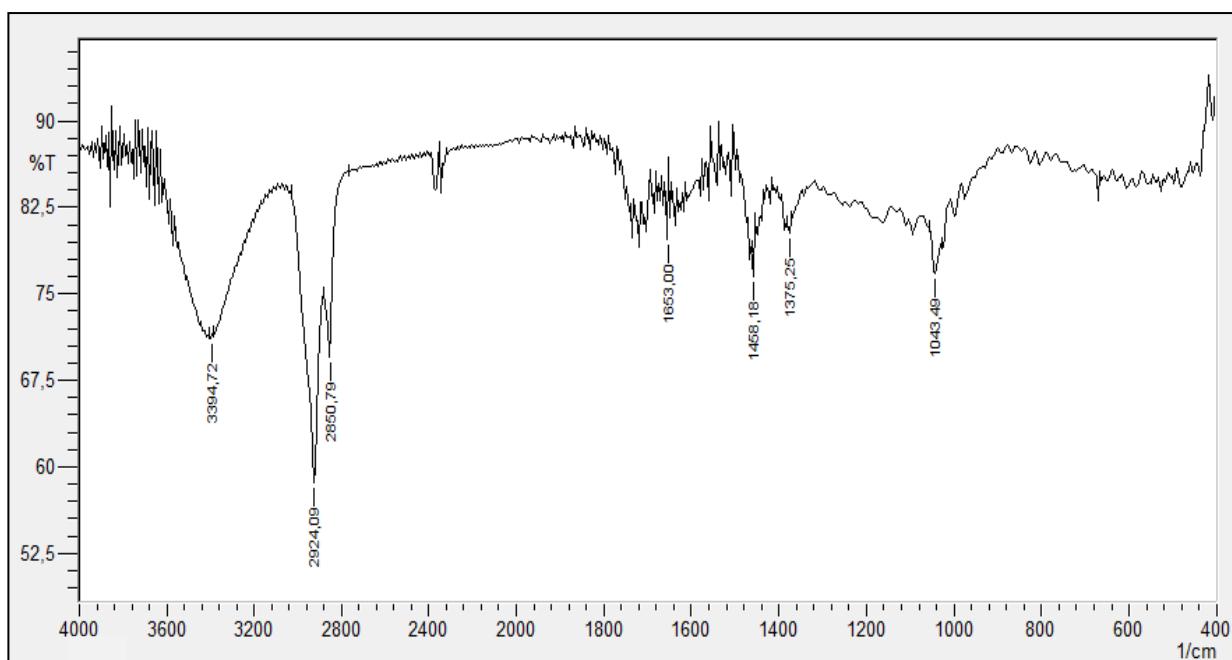
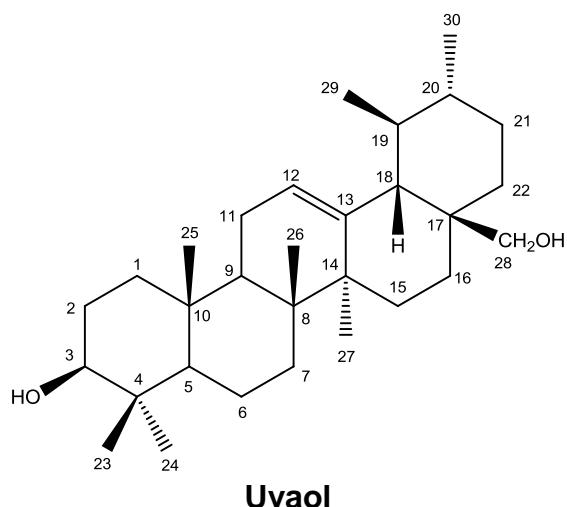


Figura 30. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de Bv-6.

Tabela 7. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para os átomos de carbono (δ_C) e hidrogênio (δ_H) da substância Bv-6, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C – APT (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em $CDCl_3$.

C	HMQC		HMBC		COSY	NOESY
	δ_C	δ_H	2J	3J		
1	38,2	1,62 (m, 1H) 1,60 (dd, J = 3,5 e 5,0 Hz, 1H)			C-3	
2	27,3	1,58 (m, 1H) 1,54 (m, 1H)			H-3	
3	79,1	3,21 (dd, J = 5,0 e 11,5 Hz, 1H)			H-2	H-5, H-24
4	38,0	-				
5	55,2	0,72 (dd, J = 1,5 e 12,0 Hz, 1H)			H-6	H-3, H-9, H-25
6	18,4	1,51 (m, 1H) 1,37 (m, 1H)			H-5	
7	32,9	1,32 (dd, J = 3,0 e 3,5 Hz, 1H) 1,30 (m, 1H)			C-5	
8	40,1	-				
9	47,7	1,51 (m, 1H)	C-8, C-10 e C-11	C-25 e C-26	H-11, H- 26	H-5, H-15
10	36,9	-				
11	23,4	1,91 (t, J = 4,0 Hz, 1H) 1,89 (dl, J = 3,5 Hz, 1H)	C-12	C-13	H-12, H-9	H-12
12	125,1	5,12 (t, J = 3,5 Hz, 1H)			H-11	H-11, H-18
13	138,7	-				
14	42,1	-				
15	26,0	1,01 (m, 1H) 0,96 (m, 1H)				H-18 H-9
16	23,4	1,16 (m, 1H) 1,20 (m, 1H)				
17	38,2	-				
18	54,1	1,38 (m, 1H)				H-12, H-15, H-28
19	39,5	1,35 (m, 1H)				
20	39,4	0,90 (m, 1H)				
21	30,6	1,44 (m, 1H) 1,47 (m, 1H)				
22	35,2	1,54 (m, 1H) 1,52 (dl, J = 3,5 Hz, 1H)				
23	16,8	0,97 (s, 3H)		C-3, C-5 e C- 24		
24	28,1	0,98 (s, 3H)		C-3, C-5 e C-23		H-3
25	15,6	0,78 (s, 3H)	C-10	C-1, C-5 e C-9		H-5
26	15,7	0,93 (s, 3H)	C-8	C-7, C-9 e C- 14		H-9
27	23,3	1,09 (s, 3H)	C-14	C-8, C-13 e C- 15		
28	69,9	3,18 (d, J = 11,0 Hz, 1H) 3,51 (d, J = 11,0 Hz, 1H)		C-16 e C-22	H-28	H-18
29	17,4	0,79 (d, J = 6,0 Hz, 3H)	C-19	C-18 e C-20		
30	21,1	0,92 (d, J = 6,0 Hz, 3H)	C-20	C-19		

Legenda: (d) duplet; (dd) duplo duplet; (dl) duplo duplo largo; (m) multiplet; (s) singlet; (t) triplet.

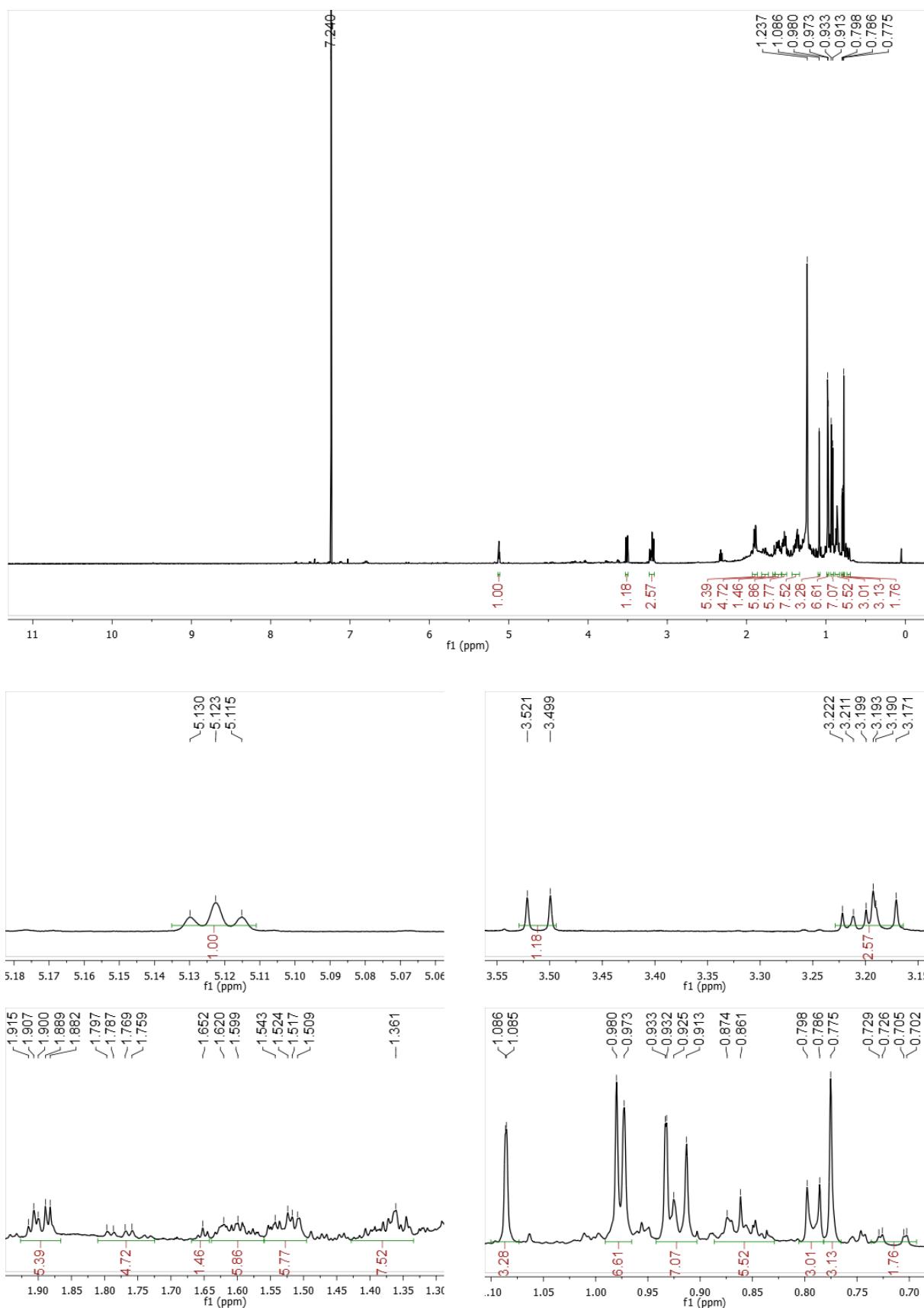


Figura 31. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Bv-6.

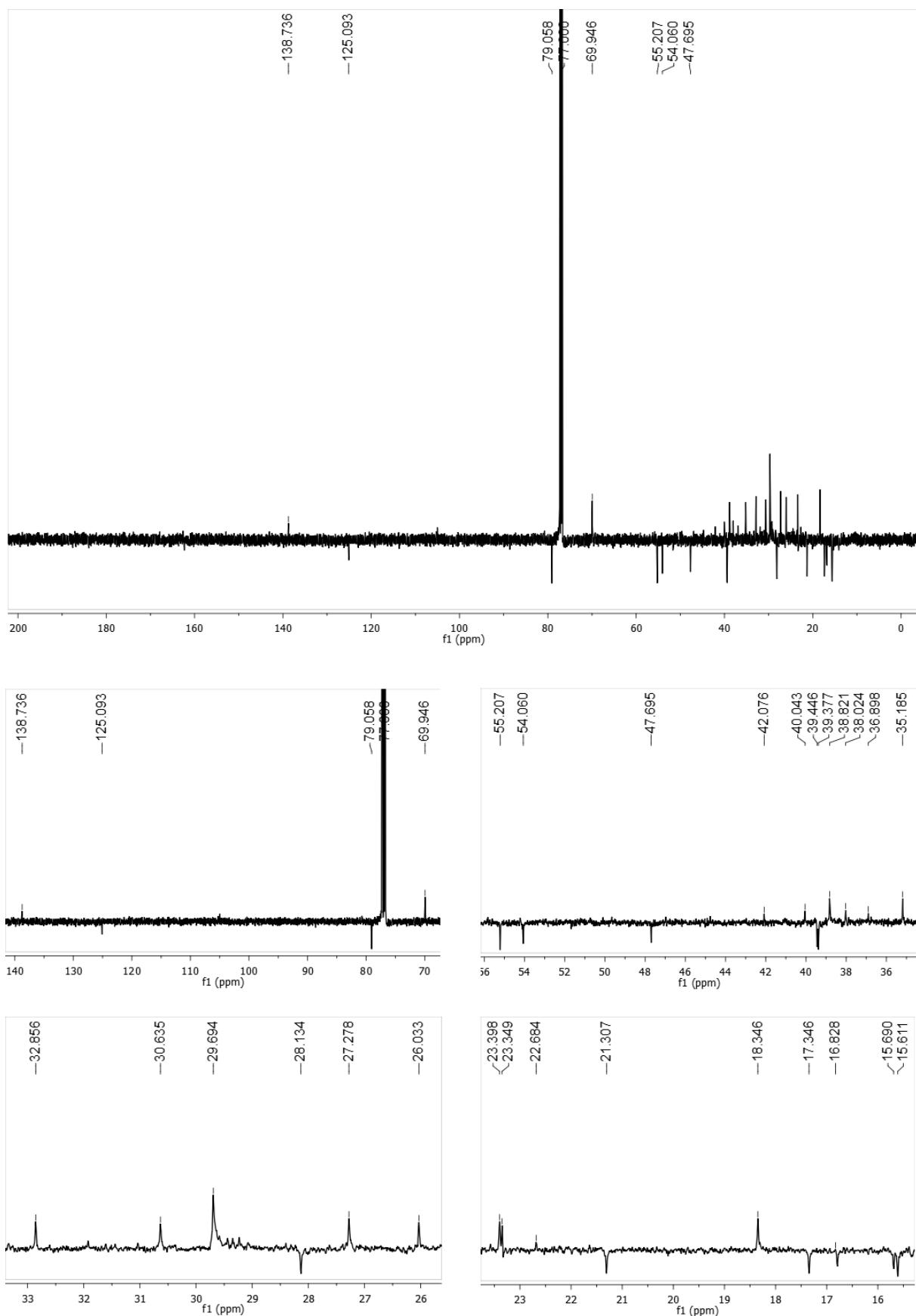


Figura 32. Espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 125 MHz) de Bv-6.

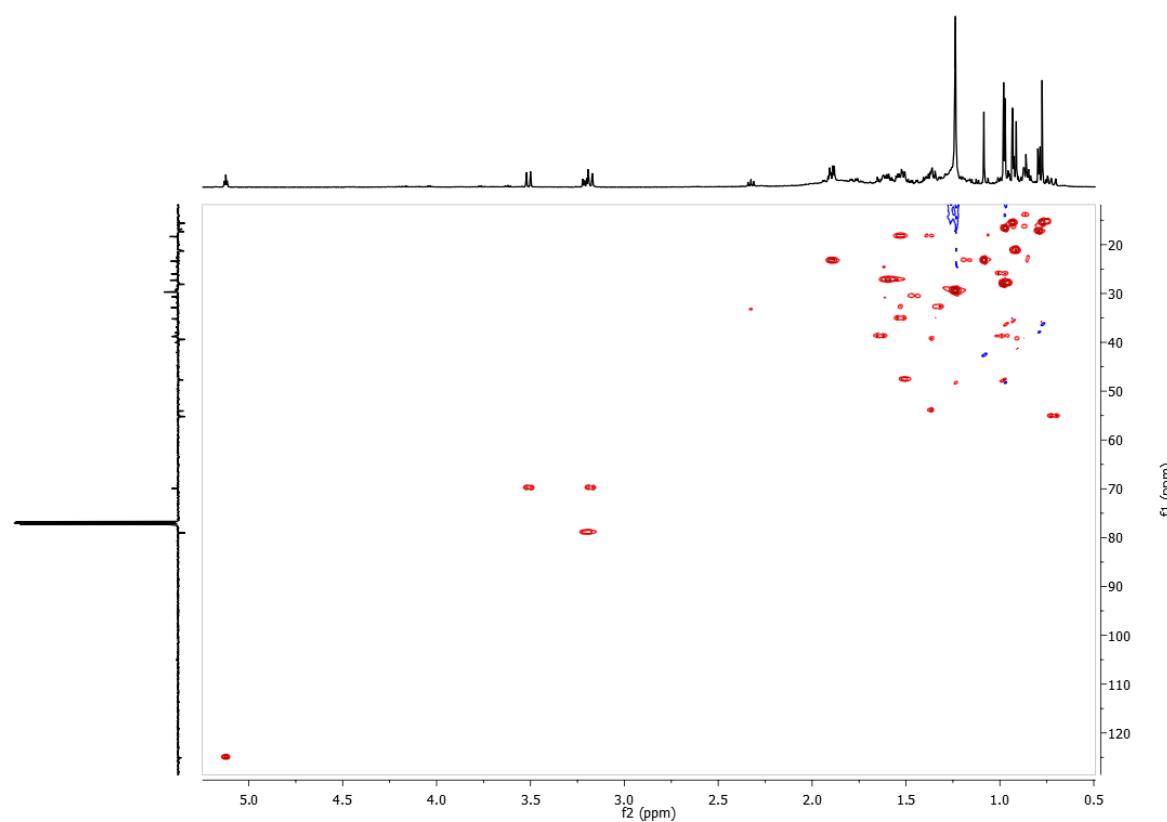


Figura 33. Espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Bv-6.

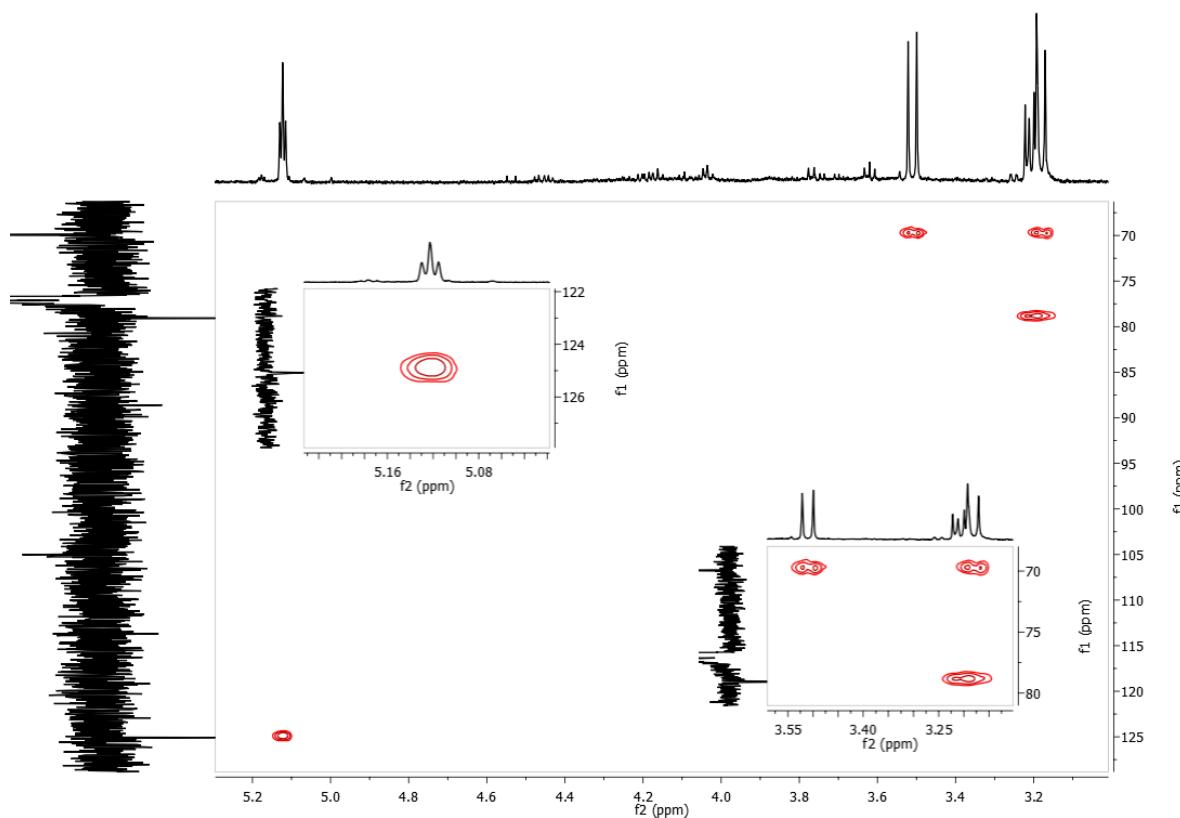


Figura 34. Expansão do espectro HMQC de Bv-6 na região de (3,0 – 5,2 ppm) x (70,0 – 125,0 ppm).

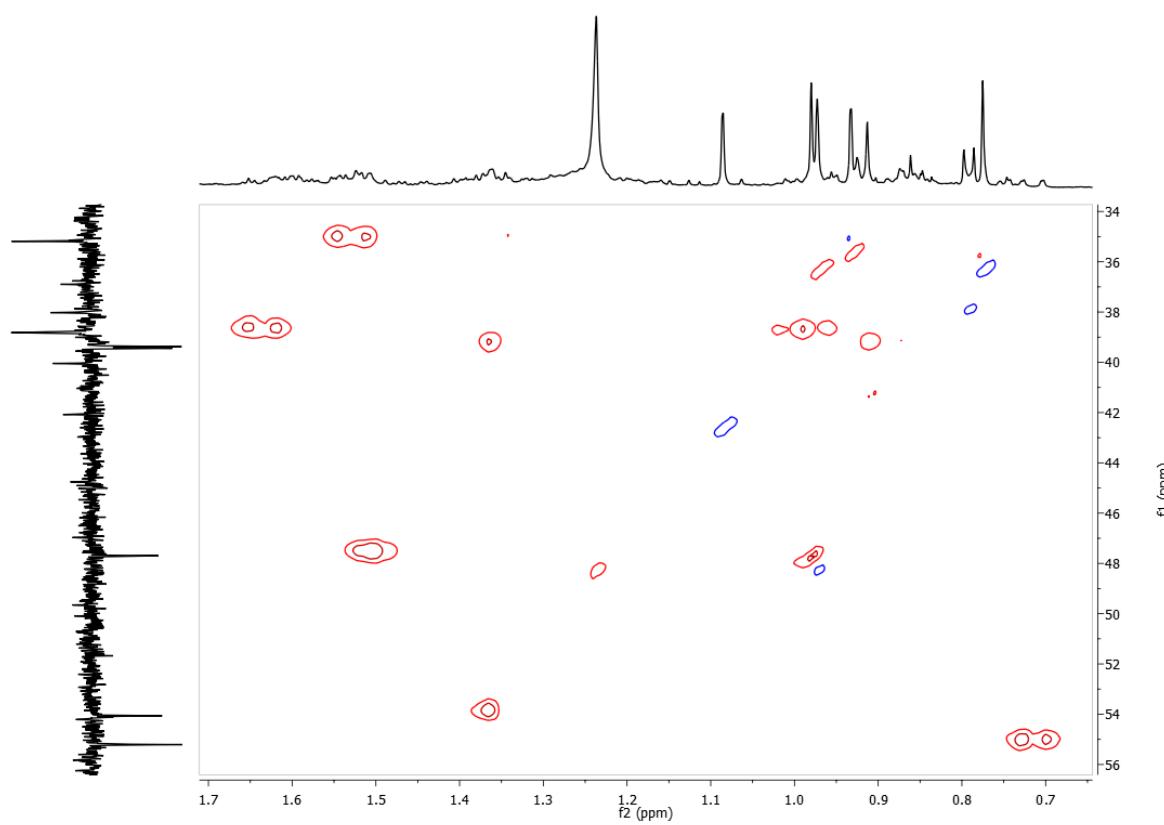


Figura 35. Expansão do espectro HMQC de Bv-6 na região de (0,6 – 1,7 ppm) x (34,0 – 56,0 ppm).

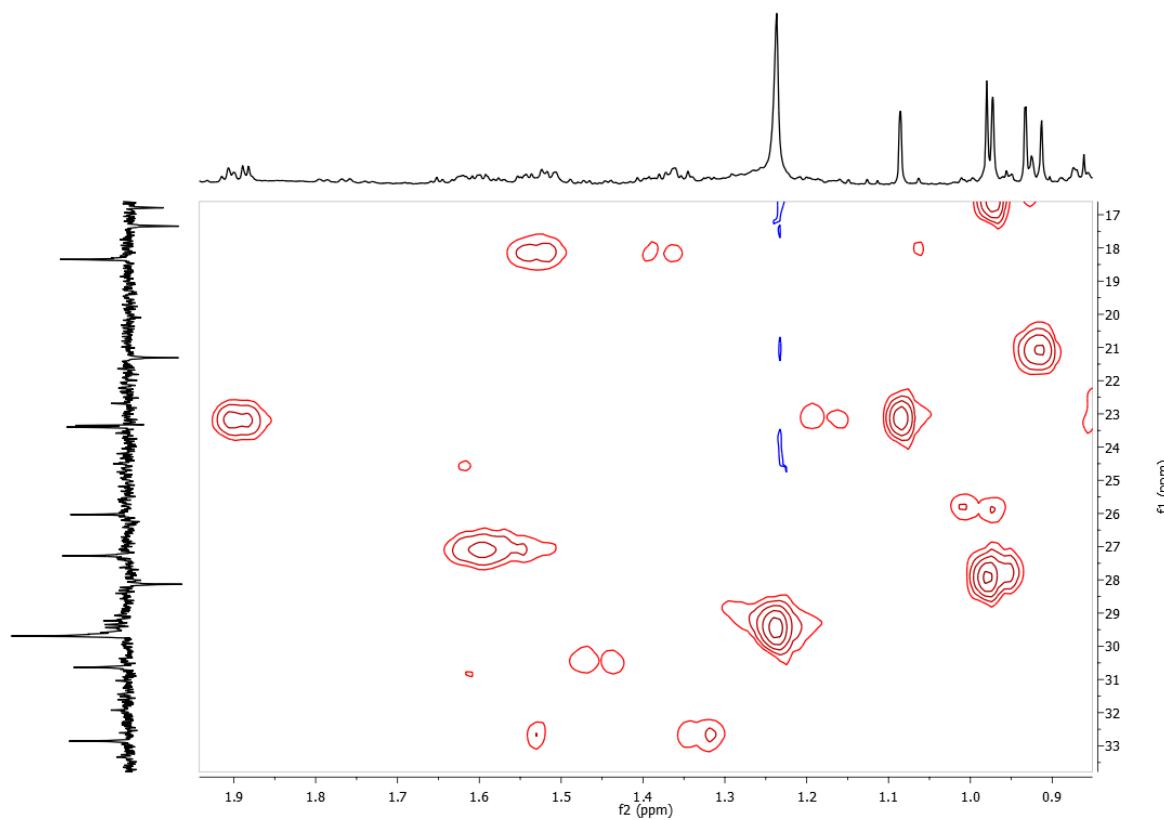
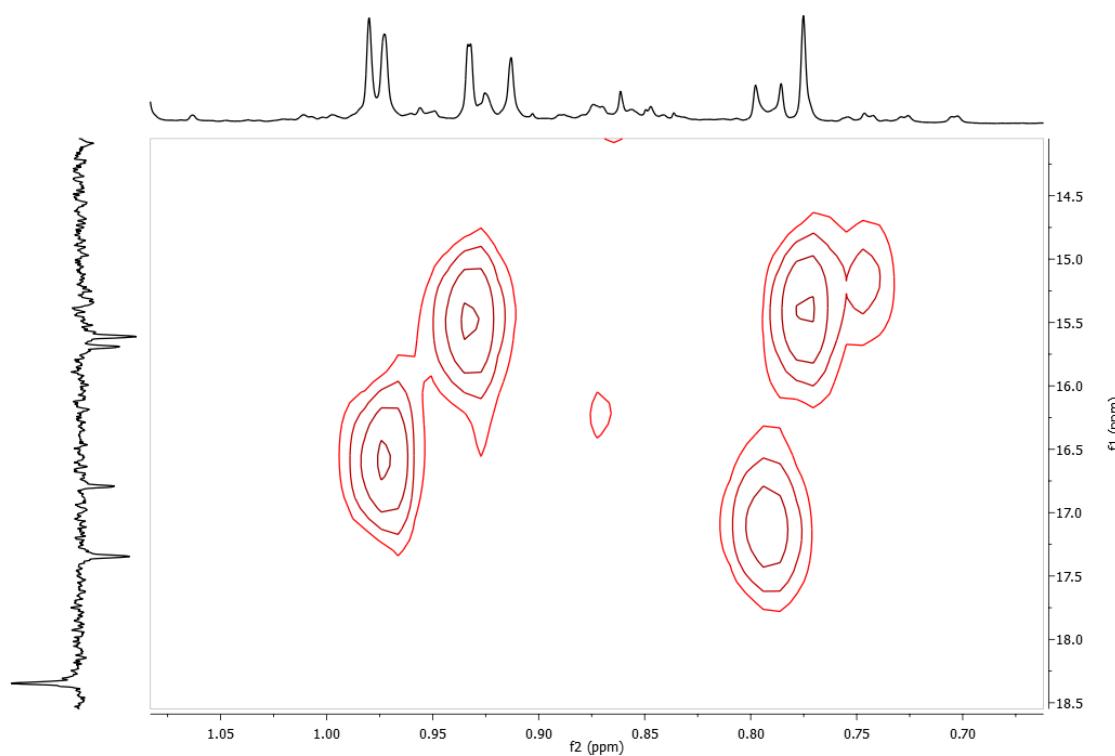


Figura 36. Expansão do espectro HMQC de Bv-6 na região de (0,9 – 1,9 ppm) x (17,0 – 33,0 ppm).



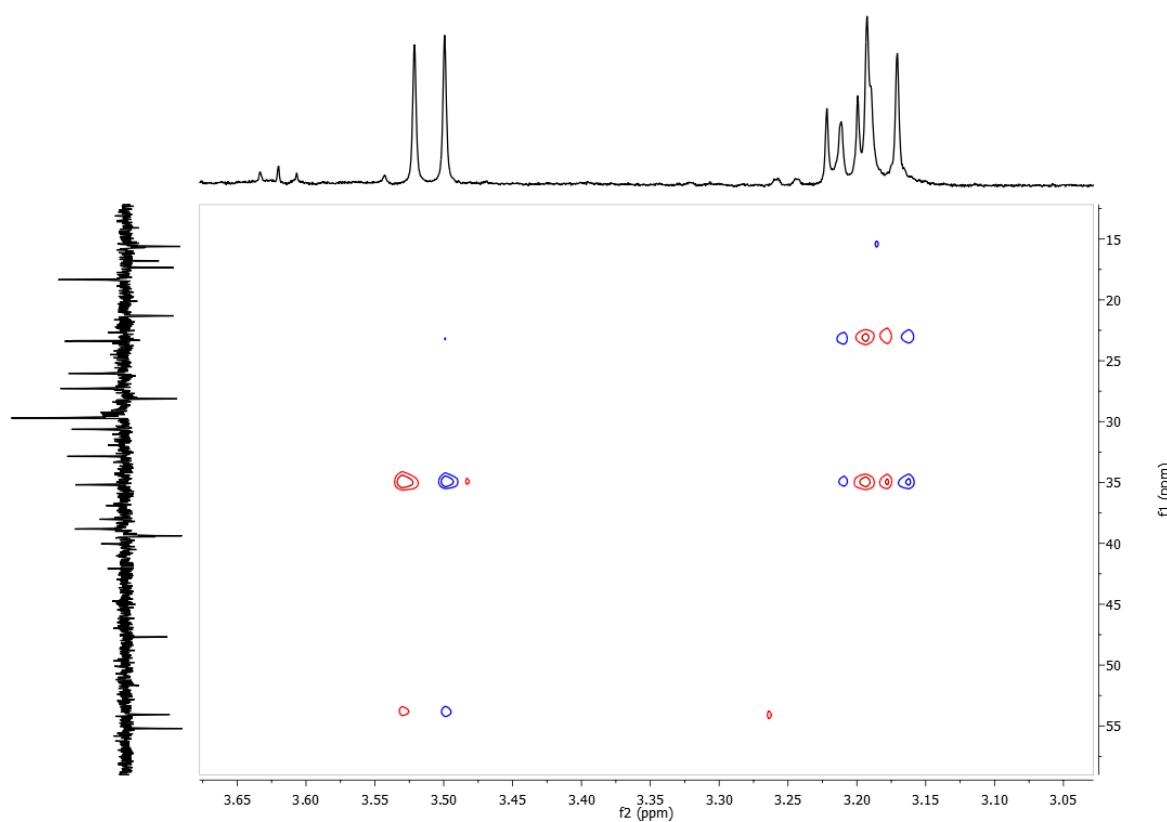


Figura 39. Expansão do espectro HMBC de Bv-6 na região de (3,0 – 3,7 ppm) x (15,0 – 55,0 ppm).

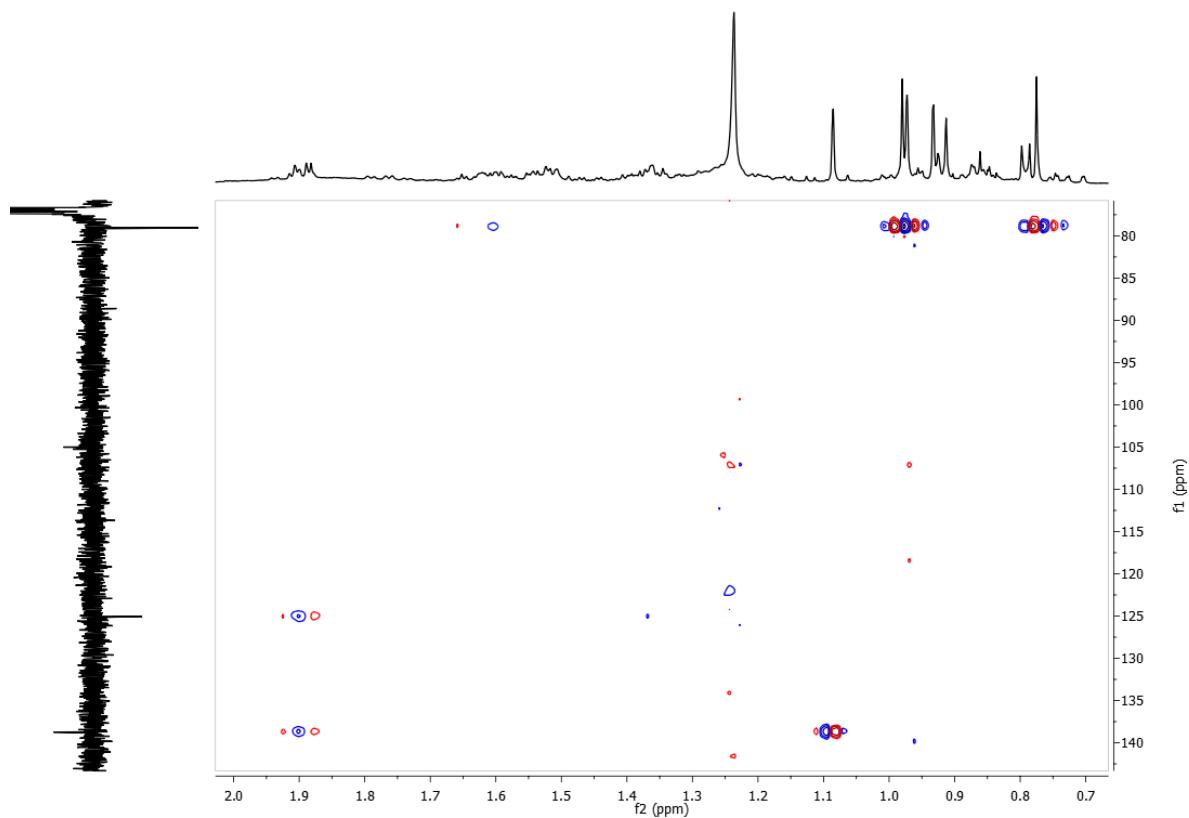


Figura 40. Expansão do espectro HMBC de Bv-6 na região de (0,7 – 2,0 ppm) x (80,0 – 140,0 ppm).

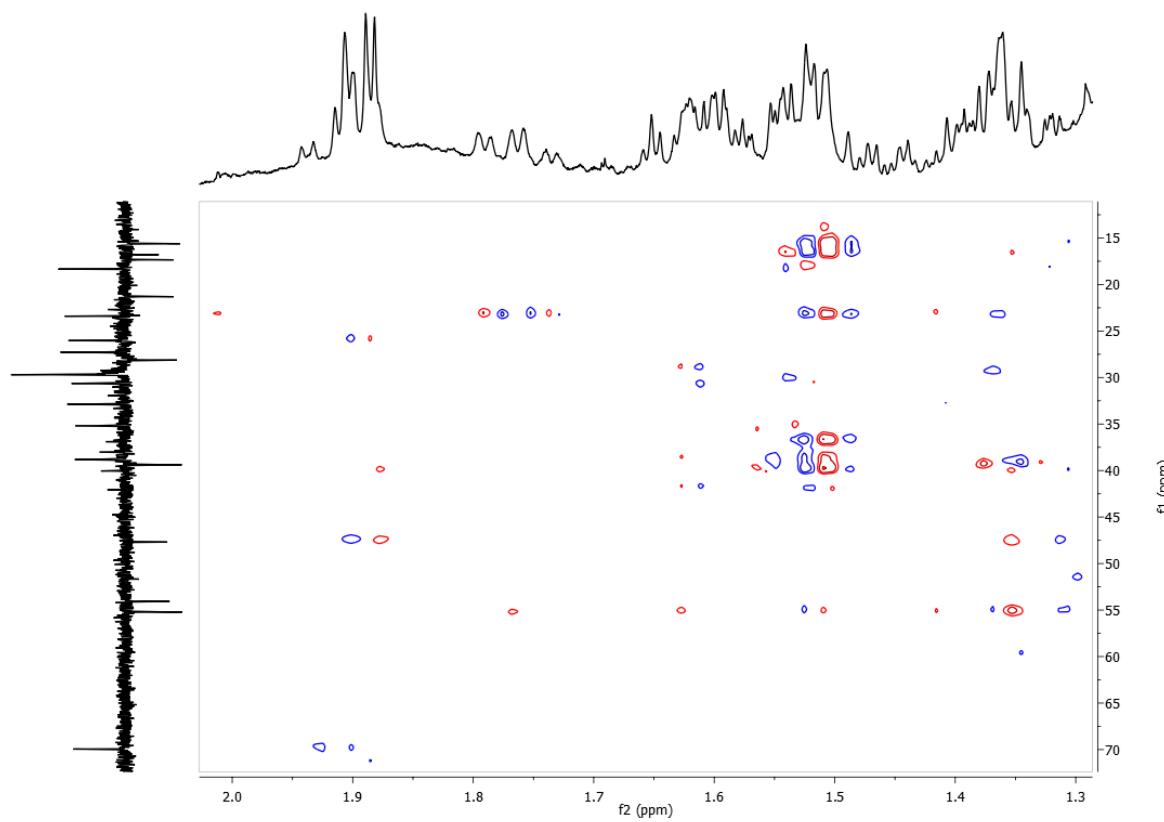


Figura 41. Expansão do espectro HMBC de Bv-6 na região de (1,3 – 2,0 ppm) x (15,0 – 70,0 ppm).

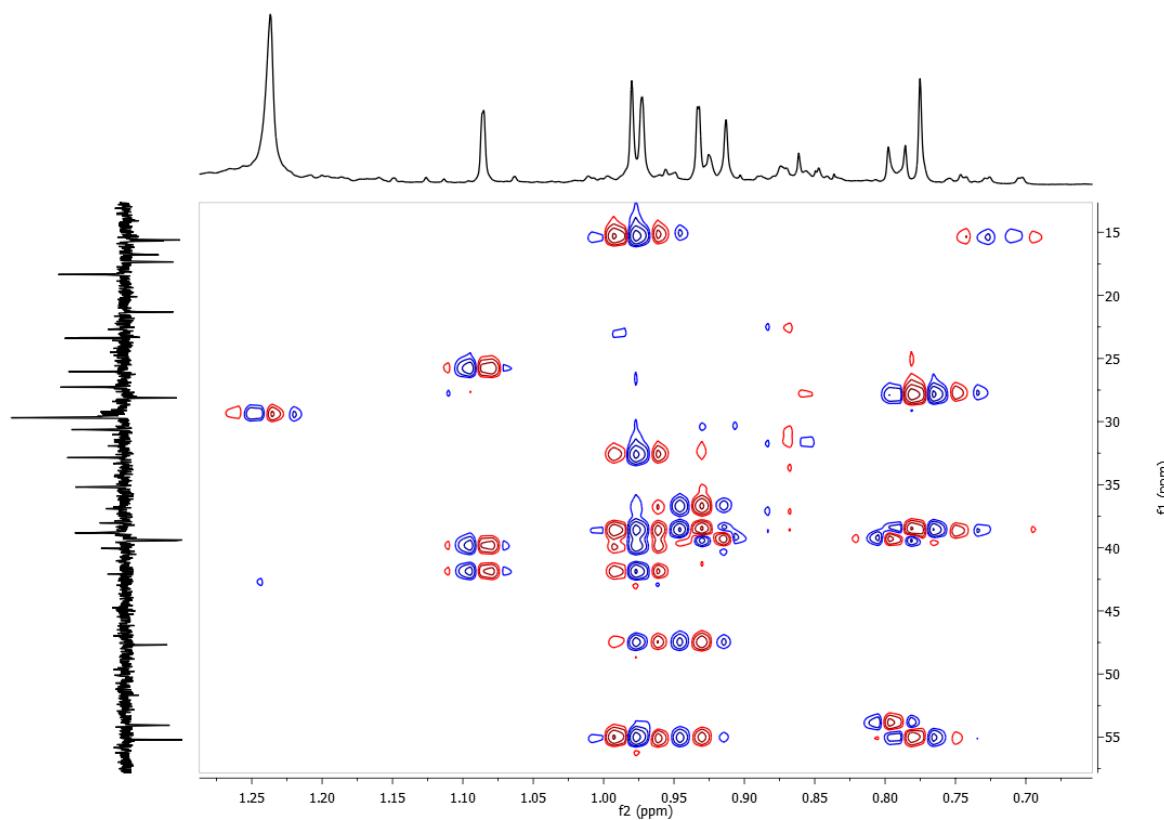


Figura 42. Expansão do espectro HMBC de Bv-6 na região de (0,7 – 1,5 ppm) x (15,0 – 55,0 ppm).

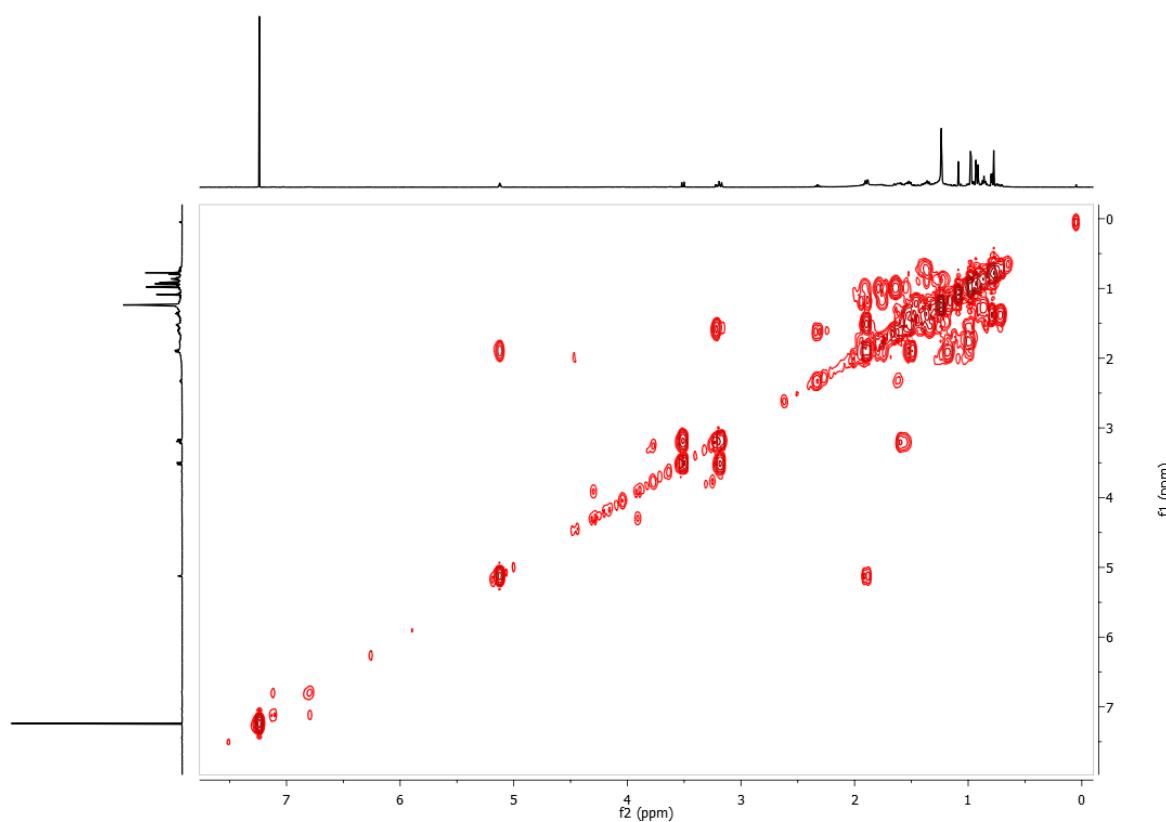


Figura 43. Espectro COSY (CDCl₃, 500 e 125 MHz) de Bv-6.

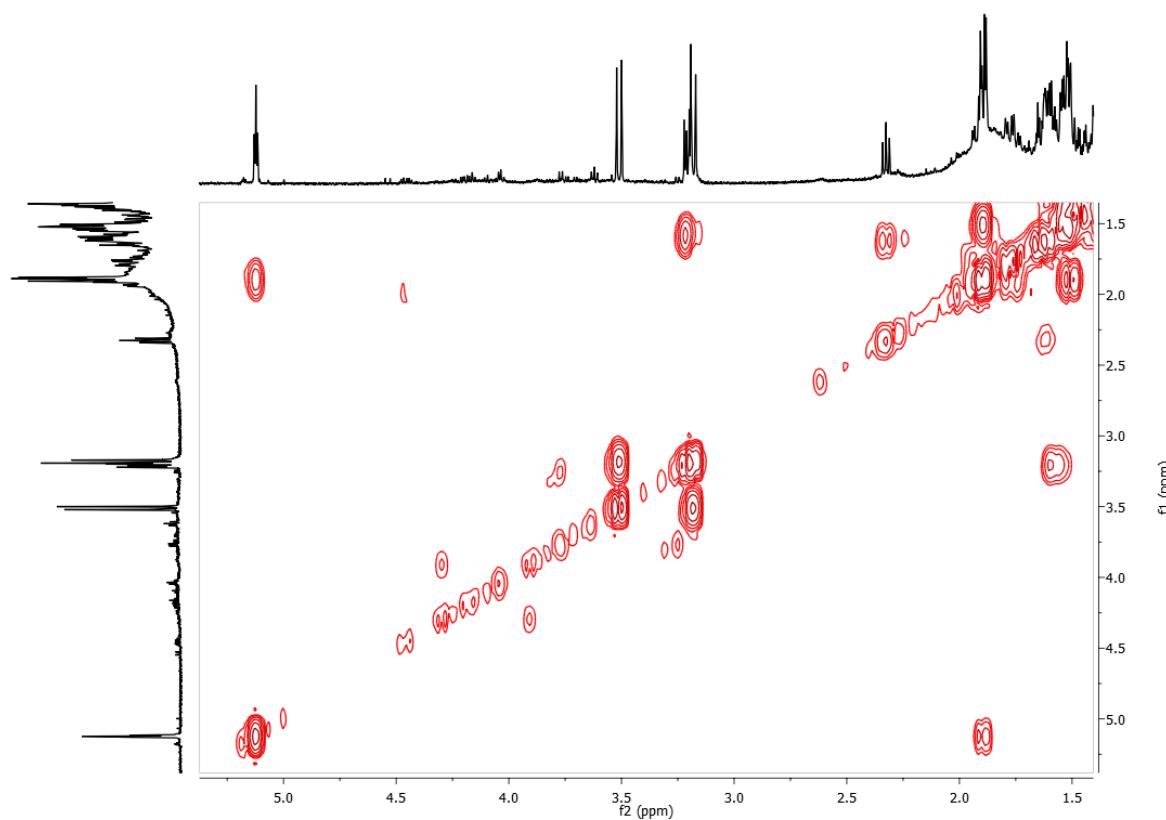


Figura 44. Expansão do espectro COSY de Bv-6 na região de (1,5 – 5,0 ppm) x (1,5 – 5,0 ppm).

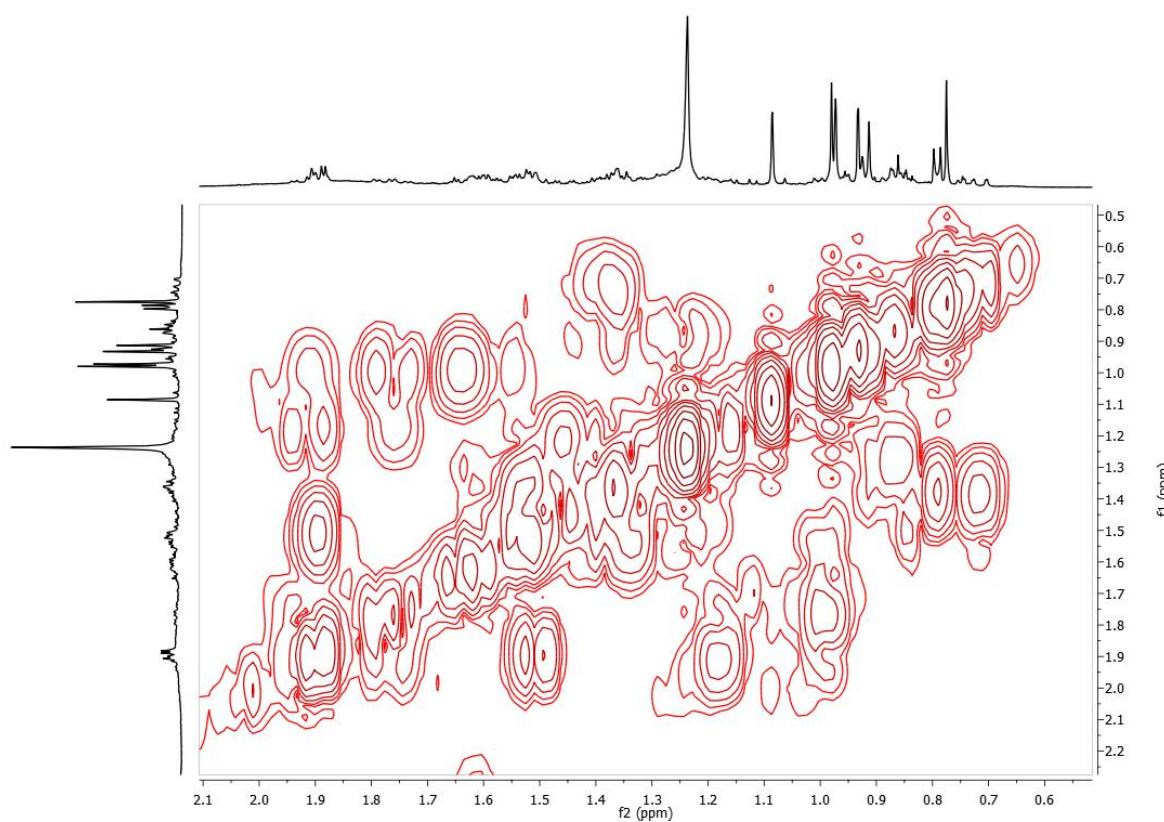


Figura 45. Expansão do espectro COSY de Bv-6 na região de (0,5 – 2,1 ppm) x (0,5 – 2,1 ppm).

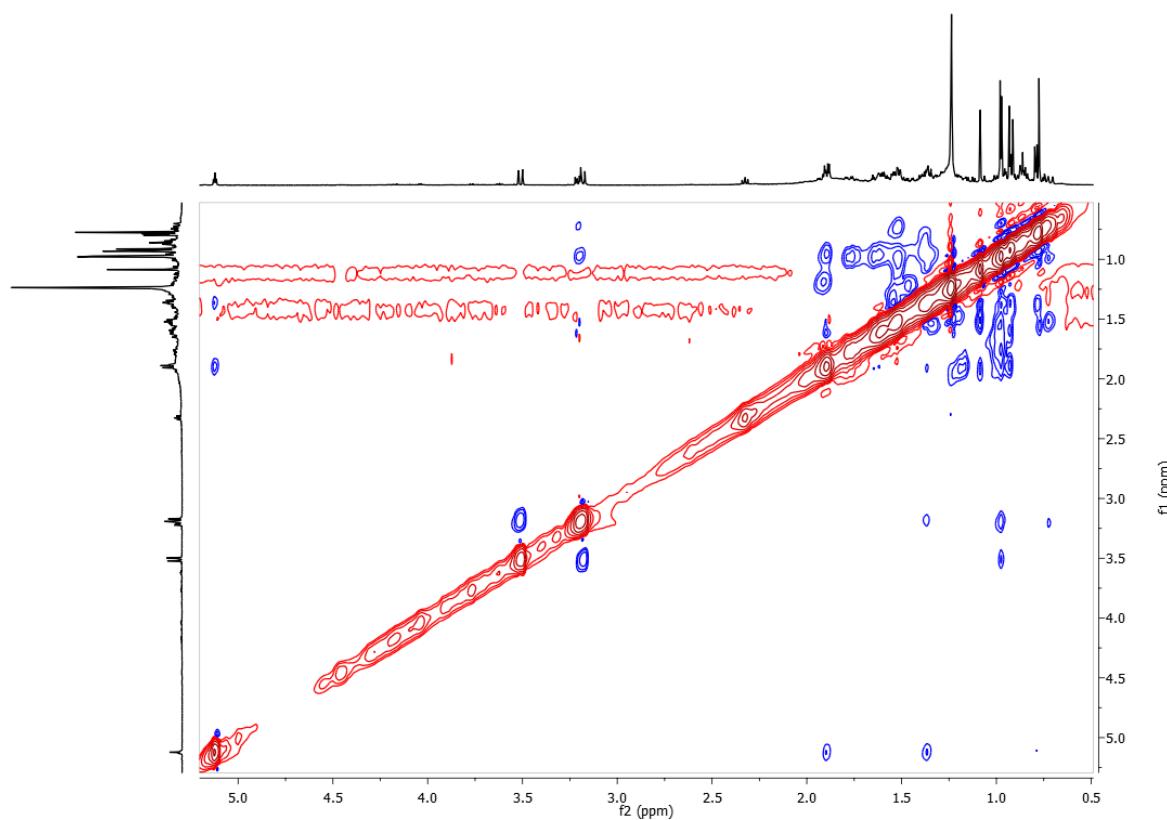
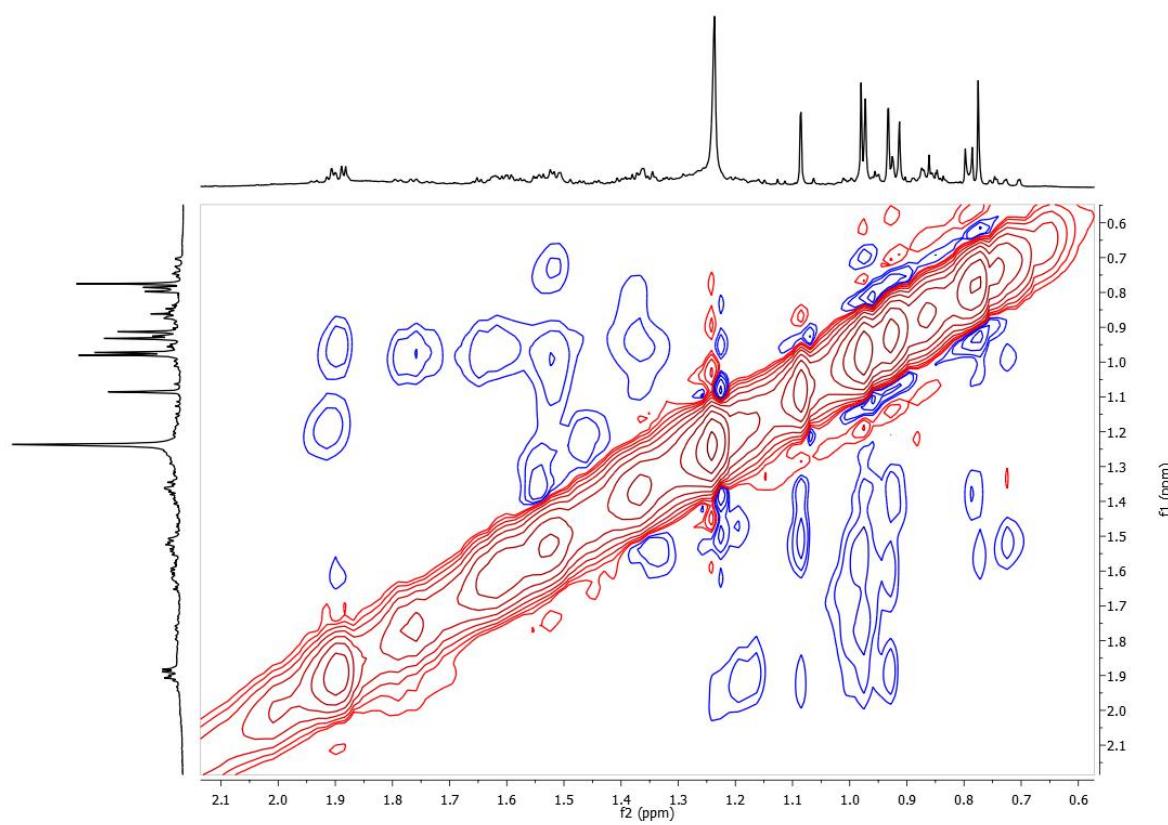


Figura 46. Espectro NOESY (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Bv-6.



. **Figura 47.** Expansão do espectro NOESY de Bv-6 na região de (0,6 – 2,1 ppm) x (0,6 – 2,1 ppm).

5.7. Determinação estrutural de Bv-7

Nos espectros de IV (Figura 49, pág. 91) e RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Figura 50, pág. 96), Bv-7 também apresentou, respectivamente, absorções em 2850 e 2922 cm^{-1} e deslocamentos químicos de alta multiplicidade em δ_{H} 0,7 – 2,2 indicando que a estrutura pertence a classe terpenoide (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

Características físico-químicas de Bv-7	
Estado físico	Sólido
Forma	Amorfo branco
Solubilidade	CHCl_3
Massa/Rendimento	3,7 mg / 0,37 %
Ponto de fusão	Não determinado
Fluorescência (254 nm)	Lilás
Fluorescência (366 nm)	Ausente
Fator de retenção (R_f)	0,43 (Hex/AcOEt 8:2)

A presença de 30 sinais, no espectro de RMN ^{13}C – APT (125 MHz, CDCl_3) (Figura 51, pág. 97), com destaque para os dos carbonos metínicos em δ_{C} 60,5 (C-18), 54,8 (C-5), 53,0 (C-9), 40,2 (C-20) e 38,1 (C-19) são compatíveis com triterpenos da série ursano (Figura 18, pág. 54).

O duplo duplet em δ_{H} 3,20 ($J = 4,5$ e 11,5 Hz) e o sinal em δ_{C} 78,8 (Figura 50 e 51, pág. 96 e 97, respectivamente), para um grupo oximetínico (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010), juntamente com os sinais em δ_{C} 54,8 (C-5), 38,9 (C-1) e 14,9 (C-23) sugeriram a presença de hidroxila em C-3 com orientação equatorial (MAHATO; KUNDU, 1994).

No espectro de RMN ^{13}C – APT (Figura 51, pág. 97), o sinal em δ_{C} 180,0 (C-28) sugeriu a presença de carbonila ($\text{C}=\text{O}$) (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010). A ausência, no espectro de IV (Figura 49, pág. 93), de absorções características de estiramento de O-H para ácidos carboxílicos são compatíveis com função éster. A ausência, nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (Figura 50 e 51, pág. 96 e 97, respectivamente), de sinais para grupo metoxila e grupo etoxi e a presença de sinais para carbono não hidrogenado e oxigenado em δ_{C} 89,7 (C-13) e outro em δ_{C} 60,5 (C-18) são compatíveis com a existência de um anel lactônico envolvendo os carbonos C-13, C-17, C-18 e C-28 (PINTO, 2008; BEGUM et al., 2000).

Bv-7 também não apresentou sinais característicos de triterpenos com dupla ligação em C-12 e C-13. Entretanto, no espectro RMN ^1H (Figura 50, pág. 96), foi observado um duploto largo em δ_{H} 5,94 ($J = 10,0$ Hz, 1H) e um duplo duploto δ_{H} 5,51 ($J = 4,5$ e $11,5$ Hz, 1H) e, no espectro de RMN ^{13}C – APT (Figura 51, pág. 97), dois sinais para carbonos metínicos em δ_{C} 128,8 e 133,4, corroboraram com a proposta de alceno dissustituído (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010). Para os triterpenos da série ursano, são previstos cinco posições para dupla ligação com essa característica e os sinais para os dois carbonos envolvidos nesta instauração foram simulados em programa ChemBioDraw Ultra 12.0 (Figura 48, pág. 91):

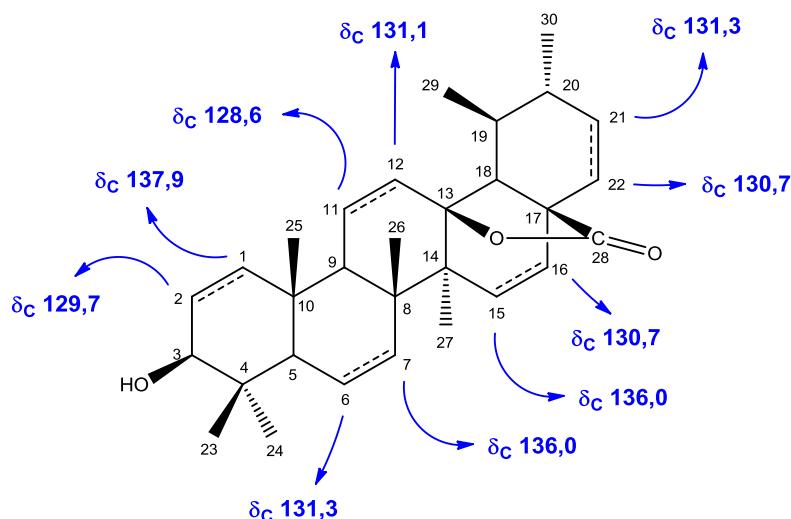


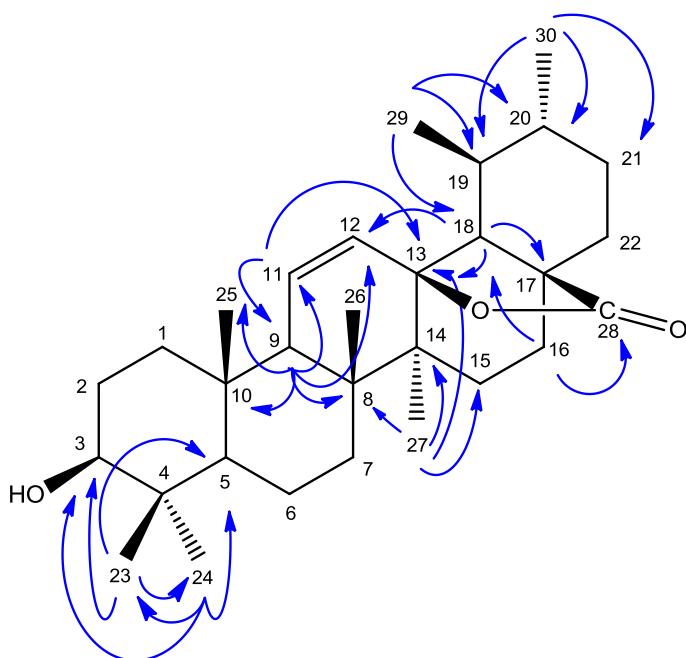
Figura 48. Deslocamentos químicos dos carbonos olefínicos simulado no programa ChemBioDraw Ultra 12.0 para diferentes alcenos dissustituídos.

Sendo assim, os sinais em δ_{C} 128,8 (C-12) e 133,4 (C-11) e comparações com os dados simulados no programa ChemBioDraw Ultra 12.0 sugeriram que a instauração estava localizada em C-11 e C-12.

O espectro de correlação heteronuclear HMQC e as expansões (Figura 52, 53, 54, 55 e 56, pág. 98 e 99) confirmaram as atribuições feitas aos hidrogênios e aos carbonos da molécula.

O espectro de correlação heteronuclear HMBC e as expansões (Figura 57 a 65, pág. 100 e 104) corroboraram com as propostas mencionadas ao mostrar correlações entre os hidrogênios e carbonos que estão a duas (^2J) ou três (^3J)

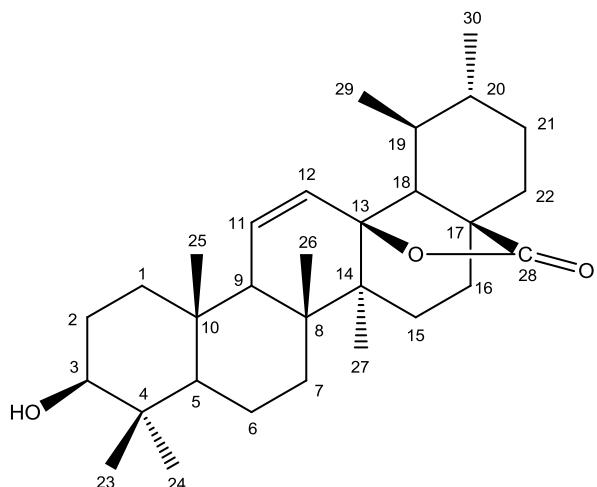
ligações. Correlações entre o duploto δ_H 0,92 (H-30) e os sinais δ_C 38,1 (C-19), 40,2 (C-20) e 30,8 (C-21), bem como, do duploto em δ_H 0,97 (H-29) com 60,5 (C-18), 38,1 (C-19) e 40,2 (C-20) ratificaram a proposta de que o triterpeno em questão pertencia à série ursano. Outras correlações do singuleto em δ_H 0,76 (C-23) e 0,97 (C-24) com os sinais em δ_C 78,8 (C-3) e 54,8 (C-5) confirmaram a localização da hidroxila em C-3. A posição da dupla ligação envolvendo os carbonos C-11 e C-12 foi corroborada pela observação de correlações entre o singuleto largo δ_H 1,93 (H-9) e os sinais em δ_C 133,4 (C-11) e 128,8 (C-12), entre o duploto em δ_H 1,61 (H-18) e δ_C 128,8 (C-12) e 89,7 (C-13), bem como, do duploto largo em δ_H 5,94 (H-11) com δ_C 89,7 (C-13). Também foi confirmada a existência de um anel lactônico envolvendo os carbonos C-13, C-17, C-18 e C-28 pelas correlações do triploto de dupletos em δ_H 2,11 (H-16) com os sinais em δ_C 180,0 (C-28) e 60,5 (C-18).



Correlações HMBC

Outras correlações HMBC também foram observadas e encontram-se compiladas na Tabela 8 (pág. 94) junto com as correlações observadas nos espectros de correlação homonuclear COSY (Figura 66, 67 e 68, pág. 105 e 106) e NOESY (Figura 69, 70 e 71, pág. 106 e 107).

Desta forma, os espectros de IV e RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e comparações com dados da literatura (Tabela 9. pág. 95) permitiram identificar Bv-7 como sendo um triterpeno da série ursano, o 3β -hidroxiurs-11-en-28,13- β -olídio. Esta substância foi relatada em uma espécie de Rubiaceae, *Richardia brasiliensis* Gomes (PINTO et al., 2008; TENÓRIO-SOUZA et al., 2012) e trata-se do primeiro relato no gênero *Borreria*.



3β -hidroxiurs-11-en-28,13- β -olídio

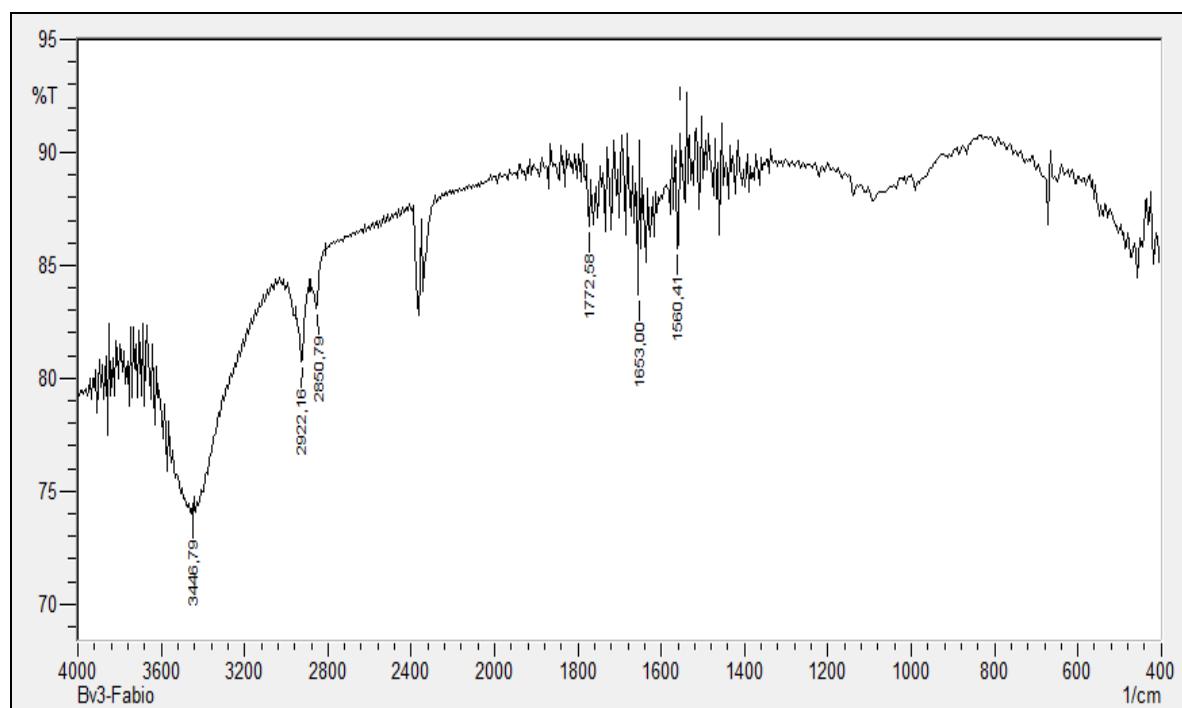


Figura 49. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de Bv-7.

Tabela 8. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para os átomos de carbono (δ_C) e hidrogênio (δ_H) da substância Bv-7, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C – APT (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em $CDCl_3$.

C	HMQC		HMBC		COSY	NOESY
	δ_C	δ_H	2J	3J		
1	38,9	1,80 (m, 1H) 1,85 (m, 1H)				H-7
2	27,0	1,57 (m, 1H) 1,63 (m, 1H)			H-3	H-3
3	78,8	3,20 (dd, $J = 4,5$ e $11,5$ Hz, 1H)		C-23, C-24	H-2	H-5, H-2, H-24
4	38,3	-				
5	54,8	0,72 (dd, $J = 2,5$ e $12,0$ Hz, 1H)	C-6, C-10	C-1, C-23		H-3, H-9, H-24
6	17,7	1,63 (m, 1H) 1,70 (m, 1H)				
7	31,2	1,22 (m, 1H) 1,26 (m, 1H)				H-1
8	41,7	-				
9	53,0	1,93 (sl, 1H)	C-10, C-11	C-12, C-14, C-25, C-26	H-11, H-12, H-25, H-26	H-9, H-11, H-24, H-27
10	36,3	-				
11	133,4	5,94 (dl, $J = 10,0$ Hz, 1H)	C-9	C-8, C10, C-13	H-9, H-12	H-9, H-12, H-25
12	128,8	5,51 (dd, $J = 3,0$ e $10,5$ Hz, 1H)		C-9, C-14	H-9, H-11	H-11, H-29
13	89,7	-				
14	41,9	-				
15	25,5	1,22 (m, 1H) 1,83 (dt, $J = 3,5$ e $13,0$ Hz, 1H)	C-14, C-16	C-8, C-13, C-17, C-27	H-16	H-27, H-22
16	22,8	1,34 (m, 1H) 2,11 (td, $J = 5,5$ e $13,0$ Hz, 1H)	C-15, C-17	C-14, C-18, C-22, C-28	H-15, H-16	
17	45,1	-				
18	60,5	1,61 (d, $J = 12,0$ Hz, 1H)	C-13, C-17	C-12, C-14, C-16, C-20, C-28		
19	38,1	0,98 (m, 1H)			H-29	
20	40,2	0,92 (m, 1H)				
21	30,8	1,54 (m, 1H) 1,59 (m, 1H)				H-30
22	31,3	1,50 (m, 1H) 1,75 (m, 1H)	C-17, C-21	C-16	H-22	H-15
23	14,9	0,76 (s, 3H)	C-4	C-3, C-5, C-24		
24	27,7	0,97 (s, 3H)	C-4	C-3, C-5, C-23		H-3, H-5, H-9
25	17,9	0,89 (s, 3H)	C-10	C-1, C-5, C-9	H-9	H-11
26	18,9	1,03 (s, 3H)		C-7, C-9, C-14	H-9	
27	16,1	1,14 (s, 3H)		C-8, C-13, C-15		H-9, H-15
28	180,0	-				
29	17,8	0,97 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	C-19	C-18, C-20	H-19	H-12
30	19,2	0,92 (d, $J = 6,0$ Hz, 3H)	C-20	C-19, C-21		H-21

Legenda: (d) duplo; (dd) duplo duplo; (dl) duplo largo; (dt) duplo de tripleto; (m) multiplet; (s) singlet; (sl) singlet largo; (t) tripleto; (td) tripleto de dupletos.

Tabela 9. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Bv-7, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente, $CDCl_3$), bem como, aqueles apresentados por Pinto (2008) para o 3β -hidroxiurs-11-en-28,13- β -olídio (200 e 50 MHz, respectivamente, $CDCl_3$).

C	Bv-7		3β -hidroxiurs-11-en-28,13- β -olídio	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	38,9	1,80 (m, 1H) 1,85 (m, 1H)	38,9	1,7 (m, 2H)
2	27,0	1,57 (m, 1H) 1,63 (m, 1H)	26,9	1,6 (m, 2H)
3	78,8	3,20 (dd, J = 4,5 e 11,5 Hz, 1H)	78,8	3,2 (dd, J = 5,6 e 10,4 Hz, 1H)
4	38,3	-	36,7	-
5	54,8	0,72 (dd, J = 2,5 e 12,0 Hz, 1H)	54,7	0,7 (m, 1H)
6	17,7	1,63 (m, 1H) 1,70 (m, 1H)	17,6	1,6 (m, 2H)
7	31,2	1,22 (m, 1H) 1,26 (m, 1H)	31,2	1,5 (m, 2H)
8	41,7	-	41,6	-
9	53,0	1,93 (sl, 1H)	52,9	1,9 (m, 1H)
10	36,3	-	36,3	-
11	133,4	5,94 (dl, J = 10,0 Hz, 1H)	133,4	5,9 (dl, J = 9,4 Hz, 1H)
12	128,8	5,51 (dd, J = 3,0 e 10,5 Hz, 1H)	128,7	5,5 (dd, J = 3,6 e 10,6 Hz, 1H)
13	89,7	-	89,6	-
14	41,9	-	41,9	-
15	25,5	1,22 (m, 1H) 1,83 (dt, J = 3,5 e 13,0 Hz, 1H)	25,5	1,1 (m, 2H)
16	22,8	1,34 (m, 1H) 2,11 (td, J = 5,5 e 13,0 Hz, 1H)	22,7	1,3 (m, 2H)
17	45,1	-	45,0	-
18	60,5	1,61 (d, J = 12,0 Hz, 1H)	60,5	1,6 (m, 1H)
19	38,1	0,98 (m, 1H)	38,1	1,8 (m, 1H)
20	40,2	0,92 (m, 1H)	40,2	0,8 (m, 1H)
21	30,8	1,54 (m, 1H) 1,59 (m, 1H)	30,8	1,5 (m, 2H)
22	31,3	1,50 (m, 1H) 1,75 (m, 1H)	31,3	1,5 (m, 2H)
23	14,9	0,76 (s, 3H)	14,9	0,7 (s, 3H)
24	27,7	0,97 (s, 3H)	27,7	0,9 (s, 3H)
25	17,9	0,89 (s, 3H)	19,1	0,8 (s, 3H)
26	18,9	1,03 (s, 3H)	18,9	1,0 (s, 3H)
27	16,1	1,14 (s, 3H)	16,0	1,1 (s, 3H)
28	180,0	-	179,0	-
29	17,8	0,97 (d, J = 6,5 Hz, 3H)	17,8	0,9 (s, 3H)
30	19,2	0,92 (d, J = 6,0 Hz, 3H)	17,9	0,9 (s, 3H)

Legenda: (d) duplo; (dd) duplo duplo; (dl) duplo largo; (dt) duplo de triplo; (m) multiplo; (s) singuleto; (sl) singuleto largo; (t) triplo; (td) triplo de duplos.

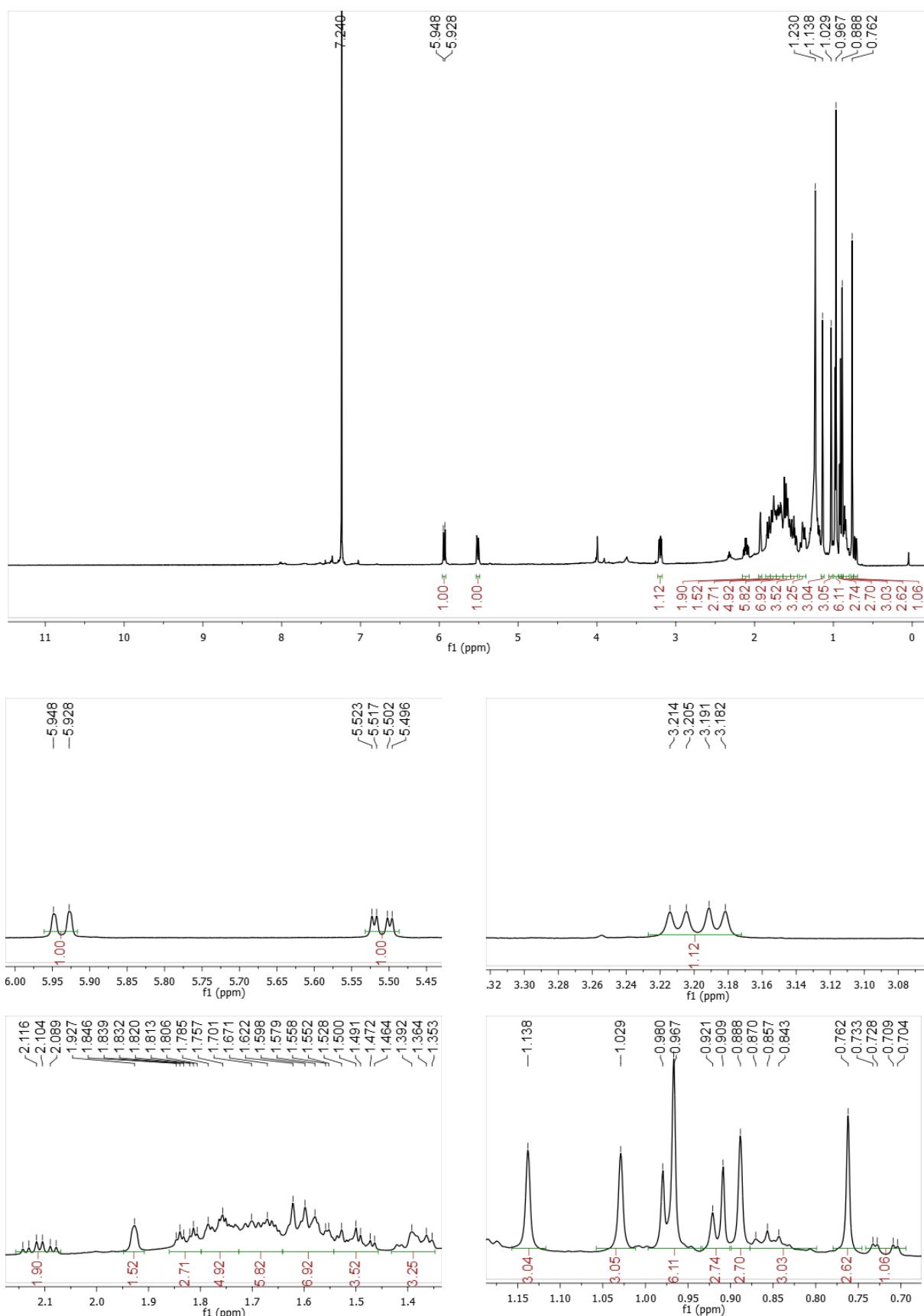


Figura 50. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Bv-7.

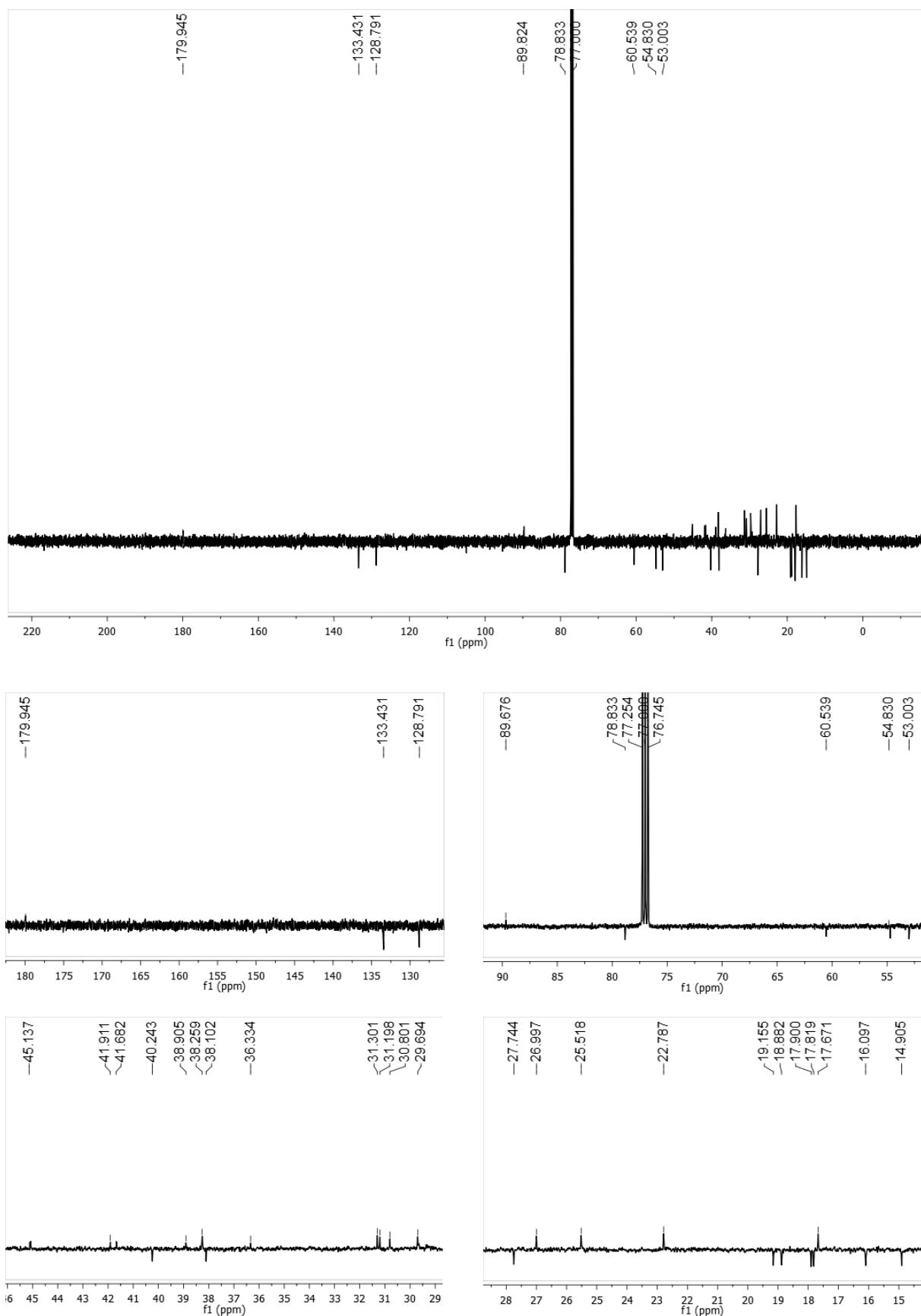


Figura 51. Espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 125 MHz) de Bv-7.

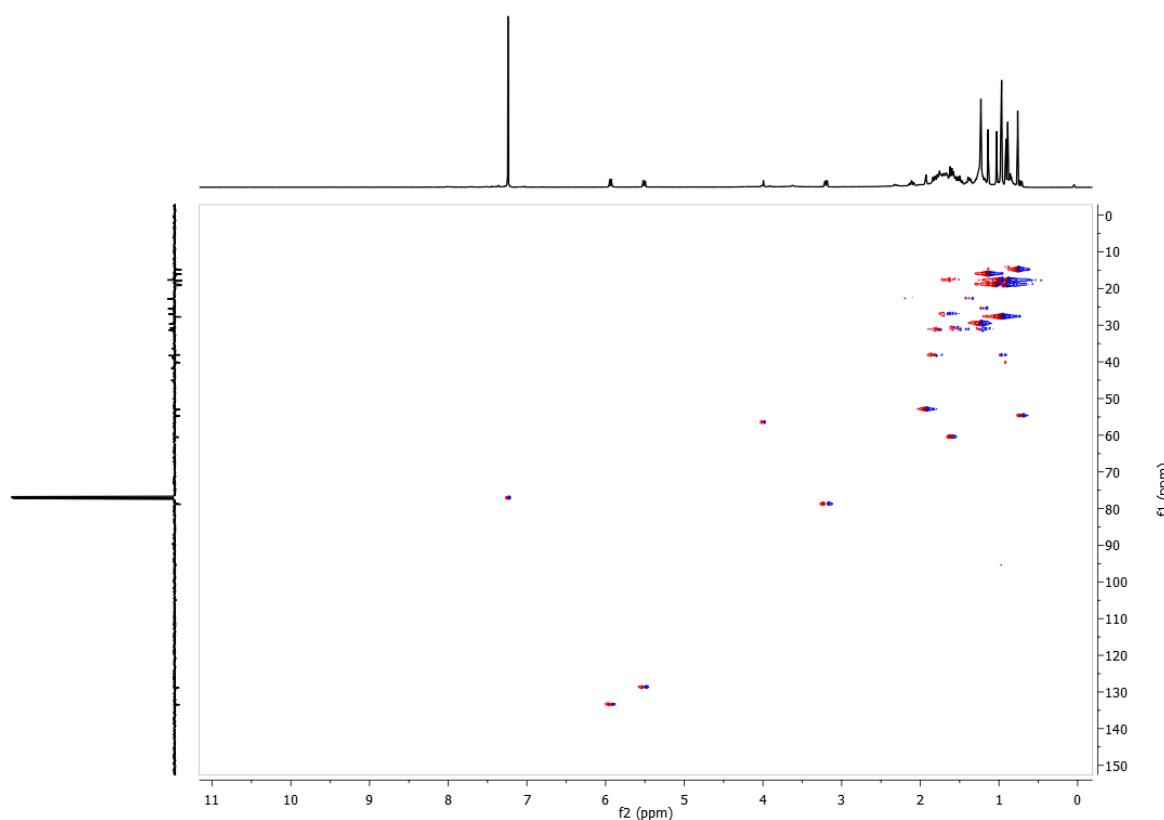


Figura 52. Espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Bv-7.

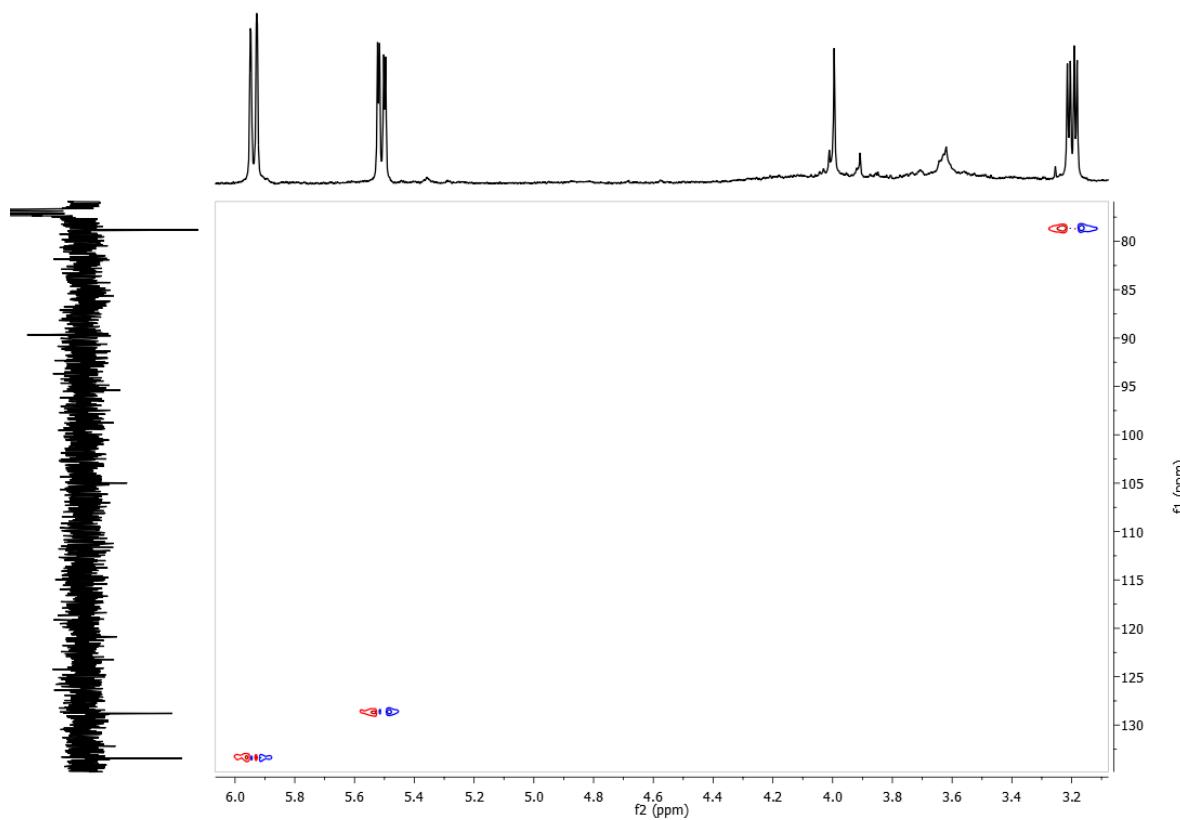


Figura 53. Expansão do espectro HMQC de Bv-7 na região de (3,2 – 6,0 ppm) x (80,0 – 130,0 ppm).

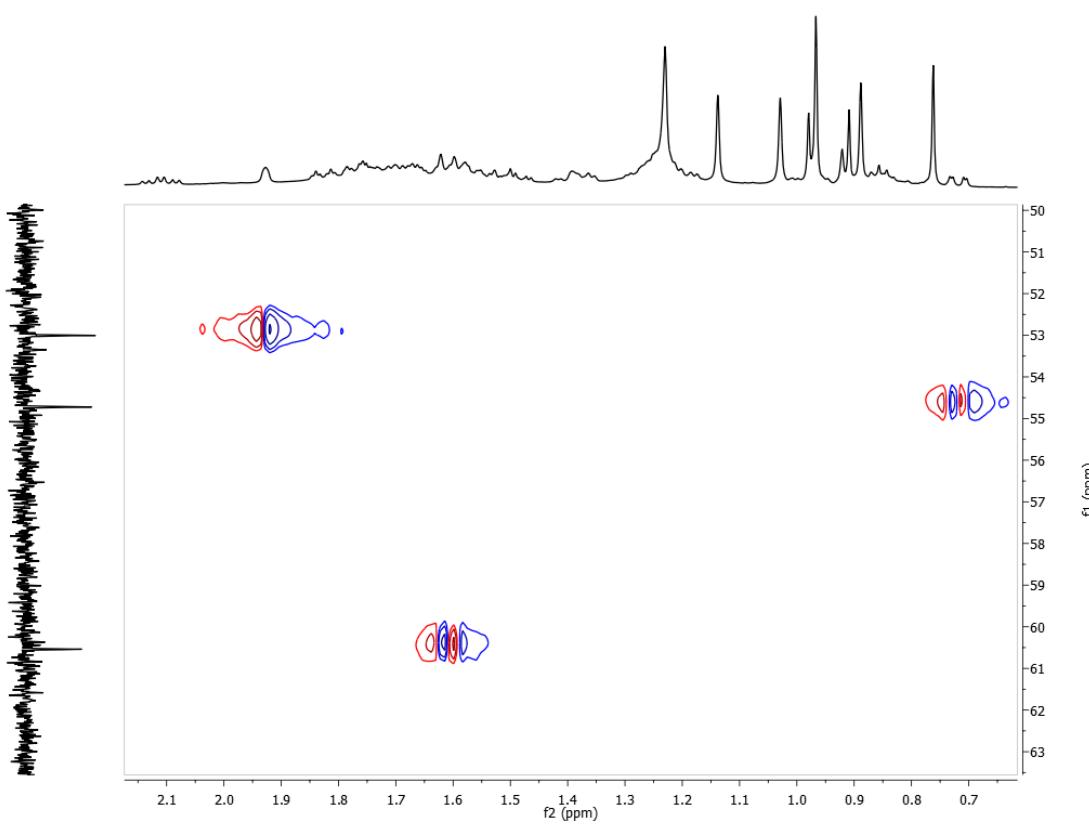


Figura 54. Expansão do espectro HMQC de Bv-7 na região de (0,7 – 2,1 ppm) x (50,0 – 63,0 ppm).

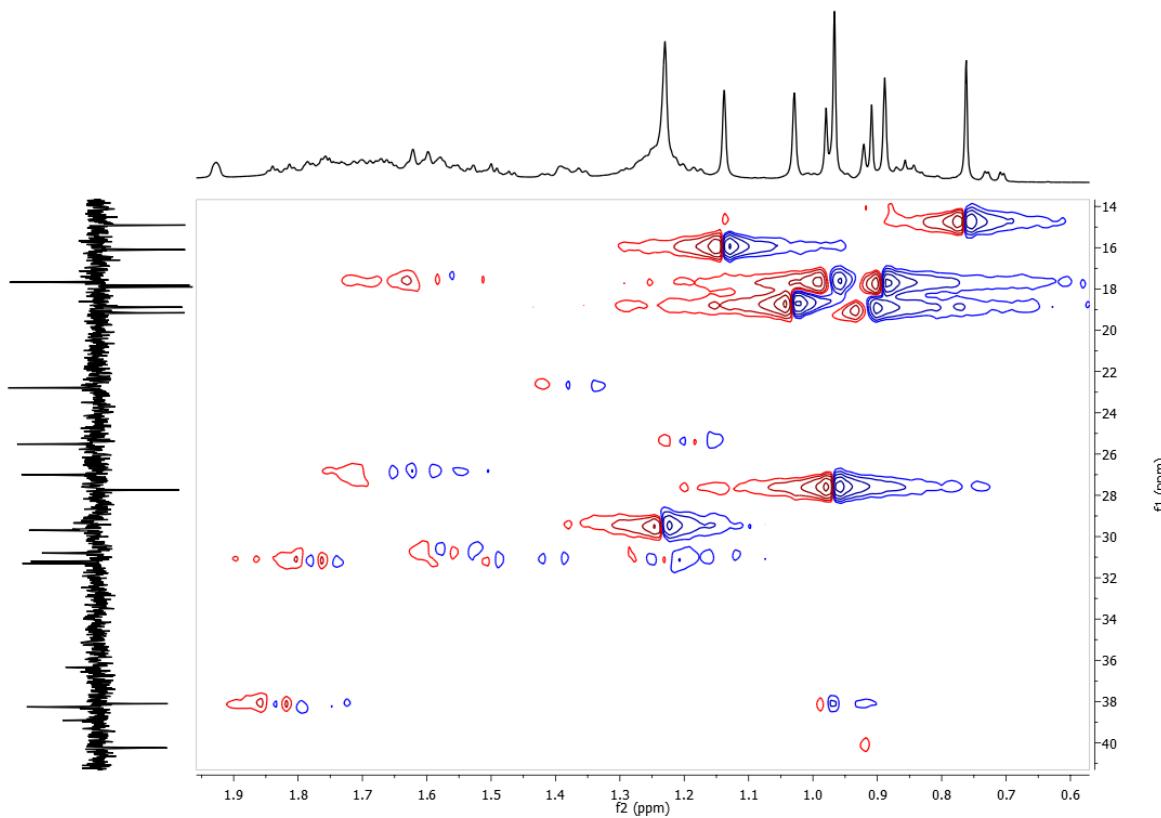


Figura 55. Expansão do espectro HMQC de Bv-7 na região de (0,6 – 1,9 ppm) x (14,0 – 40,0 ppm).

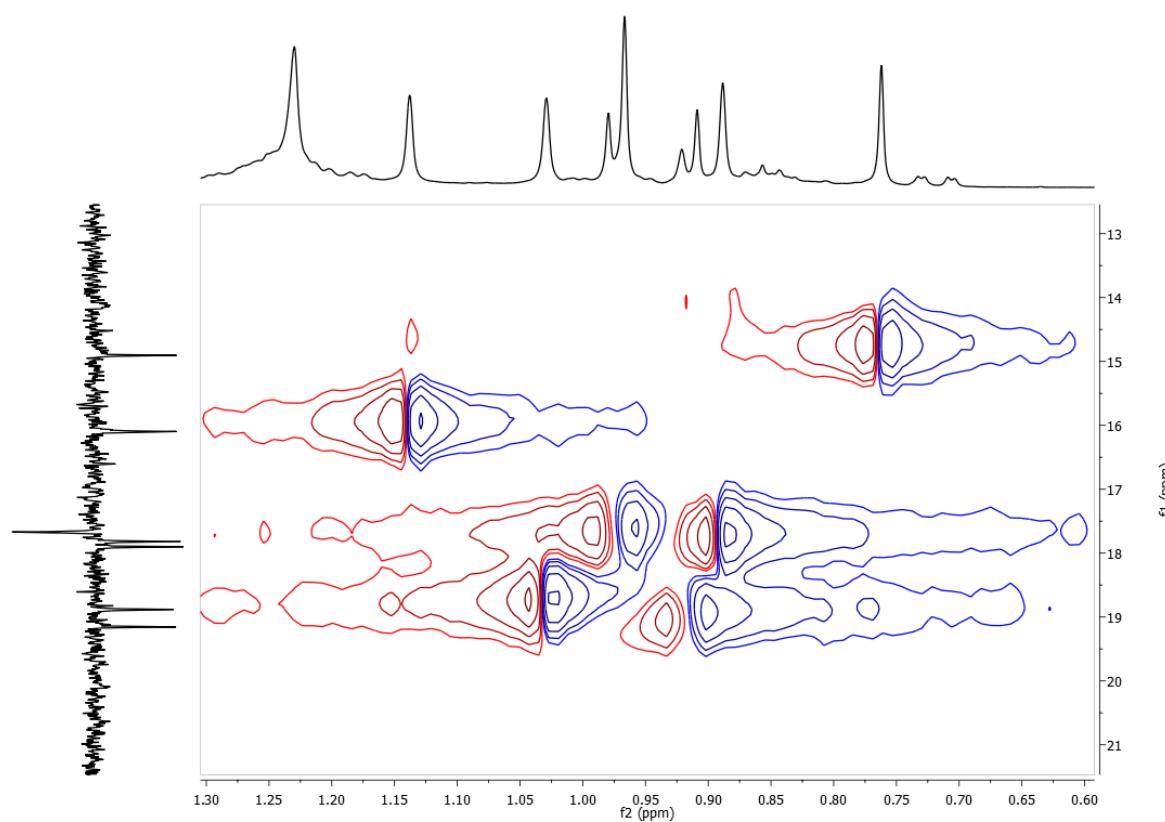


Figura 56. Expansão do espectro HMQC de Bv-7 na região de (0,6 – 1,3 ppm) x (13,0 – 21,0 ppm).

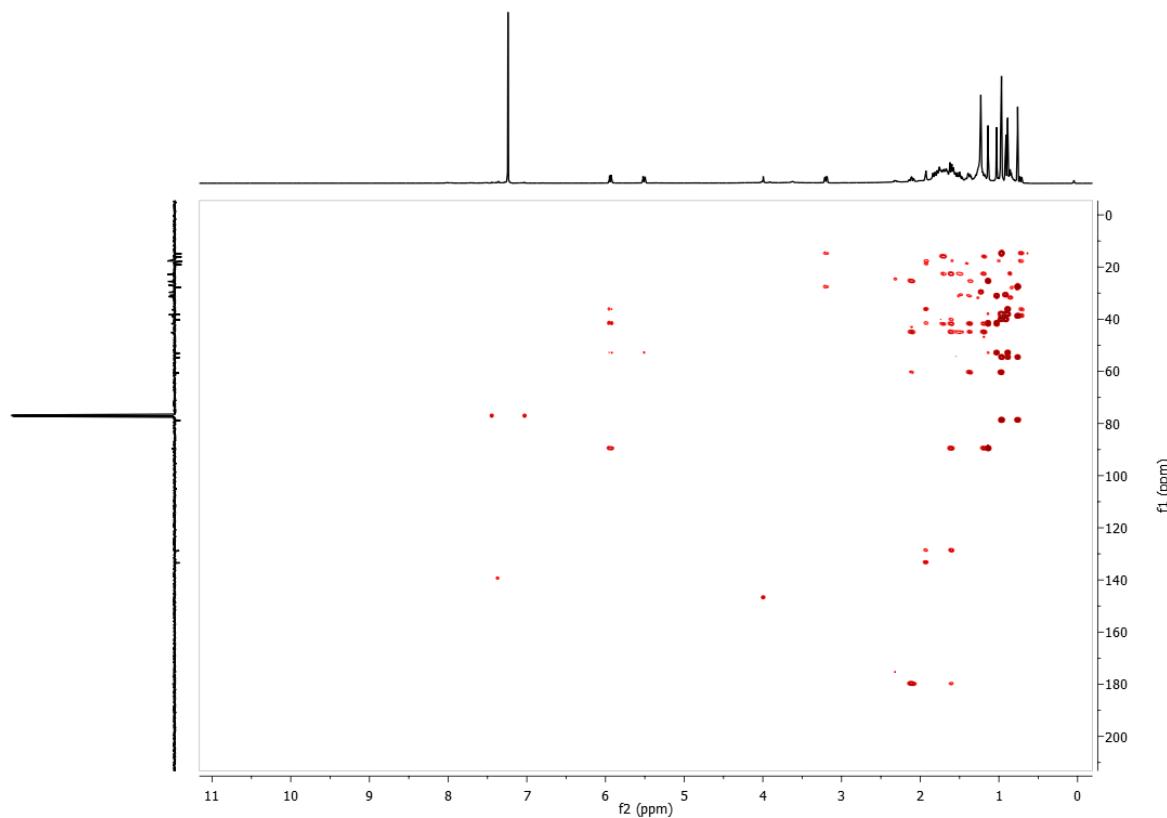


Figura 57. Espectro HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Bv-7.

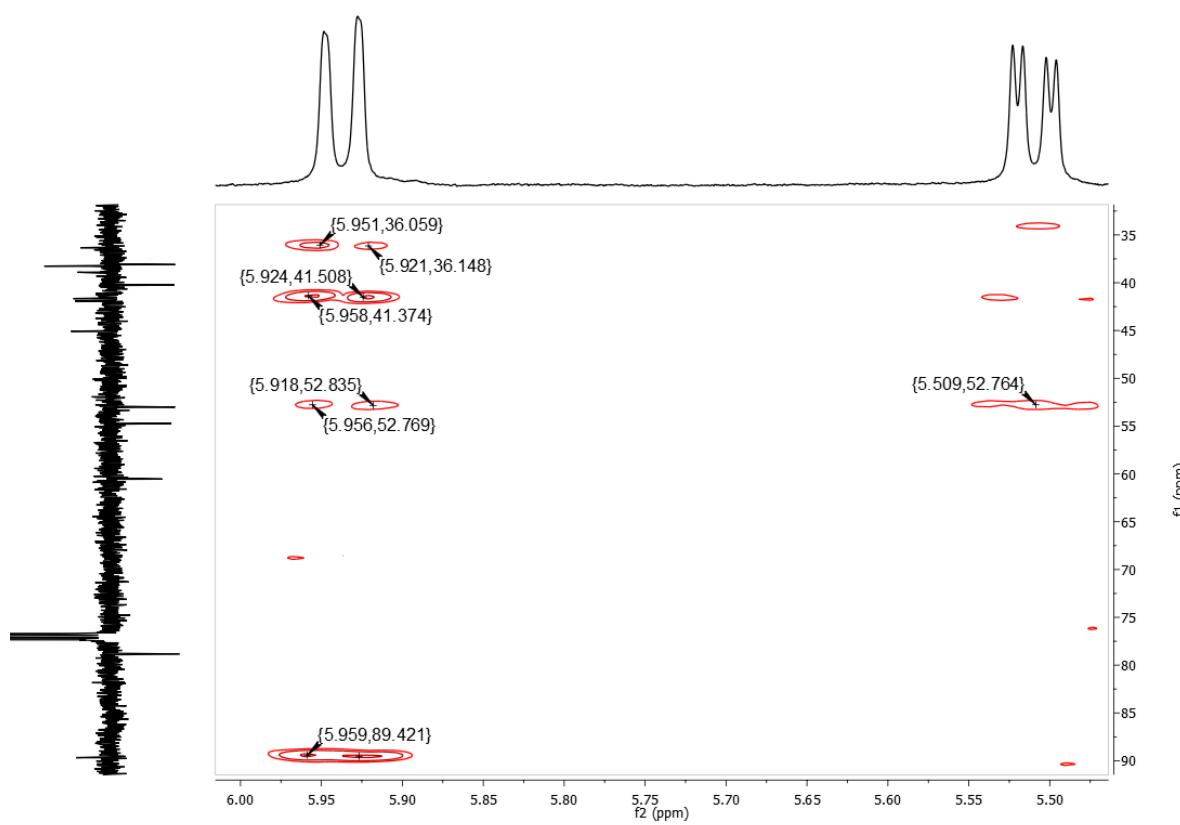


Figura 58. Expansão do espectro HMBC de Bv-7 na região de (5,5 – 6,0 ppm) x (35,0 – 90,0 ppm).

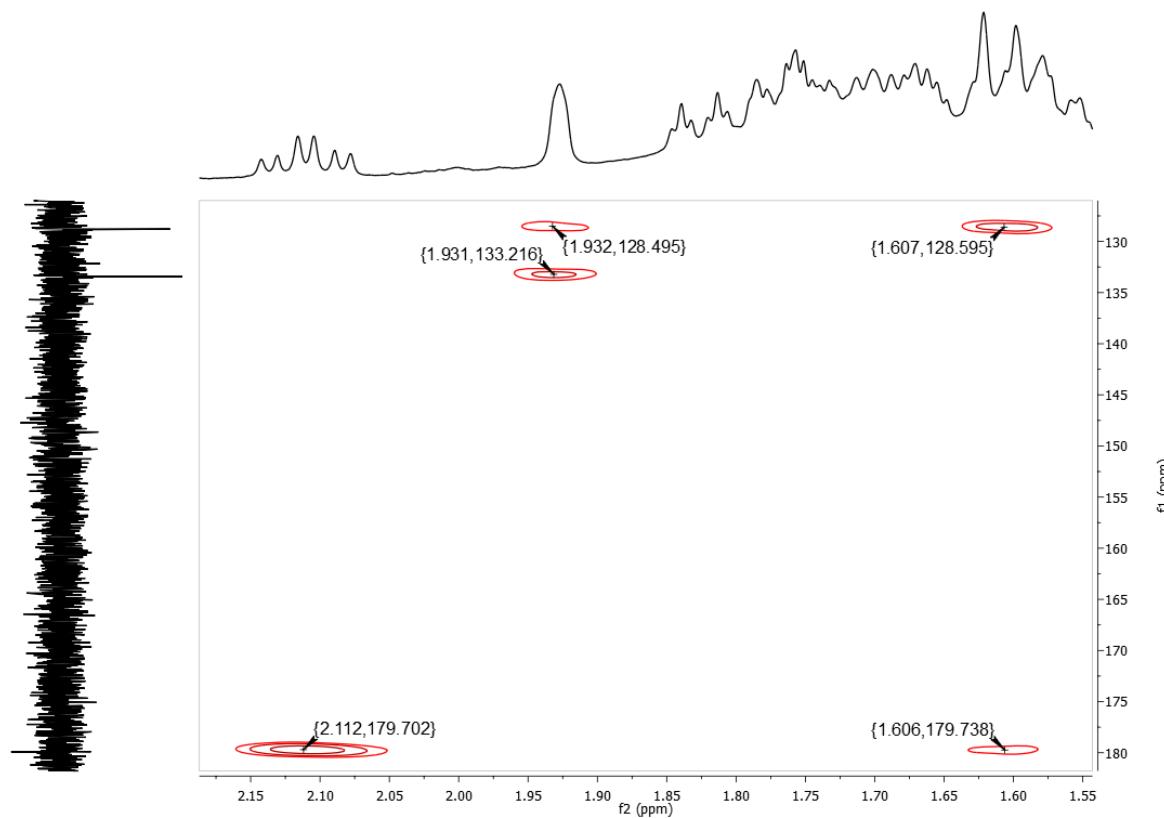


Figura 59. Expansão do espectro HMBC de Bv-7 na região de (1,5 – 2,1 ppm) x (130,0 – 180,0 ppm).

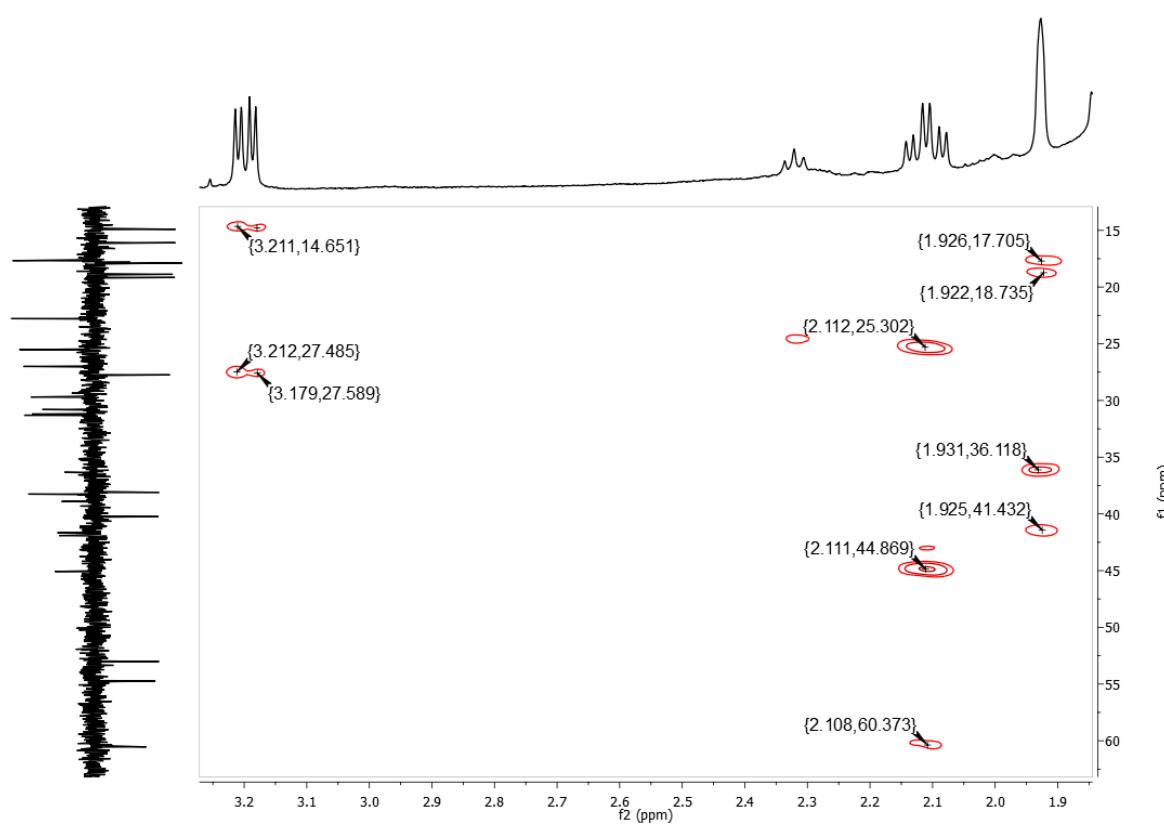


Figura 60. Expansão do espectro HMBC de Bv-7 na região de (1,9 – 3,2 ppm) x (15,0 – 60,0 ppm).

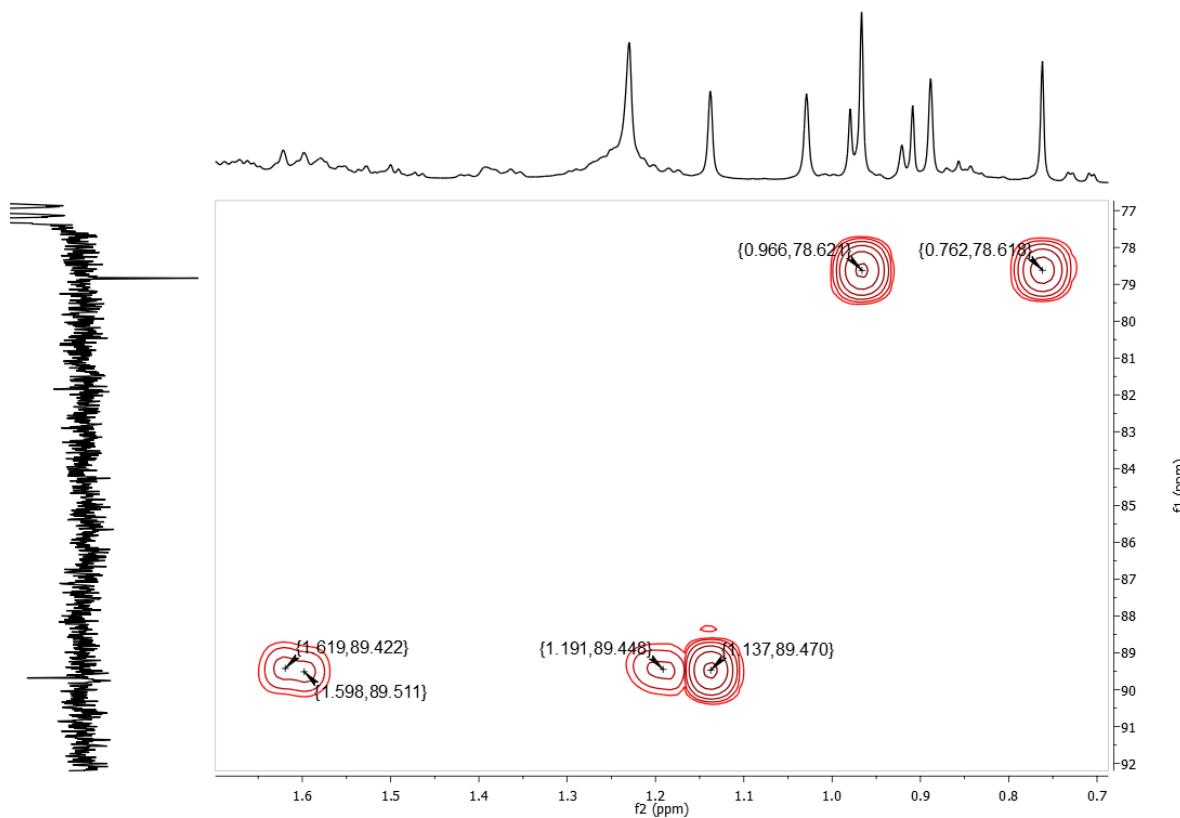


Figura 61. Expansão do espectro HMBC de Bv-7 na região de (0,7 – 1,7 ppm) x (77,0 – 92,0 ppm).

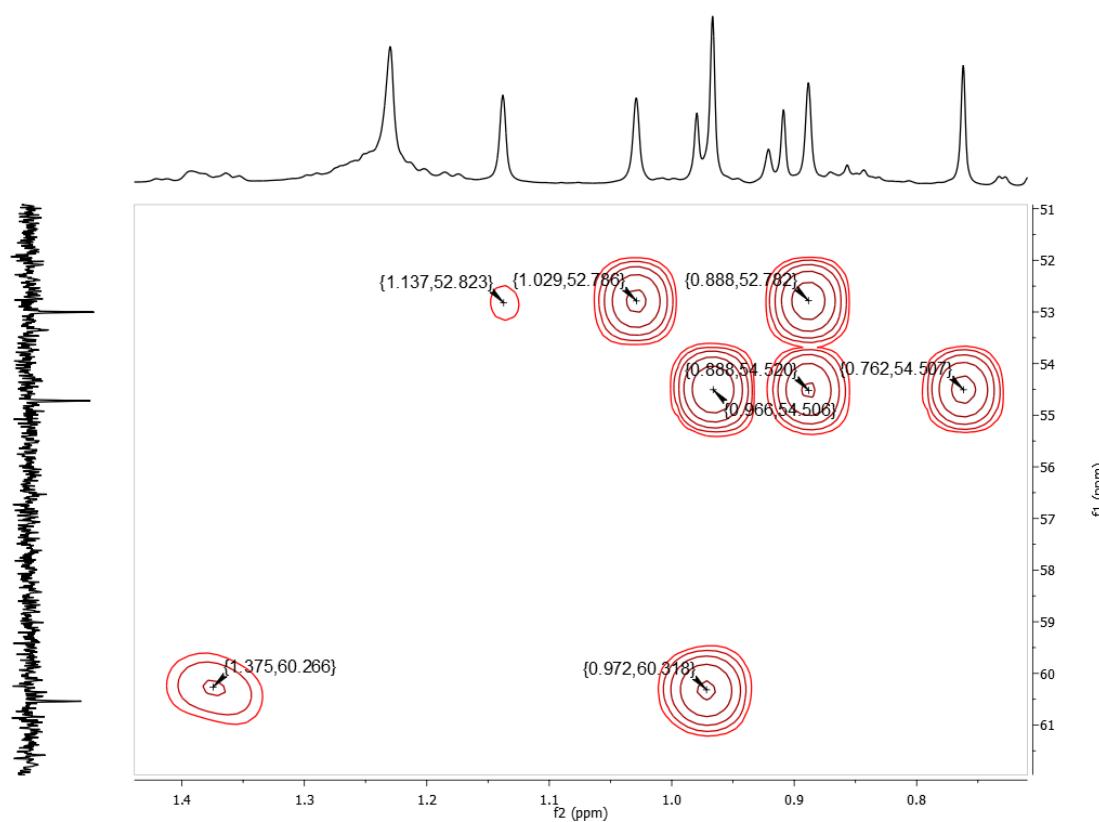


Figura 62. Expansão do espectro HMBC de Bv-7 na região de (0,8 – 1,4 ppm) x (51,0 – 62,0 ppm).

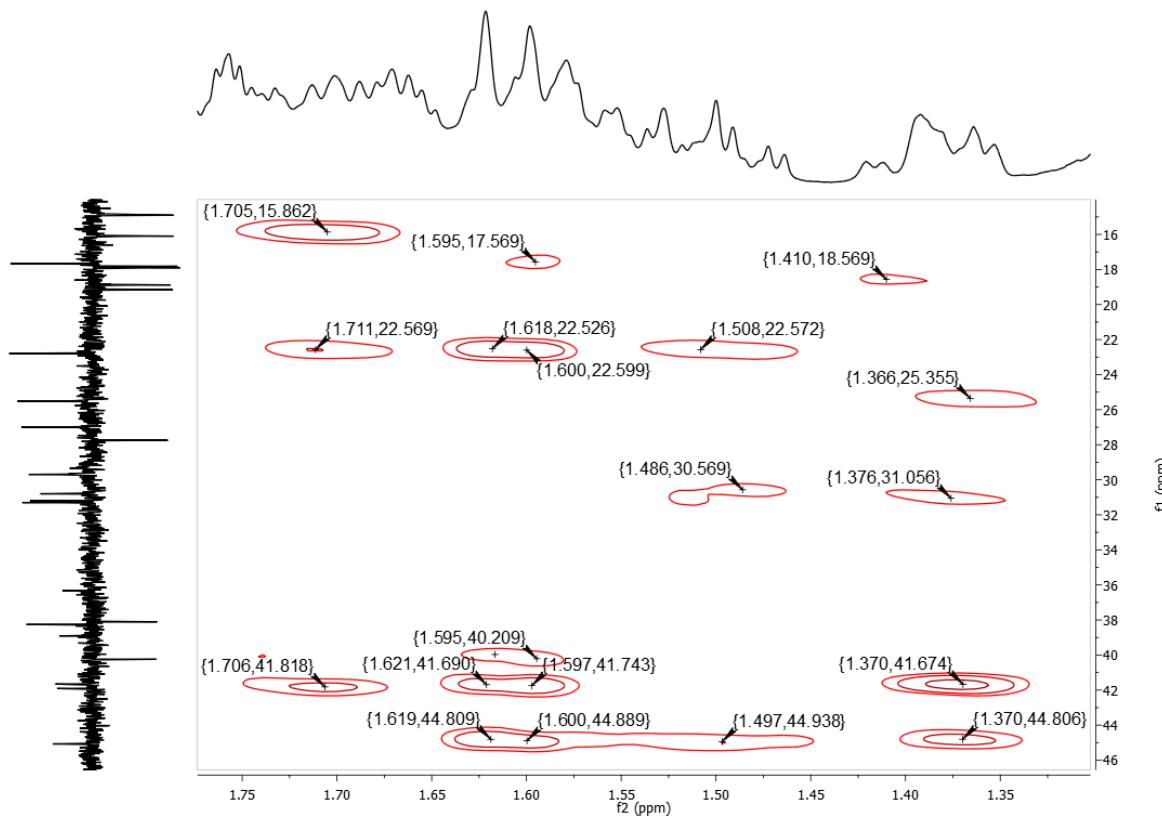


Figura 63. Expansão do espectro HMBC de Bv-7 na região de (1,3 – 1,8 ppm) x (15,0 – 46,0 ppm).

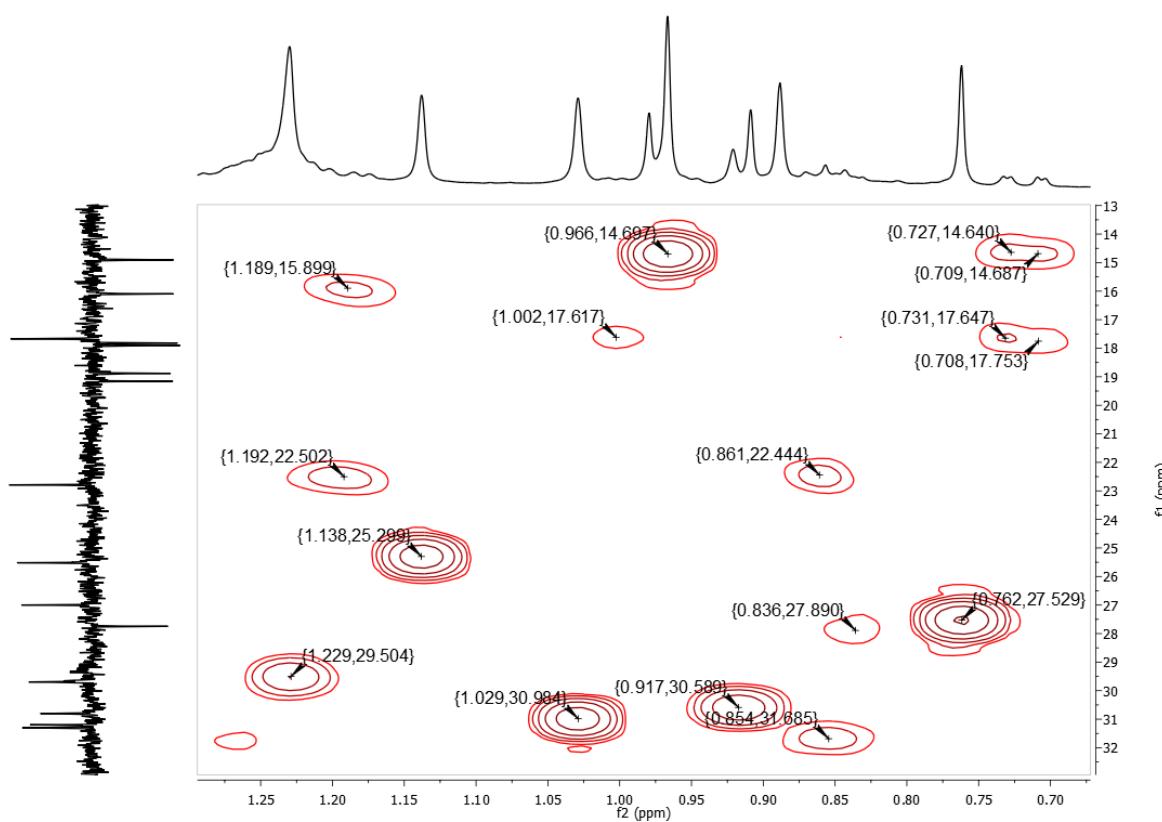


Figura 64. Expansão do espectro HMBC de Bv-7 na região de (0,7 – 1,3 ppm) x (13,0 – 33,0 ppm).

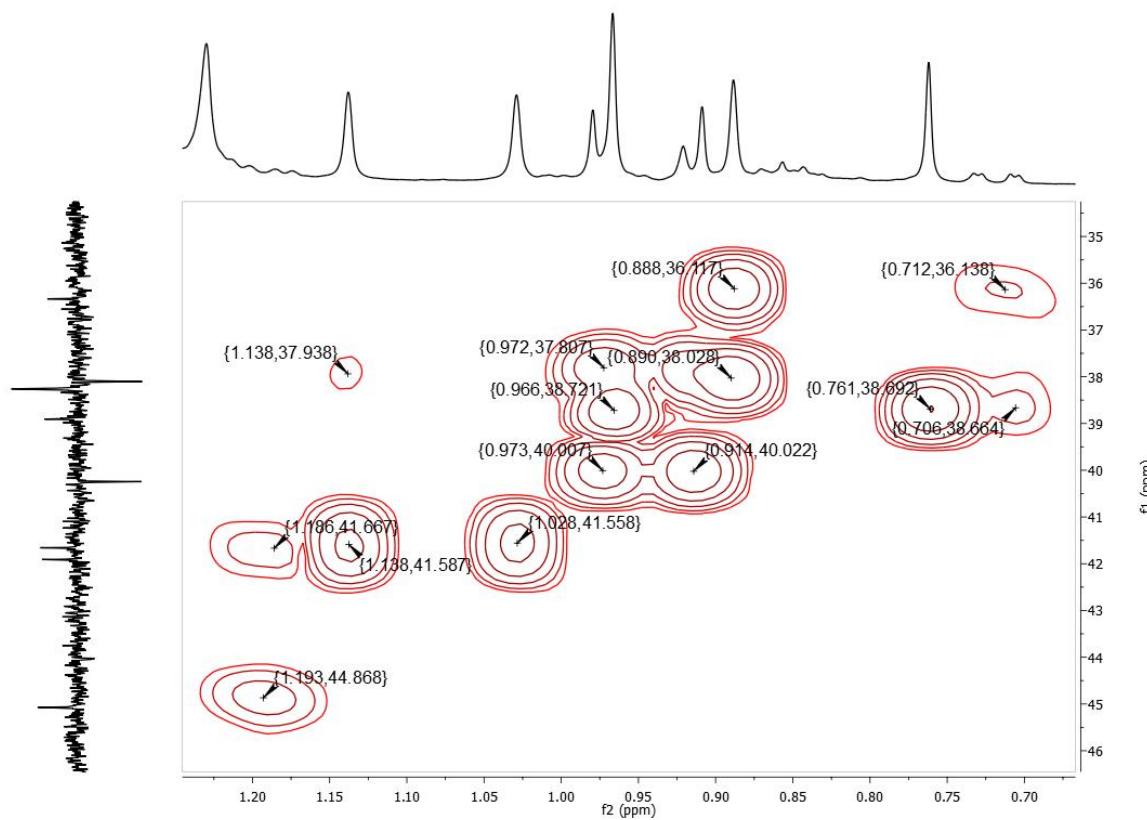


Figura 65. Expansão do espectro HMBC de Bv-7 na região de (0,7 – 1,2 ppm) x (35,0 – 46,0 ppm).

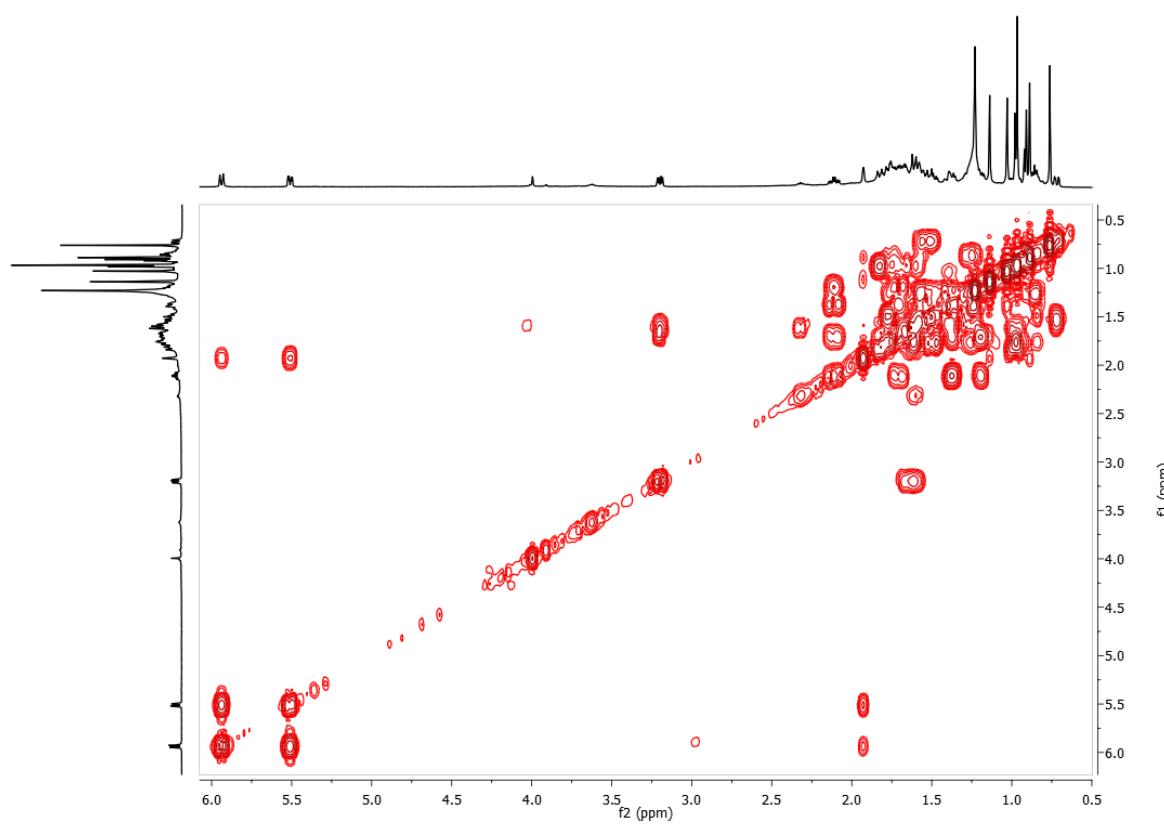


Figura 66. Espectro COSY (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Bv-7.

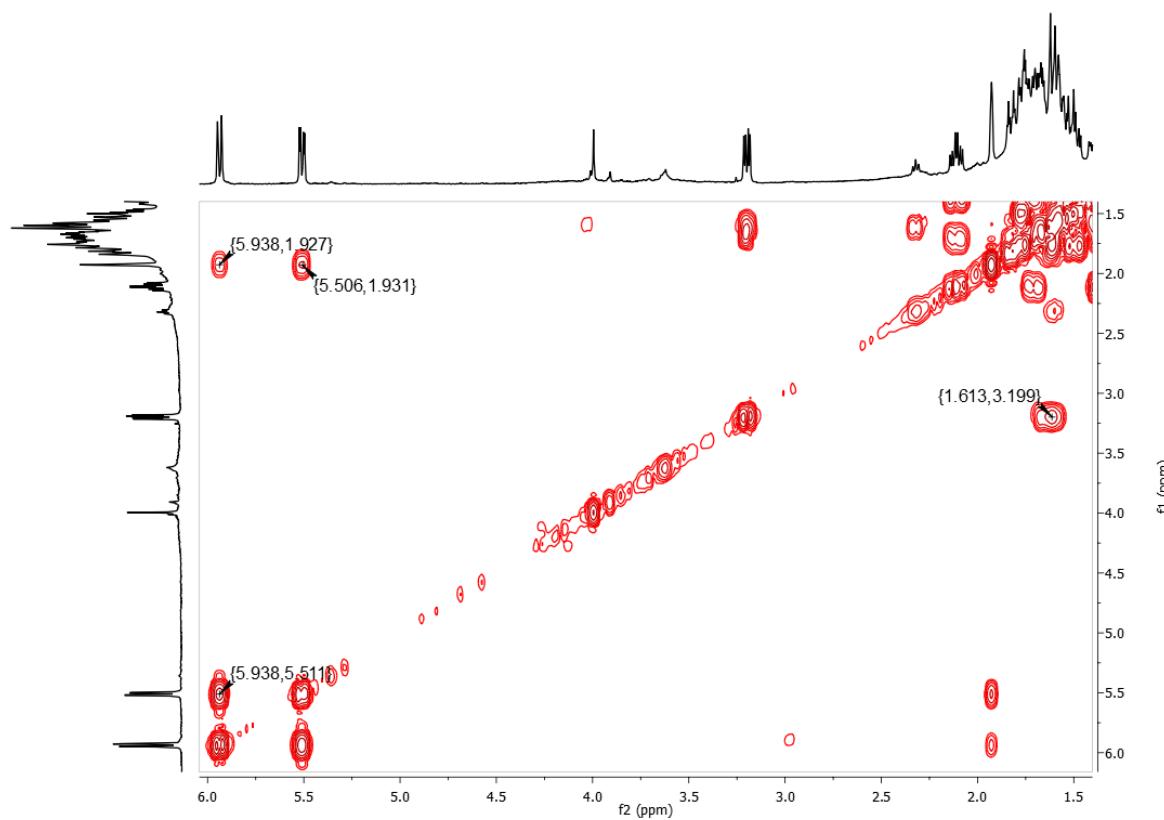


Figura 67. Expansão do espectro COSY de Bv-7 na região de (1,5 – 6,0 ppm) x (1,5 – 6,0 ppm).

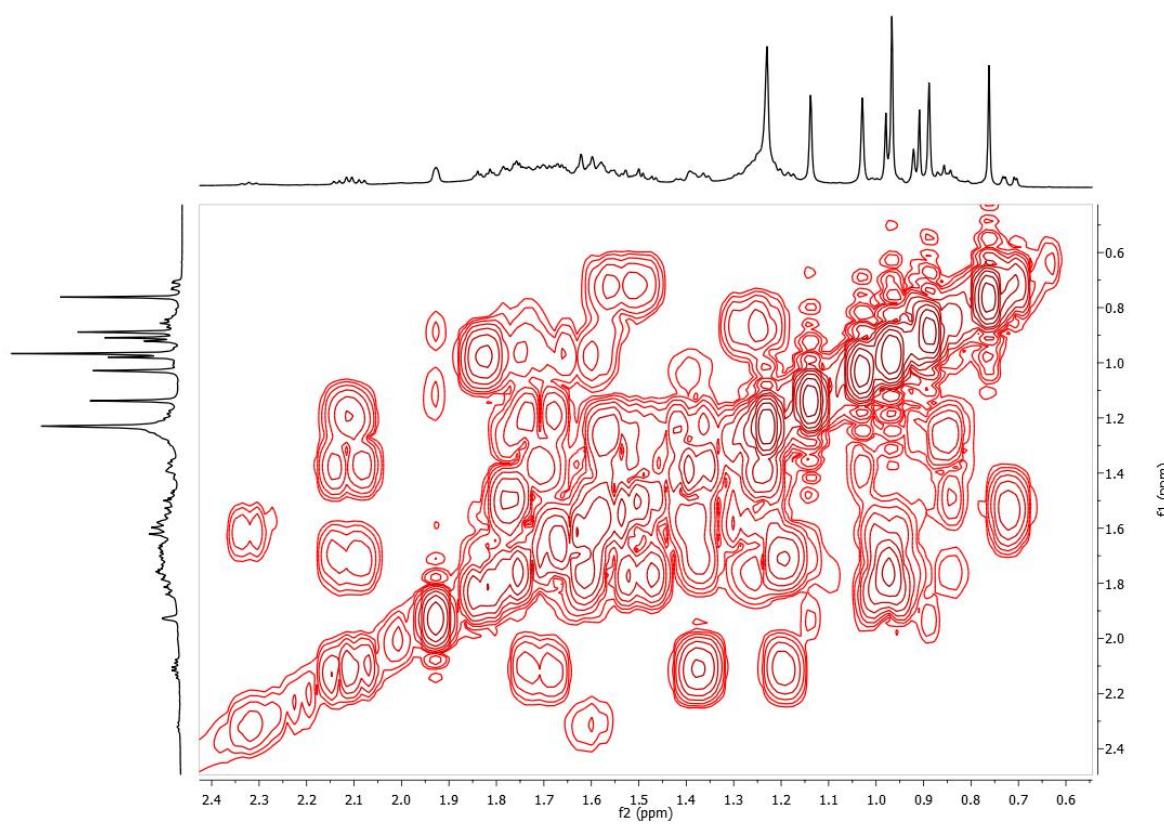


Figura 68. Expansão do espectro COSY de Bv-7 na região de (0,6 – 2,4 ppm) x (0,6 – 2,4 ppm).

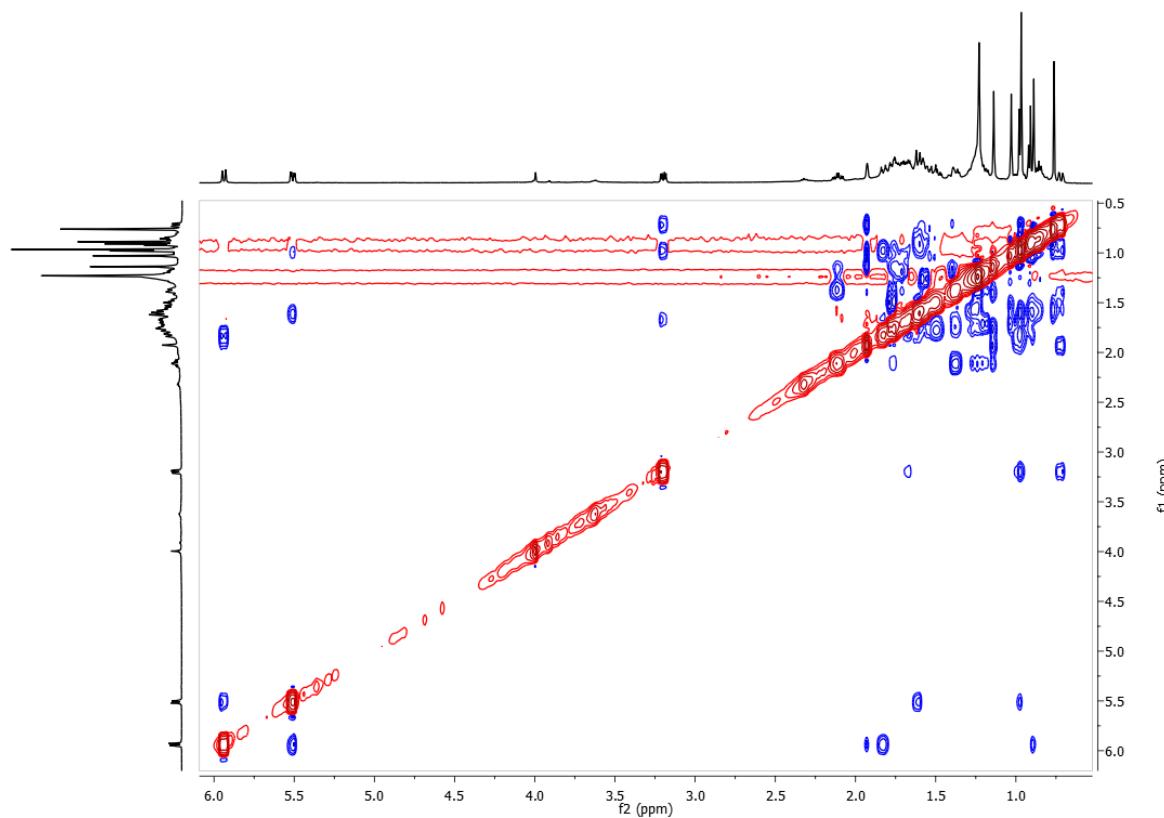


Figura 69. Espectro NOESY (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Bv-7.

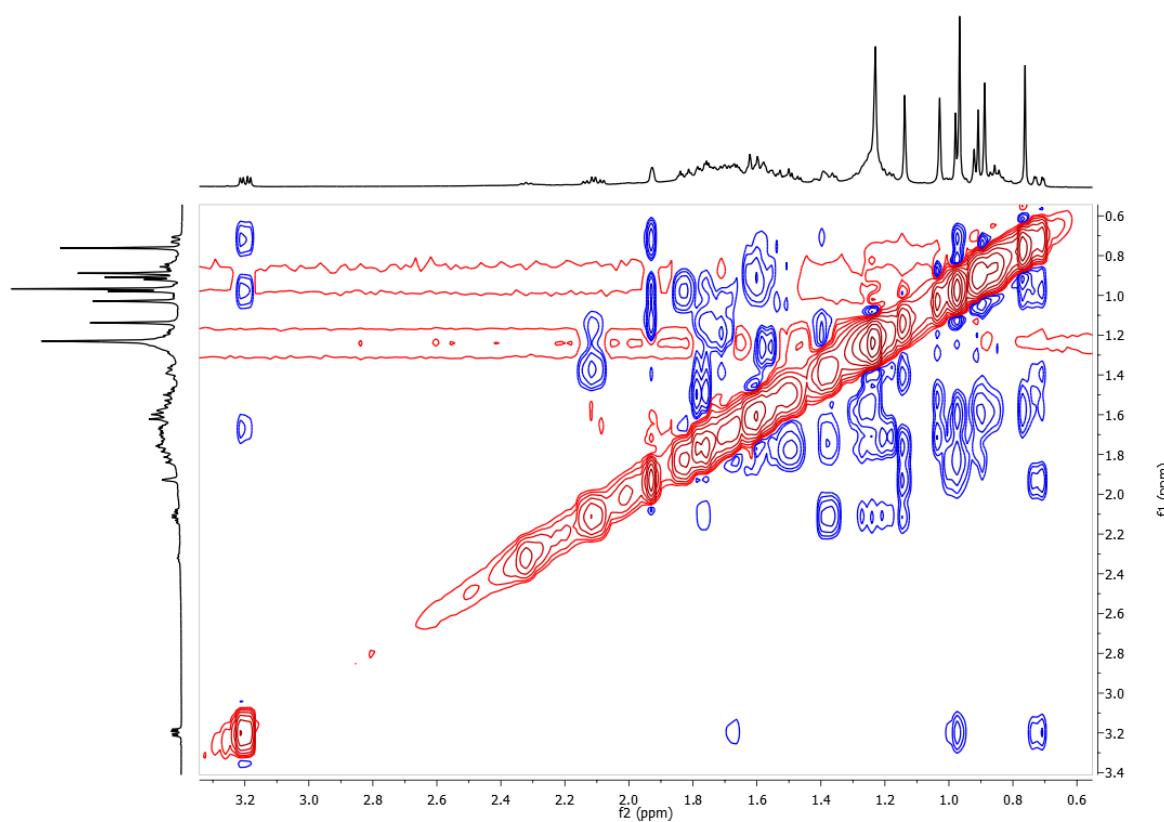


Figura 70. Expansão do espectro NOESY de Bv-7 na região de (0,6 – 3,2 ppm) x (0,6 – 3,2 ppm).

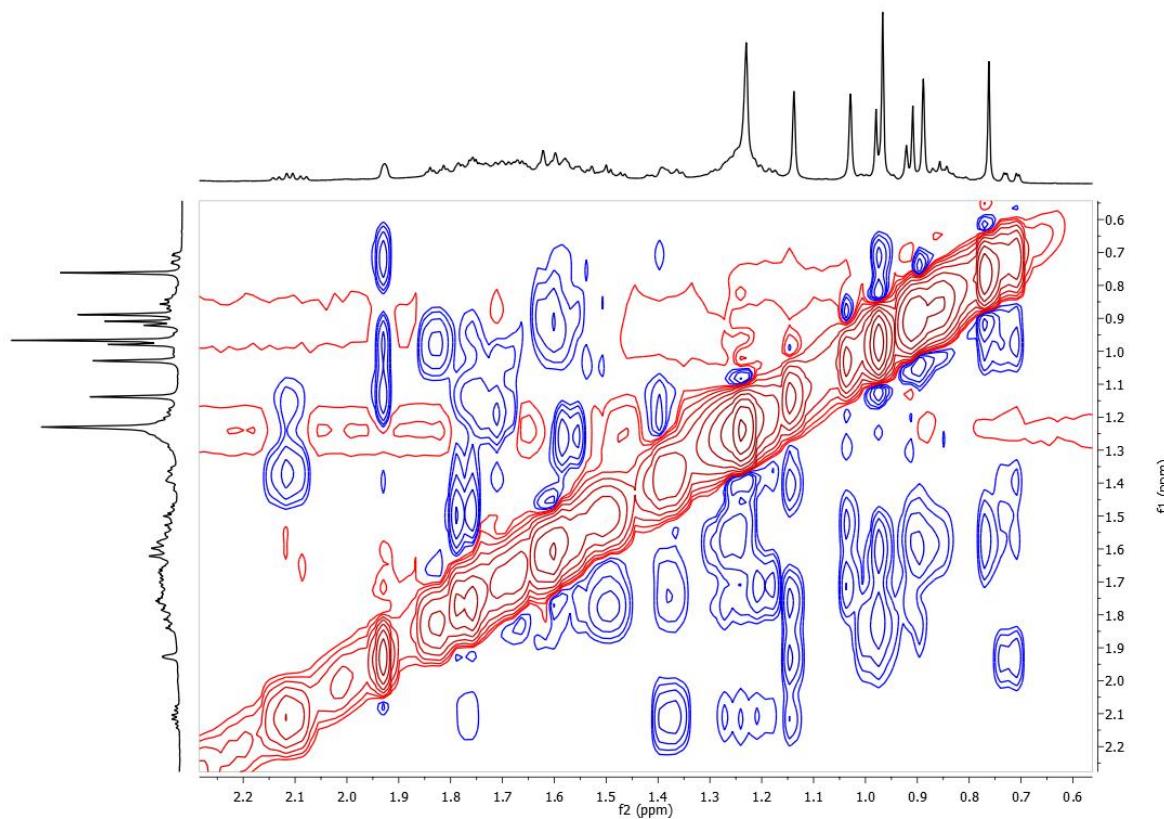
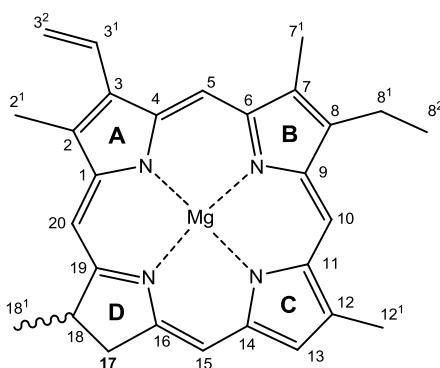


Figura 71. Expansão do espectro NOESY de Bv-7 na região de (0,6 – 2,2 ppm) x (0,6 – 2,2 ppm).

5.8. Determinação estrutural de Bv-8

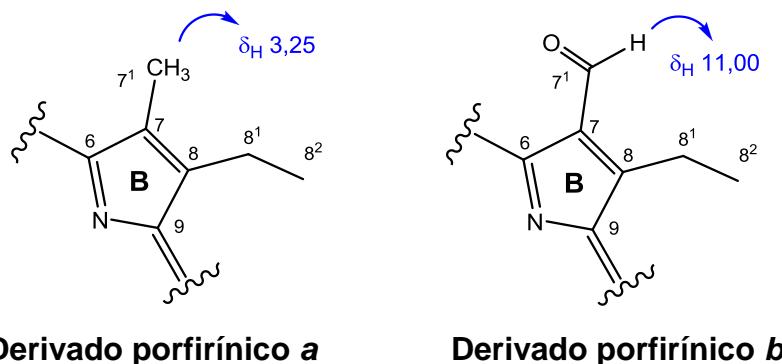
O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de Bv-8 (Figura 73, pág. 113) apresentou sinais característicos de compostos que possuem núcleo porfirínico: três singletos em δ_{H} 9,48, 9,33 e 8,54 correspondentes aos hidrogênios olefínicos H-10, H-5 e H-20, respectivamente; um duplo-duplo em δ_{H} 7,99 ($J = 11,6$ e 17,6 Hz) acoplando *trans* com um duplo-duplo em δ_{H} 6,26 ($J = 1,4$ e 17,8 Hz) e *cis* com outro duplo-duplo em δ_{H} 6,16 ($J = 1,4$ e 11,6 Hz), condizentes aos hidrogênios do grupo vinila terminal inserido na posição 3 (H-3^1 , $\text{H-3}^2_{(\text{trans})}$ e $\text{H-3}^2_{(\text{cis})}$, respectivamente); e três singletos em δ_{H} 3,67, 3,38 e 3,19 referentes aos hidrogênios H-12 1 , H-2 1 e H-7 1 de três metilas olefínicas, respectivamente. Estes dados foram corroborados pelo espectro de RMN ^{13}C – APT (50 MHz, CDCl_3) (Figura 74, pág. 114) que apresentou 55 sinais, entre os quais se destacaram aqueles em δ_{C} 104,4 (C-10), 97,5 (C-5) e 93,1 (C-20) do núcleo porfirínico, em δ_{C} 129,1 (C-3 1) e 122,8 (C-3 2) do grupo vinila terminal, bem como, em δ_{C} 12,2 (C-12 1), 12,1 (C-2 1) e 11,3 (C-7 1) para as três metilas olefínicas (SCHWIKKARD et al., 1998; TOMAZ et al., 2008; HUANG et al., 2007).

Características físico-químicas de Bv-8	
Estado físico	Sólido
Forma	Amorfo verde oliva
Solubilidade	CH_2Cl_2
Massa/Rendimento	21 mg / 0,21 %
Ponto de fusão	109-111 °C
Fluorescência (254 nm)	Negra
Fluorescência (366 nm)	Negra
Fator de retenção (R_f)	0,53 (Hex/AcOEt 8:2)



Esqueleto porfirínico

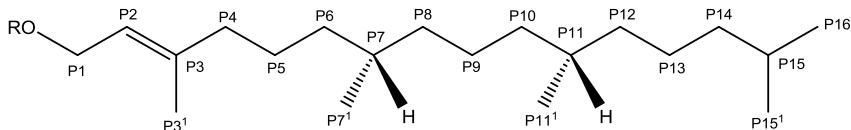
O deslocamento químico em δ_H 3,19 (s, 3H) (Figura 73, pág. 113) permitiu classificar o derivado porfirínico como do tipo *a*, uma vez que este sinal corresponde aos hidrogênios do grupo metila em C-7. A ausência de um sinal em aproximadamente δ_H 11,00 referente ao hidrogênio do grupo aldeído em C-7, característico dos derivados porfirínicos do tipo *b*, fortaleceu tal classificação (BUCHANAN et al., 1996; SCHWIKKARD et al., 1998).



Dois singletos largos em δ_H -1,48 e -1,66 (Figura 73, pág. 113), atribuídos a dois hidrogênios N-H pirrólicos protegidos pela corrente de anel formada quando o composto é submetido a um campo magnético, sugeriu a ausência do íon magnésio central na molécula, o que indicou que o composto tratava-se de um derivado da clorofila. O espectro de IV (Figura 72, pág. 112) reforçou esta observação pois apresentou uma banda de absorção em 3394 cm^{-1} típica de deformação axial de N-H (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

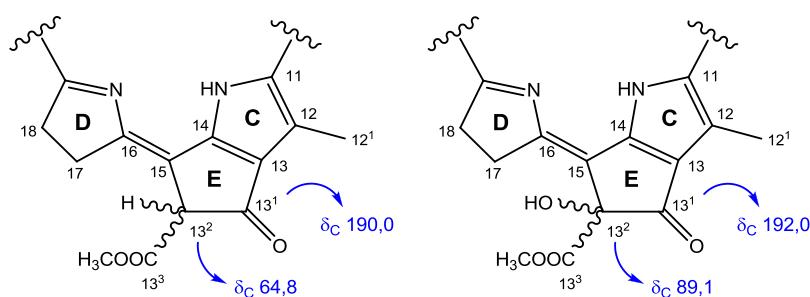
No espectro de RMN ^1H (Figura 73, pág. 113), um conjunto de sinais de alta multiplicidade em δ_H 0,75 – 2,00 provenientes de hidrogênios CH, CH_2 e CH_3 alifáticos sugeriu a presença de um grupo fitil ($-\text{C}_{20}\text{H}_{39}$) comumente encontrado em substâncias com natureza porfirínica. O multiplet em δ_H 4,44 (2H) e o triploto em δ_H 5,12 ($J = 7,4 \text{ Hz}$, 1H) reforçaram esta proposta uma vez que correspondem aos deslocamentos químicos dos hidrogênios H-P1 e H-P2 da cadeia fitílica, respectivamente (SCHWIKKARD et al., 1998; HUANG et al., 2007; JERZ et al., 2007). Estes dados foram importantes na classificação da substância como feofitina pois a ausência destes caracterizaria a substância como sendo um feoforbídeo (SCHWIKKARD et al., 1998). Esta unidade foi conectada a carbonila C-17³ (δ_C 172,2) para forma um éster, em concordância com os dados da literatura. Quando

esta carbonila apresenta substituinte formando um ester, o sinal que é gerado no espectro de RMN ^{13}C é aproximadamente δ_{C} 173,0; na ausência de substituinte nessa posição observa-se um sinal mais desprotegido para ácido carboxílico em torno δ_{C} 176,0 (DUAN et al., 2002; MATSUO et al., 1996).



Cadeia fitílica

Derivados porfirínicos geralmente são encontrados na natureza apresentando o anel E do tipo ciclopentanona (ver abaixo). Neste anel, a carbonila cetônica encontra-se localizada em C-13¹ e apresenta deslocamento químico em aproximadamente δ_{C} 190,0 – 192,0. O sinal para carbono C-13² pode variar conforme o tipo de substituinte que possui, sendo aproximadamente δ_{C} 89,0 quando se trata de um carbono quaternário hidroxilado ou δ_{C} 64,0 quando o mesmo é um carbono metínico não hidroxilado (KOBAYASHI et al., 1991; MATSUO et al., 1996). A presença de sinais em δ_{C} 189,6 (C-13¹) e 64,6 (C-13²) (Figura 74, pág. 114), bem como, a presença de sinal em δ_{H} 6,25 (s, 1H) para o hidrogênio H-13² (Figura 73, pág. 113) permitiram propor uma estrutura do tipo ciclopentanona não hidroxilada para o anel E de Bv-8. No espectro de IV (Figura 72, pág. 112) absorções em 1701 e 1734 cm^{-1} , referentes a estiramentos de C=O, sugerem a presença de carbonila cetônica conjugada e carbonila de éster, respectivamente (PAVIA et al., 2010).

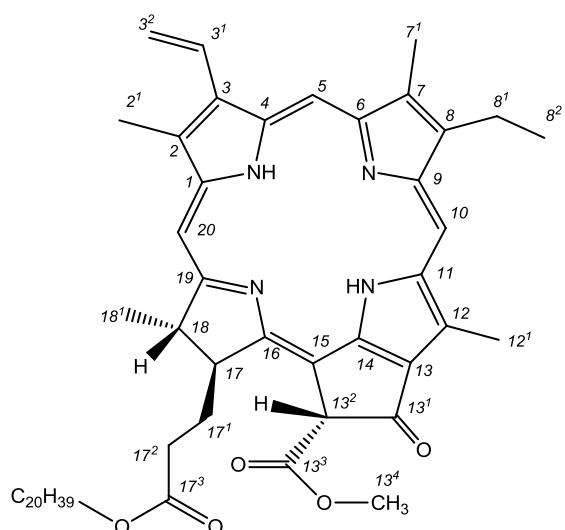


Os demais dados de RMN ^1H e ^{13}C , bem como, aqueles citados por Schwikkard e colaboradores (1998) para a feofitina a são apresentados na Tabela 10 (pág. 111).

Tabela 10. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente, em CDCl_3) para Bv-8 e da Feofitina a citados por Schwikkard e colaboradores (1998) (300 e 75 MHz, respectivamente, CDCl_3).

C	Bv-8		Feofitina a	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	142,9	-	142,9	-
2	131,8	-	131,8	-
2 ¹	12,1	3,38 (s, 3H)	12,1	3,39 (s, 3H)
3	136,5	-	136,5	-
3 ¹	129,1	7,99 (dd, $J = 11,6$ e 17,6 Hz, 1H)	129,0	7,98 (dd, $J = 11,4$ e 15,2 Hz, 1H)
3 ²	122,8	6,26 (dd, $J = 1,4$ e 17,8 Hz, 1H) 6,16 (dd, $J = 1,4$ e 11,6 Hz, 1H)	122,8	6,28 (dd, $J = 2,3$ e 15,2 Hz, 1H) 6,17 (dd, $J = 2,3$ e 11,4 Hz, 1H)
4	136,2	-	136,2	-
5	97,5	9,33 (s, 1H)	97,3	9,36 (s, 1H)
6	155,6	-	155,5	-
7	136,1	-	136,1	-
7 ¹	11,3	3,19 (s, 3H)	11,2	3,21 (s, 3H)
8	145,2	-	145,2	-
8 ¹	19,4	3,63 (m, 2H)	19,7	3,66 (q, $J = 8,4$ Hz, 2H)
8 ²	16,3	1,67 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H)	16,3	1,68 (t, $J = 8,4$ Hz, 3H)
9	150,9	-	151,0	-
10	104,4	9,48 (s, 1H)	104,4	9,50 (s, 1H)
11	137,9	-	137,9	-
12	128,9	-	129,1	-
12 ¹	12,2	3,67 (s, 3H)	12,2	3,68 (s, 3H)
13	128,9	-	129,0	-
13 ¹	189,6	-	189,6	-
13 ²	64,6	6,25 (s, 1H)	64,7	6,26 (s, 1H)
13 ³	172,9	-	173,0	-
13 ⁴	52,9	3,87 (s, 3H)	53,0	3,88 (s, 3H)
14	149,6	-	150,0	-
15	105,2	-	105,2	-
16	161,2	-	161,3	-
17	51,1	4,19 (dl, $J = 8,4$ Hz, 1H)	51,1	4,20 (m, 1H)
17 ¹	29,7	-	29,8	-
17 ²	31,2	-	31,2	-
17 ³	172,2	-	172,0	-
18	50,1	4,44 (m, 1H)	50,1	4,45 (m, 1H)
18 ¹	23,1	-	22,7	1,80 (d, $J = 7,6$ Hz, 3H)
19	169,6	-	170,0	-
20	93,1	8,54 (s, 1H)	93,1	8,55 (s, 1H)
P1	61,5	4,44 (m, 2H)	61,0	4,35 (dd, $J = 5,3$ e 7,7 Hz, 2H)
P2	117,7	5,12 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H)	118,0	5,10 (t, $J = 5,3$ Hz, 1H)
P3	142,0	-	142,0	-
P3 ¹	17,4	1,56 (sl, 3H)	16,7	1,56 (sl, 3H)
P4	39,8	-	39,8	1,87 (m, 2H)
P5	25,0	-	25,0	1,29 (m, 2H)
P6	36,6	-	36,6	0,97 (m, 2H)
P7	32,7	-	32,8	1,29 (m, 1H)
P7 ¹	19,7	0,76 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H)	19,6	0,76 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)
P8	37,4	-	37,4	1,24 (m, 2H)
P9	24,4	-	24,4	1,24 (m, 2H)
P10	37,3	-	37,3	0,97 (m, 2H)
P11	32,6	-	32,6	1,24 (m, 1H)
P11 ¹	19,7	0,78 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H)	19,7	0,79 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)
P12	37,2	-	37,3	0,97 (m, 2H)
P13	24,8	-	24,8	1,65 (m, 2H)
P14	39,3	-	39,4	1,10 (m, 2H)
P15	27,9	-	27,9	1,52 (m, 1H)
P15 ¹	22,7	0,83 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H)	22,7	0,83 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)
P16	22,6	0,83 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H)	22,6	0,83 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)
-NH	-	-1,48 (sl, 1H) e -1,66 (sl, 1H)	-	-

Assim, a análise dos espectros de IV e RMN de ^1H e ^{13}C unidimensionais de Bv-8, bem como, a comparação com os dados da literatura permitiram identificá-la como sendo a **feofitina a**. O relato desta substância no reino vegetal é bastante escasso, no entanto, ela já foi isolada de espécies da família Rubiaceae, sendo o primeiro relato no gênero *Borreria*.



Feofitina a

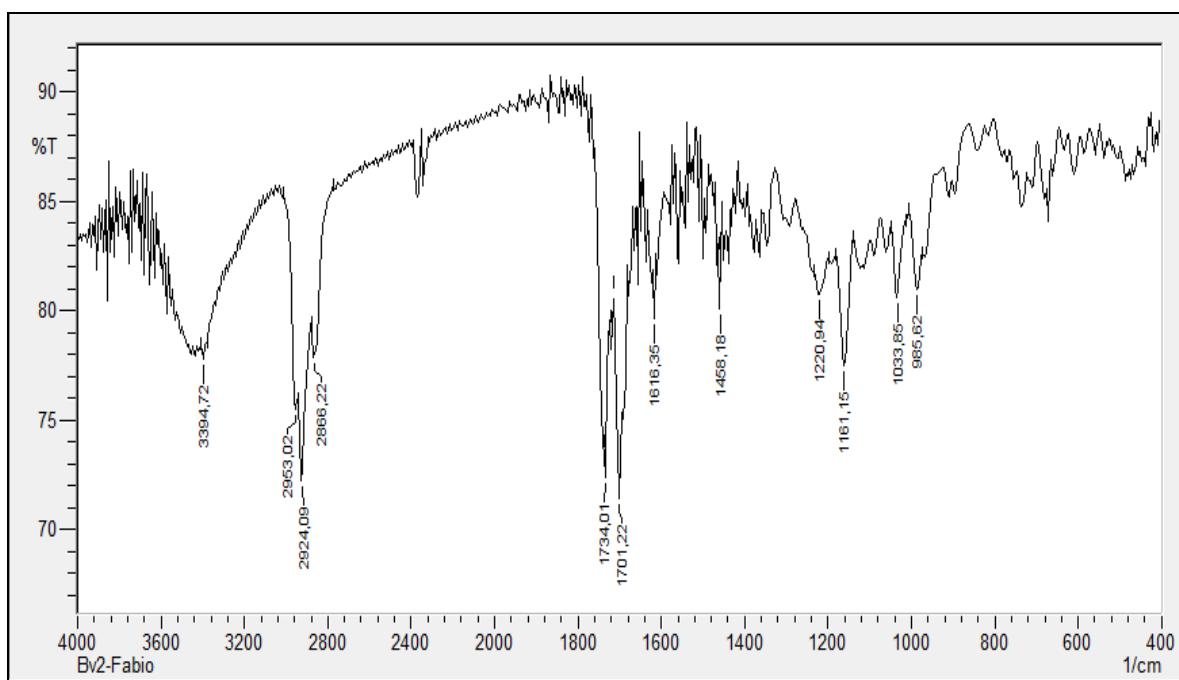


Figura 72. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de Bv-8.

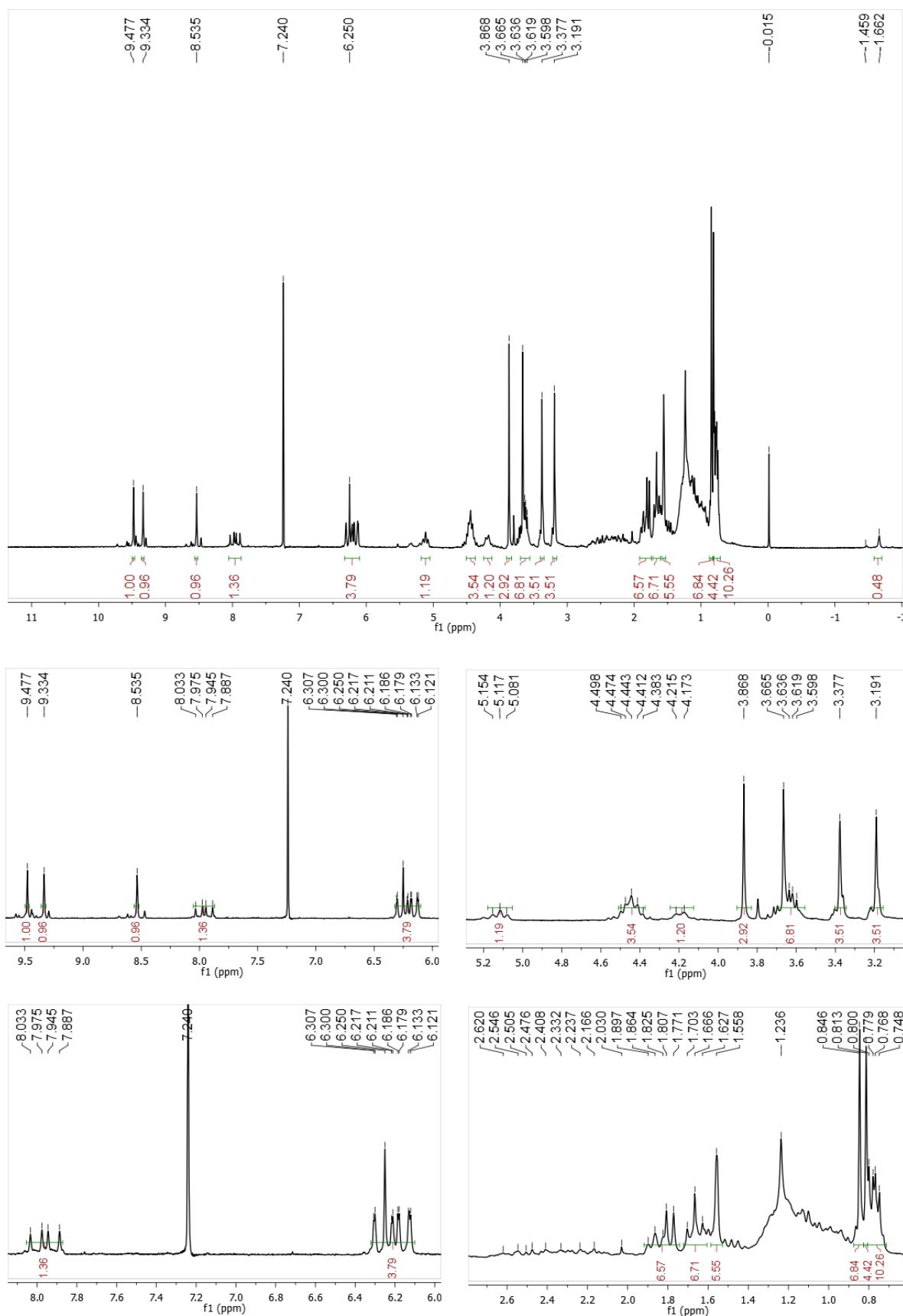


Figura 73. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de Bv-8.

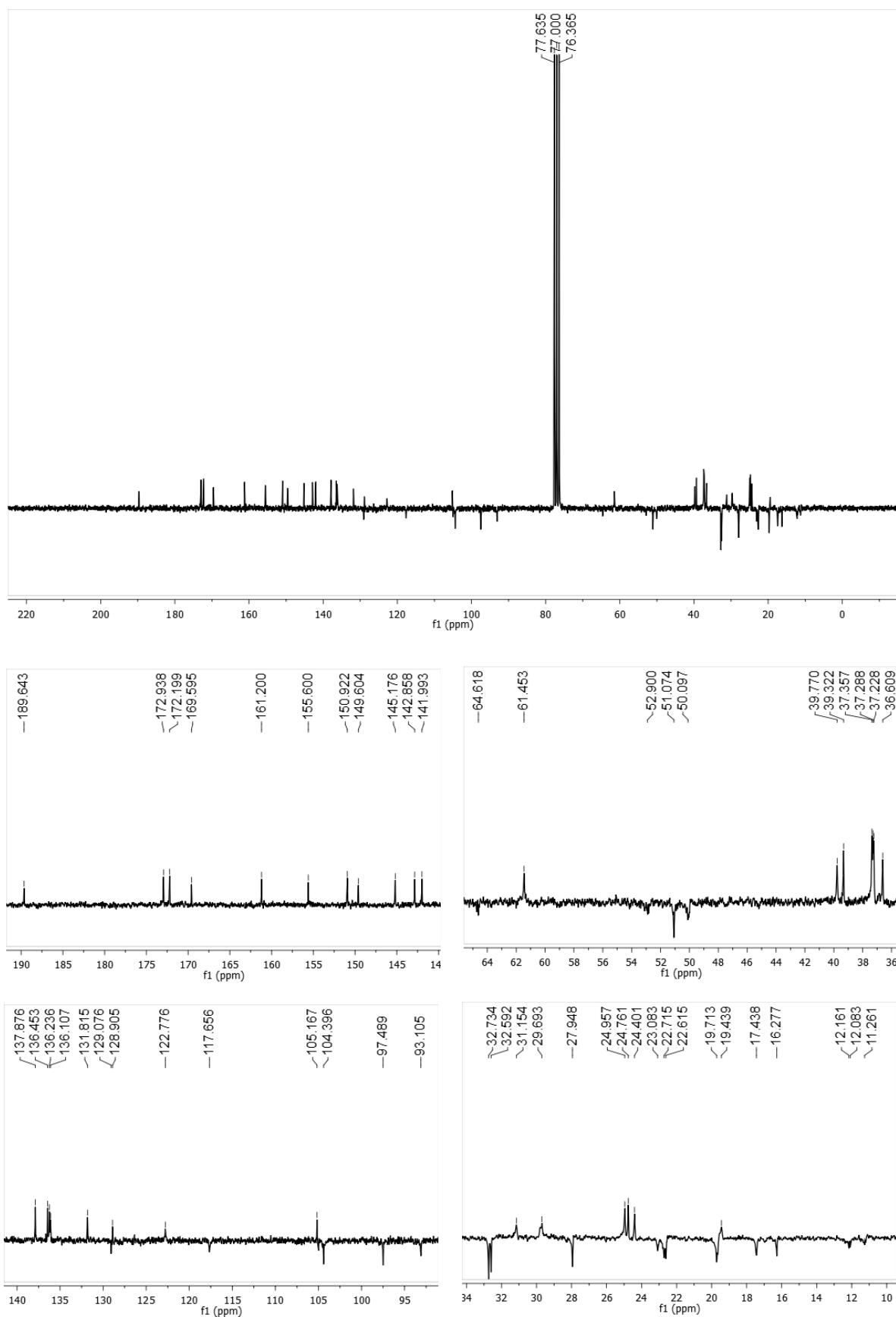


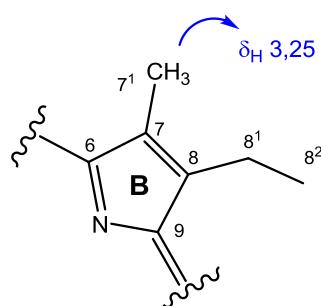
Figura 74. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de Bv-8.

5.9. Determinação estrutural de Bv-9

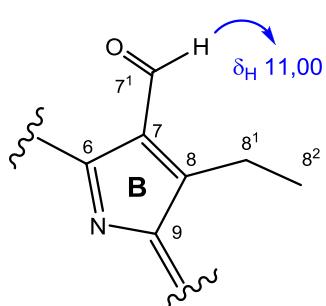
Assim como Bv-8, os espectros de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente, CDCl_3) de Bv-9 (Figuras 76 e 77, pág. 118 e 119) apresentaram sinais que permitiram sugerir que a substância em questão também pertencia ao grupo das feofitinas uma vez que é possível observar sinais para o esqueleto porfirínico, os dois hidrogênios N-H pirrólicos, a cadeia fitílica em C-17³ e o anel E do tipo ciclopentanona não hidroxilada (Tabela 11, pág. 116).

No entanto, ausência de singlet para metila em C-7 em aproximadamente δ_{H} 3,25, bem como, a presença de um singlet em δ_{H} 11,00 (Figura 76, pág. 118) e do sinal para carbono metínico em δ_{C} 187,4 (Figura 77, pág. 119) permitiram classificar a feofitina como do tipo *b*, uma vez que estes sinais correspondem ao hidrogênio H-7¹ e ao carbono C-7¹, respectivamente, do grupo aldeído inserido em C-7 (BUCHANAN et al., 1996; SCHWIKKARD et al., 1998). O espectro de IV (Figura 75, pág. 117) fortaleceu tal classificação ao mostrar absorções em 2725 e 1653 cm^{-1} característicos de estiramento de C-H e C=O da função aldeído, respectivamente (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

Características físico-químicas de Bv-9	
Estado físico	Sólido
Forma	Amorfo marrom
Solubilidade	CH_2Cl_2
Massa/Rendimento	19,0 mg / 0,19 %
Ponto de fusão	109-110 °C
Fluorescência (254 nm)	Negro
Fluorescência (366 nm)	Negro
Fator de retenção (R_f)	0,17 (Hex/AcOEt 8:2)



Derivado porfirínico a

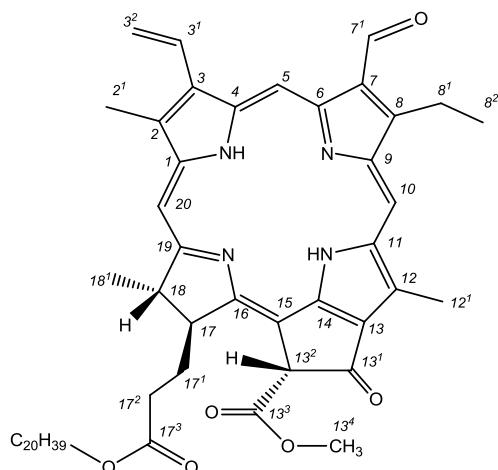


Derivado porfirínico b

Tabela 11. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz, respectivamente, em CDCl_3) para Bv-9 e da Feofitina *b* citados por Schwikkard e colaboradores (1998) (300 e 75 MHz, respectivamente, CDCl_3).

C	Bv-9		Feofitina <i>b</i>	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	143,4	-	143,5	-
2	132,1	-	132,3	-
2 ¹	12,1	3,35 (s, 3H)	12,1	3,39 (s, 3H)
3	137,7	-	137,5	-
3 ¹	128,5	7,94 (dd, $J = 11,8$ e 18,0 Hz, 1H)	128,6	7,98 (dd, $J = 11,4$ e 15,2 Hz, 1H)
3 ²	123,4	6,33 (dd, $J = 18,0$ Hz, 1H) 6,13 (dd, $J = 11,2$ Hz, 1H)	123,3	6,35 (dd, $J = 2,3$ e 15,2 Hz, 1H) 6,20 (dd, $J = 2,3$ e 11,4 Hz, 1H)
4	136,9	-	136,9	-
5	101,3	10,21 (s, 1H)	101,5	10,28 (s, 1H)
6	151,6	-	151,0	-
7	132,5	-	132,5	-
7 ¹	187,4	11,00 (s, 1H)	187,1	11,07 (s, 1H)
8	159,2	-	158,8	-
8 ¹	18,6	3,88 (m, 2H)	18,5	3,66 (q, $J = 8,4$ Hz, 2H)
8 ²	19,3	1,73 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H)	19,5	1,68 (t, $J = 8,4$ Hz, 3H)
9	146,9	-	146,8	-
10	106,7	9,47 (s, 1H)	106,5	9,57 (s, 1H)
11	137,7	-	137,9	-
12	132,1	-	132,2	-
12 ¹	12,0	3,62 (s, 3H)	11,9	3,65 (s, 3H)
13	129,6	-	129,7	-
13 ¹	189,5	-	189,6	-
13 ²	64,6	6,22 (s, 1H)	64,7	6,20 (s, 1H)
13 ³	169,3	-	169,5	-
13 ⁴	53,0	3,90 (s, 3H)	53,0	3,88 (s, 3H)
14	150,6	-	150,8	-
15	104,8	-	105,1	-
16	163,9	-	164,0	-
17	51,3	4,18 (m, 1H)	51,5	4,15 (m, 1H)
17 ¹	31,2	-	31,3	-
17 ²	29,7	-	29,8	-
17 ³	173,9	-	174,0	-
18	50,1	4,47 (m, 1H)	50,0	4,45 (m, 1H)
18 ¹	23,1	1,82 (d, $J = 7,2$ Hz)	23,1	1,80 (d, $J = 7,6$ Hz, 3H)
19	172,8	-	173,0 xx	-
20	93,3	8,51 (s, 1H)	93,1	8,55 (s, 1H)
P1	61,5	4,47 (m, 2H)	61,0	4,35 (dd, $J = 5,3$ e 7,7 Hz, 2H)
P2	117,7	5,14 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H)	118,0	5,10 (t, $J = 5,3$ Hz, 1H)
P3	143,0	-	142,0	-
P3 ¹	16,3	1,57 (sl, 3H)	16,7	1,56 (sl, 3H)
P4	39,8	-	39,8	-
P5	25,0	-	25,0	-
P6	36,6	-	36,6	-
P7	32,7	-	32,8	-
P7 ¹	19,6	0,77 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H)	19,6	0,76 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)
P8	37,3	-	37,4	-
P9	24,4	-	24,4	-
P10	37,3	-	37,3	-
P11	32,6	-	32,6	-
P11 ¹	19,7	0,78 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H)	19,7	0,79 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)
P12	37,3	-	37,3	-
P13	24,7	-	24,8	-
P14	39,3	-	39,4	-
P15	27,9	-	27,9	-
P15 ¹	22,7	0,82 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H)	22,7	0,83 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)
P16	22,6	0,82 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H)	22,6	0,83 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)
-NH	-	-1,42 (sl, 1H) e -1,65 (sl, 1H)	-	-

Assim, a análise dos espectros de IV e RMN de ^1H e ^{13}C unidimensionais de Bv-9, bem como, a comparação com os dados da literatura (Tabela 11, pág. 116) permitiram identificá-la como sendo a **feofitina b**. O relato desta substância no reino vegetal é bastante escasso e trata-se do primeiro relato na família Rubiaceae.



Feofitina b

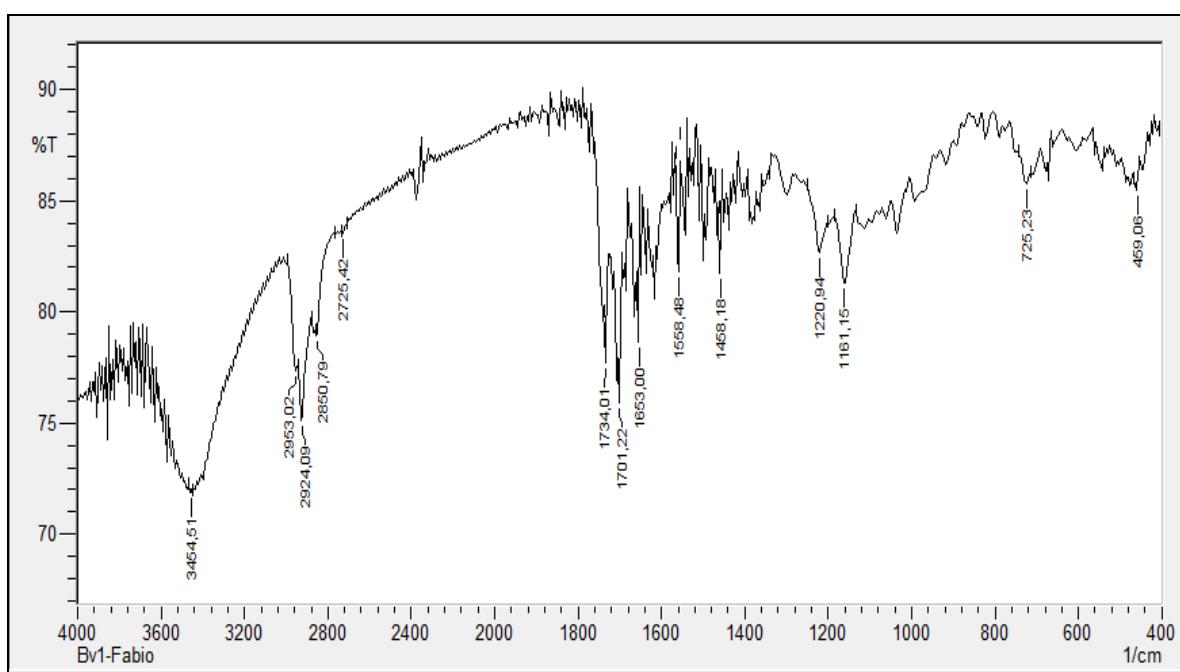


Figura 75. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de Bv-9.

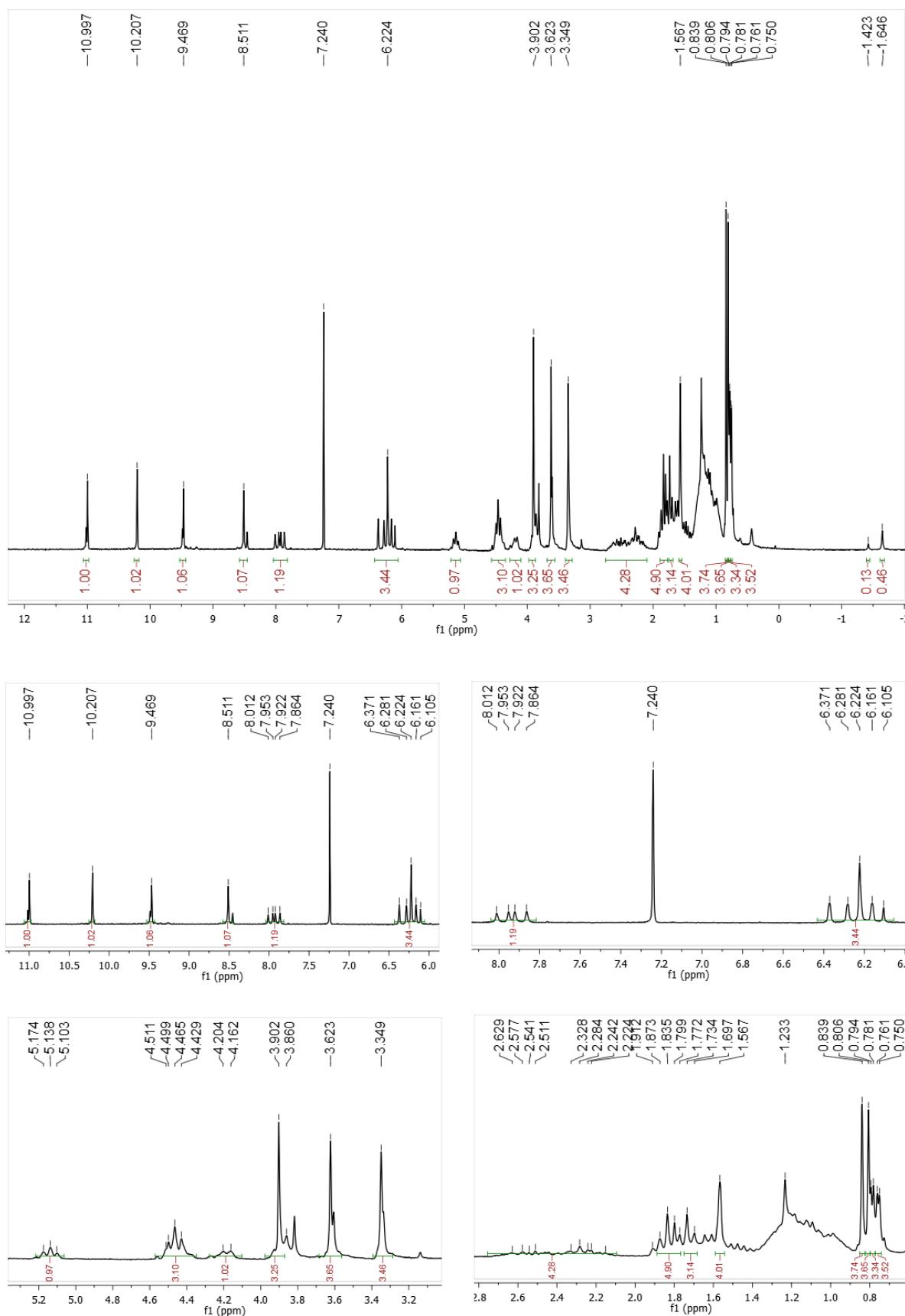


Figura 76. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de Bv-9.

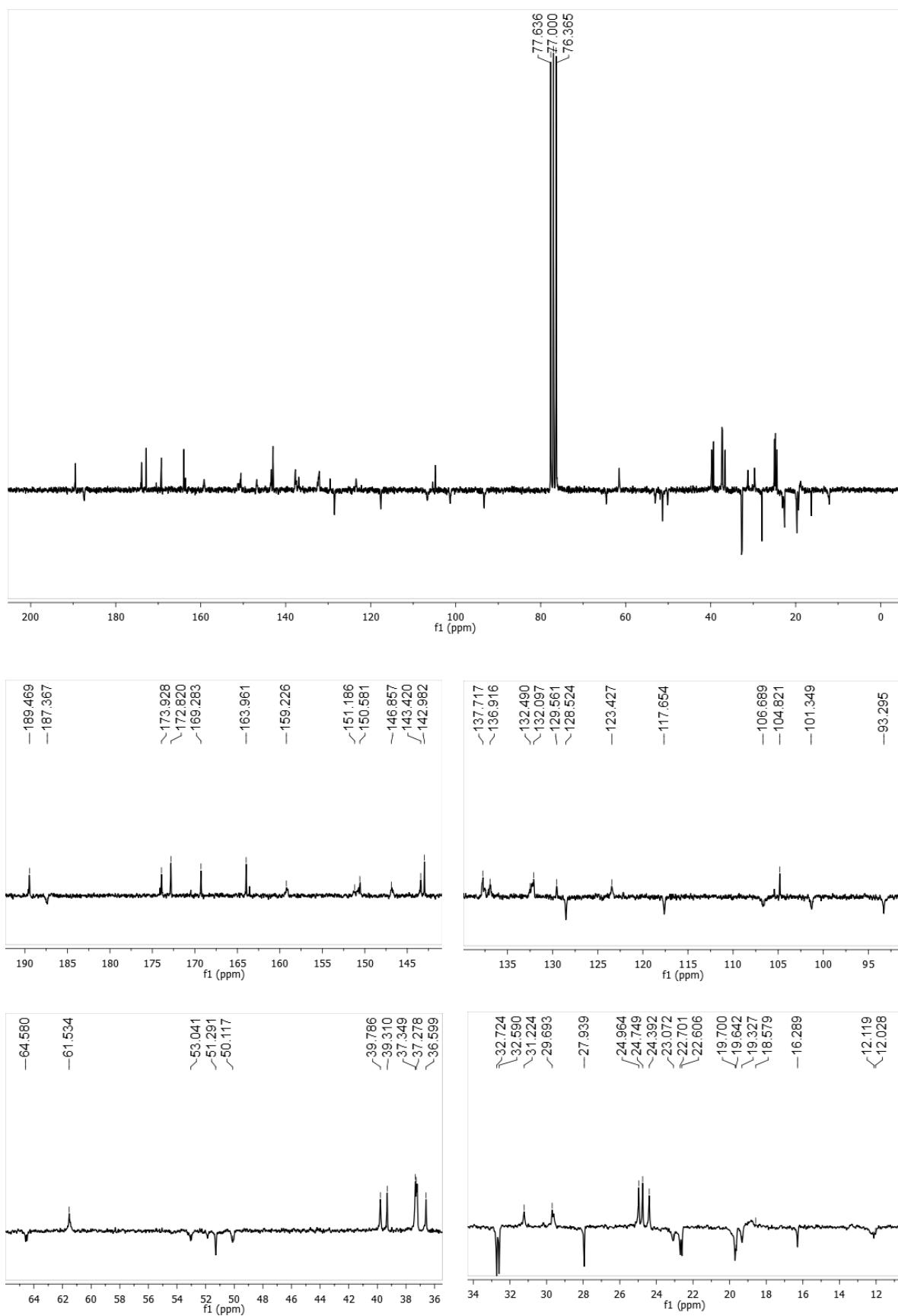


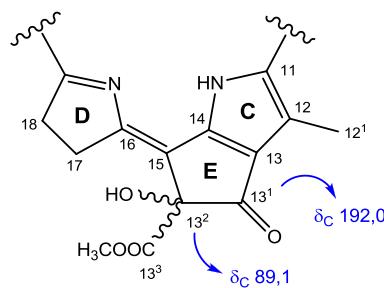
Figura 77. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de Bv-9.

5.10. Determinação estrutural de Bv-10

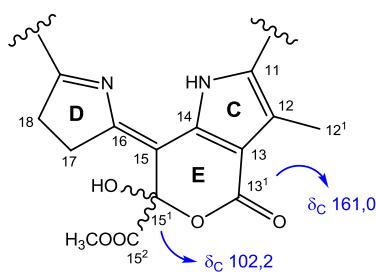
De forma semelhante a Bv-8, os espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente, CDCl_3) de Bv-10 (Figuras 79 e 80, pág. 124 e 125) também apresentaram sinais que permitiram sugerir que a substância pertencia ao grupo das feofitinas a uma vez que é possível observar sinais para o esqueleto porfirínico, os hidrogênios da metila inserida em C-7, os dois hidrogênios N-H pirrólicos e a cadeia fitílica em C-17³ (Tabela 12, pág. 122).

Apesar disso, o espectro de RMN ^{13}C (Figura 80, pág. 125) não apresentou os sinais característicos de anel E do tipo ciclopentanona como em Bv-8 e Bv-9. Vários esqueletos carbônicos são relatados na literatura para o anel E dos derivados porfirínicos, um exemplo é o anel δ -lactona conjugada que, segundo alguns autores, trata-se de um produto de alomerização daqueles compostos que possuem sistema de anel ciclopentanona (OCAMPO; REPETA, 2004; HUANG et al., 2007). Neste tipo de anel, a carbonila cetônica foi convertida em carbonila de éster e o sinal deslocado para aproximadamente δ_{C} 161,0. O carbono C-15¹, outrora denominado C-13² (antes da alomerização), apresenta-se hidroxilado em todos os relatos e o sinal aparece em torno de δ_{C} 102,2.

Características físico-químicas de Bv-10	
Estado físico	Sólido
Forma	Amorfo verde
Solubilidade	CH_2Cl_2
Massa/Rendimento	14,0 mg / 0,14 %
Ponto de fusão	171-172 °C
Fluorescência (254 nm)	Negro
Fluorescência (366 nm)	Negro
Fator de retenção (R_f)	0,15 (Hex/AcOEt 7:3)



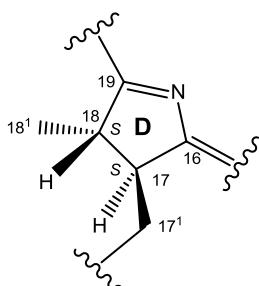
Anel E cícopentanona



Anel E δ-lactona conjugada

Este tipo de anel foi verificado para Bv-10 pela presença de sinais, no espectro de RMN ^{13}C (Figura 80, pág. 125), em δ_{C} 160,9 para carbonila conjugada e em δ_{C} 102,0 para carbono não hidrogenado. Isto explica o fato do espectro de IV (Figura 78, pág. 123) desta substância só apresentar absorção para carbonila de éster em 1734 cm^{-1} . Outros sinais também corroboraram com as atribuições feitas ao mostrar, no espectro de RMN ^1H (Figura 79, pág. 124), um singuleto largo em δ_{H} 6,13 atribuído ao hidrogênio da hidroxila em C-15¹ e outro singuleto em δ_{H} 3,74 que, juntamente com o sinal em δ_{C} 54,1, confirmaram a presença de hidrogênios e carbono da metoxila em C-15³.

A estereoquímica do anel D foi definida como 17S e 18S (igual ao de outras feofitinas) pela observação de um duplo-duplo em δ_{H} 4,07 ($J = 2,0$ e $9,0\text{ Hz}$) para o H-17 que só apresenta esta multiplicidade quando não há acoplamento ($J = 0\text{ Hz}$) entre eles e H-18. E isto só é possível quando o ângulo diedro entre esses dois átomos vicinais é de 90° (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010), ou seja, quando a orientação espacial desses hidrogênios for *trans* (HUANG et al., 2007).



A configuração de C-15¹ também foi determinada como S, baseado na blindagem apresentada pelo hidrogênio H-17 (δ_{H} 4,07) (Figura 79, pág. 124), em contraste com δ_{H} 4,82 para a configuração R (NAKATANI et al., 1981; HUANG et al., 2007; KOBAYASHI et al., 1991).

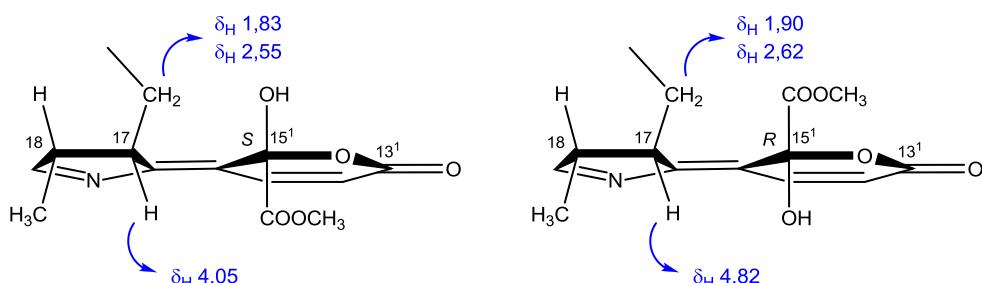
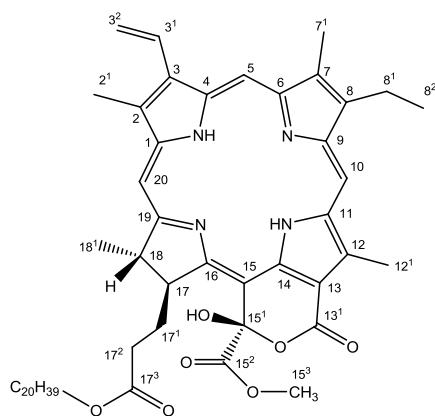


Tabela 12. Dados de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente, em CDCl_3) para Bv-10 e da porfirinolactona (400 e 100 MHz, respectivamente, em CDCl_3) citado por National (2004).

C	Bv-10		15 ¹ -hidroxi-(15 ¹ -S)-porfirinolactona a.	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	141,2	-	141,5	-
2	131,6	-	131,8	-
2 ¹	12,1	3,42 (s, 3H)	12,3	3,44
3	136,1	-	136,3	-
3 ¹	129,0	7,99 (dd, $J = 11,5$ e 18,0 Hz, 1H)	129,2	8,02
3 ²	122,7	6,32 (dd, $J = 1,5$ e 18,0 Hz, 1H) 6,16 (dd, $J = 1,5$ e 11,5 Hz, 1H)	123,0	6,34 6,17
4	136,0	-	136,3	-
5	99,7	9,52 (s, 1H)	99,9	9,55 (s)
6	155,7	-	155,6	-
7	136,5	-	136,7	-
7 ¹	11,3	3,25 (s, 3H)	11,5	3,28
8	145,6	-	145,8	-
8 ¹	19,6	3,74 (q, $J = 9,0$ e 15,5 Hz, 2H)	19,8	3,76
8 ²	17,5	1,70 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H)	17,8	1,72
9	150,0	-	149,9	-
10	104,1	9,74 (s, 1H)	104,4	9,77 (s)
11	138,7	-	139,0	-
12	131,4	-	131,7	-
12 ¹	12,4	3,88 (s, 3H)	12,7	3,92
13	111,4	-	111,6	-
13 ¹	160,9	-	161,2	-
14	145,6	-	145,8	-
15	134,8	-	135,0	-
15 ¹	102,0	-	102,2	-
15 ²	170,9	-	171,1	-
15 ³	54,1	3,74 (s, 3H)	54,4	3,76
16	166,3	-	166,5	-
17	53,8	4,07 (dd, $J = 2,0$ e 9,0 Hz, 1H)	53,9	4,05 e 4,96
17 ¹	32,2	1,87 (m, 1H) e 2,56 (m, 1H)	32,3	1,83 e 2,55
17 ²	31,4	2,17 (m, 1H) e 2,43 (m, 1H)	31,5	2,46
17 ³	173,2	-	173,6	-
18	50,2	4,44 (q, $J = 6,0$ e 13,5 Hz, 1H)	50,4	4,43
18 ¹	22,2	1,58 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H)	22,5	1,61
19	171,1	-	171,4	-
20	93,9	8,69 (s, 1H)	94,1	8,71 (s)
P1	61,5	4,43 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H)	61,8	4,42
P2	117,8	5,13 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H)	119,9	5,12
P3	142,8	-	142,4	-
P3 ¹	16,3	1,56 (sI, 3H)	16,7	1,58
P4	39,8	-	40,5	-
P5	25,0	-	?	-
P6	36,6	-	?	-
P7	32,8	-	?	-
P7 ¹	19,6	0,76 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	20,4	0,77 (d, $J = 6,9$ Hz)
P8	37,4	-	?	-
P9	24,4	-	?	-
P10	37,3	-	?	-
P11	32,6	-	?	-
P11 ¹	19,7	0,79 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	20,4	0,80 (d, $J = 6,4$ Hz)
P12	37,3	-	?	-
P13	24,8	-	?	-
P14	39,4	-	?	1,11
P15	27,9	-	?	1,49
P15 ¹	22,7	0,83 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	23,4	0,84 (d, $J = 6,8$ Hz)
P16	22,6	0,83 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)	23,3	0,84 (d, $J = 6,8$ Hz)
15 ¹ -OH	-	6,13 (sI, 1H)	?	6,12 (sI, 1H)
21-NH	-	-1,09 (sI, 1H)	-	-1,11
23-NH	-	-1,44 (sI, 1H)	-	-1,49

Assim, a análise dos espectros de IV e RMN de ^1H e ^{13}C unidimensionais de Bv-10, bem como, a comparação com os dados da literatura (Tabela 12, pág. 122) permitiram identificá-la como sendo a **15 1 -hidroxi-(15 1 -S)-porfirinolactona a**. Esta substância já foi isolada das folhas do bambu *Phyllostachys pubescens* (Poaceae) (NATIONAL, 2004), de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae) (NUNES et al., 2008) e *Anisacanthus brasiliensis* Lindau (Acanthaceae) (DIAS et al., 2007). Na família Rubiaceae, já foi relatada em *Richardia brasiliensis* Gomes (TENÓRIO-SOUZA, 2009), no entanto, trata-se do primeiro relato no gênero *Borreria*.



15¹-hidroxi-(15¹-S)-porfirinolactona a

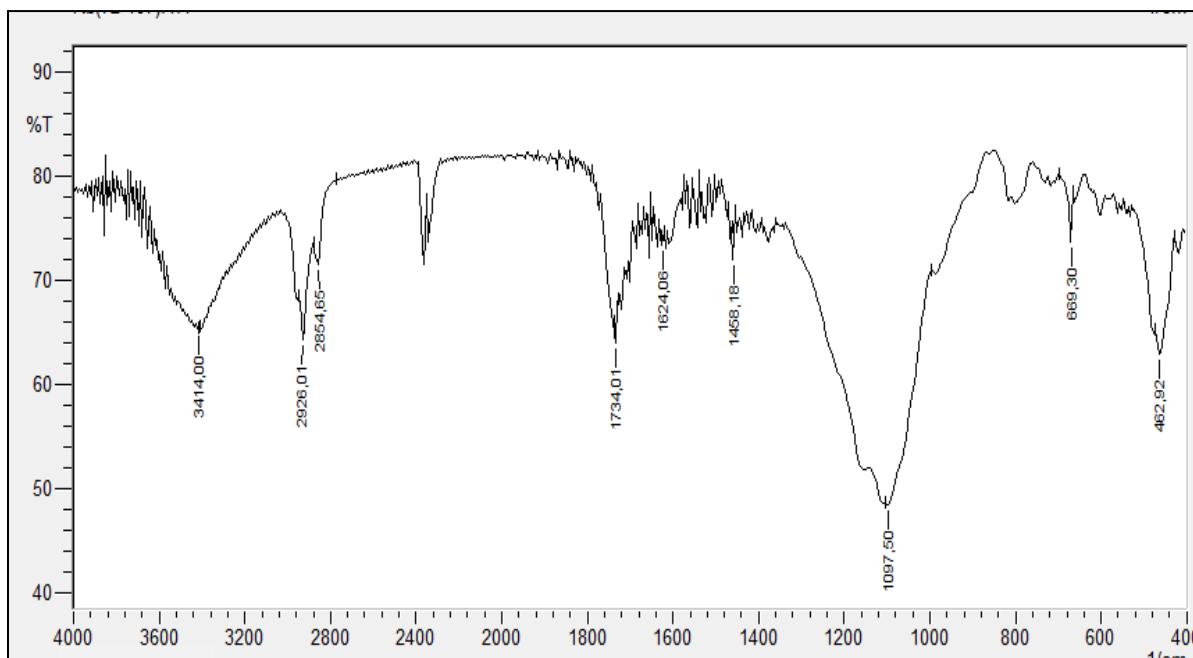


Figura 78. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de Bv-10.

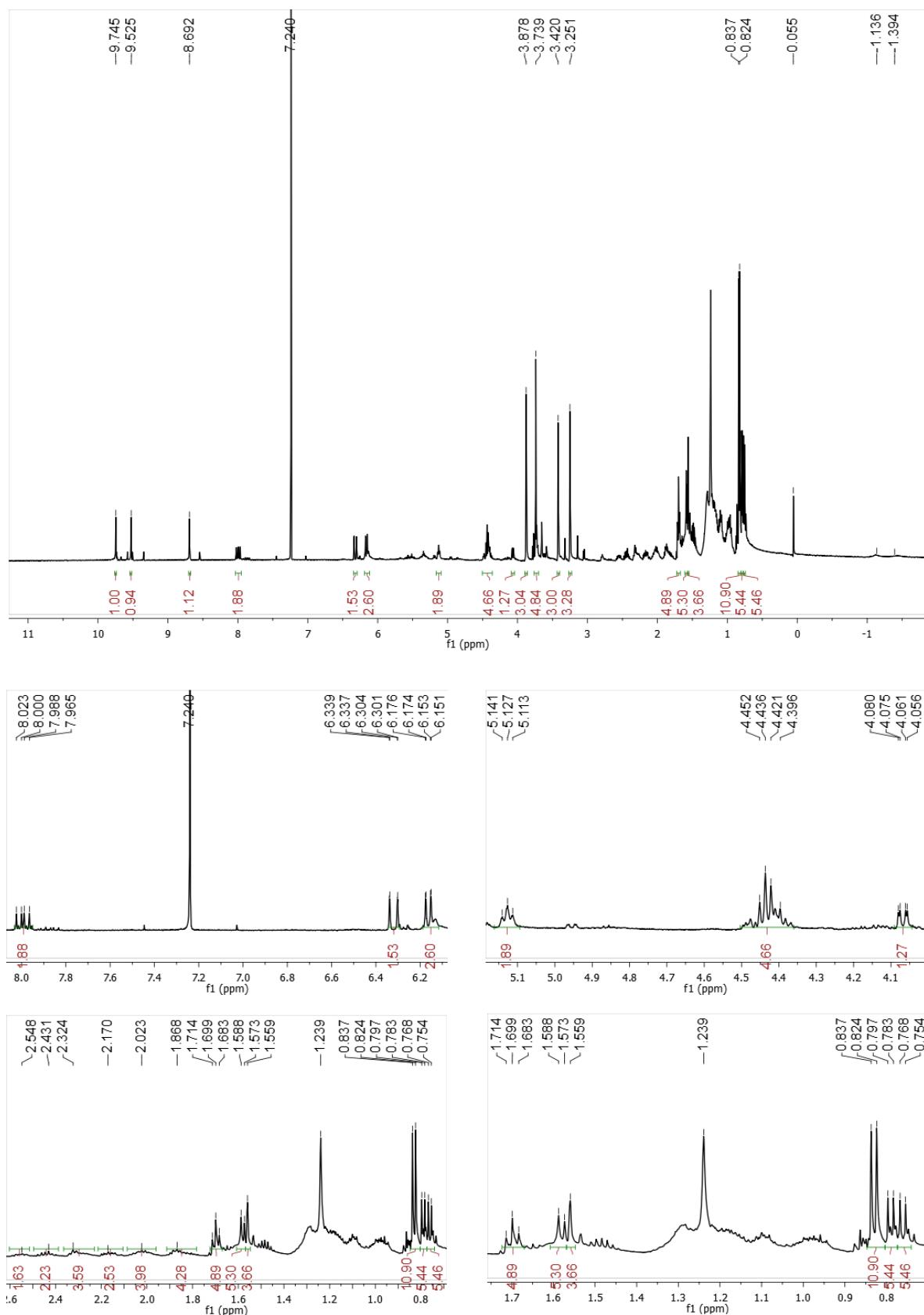


Figura 79. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Bv-10.

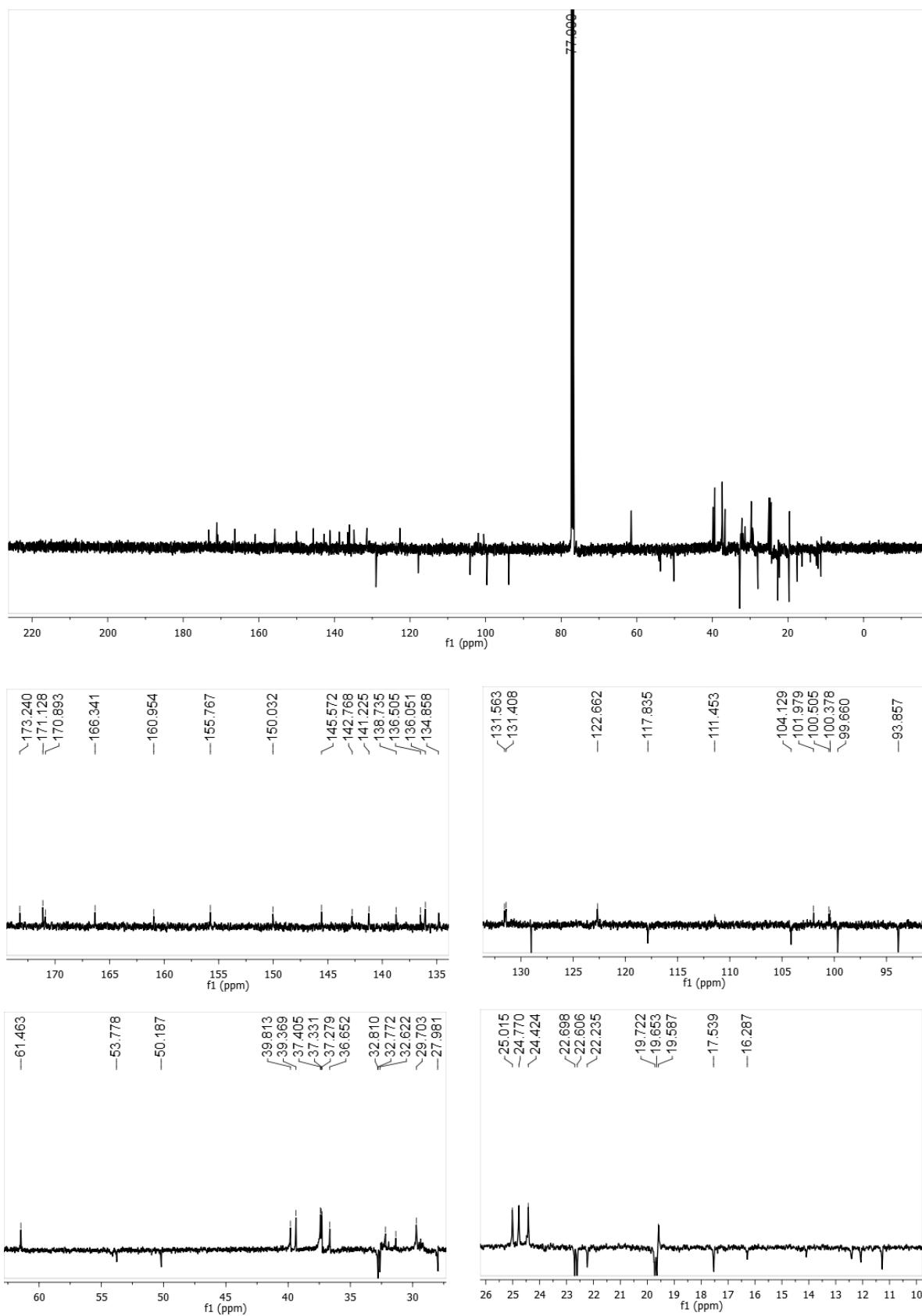


Figura 80. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de Bv-10.

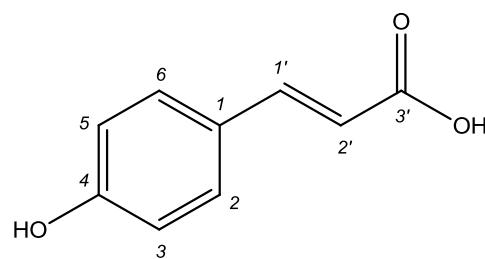
5.11. Determinação estrutural de Bo-1

No espectro de IV de Bo-1 (Figura 81, pág. 127), foram observadas absorções em 1541 e 1577 cm^{-1} característicos de C=C de aromáticos. No espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) (Figura 82, pág. 128), dois dupletos com integral para dois hidrogênios cada, acoplando *ortho* entre si, em δ_{H} 7,44 ($J = 8,5$ Hz) e 6,81 ($J = 8,5$ Hz) são condizentes com substâncias que apresentam sistema aromático AA'BB', sendo esses sinais característicos dos hidrogênios H-2/6 e H-3/5, respectivamente. Estes dados foram corroborados pela presença de dois sinais intensos no espectro de RMN ^{13}C – APT (125 MHz, CD_3OD) (Figura 83, pág. 128) em δ_{C} 131,0 (C-2/6) e 116,8 (C-3/5).

Ainda no espectro de RMN ^1H (Figura 82, pág. 128), outros dois dupletos com integral para um hidrogênio cada, acoplando *trans* entre si, em δ_{H} 7,59 ($J = 16,0$ Hz, H-1') e 6,27 ($J = 16,0$ Hz, H-2') e os sinais no espectro de RMN ^{13}C (Figura 83, pág. 128) em δ_{C} 171,2 (C-3', COOH), 146,6 (C-1') e 115,7 (C-2') foram sugestivos da presença do grupo carboxil *trans* α,β -insaturado. Absorção, no espectro de IV (Figura 81, pág. 127), em 1710 cm^{-1} de estiramento de C=O e outra larga em 3435 cm^{-1} para estiramento de O-H estendendo-se até aproximadamente 2400 cm^{-1} corroborou com os espectros de RMN para existência de função ácido carboxílico (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

A ausência de outros sinais nos espectros de RMN permitiu sugerir que o substituinte em C-4 do anel aromático tratava-se de uma hidroxila. Sendo assim, os dados de RMN ^1H e ^{13}C e comparação com os dados da literatura (Tabela 13, pág. 127) permitiram determinar a estrutura de Bo-1 como sendo ácido *p*-hidroxicinâmico, isolado pela primeira vez no gênero *Borreria*.

Características físico-químicas de Bo-1	
Estado físico	Sólido
Forma	Amorfo branco
Solubilidade	CH_3OH
Massa/Rendimento	47 mg / 0,47 %
Ponto de fusão	217-219 °C
Fluorescência (254 nm)	Lilás
Fluorescência (366 nm)	Negra
Fator de retenção (R_f)	0,33 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 99,9:0,1)



Ácido *p*-hidroxicinâmico

Tabela 13. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Bo-1, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente, CD_3OD), bem como, aqueles apresentados por Souza Filho e colaboradores (2005) para o ácido *p*-hidroxicinâmico (300 e 75 MHz, respectivamente, CD_3OD).

C	Bo-1		Ácido <i>p</i> -hidroxicinâmico	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	127,3	-	127,3	-
2 e 6	131,0	7,44 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz, 2H)	131,0	7,40 (<i>d</i> , $J = 8,7$ Hz, 2H)
3 e 5	116,8	6,81 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz, 2H)	116,8	6,80 (<i>d</i> , $J = 8,7$ Hz, 2H)
4	161,0	-	161,0	-
1'	146,6	7,59 (<i>d</i> , $J = 16,0$ Hz, 2H)	146,6	7,60 (<i>d</i> , $J = 15,9$ Hz, 2H)
2'	115,7	6,27 (<i>d</i> , $J = 16,0$ Hz, 2H)	115,7	6,30 (<i>d</i> , $J = 15,9$ Hz, 2H)
3'	171,2	-	171,2	-

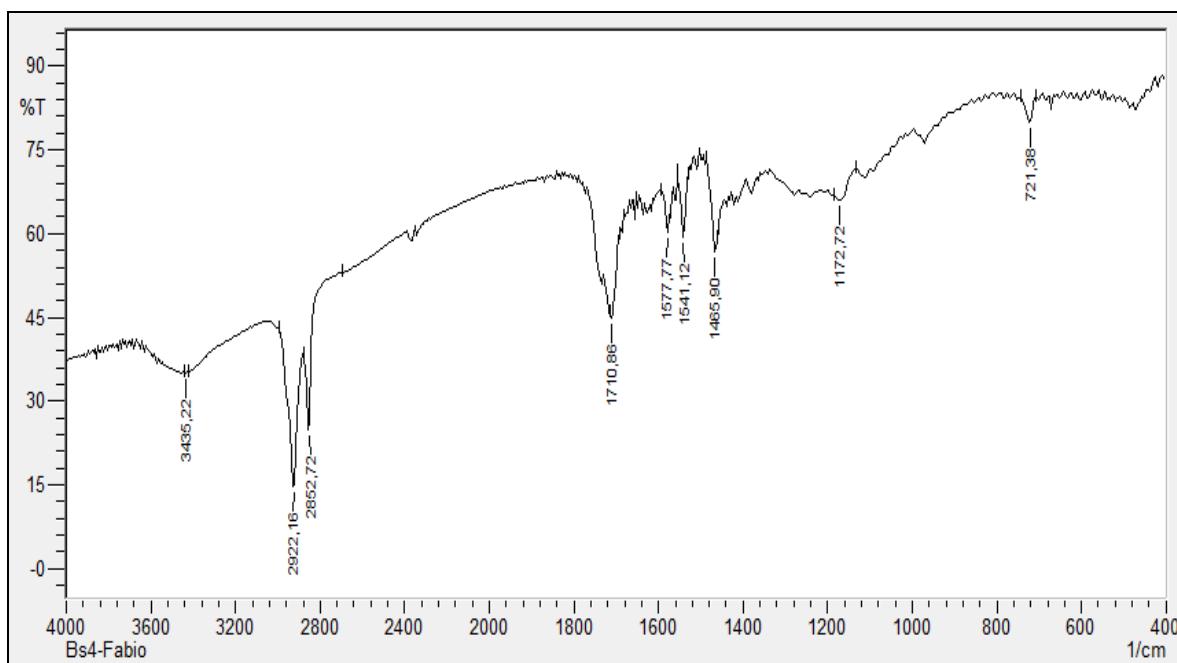


Figura 81. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de Bo-1.

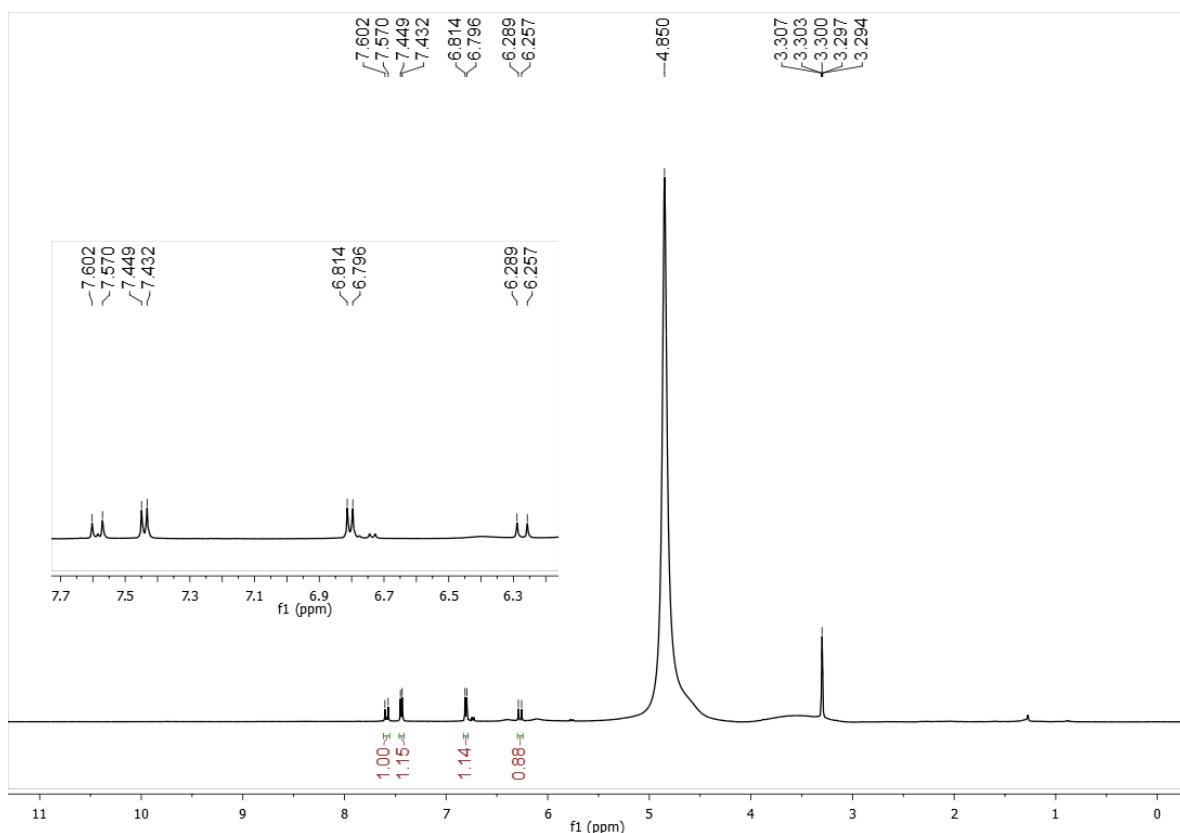


Figura 82. Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de Bo-1.

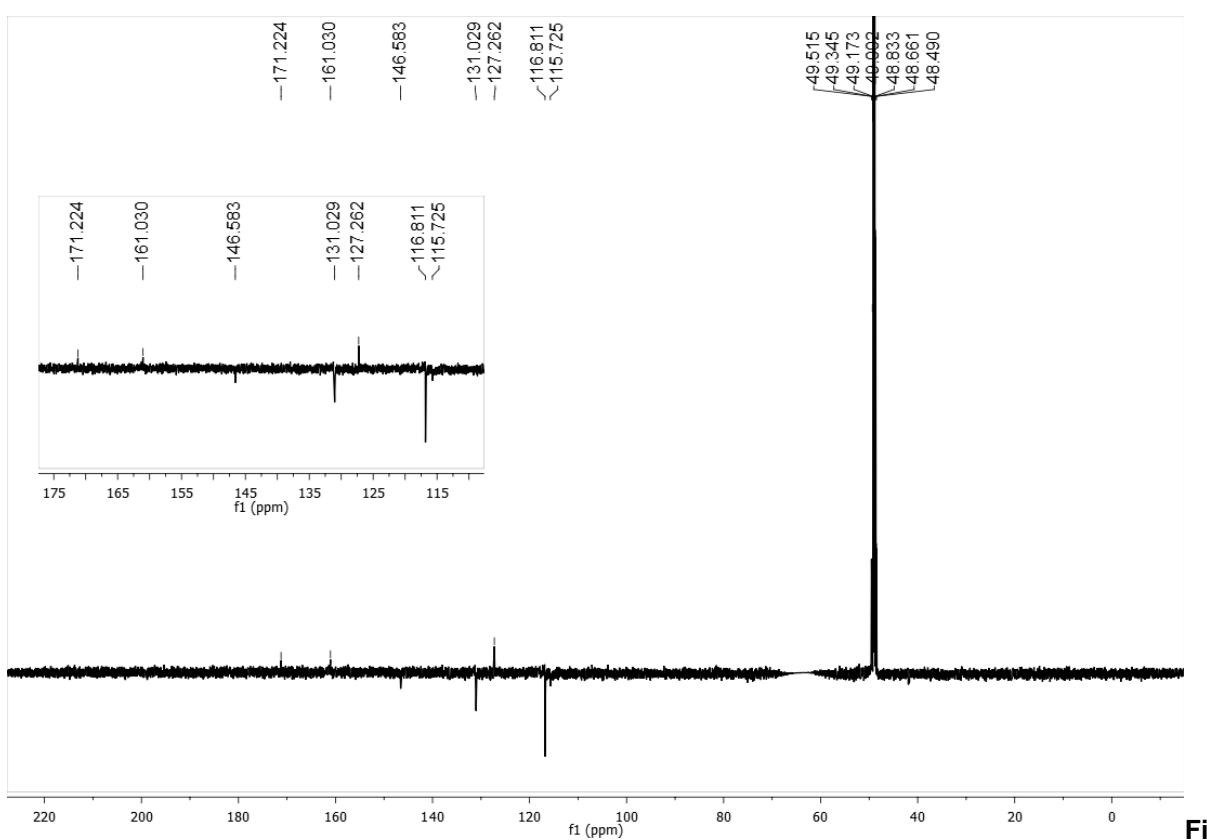


Figura 83. Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) de Bo-1.

5.12. Determinação estrutural de Bo-2

O espectro de IV (Figura 84, pág. 129) desta substância apresentou absorções em 1701 e 1608 cm^{-1} referentes aos estiramentos de C=O e C=C de alcenos conjugados, respectivamente, que juntas são compatíveis com estruturas que apresentam carbonila de éster α,β -insaturada. A proposta de um sistema aromático também pode ser sugerida pelas absorções atribuídas a estiramento de C=C de aromáticos em 1566 e 1508 cm^{-1} (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010). Estes dados indicam que a substância apresenta um grupo cromóforo o que justifica o composto apresentar fluorescência à luz ultravioleta.

Características físico-químicas de Bo-2	
Estado físico	Sólido
Forma	Cristais amarelos
Solubilidade	CH_2Cl_2
Massa/Rendimento	53 mg / 0,53 %
Ponto de fusão	190-191 °C
Fluorescência (254 nm)	Lilás forte
Fluorescência (366 nm)	Negra
Fator de retenção (R_f)	0,12 (Hex/AcOEt 8:2)

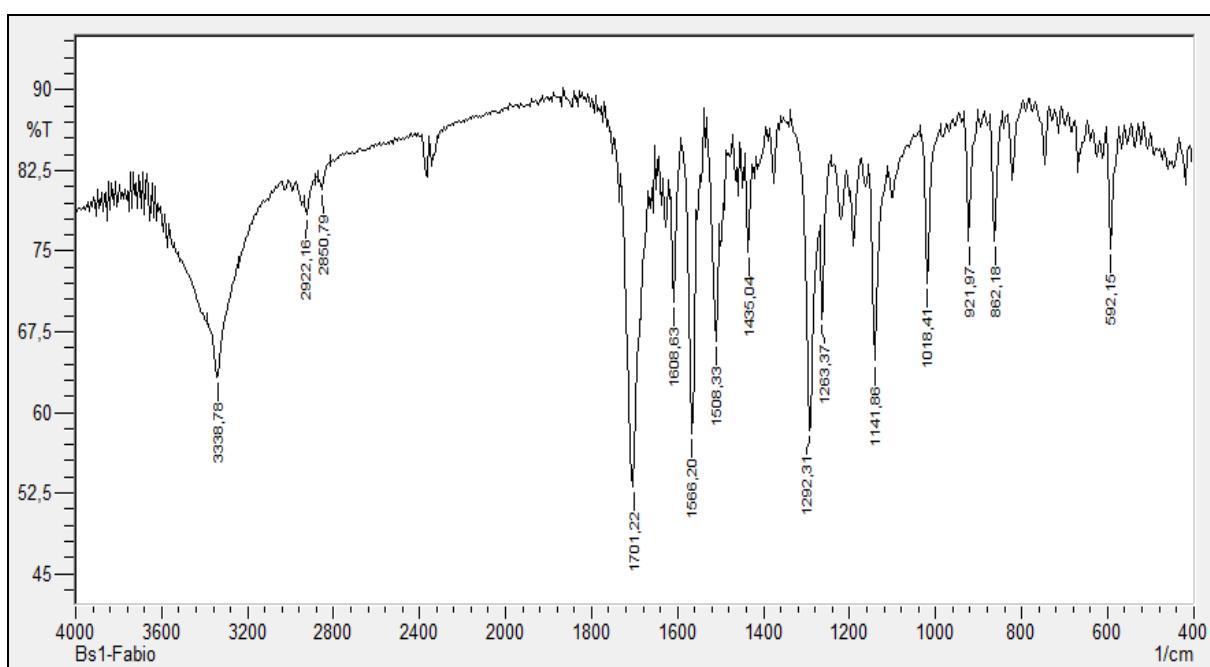
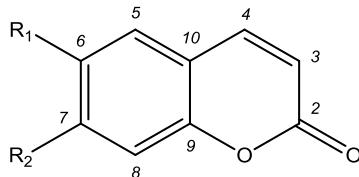


Figura 84. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de Bo-2.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Figura 85, pág. 132) exibiu deslocamentos químicos que, aliados as informações do espectro de IV, são característicos de substâncias que apresentam núcleo cumarínico: par de dupletos acoplando *cis* entre si em δ_{H} 7,57 ($J = 9,5$ Hz) e 6,24 ($J = 9,5$ Hz), correspondentes aos hidrogênios H-4 e H-3 do anel δ -lactônico α - β insaturado, respectivamente (CHEN et al., 2006; UM et al., 2003). Isto foi corroborado pelo espectro de RMN ^{13}C – APT (125 MHz, CDCl_3) (Figura 86, pág. 132) que apresentou sinais para carbonila lactônica em δ_{C} 161,4 (C-2) e para os carbonos α e β à carbonila em δ_{C} 113,4 (C-3) e 143,3 (C-4) (PELTER et al., 1976).

Singletos em δ_{H} 6,82 e 6,89 (Figura 85, pág. 132) permitiram sugerir que a cumarina em questão é 6,7-dissubstituída uma vez que estes sinais correspondem aos dos hidrogênios H-5 e H-8, respectivamente (PINTO et al., 2008).



Esqueleto cumarínico 6,7-dissubstituído

Os sinais em δ_{H} 3,93 (s) (Figura 85, pág. 132) e δ_{C} 56,4 (Figura 86, pág. 132) foram condizentes com a presença de metoxila na molécula (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010). A ausência de outros sinais nos espectros de RMN em adição à absorção, no espectro de IV (Figura 84, pág. 129), em 3338 cm^{-1} de estiramento de O-H (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010) permitiram sugerir que o segundo substituinte na molécula é uma hidroxila.

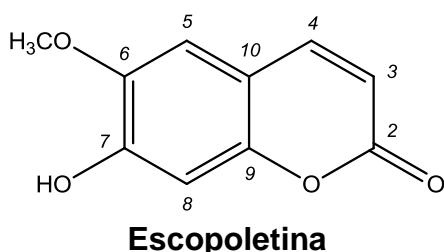
Sendo assim têm-se duas possibilidades estruturais para Bo-2 que variam conforme a posição dos substituintes: 7-hidroxi-6-metoxicumarina (escopoletina) e 6-hidroxi-7-metoxicumarina (isoescopoletina), cujas estruturas e dados de RMN ^1H e ^{13}C estão descritos na Tabela 14 (pág. 131):

Tabela 14. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Bo-2, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente, $CDCl_3$), bem como, aqueles apresentados por Pinto e colaboradores (2008) para escopoletina (200 e 50 MHz, respectivamente, $CDCl_3$) e por Jiang e colaboradores (1996) para isoescopoletina (400 e 100 MHz, respectivamente, $CDCl_3$).

C						
	Bo-2		Escopoletina		Isoescopoletina	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
2	161,4	-	161,4	-	160,8	-
3	113,4	6,24 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H)	113,3	6,24 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H)	109,6	6,18 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H)
4	143,3	7,57 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H)	143,3	7,58 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H)	144,4	7,86 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H)
5	107,5	6,82 (s, 1H)	107,4	6,82 (s, 1H)	111,6	7,16 (s, 1H)
6	144,1	-	143,9	-	145,3	-
7	149,7	-	149,6	-	151,8	-
8	103,2	6,89 (s, 1H)	103,1	6,89 (s, 1H)	102,7	6,75 (s, 1H)
9	150,3	-	150,2	-	149,5	-
10	111,5	-	111,4	-	110,5	-
H ₃ CO-6	56,4	3,93 (s, 3H)	56,3	3,93 (s, 3H)	?	3,80 (s, 3H)

Legenda: (d) duplo; (s) singlet.

Observando os dados de RMN 1H e ^{13}C e comparando-os com os dados da literatura (Tabela 14, pág. 131) pôde-se determinar a estrutura de Bo-2 como sendo 7-hidroxi-6-metoxicumarina, conhecida como escopoletina. Este resultado corresponde ao primeiro relato de cumarina no gênero *Borreria*.



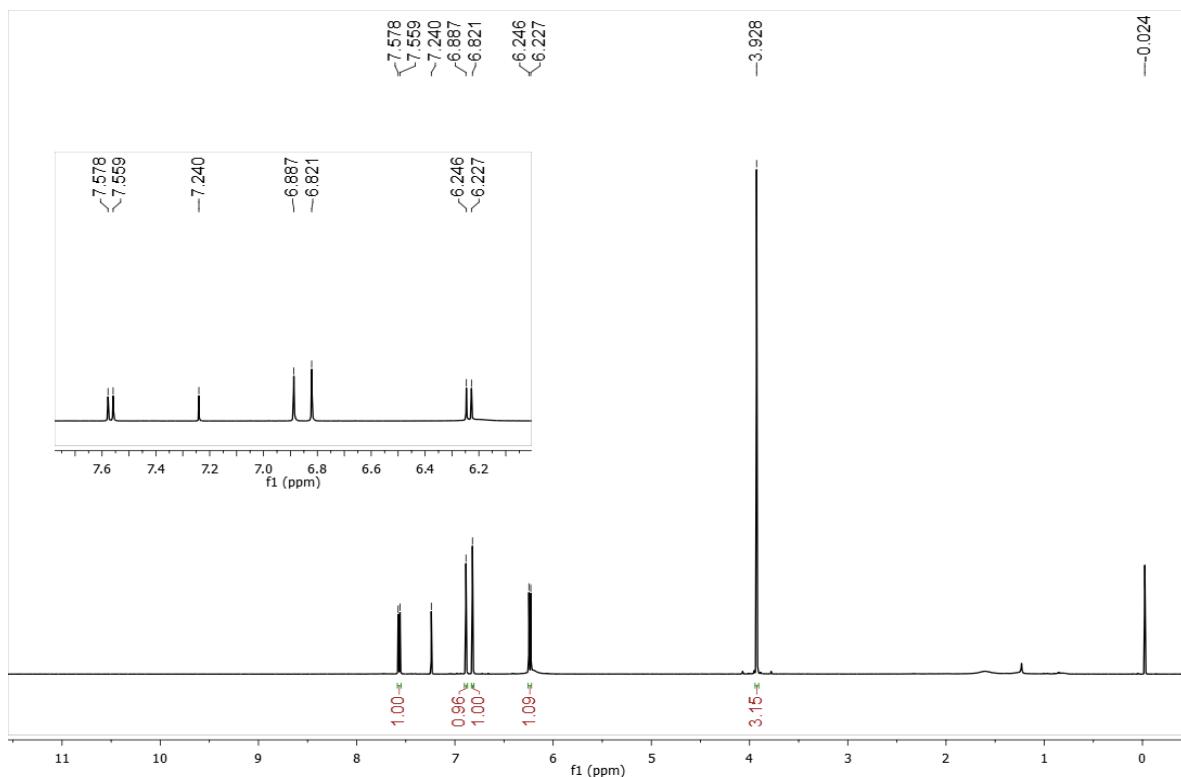


Figura 85. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Bo-2.

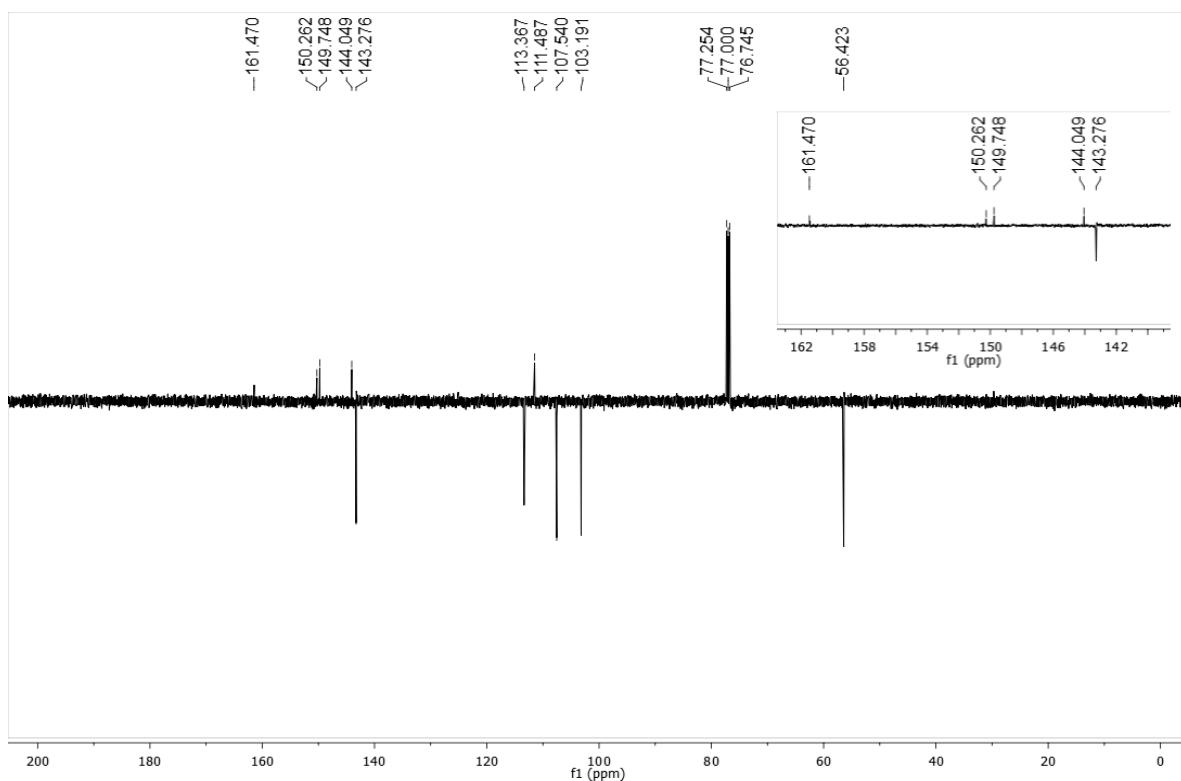


Figura 86. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de Bo-2.

5.13. Determinação estrutural de Bo-3

Assim como Bo-2, os espectros de RMN ^1H e ^{13}C -BB (500 e 125 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) (Figuras 87-89, pág. 134-135), também exibiram deslocamentos químicos para cumarinas: par de dupletos acoplando *cis* entre si em δ_{H} 7,86 ($J = 9,5$ Hz) e 6,16 ($J = 9,5$ Hz), correspondentes aos hidrogênios H-4 e H-3, respectivamente; e em δ_{C} 161,1 (C-2), 113,0 (C-3) e 144,7 (C-4).

Características físico-químicas de Bo-3	
Estado físico	Sólido
Forma	Amorfo branco
Solubilidade	CH_2Cl_2
Massa/Rendimento	17 mg / 0,12 %
Ponto de fusão	121-122 °C
Fluorescência (254 nm)	Lilás forte
Fluorescência (366 nm)	Negra
Fator de retenção (R_f)	0,10 (Hex/AcOEt 8:2)

Em adição, os espectros de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) (Figura 87 e 88, pág. 134 e 135) apresentaram um duplo dupletos em δ_{H} 6,84 ($J = 2,0$ e 8,5 Hz, H-6) acoplando *ortho* com um dupletos em δ_{H} 7,51 ($J = 8,5$ Hz, H-5) e *meta* com outro dupletos em δ_{H} 6,75 ($J = 2,0$ Hz, H-8) típicos de um sistema aromático ABX (PAVIA et al., 2010). Esta informação foi corroborada pelo espectro de RMN ^{13}C – BB (125 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) (Figura 89, pág. 135) ao mostrar sinais intensos em δ_{C} 130,7 (C-5), 113,8 (C-6) e 103,3 (C-8) (LIU; TIAN, 2004).

A ausência de outros sinais nos espectros de RMN permitiu sugerir que o substituinte na molécula tratar-se-ia de uma hidroxila que, pelo padrão de substituição do anel ABX, poderia estar inserida em C-6 ou C-7. Observando o mecanismo biossintético das cumarinas, nota-se uma tendência à formação de cumarinas 7-substituídas uma vez que a grande maioria é derivada do ácido *p*-hidroxicinâmico (KUSTER; ROCHA, 1999). Sendo assim, foi proposto que a hidroxila de Bo-3 estaria inserida no carbono C-7.

Desta forma, os dados de RMN ^1H e ^{13}C e dados comparativos da literatura (Tabela 15, pág. 134) permitiram determinar a estrutura de Bo-3 como sendo 7-hidroxicumarina, conhecida como umbeliferona, relatada pela primeira vez no gênero *Borreria*.

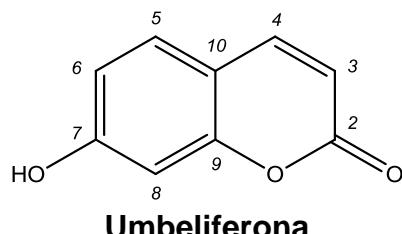


Tabela 15. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Bo-3, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C – BB (500 e 125 MHz, respectivamente, C_3D_6O), bem como, aqueles apresentados por Liu e Tian (2004) para umbeliferona (500 e 125 MHz, respectivamente, C_3D_6O).

C	Bo-3		Umbeliferona	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
2	161,1	-	161,4	-
3	113,0	6,16 (<i>d</i> , $J = 9,5$ Hz, 1H)	112,6	6,14 (<i>d</i> , $J = 9,2$ Hz, 1H)
4	144,7	7,86 (<i>d</i> , $J = 9,5$ Hz, 1H)	144,8	7,85 (<i>d</i> , $J = 9,2$ Hz, 1H)
5	130,7	7,51 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz, 1H)	130,4	7,48 (<i>d</i> , $J = 8,4$ Hz, 1H)
6	113,8	6,84 (<i>dd</i> , $J = 2,0$ e $8,5$ Hz, 1H)	113,8	6,82 (<i>dd</i> , $J = 2,3$ e $8,4$ Hz, 1H)
7	162,1	-	162,2	-
8	103,3	6,75 (<i>d</i> , $J = 2,0$ Hz, 1H)	103,1	6,73 (<i>d</i> , $J = 2,3$ Hz, 1H)
9	157,0	-	156,8	-
10	112,9	-	112,6	-

Legenda: (*d*) duploto; (*dd*) duplo-duploto.

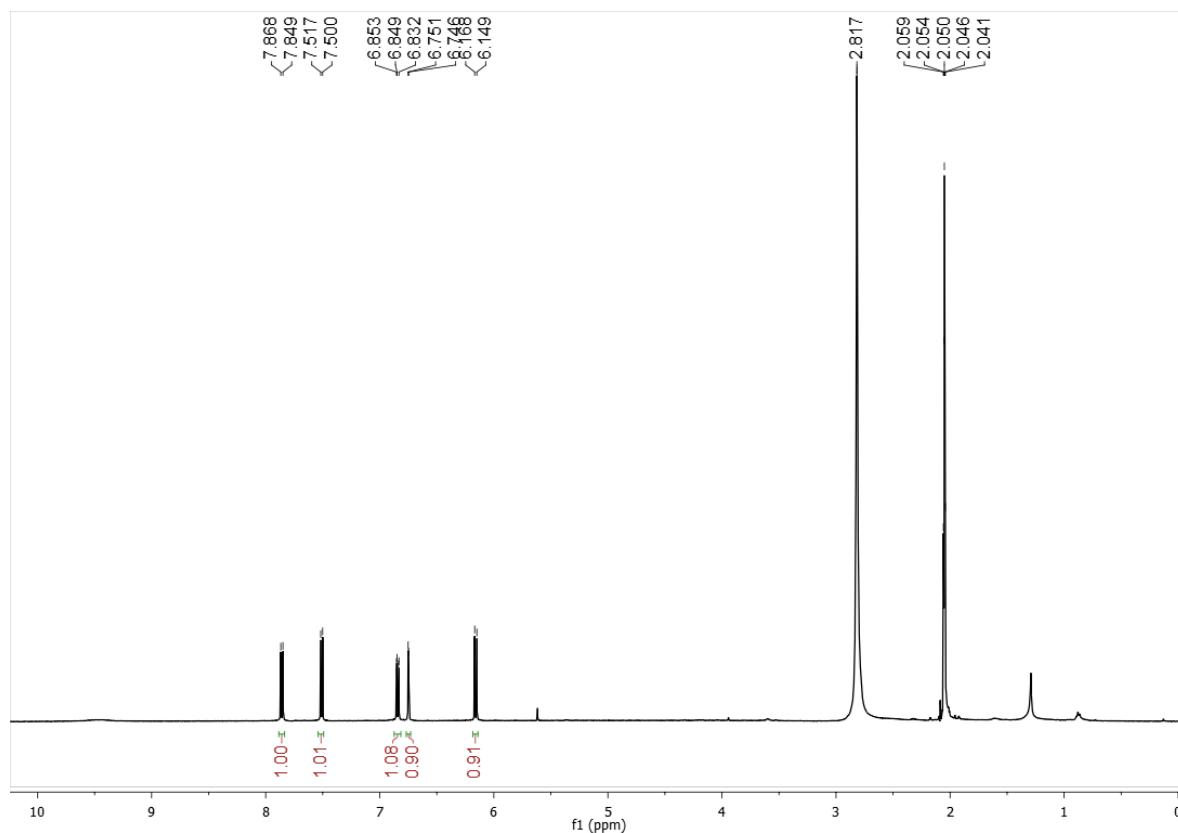


Figura 87. Espectro de RMN 1H (C_3D_6O , 500 MHz) de Bo-3.

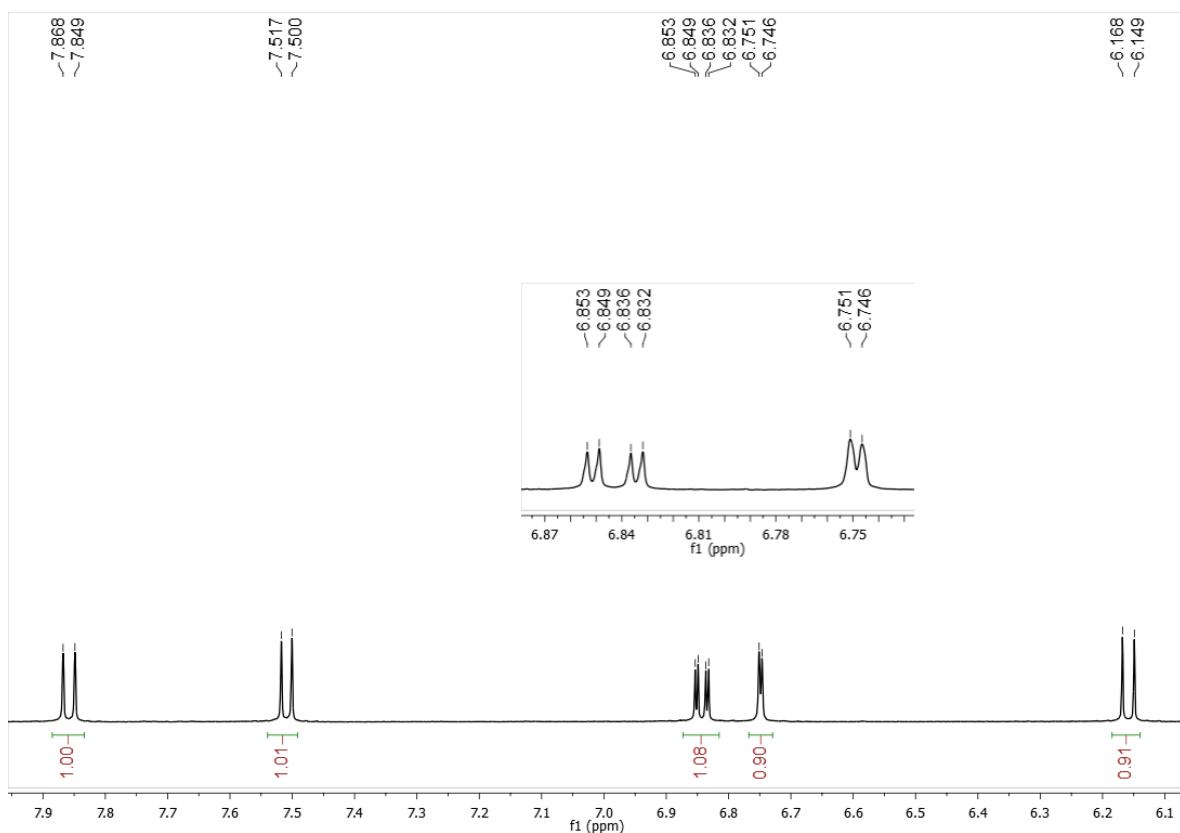


Figura 88. Expansão do espectro de RMN ^1H ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, 500 MHz) de Bo-3.

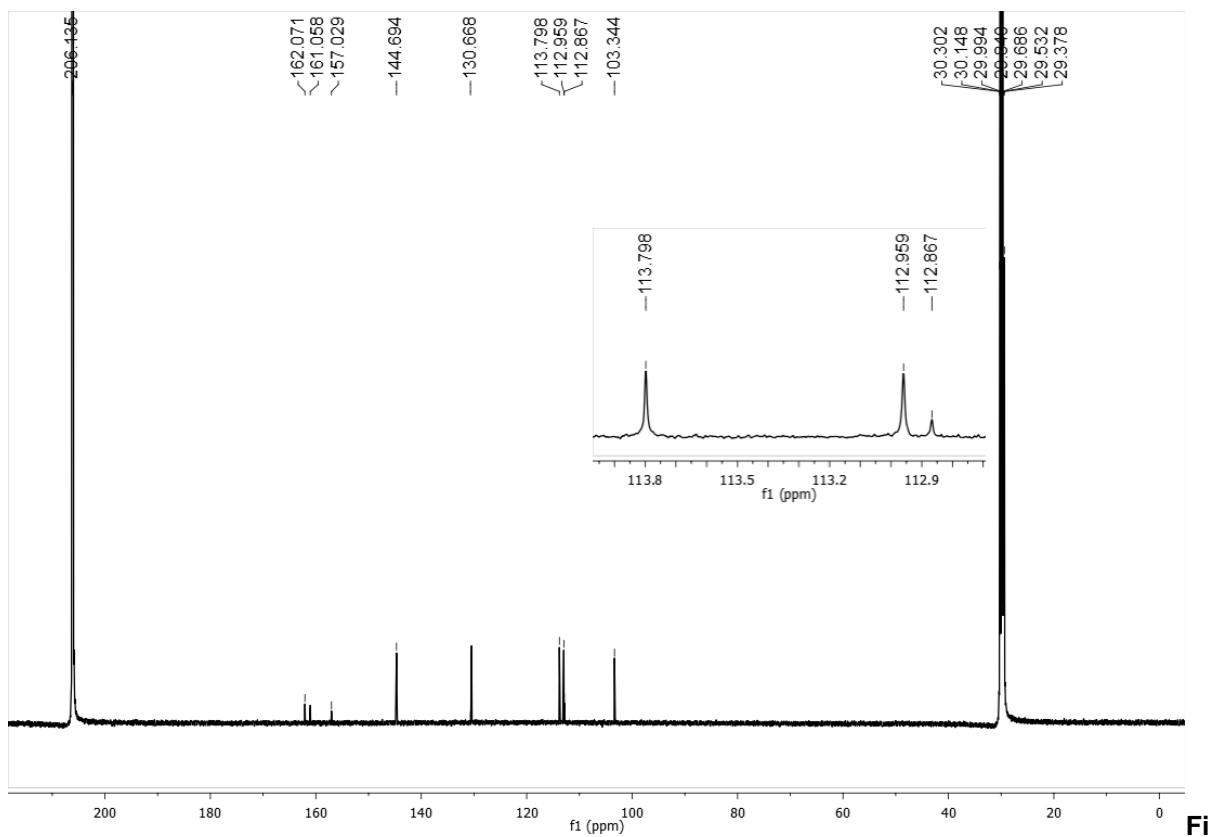


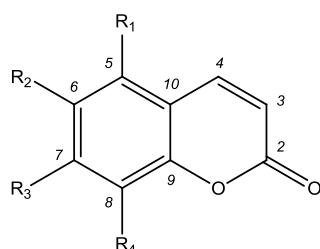
Figura 89. Espectro de RMN ^{13}C – BB ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, 125 MHz) de Bo-3.

5.14. Determinação estrutural de Bo-4

O espectro de IV (Figura 90, pág. 140) desta substância apresentou absorções em 1716 e 1608 cm^{-1} referentes aos estiramentos de C=O e C=C, respectivamente, compatíveis com carbonila de éster α,β -insaturada. Um sistema aromático foi sugerido pelas absorções em 1477 e 1585 cm^{-1} de estiramento C=C de aromáticos (PAVIA et al., 2010).

Características físico-químicas de Bo-4	
Estado físico	Sólido
Forma	Cristais brancos
Solubilidade	CH_2Cl_2
Massa/Rendimento	11,0 mg / 0,11 %
Ponto de fusão	106-107 °C
Fluorescência (254 nm)	Lilás forte
Fluorescência (366 nm)	Ausente
Fator de retenção (R_f)	0,17 (Hex/AcOEt 7:3)

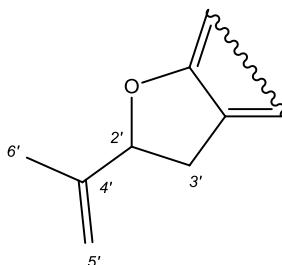
Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C – APT (500 e 125 MHz, CDCl_3) (Figura 91 e 92, pág. 140 e 141), assim com Bo-2 e Bo-3, também apresentaram deslocamentos químicos de substâncias cumarínicas (Tabela 16, pág. 139). Diferentemente de Bo-2 e Bo-3, a ausência de outros sinais para prótons aromáticos fez sugerir que a cumarina em questão é substituída nas posições 5, 6, 7 e 8.



Esqueleto cumarínico 5,6,7,8-tetrassubstituído

O espectro de RMN ^1H (Figura 91, pág. 140) também apresentou dois duplo-dupletos em δ_{H} 3,18 ($J = 7,5$ e 15,0 Hz, H-3') e 3,53 ($J = 9,5$ e 15,0 Hz, H-3') característicos de hidrogênios metilênicos geminais; um triplete em δ_{H} 5,31 ($J = 9,0$ Hz, H-2') para hidrogênio oximetínico; dois singletos largos em δ_{H} 4,96 (H-5') e 5,11 (H-5') compatíveis com hidrogênios de grupo vinila terminal; e outro singuleto em δ_{H} 1,78 (H-6') de hidrogênios metil vinílicos. Estes dados fez sugerir que Bo-4

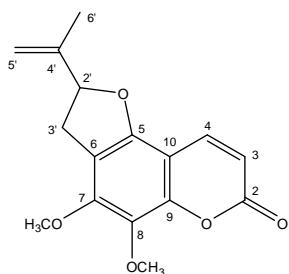
apresenta uma unidade 2-isopropenil-2,3-diidrofuran. Os sinais, no espectro de RMN ^{13}C – APT (Figura 92, pág. 141), em δ_{C} 17,0 (C-6'), 33,1 (C-3'), 87,8 (C-2'), 113,1 (C-5') e 142,7 (C-4') e comparações com a literatura (CHEN et al., 2006; MALIKOV; SAIDKHODZHAEV, 1998) ratificaram esta afirmação.



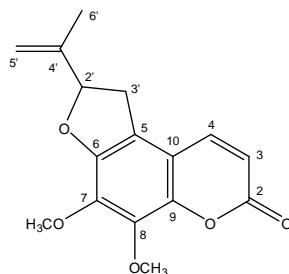
Unidade 2-isopropenil-2,3-diidrofuran

A presença de dois singletos com integral para três hidrogênios cada em δ_{H} 3,91 e 3,96 (Figura 91, pág. 140) e os sinais em δ_{C} 60,1 e 61,3 permitiram sugerir que Bo-4 apresenta duas metoxila aromáticas impedidas estericamente (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

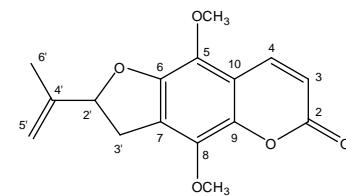
Esses dados permitiram estabelecer seis possibilidades estruturais para Bo-4:



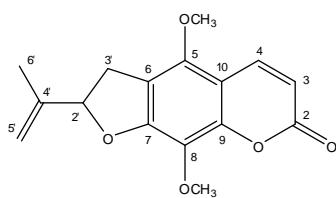
(a)



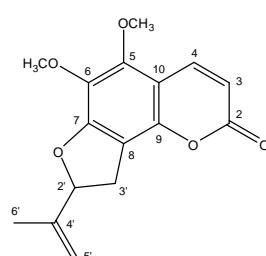
(b)



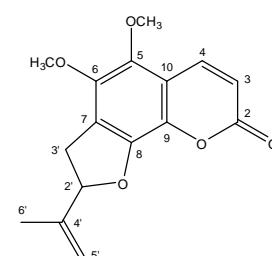
(c)



(d)

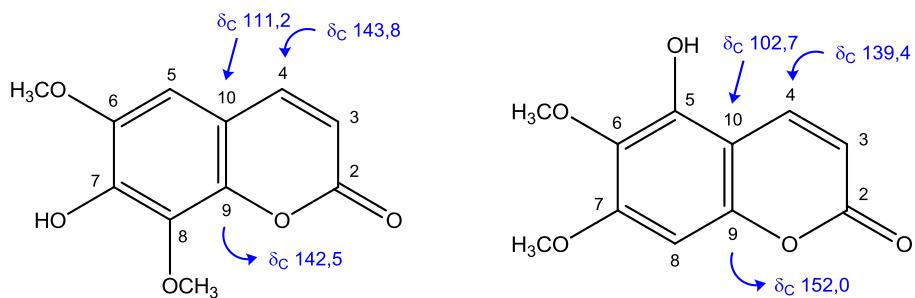


(e)



(f)

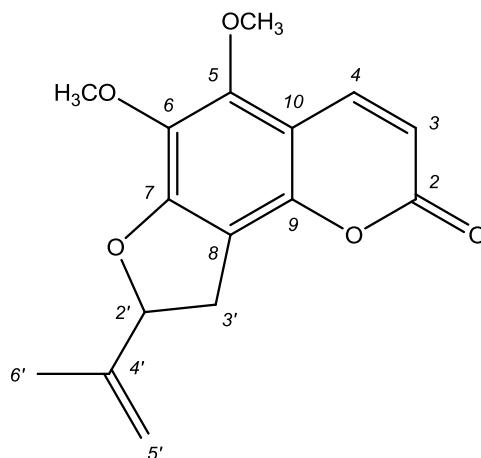
De acordo com a literatura, nas cumarinas que não possuem substituinte oxigenado em C-5, os carbonos C-4, C-10 geram sinais nos espectros de RMN ^{13}C em aproximadamente δ_{C} 144,0 e 111,0 (PANICHAYUPAKARANANT et al., 1995), respectivamente. Quando há substituinte oxigenado em C-5, os carbonos C-4 e C-10 sofrem proteção e apresentam deslocamentos químicos em aproximadamente δ_{C} 139,0 e 103,0, respectivamente (HAMMODA et al., 2008).



Observando, no espectro de RMN ^{13}C – APT (Figura 92, pág. 141), os sinais em δ_{C} 139,1 (C-4) e 106,9 (C-10), foi possível determinar que Bo-4 apresenta uma função oxigenada em C-5, eliminando a possibilidade estrutural **(b)**.

Recorrendo novamente a literatura, as cumarinas que apresentam função oxigenada em C-8, possuem deslocamento químico para o carbono C-9 em aproximadamente δ_{C} 142,0 (HAMMODA et al., 2008). Mas quando não há substituinte oxigenado em C-8, o carbono C-9 sofre desproteção de aproximadamente 7,0 ppm. Então, o sinal em δ_{C} 148,3 indica que C-8 não apresenta função oxigenada, desta forma as possibilidades estruturais **(a)**, **(c)**, **(d)** e **(f)** foram descartadas.

Sendo assim, os dados de RMN ^1H e ^{13}C unidimensionais e comparação com os dados da literatura (Tabela 16, pág. 139) permitiram determinar a estrutura de Bo-4 como sendo 5,6-dimetoxi-7,8-[2'-(prop-1-en-2-il)-2',3'-diidofurano] cumarina, conhecida como cumarieletefina. Esta substância foi isolada pela primeira vez em *Richardia brasiliensis* Gomes (TENÓRIO-SOUZA, 2009) pelo nosso próprio grupo de pesquisa e corresponde ao primeiro relato no gênero *Borreria*.



Cumarieletefina

Tabela 16. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Bo-4, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente, $CDCl_3$), bem como, aqueles apresentados por Tenório-Souza (2009) para cumarieletefina (500 e 125 MHz, respectivamente, $CDCl_3$).

C	Bo-4		Cumarieletefina	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
2	160,8	-	160,8	-
3	111,0	6,14 (<i>d</i> , $J = 9,5$ Hz, 1H)	111,0	6,14 (<i>d</i> , $J = 9,5$ Hz, 1H)
4	139,1	7,89 (<i>d</i> , $J = 9,5$ Hz, 1H)	139,1	7,89 (<i>d</i> , $J = 9,5$ Hz, 1H)
5	147,6	-	147,6	-
6	127,5	-	127,5	-
7	155,9	-	155,9	-
8	112,4	-	112,4	-
9	148,3	-	148,3	-
10	106,9	-	106,9	-
2'	87,8	5,31 (<i>t</i> , $J = 8,5$ e 17,0 Hz, 1H)	87,8	5,31 (<i>t</i> , $J = 8,5$ e 17,0 Hz, 1H)
3'	33,1	3,18 (<i>dd</i> , $J = 8,0$ e 15,5 Hz, 1H) 3,53 (<i>dd</i> , $J = 9,5$ e 15,5 Hz, 1H)	33,1	3,18 (<i>dd</i> , $J = 8,0$ e 15,5 Hz, 1H) 3,53 (<i>dd</i> , $J = 9,5$ e 15,5 Hz, 1H)
4'	142,7	-	142,7	-
5'	113,1	4,96 (<i>sl</i> , 1H) 5,11 (<i>sl</i> , 1H)	113,1	4,96 (<i>sl</i> , 1H) 5,11 (<i>sl</i> , 1H)
6'	17,0	1,78 (<i>s</i> , 3H)	17,0	1,78 (<i>s</i> , 3H)
5-OCH ₃	60,1	3,91 (<i>s</i> , 3H)	60,1	3,91 (<i>s</i> , 3H)
6-OCH ₃	61,3	3,96 (<i>s</i> , 3H)	61,3	3,96 (<i>s</i> , 3H)

Legenda: (*s*) singuleto; (*sl*) singuleto largo; (*d*) dupleto; (*dd*) duplo-dupleto; (*t*) triploto.

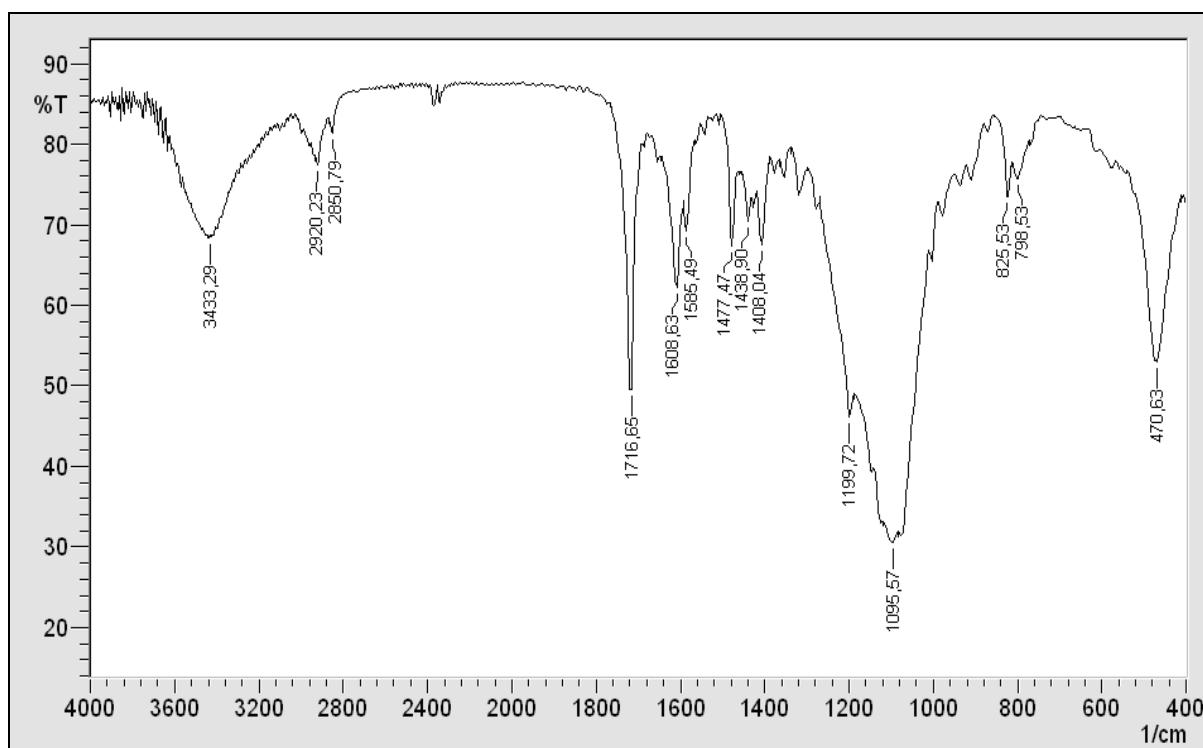


Figura 90. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de Bo-4.

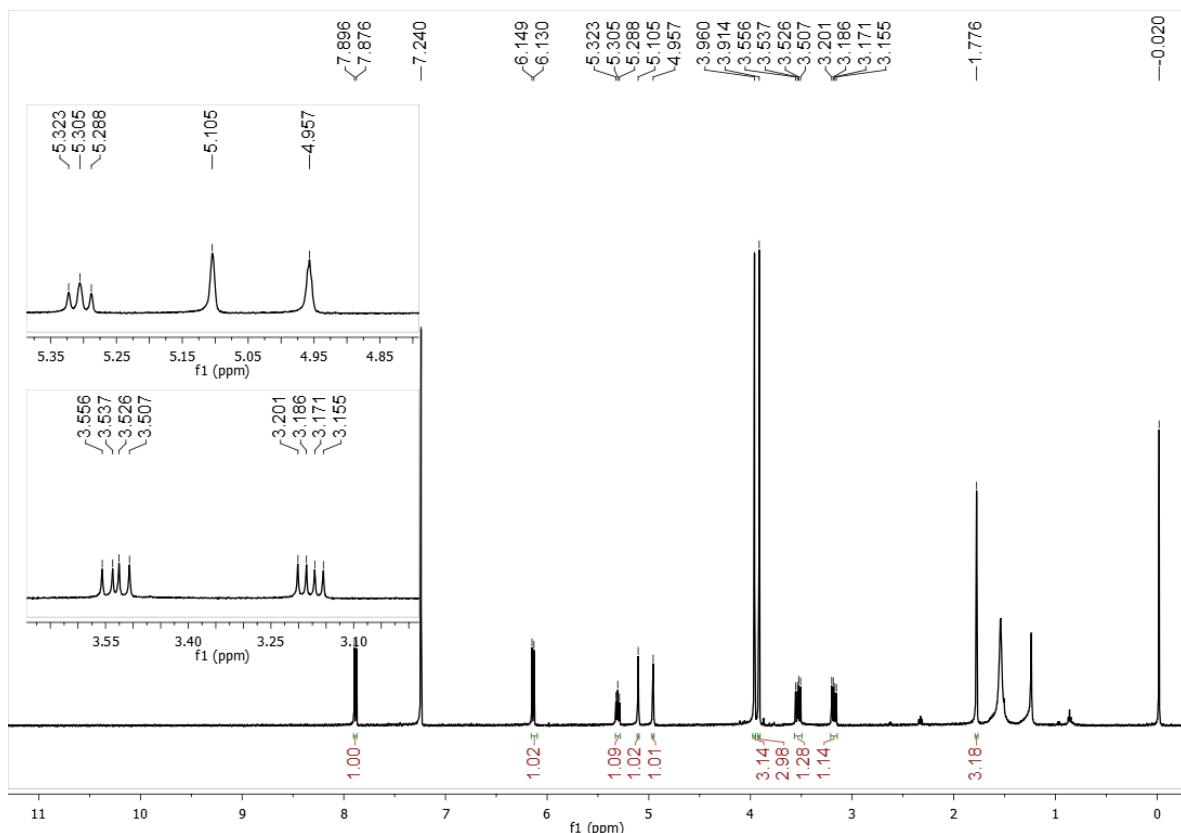


Figura 91. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Bo-4.

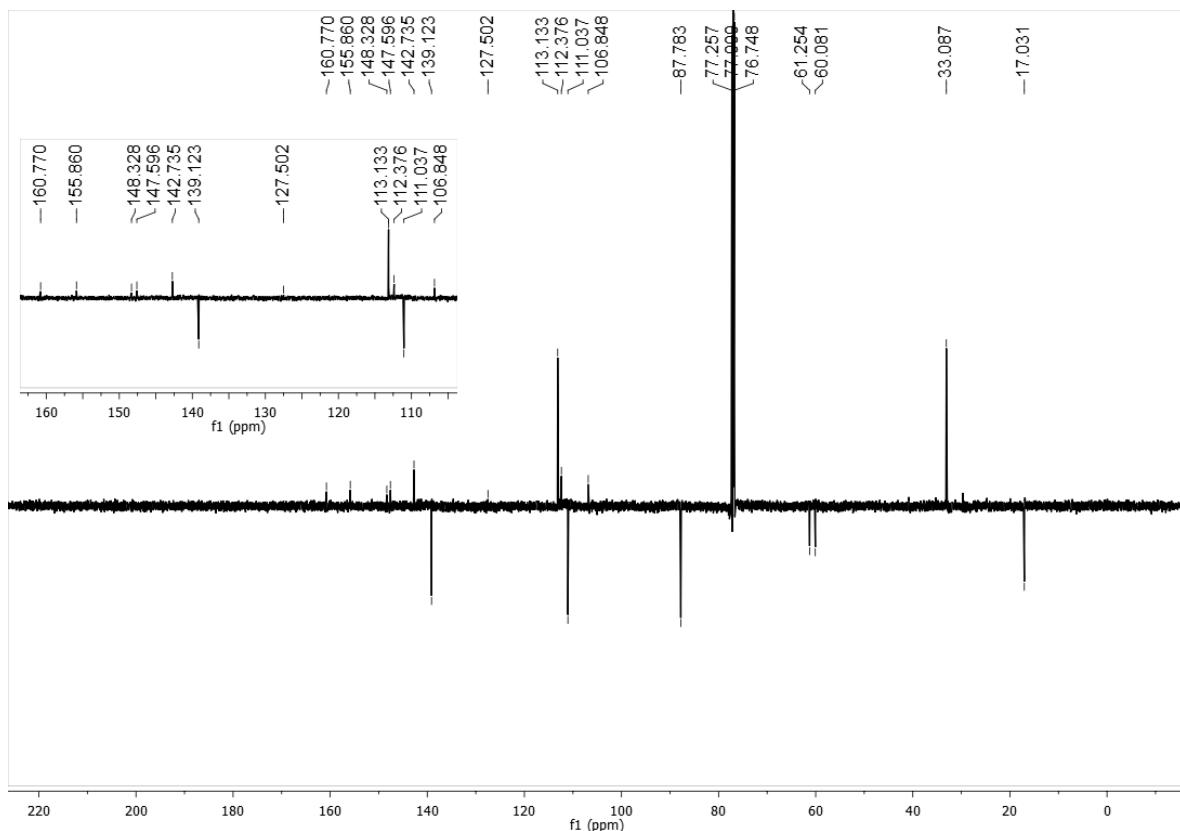


Figura 92. Espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 125 MHz) de Bo-4.

5.15. Determinação estrutural de Bo-5

O espectro de IV (Figura 94, pág. 146) de Bo-5 apresentou absorções em 1570 e 1597 cm^{-1} referentes aos estiramentos C-H de compostos aromáticos. O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Figura 95, pág. 146) apresentou: dois duplos dupletos em δ_{H} 7,53 ($J = 1,5$ e 8,0 Hz, H-2) e 8,14 ($J = 2,0$ e 7,5 Hz, H-1) e um singletos largo em δ_{H} 8,04 (H-4) que são típicos de um anel aromático trissubstituído com sistema ABX; e dois singletos em δ_{H} 7,72 (H-5) e 7,75 (H-8) indicando a presença de outro anel aromático tetrassubstituído. O espectro de RMN ^{13}C – APT e/ou BB (125 MHz, CDCl_3) (Figura 96 e 97, pág. 147) corroborou ao mostrar sinais em δ_{C} 127,3 (C-1), 134,5 (C-2), 127,3 (C-4), 108,3 (C-5) e 112,6 (H-8) (PAVIA et al., 2010).

Características físico-químicas de Bo-5	
Estado físico	Sólido
Forma	Cristal laranja
Solubilidade	CH_3OH
Massa/Rendimento	5 mg / 0,05 %
Ponto de fusão	211-213 °C
Fluorescência (254 nm)	Avermelhada
Fluorescência (366 nm)	Negra
Fator de retenção (R_f)	0,23 (Hex/AcOEt 8:2)

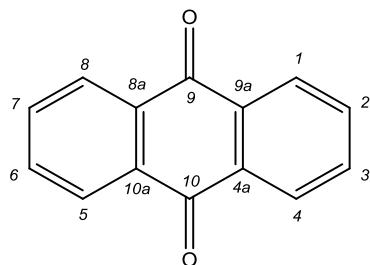
Também no espectro de IV (Figura 94, pág. 146) foi observado uma absorção intensa 3377 cm^{-1} de estiramento de O-H (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010) que juntamente com o singletos largo em δ_{H} 6,14 (Figura 95, pág. 146) indicaram que Bo-5 apresentava uma hidroxila fenólica.

Ainda nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (Figura 95 e 96, pág. 146 e 147), singletos em δ_{H} 2,50 e 4,07 e sinais em δ_{C} 21,9 e 56,6 sugeriram a presença de metila ligada a carbono sp^2 e metoxila não impedida estericamente, respectivamente (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

Os espectros de correlação heteronuclear HMQC e homonuclear COSY (Figura 98, 99 e 105, pág. 148 e 151) confirmaram as atribuições feitas aos átomos de hidrogênios e carbonos da molécula ao mostrar correlação entre eles. No espectro de correlação heteronuclear HMBC (Figura 100 a 103, pág. 149 e 150) foi possível constatar a existência de alguns sinais para carbonos que não foram observados nos espectros de RMN ^{13}C – APT e BB, com destaque para aqueles em

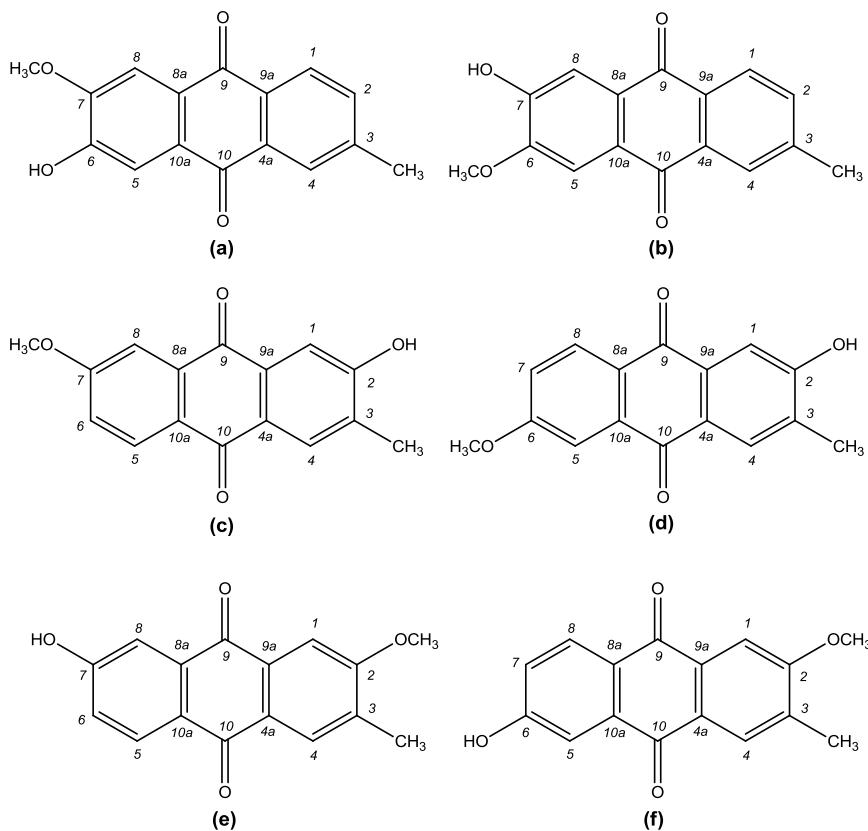
δ_C 182,1 e 182,7. Estes dados em conjunto com as absorções, no espectro de IV (Figura 94, pág. 146), em 1664 e 1670 cm⁻¹ indicaram que Bo-5 possui duas carbonilas conjugadas (HUANG et al., 2008).

O sinal para metila ligada a carbono sp² (δ_H 2,50 e δ_C 21,9) e a presença de duas carbonilas conjugadas são característicos de compostos que possuem um esqueleto 9,10-antraquinona com metila inserida em C-3 como na maioria dos compostos pertencentes a esta classe (SIMÕES et al., 2010).



Esqueleto básico de 9,10-antraquinona

Assim, foi possível estabelecer seis possibilidades estruturais para Bo-5:



A posição dos substituintes foi determinada por análise extensiva dos espectros HMBC (Figura 100 a 103, pág. 149 e 150). Uma correlação do singuleto em δ_H 2,50 com os sinais para os carbonos metínicos em δ_C 127,3 (C-4) e 134,5 (C-2) permitiu sugerir que a metila estaria ligada ao anel aromático que apresenta o sistema ABX, descartando as possibilidades estruturais (c), (d), (e) e (f).

No espectro bidimensional HMBC (Figura 100 a 103, pág. 149 e 150) e NOESY (Figura 105, pág. 151), correlações espaciais do singuleto δ_H 7,72 (H-5) com o singuleto em δ_H 4,07 (OCH_3); correlação a três ligações do singuleto em δ_H 7,72 (H-5) com δ_C 182,7 (C-10); e do singuleto largo em δ_H 8,04 (H-4) com δ_C 182,7 (C-10) e 21,9 (3- CH_3), permitiram descartar a proposta (a) (Figura 93, pág. 144).

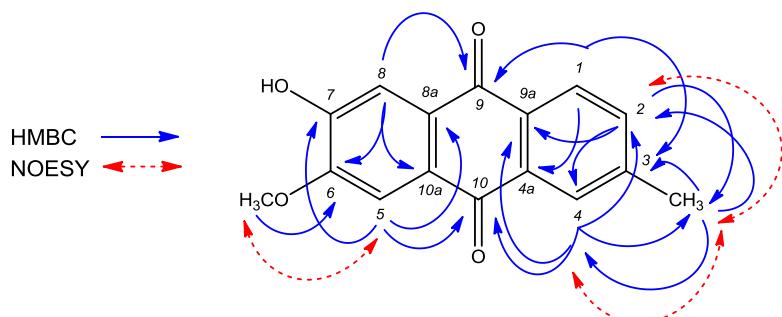


Figura 93. Correlações a duas e três ligações entre os hidrogênios e carbonos no espectro HMBC e correlações espaciais no espectro NOESY observadas nos espectros de Bo-5.

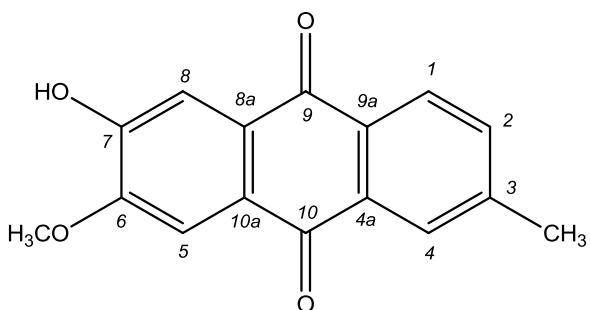
Tabela 17. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para os átomos de carbono (δ_C) e hidrogênio (δ_H) da substância Bo-5, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C – APT ou BB (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CDCl_3 .

C	HMQC		HMBC		COSY	NOESY
	δ_C	δ_H	2J	3J		
1	127,3	8,14 (dd, $J = 2,0$ e $7,5$ Hz, 1H)			C-3, C-4a, C-9	H-2
2	134,5	7,53 (dd, $J = 1,5$ e $8,0$ Hz, 1H)			3- CH_3 , C-4, C-9a	H-1
3	144,8	-				H-1, 3- CH_3 , H-4
4	127,3	8,04 (s, 1H)			C-2, 3- CH_3 , C-9a	3- CH_3
4a	133,5 ^a	-				
5	108,3	7,72 (s, 1H)			C-7, C-8a, C-10	6-OCH ₃
6	151,0	-				
7	150,8 ^a	-				
8	112,6	7,75 (s, 1H)			C-6, C-9, C-10a	
8a	129,4 ^a	-				
9	182,1 ^a	-				
9a	131,4 ^a	-				
10	182,7 ^a	-				
10a	128,2	-				
3- CH_3	21,9	2,50 (s, 3H)	C-3	C-2, C-4		H-2, H-4
6-OCH ₃	56,6	4,07 (s, 3H)		C-6		H-5
7-OH	-	6,14 (s, 1H)				

Legenda: (dd) duplo duplo; (s) singuleto; (sl) singuleto largo.

^aDeslocamento químico observado apenas no espectro de correlação HMBC.

Os espectros HMBC e NOESY também mostraram outras correlações que corroboraram com a proposta (b) (Figura 93, pág. 144; Tabela 17, pág. 144). Desta forma, os espectros de IV e RMN de ^1H e ^{13}C unidimensionais e bidimensionais e comparações com dados da literatura (Tabela 18. pág. 145) permitiram identificar Bo-5 como sendo 7-hidroxi-3-metil-6-metoxi-9,10-antraquinona. Até o momento, está substância foi mencionada em trabalhos feitos com *Hedyotis difusa* (HUANG et al., 2008) e *Rennellia elliptica* (ISMAIL; ALIAS; OSMAN, 2012), ambas da família Rubiaceae. Trata-se de um dado muito importante pois corresponde ao primeiro relato que antraquinonas no gênero *Borreria*, confirmando as triagens fitoquímicas feitas por Ebana e colaboradores (1991) com *Borreria ocymoides*.



7-hidroxi-3-metil-6-metoxi-9,10-antraquinona

Tabela 18. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_{H}) e carbono (δ_{C}) de Bo-5, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente, CDCl_3), bem como, aqueles apresentados por Huang e colaboradores (2008) para o 7-hidroxi-3-metil-6-metoxi-9,10-antraquinona (500 e 125 MHz, respectivamente, $\text{DMSO}-d_6$).

C	Bo-5		7-hidroxi-3-metil-6-metoxi-9,10-antraquinona	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	127,3	8,14 (dd, $J = 2,0$ e $7,5$ Hz, 1H)	126,5	8,00 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H)
2	134,5	7,53 (dd, $J = 1,5$ e $8,0$ Hz, 1H)	134,5	7,64 (dd, $J = 1,3$ e $8,0$ Hz, 1H)
3	144,8	-	144,2	-
4	127,3	8,04 (s/l, 1H)	126,4	7,80 (d, $J = 1,3$ Hz, 1H)
4a	133,5 ^a	-	130,8	-
5	108,3	7,72 (s, 1H)	108,7	7,56 (s, 1H)
6	151,0	-	152,2	-
7	150,8 ^a	-	152,6	-
8	112,6	7,75 (s, 1H)	112,3	7,49 (s, 1H)
8a	129,4 ^a	-	127,9	-
9	182,1 ^a	-	181,7	-
9a	131,4 ^a	-	132,9	-
10	182,7 ^a	-	181,1	-
10a	128,2	-	126,5	-
3-CH ₃	21,9	2,50 (s, 3H)	21,2	2,48 (s, 3H)
6-OCH ₃	56,6	4,07 (s, 3H)	55,9	3,97 (s, 3H)
7-OH	-	6,14 (s/l, 1H)	-	10,70 (s/l, 1H)

Legenda: (d) duplo; (dd) duplo duplo; (s) singuleto; (s/l) singuleto largo.

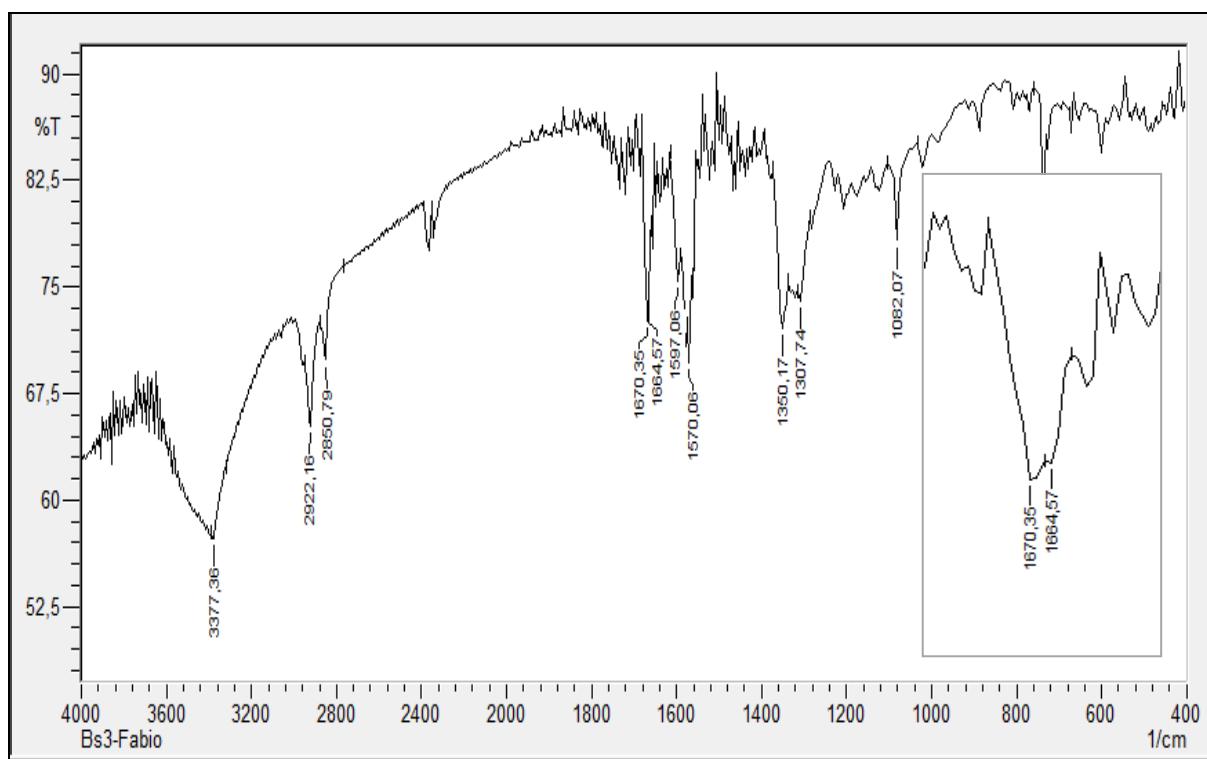


Figura 94. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de Bo-5.

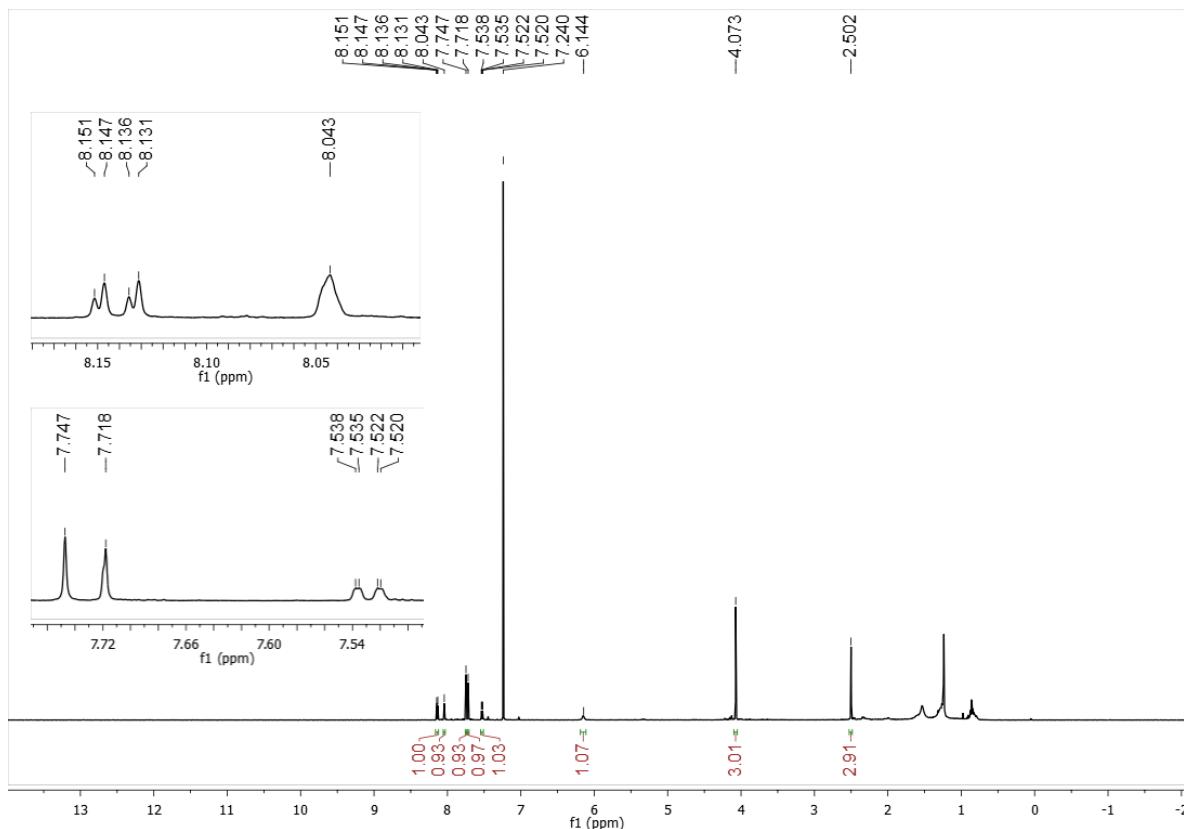


Figura 95. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Bo-5.

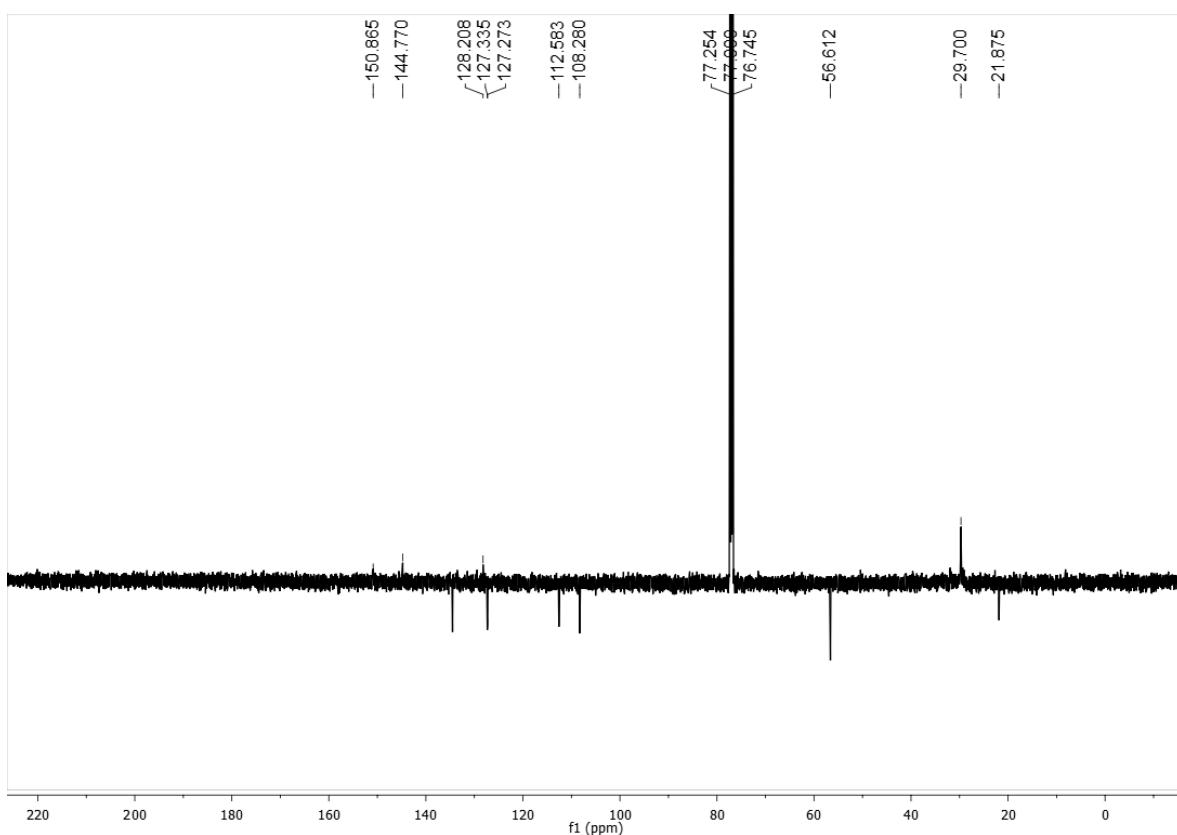


Figura 96. Espectro de RMN ^{13}C – APT (CDCl_3 , 125 MHz) de Bo-5.

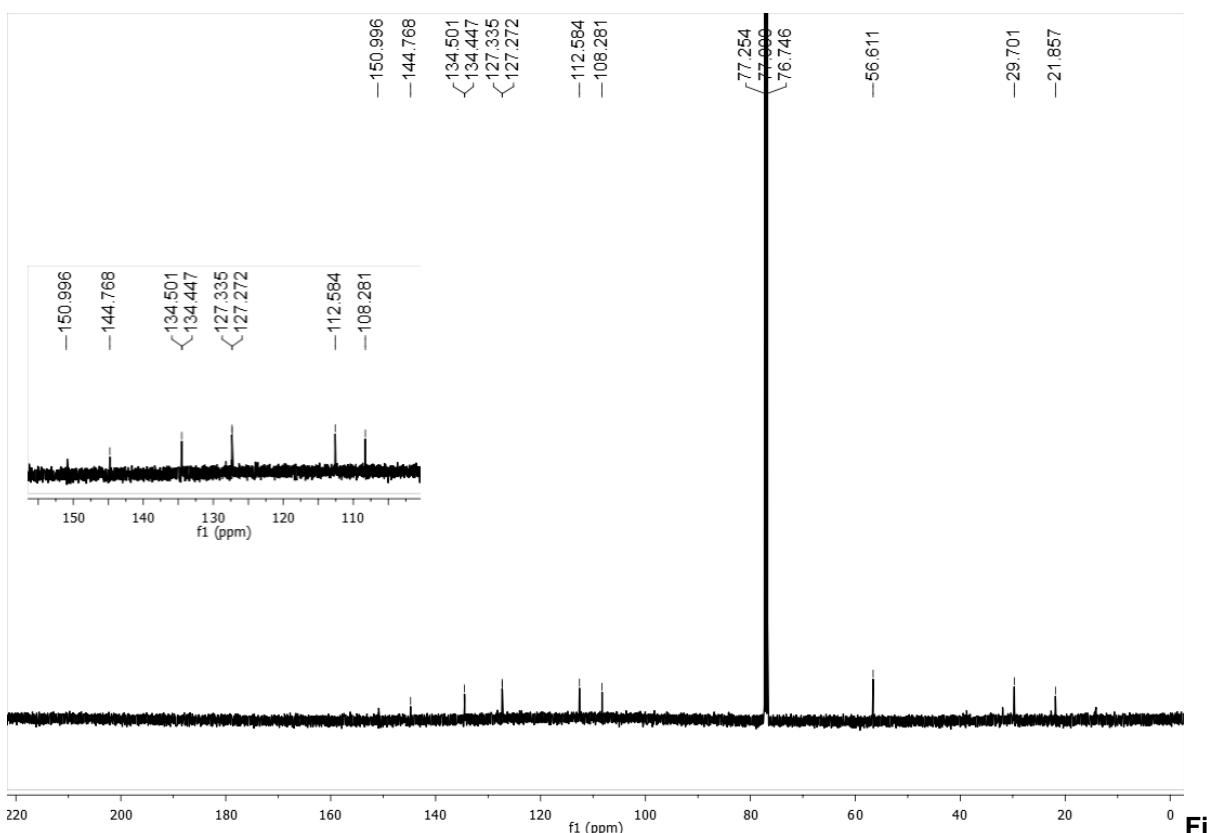


Figura 97. Espectro de RMN ^{13}C – BB (CDCl_3 , 125 MHz) de Bo-5.

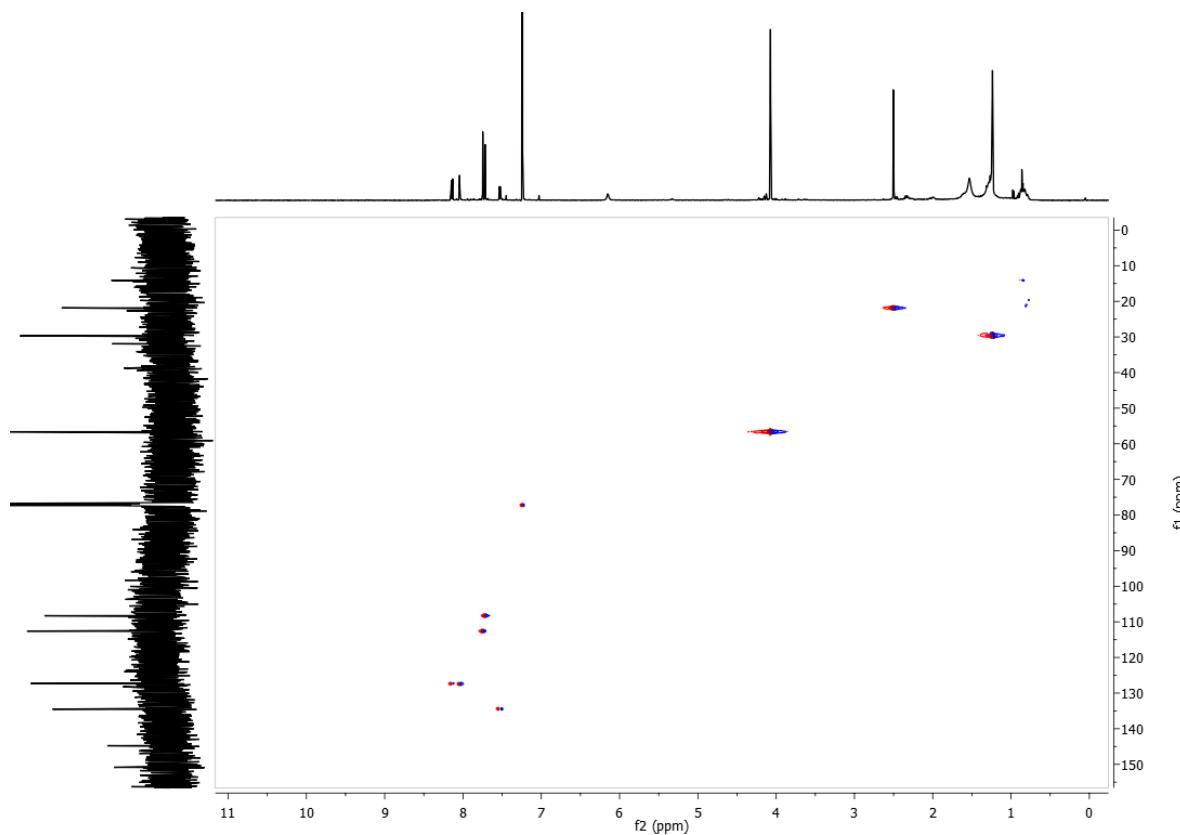


Figura 98. Espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Bo-5.

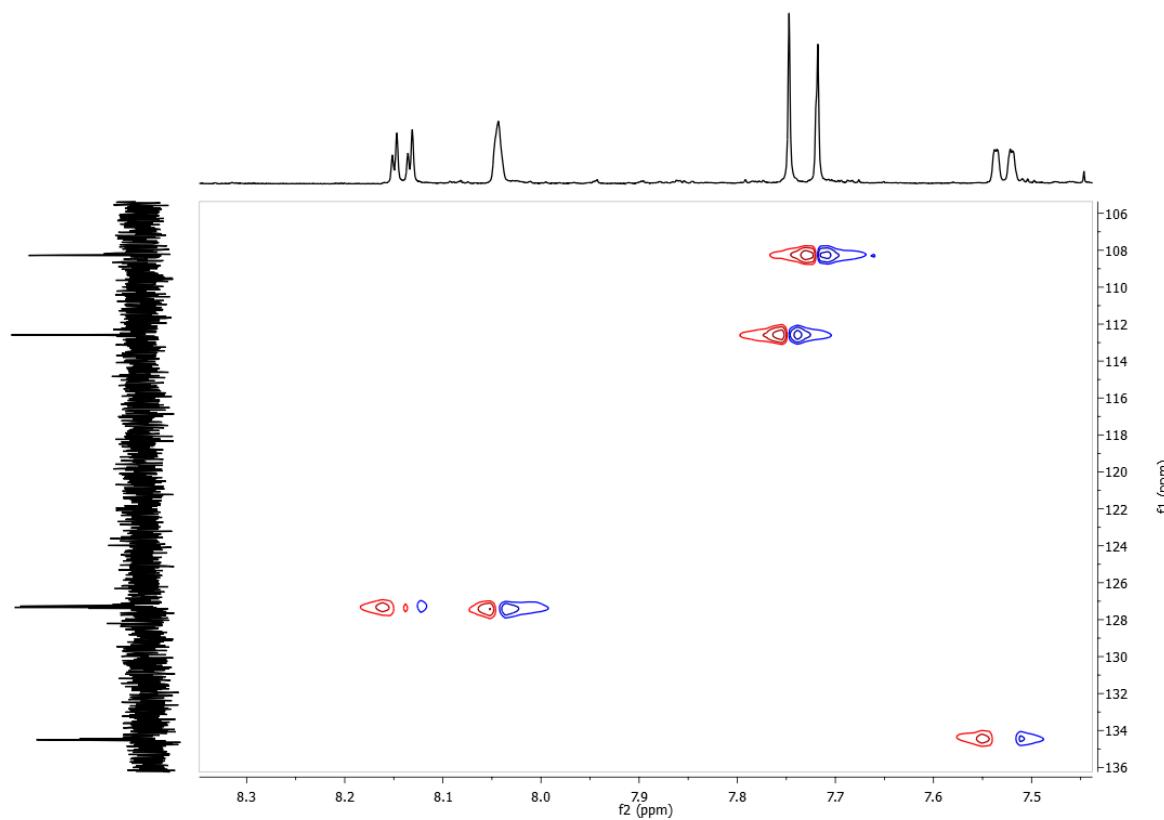


Figura 99. Expansão do espectro HMQC de Bo-5 na região de (7,5 – 8,3 ppm) x (106,0 - 136,0 ppm).

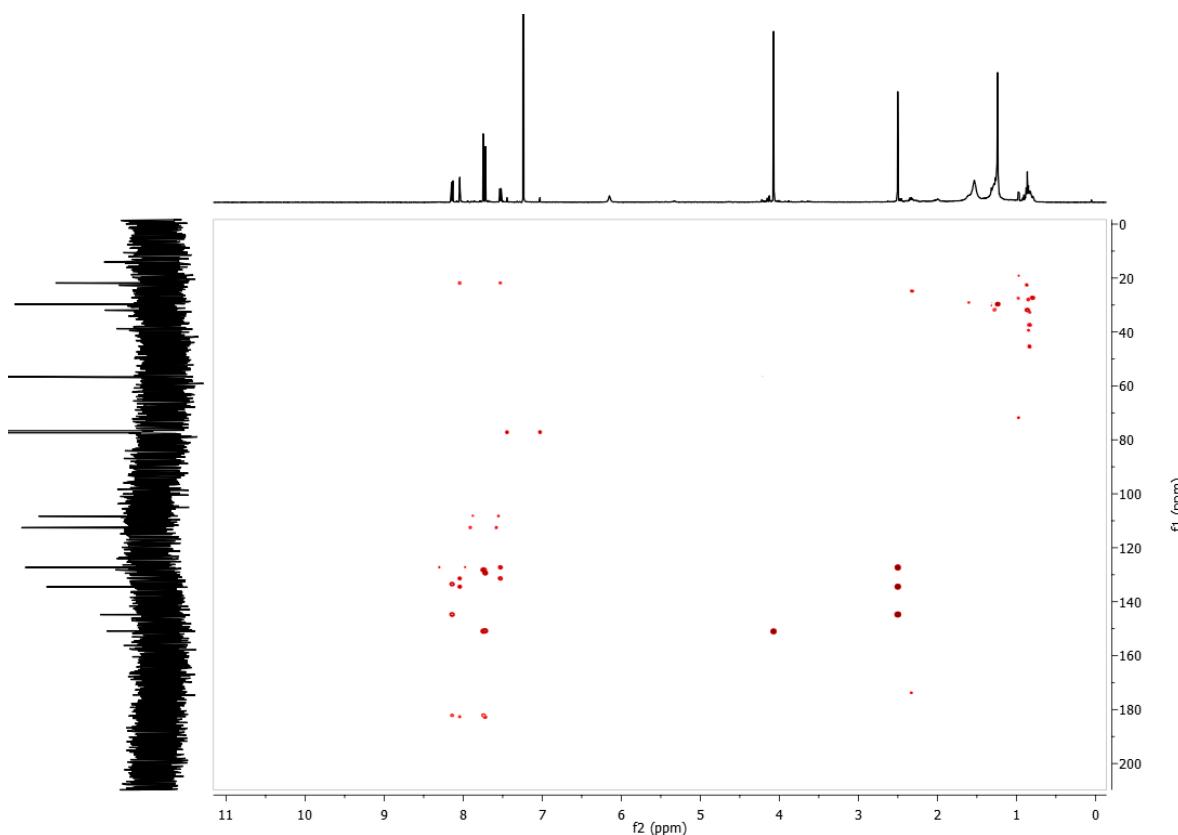


Figura 100. Espectro HMBC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Bo-5.

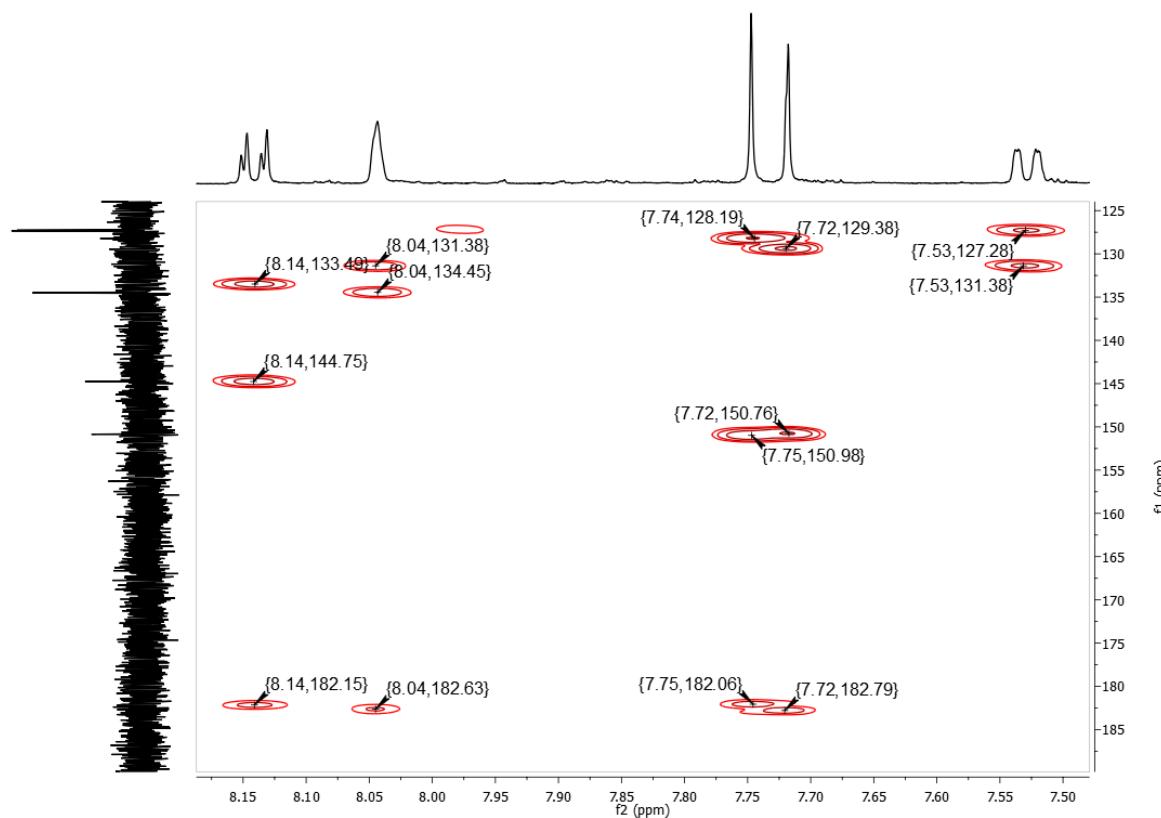


Figura 101. Expansão do espectro HMBC de Bo-5 na região de (7,5 - 8,2 ppm) x (125,0 - 190,0 ppm).

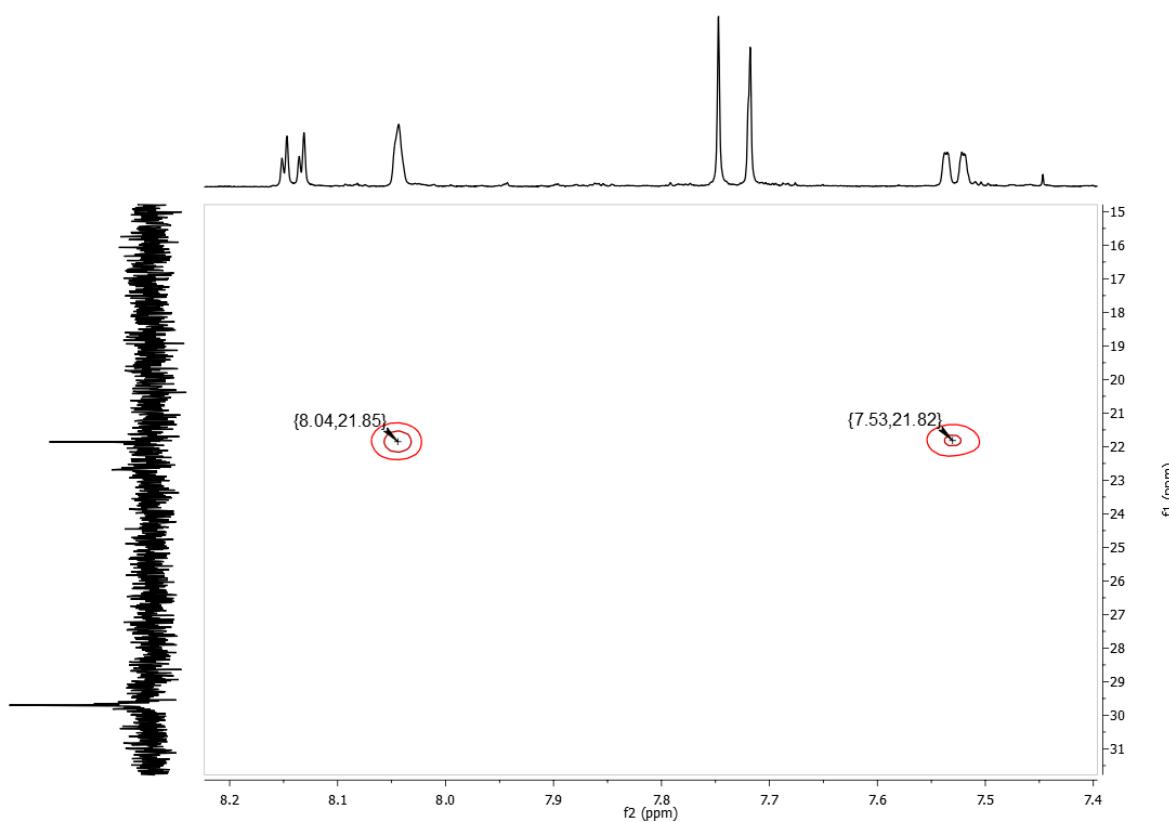


Figura 102. Expansão do espectro HMBC de Bo-5 na região de (7,4 - 8,2 ppm) x (15,0 - 32,0 ppm).

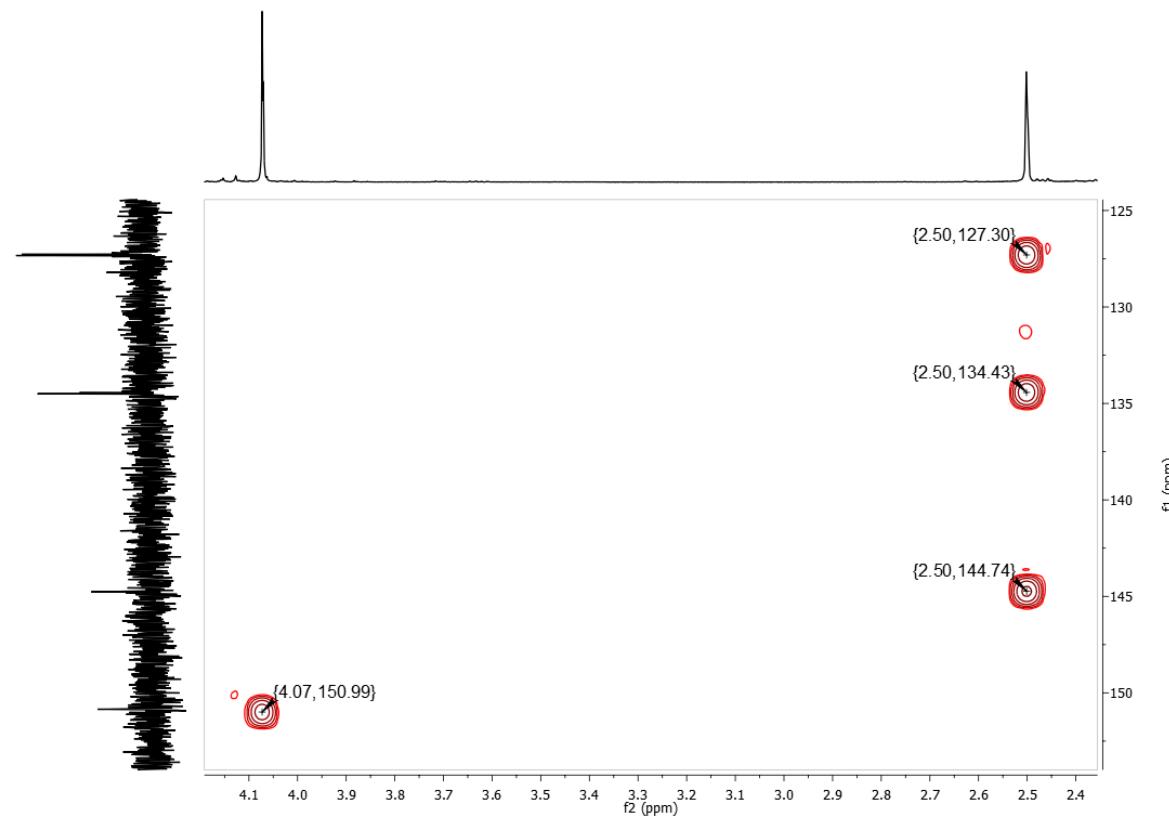


Figura 103. Expansão do espectro HMBC de Bo-5 na região de (2,4 - 4,2 ppm) x (125,0 - 155,0 ppm).

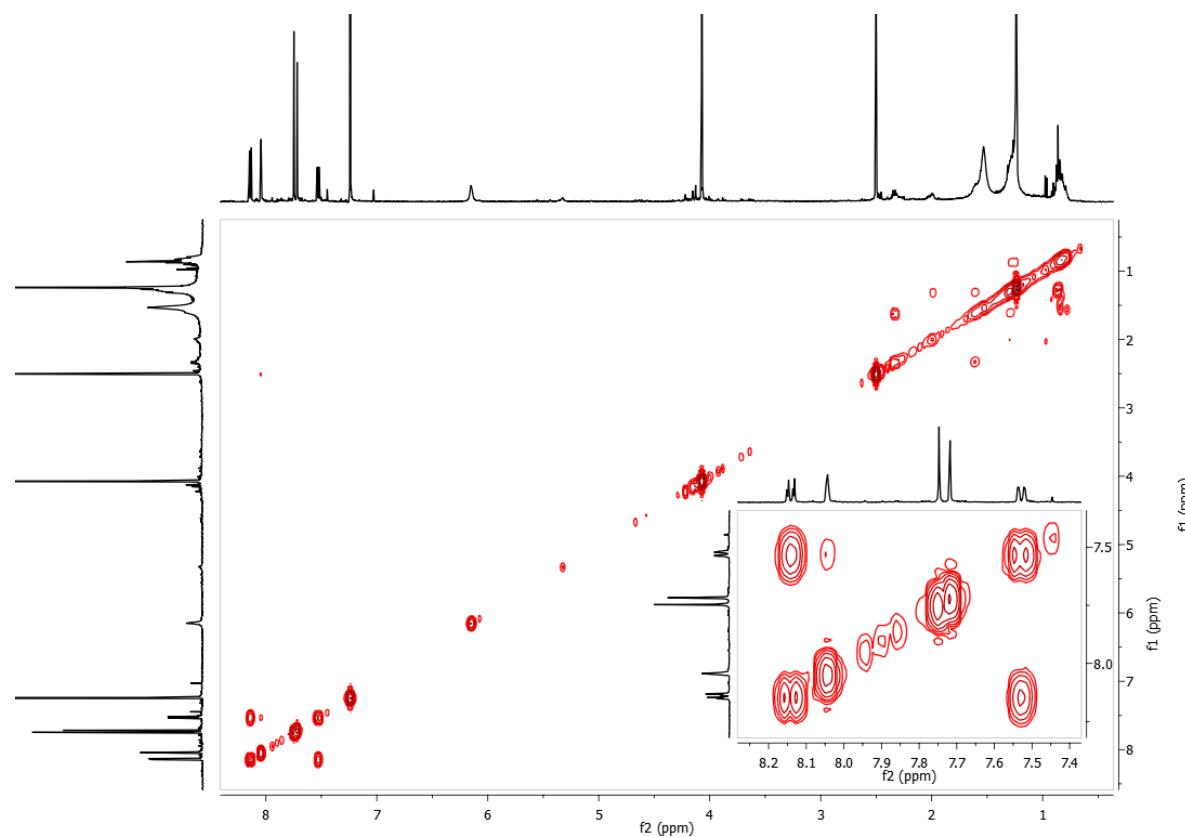


Figura 104. Espectro COSY (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Bo-5.

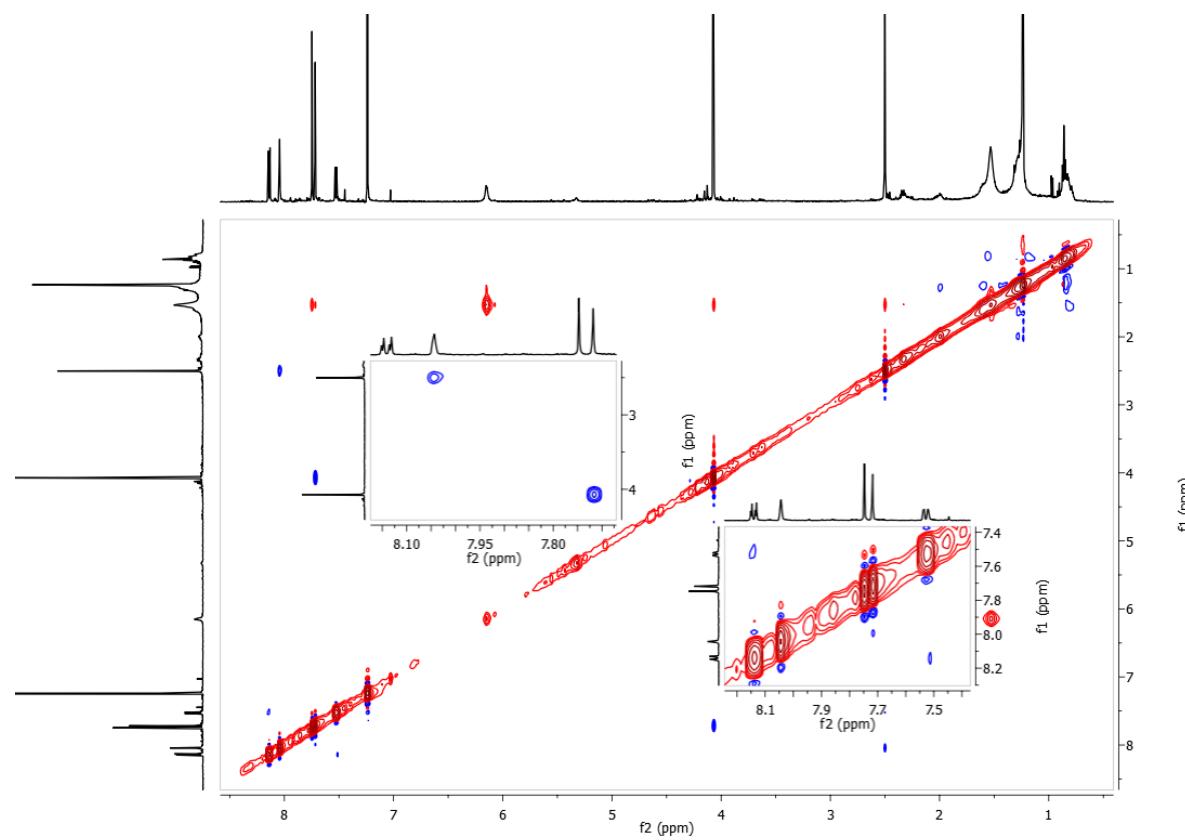


Figura 105. Espectro NOESY (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Bo-5.

5.16. Determinação estrutural de Bo-6

Assim como Bo-5, o espectro de IV (Figura 107, pág. 155) de Bo-6 apresentou absorções em 1570 e 1577 cm⁻¹ referentes aos estiramentos C-H aromáticos. O espectro de RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) (Figura 108, pág. 155) apresentou um multiplet em δ_H 8,21 (H-5 e H-8) e um duplo duplo dobrado em δ_H 7,81 (J = 1,5, 4,0 e 7,5 Hz, H-6 e H-7), ambos com integral para dois hidrogênios, típicos de um anel aromático 1,2-dissubstituído; e um singlet em δ_H 7,54 (H-1) e um duplet em δ_H 8,00 (J = 0,5 Hz, H-4) indicando a presença de outro anel aromático tetrassubstituído. O espectro de RMN ¹³C – APT (125 MHz, CD₃OD) (Figura 109, pág. 156) corroborou ao mostrar sinais para carbonos metínicos em δ_C 112,5 (C-1), 127,8 (C-5 e C-8), 131,3 (C-4), 134,8 (C-6) e 135,2 (C-7) (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2010).

Uma absorção intensa, no espectro de IV (Figura 107, pág. 155), em 3414 cm⁻¹ (PAVIA et al., 2010) em conjunto com o singlet largo em δ_H 4,52 (Figura 108, pág. 155) indicaram que Bo-6 apresentava uma hidroxila fenólica.

Ainda nos espectros de RMN ¹H e ¹³C (Fig. 108 e 109, pág. 155 e 156), um singlet em δ_H 2,33 e o sinal em δ_C 16,5, assim com em Bo-4, também sugeriram a presença de metila ligada a carbono sp² possivelmente a três ligações de um grupo oxigenado por estar 5,0 ppm mais protegida do que em Bo-4 (PAVIA et al., 2010).

Os espectros de correlação heteronuclear HMQC (Figura 110 e 111, pág. 156 e 157) e homonuclear COSY (Figura 115, pág. 159) confirmaram as atribuições feitas aos átomos de hidrogênios e carbonos da molécula ao mostrar correlação entre eles. No espectro HMBC (Figura 112, 113 e 114, pág. 157 e 158) também foi possível constatar a existência de alguns sinais para carbonos que não foram observados nos espectros de RMN ¹³C – APT, inclusive aqueles para carbonilas

Características físico-químicas de Bo-6	
Estado físico	Sólido
Forma	Cristal laranja
Solubilidade	CH ₃ OH
Massa/Rendimento	5 mg / 0,05 %
Ponto de fusão	140-141 °C
Fluorescência (254 nm)	Avermelhada
Fluorescência (366 nm)	Negra
Fator de retenção (R _f)	0,19 (Hex/AcOEt 7:1)

conjugadas em δ_{C} 183,8 e 184,6. O espectro de IV (Figura 107, pág. 155) corroborou com esta proposta ao mostrar absorções em 1653 e 1664 cm^{-1} (HUANG et al., 2008). Estas observações indicaram que Bo-6 também possui um esqueleto 9,10-antraquinona com metila inserida em C-3 (SIMÕES et al., 2010).

Os espectros HMBC e NOESY (Figura 106, pág. 153; Tabela 19, pág. 154) mostraram correlações que permitiram fazer as atribuições dos sinais para os átomos de hidrogênio e carbono da molécula, com destaque para as correlações do singuleto em δ_{H} 7,54 (H-1) com os sinais em δ_{C} 127,0 (C-4a), 133,7 (C-3) e 184,6 (C-9); do singuleto em δ_{H} 2,33 (3-CH₃) com os sinais em δ_{C} 131,3 (C-4) e 133,7 (C-3) e 163,2 (C-2), confirmando a existência de função oxigenada *ortho* ao carbono que sustenta a metila; e do duploto em δ_{H} 8,00 (H-4) com os sinais em δ_{C} 133,7 (C-3), 135,0 (C-9a), 163,2 (C-2) e 183,8 (c-10).

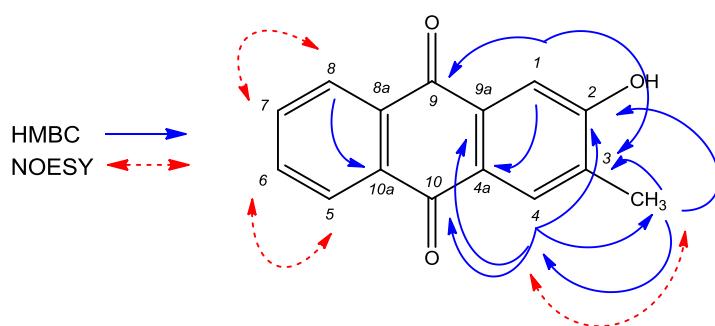
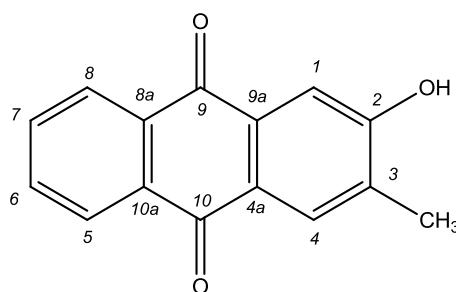


Figura 106. Correlações a duas e três ligações entre os hidrogênios e carbonos no espectro HMBC e correlações espaciais no espectro NOESY observadas nos espectros de Bo-6.

Desta forma, os espectros de IV e RMN de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais e comparações com dados da literatura (Tabela 20. pág. 154) permitiram identificar Bo-6 como sendo 2-hidroxi-3-metil-9,10-antraquinona, isolada pela primeira vez no gênero *Borreria*.



2-hidroxi-3-metil-9,10-antraquinona

Tabela 19. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para os átomos de carbono (δ_C) e hidrogênio (δ_H) da substância Bo-6, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C – APT ou BB (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CD_3OD .

C	HMQC		HMBC		COSY	NOESY
	δ_C	δ_H	2J	3J		
1	112,5	7,54 (s, 1H)			C-3, C-4a, C-9	
2	163,2 ^a	-				
3	133,7	-				
4	131,3	8,00 (d, $J = 0,5$ Hz, 1H)		C-2, 3-CH ₃ , C-9a, C-10		3-CH ₃
4a	127,0	-				
5	127,8	8,21 (m, 1H)			H-6, H-7	H-6
6	134,8	7,80 (ddd, $J = 1,5, 4,0$ e $7,5$ Hz, 1H)			H-5, H-7, H-8	H-5
7	135,2	7,80 (ddd, $J = 1,5, 4,0$ e $7,5$ Hz, 1H)			H-5, H-6, H-8	H-8
8	127,8	8,21 (m, 1H)		C-10 ^a	H-6, H-7	H-7
8a	?	-				
9	184,6 ^a	-				
9a	135,0	-				
10	183,8 ^a	-				
10a	135,1	-				
3-CH ₃	16,5	2,33 (s, 3H)	C-3	C-2, C-4		
2-OH	-	4,52 (sI, 1H)				H-4

Legenda: (ddd) duplo duplo dobrado; (d) duplo; (m) mutiplo; (s) singuleto; (sI) singuleto largo.

^aDeslocamento químico observado apenas no espectro de correlação HMBC.**Tabela 20.** Deslocamentos químicos, tipos de sinal e constantes de acoplamento (J) para os átomos de hidrogênio (δ_H) e carbono (δ_C) de Bo-6, verificados nos espectros de RMN 1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente, CD_3OD), bem como, aqueles apresentados por Ismail, Alias e Osman (2012) para o 2-hidroxi-3-metil-9,10-antraquinona (300 e 75,5 MHz, respectivamente, C_3D_6O).

C	Bo-6		2-hidroxi-3-metil-9,10-antraquinona	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	112,5	7,54 (s, 1H)	111,4	7,67 (s, 1H)
2	163,2 ^a	-	161,0	-
3	133,7	-	134,1	-
4	131,3	8,00 (d, $J = 0,5$ Hz, 1H)	130,1	8,05 (s, 1H)
4a	127,0	-	132,2	
5	127,8	8,21 (m, 1H)	126,5	8,23 (m, 1H)
6	134,8	7,80 (ddd, $J = 1,5, 4,0$ e $7,5$ Hz, 1H)	133,6	7,89 (m, 1H)
7	135,2	7,80 (ddd, $J = 1,5, 4,0$ e $7,5$ Hz, 1H)	133,7	7,89 (m, 1H)
8	127,8	8,21 (m, 1H)	126,6	8,23 (m, 1H)
8a	?	-	?	-
9	184,6 ^a	-	182,6	-
9a	135,0	-	133,8	-
10	183,8 ^a	-	181,5	-
10a	135,1	-	126,5	-
3-CH ₃	16,5	2,33 (s, 3H)	15,6	2,39 (s, 3H)
2-OH	-	4,52 (sI, 1H)	-	-

Legenda: (ddd) duplo duplo dobrado; (d) duplo; (m) mutiplo; (s) singuleto; (sI) singuleto largo.

^aDeslocamento químico observado apenas no espectro de correlação HMBC.

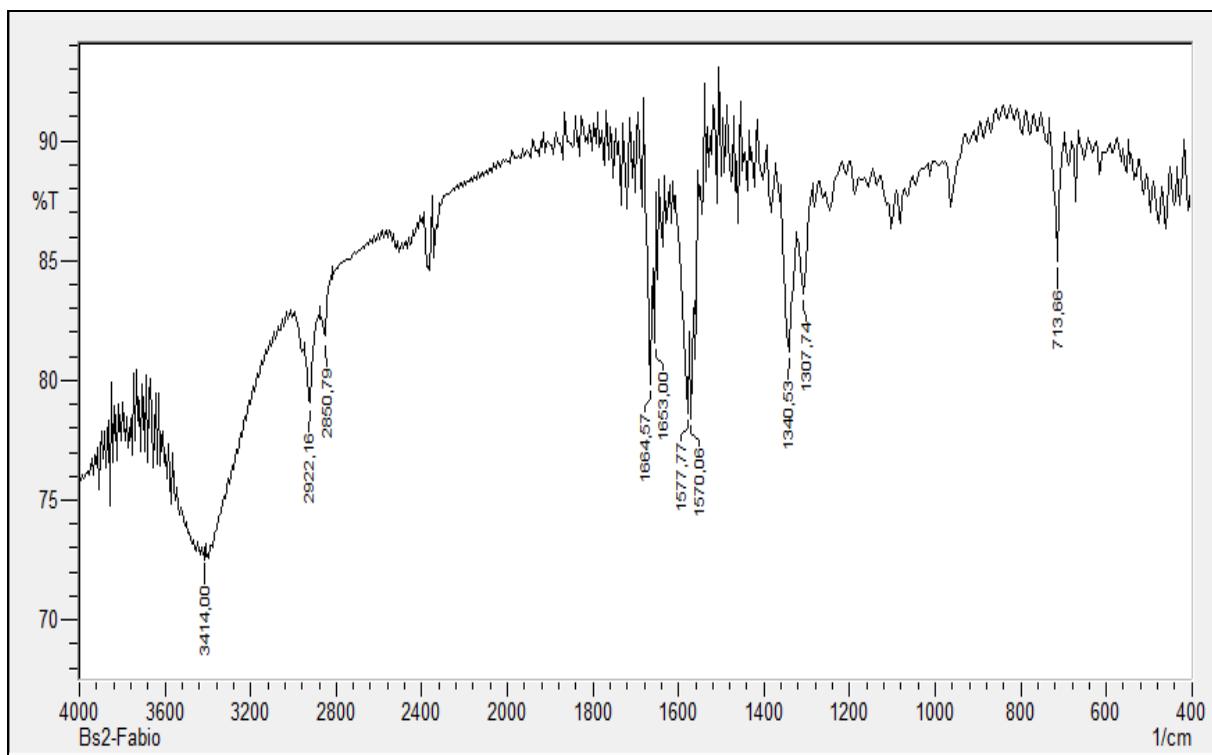


Figura 107. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de Bo-6.

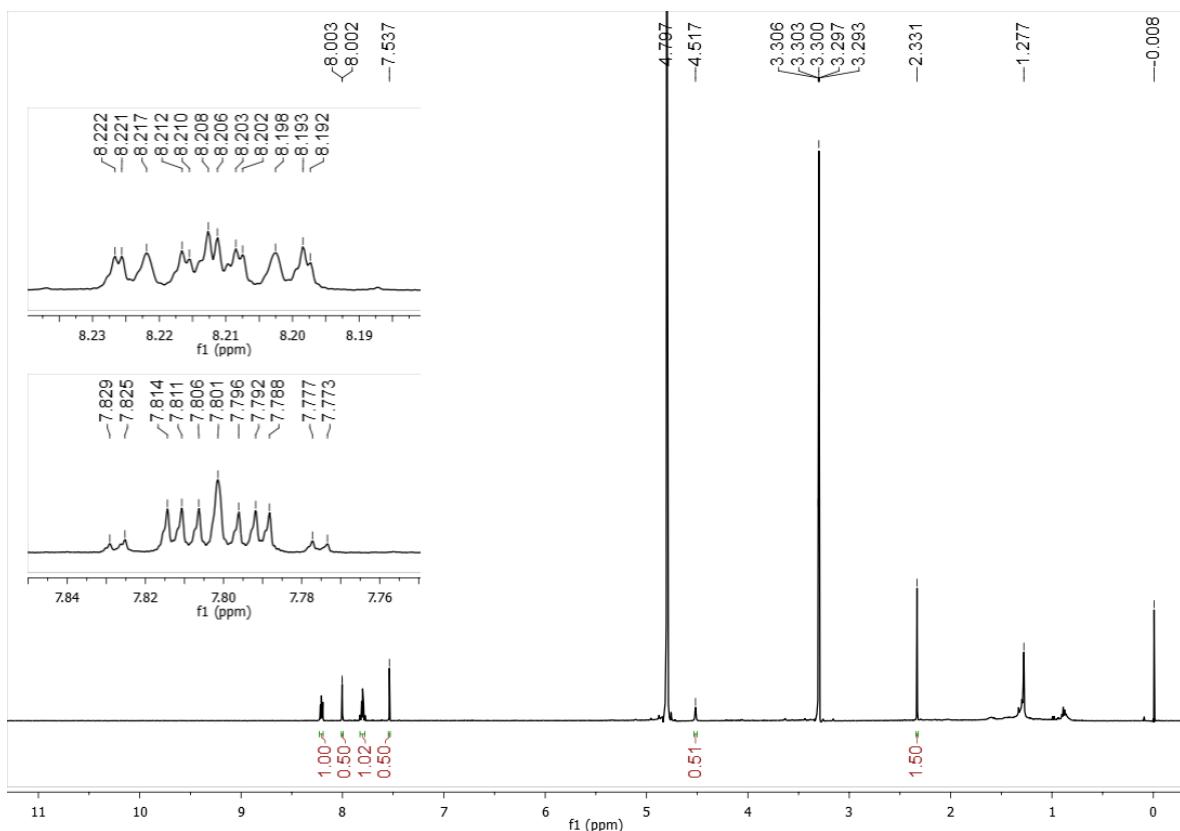


Figura 108. Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de Bo-6.

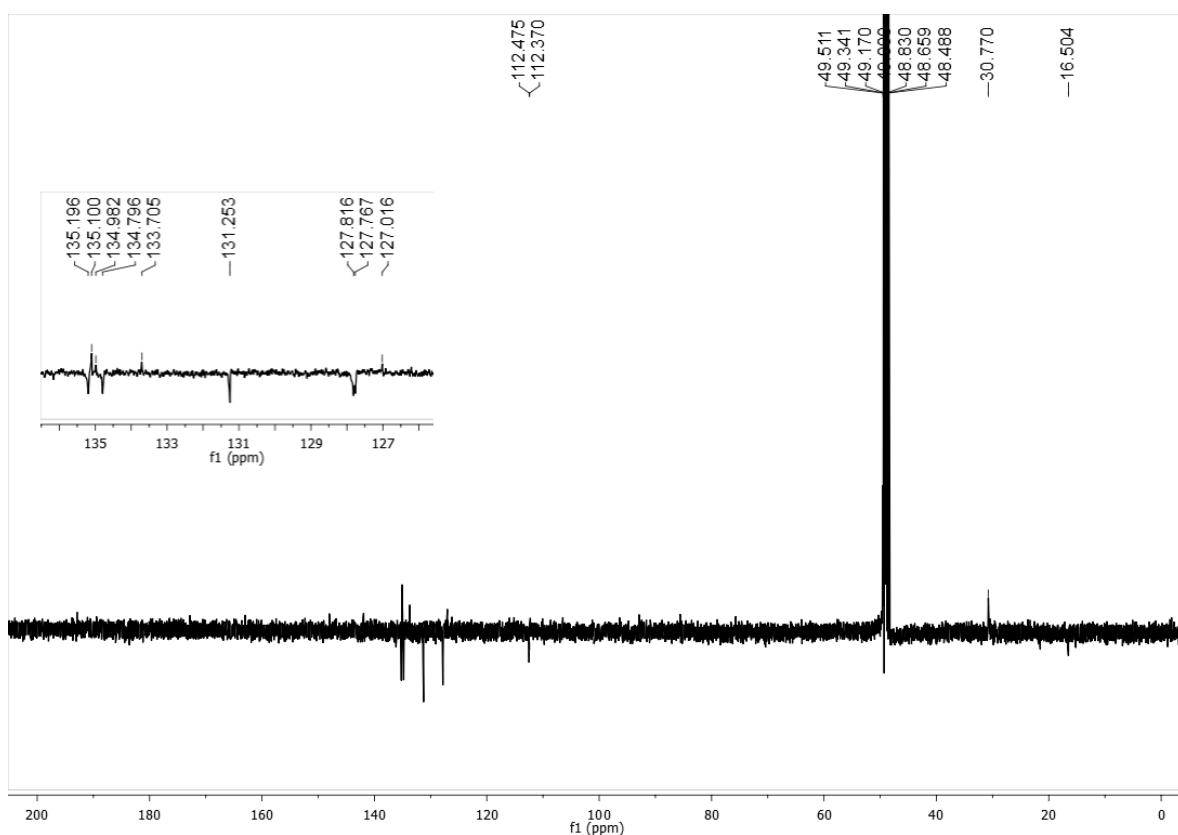


Figura 109. Espectro de RMN ^{13}C – APT (CD_3OD , 125 MHz) de Bo-6.

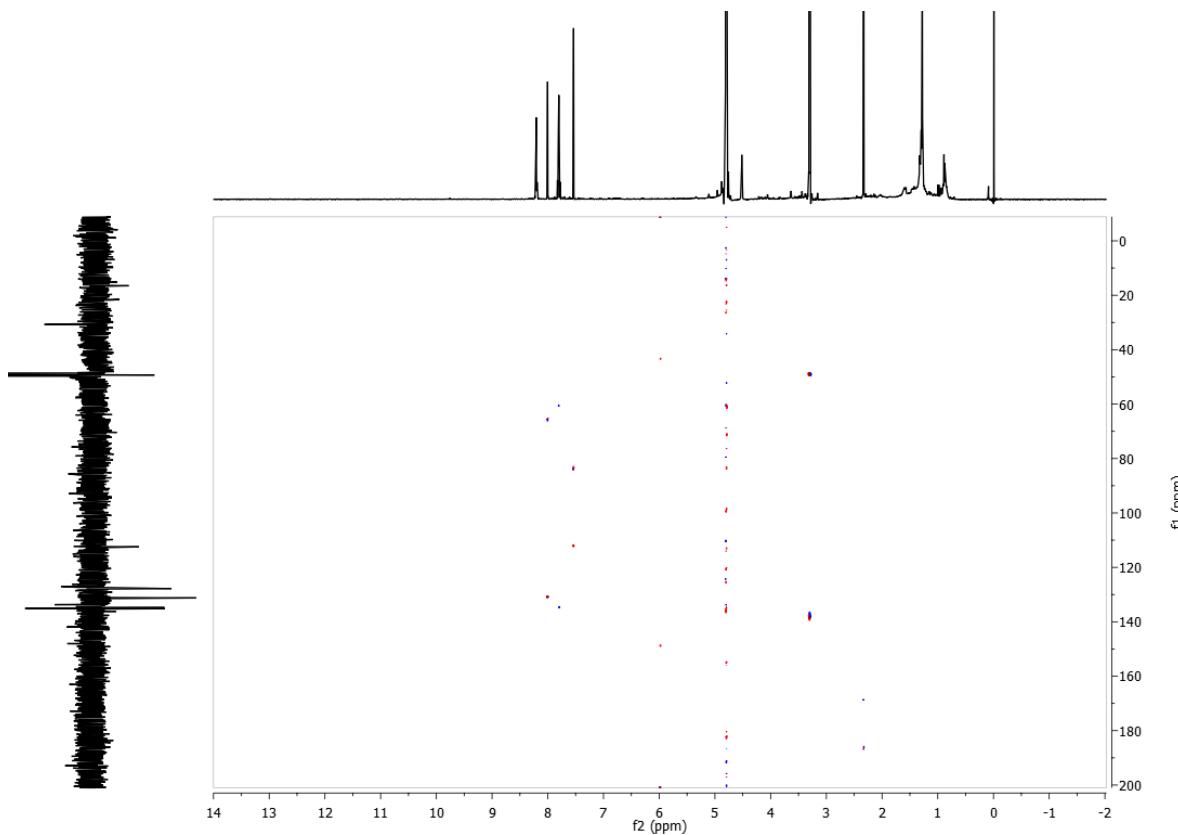


Figura 110. Espectro HMQC (CD_3OD , 500 e 125 MHz) de Bo-6.

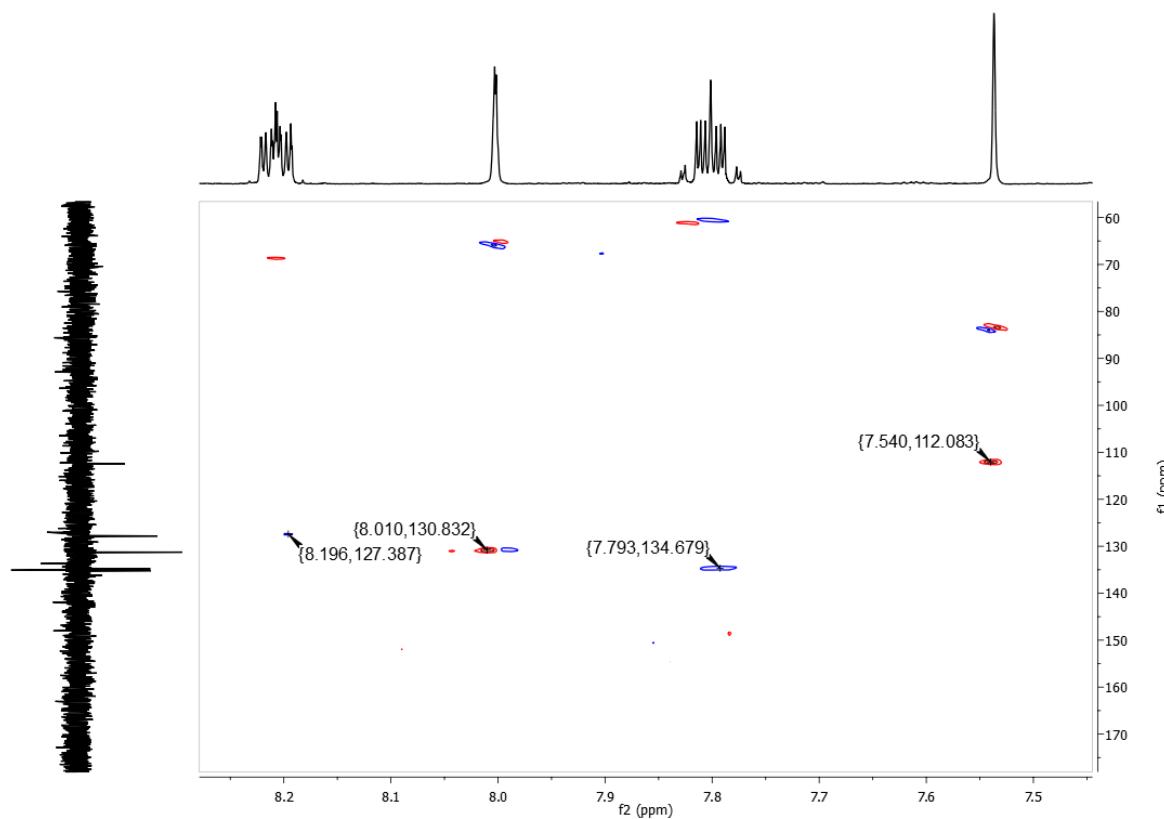


Figura 111. Expansão do espectro HMQC de Bo-6 na região de (7,5 - 8,3 ppm) x (60,0 - 170,0 ppm).

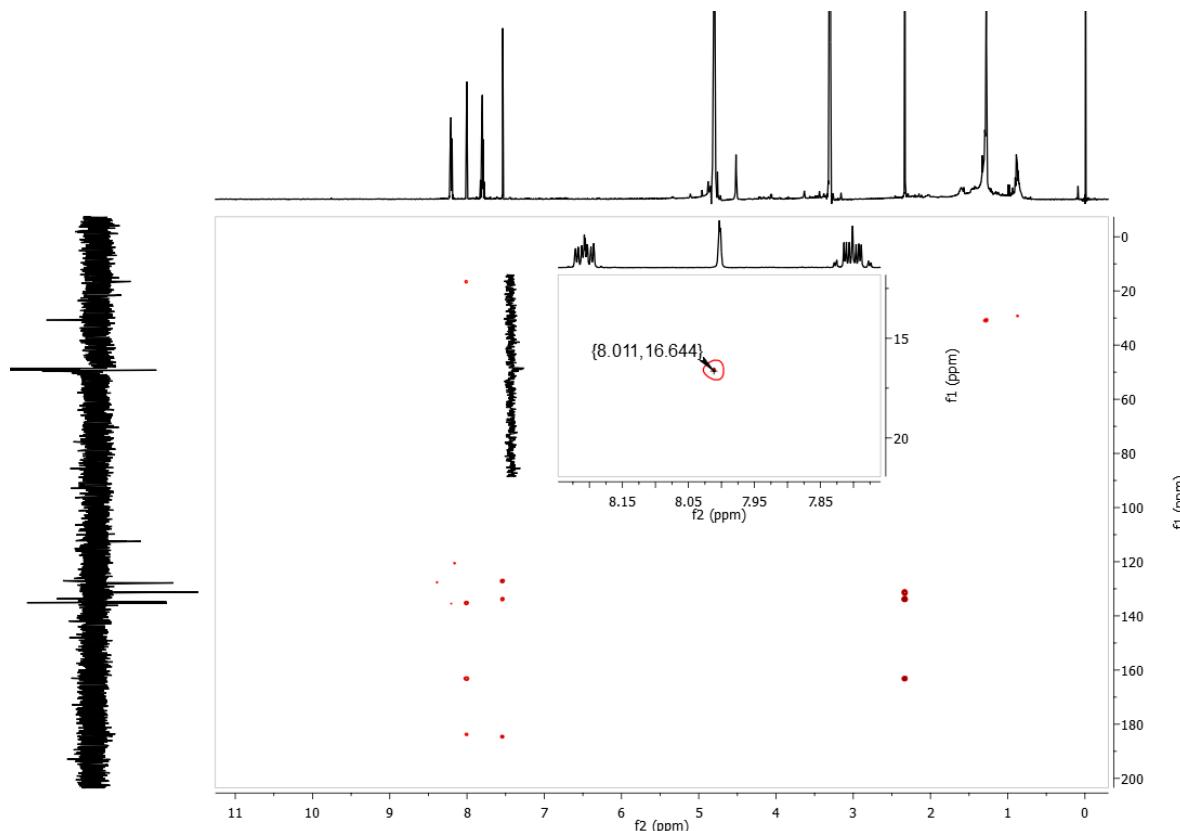


Figura 112. Espectro HMBC (CD_3OD , 500 e 125 MHz) de Bo-6.

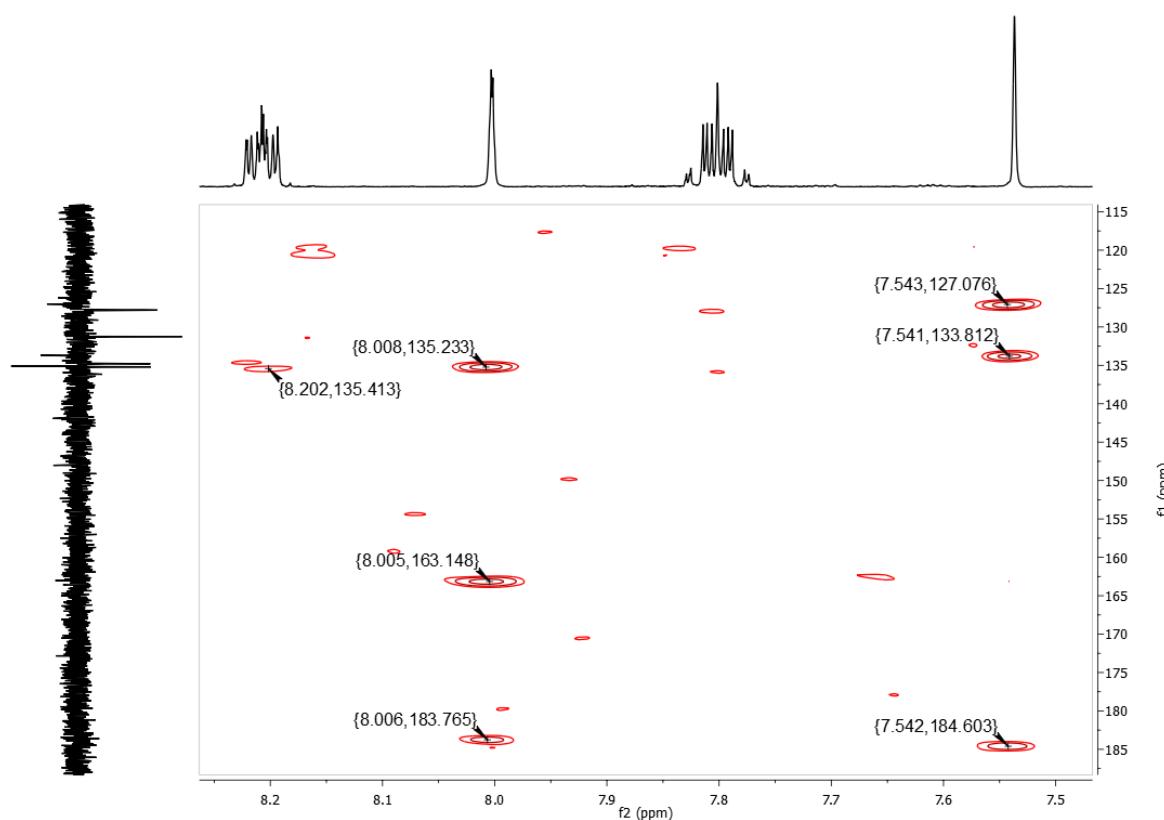


Figura 113. Expansão do espectro HMBC de Bo-6 na região de (7,5 - 8,2 ppm) x (115,0 - 185,0 ppm).

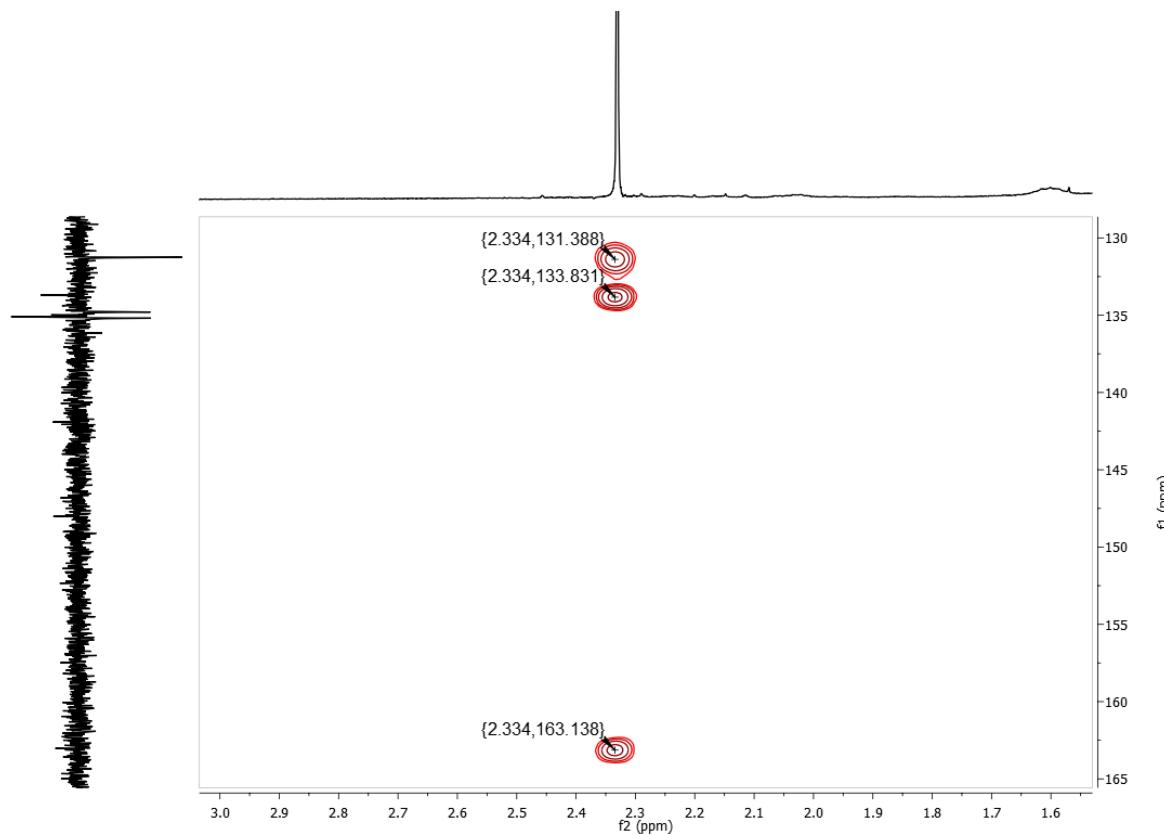


Figura 114. Expansão do espectro HMBC de Bo-6 na região de (1,6 – 3,0 ppm) x (130,0-165,0 ppm).

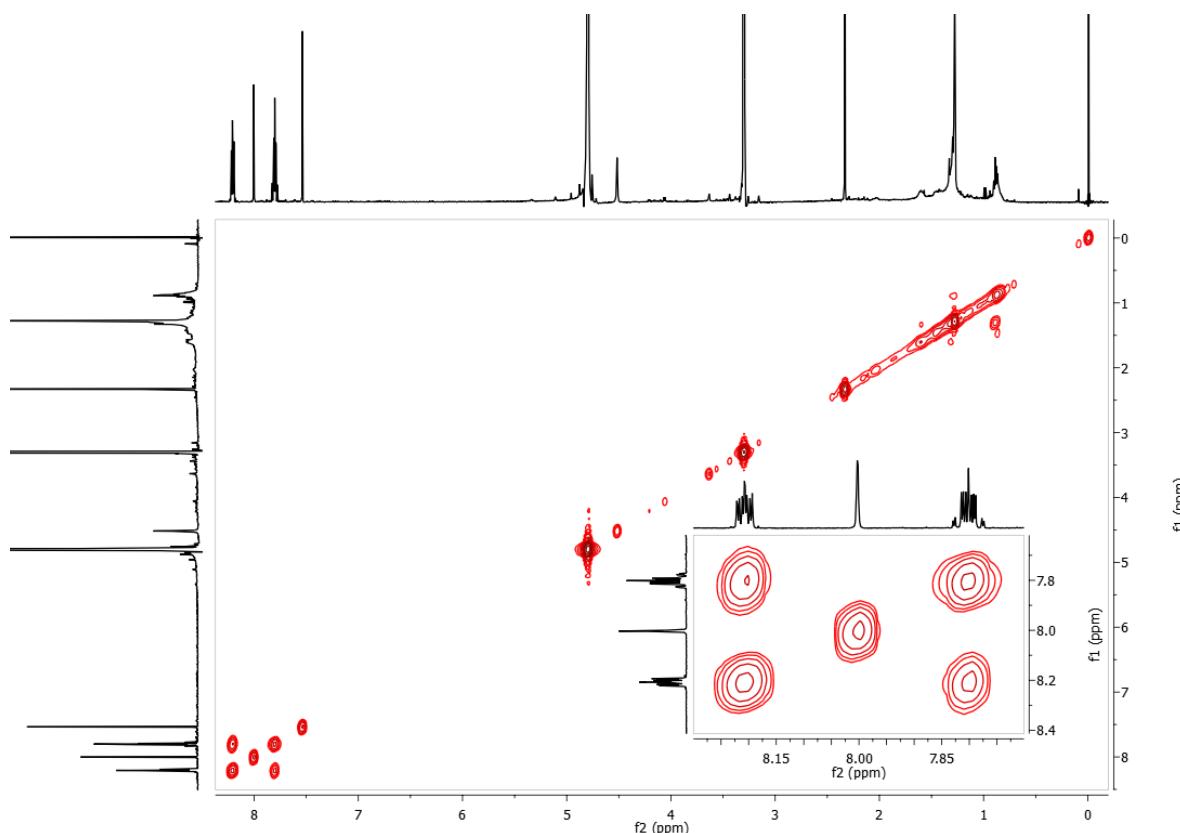


Figura 115. Espectro COSY (CD_3OD , 500 e 125 MHz) de Bo-6.

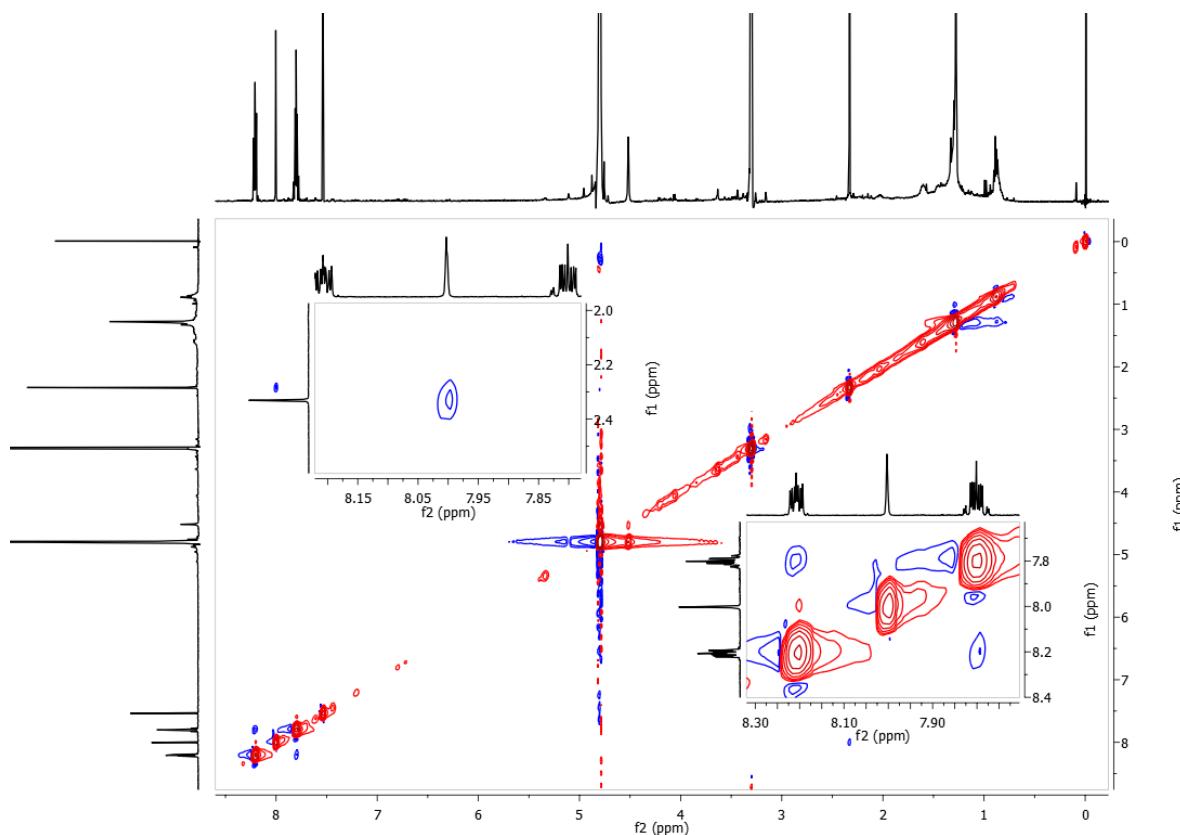
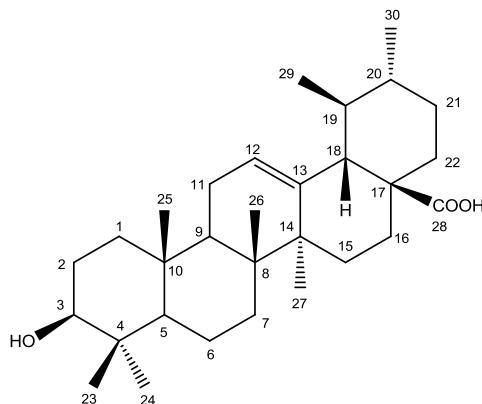


Figura 116. Espectro NOESY (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Bo-6.

5.17. Determinação estrutural de Bo-7

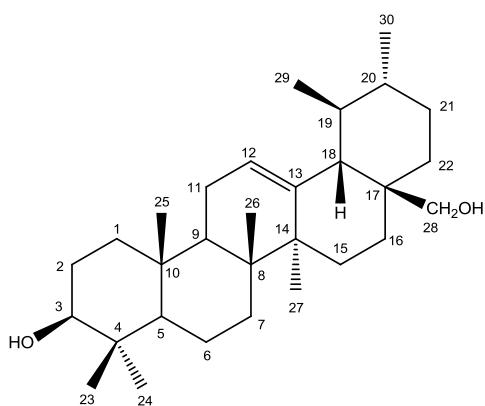
Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) unidimensionais de Bo-7 revelaram-se idênticos aos de Bv-5 permitindo identificá-la como sendo um triterpeno da série ursano, o ácido 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-óico (ácido ursólico).



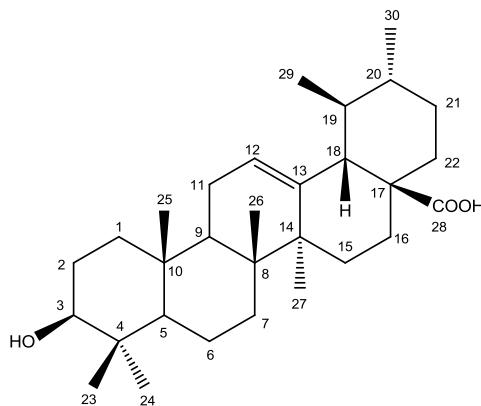
Ácido ursólico

5.18. Determinação estrutural de Rb-1 e Rb-2

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, em CDCl_3 de Rb-1 e $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ de Rb-2) unidimensionais revelaram-se idênticos aos de Bv-6 e Bv-5, respectivamente, permitindo identificá-las também como triterpenos da série ursano: o ácido 3 β ,28-diidroxi-urs-12-eno (uvaol) (Rb-1) e o ácido 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-óico (ácido ursólico) (Rb-2).



Uvaol



Ácido ursólico

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ *Borreria verticillata* apresentou compostos de duas classes metabólicas: oito terpenoides (β -sitosterol, estigmasterol, ácido betulínico, ácool betulínico, ácido oleanólico, ácido ursólico, uvaol e 3β -hidroxiurs-11-en-28,13- β -olídio) e três porfirínicos (feofitina a, feofitina b e 15^1 -hidroxi-(15^1 -S)-porfirinolactona a).
- ✓ *Borreria ocymoides* apresentou três cumarinas (escopoletina, umbeliferona e cumarieletefina), um derivado fenólico (ácido *p*-hidroxicinâmico), duas antraquinonas (2-hidroxi-3-metoxi-6-metilantraceno-9,10-diona e 2-hidroxi-3-metilantraceno-9,10-diona) e um triterpeno (ácido ursólico). Sendo dados extremamente relevantes pois corresponde ao primeiro relato de cumarinas e antraquinonas para o gênero *Borreria*, confirmando as triagens fitoquímicas feitas com espécies nigerianas (EBANA et al., 1991).
- ✓ Este estudo revela que *Borreria verticillata* apresenta metabólitos secundários diferentes daqueles isolados em *Borreria ocymoides* mostrando perfis químicos diferentes para estas espécies morfologicamente semelhantes e que podem representar perfis farmacológicos diferentes sendo necessários estudos de atividade farmacológica para verificação disto.
- ✓ *Richardia brasiliensis* demonstrou dois terpenóides: ácido ursólico e uvaol.
- ✓ Este estudo além de fornecer importantes conhecimentos básicos sobre os gêneros *Borreria* e *Richardia*, viabiliza novos estudos, como os de atividade biológica. Sendo assim, pretende-se dar continuidade ao estudo químico, utilizando as fases hexânica, acetato de etila e n-butanólica, bem como, realizar estudos de atividade farmacológica que possam comprovar o uso deste vegetal na medicina popular e verificar a possibilidade de aproveitamento destas espécies pelo setor farmacêutico.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ACHREM-ACHREMOWICZ, J.; JANECZKO, Z. Betulin - a pentacyclic triterpene. **Wiadomosci Chemiczne**, v. 57, p. 223-246, 2003.

ADEKUNLE, A. A. Antifungal property of the crude extracts of *Rachystegia eurycoma* and *Richardia brasiliensis*. **Nigerian of Journal Natural Products and Medicine** v. 4, p. 70-72, 2000.

ADOLPHO, L. O.; DALCOL, I.; SILVA, V. S.; STÜCKER, C. Atividade antimicrobiana e antioxidante das frações de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). In: JORNADA DE JOVENS PESQUISADORES DO AUGM, 14., 2006, São Paulo. **Anais...** São Paulo: AUGM, 2006.

AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I. J. L. D.; COELHO, V. P. M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 383–395, 2007a.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007b.

AHMAD, R.; SHAARI, K.; LAJIS, N. H.; HAMZAH, A. S.; ISMAIL, N. H.; KITAJIMA, M. Anthraquinones from *Hedyotis capitellata*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1141-1147, 2005.

ANDERSSON, L. A provisional checklist of neotropical Rubiaceae. **Scripta Botanica Bélgica**, v. 1, p. 1-199, 1992.

ANDRE, R.; DELAVEAU, P.; JACQUEMIN, H. Phytochemical research on several Madagascan Rubiaceae. **Plant. Med. Phytother.**, v. 10, p. 233-242, 1976.

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R; ZORZETTO FILHO, D. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, n. 4, p. 233-242, 2001.

ASPREY, G. F.; THORNTON, P. Medicinal plants of Jamaica. IV. **West Indian Med. J.**, v. 4, p. 145-165, 1955.

ASSIS, M. C.; GIULIETTI, A. M. Diferenciação morfológica e anatômica em populações de "ipecacuanha" - *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 205-216, 1999.

AYENSU, E. S. **Medicinal plants of the west Indies**. Unpublished manuscript, 1978.

AYYANAR, M.; IGNACIMUTHU, S. **Traditional knowledge of Kani tribals in Kouthalai of Tirunelveli hills**, India: Tamil Nadu, 2005.

BALDE, A. M.; PIETERS, L. A.; GERGELY, A.; WRAY, V.; CLAEYS, M.; VLIETINCK, A. J. Spermacoceine, a bis-indole alkaloid from *Borreria verticillata*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 3, p. 997-1000, 1991.

BANDYOPADHYAY, D.; NAYAK, A.; BASAK, B.; BANERJI, A.; BANERJI, J.; CHATTERJEE, A.; PRANGE, T.; NEUMAN, A. *N*-(4-methylphenyl) benzene propanamide – the first isolated amide from the genus *Paederia*. **Natural Product Communications**, v. 2, n. 7, p. 753-754, 2007.

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, A. A. M. Vegetação vascular litorânea da Lagoa de Jacarepiá, Saquarema, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n. 1, p. 97-110, 2009.

BARTOLI, A.; SÁNCHEZ GULLÓN, E.; WEICKERT, P.; TORTOSA, R. D. Plantas americanas nuevas para la flora adventicia del sur de España. **Acta Botánica Malacitana**, v. 32, p. 276-282, 2007.

BENEVIDES, P. J. C.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Biological activities of constituents from *Psychotria spectabilis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, n. 8, p. 565-569, 2004.

BENJAMIN, T. V. Investigation of *Borreria verticillata*, an antieczematic plant of Nigeria. **Q. J. Crude Drug Res.**, v. 17, p. 135-136, 1979.

BHADORIA, B. K.; GUPTA, R. K. Chemical constituents of *Borreria stricta* Linn. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 58, n. 2, p. 202-203, 1981.

BRUNETON, J. **Pharmacognosie Phytochimie Plantes Medicinales**. Londres Tec. Doc. 1993.

BUCHANAN, M. S.; HASHIMOTO, T.; ASAKAWA, Y. Phytol esters and phaeophytins from the hornwort *Megaceros flagellaris*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1373-1376, 1996.

CABRAL, E. L.; BACIGALUPO, N. M. Estudio de las especies americanas de *Borreria* series Leaves (Rubiaceae, Spermacoceae). **Darwiniana**, v. 37, n. (3-4), p. 259-277, 1999.

CARBONEZI, C. A.; HAMERSKI, L.; FLAUSINO JÚNIOR, O. A.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M. Determinação por RMN das configurações relativas e conformações de alcalóides oxindólicos isolados de *Uncaria guianensis*. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 878-881, 2004.

CARDOSO, C. L. **Estudo fitoquímico e biológico de *Chimarrhis turbinata* DC. Prod. (Rubiaceae).** 2003. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHEN, Y.; CHANG, F.; WU, C.; YEN, M.; LIAW, C.; HUANG, H.; KUO, Y.; WU, Y. New cytotoxic 6-oxygenated 8,9-dihydrofurocoumarins, hedyotiscone A - C, from *Hedyotis biflora*. **Planta Medica**, v. 72, n. 1, p. 75-78, 2006.

CHUNGSAMARNYART, N.; SIRINARUMITR, T.; CHUMSING, W.; WAJJAWALKU, W. *In vitro* Study of Antiviral Activity of Plant Crude-extracts against the Foot and Mouth Disease Virus. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**, v. 41, p. 97-103, 2007.

COELHO, V. P. M.; AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R. V. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schleidl.) K.Schum. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 170-177, 2006.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L. FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 183-205, 2001.

COUTINHO, H. D.M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine, **Chemotherapy**, v. 54, p. 328-330, 2008.

DEL VITTO, L. A.; PETENATTI, E. M.; PETENATTI, M. E. Recursos herbolarios de San Luis (República Argentina) - Primera parte: Plantas nativas. **Multequina**, v. 6, p. 49-66, 1997.

DIAS, C. S.; MOURA, M. D.; CABRAL, A. G. S.; MOTA, S. G. R.; DA-CUNHA, E. V. L.; SILVA, T. M. S.; HARLEY, A. M. G.; BARBOSA-FILHO, J. M. Nuevas feofitinas aisladas de *Anisacanthus brasiliensis* lindau (Acanthaceae). **LABCIENCIA noticias técnicas del laboratório**, v. 1, pág. 14-15, 2007.

DUAN, H.; TAKAISHI, Y.; MOMOTA, H.; OHMOTO, Y.; TAKI, T. Immunosuppressive constituents from *Saussurea medusa*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 85-90, 2002.

EBANA, R.U.B.; MADUNAGU, B.E.; EKPE, E.D.; OTUNG, I.N. Microbiological exploitation of cardiac glycosides and alkaloids from *Garcinia kola*, *Borreria ocymoides*, *Kola nitida* and *Citrus aurantifolia*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, p. 398-401, 1991.

EDEOGA, H. O.; OKWU, D. E.; MBAEBIE, B. O. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 7, p. 685-688, 2005.

EKPENDU, T. O. E.; EKUNDAYO, O.; LAAKSO, I. Constituents and antimicrobial activity of the volatile oil of *Spermacoce verticillata* Linn - a Nigerian medicinal Rubiaceous weed. **Journal of Chemical Society of Nigeria**, v. 26, n. 2, p. 194-198, 2001.

EKPENDU, T. O. E.; EKUNDAYO, O.; LAAKSO, I. Constituents of the volatile oil of *Spermacoce ocymoides* (Syn. *Borreria scrabra*) (Rubiaceae). **Journal of Chemical Society of Nigeria**, v. 27, n. 2, p. 147-149, 2002.

FERREIRA, A. G.; ROSA, S. G. T. Germinação de sementes de sete espécies medicinais nativas do sul do Brasil. **Brazilian Journal of Medicinal Plants**, v. 11, n. 3, p. 230-235, 2009.

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

FORMAN, L.; BRIDSON, D. **The herbarium handbook**. Great Britanic: Royal Botanic Gardens, Kew, 1989.

FREITAS, J. C.; FERNANDES, M. E. B. Uso de plantas medicinais pela comunidade de Enfarrusca, Bragança, Pará. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, Ciências Naturais**, v. 1, n. 3, p. 11-26, 2006.

FUJIOKA, T.; KASHIWADA, Y.; KILKUSKIE, R. E.; CONSENTINO, L. M.; BALAS, L. M.; JIANG, J. B.; JAZEN, W. P.; CHEN, I.; LEE, K. Anti-aids agents. Betulinic acid and platonic acid as Anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. **Journal Natural Products**, v. 57, p. 243, 1994.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 2, p. 178-182, 2005.

GOGOI, B.; DAS, K.; BARUAH, K. K. Allelopathic effects of some weeds on growth and yield of direct seeded upland rice (*Oryza sativa* L.). **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 7, n. 2, p. 119-125, 2002.

GRANDI, T. S. M.; TRINDADE, J. A.; PINTO, M. J. F.; FERREIRA, L. L.; CATELLA, A. C. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 3, n. 2, p. 185-224 (suplemento), 1989.

GROENINCKX, I.; DESSEIN, S.; OCHOTERENA, H.; PERSSON, C.; MOTLEY, T. J.; KAREHED, J.; BREMER, B.; HUYSMANS, S.; SMETS, E. Phylogeny of the herbaceous tribe Spermacoceae (Rubiaceae) based on plastid DNA data. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 96, p. 109-132, 2009.

GROTH, D. Identificação botânica de plantas e sementes de espécies invasoras na cultura da soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 2, n. 3, p. 59-95, 1980.

GUERRERO-ANALCO, J. A.; HERSCHE-MARTINEZ, P.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; NAVARRETE, A.; MATA, R. Antihyperglycemic effect of constituents from *Hintonia standleyana* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Planta Medica**, v. 71, n. 12, p. 1099-1105, 2005.

GYLMAN, A. G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9. ed. México: McGraw-Hill, 1996.

HAMERSKI, L.; CAVALHEIRO, A. J.; CARBONEZI, C. A.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Saponinas triterpênicas de *Tocoyena brasiliensis* Mart. (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 601-604, 2005.

HAMMODA, H. M.; ELA, M. A. A.; EL-LAKANY, A. M.; EL-HANBALI, O.; ZAKI, C. S.; GHAZY, N. M. New constituents of *Artemisia monosperma* Del. **Pharmazie**, v. 63, n. 8, p. 611-614, 2008.

HAUSER, E. W.; PARHAM, S. A. Effects of annual weeds and cultivation on the yield of peanuts. **Weed Research**, v. 9, n. 3, p. 192-197, 1969.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EDUFSCAR, 2002.

HUANG, W.; YU, S.; LI, Y.; JIANG, J. Four anthraquinones from *Hedyotis diffusa*. **Journal of Asian Natural Products Research**. v. 10, n. 9, p. 887-889, 2008.

HUANG, X.; LI, M.; XU, B.; ZHU, X.; DENG, Z.; LIN, W. Proteasome and NF- κ B inhibiting phaeophytins from the green alga *Cladophora fascicularis*. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 582-592, 2007.

INOUE, H.; TAKEDA, Y.; NISHIMURA, H.; KANOMI, A.; OKUDA, T.; PUFF, C.; Chemotaxonomic studies of Rubiaceous plants containing iridoids glucosides. **Phytochemistry**, v.27, p. 2591-2598, 1988.

ISMAIL, N. H.; ALIAS, A.; OSMAN, C. P. Alkaloids and anthraquinones from Malaysian Flora. In: **Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**. Malaysia: Universiti Teknologi MARA, 2012. Disponível em: http://cdn.intechopen.com/pdfs/32949/InTech-Alkaloids_and_anthraquinones_from_malaysian_flora.pdf Acesso em: 04 de Abril de 2013.

JERZ, G.; ARREY, T. N.; WRAY, V.; DU, Q.; WINTERHALTER, P. Structural characterization of 13²-hydroxy-(13²-S)-phaeophytin-a from leaves and stems of *Amaranthus tricolor* isolated by high-speed countercurrent chromatography. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 413-413, 2007.

JIANG, D.; MING-HUA, Q.; RUI-LIN, N.; YANG, L.; NAN, W.; QI-TAI, Z. Two new *Buxus* alkaloids from *Buxus Microphylla* Sieb. et Zucc. **Acta Botanica Sinica**, v. 38, n. 6, p. 483-488, 1996.

JOSSANG, A.; JACQUEMIN, H.; POUSSET, J. L.; CAVÉ, A. Alkaloids of *Borreria capitata*. **Planta Medica**, v. 43, p. 301-304, 1991.

JUMA B. F.; MAJINDA R. R. T. Constituents of *Gardenia volkensii*: their brine shrimp lethality and DPPH radical scavenging properties. **Natural Product Research**, v. 21, n. 2, p. 121-125, 2007.

JUNQUEIRA NETTO, A.; MILANEZ de REZENDE, P.; NUNES de ALCANTARA, E. Effect of herbicides on weed control and grain yield of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Prática**, v. 7, n. 1, p. 23-37, 1983.

KAISER, C. R. RMN 2D: detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 231-236, 2000.

KALITA, D. Allelopathic effect of weeds on physio-chemical properties of rice and nutrient status of soil. **Ecology, Environment and Conservation**, v. 7, n. 1, p. 79-85, 2001.

KAMIYA, K.; FUJITA, Y.; SAIKI, Y.; HANANI, E.; MANSUR, U.; SATAKE, T. Studies on the constituents of Indonesian *Borreria latifolia*. **Heterocycles**, v. 56, n. (1/2), p. 537-544, 2002.

KAMIYA, K.; TANAKA, Y.; ENDANG, H.; UMAR, M.; SATAKE, T. Chemical constituents of *Morinda citrifolia* fruits inhibit copper-induced low-density lipoprotein oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5843-5848, 2004.

KAMIYA, K.; TANAKA, Y.; ENDANG, H.; UMAR, M.; SATAKE, T. New anthraquinone and iridoid from the fruits of *Morinda citrifolia*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 12, p. 1597-1599, 2005.

KAPOOR, S. K.; PRAKASH, L.; ZAMAN, A. Chemical constituents of *Borreria hispida*. **Indian Journal of Applied Chemistry**, v. 32, n. 6, p. 402, 1969.

KOBAYASHI, M.; ISHIDA, K.; TERABAYASHI, S.; MITSUHASHI, H. 10-hydroxypheophytins and a new norlabdame diterpene from the leaves of *Cupressus funebris*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 12, p. 3348-3349, 1991.

KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2351-2355, 1990.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS, 2001.

LEWIS, W. H.; OLIVER, R. L. Revision of *Richardia* (Rubiaceae). **Brittonia**, v. 26, p. 271-301, 1974.

LIU, Z. L.; TIAN, X. The components of *Cacalia tangutica*. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 25, n. 7, p. 1078-1080, 2004.

LOPES, L. E.; BUZATO, S. Biologia reprodutiva de *Psychotria suterella* Muell. Arg. (Rubiaceae) e a abordagem de escalas ecológicas para a fenologia de floração e frutificação. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 4, p. 785-795, 2005.

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

MAHATO, S. B.; SEM, S. Advances in Triterpenoid research. **Phytochemistry**, v. 44, p. 1185, 1997.

MAIA, G. L. A. **Estudo fitoquímico de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Reis (Fabaceae)**. 2008. 151 p. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros”, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

MALIKOV, V. M.; SAIDKHODZHAEV, A. I. Coumarins. Plants, structure, properties. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 34, n. 3, p. 345-432, 1998.

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

MATSUO, A.; ONO, K.; HAMASAKI, K.; NOZAKI, H. Phaeophytins from a cell suspension culture of the liverwort *Plagiochila ovalifolia*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 2, p. 427-430, 1996.

MAYNART, G.; POUSET, J. L.; MBOUP, S.; DENIS, F. Antibacterial activity of borreverine, an alkaloid isolated from *Borreria verticillata* (Rubiaceae). **C. R. Soc. Biol.**, v. 174, p. 925-928, 1980.

MELO, A. S.; BARBOSA, M. R.V. O gênero *Borreria* G.Mey (Rubiaceae) na Mata do Buraquinho, João Pessoa, Paraíba. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 627-629, 2007.

MERÉTIKA, A. H. C. **Conhecimento e utilização de plantas medicinais por comunidades de pescadores do município de Itapoá – SC**. 2008. 78 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

MONGRAND, S.; BADOC, A.; PATOUILLE, B.; LACOMBLEZ, C.; CHAVENT, M.; BESSOULE, J. Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition. **Phytochemistry**, v. 66, p. 549-559, 2005.

MONQUERO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Dinâmica do banco de sementes em áreas com aplicação freqüente do herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 21, n. 1, p. 63-69, 2003.

- MOREIRA, E. A. Identification of emetine in some *Borreria* species. (Paper Chromatography). **Trib. Farm.**, v. 32, p. 9-30, 1964.
- MOREIRA, V. F.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Constituintes químicos de *Borreria verticillata* (Rubiaceae). In: 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **Anais...**, Fortaleza, 2009.
- MOREIRA, V. F.; OLIVEIRA, R. R.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. New chemical constituents from *Borreria verticillata* (Rubiaceae). **Helv Chim Acta**, v. 93, p. 1751-1757, 2010.
- MOURA, V. M.; SANTOS, D. P.; SANTIN, S. M. O.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. Constituintes químicos de *Galianthe brasiliensis* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 452-455, 2006.
- MUDALAIR, M. K. S. **Gunapadam (Materia medica) - Mooligai Vagupu**. 7 ed. Directorate of Indian Medicine and Homeopathy, 2003.
- MUKHERJEE, K. S.; MANNA, T. K.; LAHA, S.; BRAHMACHARI, G. Chemical investigation of *Limnophila heterophylla* and *Borreria articulatis*. **J. Indian Chem. Soc.**, v. 71, n. 10, p. 655-656, 1994.
- MUKHERJEE, K. S.; MANNA, T. K.; LAHA, S.; CHAKRAVORTY, C. K. Phytochemical investigation of *Borreria articulatis* Linn. **J. Indian Chem. Soc.** v. 70, n. 6, p. 609-610, 1993.
- MUKHERJEE, K. S.; MUKHOPADHYAY, B.; MONDAL, S.; GORAI, D.; BRAHMACHARI, G. Triterpenoid constituents of *Borreria articulatis*. **Jour. Chin. Chem. Soc.**, v. 51, n.1, p. 229-231, 2004.
- NAKATANI, Y.; OURISSON, G.; BECK, J. P.; Chemistry and biochemistry of Chinese drugs. VII. Cytostatic pheophytins from silkworm excreta, and derived photocytotoxic pheophorbides. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 2261-2269, 1981.
- NARINE, L. L.; MAXWELL, A. R. Monoterpenoid indole alkaloid from *Palicourea crocea*. **Phytochemistry Letters**, v. 2; n. 1, p. 34-36, 2009.
- NATIONAL Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Japan). Yukinae Yamazaki, Yasuhiro Kono. **Photosensitizers and tumor cytotoxic agents containing porphyrins from plants**. JP 2004217541, 05 agosto 2004.
- NIÑO, J.; NARVÁEZ, D. M.; MOSQUERA, O. M.; CORREA, Y. M. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from colombian biodiversity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 566-570, 2006.
- NOELLI, F. S. Múltiplos usos de espécies vegetais pela farmacologia Guarani através de informações históricas. **Diálogos**, v. 2, p. 177-199, 1998.

NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A.; LIRA, D. P.; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. V. B.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18 (Supl.), p. 718-723, 2008.

OCAMPO, R.; REPETA, D. J. 13^2 (S)-OH methyl bacteriopheophorbide a allomer in sedimentary organic matter. **Organic Geochemistry**, v. 35, p. 209-214, 2004.

OLEA, R. S.; ROQUE, N. F. Análise de mistura de triterpenos por RMN de ^{13}C . **Química Nova**, v. 13, p. 278, 1990.

OLMEDO, D.; RODRIGUEZ, N.; VASQUEZ, Y.; SOLIS, P. N.; LOPEZ-PEREZ, J. L.; SAN FELICIANO, A.; GUPTA, M. P. A new coumarin from the fruits of *Coutarea hexandra*. **Natural Product Research**, v. 21, n. 7, p. 625-631, 2007.

PANICHAYUPAKARANANT, P.; NOGUCHI, H.; DE-EKNAMKUL, W.; SANKAWA, U. Naphthoquinones and coumarins from *Impatiens balsamina* root cultures. **Phytochemistry**, v. 40, n. 4, p. 1141 1143, 1995.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PEDRINHO JÚNIOR, A. F. F.; BIANCO, S.; PITELLI, R. A. Acúmulo de massa seca e macronutrientes por plantas de *Glycine max* e *Richardia brasiliensis*. **Planta daninha**, v. 22, n. 1, p. 53-61, 2004.

PEIXOTO NETO, P. A.; SILVA, M. V.; CAMPOS, N. V.; PORFIRIO, Z.; CAETANO, L. C. Antibacterial activity of *Borreria verticillata* roots. **Fitoterapia**, v. 73, p. 529-531, 2002.

PELTER, A.; WARD, R. S.; GRAY, T. I. The Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance spectra of Flavonoids and related compounds. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 23, p. 2475-2483, 1976.

PEREIRA, C. O.; LIMA, E. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; TOLEDO, M. S.; AZEVEDO, A. K. A.; GUERRA, M. F.; PEREIRA, R. C. Abordagem etnobotânica de plantas medicinais utilizadas em dermatologia na cidade de João Pessoa-Paraíba, Brasil. **Brazilian Journal of Medicinal Plants**, v. 7, n. 3, p. 9-17, 2005.

PEREIRA, G. F. **A família Rubiaceae Juss. na vegetação ripária de um trecho do alto Rio Paraná, Brasil, com ênfase na tribo Spermacoceae**. 2007. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais) – Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.

PEREIRA, M. S.; BARBOSA, M. R. V. A Família Rubiaceae na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. Subfamílias Antirheoideae, Cinchonoideae e Ixoroideae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 2, p. 305-318, 2004.

PEREIRA, Z. V.; CARVALHO-OKANO, R. M.; GARCIA, F. C. P. Rubiaceae Juss. da Reserva Florestal Mata do Paraíso, Viçosa, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 207-224, 2006.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PINTO, D. S. **Primeiros estudos quimiotaxonômicos do gênero Richardia: fitoquímica da espécie Richardia brasiliensis Gomes (Rubiaceae)**. 2008. 148 p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – LTF/CCS/UFPB, João Pessoa, 2008.

PINTO, D. S.; TOMAZ, A. C. A.; NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; ALMEIDA, J. R. G. S.; CAVALCANTE, L. S.; DIAS, C. S.; CUNHA, E. V. L. Antioxidant activity of *Richardia brasiliensis* Gomes. In: **SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, 20., 2008, São Paulo. **Anais...** São Paulo: USP, 2008a.

PINTO, D. S.; TOMAZ, A. C. A.; TAVARES, J. F.; TENÓRIO-SOUZA, F. H.; DIAS, C. S.; BRAZ-FILHO, R.; DA-CUNHA, E. V. L. Secondary metabolites isolated from *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 3, p. 367-372, 2008b.

POLLITO, P. A. Z.; TOMAZELLO FILHO, M. *Cinchona amazonica* Standl: (Rubiaceae) in the state of Acre, Brazil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais**, v. 1, n. 1, p. 9-18, 2008.

PURUSHOTHAMAN, K. K.; KALYANI, K. Isolation of isorhamnetin from *Borreria hispida* Linn. **J. Res. Indian Med. Yoga Homeopathy**, v. 14, p. 131-132, 1979.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto Rio Grande – Minas Gerais. **Ciênc. Agrotec.**, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.

ROSSI, A. A. B.; OLIVEIRA, L. O.; VIEIRA, M. F. Distyly and variation in floral traits in natural populations of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 2, p. 285-294, 2005.

SAINTY, D.; BAILLEUL, F.; DELAVEAU, P.; JACQUEMIN, H. Iridoids of *Borreria verticillata*. **Planta Medica**, v. 42, p. 260-264, 1981.

SCHUMANN, C. Rubiaceae, Tribus VIII, Spermacoceae, XXIII Borreria. **Flora Brasiliensis**, v. 6, n. 6, p. 39-71, 1988.

SCHWIKKARD, S. L.; MULHOLLAND, D. A.; HUTCHINGS, A. Phaeophytins from *Tapura fisheri*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 8, p. 2391-2394, 1998.

SCOLES, R. Sabiduria popular y plantas medicinales: el ejemplo de la comunidad negra de Itacoã, Acará, Pará. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Ciências Naturais**, v. 1, n. 2, p. 79-102, 2006.

SEEBACHER, W.; SIMIC, N.; WEIS, R.; SAF, R.; KUNERT, O. Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR resonances of oleanolic acid, 18 α -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. **Magn. Reson. Chem.** v. 41, p. 636, 2003.

SENER, B.; ERGUN, F. The first isolation of an isoquinoline alkaloid from *Galium aparine* L. **Journal of Faculty of Pharmacy of Gazi University**, v. 8, n.1, p. 13-15, 1991.

SHARMA, K. M. N.; GUPTA, R. K. Chemical constituents of *Borreria stricta* seeds. **Fitoterapia**, v. 58, n. 2, p. 135-136, 1987.

SIDDQUI, S.; SIDDQUI, B. S.; NAEED, A.; BEGUN, S. Pentacyclic triterpenoids from the leaves of *Plumeria obtusa*. **Phytochemistry**. v. 28, n. 11, p. 3143, 1989.

SILVA, A. J. R.; ANDRADE, L. H. C. Etnobotânica nordestina: estudo comparativo da relação entre comunidades e vegetação na Zona do Litoral – Mata do estado de Pernambucano, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 1, p. 45-60, 2005.

SILVA, V. C.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. S.; LOPES, M. N. Isolation of lignans glycosides from *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. (Rubiaceae) by preparative high-performance liquid chromatography. **Eclética Química**, v. 31, n. 4, p. 55-58, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 7. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS, 2010.

SINHA, S. K. P.; DOGRA, J. V. V. A survey of the plants of bhagalpur and santhal pargana for saponins, flavonoids and alkaloids. **Int. J. Crude Drug Res.**, v. 23, n. 2, p. 77-86, 1985.

SIRSI, S.; JAYARAMAN, K.; ALWAR, R. P. A.; TAGAT, V. Crop-weed competition in coffee: dry matter production and nutrient composition of weeds. **Journal of Coffee Research**, v. 11, n. 4, p. 115-120, 1981.

SISON, C. M.; BUKIDNON, P. Sulfentrazone for preplant weed control in pineapple. **Acta Horticulturae**, v. 529 (Proceedings of the Third International Pineapple Symposium, 1998), p. 303-307, 2000.

SOARES, E. L. C.; VENDRUSCOLO, G. S.; EISINGER, S. M.; ZÁCHIA, R. A. Estudo etnobotânico do uso de recursos vegetais em São João do Polêsine, RS, Brasil, no período de outubro de 1999 a junho de 2001. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 6, n. 3, p. 69-95, 2004.

SOUZA FILHO, A. P. S.; PEREIRA, A. A. G.; BAYMA, J. C. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 25, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de faneróginas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II.** 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

SU, B.; KANG, Y.; PINOS, R. E.; SANTARSIERO, B. D.; MESECAR, A. D.; SOEJART, D. D.; FONG, H. H. S.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Isolation and absolute stereochemistry of coussaric acid, a new bioactive triterpenoid from the stems of *Coussarea brevicaulis*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 293-302, 2003.

SZUSTER-CIESIELSKA, A.; KANDEFER-SZERSZEN, M. Protective effects of betulin and betulinic acid against ethanol-induced cytotoxicity in hepG2 cells. **Pharmacological Reports**, v. 57, p. 588-595, 2005.

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Medadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 132-138, 2005.

TENÓRIO-SOUZA, F. H. **Farmacoquímica e Farmacobotânica de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae)**. 2009. 195 p. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros”, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

TOMAZ, A. C. A. **Abordagem fitoquímica de *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud. (Rubiaceae)**. 2008. 165 p. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros”, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

TOMAZ, A. C. A.; NOGUEIRA, R. B. S. S.; PINTO, D. S.; AGRA, M. F.; SOUZA, M. F. V.; DA-CUNHA, E. V. L. Chemical constituents from *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n 1, p. 47-52, 2008.

UM, B. H.; LOBSTEIN, A.; WENIGER, B.; SPIEGEL, C.; YICE, F.; RAKOTOARISON, O.; ANDRIANTSITOHAINA, R.; ANTON, R. New coumarins from *Cedrelopsis grevei*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 7-8, p. 638-642, 2003.

VASANTHI, H. R.; MUKHERJEE, S.; LEKLI, I.; RAY, D.; VEERARAGHAVAN, G.; DAS, D. K. Potential role of *Borreria hispida* in ameliorating cardiovascular risk factors. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 53, p. 499–506, 2009.

VICTORIA FILHO, R.; CRUZ, L. S. P. Weed control in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) with preplant incorporated prodiamine. **Revista de Agricultura (Piracicaba, Brazil)**, v. 57, n. 4, p. 273-88, 1982.

VIEGAS-JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA, I. J. C.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; SCHRISEMA, J. Iridoids from *Borreria verticillata*. **Organic Letter**, v. 1, n. 8, p. 1169-1171, 1999.

VIEIRA, M. F.; PEREIRA, Z. V.; CARVALHO-OKANO, R. M. Fenologia da floração, morfologia floral e sistema de incompatibilidade em espécies distílicas de Rubiaceae em fragmento florestal do Sudeste brasileiro. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 3, p. 471-480, 2006.