

MERI EMILI FERREIRA PINTO

**Constituintes Químicos de *Nanuzia plicata* (Mart.) L.B.Sm. &
Ayensu (Velloziaceae)**

Universidade Federal da Paraíba

Centro de Ciências da Saúde

**Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de
Medeiros”**

Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

JOÃO PESSOA - PB

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MERI EMILI FERREIRA PINTO

Constituintes Químicos de *Nanuzia plicata* (Mart.) L.B.Sm. & Ayensu
(Velloziaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de
Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, em
cumprimento as exigências para a obtenção do título de
MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS. Área de concentração:
FARMACOQUÍMICA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

João Pessoa - PB
2009

P659o Pinto, Meri Emili Ferreira.
Constituintes químicos de *Nanuzia plicata* (Mart.) L.B.Sm. &
Ayensu (Velloziaceae)
/ Meri Emili Ferreira Pinto.- João Pessoa, 2009.
154p. : il.
Orientador: Marcelo Sobral da Silva
Co-orientador: Josean Fachine Tavares
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCCEN
1. *Nanuzia plicata* (canela d'ema). 2. Biflavonóides. 3. Diterpenos
Clerodanos. 4. Derivados do Ácido Clorogênicos.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

MERI EMILI FERREIRA PINTO

Constituintes Químicos de *Nanuza plicata* (Mart.) L.B.Sm. & Ayensu
(Velloziaceae)

Dissertação aprovada em ____ / ____ / ____

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva
(Universidade Federal da Paraíba- Orientador)

Profa. Dra. Sâmia Andréia Souza da Silva
(Universidade Federal de Alagoas- Examinadora Externa)

Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos
(Universidade Federal da Paraíba –Examinadora Interna)

*“Aos meus pais que são os principais mestres da
minha jornada”*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo o que me tem concedido.

Aos meus pais, Marco Antonio e Maria das Graças por todo carinho, apoio, dedicação e ensinamentos de vida.

Aos meus irmãos, Júnior e Monik Helen, e à minha cunhada Ivna Rosenhaim, pelo companheirismo, confiança e ajuda em todos os momentos dessa caminhada.

Aos meus tios Sônia e Valderedo por todo apoio e incentivo na vida pessoal e profissional.

Ao meu orientador prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva por ter sido um instrumento de Deus na minha vida, possibilitando a elucidação da minha carreira científica. Obrigada pelo privilégio.

Ao professor Dr. Josean Fachine Tavares pela excelente co-orientação, pela amizade e exemplo de profissionalismo. Jamais esquecerei a contribuição prestada.

As professoras Dra Sâmia Andréia e Bárbara Viviana pelas correções e considerações feitas.

Aos professores Dra. Vania Medeiros e Crisvalter Medeiros pelo engajamento, estímulo e confiança.

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho pela colaboração.

A professora Dra. Maria de Fátima Agra pela identificação do material botânico.

À equipe Sobral: Fernando Antônio, Viviane Marcelino, Steno Lacerda, Karine Formiga, Camila, Marcelo (Manso), Hellane Fabrícia, Ana Livia, Yanne, Gabriela e Heloísa pelo auxílio, companheirismo e dedicação no laboratório.

Aos colegas de turma, Vicente Carlos, Fábio Monteiro, Kelly Samara e Gláucia Faheina por tudo o que passamos juntos e pela amizade sincera.

Aos colegas doutorandos Roosevelt, Ionaldo, Antônio, Kiriaki Nurit, Alexsandro, Roberto Jefferson e Sócrates Golzio, sempre dispostos a esclarecer minhas dúvidas.

A equipe do Laboratório Funcional, coordenado pela Profa. Bagnólia Araújo pelo acolhimento e ensinamentos.

Aos técnicos, Ataíde, Raimundo Nonato e Glória pela prestação e disponibilidade nos trabalhos de bancada.

A todos os colegas do laboratório que cooperaram de alguma forma para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos os professores e funcionários do LTF que além de contribuírem com a minha formação e construção deste trabalho, demonstraram-se bons amigos.

A CAPES pela bolsa concedida.

A todos que direta ou indiretamente possibilitaram a formação desse trabalho.

A todos,

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

Nanuzia plicata (Mart.) L.B.Sm. & Ayensu (Velloziaceae), (sinonímias: *Xerophyta plicata* e *Vellozia plicata*) é conhecida popularmente como canela d'ema. É uma interessante espécie vegetal com crescimento em ambientes sob alta irradiação solar e rápida drenagem de água. Na busca por fitoconstituintes foi realizado, em nosso laboratório, um estudo utilizando as partes aéreas dessa espécie. Essa planta foi coletada no município de Serra-Branca, estado da Paraíba, em março de 2007 e uma exsicata (AGRA 5730) encontra-se depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB). O material vegetal seco e pulverizado foi submetido à maceração com etanol 95% obtendo-se um extrato etanólico bruto (120 g). Após a utilização de métodos de separação e purificação por cromatografia em coluna de sílica gel e/ ou sephadex LH-20, os constituintes químicos foram identificados através da análise de dados obtidos por métodos espectroscópicos como Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C unidimensionais e técnicas bidimensionais (COSY, HMQC, HSQC e HMBC), Espectrometria de Massas, além de comparação com dados descritos na literatura. Neste trabalho, reportamos o isolamento de sete componentes, dos quais dois são derivados do ácido clorogênico (3-*O*-*E*-cafeoil quinato de metila e ácido 3,5-di-*O*-*E*-cafeoil-quínico), dois diterpenos do tipo clerodano (Ácido Patagônico e Ácido clerodan - 15-metoxi-3,13-dien-15,16-olideo-8-óico), uma flavona (Luteolina) e duas biflavonas (Amentoflavona e Nanuzoflavona). Nanuzoflavona está sendo relatada pela primeira vez na literatura. Tanto os derivados clorogênicos como os diterpenos estão sendo descritos pela primeira vez na família Velloziaceae. Para Luteolina essa foi a primeira descrição no gênero *Nanuzia*.

Palavras-Chave: Velloziaceae, *Nanuzia plicata*, Biflavonóides, Diterpenos Clerodanos, Derivados do Ácido Clorogênico.

ABSTRACT

Nanuza plicata (Mart.) L.B.Sm. & Ayensu (Velloziaceae) (*Xerophyta plicata* and *Vellozia plicata*) is popularly known as canela d'ema. It is an interesting plant, with growth in areas under high solar irradiation and rapid drainage of water. In the search for phytochemicals, a study using the aerial parts of this species was conducted in our laboratory. It was collected at Serra-Branca, state of Paraíba, in March 2007 and a voucher specimen (AGRA 5730) is deposited at the Herbarium Lauro Pires Xavier (JPB). The dried and powdered plant material was submitted to maceration with ethanol 95% resulting in a crude ethanolic extract (120 g). After separation by chromatography methods using silica gel column and/or Sephadex® LH-20, the chemical constituents were identified through analysis of data obtained by mass spectrometry and spectroscopic methods such as infrared and NMR ¹H, ¹³C dimensional and two dimensional techniques (COSY, HMQC, HSQC and HMBC), and compared with data from the literature. In this work, report the isolation of seven components, two derivatives of chlorogenic acid (3-*O*-caffeoylquinic acid methyl ester and 3,5-*O*-di-caffeoylquinic acid), two clerodane diterpene acid (Patagonic acid and 15-hydroxyclerodan -3,13-dien-15,16-olide-18-oic), a flavone (luteolin) and two biflavones (amentoflavone and nanuzoflavone). Nanuzoflavone is reported as a new biflavonoid. The derivatives chlorogenics and diterpenes are described by first time in the family Velloziaceae. For luteolin was the first description in the genus *Nanuza*.

Key-words: Velloziaceae, *Nanuza plicata*, Biflavonoids, Clerodane Diterpene, Chlorogenic acid's derivatives.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica de espécies da família Velloziaceae.....	6
Figura 2. Alguns flavonóides isolados de espécies da família Velloziaceae	12
Figura 3. Alguns diterpenos isolados de espécies da família Velloziaceae	13
Figura 4. <i>Nanuza plicata</i> em seu ambiente natural (Serra Branca-PB, 2007).....	15
Figura 5. Substâncias isoladas de <i>N. plicata</i>	17
Figura 6. Estruturas químicas das unidades básicas, monoésteres e diésteres dos derivados clorogênicos.....	19
Figura 7. Núcleo Fundamental dos flavonóides	22
Figura 8. Esqueleto de flavonas.....	23
Figura 9. Exemplos biflavonóides com diferentes uniões interflavonoídicas	25
Figura 10. Placa cromatográfica relacionando o perfil de eluição das substâncias Np_3, Np_4 e Np_5.....	34
Figura 11. Constituintes químicos isolados neste estudo	36
Figura 12. Valores de RMN ¹³ C obtidos em 15.1 MHz D ₂ O	37
Figura 13. Espectro de RMN ¹³ C-APT (125 MHz) de Np_1 em CD ₃ OD.....	41
Figura 14. Expansão do espectro de RMN ¹³ C-APT (125 MHz) de Np_1 em CD ₃ OD na região entre δ _C 115- 180 ppm.....	42

Figura 15. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{C} 37- 75 ppm.....	42
Figura 16. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD	43
Figura 17. Expansão do espectro de RMN ^1H (125 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{H} 6,2 - 7,6 ppm	44
Figura 18. Expansão Expansão do espectro de RMN ^1H (125 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{H} 6,75 - 7,05 ppm	44
Figura 19. Expansão do espectro de RMN ^1H (125 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{H} . 4,10 - 5.29 ppm	45
Figura 20. Expansão do espectro de RMN ^1H (125 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{H} 3,64 - 3,7 ppm	45
Figura 21. Expansão do espectro de RMN ^1H (125 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{H} 1,98- 2,25 ppm	46
Figura 22. Espectro Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ HMQC (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{C} 115- 150 ppm	46
Figura 23. Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ HMQC (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{C} 70,0- 73,5 ppm	47
Figura 24. Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ HMQC (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD . Na região entre δ_{C} 38- 54 ppm	47
Figura 25. Espectro de IV de Np_1 em pastilhas de KBr	48
Figura 26. Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e 3) HMBC (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{C} 164- 178 ppm	49

Figura 27. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) HMBC (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{C} 145,5- 150,5 ppm	49
Figura 28. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) HMBC (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{C} 114- 130 ppm	50
Figura 29. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) HMBC (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{C} 113,5- 118,0 ppm	50
Figura 30. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) HMBC (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{C} 69 - 75 ppm	51
Figura 31. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) HMBC (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{C} 35- 37 ppm	51
Figura 32. Expansão de espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{H} 6,2- 7,6 ppm	52
Figura 33. Expansão de espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{H} 2,0- 5,5 ppm	52
Figura 34. Expansão de espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{H} 1,85- 2,30 ppm	53
Figura 35. Espectro de RMN ^1H NOESY-1D (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD , irradiação em δ_{H} 4,12, 3,72 e 5,27, respectivamente	54
Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_2 em CD_3OD	58
Figura 37. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_2 em CD_3OD na região entre δ_{C} 146.- 180 ppm	58

Figura 38. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_2 em CD_3OD na região entre δ_{C} 114.- 129 ppm	59
Figura 39. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_2 em CD_3OD na região entre δ_{C} 19.- 80 ppm	60
Figura 40. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_2 em CD_3OD na região entre δ_{C} 19- 46 ppm	60
Figura 41. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Np_2 em CD_3OD	61
Figura 42. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Np_2 em CD_3OD na região entre δ_{H} 5,6 - 7,6 ppm	62
Figura 43. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Np_2 em CD_3OD na região entre δ_{H} 1,0- 4,0 ppm	63
Figura 44. Espectro de RMN ^1H x ^{13}C - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ HMQC (500 MHz) de Np_2 em CD_3OD	64
Figura 45. Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ HMQC (500 MHz) de Np_2 em CD_3OD na região entre δ_{C} 115- 150 ppm	65
Figura 46. Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ HMQC (500 MHz) de Np_2 em CD_3OD na região entre δ_{C} 114-116 ppm	66
Figura 47. Espectro de RMN ^1H x ^{13}C - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e 3) HMBC (500 MHz) de Np_2 em CD_3OD	67
Figura 48. Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e 3) HMBC (500 MHz) de Np_2 em CD_3OD região entre δ_{C} .15- 40 ppm.....	68
Figura 49. Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e 3) HMBC (500 MHz) de Np_2 em CD_3OD na região entre δ_{C} .56- 78 ppm	69

Figura 50. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) HMBC (500 MHz) de Np_2 em CD_3OD na região entre δ_{C} .115- 170 ppm	70
Figura 51. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) HMBC (500 MHz) de Np_2 em CD_3OD na região entre δ_{C} .114- 132 ppm	71
Figura 52. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) HMBC (500 MHz) de Np_2 em CD_3OD na região entre δ_{C} .145- 151 ppm	72
Figura 53. Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Np_3 em CD_3OD	75
Figura 54. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Np_3 em CD_3OD na região entre δ_{C} 100- 180 ppm	76
Figura 55. Espectro de RMN ^1H (200 MHz) de Np_3 em CD_3OD	77
Figura 56. Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_4 em CD_3OD	82
Figura 57. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_4 em CD_3OD na região entre δ_{C} 165- 185 ppm	83
Figura 58. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_4 em CD_3OD na região entre δ_{C} 95- 135 ppm	83
Figura 59. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Np_4 em CD_3OD	84
Figura 60. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Np_4 em CD_3OD na região entre δ_{C} 6,4- 8,0 ppm	85
Figura 61. Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz) de Np_4 em CD_3OD	85
Figura 62. Expansão de espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz) de Np_4 em CD_3OD na região entre δ_{H} 6,2- 8,0 ppm	86

Figura 63. . Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ HMQC (500 MHz) de Np_4 em CD_3OD . Na região entre δ_{C} 95- 135 ppm	86
Figura 64. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e 3) HMBC (500 MHz) de Np_4 em CD_3OD na região entre δ_{C} 157- 169 ppm	87
Figura 65. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e 3) HMBC (500 MHz) de Np_4 em CD_3OD na região entre δ_{C} 95- 135 ppm	87
Figura 66. Espectro de IV de Np_5 em pastilhas de KBr.....	92
Figura 67. Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_5 em CD_3OD	93
Figura 68. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_5 em CD_3OD na região entre δ_{C} 156- 182 ppm	94
Figura 69. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_5 em CD_3OD na região entre δ_{C} 94- 139 ppm	94
Figura 70. Espectro de massas HR-ESI-MS de Np_5	95
Figura 71. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Np_5 em CD_3OD	97
Figura 72. . Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Np_5 em CD_3OD na região entre δ_{C} 7,8- 8,2 ppm	98
Figura 73. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Np_5 em CD_3OD na região entre δ_{C} 6,1- 7,1 ppm	98
Figura 74. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Np_5 em DMSO na região entre δ_{C} 6,0-13,0 ppm	99

Figura 75. Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ HSQC (500 MHz) de Np_5 em CD_3OD	100
Figura 76. Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e 3) HMBC (500 MHz) de Np_5 em CD_3OD	101
Figura 77. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e 3) HMBC (500 MHz) Np_5 em CD_3OD na região entre δ_{C} 158- 168 ppm	102
Figura 78. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e 3) HMBC (500 MHz) Np_5 em CD_3OD na região entre δ_{C} 95- 140 ppm	103
Figura 79. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e 3) HMBC (500 MHz) Np_5 em CD_3OD na região entre δ_{C} 138- 140 ppm	104
Figura 80. Expansão de espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz) de Np_5 em CD_3OD na região entre δ_{H} 6,0- 8,4 ppm	105
Figura 81. Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_6 em CDCl_3	110
Figura 82. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_6 em CDCl_3 na região entre δ_{C} 110- 175 ppm	111
Figura 83. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_6 em CDCl_3 na região entre δ_{C} 15- 70 ppm	111
Figura 84. Espectro de IV de Np_6 em pastilhas de KBr.....	112
Figura 85. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Np_6 em CDCl_3 . Em destaque expansão na região entre δ_{H} 4,0 - 7,0 ppm	113
Figura 86. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Np_6 em CDCl_3 na região entre δ_{C} 2,0- 2,5 ppm	114

Figura 87. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Np_6 em CDCl_3 na região entre δ_{C} 0,65- 0,95 ppm	114
Figura 88. Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ HMQC (500 MHz) de Np_6 em CDCl_3 . Na região entre δ_{C} 140- 143 ppm	115
Figura 89. Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ HMQC (500 MHz) de Np_6 em CDCl_3 . Na região entre δ_{C} 45- 105 ppm	115
Figura 90. Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ HMQC (500 MHz) de Np_6 em CDCl_3 . Na região entre δ_{C} 15- 45 ppm	116
Figura 91. Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e 3) HMBC (500 MHz) de Np_6 em CDCl_3 na região entre δ_{C} .100- 145 ppm	116
Figura 92. Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n=2 e 3) HMBC (500 MHz) de Np_6 em CDCl_3 na região entre δ_{C} .15- 50 pp	117
Figura 93. Espectro de RMN ^1H x ^1H COSY (500 MHz) de Np_6 em CDCl_3	118
Figura 94. Expansão de espectro de RMN ^1H x ^1H COSY (500 MHz) de Np_6 em CDCl_3 na região entre δ_{H} 3,5- 7,5	119
Figura 95. Expansão de espectro de RMN ^1H x ^1H COSY (500 MHz) de Np_6 em CDCl_3 na região entre δ_{H} 0,8- 2,6	120

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) 1D e 2D em CD_3OD de Np_1 ...40
- Tabela 2** - Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) 1D e 2D em CD_3OD de Np_2..... 57
- Tabela 3** - Dados de RMN ^1H (200 MHz), ^{13}C (50 MHz) em CD_3OD de Np_3 em comparação coma Luteolina 74
- Tabela 4** - Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) 1D e 2D em CD_3OD de Np_4..... 80
- Tabela 5** - Comparação dos dados de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Np_4 com os dados de RMN ^{13}C da literatura (20 MHz, DMSO)..... 81
- Tabela 6** - Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) em CD_3OD 1D e 2D de Np_5... 90
- Tabela 7** - . Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) 1D e 2D de Np_6a e Np-6b em CDCl_3 109

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Inclusão dos gêneros nas subfamílias de Velloziaceae pelos sistemas de classificações proposto por Smith & Ayensu e Menezes.....7
- Quadro 2** - Algumas classes químicas e partes estudadas por espécies.....9
- Quadro 3** - Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico bruto32

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Rota biossintética do ácido clorogênico.....	21
Esquema 2 - Biossíntese de flavonas.....	26
Esquema 3 - Processo cromatográfico do EEB de <i>N. plicata</i>	33
Esquema 4 - Proposta biossintética de biflavonas.....	91
Esquema 5 - Proposta de Fragmentação para Np_5em HR-ESI-MS	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACFQ	Ácido cafeoil-feruloil-quínicos
ACG	Ácido Clorogênico
ACQ	Ácido cafeoilquínico
AFQ	Ácido feruloilquínico
APT	Attached Proton Test
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	Metanol Deuterado
C4H	Cinamato 4-hidroxilase
COSY	Correlation Spectroscopy
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplodupleto
DMSO	Dimetil sulfóxido deuterado
EEB	Extrato etanólico bruto
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LTF	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
<i>m</i>	Multiplete
MeOD	Metanol Deuterado
NOESY-1D	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAL	Fenilalanina amônia-liase
pCoAQ	Ácido p-cumaroilquínico
ppm	Partes por milhão
QPN	Química de Produtos Naturais
Rf	Fator de Retenção
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>s</i>	Simpleto
<i>sl</i>	Simpleto largo
UV-β	Raios-β ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRIA	5
2.1	Considerações sobre a família Velloziaceae	6
2.2	Considerações sobre o Gênero <i>Nanuza</i>	14
2.2.1	Constituintes Químicos presentes no gênero	14
2.3	Considerações sobre a espécie <i>Nanuza plicata</i>	15
2.3.1	Posição sistemática da espécie, segundo APGweb (2007)	16
2.3.2	Estudos químicos de <i>Nanuza plicata</i> .	16
2.4	Considerações sobre Derivados Clorogênicos	18
2.4.1	Rota Biossintética do Ácido Clorogênico	21
2.5	Considerações sobre Flavonóides	22
2.5.1.	Aspectos Gerais sobre Flavonas	23
2.5.2	Aspectos Gerais sobre Biflavonóides	24
2.5.3	Aspectos Biossintéticos	26
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo Geral	28
3.2	Objetivos Específicos	28
4	METODOLOGIA	29
4.1	Métodos Cromatográficos	30
4.2	Métodos Espectroscópicos	30
4.3	Coleta do material botânico	31
4.4	Processamento das partes aéreas de <i>Nanuza plicata</i>	31
4.5	Obtenção do Extrato Etanólico Bruto (EEB)	31
4.6	Fracionamento cromatográfico do Extrato Etanólico Bruto (EEB)	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1	Substâncias isoladas das partes aéreas de <i>Nanuza plicata</i>	36

5.2	Identificação estrutural dos constituintes químicos de <i>Nanuza plicata</i> : DERIVADOS CLOROGÊNICOS	37
5.2.1	Identificação estrutural de Np_1	37
5.2.2	Identificação estrutural de Np_2	55
5.3	Identificação estrutural dos constituintes químicos de <i>Nanuza plicata</i> : FLAVONÓIDES	73
5.3.1	Identificação Estrutural de Np_3	73
5.3.2	Identificação estrutural de Np_4	78
5.3.3	Identificação estrutural de Np_5	88
5.4	Identificação estrutural dos constituintes químicos de <i>Nanuza plicata</i> : DITERPENOS	106
5.4.1	Identificação estrutural de Np_6	106
6	CONCLUSÃO	121
	REFERÊNCIAS	123

1- Introdução
1- Introdução

1. INTRODUÇÃO

A Química de Produtos Naturais (QPN) é, dentro da química brasileira, a área mais antiga e acredita-se que ainda hoje, congregue o maior número de pesquisadores (PINTO et al., 2002).

Os estudos de QPN iniciaram-se em uma instituição pública brasileira em 1874, data esta que marca a contratação de Theodoro Peckolt, farmacêutico alemão que chegou ao Brasil em novembro de 1847 e, aqui permaneceu os 65 anos restantes de sua vida (SANTOS, 2005). Este farmacêutico pode ser considerado, pelo seu trabalho, o pai da fitoquímica brasileira, além de ser o patriarca de uma família de cientistas notáveis que se dedicaram com afinco ao estudo químico de plantas brasileiras (PINTO et al., 2002).

O marco da evolução científica da QPN no Brasil se deu na fitoquímica clássica (isolamento e determinação estrutural), de onde surgiram os grupos consolidados e atuantes na área por todo o país. Vários grupos de pesquisa vêm alterando o enfoque da fitoquímica tradicional privilegiando trabalhos que envolvam atividade biológica, ecologia química e biossíntese de micromoléculas de plantas, microorganismos, organismos marinhos, entre outros, assim como novas metodologias analíticas de trabalho com produtos naturais, como uma maneira de atuar na fronteira do conhecimento (SANTOS, 2005).

A Fitoquímica, reconhecida como Química de Vegetais ou Química de Produtos Naturais, trata do isolamento e identificação, determinação e modificação estrutural de substâncias orgânicas presentes nas plantas sem uma relação prévia com eventual atividade biológica (MIGUEL; MIGUEL, 2004). Busca assim, obter novos compostos ou derivados já isolados, na perspectiva destes possuírem maior atividade farmacológica e/ou menor toxicidade.

As plantas medicinais - plantas que exercem sobre o homem uma ação farmacológica - sempre foram objeto de estudo na tentativa de descobrir novas fontes de obtenção de seus princípios ativos. O uso de dessas plantas pela população mundial tem sido muito significativo nos últimos anos, sendo este, incentivado pela própria OMS (CRAVO, 1999). Ao longo da história, as plantas são fontes de importantes fármacos como: digoxina (*Digitalis lanata*), digitoxina (*Digitalis purpurea*), reserpina (*Rauwolfia serpentina*), pilocarpina (*Pilocarpus jaborandi*), morfina e codeína (*Papaver somniferum*) e o taxol (*Taxus ssp*) (BARREIRO, 1990). A fantástica variedade e complexidade dos metabólitos especiais biossintetizados pelas plantas teriam se formado e evoluído como mecanismo de defesa destes

vegetais às condições ambientais ricas em microrganismos, insetos, animais e também às condições de adaptação e regulação (REINBOTHE et al., 1990). Esses processos biossintéticos são responsáveis pela formação, acúmulo e degradação de inúmeras substâncias orgânicas no interior das células teciduais vegetais e animais.

Muitos fármacos de origem natural são obtidos hoje através da síntese química ou servem de modelo para a produção de outros fármacos bioativos, como a cocaína, cujo esqueleto tropânico serviu de protótipo para anestésicos locais como a procaína. A papaverina, um alcalóide isoquinolínico com propriedades antiespasmódicas, que serviu de modelo para o desenvolvimento de inúmeros derivados, entre os quais compostos de cadeia aberta, resultou na descoberta do verapamil. Outro fármaco oriundo da transformação de produto vegetal da saligenina é o ácido acetilsalicílico e os sais de amônio quaternário usados como bloqueadores neuromusculares, originários da tubocurarina (BARREIRO, 1990). Newman et al. (2003), relataram que 61% das 877 novas moléculas ativas introduzidas mundialmente na indústria farmacêutica, durante o período de 1981-2002, foram derivadas ou inspiradas em produtos naturais. Destas, 6% são produtos naturais, 27% são derivados de produtos naturais, 5% são compostos sintéticos, cujos farmacóforos são derivados de produtos naturais e, 23% são compostos sintéticos que mimetizam produtos naturais.

Das 250.000 espécies de plantas no mundo, menos de 10% foram exaustivamente investigadas com vistas ao descobrimento de propriedades terapêuticas (SCIENTIFIC AMERICAN, 1993). Nas últimas três décadas, com o desenvolvimento de técnicas analíticas de separação e elucidação estrutural, mais recentemente de instrumentos analíticos hifenados, conhecem-se cerca de 50.000 metabólitos isolados de angiospermas (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Há no Brasil uma grande diversidade de plantas com potencialidades medicinais, ainda não estudadas, sendo estas, promissoras fontes de inovações terapêuticas e farmacológicas para as diversas áreas da saúde humana. A importância medicinal, econômica e ecológica de espécies nativas brasileiras, bem como o risco de sua extinção pela ação predatória do homem, tem motivado os estudos destas plantas, visando sua preservação e aproveitamento racional (SOUZA et al., 2003).

É inegável a contribuição científica brasileira. Há nas áreas de QPN cerca de 900 profissionais e, pelo menos, 1500 outros atuando na Farmacologia. Corroborando este cenário, o sistema de pós-graduação congrega 36.000 bolsistas atuantes no país e 4.000 no exterior. São aproximadamente 70 grupos lidando com pesquisa de Produtos Naturais no

Brasil, especializados em química e farmacologia (BARRETO DE CASTRO, 1994. apud FERREIRA, 2002).

O Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos da Universidade Federal da Paraíba vem ao longo de 30 anos contribuindo com a pesquisa científica brasileira nas áreas da botânica, química, controle de qualidade, farmacologia e toxicologia de produtos naturais e sintéticos.

Como nova contribuição aos trabalhos desenvolvidos no LTF, é apresentado aqui, um estudo fitoquímico da espécie *Nanuzia plicata* (Mart.) L.B.Sm. & Ayensu, pertencente à família Velloziaceae. Esta, caracterizada quimicamente pela presença predominante de flavonóides, diterpenos, triterpenos, esteróides e alcanos lineares (Quadro 2, p. 8).

Mediante a carência de trabalhos que descrevam a constituição química do gênero *Nanuzia*, especificamente da espécie *N. plicata*, concentramo-nos em isolar, identificar e elucidar alguns constituintes químicos das partes aéreas de *Nanuzia Plicata*.

2- Fundamentação Teórica

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA VELLOZIACEAE

A família Velloziaceae é essencialmente tropical e possui cerca de 240 espécies que vivem comumente em ambientes xéricos da América do Sul, América Central e África (Figura 1) (APGweb, 2007). No Brasil, a grande maioria das espécies, se encontram distribuídas na região litorânea entre o Rio de Janeiro e Piauí, Goiás, Minas Gerais, interior da Bahia (RIEHL, 1998) e Paraíba.

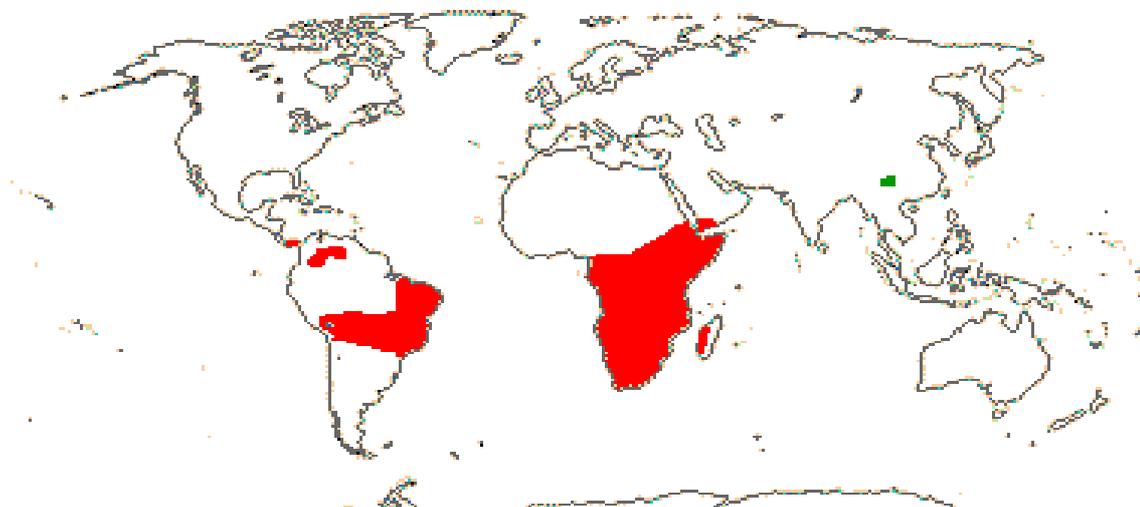


Figura 1. Distribuição geográfica de espécies da família Velloziaceae (APGweb, 2007)

Filogeneticamente, as Velloziaceae estão situadas no clado monocotiledôneas basais, seguido da ordem Pandanales. Esta família é dividida em 2 subfamílias, Vellozioidae e Barbacenoideae. O número e a delimitação dos gêneros são controversos, e há dois sistemas de classificação (SMITH & AYENSUS, 1976; MENEZES, 1970) com pontos divergentes (SALANTINO et al., 2000). Para Menezes a subfamília Vellozioidae compreende os gêneros *Vellozia* e *Xerophyta*, e a subfamília Barbacenoideae os gêneros *Aythonia*, *Barbacenia*, *Pleurostima* e *Burlemarxia*. Para Smith & Ayensus, em Vellozioidae se encontram os gêneros *Vellozia* e *Nanuzia*, e em Barbacenoideae, *Barbacenia*, *Talbotia*, *Barbaceniopsis* e *Xerophyta* (SOUSA, 2005) (Quadro 1, p. 7).

Quadro 1 -: Inclusão dos gêneros nas subfamílias de Velloziaceae pelos sistemas de classificações proposto por Smith & Ayensus e Menezes.

GÊNERO	SUBFAMÍLIA	
	Smith & Ayensus	Menezes
<i>Vellozia</i> Vand.	V	V
<i>Barbacenia</i> Vand	B	B
<i>Barbaceniopsis</i> L.B.Sm	B	
<i>Aylthonia</i> N.L.Menezes		B
<i>Burlemarxia</i> N.L.Menezes & Semir		B
<i>Nanuza</i> L.B.Sm. & Ayensu	V	
<i>Pleurostima</i> Raf.		B
<i>Talbotia</i> Balf. = <i>Talbotiopsis</i> L.B.Sm. (SUS)	B	
<i>Xerophyta</i> Juss.	B	V

*V= Velloziaceae; *B= Barbaceniaceae

São plantas de hábito desde herbáceo, ultrapassando 5 cm, até arbustivo de grande porte, chegando a 6 m (MENEZES, 1980). O caule pode ser simples ou ramificado, muitas vezes, aparentemente espesso, devido à superposição de bainhas velhas sobre um caule real de dois centímetros de diâmetro com inúmeras raízes adventícias (SOUSA, 2005). Crescem sobre rochas totalmente nuas, fendas, terrenos arenosos ou pedregosos (MENEZES, 1970, AYENSUS, 1973).

No Brasil, as Velloziaceae são encontradas, principalmente, nos campos rupestres a altitudes de 800 - 2000 m, sob alta irradiação solar e rápida drenagem da água. São, portanto adaptadas a reter e absorver grande quantidade de água nos dias chuvosos, além de minimizar a perda de água através de seus órgãos vegetativos (SALANTINO, 1986). O enrolamento das folhas de algumas espécies foi citado por Menezes (1970) como exemplo desta adaptação à seca.

Muitos estudos fitoquímicos são descritos para essa família, dentre esses há presença predominante de diterpenos, triterpenos e flavonóides, como mostrado no gráfico 1 a seguir. Uma coletânea de dados bibliográficos disponíveis no Banco de dados da Universidade de Illinois NAPRALERT (Natural Products Alert) evidenciou para 32 espécies desta família o isolamento de 322 compostos publicados até agosto de 2008.

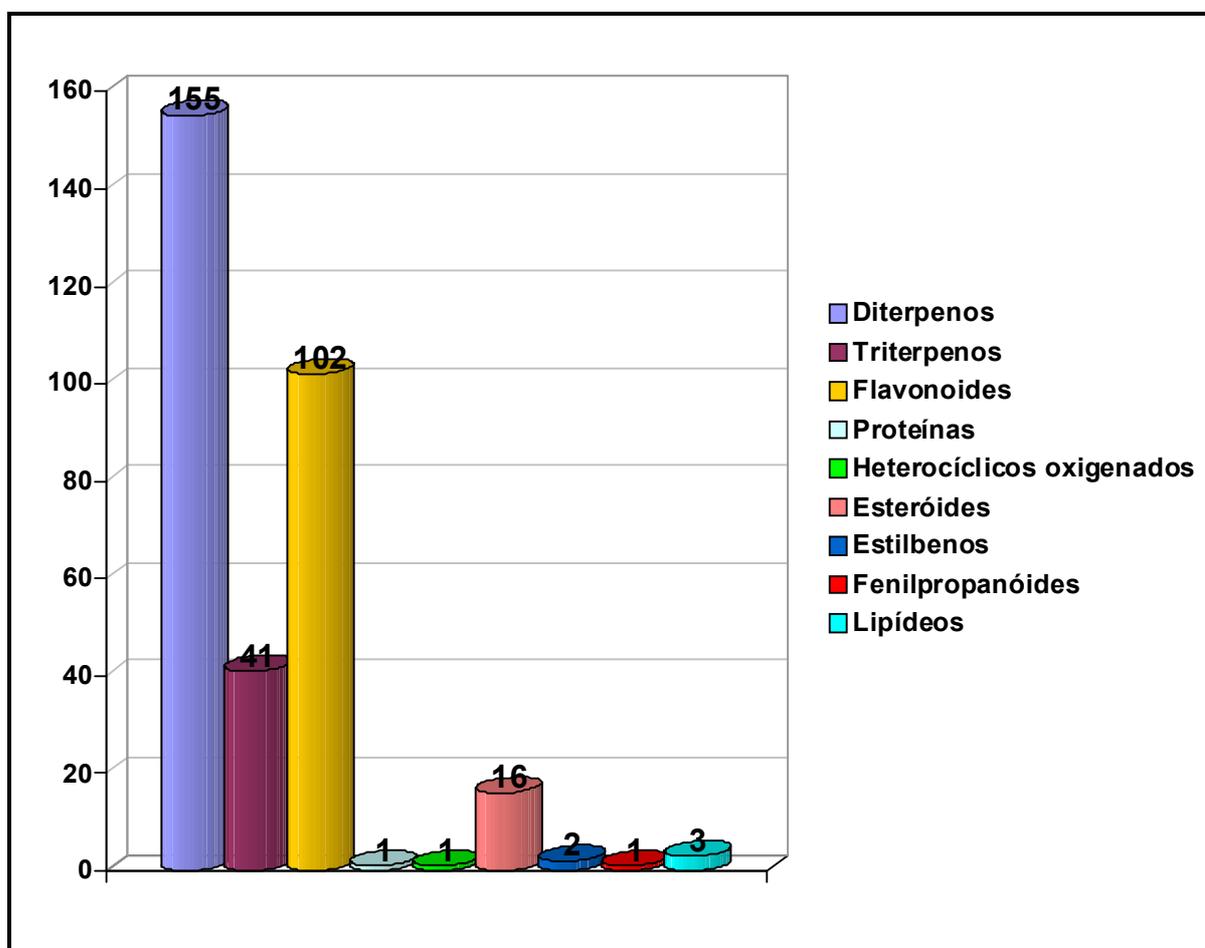


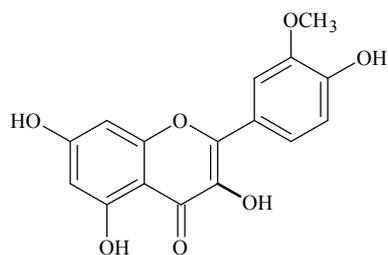
Gráfico 1. Classes de Produtos Naturais presentes em espécies da família Velloziaceae segundo dados coletados no NAPRALERT.

Quadro 2. Algumas classes químicas e partes estudadas por espécies (NAPRALERT, 2008).

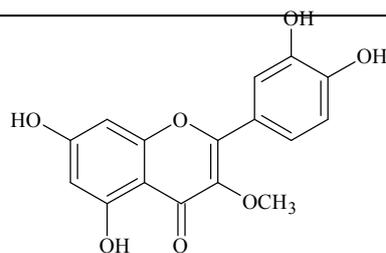
Espécies	Partes Estudadas	Constituintes presentes	Referências:
<i>Acanthochlamys bracteata</i>	Planta inteira	Proteínas, triterpenos, lipídeos, esteróides	ZHOU, et al. 2000.
<i>Aylthonia macrantha</i>	Planta inteira	Diterpenos	PINTO et al., 2004.
<i>Barbacenia bicolor</i>	Caule e planta inteira	Triterpenos (Damarano)	BAKER et al., 1976.
<i>Barbacenia conicostigma</i>	Raízes e Caule	Triterpenos	PINTO et. al.; 1981a.
<i>Barbacenia flava</i>	Planta inteira, caule e raízes	Diterpenos (Ácido barbacênico) Triterpenos (Damarano)	PEIXOTO DA SILVA et al.; 1980; PINTO et al., 1985, 1988a.
<i>Vellozia bicolor</i>	Planta inteira, folhas, caule e raízes	Diterpenos (Clerodano, Pimarano)	PINTO et al., 1983a, 1991, 1994; GARCEZ et al., 1981.
<i>Vellozia candida</i>	Folhas e planta inteira	Diterpenos e Flavonóis	PINTO et al., 1982a 1983b; BRANCO, et al. 2002; VALENTE, et. al., 1997
<i>Vellozia caput-ardeae</i>	Planta inteira, caule e raízes	Diterpenos (Kaurano)	PINTO et al., 1981b, 1982b, 1983c, 1983d
<i>Vellozia carunculares aff.</i>	Planta inteira	Diterpenos (Cleinstantano)	SILVA et al., 2001
<i>Vellozia compacta</i>	Planta inteira, partes aéreas, pecíolo, caule e raízes	Diterpenos (Cleinstantano, Pimarano) Triterpenos	RIEHL & PINTO, 2000; PINTO & BORGES, 1983; PINTO, 1980, 1981c; BARNES et al., 1984.
<i>Vellozia coronata</i>	Folhas, caule e raízes	Heterocíclico Oxigenado, Flavanonas, Flavonas, Flavonóis e estilbenos	HARBONE et al., 1993.
<i>Vellozia declinans</i>	Planta inteira, folhas, caule e raízes	Diterpenos (Cleinstantano) Triterpenos	PINTO et al., 1979.
<i>Vellozia epidendroides</i>	Planta inteira	Diterpenos (nor-Cleinstantano e pimarano)	PINTO et al., 1981c, 1984a.
<i>Vellozia epidendroides aff.</i>	Planta inteira e folhas	Flavonóis e Flavonas	
<i>Vellozia flavicans</i>	Planta inteira, caule, folhas e raízes	Diterpenos (Abietano, cleinstantano, labdano, pimarano, veadeirol)	PINTO et al., 1995a., 1995b, 1996, 1997a; PINCHIN et al., 1978.
Cont...			

Cont...			
<i>Vellozia glabra</i>	Folhas, caule e raízes	Triterpenos e Flavonas	PINTO et al., 1981d; HARBONE et al., 1993.
<i>Vellozia graminifolia</i>	Planta inteira	Diterpenos (Cleinstantano, Labdano) e Flavonóis	BRANCO et. al., 1998, 2001.
<i>Vellozia laevis</i>	Folhas frescas	Flavonóis e flavones	HARBONE et al., 1994.
<i>Vellozia leptopetala</i>	Folhas, caule e raízes	Diterpeno (Cleinstantano)	PINTO et al., 1983e.
<i>Vellozia magdalenae</i>	Planta inteira e folhas	Diterpenos e flavona	PINTO et al., 1997b
<i>Vellozia nanuzae</i>	Planta inteira e folhas	Fenilpropanóides, Diterpenos (cleinstantano), Triterpenos, Flavanona Flavonas, Flavonóis, Lipídeos e Esteróides	HARBONE et. al., 1993; PINTO et al., 1981c.
<i>Vellozia nivea</i>	Planta inteira	Diterpeno (Cleinstantano)	
<i>Vellozia phalocarpa</i>	Folhas Frescas e Planta inteira	Diterpenos, Flavonóis, Flavonas e Flavanonas	HARBONE et al., 1994; PINTO et al., 1984a.
<i>Vellozia piresiana</i>	*Planta inteira fresca, caules e raízes	Diterpenos (Cleinstantano, Pimarano), Triterpenos e Esteróides	PINTO et al., 1984b; PEIXOTO et al., 1980.
<i>Vellozia pusilla</i>	Planta inteira	Diterpenos, Triterpenos e Esteróides	PINTO et al., 1981c, 1983b.
<i>Vellozia scoparia aff.</i>	Folhas frescas	Flavonas	HARBONE et. al., 1994.
<i>Vellozia stipitata</i>	Planta inteira, folhas, caule e raízes	Diterpenos, Triterpenos, Flavonas, Flavonóides, Flavonóis e Esteróides	PINTO et al., 1979, 1980b, 1980c, 1996.
<i>Vellozia streptophylla</i>	Folhas	Flavonas e Flavonóis.	
<i>Vellozia variabilis</i>	Planta inteira	Diterpenos (pimareno, nor-diterpenóides)	PINTO et al., 1988b.
<i>Xerophyta plicata</i>	Espécie do herbário	Biflavonóides	WILLIAMS et al., 1987.

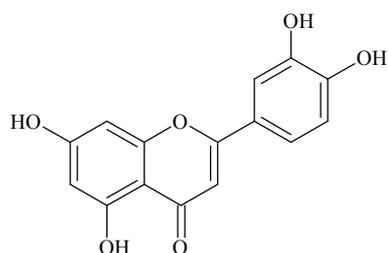
Além desses constituintes, estudos realizados com a cera epicular das folhas de 110 espécies de Velloziaceae demonstrou que os principais flavonóides encontrados nas folhas são flavonóis glicosilados (68%) e flavonas C- glicosiladas (48%). Na subfamília Vellozioideae, as flavonas, tais como o luteolina, ocorrem tanto no estado livre como C- glicosiladas e essa constituição se difere das espécies presentes na subfamília Barbacenioideae (WILLIAMS, 1991). Segundo Williams 1991, o gênero *Pleurostima* é caracterizado por produzir hidroxiflavonas glicosiladas, o gênero *Barbacenia* pela presença da isohamnetina e ocasionalmente, da quercetina 3- metil éter. Isohamnetina são frequentes, ainda, em espécies de *Xerophyta*, que produzem também a quercetina 3- metil éter e luteolina. Testes similares para padrões de flavonóides para *Vellozia* e *Xerophyta* sugerem a presença de 5-deoxykaempferol e da antocianina. *Nanuzia plicata* se difere de todos gênero restantes pela presença de biflavonóides (WILLIAMS et al., 1991).



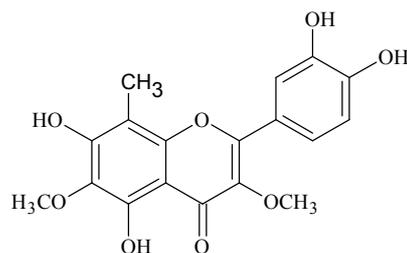
Isoramnetina (WILLIAMS et.al., 1991)



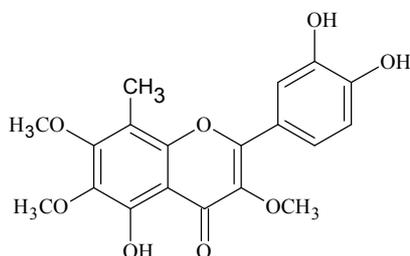
3-O-metil quercetina (WILLIAMS et.al., 1991)



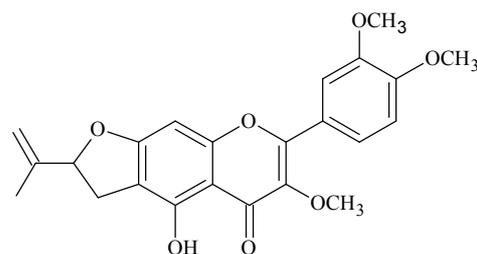
Luteolina (WILLIAMS et.al., 1991)



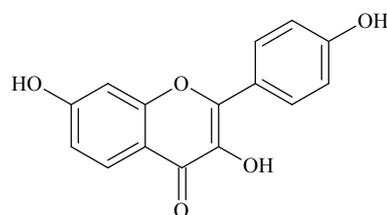
3',4',5,7-tetrahydroxi-3,6-dimetoxi-8-metilflavona (BRANCO et.al., 2002)



3',4',5,7-tetrahydroxi-3,6,7-trimetoxi-8-metilflavona (BRANCO et.al., 2002)

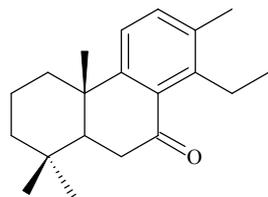


3,3,4'-O-trimetil velloquercetina (BRANCO et.al., 1998)

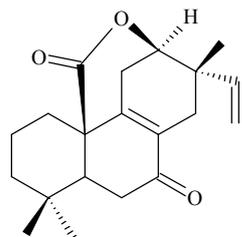


5-Deoxicamferol (WILLIAMS et.al., 1991)

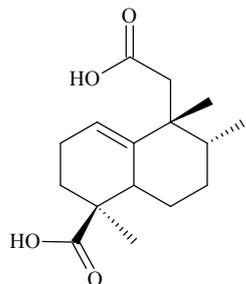
Figura 2. Alguns flavonóides isolados de espécies da família Velloziaceae.



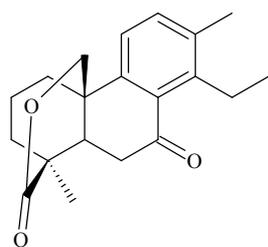
8,11,13-cleistantatrien-7-ona (RIEHL & PINTO, 2000)



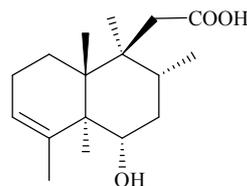
8(9),15-isopimarandien-7-ona-20,12-carbolactona (DANTAS et.al., 2003)



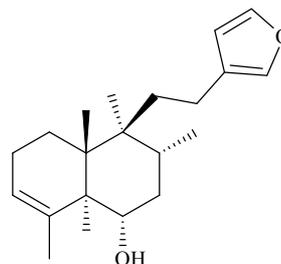
Ácido 13,14,15,16-tetranorfriedo-1(10)-labden-12,19-dióico (PINTO et.al., 1996a)



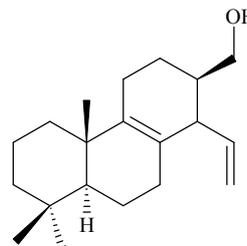
8,11,13-cleistantatrien-7-one-19,20β-olide (RIEHL & PINTO, 2000)



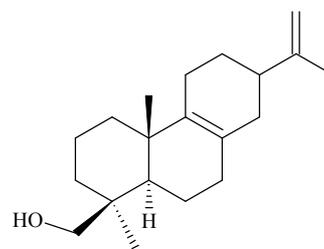
Ácido 6α-hidroxi-13,14,15,16-tetranor-neo-clerodan-3-en-12-óico (PINTO et.al., 2004)



6α-hidroxiannoneno(PINTO et.al., 2004)



17-hidroxi-8(9),15-isopimaradieno (PINTO et.al., 1996b)



19-hidroxi-8(9),13(16)-14S,17-ciclolabdadieno (PINTO et.al., 1996)

Figura 3. Alguns diterpenos isolados de espécies da família Velloziaceae.

2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *NANUZA*

O gênero *Nanuza* foi segregado do gênero *Vellozia* Vandelli por Smith e Ayensu (1976), baseando-se na espécie *Vellozia plicata* Martius (1823). Dessa divisão surgiu o gênero *Nanuza* considerado, até então, monoespecífico com apenas *Nanuza plicata* L.B.Sm. & Ayensu.

A partir de março de 2002 houve a inserção de duas novas espécies no gênero: *N. almeidae* Alves e *N. luetzelburgii* Alves.

Nanuza almeidae se diferencia de *N. plicata* e *N. luetzelburgii* pelas tépalas linear-lanceoladas, limbo foliar na base estreitado em pseudopecíolo, mais largo e curto, adaxialmente glabrescente, filetes triangulares com base achatada. *Nanuza luetzelburgii* se diferencia de *N. plicata* e *N. almeidae* pelas margens arredondadas do caudex trígono, preenchimento dos sulcos no limbo por abundantes pêlos rígidos, sulcos vestigiais na face adaxial, bainhas foliares com margens serradas, sem as cerdas características de *N. plicata* e *N. almeidae* (ALVES, 2002).

2.2.1 Constituintes Químicos presentes no gênero

Análises realizadas com o extrato bruto dessas duas novas espécies, utilizando-se cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas revelaram a presença de diterpenos do tipo labdano e de ácido heptadecênico para *N. almeidae* e *N. luetzelburgii*, respectivamente (ALVES, 2002).

2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÈCIE *NANUZA PLICATA*

Nanuza plicata L.B.Sm. & Ayensu foi descrita inicialmente como *Vellozia plicata* Martius (1823), baseada em espécies coletadas na Bahia em 1819. Subsequentemente, em 1827, Sprengel transferiu-a para o gênero *Xerophyta*. Somente em 1976, Smith e Ayensus criaram um novo gênero na família Velloziaceae, *Nanuza*, incluindo-se assim *Nanuza plicata*.

Esta interessante espécie, destacada pelo seu crescimento ao redor de rochas possui um comportamento exótico. Quando em condições adequadas de disponibilidade de água as folhas apresentam uma coloração esverdeada e à medida que o estoque de água vai terminando sua coloração tende a se tornar avermelhada, chegando a ter uma aparência de ressecamento total. Porém, se repormos água a mesma folha volta a situação original (totalmente verde). Este processo da mesma folha passar do verde para o vermelho amarronzado e, posteriormente retornando ao verde pode ser repetido várias vezes durante períodos semanais (NASCIMENTO et al., 2001).



Figura 4. *Nanuza plicata* em seu ambiente natural (Foto: Josean Fechine Tavares, Serra Branca-PB, 2007).

2.3.1 Posição sistemática da espécie, segundo APGweb (2007)

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Liliatae

Ordem: Velloziales

Família: Velloziaceae Endl.

Subfamília: Vellozioideae

Gênero: *Nanuza* L.B.Sm. & Ayensu

Espécie: *Nanuza plicata* (Mart.) L.B.Sm. & Ayensu

2.3.2 Estudos químicos de *Nanuza plicata*.

Três artigos reportam a composição fitoquímica de *Nanuza plicata*.

A espécie herborizada obtida em Minas Gerais em 1984 foi analisada através de cromatografia em camada delgada analítica e espectrometria de massas, sendo identificado pela primeira vez um biflavonóide (amentoflavona) na família Velloziaceae isolado de *N. plicata* (WILLIAMS et. El., 1987). Hiehl (2000, 2006) descreve dois novos derivados do ácido 3-geranil-4-hidroxibenzoico obtidos de espécies coletadas em setembro de 1990, Nova Friburgo-RJ. Neste estudo o extrato hexânico da planta inteira foi cromatografado em coluna de sílica-gel. Das frações obtidas, após metilação, identificou-se os dois novos derivados como sendo o ácido xeroftólico (RIEHL, 2000) e o xeroftalato A (RIEHL, 2006).

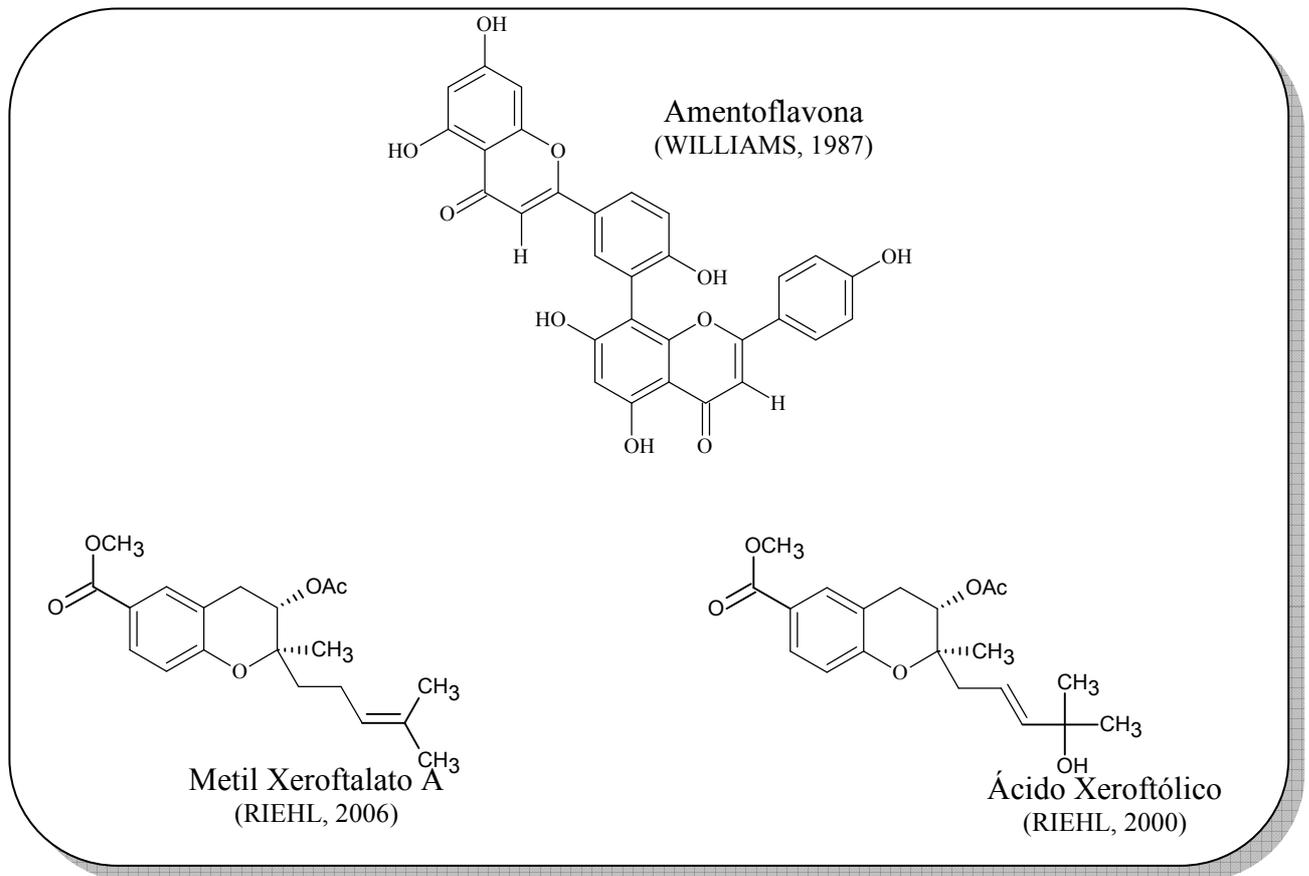


Figura 5. Substâncias isoladas de *N. plicata*.

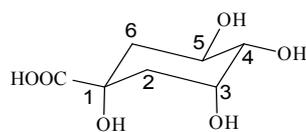
2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE DERIVADOS CLOROGÊNICOS

O termo ácido clorogênico (ACG) parece ter sido introduzido em 1846 por Payen para designar um composto fenólico com função ácida, de estrutura ainda desconhecida, que conferia cor verde ao meio aquoso quando em meio levemente alcalino e exposto ao ar. Esse ácido foi obtido primeiramente em 1907 na forma de um complexo cristalino, denominado clorogenato de cafeína, a partir do qual se preparou um ácido puro. A estrutura química para este composto foi estabelecida por Fischer como ácido 3-cafeoilquínico (atualmente conhecido como ácido 5-cafeoilquínico). É resultado da combinação entre os ácidos caféico e quínico (DE MARIA & MOREIRA, 2004). Atualmente, o termo ACG é usado para designar uma família de ésteres formados pela esterificação de um ou mais derivados do ácido trans-cinâmico com o ácido quínico; este último tem hidroxilas na posição axial nos carbonos 1 e 3 e hidroxilas equatoriais nos carbonos 4 e 5. Os isômeros *cis* dos derivados do ácido cinâmico já foram detectados em produtos processados, porém não têm sido detectados naqueles *in natura* (CLIFFORD, 1999)

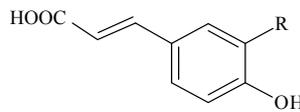
Os principais grupos de ACG incluem: ácidos cafeoilquínicos (ACQ), com 3 isômeros (3-, 4- e 5-ACQ); ácidos dicafeoilquínicos (diACQ), com 3 isômeros (3,4-diACQ; 3,5-diACQ; 4,5-diACQ); ácidos feruloilquínicos (AFQ), com 3 isômeros (3-, 4- e 5-AFQ); ácidos p-cumaroilquínicos (pCoAQ), com 3 isômeros (3-, 4- e 5-pCoAQ), e diésteres mistos de ácidos cafeoil-feruloil-quínicos (ACFQ) (Figura 6, p.19) (FARAH & DONANGELO, 2006).

São compostos de origem vegetal derivados dos fenilpropanóides onipresentes nos metabólitos secundários (CLÉ et al., 2008). Estão envolvidos em uma gama de processos ecológicos e fisiológicos, como a atração de polinizadores e dispersores de sementes, interações com agentes patogênicos, controle da fertilidade masculina, tolerância contra os raios UV, antioxidantes, transportes de auxinas, defesa e contra micróbios (ALBRECHT et al., 1999; SHIRLEY-WINKEL, 2002; GROTEWOLD, 2006). Esta vasta gama de funções biológicas é compensada por tão grande diversidade estrutural. Estima-se que cerca de 8000 compostos fenólicos diferentes são biosintetizados por plantas (ALBRECHT et al., 1999), através de uma variedade de polimerização, hidroxilação, metilação, glicosilação, acilação, prenilação e reações de condensação (POURCEL et al., 2007).

Unidades Básicas



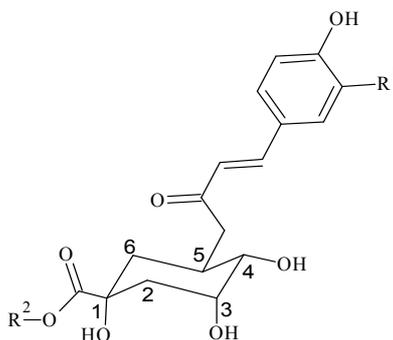
Ácido Quínico



R = OH ácido caféico (AC)

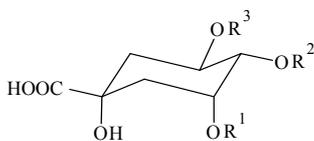
R = OCH₃ ácido ferrúlico (AF)R = H ácido *p*-cumaroil CoA (pCoA)

Monoésteres

R₁=H, R₂= H ácido *p*- cumaroilquínicoR₁=OCH₃, R₂= H ácido feruloilquínicoR₁=OH, R₂= H ácido clorogênicoR₁=OH, R₂= CH₃ ácido clorogênico 4-metil-O-cafeoilquinato

Diésteres

Derivados do ácido Caféico

R₁= AC, R₂= AC, R₃= H ácido 3,4-dicafeoilquínicoR₁= AC, R₂= H, R₃= AC ácido 3,5-dicafeoilquínicoR₁= H, R₂= AC, R₃= AC ácido 4,5-dicafeoilquínico

Mistos

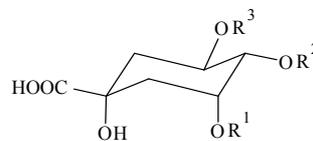
R₁= AF, R₂= AC, R₃= H ácido 3- feruloil-4-cafeoilquínicoR₁= AC, R₂= AF, R₃= H ácido 3- cafeoil-4- feruloilquínicoR₁= AF, R₂= H, R₃= AC ácido 3- feruloil-5- cafeoilquínicoR₁= AC, R₂= H, R₃= AF ácido 3- cafeoil -5- feruloilquínicoR₁= H, R₂= AF, R₃= AC ácido 4- feruloil-5-cafeoilquínicoR₁= H, R₂= AC, R₃= AF ácido 4- cafeoil- 5-feruloilquínico

Figura 6. Estruturas químicas das unidades básicas, monoésteres e diésteres dos derivados clorogênicos. (adaptado de FARAH & DONANGELO, 2006)

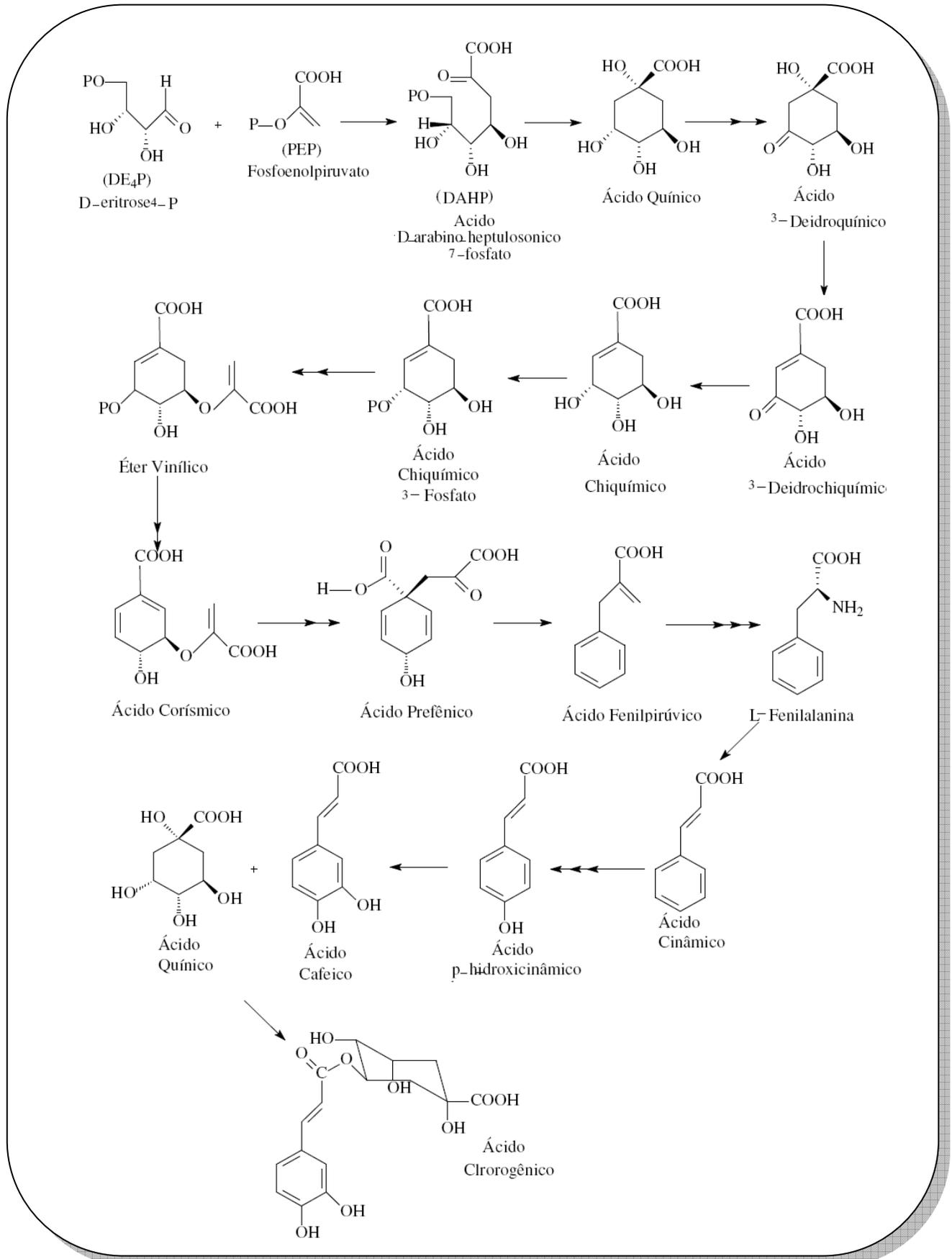
Esses compostos fenólicos desempenham um papel essencial na proteção contra radiações UV- β potencialmente nocivas às plantas. Nas plantas, os raios UV- β afetam os processos metabólicos, como crescimento, morfogênese, fotossíntese e floração. Também catalisam a dimerização das bases de nucleotídeos, que, por sua vez, tem conseqüências na transcrição e replicação do DNA. Numerosos estudos têm demonstrado que a exposição das plantas aos raios UV resulta em aumento dos níveis globais de compostos fenólicos (HOLLOSY, 2002; JANSEN et al., 1998; JORDAN, 1996). Especificamente nas plantas, os compostos fenólicos desempenham o papel de proteção contra a absorção de luz com comprimentos de onda entre 280 e 340 nm e, portanto, não diminui a penetração da radiação necessária a fotossíntese, mas atuam filtrando as radiações UV- β nocivas.

Os níveis de fenóis acumulam-se na camada superior das células epidérmicas, principalmente, onde estão localizados os vacúolos. Como resultado, pouca radiação UV- β (<10%) realmente penetra no mesófilo (TURUNEN et al., 1999), e os diretos efeitos inibidores das doses de UV- β são geralmente menores.

O acúmulo de compostos fenólicos é um processo cuidadosamente controlado pelas plantas com os níveis e composição variando consideravelmente entre os espécies - organismo, tecidos, estágios de desenvolvimento e condições ambientais (SHIRLEY-WINKEL, 2002). A expressão de diversos níveis de genes que codificam enzimas-chave, dos precursores dos fenilpropanóides, é elevada em resposta à radiação UV- β , bem como uma gama de sinais ambientais (WEISSHAAR & JENKINS, 1998; LONG & JENKINS, 1998). Estas enzimas incluem fenilalanina amônia-liase (PAL), cinamato 4-hidroxilase (C4H) e 4-cumarato: coenzima A ligase (4CL). PAL catalisa a conversão de fenilalanina em ácido cinâmico, primeira etapa da via biossintética dos fenilpropanóides (Esquema 1, p. 21).

2.4.1 Rota biossintética do ácido clorogênico

Esquema 1 - Rota biossintética do ácido clorogênico (LEAL, 2006)



2.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE FLAVONÓIDES

Os flavonóides são compostos largamente distribuídos no reino vegetal, encontrando-se presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos ou agliconas (HARBORNE et al., 1999). São compostos de baixo peso molecular, com esqueleto básico de 15 átomos de carbono, assumindo uma disposição C6–C3–C6. A estrutura química dos flavonóides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (Figura 7). Essa classe faz parte da via biossintética dos fenilpropanóides (ZUANAZZI & MONTANHA, 2007). O anel aromático A é derivado do ciclo acetato/malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina (MERKEN et al., 2000). Variações no padrão de substituição do anel C resultam em importantes classes de flavonóides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas. Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonóides. Estas substituições podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfação (HOLLMAN & KATAN, 1999).

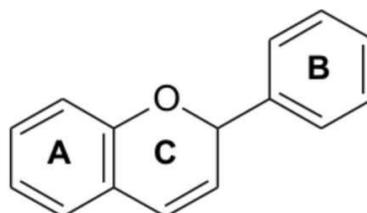


Figura 7. Núcleo Fundamental dos flavonóides.

São conhecidos aproximadamente 4.200 flavonóides diferentes, sendo que o número de novas estruturas identificadas praticamente dobrou nos últimos vinte anos. Os flavonóides de origem natural apresentam-se, frequentemente, oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares. Esta forma, chamada conjugada, também é conhecida como heterosídeo (ZUANAZZI & MONTANHA, 2007). Esses metabólitos secundários são de grande importância na manutenção da saúde de muitos animais herbívoros, incluindo o homem.

Muitas funções são citadas para esses metabólitos, dentre elas a proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais com finalidade de polinização; antioxidantes; controle de

ações de hormônios vegetais; agentes alelopáticos e inibidores de enzimas (HARBORNE et. al., 1999; HARBORNE & WILLIAMS, 2000 apud ZUANAZZI & MONTANHA, 2007).

O conceito de resistência à incidência de raios ultravioleta e visível em plantas pode ser explicado pela capacidade das plantas em se adaptar às crescentes quantidades de raios UV-β que atingem o solo, por exemplo, a partir de furos na camada de ozônio. Essa resistência pode estar associada à vários fatores, mas um tipo de resistência poderia residir nos pigmentos - flavonóides, que são conhecidos por serem quase universalmente presentes em folhas verdes. Estes flavonóides geralmente absorvem na região de 280 ± 315 nm e, portanto, são capazes de agir como filtros UV, protegendo os tecidos fotossintéticos de danos (HARBORNE & WILLIAMS, 2000).

Recentemente, o interesse pelos estudos das propriedades farmacológicas e bioquímicas destes compostos tem crescido largamente, principalmente pela sua atividade antiinflamatória. Para explicá-la tem-se estudado suas propriedades antioxidantes, tais como: sua capacidade em inibir enzimas, sua excelente quelação de metais, como o ferro, e sua atuação como “scavenging” (sequestrador) de radicais de oxigênio (ROS), uma vez que a presença destes tem sido relacionada a certas doenças crônicas, como: doenças auto-imune (artrite reumatóide, lupus, entre outros), câncer, doença de Parkinson (KANASHIRO et al., 2000).

2.5.1 Aspectos Gerais sobre Flavonas

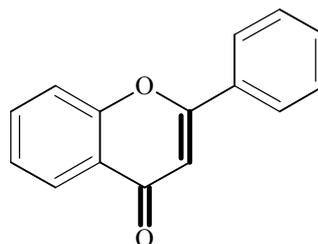


Figura 8. Esqueleto de flavonas.

São flavonóides derivados da 2-fenilcromona, possuindo no seu esqueleto flavonoídico uma dupla ligação entre os carbonos C-2 e C-3 e uma carbonila em 4. São biossinteticamente formadas pela oxidação de flavanonas (Esquema 2, p. 26). As flavonas naturais são frequentemente oxigenadas, substituídas com hidroxilas e/ou metoxilas. Outros substituintes encontrados com bastante freqüência são: acila, C-metila, metilenodioxila, prenila, pirano, furano e seus derivados clorados. As oxigenações nas posições 5, 7, 3' e 4' são padrões, característicos da rota biossintética (ZUANAZZI & MONTANHA, 2007).

2.5.2 Aspectos Gerais sobre Biflavonóides

Biflavonóide são formados por duas unidades (C6-C3-C6), diferenciando-se de outros oligômeros como as proantocianidinas, devido à sua origem biossintética comum. No geral, os biflavonóides de ocorrência natural são dímeros de flavonas e flavanonas – raramente chalconas – através de acoplamento oxidativo. A numeração dos biflavonóides se baseia na atribuição de números ordinários para os anéis **A** e **C** e primados (') para o anel **B** de um dos monômeros. Para a segunda unidade, empregam-se números ordinários duplamente primados (") para os núcleos **A** e **C** e números ordinários triplamente primados (''') para o núcleo **B**. Outra forma de numeração é o emprego de números romanos I e II para cada monômero seguido da numeração comum de flavonóides, por exemplo I-3, I-4', II-5, II-2', etc. Esta última numeração será empregada nesta dissertação.

Seus substituintes apresentam-se nas posições 5, 7, 4' e, mais raramente, 5, 7, 3', 4' (ZUANAZZI & MONTANHA, 2007). A ligação dos monômeros pode ser feita através de ligações entre carbonos (C-C) ou carbono-oxigênio-carbono (C-O-C). No geral, as formas mais abundante se apresentam ligados entre carbonos (C-C) sendo estes C-3-I e C-8-II. Um dos exemplos clássicos desse padrão é a Amentoflavona, biflavonóide dímero de duas moléculas de apigeninas (5,7,4'-trihidroxi-flavona) unidas entre si pelos carbonos C-8-I com o C-3-II. Outros padrões podem ser relatado, a exemplo da agatisflavona com união em C-8-I com C-6-II, cupressoflavona C-8-I-C-8-II, robustaflavona C-6-I com C-3'-II e a série das hinoquiflavonas, com ligações entre carbonos C-4'II-O-C-6 I. (Figura 9, p. 25) (ZUANAZZI & MONTANHA, 2007).

Esses biflavonóides possuem ampla ocorrência em gimnospermas musgos e samambaias e uma presença limitada em angiospermas. A primeira biflavona, foi isolada em 1929, e é conhecida como gingentina. Desde então, mais de mil biflavonóides foram isolados de plantas e muitas atividades biológicas têm sido relacionadas a essa classe de substâncias (LIN, et al., 1999).

A principal função vegetal relatada é a de agir como antifúngico ou alimento dissuasivo para insetos. Outra seria a proteção contra os raios ultravioletas nas folhas (ZUANAZZI & MONTANHA, 2007).

Algumas atividades farmacológicas conhecidas são, principalmente, estimulantes cardíacos, antiinflamatórios, como o bloqueio de efeitos inflamatórios de hepatotoxinas, supressão de atividade linfocitária, inibição de adesão plaquetária, inibição de ciclooxigenases, inibição da ligação de neurotransmissores, inibição de peroxidação lipídica,

vasodilatação periférica, efeito hipoglicêmico, anticarcinogênico, antiespasmogênico, hepatoprotetor, antifúngico, antiviral, entre outras (BERETZ et al, 1986; apud ALMEIDA, 2003).

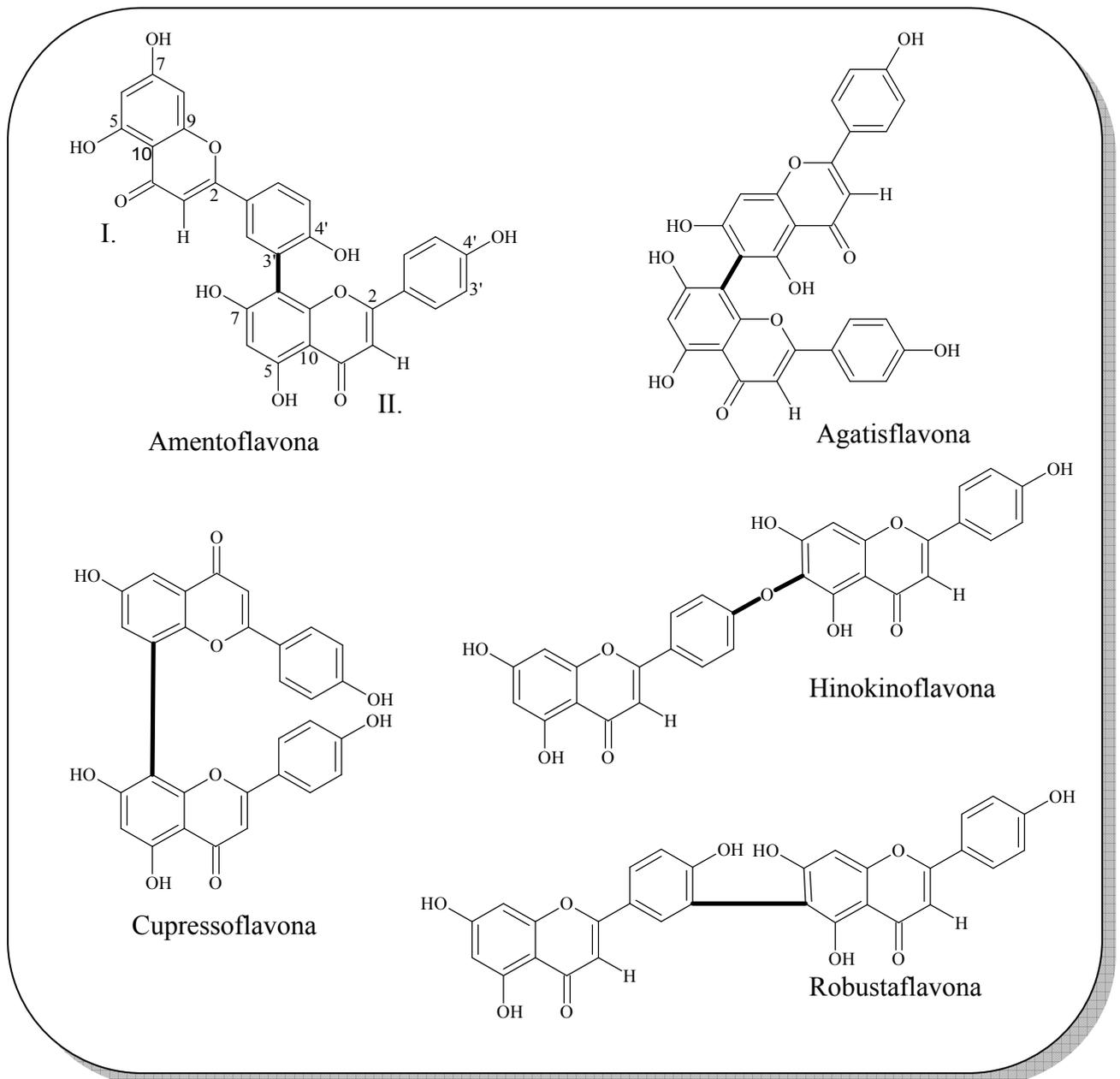
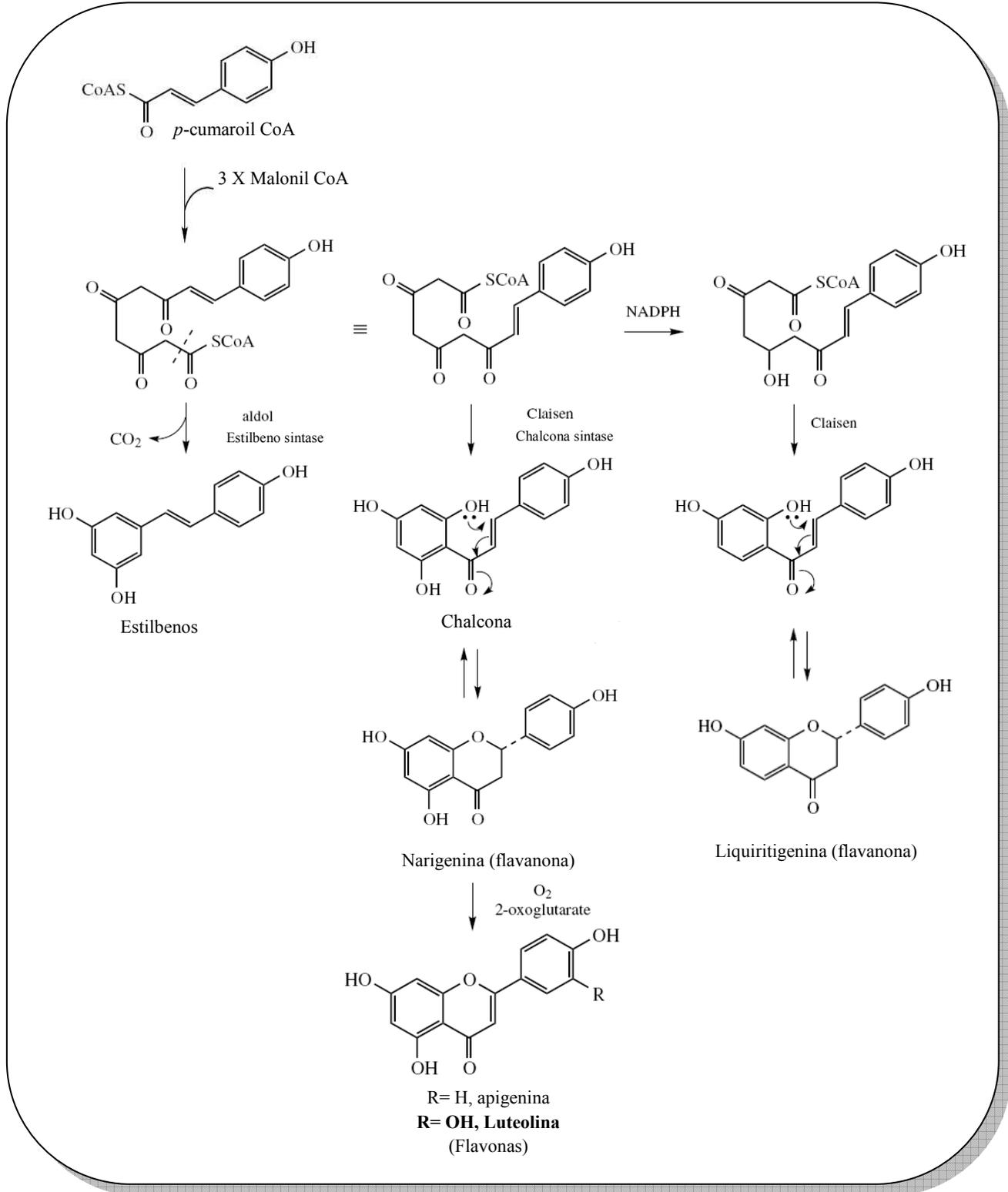


Figura 9. Exemplos biflavonóides com diferentes uniões interflavonoídicas.

2.5.3 Aspectos Biossintéticos

Esquema 2 – Rota Biossintética para flavonas.



3-Objetivos

3- Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Contribuir com o estudo químico de plantas do norte/nordeste brasileiro possibilitando estudos entre estrutura química e atividade farmacológica dos constituintes isolados de *Nanuza plicata* Smith & Ayensus.

3.2. Objetivos Específicos

- Isolar, identificar e/ou elucidar outros constituintes químicos de *N. plicata*;
- Contribuir com a quimiotaxonomia da espécie em estudo;
- Disponibilizar extratos, frações e substâncias isoladas para estudos farmacológicos.

4- Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Métodos Cromatográficos

- Para cromatografia em coluna por exclusão molecular (CC) foi utilizado SEPHADEX LH-20 da Biochemika (Fluka) granulometria de 25-100 μm , empacotado com metanol. O extrato foi acondicionado sobre o topo da coluna, eluindo-a, inicialmente com metanol puro e, posteriormente com clorofórmio: metanol 1:1. O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades das amostras;
- Cromatografias em coluna por adsorção (CC) utilizando-se como adsorvente sílica gel da Merck 7734, com partículas 0,063-0,200 mm de diâmetros. A eluição se procedeu utilizando-se como eluentes, clorofórmio e metanol, puros ou em misturas binárias em gradiente crescente de polaridade.
- As Cromatografias em Camada Delgada Analítica (CCDA) foram feitas utilizando sílica gel 60, da Merck PF₂₅₄ artigo 7749 na espessura 0,25mm, suspensa em água destilada (1:2), distribuída sobre placas de vidro por meio de um cursor “Quick fit”, secas ao ar e ativadas em estufa a 110 °C durante cerca de 2 horas.
- Os solventes empregados foram das marcas MERCK, VETEC e solventes comerciais destilados no LTF/UFPB.
- As revelações das substâncias nas cromatoplasmas analíticas foram executadas pela exposição à lâmpada de irradiação ultravioleta em aparelho Mineralight, modelo UVGL-58 em dois comprimentos de onda (254 e 366nm) e/ou câmara saturada com vapores de iodo.

4.2. Métodos Espectroscópicos

- Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro: BOMEM, modelo MB 100, na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , utilizando-se pastilhas de KBr.

➤ Os espectros de RMN foram registrados em espectrômetros VARIAN, modelo MERCURY, operando a 200 MHz (RMN ^1H) e 50 MHz (RMN ^{13}C) e SYSTEM operando a 500 MHz (RMN ^1H) e 125 MHz (RMN ^{13}C). Os solventes utilizados na dissolução das amostras foram clorofórmio deuterado (CDCl_3), Dimetil sulfóxido deuterado (DMSO) e metanol deuterado (CD_3OD). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento em Hz. As multiplicidades dos sinais em RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: *s* (simpleto), *sl* (simpleto largo), *d* (duplete), *dd* (duploduplete) e *m* (multiplete).

4.3. Coleta do material botânico

As partes aéreas de *Nanuza plicata* foram coletadas no município de Serra-Branca, estado da Paraíba, em março de 2007. O material botânico foi identificado pela Prof^a Maria de Fátima Agra, do setor de botânica do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF); uma exsicata da planta está depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), da Universidade Federal da Paraíba sob identificação AGRA 5730.

4.4. Processamento das partes aéreas de *Nanuza plicata*

O material botânico foi seco em estufa com ar circulante à temperatura de 45 °C durante 3 a 4 dias. Quando seco, o material foi submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico, obtendo-se 3,0 Kg de pó.

4.5. Obtenção do Extrato Etanólico Bruto (EEB)

O pó das partes aéreas seco e pulverizado foi submetido à maceração exaustiva com etanol a 95%, em um recipiente de aço não inoxidável, durante 72 horas. Essa etapa foi repetida por 4 vezes. Após a extração a solução extraída foi concentrada em rotavapor sob pressão reduzida a uma temperatura de 45 °C obtendo-se o extrato etanólico bruto (120g).

4.6. Fracionamento cromatográfico do Extrato Etanólico Bruto (EEB)

O EEB (3,0 g) foi submetido a cromatografia em coluna (CC) utilizando SEPHADEX como gel de permeação e, como eluentes, metanol puro ou uma mistura binária de metanol: clorofórmio 1:1. Desta eluição obteve-se 76 frações de 8 mL cada, sendo as concentrações de eluição indicadas no quadro a seguir.

Quadro 3: Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico bruto.

Frações	Metanol %	Clorofórmio %
1 – 65	100	-
66 – 76	50	50

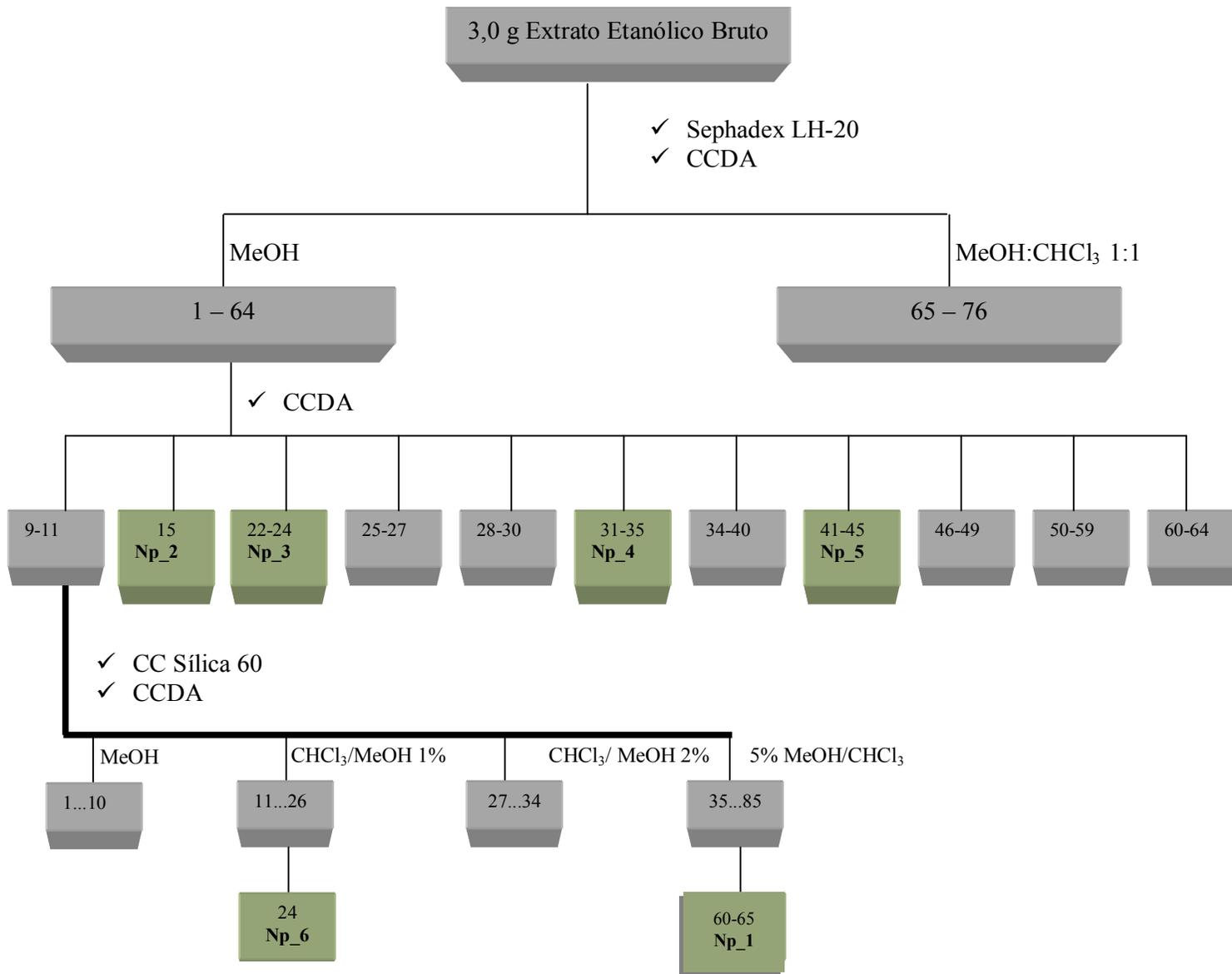
As frações foram monitoradas através de Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) em diversos sistemas de solventes (clorofórmio ou clorofórmio-metanol em ordem crescente de polaridade à 0,5%, 1%, 2%, 3%, 5% e 10%) e reunidas em 11 grupos de acordo com seus R_f , em: 9-11, 22-24, 25-27, 28-30, 31-35, 36-40, 41-45, 46-49, 50-59, 60-64, 72-76.

A fração 15 foi encaminhada à análise espectral, visto que a mesma se apresentava como uma única mancha na placa cromatográfica, sendo então codificada como Np₂ (12 mg). As frações 22-24, 31-35 e 41-45 eluídas na cromatoplaça a 10% MeOH: CHCl₃ foram posteriormente lavadas com hexano para retirada da graxa remanescente. Esse procedimento levou-nos ao isolamento das substâncias Np₃ (18 mg), Np₄ (30 mg) e Np₅ (20 mg), respectivamente.

A fração 9-11 foi submetida à recromatografia em coluna, utilizando-se sílica gel 60 como fase estacionária sendo a fase móvel: clorofórmio puro ou em mistura com metanol em ordem crescente de polaridade - obtendo-se 65 subfrações. Da fração 24, eluída a 1% MeOH: CHCl₃, pode-se isolar uma mistura codificada como Np₆ (10 mg), bem como das frações 60-65, eluídas 5% MeOH:CHCl₃, um óleo amarelado codificado como Np₁ (15 mg).

Um esquema geral para isolamento dessas substâncias é mostrado no Esquema 3 (p.33)

Esquema 3: Processo cromatográfico do EEB de *N. plicata*.



Essa metodologia foi reproduzida 3 vezes para a coluna de Sephadex com o objetivo de acumular as substâncias isoladas.

Após a reprodução das colunas, diversas placas cromatográficas foram feitas e comparadas, evidenciando assim o perfil de eluição das mesmas. Pela comparação entre os fatores de retenção (RFs) pode-se reunir as frações semelhantes na mesma coluna e, posteriormente frações semelhantes, porém de colunas diferentes.

A figura 10 exemplifica a correlação de Rfs dos flavonóides isolados entre as 4 colunas.

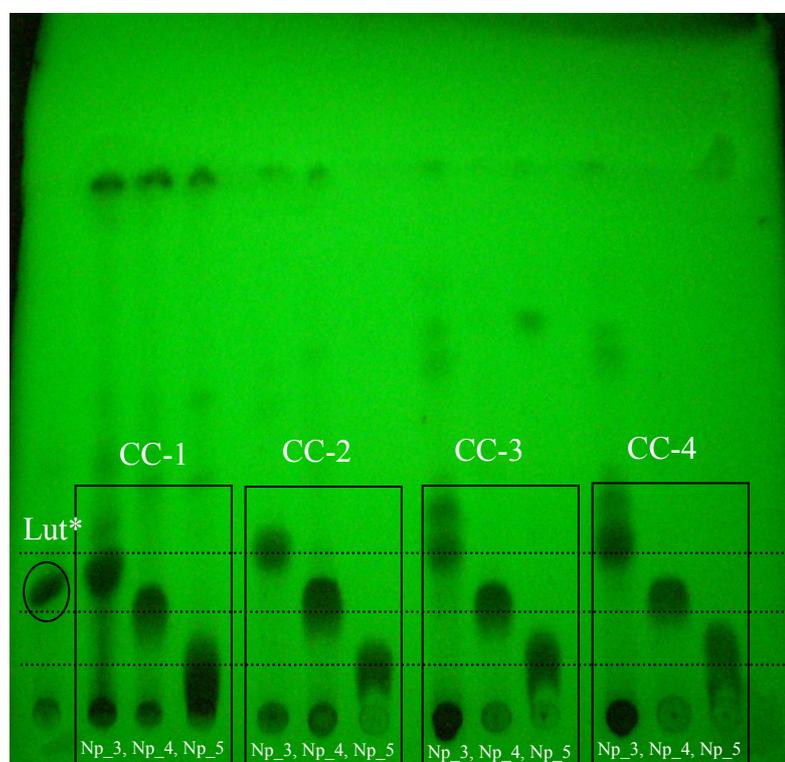


Figura 10: Placa cromatográfica relacionando o perfil de eluição das substâncias Np_3, Np_4 e Np_5, respectivamente para as 4 colunas.

* Luteolina

Após as reuniões somente as frações Np_3, Np_4 e Np_5 foram lavadas em hexano a temperatura ambiente para retirada da graxa remanescente.

5- Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Substâncias isoladas das partes aéreas de *Nanuza plicata*

O estudo fitoquímico das partes aéreas de *Nanuza plicata* resultou no isolamento e identificação estrutural dos seguintes compostos:

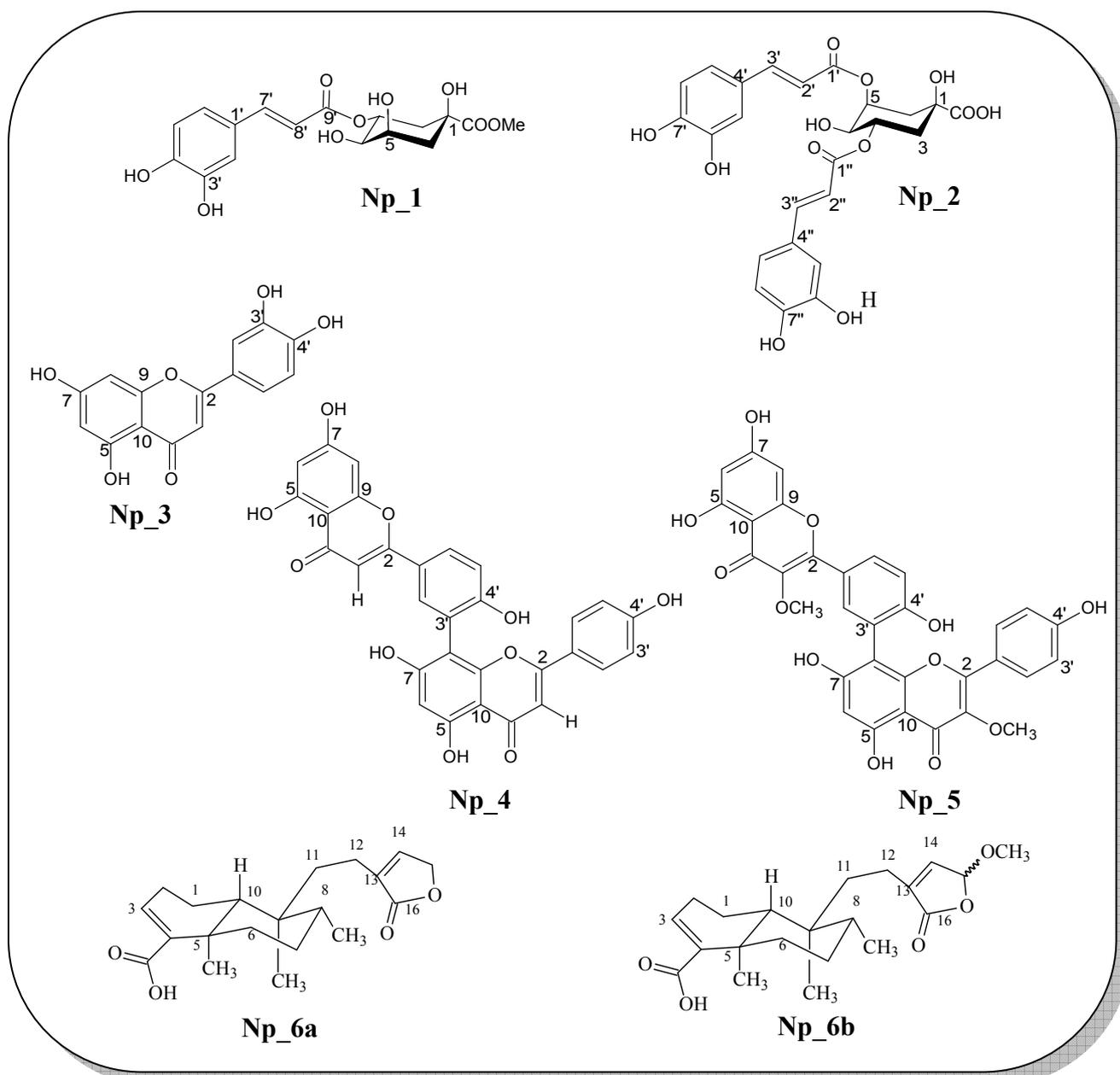


Figura 11: Constituintes químicos isolados neste estudo

5.2. Identificação estrutural dos constituintes químicos de *Nanuza plicata*: DERIVADOS CLOROGÊNICOS

5.2.1 Identificação estrutural de Np_1

A substância codificada como Np_1, foi isolada como de um óleo amarelo transparente. O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) (Figura 13, p. 41) e suas expansões (Figura 14-15, p. 42) mostrou a presença de dezessete sinais, destes, seis foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, oito a carbonos metínicos, dois a carbonos metilênicos e um a carbono metoxílico.

Os deslocamentos químicos observados em δ_{C} 175,4, bem como o δ_{C} 52,9 sugerem a presença de uma carbonila de éster ligada a uma metoxila. O sinal em δ_{C} 168,3, aponta outra carbonila, porém mais protegida o que indica que esta se apresenta ligada a um grupo protetor ou conjugada a uma dupla. Os sinais em δ_{C} 149,7 e 146,8 são característicos de carbonos quaternários aromáticos e oxigenados, bem como os deslocamentos em δ_{C} 72,1, 72,6, 70,4 são compatíveis com carbonos oxigenados alifáticos. Comparando esses dados com a literatura (KELLY; HARRUFF; CARMACK, 1976), observou-se que os sinais δ_{C} 149,3, 146,8, 116,5, 122,9, 127,7, 115,1, 147,1, 115,1 e 168,3 são compatíveis com os deslocamentos químicos de uma unidade cafeoila. Por outro lado, os deslocamentos químicos em δ_{C} 75,8, 72,1, 72,6, 38,2, 70,6, 175,4 e 52,9 são compatíveis com uma unidade de quinato de metila.

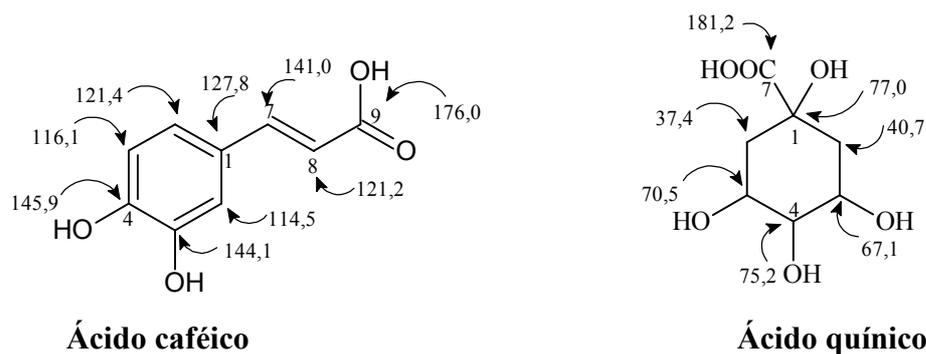


Figura 12. Valores de RMN ^{13}C obtidos em 15.1 MHz D_2O . (KELLY; HARRUFF; CARMACK, 1976).

No espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) (Figura 16, p. 41) e suas expansões (Figuras 17-21, p. 44-46) foi possível observar na região de prótons em sistemas aromáticos e olefinicos um duplete em δ_{H} 7,03 ($J = 2,0$ Hz), um duplete em δ_{H} 6,78 ($J = 8,0$ Hz), um

duplodupletos em δ_{H} 6,93 ($J_1 = 8,0$ Hz e $J_2 = 2,0$ Hz), dois dupletos, um em δ_{H} 6,19 ($J = 15,5$ Hz) e outro em δ_{H} 7,50 ($J = 15,5$ Hz), característicos dos prótons α e β à carbonila, respectivamente, em um sistema trans da unidade caféica. Na região de prótons em sistemas alifáticos foi possível observar um duplo duplodupletos em δ_{H} 5,25 ($J_1 = 4,5$ Hz, $J_2 = 8,0$ Hz $J_3 = 11,0$ Hz), um duplo dupletos em δ_{H} 4,11 ($J_1 = 6,5$ Hz e $J_2 = 10,0$ Hz), um duplo dupletos em δ_{H} 3,70 ($J = 11,0$ Hz), um simpleto em δ_{H} 3,3 atribuído a hidrogênio metoxílico, além de um multipletos entre δ_{H} 1,98 e 2,21. Esses dados corroboram com uma unidade de quinato de metila. O sinal em δ_{H} 5,24, correspondente a um hidrogênio oximetínico está sofrendo desproteção, quando comparado com o ácido quínico, o que sugere que a unidade cafeoila está esterificando uma hidroxila pertencente ao quinato de metila.

As correlações diretas entre hidrogênios e carbonos foram observadas no HMQC (Figuras 22-24, p. 46-47) e estão compiladas na Tabela 1 (p. 40).

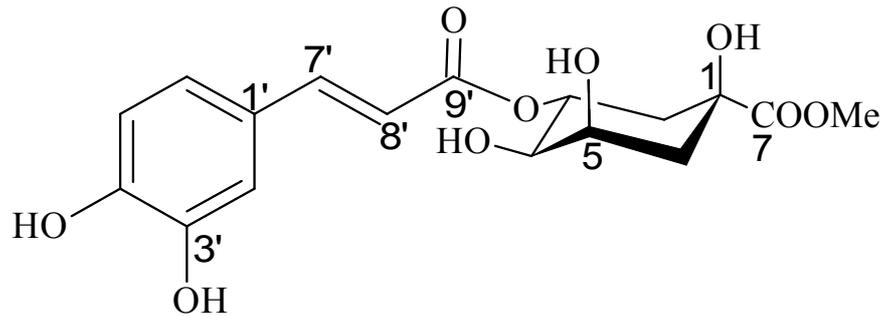
No espectro de infravermelho obtido em KBr foi possível observar absorções em 1701 e 1735 cm^{-1} o que corrobora com uma carbonila de éster conjugada e uma carbonila de éster metílico, respectivamente (Figura 25, p. 48). Essa informação, associada à correlação observada no espectro de HMBC (Figura 26, p. 49) do próton em δ_{H} 5,25 (H-3) com o carbono em δ_{C} 168,3 (C-9'), confirmaram a esterificação do quinato de metila com o ácido caféico. Por outro lado a correlação do sinal em δ_{H} 3,70 com o carbono δ_{C} 175,4 nos fez atribuir esse sinal a C-7. Ainda no espectro de HMBC (Figuras 27-29, p. 49 e 50) foi possível observar sinais de correlações entre δ_{H} 7,50 (H-7') com 168,3 (C-9'), 6,19 (H-8') com 168,3 (C-9'), 6,93 (H-6') com 149,3 (C-4'), 6,19 (H-8') com 127,7 (C-1'), 7,50 (H-7') com 122,9 (C-6'). As demais correlações estão compiladas na Tabela 1 (p.40).

No espectro de COSY foi possível observar correlação entre o sinal em δ_{H} 7,50 (H-7') com 6,19 (H-8'), 6,93 (H-6') com 7,03 (H-2') e 6,77 (H-5'), 5,25 (H-3) com 3,70 (H-4) e 2,02 (H-2) e 4,11 (H-5) com 3,70 (H-4) (Figuras 32-34, p.52 e 53).

Esses dados justificam a unidade caféica e a esterificação em C-3. Haveria a possibilidade da esterificação ser em C-5. Para comprovar essa hipótese e definirmos a estereoquímica relativa da unidade do quinato de metila, foi feito um espectro NOESY-1D (Figuras 35, p. 54). Nesse espectro ao irradiar o próton mais desprotegido 5,72 (H-3), o próton e δ_{H} 3,72 (H-4) ganhou NOE de 3,96%. Entretanto, quando o sinal em δ_{H} 4,13 (H-5) foi irradiado o sinal em δ_{H} 3,72 (H-4) ganhou de 11,58%. Comparando a estereoquímica do quinato com os modelos da literatura percebeu-se que os hidrogênios nos centros quirais em C-4 e C-5 possuíam uma relação *cis*. Este fato, sustentou a proposta levantada pelo

experimento de NOESY-1D o qual permitiu estabelecer uma relação *cis* entre os hidrogênios H-4 e H-5.

A análise desses dados e comparação com a literatura (RUMBERO-SANCHEZ et.al., 1991) possibilitou identificar Np_1 como 3-*O*- cafeoil quinato de metila. Essa substância está sendo relatada pela primeira vez na família Velloziaceae.



Relatos mostram que derivados clorogênicos estão envolvidos nos processos de proteção a radiação UV- β (p.16), nocivas às plantas (CLÉ et. al., 2008). Esse fato leva a justificar a sobrevivência de *N. plicata* em locais extremamente quentes, sob alta irradiação solar e pouca drenagem de água.

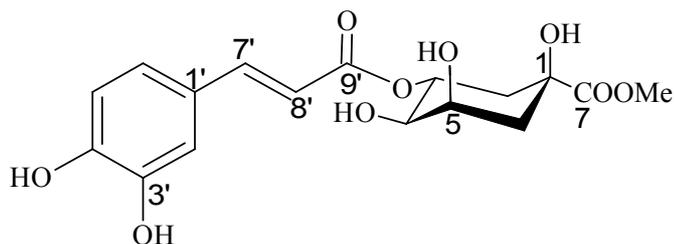


Tabela 1 - Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) 1D e 2D em CD_3OD de Np_1.

C	HMQC		HMBC	COSY
	δ_{C}	δ_{H}		
1	75,8			
1'	127,7			
3'	146,8			
4'	149,3			
7	175,4			
9'	168,3			
CH				
2'	115,1	7,03 (<i>d</i> , $J=2,0$)	C-1', C-4', C-7'	H-6'
3	72,1	5,25 (<i>ddd</i> , $J=4,5, 8,0, 11,0$)	C-9'	H-4, H-5
4	72,6	3,70 (<i>dd</i> , $J=11,0$)		H-3, H-5
5	70,4	4,11 (<i>dd</i> , $J=6,5, 10,0$)		H-4, H-6
5'	116,5	6,77 (<i>d</i> , $J=8,0$)	C-1', C-3', C-4', C-6'	H-6'
6'	122,9	6,93 (<i>dd</i> , $J=8,0, 2,0$)	C-1', C-4', C-7'	H-2', H-5'
7'	147,1	7,50 (<i>d</i> , $J=15,5$)	C-1', C-6', C-9'	H-8'
8'	115,1	6,19 (<i>d</i> , $J=15,5$)	C-1', C-9'	H-7'
CH₂				
2	37,8	2,10 (<i>m</i>) 2,17 (<i>m</i>)	C-3	H-3
6	38,2	1,98 (<i>ddd</i>)		H-5
CH₃				
8	52,9		C-7	

J em Hz; δ em ppm.

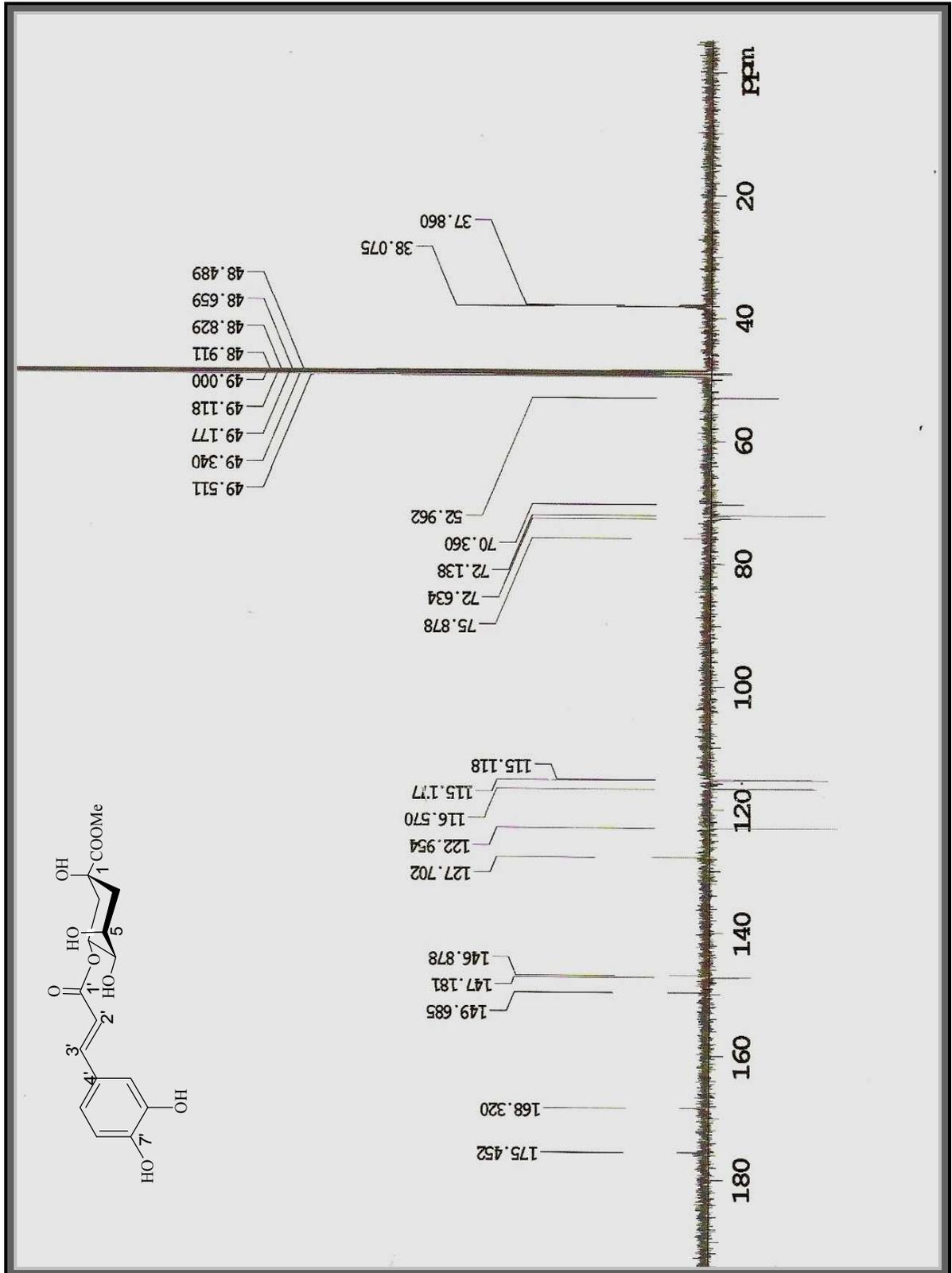


Figura 13. Espectro de RMN ¹³C-APT (125 MHz) de Np₁ em CD₃OD.

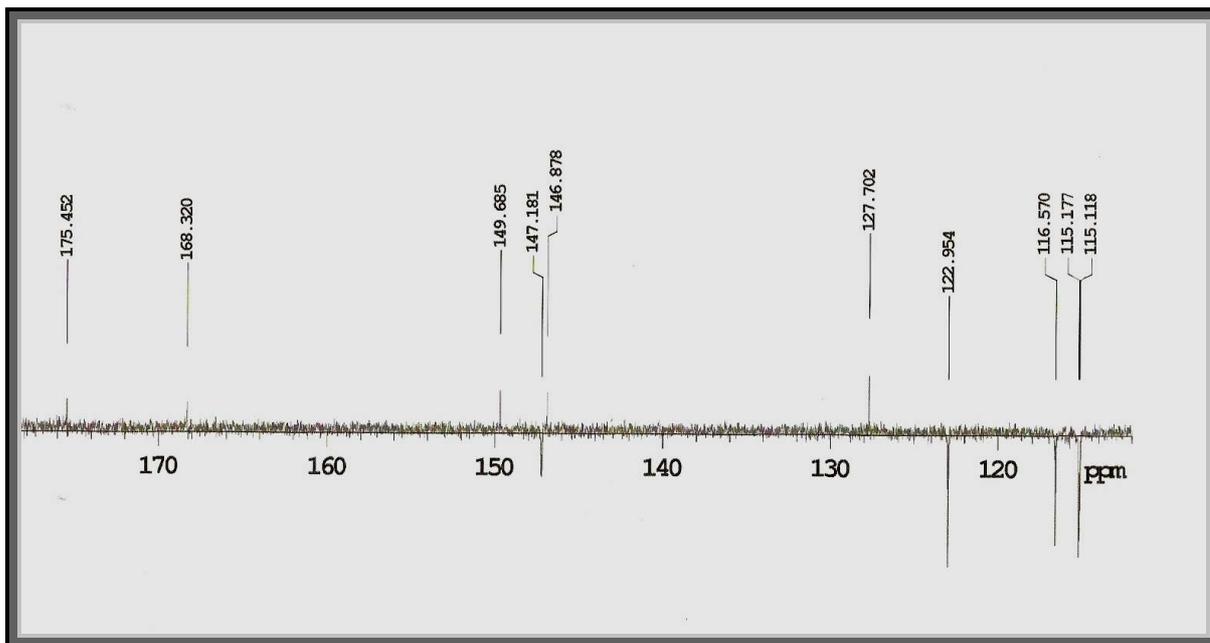


Figura 14. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{C} 115 - 180 ppm

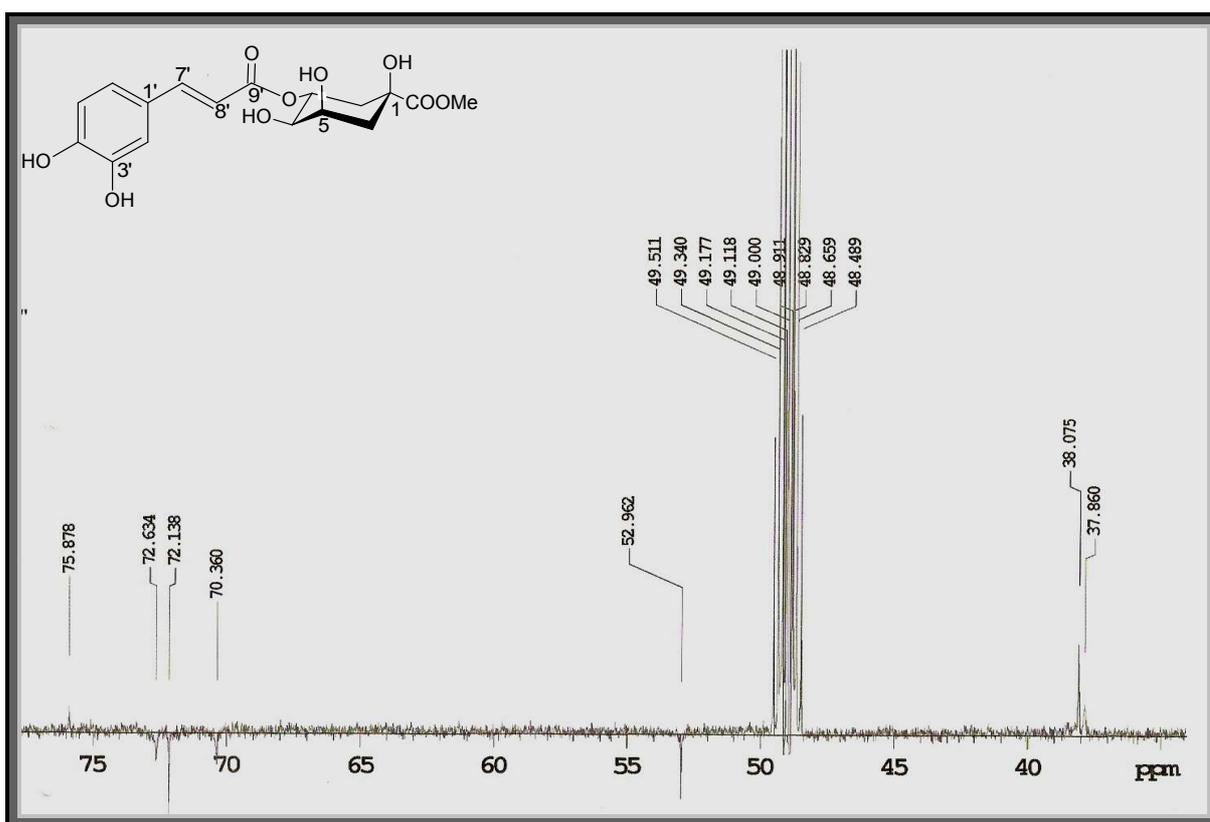


Figura 15. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{C} 37- 75 ppm

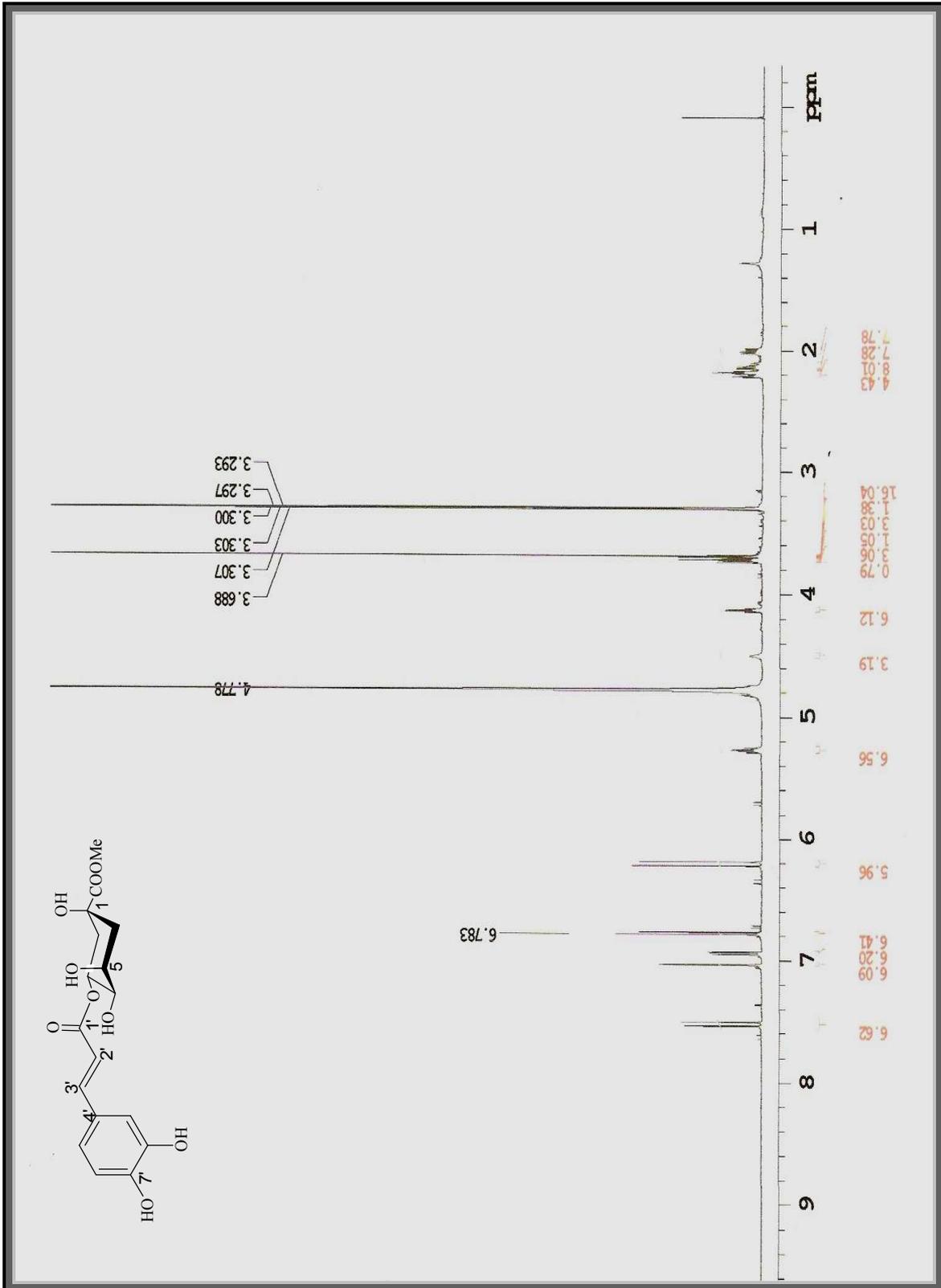


Figura 16. Espectro de RMN ^1H (500 MHz) de **Np_1** em CD_3OD .

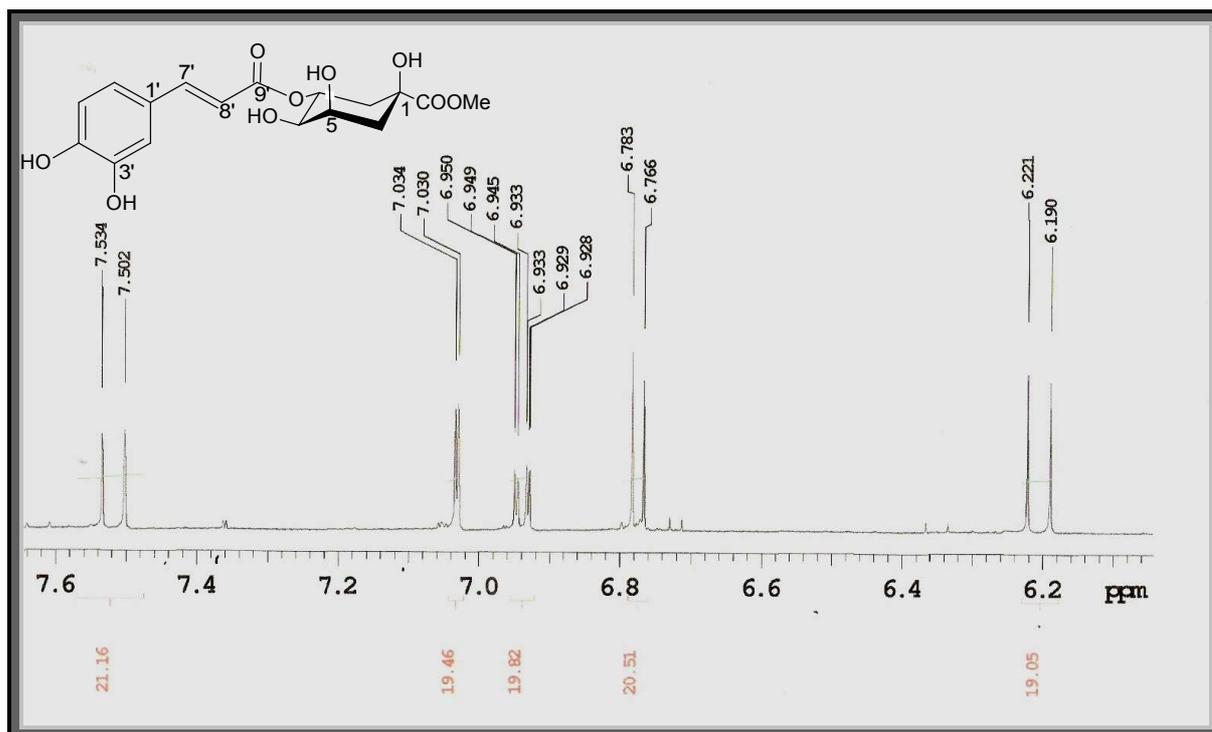


Figura 17. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{H} 6,2 - 7,6 ppm.

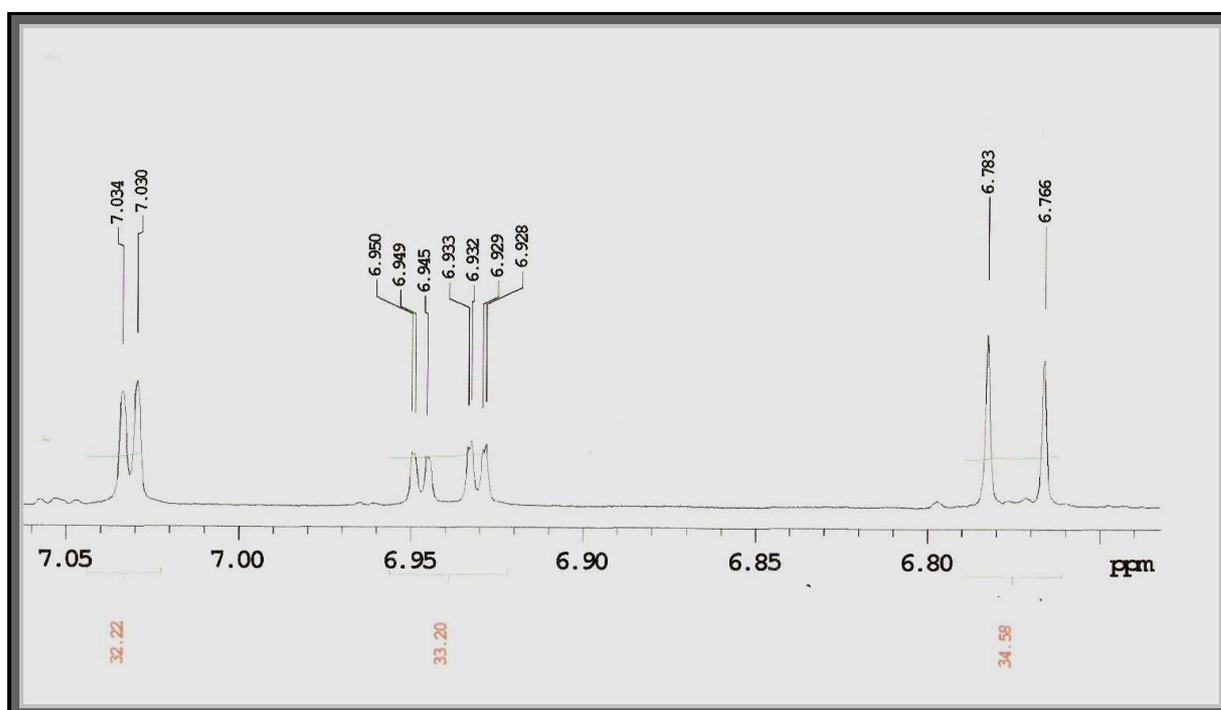


Figura 18. Expansão do espectro de RMN ^1H (500MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{H} 6,75 - 7,05 ppm.

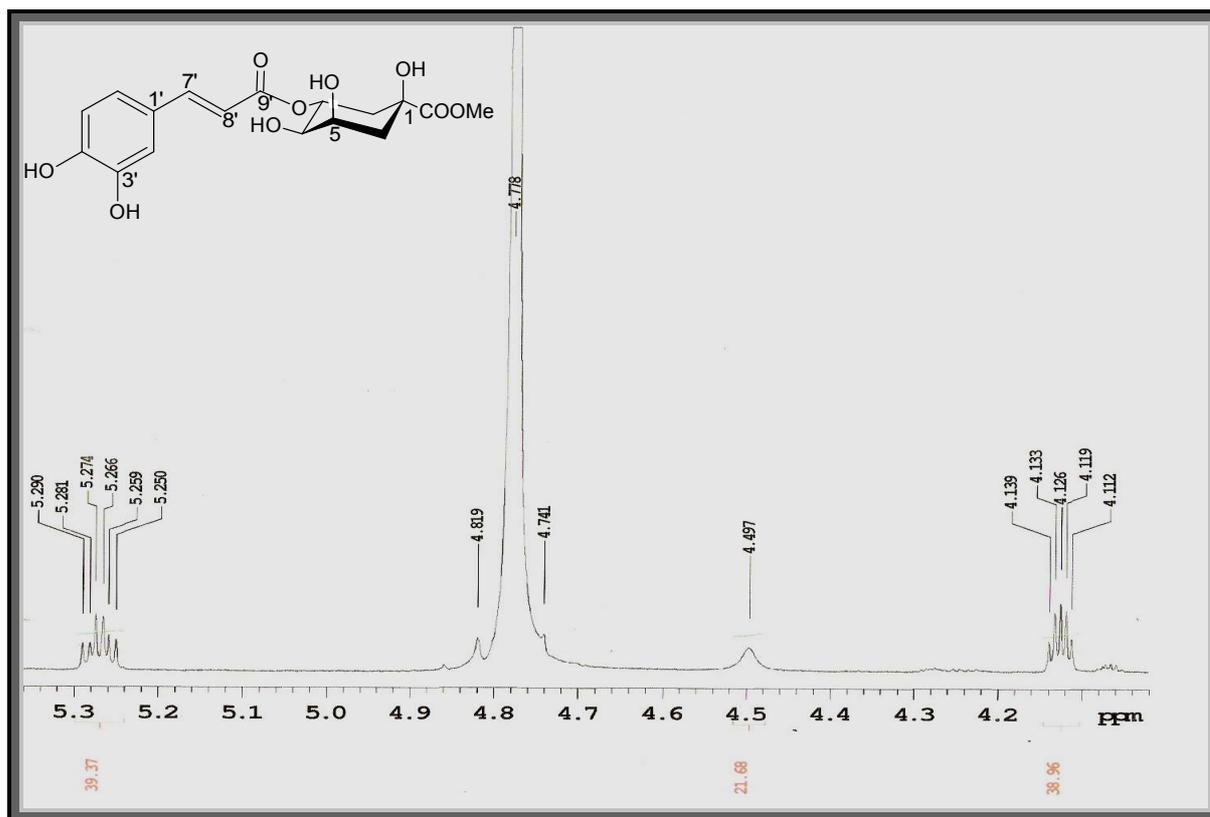


Figura 19. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{H} 4,10 - 5,29 ppm.

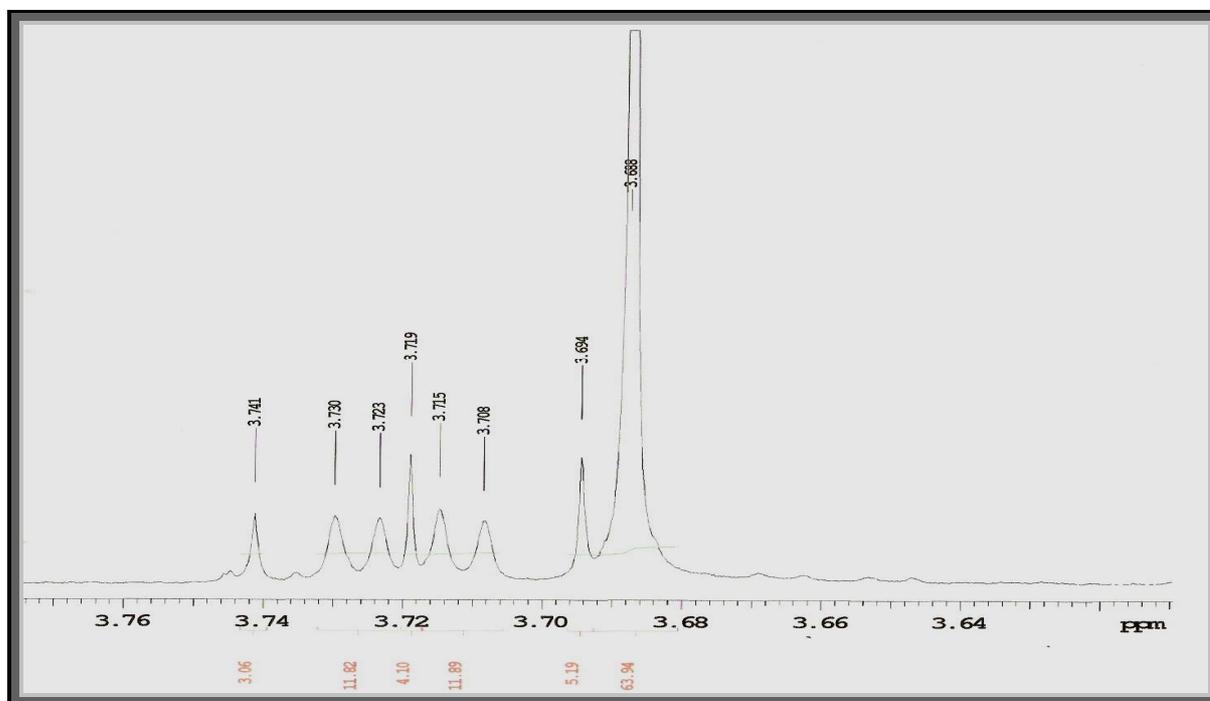


Figura 20. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{H} 3,64 - 3,7 ppm.

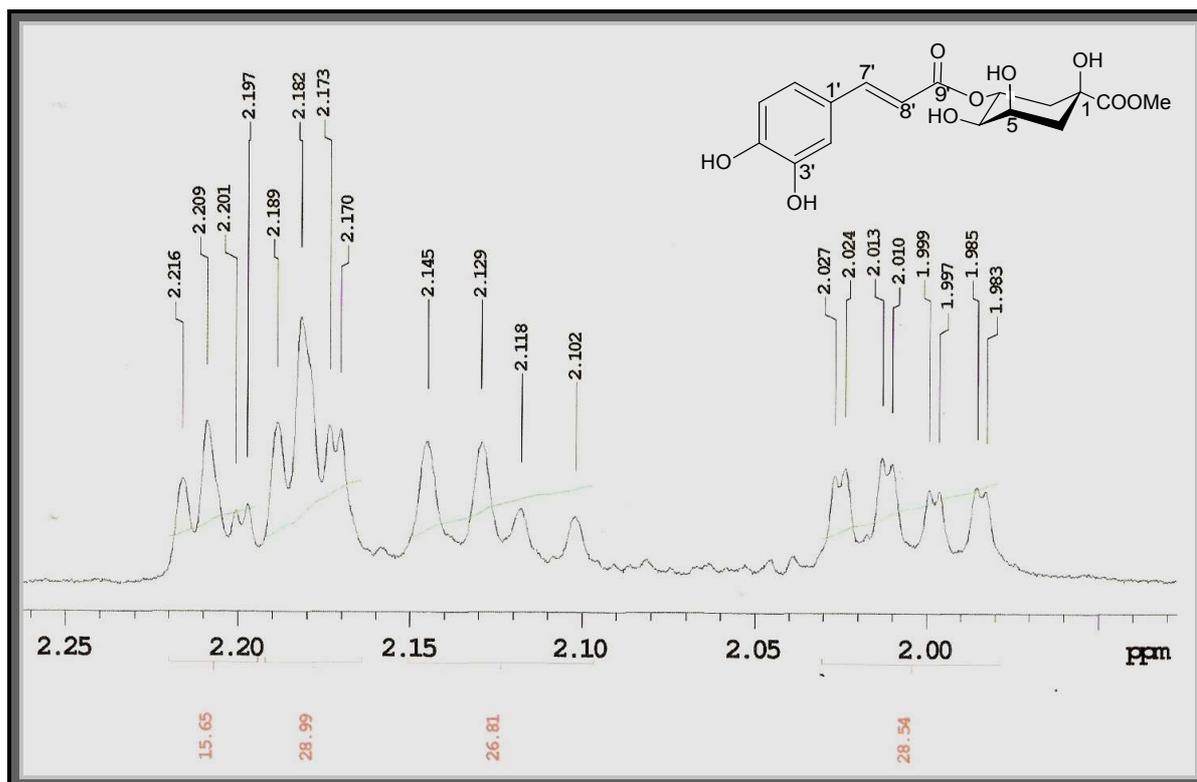


Figura 21. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{H} 1,98 - 2,25 ppm.

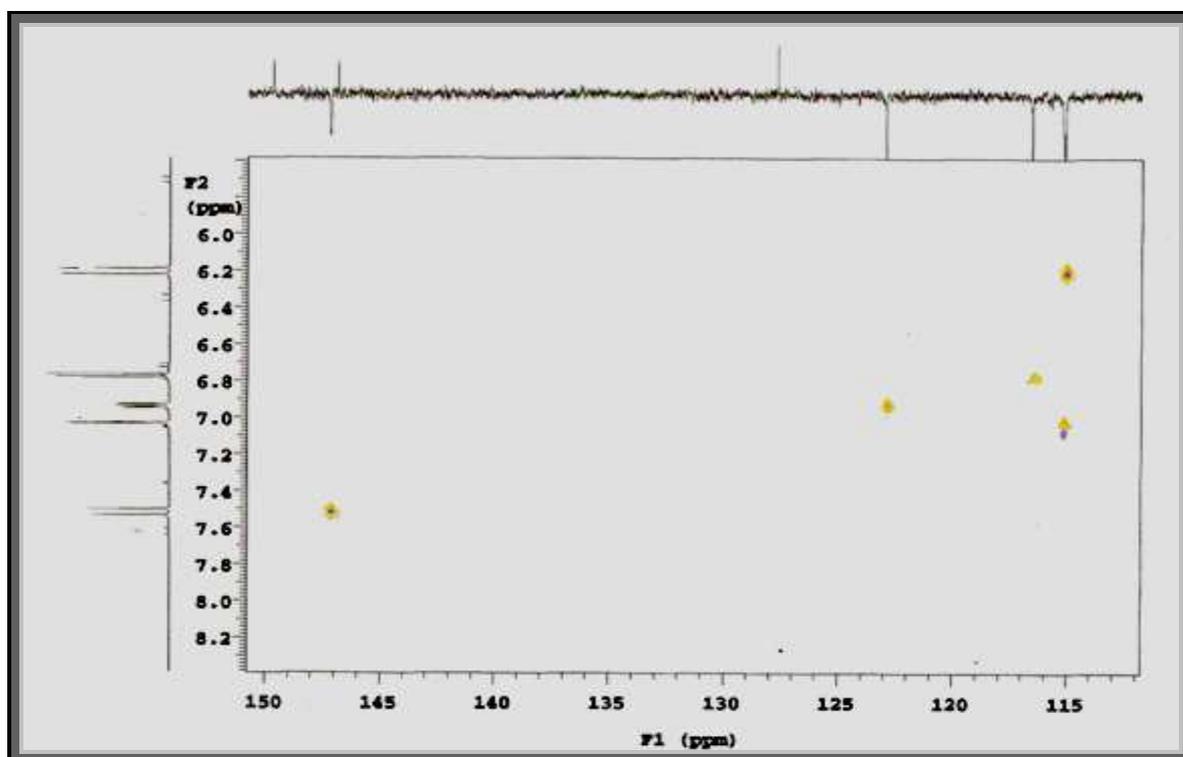


Figura 22. Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C - J_{CH} HMQC (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{C} 115 - 150 ppm.

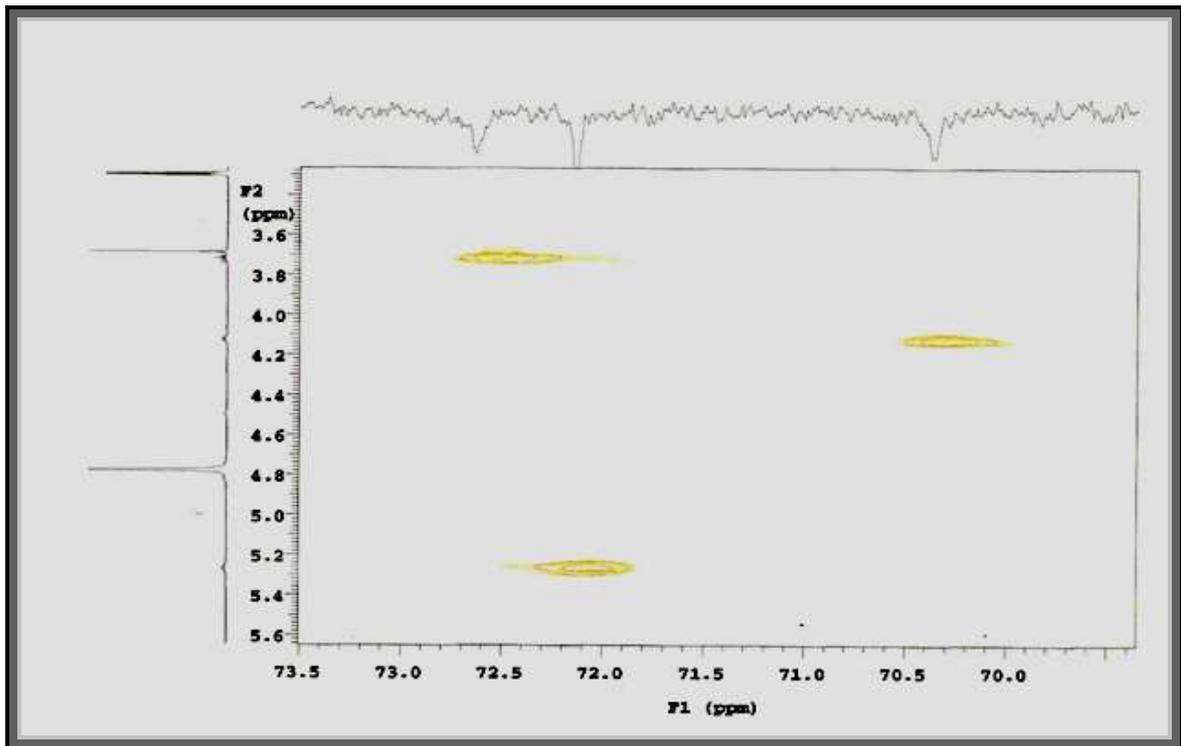


Figura 23. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ HMQC (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{C} 70,0- 73,5 ppm..

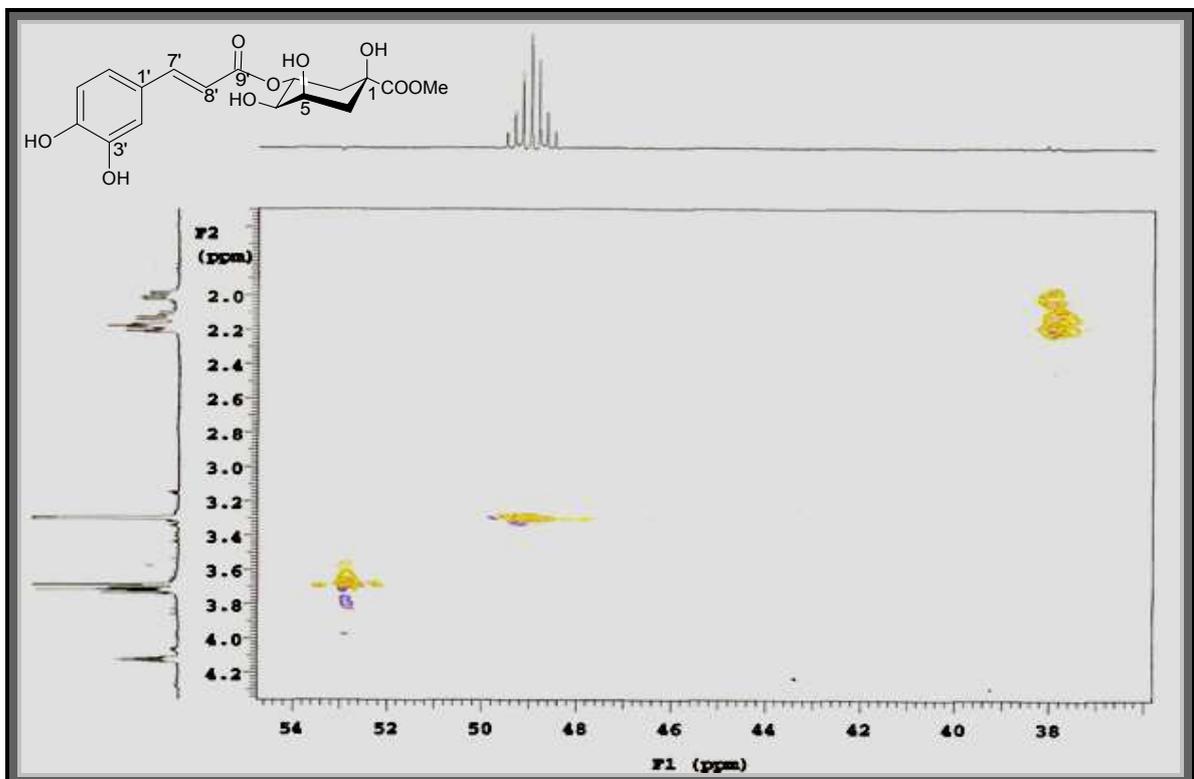


Figura 24. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ HMQC (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{C} 38- 54 ppm

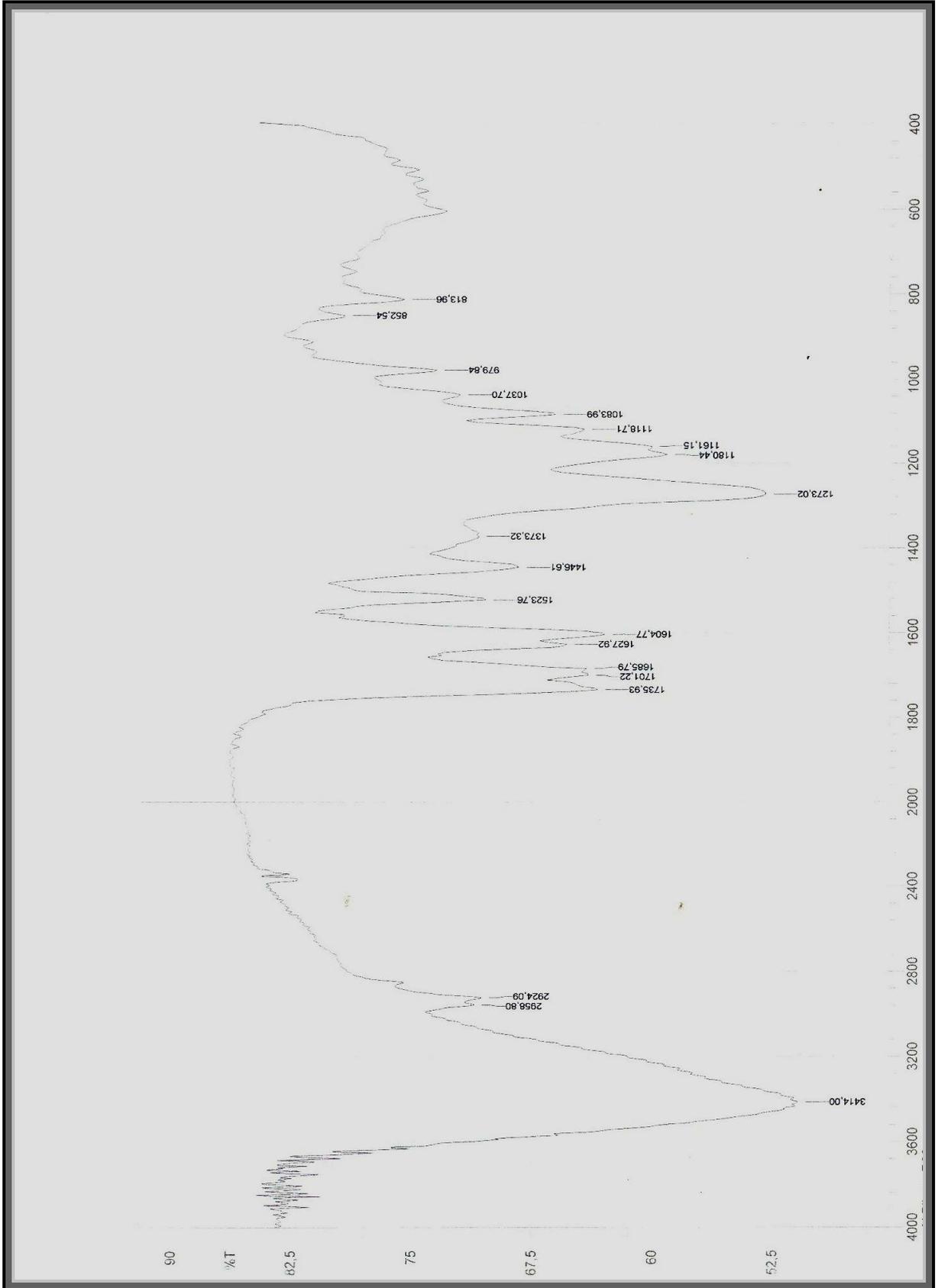


Figura 25. Espectro de IV de Np_1 em pastilhas de KBr

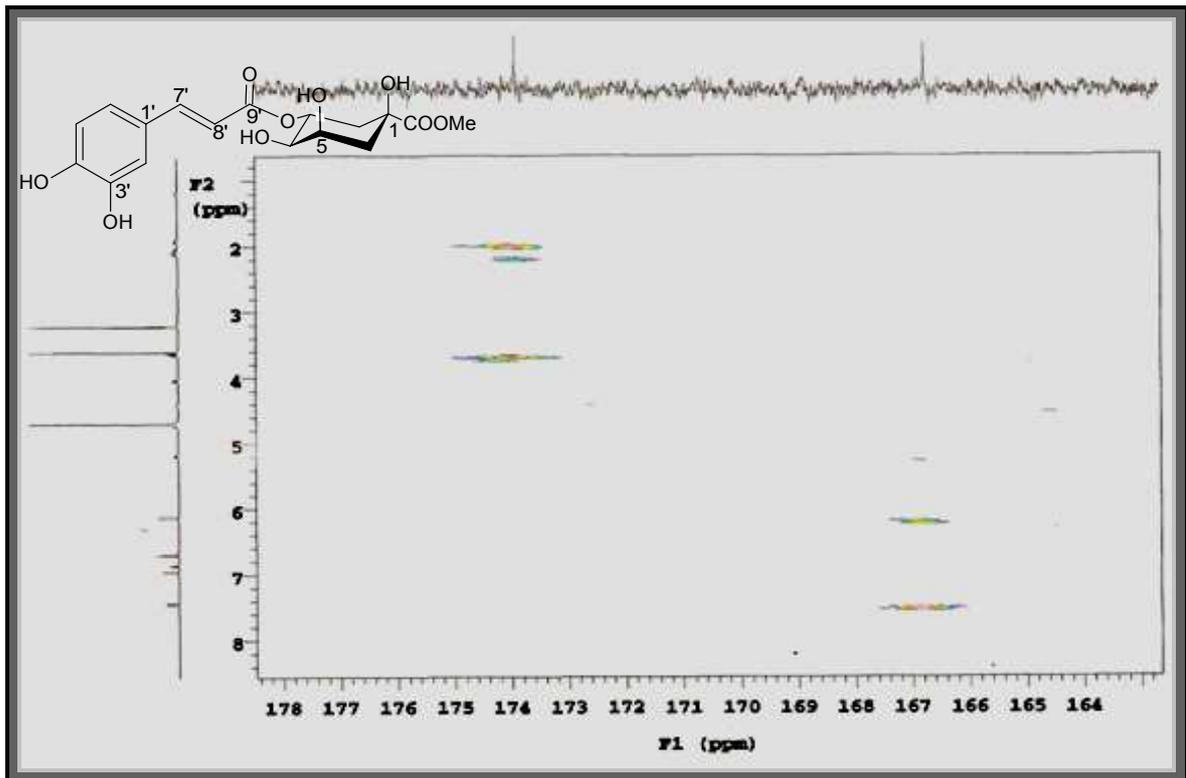


Figura 26. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) HMBC (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{C} 164- 178 ppm.

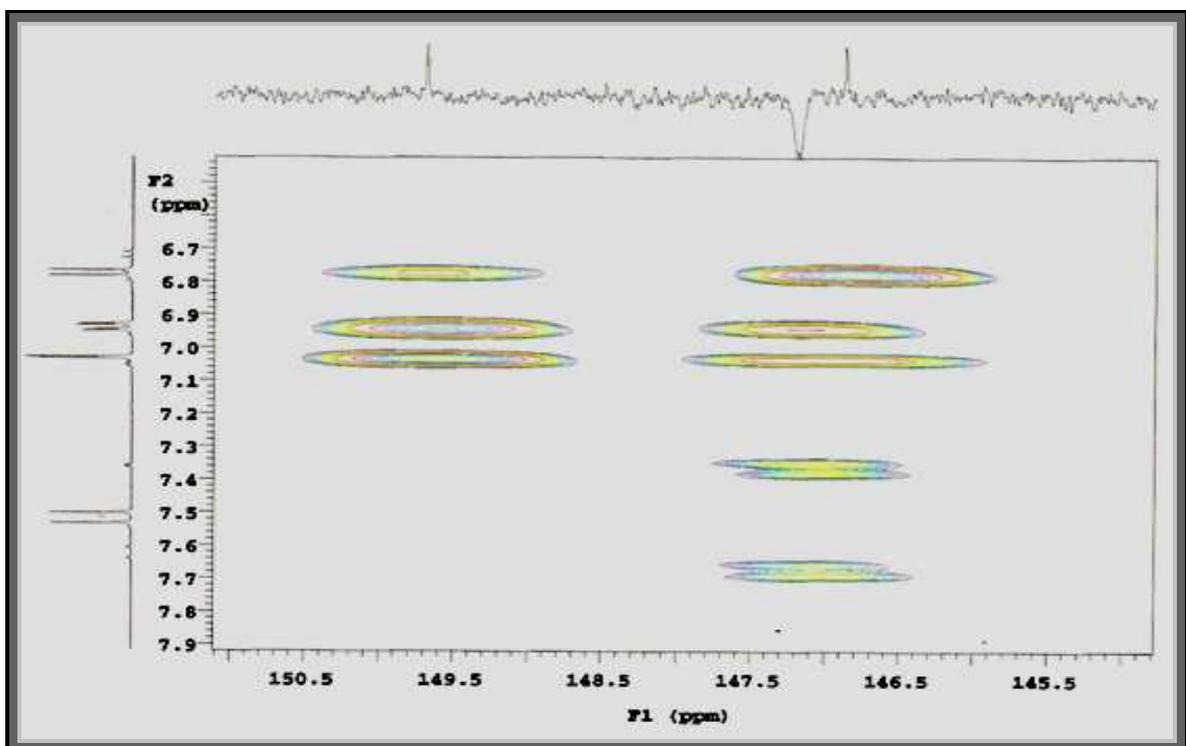


Figura 27. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) HMBC (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{C} 145,5 - 150,5 ppm.

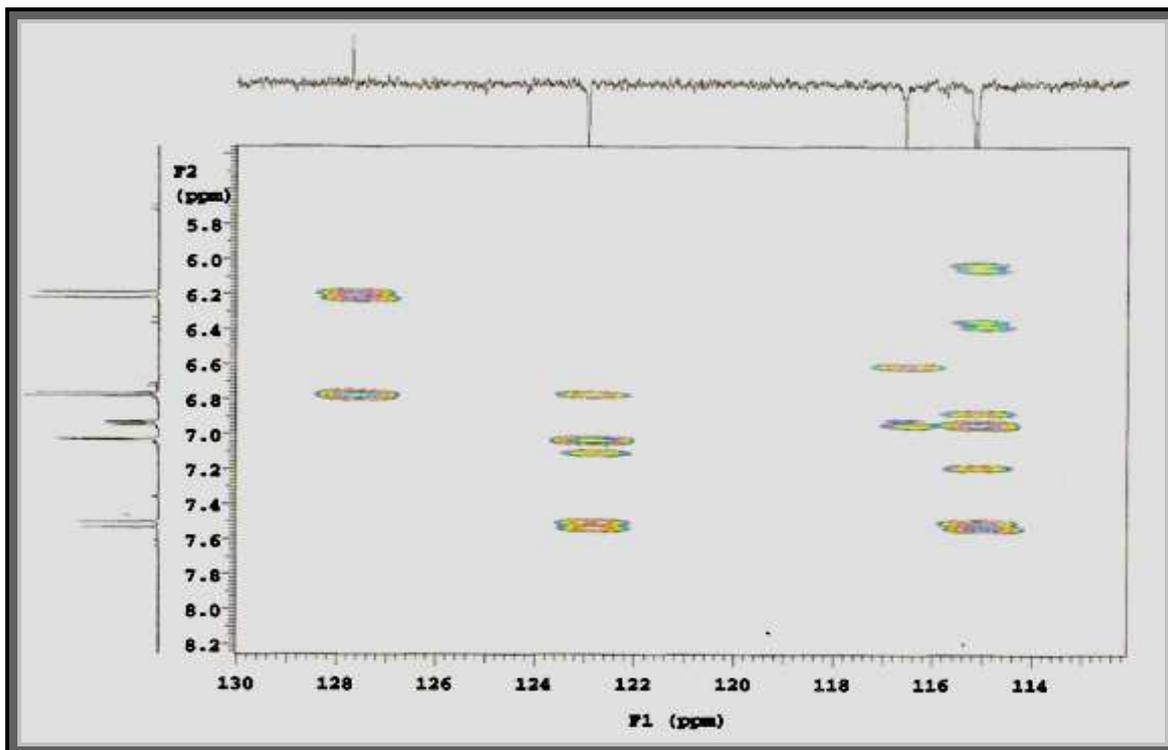


Figura 28. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}-^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) HMBC (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{C} 114- 130 ppm.

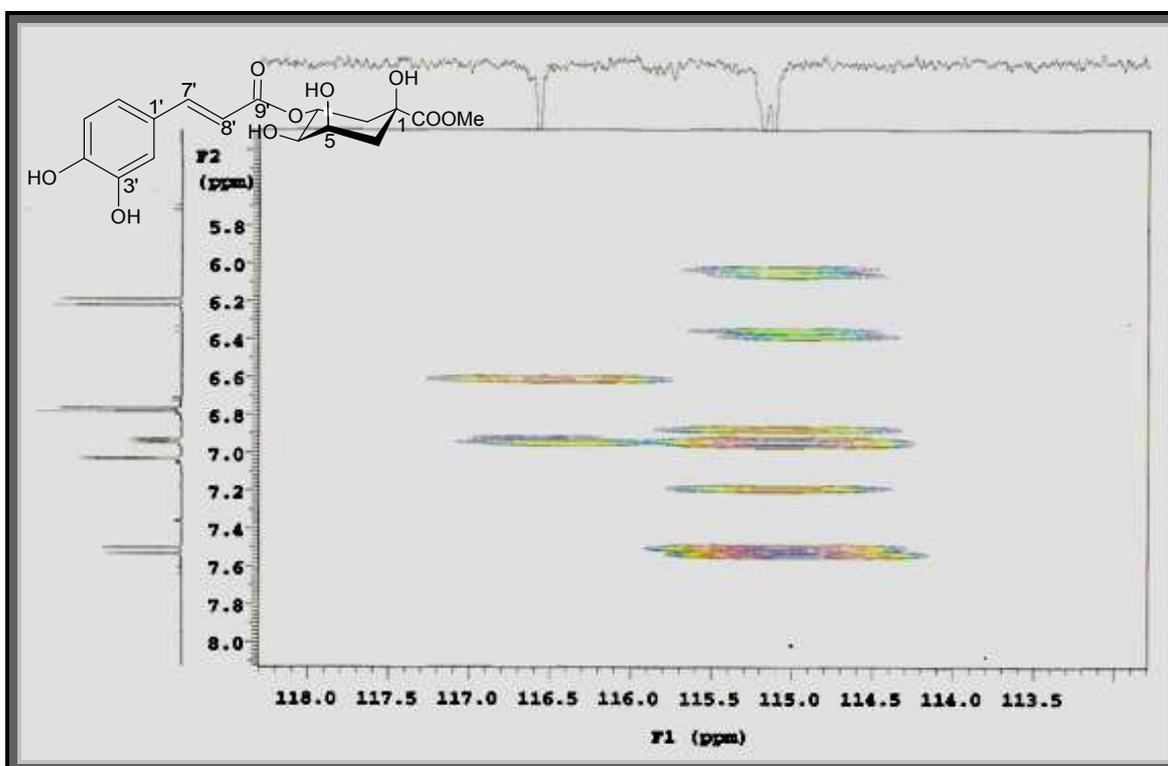


Figura 29. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}-^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n= 2$ e 3) HMBC (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{C} 113,5 - 118,0 ppm.

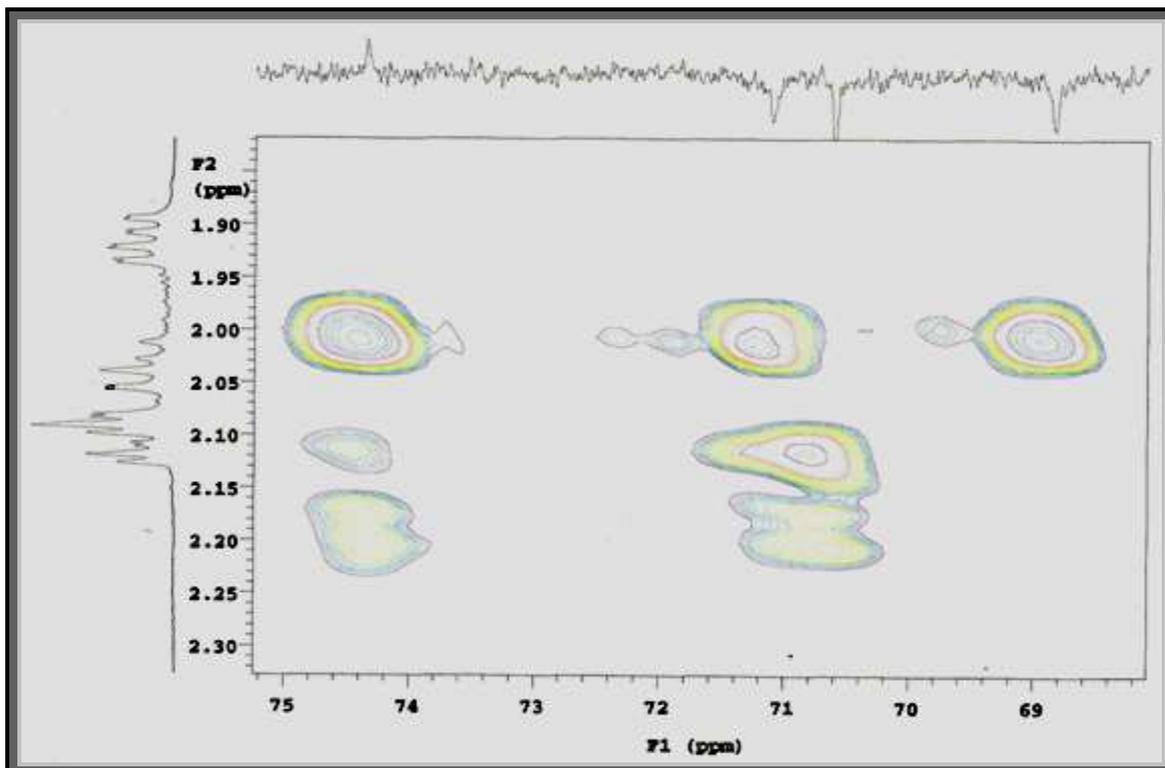


Figura 30. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) HMBC (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{C} 69 - 75 ppm.

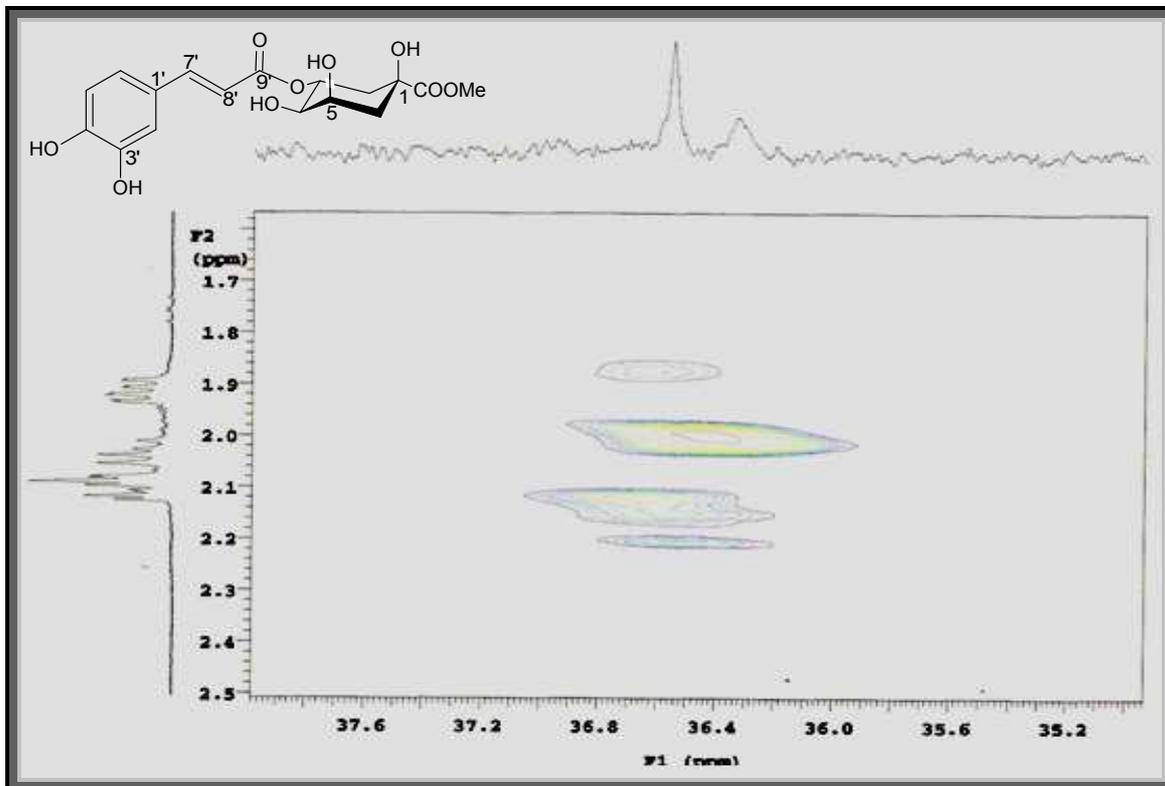


Figura 31. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) HMBC (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{C} 35- 37 ppm.

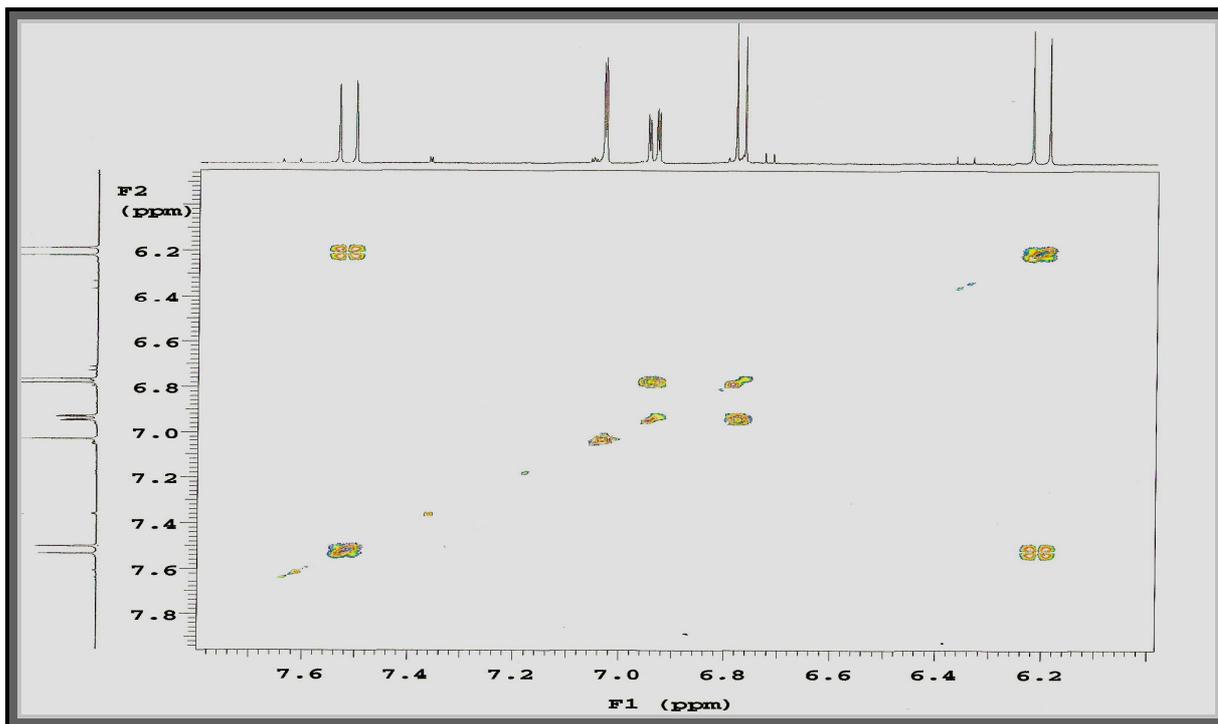


Figura 32. Expansão de espectro de RMN ¹H x ¹H COSY (500 MHz) de Np_1 em CD₃OD na região entre δ_H 6,2 - 7,6 ppm.

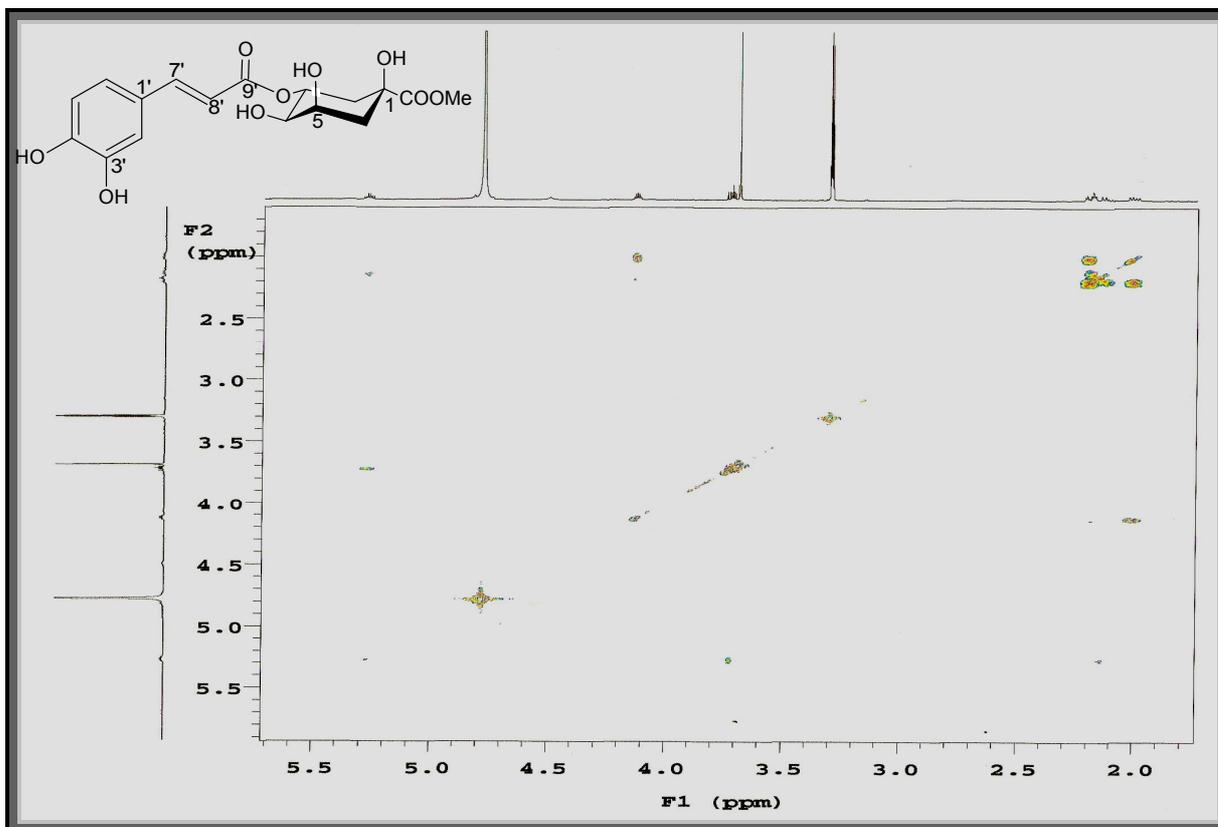


Figura 33. Expansão de espectro de RMN ¹H x ¹H COSY (500 MHz) de Np_1 em CD₃OD na região entre δ_H 2,0 - 5,5 ppm.

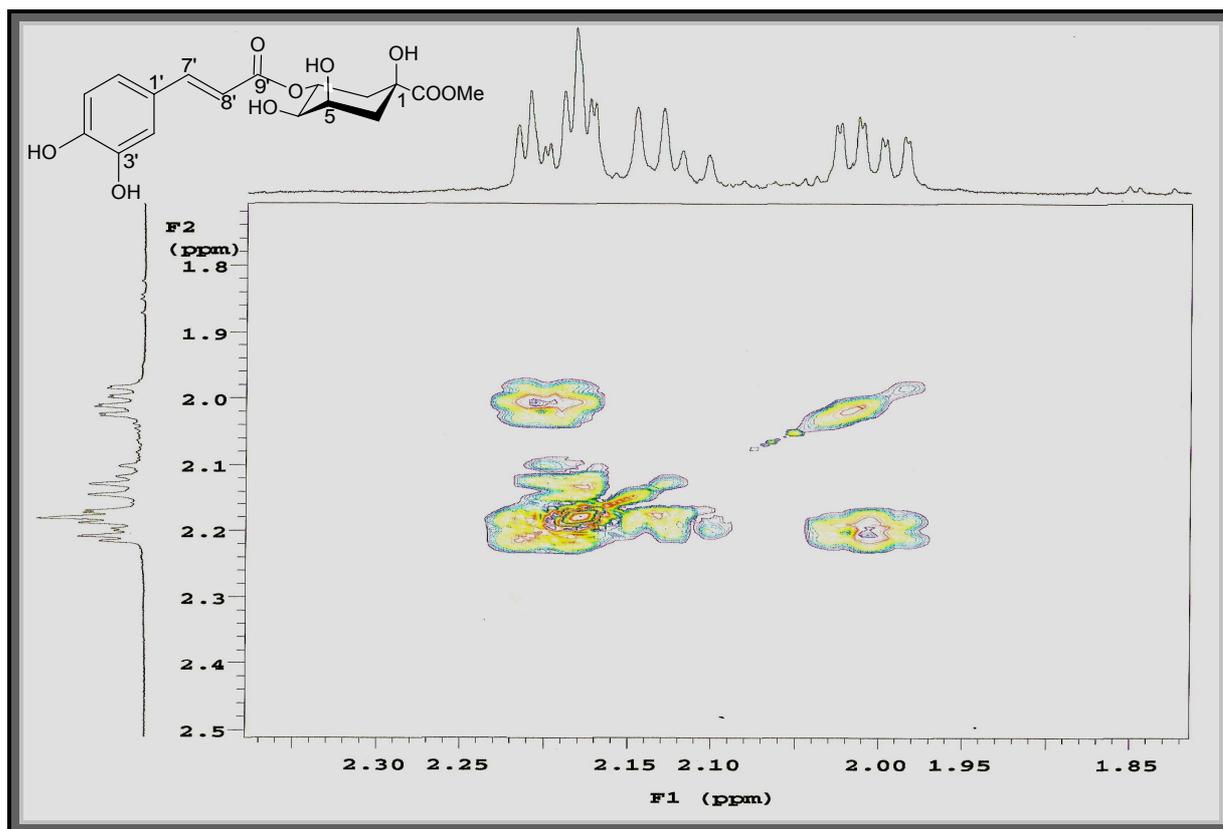


Figura 34. Expansão de espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD na região entre δ_{H} 1,85 - 2,30 ppm.

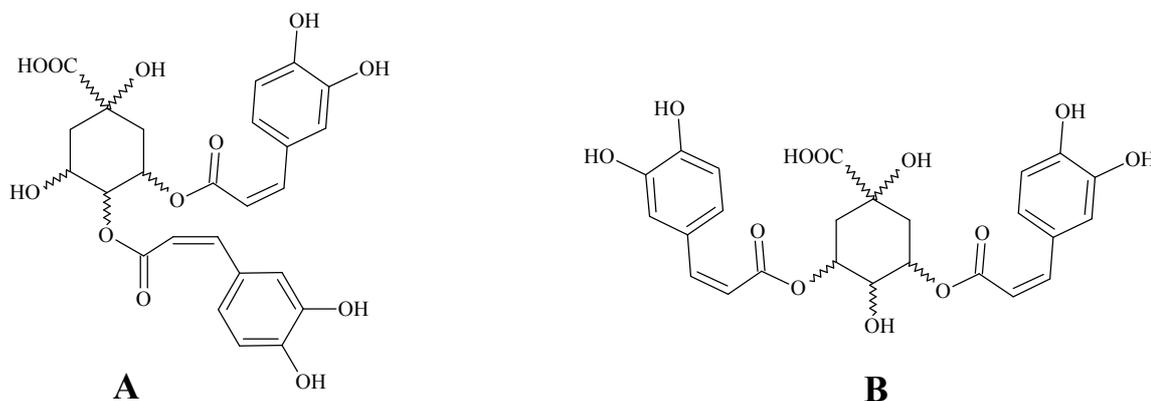


Figura 35. Espectro de RMN ^1H NOESY-1D (500 MHz) de Np_1 em CD_3OD , irradiação em δ_{H} 4,12, 3,72 e 5,27, respectivamente.

5.2.2 Identificação estrutural de Np_2

A substância codificada como Np_2 foi isolada na forma de um óleo verde escuro. O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) (Figura 36, p. 56) e suas expansões (Figuras 37-40, p. 58-60) mostraram a presença de 21 sinais correspondentes a 25 átomos de carbonos. Destes, 10 foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, 13 a carbonos metínicos e 2 a carbonos metilênicos. Os deslocamentos químicos em δ_{C} 75,6, 38,3, 73,5, 72,0, 72,3, 36,8 e 179,4, este último característico de carbonila juntamente com a ausência do sinal em δ_{C} 52,9, além de comparação com os dados de Np_1, nos fizeram propor a presença de uma unidade de ácido quínico. Observou-se também, um conjunto de sinais em δ_{C} 128,0/127,8, 115,2/115,1, 146,7/146,8, 149,4/149,5, 116,4/116,4, 122,9/122,9, 147,1/147,5, 115,4/115,8, 168,6/169,1, que comparados aos deslocamentos químicos de Np_1, sugeriram a existência de duas unidades cafeoilas.

O espectro de RMN ^1H (Figura 41, p. 61) e suas expansões (Figura 42 e 43, p. 62 e 63) mostraram sinais para quatro dupletos em δ_{H} 6,29, 6,38, 7,55 e 7,62 característicos de hidrogênios olefinicos em configuração trans ($J = 16,0$ Hz). Observou-se também sinais em δ_{H} 7,06 (*d*, $J = 2,5$ Hz), 6,78 (*d*, $J = 8,0$ Hz) e 6,95 (*dd*, $J = 8,0$ e $2,0$ Hz), todos eles com integração para dois hidrogênios o que corrobora com dois sistemas AMX, indicando a presença de dois anéis aromáticos 1,3,4 trissubstituídos. Nesse mesmo espectro observou-se ainda, um multipletto entre δ_{H} 2,1-2,2, atribuído aos hidrogênios em carbono sp^3 do ácido quínico. Uma informação relevante foi o efeito de desproteção em dois prótons oximetínicos que absorveram em δ_{H} 5,48 e 5,39 indicando que as unidades cafeoilas estavam esterificando o ácido quínico. Assim, a possibilidade dessas esterificações ocorrerem na hidroxila do ácido ou na hidroxila em C-1, foi descartada. Contudo sugeriu-se duas possibilidades estruturais para Np_2:

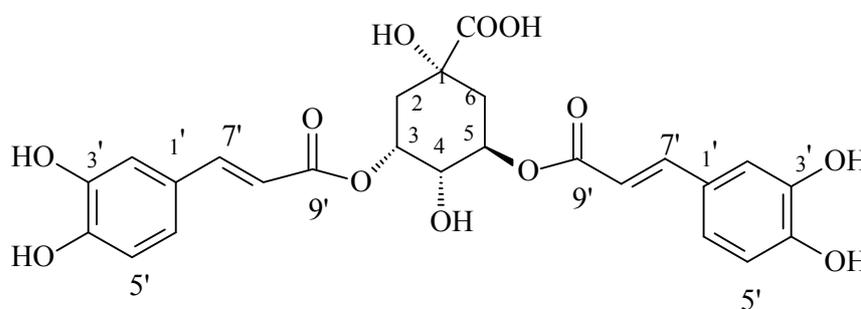


Na situação B o próton H-3 se apresenta no espectro de RMN ^1H , como um duploduploduplete, porém o próton H-4 em ambas as situações se apresenta como um duploduplete ($J = 3,0$ e $8,1$ Hz) (MEIRA et al., 2008). No espectro de RMN ^1H de Np_2 observou-se um duploduplete em δ_{H} 3,94 ($J = 3,5$ e $9,0$ Hz) que foi atribuído a H-4. Dessa forma, os dois grupos cafeoilas estão esterificando o ácido quínico em H-5 e H-3 como na proposta A e por comparação com a literatura, os deslocamentos químicos em δ_{H} 5,48 e 5,39 foram atribuídos a esses hidrogênios, respectivamente.

No espectro de HMQC (Figura 44, p. 64) e suas expansões (Figura 45 e 46, p 65 e 66) foi possível observar uma correlação direta do sinal em δ_{H} 6,78 (d , $J = 8,0$ Hz) com o carbono em 116,4 e do sinal em δ_{H} 6,95 (dd , $J = 8,0$ e $2,5$ Hz) com o carbono em 122,9 sendo possível atribuir o sinal em 116,4 a C-5' e 122,9 a C-6'. Mediante esses dados, constatou-se que os valores descritos na literatura para esses dois carbonos estavam invertidos (MEIRA et al., 2008). As demais correlações diretas estão compiladas na Tabela 2, p 57.

No espectro de HMBC (Figura 47, p.67) e suas expansões (Figura 48-52, p 68-72) observou-se sinais de correlações entre δ_{H} 5,48 com δ_{C} 168,3 (C-9'') e 5,39 com 169,1 (C-1'), corroborando com duas esterificações no ácido quínico das unidades cafeoilas. Observou-se ainda, correlação do sinal em δ_{H} 6,29 (H-8'') com 168,3 (C-9'') e com 127,8 (C-1''), 6,38 (H-8') com 169,1 (C-9') e com 128,0 (C-1').

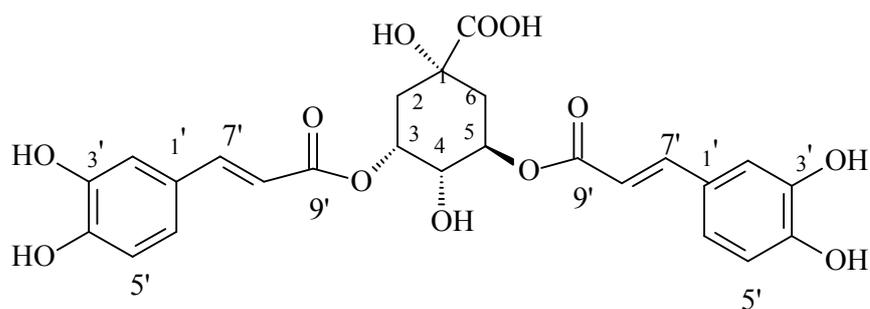
A comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de Np_2 com dados de modelos da literatura permitiram concluir que essa substância corresponde ao ácido 3,5-di-O-E-cafeoil quínico, sendo esse o primeiro relato para a família Velloziaceae.



Ácido 3,5-di-O-E-cafeoil quínico

Tabela 2 - Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) 1D e 2D em CD_3OD de Np₂.

C	HMQC		HMBC
	δ_{H}	δ_{C}	
1	-----	75,6	
2	2,1-2,2 (m)	38,3	C-1, C-6
3	5,39 (m)	73,5	C-9'
4	3,94 (dd, $J = 3,5$ e $9,0$)	72,0	
5	5,48 (m)	72,3	C-9''
6	2,1-2,2 (m)	36,8	
7 (COOH)	-----	179,4	C-2, C-5
1'	-----	128,0	
2'	7,06 (d, $J = 2,5$)	115,2	C-1', C-4', C-7
3'	-----	146,7	
4'	-----	149,4	
5'	6,78 (d, $J = 8,0$)	116,4	C-3', C-4'
6'	6,95 (dd, $J = 2,5$ e $8,0$)	122,9	C-3', C-4', C-7'
7'	7,55 (d, $J = 16,0$)	147,1	C-1', C-6', C-9'
8'	6,38 (d, $J = 16,0$)	115,8	C-1', C-9'
9'	-----	169,1	
1''	-----	127,8	
2''	7,04 (d, $J = 2,5$)	115,1	C-1'', C-4'', C-7''
3''	-----	146,8	
4''	-----	149,5	
5''	6,78 (d, $J = 8,0$)	116,4	
6''	6,95 (dd, $J = 2,5$ e $8,0$)	122,9	C-3'', C-4'', C-7''
7''	7,62 (d, $J = 16,0$)	147,4	C-1'', C-6'', C-9''
8''	6,29 (d, $J = 16,0$)	115,4	C-9''
9''	-----	168,6	

 J em Hz, δ em ppm.

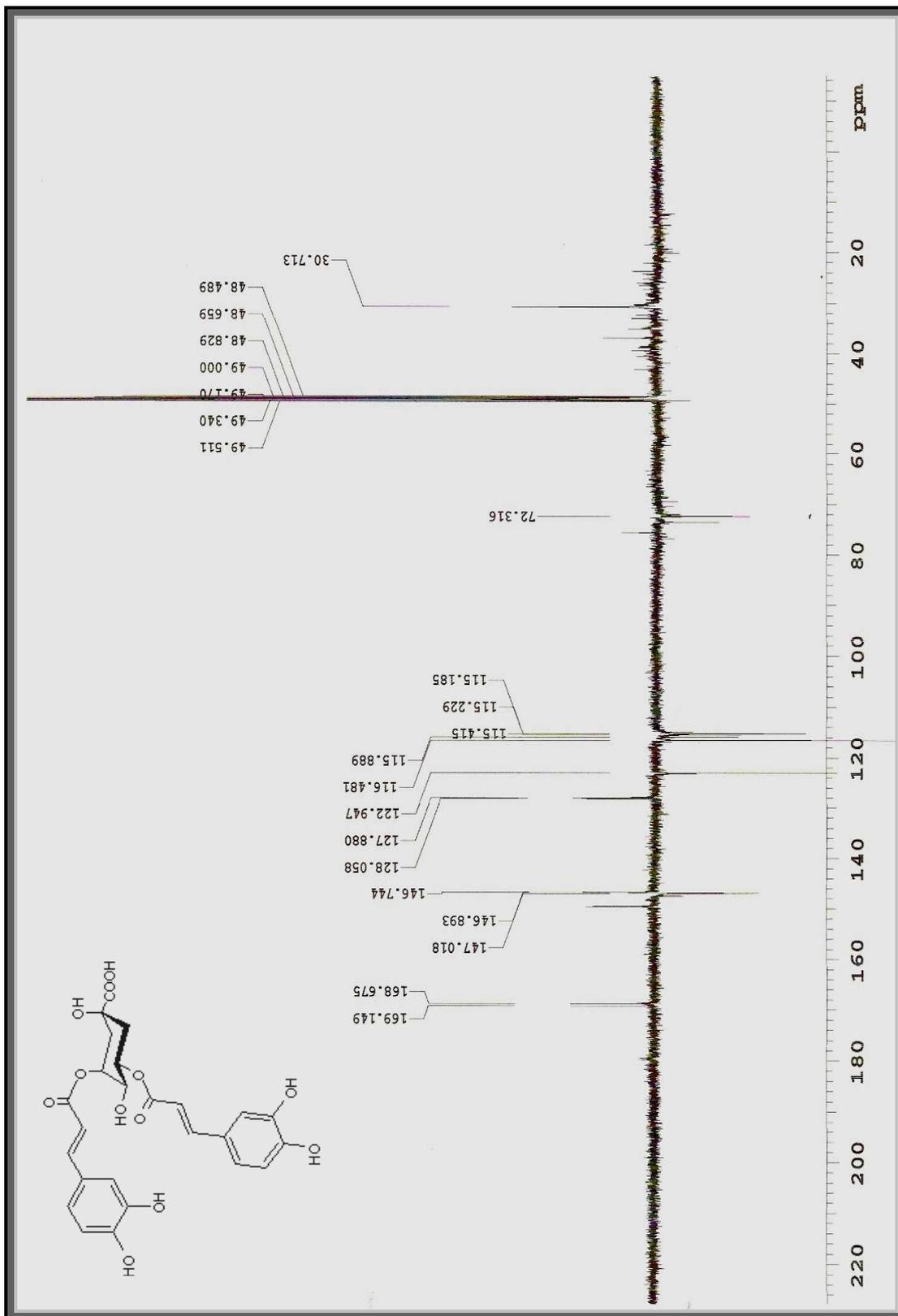


Figura 36. Espectro de RMN ¹³C-APT (125 MHz) de Np₂ em CD₃OD.

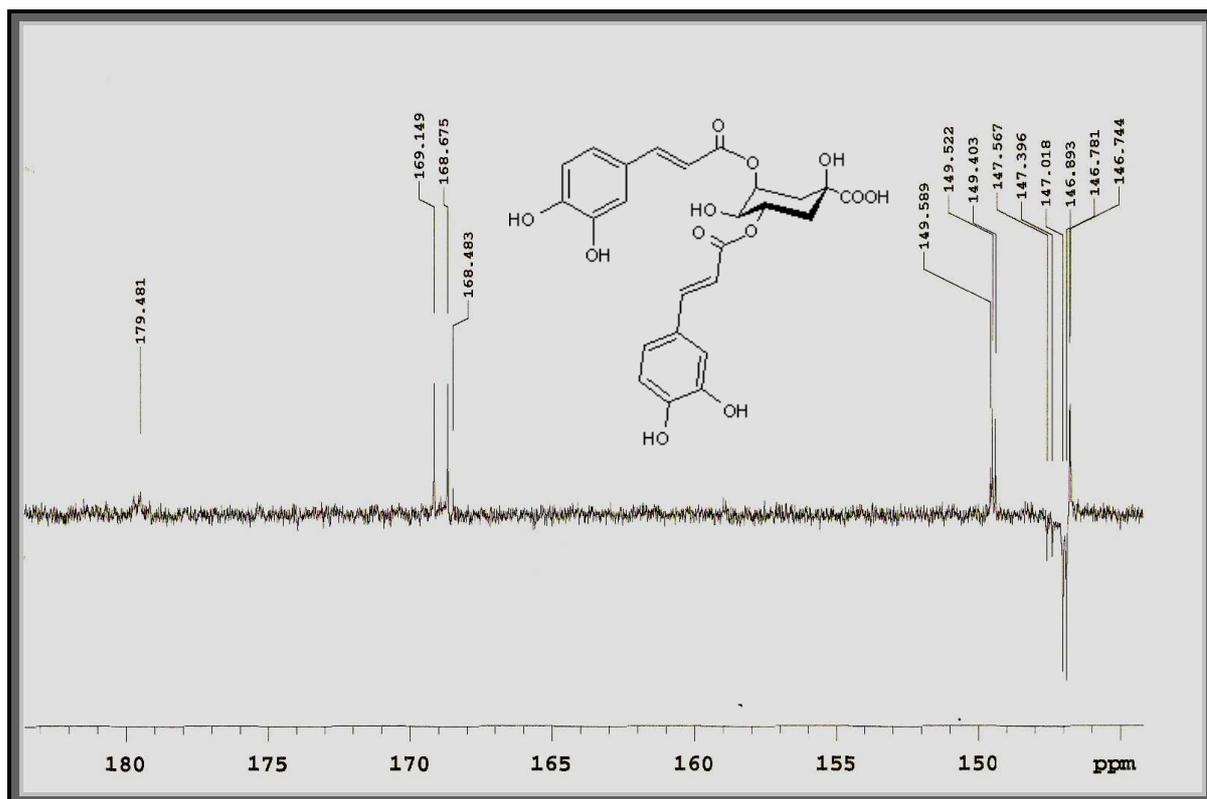


Figura 37. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np₂ em CD_3OD na região entre δ_{C} 146- 180 ppm

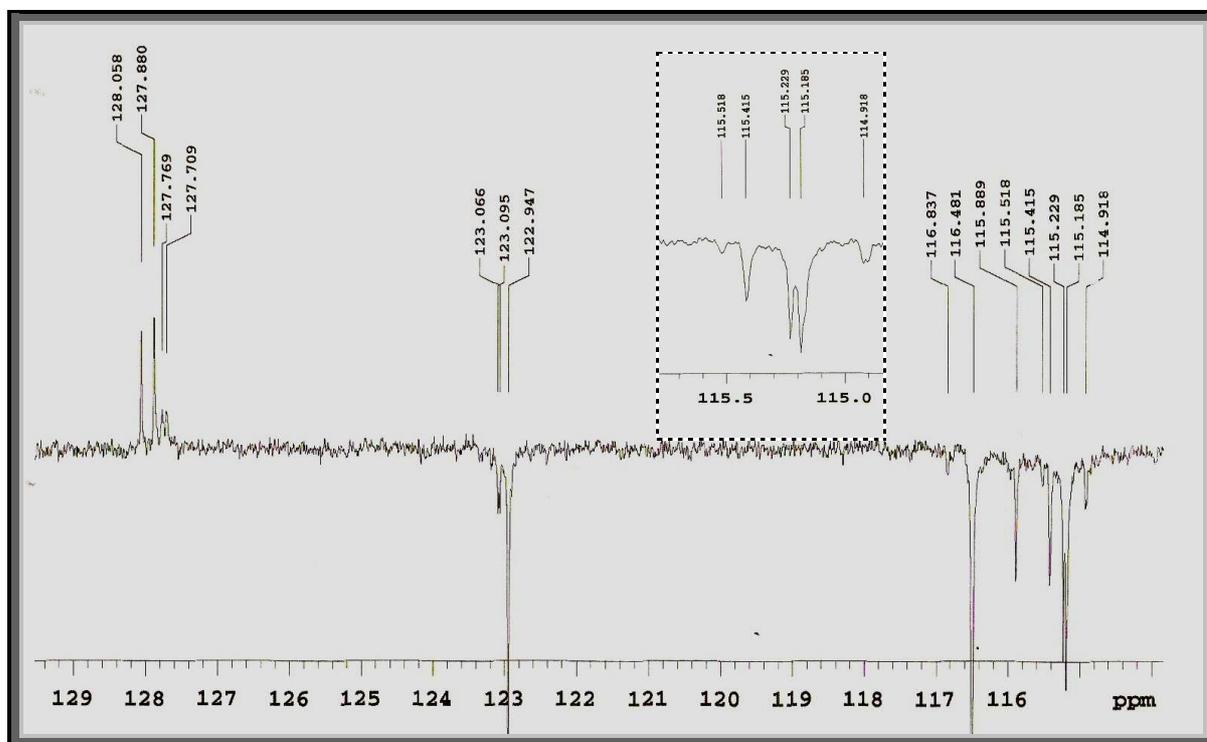


Figura 38. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np₂ em CD_3OD na região entre δ_{C} 114- 129 ppm

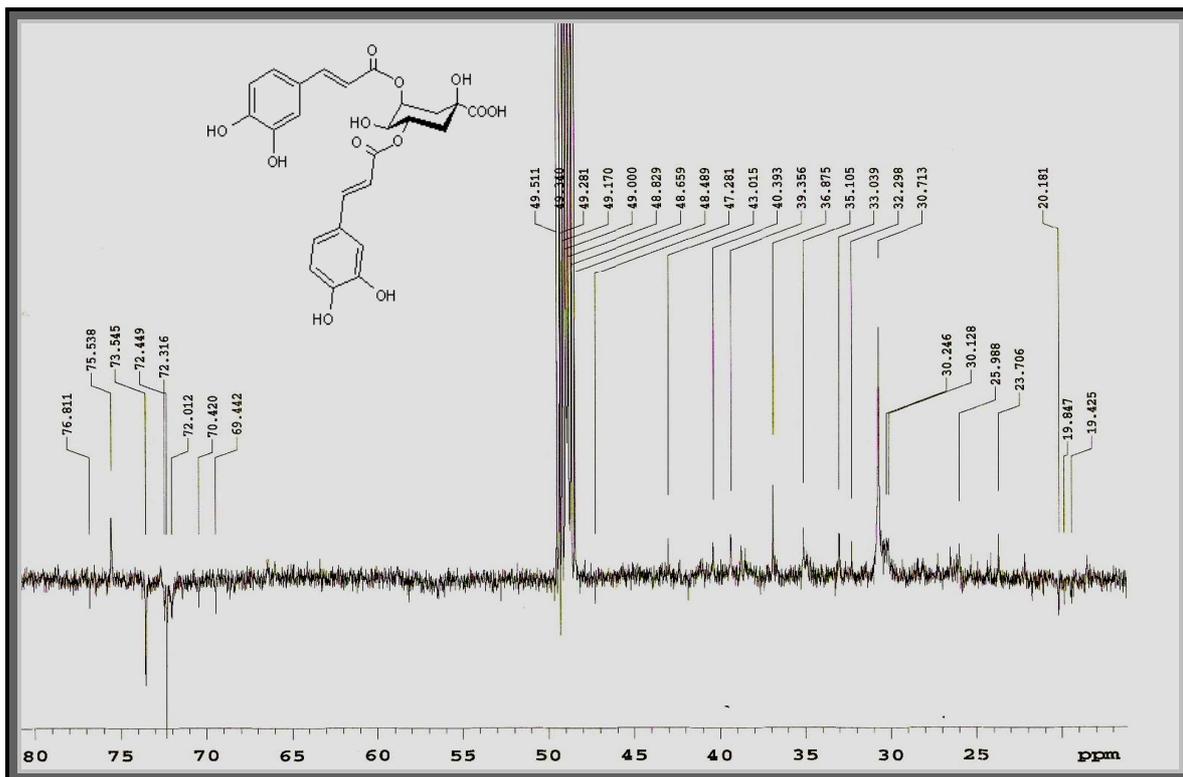


Figura 39. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_2 em CD_3OD na região entre δ_{C} 19- 80 ppm

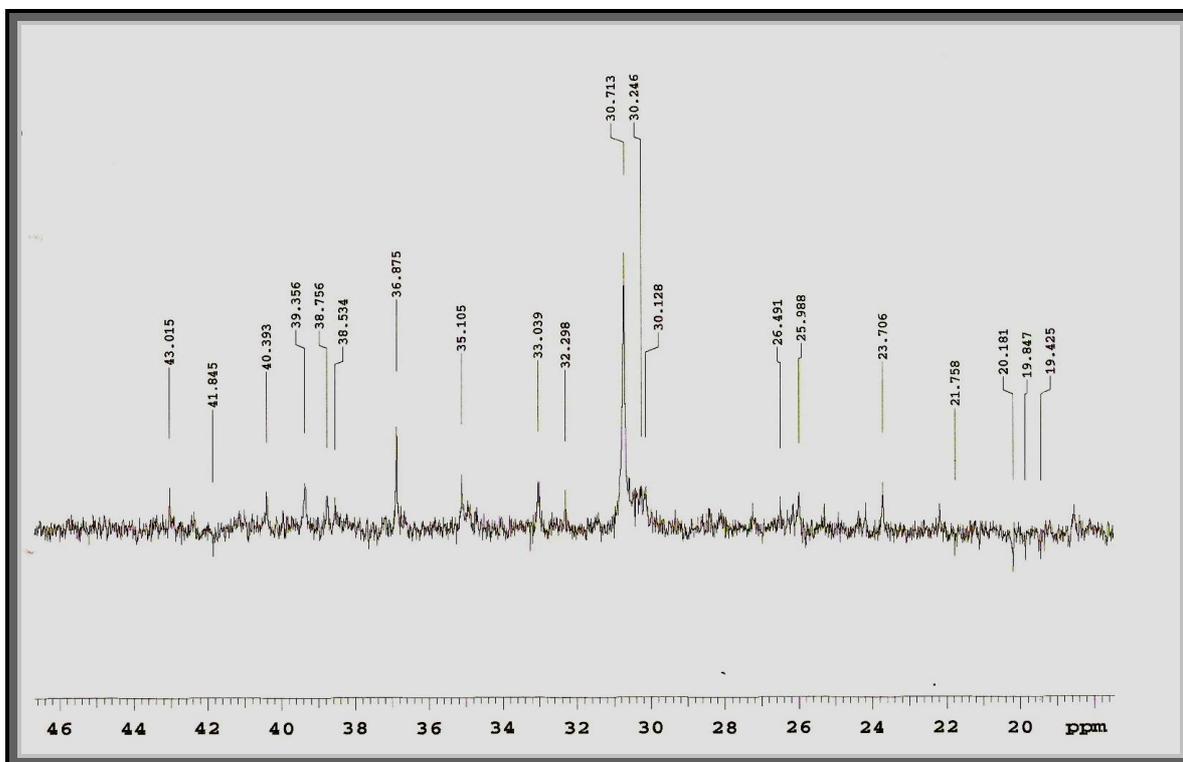


Figura 40. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_2 em CD_3OD na região entre δ_{C} 19- 46 ppm

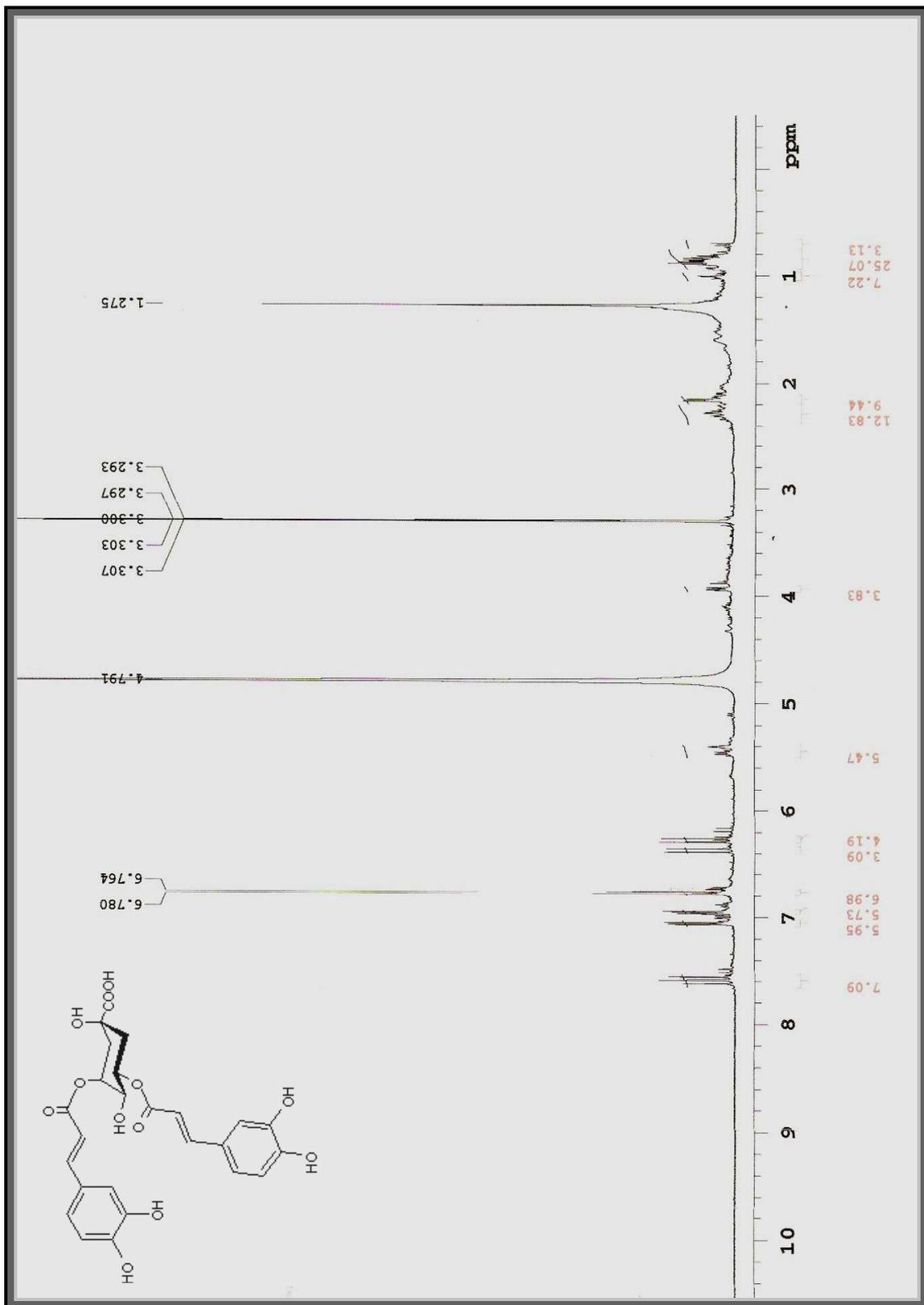


Figura 41. Espectro de RMN ¹H (500 MHz) de Np_2 em CD₃OD.

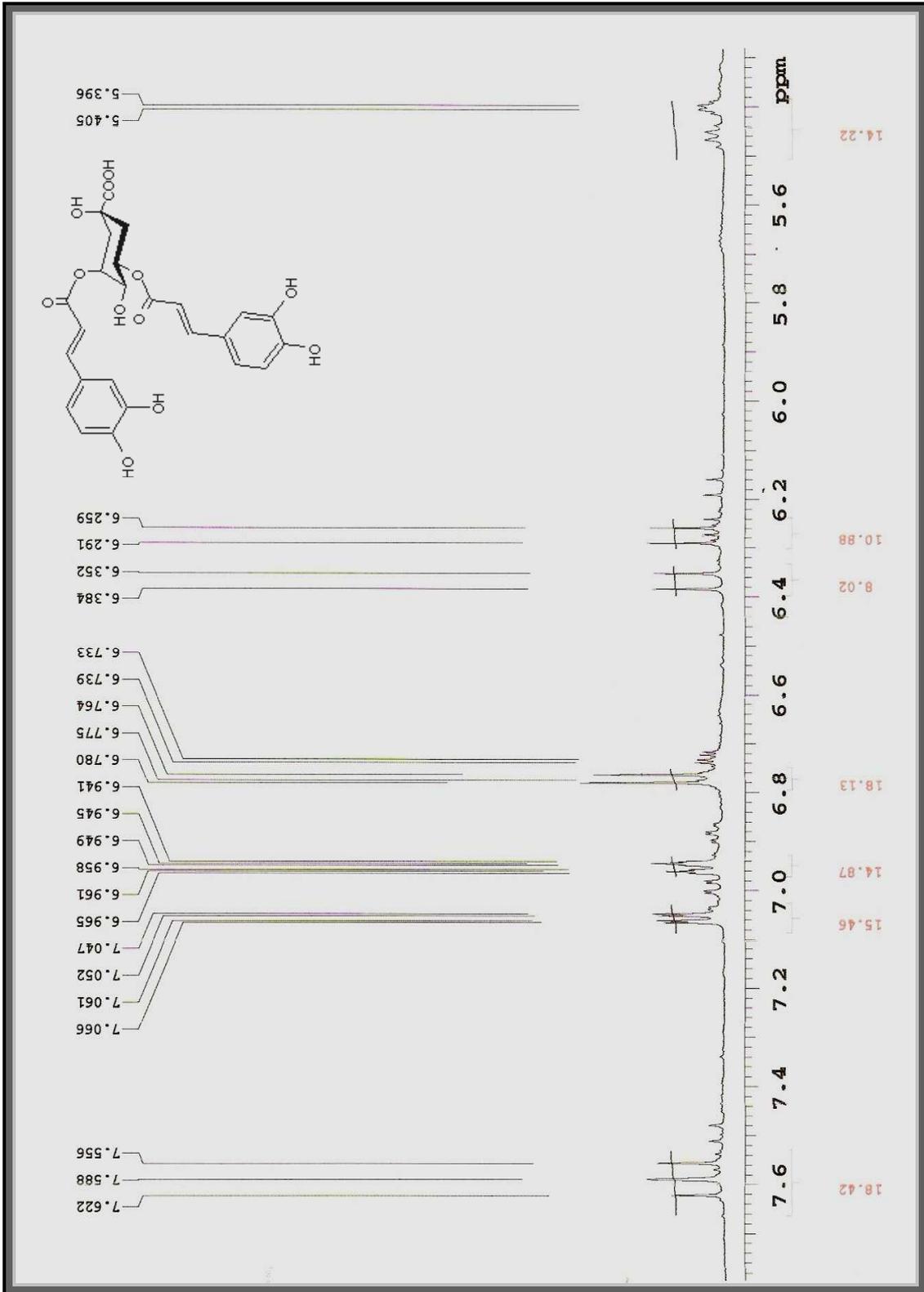


Figura 42. Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz) de Np₂ em CD₃OD na região entre δ_H 5,6 - 7,6 ppm

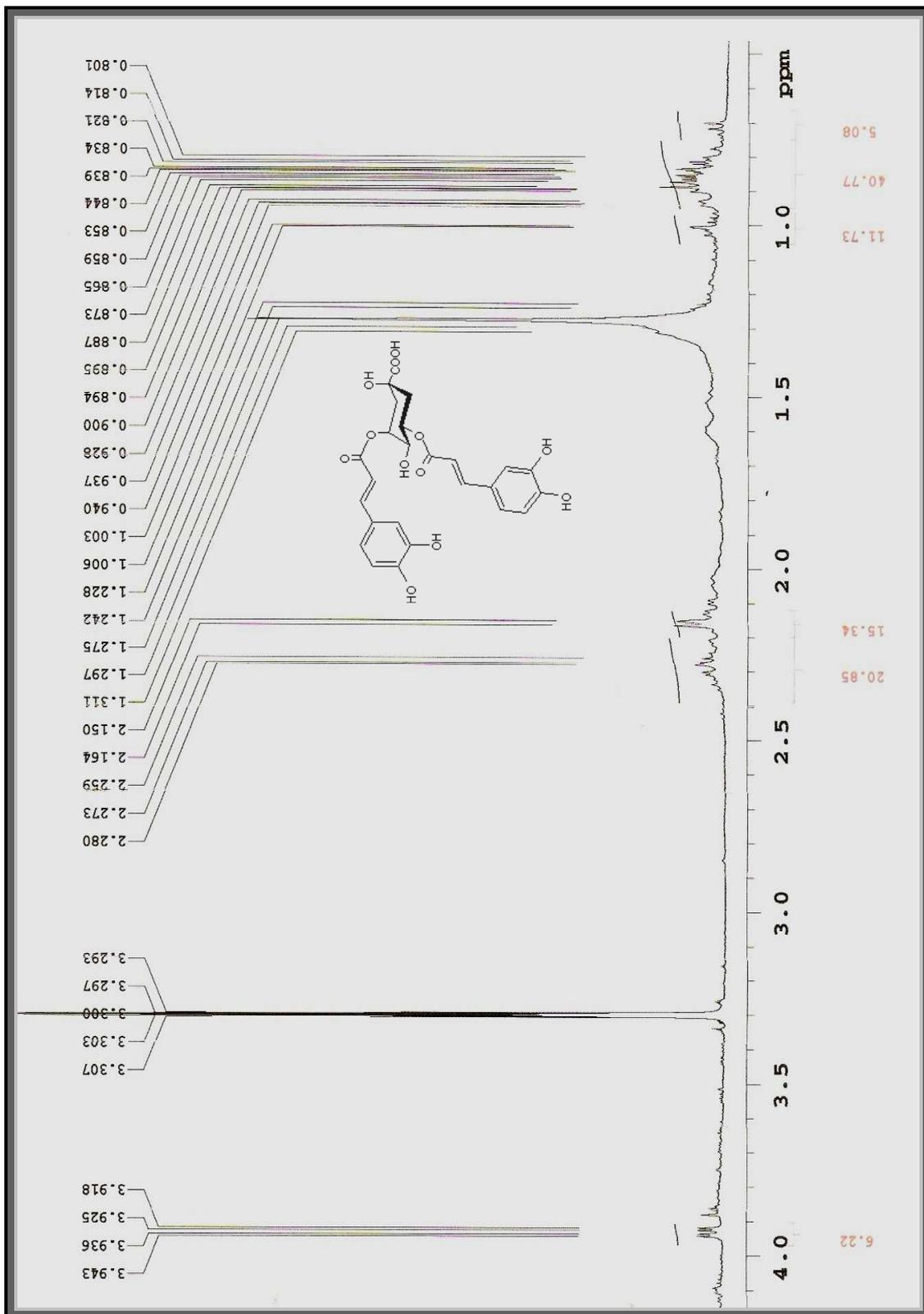


Figura 43. Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz) de Np₂ em CD₃OD na região entre δ_H 1,0-4,0 ppm

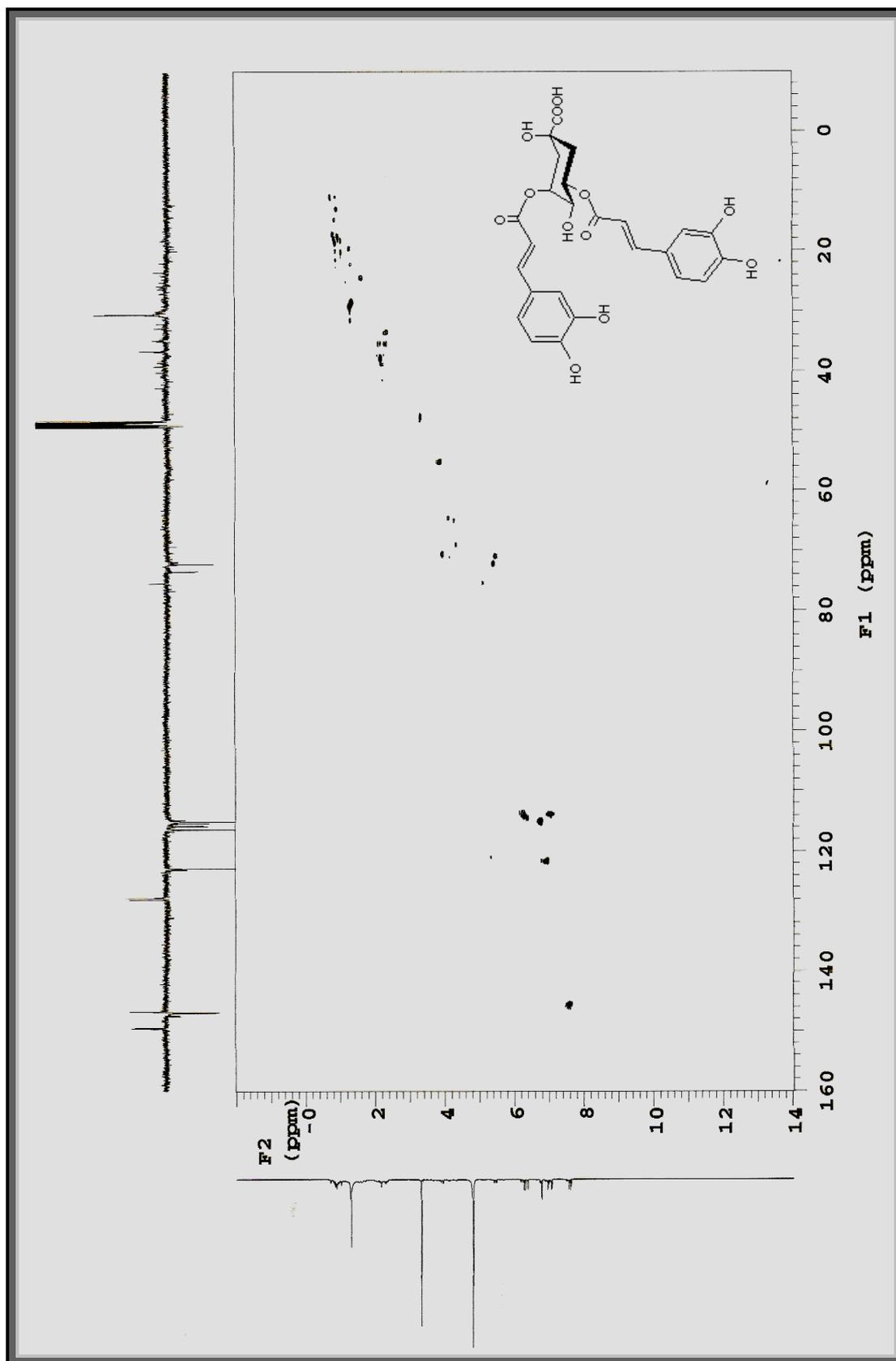


Figura 44. Espectro de RMN ^1H x ^{13}C - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ HMQC (500 MHz) de Np₂ em CD_3OD .

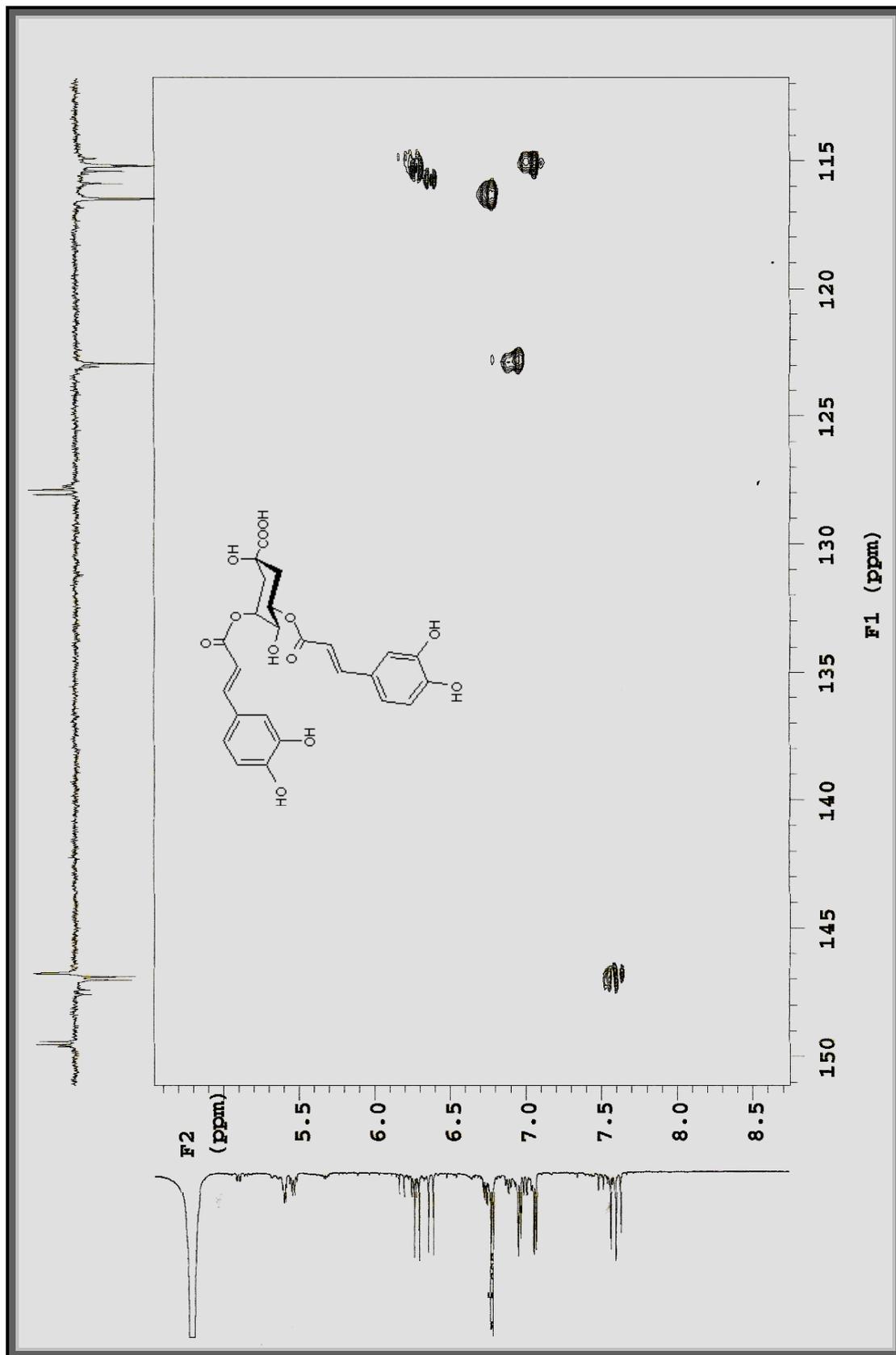


Figura 45. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ HMQC (500 MHz) de Np_2 em CD_3OD na região entre δ_{C} 115- 150 ppm.

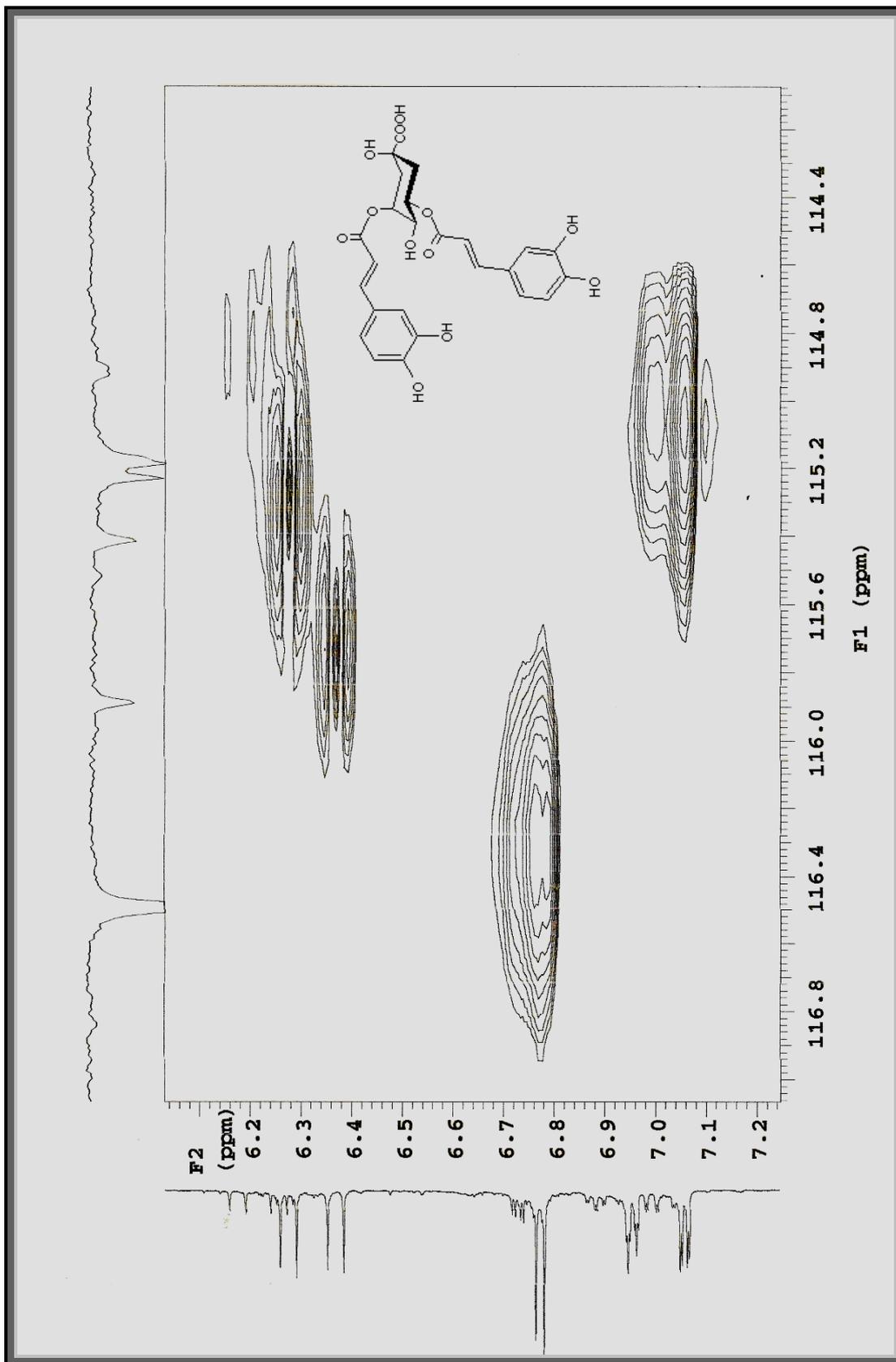


Figura 46. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ J_{CH} HMQC (500 MHz) de Np₂ em CD₃OD na região entre δ_{C} 114-116 ppm.

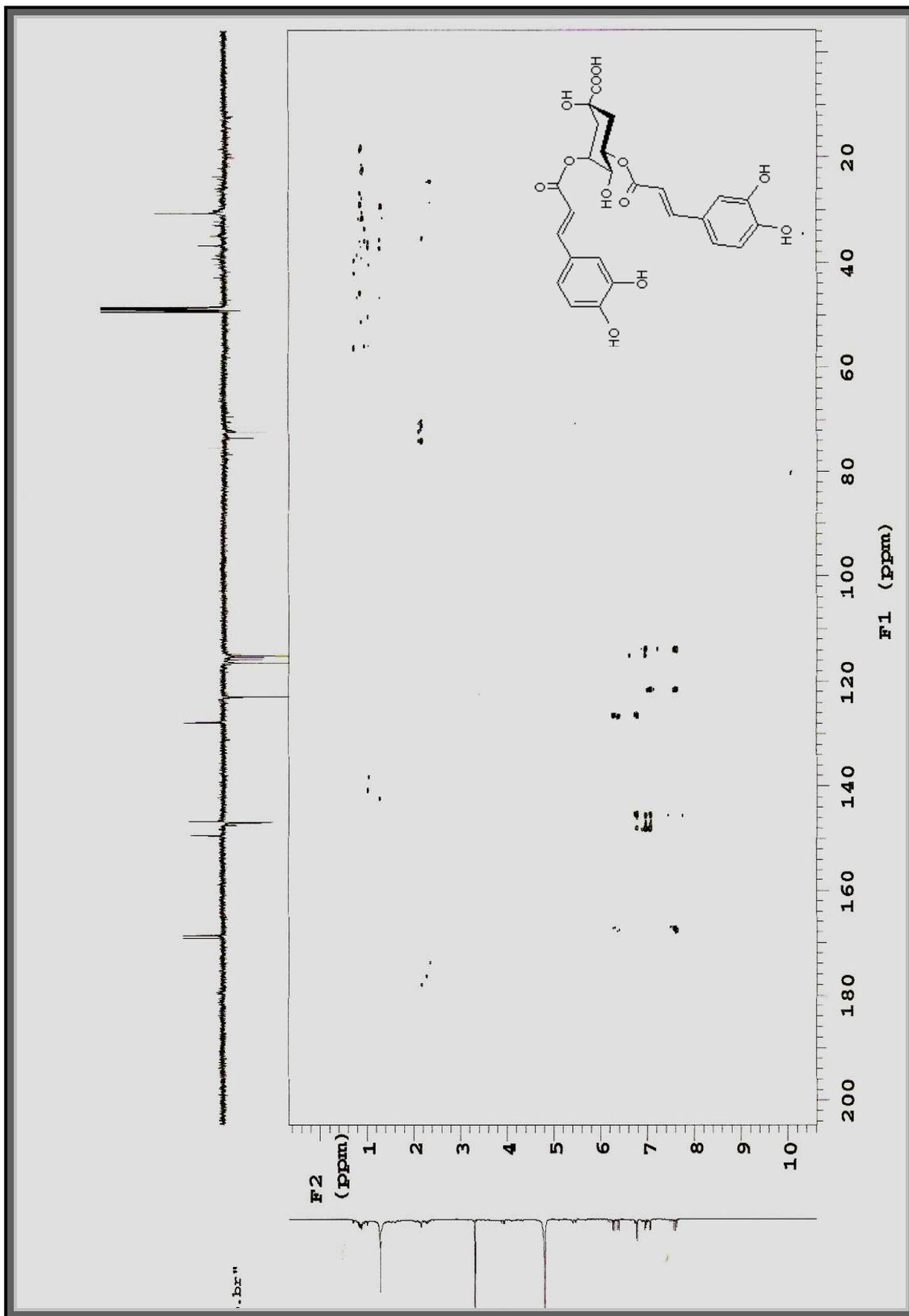


Figura 47. Espectro de RMN ¹H x ¹³C-ⁿJ_{CH} (n=2 e 3) HMBC (500 MHz) de Np 2 em CD₃OD.

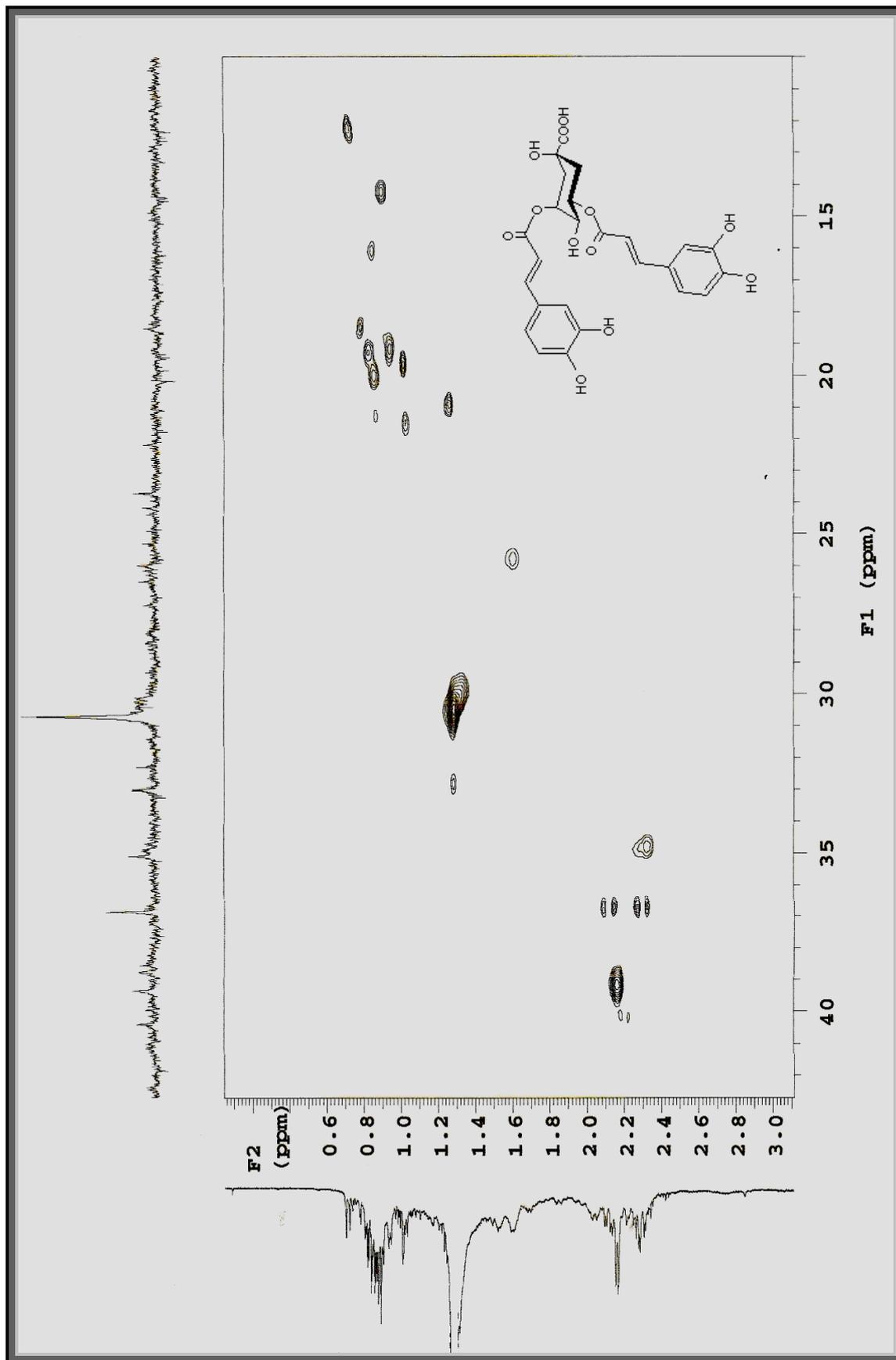


Figura 48. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) HMBC (500 MHz) de **Np_2** em CD_3OD na região entre δ_{C} .15- 40 ppm

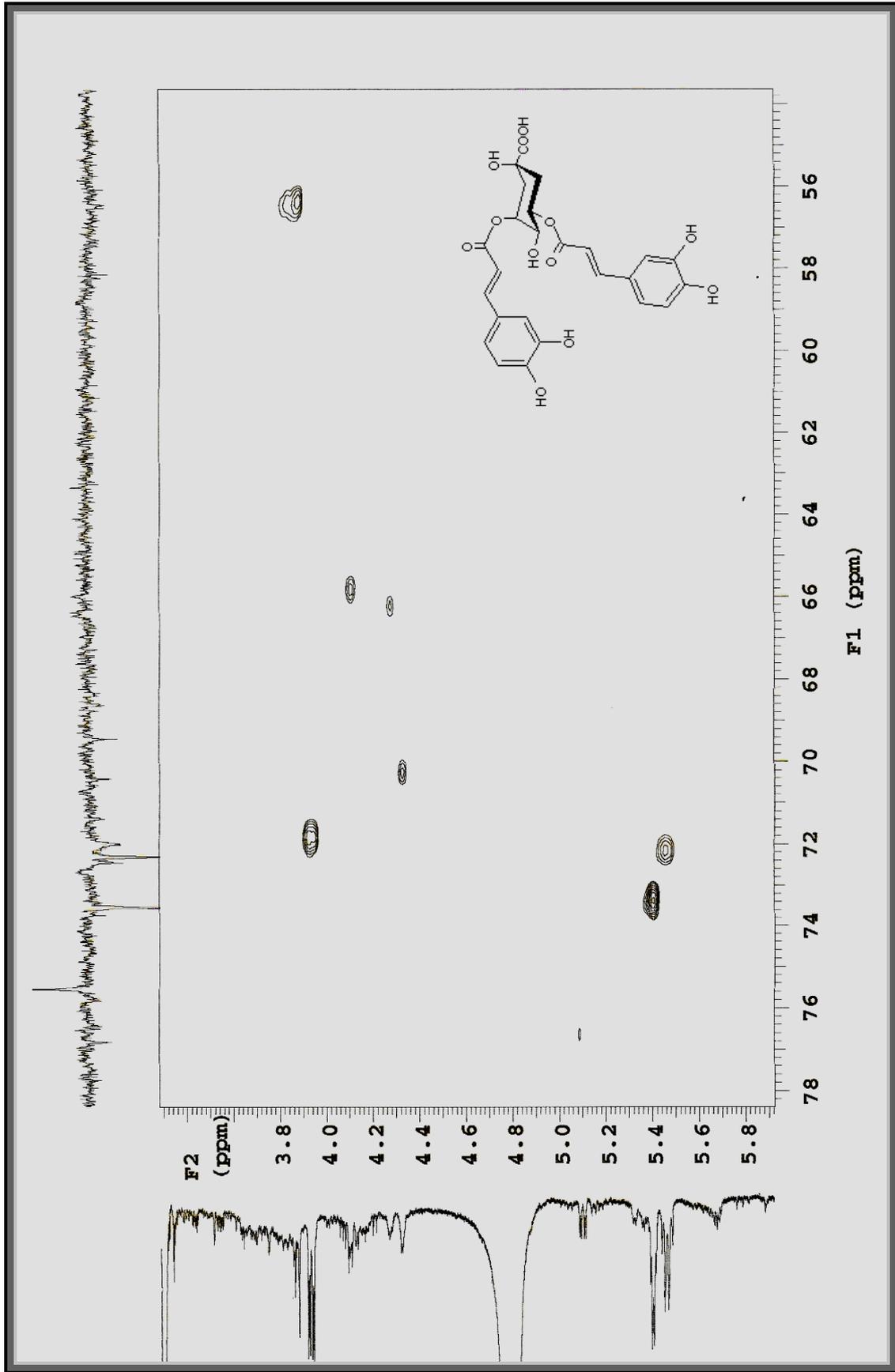


Figura 49. Expansão do espectro de RMN ¹H x ¹³C-ⁿJ_{CH} (n=2 e 3) HMQC (500 MHz) de Np₂ em CD₃OD na região entre δ_c:56- 78 ppm

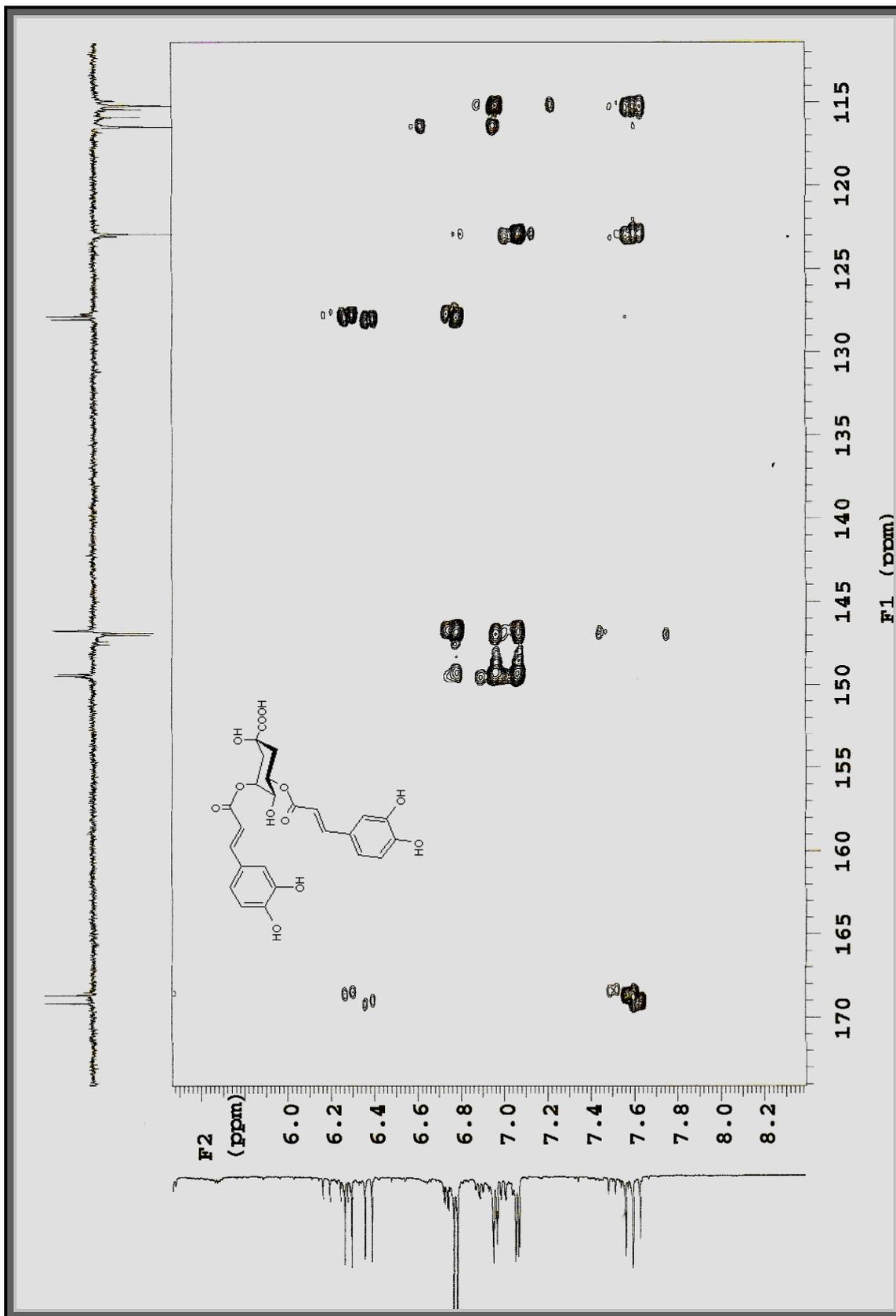


Figura 50. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) HMBC (500 MHz) de Np₂ em CD₃OD na região entre δ_{C} .115-

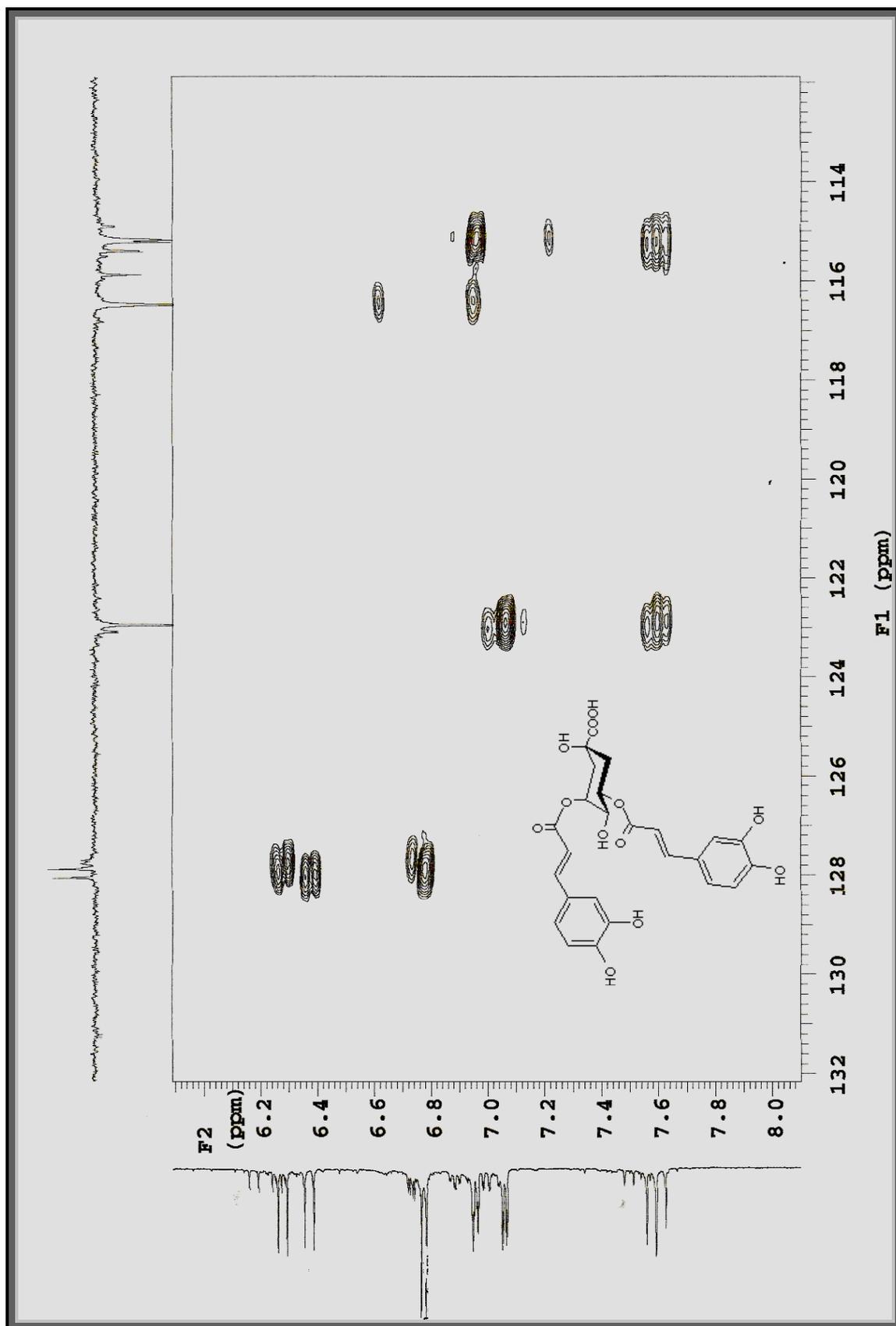


Figura 51. Expansão do espectro de RMN ¹H x ¹³C-ⁿJ_{CH} (n=2 e 3) HMBC (500 MHz) de Np₂ em CD₃OD na região entre δ_C.114- 132 ppm

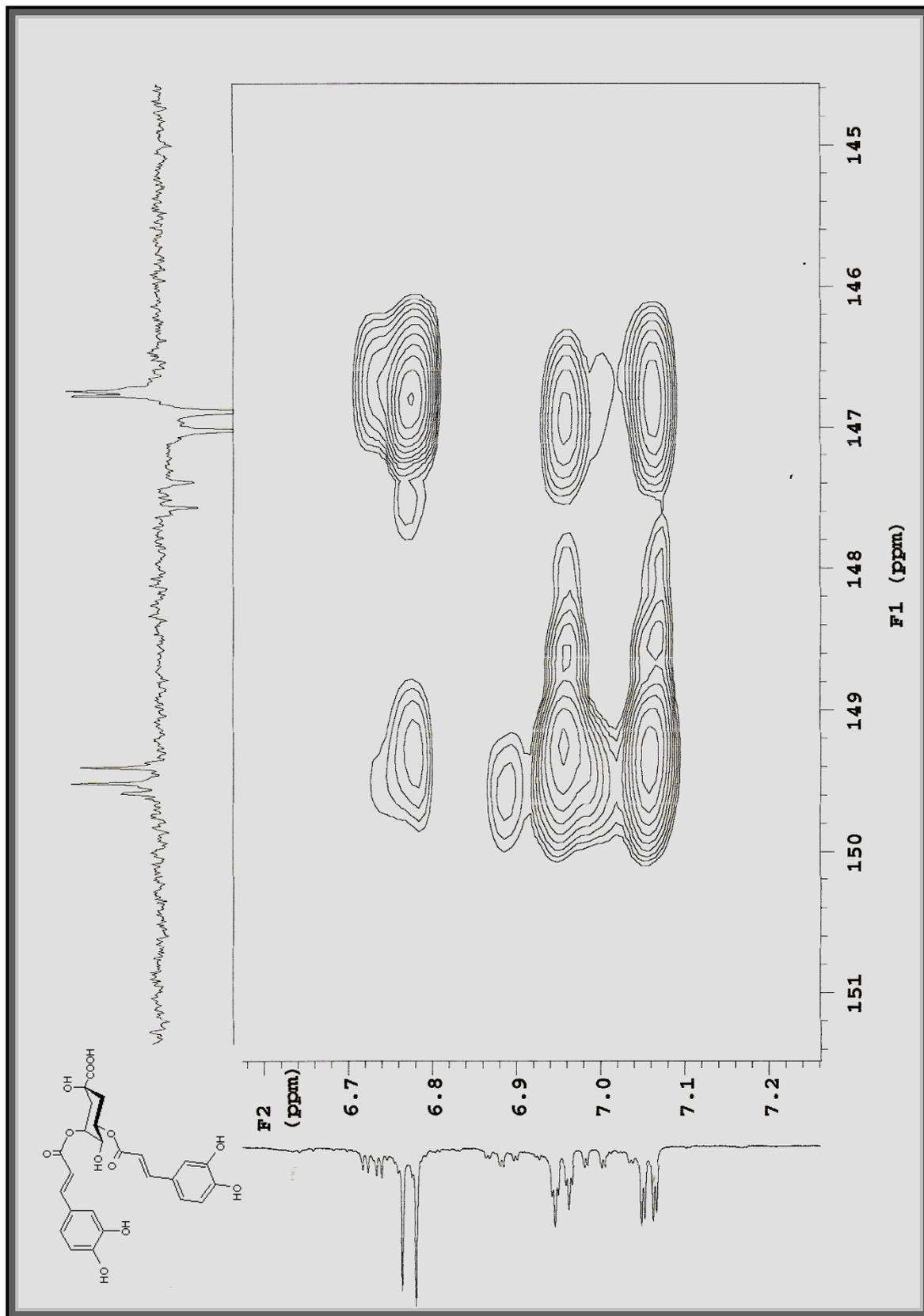


Figura 52. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) HMBBC (500 MHz) de Nb 2 em CD_3OD na região entre δ_c .145- 151 ppm

5.3. Identificação estrutural dos constituintes químicos de *Nanuza plicata*: FLAVONÓIDES

5.3.1. Identificação Estrutural de Np_3.

A substância codificada como Np_3, apresentou-se sob a forma de um pó amorfo amarelo escuro. Analisando o espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz, CD_3OD) (Figura 53, p.75), observou-se a presença de quatorze sinais, referentes a quinze carbonos, sendo oito sinais para carbonos não hidrogenados e seis metínicos, sugerindo que a substância tratava-se de um flavonóide.

A conjunto de sinais entre δ_{C} 95,78 e 124,46, foram atribuídos aos carbonos metínicos e quaternários não oxigenados dos anéis A, B e C (Tabela 3, p. 74). Dentre esses, os sinais em δ_{C} 184,6 referente à carbonila, e em 104,6 (C-3) e 166,8 (C-2), indicaram que o composto Np_3 possuía um núcleo de flavona. Os deslocamentos químicos entre δ_{C} 147,84 e 184,66, foram atribuídos à sete carbonos quaternários oxigenados (Figura 54, p. 76). Mediante a esses dados foi possível sugerir que o composto tratava-se de uma flavona tetrasubstituída (SILVA, 2004).

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD) (Figura 55, p 77) apresentou dois dupletos na região de hidrogênios aromáticos, em δ_{H} 6,42 (1H, $J=2,0$ Hz) e δ_{H} 6,19 (1H, $J=2,0$ Hz), característicos dos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A de flavonas oxigenadas nas posições 5 e 7 (HARBORNE, 1994). Para o anel B foi possível observar um duplodupletos em δ_{H} 7,35 ($J_1=2,2$ e $J_2=6,4$ Hz), atribuído ao H-6', que acoplou orto e meta com H-5' e H-2', respectivamente; um dupletos em δ_{H} 6,86 (1H, $J=8,8$), assinalado ao H-5', acoplando orto com H-6' e outro dupletos em δ_{H} 7,35 ($J=2,2$ Hz), atribuído ao H-2', que acoplou meta com H-6', caracterizando um sistema AMX.

A presença da hidroxila em C-5 fazendo uma ligação de hidrogênio com a carbonila C-4, não foi observada no espectro de RMN ^1H obtido em metanol.

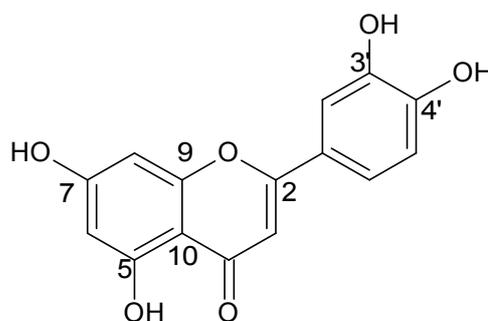
Mediante as atribuições feitas ao composto pelos dados de RMN, caracterizando os anéis A, B e C e comparações com os dados da literatura (Tabela 3, p. 74) foi possível propor para Np_3 a estrutura da 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona, com nome trivial de Luteolina.

Luteolina é uma flavona com ampla distribuição na natureza (NIELSEN et al., 1998), porém está sendo decrita pela primeira vez no gênero *Nanuza*.

Tabela 3 - Dados de RMN ^1H (200 MHz), ^{13}C (50 MHz) em CD_3OD de Np_3 em comparação com a Luteolina

C	NP_3		Luteolina*
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
2		166,8	164,5
3	6,52 (s)	104,4	103,3
4		184,6	182,2
5		164,0	162,1
6	6,19 (d, $J=2,0$)	100,9	99,2
7		167,3	164,7
8	6,42 (d, $J=2,0$)	95,7	94,2
9		160,2	157,9
10		104,6	104,2
1'		124,4	119,3
2'	7,35 (d, $J=2,2$ Hz)	114,9	113,8
3'		147,8	146,2
4'		151,7	150,1
5'	6,86 (d, $J=8,8$ Hz)	117,5	116,4
6'	7,35 (dd, $J_1=2,2$ Hz)	121,0	122,1

*DMSO (WAGNER, et al., 1976)



Luteolina

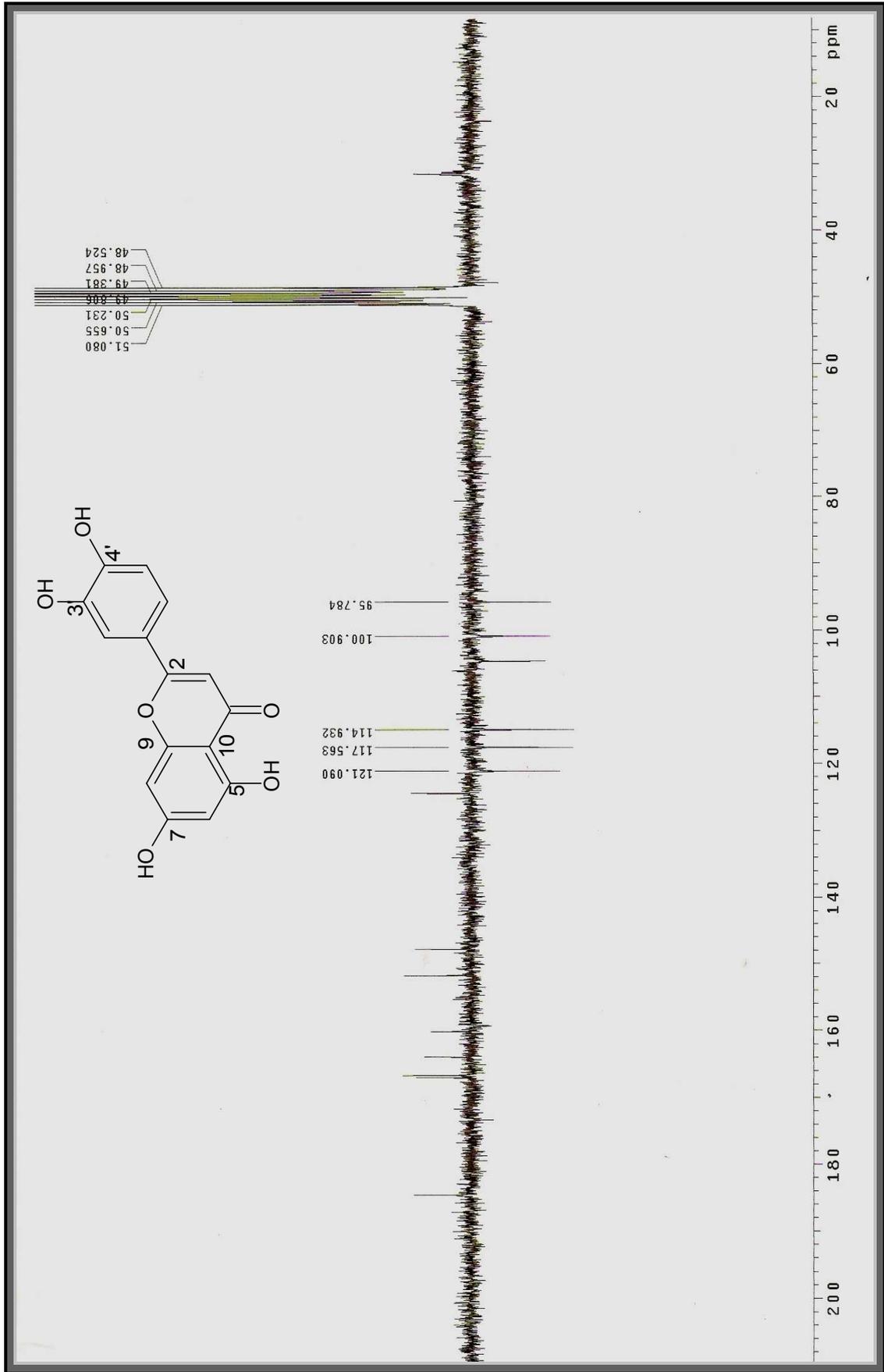


Figura 53. Espectro de RMN ¹³C-APT (50 MHz) de Np₃ em CD₃OD .

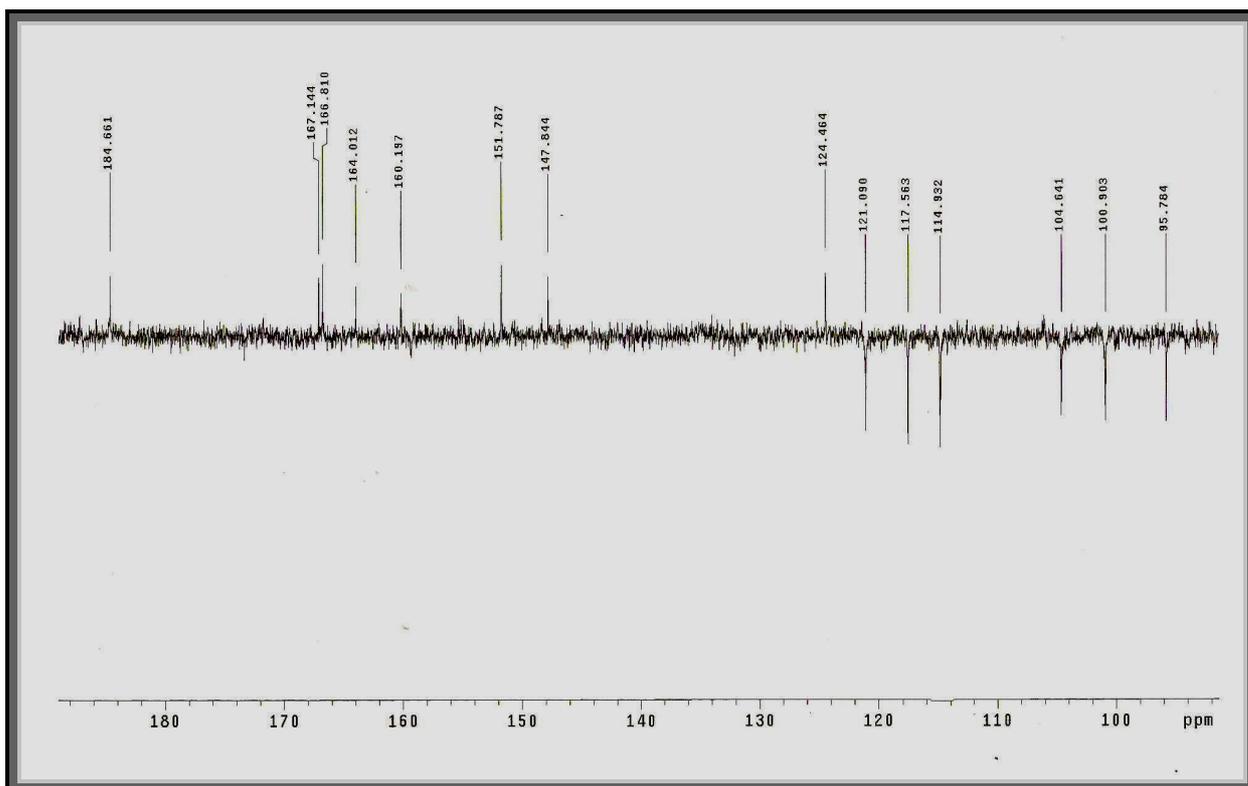
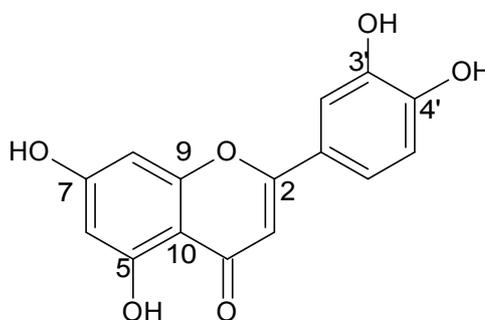


Figura 54. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz) de Np₃ em CD_3OD na região entre δ_{C} 100- 180 ppm



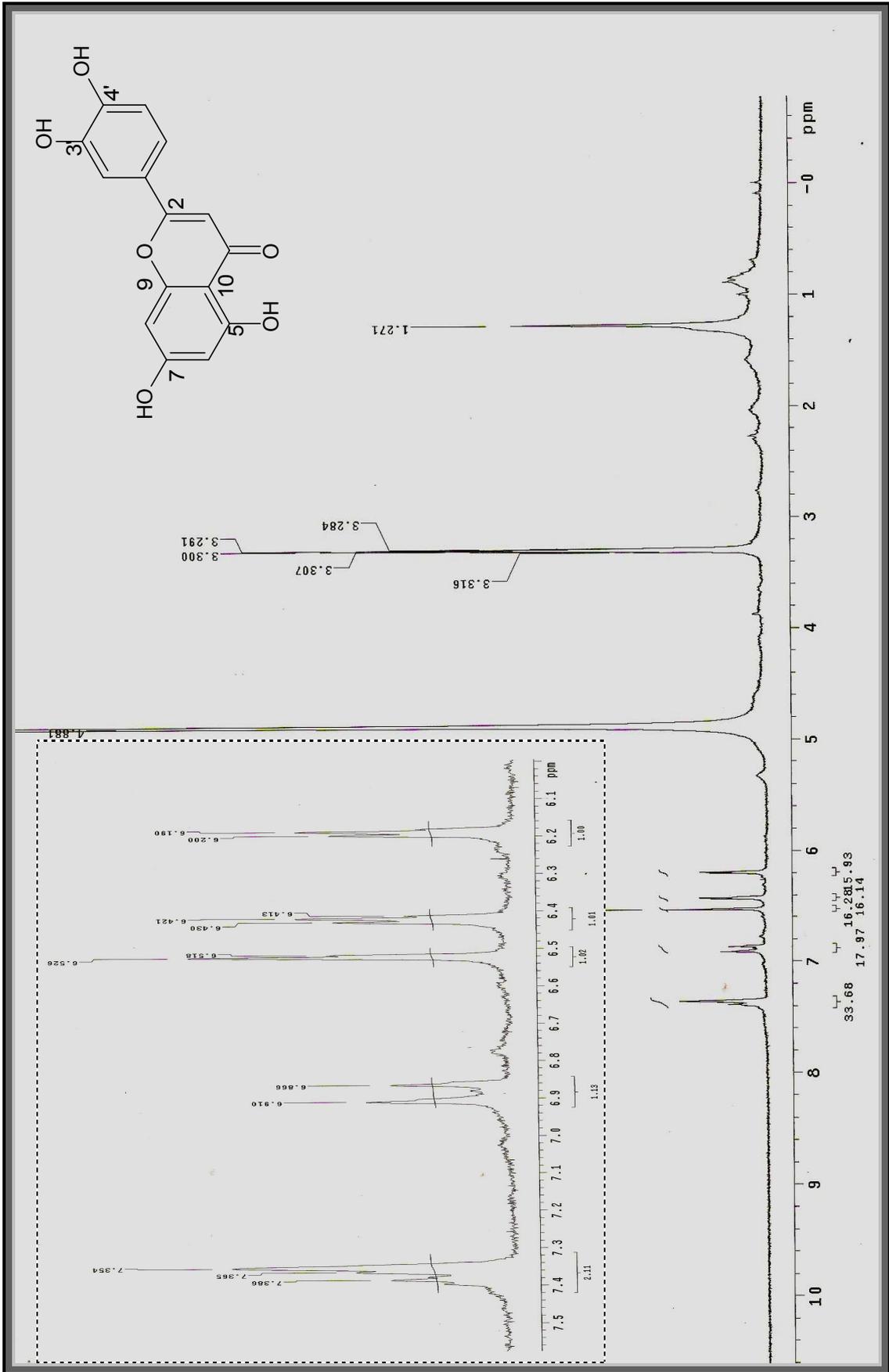
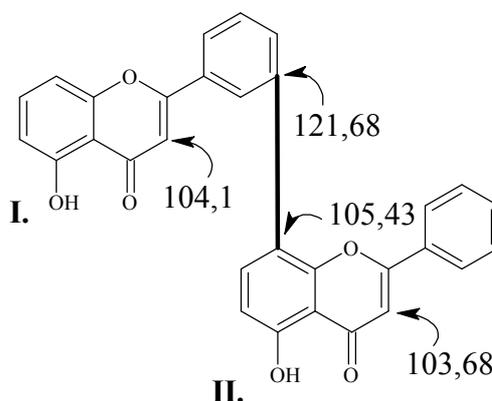


Figura 55. Espectro de RMN ¹H (200 MHz) de Np₃ em CD₃OD.

5.3.2 Identificação estrutural de Np_4

A substância codificada como Np_4 foi isolada sob a forma de um pó amorfo amarelo.

Nos espectros de RMN-¹³C-APT (125 MHz, CD₃OD) (Figura 56, p. 82) e suas expansões (Figura 57 e 58, p. 83), pode-se constatar a presença de 26 sinais referentes à 30 carbonos, característicos de compostos flavonoídicos (MABRY, 1970). São observados dezessete sinais para carbonos quaternários, bem como nove sinais para carbonos metínicos. Mediante os deslocamentos e a quantidade de sinais, pode-se inferir que Np_4 tratava-se de dois monoflavonóides ou de um biflavonóide. Os sinais em δ_C 95,16 e 100,18 são característicos dos carbonos C-8 e C-6, respectivamente do anel A de flavonóides. Os carbonos metínicos em δ_C 104,0 e 103,4, bem como a presença de dois sinais em δ_C 184,19 e 183,78 ppm, sugerem que o(s) composto(s) possui(m) o núcleo de flavona (MABRY, 1970). Com a presença dos sinais quaternários não oxigenados em δ_C 121,68 e 105,43, juntamente com dados da literatura, sugere que Np_4 tratava-se de um biflavonóide do tipo biflavona.

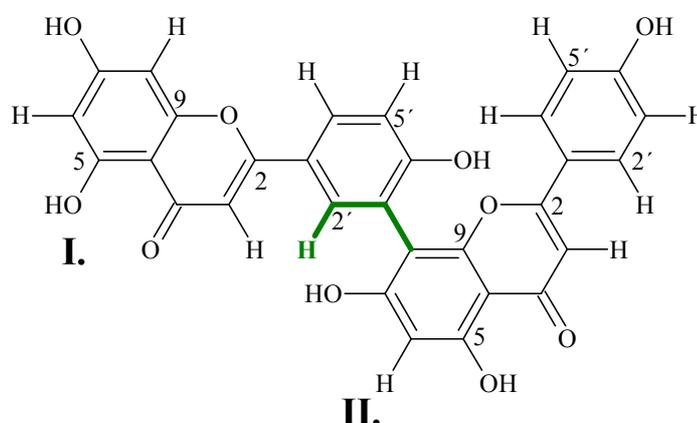


No espectro de RMN-¹H (500 MHz, CD₃OD) (Figura 59, p. 84), observou-se nove sinais referentes a 12 prótons. A presença de dois dupletos δ_H 6,16 ($J=2,0$ Hz) e 6,37 ($J=2,0$ Hz), (Figura 60, p. 85) representando H-6 e H-8 do anel A (unidade I) de flavona, respectivamente, caracterizavam o padrão de oxigenação nas posições 5 e 7 (HARBONE, 1994). Esses sinais não são observados para o anel A da unidade II, visto que há somente a presença de um simpleto em δ_H 6,34 (H-6 II), o que, juntamente com os dados de RMN ¹³C, nos indicou que o padrão de oxigenação em 5 e 7 foi mantido, porém a posição C-8 II foi um dos ponto de união interflavonoil.

O duplete em δ_H 7,06 (1H, $J=8,5$), duploduplete em δ_H 7,82 (1H, $J_1=2,5$, $J_2=8,5$) e duplete em δ_H 7,92 (1H, $J=2,5$), representaram um sistema AMX, atribuído aos hidrogênios do anel B-I. Dois dupletos em δ_H 6,67 (1H, $J=9,0$) e 7,47 (1H, $J=9,0$) caracterizaram um

sistema AA'BB', sendo atribuídos, então aos hidrogênios H-3'II e H-5'II e H-2'II e H-6'II), respectivamente. Esses acoplamentos foram observados no espectro de COSY (Figura 61 e 62, p. 85 e 86).

No espectro de HMQC (Figura 63, p. 86), pode-se observar correlações diretas entre os hidrogênios e carbonos, conforme a Tabela 4 (p. 80), confirmando assim a proposta apresentada anteriormente.



A união interflavonoil pode ser assinalada pelo espectro de HMBC (Figura 64 e 65, p. 87), ao qual evidenciou a correlação entre o H-2'I e C-8 II, em destaque na estrutura acima. Os dados de RMN ^{13}C foram comparados com a literatura (MARKHAM et al., 1987) (Tabela 5, p.81), sendo possível identificar Np_4 como sendo amentoflavona, uma biflavona com grande distribuição entre gimnospermas. Do ponto de vista evolutivo, estes são considerados os biflavonóides mais primitivos (ALMEIDA, 2003). Esse composto já foi descrito para *N. plicata* em estudo anterior (WILLIAMS et al., 1987).

Tabela 4 - Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) 1D e 2D em CD_3OD de Np_4.

C	HMQC		HMBC	COSY
	^1H	^{13}C		
2-I	-	166,18		
3-I	*6,54(s)	104,01	C-2[I], C-1'[I], C-10[I]	
4-I	-	183,19		
5-I	-	163,85		
6-I	6,15 (<i>d</i> , $J = 2,0$)	100,18	C-8 [II]	H-8 [I]
7-I	-	165,98		
8-I	6,37 (<i>d</i> , $J = 2,0$)	95,16	C-7 [I], C-5 [I]	H-6 [I]
9-I	-	159,35		
10-I	-	105,37		
1'-I	-	123,16		
2'-I	7,92 (<i>d</i> , $J = 2,5$)	132,79	C-4'[I], C-6'[I], C-8[II]	H-6' [I]
3'-I	-	121,68		
4'-I	-	161,04		
5'-I	7,06 (<i>d</i> , $J = 8,5$)	117,52	C-1'[I], C-3'[I]	H-6' [I]
6'I	7,82 (<i>dd</i> , $J = 8,5; 2,5$)	128,86	C-2'[I], C-4'[I]	H-5' [I]
2-II	-	166,18		
3-II	*6,55(s)	103,38	C-2[II], C-1'[II], C-10[II]	
4-II	-	184,78		
5-II	-	163,15		
6-II	6,34 (<i>s</i>)	100,18	C-10[II], C-5[II]	
7-II	-	165,92		
8-II	-	105,43		
9-II	-	156,47		
10-II	-	105,33		
1'-II	-	123,23		
2'-II	7,47 (<i>d</i> , $J = 9,0$)	129,28	C-2[II], C-4'[II], C-5[II]	H-3' [II]
3'-II	6,67 (<i>d</i> , $J = 9,0$)	116,83	C-5'[II], C-4'[II], C-1'[II]	H-2' [II]
4'-II	-	162,49		
5'-II	6,67 (<i>d</i> , $J = 9,0$)	116,83	C-1'[II]	H-6' [II]
6'II	7,47 (<i>d</i> , $J = 9,0$)	129,28	C-2'[II], C-4'[II]	H-5' [II]

* Podem estar trocados.

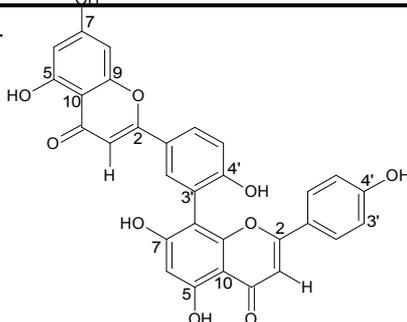
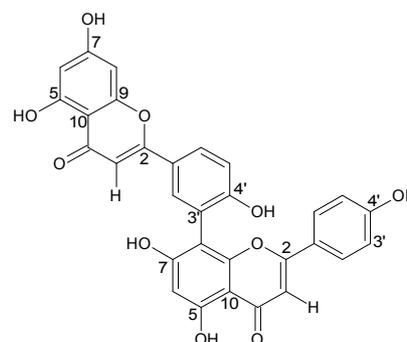


Tabela 5 - Comparação dos dados de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de Np_4 com os dados de RMN ^{13}C da literatura (20 MHz, DMSO) (MARKHAM et al., 1987) .

C	Np_4	Amentoflavona
	δ_{C}	δ_{C}
2-I	166,18	164,1
3-I	104,01	103,2
4-I	183,19	181,9
5-I	163,85	161,6
6-I	100,18	98,8
7-I	165,98	163,9
8-I	95,16	94,2
9-I	159,35	157,6
10-I	105,37	104,0
1'-I	123,16	120,3
2'-I	132,79	127,9
3'-I	121,68	121,9
4'-I	161,04	159,6
5'-I	117,52	116,4
6'I	128,86	131,6
2-II	166,18	164,3
3-II	103,38	102,8
4-II	184,78	182,2
5-II	163,15	160,8
6-II	100,18	99,1
7-II	165,92	161,9
8-II	105,43	104,1
9-II	156,47	154,7
10-II	103,33	104,0
1'-II	123,23	121,4
2'-II	129,28	128,3
3'-II	116,83	116,0
4'-II	162,49	161,1
5'-II	116,83	116,0
6'II	129,28	128,3



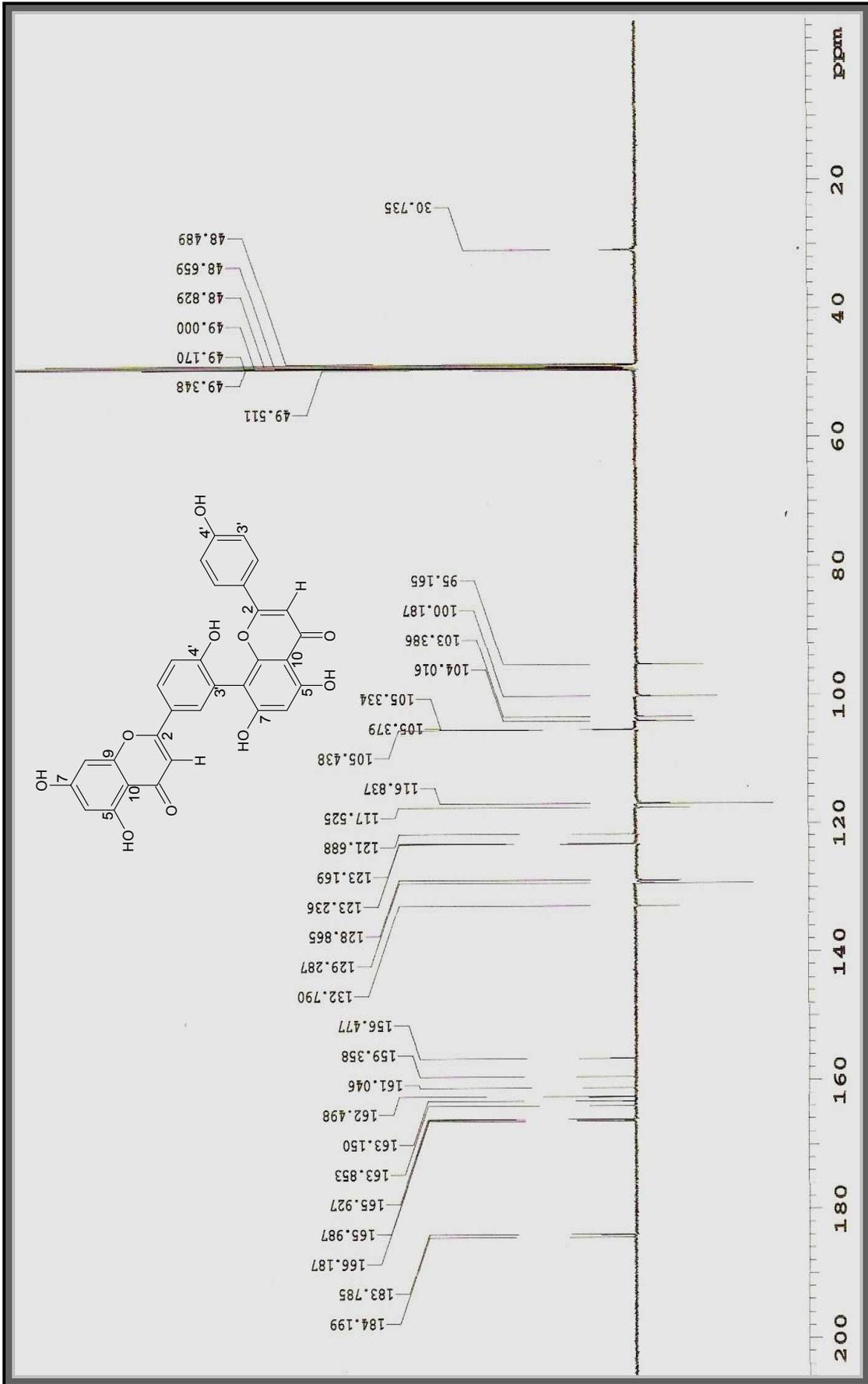


Figura 56. Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np₄ em CD₃OD .

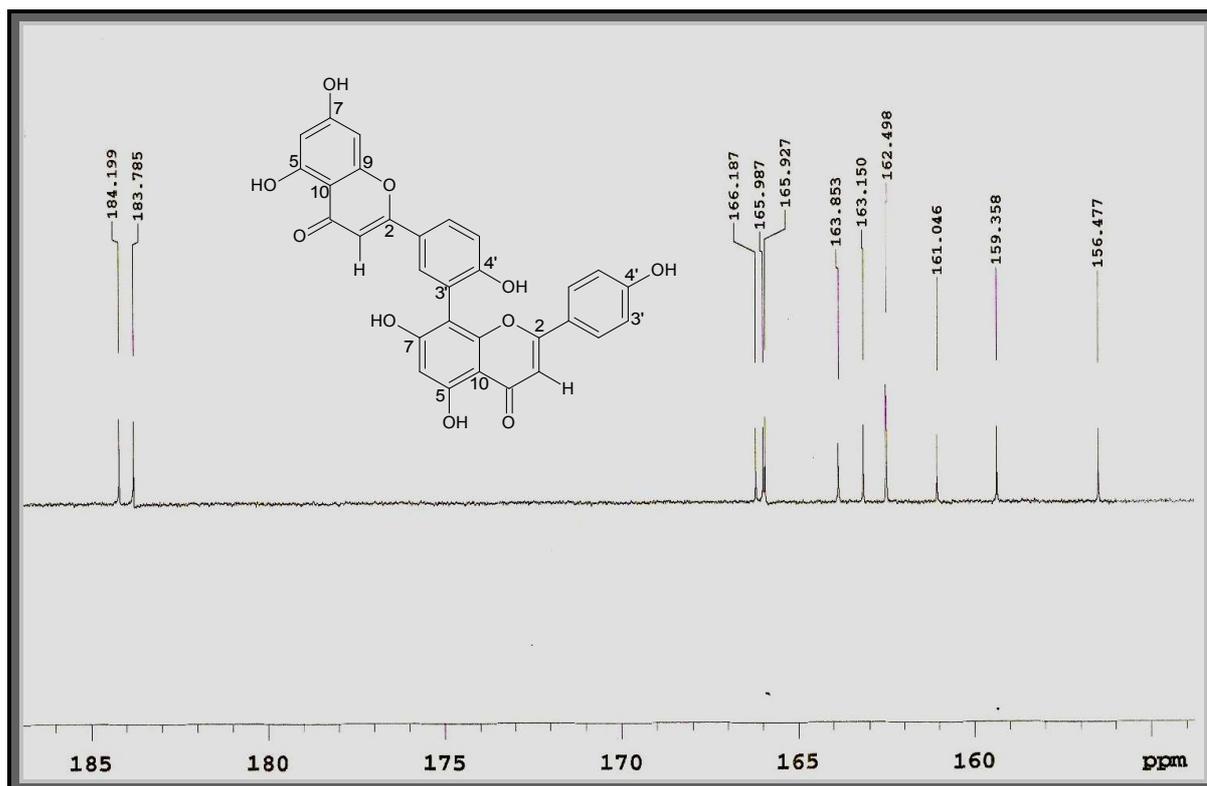


Figura 57. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_4 em CD_3OD na região entre δ_{C} 165- 185 ppm

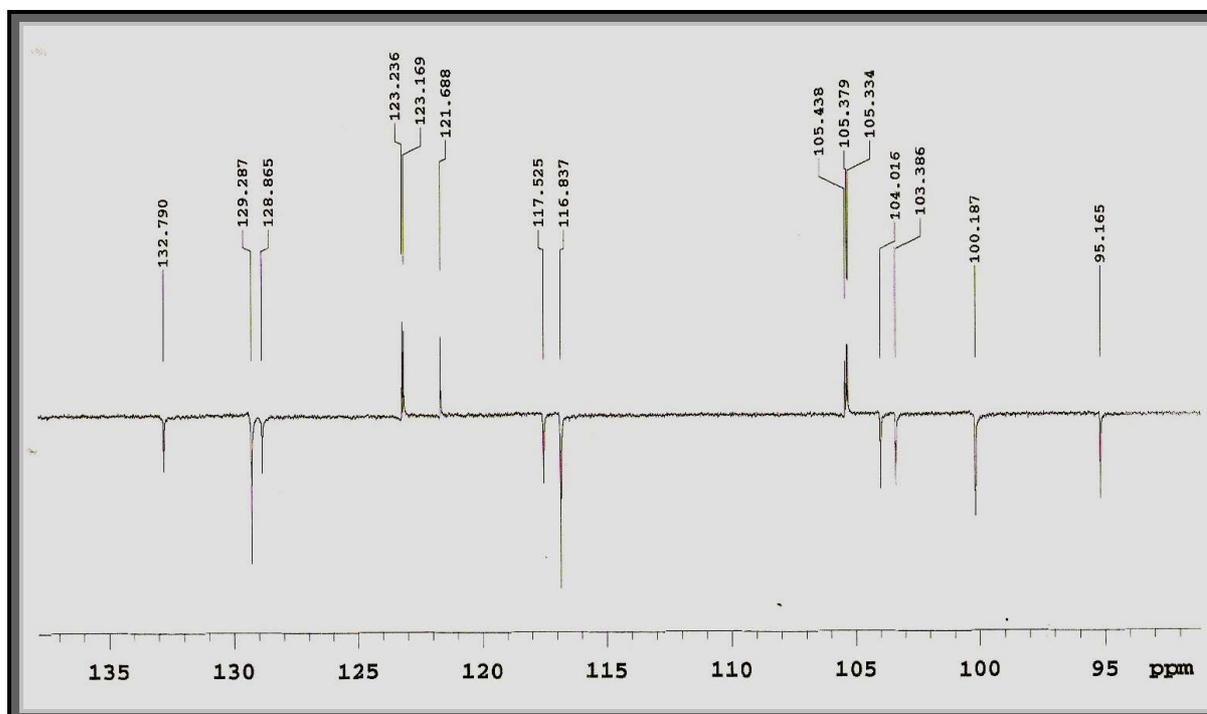


Figura 58. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_4 em CD_3OD na região entre δ_{C} 95- 135 ppm

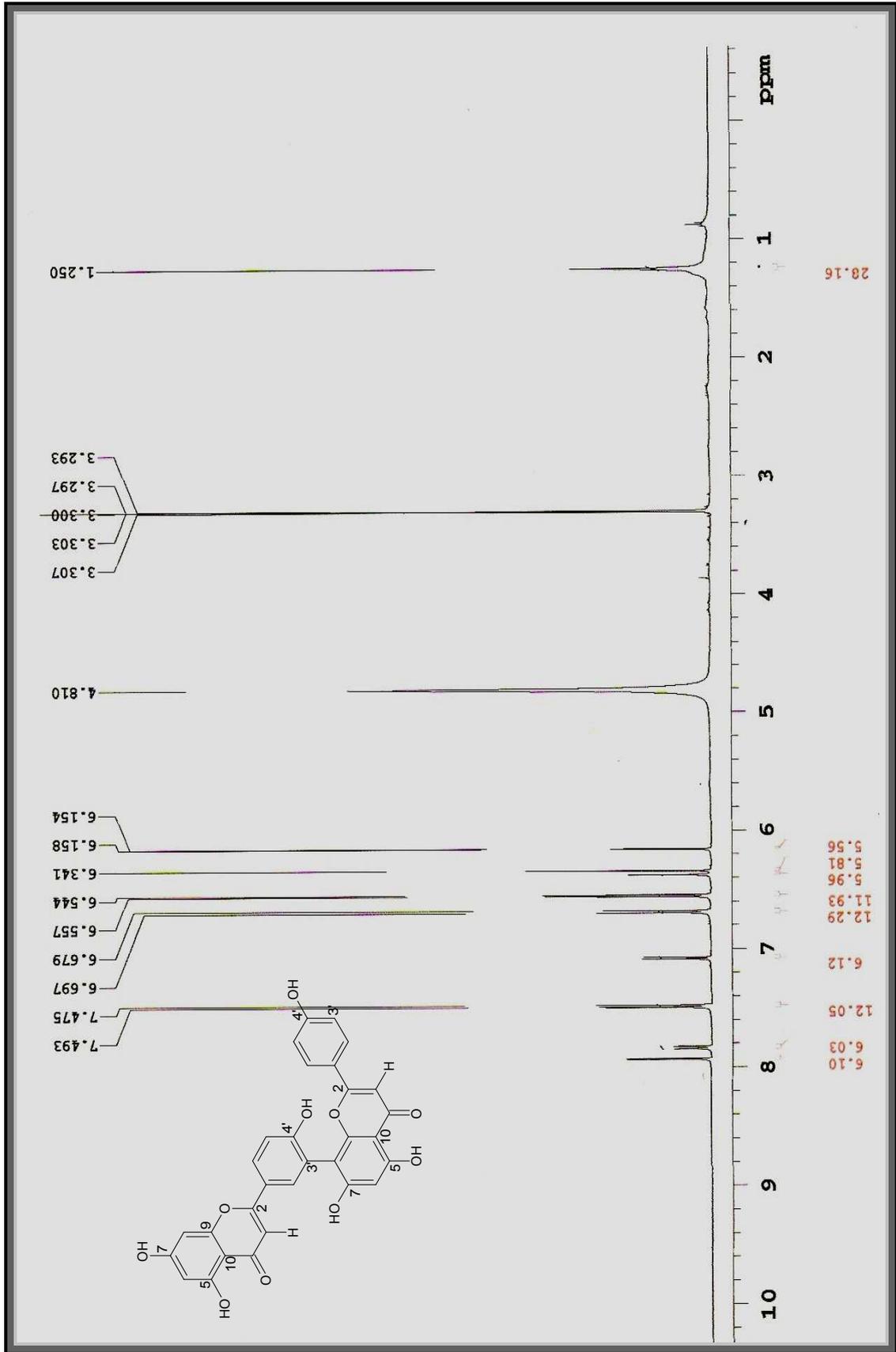


Figura 59. Espectro de RMN ¹H (500 MHz) de Np_4 em CD₃OD.

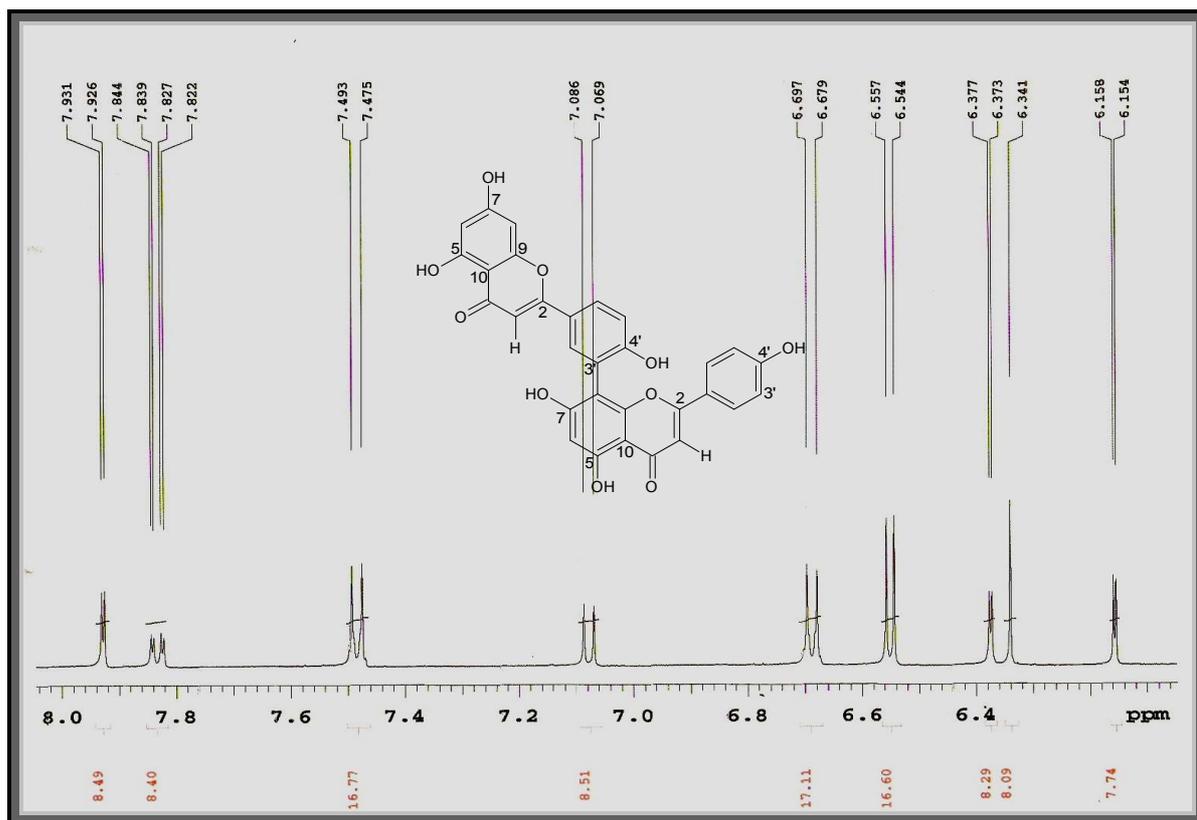


Figura 60. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Np_4 em CD_3OD na região entre δ_{C} 6,4- 8,0 ppm

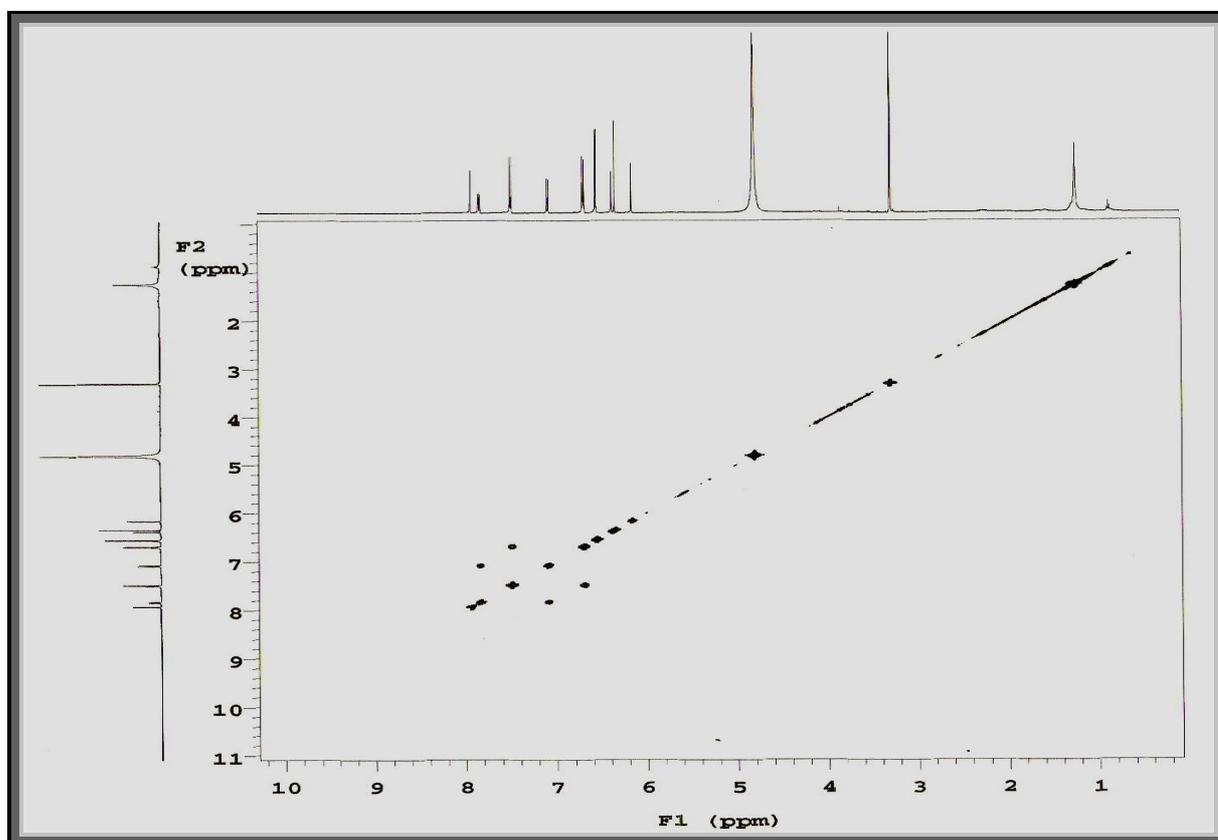


Figura 61. Espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz) de Np_4 em CD_3OD .

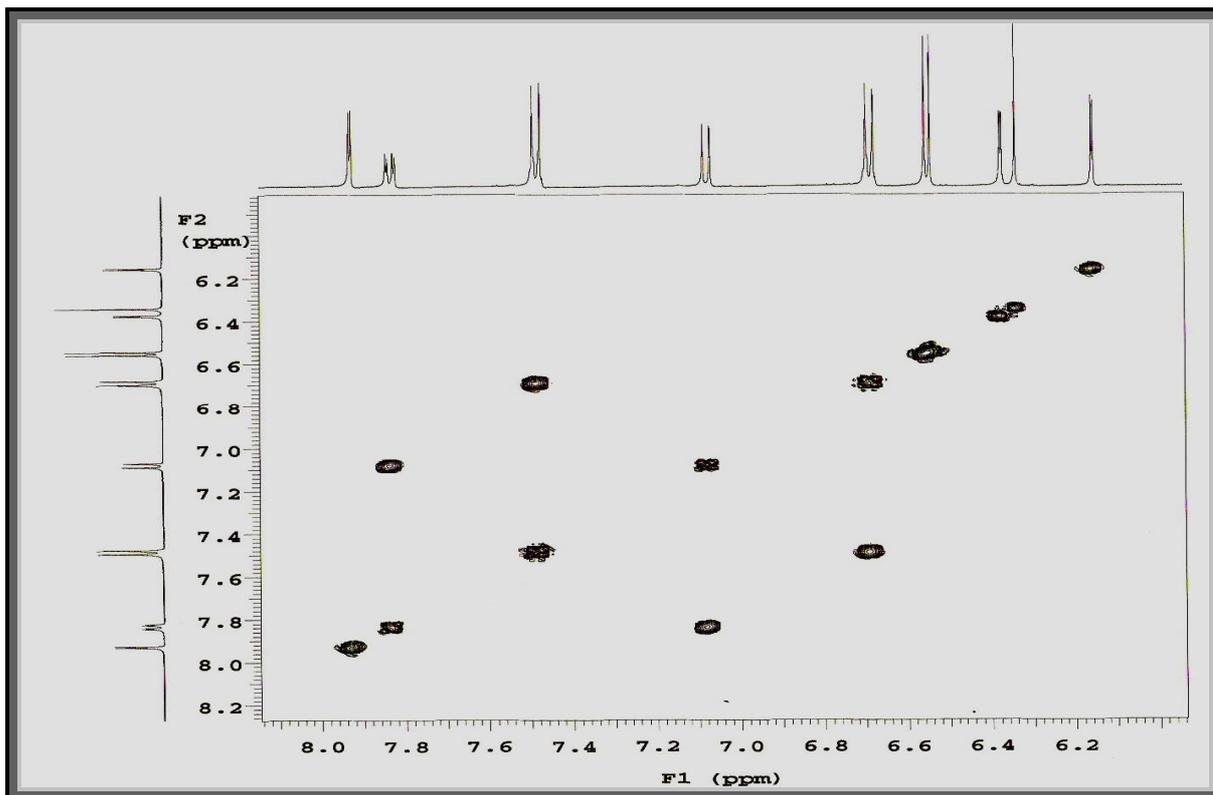


Figura 62. Expansão de espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz) de Np_4 em CD_3OD na região entre δ_{H} 6,2- 8,0 ppm

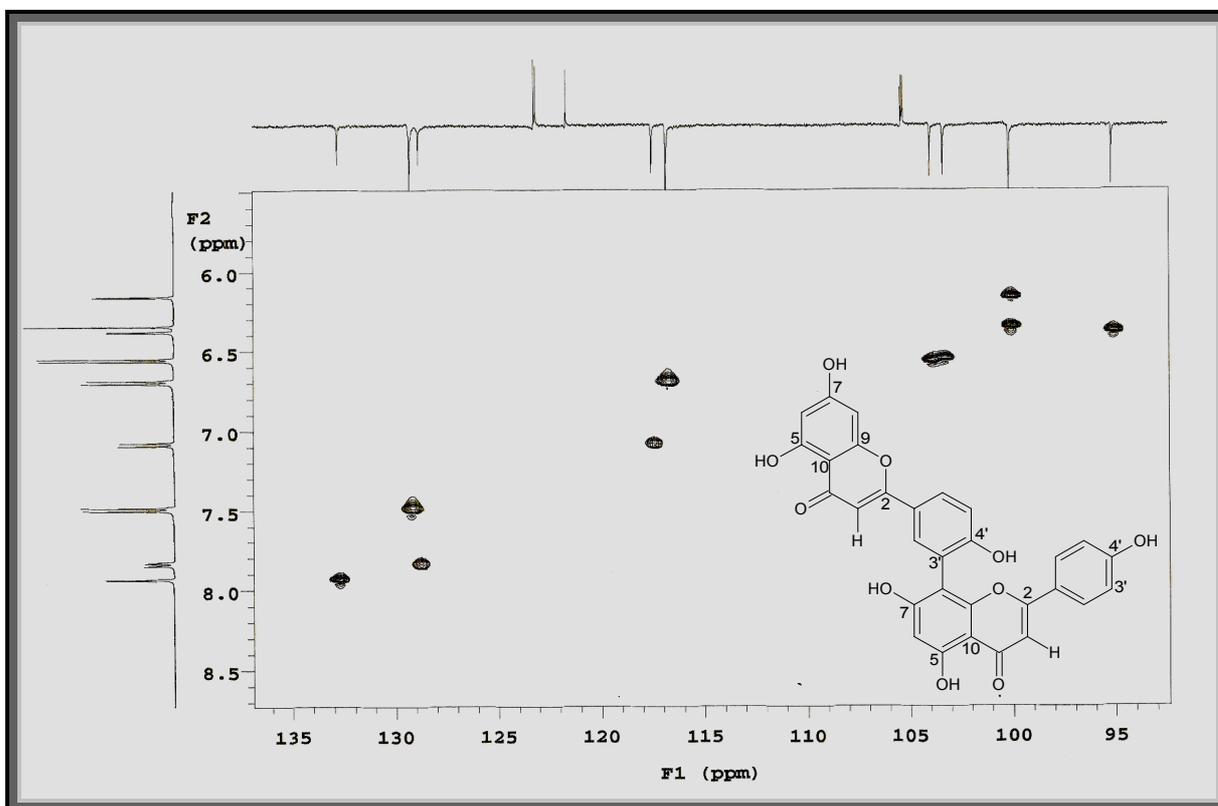


Figura 63. . Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ HMQC (500 MHz) de Np_4 em CD_3OD na região entre δ_{C} 95- 135 ppm.

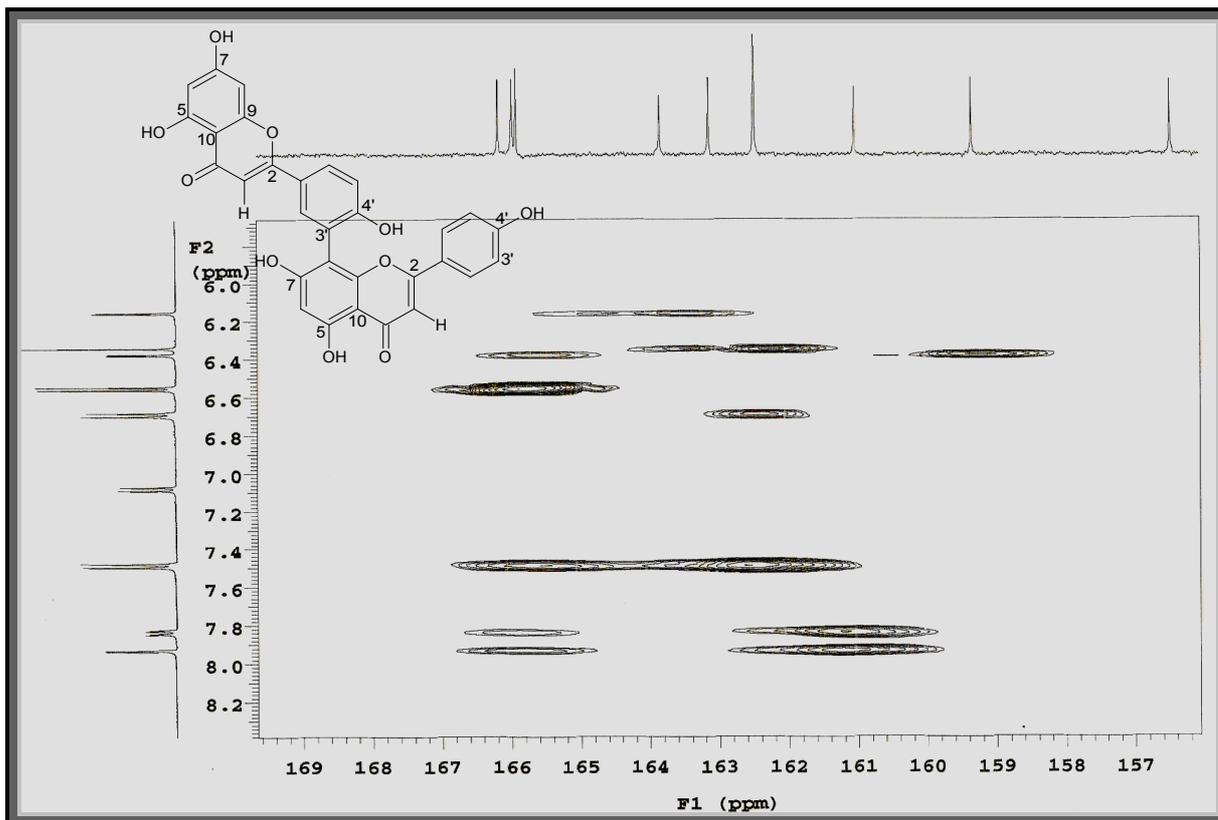


Figura 64. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) HMBC (500 MHz) de Np_4 em CD_3OD . Na região entre δ_{C} 157- 169 ppm.

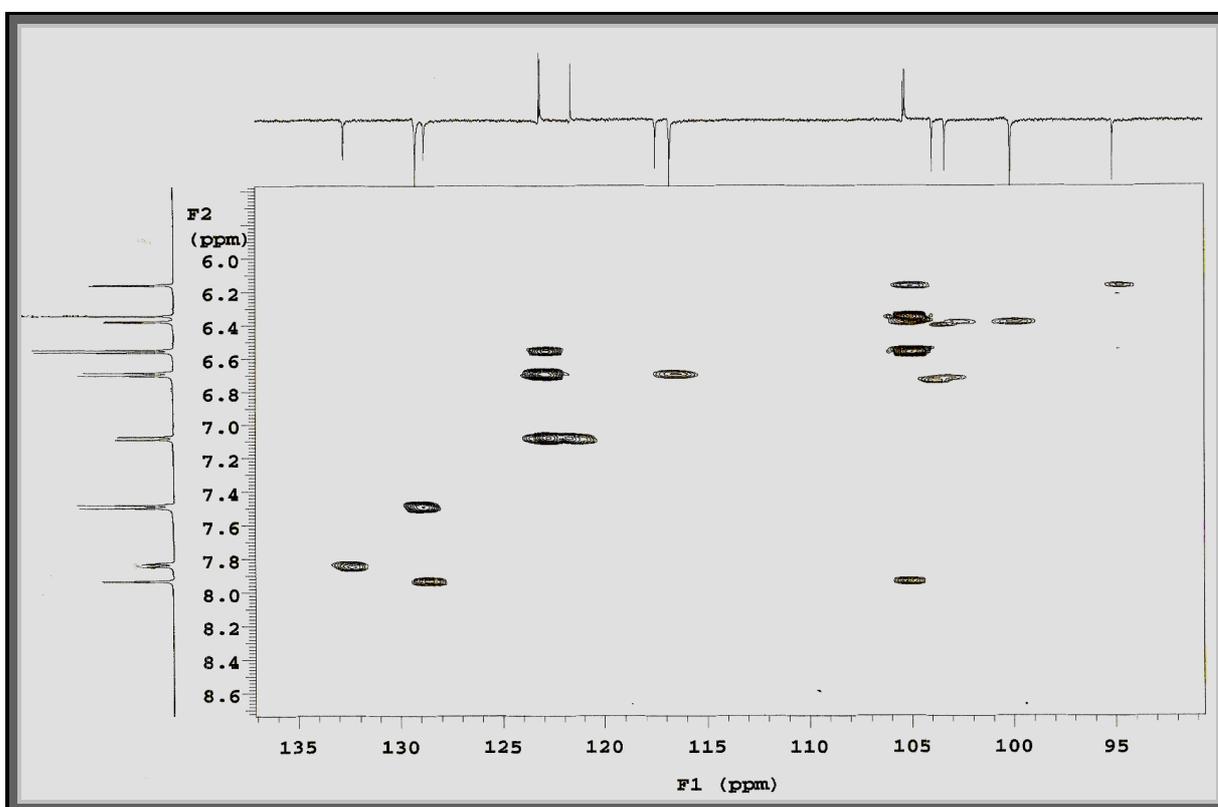


Figura 65. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) HMBC (500 MHz) de Np_4 em CD_3OD . Na região entre δ_{C} 95- 135 ppm.

5.3.5 Identificação estrutural de Np_5

A substância codificada como Np_5 foi isolada na forma de um pó amarelo, P.F. 340-345 °C. No espectro de infravermelho em KBr observou-se bandas de absorção em 3350 cm^{-1} e 1694 cm^{-1} , característicos de OH e carbonila, respectivamente (Figura 66, p. 92). O espectro de RMN- ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO) mostrou a presença de 30 sinais correspondente a 32 carbonos. Destes vinte sinais foram atribuídos a carbonos quaternários, dez a carbonos metínicos e dois a carbonos metoxílicos (Figura 67, p. 93). Os deslocamentos químicos em δ_{C} 158,1, 139,4, 180,0, 162,9, 99,8, 166,2, 94,8, 158,4 e 105,3 (Figuras 68 e 69, p. 94), sugeriram um esqueleto típico de flavona 5,7 dissustituída. Considerando a quantidade de sinais, supôs-se que Np_5 tratava-se de uma mistura de flavonas ou de um biflavonóide.

Analisando o espectro de massas em HR-ESI-MS (Figura 70, p. 95), constatou-se a presença do pico do íon molecular em 599.5331 [M+ H] compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{32}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$ e seus fragmentos (Esquema 5, p. 96), sugerindo dessa forma que Np_5 seria um biflavonóide. Além disso, sinais em δ_{C} 121,9 (C) e 106,8 (C), comparados com os dados da amentoflavona (p. 80), indicaram uma união C-3'I com C-8 II. A ausência do sinal em δ_{C} 94,8, juntamente com os sinais em δ_{C} 101,4, 131,3 e 116,3, sugeriram que o anel A da unidade II é do tipo pentasustituído e o anel B do tipo AA'BB'.

A ausência de sinais de carbono em δ_{C} 104,0 e 103,4, e os deslocamentos químicos para os carbonos metoxílicos em δ_{C} 60.5 e 60.6 sugeriram a inserção desses grupos em C-3 I e C-3 II, respectivamente. Isto está de acordo com os dados na literatura para flavonóides (BRANCO et al., 2002).

No espectro de RMN- ^1H (500 MHz, DMSO) (Figura 71, p. 97), observamos a presença de dois dupletos δ_{H} 6,14 ($J= 2,0$ Hz) e 6,19 ($J= 2,0$ Hz) (Figura 72, p. 98) o que está de acordo com anel A de flavonóides 5,7 dissustituídos. Observou-se ainda um duplete em δ_{H} 8,16 ($J= 2,0$ Hz), um duplete em δ_{H} 7,09 ($J= 9,0$ Hz) e um duploduplete em δ_{H} 8,08 ($J= 9,0$ e 2,0 Hz) o que corrobora com um sistema AMX no anel B da unidade I. Nesse espectro foi possível observar um simpleto em δ_{H} 6,31 que foi atribuído ao H-6 II, o que reforçou a possibilidade da união C-3'I e C-8 II. Além disso, observou-se a presença de dois simpletos em δ_{H} 3,73 e 3,78 atribuídos as duas metoxilas.

No espectro de HSQC (Figura 75, p. 100) observou-se a correlação de δ_{H} 6,14 (H-6 I) com δ_{C} 99,8 e (C-6 I) e de δ_{H} 6,19 (H-8 I) com δ_{C} 94,8 e (C-8 I) confirmando as atribuições feitas a C-6 e C-8 da unidade I. As demais correlações diretas estão compiladas na Tabela 6 (p. 90).

No espectro de HMBC (Figura 76, p. 101) e suas expansões (Figuras 77-79, p. 102-104) foi possível observar correlações do sinal em δ_H 6,14 (H-6 I) com δ_C 162,9 (C-5 I), 166,2 (C-7 I) e 105,7 (C-10 I). Ainda, constatou-se as correlações do sinal em δ_H 8,16 (H-2' I) com δ_C 158,1 (C-2 I), 161,1 (C-4'), 130,4 (C-6' I) e 106,8 (C-8 II), o que confirmou a trissubstituição do anel B da unidade I além de reforçar a união interflavonoil proposta. Ainda nesse espectro, foram observadas correlações de δ_H 6,31 (H-6 II) com δ_C 106,8 (C-8 II) o que também confirmou a união C-3' I e C-8 II.

As correlações dos sinais em δ_H 3,73 com δ_C 139,4 e em δ_H 3,78 com δ_C 139,3 confirmaram a inserção das metoxilas nos carbonos C-3 I e C-3 II, respectivamente. As demais correlações estão compiladas na Tabela 6. (p. 90)

No espectro de COSY (Figura 80, p. 105) evidenciaram-se correlações entre os sinais em δ_H 6,14 (H-6 I) com δ_H 6,19 (H-8 I), confirmando para o anel A uma dissubstituição nos carbonos 5,7. Também, correlações de δ_H 8,16 (H-2' I) com δ_H 8,08 (H-6' I), δ_H 7,08 (H-5' I) com δ_H 8,08 (H-6' I) e de H-6' I com H-2' I e H-5' I, as quais corroboraram um sistema AMX para o anel B da unidade I.

Assim, Np₄ tratava-se de um novo biflavonóide, sendo aqui descrito pela primeira vez na literatura. Para este, foi atribuído o nome trivial de nanuzoflavona em homenagem ao gênero ao qual a espécie produtora faz parte.

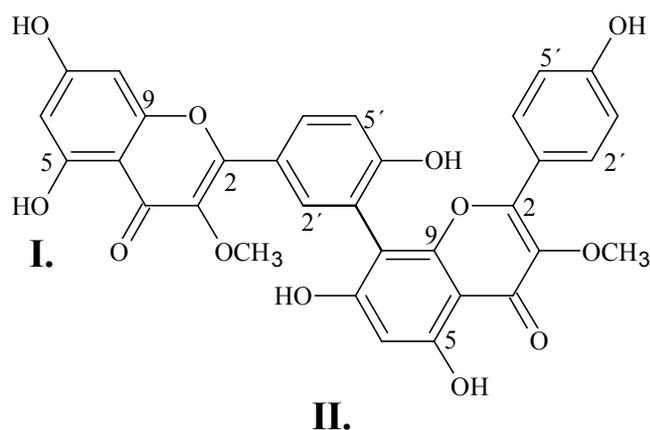
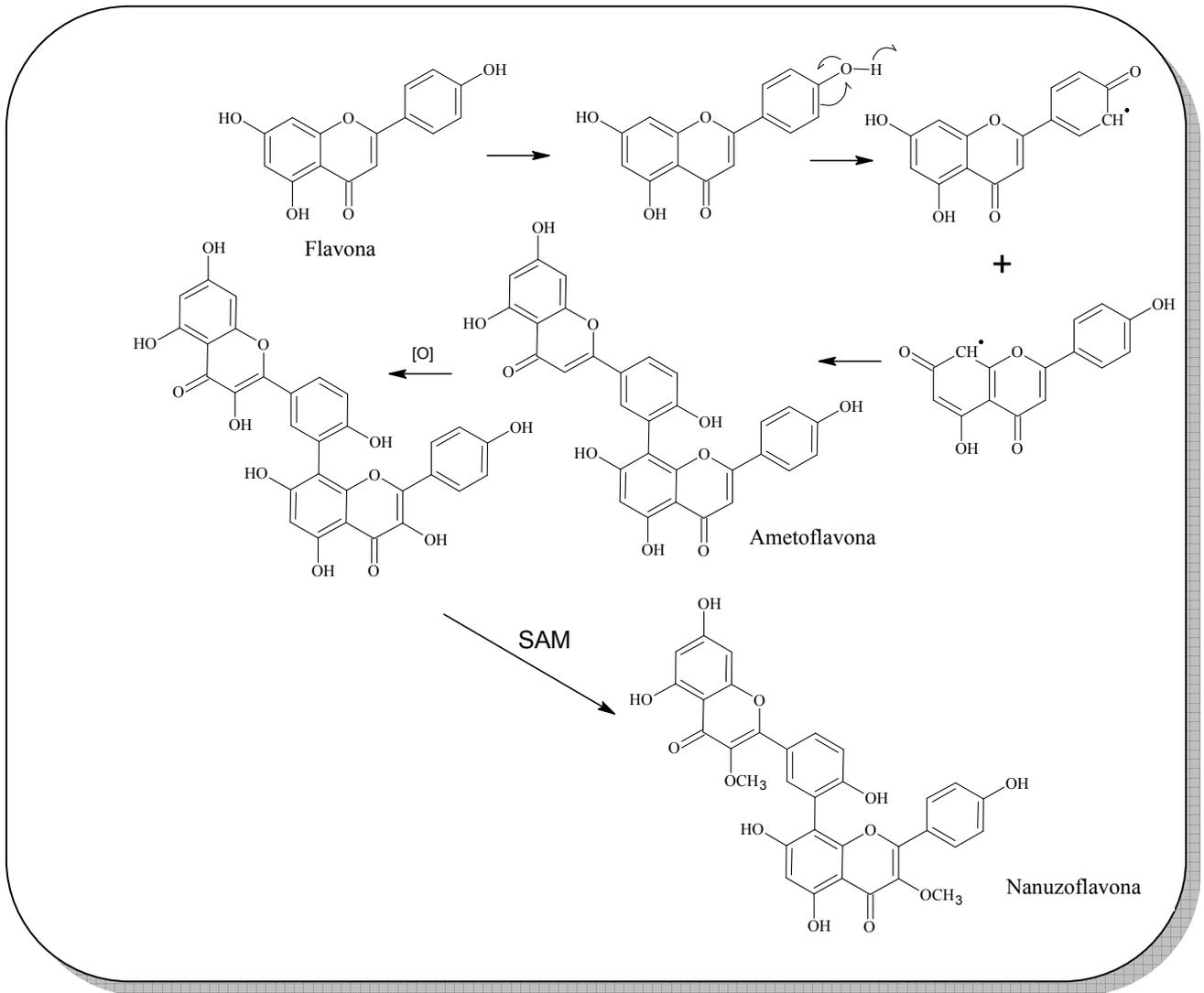


Tabela 6 - Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) 1D e 2D em CD_3OD de Np_5.

C	HMQC		HMBC	COSY
	^1H	^{13}C		
2-I	-	158,1		
3-I	-	139,4		
4-I	-	180,0		
5-I	-	162,9		
6-I	6,14 (<i>d</i> , $J = 2,0$)	99,8	C-5 [I], C-7 [I], C-10 [I]	H-8 I
7-I	-	166,2		
8-I	6,19 (<i>d</i> , $J = 2,0$)	94,8	C-7 [I], C-9 [I], C-10 [I]	H-6 I
9-I	-	158,4		
10-I	-	105,7		
1'-I	-	122,7		
2'-I	8,16 (<i>d</i> , $J = 2,0$)	134,6	C-2 [I], C-4' [I], C-6' [I], C-8 [II]	H-6' I
3'-I	-	121,9		
4'-I	-	161,1		
5'-I	7,08 (<i>d</i> , $J = 9,0$)	118,4	C-1' [I], C-3' [I], C-4' [I]	H-6' I
6'I	8,08 (<i>dd</i> , $J = 9,0$; 2,0)	130,4	C-4' [I]	H-2', H-5' I
2-II	-	157,2		
3-II	-	139,3		
4-II	-	179,9		
5-II	-	162,1		
6-II	6,31(<i>s</i>)	101,4	C-5 [II], C-7 [II], C-8 [II]	
7-II	-	167,5		
8-II	-	106,8		
9-II	-	155,6		
10-II	-	105,2		
1'-II	-	122,6		
2'-II	7,78 (<i>d</i> , $J = 8,0$)	131,3	C-2 [II], C-4' [II]	H-3' II
3'-II	6,65 (<i>d</i> , $J = 8,0$)	116,3	C-1' [II], C-4' [II]	H-2' II
4'-II	-	161,4		
5'-II	6,65 (<i>d</i> , $J = 8,0$)	116,3	C-4' [II]	H-6' II
6'II	7,78 (<i>d</i> , $J = 8,0$)	131,3	C-2 [II], C-4' [II]	H-5' II
3-OCH ₃ -I	3,73 (<i>s</i>)	60,5	C-3 [I]	
3-OCH ₃ -II	3,78 (<i>s</i>)	60,6	C-3 [II]	
5-OH I	12,74 (<i>s</i>)*	-		
5-OH II	12,86 (<i>s</i>)*	-		

*Obtido em DMSO

Esquema 4 - Proposta da biossíntese de Biflavonas: Acoplamento oxidativo



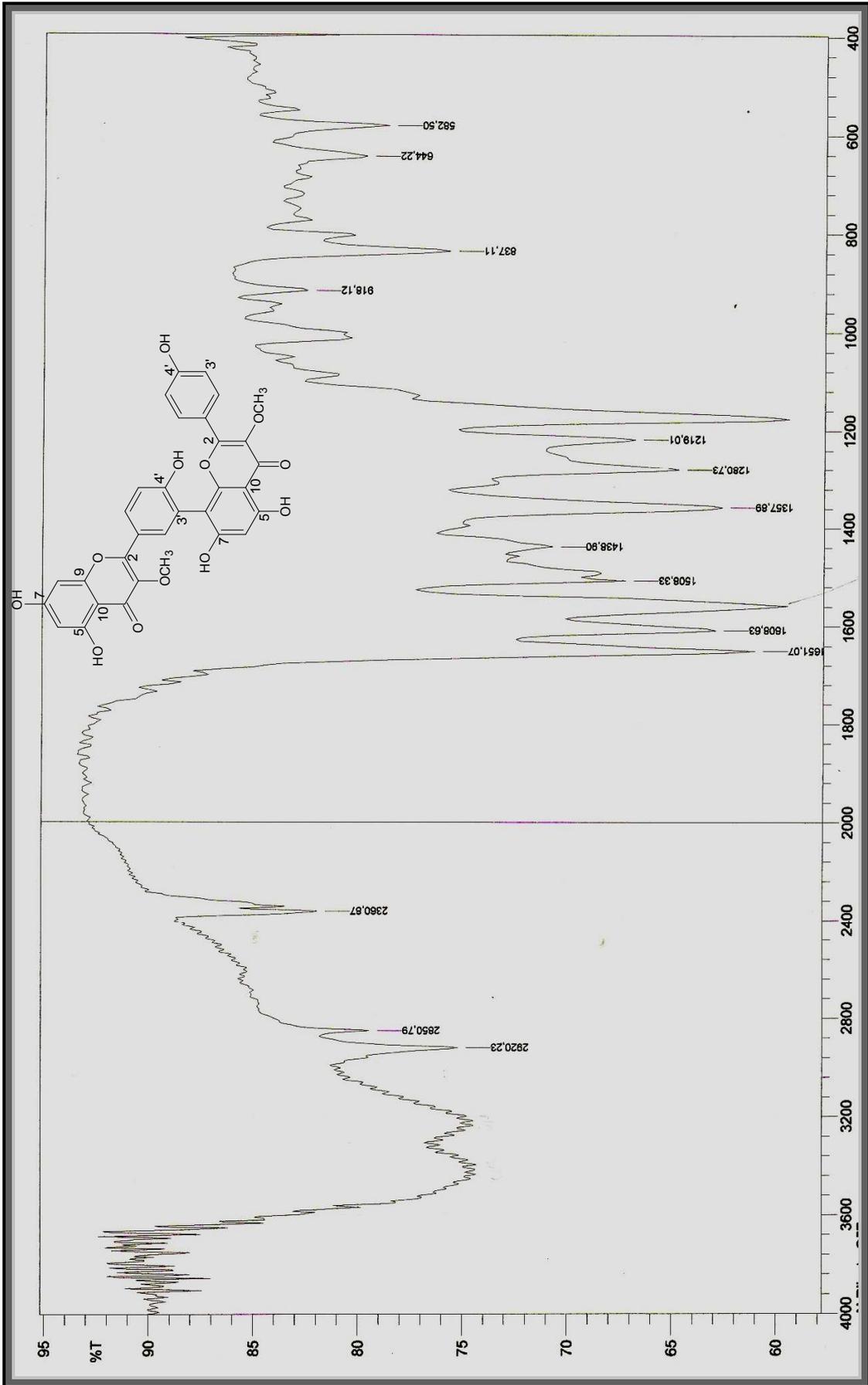


Figura 66. Espectro de IV de Np_5 em pastilhas de KBr

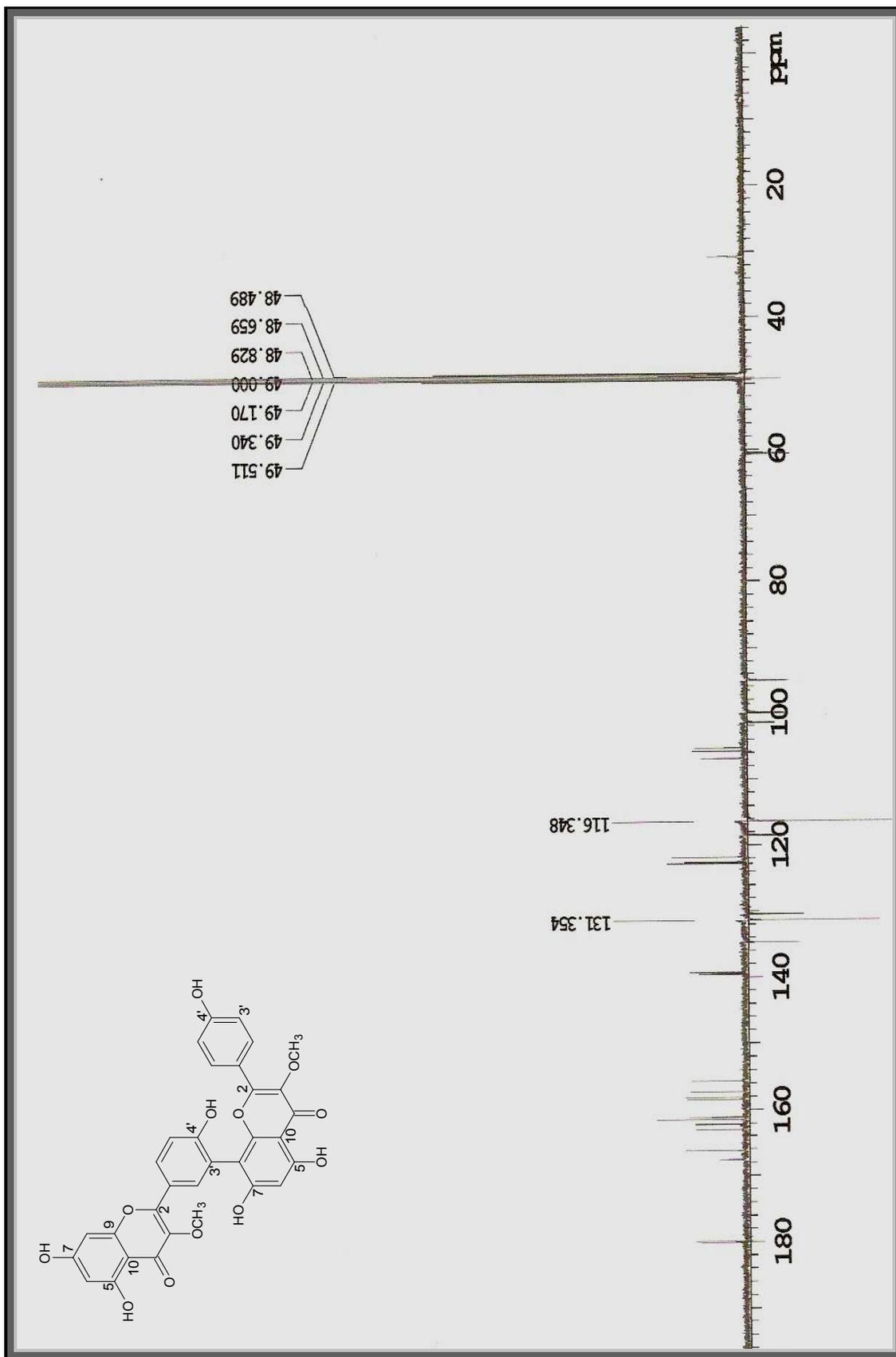


Figura 67. Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_5 em CD_3OD .

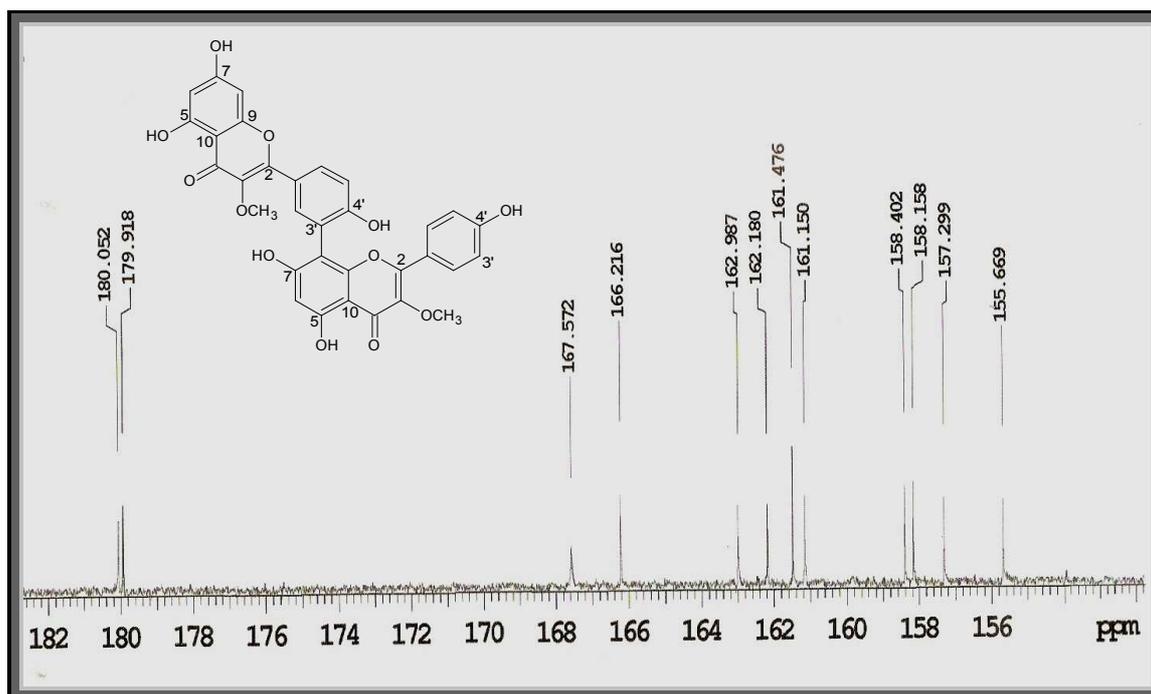


Figura 68. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_5 em CD_3OD na região entre δ_{C} 156 - 182 ppm.

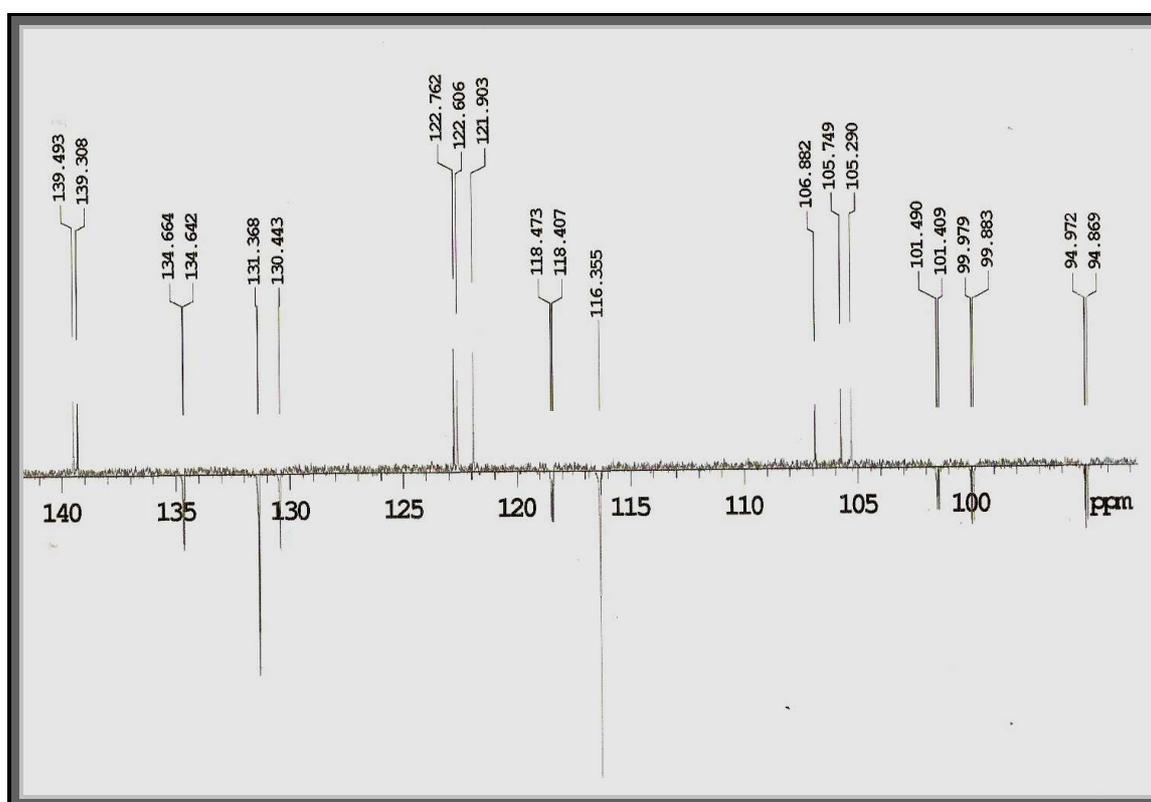


Figura 69. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_5 em CD_3OD na região entre δ_{C} 94 - 139 ppm.

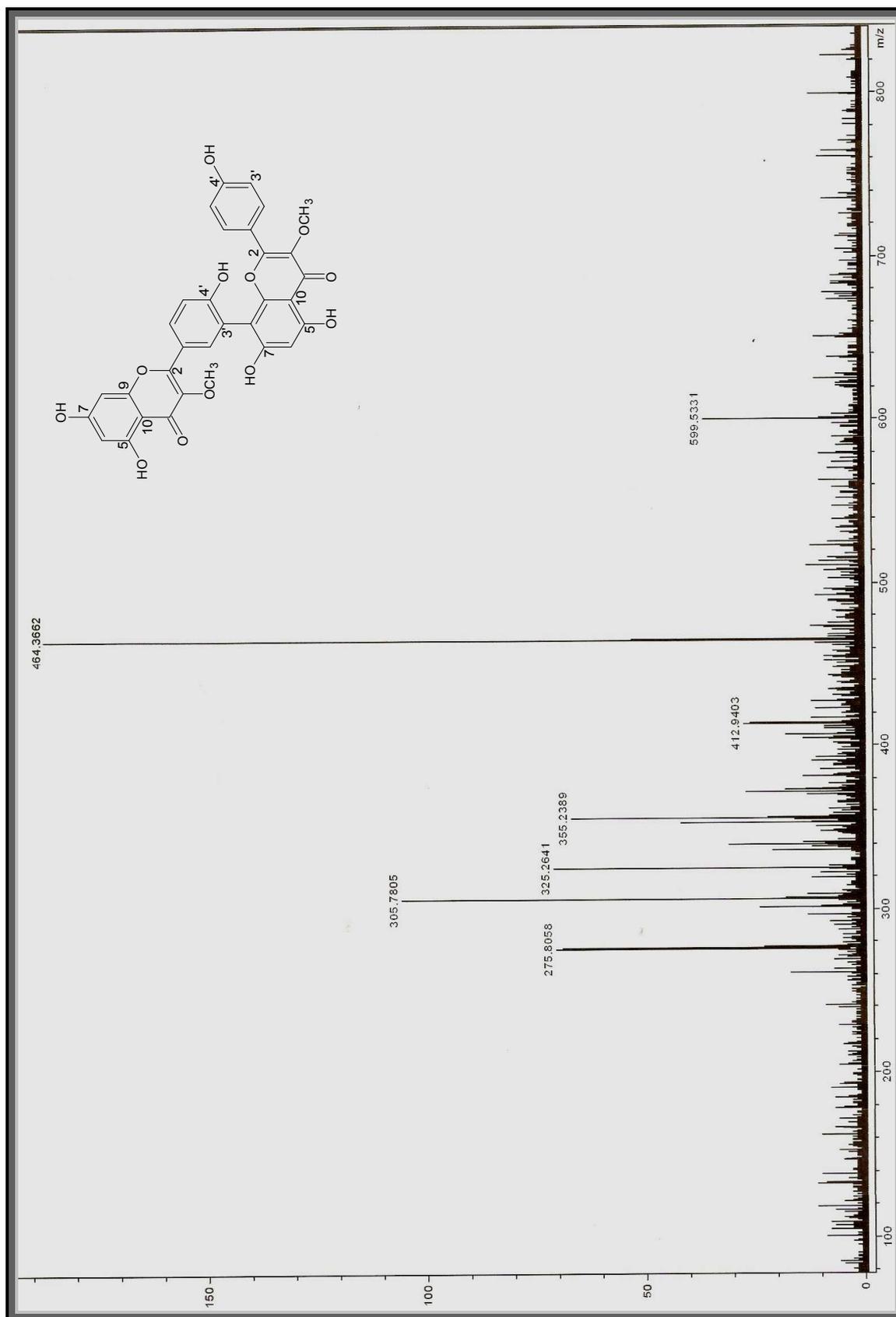
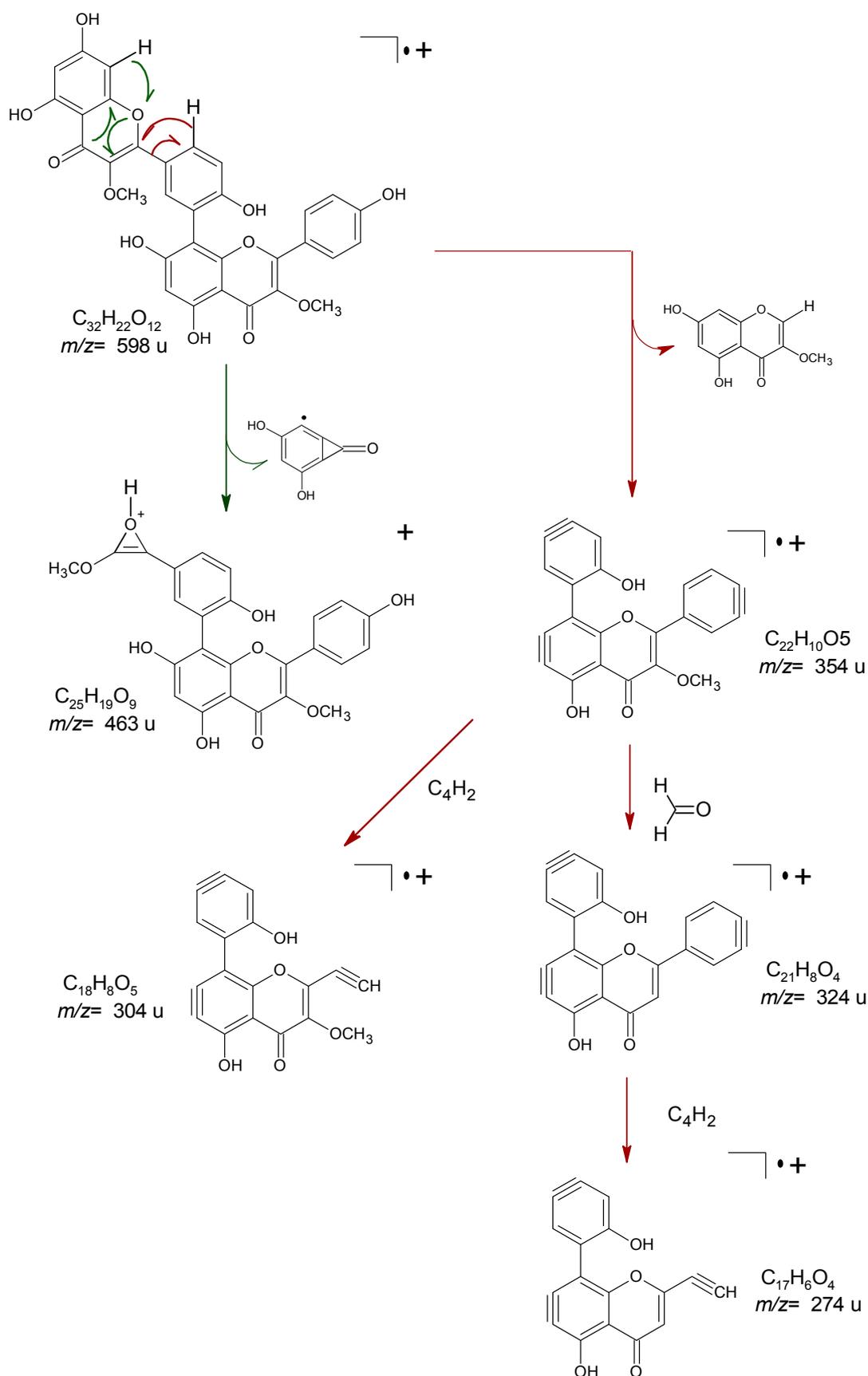


Figura 70. Espectro de massas HR-ESI-MS de Np_5.

Esquema 5 - Proposta de Fragmentação para Np_5em HR-ESI-MS.



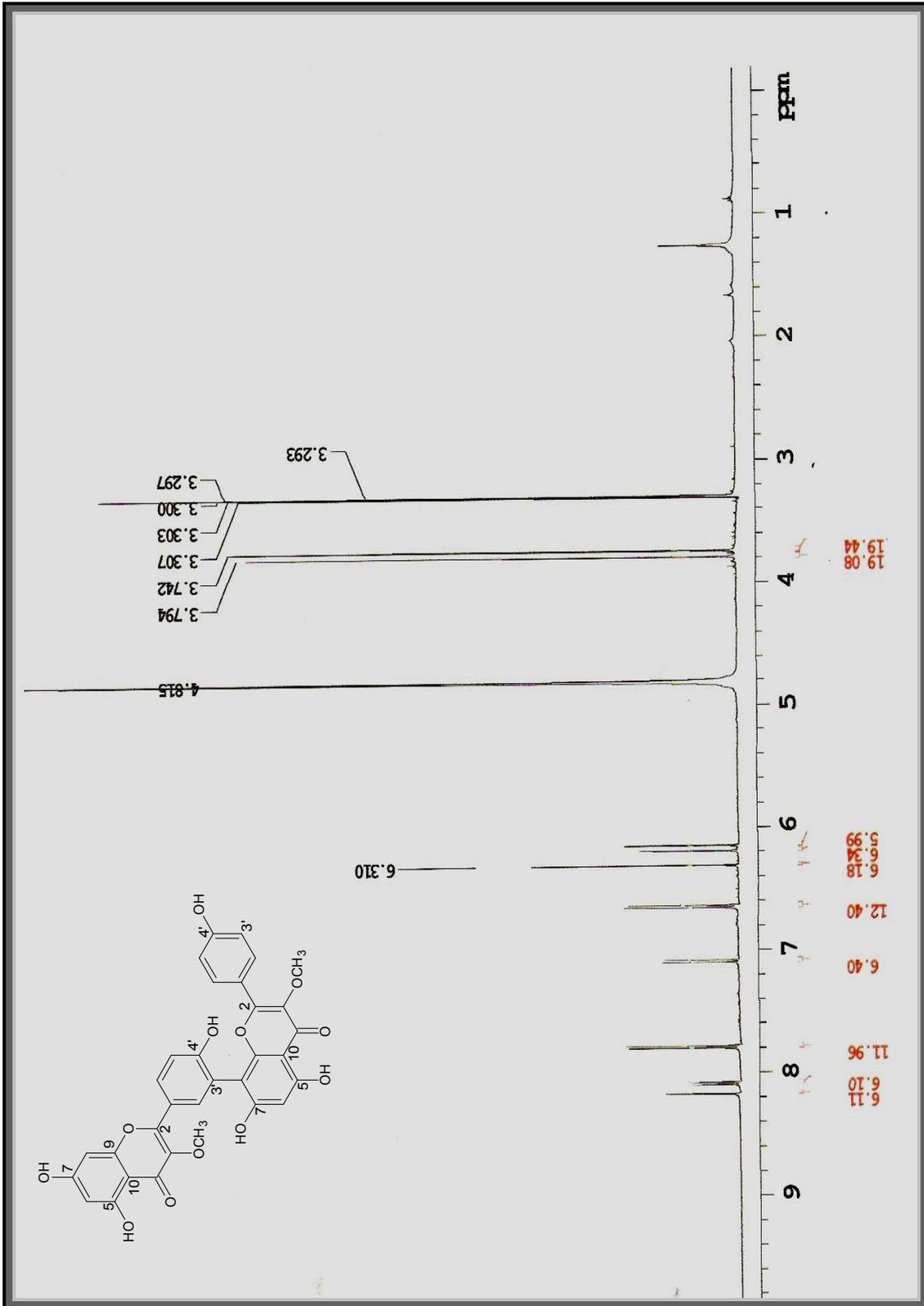


Figura 71. Espectro de RMN ¹H (500 MHz) de Np₅ em CD₃OD.

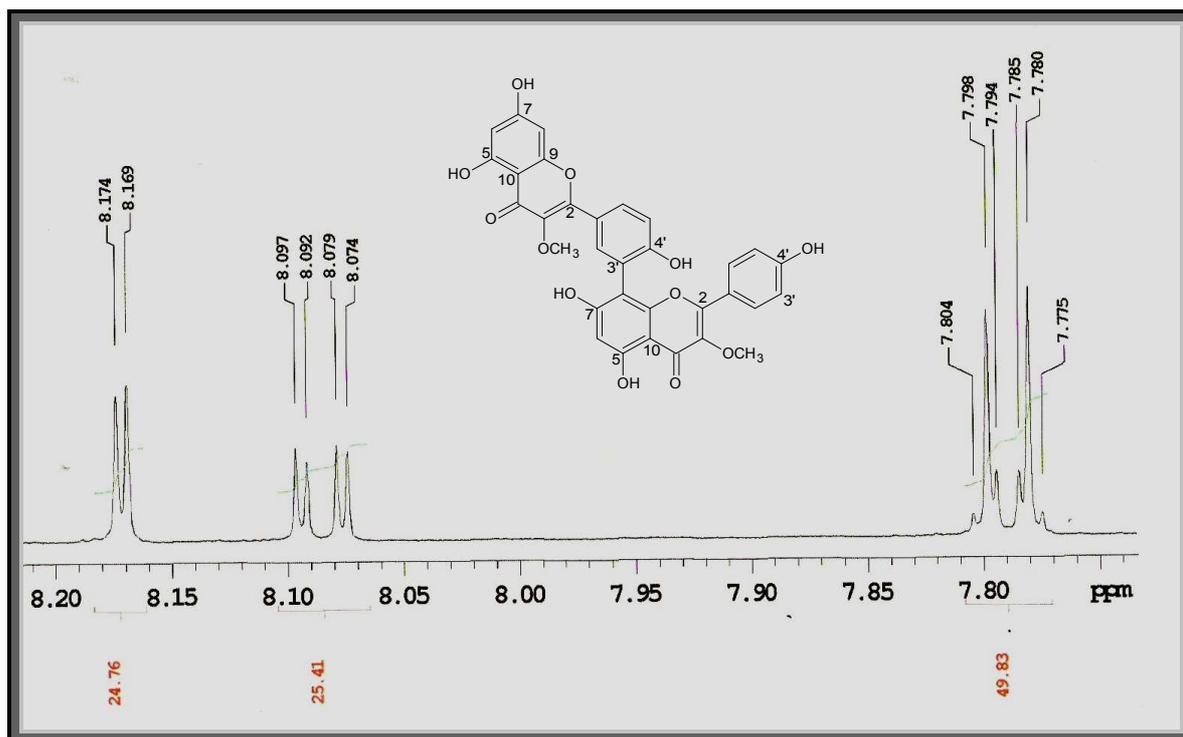


Figura 72. Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz) de Np₅ em CD₃OD na região entre δ_C 7,8- 8,2 ppm



Figura 73. Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz) de Np₅ em CD₃OD na região entre δ_C 6,1- 7,1 ppm

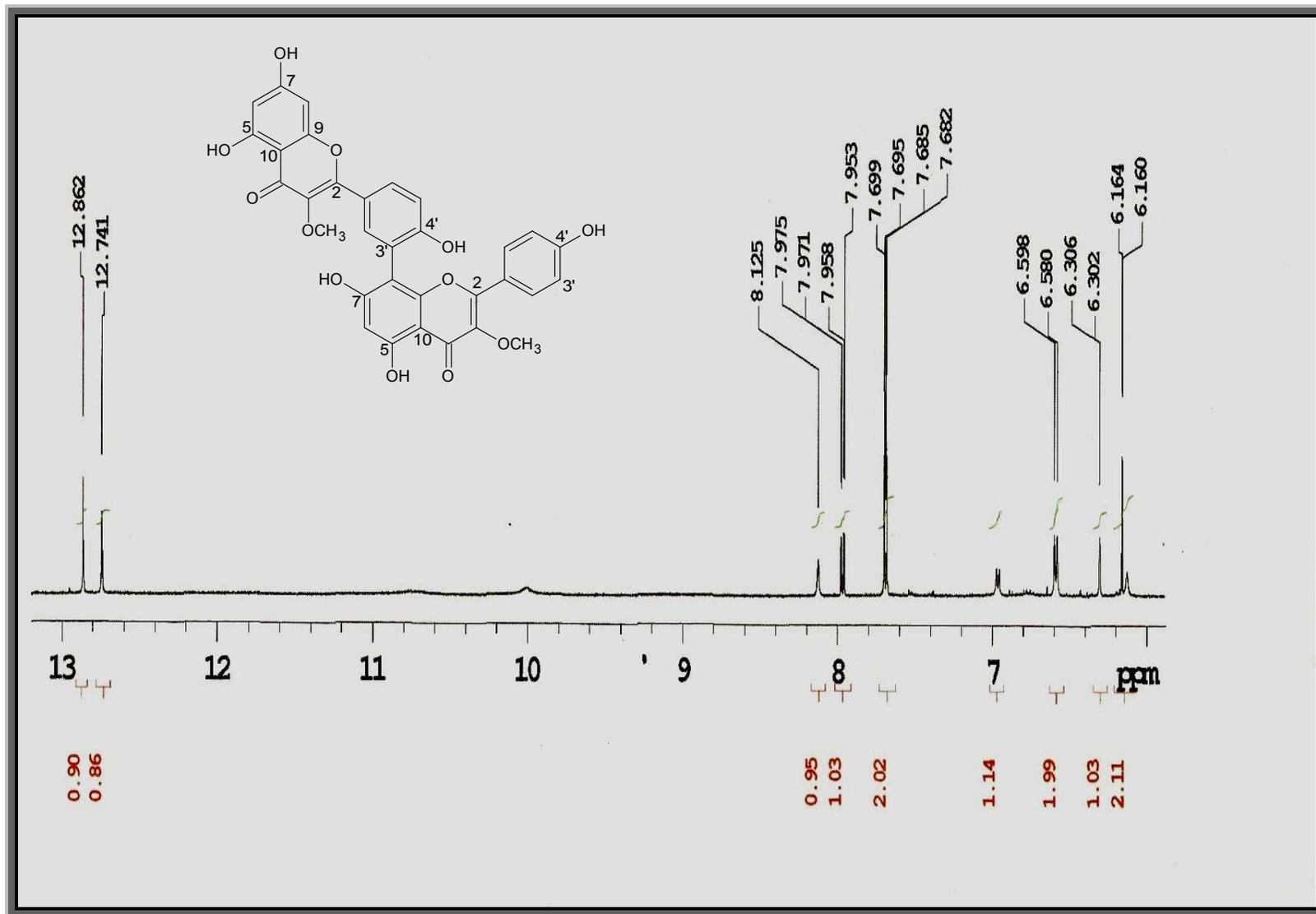


Figura 74. Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz) de Np₅ em DMSO na região entre δ_C 6,0-13,0 ppm.

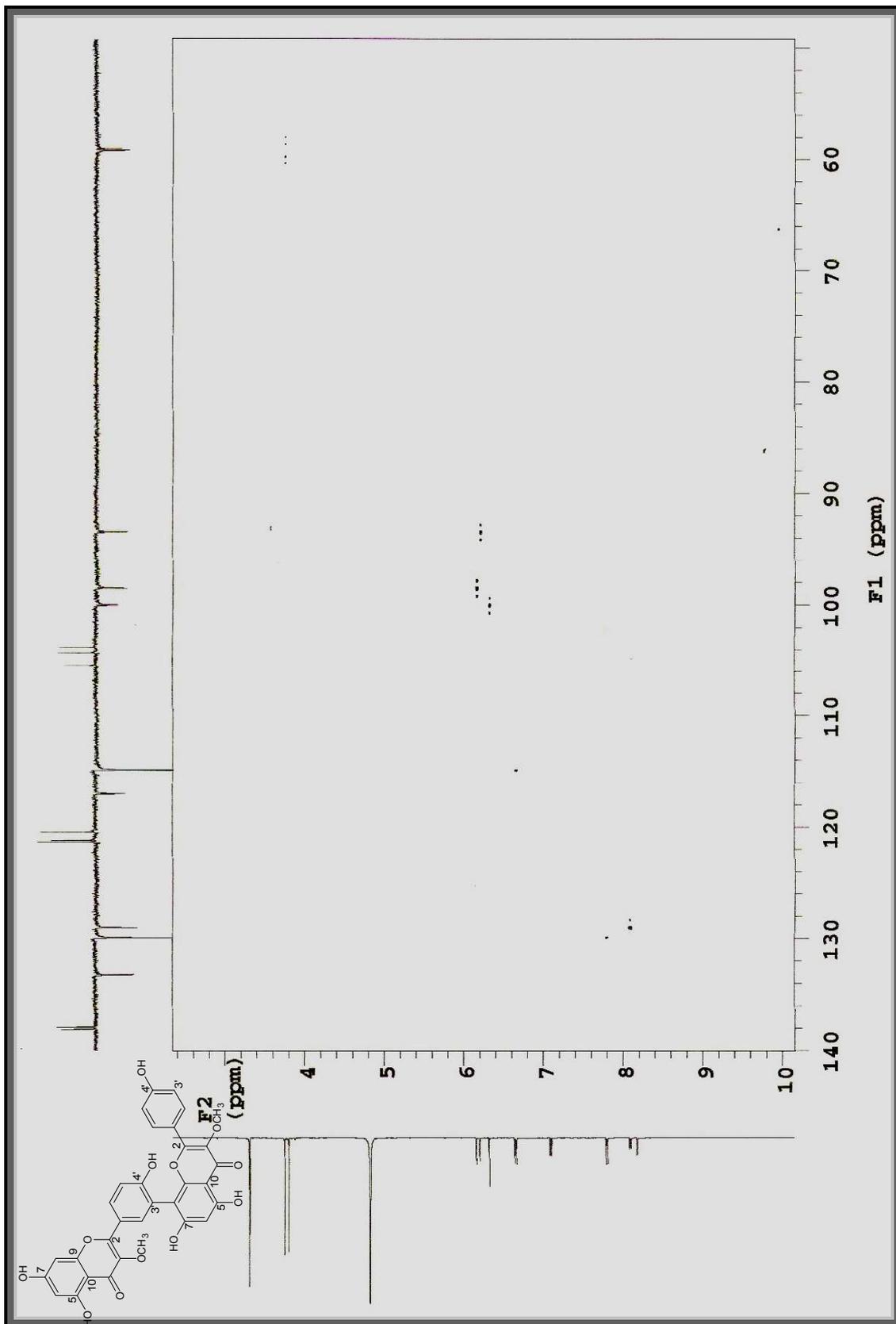


Figura 75. Espectro de RMN ¹H x ¹³C- ¹J_{CH} HSQC (500 MHz) de Np₅ em CD₃OD.

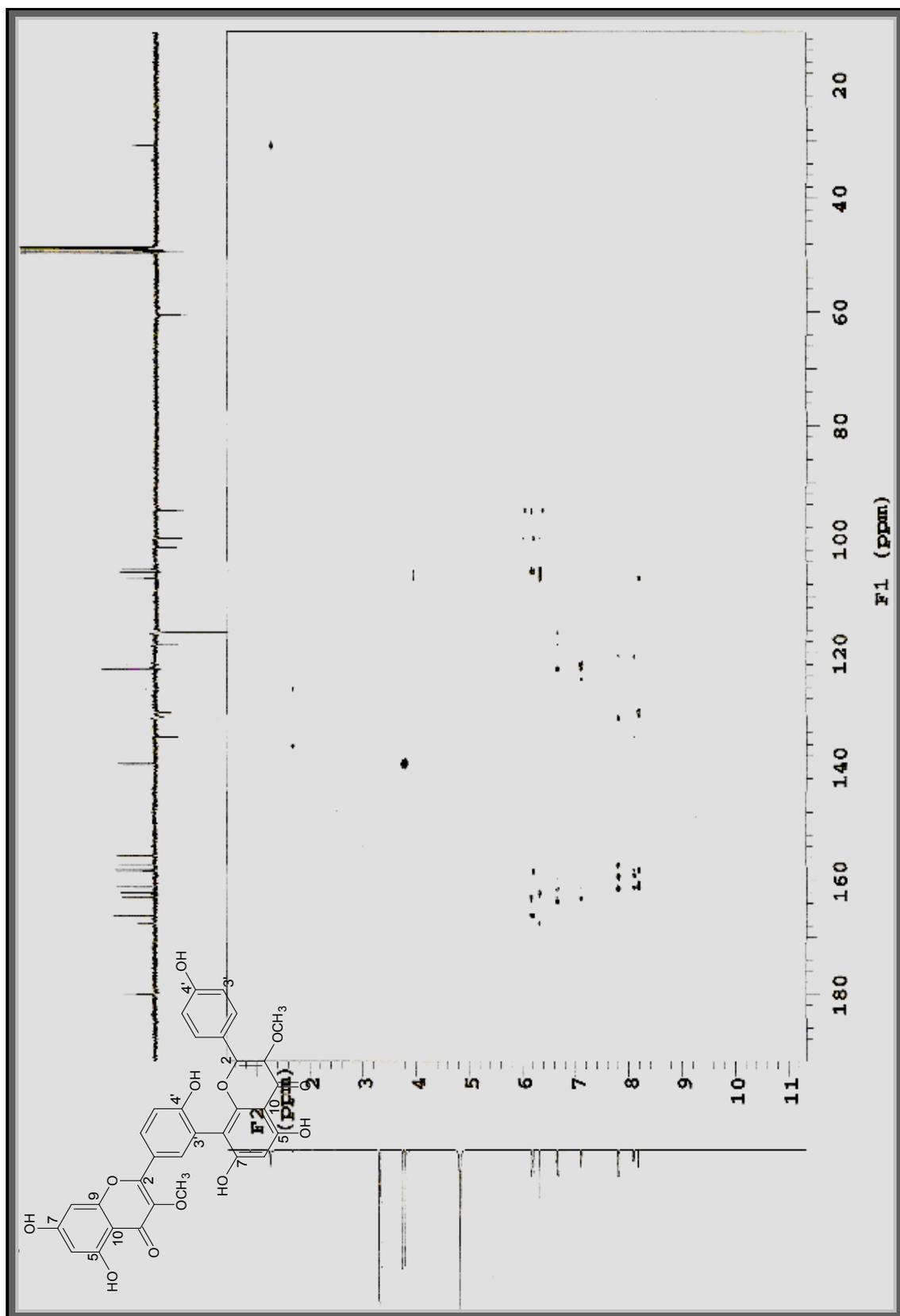


Figura 76. Espectro de RMN ¹H x ¹³C-ⁿJ_{CH} (n=2 e 3) HMBC (500 MHz) de Np₅ em CD₃OD.

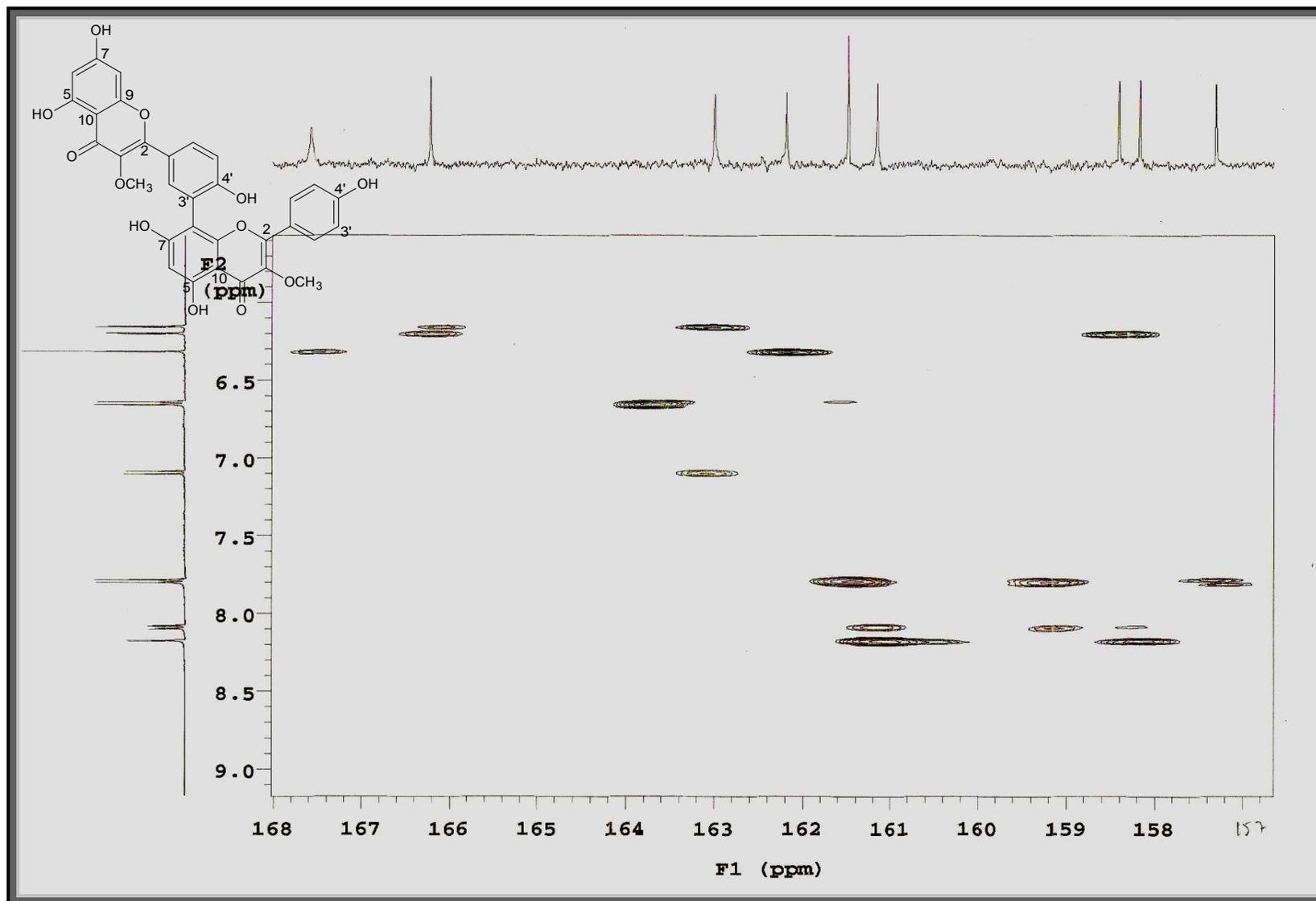


Figura 77. Expansão do espectro de RMN ¹H x ¹³C-ⁿJ_{CH} (n=2 e 3) HMBC (500 MHz) Np₅ em CD₃OD na região entre δ_C 158- 168 ppm.

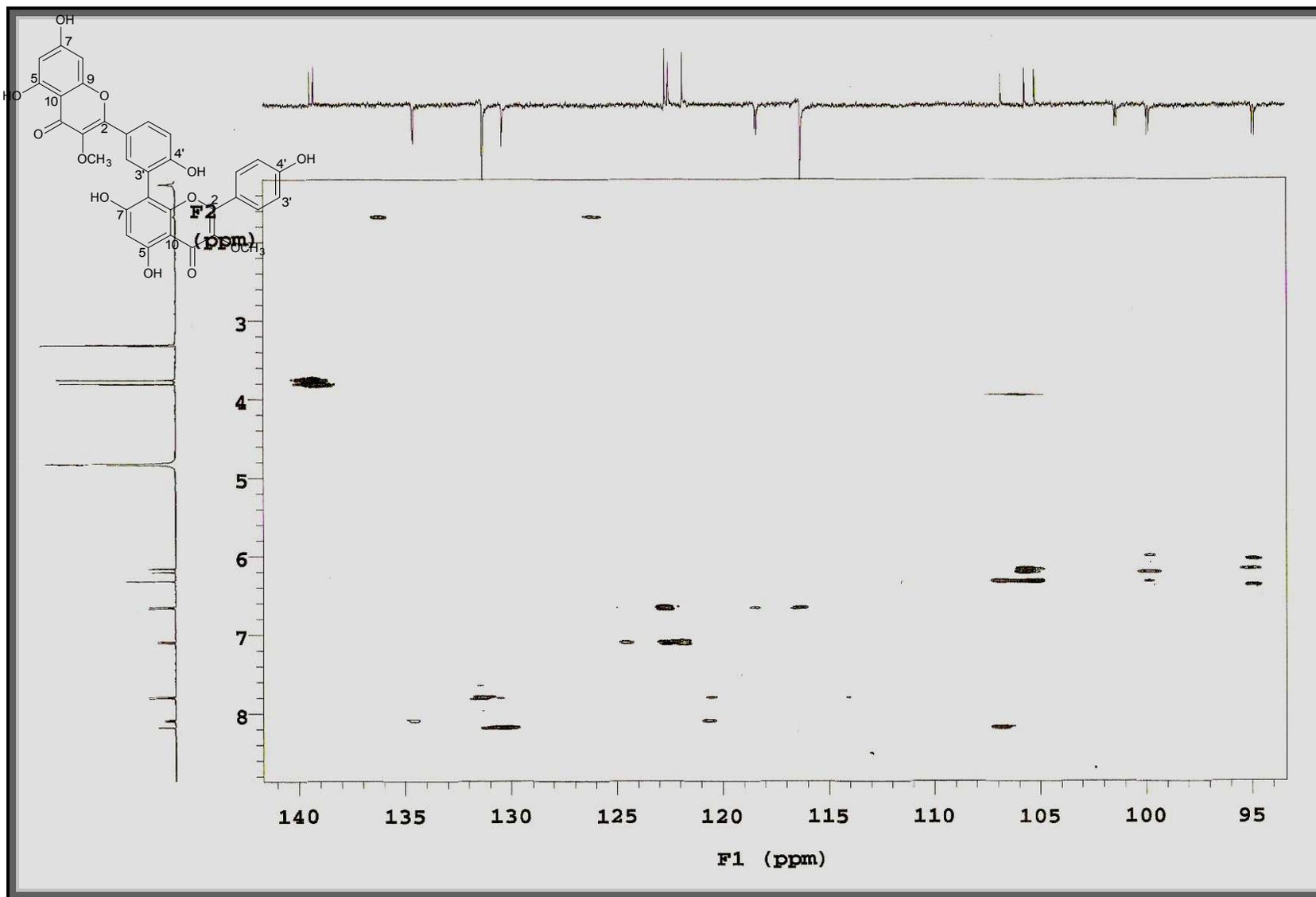


Figura 78. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}-^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) HMBC (500 MHz) Np_5 em CD_3OD na região entre δ_{C} 95- 140 ppm.

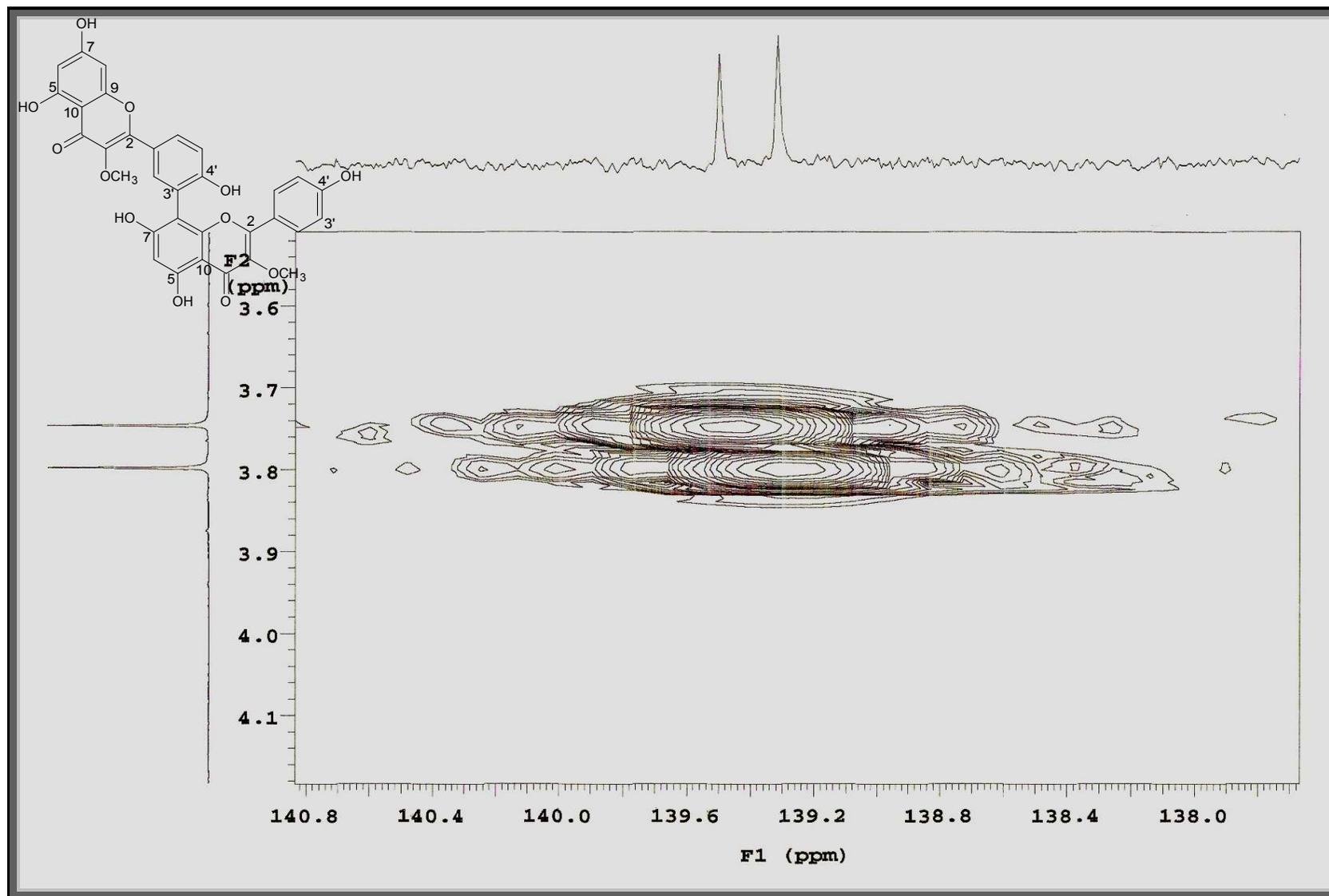


Figura 79. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) HMBC (500 MHz) Np_5 em CD_3OD na região entre δ_{C} 138- 140 ppm.

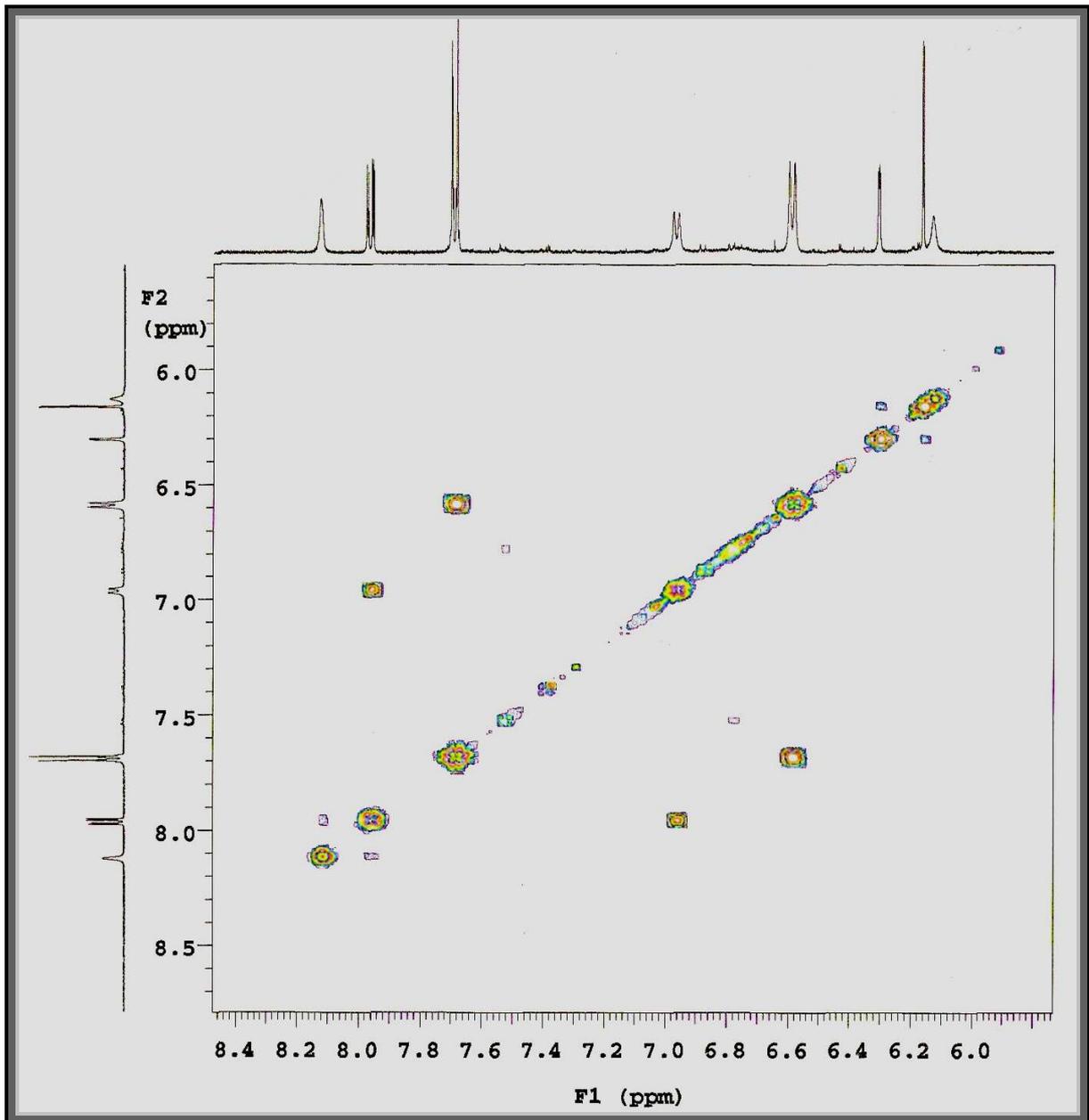
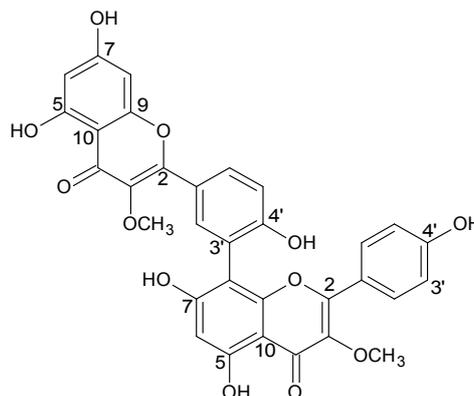


Figura 80. Expansão de espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz) de Np_5 em CD_3OD na região entre δ_{H} 6,0- 8,4 ppm

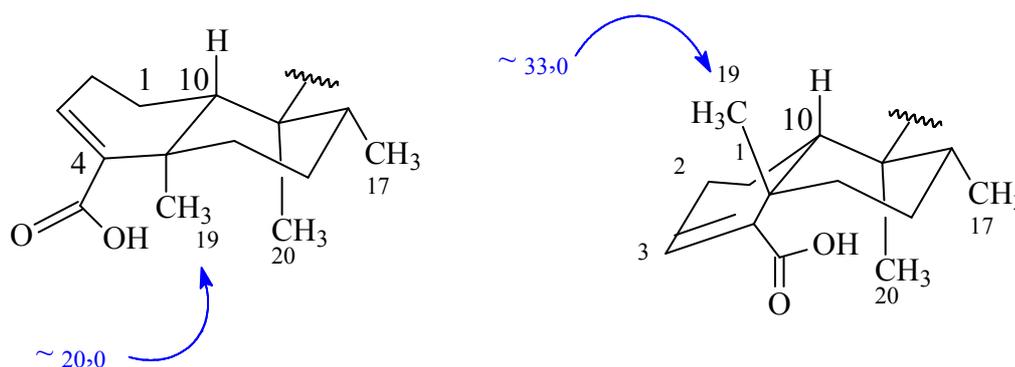


5.4. Identificação estrutural dos constituintes químicos de *Nanuza plicata*:

DITERPENOS

5.4.1 Identificação estrutural de Np_6

A substância codificada como Np_6 foi isolada na forma de um óleo esverdeado. No espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) (Figura 81, p. 110) e suas expansões (Figuras 82 e 83, p. 111) foi possível observar a presença de 25 sinais. Destes, seis foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, quatro a carbonos metínicos, sete a carbonos metilênicos e três a carbonos metílicos. Os sinais em δ_{C} 37,6 (C), 36,3 (CH), 38,7 (CH) e 46,7 (CH), são compatíveis com esqueleto carbônico de diterpenos do tipo clerodano (SANTOS et al., 2007). Ainda nesse espectro observou-se sinais em δ_{C} 70,1 135,0, 143,4 e 174,3 que associados aos dados do espectro de infravermelho (Figura 84, p. 112) corroboram com a presença de grupos funcionais com bandas de absorções em 3433 referente a hidroxila, 1751 de carbonila e, 1678 e 1458 cm^{-1} referentes a anel γ -lactônico α,β insaturado. Um aspecto relevante em RMN ^{13}C de diterpenos clerodanos é a determinação da estereoquímica dos centros quirais C-5, C-8, C-9 e C-10. Portanto alguns aspectos foram investigados. O primeiro deles se refere à configuração da fusão dos anéis A/B na decalina que pode ser *cis* ou *trans*, sendo utilizado o deslocamento químico do carbono da metila CH_3 -19 para diferencia-los. Na fusão *cis* o δ_{C} CH_3 -19 é $\sim 33,0$ enquanto que na *trans* é $\sim 20,0$ (SANTOS et al., 2007), como mostrado abaixo:



No espectro de RMN ^{13}C de Np_6 o sinal em δ_{C} 20,5 foi atribuído ao CH_3 -19 e é condizente com fusão dos anéis A/B em configuração *trans*-decalina. O segundo aspecto é a possibilidade de diferenciar se o CH_3 -17 e o CH_3 -20 os quais podem estar *cis* ou *trans* entre si. Em diterpenos clerodanos, quando as metilas CH_3 -17 e CH_3 -20 estão em configuração *cis*, o deslocamento químico do CH_3 -20 é $\sim 18,0$, enquanto que em configuração *trans* o

deslocamento químico é em $\sim 26,0$ (SANTOS et al., 2007). O sinal observado no RMN ^{13}C de Np_6 em 18,1 foi atribuído ao CH_3 -20 e é condizente com uma configuração *cis* entre CH_3 -17 e CH_3 -20.

No espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Figura 85, p. 113) e suas expansões (Figura 86 e 87, p. 114) foi possível observar dois sinais em δ_{H} 7,06 (sl) e 6,82 (sl), característico de prótons olefínicos conjugados com carbonila. Observou-se também, três sinais referentes a metilas sendo eles 0,85 (d), 1,27 (s) e 0,75 (s) que corroboraram com esqueleto de diterpenos clerodanos e, ainda, um sinal em 4,79 (s) com integração para dois hidrogênios característicos dos prótons oximetilênicos do anel lactônico. Um dado relevante desse espectro é o deslocamento em 0,75 (s) que por HMQC (Figura 90, p. 116) (Tabela 7, p.103) foi atribuído ao CH_3 -20. Esse deslocamento é compatível com diterpenos clerodanos da série *ent*, pois quando da série *normal* esses prótons sofrem proteção e absorvem em $\sim 0,57$. Sinais múltiplos observados entre 1,70 e 2,20 foram atribuídos aos demais hidrogênios alifáticos.

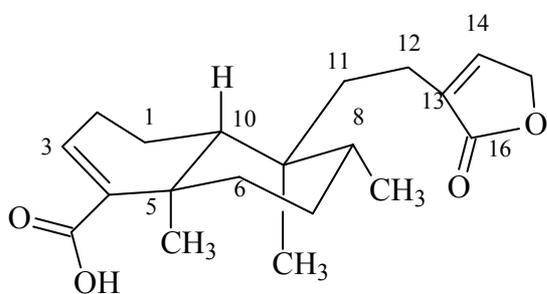
No espectro de HMBC (Figura 90 e 91, p. 110 e 111) foi possível observar sinais de correlações entre 1,27 (CH_3 -19) com 46,7 (CH-10), 075 (CH_3 -20) com 38,7 (C-9) e 46,7 (C-10), por sua vez o sinal em 36,3 foi atribuído a CH-8. Correlações observadas do sinal em 4,79 (CH_2 -15) com 143,4 (CH-14) e com 135,0 (C-13), definem os deslocamentos químicos do anel lactônico. A correlação do sinal em 1,27 (CH_3 -19) com 141,1 e 36,0 confirma o primeiro deslocamento para C-4 e o segundo para CH_2 -6, corrigindo os valores encontrados na literatura (RIVERA et al., 1988) para CH_2 -11, o qual nesta apresenta-se mais desprotegido que C-6. Essa inversão é reforçada pela correlação do sinal em 1,35 (CH-10) com 35,7 (CH_2 -11). Da mesma forma a correlação observada entre 0,85 (CH_3 -17) e 27,2 (CH_2 -7) corrige essa atribuição que anteriormente foi feita à CH_2 -2.

No espectro de COSY (Figura 92, p.112) e suas expansões (Figuras 93 e 94, p. 113 e 114) foi possível observar as correlações do sinal em 0,85 (CH_3 -17) com 1,50 (CH-8) e deste com 2,25 (CH_2 -7). As demais correlações estão compiladas a Tabela 7, p. 109.

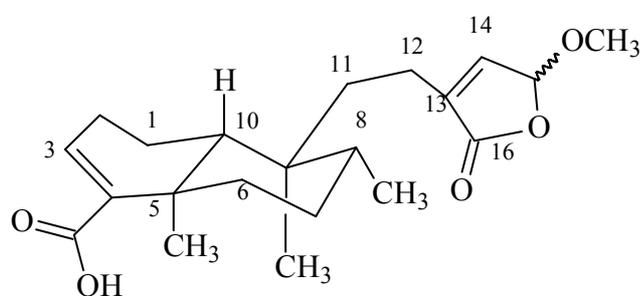
A análise desses dados, bem como sua comparação com a literatura permitiu concluir que Np_6 tratava-se do ácido patagônico, um diterpeno do tipo clerodano. Este está sendo relatado pela primeira vez no gênero *Nanuza* e teve seus dados de RMN inequivocamente assinalados, neste trabalho.

Analisando o espectro de RMN ^{13}C detalhadamente percebe-se a existência de sinais a mais, sendo eles em 170,7, 141,2, 139,3, 102,4 e 19,1 sugerindo que Np_6 pode tratar-se de uma mistura de diterpenos clerodanos. O sinal em 102,4 sugeriu tratar-se de um CH vizinho a

dois oxigênios (AHMAD, et al., 2005), indicando a inserção de uma função oxigenada no anel lactônico. No espectro de RMN ^1H o sinal em 5,72 é compatível com hidrogênio oximetínico e o sinal em 3,55 corrobora com a presença de grupos metoxilas. No HMBC observou-se uma correlação do sinal em 3,55 com 102,4 reforçando a inserção do grupo metoxi em C-15. Assim Np_6 trata-se de uma mistura composta por ácido patagônico (6a) e ácido clerodan-15-metoxi-3,13-dien-15,16-olideo-8-óico (6b). Através dos valores das integrais foi possível calcular a porcentagem de cada diterpeno na mistura estando o ácido patagônico na proporção de 82,04 % e ácido clerodan-15-metoxi-3,13-dien-15,16-olideo-8-óico, 17,95 %.



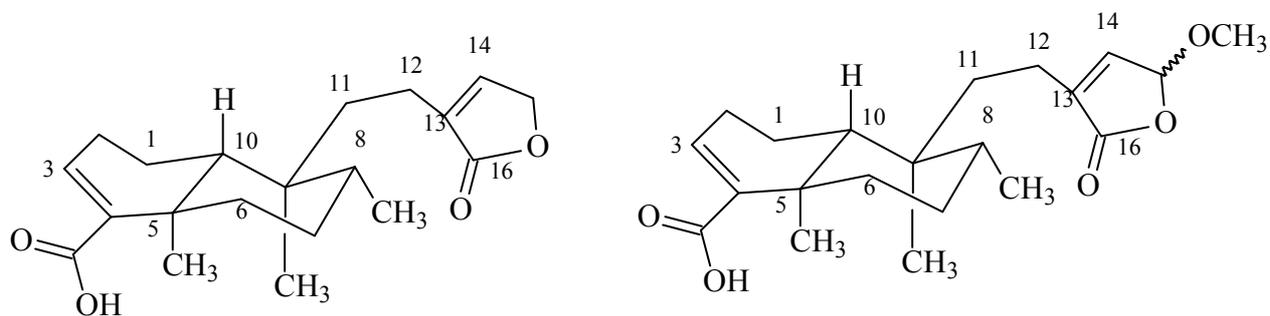
6a: Ácido clerodan- 3,13-dien-15,16-olideo-8-óico (ácido patagônico).



6b: Ácido clerodan- 15-metoxi-3,13-dien-15,16-olideo-8-óico.

Tabela 7. Dados de RMN 1H (500 MHz) e ¹³C(125 MHz) 1D e 2D de Np_6a e Np-6b em CDCl₃

C	HMQC Np_6a		Np-6a		Ac. Patagônico*	Np-6b
	δ _C	δ _H	HMBC	COSY	¹³ C	¹³ C
1	17,4	1,70 (m)	C-3	H-2	17,6	17,4
2	27,2	1,45 (m)			27,4	27,2
3	140,1	6,81 (sl)			140,2	139,3
4	141,1	-----			141,6	141,2
5	37,4	-----			37,8	37,4
6	36,0	1,43 e 2,40 (m)		H-7	36,0	36,0
7	27,2	2,25 (m)		H-8	27,6	27,2
8	36,3	1,50 (m)		H-17	36,5	36,3
9	38,7	-----			39,0	38,7
10	46,7	1,35 (m)			47,0	46,7
11	35,7	1,19 e 2,40 (m)		H-11	36,3	35,7
12	19,0	2,05 e 2,20 (m)			19,3	19,1
13	135,0	-----			135,2	135,0
14	143,4	7,06 (sl)			143,6	143,4
15	70,1	4,79 (s)	C-13, C-14		70,2	102,4
16	174,3	-----			174,3	170,7
17	15,8	0,85 (m)	C-7, C-8, C-9		16,0	15,8
18	174,3	-----			174,4	171,0
19	20,5	1,27 (s)	C-4, C-5, C-10		20,7	20,5
20	18,1	0,75 (s)			18,3	18,1
OCH ₃	-----	-----			-----	55,3

* RIVERA et al., 1988, (CDCl₃)

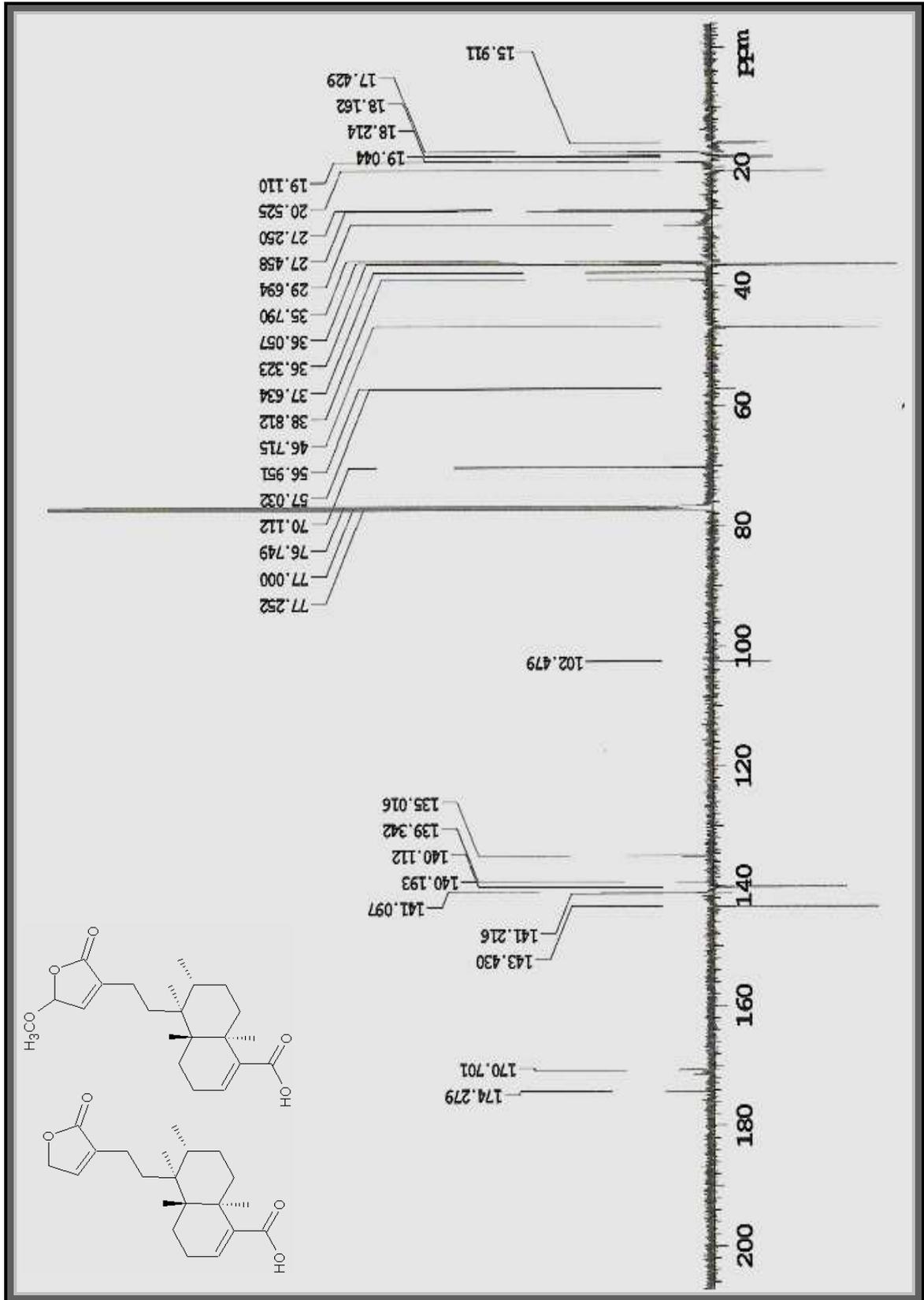


Figura 81. Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np₆ em CDCl_3 .

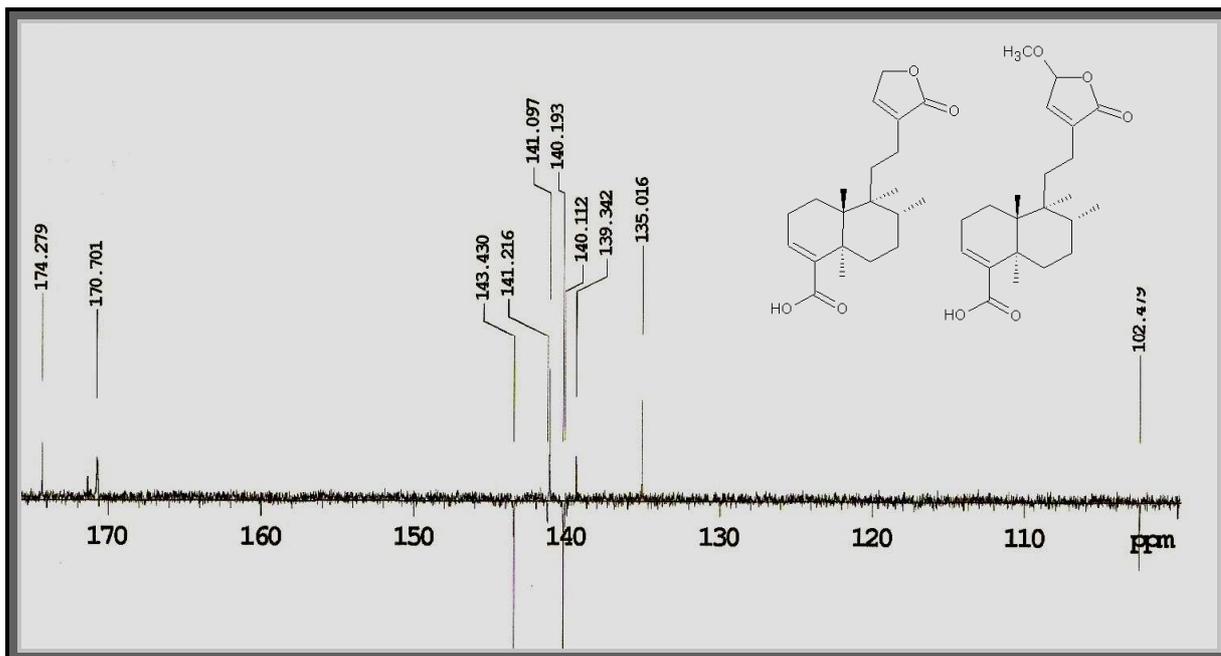


Figura 82. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_6 em CDCl_3 na região entre δ_{C} 110- 175 ppm

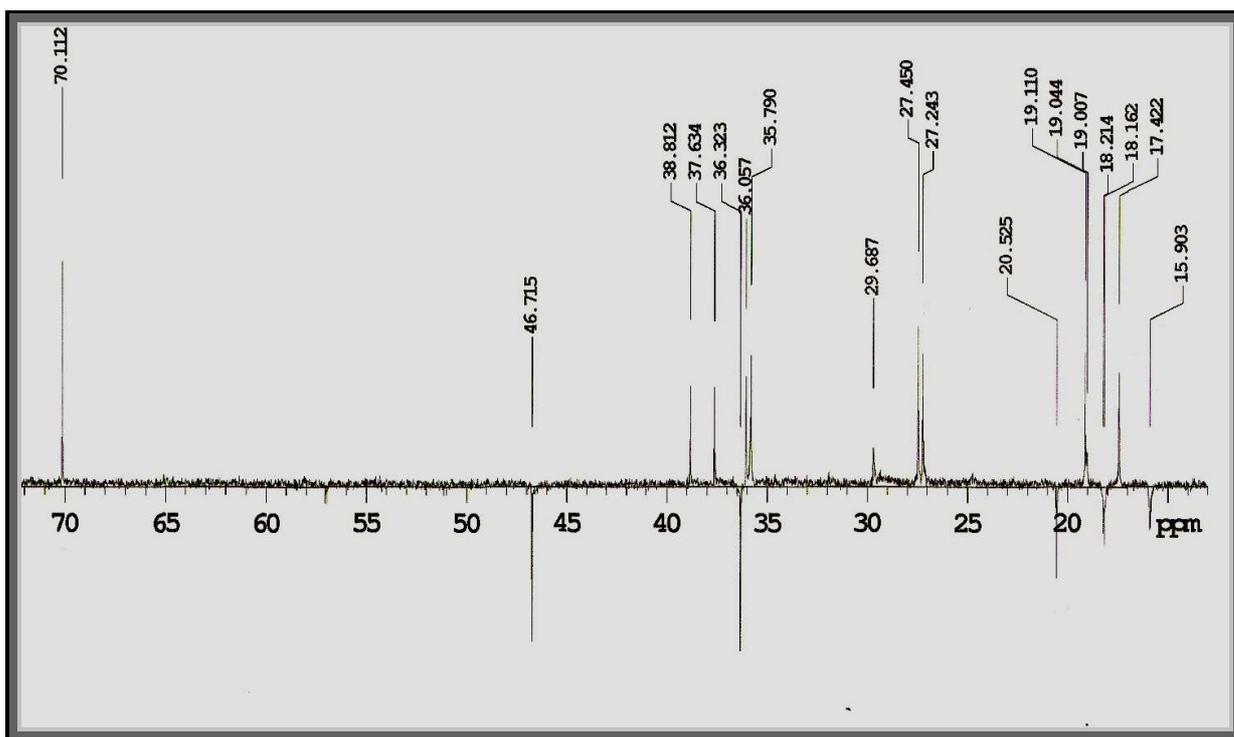


Figura 83. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz) de Np_6 em CDCl_3 na região entre δ_{C} 15- 70 ppm

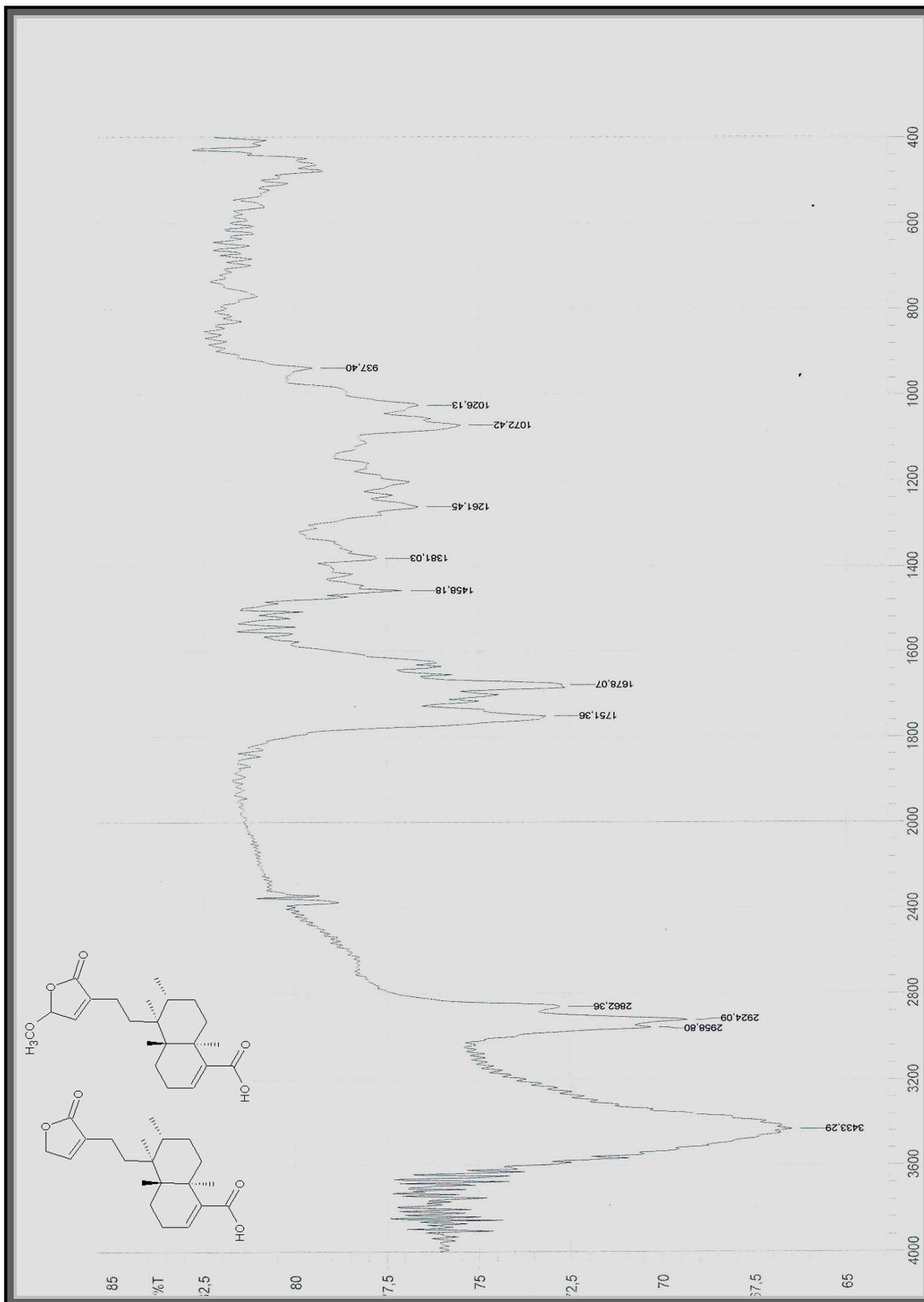


Figura 84. Espectro de IV de Np_6 em pastilhas de KBr

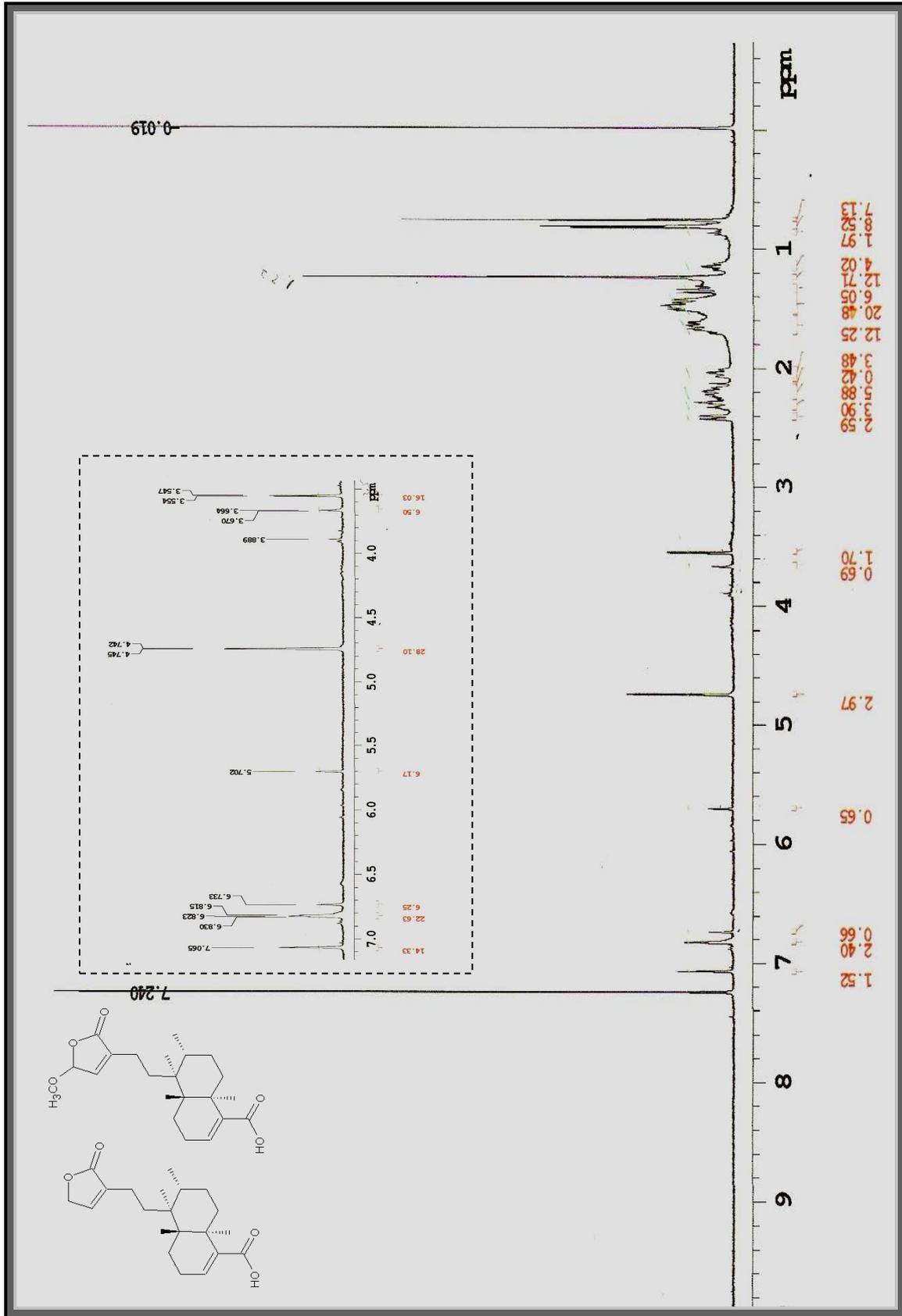


Figura 85. Espectro de RMN ¹H (500 MHz) de Np₆ em CDCl₃. Em destaque, expansão na região entre δ_H 4,0 - 7,0 ppm.

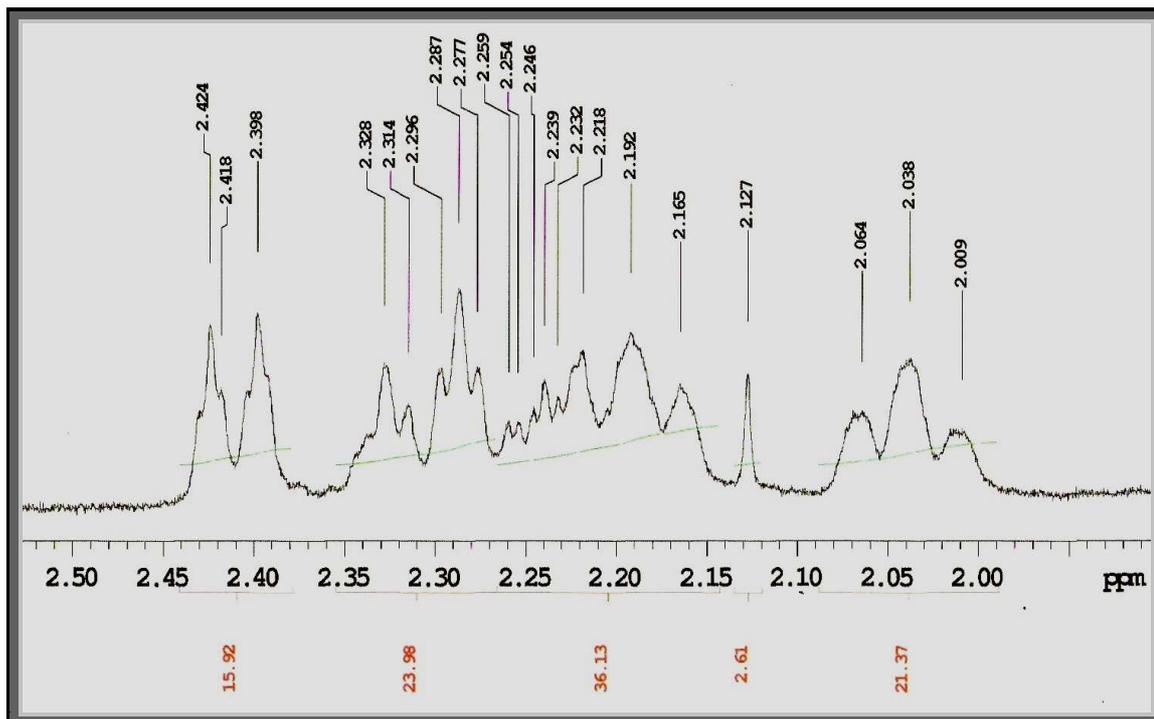


Figura 86. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Np_6 em CDCl_3 na região entre δ_{C} 2,0- 2,5 ppm.

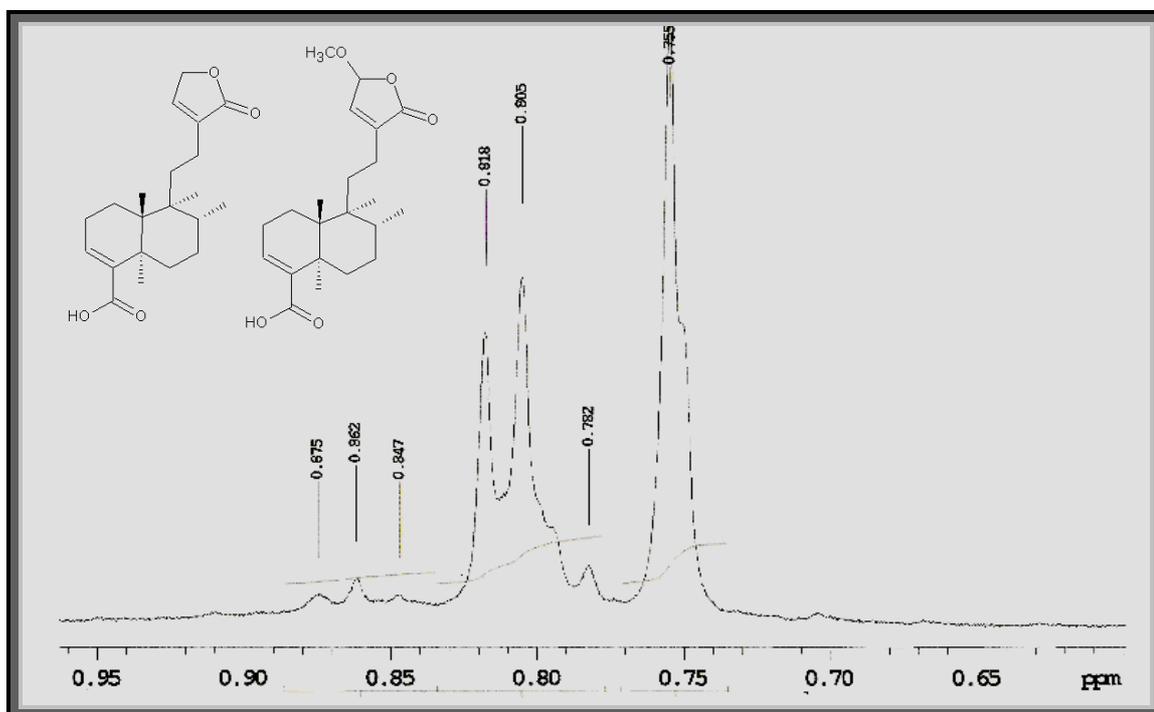


Figura 87. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz) de Np_6 em CDCl_3 na região entre δ_{C} 0,65- 0,95 ppm.

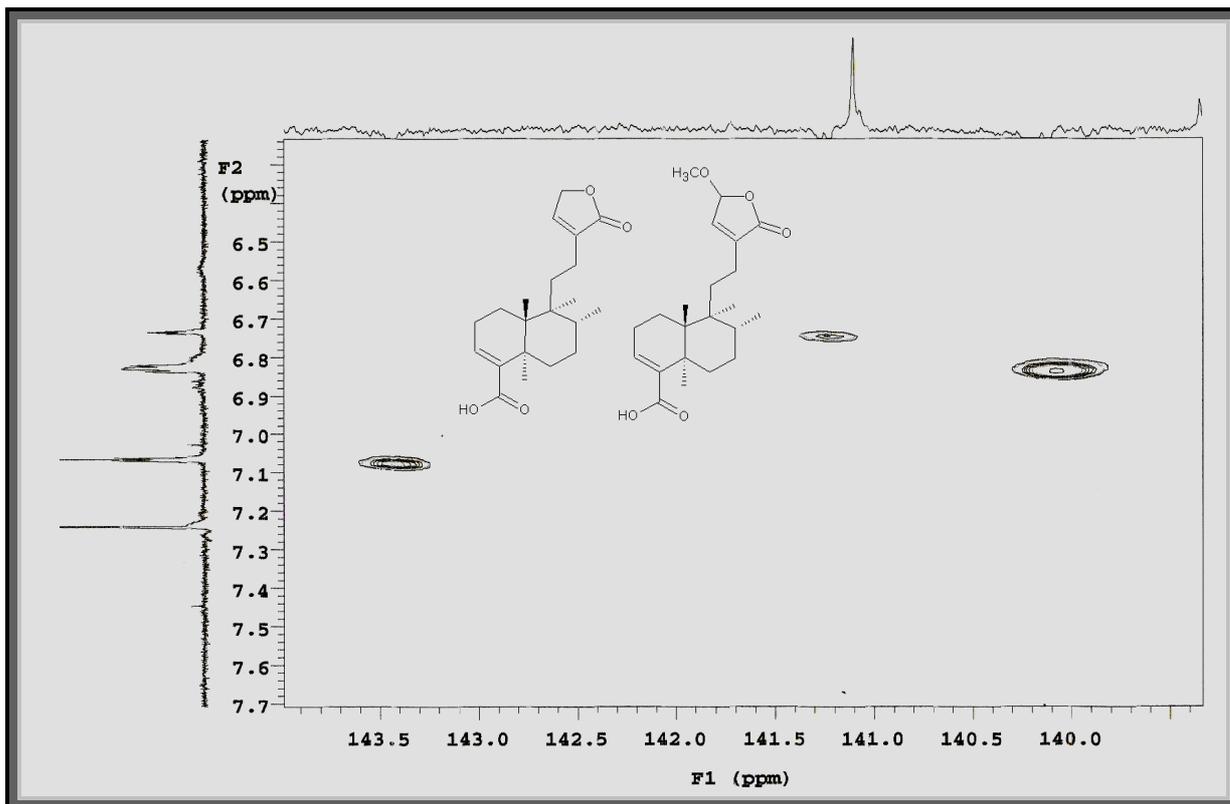


Figura 88. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ HMQC (500 MHz) de Np_6 em CDCl_3 na região entre δ_{C} 140- 143 ppm.

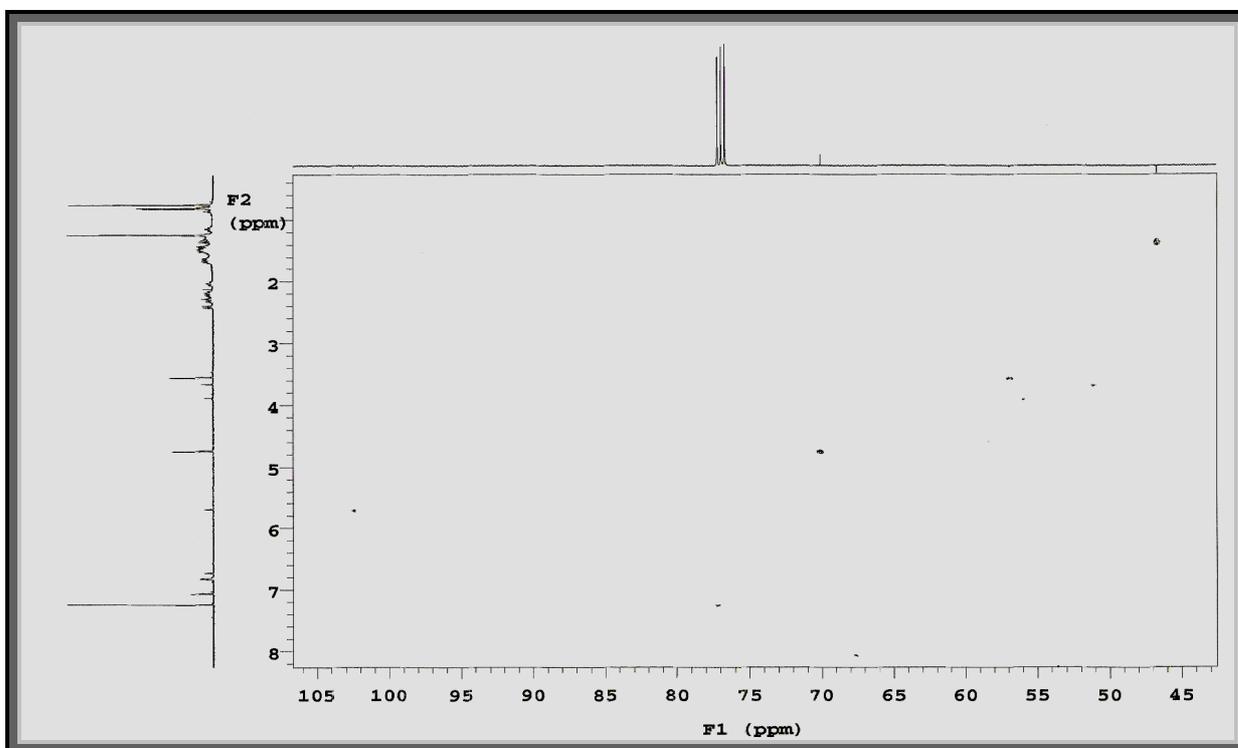


Figura 89. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ HMQC (500 MHz) de Np_6 em CDCl_3 na região entre δ_{C} 45- 105 ppm.

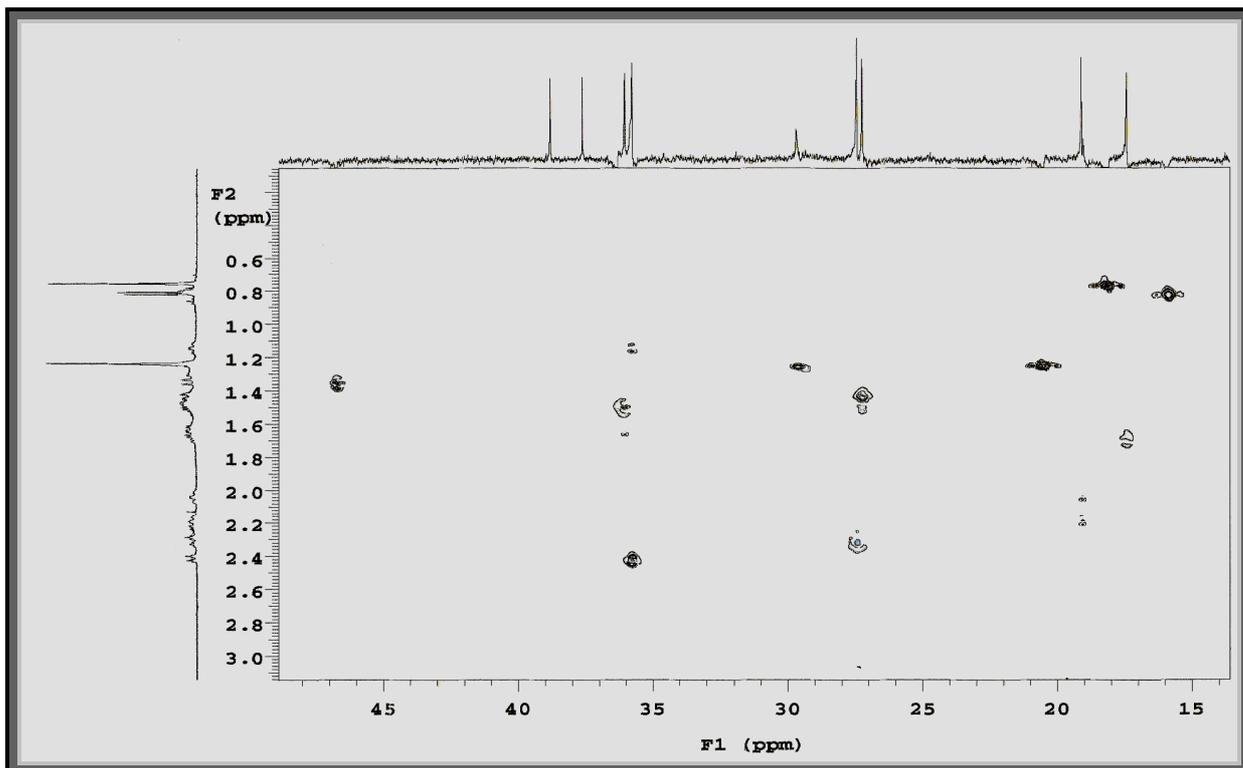


Figura 90. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^1J_{\text{CH}}$ HMQC (500 MHz) de Np_6 em CDCl_3 na região entre δ_{C} 15- 45 ppm.

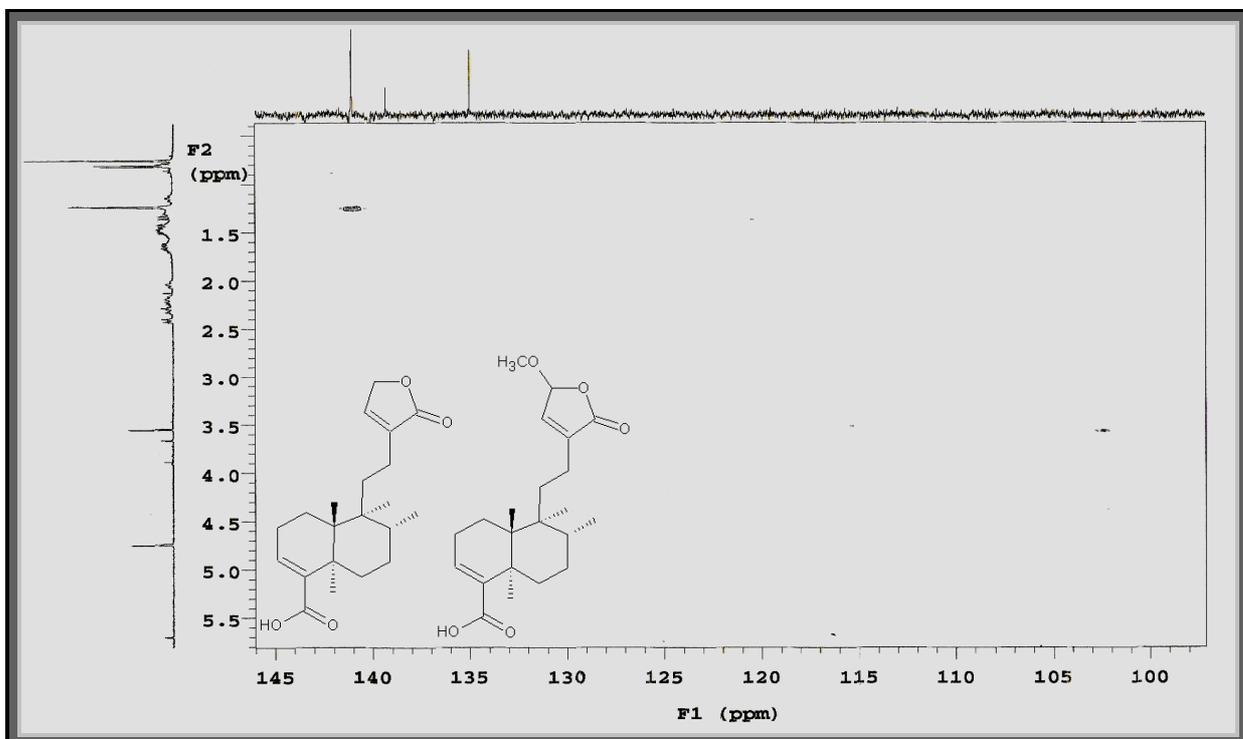


Figura 91. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^nJ_{\text{CH}}$ (n=2 e 3) HMBC (500 MHz) de Np_6 em CDCl_3 na região entre δ_{C} .100- 145 ppm.

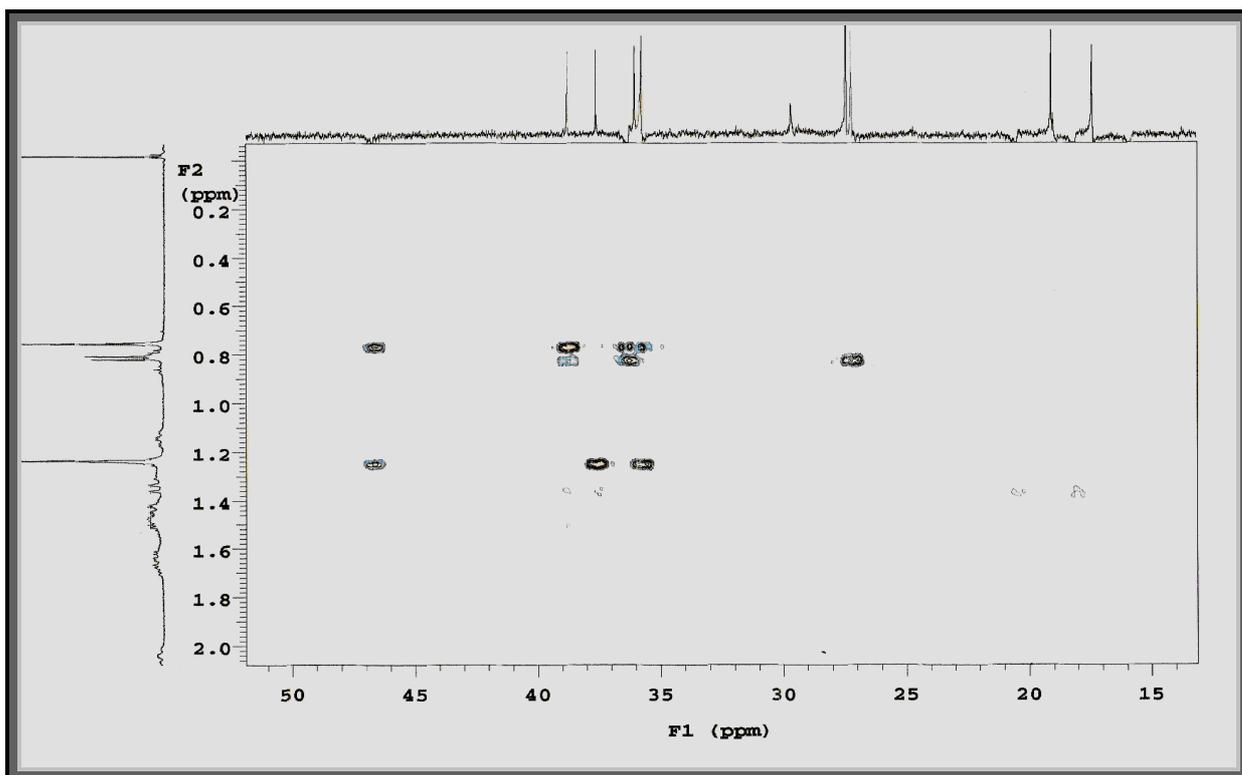
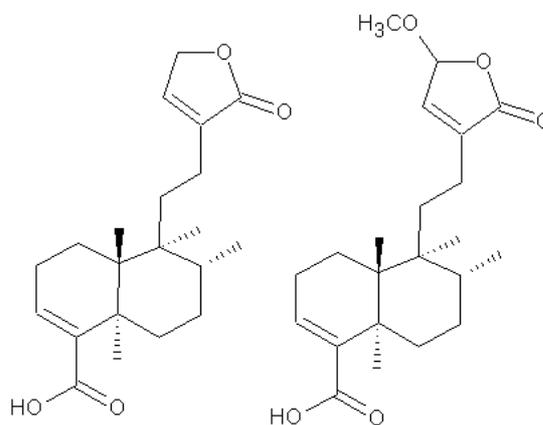


Figura 92. Expansão do espectro de RMN $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ - $^n\text{J}_{\text{CH}}$ ($n=2$ e 3) HMBC (500 MHz) de Np_6 em CDCl_3 na região entre δ_{C} .15- 50 ppm.



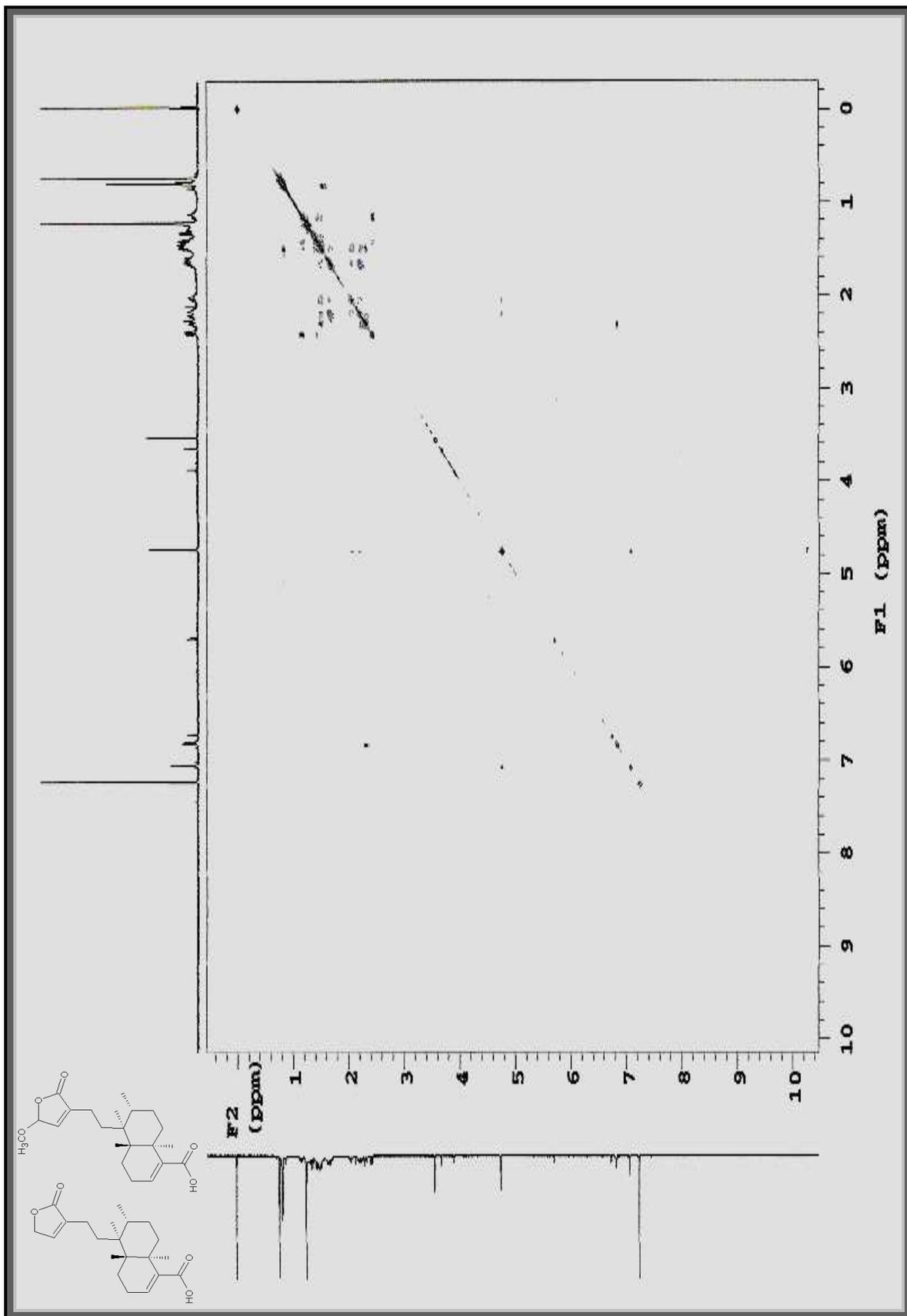


Figura 93. Espectro de RMN ¹H x ¹H COSY (500 MHz) de Np_6 em CDCl₃.

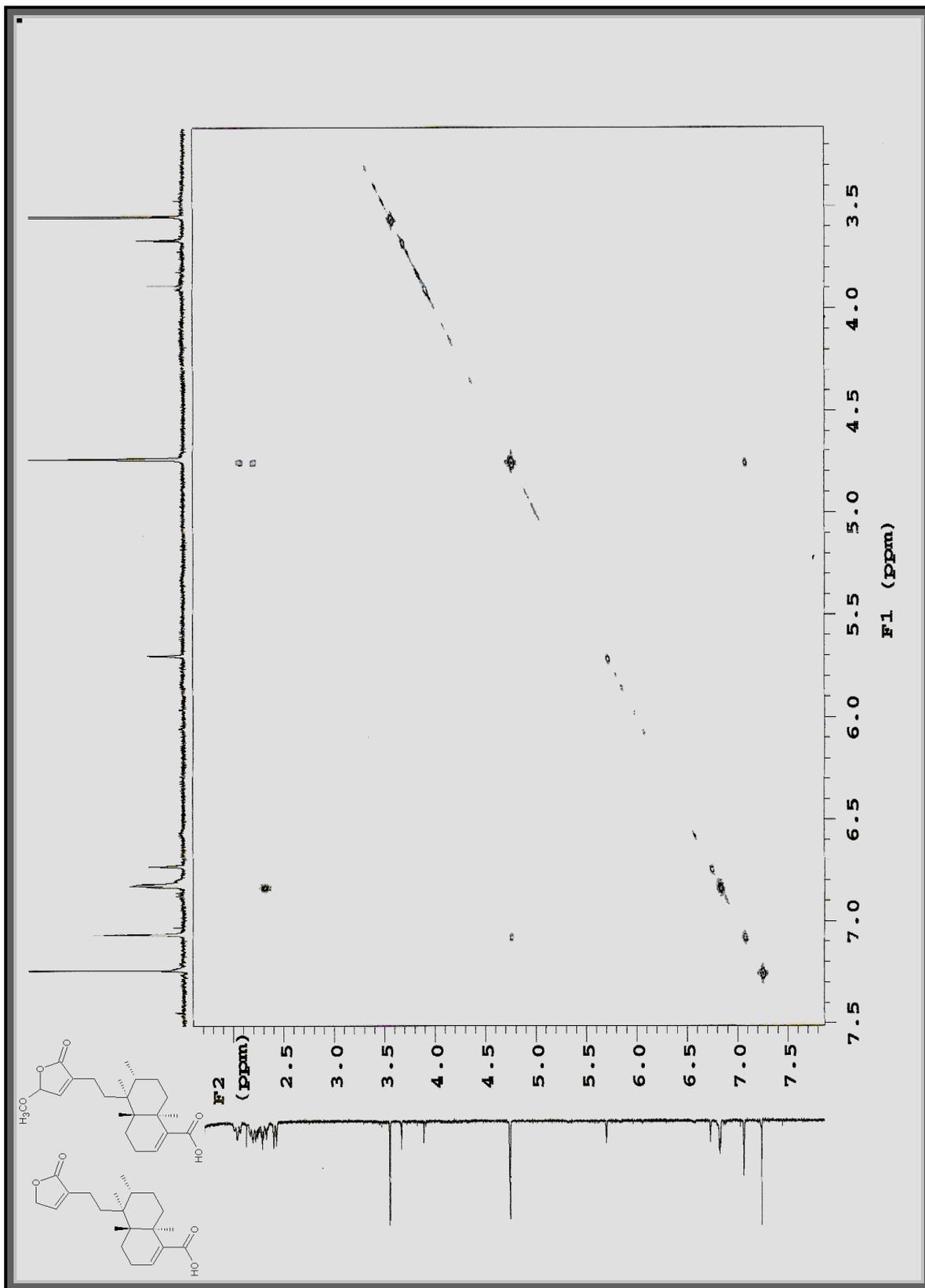


Figura 94. Expansão de espectro de RMN $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY (500 MHz) de Np_6 em CDCl_3 na região entre δ_{H} 3,5- 7,5.

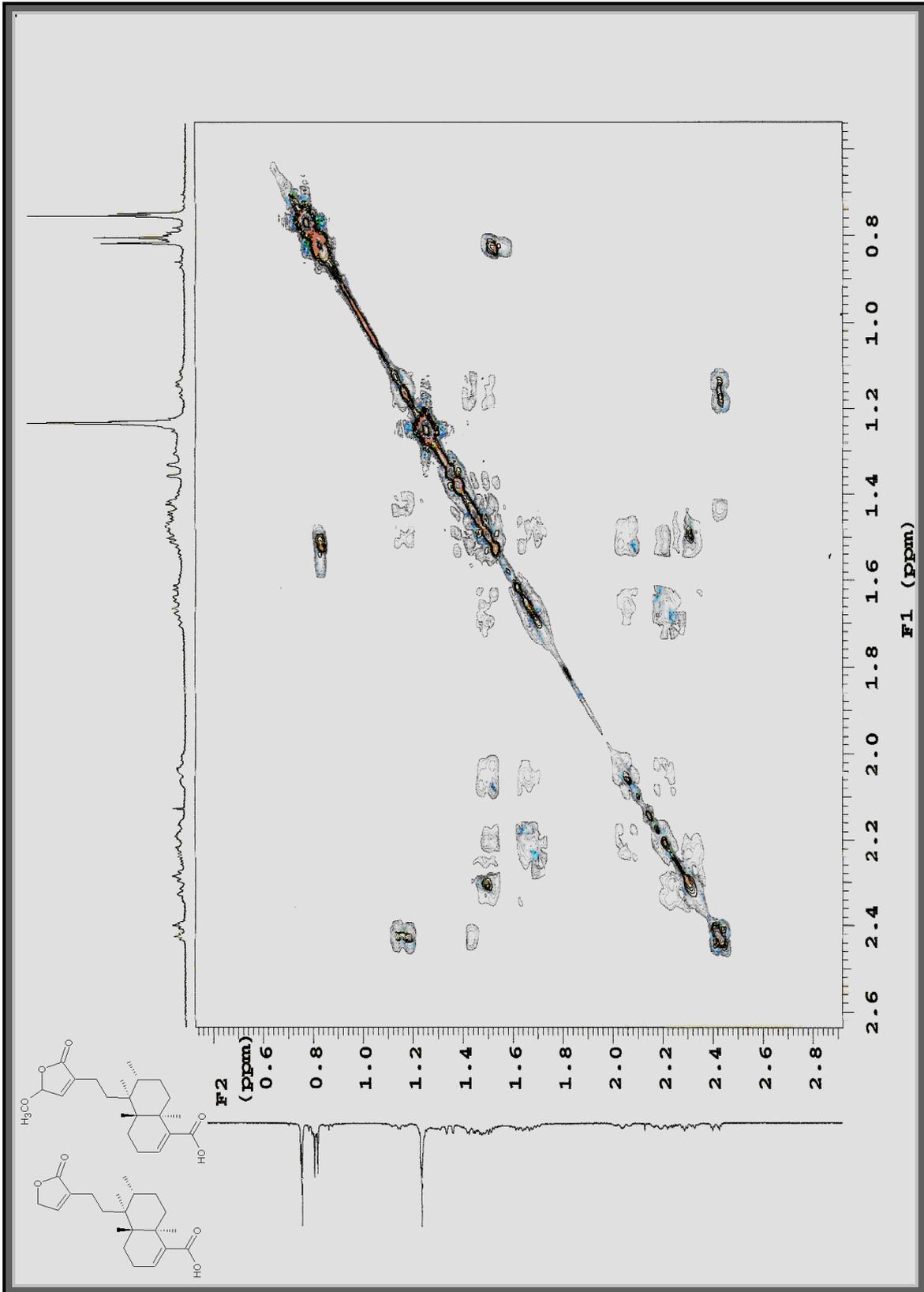


Figura 95. Expansão de espectro de RMN ¹H x ¹H COSY (500 MHz) de Np₆ em CDCl₃ na região entre δ_H 0,8- 2,6.

6- Conclusões

6. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico de *Nanuza plicata* (Mart.) L.B.Sm. & Ayensu (Velloziaceae) levou ao isolamento de quatro substâncias e uma mistura de diterpenos. Através de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono treze (RMN ^1H e ^{13}C), incluindo técnicas bidimensionais (HMQC (HSQC), HMBC, COSY e NOESY-1D), foi possível identificar:

- ★ dois derivados do ácido clorogênico, de nomes 3-*O*- cafeoil quinato de metila e Ácido 3,5-di-*O*-*E*-cafeoil sendo ambas isolados pela primeira vez no família Velloziaceae;
- ★ três flavonóides, sendo um do tipo flavona, de nome Luteolina isolado pela primeira vez no gênero, duas biflavonas, a primeira - amentoflavona, já isolada anteriormente para a espécie e a segunda nomeada nanuzoflavona descrita pela primeira vez na literatura;
- ★ uma mistura de diterpenos do tipo clerodano de nomes ácido patagônico e Ácido clerodan- 15-metoxi-3,13-dien-15,16-olideo-8-óico isolados, também, pela primeira vez na família.

O isolamento dessas substâncias contribuiu significativamente para a quimiotaxonomia de *Nanuza plicata*.

Referências
Referências

ALBRECHT, H., YODER, J. I., PHILLIPS, D.A. Flavonoids promote haustoria formation in the root parasite *Triphysaria versicolor*. **Plant Physiology**. v. 119, p. 585–591, 1999.

ALMEIDA, M. T. R. Isolamento e Identificação de Substâncias Ativas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze com potencial atividade antiviral. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

AHMAD, V. U., KHAN, A., FAROOQ, U., KOUSAR, F., KHAN, S. S., NAWAZ, S. A., ABBASI, M. A., CHOUDHARY, M. I. Three New Cholinesterase-Inhibiting *cis*-Clerodane Diterpenoids from *Ostostegia limbata*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. V. 53(4) p. 378-381, 2005.

ALVES, R. J. V. Two new species of *Namuza* (Velloziaceae) from Brazil. **Novon**, v.12, p. 12-17, 2002.

APG, ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> Acesso em: novembro de 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002a.

_____. **NBR 6024**: informação e documentação: numeração progressiva das seções de um documento escrito: apresentação. Rio de Janeiro, 2003a.

_____. **NBR 6027**: informação e documentação: sumário: apresentação. Rio de Janeiro, 2003b.

_____. **NBR 6028**: resumos. Rio de Janeiro, 1980.

_____. **NBR 6028**: informação e documentação: resumo: apresentação. Rio de Janeiro, 2003c.

_____. **NBR 6029**: informação e documentação: livros e folhetos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002b.

_____. **NBR 6034**: preparação de índice de publicações. Rio de Janeiro, 1989.

_____. **NBR 10520**: informação e documentação: citações em documentos. Rio de Janeiro, 2002c.

_____. **NBR 12225**: informação e documentação: lombada; apresentação. Rio de Janeiro, 2004.

_____. **NBR 14724**: informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002d.

AYENSUS, E. S. Biological and Morphological Aspects of the Velloziaceae. **Biotropica** v. 5, p. 135-149, 1973.

BAKER, P. M., BARREIRO, E. J. L., GILBERT, B. Tetracyclic Triterpenes of *Barbacenia bicolor*. **Phytochemistry**, v. 15, p. 785-787, 1976.

BARNES, R. A., PEREIRA, A. L., SCOFIELD, T. C. V., BRAZ FILHO, R., PINTO, A. C. A new triterpene from *Vellozia compacta*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. V. 32(9) p. 3674-3677, 1984.

BARREIRO, E. J. Produtos Naturais e Bioativos de Origem Vegetal e o Desenvolvimento de Fármacos. **Química Nova**, v.13, nº 1, p. 29-39, 1990.

BARRETO DE CASTRO, L. A., Conclusions and recommendations, in SEIDL, P. (ed.), The use of biodiversity for sustainable development: investigation os bioactive products and their commercial applications, **Proceedings of a Workshop, Academia Brasileira de Ciências & MCT**, Manaus, p. 104, 1994.

BERETZ A., BRIANÇON-SCHIED, F., STIERLÉ, A., CORRE, G., ANTON, R., CAZENAVE, J. Inhibition of human platelet cyclic AMP phosphodiesterase and of platelet aggregation by a hemisynthetic flavonoid, amentoflavone hexaacetate, **Biochemical Pharmacology**, v. 35, n., 2, p. 257-262, 1986.

BRANCO, A., BRAZ-FILHO, R., KAISER, C. R., PINTO, A. C. Two Monoisoprenylated flavonoids from *Vellozia graminifolia*. **Phytochemistry**. v.47(3), p. 471-474, 1998.

BRANCO, A., PEREIRA, A. D. S., CARDOSO, J. N., NETO, F. R. A., PINTO, A. C., BRAZ-FILHO, R. Further Lipophilic Flavonols in *Vellozia graminifolia* (Velloziaceae) by high Temperature gás chromatography: Quick Detectection of New Compounds. **Phytochemical analysisl**. v. 12 (4), p. 266-270, 2001.

BRANCO, A., PINTO, A. C., IFA, D. R., BRAZ FILHO, R. Two 8-C-Methylated flavonols from the leaves of *Vellozia mikan* (Velloziaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society** . v. 13(3), p. 318-323, 2002.

CLÉ, C., HILL, L.M., NIGGEWEG, R., MARTIN, C.R., GUISEZ, Y., PRINSEN, E., JANSEN, M.A. Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance. **Phytochemistry**. 69, 2149-2156, 2008.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.79,p. 362-372, 1999.

CRAVO, A. B. **Frutas e Ervas que Curam.**: Ed. Húmus, São Paulo-SP, 1999.

DE MARIA, C. A. B., MOREIRA, R. F. A. Analytical methods for chlorogenic acid. **Química Nova** . v. 27(4), p. 586-592, 2004.

DANTAS,A. L. A., VALENTE, L.M.M., PINTO, A.C. A new isopimarane diterpenoid from *Vellozia pusilla* (Velloziaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14 (1), p. 126-128, 2003.

FARAH, A., DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.23-36, 2006.

FERREIRA, S. H., Medicamentos a partir de Plantas Medicinais no Brasil. 2002. Disponível em: <http://www.abc.org.br/arquivos/medicamentos.pdf>

GARCEZ, W. S., QUEIROZ ,P. P. S: PINTO, A. C. Chemical Constituents of *Vellozia bicolor*. **Ciência e Cultura** - São Paulo, v. 33, p. 107-108, 1981.

GROTEWOLD, E. The genetics and biochemistry of floral pigments. **Annual Review of Plant Biology**. v.57,p. 761–780, 2006.

HARBORNE J.B., BAXTER H., MOSS G.P. **Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants**. 2nd ed. London: Taylor & Francis; 1999.

HARBORNE, J. B., WILLIAMS C, A. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochemistry**. V. 55, p. 481-504, 2000.

HARBORNE, J. B., GREENHAM, J., WILLIAMS, C. A., EAGLES, J., MARKHAM, K. R. Ten isoprenylated and C-methylated flavonoids from the leaves of three *Vellozia* species. **Phytochemistry**. v.34(1) p. 219-226, 1993.

HARBORNE, J. B., WILLIAMS, C. A., GREENHAM, J., EAGLES, J. Variations the Lipophilic and Vacuolar Flavonoids of the genus *Vellozia*. **Phytochemistry**. v 35 (6), p. 1475-1480, 1994.

HOLLMAN P.C.H., KATAN M.B. Dietary flavonoids:intake, health effects and bioavailability. **Food Chemical Toxicology** v.37,p. 937-942, 1999.

HOLLOSZY, F. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. **Micron** v. 33, p. 179–197, 2002.

JANSEN, M.A.K., GABA, V., GREENBERG, B.M. Higher plants and UV-B radiation: Balancing damage, repair and acclimation. **Trends in Plant Science**. v. 3, p. 131–135, 1998.

JORDAN, B.R. The effects of ultraviolet-B radiation on plants: A molecular perspective. **Advances Botanical Research**. v 22, p. 97–162, 1996.

KANASHIRO, A., POLIZELLO, A.C. M., LOPES, J. L. VALIM, Y. M. L. Produção radicais de oxigênio por neutrófilos ativados por diferentes estímulos: função de flavonóides. **In: 23 Reunião Anual da SBQ**, 2000.

KELLEY,C. J., HARRUFF, R. C, CARMACK, M.. The Polyphenolic Acids of *Lithospermum ruderales*. Carbon- 13 Nuclear Magnetic Resonance of Lithospermic and Rosmarinic Acids. **Journal of Organic. Chemistry.**, Vol. 41, No. 3, 1976.

LEAL, C.P. Isolamento e Quantificação de Marcadores Químicos de *Centella asiática* L. E. *Cynara scolymus*. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LONG, J.C., JENKINS, G.I. Involvement of plasma membrane redox activity and calcium homeostasis in the UV-B and UV-A/blue light induction of gene expression in *Arabidopsis*. **The Plant Cell** v.10,p.2077–2086, 1998.

MABRY, T. J.; MARKHAN, K. R.; THOMAS, M. B.. **The Systematic Identification of Flavonoids**. New York: Springer, 1970.

MARKHAM, K. R.; SHEPPARD, C.; GEISER, H.. ¹³C NMR studies of some naturally occurring amentoflavone and hinokiflavone biflavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, n. 12, p 3335–3337, 1987.

MEIRA, M., DAVID, J. M., DAVID, J. P., ARAÚJO, S. V., REGIS, T. L., GIULIETTI, A. M., QUEIROZ, L. P. Constituintes Químicos de *Ipomoea subincana* Meisn. (Convolvulaceae). **Química Nova**, v. 31, p. 751-754, 2008.

MENEZES, N. L. **Estudos anatômicos e a taxonomia da família Velloziaceae**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1970.

MENEZES, N. L., Reestablishment of genus *Pleurostima* Raf. (Velloziaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.3, p. 37-47, 1980.

MERKEN H.M., BEECHER G.R., Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, p. 577-599, 2000.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL O. G., **Desenvolvimento de Fitoterápicos**. p. 34, Brasil, São Paulo, 2004.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S., Planejamento racional de Fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

NASCIMENTO, A., MENDONÇA, C., BELL, M. J., MENDONÇA, J. P. R. F. **Medida da refletância e transmitância em folhas de plantas 'in vivo'**. Trabalho apresentado no XXIV Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada, São Lourenço, Minas Gerais, 2001.

NIELSEN, J. K., NORBEK, R., OISEN, C. E. Kaempferol tetraglucosides from *Cabbage* leaves. **Phytochemistry**, v. 49, n.7, p.2171-2176, 1998.

PEIXOTO DA SILVA, K., PINCHIN, R., PINTO, A. D. C. Phytochemical Studies on Brazilian Velloziaceae. II Triterpenes from *Barbacenia flava*. **Ciência e Cultura**. Supl. 32, p. 120-121, São Paulo, 1980.

PEIXOTO, E. M., PINCHIN, R., PINTO, A. C. Phytochemical Studies on Brazilian Velloziaceae. IV. Chemical Constituents of *Vellozia piresiana*. **Ciência e Cultura** - São Paulo, v. 32, p. 125-127, 1980.

PINCHIN, R., MAYER, L. M., PINTO, A. C. Veadeirol and Veadeirol acid: Two novel diterpenes from *Vellozia flavicans*. **Phytochemistry**. v. 17, p. 1671-1672, 1978.

PINTO, A. C., Phytochemical studies on brasilian Velloziaceae. Part VII: A new diterpene from *Vellozia*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 52, p. 473-475, 1980a.

PINTO, A. C., ANTUNES, O. A. C., PIZZOLATTI, M. G., ARUMJANEK, V. M. A tetranorfriedolabdane diterpene from *Vellozia stipitata*. **Phytochemistry**. v. 42 (3), p. 771-774, 1996.

PINTO, A. C., ANTUNES, O. A. C., REZENDE, C. M., CORRELA, C. R. D. Separation of Acidic Components of *Vellozia flavicans* by silica gel/ potassium hydroxide chromatography. **Phytochemical Analysis**. v. 8, p. 14-17, 1997a.

PINTO, A. C., BAKER, P. M., GILBERT, B., PINCHIN, R., REIS, F. A. M., WAINERAICH, M. S., ZOCHER, D. H. T. The Chemistry of S. American Velloziaceae. Part IX: Vellozone, A tetracyclic Triterpene from *Vellozia stipitata*. **Phytochemistry**. v. 19, p. 2486-2487, 1980b.

PINTO, A. C., BORGES, C. Six Diterpenes from *Vellozia compacta*. **Phytochemistry**. v. 22(9) p. 2011-2015, 1983.

PINTO, A. C., CRISTINA, T., SCOFIELD, V., BRAZ FILHO, R. Two New Diterpenes with a Rosane skeleton from Velloziaceae. **Tetrahedron Letter**. v. 24 (46) p. 5043-5046, 1983 b.

PINTO, A. C., DO PRADO, S. K., BRAZ FILHO, R., HULL, W. E., NESZMELYI, A., LUKACS, G. Natural Abundance ^{13}C - ^{13}C Coupling Constants observed via double quantum coherence structural elucidation by the one and the two dimensional NMR experiments of Velloziolone: A new seco-Diterpene. **Tetrahedron Letter**. v.23 (50) p. 5267-5270, 1982b.

PINTO, A. C., EPIFANIO, R. A., ZOCHER, D. H. T. Aylthonic Acid, a new tetranorneoclerodane from *Aylthonia macrantha* (Vellozoaceae). **Biochemical Systematic and Ecological**. , v. 32 (6), p. 597-601, 2004.

PINTO, A. C., FRECHIANI, C., M., TINANT, B., DECLERCQ, J. P., VAN MEERSSCHE, M. Barbacenic Acid, a Bisnorditerpene with a Novel Skeleton from *Barbacenia flava*. **Chemical Communications** , v. 8, p. 446-447, 1985.

PINTO, A. C., FRECHIANI, C., PEREIRA, A. L., Bisnorditerpenes with a Barbacenane Skeleton from *Barbacenia flava*. **Phytochemistry**, v. 27 (12) p. 3917-3918, 1988a.

PINTO, A. C., GARCEZ, W. S., HULL, W. E., NESZMELYLA, A., LUKACS, G. The 2-dimensional inadequate NMR experiment for Carbon Connectivity pattern determin. **Chemical Communications**. v. 1983(8), p. 464-465, 1983a.

PINTO, A. C., GONCALVES, M. L. A., FILHO, R. B., NESZMELYI, A., LUKACS, G. Natural Abundance ^{13}C - ^{13}C Coupling Constants observed via double quantum coherence structural elucidation Velloziolide: A diterpene with a novel skeleton. **Chemical Communications**. p. 293-295, 1982a.

PINTO, A. C., GONZAGA, L., FIORANI, N. G. M. A Naphthalenic norditerpene from Velloziaceae. **Phytochemistry**. v. 23(4), p. 918-919, 1984a.

PINTO, A. C., GONZAGA, L., ZOCHER, D. H. T. Triterpenes from *Vellozia glabra* and *Babacenia conicostigma*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** v. 53(1), p. 69-72, 1981a.

PINTO, A. C., PATITUCCI, M. L., SILVA, R. S., QUEIROZ, P. P. S., KELECOM, A. Pimarane and Cleistanthane diterpenes from Velloziaceae: absolute Configuration and Biomimetic Conversion. **Tetrahedron** v.39 (20), p. 3351-3354, 1983 e.

PINTO, A. C., PEIXOTO, E. M., FIORANI, N. G. M. Diterpenes ith Pimarane and Cleistanthane Sketetons from *Vellozia piresiana*. **Phytochemistry**. v. 23 (6), p. 1293-1296, 1984b

PINTO, A. C., PEREIRA, A. L., COMASSETO, J. V. 11,12-Dehydrovelloziolone, A Minor Constituent of *Vellozia caput-ardeae*. **Química Nova**. v. 6 (2) p. 71. 1983 d.

PINTO, A. C., PINCHIN, R., PRADO, S. K. Three *ent*-Kaurene diterpenos from *Vellozia caput-ardeae*. **Phytochemistry**, v.22 (9), p. 20171-2019, 1983c.

PINTO, A. C., PINCHIN, R., ZOCHER, D. H. T., LOPES, C. C., Two Naphthalenic nor-Diterpenes from Velloziaceae. **Tetrahedron Letter**. p. 405, 1979.

PINTO, A. C., PIZZOLATTI, M. G., EPIFANIO, R. D. A. FRANKMOLLE, W., FENICAL, W. The isolation of Novel diterpenoids, including a C-40 Bis-diterpenoid, from the Brazilian Plant *Vellozia magdalenae* (Velloziaceae). **Tetrahedron** v.53 (6), p. 2005-2012, 1997b.

PINTO, A. C., PRADO, S. K., PINCHIN, R. The Chemistry of S. American Velloziaceae. Part 12: Two Kaurenes from *Vellozia caput-ardeae*. **Phytochemistry**. v. 20, p. 520-521, 1981b.

PINTO, A. C., REZENDE, C. M., ANTUNES, O. A. C., CORREIA, C. R. D. Three Isomeric Diterpenes from *Vellozia flavicans*. **Phytochemistry**. v. 42 (3), p. 767-769, 1996b.

PINTO, A. C., RIBEIRO, N. M., BRITO, L., TINANT, B., DECLERCQ, J. P. Three New Norditerpenes wirh na Isopimarane skeleton from *Vellozia variabilis*. **Bulletin de la societe chimique de Belg**. v. 97 (11/12), p. 1067-1074, 1988b.

PINTO, A. C., VALENTE, L. M. M., DA SILVA, R. S., GARCEZ, W. S., PAULO DA, S., QUEIROZ, P. Isolation and Chemical reactivity of a new diterpene with a pimarane skeleton. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 53 (1), p. 73-76, 1981c.

PINTO, A. C., ZOCHER, D. H. T., GONZAGA, L., PINCHIN, R., LOPES, C. C. Phytochemical studies on Brazilian Velloziaceae. III. Chemical Constituents of *Vellozia stipitata*. **Ciência e Cultura** - São Paulo, v. 32, p. 122-124, 1980c.

PINTO, A. C., ZOCHER, D. H. T., REZENDE, C. M., GOTTLIER, H. E. New Diterpene with a Totarane skeleton from *Vellozia flavicans*. **Natural Product Letters**. v.6 (3), p. 209-213, 1995a.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V, S.; LOPES, N. P; EPIFÂNIO, R. A., Produtos Naturais: Atualidades, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

PINTO, A.C., ANTUNES, O. A. C., REZENDE, C. M., CORREIA, C. R. D. Minor Cleisthantane and Tetranorfriedolabdane from *Vellozia flavicans*. **Phytochemistry**. v.38 (5) p. 1269-1271, 1995b.

PINTO, A.C., GARCEZ, W. S., QUEIROZ, P. P. S., FIORANI, N.G. Clerodane and Tetranorclerodane from *Vellozia bicolor*. **Phytochemistry**. v. 37 (4), p. 1115-1117, 1994.

PINTO, A.C., GONZAGA, L., ZOCHER, D. H. T. Triterpenes from *Vellozia glabra* and *Barbacenia conicostigma*. **An Academia Brasileira de Ciências**, v. 53 (1), p. 69-72, 1981 d.

PINTO, A.C., QUEIROZ, P. P. S., GARCEZ, W. S. Diterpenes from *Vellozia bicolor*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 2 (1), p. 25-30, 1991.

POURCEL, L., ROUTABOUL, J.-M., CHEYNIER, V., LEPINIEC, L., DEBEAUJON, I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. **Trends in Plant Science**. v. 12, p. 29–36, 2007.

REINBOTHE, C.; DIETRICH, B.; LUCKNER, M.: Regeneration of plants from somatic embryos of *Digitalis lanata*. *Journal. Plant Physiology.*, v. 137, p. 224-228, 1990.

RIEHL, C. A. S, **Constituintes Químicos do Extrato hexânico de xerophyta sp (Velloziaceae)**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998.

RIEHL, C. A.S., PINTO, A. C., FIGUEROA VILLAR, J.D. Isolation and Structural Determination of Xerophytolic acid A, a 3-geranyl-4-hydroxybenzoate derivate from *Xerophyta plicata*. **Natural Products Research**. v.20 (13), p.1225-1230, 2006.

RIEHL, C. A.S., PINTO, A. C., KAISER, C. R., FIGUEROA VILLAR, J.D., CRUZ, E. R. Isolation and Structural Determination of Xerophytolic acid, a Novel 3-geranyl-4-hydroxybenzoate derivate from *Xerophyta plicata*. **Spectroscopy Letters**. v.33 (5), p. 643-651, 2000.

RIEHL, C.A.S., PINTO, A. C. Cleistanthane Diterpene Lactone from *Vellozia compacta*. **Phytochemistry**. v. 53(8), p. 917-919, 2000.

RIVERA, A. P., FAINI, F, CASTILLO, M. 15 α -hydroxy- β -amyrin and patagonic acid from *Baccharis magellanica* and *Baccharis patagonica*. **Journal of Natural Products**, v.51 (1), p. 155-157, 1988.

RUMBERO-SANCHEZ, A., VAZQUEZ, P. Quinic Acid esters from *Isertia haenkeana*. **Phytochemistry**. v.30, p. 311-313, 1991.

SALANTINO, A., SALANTINO, M. L. F., SANTOS, D.Y.A.C., PATRÍCIO, M.C.B. Distribution and evolution of secondary metabolites in Eriocaulaceae, Lythraceae and Velloziaceae from “campos ruprestes”. **Genetics and Molecular Biology**. v. 23, p. 931–940, 2000.

SALANTINO, M. L. F. **Constituintes da cera foliar epicular e a taxonomia de Velloziaceae**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1986.

SANTOS, A. G, PEREZ, C. C., TININIS, A. G., BOLZANI, V. S., CAVALHEIRO, A. J. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. **Química Nova**, v. 30 (5) p. 1100-1103, 2007.

SANTOS, N. P. dos, Theodoro Peckolt: a produção científica de um pioneiro da fitoquímica no Brasil. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, v. 12, n. 2, p. 515-33, 2005.

SCIENTIFIC AMERICAN, Back to roots. **Scientific American**, p.118, 1993.

SHIRLEY-WINKEL, B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. **Current. Opinion in .Plant Biology**. v.5, p. 218–223. 2002.

SILVA, D. A. Estudo fitoquímico de duas espécies da família Malvaceae: *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky e *Sida galheirensis* Ulbr. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal da Paraíba, 2004.

SILVA, G. C., VALENTE, L. M. M., PATITUCCI, M. L., CUNHA, P. A., MENEZES, N. L., Cleistanthane diterpenoids from *Vellozia* *app. carunculares* Martius Ex Seubert (Velloziaceae). **Química Nova**, v. 24 (5) p. 619-625, 2001.

SMITH, L. B. & AYENSUS, E. S., A revision of American Velloziaceae. **Smithsonian contributions of American Velloziaceae**, 1976.

SMITH, L. B. & AYENSUS, E. S., Classification of Old World Velloziaceae. **Kew Bulletin**, v. 29, p. 181-215, 1974.

SOUSA, M. S. **Morfogênese de frutos e sementes em Velloziaceae**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SOUZA, L. A.; MOURÃO, K. S. M.; MOSCHETA, I. S.; ROSA, S. M., Morfologia e anatomia da flor de *Pilocarpus pennatifolius* Lem. (Rutaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 175-184, 2003.

TURUNEN, M.T., VOGELMANN, T.C., SMITH, W.K. UV screening in lodgepole pine (*Pinus contortaspp. latifolia*) cotyledons and needles. **International Journal of Plant. Sciences**. 160, 315–320, 1999.

VALENTE, L. M. M., GUNATILAKA, A. A. L., KINGSTON, D. G. I., PATITUCCI, M. L., PINTO, A. C. A Bioactive Seco-Rosane Diterpenoid from *Vellozia canndida*. **Journal Natural Products**, v. 60 (5) p. 478-481, 1997.

WEISSHAAR, B., JENKINS, G.I. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. **Current Opinion in Plant Biology**. 1, 251–257, 1998.

WILLIAMS, C. A., HARBORNE, J. B., MENEZES, N. L. The utility of leaf flavonoids as Taxonomic Markers in the subfamily and generic classification of the Velloziaceae. **Biochemical Systematics and ecology**. v. 19, n. 6, p. 483-495, 1991.

WILLIAMS, C. A., HARBORNE, J. B., TOMAS-BARBERAN, F. A. Biflavonoids in the primitive monocots *Isophysis tasmanica* and *Xerophyta plicata*. **Phytochemistry**. v. 26 (9), p. 2553-2555, 1987.

ZHOU, Y., LU, F. Q., KAO, P. C., DING, L. Chemical Constituents of *Acanthochlamys braceteata*. **Yingyong Yu Huanjing Shengwu Xuebao**, China, v. 6(4) p. 331-333, 2000.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. et al (Org.). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRS/UFSC, 2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)