# UFRRJ

## INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA


**DISSERTAÇÃO**

# Estudo Químico e Atividades Biológicas de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. (Ochnaceae).


**RENATA DUARTE FERNANDES**



**2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

# ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. (Ochnaceae).

**RENATA DUARTE FERNANDES**

*Sob a Orientação do Professor*

**Dr. Mário Geraldo de Carvalho**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química de Produtos Naturais

Seropédica, RJ
Julho de 2008

547
F363e
T

Fernandes, Renata Duarte, 1977-
Estudo químico e atividades biológicas de ***Ouratea hexasperma var. planchonii Engl. (Ochnaceae)*** / Renata Duarte Fernandes – 2008.
118f. : il.

Orientador: Mário Geraldo de Carvalho.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química.
Bibliografia: f. 93-101.

1. Química orgânica – Teses. 2. Ouratea – Análise – Teses. 3. Ochnaceae – Análise – Teses. 4. Produtos naturais – Teses. I. Carvalho, Mário Geraldo de, 1952- . II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

**Bibliotecário: _____ Data: ___/___/_____**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**RENATA DUARTE FERNANDES**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Química, área de Concentração em Química de Produtos Naturais.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 11/07/2008

Dr. Mário Geraldo de Carvalho (ICE-DQ-UFRRJ)
(Orientador e Presidente)

Dr. Marco Edílson Freire de Lima (ICE-DQ-UFRRJ)

Dra. Alceni Augusta Werle (Dpto de Química/ICEB/UFOP)

Dra. Geizi Jane Alves de Carvalho (FAETEC-RJ)
(Suplente)

*Ao meu marido Cristiano de Deus Correa e*
*À minha mãe Fátima Maria Duarte.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus;

Ao meu marido Cristiano pelo amor, compreensão, incentivo, paciência e carinho;

À minha mãe Fátima por acreditar em meus sonhos e me incentivar sempre;

Aos meus irmãos Rodrigo e Robson pelo incentivo e ajuda;

À minha vovó Maria dos Anjos, aos meus tios pelo carinho e alegria em cada vitória minha, aos meus primos e meu afilhado;

À minha amiga de todas as horas Juliana Moura;

Ao Professor Dr. Mário Geraldo de Carvalho pela orientação, ensinamentos, atenção e paciência;

Aos amigos do LQPN-UFRuralRJ: Eduardo (Ceará), Delcí, Marcelo, Maritza, Virgínia, Luciano, Luiz Roberto (Pilha), Mário Sérgio, pela amizade e pelos momentos de descontração que passamos juntos e à nova integrante da equipe Roberta pelas palavras de incentivo;

Aos alunos de iniciação científica e estagiários do LQPN-UFRuralRJ: Luciane, Claudiana, Daniel, Letícia, Raquel, Tatiane, Verônica, Débora, Ana Paula, Aline e Aline' pela amizade, convivência agradável e auxílio durante a realização deste trabalho.

A todos os colegas do PPGQO, sem exceção, pelo bom relacionamento durante este período; em especial aos amigos Ari, Cláudio, Janaína, Kênia, Ana Paula, Andréa Janaína, Andréa Rose, Willian, Camilla, Alessandra, André Vinícius, Letícia, Vinícius, Suzana e Raquel; e à Regina pela amizade, incentivo e apoio;

Aos professores do PPGQO pela formação e evolução profissional;

À professora Dra. Rosane Nora Castro pelos ensinamentos e auxílio nas análises no HPLC;

Aos funcionários do ICE-UFRRJ, Maurício, Welisson, Carlão, Eli, Fábio, Francês, Osmar, Rui, Aldir e André;

À professora Dra. Maria de Fátima Agra (LTF-UFPB) pela coleta e identificação do material vegetal;

Ao Prof Dr. Edilberto Rocha Silveira do (CENAUREMN/UFC), pela obtenção dos espectros a 500 MHz;

À professora Dra. Alceni Augusta Werle (UFOP) pelas análises no CLAE-EM;

Aos professores Dra. Miliane Moreira Soares de Souza e Dr. Francisco de Assis Baroni (IV/UFRRJ) pelos ensaios de atividade antibacteriana e antifúngico;

Aos professores Dr. Fábio Fagundes Rocha e Frederico Argollo Vanderlinde do Departamento de Ciências Fisiológicas (IB/UFRRJ) pelo teste de toxicidade;

Ao mestrando Élio Barbieri Departamento de Parasitologia Animal-UFRRJ pelo ensaio de atividade inseticida;

À professora Denise Monte Braz do Departamento de Botânica da UFRRJ, pela atenção e auxílio na classificação botânica;

Às meninas do alojamento da graduação F1-32 Tati, Marcele, Dailane, Camila, Wilma, Germana, Joyce e Geovana pela amizade, momentos de estudos e de descontração;

Às meninas do alojamento da Pós-graduação Janaína, Vanessa, Renata, Michelle, Daniele, Patrícia, Sabrina, Silvana, Eliane, Kênia, Fabiana, Fernanda, Daniela, Fabíola, Ana Luisa, e Veridiana pelo acolhimento, amizade e bons momentos;

Desde já, à banca examinadora, pelas sugestões e correções sugeridas a este trabalho;

À UFRRJ, por mais uma oportunidade e acolhimento;

A CNPQ pela concessão da bolsa de estudos;

A todos que, de algum modo, me ajudaram na realização deste trabalho.

*Quando alguém encontra seu caminho,*
*precisa ter coragem suficiente*
*para dar passos errados.*
*As decepções, as derrotas, o desânimo*
*são ferramentas que Deus*
*utiliza para mostrar a estrada.*

*Paulo Coelho*

# RESUMO

FERNANDES, Renata Duarte. **Estudo Químico e Avaliação de Atividades Biológicas de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl**. 2008 101f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Os metabólitos especiais isolados de galhos de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl., permitiram a comparação com os constituintes de *O. hexasperma* (St. Hil.) para confirmar a classificação botânica da mesma. Neste trabalho também foram avaliadas algumas atividades biológicas.

As analises das frações obtidas do fracionamento com partição com solventes e técnicas cromatográficas dos extratos preparados com diclorometano e metanol dos galhos de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. conduziu à identificação de alguns constituintes químicos. Identificaram-se misturas de hidrocarbonetos alifáticos, ácidos alilfáticos, de esteróides (sitosterol, estigmasterol e campesterol), além de três triterpenos, lupeol, α e β amirina, e os flavonóides (7"-O-metilagatisflavona e agatisflavona) e sitosterol-3-O-β-D-glicopiranosideo. As estruturas foram determinadas através de análise dos dados espectrométricos de IV, RMN de $^{1}H$ e $^{13}C$ uni e bidimensional e massas, além de comparação com dados da literatura. A técnica CLAE-EM foi utilizada na análise adicional de duas frações contendo dois biflavonóides e alguns constituintes adicionais. Esta análise permitiu propor a presença de metil-vitexina, orientina, metil-diidroxiflavona, glicopiranosil-flavonas, dimetilagatisflavona, glicopiranosil-prenil-flavonol além da confirmação das duas biflavonas identificadas inicialmente.

Os extratos dos galhos de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. foram submetidos à avaliação de atividade antibacteriana, antifúngica, inseticida e de toxidez. O crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* reduziu com extrato metanólico. As frações contendo as biflavonas foram parcialmente ativas como inseticida contra *Musca domestica*. Os extratos apresentaram baixa toxicidade em dose única.

**Palavras–chave:** *Ouratea hexasperma,* flavonóides, atividades biológicas.

## ABSTRACT

FERNANDES, Renata Duarte. **Phytochemical Study and Biological Activities extracts from the branches of *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl**. 2008 103f. Dissertation (Magister Scientiae in Organic Chemistry), Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

The specials metabolites isolated from the branches of the *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl., allowing to the comparison with the chemical constituents from variety *Ouratea hexasperma* (St. Hil.) to confirm the botanical classification. Some biological activities were evaluated.

The analysis of the fractions from solvents and chromatographic fractionation of the dichloromethane and methanolic extracts from the branches of *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. led to the identification of some chemical constituents. This procedure led to identification of aliphatics compounds mixture, aliphatic alcohol mixture, steroids mixture (sitosterol, stigmasterol and campesterol), three triterpenes, lupeol e α-amiryn e β-amiryn, and the biflavonoids (7"-O-methylagathisflavone and agathisflavone) and sitosterol-3-O-β-D-glycopyranoside. The structures were determined by IR, de $^{1}H$ (1D e 2D) e $^{13}C$ (BBD e DEPT) NMR spectral data analysis and comparison with literature values. The HPLC-MS were used in the analysis of two fractions containing the these two biflavones and some additional compounds. This analysis led us to identify the presence of methyl-vitexin, orientin, methyl-dihydroxyflavone, glycopiranosil-flavones, dimethylagathisflavone and glycopyranosil-prenyl-dihydroxyflavonol besides the confirmation of these two biflavonoids.

The extracts from the branches of *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. were submitted on evaluations of the antibacterial, antifungal, insecticide and toxicity activities. The *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* growth was inhibited with methanolic extract. The fractions containing the biflavonoids were partially active as insecticide against *Musca domestica*. The extracts presented low toxicity on unique dose.



**Key words**: *Ouratea hexasperma,* flavonoids, biologicals activities.

# LISTA DE FIGURAS


| | |
|---|---|
| Figura 1: Triflavonóides isolados no Gênero *Ochna* | 3 |
| Figura 2: Biflavonóides e dímeros de chalconas isolados dos Gêneros *Ochna e Lophira*. | 4 |
| Figura 3: Flavonóides e chalconas isolados do gênero *Luxemburgia* | 5 |
| Figura 4: Flavonóides isolados do Gênero *Ouratea* | 7 |
| Figura 5: Outras classes de substâncias isoladas nos gêneros Ouratea. | 9 |
| Figura 6: Diferenças morfológicas entre as folhas de *Ouratea hexasperma.* | 10 |
| Figura 7: Dímeros de flavonóides | 11 |
| Figura 8: Constituintes químicos isolados neste trabalho | 17 |
| Figura 9: Mecanismo proposto da reação de metilação com diazometano. | 23 |
| Figura 10: Espectro de IV do material alifático de *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl.. | 25 |
| Figura 11: Espectro de RMN de $^1$H (200 MHz, $CDCl_3$) do material alifático. | 26 |
| Figura 12: Espectro de IV de **1** | 27 |
| Figura 13: Espetro de RMN de $^1$H (200 MHz, $CDCl_3$) de **1**. | 28 |
| Figura 14: Cromatograma de **1**. | 28 |
| Figura 15: Espectro de massas de **1** | 29 |
| Figura 16: RMN de $^1$H (200 MHz, $CDCl_3$) da mistura de esteróides, **2** (a, b e c) | 30 |
| Figura 17: Cromatograma da mistura dos esteróides **2** (a, b e c) | 30 |
| Figura 18a : Espetro de massas de **2 (a)** comparado com a biblioteca do aparelho. | 31 |
| Figura 18b : Espetro de massas de **2 (b)** comparado com a biblioteca do aparelho. | 32 |
| Figura 18c : Espetro de massas de **2 (c)** comparado com a biblioteca do aparelho. | 33 |
| Figura 19: Espectro de RMN de $^1$H (200 MHz, $CDCl_3$) de **3** (a, b e c). | 34 |
| Figura 20: Espetro de massas de **3** (a) comparado com a biblioteca do aparelho. | 35 |
| Figura 21: Espetro de massas de **3** (b e c) comparado com a biblioteca do aparelho | 35 |
| Figura 22: Espectro de IV de **4** | 37 |
| Figura 23: Espectro de RMN de $_1$H (500 MHz , $D_3CCOCD_3$) de **4** | 39 |
| Figura 24: Espectro de $^1$H-$^1$H-COSY - (500 MHz, $D_3CCOCD_3$) de **4**. | 40 |
| Figura 25: Espectro de $^1$H-$^1$H-NOESY - (500 MHz, $D_3CCOCD_3$) de **4.** | 41 |

| | |
|---|---|
| Figura 26: Ampliação do Espectro de $^{1}H$-$^{1}H$-NOESY - (500 MHz, $D_3CCOCD_3$) de **4.** | 42 |
| Figura 27: Ampliação do Espectro de $^{1}H$-$^{1}H$-NOESY - (500 MHz, $D_3CCOCD_3$) de **4.** | 43 |
| Figura 28: RMN de C (125 MHz, $D_3CCOCD_3$) da substância **4** | 44 |
| Figura 29: Ampliação(180-187 ppm) do Espectro de RMN de $^{13}C$ (125 MHz, $D_3CCOCD_3$) da substância **4** | 44 |
| Figura 30: Ampliação (156-166 ppm) do Espectro de RMN de $^{13}C$ (125 MHz, $D_3CCOCD_3$) da substância **4** | 45 |
| Figura 31: Espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância **4.** | 45 |
| Figura 32: Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância **4.** | 46 |
| Figura 33: Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância **4** | 46 |
| Figura 34: Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância **4.** | 47 |
| Figura 35: Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância **4.** | 47 |
| Figura 36: Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância **4** | 48 |
| Figura 37: Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância **4** | 48 |
| Figura 38: Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância **4** | 49 |
| Figura 39: Espectro de HSQC ($D_3CCOCD_3$) da substância **4** | 50 |
| Figura 40: Espectro de IV de **5.** | 51 |
| Figura 41: Espectro de RMN de $_1H$ (200MHz, $D_3CCOCD_3$) da mistura dos biflavonóides 4 e **5.** | 53 |
| Figura 42: Ampliação do espectro (6.0-8.5 ppm) de RMN de $_1H$ (200MHz, $D_3CCOCD_3$) da mistura dos biflavonóides **4 e 5.** | 53 |
| Figura 43: Espectro de RMN de $^{13}C$ (50 MHz, $D_3CCOCD_3$) da mistura dos biflavonóides **4 e 5.** | 54 |
| Figura 44: Ampliação do espectro de RMN de $^{1}H$ (500 MHz , $D_3CCOCD_3$) do derivado **4a.** | 54 |
| Figura 45: Cromatograma obtido em CLAE de **4** | 55 |
| Figura 46: Cromatograma obtido em CLAE da mistura **4 e 5.** | 55 |
| Figura 47: Espectro de RMN de $^{1}H$ (500 MHz , $D_3CCOCD_3$) do derivado **4a.** | 58 |
| Figura 48: Ampliação do espectro de RMN de $^{1}H$ (500 MHz , $D_3CCOCD_3$) do derivado **4a.** | 59 |
| Figura 49: Ampliação do espectro de RMN de $^{1}H$ (500 MHz , $D_3CCOCD_3$) do derivado **4a.**. | 59 |

| | |
|---|---|
| Figura 50: Espectro de $^{1}H$-$^{1}H$-COSY (500MHz, $D_3CCOD_3$) de **4a** | 60 |
| Figura 51: Espectro de NOESY de **4a.** | 60 |
| Figura 52: Ampliação do espectro de NOESY de **4a.** | 61 |
| Figura 53: Espetro de $^{13}C$ (125MHZ, $D_3CCOD_3$) de **4a**. | 61 |
| Figura 54: Ampliação do espectro de $^{13}C$ (125MHZ, $D_3CCOCD_3$)de **4a.** | 62 |
| Figura 55: Espectro de HMBC ($D_3COD_3$) da substância **4**. | 63 |
| Figura 56: Espectro de HSQC ($D_3COD_3$) da substância **4.** | 64 |
| Figura 57: Espectro de IV da substância **6** | 66 |
| Figura 58: RMN de $^{1}H$ da substância **6** | 68 |
| Figura 59: RMN de $^{13}C$ da substância **6** | 69 |
| Figura 60: Ampliação do RMN de $^{13}C$(125 Hz, DMSO-$d_6$) da substância **6** | 70 |
| Figura 61: CLAE da fração OSPGMC. | 71 |
| Figura 62: CLAE da fração OSPMC1-6p | 72 |
| Figura 63: RMN de $^{1}H$ (200MHz, $D_3CCOCD_3$) da fração OSPGMC | 73 |
| Figura 64: RMN de $^{1}H$ (200MHz, $D_3CCOCD_3$) da fração OSPGMC1.6p | 73 |
| Figura 65: Identificação dos valores de *m/z* para os picos detectados no CLAE-EM da fração OSPGMC | 74 |
| Figura 66: Estruturas propostas através da análise CLAE-EM na fração OSPGC. | 76 |
| Figura 67: Identificação dos valores de *m/z* para os picos detectados no CLAE-EM da fração OSPGMC1.6p | 77 |
| Figura 68: Estruturas propostas através da análise CLAE-EM na fração OSPGCM1.6p. | 79 |

# LISTA DE TABELAS


| | |
|---|---|
| Tabela 1: Ocorrência de Agatisflavonas e derivados em espécies vegetais. | 12 |
| Tabela 2: Divisões Botânicas das espécies que onde há ocorrência de agatisflavonas e derivados. | 15 |
| Tabela 3: Registro dos resultados da prospecção química do extrato metanólico de *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl. | 24 |
| Tabela 4. Dados de RMN $^{1}H$ e $^{13}C$ ($D_3CCOCD_3$,$^{1}H$ e $D_3CSOCD_3$,$^{13}C$) da substâncias 4. | 38 |
| Tabela 5. Dados de RMN $^{1}H$ (200 MHz) e $^{13}C$ (50 MHz) em Metanol-D, (AGRAWAL, 1989) da substância 5 (agatisflavona). | 52 |
| Tabela 6: Dados de RMN $^{1}H$ (200 MHz) e $^{13}C$ (50 MHz) da substância 4 (MOREIRA *et al*., 1999) com o derivado 4a. | 57 |
| Tabela 7: Dados de RMN de $^{1}H$ e $^{13}C$ da substância 6 | 67 |
| Tabela 8 – Mortalidade (%) de amostras vegetais sobre *Musca domestica* após 24 horas da aplicação. | 90 |
| Tabela 9 – Mortalidade (%) de amostras vegetais sobre *Musca domestica* após 48 horas da aplicação. | 90 |

# LISTA DE ESQUEMAS


| | |
|---|---|
| Esquema 1: Marcha para o isolamento das substâncias dos galhos de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* engl. | 21 |
| Esquema 2: Propostas de estruturas compatíveis com os valores de *m/z* detectados na análise de CLAE-EM | 75 |
| Esquema 3: Propostas de estruturas compatíveis com os valores de *m/z* detectados na análise de CLAE-EM | 78 |
| Esquema 4: Biossíntese de ácidos graxos (adaptado de DEWICK, 2002) | 80 |
| **Esquema 5: Proposta de a-oxidações em aácidos graxos (HARWOOD, 1997).** | 81 |
| Esquema 6: Proposta biogenética para os esteróides (Adaptado de MANN, 1994). | 82 |
| Esquema 7: Proposta biogenética para os terpenos lupeol e α-amirina. (Adaptado de MANN, 1994; DEWICK, 2002). | 83 |
| Esquema 8: Proposta biogenética para as flavonas (DEWICK, 2002) e biflavonas (MOREIRA, 1994) | 84 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|---|---|
| 1D | Unidimensional |
| 2D | Bidimensional |
| $\delta_H$ | Deslocamento Químico de Hidrogênio (ppm) |
| $\delta_C$ | Deslocamento Químico de Carbono (ppm) |
| ν | Estiramento |
| δ | Deslocamento químico |
| Acetona-$D_6$ | Acetona deuterada |
| CCDA | Cromatografia em Camada Delgada Analítica |
| CCF | Cromatografia em Camada Fina |
| CCP | Cromatografia em Camada Preparativa |
| CG-EM | Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| cm | Centímetro |
| COSY | COrrelation SpectroscopY |
| d | Dubleto |
| dd | Duplo Dubleto |
| DMSO-$d_6$ | Dimetilsulfóxido deuterado |
| EM | Espectrometria de Massas |
| HMBC | Heteronuclear Multiple-Bond Correlation |
| HSQC | Heteronuclear Single Quantum Coherence |
| Hz | Hertz |
| IV | Infravermelho |
| *J* | Constante de acoplamento em hertz |
| λ | comprimento de onda |
| μm | micrômetro |
| *m* | multipleto |
| $M^{+\cdot}$ | pico do íon molecular positivo |
| MHz | Mega Hertz |
| *m/z* | relação massa/carga |
| nm | nanómetro |
| OspGD | Extrato diclometano dos galhos de *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl. |
| OspGM | Extrato metanólico dos galhos de *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl. |
| NOESY | Nuclear Overhauser Experiment Spectroscopy |
| P.F. | ponto de fusão |
| ppm | parte por milhão |
| *q* | quarteto |
| RF | Fator de Retenção |
| RMN $^1H$ | Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio |
| RMN $^{13}C$ | Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 |
| *s* | singleto |
| *sl* | singleto largo |
| *t* | tripleto |
| TR | Tempo de Retenção |
| TMS | tetrametilsilano |

OBS: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

# SUMÁRIO


| | |
|---|---|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| Objetivos | 2 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1. Generalidades Sobre a Família Ochnaceae e o Gênero *Ouratea* | 3 |
| 2.2 Classificação botânica de *O. hexasperma* (St. Hill) Bail var. *hexasperma e O. hexasperma* var. *planchonii* Engl. | 9 |
| 2.3. Estudo Químico Realizado com *Ouratea hexasperma* (St. Hil.) Bail | 10 |
| 2.4. Biflavonóides | 10 |
| 2.4.1. Agatisflavona e derivados | 12 |
| 3. CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl. | 16 |
| 4. PARTE EXPERIMENTAL | 18 |
| 4.1. Equipamentos e Reagentes | 18 |
| 4.2. Material vegetal | 18 |
| 4.3. Obtenção dos extratos brutos | 19 |
| 4.4. Prospecção Química do Extrato Metanólico | 19 |
| 4.5. Isolamento e Purificação dos Constituintes dos Galhos de *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl. | 19 |
| 4.5.1. Extrato com diclorometano | 19 |
| 4.5.2. Extrato com metanol | 20 |
| 4.6. Derivação | 22 |
| 4.6.1. Metilação com diazometano | 22 |
| 5. **RESULTADOS E DISCUSSÃO** | 24 |
| 5.1. Prospecção Química do extrato metanólico | 24 |
| 5.2. Determinação Estrutural dos Constituintes Isolados de O*uratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. | 25 |
| 5.2.1. Alcanos | 25 |
| 5.2.2 Substância **1** | 27 |
| 5.2.3. Substâncias **2 (a, b e c)** | 29 |

| | |
|---|---|
| 5.2.4. Substâncias **3 (a, b e c)** | 33 |
| 5.2.5. Substância **4** | 36 |
| 5.2.6. Substância **5** | 50 |
| 5.2.7 Derivado **4a** | 56 |
| 5.2.8. Substância **6** | 65 |
| 5.3. ANÁLISE COM CLAE DAS FRAÇÕES *OSPGMC* E *OSPMC-16P*. | 71 |
| 5.4. Propostas Biossintéticas para os constituintes isolados de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. | 80 |
| 5.4.1. Ácidos graxos | 80 |
| **5.4.2. Esteróides** | 82 |
| 5.4.3. Terpenos | 83 |
| **5.4.4. Biflavonóides** | 84 |
| 5.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS | 85 |
| 5.5.1. Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Extrato Metanólico de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. | 85 |
| 5.5.2. Verificação de atividade antifúngica do Extrato Metanólico de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. | 86 |
| 5.5.3. Avaliação da Atividade Inseticida contra *Musca doméstica* | 88 |
| 5.5.4. Avaliação da toxidez do extrato metanólico em *Mus musculus.* | 90 |
| 6. CONCLUSÕES | 92 |
| 7. REFERÊNCIAS | 93 |

# 1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais vêm sendo utilizados pela humanidade como remédio desde os primórdios. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais.

O profundo conhecimento do arsenal químico da natureza, pelos povos primitivos e pelos indígenas, pode ser considerado fator fundamental para o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo. A convivência e o aprendizado com os mais diferentes grupos étnicos trouxeram valiosas contribuições para o desenvolvimento da pesquisa sobre utilização de substâncias naturais para a cura de doenças ou criar produtos em benefício do bem estar do homem. Há relatos, por exemplo, do uso de plantas com finalidades terapêuticas por volta de 3.000 a.C. na obra *Pen Ts'ao* do chinês Shen Nung (VEIGA JR. *et al,* 2005). As pesquisas na área da química de produtos naturais permitiram a descoberta de muitos modelos moleculares que fundamentaram estudos de relação estrutura-atividade (SAR) e inspiraram o desenvolvimento da síntese orgânica clássica. (VIEGAS JR. *et al,* 2006).

No início, os químicos estudavam plantas consagradas pelo uso popular, geralmente incorporadas às farmacopéias da época, limitando-se ao isolamento e à determinação estrutural de substâncias ativas (YUNES & CECHINEL FILHO, 2001). Dada a importância das plantas para a medicina da época, a Química e a Medicina passaram a ter uma estreita relação, o que permitiu um rápido desenvolvimento de seus campos específicos (YUNES & CECHINEL FILHO, 2001). Desta forma, muitas substâncias ativas foram conhecidas e introduzidas na terapêutica, permanecendo até hoje como medicamentos. Um exemplo importante do desenvolvimento dos fármacos a partir de produtos naturais de plantas foi o descobrimento dos salicilatos obtidos de *Salix alba*.

A natureza sempre despertou no homem um fascínio encantador, não só pelos recursos oferecidos para sua alimentação e manutenção, mas por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado. A busca incessante pela compreensão das leis naturais e o desafio de transpor barreiras à sua sobrevivência, como o clima e as doenças, levaram o homem ao atual estágio de desenvolvimento científico, mesmo após o avanço tecnológico observado nos dias de hoje. (VIEGAS JR *et al.* 2006).

Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase que inacreditável de diversidade em termos de estrutura, propriedades físico-químicas e biológicas (WALL & WANI, 1996). Diversos autores têm apontado a importância dos estudos químicos e farmacológicos de várias espécies vegetais pela intensa produção de metabólitos especiais, principalmente, nas espécies dos ecossistemas tropicais (BRITO & BRITO, 1993). Nesta perspectiva, a botânica, a química e a farmacologia abrangem conhecimentos indispensáveis para a utilização segura de plantas medicinais, mostrando que a busca sistemática de novos medicamentos tem sido realizada por inúmeras abordagens de estudo. Desta forma, uma abordagem interdisciplinar, na pesquisa de novos medicamentos, representa, de modo inegável, a alternativa mais eficaz e promissora para o alcance deste objetivo (Di STASI, 1996).

Nas últimas décadas o estudo de plantas medicinais evoluiu muito, principalmente, do ponto de vista químico. Esta evolução deve-se ao desenvolvimento de técnicas analíticas que corroboram para a determinação estrutural. Os produtos naturais vêm recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos (VIEGAS JR *et al.* 2006). Cerca de 25% das prescrições dispensadas nos Estados Unidos durante os últimos 25 anos estavam relacionadas a medicamentos que com princípios

ativos de origem natural ou semi-sintéticos, oriundos normalmente de plantas superiores. Além de cerca de 13% relativas a medicamentos de fontes microbianas e 2,7% de origem animal (CRAGG, et. al., 2003). Resultados de análise de novos fármacos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) e por entidades reguladoras de outros países, no período de 1981 a 2006, indicaram que os medicamentos recomendados para tratamento de doenças infecciosas atingiram 230 novos medicamentos, dos quais 5,2% eram de produtos naturais e 32,3% eram de derivados de produtos naturais (NEWMAN & CRAGG, 2007). Para o tratamento do câncer cerca de 175 novos medicamentos tem sido aprovados, dos quais 14% são de produtos naturais e 28% de derivados de produtos naturais. (NEWMAN & CRAGG, 2007).

O Brasil, com a grandeza de seu litoral, de sua flora e, sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais. A Química de Produtos Naturais (QPN) é, dentro da Química brasileira, a área mais antiga e a que, talvez, congregue o maior número de pesquisadores (PINTO *et al.,* 2002).

O grupo de pesquisa em química de produtos naturais da UFRRJ tem registrado, dentre outros trabalhos, estudos com a família Ochnaceae, principalmente com espécies do gênero *Ouratea* e *Luxemburgia,* dando valiosas contribuições para o conhecimento da química dessa família, propiciando subsídios para avaliações quimiotaxonômicas, além de apresentar substâncias com importantes atividades biológicas contribuindo para busca de novos fármacos (SUZART, *et. al*.2007).

**Objetivos**

Os objetivos do presente trabalho são:

- Isolar e identificar os principais metabólitos especiais dos galhos de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl.;
- Verificar se há semelhanças químicas entre as variedades de *Ouratea hexasperma* (*O. hexasperma* (A. St.-Hil.) Bail. var. *hexasperma* e *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl.);
- Avaliar atividades biológicas de extratos e/ou frações dos galhos de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl., como atividades antibacteriana, antifúngica, inseticida e de toxicidade;
- Preparar derivados dos constituintes isolados;
- Fazer a atribuição de dados espectrométricos das substâncias naturais isoladas e derivados;
- Utilizar CLAE-EM para identificar componentes minoritários que são difíceis de identificar pelas técnicas usuais;
- Realizar um estudo de informações relacionadas aos biflavonóides considerados como marcadores sistemáticos do gênero *Ouratea*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Generalidades Sobre a Família Ochnaceae e o Gênero *Ouratea*

A família Ochnaceae pertence à ordem Theales e compreende cerca de 28 gêneros e 400 espécies, de ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. No Brasil ocorrem aproximadamente 9 gêneros com 105 espécies (BARROSO, 1986). Essas são plantas essencialmente arbóreas ou arbustivas, raramente herbáceas (*Sauvagesia*), folhas em geral inteiras, de distribuição alterna e com estípulas. Apresentam flores amarelas, alvas ou avermelhadas. (BARROSO et. al, 2002).

A família Ochnaceae é pouco conhecida do ponto de vista químico e biológico. Estudos químicos demonstram que são capazes de biossintetizar flavonóides e biflavonóides, sendo os gêneros *Ochna, Lophira, Luxemburgia* e *Ouratea* os mais estudados. Investigações sobre a composição química de espécies do gênero *Ouratea*, levaram ao isolamento de vários biflavonóides (SIMONI *et al*., 2002). A freqüência e a diversidade estrutural dos biflavonóides em espécies desses gêneros permitem que sejam utilizados como marcadores taxonômicos (SUZART *et al.,* 2007).

O gênero *Ochna* consiste em mais de 85 espécies distribuídas por toda África (PEGNYEMB *et al*., 2003), principalmente na região de Camarões. O estudo de algumas espécies desse gênero forneceu triflavonóides: caloflavanas A e B (**figura 1**, pág. 3). (MESSANGA *et al*., 2002); biflavonóides (KAMIL *et al*., 1987): calodeninas A e B e lophironas K e C (**figura 2**, pág. 4). (MESSANGA *et al*., 1994; PEGNYEMB *et al*., 2001). Biflavonóides, isoflavona e flavona C-glicosilada foram isolados de *O*. *squarrosa*. Esta espécie é utilizada no tratamento de indigestão, complicações menstruais e contra asma (RAO & GUNASEKAR, 1989). O extrato etanólico e os biflavonóides isolados do caule de *O*. *macrocalyx* mostraram atividades citotóxicas e antibacterianas (TANG *et al*., 2003).

O gênero *Lophira* é comumente encontrado na região tropical da África, onde é conhecido pelos seus usos medicinais (GHOGOMU *et al*., 1987). As espécies mais estudadas são *L. alata* e *L. lanceolata*. Desses gêneros foram isolados flavonóides, biflavonóides e dímeros de chalconas (lophironas F, G e H) (**figura 2,** pág. 4). (TIH GHOGOMU *et al*., 1989a; TIH GHOGOMU *et al*., 1989b; TIH GHOGOMU *et al*., 1990; TIH *et al*., 1992a; TIH *et al*., 1992b; TIH *et al*., 2003).

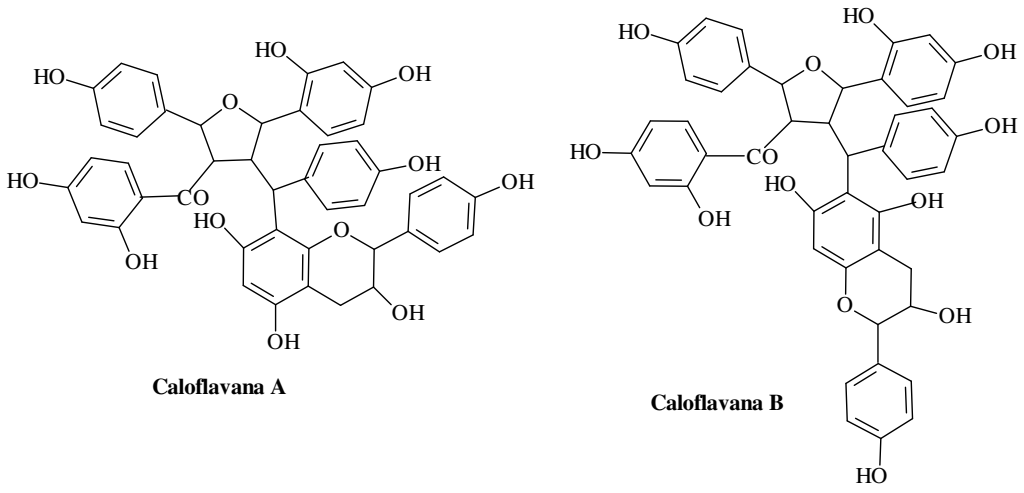



**Figura 1:** Triflavonóides isolados no Gênero *Ochna*

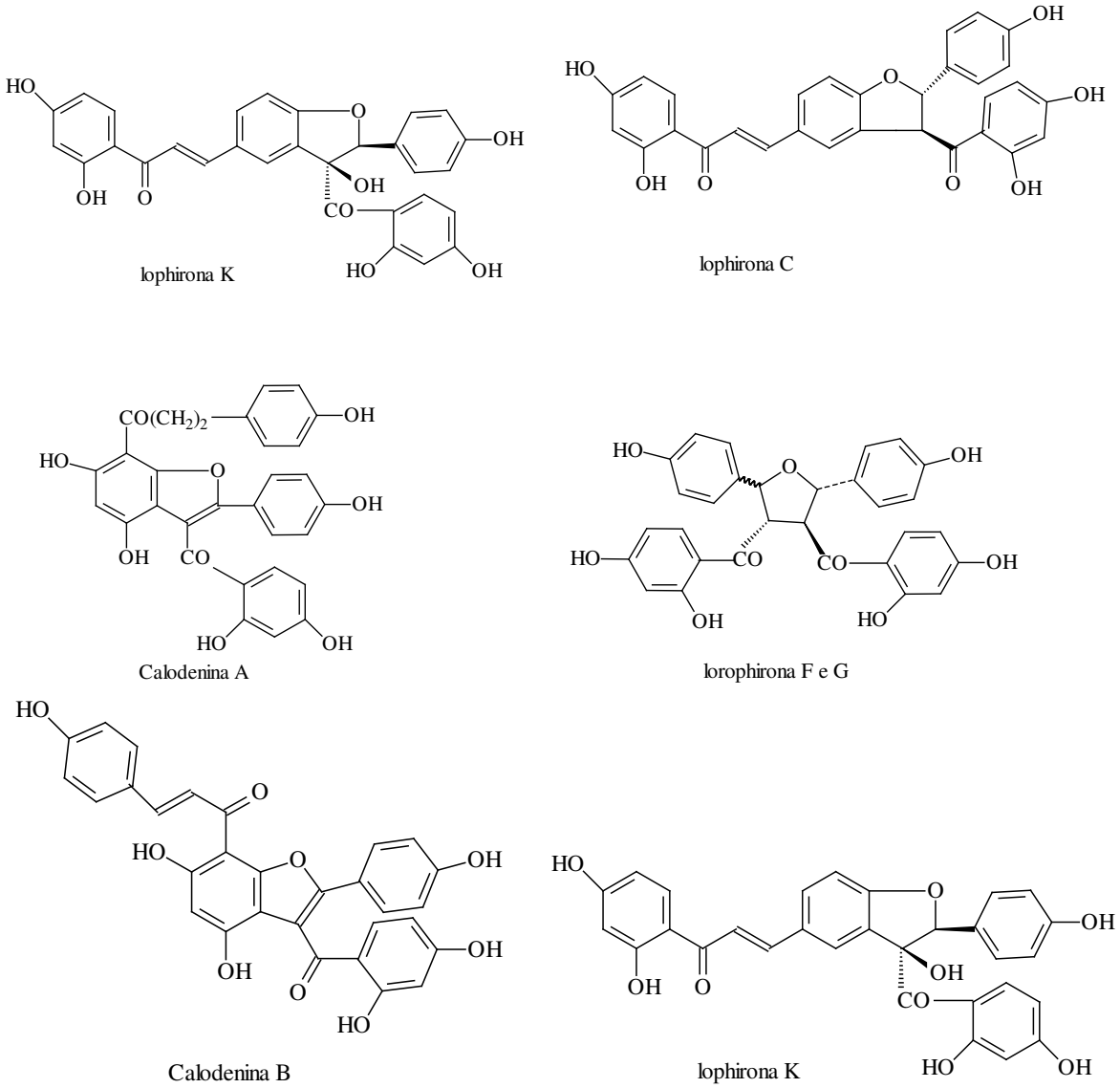



**Figura 2**: Biflavonóides e dímeros de chalconas isolados dos Gêneros *Ochna e Lophira*.

O Gênero *Luxemburgia* ocorre somente no Brasil e suas espécies são encontradas principalmente nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço, em Minas Gerais e na Bahia (FERES, 2006). Estas espécies são capazes de biossintetizar flavonóides e biflavonóides com esqueleto próximo a chalconas (OLIVEIRA *et al*., 2002; CARVALHO *et al*., 2004) e a bichalcona luxenchalcona (I-3-O-II-4") (**figura 3,** pág. 5**)** (CARVALHO *et al*., 2004). A rutina (3-*O*-rutinosídeo-quercetina) foi isolada de *Luxemburgia nobilis* (OLIVEIRA *et al*., 2002) e das flores de *Luxemburgia octandra* foram isolados dois flavonóides 8-*C*-glicosilados (**figura 3**) (ALVES *et al*., 2003).

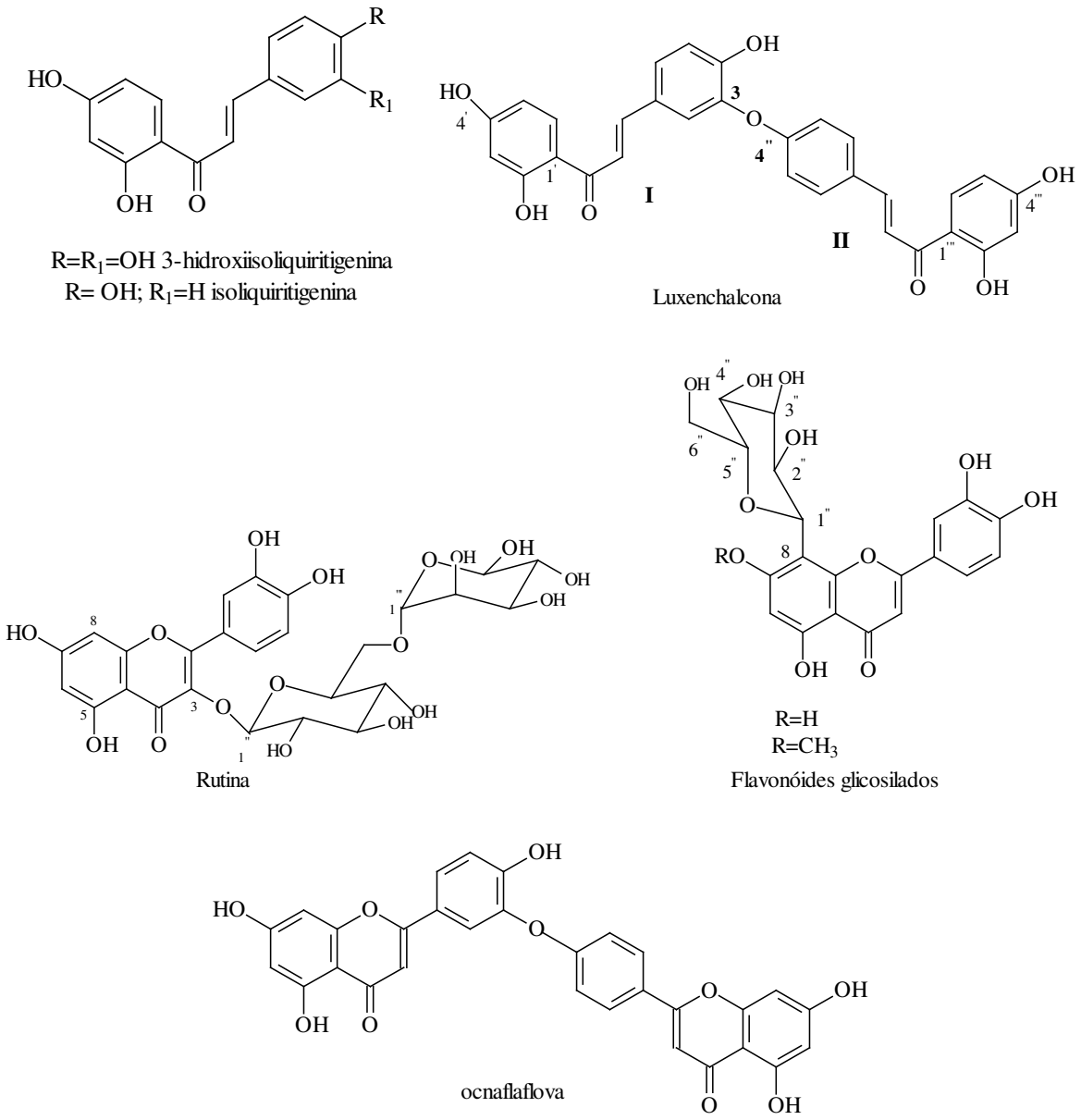



**Figura 3:** Flavonóides e chalconas isolados do gênero *Luxemburgia*

O gênero *Ouratea* ocorre em todo território Nacional, destacando-se no Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraíba, Bahia e Pernambuco. Algumas espécies do gênero *Ouratea* incluindo a *O. grandifolia,* ocorrem na Restinga da Marambaia, Corcovado e Campo Grande (Limeirão)/RJ. (BARROSO, 1986).

As espécies de *Ouratea* são caracterizadas pelas flores geralmente vistosas, freqüentemente de coloração amarela. No Nordeste as espécies de *Ouratea* são conhecidas como batiputá, as sementes de batiputá fornecem a "Manteiga de batiputá", óleo adocicado e aromático, utilizado em conservas e temperos, tornando-se rançoso com facilidade. As espécies de *Ouratea* espalhadas pelo país recebem designações específicas como Angelim

(*Ouratea vaccinoides*), Caju Bravo (*Ouratea floribunda* e *Ouratea salicifolia)* e Coração de Bugre (*Ouratea parviflora*). As *Ouratea floribunda* e *Ouratea castanaefolia* são empregadas em ornamentação urbana (SUZART *et al.,* 2007). São utilizadas na medicina popular como adstringentes, tônicas, estomáquicas, vermífugas (BRAGA, 1960), em distúrbios gástricos e reumatismo (MBING et al., 2003a) e útil na cura de paralisias, erisipela, feridas no útero e úlceras, distúrbios gástricos e na cicatrização de feridas (BARROSO, 1986).

Em estudos com espécies do gênero *Ouratea,* podemos destacar os que mostraram atividade antitumoral contra células do carcinoma Ehrlich (CARVALHO *et al*., 2002), inibição das DNA topoisomerases (GRYNBERG *et al*., 2002), efeitos antiproliferativos e ativação da apoptose em células de tumor Ehrlich (GRYNBERG *et al*., 1998). O extrato hidroetanólico e a fração acetato de etila de *Ouratea semisserrata* apresentaram efeito vasodilatador dependente do endotélio (CORTES *et al*., 2002) e atividade anti-hipertensiva, inibindo a conversão da enzima angiotensina I (ACE) (CASTRO *et al*., 2000). O extrato metanólico de *Ouratea elongata, Ouratea flava e Ouratea sulcata*, demostrou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus, S. epidermidis, Enterococcus hirae e Candida albicans* (GANGOUE-PIEBOJI et al., 2006). Também apresentou atividade antimicrobiana o óleo da fruta de *Ouratea parviflora* Baill extraído com hexano (PAULO, et al., 1986). O extrato metanólico das folhas de *Ouratea cuspidata* revelou atividade antiparasitária frente a *Leishmania braziliensis*, biopoteção contra radicais livres e ação antiinflamatória. (SUZART*,* 2007).

Estudos químicos realizados em espécies deste gênero revelaram que são bioprodutores de flavonóides, flavonóides glicosilados (SUZART *et al.,* 2007) e biflavonóides (SUZART *et al.,* 2007; CARVALHO *et al*., 2008). Na figura **4**, págs. 7 e 8, são mostradas estruturas químicas de substâncias deste gênero. De *Ouratea sp*. (MONACHE *et al*., 1967) foram isolados a protocianidina (**1**) e catequina (**2**); de *O. affinis* Engl. e *O. calantha* Gilg. (GARTLAN *et al*., 1980) foi isolado a cianidina (**3**); *de O. spectabilis* (Mart.) Engl. (FELÍCIO *et al*., 1995) foram isolados bigenkanina (**4**) e 7,7”- O-dimetilagatisflavona (**5**); de *O. multiflora Pohl* (FELÍCIO *et al*., 2001) foram isolados amentoflavona (**6**) e , 3-OH-4’,5,7-OMe-flavona-(6→8”)- 3”-OH -3’”,4’”,5”,7”-OMe flavona (**7**); de *O. semisserata* (Mart.) Engl. (VELANDIA *et al*., 2002) foram isolados 3',6,8-cloro-4’,5-OH-7-OMe isoflavona (**8**), 3',5',6,8-cloro-4’,5-OH-7-OMe isoflavona (**9**), 5,7-OH-flavona-(4’→O→8”)- 4‴,5″,7″-OH flavona (**10**), 5-OH -7- OMe-flavona-(4′→O→8″)- 4‴, 5″,7″-OH flavona (**11**), 5-OH-7-OMe-flavona-(4′→O→8″)-5″,7″-OH-4‴-OMe flavona (**12**), amentoflavona (**6**), podocarpusflavona (**13**) e rutina, (**14**); De *O. flava* Schum e Thon (MBING *et al*., 2003a) foram isolados calodenina B (**15**), flavumona A (**16**), flavumona B (**17**), calodenina C (**18**), lophirona A (**19**) e 4′,5-OMe-6,7-metilenodioxi-isoflavona (**20**); de *Ouratea hexasperma* (St. Hil.) Bail. (MOREIRA *et al*., 1994; DANIEL *et al*., 2005) foram isolados Hexaspermona A (**21**), Hexaspermona B (**22),** Hexaspermona C (**23),** 5,7,4’-OMe-isoflavona (**24**), 7″-O-metilagatisflavona (**25),** 7,7″-O-dimetillanaraflavona (**26**), agastiflavona (**27**), epicatequina (**28**), 6-C-glicopiranosil-luteolina (**29**), 3-O-glicopiranosil-quercetina (**30**), 2″-O-β-D-glicopiranosil-8-C-β-D-glicopiranosil luteolina (**31**); de *O. microdonta* (CARVALHO et al., 2008) foram isolados agatisflavona (**27**), 7”-O-metilagatisflavona (**25**) e amentoflavona (**6**). (**Figura 4**, págs. 7 e 8**)**.

Além de flavonóides e biflavonóides, ocorrem no gênero outras classes de subsâncias como norisoprenóides (VELANDIA *et al*., 1998), diterpenos (VELANDIA *et al*., 1998; FELÍCIO *et al*., 2004), triterpenos, (MBING *et al*., 2003b; CARVALHO *et al*., 2008), esteróides (CARVALHO *et al*., 2008), lignanas (VELANDIA *et al.*, 1998), hidrocarbonetos e ésteres alifáticos (MOREIRA *et al*., 1994; PAULO *et al*., 1986; ESTEVAM *et al*., 2005) além de derivado do ácido benzóico (CARVALHO *et al*., 2008). As estruturas químicas de alguns representantes desta classe são mostrados na **figura 5**, pág. 9**.**

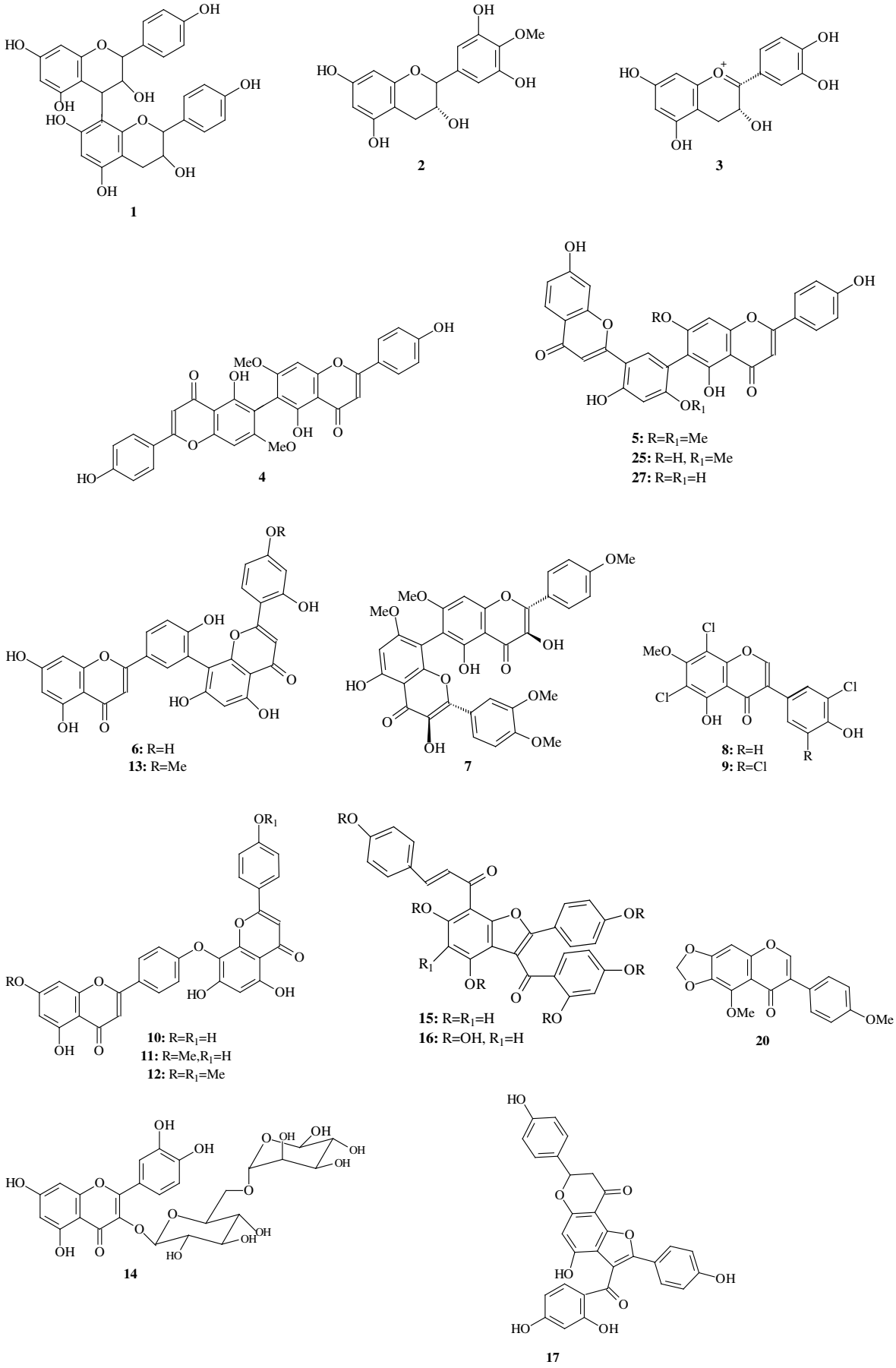
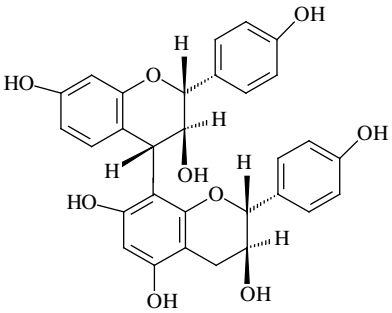
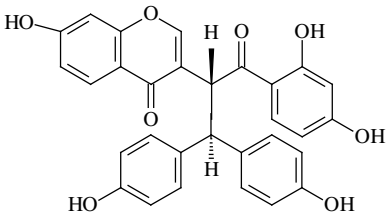


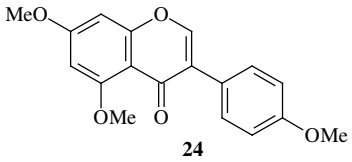

**Figura 4:** Flavonóides isolados do Gênero *Ouratea*



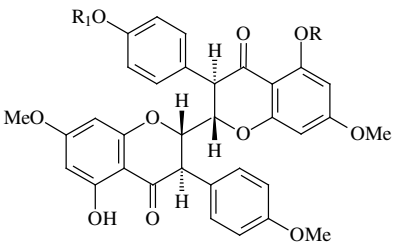
**18**



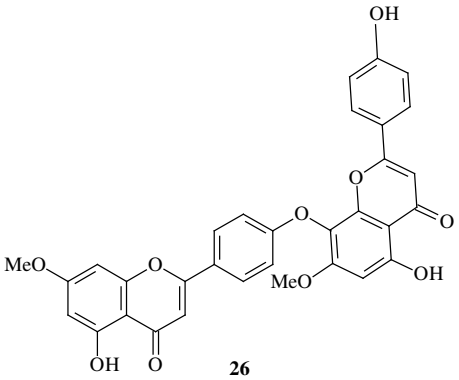
**19**



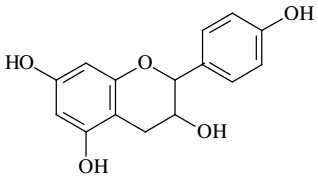
**24**



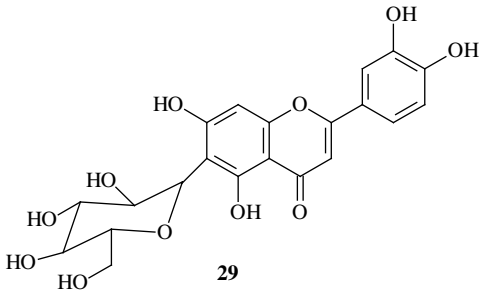
**21:** R=H, $R_1$=Me
**22:** R=Me, $R_1$=H
**23:** R=$R_1$=H



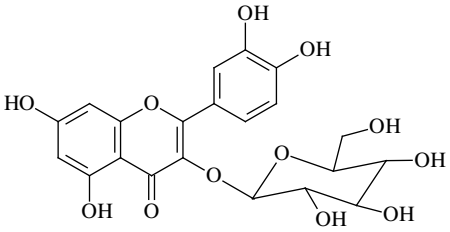
**26**



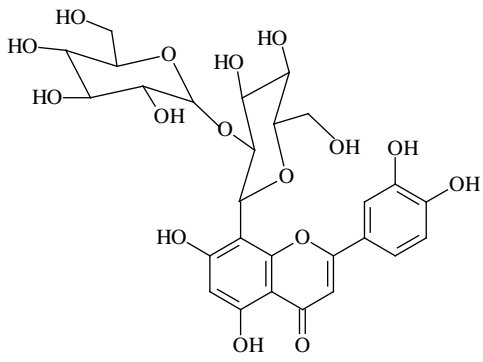
**28**



**29**



**30**



**31**

Continuação da **Figura 4:** Flavonóides isolados do Gênero *Ouratea.*

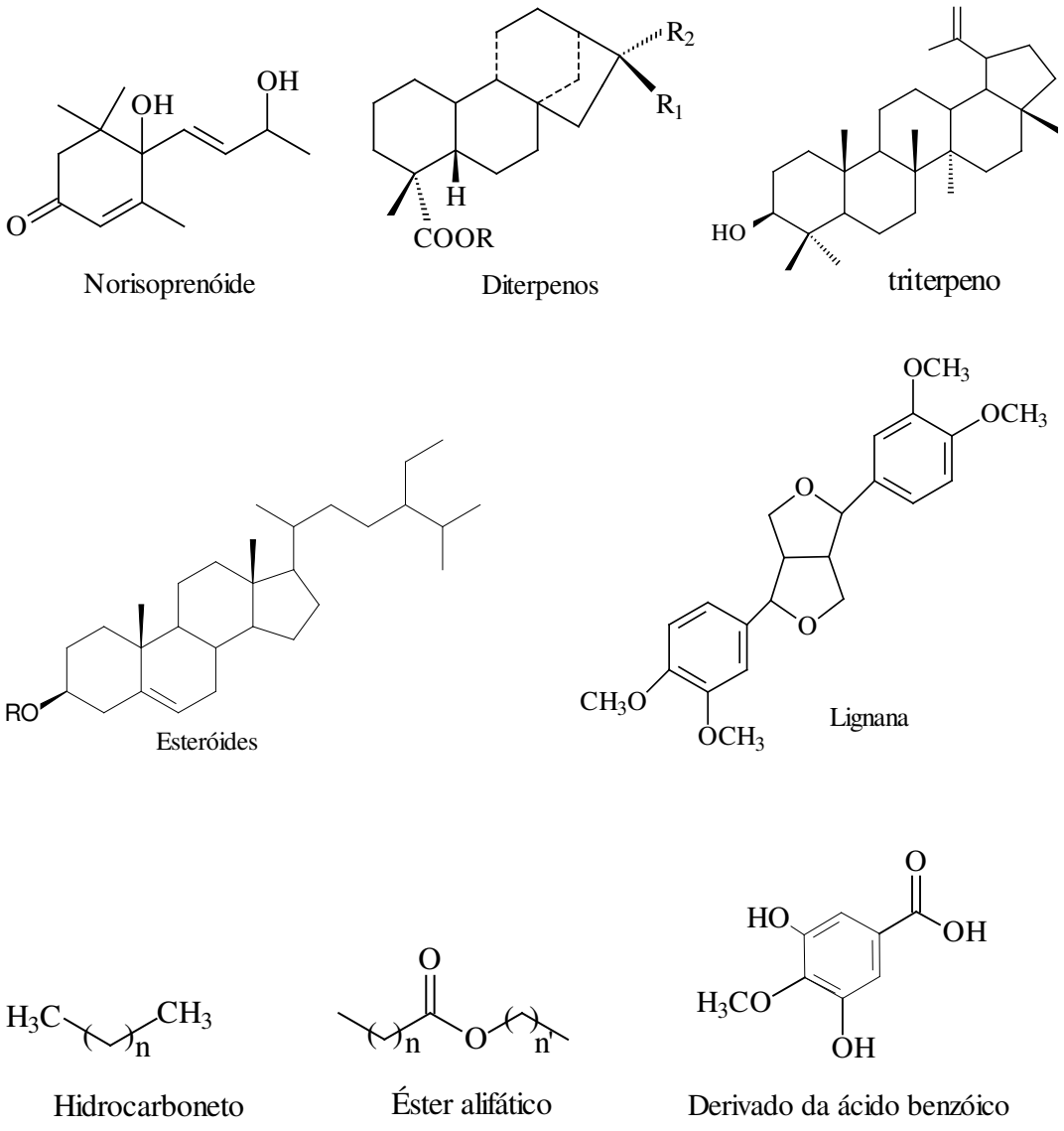



**Figura 5:** Outras classes de substâncias isoladas nos gêneros *Ouratea.*

## 2.2 Classificação botânica de *O. hexasperma* (St. Hill) Bail var. *hexasperma e O. hexasperma* var. *planchonii* Engl.

*Ouratea hexaperma* foi classificada pela primeira vez como *Ghomphia hexasperma* A. St. Hil. (Flora Brasiliae Meridionalis (quarto ed.) 1: 61. 1824), posteriormente a classificação botânica foi modificada para *Ouratea hexasperma* (A. St.-Hill.) Bail. (Histoire des Plantes 4: 366. 1873) e após verificar diferenças morfológicas dentro na prórpria espécie, classificou-se em duas variedades, a típica, *O. hexasperma* (A. St. Hill.) Bail var. *hexasperma* e uma nova variedade *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl. (Flora Brasiliensis 12(2):321. 1876).

A variedade típica (A. St.-Hill.) Bail, apresenta folhas lanceoladas, provida de acúmem de 1 cm de comprimento e a variedade *planchonii* Engl. apresenta folhas oblongas ou oblonga-ovadas, raramente acuminada aguda. (Flora Brasiliensis). (**Figura 6**, pág. 10**).**

Atualmente estas variedades foram sinonimizadas, especialistas da família não consideram as variedades e apenas a espécie *Ouratea hexasperma* (A. St.-Hill.) Bail., devido à estas pequenas diferenças morfológicas.

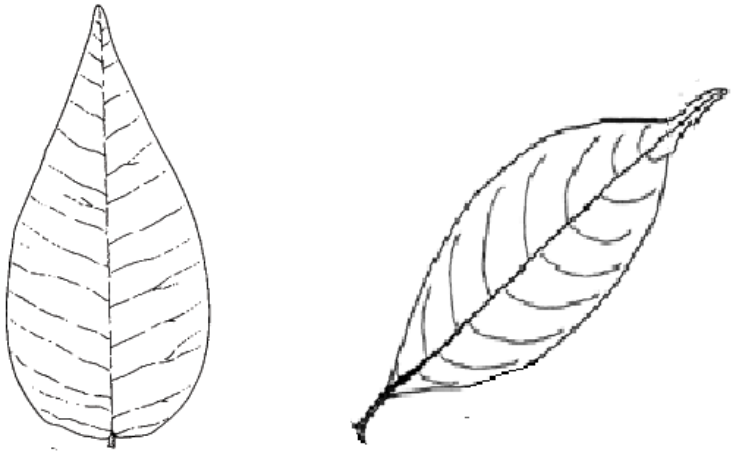



**Figura 6:** Diferenças morfológicas marcantes entre as folhas de *Ouratea hexasperma.*

### 2.3. Estudo Químico Realizado com *Ouratea hexasperma* (St. Hil.) Bail

Como citado anteriormente, estudos químicos com *Ouratea hexasperma*, coletada no cerrado da Amazônia, conduziu ao isolamento de hidrocarbonetos, de biisoflavonóides: hexaspermona A, B, C, estruturas 21, 22 e 23 da figura 4, pág. 7 e 8. e da biflavona 7'' -metilagatisflavona, estrutura 25 da figura 4, pág. 7 (MOREIRA *et al*., 1994; MOREIRA, *et al*., 1999). Das folhas, inflorescência e caule de *Ouratea hexasperma,* coletadas no Município de João Pessoa na Paraíba, foram isolados hidrocarbonetos, esteróides, saponinas, triterpenos (**figura 5,** pág. 10), flavonóides, epicatequina, biflavonóides (7,7''-*O*-dimetillanaraflavona, 7''-*O*-metilagatisflavona e Agatisflavona) além de flavonóides glicosilados, **figura 4**, pág. 8 e 9 (DANIEL, 2005; SUZART, 2007).

O grupo de pesquisa em Química de Produtos Naturais da UFRRJ tem registrado, dentre outros trabalhos, estudos de espécies do gênero *Ouratea* e *Luxemburgia* (Ochnaceae) dando valiosas contribuições para o conhecimento da química dessa família, propiciando subsídios para avaliações quimiotaxonômicas, além de apresentar substâncias com importantes atividades biológicas contribuindo para busca de novos fármacos (SUZART, *et al*. 2007).

O levantamento na literatura sobre biflavonóides presentes na família Ochnaceae e em espécies do gênero *Ouratea* permitiu tirar deduções e fazer considerações sobre essa classe de substâncias, que são freqüentes no gênero, além de detectar alguns aspectos farmacológicos.

A quantidade de resultados obtidos até o momento com estudo das espécies *Ouratea* orientou-nos a fazer um estudo de informações relacionadas aos biflavonóides comumente presentes, entre eles os mais abundantes: Agatisflavona e 7''-O-metilagatisflavona, Pode-se aferir a estes possibilidades de marcadores quimiotaxonômicos.

### 2.4. Biflavonóides

Os biflavonóides constituem uma classe de flavonóides diméricos, diferenciando-se de outros oligômeros como as proantocianidinas, devido à origem biogenética das unidades

constituintes. A maioria dos representantes dessa classe de produtos naturais é formada pelos dímeros flavona-flavona, flavona-flavanona, flavanona-flavanona além de ocorrer, mais raramente, os dímeros de chalconas e de isoflavonas. Quando as duas unidades são iguais constituem os bisflavonóides e quando as duas unidades são diferentes são os biflavonóides. As ligações entre as unidades flavonoídicas podem ser C-C ou C-O-C envolvendo os anéis A, B ou C dos monômeros (**Figura 7,** pág. 11). (SUZART *et al.,* 2007).

Segundo Suzart (2007) e colaboradores, seguindo a literatura (SIMÕES *et al*., 2001, CHARI, *et. al*., 1977, DORA, *et. al*., 1991), utiliza-se a numeração dos biflavonóides atribuindo 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**. De acordo com os átomos de carbonos envolvidos na ligação entre as unidades, os dímeros são classificados em grupos de biflavonóides (**figura 7,** pág. 13**)**, além dos dímeros de chalconas: C-3→O-C-4‴ (luxenchalconas), **figura 3**, pág. 5 (CARVALHO *et al*., 2004) e C-3′→C3″ (brackeninas), **figura 7,** pág. 11 (DREWES, *et al*., 1984) e dos dímeros de isoflavonas C-2→C-2″ (hexaspermonas), estruturas 21, 22 e 23 da **figura 4**, pág. 7 e 8 (MOREIRA *et al*.,1994), sem destacar os dímeros com duas ligações entre as unidades. A ligação tipo C-O-C é característica das ochnaflavonas (C-3′→O-C-4‴), **figura 3,** pág. 5 e das lanaraflavonas (C-4′-O→C-8″), **figura 7,** pág. 11. Alguns dos grupos hidroxila podem apresentar-se metilados originando os respectivos éteres metílicos que, às vezes, recebem nomes especiais (MOREIRA, *et. al*., 1999; FELICIO *et al*., 1995; VELANDIA *et al*., 2002; DANIEL *et al*., 2005

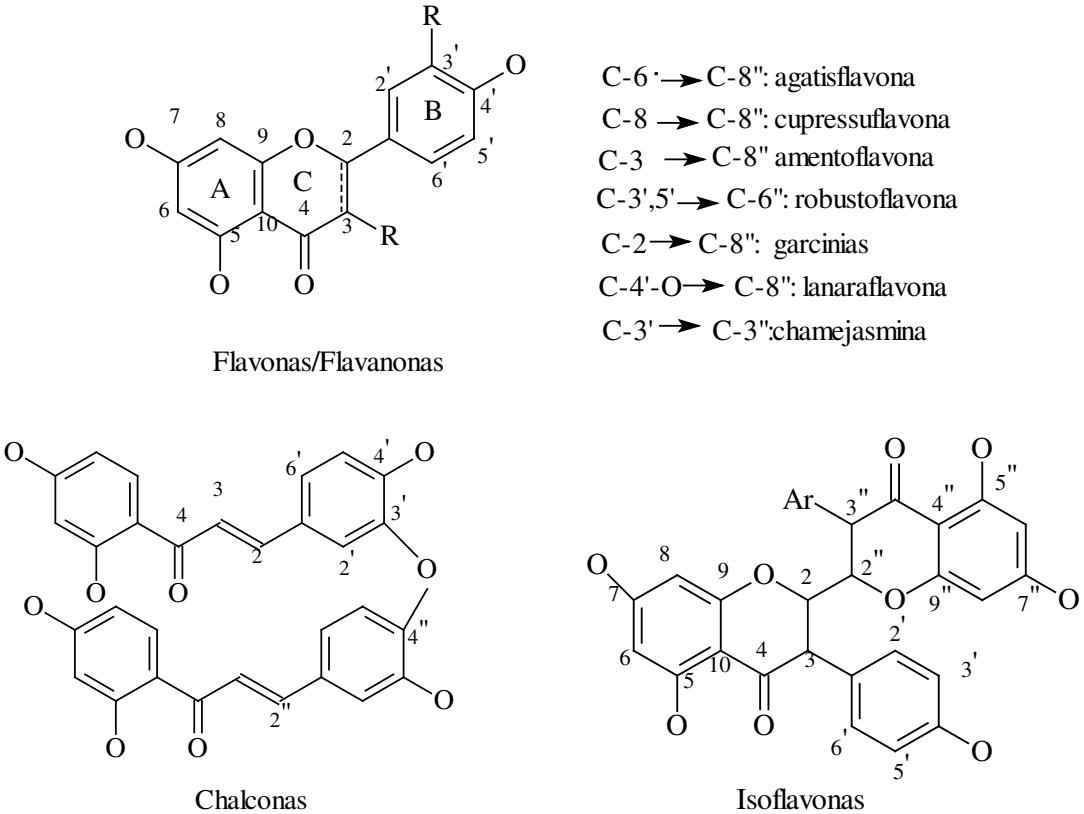



Figura 7: Dímeros de flavonóides

Uma característica marcante dos metabólitos isolados do gênero *Ouratea* é a ligação entre seus monômeros, sendo as mais abundantes C-3→C-8'' e C-6→C-8'', acrescentando uma variação no padrão de metilação. No caso dos derivados da agatisflavona (C-6→C-8''), estruturas 25 e 27 da **figura 4**, págs. 7 e 8, a metilação é mais freqüente na posição 7", sendo esta a biflavona mais abundante no gênero *Ouratea*. Em 1929 foi isolada a primeira biflavona, a gingentina, do Ginkgo Biloba (LIN *et al.*, 1997). A partir desse isolamento muitos biflavonóides foram isolados de plantas e várias atividades biológicas têm sido relacionadas a essa classe de substâncias (LIN *et a.,l* 1999).

Os biflavonóides são geralmente encontrados em grande quantidade em diferentes plantas e muitos tecidos vegetais. Apresentam várias propriedades, como proteção contra raios ultravioleta nas folhas, antifúngico e alimento para insetos (SIMÕES *et al*., 2001). As atividades farmacológicas conhecidas são: Estimulantes cardíacos, antivirais, antimicrobianas, antiinflamatórias e anti-hepatotóxicas (SIMÕES *et al*., 2001, LIN *et al*., 1999). Em estudos de atividades biológicas, os biflavonóides isolados de *O. spectabilis*, *O. multiflora* e *O. parviflora* mostraram inibição da produção de aflatoxina por *Aspergillus flavus* (GONÇALEZ *et al*., 2001), Os biflavonóides isolados das partes aéreas de *Ouratea sulcata* exibiram significante atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Bacillus subtilis, Escherichia coli, Listonella anguillarum, Staphylococcus aureus* (PEGNYEMB et al., 2005) Os dímeros de flavonas das folhas de *O. multiflora* mostraram atividade contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis.* **(**CARBONEZI et al., 2007)**,** os biflavonóides isolados de *O. spectabilis* inibiram a enzima aldose redutase (FELICIO *et al*., 1995), além de atividade antitumoral detectadas para os biflavonóides isolados de *O. hexasperma* (St.Hil.) Bail (DANIEL *et al.* 2007).

### 2.4.1. Agatisflavona e derivados

Fazendo uma avaliação sobre os flavonóides que são mais freqüentes em espécies de *Ouratea* percebeu-se que a agatisflavona e principalmente, seu derivado 7"-metil éter são os mais freqüentes. Resolvemos fazer um levantamento para verificar a ocorrência destes flavonóides em outras famílias, através deste levantamento observou-se que estas substâncias também ocorrem em outras famílias vegetais, como apresentado na tabela **1.**

**Tabela 1:** Ocorrência de Agatisflavonas e derivados em espécies vegetais.

| BIFLAVONOIDES | ESPÉCIES | FAMÍLIAS | REFERÊNCIAS |
|---|---|---|---|
| 4"',7-O-dimetilagatisflavona; 7-O-metilagatisflavona | *Agathis alba* | Araucariaceae (conífera) | MASHIMA et al.,1970 |
| 4"',7-O-dimetilagatisflavona; 7-O-metilagatisflavona; 7,7"-O-dimetilagatisflavona | *Araucaria bidwillii* and *Agathis alba* | Araucariaceae | KHAN et al., 1972 |
| 7-O-metilagatisflavona | *Araucaria rulei* | Araucariaceae | ILYAS et al., 1977 |
| 7,7"-O-dimetilagatisflavona 7-O-metilagatisflavona | *Agathis australis* | Araucariaceae | OFMAN et al., 1995 |
| 7-O-metilagathisflavona | *Araucaria araucana* | Araucariaceae | PARVEEN et al., 1987 |
| Agatisflavona 7,7"-O-dimetilagatisflavona 7-O-metilagatisflavona | *Araucaria angustifolia* *Araucaria genus* | Araucariaceae | ILYAS et al., 1994 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Agatisflavona | *Rhus succedanea e Garcinia multiflora* | Araucariaceae | LIN et al., 1997 |
| Agatisflavona | *Rhus succedanea* | Anacardiaceae | CHEN, 1973 |
| Agatisflavona | *Rhus succedanea* | Anacardiaceae | LIN et al., 1974 |
| Agatisflavona | *Rhus punjabensis* | Anacardiaceae | KAMIL et al., 1984 |
| Agatisflavona | *Rhus semialata* | Anacardiaceae | BAGCHI et al., 1985 |
| Agatisflavona | *Picea morinda Linn* | Anacardiaceae | AZAM et al., 1985 |
| Agatisflavona | *Rhus semialata Murr* | Anacardiaceae | PARVEEN et al., 1988 |
| Agatisflavona | *Amphipterygium amplifolium; Orthopterygium huaucui* | Anacardiaceae | WANNAN et al., 1988 |
| Agatisflavona | *Rhus coriaria* | Anacardiaceae | VAN LOO et al., 1988 |
| Agatisflavona | *Anacardium occidentale* | Anacardiaceae | ARYA et al., 1989 |
| Agatisflavona | *Schinus terebenthefolus* | Anacardiaceae | KASSEM et al., 2004 |
| Agatisflavona | *Rhus pyroides, Rhus dentata and Rhus pentheri* | Anacardiaceae | SVENNINGSEN et al., 2006 |
| Agatisflavona | *Canarium manii* | Burseraceae | ANAND et al., 1992 |
| Agatisflavona | *Juniperus virginiana* | Cupressaceae (coníferas) | ROY et al., 1984 |
| Agatisflavona | *Garcinia xanthochymus* | Clusiaceae | PARVEEN et al., 1994 |
| Agatisflavona | *Bauhinia vahlii Linn* | Leguninoceae | SULTANA et. al, 1985 |
| Agatisflavona | *Caesalpinia pyramidalis* | Leguminosae Fabaceae | MENDES et al., 2000 |
| Agatisflavona | Caesalpinia pyramidalis | Leguminosae Fabaceae | BAHIA et al., 2005 |
| 7,7"-O-dimetilagatisflavona | *Ouratea spectabilis* | Ochnaceae | FELÍCIO et al. 1995 |
| 7"-O-metilagatisflavona | *Ouratea hexasperma* | Ochnaceae | MOREIRA et al., 1999 |
| 7,7"-O-dimetilagatisflavona | *Ouratea parviflora* | Ochnaceae | FELÍCIO et al., 2004 |
| Agatisflavona 7"-O-metilagatisflavona | *Ouratea hexasperma* | Ochnaceae | DANIEL et al., 2005 |
| Agatisflavona | *Ouratea sulcata* | Ochnaceae | PEGNYEMB et al., 2005 |
| Agatisflavona | *Ouratea nigroviolacea* | Ochnaceae | NGO MBING et al., 2006 |
| Agatisflavona | *Ouratea staudtii* | Ochnaceae | ZINTCHEM et al., 2007 |
| Agatisflavona; 7"-O-metilagatisflavona | *Ouratea microdonta* | Ochnaceae | CARVALHO, et al, 2008* |

Através da observação da **tabela 1** vemos que os biflavonóides Agatisflavona e derivados ocorrem em diferentes espécies de diferentes famílias, gêneros e espécies vegetais. Para verificar a ligação taxionômica desses gêneros com a ocorrência desses biflavonóides foi realizada uma avaliação através da divisão botânica da possível ligação entre as espécies onde foram encontradas essas substâncias. Na **tabela 2,** pág. 15, observam-se os dados de divisão, ordem, classe, família de cada espécie que foi isolado os biflavonóides Agatisflavona e derivados.

A partir desses dados observa-se que há relação entre algumas espécies, como as espécies da família Araucariaceae e Cupressaceae, que pertencem à mesma ordem, classe e divisão botânica. As famílias Anacardiaceae, Burseraceae, Leguminosae, Clusiaceae e Ochnaceae pertencem a ordens botânicas diferentes, mas pertencem a mesmas classes e divisões botânicas.

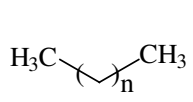
Nas famílias Araucariaceae e Ochnaceae encontram-se a maior variedade de derivados da agatisflavona, sendo que somente no gênero Ochnaceae, mas especificamente nas espécies de *Ouratea* que foi encontrado o biflavonóide 7"-*O*-metilagatisflavona. Isso demonstra que essa substância é um marcador quiotaxinômico da espécie *Ouratea*.

**Tabela 2:** Divisões Botânicas das espécies que onde há ocorrência de Agatisflavonas e derivados.

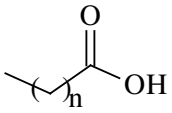
| DIVISÃO | CLASSE | ORDEM | FAMÍLIA | ESPÉCIE | BIFLAVONÓIDE |
|---|---|---|---|---|---|
| Pinophyta | Pinopsida | Pinales | Araucariaceae (coníferas) | *A. alba;*<br>*A. bidwillii;*<br>*A. rulei;*<br>*A. australis;*<br>*A. araucana;*<br>*A. angustifólia;* | 4”’,7-O-dimetillagatisflavona<br><br>7-O-metilagatisflavona<br><br>7,7"-O-dimetilagatisflavona<br><br>Agatisflavona |
| Pinophyta | Pinopsida | Pinales | Cupressaceae (coníferas) | *J. virginiana* | Agatisflavona |
| Magnoliophyta | Magnoliopsida | Sapindales | Anacardiaceae | *R. succedanea;*<br>*R. punjabensis;*<br>*R. semialata;*<br>*P. morinda Linn;*<br>*R. semialata Murr;*<br>*A. amplifolium;*<br>*O. huaucui;*<br>*R. coriaria;*<br>*A. occidentale;*<br>*S.terebenthefolus;*<br>*R. pyroides;*<br>*R. entata;*<br>*R. pentheri* | Agatisflavona |
| Magnoliophyta | Magnoliopsida | Sapindales | Burseraceae | *C. manii* | Agatisflavona |
| Magnoliophyta | Magnoliopsida | Fabales | Leguminosae Fabaceae | *B. vahlii Linn;*<br>*C. pyramidalis* | Agatisflavona |
| Magnoliophyta | Magnoliopsida | Malphiales | Clusiaceae | *G. xanthochymus* | Agatisflavona |
| Magnoliophyta | Magnoliopsida | Malphiales | Ochnaceae | *O. spectabilis;*<br>*O. hexasperma;*<br>*O. parviflora;*<br>*O. sulcata;*<br>*O. nigroviolacea;*<br>*O. staudtii;*<br>*O. microdonta* | 7,7"-O-dimetilagatisflavona<br><br>7"-O-metilagatisflavona<br><br>Agatisflavona |

## 3. CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl.

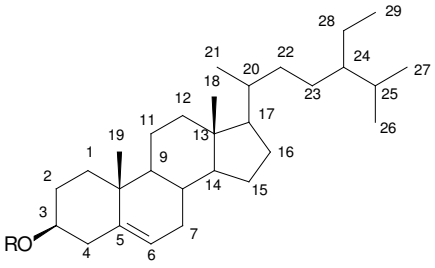
No presente trabalho, *O. hexasperma* (var. *planchonii* Engl.) foi submetida a estudo fitoquímico para verificar a presença de marcadores taxonômicos e servir como argumento adicional para localização da mesma na espécie. Com esse estudo, foram isolados compostos alifáticos; ácido alifático (**1**); uma mistura de esteróides: sitoesterol (**2a**), estigmasterol (**2b**) e campesterol (**2c**); os triterpenos lupeol (**3a**) e α-amirina (**3b**) e β-amirina (**3c**); os biflavonóides 7”-O-metilagatisflavona (**4**) e agatisflavona (**5**) e sitosterol-3-O-β-D-glicopiranosideo (**6**). **Figura 8,** pág. 17.



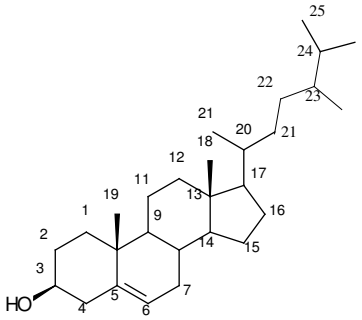
Compostos alifáticos



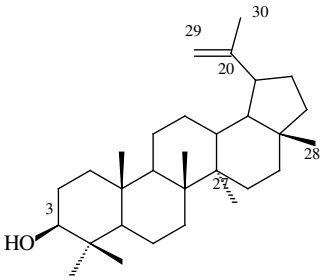
**1**



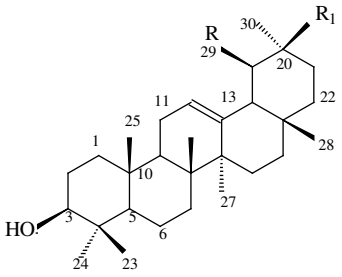
**2a:** 22,23-diidro
**2b:** $\Delta^{22,23}$



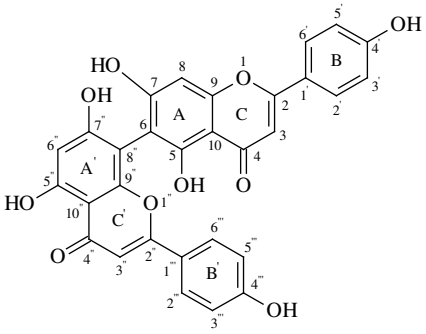
**2c**



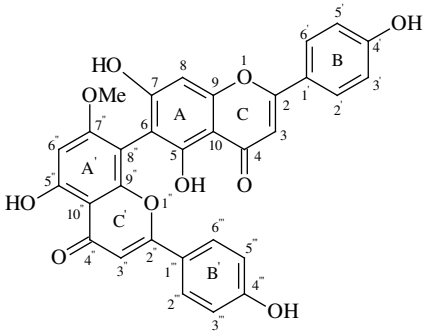
**3a**



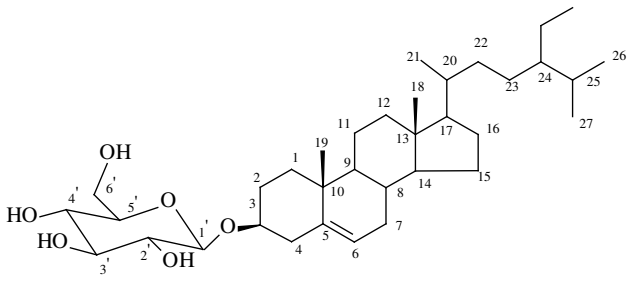
(**3b**) R = $CH_3$, $R_1$ = H
(**3c**) R = H, $R_1$ = $CH_3$



**5**



**4**



**6**

**Figura 8:** Constituintes químicos isolados neste trabalho (*O. hexasperma* var. *planchonii* Engl.)

# 4. PARTE EXPERIMENTAL

## 4.1. Equipamentos e Reagentes

Os pontos de fusão foram determinados em placa de aquecimento MEL-TEMP II, Laboratory Devices USA, utilizando capilar, sem correção dos valores obtidos. Os espectros de infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin-Elmer 1600/1605 FT-IR em pastilha de KBr. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de $^{1}H$ e $^{13}C$ (incluindo experimentos em 2D), foram registrados em espectrômetros Bruker AC-200 Advance ($^{1}H$: 200 e $^{13}C$: 50,3 MHz) e Bruker DRX-500 ($^{1}H$: 500 MHz e $^{13}C$: 125 MHz). Como padrão interno foi usado tetrametilsilano ou resíduo do solvente $CHCl_3$ ($\delta_H$ 7.24) e o pico central do tripleto em $\delta_C$ 77.00 do $CDCl_3$. Os espectros de massas foram registrados em cromatógrafo com fase gasosa acoplado a espectrômetro de massas de analisador de íons quadrupolo e ionização por impacto de elétrons, 70 eV; marca Varian Saturn 2000 da UFRRJ. As análises com CLAE foram realizadas com aparelho Shimadzu bomba modelo 10AS Shimadzu 10AD/10AS com detector UV-Vis 10AD, injetor manual Rhoodune 1175 com loop de 20μL, integrador 6 CR, com coluna de fase reversa C18 (250mm x 4,6 mm x 5μm) Betasil, utilizando um sistema isocrático de metanol/$H_2O$/acetonitrila/ácido acético (20:40:39:1) em duas bombas, na bomba A foi adicionada a fase orgânica ($CH_3OH$/ $CH_3CN$) e na Bomba B a fase aquosa ($H_2O$/ácido acético). A fase móvel foi ajustada para A 62% e B 38% e velocidade de fluxo 1mL.min$^{-1}$, os extratos foram monitorados a 270 nm. As análises em CLAE acoplado a espectômetro de massas foram feitas com o aparelho LCMS-IT_TOF Shimadzu, foram usados quatro solventes e duas bombas A (metanol/acetonitrila, 20:34) e B (água/ácido acético, 10:1), com sistema gradiente.

As cromatografias em coluna foram realizadas tendo como suporte gel de sílica (230-400 e 70-230 mesh, Vetec) e Sephadex LH-20 (Sigma, USA). A cromatografia em camada preparativa (CCP) foi feita em placas de gel de sílica 60 $PF_{254}$, Merck e Vetec, sobre suporte de vidro e espessura de 1mm.

As substâncias foram detectadas por irradiação na região do ultravioleta (254 e 366 nm). Foram usadas placas em folha de alumínio de gel de sílica 60 $PF_{254}$ Merck para cromatografia em camada fina (CCF) e como reveladores foram utilizados, detecção por irradiação ultravioleta (254 e 366 nm), e/ou reagentes cromogênicos:

- Dragendorff (solução de nitrato básico de bismuto II em ácido acético diluído com iodeto de potássio), reagente para alcalóides (MATOS, 1997).
- Liebermann Burchard (20mL de anidrido acético e 20 mL de ácido sulfúrico diluídos em 200 mL de etanol, em banho de gelo), seguido de aquecimento, reagente para terpenos e esteróides (MATOS, 1997).
- Soluções de $AlCl_3$-EtOH (1%), seguido de aquecimento, reagente para flavonóides. (VENNAT, B. et al, 1992).
- Godin A: Solução I: vanilina etanólica 1%
  Solução II: ácido perclorico 3%
  Godin B: Acido sulfúrico10 % v/v
  Misturar as soluções I e II em partes iguais e borrifar sobre a placa cromatográfica, revelar com Godin B e colocar em estufa. Para identificação de esteróides, triterpenos e flavonóides. (MARTINS, 2006).
- Vapores de iodo revelam a maioria das substâncias orgânicas.

## 4.2. Material vegetal

O material vegetal, galhos de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl., (Ochnaceae), coletado na época de frutificação, em área de restinga, no município de Conde, praia de Jacunã, em área de restinga e identificados pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra.

Uma excicata desta espécie (Nº6747) está depositada no herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

### 4.3. Obtenção dos extratos brutos

O material foi seco à temperatura ambiente, logo após a coleta e moídas em moinho de facas. O pó dos galhos de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. (1900g) foi submetido à extração através de maceração contínua com diclorometano e metanol. Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório a 40°C sob pressão reduzida e, após o uso de ar quente para retirar o resíduo de solventes, obtiveram-se os extratos de diclorometano (OspGD, 206,5 g) e o extrato metanólico (OspGM, 190,0 g).

### 4.4. Prospecção Química do Extrato Metanólico

Do extrato metanólico, aproximadamente 1,0 g, fez-se prospecção química que permitiu o conhecimento preliminar das principais classes de substâncias naturais presentes. Esta avaliação é freqüentemente usada para direcionar trabalhos posteriores de fracionamento e isolamento das substâncias (MATOS, 1988). Esta abordagem foi elaborada com testes para detectar os metabólitos especiais dos galhos da espécie, conforme metodologias descritas na literatura. As classes de substâncias avaliadas: alcalóides, saponinas, esteróides e triterpenóides, depsídio e depsidonas, flavonóides, catequinas, quinonas, sesquiterpenos e outras lactonas, carotenóides e xantofilas, glicosídios cardíacos, açúcares redutores, sacarídios, ácidos orgânicos e taninos.

### 4.5. Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos dos Extratos de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl.

#### 4.5.1. Extrato com diclorometano:

O extrato **OspGD** foi filtrado em funil de separação de gel de sílica usando hexano, clorofórmio e metanol e obtiveram-se as frações: hexano (**OspGDH**, 11,06g); Clorofórmio (**OspGDC**, 5,43g) e metanol (**OspGDM**, 116,9g).

A partição em hexano (**OspGDH)**, foi cromatografada em coluna de gel de sílica, usando eluentes diclorometano, diclorometano : metanol, aumentando gradativamente a polaridade até 100% de metanol, fornecendo 15 frações, que através da análise dos dados espetrométricos foram identificadas como uma mistura de alcanos alifáticos, ácido alifático, (**substância 1,** 57 mg) e uma mistura de esteóides (sitoesterol, estigmasterol e campesterol), que foi denominada **substância 2 (a, b e c,** PF.: 120-122ºC, 84 mg**)**.

A partição clorofórmio (**OspGDC**) foi cromatografada em coluna de gel de sílica, usando eluentes diclorometano **OspGDCD** (26 frações), acetato de etila **OspGDCA** (11 frações) e metanol **OspGDCM** (26 frações), que forneceram uma mistura de alcanos alifáticos e álcoois alifáticos, o triterpeno lupeol (**substância 3,** PF.: 179-180ºC, 50 mg) e a mistura de esteróides sitoesterol, estigmasterol.

A fração obtida com metanol (**OspGDM,** 95g), foi fracionada através de cromatografia em coluna de sílica gel utilizando os eluentes clorofórmio e metanol 9:1 e aumentando gradativamente a polaridade. As frações 5-7 forneceram um material amarelo de ponto de fusão 226/228ºC , solúvel em acetona, que após análise dos dados espectrométricos foi identificado como o biflavonóide 7''-O-metilagatisflavona (**substância 4,** PF.: 226-228ºC, 74 mg).

Os procedimentos relatados acima estão representados no **Esquema 1,** pág. 21.

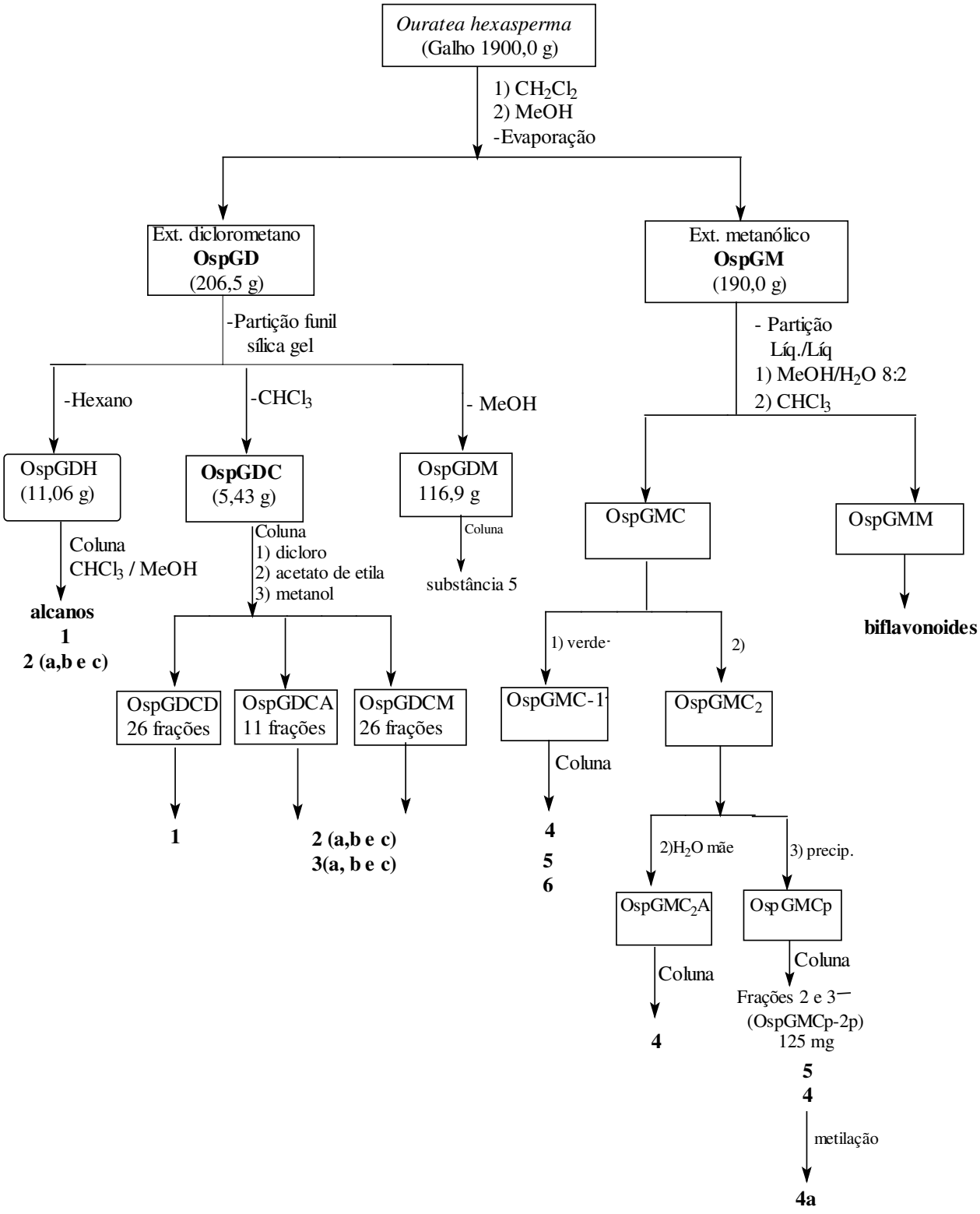
**4.5.2. Extrato com metanol:**

O extrato metanólico (**OspGM**, 160,0g) foi submetido à partição com metanol:água (8:2) e clorofórmio, no qual o extrato foi diluído em metanol/água 8:2 e extraído com clorofórmio, obtendo-se as partições clorofórmio (**OspGMC**, 67,0 g) e metanol (**OspGMM**, 58,8 g). A partição clorofórmio foi dividida em duas frações, a primeira de cor esverdeada (**OspGMC1,** 23,2 g) e outra de cor marrom (**OspGMC2,** 22,0 g), da segunda fração retirou-se um precipitado (**OspGMC2p,** 20,8 g**),** o qual uma parte (18,0g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel com a mistura diclorometano/metanol com aumento gradual de polaridade até metanol 100%. Foram coletadas 20 frações, as frações 2-4 foram recristalizadas em metanol e forneceram um material amarelo que, apresentava 2 manchas em cromatografia de camada fina (CCF) com o eluente $CH_2Cl_2/CH_3OH$, 8:2. Após análise dos dados espectrométricos, e comparação em cromatografia de camada fina com os padrões 7''-O-metilagatisflavona e agatisflavona, usando os eluentes $CH_2Cl_2/CH_3OH$, 8:2; $CHCl_3/CH_3COCH_3$, 7:3 e AcOEt/$CH_3OH$, 9,5:0,5, foram identificados como os biflavonóides, em mistura, **4** (7''-O-metilagatisflavona), e **5 (**agatisflavona), 103 mg, solúveis em acetona.

A mistura dos biflavonóides **4** e **5** foi metilado com diazometano (40,0 mg). Após a metilação foi feita a purificação do produto através de cromatrografia em camada preparativa($CHCl_3/CH_3COCH_3$, 7:3), fornecendo o derivado permetilado **4a** (28,0 mg).

A fração (**OspGMC1,** 20,0g) foi cromatografada em coluna de sílica gel com a mistura diclorometano/metanol com aumento gradual de polaridade até metanol 100%. Sendo coletadas 30 frações. As frações 5 e 6 forneceram um material amarelo, que após a purificação e análises dos dados do RMN de hidrogênio e carbono-13, concluiu-se que também é a 7''-*O*-metilagatisflavona (32,0 mg) e a fração 17, que foi recristalizada em metanol forneceu um material (9,0 mg) insolúvel em acetona e metanol, e através das análises dos dados do RMN de hidrogênio e carbono, verificou-se que que a fração contém o sitosterol glicosilado (**6**).

Os procedimentos relatados acima também estão representados no **Esquema 1,** pág. 21.




Esquema 1: Fluxograma da marcha para o isolamento das substâncias dos galhos de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl.

### 4.6. Derivação

A preparação do derivado metilado da agatisflavona serviu para facilitar a análise dos dados espectrométricos, devido ao aumento da solubilidade em clorofórmio e, fazer análises com algumas técnicas especiais de RMN.

#### 4.6.1. Metilação com diazometano

A solução de diazometano foi preparada de acordo com a metodologia experimental descrita na literatura (VOGEL, 1989 e CARVALHO *et al.* 2006). A mistura das substâncias (agatisflavona e 7”-O-metilagatisflavona) foi completamente dissolvida em MeOH, adicionou-se a solução etérea do diazometano em excesso, observando desprendimento gasoso, a solução foi deixada em repouso para a evaporação natural dos solventes. A ocorrência da reação foi monitorada através de comparações em CCF com as substâncias puras, após repetições do procedimento de adição da solução de Diazometano, realizou-se cromatografia em camada preparativa, fornecendo a substância metilada. A **figura 9**, pág. 23 apresenta um esquema da reação e o mecanismo proposto para a mesma.

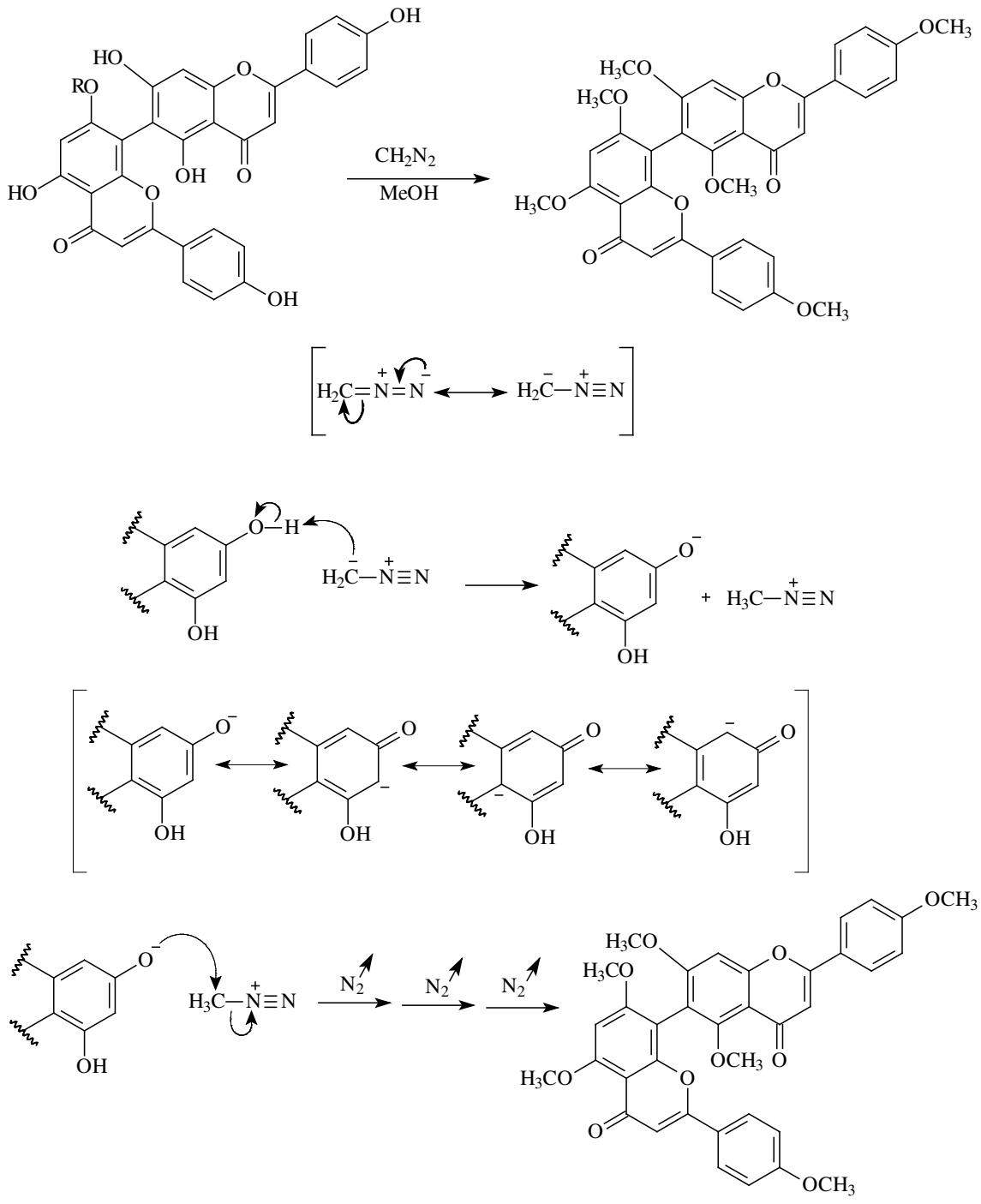



**Figura 9:** Mecanismo proposto da reação de metilação com diazometano.

# 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1. Prospecção Química do extrato metanólico:

Parte do extrato metanólico foi utilizado para a realização da avaliação da classe dos constituintes presentes, através da prospecção química, e posterior isolamento e purificação dos principais metabólitos especiais. A **tabela 3** demonstra os resultados da prospecção química do extrato metanólico, que revelou testes positivos para as classes de metabólitos especiais: alcalóides, saponinas, esteróides e triterpenóides, depsídio e depsidonas, flavonóides, catequinas, quinonas, açúcares redutores, sacarídeos e taninos. Os testes realizados seguiram as metodologias segundo as literaturas: Alcalóides, esteróides, triterpenos e flavonóides (WALL et al., 1954); saponinas, depsídios e depsidonas, quinonas e sacarídios (MATOS, 1988); catequinas, derivados de cumarinas e açúcares redutores (COSTA, 1972); Ácidos orgânicos (MERK, 1980); Taninos (MATOS, 1997).

Tabela 3: Registro dos resultados da prospecção química do extrato metanólico de *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl.

| **Classes de metabólitos especiais** | **Extrato metanólico** |
|---|---|
| Alcalóides | +++ |
| Saponinas | +++ |
| Esteróides e triterpenóides | +++ |
| Depsídio e depsidonas | +++ |
| Flavonóides | +++ |
| Catequinas | +++ |
| Quinonas | + |
| Sesquiterpenos e outras lactonas | - |
| Derivados de cumarinas | - |
| Glicosídios cardíacos | - |
| Açúcares redutores | ++ |
| Sacarídios | + |
| Ácidos orgânicos | - |
| Taninos | +++ |
| - ausente + fraco ++ médio +++ forte | |

### 5.2. Determinação Estrutural dos Constituintes Isolados de O*uratea hexasperma var. planchonii Engl.*

O fracionamento dos extratos dos galhos *de O. hexasperma* var. *planchonii* Engl. forneceu uma mistura de hidrocarbonetos, ácidos alifáticos, os esteróides sitoesterol, estigmasterol e campesterol, os triterpenos α-amirina e β-amirina, os biflavonóides 7"-O-metilagatisflavona e agatisflavona e sitosterol-3-O-β-D-glicopiranosideo. A identificação através de métodos físicos desses materiais foi feita através das análises de espectros de IV, RMN de $^{1}H$ e $^{13}C$, massas e comparação com padrões isolados das espécies de *Ouratea* em estudos anteriores.

#### 5.2.1. Alcanos

O espectro de IV da mistura de alcanos (**Figura 10**, pág. 25) revela bandas de absorção em 2918 e 2848 $cm^{-1}$ relativas a estiramentos de grupos $CH_3$ e $CH_2$, sugerindo a presença de uma longa cadeia carbônica. As bandas em 1466 $cm^{-1}$ (deformação angular da ligação C-H), e 723 $cm^{-1}$ confirmam esta atribuição. O espectro de RMN $^{1}H$ (**Figura 11,** pág. 26) apresenta sinais em $\delta_H$ 0,90 e 1,27ppm de cadeia normal hidrocarbônica.

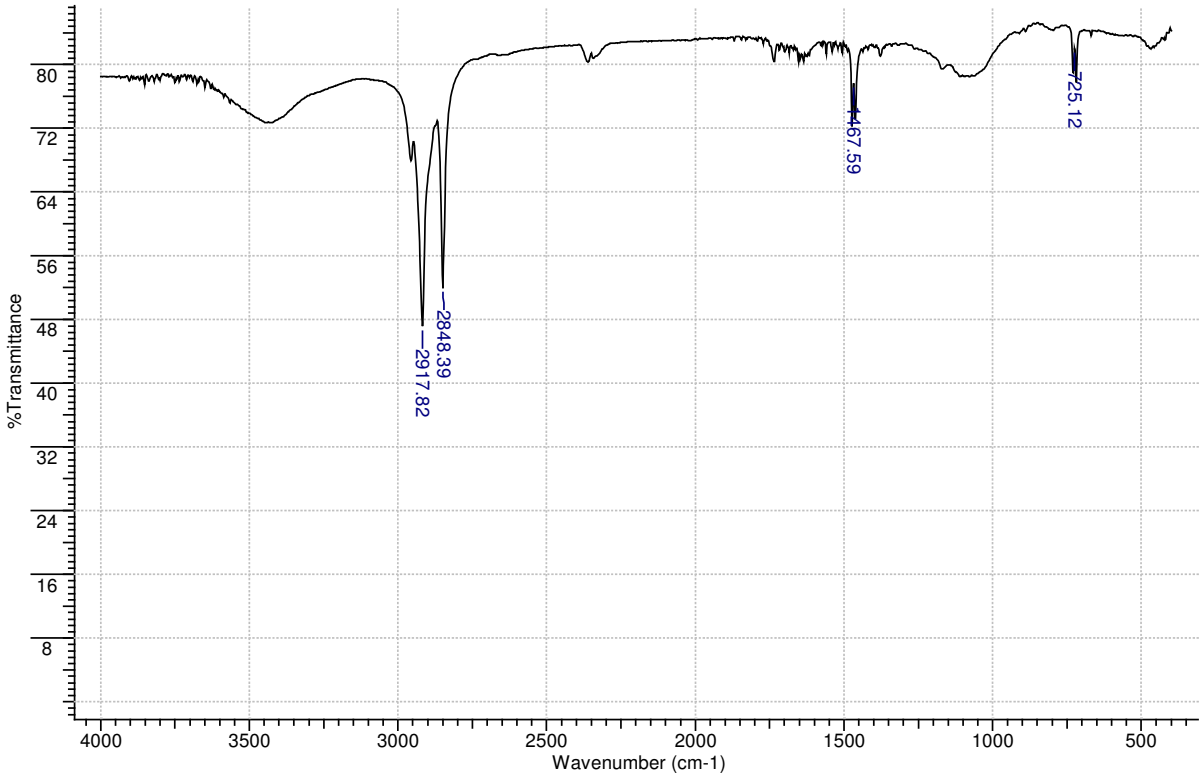



**Figura 10**: Espectro de IV do material alifático de *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl.

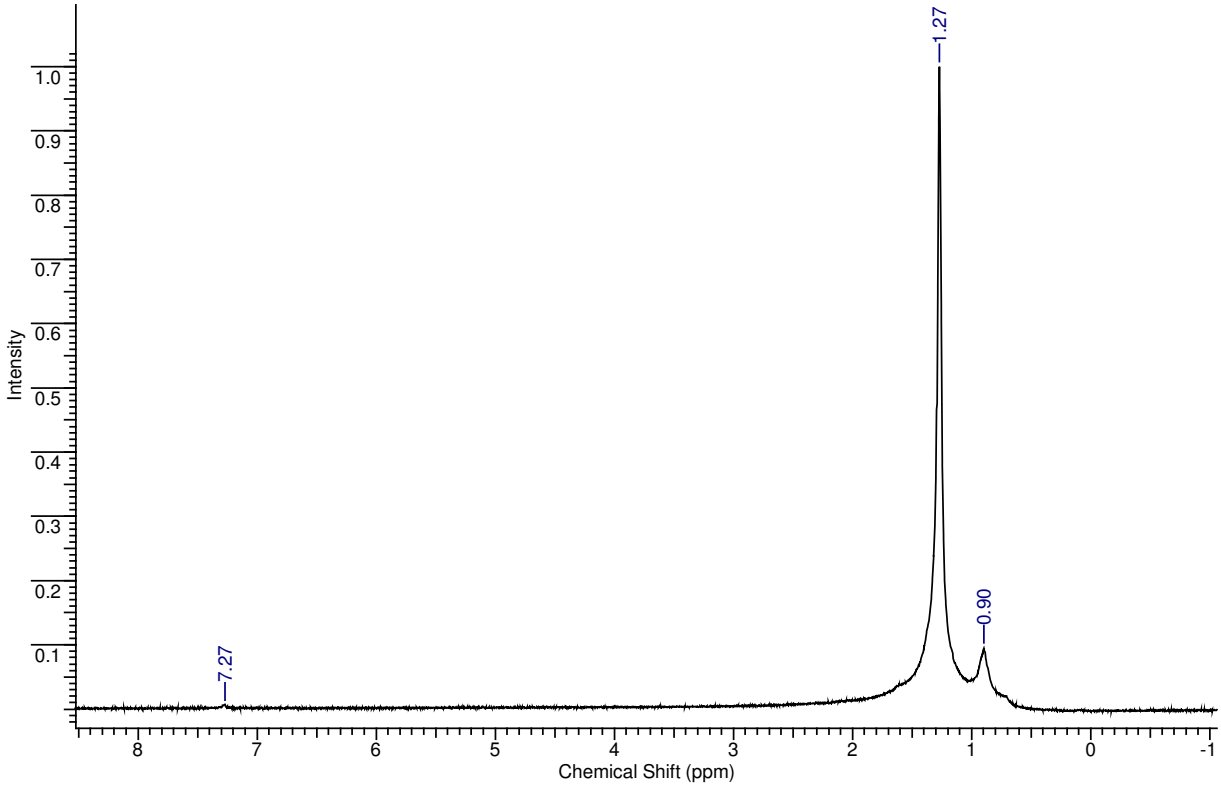



**Figura 11:** Espectro de RMN de $^{1}H$ (200 MHz, $CDCl_3$) do material alifático.

### 5.2.2 Substância 1

O ácido alifático **1**, foi identificado através da análise dos espectros de IV, RMN $^{1}H$ e CG-EM. O espectro de IV (**Figura 12**, pág. 27) revela bandas de absorção em 2918 e 2848 $cm^{-1}$ relativas a estiramentos de grupos $CH_3$ e $CH_2$, sugerindo a presença de uma longa cadeia carbônica. As bandas em 1473 $cm^{-1}$ (deformação angular da ligação C-H), 723 $cm^{-1}$ e o sinal em 1724 $cm^{-1}$ compatível com carbonila de ácido, confirmam esta atribuição. O espectro de RMN $^{1}H$ (**Figura 13,** pág. 28) apresenta sinais em $\delta_H$ 0,89 e 1,26 de cadeia alifática, e 2,35 indicando a presença e de hidrogênio de carbono alfa ao grupo carbonila. O cromatograma da amostra (**figura 14,** pág 28), demonstra os picos indicando a mistura das substâncias, tendo a substância majoritária em TR=5,74, o CG-EM apresentou picos em *m/z* 57 $[C_4H_9]^+$, *m/z* 87 $[C_4H_7O_2]^+$, *m/z* 129 $[C_7H_{13}O_2]^+$, *m/z* 185 $[C_{11}H_{21}O_2]^+$, *m/z* 213 $[C_{13}H_{25}O_2]^+$, os picos em *m/z* 257 ($M^{+\cdot}$ +1) e 242 ($M^{+\cdot}$) (**Figura 15**, pág. 29), permitiu identificar os ácidos hexadecanóico e pentadecanóico presentes na mistura.

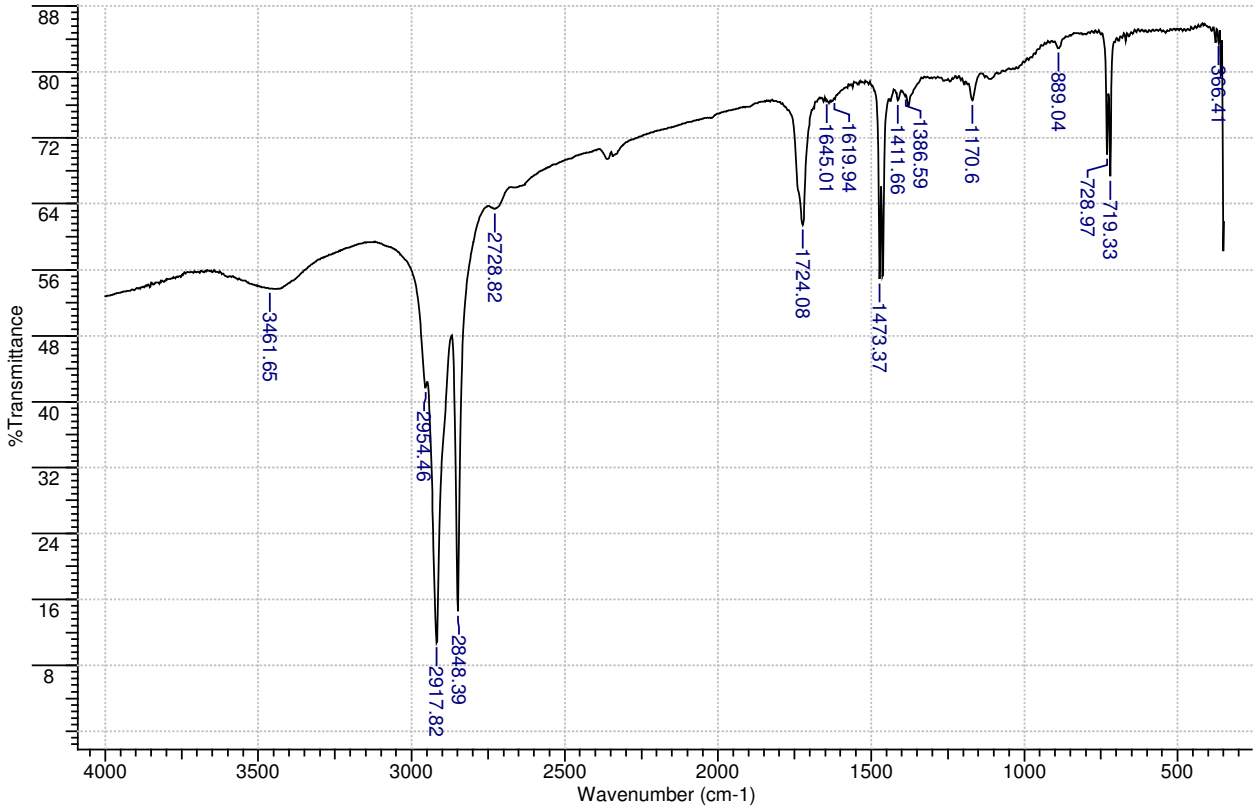



Figura 12: Espectro de IV de **1.**

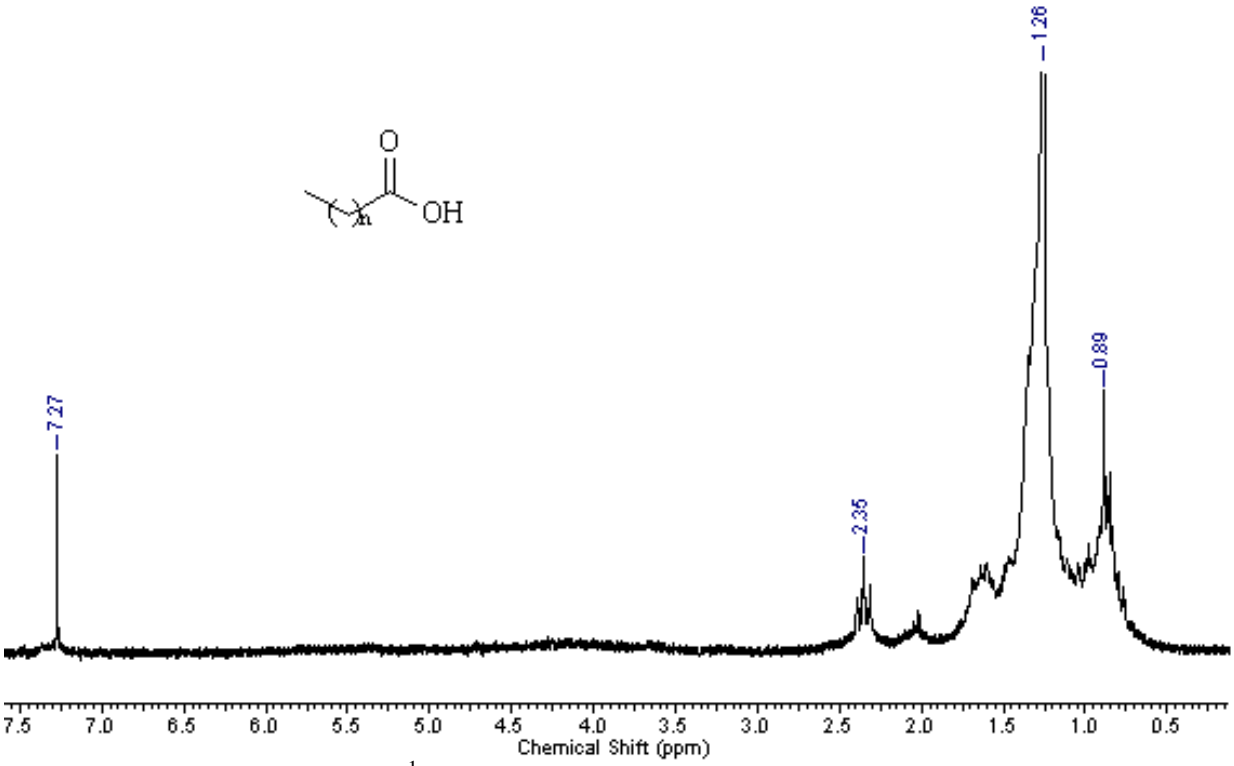



Figura 13: Espetro de RMN de $^{1}H$ (200 MHz, $CDCl_3$) de **1**.

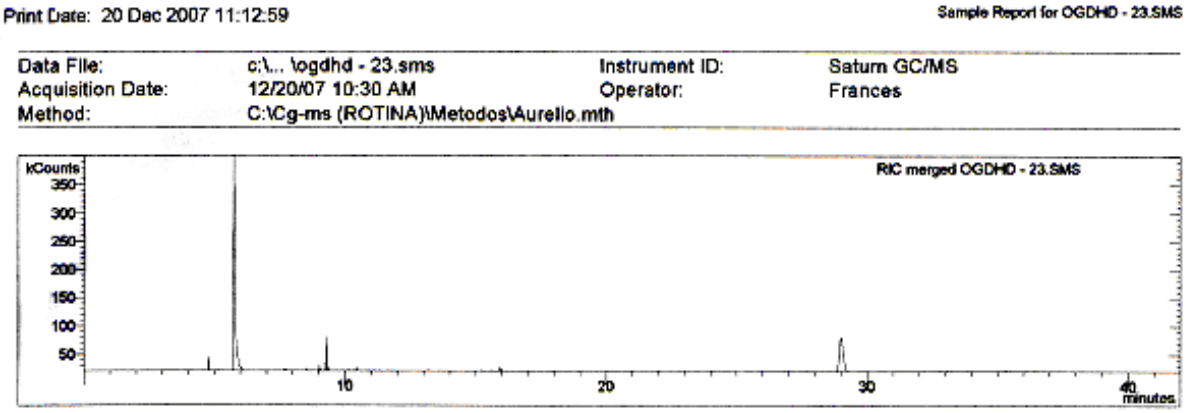



Figura 14: Cromatograma de **1**.

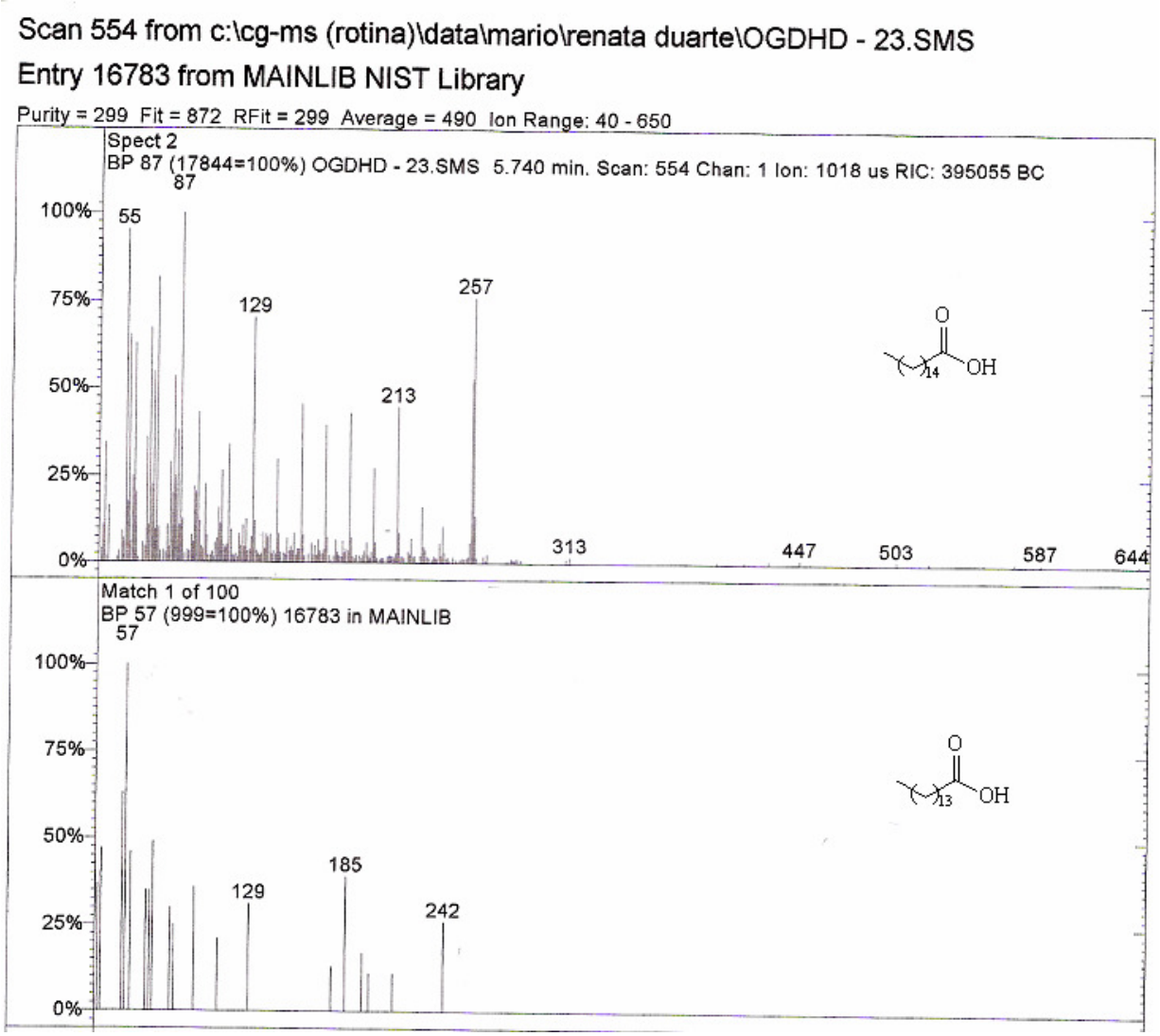


Figura 15: Espectro de massas de **1**.

### 5.2.3. Substância 2 (a, b e c)

Os esteróides **2 (a, b e c)** foram identificados respectivamente, como sitosterol, estigmasterol e campesterol, com base na comparação com amostra autêntica, envolvendo espectros de RMN de $^1$H (**Figura 16**, pág. 30), CG-EM, além de P.F. e CCF.

O espectro de RMN de $^1$H da mistura **2 (a, b e c)** mostrou sinais entre $\delta_H$ 0,65 e $\delta_H$ 1,23 correspondentes as metilas, multipleto em $\delta_H$ 3,53 atribuído ao hidrogênio carbinólico H-3, um singleto largo em $\delta_H$ 5,31 atribuído ao hidrogênio olefínico H-6 e o multipleto em $\delta_H$ 5,07 correspondentes aos hidrogênios H-22 e H-23 para o estigmasterol. Através do CG-EM que se detectou a presença do terceiro componente (campesterol), através do cromatograma (**Figura 17**, pág. 30), indicando os picos dos esteróides e comparação com padrões da biblioteca do equipamento (**Figuras 18 a, b e c,** págs. 31, 32 e 33) permitiu confirmar a proposta da mistura dos esteróides sitosterol (**2 a**), estigmasterol (**2 b**) e campesterol(**2 c**).

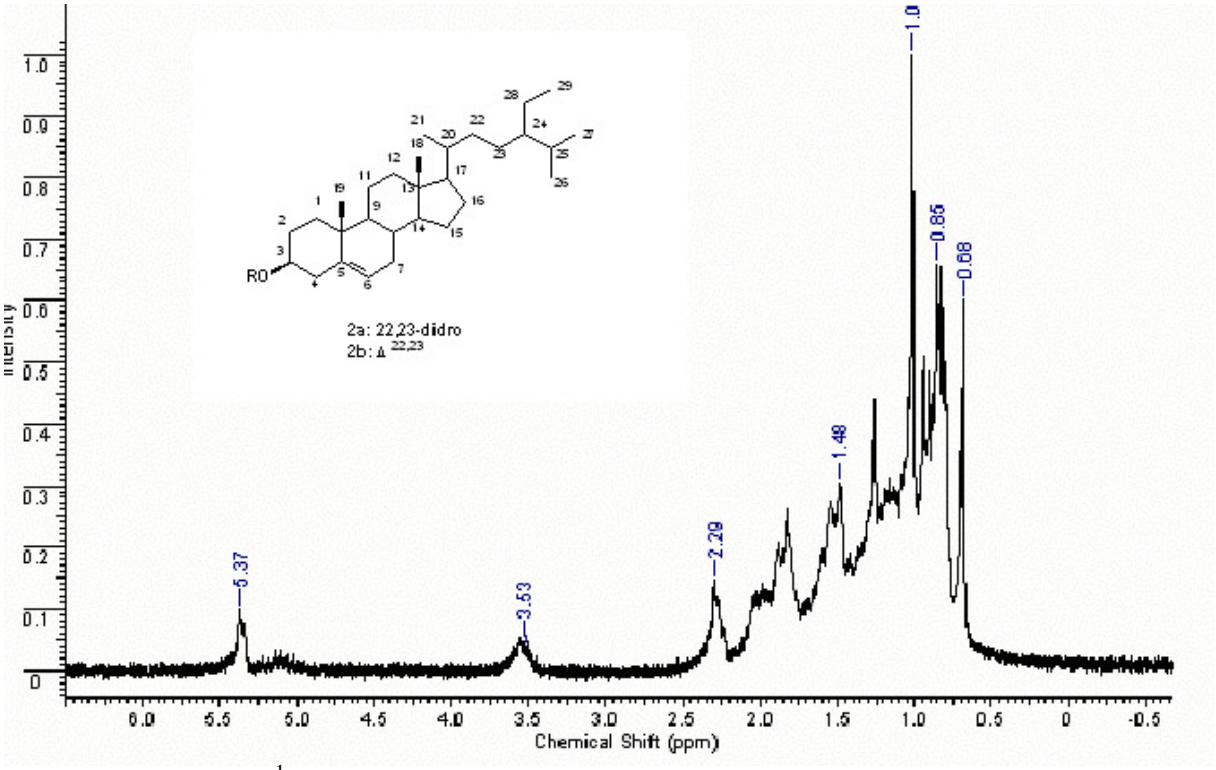



**Figura 16:** RMN de $^{1}H$ (200 MHz, $CDCl_3$) da mistura de esteróides **2** (a, b e c)

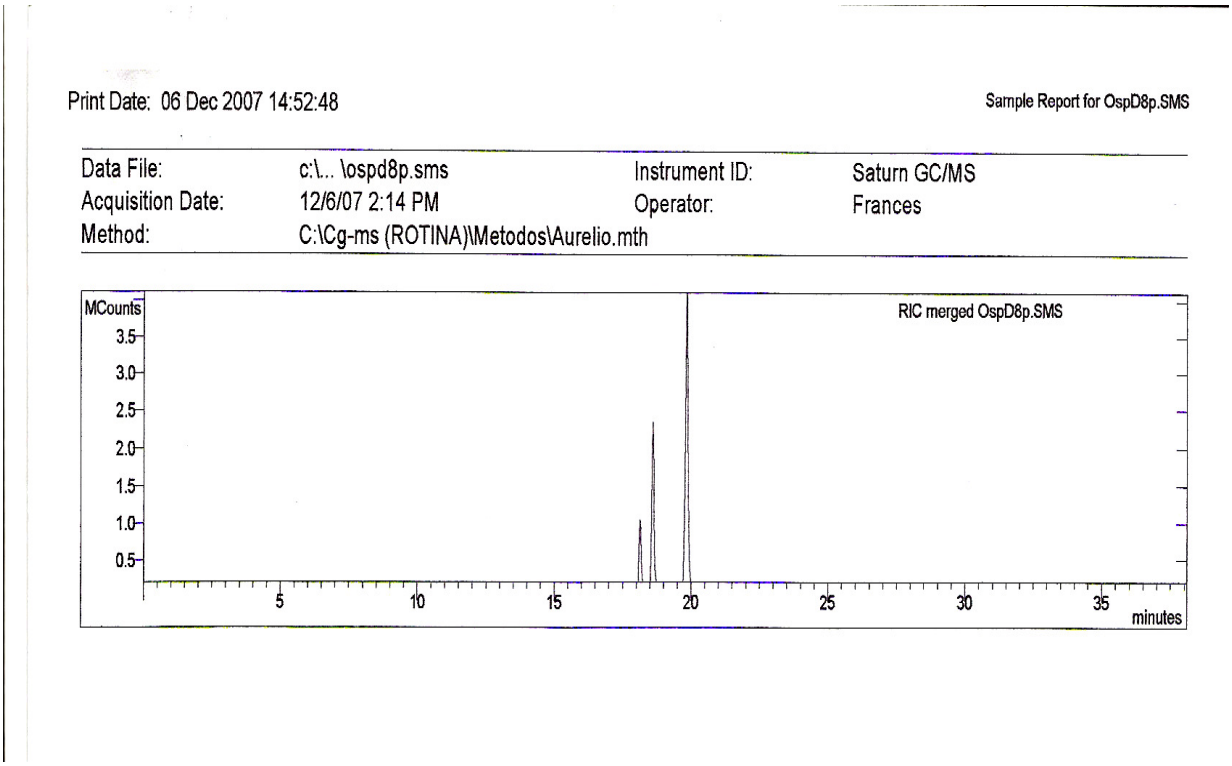



**Figura 17**: Cromatograma da mistura dos esteróides **2** (a, b e c)

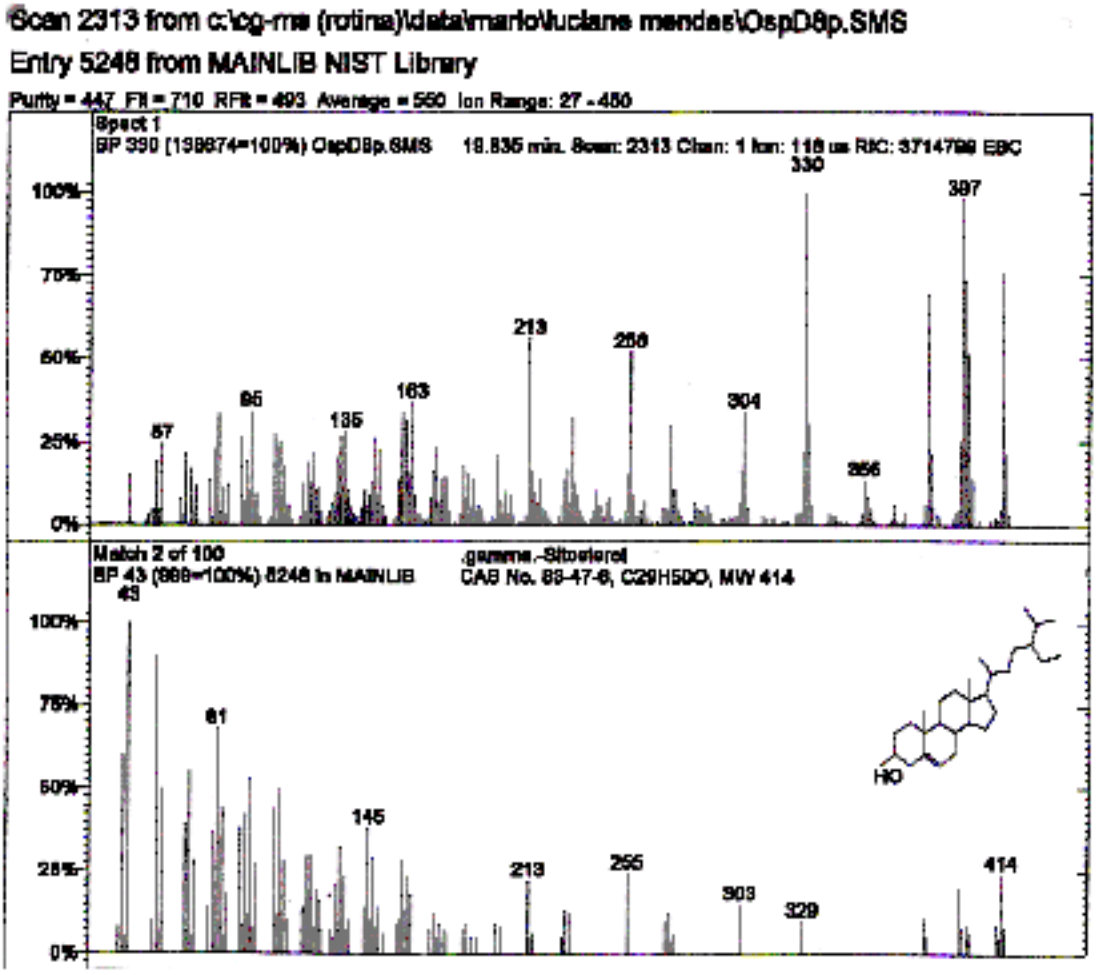



**Figura 18a** : Espetro de massas de **2 (a)** comparado com a biblioteca do aparelho.

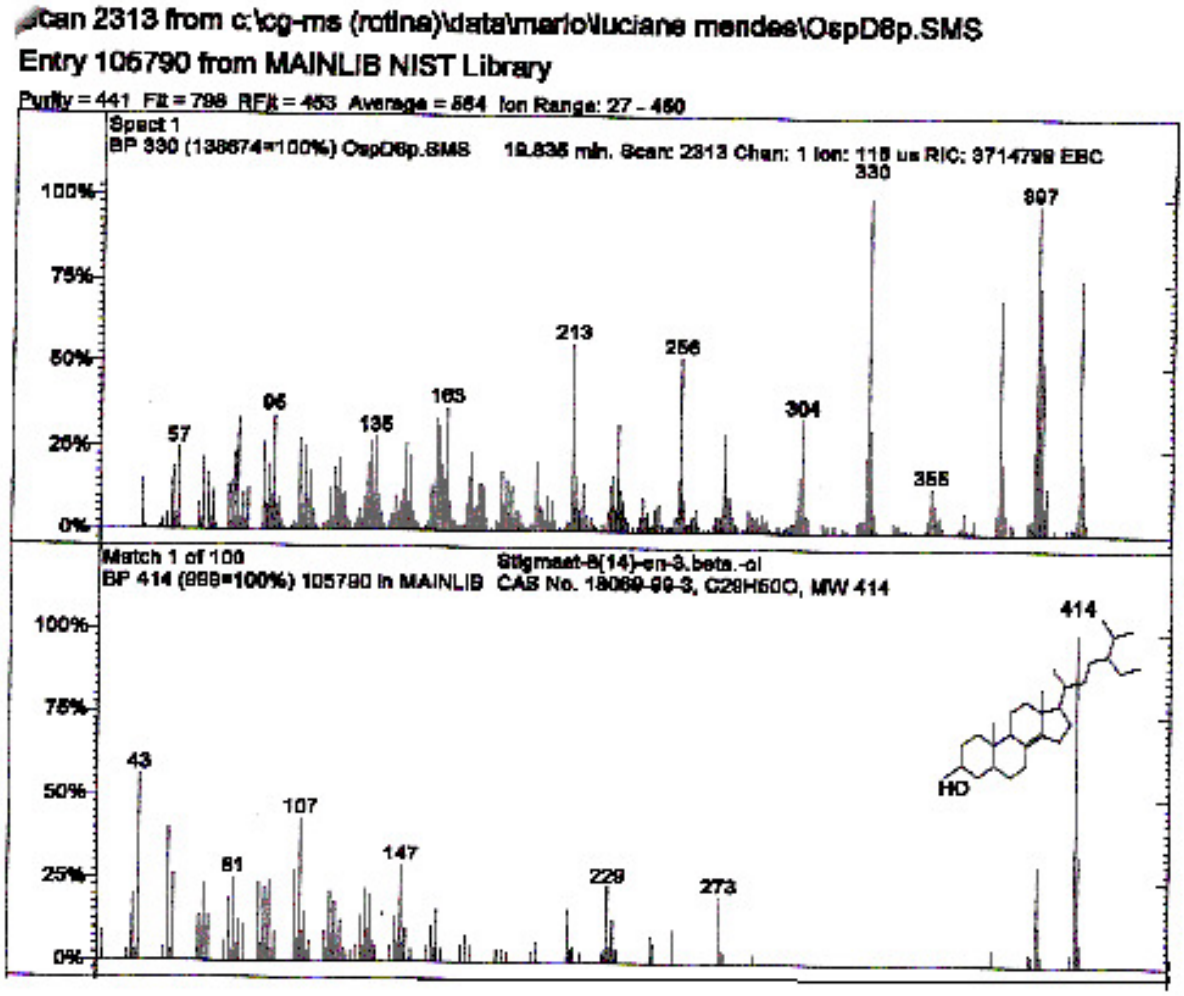



**Figura 18b:** Espetro de massas de 2 (b) comparado com a biblioteca do aparelho.

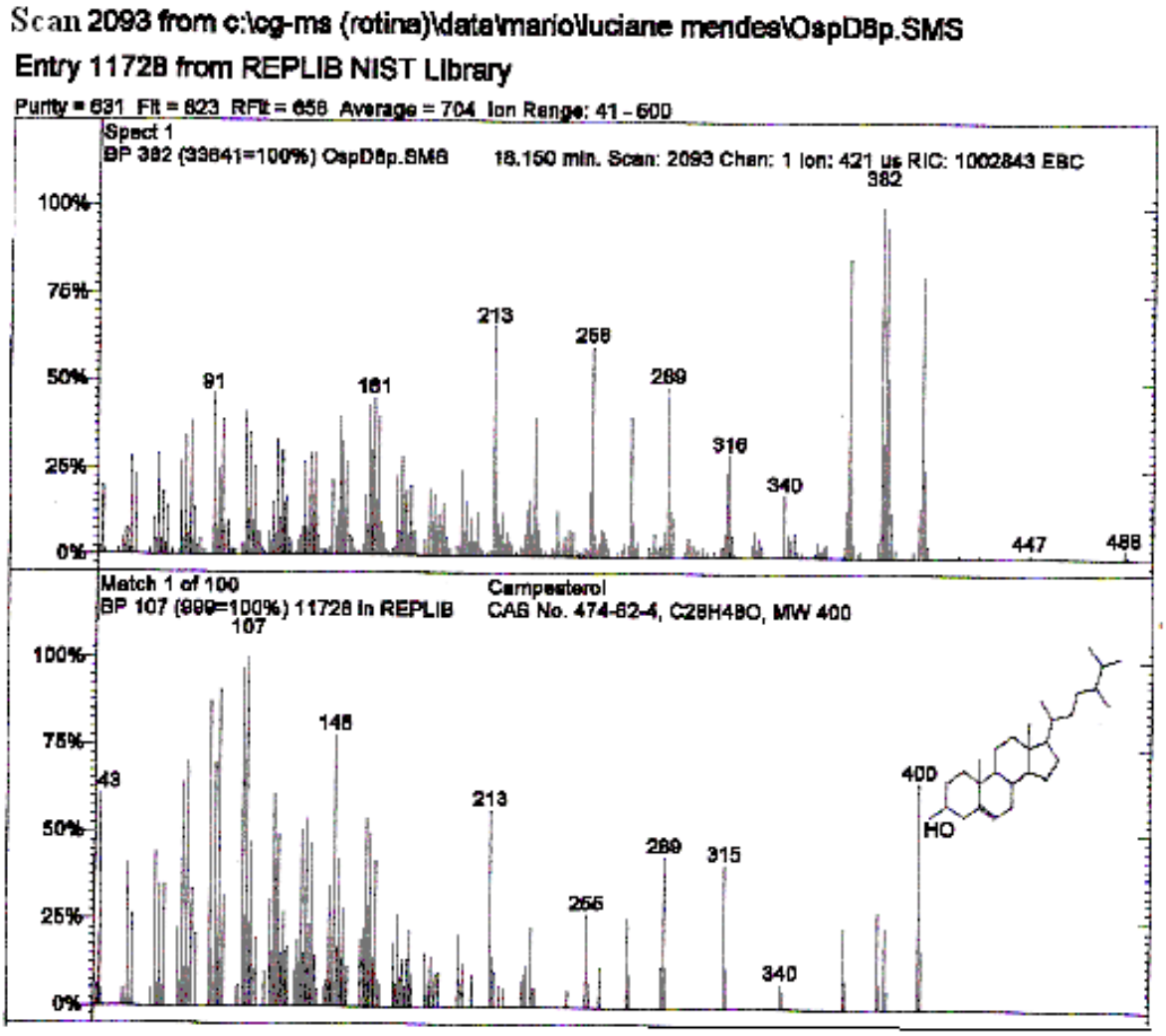



**Figura 18c :** Espetro de massas de 2 (c) comparado com a biblioteca do aparelho.

### 5.2.4. Substâncias 3: Lupeol, α-amirina e β-amirina

A mistura dos triterpenos **3 (a, b e c)** foram identificados como lupeol, α-amirina e β-amirina, através da interprtação dos espectros de RMN de $^{1}H$ , CG-EM e CCF.

O espectro de RMN $^{1}H$ (**Figura 19,** pág. 34) mostra os sinais de metilas: $\delta_H$ 1,26, 0,95, 0,80 e 0,77 e um sinal em $\delta_H$ 1,69 (*s*) correspondente à freqüência de metila ligada a carbono $sp^2$. Os sinais referentes aos hidrogênios vinílicos estão representados por dois singletos largos em $\delta_H$ 4,57 e 4,70, o sinal em $\delta_H$ 3,19 representa o hidrogênio do carbono metínico oxigendo (H-3) o sinal em $\delta_H$ 5,1 representa os hidrogênios (H-12) de α e β-amirina. Através do CG-EM e comparação com padrões da biblioteca do equipamento (**Figuras 20 e 21,** pág. 35) e comparação com amostra padrão da mistura, permitiu identificar os três isômeros triterpênicos lupeol (3a), α-amirina (3b) e β-amirina (3c).

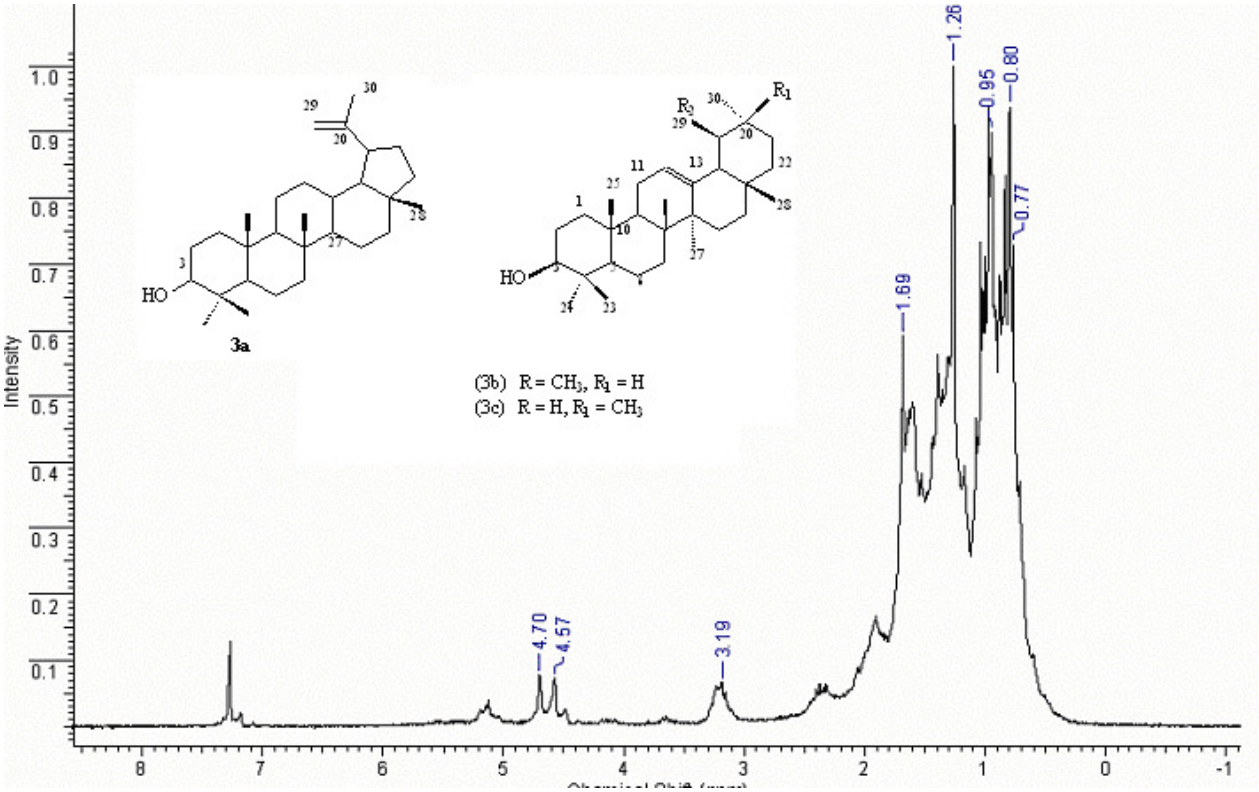



**Figura 19:** Espectro de RMN de $^{1}H$ (200 MHz, $CDCl_3$) do Lupeol (**3a**), α-amirina (**3b**) e β-amirina (**3c**).

.

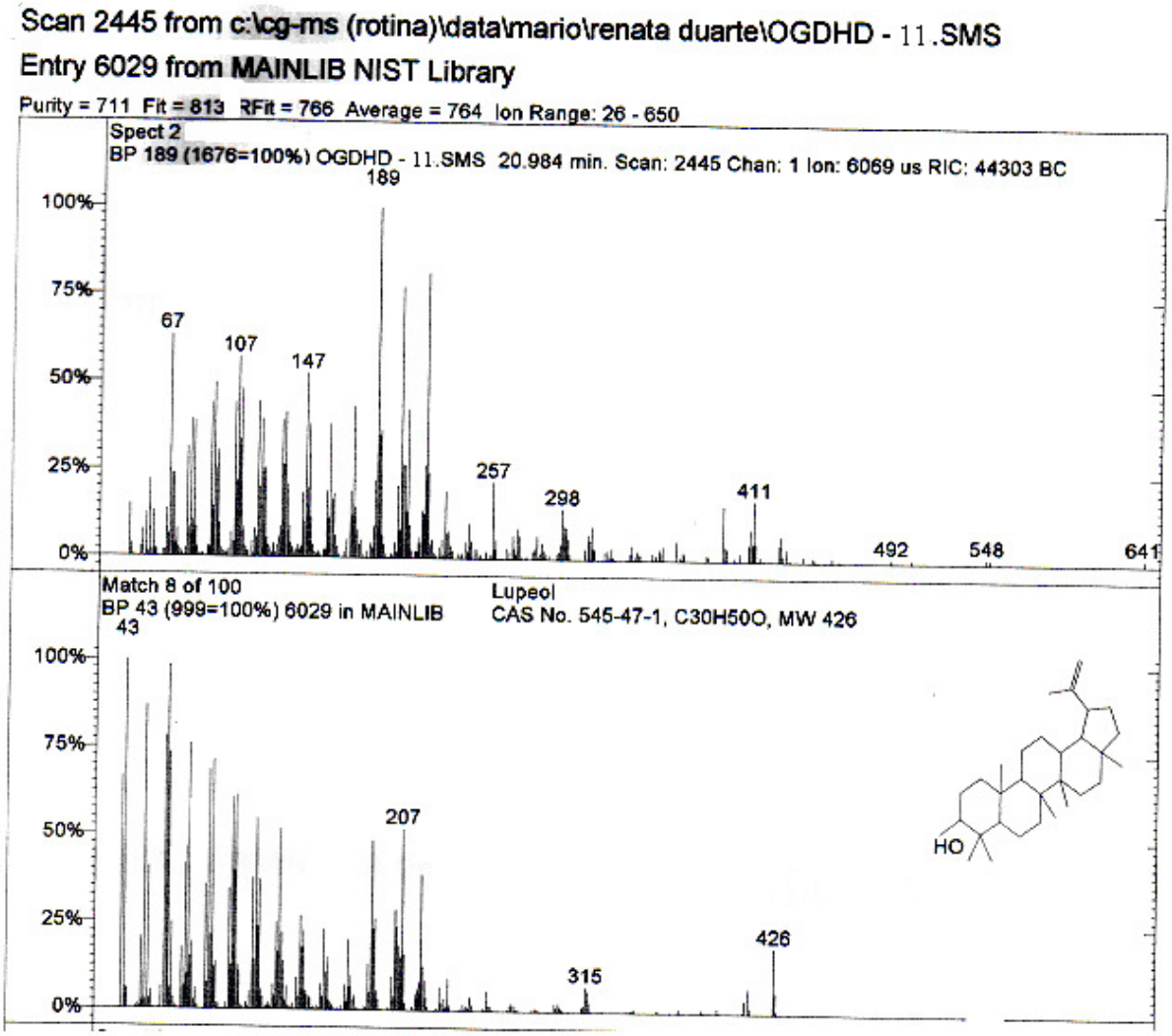



**Figura 20:** Espetro de massas de 2 (a) comparado com a biblioteca do aparelho.

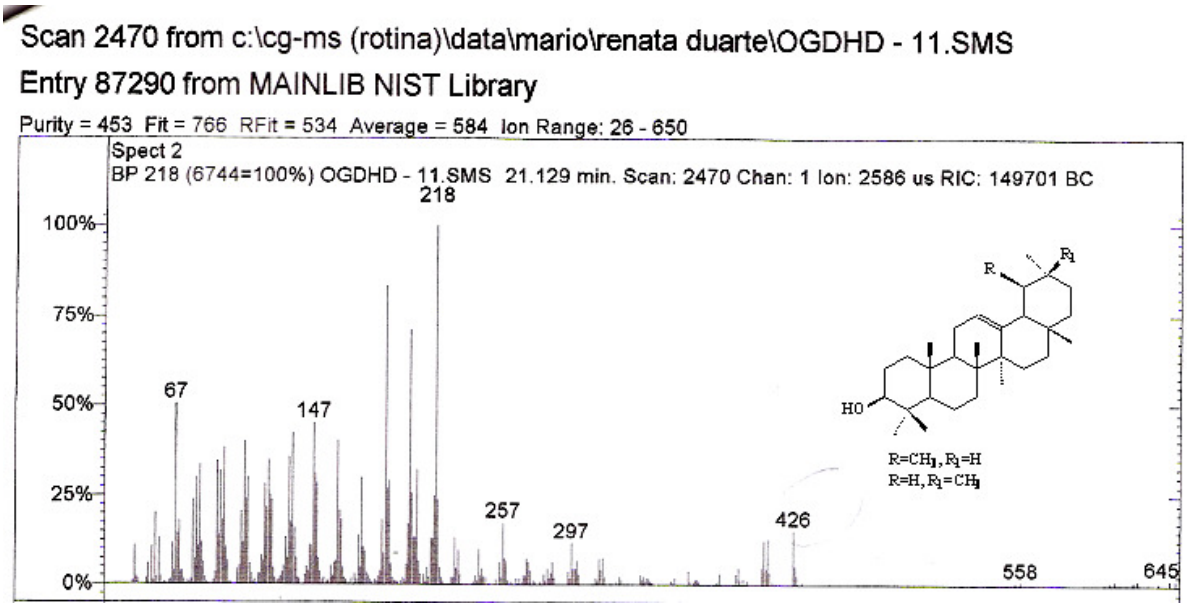



**Figura 21:** Espetro de massas de 2 (b e c).

### 5.2.5. Substância 4

O biflavonóide **4** foi identificado como um derivado da agatisflavona, devido a semelhança do espectro de RMN $^{1}H$ com da substância com a isolada anteriormente (MOREIRA et al., 1999; DANIEL et. al., 2005), além do sinal de um grupo metoxila cuja posição foi definida através de análises com técnicas especiais de RMN.

O espectro de IV de **4** (**Figura 22,** pág. 37**)** revela bandas de absorção para grupo hidroxila (3392 $cm^{-1}$, estiramento O-H), grupamentos C=O (1648 $cm^{-1}$) de carbonila conjugada e C=C (1604 $cm^{-1}$, 1504 $cm^{-1}$, 1442 $cm^{-1}$) de anel benzenóide.

O espectro de RMN $^{1}H$ (**Figura, 23,** pág. 39**)** mostra sinais de átomos de hidrogênios atribuídos a dois sistemas AA'BB' dos anéis C e C" $\delta_H$ 7,98 (d, 2H, *J*= 8Hz), 7,65 (d, 2H, *J*= 8 Hz), 7,05 (d, 2H, *J*= 8 Hz) e 6,84 (d, 2H, *J*= 8 Hz), quatro singletos atribuídos a H-3, 8, 3" e 6" com $\delta_H$ 6,70, 6,78, 6,65 e 6,56, respectivamente e uma metoxila ($\delta_H$ 3,89, *s*, 3H). Os sinais em $\delta_H$ 9,37 para hidroxila livre e $\delta_H$ 13,26 e 13,41 para os dois grupos hidroxilas em ligação de hidrogênio com carbonila.

O espectro de $^{1}H,^{1}H$-COSY (**Figuras 24,** pág. 40) apresentou sinais de interação de acoplamento entre H-2',6' ($\delta_H$ 7,65) com H-3',5' ($\delta_H$ 6,84) e H-2'",6'" ($\delta_H$ 7,98) com H-3'",5'" ($\delta_H$ 7,50). Confirmando os pares de dubletos de cada sistema *para* substituído.

O espectro de RMN $^{13}C$ da substância **4** (**Figuras 28-30,** pág. 44 e 45) mostra os valores de deslocamentos dos carbonos metínicos CH-8 ($\delta_C$ 94,7) e CH-6" ($\delta_C$ 96,4), e para os carbonos quaternários 6 e 8" ($\delta_C$ 104,3 e 104,0 ppm). Os valores dos deslocamentos químicos indicam que os carbonos 6 e 8" estão envolvidos na ligação interflavonoídica, a comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos de **4** (**Tabela 4,** pág. 40) com agatisflavona (CHARI *et al*., 1977; AGRAWAL, 1989) e 7"-*O*-metilagatisflavona (MOREIRA, *et al*., 1999) confirmam a proposta de estrutura semelhante desta biflavona como 4′,5,7-OH-flavona-(6→8″)-5″,4‴-OH-7″-OMe flavona.

Como citado anteriormente, o grupo metoxila poderia estar localizado em outra posição sem causar alteração significativa nos espectros e, assim não garante a identificação entre **4** como 7"-*O*-metilagatisflavona registrada na literatura. Fez-se experimentos de NOESY (**Figuras 25, 26 e 27,** págs. 41-43), HMBC (**figuras 31-38,** págs. 45-49) e HSQC (**figura 39,** pág. 50) e observou-se que a metoxila está próxima do singleto em $\delta_H$ 6,57 (H-6"), este hidrogênio está ligado ao carbono com $\delta_C$ = 95,7 e acopla a longa distância com H-O-5"($J^{3}_{H-C}$) **Tabela 4,** pág. 38. Ficando, então definida sua estrutura como o previsto: 4',5,7-OH-flavona (6→8) 5",4'"-OH-7"-OMe flavona (7"-*O*-metilagatisflavona).

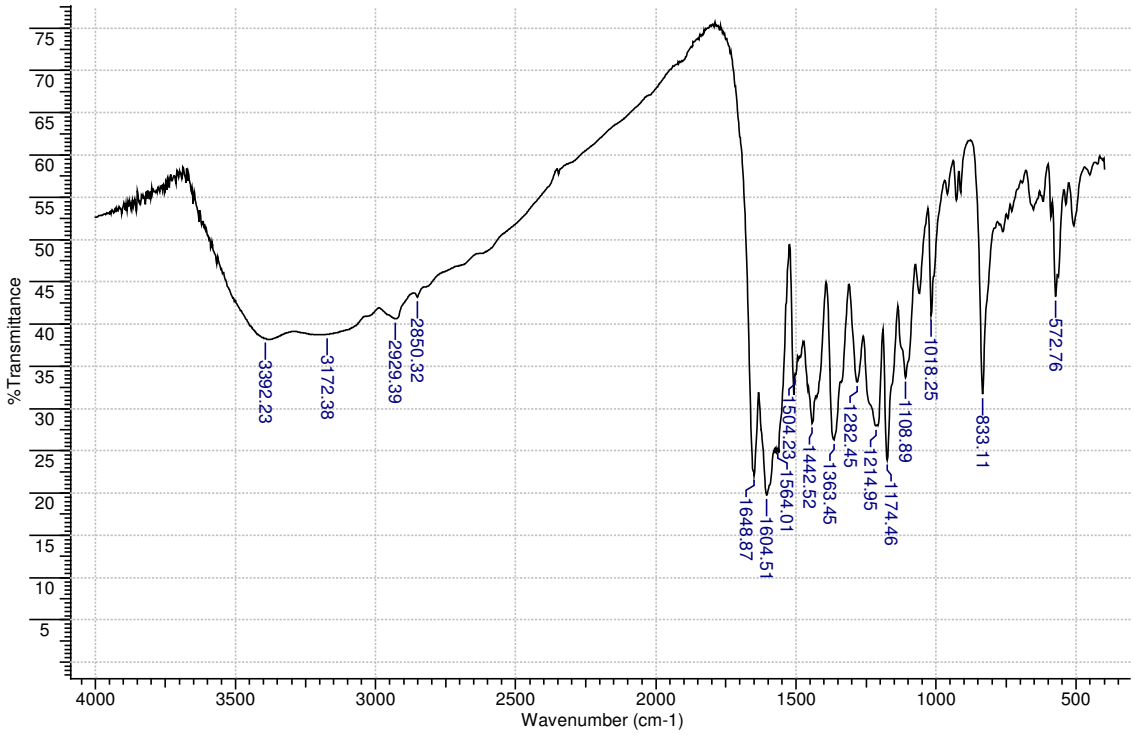
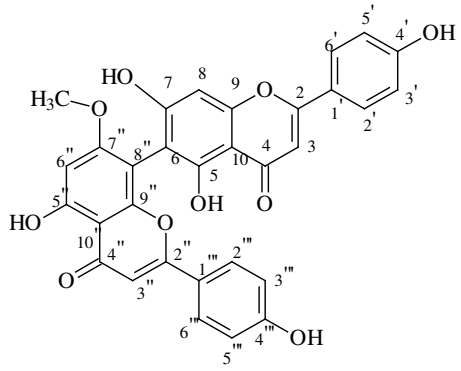



Figura 22: Espectro de IV de 4.

**Tabela 4.** Dados de RMN $^{1}H$ e $^{13}C$ ($D_3CCOCD_3$ ,$^{1}H$ e $D_3CSOCD_3$,$^{13}C$).da substâncias **4.**



| | 7”-o-metil agatisflavona | Substância 4 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | $^{1}H$-$^{13}C$-COSY | | | |
| C | δC | δC | δH | CH | $^{1}J_{CH}$ | $^{2,3}J_{CH}$ | Noe |
| 2 | 165,03 | 165,3 | | H-2’, H-3 | | | |
| 3 | 103,22 | 104,4 | 6,70 | | | | H-2’,6’ |
| 4 | 183,5 | 183,7 | | | | | |
| 5 | 161,3 | 161,6 | | | | | |
| 6 | 104,1 | 104,3 | | H-8 | | | |
| 7 | 163,1 | 163,3 | | H-8 | | | |
| 8 | 94,5 | 94,7 | 6,78 (s) | | | | |
| 9 | 158,2 | 158,5 | | H-8 | | | |
| 10 | 105,1 | 105,5 | | H-O-5, H-3 | | | |
| 1’ | 123,2 | 123,6 | | H-3’,5’, H-3 | | | |
| 2’,6’ | 129,3 | 129,3 | 7,98 (d,8Hz) | | | | |
| 3’,5’ | 116,8 | 117,1 | 7,05 (d, 8Hz) | | | | |
| 4’ | 161,8 | 162,0 | | | | | |
| 2” | 165,2 | 165,5 | | H-2’”,6’”, H-3” | | | |
| 3” | 103,4 | 103,9 | 6,65 (s) | | | | H-2’”,6’” |
| 4” | 183,3 | 183,4 | | | | | |
| 5” | 163,4 | 163,8 | | H-O-5”, H-6” | | | |
| 6” | 96,0 | 96,4 | 6,57 (s) | H-O-5” | | | $H_3CO$-7” |
| 7” | 164,8 | 165,1 | | $H_3C$-O | | | |
| 8” | 101,0 | 104,0 | | H-6” | | | |
| 9” | 155,5 | 156,0 | | | | | |
| 10” | 105,6 | 105,9 | | H-O-5”, H-6”, H-3” | | | |
| 1’” | 123,2 | 123,6 | | H-3’”,5’”, H-3” | | | |
| 2’”,6’” | 129,1 | 129,5 | 7,65 (d,8Hz) | | | | |
| 3’’,5’” | 116,8 | 116,9 | 6,84 (d,8Hz) | | | | |
| 4’” | 161,8 | 162,1 | | H-2’”,5’”, H-3”’,5’” | | | |
| $OCH_3$ | 56,7 | 56,9 | 3,89(s,3H) | | | | |
| H-O 5 | | | 13,4 | | | | |
| H-O 5” | | | 13,3 | | | | |

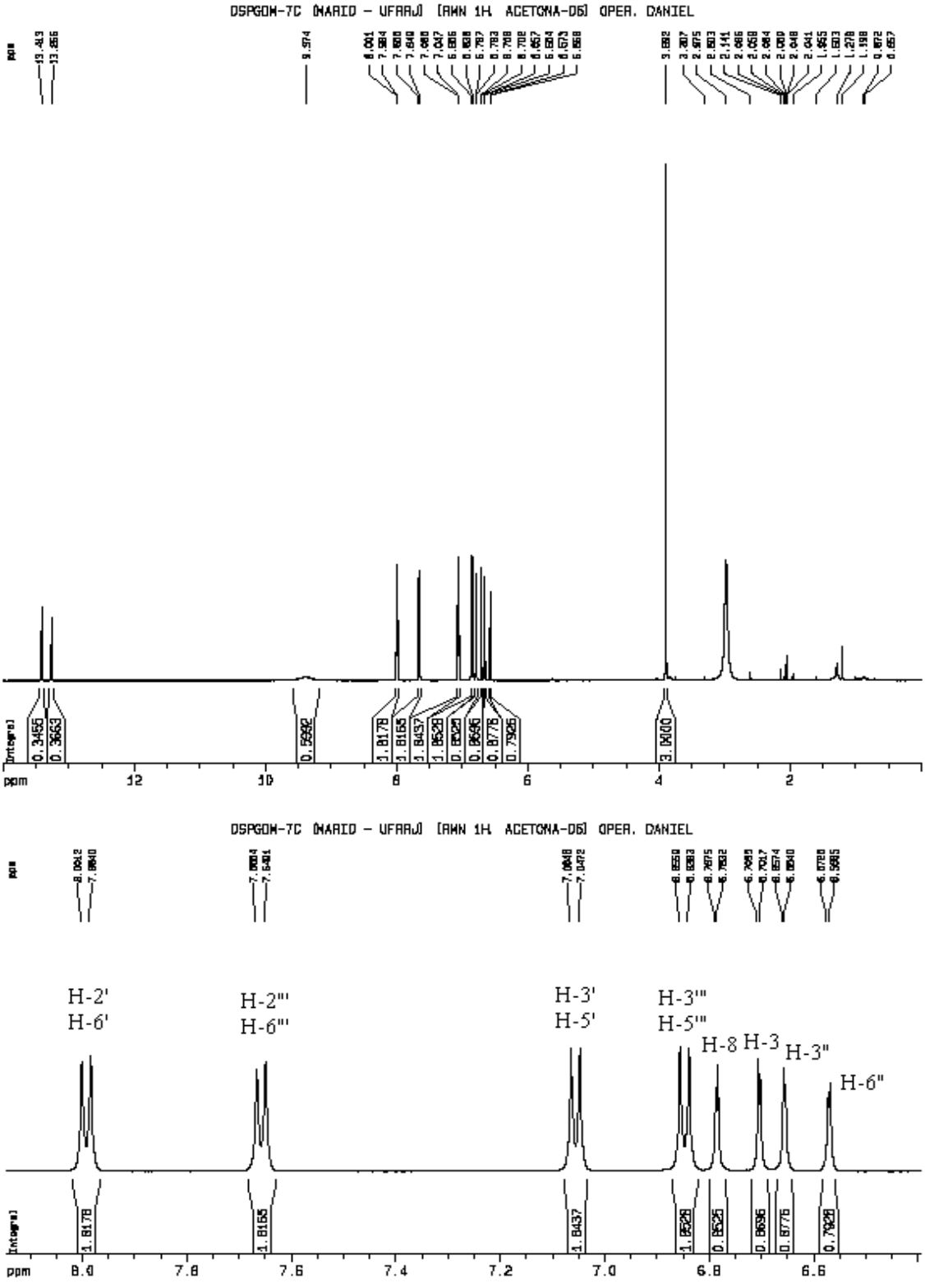



**Figura 23**: Espectro de RMN de $_1$H (500 MHz , $D_3CCOCD_3$) do biflavonóide **4** (7''-O-metilagatisflavona)

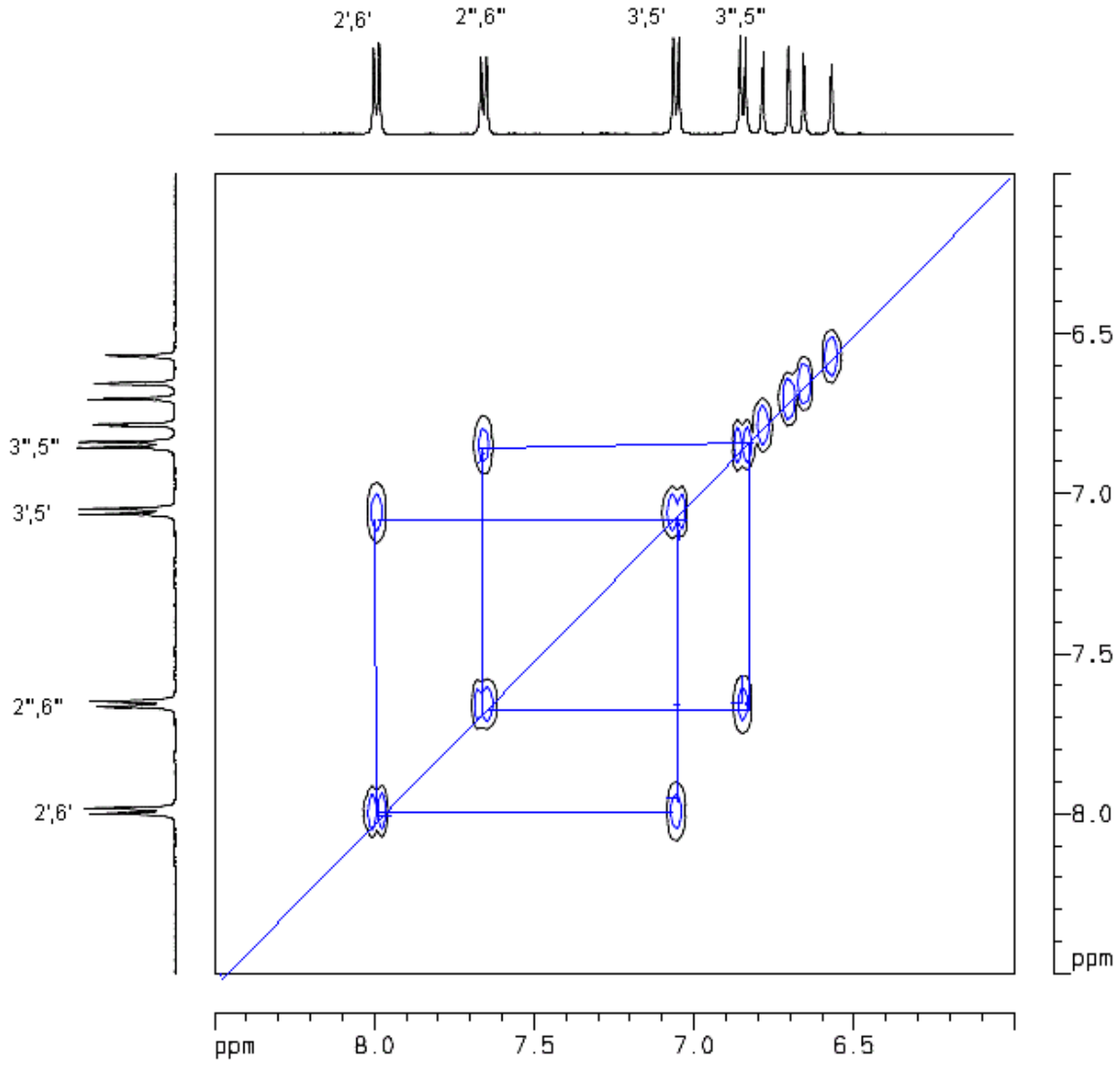



**Figura 24**: Espectro de $^{1}H$-$^{1}H$-COSY - (500 MHz, $D_3CCOCD_3$) de 4.

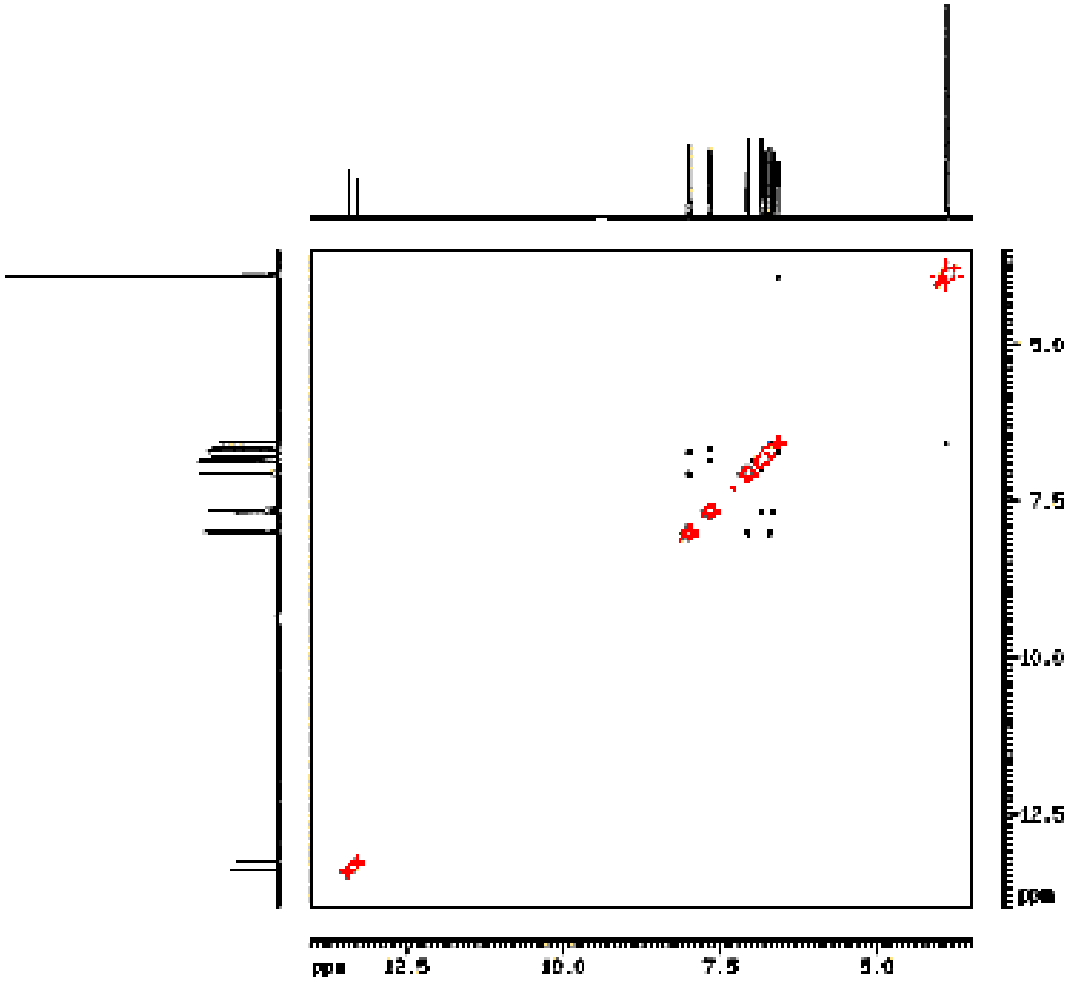



**Figura 25**: Espectro de $^{1}H$-$^{1}H$-NOESY - (500 MHz, $D_3CCOCD_3$) de 4.

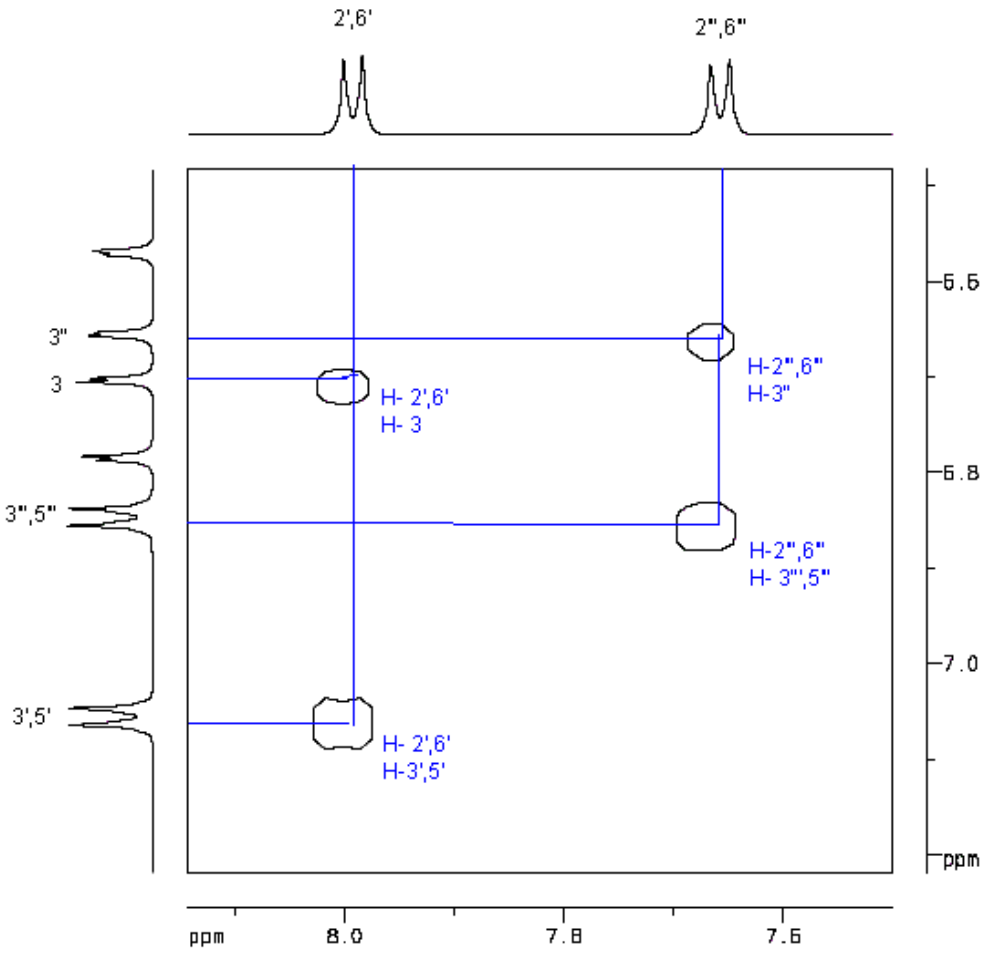



**Figura 26:** Ampliação do Espectro de $^{1}H$-$^{1}H$-NOESY - (500 MHz, $D_3CCOCD_3$) de 4.

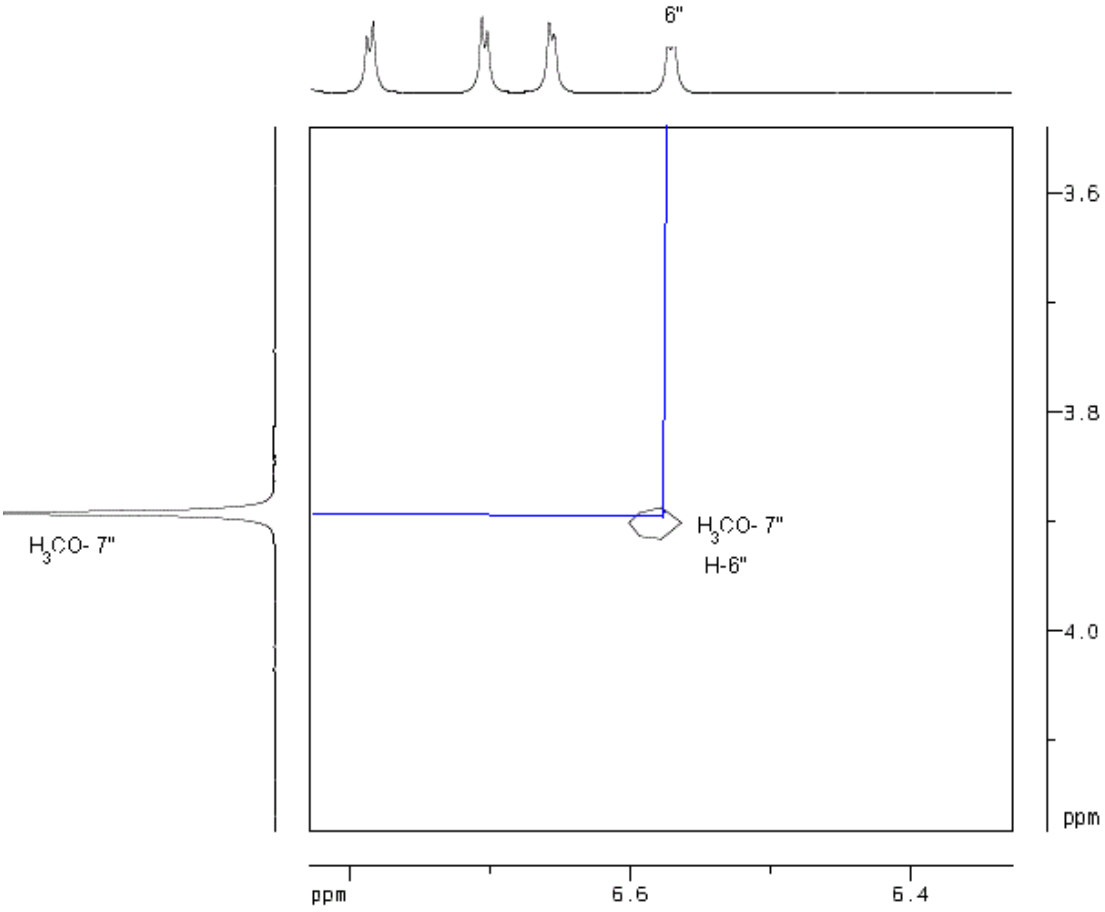



**Figura 27:** Ampliação do Espectro de $^{1}H$-$^{1}H$-NOESY - (500 MHz, $D_3CCOCD_3$) de 4.

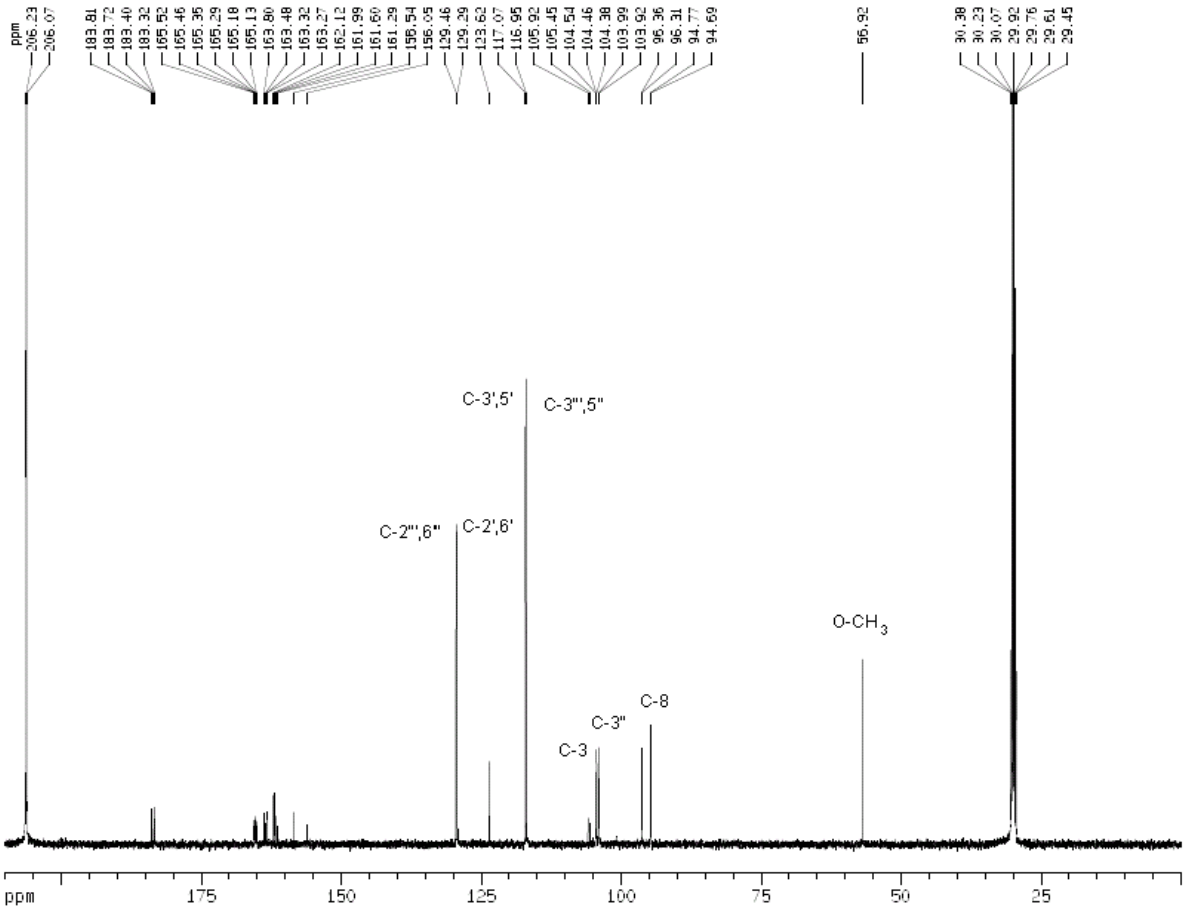



**Figura 28:** RMN de C (125 MHz, $D_3CCOCD_3$) da substância 4

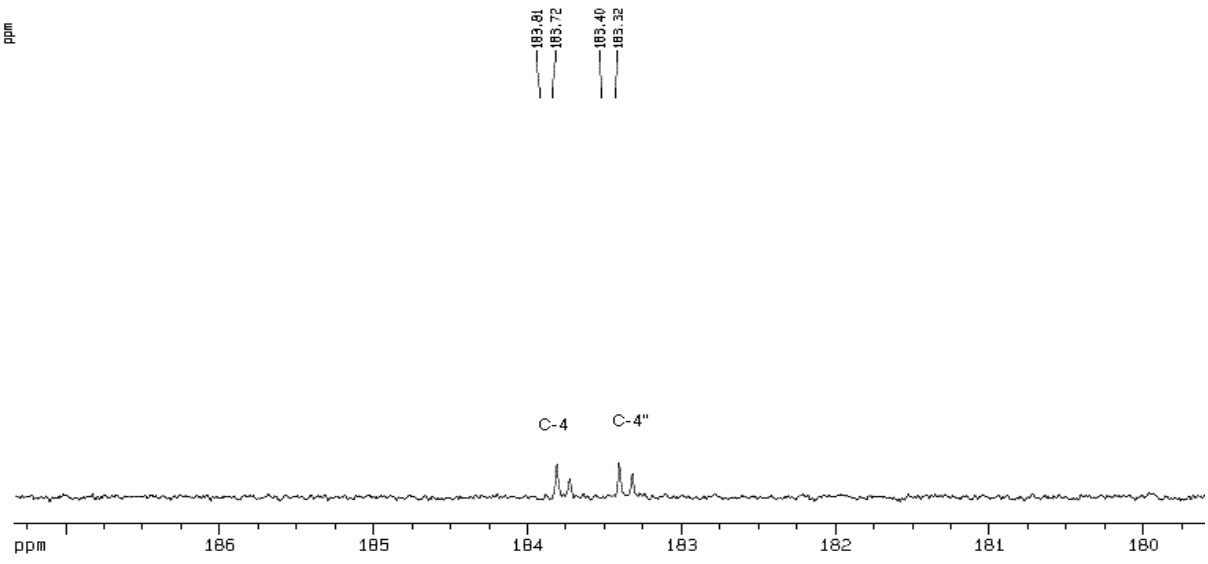



**Figura 29:** Ampliação(180-187 ppm) do Espectro de RMN de C (125 MHz, $D_3CCOCD_3$) da substância 4

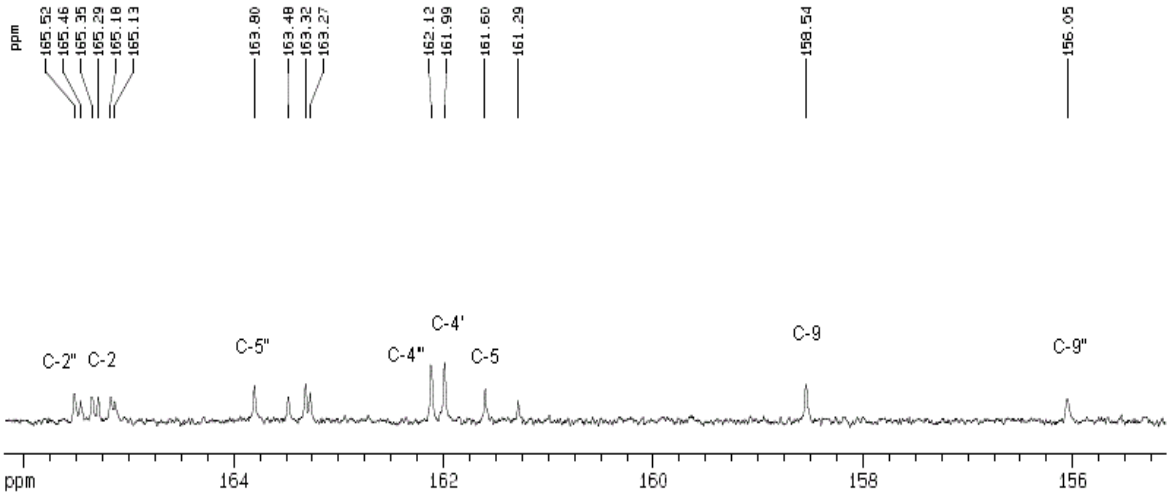



**Figura 30:** Ampliação (156-166 ppm) do Espectro de RMN de $^{13}C$ (125 MHz , $D_3CCOCD_3$ ) da substância 4

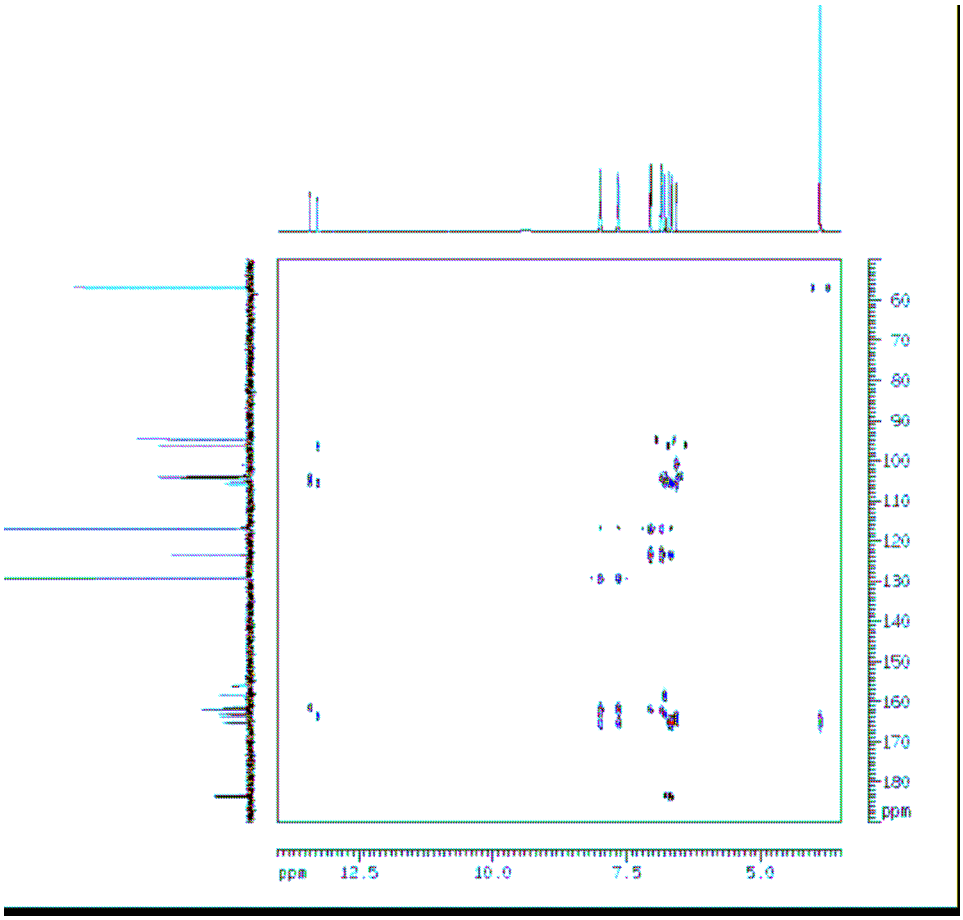



**Figura 31:** Espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância 4.

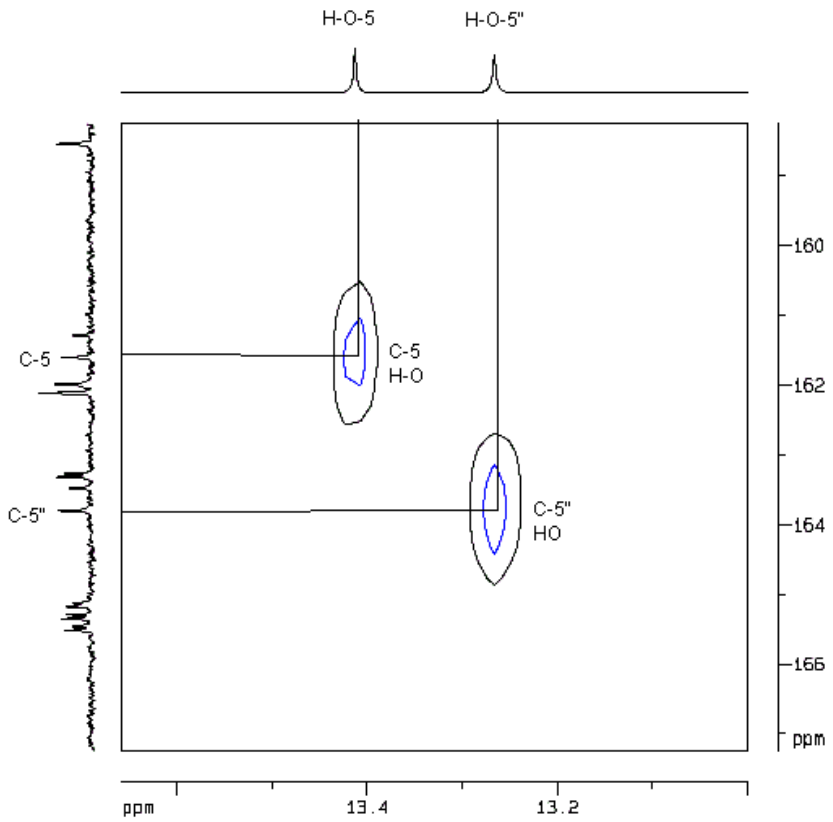



**Figura 32:** Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância 4.

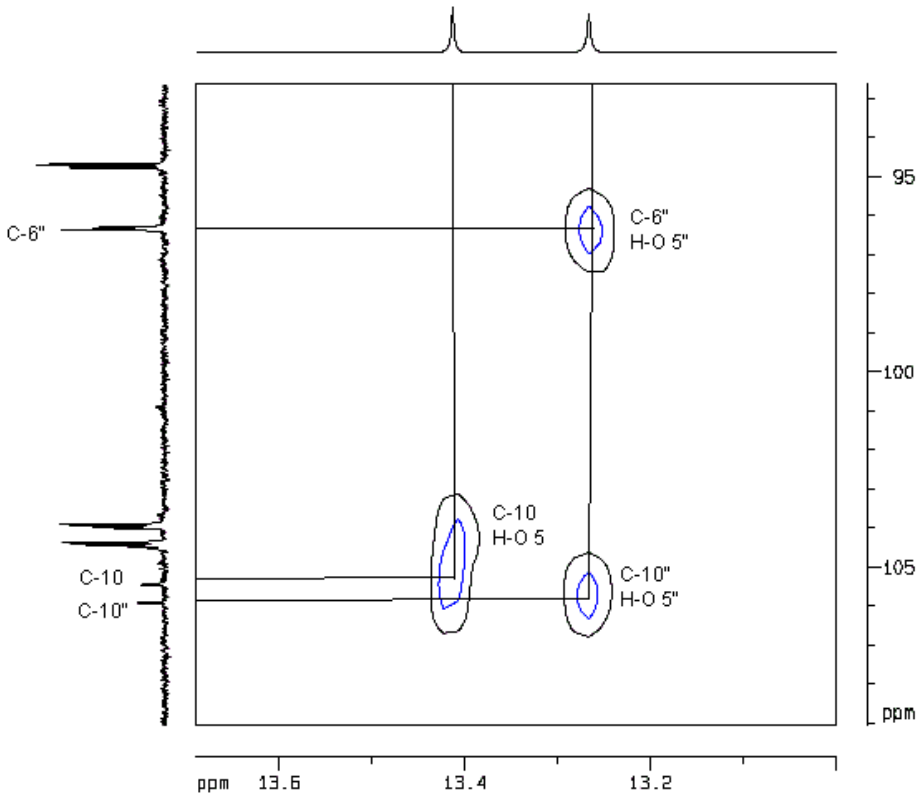



**Figura 33:** Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância 4.

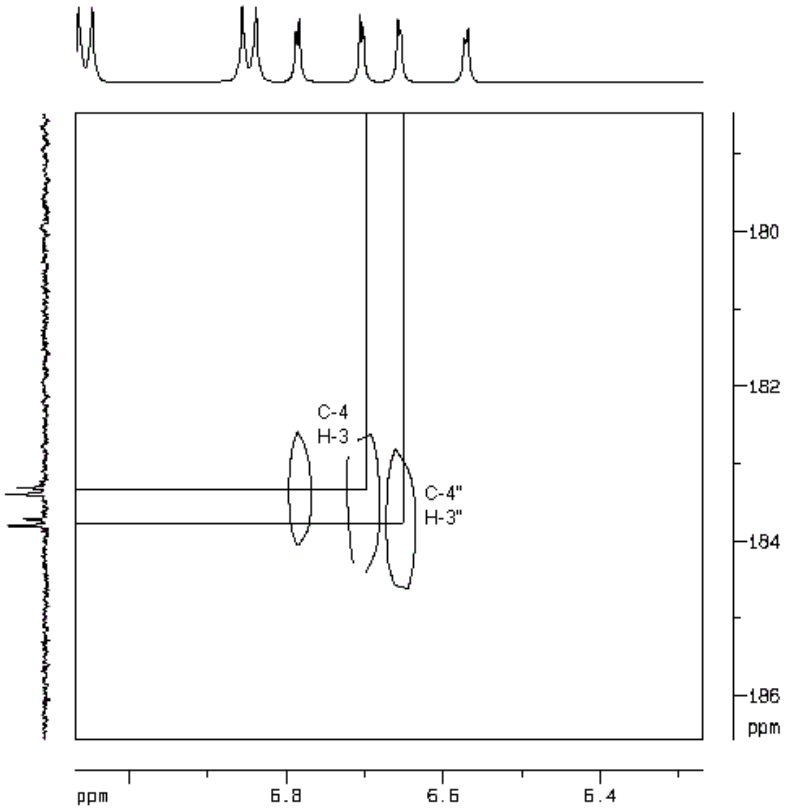



**Figura 34:** Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância 4.

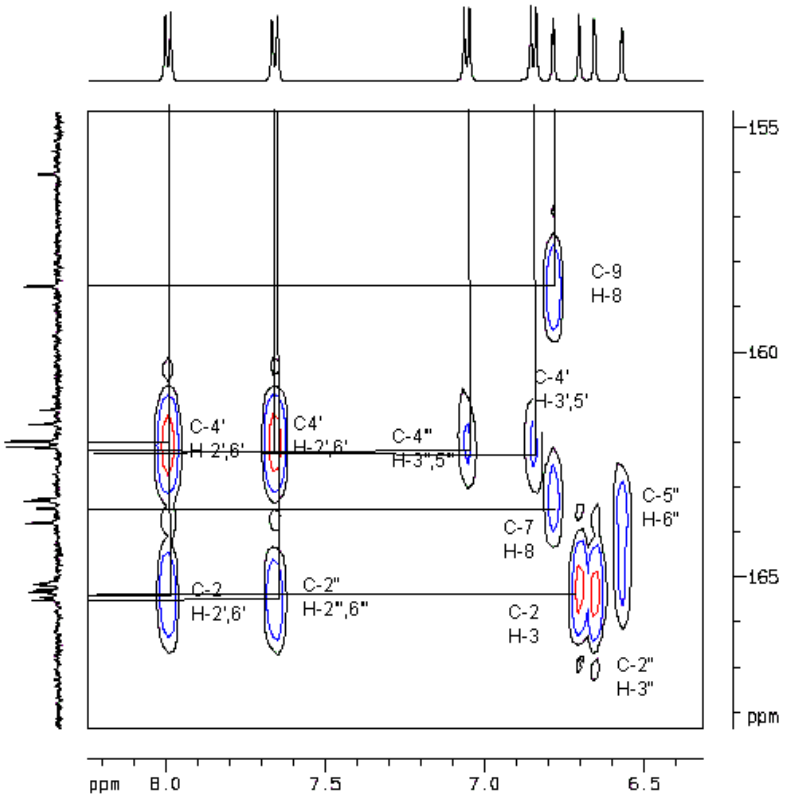



**Figura 35:** Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância 4.

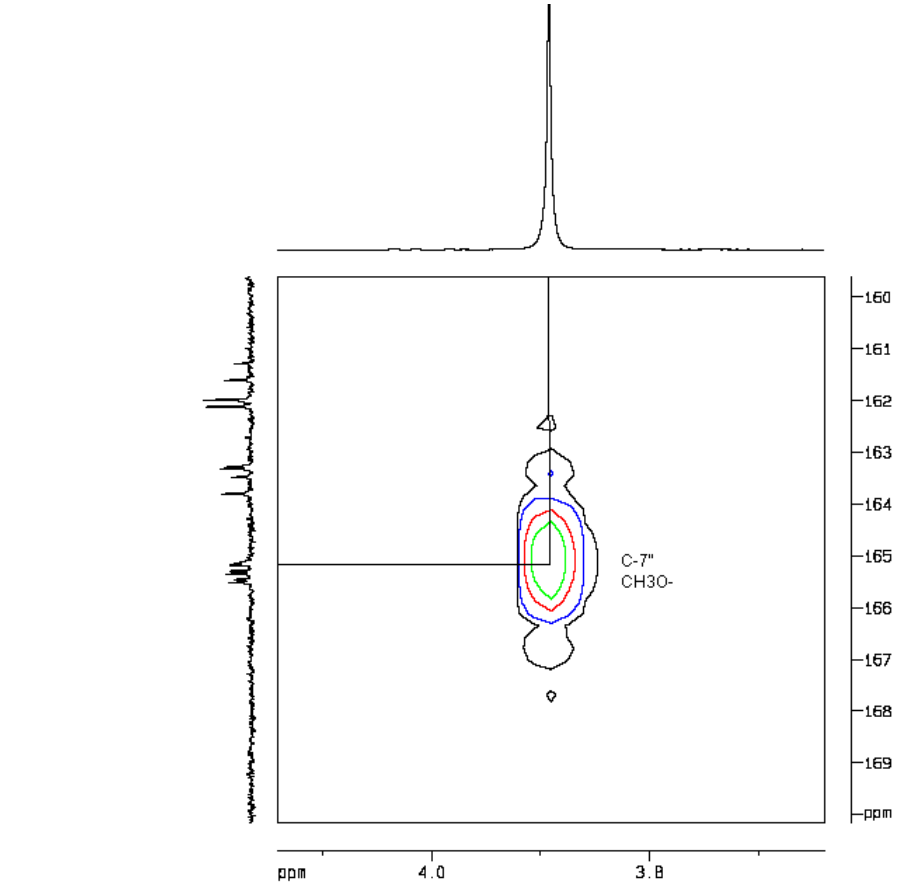



**Figura 36:** Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância 4

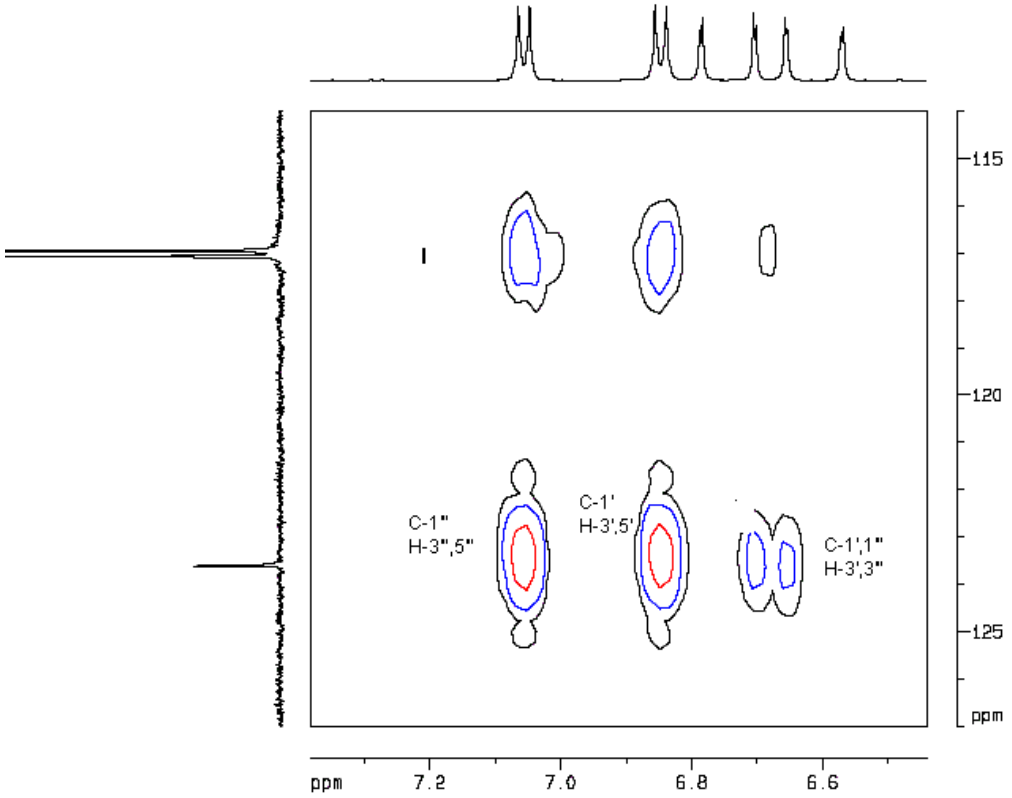



**Figura 37:** Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância 4

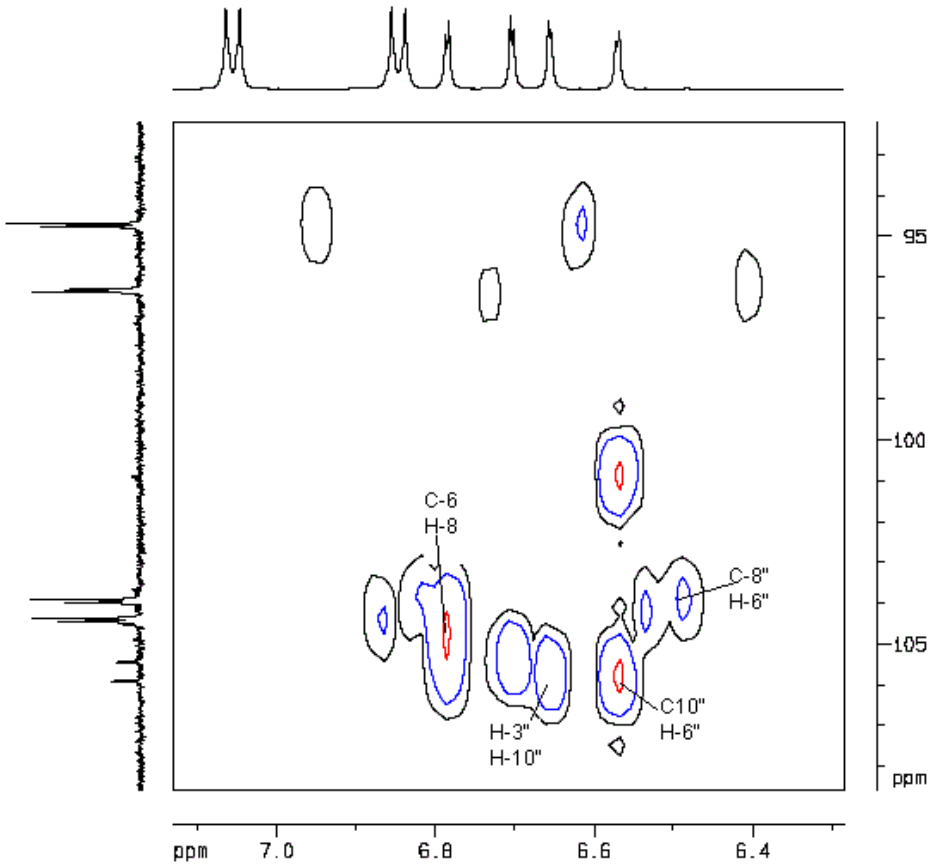



**Figura 38:** Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$ ) da substância 4

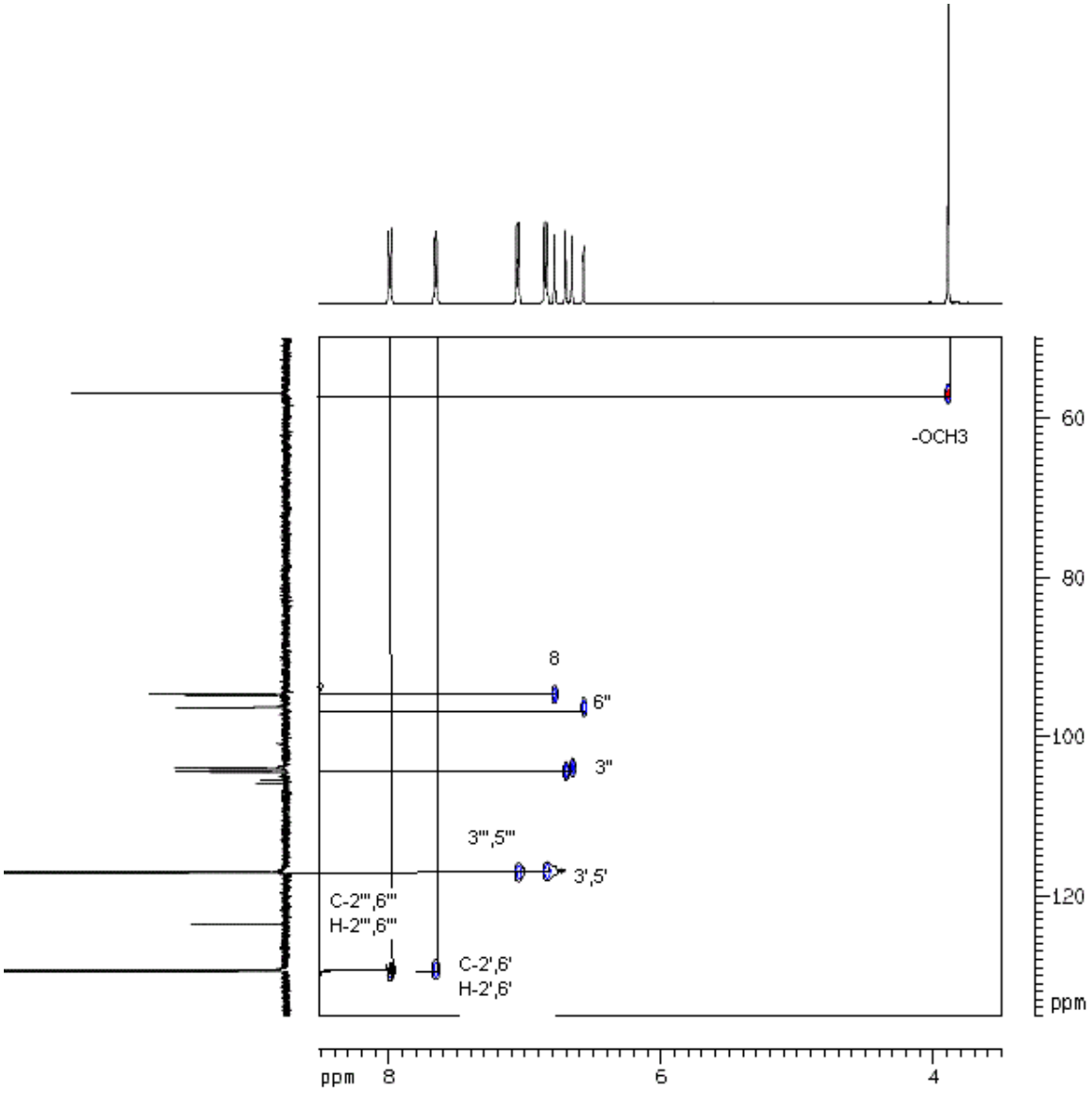



**Figura 39:** Espectro de HSQC ($D_3CCOCD_3$) da substância 4

### 5.2.6. Substância 5

O espectro no IV de **5** (**Figura 40,** pág. 51) evidencia bandas de absorção em 3425 $cm^{-1}$ (estiramento O-H), 1651 $cm^{-1}$ (estiramento de carbonila conjugada) e 1605 $cm^{-1}$ (estiramento C=C de anel aromático) e 1367 $cm^{-1}$ (estiramento C-O).

O espectro de RMN $^{1}H$ (**Figuras 41 e 42,** pág. 53) possui sinais típicos de biflavonóide, sinais de dois sistemas AA'BB' {($\delta_H$ 7,88 (2H, *J*= 7,9 Hz), 7,56 (2H, J= 7,9 Hz), 6,93 (2H, *J*= 7,9 Hz) e 6,72 (2H, *J*= 7,9 Hz)}, quatro singletos em $\delta_H$ 6,38, 6,57, 6,62 (2x), atribuídos aos hidrogênios H-6", 8, 3 e 3". O sinal de $\delta_{C=O}$ (183,74 e 184,26) verificado no espectro de $^{13}C$ (**Figuras 43 e 44,** pág. 54) estão compatíveis com os carbonos carbinólicos em ligação de hidrogênio (**Tabela 5,** pág. 52). A análise em CCDA revelou duas manchas próximas com R.F. 0,35 e 0,19 ($CH_3Cl/CH_3COCH_3$ 7:3). O espectro de RMN $^{1}H$ apresenta sinais com menor intensidade em $\delta_H$ 3,89. Isso permitiu propor a mistura de Agatisflavona **5** com 7"-O-metilagatisflavona **4**.

Para confirmar essa dedução fez-se a análise em CCDA, comparando com os padrões isolados anteriormente e a análise revelou que as substâncias possuíam o mesmo RF dos padrões. Utilizou-se também análise em CLAE utilizando sistema isocrático de metanol/água/acetonitrila/ácido acético (20:40:39:1) como fase móvel e velocidade de fluxo 1mL.$min^{-1}$ , no comprimento de onda 270nm, da fração contendo **4** e **5,** comparando-a com o padrão (7"-O-metilagatisflavona) e obteve-se os cromatogramas (**figuras 45 e 46,** pág**. 55).** O T.R=6,79 da 7"-O-metilagatisflavona permitiu confirmar a presença de **4** e o pico em T.R. = 3,93 foi atribuída a agatisflavona.

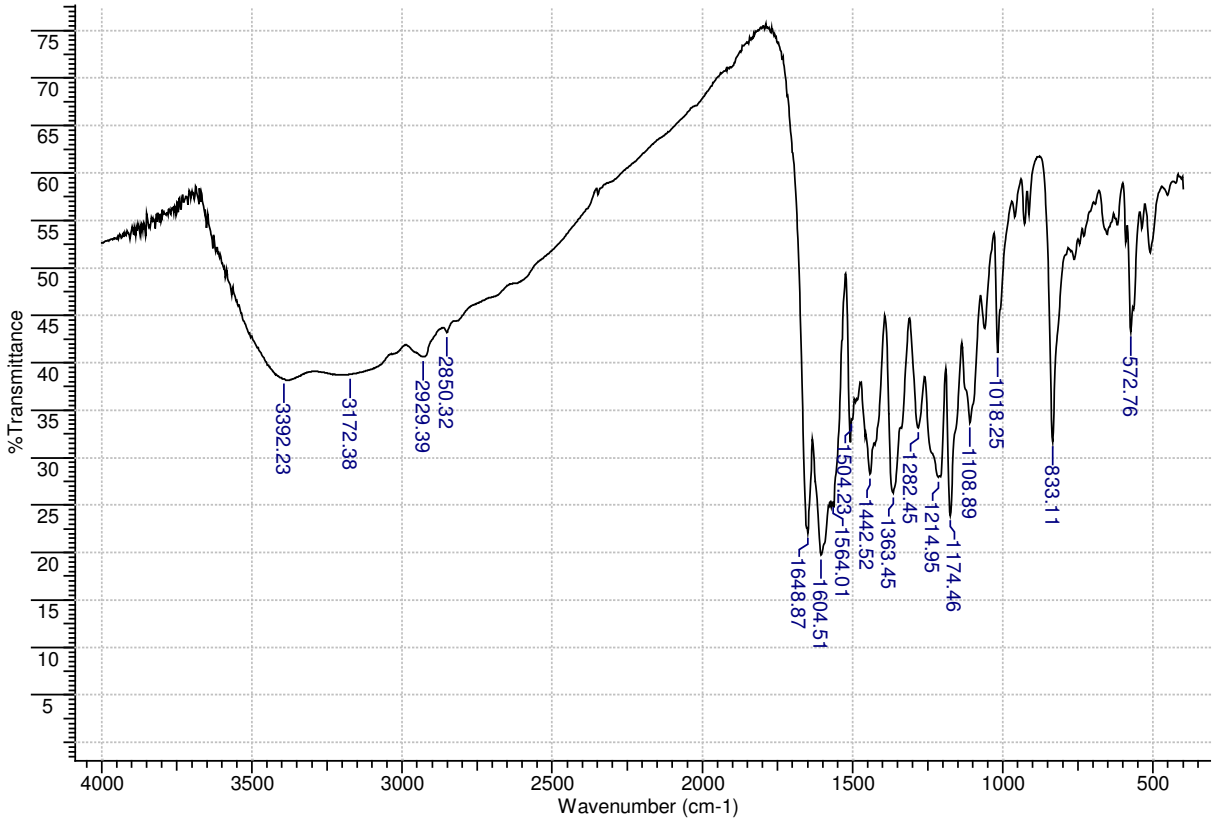
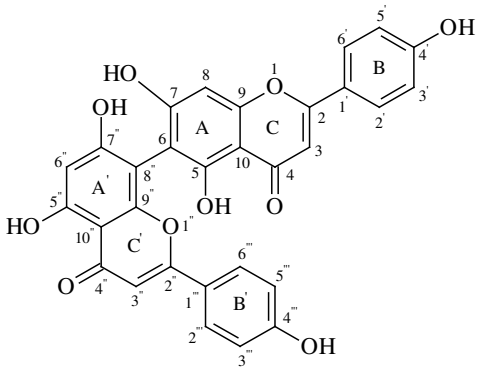



**Figura 40**: Espectro de IV de 5.

**Tabela 5.** Dados de RMN $^{1}H$ (200 MHz) e $^{13}C$ (50 MHz) em Acetona-$D_6$, comparando com os dados de RMN de $^{13}C$ da literatura (AGRAWAL, 1989) da substância **5** (agatisflavona).



| C | δC **(Metanol-$D_4$)** | δC **(literatura-DMSO-$D_6$)** | $\delta_H$(mult, Hz) |
|---|---|---|---|
| 2 | 167,5 | 164,1 | - |
| 4 | 184,3 | 182,3 | - |
| 5 | 162,5 | 160,0 | - |
| 6 | 103,1 | 103,6 | - |
| 7 | 165,9 | 162,9 | - |
| 9 | 160,9 | 157,0 | - |
| 10 | 103,5 | 103,8 | - |
| 1' | 123,4 | 121,5 | - |
| 4' | 162,7 | 161,3 | - |
| 2" | 166,3 | 163,9 | - |
| 4" | 183,7 | 182,0 | - |
| 5" | 162,5 | 160,9 | - |
| 7" | 166,3 | 162,7 | - |
| 8" | 101,1 | 99,4 | - |
| 9" | 159,0 | 155,1 | - |
| 10" | 103,5 | 104,0 | - |
| 1''' | 121,4 | 121,7 | - |
| 4''' | 162,5 | 161,2 | - |
| 3 | 103,1 | 103,1 | 6,70 (*s*) |
| 8 | 95,9 | 93,7 | 6,81 (*s*) |
| 2',6' | 129,6 | 128,6 | 7,96 (*d*, 7,9) |
| 3',5' | 117,2 | 116,2 | 7,66 (*d*, 7,9) |
| 3" | 103,5 | 102,8 | 6,67 (*s*) |
| 6" | 101,1 | 98,9 | 6,57 (*s*) |
| 2''',6''' | 129,6 | 128,2 | 7,03 (*d*, 7,9) |
| 3''',5''' | 117,2 | 116,2 | 6,85 (*d*, 7,9) |

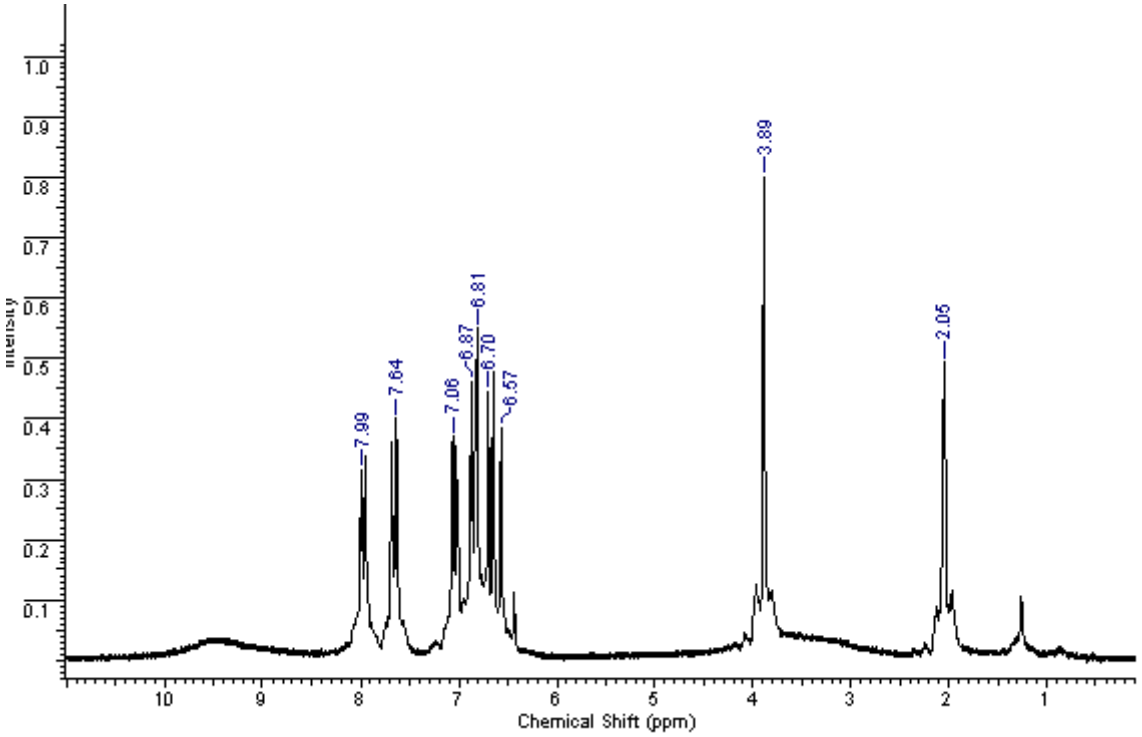



**Figura 41:** Espectro de RMN de $_1$H (200MHz, $D_3CCOCD_3$) da mistura dos biflavonóides **4 e 5.**

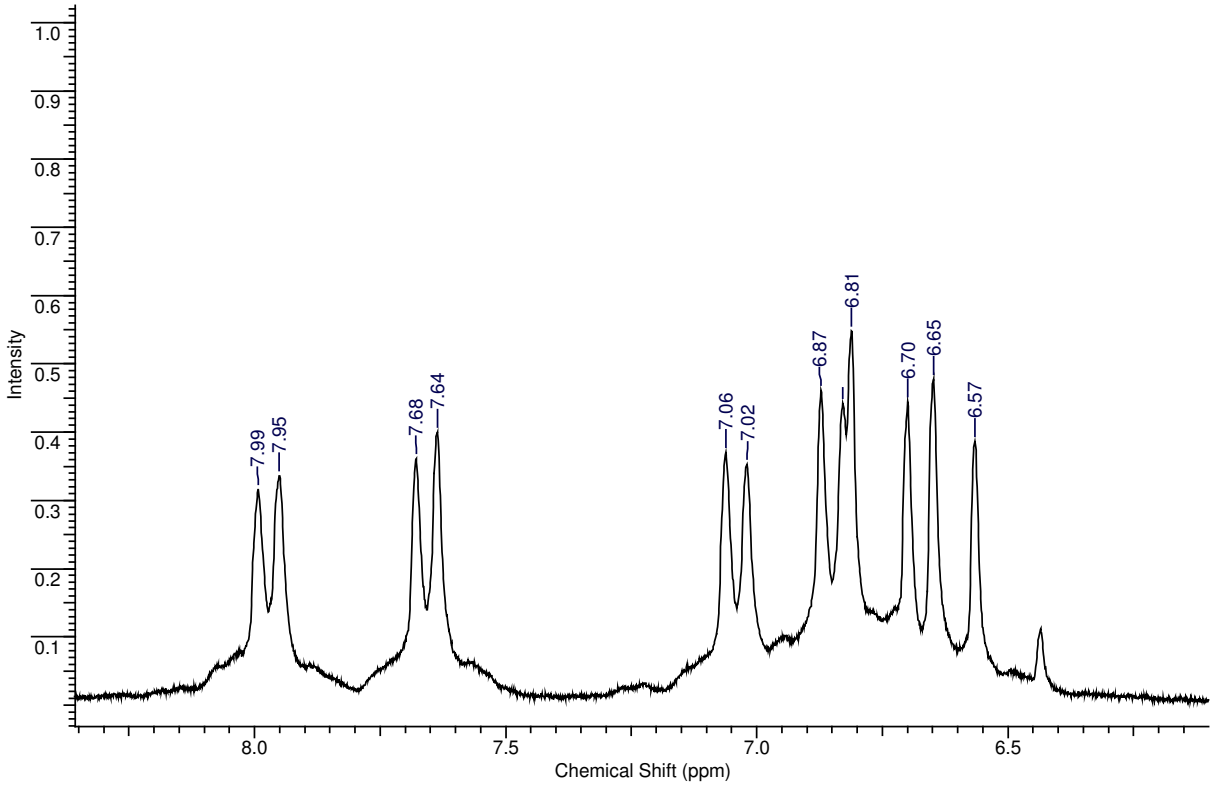



**Figura 42:** Ampliação do espectro (6.0-8.5 ppm) de RMN de $_1$H (200MHz, $D_3CCOCD_3$) da mistura dos biflavonóides **4 e 5.**

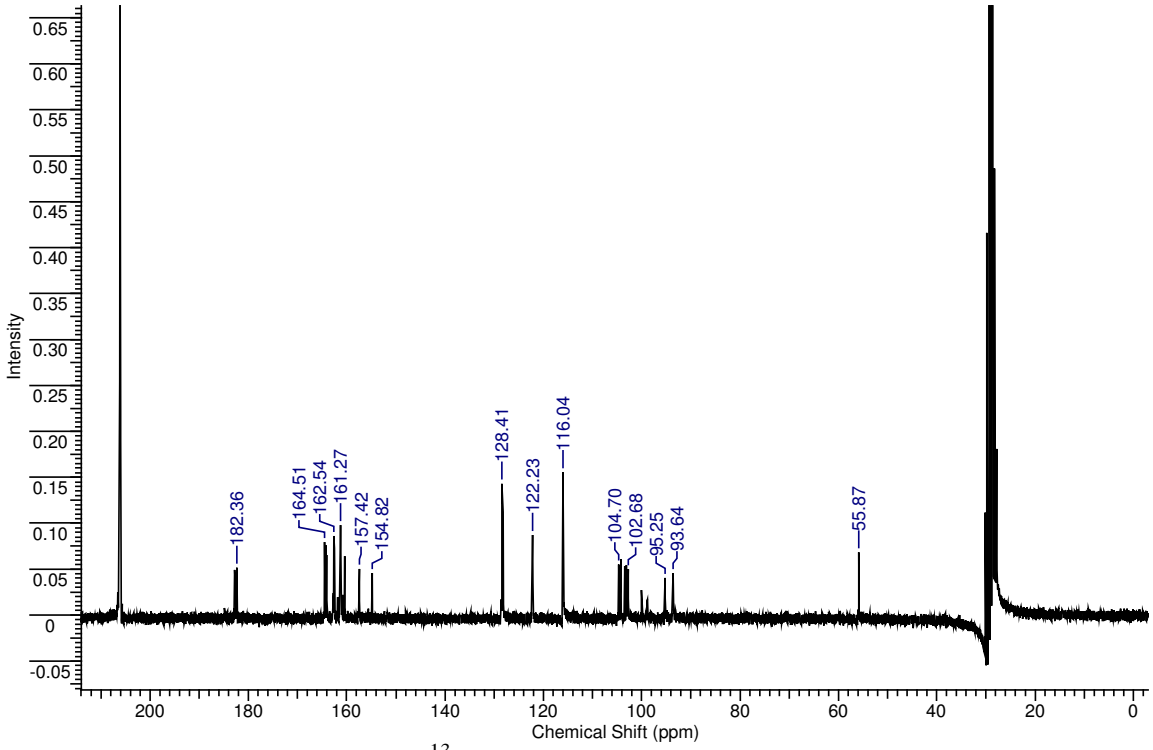



**Figura 43:** Espectro de RMN de $^{13}C$ (50 MHz, $D_3CCOCD_3$) da mistura dos biflavonóides **4 e 5.**

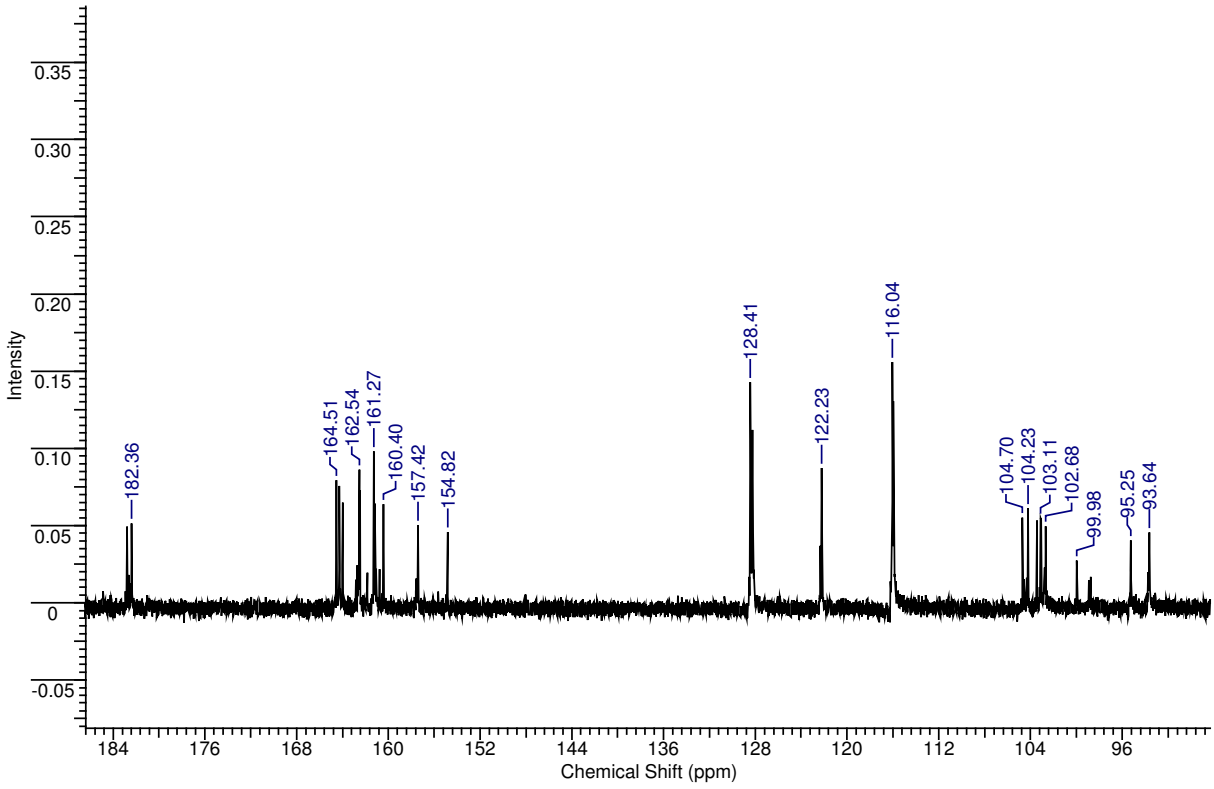



**Figura 44:** Ampliação do espectro de RMN de $^{13}C$ (50 MHz, $D_3CCOCD_3$) da mistura dos biflavonóides **4 e 5.**

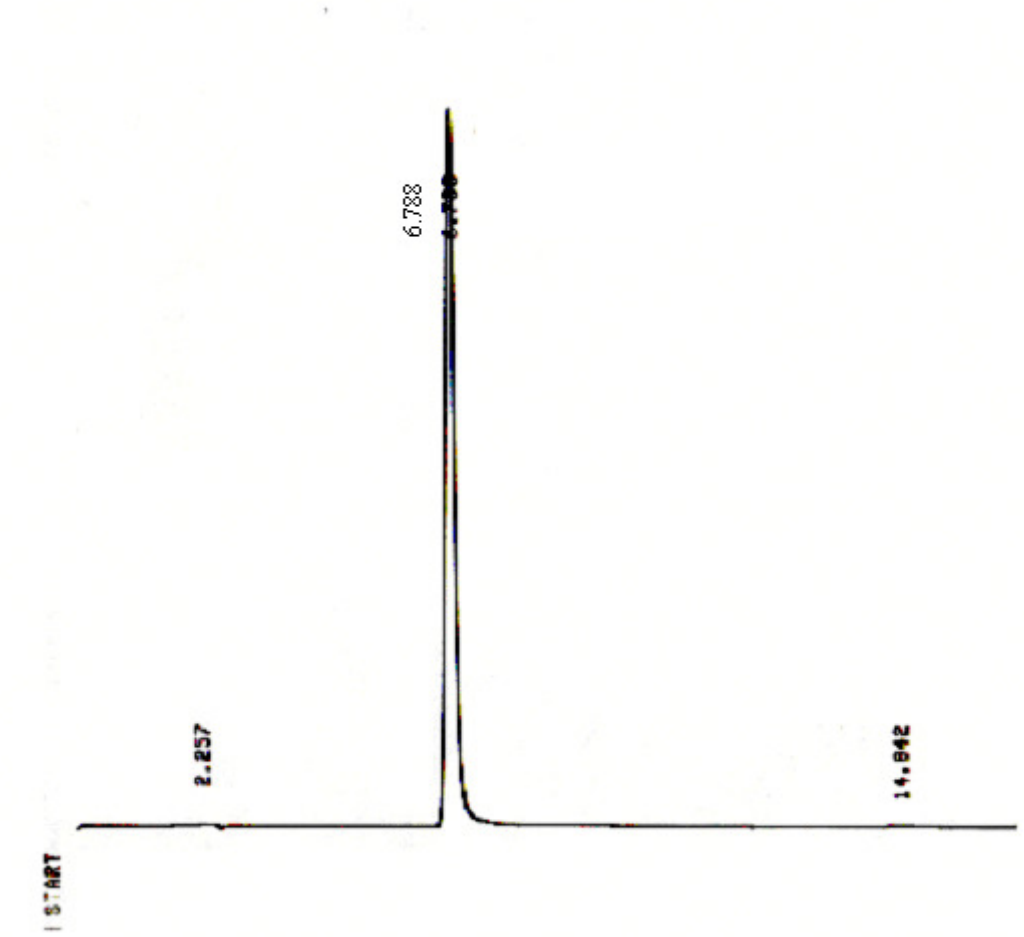



**Figura 45:** Cromatograma obtido em CLAE de 7”-O-metilagatisflavona (**4**).

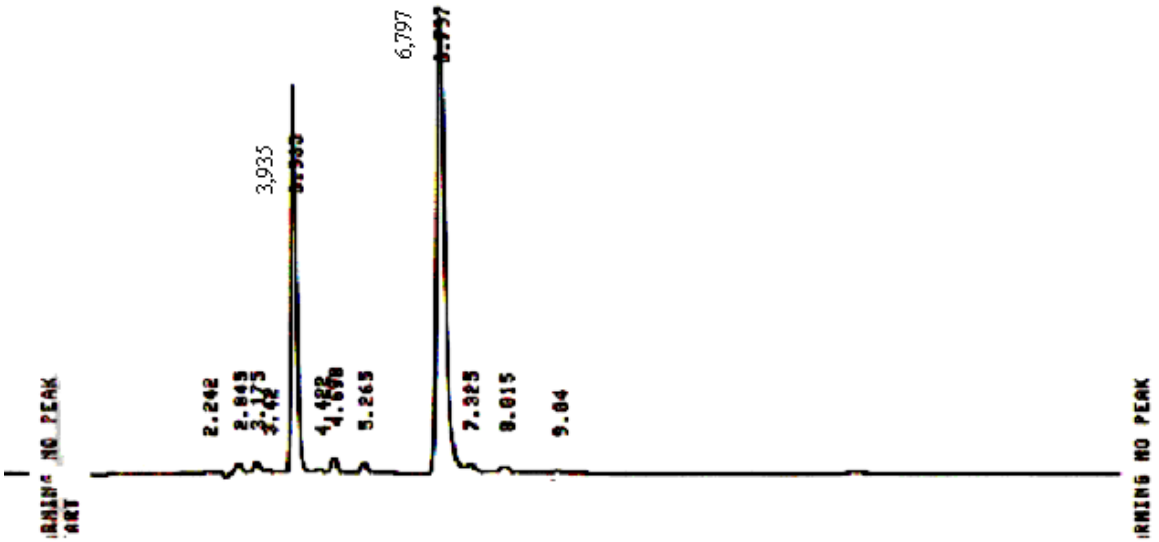



**Figura 46:** Cromatograma obtido em CLAE da mistura **4 e 5.**

### 5.2.7. Derivado 4a (hexametilagatisflavona).

A reação de metilação de 7"-*O*-metilagatisflavona com diazometano forneceu o derivado hexametilado **4a**, através da substituição dos hidrogênios das hidroxilas por grupos metilas nas posições 7, 5, 5", 4', 4"'. A mudança significativa no espectro de RMN $^{1}$H de **4a**, quando comparada com o biflavonóide natural **4** (7"-O-metilagatisflavona), foi o aparecimento de 5 sinais adicionais de metoxilas.

Os espectros de RMN $^{1}$H (1D e 2D $^{1}$H-$^{1}$H-COSY) revelam sinais para os átomos de hidrogênios H-3"',5"' ($\delta_H$ 6,94, *d*, *J*=8,5) acoplando com H-2"',6"' ($\delta_H$ 7,69, *d*, *J*=8,5) e H-3',5' ($\delta_H$ 7,16, *d*, *J*=8,5) acoplando com H-2',6' ($\delta_H$ 8,11, *d*, *J*=8,5), correspondentes a dois sistemas AA'BB'. Os hidrogênios H-6",3",3 e 8 estão representados pelos sinais simples de $\delta_H$ 6,57, $\delta_H$ 6,69, $\delta_H$ 6,81 e $\delta_H$ 6,99, respectivamente. Os sinais das metoxilas 7, 7", 5, 5", 4' e 4" aparecem no espectro em $\delta_H$ 4,07, 3,94, 3,61, 3,93, 3,88 e 3,77 ppm.

O espectro de RMN $^{1}$H (**Figuras 47-49**, pág. 58 e 59) de **4a** mostra o desaparecimento dos sinais dos hidrogênios em ligação de hidrogênio em torno de 13 ppm e o revelando que ambas foram substituídas por grupos metilas. Os espectros obtidos com $^{1}$Hx$^{1}$H COSY (**Figura 50,** pág. 60) e NOESY (**Figuras 51 e 52**, págs. 60 e 61), permitiram fazer a completa atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios de **4a** (**Tabela 6,** pág. 57). Os sinais de interações espaciais detectados no espectro NOESY permitiram confirmar as localizações e os respectivos deslocamentos químicos: MeO-4' com interação espacial com H-3',5' ($\delta_H$ 7,05), MeO-4"' com interação espacial com H-3"',5"' ($\delta_H$ 6,84), MeO-7 com interação espacial com H-8 ($\delta_H$ 7,01) e MeO-7", pela interação espacial com H-6" ($\delta_H$ 6,73).

O espectro de RMN $^{13}$C de **4a** (**Figura 53 e 54,** págs. 61 e 62) foi comparado com a literatura (MOREIRA *et al*,, 1999). O espectro de HMQC (**Figura 55,** pág. 63) permitiu estabelecer as correlações diretas ($^{1}J_{CH}$) enquanto que os deslocamentos químicos dos carbonos não hidrogenados deste derivado foram estabelecidos pelos espectros de HMBC através ($^{2,3}J_{CH}$). (**Figura 56,** pág. 64).

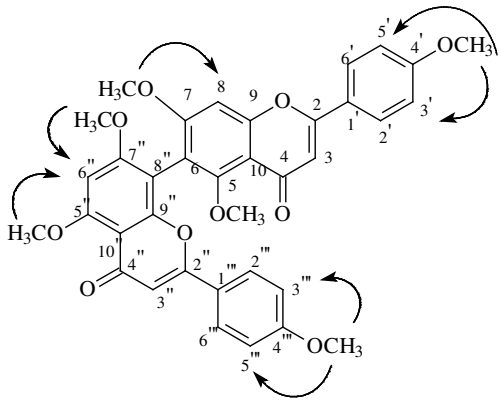


**Tabela 6:** Dados de RMN $^{1}H$ (200 MHz) e $^{13}C$ (50 MHz) da substância **4** (MOREIRA *et al*., 1999) com o derivado **4a**.

| | **Substância 4** | **Derivado 4a** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | HMBC | | | |
| C | δC | δC | δH | CH | $^{1}J_{CH}$ | $^{2,3}J_{CH}$ | Noe |
| 2 | 165,03 | 161,8 | | H-3;H-2',6' | | | |
| 3 | 103,22 | 107,6 | 6,91(s,1H) | | | | |
| 4 | 183,5 | 177,1 | | H-3 | | | |
| 5 | 161,3 | 159,7 | | $CH_3O$- 6 | | | |
| 6 | 104,1 | 113,8 | | H-8 | | | |
| 7 | 163,1 | 163,2 | | $H_3CO$- 7; H-8 | | | |
| 8 | 94,5 | 95,8 | 7,0(s,1H) | | | | $OCH_3$-7 |
| 9 | 158,2 | 160,5 | | H-8 | | | |
| 10 | 105,1 | 105,9 | | | | | |
| 1' | 123,2 | 123,7 | | H-3',5' | | | |
| 2',6' | 129,3 | 128,1 | 7,96(d,8Hz,2H) | | | | |
| 3',5' | 116,8 | 114,8 | 7,1(d,8Hz,2H) | | | | $OCH_3$-4' |
| 4' | 161,8 | 163,4 | | $H_3CO$- 4';H-2',6';H-3',5' | | | |
| 2" | 165,2 | 161,2 | | H-3";H-2'",6'" | | | |
| 3" | 103,4 | 106,0 | 7,26(s,1H) | | | | |
| 4" | 183,3 | 178,3 | | | | | |
| 5" | 163,4 | 162,0 | | $H_3CO$- 7";H-6" | | | |
| 6" | 96,0 | 92,4 | 6,6(s,1H) | H-6" | | | $OCH_3$-5",$H_3CO$-7" |
| 7" | 164,8 | 162,8 | | | | | |
| 8" | 101,0 | 103,1 | | H-6";H-3" | | | |
| 9" | 155,5 | 157,3 | | H-3'',5'" | | | |
| 10" | 105,6 | 107,0 | | | | | |
| 1'" | 123,2 | 124,0 | | | | | |
| 2'",6'" | 129,1 | 128,1 | 7,50(d,8Hz,2H) | H-2'",6'";H-3'",5'" | | | |
| 3'',5'" | 116,8 | 114,9 | 6,86(d,8Hz) | | | | $OCH_3$-4'" |
| 4'" | 161,8 | 163,1 | | | | | |
| $OCH_3$-5 | | 62,4 | 3,62 | | | | |
| $OCH_3$-7 | | 56,5 | 3,88 | | | | H-8 |
| $OCH_3$-4' | | 55,9 | 3,93 | | | | H-3',5' |
| $OCH_3$-5" | | 56,8 | 4,03 | | | | H-6" |
| $OCH_3$-7" | 56,7 | 56,4 | 3,95 | | | | H-6" |
| $OCH_3$-4'" | | 55,7 | 3,82 | | | | H-3'",5'" |

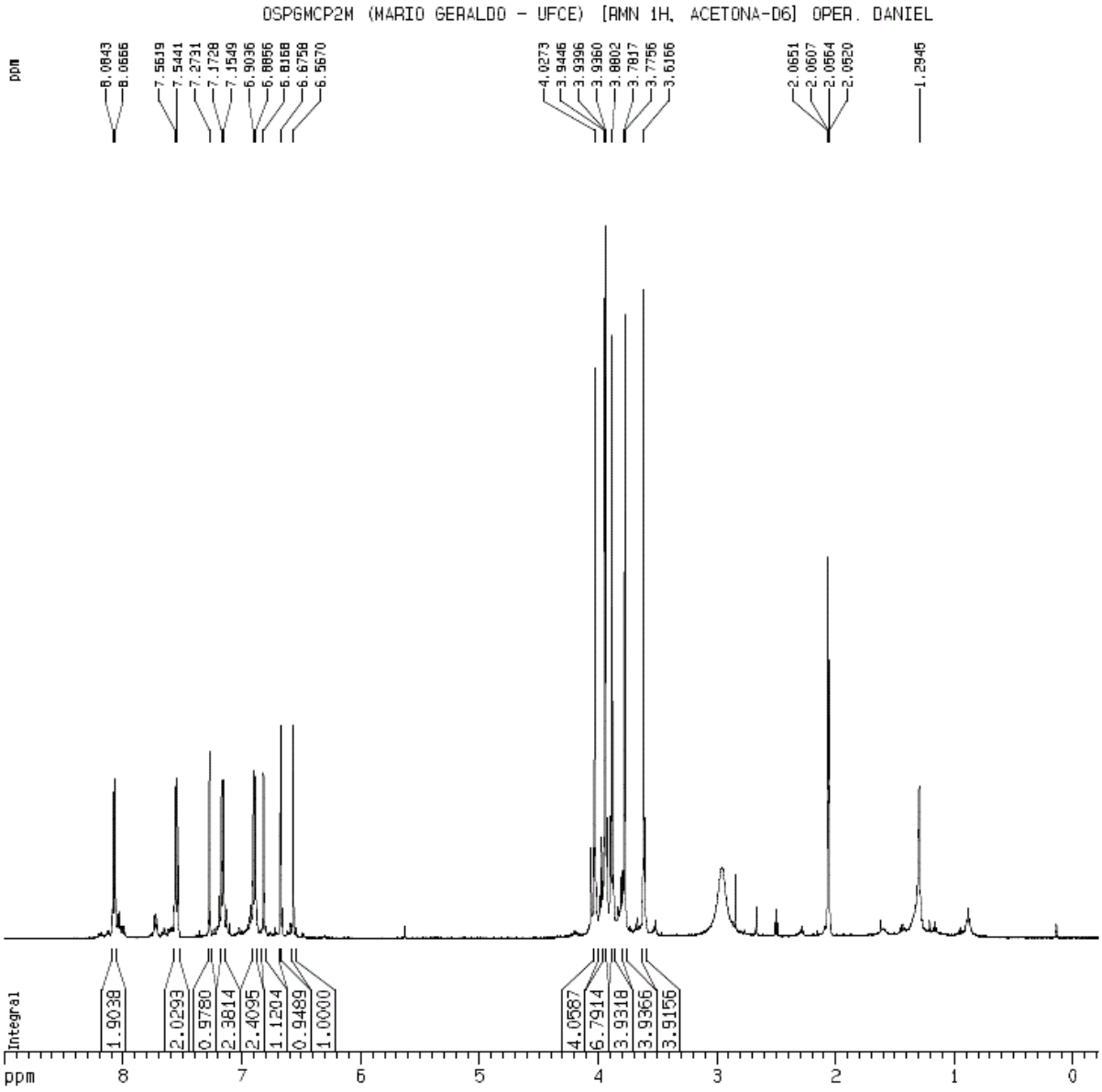



**Figura 47:** Espectro de RMN de $^{1}H$ (500 MHz , $D_3CCOCD_3$) do derivado **4a.**

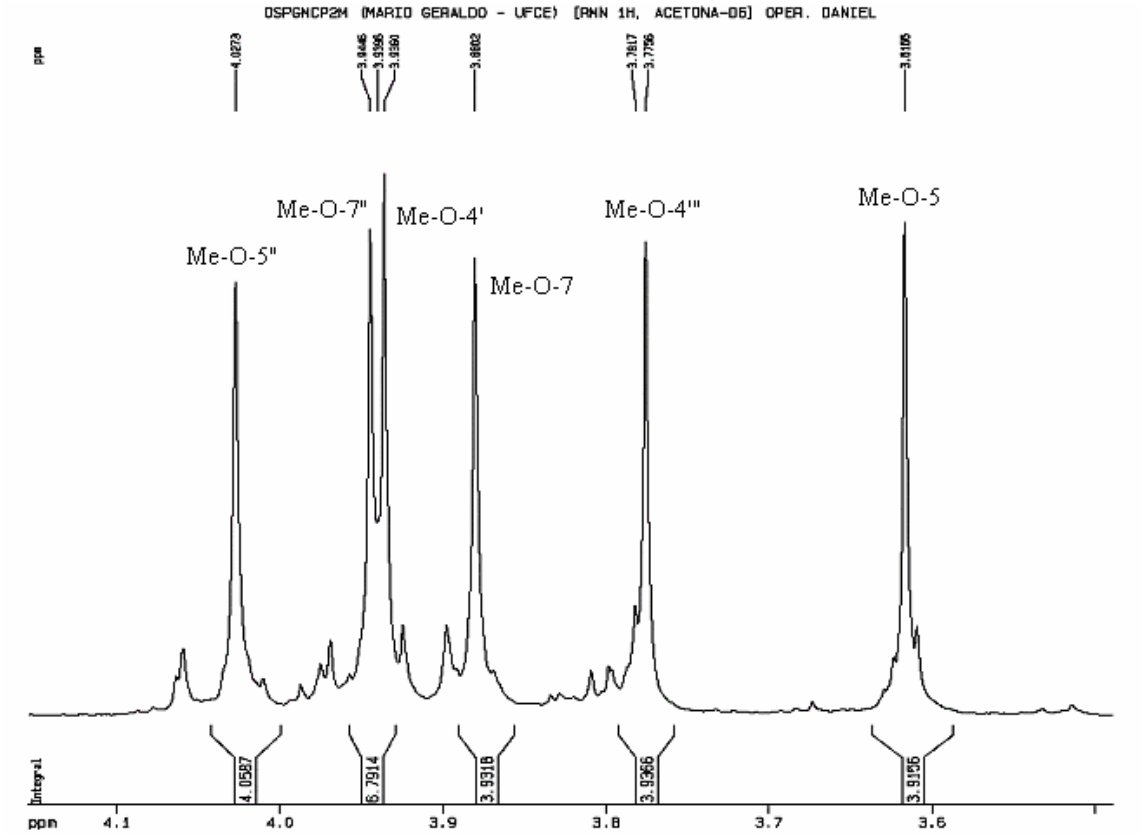



**Figura 48:** Ampliação do espectro de RMN de $^{1}H$ (500 MHz , $D_3CCOCD_3$) do derivado **4a.**

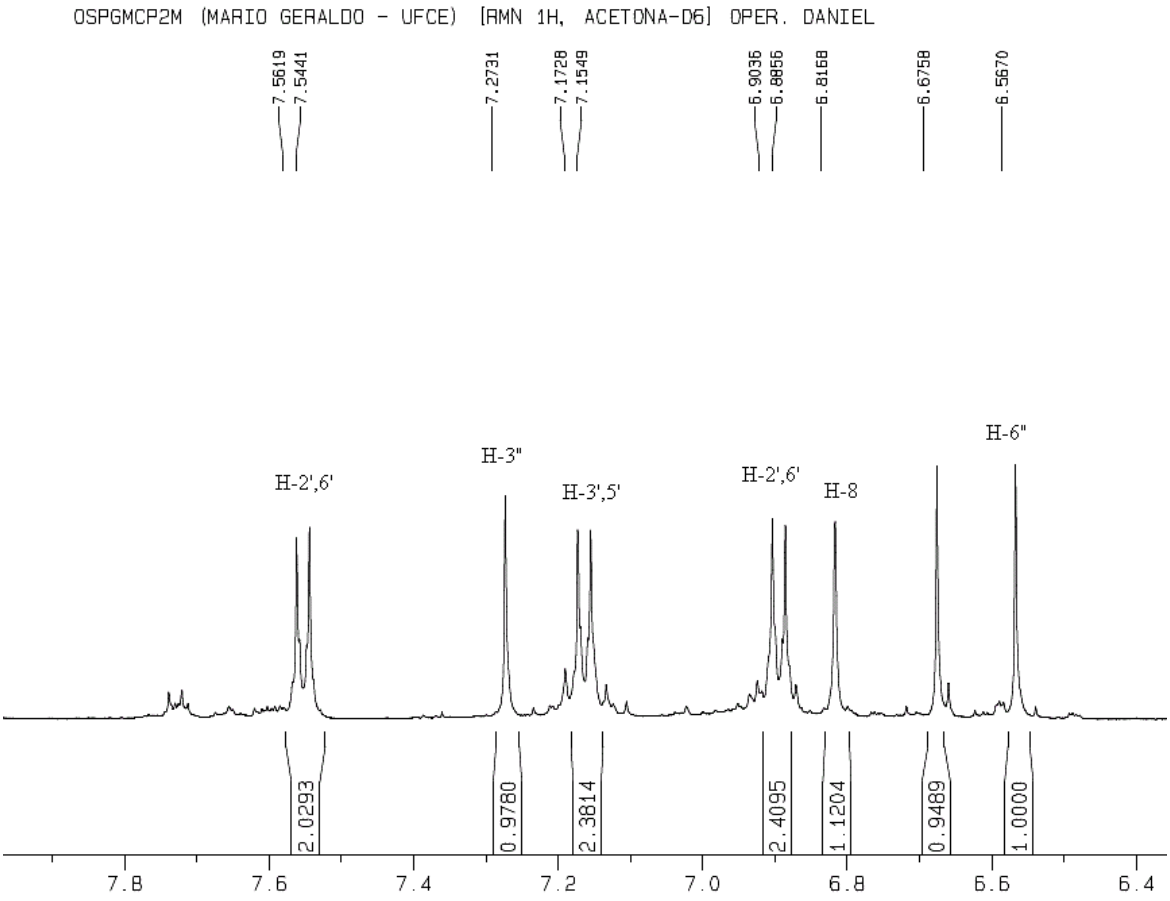



**Figura 49:** Ampliação do espectro de RMN de $^{1}H$ (500 MHz , $D_3CCOCD_3$) do derivado **4a.**

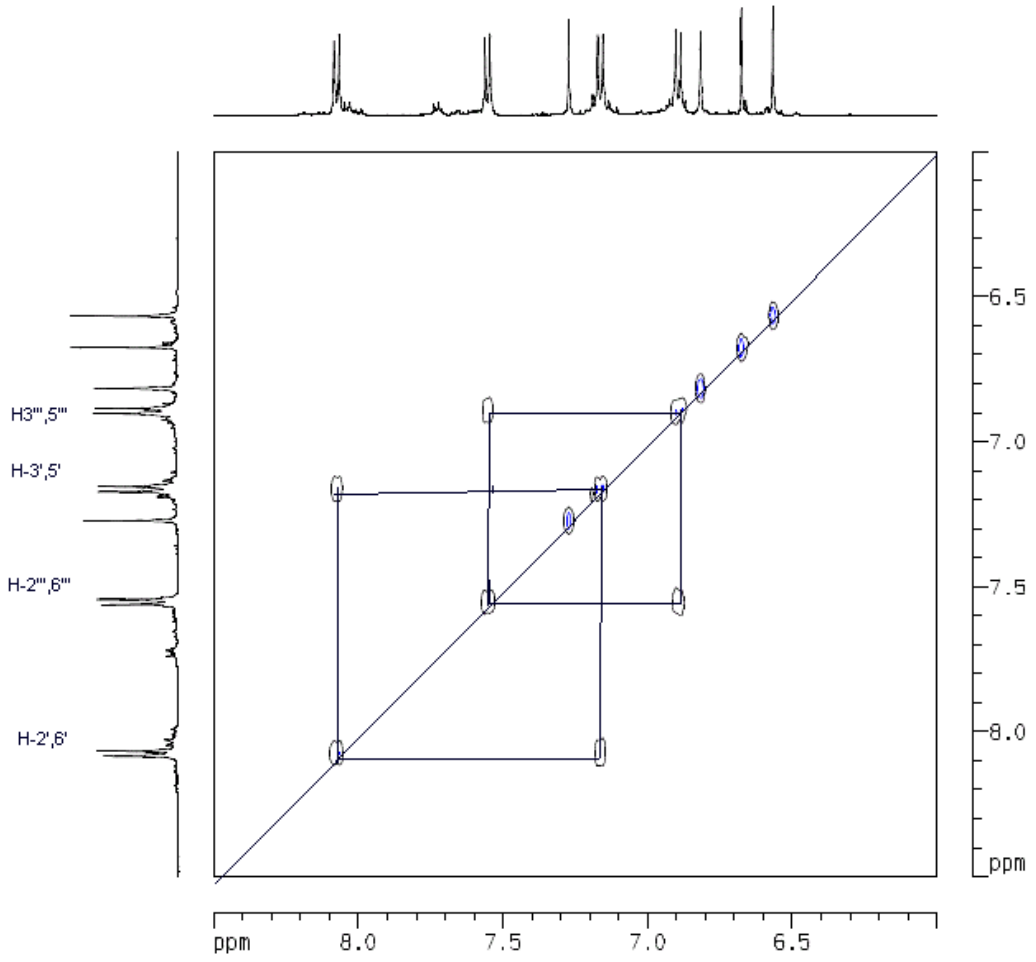



**Figura 50:** Espectro de $^{1}H$-$^{1}H$-COSY (500MHz, $D_3CCOCD_3$) de **4a.**

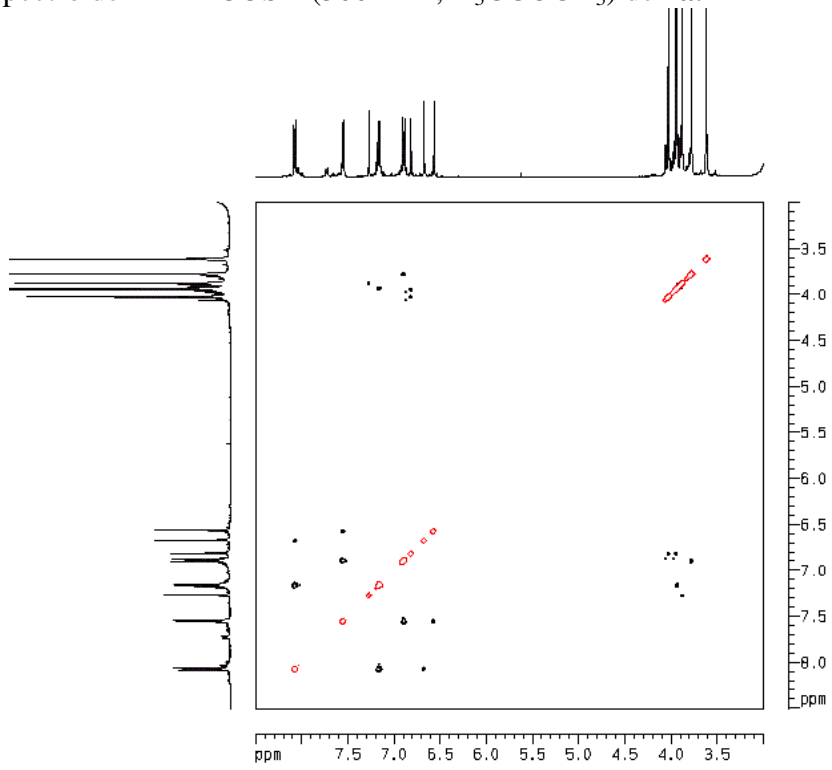



**Figura 51:** Espectro de NOESY de **4a**.

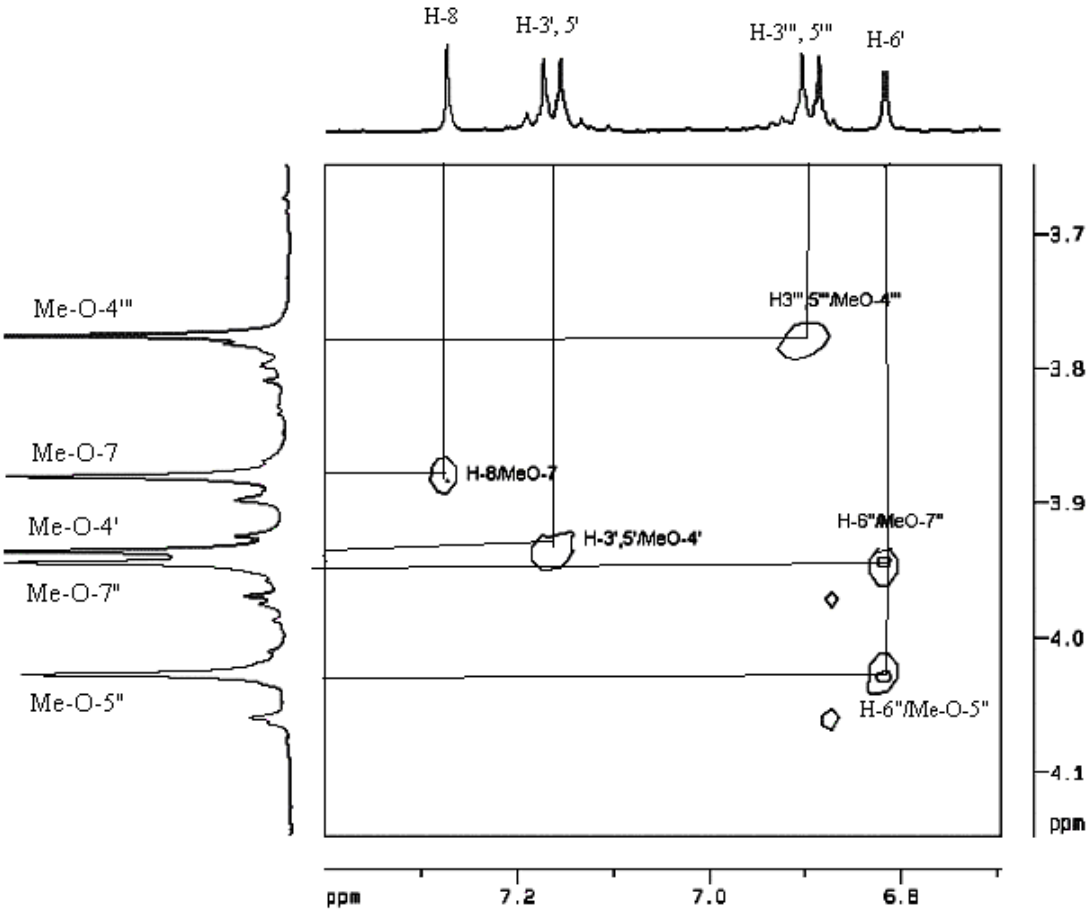



**Figura 52:** Ampliação do espectro de NOESY de **4a**.

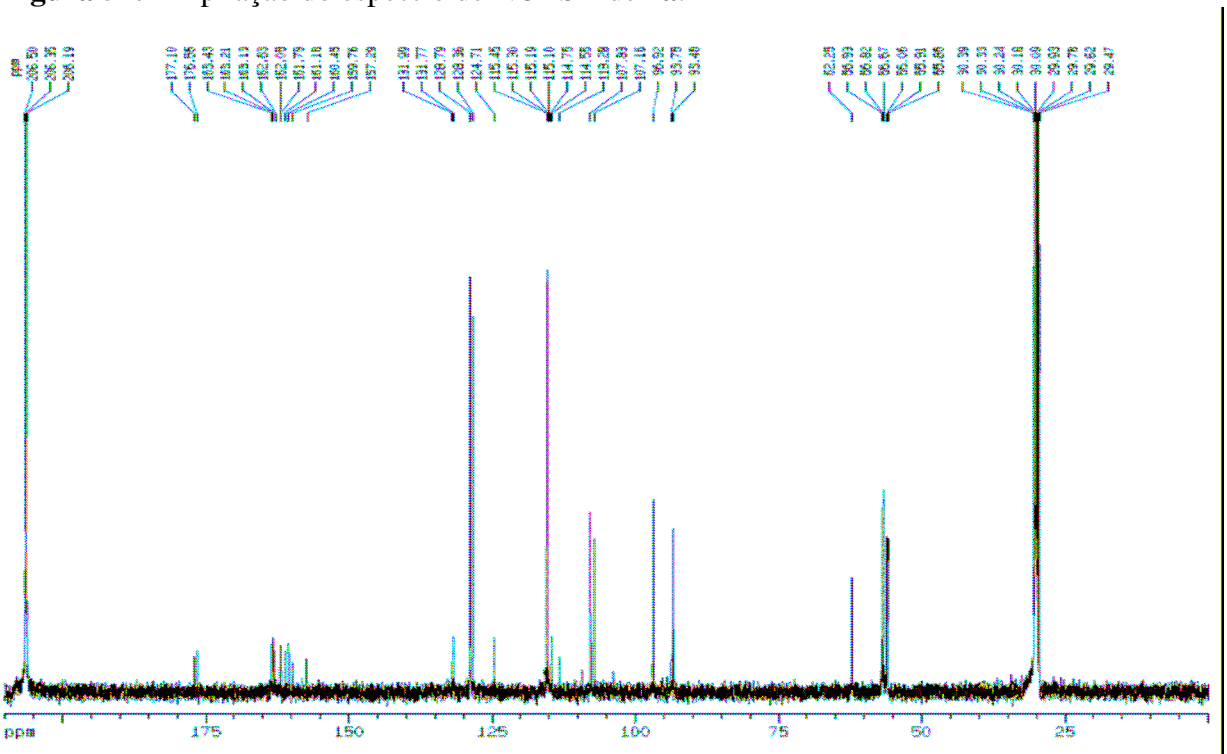



**Figura 53:** Espectro de $^{13}C$ (125MHZ, $D_3CCOCD_3$)de **4a.**

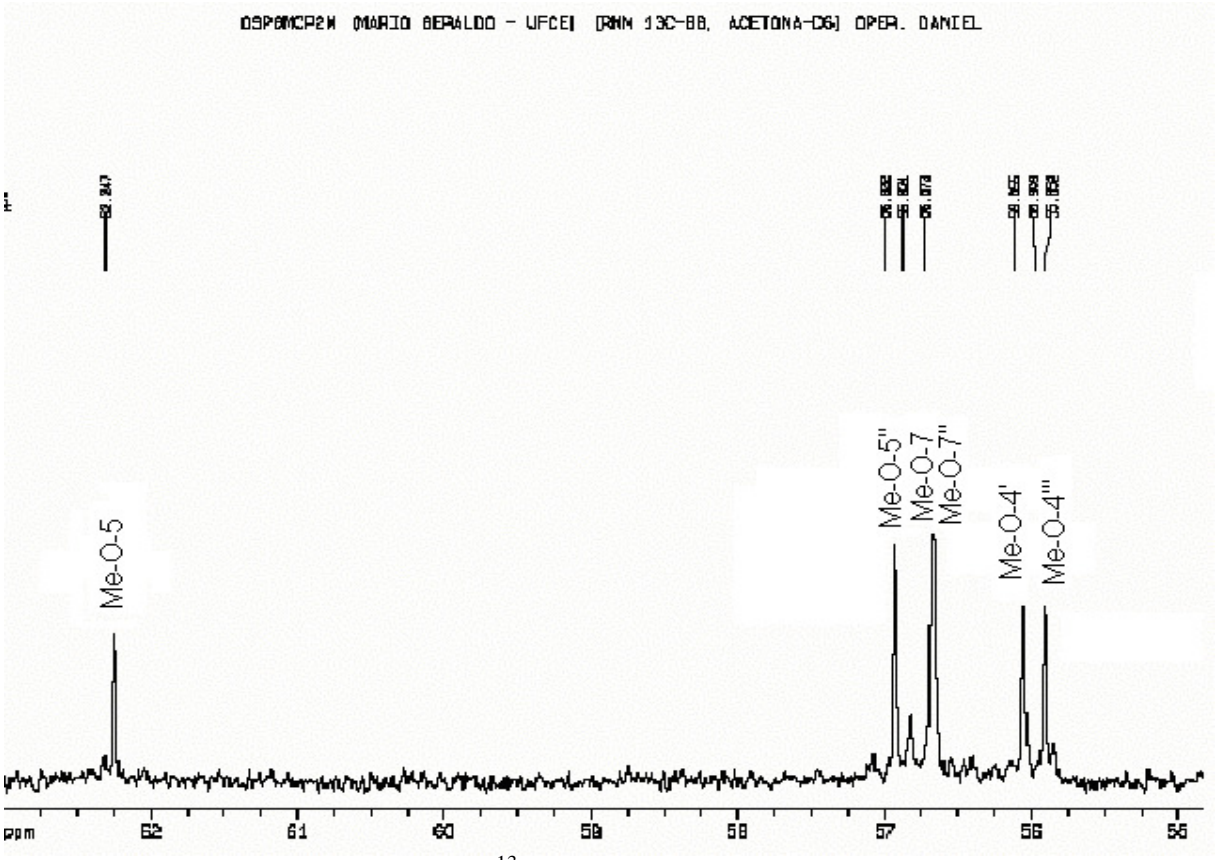



**Figura 54:** Ampliação do espectro de $^{13}C$ (125MHZ, $D_3CCOCD_3$) de **4a.**

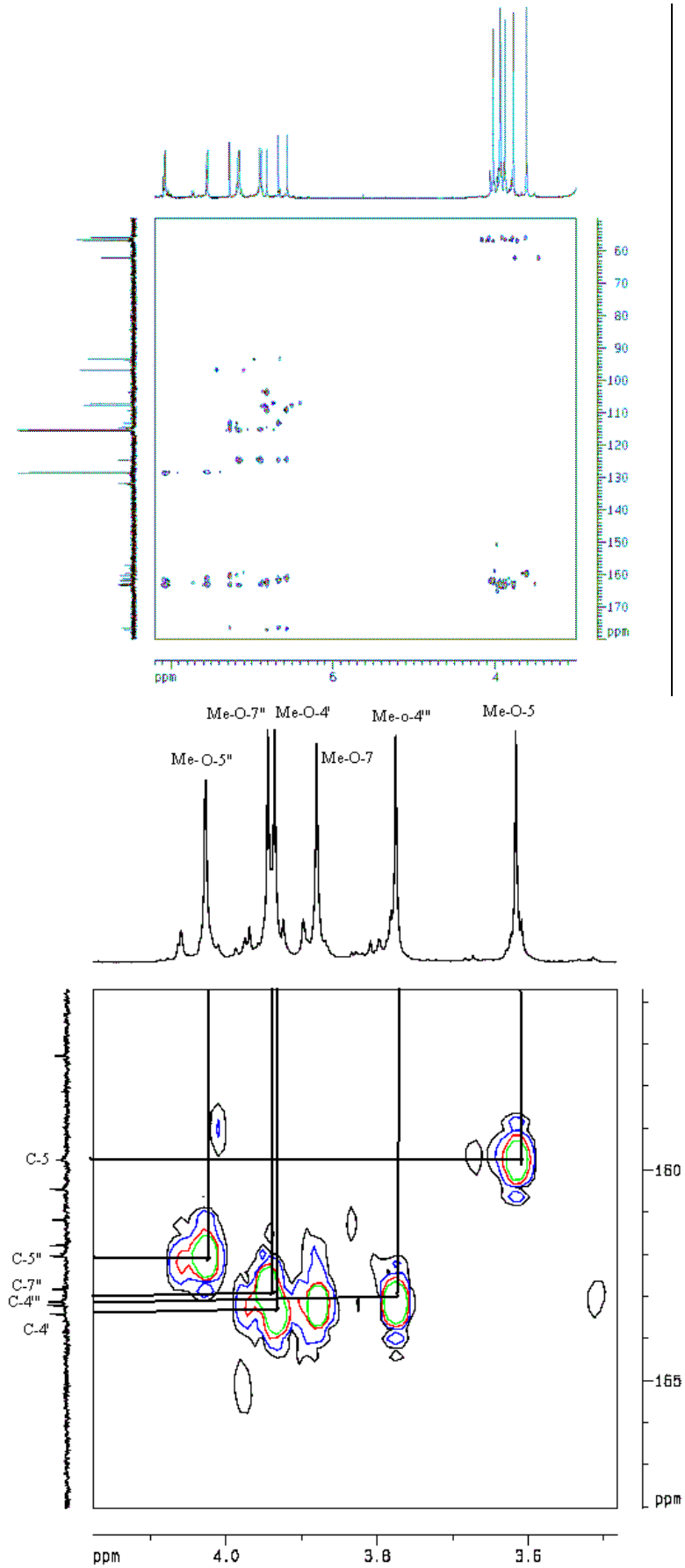



**Figura 55**: Espectro e ampliação (3-5 ppm) de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância **4a**.

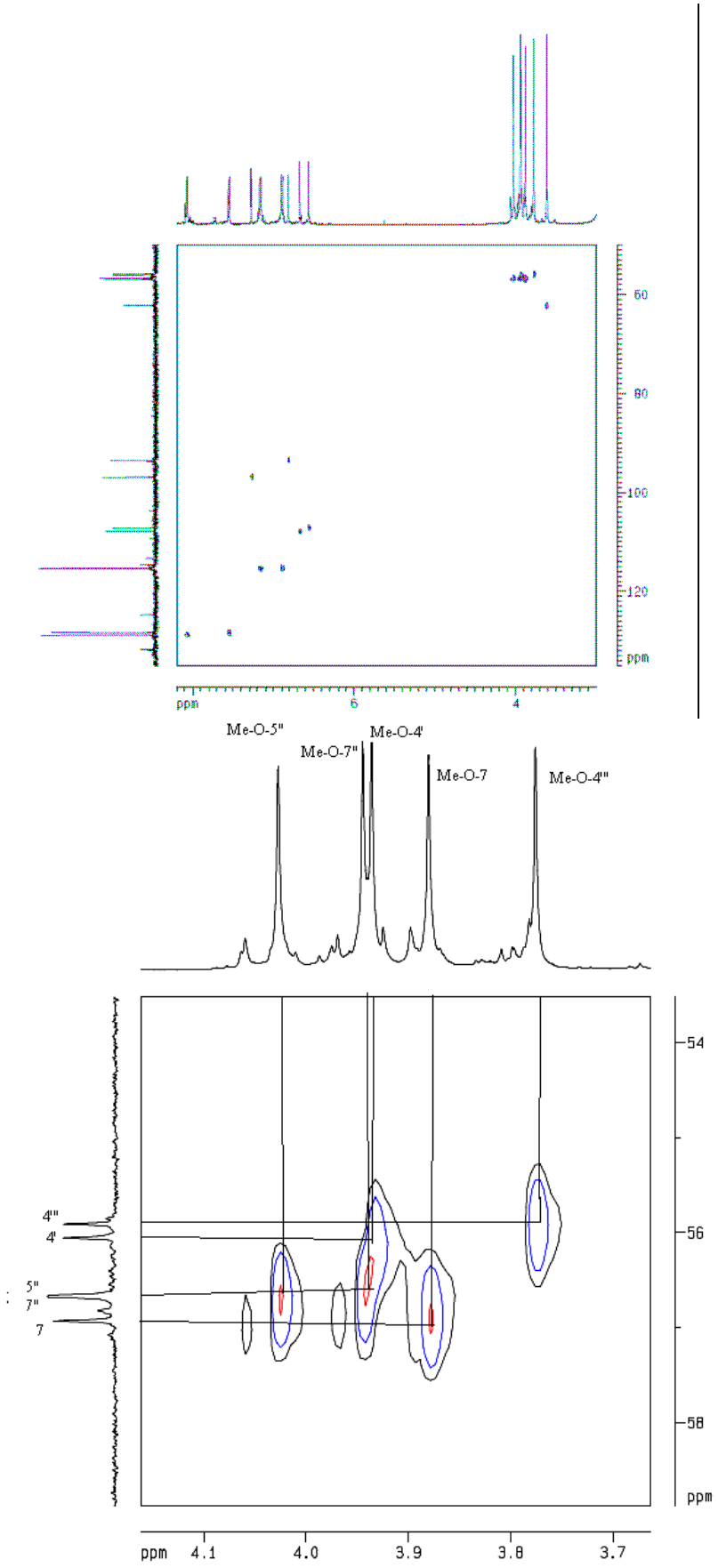



**Figura 56**: Espectro e ampliação (3,7-4,1 ppm) de HSQC ($D_3CCOCD_3$) da substância **4a**.

### 5.2.8. Substância 6

Uma fração do extrato metanólico partição clorofórmio, foi analisada em CCDA e revelou a presença de um componente terpênico e biflavonóide.

O espectro de IV desse material (**Figura 57,** pág. 66) revelou bandas de absorção em 3408 $cm^{-1}$ de estiramento axial de O-H, bandas em 2959 e 2934 e 2870 $cm^{-1}$ de $\nu_{C-H}$ ($CH_2$ e $CH_3$), 1633 ($\nu_{C=C}$); 1460,1380 ($\nu_{C-C}$); 1164-1023 ($\nu_{C-O}$); 1648 ($\nu_{C=O}$); 1604,01504 e 1442 $\nu_{C=C}$ (aromático); 1214 e 1174 ($\nu_{C-O}$); 833 $\delta_{=C-H}$ (2 H vizinhos). Compatíveis com o revelado em placa.

O espectro de RMN $^1H$ deste material **(Figura**, **58,** pág. 68) apresenta sinais de metilas entre $\delta_H$ 0,63 e $\delta_H$ 0,94, de hidrogênio alifático e em $\delta_H$ 5,34, típico de H-6 de fitosteróides. Além dos sinais da parte da aglicona aparecem sinais em $\delta_H$ 3,10 (*m*, H-5´), 4,22 (*d*, H-1'), 2,91 (*m*, H-2'), 3,02 (*m*, H-4') e 3,15 (*m*, H-3') que podem ser atribuídos aos hidrogênios do carboidrato. Esta unidade de açúcar pode ser atribuída como β-glicosídeo devido à presença do dubleto em δ 4,23 (*J*=8 Hz) que representa o hidrogênio anomérico (H-1') acoplando com o hidrogênio H-2' *trans*-diaxial. Os demais valores dos sinais de H-3', 4', 5' e 6' estão assinalados na **Tabela 7,** pág. 67.

Os espectros de RMN $^{13}C$ (**Figuras, 59 e 60,** pág. 69 e 70) de **6** apresentam 4xCH e um $CH_2$ do açúcar, sendo um com δ 103,4 do CH anomérico. A comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos metínicos de **6** com valores da literatura, permitiu propor a glicose como representante da unidade de açúcar ligado no C-3 do esteróide. A comparação dos dados de **6** com valores atribuídos para o sitoesterol glicosilado permiiu identificar como 3-*O*-β-D-glicopiranosilsitosterol. Na parte da aglicona temos $\delta_C$ 70,1 do CH-3. Os sinais dos carbonos $sp^2$ em $\delta_{C-5}$ 140,4 e $\delta_{C-6}$ 121,0, são compatíveis com os dois carbonos sp2 (C-5 e C-6) do sitosterol de acordo com comparação dos valores de $^{13}C$ com os da literatura (VELANDIA, 2002). Os sinais de H em anel aromático no espectro de RMN 1H, confirmam a presença do biflavonóide agatisflavona como impureza na fração.

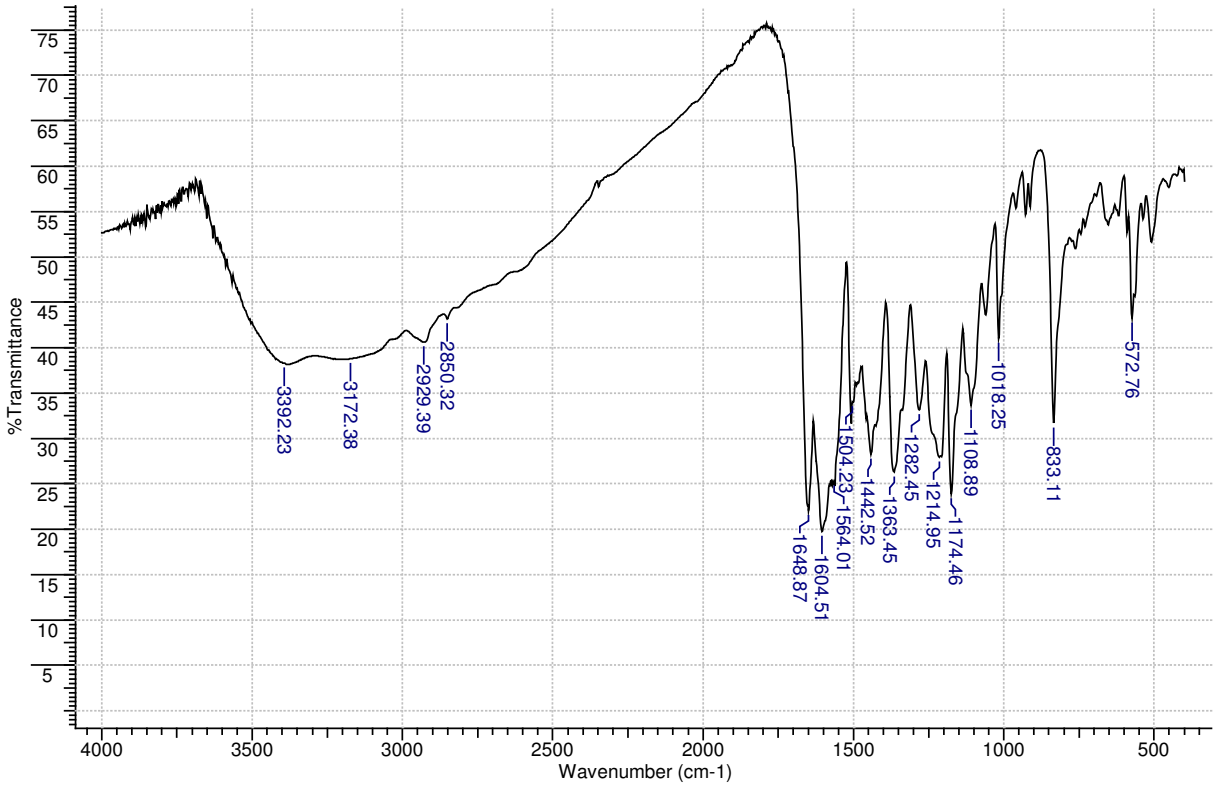
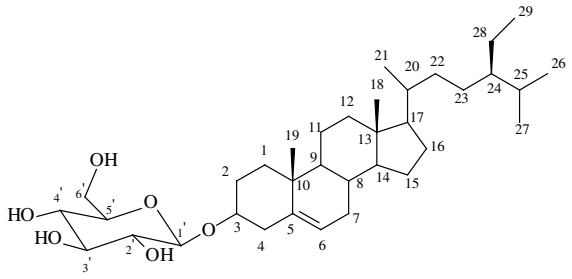



**Figura 57:** Espectro de IV da substância **6**.

**Tabela 7:** Dados de RMN de $^{1}H$ e $^{13}C$ da substância **6**



**6**

| Substância **6** | | Literatura (VELANDIA, 2002) | |
|---|---|---|---|
| C | δC | δH | δC |
| 1 | 36,7 | | 37,3 |
| 2 | 32,2 | | 31,6 |
| 3 | 70,1 | 3,47 | 71,8 |
| 4 | 41,8 | | 42,9 |
| 5 | 140,4 | | 140,7 |
| 6 | 121,0 | 5,34 | 121,7 |
| 7 | 31,2 | | 31,9 |
| 8 | 31,3 | | 31,9 |
| 9 | 49,5 | | 50,1 |
| 10 | 36,1 | | 36,4 |
| 11 | 22,6 | | 21,1 |
| 12 | 39,2 | | 39,8 |
| 13 | 41,7 | | 42,9 |
| 14 | 56,1 | | 56,7 |
| 15 | 25,5 | | 24,3 |
| 16 | 27,6 | | 28,24 |
| 17 | 55,4 | | 56,0 |
| 18 | 11,5 | 0,63 | 11,9 |
| 19 | 19,5 | 0,94 | 19,4 |
| 20 | 35,3 | | 32,2 |
| 21 | 18,8 | | 14,0 |
| 22 | 33,3 | | 33,9 |
| 23 | 38,2 | | 39,1 |
| 24 | 45,1 | | 45,8 |
| 25 | 28,7 | | 26,0 |
| 26 | 18,8 | 0,89 | 18,8 |
| 27 | 18,9 | 0,78 | 19,0 |
| 28 | 23,7 | 0,87 | 23,0 |
| 29 | 117,7 | 0,82 | 12,0 |
| 1’ | 103,4 | 4,23 | 101,4 |
| 2’ | 74,8 | 2,91 | 73,3 |
| 3’ | 77,8 | 3,15 | 76,5 |
| 4’ | 71,9 | 3,02 | 70,3 |
| 5’ | 75,4 | 3,10 | 73,7 |
| 6’ | 65,0 | 3,71 | 64,4 |

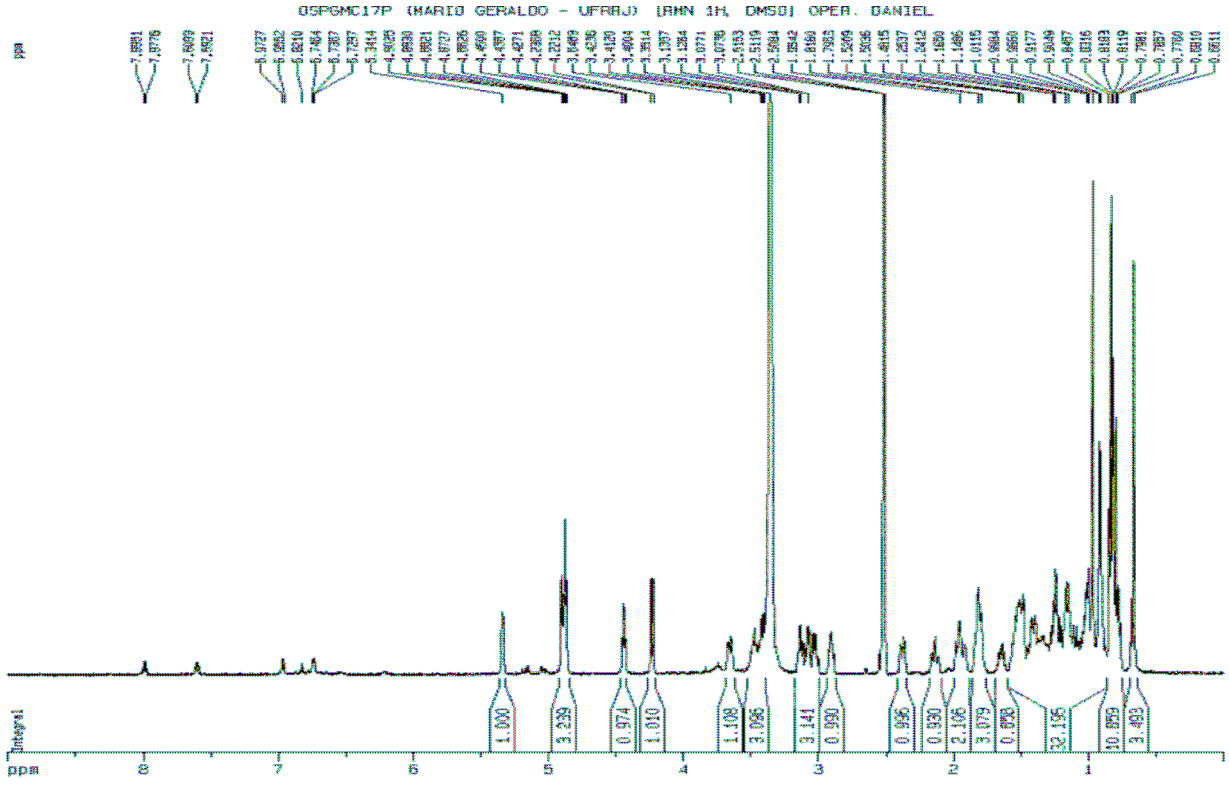



**Figura 58**: RMN de $^{1}H$ (400MHz, DMSO-$d_6$) da fração contendo a substância **6**.

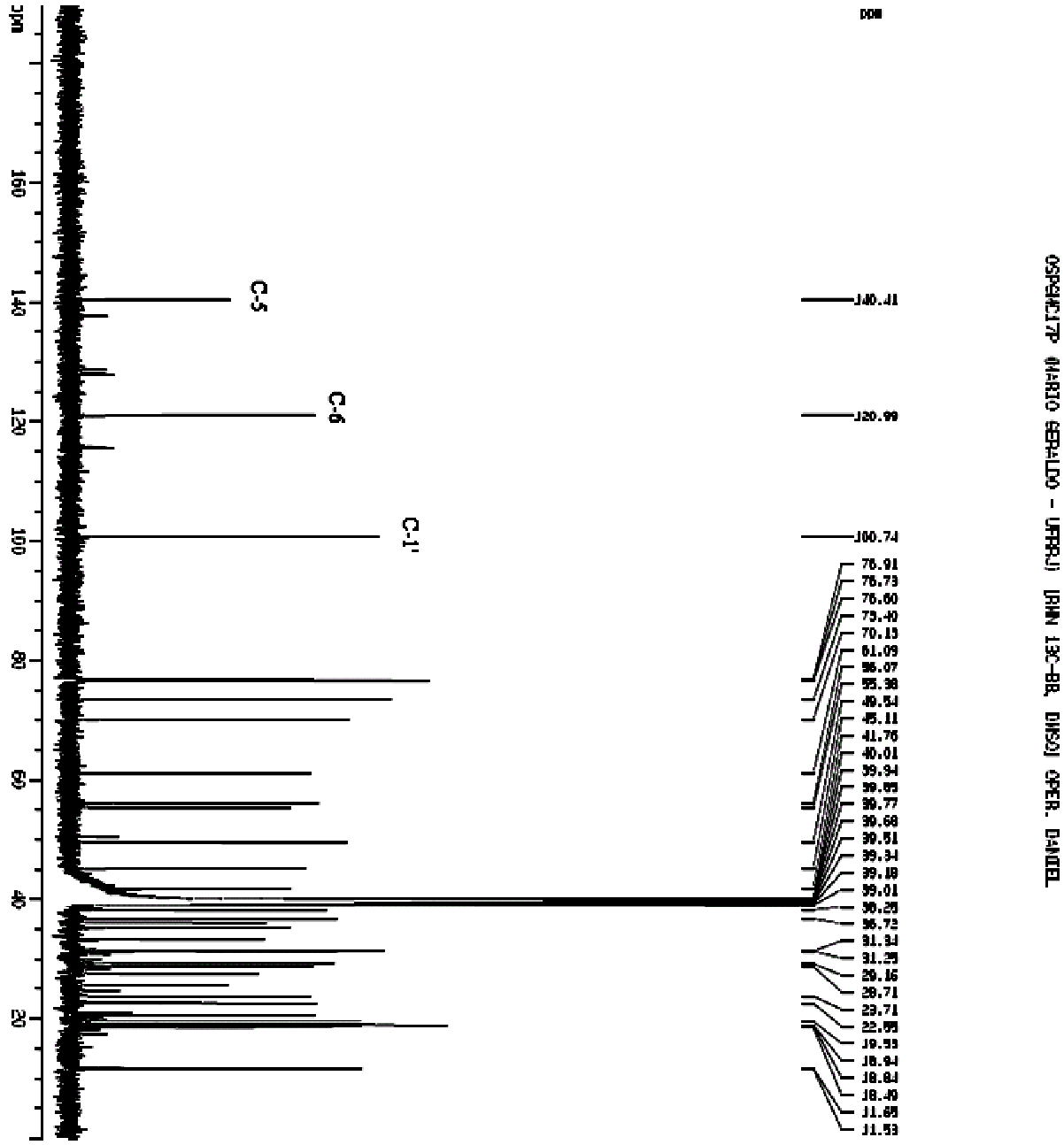



**Figura 59**: RMN de $^{13}C$ (125MHz, DMSO-$d_6$) da fração contendo a substância **6.**

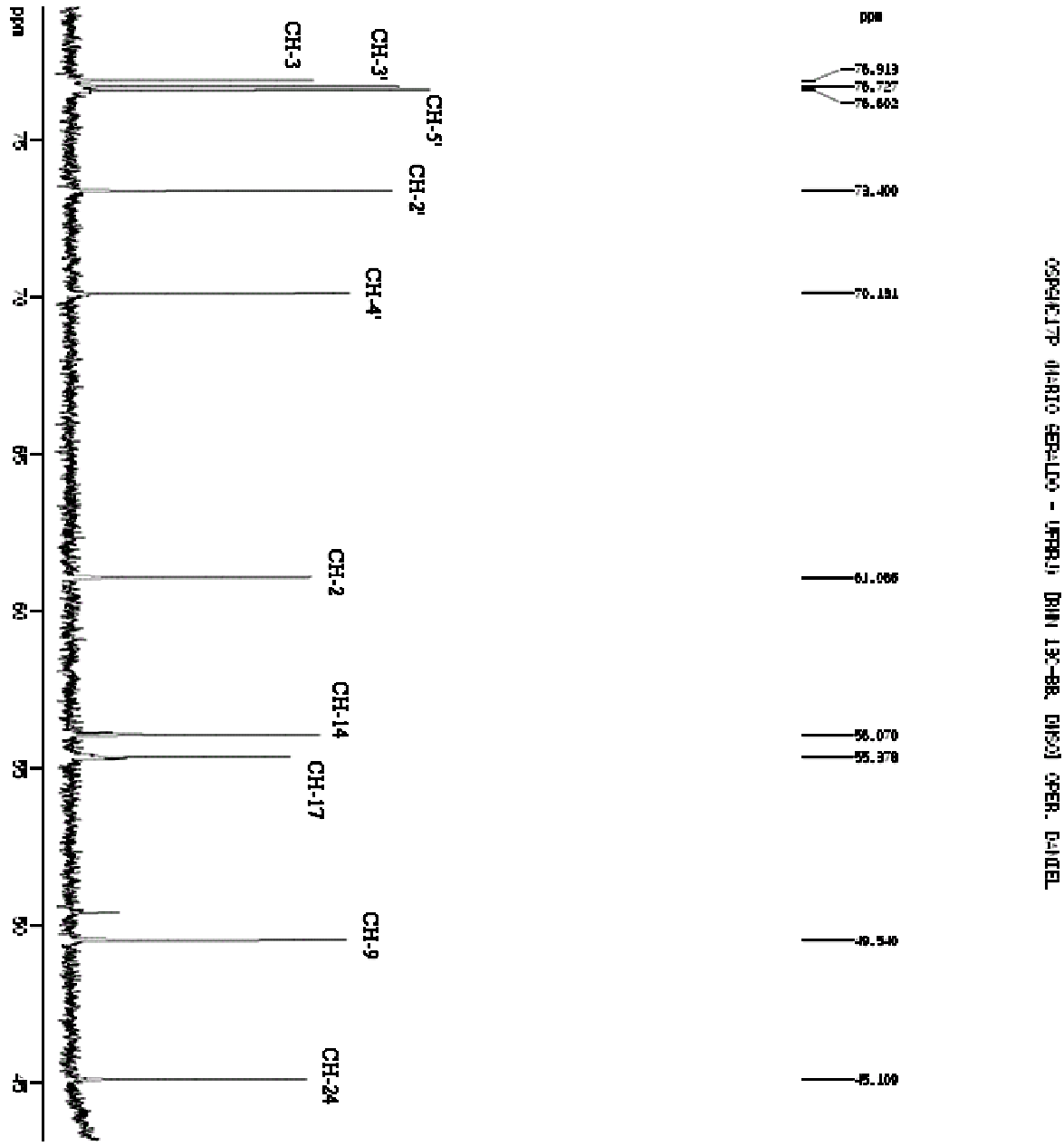



**Figura 60**: Ampliação do RMN de $^{13}C$ (125 MHz, DMSO-$d_6$) da fração contendo a substância **6**.

## 5.3. ANÁLISE COM CLAE DAS FRAÇÕES *OSPGMC* E *OSPMC-16P.*

Considerando que estas frações continham mistura de flavonóides resolveu-se fazer análise cromatográfica. O cromatograma obtido com CLAE utilizando sistema isocrático de metanol/água/acetonitrila/ácido acético (20:40:39:1) como fase móvel e velocidade de fluxo 1mL.min$^{-1}$ e detecção UV ($\lambda_{máx}$=270nm), confirmaram a presença de outros componentes na fração OSPMC (**figura 61,** pág. 71) além de agatisflavona e 7''-O-metil-agatisflavona e na fração OSPMC-1-6P (**figura 62,** pág. 72) que continha como componente majoritário a 7''-O-metil-agatisflavona.

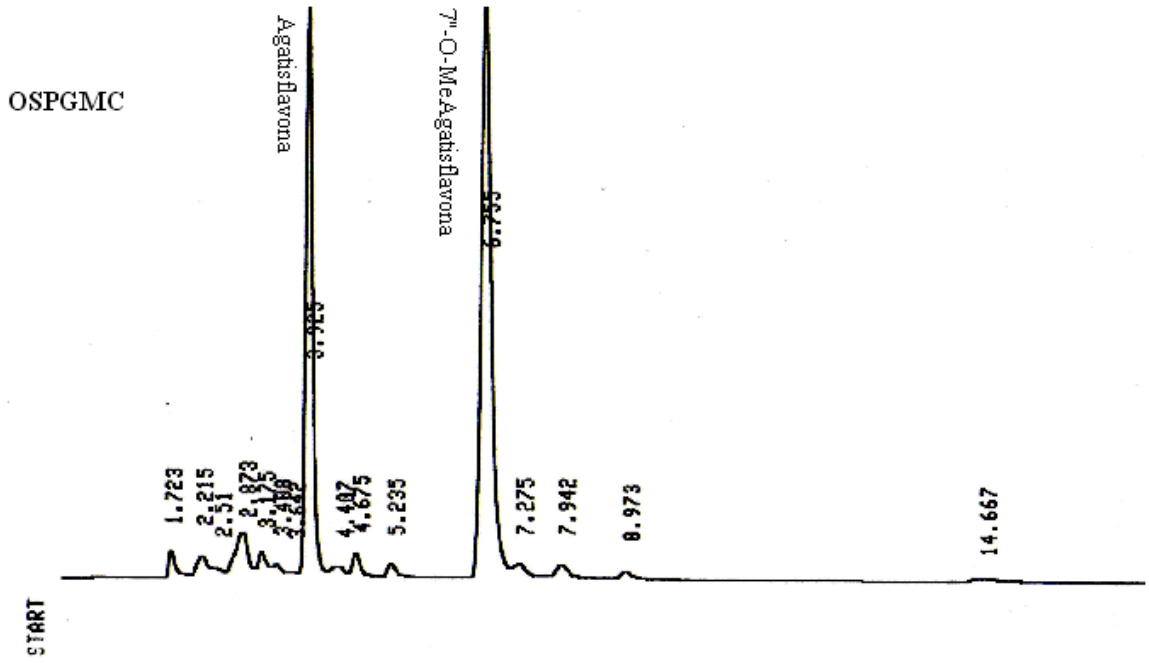



**Figura 61:** CLAE da fração OSPGMC.

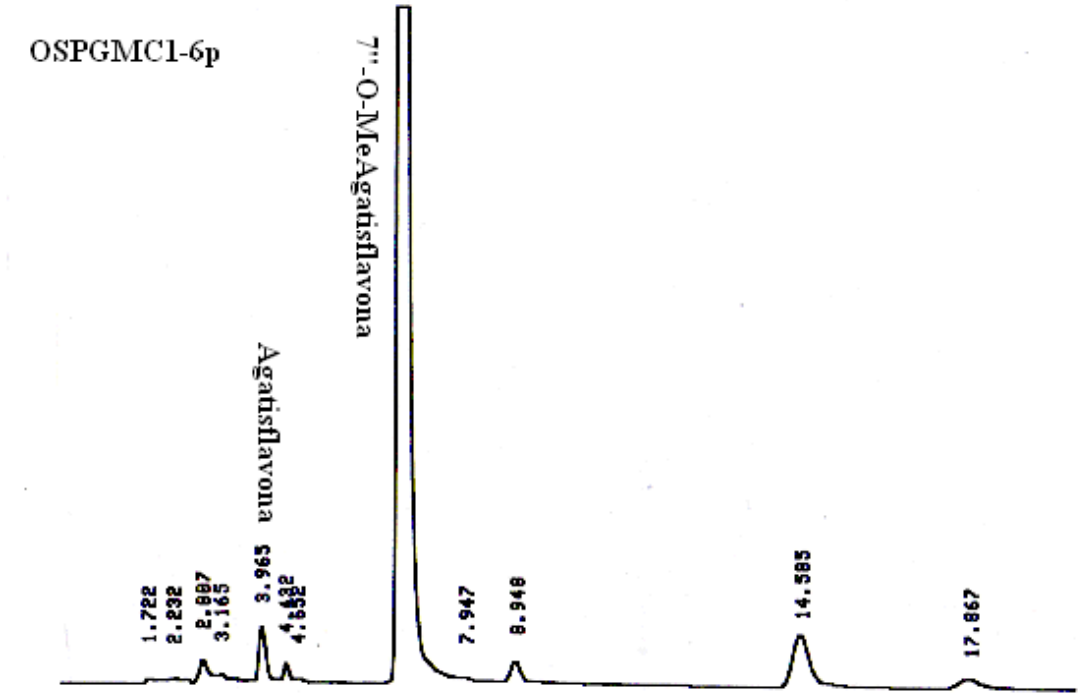



**Figura 62:** CLAE da fração OSPMC1-6p.

A análise CLAE-EM dessas frações, "ricas em flavonóides", permitiu detectar os valores de *m/z* de várias faixas de tempo de retenção reveladas pelos picos representantes dos componentes da mistura**.** A análise desses valores, aliada às possibilidades de substituição com grupos freqüentes em flavonóides isolados de *Ouratea hexasperma* (St. Hil.) Bail. em trabalhos anteriores (Suzart, 2007; Suzart et al., 2007; Daniel, 2005), a análise do espectro de RMN de $^1$H (**figuras 63 e 64**, pág. **7**3) e considerando a possibilidade de formação de "adutos" com traços dos solventes utilizados, pôde-se propor estruturas que certamente estão presentes no material analisado. Os sinais no espectro de RMN de $^1$H na região entre $\delta_H$ 4,22ppm e $\delta_H$ 3,10ppm podem ser atribuídos aos hidrogênios do carboidrato. Possui também sinais típicos de biflavonóide, como os dubletos na região entre $\delta_H$ 7,93ppm e 6,60 ppm e singletos em $\delta_H$ 6,57ppm e 6,39ppm. Os esquemas **2** e **3** foram utilizados para facilitar esta interpretação. Nesses são apresentadas as estruturas dos flavonóides que incorporadas aos substituintes (R e/ou R') ou resíduos de solventes chega-se aos valores de *m/z* detectados. Estas propostas dependem de análises adicionais como EM/EM dos íons detectados, o que confirmaria a formação de "adutos" e, assim, as estruturas propostas poderão ser aceitas com maior segurança. A análise da fração **OSPMC** permitiu a identificação dos valores de *m/z* para os picos detectados no CLAE-EM e estão representados na **Figura 65**, pág. 74 e **Esquema 2**, pág. 75, foi possível propor a metil-vitexina e orientina (**B**), ramnosil-triidroxiflavona (**K**), agatisflavona (**F**), metil-agatisflavona (**H**) e dimetil-agatisflavona (**G**) cujas estruturas estão representadas na **Figura 66**, pág. 76. A análise da fração **OSPMC1-6P** (**Figura 67,** pág. 77 e **Esquema 3,** pág. 78) permitiu confirmar a metil-agatisflavona (**A1**) como componente majoritário, além das metil-diidroxiflavonas (**B1** e **D1**), a ramnosil-triidroxiflavona (**C2**) e a glicopiranosil-prenil-diidroxi-flavonol (**D2**) (**Figura 68,** pág. 79)**.**

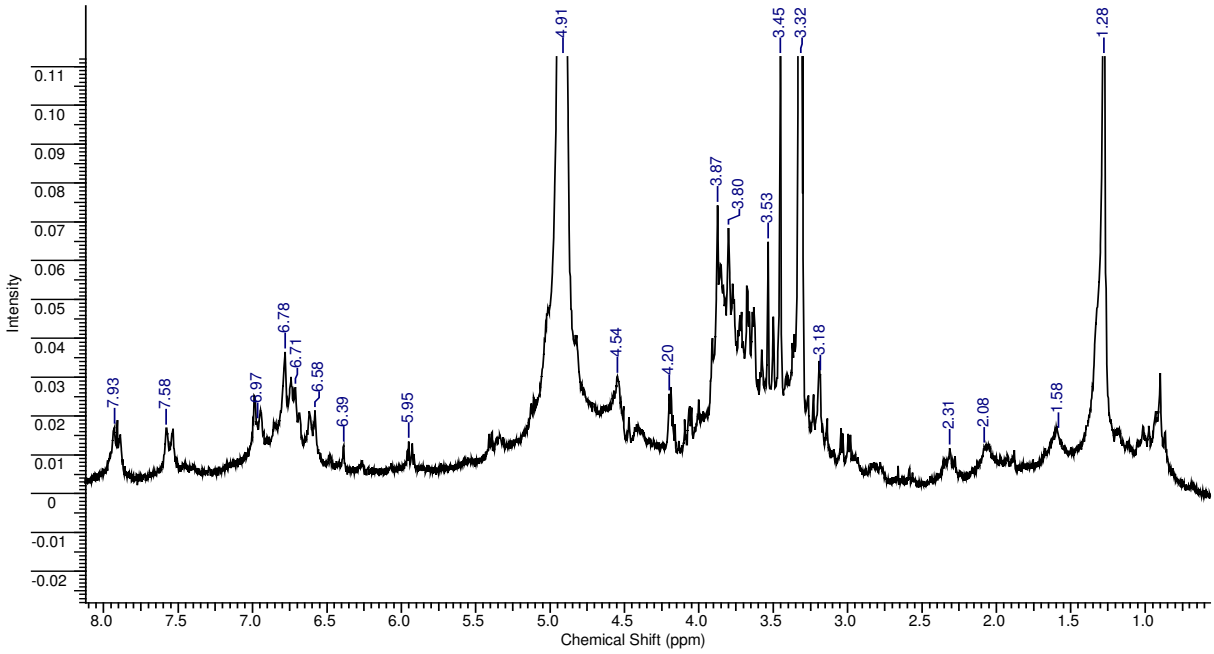



**Figura 63:** Espectro de RMN $^{1}H$ (200MHz, $D_3CCOCD_3$) da fração OSPGMC.

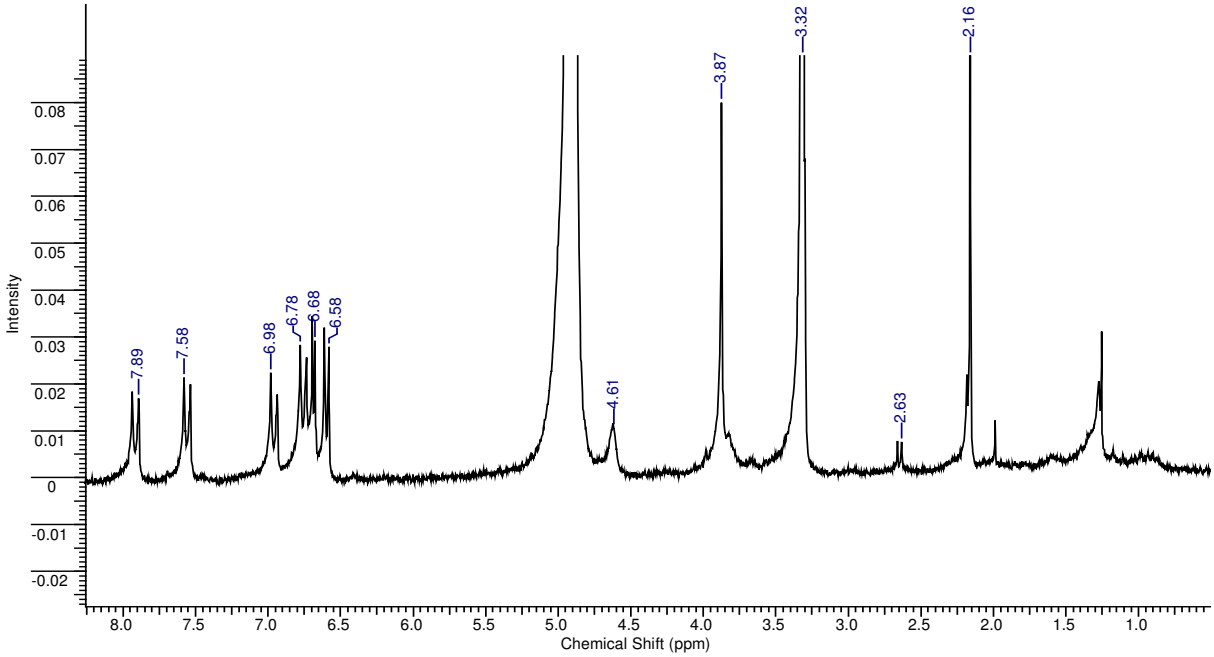
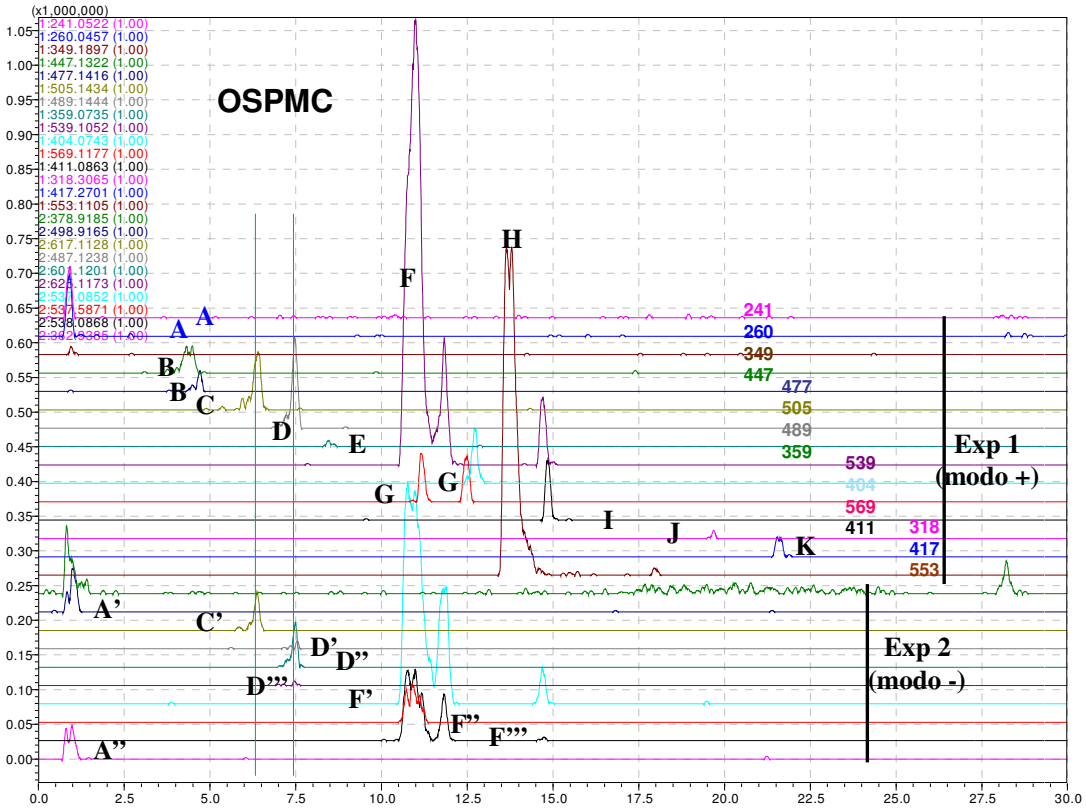



**Figura 64:** Espectro de RMN $^{1}H$ (200MHz, $D_3CCOCD_3$) da fração OSPGMC1-6p.




**A-Raw Spectrum**
**[0.687->1.273]**
Event1 (Modo +)
*m/z*
**241.0522**
**260.0457**
**349.1897**
Event2 (Modo -)
m/z
378.9185
**498.9165**

**B-Raw Spectrum**
**[3.887->4.987]**
Event1 (Modo +)
m/z
447.1322
477.1416

**C-Raw Spectrum**
**[5.540->6.813]**
Event1 (Modo +)
*m/z*
505.1434
Event2 (Modo -)
m/z
617.1128

**D-Raw Spectrum**
**[6.813->8.013]**
**Event1 (Modo +)**
m/z
489.1444
Event2 (Modo -)
m/z
487.1238
601.1201
625.1173

**E-Raw Spectrum**
**[8.013->9.047]**
**Event1 (Modo +)**
*m/z*
**359.0735**

**F-Raw Spectrum**
**[10.427->12.113]**
**Event1 (Modo +)**
**m/z**
**539.1052**
**Event2 (Modo -)**
**537.0852**
**538.0868**

**G-Raw Spectrum**
**[12.180->13.280]**
**Event1 (Modo +)**
*m/z*
**404.0743**
**569.1177**

**H-Raw Spectrum**
**[13.313->14.487]**
**Event1 (Modo +)**
**m/z**
**553.1105**

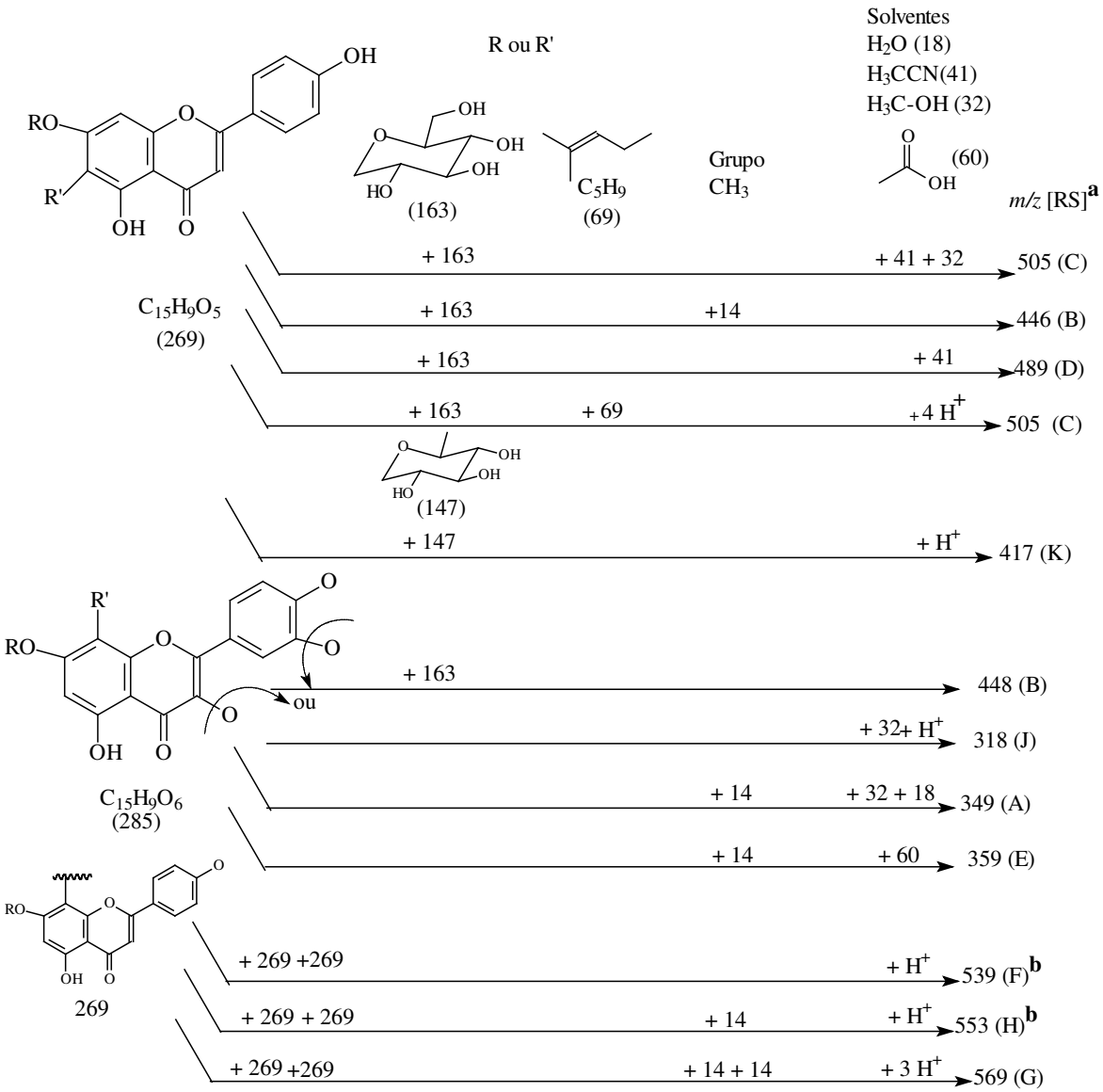
**I-Raw Spectrum**
**[14.487->15.620]**
**Event1 (Modo +)**
**m/z**
**411.0863**

**J-Raw Spectrum**
**[19.407->20.267]**
**Event1 (Modo +)**
*m/z*
**318.3065**

**K-Raw Spectrum**
**[21.367->22.400]**
**Event1 (Modo +)**
**m/z**

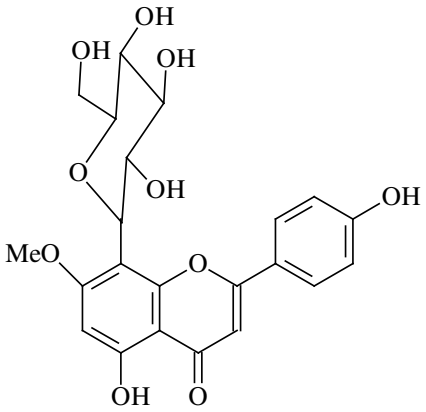
**417.2701**

**Figura 65:** Identificação dos valores de *m/z* para os picos detectados no CLAE-EM da fração *OSPGMC*.

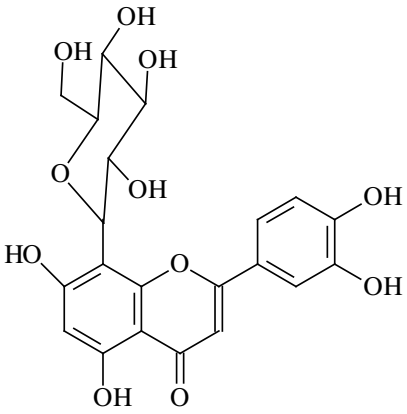



**a** *m/z* [RS] = "Raw Spectrum", faixa do(s) picos do CLAE; **b**Detectadas na análise dos espectros de RMN na fração deste material.

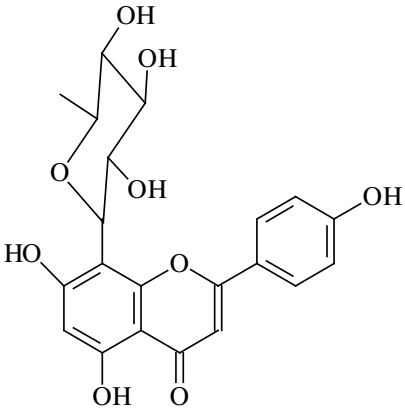
**Esquema 2:** Propostas de estruturas compatíveis com os valores de *m/z* detectados na análise de CLAE-EM (Figura 65)



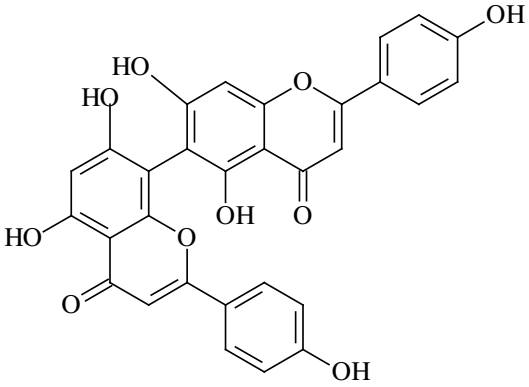
**B**



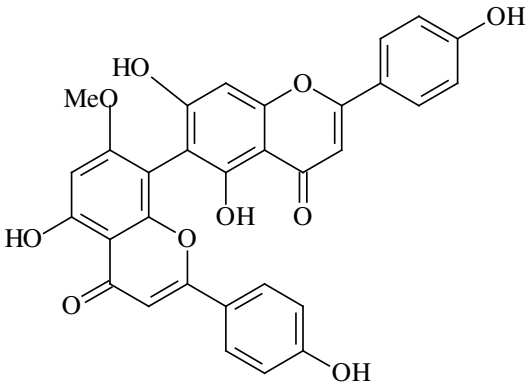
**B**



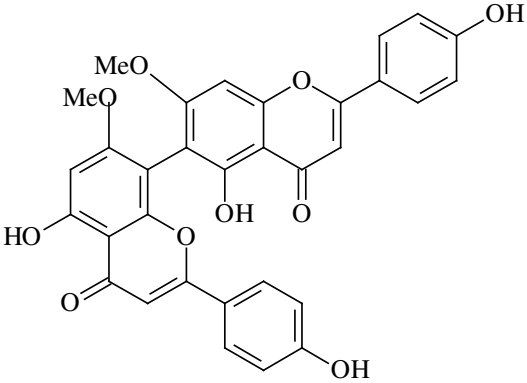
**K**



**F**

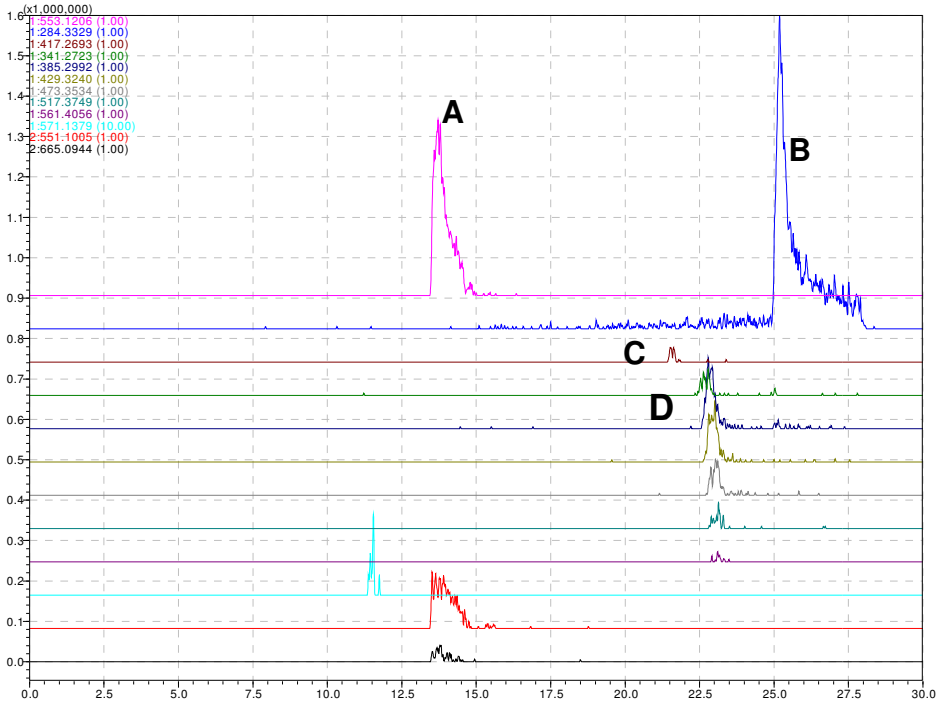


**H**



**G**

**Figura 66:** Estruturas propostas através da análise CLAE-EM na fração OSPGMC.




**A. Raw Spectrum [13.060->15.233]**
Event 1 (Modo +)
m/z Abs. Inten. Rel. Inten.
**A1: 553.1206 159599 100.00**
**[metil-agatisflavona]**
Event 2 (Modo -)
551.1005 52936 38.45 **(M-2H)**
665.0944 7293 5.30
**[M+AcAcetico+MeOH+$H_2O$]**

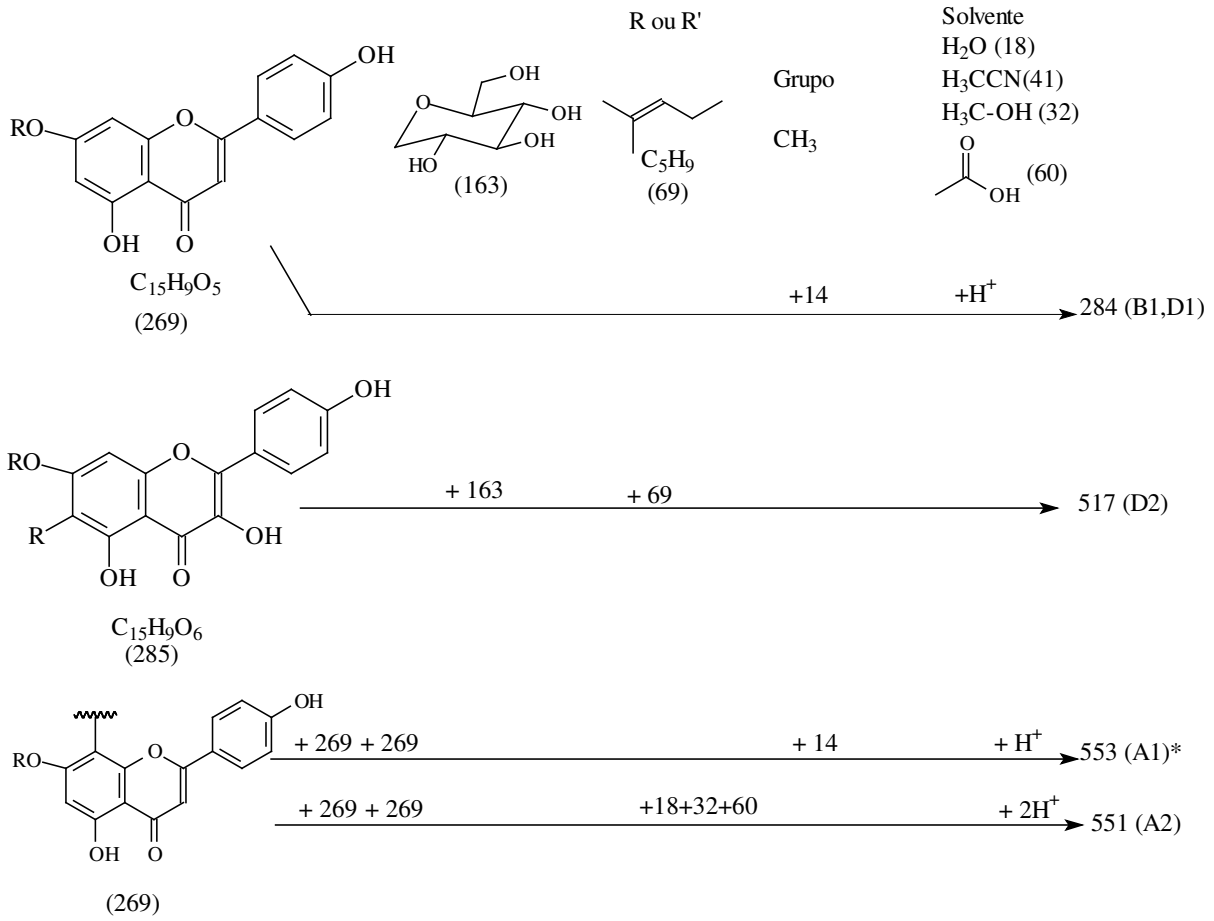
**B- Raw Spectrum [19.393->20.180] [25->26]**
Event 1 (Modo +)
m/z Abs. Inten. Rel. Inten.
**B1: 284.3329 3113 5.20**
**[269 + 14 (metil)]**

**C. Raw Spectrum [21.460->22.280]**
Event 1 (Modo +)
m/z Abs. Inten. Rel. Inten.
413.2763 2900 6.01
**C2: 417.2693 8432 17.47**
**[269 + 147(ramnose) + H]**

**D. Raw Spectrum [22.527->23.347]**
Event 1 (Modo +)
m/z Abs. Inten. Rel. Inten.
**D1. 284.33774973 5.64**
**[269 + 14 (metil)]**
341.2723 21998 24.95
**385.2992 88164 100.00**
429.3240 72304 82.01
473.3534 38277 43.42
**D2. 517.374917511 19.86**
**[516 + H = Gic-Prenil-Flavonol]**
561.4056 4613 5.23

**Figura 67:** Identificação dos valores de *m/z* para os picos detectados no CLAE-EM da fração *OSPGMC1.6p*

.




* Detectado na análise dos espectros de RMN na fração deste material.

**Esquema 3:** Propostas de estruturas compatíveis com os valores de *m/z* detectados na análise de CLAE-EM (Figura 67)

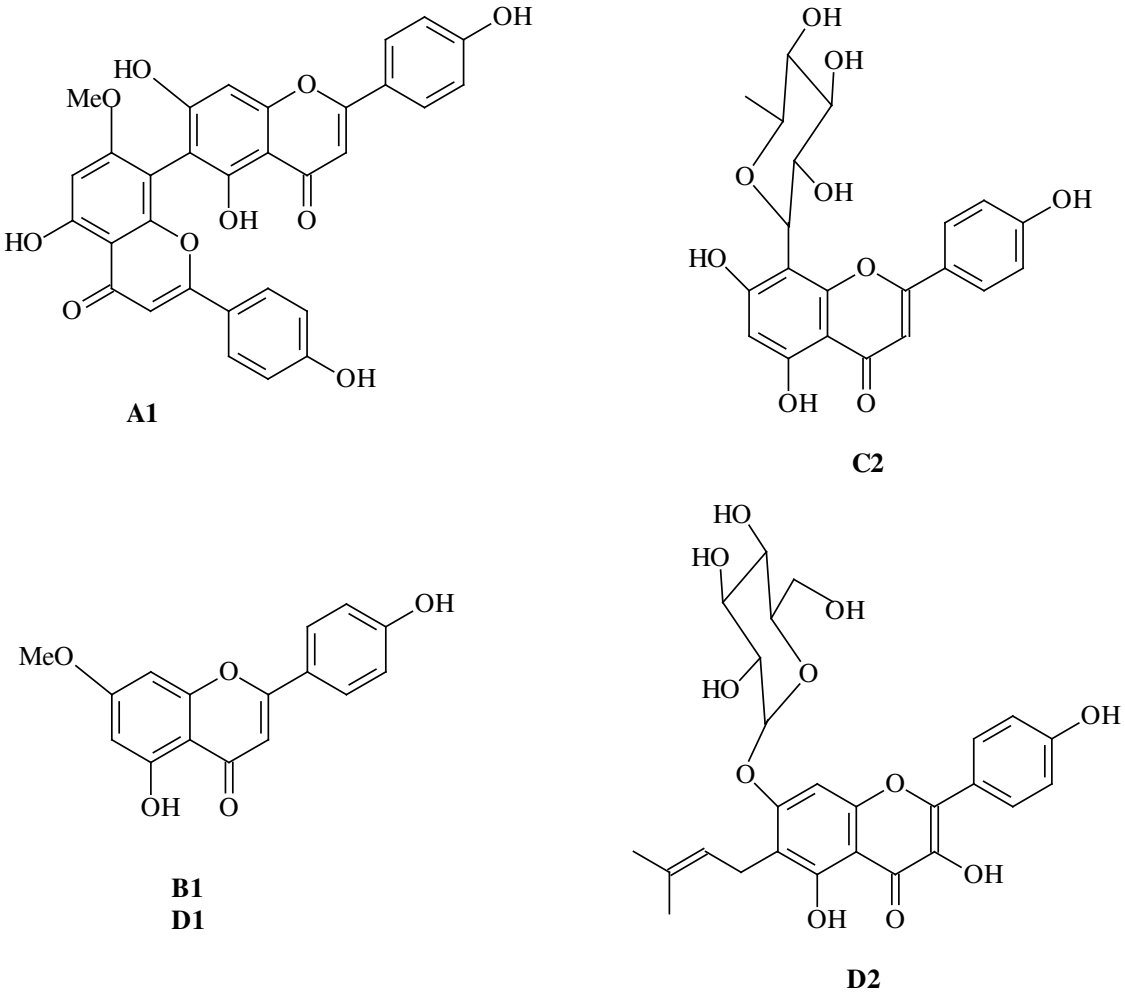



**Figura 68:** Estruturas propostas através da análise CLAE-EM na fração OSPGCM1.6p.

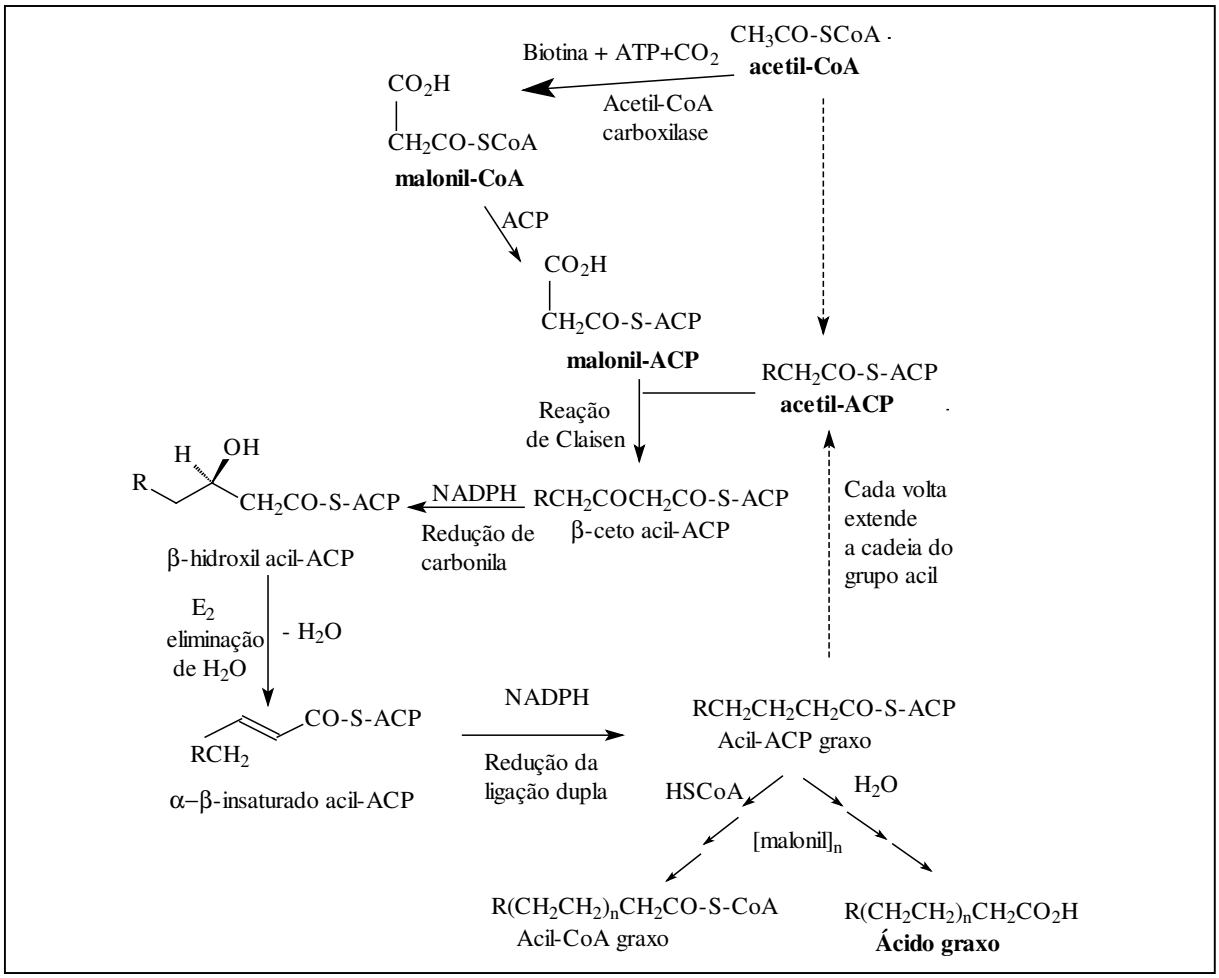
## 5.4. Propostas Biossintéticas para os constituintes isolados de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl.

Uma das principais considerações em determinação estrutural é o conhecimento da biossíntese das diferentes classes dos metabólitos especiais, por isso incluímos este capítulo para auxiliar na determinação das estruturas das substâncias isoladas de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl.

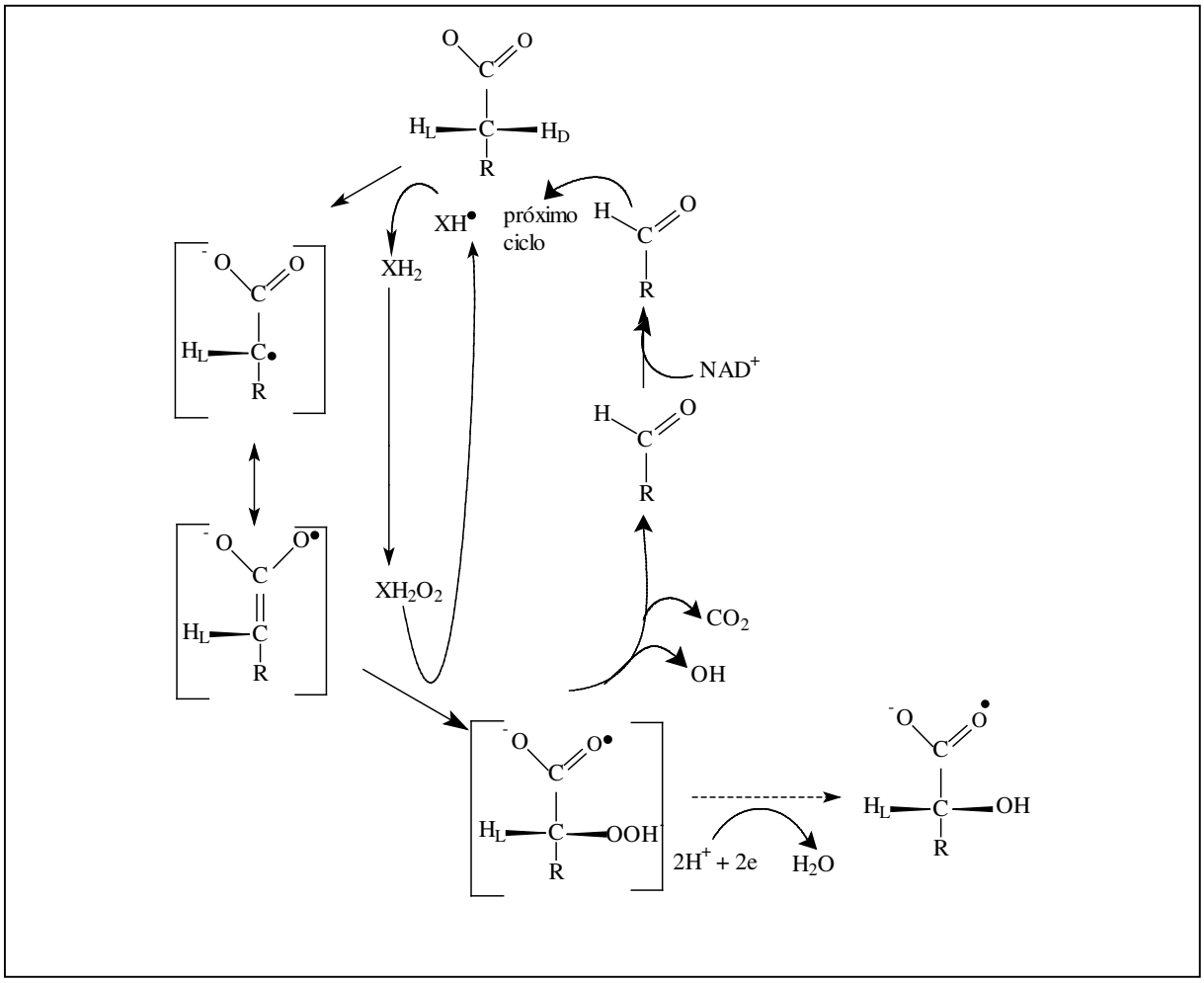
As substâncias isoladas da espécie estudada neste trabalho, pertencem a classe dos ácidos alifáticos, dos esteróides (β-sitosterol, estigmasterol, campesterol e 3-O-β-D-glucopiranosil sitosterol); dos triterpenos (lupeol e α e β-amirina) e dos biflavonóides (7"-O-metilagatisflavona e agatisflavona). A seguir apresenta-se algumas propostas biossintéticas.

### 5.4.1. Ácidos graxos

Os ácidos graxos são formados pela ligação de unidades de ácido acético (C2) via reação de condensação. A biossíntese envolve a conversão do acetil-CoA em malonil-CoA, que são convertidos em acetil-ACP e malonil-ACP, ocorrendo então a condensação de Claisen e formação do β-ceto acil-ACP que, após reduções, formam os ácidos graxos com um número par de átomos de carbono, **esquema 4** (DEWICK, 2002). Através de oxidações α ocorre a perda de um átomo de carbono, fornando ácidos graxos de cadeias com número ímpar de carbonos, **esquema 5** (HARWOOD, 1997).



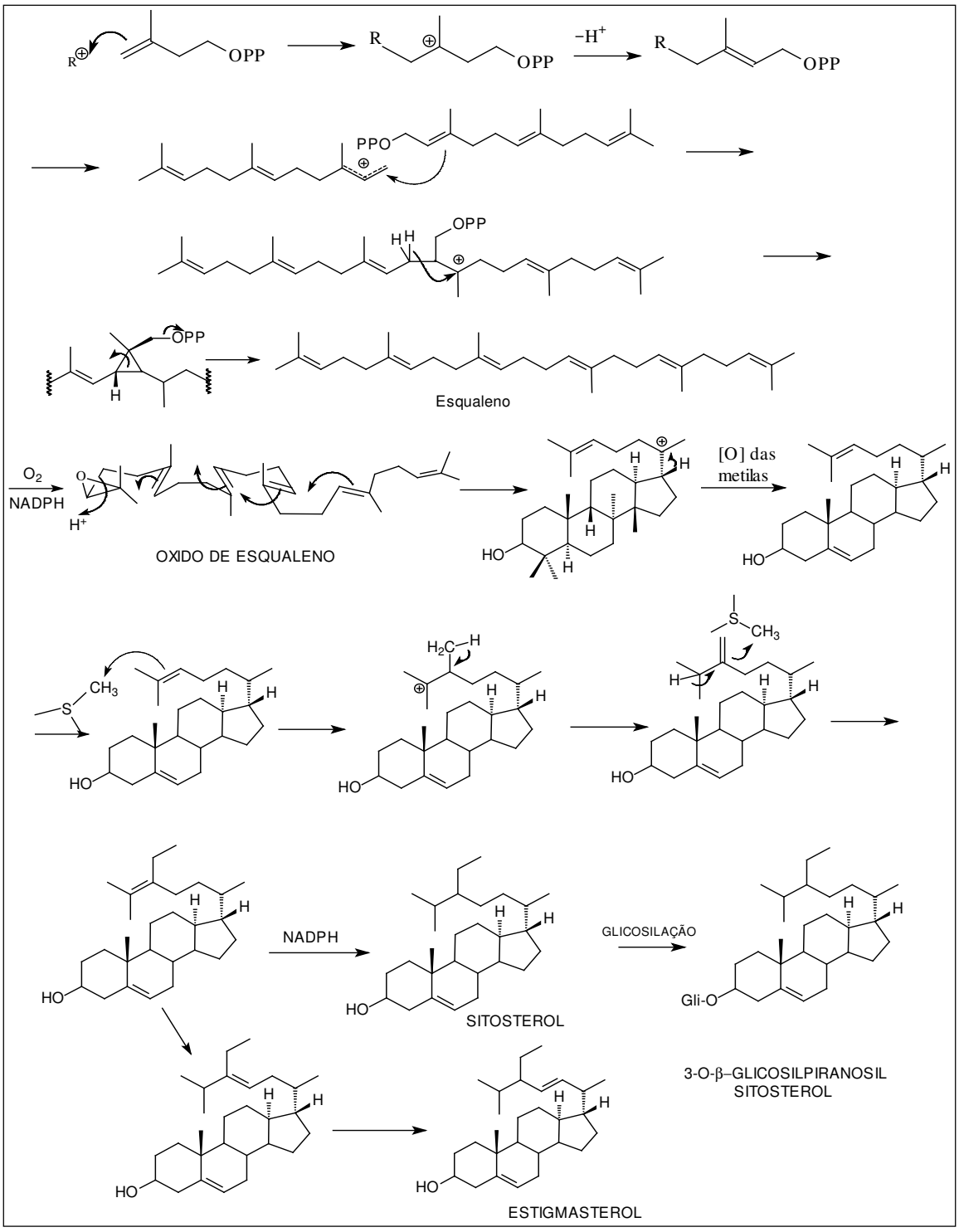

Esquema 4: Biossíntese de ácidos graxos (adaptado de DEWICK, 2002)




**Esquema 5: Proposta de a-oxidações em aácidos graxos (HARWOOD, 1997).**

### 5.4.2. Esteróides

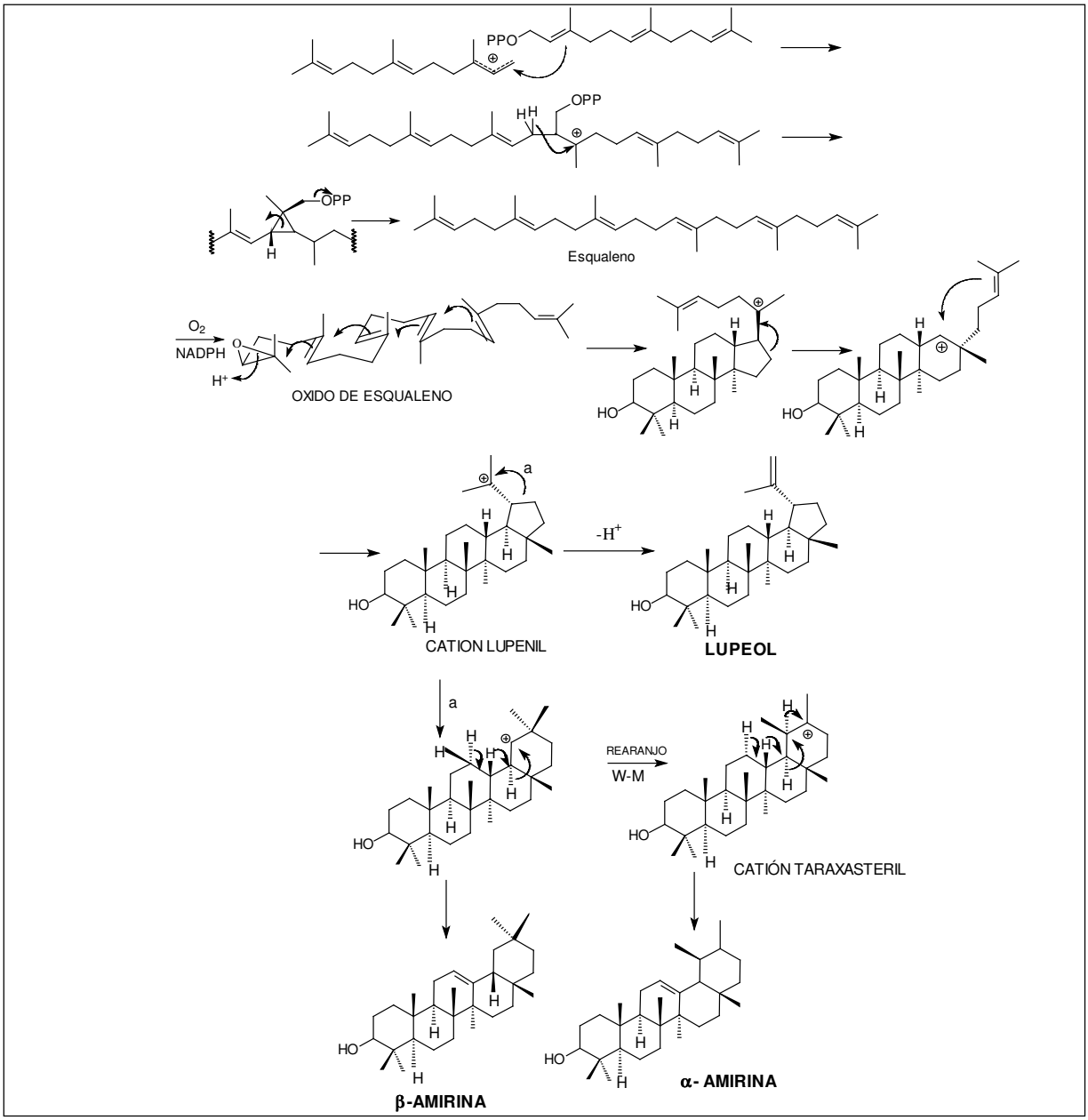
As substâncias sitosterol, estigmasterol, campesterol e 3-O-β-glicosilpiranosil sitosterol se caracterizam por ter um esqueleto básico de 27 carbonos dispostos num sistema tetracíclico. Biogeneticamente formam-se via pirofosfato de isopentenila originando o esqualeno, estrutura que contém duas unidades de farnesil pirofosfato ligadas cauda-cauda. O esqualeno epoxi (óxido de esqualeno), em sua forma cadeira-bote-cadeira–bote, cicliza após vários rearranjos do tipo 1,2 formando o cicloartenol, estrutura que contém 24 carbonos. O cicloartenol após clivagem oxidativa de três metilas forma os esteróides (Esquema 6).




Esquema 6: Proposta biogenética para os esteróides (Adaptado de MANN, 1994).

### 5.4.3. Terpenos

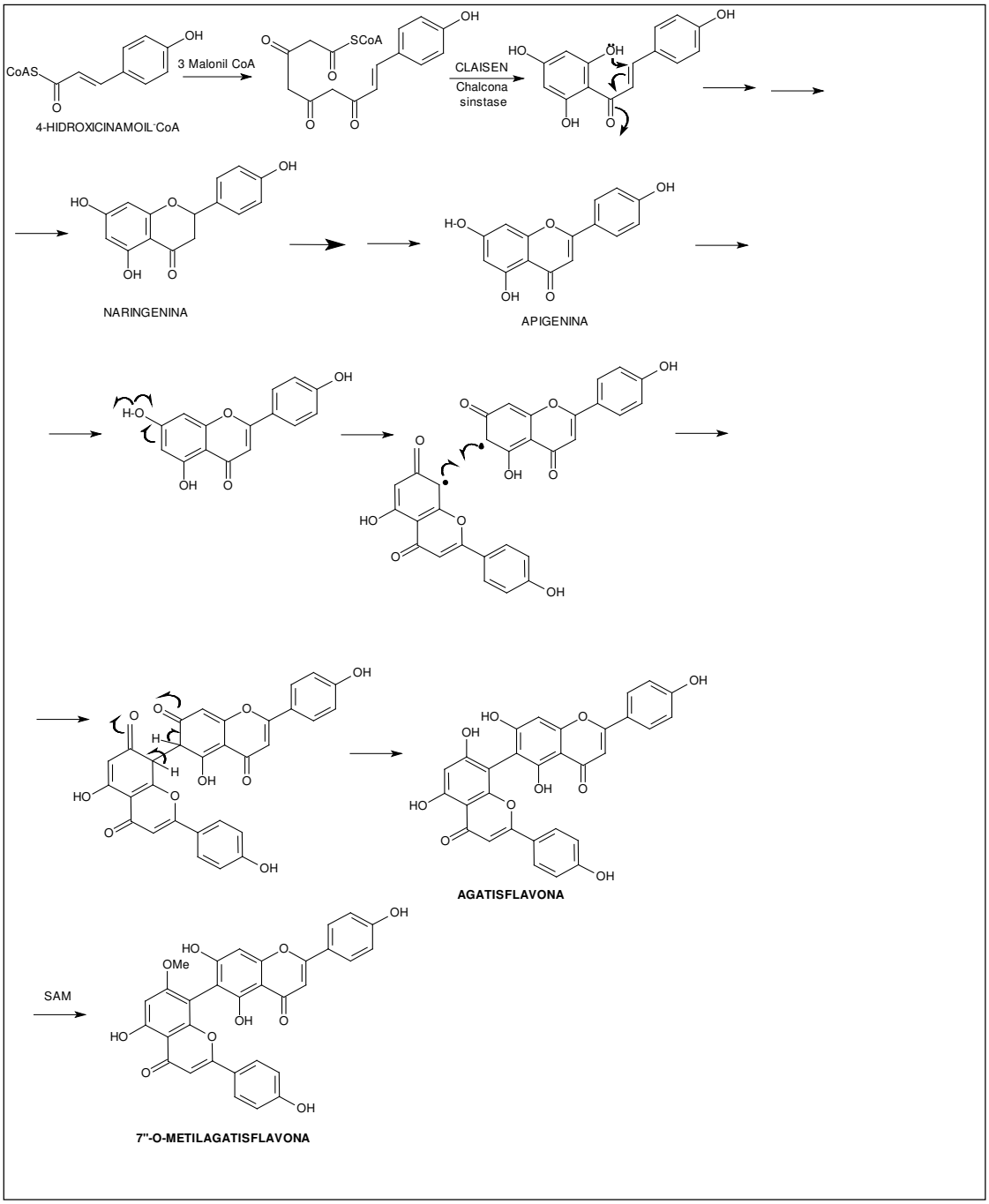
Os terpenos constituem uma classe de substâncias provenientes da via pirofosfato de isopentenila, que da mesma forma que os esteróides, da origem ao esqualeno pela fusão cauda-cauda de duas unidades de farnesil. No caso dos terpenos o óxido de esqualeno em sua forma cadeia-cadeira-cadeira-bote é ciclizado para gerar o cátion dammarenil e, conseqüentemente, o cátion lupenil que pode ser estabilizado pela formação de um novo anel de cinco membros gerando compostos do tipo lupeol. O cátion lupenil também pode ser estabilizado pela formação do anel de 6 membros, gerando o cátion oleanil. Esse é estabilizado com migração de uma metila e rearrango do tipo Wagner-Meerwein gerando o núcleo básico α-amirina (Esquema 7).




Esquema 7: Proposta biogenética para os terpenos lupeol e α-amirina. (Adaptado de MANN, 1994; DEWICK, 2002).

### 5.4.4. Biflavonóides

Os flavonóides derivam seu esqueleto de 15 carbonos, de dois precursores básicos: malonil-CoA e *p*-coumaroil-CoA. Na reação biossintética ocorre condensação de três moléculas de malonil-CoA com a molécula de *p*-coumaroil-CoA formando uma chalcona intermediaria (1,3 difenilpropano-1-ona). Da chalcona são formadas estruturas de três anéis, as flavanonas, a partir das flavanonas formam-se todas as outras classes de flavonóides (HARBONE & BAXTER, 1999). Através da formação de dímetos da apigenina formam-se os biflavonóides, agtisflavona e 7"-O-metilagatisflavona (Esquema 8).




Esquema 8: Proposta biogenética para as flavonas (DEWICK, 2002) e biflavonas (MOREIRA, 1994)

## 5.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os ensaios biológicos realizados foram de atividade antibacteriana, atividade antifúngica, atividade inseticida e de avaliação da toxicidade. O ensaio de atividade antibacteriana foi realizado no Laboratório de Bacteriologia Veterinária do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, do Instituto de Veterinária – IV da UFRRJ sob orientação da Professora Dra. Miliane Moreira Soares de Souza. O ensaio de atividade antifúngica foi realizado no Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária – IV da UFRRJ sob orientação do Professor Dr. Francisco de Assis Baroni. A Avaliação da atividade inseticida foi realizada no Laboratório de Miíases Tropicais do Departamento de Parasitologia Animal-UFRRJ, sob orientação do Professor Dr. Gonzalo Efrain Moya Borja e colaboração do mestrando Élio Barbieri Junior. A avaliação da toxicidade do extrato metanólico foi realizado no laboratório de Farmacologia do Departamento de Fisiologia Animal IB/UFRRJ, sob orientação dos professores Fábio Fagundes Rocha e Frederico Argollo Vanderlinde.

### 5.5.1. Avaliação da Atividade Antibacteriana do Extrato Metanólico de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl.

A metodologia utilizada foi adaptada do teste de difusão em placas desenvolvido por Kirby-Bauer. Esta metodologia é amplamente utilizada no mundo como teste-padrão para ensaios biológicos, devido a simplicidade e eficiência na reprodução dos resultados obtidos e é regulamentado internacionalmente pelo Clinical Laboratory Standards Institute (WAYNE, 2005).

AS bactérias utilizadas para a realização deste experimento foram escolhidas por representar os dois grandes grupos bacterianos existentes: a espécie Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, um isolado clínico sensível e outro resistente, e a espécie Gram-negativa *Escherichia coli*, ambas derivadas de isolados clínicos de mastite. (JAWETZ, 2000).

***Staphylococcus aureus***

As bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* são cocos gram-positivos, membro da família Micrococcaceae, habitantes naturais da pele e membranas mucosas de humanos e animais (KONEMAN *et. al,* 2001). Estão envolvidas em uma série de processos infecciosos de grande importância na clínica médica humana e veterinária. Em humanos, *S. aureus* é a principal causa das infecções hospitalares.

***Escherichia coli***

A espécie *Escherichia coli* representa bactérias gram-negativas entéricas largamente disseminadas no ambiente. Além do impacto sobre a saúde, a *E. coli* é um dos mais bem estudados modelos bacterianos, e nos últimos anos vem apresentando uma drástica mudança em seu perfil de sensibilidade aos antimicrobianos (JAWETZ, 2000).

Foram utilizadas 3 amostras de microrganismos, sendo duas de *Staphylococcus aureus*, uma de *Escherichia coli.* Para *S.aureus*, foram utilizados isolados clínicos oriundos de quadros de mastite bovina, sendo um dos isolados resistente aos antibióticos usuais. O isolado clínico de *E. coli*, de mesma origem, foi classificado como sensível.

Os isolados bacterianos foram estocados em freezer a $-20^0$ C e repicados em caldo enriquecido. Posteriormente foram incubados em estufa a 37 ºC por 24 horas, para ativação de seu metabolismo. Após o crescimento, foi realizada uma bateria de identificação presuntiva consistindo na coloração de Gram, realizada após o período de incubação de 24 horas, para observação das características morfotintoriais, e no teste da catalase, para observação da

quebra do peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$), pela enzima catalase (KONEMAN *et. al*, 2001). Como as amostras já haviam sido previamente identificadas, estes procedimentos foram realizados para garantir que não houve contaminação das amostras.

As amostras bacterianas foram inoculadas em caldo enriquecido, e incubadas em estufa a 37 ºC por 24 horas antes da realização dos ensaios, para que todas estivessem em fase exponencial de crescimento durante o experimento. Após o período de incubação, o crescimento deveria ser equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, correspondendo a uma concentração de 1,5 x $10^8$ UFC/mL, ideal para os ensaios de avaliação de antimicrobianos, obedecendo às recomendações do órgão responsável pela aceitação de testes como padrão, o Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).

O extrato metanólico de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. foi utilizado na concentração de 500mg/mL. Para realização do ensaio de difusão, 50µL de uma solução do material-teste na concentração de 500mg/mL foi inoculada em um poço feito no centro da placa contendo o ágar Mueller Hinton, como postulado pelo CLSI, semeado com 100µL de caldo de cultura do microorganismo previamente identificado. Na incubação, o extrato se difunde radialmente em todo o ágar em volta do poço enquanto o microorganismo está crescendo no ágar. Isto resulta em uma zona de inibição de crescimento ao redor de cada disco de aplicação (TRUJILLO, 2002).

O dimeltilsulfóxido (DMSO), veículo utilizado nas amostras-testes, foi testado separadamente para verificação de uma possível atividade antimicrobiana. Após realização dos ensaios com o veículo, foi comprovada sua inatividade sobre o crescimento bacteriano, permitindo o prosseguimento dos testes com as diluições do extrato. Foi possível detectar a formação de halo de inibição nos ensaios frente ao isolado testado de *Escherichia coli* e a um isolado de *Staphylococcus aureus* que já se mostrara resistente aos antibióticos de eleição. No entanto, o outro isolado testado de *Staphylococcus aureus* não apresentou halo de inibição nos ensaios realizados. Avaliações adicionais devem ser feitas para confirmar a atividade antibacteriana.

### 5.5.2. Verificação de atividade antifúngica do Extrato Metanólico de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl.

Para a verificação de atividade antifúngica, foram realizados dois experimentos, o primeiro com o extrato metanólico bruto de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. e o segundo com a fração clorofórmica do extrato metanólico. A metodologia utilizada para o primeiro experimento, com o extrato metanólico bruto, foi utilizando o meio Sabouraud dextrose a 3% acrescido do extrato da planta, em tubos de ensaios. Para o segundo experimento, utilizando a fração clorofórmica do extrato metanólico, em placas de Petri com o meio Sabouraud dextrose a 3% e discos de papel, a partir de círculos de pré-filtros semelhantes aos discos empregados nas provas de antibiograma, embebidos com a fração do extrato da palnta. A avaliação foi realizada com os seguintes microrganismos: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Malassezia pachydermatis*, *Rhodotorula spp* e *Aspergillus niger*.

***Candida albicans***

*Candida albicans* está freqüentemente relacionada às micoses mais comuns que acometem os seres humanos, é um habitante normal do trato gastrointestinal e regiões mucocutâneas, incluindo boca e vagina. Milhares de células da levedura podem estar presentes em um indivíduo, sem qualquer efeito danoso, entretanto, *C. albicans* é também, dentre os fungos, o de maior patogenicidade aos humanos (SCHMID, 2003).

***Cryptococcus neoformans***

*Cryptococcus neoformans* é um basidiomiceto, que se apresenta na forma tecidual como levedura encapsulada, corresponde a duas variedades fúngicas, com quatro sorotipos: var. *neoformans* (sorotipos A e D) e var *gattii* (sorotipos B e C). É fungo que vive em solos contaminados com fezes de pombos (var. *neoformans)* e junto a eucaliptos (var. *gattii*). A infecção criptococócica mais freqüentemente ocorre em pacientes imunodeprimidos (var. *neoformans*, fungo oportunista), mas pode ocorrer no hospedeiro normal (var. gattii, patógeno primário) (KWON-CHUNG et al., 1992).

***Malassezia pachydermatis***

*Malassezia pachydermatis* se apresenta de forma isolada ou em grupo, faz parte da microbiota da pele e quando ocorrem alterações no microambiente local como aumento da umidade, da temperatura e do substrato, estimulam o aumento do número de células desta levedura, fazendo-a passar da forma comensal para o parasitismo. (NOBRE et al., 1998).

***Rhodotorula spp***

Leveduras do gênero *Rhodotorula* são produtoras de pigmentos carotenóides de pigmentação amarela ou vermelha, têm sido associados a alterações de cor dos alimentos. (FRANCO E LANDGRAF, 2004). Embora infecções sérias devido a *Rhodotorula spp* em humanos são raras, foram informados septicemia, endocarditis, meningites, ventriculitis, peritonitis, keratitis, endophthalmitis, dacryocystitis, e pneumonia. (RUSTHOVEN et al., 1984).

***Aspergillus niger***

Os *aspergillus* tem ampla distribuição geográfica, e encontram-se no solo, ar, plantas e matérias orgânicas em geral, sendo contaminantes comuns em laboratórios e hospitais (MINOMI, 2003). *Aspergillus niger* geralmente está associado nos casos de otomicose, aspergilomas e infecções dos seios nasais. (FISHER, 2001)

**Primeiro Experimento**

Para o primeiro experimento utilizou-se o meio Sabouraud dextrose a 3%, acrescido do extrato da planta. A fórmula do Sabouraud, normalmente feita para 100mL foi preparada para 60mL e os 40mL restantes de $H_2O$ destilada que completariam o volume foram esterilizados em autoclave e usados para diluir 3g do extrato. Este após a diluição foi submetido a exposição a ultra-violeta em capela de segurança biológica nível II. O meio Sabouraud (60mL) foi esterilizado por autoclavação (120ºC por 20 minutos). Após esterilização o meio foi resfriado a 50ºC e misturado com o extrato diluído. Desta forma, foi obtida um meio com concentração de 3% de extrato.

Do frasco com a concentração 3%, foram retirados metade do volume que foi imediatamente distribuída em tubos de ensaio previamente esterilizados. Estes tubos foram dispostos de modo que o meio solidificasse no modo "inclinado". A outra metade do meio Sabouraud contida em frasco de Erlenmeyer foi acrescida de mais 50mL de Sabouraud puro, tornando a concentração de 1,5%. O material foi homogeneizado, separando-se 50mL que foram imediatamente distribuídos em tubos de ensaio que também foram inclinados. Os 50mL restantes foram acrescidos de 50mL de Sabouraud puro fazendo com que a concentração ficasse a 0,75%. Este procedimento foi continuado, sempre se separando 50mL de meio para distribuir em tubos de ensaios adicionando-se 50mL de Sabouraud puro ao restante para reduzir a concentração à metade. Desta forma obtivemos cerca de 12 tubos de ensaio contendo meio Sabouraud de cada uma das concentrações do extrato (3%, 1,5%, 0,75%, 0,375%, 0,187% e 0,093%).

As suspensões salinas (NaCl em água destilada, 0,9%, estéril) de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* (fungos unicelulares) foram padronizadas de acordo com o grau 3 da escala de Mc Farland e suspensão padronizada de *Aspergillus niger* (fungo filamentoso). Uma alíquota de 100µL de cada uma destas suspensões foi semeada nos tubos com as concentrações diferentes. Foram empregados quatro tubos de cada concentração para cada suspensão microbiana. Os tubos correspondentes às leveduras foram incubados em estufa microbiológica a 37ºC enquanto os tubos correspondentes ao fungo filamentoso foram incubados em temperatura ambiente. O tempo de observação foi de 5 dias. Todo o procedimento foi realizado em capela, em ambiente estéril.

**Segundo Experimento**

O extrato da planta (1g) foi diluído em 25mL de etanol. Foram preparados discos de papel, a partir de círculos de pré-filtros semelhantes aos discos empregados nas provas de antibiograma. O diâmetro foi de 1cm.

Cada disco foi embebido várias vezes com 50µl do extrato em etanol. Grupos de 5 a 10 discos foram separados e receberam cargas diferentes de aplicações do extrato. Considerando que cada alíquota de 50µl corresponde a 2mg do extrato, os discos receberam desde 4 aplicações (correspondente a 8mg) até 30mg.

Numa segunda etapa, foram preparadas placas de Petri contendo meio Sabouraud dextrose (3%). As placas em quadruplicata foram semeadas com suspensões salinas preparadas como no experimento anterior para os seguintes microrganismos: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Malassezia pachydermatis*, *Rhodotorula spp* e *Aspergillus niger*. A suspensão de cada um destes microrganismos foi semeada na superfície das placas de Petri, utilizando-se um swab estéril para cada uma das amostras, embebido nas mesmas. Após esta etapa, os discos foram aplicados na superfície, utilizando-se uma pinça estéril. Todo o procedimento foi realizado em capela de segurança, na proximidade de bico de Bunsen.

As placas foram incubadas em temperatura de 37ºC (exceção para *Aspergillus niger*) por cinco dias com observações a partir das primeiras 24 horas.

Para o primeiro experimento, os crescimentos foram evidentes já nas primeiras horas. Observou-se o crescimento de todos os fungos submetidos ao teste em todos os tubos de todas as concentrações após o tempo de observação de cinco dias.

No segundo experimento ocorreu crescimento em todas as placas e em nenhuma delas foi observado qualquer halo que demonstrasse efeito inibitório do extrato aplicado nos discos sobre os microrganismos cultivados. Os resultados obtidos devem ser aprofundados através de diferentes métodos de avaliação.

### 5.5.3. Avaliação da Atividade Inseticida contra *Musca domestica*

Para este experimento utilizou-se a espécie *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), que é uma espécie de grande importância médico sanitária, pois atua como vetor mecânico e/ou biológico de diversos agentes patogênicos, incluindo parasitos do homem e de animais domésticos (BERNARDI *et al*., 2006). Estes insetos, por manterem um alto grau de associação com o ambiente modificado pelo homem, são amplamente relacionados na literatura como causadores de diversos danos e graves prejuízos, principalmente na pecuária (GUIMARÃES *et al.*, 1983). Estes dados têm motivado diversos grupos pela busca de novos métodos aplicáveis ao controle químico como alternativo aos inseticidas sintéticos comumente utilizados no controle destas pragas.

Os insetos utilizados neste experimento foram oriundos de colônia formada por moscas coletadas no Campus da UFRRJ, e seu desenvolvimento pré-embrionário ocorreu em um meio composto por ração concentrada contendo 23% de proteína bruta, farelo de arroz e

água, na relação 1:1:2. Os insetos tratados representam o nível de resistência da comunidade a inseticidas comumente utilizados no controle desta mosca. Os insetos avaliados foram da geração F1 a espécie *Musca domestica*.

Após o nascimento os testes foram feitos em até 48 horas da emergência dos insetos. As frações e extratos foram diluídos em 1 ml de Acetona PA. Foram utilizados 20 mg da fração OSPGMCp-2a e aproximadamente 50mg dos demais extratos e frações. Os insetos foram retirados das gaiolas e anestesiados com $CO_2$ para manipulação e separação de machos e fêmeas, e realização da aplicação de 0,5µl da solução estoque formada de cada amostra. A aplicação foi feita sobre o tórax com auxílio de uma micro-seringa automática de 25µl. Após a aplicação os insetos foram transferidos para frascos forrados com papel filtro, fechados com gaze estéril presa com liga elástica. Cada frasco recebeu 20 insetos, sendo cada amostra avaliada em 20 machos e 20 fêmeas. Também foram realizados testes controle com a aplicação somente do solvente. A leitura foi realizada em 24 horas (**tabela 8,** pág. 90) e 48 horas (**tabela 9,** pág. 90), e nestas são contados os insetos mortos. Durante as avaliações os insetos foram alimentados com solução de glicose a 20% através de algodão embebido sobre a gaze.

Considerando os resultados apresentados, observa-se que o extrato metanólico bruto (**OspGM**) e frações do extrato, **OSPGMCp** e **OSPGMM** apresentaram pouca atividade inseticida frente a *Musca domestica*. As frações **OSPGMCp2a** e **OSPGMC** apresentaram maior atividade inseticida. Estas frações são ricas em flavonóides, no qual foram isoladas a 7”-O-metilagatisflavona e agatisflavona. Essas observações foram feitas em 24h (**tabela 8**) e 48h (**tabela 9**). De acordo com a maior atividade inseticida presente nas frações ricas em flavonóides, sugerimos que estas sejam as substâncias responsáveis por esta atividade.

**Tabela 8** – Mortalidade (%) de amostras vegetais sobre *Musca domestica* após 24 horas da aplicação.

| Substância | Mortalidade | | |
|---|---|---|---|
| | ♀ | ♂ | ♀ + ♂ |
| *OSPGD* | 0% | 0% | 0% |
| *OSPGDH* | 0% | 0% | 0% |
| *OSPGDC* | 0% | 0% | 0% |
| *OSPGDM* | 0% | 0% | 0% |
| *OSPGM* | 0% | 10% | 5% |
| *OSPGMC* | 0% | 20% | 10% |
| *OSPGMCp* | 10% | 0% | 5% |
| *OSPGMCp2a* | 10% | 20% | 15% |
| *OSPGMM* | 0% | 0% | 0% |
| *OSPGMMp* | 10% | 0% | 5% |
| *CONTROLE* | 0% | 0% | 0% |

**Tabela 9** – Mortalidade (%) de amostras vegetais sobre *Musca domestica* após 48 horas da aplicação.

| Substância | Mortalidade | | |
|---|---|---|---|
| | ♀ | ♂ | ♀ + ♂ |
| *OSPGD* | 10% | 10% | 10% |
| *OSPGDH* | 10% | 20% | 15% |
| *OSPGDC* | 0% | 10% | 5% |
| *OSPGDM* | 0% | 0% | 0% |
| *OSPGM* | 10% | 10% | 10% |
| *OSPGMC* | 10% | 20% | 15% |
| *OSPGMCp* | 10% | 0% | 5% |
| *OSPGMCp2a* | 20% | 30% | 25% |
| *OSPGMM* | 0% | 10% | 5% |
| *OSPGMMp* | 10% | 0% | 5% |
| *CONTROLE* | 0% | 0% | 0% |

a) Peso médio de machos e fêmeas de *M. domestica*: 0,0105 e 0,0158 gramas.

b) OSPGD = Ouratea sp galhos dicloro; OSPGDH = Ouratea sp galhos dicloro hexano; OSPGDC=Ouratea sp galhos dicloro clorofórmio; OSPGDM = Ouratea sp galhos dicloro metanol; OSPGM = Ouratea sp galhos metanol; OSPGMC = Ouratea sp galhos metanol clorofórmio; OSPGMCp = Ouratea sp galhos metanol clorofórmio precipitado; OSPGMCp2a = Ouratea sp galhos metanol clorofórmio precipitado fração 2 a; OSPGMM = Ouratea sp galhos metanol metanol; OSPGMMp = Ouratea sp galhos metanol metanol precipitado.

### 5.5.4. Avaliação da toxidez do extrato metanólico em *Mus musculus.*

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus)* albinos *swiss* machos e fêmeas pesando entre 30 e 35 g fornecidos pelo Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas (IB) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (23 ± 2$^{o}$C) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso à água e ração.

**Determinação da Dose Letal Aproximada (DLA)**

Neste ensaio foi utilizado apenas um animal tratado com o extrato a cada dose conforme proposto por Kennedy et al em 1986. O extrato metanólico de *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl. foi solubilizado em solução salina 0,9 % acrescido de 1% de Tween 80 e administrado nos camundongos pelas vias oral ou subcutânea. O teste se iniciou com uma

dose bastante baixa (10 mg/kg) e a próxima dose foi adicionada de 50% do valor da anterior e assim sucessivamente (o que na prática corresponde a uma chance muita remota de que uma determinada dose mate um animal e sua subseqüente falhe em fazê-lo), até que a menor dose na seqüência considerada, induzisse a morte do animal. Os animais foram observados nos tempos de 15 min, 30 min, 60 min, 24 h e 1 semana após a administração do extrato.

A administração do extrato tanto pelas vias oral quanto subcutânea não gerou sinais de toxicidade aguda nos camundongos. Doses de até 5g/kg não ocasionaram a morte dos animais em até uma semana após a administração em dose única do extrato, demonstrando a baixa toxicidade aguda do extrato.

O extrato apresenta baixa toxicidade quando administrado em dose única. Estudos com doses repetidas, subcrônicos e crônicos são necessários para complementar a avaliação toxicológica em função do potencial antitumoral da planta e conseqüente necessidade de uso crônico. Estudos para avaliar a toxicidade *in vivo* da fração enriquecida com biflavonóides também são necessários em função dos relatos de toxicidade destas substâncias.

# CONCLUSÕES

A prospecção química do extrato metanólico de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. revelou testes positivos para as classes de substâncias: alcalóides, saponinas, esteróides, depsídio e depsidonas, flavonóides, catequinas, quinonas, açúcares redutores, sacarídeos e taninos.

Com os extratos obtidos dos galhos de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. foi realizado o fracionamento, a partir dessas frações foram isolados compostos alifáticos, ácidos alifáticos, esteróides (sitoesterol, estigmasterol e campesterol), terpenos (lupeol e α-amirina e β-amirina) e biflavonas (7”-O-metilagatisflavona e agatisflavona) e sitoesterol glicosilado.

Através de análise utilizando CLAE-EM permitiu-se detectar a presença de outros compostos presentes no extrato, como metil-vitexina, orientina, ramnosil-triidroxiflavona, agatisflavona, metil-agatisflavona, dimetil-agatisflavona, metil-diidroxiflavon, e glicopiranosil-prenil-diidroxi-flavonol, embora necessitem de confirmação.

Através dos resultados obtidos neste trabalho e levantamento de dados da literatura sobre as substãncias encontradas no gênero Ouratea, foi possível concluir que o biflavonóide 7”-O-metilagatisflavona serve como um marcador quimiossistemático do Gênero Ouratea e que as variedades de *O. hexasperma* (St. Hil.) Bail e *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl. tem poucas diferenças morfológicas e quimicamente podem ser incluídas como uma única espécie.

Os testes de atividades biológicas realizados foram os de atividade antibacteriana, antifúngica, inseticida e de toxicidade utilizando os extratos e frações de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. Com os ensaios de atividade antimicrobiana, o extrato metanólico inibiu o crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Este extrato e a fração clorofórmica do extrato metanólico foi inativo para os fungos avaliados. Com os ensaios de atividade contra *Musca doméstica*, os extratos e frações não apresentaram atividade significativa, as frações que apresentaram maior atividade foi a fração que contém a mistura dos biflavonóides 7”-O-metilagatisflavona e agatisflavona e as frações metanólicas que também contém essas substâncias. Ensaios adicionais deverão ser realizados afim de confirmar esses resultados.

Com os ensaios de toxicidade, o extrato apresentou baixa toxicidade quando administrado em dose única. Estudos para avaliar a toxicidade *in vivo* da fração enriquecida com biflavonóides também são necessários em função dos relatos de toxicidade destas substâncias.

## REFERÊNCIAS


AGRAWAL, P. K.; BANSAL, M. C.; PORTER, L. J.; FOO, L. Y. *Carbon-13 NMR of flavonoids – studies in organic chemistry 39;* AGRAWAL, P. K. ed; elsevier Science Publishers B. V.: Amsterdam (1989). v 39 201p.

ALVES C. C. F. *Estudo Químico de Luxemburgia octandra (Ochnaceae), Laseguea erecta (Apocynaceae), do Látex de Parahancornia amapá (Apocinaceae) e de Solanum crinitum (Solanaceae).* 2003 Tese, Doutorado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, 2003.

ANAND, K. K.; GUPTA, V N; RANGARI, V.; SINGH, B.; CHANDAN, B. K. Structure and hepatoprotective activity of a biflavonoid from Canarium manii. Department of Pharmacology, Regional Research Laboratory, Jammu-Tawi, India *Planta medica* (1992), 58(6), 493-5.

ARYA, R.; BABU, V.; ILYAS, M.; NASIM, K. T. Phytochemical examination of the leaves of Anacardium occidentale. Dep. Chem., Aligarh Muslim Univ., Aligarh, India. *Journal of the Indian Chemical Society* (1989), 6(1), 67-8.

A. St. Hil. *Ghomphia Hexasperma*. *Flora Brasiliae Meridionalis* (quarto ed.) 1: 61. 1824

A. St.-Hill.; Bail *Ouratea hexasperma*. *Histoire des Plantes* 4: 366. 1873.

AZAM, A.; QASIM, M. A.; KHAN, M. S. Y. Biflavones from Picea morinda Linn. Inst. Hist. Med. Med. Res., New Delhi, India. *Journal of the Indian Chemical Society* (1985), 62(10), 788-9.

BAGCHI, A.; SAHAI, M.; RAY, A. B. Phenolic constituents of Rhus semialata leaves. Inst. Med. Sci., Banaras Hindu Univ., Varanasi, India. *Planta Medica* (1985), (5), 467-8.

BAHIA, M. V.; DOS SANTOS, J. B.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). Instituto de Quimica and Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, Salvador, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society* (2005), 16(6B), 1402-1405.

BARROSO, G. M.; *Sistemática de Angiosperma do Brasil*, UFV-MG, 130, 1986.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. et. al. *Sistemática de Angiosperma do Brasil*, UFV-MG,2.ed. 2002.

Engl. *O. hexasperma* var. *planchonii. Flora Brasiliensis* 12(2):321. 1876.

FRANCO, B. D. G. DE M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos.* São Paulo. Ed. Atheneu, 2004.

BERNARDI, E. PINTO, D.M. NASCIMENTO, J.S. DO et al., Efeito dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sobre o desenvolvimento de Musca domestica L. (Diptera: Muscidae) em laboratório *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.73, n.1, p.127-129., 2006.

Braga R. *Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará*. Fortaleza: Imprensa Oficial., 1960

BRITO, A.R.M.S.; BRITO, A.A.S. Forty Years of Brazilian Medicinal Plant Research. J. of *Ethnopharmacology*, 49(6), 53-67, 1993.

CARBONEZI, C. A.; HAMERSKI, L.; GUNATILAKA, A. A. L.; CAVALHEIRO, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C. M.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. DA S. Bioactive flavone dimers from Ouratea multiflora (Ochnaceae) *Revista Brasileira de Farmacognosia* (2007), 17(3), 319-324.

CARVALHO, M. G. de; VELANDIA, J. R.; OLIVEIRA, M. C. C. de; ECHEVARRIA, A.; BRAZ-FILHO, R.; GRYNBERG, N. F. Chemical Structure, Cytotoxic and Antitumours Activities of Biflavonoids from Brazilian Ouratea (Ochnaceae). In: GOVIL, J. N.; CENTRE, Res. Book. (Org.). *Recent Progress in Medicinal Plants, Phytochemistry & Pharmacology II*. New Dehli, v. 08, 77-92, 2002.

CARVALHO, M. G. DE, JUNIOR, J. G. R., SUZART, L.R., CORNELIUS, M. T. F., SILVA, V. C. DA & CARDOSO, M. A. R. Determinação Estrutural de Flavonóides Usando Análise Espectrométrica de RMN 1H 1D e Reação com Diazometano. *Revista Universidade Rural:* Série Ciências Exatas e da Terra, Seropédica, RJ: EDUR, v. 25, n.1-2, p. 46-60, jan-dez., 2006.

CARVALHO, M. G. DE.; ALVES, C. C. F.; SILVA, K. G. S.; EBERLIN, M. N.; WERLE, A. A.; *Luxenchalcone, a new bichalcone and other Constituents from Luxemburgia octandra.* J. Braz. Chem. Soc. V.15, n. 1 p. 146-149, 2004.

CARVALHO, M. G DE., ALBUQUERQUE, L. R. M.; MENDES, L. S.; GUILHON, G. M. S. P.; RODRIGUES, S. T. Biflavonoids And Terpenoids Isolated From The Leaves Of *Ouratea Microdonta* Engl. (Ochnaceae) *J. Nar. Med.,* 2008, submetido.

CASTRO, F. B.; BRAGA, A. O.; LOMBARDI, J. A.; WAGNER, H. Screening the Brazilian flora for antihypertensive plant species for in vitro angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. *Phytomedicine-Jena* (2000), 7 (3), 245-250.

CHARI; V. M.; CHEN, F.; CHEN; L.; ILYAS, M.; LIN, Y. C.; LIN, Y. M.; NESAMELY; A; WAGNER; H.; 13C-NMR Spectroscopy of biflavanoids. *Phytochemistry* v.16 p.1273-1278,. 1977.

CHEN, FA-CHING. Plant biflavonyls. II. *Chem. Res. Cent*., Natl. Taiwan Univ., Taipei, Taiwan. Taiwan Kexue (1973), 26(3-4), 100-3. CODEN: TKHSAU ISSN: 0015-7791. Journal written in Chinese.

CORTES, S. F.; VALADARES, M. Y.; OLIVEIRA, A B. DE; LEMOS. S. V.; BARBOSA, M. P. T.; BRAGA, F. C. Mechanism of endothelium-dependent vasodilation induced bv a proanthocyanidin-rich fractaion from Ouratea semisserata, *Planta Medica* v.68 n.5, p. 412-415; 2002

COSTA, A.F. *Farmacognosia experimental*. Lisboa: Fundação Calauste Gulbenkian, 1972, p. 932-39 v.3

CRAGG, G. M.; NEWMANN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 2003 Jul;66(7):1022-37.

DANIEL. J.F. de S.; CARVALHO. M. G. de; CARDOSO. R. DA S.; EBERLIN. M. N. Others flavonoids from Ouratea hexasperma (Ochnaceae). *J. Braz. Chem. Soc*., 2005.

DANIEL, J. F. DE S. *Metabólitos Especiais Isolados de Ouratea hexasperma (Ochnaceae), Dipladenia martiana (Apocynaceae) e de Caesalpinia peltophoroides (Leguminosae),* 2005 Tese, Doutorado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, 2005.

DANIEL, J. F. DE S.; ALVES, C. C. F.; GRIVICICH, I.; BRONDANI DA ROCHA, A.; GERALDO DE CARVALHO, M. Antitumor activity of biflavonoids from *Ouratea* and *Luxemburgia* on human cancer cell lines. *Indian Journal of Pharmacology* (2007), 39(4), 184-186.

DEWICK, P.M. *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*, 2nd edition, Jonh Wiley & Sons., **2002**, 507 p.

Di STASI, L.C. *Plantas Medicinais: Arte e Ciência – Um Guia de Estudo Multidisciplinar.* São Paulo: Ed. da Universidade Estadual Paulista, 1996. 230p

DOMINGUEZ, X. A. *Metodos de investigación fitiquimica*. Mexico Limusa- Wiley, 1973.281p.

DORA. G.; EDWARDS. J. M. Taxonomic status of Lanaria lanata and isolation of a novel biflavone*. J. Nat. Products*. 54 (3), 796-801, 1991.

DREWES S. E.; Hudson, N. A.; Bates, R. B.; Linz, G. S. Novel dimeric chalcone based pigments from Brackenridgea zanguebarica*. Tetrahedron Letters* v. 25 n. 1 105-108, 1984

ESTEVAM, C. S.; OLIVEIRA, F. M.; CONSERVA, L. M.; LIMA, L. DE F. C.O.;. BARROS, E. C.P.; BARROS, A. C.P.; ROCHA, E. M.M. ; ANDRADE, E.H.A. Constituintes químicos e avaliação preliminar in vivo da atividade antimalárica de Ouratea nitida Aubl (Ochnaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 15(3): 195-198, Jul./Set. 2005.

FELICIO, J. D.; GONÇALEZ, E.; BRAGGIO, M. M.; COSTANTINO, L.; ALBASINI, A.; LINS, A. P. Inhibition of Lens Aldose Reductase by biflavones from Ouratea spectabilis. *Planta Medica*, 61, 217-220, 1995.

FELICIO, J. D.; ROSSI, M. H.; PARK, H. R; GONÇALEZ, E.; BRAGGIO, M. M.; DAVID, J. M.; CORDEIRO, I*. Biflavonoids from Ouratea multiflora*. *Fitoterapia*, 72, 453-455, 2001.

FELICIO, J. D.; ROSSI, M. H.; BRAGGIO, M. M.; GONÇALEZ, E.; PAK, A.; CORDEIRO, I.; FELICIO, R. C. Chemical constituents Ouratea parviflora. *Biochem. Syst. Ecol*., 32, 79-81, 2004.

FERES, F. Estudos taxonômicos e Estudos em Philacra Dwyer (Ochnaceae) *Acta Sci. Biol*. Sci. Maringá, v. 28, n. 3, p. 183-187, July/Sept., 2006.

FISHER, F.; COOK, N.B. *Micologia Fundamentos e Diagnóstico*. Rio De Janeiro: Reviter, 2001

GANGOUE-PIEBOJI, J.; PEGNYEMB, D. E.; NIYITEGEKA, D.; NSANGOU, A.; EZE, N.; MINYEM, C.; MBING, J. N.; NGASSAM, P.; TIH, R. G.; SODENGAM, B. L.; BODO, B.

The in-vitro antimicrobial activities of some medicinal plants from Cameroon. *Annals of tropical medicine and parasitology* (2006), 100(3), 237-43.)

GARTLAN, S.; MCKEY D. B.; WATERMAN, P. G.; MBI, C. N.; STRUHSAKER, T. T.; A comparative study of the phytochemistry of two African rain florests. *Biochem. Syst. Ecol.* , V. *8*, p. 401-422. 1980.

GHOGOMU, R.; SONDENGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Lophirone A, a biflavonoid with unusual skeleton from Lophira lanceolata. *Tetrahedron Lett*., 28 (26), 2967-2968, 1987.

GONÇALEZ, E.; FELICIO, J. D.; PINTO, M. M. Biflavonoids inhibit the production of aflatoxin by Aspergillus flavus. *Braz. J. Med. Biol. Res*., 34, 1453-1456, 2001.

GRYNBERG, N. F.; BRIOSO, P. S. T.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R. *Antiproliferative effects and activation of apoptosis on Ehrlich tumour cells by flavones*, Proceedings of the XVII International Cancer Congress, 317-320, 1998.

GRYNBERG, N. F.; CARVALHO, M. G. de; VELANDIA, J. R.; OLIVEIRA, M. C.; MOREIRA, I. C.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. DNA topoisomerase inhibitors: biflavonoids from Ouratea species. *Braz. J. Med. Biol. Res*., 35 (7), 819-822, 2002.

GUIMARÃES, J. H. G.; PAPAVERO, N.; PRADO, A. P. As Miíases Na Região Neotropical: Identificação, Biologia, Bibliografia. *Revista Brasileira De Zoologia***,** v. 1, n. 4, p. 239-416, 1983

HARBORNE, J.B.; BAXTER, H. *Handbook of Natural Flavonoids*, Wiley, Chichester. 1999, 2 vols.

HARWOOD, J. L. *Plant lipid metabolism in Plant biochemistry*, Academic Press, inc. 525B Street, Suite 1900, San Diego, Califórnia 92101-4495, USA. ISBN 0-12-214674-3, 1997.

ILYAS, M.; SELIGMANN, O.; WAGNER, H. Biflavones from the leaves of Araucaria rulei F. Muell. and a survey on biflavanoids of the Araucaria genus. Inst. Pharm. Arzneimittell Univ. Muenchen, Munich, Fed. Rep. Ger. Zeitschrift fuer Naturforschung, C: *Journal of Biosciences* (1977), 32C(3-4), 206-9.

ILYAS, M.; ILYAS, N. Biflavones from the leaves of Araucaria angustifolia and a survey on biflavonoids of Araucaria genus. Department of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria. *Ghana Journal of Chemistry* (1994), 1(10), 441-4.

JAWETZ, E. MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. *Microbiologia Médica*. 21ª ed., Editora Guanabara-Koogan, 2000.

KAMIL, M.; AHMAD, I.; ILYAS, M. Constituents of Rhus punjabensis. Dep. Chem., Aligarh Muslim Univ., Aligarh, India. *Journal of the Indian Chemical Society* (1984), 61(4), 375.

KAMIL, M.; KHAN, N. A.; ALAM, M. S.; ILYAS, M. A biflavone from Ochna pumila. *Phytochem*., 26 (4), 1171-1173, 1987.

KASSEM, M. E. S.; EL-DESOKY, S. K. AND SHARAF, M. Biphenyl Esters and Biflavonoids from the Fruits of Schinus terebenthefolus *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 40, No. 5, 2004

KENNEDY GL JR, FERENZ RL, BURGESS BA. Estimation of Acute Oral Toxicity in rats by determination of the Aproximate Lethal Dose Rather than the LD50. *J. Appl. Toxicol*., 6: 145-148,1986.

KHAN, N. U.; ILYAS, M.; RAHMAN, W.; MASHIMA, T.; OKIGAWA, M.; KAWANO, N. Biflavones from the leaves of Araucaria bidwillii and Agathis alba (Araucariaceae) Dep. Chem., Aligarh Muslim Univ., Aligarh, India. *Tetrahedron* (1972), 28(23), 5689-95.

KIRBY W M, BAUER A W, SHERRIS J C, TURCK M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, 45: 493-6, 1966.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M. & SCHRECKENBERGER, P.C. & WINN JR., W.C. *Diagnóstico Microbiológico***.** 5ª.ed. Rio de Janeiro: Editora MEDSI, 2001.

KWON-CHUNG, K.J., BENNET, J.E. Cryptococcosis. In: Kwon- Chung KJ, Bennet JE (eds) *Medical mycology*. Philadelphia, Lea & Febiger, chap 16, p. 397-446, 1992.

LIN, Y. M.; CHEN, F. C. Agathisflavone from the drupes of Rhus succedanea. Chem. Res. Cent., Natl. Taiwan Univ., Taipei, Taiwan. *Phytochemistry* (Elsevier) (1974), 13(3), 657-8.

LIN Y. M., ANDERSON H., FLAVIN M. T. AND PAI Y. H. S., In vitro anti-HIV activity of biflavonoids isolated from Rhus succedanea and Garcinia multiflora*. J. Nat. Prod.* 60, 884-888, 1997.

LIN, Y. M.; FLAVIN, M. T.; SCHURE, R.; CHEN, F. C.; SIDWELL, R.; BARNARD, D. L.; HUFFMAN, J. H.; KERN, E. R. Antiviral activities of biflavonoids. *Planta Med.,* 65 (2), 120-125, 1999.

MANN, J. *Chemical aspects of biosynthesis*, 1ST ed. Oxford University press Inc., New York. **1994**

MARTINS, L. R. R.; CORTEZ, L. E. R.; DIAS-FILHO B P.; NAKAMURA, C. V.; FERREIRA, A. G.;, CORTEZ, D. A. G**.** Atribuição Dos deslocamentos químicos dos átomos de 1H e 13C do acetato de acantoaustralida. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 16(4): 490-496, Out./Dez. 2006.

MASHIMA, T.; OKIGAWA, M.; KAWANO, N.; KHAN, N. U.; ILYAS, M.; RAHMAN, W. Bisflavones in the leaves of Agathis alba. Fac. Pharm. Sci., Nagasaki Univ., Nagasaki, Japan. *Tetrahedron Letters* (1970), (33), 2937-40.

MATOS, F.J.A. *Introdução a Fitoquímica Experimental*. Fortaleza: Editora UFC, 1988.129p. (Coleção Ciência,3)

MATOS, F.J.A. *Introdução a Fitoquímica Experimental*. Fortaleza: Editora UFC, 1997.107-111, 135p.

aMBING, J. N.; PEGNYEMB, D. E.; GHOGOMU TIH, R.; SONDENGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Two biflavonoids from Ouratea flava stem bark. *Phytochem*., 63, 427-431, 2003.

bMBING, J. N.; BASSOMO, M. Y.; PEGNYEMB, D. E.; TIH, R. G.; SONDEMGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Constituents of Ouratea flava. *Biochem. Syst. Ecol*., 31, 215-217, 2003.

MENDES, C. C.; BAHIA, M. V.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Constituents of Caesalpinia pyramidalis. Instituto de Quimica, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil. *Fitoterapia* (2000), 71(2), 205-207.

MESSANGA, B.; TIH, G. R.; SONDENGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Biflavonoids from Ochna calodendron. *Phytochem.*, 35 (3), 791-794, 1994.

MESSANGA, B. B.; KIMBU, S. F.; SONDENGAM, B. L.; BODO, B. Triflavonoids of Ochna calodendron. *Phytochem*., 59, 435-438, 2002.

MINOMI, P.S. *Micologia: Métodos Laboratoriais de Diagnóstico de Micoses*. 1ed. São Paulo: Manole, 2003

MONACHE F. D.; ALBUQUERQUE, I. L.DE; FERRARI, F.; BETOLLO, G. B. M.; A new catechin and a dimeric proantocianidin from Ouratea especies; *Tetrahedron Letters*, 1967, *8* (43) p. 4211-42144. 1967. Resumo do Chemical Abstracts, vol. 68:104905u, p 10120, 1968.

MOREIRA, I. C.; SOBRINHO, D. C.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R. Isoflavanone dimers hexaspermone A, B and C from Ouratea hexasperma. *Phytochem*., 35 (6), 1567-1572, 1994.

MOREIRA. I. C.; CARVALHO. M. G. de; BASTOS. A. B. F. O.; BRAZ-FILHO. R. A flavone dimer from Ouratea hexasperma. *Phytochem*., 51, 833-838, 1999.

MOREIRA. I. C. *Estudo Químico de Ouratea hexasperma St. Hil (Ochnaceae).* 1994 Dissertação, Mestrado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, 1994.

NEWMAN, D. J. AND CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years *J. Nat. Prod.* 2007, *70,* 461-477

NGO MBING, J.; ENGUEHARD-GUEIFFIER, C.; ATCHADE, A. T.; ALLOUCHI, H.; GANGOUE-PIEBOJI, J.; MBAFOR, J. T.; TIH, R. G.; POTHIER, J.; PEGNYEMB, D. E.; GUEIFFIER, A. Two biflavonoids from Ouratea nigroviolacea. Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaounde I, Yaounde, Cameroon. *Phytochemistry* (Elsevier) (2006), 67(24), 2666-2670.

NOBRE, M., MEIRELES, M., GASPAR, L. F. et al. Malassezia pachydermatis e outros agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães. *Cienc. Rural*, July/Sept. 1998, vol.28, no.3, p.447-452.

OFMAN, D. J.; MARKHAM, K. R.; VILAIN, C.; MOLLOY, B. P. J. Flavonoid profiles of New Zealand kauri and other species of Agathis. New Zealand Inst. Ind. REs. DEv., Lower Hutt, N. Z. *Phytochemistry* (1995), 38(5), 1223-8.

OLIVEIRA, M. C. C.; CARVALHO, M. G. de; SILVA, C. J.; WERLE, A. A. New biflavonoid and Other constituents from Luxemburgia nobilis (EICHL). *J. Braz. Chem. Soc*., 13 (1), 119-123, 2002.

PARVEEN, N.; TAUFEEQ, H. M.; KHAN, N. U. D. Biflavones from the leaves of Araucaria araucana. Dep. Chem., Aligarh Muslim Univ., Aligarh, India. *Journal of Natural Products* (1987), 50(2), 332-3.

PARVEEN, N.; KHAN, U. D. Phenolic constituents from leaves of Rhus semialata Murr. Dep. Chem., Aligarh Muslim Univ., Aligarh, India. *Journal of the Indian Chemical Society* (1988), 65(10), 737-8.

PARVEEN, N.; SINGH, M. P.; KHAN, NIZAM U.; LOGANI, M. K. Flavonoid constituents of Garcinia xanthochymus leaves. Department Chemistry, Aligarh Muslim University, Aligarh, India. *Fitoterapia* (1994), 65(1), 89-90.

PAULO, M.Q.; LIMA, E.O.; MAIA, R.F.; XAVIER FILHO, L. Antimicrobial activity of the oil of the fruit of Ouratea parvifl ora Baill (Ochnaceae). *CCS 8*: 19-21, 1986.

PEGNYEMB, D. E.; TIH, G. R.; SONDENGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Biflavonoids from Ochna afzelii. *Phytochem*., 57, 579-582, 2001.

PEGNYEMB, D. E.; TIH, G. R.; SONDENGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Flavonoids from leaves of Ochna afzelii. *Biochem. Syst. Ecol*., 31, 219-221, 2003.

PEGNYEMB, D. E.; MBING, J. N.; DE THEODORE ATCHADE, A.; TIH, R. G.; SONDENGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Antimicrobial biflavonoids from the aerial parts of Ouratea sulcata. Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaounde I, Yaounde, Cameroon. *Phytochemistry* (Elsevier) (2005), 66(16), 1922-1926.

PINTO, A. C. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas *Quim. Nova*, Vol. 25, Supl. 1, 45-61, 2002

RAO, C. V.; GUNASEKAR, D. Squarrosin, A new isoflavone from Ochna squarrosa (Linn.). *Indian Journal of Chemistry*, 28 B, 780-781, 1989.

ROY, S. K.; QASIM, M. A.; KAMIL, M.; ILYAS, N.; ILYAS, M.; RAHMAN, WASIUR. Biflavones in the leaves of Juniperus virginiana. Dep. Chem., Aligarh Muslim Univ., Aligarh, India. *Journal of the Indian Chemical Society* (1984), 61(2), 172-3.

RUSTHOVEN, J. J.; FELD, R.; TUFFNELL, P.G. Systemic infection by Rhodotorula spp in the immunocompromised host. *J Infect* 1984; 8:241—6.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento*. UFSC/UFRGS, 2001.

SIMONI, I.C.; FELICIO, J.D.; GONÇALEZ, E.; ROSSI, M.H. Avaliação da Citotoxicidade de Biflavonóides Isolados de Ouratea Spectabilis (Ochnaceae) em Células de Córnea de Coelho Sirc. *Arq. Inst. Biol*., São Paulo, v.69, n.4, p.95-97, out./dez., 2002.

SULTANA, SARWAT; ILYAS, M.; KAMIL, MOHAMMED; SHAIDA, W. A. Chemical investigation of Bauhinia vahlii Linn. (Leguninoceae). Dep. Chem., Aligarh Muslim Univ., Aligarh, India. *Journal of the Indian Chemical Society* (1985), 62(4), 337-8.

SUZART, L. R.; DANIEL, J. F. DE S.; CARVALHO, M. G. Biodiversidade Flavonoídica e Aspectos Farmacológicos em Espécies dos Gêneros *Ouratea e Luxemburgia* (OCHNACEAE) *Quim. Nova,* Vol. 30, No. 4, 984-987, 2007.

SUZART, L. R. *Considerações Sobre os Gêneros Ouratea e Luxemburgia, Estudo Químico de duas Espécies de Ochnaceae: Ouratea Hexasperma St. Hil E Ouratea Cuspidata St. Hil e Atividades Biológicas.* 2007 Tese, Doutorado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, 2007.

SVENNINGSEN, A. B.; MADSEN, K. D.; LILJEFORS, T.; STAFFORD, G. I.; VAN STADEN, J.; JAEGER, A. K. Biflavones from Rhus species with affinity for the GABAA/benzodiazepine receptor. Department of Medicinal Chemistry, The Danish University of Pharmaceutical Sciences, Copenhagen, Den. *Journal of Ethnopharmacology* (2006), 103(2), 276-280.

TANG, S.; BREMNER, P.; KORTENKAMP, A.; SCHLAGE, C.; GRAY, A.; GIBBONS, S.; HEINRICH, M. Biflavonoids with cytotoxic and antibacterial activicty from Ochna macrocalyx. *Planta Med*., 69 (3), 247-253, 2003.

aTIH GHOGOMU, R.; SONDENGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Structures of Isombamichalcone and Lophirochalcone, bi- and tetra-flavonoids from Lophira lanceolata. *Tetrahedron Lett*., 30 (14), 1807-1810, 1989.

bTIH GHOGOMU, R.; SONDENGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Structure of Lophirones B and C, Biflavonoids from the bark of Lophira lanceolata. *Phytochem*., 28 (5), 1557-1559, 1989.

TIH GHOGOMU, R.; SONDENGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Structure of the chalcone dimers Lophirone F, G and H from Lophira lanceolata stem bark. *Phytochemistry,* 29 (7), 2289-2293, 1990.

TIH, A. E.; GHOGOMU, R. T.; SONDENGAM, B. L.; CAUX, C.; BODO, B. Constituents of Lophira alata leaves. *Biochem. Syst. Ecol*., 31, 549-551, 2003.

aTIH, A.; MARTIN, M. T.; TIH GHOGOMU, R.; VUIDEPOT, I.; SONDENGAM, B. L.; BODO, B. Lophiroflavans B and C, Tetraflavonoids of Lophira alata. *Phytochemistry*, 31 (10), 3595-3599, 1992.

bTIH, A.; TIH GHOGOMU, R.; SONDENGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Tetraflavonoids of Lophira alata. *Phytochem*., 31 (3), 981-984, 1992.

TRUJILLO, E. C. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Revista Chilena de Infectología*, v.19, supl.2, Santiago, 2002.

VAN LOO, P.; DE BRUYN, A.; VERZELE, M. Lab. Org. Chem., State Univ. Ghent, Ghent, Belg. Liquid chromatography and identification of the flavonoids present in the sumac tannic acid extracted from Rhus coriaria. *Chromatographia* (1988), 25(1), 15-20.

VEIGA JR, V. F.; PINTO, A. C. PLANTAS MEDICINAIS: CURA SEGURA? *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 3, 519-528, 2005.

VELANDIA, J. R.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R. Novel trichloro and tetrachloroisoflavone isolated from Ouratea semiserrata. *Nat. Prod. Lett*., 12 (3), 191-198, 1998.

VELANDIA. J. R.; CARVALHO. M. G. de; BRAZ-FILHO. R.; WERLE. A. A. Biflavonoids and a glucopyranoside derivative from Ouratea semiserrata. *Phytochem. Anal*., 13, 283-292, 2002.

VENNAT, B. et al. Hamamelis virginiana: Identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v. 67, n. 1. p. 11-14, 1992.

VIEGAS JR, C. E BOLZANI, V. DA S. OS PRODUTOS NATURAIS E A QUÍMICA MEDICINAL MODERNA *Quim. Nova,* Vol. 29, No. 2, 326-337, 2006**.**

VOGEL, A. I. *Vogel's Textbook of pratical organic chemistry*, 5th ed., Longman, England, 433, 1989.

WALL, J.M.; KRIDER, M.M.; KREWSON, C.F.; EDDY, C.R.; WILLAMAN, J.J.; CORELL, D.S.; GENTRY, H.S. Steroidal sapogenins VII. Survly of plants for steroidal sapogenins and other constituents. *Am. J. Pharm*. Ass., 63: 1-7. 1954.

WALL, M.E.; WANI, M.C. *Camptothecin and Taxol: From Discovery to Clinic. J. of Ethnopharmacology*, 51, 239-254, 1996.

WANNAN, B. S.; QUINN, C. J. Biflavonoids in the Julianiaceae. Univ. New South Wales, Kensington, Australia. *Phytochemistry* (1988), 27(10), 3161-2.

WAYNE, Pa. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.* Approved standards. CLSI document M45-P, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 2005.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. *Quim. Nova* 2001, *24*, 147.

ZINTCHEM, A. A.; ATCHADE, A. T.; TIH, R. G.; MBAFOR, J. T.; BLOND, A.; PEGNYEMB, D. E.; BODO, B. Flavonoids from Ouratea staudtii Van Tiegh. (ex Keay) (Ochnaceae). Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaounde I, Yaounde, Cameroon. *Biochemical Systematics and Ecology* (2007), 35(4), 255-256.

# UFRRJ

## INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA


**DISSERTAÇÃO**

# Estudo Químico e Atividades Biológicas de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. (Ochnaceae).


**RENATA DUARTE FERNANDES**



**2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

# ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. (Ochnaceae).

**RENATA DUARTE FERNANDES**

*Sob a Orientação do Professor*

**Dr. Mário Geraldo de Carvalho**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química de Produtos Naturais

Seropédica, RJ
Julho de 2008

547
F363e
T

Fernandes, Renata Duarte, 1977-
Estudo químico e atividades biológicas de ***Ouratea hexasperma var. planchonii Engl. (Ochnaceae)*** / Renata Duarte Fernandes – 2008.
118f. : il.

Orientador: Mário Geraldo de Carvalho.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química.
Bibliografia: f. 93-101.

1. Química orgânica – Teses. 2. Ouratea – Análise – Teses. 3. Ochnaceae – Análise – Teses. 4. Produtos naturais – Teses. I. Carvalho, Mário Geraldo de, 1952- . II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

**Bibliotecário: _____ Data: ___/___/_____**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**RENATA DUARTE FERNANDES**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Química, área de Concentração em Química de Produtos Naturais.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 11/07/2008

Dr. Mário Geraldo de Carvalho (ICE-DQ-UFRRJ)
(Orientador e Presidente)

Dr. Marco Edílson Freire de Lima (ICE-DQ-UFRRJ)

Dra. Alceni Augusta Werle (Dpto de Química/ICEB/UFOP)

Dra. Geizi Jane Alves de Carvalho (FAETEC-RJ)
(Suplente)

*Ao meu marido Cristiano de Deus Correa e*
*À minha mãe Fátima Maria Duarte.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus;

Ao meu marido Cristiano pelo amor, compreensão, incentivo, paciência e carinho;

À minha mãe Fátima por acreditar em meus sonhos e me incentivar sempre;

Aos meus irmãos Rodrigo e Robson pelo incentivo e ajuda;

À minha vovó Maria dos Anjos, aos meus tios pelo carinho e alegria em cada vitória minha, aos meus primos e meu afilhado;

À minha amiga de todas as horas Juliana Moura;

Ao Professor Dr. Mário Geraldo de Carvalho pela orientação, ensinamentos, atenção e paciência;

Aos amigos do LQPN-UFRuralRJ: Eduardo (Ceará), Delcí, Marcelo, Maritza, Virgínia, Luciano, Luiz Roberto (Pilha), Mário Sérgio, pela amizade e pelos momentos de descontração que passamos juntos e à nova integrante da equipe Roberta pelas palavras de incentivo;

Aos alunos de iniciação científica e estagiários do LQPN-UFRuralRJ: Luciane, Claudiana, Daniel, Letícia, Raquel, Tatiane, Verônica, Débora, Ana Paula, Aline e Aline' pela amizade, convivência agradável e auxílio durante a realização deste trabalho.

A todos os colegas do PPGQO, sem exceção, pelo bom relacionamento durante este período; em especial aos amigos Ari, Cláudio, Janaína, Kênia, Ana Paula, Andréa Janaína, Andréa Rose, Willian, Camilla, Alessandra, André Vinícius, Letícia, Vinícius, Suzana e Raquel; e à Regina pela amizade, incentivo e apoio;

Aos professores do PPGQO pela formação e evolução profissional;

À professora Dra. Rosane Nora Castro pelos ensinamentos e auxílio nas análises no HPLC;

Aos funcionários do ICE-UFRRJ, Maurício, Welisson, Carlão, Eli, Fábio, Francês, Osmar, Rui, Aldir e André;

À professora Dra. Maria de Fátima Agra (LTF-UFPB) pela coleta e identificação do material vegetal;

Ao Prof Dr. Edilberto Rocha Silveira do (CENAUREMN/UFC), pela obtenção dos espectros a 500 MHz;

À professora Dra. Alceni Augusta Werle (UFOP) pelas análises no CLAE-EM;

Aos professores Dra. Miliane Moreira Soares de Souza e Dr. Francisco de Assis Baroni (IV/UFRRJ) pelos ensaios de atividade antibacteriana e antifúngico;

Aos professores Dr. Fábio Fagundes Rocha e Frederico Argollo Vanderlinde do Departamento de Ciências Fisiológicas (IB/UFRRJ) pelo teste de toxicidade;

Ao mestrando Élio Barbieri Departamento de Parasitologia Animal-UFRRJ pelo ensaio de atividade inseticida;

À professora Denise Monte Braz do Departamento de Botânica da UFRRJ, pela atenção e auxílio na classificação botânica;

Às meninas do alojamento da graduação F1-32 Tati, Marcele, Dailane, Camila, Wilma, Germana, Joyce e Geovana pela amizade, momentos de estudos e de descontração;

Às meninas do alojamento da Pós-graduação Janaína, Vanessa, Renata, Michelle, Daniele, Patrícia, Sabrina, Silvana, Eliane, Kênia, Fabiana, Fernanda, Daniela, Fabíola, Ana Luisa, e Veridiana pelo acolhimento, amizade e bons momentos;

Desde já, à banca examinadora, pelas sugestões e correções sugeridas a este trabalho;

À UFRRJ, por mais uma oportunidade e acolhimento;

A CNPQ pela concessão da bolsa de estudos;

A todos que, de algum modo, me ajudaram na realização deste trabalho.

*Quando alguém encontra seu caminho,*
*precisa ter coragem suficiente*
*para dar passos errados.*
*As decepções, as derrotas, o desânimo*
*são ferramentas que Deus*
*utiliza para mostrar a estrada.*

*Paulo Coelho*

# RESUMO

FERNANDES, Renata Duarte. **Estudo Químico e Avaliação de Atividades Biológicas de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl**. 2008 101f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Os metabólitos especiais isolados de galhos de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl., permitiram a comparação com os constituintes de *O. hexasperma* (St. Hil.) para confirmar a classificação botânica da mesma. Neste trabalho também foram avaliadas algumas atividades biológicas.

As analises das frações obtidas do fracionamento com partição com solventes e técnicas cromatográficas dos extratos preparados com diclorometano e metanol dos galhos de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. conduziu à identificação de alguns constituintes químicos. Identificaram-se misturas de hidrocarbonetos alifáticos, ácidos alilfáticos, de esteróides (sitosterol, estigmasterol e campesterol), além de três triterpenos, lupeol, α e β amirina, e os flavonóides (7"-O-metilagatisflavona e agatisflavona) e sitosterol-3-O-β-D-glicopiranosideo. As estruturas foram determinadas através de análise dos dados espectrométricos de IV, RMN de $^{1}H$ e $^{13}C$ uni e bidimensional e massas, além de comparação com dados da literatura. A técnica CLAE-EM foi utilizada na análise adicional de duas frações contendo dois biflavonóides e alguns constituintes adicionais. Esta análise permitiu propor a presença de metil-vitexina, orientina, metil-diidroxiflavona, glicopiranosil-flavonas, dimetilagatisflavona, glicopiranosil-prenil-flavonol além da confirmação das duas biflavonas identificadas inicialmente.

Os extratos dos galhos de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. foram submetidos à avaliação de atividade antibacteriana, antifúngica, inseticida e de toxidez. O crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* reduziu com extrato metanólico. As frações contendo as biflavonas foram parcialmente ativas como inseticida contra *Musca domestica*. Os extratos apresentaram baixa toxicidade em dose única.

**Palavras–chave:** *Ouratea hexasperma,* flavonóides, atividades biológicas.

## ABSTRACT

FERNANDES, Renata Duarte. **Phytochemical Study and Biological Activities extracts from the branches of *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl**. 2008 103f. Dissertation (Magister Scientiae in Organic Chemistry), Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

The specials metabolites isolated from the branches of the *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl., allowing to the comparison with the chemical constituents from variety *Ouratea hexasperma* (St. Hil.) to confirm the botanical classification. Some biological activities were evaluated.

The analysis of the fractions from solvents and chromatographic fractionation of the dichloromethane and methanolic extracts from the branches of *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. led to the identification of some chemical constituents. This procedure led to identification of aliphatics compounds mixture, aliphatic alcohol mixture, steroids mixture (sitosterol, stigmasterol and campesterol), three triterpenes, lupeol e α-amiryn e β-amiryn, and the biflavonoids (7"-O-methylagathisflavone and agathisflavone) and sitosterol-3-O-β-D-glycopyranoside. The structures were determined by IR, de $^{1}H$ (1D e 2D) e $^{13}C$ (BBD e DEPT) NMR spectral data analysis and comparison with literature values. The HPLC-MS were used in the analysis of two fractions containing the these two biflavones and some additional compounds. This analysis led us to identify the presence of methyl-vitexin, orientin, methyl-dihydroxyflavone, glycopiranosil-flavones, dimethylagathisflavone and glycopyranosil-prenyl-dihydroxyflavonol besides the confirmation of these two biflavonoids.

The extracts from the branches of *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. were submitted on evaluations of the antibacterial, antifungal, insecticide and toxicity activities. The *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* growth was inhibited with methanolic extract. The fractions containing the biflavonoids were partially active as insecticide against *Musca domestica*. The extracts presented low toxicity on unique dose.



**Key words**: *Ouratea hexasperma,* flavonoids, biologicals activities.

# LISTA DE FIGURAS


| | |
|---|---|
| Figura 1: Triflavonóides isolados no Gênero *Ochna* | 3 |
| Figura 2: Biflavonóides e dímeros de chalconas isolados dos Gêneros *Ochna e Lophira*. | 4 |
| Figura 3: Flavonóides e chalconas isolados do gênero *Luxemburgia* | 5 |
| Figura 4: Flavonóides isolados do Gênero *Ouratea* | 7 |
| Figura 5: Outras classes de substâncias isoladas nos gêneros Ouratea. | 9 |
| Figura 6: Diferenças morfológicas entre as folhas de *Ouratea hexasperma.* | 10 |
| Figura 7: Dímeros de flavonóides | 11 |
| Figura 8: Constituintes químicos isolados neste trabalho | 17 |
| Figura 9: Mecanismo proposto da reação de metilação com diazometano. | 23 |
| Figura 10: Espectro de IV do material alifático de *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl.. | 25 |
| Figura 11: Espectro de RMN de $^1$H (200 MHz, $CDCl_3$) do material alifático. | 26 |
| Figura 12: Espectro de IV de **1** | 27 |
| Figura 13: Espetro de RMN de $^1$H (200 MHz, $CDCl_3$) de **1**. | 28 |
| Figura 14: Cromatograma de **1**. | 28 |
| Figura 15: Espectro de massas de **1** | 29 |
| Figura 16: RMN de $^1$H (200 MHz, $CDCl_3$) da mistura de esteróides, **2** (a, b e c) | 30 |
| Figura 17: Cromatograma da mistura dos esteróides **2** (a, b e c) | 30 |
| Figura 18a : Espetro de massas de **2 (a)** comparado com a biblioteca do aparelho. | 31 |
| Figura 18b : Espetro de massas de **2 (b)** comparado com a biblioteca do aparelho. | 32 |
| Figura 18c : Espetro de massas de **2 (c)** comparado com a biblioteca do aparelho. | 33 |
| Figura 19: Espectro de RMN de $^1$H (200 MHz, $CDCl_3$) de **3** (a, b e c). | 34 |
| Figura 20: Espetro de massas de **3** (a) comparado com a biblioteca do aparelho. | 35 |
| Figura 21: Espetro de massas de **3** (b e c) comparado com a biblioteca do aparelho | 35 |
| Figura 22: Espectro de IV de **4** | 37 |
| Figura 23: Espectro de RMN de $_1$H (500 MHz , $D_3CCOCD_3$) de **4** | 39 |
| Figura 24: Espectro de $^1$H-$^1$H-COSY - (500 MHz, $D_3CCOCD_3$) de **4**. | 40 |
| Figura 25: Espectro de $^1$H-$^1$H-NOESY - (500 MHz, $D_3CCOCD_3$) de **4.** | 41 |

| | |
|---|---|
| Figura 26: Ampliação do Espectro de $^{1}H$-$^{1}H$-NOESY - (500 MHz, $D_3CCOCD_3$) de **4.** | 42 |
| Figura 27: Ampliação do Espectro de $^{1}H$-$^{1}H$-NOESY - (500 MHz, $D_3CCOCD_3$) de **4.** | 43 |
| Figura 28: RMN de C (125 MHz, $D_3CCOCD_3$) da substância **4** | 44 |
| Figura 29: Ampliação(180-187 ppm) do Espectro de RMN de $^{13}C$ (125 MHz, $D_3CCOCD_3$) da substância **4** | 44 |
| Figura 30: Ampliação (156-166 ppm) do Espectro de RMN de $^{13}C$ (125 MHz, $D_3CCOCD_3$) da substância **4** | 45 |
| Figura 31: Espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância **4.** | 45 |
| Figura 32: Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância **4.** | 46 |
| Figura 33: Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância **4** | 46 |
| Figura 34: Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância **4.** | 47 |
| Figura 35: Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância **4.** | 47 |
| Figura 36: Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância **4** | 48 |
| Figura 37: Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância **4** | 48 |
| Figura 38: Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância **4** | 49 |
| Figura 39: Espectro de HSQC ($D_3CCOCD_3$) da substância **4** | 50 |
| Figura 40: Espectro de IV de **5.** | 51 |
| Figura 41: Espectro de RMN de $_1H$ (200MHz, $D_3CCOCD_3$) da mistura dos biflavonóides 4 e **5.** | 53 |
| Figura 42: Ampliação do espectro (6.0-8.5 ppm) de RMN de $_1H$ (200MHz, $D_3CCOCD_3$) da mistura dos biflavonóides **4 e 5.** | 53 |
| Figura 43: Espectro de RMN de $^{13}C$ (50 MHz, $D_3CCOCD_3$) da mistura dos biflavonóides **4 e 5.** | 54 |
| Figura 44: Ampliação do espectro de RMN de $^{1}H$ (500 MHz , $D_3CCOCD_3$) do derivado **4a.** | 54 |
| Figura 45: Cromatograma obtido em CLAE de **4** | 55 |
| Figura 46: Cromatograma obtido em CLAE da mistura **4 e 5.** | 55 |
| Figura 47: Espectro de RMN de $^{1}H$ (500 MHz , $D_3CCOCD_3$) do derivado **4a.** | 58 |
| Figura 48: Ampliação do espectro de RMN de $^{1}H$ (500 MHz , $D_3CCOCD_3$) do derivado **4a.** | 59 |
| Figura 49: Ampliação do espectro de RMN de $^{1}H$ (500 MHz , $D_3CCOCD_3$) do derivado **4a.**. | 59 |

| | |
|---|---|
| Figura 50: Espectro de $^{1}H$-$^{1}H$-COSY (500MHz, $D_3CCOD_3$) de **4a** | 60 |
| Figura 51: Espectro de NOESY de **4a.** | 60 |
| Figura 52: Ampliação do espectro de NOESY de **4a.** | 61 |
| Figura 53: Espetro de $^{13}C$ (125MHZ, $D_3CCOD_3$) de **4a**. | 61 |
| Figura 54: Ampliação do espectro de $^{13}C$ (125MHZ, $D_3CCOCD_3$)de **4a.** | 62 |
| Figura 55: Espectro de HMBC ($D_3COD_3$) da substância **4**. | 63 |
| Figura 56: Espectro de HSQC ($D_3COD_3$) da substância **4.** | 64 |
| Figura 57: Espectro de IV da substância **6** | 66 |
| Figura 58: RMN de $^{1}H$ da substância **6** | 68 |
| Figura 59: RMN de $^{13}C$ da substância **6** | 69 |
| Figura 60: Ampliação do RMN de $^{13}C$(125 Hz, DMSO-$d_6$) da substância **6** | 70 |
| Figura 61: CLAE da fração OSPGMC. | 71 |
| Figura 62: CLAE da fração OSPMC1-6p | 72 |
| Figura 63: RMN de $^{1}H$ (200MHz, $D_3CCOCD_3$) da fração OSPGMC | 73 |
| Figura 64: RMN de $^{1}H$ (200MHz, $D_3CCOCD_3$) da fração OSPGMC1.6p | 73 |
| Figura 65: Identificação dos valores de *m/z* para os picos detectados no CLAE-EM da fração OSPGMC | 74 |
| Figura 66: Estruturas propostas através da análise CLAE-EM na fração OSPGC. | 76 |
| Figura 67: Identificação dos valores de *m/z* para os picos detectados no CLAE-EM da fração OSPGMC1.6p | 77 |
| Figura 68: Estruturas propostas através da análise CLAE-EM na fração OSPGCM1.6p. | 79 |

# LISTA DE TABELAS


| | |
|---|---|
| Tabela 1: Ocorrência de Agatisflavonas e derivados em espécies vegetais. | 12 |
| Tabela 2: Divisões Botânicas das espécies que onde há ocorrência de agatisflavonas e derivados. | 15 |
| Tabela 3: Registro dos resultados da prospecção química do extrato metanólico de *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl. | 24 |
| Tabela 4. Dados de RMN $^{1}H$ e $^{13}C$ ($D_3CCOCD_3$,$^{1}H$ e $D_3CSOCD_3$,$^{13}C$) da substâncias 4. | 38 |
| Tabela 5. Dados de RMN $^{1}H$ (200 MHz) e $^{13}C$ (50 MHz) em Metanol-D, (AGRAWAL, 1989) da substância 5 (agatisflavona). | 52 |
| Tabela 6: Dados de RMN $^{1}H$ (200 MHz) e $^{13}C$ (50 MHz) da substância 4 (MOREIRA *et al*., 1999) com o derivado 4a. | 57 |
| Tabela 7: Dados de RMN de $^{1}H$ e $^{13}C$ da substância 6 | 67 |
| Tabela 8 – Mortalidade (%) de amostras vegetais sobre *Musca domestica* após 24 horas da aplicação. | 90 |
| Tabela 9 – Mortalidade (%) de amostras vegetais sobre *Musca domestica* após 48 horas da aplicação. | 90 |

# LISTA DE ESQUEMAS


| | |
|---|---|
| Esquema 1: Marcha para o isolamento das substâncias dos galhos de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* engl. | 21 |
| Esquema 2: Propostas de estruturas compatíveis com os valores de *m/z* detectados na análise de CLAE-EM | 75 |
| Esquema 3: Propostas de estruturas compatíveis com os valores de *m/z* detectados na análise de CLAE-EM | 78 |
| Esquema 4: Biossíntese de ácidos graxos (adaptado de DEWICK, 2002) | 80 |
| **Esquema 5: Proposta de a-oxidações em aácidos graxos (HARWOOD, 1997).** | 81 |
| Esquema 6: Proposta biogenética para os esteróides (Adaptado de MANN, 1994). | 82 |
| Esquema 7: Proposta biogenética para os terpenos lupeol e α-amirina. (Adaptado de MANN, 1994; DEWICK, 2002). | 83 |
| Esquema 8: Proposta biogenética para as flavonas (DEWICK, 2002) e biflavonas (MOREIRA, 1994) | 84 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|---|---|
| 1D | Unidimensional |
| 2D | Bidimensional |
| $\delta_H$ | Deslocamento Químico de Hidrogênio (ppm) |
| $\delta_C$ | Deslocamento Químico de Carbono (ppm) |
| ν | Estiramento |
| δ | Deslocamento químico |
| Acetona-$D_6$ | Acetona deuterada |
| CCDA | Cromatografia em Camada Delgada Analítica |
| CCF | Cromatografia em Camada Fina |
| CCP | Cromatografia em Camada Preparativa |
| CG-EM | Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| cm | Centímetro |
| COSY | COrrelation SpectroscopY |
| d | Dubleto |
| dd | Duplo Dubleto |
| DMSO-$d_6$ | Dimetilsulfóxido deuterado |
| EM | Espectrometria de Massas |
| HMBC | Heteronuclear Multiple-Bond Correlation |
| HSQC | Heteronuclear Single Quantum Coherence |
| Hz | Hertz |
| IV | Infravermelho |
| *J* | Constante de acoplamento em hertz |
| λ | comprimento de onda |
| μm | micrômetro |
| *m* | multipleto |
| $M^{+\cdot}$ | pico do íon molecular positivo |
| MHz | Mega Hertz |
| *m/z* | relação massa/carga |
| nm | nanómetro |
| OspGD | Extrato diclometano dos galhos de *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl. |
| OspGM | Extrato metanólico dos galhos de *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl. |
| NOESY | Nuclear Overhauser Experiment Spectroscopy |
| P.F. | ponto de fusão |
| ppm | parte por milhão |
| *q* | quarteto |
| RF | Fator de Retenção |
| RMN $^1H$ | Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio |
| RMN $^{13}C$ | Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 |
| *s* | singleto |
| *sl* | singleto largo |
| *t* | tripleto |
| TR | Tempo de Retenção |
| TMS | tetrametilsilano |

OBS: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

# SUMÁRIO


| | |
|---|---|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| Objetivos | 2 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1. Generalidades Sobre a Família Ochnaceae e o Gênero *Ouratea* | 3 |
| 2.2 Classificação botânica de *O. hexasperma* (St. Hill) Bail var. *hexasperma e O. hexasperma* var. *planchonii* Engl. | 9 |
| 2.3. Estudo Químico Realizado com *Ouratea hexasperma* (St. Hil.) Bail | 10 |
| 2.4. Biflavonóides | 10 |
| 2.4.1. Agatisflavona e derivados | 12 |
| 3. CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl. | 16 |
| 4. PARTE EXPERIMENTAL | 18 |
| 4.1. Equipamentos e Reagentes | 18 |
| 4.2. Material vegetal | 18 |
| 4.3. Obtenção dos extratos brutos | 19 |
| 4.4. Prospecção Química do Extrato Metanólico | 19 |
| 4.5. Isolamento e Purificação dos Constituintes dos Galhos de *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl. | 19 |
| 4.5.1. Extrato com diclorometano | 19 |
| 4.5.2. Extrato com metanol | 20 |
| 4.6. Derivação | 22 |
| 4.6.1. Metilação com diazometano | 22 |
| 5. **RESULTADOS E DISCUSSÃO** | 24 |
| 5.1. Prospecção Química do extrato metanólico | 24 |
| 5.2. Determinação Estrutural dos Constituintes Isolados de O*uratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. | 25 |
| 5.2.1. Alcanos | 25 |
| 5.2.2 Substância **1** | 27 |
| 5.2.3. Substâncias **2 (a, b e c)** | 29 |

| | |
|---|---|
| 5.2.4. Substâncias **3 (a, b e c)** | 33 |
| 5.2.5. Substância **4** | 36 |
| 5.2.6. Substância **5** | 50 |
| 5.2.7 Derivado **4a** | 56 |
| 5.2.8. Substância **6** | 65 |
| 5.3. ANÁLISE COM CLAE DAS FRAÇÕES *OSPGMC* E *OSPMC-16P*. | 71 |
| 5.4. Propostas Biossintéticas para os constituintes isolados de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. | 80 |
| 5.4.1. Ácidos graxos | 80 |
| **5.4.2. Esteróides** | 82 |
| 5.4.3. Terpenos | 83 |
| **5.4.4. Biflavonóides** | 84 |
| 5.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS | 85 |
| 5.5.1. Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Extrato Metanólico de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. | 85 |
| 5.5.2. Verificação de atividade antifúngica do Extrato Metanólico de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. | 86 |
| 5.5.3. Avaliação da Atividade Inseticida contra *Musca doméstica* | 88 |
| 5.5.4. Avaliação da toxidez do extrato metanólico em *Mus musculus.* | 90 |
| 6. CONCLUSÕES | 92 |
| 7. REFERÊNCIAS | 93 |

# 1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais vêm sendo utilizados pela humanidade como remédio desde os primórdios. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais.

O profundo conhecimento do arsenal químico da natureza, pelos povos primitivos e pelos indígenas, pode ser considerado fator fundamental para o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo. A convivência e o aprendizado com os mais diferentes grupos étnicos trouxeram valiosas contribuições para o desenvolvimento da pesquisa sobre utilização de substâncias naturais para a cura de doenças ou criar produtos em benefício do bem estar do homem. Há relatos, por exemplo, do uso de plantas com finalidades terapêuticas por volta de 3.000 a.C. na obra *Pen Ts'ao* do chinês Shen Nung (VEIGA JR. *et al,* 2005). As pesquisas na área da química de produtos naturais permitiram a descoberta de muitos modelos moleculares que fundamentaram estudos de relação estrutura-atividade (SAR) e inspiraram o desenvolvimento da síntese orgânica clássica. (VIEGAS JR. *et al,* 2006).

No início, os químicos estudavam plantas consagradas pelo uso popular, geralmente incorporadas às farmacopéias da época, limitando-se ao isolamento e à determinação estrutural de substâncias ativas (YUNES & CECHINEL FILHO, 2001). Dada a importância das plantas para a medicina da época, a Química e a Medicina passaram a ter uma estreita relação, o que permitiu um rápido desenvolvimento de seus campos específicos (YUNES & CECHINEL FILHO, 2001). Desta forma, muitas substâncias ativas foram conhecidas e introduzidas na terapêutica, permanecendo até hoje como medicamentos. Um exemplo importante do desenvolvimento dos fármacos a partir de produtos naturais de plantas foi o descobrimento dos salicilatos obtidos de *Salix alba*.

A natureza sempre despertou no homem um fascínio encantador, não só pelos recursos oferecidos para sua alimentação e manutenção, mas por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado. A busca incessante pela compreensão das leis naturais e o desafio de transpor barreiras à sua sobrevivência, como o clima e as doenças, levaram o homem ao atual estágio de desenvolvimento científico, mesmo após o avanço tecnológico observado nos dias de hoje. (VIEGAS JR *et al.* 2006).

Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase que inacreditável de diversidade em termos de estrutura, propriedades físico-químicas e biológicas (WALL & WANI, 1996). Diversos autores têm apontado a importância dos estudos químicos e farmacológicos de várias espécies vegetais pela intensa produção de metabólitos especiais, principalmente, nas espécies dos ecossistemas tropicais (BRITO & BRITO, 1993). Nesta perspectiva, a botânica, a química e a farmacologia abrangem conhecimentos indispensáveis para a utilização segura de plantas medicinais, mostrando que a busca sistemática de novos medicamentos tem sido realizada por inúmeras abordagens de estudo. Desta forma, uma abordagem interdisciplinar, na pesquisa de novos medicamentos, representa, de modo inegável, a alternativa mais eficaz e promissora para o alcance deste objetivo (Di STASI, 1996).

Nas últimas décadas o estudo de plantas medicinais evoluiu muito, principalmente, do ponto de vista químico. Esta evolução deve-se ao desenvolvimento de técnicas analíticas que corroboram para a determinação estrutural. Os produtos naturais vêm recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos (VIEGAS JR *et al.* 2006). Cerca de 25% das prescrições dispensadas nos Estados Unidos durante os últimos 25 anos estavam relacionadas a medicamentos que com princípios

ativos de origem natural ou semi-sintéticos, oriundos normalmente de plantas superiores. Além de cerca de 13% relativas a medicamentos de fontes microbianas e 2,7% de origem animal (CRAGG, et. al., 2003). Resultados de análise de novos fármacos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) e por entidades reguladoras de outros países, no período de 1981 a 2006, indicaram que os medicamentos recomendados para tratamento de doenças infecciosas atingiram 230 novos medicamentos, dos quais 5,2% eram de produtos naturais e 32,3% eram de derivados de produtos naturais (NEWMAN & CRAGG, 2007). Para o tratamento do câncer cerca de 175 novos medicamentos tem sido aprovados, dos quais 14% são de produtos naturais e 28% de derivados de produtos naturais. (NEWMAN & CRAGG, 2007).

O Brasil, com a grandeza de seu litoral, de sua flora e, sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais. A Química de Produtos Naturais (QPN) é, dentro da Química brasileira, a área mais antiga e a que, talvez, congregue o maior número de pesquisadores (PINTO *et al.,* 2002).

O grupo de pesquisa em química de produtos naturais da UFRRJ tem registrado, dentre outros trabalhos, estudos com a família Ochnaceae, principalmente com espécies do gênero *Ouratea* e *Luxemburgia,* dando valiosas contribuições para o conhecimento da química dessa família, propiciando subsídios para avaliações quimiotaxonômicas, além de apresentar substâncias com importantes atividades biológicas contribuindo para busca de novos fármacos (SUZART, *et. al*.2007).

**Objetivos**

Os objetivos do presente trabalho são:

- Isolar e identificar os principais metabólitos especiais dos galhos de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl.;
- Verificar se há semelhanças químicas entre as variedades de *Ouratea hexasperma* (*O. hexasperma* (A. St.-Hil.) Bail. var. *hexasperma* e *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl.);
- Avaliar atividades biológicas de extratos e/ou frações dos galhos de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl., como atividades antibacteriana, antifúngica, inseticida e de toxicidade;
- Preparar derivados dos constituintes isolados;
- Fazer a atribuição de dados espectrométricos das substâncias naturais isoladas e derivados;
- Utilizar CLAE-EM para identificar componentes minoritários que são difíceis de identificar pelas técnicas usuais;
- Realizar um estudo de informações relacionadas aos biflavonóides considerados como marcadores sistemáticos do gênero *Ouratea*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Generalidades Sobre a Família Ochnaceae e o Gênero *Ouratea*

A família Ochnaceae pertence à ordem Theales e compreende cerca de 28 gêneros e 400 espécies, de ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. No Brasil ocorrem aproximadamente 9 gêneros com 105 espécies (BARROSO, 1986). Essas são plantas essencialmente arbóreas ou arbustivas, raramente herbáceas (*Sauvagesia*), folhas em geral inteiras, de distribuição alterna e com estípulas. Apresentam flores amarelas, alvas ou avermelhadas. (BARROSO et. al, 2002).

A família Ochnaceae é pouco conhecida do ponto de vista químico e biológico. Estudos químicos demonstram que são capazes de biossintetizar flavonóides e biflavonóides, sendo os gêneros *Ochna, Lophira, Luxemburgia* e *Ouratea* os mais estudados. Investigações sobre a composição química de espécies do gênero *Ouratea*, levaram ao isolamento de vários biflavonóides (SIMONI *et al*., 2002). A freqüência e a diversidade estrutural dos biflavonóides em espécies desses gêneros permitem que sejam utilizados como marcadores taxonômicos (SUZART *et al.,* 2007).

O gênero *Ochna* consiste em mais de 85 espécies distribuídas por toda África (PEGNYEMB *et al*., 2003), principalmente na região de Camarões. O estudo de algumas espécies desse gênero forneceu triflavonóides: caloflavanas A e B (**figura 1**, pág. 3). (MESSANGA *et al*., 2002); biflavonóides (KAMIL *et al*., 1987): calodeninas A e B e lophironas K e C (**figura 2**, pág. 4). (MESSANGA *et al*., 1994; PEGNYEMB *et al*., 2001). Biflavonóides, isoflavona e flavona C-glicosilada foram isolados de *O*. *squarrosa*. Esta espécie é utilizada no tratamento de indigestão, complicações menstruais e contra asma (RAO & GUNASEKAR, 1989). O extrato etanólico e os biflavonóides isolados do caule de *O*. *macrocalyx* mostraram atividades citotóxicas e antibacterianas (TANG *et al*., 2003).

O gênero *Lophira* é comumente encontrado na região tropical da África, onde é conhecido pelos seus usos medicinais (GHOGOMU *et al*., 1987). As espécies mais estudadas são *L. alata* e *L. lanceolata*. Desses gêneros foram isolados flavonóides, biflavonóides e dímeros de chalconas (lophironas F, G e H) (**figura 2,** pág. 4). (TIH GHOGOMU *et al*., 1989a; TIH GHOGOMU *et al*., 1989b; TIH GHOGOMU *et al*., 1990; TIH *et al*., 1992a; TIH *et al*., 1992b; TIH *et al*., 2003).

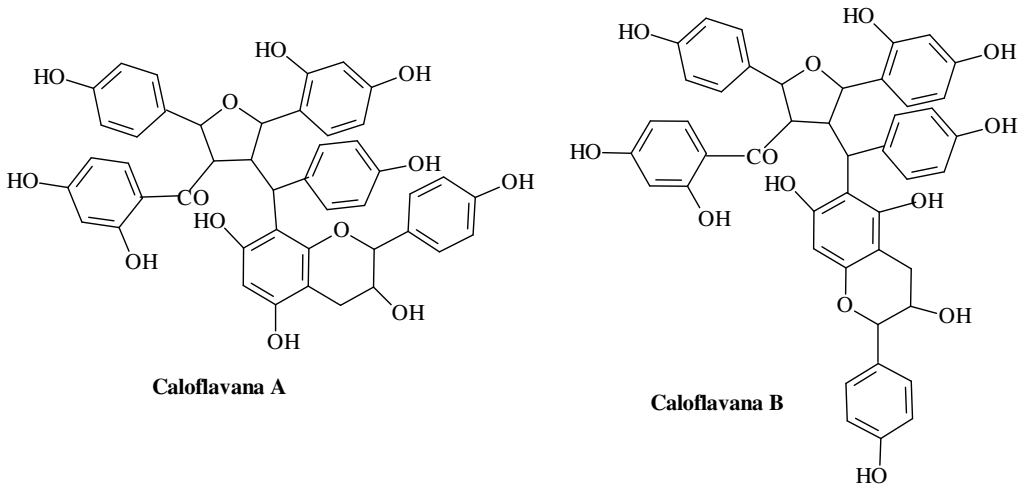



**Figura 1:** Triflavonóides isolados no Gênero *Ochna*

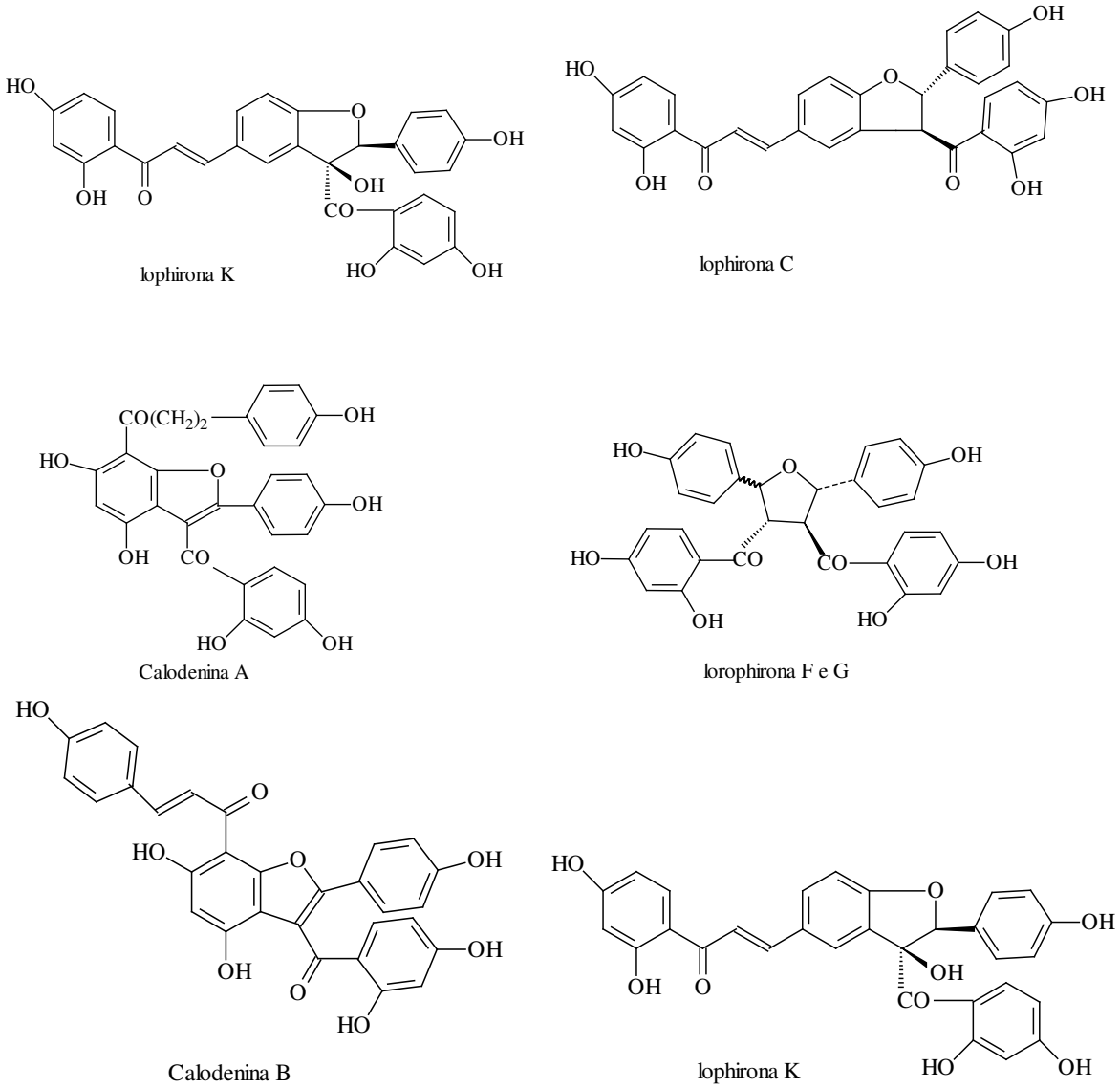



**Figura 2**: Biflavonóides e dímeros de chalconas isolados dos Gêneros *Ochna e Lophira*.

O Gênero *Luxemburgia* ocorre somente no Brasil e suas espécies são encontradas principalmente nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço, em Minas Gerais e na Bahia (FERES, 2006). Estas espécies são capazes de biossintetizar flavonóides e biflavonóides com esqueleto próximo a chalconas (OLIVEIRA *et al*., 2002; CARVALHO *et al*., 2004) e a bichalcona luxenchalcona (I-3-O-II-4") (**figura 3,** pág. 5**)** (CARVALHO *et al*., 2004). A rutina (3-*O*-rutinosídeo-quercetina) foi isolada de *Luxemburgia nobilis* (OLIVEIRA *et al*., 2002) e das flores de *Luxemburgia octandra* foram isolados dois flavonóides 8-*C*-glicosilados (**figura 3**) (ALVES *et al*., 2003).

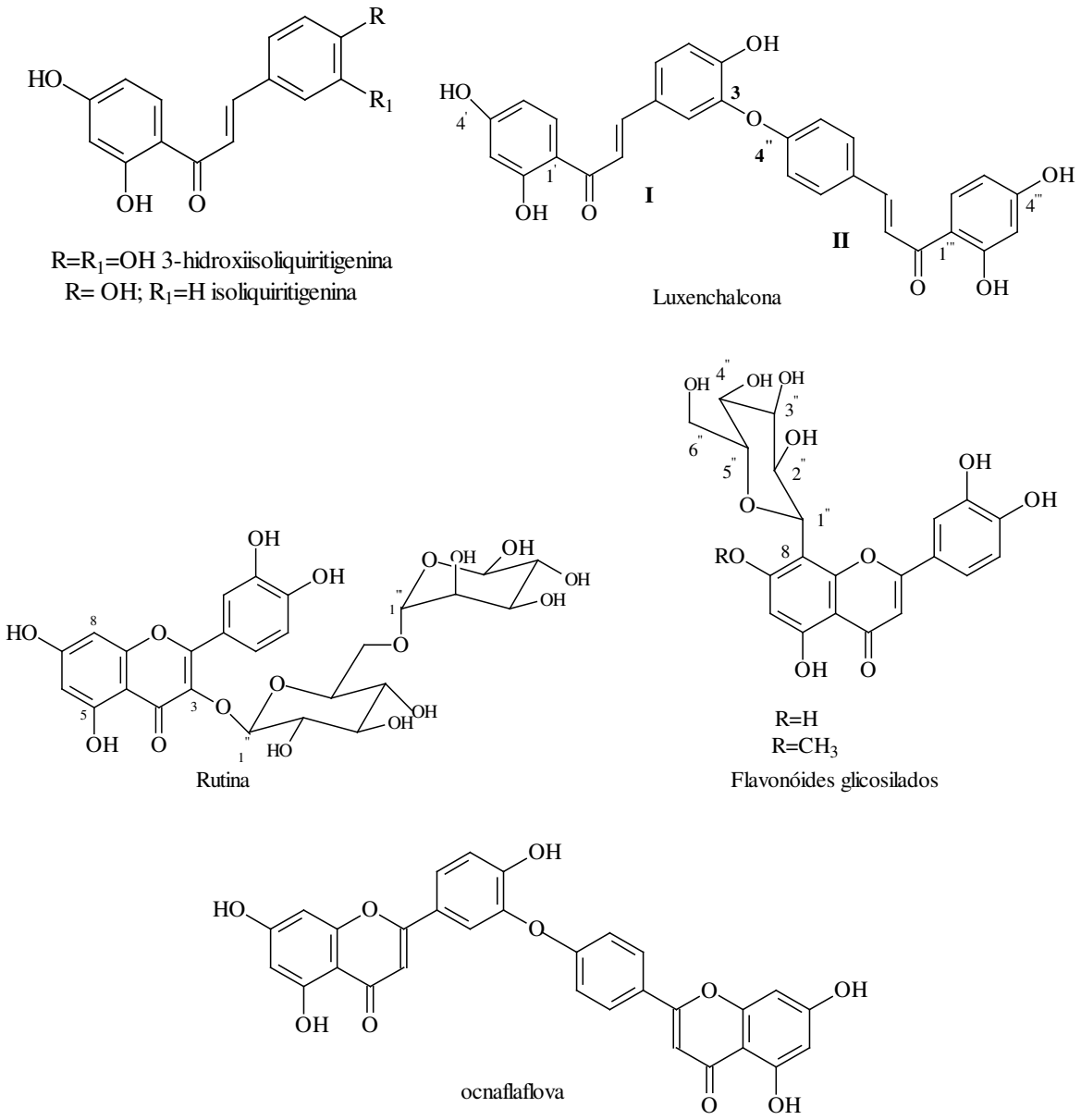



**Figura 3:** Flavonóides e chalconas isolados do gênero *Luxemburgia*

O gênero *Ouratea* ocorre em todo território Nacional, destacando-se no Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraíba, Bahia e Pernambuco. Algumas espécies do gênero *Ouratea* incluindo a *O. grandifolia,* ocorrem na Restinga da Marambaia, Corcovado e Campo Grande (Limeirão)/RJ. (BARROSO, 1986).

As espécies de *Ouratea* são caracterizadas pelas flores geralmente vistosas, freqüentemente de coloração amarela. No Nordeste as espécies de *Ouratea* são conhecidas como batiputá, as sementes de batiputá fornecem a "Manteiga de batiputá", óleo adocicado e aromático, utilizado em conservas e temperos, tornando-se rançoso com facilidade. As espécies de *Ouratea* espalhadas pelo país recebem designações específicas como Angelim

(*Ouratea vaccinoides*), Caju Bravo (*Ouratea floribunda* e *Ouratea salicifolia)* e Coração de Bugre (*Ouratea parviflora*). As *Ouratea floribunda* e *Ouratea castanaefolia* são empregadas em ornamentação urbana (SUZART *et al.,* 2007). São utilizadas na medicina popular como adstringentes, tônicas, estomáquicas, vermífugas (BRAGA, 1960), em distúrbios gástricos e reumatismo (MBING et al., 2003a) e útil na cura de paralisias, erisipela, feridas no útero e úlceras, distúrbios gástricos e na cicatrização de feridas (BARROSO, 1986).

Em estudos com espécies do gênero *Ouratea,* podemos destacar os que mostraram atividade antitumoral contra células do carcinoma Ehrlich (CARVALHO *et al*., 2002), inibição das DNA topoisomerases (GRYNBERG *et al*., 2002), efeitos antiproliferativos e ativação da apoptose em células de tumor Ehrlich (GRYNBERG *et al*., 1998). O extrato hidroetanólico e a fração acetato de etila de *Ouratea semisserrata* apresentaram efeito vasodilatador dependente do endotélio (CORTES *et al*., 2002) e atividade anti-hipertensiva, inibindo a conversão da enzima angiotensina I (ACE) (CASTRO *et al*., 2000). O extrato metanólico de *Ouratea elongata, Ouratea flava e Ouratea sulcata*, demostrou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus, S. epidermidis, Enterococcus hirae e Candida albicans* (GANGOUE-PIEBOJI et al., 2006). Também apresentou atividade antimicrobiana o óleo da fruta de *Ouratea parviflora* Baill extraído com hexano (PAULO, et al., 1986). O extrato metanólico das folhas de *Ouratea cuspidata* revelou atividade antiparasitária frente a *Leishmania braziliensis*, biopoteção contra radicais livres e ação antiinflamatória. (SUZART*,* 2007).

Estudos químicos realizados em espécies deste gênero revelaram que são bioprodutores de flavonóides, flavonóides glicosilados (SUZART *et al.,* 2007) e biflavonóides (SUZART *et al.,* 2007; CARVALHO *et al*., 2008). Na figura **4**, págs. 7 e 8, são mostradas estruturas químicas de substâncias deste gênero. De *Ouratea sp*. (MONACHE *et al*., 1967) foram isolados a protocianidina (**1**) e catequina (**2**); de *O. affinis* Engl. e *O. calantha* Gilg. (GARTLAN *et al*., 1980) foi isolado a cianidina (**3**); *de O. spectabilis* (Mart.) Engl. (FELÍCIO *et al*., 1995) foram isolados bigenkanina (**4**) e 7,7”- O-dimetilagatisflavona (**5**); de *O. multiflora Pohl* (FELÍCIO *et al*., 2001) foram isolados amentoflavona (**6**) e , 3-OH-4’,5,7-OMe-flavona-(6→8”)- 3”-OH -3’”,4’”,5”,7”-OMe flavona (**7**); de *O. semisserata* (Mart.) Engl. (VELANDIA *et al*., 2002) foram isolados 3',6,8-cloro-4’,5-OH-7-OMe isoflavona (**8**), 3',5',6,8-cloro-4’,5-OH-7-OMe isoflavona (**9**), 5,7-OH-flavona-(4’→O→8”)- 4‴,5″,7″-OH flavona (**10**), 5-OH -7- OMe-flavona-(4′→O→8″)- 4‴, 5″,7″-OH flavona (**11**), 5-OH-7-OMe-flavona-(4′→O→8″)-5″,7″-OH-4‴-OMe flavona (**12**), amentoflavona (**6**), podocarpusflavona (**13**) e rutina, (**14**); De *O. flava* Schum e Thon (MBING *et al*., 2003a) foram isolados calodenina B (**15**), flavumona A (**16**), flavumona B (**17**), calodenina C (**18**), lophirona A (**19**) e 4′,5-OMe-6,7-metilenodioxi-isoflavona (**20**); de *Ouratea hexasperma* (St. Hil.) Bail. (MOREIRA *et al*., 1994; DANIEL *et al*., 2005) foram isolados Hexaspermona A (**21**), Hexaspermona B (**22),** Hexaspermona C (**23),** 5,7,4’-OMe-isoflavona (**24**), 7″-O-metilagatisflavona (**25),** 7,7″-O-dimetillanaraflavona (**26**), agastiflavona (**27**), epicatequina (**28**), 6-C-glicopiranosil-luteolina (**29**), 3-O-glicopiranosil-quercetina (**30**), 2″-O-β-D-glicopiranosil-8-C-β-D-glicopiranosil luteolina (**31**); de *O. microdonta* (CARVALHO et al., 2008) foram isolados agatisflavona (**27**), 7”-O-metilagatisflavona (**25**) e amentoflavona (**6**). (**Figura 4**, págs. 7 e 8**)**.

Além de flavonóides e biflavonóides, ocorrem no gênero outras classes de subsâncias como norisoprenóides (VELANDIA *et al*., 1998), diterpenos (VELANDIA *et al*., 1998; FELÍCIO *et al*., 2004), triterpenos, (MBING *et al*., 2003b; CARVALHO *et al*., 2008), esteróides (CARVALHO *et al*., 2008), lignanas (VELANDIA *et al.*, 1998), hidrocarbonetos e ésteres alifáticos (MOREIRA *et al*., 1994; PAULO *et al*., 1986; ESTEVAM *et al*., 2005) além de derivado do ácido benzóico (CARVALHO *et al*., 2008). As estruturas químicas de alguns representantes desta classe são mostrados na **figura 5**, pág. 9**.**

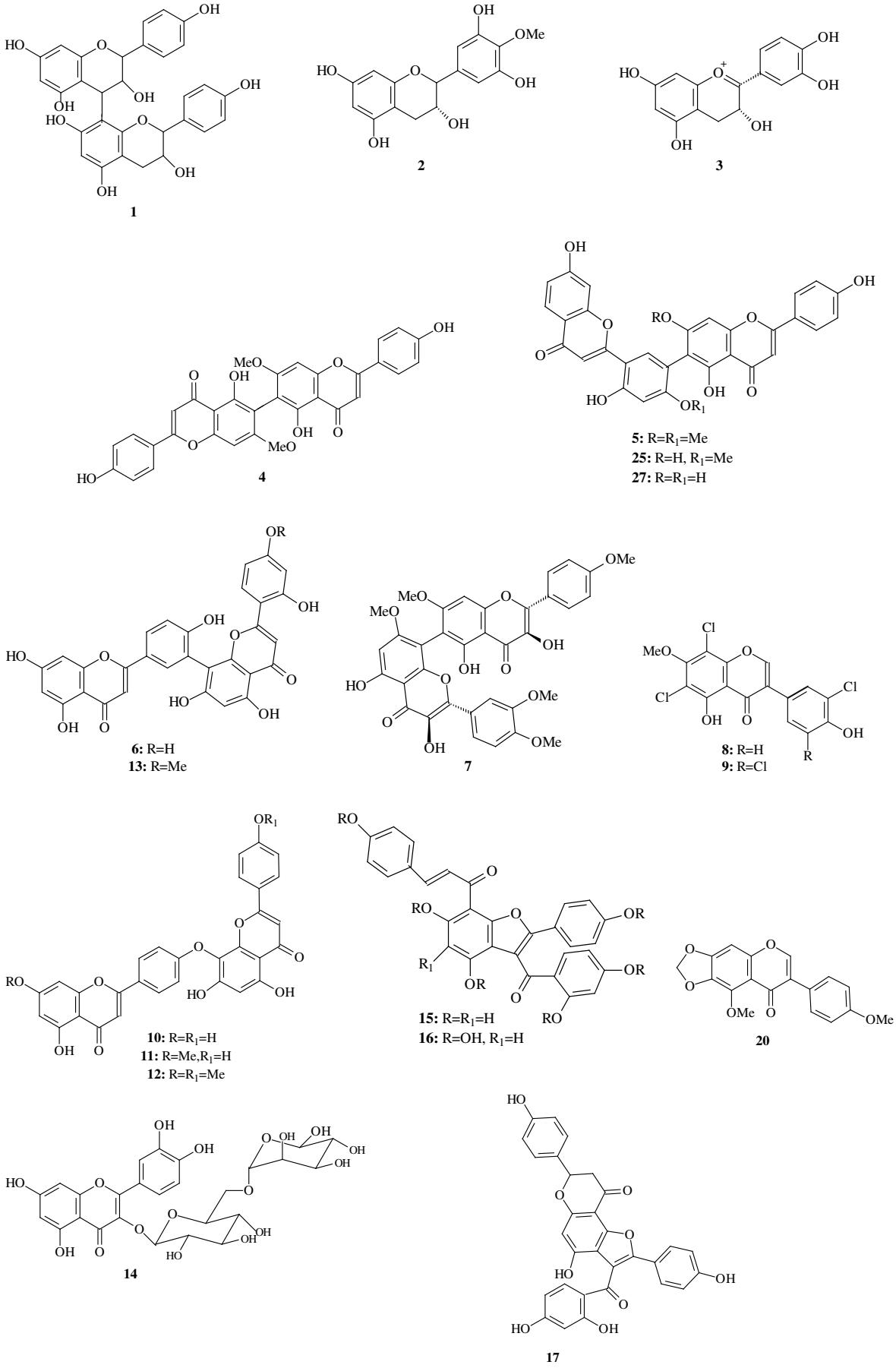
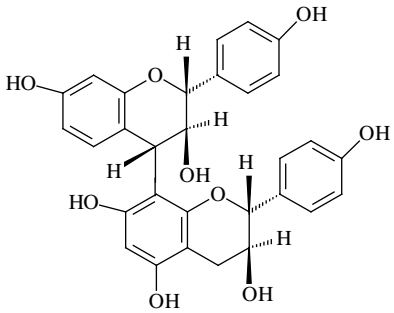
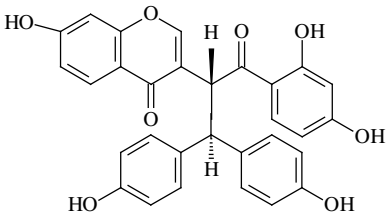


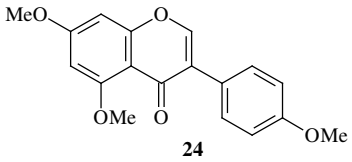

**Figura 4:** Flavonóides isolados do Gênero *Ouratea*



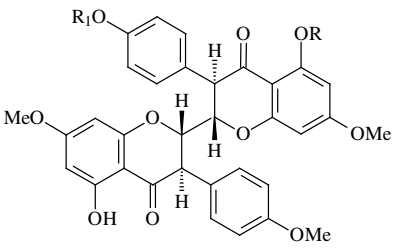
**18**



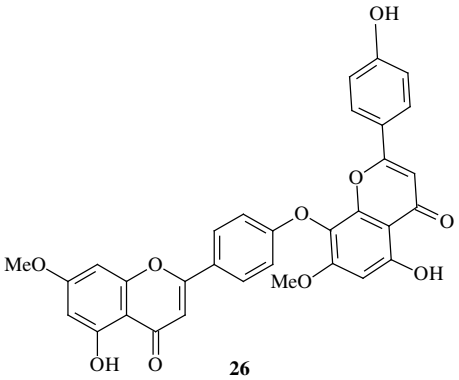
**19**



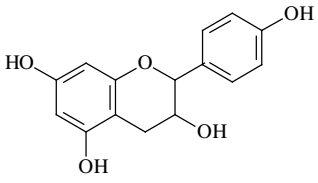
**24**



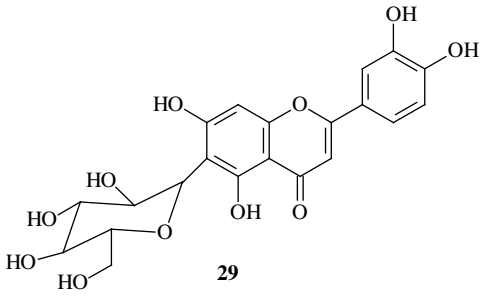
**21:** R=H, $R_1$=Me
**22:** R=Me, $R_1$=H
**23:** R=$R_1$=H



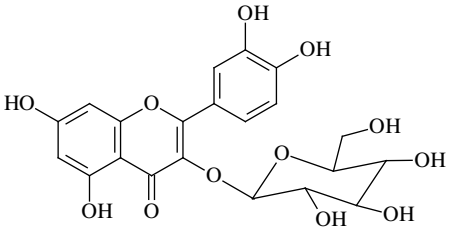
**26**



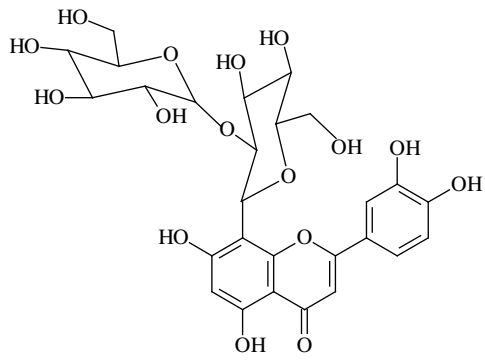
**28**



**29**



**30**



**31**

Continuação da **Figura 4:** Flavonóides isolados do Gênero *Ouratea.*

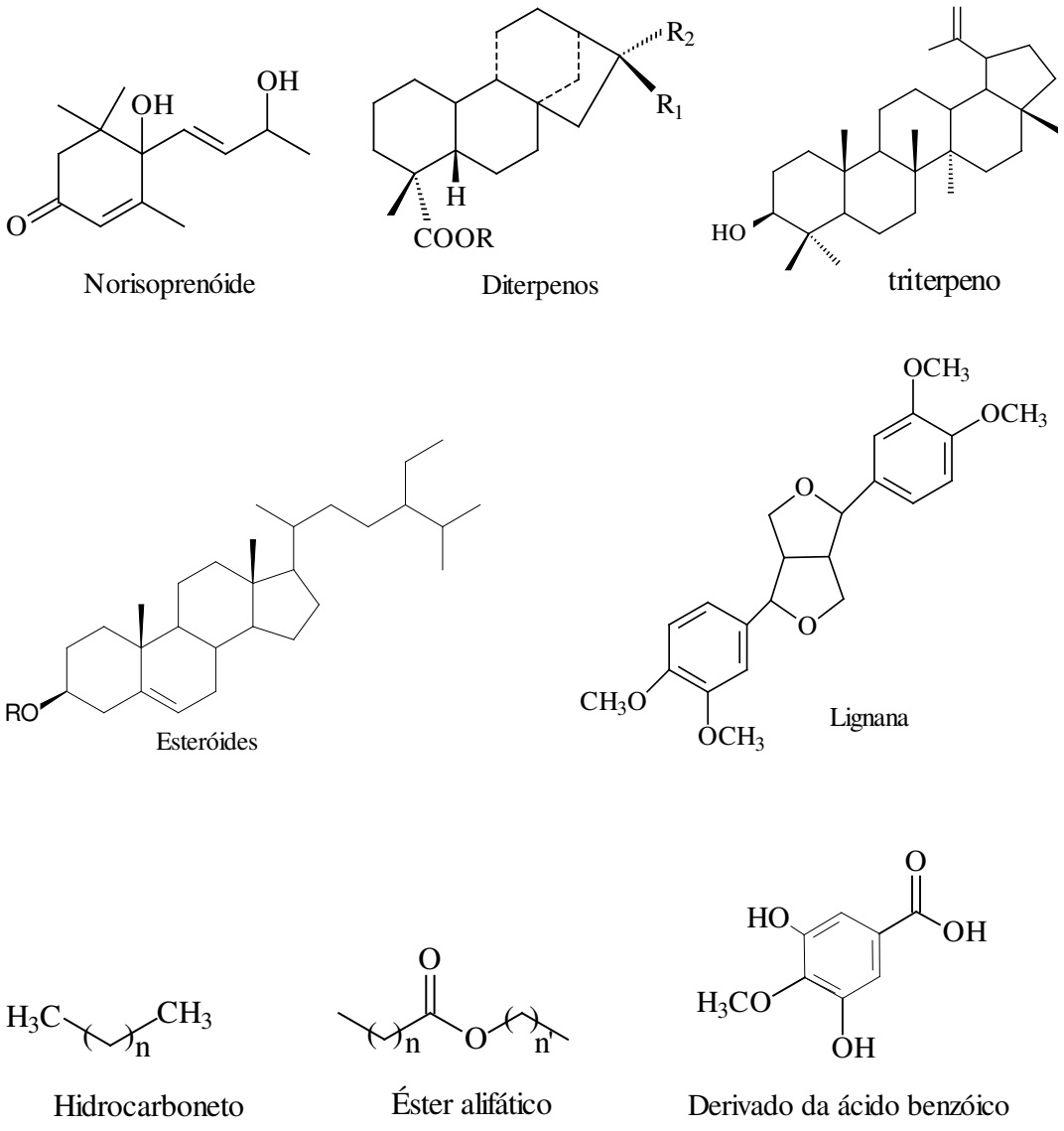



**Figura 5:** Outras classes de substâncias isoladas nos gêneros *Ouratea.*

## 2.2 Classificação botânica de *O. hexasperma* (St. Hill) Bail var. *hexasperma e O. hexasperma* var. *planchonii* Engl.

*Ouratea hexaperma* foi classificada pela primeira vez como *Ghomphia hexasperma* A. St. Hil. (Flora Brasiliae Meridionalis (quarto ed.) 1: 61. 1824), posteriormente a classificação botânica foi modificada para *Ouratea hexasperma* (A. St.-Hill.) Bail. (Histoire des Plantes 4: 366. 1873) e após verificar diferenças morfológicas dentro na prórpria espécie, classificou-se em duas variedades, a típica, *O. hexasperma* (A. St. Hill.) Bail var. *hexasperma* e uma nova variedade *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl. (Flora Brasiliensis 12(2):321. 1876).

A variedade típica (A. St.-Hill.) Bail, apresenta folhas lanceoladas, provida de acúmem de 1 cm de comprimento e a variedade *planchonii* Engl. apresenta folhas oblongas ou oblonga-ovadas, raramente acuminada aguda. (Flora Brasiliensis). (**Figura 6**, pág. 10**).**

Atualmente estas variedades foram sinonimizadas, especialistas da família não consideram as variedades e apenas a espécie *Ouratea hexasperma* (A. St.-Hill.) Bail., devido à estas pequenas diferenças morfológicas.

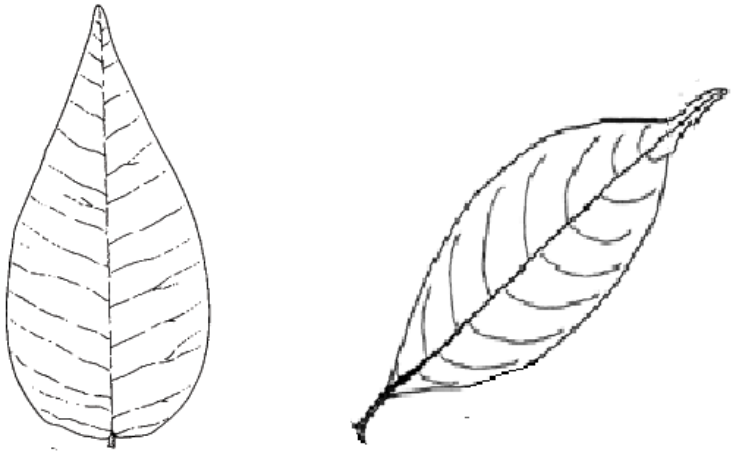



**Figura 6:** Diferenças morfológicas marcantes entre as folhas de *Ouratea hexasperma.*

### 2.3. Estudo Químico Realizado com *Ouratea hexasperma* (St. Hil.) Bail

Como citado anteriormente, estudos químicos com *Ouratea hexasperma*, coletada no cerrado da Amazônia, conduziu ao isolamento de hidrocarbonetos, de biisoflavonóides: hexaspermona A, B, C, estruturas 21, 22 e 23 da figura 4, pág. 7 e 8. e da biflavona 7'' -metilagatisflavona, estrutura 25 da figura 4, pág. 7 (MOREIRA *et al*., 1994; MOREIRA, *et al*., 1999). Das folhas, inflorescência e caule de *Ouratea hexasperma,* coletadas no Município de João Pessoa na Paraíba, foram isolados hidrocarbonetos, esteróides, saponinas, triterpenos (**figura 5,** pág. 10), flavonóides, epicatequina, biflavonóides (7,7''-*O*-dimetillanaraflavona, 7''-*O*-metilagatisflavona e Agatisflavona) além de flavonóides glicosilados, **figura 4**, pág. 8 e 9 (DANIEL, 2005; SUZART, 2007).

O grupo de pesquisa em Química de Produtos Naturais da UFRRJ tem registrado, dentre outros trabalhos, estudos de espécies do gênero *Ouratea* e *Luxemburgia* (Ochnaceae) dando valiosas contribuições para o conhecimento da química dessa família, propiciando subsídios para avaliações quimiotaxonômicas, além de apresentar substâncias com importantes atividades biológicas contribuindo para busca de novos fármacos (SUZART, *et al*. 2007).

O levantamento na literatura sobre biflavonóides presentes na família Ochnaceae e em espécies do gênero *Ouratea* permitiu tirar deduções e fazer considerações sobre essa classe de substâncias, que são freqüentes no gênero, além de detectar alguns aspectos farmacológicos.

A quantidade de resultados obtidos até o momento com estudo das espécies *Ouratea* orientou-nos a fazer um estudo de informações relacionadas aos biflavonóides comumente presentes, entre eles os mais abundantes: Agatisflavona e 7''-O-metilagatisflavona, Pode-se aferir a estes possibilidades de marcadores quimiotaxonômicos.

### 2.4. Biflavonóides

Os biflavonóides constituem uma classe de flavonóides diméricos, diferenciando-se de outros oligômeros como as proantocianidinas, devido à origem biogenética das unidades

constituintes. A maioria dos representantes dessa classe de produtos naturais é formada pelos dímeros flavona-flavona, flavona-flavanona, flavanona-flavanona além de ocorrer, mais raramente, os dímeros de chalconas e de isoflavonas. Quando as duas unidades são iguais constituem os bisflavonóides e quando as duas unidades são diferentes são os biflavonóides. As ligações entre as unidades flavonoídicas podem ser C-C ou C-O-C envolvendo os anéis A, B ou C dos monômeros (**Figura 7,** pág. 11). (SUZART *et al.,* 2007).

Segundo Suzart (2007) e colaboradores, seguindo a literatura (SIMÕES *et al*., 2001, CHARI, *et. al*., 1977, DORA, *et. al*., 1991), utiliza-se a numeração dos biflavonóides atribuindo 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**. De acordo com os átomos de carbonos envolvidos na ligação entre as unidades, os dímeros são classificados em grupos de biflavonóides (**figura 7,** pág. 13**)**, além dos dímeros de chalconas: C-3→O-C-4‴ (luxenchalconas), **figura 3**, pág. 5 (CARVALHO *et al*., 2004) e C-3′→C3″ (brackeninas), **figura 7,** pág. 11 (DREWES, *et al*., 1984) e dos dímeros de isoflavonas C-2→C-2″ (hexaspermonas), estruturas 21, 22 e 23 da **figura 4**, pág. 7 e 8 (MOREIRA *et al*.,1994), sem destacar os dímeros com duas ligações entre as unidades. A ligação tipo C-O-C é característica das ochnaflavonas (C-3′→O-C-4‴), **figura 3,** pág. 5 e das lanaraflavonas (C-4′-O→C-8″), **figura 7,** pág. 11. Alguns dos grupos hidroxila podem apresentar-se metilados originando os respectivos éteres metílicos que, às vezes, recebem nomes especiais (MOREIRA, *et. al*., 1999; FELICIO *et al*., 1995; VELANDIA *et al*., 2002; DANIEL *et al*., 2005

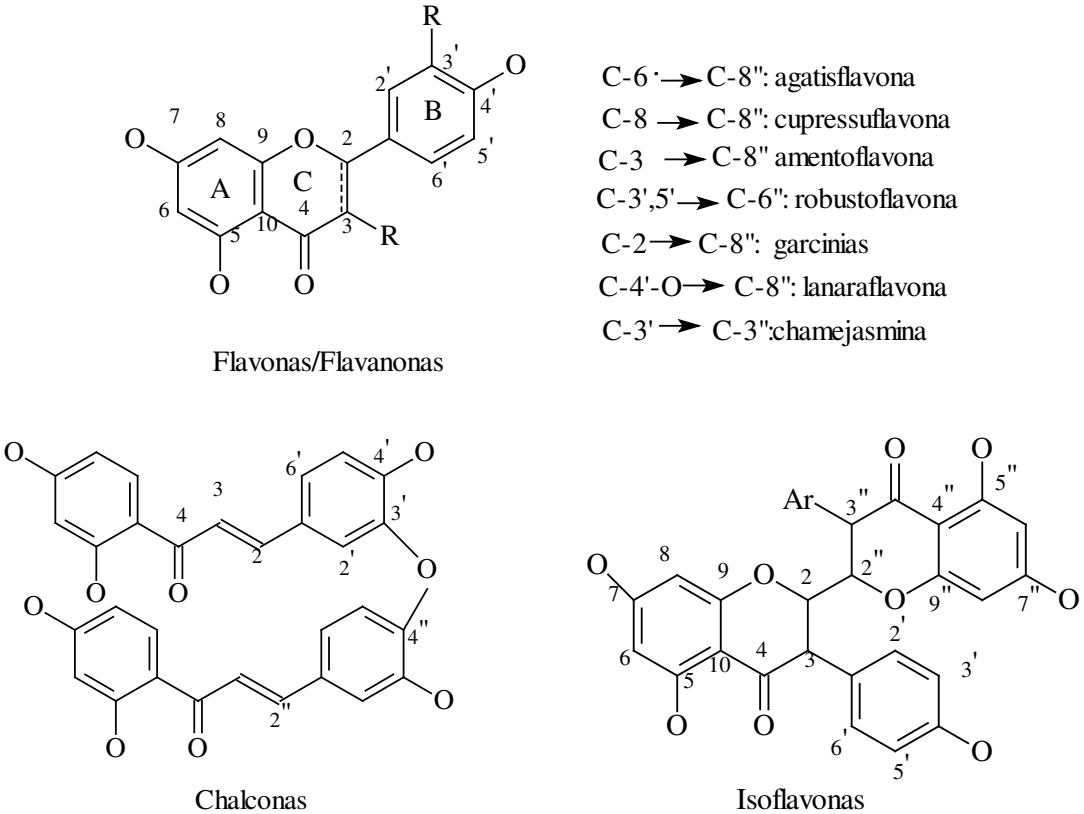



Figura 7: Dímeros de flavonóides

Uma característica marcante dos metabólitos isolados do gênero *Ouratea* é a ligação entre seus monômeros, sendo as mais abundantes C-3→C-8'' e C-6→C-8'', acrescentando uma variação no padrão de metilação. No caso dos derivados da agatisflavona (C-6→C-8''), estruturas 25 e 27 da **figura 4**, págs. 7 e 8, a metilação é mais freqüente na posição 7", sendo esta a biflavona mais abundante no gênero *Ouratea*. Em 1929 foi isolada a primeira biflavona, a gingentina, do Ginkgo Biloba (LIN *et al.*, 1997). A partir desse isolamento muitos biflavonóides foram isolados de plantas e várias atividades biológicas têm sido relacionadas a essa classe de substâncias (LIN *et a.,l* 1999).

Os biflavonóides são geralmente encontrados em grande quantidade em diferentes plantas e muitos tecidos vegetais. Apresentam várias propriedades, como proteção contra raios ultravioleta nas folhas, antifúngico e alimento para insetos (SIMÕES *et al*., 2001). As atividades farmacológicas conhecidas são: Estimulantes cardíacos, antivirais, antimicrobianas, antiinflamatórias e anti-hepatotóxicas (SIMÕES *et al*., 2001, LIN *et al*., 1999). Em estudos de atividades biológicas, os biflavonóides isolados de *O. spectabilis*, *O. multiflora* e *O. parviflora* mostraram inibição da produção de aflatoxina por *Aspergillus flavus* (GONÇALEZ *et al*., 2001), Os biflavonóides isolados das partes aéreas de *Ouratea sulcata* exibiram significante atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Bacillus subtilis, Escherichia coli, Listonella anguillarum, Staphylococcus aureus* (PEGNYEMB et al., 2005) Os dímeros de flavonas das folhas de *O. multiflora* mostraram atividade contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis.* **(**CARBONEZI et al., 2007)**,** os biflavonóides isolados de *O. spectabilis* inibiram a enzima aldose redutase (FELICIO *et al*., 1995), além de atividade antitumoral detectadas para os biflavonóides isolados de *O. hexasperma* (St.Hil.) Bail (DANIEL *et al.* 2007).

### 2.4.1. Agatisflavona e derivados

Fazendo uma avaliação sobre os flavonóides que são mais freqüentes em espécies de *Ouratea* percebeu-se que a agatisflavona e principalmente, seu derivado 7"-metil éter são os mais freqüentes. Resolvemos fazer um levantamento para verificar a ocorrência destes flavonóides em outras famílias, através deste levantamento observou-se que estas substâncias também ocorrem em outras famílias vegetais, como apresentado na tabela **1.**

**Tabela 1:** Ocorrência de Agatisflavonas e derivados em espécies vegetais.

| BIFLAVONOIDES | ESPÉCIES | FAMÍLIAS | REFERÊNCIAS |
|---|---|---|---|
| 4"',7-O-dimetilagatisflavona; 7-O-metilagatisflavona | *Agathis alba* | Araucariaceae (conífera) | MASHIMA et al.,1970 |
| 4"',7-O-dimetilagatisflavona; 7-O-metilagatisflavona; 7,7"-O-dimetilagatisflavona | *Araucaria bidwillii* and *Agathis alba* | Araucariaceae | KHAN et al., 1972 |
| 7-O-metilagatisflavona | *Araucaria rulei* | Araucariaceae | ILYAS et al., 1977 |
| 7,7"-O-dimetilagatisflavona 7-O-metilagatisflavona | *Agathis australis* | Araucariaceae | OFMAN et al., 1995 |
| 7-O-metilagathisflavona | *Araucaria araucana* | Araucariaceae | PARVEEN et al., 1987 |
| Agatisflavona 7,7"-O-dimetilagatisflavona 7-O-metilagatisflavona | *Araucaria angustifolia* *Araucaria genus* | Araucariaceae | ILYAS et al., 1994 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Agatisflavona | *Rhus succedanea e Garcinia multiflora* | Araucariaceae | LIN et al., 1997 |
| Agatisflavona | *Rhus succedanea* | Anacardiaceae | CHEN, 1973 |
| Agatisflavona | *Rhus succedanea* | Anacardiaceae | LIN et al., 1974 |
| Agatisflavona | *Rhus punjabensis* | Anacardiaceae | KAMIL et al., 1984 |
| Agatisflavona | *Rhus semialata* | Anacardiaceae | BAGCHI et al., 1985 |
| Agatisflavona | *Picea morinda Linn* | Anacardiaceae | AZAM et al., 1985 |
| Agatisflavona | *Rhus semialata Murr* | Anacardiaceae | PARVEEN et al., 1988 |
| Agatisflavona | *Amphipterygium amplifolium; Orthopterygium huaucui* | Anacardiaceae | WANNAN et al., 1988 |
| Agatisflavona | *Rhus coriaria* | Anacardiaceae | VAN LOO et al., 1988 |
| Agatisflavona | *Anacardium occidentale* | Anacardiaceae | ARYA et al., 1989 |
| Agatisflavona | *Schinus terebenthefolus* | Anacardiaceae | KASSEM et al., 2004 |
| Agatisflavona | *Rhus pyroides, Rhus dentata and Rhus pentheri* | Anacardiaceae | SVENNINGSEN et al., 2006 |
| Agatisflavona | *Canarium manii* | Burseraceae | ANAND et al., 1992 |
| Agatisflavona | *Juniperus virginiana* | Cupressaceae (coníferas) | ROY et al., 1984 |
| Agatisflavona | *Garcinia xanthochymus* | Clusiaceae | PARVEEN et al., 1994 |
| Agatisflavona | *Bauhinia vahlii Linn* | Leguninoceae | SULTANA et. al, 1985 |
| Agatisflavona | *Caesalpinia pyramidalis* | Leguminosae Fabaceae | MENDES et al., 2000 |
| Agatisflavona | Caesalpinia pyramidalis | Leguminosae Fabaceae | BAHIA et al., 2005 |
| 7,7"-O-dimetilagatisflavona | *Ouratea spectabilis* | Ochnaceae | FELÍCIO et al. 1995 |
| 7"-O-metilagatisflavona | *Ouratea hexasperma* | Ochnaceae | MOREIRA et al., 1999 |
| 7,7"-O-dimetilagatisflavona | *Ouratea parviflora* | Ochnaceae | FELÍCIO et al., 2004 |
| Agatisflavona 7"-O-metilagatisflavona | *Ouratea hexasperma* | Ochnaceae | DANIEL et al., 2005 |
| Agatisflavona | *Ouratea sulcata* | Ochnaceae | PEGNYEMB et al., 2005 |
| Agatisflavona | *Ouratea nigroviolacea* | Ochnaceae | NGO MBING et al., 2006 |
| Agatisflavona | *Ouratea staudtii* | Ochnaceae | ZINTCHEM et al., 2007 |
| Agatisflavona; 7"-O-metilagatisflavona | *Ouratea microdonta* | Ochnaceae | CARVALHO, et al, 2008* |

Através da observação da **tabela 1** vemos que os biflavonóides Agatisflavona e derivados ocorrem em diferentes espécies de diferentes famílias, gêneros e espécies vegetais. Para verificar a ligação taxionômica desses gêneros com a ocorrência desses biflavonóides foi realizada uma avaliação através da divisão botânica da possível ligação entre as espécies onde foram encontradas essas substâncias. Na **tabela 2,** pág. 15, observam-se os dados de divisão, ordem, classe, família de cada espécie que foi isolado os biflavonóides Agatisflavona e derivados.

A partir desses dados observa-se que há relação entre algumas espécies, como as espécies da família Araucariaceae e Cupressaceae, que pertencem à mesma ordem, classe e divisão botânica. As famílias Anacardiaceae, Burseraceae, Leguminosae, Clusiaceae e Ochnaceae pertencem a ordens botânicas diferentes, mas pertencem a mesmas classes e divisões botânicas.

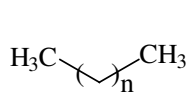
Nas famílias Araucariaceae e Ochnaceae encontram-se a maior variedade de derivados da agatisflavona, sendo que somente no gênero Ochnaceae, mas especificamente nas espécies de *Ouratea* que foi encontrado o biflavonóide 7"-*O*-metilagatisflavona. Isso demonstra que essa substância é um marcador quiotaxinômico da espécie *Ouratea*.

**Tabela 2:** Divisões Botânicas das espécies que onde há ocorrência de Agatisflavonas e derivados.

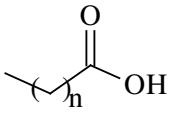
| DIVISÃO | CLASSE | ORDEM | FAMÍLIA | ESPÉCIE | BIFLAVONÓIDE |
|---|---|---|---|---|---|
| Pinophyta | Pinopsida | Pinales | Araucariaceae (coníferas) | *A. alba;*<br>*A. bidwillii;*<br>*A. rulei;*<br>*A. australis;*<br>*A. araucana;*<br>*A. angustifólia;* | 4”’,7-O-dimetillagatisflavona<br><br>7-O-metilagatisflavona<br><br>7,7"-O-dimetilagatisflavona<br><br>Agatisflavona |
| Pinophyta | Pinopsida | Pinales | Cupressaceae (coníferas) | *J. virginiana* | Agatisflavona |
| Magnoliophyta | Magnoliopsida | Sapindales | Anacardiaceae | *R. succedanea;*<br>*R. punjabensis;*<br>*R. semialata;*<br>*P. morinda Linn;*<br>*R. semialata Murr;*<br>*A. amplifolium;*<br>*O. huaucui;*<br>*R. coriaria;*<br>*A. occidentale;*<br>*S.terebenthefolus;*<br>*R. pyroides;*<br>*R. entata;*<br>*R. pentheri* | Agatisflavona |
| Magnoliophyta | Magnoliopsida | Sapindales | Burseraceae | *C. manii* | Agatisflavona |
| Magnoliophyta | Magnoliopsida | Fabales | Leguminosae Fabaceae | *B. vahlii Linn;*<br>*C. pyramidalis* | Agatisflavona |
| Magnoliophyta | Magnoliopsida | Malphiales | Clusiaceae | *G. xanthochymus* | Agatisflavona |
| Magnoliophyta | Magnoliopsida | Malphiales | Ochnaceae | *O. spectabilis;*<br>*O. hexasperma;*<br>*O. parviflora;*<br>*O. sulcata;*<br>*O. nigroviolacea;*<br>*O. staudtii;*<br>*O. microdonta* | 7,7"-O-dimetilagatisflavona<br><br>7"-O-metilagatisflavona<br><br>Agatisflavona |

## 3. CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl.

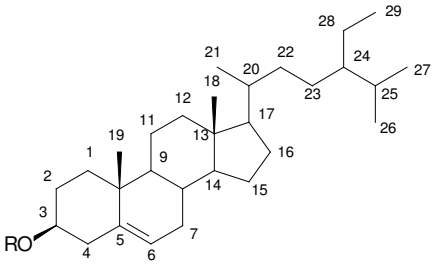
No presente trabalho, *O. hexasperma* (var. *planchonii* Engl.) foi submetida a estudo fitoquímico para verificar a presença de marcadores taxonômicos e servir como argumento adicional para localização da mesma na espécie. Com esse estudo, foram isolados compostos alifáticos; ácido alifático (**1**); uma mistura de esteróides: sitoesterol (**2a**), estigmasterol (**2b**) e campesterol (**2c**); os triterpenos lupeol (**3a**) e α-amirina (**3b**) e β-amirina (**3c**); os biflavonóides 7”-O-metilagatisflavona (**4**) e agatisflavona (**5**) e sitosterol-3-O-β-D-glicopiranosideo (**6**). **Figura 8,** pág. 17.



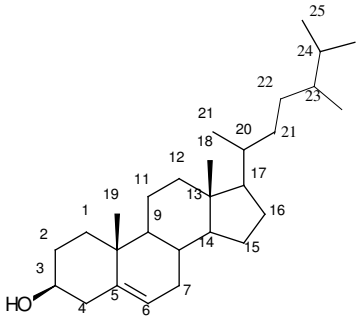
Compostos alifáticos



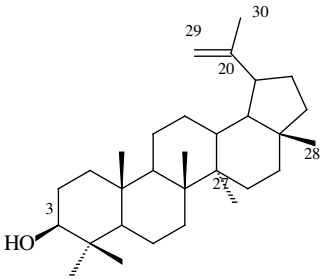
**1**



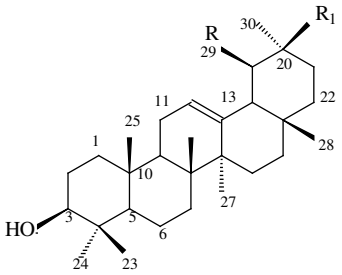
**2a:** 22,23-diidro
**2b:** Δ 22,23



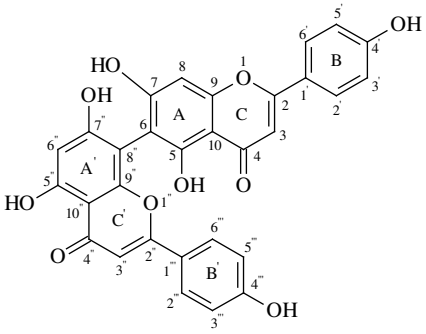
**2c**



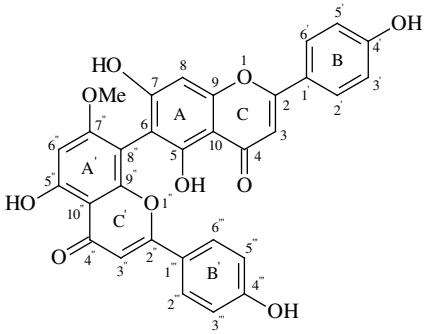
**3a**



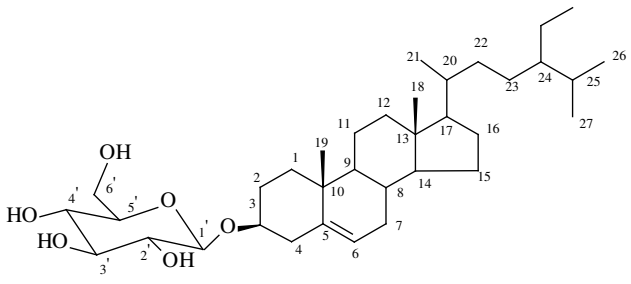
(**3b**) R = $CH_3$, $R_1$ = H
(**3c**) R = H, $R_1$ = $CH_3$



**5**



**4**



**6**

**Figura 8:** Constituintes químicos isolados neste trabalho (*O. hexasperma* var. *planchonii* Engl.)

# 4. PARTE EXPERIMENTAL

## 4.1. Equipamentos e Reagentes

Os pontos de fusão foram determinados em placa de aquecimento MEL-TEMP II, Laboratory Devices USA, utilizando capilar, sem correção dos valores obtidos. Os espectros de infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin-Elmer 1600/1605 FT-IR em pastilha de KBr. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de $^{1}H$ e $^{13}C$ (incluindo experimentos em 2D), foram registrados em espectrômetros Bruker AC-200 Advance ($^{1}H$: 200 e $^{13}C$: 50,3 MHz) e Bruker DRX-500 ($^{1}H$: 500 MHz e $^{13}C$: 125 MHz). Como padrão interno foi usado tetrametilsilano ou resíduo do solvente $CHCl_3$ ($\delta_H$ 7.24) e o pico central do tripleto em $\delta_C$ 77.00 do $CDCl_3$. Os espectros de massas foram registrados em cromatógrafo com fase gasosa acoplado a espectrômetro de massas de analisador de íons quadrupolo e ionização por impacto de elétrons, 70 eV; marca Varian Saturn 2000 da UFRRJ. As análises com CLAE foram realizadas com aparelho Shimadzu bomba modelo 10AS Shimadzu 10AD/10AS com detector UV-Vis 10AD, injetor manual Rhoodune 1175 com loop de 20μL, integrador 6 CR, com coluna de fase reversa C18 (250mm x 4,6 mm x 5μm) Betasil, utilizando um sistema isocrático de metanol/$H_2O$/acetonitrila/ácido acético (20:40:39:1) em duas bombas, na bomba A foi adicionada a fase orgânica ($CH_3OH$/ $CH_3CN$) e na Bomba B a fase aquosa ($H_2O$/ácido acético). A fase móvel foi ajustada para A 62% e B 38% e velocidade de fluxo 1mL.min$^{-1}$, os extratos foram monitorados a 270 nm. As análises em CLAE acoplado a espectômetro de massas foram feitas com o aparelho LCMS-IT_TOF Shimadzu, foram usados quatro solventes e duas bombas A (metanol/acetonitrila, 20:34) e B (água/ácido acético, 10:1), com sistema gradiente.

As cromatografias em coluna foram realizadas tendo como suporte gel de sílica (230-400 e 70-230 mesh, Vetec) e Sephadex LH-20 (Sigma, USA). A cromatografia em camada preparativa (CCP) foi feita em placas de gel de sílica 60 $PF_{254}$, Merck e Vetec, sobre suporte de vidro e espessura de 1mm.

As substâncias foram detectadas por irradiação na região do ultravioleta (254 e 366 nm). Foram usadas placas em folha de alumínio de gel de sílica 60 $PF_{254}$ Merck para cromatografia em camada fina (CCF) e como reveladores foram utilizados, detecção por irradiação ultravioleta (254 e 366 nm), e/ou reagentes cromogênicos:

- Dragendorff (solução de nitrato básico de bismuto II em ácido acético diluído com iodeto de potássio), reagente para alcalóides (MATOS, 1997).
- Liebermann Burchard (20mL de anidrido acético e 20 mL de ácido sulfúrico diluídos em 200 mL de etanol, em banho de gelo), seguido de aquecimento, reagente para terpenos e esteróides (MATOS, 1997).
- Soluções de $AlCl_3$-EtOH (1%), seguido de aquecimento, reagente para flavonóides. (VENNAT, B. et al, 1992).
- Godin A: Solução I: vanilina etanólica 1%
  Solução II: ácido perclorico 3%
  Godin B: Acido sulfúrico10 % v/v
  Misturar as soluções I e II em partes iguais e borrifar sobre a placa cromatográfica, revelar com Godin B e colocar em estufa. Para identificação de esteróides, triterpenos e flavonóides. (MARTINS, 2006).
- Vapores de iodo revelam a maioria das substâncias orgânicas.

## 4.2. Material vegetal

O material vegetal, galhos de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl., (Ochnaceae), coletado na época de frutificação, em área de restinga, no município de Conde, praia de Jacunã, em área de restinga e identificados pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra.

Uma excicata desta espécie (Nº6747) está depositada no herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

### 4.3. Obtenção dos extratos brutos

O material foi seco à temperatura ambiente, logo após a coleta e moídas em moinho de facas. O pó dos galhos de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. (1900g) foi submetido à extração através de maceração contínua com diclorometano e metanol. Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório a 40°C sob pressão reduzida e, após o uso de ar quente para retirar o resíduo de solventes, obtiveram-se os extratos de diclorometano (OspGD, 206,5 g) e o extrato metanólico (OspGM, 190,0 g).

### 4.4. Prospecção Química do Extrato Metanólico

Do extrato metanólico, aproximadamente 1,0 g, fez-se prospecção química que permitiu o conhecimento preliminar das principais classes de substâncias naturais presentes. Esta avaliação é freqüentemente usada para direcionar trabalhos posteriores de fracionamento e isolamento das substâncias (MATOS, 1988). Esta abordagem foi elaborada com testes para detectar os metabólitos especiais dos galhos da espécie, conforme metodologias descritas na literatura. As classes de substâncias avaliadas: alcalóides, saponinas, esteróides e triterpenóides, depsídio e depsidonas, flavonóides, catequinas, quinonas, sesquiterpenos e outras lactonas, carotenóides e xantofilas, glicosídios cardíacos, açúcares redutores, sacarídios, ácidos orgânicos e taninos.

### 4.5. Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos dos Extratos de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl.

#### 4.5.1. Extrato com diclorometano:

O extrato **OspGD** foi filtrado em funil de separação de gel de sílica usando hexano, clorofórmio e metanol e obtiveram-se as frações: hexano (**OspGDH**, 11,06g); Clorofórmio (**OspGDC**, 5,43g) e metanol (**OspGDM**, 116,9g).

A partição em hexano (**OspGDH)**, foi cromatografada em coluna de gel de sílica, usando eluentes diclorometano, diclorometano : metanol, aumentando gradativamente a polaridade até 100% de metanol, fornecendo 15 frações, que através da análise dos dados espetrométricos foram identificadas como uma mistura de alcanos alifáticos, ácido alifático, (**substância 1,** 57 mg) e uma mistura de esteóides (sitoesterol, estigmasterol e campesterol), que foi denominada **substância 2 (a, b e c,** PF.: 120-122ºC, 84 mg**)**.

A partição clorofórmio (**OspGDC**) foi cromatografada em coluna de gel de sílica, usando eluentes diclorometano **OspGDCD** (26 frações), acetato de etila **OspGDCA** (11 frações) e metanol **OspGDCM** (26 frações), que forneceram uma mistura de alcanos alifáticos e álcoois alifáticos, o triterpeno lupeol (**substância 3,** PF.: 179-180ºC, 50 mg) e a mistura de esteróides sitoesterol, estigmasterol.

A fração obtida com metanol (**OspGDM,** 95g), foi fracionada através de cromatografia em coluna de sílica gel utilizando os eluentes clorofórmio e metanol 9:1 e aumentando gradativamente a polaridade. As frações 5-7 forneceram um material amarelo de ponto de fusão 226/228ºC , solúvel em acetona, que após análise dos dados espectrométricos foi identificado como o biflavonóide 7''-O-metilagatisflavona (**substância 4,** PF.: 226-228ºC, 74 mg).

Os procedimentos relatados acima estão representados no **Esquema 1,** pág. 21.

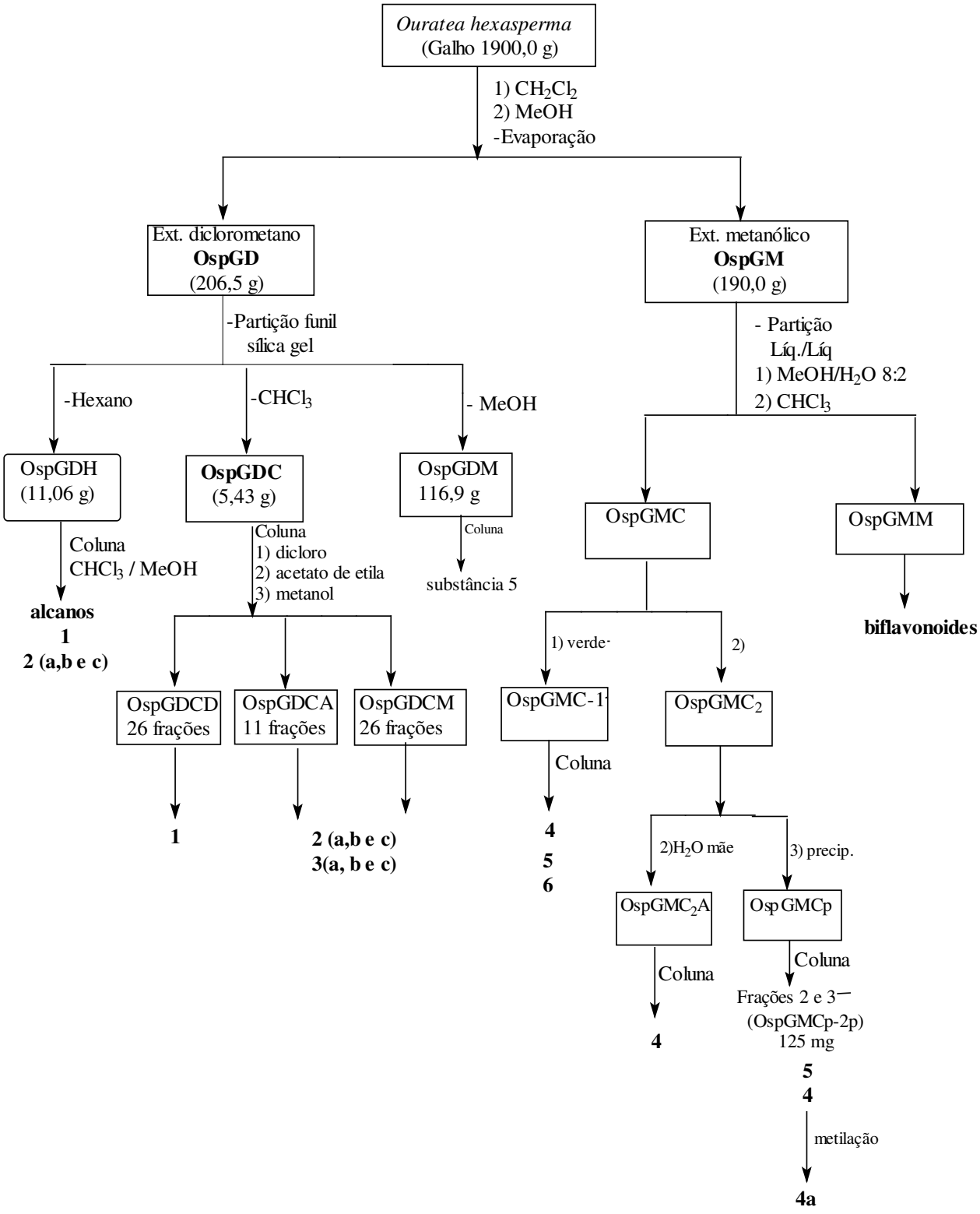
**4.5.2. Extrato com metanol:**

O extrato metanólico (**OspGM**, 160,0g) foi submetido à partição com metanol:água (8:2) e clorofórmio, no qual o extrato foi diluído em metanol/água 8:2 e extraído com clorofórmio, obtendo-se as partições clorofórmio (**OspGMC**, 67,0 g) e metanol (**OspGMM**, 58,8 g). A partição clorofórmio foi dividida em duas frações, a primeira de cor esverdeada (**OspGMC1,** 23,2 g) e outra de cor marrom (**OspGMC2,** 22,0 g), da segunda fração retirou-se um precipitado (**OspGMC2p,** 20,8 g**),** o qual uma parte (18,0g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel com a mistura diclorometano/metanol com aumento gradual de polaridade até metanol 100%. Foram coletadas 20 frações, as frações 2-4 foram recristalizadas em metanol e forneceram um material amarelo que, apresentava 2 manchas em cromatografia de camada fina (CCF) com o eluente $CH_2Cl_2/CH_3OH$, 8:2. Após análise dos dados espectrométricos, e comparação em cromatografia de camada fina com os padrões 7''-O-metilagatisflavona e agatisflavona, usando os eluentes $CH_2Cl_2/CH_3OH$, 8:2; $CHCl_3/CH_3COCH_3$, 7:3 e AcOEt/$CH_3OH$, 9,5:0,5, foram identificados como os biflavonóides, em mistura, **4** (7''-O-metilagatisflavona), e **5 (**agatisflavona), 103 mg, solúveis em acetona.

A mistura dos biflavonóides **4** e **5** foi metilado com diazometano (40,0 mg). Após a metilação foi feita a purificação do produto através de cromatrografia em camada preparativa($CHCl_3/CH_3COCH_3$, 7:3), fornecendo o derivado permetilado **4a** (28,0 mg).

A fração (**OspGMC1,** 20,0g) foi cromatografada em coluna de sílica gel com a mistura diclorometano/metanol com aumento gradual de polaridade até metanol 100%. Sendo coletadas 30 frações. As frações 5 e 6 forneceram um material amarelo, que após a purificação e análises dos dados do RMN de hidrogênio e carbono-13, concluiu-se que também é a 7''-*O*-metilagatisflavona (32,0 mg) e a fração 17, que foi recristalizada em metanol forneceu um material (9,0 mg) insolúvel em acetona e metanol, e através das análises dos dados do RMN de hidrogênio e carbono, verificou-se que que a fração contém o sitosterol glicosilado (**6**).

Os procedimentos relatados acima também estão representados no **Esquema 1,** pág. 21.




Esquema 1: Fluxograma da marcha para o isolamento das substâncias dos galhos de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl.

### 4.6. Derivação

A preparação do derivado metilado da agatisflavona serviu para facilitar a análise dos dados espectrométricos, devido ao aumento da solubilidade em clorofórmio e, fazer análises com algumas técnicas especiais de RMN.

#### 4.6.1. Metilação com diazometano

A solução de diazometano foi preparada de acordo com a metodologia experimental descrita na literatura (VOGEL, 1989 e CARVALHO *et al.* 2006). A mistura das substâncias (agatisflavona e 7”-O-metilagatisflavona) foi completamente dissolvida em MeOH, adicionou-se a solução etérea do diazometano em excesso, observando desprendimento gasoso, a solução foi deixada em repouso para a evaporação natural dos solventes. A ocorrência da reação foi monitorada através de comparações em CCF com as substâncias puras, após repetições do procedimento de adição da solução de Diazometano, realizou-se cromatografia em camada preparativa, fornecendo a substância metilada. A **figura 9**, pág. 23 apresenta um esquema da reação e o mecanismo proposto para a mesma.

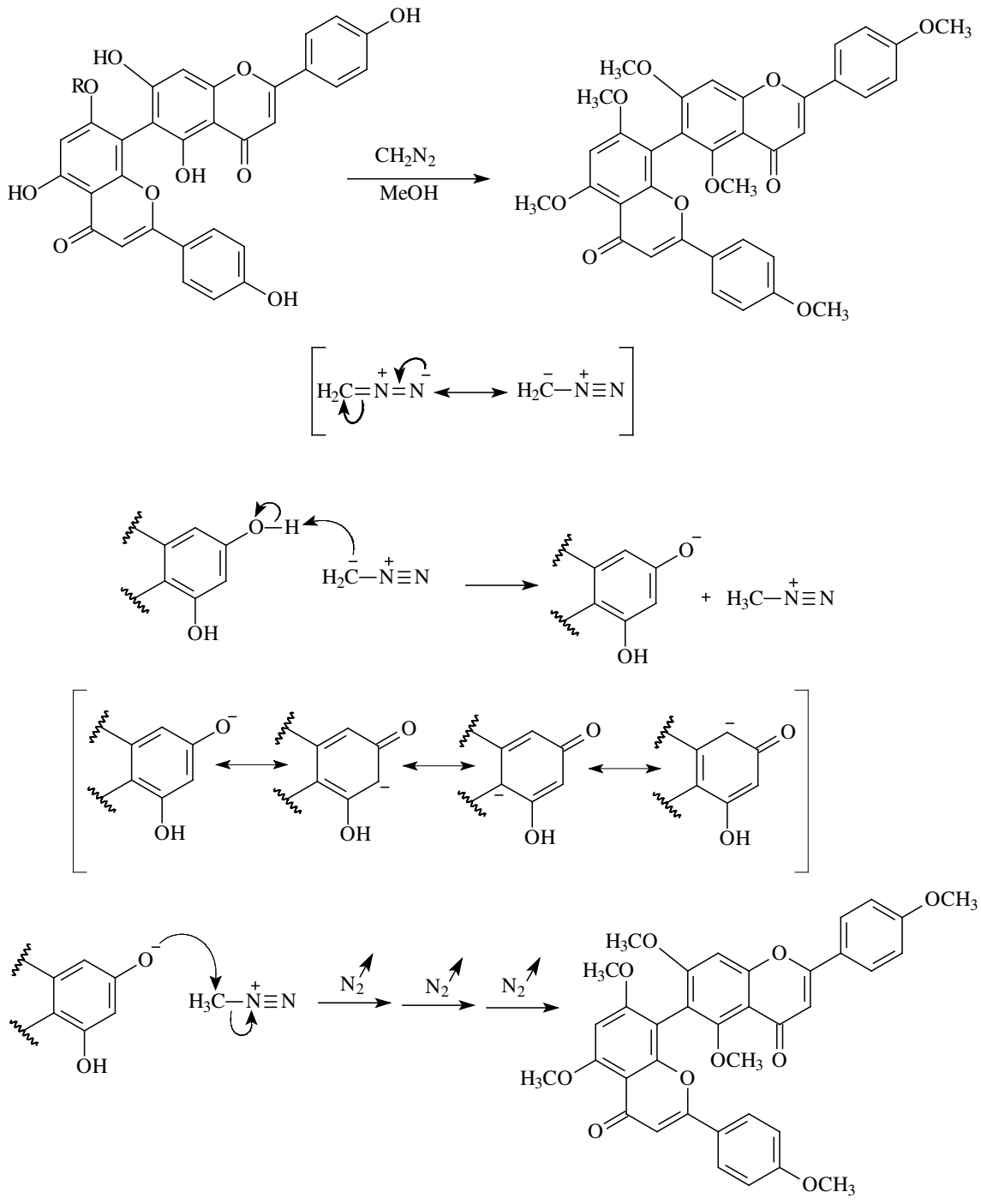



**Figura 9:** Mecanismo proposto da reação de metilação com diazometano.

# 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1. Prospecção Química do extrato metanólico:

Parte do extrato metanólico foi utilizado para a realização da avaliação da classe dos constituintes presentes, através da prospecção química, e posterior isolamento e purificação dos principais metabólitos especiais. A **tabela 3** demonstra os resultados da prospecção química do extrato metanólico, que revelou testes positivos para as classes de metabólitos especiais: alcalóides, saponinas, esteróides e triterpenóides, depsídio e depsidonas, flavonóides, catequinas, quinonas, açúcares redutores, sacarídeos e taninos. Os testes realizados seguiram as metodologias segundo as literaturas: Alcalóides, esteróides, triterpenos e flavonóides (WALL et al., 1954); saponinas, depsídios e depsidonas, quinonas e sacarídios (MATOS, 1988); catequinas, derivados de cumarinas e açúcares redutores (COSTA, 1972); Ácidos orgânicos (MERK, 1980); Taninos (MATOS, 1997).

Tabela 3: Registro dos resultados da prospecção química do extrato metanólico de *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl.

| **Classes de metabólitos especiais** | **Extrato metanólico** |
|---|---|
| Alcalóides | +++ |
| Saponinas | +++ |
| Esteróides e triterpenóides | +++ |
| Depsídio e depsidonas | +++ |
| Flavonóides | +++ |
| Catequinas | +++ |
| Quinonas | + |
| Sesquiterpenos e outras lactonas | - |
| Derivados de cumarinas | - |
| Glicosídios cardíacos | - |
| Açúcares redutores | ++ |
| Sacarídios | + |
| Ácidos orgânicos | - |
| Taninos | +++ |
| - ausente + fraco ++ médio +++ forte | |

### 5.2. Determinação Estrutural dos Constituintes Isolados de O*uratea hexasperma var. planchonii Engl.*

O fracionamento dos extratos dos galhos *de O. hexasperma* var. *planchonii* Engl. forneceu uma mistura de hidrocarbonetos, ácidos alifáticos, os esteróides sitoesterol, estigmasterol e campesterol, os triterpenos α-amirina e β-amirina, os biflavonóides 7"-O-metilagatisflavona e agatisflavona e sitosterol-3-O-β-D-glicopiranosideo. A identificação através de métodos físicos desses materiais foi feita através das análises de espectros de IV, RMN de $^{1}H$ e $^{13}C$, massas e comparação com padrões isolados das espécies de *Ouratea* em estudos anteriores.

#### 5.2.1. Alcanos

O espectro de IV da mistura de alcanos (**Figura 10**, pág. 25) revela bandas de absorção em 2918 e 2848 $cm^{-1}$ relativas a estiramentos de grupos $CH_3$ e $CH_2$, sugerindo a presença de uma longa cadeia carbônica. As bandas em 1466 $cm^{-1}$ (deformação angular da ligação C-H), e 723 $cm^{-1}$ confirmam esta atribuição. O espectro de RMN $^{1}H$ (**Figura 11,** pág. 26) apresenta sinais em $\delta_H$ 0,90 e 1,27ppm de cadeia normal hidrocarbônica.

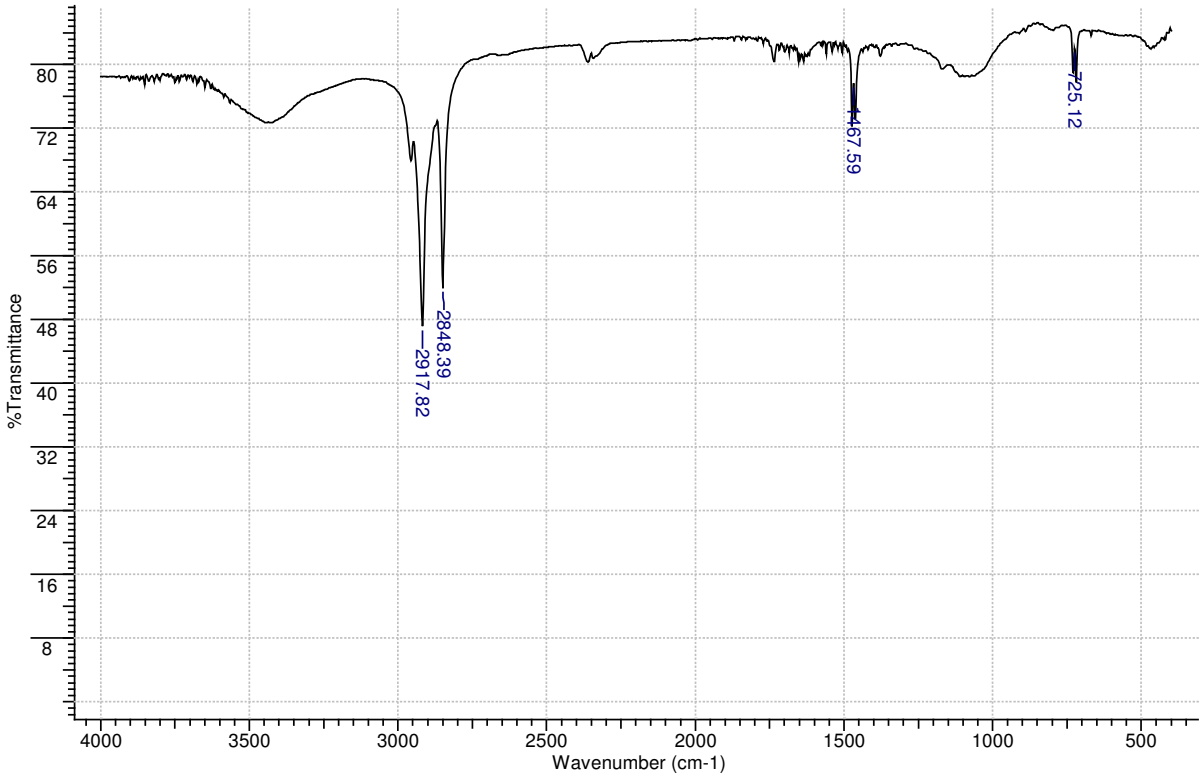



**Figura 10**: Espectro de IV do material alifático de *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl.

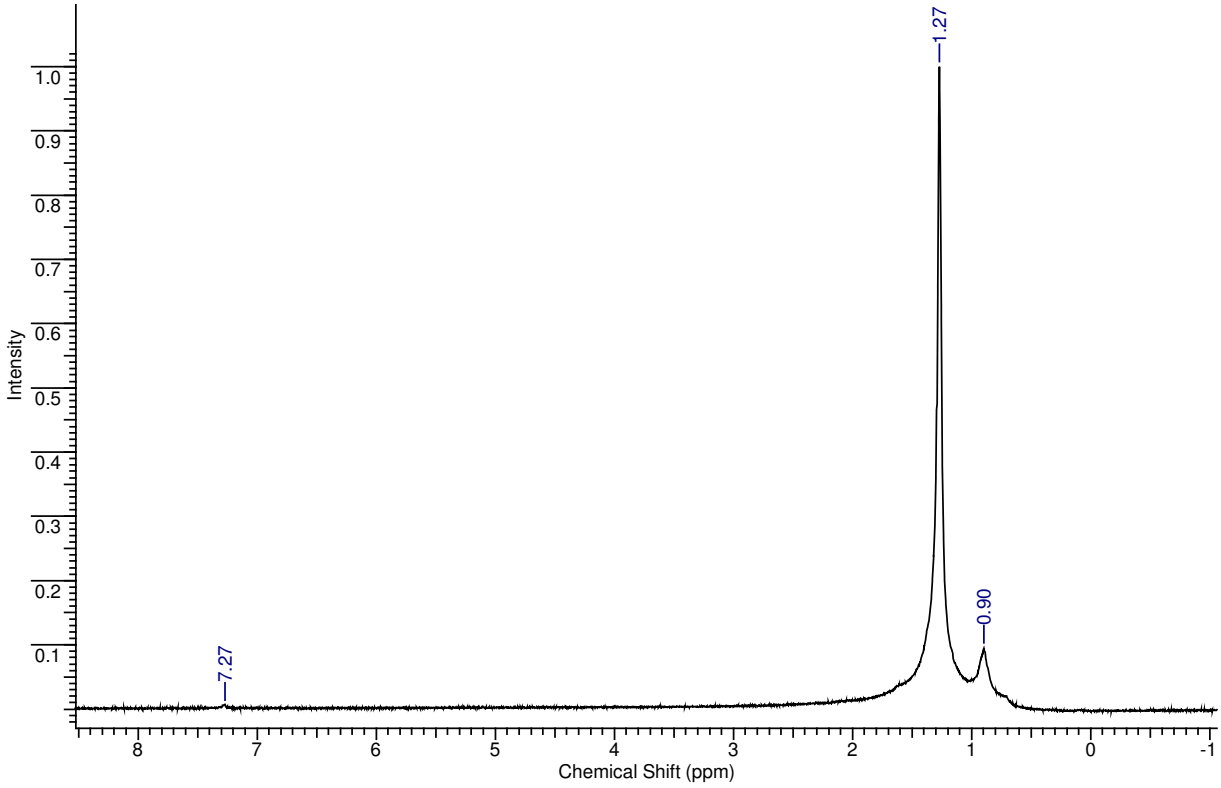



**Figura 11:** Espectro de RMN de $^{1}H$ (200 MHz, $CDCl_3$) do material alifático.

### 5.2.2 Substância 1

O ácido alifático **1**, foi identificado através da análise dos espectros de IV, RMN $^{1}H$ e CG-EM. O espectro de IV (**Figura 12**, pág. 27) revela bandas de absorção em 2918 e 2848 $cm^{-1}$ relativas a estiramentos de grupos $CH_3$ e $CH_2$, sugerindo a presença de uma longa cadeia carbônica. As bandas em 1473 $cm^{-1}$ (deformação angular da ligação C-H), 723 $cm^{-1}$ e o sinal em 1724 $cm^{-1}$ compatível com carbonila de ácido, confirmam esta atribuição. O espectro de RMN $^{1}H$ (**Figura 13,** pág. 28) apresenta sinais em $\delta_H$ 0,89 e 1,26 de cadeia alifática, e 2,35 indicando a presença e de hidrogênio de carbono alfa ao grupo carbonila. O cromatograma da amostra (**figura 14,** pág 28), demonstra os picos indicando a mistura das substâncias, tendo a substância majoritária em TR=5,74, o CG-EM apresentou picos em *m/z* 57 $[C_4H_9]^+$, *m/z* 87 $[C_4H_7O_2]^+$, *m/z* 129 $[C_7H_{13}O_2]^+$, *m/z* 185 $[C_{11}H_{21}O_2]^+$, *m/z* 213 $[C_{13}H_{25}O_2]^+$, os picos em *m/z* 257 ($M^{+\cdot}$ +1) e 242 ($M^{+\cdot}$) (**Figura 15**, pág. 29), permitiu identificar os ácidos hexadecanóico e pentadecanóico presentes na mistura.

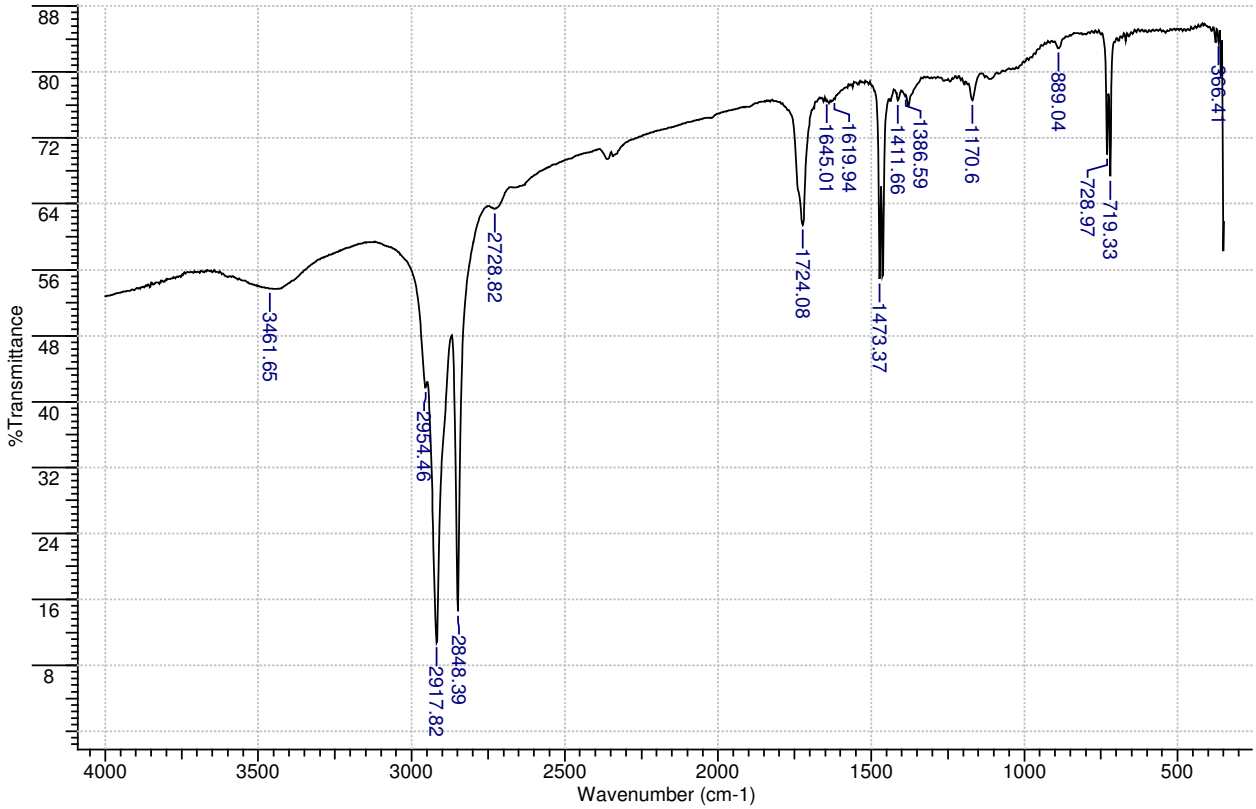



Figura 12: Espectro de IV de **1.**

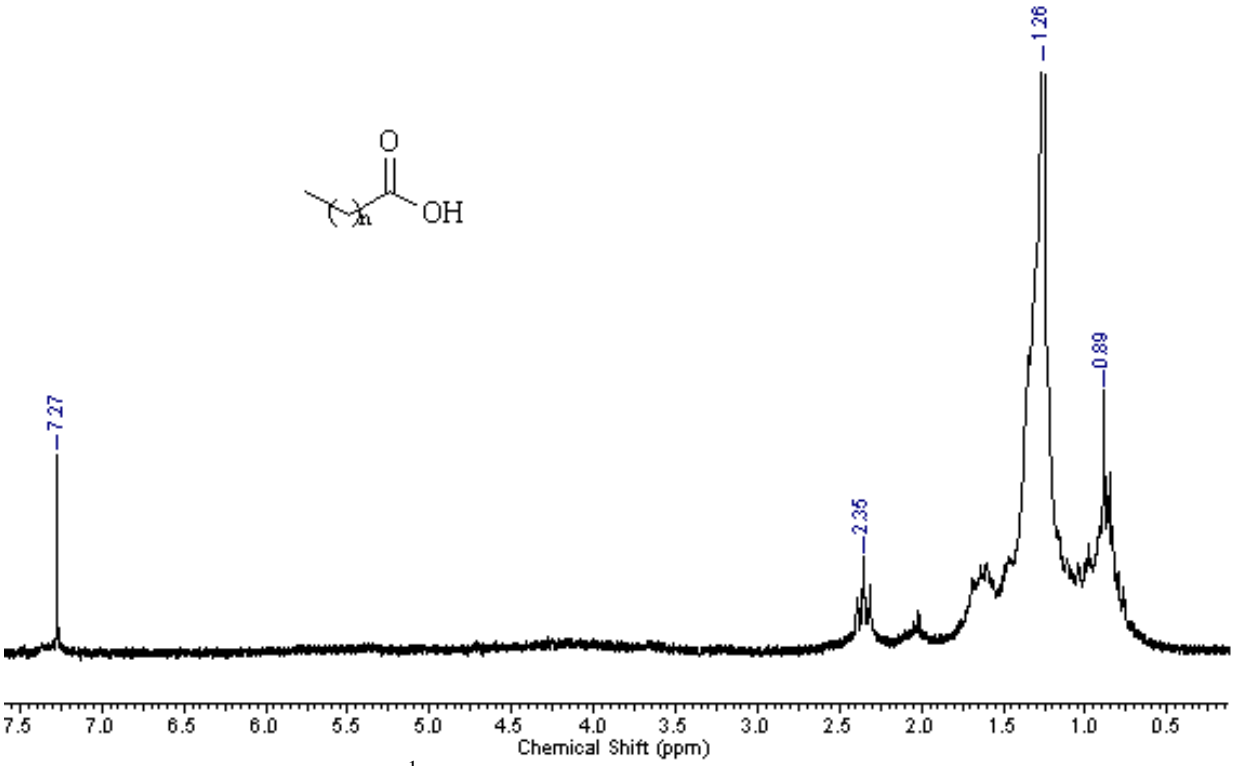



Figura 13: Espetro de RMN de $^{1}H$ (200 MHz, $CDCl_3$) de **1**.

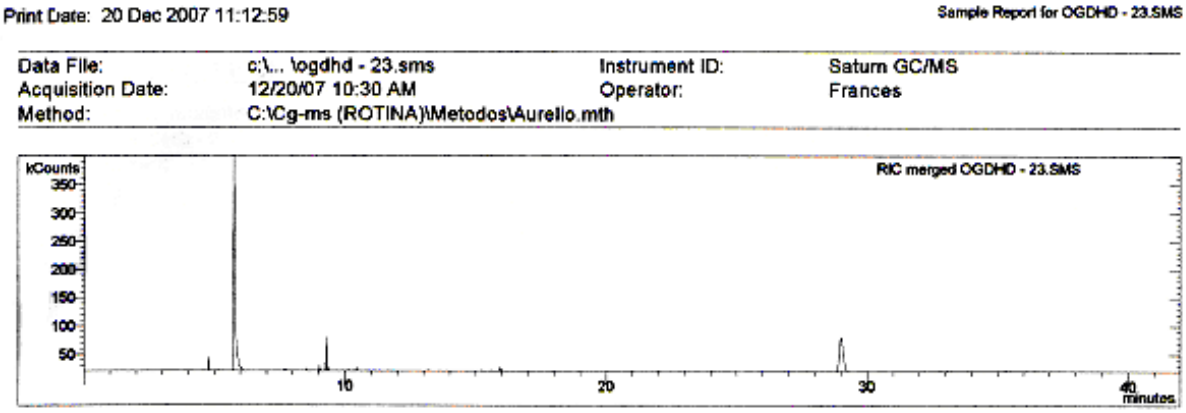



Figura 14: Cromatograma de **1**.

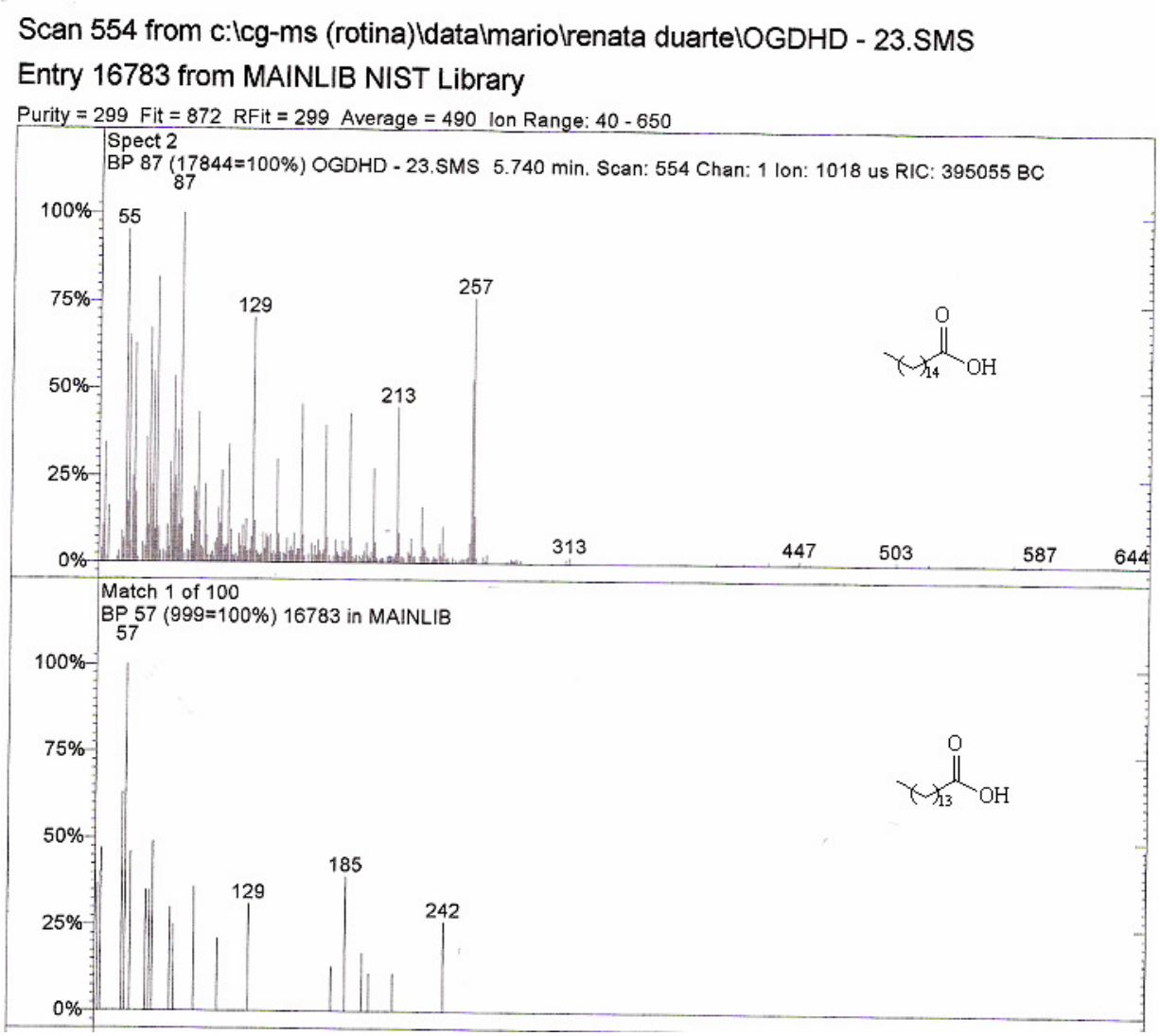


Figura 15: Espectro de massas de **1**.

### 5.2.3. Substância 2 (a, b e c)

Os esteróides **2 (a, b e c)** foram identificados respectivamente, como sitosterol, estigmasterol e campesterol, com base na comparação com amostra autêntica, envolvendo espectros de RMN de $^1$H (**Figura 16**, pág. 30), CG-EM, além de P.F. e CCF.

O espectro de RMN de $^1$H da mistura **2 (a, b e c)** mostrou sinais entre $\delta_H$ 0,65 e $\delta_H$ 1,23 correspondentes as metilas, multipleto em $\delta_H$ 3,53 atribuído ao hidrogênio carbinólico H-3, um singleto largo em $\delta_H$ 5,31 atribuído ao hidrogênio olefínico H-6 e o multipleto em $\delta_H$ 5,07 correspondentes aos hidrogênios H-22 e H-23 para o estigmasterol. Através do CG-EM que se detectou a presença do terceiro componente (campesterol), através do cromatograma (**Figura 17**, pág. 30), indicando os picos dos esteróides e comparação com padrões da biblioteca do equipamento (**Figuras 18 a, b e c,** págs. 31, 32 e 33) permitiu confirmar a proposta da mistura dos esteróides sitosterol (**2 a**), estigmasterol (**2 b**) e campesterol(**2 c**).

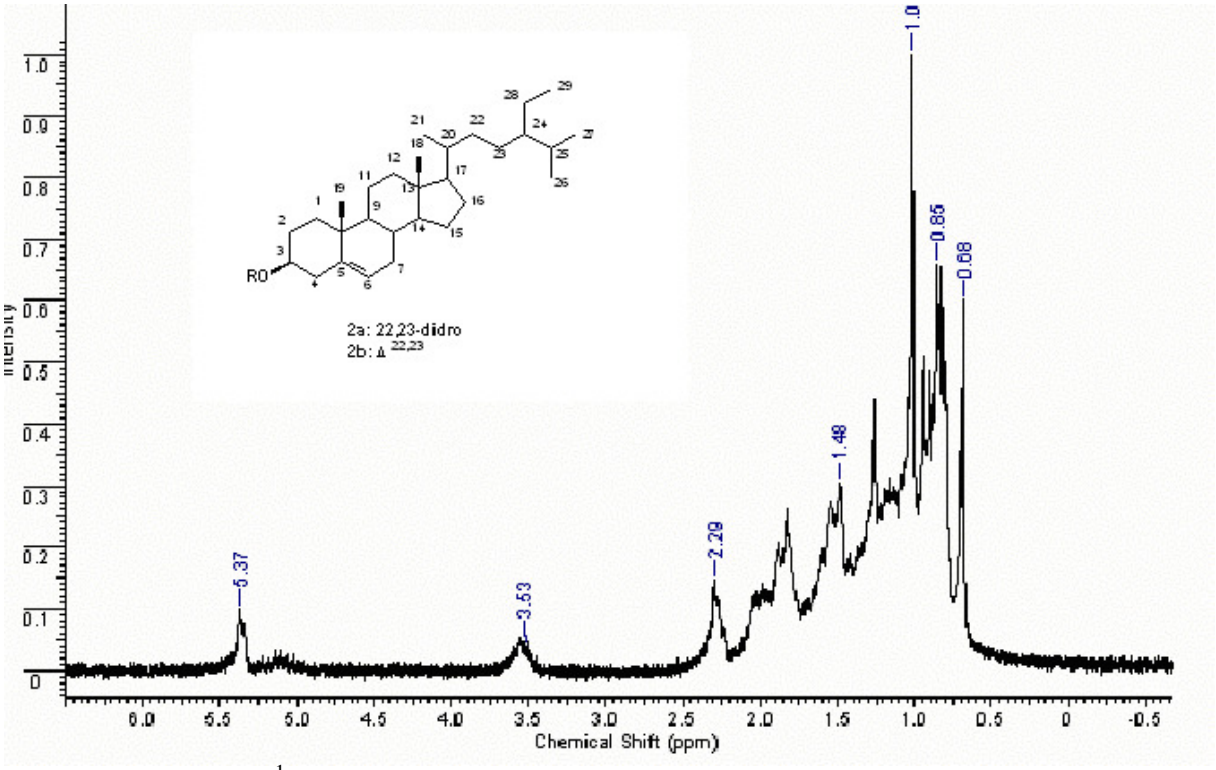



**Figura 16:** RMN de $^{1}H$ (200 MHz, $CDCl_3$) da mistura de esteróides **2** (a, b e c)

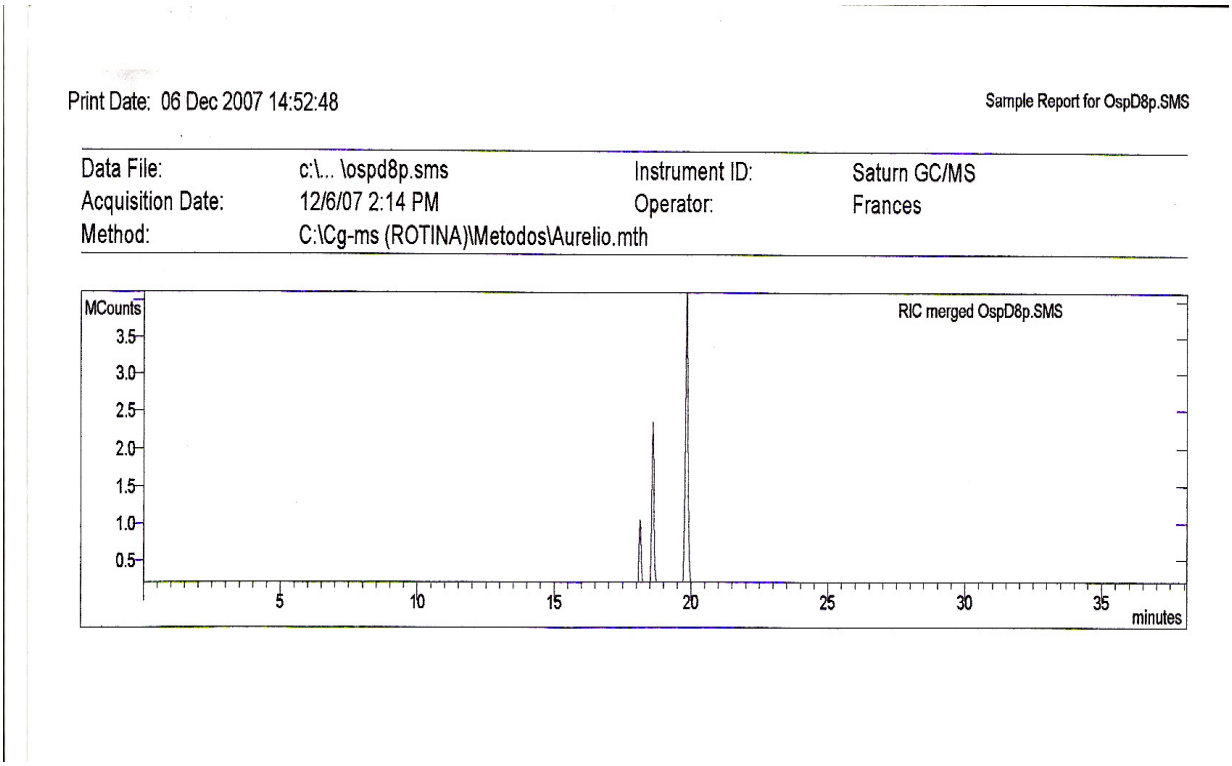



**Figura 17**: Cromatograma da mistura dos esteróides **2** (a, b e c)

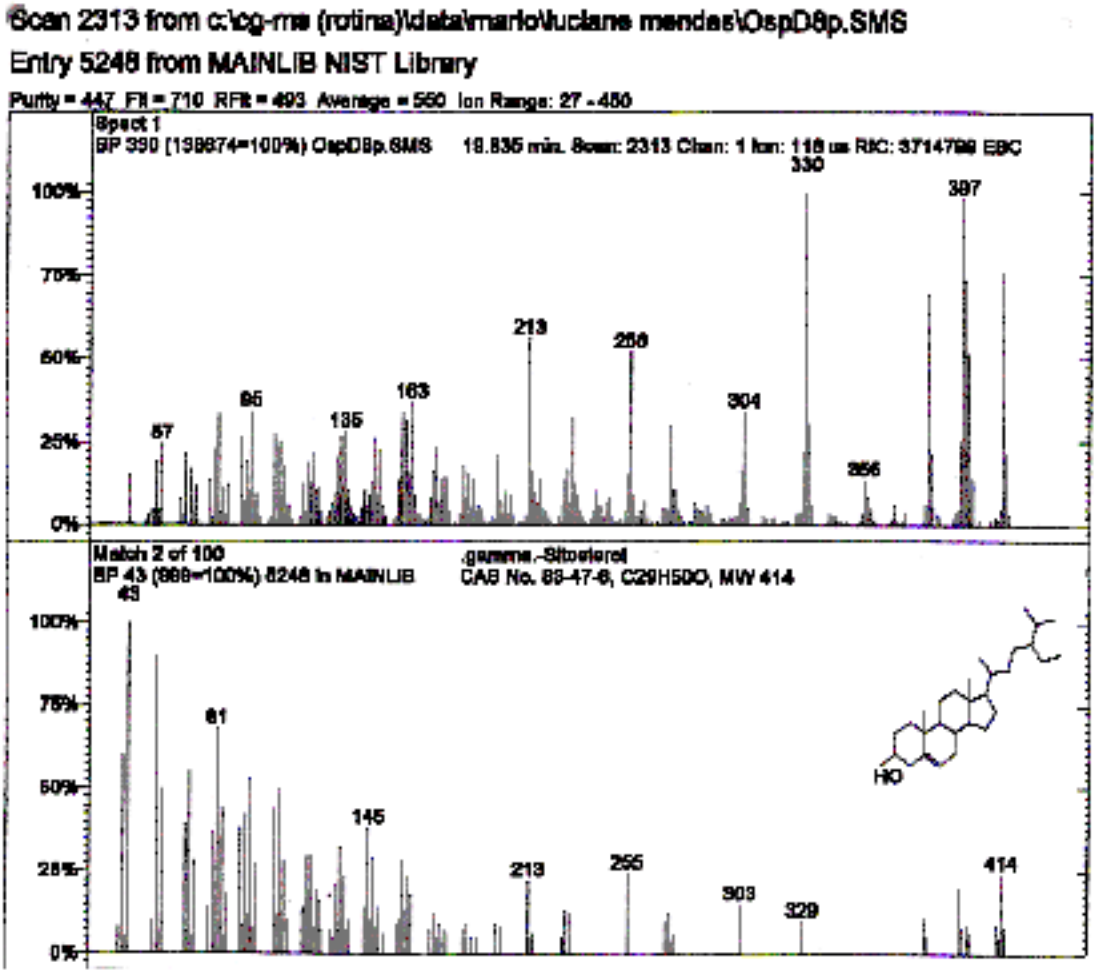



**Figura 18a** : Espetro de massas de **2 (a)** comparado com a biblioteca do aparelho.

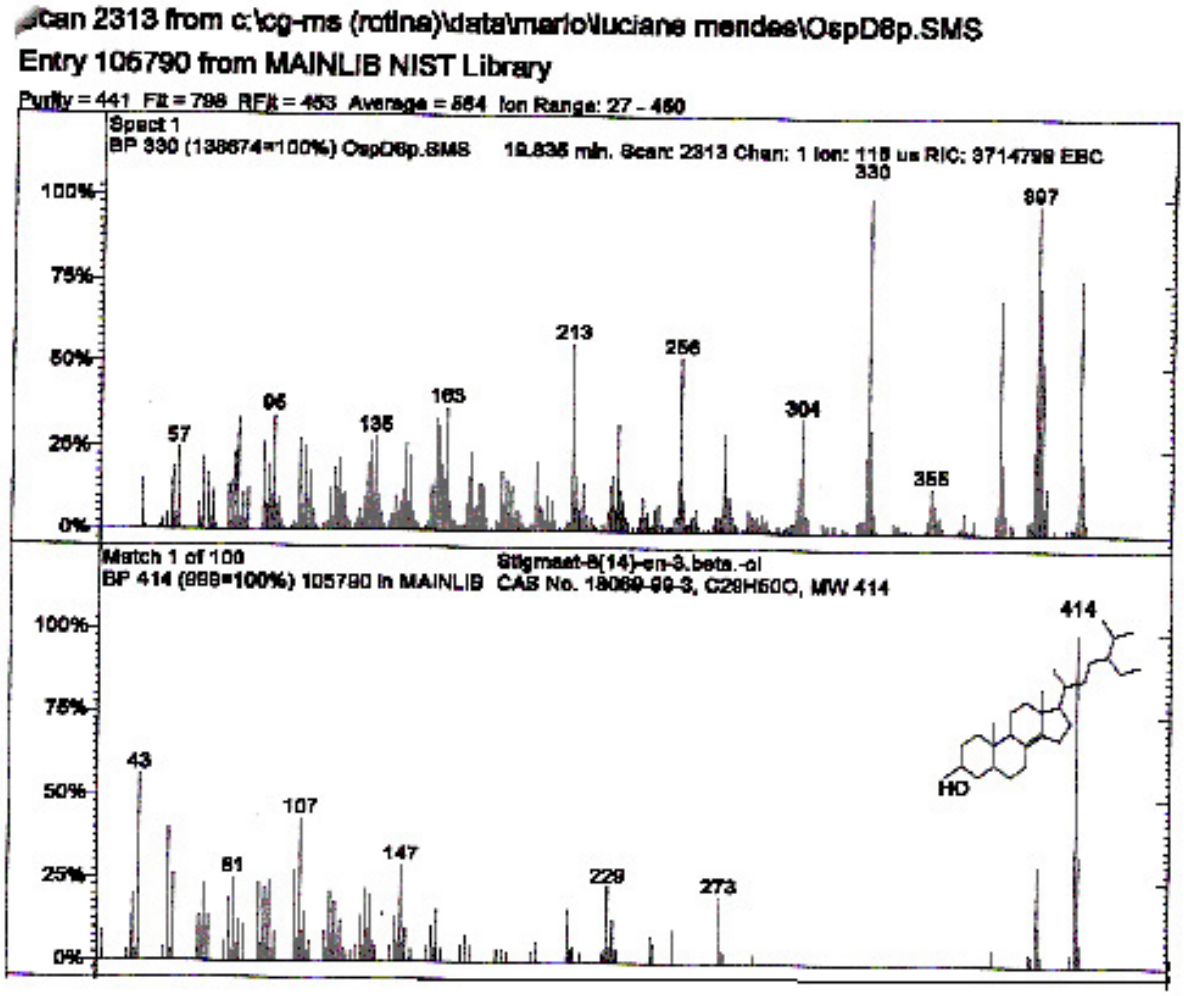



**Figura 18b:** Espetro de massas de 2 (b) comparado com a biblioteca do aparelho.

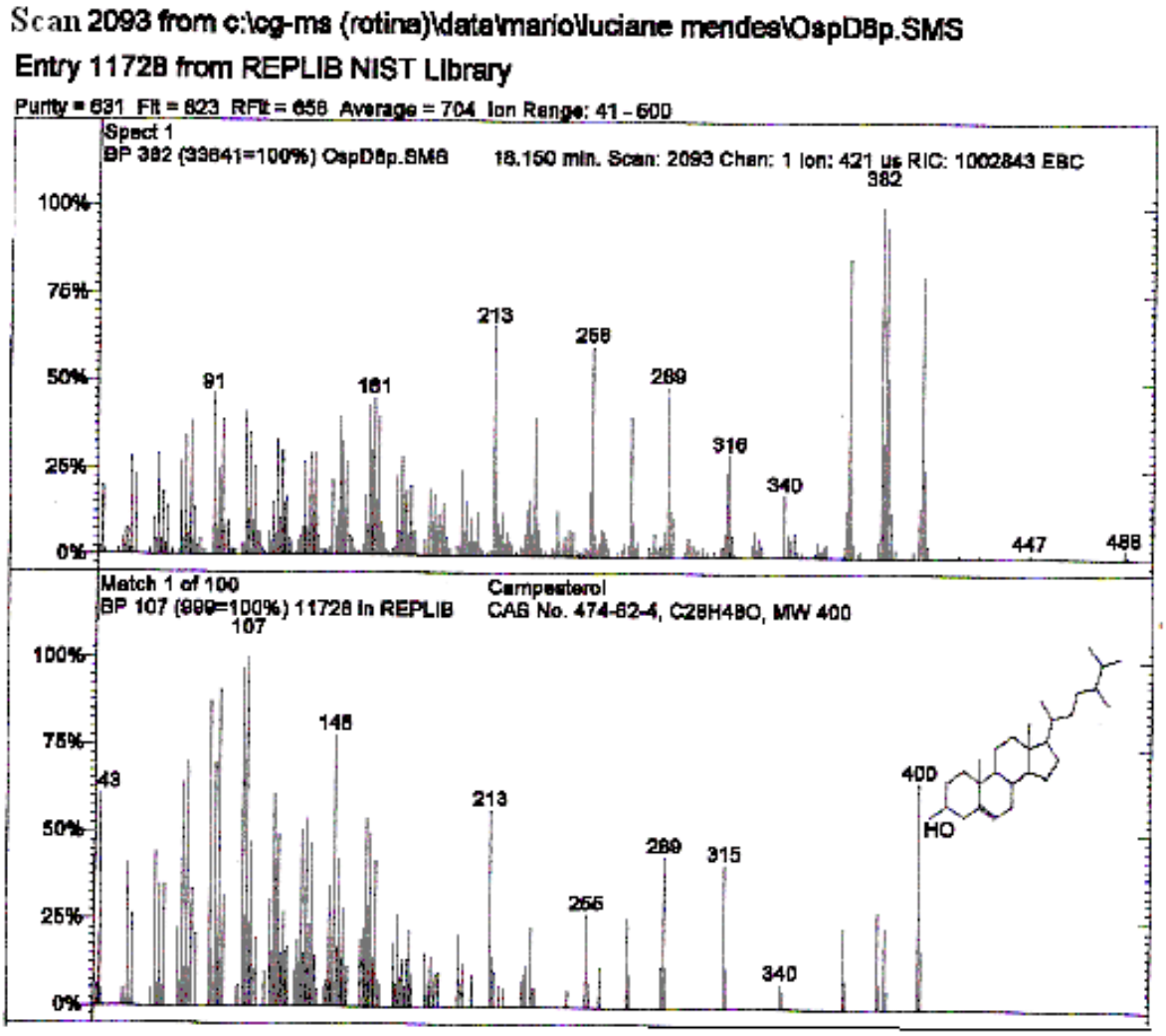



**Figura 18c :** Espetro de massas de 2 (c) comparado com a biblioteca do aparelho.

### 5.2.4. Substâncias 3: Lupeol, α-amirina e β-amirina

A mistura dos triterpenos **3 (a, b e c)** foram identificados como lupeol, α-amirina e β-amirina, através da interprtação dos espectros de RMN de $^{1}H$ , CG-EM e CCF.

O espectro de RMN $^{1}H$ (**Figura 19,** pág. 34) mostra os sinais de metilas: $\delta_H$ 1,26, 0,95, 0,80 e 0,77 e um sinal em $\delta_H$ 1,69 (*s*) correspondente à freqüência de metila ligada a carbono $sp^2$. Os sinais referentes aos hidrogênios vinílicos estão representados por dois singletos largos em $\delta_H$ 4,57 e 4,70, o sinal em $\delta_H$ 3,19 representa o hidrogênio do carbono metínico oxigendo (H-3) o sinal em $\delta_H$ 5,1 representa os hidrogênios (H-12) de α e β-amirina. Através do CG-EM e comparação com padrões da biblioteca do equipamento (**Figuras 20 e 21,** pág. 35) e comparação com amostra padrão da mistura, permitiu identificar os três isômeros triterpênicos lupeol (3a), α-amirina (3b) e β-amirina (3c).

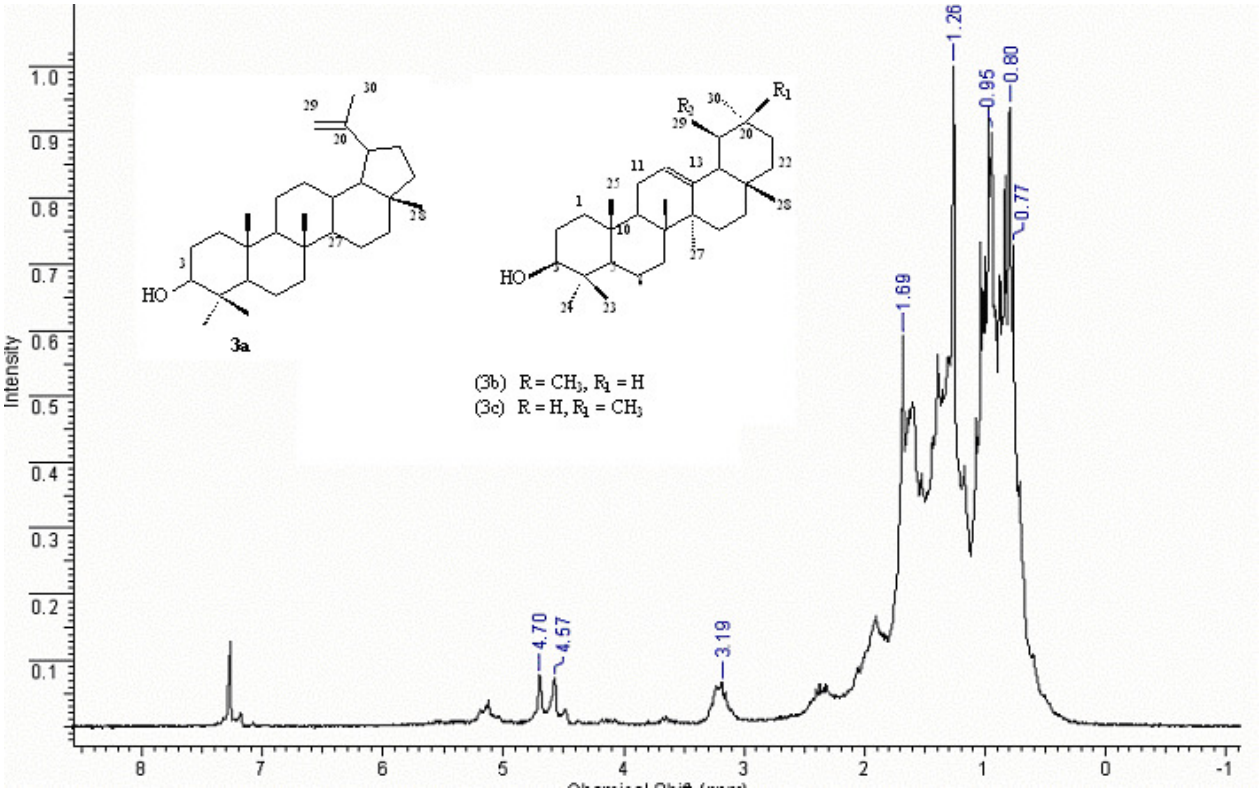



**Figura 19:** Espectro de RMN de $^{1}H$ (200 MHz, $CDCl_3$) do Lupeol (**3a**), α-amirina (**3b**) e β-amirina (**3c**).

.

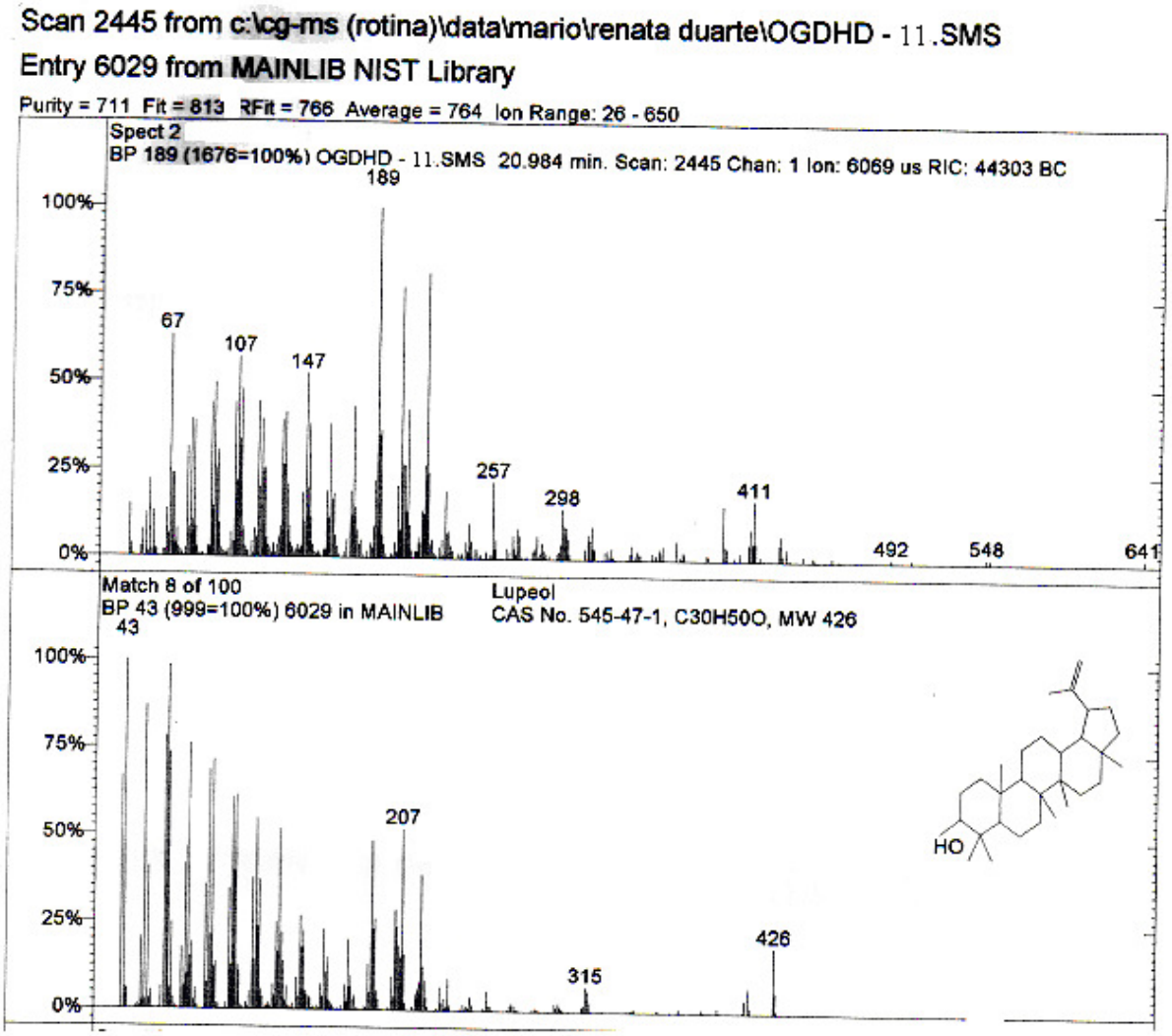



**Figura 20:** Espetro de massas de 2 (a) comparado com a biblioteca do aparelho.

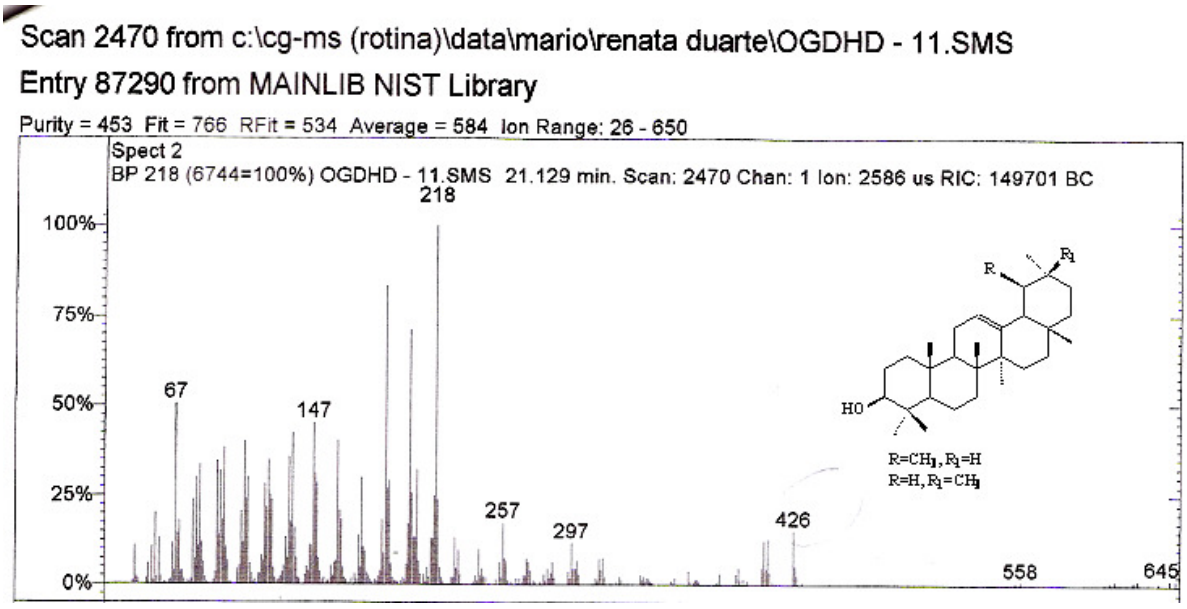



**Figura 21:** Espetro de massas de 2 (b e c).

### 5.2.5. Substância 4

O biflavonóide **4** foi identificado como um derivado da agatisflavona, devido a semelhança do espectro de RMN $^{1}H$ com da substância com a isolada anteriormente (MOREIRA et al., 1999; DANIEL et. al., 2005), além do sinal de um grupo metoxila cuja posição foi definida através de análises com técnicas especiais de RMN.

O espectro de IV de **4** (**Figura 22,** pág. 37**)** revela bandas de absorção para grupo hidroxila (3392 $cm^{-1}$, estiramento O-H), grupamentos C=O (1648 $cm^{-1}$) de carbonila conjugada e C=C (1604 $cm^{-1}$, 1504 $cm^{-1}$, 1442 $cm^{-1}$) de anel benzenóide.

O espectro de RMN $^{1}H$ (**Figura, 23,** pág. 39**)** mostra sinais de átomos de hidrogênios atribuídos a dois sistemas AA'BB' dos anéis C e C" $\delta_H$ 7,98 (d, 2H, *J*= 8Hz), 7,65 (d, 2H, *J*= 8 Hz), 7,05 (d, 2H, *J*= 8 Hz) e 6,84 (d, 2H, *J*= 8 Hz), quatro singletos atribuídos a H-3, 8, 3" e 6" com $\delta_H$ 6,70, 6,78, 6,65 e 6,56, respectivamente e uma metoxila ($\delta_H$ 3,89, *s*, 3H). Os sinais em $\delta_H$ 9,37 para hidroxila livre e $\delta_H$ 13,26 e 13,41 para os dois grupos hidroxilas em ligação de hidrogênio com carbonila.

O espectro de $^{1}H,^{1}H$-COSY (**Figuras 24,** pág. 40) apresentou sinais de interação de acoplamento entre H-2',6' ($\delta_H$ 7,65) com H-3',5' ($\delta_H$ 6,84) e H-2'",6'" ($\delta_H$ 7,98) com H-3'",5'" ($\delta_H$ 7,50). Confirmando os pares de dubletos de cada sistema *para* substituído.

O espectro de RMN $^{13}C$ da substância **4** (**Figuras 28-30,** pág. 44 e 45) mostra os valores de deslocamentos dos carbonos metínicos CH-8 ($\delta_C$ 94,7) e CH-6" ($\delta_C$ 96,4), e para os carbonos quaternários 6 e 8" ($\delta_C$ 104,3 e 104,0 ppm). Os valores dos deslocamentos químicos indicam que os carbonos 6 e 8" estão envolvidos na ligação interflavonoídica, a comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos de **4** (**Tabela 4,** pág. 40) com agatisflavona (CHARI *et al*., 1977; AGRAWAL, 1989) e 7"-*O*-metilagatisflavona (MOREIRA, *et al*., 1999) confirmam a proposta de estrutura semelhante desta biflavona como 4′,5,7-OH-flavona-(6→8″)-5″,4‴-OH-7″-OMe flavona.

Como citado anteriormente, o grupo metoxila poderia estar localizado em outra posição sem causar alteração significativa nos espectros e, assim não garante a identificação entre **4** como 7"-*O*-metilagatisflavona registrada na literatura. Fez-se experimentos de NOESY (**Figuras 25, 26 e 27,** págs. 41-43), HMBC (**figuras 31-38,** págs. 45-49) e HSQC (**figura 39,** pág. 50) e observou-se que a metoxila está próxima do singleto em $\delta_H$ 6,57 (H-6"), este hidrogênio está ligado ao carbono com $\delta_C$ = 95,7 e acopla a longa distância com H-O-5"($J^{3}_{H-C}$) **Tabela 4,** pág. 38. Ficando, então definida sua estrutura como o previsto: 4',5,7-OH-flavona (6→8) 5",4'"-OH-7"-OMe flavona (7"-*O*-metilagatisflavona).

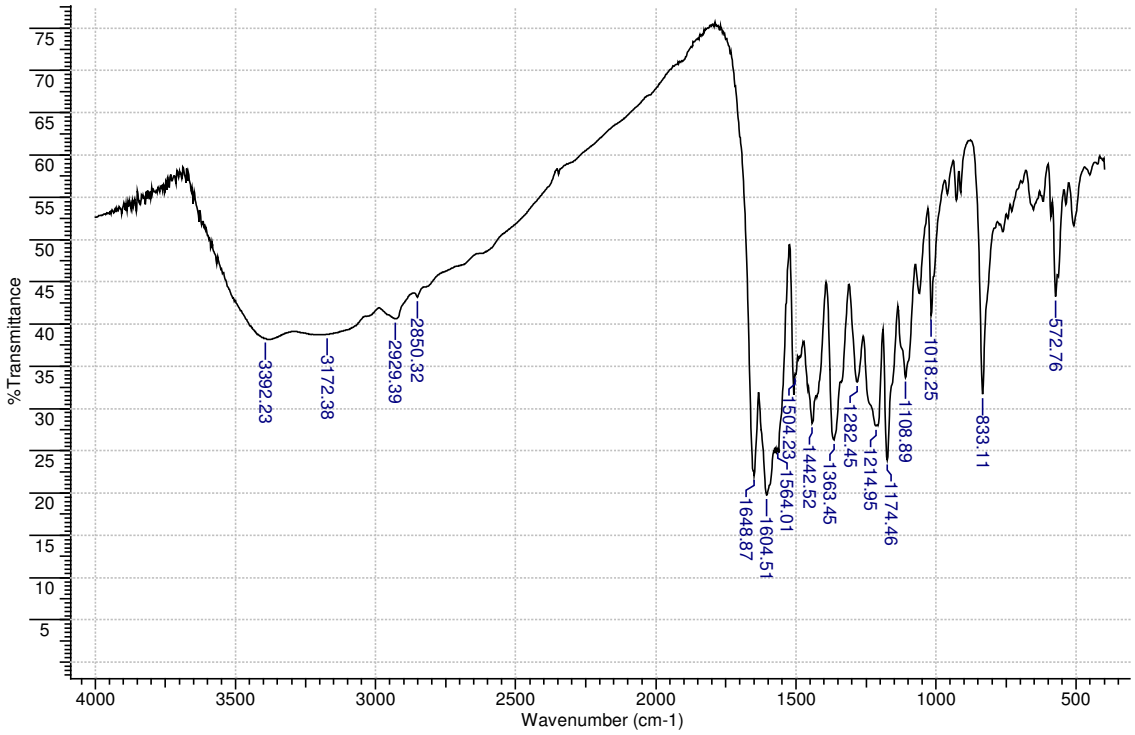
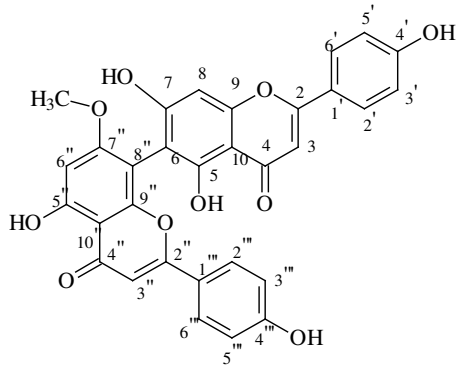



Figura 22: Espectro de IV de 4.

**Tabela 4.** Dados de RMN $^{1}H$ e $^{13}C$ ($D_3CCOCD_3$ ,$^{1}H$ e $D_3CSOCD_3$,$^{13}C$).da substâncias **4.**



| | 7”-o-metil agatisflavona | Substância 4 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | $^{1}H$-$^{13}C$-COSY | | | |
| C | δC | δC | δH | CH | $^{1}J_{CH}$ | $^{2,3}J_{CH}$ | Noe |
| 2 | 165,03 | 165,3 | | H-2’, H-3 | | | |
| 3 | 103,22 | 104,4 | 6,70 | | | | H-2’,6’ |
| 4 | 183,5 | 183,7 | | | | | |
| 5 | 161,3 | 161,6 | | | | | |
| 6 | 104,1 | 104,3 | | H-8 | | | |
| 7 | 163,1 | 163,3 | | H-8 | | | |
| 8 | 94,5 | 94,7 | 6,78 (s) | | | | |
| 9 | 158,2 | 158,5 | | H-8 | | | |
| 10 | 105,1 | 105,5 | | H-O-5, H-3 | | | |
| 1’ | 123,2 | 123,6 | | H-3’,5’, H-3 | | | |
| 2’,6’ | 129,3 | 129,3 | 7,98 (d,8Hz) | | | | |
| 3’,5’ | 116,8 | 117,1 | 7,05 (d, 8Hz) | | | | |
| 4’ | 161,8 | 162,0 | | | | | |
| 2” | 165,2 | 165,5 | | H-2’”,6’”, H-3” | | | |
| 3” | 103,4 | 103,9 | 6,65 (s) | | | | H-2’”,6’” |
| 4” | 183,3 | 183,4 | | | | | |
| 5” | 163,4 | 163,8 | | H-O-5”, H-6” | | | |
| 6” | 96,0 | 96,4 | 6,57 (s) | H-O-5” | | | $H_3CO$-7” |
| 7” | 164,8 | 165,1 | | $H_3C$-O | | | |
| 8” | 101,0 | 104,0 | | H-6” | | | |
| 9” | 155,5 | 156,0 | | | | | |
| 10” | 105,6 | 105,9 | | H-O-5”, H-6”, H-3” | | | |
| 1’” | 123,2 | 123,6 | | H-3’”,5’”, H-3” | | | |
| 2’”,6’” | 129,1 | 129,5 | 7,65 (d,8Hz) | | | | |
| 3’’,5’” | 116,8 | 116,9 | 6,84 (d,8Hz) | | | | |
| 4’” | 161,8 | 162,1 | | H-2’”,5’”, H-3”’,5’” | | | |
| $OCH_3$ | 56,7 | 56,9 | 3,89(s,3H) | | | | |
| H-O 5 | | | 13,4 | | | | |
| H-O 5” | | | 13,3 | | | | |

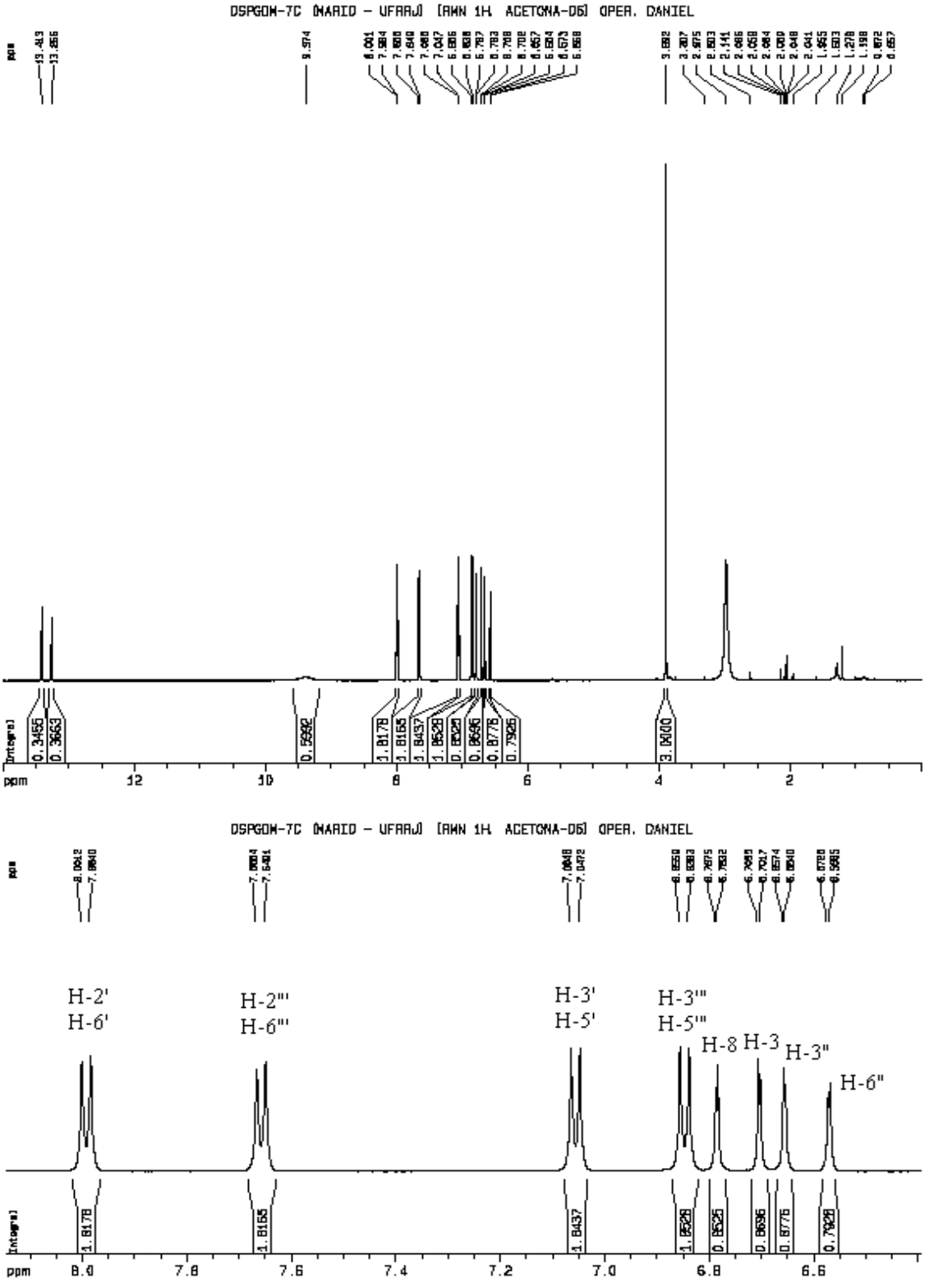



**Figura 23**: Espectro de RMN de $_1$H (500 MHz , $D_3CCOCD_3$) do biflavonóide **4** (7''-O-metilagatisflavona)

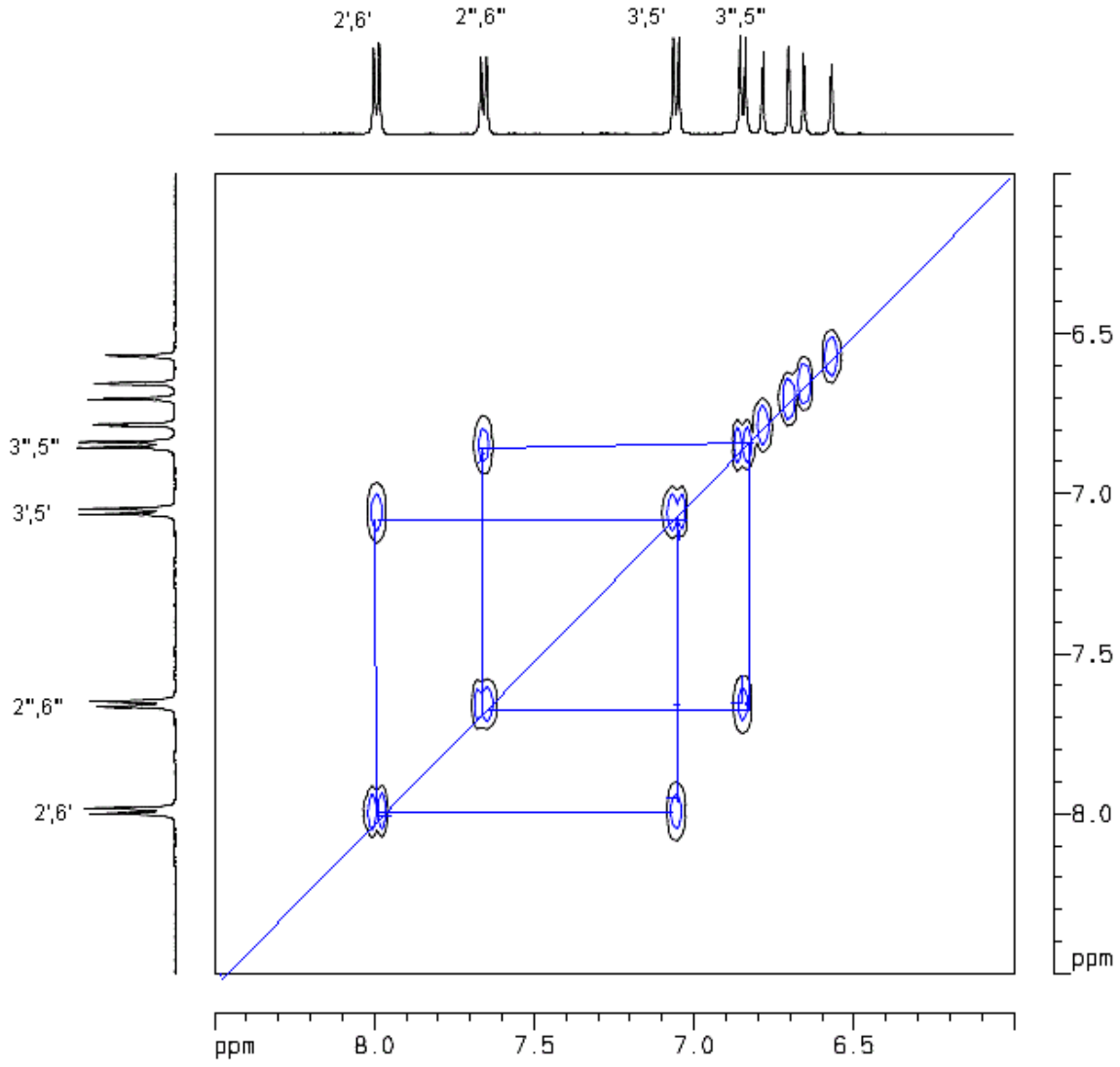



**Figura 24**: Espectro de $^{1}H$-$^{1}H$-COSY - (500 MHz, $D_3CCOCD_3$) de 4.

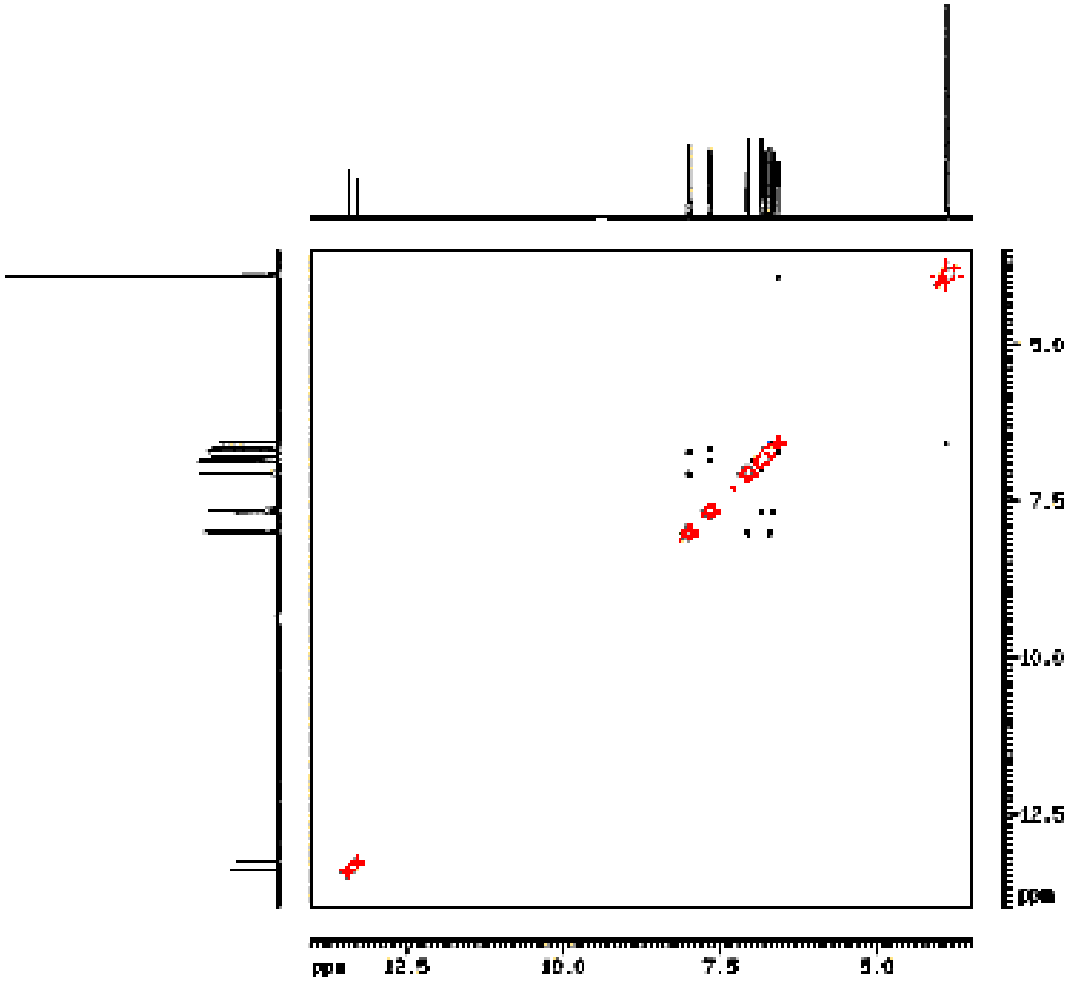



**Figura 25**: Espectro de $^{1}H$-$^{1}H$-NOESY - (500 MHz, $D_3CCOCD_3$) de 4.

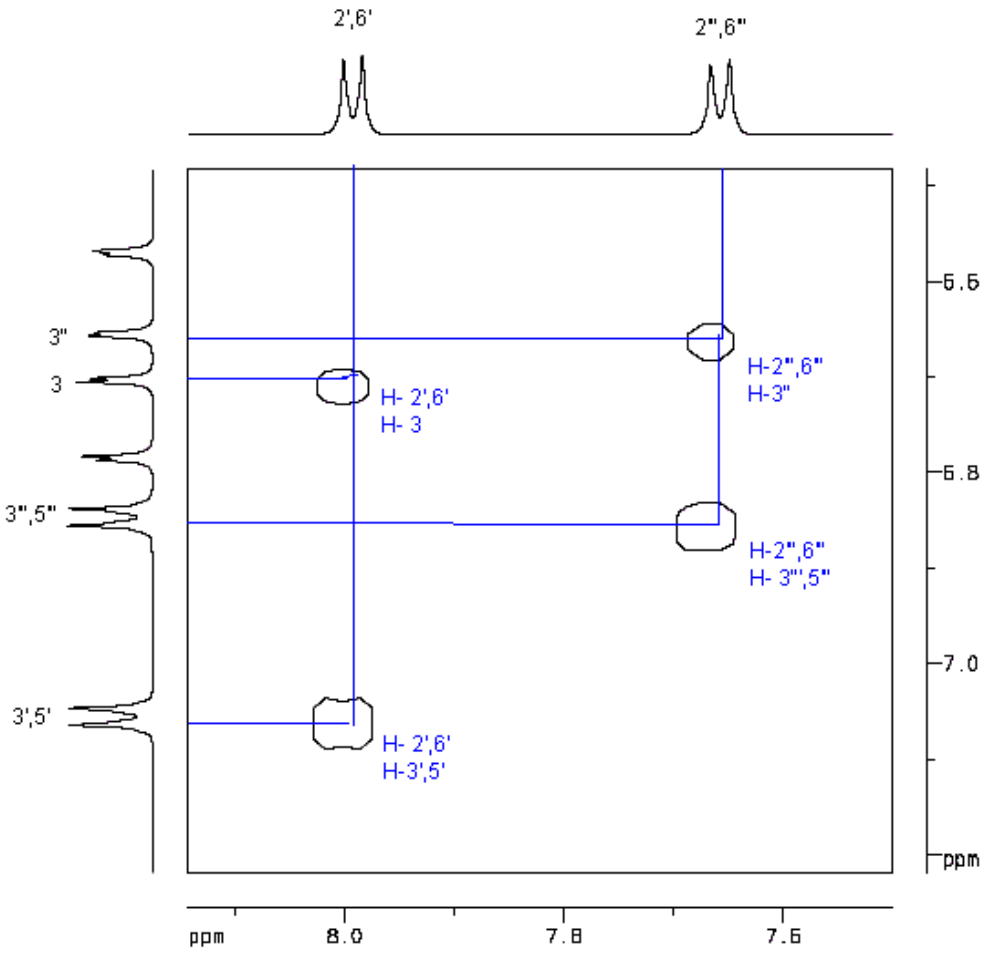



**Figura 26:** Ampliação do Espectro de $^{1}H$-$^{1}H$-NOESY - (500 MHz, $D_3CCOCD_3$) de 4.

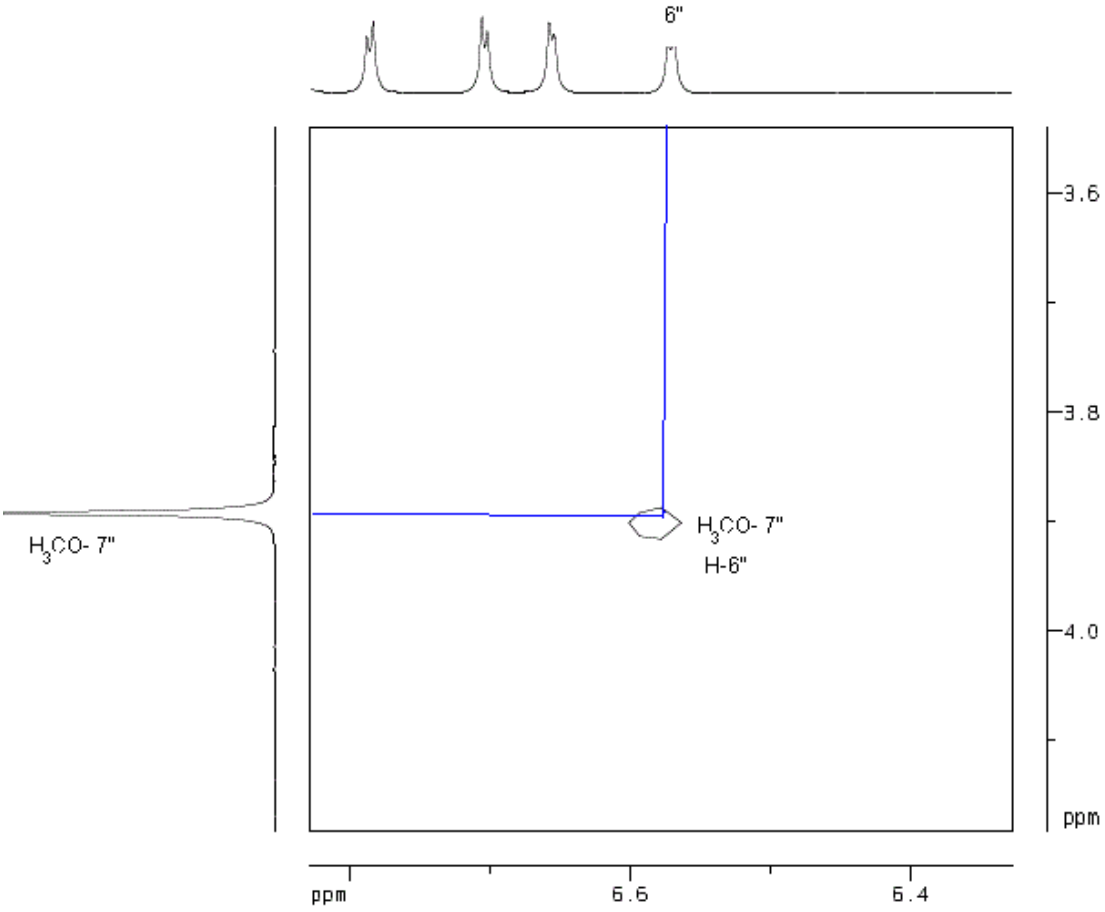



**Figura 27:** Ampliação do Espectro de $^{1}H$-$^{1}H$-NOESY - (500 MHz, $D_3CCOCD_3$) de 4.

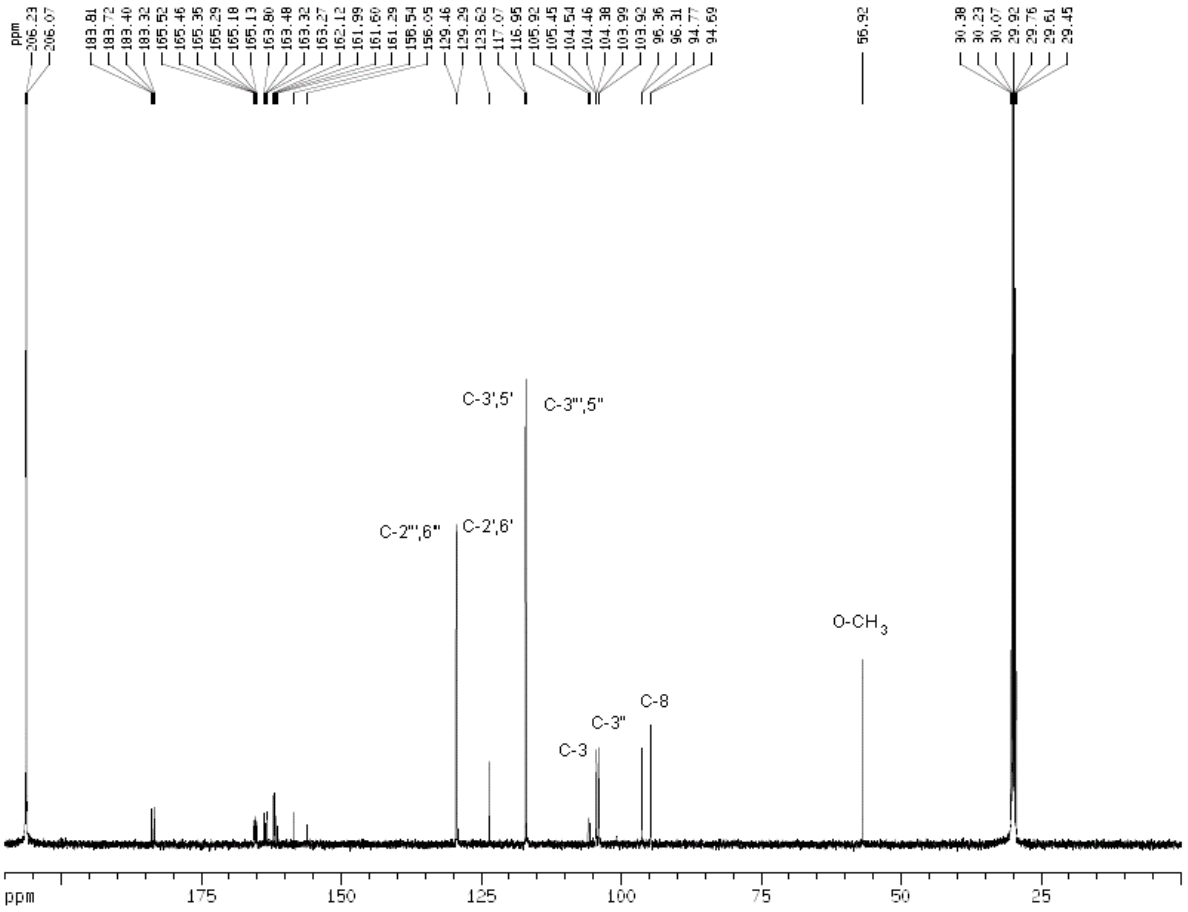



**Figura 28:** RMN de C (125 MHz, $D_3CCOCD_3$) da substância 4

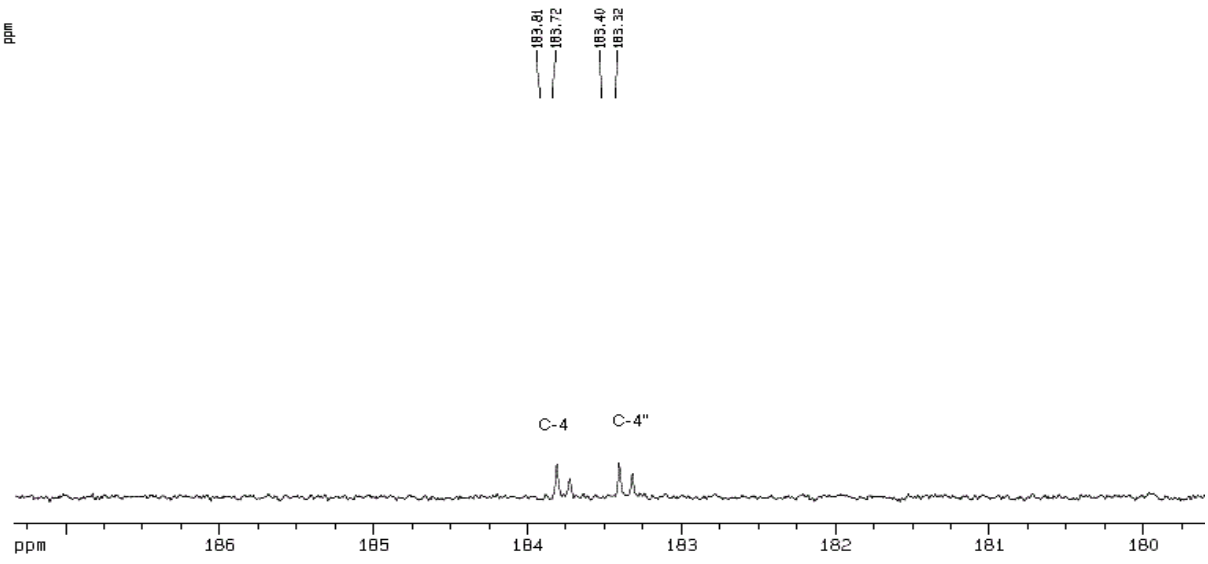



**Figura 29:** Ampliação(180-187 ppm) do Espectro de RMN de C (125 MHz, $D_3CCOCD_3$) da substância 4

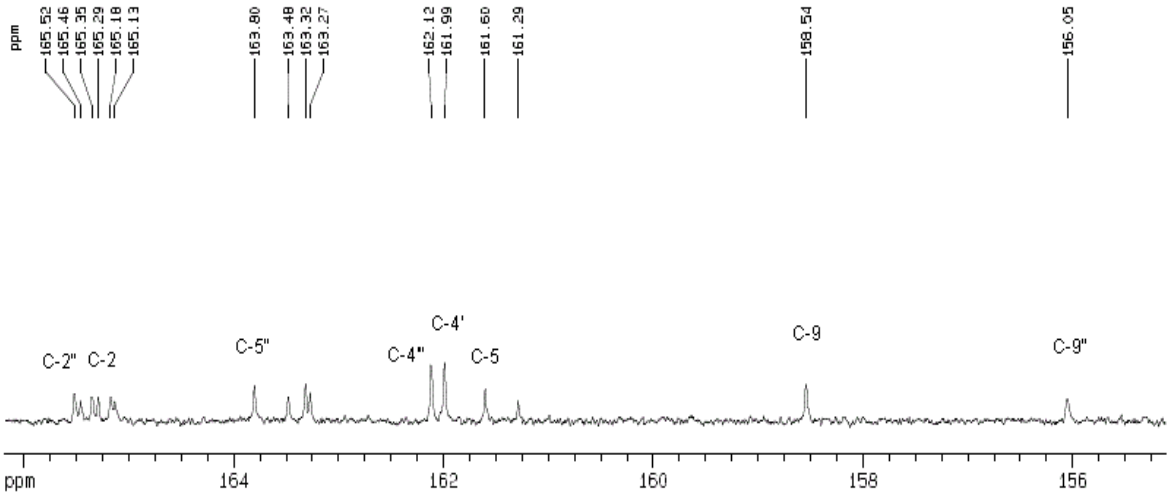



**Figura 30:** Ampliação (156-166 ppm) do Espectro de RMN de $^{13}C$ (125 MHz , $D_3CCOCD_3$ ) da substância 4

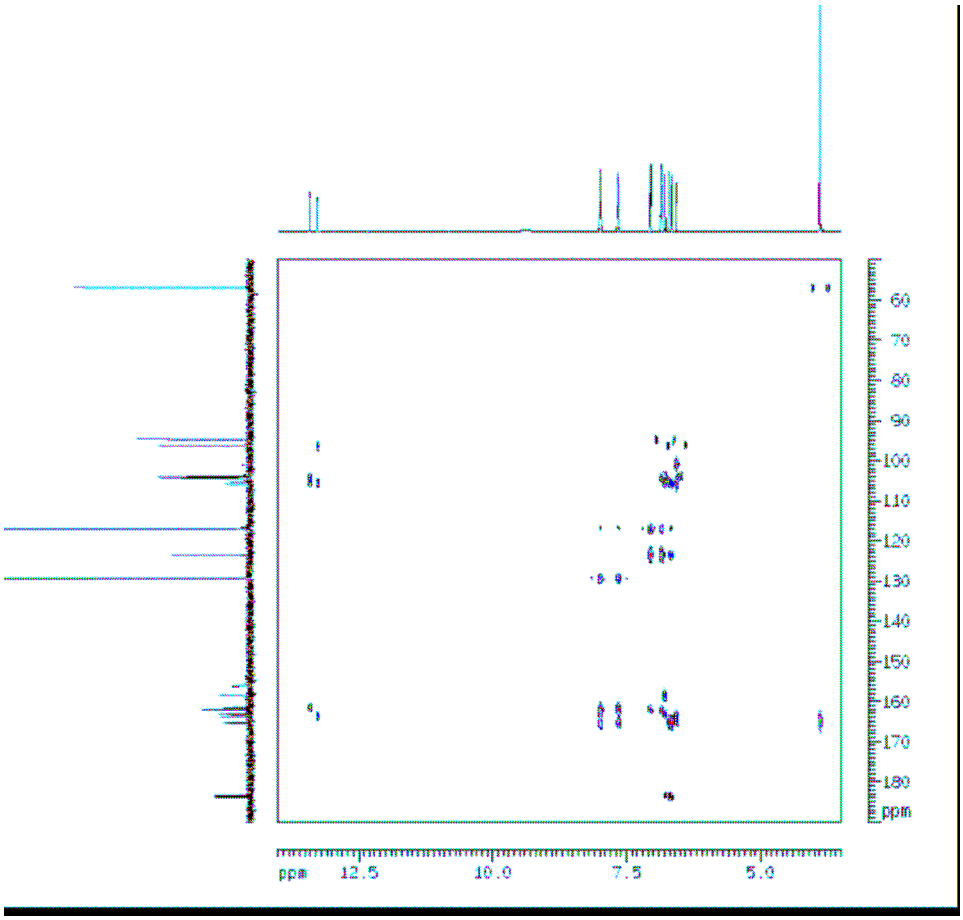



**Figura 31:** Espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância 4.

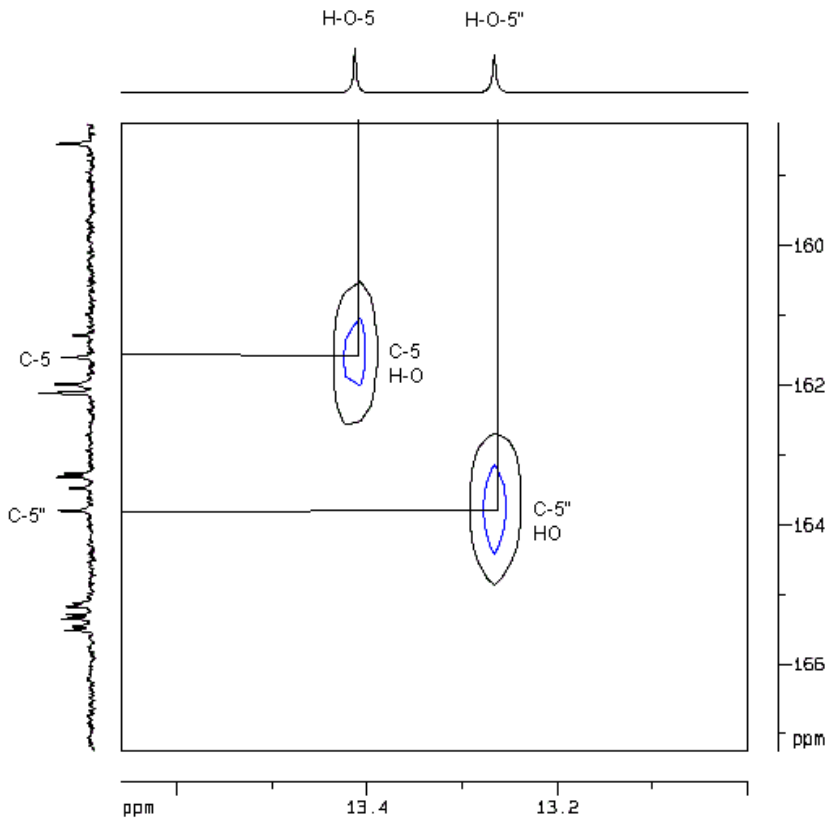



**Figura 32:** Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância 4.

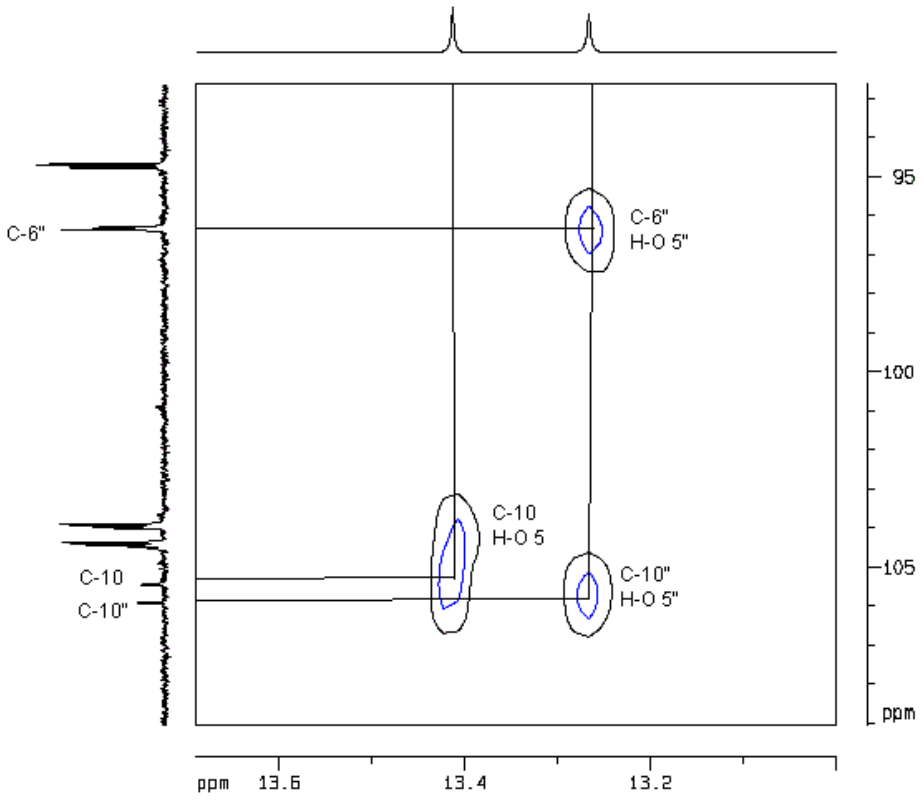



**Figura 33:** Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância 4.

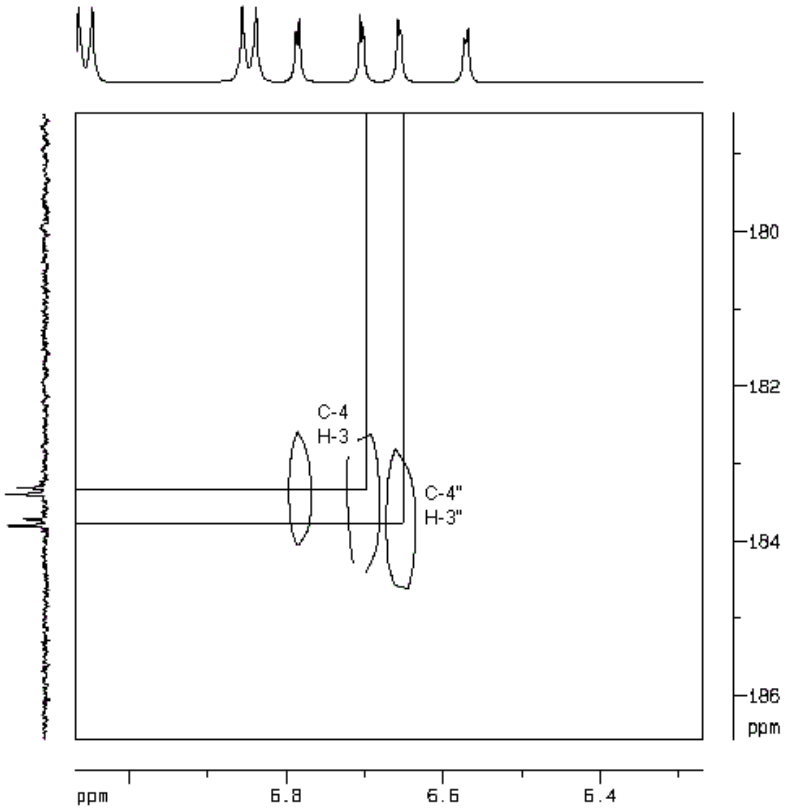



**Figura 34:** Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância 4.

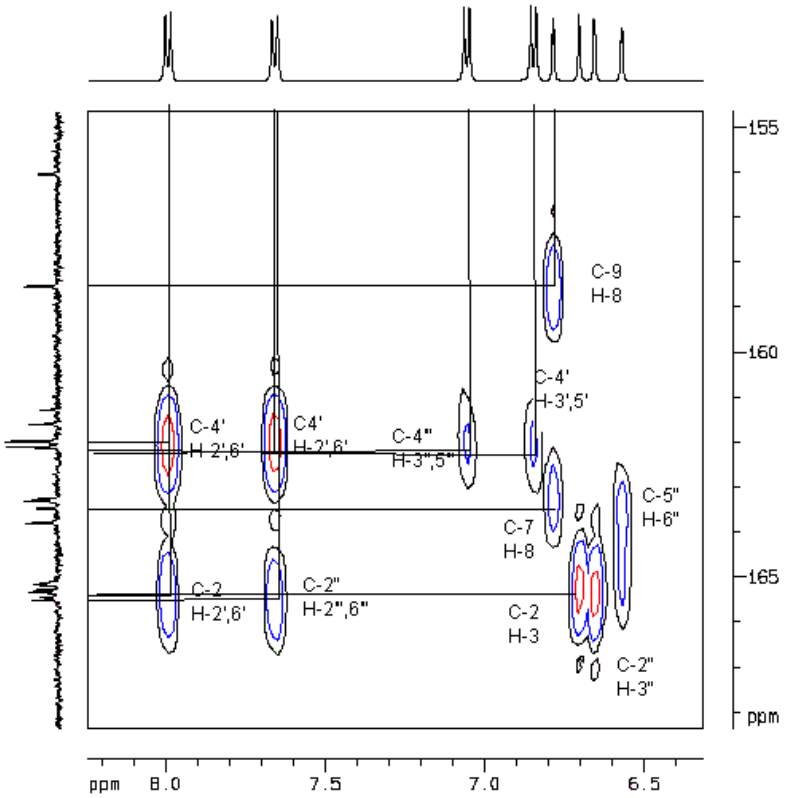



**Figura 35:** Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância 4.

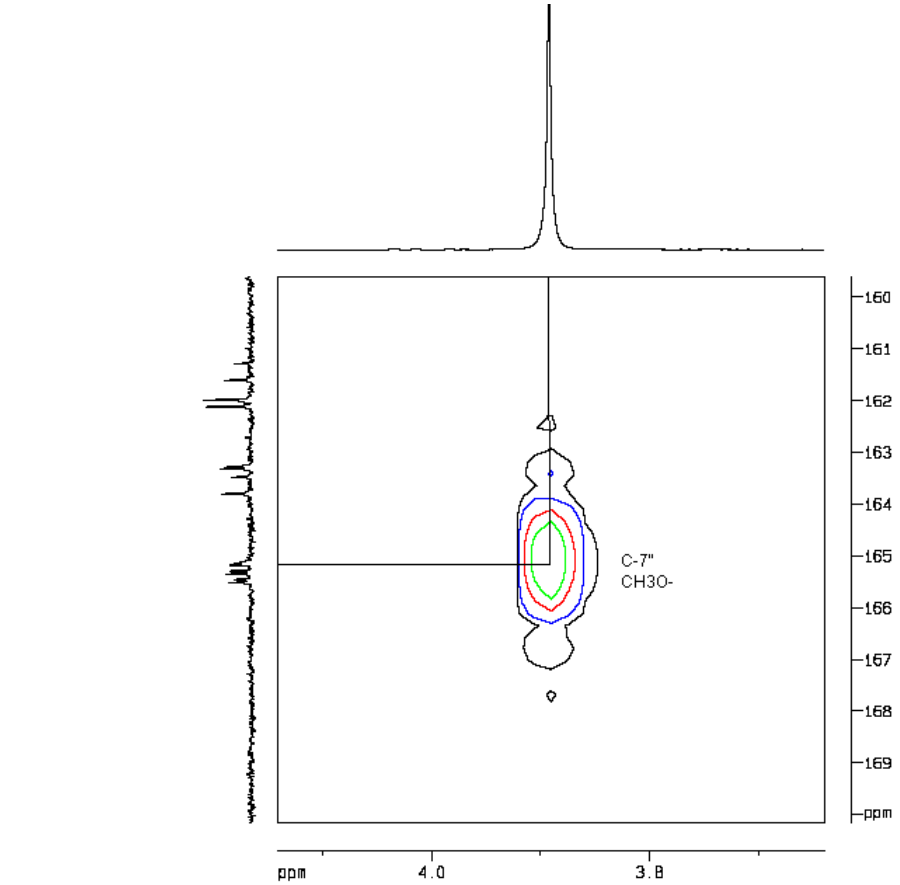



**Figura 36:** Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância 4

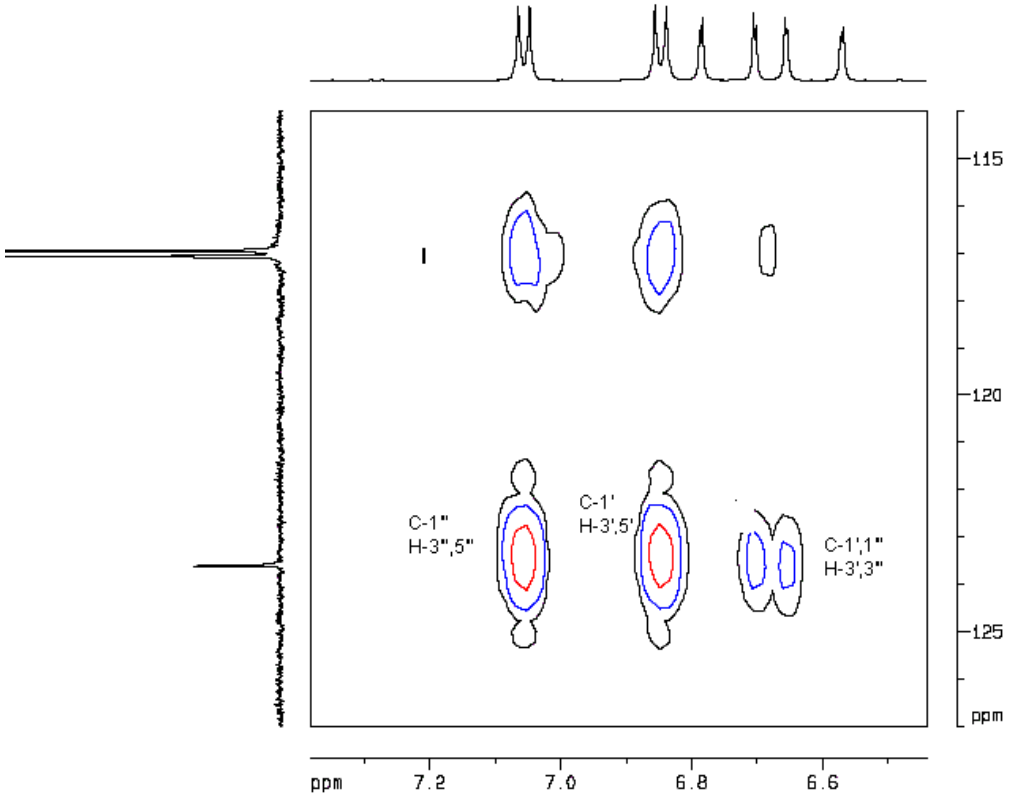



**Figura 37:** Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância 4

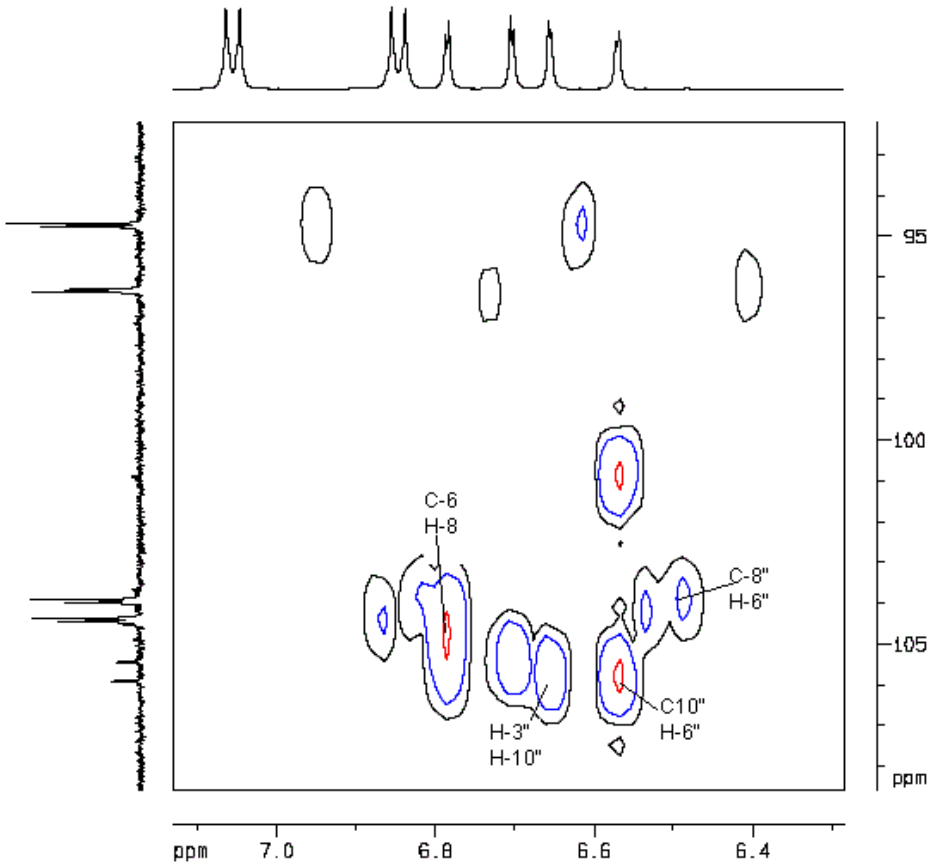



**Figura 38:** Ampliação do espectro de HMBC ($D_3CCOCD_3$ ) da substância 4

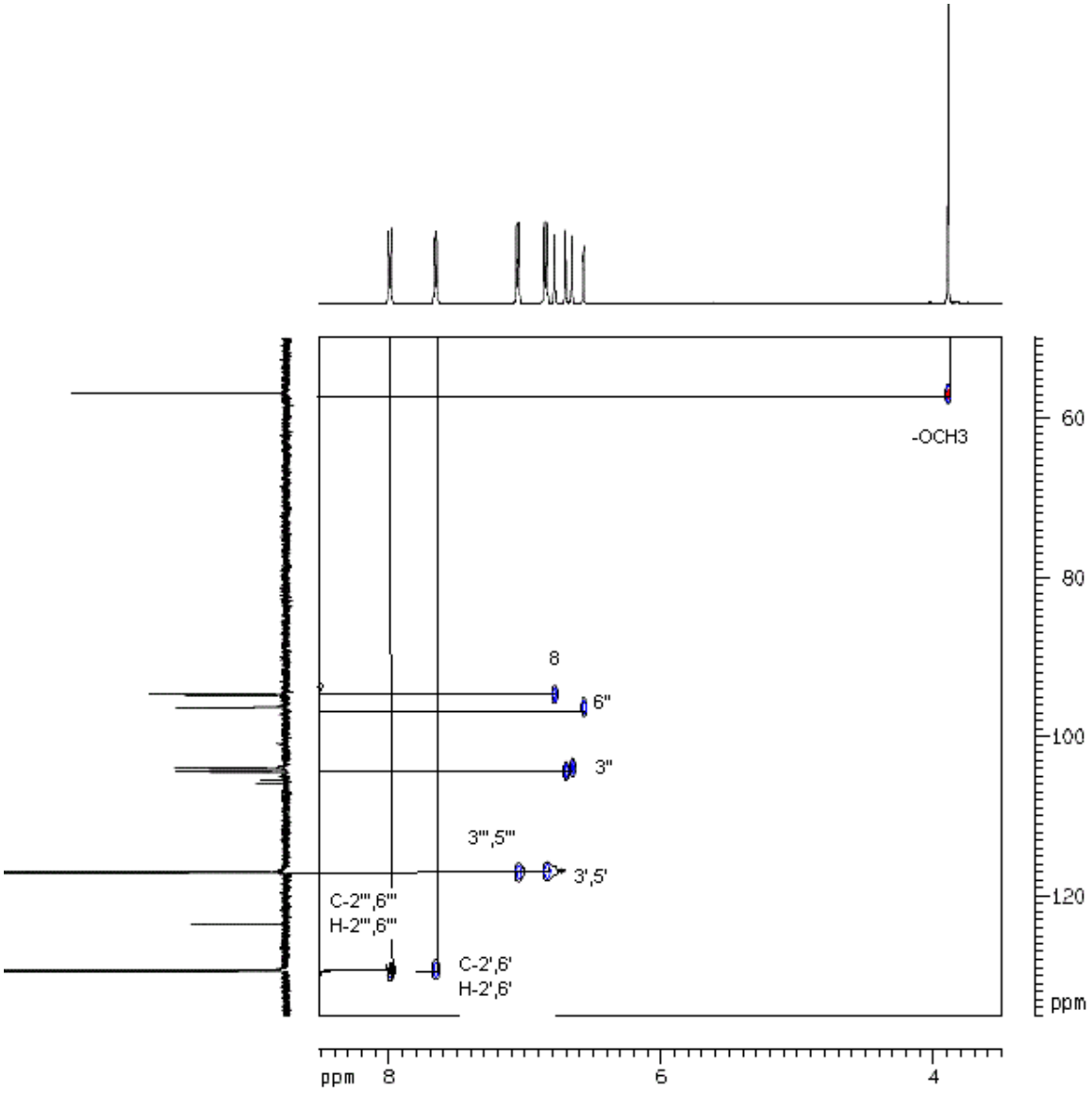



**Figura 39:** Espectro de HSQC ($D_3CCOCD_3$) da substância 4

### 5.2.6. Substância 5

O espectro no IV de **5** (**Figura 40,** pág. 51) evidencia bandas de absorção em 3425 $cm^{-1}$ (estiramento O-H), 1651 $cm^{-1}$ (estiramento de carbonila conjugada) e 1605 $cm^{-1}$ (estiramento C=C de anel aromático) e 1367 $cm^{-1}$ (estiramento C-O).

O espectro de RMN $^{1}H$ (**Figuras 41 e 42,** pág. 53) possui sinais típicos de biflavonóide, sinais de dois sistemas AA'BB' {($\delta_H$ 7,88 (2H, *J*= 7,9 Hz), 7,56 (2H, J= 7,9 Hz), 6,93 (2H, *J*= 7,9 Hz) e 6,72 (2H, *J*= 7,9 Hz)}, quatro singletos em $\delta_H$ 6,38, 6,57, 6,62 (2x), atribuídos aos hidrogênios H-6", 8, 3 e 3". O sinal de $\delta_{C=O}$ (183,74 e 184,26) verificado no espectro de $^{13}C$ (**Figuras 43 e 44,** pág. 54) estão compatíveis com os carbonos carbinólicos em ligação de hidrogênio (**Tabela 5,** pág. 52). A análise em CCDA revelou duas manchas próximas com R.F. 0,35 e 0,19 ($CH_3Cl/CH_3COCH_3$ 7:3). O espectro de RMN $^{1}H$ apresenta sinais com menor intensidade em $\delta_H$ 3,89. Isso permitiu propor a mistura de Agatisflavona **5** com 7"-O-metilagatisflavona **4**.

Para confirmar essa dedução fez-se a análise em CCDA, comparando com os padrões isolados anteriormente e a análise revelou que as substâncias possuíam o mesmo RF dos padrões. Utilizou-se também análise em CLAE utilizando sistema isocrático de metanol/água/acetonitrila/ácido acético (20:40:39:1) como fase móvel e velocidade de fluxo 1mL.$min^{-1}$ , no comprimento de onda 270nm, da fração contendo **4** e **5,** comparando-a com o padrão (7"-O-metilagatisflavona) e obteve-se os cromatogramas (**figuras 45 e 46,** pág**. 55).** O T.R=6,79 da 7"-O-metilagatisflavona permitiu confirmar a presença de **4** e o pico em T.R. = 3,93 foi atribuída a agatisflavona.

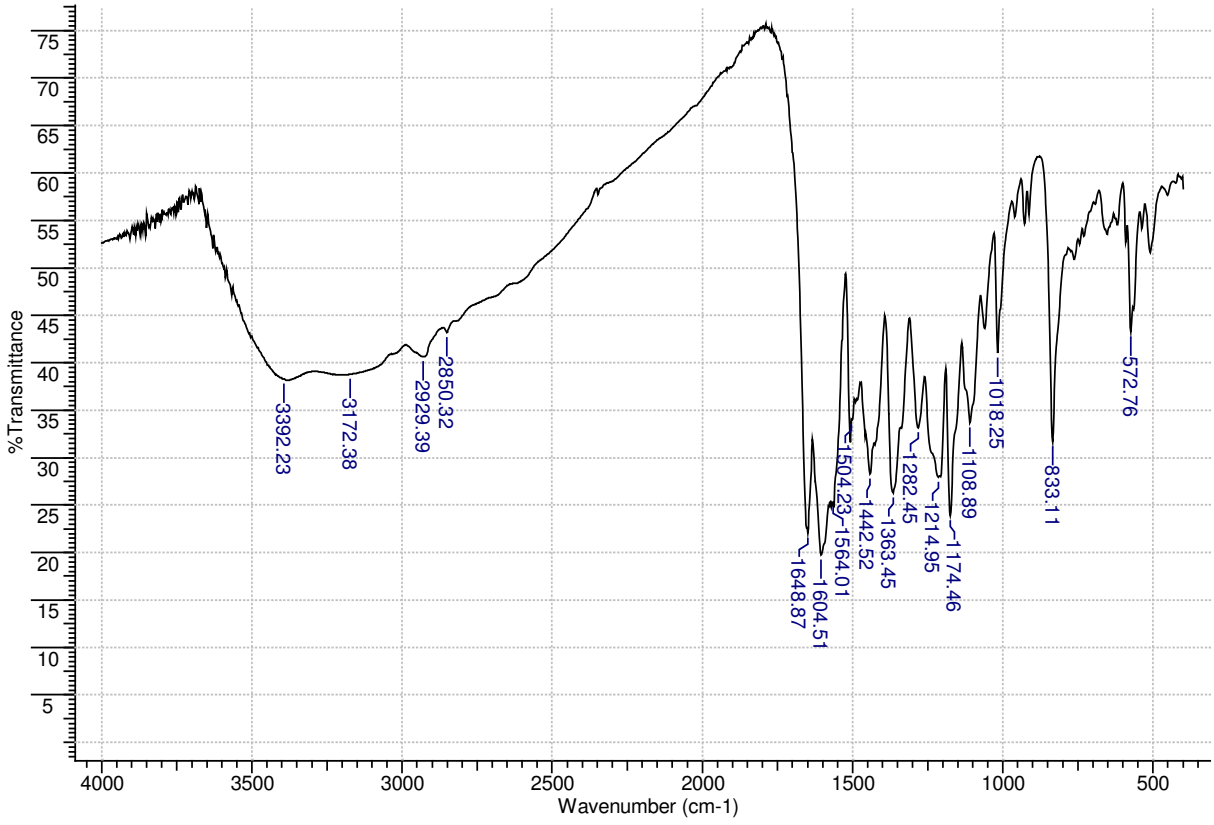
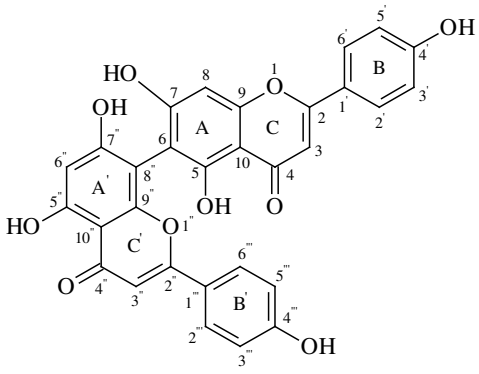



**Figura 40**: Espectro de IV de 5.

**Tabela 5.** Dados de RMN $^{1}H$ (200 MHz) e $^{13}C$ (50 MHz) em Acetona-$D_6$, comparando com os dados de RMN de $^{13}C$ da literatura (AGRAWAL, 1989) da substância **5** (agatisflavona).




| C | δC **(Metanol-$D_4$)** | δC **(literatura-DMSO-$D_6$)** | $\delta_H$(mult, Hz) |
|---|---|---|---|
| 2 | 167,5 | 164,1 | - |
| 4 | 184,3 | 182,3 | - |
| 5 | 162,5 | 160,0 | - |
| 6 | 103,1 | 103,6 | - |
| 7 | 165,9 | 162,9 | - |
| 9 | 160,9 | 157,0 | - |
| 10 | 103,5 | 103,8 | - |
| 1' | 123,4 | 121,5 | - |
| 4' | 162,7 | 161,3 | - |
| 2" | 166,3 | 163,9 | - |
| 4" | 183,7 | 182,0 | - |
| 5" | 162,5 | 160,9 | - |
| 7" | 166,3 | 162,7 | - |
| 8" | 101,1 | 99,4 | - |
| 9" | 159,0 | 155,1 | - |
| 10" | 103,5 | 104,0 | - |
| 1"' | 121,4 | 121,7 | - |
| 4"' | 162,5 | 161,2 | - |
| 3 | 103,1 | 103,1 | 6,70 (*s*) |
| 8 | 95,9 | 93,7 | 6,81 (*s*) |
| 2',6' | 129,6 | 128,6 | 7,96 (*d*, 7,9) |
| 3',5' | 117,2 | 116,2 | 7,66 (*d*, 7,9) |
| 3" | 103,5 | 102,8 | 6,67 (*s*) |
| 6" | 101,1 | 98,9 | 6,57 (*s*) |
| 2"',6"' | 129,6 | 128,2 | 7,03 (*d*, 7,9) |
| 3"',5"' | 117,2 | 116,2 | 6,85 (*d*, 7,9) |

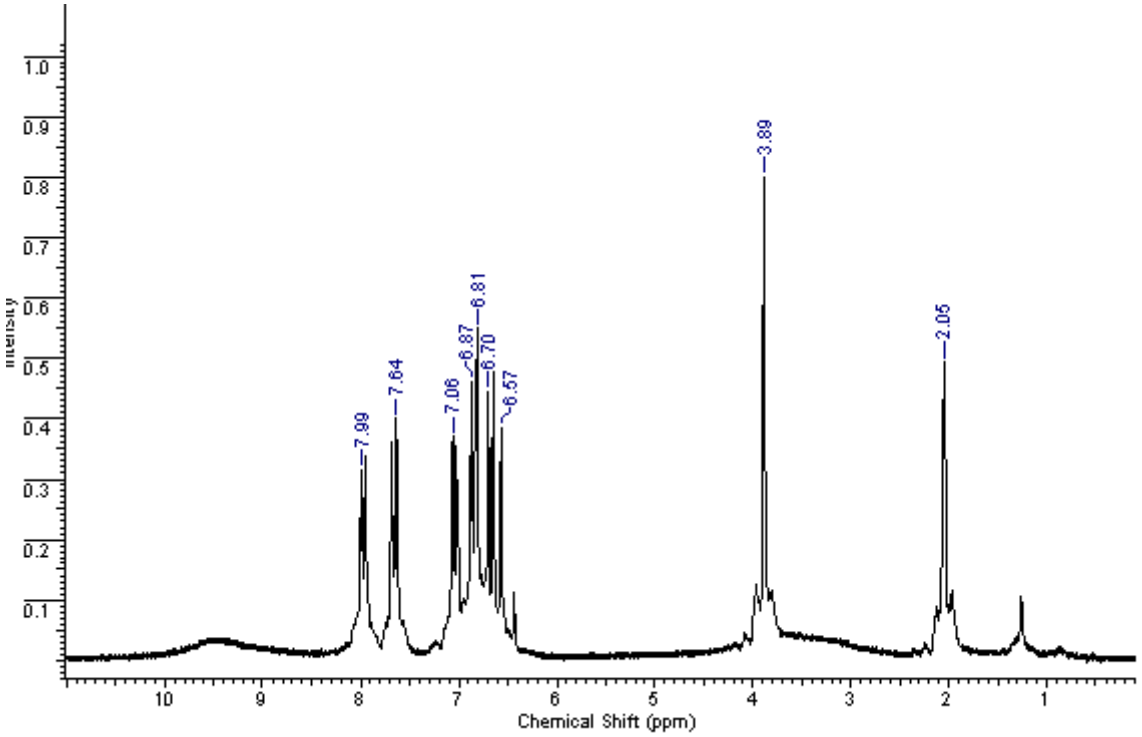



**Figura 41:** Espectro de RMN de $_1$H (200MHz, $D_3CCOCD_3$) da mistura dos biflavonóides **4 e 5.**

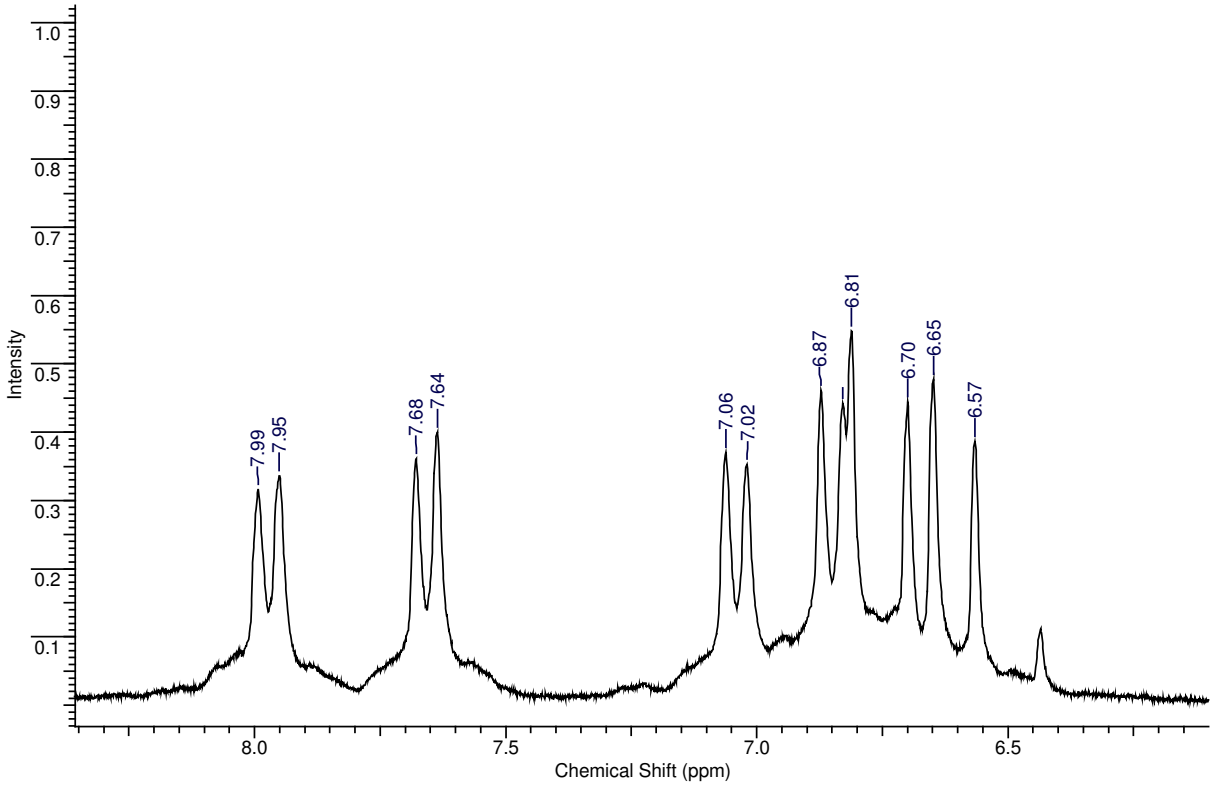



**Figura 42:** Ampliação do espectro (6.0-8.5 ppm) de RMN de $_1$H (200MHz, $D_3CCOCD_3$) da mistura dos biflavonóides **4 e 5.**

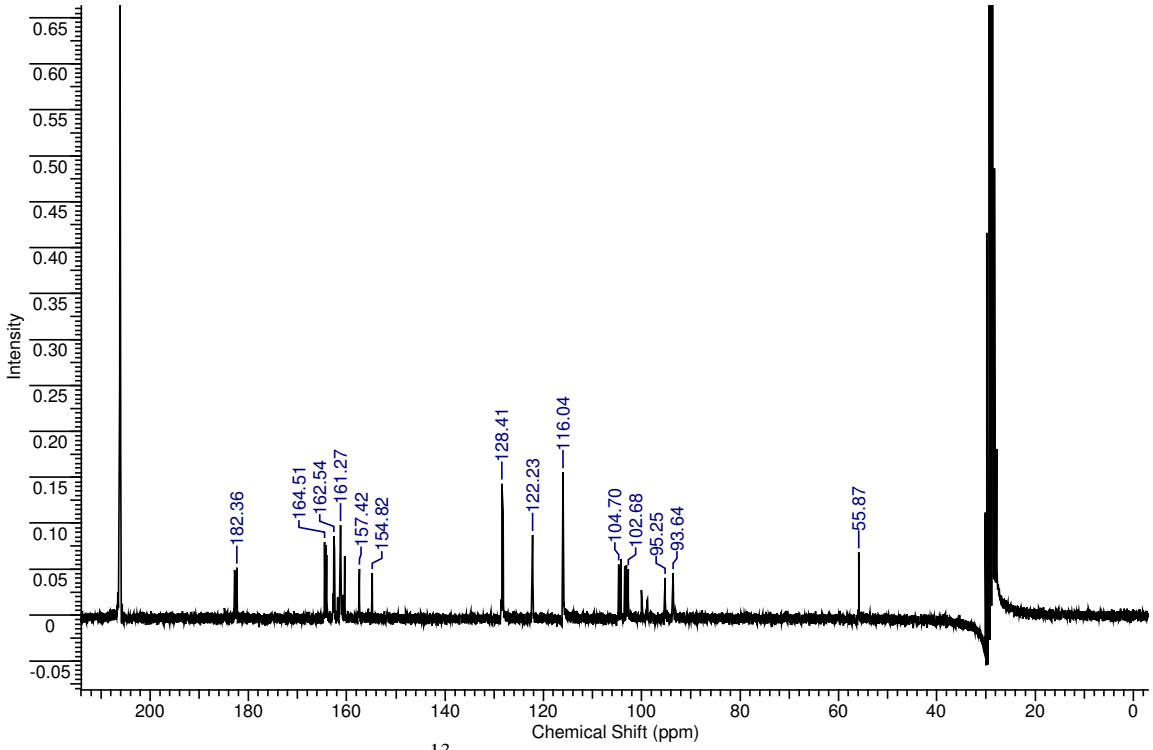



**Figura 43:** Espectro de RMN de $^{13}C$ (50 MHz, $D_3CCOCD_3$) da mistura dos biflavonóides **4 e 5.**

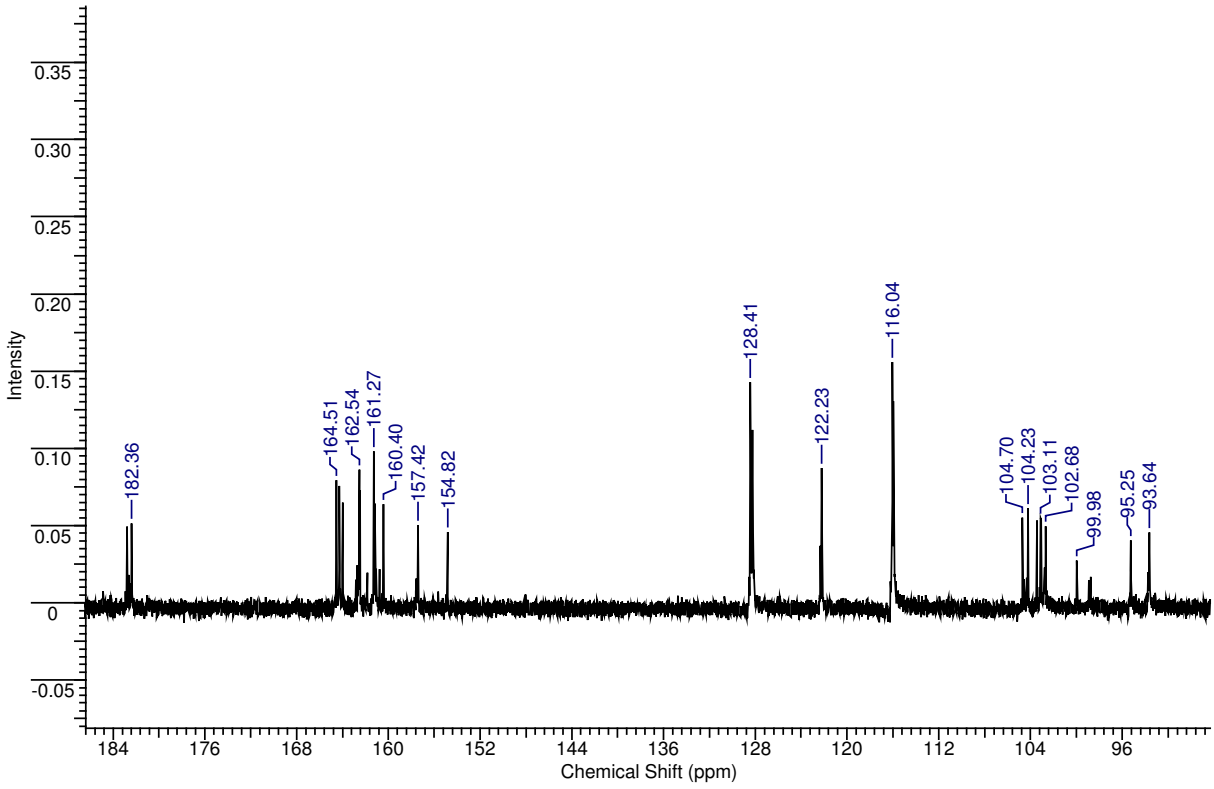



**Figura 44:** Ampliação do espectro de RMN de $^{13}C$ (50 MHz, $D_3CCOCD_3$) da mistura dos biflavonóides **4 e 5.**

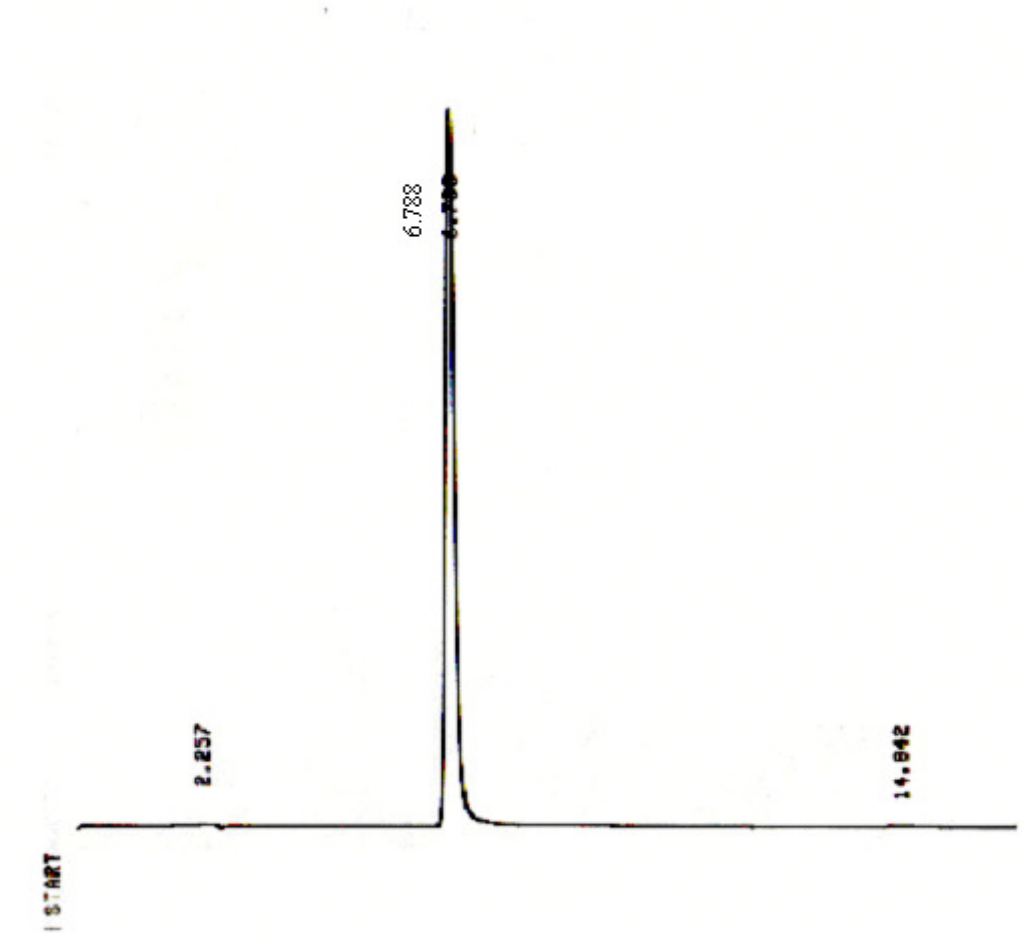



**Figura 45:** Cromatograma obtido em CLAE de 7”-O-metilagatisflavona (**4**).

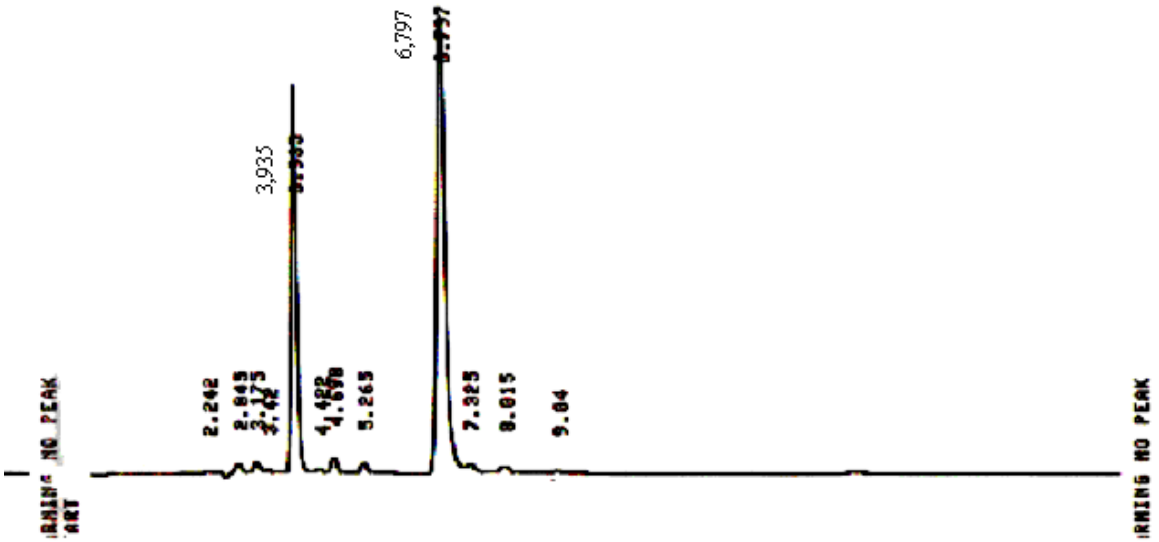



**Figura 46:** Cromatograma obtido em CLAE da mistura **4 e 5.**

### 5.2.7. Derivado 4a (hexametilagatisflavona).

A reação de metilação de 7"-*O*-metilagatisflavona com diazometano forneceu o derivado hexametilado **4a**, através da substituição dos hidrogênios das hidroxilas por grupos metilas nas posições 7, 5, 5", 4', 4"'. A mudança significativa no espectro de RMN $^{1}$H de **4a**, quando comparada com o biflavonóide natural **4** (7"-O-metilagatisflavona), foi o aparecimento de 5 sinais adicionais de metoxilas.

Os espectros de RMN $^{1}$H (1D e 2D $^{1}$H-$^{1}$H-COSY) revelam sinais para os átomos de hidrogênios H-3"',5"' ($\delta_H$ 6,94, *d*, *J*=8,5) acoplando com H-2"',6"' ($\delta_H$ 7,69, *d*, *J*=8,5) e H-3',5' ($\delta_H$ 7,16, *d*, *J*=8,5) acoplando com H-2',6' ($\delta_H$ 8,11, *d*, *J*=8,5), correspondentes a dois sistemas AA'BB'. Os hidrogênios H-6",3",3 e 8 estão representados pelos sinais simples de $\delta_H$ 6,57, $\delta_H$ 6,69, $\delta_H$ 6,81 e $\delta_H$ 6,99, respectivamente. Os sinais das metoxilas 7, 7", 5, 5", 4' e 4" aparecem no espectro em $\delta_H$ 4,07, 3,94, 3,61, 3,93, 3,88 e 3,77 ppm.

O espectro de RMN $^{1}$H (**Figuras 47-49**, pág. 58 e 59) de **4a** mostra o desaparecimento dos sinais dos hidrogênios em ligação de hidrogênio em torno de 13 ppm e o revelando que ambas foram substituídas por grupos metilas. Os espectros obtidos com $^{1}$Hx$^{1}$H COSY (**Figura 50,** pág. 60) e NOESY (**Figuras 51 e 52**, págs. 60 e 61), permitiram fazer a completa atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios de **4a** (**Tabela 6,** pág. 57). Os sinais de interações espaciais detectados no espectro NOESY permitiram confirmar as localizações e os respectivos deslocamentos químicos: MeO-4' com interação espacial com H-3',5' ($\delta_H$ 7,05), MeO-4"' com interação espacial com H-3"',5"' ($\delta_H$ 6,84), MeO-7 com interação espacial com H-8 ($\delta_H$ 7,01) e MeO-7", pela interação espacial com H-6" ($\delta_H$ 6,73).

O espectro de RMN $^{13}$C de **4a** (**Figura 53 e 54,** págs. 61 e 62) foi comparado com a literatura (MOREIRA *et al*,, 1999). O espectro de HMQC (**Figura 55,** pág. 63) permitiu estabelecer as correlações diretas ($^{1}J_{CH}$) enquanto que os deslocamentos químicos dos carbonos não hidrogenados deste derivado foram estabelecidos pelos espectros de HMBC através ($^{2,3}J_{CH}$). (**Figura 56,** pág. 64).

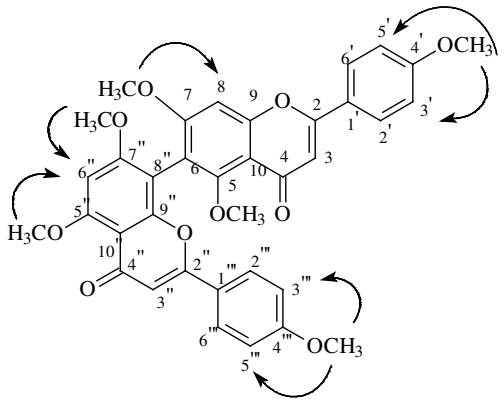


**Tabela 6:** Dados de RMN $^{1}H$ (200 MHz) e $^{13}C$ (50 MHz) da substância **4** (MOREIRA *et al*., 1999) com o derivado **4a**.

| | **Substância 4** | **Derivado 4a** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | HMBC | | | |
| C | δC | δC | δH | CH | $^{1}J_{CH}$ | $^{2,3}J_{CH}$ | Noe |
| 2 | 165,03 | 161,8 | | H-3;H-2',6' | | | |
| 3 | 103,22 | 107,6 | 6,91(s,1H) | | | | |
| 4 | 183,5 | 177,1 | | H-3 | | | |
| 5 | 161,3 | 159,7 | | $CH_3O$- 6 | | | |
| 6 | 104,1 | 113,8 | | H-8 | | | |
| 7 | 163,1 | 163,2 | | $H_3CO$- 7; H-8 | | | |
| 8 | 94,5 | 95,8 | 7,0(s,1H) | | | | $OCH_3$-7 |
| 9 | 158,2 | 160,5 | | H-8 | | | |
| 10 | 105,1 | 105,9 | | | | | |
| 1' | 123,2 | 123,7 | | H-3',5' | | | |
| 2',6' | 129,3 | 128,1 | 7,96(d,8Hz,2H) | | | | |
| 3',5' | 116,8 | 114,8 | 7,1(d,8Hz,2H) | | | | $OCH_3$-4' |
| 4' | 161,8 | 163,4 | | $H_3CO$- 4';H-2',6';H-3',5' | | | |
| 2" | 165,2 | 161,2 | | H-3";H-2'",6'" | | | |
| 3" | 103,4 | 106,0 | 7,26(s,1H) | | | | |
| 4" | 183,3 | 178,3 | | | | | |
| 5" | 163,4 | 162,0 | | $H_3CO$- 7";H-6" | | | |
| 6" | 96,0 | 92,4 | 6,6(s,1H) | H-6" | | | $OCH_3$-5",$H_3CO$-7" |
| 7" | 164,8 | 162,8 | | | | | |
| 8" | 101,0 | 103,1 | | H-6";H-3" | | | |
| 9" | 155,5 | 157,3 | | H-3'',5'" | | | |
| 10" | 105,6 | 107,0 | | | | | |
| 1'" | 123,2 | 124,0 | | | | | |
| 2'",6'" | 129,1 | 128,1 | 7,50(d,8Hz,2H) | H-2'",6'";H-3'",5'" | | | |
| 3'',5'" | 116,8 | 114,9 | 6,86(d,8Hz) | | | | $OCH_3$-4'" |
| 4'" | 161,8 | 163,1 | | | | | |
| $OCH_3$-5 | | 62,4 | 3,62 | | | | |
| $OCH_3$-7 | | 56,5 | 3,88 | | | | H-8 |
| $OCH_3$-4' | | 55,9 | 3,93 | | | | H-3',5' |
| $OCH_3$-5" | | 56,8 | 4,03 | | | | H-6" |
| $OCH_3$-7" | 56,7 | 56,4 | 3,95 | | | | H-6" |
| $OCH_3$-4'" | | 55,7 | 3,82 | | | | H-3'",5'" |

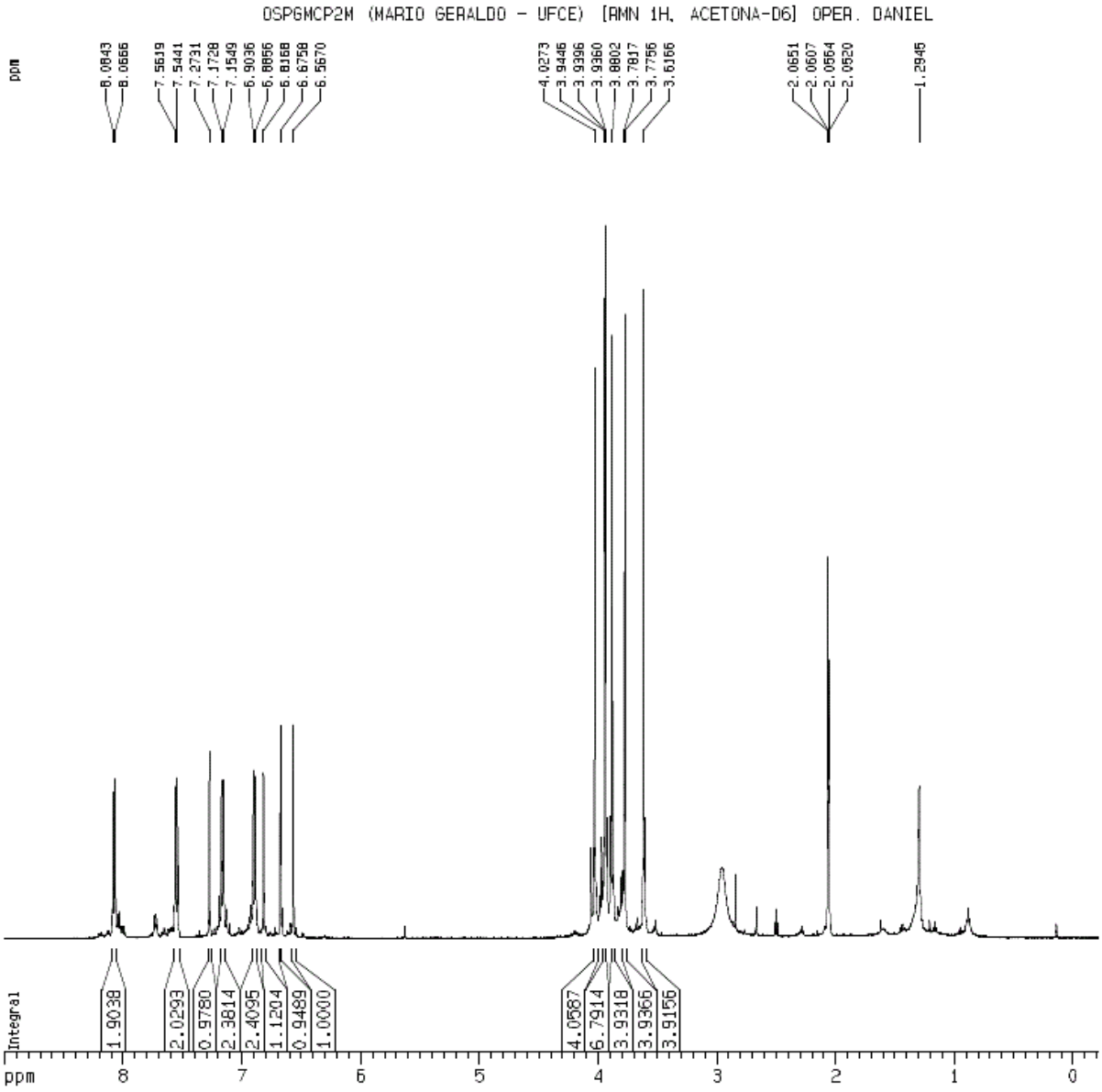



**Figura 47:** Espectro de RMN de $^{1}H$ (500 MHz , $D_3CCOCD_3$) do derivado **4a.**

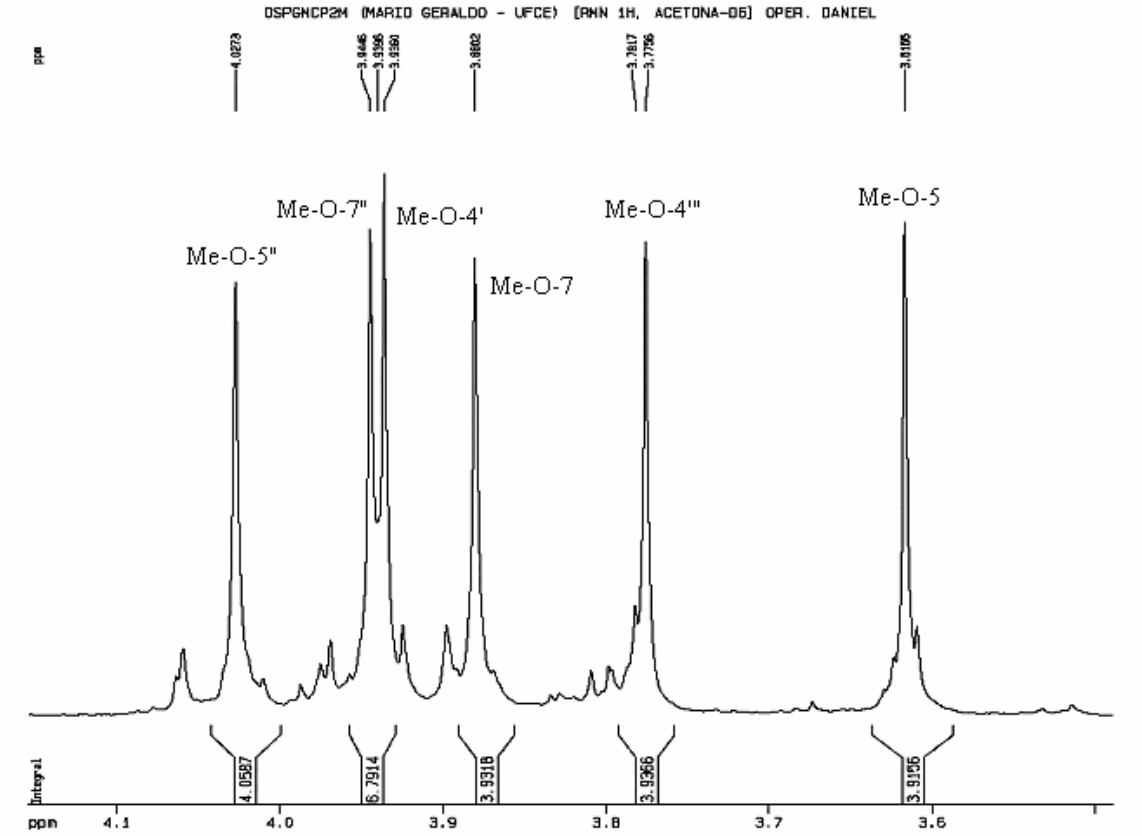



**Figura 48:** Ampliação do espectro de RMN de $^{1}H$ (500 MHz , $D_3CCOCD_3$) do derivado **4a.**

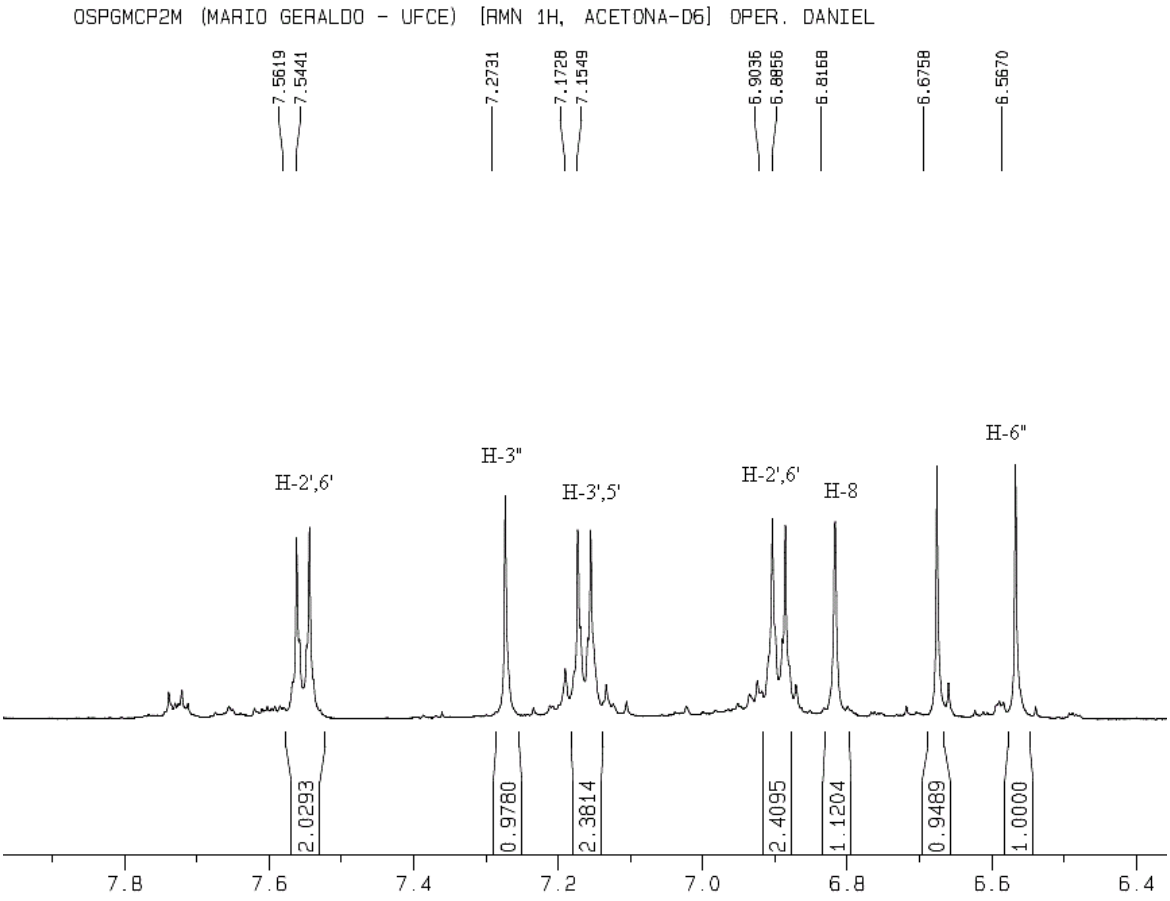



**Figura 49:** Ampliação do espectro de RMN de $^{1}H$ (500 MHz , $D_3CCOCD_3$) do derivado **4a.**

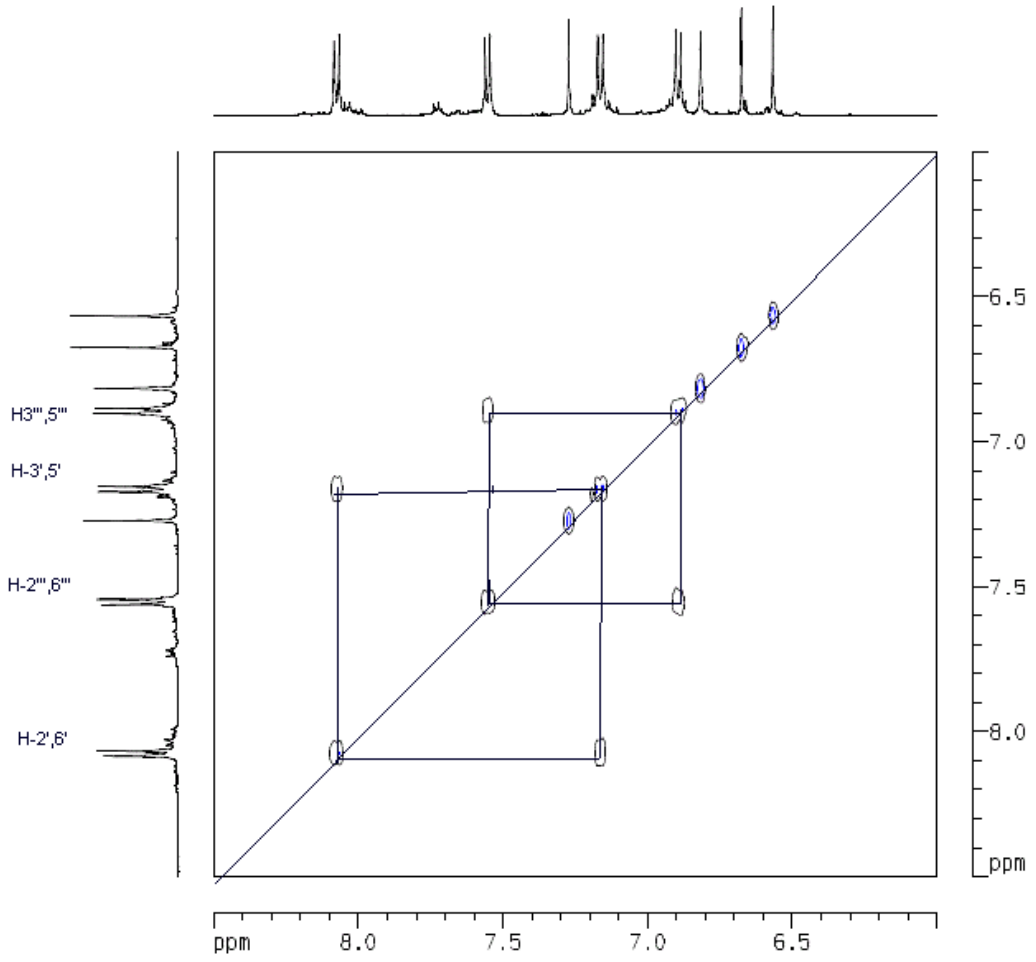



**Figura 50:** Espectro de $^{1}H$-$^{1}H$-COSY (500MHz, $D_3CCOCD_3$) de **4a.**

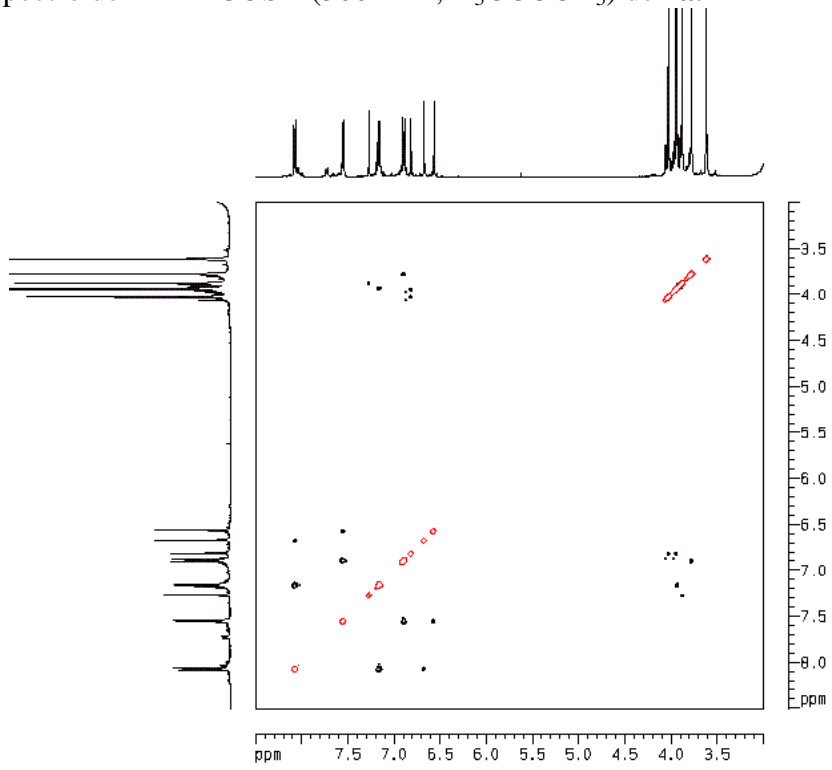



**Figura 51:** Espectro de NOESY de **4a**.

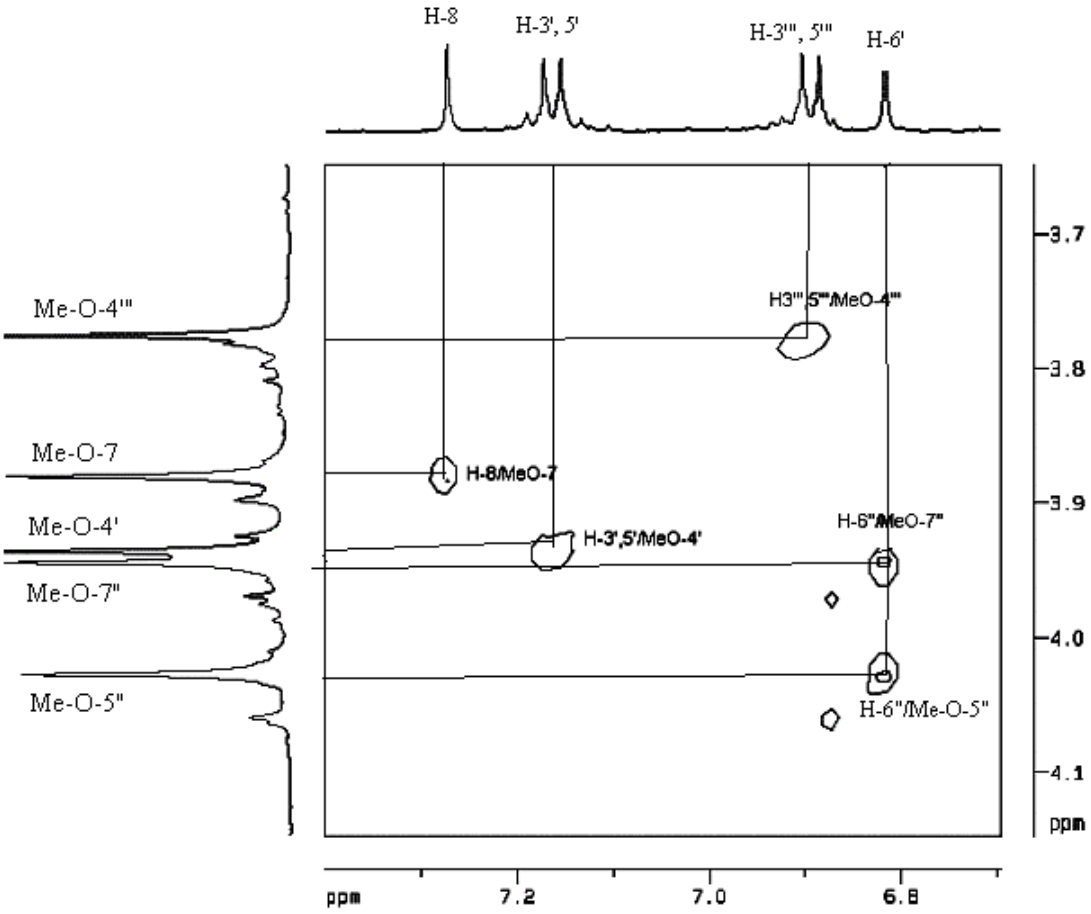



**Figura 52:** Ampliação do espectro de NOESY de **4a**.

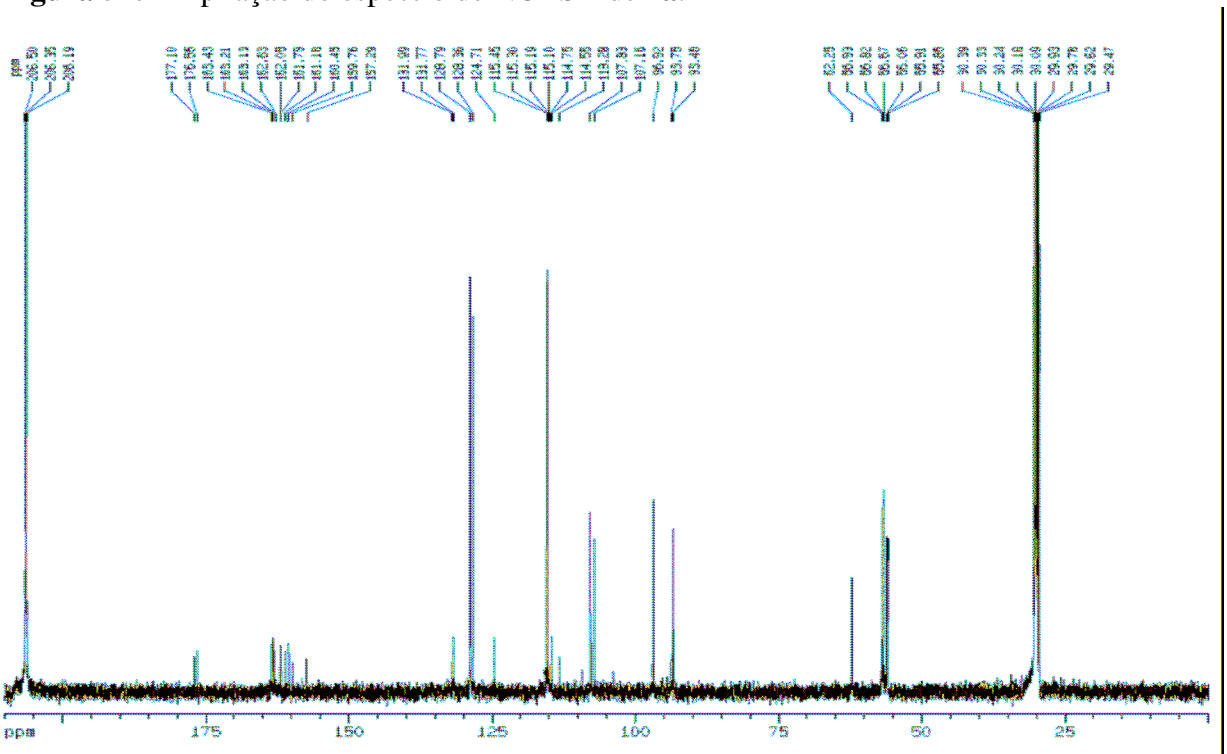



**Figura 53:** Espectro de $^{13}C$ (125MHZ, $D_3CCOCD_3$)de **4a.**

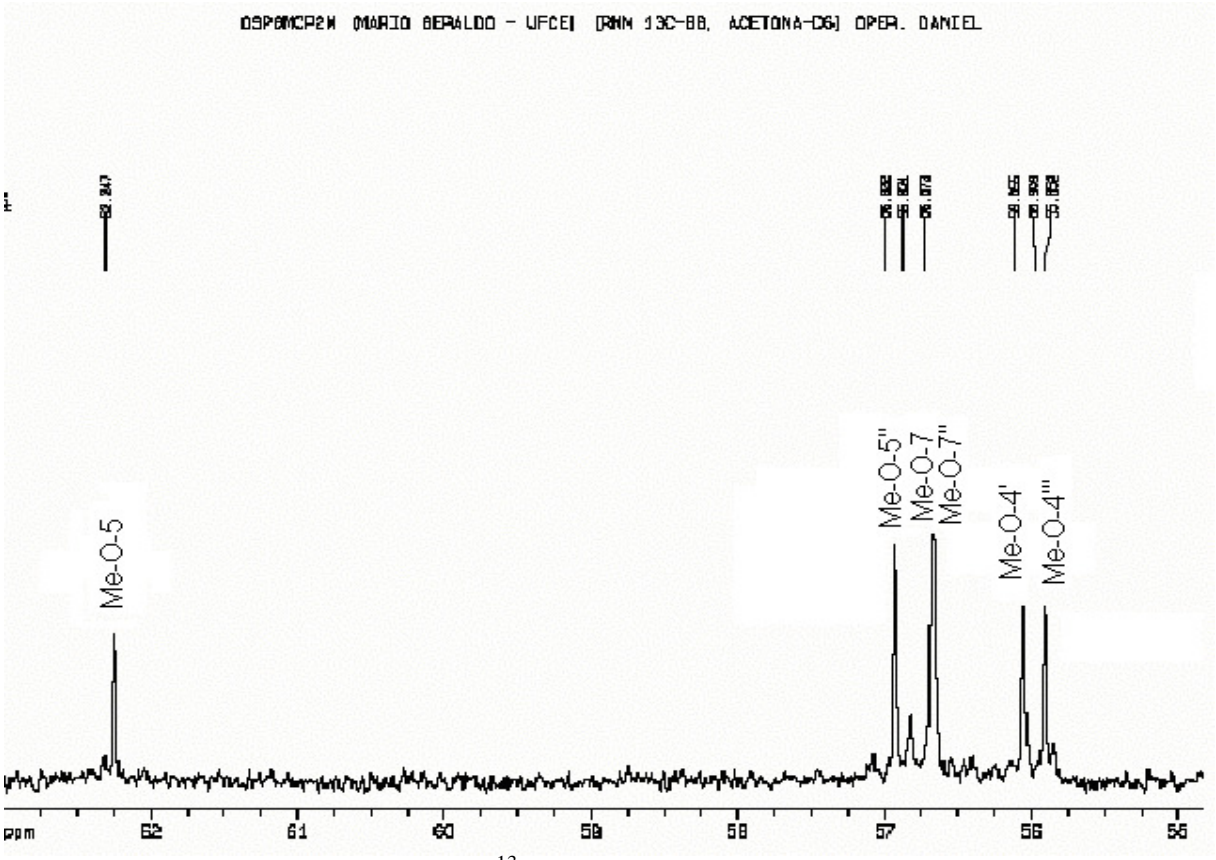



**Figura 54:** Ampliação do espectro de $^{13}C$ (125MHZ, $D_3CCOCD_3$) de **4a.**

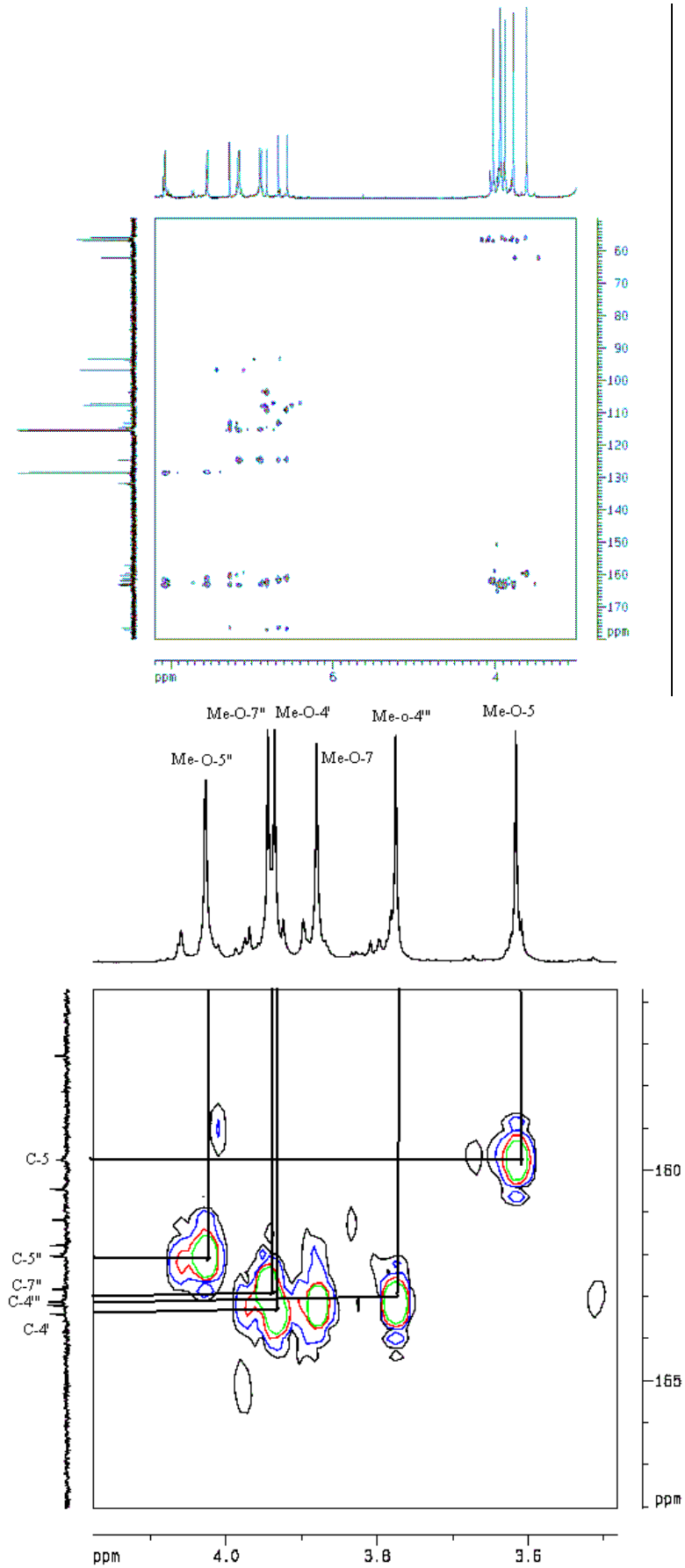



**Figura 55**: Espectro e ampliação (3-5 ppm) de HMBC ($D_3CCOCD_3$) da substância **4a**.

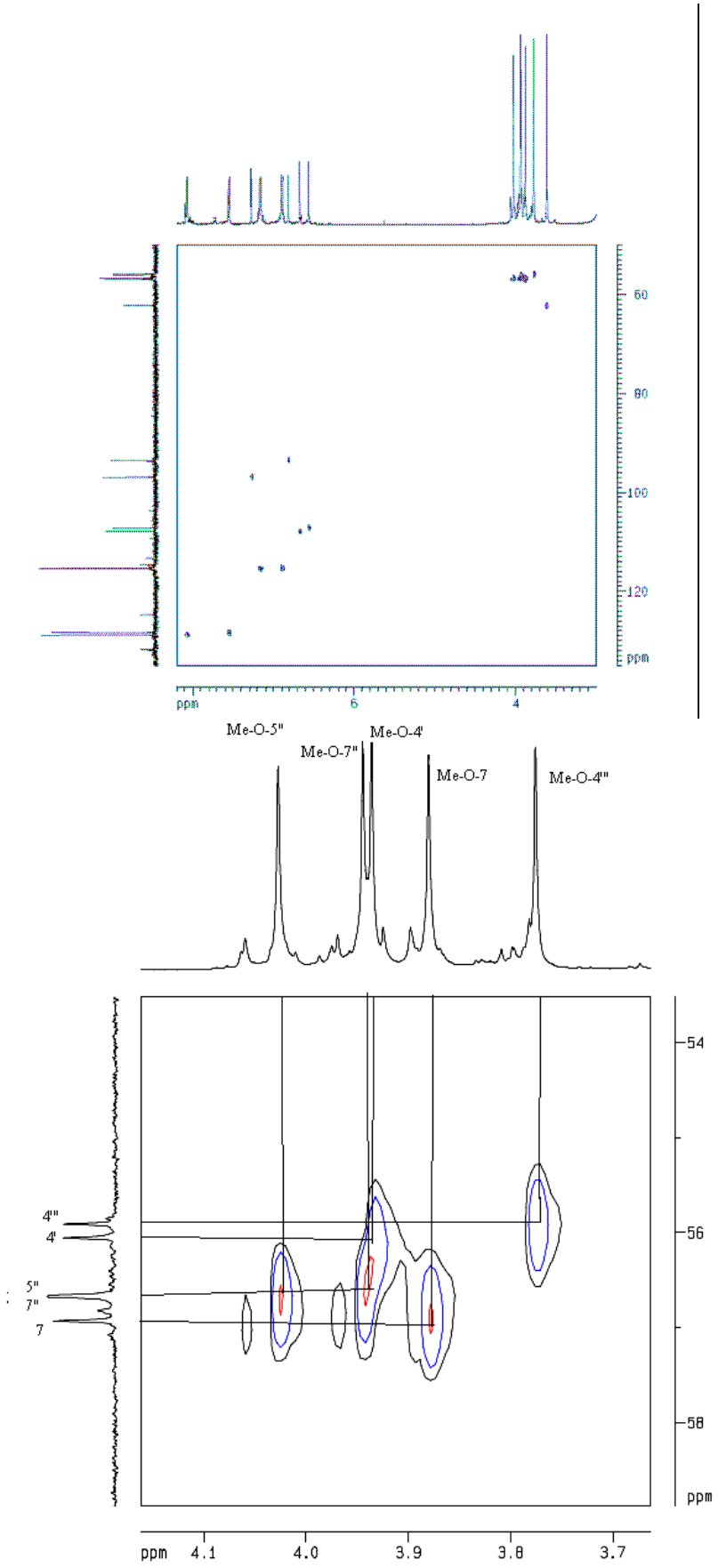



**Figura 56**: Espectro e ampliação (3,7-4,1 ppm) de HSQC ($D_3CCOCD_3$) da substância **4a**.

### 5.2.8. Substância 6

Uma fração do extrato metanólico partição clorofórmio, foi analisada em CCDA e revelou a presença de um componente terpênico e biflavonóide.

O espectro de IV desse material (**Figura 57,** pág. 66) revelou bandas de absorção em 3408 $cm^{-1}$ de estiramento axial de O-H, bandas em 2959 e 2934 e 2870 $cm^{-1}$ de $\nu_{C-H}$ ($CH_2$ e $CH_3$), 1633 ($\nu_{C=C}$); 1460,1380 ($\nu_{C-C}$); 1164-1023 ($\nu_{C-O}$); 1648 ($\nu_{C=O}$); 1604,01504 e 1442 $\nu_{C=C}$ (aromático); 1214 e 1174 ($\nu_{C-O}$); 833 $\delta_{=C-H}$ (2 H vizinhos). Compatíveis com o revelado em placa.

O espectro de RMN $^1H$ deste material **(Figura**, **58,** pág. 68) apresenta sinais de metilas entre $\delta_H$ 0,63 e $\delta_H$ 0,94, de hidrogênio alifático e em $\delta_H$ 5,34, típico de H-6 de fitosteróides. Além dos sinais da parte da aglicona aparecem sinais em $\delta_H$ 3,10 (*m*, H-5´), 4,22 (*d*, H-1'), 2,91 (*m*, H-2'), 3,02 (*m*, H-4') e 3,15 (*m*, H-3') que podem ser atribuídos aos hidrogênios do carboidrato. Esta unidade de açúcar pode ser atribuída como β-glicosídeo devido à presença do dubleto em δ 4,23 (*J*=8 Hz) que representa o hidrogênio anomérico (H-1') acoplando com o hidrogênio H-2' *trans*-diaxial. Os demais valores dos sinais de H-3', 4', 5' e 6' estão assinalados na **Tabela 7,** pág. 67.

Os espectros de RMN $^{13}C$ (**Figuras, 59 e 60,** pág. 69 e 70) de **6** apresentam 4xCH e um $CH_2$ do açúcar, sendo um com δ 103,4 do CH anomérico. A comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos metínicos de **6** com valores da literatura, permitiu propor a glicose como representante da unidade de açúcar ligado no C-3 do esteróide. A comparação dos dados de **6** com valores atribuídos para o sitoesterol glicosilado permiiu identificar como 3-*O*-β-D-glicopiranosilsitosterol. Na parte da aglicona temos $\delta_C$ 70,1 do CH-3. Os sinais dos carbonos $sp^2$ em $\delta_{C-5}$ 140,4 e $\delta_{C-6}$ 121,0, são compatíveis com os dois carbonos sp2 (C-5 e C-6) do sitosterol de acordo com comparação dos valores de $^{13}C$ com os da literatura (VELANDIA, 2002). Os sinais de H em anel aromático no espectro de RMN 1H, confirmam a presença do biflavonóide agatisflavona como impureza na fração.

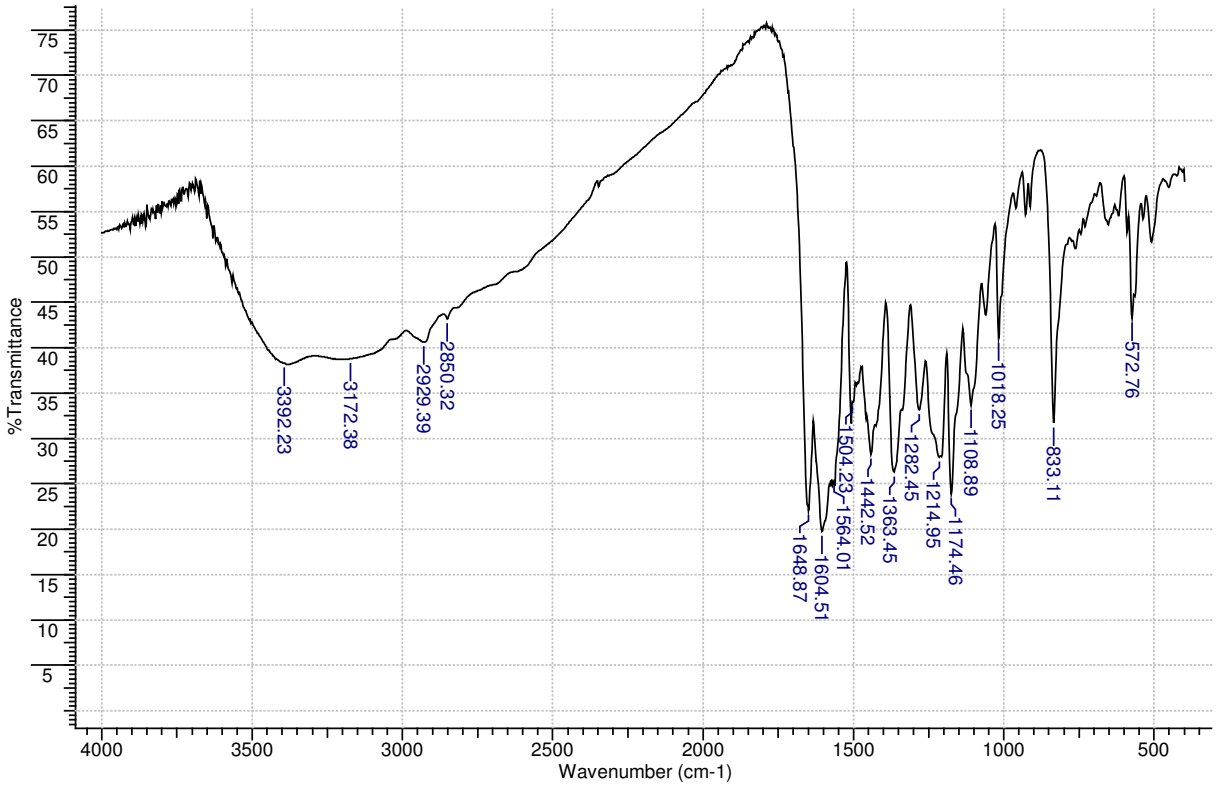
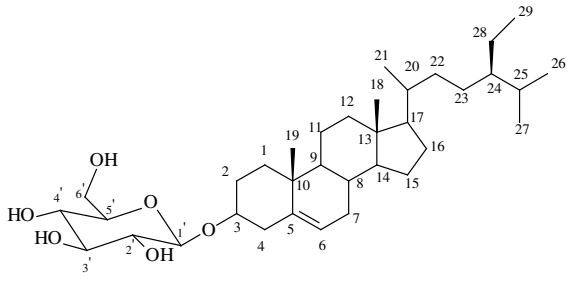



**Figura 57:** Espectro de IV da substância **6**.

**Tabela 7:** Dados de RMN de $^{1}H$ e $^{13}C$ da substância **6**



**6**

| Substância **6** | | Literatura (VELANDIA, 2002) | |
|---|---|---|---|
| C | δC | δH | δC |
| 1 | 36,7 | | 37,3 |
| 2 | 32,2 | | 31,6 |
| 3 | 70,1 | 3,47 | 71,8 |
| 4 | 41,8 | | 42,9 |
| 5 | 140,4 | | 140,7 |
| 6 | 121,0 | 5,34 | 121,7 |
| 7 | 31,2 | | 31,9 |
| 8 | 31,3 | | 31,9 |
| 9 | 49,5 | | 50,1 |
| 10 | 36,1 | | 36,4 |
| 11 | 22,6 | | 21,1 |
| 12 | 39,2 | | 39,8 |
| 13 | 41,7 | | 42,9 |
| 14 | 56,1 | | 56,7 |
| 15 | 25,5 | | 24,3 |
| 16 | 27,6 | | 28,24 |
| 17 | 55,4 | | 56,0 |
| 18 | 11,5 | 0,63 | 11,9 |
| 19 | 19,5 | 0,94 | 19,4 |
| 20 | 35,3 | | 32,2 |
| 21 | 18,8 | | 14,0 |
| 22 | 33,3 | | 33,9 |
| 23 | 38,2 | | 39,1 |
| 24 | 45,1 | | 45,8 |
| 25 | 28,7 | | 26,0 |
| 26 | 18,8 | 0,89 | 18,8 |
| 27 | 18,9 | 0,78 | 19,0 |
| 28 | 23,7 | 0,87 | 23,0 |
| 29 | 117,7 | 0,82 | 12,0 |
| 1’ | 103,4 | 4,23 | 101,4 |
| 2’ | 74,8 | 2,91 | 73,3 |
| 3’ | 77,8 | 3,15 | 76,5 |
| 4’ | 71,9 | 3,02 | 70,3 |
| 5’ | 75,4 | 3,10 | 73,7 |
| 6’ | 65,0 | 3,71 | 64,4 |

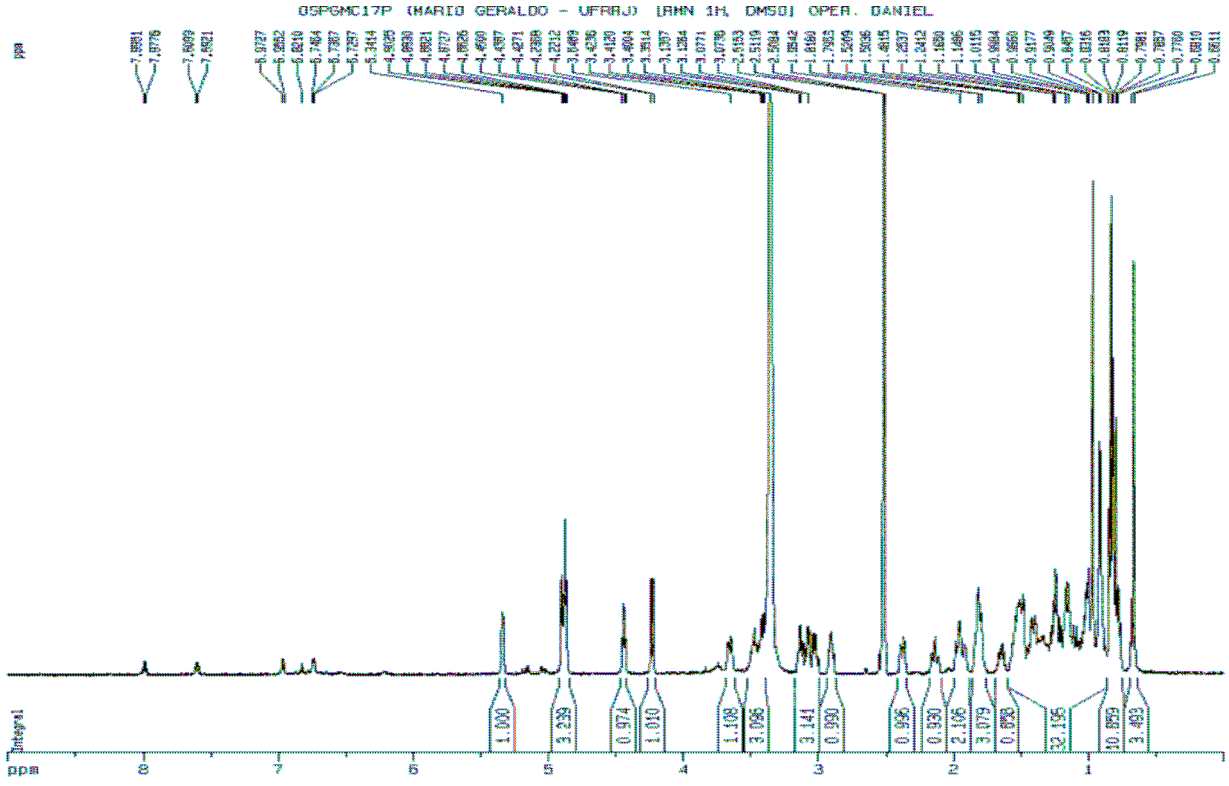



**Figura 58**: RMN de $^{1}H$ (400MHz, DMSO-$d_6$) da fração contendo a substância **6**.

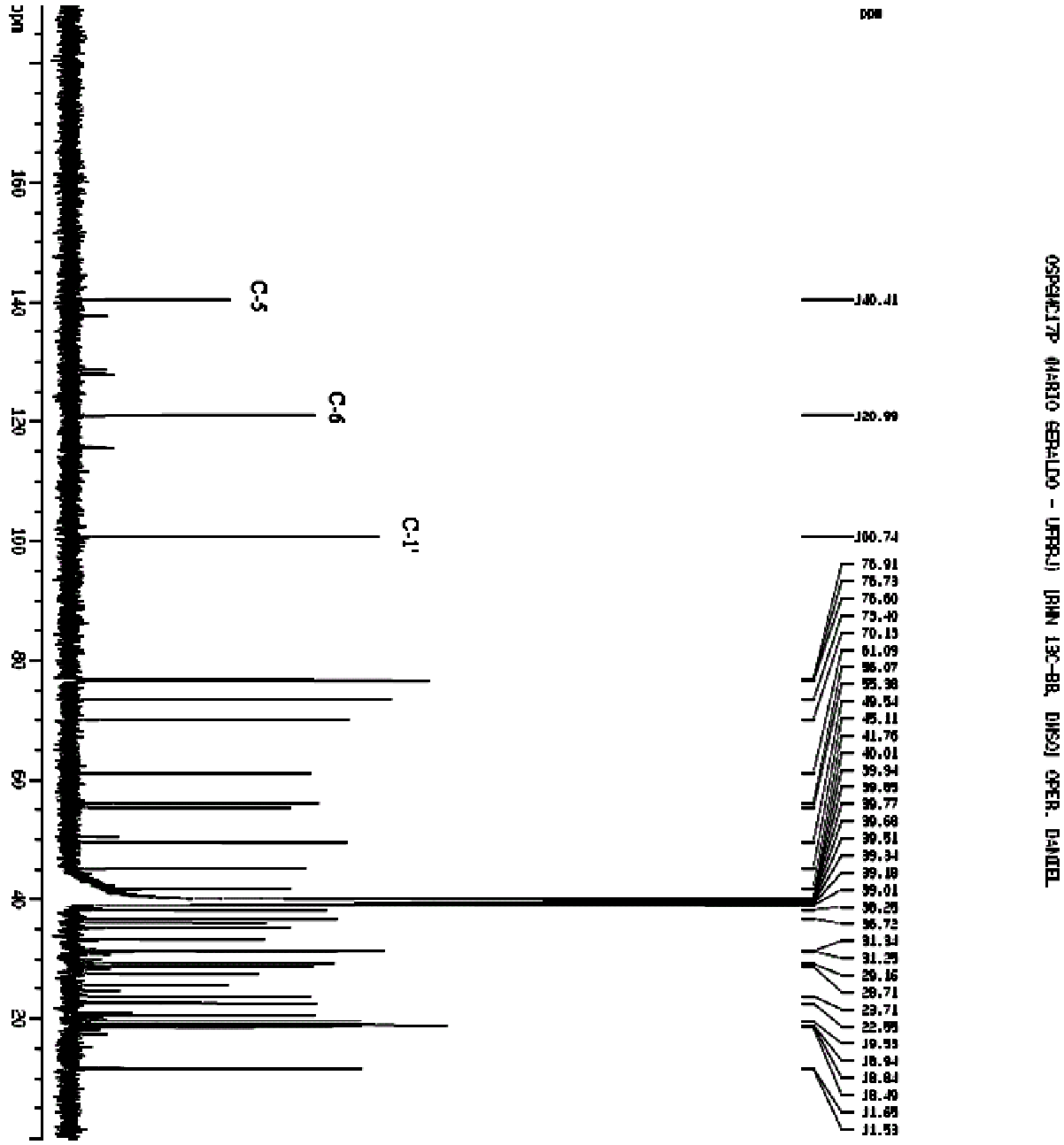



**Figura 59**: RMN de $^{13}C$ (125MHz, DMSO-$d_6$) da fração contendo a substância **6.**

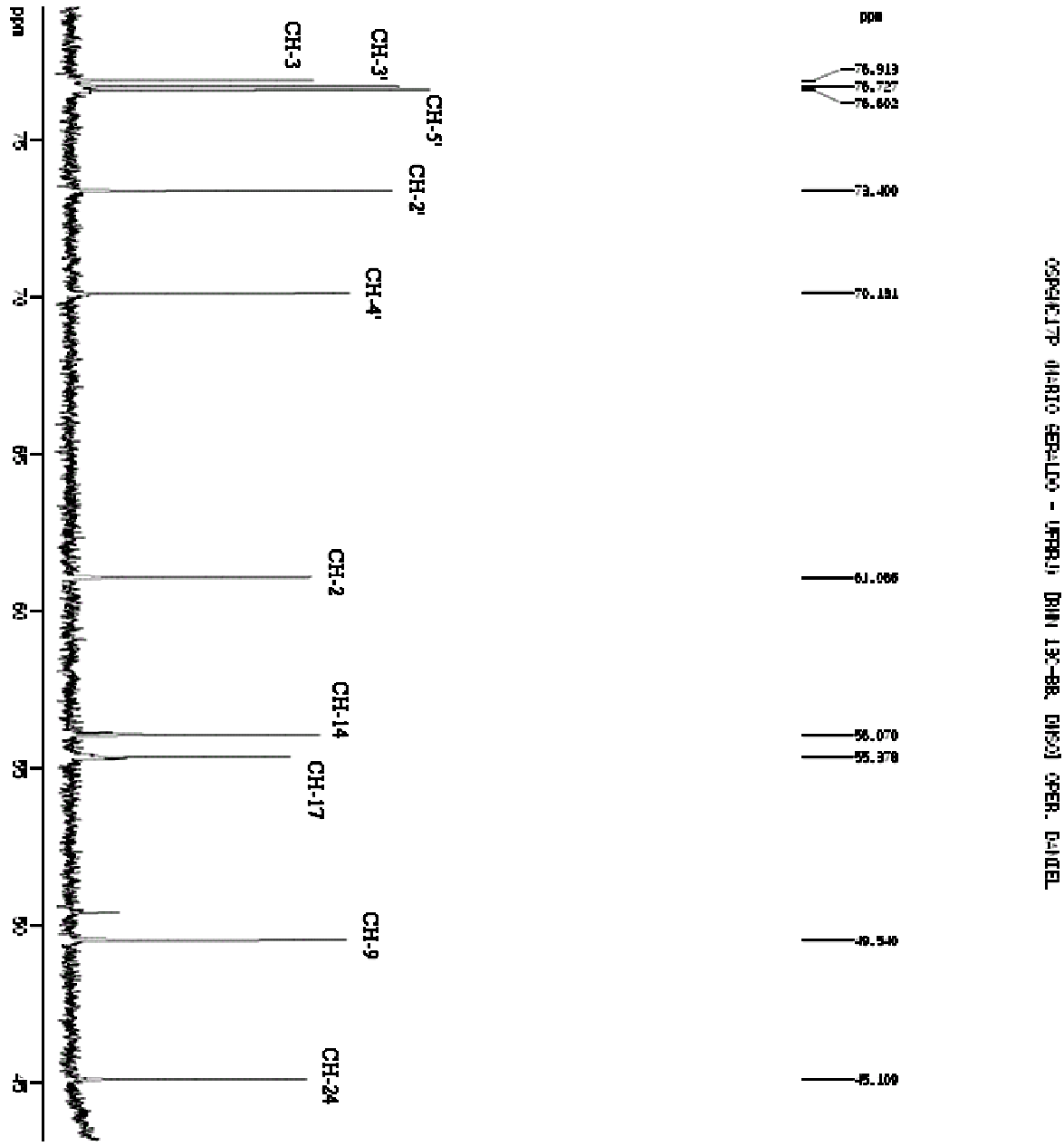



**Figura 60**: Ampliação do RMN de $^{13}C$ (125 MHz, DMSO-$d_6$) da fração contendo a substância **6**.

## 5.3. ANÁLISE COM CLAE DAS FRAÇÕES *OSPGMC* E *OSPMC-16P.*

Considerando que estas frações continham mistura de flavonóides resolveu-se fazer análise cromatográfica. O cromatograma obtido com CLAE utilizando sistema isocrático de metanol/água/acetonitrila/ácido acético (20:40:39:1) como fase móvel e velocidade de fluxo 1mL.min$^{-1}$ e detecção UV ($\lambda_{máx}$=270nm), confirmaram a presença de outros componentes na fração OSPMC (**figura 61,** pág. 71) além de agatisflavona e 7''-O-metil-agatisflavona e na fração OSPMC-1-6P (**figura 62,** pág. 72) que continha como componente majoritário a 7''-O-metil-agatisflavona.

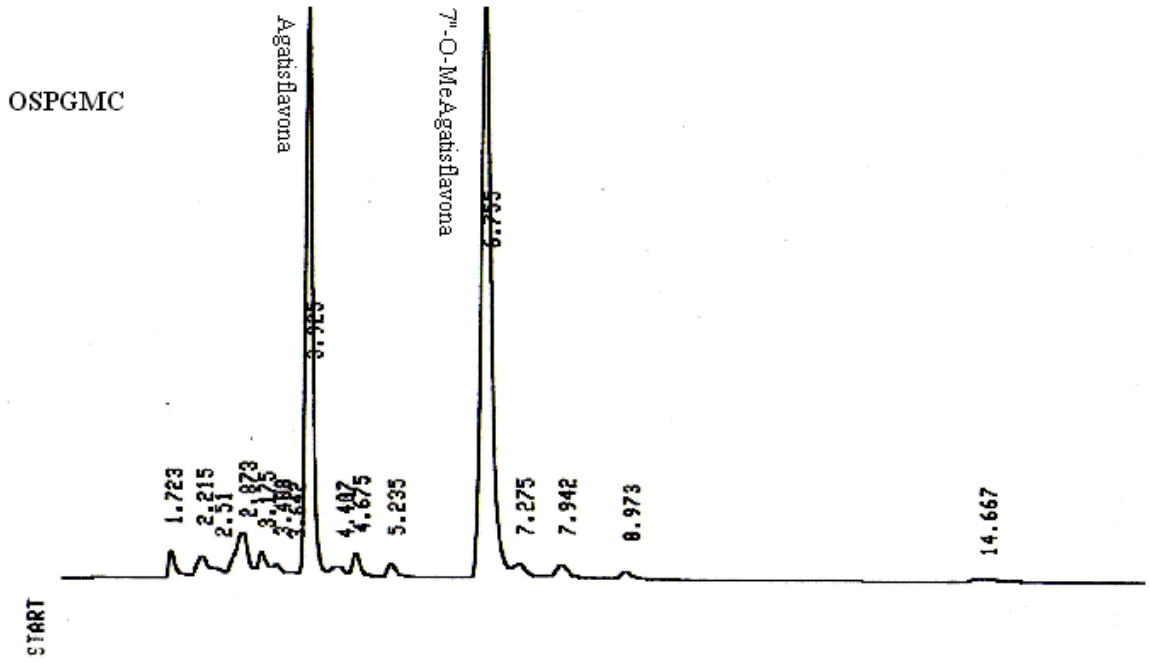



**Figura 61:** CLAE da fração OSPGMC.

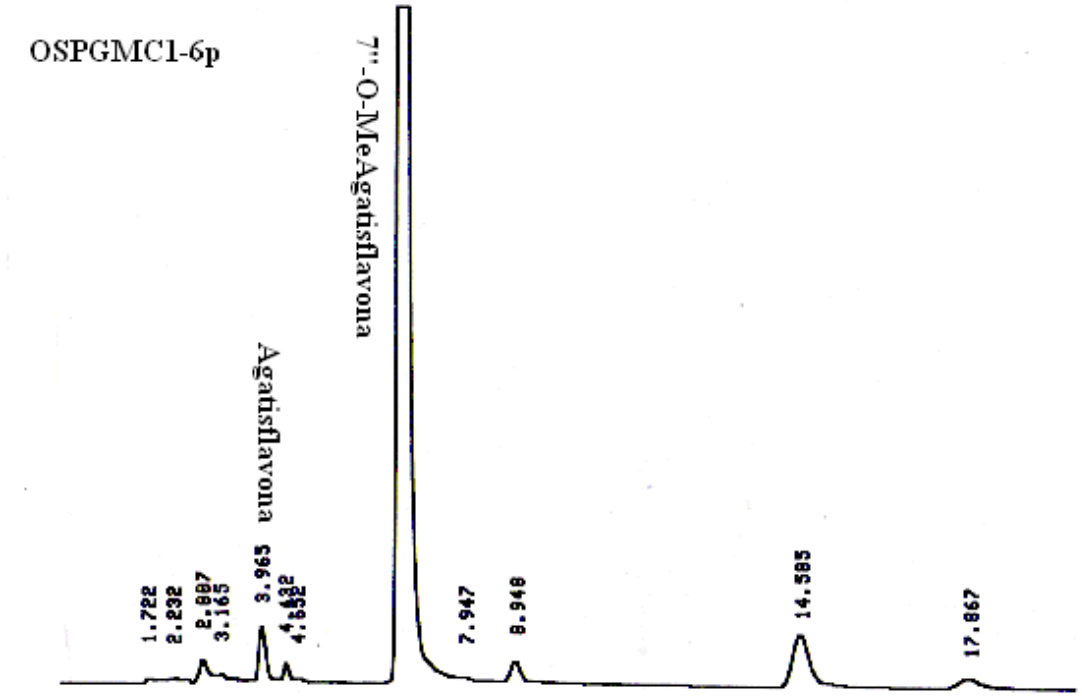



**Figura 62:** CLAE da fração OSPMC1-6p.

A análise CLAE-EM dessas frações, "ricas em flavonóides", permitiu detectar os valores de *m/z* de várias faixas de tempo de retenção reveladas pelos picos representantes dos componentes da mistura**.** A análise desses valores, aliada às possibilidades de substituição com grupos freqüentes em flavonóides isolados de *Ouratea hexasperma* (St. Hil.) Bail. em trabalhos anteriores (Suzart, 2007; Suzart et al., 2007; Daniel, 2005), a análise do espectro de RMN de $^1$H (**figuras 63 e 64**, pág. **7**3) e considerando a possibilidade de formação de "adutos" com traços dos solventes utilizados, pôde-se propor estruturas que certamente estão presentes no material analisado. Os sinais no espectro de RMN de $^1$H na região entre $\delta_H$ 4,22ppm e $\delta_H$ 3,10ppm podem ser atribuídos aos hidrogênios do carboidrato. Possui também sinais típicos de biflavonóide, como os dubletos na região entre $\delta_H$ 7,93ppm e 6,60 ppm e singletos em $\delta_H$ 6,57ppm e 6,39ppm. Os esquemas **2** e **3** foram utilizados para facilitar esta interpretação. Nesses são apresentadas as estruturas dos flavonóides que incorporadas aos substituintes (R e/ou R') ou resíduos de solventes chega-se aos valores de *m/z* detectados. Estas propostas dependem de análises adicionais como EM/EM dos íons detectados, o que confirmaria a formação de "adutos" e, assim, as estruturas propostas poderão ser aceitas com maior segurança. A análise da fração **OSPMC** permitiu a identificação dos valores de *m/z* para os picos detectados no CLAE-EM e estão representados na **Figura 65**, pág. 74 e **Esquema 2**, pág. 75, foi possível propor a metil-vitexina e orientina (**B**), ramnosil-triidroxiflavona (**K**), agatisflavona (**F**), metil-agatisflavona (**H**) e dimetil-agatisflavona (**G**) cujas estruturas estão representadas na **Figura 66**, pág. 76. A análise da fração **OSPMC1-6P** (**Figura 67,** pág. 77 e **Esquema 3,** pág. 78) permitiu confirmar a metil-agatisflavona (**A1**) como componente majoritário, além das metil-diidroxiflavonas (**B1** e **D1**), a ramnosil-triidroxiflavona (**C2**) e a glicopiranosil-prenil-diidroxi-flavonol (**D2**) (**Figura 68,** pág. 79)**.**

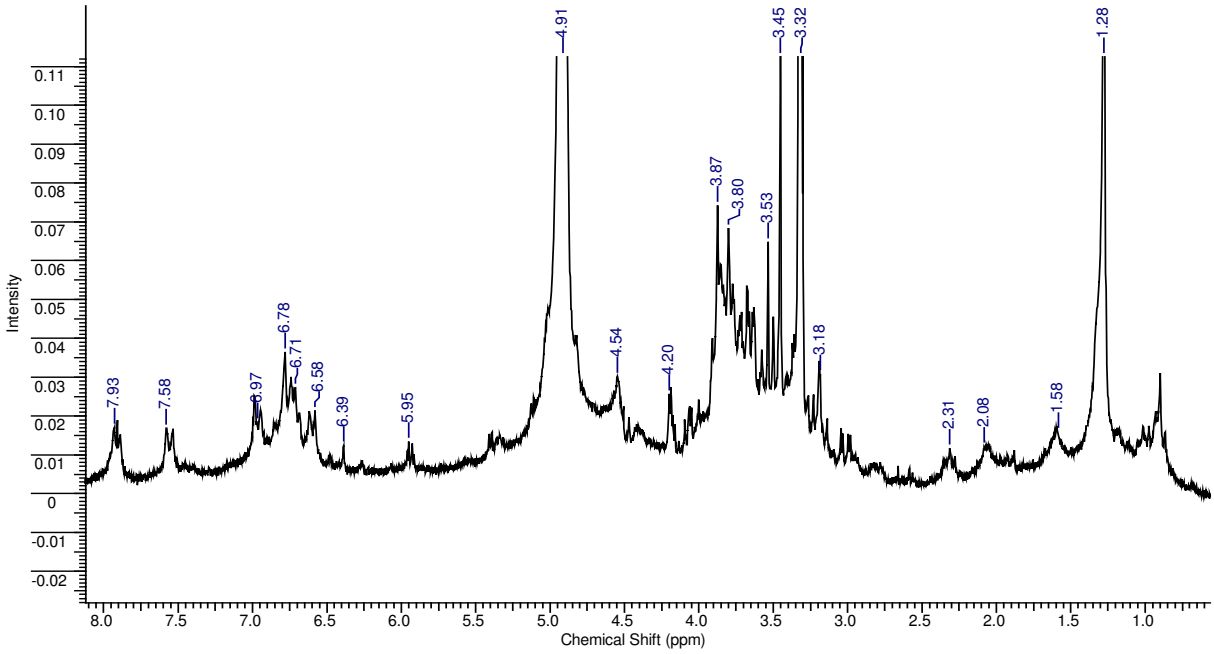



**Figura 63:** Espectro de RMN $^{1}H$ (200MHz, $D_3CCOCD_3$) da fração OSPGMC.

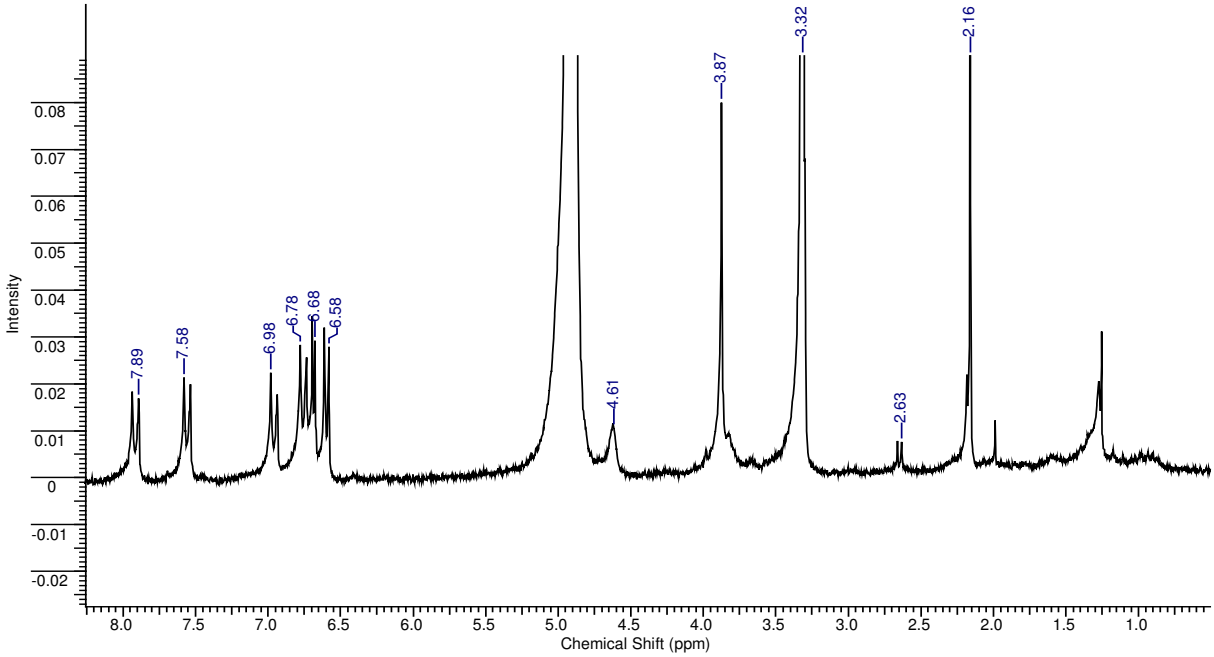
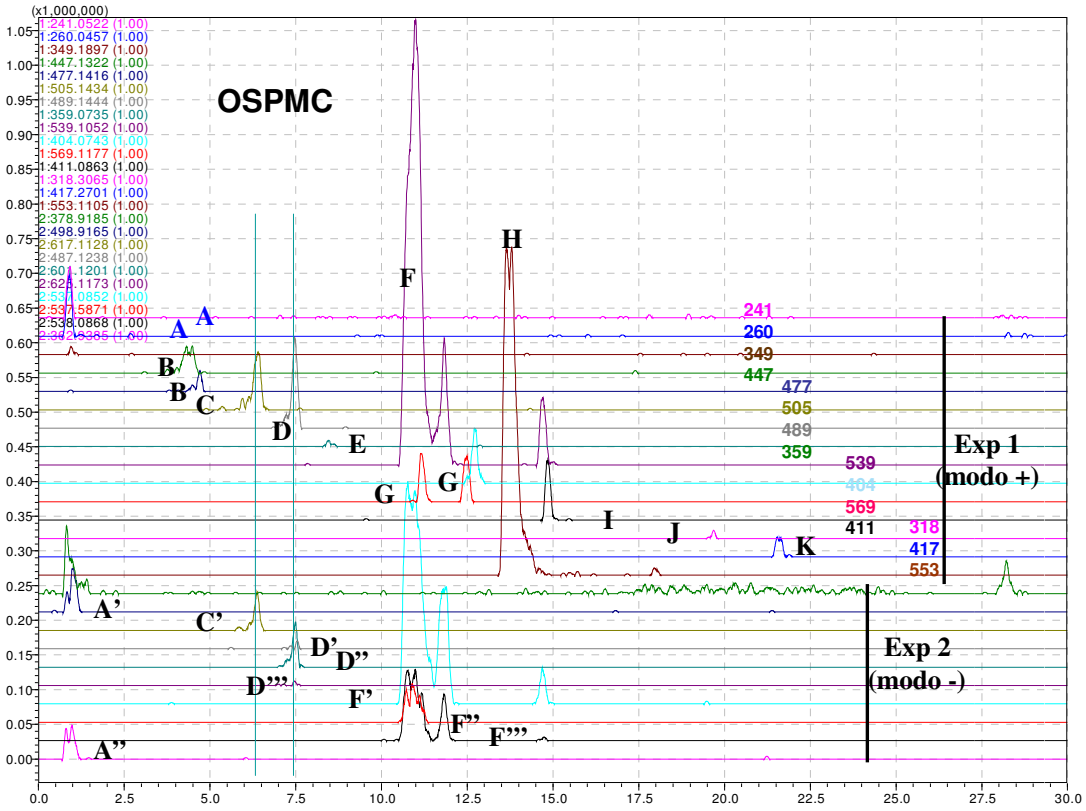



**Figura 64:** Espectro de RMN $^{1}H$ (200MHz, $D_3CCOCD_3$) da fração OSPGMC1-6p.




**A-Raw Spectrum**
**[0.687->1.273]**
Event1 (Modo +)
*m/z*
**241.0522**
**260.0457**
**349.1897**
Event2 (Modo -)
m/z
378.9185
**498.9165**

**B-Raw Spectrum**
**[3.887->4.987]**
Event1 (Modo +)
m/z
447.1322
477.1416

**C-Raw Spectrum**
**[5.540->6.813]**
Event1 (Modo +)
*m/z*
505.1434
Event2 (Modo -)
m/z
617.1128

**D-Raw Spectrum**
**[6.813->8.013]**
**Event1 (Modo +)**
m/z
489.1444
Event2 (Modo -)
m/z
487.1238
601.1201
625.1173

**E-Raw Spectrum**
**[8.013->9.047]**
**Event1 (Modo +)**
*m/z*
**359.0735**

**F-Raw Spectrum**
**[10.427->12.113]**
**Event1 (Modo +)**
**m/z**
**539.1052**
**Event2 (Modo -)**
**537.0852**
**538.0868**

**G-Raw Spectrum**
**[12.180->13.280]**
**Event1 (Modo +)**
*m/z*
**404.0743**
**569.1177**

**H-Raw Spectrum**
**[13.313->14.487]**
**Event1 (Modo +)**
**m/z**
**553.1105**

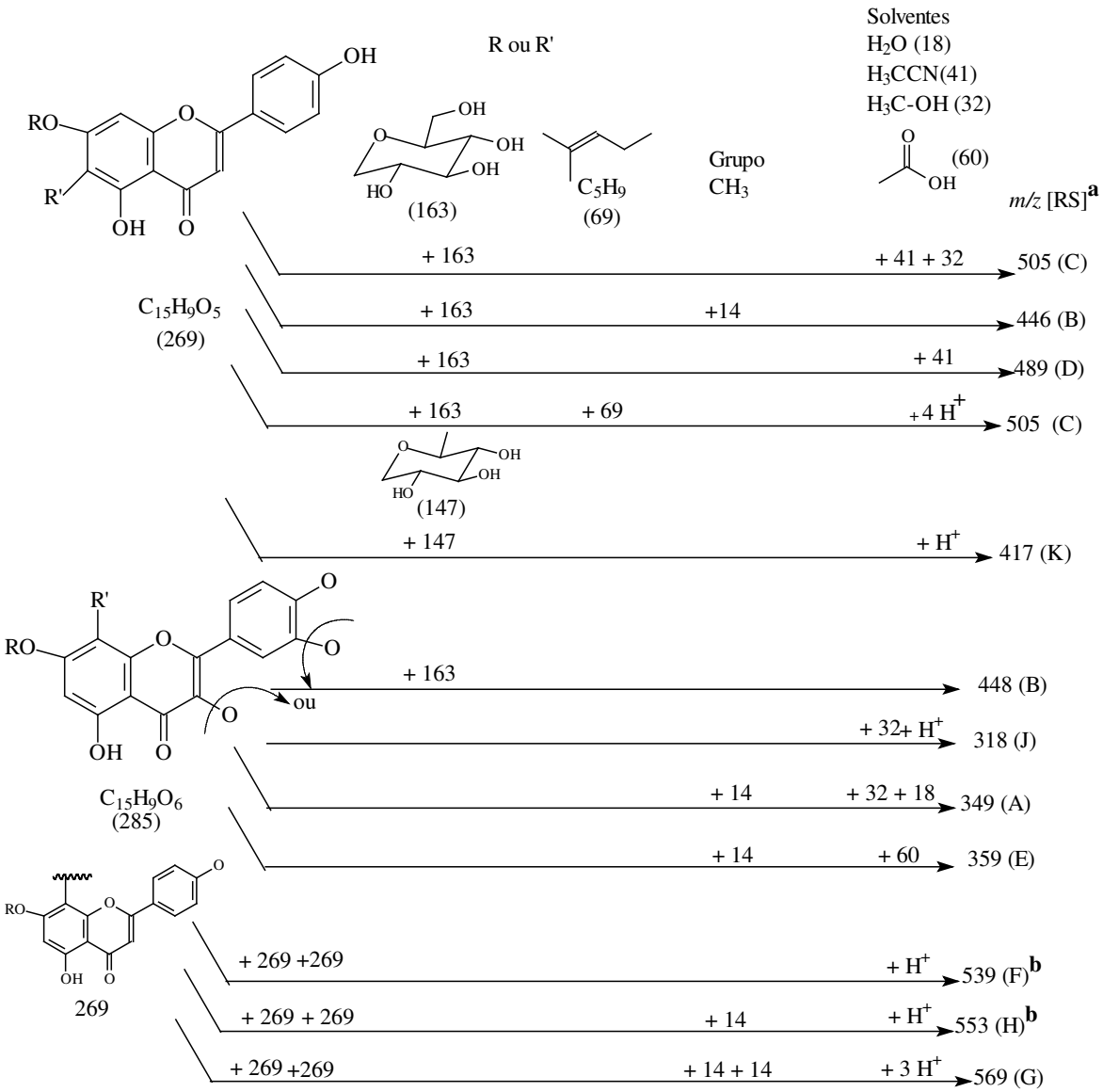
**I-Raw Spectrum**
**[14.487->15.620]**
**Event1 (Modo +)**
**m/z**
**411.0863**

**J-Raw Spectrum**
**[19.407->20.267]**
**Event1 (Modo +)**
*m/z*
**318.3065**

**K-Raw Spectrum**
**[21.367->22.400]**
**Event1 (Modo +)**
**m/z**

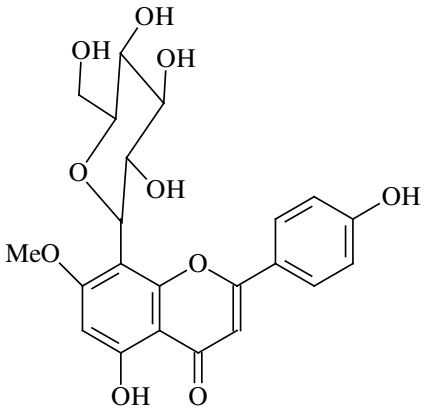
**417.2701**

**Figura 65:** Identificação dos valores de *m/z* para os picos detectados no CLAE-EM da fração *OSPGMC*.

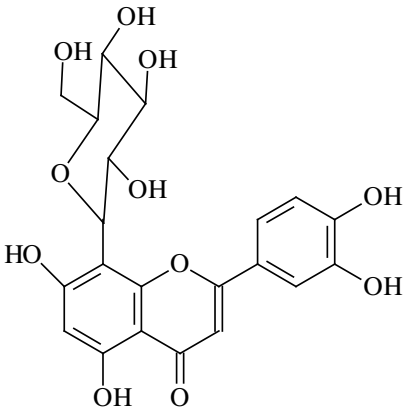



**a** *m/z* [RS] = "Raw Spectrum", faixa do(s) picos do CLAE; **b** Detectadas na análise dos espectros de RMN na fração deste material.

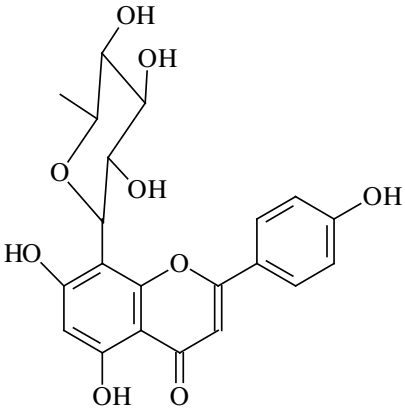
**Esquema 2:** Propostas de estruturas compatíveis com os valores de *m/z* detectados na análise de CLAE-EM (Figura 65)



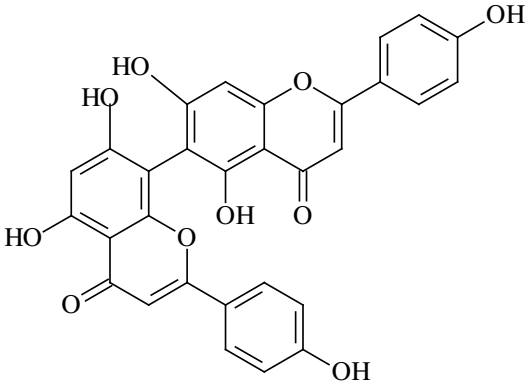
**B**



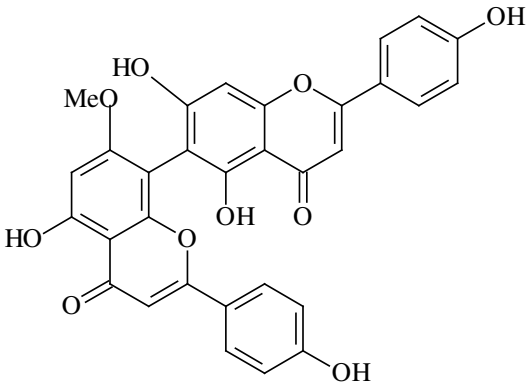
**B**



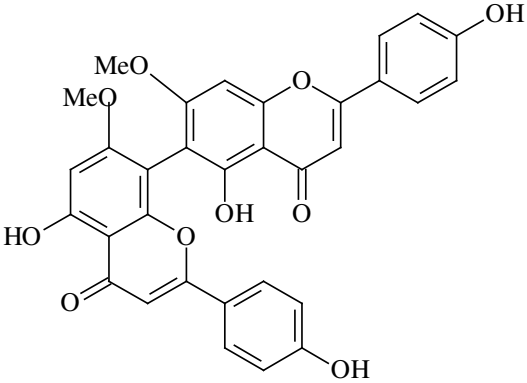
**K**



**F**

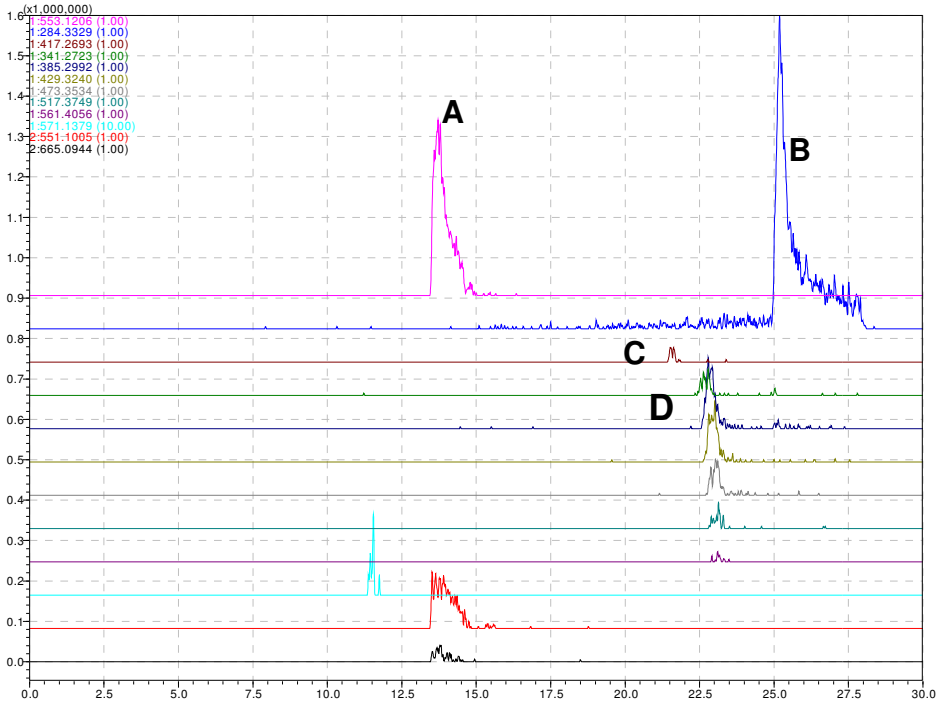


**H**



**G**

**Figura 66:** Estruturas propostas através da análise CLAE-EM na fração OSPGMC.




**A. Raw Spectrum [13.060->15.233]**
Event 1 (Modo +)
m/z Abs. Inten. Rel. Inten.
**A1: 553.1206 159599 100.00**
**[metil-agatisflavona]**
Event 2 (Modo -)
551.1005 52936 38.45 **(M-2H)**
665.0944 7293 5.30
**[M+AcAcetico+MeOH+$H_2O$]**

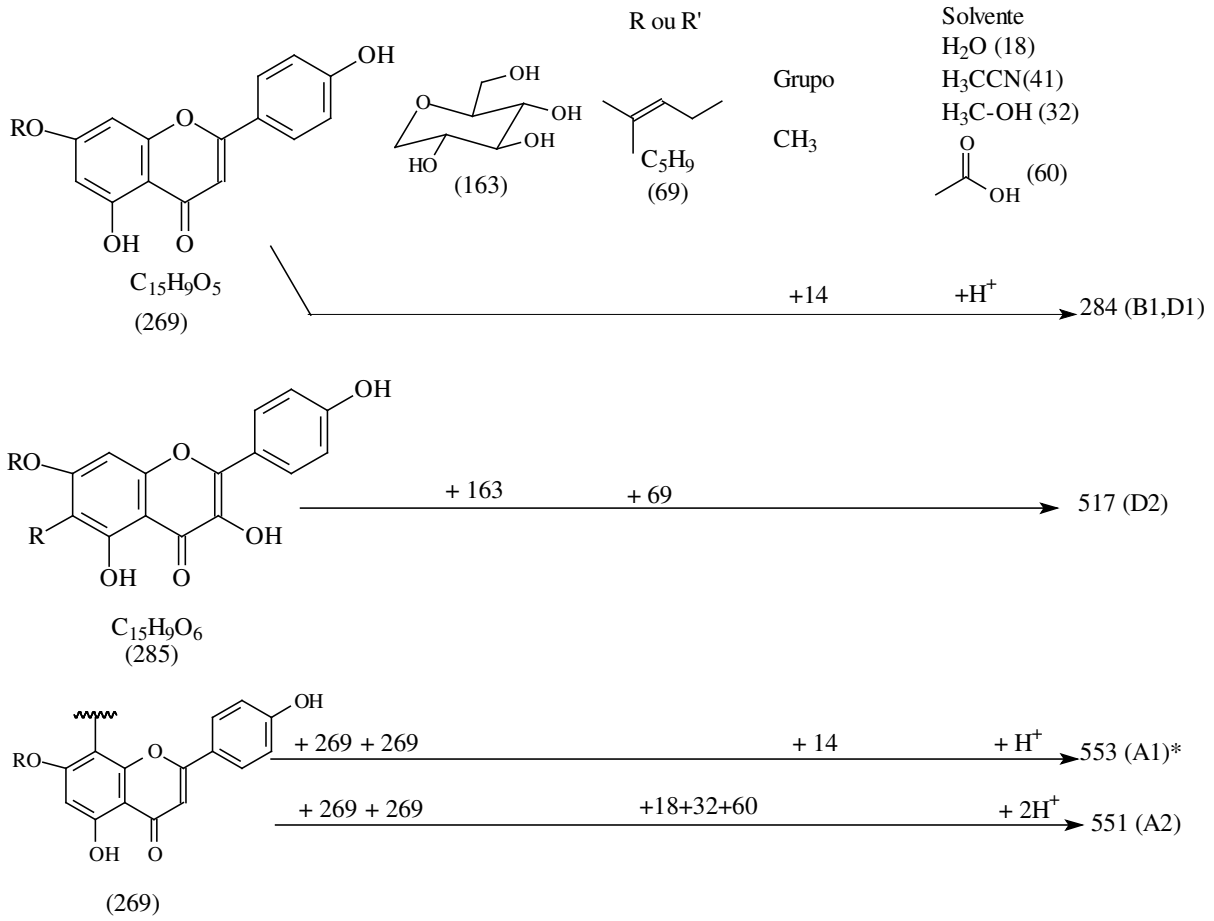
**B- Raw Spectrum [19.393->20.180] [25->26]**
Event 1 (Modo +)
m/z Abs. Inten. Rel. Inten.
**B1: 284.3329 3113 5.20**
**[269 + 14 (metil)]**

**C. Raw Spectrum [21.460->22.280]**
Event 1 (Modo +)
m/z Abs. Inten. Rel. Inten.
413.2763 2900 6.01
**C2: 417.2693 8432 17.47**
**[269 + 147(ramnose) + H]**

**D. Raw Spectrum [22.527->23.347]**
Event 1 (Modo +)
m/z Abs. Inten. Rel. Inten.
**D1. 284.33774973 5.64**
**[269 + 14 (metil)]**
341.2723 21998 24.95
**385.2992 88164 100.00**
429.3240 72304 82.01
473.3534 38277 43.42
**D2. 517.374917511 19.86**
**[516 + H = Gic-Prenil-Flavonol]**
561.4056 4613 5.23

**Figura 67:** Identificação dos valores de *m/z* para os picos detectados no CLAE-EM da fração *OSPGMC1.6p*

.




* Detectado na análise dos espectros de RMN na fração deste material.

**Esquema 3:** Propostas de estruturas compatíveis com os valores de *m/z* detectados na análise de CLAE-EM (Figura 67)

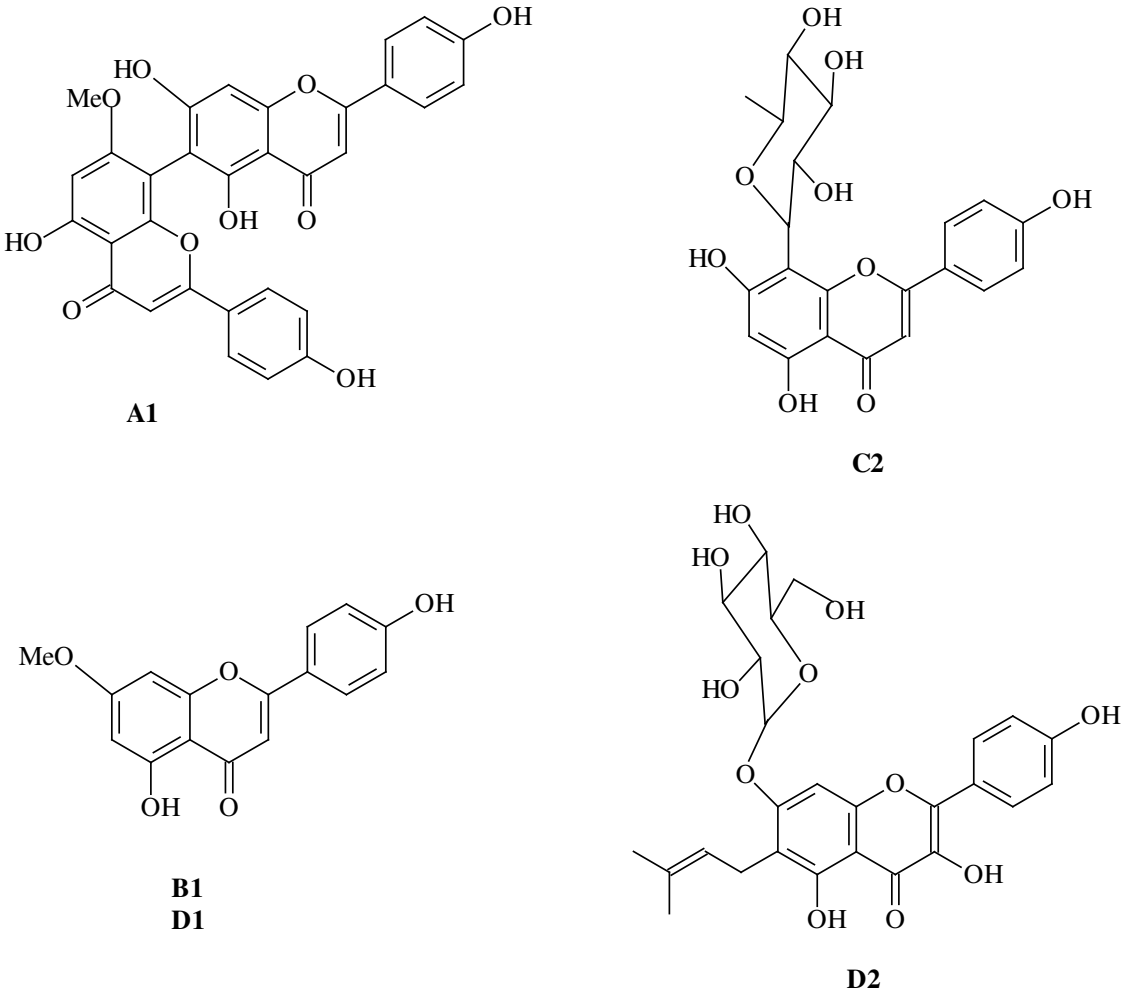



**Figura 68:** Estruturas propostas através da análise CLAE-EM na fração OSPGCM1.6p.

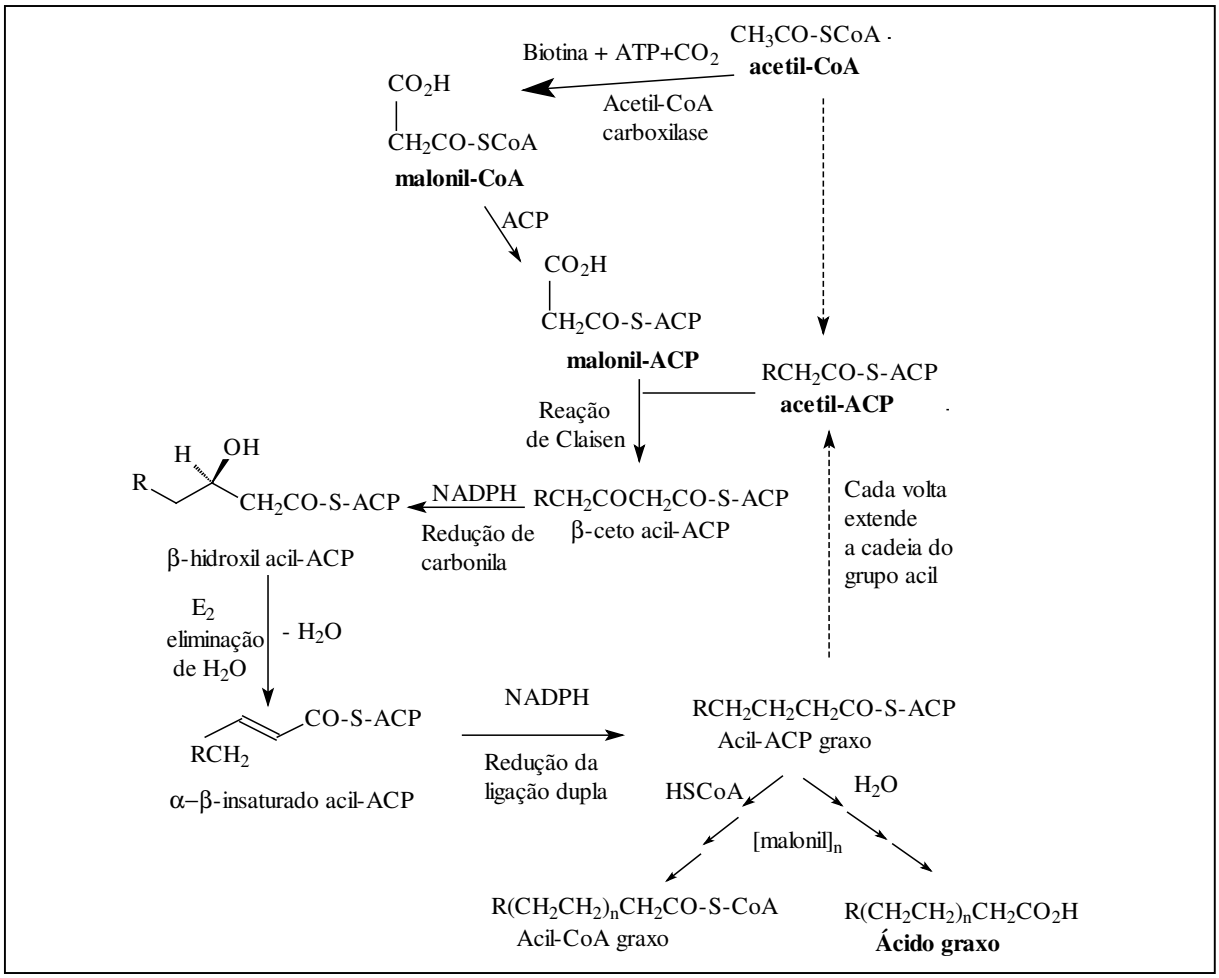
## 5.4. Propostas Biossintéticas para os constituintes isolados de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl.

Uma das principais considerações em determinação estrutural é o conhecimento da biossíntese das diferentes classes dos metabólitos especiais, por isso incluímos este capítulo para auxiliar na determinação das estruturas das substâncias isoladas de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl.

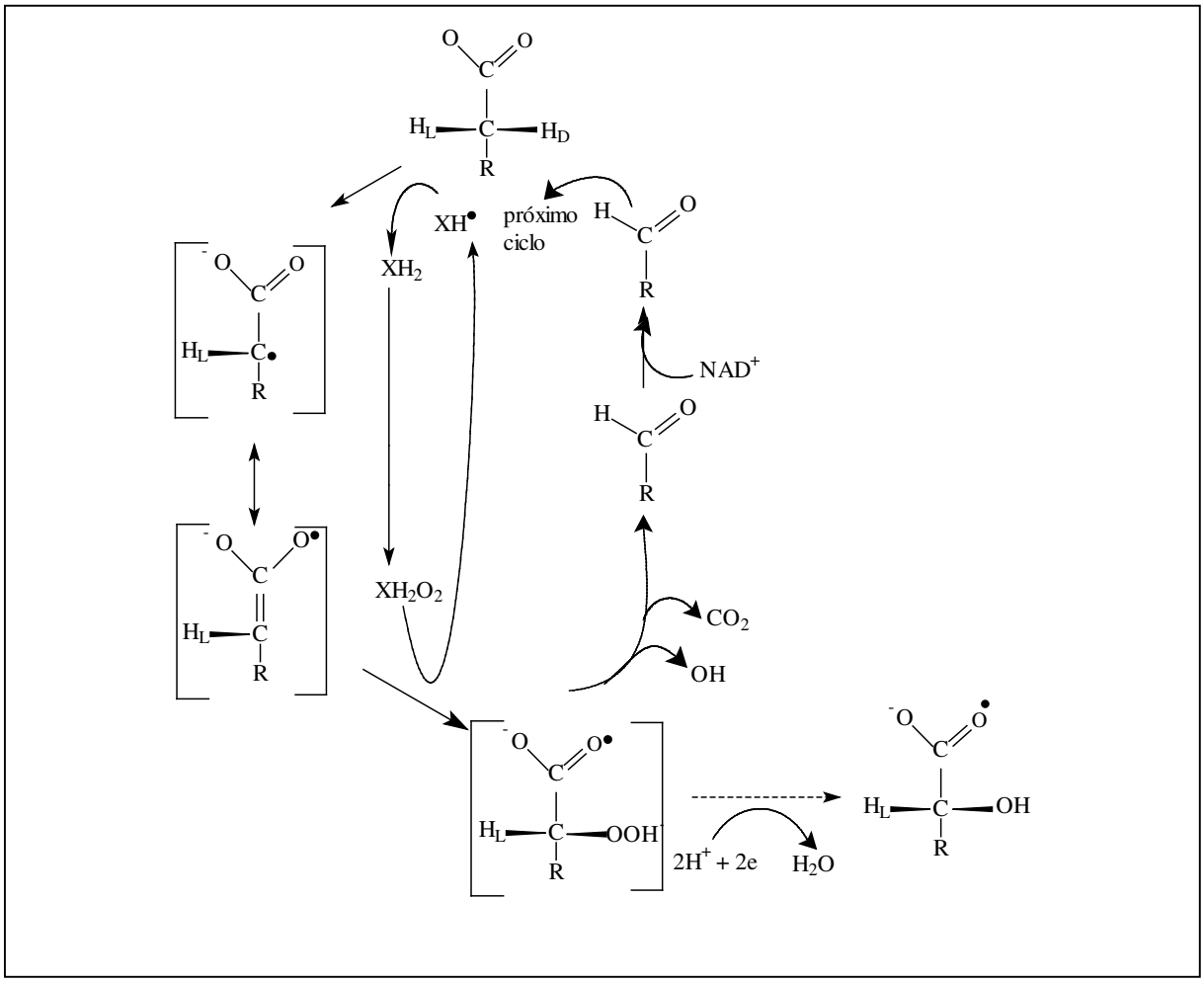
As substâncias isoladas da espécie estudada neste trabalho, pertencem a classe dos ácidos alifáticos, dos esteróides (β-sitosterol, estigmasterol, campesterol e 3-O-β-D-glucopiranosil sitosterol); dos triterpenos (lupeol e α e β-amirina) e dos biflavonóides (7"-O-metilagatisflavona e agatisflavona). A seguir apresenta-se algumas propostas biossintéticas.

### 5.4.1. Ácidos graxos

Os ácidos graxos são formados pela ligação de unidades de ácido acético (C2) via reação de condensação. A biossíntese envolve a conversão do acetil-CoA em malonil-CoA, que são convertidos em acetil-ACP e malonil-ACP, ocorrendo então a condensação de Claisen e formação do β-ceto acil-ACP que, após reduções, formam os ácidos graxos com um número par de átomos de carbono, **esquema 4** (DEWICK, 2002). Através de oxidações α ocorre a perda de um átomo de carbono, fornando ácidos graxos de cadeias com número ímpar de carbonos, **esquema 5** (HARWOOD, 1997).



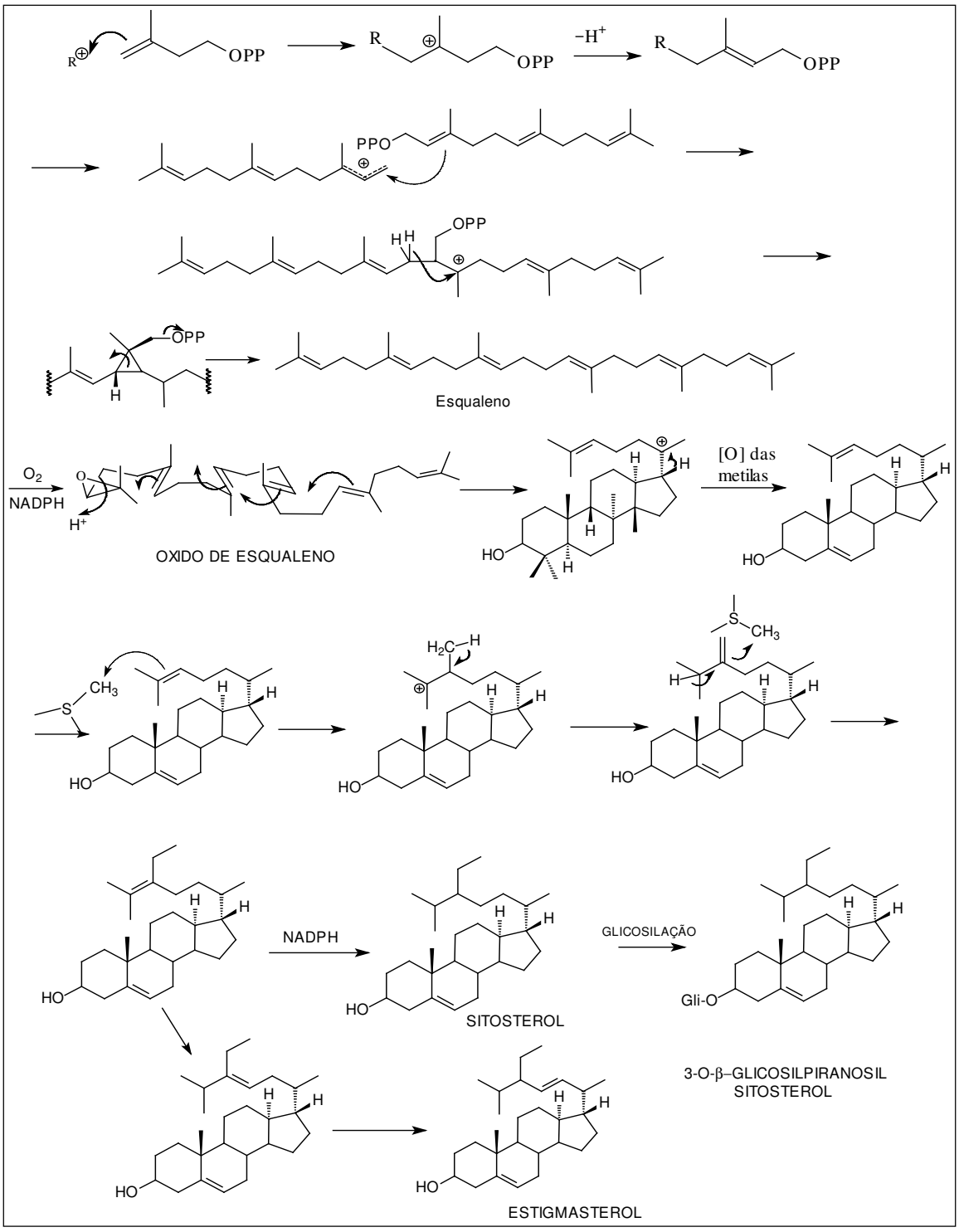

Esquema 4: Biossíntese de ácidos graxos (adaptado de DEWICK, 2002)




**Esquema 5: Proposta de a-oxidações em aácidos graxos (HARWOOD, 1997).**

### 5.4.2. Esteróides

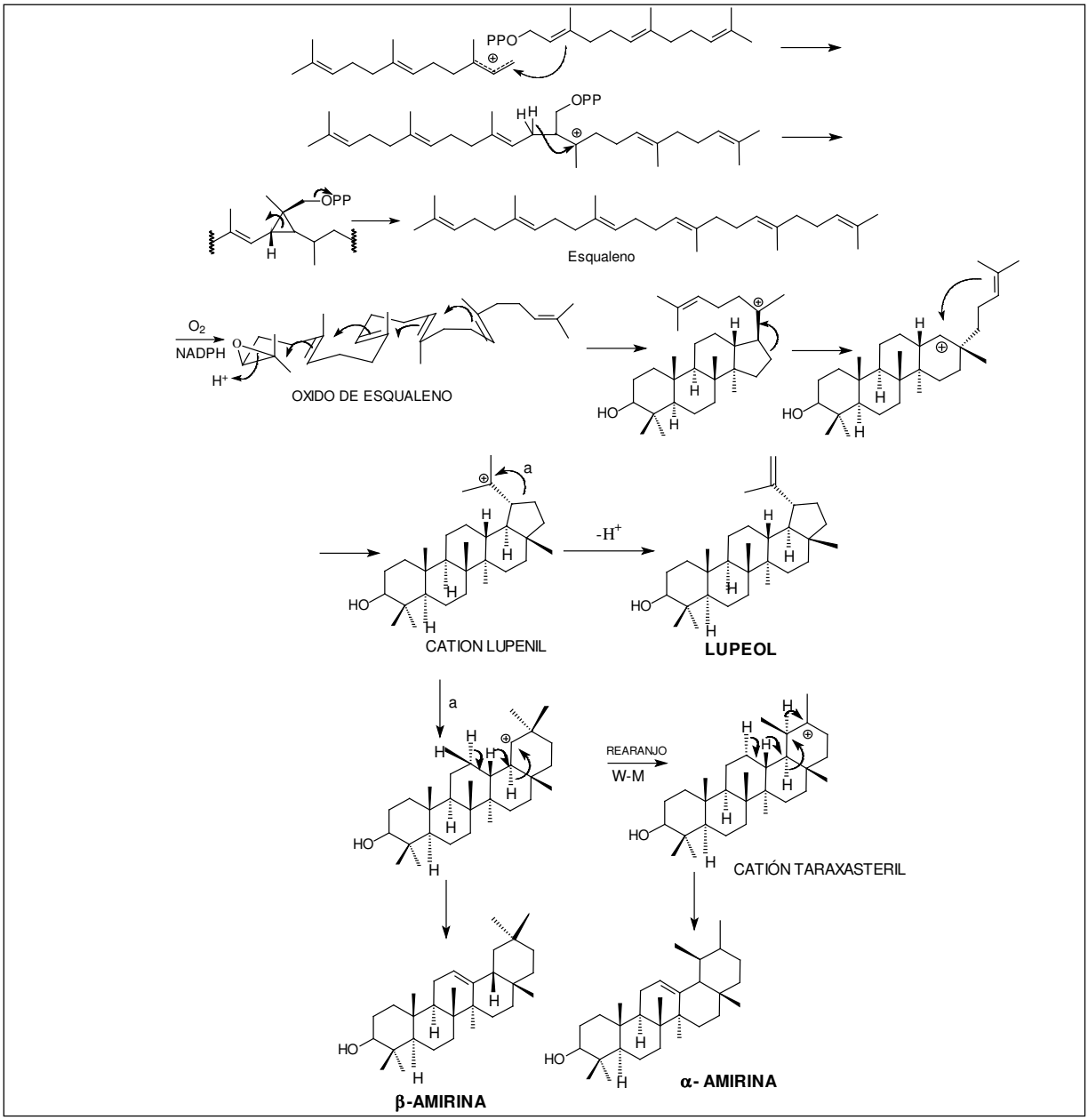
As substâncias sitosterol, estigmasterol, campesterol e 3-O-β-glicosilpiranosil sitosterol se caracterizam por ter um esqueleto básico de 27 carbonos dispostos num sistema tetracíclico. Biogeneticamente formam-se via pirofosfato de isopentenila originando o esqualeno, estrutura que contém duas unidades de farnesil pirofosfato ligadas cauda-cauda. O esqualeno epoxi (óxido de esqualeno), em sua forma cadeira-bote-cadeira–bote, cicliza após vários rearranjos do tipo 1,2 formando o cicloartenol, estrutura que contém 24 carbonos. O cicloartenol após clivagem oxidativa de três metilas forma os esteróides (Esquema 6).




Esquema 6: Proposta biogenética para os esteróides (Adaptado de MANN, 1994).

### 5.4.3. Terpenos

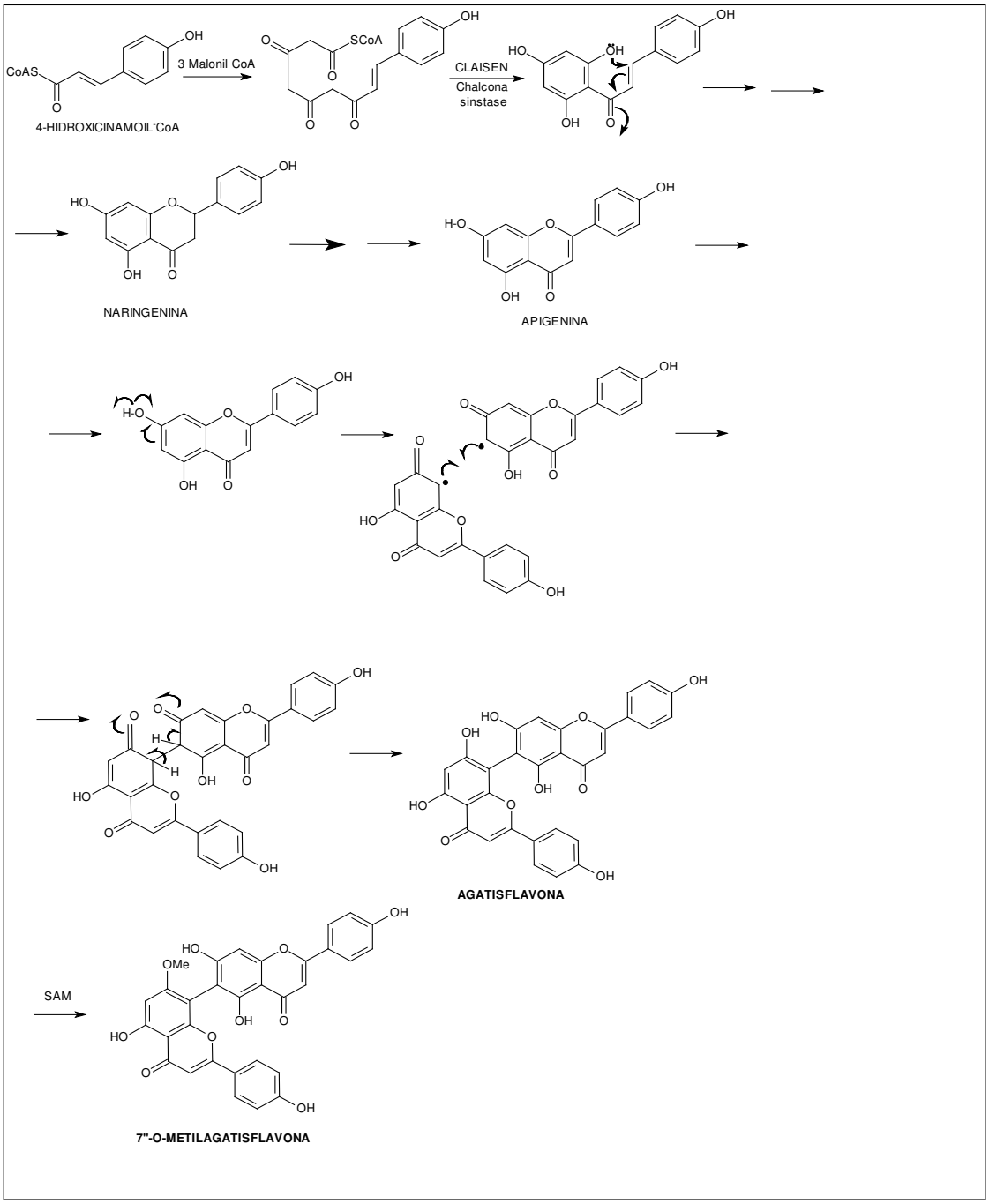
Os terpenos constituem uma classe de substâncias provenientes da via pirofosfato de isopentenila, que da mesma forma que os esteróides, da origem ao esqualeno pela fusão cauda-cauda de duas unidades de farnesil. No caso dos terpenos o óxido de esqualeno em sua forma cadeia-cadeira-cadeira-bote é ciclizado para gerar o cátion dammarenil e, conseqüentemente, o cátion lupenil que pode ser estabilizado pela formação de um novo anel de cinco membros gerando compostos do tipo lupeol. O cátion lupenil também pode ser estabilizado pela formação do anel de 6 membros, gerando o cátion oleanil. Esse é estabilizado com migração de uma metila e rearrango do tipo Wagner-Meerwein gerando o núcleo básico α-amirina (Esquema 7).




Esquema 7: Proposta biogenética para os terpenos lupeol e α-amirina. (Adaptado de MANN, 1994; DEWICK, 2002).

### 5.4.4. Biflavonóides

Os flavonóides derivam seu esqueleto de 15 carbonos, de dois precursores básicos: malonil-CoA e *p*-coumaroil-CoA. Na reação biossintética ocorre condensação de três moléculas de malonil-CoA com a molécula de *p*-coumaroil-CoA formando uma chalcona intermediaria (1,3 difenilpropano-1-ona). Da chalcona são formadas estruturas de três anéis, as flavanonas, a partir das flavanonas formam-se todas as outras classes de flavonóides (HARBONE & BAXTER, 1999). Através da formação de dímetos da apigenina formam-se os biflavonóides, agtisflavona e 7"-O-metilagatisflavona (Esquema 8).




Esquema 8: Proposta biogenética para as flavonas (DEWICK, 2002) e biflavonas (MOREIRA, 1994)

## 5.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os ensaios biológicos realizados foram de atividade antibacteriana, atividade antifúngica, atividade inseticida e de avaliação da toxicidade. O ensaio de atividade antibacteriana foi realizado no Laboratório de Bacteriologia Veterinária do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, do Instituto de Veterinária – IV da UFRRJ sob orientação da Professora Dra. Miliane Moreira Soares de Souza. O ensaio de atividade antifúngica foi realizado no Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária – IV da UFRRJ sob orientação do Professor Dr. Francisco de Assis Baroni. A Avaliação da atividade inseticida foi realizada no Laboratório de Miíases Tropicais do Departamento de Parasitologia Animal-UFRRJ, sob orientação do Professor Dr. Gonzalo Efrain Moya Borja e colaboração do mestrando Élio Barbieri Junior. A avaliação da toxicidade do extrato metanólico foi realizado no laboratório de Farmacologia do Departamento de Fisiologia Animal IB/UFRRJ, sob orientação dos professores Fábio Fagundes Rocha e Frederico Argollo Vanderlinde.

### 5.5.1. Avaliação da Atividade Antibacteriana do Extrato Metanólico de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl.

A metodologia utilizada foi adaptada do teste de difusão em placas desenvolvido por Kirby-Bauer. Esta metodologia é amplamente utilizada no mundo como teste-padrão para ensaios biológicos, devido a simplicidade e eficiência na reprodução dos resultados obtidos e é regulamentado internacionalmente pelo Clinical Laboratory Standards Institute (WAYNE, 2005).

AS bactérias utilizadas para a realização deste experimento foram escolhidas por representar os dois grandes grupos bacterianos existentes: a espécie Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, um isolado clínico sensível e outro resistente, e a espécie Gram-negativa *Escherichia coli*, ambas derivadas de isolados clínicos de mastite. (JAWETZ, 2000).

***Staphylococcus aureus***

As bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* são cocos gram-positivos, membro da família Micrococcaceae, habitantes naturais da pele e membranas mucosas de humanos e animais (KONEMAN *et. al,* 2001). Estão envolvidas em uma série de processos infecciosos de grande importância na clínica médica humana e veterinária. Em humanos, *S. aureus* é a principal causa das infecções hospitalares.

***Escherichia coli***

A espécie *Escherichia coli* representa bactérias gram-negativas entéricas largamente disseminadas no ambiente. Além do impacto sobre a saúde, a *E. coli* é um dos mais bem estudados modelos bacterianos, e nos últimos anos vem apresentando uma drástica mudança em seu perfil de sensibilidade aos antimicrobianos (JAWETZ, 2000).

Foram utilizadas 3 amostras de microrganismos, sendo duas de *Staphylococcus aureus*, uma de *Escherichia coli.* Para *S.aureus*, foram utilizados isolados clínicos oriundos de quadros de mastite bovina, sendo um dos isolados resistente aos antibióticos usuais. O isolado clínico de *E. coli*, de mesma origem, foi classificado como sensível.

Os isolados bacterianos foram estocados em freezer a $-20^0$ C e repicados em caldo enriquecido. Posteriormente foram incubados em estufa a 37 ºC por 24 horas, para ativação de seu metabolismo. Após o crescimento, foi realizada uma bateria de identificação presuntiva consistindo na coloração de Gram, realizada após o período de incubação de 24 horas, para observação das características morfotintoriais, e no teste da catalase, para observação da

quebra do peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$), pela enzima catalase (KONEMAN *et. al*, 2001). Como as amostras já haviam sido previamente identificadas, estes procedimentos foram realizados para garantir que não houve contaminação das amostras.

As amostras bacterianas foram inoculadas em caldo enriquecido, e incubadas em estufa a 37 ºC por 24 horas antes da realização dos ensaios, para que todas estivessem em fase exponencial de crescimento durante o experimento. Após o período de incubação, o crescimento deveria ser equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, correspondendo a uma concentração de 1,5 x $10^8$ UFC/mL, ideal para os ensaios de avaliação de antimicrobianos, obedecendo às recomendações do órgão responsável pela aceitação de testes como padrão, o Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).

O extrato metanólico de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. foi utilizado na concentração de 500mg/mL. Para realização do ensaio de difusão, 50µL de uma solução do material-teste na concentração de 500mg/mL foi inoculada em um poço feito no centro da placa contendo o ágar Mueller Hinton, como postulado pelo CLSI, semeado com 100µL de caldo de cultura do microorganismo previamente identificado. Na incubação, o extrato se difunde radialmente em todo o ágar em volta do poço enquanto o microorganismo está crescendo no ágar. Isto resulta em uma zona de inibição de crescimento ao redor de cada disco de aplicação (TRUJILLO, 2002).

O dimeltilsulfóxido (DMSO), veículo utilizado nas amostras-testes, foi testado separadamente para verificação de uma possível atividade antimicrobiana. Após realização dos ensaios com o veículo, foi comprovada sua inatividade sobre o crescimento bacteriano, permitindo o prosseguimento dos testes com as diluições do extrato. Foi possível detectar a formação de halo de inibição nos ensaios frente ao isolado testado de *Escherichia coli* e a um isolado de *Staphylococcus aureus* que já se mostrara resistente aos antibióticos de eleição. No entanto, o outro isolado testado de *Staphylococcus aureus* não apresentou halo de inibição nos ensaios realizados. Avaliações adicionais devem ser feitas para confirmar a atividade antibacteriana.

### 5.5.2. Verificação de atividade antifúngica do Extrato Metanólico de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl.

Para a verificação de atividade antifúngica, foram realizados dois experimentos, o primeiro com o extrato metanólico bruto de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. e o segundo com a fração clorofórmica do extrato metanólico. A metodologia utilizada para o primeiro experimento, com o extrato metanólico bruto, foi utilizando o meio Sabouraud dextrose a 3% acrescido do extrato da planta, em tubos de ensaios. Para o segundo experimento, utilizando a fração clorofórmica do extrato metanólico, em placas de Petri com o meio Sabouraud dextrose a 3% e discos de papel, a partir de círculos de pré-filtros semelhantes aos discos empregados nas provas de antibiograma, embebidos com a fração do extrato da palnta. A avaliação foi realizada com os seguintes microrganismos: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Malassezia pachydermatis*, *Rhodotorula spp* e *Aspergillus niger*.

***Candida albicans***

*Candida albicans* está freqüentemente relacionada às micoses mais comuns que acometem os seres humanos, é um habitante normal do trato gastrointestinal e regiões mucocutâneas, incluindo boca e vagina. Milhares de células da levedura podem estar presentes em um indivíduo, sem qualquer efeito danoso, entretanto, *C. albicans* é também, dentre os fungos, o de maior patogenicidade aos humanos (SCHMID, 2003).

***Cryptococcus neoformans***

*Cryptococcus neoformans* é um basidiomiceto, que se apresenta na forma tecidual como levedura encapsulada, corresponde a duas variedades fúngicas, com quatro sorotipos: var. *neoformans* (sorotipos A e D) e var *gattii* (sorotipos B e C). É fungo que vive em solos contaminados com fezes de pombos (var. *neoformans)* e junto a eucaliptos (var. *gattii*). A infecção criptococócica mais freqüentemente ocorre em pacientes imunodeprimidos (var. *neoformans*, fungo oportunista), mas pode ocorrer no hospedeiro normal (var. gattii, patógeno primário) (KWON-CHUNG et al., 1992).

***Malassezia pachydermatis***

*Malassezia pachydermatis* se apresenta de forma isolada ou em grupo, faz parte da microbiota da pele e quando ocorrem alterações no microambiente local como aumento da umidade, da temperatura e do substrato, estimulam o aumento do número de células desta levedura, fazendo-a passar da forma comensal para o parasitismo. (NOBRE et al., 1998).

***Rhodotorula spp***

Leveduras do gênero *Rhodotorula* são produtoras de pigmentos carotenóides de pigmentação amarela ou vermelha, têm sido associados a alterações de cor dos alimentos. (FRANCO E LANDGRAF, 2004). Embora infecções sérias devido a *Rhodotorula spp* em humanos são raras, foram informados septicemia, endocarditis, meningites, ventriculitis, peritonitis, keratitis, endophthalmitis, dacryocystitis, e pneumonia. (RUSTHOVEN et al., 1984).

***Aspergillus niger***

Os *aspergillus* tem ampla distribuição geográfica, e encontram-se no solo, ar, plantas e matérias orgânicas em geral, sendo contaminantes comuns em laboratórios e hospitais (MINOMI, 2003). *Aspergillus niger* geralmente está associado nos casos de otomicose, aspergilomas e infecções dos seios nasais. (FISHER, 2001)

**Primeiro Experimento**

Para o primeiro experimento utilizou-se o meio Sabouraud dextrose a 3%, acrescido do extrato da planta. A fórmula do Sabouraud, normalmente feita para 100mL foi preparada para 60mL e os 40mL restantes de $H_2O$ destilada que completariam o volume foram esterilizados em autoclave e usados para diluir 3g do extrato. Este após a diluição foi submetido a exposição a ultra-violeta em capela de segurança biológica nível II. O meio Sabouraud (60mL) foi esterilizado por autoclavação (120ºC por 20 minutos). Após esterilização o meio foi resfriado a 50ºC e misturado com o extrato diluído. Desta forma, foi obtida um meio com concentração de 3% de extrato.

Do frasco com a concentração 3%, foram retirados metade do volume que foi imediatamente distribuída em tubos de ensaio previamente esterilizados. Estes tubos foram dispostos de modo que o meio solidificasse no modo "inclinado". A outra metade do meio Sabouraud contida em frasco de Erlenmeyer foi acrescida de mais 50mL de Sabouraud puro, tornando a concentração de 1,5%. O material foi homogeneizado, separando-se 50mL que foram imediatamente distribuídos em tubos de ensaio que também foram inclinados. Os 50mL restantes foram acrescidos de 50mL de Sabouraud puro fazendo com que a concentração ficasse a 0,75%. Este procedimento foi continuado, sempre se separando 50mL de meio para distribuir em tubos de ensaios adicionando-se 50mL de Sabouraud puro ao restante para reduzir a concentração à metade. Desta forma obtivemos cerca de 12 tubos de ensaio contendo meio Sabouraud de cada uma das concentrações do extrato (3%, 1,5%, 0,75%, 0,375%, 0,187% e 0,093%).

As suspensões salinas (NaCl em água destilada, 0,9%, estéril) de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* (fungos unicelulares) foram padronizadas de acordo com o grau 3 da escala de Mc Farland e suspensão padronizada de *Aspergillus niger* (fungo filamentoso). Uma alíquota de 100µL de cada uma destas suspensões foi semeada nos tubos com as concentrações diferentes. Foram empregados quatro tubos de cada concentração para cada suspensão microbiana. Os tubos correspondentes às leveduras foram incubados em estufa microbiológica a 37ºC enquanto os tubos correspondentes ao fungo filamentoso foram incubados em temperatura ambiente. O tempo de observação foi de 5 dias. Todo o procedimento foi realizado em capela, em ambiente estéril.

**Segundo Experimento**

O extrato da planta (1g) foi diluído em 25mL de etanol. Foram preparados discos de papel, a partir de círculos de pré-filtros semelhantes aos discos empregados nas provas de antibiograma. O diâmetro foi de 1cm.

Cada disco foi embebido várias vezes com 50µl do extrato em etanol. Grupos de 5 a 10 discos foram separados e receberam cargas diferentes de aplicações do extrato. Considerando que cada alíquota de 50µl corresponde a 2mg do extrato, os discos receberam desde 4 aplicações (correspondente a 8mg) até 30mg.

Numa segunda etapa, foram preparadas placas de Petri contendo meio Sabouraud dextrose (3%). As placas em quadruplicata foram semeadas com suspensões salinas preparadas como no experimento anterior para os seguintes microrganismos: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Malassezia pachydermatis*, *Rhodotorula spp* e *Aspergillus niger*. A suspensão de cada um destes microrganismos foi semeada na superfície das placas de Petri, utilizando-se um swab estéril para cada uma das amostras, embebido nas mesmas. Após esta etapa, os discos foram aplicados na superfície, utilizando-se uma pinça estéril. Todo o procedimento foi realizado em capela de segurança, na proximidade de bico de Bunsen.

As placas foram incubadas em temperatura de 37ºC (exceção para *Aspergillus niger*) por cinco dias com observações a partir das primeiras 24 horas.

Para o primeiro experimento, os crescimentos foram evidentes já nas primeiras horas. Observou-se o crescimento de todos os fungos submetidos ao teste em todos os tubos de todas as concentrações após o tempo de observação de cinco dias.

No segundo experimento ocorreu crescimento em todas as placas e em nenhuma delas foi observado qualquer halo que demonstrasse efeito inibitório do extrato aplicado nos discos sobre os microrganismos cultivados. Os resultados obtidos devem ser aprofundados através de diferentes métodos de avaliação.

### 5.5.3. Avaliação da Atividade Inseticida contra *Musca domestica*

Para este experimento utilizou-se a espécie *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), que é uma espécie de grande importância médico sanitária, pois atua como vetor mecânico e/ou biológico de diversos agentes patogênicos, incluindo parasitos do homem e de animais domésticos (BERNARDI *et al*., 2006). Estes insetos, por manterem um alto grau de associação com o ambiente modificado pelo homem, são amplamente relacionados na literatura como causadores de diversos danos e graves prejuízos, principalmente na pecuária (GUIMARÃES *et al.*, 1983). Estes dados têm motivado diversos grupos pela busca de novos métodos aplicáveis ao controle químico como alternativo aos inseticidas sintéticos comumente utilizados no controle destas pragas.

Os insetos utilizados neste experimento foram oriundos de colônia formada por moscas coletadas no Campus da UFRRJ, e seu desenvolvimento pré-embrionário ocorreu em um meio composto por ração concentrada contendo 23% de proteína bruta, farelo de arroz e

água, na relação 1:1:2. Os insetos tratados representam o nível de resistência da comunidade a inseticidas comumente utilizados no controle desta mosca. Os insetos avaliados foram da geração F1 a espécie *Musca domestica*.

Após o nascimento os testes foram feitos em até 48 horas da emergência dos insetos. As frações e extratos foram diluídos em 1 ml de Acetona PA. Foram utilizados 20 mg da fração OSPGMCp-2a e aproximadamente 50mg dos demais extratos e frações. Os insetos foram retirados das gaiolas e anestesiados com $CO_2$ para manipulação e separação de machos e fêmeas, e realização da aplicação de 0,5µl da solução estoque formada de cada amostra. A aplicação foi feita sobre o tórax com auxílio de uma micro-seringa automática de 25µl. Após a aplicação os insetos foram transferidos para frascos forrados com papel filtro, fechados com gaze estéril presa com liga elástica. Cada frasco recebeu 20 insetos, sendo cada amostra avaliada em 20 machos e 20 fêmeas. Também foram realizados testes controle com a aplicação somente do solvente. A leitura foi realizada em 24 horas (**tabela 8,** pág. 90) e 48 horas (**tabela 9,** pág. 90), e nestas são contados os insetos mortos. Durante as avaliações os insetos foram alimentados com solução de glicose a 20% através de algodão embebido sobre a gaze.

Considerando os resultados apresentados, observa-se que o extrato metanólico bruto (**OspGM**) e frações do extrato, **OSPGMCp** e **OSPGMM** apresentaram pouca atividade inseticida frente a *Musca domestica*. As frações **OSPGMCp2a** e **OSPGMC** apresentaram maior atividade inseticida. Estas frações são ricas em flavonóides, no qual foram isoladas a 7”-O-metilagatisflavona e agatisflavona. Essas observações foram feitas em 24h (**tabela 8**) e 48h (**tabela 9**). De acordo com a maior atividade inseticida presente nas frações ricas em flavonóides, sugerimos que estas sejam as substâncias responsáveis por esta atividade.

**Tabela 8** – Mortalidade (%) de amostras vegetais sobre *Musca domestica* após 24 horas da aplicação.

| Substância | Mortalidade | | |
|---|---|---|---|
| | ♀ | ♂ | ♀ + ♂ |
| *OSPGD* | 0% | 0% | 0% |
| *OSPGDH* | 0% | 0% | 0% |
| *OSPGDC* | 0% | 0% | 0% |
| *OSPGDM* | 0% | 0% | 0% |
| *OSPGM* | 0% | 10% | 5% |
| *OSPGMC* | 0% | 20% | 10% |
| *OSPGMCp* | 10% | 0% | 5% |
| *OSPGMCp2a* | 10% | 20% | 15% |
| *OSPGMM* | 0% | 0% | 0% |
| *OSPGMMp* | 10% | 0% | 5% |
| *CONTROLE* | 0% | 0% | 0% |

**Tabela 9** – Mortalidade (%) de amostras vegetais sobre *Musca domestica* após 48 horas da aplicação.

| Substância | Mortalidade | | |
|---|---|---|---|
| | ♀ | ♂ | ♀ + ♂ |
| *OSPGD* | 10% | 10% | 10% |
| *OSPGDH* | 10% | 20% | 15% |
| *OSPGDC* | 0% | 10% | 5% |
| *OSPGDM* | 0% | 0% | 0% |
| *OSPGM* | 10% | 10% | 10% |
| *OSPGMC* | 10% | 20% | 15% |
| *OSPGMCp* | 10% | 0% | 5% |
| *OSPGMCp2a* | 20% | 30% | 25% |
| *OSPGMM* | 0% | 10% | 5% |
| *OSPGMMp* | 10% | 0% | 5% |
| *CONTROLE* | 0% | 0% | 0% |

a) Peso médio de machos e fêmeas de *M. domestica*: 0,0105 e 0,0158 gramas.

b) OSPGD = Ouratea sp galhos dicloro; OSPGDH = Ouratea sp galhos dicloro hexano; OSPGDC=Ouratea sp galhos dicloro clorofórmio; OSPGDM = Ouratea sp galhos dicloro metanol; OSPGM = Ouratea sp galhos metanol; OSPGMC = Ouratea sp galhos metanol clorofórmio; OSPGMCp = Ouratea sp galhos metanol clorofórmio precipitado; OSPGMCp2a = Ouratea sp galhos metanol clorofórmio precipitado fração 2 a; OSPGMM = Ouratea sp galhos metanol metanol; OSPGMMp = Ouratea sp galhos metanol metanol precipitado.

### 5.5.4. Avaliação da toxidez do extrato metanólico em *Mus musculus.*

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus)* albinos *swiss* machos e fêmeas pesando entre 30 e 35 g fornecidos pelo Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas (IB) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (23 ± 2$^{o}$C) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso à água e ração.

**Determinação da Dose Letal Aproximada (DLA)**

Neste ensaio foi utilizado apenas um animal tratado com o extrato a cada dose conforme proposto por Kennedy et al em 1986. O extrato metanólico de *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl. foi solubilizado em solução salina 0,9 % acrescido de 1% de Tween 80 e administrado nos camundongos pelas vias oral ou subcutânea. O teste se iniciou com uma

dose bastante baixa (10 mg/kg) e a próxima dose foi adicionada de 50% do valor da anterior e assim sucessivamente (o que na prática corresponde a uma chance muita remota de que uma determinada dose mate um animal e sua subseqüente falhe em fazê-lo), até que a menor dose na seqüência considerada, induzisse a morte do animal. Os animais foram observados nos tempos de 15 min, 30 min, 60 min, 24 h e 1 semana após a administração do extrato.

A administração do extrato tanto pelas vias oral quanto subcutânea não gerou sinais de toxicidade aguda nos camundongos. Doses de até 5g/kg não ocasionaram a morte dos animais em até uma semana após a administração em dose única do extrato, demonstrando a baixa toxicidade aguda do extrato.

O extrato apresenta baixa toxicidade quando administrado em dose única. Estudos com doses repetidas, subcrônicos e crônicos são necessários para complementar a avaliação toxicológica em função do potencial antitumoral da planta e conseqüente necessidade de uso crônico. Estudos para avaliar a toxicidade *in vivo* da fração enriquecida com biflavonóides também são necessários em função dos relatos de toxicidade destas substâncias.

# CONCLUSÕES

A prospecção química do extrato metanólico de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. revelou testes positivos para as classes de substâncias: alcalóides, saponinas, esteróides, depsídio e depsidonas, flavonóides, catequinas, quinonas, açúcares redutores, sacarídeos e taninos.

Com os extratos obtidos dos galhos de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. foi realizado o fracionamento, a partir dessas frações foram isolados compostos alifáticos, ácidos alifáticos, esteróides (sitoesterol, estigmasterol e campesterol), terpenos (lupeol e α-amirina e β-amirina) e biflavonas (7”-O-metilagatisflavona e agatisflavona) e sitoesterol glicosilado.

Através de análise utilizando CLAE-EM permitiu-se detectar a presença de outros compostos presentes no extrato, como metil-vitexina, orientina, ramnosil-triidroxiflavona, agatisflavona, metil-agatisflavona, dimetil-agatisflavona, metil-diidroxiflavon, e glicopiranosil-prenil-diidroxi-flavonol, embora necessitem de confirmação.

Através dos resultados obtidos neste trabalho e levantamento de dados da literatura sobre as substãncias encontradas no gênero Ouratea, foi possível concluir que o biflavonóide 7”-O-metilagatisflavona serve como um marcador quimiossistemático do Gênero Ouratea e que as variedades de *O. hexasperma* (St. Hil.) Bail e *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl. tem poucas diferenças morfológicas e quimicamente podem ser incluídas como uma única espécie.

Os testes de atividades biológicas realizados foram os de atividade antibacteriana, antifúngica, inseticida e de toxicidade utilizando os extratos e frações de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. Com os ensaios de atividade antimicrobiana, o extrato metanólico inibiu o crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Este extrato e a fração clorofórmica do extrato metanólico foi inativo para os fungos avaliados. Com os ensaios de atividade contra *Musca doméstica*, os extratos e frações não apresentaram atividade significativa, as frações que apresentaram maior atividade foi a fração que contém a mistura dos biflavonóides 7”-O-metilagatisflavona e agatisflavona e as frações metanólicas que também contém essas substâncias. Ensaios adicionais deverão ser realizados afim de confirmar esses resultados.

Com os ensaios de toxicidade, o extrato apresentou baixa toxicidade quando administrado em dose única. Estudos para avaliar a toxicidade *in vivo* da fração enriquecida com biflavonóides também são necessários em função dos relatos de toxicidade destas substâncias.

## REFERÊNCIAS


AGRAWAL, P. K.; BANSAL, M. C.; PORTER, L. J.; FOO, L. Y. *Carbon-13 NMR of flavonoids – studies in organic chemistry 39;* AGRAWAL, P. K. ed; elsevier Science Publishers B. V.: Amsterdam (1989). v 39 201p.

ALVES C. C. F. *Estudo Químico de Luxemburgia octandra (Ochnaceae), Laseguea erecta (Apocynaceae), do Látex de Parahancornia amapá (Apocinaceae) e de Solanum crinitum (Solanaceae).* 2003 Tese, Doutorado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, 2003.

ANAND, K. K.; GUPTA, V N; RANGARI, V.; SINGH, B.; CHANDAN, B. K. Structure and hepatoprotective activity of a biflavonoid from Canarium manii. Department of Pharmacology, Regional Research Laboratory, Jammu-Tawi, India *Planta medica* (1992), 58(6), 493-5.

ARYA, R.; BABU, V.; ILYAS, M.; NASIM, K. T. Phytochemical examination of the leaves of Anacardium occidentale. Dep. Chem., Aligarh Muslim Univ., Aligarh, India. *Journal of the Indian Chemical Society* (1989), 6(1), 67-8.

A. St. Hil. *Ghomphia Hexasperma*. *Flora Brasiliae Meridionalis* (quarto ed.) 1: 61. 1824

A. St.-Hill.; Bail *Ouratea hexasperma*. *Histoire des Plantes* 4: 366. 1873.

AZAM, A.; QASIM, M. A.; KHAN, M. S. Y. Biflavones from Picea morinda Linn. Inst. Hist. Med. Med. Res., New Delhi, India. *Journal of the Indian Chemical Society* (1985), 62(10), 788-9.

BAGCHI, A.; SAHAI, M.; RAY, A. B. Phenolic constituents of Rhus semialata leaves. Inst. Med. Sci., Banaras Hindu Univ., Varanasi, India. *Planta Medica* (1985), (5), 467-8.

BAHIA, M. V.; DOS SANTOS, J. B.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). Instituto de Quimica and Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, Salvador, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society* (2005), 16(6B), 1402-1405.

BARROSO, G. M.; *Sistemática de Angiosperma do Brasil*, UFV-MG, 130, 1986.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. et. al. *Sistemática de Angiosperma do Brasil*, UFV-MG,2.ed. 2002.

Engl. *O. hexasperma* var. *planchonii. Flora Brasiliensis* 12(2):321. 1876.

FRANCO, B. D. G. DE M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos.* São Paulo. Ed. Atheneu, 2004.

BERNARDI, E. PINTO, D.M. NASCIMENTO, J.S. DO et al., Efeito dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sobre o desenvolvimento de Musca domestica L. (Diptera: Muscidae) em laboratório *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.73, n.1, p.127-129., 2006.

Braga R. *Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará*. Fortaleza: Imprensa Oficial., 1960

BRITO, A.R.M.S.; BRITO, A.A.S. Forty Years of Brazilian Medicinal Plant Research. J. of *Ethnopharmacology*, 49(6), 53-67, 1993.

CARBONEZI, C. A.; HAMERSKI, L.; GUNATILAKA, A. A. L.; CAVALHEIRO, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C. M.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. DA S. Bioactive flavone dimers from Ouratea multiflora (Ochnaceae) *Revista Brasileira de Farmacognosia* (2007), 17(3), 319-324.

CARVALHO, M. G. de; VELANDIA, J. R.; OLIVEIRA, M. C. C. de; ECHEVARRIA, A.; BRAZ-FILHO, R.; GRYNBERG, N. F. Chemical Structure, Cytotoxic and Antitumours Activities of Biflavonoids from Brazilian Ouratea (Ochnaceae). In: GOVIL, J. N.; CENTRE, Res. Book. (Org.). *Recent Progress in Medicinal Plants, Phytochemistry & Pharmacology II*. New Dehli, v. 08, 77-92, 2002.

CARVALHO, M. G. DE, JUNIOR, J. G. R., SUZART, L.R., CORNELIUS, M. T. F., SILVA, V. C. DA & CARDOSO, M. A. R. Determinação Estrutural de Flavonóides Usando Análise Espectrométrica de RMN 1H 1D e Reação com Diazometano. *Revista Universidade Rural:* Série Ciências Exatas e da Terra, Seropédica, RJ: EDUR, v. 25, n.1-2, p. 46-60, jan-dez., 2006.

CARVALHO, M. G. DE.; ALVES, C. C. F.; SILVA, K. G. S.; EBERLIN, M. N.; WERLE, A. A.; *Luxenchalcone, a new bichalcone and other Constituents from Luxemburgia octandra.* J. Braz. Chem. Soc. V.15, n. 1 p. 146-149, 2004.

CARVALHO, M. G DE., ALBUQUERQUE, L. R. M.; MENDES, L. S.; GUILHON, G. M. S. P.; RODRIGUES, S. T. Biflavonoids And Terpenoids Isolated From The Leaves Of *Ouratea Microdonta* Engl. (Ochnaceae) *J. Nar. Med.,* 2008, submetido.

CASTRO, F. B.; BRAGA, A. O.; LOMBARDI, J. A.; WAGNER, H. Screening the Brazilian flora for antihypertensive plant species for in vitro angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. *Phytomedicine-Jena* (2000), 7 (3), 245-250.

CHARI; V. M.; CHEN, F.; CHEN; L.; ILYAS, M.; LIN, Y. C.; LIN, Y. M.; NESAMELY; A; WAGNER; H.; 13C-NMR Spectroscopy of biflavanoids. *Phytochemistry* v.16 p.1273-1278,. 1977.

CHEN, FA-CHING. Plant biflavonyls. II. *Chem. Res. Cent*., Natl. Taiwan Univ., Taipei, Taiwan. Taiwan Kexue (1973), 26(3-4), 100-3. CODEN: TKHSAU ISSN: 0015-7791. Journal written in Chinese.

CORTES, S. F.; VALADARES, M. Y.; OLIVEIRA, A B. DE; LEMOS. S. V.; BARBOSA, M. P. T.; BRAGA, F. C. Mechanism of endothelium-dependent vasodilation induced bv a proanthocyanidin-rich fractaion from Ouratea semisserata, *Planta Medica* v.68 n.5, p. 412-415; 2002

COSTA, A.F. *Farmacognosia experimental*. Lisboa: Fundação Calauste Gulbenkian, 1972, p. 932-39 v.3

CRAGG, G. M.; NEWMANN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 2003 Jul;66(7):1022-37.

DANIEL. J.F. de S.; CARVALHO. M. G. de; CARDOSO. R. DA S.; EBERLIN. M. N. Others flavonoids from Ouratea hexasperma (Ochnaceae). *J. Braz. Chem. Soc*., 2005.

DANIEL, J. F. DE S. *Metabólitos Especiais Isolados de Ouratea hexasperma (Ochnaceae), Dipladenia martiana (Apocynaceae) e de Caesalpinia peltophoroides (Leguminosae),* 2005 Tese, Doutorado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, 2005.

DANIEL, J. F. DE S.; ALVES, C. C. F.; GRIVICICH, I.; BRONDANI DA ROCHA, A.; GERALDO DE CARVALHO, M. Antitumor activity of biflavonoids from *Ouratea* and *Luxemburgia* on human cancer cell lines. *Indian Journal of Pharmacology* (2007), 39(4), 184-186.

DEWICK, P.M. *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*, 2nd edition, Jonh Wiley & Sons., **2002**, 507 p.

Di STASI, L.C. *Plantas Medicinais: Arte e Ciência – Um Guia de Estudo Multidisciplinar.* São Paulo: Ed. da Universidade Estadual Paulista, 1996. 230p

DOMINGUEZ, X. A. *Metodos de investigación fitiquimica*. Mexico Limusa- Wiley, 1973.281p.

DORA. G.; EDWARDS. J. M. Taxonomic status of Lanaria lanata and isolation of a novel biflavone*. J. Nat. Products*. 54 (3), 796-801, 1991.

DREWES S. E.; Hudson, N. A.; Bates, R. B.; Linz, G. S. Novel dimeric chalcone based pigments from Brackenridgea zanguebarica*. Tetrahedron Letters* v. 25 n. 1 105-108, 1984

ESTEVAM, C. S.; OLIVEIRA, F. M.; CONSERVA, L. M.; LIMA, L. DE F. C.O.;. BARROS, E. C.P.; BARROS, A. C.P.; ROCHA, E. M.M. ; ANDRADE, E.H.A. Constituintes químicos e avaliação preliminar in vivo da atividade antimalárica de Ouratea nitida Aubl (Ochnaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 15(3): 195-198, Jul./Set. 2005.

FELICIO, J. D.; GONÇALEZ, E.; BRAGGIO, M. M.; COSTANTINO, L.; ALBASINI, A.; LINS, A. P. Inhibition of Lens Aldose Reductase by biflavones from Ouratea spectabilis. *Planta Medica*, 61, 217-220, 1995.

FELICIO, J. D.; ROSSI, M. H.; PARK, H. R; GONÇALEZ, E.; BRAGGIO, M. M.; DAVID, J. M.; CORDEIRO, I*. Biflavonoids from Ouratea multiflora*. *Fitoterapia*, 72, 453-455, 2001.

FELICIO, J. D.; ROSSI, M. H.; BRAGGIO, M. M.; GONÇALEZ, E.; PAK, A.; CORDEIRO, I.; FELICIO, R. C. Chemical constituents Ouratea parviflora. *Biochem. Syst. Ecol*., 32, 79-81, 2004.

FERES, F. Estudos taxonômicos e Estudos em Philacra Dwyer (Ochnaceae) *Acta Sci. Biol*. Sci. Maringá, v. 28, n. 3, p. 183-187, July/Sept., 2006.

FISHER, F.; COOK, N.B. *Micologia Fundamentos e Diagnóstico*. Rio De Janeiro: Reviter, 2001

GANGOUE-PIEBOJI, J.; PEGNYEMB, D. E.; NIYITEGEKA, D.; NSANGOU, A.; EZE, N.; MINYEM, C.; MBING, J. N.; NGASSAM, P.; TIH, R. G.; SODENGAM, B. L.; BODO, B.

The in-vitro antimicrobial activities of some medicinal plants from Cameroon. *Annals of tropical medicine and parasitology* (2006), 100(3), 237-43.)

GARTLAN, S.; MCKEY D. B.; WATERMAN, P. G.; MBI, C. N.; STRUHSAKER, T. T.; A comparative study of the phytochemistry of two African rain florests. *Biochem. Syst. Ecol.* , V. *8*, p. 401-422. 1980.

GHOGOMU, R.; SONDENGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Lophirone A, a biflavonoid with unusual skeleton from Lophira lanceolata. *Tetrahedron Lett*., 28 (26), 2967-2968, 1987.

GONÇALEZ, E.; FELICIO, J. D.; PINTO, M. M. Biflavonoids inhibit the production of aflatoxin by Aspergillus flavus. *Braz. J. Med. Biol. Res*., 34, 1453-1456, 2001.

GRYNBERG, N. F.; BRIOSO, P. S. T.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R. *Antiproliferative effects and activation of apoptosis on Ehrlich tumour cells by flavones*, Proceedings of the XVII International Cancer Congress, 317-320, 1998.

GRYNBERG, N. F.; CARVALHO, M. G. de; VELANDIA, J. R.; OLIVEIRA, M. C.; MOREIRA, I. C.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. DNA topoisomerase inhibitors: biflavonoids from Ouratea species. *Braz. J. Med. Biol. Res*., 35 (7), 819-822, 2002.

GUIMARÃES, J. H. G.; PAPAVERO, N.; PRADO, A. P. As Miíases Na Região Neotropical: Identificação, Biologia, Bibliografia. *Revista Brasileira De Zoologia***,** v. 1, n. 4, p. 239-416, 1983

HARBORNE, J.B.; BAXTER, H. *Handbook of Natural Flavonoids*, Wiley, Chichester. 1999, 2 vols.

HARWOOD, J. L. *Plant lipid metabolism in Plant biochemistry*, Academic Press, inc. 525B Street, Suite 1900, San Diego, Califórnia 92101-4495, USA. ISBN 0-12-214674-3, 1997.

ILYAS, M.; SELIGMANN, O.; WAGNER, H. Biflavones from the leaves of Araucaria rulei F. Muell. and a survey on biflavanoids of the Araucaria genus. Inst. Pharm. Arzneimittell Univ. Muenchen, Munich, Fed. Rep. Ger. Zeitschrift fuer Naturforschung, C: *Journal of Biosciences* (1977), 32C(3-4), 206-9.

ILYAS, M.; ILYAS, N. Biflavones from the leaves of Araucaria angustifolia and a survey on biflavonoids of Araucaria genus. Department of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria. *Ghana Journal of Chemistry* (1994), 1(10), 441-4.

JAWETZ, E. MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. *Microbiologia Médica*. 21ª ed., Editora Guanabara-Koogan, 2000.

KAMIL, M.; AHMAD, I.; ILYAS, M. Constituents of Rhus punjabensis. Dep. Chem., Aligarh Muslim Univ., Aligarh, India. *Journal of the Indian Chemical Society* (1984), 61(4), 375.

KAMIL, M.; KHAN, N. A.; ALAM, M. S.; ILYAS, M. A biflavone from Ochna pumila. *Phytochem*., 26 (4), 1171-1173, 1987.

KASSEM, M. E. S.; EL-DESOKY, S. K. AND SHARAF, M. Biphenyl Esters and Biflavonoids from the Fruits of Schinus terebenthefolus *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 40, No. 5, 2004

KENNEDY GL JR, FERENZ RL, BURGESS BA. Estimation of Acute Oral Toxicity in rats by determination of the Aproximate Lethal Dose Rather than the LD50. *J. Appl. Toxicol*., 6: 145-148,1986.

KHAN, N. U.; ILYAS, M.; RAHMAN, W.; MASHIMA, T.; OKIGAWA, M.; KAWANO, N. Biflavones from the leaves of Araucaria bidwillii and Agathis alba (Araucariaceae) Dep. Chem., Aligarh Muslim Univ., Aligarh, India. *Tetrahedron* (1972), 28(23), 5689-95.

KIRBY W M, BAUER A W, SHERRIS J C, TURCK M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, 45: 493-6, 1966.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M. & SCHRECKENBERGER, P.C. & WINN JR., W.C. *Diagnóstico Microbiológico***.** 5ª.ed. Rio de Janeiro: Editora MEDSI, 2001.

KWON-CHUNG, K.J., BENNET, J.E. Cryptococcosis. In: Kwon- Chung KJ, Bennet JE (eds) *Medical mycology*. Philadelphia, Lea & Febiger, chap 16, p. 397-446, 1992.

LIN, Y. M.; CHEN, F. C. Agathisflavone from the drupes of Rhus succedanea. Chem. Res. Cent., Natl. Taiwan Univ., Taipei, Taiwan. *Phytochemistry* (Elsevier) (1974), 13(3), 657-8.

LIN Y. M., ANDERSON H., FLAVIN M. T. AND PAI Y. H. S., In vitro anti-HIV activity of biflavonoids isolated from Rhus succedanea and Garcinia multiflora*. J. Nat. Prod.* 60, 884-888, 1997.

LIN, Y. M.; FLAVIN, M. T.; SCHURE, R.; CHEN, F. C.; SIDWELL, R.; BARNARD, D. L.; HUFFMAN, J. H.; KERN, E. R. Antiviral activities of biflavonoids. *Planta Med.,* 65 (2), 120-125, 1999.

MANN, J. *Chemical aspects of biosynthesis*, 1ST ed. Oxford University press Inc., New York. **1994**

MARTINS, L. R. R.; CORTEZ, L. E. R.; DIAS-FILHO B P.; NAKAMURA, C. V.; FERREIRA, A. G.;, CORTEZ, D. A. G**.** Atribuição Dos deslocamentos químicos dos átomos de 1H e 13C do acetato de acantoaustralida. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 16(4): 490-496, Out./Dez. 2006.

MASHIMA, T.; OKIGAWA, M.; KAWANO, N.; KHAN, N. U.; ILYAS, M.; RAHMAN, W. Bisflavones in the leaves of Agathis alba. Fac. Pharm. Sci., Nagasaki Univ., Nagasaki, Japan. *Tetrahedron Letters* (1970), (33), 2937-40.

MATOS, F.J.A. *Introdução a Fitoquímica Experimental*. Fortaleza: Editora UFC, 1988.129p. (Coleção Ciência,3)

MATOS, F.J.A. *Introdução a Fitoquímica Experimental*. Fortaleza: Editora UFC, 1997.107-111, 135p.

aMBING, J. N.; PEGNYEMB, D. E.; GHOGOMU TIH, R.; SONDENGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Two biflavonoids from Ouratea flava stem bark. *Phytochem*., 63, 427-431, 2003.

bMBING, J. N.; BASSOMO, M. Y.; PEGNYEMB, D. E.; TIH, R. G.; SONDEMGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Constituents of Ouratea flava. *Biochem. Syst. Ecol*., 31, 215-217, 2003.

MENDES, C. C.; BAHIA, M. V.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Constituents of Caesalpinia pyramidalis. Instituto de Quimica, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil. *Fitoterapia* (2000), 71(2), 205-207.

MESSANGA, B.; TIH, G. R.; SONDENGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Biflavonoids from Ochna calodendron. *Phytochem.*, 35 (3), 791-794, 1994.

MESSANGA, B. B.; KIMBU, S. F.; SONDENGAM, B. L.; BODO, B. Triflavonoids of Ochna calodendron. *Phytochem*., 59, 435-438, 2002.

MINOMI, P.S. *Micologia: Métodos Laboratoriais de Diagnóstico de Micoses*. 1ed. São Paulo: Manole, 2003

MONACHE F. D.; ALBUQUERQUE, I. L.DE; FERRARI, F.; BETOLLO, G. B. M.; A new catechin and a dimeric proantocianidin from Ouratea especies; *Tetrahedron Letters*, 1967, *8* (43) p. 4211-42144. 1967. Resumo do Chemical Abstracts, vol. 68:104905u, p 10120, 1968.

MOREIRA, I. C.; SOBRINHO, D. C.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R. Isoflavanone dimers hexaspermone A, B and C from Ouratea hexasperma. *Phytochem*., 35 (6), 1567-1572, 1994.

MOREIRA. I. C.; CARVALHO. M. G. de; BASTOS. A. B. F. O.; BRAZ-FILHO. R. A flavone dimer from Ouratea hexasperma. *Phytochem*., 51, 833-838, 1999.

MOREIRA. I. C. *Estudo Químico de Ouratea hexasperma St. Hil (Ochnaceae).* 1994 Dissertação, Mestrado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, 1994.

NEWMAN, D. J. AND CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years *J. Nat. Prod.* 2007, *70,* 461-477

NGO MBING, J.; ENGUEHARD-GUEIFFIER, C.; ATCHADE, A. T.; ALLOUCHI, H.; GANGOUE-PIEBOJI, J.; MBAFOR, J. T.; TIH, R. G.; POTHIER, J.; PEGNYEMB, D. E.; GUEIFFIER, A. Two biflavonoids from Ouratea nigroviolacea. Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaounde I, Yaounde, Cameroon. *Phytochemistry* (Elsevier) (2006), 67(24), 2666-2670.

NOBRE, M., MEIRELES, M., GASPAR, L. F. et al. Malassezia pachydermatis e outros agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães. *Cienc. Rural*, July/Sept. 1998, vol.28, no.3, p.447-452.

OFMAN, D. J.; MARKHAM, K. R.; VILAIN, C.; MOLLOY, B. P. J. Flavonoid profiles of New Zealand kauri and other species of Agathis. New Zealand Inst. Ind. REs. DEv., Lower Hutt, N. Z. *Phytochemistry* (1995), 38(5), 1223-8.

OLIVEIRA, M. C. C.; CARVALHO, M. G. de; SILVA, C. J.; WERLE, A. A. New biflavonoid and Other constituents from Luxemburgia nobilis (EICHL). *J. Braz. Chem. Soc*., 13 (1), 119-123, 2002.

PARVEEN, N.; TAUFEEQ, H. M.; KHAN, N. U. D. Biflavones from the leaves of Araucaria araucana. Dep. Chem., Aligarh Muslim Univ., Aligarh, India. *Journal of Natural Products* (1987), 50(2), 332-3.

PARVEEN, N.; KHAN, U. D. Phenolic constituents from leaves of Rhus semialata Murr. Dep. Chem., Aligarh Muslim Univ., Aligarh, India. *Journal of the Indian Chemical Society* (1988), 65(10), 737-8.

PARVEEN, N.; SINGH, M. P.; KHAN, NIZAM U.; LOGANI, M. K. Flavonoid constituents of Garcinia xanthochymus leaves. Department Chemistry, Aligarh Muslim University, Aligarh, India. *Fitoterapia* (1994), 65(1), 89-90.

PAULO, M.Q.; LIMA, E.O.; MAIA, R.F.; XAVIER FILHO, L. Antimicrobial activity of the oil of the fruit of Ouratea parvifl ora Baill (Ochnaceae). *CCS 8*: 19-21, 1986.

PEGNYEMB, D. E.; TIH, G. R.; SONDENGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Biflavonoids from Ochna afzelii. *Phytochem*., 57, 579-582, 2001.

PEGNYEMB, D. E.; TIH, G. R.; SONDENGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Flavonoids from leaves of Ochna afzelii. *Biochem. Syst. Ecol*., 31, 219-221, 2003.

PEGNYEMB, D. E.; MBING, J. N.; DE THEODORE ATCHADE, A.; TIH, R. G.; SONDENGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Antimicrobial biflavonoids from the aerial parts of Ouratea sulcata. Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaounde I, Yaounde, Cameroon. *Phytochemistry* (Elsevier) (2005), 66(16), 1922-1926.

PINTO, A. C. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas *Quim. Nova*, Vol. 25, Supl. 1, 45-61, 2002

RAO, C. V.; GUNASEKAR, D. Squarrosin, A new isoflavone from Ochna squarrosa (Linn.). *Indian Journal of Chemistry*, 28 B, 780-781, 1989.

ROY, S. K.; QASIM, M. A.; KAMIL, M.; ILYAS, N.; ILYAS, M.; RAHMAN, WASIUR. Biflavones in the leaves of Juniperus virginiana. Dep. Chem., Aligarh Muslim Univ., Aligarh, India. *Journal of the Indian Chemical Society* (1984), 61(2), 172-3.

RUSTHOVEN, J. J.; FELD, R.; TUFFNELL, P.G. Systemic infection by Rhodotorula spp in the immunocompromised host. *J Infect* 1984; 8:241—6.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento*. UFSC/UFRGS, 2001.

SIMONI, I.C.; FELICIO, J.D.; GONÇALEZ, E.; ROSSI, M.H. Avaliação da Citotoxicidade de Biflavonóides Isolados de Ouratea Spectabilis (Ochnaceae) em Células de Córnea de Coelho Sirc. *Arq. Inst. Biol*., São Paulo, v.69, n.4, p.95-97, out./dez., 2002.

SULTANA, SARWAT; ILYAS, M.; KAMIL, MOHAMMED; SHAIDA, W. A. Chemical investigation of Bauhinia vahlii Linn. (Leguninoceae). Dep. Chem., Aligarh Muslim Univ., Aligarh, India. *Journal of the Indian Chemical Society* (1985), 62(4), 337-8.

SUZART, L. R.; DANIEL, J. F. DE S.; CARVALHO, M. G. Biodiversidade Flavonoídica e Aspectos Farmacológicos em Espécies dos Gêneros *Ouratea e Luxemburgia* (OCHNACEAE) *Quim. Nova,* Vol. 30, No. 4, 984-987, 2007.

SUZART, L. R. *Considerações Sobre os Gêneros Ouratea e Luxemburgia, Estudo Químico de duas Espécies de Ochnaceae: Ouratea Hexasperma St. Hil E Ouratea Cuspidata St. Hil e Atividades Biológicas.* 2007 Tese, Doutorado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciências Exatas, PPGQO, Seropédica-RJ, Brasil, 2007.

SVENNINGSEN, A. B.; MADSEN, K. D.; LILJEFORS, T.; STAFFORD, G. I.; VAN STADEN, J.; JAEGER, A. K. Biflavones from Rhus species with affinity for the GABAA/benzodiazepine receptor. Department of Medicinal Chemistry, The Danish University of Pharmaceutical Sciences, Copenhagen, Den. *Journal of Ethnopharmacology* (2006), 103(2), 276-280.

TANG, S.; BREMNER, P.; KORTENKAMP, A.; SCHLAGE, C.; GRAY, A.; GIBBONS, S.; HEINRICH, M. Biflavonoids with cytotoxic and antibacterial activicty from Ochna macrocalyx. *Planta Med*., 69 (3), 247-253, 2003.

aTIH GHOGOMU, R.; SONDENGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Structures of Isombamichalcone and Lophirochalcone, bi- and tetra-flavonoids from Lophira lanceolata. *Tetrahedron Lett*., 30 (14), 1807-1810, 1989.

bTIH GHOGOMU, R.; SONDENGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Structure of Lophirones B and C, Biflavonoids from the bark of Lophira lanceolata. *Phytochem*., 28 (5), 1557-1559, 1989.

TIH GHOGOMU, R.; SONDENGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Structure of the chalcone dimers Lophirone F, G and H from Lophira lanceolata stem bark. *Phytochemistry,* 29 (7), 2289-2293, 1990.

TIH, A. E.; GHOGOMU, R. T.; SONDENGAM, B. L.; CAUX, C.; BODO, B. Constituents of Lophira alata leaves. *Biochem. Syst. Ecol*., 31, 549-551, 2003.

aTIH, A.; MARTIN, M. T.; TIH GHOGOMU, R.; VUIDEPOT, I.; SONDENGAM, B. L.; BODO, B. Lophiroflavans B and C, Tetraflavonoids of Lophira alata. *Phytochemistry*, 31 (10), 3595-3599, 1992.

bTIH, A.; TIH GHOGOMU, R.; SONDENGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B. Tetraflavonoids of Lophira alata. *Phytochem*., 31 (3), 981-984, 1992.

TRUJILLO, E. C. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Revista Chilena de Infectología*, v.19, supl.2, Santiago, 2002.

VAN LOO, P.; DE BRUYN, A.; VERZELE, M. Lab. Org. Chem., State Univ. Ghent, Ghent, Belg. Liquid chromatography and identification of the flavonoids present in the sumac tannic acid extracted from Rhus coriaria. *Chromatographia* (1988), 25(1), 15-20.

VEIGA JR, V. F.; PINTO, A. C. PLANTAS MEDICINAIS: CURA SEGURA? *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 3, 519-528, 2005.

VELANDIA, J. R.; CARVALHO, M. G. de; BRAZ-FILHO, R. Novel trichloro and tetrachloroisoflavone isolated from Ouratea semiserrata. *Nat. Prod. Lett*., 12 (3), 191-198, 1998.

VELANDIA. J. R.; CARVALHO. M. G. de; BRAZ-FILHO. R.; WERLE. A. A. Biflavonoids and a glucopyranoside derivative from Ouratea semiserrata. *Phytochem. Anal*., 13, 283-292, 2002.

VENNAT, B. et al. Hamamelis virginiana: Identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v. 67, n. 1. p. 11-14, 1992.

VIEGAS JR, C. E BOLZANI, V. DA S. OS PRODUTOS NATURAIS E A QUÍMICA MEDICINAL MODERNA *Quim. Nova,* Vol. 29, No. 2, 326-337, 2006**.**

VOGEL, A. I. *Vogel's Textbook of pratical organic chemistry*, 5th ed., Longman, England, 433, 1989.

WALL, J.M.; KRIDER, M.M.; KREWSON, C.F.; EDDY, C.R.; WILLAMAN, J.J.; CORELL, D.S.; GENTRY, H.S. Steroidal sapogenins VII. Survly of plants for steroidal sapogenins and other constituents. *Am. J. Pharm*. Ass., 63: 1-7. 1954.

WALL, M.E.; WANI, M.C. *Camptothecin and Taxol: From Discovery to Clinic. J. of Ethnopharmacology*, 51, 239-254, 1996.

WANNAN, B. S.; QUINN, C. J. Biflavonoids in the Julianiaceae. Univ. New South Wales, Kensington, Australia. *Phytochemistry* (1988), 27(10), 3161-2.

WAYNE, Pa. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.* Approved standards. CLSI document M45-P, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 2005.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. *Quim. Nova* 2001, *24*, 147.

ZINTCHEM, A. A.; ATCHADE, A. T.; TIH, R. G.; MBAFOR, J. T.; BLOND, A.; PEGNYEMB, D. E.; BODO, B. Flavonoids from Ouratea staudtii Van Tiegh. (ex Keay) (Ochnaceae). Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaounde I, Yaounde, Cameroon. *Biochemical Systematics and Ecology* (2007), 35(4), 255-256.